

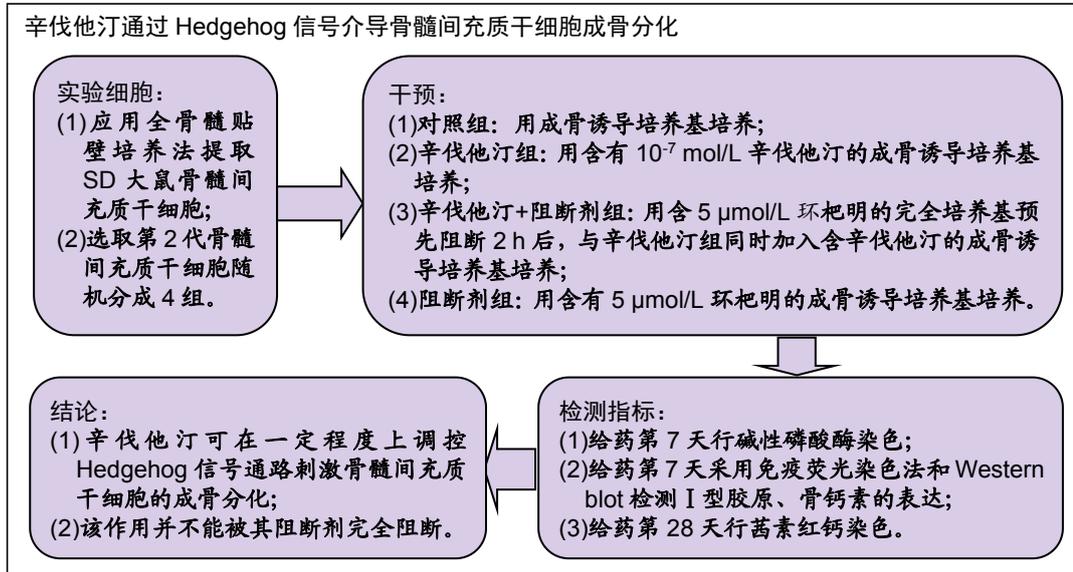
辛伐他汀刺激骨髓间充质干细胞的成骨分化

邢磊¹, 高静媛¹, 汪晓旭¹, 陈俞洁¹, 迟博婧¹, 田发明² (¹华北理工大学附属医院老年病科, 河北省唐山市 063000; ²华北理工大学医学实验研究中心, 河北省唐山市 063000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1769

ORCID: 0000-0001-6651-0466(高静媛)

文章快速阅读:



邢磊, 男, 1978 年生, 汉族, 硕士, 副主任医师, 主要从事骨质疏松、骨性关节炎等中老年疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 高静媛, 副主任医师, 华北理工大学附属医院老年病科, 河北省唐山市 063000

文献标识码:A

稿件接受: 2019-03-06



文题释义:

Hedgehog 信号转导通路: 是一个经典的控制胚胎发育的信号转导通路, 在胚胎发育和胚胎形成后细胞的生长、分化过程中起着重要的作用。Hedgehog 信号通路的异常激活与肿瘤发生有关, 很多参与肿瘤细胞增殖、扩散的效应分子(如 n-Myc、EGF、CyclinD、CyclinE、CyclinB、BMP 等)被证明是 Hedgehog 信号通路的靶基因或下游分子。此外 Hedgehog 信号通路与很多已知调控细胞分化增殖的其他信号通路(如 Notch、Wnt 等)还有交叉作用。

I 型胶原蛋白: 是骨组织中含量最丰富的蛋白质, 对于维持骨骼结构完整性及骨强度具有重要作用。I 型胶原代谢异常可能引起胶原数量减少或结构紊乱, 导致骨密度降低、骨强度减弱。

摘要

背景: 体外研究显示辛伐他汀有明确的刺激骨髓间充质干细胞成骨分化的作用, 但机制不清。最新研究显示 Hedgehog 信号通路是骨髓间充质干细胞成骨分化的重要信号通路。

目的: 结合 Hedgehog 通路阻断剂环杷明的应用, 观察辛伐他汀体外刺激大鼠骨髓间充质干细胞成骨分化的作用机制。

方法: 4 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 8 只, 分离出股骨和胫骨并去除干骺端, 应用全骨髓贴壁培养法提取骨髓间充质干细胞。选取第 2 代骨髓间充质干细胞随机分成 4 组: ①对照组: 用成骨诱导培养基培养; ②辛伐他汀组: 用含有 10^{-7} mol/L 辛伐他汀的成骨诱导培养基培养; ③辛伐他汀+阻断剂组: 用含 $5 \mu\text{mol/L}$ 环杷明的完全培养基预先阻断 2 h 后, 与辛伐他汀组同时加入含辛伐他汀的成骨诱导培养基培养; ④阻断剂组: 用含有 $5 \mu\text{mol/L}$ 环杷明的成骨诱导培养基培养。给药第 7 天行碱性磷酸酶染色, 免疫荧光染色法和 Western blot 检测 I 型胶原、骨钙素的表达; 给药第 28 天行茜素红钙染色。

