基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001206

TNF-α 抑制剂在细胞水平上抑制丙型肝炎病毒的感染

刘 媛[1],王文博[2],邹自英[1],朱 冰[1],弓 超[2],曹雪峰[2],胡宗海[1],熊 杰[1]
(1. 成都军区总医院检验科,成都 610083;2. 成都军区疾病预防控制中心,成都 610021)

【摘 要】**目的**:探索 TNF-α 抑制剂对丙型肝炎病毒感染肝细胞的影响。**方法**:体外培养肝癌细胞株 Huh7 细胞,分为未处理组、NFκB 抑制剂[6-amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino) quinazoline,QNZ]处理组、咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester,CAPE)处理组和 TNF-α 抑制剂来那度胺(Lenalidomide)处理组,每组设置浓度梯度为 100 μmol/L 至 1.28 nmol/L,5 倍倍比稀释,通过 CCK8 法检测各抑制剂对细胞增殖的影响;Huh7 细胞经抑制剂处理后,再以丙型肝炎病毒感染,通过荧光定量 PCR 和免疫荧光法检测细胞内病毒的感染水平。**结果**:100 μmol/L QNZ 处理组(0.730 ± 0.056)和 100 μmol/L CAPE 处理组(1.040 ± 0.014)细胞在 450 nm 处的吸光度(absorbance,A)值均低于未处理组(1.190 ± 0.040,P=0.000)。Lenalidomide 各浓度处理组(100 μmol/L 处理组,1.250 ± 0.016)细胞增殖水平与未处理组相当(P=0.306)。在抗病毒活性方面,100 nmol/L Lenalidomide 处理组[(3.79 ± 0.88) × 10^5]和 QNZ 处理组[(6.64 ± 1.11) × 10^5]HCV RNA 水平明显低于未处理组[(1.51 ± 0.45) × 10^6,P=0.000],而 CAPE 处理组[(1.61 ± 0.15) × 10^6]与未处理组 HCV RNA 水平相当(P=0.383)。**结论**:TNF-α 抑制剂 Lenalidomide 对细胞毒性较小,能够在细胞水平上抑制丙型肝炎病毒的感染。

【关键词】丙型肝炎病毒;TNF-α 抑制剂;抗病毒活性
【中图分类号】R373.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-03-01

TNF-α inhibitor suppresses hepatitis C virus infection in hepatocytes *in vitro*

Liu Yuan[1], Wang Wenbo[2], Zou Ziying[1], Zhu Bing[1], Gong Chao[2], Cao Xuefeng[2], Hu Zonghai[1], Xiong Jie[1]
(1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital;
2. Center for Disease Control and Prevention of Chengdu Military Region)

【Abstract】***Objective***: To research the effect of TNF-α inhibitors on hepatitis C virus(HCV) infection in hepatocytes. ***Methods***: Hepatoma Huh7 cells were cultured in vitro. Huh7 cells divided into four groups: untreated group, NFκB inhibitors [6-amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino) quinazoline, QNZ] treated group, caffeic acid phenethyl ester(CAPE)) treated group and TNF-α inhibitors (Lenalidomide) treated group. Concentrations of the inhibitors were from 100 μmol/L to 1.28 nmol/L with 5-fold serial dilution in each group. Cell proliferation was observed via CCK8 methods. Huh7 cells pre-treated with inhibitors were followed with HCV infection. The intracellular HCV RNA and protein levels were determined by quantitative PCR and immunofluorescence assay. ***Results***: The absorbance values at 450 nm of 100 μmol/L QNZ treatment group(0.730 ± 0.056) and 100 μmol/L CAPE treatment group(1.040 ± 0.014) were lower than those of untreated group(1.190 ± 0.040, P=0.000). The proliferation level of each concentration of Lenalidomide treatment group(100 μmol/L treatment group, 1.250 ± 0.016) was similar with untreated group(P=0.306). In terms of antiviral activity, the HCV RNA levels of 100 nmol/L Lenalidomide treatment group[(3.79 ± 0.88) × 10^5] and QNZ treatment group[(6.64 ± 1.11) × 10^5] were significantly lower than those of untreated group[(1.51 ± 0.45) × 10^6, P=0.000]. CAPE treatment group[(1.61 ± 0.15) × 10^6] had a similar HCV RNA level with untreated group(P=0.383). ***Conclusion***: TNF-α inhibitor Lenalidomide is less toxic to cells and can inhibit hepatitis C virus infection in hepatocytes.

