

矢车菊素-3-葡萄糖苷促进成骨细胞 MC3T3-E1 增殖的作用机制

胡博森, 张 卓, 王晓红, 周 波

【摘要】 目的 探究矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)促进成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖的作用,以及对 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。**方法** 设置分组为对照组(C3G 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$)和不同浓度 C3G 组(25、50、100、200 和 400 $\mu\text{mol/L}$),在无血清培养基同步化处理后孵育 24 h、48 h 和 72 h,使用 MTT 法测定细胞增殖率,实时细胞分析(RTCA)术收集 96 h 内细胞生长产生的电信号绘制时间-细胞指数散点图。另设置分组 Wnt-C59-C3G 组、DMSO-C3G 组、Wnt-C59-对照组和 DMSO-对照组,使用 Wnt/ β -catenin 特异性抑制剂预处理 4 h,比较 C3G 在 5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下抑制剂下促成骨细胞增殖作用的变化。使用 Western blot 测定 C3G 浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)和 100 $\mu\text{mol/L}$ (C3G 组)的组间细胞中 β -catenin 蛋白水平。**结果** 与对照组相比,各浓度 C3G 组细胞增殖率提高($P<0.01$),其中 24 h 时各浓度组间增殖率差异达到最大。Wnt-C59 抑制剂未对 C3G 促 MC3T3-E1 细胞增殖作用产生明显改变,各组间差异具有明显的统计学意义($F=22.913$, $P<0.001$)。Western blot 分析显示 C3G 组与对照组 β -catenin 蛋白水平差异无统计学意义($P=0.38$)。**结论** C3G 可以促进 MC3T3-E1 细胞增殖,其增殖作用可能未通过 Wnt/ β -catenin 途径。

【关键词】 矢车菊素-3-葡萄糖苷;Wnt 信号通路;成骨细胞;MC3T3-E1;骨质疏松症

【中图分类号】 R580 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)06-0581-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.06.007

Cyanidin-3-O-glucoside promotes proliferation of osteoblast MC3T3-E1 without Wnt/ β -catenin pathway

HU Bo-sen, ZHANG Zhuo, WANG Xiao-hong, ZHOU Bo

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, Liaoning, China)

【Abstract】 Objective To investigate whether Cyanidin-3-O-glucoside (C3G) promotes the proliferation of MC3T3-E1 cells and whether C3G regulates osteoblasts via Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** The cells were grouped into control group (0 $\mu\text{mol/L}$) and C3G groups (25, 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{mol/L}$), then were incubated for 24 h, 48 h, and 72 h at a C3G concentration set in a group after treatment for the synchronized serum-free medium. The cell proliferation rate was measured using the MTT assay. Real-time call analysis (RTCA) was used to collect electrical signals generated by cell growth within 96 h and to plot time-cell index scatter plots. The groupings were Wnt-C59-C3G, DMSO-C3G, Wnt-C59-control and DMSO-control, respectively, and then pre-treatment with Wnt/ β -catenin inhibitor Wnt-C59 for 4 h. Comparison of the effects of C3G on the proliferation of osteoblasts induced by inhibitors at concentrations of 5, 10, 25, and 50 $\mu\text{mol/L}$. The levels of β -catenin in the cells with C3G concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$ (control group) and 100 $\mu\text{mol/L}$ (C3G group) were determined by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the cell proliferation rate of each concentration of C3G group was increased ($P<0.01$). Wnt-C59 inhibitor did not significantly change the proliferation of C3G-promoting MC3T3-E1 cells, and the difference between the groups was statistically significant ($F=22.913$, $P<0.001$). Western blot analysis showed that there was no statistically significant difference in the level of β -catenin protein between C3G group and control group ($P=$

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(20170540879);沈阳医学院硕士研究生科技创新基金项目(Y20170604)

作者单位:110034 沈阳,沈阳医学院营养与食品卫生学教研室(胡博森、张 卓、王晓红、周 波)

通信作者:周 波, E-mail: zhoubo63@hotmail.com

0.38). **Conclusion** C3G can promote MC3T3-E1 cell proliferation in a Wnt/ β -catenin pathway-independent manner.

