

УДК 577.19

РЕСВЕРАТРОЛ СПОСОБСТВУЕТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ *in vitro* ОСТЕОБЛАСТОВ МСЗТЗ-Е1 ПУТЕМ ПОТЕНЦИРОВАНИЯ КАЛЬЦИНЕУРИН/NFATC1-ОПОСРЕДОВАННОГО СИГНАЛЬНОГО ПУТИ*

© 2019 Y. Huang^{1#}, J. Huo^{2#}, F.Q. Liu³, J. Liu³,
X.J. Zhang⁴, C.H. Guo⁴, L.H. Song^{4**}

¹ Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China

² Department of Biology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China

³ Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China

⁴ Department of Pharmacology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China; E-mail: slh10282001@163.com

Поступила в редакцию 15.03.2019

После доработки 15.03.2019

Принята к публикации 08.04.2019

Ранее было показано, что ресвератрол (RSVL) может стимулировать *in vitro* дифференцировку остеобластов МСЗТЗ-Е1. Однако механизмы, лежащие в основе анаболического влияния ресвератрола на остеобласты, остаются в большей части невыясненными. Целью настоящей работы являлось изучение молекулярного механизма действия ресвератрола на процесс дифференцировки клеток МСЗТЗ-Е1. Эти клетки на протяжении 8 дней подвергали обработке различными концентрациями ресвератрола (10^{-8} моль/л– 10^{-6} моль/л) и циклоспорина А (является специфическим ингибитором кальцинеурин/NFAT-опосредованного сигнального пути) в концентрации 10^{-6} моль/л. На основании результатов предварительных тестирований клеточной пролиферации и определения активности щелочной фосфатазы, нами была определена концентрация ресвератрола, равная 10^{-7} моль/л, которую затем использовали в последующих экспериментах. Определение уровня экспрессии мРНК и белка, кодируемых генами, ассоциированными с процессом остеоза, а именно, генами *CaN*, *NFATc1* и *Runx2* осуществляли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга соответственно. Было обнаружено, что ресвератрол вызывает повышение экспрессии генов *CaN*, *NFATc1* и *Runx2* с образованием соответствующих мРНК и белков по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Циклоспорин А, напротив, снижал стимулирующий эффект ресвератрола ($p < 0,05$). С помощью иммуногистохимических методов показано, что обработка клеток ресвератролом приводит к накоплению белка NFATc1 в клеточных ядрах. Обработка клеток циклоспорином А вызывает ингибирование индукции ресвератролом накопления белка NFATc1. Ресвератрол оказывает свое действие на остеобласты при участии CaN/NFATc1-опосредованного сигнального пути.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ресвератрол, циклоспорин А, кальцинеурин/NFATc1, дифференцировка остеобластов.

DOI: 10.1134/S0320972519080062

Фитоэстрогены образуют группу существующих в природе химических соединений растительного происхождения, биологическая активность которых сходна с активностью эстрогенов

клеток млекопитающих. Ресвератрол (RSVL – *resveratrol*, 3,4',5-тригидроксистерильбен) является пригодным в пищу полифенольным фитоэстрогеном, который обнаруживается в коже

Принятые сокращения: ALP – *alkaline phosphatase*, щелочная фосфатаза; CaN – *calcineurin*, кальцинеурин; CsA – *cyclosporin A*, циклоспорин А; NFATc1 – *nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1*, ядерный фактор активированных Т-клеток цитоплазматический 1; NF-κB – *nuclear factor kappa B*, ядерный фактор каппа В; pNPP – *p-nitrophenyl phosphate*, п-нитрофенилфосфат; PVDF – *polyvinylidene fluoride*, поливинилиденфторид; RIPA – *radioimmunoprecipitation assay*, метод радиоиммунопреципитации; RSVL – *resveratrol*, ресвератрол; real-time RT-PCR – *real-time reverse transcription-polymerase chain reaction*, ОТ-ПЦР в реальном времени, полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией; Runx2 – *Runt-related transcription factor 2*, родственному белку Runt фактор транскрипции 2; SDS – *sodium dodecyl sulfate*, додецилсульфат натрия; α-MEM – *alpha minimum essential medium*, минимальная эссенциальная среда альфа; ИHC – *immunohistochemistry*, иммуногистохимия.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-077, 13.05.2019. Статья на английском языке опубликована в № 6 2019.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

большинства сортов винограда, корнях арахиса и в различных лекарственных растениях [1]. В различных исследованиях было показано, что ресвератрол является антиоксидантом, антинеопластическим, антитромбоцитарным и противовоспалительным средством [2]. Он также снижает потерю костной ткани у крыс с удаленным яичником [3]. Тем не менее, механизмы, лежащие в основе анаболического влияния ресвератрола на остеобласты, остаются в большей части невыясненными.

