基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001075

代综方对 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖摄取及 GLUT4蛋白表达的影响

赵玉雪，朱晓云，袁 泉，刘喜明
（中国中医科学院广安门医院内分泌科，北京 100053）

【摘 要】**目的**：研究代综方（dai zong fang，DZF）对骨骼肌细胞葡萄糖摄取及葡萄糖转运体 4（glucose transporter 4，GLUT4）蛋白表达的影响。**方法**：采用含 2%马血清（horse serum，HS）的 DMEM 培养液诱导 C2C12 骨骼肌细胞分化为肌管，荧光标记的葡萄糖类似物 2-NBDG 测定葡萄糖摄取，对 2-NBDG 的量效时效关系进行测定；采用不同剂量 DZF 干预分化的 C2C12 细胞，检测其对细胞基础状态及胰岛素刺激状态下葡萄糖摄取的影响；Western blot 检测 DZF 对 C2C12 细胞 GLUT4 总蛋白表达及膜转位的影响。**结果**：在基础状态或胰岛素刺激下，DZF 低、中、高剂量均可提高骨骼肌葡萄糖摄取，差异有统计学意义（$P<0.05$）。基础状态下，DZF 能促进 GLUT4 总蛋白及膜转位蛋白的表达（$P<0.05$）；胰岛素刺激状态下，DZF 对 GLUT4 总蛋白表达无显著影响（$P>0.05$），但仍可促进 GLUT4 膜转位蛋白的表达（$P<0.05$）。**结论**：DZF 可增加骨骼肌细胞葡萄糖摄取，具有类胰岛素作用，其作用机制可能与促进 GLUT4 蛋白向细胞膜转位有关。

【关键词】代综方；2-NBDG；C2C12 细胞；葡萄糖转运体 4
【中图分类号】R587.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-04-11

Effects of DZF on glucose uptake and GLUT4 protein expression in C2C12 myotubes

Zhao Yuxue, Zhu Xiaoyun, Yuan Quan, Liu Ximing
(*Department of Endocrinology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences*)

【Abstract】***Objectives***: To investigate the effects of dai zong fang(DZF) on glucose uptake and glucose transporter 4 protein expression in skeletal muscle cells. ***Methods***: C2C12 skeletal muscle cells were differentiated into myotubes by incubating in DMEM with 2% horse serum; glucose uptake in C2C12 myotubes were measured by 2-NBDG; the dose effect and time effect of 2-NBDG were analyzed. After the intervention of different concentrations of DZF, glucose uptake in C2C12 myotubes were analyzed in basal and insulin-stimulated state. Effects of DZF on GLUT4 protein expression and translocation were analyzed by Western blot. ***Results***: Both in basal and insulin-stimulated state, different concentrations of DZF could stimulate the glucose uptake in skeletal muscle cells, with statistically significant difference($P<0.05$). In the basal state, DZF significantly increased total and membrane GLUT4 protein expression($P<0.05$). In the insulin-stimulated state, DZF had no significant effect on the total GLUT4 protein expression($P>0.05$), however, it could significantly promote the membrane GLUT4 protein expression($P<0.05$). ***Conclusion***: DZF could increase glucose uptake in skeletal muscle cells and have insulin-like function, the mechanisms might be related to the promotion of GLUT4 translocation.

【Key words】dai zong fang; 2-NBDG; C2C12 myotubes; glucose transporter 4

随着经济发展及生活方式的变化，代谢综合征（metabolic syndrome，MS）的患病率逐年增加[1]，严重威胁人类健康。其中，血糖代谢异常是 MS 的重要组分之一，维持血糖稳态是控制 MS、降低心脑血管并发症的重要环节。骨骼肌作为机体最大的器官之一，在血糖的动态平衡中起着重要的作用。代综方（dai zong fang，DZF）是“十二五”重大新药创制研发药物，主要由黄连、半夏和瓜蒌等组成，具有减轻 MS 患者腹型肥胖、改善糖代谢紊乱的作用[2]。本实验以 C2C12 骨骼肌细胞为载体，研究 DZF 对骨骼肌细胞葡萄糖摄取及 GLUT4 蛋白表达的影响，为临床应用 DZF 治疗 MS 提供科学依据。

作者介绍：赵玉雪，Email：zyxdoc124@163.com，研究方向：代谢综合征的中医治疗
通信作者：刘喜明，Email：lxmhos@aliyun.com。
基金项目：“十二五”重大新药创制资助项目（编号：2011ZX09102-011-08）；中英国际合作资助项目（编号：2010DFA31620）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20161215.1103.016.html（2016-12-15）