[Key words] Cyanidin-3-O-glucoside; Wnt signaling pathway; osteoblasts; MC3T3-E1; osteoporosis

0 引言

骨质疏松症是老年群体的常见疾病,源于成骨细胞和破骨细胞功能平衡失常。骨质疏松症最严重的并发症是骨质疏松性骨折,可导致患者死亡^[1]。有研究显示花色苷对骨骼健康有促进作用,富含花色苷的食物可以降低骨质疏松症的发生率^[2]。成骨细胞和破骨细胞在骨质疏松症发展过程中具有重要作用,花色苷对成骨细胞和破骨细胞的调节作用均有报道^[3-6]。花色苷类物质抑制破骨细胞分化和成熟与核因子活化B细胞 κ 轻链增强子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)途径有关^[5-6];花色苷对成骨细胞的增殖或分化影响及机制均未明确,有限的研究结果不能达成一致^[7-9]。Jang等^[4]报道,黑米色素[主要成分矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cyanidin-3-glucoside, C3G)和芍药苷-3-O-葡萄糖苷(Peonidin-3-O-glucoside, P3G)]通过Wnt/ β -catenin促进间充质干细胞C3H10T1/2的增殖并调节成骨分化功能,但在同一个研究中C3G和P3G单品均未表现出类似作用。Park等^[3]报道C3G对成骨细胞株MC3T3-E1分化具有潜在的调节作用,但相关机制未能明确。Wnt/ β -catenin信号通路是调控成骨细胞功能的重要通路,其控制细胞增殖信号并对成骨细胞分化有特殊的调节作用^[10-13]。 β -catenin是Wnt/ β -catenin通路的关键蛋白,细胞内 β -catenin蛋白的水平决定下游转录因子的表达^[14]。本研究使用成骨细胞MC3T3-E1作为模型,旨在分析C3G能否促进MC3T3-E1细胞增殖,以及C3G调节MC3T3-E1细胞是否依赖Wnt/ β -catenin途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 C3G分子式为 $C_{21}H_{21}O_{11}Cl$,相对分子质量484.84,购于大连美仑生物技术有限公司,批号:M86905,含量 $\geq 98\%$ (HPLC检测)。MC3T3-E1亚克隆14,又称为MC3T3-E1,购自上海生命科学研究院细胞库。Wnt-C59(Sellck, Houston, TX, USA)。改良型 α -MEM培养基(Hyclone, Logan, UT, USA),标准磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, Hyclone, Logan, UT, USA, pH=7.4),标准胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclone, Logan, UT, USA),噻唑蓝(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bro-

me, MTT)细胞增殖测定试剂盒(南京建成,江苏南京),总蛋白提取试剂盒(Key GEN BioTECH, 江苏南京),BCA蛋白测定试剂盒(Key GEN BioTECH, 江苏南京),抗 β -catenin(YT0675)和抗 β -肌动蛋白(YM3028)购自Immunoway,第二抗体(A23920)购自Abbkine,二甲基亚砷(DMSO,生工生物工程(上海)股份有限公司,上海)。实时细胞分析(real-time cell analysis, RTCA)设备iCELLigence (ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA, USA),BB-15二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),SPECTRAMAX PLUS 384酶标仪(Molecular Devices, San Jose, CA, USA),凝胶成像分析系统(LICOR Biosciences, Lincoln, NE, USA)。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制 C3G溶解于PBS并分装、储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,用于实验的含有C3G的细胞培养基现用现配。Wnt-C59使用DMSO溶解中并保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。