结果与结论: 辛伐他汀组与对照组比较, 碱性磷酸酶阳性着色细胞和钙结节增多, I 型胶原、骨钙素荧光强度和相应蛋白表达增高($P < 0.05$); 除骨钙素荧光强度和蛋白表达外, 其他指标在辛伐他汀+阻断剂组显著低于辛伐他汀组($P < 0.05$); 阻断剂组各项指标均低于对照组($P < 0.05$)。结果证实辛伐他汀通过刺激 Hedgehog 信号通路促进骨髓间充质干细胞成骨分化, 且不完全被环杷明阻断。

关键词:

骨质疏松; 骨髓间充质干细胞; 辛伐他汀; 环杷明; I 型胶原; 骨钙素; 成骨分化; 河北省自然科学基金
 中图分类号: R459.9; R394.2

基金资助:

河北省自然科学基金项目(H2013209255), 项目负责人: 田发明; 河北省高等学校科学研究计划(QN20131007), 项目负责人: 田发明

Xing Lei, Master, Associate chief physician, Department of Geriatrics, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Corresponding author: Gao Jingyuan, Associate chief physician, Department of Geriatrics, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Simvastatin promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

Xing Lei¹, Gao Jingyuan¹, Wang Xiaoxu¹, Chen Yujie¹, Chi Bojing¹, Tian Faming² (¹Department of Geriatrics, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China; ²Medical Experimental Research Center of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: *In vitro* studies have shown that simvastatin can stimulate osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, but the mechanism is unclear. Recent studies have shown that the Hedgehog signaling pathway is crucial for osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells.

OBJECTIVE: In combination with Hedgehog pathway blocker (cyclopamine), to observe the effect of simvastatin on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*.

METHODS: Eight 4-week-old Sprague-Dawley female rats, SPF grade, were used in this study. The rats were killed by cervical dislocation and removed of bilateral femur and tibia under sterilization conditions. The second generation of bone marrow mesenchymal stem cells was randomly divided into four groups: control group cultured with osteogenic induction medium; simvastatin group cultured in the induction medium containing 10^{-7} mol/L simvastatin; simvastatin+cyclopamine group (combination group) cultured in complete culture medium containing 5 μ mol/L cyclopamine for 2 hours and then cultured in the induction medium containing 10^{-7} mol/L simvastatin; cyclopamine group cultured in the osteogenic induction medium containing 5 μ mol/L cyclopamine. After 7 days of culture, alkaline phosphatase staining was used. The levels of type I collagen and osteocalcin were evaluated by immunofluorescence and western blot assay. Alizarin red S staining was performed at 28 days of culture.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the simvastatin group had more alkaline phosphatase positive cells and calcium nodules, and higher type I collagen and osteocalcin fluorescence intensities ($P < 0.05$). All the measurement indexes except for osteocalcin fluorescence intensity and protein expression were significantly lower in the combination group than the simvastatin group ($P < 0.05$). All the measurement indexes in the cyclopamine group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). To conclude, simvastatin can promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via Hedgehog signaling pathway that cannot be completely blocked by cyclopamine.

Key words: osteoporosis; bone marrow mesenchymal stem cells; simvastatin; cyclopamine; type I collagen; osteocalcin; osteogenic differentiation; Natural Science Foundation of Hebei Province

Funding: the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. H2013209255 (to TFM); Higher Education Research Plan of Hebei Province, No. QN20131007 (to TFM)

0 引言 Introduction

骨质疏松症是一种以骨量低下、骨组织微结构损坏为特征, 最终导致骨脆性增加, 容易发生骨折的全身性骨疾病^[1-2]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)成骨分化减少是骨质疏松症的基础病因之一^[3-4]。

骨髓间充质干细胞的成骨分化是影响骨形成乃至骨量的主要因素之一, 并且这一过程受到多个信号通路及诸多细胞因子的调控, 如Wnt、BMP/Smads、Hedgehog及Notch信号通路。Hedgehog信号通路参与多种类型细胞的分化与增殖, 并在组织和器官的发育过程中起关键作用。最近研究显示Hedgehog信号通路可诱导骨髓间充质干细胞分化为成骨细胞同时抑制其向脂肪细胞分化^[5], 进而促进骨形成。对Hedgehog信号进行靶向调控或可作为治疗一些骨相关疾病的潜在靶点^[6-8], 他汀类药物长久以来一直应用于心血管疾病的治疗, 自1999年Mundy等^[9]首次发现他汀类药物可能具有促进骨形成的作用, 之后对其研究越来越受到人们的重视。辛伐他汀可在体内促进骨质疏松性骨折愈合^[9], 在体外单独给予 10^{-7} mol/L辛伐他汀而且没有其他成骨诱导成分的环境下, 通过活化p38MAPK信号诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[10], 并伴随Wnt信号途径相关因子表达水平的改变^[11]。Hedgehog信号通路是否参与辛伐他汀诱导骨髓间充质干细胞向成骨分化目前尚无报道。实验结合Hedgehog通路阻断剂环杷明(cyclopamine, Cpn)的应用, 观察辛伐他汀是否通过影响Hedgehog信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 于2016年6月至2017年12月在华北理工大学中心实验室及附属医院骨科实验室完成。

