

他汀类药物对 TNF α 诱导成骨细胞生长抑制的保护作用

赵奇江^{1,2}, 李芬芬², 董新威², 徐哲荣³, 杨云梅³, 谢强敏^{2*} (1.浙江绍兴市东浦镇社区卫生服务中心, 浙江 绍兴 312069; 2.浙江大学医学院药理学系, 杭州 310058; 3.浙江大学医学院附属第一医院老年病科, 杭州 310003)

摘要: 目的 比较 4 种他汀类药物对 TNF- α 诱导的小鼠成骨细胞(MC3T3-E1)生长抑制的影响。方法 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 用 DMEM+10%胎牛血清培养, 细胞活性用 MTT 法测定。结果 TNF α (1~100 ng·mL⁻¹)呈浓度和时间依赖抑制 MC3T3-E1 细胞生长;低浓度的辛伐他汀(10⁻¹⁰~10⁻⁷ mol·L⁻¹)、氟伐他汀(10⁻¹⁰~10⁻⁶ mol·L⁻¹)和阿托伐他汀(10⁻⁸~10⁻⁶ mol·L⁻¹)处理 MC3T3-E1 细胞 72 h 后能明显促进成骨细胞生长, 而低浓度的罗舒伐他汀(10⁻¹⁰~10⁻⁷ mol·L⁻¹)无作用, 在高浓度(10⁻⁶~10⁻⁵ mol·L⁻¹)时抑制 MC3T3-E1 的生长;用辛伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀与 TNF- α (10 ng·mL⁻¹)共同培养 MC3T3-E1 细胞 72 h, 呈浓度依赖逆转 TNF- α 诱导的 MC3T3-E1 生长抑制, 而罗舒伐他汀在低浓度时显示较强的逆转作用, 在高浓度(10⁻⁶ mol·L⁻¹)时无作用或促进 TNF α 诱导的 MC3T3-E1 生长抑制。结论 辛伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀(10⁻¹⁰~10⁻⁷ mol·L⁻¹)能促进 MC3T3-E1 细胞生长, 逆转 TNF α 诱导的 MC3T3-E1 生长抑制;而罗舒伐他汀高浓度(10⁻⁶~10⁻⁵ mol·L⁻¹)时抑制 MC3T3-E1 的生长, 在低浓度时能明显逆转 TNF- α 诱导的成骨细胞生长抑制。

关键词: 骨质疏松症; 成骨细胞; 他汀类; 肿瘤坏死因子 α

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)05-0389-05

Protective Effects of Statins on TNF α -induced Growth Inhibition in MC3T3-E1 Osteoblastic Cells

ZHAO Qijiang^{1,2}, LI Fenfen², DONG Xinwei², XU Zherong³, YANG Yunmei³, XIE Qiangmin^{2*} (1.Dongpu Town of Community Health Service Center, Shaoxing 312069, China; 2.Department of Pharmacology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3.Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study if four statins could attenuate TNF α -induced growth inhibition and compare their effects in MC3T3-E1 osteoblastic cells. **METHODS** Murine osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured in DMEM essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) was used to evaluate cell viability. **RESULTS** TNF α at concentrations (1~100 ng·mL⁻¹) inhibited the viability of MC3T3-E1 cells in time and concentration-dependent manners. MC3T3-E1 cells exposed to low concentrations of simvastatin(10⁻¹⁰~10⁻⁷ mol·L⁻¹), fluvastatin(10⁻¹⁰~10⁻⁶ mol·L⁻¹) and atorvastatin(10⁻⁸~10⁻⁶ mol·L⁻¹) increased growth and viability. In contrast, rosuvastatin(10⁻¹⁰~10⁻⁷ mol·L⁻¹) had no effect, and high concentration of rosuvastatin(10⁻⁶~10⁻⁵ mol·L⁻¹) decreased cell growth. MC3T3-E1 cells treated with simvastatin, fluvastatin and atorvastatin in the presence of TNF α concentration-dependently increased cell growth compared with that of untreated control cells. Low concentration of rosuvastatin(10⁻¹⁰~10⁻⁸ mol·L⁻¹) in the presence of TNF α markedly increased cell growth, and high concentration of rosuvastatin(10⁻⁶ mol·L⁻¹) in the presence of TNF α decreased cell growth. **CONCLUSION** The results demonstrate that statins can increase growth and viability of osteoblastic cells and decrease TNF α induced growth inhibition in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells, and rosuvastatin at low and high concentration had opposite effects.