【Key words】hepatitis C virus; TNF-α inhibitor; antiviral activity

作者介绍:刘 媛,Email:liuyuan198231@163.com,
研究方向:肝炎病毒致病机制及病原微生物诊断。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81301445);院管课题基金资助项目(编号:2013YG-B055)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1121.066.html (2017-03-13)

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus,HCV)是引起慢性肝炎的主要病原体之一。自 1989 年发现以来,对 HCV 的感染、免疫与致病机制等方面的认识有了巨大进展[1]。最近几年,一些直接抗 HCV 药物(direct-acting antiviral agents,DAAs)相继上市,对 HCV 的治疗起了很大的推动作用[2]。医学权威杂志 Lancet 在 2015 年连续发文[3-5],强调靶向药物研发的突破进展,并对人类清除丙肝寄予厚望。

Fletcher 等[6]2014 年在 Hepatology 发文称,巨噬细胞释放的 TNF-α 能够诱导肝细胞表面紧密连接蛋白 occludin 重排,增强 CD81 的侧向移动速度,进而提高肝细胞对 HCV 的敏感性,促进 HCV 入侵肝细胞。

在之前的研究中发现,核因子 κB(nuclear factor-κB,NF-κB)抑制剂 6-amino-4-(4-phenoxyphenylethylamino)quinazoline(QNZ)能够抑制 HCV 感染肝细胞[7]。进一步查阅文献发现,QNZ 除了能够抑制 NF-κB 的活性(IC_{50} 为 11 nmol/L),同时也能够抑制 TNF-α的释放,IC_{50} 约为 7 nmol/L[8]。因此,本研究用 NF-κB 的特异性抑制剂咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester,CAPE)和 TNF-α 的特异性抑制剂来那度胺(Lenalidomide)分别进行抗丙型肝炎病毒试验。结果发现 NF-κB 的特异性抑制剂CAPE 对 HCV 感染没有影响,而 Lenalidomide 可以剂量依赖性抑制 HCV 的感染,提示 QNZ 的抗丙肝病毒活性是通过抑制 TNF-α 实现的。本文的研究结果说明 TNF-α 抑制剂能够在细胞水平上抑制 HCV 的感染。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胎牛血清、DMEM、Alex488 羊抗鼠荧光二抗均购自美国 GIBCO 公司;RNA 抽提试剂 TRIzol、反转录酶及 SYBR 荧光染料均购自宝生物工程(大连)有限公司;anti-HCV NS5A 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;CCK8 细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;HCV 感染者血清收集自本科室常规检测标本;生化试剂购自上海生工生物工程有限公司。抑制剂 QNZ、来那度胺(CC-5013)、咖啡酸苯乙酯购自 Selleck(中国,上海蓝木化工有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Huh7 细胞及感染性 HCV 病毒颗粒由本实验室保存[9],用含 10%胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸(nonessentialamino acid,NEAA)、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养液,于 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

感染性 HCV 病毒颗粒(cell-culture-derived infectious HCV,HCVcc)的制备参考文献[9]。将获得的 HCVcc 病毒液进行梯度稀释,测定其感染 Huh7 细胞的半数致死量(TCID50),分装保存于-70 ℃冰箱。

1.2.2 HCV 感染 Huh7 细胞 抑制剂处理组和未处理组 Huh7细胞接种 24 孔板,接种后 24 h 向培养上清中加入 HCVcc,使感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 0.5,将细胞放入培养箱孵育 6 h 后,弃培养上清,更换为新鲜的完全培养基继续培养 48 h 后,进行后续检测。

1.2.3 抑制剂处理 Huh7 细胞接种 24 孔板,接种密度为 1.5×10^5 个/孔。培养 24 h 后弃培养基,加入含有不同浓度(100 μmol/L 至 1.28 nmol/L,5 倍倍比稀释)抑制剂的培养基继续培养 24 h 后,进行后续实验,包括 CCK8 法检测细胞增殖、结晶紫染色拍照、HCV 感染。

1.2.4 CCK8 法检测细胞增殖和细胞毒性 将处理后的细胞接种 96 孔板,接种密度为 0.5×10^5 个/孔。在细胞培养箱中培养 24 h,每孔加入培养基总体积 10%的 CCK 溶解液,在细胞培养箱中继续培养 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(absorbance,A)值。

1.2.5 结晶紫染色 将处理过的细胞接种 96 孔板,处理后 48 h 弃培养基,加结晶紫染料 100 μL/孔,室温染色 15 min,弃染色液,加 PBS 100 μL/孔洗涤 1 遍,显微镜下观察并拍照。

