

绞股蓝皂苷对 C2C12 细胞成肌分化的影响

唐子佳¹ 东智卓玛¹ 吴建军¹ 林适¹ 杨彬彬¹ 陈桐莹¹ 黄佳纯² 林燕平² 黄幸儒² 黄宏兴^{2*}

1. 广州中医药大学第三临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510378

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2023)10-1405-05

摘要: **目的** 研究发现, 绞股蓝皂苷不仅具有抗炎、抗衰老等多重作用, 而且还能促进成骨细胞增殖分化, 保护其氧化应激损伤; 本研究拟探讨绞股蓝皂苷对 C2C12 细胞成肌分化的影响。 **方法** 完全培养基培养 C2C12 细胞, 细胞增殖贴壁后用含有不同浓度绞股蓝皂苷的分化培养基诱导细胞分化, 每个浓度均设置 3 个复孔; 第 5 天观察细胞分化的形态、计算细胞的分化活力, Western blot 检测相关成肌标志物 MYF5 和 MyoD1 的表达, 免疫荧光检测 MyoD1 的表达, Image J 软件计算肌管融合指数。 **结果** 诱导 C2C12 细胞分化的第 5 天可见细胞分化为典型的肌管形态, 10 mg/L 和 5 mg/L 的绞股蓝皂苷浓度干预下的 MYF5 和 MyoD1 的表达较为显著, 且肌管融合指数更高, 相较于对照组差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 绞股蓝皂苷可促进 C2C12 细胞的成肌分化, 以 10 mg/L 和 5 mg/L 的浓度较好。

关键词: 绞股蓝皂苷; C2C12 细胞; 成肌分化

Effect of gypenoside on myoblast differentiation of C2C12 cells

TANG Zijia¹, DONGZHI Zhuoma¹, WU Jianjun¹, LIN Shi¹, YANG Binbin¹, CHEN Tongying¹, HUANG Jiachun², LIN Yanping², HUANG Xingru², HUANG Hongxing^{2*}

1. The Third Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378, China

* Corresponding author: HUANG Hongxing, Email: gzhhx@126.com

Abstract: **Objective** It was found that gypenoside not only have anti-inflammatory and anti-aging effects, but also can promote the proliferation and differentiation of osteoblasts and protect their oxidative stress damage. This study aims to investigate the effect of gypenoside on myoblast differentiation of C2C12 cells. **Methods** C2C12 cells were cultured in complete medium. After cell proliferation and adherent to the wall, differentiation medium containing different concentrations of gypenoside was used to induce cell differentiation, and three repores were set for each concentration. On the fifth day, observed the morphology of cell differentiation and calculated the activity of cell differentiation. Western Blot was used to detect the expression of myoblast markers MYF5 and MyoD1, immunofluorescence staining was used to detect the expression of MyoD1, and Image J software was used to calculate the fusion index of myotube. **Results** On the fifth day of induction of C2C12 cell differentiation, the cells could differentiate into typical myotube morphology. MYF5 and MyoD1 were significantly expressed under the intervention of 10 mg/L and 5 mg/L gypenoside concentrations, and the fusion index of myotube was also higher with statistically significant differences compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Gypenoside can promote myoblast differentiation of C2C12 cells, and the concentration of 10 mg/L and 5 mg/L is better.

Key words: gypenoside; C2C12 cells; myoblast differentiation

绞股蓝皂苷(gypenoside)是葫芦科属草本植物

基金项目: 国家自然科学基金(81973886, 82274551); 广州中医药大学“双一流”与高水平大学学科协同创新团队重点项目(2021XK21); 沃华科研基金资助项目(BYPDF2231206); 广东省中医药局科研项目(20231156)

* 通信作者: 黄宏兴, Email: gzhhx@126.com

绞股蓝的重要生物活性成分之一^[1], 基于 Cite Space 软件的文献研究发现, 绞股蓝皂苷类成分是国内外近年来有关绞股蓝的研究热点^[2]。相关药理学研究表明, 作为绞股蓝中的高营养成分, 绞股蓝皂苷具有抗炎、抗衰老、降糖调脂、护心护肝等多方面作用^[3-5]。课题组的前期实验还发现, 绞股蓝皂苷不