1.3 材料 4周龄雌性SPF级SD大鼠8只, 体质量(75±10)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2009-0015。辛伐他汀(Merck, 美国), 先用高压灭菌后的超纯水溶解配制成 10^{-3} mmol/L, 过滤除菌后分装, -20 °C 储存备用。Hedgehog通路阻断剂环杷明(Selleck, 美国), 用二甲基甲酰胺溶剂溶解分装后于-80 °C 储存, 过滤除菌后备用。DMEM高糖培养基(HyClone公司, 美国); 碱性磷酸酶染色试剂盒(Baso公司, 中国); 细胞茜素红钙染色试剂盒(上海杰美基因公司, 中国); 兔Ihh单克隆抗体(Abcam公司, 美国); 鼠Gli1单克隆抗体(Santa Cruz公司, 美国)等。

1.4 实验方法

1.4.1 骨髓间充质干细胞的培养及鉴定 采用颈椎脱臼法处死SD大鼠, 无菌条件下分离出双侧股骨和胫骨, 去除干骺端, 用注射器抽取含有双抗的DMEM培养基不断反复冲洗骨髓腔, 收集冲洗液, 1 000 r/min离心10 min, 保留下部沉淀, 用10 mL移液管反复吹打成细胞悬液, 将细胞悬液接种到培养瓶中, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂的培养箱中进行培养, 待细胞生长达80%–90%融合后可进行1:2传代。超净台内倒掉细胞培养瓶内的培养液, 生理盐水冲洗细胞2次, 加入0.25%胰蛋白酶消化, 显微镜下观察部分细胞变成圆形并从瓶底脱落后迅速移入超净台内, 加

入完全培养基终止消化过程,接种于细胞培养液中,显微镜下观察形态。

骨髓间充质干细胞的培养及鉴定

细胞来源:	SD大鼠股骨骨髓、胫骨骨髓
原代培养方法:	采用全骨髓贴壁培养法提取骨髓间充质干细胞
基础培养基:	DMEM培养基
添加材料:	体积分数为10%无菌胎牛血清,1%青霉素和链霉素
原代培养时间:	24 h细胞贴壁后进行首次半量换液,48 h后进行全量换液,之后每2 d或3 d换液1次。原代培养9 d左右,细胞生长达80%~90%融合后可进行1:2传代
细胞传代:	9~12 d传代1次,共传3代
细胞鉴定:	经流式细胞仪检测细胞表面标志、成骨诱导分化的细胞形态学变化以及碱性磷酸酶染色、茜素红钙染色鉴定为骨髓间充质干细胞
伦理学批准:	实施方案经华北理工大学动物实验伦理委员会批准

1.4.2 实验分组及处理 骨髓间充质干细胞传到第2代时开始进行成骨诱导培养,随机分成4组:①对照组:用成骨诱导培养基(含有10 mmol/L β -甘油酸磷酸钠、50 mg/L抗坏血酸的DMEM完全培养基)培养,作为阴性对照;②辛伐他汀组:用含有 10^{-7} mol/L辛伐他汀的成骨诱导培养基培养;③辛伐他汀+阻断剂组:用含5 μ mol/L环杷明的完全培养基预先阻断2 h后,与辛伐他汀组同时加入含 10^{-7} mol/L辛伐他汀的成骨诱导培养基培养;④阻断剂组:用含有5 μ mol/L环杷明的成骨诱导培养基培养^[12]。

1.5 主要观察指标

1.5.1 碱性磷酸酶染色 4组细胞分别于加药后第5天用胰酶消化,以 1.5×10^7 L⁻¹的细胞浓度接种于预置细胞爬片的12孔板中,制备细胞爬片,每组3个复孔,于加药后第7天,细胞约铺满细胞爬片的60%,按碱性磷酸酶染色试剂盒说明进行碱性磷酸酶染色。

1.5.2 茜素红钙染色 各组成骨诱导培养第28天行茜素红钙染色并用分光光度计测定各组在570 nm吸光度值。每个35 mm培养皿加入1 mL配制的10%氯化十六烷基吡啶,置于摇床上室温摇动15 min后用枪头吸取200 μ L混合物加入比色杯中,用紫外分光光度计测定其在570 nm的吸光度值,每组重复3个样本。