Белок кальцинеурин (CaN) является широко распространенной серин-треониновой фосфатазой. Ее субстратом внутри клеток выступает ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT). Кальцинеурин-зависимое дефосфорилирование факторов NFAT приводит к передаче сигналов о необходимости их локализации внутри ядра и транслокации этих факторов внутрь ядра с последующей активацией определенных генов. Белки NFAT вместе образуют семейство, состоящее из четырех факторов транскрипции: NFAT1 (p, c2), NFAT2 (c, c1), NFAT3 (c4) и NFAT4 (x, c3). Показано, что в эмбриональных фибробластах NFATc1^{-/-} происходит существенное нарушение процесса формирования костной ткани [4]. В настоящее время основное внимание уделяется изучению влияния активации гена *NFATc1* на процесс остеокластогенеза [5, 6]. В то же время до сих пор не выяснена специфическая роль NFATc1 в процессе дифференцировки остеобластов. Кроме того, в некоторых случаях полученные результаты противоречат друг другу. Фактор транскрипции *Runx2* является основным регулятором процесса дифференцировки остеобластов [7, 8]. Показано, что в его отсутствии дифференцировка остеобластов становится невозможной. В этих условиях происходит нарушение процесса формирования костей и снижение уровня транскрипции генов-мишеней, на которые действует *Runx2* [9–11].

Основной целью настоящей работы было изучение молекулярного механизма действия ресвератрола на процесс дифференцировки остеобластов MC3T3-E1. Роль ресвератрола и возможный механизм его действия оценивали путем анализа уровня экспрессии мРНК и белка у генов, ассоциированных с остеозисом, таких как *CaN*, *NFATc1* и *RunX2*. Для проверки влияния ресвератрола на процесс дифференцировки остеобластов, также был использован циклоспорин А (CsA), специфический ингибитор кальцинеурина. Его концентрация, равная 10⁻⁶ моль/л, была отобрана на основе результатов предварительных экспериментов и с учетом литературных данных [12].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры. Клетки MC3T3-E1 были получены от Шанхайского института биохимии и биологии клеток (Китай). Культуральные среды и препарат МТТ (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide; 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2-Н-тетразолиум бромид) были приобретены в BD Company (США), а фетальная бычья сыворотка в «Invitrogen» (США). Препарат циклоспорина А (CsA) был получен от «ALEXIS Laboratories» (США).

Клетки MC3T3-E1 поддерживали в ростовой среде (свободная от красного фенола минимальная эссенциальная среда, α -MEM), дополненной 10%-ной (в/в) фетальной бычьей сывороткой, 5 × 10⁻³ моль/л β -глицерофосфата и 25 г/л аскорбиновой кислоты, при 37 °С в 5%-ной CO₂. Реагенты, которыми обрабатывали клетки, как показано ранее, добавляли в культуральную среду через день. Затем культуральную среду меняли каждые четыре дня.

Определение выживаемости клеток с МТТ. Клетки инкубировали с различными концентрациями ресвератрола (10⁻⁸ моль/л–10⁻⁶ моль/л) в течение 8 дней. Затем клетки рассеивали в 96-ячеечный планшет при плотности 3 × 10³ клеток на ячейку. После этого в каждую ячейку добавляли 20 мкл концентрированного раствора МТТ в фосфатно-солевом растворе (5 мг/мл) до достижения конечной концентрации 0,5 мг/л МТТ. Клетки инкубировали при 37 °С в течение 4 ч. Среду с МТТ удаляли, образовавшиеся фиолетовые кристаллы формазана растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида и регистрировали оптическую плотность (ОП) при 570 нм в каждой ячейке с использованием ридера микропланшет. Контрольная группа выступала в качестве отрицательного контроля с 100%-ой выживаемостью клеток. Пролиферацию клеток в обработанной группе, выраженную в процентах, рассчитывали следующим образом:

ОП обработанной группы/ОП контрольной группы × 100.

Определение активности щелочной фосфатазы. Клетки MC3T3-E1 при исходной плотности клеток, равной 2 × 10⁴ клеток на ячейку, культивировали в среде α -MEM в 24-ячеечном культуральном планшете. После 8 дней культивирования клетки собирали и определяли активность щелочной фосфатазы (ALP) с помощью набора для определения активности, содержащего п-нитрофенилфосфат (pNPP) («Sigma Chemical Co.», США) в соответствии с инструкциями производителя. Сначала клетки лизировали в лизисном буфере и инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем

клеточные лизаты центрифугировали при 12 000 g при 4 °C в течение 10 мин. Осветленные лизаты клеток переносили в новые центрифужные пробирки объемом 1,5 мл и проводили определение активности щелочной фосфатазы следующим образом: 10 мкл осветленного клеточного лизата помещали в 96-ячеечную прозрачную планшету. Затем в каждую ячейку добавляли по 200 мкл раствора п-нитрофенилфосфата. Далее планшету инкубировали в темноте в течение ~30 мин. при комнатной температуре. После завершения инкубации измеряли оптическую плотность образцов в ячейках при длине волны 405 нм на ридере многоячеечных планшет (США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР в реальном времени). Получали препарат общей РНК с использованием набора MiniBEST Universal RNA Extraction kit (Япония). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора PrimeScript RT Reagent kit with gDNA Eraser (Япония). ОТ-ПЦР проводили с использованием набора SYBR Green Mix kit (Япония). Все образцы обрабатывали в трех экземплярах в оптических пробирках в стрипах по восемь штук (США). Последовательности праймеров представлены в табл.1. ОТ-ПЦР в реальном времени проводили следующим образом: исходное нагревание при 95 °C в течение 30 с и последующие 40 циклов по 5 с при 95 °C (денатурация) и при 60 °C (отжиг/элонгация) в течение 30 с и затем диссоциация. Относительную величину экспрессии гена-мишени рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [13].

