

鹿茸多肽对 C2C12 成肌细胞分化的调控作用及机制

王 博, 林 喆

(长春中医药大学药学院临床药学与中药药理教研室, 吉林 长春 130117)

[摘要] **目的:** 探讨鹿茸多肽对 C2C12 成肌细胞分化过程中线粒体能量代谢效率的调控作用, 并阐明其相关机制。**方法:** 采用生长培养基 (GM) 维持 C2C12 成肌细胞增殖, 加入分化培养基 (DM) 诱导细胞分化, 分化时间为 1、3 和 5 d, 分化的 C2C12 成肌细胞分为对照组和鹿茸多肽组, 鹿茸多肽组加入 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽, 对照组给予同等体积磷酸盐缓冲液 (PBS)。采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 法检测 0、5、10、20、40、60、80、120、160 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理后各组未分化细胞增殖率, 免疫荧光法检测各组细胞融合指数, Western blotting 法检测各组细胞中肌球蛋白、肌细胞生成素、泛醌氧化还原酶 B8 (NDUFB8)、线粒体编码细胞色素 C 氧化酶 1 (MT-CO1) 和琥珀酸脱氢酶复合体黄蛋白亚基 A (SDHA) 蛋白表达水平, $2', 7'$ -二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 荧光探针法检测各组细胞中活性氧 (ROS) 水平, 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 检测各组细胞线粒体膜电位, 试剂盒检测各组细胞中三磷酸腺苷 (ATP) 水平、葡萄糖摄取量和乳酸水平。**结果:** 与 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理组比较, 60、80、120、160 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理组未分化 C2C12 成肌细胞增殖率均明显升高 ($P < 0.05$)。免疫荧光法检测, 与分化同期对照组比较, 分化 3 和 5 d 鹿茸多肽处理组 C2C12 成肌细胞融合指数均明显降低 ($P < 0.05$), 多核肌管细胞数量明显减少。Western blotting 法, 与分化同期对照组比较, 分化 1、3 和 5 d 鹿茸多肽组细胞中肌球蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), 分化 3 和 5 d 鹿茸多肽组细胞中肌细胞生成素蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与分化同期对照组比较, 分化 5 d 鹿茸多肽组细胞中 NDUFB8 和 MT-CO1 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 分化 1、3 和 5 d 鹿茸多肽组细胞 SDHA 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。DCFH-DA 荧光探针法, 与分化同期对照组比较, 分化 5 d 鹿茸多肽组细胞 ROS 水平明显降低 ($P < 0.01$)。JC-1 试剂盒检测, 与分化同期对照组比较, 分化 3 和 5 d 鹿茸多肽组细胞线粒体膜电位均明显升高 ($P < 0.05$)。与分化同期对照组比较, 分化 1 d 鹿茸多肽组细胞葡萄糖摄取量明显降低 ($P < 0.01$), 分化 5 d 鹿茸多肽组细胞葡萄糖摄取量明显升高 ($P < 0.05$), 分化 1、3 和 5 d 鹿茸多肽组细胞乳酸水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 分化 1 和 3 d 鹿茸多肽组细胞 ATP 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 鹿茸多肽对 C2C12 成肌细胞分化具有抑制作用, 其机制可能与鹿茸多肽降低线粒体氧化磷酸化复合体亚基表达, 提高线粒体氧化磷酸化效率有关。

[关键词] 鹿茸多肽; 成肌细胞分化; 线粒体; 衰老; 肌肉退行性疾病

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-06-22 **[录用日期]** 2024-12-20

[基金项目] 吉林省科技厅医药健康领域项目 (20210204014YY)

[作者简介] 王 博 (1992—), 女, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理方面的研究。

[通信作者] 林 喆, 教授, 博士研究生导师 (E-mail: linzhe1228@163.com)

©《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Regulatory effect of velvet antler polypeptides on differentiation of C2C12 myoblasts and its mechanism

WANG Bo, LIN Zhe

(Department of Clinical Pharmacy and Chinese Medicine Pharmacology, School of Pharmacy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the regulatory effect of velvet antler polypeptide on mitochondrial energy metabolism efficiency during myoblast differentiation, and to clarify its related mechanism. **Methods:** The C2C12 myoblasts were maintained in growth medium (GM) and then induced to differentiate in differentiation medium (DM) for 1, 3, and 5 d. The differentiated C2C12 myoblasts were divided into control group and velvet antler polypeptide group. The VAP group was treated with $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ velvet antler polypeptide, while the control group was given an equal volume of phosphate buffer saline (PBS). Cell counting kit-8 (CCK-8) method was used to detect the proliferation rate of the undifferentiated cells in various groups after treated with 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 120, 160, and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ velvet antler polypeptide; immunofluorescence staining was used to detect the fusion indexes of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of myosin, myogenin, myogenin: ubiquinone oxidoreductase subunit B8 (NDUFB8), mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (MT-CO1), and succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA) proteins in the cells in various groups; 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe assay was used to detect the reactive oxygen species (ROS) level in the cells in various groups; JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit was used to detect the mitochondrial membrane potential of the cells in various groups; commercial kits were used to detect the adenosine triphosphate (ATP) level, glucose uptake, and lactate level in the cells in various groups. **Results:** The CCK-8 results showed that compared with $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ velvet antler polypeptide group, the proliferation rates of undifferentiated C2C12 myoblasts in 60, 80, 120, 160, and $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ velvet antler polypeptide groups were significantly increased ($P < 0.05$). The immunofluorescence results showed that compared with control group at the same differentiation stage, the fusion indices of the C2C12 myoblasts in velvet antler polypeptide group at 3 and 5 d of differentiation were significantly decreased ($P < 0.05$), and the number of multinucleated myotubes was significantly decreased. The Western blotting results showed that compared with control group at the same differentiation stage, the expression levels of myosin in the cells in velvet antler polypeptide group at 1, 3, and 5 d of differentiation were significantly decreased ($P < 0.05$); the expression levels of myogenin protein in the cells in velvet antler polypeptide group at 3 and 5 d of differentiation were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with control group at the same differentiation stage, the expression levels of NDUFB8 and MT-CO1 proteins in the cells in velvet antler polypeptide group at 5 d of differentiation were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the expression levels of SDHA protein in the cells in velvet antler polypeptide group at 1, 3, and 5 d of differentiation were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The DCFH-DA results showed that compared with control group at the same differentiation stage, the ROS level in velvet antler polypeptide group at 5 d of differentiation was significantly decreased ($P < 0.01$). The JC-1 assay results showed that compared with control group at the same differentiation stage, the mitochondrial membrane potentials in the cells in velvet antler polypeptide group at 3 and 5 d of differentiation were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with control group at the same differentiation stage, the glucose uptake in the cells in velvet antler polypeptide group at 1 d of differentiation was significantly decreased ($P < 0.01$), and the glucose uptake at 5 d of differentiation

