



设计题目： Rapamycin 对 C2C12 肌细胞

活性影响分析

学院： 生物与环境工程学院

专业： 生物制药

学生姓名： 胥曼格

班级： 制药1班 学号 B20150504112

指导教师姓名： 张建社 职称 教授

最终评定成绩 _____

长沙学院教务处

二〇一九年六月

长沙学院本科生毕业论文

Rapamycin 对 C2C12 肌细胞活性影响分析

学 院: 生物与环境工程学院

专 业: 生物制药

学 号: B20150504112

学 生 姓 名: 胥曼格

指 导 教 师: 张建社 教 授

2019 年 6 月



摘要

本课题实验研究采用常规细胞培养技术在实验室条件下培养 C2C12 肌细胞，使用倒置显微镜和 DAPI 荧光染色法观察培养不同时间的 C2C12 细胞生长情况，继而采用不同浓度 Rapamycin 处理 C2C12 细胞，并采用 MTT 比色法分析经 Rapamycin 处理 C2C12 肌细胞生长活性状况，揭示 Rapamycin 处理肌细胞产生的影响，为针对不同肿瘤设计的雷帕霉素抑制剂联合用药的治疗方案提供实验依据。获得的使用结果如下：抑制剂浓度为 0.01 nM 时，OD 值最高（1.042 A），生存率最高（79.23%），死亡率最低（19.42%），抑制率最低（20.77%）；抑制剂浓度为 1 nM 时，OD 值最低（0.174 A），生存率最低（8.07%），死亡率最高（85.49%），抑制率最高（91.93%）。随着 Rapamycin 抑制剂浓度的增高，实验组细胞的 OD 值显著下降，细胞存活率明显下降，死亡率明显上升，抑制率增大。表明 Rapamycin 抑制剂对 C2C12 细胞活性有抑制作用，且抑制剂浓度的升高，对 C2C12 细胞的生长抑制作用呈现明显上升的趋势。

关键词：Rapamycin 抑制剂，C2C12 肌细胞，DAPI 染色，MTT



ABSTRACT

This topic used conventional cell culture techniques to grow C2C12 muscle cells under laboratory conditions, used inverted microscope and DAPI fluorescence staining to observe the growth of C2C12 cells at different times, and then treated C2C12 cells with different concentrations of Rapamycin. The mTT color ological method analyzed the growth activity of C2C12 muscle cells treated by Rapamycin, revealed the effect of Rapamycin's processing of muscle cells, and provided experimental basis for the treatment of rapamycin inhibitors designed for different tumors. The results were as follows: the highest OD value (1.042 A), the highest survival rate (79.23%), the lowest mortality rate (19.42%), the lowest inhibition rate (20.77%) at the inhibitor concentration of 0.01 nM, and the lowest OD value (0.174 A) at the inhibitor concentration of 1 nM, the lowest survival rate (8.07%), with the highest mortality rate (85.49%) and the highest rate of inhibition (91.93%). With the increase of Rapamycin inhibitor concentration, the OD value of the experimental group decreased significantly, the cell survival rate decreased significantly, the mortality rate increased significantly, and the inhibition rate increased. It is shown that Rapamycin inhibitors have inhibition effect on C2C12 cell activity, and the concentration of inhibitors increases, and the growth inhibition effect of C2C12 cells shows a significant upward trend.

Keywords:Rapamycin inhibitor, C2C12 muscle cells, DAPI staining, MTT



目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
第 1 章 前言	1
1.1 雷帕霉素简介	1
1.2 雷帕霉素的作用机制及作用途径	2
1.3 雷帕霉素对免疫效应细胞的作用	2
1.3.1 对 T 细胞激活途径及增殖的作用	2
1.3.2 对非 T 细胞及体液免疫的作用	2
1.4 雷帕霉素的用药方法及毒副作用	3
1.5 雷帕霉素的发展	3
1.6 论文研究的主要目的与意义	3
第 2 章 材料与方法	4
2.1 实验材料	4
2.1.1 实验细胞	4
2.1.2 实验试剂	4
2.1.3 实验仪器	5
2.1.4 配制试剂	6
2.2 细胞培养方法	6
2.2.1 细胞传代	6
2.2.2 细胞复苏	7
2.2.3 细胞冻存	7
2.3 Rapamycin 抑制剂处理细胞	8
2.3.1 雷帕霉素抑制剂浓度梯度设置与配制	8
2.3.2 雷帕霉素抑制剂处理细胞	9
2.4 DAPI 荧光染色	9
2.5 MTT 试剂盒检测细胞活性	10
2.6 实验操作注意事项	11
第 3 章 结果与分析	12
3.1 细胞培养时间与生长速率分析	12
3.1.1 观察不同时期的细胞形态	12
3.1.2 DAPI 荧光染色观察细胞活性	13
3.2 筛选最优雷帕霉素抑制剂浓度	14
3.2.1 倒置显微镜下观察抑制剂对细胞生长的影响	14



3.2.2 DAPI 荧光染色观察细胞活性	15
3.3 MTT 法检测细胞活性	16
3.3.1 Rapamycin 对细胞活性影响作用趋势	17
3.3.2 Rapamycin 对细胞的抑制率分析	17
结 论	19
参考文献	20
致 谢	22



第1章 前言

1.1 雷帕霉素简介

雷帕霉素（Rapamycin, RAPA），又称西罗莫司，是由吸水链霉菌产生的具有抗真菌、抗肿瘤、抗增殖作用的强效免疫抑制剂^[1]。RAPA 是一种白色结晶状物体，熔点为 183-185 °C，可以通过溶化提取法从吸水性链霉菌菌丝体中提取出，自由溶解于甲醇、乙醇、丙醇、氯仿、二氯甲烷、三氯甲烷、二甲基甲酰胺及硫氧化物中，在水中只是部分溶解或不溶解^[2]。Rapa 的分子式为 C₅₆H₈₉NO₁₄，是一种大环内酯物。Rapa 的紫外线最大吸收光谱为 $\lambda_{\text{max}}=288$ 它在 0.1 N 的 NaOH 甲醇溶液中溶解并在加热到 60 °C 时形成黄色的基团^[3]。

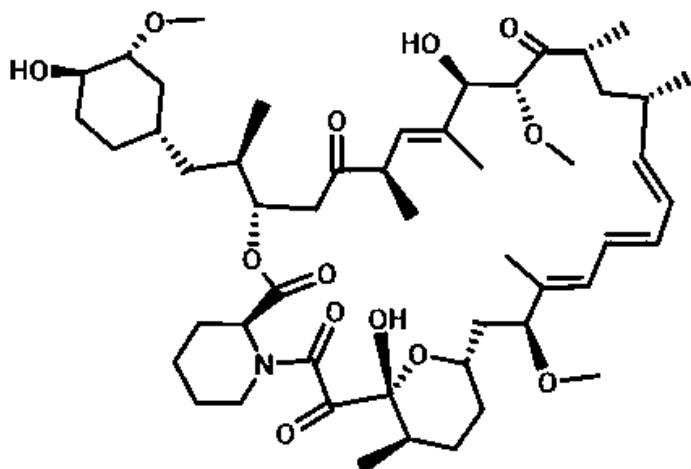


图 1.1 化学结构

1977 年发现其具有免疫抑制作用，1989 年开始把 RAPA 作为治疗器官移植的排斥反应的新药进行试用，从动物实验及临床应用的效果看，是一种疗效好，低毒，无肾毒性的新型免疫抑制剂^[4]。器官移植手术后出现的免疫排斥反应，可以使用雷帕霉素药物进行缓解，因为雷帕霉素药物能够维持机体移植器官免疫能力，尤其是在肾移植方面。雷帕霉素通过不同的细胞因子受体阻断信号传导，阻断 T 淋巴细胞及其他细胞由 G1 期至 S 期的进程，从而发挥免疫抑制效应^[5]。