1.5.3 免疫荧光染色法检测I型胶原、骨钙素的表达 4组细胞分别于加药后第7天行免疫荧光染色。从孵育箱中取出12孔板,去除培养基,40 g/L多聚甲醛固定40 min,取出细胞爬片放置于载玻片上并置于湿盒中,用1 \times PBS冲洗3次,每次5 min,用0.1%TritonX-100覆盖细胞爬片处理20 min,用一抗稀释液配制目的蛋白特异性抗体Gli1 (1:50)、I型胶原(1:500)、骨钙素(1:100)覆盖细胞爬片,4 $^{\circ}$ C过夜,次日用1 \times PBS冲洗3次,每次5 min,用DyLight488及DyLight594标记的抗兔或抗小鼠的荧光二抗用二抗稀释液配制成一定比例[I型胶原(1:500)、Gli1 (1:500)、骨钙素(1:500)],37 $^{\circ}$ C避光孵育1 h,再用1 \times PBS冲洗3次,每次5 min,待爬片稍干燥后用含有DAPI的封固

剂封固,封固后立即用荧光显微镜避光观察并拍照记录。每组选取5个高倍镜视野,用Image pro plus 6.0图像分析软件测定积分吸光度值。

1.5.4 Western blot检测I型胶原、骨钙素蛋白表达 4组细胞分别于加药后第7天行Western blot检测,从孵育箱中取出细胞培养瓶,倒掉培养基,蛋白提取后制备凝胶电泳,放入用二抗稀释液配制的HRP标记的羊抗兔或羊抗鼠IgG二抗(1:5 000)孵育盒中,室温孵育1 h后洗膜显色,图像分析。

1.6 统计学分析 依据实验数据建立EXCEL数据库,采用SPSS 17.0软件进行处理。利用单因素方差分析(Oneway-ANOVA)比较各组之间的差异,两组间比较采用LSD-*t*检验。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞形态及鉴定结果 原代接种72 h,可见贴壁细胞呈短梭形,可随换液及传代纯化;细胞培养至7 d,倒置相差显微镜下观察可见大量贴壁的骨髓间充质干细胞,呈一定方向性生长;4组细胞给药干预7,14 d后,对照组与辛伐他汀组形态接近,随培养时间增加细胞体积变大,接近三角形,辛伐他汀+阻断剂组及阻断剂组形态较为接近,形态较为细长呈长梭形。

2.2 碱性磷酸酶染色结果 给药第7天行碱性磷酸酶染色,光学显微镜观察并拍照记录。辛伐他汀组较对照组碱性磷酸酶染色较深,着色范围广,阳性细胞数多,辛伐他汀+阻断剂组较辛伐他汀组阳性细胞数少,但比阻断剂组阳性细胞数多且着色较深,阻断剂组染色较对照组浅且阳性细胞数少,见图1。

2.3 茜素红钙染色结果 给药第28天行茜素红钙染色,结果显示对照组及辛伐他汀组钙结节形成较多,染色较深,辛伐他汀+阻断剂组及阻断剂组钙结节形成较少,染色较浅。分光光度计检测570 nm的吸光度值,辛伐他汀组吸光度值显著高于对照组($P < 0.05$),辛伐他汀+阻断剂组吸光度值显著低于辛伐他汀组,且显著高于阻断剂组($P < 0.05$),阻断剂组吸光度值显著低于对照组($P < 0.05$),见图2及表1。

表1 各组给药第28天茜素红染色定量分析 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Quantitative analysis of alizarin red S staining results at 28 days of treatment

组别	吸光度值(570 nm)	F值	P值
对照组	1.55 \pm 0.15	20.816	< 0.001
辛伐他汀组	1.94 \pm 0.23		
辛伐他汀+阻断剂组	1.22 \pm 0.16 ^b		
阻断剂组	0.81 \pm 0.17 ^{ac}		

表注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与辛伐他汀组比较,^b $P < 0.05$;与辛伐他汀+阻断剂组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.4 免疫荧光染色法检测各组细胞中I型胶原的表达 I型胶原主要在胞浆中表达,少量表达于胞核,辛伐他汀组I型胶原平均荧光强度显著高于对照组($P < 0.05$);辛伐

他汀+阻断剂组平均荧光强度显著低于辛伐他汀组($P < 0.05$)且显著高于阻断剂组($P < 0.05$); 阻断剂组平均荧光强度显著低于对照组($P < 0.05$), 见表2和图3。

表2 给药第7天各组细胞I型胶原平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Mean fluorescence intensity of type I collagen at 7 days of treatment

组别	n	平均荧光强度	F值	P值
对照组	5	41.34±3.41	60.867	< 0.001
辛伐他汀组	5	46.12±2.93 ^a		
辛伐他汀+阻断剂组	5	35.91±2.26 ^b		
阻断剂组	5	24.73±1.56 ^{ac}		

