机制研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001677

Lrtm1基因在成肌分化过程中的功能探索

熊　雷,李浩可,聂　茂,邓忠良
(重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆　400010)

【摘　要】**目的**:观察成肌分化过程中 C2C12 细胞 Lrtm1 表达;构建小鼠 Lrtm1 慢病毒过表达载体;筛选稳定表达外源 Lrtm1 细胞株诱导其分化后观察对成肌分化标志基因 Myogenin、Myosin 的影响;发现 Lrtm1 蛋白质表达水平受调控的机制。**方法**:诱导 C2C12 细胞分化用 Hoechst 染色细胞核;将小鼠 Lrtm1 基因连接到慢病毒载体质粒 pLJM1-GFP 上并进行慢病毒包装;筛选稳定过表达 Lrtm1 基因的 C2C12 细胞系，诱导分化 Lrtm1-DDK 组、GFP 组检测对成肌分化标志基因 Myogenin、Myosin 表达的影响;MG132 处理 C2C12-Lrtm1-DDK 细胞系后,观察内源性 Lrtm1 蛋白质表达。**结果**:诱导分化过程中,肌管形成,Lrmt1、Myosin mRNA 水平随分化的进行表达上升;成功构建重组 pLJM1-Lrtm1-DDK 表达载体;成功筛选稳定表达外源 Lrtm1 细胞株;诱导稳定细胞系分化后,real-time PCR 在 144 h 时显示 Lrtm1-DDK 组(272.1 ± 18.22)Myogenin mRNA 水平较 GFP 组(332.41 ± 41.21)减少(P<0.05);Lrtm1-DDK 组(76.11 ± 10.47)Myogenin mRNA 水平较 GFP 组(145.51 ± 10.02)减少(P<0.05);C2C12 细胞中 Lrtm1 蛋白质被蛋白酶体降解。**结论**:Lrtm1 基因在成肌分化过程中高表达;过表达 Lrtm1 基因部分抑制了 Myogenin、Myosin 基因的表达;Lrtm1 蛋白质表达水平受蛋白酶体降解调控。

【关键词】Lrtm1 基因;成肌分化;慢病毒载体;肌减少症
【中图分类号】R322.7+4　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2018-04-03

Functional exploration of Lrtm1 gene in myogenic differentiation

Xiong Lei, Li Haoke, Nie Mao, Deng Zhongliang
(*Department of Orthopedics, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To observe Lrtm1 expression in C2C12 cells, to construct a lentiviral vector overexpressing Lrtm1 gene effectively in C2C12 cells, to determine its role in myoblast differentiation and to explore the mechanism by which the expression level of Lrtm1 protein is regulated. ***Methods***: The differentiation of C2C12 cells was induced and the nucleus was stained by Hoechst. The mouse Lrtm1 gene was recombined with lentiviral vectors pLJM1-GFP. C2C12 cells which overexpress ectopic Lrtm1 were selected. After treating with C2C12-Lrtm1-DDK cell lines with MG132, the expression of endogenous Lrtm1 protein was observed. ***Results***: Myotubes had formed during its differentiation. The expression of Lrmt1 and Myosin mRNA increased during differentiation.The recombinant pLJM1-Lrtm1-DDK vector was successfully constructed and stable cell lines were screened. The results of real-time PCR at 144 h showed that the Myogenin mRNA level in the Lrtm1-DDK group(272.1 ± 18.22) was lower than that in the GFP group(332.41 ± 41.21) (P<0.05). The Myosin mRNA level was significantly lower in Lrtm1-DDK group(76.11 ± 10.47) than in GFP group(145.51 ± 10.02) (P<0.05). Lrtm1 protein was degraded by the proteasome in C2C12 cells. ***Conclusion***: Lrtm1 gene is highly expressed during myogenic differentiation. Overexpression of Lrtm1 partially inhibits the expression of Myogenin and Myosin. Lrtm1 protein is degraded by the proteasome.

【Key words】Lrtm1 gene; differentiation of skeletal muscle; lentiviral vector; sarcopenia

肌肉减少症是指骨骼肌在衰老、损伤修复等过程中质量减少及其功能减退的综合征[1-2]。该病具体特征为肌肉萎缩(肌肉体积减小)及肌肉组织质量降低[3-4]。常见发病机制为骨骼肌再生能力受损,脂肪代替肌纤维,纤维化增加,肌肉代谢改变,氧化应激导致神经肌肉接头的退化等[2-3,5]。如何提高骨骼肌的再生能力,是找到有效治疗骨骼肌疾病的关键。骨骼肌再生修复与肌卫星细胞成肌分化相关[2,6]。当骨骼肌损伤后,静息的肌卫星细胞被激活,重新进

作者介绍:熊　雷,Email:1044232072@qq.com,
研究方向:肌肉再生与修复。
通信作者:邓忠良,Email:zhongliang.deng@qq.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81501867)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20180503.1344.028.html
(2018-05-04)

