

李孝涵, 朱弘焱, 韩佳琪, 等. skMLCK 基因对成肌细胞 C2C12 肌纤维组成及信号通路的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 47-57.

LI X H, ZHU H Y, HAN J Q, et al. Effects of skMLCK gene on muscle fiber composition and signaling pathway in C2C12 cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 47-57.

# skMLCK 基因对成肌细胞 C2C12 肌纤维组成及信号通路的影响

李孝涵<sup>1</sup>, 朱弘焱<sup>2</sup>, 韩佳琪<sup>1</sup>, 张尚松<sup>1</sup>, 田玉民<sup>1</sup>, 苏玉虹<sup>1,3\*</sup>

(1. 锦州医科大学畜牧兽医学院, 辽宁 锦州 121000;

2. 锦州医科大学基础医学院, 辽宁 锦州 121000;

3. 锦州医科大学食品与健康学院, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:** 旨在研究高、低表达骨骼肌肌球蛋白轻链激酶 (skMLCK) 基因对肌纤维组成成分和信号通路关键分子的影响。采用高表达和 RNAi 技术, 获得 skMLCK 高、低表达稳转成肌细胞 C2C12 细胞株, 提取细胞总 RNA 和总蛋白质, 采用实时定量 PCR 和 Western blot 方法检测 skMLCK 高、低表达后 C2C12 中 skMLCK 基因, 5 种肌纤维组成成分肌球蛋白轻链 (MLC)、肌球蛋白重链 (MyHC) slow、MyHC 2a、MyHC 2x 和 MyHC 2b 和 6 种信号通路关键因子肌球蛋白增强因子 2C (MEF2C)、钙调蛋白 (CaM)、促分裂原活化蛋白激酶 p38 (MAPKp38)、AMPK 激活蛋白激酶  $\alpha$ 2 (AMPK $\alpha$ 2)、RhoA 和丝切蛋白 2 (CFL2) 的表达情况。结果: 在高、低表达稳转株中信号通路关键分子 MAPKp38 与 skMLCK 蛋白和 mRNA 表达量变化相同; 2 种肌纤维组成成分 (MyHC 2x 和 MyHC 2b) 和 3 种信号通路关键分子 (CFL2、AMPK $\alpha$ 2 和 RhoA) 与 skMLCK 基因 mRNA 表达量变化相反; 2 种肌纤维组成成分 (MyHC 2x 和 MyHC 2b) 和 4 种信号通路关键分子 (MEF2C、CaM、AMPK $\alpha$ 2 和 CFL2) 与 skMLCK 蛋白表达量变化相反, 其余组分结果均一致; 将所有蛋白质表达结果合并进行统计学分析发现, skMLCK 基因与信号通路 RhoA 高度相关。综上, skMLCK 基因可能通过改变 C2C12 细胞中 RhoA 信号通路来影响肌纤维的组成, skMLCK 基因可以抑制 CFL2 的表达和肌纤维的生长。

**关键词:** 骨骼肌肌球蛋白轻链激酶; C2C12 细胞株; 肌纤维; 信号通路

中图分类号: S852 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0047-11

## Effects of skMLCK gene on muscle fiber composition and signaling pathway in C2C12 cells

LI Xiaohan<sup>1</sup>, ZHU Hongyan<sup>2</sup>, HAN Jiaqi<sup>1</sup>, ZHANG Shangsong<sup>1</sup>, TIAN Yumin<sup>1</sup>, SU Yuhong<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China;

2. College of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China;

3. College of Food and Health, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of high and low expressions of skMLCK on myofiber components and key molecules of the signaling pathway. The high and low expression and stable transformation of skMLCK into myoblast C2C12 cell line was obtained using the high expression and RNAi technology. Then, total RNA and total protein were extracted, and Real-time PCR and Western blot were used to detect skMLCK, five myofiber components (MLC, MyHC slow, MyHC 2a, MyHC 2x, and MyHC 2b), and six key molecules of the signaling pathways (MEF2C, CaM, MAPKp38, AMPK $\alpha$ 2, RhoA and CFL2) in C2C12 cells after high and low skMLCK expressions. The results showed that key molecule MAPKp38 of the signaling pathway underwent the same changes with those of skMLCK protein and mRNA expression in high and low expression stable transplants. Two myofiber components (MyHC 2x and MyHC 2b) and the key molecules (CFL2, AMPK $\alpha$ 2 and RhoA) of three signaling pathways showed opposite changes with mRNA expression of the skMLCK gene. Two myofiber components (MyHC 2x and MyHC 2b) and 4 signaling pathway key molecules (MEF2C, CaM, AMPK $\alpha$ 2, and CFL2) were associated with the opposite changes in skMLCK protein expression; and the results of the remaining components were consistent. Statistical analysis of all protein expression results combined revealed that skMLCK was highly correlated with the signaling pathway RhoA. It suggested that skMLCK might affect myofiber composition by altering the RhoA signaling pathway in C2C12 cells. Meanwhile, skMLCK might inhibit CFL2

收稿日期: 2024-03-29; 修回日期: 2025-01-20

基金项目: 辽宁省种质创新藏粮于技专项 (2023020531-JH1/102-04 和 JH1/102-05); 辽宁省教育厅基础研究项目 (LJKMZ20221240)

第一作者: 李孝涵, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 苏玉虹, 教授, 研究方向为动物分子遗传育种, E-mail: suyuhong@jzmu.edu.cn.

expression and myofiber growth.

**Keywords:** skMLCK; C2C12 cells; muscle fiber; pathway

随着当今社会人民生活水平的提高,对肉制品品质的需求成为了新焦点,肌纤维类型直接影响肉制品的品质。肌球蛋白是肌纤维的重要组成部分,主要由肌球蛋白重链(MyHC)和肌球蛋白轻链(MLC)组成<sup>[1]</sup>。根据肌纤维代谢和收缩功能的不同,可以将骨骼肌纤维分为快速氧化型(slow)、慢速氧化型(2a)、快速酵解型(2b)和中间型(2x)4种,分别由不同的肌球蛋白重链异构体MyHC slow、MyHC 2a、MyHC 2b和MyHC 2x来决定。肌纤维的类型是影响猪肉质量的因素之一,例如与含有较多2b型肌纤维的肌肉相比,含有更多slow型肌纤维的肌肉中高铁肌红蛋白、血红素和铁元素的含量更高,色泽更红,并且具有更高的极限pH值和持水力<sup>[2]</sup>。MLC按照存在位置可以分为以下5种类型:MLC1f、MLC2f、MLC3f、MLC1s、MLC2s,其中在快速收缩肌纤维中主要存在MLC1f、MLC2f、MLC3f,在慢速收缩肌纤维中主要存在MLC1s和MLC2s<sup>[3]</sup>。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)是一种钙调素(CaM)依赖性激酶,它可以使构成肌纤维的MLC特异性磷酸化,进而激活肌球蛋白三磷酸腺苷(ATP)酶,并与肌动蛋白相互作用,从而导致骨骼肌收缩、平滑肌收缩等<sup>[4]</sup>。在3种MLCK蛋白中,由肌球蛋白轻链激酶2基因编码的骨骼肌肌球蛋白轻链激酶(skMLCK)在骨骼肌中特异性表达。因此,skMLCK基因的表达水平可调节骨骼肌的收缩能力<sup>[5-6]</sup>,由此可以推断出skMLCK基因与骨骼肌的运动有密切的联系。研究发现影响肌纤维组成的信号通路主要有4种,分别为腺苷酸活化蛋白激酶通路、Rho连接激酶、钙调蛋白(CaM)和丝裂原活化蛋白激酶。skMLCK均参与这4条信号通路并起到一定作用<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究表明,skMLCK在C2C12细胞中高表达后,与肌纤维形成有关基因,如丝切蛋白2(CFL2)、肌球蛋白增强因子2C(MEF2C)的表达均下调,这表明高表达skMLCK基因对肌纤维的生长发育有抑制作用<sup>[8]</sup>。为进一步了解skMLCK对肌纤维,尤其是肌球蛋白重链类型的影响,以及这种影响可能涉及的信号通路,利用小鼠成肌细胞株C2C12进行skMLCK基因高、低表达,检测和分析表达后MyHC重链类型及4条信号通路关键分子的变化情况,初步获得skMLCK基因对肌纤维类型影响的分子机制,为后续进一步研究skMLCK基因功能提供前期工作基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