1.2.6 qRT-PCR 采用 Trizol 试剂抽提细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA,以 GAPDH 作为内参基因,采用 ΔΔCt 法分析各处理组 HCV RNA 水平。设计引物如下,HCV-F:5'-CTTCACGCAGAAAGCGTCTA-3';HCV-R:5'-CAAGCACCCTATCAGGCAGT-3',预期产物 245 bp;GAPDH-F:5'-TGGGCTACACTGAGCACCAG-3',GAPDH-R:5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAAT-3',预期产物 100 bp。

1.2.7 免疫荧光(immunoflourence assay,IFA) 将处理后的细胞接种 96 孔细胞培养板,在细胞培养箱培养 48 h 后弃上清,加入 100 μL 甲醇,-20 ℃ 固定 20 min;PBS 洗涤 3 次,每孔加入 100 μL 3% BSA,室温封闭 2 h;弃封闭液,每孔加入 100 μL NS5A 单抗(1:2 000),室温孵育 2 h;PBS 洗涤 3 次;每孔加入 100 μL Alex-488 羊抗鼠 IgG(1:100),避光孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,DAPI 染核 10 min,荧光显微镜观察并拍照。以 HCV 感染者血清为一抗进行免疫荧光检测,对应的二抗为 Alex-488 羊抗人 IgG,其他试剂和操作方法与上述一致。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本组间差异采用单因素方差分析检验,两两组间比较采用 Tukey 检验,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 NFκB 抑制剂和 TNF-α 抑制剂对 Huh7 细胞毒性实验

Huh7 细胞接种 96 孔板,抑制剂设立不同的浓度梯度

表 1 各抑制剂处理组在 450 nm 处的吸光度值（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Absorbance at 450 nm wavelength of inhibitors treated groups（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	100 μmol/L	20 μmol/L	4 μmol/L	800 nmol/L	160 nmol/L	32 nmol/L	6.4 nmol/L	1.28 nmol/L
QNZ	0.73 ± 0.06^{abc}	0.91 ± 0.06^{ghi}	1.20 ± 0.03	1.21 ± 0.03	1.19 ± 0.05	1.21 ± 0.03	1.14 ± 0.09	1.15 ± 0.05
Lenalidomide	1.25 ± 0.02^{de}	1.22 ± 0.05^{jk}	1.28 ± 0.06	1.28 ± 0.07	1.28 ± 0.05	1.21 ± 0.03	1.24 ± 0.04	1.22 ± 0.05
CAPE	1.04 ± 0.01^{f}	1.26 ± 0.04	1.25 ± 0.02	1.25 ± 0.02	1.25 ± 0.06	1.24 ± 0.03	1.18 ± 0.03	1.20 ± 0.03
未处理组	1.19 ± 0.04	1.15 ± 0.10	1.23 ± 0.08	1.22 ± 0.03	1.17 ± 0.09	1.19 ± 0.09	1.18 ± 0.04	1.19 ± 0.04
F 值	124.430	15.270	1.303	1.651	1.879	0.788	1.579	1.628
P 值	0.000	0.001	0.339	0.253	0.212	0.534	0.269	0.258

注：a，与 Lenalidomide 处理组比较，P=0.000；b：与 CAPE 处理组比较，P=0.000；c：与未处理组比较，P=0.000；d：与 CAPE 处理组比较，P=0.000；e：与未处理组比较，P=0.306；f：与未处理组比较，P=0.004；g：与 Lenalidomide 处理组比较，P=0.003；h：与 CAPE 处理组比较，P=0.001；i：与未处理组比较，P=0.011；j：与 CAPE 处理组比较，P=0.883；k：与未处理组比较，P=0.703；l：与未处理组比较，P=0.330

（100 μmol/L 至 1.28 nmol/L，5 倍倍比稀释），加入 Huh7 细胞培养基中，孵育 48 h 后用 CCK8 法测定细胞增殖活性（图1），利用结晶紫对细胞进行染色，观察抑制剂对细胞增殖的影响（图 2~4）。由图可见，QNZ 在 100 μmol/L 和 20 μmol/L 时对 Huh7 细胞有明显毒性，100 μmol/L 的 CAPE 显著抑制 Huh7 细胞增殖，100 μmol/L 至 1.28 nmol/L 的 Lenalidomide 对 Huh7 细胞生长没有明显影响。各抑制剂处理组细胞在 450 nm 处的 A 值详见表 1。

