

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.21.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210918.0837.014.html\(2021-09-22\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210918.0837.014.html(2021-09-22))

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*

何廉旗¹,任智超¹,徐丹²,张翠丽³,宋占春^{1△}

(1. 辽宁省抚顺市中心医院心血管内科 113006; 2. 辽宁省抚顺市中心医院科教部 113006;

3. 大连医科大学基础医学院, 辽宁大连 116044)

[摘要] **目的** 探讨达格列净(DAPA)在促进骨骼肌细胞分化中的作用及机制。**方法** 将小鼠成肌细胞系 C2C12 分为未分化组以及分化组(DAPA 0、5、10、50 $\mu\text{mol/L}$)。使用含 2% 马血清分化培养基诱导 C2C12 细胞分化,观察肌管形成情况,计算细胞分化指数,测定肌酸激酶(CK)活性。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测生肌决定因子 1(MyoD)、生肌素(Myogenin)、肌球蛋白重链(MyHC)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)及 p-AMPK mRNA 表达水平,Western blot 检测 MyoD、Myogenin、MyHC、AMPK 及 p-AMPK 蛋白表达水平。**结果** 随 DAPA 浓度增加,C2C12 细胞分化指数明显增加,CK 活性也明显增加;但 DAPA 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 C2C12 细胞分化指数、CK 活性与 DAPA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);C2C12 细胞分化过程中 DAPA(10 $\mu\text{mol/L}$)使 MyoD、Myogenin、MyHC 在 mRNA 和蛋白水平表达均明显上调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。DAPA 促进 C2C12 细胞 AMPK 磷酸化,而 AMPK 抑制剂——Compound C 可阻断 DAPA 对 C2C12 细胞的促分化作用。**结论** DAPA 可通过激活 C2C12 细胞 AMPK 活性,促进细胞分化。

[关键词] 达格列净;骨骼肌细胞;分化;代谢综合征**[中图分类号]** Q291**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)21-3617-05

Study on effect and mechanism of dapagliflozin in promoting differentiation of mouse skeletal muscle cell line C2C12*

HE Lianqi¹,REN Zhichao¹,XU Dan²,ZHANG Cuili³,SONG Zhanchun^{1△}

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Fushun Municipal Central Hospital, Fushun, Liaoning 113006, China; 2. Department of Science and Education, Fushun Municipal Central Hospital, Fushun, Liaoning 113006, China; 3. Basic Medical School, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role and mechanism of dapagliflozin (DAPA) in promoting the differentiation of skeletal muscle cells. **Methods** The mouse myoblast cell line C2C12 was divided into 5 groups: undifferentiated group and differentiated groups (DAPA 0, 5, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$). The differentiation medium containing 2% horse serum was used to induce the differentiation of C2C12 cells. The formation of myotubes was observed, the cell differentiation index was calculated, and the CK activity was measured. The real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect myogenic determination factor 1 (MyoD), myogenin, myosin heavy chain (MyHC), and adenylyate-activated protein kinase (AMPK) and p-AMPK mRNA expression levels; the Western blot was used to detect the protein expression levels of MyoD, Myogenin, MyHC, AMPK and p-AMPK. **Results** With the increase of DAPA concentration, the C2C12 cell differentiation index and CK activity were increased significantly; however, compared with the DAPA 10 $\mu\text{mol/L}$ group, the difference in the C2C12 cell differentiation index and CK activity of the DAPA 50 $\mu\text{mol/L}$ group had no statistically significant difference ($P>0.05$); DAPA (10 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the expression of MyoD, Myogenin and MyHC at the mRNA level and protein level during the differentiation of C2C12 cells, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). DAPA promoted the phosphorylation of AMPK in C2C12 cells, while the AMPK inhibitor Compound C could block the differentiation-promoting effect of DAPA on C2C12

* 基金项目:辽宁省自然科学基金博士启动基金项目(2020-BS-284)。 作者简介:何廉旗(1984-),主治医师,博士,主要从事代谢性心血管病的研究。 △ 通信作者, E-mail: szcclszccl@163.com。

cells. **Conclusion** DAPA can promote the cell differentiation by activating the AMPK activity of C2C12 cells.

[Key words] dapagliflozin; skeletal muscle cells; differentiation; metabolic syndrome

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病。而骨骼肌占人体重量的 40%，是人体最大的代谢器官，因此，骨骼肌功能完整对维持机体代谢稳态至关重要^[1]。骨骼肌的肌纤维表面的卫星细胞是一种干细胞，当骨骼肌受到损伤(包括运动导致的牵拉伤、物理创伤、化学损伤等)时，静止的卫星细胞被激活，进行增殖、分化、融合，最终生长为成熟肌纤维，完成对受损骨骼肌的修复^[2]。有研究表明，糖尿病患者骨骼肌卫星细胞分化能力明显降低，导致骨骼肌再生能力下降^[3-4]。

新型口服降糖药——达格列净(dapagliflozin, DAPA)通过抑制钠-葡萄糖共转运蛋白 2 活性，促进尿糖排泄，降低血糖水平^[5]。有研究表明，DAPA 对腺苷酸活化蛋白激酶(adenylate-activated protein kinase, AMPK)具有激活作用^[6-7]。而 AMPK 是骨骼肌细胞分化的重要的调控因子，可通过激活一系列下游分子促进骨骼肌细胞分化^[8-9]。尽管如此，DAPA 在骨骼肌细胞分化中的作用尚少见相关文献报道。本研究采用小鼠成肌细胞系 C2C12 细胞作为研究对象，拟明确 DAPA 在 C2C12 细胞分化中的作用，并初步阐明其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠成肌细胞系 C2C12 细胞购自美国 ATCC 公司，DAPA 购自美国 MCE 公司，胎牛血清及马血清均购自美国 Gibco 公司，AMPK 抑制剂 Compound C (CC)、小鼠抗肌素(myogenin)抗体(ab1835)及小鼠抗肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MyHC)抗体(ab51263)均购自美国 Abcam 公司，肌酸激酶(creatinine kinase, CK)活性测定试剂盒及小鼠抗 β -tubulin (SAB4200732)抗体均购自美国 Sigma 公司，小鼠抗肌决定因子 1(myogenic determination factor 1, MyoD)抗体(sc_32758)购自美国 Santa Cruz 公司，兔抗 AMPK α 抗体(2532s)及兔抗 p-AMPK 抗体(2537s)均购自美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 C2C12 细胞接种于 100 mm 培养皿中，使用含 10%胎牛血清杜氏改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基(生长培养基)，于 37℃、含 5%CO₂ 培养箱中进行培养，待细胞密度达到 80%~90%融合时按 1:3 进行细胞传代。传代细胞仍按上述培养条件继续培养，以备后续实验使用。

1.2.2 细胞分化体系的建立及形态学观察

在生长培养基中待 C2C12 细胞融合至 80%左右时将培养基更换为含 2%马血清的 DMEM 培养基(分化培养基)继续培养，每隔 1 d 换液 1 次，诱导分化 7 d，使用相差显微镜观察分化后肌管形态并采集图像，计算细胞分化指数(融合 2 个或 2 个以上细胞核的细胞的百分比)。药物干预即在基础培养基基础上加入不同浓度 DAPA(终浓度为 0、5、10、50 μ mol/L)及 CC(终浓度为 10 μ mol/L)。

1.2.3 CK 活性测定

使用细胞刮分别从培养皿刮下 1.2.2 项各组细胞。采用适量冰缓冲液(50 mmol/L 磷酸钾)对细胞进行匀浆处理，4℃、10 000 g 离心 15 min，留取沉淀待测。按照 CK 测定试剂盒说明书于 96 孔板中单孔加入 10 μ L 标本及 100 μ L 反应试剂体系(缓冲液 100 μ L，底物溶液 10 μ L，酶混合物 1 μ L)，轻敲，混匀。37℃孵育 20 min，340 nm 波长检测吸光度(A₃₄₀)_{initial}。37℃继续孵育 20 min，340 nm 波长检测吸光度(A₃₄₀)_{final}。按照公式计算 CK 活性:CK 活性(unist/L) = $\frac{(A_{340})_{\text{final}} - (A_{340})_{\text{initial}}}{(A_{340}) - (A_{340})}$ 。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达水平

收集 1.2.2 项各组细胞，加入蛋白裂解液于冰上放置 30 min，4℃、10 000 g 离心 10 min，上清液为细胞总蛋白。采用蛋白定量(BCA)法测定蛋白浓度。50 μ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳。湿转法转膜后于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h。加入一抗(稀释比均为 1:1 000)，4℃封闭过夜。次日，二抗(稀释比均为 1:5 000)孵育 45 min 后进行电化学发光(ECL)显色。采用 ImageJ 1.51 软件对 Western blot 带进行灰度分析。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

收集 1.2.2 项各组细胞，使用北京普洛麦格公司 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA，并测定其浓度及纯度。使用日本 TAKARA 公司逆转录试剂盒获取细胞 cDNA。从 NCBI 网站下载小鼠 MyoD、Myogenin、MyHC 及 GAPDH 基因 DNA 及 mRNA 序列。采用 primer 3.0 软件设计引物，MyoD-正向: CAA-GACCACCAACGCTGATC，MyoD-反向: CAGAC-CTTCGATGTAGCGGA; Myogenin-正向: ATCTG-CACTCCCTTACGTCC，Myogenin-反向: GACAGC-CCCACTTAAAAGCC; MyHC-正向: AGCTT-GAAAACGAGGTGGAA，MyHC-反向: CCTCCT-CAGCCTGTCTCTTG; GAPDH-正向: AGT-GTTTCCTCGTCCCGTAG，GAPDH-反向: GCCGT-

GAGTGGAGTCATACT。采用实时荧光定量法测定上述基因循环数(cycle threshold, Ct)值,反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 31 s,共 40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 mRNA 相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DAPA 促进 C2C12 细胞分化

DAPA 以浓度依赖方式促进 C2C12 细胞分化,同时,细胞 CK 活性增加,见图 1。DAPA 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 C2C12 细胞分化指数、CK 活性与 DAPA 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),故

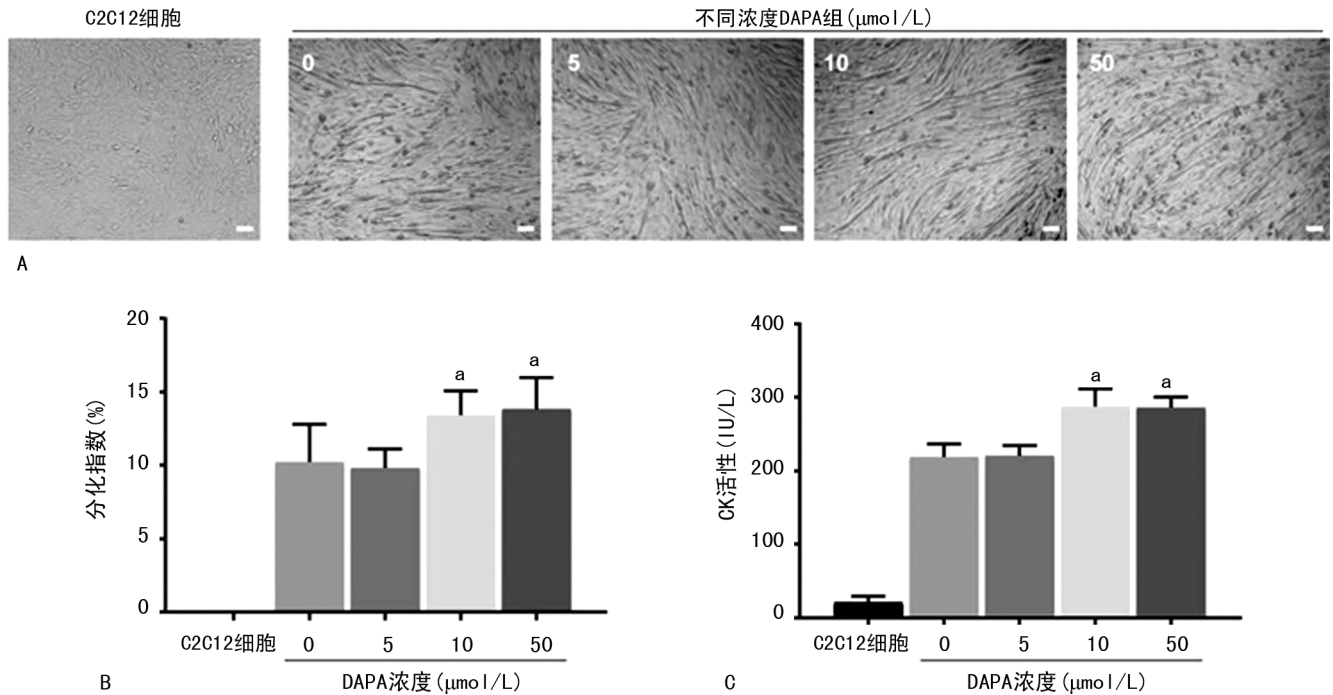
选用 DAPA 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

2.2 DAPA 在 mRNA 水平及蛋白水平上调 C2C12 细胞 MyoD、Myogenin、MyHC 的表达

DAPA 上调 C2C12 细胞 MyoD、Myogenin、MyHC 的表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

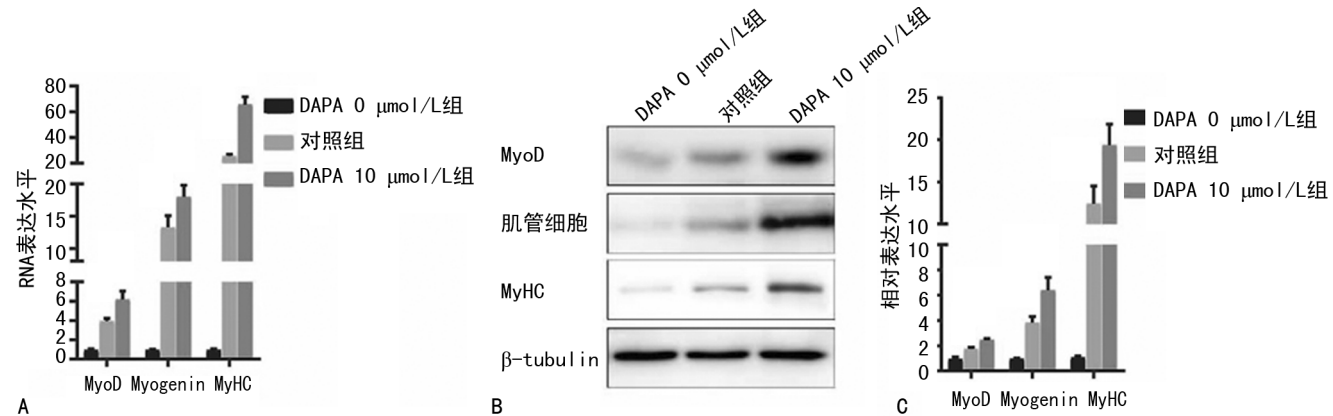
2.3 DAPA 通过上调 AMPK 磷酸化水平促进 C2C12 细胞分化。

与 DAPA 组细胞分化程度比较,DAPA+CC 组分化明显减低,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3 A、B。与对照组比较,DAPA 组 AMPK 磷酸化水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);DAPA+CC 组 AMPK 磷酸化水平及 MyHC 表达水平均明显低于 DAPA 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 3 C、D。



A: 相差显微镜观察细胞形态(比例尺=20 μm); B: 分化指数柱状图; C: CK 活性测定; ^a: $P < 0.05$, 与 DAPA 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较。

图 1 DAPA 促进 C2C12 细胞分化



A: 实时荧光定量 PCR 分析 mRNA 表达水平,以 GAPDH 为内参; B: Western blot 分析蛋白表达水平; C: 灰度分析柱状图; 对照组: 未给予 DAPA 分化 7 d 的 C2C12 细胞。

图 2 DAPA 使 C2C12 细胞 MyoD、肌管细胞、MyHC 表达水平上调

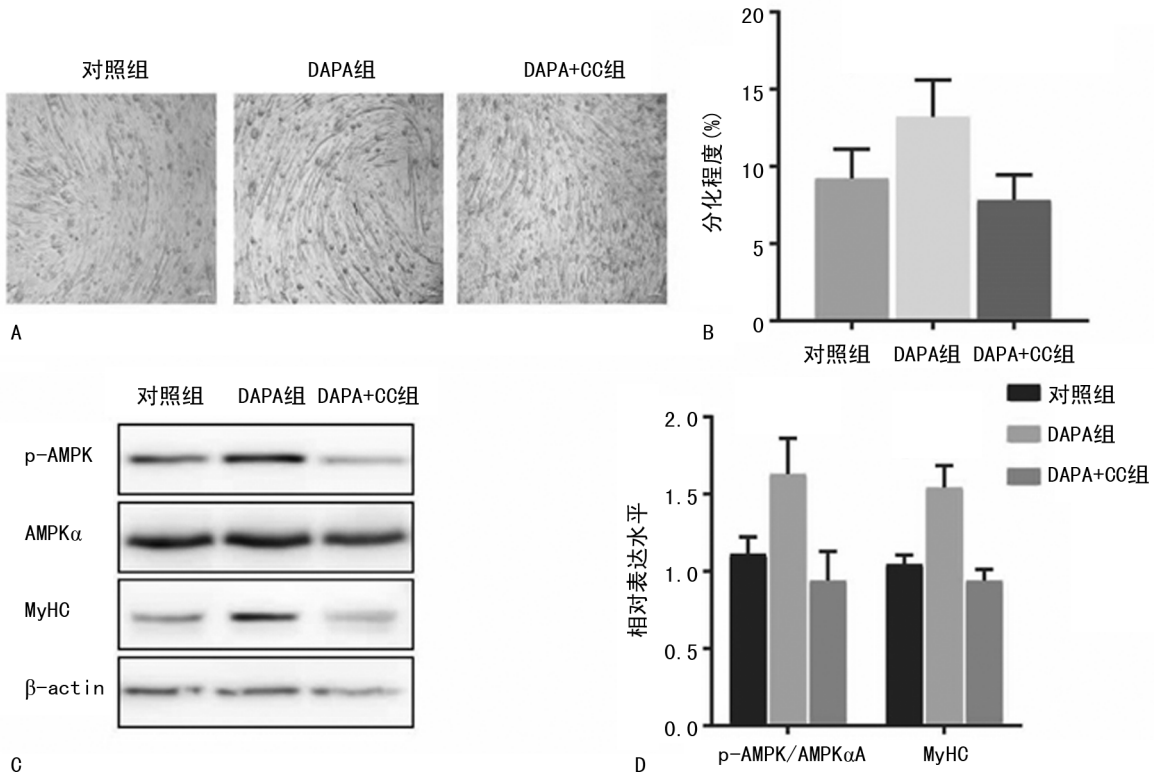


图 3 DAPA 通过增加 AMPK 磷酸化水平促进 C2C12 细胞分化

3 讨论

随着生活方式的改变,肥胖及其相关代谢综合征的发生日趋普遍。骨骼肌是全身最大的代谢器官,对维持机体代谢稳态发挥着重要作用。骨骼肌再生是保护骨骼肌结构及功能完整的关键。骨骼肌再生分为 4 个阶段,包括卫星细胞增殖、分化、融合及生长。有研究表明,肥胖导致骨骼肌细胞分化障碍^[10]。而在诸多调控卫星细胞分化的转录因子及信号分子中生肌调控因子(包括生肌因子 5、MyoD、Myogenin 和生肌调节因子 4)最为重要^[11]。首先,生肌因子 5 在卫星细胞分化初始阶段表达持续增加,随之激活其他生肌调控因子。随着 MyoD 高表达,卫星细胞正式进入分化阶段。MyoD、Myogenin 相互交叉激活,与启动子或增强子区域的 E-box 元件结合,诱导一系列生肌相关基因的表达。有研究发现,下调 MyoD 或 Myogenin 会直接抑制骨骼肌细胞分化^[12]。因此,MyoD、Myogenin 在调节骨骼肌细胞分化中至关重要。

新型口服降糖药 DAPA 因具有独立于降糖作用以外的诸多优势备受关注。有研究表明,DAPA 具有明显抗炎作用,对诸多脏器具有保护作用,如心脏、肝脏、肾脏及脑^[13-16]。本研究采用 DAPA 作用于 C2C12 细胞,诱导分化,通过相差显微镜观察发现,DAPA 可促进 C2C12 细胞分化。同时,DAPA 使 C2C12 细胞中生肌调控因子 MyoD、Myogenin 及卫星细胞分化标志物 MyHC 表达增加,肌管特异性标志物 CK 活性增加。

有研究表明,肥胖抑制 AMPK 磷酸化,导致骨骼肌再生障碍^[17]。而 AMPK 磷酸化是骨骼肌细胞分化的重要调控因子^[18-19]。有研究表明,DAPA 在许多组织中可促进 AMPK 磷酸化^[7,20-21]。本研究结果显示,DAPA 作用于 C2C12 细胞后 AMPK 磷酸化明显增加。而在加入 CC 干预后通过相差显微镜观察发现,DAPA 促进 C2C12 细胞分化的作用消失,MyHC 表达明显减低,说明 DAPA 通过增加 AMPK 磷酸化促进 C2C12 细胞分化。

综上所述,DAPA 在小鼠成肌细胞系 C2C12 细胞中促进 AMPK 磷酸化,进而促进 C2C12 细胞分化。尽管如此,但 DAPA 在小鼠骨骼肌再生中的作用仍需进一步探究。本研究证实了 DAPA 在骨骼肌损伤后再生中可能存在潜在的价值,为临床肌病的治疗提供了新的思路。

参考文献

- [1] MIKOLASEVIC I, PAVIC T, KANIZAJ T F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease and sarcopenia: where do we stand? [J]. Can J Gastroenterol Hepatol, 2020, 2020: 8859719.
- [2] BAGHDADI M B, TAJBAKSH S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration [J]. Dev Biol, 2018, 433(2): 200-209.
- [3] FUJIMAKI S, KUWABARA T. Diabetes-induced

- dysfunction of mitochondria and stem cells in skeletal muscle and the nervous system[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2147.
- [4] NGUYEN M H, CHENG M, KOH T J. Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice[J]. *Sci World J*, 2011, 11:1525-1535.
- [5] LUO M, KONG X, WANG H, et al. Effect of Dapagliflozin on glycemic variability in patients with type 2 diabetes under insulin glargine combined with other oral hypoglycemic drugs [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020:6666403.
- [6] CHANG Y K, CHOI H, JEONG J Y, et al. Dapagliflozin, SGLT2inhibitor, attenuates renal ischemia-reperfusion injury [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7):e0158810.
- [7] ZHOU J, ZHU J, YU S J, et al. Sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2) inhibition reduces glucose uptake to induce breast cancer cell growth arrest through AMPK/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132:110821.
- [8] SAKUSHIMA K, YOSHIKAWA M, OSAKI T, et al. Moderate hypoxia promotes skeletal muscle cell growth and hypertrophy in C2C12 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(4): 921-927.
- [9] MA J, MENG X, KANG S Y, et al. Regulatory effects of the fruit extract of *Lycium chinense* and its active compound, betaine, on muscle differentiation and mitochondrial biogenesis in C2C12 cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118:109297.
- [10] GHANIM H, DHINDSA S, BATRA M, et al. Effect of testosterone on FGF2, MRF4 and myostatin in hypogonadotropic hypogonadism; relevance to muscle growth[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(6):2094-2102.
- [11] HW L, TIAN X, YAN C, et al. Nicotine promotes the differentiation of C2C12 myoblasts and improves skeletal muscle regeneration in obese mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(4):739-745.
- [12] ZAMMIT P S. 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.
- [13] RAZ I, MOSWAZON O, BONACA M P, et al. DECLARE-TIMI 58: Participants' baseline characteristics[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(5):1102-1110.
- [14] WIVIOTT S D, RAZ I, BONACA M P, et al. Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(4):347-357.
- [15] LENG W, WU M, PAN H, et al. The SGLT2 inhibitor dapagliflozin attenuates the activity of ROS-NLRP3 inflammasome axis in steatohepatitis with diabetes mellitus [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(18):429.
- [16] SA-NGUANMOO P, TANAJAK P, KERDPH OO S, et al. SGLT2-inhibitor and DPP-4 inhibitor improve brain function via attenuating mitochondrial dysfunction, insulin resistance, inflammation, and apoptosis in HFD-induced obese rats[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 333:43-50.
- [17] FU X, ZHU M, ZHANG S, et al. Obesity impairs skeletal muscle regeneration through inhibition of AMPK [J]. *Diabetes*, 2016, 65(1): 188-200.
- [18] CHANG E, KIM Y. Vitamin D Ameliorates fat accumulation with AMPK/SIRT1 activity in C2C12 skeletal muscle cells [J]. *Nutrients*, 2019, 11(11):2806..
- [19] SHIN E J, JO S, CHOI S, et al. Red ginseng improves exercise endurance by promoting mitochondrial biogenesis and myoblast differentiation[J]. *Molecules*, 2020, 25(4):865.
- [20] CHEN H, TRAN D, YANG H C, et al. Dapagliflozin and ticagrelor have additive effects on the attenuation of the activation of the nlrp3 inflammasome and the progression of diabetic cardiomyopathy: an AMPK-mTOR interplay [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(4):443-461.
- [21] ESTERLINE R, OSCARSSON J, BURNS J. A role for sodium glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2is) in the treatment of Alzheimer's disease? [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2020, 155: 113-140.