

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.03.0243

论著

维生素 D 对骨骼肌细胞分化的影响及机制研究

古秋¹, 岳莹莹², 牛文彦¹

(1.天津医科大学基础医学院免疫学系,天津 300070;2.天津市第一中心医院检验科,天津 300192)

摘要 **目的:**探讨维生素 D 对骨骼肌细胞分化的影响及其分子机制。**方法:**用不同浓度的 1,25-二羟维生素 D₃(VD₃)孵育 C2C12 小鼠骨骼肌细胞,选择合适的药物浓度进行后续实验。将 C2C12 细胞分为对照(control)组、Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂(SKL2001)组、VD₃组和 VD₃+SKL2001 组。qPCR 检测维生素 D 受体(VDR)、肌球蛋白重链(MyHC)、肌生成素(Myog)、肌生成决定因子(Myod)、 β -连环蛋白(β -catenin)、无翅型 MMTV 整合位点家族成员 11(Wnt11)、轴抑制蛋白 2(Axin2)和 Fermitin 家族同源蛋白 2(Fermt2)mRNA 水平;细胞免疫荧光检测 MyHC 和 MyoG。倒置显微镜观察各组细胞形态。免疫印迹检测各组 VDR、MyHC、MyoG、MyoD 和 β -catenin 蛋白水平。**结果:**与 control 组相比,VD₃组 VDR 的 mRNA 水平显著升高($t=11.50, P<0.001$), MyHC、MyoG、MyoD、Wnt11、Axin2 和 Fermt2 的 mRNA 水平显著降低($t=9.849, 8.620, 17.88, 4.069, 6.953, 4.685$, 均 $P<0.01$), β -catenin 的 mRNA 水平无明显变化($t=2.657, P>0.05$);与 control 组相比,VD₃组 MyHC 和 MyoG 阳性的肌管数量减少,细胞融合受损。显微镜观察结果显示,与 control 组相比,SKL2001 组肌管数量增多,肌管长度增加,VD₃组细胞融合受损、肌管数量减少、肌管长度缩短,与 VD₃组相比,VD₃+SKL2001 组肌管数量增多,肌管长度增加;免疫印迹结果显示,与 control 组相比,SKL2001 组 MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平升高($F=27.91, 133.6, 33.25$, 均 $P<0.05$),VD₃组 VDR 蛋白水平上升($F=118.0, P<0.001$), MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平降低($F=27.91, 133.6, 33.25$, 均 $P<0.05$);与 VD₃组相比,VD₃+SKL2001 组 MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平升高($F=27.91, 133.6, 33.25$, 均 $P<0.05$);与 control 组相比,SKL2001 组胞质中 β -catenin 蛋白水平降低($F=64.00, P<0.05$),胞核中 β -catenin 蛋白水平显著升高($F=32.89, P<0.05$);VD₃组胞质中 β -catenin 蛋白水平上调($F=64.00, P<0.001$),胞核中 β -catenin 蛋白水平下调($F=32.89, P<0.05$);与 VD₃组相比,VD₃+SKL2001 组胞质中 β -catenin 蛋白水平降低($F=64.00, P<0.05$),胞核中 β -catenin 蛋白水平显著升高($F=32.89, P<0.05$)。**结论:**维生素 D 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 C2C12 骨骼肌细胞分化。

关键词 骨骼肌;分化;维生素 D;Wnt/ β -catenin

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)03-0243-08

The effect and mechanism of vitamin D on the differentiation of skeletal muscle cells

GU Qiu¹, YUE Yingying², NIU Wenyan¹

(1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of vitamin D on the differentiation of skeletal muscle cells and its potential molecular mechanism. **Methods:** The C2C12 mouse skeletal muscle cells were incubated with different concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (VD₃), and appropriate drug concentrations were selected for follow-up experiments. The C2C12 cells were divided into control group, Wnt/ β -catenin signaling pathway agonists (SKL2001) group, VD₃ group and VD₃+SKL2001 group. The mRNA levels of vitamin D receptor (VDR), myosin heavy chain (MyHC), myogenin (MyoG), myogenic determining factor (MyoD), β -catenin, wingless-type MMTV integration site family member 11 (Wnt11), Axis inhibitor 2 (Axin2) and fermitin family member 2 (Fermt2) were detected by qPCR. Cellular immunofluorescence was used to detect MyHC and MyoG. The cell morphology of all groups was observed by inverted microscope. The protein levels of VDR, MyHC, MyoG, MyoD and β -catenin were detected by Western blotting. **Results:** Compared with control group, the mRNA level of VDR in VD₃ group was significantly increased ($t=11.50, P<0.001$), while the mRNA levels of MyHC, MyoG, MyoD, Wnt11, Axin2 and Fermt2 were decreased ($t=9.849, 8.620, 17.88, 4.069, 6.953, 4.685$, all $P<0.01$). The mRNA level of β -catenin remained stable ($t=2.657, P>0.05$). Compared with control group, the numbers of MyHC and MyoG positive myotubes were decreased, and cell fusion were impaired in VD₃ group. Microscopic observation showed that compared with the control group, the numbers and length of myotubes were increased in SKL2001 group, while cell fusion was impaired, the numbers and length of myotubes were decreased in VD₃ group. Compared with VD₃ group, the numbers and length of myotubes were increased in VD₃+SKL2001 group. Western blotting showed that the protein levels of MyHC, MyoG and MyoD in SKL2001 group were significantly increased ($F=27.91, 133.6, 33.25, 32.89$, all $P<0.05$) compared with control group. The protein levels of MyHC, MyoG and MyoD in VD₃ group were signifi-

基金项目 国家自然科学基金面上项目(82270856,81870547)

作者简介 古秋(1999-),女,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:牛文彦,E-mail:wniu@tmu.edu.cn.

cantly decreased ($F=27.91, 133.6, 33.25$, all $P<0.05$), whereas the protein level of VDR was significantly increased ($F=118.0, P<0.001$). Compared with VD_3 group, the protein levels of MyHC, MyoG and MyoD in $VD_3+SKL2001$ group were significantly increased ($F=27.91, 133.6, 33.25$, all $P<0.05$). Compared with control group, β -catenin protein level in cytoplasm of SKL2001 group was decreased ($F=64.00, P<0.05$), and β -catenin protein level in nucleus was significantly increased ($F=32.89, P<0.05$). The level of β -catenin protein in the cytoplasm of VD_3 group was increased ($F=64.00, P<0.001$), and the level of β -catenin protein in the nucleus was decreased ($F=32.89, P<0.05$) compared with control group. Compared with VD_3 group, the level of β -catenin protein in cytoplasm was decreased ($F=64.00, P<0.05$) in $VD_3+SKL2001$ group, and the level of β -catenin protein in nucleus was significantly increased ($F=32.89, P<0.05$). **Conclusion:** Vitamin D may inhibit the differentiation of C2C12 skeletal muscle cell by suppressing the Wnt/ β -catenin signal pathway.