was significantly increased ($P < 0.05$); there were no significant differences in lactate levels in the cells in velvet antler polypeptide group at 1, 3, and 5 d of differentiation ($P > 0.05$); the ATP levels in velvet antler polypeptide group at 1 and 3 d of differentiation were significantly increased ($P < 0.05$).

Conclusion: Velvet antler polypeptide inhibits the differentiation of the C2C12 myoblasts, and its mechanism may be related to the down-regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex subunit expression and the improvement of mitochondrial oxidative phosphorylation efficiency.

KEYWORDS Velvet antler polypeptide; Myoblast differentiation; Mitochondria; Aging; Muscular degenerative diseases

随着人口老龄化的加剧, 衰老相关研究成为医学研究的热点, 特别是在肌肉健康领域。骨骼肌是人体质量最大的器官, 约占体质量的30%~40%, 骨骼肌的功能变化直接影响人体健康^[1]。衰老相关的肌肉退行性疾病是人类最常见的肌肉萎缩类型, 随着年龄的增长, 骨骼肌的逐渐丧失会对机体多种生理功能产生负面影响, 包括运动、呼吸、视力、体温调节和代谢稳态^[2-4]。尽管导致衰老相关的肌肉退行性疾病机制较为复杂, 但其中最核心的问题可能是肌肉细胞损伤和再生的失衡。

C2C12成肌细胞由小鼠的肌肉卫星细胞(muscle satellite stem cells, MuSCs)激活, 能够在体外培养的环境下进行增殖。在含10%血清的培养液中能够自我复制, 并且维持干性。在2%马血清的培养条件下, 达到一定程度融合度的C2C12成肌细胞开始分化并融合, 于3~5 d形成多核肌管细胞, 多核肌管细胞的形成是C2C12成肌细胞分化的主要标志之一。C2C12成肌细胞的特点使其成为肌细胞分化研究的经典细胞模型^[5-6]。研究^[5]显示: 在C2C12成肌细胞分化过程中线粒体生物合成明显增加, 线粒体数量明显高于未分化的成肌细胞, 线粒体氧化磷酸化复合体亚基线粒体编码的细胞色素C氧化酶I(mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I, MT-CO1)和泛醌氧化还原酶B8(ubiquinone oxidoreductase subunit B8, NDUFB8)等表达水平明显升高, 氧化磷酸化效率明显高于未分化的成肌细胞。研究^[6]显示: 利用鱼藤酮和噻吩甲酰三氟丙酮抑制C2C12成肌细胞线粒体氧化磷酸化效率, 导致多核肌管细胞形成减少, 细胞的融合指数降低, 成肌细胞分化标志物肌球蛋白和肌细胞生成素表达减少, 从而抑制成肌细胞分化。因此, 线粒体氧化磷酸化的效率可能是调控成肌细胞分化的关键机制之一, 但仍需进一步探索。

鹿茸作为典型的动物药, 其在中药领域的应用

已有超过2 000年的历史, 鹿茸在我国及亚洲其他国家主要被用于增强性功能和延缓衰老^[7]。鹿茸多肽作为鹿茸的主要活性成分, 约占鹿茸湿重的60%, 含有丰富的蛋白质、氨基酸和磷脂等对机体有利的营养物质^[8]。鹿茸多肽具有抗氧化、抗衰老和免疫调节等多种对人体有益的功能。研究^[7]显示: 在强迫游泳实验中, 给予鹿茸多肽的小鼠游泳时间明显长于对照组小鼠。以C2C12成肌细胞作为体外细胞模型的研究^[9]显示: 鹿茸多肽能够明显上调细胞中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性及谷胱甘肽(glutathione, GSH)/氧化型GSH(oxidized GSH, GSSG)比值, 有效抑制氧化应激对成肌细胞产生的损伤作用。但鹿茸多肽对成肌细胞分化的调控作用尚未完全阐明。因此, 本研究通过构建体外C2C12成肌细胞分化模型, 探讨线粒体能量代谢效率影响成肌细胞分化的机制, 为鹿茸多肽的抗衰老应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 C2C12成肌细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), DMEM培养液(美国Gibco公司), 胎牛血清(以色列Biological Industries公司), 马血清(江苏科维生物技术有限公司), 0.25%胰蛋白酶和磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(武汉赛维尔生物科技有限公司), 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8)检测试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司), 葡萄糖检测试剂盒和乳酸检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), NDUFB8和琥珀酸脱氢酶复合体黄蛋白亚基A(succinate dehydrogenase complex flavoprotein

subunit A, SDHA) 一抗 (杭州景杰生物科技股份有限公司), MT-CO1 一抗 (武汉爱博泰克生物科技股份有限公司), 肌球蛋白、肌细胞生成素和 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔二抗及 HRP 标记山羊抗小鼠二抗 (武汉三鹰生物技术有限公司)。多功能酶标仪 (德国 Omega 公司), 倒置荧光显微镜和倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 流式细胞仪 (美国 BD 公司), NanoDrop 分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 C2C12 成肌细胞分化模型制备和细胞分组