小鼠成肌细胞C2C12购于北京协和医科大学细胞资源中心。胎牛血清、G418、DMEM高糖细胞培养基和胰蛋白酶购于美国GIBCO公司,二甲基亚砜(DMSO)购于Sigma公司,细胞总RNA提取试剂盒和实时定量PCR试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,PrimeScript RT-PCR Kit购于TaKaRa公司,细胞蛋白提取试剂盒、RIPA/buffer裂解液和PMSF蛋白酶抑制剂购于北京碧云天公司,BCA蛋白定量试剂盒购于美国Thermo公司。一抗为兔抗His抗体,购自Abcam公司;二抗为山羊抗兔IgG抗体,购自北京中杉公司。

### 1.2 skMLCK高表达稳转C2C12细胞株的筛选

将课题组前期构建的skMLCK基因高表达载体<sup>[7]</sup>转染入C2C12细胞,选取G418浓度为0至1200 μg/mL共12组。以全部细胞死亡的最低G418浓度为基准,确定最佳筛选浓度为500 μg/mL。将转染后的细胞正常培养12 h后,用500 μg/mL的G418及含20%血清的筛选培养液继续培养至细胞不再大量死亡时,减半G418浓度继续培养,维持筛选压力,直至出现大量聚集在一起的阳性克隆团。荧光显微镜下标记3处较好的阳性细胞团,用套环法挑取阳性细胞团继续培养,进行后续检测。

将正常C2C12细胞设置为空白对照组,具有最大干扰效率的序列重组载体稳定转染后筛选的3组高表达稳转细胞株设置为试验组1~3。

### 1.3 skMLCK低表达稳转C2C12细胞株的筛选

用慢病毒载体GV248-skMLCK-shRNA转染C2C12细胞,选取嘌呤霉素浓度为1~7 μg/mL,每个浓度重复3次,将从药物作用的第1~4天细胞全部死亡的浓度确定为嘌呤霉素最小致死浓度。最终确定最佳筛选浓度为4 μg/mL。C2C12细胞转染48 h后进行稳转株的筛选,当嘌呤霉素筛选后的细胞不再大量死亡时,将嘌呤霉素筛选用量减半继续培养。当嘌呤霉素筛选第3~5天时,荧光显微镜下可见绿色荧光的细胞团。将含有荧光的细胞团用套环法挑取3个克隆细胞团继续培养,当细胞密度达到90%左右时,进行相关检测。使用倒置荧光显微镜进行拍照检测细胞活性并计数,计算转染效率,收集转染后的细胞,用于后续检测。

将正常C2C12细胞设置为空白对照组,空载体

转染的 C2C12 细胞设置为阴性对照组, 具有最大干扰效率的序列重组载体稳定转染后筛选的 3 组低表达稳转细胞株设置为试验组 1~3。

#### 1.4 skMLCK 基因高、低表达稳转株总 RNA 的提取

按照细胞总 RNA 提取试剂盒说明书和实时定量 PCR 试剂盒说明书进行 RNA 提取和 cDNA 第一条链的合成。

#### 1.5 实时定量 PCR 反应

实时定量 PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, SYBR Green PCR Master Mix (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 40 个循环。具体扩增的引物有 skMLCK、MLC、CFL2、MEF2C、CaM、促分裂原活化蛋白激酶 p38 (MAPKp38)、AMPK 激活性蛋白激酶  $\alpha$ 2 (AMPK $\alpha$ 2) 等, 见表 1。

表 1 实时定量 PCR 扩增引物序列

基因名称	基因登录号	引物序列(5'→3')	扩增长度/bp
skMLCK	XM_003134383	F: GGCAGCCAAGGTCATCAAGAA R: GAGGTCTCAATGGCTGCGTACA	123
$\beta$ -actin	XM_034489257.1	F: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC R: ATGGAGCCACCGATCCACA	171
MLC	NM_133241.2	F: GCTATTCAGTGCCTCTGGATATCTG R: CGCTGACTTTGAAGCTCACACA	182
$\alpha$ -actin	NM_001272041.1	F: CCACCGCTCTTGTGTGTGA R: GGATACCTCGCTTGCTCTGG	180
MyHC 2b	NM_010855.3	F: GAGTTCATTGACTTCGGGATGG R: TGCTGCTCATAACAGCTTGTCTTG	143
MyHC 2x	NM_030679.1	F: AAGGCTCTGCGCAAACATGA R: TTGGCCAGGTTGACATTGGA	173
MyHC 2a	NM_001039545.2	F: ATTCTCAGGCTTCAGGATTTGGTG R: CTTGCGGAACTTGGATAGATTGTG	114
MyHC slow	NM_080728.2	F: ATGAGCTGGAGGCTGAGCA R: TGCAGCCGCACTAGGTTCTT	124
CFL2	NM_001025215.1	F: AACTCCCCACCCTCACAAAA R: CAAATATGCCCAACAACTGGA	111
MEF2C	XM_001044540.1	F: AGGATATCCATCAGCCATTCAACA R: GCTGCTGCCAGCCAGTTACA	131
RhoA	NM_016802.4	F: GTCCAAATGTGCCATCATCC R: CGCCAATCCTGTTTGCCATA	138
AMPK $\alpha$ 2	NM_178143.2	F: AAGGGCATACTGCTGAGAATG R: GGCAGCTTCAGACAACACTTT	160
MAPKp38	NM_001168508.1	F: TTAACAGGATGCCAAGCCATGA R: GGCACCAATAAATACATTTGCCAAG	92
CaM	NM_009790.4	F: GAGCTGCAGGATATGATCAACGA R: TCATGACGTGGCCGACTTC	190

#### 1.6 Western blot 检测 skMLCK 稳转细胞株的蛋白表达

收集 skMLCK 高、低表达稳转株细胞, 离心后去除上清液, 加入裂解液充分裂解后, 取上清液采用 BCA 法进行蛋白定量。根据蛋白分子量大小选取 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 于半干转印上 20 V 恒压下进行转膜, 封闭, 加入一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二