1.2 雷帕霉素的作用机制及作用途径

由文献可知，Rapamycin 的靶向基因（mTOR），mTOR 在很多生物过程中发挥着至关重要的作用，比如调节细胞代谢生长、增殖生存等。mTOR 控制细胞内 mRNA 翻译，参与膜蛋白转运，核糖体合成，蛋白激酶信号转导和蛋白质降解等一系列生理病理过程^[6]。另有研究发现，mTOR 通路参与肿瘤形成、血管新生、胰岛素抵抗和淋巴细胞激活等过程^[7]。

雷帕霉素通过抑制 T 淋巴细胞的活化，抑制细胞因子的产生与表达，其中通过抑制 IL-2、r-IFN 的产生，IL-2 受体及转移因子受体表达来抑制免疫细胞的功能。作用途径：不仅抑制细胞 G0 期，还抑制 G1 期，从而抑制了细胞因子和生长因子的 DNA 在免疫和非免疫细胞内的合成^[8]。

1.3 雷帕霉素对免疫效应细胞的作用

1.3.1 对 T 细胞激活途径及增殖的作用

雷帕霉素通过抑制胸腺细胞的增殖，引起胸腺的萎缩，而不是导致细胞凋亡。雷帕霉素可以作用于细胞因子（白细胞介素 2 和 4）介导的胸腺细胞的激活与增殖，干扰其在 T 细胞激活后的自分泌环，抑制白介素 2 α 链和 4R 的表达；雷帕霉素对 IL-2 引起的 T 细胞增殖有明显的抑制作用，IL-2 参与调节自然杀伤细胞及 T 细胞的激活^[9]。

1.3.2 对非 T 细胞及体液免疫的作用

Rapamycin 对各种非 T 细胞如巨噬细胞、B 细胞、粒细胞、内皮细胞等的增殖及功能都有一定的影响，也是雷帕霉素免疫抑制的一个重要组成部分^[10]。雷帕霉素可以抑制由白细胞介素 3 诱导的骨髓单核巨噬细胞的增殖，并且可以抑制 IL-1 β 巨噬细胞以及 B 细胞产生免疫球蛋白。同时还可以抑制外源性细胞因子如 IL-2、IL-6 引起的 IgM 产生，还可以抑制细胞毒性抗体 IgG 的产生，而该作用与 RAPA 取消或减轻预致敏动物同种异体移植物的加速排斥反应有关^[11]。雷帕霉素能够减少 GRA 的浸润，是因为它可以抑制移植物产生 IL-8 类似、CTL 依赖的 mRNA 介导的蛋白。Rapamycin 能够抑制内皮细胞增殖，还可以减少血管内皮细胞中由移植排斥反应引起的损伤，并能抑制内皮细胞的增殖。这些作用在 RAPA 抑制加速排斥反应中有着一定的意义^[12]。



1.4 雷帕霉素的用药方法及毒副作用

RAPA 在动物实验中通常通过以下几种途径给予：腹腔内注射、静脉泵入、肌肉注射和鼻饲，对排斥反应的治疗有良好的效果，其毒副作用主要表现在胃肠道^[3]。

1.5 雷帕霉素的发展

雷帕霉素（又名“西罗莫司”）是科学家于 1975 年首次从智利复活节岛的土壤中发现的一种由土壤链霉菌分泌的次生代谢物，其化学结构属于“三烯大环内酯类”化合物^[13]。Rapamycin 于 1977 年被发现具有免疫抑制的功能，1989 年开始被作为新药试用，治疗器官移植引起的排斥反应。2010 年，Rapamycin 作为免疫抑制剂被 FDA（美国食药监局）批准生产。RAPA 在临床使用中表现出的免疫抑制作用十分强大，且副作用少，因此很受全世界各地的器官移植者的喜爱。

根据研究表明，用含有 Rapamycin 的食物投喂患有阿尔茨海默症的老鼠十周后，发现 RAPA 可以缓解 AD 损伤。这是首次证实雷帕霉素能够对动物实验体恢复阿尔茨海默症相应症状的缺陷^[14]。

1.6 论文研究的主要目的与意义

雷帕霉素是一种能够让正常生长增殖的细胞速度减缓、改变其生长规律甚至使其发生凋亡的抑制剂。据报道，它发生作用的具体机理是破坏细胞正常生长增殖过程中重要的信号分子 mTOR 的传递及相关分子的正常作用。与此同时，它还能够使信号通路中能够被磷酸化的分子失去该作用，从而导致所培养的细胞不能按常规生长周期增殖分化。研究表明，雷帕霉素通过抑制 mTOR 的活化，下调 RPS6 的磷酸化表达，阻滞细胞周期于 G1/G0 期，并抑制 Survivin 表达水平，诱导 caspase-3 激活，促进肿瘤细胞凋亡^[15]。

雷帕霉素成为近年来肿瘤化疗研究的热点，在抗肿瘤方面有巨大作用，可以阻滞肿瘤细胞周期于 G1 期，抑制肿瘤的转移。RAPA 作为抗肿瘤药物已在临幊上用于治疗晚期肾细胞癌和黑素瘤等^[16]。但实验研究与临幊试验均发现，RAPA 针对不同肿瘤的抑瘤效果不尽相同^[17]，其机制尚不明确。

本课题实验研究拟采用常规细胞培养技术在实验室条件下培养 C2C12 肌细胞，继而采用不同浓度 Rapamycin 处理 C2C12 肌细胞，并采用 MTT 技术方法分析经 Rapamycin 处理 C2C12 肌细胞分裂和活性状况，揭示 Rapamycin 处理肌细胞产生的影响，为肌肉发生分化提供理论基础。研究雷帕霉素对 C2C12 肌细胞活性及基因表达的影响和可能的机制，为针对不同肿瘤设计雷帕霉素联合用药的治疗方案提供实验依据^[18]。



第2章 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验细胞

C2C12 细胞是小鼠骨骼肌的成肌细胞系,最早是在 1977 年由 Yaffe 和 Saxel 从 C3H 小鼠肌细胞体外培养中分离获得^[19]。使用倒置显微镜观察,可以看到: C2C12 细胞经胰酶消化后,刚刚加入胎牛血清培养基转入培养瓶培养时,细胞形态呈现为圆形且均一,大部分在培养基表面悬浮,折光性强; 48 h 后细胞呈梭形,单核,核仁明显,细胞呈贴壁生长,融合度 80%~95%, 折光性减弱^[20]。

本次实验所用 C2C12 细胞购于丰晖生物公司。传代比例为细胞 80-90% 汇合时 1:2~1:4 传代,冻存条件为 70%基础培养基+20% FBS+10% DMSO, 培养条件为 90% DMEM-H, 10%胎牛血清(优质), 100 U/ml, 37 °C、5%CO₂。

2.1.2 实验试剂

实验所用试剂溶液如表 2.1。

表 2.1 试剂溶液

试剂名称	生产厂家
DMEM (1X) 培养基	ThermoFisher Scientific
FBS 胎牛血清	杭州天杭生物科技有限公司
PSG1 单克隆抗体	ThermoFisher Scientific
DMSO 二甲基亚砜	Solarbio Science
Rapamycin (0.5 mg) 抑制剂	MedChemExpress USA
DPBS 磷酸盐缓冲液	ThermoFisher Scientific
PBS 缓冲液	ThermoFisher Scientific
DAPI	ThermoFisher Scientific
0.25%胰酶	ThermoFisher Scientific
MTT 试剂盒	Solarbio Science



2.1.3 实验仪器

实验所用试剂溶液如表 2.2。

表 2.2 仪器设备

仪器名称	生产厂家
BCD-215SEBB 型冰箱	青岛海尔股份有限公司
TTSE320V 超低温冰箱	ThermoFisher Scientific
BHC-130A11/B ₂ 型生物洁净安全柜	苏州净化设备有限公司
启天 B4550-B031 微型计算机	联想北京有限公司
DM11/MC170HD 倒置生物显微镜	Leica Microsystems
4111 水套式二氧化碳培养箱	ThermoFisher Scientific
TDL-50B 离心机	湖南星科科学仪器有限公司
A360 分光光度仪	AOE Instruments
YDS-35 液氮罐	Golden phoenix
移液枪	Eppendorf
酶标板	广州浩特生物过滤股份有限公司
T25 Flask	CORNING
12 孔板	CORNING
96 孔板	CORNING
15 mL 离心管	CORNING
50 mL 离心管	CORNING
5 mL 吸管	ThermoFisher Scientific
10 mL 吸管	ThermoFisher Scientific
冻存管	ThermoFisher Scientific