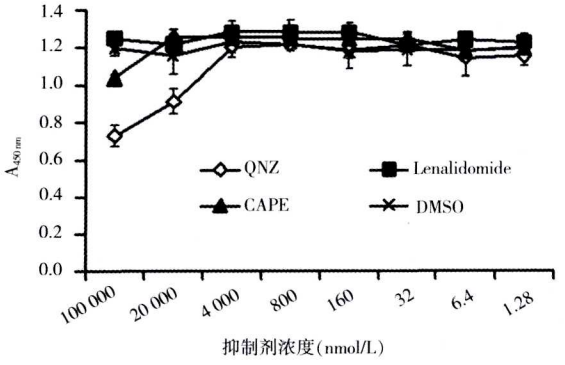


图 1 QNZ、Lenalidomide 及 CAPE 对 Huh7 的细胞毒性试验（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.1 Cytotoxicity assay of QNZ, Lenalidomide and CAPE on Huh7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

为进一步观察各药物长期作用对细胞的毒性，Huh7 细胞经 1 μmol/L 的 QNZ、Lenalidomide 及 CAPE 持续作用 7 d 后，接种 96 孔板，细胞密度为 1×10^5 个/孔，培养 24 h 后，CCK8 法检测细胞增殖水平，结果见表 2。QNZ 处理组细胞增殖水平稍减弱，但与其他各组相比没有统计学差异；Lenalidomide 和 CAPE 处理组细胞增殖水平与未处理相比没有差异。

表 2 各抑制剂处理组在 450 nm 处的吸光度值（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2 Absorbance at 450 nm wavelength of inhibitors treated groups（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	1 μmol/L
QNZ	1.74 ± 0.25
Lenalidomide	2.42 ± 0.25
CAPE	2.26 ± 0.35
未处理组	2.30 ± 0.31
F 值	3.900
P 值	0.055

2.2 NF-κB 抑制剂和 TNF-α 抑制剂对 HCV 感染的影响

为进一步观察 3 种抑制剂对 HCV 感染 Huh7 细胞的影响，将 Huh7 细胞接种 24 孔板，分别以 100 nmol/L 和 10 nmol/L 的 3 种抑制剂处理细胞 24 h。PBS 洗涤细胞 3 遍，以 0.5 MOI 的 HCVcc 感染细胞。感染后 48 h，TRIzol 法抽提细胞总

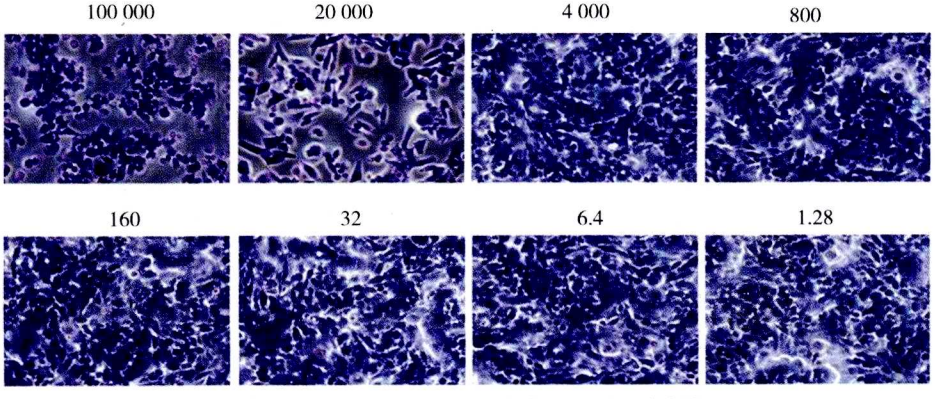


图 2 结晶紫染色法检测 QNZ（nmol/L）对 Huh7 的细胞毒性

Fig.2 Cytotoxicity of QNZ（nmol/L）on Huh7 cells detected by crystal violet staining

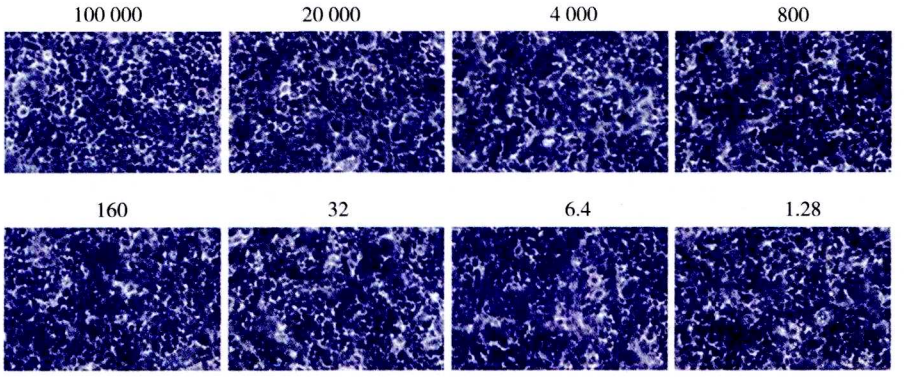


图 3 结晶紫染色法检测 Lenalidomide（nmol/L）对 Huh7 的细胞毒性

Fig.3 Cytotoxicity of Lenalidomide（nmol/L）on Huh7 cells detected by crystal violet staining

