

高效抗逆转录病毒治疗对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响

权学民¹ 张强¹ 高峥嵘¹ 赵昌松¹ 赵汝岗¹ 王晶晶² 刘琨³ 陈宗锋³

【摘要】目的 观察高效抗逆转录病毒药物血清干预骨髓间充质干细胞(BMSC)增殖及成骨分化的研究,探讨抗病毒药物对骨代谢的影响。**方法** 采用3种HAART药物分别制备药物血清干预BMSC增殖及分化,CCK法检测细胞增殖情况,碱性磷酸酶、钙茜素及油红O染色观察细胞成骨、成脂分化,PCR检测BMSC向成骨分化过程中Runx 2和OPG基因表达水平。**结果** 替诺福韦酯药物血清组与大鼠血清组比较,药物血清干预72 h时(A_{72h})值差异具有统计学意义($F = 15.42$ 、 $P = 0.004$)。BMSC成骨诱导分化试验中,与对照组比较药物血清组干预组碱性磷酸酶染色阳性细胞减少,茜素红染色钙结节减少,其中替诺福韦酯药物血清组改变最为显著,而且成脂诱导分化中与对照组比较成脂样细胞增多。BMSC成骨诱导分化,PCR检测与对照组比较替诺福韦酯药物血清组Runx 2表达减少,OPG表达增加($F = 11.81$ 、 $P = 0.026$, $F = 10.14$ 、 $P = 0.033$)。**结论** HAART药物可能抑制BMSC增殖和成骨分化,其中替诺福韦酯的影响最为显著。

【关键词】 高效抗逆转录病毒治疗; 骨髓间充质干细胞; 成骨细胞

Effects of High active antiretroviral therapy on the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cell

Quan Xuemin¹, Zhang Qiang¹, Gao Zhengrong¹, Zhao Changsong¹, Zhao Rugang¹, Wang Jingjing², Liu Kun³, Chen Zongfeng³. ¹Department of Orthopedics, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ²Weifang Medical University, Weifang 261000, China; ³Taishan Medical University, Taian 271000, China

Corresponding author: Zhang Qiang, Email: zhangqwte@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the intervention of three high active antiretroviral therapy (HAART) drugs serum on proliferation and osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cell (BMSCs), and explore the effects of HAART drugs on bone metabolism. **Methods** Rats' serums containing three kinds of HAART drug were prepared to intervene the culture and differentiation of BMSCs. Proliferation of BMSCs was measured by CCK assay. Alkaline phosphatase, calcium alizarin and oil red O staining were used to observed the differentiation of cells osteogenesis and adipogenesis. The levels of gene expression of Runx 2 and osteoprotegerin (OPG) in the osteogenetic differentiation of BMSCs were tested by RT-PCR. **Results** Compared with the rat serum group, A_{72h} value of three kinds of drug serum group were significantly different ($F = 15.42$, $P = 0.004$). Compared with the control group, alkaline phosphatase positive cells which reflected osteogenesis differentiation decreased in drug serum group, and calcium nodules decreased in alizarin red staining test, in which tenofovir disoproxil containing group was the most significantly decreased. Fat cells which reflect adipogenic induction increased. In PCR detection, compared with control group, the expression of Runx 2 decreased and OPG expression increased in tenofovir disoproxil containing group ($F = 11.81$, $P = 0.026$; $F = 10.14$, $P = 0.033$). **Conclusions** HAART drugs suppressed the proliferation and osteogenic differentiation of BMSCs which the influence of tenofovir disoproxil was most significant.