入细胞周期，继而大量增殖、向肌细胞分化并融合形成新的肌纤维[2,7]。肌卫星细胞向骨骼肌的定向分化过程受一系列成肌转录因子的层级调控[3,8-10]。除此之外，本实验室前期研究发现未知功能基因Lrtm1也参与成肌分化的调控。

关于基因 Lrtm1（leucine-rich repeats and transmembrane domains 1）的相关研究报道较少。Lrtm1是位于人染色体 3p14.3 的蛋白编码基因[11-12]。Lopez-Jimenez 等[13]报道，在对先天性膈肌发育缺陷的研究中发现，Lrtm1 在膈肌发育障碍的基因敲除小鼠中表达明显下降。Samata 等[14]报道，Lrtm1 与神经干细胞分化有关，是其终末分化的细胞表面标记分子。对于 Lrtm1 参与成肌分化的调控机制还未见相关报道，本文将深入研究 Lrtm1 调控成肌分化以及Lrtm1蛋白质表达水平受调控的调节过程。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

C2C12 细胞（小鼠胚胎肌母细胞）购自中国科学院干细胞库，人胚肾 HEK293T 细胞购自中国科学院干细胞库。

DMEM（H）、磷酸盐缓冲液（PBS）、胰酶 Trypsin-EDTA 购自美国 HyCLone 公司；*Age* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ内切酶购自 NEB；DNA 凝胶回收试剂盒购自 Takara；Lrtm1-DDK 质粒、抗体购自 ORIGENE；Lrtm1 截断体质粒自己构建；Lrtm1 小鼠一抗购自 Santa Cruz；pLJM1-GFP 由重庆大学生命科学学院馈赠；psPAX2、pVSV-G 购自淼灵生物；Polybrene 购自 Santa Cruz；FuGENE 转染试剂购自 Progema；DNA 测序由擎科生物完成；MG132 购自 Progema；Hoechst 购自 Invitrogen。

1.2 方法

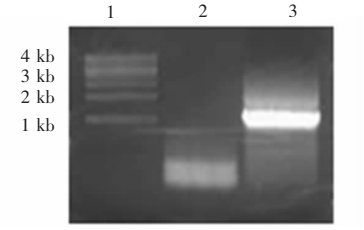
1.2.1 诱导 C2C12 成肌细胞系分化、染色 C2C12 成肌细胞培养于 10%FBS 的 DMEM 中，16 h 后观察细胞密度约 80%，更换 2%马血清（HS）DMEM 分化培养基[15-16]。分化培养基每间隔 24 h 更换 1 次，分别按时间点诱导 C2C12 细胞分化。固定时间点 Hoechst 染色细胞核，10 min 后观察细胞核形态。

1.2.2 qRT-PCR 检测 Lrtm1 基因 mRNA 表达水平 收集 0、48、72、96 h 组细胞并提取总 RNA，紫外分光光度计检测RNA 的浓度和纯度。各取 700 ng RNA 进行反转录（42 ℃ 15 min；85 ℃ 5 s）。qRT-PCR 反应条件为 95 ℃，2 min；95 ℃ 10 s；55 ℃ 20 s；60 ℃ 5 s；40 个循环。重复 3 次实验，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对 mRNA 含量，$\Delta C_t = C_t$（目的基因）$- C_t$（内参基因 GAPDH），$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$（实验组）$- \Delta C_t$（对照组），$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组目的基因 mRNA 含量相对对照组改变的倍数。各基因引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

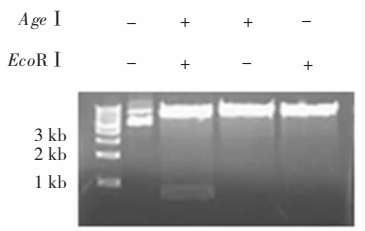
基因	引物序列	序列长度（bp）
Lrtm1	F:5-TGTTGAATGAGGGTTTGTGCT-3	139
	R:5-TCCACGGAGTTTGATGATGG-3	
DDK	F:5-TGAGAAGATGGGAAGTAAGG-3	142
	R:5-CTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGT-3	
Myogenin	F:5-CTGACCCTACAGACGCCCAC-3	162
	R:5-TGTCCACGATGGACGTAAGG-3	
Myosin	F:5-CCAAGGGCCTGAATGAGGAG-3	153
	R:5-GCAAAGGCTCCAGGTCTGAG-3	
GAPDH	F:5-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3	150
	R:5-AGTTGGGATAGGGCCTCTCTTG-3	

1.2.3 重组质粒的构建 为进一步研究 Lrtm1 基因在成肌分化过程中的作用，本研究决定构建稳定过表达 Lrtm1 的细胞株。将目的基因 Lrtm1 进行扩增，用琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物，电泳结果显示，PCR 扩增产物的长度为 1 164 bp，与理论计算长度相同（图 1A）。pLJM1-GFP 载体用 *Age* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ内切酶（37 ℃，60 min）酶切进行琼脂糖凝胶电泳，结果显示 pLJM1 载体双酶切后出现的各个片段与理论计算的条带相符（图 1B）。连接转化后挑选 8 个单克隆菌落进行菌液 PCR，实验结果表明 1~6 号，8 号克隆成功连接 Lrtm1 基因（图1C）。