2.1.4 配制试剂

实验所用试剂溶液如表 2.3。

表 2.3 试剂配方

名称	配方
全培养基	90% DMEM+10% 进口胎牛血清+1% 双抗（青霉素、链霉素）
国产培养基	90% DMEM+10% 国产胎牛血清
冻存液	70% 全培养基+20% 进口胎牛血清+10%DMSO
DAPI 溶液	10 μL DAPI+10 mL PBS
双抗溶液	10 万 U 青霉素+100 mg 链霉素+10 mL 无菌 PBS

2.2 细胞培养方法

2.2.1 细胞传代

在细胞培养过程中，细胞将不断分裂，随着细胞数量的增多，当细胞与细胞之间相互接触的时候，细胞之间将会发生接触性抑制，此时，细胞将会减慢生长速率，甚至停止生长；另一方面，由于细胞数目过多，细胞之间将会争夺营养物质，致使有些细胞因营养不足而死亡，同时，细胞代谢物不断积累，将不利于细胞的生长，甚至发生中毒。当细胞达到合适密度时，进行传代培养。

细胞传代实验步骤如表 2.4。

表 2.4 细胞传代实验步骤

步骤	操作
1	弃去原培养基上清，用 PBS 缓冲液清洗 1-2 次
2	加入 1.5 mL 0.25% 胰酶消化，使胰酶覆盖整个培养瓶
3	1-2 min 后，在显微镜下观察细胞，是否皱缩成圆粒并脱落，若大部分细胞回缩且有少量细胞脱落，轻轻吹打几下确认消化完成；若细胞还是贴壁，放回培养箱继续消化至可以轻轻吹打为止
4	加入 3ml 国产培养基稀释中和，终止消化，轻轻吹打使细胞脱落
5	将细胞悬液转入 15 mL 离心管，300 g 左右条件下离心 5 min，弃上清
6	用新鲜的全培养基重悬后转入 T25 培养瓶 (5 mL/瓶)
7	培养瓶放入 37°C、5%CO2 环境培养箱培养



2.2.2 细胞复苏

细胞复苏即将液氮中冻存的细胞解冻，重新培养，使其恢复生长活性的过程。细胞复苏之后能够重新生长，是因为当温度变为常温状态的时候，细胞还保持着正常的形态结构，这时细胞便可重新开始生理生化活动。细胞复苏要求“速融”，如果融化速度太慢，那么解冻过程中进入细胞的水分会在细胞中形成结晶，将会影响细胞生存。

细胞复苏实验步骤如表 2.5。

表 2.5 细胞复苏实验步骤

步骤	操作
1	将冻存管放入 37℃水浴锅中快速摇晃溶化，时间 1 min 左右
2	转入 15 mL 离心管中，加入 8 mL 全培养基混匀
3	在 300 g 左右条件下离心 5 min，弃上清
4	加入 10ml 全培养基吹匀重悬将细胞悬液分装至培养瓶中 (5ml/瓶)
5	培养瓶放入 37℃、5%CO2 环境培养箱培养

2.2.3 细胞冻存

细胞冻存即将细胞置于极低温 (-196 °C液氮) 环境中保存，在低温环境中，细胞将暂时停止生长，因此细胞冻存方法可以很好地保存细胞的特性，如果需要进行实验，可以使细胞复苏再用于实验。一般情况下，冻存细胞需要“慢冻速溶”，来保证细胞的存活率。在冷冻开始时，先将准备冻存的细胞放入 4 °C环境中 10 min，随后在放进-20 °C 环境 30 min，再放进-80 °C环境中 24 h，最后再直接存入液氮内 (-196 °C)。

细胞实验冻存步骤如表 2.6。

表 2.6 细胞冻存实验步骤

步骤	操作
1	弃去原培养基上清，用 PBS 缓冲液清洗 1-2 次
2	加入 1.5 mL 0.25% 胰酶消化，使胰酶覆盖整个培养瓶
3	1-2 min 后，在显微镜下观察细胞，是否皱缩成圆粒并脱落，若大部分细胞回缩且有少量细胞脱落，轻轻吹打几下确认消化完成；若细胞还是贴壁，放回培养箱继续消化至可以轻轻吹打为止
4	加入 3 mL 国产培养基稀释中和，终止消化，轻轻吹打使细胞脱落
5	将细胞悬液转入 15 mL 离心管，300 g 左右条件下离心 5 min，弃上清
6	加入 1.5 mL 冻存液使细胞重悬后转入 2 mL 冻存管
7	将准备冻存的细胞放入 4 °C环境中 10 min，随后在放进-20 °C环境 30 min，再放进-80 °C环境中 24 h，最后再直接存入液氮内 (-196 °C)



2.3 Rapamycin 抑制剂处理细胞

2.3.1 雷帕霉素抑制剂浓度梯度设置与配制

参考 Rapamycin 作用于 HEK293 细胞 mTOR 靶点时的 IC₅₀ 值 0.1 nM, 浓度梯度设为: 0.01 nM、0.05 nM、0.1 nM、0.5 nM、1 nM。

2.3.1.1 配制雷帕霉素抑制剂储备液

根据表 2.7 所示的雷帕霉素的溶解比例和表 2.8 所示的雷帕霉素配方, 配制雷帕霉素抑制剂储备液。

表 2.7 Rapamycin 溶解比例

	0.5 mg	1 mg	5 mg	10 mg
1 mM	0.5470 mL	1.0939 mL	5.4694 mL	10.9388 mL
5 mM	0.1094 mL	0.2188 mL	1.0939 mL	2.1878 mL
10 mM	0.0547 mL	0.1094 mL	0.5469 mL	1.0939 mL

注: 溶剂为 DMSO。

表 2.8 Rapamycin 储备液配方

浓度	配方
10 mM	0.5 mg Rapamycin 粉末 + 0.0547 mL DMSO → 0.0547 mL (10 mM Rapamycin 抑制剂母液)
10 μM	1 μL (10 mM Rapamycin 抑制剂母液) + 999 μL 全培养基 → 1mL (10 μM Rapamycin 抑制剂培养基)
10 nM	1 μL (10 μM Rapamycin 抑制剂母液) + 999 μL 全培养基 → 1mL (10 nM Rapamycin 抑制剂培养基)
1 nM	1 mL (10 nM Rapamycin 抑制剂母液) + 9 mL 全培养基 → 10mL (10 nM Rapamycin 抑制剂培养基)



2.3.1.2 配制雷帕霉素抑制剂培养基

根据表 2.9，配制雷帕霉素抑制剂培养基。

表 2.9 Rapamycin 抑制剂培养基比例

浓度	0 nM	0.01 nM	0.05 nM	0.1 nM	0.2 nM	0.5 nM	1 nM
雷帕霉素	0 mL	0.01 mL	0.05 mL	0.1 mL	0.2 mL	0.5 mL	1 mL
全培养基	1 mL	0.99 mL	0.95 mL	0.9 mL	0.8 mL	0.5 mL	0 mL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