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。

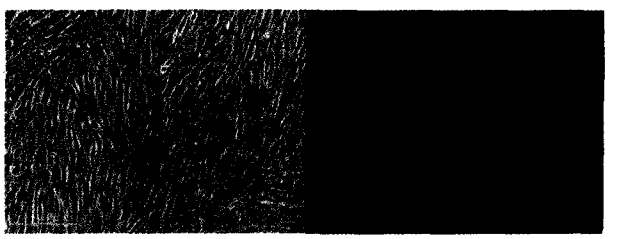
1.3 统计学处理

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。



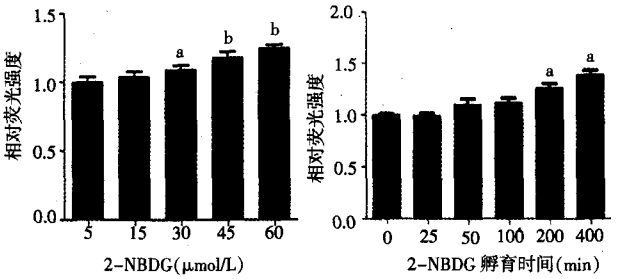
A. 诱导分化成熟的 C2C12 细胞　　B. 荧光成像

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。



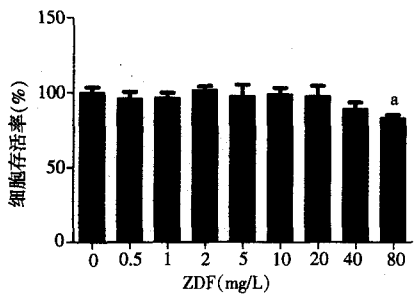
注：不同浓度组经方差分析，F=45.312，P=0.000，200 μmol/L、400 μmol/L 组与 0 μmol/L 相比（P_1=0.000，P_2=0.000），a：P<0.05，200 μmol/L 组与 400 μmol/L 组相比，P=0.053；不同时间组经方差分析，F=17.561，P=0.000，30、45、60 min 组与 5 min 组相比（P_1=0.039，P_2=0.000，P_3=0.000），a：P<0.05，b：P<0.01，45 min 组与 60 min 组相比，P=0.294

图 2 2-NBDG 的最佳浓度、时间（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Fig.2 Optimal concentration and time of 2-NBDG（n=6，$\bar{x}\pm s$）

2.3 DZF 对 C2C12 骨骼肌细胞增殖的影响

经不同浓度的 DZF 干预处理 24 h，细胞存活率分别为（100.00±6.90）%、（96.24±8.89）%、（96.48±8.05）%、（100.89±5.65）%、（97.66±13.81）%、（98.90±9.99）%、（97.74±13.22）%、（89.13±10.51）%、（83.27±5.09）%。与对照组（0 mg/L）相比，0.5、1、2、5、10、20、40 mg/L 组差异无统计学意义（P>0.05），而 80 mg/L 组具有统计学差异（P<0.05），对细胞增殖有抑制作用。见图 3。



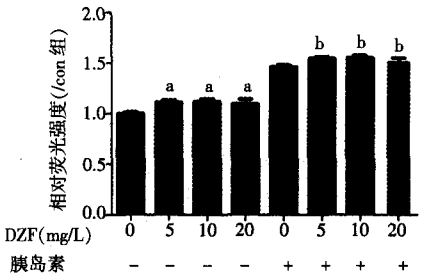
注：经方差分析，F=2.182，P=0.047，与 0 mg/L 组相比，a：P=0.003

图 3 DZF 对 C2C12 细胞活性的影响（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Fig.3 Effects of DZF on the viability of C2C12 myotubes（n=6，$\bar{x}\pm s$）

2.4 DZF 促进 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖摄取

在基础状态及胰岛素刺激状态下，DZF 均可促进骨骼肌细胞葡萄糖摄取。基础状态下，DZF 低、中、高剂量组干预的细胞葡萄糖摄取量分别比对照组升高 11.2%、11.8%、9.4%，差异具有统计学意义（P<0.05）。胰岛素刺激状态下，DZF 低、中、高剂量组分别比对照组升高 5.6%、6.1%、4.8%，差异具有统计学意义（P<0.05），说明 DZF 可与胰岛素协同促进骨骼肌细胞摄取葡萄糖。见图 4。



注：基础状态下，F=3.412，P=0.037，DZF 低、中、高剂量组与对照组比较（P_1=0.015，P_2=0.011，P_3=0.037），a：P<0.05；胰岛素刺激状态下，F=4.622，P=0.013，DZF 低、中、高剂量组与对照组比较（P_1=0.006，P_2=0.004，P_3=0.017），b：P<0.05

图 4 DZF 对 C2C12 骨骼肌细胞葡萄糖摄取的影响（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Fig.4 Effects of DZF on glucose uptake in C2C12 myotubes（n=6，$\bar{x}\pm s$）

