

二甲双胍通过激活自噬促进 MC3T3-E1 细胞系成骨分化的研究

徐庆, 陈旭, 张彦超, 何敬腾, 李建军*

中国医科大学附属盛京医院 创伤骨科, 辽宁 沈阳 110004

摘要: **目的** 探讨二甲双胍通过激活自噬促进 MC3T3-E1 细胞系成骨分化的作用。**方法** 用含有不同浓度二甲双胍的成骨诱导剂处理 MC3T3-E1 细胞, 其中二甲双胍的浓度分别为 0 (对照)、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 。利用碱性磷酸酶 (ALP) 染色检测二甲双胍促进 MC3T3-E1 细胞成骨的最适浓度, 采用免疫印迹法 (Western blotting) 和免疫荧光法检测自噬相关蛋白, 并选择出二甲双胍的最佳干预浓度。对照组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ + 3-甲基腺嘌呤 (3-MA, 5 mmol/L) 组和 3-MA 5 mmol/L 组分别干预 MC3T3-E1 细胞 4 h 后, 采用 Western blotting 法、免疫荧光法、透射电镜检测自噬指标, 并利用 ALP 染色、半定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测成骨能力。**结果** 二甲双胍能够剂量相关性地促进 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性, 并且 400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍是促进 MC3T3-E1 细胞成骨的最适浓度。二甲双胍 0 (对照)、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 组的 LC3 II/I 比值逐渐增大, P62/ β -actin 比值逐渐减小, LC3 荧光强度逐渐增强; 800 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍组的 LC3 II/I 值减小, P62/ β -actin 比例增大, LC3 荧光强度下降; 且与对照组比较, 400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍组的 LC3 II/I 比值明显增大, P62/ β -actin 比值明显降低 ($P < 0.05$), LC3 荧光强度最强。与对照组比较, 二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组中 LC3 II/I 的比值增大, P62 蛋白表达减少 ($P < 0.05$), LC3 荧光强度增强, 自噬体数量增多; ALP 活性增强, 成骨相关基因和蛋白 OCN, COL1 的表达增强 ($P < 0.001, 0.05, 0.01$)。二甲双胍中加入 3-MA 5 mmol/L 后, LC3 II/I 的比值减小, P62 蛋白表达增多, LC3 荧光强度减弱, 自噬体数量减少; ALP 活性减弱, 成骨相关基因和蛋白 OCN, COL1 的表达减弱。**结论** 二甲双胍能通过激活 MC3T3-E1 细胞系的适度自噬促进其成骨分化。

关键词: 二甲双胍; 自噬; MC3T3-E1 细胞; 成骨分化

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2019)03 - 0583 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.03.002

Research on metformin promotes osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells by activating autophagy

XU Qing, CHEN Xu, ZHANG Yan-chao, HE Jing-teng, LI Jian-jun

Department of Trauma Orthopaedics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China

Abstract: Objective To investigate the effects of metformin promoting osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells by activating autophagy. **Methods** MC3T3-E1 cells were treated with osteogenic inducers containing different concentrations of metformin, and the concentrations of metformin were 0 (control), 200, 400, and 800 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The optimal concentration of metformin in MC3T3-E1 cells was determined by ALP staining. Western blotting and immunofluorescence were used to detect autophagy-related proteins, and the optimal intervention concentration of metformin was selected. The MC3T3-E1 cells in control group, metformin 400 $\mu\text{mol/L}$ group, metformin 400 $\mu\text{mol/L}$ + 3-MA 5 mmol/L group, and 3-MA 5 mmol/L group were interfered for 4 h, respectively. Autophagy indexes were detected by Western blotting, immunofluorescence, and transmission electron microscopy methods. And the ALP staining, semi-quantitative RT-PCR, and Western blotting methods were used to detect the osteogenic ability. **Results** Metformin could promote the ALP activity of MC3T3-E1 cells in a dose-dependent manner, and 400 $\mu\text{mol/L}$ was the optimum concentration for promoting the osteogenesis of MC3T3-E1 cells. In the metformin 0 (control), 200, and 400 $\mu\text{mol/L}$ group, the LC3 II/I ratio was gradually increased, the P62/ β -actin ratio was gradually decreased, and the LC3 fluorescence intensity was gradually increased. In the 800 $\mu\text{mol/L}$ metformin group, LC3 II/I ratio was decreased, P62/ β -actin ratio was increased, and LC3 fluorescence

收稿日期: 2018-10-28

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (201602836)

作者简介: 徐庆 (1985—), 男 (土家族), 湖北恩施人, 外科学硕士研究生, 专业方向为创伤骨科。E-mail: 13517130999@163.com