Key words skeletal muscle; differentiation; Vitamin D; Wnt/ β -catenin

骨骼肌占人体体重的 30%~40%^[1], 是人体最大的糖代谢器官和内分泌器官, 维持着人体的基本生理功能, 如运动、能量稳态^[2]和代谢^[3]。骨骼肌肌量减少、肌肉力量下降造成肌少症, 常引起跌倒和关节损伤等问题, 也影响机体的代谢。成肌细胞的分化主要由肌生成调节转录因子(MRFs)有序表达所控制^[4], 其中肌生成决定因子(MyoD)参与细胞分化, 肌生成素(MyoG)驱动和调节分化, 肌球蛋白重链(MyHC)常作为肌分化的最终标志物。Wnt/ β -catenin 信号通路在细胞增殖、细胞自我更新和血管生成中起关键作用^[5]。有研究报道经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路在肌分化中起至关重要的作用^[6], 可抑制肌分化^[6-8]。

维生素 D 的经典功能是调节钙磷代谢, 维持骨骼健康和预防骨相关疾病^[9], 对人体健康起着不可或缺的作用。维生素 D 在体内主要以活性形式 1,25-二羟维生素 D_3 (VD_3) 发挥作用^[10]。近年来有研究报道 VD_3 在肌分化中发挥作用^[11], 其可抑制肌细胞分化、肌管形成^[12], 导致肌管减少^[11], 还可影响肌管直径^[13]。而此前有研究报道 VD_3 促进肌细胞分化^[14]。因此, VD_3 对骨骼肌细胞分化的影响目前说法不一, 且 VD_3 抑制骨骼肌分化的分子机制尚不清楚。C2C12 小鼠骨骼肌细胞常作为肌生成的研究模型, 骨骼肌细胞和组织表达维生素 D 受体(VDR), C2C12 细胞也表达 VDR^[10]。本研究选取 C2C12 细胞, 探讨维生素 D 对 C2C12 细胞分化的影响及分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠骨骼肌细胞株 C2C12(美国, ATCC), DMEM 培养基和 Opti-MEM 培养基(美国, Gibco), 胎牛血清(FBS)和马血清(HS)(德国, Viva-cell), 胰酶(中国, 新赛美), HBSS(中国, 凯基生物), VD_3 (德国, Sigma), SKL2001(美国, MCE), Trizol(德国, Ambion), DAPI(中国, 索莱宝), Trizol(美国, Invitrogen), TritonX-100 和核蛋白提取试剂盒(中国, 碧云天), 逆转录试剂盒和 qPCR Mix(中国, 全式

金), 蛋白 marker(中国, 雅酶), RIPA 裂解液、PVDF 膜、PIC 和 PMSF(美国, Millipore)。荧光二抗(德国, Sigma), VDR、MyHC、MyoG、MyoD、Lamin B 和 β -catenin 抗体(美国, Santa)。GAPDH 抗体、耦联 HRP 的山羊抗兔抗体和耦联 HRP 的山羊抗鼠抗体(CST), DAPI(中国, 博诚科技), 化学发光底物显影液(ECL)(中国, GenStar)。罗氏 96 qPCR 仪, Tan-non-5200 化学发光成像系统。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 取出冻存于液氮中的 C2C12 小鼠骨骼肌细胞, 放入 37℃ 恒温水浴中迅速融化, 加到含 10%FBS 的 DMEM 培养基的培养瓶中。细胞贴壁后, 用 HBSS 洗 2 遍, 加入同样的培养基继续培养。待细胞密度达 60%~70% 时, 用胰酶消化传代, 接种到培养板中, 用于实验。

1.2.2 诱导细胞分化与药物处理 接种细胞, 待培养板中的细胞密度达 80%~90% 时, 分别加入 5% HS 的 DMEM 配制的 0、10、50、100 nmol/L 的 VD_3 溶液诱导分化, 每天更换分化液以及 VD_3 , 分化 4 d, 观察细胞分化状态, 选择最合适的浓度进行后续实验。将细胞分为对照(control)组、Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂(SKL2001)组、 VD_3 组和 $VD_3+SKL2001$ 组。从诱导分化第 1 天时, SKL2001 组和 VD_3 组分别加入 20 μ mol/L SKL2001 和 100 nmol/L VD_3 , $VD_3+SKL2001$ 组加入 20 μ mol/L SKL2001 和 100 nmol/L VD_3 共同孵育细胞。每天更换分化液、 VD_3 和 SKL2001, 诱导分化 4 d。

1.2.3 细胞形态学观察 同 1.2.2 处理好的细胞, 倒置显微镜观察分化后肌管形态并采集图像。

1.2.4 提取 RNA 和实时荧光定量 PCR 同 1.2.2 处理好的细胞, 用预冷的 PBS 冲洗细胞, 每孔加入 500 μ L Trizol 裂解细胞 5 min 后, 加入 100 μ L 氯仿取代物抽提 RNA。12 000 \times g, 4℃ 离心 15 min, 收集透明上清, 使用与上清同等量的异丙醇沉淀 RNA, 用 75% 乙醇清洗, 8 000 \times g, 4℃ 离心 5 min, 重复 3 次。用高压水 58℃ 水浴溶解 RNA 沉淀, 分光光度计检