2.5 GLUT4 总蛋白、膜转位蛋白表达结果

GLUT4 是骨骼肌细胞膜上主要的葡萄糖转运蛋白，在骨骼肌细胞摄取葡萄糖的过程中起着至关重要的作用。基础状态下，DZF 低、中、高剂量组可增加总 GLUT4、膜 GLUT4 蛋白表达，与对照组相比，差异具有统计学意义（P<0.05）。胰岛素刺激状态下，DZF 各剂量组总 GLUT4 灰度比值降低，但差异无统计学意义（P>0.05）。膜 GLUT4 蛋白表达较对照组增加，差异具有统计学意义（P<0.05），表明在胰岛素刺激状态下，DZF 可促进 GLUT4 向细胞膜转位（图 5、表 1）。

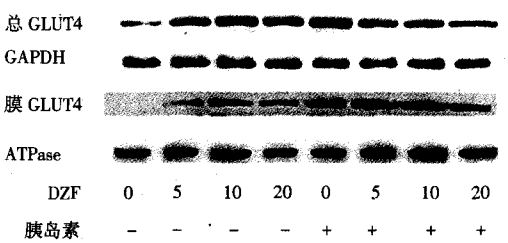


图 5 DZF 对 C2C12 细胞总 GLUT4、膜 GLUT4 蛋白表达的影响（n=3，$\bar{x}\pm s$）

Fig.5 Effects of DZF on the expression of total GLUT4 protein and membranous GLUT4 protein（n=3，$\bar{x}\pm s$）

表 1 DZF 对 C2C12 细胞总 GLUT4、膜 GLUT4 蛋白表达的影响(n=3,x？±s)

Tab.1 Effects of DZF on the expression of total GLUT4 protein and membranous GLUT4 protein(n=3,x？±s)

组别	总 GLUT4/GAPDH		膜 GLUT4/ATPase	
	基础状态	胰岛素刺激状态	基础状态	胰岛素刺激状态
对照组	0.243±0.008	0.912±0.061	0.006±0.000	0.981±0.061
DZF低剂量组	0.717±0.030[a]	0.853±0.023	0.457±0.042[a]	1.138±0.042[b]
DZF中剂量组	0.825±0.022[a]	0.807±0.063	0.835±0.027[a]	1.258±0.051[b]
DZF高剂量组	0.633±0.041[a]	0.801±0.075	0.549±0.037[a]	1.098±0.086[b]
F 值	267.839	2.299	364.667	10.121
P 值	0.000	0.154	0.000	0.004

注：a，基础状态下，DZF 低、中、高剂量组总 GLUT4 与对照组比较（P_1=0.000，P_2=0.000，P_3=0.000）；DZF 低、中、高剂量组膜 GLUT4 与对照组比较（P_1=0.000，P_2=0.000，P_3=0.000）；b：胰岛素刺激状态下，DZF 低、中、高剂量组膜 GLUT4 与对照组比较（P_1=0.015；P_2=0.001，P_3=0.049）

3 讨 论

MS与生活方式和生活环境改变有密切的关系，过食肥甘，久坐少动是 MS 的直接或重要病因。“肥者令人内热，甘者令人中满”，肥甘厚味摄入过多，又不增加运动量以消耗之，遂积于腹部皮下，出现腹型肥胖。以“肥满”命名准确而贴切[3]。本课题组在国家“十一五”支撑计划“代谢综合征的行为干预技术分课题——中医证候学研究”中，通过对 3 398 例 MS 患者的中医证候学调研发现，“痰热互结”为 MS 的基本证候[4]。由此制定了 MS 的基本治法“清热化痰，行气散满”，并拟定了基本方——代综方，由黄连、姜半夏、全瓜蒌等组成。既往研究证实，DZF 能促进 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗和胞内 TG 分解，上调脂肪细胞葡萄糖转运蛋白 GLUT4 的 mRNA 表达[5]，明显抑制 3T3-L1 脂肪细胞的分化程度[6]。DZF 还可降低油酸诱导的 HepG2 胞内脂质积累，并呈量效关系[7]。

骨骼肌是机体最大的胰岛素靶器官，参与餐后约 80%葡萄糖摄取，增加骨骼肌对葡萄糖的摄取和利用能力对改善胰岛素抵抗具有重要意义。2-NBDG 是新合成的一种荧光葡萄糖，目前已被用于细胞葡萄糖摄取及代谢的研究[8-10]，具有检测方便、无辐射损伤等优点。本研究首先测定了 2-NBDG 作用的量效时效关系，并以此为基础进行 DZF 对骨骼肌细胞葡萄糖摄取的干预研究，分别测定了基础状态及胰岛素刺激状态下 DZF 对 C2C12 细胞葡萄糖摄取的影响。证实在基础状态下，DZF 低、中、高剂量均可促进骨骼肌摄取 2-NBDG，具有类胰岛素作用。在胰岛素刺激下，DZF 各剂量可与胰岛素协同促进 2-NBDG 的摄取，并不会抑制胰岛素的作用效果。需要注意的是，DZF 高剂量的作用效果较中剂量反而下降，说明其作用剂量可能存在峰值，在高于峰值剂量的刺激下，葡萄糖摄取会下降。有关 DZF 的量效关系尚需进一步研究。