利用生长培养基 (growth medium, GM) 复苏 C2C12 成肌细胞, 取细胞生长状态良好且细胞融合度达 70%~80% 的细胞进行传代, 以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板。铺板后的细胞在 GM 中增殖培养 24 h, 细胞融合度达 90% 时, 弃 GM 并用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 加入分化培养基 (differentiation medium, DM) 诱导细胞分化。分化的成肌细胞分为对照组和鹿茸多肽组, 鹿茸多肽组加入 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽, 对照组给予同等体积 PBS 缓冲液, 连续培养 7 d, 每日更换 DM 培养液, 细胞均于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养。GM 为含有 1% 青-链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, DM 为含有 1% 青-链霉素和 2% 马血清的 DMEM 培养液。

1.3 CCK-8 法检测各组未分化细胞增殖率 将处于对数生长期的 C2C12 成肌细胞消化离心, 计数后以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 12 h 后分别加入 0、5、10、20、40、60、80、120、160 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理, 培养 24 h 后每孔加入 $10 \text{ } \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 将细胞培养孔板置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 2 h, 采用多功能酶标仪于波长 450 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率。细胞增殖率 = $[(\text{药物孔 A 值} - \text{空白孔 A 值}) / (\text{对照孔 A 值} - \text{空白孔 A 值})] \times 100\%$ 。

1.4 免疫荧光法检测各组细胞融合指数 分别取各组分化后 3 和 5 d 的细胞爬片, 弃置培养基, 1 mL PBS 缓冲液清洗 3 次; 加入 4% 多聚甲醛固定液室温静置 15 min; 1 mL PBS 缓冲液清洗 3 次; 加入 0.2% Triton X-100 PBS 缓冲液, 室温静置 60 min, 1 mL PBS 缓冲液清洗 3 次; 加入 $500 \text{ } \mu\text{L}$ 的 5% BSA 封闭液, 室温静置 60 min; 加入 $300 \text{ } \mu\text{L}$

肌球蛋白一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 1 mL PBS 缓冲液清洗 5 次, 每次 5 min; 荧光二抗孵育细胞爬片 1 h, 于避光条件下使用 PBS 缓冲液对爬片进行清洗, 清洗 5 次, 每次 5 min; 加入 $200 \text{ } \mu\text{L}$ $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 染液, 室温静置 5 min; 1 mL PBS 缓冲液清洗 3 次; 最后加入抗淬灭荧光封片剂封片, 荧光显微镜观察并收集图像, 计数总细胞核数和多核肌管细胞核数, 计算细胞融合指数。细胞融合指数 = $(\text{多核肌管细胞的细胞核数} / \text{总细胞核数}) \times 100\%$ 。

1.5 Western blotting 法检测各组细胞中肌球蛋白、肌细胞生成素、NDUFB8、MT-CO1 和 SDHA 蛋白表达水平

将处于对数生长期的细胞消化离心, 计数后以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板。弃培养液, 预冷 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每孔加入 $200 \text{ } \mu\text{L}$ RIPA 裂解液 (加入蛋白酶抑制剂), 冰上裂解 20 min, 细胞刮收集样品后超声处理, 冰浴静置 40 min, $14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 取上清加入上样缓冲液, BCA 试剂盒定量后, 沸水煮 10 min 使蛋白充分变性。SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后转膜 30 min, 取出膜后 5% 脱脂奶粉于室温条件下置于摇床上封闭 1 h, 一抗 (1:1 000) 过夜, TBST 溶液洗膜 3 次, 每次清洗 10 min, 二抗 (1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 溶液洗膜 3 次, 每次清洗 10 min, 显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = $\text{目的蛋白条带灰度值} / \text{内参蛋白条带灰度值}$ 。

1.6 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针法检测各组细胞中 ROS 水平

将处于对数生长期的细胞消化离心, 计数后以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板。待细胞融合度达到 90%, 更换分化培养液, 分别在细胞分化 1、3 和 5 d 时检测细胞中 ROS 水平。每孔加入配制好的 1 mL DCFH-DA (无血清培养液 1:1 000 稀释), 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 20 min, 吸弃上清液, 采用无血清 DMEM 培养液洗涤细胞 3 次, 采用不含有 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞, $1\ 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温离心 5 min, 弃上清, 加入 $500 \text{ } \mu\text{L}$ PBS 缓冲液重悬细胞, 200 目滤网过滤后, 采用流式细胞术检测细胞中绿色荧光强度。采用流式细胞仪自带软件分析 ROS 水平, 固定荧光强度阈值, 以超过阈值细胞百分率代表 ROS 水平。

1.7 JC-1试剂盒检测各组细胞线粒体膜电位 将处于对数生长期的细胞消化离心,计数后以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板。待细胞融合度达到90%,更换分化培养液,分别在细胞分化1、3和5 d时检测线粒体膜电位。每孔加入1 mL JC-1染色液,置于37 °C培养箱中避光孵育20 min,孵育期间配制染色缓冲液并置于冰上预冷,孵育结束后,用预冷染色缓冲液清洗2次,用不含有EDTA的0.25%胰酶消化细胞, $1\ 200\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 室温离心5 min, $500\ \mu\text{L}$ PBS缓冲液吹打混匀,200目滤网过滤后,流式细胞仪检测细胞中红色和绿色荧光强度,计算细胞线粒体膜电位。红色荧光强度越强,线粒体膜电位越高;绿色荧光强度越强,线粒体膜电位越低。线粒体膜电位=红色荧光强度/绿色荧光强度。