【Key words】 High active antiretroviral therapy; Bone mesenchymal stem cell; Osteoblast

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.04.002

基金项目: 首都医科大学附属北京地坛医院内科研基金“启航计划”项目(No. DTQH201404)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院骨科¹; 261000 潍坊市, 潍坊医学院²; 271000 泰安市, 泰山医学院³

通信作者: 张强, Email: zhangqwte@sina.com

高效抗逆转录病毒治疗 (high active antiretroviral therapy, HAART) 的应用有效降低了获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) 患者的病死率和人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染相关疾病的发病率, 提高了患者的生活质量^[1-2]。但长期服用HAART药物的不良反应也不容小觑^[3]。关于HAART药物影响骨代谢的报道日渐增多, 特别是骨密度降低、骨折风险增加及骨坏死等发生率增加, 倍受学者们的关注^[4-10]。研究报道^[4, 11], HAART药物可以直接干扰成骨细胞和破骨细胞分化, 也可以影响体内维生素D代谢。已知骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cell, BMSC) 是体内骨代谢的重要储备, 已有文献报道HIV对BMSC的影响^[12], 但HAART药物及代谢产物对BMSC增殖和分化有何影响报道甚少。本实验通过观察HAART药物血清干预BMSC增殖及成骨分化, 探讨HAART药物对骨代谢的影响, 报道如下。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物及药物: 8只雄性Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF级, 体重平均为 (300 ± 20) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司[合格证: SCXK (京) 2012-0001]。

2. HAART药物: 拉米夫定 (lamivudine, 3TC), 替诺福韦酯 (tenofovir disoproxil fumarate, TDF), 克力芝 (keletra, LPV/r), 由首都医科大学附属北京地坛医院红丝带之家提供。

3. 主要实验试剂: DMEM培养基 (Gibico公司); 胎牛血清 (sciencell公司); CCK试剂盒 (碧云天生物技术研究); Oricell™ SD大鼠骨髓间充质干细胞成骨诱导分化培养基试剂盒 (Cyagen公司); Oricell™ SD大鼠骨髓间充质干细胞成脂诱导分化培养基试剂盒 (Cyagen公司); 碱性磷酸酶活性 (ALP) 染色试剂盒 (斯丹赛生物技术有限公司); 茜素红 (Alizarin Red S) 钙染色试剂盒 (Cyagen公司); 油红O (oil red) 染色试剂盒 (Cyagen公司); real-time PCR反应试剂盒 (Toyobo公司)。

二、方法

1. HAART药物血清的制备: 8只SD大鼠随机分

成4组, 称重, 计算给药量, 分别用3种不同HAART药物灌胃取药物血清, 其中一组取空白血清。根据药物代谢周期, 3TC和TDF片1次/d, LPV/r 2次/d, 相同剂量重复给药3 d, 待血药浓度达到稳定。终末给药1 h后大鼠处死, 无菌操作下腹主动脉采血5~10 ml, 4℃冰箱过夜, 2 500 r/min (离心半径r = 20 cm) 离心25 min, 56℃灭活, -20℃保存备用。

2. HAART药物血清对BMSC增殖的影响 (CCK法): 取第3代BMSC, 以500 000 cells/ml浓度接种于96孔板, 待细胞贴壁, 换液后分别加入100 μl不同培养基、10% FBS、10%大鼠血清, 以3种药物3TC、TDF、LPV/r制备的10%药物血清干预细胞培养, 分别于干预后0 h、24 h、48 h、72 h显微镜观察细胞生长情况, 采用CCK法检测吸光度值 ($A_{450\text{ nm}}$)。

3. HAART药物血清对BMSC向成骨、成脂分化的影响: 取第3代BMSC, 以500 000 cells/ml浓度接种于6孔板, 待细胞贴壁, 更换培养基进行成骨诱导分化时加入100 μl按比例浓缩的10%药物血清 (3TC、TDF和LPV/r) 干预, 大鼠血清组作为对照, 诱导培养14 d行碱性磷酸酶染色, 28 d行茜素红染色; 成脂诱导分化培养基培养的细胞, 诱导培养30 d采用油红O染色。染色成功后在显微镜下观察。