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与辛伐他汀组比较, ^b $P < 0.05$; 与辛伐他汀+阻断剂组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.5 免疫荧光染色法检测各组细胞中骨钙素的表达 骨钙素主要在胞浆中表达, 少量表达于胞核, 辛伐他汀组与对照组平均荧光强度差异无显著性意义($P > 0.05$), 辛伐他汀+阻断剂组与辛伐他汀组平均荧光强度差异无显著性意义($P > 0.05$), 骨钙素在辛伐他汀+阻断剂组表达显著高于阻断剂组($P < 0.05$), 骨钙素在阻断剂组表达显著低于对照组($P < 0.05$), 见表3和图4。

表3 给药第7天各组细胞骨钙素平均荧光强度 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Mean fluorescence intensity of osteocalcin at 7 days of treatment

组别	n	平均荧光强度	F值	P值
对照组	5	19.43±0.46	59.761	< 0.001
辛伐他汀组	5	20.33±1.82		
辛伐他汀+阻断剂组	5	16.63±0.76		
阻断剂组	5	13.61±1.24 ^{ab}		

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与辛伐他汀+阻断剂组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.6 Western blot检测I型胶原、骨钙素蛋白的表达 给药第7天I型胶原在辛伐他汀组表达显著高于对照组($P < 0.05$), 辛伐他汀+阻断剂组显著低于辛伐他汀组($P < 0.05$)且显著高于阻断剂组($P < 0.05$), 在阻断剂组表达显著低于对照组($P < 0.05$); 给药第7天辛伐他汀组与对照组骨钙素表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 辛伐他汀+阻断剂组与辛伐他汀组骨钙素表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 辛伐他汀+阻断剂组骨钙素表达显著高于阻断剂组($P < 0.05$), 阻断剂组骨钙素表达显著低于对照组($P < 0.05$), 见表4和图5。

表4 给药第7天I型胶原、骨钙素蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 4 The expressions of type I collagen and osteocalcin proteins at 7 days of treatment

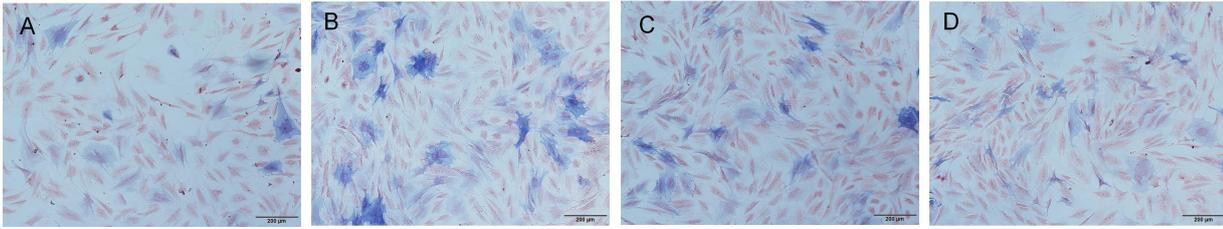
组别	I型胶原	骨钙素
对照组	0.695±0.134	0.675±0.047
辛伐他汀组	1.222±0.076 ^a	0.726±0.084
辛伐他汀+阻断剂组	0.669±0.090 ^b	0.612±0.073
阻断剂组	0.432±0.107 ^{ac}	0.304±0.027 ^{ac}

表注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与辛伐他汀组比较, ^b $P < 0.05$; 与辛伐他汀+阻断剂组比较, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

3.1 Hedgehog信号通路传导参与成骨分化过程 Hedgehog信号通路参与多种类型细胞的分化与增殖并在诸多组织和器官的发育过程中起关键作用。Kim等^[13]用H₂O₂干预M2-10B4细胞及C3H10T1/2细胞, 发现氧化应激可抑制Hedgehog信号转导及成骨分化, 通路相关因子表达降低。Montgomery等^[14]用Hedgehog信号激动剂Oxy133诱导M2-10B4小鼠骨髓间充质干细胞及人骨髓间充质干细胞, 研究发现成骨标志物Runx2、OSX、OCN及ALP表达显著增加。Lin等^[15]发现柚苷可通过Hedgehog通路表达促进骨髓间充质干细胞的成骨分化。Gao等^[16]用Hedgehog通路阻断剂环杷明及Gli1-siRNA处理成骨细胞系MC3T3-E1, 结果表明Exendin-4上调Hedgehog及Gli1的表达促进成骨细胞的形成, Gli1-siRNA可显著下调Gli1及Runx2表达并可抵消Exendin-4诱导的成骨分化, 环杷明可抵消Exendin-4诱导的Gli1上调, 表明Exendin-4通过Hedgehog/Gli1信号通路促进了成骨分化。众多研究结果显示Hedgehog信号可能直接参与骨髓间充质干细胞的成骨分化过程, 促进骨形成。环杷明是Hedgehog信号通路特异性阻断剂, 可特异性作用于Smo, 抑制Hedgehog信号向下传导^[17-18]。实验首次采用环杷明诱导培养骨髓间充质干细胞, 在阻断剂组发现传代的细胞形态细长且数量较对照组减少, 碱性磷酸酶染色较其他组范围小且浅淡。免疫荧光染色发现阻断剂组I型胶原、骨钙素平均荧光强度显著低于对照组。给药第7天应用Image J图像分析软件分析I型胶原及骨钙素蛋白条带图像的吸光度值, 发现阻断剂组I型胶原和骨钙素表达均显著低于对照组($P < 0.05$)。给药第28天行茜素红钙染色, 结果显示钙结节在阻断剂组形成较少, 染色较浅, 以上实验数据充分印证了环杷明阻断Hedgehog信号通路传导后, 骨形成减少, 可推测Hedgehog信号通路传导在成骨分化中占一定地位。