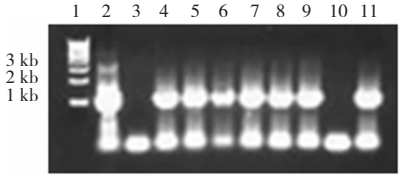


1：Marker；2：阴性对照；3：PCR 产物

A. Lrtm1 基因 PCR 产物电泳鉴定



B. pLJM1-GFP 载体酶切电泳图



1：Marker；2：阳性对照；3：阴性对照；4~11：单克隆菌落

C. 阳性克隆 PCR 鉴定

图 1 重组质粒的构建

测序结果显示，目的质粒 pLJM1-Lrtm1-DDK 与 GenBank 信息库小鼠 Lrtm1 mRNA 信息完全一致。

1.2.4 慢病毒的包装 将 HEK293T 细胞置于含 10%FBS 的 DMEM 中，在 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度培养箱中培养，按照fu-GENE 转染试剂说明书转染重组质粒 pLJMI-Lrtm1-DDK 和包装质粒（psPAX2、pVSV-G）制备转染混合液。具体方法：pLJMI-Lrtm1-DDK、psPAX2、pVSV-G 3 种质粒以 2:2:1 的比例在转染试剂的辅助下共同过表达于 HEK293T 细胞中，72 h 后将细胞上清液回收，并用病毒浓缩试剂盒浓缩病毒液，将包装好的病毒液收集，命名 Lrtm1-DDK（LV）、GFP（LV），LV(-)4 ℃保存。

1.2.5 Western blot 检测重组质粒 pLJM1-Lrtm1-DDK 在 HEK293T 表达 将重组的质粒载体 pLJM1-Lrtm1-DDK、阳性对照质粒 pCMV6-Lrtm1-DDK、阴性对照质粒 pLJM1-GFP 瞬时转染于 HEK293T 细胞中，转染后收集细胞进行 Western blot 检测。5%脱脂牛奶封闭 1 h 后加入一抗（anti-DDK 抗体，1:2 000；anti-GFP 抗体，1:2 000，4 ℃孵育过夜；HSP70 抗体，1:2 000，常温孵育 1 h），再加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1:5 000），室温孵育 1 h。用 ChemiDOCTMXRS+ imanging syetem 化学发光成像仪曝光，使用 Quantity One 软件分析处理。分析 HEK293T 细胞中的 Lrtm1 蛋白质表达。

1.2.6 Lrtm1-DDK（LV）、GFP（LV）感染 C2C12 成肌细胞 C2C12 成肌细胞培养于含 10%胎牛血清（FBS）的 DMEM 中（含 1.5 mmol/L L-谷氨酰胺，100 U/mL 青霉素，100 μg/mL 链霉素）。具体方法：生长培养基、病毒液以 9:1 的比例培养 C2C12 细胞 72 h，观察有荧光表达后，用 10 mg/mL 嘌呤霉素筛选 96 h，收集细胞用 qRT-PCR 检测 Lrtm1 mRNA 水平表达。

1.2.7 qRT-PCR 检测 Lrtm1、Myogenin、Myosin 基因 mRNA 水平表达 诱导 C12C12-Lrtm1 组和 C2C12-GFP 组细胞系分化 0、96、120、144 h 后，收集 Lrtm1-DDK（LV）、GFP（LV）组细胞并提取总 RNA，紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度。各取 700 ng RNA 进行反转录（42 ℃ 15 min；85 ℃5 s）。qRT-PCR 反应条件为 95 ℃，2 min；95 ℃ 10 s；55 ℃ 20 s；60 ℃ 5 s；40 个循环。分析 C2C12 细胞中的Lrtm1、Myogenin、Myosin mRNA 水平表达。

1.2.8 Western blot 检测 Lrtm1、Myogenin、Myosin 蛋白质水平表达 诱导 C12C12-Lrtm1 组和 C2C12-GFP 组细胞系分化 0、96、120、144 h 后，收取细胞样本。5%脱脂牛奶封闭 1 h 后加入一抗（anti-DDK 抗体，1:2 000，4 ℃孵育过夜 anti-Myosin，1:2 000，4 ℃孵育过夜，anti-Myogenin，1:2 000，4 ℃孵育过夜；anti-Tubulin，1:2 000，1 h），再加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1:5 000），室温孵育 1 h。分析 C2C12 细胞中的 Lrtm1、Myogenin、Myosin 蛋白质水平表达。

1.2.9 观察 Lrtm1 蛋白质降解情况 ①观察内源性 Lrtm1 蛋白质降解情况：在 C2C12-Lrtm1-DDK 细胞系中用 MG132 处理 0、8 h 后用 Western blot 检测 Lrtm1 蛋白质表达。②观察外源性 Lrtm1 蛋白质情况：在 C2C12 细胞中过表达 Lrtm1-DDK 质粒分别表达 24、48、72 h，用 Western blot 检测 Lrtm1 蛋白质表达。

1.3 统计学方法

所有数据资料采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行处理，所得到的数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多样本均数比较用单因素方差分析，其中两两比较用 LSD-t 检验、SNK-q 检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 C2C12 细胞诱导分化过程中 Lrtm1、Myosin mRNA 水平升高

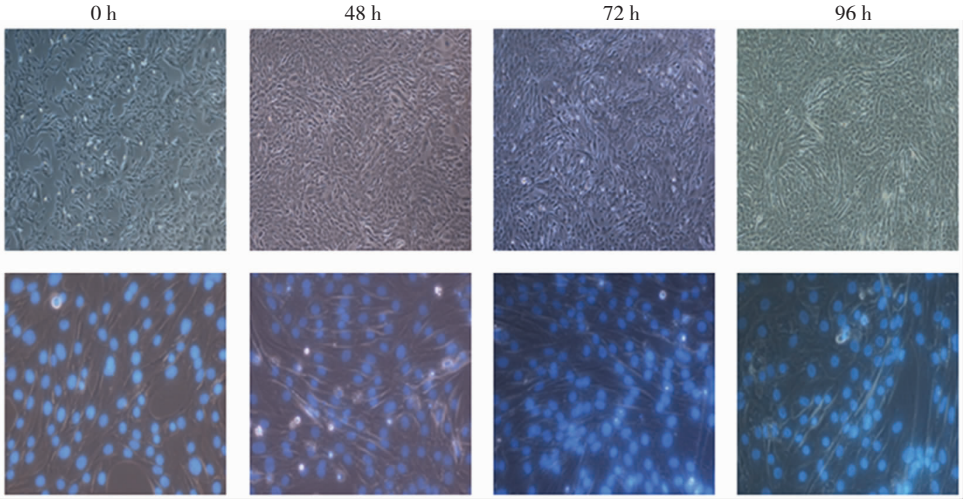
将 C2C12 细胞诱导分化 0、48、72、96 h 后，用 Hoechst 染细胞核镜下观察细胞融合情况并同时收取细胞样品，用 qRT-PCR 检测内源性 Lrmt1 mRNA 水平表达（图 2A、B）。结果显示，随诱导分化时间延长，96 h 组肌管中出现多个细胞核。以 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 比较 Myosin、Lrtm1 mRNA 水平定量结果。以 0 h 组为对照，在 Myosin mRNA 水平表达中，48 h 组、72 h组、96 h 组分别为 0 h 组的（5.35 ± 2.24）、（28.07 ± 7.41）、（77.05 ± 3.09）倍。方差分析 Myosin mRNA 表达水平具有统计学意义（F=210.000，P=0.000）。组间两两比较 72 h 组较 48 h 组增加（t_D=6.670，P=0.000），96 h 组较 72 h 组增加（t_D=14.390，P=0.000）。在 Lrtm1 mRNA 水平表达中，48 h 组、72 h 组、96 h 组分别为 0 h 组的（14.27 ± 4.13）、（91.41 ± 10.21）、（141.5 ± 12.73）倍。方差分析 Lrtm1 mRNA 表达水平具有统计学意义（F=186.100，P=0.000）。组间两两比较 72 h 组较 48 h 组增加（t_D=11.230，P=0.000），96 h 组较 72 h 组增加（t_D=14.390，P=0.000）。Myosin mRNA 表达水平随诱导分化时间延长升高，与文献报道相符，表明成肌分化模型诱导成功。Lrtm1 mRNA 表达水平同样随分化过程的进行逐步升高。

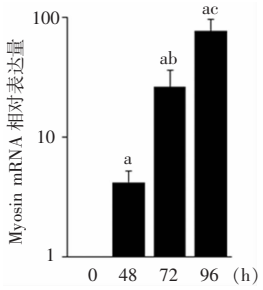
2.2 重组质粒 pLJM1-Lrtm1-DDK 在 HEK293T 细胞中表达

为验证此重组质粒是否能够正确表达 Lrtm1 蛋白质，将重组质粒 pLJM1-Lrtm1-DDK、pCMV6-Lrtm1-DDK、pLJM1-GFP 瞬时转染在 HEK293T 细胞中，转染后 48 h，裂解细胞用 DDK 抗体检测，结果如图 3 所示，pLJM1-Lrtm1-DDK 在 HEK293T 细胞中能够表达 Lrtm1 蛋白质。

2.3 建立 C2C12-Lrtm1-DDK 稳定细胞系

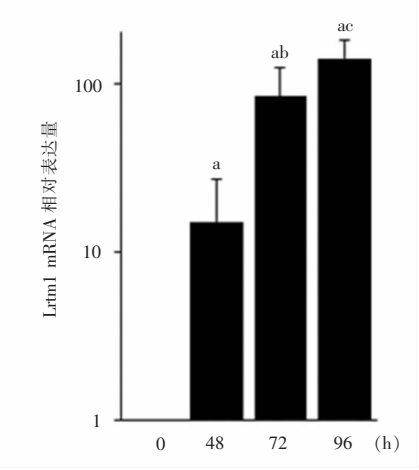
2.3.1 qRT-PCR 检测 Lrtm1 mRNA 表达水平 pLJM1-Lrtm1-DDK 质粒及慢病毒相关质粒在 HEK293T 细胞中包装慢病毒、用 pLJM1-GFP 载体质粒作为阴性对照，通过病毒感染以及压力筛选建立 C2C12-GFP 和 C2C12-Lrtm1-DDK 稳定表达细胞株。收集细胞采用针对不同段 Lrtm1 的引物（Primer A 和 Primer B）检测 Lrmt1 mRNA 水平表达（图 4A、B）。以 GFP 组作为对照（即 100%），Lrtm1-DDK 组的 Lrmt1 mRNA 水平分别为 GFP 组的（4.40 ± 0.86）× 10^4、（3.3 ± 1.1）× 10^4 倍，两两比较有统计学差异（t_D=12.350，P=0.000；t_D=16.450，





a：与 0 h 组比较 P=0.000；
b：与 48 h 组比较 P=0.000；
c：与 72 h 组比较 P=0.000

A. qRT-PCR 检测 Myosin mRNA 水平表达



a：与 0 h 组比较 P=0.000；b：与 0 h 组比较 P=0.000；c：与 0 h 组比较 P=0.000

B. qRT-PCR 检测 Lrtm1 mRNA 水平表达

图 2　诱导 C2C12 成肌细胞分化在检测 Lrtm1、Myosin mRNA 水平表达

P=0.000）。诱导分化上述 2 株稳定细胞株 0、96、120、144 h 后，收取细胞检测 Lrtm1 mRNA 表达水平（图 4C）。以 GFP 组为对照，对应时间点 Lrtm1-DDK 组的 Lrtm1 mRNA 水平分别为GFP 组的（72.3 ± 10.76）×10^2、（79.23 ± 12.33）×10^2、（127.41 ± 8.75）×10^2、（140 ± 12.1）×10^2 倍。方差分析 Lrtm1 mRNA 表达水平具有统计学意义（F=93.450，P=0.000）。Lrtm1-DDK 组间两两比较，96 h 组较 0 h 组增加（t_D=9.792，P=0.000），120 h 组较 96 h 组增加（t_D=15.750，P=0.000），144 h 组较 120 h 组增加（t_D=17.300，P=0.000）。结果显示：Lrtm1-DDK 组随诱导分化时间延长 Lrtm1 mRNA 水平在 0 h 过表达的水平上继续升高。

2.3.2　qRT-PCR 检测 Myogenin、Myosin mRNA 水平表达　诱导分化上述 2 株稳定细胞株 0、96、120、144 h 后，收取细胞检测 Myogenin、Myosin mRNA 表达水平。结果如图5A、B 所示，检测 Myogenin mRNA 表达水平，在 144 h 时Lrtm1-DDK 组（272.1 ± 18.22）较 GFP 组（332.41 ± 41.21）减少（P<0.05），Myosin mRNA 水平在分化 144 h 时 Lrtm1-DDK 组（76.11 ± 10.47）较 GFP 组（145.51 ± 10.02）明显减少（P<0.05）。

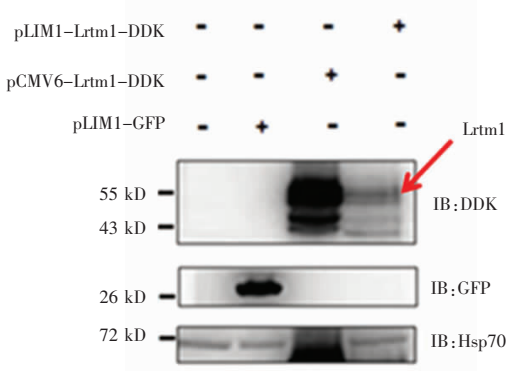
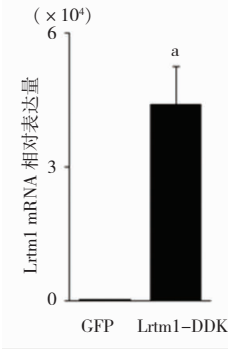
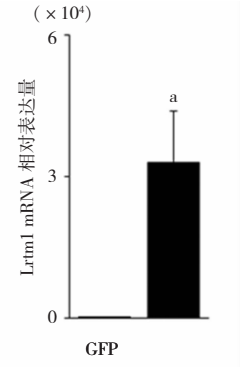


图 3　重组质粒 pLJM1-Lrtm1-DDK 在 293T 细胞中的表达



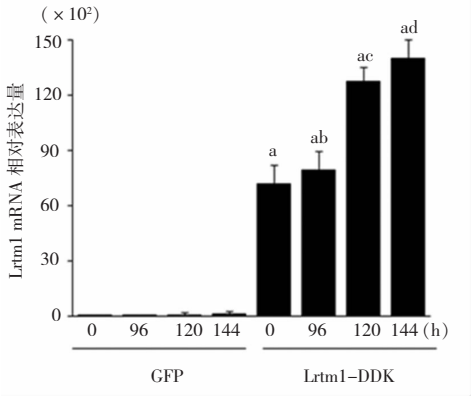
a：与 GFP 组比较 P=0.000

A. 检测 Lrtm1 mRNA 水平表达



a：与 GFP 组比较 P=0.000

B. 检测 Lrtm1 mRNA 水平表达



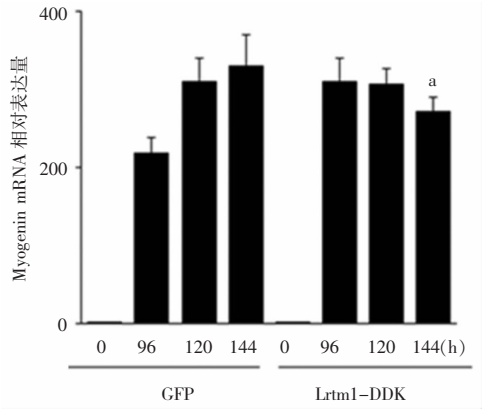
a：与 GFP 组 0 h 比较 P=0.000；b：与 Lrtm1-DDK 组 0 h 比较 P=0.000；c：与 Lrtm1-DDK 组 96 h 比较 P=0.000；d：与 Lrtm1-DDK 组120 h 比较 P=0.000

C. 检测 Lrtm1 mRNA 水平表达

图 4　Lrtm1-DDK 组与 GFP 组 Lrtm1 mRNA 水平表达比较

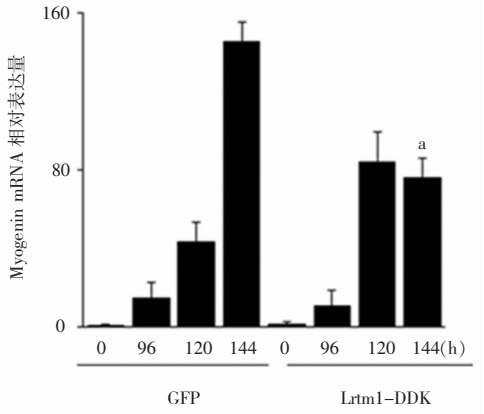
2.4　过表达 Lrtm1-DDK 基因对 Myogenin、Myosin 蛋白质水平的影响

为检测过表达 Lrtm1 基因对成肌分化标志分子 Myogenin、Myosin 蛋白质水平的影响，诱导分化 C2C12-GFP 和 C2C12-Lrtm1 稳定表达细胞株 0、96、120、144 h，收取细胞，Western blot 检测 Lrtm1、Myogenin、Myosin 蛋白质表达水平。结果如图 6 所示，外源表达的 Lrtm1 蛋白质在分化后期出现条带；在诱导分化 144 h 时，Lrtm1-DDK 组较 GFP 组Myosin、Myogenin 蛋白质水平减少。以上结果表明稳定过表达 Lrtm1 基因影响 Myogenin、Myosin 蛋白质表达水平，即过表达Lrtm1 基因对成肌分化有部分抑制作用。



a：与 GFP 组 144 h 比较 P < 0.05

A. 检测 Myogenin mRNA 水平表达



a：与 GFP 组 144 h 比较 P < 0.05

B. 检测 Myosin mRNA 水平表达

图 5　Lrtm1-DDK 组与 GFP 组 Myogenin、Myosin mRNA 水平表达比较

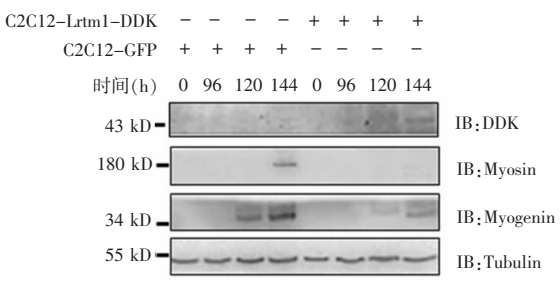


图 6　Lrtm1-DDK 组与 GFP 组 Lrtm1、Myogenin、Myosin 蛋白质水平表达比较

2.5 Lrtm1 蛋白质水平表达受蛋白酶体通路调节

在上述实验中，本课题组发现在诱导分化 0 h，Lrtm1 蛋白质表达检测不到（图 6），与细胞中 mRNA 水平高表达（图 4）不成比例，推测 Lrtm1 蛋白质表达受到某种翻译后修饰的调节。本课题组提出假说，Lrtm1 的蛋白质表达水平受蛋白酶体的调节。MG132 是蛋白酶体抑制剂[17-18]，所以用MG132 抑制蛋白酶体活性，检测 Lrtm1 蛋白质水平。结果如图 7 所示，加入 MG132 后，Lrtm1 蛋白质水平表达增高。

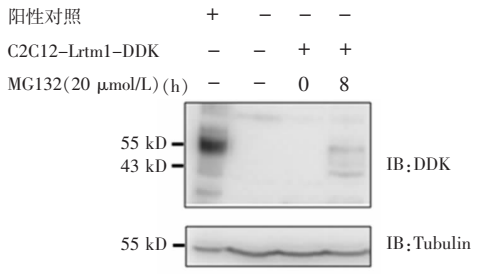
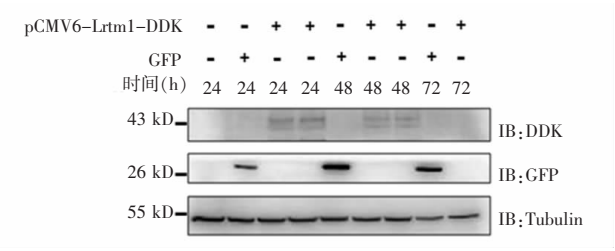


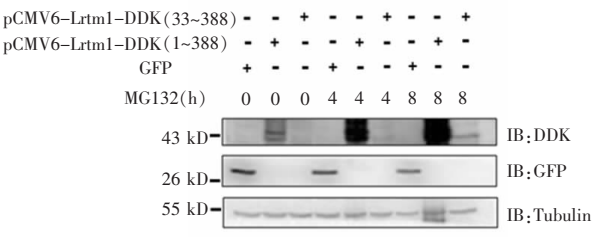
图 7 稳定细胞系中检测 Lrtm1 蛋白表达

2.6 检测外源性 Lrtm1 蛋白质

2.6.1 观察外源性 Lrtm1 蛋白质表达 为进一步研究 Lrtm1 蛋白质表达受蛋白酶体通路调控的具体机制，利用瞬时过表达的方法检测是否此调控通路同样存在于瞬时过表达系统中。在 C2C12 细胞中，瞬时过表达 Lrtm1-DDK 质粒 24、48、72 h 后收取细胞，Western blot 检测 Lrtm1 蛋白质水平表达。如图 8A 所示，随转染时间延长，Lrtm1 蛋白质表达量减少。如图 8B 所示，在加入 MG132 后，Lrtm1-DDK 全长以及信号肽缺失截短体的表达水平均升高。表明 Lrtm1 受蛋白酶体通路调控同样存在于瞬时过表达系统中。且此降解过程与 Lrtm1 含有的信号肽序列无关。



A. 检测 Lrtm1 蛋白质水平表达



B. 检测 Lrtm1 蛋白质水平表达

图 8 C2C12 细胞中过表达 Lrtm1 基因检测 Lrtm1 蛋白质水平表达

3 讨 论

为验证未知功能基因 Lrtm1 与成肌分化的关系，首先在最常用的成肌分化模型 C2C12 细胞中进行相关实验。随着成肌分化的进行 Lrtm1 mRNA 表达水平与 Myosin 相似逐渐升高，表明 Lrtm1 基因可能同样参与了成肌分化过程的调节。因为存在特异性识别内源 Lrtm1 的商业化抗体不可用的技术难点，只能通过表达外源带有标签的 Lrtm1 完成其分子功能的探索。通过表达外源 Lrtm1 基因，在 mRNA 以及蛋白质水平检测对成肌分化标志物 Myogenin 和 Myosin[19]的影响，发现过表达 Lrtm1 后对成肌分化起到部分抑制作用。其发挥作用的程度有限，可能与其蛋白质表达水平受蛋白酶体通路调节有关。本研究中外源表达 Lrtm1 基因后检测Lrtm1 蛋白质表达水平一直较低与其 mRNA 表达水平升高不成比例。因此为更好地研究 Lrtm1 基因与成肌分化的关系应该找到 Lrtm1 基因受调控的具体位点并将其突变，得到不受蛋白酶体通路调控又有活性的Lrtm1 蛋白质。

实验过程中发现，通过构建稳定细胞株表达外源 Lrmt1 后，在未分化时 2 组 mRNA 水平差异十分明显，分析原因可能是由于在未分化组细胞本底 Lrtm1 的 mRNA 表达水平十分低，接近零，所以外源导入 Lrtm1 基因后其 mRNA 表达水平会有近万倍的差异。在 C2C12-Lrtm1-DDK 细胞株中 Lrtm1 mRNA 水平很高，但蛋白质表达水平却很低，推测 Lrtm1 蛋白受蛋白酶体的调节。用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理后 Lrtm1 蛋白表达水平升高。蛋白酶体对 Lrtm1 蛋白质的调控作用不仅可以调控 Lrtm1 的蛋白表达水平还可以通过影响 Lrtm1 蛋白质的表达水平进而影响成肌分化过程。Lrtm1 蛋白质表达水平还可能受其他因素如 MicroRNA、LncRNA 等调节，其相关机制需要继续进行探索。

从 Lrtm1 蛋白质结构分析，具有 1 个跨膜序列和 5 个重复的 LRR 结构域[14]。Liu 等[15]研究了降钙素，通过激活 PI3K/Akt、P38 MAPK 信号通路促进成肌细胞增殖，通过激活 GPRC6A-ERK1/2 促进成肌细胞分化。因为降钙素与其相应的跨膜受体蛋白相结合，进而作用于成肌转录因子调控成肌分化过程。Tanaka 等[10]研究内源性大麻素与大麻素受体结合通