KEY WORDS: osteoporosis; osteoblastic cell; statins; TNF α

骨质疏松症(osteoporosis, OP)和动脉粥样硬化是机体衰老过程中的普遍现象, 发病率和死亡率较高。日益增多的证据表明, 衰老、骨质疏松症和动脉粥样硬化这三者之间有紧密的相关性^[1-3]。他汀类

药物是胆固醇合成酶系中的限速酶 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A(3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, HMG-CoA)还原酶抑制剂, 能有效降低总胆固醇以及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。近年研究表

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973542)

作者简介: 赵奇江, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: 13185598998
(0571)88208231 E-mail: xieqm@zju.edu.cn

E-mail: wszqj1974@163.com

*通信作者: 谢强敏, 男, 教授 Tel:

明,他汀类药物能促进骨形成及提高骨密度。流行病学调查、动物实验和细胞学以及临床应用的结果显示,他汀类药物与骨代谢相关^[4-6]。骨细胞系对生长因子、激素和细胞因子非常敏感,特别是对激活的巨噬细胞和骨髓细胞以及单核细胞产生的肿瘤坏死因子 α (TNF α)敏感。TNF α 在骨代谢调节方面起着关键性作用,它可刺激成骨细胞分泌其他的炎症性细胞因子,包括白介素-1(IL-1)、TNF α 和IL-6以及前列腺素E₂(PGE₂)^[7],这些因子可直接影响成骨细胞生长与凋亡^[8-9]。因此,可以认为TNF α 水平的升高和成骨细胞数目的减少反映了机体的骨丢失。但是,他汀类药物能否直接影响成骨细胞的生长?高浓度的他汀类药物是否对MC3T3-E1细胞产生细胞毒反应?他汀类药物能否拮抗TNF α 诱导成骨细胞生长抑制,不同结构不同理化性质(亲脂性与亲水性)的他汀类药物对成骨细胞的生长是否有不同作用?这些至今尚未见有报道,也是临床应用他汀类药物急需解决的问题。本实验针对上述问题进行了研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂和仪器

成骨细胞株 MC3T3-E1(ATCC, CRL-2593);高糖 DMEM(赛默飞世尔生物化学制品有限公司);胎牛血清(海克隆生物医药技术有限公司);3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑噻唑蓝(MTT)(Sigma Co.USA);二甲基亚砜(DMSO,无锡海硕生物有限公司);0.02% EDTA 胰酶(吉诺生物医药技术有限公司);小鼠 TNF α (Peprotech Co.);辛伐他汀(simvastatin,浙江京新制药有限公司);罗舒伐他汀(rosuvastatin)、氟伐他汀(fluvastatin)和阿托伐他汀(atorvastatin)均购于衢州埃菲姆化工有限公司。CO₂培养箱(Forma 3111, USA);纯水仪

(Labconco, USA);酶标仪(ELX800UV Bio-tek instrument INC)。

1.2 细胞培养与检测(MTT 法)

1.2.1 TNF α 对 MC3T3-E1 生长的影响 用 DMEM+10%胎牛血清培养 MC3T3-E1 细胞,置于 5%CO₂ 培养箱中培养至细胞密度>80%。用 0.25% 胰蛋白酶-0.02%EDTA 消化细胞,消化前用 PBS 洗 2 次。将细胞稀释成 7×10^4 cells·mL⁻¹,按每孔 100 μ L 加入 96 孔板。2 d 后换新鲜培养液并分别加入 TNF α 1, 10, 50, 100 ng·mL⁻¹ 培养 24、48 和 72 h 后,加 10 μ L 新鲜配置的 MTT(5 mg·mL⁻¹),5%CO₂ 培养箱中继续培养 4 h,吸尽上清液,加入 DMSO 100 μ L,振荡混匀后置酶标仪 490 nm 比色,得 OD 值。

1.2.2 他汀类药物对 MC3T3-E1 生长的影响 将细胞稀释成 7×10^4 cells·mL⁻¹,100 μ L 每孔加入 96 孔板置 5%CO₂ 培养箱中培养。2 d 后换新鲜培养液并分别加入辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀和罗舒伐他汀(10^{-10} ~ 10^{-5} mol·L⁻¹)培养 MC3T3-E1 细胞 72 h,其他步骤按“1.2.1”项下方法。