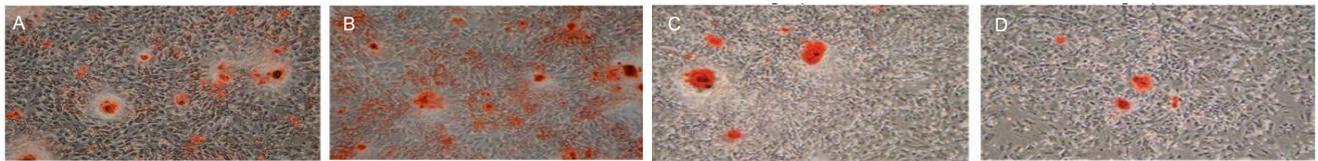
3.2 辛伐他汀刺激骨髓间充质干细胞的成骨分化 辛伐他汀是羟甲基戊二酰辅酶A还原酶的特异性抑制剂, 抑制内源性胆固醇的合成, 是治疗心血管疾病的常用药物。研究发现辛伐他汀不仅可以在体外诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化及影响细胞的增殖能力, 还可在动物模型中促进骨折愈合以及骨的形成及重建^[19-21]。Zanette等^[22]研究显示辛伐他汀可调节间充质干细胞的增殖及相关基因表达; Chuang等^[23]发现辛伐他汀可通介导雌激素受体诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化; Niu等^[24]发现辛伐他汀可提高骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶的表达以及基质矿化能力。Song等^[25]发现辛伐他汀可通过上调骨钙素及骨桥蛋白的基因表达诱导骨髓间充质干细胞的成骨分化, 实验中辛伐他汀组无论光学显微镜观察细胞形态、碱性磷酸酶及茜素红钙染色定量分析都表现了明显的成骨分化活性; 在免疫荧光染色检测时发现, 虽然辛伐他汀组I型胶原平均荧光强度明显高于对照组, 但其骨钙素平均荧光强度与对照组差异无显著性意义($P > 0.05$), 蛋白定量分析时也表现此特征, 重复实验后仍无差异, 与以往研究结果不同, 考虑原因可能与环杷明使骨钙素蛋白降解增加有关。



图注：图中 A 为对照组；B 为辛伐他汀组；C 为辛伐他汀+阻断剂组；D 为阻断剂组。按阳性细胞数和染色深浅进行排序：辛伐他汀组>辛伐他汀+阻断剂组>阻断剂组；对照组>阻断剂组；辛伐他汀+阻断剂组与对照组差别不大。

图 1 给药第 7 天各组细胞碱性磷酸酶染色(×100)

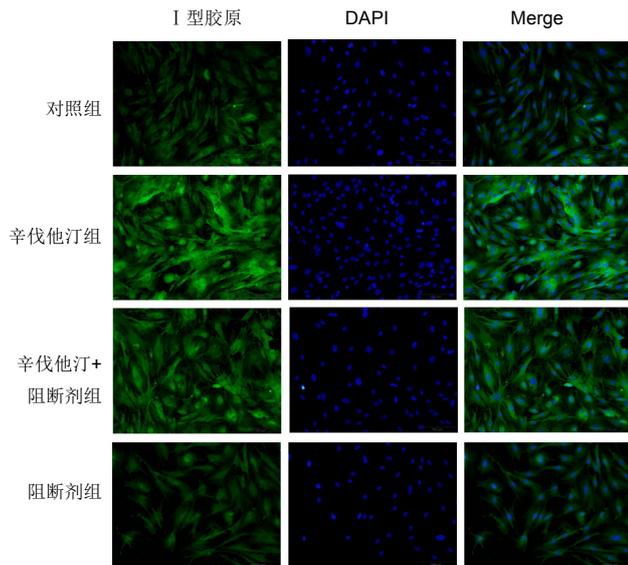
Figure 1 Alkaline phosphatase staining of the cells at 7 days of treatment (×100)