1.8 采用试剂盒检测各组细胞中ATP水平 将处于对数生长期的细胞消化离心,计数后以每孔 5×10^5 个细胞的密度接种于6孔细胞培养板。待细胞融合度达到90%,更换分化培养液,分别在细胞分化1、3和5 d时检测细胞中ATP水平。每孔加入200 μL ATP裂解液裂解细胞,4 °C、 $11\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,收集上清液于新EP管中;酶标板中加100 μL ATP检测工作液,室温静置5 min后加2 μL 样品,混匀;使用多功能酶标仪中检测绿色荧光强度。以绿色荧光强度代表细胞中ATP水平,绿色荧光越强,ATP水平越高;绿色荧光强度越弱,ATP水平越低。

1.9 采用试剂盒检测各组细胞葡萄糖摄取量 96孔细胞培养板中每孔分别加入2 μL 蒸馏水(空白孔)、2 μL 标准液(标准孔)和2 μL 样品(样品孔),样品包括各组细胞的培养液上清和新鲜培养液。每孔加入200 μL 葡萄糖检测液,37 °C避光孵育10 min,使用多功能酶标仪于波长505 nm处测定A值。葡萄糖水平($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) = [(样品孔A值 - 空白孔A值) / (标准孔A值 - 空白孔A值)] × 标准液浓度。葡萄糖摄取量 = 新鲜培养液葡萄糖水平 - 培养液上清葡萄糖水平。

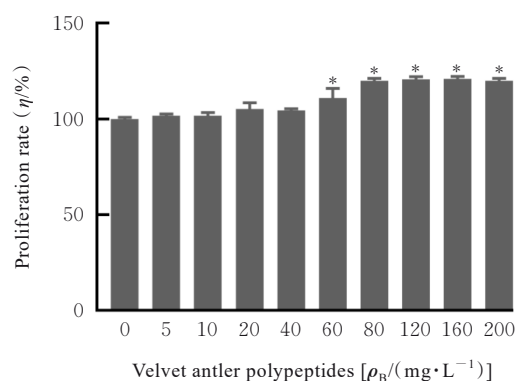
1.10 采用试剂盒检测各组细胞培养上清中乳酸水平 96孔细胞培养板每孔分别加入2 μL 蒸馏水(空白孔)、2 μL 标准液(标准孔)和2 μL 细胞培养液上清(样品孔),加入100 μL 酶工作液,加入20 μL 底物,37 °C避光孵育10 min,加入200 μL 终止液,采用多功能酶标仪于波长530 nm处测定

A值。乳酸水平($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) = [(样品孔A值 - 空白孔A值) / (标准孔A值 - 空白孔A值)] × 标准液浓度。

1.11 统计学分析 采用GraphPad 8.0统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖率、细胞融合指数、细胞中成肌细胞分化标志物蛋白和氧化磷酸化相关蛋白表达水平、细胞中ROS水平、线粒体膜电位、ATP水平、葡萄糖摄取量、培养液上清中乳酸水平均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组未分化C2C12成肌细胞增殖率 与 $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理组比较,60、80、120、160和 $200\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理组未分化C2C12成肌细胞增殖率均明显升高($P < 0.05$),5、10、20和 $40\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 鹿茸多肽处理组未分化C2C12成肌细胞增殖率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。



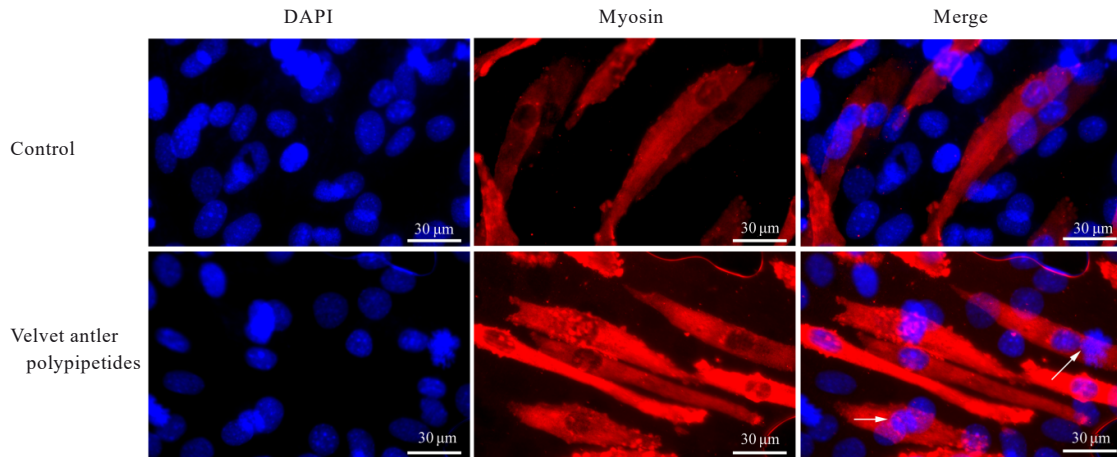
* $P < 0.05$ compared with $0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ velvet antler polypeptides group.

图1 CCK-8法检测各组未分化C2C12成肌细胞增殖率

Fig. 1 Proliferation rates of undifferentiated C2C12 myoblasts cells in various groups detected by CCK-8 method

2.2 各组成肌细胞融合指数 与分化同期对照组($22.11\% \pm 2.20\%$ 和 $39.51\% \pm 1.81\%$)比较,分化3和5 d鹿茸多肽处理组成肌细胞融合指数($18.21\% \pm 1.38\%$ 和 $31.68\% \pm 0.91\%$)均明显降低($P < 0.05$),多核肌管细胞数量明显减少。见图2和3。