1.2.3 他汀类药物对 TNF α 诱导 MC3T3-E1 生长抑制的影响 按“1.2.2”项下方法外,在加入 TNF α 前 30 min 分别加入不同浓度的他汀类药物到 MC3T3-E1 细胞培养皿中,培养 72 h。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Sigma Stat 3.0 统计软件统计,方法采用 Student-Newman-Keuls(SNK)检验;统计学检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF α 对 MC3T3-E1 生长的抑制作用

TNF α (1~100 ng·mL⁻¹)呈浓度和时间依赖抑制 MC3T3-E1 细胞生长,结果见表 1。重复 3 批试验。表中 OD 值表示数值越高细胞存活率越高。

表 1 TNF α 对 MC3T3-E1 细胞生长的抑制作用[MTT 测定,24 h 和 48 h ($\bar{x} \pm s$, $n=4$),72 h ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)]

Tab 1 Inhibition of TNF α on the viability in MC3T3-E1 cells [MTT assay, 24 h and 48 h ($\bar{x} \pm s$, $n=4$), 72 h ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)]

培养 时间/h	OD 值				
	TNF α 0 ng·mL ⁻¹	TNF α 1 ng·mL ⁻¹	TNF α 10 ng·mL ⁻¹	TNF α 50 ng·mL ⁻¹	TNF α 100 ng·mL ⁻¹
24	0.73 $\pm$ 0.014	0.74 $\pm$ 0.050	0.67 $\pm$ 0.011 ²⁾	0.64 $\pm$ 0.021 ²⁾	0.61 $\pm$ 0.015 ²⁾
48	0.71 $\pm$ 0.016	0.72 $\pm$ 0.032	0.61 $\pm$ 0.031 ²⁾	0.52 $\pm$ 0.043 ²⁾	0.48 $\pm$ 0.020 ²⁾
72	0.72 $\pm$ 0.043	0.66 $\pm$ 0.042 ¹⁾	0.46 $\pm$ 0.034 ²⁾	0.41 $\pm$ 0.037 ²⁾	0.33 $\pm$ 0.025 ²⁾

注:与 TNF- α (0 ng·mL⁻¹)相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with TNF- α (0 ng·mL⁻¹), ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$

2.2 4种他汀类药物对 MC3T3-E1 细胞生长的影响
辛伐他汀 $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 MC3T3-E1 培养 72 h, 明显促进细胞增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 辛伐他汀 10^{-6} 或 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对细胞活性无明显影响; 氟伐他汀 $10^{-10} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 MC3T3-E1 细胞生长有非常明显的促进作用, $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 也没有明显的细胞毒作用; 阿托伐他汀 $10^{-8} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能促进成骨细胞生长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 也

没有明显的细胞毒作用; 低浓度的罗舒伐他汀 $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 MC3T3-E1 细胞生长无明显影响($P > 0.05$), 高浓度 $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有明显的抑制作用($P < 0.01$), 结果见表 2。比较上述 4 种他汀类药物($10^{-10} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内)对 MC3T3-E1 细胞的增殖作用强度, 氟伐他汀 $\geq$ 辛伐他汀 $>$ 阿托伐他汀 $>$ 罗舒伐他汀, 而罗舒伐他汀在 $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内对 MC3T3-E1 细胞有较强的细胞毒作用。

表 2 他汀类药物对 MC3T3-E1 细胞增殖或细胞毒作用($\bar{x} \pm s$, $n=5 \sim 6$)

Tab 2 Effects of four statins on cell proliferation and cytotoxicity in MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s$, $n=5 \sim 6$)

组 别	药物浓度(-log M)						
	对照	10	9	8	7	6	5
辛伐他丁	0.72±0.043	0.81±0.022 ²⁾	0.79±0.025 ²⁾	0.91±0.007 ²⁾	0.81±0.073 ¹⁾	0.75±0.098	0.71±0.080
氟伐他汀	0.71±0.034	0.84±0.035 ²⁾	0.86±0.028 ²⁾	0.88±0.026 ²⁾	0.89±0.047 ²⁾	0.80±0.056 ¹⁾	0.73±0.012
阿托伐他丁	0.74±0.038	0.77±0.053	0.79±0.051	0.80±0.043 ¹⁾	0.81±0.050 ¹⁾	0.81±0.039 ²⁾	0.76±0.044
罗舒伐他汀	0.73±0.019	0.72±0.042	0.73±0.041	0.71±0.096	0.69±0.040	0.58±0.057 ²⁾	0.37±0.078 ²⁾