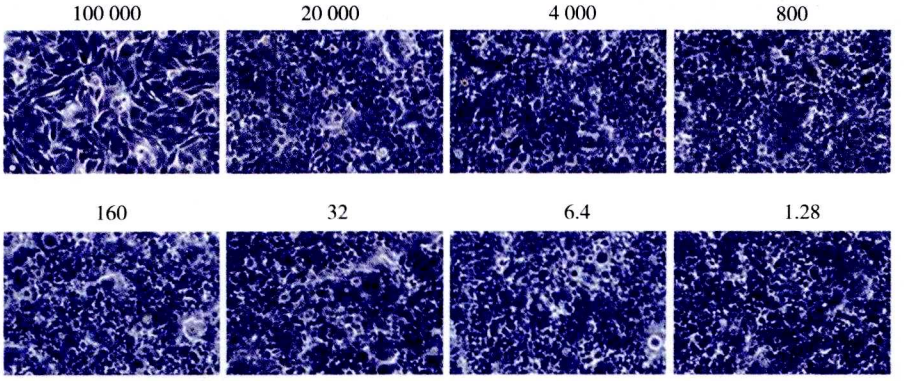
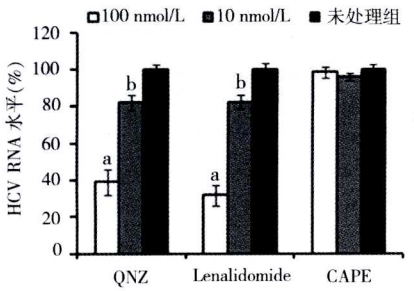


图 4 结晶紫染色法检测 CAPE（nmol/L）对 Huh7 的细胞毒性

Fig.4 Cytotoxicity of CAPE（nmol/L）on Huh7 cells detected by crystal violet staining

RNA，荧光定量 PCR 检测细胞内 HCV RNA 水平。结果如图 5 和表 3 所示，100 nmol/L 和 10 nmol/L 的 QNZ 处理的 Huh7 细胞，HCV 感染水平分别降低约 61%和 18%；NFκB 的特异性抑制剂 CAPE 对 Huh7 细胞中 HCV 的感染基本没有影响，与未处理组相比，P=0.383；TNF-α 特异性抑制剂 Lenalidomide 能够抑制 Huh7 细胞中 HCV 的感染，100 nmol/L 和 10 nmol/L Lenalidomide 处理的细胞中 HCV 的感染水平分别降低约 69%和 18%（表 3）。



a：与未处理组比较，P=0.000；b：与未处理组比较，P=0.002

图 5 QNZ、Lenalidomide 及 CAPE 对 Huh7 细胞中 HCV 感染的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.5 Effect of QNZ, Lenalidomide and CAPE on HCV infection in Huh7 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 3 各处理组 HCV RNA 水平（拷贝数/mL，$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 HCV RNA levels of inhibitors treated groups（copies/mL，$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	100 nmol/L	10 nmol/L
QNZ	$(6.64\pm1.11)\times10^{5abc}$	$(1.06\pm0.18)\times10^{6ghi}$
Lenalidomide	$(3.79\pm0.88)\times10^{5de}$	$(9.82\pm1.67)\times10^{5jk}$
CAPE	$(1.61\pm0.15)\times10^{6f}$	$(1.53\pm0.36)\times10^{6l}$
未处理组	$(1.51\pm0.45)\times10^{6}$	$(1.70\pm0.35)\times10^{6}$
F 值	200.680	23.550
P 值	0.000	0.000

注：a，与 Lenalidomide 处理组比较，P=0.007；b：与 CAPE 处理组比较，P=0.000；c：与未处理组比较，P=0.000；d：与 CAPE 处理组比较，P=0.000；e：与未处理组比较，P=0.000；f：与未处理组比较，P=0.383；g：与 Lenalidomide 处理组比较，P=0.854；h：与 CAPE 处理组比较，P=0.008；i：与未处理组比较，P=0.001；j：与 CAPE 处理组比较，P=0.003；k：与未处理组比较，P=0.001；l：与未处理组比较，P=0.407