抗杂交 1.5 h, 加入发光液, 利用成像系统 Lane 1D 软件测量目标条带灰度值。

#### 1.7 数据统计与分析

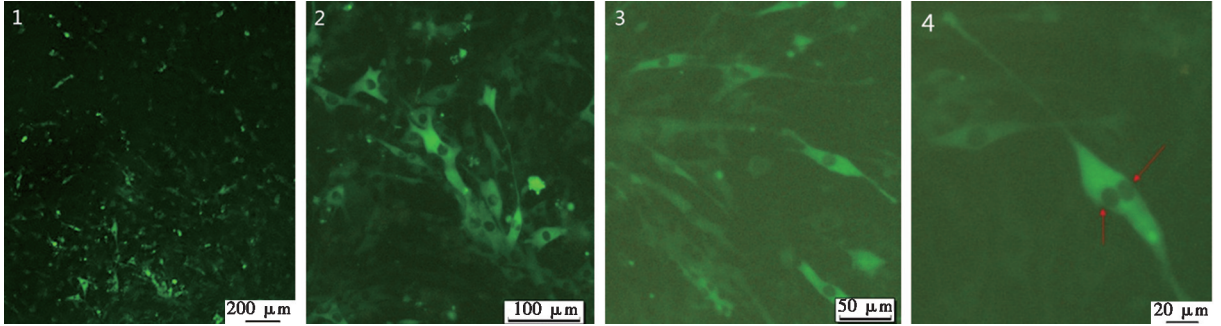
采用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA)、连续变量的简单相关分析、曲线估计分析, 结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 稳定高表达 C2C12 细胞株的筛选

不同倍镜的荧光显微镜下观察 skMLCK 高表达稳

转株，可见均为阳性细胞，细胞状态良好，荧光亮度强，细胞形态明显为梭形，结果如图 1。



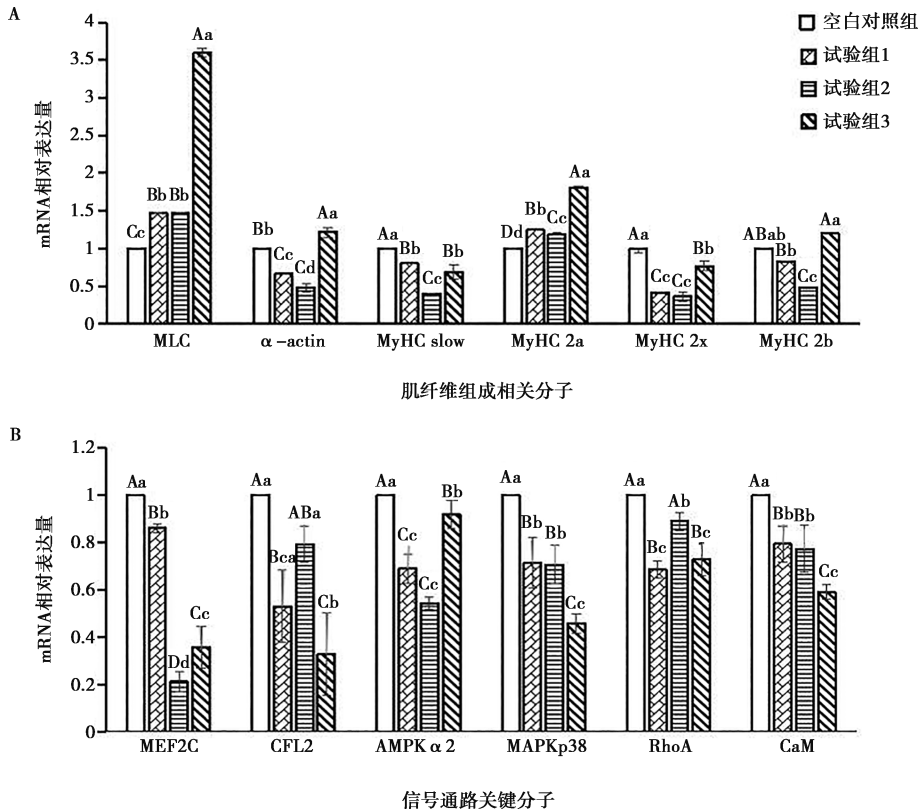
红色箭头所指为双核细胞。

图 1 skMLCK 高表达稳转株筛选阳性克隆细胞团

### 2.2 skMLCK 高表达稳转 C2C12 细胞株肌纤维和信号通路关键分子 mRNA 的表达

skMLCK 基因高表达稳转株中肌纤维类型和信号通路关键分子的 mRNA 表达情况见图 2，肌纤维组成相关分子 MLC 和 MyHC 2a 的 mRNA 表达量极显著升

高 ( $P < 0.01$ )，MyHC slow、MyHC 2x 和 MyHC 2b 的 mRNA 表达量均极显著下调 ( $P < 0.01$ )。信号通路关键分子 MEF2C、CFL2、AMPK $\alpha$ 2、MAPKp38、RhoA 和 CaM 的 mRNA 表达量均显著或极显著下调 ( $P < 0.01$ )。



大写字母不同表示差异极显著 ( $P < 0.01$ )，小写字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

图 2 高表达稳转株中肌纤维组成相关分子 (A) 和信号通路关键分子 (B) 的 mRNA 相对表达量

### 2.3 skMLCK 高表达稳转 C2C12 细胞株肌纤维和信号通路关键因子的蛋白表达

对空白对照组和 3 个试验组进行肌纤维类型和信号通路关键分子的 Western blot 检测和蛋白表达水平分析, 结果见图 3 和图 4。高表达稳转株中, 肌纤维组成成分 MLC 和 MyHC 2a 极显著上调 ( $P < 0.01$ ), MyHC slow、MyHC 2x 和 MyHC 2b 极显著下调 ( $P < 0.01$ )。信号通路的关键分子 RhoA 和 MAPKp38 极显著升高 ( $P < 0.01$ ), CFL2、MEF2C、AMPK $\alpha$ 2 和 CaM 极显著下调 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 稳定低表达细胞株的筛选

转染 48 h 后加入嘌呤霉素 (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行筛选, 培养至 5 d 时出现带绿色荧光的细胞团, 如图 5。

