

## 技术与方法

## 分化的骨骼肌细胞的不同固定和化学染色方法比较

李晶 刘陆淘 顾曙余 陈华群\*

(南京师范大学生命科学学院, 南京 210023)

**摘要** 该文比较了几种不同固定和化学染色方法对分化的骨骼肌细胞的效果及优缺点, 并探讨了用化学染色法进行骨骼肌细胞形态学分析的可行性。骨骼肌前体细胞系 C2C12 经肌分化诱导 3 天后分别使用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)、甲醇 (methanol)、卡诺氏 (Carnoy) 固定液固定 5 min、10 min 和 15 min, 以确定最适固定方法; 然后分别用改良苯酚品红 (modified phenol fuchsin)、吉姆萨 (Giemsa)、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 三种不同的染液进行染色。结果表明, 4% PFA 固定 5 min 或 10 min 较其他方法更好地保持了肌管的形态; 对于分化的骨骼肌细胞包括形成肌管的细胞和未形成肌管的细胞, HE 染色优于其他几种染色方法, 但以上几种方法均不如免疫荧光染色方法。

**关键词** 骨骼肌细胞; 肌分化; 细胞固定; 化学染色

## Comparison of the Different Protocols for Fixation and Staining of Differentiated Skeletal Muscle Cells

LI Jing, LIU Lutao, GU Shuyu, CHEN Huaqun\*

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract** The effects, as well as the advantages and disadvantages of different fixation and chemical staining methods for differentiated skeletal muscle cells were compared. The possibility of the chemical staining applied in the analysis of the cells was explored. C2C12, the precursor skeletal muscle cell, was used in this study. After three days of myogenic differentiation, the cells were fixed with 4% PFA (paraformaldehyde), 100% methanol or Carnoy fixative for 5 min, 10 min, and 15 min, respectively. The best fixation protocol was thus determined. Then, the fixed cells were stained with the dye solutions of modified phenol fuchsin, Giemsa, or HE (hematoxylin-eosin). The results showed that among those protocols, the fixation with 4% PFA for 5 min or 10 min better preserved the morphology of the myotubes than the others, while the HE staining was the best one for the staining of differentiated myocytes including the formed myotubes and the unfused myocytes. However, immunofluorescence staining was better than all those three chemical staining protocols.

**Keywords** skeletal muscle cells; myogenic differentiation; cell fixation; chemical staining

收稿日期: 2021-04-21

接受日期: 2021-07-14

南京师范大学教学改革项目(批准号: 2019NSDJG045)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13611592002, E-mail: chenhuqun@njnu.edu.cn

Received: April 21, 2021

Accepted: July 14, 2021

This work was supported by the Education Innovation Project of Nanjing Normal University (Grant No.2019NSDJG045)

\*Corresponding author. Tel: +86-13611592002, E-mail: chenhuqun@njnu.edu.cn

C2C12细胞是由C3H小鼠肌细胞永生化的细胞系, 体外可增殖并被诱导分化为骨骼肌细胞, 是研究肌肉发育理想的细胞模型<sup>[1-2]</sup>。C2C12为肌肉的前体细胞, 具有类似于干细胞的特性<sup>[3]</sup>, 经分化培养基诱导后表达骨骼肌特征性蛋白质的骨骼肌细胞(myocyte)(下文简称肌细胞), 之后细胞之间发生融合(fusion), 形成肌管(myotube)。体外研究中, 通常需要分析C2C12细胞的肌分化能力<sup>[2-5]</sup>。

肌细胞的细胞学特征性指标通常包括肌管的形态(主要指肌管的直径和长度)、肌分化指数(发生了肌分化的细胞占总细胞数的百分比)和融合指数(发生了融合的分化细胞数量在总细胞中所占的比例)等<sup>[4-5]</sup>。目前, 科研工作中最常用的方法是对肌细胞特征蛋白-肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MyHC)进行免疫荧光染色(immunofluorescence staining, IF), 然后在荧光显微镜下拍照后利用绘图软件(如Photoshop)和图像处理软件(如ImageJ)进行分析。免疫荧光染色由于需要特异性抗体及荧光显微镜, 费用较高, 对于研究平台要求也较高; 同时研究人员还应经过较好的训练。因此, 对于教学实验和部分研究如药物初步筛选等, 该方法一般并不适用。虽然, 对肌分化后形成的肌管可在普通光学显微镜下直接观察拍照, 并进行形态分析, 但这一方法无法区分化和未分化的细胞, 样品无法长期保存。本文尝试使用普通实验室常用的方法对分化的骨骼肌细胞进行固定与化学染色, 并在普通光学显微镜下拍照, 探讨其用于肌分化实验教学 and 初步肌分化研究的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