为进一步明确 QNZ 和 Lenalidomide 对 HCV 感染的抑制作用，通过免疫荧光法检测抑制剂处理的细胞内 HCV NS5A 蛋白表达水平。检测结果如图 6 所示，结果证明 QNZ 和 Lenalidomide 能够抑制 HCV 的感染。HCV 慢性感染者血清中含有抗核心蛋白抗体和抗包膜蛋白抗体，因此为进一步佐

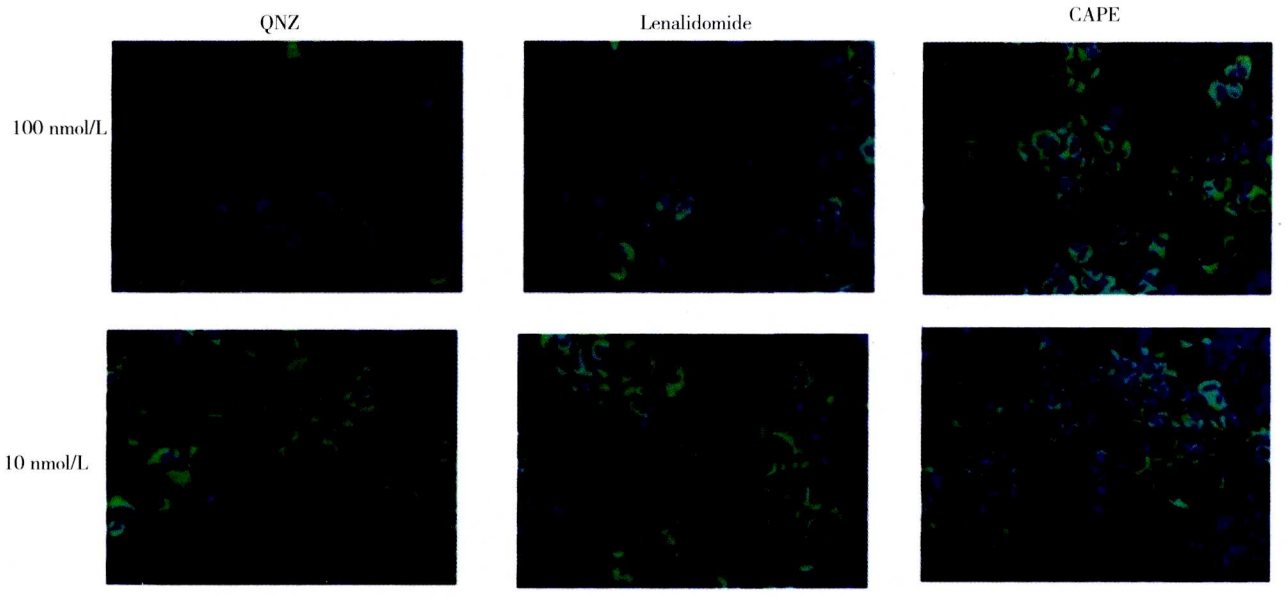


图 6 免疫荧光法检测 Huh7 细胞中 HCV NS5A 蛋白(200×)

Fig.6 Detection of HCV NS5A protein in Huh7 cells through immunoflourence assay(200×)

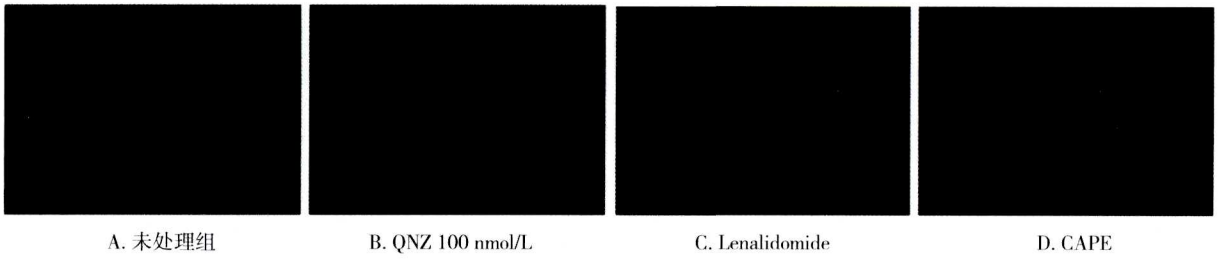


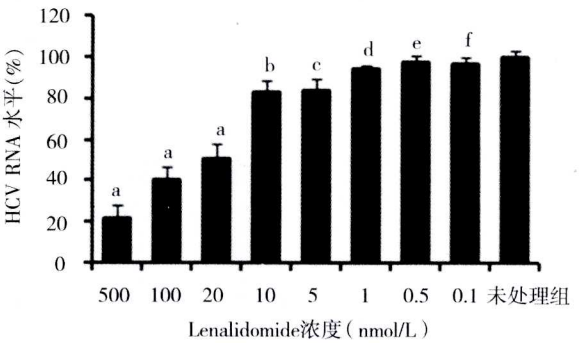
图 7 以 HCV 感染者血清为一抗检测 Huh7 细胞中HCV 蛋白(100×)