1.2.2 细胞培养 研究使用小鼠颅顶骨源成骨细胞株MC3T3-E1,通过含10%FBS的 α -MEM培养基培养。培养温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,含有5% CO_2 ,相对湿度95%。当细胞生长铺满培养瓶平底80%面积时使用胰蛋白酶消化细胞,用于传代或后续实验。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖 MC3T3-E1细胞以 4×10^3 个细胞/孔密度接种于96孔板,待细胞贴壁后使用无血清培养基同步化处理24 h,再次更换培养基为含有不同浓度C3G的完全培养基并保持24 h、48 h和72 h,设置C3G浓度分别为 $0\text{ }\mu\text{mol/L}$ (对照组)以及25、50、100、200和 $400\text{ }\mu\text{mol/L}$ (C3G组),每个浓度设置10个平行孔。MTT试剂的使用方法以及相关操作依照试剂说明书进行,吸光度值的测定波长为570 nm。使用仅添加有DMSO的孔作为空白孔调零,细胞增殖率计算方法:

$$\text{细胞增殖率}(\%) = (\text{C3G组OD值} - \text{空白孔OD值}) / (\text{对照组OD值} - \text{空白孔OD值}) \times 100\%$$

1.2.4 RTCA法测定细胞增值曲线 将细胞以 1×10^4 个细胞/孔密度接种于RTCA专用培养板,培养板的孔中有电极。随着细胞生长,孔中电信号发生改变,程序自动将电信号转换为细胞指数(cell index, CI)数据,能够实时跟踪和绘制细胞生长曲线,无需

添加任何标记。待细胞贴壁稳定后使用无血清培养基同步化处理 24 h, 更换含有不同浓度 (0、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) C3G 的完全培养基, 每个浓度设置 4 个平行孔, 孵育 48 h。RTCA 对环境变化敏感, 实验期间减少开启细胞培养箱次数。实验结束后使用 iPad 导出原始数据, 利用 Microsoft Office 2016 (Microsoft, Seattle, WA, USA) 以时间为横坐标、CI 为纵坐标, 绘制 X-Y 散点图。

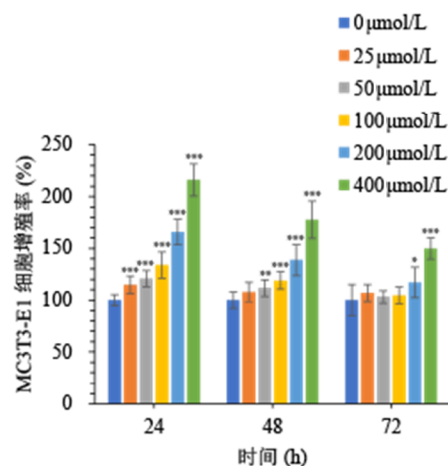
1.2.5 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂预处理 以 6×10^3 个细胞/孔密度将细胞接种到 96 孔板, 待细胞贴壁稳定后使用无血清培养基同步化处理 24 h。在同步化处理结束前 4 h, 加入不同浓度的 Wnt-C59 或 DMSO (培养基中 Wnt-C59 终浓度为 5、10、25、50 $\mu\text{mol/L}$, 抑制剂的溶剂 DMSO 在培养基中的终浓度均为 50 $\mu\text{mol/L}$)。处理结束后更换完全培养基, 每种 Wnt-C59/DMSO 预处理浓度孔取一半培养基中添加 C3G (100 $\mu\text{mol/L}$) 作为 Wnt-C59-C3G 组或 DMSO-C3G 组, 另一半作为 Wnt-C59-对照组或 DMSO-对照组, 最终每组设置 6 个平行孔。更换培养基后, 继续按照预处理阶段的操作添加相同浓度的 Wnt-C59 或 DMSO。继续培养 24 h, 通过 MTT 法测定各组细胞增殖率, 全部处理组均以 DMSO-对照组 OD 值作为对照计算增殖率。