注：雷帕霉素抑制剂浓度为 1nM。

2.3.2 雷帕霉素抑制剂处理细胞

雷帕霉素抑制剂处理细胞的实验操作步骤如表 2.10 所示。

表 2.10 抑制剂处理细胞实验步骤

步骤	操作
1	弃去原培养基上清，用 PBS 缓冲液清洗 1-2 次
2	加入 1.5 mL 0.25% 胰酶消化，使胰酶覆盖整个培养瓶
3	1-2 min 后，在显微镜下观察细胞，是否皱缩成圆粒并脱落，若大部分细胞回缩且有少量细胞脱落，轻轻吹打几下确认消化完成；若细胞还是贴壁，放回培养箱继续消化至可以轻轻吹打为止
4	加入 3 mL 国产培养基稀释中和，终止消化，轻轻吹打使细胞脱落
5	将细胞悬液转入 15 mL 离心管，300 g 左右条件下离心 5 min，弃上清
6	加入 12 mL 全培养基重悬，每孔 1 mL 转入 12 孔板中培养 24 h
7	吸去原培养基，按表 2.9 加入各组分，每孔最终体积为 1 mL
8	第 0-2-4-6-8-12-24-36-48 h 显微镜下观察细胞活性情况，记录拍照

2.4 DAPI 荧光染色

DAPI：汉语化学名称为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole)。DAPI 是一种荧光染料，能够与双链 DNA 分子特异性结合，发挥增强荧光的作用，同时它还可以快速敏感检测 DNA。

DAPI 荧光染色实验操作步骤如表 2.11 所示。



表 2.11 DAPI 荧光染色实验步骤

步骤	操作
1	使用 4% 浓度的多聚甲醛 (500–1000 μL /孔) 固定 15–30 min
2	再用 PBS (1 mL/孔) 洗涤 2–3 次 (每次 20–30 s)
3	DAPI 溶液 (100 μL /孔) 室温染色 5 min
4	使用 PBS 洗涤 2 次, 每次 5 min
5	使用宽场成像高内涵系统检测 DAPI 荧光染色效果, 于 100 放大倍数下对每个视野进行计数观察

2.5 MTT 试剂盒检测细胞活性

MTT：汉语化学名为 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐，是一种黄色的染料。它能沉积在活细胞中，并且被线粒体中的琥珀酸脱氢酶被氧化为甲臜（Formazan，不溶于水的蓝紫色结晶），使用 DMSO 溶解甲臜，在 490 nm 处用酶标仪测得 OD 值，间接判断活细胞数量，从而检测细胞活性。

1. 设置实验浓度梯度（每组设定三个复孔）：

- (1) 空白组（调零）：全培养基
- (2) 标准组：全培养基+C2C12 细胞
- (3) 实验组：全培养基+C2C12 细胞+Rapamycin 抑制剂
(0.01 nM、0.05 nM、0.1 nM、0.2 nM、0.5 nM、1 nM)
- (4) 对照组：全培养基+C2C12 细胞+DMSO
(0.01 nM、0.05 nM、0.1 nM、0.2 nM、0.5 nM、1 nM)

2. 收集对数期细胞（96 孔板）：

- (1) 将原培养基上清吸掉（如果培养基中死细胞有点多，可以用 PBS 洗 1-2 次）；
 - (2) 加入 1.5 mL 0.25% 胰酶消化，轻轻晃动培养瓶，使胰酶覆盖整个底面；
 - (3) 大约消化 1-2 min 后，可以在显微镜下观察细胞消化情况，是否皱缩成圆粒并脱落，若大部分细胞回缩且有少量细胞脱落，轻轻吹打几下确认消化完成；若细胞还是贴壁，放回培养箱继续消化至可以轻轻吹打为止；
 - (4) 随后加入 3ml 国产培养基，轻轻吹打，稀释中和胰酶，终止消化；
 - (5) 细胞悬液离心 (300 g、5 min)，吸去上清（动作要轻，避免吸走沉淀）；
 - (6) 沉淀重悬 (180 μL /孔)；
 - (7) 置 37 °C、5%CO₂ 环境培养箱培养使细胞贴壁，培养 6-24 h。
3. 吸去上清，按设置好的浓度梯度加入各物质，继续培养 24-48 h。
4. 小心吸去上清，加入 90 μL 新鲜全培养基，再加入 10 μL MTT，继续培养 24 h。



5. 然后吸掉上清，每孔加入 110 μL Formazan 溶解液，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。
6. 在酶联免疫检测仪 490nm 出测量各孔吸光值。
7. 处理数据：以时间为横坐标，吸光度(A)的均数为纵轴绘制成生长曲线。
 - (1) 细胞存活率= $(\text{OD 实验组} - \text{OD 调零组}) / (\text{OD 对照组} - \text{OD 调零组}) \times 100\%$ 。
 - (2) 细胞死亡率= $(\text{OD 对照组} - \text{OD 实验组}) / \text{OD 对照组} \times 100\%$
 - (3) 细胞抑制率= $1 - (\text{OD 实验组} - \text{OD 调零组}) / (\text{OD 对照组} - \text{OD 调零组}) \times 100\%$

2.6 实验操作注意事项

1. 培养细胞的培养基是双抗培养基；
2. 稀释中和胰酶的培养基是国产培养基；
3. 胰酶在使用前颜色不均一，表示酶浓度不均一，需吸打混匀；
4. 冻存液中含 DMSO，有剧毒，使用时要小心（现配现用）；
5. 除双抗外，所有试剂都不能反复冻融；
6. 血清使用前需提前一天放在 4 °C 冰箱化冻；
7. 培养老鼠（哺乳动物）细胞所用的培养瓶的瓶盖不是封闭的（5%CO₂ 环境）；
8. 25 mL 培养瓶一般加 5 mL 培养基（最少量），6 孔板加 2 mL，12 孔板加 1 mL，24 孔板加 0.5 mL，96 孔板加 100 μL ；
9. 吸取不同的试剂需要更换吸管，防止污染；
10. 酒精灯中的酒精要充足（加无水乙醇至瓶颈）；
11. 喷壶中的酒精为 75% 酒精；
12. 开紫外前需将台面喷酒精杀菌消毒（同配培养基前）；
13. 灭菌前补齐吸管、离心管、培养瓶等；
14. 细胞不能太贴近火焰，容易烧死；
15. 手及袖口不能触碰瓶口，容易污染，触碰到了即废弃；
16. 试剂瓶口多灼烧，减少污染，封口；
17. 血清只要吹打就会起泡，离心时会沉降；
18. 细胞离心条件为 300 g (rcf)、5 min，过快过久会使细胞破碎；
19. 重悬后的细胞要尽快分装，否则细胞将贴壁生长（活力好的细胞只需 3 分钟）；
20. 所有试剂在实验完后都要拿出来，并封口；
21. 试验完成后记得清理台面，尤其是废液缸，用酒精喷、擦干净，否则容易染菌；
22. 冻存液要预冷（放在冰盒）；
23. 96 孔板的最外侧一圈不用来做实验，因为容易挥发，一般用 PBS 或无菌水填充。