注: 与对照相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

Note: Compared with control, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

2.3 4种他汀类药物对 TNF α 诱导 MC3T3-E1 细胞生长抑制的保护作用

辛伐他汀和氟伐他汀 $10^{-10} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + TNF α (10 ng·mL⁻¹)与 MC3T3-E1 细胞共培养 72 h 呈剂量依赖逆转 TNF α 诱导的 MC3T3-E1 细胞生长抑制反应, $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时可逆转 TNF α 的抑制作用, 结果见图 1, 而高浓度 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用反不及低浓度。阿托伐他汀的作用与前两者有所不同, 它在 $10^{-10} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 内呈量效关系, 且在高浓度 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时作用最强。罗舒伐他汀 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 单独培养 72 h 抑制细胞的增殖反应($P < 0.01$), 罗舒伐他汀 $10^{-10} \sim 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + TNF α (10 ng·mL⁻¹)与 MC3T3-E1 细胞共培养 72 h 可明显逆转 TNF- α 的作用, 且低浓度显示更好的逆转作用, 高浓度 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + TNF α (10 ng·mL⁻¹)与 MC3T3-E1 细胞共培养 72 h 反而增加 TNF- α 的抑制作用($P < 0.05$), 单独罗舒伐他汀 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与罗舒伐他汀 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + TNF α (10 ng·mL⁻¹)组比较也有明显的差异性($P < 0.01$), 提示高浓度的罗舒伐他汀与 TNF- α 有相加作用, 低浓度的罗舒伐他汀可直接对抗 TNF- α 的作用, 反应了罗舒伐他汀作用的双向性, 结果见图 1。

3 讨论

最近的研究表明, 他汀类药物可以促进骨骼形成, 用于治疗骨质疏松症、骨折、原发性或继

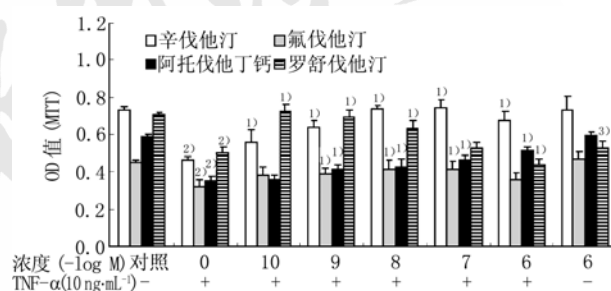


图 1 他汀类药物对 TNF α 诱导 MC3T3-E1 细胞生长抑制的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与无药物浓度+TNF- α (10 ng·mL⁻¹)相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与对照+TNF- α (0 ng·mL⁻¹)相比, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ $P < 0.05$

Fig 1 Effects of statins on TNF α -induced inhibition of cell proliferation in MC3T3-E1 cells($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with agents+TNF- α (10 ng·mL⁻¹), ¹⁾ $P < 0.05$; compared with control+TNF- α (0 ng·mL⁻¹), ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$

发性甲状腺机能亢进、溶骨病等疾病。他汀类药物可刺激骨生长、增加骨密度, 减少绝经妇女骨折的发生率, 其作用机理是他汀类药物可抑制 HMG-CoA 还原酶, 使甲基二羟戊酸产生减少, 因为甲基二羟戊酸可抑制骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)基因的启动因素。他汀可增加成骨细胞 BMP-2 基因的表达, 辛伐他汀可通过调节 Smed 信号和 Ras/Rho 有丝分裂激活蛋白激酶途径 (Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway), 拮抗 TNF α 对 BMP-2 诱导成骨细胞分化的抑制作用^[10-11]。其他对促进骨细胞生成的影响因素