图注：图中 A 为对照组；B 为辛伐他汀组；C 为辛伐他汀+阻断剂组；D 为阻断剂组。按钙结节数和染色深浅进行排序：辛伐他汀组>辛伐他汀+阻断剂组>阻断剂组；对照组>阻断剂组；辛伐他汀+阻断剂组与对照组差别不大。

图 2 给药第 28 天各组细胞茜素红钙染色(×40)

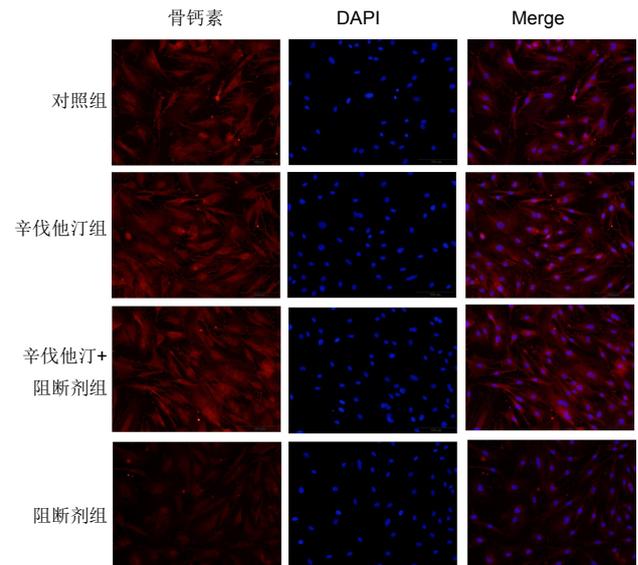
Figure 2 Alizarin red S staining of the cells at 28 days of treatment (×40)



图注：辛伐他汀组 I 型胶原平均荧光强度显著高于其他组；阻断剂组平均荧光强度显著低于其他组。

图 3 给药第 7 天荧光显微镜观察 I 型胶原的表达(×200)

Figure 3 The expression of type I collagen under fluorescence microscope at 7 days of treatment (×200)



图注：辛伐他汀组骨钙素平均荧光强度显著高于其他组；阻断剂组平均荧光强度显著低于其他组。

图 4 给药第 7 天荧光显微镜观察骨钙素的表达(×200)

Figure 4 The expression of osteocalcin under fluorescence microscope at 7 days of treatment (×200)

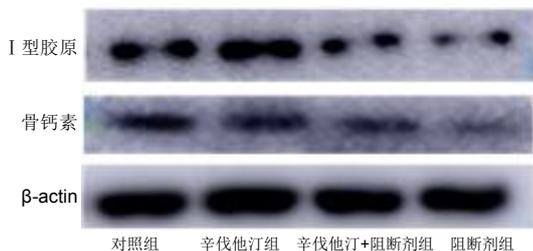


图 5 给药第 7 天 Western blot 检测各组细胞 I 型胶原、骨钙素蛋白的表达
Figure 5 The expression of type I collagen and osteocalcin proteins at 7 days of treatment

3.3 辛伐他汀影响Hedgehog信号通路传导 Tai等^[26]研究发现辛伐他汀可通过增强RhoA/actin信号促进骨髓间充质干细胞的成骨分化。研究表明辛伐他汀可通过Wnt、BMP/Smads信号通路促进骨髓间充质干细胞的成骨分化,但Hedgehog信号通路是否参与辛伐他汀诱导骨髓间充质干细胞成骨分化目前尚无报道。实验中采用浓度为5 μmol/L环杷明,为使环杷明的作用不受辛伐他汀的影响,在辛伐他汀+阻断剂组采取预先阻断2 h后与辛伐他汀组同时加入辛伐他汀,结果发现辛伐他汀+阻断剂组的碱性磷酸酶染色及茜素红染色钙结节较辛伐他汀组少,但比阻断剂组多。同样,辛伐他汀+阻断剂组I型胶原、骨钙素平均荧光强度显著低于辛伐他汀组($P < 0.05$)且显著高于阻断剂组($P < 0.05$),说明了辛伐他汀刺激骨髓间充质干细胞成骨分化的活性增加作用不能被环杷明完全阻断,提示辛伐他汀可通过刺激Hedgehog信号通路传导影响成骨分化,但是不完全依赖于该信号传导通路,还有可能刺激其他成骨相关通路的活性,利用通路与通路之间的交联促进骨生长。

3.4 研究意义及展望 辛伐他汀可在一定程度上调控Hedgehog信号通路刺激骨髓间充质干细胞的成骨分化,且该作用并不能被其阻断剂完全阻断。辛伐他汀对骨髓间充质干细胞成骨分化的作用机制中可能涉及Hedgehog信号通路与其他信号通路相互作用与调节,有待进一步实验验证。辛伐他汀调控Hedgehog信号通路的具体机制及其对通路中关键分子的影响有待进一步研究发现。