*通信作者 李建军, 主任医师, 教授, 博士。E-mail: lij2046@126.com

intensity was gradually decreased. Compared with the control group, the LC3 II/I ratio in the 400 $\mu\text{mol/L}$ metformin group was significantly increased, but the P62/ β -actin ratio was significantly decreased ($P < 0.05$). And the LC3 had the strongest fluorescence intensity. Compared with the control group, the ratios of LC3 II/I were significantly increased in the 400 $\mu\text{mol/L}$ metformin group, the expression of P62 protein was decreased ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of LC3 was increased, and the number of autophagosome was increased. The activity of ALP was enhanced, and the osteogenesis related genes and protein expression of OCN and COL1 were increased ($P < 0.001, 0.05, 0.01$). After 3-MA 5 mmol/L was added to metformin, the ratio of LC3 II/I was decreased, and expression of P62 protein was increased, but the fluorescence intensity of LC3 and the number of autophagosomes were decreased. The activity of ALP and the osteogenesis related genes and protein expression of OCN and COL1 were decreased.

Conclusion Metformin can promote osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cell line by activating moderate autophagy.

Key words: metformin; autophagy; MC3T3-E1 cell; osteogenic differentiation

随着人口逐渐老龄化, 2 型糖尿病和骨质疏松症的发病率逐渐增多。骨质疏松症合并糖尿病患者的骨重建和骨转换量均会受损^[1]。二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的一线药物, 但有研究表明二甲双胍对骨质疏松有缓解作用, 能促进骨髓间充质干细胞向成骨方向分化^[2], 抑制破骨细胞功能^[3], 促进成骨细胞分化^[4]。自噬是降解细胞内大分子物质和受损细胞器的过程, 其降解产物能循环再利用, 在维持细胞内环境的稳态和促进细胞生存方面发挥着重要作用。自噬与人类多种疾病相关, 研究较多的有癌症、神经退行性病变、老化与寿命等^[5]。研究发现, 在维持骨代谢平衡方面, 自噬水平的改变是导致骨质疏松发病的重要原因^[6]。因此本研究拟探讨二甲双胍是否能通过激活自噬促进 MC3T3-E1 细胞系的成骨分化。

1 材料

盐酸二甲双胍 (质量分数 $\geq 97\%$, 货号 PHR1084), β -甘油磷酸钠 (β -GP, 质量分数 $\geq 98\%$, 货号 50020), L-抗坏血酸 (质量分数 $\geq 99\%$, 货号 A5960), 3-甲基腺嘌呤 (3-MA, 质量分数 $\geq 98\%$, 货号 M3281) 均购自 Sigma 公司。胎牛血清 (FBS)、 α -MEM 培养基、青-链霉素、0.25% 胰蛋白酶 EDTA 溶液、磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 均购自 Bioind 公司。PCR PrimeScriptTM RT Reagent Kit、TB Green Premix Ex Taq II、RNAiso Plus 购自 TaKaRa 公司。Anti-LC3 抗体、Anti-SQSTM1/P62 抗体购自 Abcom 公司。Rabbit Anti-Osteocalcin Polyclonal Antibody 购自 absin 公司。GAPDH Antibody 购自 Proteintech 公司。Anti-Collagen1 Rabbit pAb、Anti- β -actin Rabbit pAb、FITC 标记山羊抗兔荧光 IgG (H+L) 购自万类生物。辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 购自中杉金桥。BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒, SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, SDS-PAGE 凝胶配制

试剂盒, PMSF, 蛋白裂解液, BCA 蛋白浓度测定试剂盒, DAPI 染色液, 山羊血清, ECL 曝光液均购自碧云天公司。Protein Ladder 购自 Thermo 公司。小鼠 MC3T3-E1 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

OCN、COL1、 β -actin 引物由上海生工生物公司设计和合成。 β -actin 前引物 5'-GGCTGTATCCCCCTCCATCG-3', β -actin 后引物 5'-CCAGTTGGTAA CAATGCCATGA-3', COL1 前引物 5'-GCCTCCC AGAACATCACCTA-3', COL1 后引物 5'-GCAGGG ACTTCTTGAGGTTG-3', OCN 前引物 5'-CGCTAC CTTGGAGCCTCAGT-3', OCN 后引物 5'-AGGCGG TCTTCAAGCCATAC-3'。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素、89% α -MEM 的培养基培养 MC3T3-E1 细胞, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 饱和湿度的孵箱。以 $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种细胞, 当细胞融合至 80%~90% 时传代。

2.2 药物处理和分组

成骨诱导剂为内含体积分数 89% α -MEM 培养基以及 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素, 再加入 β -甘油磷酸钠和抗坏血酸, 使成骨诱导剂含 β -甘油磷酸钠的浓度为 3.3 mmol/L, 含抗坏血酸的浓度为 16.67 mg/L。本实验中, 把传统成骨诱导剂中的地塞米松去除, 因为有文献发现地塞米松能影响到细胞的自噬^[7], 这可能影响到后期实验结果。另外降低了甘油磷酸钠和抗坏血酸的浓度, 以便能够更直观地显示不同浓度二甲双胍带来的成骨效应。成骨诱导剂中再加入二甲双胍, 配制含有不同浓度二甲双胍的成骨诱导剂, 其中二甲双胍的浓度分别为 0 (对照)、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$, 在该浓度梯度中考察最佳干预浓度。