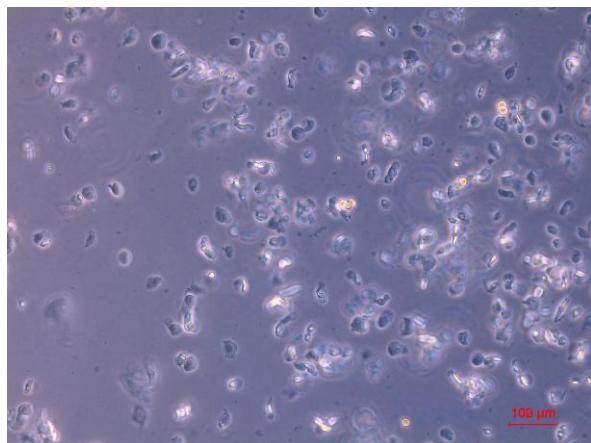


第3章 结果与分析

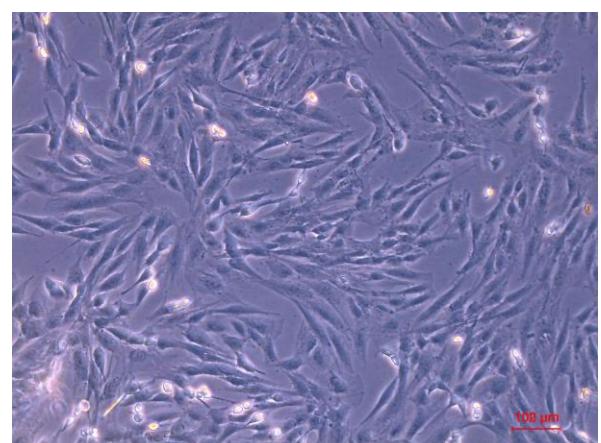
3.1 细胞培养时间与生长速率分析

3.1.1 观察不同时期的细胞形态

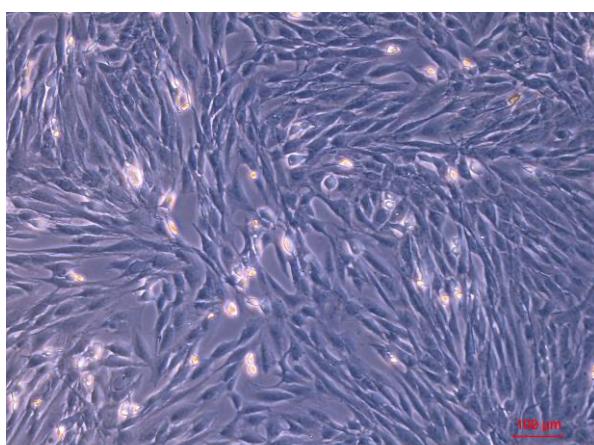
如图 3.1，在倒置显微镜下观察可见：C2C12 细胞刚刚加入胎牛血清培养基转入培养瓶培养时，细胞形态呈现为圆形且均一，大部分在培养基表面悬浮，折光性强；48 h 后细胞体积明显增大、横径变长，开始形成明显的肌管结构，排列有序；72 h 后细胞增殖速度减慢，且出现皱缩的死细胞，单核，核仁明显，细胞呈贴壁生长，融合度 80%~95%，折光性减弱。



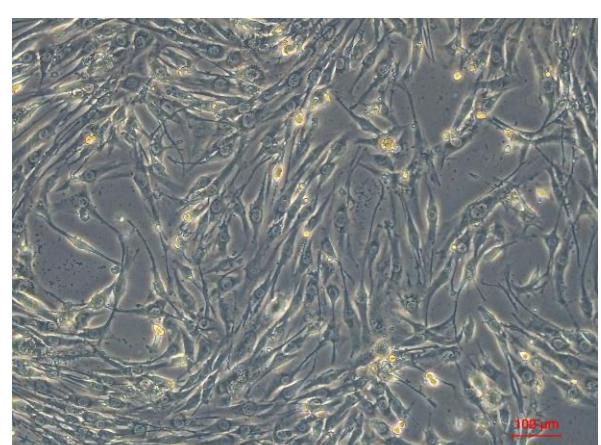
(a) 培养 0 h 时细胞情况



(b) 培养 24 h 时细胞情况



(b) 培养 48 h 时细胞情况



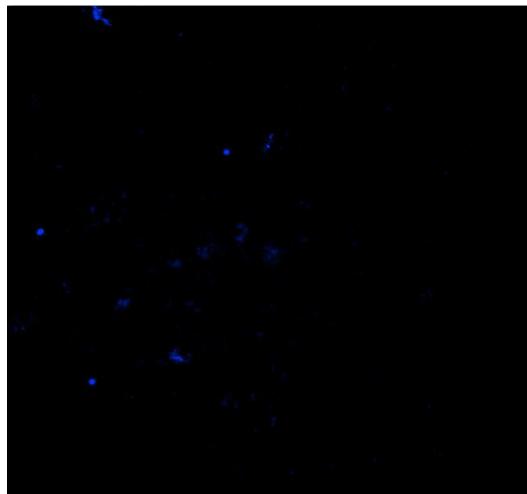
(d) 培养 72 h 时细胞情况

图 3.1 培养不同时间的细胞情况 (100X)

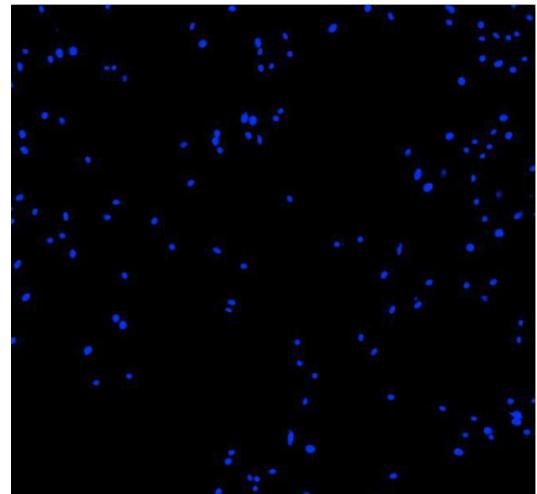


3.1.2 DAPI 荧光染色观察细胞活性

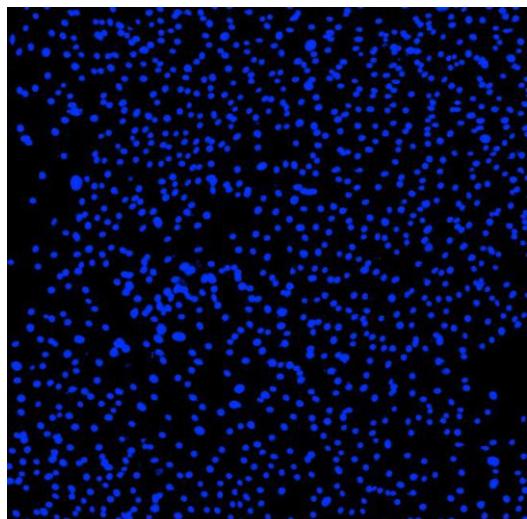
如图 3.2, 使用宽场成像高内涵系统检测 DAPI 荧光染色效果可见: 0 h 时 C2C12 细胞数量较少, 分布不均匀; 24 h 后细胞逐渐增多, 呈指数增长; 48 h 后细胞数量明显增多, 分布均匀, 细胞活性较高; 72 h 后细胞标记率下降, 表示细胞活性有所下降。



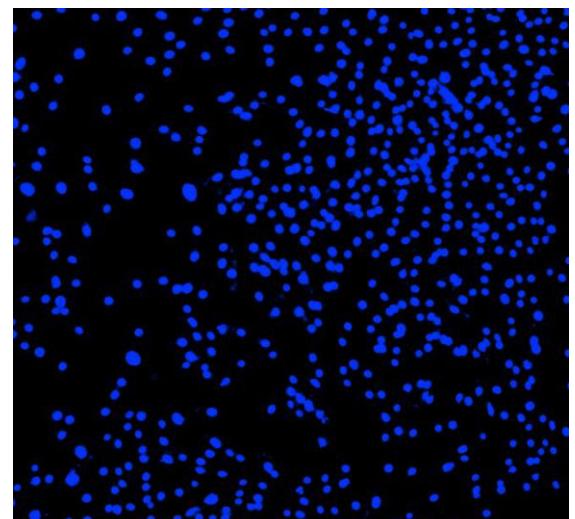
(a) 培养 0 h 时细胞情况



(b) 培养 24 h 时细胞情况



(c) 培养 48 h 时细胞情况



(d) 培养 72 h 时细胞情况

图 3.2 DAPI 荧光染色标记培养不同时间的细胞 (100X)



3.2 筛选最优雷帕霉素抑制剂浓度

3.2.1 倒置显微镜下观察抑制剂对细胞生长的影响

倒置显微镜下观察不同浓度梯度 Rapamycin 抑制剂处理 C2C12 细胞不同时间后的细胞生长情况，分析抑制剂对细胞活性的影响。

3.2.1.1 不同浓度 RAPA 处理细胞 24 h 后细胞生长情况

不同浓度梯度的雷帕霉素抑制剂处理 C2C12 细胞 24 h 后，如图 3.3 所示，细胞生长情况在倒置显微镜下观察可见：随着抑制剂浓度的增加，细胞开始由原来排列规则的梭形渐渐转变成了短粒状，生长速率减缓，细胞活性越来越低，贴壁生长的细胞逐渐减少，悬浮的死亡细胞逐渐增多。