C2C12成肌细胞由本实验室保存; 胎牛血清、马血清、山羊血清、青链霉素(双抗)、DMEM高糖培养基和FITC标记的二抗均购自Thermo Fisher Scientific公司; 甲醇购自上海沪试试剂公司; 4%多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)购自Biosharp公司; Giemsa染液、HE染液和细胞裂解液购自碧云天生物技术有限公司; Carnoy固定液和改良苯酚品红(modified phenol fuchsin)染液由本院生物学教学实验中心提供; Triton X-100和DAPI购自Sigma-Aldrich公司; MyHC抗体(MF20)和生肌素(myogenin, MyoG)抗体均购自DSHB(Developmental Studies Hybridoma Bank); GAPDH抗体购自爱必梦(abm)生物科技有限

公司; ECL显色试剂盒购自Bio-Rad公司; PVDF膜购自Millipore公司; 24孔细胞培养板购自Corning公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养及肌分化 C2C12细胞用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基[生长培养基(growth medium, GM)]传代培养。实验前将细胞接种于提前铺好盖玻片的24孔细胞培养板中, 当细胞密度达到80%左右时, 更换为含有2%马血清的DMEM培养基[分化培养基(differentiation medium, DM)]进行肌分化诱导, 隔天换液。

1.2.2 Western blot分析 细胞裂解液进行8% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白转印至PVDF膜上, 用5%脱脂奶[溶于TBST溶液(含0.1% Tween 20的PBS)]室温封闭30 min, 一抗(MF20以1:1 000稀释, MyoG抗体以1:100稀释)4 °C孵育过夜, TBST洗涤后用二抗(1:8 000稀释)室温孵育1 h, 以ECL进行化学发光显色, 用凝胶成像系统(Tanon-4500)扫膜显示蛋白条带, Photoshop软件作图。

1.2.3 细胞固定 C2C12细胞分化3天后, 弃去培养基, 室温PBS清洗3次, 分别用不同的固定剂在室温下固定5、10、15 min, 弃去固定液, PBS清洗3次, 在显微镜(Nikon ECLIPSE Ti-S)下拍照。每种固定方法重复3次, 每次拍摄3个视野, 选择每个视野中最大的5根肌管用Photoshop软件分析并测量直径。

1.2.4 细胞化学染色 按常规方法进行。Giemsa和改良苯酚品红按以下方法染色: 染色10 min后吸去染色液, 自来水清洗3次, 自然干燥后用中性树胶封片。HE染色: 苏木素染液染色10 min后吸去染色液, 自来水清洗3次, 再用伊红染色5 s, 吸去染液, 自来水清洗3次, 自然干燥后用中性树胶封片。所有样品在显微镜白光下拍照, 每个孔随机拍摄3个视野, 实验重复3次。

1.2.5 细胞免疫荧光染色 细胞经4% PFA固定后, 用含0.2% Triton X-100的PBS进行透化处理, 再用5%山羊血清室温封闭1 h, 用一抗MF20(1:600)于4 °C孵育过夜, 以FITC标记的二抗(1:2 000稀释)室温孵育1 h, 最后用DAPI(1:1 000稀释)染核10 min, 荧光显微镜下拍照。

1.2.6 统计分析 肌管直径大小用Photoshop软件进行分析获得。未固定的肌管直径对照设为100%, 固定后肌管直径的相对值通过计算实验组与对照组的比值得到, 结果以均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。数据用Graphpad进行统计分析, 组间差异性用One-Way ANOVA和t检验进行分析。 $P<0.001$ 表示差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 肌分化的诱导