仅能促进成骨细胞的增殖分化,而且对 H_2O_2 诱导的成骨细胞氧化应激损伤具有保护作用^[6-7]。然而,有关绞股蓝活性成分在 C2C12 细胞成肌分化方面的研究相对较少;因此,本研究以小鼠 C2C12 细胞株为研究对象,拟探寻绞股蓝皂苷对其成肌分化的影响,旨在从细胞层面丰富肌骨同治的理论内涵^[8]。

1 材料和方法

1.1 实验对象

C2C12 细胞购于中科院细胞库(目录号 GNM26),它是小鼠成肌细胞株的亚克隆,在一定条件下能够分化为可伸缩的肌管并生成特征性的肌蛋白。

1.2 实验药物

绞股蓝皂苷购自曼斯特生物科技有限公司(成都),规格 20 mg,批号 MUST-21070818,纯度为 98.00 %。

1.3 主要仪器与试剂

徕卡倒置荧光显微镜 SOP(型号:DMI 3000B),全波长酶标仪(型号:Multiskan GO),全能凝胶成像仪(型号:Chemidoc MP),奥林巴斯倒置荧光显微镜(型号:IX73)。

DMEM 培养基(含 4.5 g/L D-葡萄糖)、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗(Gibco),Horse Serum(VivaCell),4%多聚甲醛、PBST 缓冲液(biosharp),抗体 MYF5、抗体 MyoD1(Affinity),Triton[®] X-100(biofrox),山羊抗兔 IgG H&L(Abcam), β -Actin Rabbit mAb(CST),CCK-8 试剂、BSA、PVDF 膜、抗荧光淬灭封片剂含 DAPI(Beyotime),改进型促凝剂、快速封闭液、RIPA 裂解液、彩色凝胶快速试剂盒、ECL 化学发光试剂盒(新赛美)。

1.4 实验方法

1.4.1 溶液配制:完全培养基:89% DMEM 培养基+10%胎牛血清+1%双抗;成肌分化培养基:96% DMEM 培养基+3% Horse Serum+1%双抗^[9];绞股蓝皂苷稀释液:20 mg 的绞股蓝皂苷溶解于二甲基亚砜(DMSO)成为母液,鉴于 DMSO 对细胞可能的毒性作用及前期研究基础,将上述溶液至少稀释 200 倍,设置浓度梯度为 160 mg/L、80 mg/L、40 mg/L、20 mg/L 和 10 mg/L。

1.4.2 C2C12 细胞培养:将预先分装于液氮罐储存的 C2C12 细胞取出 1 管复苏,培养皿中用完全培养基培养复苏的 C2C12 细胞,置于 37 °C、含 5% CO_2

的培养箱中孵育,固定倍数镜下观察细胞的贴壁及生长状况,待细胞生长至覆盖培养皿面积的 70%~80%再予以传代,每两天换液 1 次。

1.4.3 C2C12 细胞分化:胰酶消化 C2C12 细胞后,以 5×10^4 /mL 的密度接种于 96 孔板和 6 孔板,培养基以铺满孔底为宜,分别为 100 μ L/孔和 1 mL/孔;隔日在显微镜下观察细胞贴壁情况,再更换为含不同浓度绞股蓝皂苷的分化培养基诱导分化,96 孔板中各浓度均设置 3 个复孔,每两天换液 1 次,5 d 后观察细胞分化形态,CCK-8 法检测各浓度下细胞的分化活力。

1.4.4 Western Blot 检测:显微镜下观察 6 孔板细胞分化形态后,弃培养基,PBS 清洗 2 次,加入预先配制好的裂解液后于冰上裂解,10 min 后用刮板分别刮取各孔,收集蛋白于 1.5 mL 的 EP 管中,再经超声、离心等步骤后取上清,测定各蛋白浓度,最后使用 PCR 仪煮蛋白后置于 -80 °C 冰箱保存备用。通过电泳、转膜、封闭、孵育抗体、显影等一系列操作完成 Western blot 检测。

1.4.5 免疫荧光检测:胰酶消化 C2C12 细胞后,以 3×10^4 /mL 的密度接种于 48 孔板,含培养基量 150 μ L/孔;细胞贴壁后即予以含不同浓度绞股蓝皂苷的分化培养基培养,每两天换液 1 次,待细胞分化为肌管后即行免疫荧光染色(5 d)。首先进行固定、通透、封闭等步骤,然后用一抗于 4 °C 冰箱孵育过夜,PBS 漂洗 3 次,暗环境下加入荧光二抗,室温避光孵育 1 h,最后用含 DAPI 的封片液染色 1 min,倒置荧光显微镜下观察日的蛋白的表达,Image J 软件进行荧光定量。