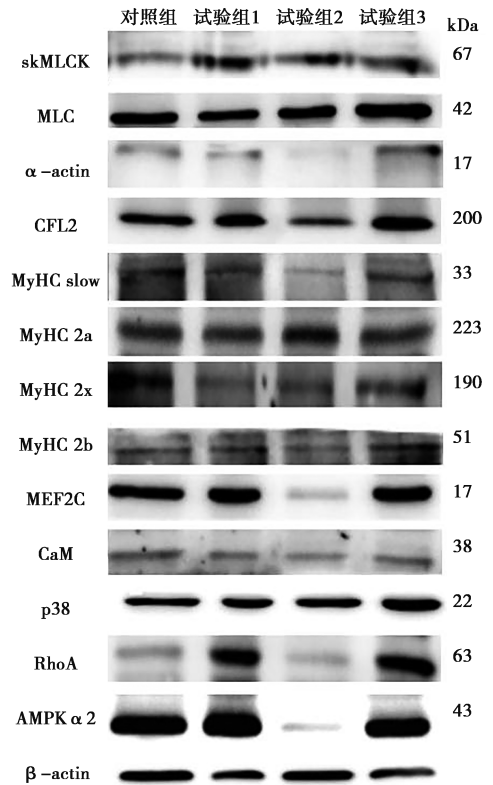


图 3 skMLCK 高表达细胞株中各蛋白表达的 Western blot 检测

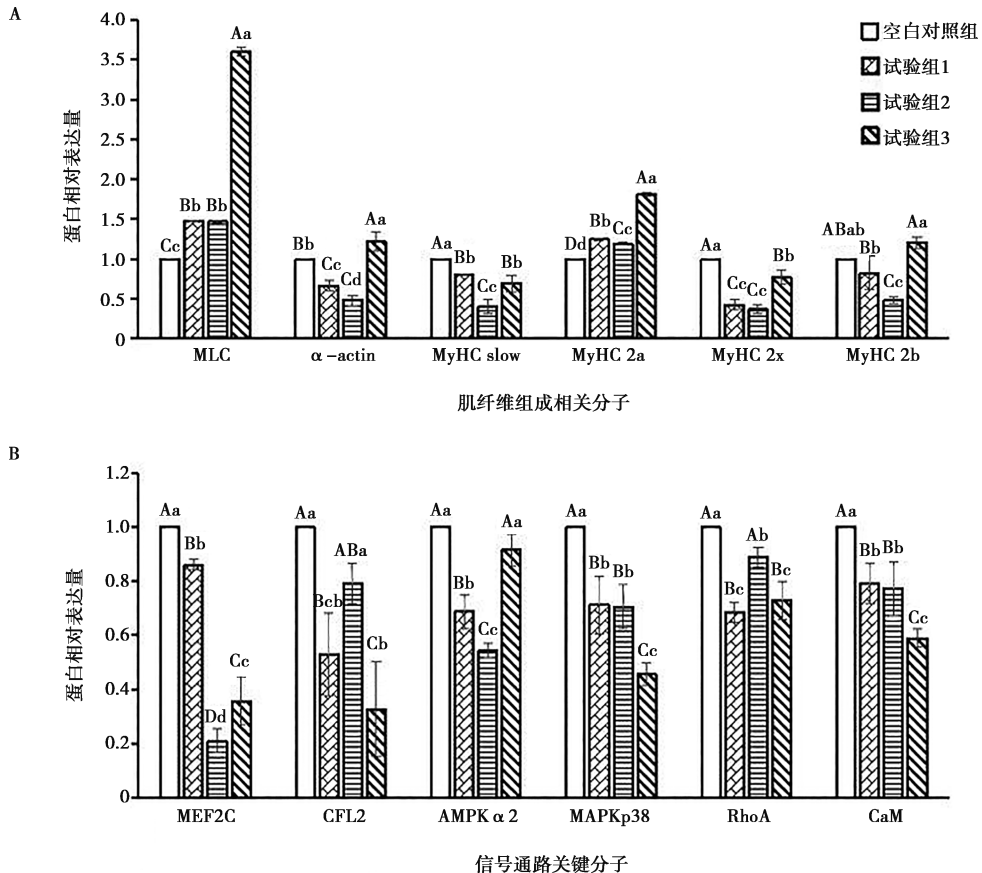


图 4 skMLCK 高表达稳转株中肌纤维组成相关分子 (A) 和信号通路关键分子 (B) 的蛋白表达水平

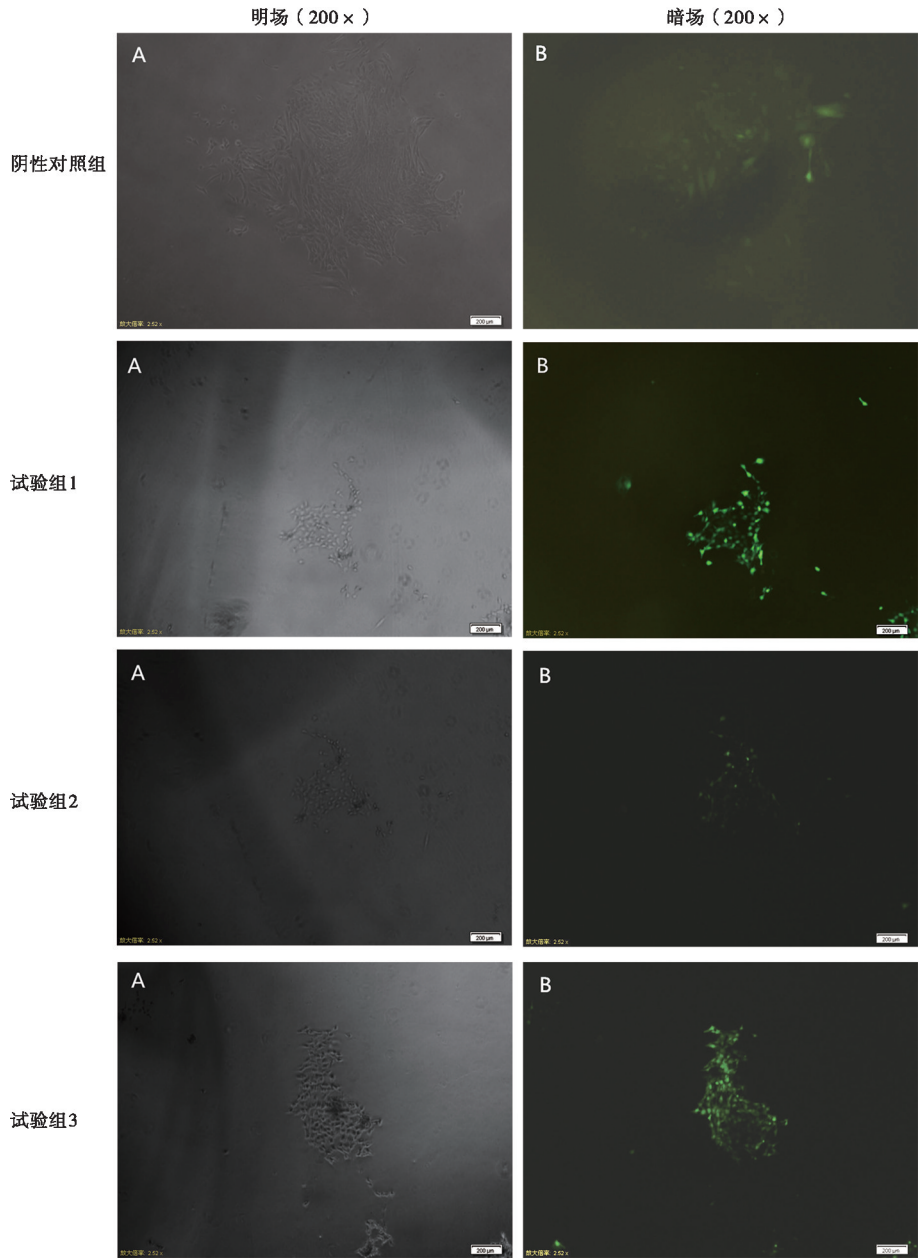


图5 转染GV248-skMLCK-shRNA嘌呤霉素筛选第5天出现的克隆细胞团

### 2.5 低表达稳转 C2C12 细胞株肌纤维和信号通路关键分子 mRNA 的表达

低表达稳转株中，肌纤维组成相关分子 MLC、MyHC 2a、MyHC 2x 和 MyHC 2b 的 mRNA 表达量极显著上调 ( $P < 0.01$ )，MyHC slow 的 mRNA 表达量极显著下调 ( $P < 0.01$ )。信号通路的关键分子 AMPK $\alpha$ 2、RhoA 和 CFL2 的 mRNA 表达量极显著上调 ( $P < 0.01$ )，MAPKp38、CaM 和 MEF2C 的 mRNA 表达量极显著下调 ( $P < 0.01$ )，如图 6。

### 2.6 低表达稳转 C2C12 细胞肌纤维和信号通路关键因子的蛋白表达

对空白对照组和各试验组进行 Western blot 检测，如图 7 所示。低表达稳转株中，肌纤维组成相关分子 MLC、MyHC 2x 和 MyHC 2b 极显著上调 ( $P < 0.01$ )，MyHC slow 和 MyHC 2a 极显著下调 ( $P < 0.01$ )。信号通路的关键分子 RhoA、CFL2、MEF2C、AMPK $\alpha$ 2 和 CaM 极显著升高 ( $P < 0.01$ )，MAPKp38 极显著下调 ( $P < 0.01$ )，见图 8。