Вестерн-блоттинг. Клетки дважды промывали ледяным натрий-фосфатным буфером (PBS). Общий белок клеток получали в лизисном буфере для проведения радиоиммунопреципитации RIP, содержащим 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1%-ный NP-40, 0,5%-ный дезоксихолат натрия и 0,1%-ный SDS, и определяли активность CaN, NFATc1 и RunX2. Содержание общего белка в лизатах клеток определяли с помощью наборов для определения концентрации белка, содержащих бицинхониновую кислоту (BCA) (Китай). Белковые фракции разделяли с помощью электрофореза в 10%-ом полиакриламидном геле с SDS, и разделенные белки переносили из геля на поливинилденфлюоридные (PVDF) мембраны. Затем среди разделенных белков с помощью специфических антител выявляли белки CaN (разведение 1 : 2000; ab137335; «Abcam», Великобритания), NFATc1 (H-10; разведение 1 : 500; «Santa Cruz Biotechnology», США) и RunX2 (разведение 1 : 3000; ab23981; «Abcam», Великобритания) в течение ночи при 4 °C. Мембраны PVDF трижды промывали натрий-Tris-буферным раствором, содержащим 0,1%-

Таблица 1. Праймеры, использованные при проведении ПЦР в реальном времени

Праймер	Последовательность праймера (5'-3')
CaN-F	CTCCCAGTTCAGCGTCAA
CaN-R	ATCGCCATCCTTATCCAG
NFATc1-F	GCGATCACTACTGGGATTTCT
NFATc1-R	TCGAGGACGTGCATCTGTT
RunX2-F	ATAGCAAAGGCCCTCACTAA
RunX2-R	AACTGGCTCTTCTGCTGATT
β-актин-F	AGACCTCTATGCCAACACAG
β-актин-R	ACTCATCGTACTCCTGCTTG

ный Tween-20. Затем мембраны инкубировали с козлиными антикроличьими вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (разведение 1 : 2000; A0208; «Beyotime Institute of Biotechnology», Китай) при комнатной температуре в течение 2 ч. В качестве контроля нагрузки использовали β-актин, который определяли с помощью мышинных поликлональных антител (разведение 1 : 5000; ab20272; «Abcam», Великобритания). Белки выявляли с помощью системы усиления хемолюминесценции («Amersham Biosciences», Германия) на приборе Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare Life Sciences», Великобритания). Определение интенсивности белковых полос серого цвета осуществляли с помощью программного пакета Image J 1.37v software («National Institutes of Health», США).

Иммуногистохимия. Клетки МТ3Т3-Е1 в количестве $1,0 \times 10^5$ клеток на ячейку рассевали на съемной крышке 6-ячеечной планшеты. Клетки культивировали в присутствии 10^{-7} моль/л ресвератрола и 10^{-6} моль/л циклоспорина А в течение 8 дней. Затем клетки в течение 15 мин. фиксировали в 4,0%-ом параформальдегиде. Пермеабиллизацию клеток проводили в 0,5%-ном Triton X-100 в течение 10 мин. Далее клетки инкубировали в блокирующем буфере. Затем добавляли мышинные моноклональные антитела против белка NFATc1 (разведение 1 : 200) и инкубировали при 37 °C в течение 2 ч. Набор мышинных антител (PV-6002) использовали в соответствии с инструкциями производителя («ZSGB-BIO Co., Ltd.», Китай). Все изображения получали с помощью светового микроскопа Olympus BX51 («Olympus Corporation», Япония) при 400-кратном увеличении. На основании интенсивности окрашивания, уровни экспрессии NFATc1 оценивали следующим образом: – (без окрашивания), 1 (+), 2 (++) и 3 (+++). С учетом доли NFATc1-положительных клеток, были установлены следующие оценочные баллы: – (0–1%; балл 0), + (1–24%; балл 1), ++ (25–49%;

балл 2) и +++ (50–100%; балл 3). Итоговые оценочные баллы окрашивания NFATc1 были рассчитаны как суммы интенсивности окрашивания и процентный балл, которые выглядели следующим образом: –, нет экспрессии (общий балл 0); +, слабая экспрессия (общий балл 1–2); 2+, умеренная экспрессия (общий балл 3–4) и 3+, усиленная экспрессия (общий балл 5–6). Средние значения получали на основе значений от десяти случайно выбранных полей зрения.