测 RNA 浓度,用随机引物将 RNA 逆转录为 cDNA,按照全式金试剂盒说明书配制成 20 μ L 扩增体系,使用 LightCycler96 运行程序。预变性:95 $^{\circ}$ C,600 s;设置 40 个循环:变性:95 $^{\circ}$ C,20 s,退火:60 $^{\circ}$ C,20 s,延伸:70 $^{\circ}$ C,20 s;溶解:95 $^{\circ}$ C,10 s,65 $^{\circ}$ C,60 s,97 $^{\circ}$ C,1 s;冷却:37 $^{\circ}$ C,30 s。根据 qPCR 得出的荧光曲线的 Ct 值,以 β -actin 基因为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算结果。所用引物序列见表 1。

表 1 扩增反应所需引物序列
Tab.1 Primer sequences for amplification reaction

基因名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
VDR	上游 ATGCGCAATCTCCATTGAAG	110
	下游 GAATGTCCTCGGATCTGTGG	
MyHC	上游 AGCGAATCGAGGCCAGA	192
	下游 CCTGCTTGCTGATCCACATC	
MyoG	上游 GCACTGGAGTTCCGGTCCAA	112
	下游 TATCTCCACCGTGATGCTG	
MyoD	上游 GTGGCAGCGAGCACTACAGT	177
	下游 ACACAGCCGCACTCTTCCT	
β -catenin	上游 TGCTGAAGGTGCTGTCTGTC	121
	下游 TATCATCGGAACCCAGAAGC	
Wnt11	上游 CTGACCTCAAGACCCGCTAC	182
	下游 AGTCCTTCACAGCCGGATA	
Axin2	上游 TTATGCTTTGCACTACGTCCTCCA	112
	下游 CGCAACATGCTCAACCTCAGAC	
Fermt2	上游 AGATCACTTTGGAAGGCGGG	182
	下游 ACTGGACTCTTCTCGCTCT	
β -actin	上游 CCTCTATGCCAACACAGTGC	206
	下游 CCTGCTTGCTGATCCACATC	

注:VDR:维生素 D 受体;MyHC:肌球蛋白重链;MyoG:肌生成素;MyoD:肌生成决定因子; β -catenin: β -连环蛋白;Axin2:轴抑制蛋白 2;Wnt11:无翅型 MMTV 整合位点家族成员 11;Fermt2:Fermtin 家族同源蛋白 2; β -actin:内参基因

1.2.5 细胞质蛋白和核蛋白提取 同 1.2.2 处理好的细胞,用预冷的 PBS 冲洗细胞,将细胞刮下并收集后离心,弃上清,留取细胞沉淀,每 20 μ L 细胞加入 200 μ L 细胞质蛋白提取液 A,高速涡旋 5 s 将沉淀溶解,冰浴 15 min,加入细胞质蛋白提取液 B 10 μ L,涡旋 5 s,冰浴 1 min,12 000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,立即吸取上清即为细胞质蛋白。将剩余的沉淀加入 50 μ L 细胞核蛋白提取试剂,高速涡旋 30 s,冰浴 1 min,重复 10 次,最后 12 000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,吸取上清即为核蛋白。

1.2.6 免疫印迹 同 1.2.2 处理好的细胞,用预冷的 PBS 冲洗细胞,用含 PIC、PMSF、氟化钠和钒酸钠的蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白。配制 10%的聚丙烯酰胺凝胶,蛋白上样量为 35 μ g,80 V 电压恒压电泳,110 V 电压恒压转膜,用 3% BSA 室温封闭

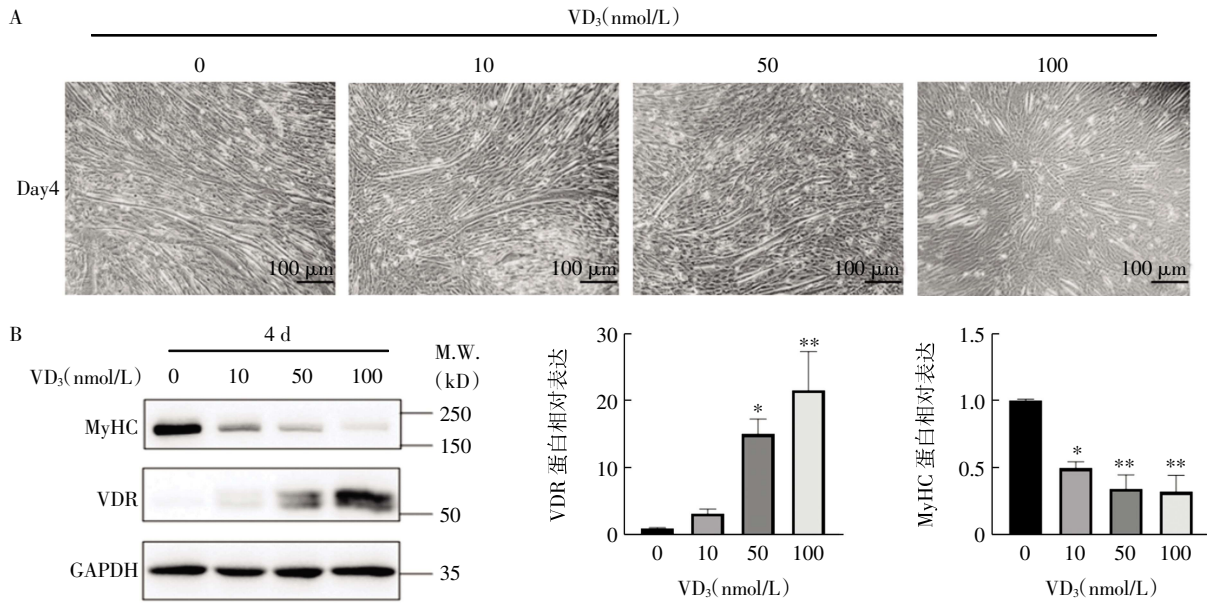
2 h,配制所需的一抗(GAPDH:1:1 000,VDR、MyHC、MyoG、MyoD、 β -catenin:1:750,均用 1%BSA 稀释),一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 PBST 液洗膜 4 次,配制所需的耦联 HRP 的二抗(1:5 000,用 1%BSA 稀释),室温孵育 2 h,用 PBS 液洗膜 4 次,用 ECL 液(A 液:B 液 1:1)孵育,化学发光成像系统显影,Image J 软件量化分析。