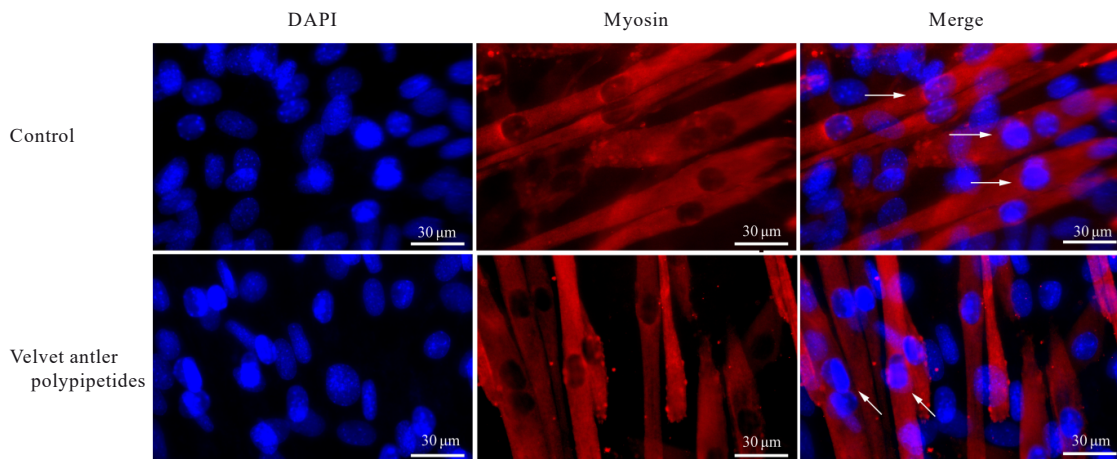
2.3 各组分化细胞中成肌细胞分化标志物蛋白表达水平 与分化同期对照组比较,分化1、3和5 d



White arrow represented multinucleated myotube cells.

图2 免疫荧光法检测分化3 d各组细胞中肌球蛋白表达情况和肌细胞核荧光染色情况

Fig. 2 Expression of myosin and fluorescence staining of myocyte nuclei of cells in various groups after differentiated for 3 d detected by immunofluorescence assay



White arrow represented multinucleated myotube cells.

图3 免疫荧光法检测分化5 d各组细胞中肌球蛋白表达情况和肌细胞核荧光染色情况

Fig. 3 Expression levels of myosin and fluorescence staining of myocyte nuclei of cells in various groups after differentiated 5 d detected by immunofluorescence assay

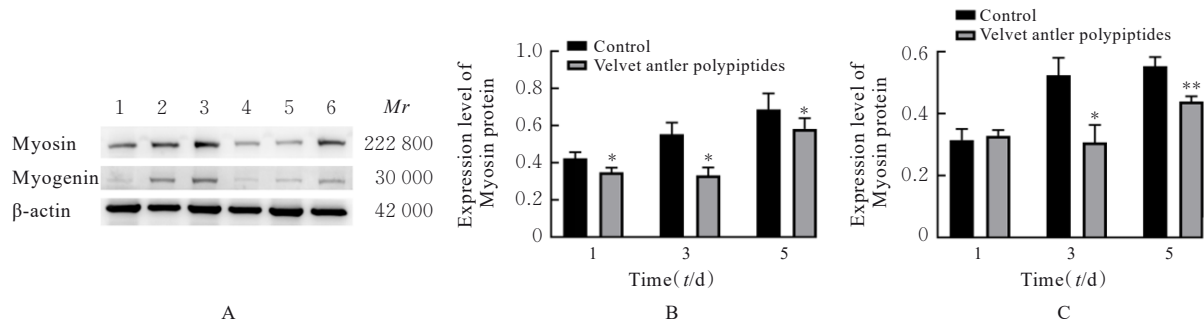
鹿茸多肽组细胞中肌球蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 分化1 d鹿茸多肽组细胞中肌细胞生成素蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 分化3和5 d鹿茸多肽组细胞中肌细胞生成素蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图4。

2.4 各组分化细胞中NDUFB8、MT-CO1和SDHA蛋白表达水平 与分化同期对照组比较, 分化1和3 d鹿茸多肽组细胞中NDUFB8和MT-CO1蛋白表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 分化5 d鹿茸多肽组细胞中NDUFB8和MT-CO1

蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 分化1、3和5 d鹿茸多肽组细胞中SDHA蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图5。

2.5 各组细胞ROS水平 与分化同期对照组 ($10.50\% \pm 1.91\%$ 、 $22.60\% \pm 0.11\%$ 和 $23.95\% \pm 1.17\%$) 比较, 分化1和3 d鹿茸多肽组细胞ROS水平 ($16.5\% \pm 2.01\%$ 和 $23.48\% \pm 1.58\%$) 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 分化5 d鹿茸多肽组细胞ROS水平 ($17.28\% \pm 1.32\%$) 明显降低 ($P < 0.01$)。见图6。