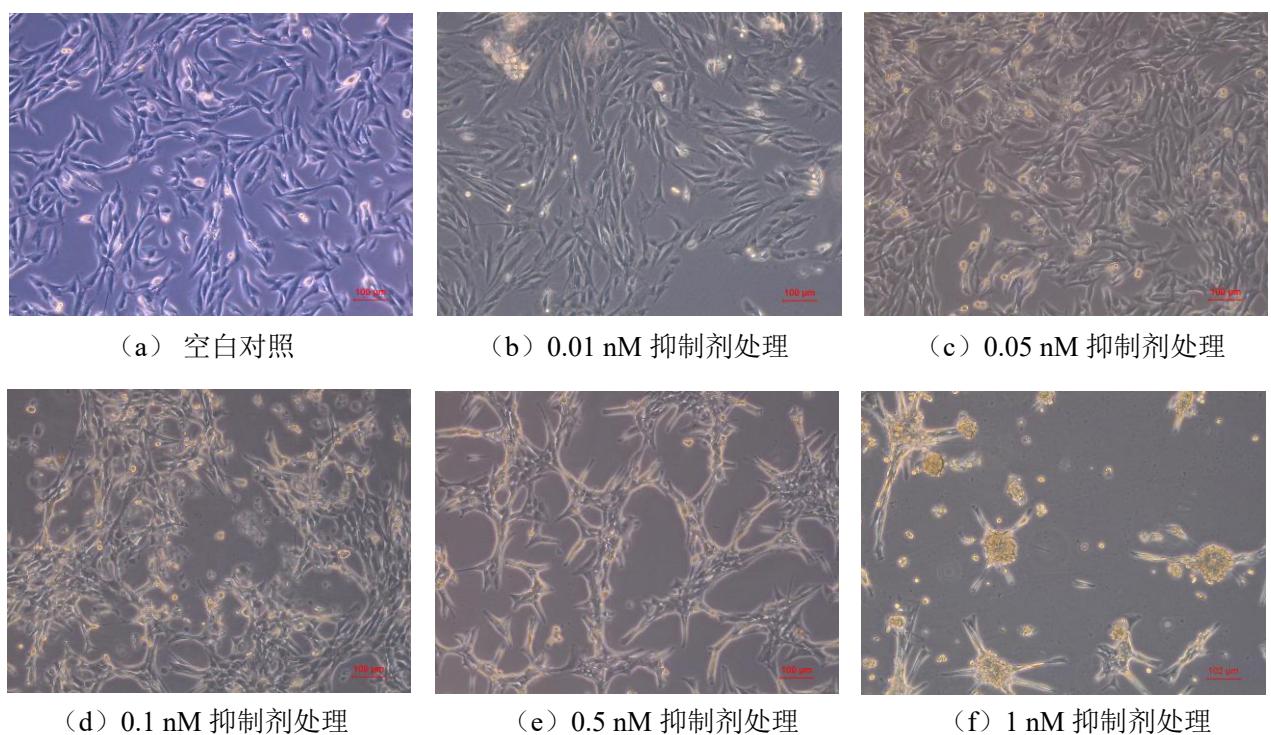


图 3.3 不同浓度 RAPA 处理细胞 24 h 后细胞生长情况 (100X)



3. 2. 1. 2 不同浓度 RAPA 处理细胞 48h 后细胞生长情况

不同浓度梯度的雷帕霉素抑制剂处理 C2C12 细胞 48 h 后, 如图 3.4 所示, 细胞生长情况在倒置显微镜下观察可见: 在同样的培养条件下, 经雷帕霉素抑制剂处理 C2C12 细胞后, 抑制剂浓度越高, 细胞的存活率越低, 死亡率越高; 与 24 h 时的情况对比, 在同一浓度的雷帕霉素抑制剂作用下, 处理时间越长, C2C12 细胞活性越低, 存活率越低, 死亡率越高。

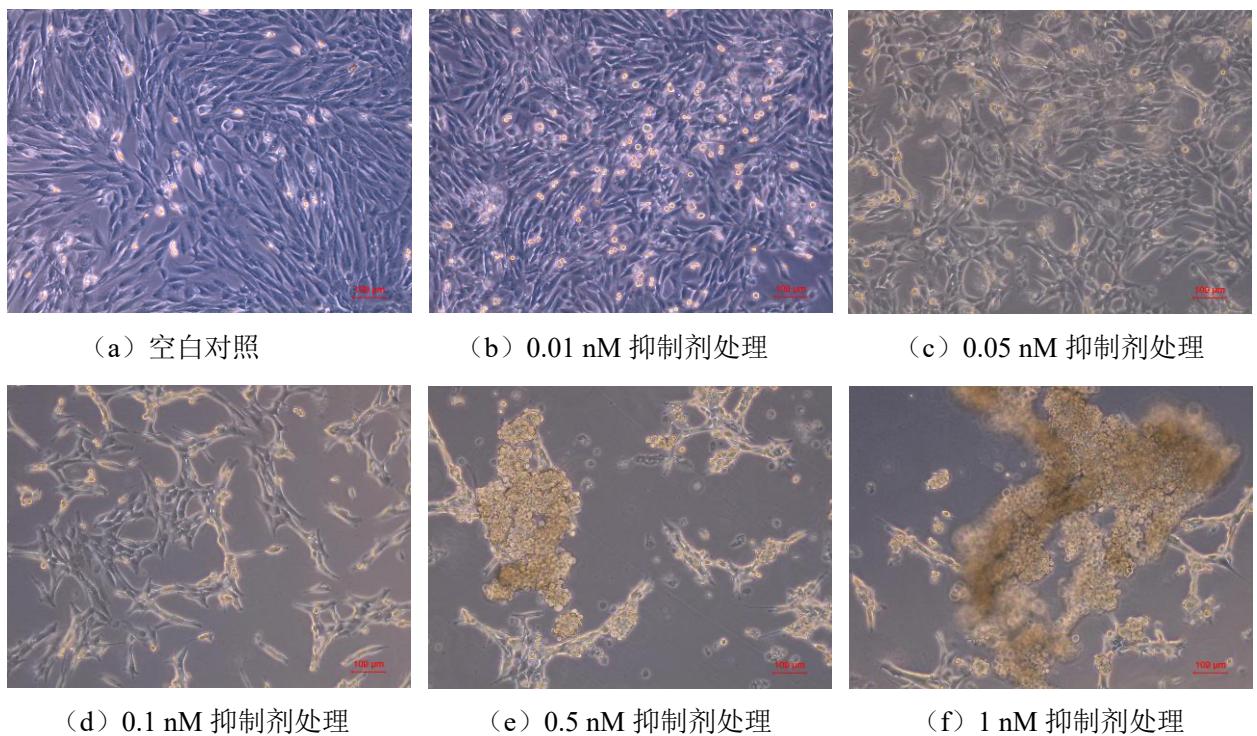


图 3.4 不同浓度 RAPA 处理细胞 48 h 后细胞生长情况 (100X)

3. 2. 2 DAPI 荧光染色观察细胞活性

通过在倒置显微镜下观察不同浓度梯度 Rapamycin 抑制剂处理 C2C12 细胞不同时间后的细胞生长情况, 如图 3.5 所示, 可以看出随着抑制剂浓度的增加, 处理时间的延长, 细胞的活性逐渐降低。使用 DAPI 荧光染色抑制剂处理 48 h 后的细胞, 宽场成像高内涵系统检测 DAPI 荧光染色效果, 观察其活细胞数量, 反映细胞活性情况。观察可见: 空白对照的细胞标记率达到 90% 以上, 随着抑制剂浓度增加, 标记率逐渐降低; 当抑制剂浓度为 0.01 nM 时, 细胞数量有所减少, 细胞活性开始降低; 抑制剂浓度为 0.05 nM 时, 抑制作用增强, 死细胞增多; 浓度达到 0.1 nM 时, 贴壁生长的细胞显著减少, 抑制作用明显; 浓度为 0.5 nM 时, 标记的细胞比之上一浓度明显减少; 当抑制剂浓度为 1 nM