将C2C12细胞在GM中过夜培养至细胞密度达到约80%时,吸弃GM,加入DM以诱导肌分化。3天后在显微镜下观察到明显的肌管形成。进行Western blot分析,结果显示MyoG和MyHC在分化3天(DM3)的细胞中均明显表达,而在GM的未分化细胞对照中,则未检测到MyHC的表达,MyoG仅有很低水平表达(图1),说明我们成功诱导了C2C12细胞肌分化。

### 2.2 不同固定方法的比较

固定剂有多种,可以分为单一固定剂和混合固定剂<sup>[6]</sup>。本文选择教学和科研实验室常规使用的4% PFA、甲醇和Carnoy固定液进行比较研究。肌细胞分别固定5 min、10 min、15 min, PBS清洗3次后在显微镜明场下拍照。图2显示,4% PFA固定5 min和10 min的样品肌管直径[分别为(41.15±7.32) μm和(41.51±5.58) μm],比未固定对照肌管直径[(47.86±10.55) μm]有所减小,说明这一方法也可引起细胞收缩,但均没有显著性差异;4% PFA固定时间延长到15 min,则肌管发生显著收缩[肌管直径减小到(25.13±5.12) μm,  $P<0.001$ ]。Carnoy固定液和甲醇固定5 min后肌管均发生显著收缩( $P<0.001$ ),肌管直径分别减小到约31.53 μm和22.12 μm。而在固定10 min和15 min后,甲醇和Carnoy液固定的肌管显示更加严重的收缩,视野中出现了更大面积的空白无细胞部分。在Carnoy液固定10 min和15 min后,除了严重的细胞收缩外,还发现有较多的细胞脱落,无法对肌管直径进行统计分析。以上结果表明,4% PFA固定5 min和10 min对于肌管的形态保持效果较好,而甲醇和Carnoy液不适合肌管的固定。

### 2.3 不同染色方法的比较

C2C12细胞经肌分化诱导3天后用4% PFA固

定10 min,然后分别用改良苯酚品红、Giemsa和HE进行染色。结果(图3)表明,改良苯酚品红染色无法清晰显示细胞核,且无法区分分化但未融合的肌细胞与未分化的细胞;Giemsa染色不能很好地显示肌管形态和细胞核;HE染色使细胞核呈蓝紫色,细胞质为淡红色,可较好地显示肌管的形态和肌管中的细胞核。因此,HE染色结果可以用来进行初步的肌分化分析,包括肌管的形态和融合指数分析。另外,HE染色的细胞中,细胞质还呈现出深浅不同的着色,肌管和部分未融合细胞(含单个核)的细胞质颜色较深;部分细胞胞质颜色较浅。细胞质伊红着色的深浅表示细胞胞质蛋白含量的差别<sup>[6]</sup>。分化细胞蛋白浓度较高,伊红着色较深;而未分化细胞胞质蛋白浓度较低,伊红着色较浅,据此可以区分分化肌细胞和未分化的成肌细胞。

### 2.4 免疫荧光染色

本文也对C2C12分化后的肌细胞进行了免疫荧光染色。如图4所示,免疫荧光染色不仅能够清楚显示肌管(红色荧光显示MyHC阳性)的形态及肌管中细胞核(蓝色荧光)的数目,而且对于发生了肌分化但未融合的肌细胞(含1个细胞核的MyHC阳性细胞)也能够显示。

## 3 讨论

肌管是指肌肉前体细胞发生肌分化并融合形成的含2个以上细胞核的肌细胞,通常在体外可通过一定条件如含2%马血清的分化培养基诱导骨骼肌前体细胞如C2C12发生肌分化<sup>[1]</sup>。分化条件下,细胞首先表达肌肉生成调节因子(muscle regulatory factor, MRF)如MyoG、MyoD等, MRF再启动骨骼肌特征蛋白如结蛋白(desmin)、骨骼肌特异性肌球蛋白等的表达<sup>[7]</sup>。与未分化的C2C12细胞相比,肌管的附着力变小,在固定过程中更易脱落,因此,其固定过

