

# 白藜芦醇通过SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 影响牛肌管细胞线粒体生物发生和肌纤维类型转化

张静月, 董鹏程, 左惠心, 梁荣蓉, 毛衍伟, 张一敏, 杨啸吟, 罗欣, 朱立贤\*  
(山东农业大学食品科学与工程学院, 国家牛肉加工技术研发专业中心, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 以牛肌管细胞为研究对象, 通过添加白藜芦醇探究其对牛肌管细胞肌纤维类型转化的影响及其作用机制。通过噻唑蓝法和比色法对细胞活力和相关代谢酶活力进行测定, 对成肌调节因子、肌球蛋白重链 (myosin heavy chains, MyHCs) 以及线粒体生物发生相关分子的基因和蛋白表达量进行测定。结果表明, 白藜芦醇处理显著提高了 *Myf5*、*Myf6*、*MyoG* 和 *MyoD* 的基因表达水平 ( $P < 0.05$ ), 促进了牛肌管细胞分化。白藜芦醇处理显著提高了慢肌纤维蛋白 (slow MyHC) 的表达, 降低了快肌纤维蛋白 (fast MyHC) 表达, 同时上调了 *MyHC I* 和 *MyHC IIa* 基因表达水平, 下调了 *MyHC IIx* 和 *MyHC IIb* 基因表达水平 ( $P < 0.05$ )。白藜芦醇还能显著提高牛肌管细胞中的琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶活性, 降低乳酸脱氢酶活性 ( $P < 0.05$ ), 此外, 白藜芦醇显著提高了沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )、核呼吸因子 (nucleus respiratory factors, NRF) -1、线粒体转录因子A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 的基因和蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ )。添加SIRT1抑制剂6-氯-2,3,4,9-四氢-1H-咔唑-1-甲酰胺 (1H-carbazole-1-carboxam, EX527) 后, 显著削弱了白藜芦醇诱导的肌纤维类型转化 ( $P < 0.05$ ), 白藜芦醇对SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM的基因和蛋白表达的促进作用被EX527显著削弱 ( $P < 0.05$ )。综上所述, 白藜芦醇通过激活SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路促进线粒体生物发生, 进而促进牛肌管肌纤维类型的转化。

**关键词:** 白藜芦醇; 牛肌管细胞; 沉默信息调节因子1/过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1 $\alpha$ ; 肌纤维类型转化; 线粒体生物发生

## Effect of Resveratrol on Mitochondrial Biogenesis and Muscle Fiber Type Transformation in Bovine Myotubes via SIRT1/PGC-1 $\alpha$

ZHANG Jingyue, DONG Pengcheng, ZUO Huixin, LIANG Rongrong, MAO Yanwei,  
ZHANG Yimin, YANG Xiaoyin, LUO Xin, ZHU Lixian\*

(National R & D Center for Beef Processing Technology, College of Food Science and Engineering,  
Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** This study investigated the effect of resveratrol on muscle fiber type transformation in bovine myotubes. Cell viability and related metabolic enzyme activities were measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and colorimetric assays, and myogenic regulatory factors (MRFs), myosin heavy chains (MyHCs), and gene and protein expression related to mitochondrial biogenesis were determined. The results showed that resveratrol treatment significantly increased the gene expression of *Myf5*, *Myf6*, *MyoG*, and *MyoD* ( $P < 0.05$ ) and promoted the differentiation of bovine myotubes. Resveratrol significantly increased slow MyHC expression and decreased fast MyHC expression, while upregulating the

收稿日期: 2023-05-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072239); 山东省牛产业技术体系项目 (SDAIT-09-09);  
现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-37)

第一作者简介: 张静月 (1998—) (ORCID: 0009-0004-5533-1912), 女, 硕士研究生, 研究方向为肉品科学。  
E-mail: 2383706451@qq.com