1.2.6 细胞免疫荧光 同 1.2.2 处理好的细胞,用 PBS 冲洗细胞,用 4% PFA 固定细胞 10 min,0.1% TritonX-100 打孔处理 10 min,再用 1% BSA 室温封闭 1 h,分别用 MyHC、MyoG 一抗(1:500,1% BSA 稀释)4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜,洗去一抗,用山羊抗鼠荧光二抗(1:2 000,1% BSA)孵育 1 h,DAPI(1:1 000,PBS 稀释)染核 10 min,荧光显微镜观察并收集图片。
1.3 统计学处理 采用 GraphPadPrism8 进行统计学分析,每个实验均重复 3 次。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)或两因素析因设计的方差分析(Two-Way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 VD₃ 对 C2C12 细胞分化的影响 显微镜下观察细胞分化后肌管形态,结果如图 1A 所示。随着 VD₃ 浓度的增加,细胞融合受损、肌管数量减少、肌管长度减短。免疫印迹检测 VDR 和 MyHC 蛋白水平,结果如图 1B 所示。在 VD₃ 浓度为 50 和 100 nmol/L 时,VDR 蛋白水平显著增加($F=9.936$, $P<0.05$),而 MyHC 蛋白水平显著降低($F=13.84$, $P<0.01$)。后续实验选择 100 nmol/L 的 VD₃ 处理细胞。

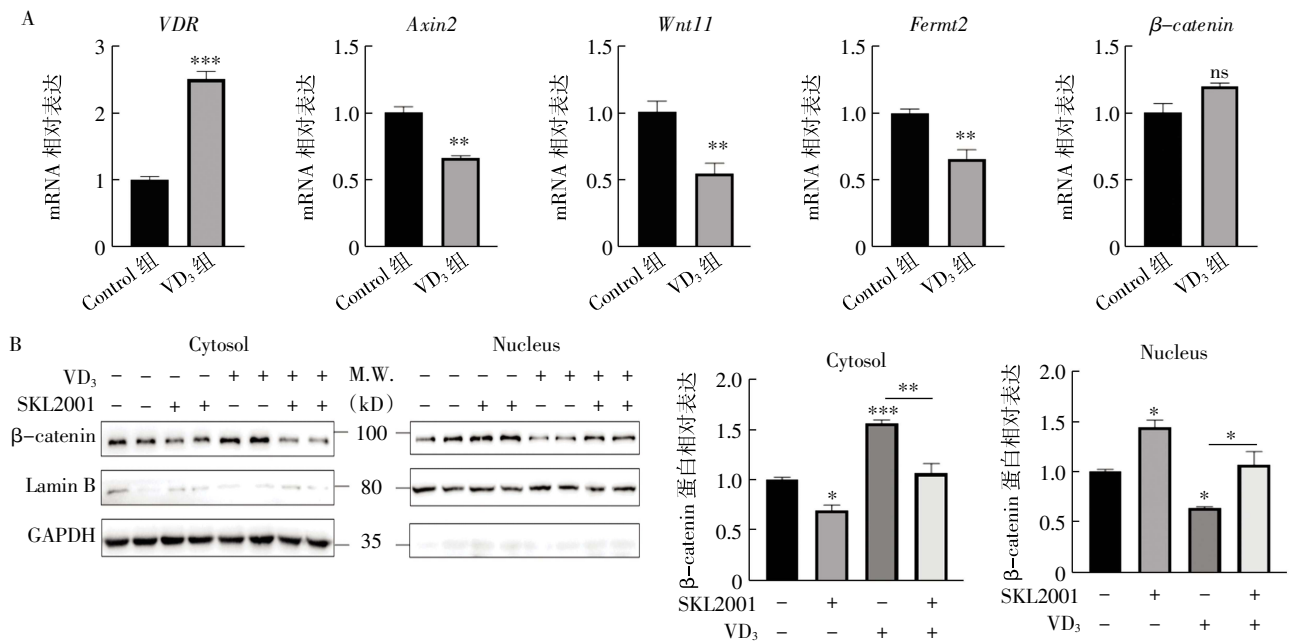
2.2 VD₃ 对 C2C12 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 qPCR 检测 control 组和 VD₃ 组 VDR、 β -catenin、Wnt11、Axin2 和 Fermt2 的 mRNA 表达水平,结果如图 2A 所示。Wnt11、Axin2 和 Fermt2 的 mRNA 表达水平均下降($t=4.069$ 、 6.953 、 4.685 ,均 $P<0.01$), β -catenin 的 mRNA 水平无明显变化($t=2.657$, $P>0.05$)。分别提取细胞中的细胞质蛋白和细胞核蛋白,免疫印迹检测 4 组(control 组、SKL2001 组、VD₃ 组和 VD₃+SKL2001 组) β -catenin 蛋白水平,结果如图 2B 所示,与 control 组相比,SKL2001 组胞质中 β -catenin 蛋白水平降低($F=64.00$, $P<0.05$),胞核中 β -catenin 蛋白水平显著升高($F=32.89$, $P<0.05$);VD₃ 组胞质中 β -catenin 蛋白水平上调($F=64.00$, $P<0.001$),胞核中 β -catenin 蛋白水平下调($F=32.89$, $P<0.05$),与 VD₃ 组相比,VD₃+SKL2001 组胞质中 β -catenin 蛋白水平降低($F=64.00$, $P<0.05$),胞核中 β -catenin 蛋白水平显著升高($F=32.89$, $P<0.05$)。



注:A:显微镜观察 C2C12 细胞形态(10×);VD₃:1,25-二羟维生素 D₃;比例尺=100 μm;B:免疫印迹检测 C2C12 细胞中 VDR 和 MyHC 蛋白水平;MyHC:肌球蛋白重链;VDR:维生素 D 受体;GAPDH:内参蛋白;n=3,*P<0.05,**P<0.01

图 1 不同浓度 VD₃ 对 C2C12 细胞分化的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of VD₃ on differentiation of C2C12 cells