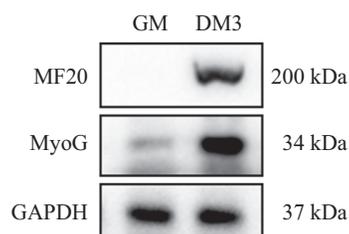
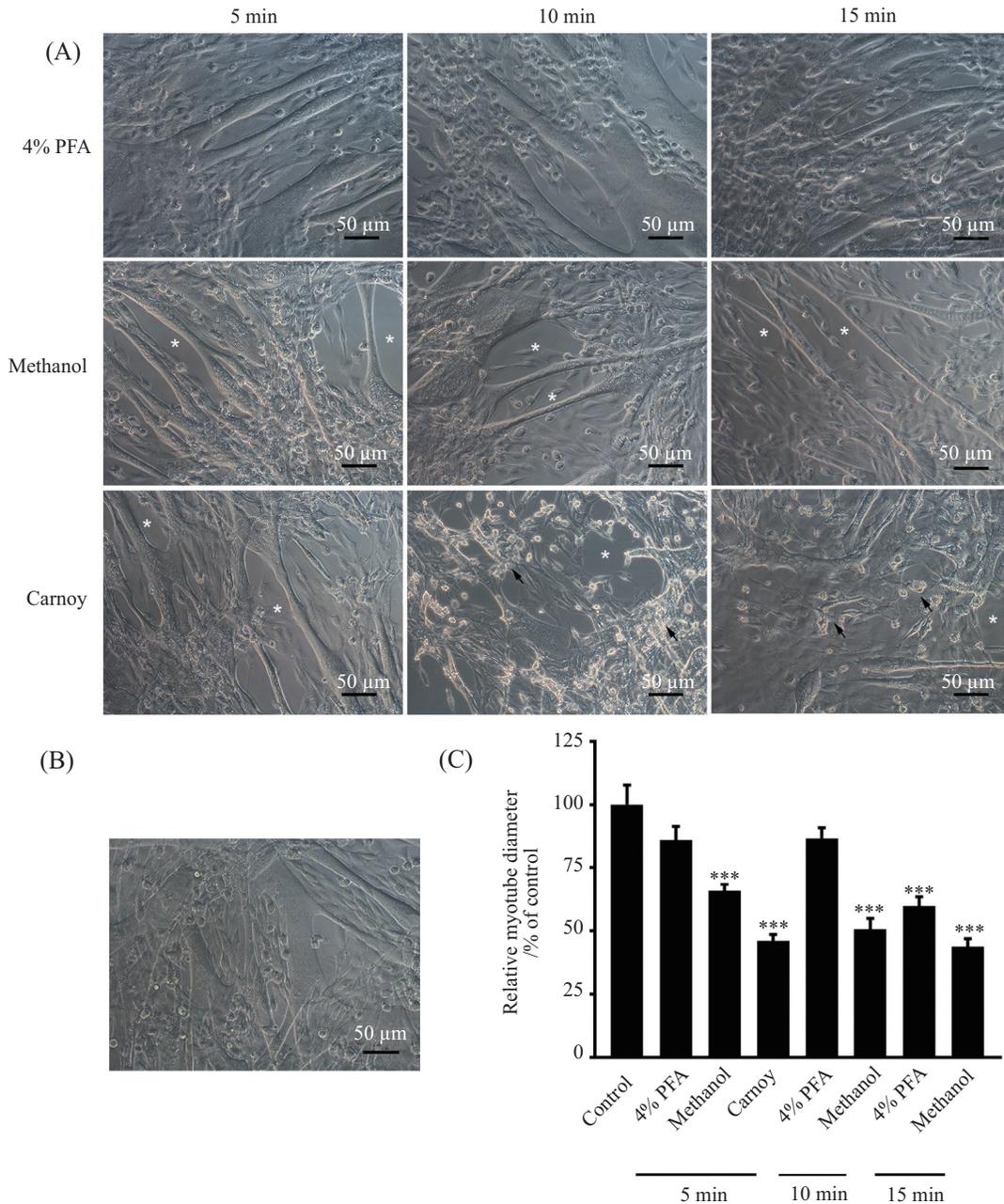


Fig.1 Western blot分析C2C12细胞肌分化3天(DM3)后肌管中特征蛋白的表达

Fig.1 Western blot analysis of the expression of marker proteins in C2C12 myoblasts after 3 days of myogenic differentiation