4. HAART药物血清对BMSC向成骨细胞分化的影响 (PCR检测): 取第3代BMSC, 以500 000 cells/ml浓度接种于6孔板, 细胞贴壁换液后加入100 μl按比例浓缩的10%药物血清 (3TC、TDF和LPV/r) 干预, 大鼠血清组作为对照, 更换培养基进行成骨诱导分化, 诱导培养的14 d, 提取RNA, 采用real-time PCR (SYBR-green染料法) 检测Runx 2和OPG基因相对表达量。

5. Runx 2和OPG基因的PCR检测: 将冻存细胞经液氮研磨至粉末后采用TriZol提取法提取总RNA。以GAPDH为内参照, 相对定量OPG、Runx 2基因表达。引物序列根据美国Promega公布的基因序列, 使用软件Primer 5.0软件设计, 由河北蓝梦生物医药科技有限公司合成, 具体引物序列详见表1。

三、统计学处理

数据采用SPSS 11.0统计软件进行处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据符合正态分布, 各组间的比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学

意义。

结 果

一、HAART药物血清对BMSC增殖的影响 (CCK法)

本实验通过检测0~72 h不同时间点 $A_{450\text{ nm}}$ 值,观察细胞增殖情况。胎牛血清、大鼠血清和药物血清组 $A_{450\text{ nm}}$ 值在72 h内呈典型的曲线增加(图1),3种(3TC、TDF和LPV/r)药物血清组与胎牛血清组比较, $A_{450\text{ nm}}$ 值于24 h时差异无统计学意义,在48 h ($F=24.84$ 、 $P=0.001$, $F=36.03$ 、 $P=0.003$, $F=21.91$ 、 $P=0.002$)和72 h ($F=64.75$ 、107.71和81.51, P 均 <0.001)时差异具有统计学意义,TDF药物血清与大鼠血清组比较, $A_{450\text{ nm}}$ 值于48 h有一定差异,但无统计学意义($F=1.66$, $P=0.233$),干预后72 h差异具有统计学意义($F=15.42$ 、 $P=0.004$),详表2。

二、HAART药物血清对BMSC成骨、成脂分化的影响

BMSC成骨诱导分化,碱性磷酸酶染色阳性细

胞呈蓝色,成骨样细胞增多染色加深。显微镜下观察,与大鼠血清对照组比较药物血清干预组碱性磷酸酶染色阳性细胞显著减少(见图2)。

钙茜素红染色,成骨样细胞内可出现云片状红染区域,或出现规则的钙结节。显微镜下观察,与大鼠血清对照组比较药物血清干预组红染区域稀疏,钙结节减少(见图2)。

BMSC成脂诱导分化,油红O染色脂肪滴呈红色,细胞核蓝色,成脂样细胞增多,视野内红染蓝核细胞增多。显微镜下观察,与大鼠血清对照组比较3TC药物血清组和LPV/r药物血清组未见红染蓝核细胞增多,而且反而减少,但TDF药物血清组红染蓝核细胞明显增多(见图2)。

三、HAART药物血清对BMSC成骨分化的影响 (PCR检测)

大鼠血清,3种(3TC、TDF和LPV/r)药物血清干预的BMSC表达Runx 2和OPG基因RNA电泳图如图3所示,RNA条带完整,显示提取的总RNA质量可靠。

用3种HAART药物血清分别干预BMSC成骨分化,结果显示3种药物血清组Runx 2 mRNA表达减

表1 内参基因与目的基因引物序列

基因	序列 (3'→5')	产物大小 (bp)
GAPDH		228
F	GGCAAGTTCAACGGCACAG	
R	CGCCAGTAGACTCCACGACA	
OPG		152
F	CGGATGGGTCTTCTCAGGT	
R	GCACAGGGTGACATCTATTCCA	
Runx 2		130
F	TGCTTCATTGCCTCACAAAC	
R	TTGCAGCCTTAAATGACTCGG	