注:A:qPCR 检测 VDR、β-catenin、Axin2、Wnt11 和 Fermt2 的 mRNA 表达水平;B:免疫印迹检测胞质和胞核中 β-catenin 蛋白水平;Control:对照;VD₃:1,25-二羟维生素 D₃;SKL2001:Wnt/β-catenin 信号通路的激动剂;Cytosol:细胞质;Nucleus:细胞核;VDR:维生素 D 受体;β-catenin:β-连环蛋白;Wnt11:无翅型 MMTV 整合位点家族成员 11;Axin2:轴抑制蛋白 2;Fermt2:Fermitin 家族同源蛋白 2;β-actin:内参基因;Lamin B:细胞核蛋白内参蛋白;GAPDH:内参蛋白;n=3,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

图 2 VD₃ 对 C2C12 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路的影响

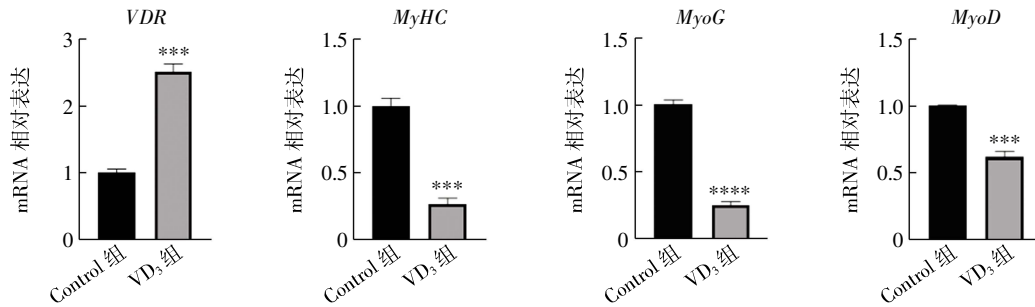
Fig.2 Effect of VD₃ on Wnt/β-catenin signal pathway in C2C12 cells

2.3 SKL2001 对 VD₃ 抑制 C2C12 细胞分化的作用的影响 qPCR 检测 control 组和 VD₃ 组 VDR、MyHC、MyoG 和 MyoD mRNA 表达水平,结果如图 3 所示。与 control 组相比,VD₃ 组 VDR mRNA 水平显著升高($t=11.50, P<0.001$),MyHC、MyoG 和 MyoD mRNA

水平显著降低($t=9.849, 8.620, 17.88$, 均 $P<0.001$)。细胞免疫荧光检测 control 组和 VD₃ 组的 MyHC 和 MyoG,结果如图 4 所示。与 control 组相比,VD₃ 组 MyHC 阳性的肌管数量减少,长度减短,MyoG 阳性的肌管数量减少。倒置显微镜观察 4 组(control 组、

SKL2001 组、VD₃ 组和 VD₃+SKL2001 组)细胞形态,免疫印迹检测 4 组 VDR、MyHC、MyoG、MyoD 和 β-catenin 蛋白水平。结果如图 5 所示。与 control 组相比,SKL2001 组肌管数量增多,肌管长度增加,VD₃ 组细胞融合受损、肌管数量减少、肌管长度缩短,与 VD₃ 组相比,VD₃+ SKL2001 组肌管数量增多,肌管长度增加;免疫印迹结果显示,与 control 组相

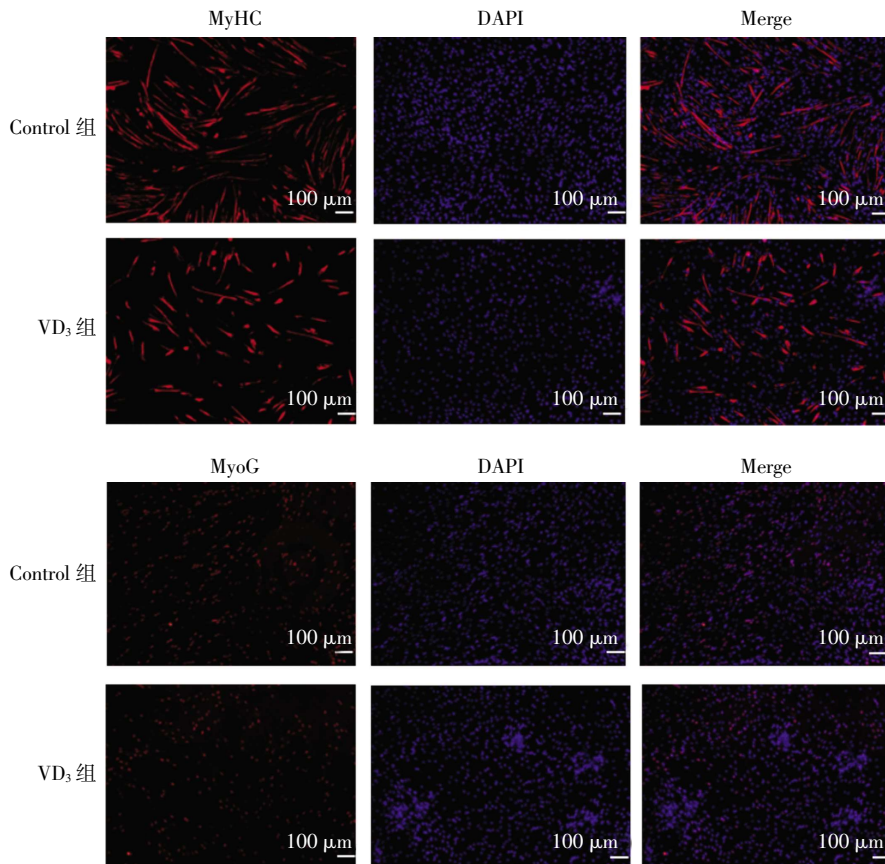
比,SKL2001 组 MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平升高 ($F=27.91, 133.6, 33.25$, 均 $P<0.05$), VD₃ 组 VDR 蛋白水平上升 ($F=118.02, P<0.001$), MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平降低 ($F=27.91, 133.6, 33.25$, 均 $P<0.05$); 与 VD₃ 组相比,VD₃+ SKL2001 组 MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平升高 ($F=27.91, 133.6, 33.25$, 均 $P<0.05$)。



注:qPCR 检测 VDR、MyHC、MyoG 和 MyoD 的 mRNA 表达水平;Control:对照;VD₃:1,25-二羟维生素 D₃;MyHC:肌球蛋白重链;MyoG:肌生成素;MyoD:肌生成决定因子;β-actin:内参基因;n=3,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$