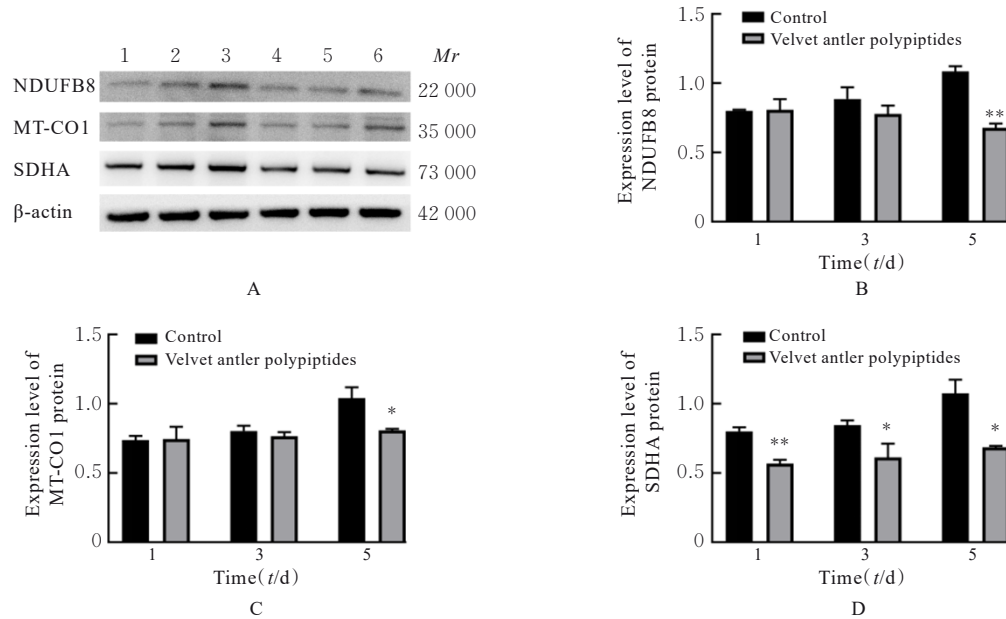
2.6 各组分化细胞中线粒体膜电位 与分化同期



A: Electrophoregram (Lane 1-3: Control group; Lane 4-6: Antler velvet peptide group; Lane 1, 4: Differentiated for 1 d; Lane 2, 5: Differentiated for 3 d; Lane 3, 6: Differentiation 5 d); B: Histogram of expression of myosin; C: Histogram of expression of myogenin. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图4 各组细胞中肌球蛋白和肌细胞生成素蛋白表达电泳图(A)及直条图(B和C)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histograms (B-C) of expressions of myosin and myogenin proteins in cells in various groups



A: Electrophoregram (Lane 1-3: Control group; Lane 4-6: Antler velvet peptide group; Lane 1, 4: Differentiated for 1 d; Lane 2, 5: Differentiated for 3 d; Lane 3, 6: Differentiated for 5 d); B-D: Histograms; B: NDUFB8; C: MT-CO1; D: SDHA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图5 各组分化细胞中NDUFB8、MT-CO1和SDHA蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 5 Electrophoregram (A) and histograms (B-D) of expressions of NDUFB8, MT-CO1, and SDHA proteins in differentiation cells in various groups

对照组 (0.16 ± 0.02 、 0.53 ± 0.01 和 1.66 ± 0.06)比较,分化1 d鹿茸多肽组细胞线粒体膜电位(0.18 ± 0.01)差异无统计学意义($P > 0.05$),分化3和5 d鹿茸多肽组细胞线粒体膜电位(0.63 ± 0.06 和 2.13 ± 0.11)均明显升高($P < 0.05$)。见图7。

2.7 各组细胞葡萄糖摄取量、乳酸水平和ATP水平与分化同期对照组比较,分化1 d鹿茸多肽组

细胞葡萄糖摄取量明显降低($P < 0.01$),分化3 d鹿茸多肽组细胞葡萄糖摄取量差异无统计学意义($P > 0.05$),分化5 d鹿茸多肽组细胞葡萄糖摄取量明显升高($P < 0.05$);分化1、3和5 d鹿茸多肽组细胞乳酸水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);分化1和3 d鹿茸多肽组细胞ATP水平均明显升高($P < 0.05$),分化5 d鹿茸多肽组细胞ATP水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图8。

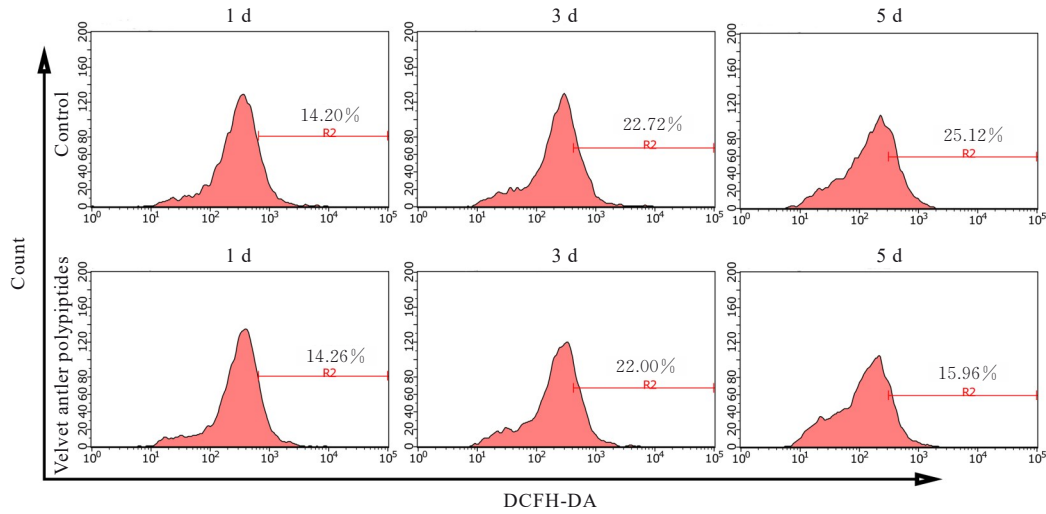


图 6 DCFH-DA 荧光探针法检测各组分化细胞中 ROS 水平

Fig. 6 Levels of ROS in differentiation cells in various groups detected by DCFH-DA fluorescence probe assay