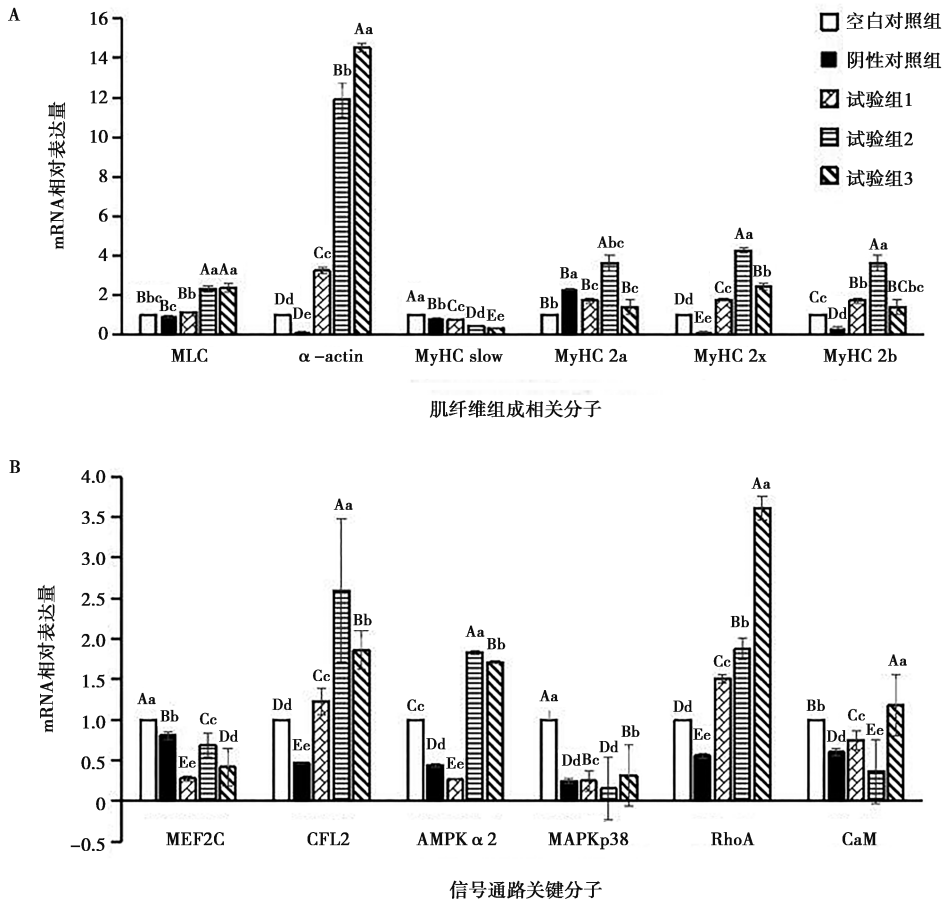


图6 skMLCK低表达稳转株中肌纤维组成成分和信号通路关键分子的mRNA相对表达量

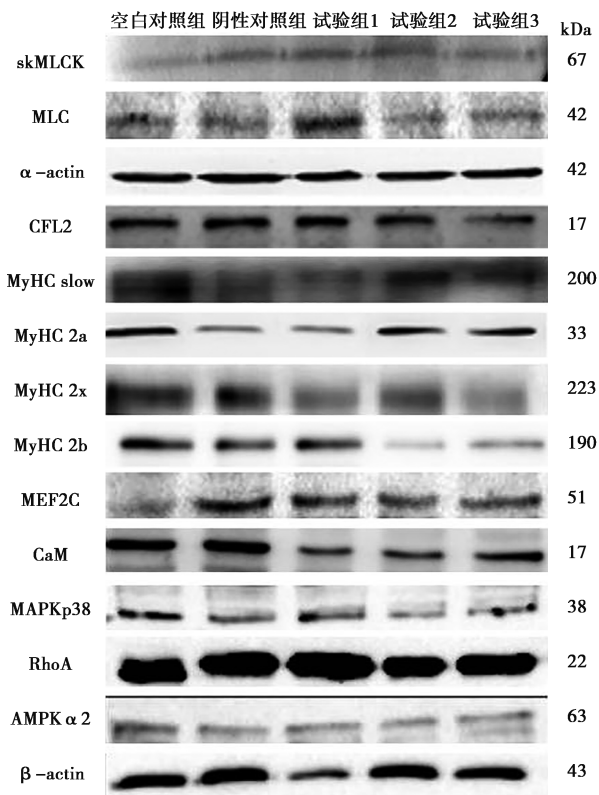


图7 skMLCK低表达稳转株中各蛋白的表达

### 2.7 skMLCK基因高、低表达稳转细胞株各蛋白间的相关分析

将skMLCK基因高、低表达稳转细胞株所有蛋白表达数据合并进行统计学相关分析，相关关系结果见表2。统计分析结果显示存在多种相关关系，如skMLCK与信号通路RhoA显著高度相关 ( $P < 0.05$ )，信号通路MEF2C与AMPK $\alpha$ 2极显著高度相关 ( $P < 0.01$ )，CFL2与信号通路CaM极显著高度相关 ( $P < 0.01$ )，MEF2C和CFL2与肌纤维较多成分相关显著，MEF2C涉及MyHC总量和MyHC 2x，CFL2涉及MyHC总量、MyHC 2b以及 $\alpha$ -actin。

将skMLCK与RhoA间显著性相关进行数学建模后，得到如下模型，其数学关系拟合见图9，图中圆圈为各样本观察值。 $RhoA = 5.037 - 3.505 (skMLCK) + 0.987 (skMLCK)^2$ ， $R^2 = 0.818$ ， $P = 0.033$ 由公式和图9可见，RhoA与skMLCK并不是单纯的线性关系，而是曲线关系。

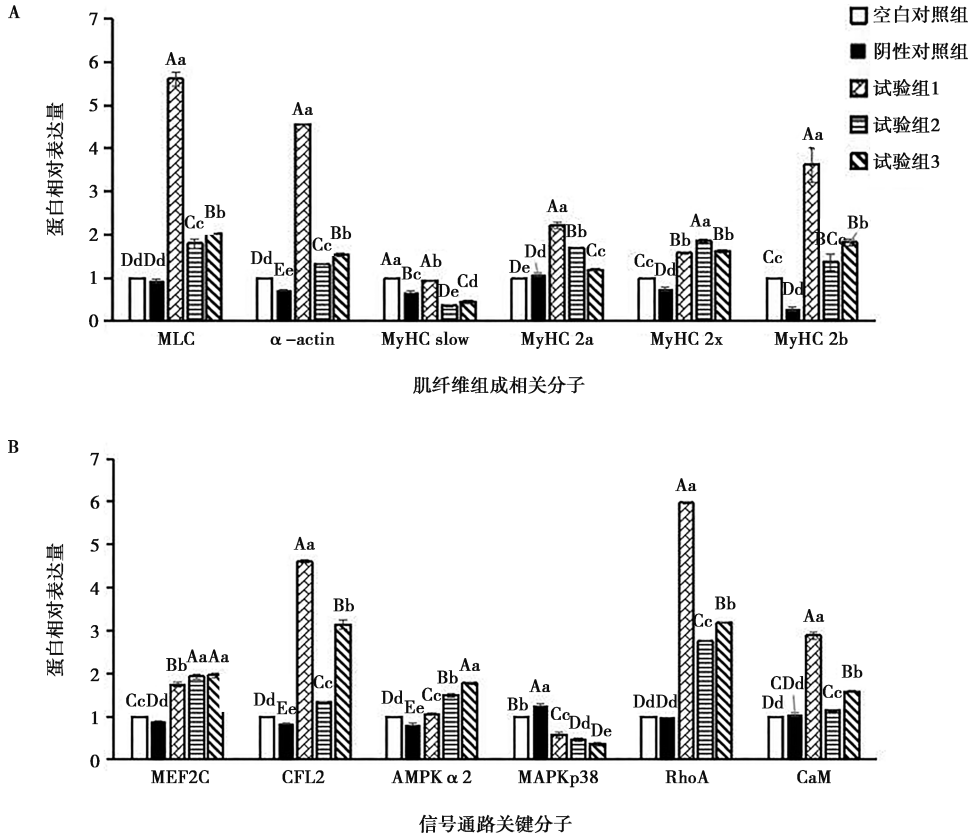


图 8 skMLCK 基因低表达稳转株中肌纤维组成相关分子 (A) 和信号通路关键分子 (B) 的蛋白相对表达量

表 2 skMLCK 高、低表达稳转株各蛋白表达的相关性分析 (n=7)