图 3 VD₃ 对 C2C12 细胞 MyHC、MyoG 和 MyoD 的 mRNA 表达水平的影响

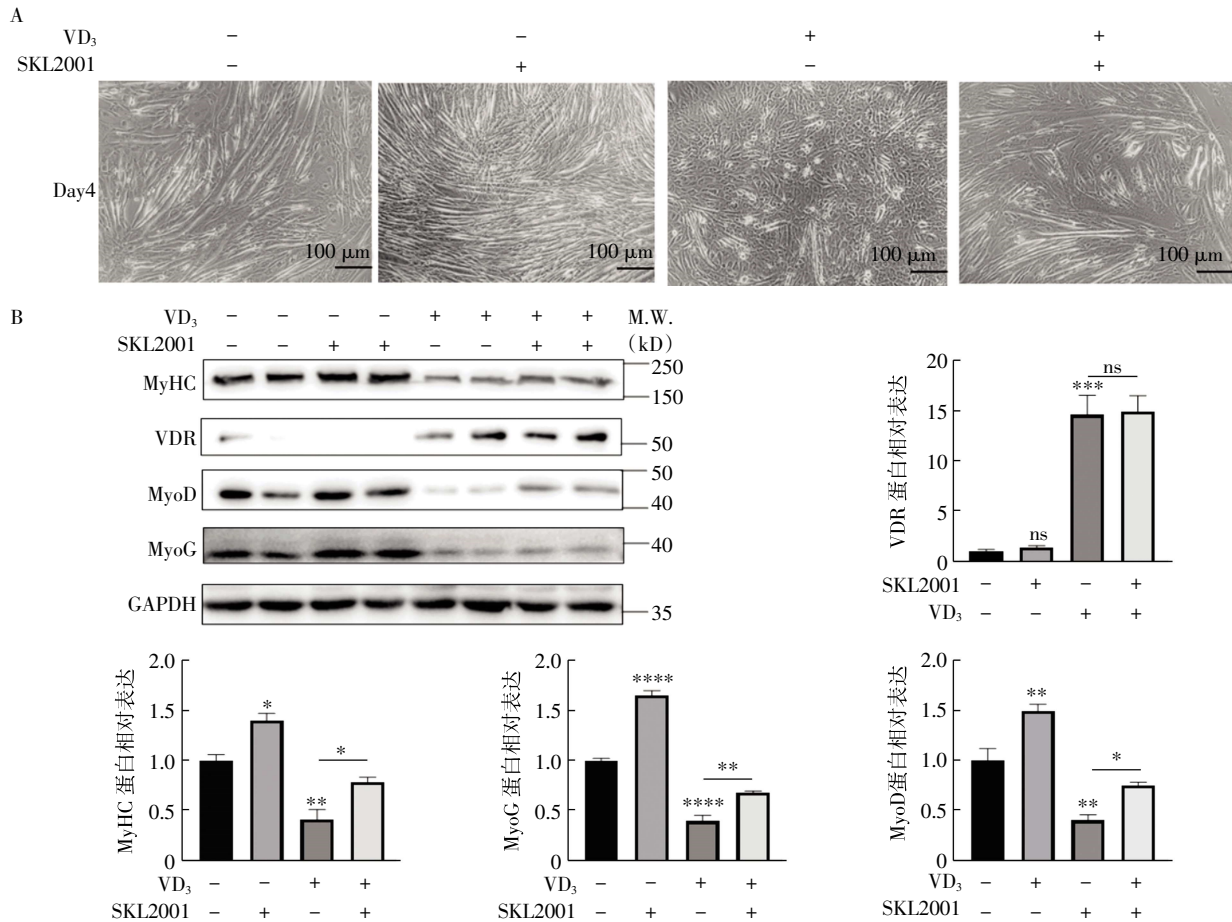
Fig.3 Effect of VD₃ on mRNA expression levels of MyHC, MyoG and MyoD in C2C12 cells



注:细胞荧光免疫检测 C2C12 细胞中 MyHC、MyoG 阳性肌纤维(4×),比例尺=100 μm;Control:对照;VD₃:1,25-二羟维生素 D₃;MyHC:肌球蛋白重链;MyoG:肌生成素;MyoD:肌生成决定因子

图 4 VD₃ 对 MyHC 和 MyoG 阳性细胞的影响

Fig.4 Effect of VD₃ on MyHC and MyoG positive cells



注:A:显微镜观察 C2C12 细胞形态(10×),比例尺=100 μm;B:免疫印迹检测 VDR、MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平;Control:对照;VD₃:1,25-二羟维生素 D₃;SKL2001:Wnt/β-catenin 信号通路的激动剂;VDR:维生素 D 受体;MyHC:肌球蛋白重链;MyoG:肌生成素;MyoD:肌生成决定因子;GAPDH:内参蛋白;n=3,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,****P<0.000 1

图 5 SKL2001 对 VD₃ 抑制 C2C12 细胞分化作用的影响

Fig.5 Effect of treated with SKL2001 on VD₃ inhibition of C2C12 cell differentiation

3 讨论

维生素 D 是一种对钙磷稳态至关重要的激素,其具有多种非钙化生理功能,如控制细胞增殖、分化和凋亡等^[15]。VD₃ 属于固醇类激素,是维生素 D 的活性形式^[16]。VD₃ 需要与 VDR 结合,启动下游级联反应和调节晚期基因转录^[16]。其在临床上的应用非常广泛,已作为骨质疏松症的预防及治疗首选方案。已证实 VDR 在骨骼肌中表达,有报道维生素 D 与一系列疾病有关,包括肌无力、肌少症^[17]和糖尿病^[18]等。因此探究维生素 D 对骨骼肌分化的作用尤为重要。

肌肉生成是一个复杂的过程,主要包括成肌细胞的增殖和分化。肌分化包括成肌细胞退出细胞周期、迁移和黏附,最后多细胞融合成肌管^[7]。多种转录因子对肌分化具有调节作用^[4],如 MRFs 家族。MRFs 由肌生成因子 5(Myf5)、MyoD 和 MyoG 组成^[4]。本研究发现,100 nmol/L VD₃ 上调 VDR 的 mRNA 和蛋白水平,下调 MyHC、MyoD 和 MyoG 的 mRNA 和