A: 4% PFA、甲醇或Carnoy固定剂固定的肌细胞, 细胞培养板底部的空白部位以白色\*标出, 脱落细胞以黑色箭头指示; B: 未固定的肌细胞; C: A和B图中的肌管直径统计分析。未固定的对照肌管直径设为100%。n=3。\*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组相比。

A: 4% PFA, methanol or Carnoy fixative fixed myocytes. The blank space was labeled by white \*, and black arrows pointed at detached cells; B: the unfixed myocytes; C: analysis of the myotube diameters from figure A and B. Unfixed myotube diameter was used as a control (100%). n=3. \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group.

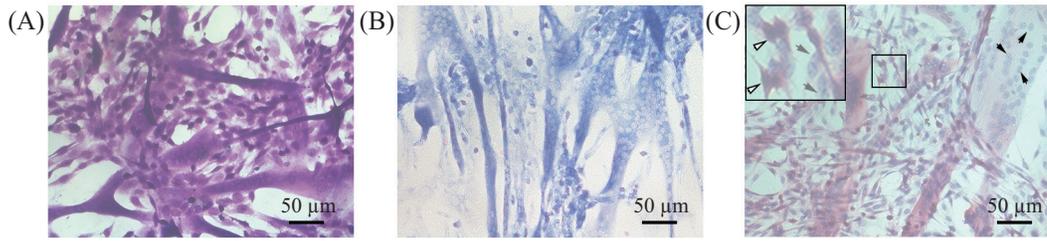
Fig.2 不同固定方法对于肌细胞(肌分化3天)的固定效果比较

Fig.2 Comparison of the fixation effects of different fixation protocols on myocytes (DM3)

程要求更加严格; 分化的肌细胞中蛋白丰度增加, 对染料的着色也与C2C12前体细胞不尽相同<sup>[8-9]</sup>。有研究发现, Jenner-Giemsa染色时, 肌管着色较深, 研究人员可以此来区分肌管和未分化的C2C12细胞<sup>[8]</sup>。

在骨骼肌细胞的细胞学研究中, PFA固定之后进行免疫荧光染色是最常用的方法, 显微图像分析

软件如Photoshop等可对肌细胞的形态、分化指数和融合指数等进行分析<sup>[2-5]</sup>。虽然用免疫荧光染色进行肌细胞的形态学分析效果好, 但其对于研究平台和研究人员的较高要求, 费用也高, 且需要的时间较长, 通常需要2个以上工作日, 因此, 寻找花费较低、耗时短且能够在没有荧光显微镜等条件下进行初步

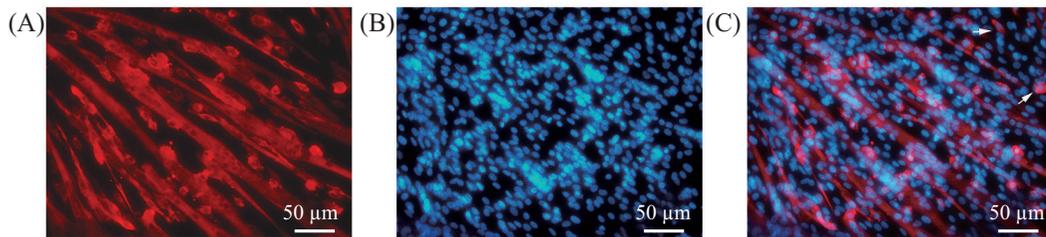


A: 肌细胞的改良苯酚品红染色; B: 肌细胞的Giemsa染色; C: 肌细胞的HE染色。黑色箭头指示肌管中的细胞核; 放大部分的空心箭头指示分化而未融合肌细胞, 实心箭头指示未分化细胞。

A: modified phenol fuchsin staining of myocytes; B: Giemsa staining of myocytes; C: HE staining of myocytes. The black arrows pointed at the nuclei in the myotube; in the high-magnification picture, the hollow arrowheads pointed at unfused myocytes, and the solid arrowheads pointed at undifferentiated myoblasts.