Статистическая обработка полученных результатов. Полученные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонения. В соответствии с планом проведения экспериментов, для сравнения результатов, полученных в различных группах, использовали метод одновариантного анализа с последующим определением значительных различий с помощью *t*-теста. Значения величины *p* менее 0,05 рассматривали как статистически достоверные.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние ресвератрола на процесс пролиферации клеток. Оптимальную концентрацию ресвератрола определяли с помощью метода оценки выживаемости клеток с использованием МТТ. В соответствии с полученными результатами, для проведения дальнейших экспериментов была выбрана концентрация ресвератрола, равная 10^{-7} моль/л (рис. 1, *a*).

Влияние ресвератрола на активность щелочной фосфатазы. Чтобы оценить влияние ресвератрола на дифференцировку остеогенных кле-

ток, в этих клетках определяли активность щелочной фосфатазы. Определение активности щелочной фосфатазы на единицу белка в клетках МС3Т3-Е1 проводили после обработки этих клеток в течение 8 дней различными концентрациями ресвератрола. Максимальную активность щелочной фосфатазы наблюдали в группе, обработанной ресвератролом в концентрации 10^{-7} моль/л, для которой было показано значительное увеличение активности в сравнении с контрольной группой (рис. 1, *b*).

Влияние обработки ресвератролом на уровень мРНК генов *CaN*, *NFATc1* и *Runx2*, ассоциированных с остеозисом. На рис. 2 представлена картина влияния ресвератрола на экспрессию мРНК генов *CaN*, *NFATc1* и *Runx2*, полученная с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Значительное повышение уровня экспрессии мРНК *CaN* наблюдали в группе, обработанной ресвератролом, по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В то же время в группе, обработанной ресвератролом и циклоспорином А, было выявлено значительное снижение уровня экспрессии мРНК *CaN* по сравнению с группой, обработанной только ресвератролом ($p < 0,05$). Сходные результаты были получены при определении уровня экспрессии мРНК генов *NFATc1* и *Runx2* (все значения $p < 0,05$).

5RunX2. Чтобы оценить эффект действия ресвератрола на клетки МС3Т3-Е1, были определены уровни белков, кодируемых генами *CaN*, *NFATc1* и *RunX2*. Как показано на рис. 3, ресвератрол значительно повышал уровень белков *CaN*, *NFATc1* и *RunX2* ($p < 0,05$). В то же время уровни этих белков в группе, обработанной ресвератролом и циклоспорином А, были значи-

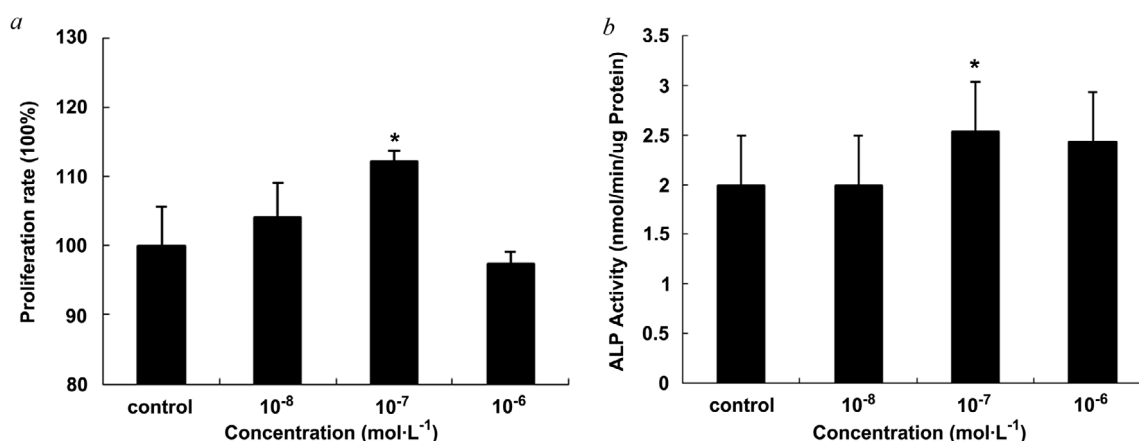


Рис. 1. Оценка пролиферации клеток МС3Т3-Е1 после их обработки ресвератролом ($n = 6$). Для проведения сравнительной оценки пролиферации клеток МС3Т3-Е1 после их обработки ресвератролом использовали тест на выживаемость клеток с использованием МТТ. При обработке клеток ресвератролом в концентрации 10^{-7} моль/л наблюдалась наибольшая пролиферация в сравнении с контрольной группой (*a*). Дифференцировка клеток оценивалась по активности щелочной фосфатазы (*b*); * $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой

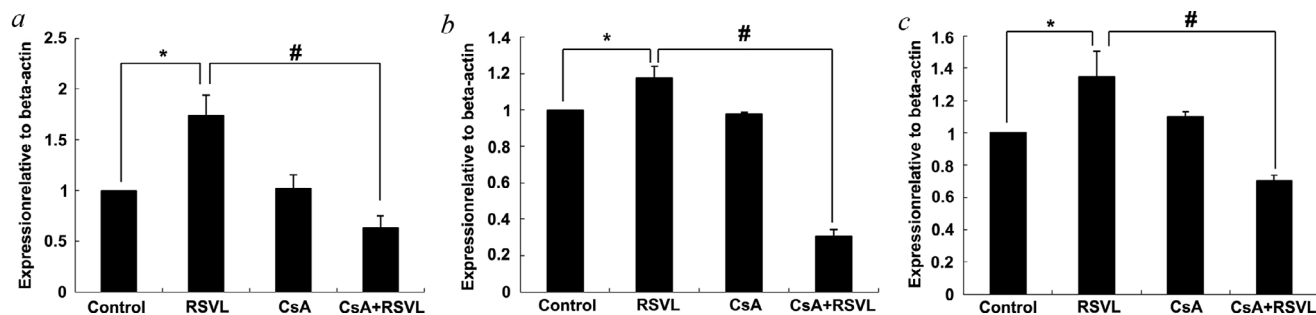


Рис. 2. Экспрессия мРНК генов, ассоциированных с остеозисом. Клетки MC3T3-E1 подвергали различным обработкам в течение 8 дней. Экспрессию мРНК генов *CaN* (a), *NFATc1* (b) и *RunX2* (c) определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($n = 3$); * $p < 0,05$ против контрольной группы. # $p < 0,05$ между группой клеток, обработанной только ресвератролом, и группой клеток, обработанных циклоспорином А и ресвератролом

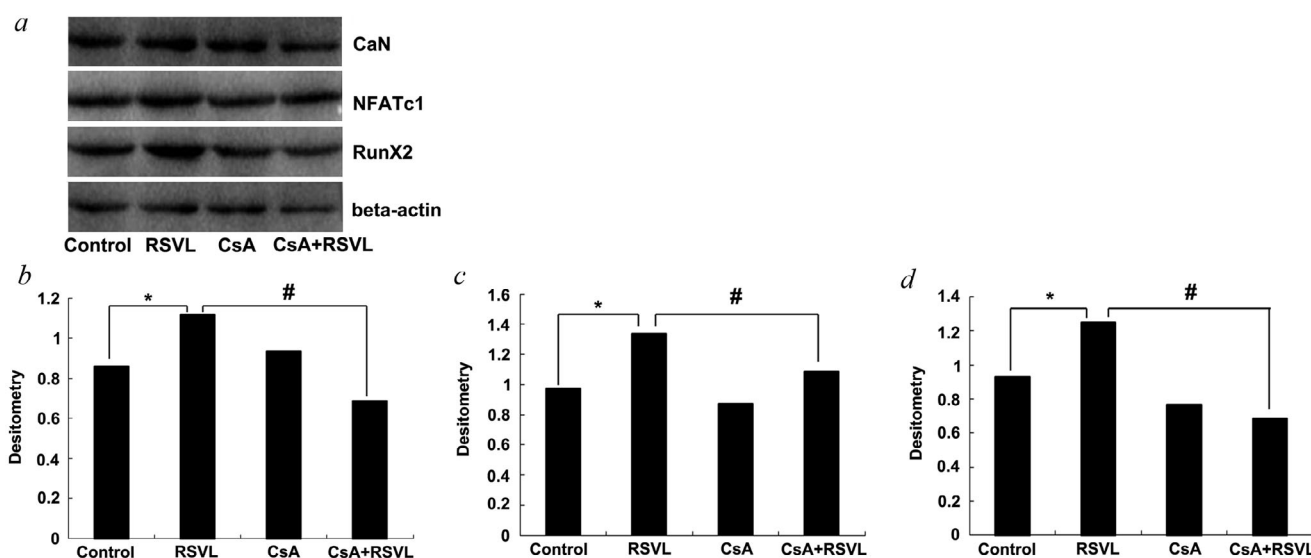


Рис. 3. Уровни белков, ассоциированных с остеопорозом, после различных обработок клеток. Уровни белков CaN, NFATc1 и RunX2 (a). Денситометрический анализ белков CaN (b), NFATc1 (c) и RunX2 (d). В качестве контроля белковой нагрузки использовали β -актин; * $p < 0,05$ против контрольной группы, # $p < 0,05$ между группой, обработанной ресвератролом, и группой, обработанной ресвератролом и циклоспорином А

тельно снижены, по сравнению с группой, обработанной только ресвератролом.