蛋白	MyHC 2a	MyHC 2x	MyHC 2b	MLC	$\alpha$ -actin	MEF2C	CFL2	AMPK $\alpha$ 2	RhoA	CaM
skMLCK	-0.003	-0.647	-0.294	0.005	-0.334	-0.538	-0.449	-0.413	0.868 *	-0.424
	0.995	0.116	0.522	0.992	0.464	0.213	0.312	0.357	0.011	0.343
MyHC	0.854 *	0.761 *	0.977 **	0.867 *	0.949 **	0.748	0.905 **	0.529	0.081	0.935 **
	0.014	0.047	0.000	0.011	0.001	0.053	0.005	0.222	0.863	0.002
MyHC 2a		0.496	0.798 *	0.910 **	0.812 *	0.430	0.583	0.175	0.367	0.749
		0.258	0.032	0.004	0.026	0.336	0.169	0.707	0.417	0.053
MyHC 2x			0.666	0.384	0.583	0.963 **	0.691	0.853 *	-0.268	0.664
			0.103	0.395	0.169	0.001	0.086	0.015	0.561	0.104
MyHC 2b				0.886 **	0.968 **	0.660	0.947 **	0.442	0.060	0.939 **
				0.008	0.000	0.107	0.001	0.321	0.898	0.002
MLC					0.902 **	0.361	0.746	0.120	0.368	0.864 *
					0.005	0.427	0.054	0.797	0.417	0.012
$\alpha$ -actin						0.567	0.914 **	0.311	0.006	0.965 **
						0.184	0.004	0.497	0.990	0.000
MEF2C							0.722	0.944 **	-0.158	0.662
							0.067	0.001	0.735	0.105
CFL2								0.554	-0.114	0.937 **
								0.197	0.808	0.002

注: \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

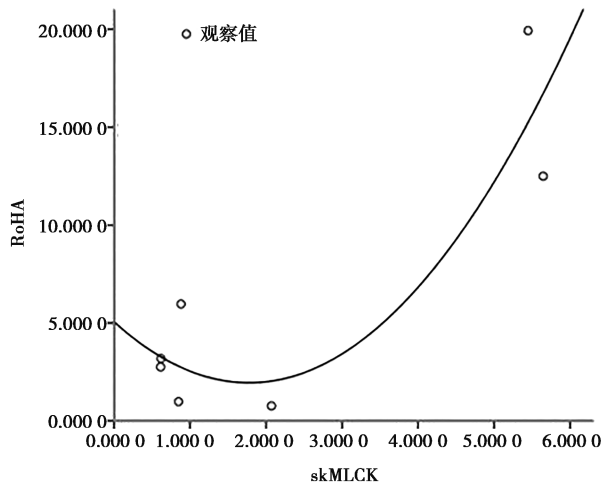


图9 skMLCK蛋白与信号通路RhoA数学模型拟图

### 3 讨论

#### 3.1 skMLCK基因对肌纤维组成相关分子的影响

骨骼肌的结构组成与其在生物体内的功能密不可分。根据接受电刺激信号后肌纤维的收缩特性可以将肌纤维分为慢速收缩型1和快速收缩型2，其中2型可以进一步分为2A型、2x型和2B型纤维<sup>[9]</sup>，4种肌纤维类型分别在纤维直径、收缩速度以及活化和松弛的速度由低到高排列，在氧化能力和抗疲劳方面则由高到低，肌纤维的组织学特征主要由肌球蛋白重链亚型的组成来决定。肌纤维类型的分类依据为每种纤维类型在肌肉总成分中所占的比例、单位面积肌纤维的数量密度、肌原纤维的总数以及这些肌原纤维的横截面积和直径<sup>[10-11]</sup>。1型和2A型肌纤维又被称为氧化纤维，其内部富含更多的线粒体和肌红蛋白。2x型又被称为中间型，2B型又被称为糖酵解纤维，其内部含有更多的糖原和葡萄糖。有研究表明，不同类型肌纤维中酶的活性、葡萄糖的含量，氧化磷酸化能力以及糖酵解能力之间的差异直接影响到肉制品的品质<sup>[12]</sup>。研究发现，skMLCK基因可以通过MEF2C磷酸化促进肌纤维形成<sup>[13]</sup>。在啮齿类动物中，skMLCK基因催化肌球蛋白轻链可以促进肌肉快速收缩运动、提高肌肉力量以及与肌肉相关的其他运动，在高频同心刺激下，skMLCK基因催化肌球蛋白轻链可以使小鼠的趾长伸肌达到最大功率<sup>[14-15]</sup>。

张雯雅等<sup>[16]</sup>通过研究发现当Wnt3 $\alpha$ 、 $\beta$ -catenin基因上调时，MyHC 1的合成水平上调，可以使骨骼肌良性增殖。研究发现提高MyHC 2A的比例可以有效地提高肉的品质<sup>[17]</sup>。本研究通过使用实时定量PCR和Western blot方法检测发现，MyHC总量与skMLCK基因呈负相关关系，即skMLCK基因高表达

量时，MyHC总量降低；skMLCK基因低表达量时，MyHC总量升高，这表明skMLCK基因有抑制肌纤维发育的功能，同时发现skMLCK基因与MyHC 2b和MyHC 2x成负相关关系，即skMLCK基因上调时，MyHC 2b和MyHC 2x总量降低；skMLCK基因下调时，MyHC 2b和MyHC 2x总量升高；结果表明skMLCK可以通过抑制肌纤维总量，控制各肌纤维的所占比例的表达从而达到抑制肌纤维的发育，其中主要抑制的纤维为MyHC 2b和MyHC 2x。

#### 3.2 skMLCK基因对C2C12细胞信号通路关键因子的影响

研究表明，CFL2和MEF2C在猪肌原纤维的形成过程中发挥着重要作用。这些蛋白质主要通过调节4种关键信号通路来影响肌原纤维类型分别为AMPK、CaM、MAPKp38和Rho<sup>[18]</sup>，经过多级信号传递，分别作用到3个共同的关键成分：CFL2、MLCK和MEF2。这3个关键成分分别直接影响F-肌动蛋白丝的组装、肌球蛋白基础及调控轻链磷酸化和肌球蛋白重链的合成，由此最终影响肌动蛋白和肌球蛋白结合形成的具有收缩功能的肌动球蛋白<sup>[19-21]</sup>。