1.5 统计学处理

利用 GraphPad Prism 9.0 软件进行相关统计,并绘制柱状图,各组间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 C2C12 细胞分化活力

预实验发现使用 160 mg/L 浓度的绞股蓝皂苷干预细胞时,显微镜下见细胞大面积死亡,故舍弃该浓度,再按浓度梯度增加 5 mg/L 的浓度进行后续实验。CCK-8 法检测细胞分化活力,即在 96 孔板中每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 °C 培养箱中孵育 1 h,最后在设置 OD 值为 450 nm 的酶标仪上检测各孔的吸光度,按照细胞活力计算公式^[10]计算各浓度的

活力百分比。如图 1 显示,相较于空白对照组,80 mg/L 浓度下的细胞活力偏低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

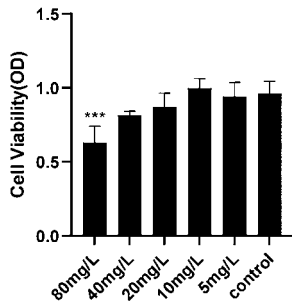


图 1 细胞活力 (OD)
Fig.1 Cell viability (OD)

2.2 C2C12 细胞分化形态

用含不同浓度绞股蓝皂苷的分化培养基诱导分化 C2C12 细胞,第 5 天可见细胞分化为辨识度较高的肌管形态^[11]。镜下见 80 mg/L 浓度下细胞的分化较少,形态不够典型,其余浓度绞股蓝皂苷干预下的 C2C12 细胞则呈现出较为明显的分化。详见图 2。

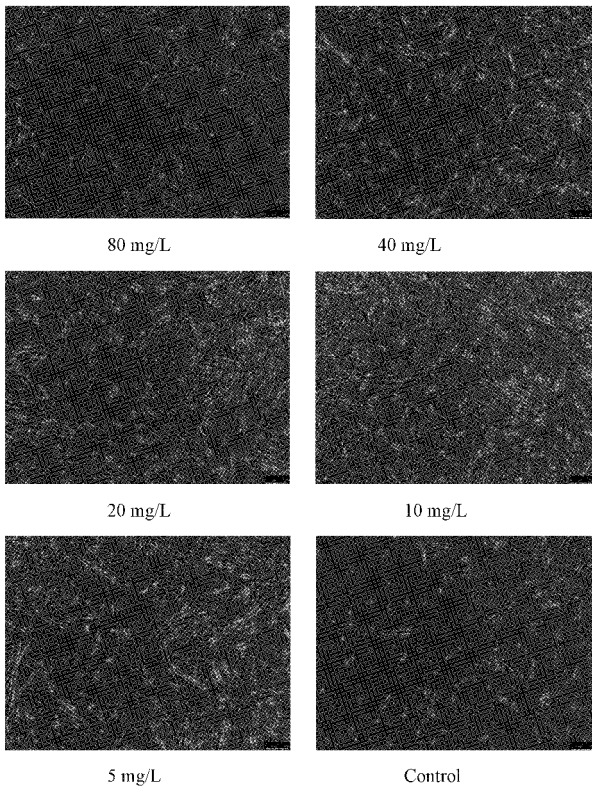


图 2 细胞分化
Fig.2 Cell differentiation

2.3 Western blot 检测

由于 80 mg/L 浓度下的 C2C12 细胞活力及分

化程度较低,故在后续实验中舍弃该浓度。收集分化第 5 天的细胞蛋白进行 Western blot 检测,选用具有代表性的成肌标志物 MYF5 和 MyoD1 作为一抗^[12], β -actin 为内参,全能凝胶成像仪上显影,结果见图 3。经 Image J 和 GraphPad Prism 软件统计分析,MYF5 和 MyoD1 相对于 β -actin 的蛋白表达量如图 4 所示,其中 10 mg/L 和 5 mg/L 浓度下的相对表达量相较于 Control 组差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$),其余各组间的差异则无统计学意义。