GLUT4 是骨骼肌细胞膜上主要的胰岛素依赖性转运蛋白，其蛋白表达水平决定了其转运葡萄糖的能力。基础状态下，GLUT4 主要位于细胞内，只有当其转位到细胞膜才能发挥作用[11]。研究表明，促进 GLUT4 向细胞膜转位可减轻胰岛素抵抗，增加葡萄糖摄取[12-13]。2-NBDG 被摄取进入细胞也是依赖于 GLUT[9]。DZF 可促进骨骼肌细胞摄取 2-NBDG，其是否通过影响 GLUT4 的蛋白表达从而促进 2-NBDG 的摄取需要进一步研究。因此，本实验对 GLUT4 总蛋白及膜转位蛋白表达进行了研究。结果表明，基础状态下，DZF 能促进总 GLUT4 表达，并促进GLUT4 向细胞膜转位，说明 DZF 具有类胰岛素作用；胰岛素刺激状态下，DZF 对 GLUT4 总蛋白表达无显著影响，但仍可促进 GLUT4 向细胞膜转位，说明 DZF 可与胰岛素协同增效。

综上所述，DZF 可增加骨骼肌细胞葡萄糖摄取，具有类胰岛素作用，其作用机制可能与促进 GLUT4 向细胞膜转位有关。但 DZF 作为中药复方提取物，其作用靶点复杂，还有待于进一步研究以得到更多的证据支持。

参 考 文 献

[1] Xi B, He D, Hu Y, et al. Prevalence of metabolic syndrome and its influencing factors among the Chinese adults: The China Health and Nutrition Survey in 2009[J]. Preventive Medicine, 2013, 57(6): 867-871.

[2] 王春霞. 代综方干预代谢综合征早期糖脂代谢紊乱的探索性研究[D]. 北京：中国中医科学院，中国中医研究院，2015.

[3] 刘喜明. 中医研究代谢综合征存在的几个关键科学问题与阐释[J]. 世界中西医结合杂志，2010，5(5)：369-371.

[4] 赵玉雪，朱晓云，曹松华，等. 3 398 例代谢综合征患者证候学分析[J]. 辽宁中医杂志，2016，59(1)：5-7.

[5] 朱晓云，王朋倩，刘喜明. 代综方对 3T3-L1 脂肪细胞糖脂代谢的作用研究[J]. 世界中西医结合杂志，2015，10(2)：175-178.

[6] 朱晓云，楚小燕，王兆礼，等. 代综方对 3T3-L1 脂肪细胞分化及相关基因表达的影响[J]. 重庆医科大学学报，2015，37(7)：1016-1020.

[7] 董菲菲，朱晓云，张俊龙，等. 代综方对油酸诱导的 HepG2 细胞内脂质堆积的影响[J]. 世界中西医结合杂志，2015，10(3)：330-334.

[8] 叶 林，陆 凯，张冬颖，等. 2-NBDG 检测 H9c2 心肌细胞葡萄糖摄取能力的研究[J]. 第三军医大学学报，2012，34(15)：1533-1537.

[9] Millon SR, Ostrander JH, Brown JQ, et al. Uptake of 2-NBDG as a method to monitor therapy response in breast cancer cell lines[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2010, 126(1): 55-62.

[10] 胡 慧，单秀红，朱 伟，等. 2-NBDG 用于乳腺癌 MDA-MB-231 细胞荧光检测研究[J]. 江苏大学学报：医学版，2010，20(3)：216-219.

[11] Baron AD, Brechtel G, Wallace P, et al. Rates and tissue sites of non-insulin-and insulin-mediated glucose uptake in humans[J]. Am J Physiol, 1988, 255(6P1): E769-E774.

[12] Li HB, Yang YR, Mo ZJ, et al. Silibinin improves palmitate-induced insulin resistance in C2C12 myotubes by attenuating IRS-1/PI3K/Akt pathway inhibition[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2015, 48(5): 440-446.

[13] Maurya CK, Singh R, Jaiswal N, et al. 4-Hydroxyisoleucine ameliorates fatty acid-induced insulin resistance and inflammatory response in skeletal muscle cells[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2014, 395(1-2): 51-60.

（责任编辑：唐秋姗）