作者贡献: 实验设计、实施为田发明,实验评估为邢磊,资料收集为高静媛。

经费支持: 该文章接受了“河北省自然科学基金项目(H2013209255)”“河北省高等学校科学研究计划(QN20131007)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实施方案经华北理工大学动物实验伦理委员会批准,批准号为SYXK(冀)2010-0038。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过华北理工大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] Aaseth J, Boivin G, Andersen O. Osteoporosis and trace elements--an overview. *J Trace Elem Med Biol.* 2012;26(2-3):149-152.
[2] 编写组组长夏维波.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2017,10(5): 413-444.
[3] Donoso O, Pino AM, Seitz G, et al. Osteoporosis-associated alteration in the signalling status of BMP-2 in human MSCs under adipogenic conditions. *J Cell Biochem.* 2015;116(7):1267-1277.

[4] Liu H, Xia X, Li B. Mesenchymal stem cell aging: Mechanisms and influences on skeletal and non-skeletal tissues. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015;240(8):1099-1106.
[5] Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999;286(5446):1946-1949.
[6] 罗明,黄宏兴,黄红,等. Hedgehog信号通路与骨质疏松症[J].中国骨伤, 2014, 27(2): 169-172.
[7] Yao E, Chuang PT. Hedgehog signaling: From basic research to clinical applications. *J Formos Med Assoc.* 2015;114(7):569-576.
[8] Ehlen HW, Buelens LA, Vortkamp A. Hedgehog signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2006;78(3):267-279.
[9] 田发明. 辛伐他汀对大鼠骨质疏松性骨折及BMSCs成骨分化的影响[D]. 石家庄:河北医科大学, 2011.
[10] 刘家寅,刘光源,田发明,等.辛伐他汀通过p38MAPK信号通路诱导BMSCs成骨分化的研究[J].中国骨质疏松杂志, 2016, 22(2): 125-130.
[11] 张磊,张柳,田发明,等.辛伐他汀对大鼠BMSCs成骨诱导Wnt信号传导通路相关因子mRNA表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(11):1371-1375.
[12] 曹华,高建华,刘小龙,等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离鉴定方法及生物学特性[J].中国组织工程研究, 2017,21(9):1357-1361.
[13] Kim WK, Meliton V, Bourquard N, et al. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress. *J Cell Biochem.* 2010;111(5): 1199-1209.
[14] Montgomery SR, Nargizyan T, Meliton V, et al. A novel osteogenic oxysterol compound for therapeutic development to promote bone growth: activation of hedgehog signaling and osteogenesis through smoothed binding. *J Bone Miner Res.* 2014;29(8):1872-1885.
[15] Lin FX, Du SX, Liu DZ, et al. Naringin promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by up-regulating Foxc2 expression via the IHH signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2016;8(11):5098-5107.
[16] Gao L, Li S, Li Y. Exendin-4 promotes the osteogenic differentiation of osteoblasts via the Hedgehog/Gli1 signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2018;10(1):315-324.
[17] Chen JK, Taipale J, Cooper MK, et al. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 2002; 16(21):2743-2748.
[18] Cousin W, Dani C, Peraldi P. Inhibition of the anti-adipogenic Hedgehog signaling pathway by cyclopamine does not trigger adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 349(2):799-803.
[19] 刘昊,张岩,刘家寅,等.辛伐他汀对骨髓基质干细胞特异性成骨分化基因表达的影响[J].中国组织工程研究,2016,20(19):2777-2782.
[20] 迟博婧,刘光源,邢磊,等.Hedgehog信号通路调控骨形成及BMSCs成骨分化的研究进展[J].中国修复重建外科杂志,2016,30(12): 1545-1550.
[21] 张岩,刘昊,邢磊,等.辛伐他汀干预卵巢切除大鼠骨密度和生物力学性能的变化[J].中国组织工程研究,2016,20(7):981-986.
[22] Zanette DL, Lorenzi JC, Panepucci RA, et al. Simvastatin modulates mesenchymal stromal cell proliferation and gene expression. *PLoS One.* 2015;10(4):e0120137.
[23] Chuang SC, Chen CH, Fu YC, et al. Estrogen receptor mediates simvastatin-stimulated osteogenic effects in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Pharmacol.* 2015;98(3):453-464.
[24] Niu J, Ding G, Zhang L. Effects of simvastatin on the osteogenic differentiation and immunomodulation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2015;12(6):8237-8240.
[25] Song C, Dang G, Jia H, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2003;35(5):533-536.
[26] Tai IC, Wang YH, Chen CH, et al. Simvastatin enhances Rho/actin/cell rigidity pathway contributing to mesenchymal stem cells' osteogenic differentiation. *Int J Nanomedicine.* 2015;10: 5881-5894.