#### 3.3 AMPK信号通路

AMPK是丝氨酸/苏氨酸激酶家族的重要成员，是生物体能量状态的关键传感器，它在调节细胞能量平衡方面起着至关重要的作用。当能量水平下降时，AMPK通过增加能量产生以及减少能量消耗来促进机体ATP的产生和储备，从而提高细胞的能量效率<sup>[22-23]</sup>。AMPK可分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 这3种亚型，每种亚型都有由2~3种基因所编码的异构体分别为 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ ， $\alpha$ 亚型在机体内主要起催化作用，而 $\beta$ 和 $\gamma$ 亚型在维持三聚体稳定性和作用底物特异性方面起重要作用。AMPK $\alpha 1$ 主要分布在肾脏、心脏和肝脏等重要器官中，而AMPK $\alpha 2$ 主要分布在骨骼和心脏组织中<sup>[24-25]</sup>。有研究表明AMPK与肌纤维类型存在着密切联系，一些啮齿类动物的肌纤维被分为I型和II型的主要原因是由于组成肌肉之间的AMPK亚基和AMPK复合物表达存在差异。I型纤维的AMPK $\alpha 1$ 、AMPK $\alpha 2$ 和AMPK $\beta 1$ 表达量较高。与此相反，II型纤维的AMPK $\beta 2$ 、AMPK $\gamma 2$ 和AMPK $\gamma 3$ 的表达量较高<sup>[26]</sup>。研究发现，AMPK的活化可促进MEF2C的表达<sup>[27]</sup>。AMPK的激活可以促进肌纤维类型向氧化型转化<sup>[28]</sup>。在本试验中，skMLCK与AMPK $\alpha 2$ 成负相关关系，即当skMLCK基因高表达时，AMPK $\alpha 2$ 表达量降低；skMLCK低表达时，AMPK $\alpha 2$ 表达量升高；AMPK $\alpha 2$ 与MyHC 2x和MyHC 2b表达变化一致。

### 3.4 CaM/钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) 信号通路

Ca<sup>2+</sup>是细胞信号通路中重要的第二信使，主要影响转录、细胞生长和细胞凋亡等方面。1965年，Ebashi等<sup>[29]</sup>首次发现了一种能与钙离子结合并在细胞内传递钙离子信号的蛋白质，随后Cheung<sup>[30]</sup>对该蛋白进行了深入研究，并将其命名为钙调蛋白。有研究表明CaM为Ca<sup>2+</sup>最重要的载体，CaM本身并不具备任何酶的活性，只有当CaM与Ca<sup>2+</sup>结合时才能发挥其生物学作用。钙调蛋白在真核生物中十分重要，它可以控制大量的靶蛋白并参与多种细胞功能，同时钙调蛋白也具备高度的保守性<sup>[31]</sup>。CaM可通过结合多种靶蛋白来发挥作用，例如CaM/Ca<sup>2+</sup>通路在信号传导中发挥关键作用<sup>[32]</sup>。本研究得出skMLCK通过调节MEF2C和CAM的表达，从而引起肌肉性状的改变。CaM在C2C12肌肉纤维细胞中可以促进快肌和慢肌的生长和调节<sup>[33]</sup>。有研究表明，当肌肉细胞内的skMLCK浓度增加时，skMLCK作为CaM的下游，可以负反馈调节CaM的表达，使CaM的表达收到负反馈抑制作用，进而导致CaM下游的Cabin1表达量降低，Cabin1为CaM依赖激酶的下游分子，而Cabin1的下游分子是MEF2C，因此MEF2C与CaM的表达量呈正相关，这与本研究结果一致<sup>[34]</sup>。CaM诱导慢肌纤维的发育生成，能够促进慢肌纤维的表达量增加。本研究中，当skMLCK低表达时，CaM表达量增加时，MyHC slow表达量降低，其原因可能为skMLCK低表达时，使其他信号通路分子表达量变化，究其原因，需进一步验证。

### 3.5 MAPKp38 信号通路

MAPK激酶是一种广泛存在于哺乳动物细胞内的一组高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，其在各种重要的生物信号系统中发挥着关键作用<sup>[35]</sup>。MAPK信号通路结构主要由细胞外信号调节激酶(ERK1/2)、Jun氨基末端激酶(JNK1/2/3)和细胞外信号调节激酶5(ERK5)三种激酶共同组成<sup>[36]</sup>。有研究表明，当细胞激活时p38从细胞质中转移到细胞核中，激活下游的多种转录因子，包括MEF2C、P53等<sup>[37]</sup>。MEF2C是MEF2基因家族成员之一，参与多种肌肉生长发育过程，因此MEF2C对肌肉生长和发育具有重要作用<sup>[38]</sup>。研究表明，当MAPKp38的表达量减少时会导致肌球蛋白重链MyHC 2b和MyHC 2x的表达量减少<sup>[39-40]</sup>。在本试验中，skMLCK基因增加时，MAPKp38表达量增加，快肌纤维MyHC 2b、MyHC 2x的表达量反而降低，其原因可能为MAPKp38表达量增加不高，即skMLCK基因与MAPKp38信号通路并无显著相关。

### 3.6 Rho 信号通路

Rho激酶是AGC激酶家族的成员，在各种生物过程中发挥着至关重要的作用，包括调节细胞收缩、运动、形态、极性、细胞分裂、基因表达等<sup>[41]</sup>。研究表明，骨骼肌中的MLC作为Rho激酶ROCK2的下游底物之一，其具有增加与肌动蛋白丝交联产生的收缩力的能力，两者存在正反馈调节关系<sup>[42]</sup>。skMLCK属于MLCK的一种亚型，目前研究发现Ca<sup>2+</sup>可以激活MLCK，进而促使体内MLCK的中丝氨酸发生磷酸化，将ATP水解转化为能量，引起体内肌肉进行收缩运动<sup>[43-44]</sup>。

## 4 结论

C2C12细胞中skMLCK基因可能通过改变RhoA信号通路的表达来影响肌纤维的组成，skMLCK基因对肌纤维的生长发育具有抑制作用。skMLCK基因不同程度地抑制了CFL2的表达，同时对其他信号通路(AMPK、CaM和MAPK)也产生影响。

## 参考文献:

- [1] LI M, ZHENG W. All-atom molecular dynamics simulations of actin-myosin interactions: a comparative study of cardiac  $\alpha$  myosin,  $\beta$  myosin, and fast skeletal muscle myosin [J]. *Biochemistry*, 2013, 52 (47): 8393-8405.
- [2] 王丽莎, 王航, 李侠, 等. 不同部位猪肉肌纤维类型组成与品质特性比较研究 [J]. *肉类研究*, 2020, 34 (6): 1-7.
- [3] 成志敏, 张宁芳, 王媛媛, 等. 基于RNA-Seq技术筛选影响猪肌纤维性状的候选基因 [J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50 (5): 918-929.
- [4] KHAPCHAEV A Y, WATTERSON D M, SHIRINSKY V P. Phosphorylation-dependent subcellular redistribution of small myosin light chain kinase [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868 (11): 119104.
- [5] OYA R, TSUKAMOTO O, HITSUMOTO T, et al. Gene transfer of skeletal muscle-type myosin light chain kinase via adeno-associated virus 6 improves muscle functions in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (3): 1747.
- [6] ANIS M, GONZALES J, HALSTROM R, et al. Non-muscle MLCK contributes to endothelial cell hyper-proliferation through the ERK pathway as a mechanism for vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (21): 13641.
- [7] 丛玲, 田玉民, 张尚松, 等. 稳定表达猪skMLCK基因的小鼠成肌细胞株构建及鉴定 [J]. *畜牧与兽医*, 2015, 47 (1): 76-81.
- [8] ANGELIDIS A, VANDENBOOM R. The effect of muscle length on post-tetanic potentiation of C57BL/6 and skMLCK<sup>-/-</sup> mouse EDL muscles [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2022, 43 (3): 99-111.
- [9] 吴振岭, 周力, 张峰硕, 等. 不同蛋白水平饲料对藏羊肌纤维类型转化及肉质特性的影响 [J]. *草业科学*, 2024, 41 (5): 1210-1220.