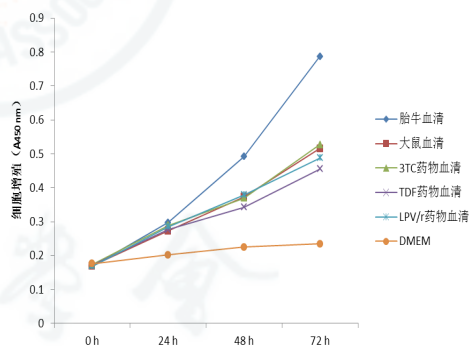


图1 胎牛血清、大鼠血清、三种(3TC、TDF和LPV/r)药物血清对BMSC增殖的影响

表2 CCK 检测 BMSC 增殖 $A_{450\text{ nm}}$ 值 ($n=6$)

分组	0 h	24 h	48 h	72 h
胎牛血清	0.169 ± 0.026	0.298 ± 0.057	0.492 ± 0.051	0.787 ± 0.066
大鼠血清	0.170 ± 0.024	0.273 ± 0.030	0.373 ± 0.047	0.516 ± 0.020
3TC药物血清	0.173 ± 0.029	0.289 ± 0.040	0.369 ± 0.022	0.527 ± 0.031
TDF药物血清	0.171 ± 0.024	0.277 ± 0.034	0.343 ± 0.022	0.455 ± 0.022 ^a
LPV/r药物血清	0.169 ± 0.024	0.285 ± 0.041	0.379 ± 0.018	0.488 ± 0.018
DMEM	0.176 ± 0.026	0.202 ± 0.022	0.225 ± 0.062	0.235 ± 0.029

注: ^a: TDF 药物血清组与大鼠血清组比较干预后 72 h 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)

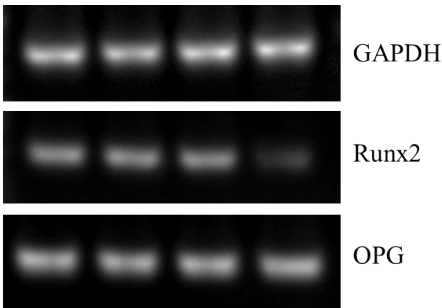
少，OPG mRNA表达增加，其中TDF药物血清组与大鼠血清对照组差异具有统计学意义，与大鼠血清对照组差异有统计学意义Runx 2 mRNA ($F = 11.81$ 、 $P = 0.026$)，OPG mRNA ($F = 10.14$ 、 $P = 0.033$)。3TC药物血清组和LPV/r药物血清组与大鼠血清对照组比较Runx 2 mRNA和OPG mRNA表达差异无统计学意义，详表3和图4。

讨 论

自1996年，HAART药物的引入使得抗HIV治疗得到了突破性进展，其发病率和病死率大

表 3 PCR 检测比较不同药物血清对 BMSC 成骨分化的影响 (ΔCt) ($n = 6$)

组别	Runx 2 mRNA	OPG mRNA
大鼠血清	1.000 ± 0.170	1.000 ± 0.194
3TC药物血清	0.962 ± 0.152	1.085 ± 0.056
TDF药物血清	0.620 ± 0.089	1.414 ± 0.114
LPV/r药物血清	0.920 ± 0.089	1.131 ± 0.055