Fig.7 Detection of HCV protein in Huh7 cells using HCV patient's serum as first antibody(100×)

证上述 HCV NS5A 免疫荧光的结果，以 HCV 慢性感染者血清为一抗进行免疫荧光实验，检测细胞 HCV Core 蛋白和包膜蛋白表达水平，检测结果如图 7 所示，QNZ 和 Lenalidomide 处理组 HCV 结构蛋白水平显著降低。

2.3 Lenalidomide 剂量依赖性抑制 HCV 的感染

为进一步明确 Lenalidomide 对 HCV 感染的抑制作用，设置 Lenalidomide 的浓度梯度为 500、100、20、10、5、1、0.5、0.1 nmol/L，各处理组感染相同滴度的 HCVcc，感染后 48 h抽提细胞总 RNA，采用荧光定量 PCR 检测细胞内 HCV RNA水平，通过细胞内 HCV RNA 水平反映 Lenalidomide 处理后Huh7 细胞内的 HCV 感染水平。如图 8 所示，0.1、0.5 及 1 nmol/L Lenalidomide 处理组 HCV 感染水平与未处理组没有统计学差异。5 nmol/L Lenalidomide 处理组细胞内 HCV 的感染水平降低约 17%，与未处理组相比，P=0.017。随着 Lenalidomide剂量增加，HCV 感染水平逐渐降低，500 nmol/L Lenalidomide 处理的 Huh7 细胞 HCV 的感染水平降低约 80%，与未处理组比较，P=0.000。说明 Lenalidomide 能够剂量依赖性抑制 HCV 的感染。



注：a，与未处理组比较，P=0.000；b：与未处理组比较，P=0.016；c：与对未处理组比较，P=0.028；d：与未处理组比较，P=0.921；e：与未处理组比较，P=1.000；f：与未处理组比较，P=0.997

图 8 Lenalidomide 剂量依赖性抑制 HCV 的感染($\bar{x}\pm s$, n=3)

Fig.8 Lenalidomide inhibits HCV infection in a dose-dependent manner($\bar{x}\pm s$, n=3)

1 材料与方法

1.1 实验材料

C2C12 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所(北京协和细胞资源中心),DZF 提取物由浙江九旭药业提供,DMEM 培养基、高糖 DMEM 培养基购自 Hyclone,胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、马血清(horse serum,HS)购自Gibco,BSA、胰岛素购自 Sigma,蛋白提取试剂盒购自上海贝博生物,2-NBDG、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 化学发光显影液购自南京凯基,GLUT4 抗体购自 Abcam。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与诱导分化 C2C12 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 培养箱内培养。当细胞达 80%左右融合时,移除含 10% FBS 的 DMEM 培养液,换用含 2% HS 的高糖 DMEM 培养基诱导分化,每 24 h 换液 1 次,4 d 后分化为成熟骨骼肌细胞用于实验。

1.2.2 荧光显微镜观测 C2C12 细胞对 2-NBDG 的摄取 C2C12 细胞接种于 6 孔板,当出现较明显肌管时,加入 2-NBDG 孵育,孵育完毕后 PBS 洗涤 2 次,荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 2-NBDG 作用的量效、时效研究 C2C12 细胞按 10^5 个/孔接种于 96 孔板,当出现较明显肌管时进行葡萄糖摄取实验。按浓度梯度设立 6 个 2-NBDG 处理组:0(不加 2-NBDG,NC 组)、25、50、100、200、400 μmol/L 组,每个组 6 个孔,37 ℃孵育 30 min 后用预冷 PBS 洗 2 次,荧光酶标仪激发波长/发射波长(Ex/Em)485/528 nm 测吸光度(absorbance value,A)值。然后每孔加 5 mg/mL MTT 20 μL,孵育 4 h,弃上清,加 150 μL/孔 DMSO,酶标仪 λ550 nm 测 A 值,以 $A_{(485/528\ nm)}/A_{(550\ nm)}$ 校正各孔因细胞数目不同所引起的荧光强度误差,计算分析 2-NBDG 的最佳作用浓度。