1.2.6 Western blot 检测 β -catenin 表达 以 1×10^6 个细胞/皿密度将细胞接种到 100 mm 培养皿中, 待细胞贴壁稳定后使用无血清培养基同步化处理 24 h, 然后设置分组, C3G 浓度分别为 0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组) 和 100 $\mu\text{mol/L}$ (C3G 组), 使用含有 10% FBS 及对应浓度 C3G 的完整培养基孵育 24 h。重复 3 次实验, 结束后收集细胞并提取总蛋白, 通过 BCA 法对蛋白定量, 上样量为 24 μg , 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白并转移到聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 上。5% 脱脂奶粉封闭, 一抗稀释比例 1:500, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 二抗稀释比例 1:8000, 室温孵育 2 h。根据 ECL 发光液使用说明配制 ECL 发光液, 对 β -catenin 蛋白免疫印迹成像拍照, 使用 ImageJ 软件对图像灰度值分析和定量。使用 β -actin 作为内参蛋白对原始定量数据标准化。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 计量资料以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间均值比较采用 t 检验, 多组间均值比较使用单因素方差分析, 事后两两比较采用 LSD 法, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

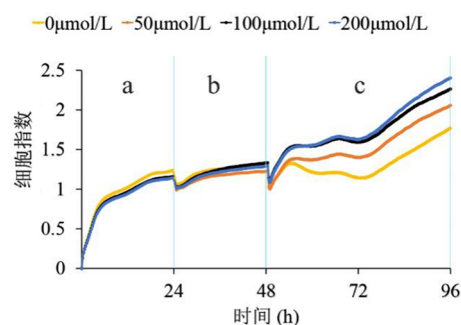
2 结 果

2.1 C3G 促进 MC3T3-E1 细胞增殖 C3G 以剂量依赖的方式提高 MC3T3-E1 细胞增殖率, 在 24 h、48 h 和 72 h 观察时间点各浓度 C3G 组与对照组相比差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$), 其中 24 h 时各浓度组间增殖率差异达到最大, 见图 1。RTCA 结果示 C3G 孵育阶段各组间细胞指数产生差异。C3G 以剂量依赖的方式提高 MC3T3-E1 细胞的细胞指数, 各组间细胞指数的差距在 C3G 孵育 24 h 时达到最大, 随着处理时间的延长高剂量组曲线的斜率逐渐降低, 曲线趋于平缓, RTCA 与 MTT 的结果相一致。见图 2。



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 MTT 测定 C3G 处理的 MC3T3-E1 细胞增殖率 ($n=10$)

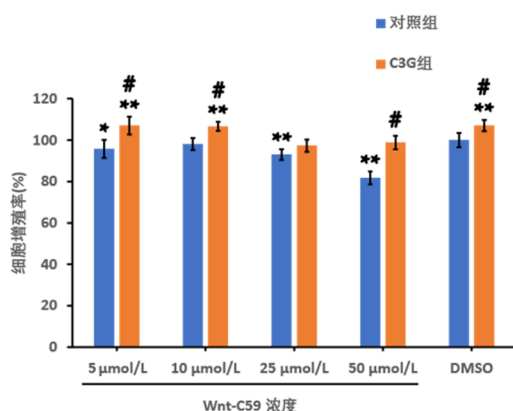


a: 细胞接种后的贴壁阶段; b: 无血清培养基同步化处理 24 h; c: C3G 处理细胞 48 h

图 2 RTCA 监测 C3G 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($n=4$)

2.2 使用 Wnt/ β -catenin 通路的抑制剂预处理后 C3G 对 MC3T3-E1 增殖的影响作用 Wnt-C59 抑制剂处理后 C3G 对 MC3T3-E1 增殖率的影响未产生明显改变, 各组间差异具有统计学意义 ($F=22.913$, $P <$

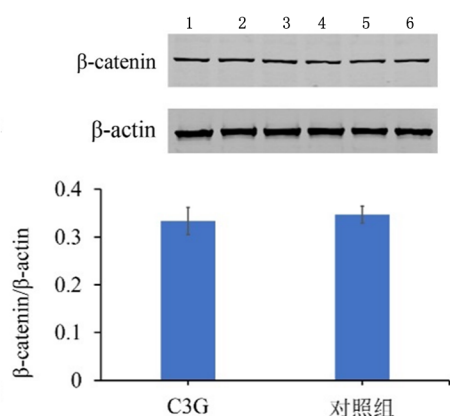
0.001)。除 10 $\mu\text{mol/L}$ Wnt-C59-对照组外,与 DMSO-对照组相比,其他各浓度 Wnt-C59-对照组均略微降低细胞增殖率,其中 50 $\mu\text{mol/L}$ Wnt-C59-对照组具有最明显的抑制细胞生长作用。除 25 $\mu\text{mol/L}$ Wnt-C59-C3G 组外,各浓度 Wnt-C59-C3G 组与其等抑制剂浓度 Wnt-C59-对照组相比细胞增殖率均有提高 ($P<0.01$)。见图 3。