Ресвератрол индуцирует накопление NFATc1 в ядрах клеток. Для определения *in situ* уровня NFATc1 в клетках MC3T3-E1 было проведено иммуногистохимическое окрашивание клеток. Результаты представлены на рис. 4. В табл. 2 показаны уровни NFATc1 в ядрах MC3T3-E1, определенные с использованием антител против белка NFATc1. Иммуногистохимически было обнаружено, что ресвератрол индуцировал накопление NFATc1 в ядрах клеток и способствовал значительному усилению окрашивания NFATc1. Обработка циклоспорином А приводила к предотвращению способности ресвератрола индуцировать экспрессию NFATc1 в клетках MC3T3-E1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для лечения остеолитических костных заболеваний применяются различные лекарства, например, бисфосфонаты, эстрогены и ралоксифен [14]. Однако, несмотря на эффективность действия этих лекарств, их применение ограничено из-за характерных для них побочных эффектов, среди которых можно отметить тромбоз и раздражение пищевода [15]. Конечной целью разработки лекарств против остеопороза является нахождение агента, который мог бы улучшить формирование кости через стимуляцию остеобластов и одновременное ингибирование остеокластов без возникновения нежелательных побочных явлений. Для достижения

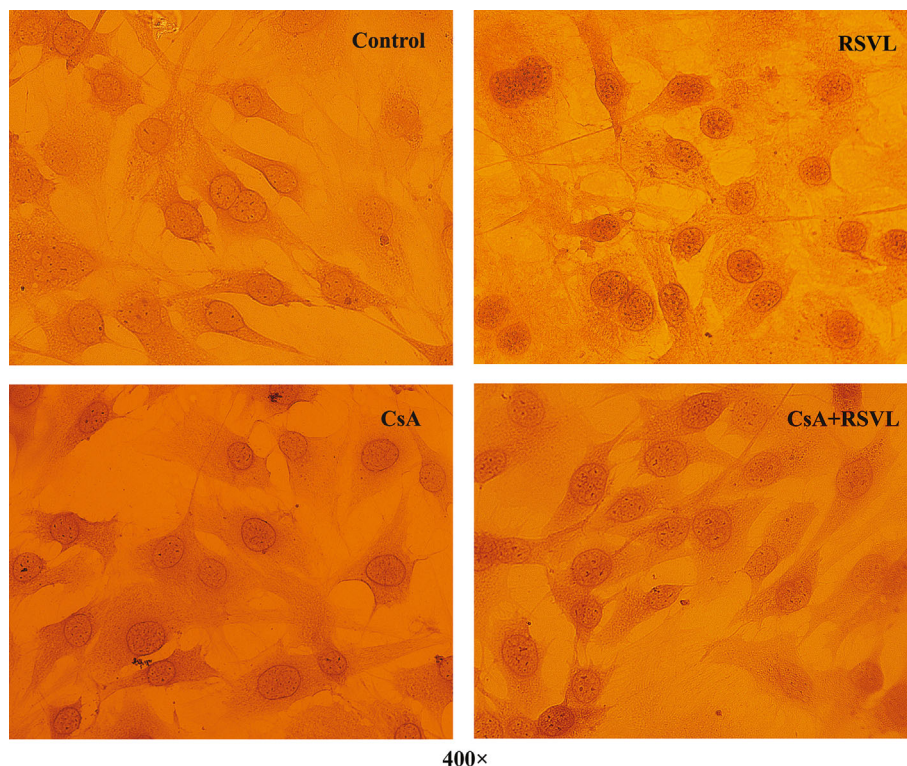


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание белка NFATc1 в клетках MC3T3-E1.

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>

этой цели были изучены природные соединения и фитоэстрогены в качестве кандидатов на анти-остеопоротические агенты. В предыдущих работах было показано, что ресвератрол может стимулировать пролиферацию и дифференцировку остеобластов [16–18]. Также было проведено изучение механизма действия ресвератрола. Например, показано, что ресвератрол может предотвращать апоптоз остеобластов путем усиления экспрессии β -катенина [16]. Ресвератрол стимулирует пролиферацию и дифференцировку остеобластов мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека через эстрогеновый рецептор-зависимый механизм и сопряжение с

активацией ERK1/2 [17]. Ресвератрол предотвращает потерю костной ткани путем стимулирования про-остеогенного фактора BMP2^[18]. В то же время до сих пор не было сообщений о существовании взаимосвязи между RSVL-индуцированной дифференцировкой остеобластов и CaN/NFATc1-зависимым сигнальным путем.

Действительно, в нашей предыдущей работе было показано, что ресвератрол может индуцировать повышение уровня мРНК, продукта гена *Runx2*. Белок Runx2, также известный как связывающий фактор ядра альфа-1, является фактором транскрипции, жизненно необходимым для дифференцировки остеобластов и образования

Таблица 2. Уровни NFATc1 в клетках MC3T3-E1, определенные с помощью иммуногистохимии

Группа	n	Всего				Значение p	
		–	1+	2+	3+		
Контроль	6	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0	0	p < 0,01	p < 0,01
RSVL	6	0	0	2 (33,3%)	4 (66,7%)		
CsA+RSVL	6	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,7%)	0		
CsA	6	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0	0		