包括抑制基质金属蛋白酶家族(MMPs)家族成员活性^[12], 诱导成骨细胞分化^[13], 下调 MMP-1 和 MMP-13 的表达; 上调钙结合蛋白(calcyclin)^[14]; 诱导热休克蛋白(HSP)高表达^[15]; 上调血管内皮生长因子(VEGF)^[16]; 抗 IL-1、IL-6、TNF α 等炎症细胞因子诱导成骨细胞生长抑制和破骨细胞的活性增强作用^[17]; 增强内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)活性^[18]; 抑制多潜能干细胞向脂肪细胞的分化^[19]等多种因素。本实验比较了 4 种他汀类药物对 TNF- α 诱导的小鼠成骨细胞(MC3T3-E1)生长抑制的影响, 结果显示, 4 种他汀类药物(辛伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀)在低浓度时(10^{-10} ~ 10^{-7} mol·L⁻¹)对 MC3T3-E1 细胞有非常明显的促增殖作用, 促进成骨细胞的生长和活性, 而罗舒伐他汀低浓度时无明显作用; 罗舒伐他汀在高浓度时(10^{-6} ~ 10^{-5} mol·L⁻¹)则直接抑制 MC3T3-E1 细胞的生长和活性。比较上述四种他汀药物对 MC3T3-E1 细胞的增殖作用强度, 氟伐他汀 $\geq$ 辛伐他汀>阿托伐他汀>罗舒伐他汀; 而细胞毒强度罗舒伐他汀>辛伐他汀=氟伐他汀=阿托伐他汀。这与 Sugiyama 等^[20]报道的脂溶性的辛伐他汀可增强 BMP-2 基因和蛋白的表达, 但水溶性更好的普伐他汀(pravastatin)却无此作用的结果相一致。这些药物的体外作用强弱可能与其药物是否亲脂的理化特性相关, 氟伐他汀、辛伐他汀和阿托伐他汀都是亲脂性的, 而罗舒伐他汀是非亲脂性水溶性很强的药物。此外, 这 4 种他汀药物均可逆转或拮抗 TNF α 诱导的成骨细胞生长抑制的作用。辛伐他汀、氟伐他汀和阿托伐他汀 10^{-10} ~ 10^{-6} mol·L⁻¹+TNF α 与 MC3T3-E1 细胞共培育 72 h 可明显翻转 TNF α 的作用, 10^{-8} ~ 10^{-7} mol·L⁻¹ 可完全翻转。除了阿托伐他汀, 辛伐他汀和氟伐他汀浓度在 10^{-6} mol·L⁻¹ 时对抗 TNF α 的抑制作用反不如其低浓度强, 综合他们对 MC3T3-E1 细胞直接作用的研究结果, 可以确定这 4 种他汀类的药物在高浓度时均显示明确的细胞毒作用。其中罗舒伐他汀的作用有些特别, 低浓度(10^{-10} ~ 10^{-8} mol·L⁻¹)时显示更好的翻转作用, 高浓度 10^{-6} mol·L⁻¹+TNF α 与 MC3T3-E1 细胞共培育 72 h 反而增加 TNF- α 的抑制作用($P<0.05$), 单独罗舒伐他汀 10^{-6} mol·L⁻¹ 与罗舒伐他汀 10^{-6} mol·L⁻¹+TNF α 组比较有明显的差异性($P<0.01$), 提示高浓度的罗舒伐他汀与 TNF- α 有相加作用, 低浓度显示很强的直接对抗 TNF α 作用,

反应了罗舒伐他汀作用的双向性。

辛伐他汀、氟伐他汀、阿托伐他汀和罗舒伐他汀口服 40 mg 的生物利用度分别为 5%、19%~29%、12%和 20%, 最大血药浓度(C_{max})分别为 10~34, 448, 27~66, 37 ng·mL⁻¹, 达峰时间(T_{max})分别为 1.3~2.4, 0.5~1, 2~3, 3 h^[21]。在本实验中, 4 种他汀药物中有 3 种在低浓度(10^{-10} ~ 10^{-7} mol·L⁻¹)时能直接促进成骨细胞的增殖生长, 也能拮抗 TNF α 诱导成骨细胞生长抑制, 这一剂量范围与临床常规服用剂量 40 mg·d⁻¹ 的最大血药浓度(C_{max} ng·mL⁻¹)基本相一致, 而在 10^{-6} ~ 10^{-5} mol·L⁻¹ 浓度或以上时将出现细胞毒反应。因此, 如果临床用于促进骨骼生长的治疗, 不需要超出常规应用的剂量, 超量可能会出现相反的结果。由于罗舒伐他汀在本实验中的结果, 笔者认为, 罗舒伐他汀或其他亲水性的他汀类药物如普伐他汀等, 不宜用于促进骨骼生长的治疗。