Fig.3 不同染色液对于分化3天肌细胞的染色效果比较

Fig.3 Comparison of the staining effects of different staining dyes on myocytes after 3 days of myogenic differentiation



A: MF20染色显示肌球蛋白重链的表达; B: DAPI显示细胞核; C: A和B图像的重合。白色箭头指示分化但未融合的肌细胞。

A: MF20 staining showing MyHC expression; B: DAPI staining of nucleus; C: figure A was merged with figure B. White arrows pointed at the differentiated but unfused myocytes.

Fig.4 肌细胞的免疫荧光染色

Fig.4 Immunofluorescence staining of myocytes

研究的方法就很有意义。

国外曾有类似的研究报道。VELICA等<sup>[8]</sup>将C2C12细胞进行肌分化诱导后用100%甲醇固定5 min,接着用Jenner-Giemsa染色进行研究。染色的原理是:染料中的亚甲基蓝使细胞核显示淡粉红色,而其中的伊红使肌纤维显示深紫红色,因为分化的肌细胞胞质中的蛋白质丰度较高;由于未分化的C2C12细胞胞质蛋白质丰度相对较低,伊红染色后颜色较浅。根据颜色深浅的比较设定分化肌细胞的颜色深度阈值,再用ImageJ软件进行肌管含量分析。他们的方法快速、便宜,但是区分分化细胞和未分化细胞基本依靠细胞质着色的深浅,对于操作人员的经验要求较高,且不同批次之间的染液也可能存在差别,因此,对肌管染色结果的判断可能会出现误差。另外,本文还发现,甲醇固定也会导致较严重的肌管收缩。

我们还发现,使用甲醇、PFA和Carnoy液均可使肌管收缩,Carnoy液固定后肌管的收缩现象最为严重。但经4% PFA固定10 min后,肌细胞包括肌管的收缩与对照没有显著性差异,也可满足后续的其

他研究需求,如免疫荧光染色。

本文选择教学和科研实验室常见的三种染料对C2C12细胞分化后形成的肌细胞进行染色。结果发现:改良苯酚品红无法区分细胞核和细胞质,因此不能进行肌管的分析;Giemsa染色后细胞核不着色,细胞质染色较浅;HE染色后细胞核呈现蓝紫色,细胞质呈现红色,分化的肌管着色较深,未分化的细胞质着色较浅,因此,HE染色后的细胞可用于骨骼肌前体细胞的肌分化(包括肌管的形态和融合指数等)分析,但是肌分化指数分析则需要研究人员有较丰富的经验。

#### 4 结论

本文比较了实验室常使用的三种细胞固定方法和三种染料对C2C12诱导分化后形成的骨骼肌细胞进行固定和化学染色的效果,结果显示用4% PFA固定分化的骨骼肌细胞10 min后进行HE染色最大程度保持了分化肌管的形态,并可区分分化和未分化细胞;该方法大大缩短了实验时间,节省了费用,

适用于肌分化的教学和部分体外肌分化的研究。而在科研工作中, 免疫荧光染色则通常是骨骼肌细胞的细胞学研究包括形态学研究和肌分化研究的最佳方法。

### 参考文献 (References)

- [1] YAFFE D, SAXEL O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle [J]. *Nature*, 1977, 270(5639): 725-7.
- [2] 崔亚凤, 严云勤, 李树峰, 等. Egr1对小鼠成肌细胞C2C12分化的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(CUI Y F, YAN Y Q, LI S F, et al. The effect of Egr1 on C2C12 differentiation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(1): 25-32.
- [3] DEY B K, GAGAN J, DUTTA A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7 [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(1): 203-14.
- [4] CRACKNELL T, MANNSVERK S, NICHOLS A, et al. Proteomic resolution of IGFN1 complexes reveals a functional interaction with the actin nucleating protein COBL [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 395(2): 112179.
- [5] 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): 921-7.
- [6] 李和, 周莉. 组织化学与细胞化学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [7] CHAL J, POURQUIE O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Development*, 2017, 144(12): 2104-22.
- [8] VELIÇA P, BUNCE C M. A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation [J]. *Muscle Nerve*, 2011, 44(3): 366-70.
- [9] CABANE C, ENGLARO W, YEOW K, et al. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38alpha pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(3): C658-66.