注：从左到右依次为大鼠血清，3种药物血清（3TC、TDF和LPV/r）对BMSC成骨诱导分化中提取的RNA

图3 Runx 2和OPG电泳图

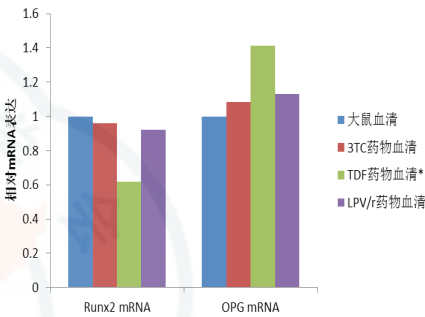
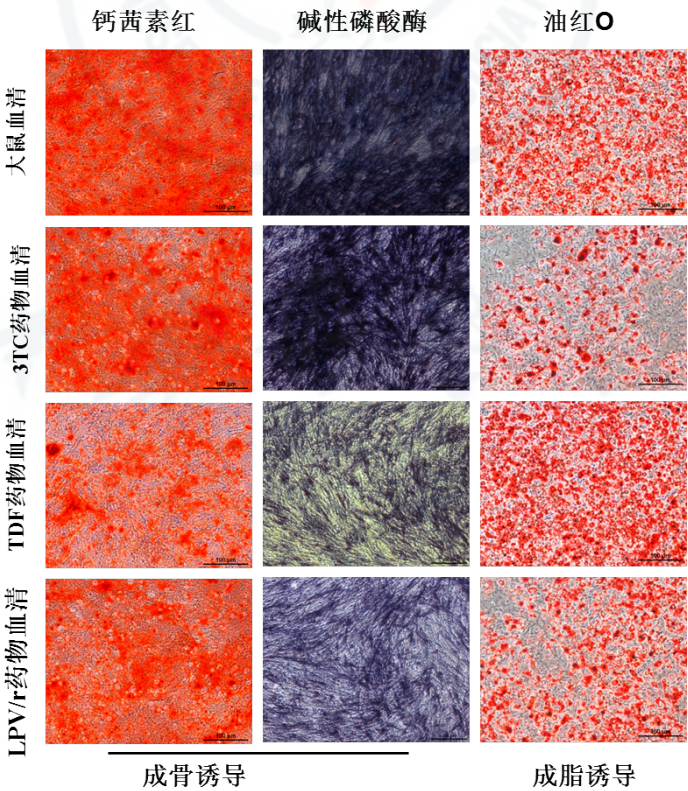


图4 大鼠血清、3种药物血清（3TC、TDF和LPV/r）对BMSC成骨分化中Runx 2和OPG基因相对表达量的影响



注：钙茜素红：成骨分化诱导培养28 d钙茜素红染色（ $\times 40$ ）；碱性磷酸酶：成骨分化诱导培养14 d碱性磷酸酶染色（ $\times 40$ ）；油红O：成脂分化诱导培养30 d油红O染色（ $\times 40$ ）

图2 观察3种药物血清与大鼠血清干预BMSC向成骨细胞、成脂细胞分化的影响

幅下降。到目前为止^[13], HAART药物的研究已发展到6大类、30多种,包括核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)、非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTIs)、蛋白酶抑制剂(PIs)、整合酶抑制剂(raltegravir)、融合酶抑制剂(FIs)和CCR5抑制剂(maraviroc)。随着HAART药物在临床广泛应用,对其不良反应的报道越来越多。最大的影响应是对骨代谢的抑制。研究报道^[4-10], HAART药物可引起骨密度降低,骨坏死、骨折风险增加。报道次数最多的是NRTIs和PIs^[14-17],也是目前应用最广泛的两种药物。HAART药物需要终生服药。因此,体内残留药物及代谢产物可能对骨代谢储备细胞,即BMSC增殖及分化有一定影响^[18]。基于以上考虑,本实验选用HAART临床一线药物:3TC、TDF、LPV/r,以灌胃的方式模拟体内变化,制备药物血清干预BMSC增殖和分化。