костной ткани. Нарушение экспрессии *Runx2* приводило к полному нарушению формирования костей у зародышей мышей [19]. Эти результаты позволили предположить, что существует важная связь между действием ресвератрола и транскрипцией в остеобластах, специфичной для костных клеток. Более того, полученные результаты указывали на необходимость поиска новых внутриклеточных молекул, на которые воздействует ресвератрол, и ассоциированных с ними сигнальных путей, которые управляют, в конечном итоге, дифференцировкой костных клеток. Производя поиск сигнального пути, который мог бы свести вместе индукцию ресвератролом и активацию гена *Runx2* в клетках MC3T3-E1, мы обратили наше внимание на CaN/NFATc1-зависимый сигнальный путь, поскольку он является жизненно необходимым для сигнального каскада, задействованного в контроле дифференцировки, апоптоза и адаптации широкого круга типов клеток и тканей [20–22]. Поэтому было целесообразно изучить возможность активации сигнальной оси CaN/NFATc1 под действием ресвератрола. В настоящей работе клетки MC3T3-E1 обрабатывали 10^{-7} моль/л ресвератрола в течение 8 дней. После обработки была изучена пролиферация клеток, экспрессия мРНК и белка у генов, которые ассоциированы с остеозисом (*CaN*, *NFATc1* и *Runx2*), и маркеры дифференцировки при остеогенезе (активность щелочной фосфатазы) (рис. 1, *b*). Показано, что обработка ресвератролом в концентрации 10^{-7} моль/л RSVL вызывала повышение экспрессии соответствующих мРНК и увеличивала содержание белков CaN, NFATc1 и RunX2 (рис. 2, рис. 3). С помощью иммуногистохимии также было показано, что обработка клеток ресвератролом вызывала накопление белка NFATc1 в клеточных ядрах (рис. 4). Чтобы проверить результаты наших наблюдений, клетки MC3T3-E1 были обработаны циклоспорином А, который действует как ингибитор, специфичный для CaN/NFATc1-зависимого пути. В результате действия циклоспорино А, было отменено стимулирующее действие ресвератрола на экспрессию генов *CaN*, *NFATc1* и *RunX2* как на уровне мРНК, так и на уровне белка (рис. 2 и рис. 3), что свидетельствовало о том, что CaN/NFATc1-зависимый сигнальный путь мо-

жет быть задействован в процессе дифференцировки остеобластов, индуцированном ресвератролом. Это наблюдение соответствует результатам, полученным Sun et al. [23], которые сообщили о том, что повышенная экспрессия CaN усиливала остеобластогенез, а делеция гена *CaN* или его ингибирование снижали формирование костной ткани и дифференцировку остеобластов. Кроме того, ранее было показано, что ресвератрол предотвращал ингибирование циклоспорином А пролиферации и дифференцировки мезенхимных стволовых клеток костного мозга (BMSCs – *bone marrow stem cells*) в остеобласты [12]. Следовательно, в настоящей работе было показано, что ресвератрол индуцировал дифференцировку остеобластов *in vitro* через потенцирование CaN/NFATc1-опосредованной оси передачи сигнала. Эффект действия ресвератрола может быть обусловлен его участием в регуляции транскрипции генов, участвующих в дифференцировке остеобластов. Тем не менее, необходимо в дальнейшем изучить возможность наблюдения подобных изменений *in vivo*.

Таким образом, в данной работе были получены доказательства влияния ресвератрола на процесс дифференцировки остеобластов и участия CaN/NFATc1-зависимого сигнального пути в индуцированной ресвератролом стимуляции остеобластов. Эти данные способствуют раскрытию молекулярных механизмов, лежащих в основе стимуляции остеобластов ресвератролом.

Финансирование. Выполнение работы проводили при поддержке грантов программ Changzhi Medical College Science and Technology Innovation Team (грант CX201413) и Shanxi Province Health and Family Planning Commission research topic (грант 201602024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии между ними конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность проф. Сун (Song) за ее тщательное руководство данной работой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen, R.S., Wu, P.L., and Chiou, R.Y. (2002) Peanut roots as a source of resveratrol, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1665-1667.
2. Fremont, L. (2000) Biological effects of resveratrol, *Life Sci.*, **66**, 663-673.
3. Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., and Yamori, Y. (2000) Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **46**, 78-83.
4. Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., Crombrughe, B., Nakashima, K., and Takayanagi, H. (2005) NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation, *Nat. Med.*, **11**, 880-885.