与 DMSO-对照组比较, * $P<0.05$ 、** $P<0.01$; 与同浓度抑制剂抑制剂的对照组比较, # $P<0.01$

图 3 Wnt-C59 预处理后 C3G 对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响 ($n=6$)

2.3 C3G 处理对成骨细胞内 β -catenin 蛋白水平的影响 细胞中 β -catenin 蛋白水平在 C3G 组与对照组间差异无统计学意义 ($P=0.38$), 见图 4。



1、3、5 为对照组; 2、4、6 为 C3G 组

图 4 C3G 处理对细胞内 β -catenin 蛋白浓度影响的 Western blot 结果 ($n=3$)

3 讨 论

尽管近年来关于花色苷与骨骼健康的研究时

有报道,但相关研究多在动物模型中进行^[4,15-16]。成骨细胞和破骨细胞均与骨密度密切相关,但花色苷对成骨细胞的影响目前尚不明确,现有研究的结论无法达成一致^[7-9]。本研究发现 C3G 在体外环境下促进 MC3T3-E1 细胞增殖,在最高剂量 (400 $\mu\text{mol/L}$) 未观察到细胞毒作用。C3G 促成骨细胞增殖作用在 24 h 时最强,随着时间推移各浓度组见细胞增殖率逐渐与对照组齐平。产生该现象的潜在原因包括培养板生长空间减小、细胞生长受限、以及 C3G 在培养基中降解。

骨组织中的成骨细胞源自间充质干细胞分化,从间充质干细胞—前成骨细胞—成骨细胞—骨细胞到最终凋亡,其分化和增殖信号受一系列细胞信号通路调节^[17-19]。据 Jang 等^[4]报道,以 C3G 为主要成分的黑米花色苷可通过经典 Wnt 通路调节间充质干细胞增殖及分化进程。本研究使用 C3G 单品,发现该种花色苷对成骨细胞增殖依然具有促进作用,但是在本研究所采用的实验条件下 C3G 对细胞的经典 Wnt 信号通路无调节作用。Wnt-C59 是 Wnt 信号通路抑制剂,能选择性抑制膜结合 O 酰基转移酶 (membrane-bound O-acyltransferases, MBOAT) 家族的 Porcupine 酶,减弱其介导的 Wnt 蛋白棕榈酰化作用,进而抑制哺乳动物所有 Wnt 蛋白的激活, Wnt-C59 能同时阻断经典和非经典 Wnt 通路的作用^[20]。如果 C3G 通过该通路促进细胞增殖,则 Wnt-C59 预处理后 C3G 促成骨细胞增殖的效应应当被削弱或彻底阻断,但是在本研究未能观察到预期的作用。与此相反, Western blot 结果显示 C3G 处理后成骨细胞内 β -catenin 蛋白水平未受影响,这意味着 C3G 没有激活 Wnt 信号通路。 β -catenin 是经典 Wnt 信号通路中的核心分子。当通路激活时 β -catenin 蛋白在细胞质中富集并进入细胞核,与特定的转录因子结合从而启动多种基因的转录和表达^[21], β -catenin 基因的表达水平是该通路被激活的标志^[14,22]。据此,在本研究所使用的条件下, C3G 调节成骨细胞增殖的过程中经典 Wnt 通路没有被激活,但 C3G 促成骨细胞增殖效应依然存在。

综上所述,本研究发现 C3G 能够促进成骨细胞株 MC3T3-E1 增殖,其作用不通过 Wnt/ β -catenin 途径。该结果为进一步探讨花色苷预防骨质疏松提供了一定的理论依据。