已知维持骨量及骨结构稳定由成骨细胞和破骨细胞完成,但BMSC增殖和分化与两种细胞的功能息息相关。BMSC具有高度自我更新和多向分化潜能,但在骨髓组织中BMSC含量并不丰富,而且受周围环境的影响^[19-20]。诱导BMSC最终分化为成熟的成骨细胞经过极为复杂的过程^[21-22],如定向成骨谱系分化,增殖,细胞外基质的成熟和基质矿化等,每个阶段都有不同亚型的基因表达和多种细胞因子调节。Runx 2是整个BMSC分化过程中的重要因子^[23],是诱导和足够的BMSC分化成骨细胞谱系和抑制其分化成脂肪细胞和软骨细胞所必需的。骨保护素(OPG)由多种间充质细胞衍化细胞所分泌,如成骨细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞等。OPG又称为破骨细胞抑制因子,OPG竞争性地与成骨细胞表达释放的RANKL结合抑制RANK活性。OPG是细胞外基质矿化时期表达增加的特异性因子,成骨细胞分泌RANKL竞争性调节OPG的作用^[24-25]。本研究通过定量RT-PCR检测Runx 2、OPG基因表达,分析HAART药物血清对BMSC成骨分化的影响。

本研究观察到3种HAART药物血清对BMSC增殖有抑制作用,但与大鼠血清组比较3TC药物血清和LPV/r药物血清组对BMSC增殖的抑制差异不大,TDF药物血清组对BMSC增殖的影响较其它两组药物血清更加明显,在72h时与大鼠血清比较有差异。根据研究结果,认为长期服用HAART药物特别是含TDF药物可能对BMSC增殖产生一定

影响。本研究还观察到HAART药物血清对BMSC成骨诱导分化的影响。在HAART药物血清干预的BMSC成骨诱导分化的细胞中,碱性磷酸酶染色阳性细胞减少,茜素红染色红染区域稀疏、钙结节减少,这种影响在TDF药物血清组最为明显,然后是LPV/r药物血清和3TC药物血清组。此外,TDF药物血清对BMSC成脂分化也有一定影响,油红O染色可见成脂样细胞增多。可以推测,长期服用HAART药物,在体内蓄留的药物和代谢产物可能影响到BMSC的成骨分化,进一步影响骨代谢。PCR检测的研究中同样观察到,HAART药物血清对BMSC成骨分化过程中Runx 2和OPG基因表达水平的影响,结果可见对照组比较HAART药物血清组Runx 2基因表达减少,OPG基因表达增加,其中TDF药物血清组与对照组比较差异有显著性。Runx 2基因表达减少可能是被激活的BMSC无法进一步分化为成熟的成骨细胞。成熟的成骨细胞表达释放的RANKL减少,OPG无法与成骨细胞表达释放的RANKL有效结合,OPG基因表达相对增加。

本实验结果显示,3种HAART药物分别制备的药物血清对BMSC增殖和成骨分化有一定抑制作用,随着时间的延长可能此种抑制作用更加明显。药物的不同浓度或药物之间的相互作用对BMSC增殖和分化的影响,本课题组于另一实验中对此进行了研究。HAART药物需长期口服,因此,对BMSC增殖和分化的影响日积月累可能是患者出现骨密度降低、骨折风险增加等骨代谢障碍的重要因素之一。

参 考 文 献

- [1] Rodger AJ, Lodwick R, Schechter M, et al. Mortality in well controlled HIV in the continuous antiretroviral therapy arms of the SMART and ESPRIT trials compared with the general population[J]. AIDS,2013,27(6):973-979.
- [2] Smit M, Brinkman K, Geerlings S, et al. Future challenges for clinical care of an ageing population infected with HIV: a modeling study[J]. Lancet Infect Dis,2015,15(7):810-818.
- [3] Daniya M, Akram M, Hamid A, et al. Review: Comprehensive review on treatment of HIV[J]. Pak J Pharm Sci,2016,29(4):1331-1338.
- [4] Grund B, Peng G, Gibert CL, et al. Continuous antiretroviral therapy decreases bone mineral density[J]. AIDS,2009,23(12):1519-1529.
- [5] Yin MT, Kendall MA, Wu X, et al. Fracture after antiretroviral initiation[J]. AIDS,2012,26(17):2175-2184.
- [6] Short CE, Shaw SG, Fisher MJ, et al. Prevalence of and risk factors osteoporosis and fracture among a male HIV-infected population in the UK[J]. Int J STD AIDS,2014,25(2):113-121.
- [7] Hoy J, Young B. Do people with HIV infection have a higher risk of