5. Penolazzi, L., Zennaro, M., Lambertini, E., Tavanti, E., Torreggiani, E., Gambari, R., and Piva, R. (2007) Induction of estrogen receptor alpha expression with decoy oligonucleotide targeted to NFATc1 binding sites in osteoblasts, *Mol. Pharmacol.*, **71**, 1457-1462.
6. Zhou, F., Shen, Y., Liu, B., Chen, X., Wan, L., and Peng, D. (2017) Gastrodin inhibits osteoclastogenesis via down-regulating the NFATc1 signaling pathway and stimulates osseointegration *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **484**, 820-826.
7. Ziros, P.G., Gil, A.P., Georgakopoulos, T., Habeos, I., Kletsas, D., Basdra, E.K., and Papavassiliou, A.G. (2002) The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells, *J. Biol. Chem.*, **277**, 23934-23941.
8. Ziros, P.G., Basdra, E.K., and Papavassiliou, A.G. (2008) Runx2: of bone and stretch, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **40**, 1659-1663.
9. Vimalraj, S., and Selvamurugan, N. (2013) MicroRNAs: synthesis, gene regulation and osteoblast differentiation, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **15**, 7-18.
10. Kang, J.S., Alliston, T., Delston, R., and Derynck, R. (2005) Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3, *EMBO J.*, **24**, 2543-2555.
11. Jeon, E.J., Lee, K.Y., Choi, N.S., Lee, M.H., Kim, H.N., Jin, Y.H., Ryoo, H.M., Choi, J.Y., Yoshida, M., Nishino, N., Oh, B.C., Lee, K.S., Lee, Y.H., and Bae, S.C. (2006) Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 16502-16511.
12. Song, L.H., Pan, W., Yu, Y.H., Quarles, L.D., Zhou, H.H., and Xiao, Z.S. (2006) Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER/NO/cGMP pathway, *Toxicol. In Vitro*, **20**, 915-922.
13. Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108.
14. Jakob, F., Genest, F., Baron, G., Stumpf, U., Rudert, M., and Seefried, L. (2015) Regulation of bone metabolism in osteoporosis: novel drugs for osteoporosis in development, *Unfallchirurg*, **118**, 925-932.
15. Rachner, T.D., Khosla, S., and Hofbauer, L.C. (2011) Osteoporosis: now and the future, *Lancet*, **377**, 1276-1287.
16. Li, P., Wang, Y., Liu, X., Zhou, Z., Wang, J., Zhou, H., Zheng, L., and Yang, L. (2019) Atypical antipsychotics induce human osteoblasts apoptosis via Wnt/ β -catenin signaling, *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 10.
17. Dai, Z., Li, Y., Quarles, L.D., Song, T., Pan, W., Zhou, H., and Xiao, Z. (2006) Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation, *Phytomedicine*, **14**, 806-814.
18. Zhao, M., Ko, S.Y., Garrett, I.R., Mundy, G.R., Gutierrez, G.E., and Edwards, J.R. (2018) The polyphenol resveratrol promotes skeletal growth in mice through a sir-tuin 1-bone morphogenic protein 2 longevity axis, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 4183-4192.
19. Maeno, T., Moriishi, T., Yoshida, C.A., Komori, H., Kanatani, N., Izumi, S., Takaoka, K., and Komori, T. (2011) Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects, *Bone*, **49**, 673-682.
20. Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 707-747.
21. Flanagan, W.M., Corthesy, B., Bram, R.J., and Crabtree, G.R. (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporine A, *Nature*, **352**, 803-807.
22. Zayzafoon, M. (2006) Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation, *J. Cell. Biochem.*, **97**, 56-70.
23. Sun, L., Blair, H. C., Peng, Y., Zaidi, N., Adebajo, O. A., Wu, X. B., Wu, X. Y., Iqbal, J., Epstein, S., and Abe, E. (2005) Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 17130-17135.

RESVERATROL PROMOTES *in vitro* DIFFERENTIATION OF OSTEOBLASTIC MC3T3-E1 CELLS VIA POTENTIATION OF THE CALCINEURIN/NFATc1 SIGNALING PATHWAY

Y. Huang^{1#}, J. Huo^{2#}, F. Q. Liu³, J. Liu³, X. J. Zhang⁴, C. H. Guo⁴, and L. H. Song^{4*}

¹ Department of Biochemistry, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China

² Department of Biology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China

³ Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China

⁴ Department of Pharmacology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, Shanxi, China; E-mail: slh10282001@163.com

Received March 15, 2019

Revised April 8, 2019

Accepted April 8, 2019

Resveratrol has been shown to stimulate differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells *in vitro*; however, the mechanisms underlying the anabolic effect of resveratrol on osteoblasts remain largely unknown. Our study was aimed to investigate the molecular mechanism of resveratrol-induced differentiation of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated for 8 days with different concentrations of resveratrol (10^{-8} - 10^{-6} M) and 10^{-6} M cyclosporine A (CsA), a specific inhibitor of the calcineurin/NFAT pathway. According to the results of pilot studies of cell proliferation and alkaline phosphatase activity, 10^{-7} M concentration of resveratrol was used in subsequent experiments. The levels of mRNA expression of the osteosis-related genes *CaN*, *NFATc1*, and *Runx2* were analyzed by real-time RT-PCR; the levels of the corresponding proteins were estimated by Western blot analysis. Resveratrol upregulated expression of the *CaN*, *NFATc1*, and *Runx2* genes at both mRNA and protein levels compared to the control group ($p < 0.05$), while CsA reduced the effects of resveratrol ($p < 0.05$). Using immunohistochemical staining, we showed that resveratrol induced NFATc1 accumulation in the cell nuclei, and treatment with CsA inhibited resveratrol-mediated induction of NFATc1, suggesting that the calcineurin/NFATc1 signaling pathway plays an important role in the regulatory effect of resveratrol on osteoblasts.

Keywords: resveratrol, cyclosporine A, calcineurin/NFATc1, osteoblast differentiation