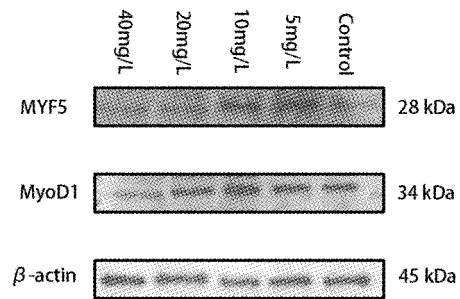


图 3 Western Blot 结果
Fig.3 The results of Western Blot

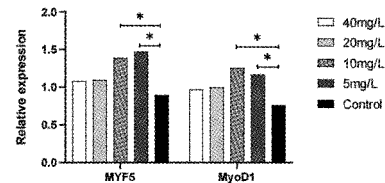


图 4 相对表达量
Fig.4 Relative expression

2.4 免疫荧光染色

48 孔板上用分化培养基诱导分化 C2C12 细胞,显微镜下见细胞分化为肌管形态即行免疫荧光染色,每个浓度设 1 个复孔,奥林巴斯倒置荧光显微镜下观察目的蛋白 MyoD1 的表达及细胞核的染色情况,见图 5。计算各个浓度下的融合指数 (fusion index),即位于阳性肌管内的细胞核数与总细胞核数的比值^[13]。如图 6 显示,10 mg/L 和 5 mg/L 浓度干预下的肌管融合指数均明显高于 Control 组,且 10 mg/L 和 40 mg/L 浓度之间的融合指数差异也具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

研究结果表明,10 mg/L 和 5 mg/L 浓度的绞股蓝皂苷能够明显促进 C2C12 细胞的成肌分化;不仅表现为分化的肌管形态清晰典型、融合指数更高,而且相关成肌标志物的表达也最为显著,差异具有统

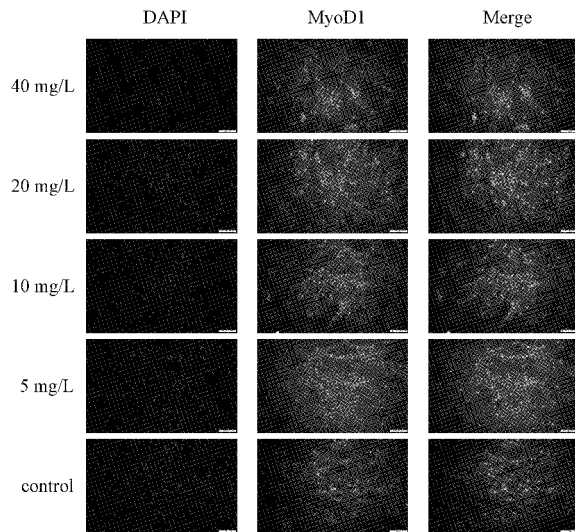


图5 免疫荧光染色

Fig.5 Immunofluorescence staining

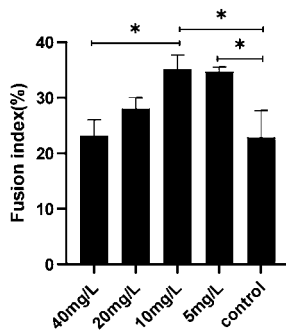


图6 肌管融合指数(%)

Fig.6 Fusion index of myotube(%)

计学意义。此外,本研究还补充了课题组前期绞股蓝作用于骨骼肌相关实验的空白,从而在体外实验进一步阐明了单体绞股蓝皂苷对成肌成骨的分化均有一定的促进作用。

成肌细胞是骨骼肌的前体细胞,具备较强的增殖分化能力,而小鼠的C2C12细胞株经Horse Serum诱导可分化为多核的肌管形态,并表达相关的蛋白标志物;因此,C2C12细胞株是研究成肌分化的优越模型之一^[12,14]。研究发现,肌源性调节因子(myogenic regulator factors, MRFs)在骨骼肌的增殖及分化过程中起着重要作用,它包括成肌调节因子5(myogenic factor 5, MYF5)、肌分化因子(myogenic differentiation, MyoD)和肌生成素(myogenin, MyoG)等^[15]。其中MyoG一般在肌细胞的分化末期表达,而MYF5和MyoD主要参与初期分化的调控^[16-17],并且MYF5表达最早,还能进一步激活MyoD的表达,从而标志着肌卫星细胞分化周期的开始^[18]。肌