2.3 不同浓度二甲双胍对 MC3T3-E1 细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性的影响

以 1×10^5 个/孔将细胞种植于 9.5 cm^2 小皿中。用含有 0 (对照)、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍的成骨诱导剂干预 MC3T3-E1 细胞系 4 h 后, 弃掉原培养基, 全部更换为成骨诱导剂继续孵育 3 d。3 d 后按上述方法继续换液, 培养 7 d 后行 ALP 染色。ALP 染色步骤: 弃培养液, PBS 轻柔洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛溶液 1 mL 固定 15 min, 按照 BCIP/NBT ALP 显色试剂盒说明书配制染色剂, 避光染色 2 h 后, 吸去染色剂, 使用 DDH_2O 终止显色, 原倍和 100 倍显微镜下观察拍照。

2.4 不同浓度二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞自噬相关蛋白的影响

以 3×10^5 个/孔把细胞种植于 6 孔板中。分别用含有 0 (对照)、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍的成骨诱导剂干预 MC3T3-E1 细胞 4 h 后采用免疫印迹 (Western blotting) 法测定自噬相关蛋白 LC3II、LC3I、P62。对照组用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白 (参考说明书), BCA 法测定蛋白浓度。分别配制 12% (LC3II、LC3I、P62、 β -actin) SDS-PAGE 分离胶与 5% 浓缩胶, 各组蛋白上样量为 30 μg , 电泳, 再转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 4°C 孵育过夜 (LC3 1 : 2 000, P62 1 : 10 000, β -actin 1 : 1 000), 二抗 (1 : 20 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤后 ECL 曝光。Image J 软件做图像分析。

2.5 不同浓度二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞 LC3 蛋白免疫荧光强度的影响

爬片置于 12 孔板中, 以 2×10^4 个/孔把细胞种植于爬片。用含有 0 (对照)、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍的成骨诱导剂干预 MC3T3-E1 细胞 4 h 后, 弃掉原培养基, 4% 的多聚甲醛室温固定 20 min, 用 0.5% Tritonx-100 室温破膜 5 min, 用山羊血清室温封闭 30 min, 吸去山羊血清, 每孔加 abcom LC3 一抗 (1 : 200) 孵育, 4°C 过夜, 万类 FITC 荧光二抗 (1 : 150) 室温避光孵育 2 h, 加碧云天 DAPI 室温避光孵育 2 min, 暗室内荧光 400 倍照相。绿光曝光 2 s, 核蓝光曝光 100 ms。采用免疫荧光法检测不同浓度二甲双胍组 LC3 蛋白的荧光强度。

通过实验选出二甲双胍的最佳干预浓度后, 在此最佳干预浓度中加入自噬抑制剂, 设为: 二甲双胍 + 3-MA 组 (含二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 、3-MA 5 mmol/L 的成骨诱导剂)。另外 3 组分别为对照组 (成

骨诱导剂)、二甲双胍组 (含二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 的成骨诱导剂) 和 3-MA 组 (含 3-MA 5 mmol/L 的成骨诱导剂)。使用 4 组分别处理 MC3T3-E1 细胞。

2.6 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞自噬相关蛋白的影响

以 3×10^5 个/孔把细胞种植于 6 孔板中。对照组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ + 3-MA 5 mmol/L 组、3-MA 5 mmol/L 组干预 MC3T3-E1 细胞 4 h 后, 采用 Western blotting 法检测自噬相关蛋白 LC3II、LC3I、P62。提取蛋白并测定浓度。配制 12% (LC3II、LC3I、P62、 β -actin) SDS-PAGE 分离胶与 5% 浓缩胶, 上样、电泳、转膜、封闭步骤同上所述, 一抗 4°C 孵育过夜 (LC3 1 : 2 000, P62 1 : 10 000, β -actin 1 : 1 000), 二抗 (1 : 20 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤后 ECL 曝光。用 Image J 软件进行图像分析。

2.7 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞 LC3 蛋白免疫荧光强度的影响

爬片置于 12 孔板中, 以 2×10^4 个/孔将细胞种植于爬片。对照组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ + 3-MA 5 mmol/L 组、3-MA 5 mmol/L 组干预 MC3T3-E1 细胞 4 h 后, 采用免疫荧光法检测 LC3 蛋白免疫荧光。

2.8 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞自噬体数量的影响

以 2×10^5 个/孔把细胞种植于 6 孔板中。对照组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ + 3-MA 5 mmol/L 组、3-MA 5 mmol/L 组分别干预 4 h 后, 弃掉培养基, 迅速加入电镜固定液戊二醛, 收集细胞离心, 加入新的电镜固定液室温固定 2 h, 转移至 4°C 保存。常规脱水, 包埋, 切片, 染色, 透射电镜 20 000 倍下观察自噬体。