以 2-NBDG 最佳浓度处理细胞,按照孵育时间设立 5 个处理组:5、15、30、45、60 min 组,按上述方法测定 $A_{(485/528\ nm)}/A_{(550\ nm)}$,计算分析 2-NBDG 的最佳作用时间。

1.2.4 DZF 对 C2C12 细胞增殖的影响 96 孔板中分化成熟的 C2C12 细胞以含 1% BSA 的低糖 DMEM 培养基饥饿培养 12 h,换以含 1% BSA 及不同终浓度 DZF(0.5、1、2、5、10、20、40、80 mg/L)的 DMEM 培养基干预 24 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,4 h 后弃上清,加入 150 μL/孔 DMSO 溶液,酶标仪测定 λ550 nm 处吸光度值 A。每组重复 6 孔。细胞存活率(%)=A 药物组/A 对照组×100%, A 药物组为 DZF 干预组 A 值;A 对照组为无 DZF 干预的正常对照组的 A 值。

1.2.5 DZF 对 C2C12 细胞葡萄糖摄取的影响 将诱导分化成熟的 C2C12 细胞分为对照组(0 mg/L)、DZF 低剂量组(5 mg/L)、DZF 中剂量组(10 mg/L)、DZF 高剂量组(20 mg/L),分别用含 0、5、10、20 mg/L DZF 的 DMEM 培养液干预 24 h,加或不加 100 nmol/L 胰岛素刺激 30 min,之后小心吸弃培养液,PBS 洗 2 次,按 2-NBDG 作用的最佳浓度及时间处理,荧光酶标仪检测 DZF 在基础状态及胰岛素刺激状态下的葡萄糖摄取。

1.2.6 DZF 对 C2C12 细胞 GLUT4 蛋白表达及膜转位的影响 实验分组同 1.2.5,DZF 干预 24 h 后,提取总蛋白和膜蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂紫外分光光度计测定样本蛋白浓度。取 50 μg 蛋白样品变性后,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 60 min,用含抗 GLUT4-抗体(1:2 500 稀释)的 TBST 孵育,4 ℃过夜,TBST 洗膜 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000 稀释)孵育 60 min 后,TBST 洗膜 3 次,用 ECL 化学发光显影,曝光 X 线片。

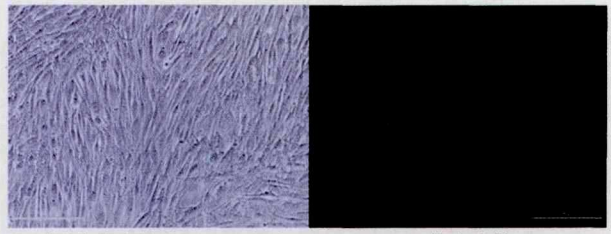
1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,计算结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 法,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 C2C12 骨骼肌细胞形态学观察

如图 1 所示,诱导分化成熟的骨骼肌细胞排列整齐,出现大量平行排列的肌管。经 2-NBDG 处理后,在荧光显微镜下可看到清晰的绿色荧光,说明 C2C12 骨骼肌细胞能有效摄取 2-NBDG。



A. 诱导分化成熟的 C2C12 细胞　　B. 荧光成像

图 1 诱导分化成熟的 C2C12 细胞显微镜观察及 2-NBDG 孵育后的荧光显微镜观察(100×)

Fig.1 Differentiated C2C12 myotubes observed by microscope and fluorescence microscope after 2-NBDG incubation (100×)

2.2 2-NBDG 作用的量效时效关系

与对照组(0 μmol/L)相比,2-NBDG 各组相对荧光强度不同程度增加,分别为(1.016±0.045)、(1.052±0.061)、(1.056±0.052)、(1.259±0.048)、(1.316±0.060)。其中,200、400 μmol/L 组与对照组比较差异有统计学意义(P<0.05),而两组之间比较无统计学差异(P>0.05)。此外,荧光强度随 2-NBDG 作用时间延长而增加,分别为(1.014±0.067)、(1.021±0.062)、(1.093±0.068)、(1.208±0.071)、(1.246±0.036),与 5 min 组相比,30 min组有统计学差异(P<0.05),45 min、60 min 组有统计学差异(P<0.01),45 min 组与 60 min 组相比,无统计学差异(P>0.05)。从浓度-时间曲线可以观察到,在一定范围内(浓度<400 μmol/L,时间<60 min),C2C12 骨骼肌细胞摄取 2-NBDG 与其作用的浓度、时间呈正相关。基于实验成本、效率、灵敏度等方面综合比较,最终选择 200 μmol/L、45 min 作为 2-NBDG 作用的实验条件。见图 2。