[参考文献]

[1] 王耿杰,倪连红,马良赞. 骨质疏松性骨折预测方法的研究

- 进展[J]. 东南国防医药, 2017, 19(5): 513-516.
- [2] Welch A, MacGregor A, Jennings A, *et al.* Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(9): 1872-1878.
- [3] Park KH, Gu DR, So HS, *et al.* Dual Role of Cyanidin-3-glucoside on the Differentiation of Bone Cells.[J]. *J Dent Res*, 2015, 94(12): 1676-1683.
- [4] Jang WS, Seo CR, Jang H H, *et al.* Black rice (*Oryza sativa* L.) extracts induce osteoblast differentiation and protect against bone loss in ovariectomized rats [J]. *Food Funct*, 2015, 6(1): 265-275.
- [5] Li Y, Li J, Li B, *et al.* Anthocyanin suppresses CoCrMo particle-induced osteolysis by inhibiting IKK α / β mediated NF- κ B signaling in a mouse calvarial model [J]. *Mol Immunol*, 2017, 85(1): 27-34.
- [6] Dou C, Li J, Kang F, *et al.* Dual Effect of Cyanidin on RANKL-Induced Differentiation and Fusion of Osteoclasts [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(3): 558-567.
- [7] Saulite L, Jekabsons K, Klavins M, *et al.* Effects of malvidin, cyanidin and delphinidin on human adipose mesenchymal stem cell differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes [J]. *Phytomedicine*, 2019, 53(1): 86-95.
- [8] Moriwaki S, Suzuki K, Muramatsu M, *et al.* Delphinidin, one of the major anthocyanidins, prevents bone loss through the inhibition of excessive osteoclastogenesis in osteoporosis model mice [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97177.
- [9] Casati L, Pagani F, Fibiani M, *et al.* Potential of delphinidin-3-rutinoside extracted from *Solanum melongena* L. as promoter of osteoblastic MC3T3-E1 function and antagonist of oxidative damage[J]. *Eur J Nutr*, 2018, 58(3): 1019-1032.
- [10] Ikehata M, Yamada A, Morimura N, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling activates nephronectin expression in osteoblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(2): 231-234.
- [11] Le Henaff C, Mansouri R, Modrowski D, *et al.* Increased NF- κ B Activity and Decreased Wnt/ β -Catenin Signaling Mediate Reduced Osteoblast Differentiation and Function in Δ F508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Mice [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(29): 18009-18017.
- [12] Taciak B, Pruszyńska I, Kiraga L, *et al.* Wnt signaling pathway in development and cancer [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2018, 69(2): 1.
- [13] 韦达隆, 劳山, 罗高斌. Wnt 家族蛋白对骨细胞的作用研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2016, 29(5): 551-555.
- [14] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [15] Zheng X, Mun S, Lee SG, *et al.* Anthocyanin-Rich Blackcurrant Extract Attenuates Ovariectomy-Induced Bone Loss in Mice [J]. *J Med Food*, 2016, 19(4): 390-397.
- [16] Hubert PA, Lee SG, Lee SK, *et al.* Dietary Polyphenols, Berries, and Age-Related Bone Loss: A Review Based on Human, Animal, and Cell Studies [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2014, 3(1): 144-158.
- [17] Yu L, Wang X, Gao X, *et al.* The calcium transient characteristics induced by fluid shear stress affect the osteoblast proliferation [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 362(1): 51-62.
- [18] Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation [J]. *Histochem Cell Biol*, 2018, 149(4): 313-323.
- [19] Greenblatt MB, Shim J, Glimcher LH. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Osteoblasts [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, 29(1): 63-79.
- [20] 蒋嘉辉. Wnt 通路抑制剂 Wnt-C59 对病理性心肌肥大治疗作用的研究 [D]. 第三军医大学, 2015.
- [21] Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20(1): 781-810.
- [22] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.

(收稿日期: 2019-05-05; 修回日期: 2019-10-15)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一起)