2.9 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

对照组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ + 3-MA 5 mmol/L 组、3-MA 5 mmol/L 组分别干预 4 h 后, 弃掉原培养基, 全部更换为成骨诱导剂继续孵育 3 d, 3 d 后按照上述方法继续换液, 培养 7 d 后进行 ALP 染色。ALP 染色步骤同上。

2.10 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞成骨相关基因的影响

以 2×10^5 个/孔把细胞种植于 6 孔板中。对照组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ 组、二甲双胍 400 $\mu\text{mol/L}$ +

3-MA 5 mmol/L 组、3-MA 5 mmol/L 组分别干预 4 h 后, 弃原液, 各组全部更换为成骨诱导剂培养 3 d 后提取 RNA, qRT-PCR 法检测 MC3T3-E1 的成骨相关基因 OCN 和 COL1。根据说明书用 Trizol 提取 RNA, 酶标仪测定浓度, 按照 PCR PrimeScript™ RT Reagent Kit 说明书配制一步法 10 μL 体积的反转录 mix, 37 °C 15 min 反应, 85 °C 5 s 反转录酶的失活反应。按照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 分别加入 OCN, COL1 前后引物和灭菌水及 4 组的 cDNA 配制扩增 mix, 罗氏 4800 两步法 PCR 扩增, 第一步预变性, 1 个循环, 95 °C、30 s。第二步 PCR 反应, 40 个循环, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s。

2.11 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞成骨相关蛋白的影响

以 1×10^5 个/孔把细胞种植于 6 孔板中。对照组、二甲双胍 400 μmol/L 组、二甲双胍 400 μmol/L + 3-MA 5 mmol/L 组、3-MA 5 mmol/L 组分别干预 4 h 后, 弃掉原培养基, 全部更换为成骨诱导剂继续孵育 3 d, 3 d 后按照上述方法继续换液, 培养 14 d 后 Western blotting 检测 MC3T3-E1 的成骨相关蛋白 OCN 和 COL1 的表达。配制 10% (OCN、COL1、GAPDH) SDS-PAGE 分离胶与 5% 浓缩胶, 上样、电泳、转膜、封闭步骤同上所述, 一抗 4 °C 孵育过夜 (OCN 1 : 1 000, COL1 1 : 500, GAPDH 1 : 5 000), 二抗 (1 : 20 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗涤后 ECL 曝光。用 Image J 软件进行图像分析。

2.12 统计学分析

所有实验结果重复 3 次, 结果采用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism V.6.00 进行分析, 均值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采取单因素方差分析和 Tukey's 检验。

3 结果

3.1 不同浓度二甲双胍对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

结果显示 0、200、400 μmol/L 二甲双胍组 MC3T3-E1 细胞的 ALP 染色逐渐加深, 但 800 μmol/L 二甲双胍组的 ALP 染色有所下降, 见图 1。提示二甲双胍能够剂量相关性地促进 MC3T3-E1 细胞的 ALP 活性, 并且 400 μmol/L 二甲双胍是促进 MC3T3-E1 细胞成骨的最适浓度。

3.2 不同浓度二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞自噬相关蛋白的影响

二甲双胍 0 (对照)、200、400 μmol/L 组的 LC3 II/I 比值逐渐增大, P62/β-actin 比值逐渐减小; 800

μmol/L 二甲双胍组的 LC3 II/I 值减小, P62/β-actin 比例增大, 见图 2。

与对照组比较, 400 μmol/L 二甲双胍组的 LC3 II/I 比值明显增大, P62/β-actin 比值明显降低 ($P < 0.05$), 见表 1。可见含 400 μmol/L 二甲双胍组的 LC3 II/I 比例最大, P62/β-actin 比例最小。

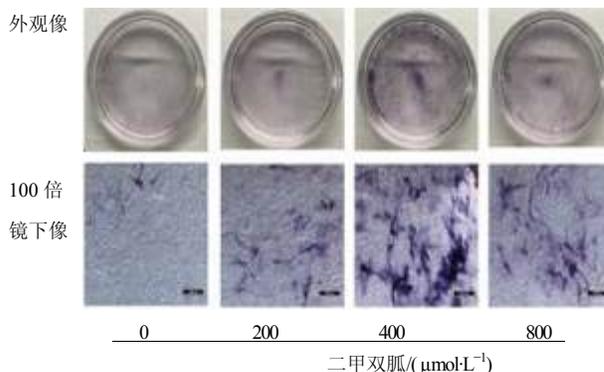


图 1 不同浓度二甲双胍对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of metformin on ALP activity of MC3T3-E1 cells