时，抑制作用达到峰值，细胞标记率低至 10%以下，存活率极低。

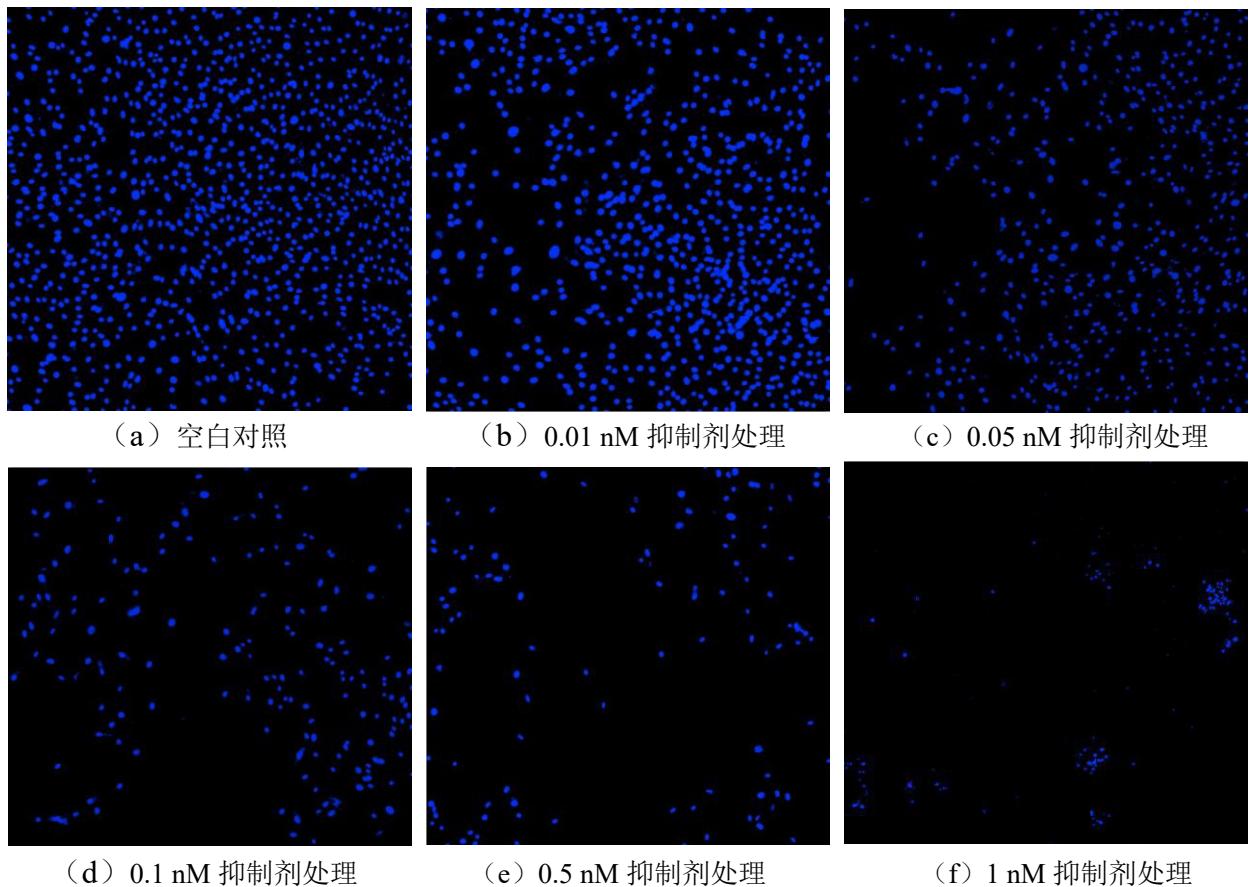


图 3.5 DAPI 荧光染色标记不同浓度抑制剂处理 48 h 后的细胞 (100X)

3.3 MTT 法检测细胞活性

MTT 法使用 96 孔板进行，弃用周围一圈 36 个孔，试验孔分为空白组、标准组、实验组、对照组四个组别。其中空白组的设置为调零，组成为全培养基、MTT、Formazan 溶解液，减少实验误差；标准组的组成为细胞、全培养基、MTT、Formazan 溶解液，排除其他因素干扰；实验组的组成为细胞、雷帕霉素抑制剂、全培养基、MTT、Formazan 溶解液，检测抑制剂对细胞活性的影响；对照组的组成为细胞、DMSO、全培养基、MTT、Formazan 溶解液，排除抑制剂溶解介质对细胞的影响。每组设 3 个复孔。实验组和对照组的 RAPA/DMSO 浓度梯度均为 0.01 nM、0.05 nM、0.1 nM、0.2 nM、0.5 nM、1 nM。抑制剂处理 48 h 后，用酶标仪在 490 nm 处测得 96 孔板各孔的吸光值，计算出各个浓度下的平均 OD 值。调零孔的平均 OD 值为：0.084 A。根据 2.5 所示的公式，求出相应浓度下的 C2C12 细胞的存活率、死亡率和抑制率，详见表 3.1。



表 3.1 MTT 法测得各浓度平均吸光值及比率

抑制剂浓度 (nM)	实验组 平均 OD 值(A)	对照组 平均 OD 值(A)	存活率 (%)	死亡率 (%)	抑制率 (%)
0.01	1.042	1.293	79.23	19.42	20.77
0.05	0.882	1.246	68.63	29.26	31.37
0.10	0.756	1.242	58.00	39.16	42.00
0.20	0.511	1.236	37.09	58.63	62.91
0.50	0.253	1.211	15.00	79.11	85.00
1.00	0.174	1.199	8.07	85.49	91.93

3.3.1 Rapamycin 对细胞活性影响作用趋势

根据表 3.1 可知，随着 Rapamycin 抑制剂浓度的增高，实验组的 OD 值显著下降，C2C12 细胞的存活率明显下降，死亡率明显上升，表示 Rapamycin 抑制剂的浓度越高，贴壁生长的活细胞越少，死亡细胞数目增多，抑制剂的抑制率增大。以雷帕霉素浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘制出 Rapamycin 对细胞活性影响作用趋势图（图 3.6）。如图 3.6 所示，在抑制剂浓度为 0.01 nM 时，OD 值最高，达到 1.042 A；而抑制剂浓度达到 1 nM 时，OD 值最低，仅 0.174 A。当抑制剂浓度从 0.1 nM 变为 0.5 nM 时，OD 值下降速度变快；而抑制剂浓度由 0.5 nM 变为 1 nM 时，OD 值下降速率变得平缓。由此可得，当抑制剂浓度高到某一点时，对细胞的活性影响将会减小。在抑制剂浓度为 0.01-1 nM 之间时，随着雷帕霉素抑制剂浓度的增大，细胞数量逐渐减少，OD 值不断减小。

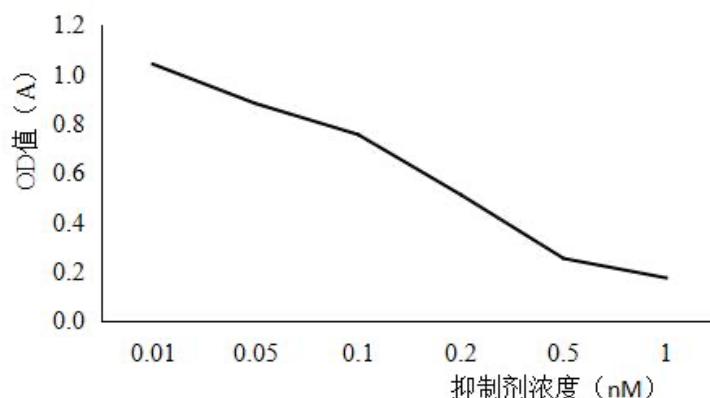


图 3.6 Rapamycin 对细胞活性影响作用趋势

3.3.2 Rapamycin 对细胞的抑制率分析

根据表 3.1 可知，随着 Rapamycin 抑制剂浓度的增高，实验组的抑制率显著上升，OD 值明显下降，表示 Rapamycin 抑制剂的浓度越高，活细胞减少，死细胞增多，抑制