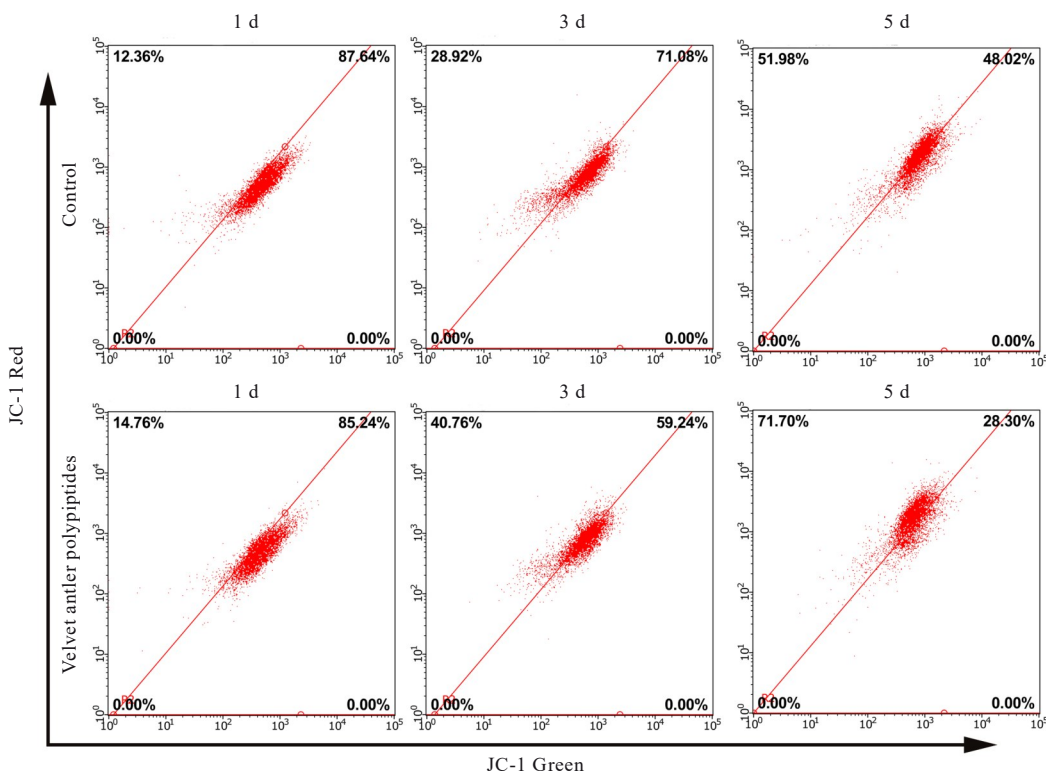


图 7 JC-1 试剂盒检测各组分化细胞中线粒体膜电位

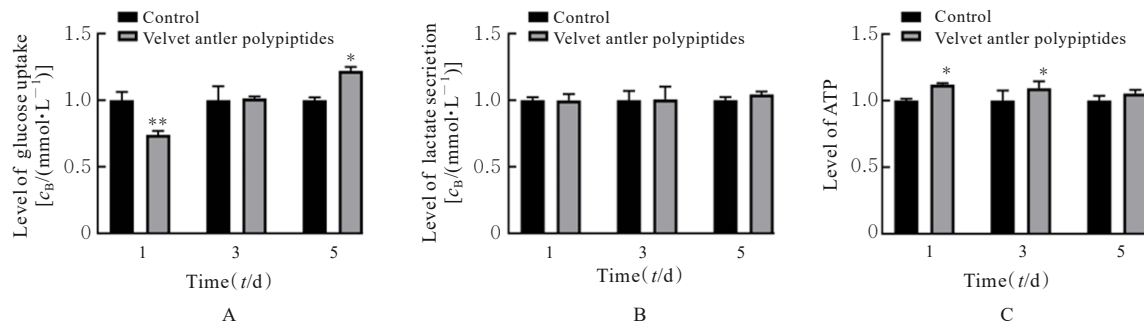
Fig. 7 Mitochondrial membrane potentials in differentiation cells in various groups detected by JC-1 kit

3 讨论

随着人口老龄化加速, 肌少症、心血管病和肿瘤等慢性疾病发病率也明显升高^[1, 3]。与衰老相关的肌少症是人类最常见的肌肉萎缩类型, 研究^[10]显示: 线粒体功能障碍导致的能量代谢异常和 ROS 产生增加是导致衰老相关肌少症发病的主

要机制之一。研究^[8, 11-12]显示: 鹿茸多肽具有抗氧化、抗衰老和抗炎等广泛作用。本研究结果显示: 与对照组比较, 当鹿茸多肽作用浓度 $>60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 能够明显促进 C2C12 成肌细胞增殖, 提示鹿茸多肽能够明显增强 C2C12 成肌细胞活力。

成熟的骨骼肌细胞是一种由细胞融合形成的合胞体, 在成肌细胞分化过程中, 最关键的步骤是成



A: Glucose uptake; B: Lactate secretion; C: ATP level. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图8 各组分化细胞中葡萄糖摄取量、乳酸和ATP水平

Fig. 8 Levels of ATP, glucose uptakes, and lactate secretion in differentiation cells in various groups

肌细胞相互融合,形成多核肌管细胞^[15],伴随着分化标志物肌球蛋白和肌细胞生成素蛋白表达水平升高^[16]。本研究结果显示:与同期对照组比较,鹿茸多肽处理3和5 d多核肌管细胞数量及细胞融合指数明显降低,提示鹿茸多肽能够抑制C2C12成肌细胞的分化;与同期对照组比较,肌球蛋白和肌细胞生成素蛋白表达水平明显降低,提示鹿茸多肽通过降低C2C12成肌细胞分化标志物的表达抑制C2C12成肌细胞的分化。

既往研究^[17-18]表明:在C2C12成肌细胞分化过程中线粒体生物合成明显增加,线粒体数量明显高于未分化的成肌细胞,氧化磷酸化效率明显大于未分化的成肌细胞。而与年轻肌肉组织比较,衰老肌肉组织中线粒体数量明显减少,氧化磷酸化效率降低,ROS水平升高。细胞内ROS水平是由ROS产生和清除双重因素决定的,ROS作为氧化磷酸化的副产物,其生成量是由氧化磷酸化效率决定的;而细胞主要通过SOD和CAT等抗氧化酶清除ROS^[10]。ROS水平升高被认为是导致细胞衰老或损伤的关键因素之一^[20]。既往研究^[12, 21]主要通过靶向清除ROS抑制细胞衰老或逆转细胞损伤,但未能从根本上解决线粒体功能异常导致的ROS水平升高。研究^[9]显示:鹿茸多肽主要通过提高细胞内抗氧化酶的表达和活性,降低ROS水平来减缓或者在一定程度上逆转细胞衰老。因此,改善线粒体功能,提高氧化磷酸化效率可能通过促进能量生成和降低ROS生成双向作用减缓细胞衰老或逆转细胞损伤。本研究结果显示:与同期对照组比较,鹿茸多肽能够明显降低C2C12成肌细胞分化过程中ROS的产生,提高线粒体膜电位。线粒体膜电位不仅为线粒体ATP产生所必需的势能,同时也为细胞核DNA编码线粒体蛋白的输入提供势