卫星细胞是C2C12细胞在骨骼肌中的主要存在形式,经过增殖分化等过程可融合为肌管,最终变为肌纤维形态^[19-20]。本研究专注于表征肌细胞分化早期的MYF5和MyoD两种因子,通过Western blot和免疫荧光检测等手段说明了一定浓度的绞股蓝皂苷能够促进相关肌源性因子的表达,从而有利于成肌分化;尤其是MyoD代表着肌细胞分化进程的开端,在骨骼肌的分化中扮演关键角色^[21],加用肌管融合指数等分化参数进行实验验证,具有较强的说服力。且有研究表明,若下调MyoD的水平会导致分化抑制^[15],更加突出了MyoD的重要性。但是本研究未涉及象征分化终期MyoG因子的相关指标,后续可以进一步检测证明。

绞股蓝最早仅被作为食用,直至《本草纲目》始逐渐发现其药用价值,2002年被我国收录为药食同源保健品后便引发诸多学者的关注与研究^[22-23]。绞股蓝的活性成分包括皂苷类、多糖和黄酮类等,其中尤以皂苷类成分为研究热点之一。研究发现,绞股蓝皂苷的相关活性成分可抑制细胞生长及迁移,有一定的抗肿瘤作用^[24-25];周文超^[26]在绞股蓝中发现了一种三萜皂苷类物质,并发现其具有抗炎活性;雷婧等^[27]发现绞股蓝皂苷能有效降低大鼠的血脂水平,万俊阳等^[28]通过对ApoE^{-/-}小鼠的研究提出了绞股蓝皂苷可以调控铁死亡降低肝脏的脂质沉积。除此以外,还有研究发现,绞股蓝皂苷类成分可以抑制活性氧的产生及细胞凋亡标志物的表达,从而起到抗衰老作用^[29];或通过调控lnc RNA/miRNA相关通路延缓骨关节炎软骨细胞的损伤^[30]。然而,目前对于绞股蓝在肌肉组织方面的相关研究较少,本研究及课题组前期研究在细胞层面为单体绞股蓝皂苷对成肌成骨的作用提供了一定的参考价值,但是其浓度设置仍可优化,分子机制也有待阐明与论证。

【参 考 文 献】

- [1] 邓芙蓉,王翰林,谢佩佩,等. 绞股蓝皂苷对人胃癌细胞增殖和凋亡的影响及作用机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(4): 646-652.
- [2] 温秀萍,蔡煜娟,徐惠龙,等. 基于CiteSpace软件的绞股蓝研究文献可视化分析[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2023, 44(1): 97-106.
- [3] 沈子琳,王振波,侯会芳,等. 绞股蓝的化学成分和药理作用及应用研究新进展[J]. 人参研究, 2020, 32(5): 59-64.
- [4] 王志丹,王群,任爽,等. 基于网络药理学探讨绞股蓝抗动脉粥样硬化作用机制研究[J]. 国际中医中药杂志, 2020, 42(10): 983-990.

(下转第1452页)

- cross-sectional study of 350 women with hip fracture [J]. *Eur J Phys Rehabil Med*, 2020, 56(2):184-190.
- [26] Binkley N, Buehring B. Beyond FRAX: it's time to consider "sarco-osteopenia" [J]. *J Clin Densitom*, 2009, 12(4):413-416.
- [27] Hirschfeld HP, Kinsella R, Duque G. Osteosarcopenia: where bone, muscle, and fat collide [J]. *Osteoporos Int*, 2017, 28(10):2781-2790.
- [28] Klein GL. The effect of glucocorticoids on bone and muscle [J]. *Osteoporos Sarcopenia*, 2015, 1(1):39-45.
- [29] Stefanaki C, Pervanidou P, Boschiero D, et al. Chronic stress and body composition disorders: implications for health and disease [J]. *Hormones (Athens)*, 2018, 17(1):33-43.
- [30] 蔡苗苗, 高艳虹. 肌少-骨质疏松症的研究进展 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2021, 41(5):678-683.
- (收稿日期: 2023-03-02; 修回日期: 2023-05-09)

(上接第 1408 页)