蛋白水平,MyHC 和 MyoG 阳性的肌纤维数量减少,提示 VD₃ 下调 MRFs,抑制 C2C12 细胞分化。这与 Garcia 等^[14,19]报道 100 nmol/L VD₃ 促进细胞分化的结果相反。Garcia 等^[19]采用 10%胎牛血清培养基诱导分化,VD₃ 通过调节关键的促肌因子和抗肌因子[如胰岛素样生长因子(IGF)-I、IGF-II、Fst 和 Mstn]的表达,抑制细胞增殖,从而促进 MRFs 表达和细胞分化。而本研究采用 5%马血清诱导分化,这是两种不同的诱导分化方式。前者诱导分化的方式和内源性 IGFs 的表达有关^[20]。本研究利用 5%马血清诱导分化属于血清剥夺方式,通过终止有丝分裂刺激来诱导细胞周期阻滞和促进 MyoG 的表达^[20]。近年来 Gunton 等^[11]、Okuno 等^[12]报道用 2%马血清的 DMEM 培养基诱导分化时加入 100 nmol/L VD₃,可下调 MRFs 的 mRNA 水平,抑制肌管形成^[11],与本研究的诱导分化方式一致,研究结果也一致。与野生型小鼠相比,VD₃ 基因缺失的小鼠 Myf5、MyoG 表达水平升高,肌肉纤维直径更小,尺寸更具有可调

节性^[22]。

Wnt/ β -catenin 信号通路在肌分化过程中发挥重要作用,Lian 等^[6]报道在无生长因子条件下,shRNA 敲低 β -catenin 完全阻断了心肌细胞的分化,而糖原合酶激酶-3(GSK-3)抑制剂则促进了 Wnt/ β -catenin 通路,促进心肌细胞的分化。Cui 等^[7]报道 β -catenin 通过与 MyoD 和 α -catenin 的协同作用,促进骨骼肌细胞分化。Son 等^[8]报道亚油酸通过诱导血管生成素样蛋白 4(ANGPTL4),抑制 Wnt/ β -catenin 通路和 C2C12 小鼠骨骼肌细胞分化。研究报道,VDR 与 Wnt/ β -catenin 信号通路存在紧密联系^[22]。Muralidhar 等^[23]报道维生素 D 抑制 Wnt/ β -catenin 介导的黑色素瘤进展并促进抗肿瘤免疫;Ling 等^[22]报道 VDR 通过 E-cadherin- β -catenin 复合物,调节甲状腺癌细胞的增殖和分化。为探究 VD₃ 抑制 C2C12 小鼠骨骼肌分化的分子机制,本研究重点关注 Wnt/ β -catenin 信号通路,通过检测 β -catenin 核易位的变化,发现 VD₃ 抑制胞质中的 β -catenin 入核,并且抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路中的 Axin2、Wnt11 和 Fermt2 的 mRNA 表达。Axin2^[24-25]和 Fermt2^[5]是 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游靶基因,Wnt11、Axin2 和 Fermt2 的 mRNA 表达降低,提示 Wnt/ β -catenin 信号通路活性可能被抑制。当 Wnt/ β -catenin 信号被激活时, β -catenin 从胞质向胞核易位,作为转录激活因子诱导 MRFs 和 Fermt2 的表达^[5]。本研究发现 VD₃ 下调 MRFs 表达,提示 VD₃ 可能通过抑制 β -catenin 核易位,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路活性,从而下调 MRFs,抑制骨骼肌细胞分化。为验证此推测,本研究应用 SKL2001 激活骨骼肌细胞中的 Wnt/ β -catenin 信号通路,激活后细胞核中 β -catenin 蛋白水平升高,促进了 β -catenin 入核,MyHC、MyoG 和 MyoD 蛋白水平上升;SKL2001 与 VD₃ 共同孵育部分逆转了 VD₃ 抑制骨骼肌细胞分化的作用,提示 VD₃ 可能通过抑制 Wnt/ β -catenin 抑制骨骼肌细胞分化。

综上,本研究证明了维生素 D 抑制 C2C12 小鼠骨骼肌细胞分化,其机制可能与抑制 β -catenin 核易位,下调 MRFs 的表达有关,更深入的机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] RELAIX F, BENCZE M, BOROK M J, et al. Perspectives on skeletal muscle stem cells [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 692.
- [2] GAN Z, FU T, KELLY D P, et al. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases [J]. *Cell Res*, 2018, 28: 969-980.
- [3] WU J, YUE B. Regulation of myogenic cell proliferation and differentiation during mammalian skeletal myogenesis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116563.
- [4] JUBAN G, CHAZAUD B. Efferocytosis during skeletal muscle regeneration [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3267.
- [5] YU Y, WU J, WANG Y, et al. Kindlin 2 forms a transcriptional complex with β -catenin and TCF4 to enhance Wnt signalling [J]. *EMBO Rep*, 2012, 13(8): 750-758.
- [6] LIAN X, HSIAO C, WILSON G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling [J]. *PNAS*, 2012, 109(27): e1848-e1857.
- [7] CUI S, LI L, YU R T, et al. β -catenin is essential for differentiation of primary myoblasts via cooperation with MyoD and α -catenin [J]. *Development*, 2019, 11: dev167080.
- [8] SON Y, LORENZ W W, PATON C M. Linoleic acid-induced ANGPTL4 inhibits C2C12 skeletal muscle differentiation by suppressing Wnt/ β -catenin [J]. *J Nutr Biochem*, 2023, 116: 109324.
- [9] BASS J J, NAKHUDA A, DEANE C S, et al. Overexpression of the vitamin D receptor (VDR) induces skeletal muscle hypertrophy [J]. *Mol Metab*, 2020, 42: 101059.
- [10] SRIKUEA R, HIRUNSAI M, CHAROENPHANDHU N. Regulation of vitamin D system in skeletal muscle and resident myogenic stem cell during development, maturation, and ageing [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 8239.
- [11] GUNTON J E, CHENG K, MOKBEL N, et al. Vitamin D signaling regulates proliferation, differentiation, and myotube size in C2C12 skeletal muscle cells [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(2): 347-357.
- [12] OKUNO H, KISHIMOTO K N, HATORI M, et al. 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D₃ enhances fast-myosin heavy chain expression in differentiated C2C12 myoblasts [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 36(5): 441-447.
- [13] VAN DER MEIJDEN K, BRAVENBOER N, DIRKS N F, et al. Effects of 1, 25(OH)₂D₃ and 25(OH)D₃ on C2C12 myoblast proliferation, differentiation, and myotube hypertrophy [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(11): 2517-2528.
- [14] GARCIA L A, FERRINI M G, NORRIS K C, et al. 1, 25(OH)₂ vitamin D₃ enhances myogenic differentiation by modulating the expression of key angiogenic growth factors and angiogenic inhibitors in C2C12 skeletal muscle cells [J]. *J Steroid Biochem*, 2013, 133: 1-11.
- [15] AGONCILLO M, YU J, GUNTON J E. The role of vitamin D in skeletal muscle repair and regeneration in animal models and humans: a systematic review [J]. *Nutrients*, 2023, 15(20): 4377.
- [16] SRIKUEA R, HIRUNSAI M. Effects of intramuscular administration of 1 α , 25(OH)₂D₃ during skeletal muscle regeneration on regenerative capacity, muscular fibrosis, and angiogenesis [J]. *J Appl Physiol*, 2016, 120(12): 1381-1393.
- [17] DHANWAL D K, DHARMSHAKTU P, GAUTAM V K, et al. Hand grip strength and its correlation with vitamin D in Indian patients with hip fracture [J]. *Arch Osteoporos*, 2013, 8: 158.
- [18] NIROOMAND M, FOTOUHI A, IRANNEJAD N, et al. Does high-dose vitamin D supplementation impact insulin resistance and risk of development of diabetes in patients with pre-diabetes? A double-