能。膜电位的升高通过促进胞核DNA编码的氧化磷酸化复合体亚基进入线粒体与线粒体DNA编码氧化磷酸化复合体亚基的组装,提高氧化磷酸化效率^[22-23]。ROS水平降低和线粒体膜电位升高提示鹿茸多肽可能通过提高线粒体氧化磷酸化功能抑制C2C12成肌细胞分化。研究^[13-14]显示:糖酵解和氧化磷酸化是细胞利用葡萄糖产生能量的最为关键的2条途径,且氧化磷酸化产生能量的效率显著高于糖酵解。糖酵解途径的终产物是乳酸,由细胞分泌至培养液上清中。本研究结果显示:鹿茸多肽组细胞氧化磷酸化复合体亚基NDUFB8、SDHA和MT-CO1蛋白的表达水平明显低于同期对照组,提示鹿茸多肽处理后C2C12成肌细胞分化过程中氧化磷酸化复合体数量明显减少。本研究中乳酸水平未出现改变,ATP水平升高,提示鹿茸多肽处理后,分化的成肌细胞利用相对较少的氧化磷酸化复合体产生更多的ATP,鹿茸多肽通过提高氧化磷酸化效率,抑制C2C12成肌细胞分化。

综上所述,鹿茸多肽对C2C12成肌细胞分化具有抑制作用,其机制可能与鹿茸多肽降低线粒体氧化磷酸化复合体亚基表达,提高线粒体氧化磷酸化效率有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王博参与研究选题、实验操作、数据收集和整理、统计学分析及论文撰写,林喆参与研究选题、数据收集和整理、论文撰写及校对。

[参考文献]

[1] SANDRI M. Autophagy in skeletal muscle [J]. FEBS

- Lett, 2010, 584(7): 1411-1416.
- [2] MURGIA M, TONIOLO L, NAGARAJ N, et al. Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging[J]. Cell Rep, 2017, 19(11): 2396-2409.
- [3] LARSSON L, DEGENS H, LI M S, et al. Sarcopenia: aging-related loss of muscle mass and function[J]. Physiol Rev, 2019, 99(1): 427-511.
- [4] WIEDMER P, JUNG T, CASTRO J P, et al. Sarcopenia-Molecular mechanisms and open questions[J]. Ageing Res Rev, 2021, 65: 101200.
- [5] SUN H Y, SHEN L Y, ZHANG P, et al. Inhibition of high-temperature requirement protein A2 protease activity represses myogenic differentiation *via* UP Rmt[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11761.
- [6] WONG C Y, AL-SALAMI H, DASS C R. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage[J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(12): 1667-1693.
- [7] CHEN J C, HSIANG C Y, LIN Y C, et al. Deer antler extract improves fatigue effect through altering the expression of genes related to muscle strength in skeletal muscle of mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 540580.
- [8] LIU X R, YANG Q, LI H, et al. The anti-aging effect of velvet antler polypeptide is dependent on modulation of the gut microbiota and regulation of the PPAR α /APOE4 pathway[J]. J Integr Neurosci, 2021, 20(3): 573-583.
- [9] JEON H, LEE K, KIM Y T, et al. Effect of HY7602 fermented Deer antler on physical fatigue and antioxidant activity in mice[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(6): 3318.
- [10] AFFOURTIT C, CARRÉ J E. Mitochondrial involvement in sarcopenia[J]. Acta Physiol (Oxf), 2024, 240(3): e14107.
- [11] WU Q, LI Y T, YE R, et al. Velvet antler polypeptide (VAP) protects against cerebral ischemic injury through NF- κ B signaling pathway *in vitro*[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2024, 33(5): 107666.
- [12] ZHU W H, WANG H Y, ZHANG W, et al. Protective effects and plausible mechanisms of antler-velvet polypeptide against hydrogen peroxide induced injury in human umbilical vein endothelial cells[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(5): 610-619.
- [13] HARGREAVES M, SPRIET L L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise [J]. Nat Metab, 2020, 2(9): 817-828.
- [14] RIGOLET M, BOUCHEZ C L, PAUMARD P, et al. Cell energy metabolism: an update [J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2020, 1861(11): 148276.
- [15] BROOKS S V, GUZMAN S D, RUIZ L P. Skeletal muscle structure, physiology, and function [J]. Handb Clin Neurol, 2023, 195: 3-16.
- [16] DUMONT N A, FLORIAN BENTZINGER C, SINCENNES M C, et al. Satellite cells and skeletal muscle regeneration[J]. Compr Physiol, 2015, 5(3): 1027-1059.
- [17] SANDRA CHOCRON E, MUNKÁCSY E, PICKERING A M. Cause or casualty: The role of mitochondrial DNA in aging and age-associated disease[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(2): 285-297.
- [18] CHABI B, LJUBICIC V, MENZIES K J, et al. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle[J]. Aging Cell, 2008, 7(1): 2-12.
- [19] LENNICKE C, COCHEMÉ H M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function[J]. Mol Cell, 2021, 81(18): 3691-3707.
- [20] HAJAM Y A, RANI R, GANIE S Y, et al. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives [J]. Cells, 2022, 11(3): 552.
- [21] MAO R Q, DU D L, ZHU X D, et al. Velvet antler polypeptide combined with calcium phosphate coating to protect peripheral nerve cells from oxidative stress[J]. J Mol Histol, 2022, 53(6): 915-923.
- [22] MAITY S, CHAKRABARTI O. Mitochondrial protein import as a quality control sensor[J]. Biol Cell, 2021, 113(9): 375-400.
- [23] WIEDEMANN N, PFANNER N. Mitochondrial machineries for protein import and assembly [J]. Annu Rev Biochem, 2017, 86: 685-714.