- [5] 翟意. 近 10 年绞股蓝抗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *基层中医药*, 2023, 2(4):121-124.
- [6] 黄伟纯. 基于内质网应激与 Wnt/ β -catenin 信号通路研究绞股蓝皂苷对成骨细胞增殖分化的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [7] 林燕平, 黄伟纯, 陈桐莹, 等. 绞股蓝皂苷减轻 H₂O₂ 诱导大鼠成骨细胞氧化应激损伤的机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(23):3649-3653.
- [8] 黄宏兴, 吴青, 李跃华, 等. 肌肉、骨骼与骨质疏松专家共识 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(10):1221-1229, 1236.
- [9] 温作晨, 楚蒨, 代宇星, 等. siRNA 沉默 Myh3 基因抑制 C2C12 细胞糖酵解 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 38(11):1511-1519.
- [10] 侯乃鹏, 王煜, 陶聪, 等. 鞘磷脂对小鼠肌卫星细胞 C2C12 成肌分化的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(11):4074-4083.
- [11] 朱国涛. 从 PI3K/AKT 信号通路探讨鹿二仙胶含药血清对 C2C12 成肌细胞增殖及分化的机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2021.
- [12] 沈龙仙, 王丽婷, 汪涵, 等. 烟酰胺单核苷酸 (NMN) 对小鼠 C2C12 细胞成肌分化的影响 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(4):695-703.
- [13] Zhou Y, Liu X, Huang C, et al. Lactate activates AMPK remodeling of the cellular metabolic profile and promotes the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(22): 13996.
- [14] 贺佳玮. PROLIFERIN 对小鼠 C2C12 细胞和卫星细胞的增殖调控作用机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [15] Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 19-32.
- [16] Churova MV, Shulgina N, Kuritsyn A, et al. Muscle-specific gene expression and metabolic enzyme activities in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fry reared under different photoperiod regimes [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2020, 239: 110330.
- [17] Ito Y, Kayama T, Asahara H. A systems approach and skeletal myogenesis [J]. *Comp Funct Genomics*, 2012, 2012: 759407.
- [18] 何廉旗, 任智超, 徐丹, 等. 达格列净促进小鼠骨骼肌细胞系 C2C12 分化的作用及机制的研究 [J]. *重庆医学*, 2021, 50(21):3617-3621.
- [19] 李贺. 乳源 MFG-E8 对老年肌症大鼠骨骼肌修复和再生的分子机制 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020.
- [20] Molnar P, Wang W, Natarajan A, et al. Photolithographic patterning of C2C12 myotubes using vitronectin as growth substrate in serum-free medium [J]. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(1): 265-268.
- [21] Song YJ, Choi JH, Lee H. Setdb1 is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblast cells via maintenance of MyoD expression [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(4): 362-372.
- [22] 刘慧, 邢韶芳, 崔伟业, 等. 绞股蓝中新达玛烷型皂苷成分及其神经保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(2):380-387.
- [23] 尚曼, 王玉荣, 崔新房, 等. 绞股蓝黄酮对氧化受损 LLC-PK1 细胞的保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1193-1200.
- [24] Xing SF, Liu LH, Zu ML, et al. Inhibitory effect of damulin B from *Gynostemma pentaphyllum* on human lung cancer cells [J]. *Planta Med*, 2019, 85(5): 394-405.
- [25] 魏依兰, 曲杰, 窦志杰, 等. 绞股蓝总皂苷对胶质母细胞瘤细胞株 U87 细胞形态、迁移能力的影响 [J]. *山东医药*, 2018, 58(11):5-8.
- [26] 周文超. 绞股蓝种子中新皂苷的提取及其消炎活性研究 [J]. *云南化工*, 2018, 45(8):34-37.
- [27] 雷婧, 许韩婷, 苏洁, 等. 不同含量绞股蓝皂苷对高脂血症大鼠血脂的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2014, 28(2): 60-64.
- [28] 万俊阳, 宋囡, 张明香, 等. 绞股蓝皂苷调控铁死亡途径对 ApoE^{-/-}小鼠肝脏脂质沉积的影响及机制研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(3):1158-1165.
- [29] 王洁, 何振兴, 赵菊花, 等. 绞股蓝总皂苷对光老化人皮肤成纤维细胞凋亡及 Caspase-3 信号通路的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(19):3632-3635, 3645.
- [30] 牛帅帅, 孙卓伟, 王承群. 绞股蓝皂苷 A 调控 lncRNA TTTY15/miR-335-5p 通路对骨关节炎软骨细胞损伤的影响及机制 [J]. *河北医药*, 2022, 44(7):981-985.
- (收稿日期: 2023-05-15; 修回日期: 2023-05-29)