- blind randomized clinical trial[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2019, 148:1–9.
- [19] GARCIA L A, KING K K, FERRINI M G, et al. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ stimulates myogenic differentiation by inhibiting cell proliferation and modulating the expression of promyogenic growth factors and myostatin in C2C12 skeletal muscle cells[J]. *Endocrinology*, 2011, 152(8):2976–2986.
- [20] ANDRÉS V, WALSH K. Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis[J]. *J Cell Biol*, 1996, 132(4):657–666.
- [21] ENDO I, INOUE D, MITSUI T, et al. Deletion of vitamin d receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12):5138–5144.
- [22] LING Y, XU F, XIA X, et al. Vitamin D receptor regulates proliferation and differentiation of thyroid carcinoma via the E-cadherin-β-catenin complex[J]. *J Mol Endocrinol*, 2022, 68(3):137–151.
- [23] MURALIDHAR S, FILIA A, NSENGIMANA J, et al. Vitamin D-VDR signaling inhibits wnt/β-catenin-mediated melanoma progression and promotes antitumor immunity [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(23):5986–5998.
- [24] JHO E H, ZHANG T, DOMON C, et al. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(4):1172–1183.
- [25] HURASKIN D, EIBER N, REICHEL M, et al. Wnt/β-catenin signaling via Axin2 is required for myogenesis and, together with YAP/Taz and Tead1, active in II a/ II x muscle fibers[J]. *Development*, 2016, 143(17):3128–3142.

(2024-12-02 收稿)

(上接第 236 页)

- of human induced pluripotent stem cells into erythroid cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1):483.
- [9] DIVISATO G, PASSARO F, RUSSO T, et al. The key role of micro-RNAs in self-renewal and differentiation of embryonic stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6059.
- [10] VARZIDEH F, GAMBARELLA J, KANSAKAR U, et al. Molecular mechanisms underlying pluripotency and self-renewal of embryonic stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9):7894.
- [11] ELKENANI M, MOHAMED B A. Murine embryonic stem cell culture, self-renewal, and differentiation[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2520:265–273.
- [12] CHEN G, YIN S, ZENG H, et al. Regulation of embryonic stem cell self-renewal[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(8):1167.
- [13] HASSANI S N, MORADI S, TALEAHMAD S, et al. Transition of inner cell mass to embryonic stem cells: mechanisms, facts, and hypotheses[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(5):873–892.
- [14] RAUTH S, KARMAKAR S, BATRA S K, et al. Recent advances in organoid development and applications in disease modeling [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1875(2):188527.
- [15] SAKUMA T, NAKADE S, SAKANE Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems[J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(1):118–133.
- [16] CONNELL Z, PARNELL T J, MCCULLOUGH L L, et al. The interaction between the Spt6-tSH2 domain and Rpb1 affects multiple functions of RNA polymerase II[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(2):784–802.
- [17] AOI Y, SHAH A P, GANESAN S, et al. SPT6 functions in transcriptional pause/release via PAF1C recruitment[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(18):3412–3423.
- [18] EHARA H, KUJIRAI T, SHIROUZU M, et al. Structural basis of nucleosome disassembly and reassembly by RNAP II elongation complex with FACT[J]. *Science*, 2022, 377(6611):eabp9466.
- [19] NARAIN A, BHANDARE P, ADHIKARI B, et al. Targeted protein degradation reveals a direct role of SPT6 in RNAP II elongation and termination[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(15):3110–3127.
- [20] WINKLER M, AUS DEM SIEPEN T, STAMMINGER T. Functional interaction between pleiotropic transactivator pUL69 of human cytomegalovirus and the human homolog of yeast chromatin regulatory protein SPT6[J]. *J Virol*, 2000, 74(17):8053–8064.
- [21] OQANI R K, LIN T, LEE J E, et al. Iws1 and Spt6 regulate trimethylation of histone H3 on lysine 36 through Akt signaling and are essential for mouse embryonic genome activation[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):3831.
- [22] YOH S M, LUCAS J S, JONES K A. The Iws1/Spt6/CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(24):3422–3434.
- [23] LI S, EDWARDS G, RADEBAUGH C A, et al. Spn1 and its dynamic interactions with Spt6, histones and nucleosomes[J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(13):167630.
- [24] ZUMER K, MAIER K C, FARNUNG L, et al. Two distinct mechanisms of RNA polymerase II elongation stimulation *in vivo*[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(15):3096–3109.

(2024-11-11 收稿)