剂作用越强。以雷帕霉素浓度为横坐标，抑制剂抑制率为纵坐标，绘制出 Rapamycin 对细胞抑制作用图（图 3.7）。如图 3.7 所示，在抑制剂浓度为 0.01 nM 时，抑制率最低，仅 20.77%；而抑制剂浓度达到 1 nM 时，抑制率最高，达到 91.93%。实验结果表明，当 Rapamycin 浓度的升高时，抑制剂对 C2C12 细胞的增殖抑制作用呈现明显上升的趋势。

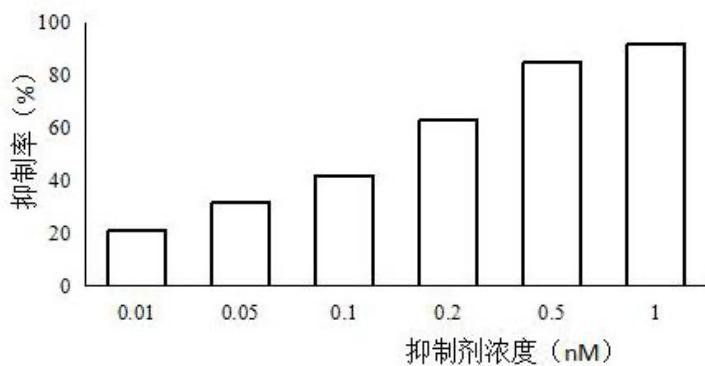


图 3.7 Rapamycin 对细胞的抑制率分析



结 论

本课题首先对 C2C12 细胞进行扩大培养，为后续实验提供充足的细胞材料，同时熟练掌握细胞培养的系列操作，如：细胞冻存、细胞复苏等。然后使用倒置显微镜和 DAPI 荧光染色法观察培养不同时间的 C2C12 细胞生长情况，采用不同浓度的 Rapamycin 抑制剂处理 C2C12 细胞，使用倒置显微镜和 DAPI 荧光染色法初步分析 Rapamycin 抑制剂对细胞活性的影响。最后运用 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒，检测分析不同浓度梯度的 Rapamycin 抑制剂对细胞的活性影响。

观察 C2C12 细胞的生长情况发现，细胞的生长周期主要是分为四个时期：潜伏期、对数生长期、稳定生长期和衰退期。随着时间增长，细胞的生长速率逐渐减慢，在 48 h 时 C2C12 细胞处于对数生长期，细胞数目达到峰值，而 72 h 后，细胞数目开始减少，进入衰退期。收集对数期细胞，采用 Rapamycin 抑制剂处理 48 h，运用 MTT 比色法，通过酶标仪测定 490 nm 波长附近的吸光度，根据所测得的 OD 值，计算出不同浓度抑制剂（0.01 M、0.05 nM、0.1 nM、0.2 nM、0.5 nM、1 nM）处理细胞 48 h 后，细胞的生存率、死亡率和抑制率，分析不同浓度梯度的 Rapamycin 抑制剂对细胞的活性影响，得出如下结论：当 Rapamycin 浓度增高时，实验组细胞的 OD 值显著下降，细胞存活率明显下降，死亡率明显上升，抑制率增大。表明 Rapamycin 抑制剂对 C2C12 细胞活性有抑制作用，且抑制剂浓度的升高，对 C2C12 细胞的生长抑制作用呈现明显上升的趋势。



参考文献

- [1] 程元荣. 强效免疫抑制剂——雷帕霉素[J]. 四川生理科学杂志, 1994(Z1): 33-34.
- [2] Ballou L M,Lin R Z.Rapamycin and mTOR kinase inhibitors[J].Journal of Chemical Biology,2008,1(1-4):27-36.
- [3] 蒋志振, 石炳毅, 申鹏飞. 新型免疫抑制剂雷帕霉素[J]. 国外医学. 泌尿系统分册, 1993(06): 253-255.
- [4] 崔晓丽. 雷帕霉素通过调节自噬-溶酶体系统功能改善 apoE-5XFAD 转基因小鼠学习记忆障碍[D]. 福建医科大学, 2014: 2-6.
- [5] 何秀娟, 张罕, 李冬妹, 邱勇, 龙军, 安云庆, 胡永秀. 西罗莫司对小鼠树突状细胞 CD_(86)、I-A~b 和 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(10): 1133-1138.
- [6] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR [J]. Genes & Development,2004,18(16):1926-1945.
- [7] Laplante M, Sabatini D M.mTOR signaling at a glanc [J]. Journal of Cell Science,2009,122(20):3589-3594.
- [8] 免疫增强剂、免疫抑制剂[J]. 国外科技资料目录. 医药卫生, 2000(06): 206-207.
- [9] 杨显文, 夏扬潮. Th9 细胞在炎症免疫性疾病及肿瘤发生机制中的作用[J]. 微创医学, 2019(02): 189-193.
- [10] 李竑. AMPK 对胃癌中 TGF- β 1 表达的抑制作用[D]. 南昌大学, 2017: 2-7.
- [11] 沈筱芸. 雷帕霉素促进小鼠 CD4~+CD25~+T 细胞增殖和 Foxp3 表达的机制研究[D]. 第二军医大学, 2010: 56-77.
- [12] 魏武, 郑军华. 雷帕霉素免疫抑制机理的研究进展[J]. 国外医学. 泌尿系统分册, 1995(05): 234-236.
- [13] 瞿利元, 王导新. mTORC2 信号通路调节上皮细胞钠通道的研究进展[J]. 中华哮喘杂志(电子版), 2013, 7(04): 39-42.
- [14] 雷帕霉素有助治疗阿尔茨海默病首次被证实[J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(07): 40.
- [15] 周伦欢, 朱雄鹏, 肖慧芳, 辛鹏亮, 李纯团. mTOR 抑制剂雷帕霉素对伯基特淋巴瘤细胞增殖抑制的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2017,25(05): 1397-1405.
- [16] EFEYAN A, SABATINI D M. mTOR and cancer: many loops in one pathway[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010,22(2):169-176.



-
- [17] FASOLO A, SESSA C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2008, 17(11):1717-1734.
 - [19] Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. Cell And Developmental Biology, 2007, 23:645-673.
 - [20] 周丽娜. C2C12 细胞培养分化及肌纤维类型鉴定[A]. 中华医学会、中华医学会呼吸病学分会. 中华医学会呼吸病学年会——2013 第十四次全国呼吸病学学术会议论文汇编[C]. 中华医学会、中华医学会呼吸病学分会:中华医学会, 2013: 2.



致 谢

本次课题实验的完成首先要感谢张建社老师，张老师以他严肃的科学态度，一丝不苟的学术精神，求同存异的工作作风激励着我，非常感谢张老师对本人的大力帮助和悉心指导。张老师治学严谨，学识渊博，视野广阔，思想深刻，用心为我营造一种良好的学术氛围，让我的论文更加的严谨。张老师不仅仅只是在学业上给我以悉心指导，更在思想、生活上给予了我关心和帮助，在此，我谨向张老师致以十二分诚挚的谢意。

其次，还十分感谢学长学姐们给我的帮助与指导，特别感谢吴萍学姐，在实验过程中学姐给了我莫大的支持与指导，从试剂的配制、细胞的培养，到试剂盒的使用，都是在吴萍学姐的教导下学会的，真的很感谢学姐给予的帮助！

同时，我还要感谢细胞实验组的小伙伴们，感谢贺魏、唐子微、胥曼格同学，如果没有你们的支持和倾心的协助，我是无法解决这些困难和疑惑，最终能够让本文顺利完成。

最后，我还要感谢我的父母。焉得艾草，言树之心，养育之恩，无法回报，你们永远健康快乐将永远是我最大的心愿！

学生签名:

日期:

