

·基础研究·

## *Ezh2* 通过维持线粒体 ATP 合成功能促进骨骼肌细胞分化

武晓慧<sup>1,2</sup>, 李青<sup>2</sup>, 徐玉乔<sup>2</sup>, 陈佳琪<sup>3</sup>, 杨帆<sup>3</sup>, 刘婉莹<sup>3</sup>, 李凯<sup>3</sup>

(1. 西安医学院肥胖与代谢病研究所, 陕西 西安 710021; 2. 空军军医大学第一附属医院病理科暨病理学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 西安医学院临床医学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:**【目的】探索组蛋白 H3K27me3 甲基转移酶 *Ezh2* 在间充质干细胞内缺失对小鼠骨骼肌细胞分化及骨骼肌线粒体的影响。【方法】构建 *Ezh2* 间充质干细胞条件性敲除小鼠 (*Ezh2<sup>fl/fl</sup>Prx1-Cre*)。HE 染色、改良 Gomori 三色染色及四氮唑还原酶染色 (NADH-TR) 法观察细胞形态及线粒体情况。电镜观察骨骼肌细胞和线粒体超微结构。Western Blot 法检测 6 周龄小鼠骨骼肌细胞中 *Ezh2*、H3K27me3 和骨骼肌分化相关基因 *Myogenin*、*Myosin*、*Desmin* 及线粒体蛋白 *CytC* 的蛋白表达量。Realtime RT-qPCR 法检测骨骼肌分化相关基因和线粒体相关基因的表达情况。免疫组化染色检测骨骼肌中 *CytC* 的表达量, ATP 含量测定试剂盒检测骨骼肌细胞内 ATP 含量。HE 和 NADH-TR 染色观察 2 周龄小鼠骨骼肌。检测 6 周龄小鼠棕色脂肪中 *Ezh2* 蛋白含量, 电镜观察小鼠棕色脂肪中的线粒体。【结果】敲除组骨骼肌中 *Ezh2* 及 H3K27me3 蛋白含量均明显降低。敲除组小鼠的骨骼肌纤维粗细不等, 部分核内移, 骨骼肌分化标志物 *Myogenin* 和 *Mhc1b* 的 mRNA 表达明显减少 (均  $P < 0.05$ ), *Myogenin* 蛋白表达量减少, NADH-TR 和 *CytC* 免疫组化染色显示线粒体增加。电镜下敲除组骨骼肌肌原纤维粗细不等, 细胞膜下及肌原纤维间线粒体数量明显增加, 呈团块状聚集。线粒体无水肿, 嵴无明显减少。敲除组线粒体相关基因 *CytC*、*Tfam*、*Pgc1 $\alpha$*  的 mRNA 和 *CytC* 蛋白表达升高 (均  $P < 0.05$ ), 但 ATP 含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。2 周龄小鼠骨骼肌纤维粗细不等, 但 NADH 含量无差别。电镜下 6 周龄小鼠棕色脂肪细胞线粒体无数量增加或形态异常。【结论】*Ezh2* 在间充质干细胞阶段对小鼠骨骼肌细胞分化是必须的, 并维持线粒体产生 ATP 的功能。*Ezh2* 缺失小鼠骨骼肌细胞线粒体产生 ATP 减少, 线粒体数量代偿性增加。

**关键词:** 骨骼肌细胞; 分化; *Ezh2*; H3K27me3; 线粒体

中图分类号: R329.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2020)06-0841-09

### *Ezh2* Promotes Differentiation of Skeletal Muscle Cells by Maintaining Mitochondrial Function in Skeletal Muscle Cells

WU Xiao-hui<sup>1,2</sup>, LI Qing<sup>2</sup>, XU Yu-qiao<sup>2</sup>, CHEN Jia-qi<sup>3</sup>, YANG Fan<sup>3</sup>, LIU Wan-ying<sup>3</sup>, LI Kai<sup>3</sup>

(1. Institute of Obesity and Metabolic Diseases, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China;

2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China;

3. Clinical Medical School of Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Correspondence to: LI Kai; E-mail: 15634056@qq.com

**Abstract:** 【Objective】To explore the effect of histone H3K27me3 methyltransferase *Ezh2* deficient in mesenchymal stem cells (MSC) on the differentiation of mouse skeletal muscle cells and mitochondria inside them. 【Methods】*Ezh2* conditional knockout mice (*Ezh2<sup>fl/fl</sup>Prx1-Cre*) were constructed. In 6-week-old mice, HE staining, modified Gomori trichrome staining and NADH-TR staining were used to observe cell morphology and mitochondria. The ultrastructures of

收稿日期: 2020-03-02

基金项目: 国家自然科学基金 (81572631, 31000559); 西安医学院配套基金项目 (2018PT37); 西安医学院高层次人才科研基金项目 (2018RCYJ01), 西安医学院 2019 年省级大学生创新创业训练计划项目 (S201911840032); 西安医学院 2019 年校级大学生创新创业训练计划项目 (121519056); 中尼友好拉吉姆医学实验室开放基金 (18LJM02)

作者简介: 武晓慧, 博士, 副教授, 研究方向: 表观遗传学与细胞分化, E-mail: wuxh5221170@126.com; 李凯, 通信作者, 主任医师, E-mail: 15634056@qq.com

skeletal muscle cells and mitochondria were observed under electron microscope. Western blot was used to detect the protein expression of *Ezh2*, H3K27me3, Myogenin, Myosin, Desmin and CytC. The expression of differentiation related genes and mitochondrial related genes in skeletal muscle were detected by Realtime RT-qPCR. The expression of CytC in skeletal muscle was detected by immunohistochemistry, and ATP content in skeletal muscle was detected by ATP content assay kit. HE staining and NADH-TR staining were used to observe the skeletal muscle of 2-week-old mice. In 6-week-old mice, the content of *Ezh2* protein in brown adipose tissues was detected by Western blot, and the mitochondria were observed under electron microscope. 【Results】 The content of *Ezh2* and H3K27me3 protein in the skeletal muscle of the knockout group decreased significantly. In the knockout group, the muscle fibers of skeletal muscle were not uniform in thickness; some nuclei moved inward, and skeletal muscle markers *Myogenin* and *Mhc1b* mRNA expression decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Myogenin protein expression decreased, but NADH-TR and CytC immunohistochemical staining showed that mitochondria increased. Under electron microscope, the myofibrils in the knock-out group were of different thickness, and the number of mitochondria under the cell membrane and between myofibrils increased significantly, which were clumped. There was no edema in mitochondria and no obvious decrease in cristae. The expression of *CytC*, *Tfam*, *Pgc1 $\alpha$*  mRNA and CytC protein increased in the knockout group ( $P < 0.05$ ), but the content of ATP decreased significantly ( $P < 0.05$ ). However, there was variation in muscle fiber thickness but no difference in the content of NADH of 2-week-old mice. Under electron microscope, there was no increase in the number or abnormal morphology of mitochondria in brown adipocytes of 6-week-old mice. 【Conclusions】 *Ezh2* is necessary in the differentiation of mouse skeletal muscle cells in MSC stage and maintain the ATP production of mitochondria. In *Ezh2* deficient mice, the ATP production of mitochondria decreased and the number of mitochondria increased compensatorily.

**Key words:** skeletal muscle cells; differentiation; *Ezh2*; H3K27me3; mitochondria

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(6):841-849]

骨骼肌是人体四大基本组织之一,骨骼肌病变严重影响人体运动功能,甚至危及生命<sup>[1]</sup>。近年来的研究表明,表观遗传学调控机制与骨骼肌细胞的分化调控及骨骼肌疾病如肌营养不良症、横纹肌肉瘤等有密切联系<sup>[2-5]</sup>,了解骨骼肌细胞的分化调控机制可以为这些疾病的发病机制研究提供理论依据。*Ezh2*是多梳族抑制性复合物2 (polycomb repressive complex 2, PRC2)的催化活性亚单位,由746个氨基酸组成,可以催化组蛋白H3K27的甲基化,形成H3K27me3。H3K27me3一般沉默靶基因的表达<sup>[6]</sup>。现有的研究表明,*Ezh2*在E9.5天的胚胎发育部位以及在未分化的骨骼肌成肌细胞中阳性表达,但随着胚胎的生长发育逐渐被抑制<sup>[7]</sup>。在肌卫星细胞系C2C12成肌诱导分化过程中,*Ezh2*表现为减少趋势<sup>[7]</sup>。在小鼠的骨骼肌卫星细胞中敲除*Ezh2*,会导致骨骼肌分化不良,肌纤维间脂肪沉着和纤维素增加,小鼠存活率下降,但在分化终末阶段敲除*Ezh2*则不会明显影响骨骼肌细胞分化<sup>[8-9]</sup>。总之,目前*Ezh2*对骨骼肌细胞分化的影响研究结果是其在成肌细胞和肌卫星细胞阶段发挥作用,在分化终末阶段不

发挥作用,但*Ezh2*在更早期的间充质干细胞阶段对骨骼肌细胞分化的具体影响尚不清楚<sup>[8,10]</sup>。本研究拟观察在间充质干细胞中敲除*Ezh2*的小鼠骨骼肌分化表型,明确此阶段*Ezh2*缺失对骨骼肌分化造成的影响。此外,本研究拟进一步观察骨骼肌收缩的能量供应细胞器-线粒体,在*Ezh2*缺失后是否受到相应的影响,从亚细胞水平探索*Ezh2*对骨骼肌细胞分化的影响。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验动物

1.1.1 *Ezh2*基因敲除小鼠的构建 采用Cre-loxp方法构建了*Ezh2*基因敲除小鼠。*Ezh2*<sup>lox/+</sup>雌雄小鼠(B6;129S1-Ezh2tm2Sho/J)及*Prx1*驱动Cre小鼠(B6.Cg-Tg(Prrx1-cre)1Cjt/J,间充质干细胞条件敲除工具鼠<sup>[11-12]</sup>)由空军军医大学张丰副教授和叶菁教授惠赠。通过*Prx1-Cre*工具小鼠与*Ezh2*<sup>lox/+</sup>小鼠杂交,获得*Ezh2*<sup>lox/+</sup>*Prx1-Cre*<sup>+</sup>小鼠,再回交获得*Ezh2*<sup>lox/lox</sup>*Prx1-Cre*<sup>+</sup>小鼠(以下简称*Ezh2*<sup>+/F</sup>*Prx1-Cre*)。同窝中基因型为*Ezh2*<sup>lox/+</sup>或*Ezh2*<sup>+/+</sup>*Prx1-Cre*<sup>+</sup>

同性别小鼠作为对照组。小鼠为SPF级,饲养于SPF级屏障实验室,生产许可证编号:SCXK(陕)2019-001;使用许可证编号:SYXK(陕)2019-001。本实验中所有动物操作符合西安医学院和空军军医大学伦理委员会标准。

1.1.2 小鼠基因鉴定 提取鼠尾DNA进行PCR,反应体系为20  $\mu$ L,引物序列(5'-3')如下:*Ezh2* Forward: CATGTGCAGCTTTCTGTTCA; *Ezh2* Reverse: CACAGCCTTTCTGCTCACTG; *Prx1-Cre* Forward: TCTCTGGCTCTGATGTTGGCA; *Prx1-Cre* Reverse: CGCATAACCAGTGAAACAGC。PCR结束后用EB预染的1.6%琼脂糖凝胶100 V电泳30 min分离DNA,紫外凝胶成像仪成像后根据条带位置判断小鼠基因型。

## 1.2 实验方法

1.2.1 小鼠骨骼肌组织化学染色 脱颈椎法处死小鼠,取小鼠小腿腓肠肌部位骨骼肌,立即进行冰冻切片,切片厚度10  $\mu$ m,行苏木素-伊红染色(HE染色)、改良Gomori三色染色(Modified Gomori Trichrome, MGT)及四氮唑还原酶(NADH-tetrazolium reductase, NADH-TR)染色。

HE染色:用甲醛固定切片上的组织后进行常规染色,脱水、透明后树胶封片。

MGT染色:Harris苏木精染色10 min后用水冲洗,Gomori氏溶液浸泡30 min,0.2%醋酸浸洗1 min,酒精脱水,二甲苯透明,树胶封固。染色后,细胞核应呈红色,肌纤维呈暗绿色,胶原纤维呈亮绿色,线粒体呈红色<sup>[13]</sup>。

四氮唑还原酶(NADH-tetrazolium reductase, NADH-TR)染色:将切片放入37  $^{\circ}$ C孵箱内孵育于含有Tris缓冲液(PH7.4)、硝基四氮唑和NADH的染色液中30 min,蒸馏水洗,甘油明胶封固。染色后,I型肌纤维呈蓝紫色,II型肌纤维呈浅灰色<sup>[14-15]</sup>。

1.2.2 免疫组化染色 腓肠肌组织用40 g/L甲醛溶液固定48 h,常规脱水、浸蜡、包埋、切片厚度3  $\mu$ m,切片脱蜡后过梯度酒精至水,柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液高压修复抗原(pH6.0);体积分数3%  $H_2O_2$ 孵育10 min;体积分数5%羊血清室温封闭15 min;用1:300稀释的细胞色素C(Cytochrome c, CytC, Abcam,美国),湿盒内4 $^{\circ}$ C孵育过夜;生物素标记的羊抗兔IgG二抗37  $^{\circ}$ C孵育15 min;辣根酶标记链霉卵白素工作液37  $^{\circ}$ C孵育15 min,DAB显

色,苏木素衬染核30 s,常规脱水透明,中性树胶封片。

1.2.3 电镜分析 取腓肠肌组织,2.5%戊二醛固定液固定24 h后,将组织块切成1 mm<sup>3</sup>左右大小,注意纵横方向,送空军军医大学第一附属医院病理科电镜室制样,透射电镜观察并照相。

1.2.4 ATP浓度测定 采用ATP检测试剂盒(S0026B,碧云天)进行检测。样品每20 mg组织加入100  $\mu$ L裂解液后进行匀浆。4  $^{\circ}$ C 13 800  $\times$ g离心5 min,取上清,用于后续的测定。ATP浓度的测定:加100  $\mu$ L ATP检测工作液到检测孔内,室温放置3 min,消耗本底ATP。在检测孔内加入20  $\mu$ L样品或标准品,迅速混匀,2 s后用荧光酶标仪进行测定,根据标准曲线计算出样品中ATP的浓度。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定样品中的蛋白浓度。ATP的浓度以nmol/ng蛋白的形式表示。

1.2.5 Western blot法检测蛋白表达量 取小鼠腓肠肌组织约100 mg,提取总蛋白,测定小鼠骨骼肌分化标志物Myogenin、Desmin和Myosin<sup>[15-18]</sup>的蛋白表达量。采用BCA法测蛋白浓度(上海,碧云天),样品上样量为20  $\mu$ g/孔,电泳结束后转至PVDF膜,将膜用50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h,1 $\times$ PBST洗膜5 min $\times$ 3次,置于1抗中4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜(兔H3K27me3抗体,Abcam(15 ku);兔Ezh2抗体,CST(98 ku);鼠 $\beta$ -Tubulin抗体,天津三箭(55 ku);兔GAPDH抗体,武汉三鹰(36 ku),兔Myosin抗体,碧云天(19 ku);兔Desmin抗体,碧云天(53 ku);小鼠Myogenin抗体,SANTA CRUZ(34 ku);兔CytC抗体,Abcam(14 ku)。1 $\times$ PBST洗膜5 min $\times$ 3次,将膜置于二抗(中衫金桥羊抗兔或羊抗鼠IgG,浓度均为1:5 000)中室温孵育1 h,再用PBST洗膜3次,ECL发光液发光。

1.2.6 逆转录荧光定量聚合酶链式反应(Real-time RT-qPCR)法检测基因相对表达量 检测骨骼肌细胞标志物Myogenin、Ckm、p16Ink4a<sup>[19]</sup>、Msx1<sup>[20]</sup>、Atf3<sup>[21]</sup>、Pax3<sup>[22]</sup>、MhcIIb和线粒体标志物COX1、CS、CytC、Tfam<sup>[23]</sup>、Pgc1 $\alpha$ <sup>[24]</sup>、IDH3a的基因表达,取小鼠腓肠肌组织,使用RNA提取试剂盒(日本TaKaRa)提取总RNA。反转录为cDNA,SYBR Green master mix(日本TaKaRa)催化下,在Real-Time PCR仪(美国Bio-Rad)上进行扩增。待测基因的引物由大连宝生公司设计并合成,所测

基因英文全称及引物序列信息见表1、2。以小鼠GAPDH为内参。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析,计量数据呈正态分布时以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较且方差齐时采用独立样本均数 $t$ 检验,方差不齐的数据采用校正 $t$ 检验。检验为双侧,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *Ezh2*基因敲除小鼠骨骼肌细胞分化不良

经观察,*Ezh2*基因敲除小鼠的体型较小、体质量较轻,精神状态、毛发光泽度、饮食以及活动情况如常,但敲除小鼠出生后死亡率较同窝对照组高,繁殖能力下降。敲除小鼠前肢出现向内曲屈畸形。取6周龄小鼠进行实验。经检测,敲除组小鼠骨骼肌中*Ezh2*( $t = 3.327, P = 0.0292$ )和H3K27me3( $t = 4.330, P = 0.0123$ )的蛋白含量降低,表明成功构建了*Ezh2*基因敲除小鼠(图1A,均 $P < 0.05$ )。小鼠骨骼肌切片HE染色结果显示,敲除组肌纤维粗细不等,核一般在周边,但部分细胞核发生内移现象,如图1B右图绿色箭头所指处,此为病理性改变。小鼠骨骼肌分化相关基因中*Myogenin*

**表1 被测基因英文全称**  
**Table 1 Full English name of detected genes**

Gene	Full English name
<i>Myogenin</i>	myogenin
<i>Ckm</i>	creatine kinase, muscle
<i>p16<sup>Ink4a</sup></i>	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
<i>Msx1</i>	msh homeobox 1
<i>Atf3</i>	activating transcription factor 3
<i>Pax3</i>	paired box 3
<i>MhcIIb</i>	myosin heavychain IIb
<i>COX1</i>	cytochrome c oxidase subunit I
<i>CS</i>	citrate synthase
<i>CytC</i>	mitochondrial cytochrome C
<i>Tfam</i>	mitochondrial transcription factor A
<i>Pgc1<math>\alpha</math></i>	peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ coactivator-1 $\alpha$
<i>IDH3a</i>	isocitrate dehydrogenase (NAD(+)) 3 catalytic subunit $\alpha$
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

( $t = 7.822, P = 0.0014$ ,校正 $t$ 检验)和*MhcIIb*( $t = 4.668, P = 0.0430$ ,校正 $t$ 检验)的mRNA表达均明显减少(均 $P < 0.05$ ;图1C),差异有统计学意义,其余基因表达差异无统计学意义。敲除组*Myogenin*( $t = 9.126, P = 0.0008$ )蛋白表达量下降,差异有统

表2 被测基因引物序列信息

Table 2 Primer sequence information of detected genes

Gene name	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
<i>Myogenin</i>	GCAATGCACTGGAGTTCG	ACGATGGACGTAAGGGAGTG
<i>Ckm</i>	GCCGCAGCATCAAGGGTTACACTCT	ACGGGCATCGGGCCAGTCTCG
<i>p16<sup>Ink4a</sup></i>	AGCAGCATGGAGTCCGCTGCAGACA	AAGAGTTCGGGGCGTTGGCGGAAA
<i>Msx1</i>	AGATCGGACCCCGTGGATGCAGAGT	TGAAAGCGCTCCTGGGCTTGGCGTT
<i>Atf3</i>	TGCGCTGGAGTCAGTTACCGTCA	TCTCGCCGCCTCTTTTCTCTCA
<i>Pax3</i>	CAAGGACGCTGTCTGTGATCGGA	CTGAGGTGCAGAGGCTCGCT
<i>MhcIIb</i>	TGTCTGACTCAAGCCTGCCTCCT	ACGGCCATCTCAGCGTCGGA
<i>COX1</i>	CTTTTATCCTCCCAGGATTTGG	GCTAAATACTTTGACACCGG
<i>CS</i>	CAGCTACAGAAGGAAGTTGG	AGGAATAGCGAGGTCAGTC
<i>CytC</i>	TGCTACACGGAGGAAGAAGC	CCATCATCATTAGGGCCATC
<i>Tfam</i>	TGAAGCTTGTAATGAGGCTTGG	CGGATCGTTTCACTTTCGAC
<i>Pgc1<math>\alpha</math></i>	ACTGAGCTACCCCTGGGATG	TAAGGATTTTCGGTGGTGACA
<i>IDH3a</i>	GAGGTTTTGCTGCTGGTGT	TCCTCCTGGTCTTGAATTG
<i>GAPDH</i>	GCCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT	GATGCCTGCTTACCACCTTC

计学意义,但 Desmin( $t = 1.767, P = 0.1520$ )和 Myosin( $t = 2.241, P = 0.0885$ )蛋白表达差异无统计学意义(图1D)。

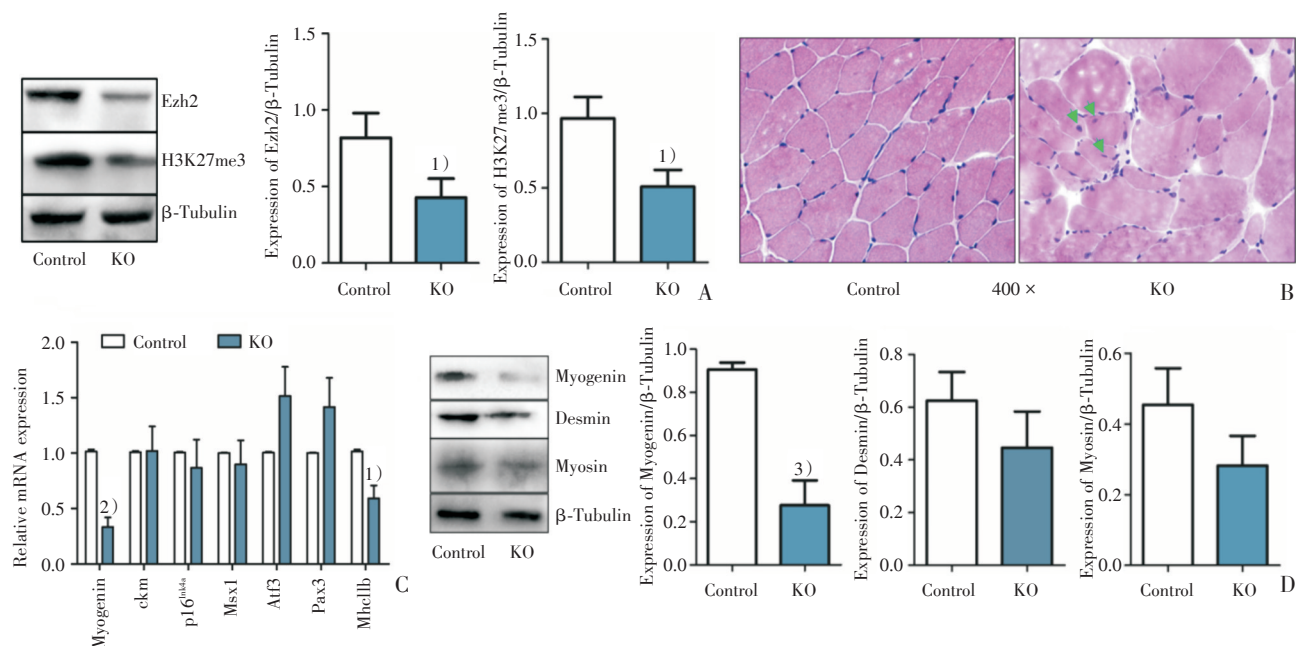
## 2.2 *Ezh2*敲除小鼠骨骼肌内线粒体数量增加

MGT染色显示,骨骼肌细胞间无明显胶原纤维增生。NADH-TR染色显示敲除组肌纤维粗细不等,I型肌纤维内NADH增多,提示线粒体数量增加或NADH增加。细胞色素C免疫组化染色显示敲除组骨骼肌I型肌纤维内线粒体数量增加或CytC表达增加(图2A)。为进一步确定表型,采用电镜在骨骼肌横纵两个切面上进行了观察,横断面上发现肌膜下线粒体数量明显增加,呈团块状堆积(图2B)。纵切面发现骨骼肌肌原纤维粗细不等,肌原纤维间的线粒体异常增加。未见线粒体水肿及明显的嵴断裂。对照组Z线、明带和暗带清晰可见,敲除组明带清晰度略下降(图2C)。

## 2.3 *Ezh2*敲除小鼠骨骼肌内线粒体可能为代偿性增加

为了判别敲除组骨骼肌细胞内线粒体增加的表型是 *Ezh2* 缺失后促进了线粒体增生还是线粒体功能异常所导致的代偿性增生,进行了一系列

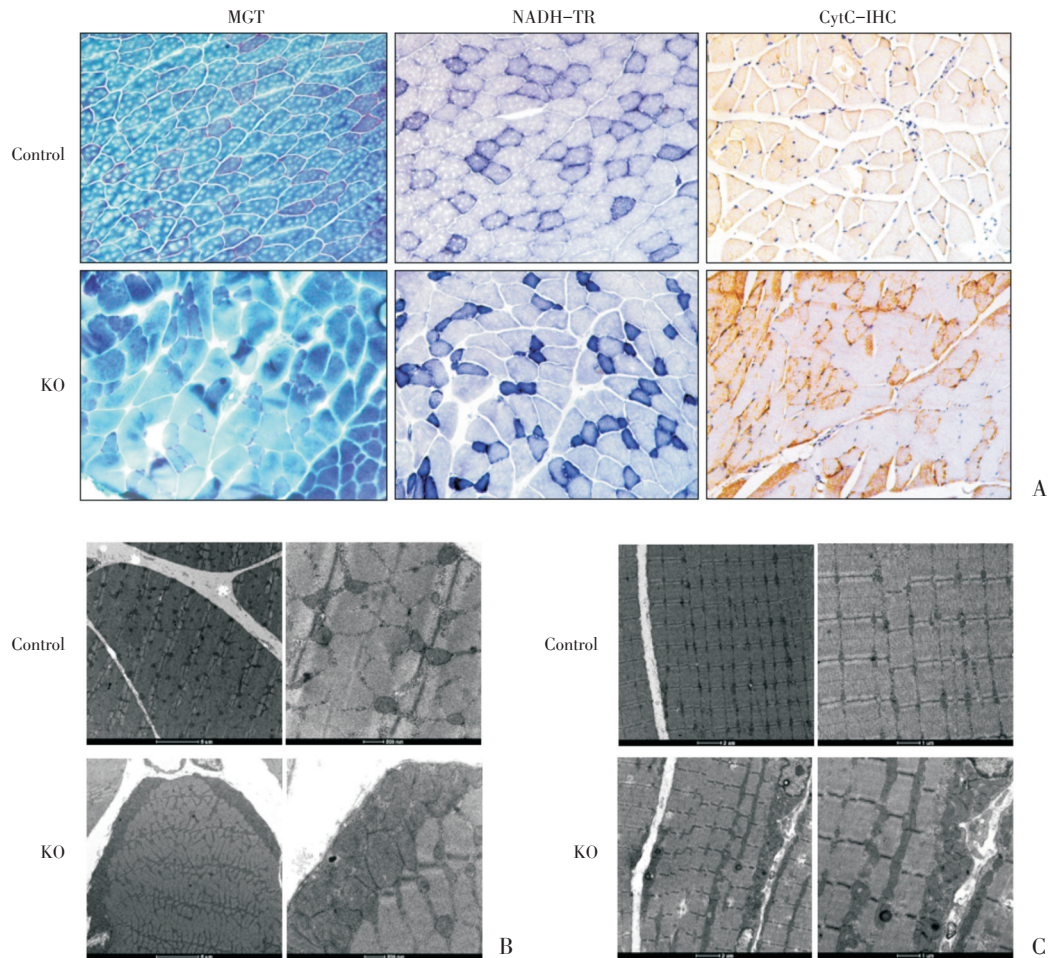
实验。经检测,线粒体结构和生成相关基因的表达有不同程度的升高,敲除组线粒体相关基因 *CytC*( $t = 7.248, P = 0.0185$ )、*Tfam*( $t = 4.927, P = 0.0388$ ,校正  $t$  检验)、*Pgc1 $\alpha$* ( $t = 8.183, P = 0.0012$ ,校正  $t$  检验)的表达明显高于对照组(图3A),差异有统计学意义。细胞色素C蛋白表达增加( $t = 3.009, P = 0.0396$ ;图3B),差异有统计学意义。经测定,敲除组骨骼肌内ATP含量明显少于对照组( $t = 4.189, P = 0.0138$ ;图3C)。取2周龄小鼠进行实验,此阶段小鼠刚开始进行自主活动,此时对骨骼肌的利用还不充分。HE染色结果显示,2周龄小鼠敲除组仍存在肌纤维粗细不等,直径较为纤细,提示骨骼肌纤维分化不良,但NADH-TR染色两组无明显差别(图4A、B),说明线粒体增加并不明显。间充质干细胞是骨骼、脂肪、骨骼肌等细胞共同的前体细胞,本实验小鼠的脂肪组织也发生了 *Ezh2* 敲除(图4C)。因棕色脂肪富含线粒体,我们对6周龄小鼠的棕色脂肪细胞中的线粒体进行了电镜观察,两组胞浆内均满布线粒体,并未发现敲除组线粒体数量的增加,线粒体形态无明显异常(图4D)。综合上述证据,推测 *Ezh2* 缺失后由于



A: Protein content of *Ezh2* and H3K27me3 in mice skeletal muscle cells,  $n = 3$ . B: HE staining of mice skeletal muscle section, 400 $\times$ , the green arrow refers to the phenomenon of nuclear migration. C: Expression of genes related to skeletal muscle differentiation in mice,  $n = 3$ . D: Protein expression of Myogenin, Desmin and Myosin in skeletal muscle of mice,  $n = 3$ . 1)  $P < 0.05$ , vs. control group, 2)  $P < 0.01$ , vs. control group, 3)  $P < 0.001$ , vs. control group. knock out: KO.

图1 *Ezh2*基因敲除小鼠骨骼肌分化表型

Fig.1 Differentiation phenotype of skeletal muscle in *Ezh2* knockout mice



A: MGT staining, NADH-TR staining and CytC immunohistochemical staining. 200 ×. B: Skeletal muscle cross-section electron micrograph. The magnification is 4 200 × on the left and 20 500 × on the right. C: Skeletal muscle longitudinal section electron micrograph. The magnification is 6 000 × on the left and 11 500 × on the right.

图2 小鼠骨骼肌细胞特殊染色、免疫组化染色及电镜照片

Fig.2 Special staining, immunohistochemical staining and electron micrograph of skeletal muscle fibers of mice

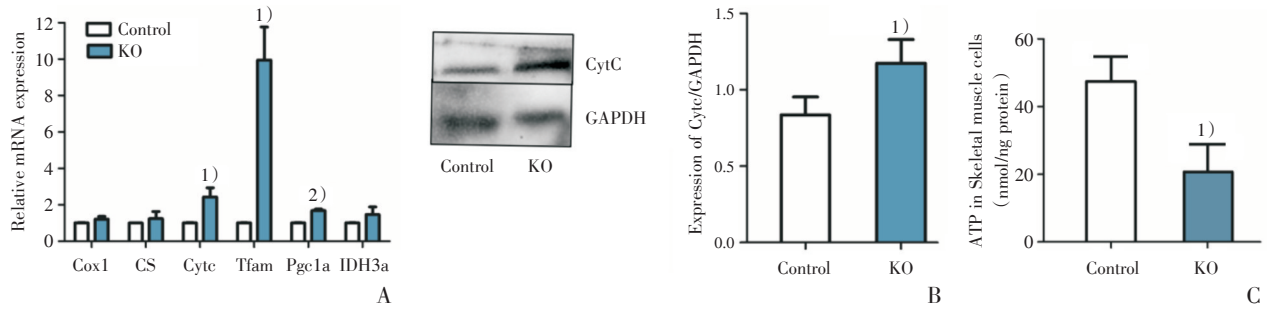
线粒体ATP产生能力下降,机体为了满足运动需求而促使线粒体数量发生了代偿性增加。

### 3 讨论

本研究利用在间充质干细胞中敲除 *Ezh2* 的小鼠,观察了骨骼肌细胞分化的表型。研究所用工具鼠的 Cre 酶驱动基因 *Prx1* 在胚胎 E10.5 天有明确的表达<sup>[25]</sup>,与文献报道的 *Ezh2* 在胎鼠体节发育阳性表达最强阶段的 E9.5 天时间接近,利用 *Prx1* 可以较完全地敲除胎鼠间充质干细胞中的 *Ezh2*。实验结果表明,在出生后 2 周龄和 6 周龄的 *Ezh2* 敲除小鼠,均观察到了骨骼肌细胞分化不良,具体表现为肌纤维粗细不等,肌原纤维粗细不

均,核内移等结构性异常。实验检测了与骨骼肌细胞分化调控密切相关的一部分基因的表达情况,结果显示, *Myogenin* 和 *Mhc1b* 的 mRNA 表达明显减少, *Myogenin* 蛋白表达量下降,提示这些重要的骨骼肌分化相关基因和蛋白的表达受到影响,与形态学表型相一致。这些研究结果表明, *Ezh2* 在间充质干细胞阶段对于骨骼肌细胞的分化是必须存在的,否则将引起分化障碍。

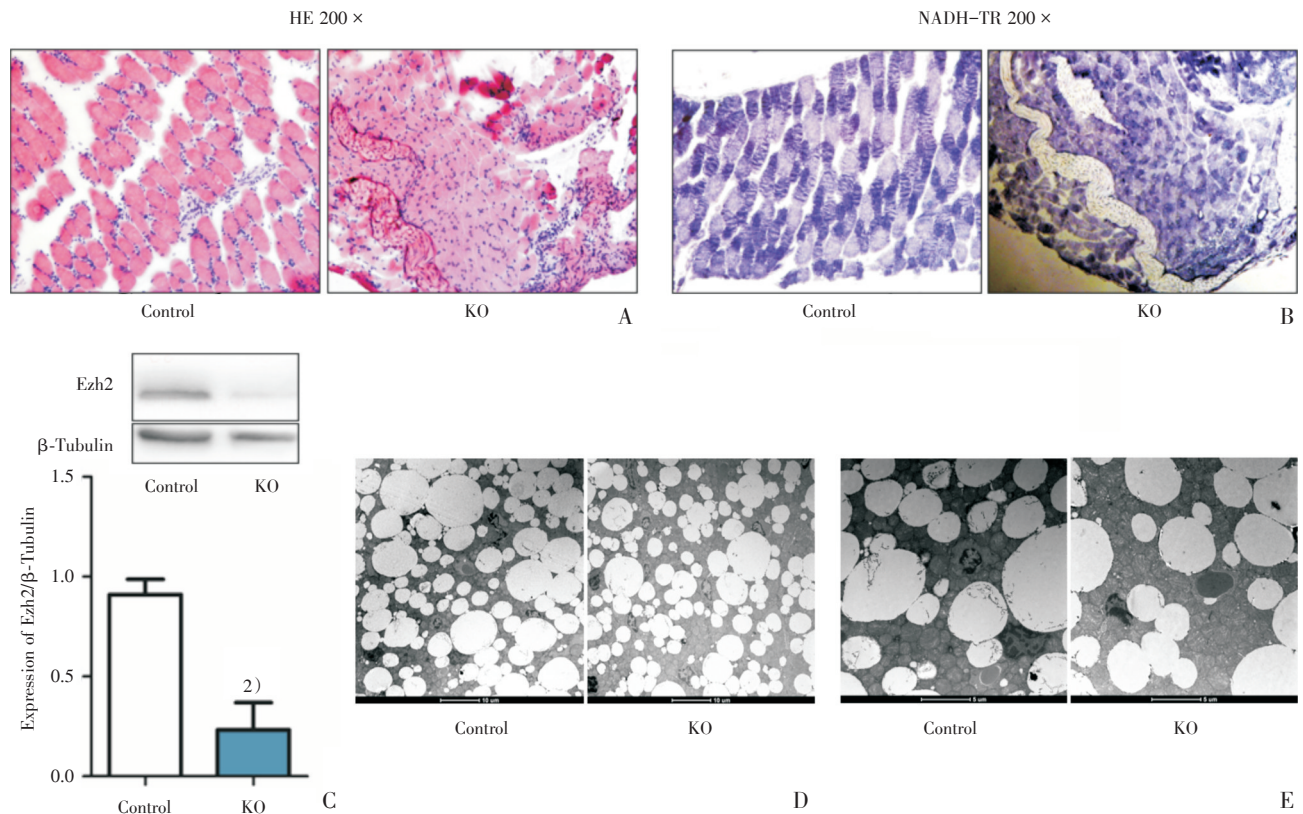
骨骼肌是高能需求组织,尤其是运动时,对能量的需求明显增多<sup>[25]</sup>。骨骼肌收缩时需要大量的能量用于离子泵、横桥摆动、细胞信号传递等,三磷酸腺苷(adenosine-triphosphate, ATP)为肌纤维收缩的直接能源物质,而线粒体是能量物质氧化产生 ATP 的主要场所<sup>[26]</sup>。骨骼肌细胞的线粒体



A: Mitochondrial related genes in skeletal muscle,  $n = 3$ . B: CytC protein content,  $n = 3$ . C: ATP content in skeletal muscle,  $n = 3$ . 1)  $P < 0.05$ , vs. control group, 2)  $P < 0.01$ , vs. control group.

图3 骨骼肌线粒体相关基因表达、CytC蛋白表达和ATP含量测定结果

Fig.3 Expression of mitochondrial related genes, CytC protein and ATP content in skeletal muscle



A-B: HE and NADH-TR staining of skeletal muscle of 2-week-old mice, magnification: 200 ×. C: Ezh2 protein content of brown adipose tissues in the back of 6-week-old mice;  $n = 3$ . 2)  $P < 0.01$ , vs control group. D: Electron micrographs of brown adipocytes in the back of 6-week-old mice, magnification: 1 700 × on the left and 4 200 × on the right.

图4 2周龄小鼠骨骼肌HE和NADH-TR染色及6周龄小鼠背部棕色脂肪电镜照片

Fig.4 HE and NADH-TR staining of skeletal muscle of 2-week-old mice and electron micrograph of brown adipocytes in the back of 6-week-old mice

根据所在位置不同,一般分为肌膜下线粒体和肌原纤维间的线粒体,前者被认为与动脉血循环氧的提供有关,主要为保持肌膜完整性以及各种离子和代谢产物的跨膜转运提供能量,后者则与肌肉收缩时能量的提供有关<sup>[27]</sup>。既往的研究没有关

注 *Ezh2* 缺失对于线粒体造成的影响。本研究通过骨骼肌特异性染色,线粒体氧化呼吸链结构蛋白 CytC 的检测以及电子显微镜观察了线粒体的形态和分子表型。实验中我们观察到在敲除组 I 型肌纤维(I 型肌纤维又称慢缩肌纤维,含有较

多的线粒体; II型肌纤维又称快缩肌纤维, 含有较少的线粒体<sup>[14]</sup>)中在线粒体NADH异常增多和标志物CytC异常增多的现象。这促使我们通过进一步实验去寻找原因。在电镜下, 我们观察到敲除组6周龄小鼠肌膜下线粒体和肌原纤维间的线粒体数量均异常增加, 呈团块状堆积, 但未见线粒体水肿及明显的嵴断裂。线粒体生成相关基因*Tfam*、*Pgc1α*的表达均升高, 免疫组化染色和Western blot结果均证实敲除组的CytC蛋白含量均加。假设增加的线粒体是功能正常的线粒体, 那么不论是动脉血氧的利用还是ATP的生成均应提高。但实验结果表明, 敲除组小鼠骨骼肌内ATP含量是减少的, 这提示实验中观察到的线粒体增加很可能是一种代偿性表现。为了观察是否在骨骼肌还未经运动刺激的幼龄动物体内是否有相同的现象, 我们观察了2周龄小鼠的骨骼肌, 此时小鼠处在刚刚开始自主运动的发育时期。结果发现, 2周龄*Ezh2*缺失小鼠骨骼肌内NADH与对照组并无明显差别。因本实验所用小鼠为间充质干细胞敲除模型, *Ezh2*敲除范围较为广泛, 骨骼肌、

骨、脂肪等间充质干细胞来源的组织内均发生了敲除, 我们又选取了富含线粒体的棕色脂肪组织作为观察对象, 观察线粒体表型。经观察, 棕色脂肪细胞内线粒体并无增加现象, 线粒体形态亦无明显异常。这说明, *Ezh2*缺失未能在其他组织细胞引起线粒体的增加, 进一步间接地证明6周龄小鼠骨骼肌内线粒体增加的原因很有可能是*Ezh2*缺失引起线粒体ATP产生能力不足的情况下, 机体为了满足自身的运动需求, 出现的一种代偿性调节, 使得线粒体数量增加<sup>[28]</sup>。目前可以确定, *Ezh2*的缺失损害了骨骼肌线粒体产生ATP的能力, 但因线粒体ATP产生的关键环节非常多, 具体哪个或哪些环节发生了障碍, 尚有待进一步系统性的实验进行探索。

综上所述, 本研究的结果证实, 在小鼠间充质干细胞成肌分化阶段, *Ezh2*发挥了重要的作用, *Ezh2*在本阶段促进骨骼肌细胞的分化。本研究还发现*Ezh2*缺失后会对骨骼肌细胞内线粒体产生ATP的能力造成不良影响, 线粒体代偿性增加, 具体环节有待进一步的研究。

#### 参考文献

- [1] Giordani L HG, Negroni E, Sakai H, et al. High-dimensional single-cell cartography reveals novel skeletal muscle-resident cell populations [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(3):609-621.
- [2] Cong FJ, Yan L, Xiang BD, et al. lnc133b, a novel, long non-coding RNA, regulates bovine skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by mediating miR-133b[J]. *Gene*, 2017, 630:35-43.
- [3] Qin C, He C, Hanrui Q, et al. Recent advances on the role of long non-coding RNA H19 in regulating mammalian muscle growth and development [J]. *Hereditas*, 2017, 39(12):1150-1157.
- [4] Wang S, Jin J, Xu Z, et al. Functions and regulatory mechanisms of lncRNAs in skeletal myogenesis, muscle disease and meat production [J]. *Cells*, 2019, 1107(8):1-19.
- [5] Zhao MJ, Xie J, Shu WJ, et al. MiR-15b and miR-322 inhibit SETD3 expression to repress muscle cell differentiation [J]. *Cell Death dis*, 2019, 10(3):183-196.
- [6] Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer [J]. *Cell stem cell*, 2010, 7(3):299-313.
- [7] Caretti G, Padova MD, Micales B, et al. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(21):2627-2638.
- [8] Woodhouse S, Pugazhendhi D, Brien P, et al. Ezh2 maintains a key phase of muscle satellite cell expansion but does not regulate terminal differentiation [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(2):565-579.
- [9] Consalvi S, Brancaccio A, Dall' Agnese A, et al. Praja1 E3 ubiquitin ligase promotes skeletal myogenesis through degradation of EZH2 upon p38α activation [J]. *Nat Commun*, 2017, 42(11):1-11.
- [10] Juan AH, Derfoul A, Feng X, et al. Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(8):789-794.
- [11] Camilleri ET, Dudakovic A, Riestter SM, et al. Loss of histone methyltransferase Ezh2 stimulates an osteogenic transcriptional program in chondrocytes but does not affect cartilage development [J]. *J Biol*

- Chem, 2018, 293(49):19001–19011.
- [12] Hemming S, Cakouros D, Codrington J, et al. EZH2 deletion in early mesenchyme compromises postnatal bone microarchitecture and structural integrity, and accelerates remodeling [J]. FASEB J, 2016, 31(3):1011–1027.
- [13] Yoshida K. Morphological study of muscle fibers stained red by modified gomori trichrome staining with special reference to smooth red fibers [J]. Hokkaido Igaku Zasshi, 1997, 72(2):163–180.
- [14] 袁云. 骨骼肌疾病的临床病理诊断 [J]. 中华神经科杂志, 2006, 39(8):505–507.  
Yuan Y. Clinical and pathological diagnosis in skeletal muscle disorders [J]. Chin J Neurol, 2006, 39(8):505–507.
- [15] 周珊珊, 陈睿, 谭夕, 等. Nec-1 对模拟缺氧条件下骨骼肌细胞损伤修复的作用研究 [J]. 新医学, 2018, 49(6):386–391.  
Zhou SY, Chen R, Tan X, et al. Effect of Nec-1 on repair of skeletal muscle cell injury under simulated hypoxia [J]. J New Med, 2018, 49(6):386–391.
- [16] Ganassi M, Badodi S, Ortuste Quiroga HP, et al. Myogenin promotes myocyte fusion to balance fibre number and size [J]. Nat Commun, 2018, 9(1):4232–4249.
- [17] Charrier EE, Montel L, Asnacios A, et al. The desmin network is a determinant of the cytoplasmic stiffness of myoblasts [J]. Biol Cell, 2018, 110(2):77–90.
- [18] Glasheen BM, Ramanath S, Patel M, et al. Five alternative myosin converter domains influence muscle power, stretch activation, and kinetics [J]. Biophys J, 2018, 114(5):1142–1152.
- [19] Yan D, Liao X, Zhao L, et al. The inhibitor of cyclin-dependent kinase4a (INK4a) signaling pathway induces aging in human skeletal muscle myoblasts and decreases the mitochondrial membrane potential [J]. J Biomater Tissue Eng, 2019, 9(9):1192–1198.
- [20] Zhu X, Li M, Jia X, et al. The homeoprotein Msx1 cooperates with Pkn1 to prevent terminal differentiation in myogenic precursor cells [J]. Biochimie, 2019, 162:55–65.
- [21] Fernández-Verdejo R, Vanwynsberghe AM, Hai T, et al. Activating transcription factor 3 regulates chemokine expression in contracting C2C12 myotubes and in mouse skeletal muscle after eccentric exercise [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 492(2):249–254.
- [22] Der Vartanian A, Quéting M, Michineau S, et al. PAX3 confers functional heterogeneity in skeletal muscle stem cell responses to environmental stress [J]. Cell stem cell, 2019, 24(6):958–973.
- [23] Litonin D, Sologub MY, Savkina M, et al. Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro [J]. J Biol Chem, 2010, 285(24):18129–18133.
- [24] Hock JM, Kralli A, Emter R, et al. The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(17):6472–6477.
- [25] Chesterman ES, Gainey GD, Varn AC, et al. Investigation of Prx1 protein expression provides evidence for conservation of cardiac-specific posttranscriptional regulation in vertebrates [J]. Dev Dyn, 2010, 222(3):459–470.
- [26] Hood DA, Uguccioni G, Vainshtein A, et al. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: implications for health and disease [J]. Compr Physiol, 2011, 1(3):1119–1134.
- [27] 曹志发, 孟昭琴, 姚为俊. 新编运动生理学 [M]. 2004, 北京: 人民体育出版社, 100–101.  
Cao ZF, Meng ZQ, Yao WJ. New exercise physiology [M]. 2004, Beijing: People's Physical Culture Publishing House, 100–101.
- [28] Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle [J]. J Appl Physiol, 2001, 90(3):1137–1157.

(编辑 余菁)