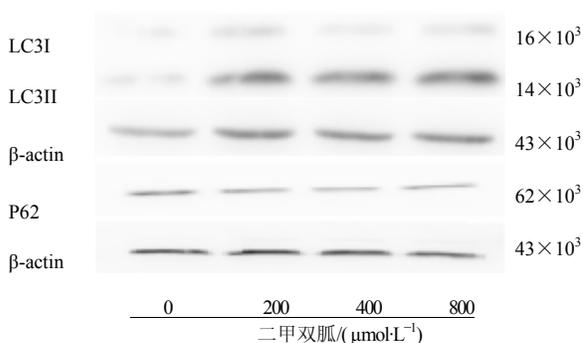


图 2 不同浓度的二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞自噬相关蛋白的影响
Fig. 2 Effects of different concentrations of metformin on autophagy-related proteins in MC3E3-E1 cells

表 1 不同浓度二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞自噬相关蛋白 LC3II 和 P62 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of different concentrations of metformin on the expression of autophagy-related proteins LC3II and P62 in MC3E3-E1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(μmol·L ⁻¹)	LC3II/I	P62/β-actin
对照	—	0.76 ± 0.08	1.06 ± 0.03
二甲	200	1.14 ± 0.10	0.62 ± 0.01
双胍	400	2.09 ± 0.02*	0.52 ± 0.01*
	800	1.53 ± 0.05	0.74 ± 0.02

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.3 不同浓度二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞 LC3 蛋白免疫荧光强度的影响

0~400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍组的 LC3 荧光强度逐渐增强, 800 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍的 LC3 荧光强度下降, 见图 3。其中 400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍组的 LC3 荧光强度最强。

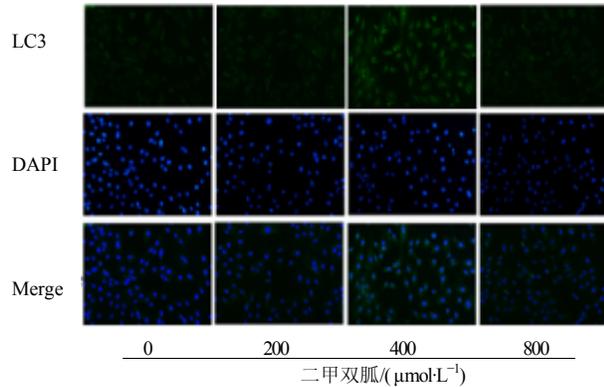


图 3 不同浓度二甲双胍对 MC3E3-E1 细胞 LC3 蛋白免疫荧光强度的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of metformin on the LC3 protein immunofluorescence intensity in MC3E3-E1 cells

3.4 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞自噬相关蛋白的影响

二甲双胍组的 LC3 II/I 比值最大, P62/ β -actin 比值最小; 二甲双胍+3-MA 组 LC3 II/I 比值减小, P62/ β -actin 比值增大; 3-MA 组中的 LC3 II/I 比值最小, P62/ β -actin 最大, 见图 4。

与对照组比较, 400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍组的 LC3 II/I 比值明显增大, P62/ β -actin 比值明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

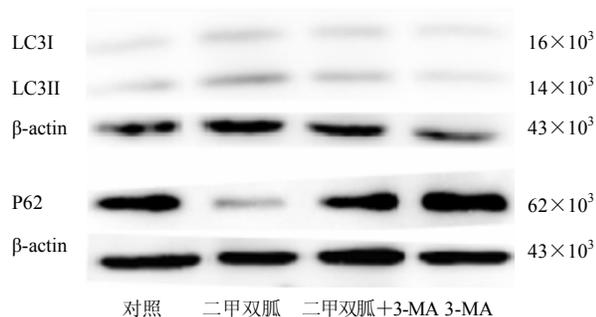


图 4 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的影响

Fig. 4 Effects on autophagy-associated proteins LC3 and P62 in MC3T3-E1 cells after metformin was added to autophagy inhibitor

表 2 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞自噬相关蛋白 LC3 和 P62 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of the expression of autophagy-associated proteins LC3 and P62 in MC3T3-E1 cells after metformin was added to autophagy inhibitor ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	LC3II/I	P62/ β -actin
对照	—	1.09 \pm 0.09	1.16 \pm 0.08
二甲双胍	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.74 \pm 0.04*	0.27 \pm 0.02*
二甲双胍+3-MA	400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.22 \pm 0.09	1.05 \pm 0.11
3-MA	5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.61 \pm 0.16	2.04 \pm 0.21