笔者的研究证明了除罗舒伐他汀外, 其他 3 个他汀药物(10^{-10} ~ 10^{-7} mol·L⁻¹)能直接促进成骨细胞的生长, 能拮抗 TNF α 诱导成骨细胞生长抑制, 这一剂量范围与临床常规服用剂量的最大血药浓度(C_{max})相一致。本实验的研究内容可有助于他汀类药物临床用药时参考。

REFERENCES

- [1] HAMERMAN D. Osteoporosis and atherosclerosis: biological linkages and the emergence of dual-purpose therapies [J]. Q J M, 2005, 98(7): 467-484.
- [2] YETKIN E, YAGMUR C, YAGMUR J, et al. Evaluation of cardiovascular risk factors and bone mineral density in patients undergoing coronary angiography and relation of findings to mitral annular calcium [J]. Am J Cardiol, 2007, 99(2): 159-162.
- [3] ANAGNOSTIS P, KARAGIANNIS A, KAKAFIKA A I, et al. Atherosclerosis and osteoporosis: age-dependent degenerative processes or related entities? [J] Osteoporos Int, 2009, 20(2): 197-207.
- [4] JADHAV S B, JAIN G K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs [J]. Pharmacotherapy, 2005; 25(2): 228-243.
- [5] GONYEAU M J. Statins and osteoporosis: a clinical review [J]. Pharmacotherapy, 2005, 25(2):228-243.
- [6] UZZAN B, COHEN R, NICOLAS P, et al. Effects of statins on bone mineral density: A meta-analysis of clinical studies [J]. Bone, 2007, 40(6): 1581-1587.
- [7] GLANTSCHNIG H, FISHER J E, WESOLOWSKI G, et al. TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase [J]. Cell Death Differ, 2003, 10(10): 1165-1177.
- [8] CHUA C C, CHUA B H L, CHEN Z, et al. TGF- β 1 inhibits multiple caspases induced by TNF- α in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1593(1): 1-8.
- [9] SUH K S, KOH G, PARK C Y, et al. Soybean isoflavones

- inhibit tumor necrosis factor- α induced apoptosis and the production of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells [J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(2): 209-215.
- [10] GHOSH-CHOUDHURY N, CHARAN MANDAL C, GHOSH-CHOUDHURY G. Statin-induced Ras Activation Integrates the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signal to Akt and MAPK for Bone Morphogenetic Protein-2 Expression in Osteoblast Differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(7): 4983 - 4993.
 - [11] YAMASHITA M, OTSUKA F, MUKAI T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Endocrinol*, 2008, 196(3): 601-613.
 - [12] THUNYAKITPISAL PD, CHAISUPARAT R. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (Gelatinase B) in osteoblastic cells and HT1080 Fibro- sarcomacells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 94(4): 403-409.
 - [13] MAEDA T, MATSUNUMA A, KURAHASHI I, et al. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(3): 458-471.
 - [14] HWANG R, LEE E J, KIM M H, et al. Calcyclin, a Ca^{2+} ion-binding protein contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 21239-21247.
 - [15] WANG X, TOKUDA H, HATAKEYAMA D, et al. Mechanism of simvastatin on induction of heat shock protein in osteoblasts [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 415(1): 6-13.
 - [16] MAEDA T, KAWANE T, HORIUCHI N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(2): 681-692.
 - [17] INOUE I, GOTO S, MIZOTANI K, et al. Lipophilic MHG-CoA reductase inhibitor has an antiinflammatory effect: reduction of mRNA levels for IL-1 β , IL-6, COX-2 and p22phox by regulation of peroxisome proliferator activated receptor alpha in primary endothelial cells [J]. *Life Sci*, 2000, 67(8): 863-876.
 - [18] GARRETT I R, GUTIERREZ G, MUNDY G R. Statins and bone formation [J]. *Curr Pharm Des*, 2001, 7(8): 715-736.
 - [19] SONG C, GUO Z, MA Q, et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308(3): 458-462.
 - [20] SUGIYAMA M, KODAMA T, KONISHI K, et al. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271(3): 688-692.
 - [21] CORSINI A, BELLOSTA S, BAETTA R, et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins [J]. *Pharmacol Ther*, 1999, 84(3): 413-428.

收稿日期: 2011-09-05