- fracture compared with those without HIV infection?[J]. *Curr Opin HIV AIDS*,2016,11(3):301-305.
- [8] Ofotokun I, McIntosh E, Weitzmann MN. HIV: inflammation and bone[J]. *Curr HIV/AIDS Rep*,2012,9(1):16-25.
- [9] Compston J. HIV infection and bone disease[J]. *J Intern Med*,2016,280(4):350-358.
- [10] Moran CA, Weitzmann MN, Ofotokun I. The protease inhibitors and HIV-associated bone loss[J]. *Curr Opin HIV AIDS*,2016,11(3):333-342.
- [11] Madeddu G, Spanu A, Solinas P, et al. Different impact of NNRTI and PI-including HAART on bone mineral density loss in HIV-infected patients[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2015,19(23):4576-4589.
- [12] Beaupere C, Garcia M, Larghero J, et al. The HIV proteins Tat and Nef promote human bone marrow mesenchymal stem cell senescence and alter osteoblastic differentiation[J]. *Aging Cell*,2015,14(4):534-546.
- [13] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南(2011版)[J]. *中华临床感染病杂志*,2011,4(6):321-330.
- [14] McComsey GA, Kitch D, Daar ES, et al. Bone mineral density and fractures in antiretroviral-naïve persons randomized to receive abacavir-lamivudine or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine along with efavirenz or atazanavir: Aids Clinical Trials Group A5224s, a substudy of ACTG A5202[J]. *J Infect Dis*,2011,203(12):1791-1801.
- [15] Hileman Co, Eckard AR, McComsey GA. Bone loss in HIV: a contemporary review[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*,2015,22(6):446-451.
- [16] Mallon PW. Aging with HIV: osteoporosis and fractures[J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2014, 9(4): 428-435.
- [17] Gedmintas L, Wright EA, Dong Y, et al. Factors associated with fractures in HIV-infected persons: which factors matter?[J]. *Osteoporos International*,2017,28(1):239-244.
- [18] Hernandez Vallejo SJ, Beaupere C, Larghero J, et al. HIV protease inhibitors induce senescence and alter osteoblastic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells:beneficial effect of pravastatin[J]. *Aging Cell*,2013,12(6):955-965.
- [19] Raveh-Amit H, Berzsenyi S, Vas V, et al. Tissue resident stem cell: till death do us part[J]. *Biogerontology*,2013,14(6):573-590.
- [20] Singh L, Brennan TA, Russell E, et al. Aging alters bone-fat reciprocity by shifting in vivo mesenchymal precursor cell fate towards an adipogenic lineage[J]. *Bone*,2016,85(1):29-36.
- [21] Titorencu I, Pruna V, Jinga W, et al. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology:an overview[J]. *Cell Tissue Res*,2014,355(1):23-33.
- [22] Chen Q, Shou P, Zheng C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?[J]. *Cell Death Differ*,2016,23(7):1128-1139.
- [23] Vishai M, Ajeetha R, Keerthana, et al. Regulation of Runx2 by Histone Deacetylases in Bone[J]. *Curr Protein Pept Sci*,2016,17(4):343-351.
- [24] Titanji K, Vunna A, Sheth An, et al. Dysregulated B cell expression of RANKL and OPG correlates with loss of bone mineral density in HIV Infection[J]. *PLoS Pathog*,2014,10(10):e1004497.
- [25] Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, et al. The Relationship between Metabolic Syndrome and Osteoporosis: A Review[J]. *Nutrients*,2016,8(6):E347.

(收稿日期: 2016-06-27)

(本文编辑: 孙荣华)

权学民, 张强, 高嵘, 等. 高效抗逆转录病毒治疗对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2017, 11(4): 320-325.