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

3.5 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞 LC3 蛋白免疫荧光强度的影响

二甲双胍组的 LC3 蛋白荧光强度最强; 二甲双胍+3-MA 组 LC3 蛋白荧光强度减弱; 3-MA 组中的 LC3 荧光蛋白强度最弱, 见图 5。

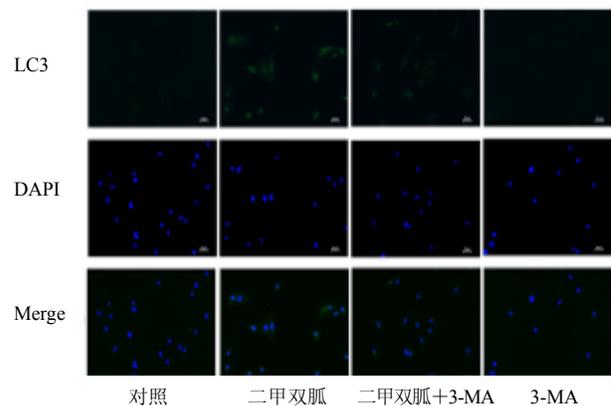


图 5 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 的 LC3 蛋白免疫荧光强度变化

Fig. 5 Changes of LC3 protein immunofluorescence intensity after metformin was added to autophagy inhibitor

3.6 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞自噬体数量的影响

二甲双胍组中自噬体数量最多, 二甲双胍+3-MA 组自噬体数量减少, 3-MA 组的自噬体数量最少, 见图 6。

3.7 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响

二甲双胍组染色最深, 二甲双胍+3-MA 组染色减弱, 3-MA 组染色最弱, 见图 7。

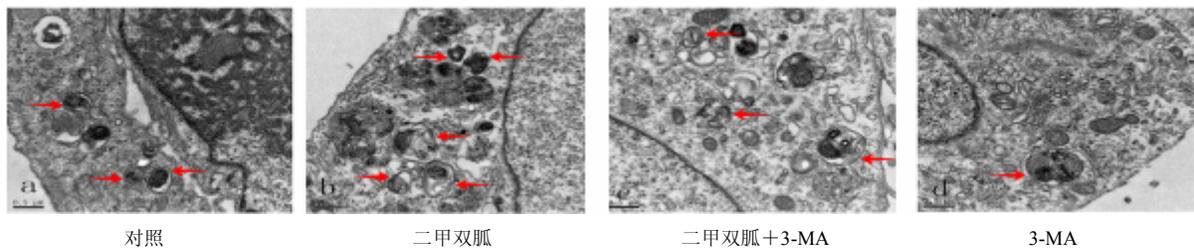


图 6 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 自噬体数量的变化

Fig. 6 Changes of the number of autophagosomes in MC3T3-E1 after metformin was added to autophagy inhibitor

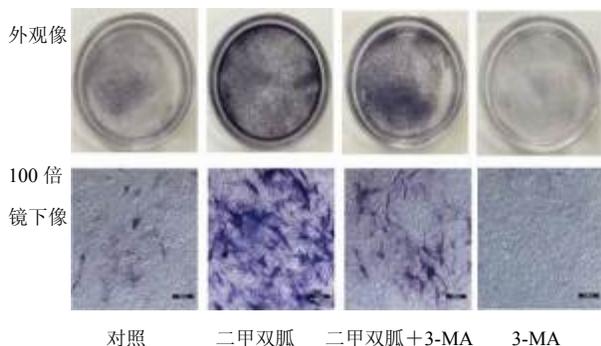


图 7 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性变化

Fig. 7 Changes of ALP activity of MC3T3-E1 cells after metformin was added to autophagy inhibitor

3.8 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞成骨相关基因的影响

二甲双胍组的 OCN 和 COL1 基因表达最强，二甲双胍+3-MA 组的 OCN 和 COL1 基因表达减弱，3-MA 组 OCN 和 COL1 基因表达最弱。与对照组比较，二甲双胍 400 μmol/L 组的 OCN mRNA、COL1 mRNA 明显增大，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.001$ 、 0.05)，见表 3。

表 3 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 成骨相关基因 OCN 和 COL1 表达量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Changes of the expression of osteoblast-related genes OCN and COL1 in MC3T3-E1 after metformin was added to autophagy inhibitor ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量	OCN mRNA	COL1 mRNA
对照	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
二甲双胍	400 μmol·L ⁻¹	1.94 ± 0.16***	1.97 ± 0.36*
二甲双胍+3-MA	400 μmol·L ⁻¹ + 5 mmol·L ⁻¹	1.24 ± 0.08	1.04 ± 0.07
3-MA	5 mmol·L ⁻¹	0.59 ± 0.10	0.86 ± 0.03

与对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.9 二甲双胍加入自噬抑制剂对 MC3T3-E1 细胞成骨相关蛋白的影响

二甲双胍组的 OCN、COL1 蛋白表达最强；二甲双胍+3-MA 组 OCN、COL1 蛋白表达减弱；3-MA 组中 OCN、COL1 蛋白表达最弱，见图 8。

与对照组比较，二甲双胍 400 μmol/L 组的 OCN/GAPDH、COL1/GAPDH 明显增大，两组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01)，见表 4。