- [10] YANG Y, LIANG G, NIU G, et al. Comparative analysis of DNA methylome and transcriptome of skeletal muscle in lean-, obese-, and mini-type pigs [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39883.
- [11] HUANG Y, CAI L, DUAN Y, et al. Whole-genome sequence-based association analyses on an eight-breed crossed heterogeneous stock of pigs reveal the genetic basis of skeletal muscle fiber characteristics [J]. *Meat Sci*, 2022, 194: 108974.
- [12] WANG Y, WANG Q, DAI C, et al. Effects of dietary energy on growth performance, carcass characteristics, serum biochemical index, and meat quality of female Hu lambs [J]. *Anim Nutr*, 2020, 6 (4): 499-506.
- [13] AL MADHOUN A S, MEHTA V, LI G, et al. Skeletal myosin light chain kinase regulates skeletal myogenesis by phosphorylation of MEF2C [J]. *EMBO J*, 2011, 30 (12): 2477-2489.
- [14] WILLIAM G, JIANG H. The effect of skeletal myosin light chain kinase gene ablation on the fatigability of mouse fast muscle [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2011, 31 (2): 337-348.
- [15] BOWSLAUGH J, GITTINGS W, VANDENBOOM R. Myosin light chain phosphorylation is required for peak power output of mouse fast skeletal muscle *in vitro* [J]. *Pflug Arch Eur J Phy*, 2016, 468 (11/12): 2007-2016.
- [16] 张雅雯, 李姜嫒, 李沅骋, 等. 针刀干预对颈型颈椎病兔颈多裂肌细胞中 Wnt3 $\alpha$ 、 $\beta$ -catenin 和 MyHC1 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41 (10): 130-134.
- [17] YANNA H, QIN X, YUEYUE C, et al. Resveratrol increases the proportion of oxidative muscle fiber through the Adipo R1-AMPK-PGC-1 $\alpha$  pathway in pigs [J]. *J Funct Foods*, 2020, 73: 104090.
- [18] 焦东东, 蔡辉. 肌球蛋白轻链在血管平滑肌收缩中的机制研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2009, 7 (12): 1452-1454.
- [19] NGUYEN M T, MIN K H, KIM D, et al. CFL2 is an essential mediator for myogenic differentiation in C2C12 myoblasts [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2020, 533 (4): 710-716.
- [20] KAZAKOVA O A, KHAPCHEAV A Y, SHIRINSKY V P. MLCK and ROCK mutualism in endothelial barrier dysfunction [J]. *Biochimie*, 2020, 168: 83-91.
- [21] TAYLOR M V, HUGHES S M. Mef2 and the skeletal muscle differentiation program [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 33-44.
- [22] LYU T, TIAN C, TAN T, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) channel: a global bibliometric analysis from 2012 to 2021 [J]. *Channels (Austin)*, 2022, 16 (1): 60-71.
- [23] YANAGI T, KIKUCHI H, SUSAKI K, et al. Absence of ULK1 decreases AMPK activity in the kidney, leading to chronic kidney disease progression [J]. *Genes Cells*, 2023, 28 (1): 5-14.
- [24] YAN C H, LIU H W, TIAN X X, et al. AMPK $\alpha$ 2 controls the anti-atherosclerotic effects of fish oils by modulating the SUMOylation of GPR120 [J]. *Nat Commun*, 2022, 13 (1): 7721.
- [25] CARATTI G, DESGEORGES T, JUBAN G, et al. Macrophagic AMPK $\alpha$ 1 orchestrates regenerative inflammation induced by glucocorticoids [J]. *Embo Rep*, 2023, 24 (2): e55363.
- [26] KRISTENSEN D E, ALBERS P H, PRATS C, et al. Human muscle fiber type-specific regulation of AMPK and downstream targets by exercise [J]. *J Physiol*, 2015, 593 (8): 2053-2069.
- [27] LIANG Y, YUAN W, ZHU J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes the expression of GLUT4 glucose transporter through MEF2 and Zac1 in cardiomyocytes [J]. *Metabolism*, 2015, 66 (12): 1682-1693.
- [28] XUE Y, HUANG Z, CHEN X, et al. Naringin induces skeletal muscle fiber type transformation via AMPK/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway in mice and C2C12 myotubes [J]. *Nutr Res*, 2021, 92: 99-108.
- [29] EBASHI S, KODAMA A. A new protein factor promoting aggregation of tropomyosin [J]. *J Biomech*. 1965, 58 (1): 107-108.
- [30] CHEUNG W Y. Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase: demonstration of an activator [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 1970, 38 (3): 533-538.
- [31] MUNK M, VILLALOBO E, VILLALOBO A, et al. Differential expression of the three independent CaM genes coding for an identical protein: potential relevance of distinct mRNA stability by different codon usage [J]. *Cell Calcium*, 2022, 107: 102656.
- [32] GECK R C, COBLENTZ C, ROFELTY A, et al. CaM kinase I regulation of p53 in breast cancer cells [J]. *J Mol Biol*, 2020, 4 (2): 7-23.
- [33] FAJARDO V A, WATSON C J F, BOTT K N, et al. Neurogranin is expressed in mammalian skeletal muscle and inhibits calcineurin signaling and myoblast fusion [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 317 (5): C1025-C1033.
- [34] HERBST S, MAUCHER D, SCHNEIDER M, et al. Munc13-like skMLCK variants cannot mimic the unique calmodulin binding mode of Munc13 as evidenced by chemical cross-linking and mass spectrometry [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (10): e75119.
- [35] JOHNSON G L, LAPADAT R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases [J]. *Science*, 2002, 298 (5600): 1911-1912.
- [36] SUN Y, LIU W Z, LIU T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Sig Transd*, 2015, 35 (6): 600-604.
- [37] 罗瑜平. 自噬调控 p38/MEF2C 通路调节突触相关蛋白的表达对改善孤独症症状的研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2019.
- [38] 朱弘淼, 沈芷伊, 张宇婷, 等. MEF2C 基因调节猪骨骼肌肌纤维的发育表达 [J]. *解剖科学进展*, 2018, 24 (4): 350-353.
- [39] 周娟, 孟祥琼, 秦鸿楠, 等. 不同海拔牦牛骨骼肌肌纤维类型 and MYHC 基因表达的比较 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (6): 1263-1269.
- [40] 史卓言, 刘小平, 冀祥, 等. 豫西黑猪不同屠宰体重肌纤维组织学及成肌调控基因发育性变化 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49 (12): 4582-4592.
- [41] AMANO M, NAKAYAMA M, KAIBUCHI K. Rho-kinase/ROCK: a key cytoskeleton regulator and cell polarity regulator [J]. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2010, 67 (9): 545-554.
- [42] 胡跃强, 向军军, 邓秋媚, 等. Rho 激酶抑制剂介导 Rho A/ROCK2 通路对 VaD 大鼠海马神经元的保护机制 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2021, 38 (12): 1060-1063.
- [43] BUNDA J, GITTINGS W, VANDENBOOM R. Myosin phosphorylation improves the contractile economy of mouse fast skeletal muscle during staircase potentiation [J]. *J Exp Biol*, 2018, 221 (Pt 2): jeb167718.
- [44] STULL J T, KAMM K E, VANDENBOOM R. Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle [J]. *Aech Biochem Biophys*, 2011, 510 (2): 120-128.