过 KV7 通道抑制骨骼肌的成肌分化，其中具体的抑制机制仍未知，但通过受体激活剂和受体拮抗剂证明大麻素受体确实参与调控骨骼肌的分化过程。Lrtm1 基因对成肌分化的抑制机制可能与上述机制相似，Lrtm1 基因通过介导细胞外的某种信号到细胞质中调节 Myogenin、Myosin 基因的转录活性，进而调控成肌分化过程。

本次研究确定了 Lrtm1 基因在成肌分化过程中表达水平逐渐升高，验证了 Lrmt1 基因对成肌分化部分抑制的生物学功能，明确了 Lrtm1 蛋白质水平受蛋白酶体通路调控。但是，Lrtm1 基因通过什么机制参与调控 Myogenin 和 myosin 基因表达水平，以及 Lrtm1 蛋白质如何被蛋白酶体调控，将是下一步研究的方向。

参 考 文 献

[1] Fearon K，Evans WJ，Anker SD. Myopenia-a new universal term for muscle wasting[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle，2011，2(1)：1-3.

[2] Higashioka K，Koizumi N，Sakurai H，et al. Myogenic differentiation from MYOGENIN-mutated human iPS cells by CRISPR/Cas9[J]. Stem Cells Int，2017，2017：9210494.

[3] Ryall JG，Schertzer JD，Lynch GS. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness[J]. Biogerontology，2008，9(4)：213-228.

[4] Messina C，Maffi G，Vitale JA，et al. Diagnostic imaging of osteoporosis and sarcopenia：a narrative review[J]. Quant Imaging Med Surg，2018，8(1)：86-99.

[5] Zembroń-Łacny A，Dziubek W，Rogowski Ł，et al. Sarcopenia：monitoring，molecular mechanisms，and physical intervention[J]. Physiol Res，2014，63(6)：683-691.

[6] Sassoli C，Vallone L，Tani A，et al. Combined use of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells(BM-MSCs) and platelet rich plasma (PRP) stimulates proliferation and differentiation of myoblasts *in vitro*：new therapeutic perspectives for skeletal muscle repair/regeneration[J]. Cell Tissue Res，2018. doi：10.1007/s00441-018-2792-3.

[7] Nozaki M，Li Y，Zhu J，et al. Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin，a negative regulator of muscle growth[J]. Am J Sports Med，2008，36(12)：2354-2362.

[8] Lindon C，Albagli O，Pinset C，et al. Cell density-dependent induction of endogenous myogenin(myf4) gene expression by Myf5[J]. Dev Biol，2001，240(2)：574-584.

[9] Tosic M，Allen A，Willmann D，et al. Lsd1 regulates skeletal muscle regeneration and directs the fate of satellite cells[J]. Nat Commun，2018，9(1)：366.

[10] Tanaka S，Ono Y，Sakamoto K. DCEBIO facilitates myogenic differentiation via intermediate conductance Ca^{2+} activated K^+ channel activation in C2C12 myoblasts[J]. J Pharmacol Sci，2017，133(4)：276-279.

[11] Hu RM，Han ZG，Song HD，et al. Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2000，97(17)：9543-9548.

[12] Strausberg RL，Feingold EA，Grouse LH，et al. Generation and initial analysis of more than 15，000 full-length human and mouse cDNA sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2002，99(26)：16899-16903.

[13] LopezJimenez N，Gerber S，Popovici V，et al. Examination of FGFRL1 as a candidate gene for diaphragmatic defects at chromosome 4p16.3 shows that Fgfrl1 null mice have reduced expression of Tpm3，sarcomere genes and Lrtm1 in the diaphragm[J]. Hum Genet，2010，127(3)：325-336.

[14] Samata B，Doi D，Nishimura K，et al. Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1[J]. Nat Commun，2016，7：13097.

[15] Liu S，Gao F，Wen L，et al. Osteocalcin induces proliferation via positive activation of the PI3K/Akt，P38 MAPK pathways and promotes differentiation through activation of the GPRC6A-ERK1/2 pathway in C2C12 myoblast cells[J]. Cell Physiol Biochem，2017，43(3)：1100-1112.

[16] Kim HK，Lee YS，Sivaprasad U，et al. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation[J]. J Cell Biol，2006，174(5)：677-687.

[17] Sun L，Trausch-Azar JS，Ciechanover A，et al. E2A protein degradation by the ubiquitin-proteasome system is stage-dependent during muscle differentiation[J]. Oncogene，2007，26(3)：441-448.

[18] Caron AZ，Haroun S，Leblanc E，et al. The proteasome inhibitor MG132 reduces immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice[J]. BMC Musculoskelet Disord，2011，12：185.

[19] McCarthy JJ，Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy[J]. J Appl Physiol，2007，102(1)：306-313.

（责任编辑：张辉洁）