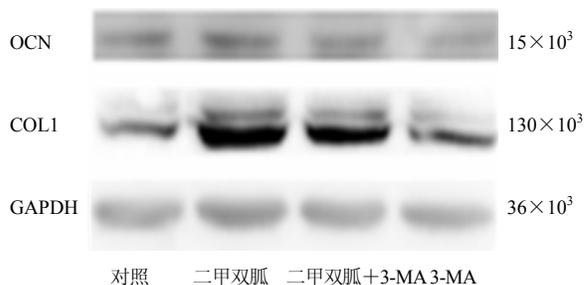


图 8 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 成骨相关蛋白 OCN 和 COL1 的变化

Fig. 8 Changes of the expression of osteoblast-related proteins OCN and COL1 in MC3T3-E1 after metformin was added to autophagy inhibitor

表 4 二甲双胍加入自噬抑制剂后 MC3T3-E1 成骨相关蛋白 OCN 和 COL1 表达量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Changes of the expression of osteoblast-related proteins OCN and COL1 in MC3T3-E1 after metformin was added to autophagy inhibitor ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量	OCN/GAPDH	COL1/GAPDH
对照	—	0.75 ± 0.03	0.73 ± 0.06
二甲双胍	400 μmol·L ⁻¹	1.01 ± 0.04*	2.39 ± 0.09**
二甲双胍+3-MA	400 μmol·L ⁻¹ + 5 mmol·L ⁻¹	0.67 ± 0.03	1.37 ± 0.05
3-MA	5 mmol·L ⁻¹	0.42 ± 0.04	0.84 ± 0.03

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

随着人口老年化和生活方式的改变, 2 型糖尿病和骨质疏松症患者逐渐增多。二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的一线药物, 目前有研究表明二甲双胍对骨质疏松有缓解作用, 能够促进成骨细胞的成骨分化和矿化, 其机制包括二甲双胍能通过激活 AMPK/USF-1/SHP 通路促进 Runx2 的表达, 从而促进成骨分化^[4], Mu 等^[8]发现在高糖环境中二甲双胍能通过促进 sirt6 的表达来促进成骨细胞的成骨分化。Cortizo 等^[9]发现二甲双胍能增加磷酸化的 ERK、iNOS (诱导型一氧化氮合酶) 和 eNOS (内皮型一氧化氮合酶) 的表达促进成骨细胞分化, 而 Kasai 等^[10]则认为二甲双胍抑制了成骨细胞的分化和后期的矿化。目前还没有二甲双胍在自噬和成骨的关系方面的研究报道。

文献报道, 二甲双胍促进 MC3T3-E1 细胞系成骨分化的浓度剂量范围在 200~800 $\mu\text{mol/L}$ ^[11]。所以本实验中首先在 0、200、400、800 $\mu\text{mol/L}$ 中寻找促进成骨的最佳浓度。MC3T3-E1 细胞系是小鼠成骨细胞前体细胞, 属于成纤维细胞类, 是一种常用的研究成骨细胞增殖、分化、矿化的模型。成骨细胞在成骨过程中需要经历 4 个阶段^[12]: 成骨细胞的增殖阶段以 COL1 的表达为标志物; 细胞外基质的成熟期主要以表达 ALP 为主; 细胞外基质的矿化期以 OCN 的表达为主; 成骨细胞的凋亡阶段。ALP 目前被认为是成骨细胞分化的早期标志, 能为矿化期磷酸盐的聚集提供条件。本研究发现 ALP 的活性在二甲双胍 0、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯度中呈剂量相关性上升, 在 400 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时最强, 但在 800 $\mu\text{mol/L}$ 时开始下降。

目前有文献发现二甲双胍能促进其他成纤维类细胞的自噬^[13]。但还没有二甲双胍能否促进成骨细胞的自噬改变的研究。LC3 II/I 的比值^[14]和 P62 蛋白^[15]分别是检测自噬体数量和反映“自噬潮”活性的关键指标。另外, 本实验选择 LC3 免疫荧光和透射电镜来判定 LC3 蛋白和自噬体的具体数量^[16]。通过上述研究, 发现 0~400 $\mu\text{mol/L}$ 二甲双胍使 MC3T3-E1 细胞系的自噬相关指标不断增强, 但在 800 $\mu\text{mol/L}$ 时 MC3T3-E1 细胞系自噬相关指标开始减弱。可能与二甲双胍能促进 MC3T3-E1 AMPK 的磷酸化有关^[17-18], 磷酸化的 AMPK 抑制了 mTOR 的活性, mTOR 下游的 ULK1 激酶复合体被激活, 从而启动自噬有关^[19-20]。

在本研究中, 二甲双胍干预的 MC3T3-E1 细胞的成骨分化能力与自噬水平呈正相关。目前已有研究发现, 适度激活细胞的自噬能促进成骨细胞的成骨分化^[21-23]。因此, 实验提出假说认为二甲双胍能通过促进 MC3T3-E1 的自噬来促进其成骨分化。3-MA 是常用的自噬抑制剂^[24], 通过抑制 III PI3K 复合体的形成来抑制自噬双层膜的延伸。本研究发现, 加入 3-MA 后, 二甲双胍诱导的 MC3T3-E1 的自噬蛋白 LC3 II/I 比值减小, P62 蛋白增多, LC3 免疫荧光强度减弱, TEM 结果显示自噬体数量明显减少; 干预细胞 3 d, 成骨相关基因 COL1、OCN mRNA 表达下降, 第 7 天时, ALP 活性减弱, 第 14 天时成骨相关蛋白 COL1、OCN 表达减少。推测原因可能为: 自噬囊泡能作为运输钙磷结晶的载体, 从而来促进成骨细胞的矿化和代谢^[25], 抑制了二甲双胍诱导的自噬后, 自噬体数量减少, 载体减少, 从而导致了成骨分化能力减弱。

由此推测, 二甲双胍能够通过激活 MC3T3-E1 的适度自噬来促进 MC3T3-E1 细胞的成骨分化。然而二甲双胍通过何种途径激活自噬还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Lecka-Czernik B. Diabetes, bone and glucose-lowering agents: basic biology [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(7): 1163-1169.
- [2] Molinuevo M S, Schurman L, McCarthy A D, et al. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(2): 211-221.
- [3] Gao Y, Li Y, Xue J, et al. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635(1): 231-236.
- [4] Jang W G, Kim E J, Bae I H, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2 [J]. *Bone*, 2011, 48(4): 885-893.
- [5] Yang Z, Klionsky D J. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(9): 814-822.
- [6] Greenhill C. Bone: Autophagy regulates bone growth in mice [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(1): 4.
- [7] Liu W, Zhao Z, Na Y, et al. Dexamethasone-induced production of reactive oxygen species promotes apoptosis via endoplasmic reticulum stress and autophagy in MC3T3-E1 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 2028-2036.

- [8] Mu W, Wang Z, Ma C, *et al.* Metformin promotes the proliferation and differentiation of murine preosteoblast by regulating the expression of sirt6 and oct4 [J]. *Pharmacol Res*, 2018(129): 462-474.
- [9] Cortizo A M, Sedlinsky C, Mccarthy A D, *et al.* Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 536(1): 38-46.
- [10] Kasai T, Bandow K, Suzuki H, *et al.* Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 221(3): 740-749.
- [11] Mai Q G, Zhang Z M, Xu S, *et al.* Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2902-2909.
- [12] 曹小俊, 施毕旻, 杜 宣, 等. 二甲双胍对高糖介导的成骨细胞 MG63 增殖及相关基因表达的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(12): 972-974.
- [13] Wang G Y, Bi Y G, Liu X D, *et al.* Autophagy was involved in the protective effect of metformin on hyperglycemia-induced cardiomyocyte apoptosis and Connexin43 downregulation in H9c2 cells [J]. *Int J Med Sci*, 2017, 14(7): 698-704.
- [14] Kimura S, Fujita N, Noda T, *et al.* Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3 [J]. *Methods Enzymol*, 2009(452): 1-12.
- [15] Benyounès A, Tajeddine N, Tailler M, *et al.* A fluorescence-microscopic and cytofluorometric system for monitoring the turnover of the autophagic substrate p62/SQSTM1 [J]. *Autophagy*, 2011, 7(8): 883-891.
- [16] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, *et al.* Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells [J]. *Methods Enzymol*, 2009(452): 143-164.
- [17] Zhou G, Myers R, Li Y, *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(8): 1167-1174.
- [18] Kanazawa I. Interaction between bone and glucose metabolism [Review] [J]. *Endocr J*, 2017, 64(11): 1043-1053.
- [19] Papinski D, Schuschnig M, Reiter W, *et al.* Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase [J]. *Mol Cell*, 2014, 53(3): 471-483.
- [20] Mihaylova M M, Shaw R J. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(9): 1016-1023.
- [21] Kim I R, Kim S E, Baek H S, *et al.* The role of kaempferol-induced autophagy on differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16(1): 333.
- [22] Ha S W, Weitzmann M N, Jr G R B. Bioactive silica nanoparticles promote osteoblast differentiation through stimulation of autophagy and direct association with LC3 and p62 [J]. *ACS Nano*, 2014, 8(6): 5898-5910.
- [23] Liu F, Fang F, Yuan H, *et al.* Suppression of autophagy by FIP200 deletion leads to osteopenia in mice through the inhibition of osteoblast terminal differentiation [J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(11): 2414-2430.
- [24] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research [J]. *Cell*, 2010, 140(3): 313-326.
- [25] Nollet M, Santucci-Darmanin S, Breuil V, *et al.* Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis [J]. *Autophagy*, 2014, 10(11): 1965-1977.