\*通信作者简介: 朱立贤 (1975—) (ORCID: 0000-0002-3700-1643), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉品科学。  
E-mail: zhlx@sdau.edu.cn

mRNA expression levels of *MyHC I* and *MyHC IIa* and downregulating the mRNA expression levels of *MyHC IIx* and *MyHC IIb* ( $P < 0.05$ ). Resveratrol also significantly increased succinate dehydrogenase (SDH) and malate dehydrogenase (MDH) activity and decreased lactic dehydrogenase (LDH) activity ( $P < 0.05$ ). In addition, resveratrol increased the gene and protein expression levels of silent information regulator 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), nucleus respiratory factors-1 (NRF-1), mitochondrial transcription factor A (TFAM) ( $P < 0.05$ ). Addition of the SIRT1 inhibitor 6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazole-1-carboxamide (EX527) significantly attenuated resveratrol-induced muscle fiber type transformation ( $P < 0.05$ ), and the promoting effect of resveratrol on the gene and protein expression of SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , NRF-1, and TFAM ( $P < 0.05$ ). Taken together, resveratrol can promote mitochondrial biogenesis and consequently muscle fiber type transformation by activating the SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway.

**Keywords:** resveratrol; bovine myotubes; silent information regulator 1/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$ ; muscle fiber type transformation; mitochondrial biogenesis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230527-256

中图分类号: TS251.5+2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 04-0001-09

引文格式:

张静月, 董鹏程, 左惠心, 等. 白藜芦醇通过SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 影响牛肌管细胞线粒体生物发生和肌纤维类型转化[J]. 食品科学, 2024, 45(4): 1-9. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230527-256. <http://www.spkx.net.cn>

ZHANG Jingyue, DONG Pengcheng, ZUO Huixin, et al. Effect of resveratrol on mitochondrial biogenesis and muscle fiber type transformation in bovine myotubes via SIRT1/PGC-1 $\alpha$ [J]. Food Science, 2024, 45(4): 1-9. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230527-256. <http://www.spkx.net.cn>

肌纤维是肌肉组织的基本结构单位, 肌纤维的组成类型对畜禽肉品质产生重要影响<sup>[1]</sup>。根据所含肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MyHC) 类型的不同, 将肌纤维分为4类: 慢速氧化型 (MyHC I)、快速氧化型 (MyHC IIa)、快速糖酵解型 (MyHC IIb) 和中间型 (MyHC IIx)<sup>[1]</sup>。I型肌纤维中线粒体含量丰富, 肌红蛋白含量和有氧代谢相关酶活性高, ATP酶活性低, 收缩速率慢且持久; IIa型肌纤维中糖原含量高并含有一定数量的肌红蛋白; IIb型肌纤维中线粒体含量少, 糖原含量高, 糖酵解相关酶活性高, 三磷酸腺苷 (adenosine 5'-triphosphate, ATP) 酶活性高, 收缩速率短且快; IIx型肌纤维中线粒体含量、肌红蛋白含量以及代谢和收缩特征介于IIa和IIb之间<sup>[2-3]</sup>。不同的肌纤维类型之间可以相互转化, 肌纤维类型可以由糖酵解型转化为氧化型, 也可以由氧化型转化为糖酵解型。肌纤维的数目在动物胚胎期已基本固定, 而肌纤维类型转化伴随整个生长发育期。外部环境刺激、能量代谢水平和营养等都会对肌纤维类型转化产生影响<sup>[4-5]</sup>。

白藜芦醇是一种天然多酚物质, 广泛存在于虎杖、花生和葡萄等植物中<sup>[6]</sup>。白藜芦醇具有广泛的生物活性, 例如预防肥胖、治疗糖尿病、抗炎抗氧化等<sup>[7]</sup>。白藜芦醇作为畜禽饲料添加剂, 可以提高动物的生长性能以及改善肉品质<sup>[8]</sup>。线粒体在细胞能量代谢和信号传导中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。线粒体生物发生是线粒体的一种自我更新途径, 新的线粒体从已存在的线粒体中产生, 即线粒体基因组的复制、转录和翻译<sup>[10]</sup>。线粒体生物发生是

一个极其复杂的过程, 对于维持细胞内线粒体数目和功能具有重要作用<sup>[11]</sup>。骨骼肌纤维中含有大量的线粒体, 肌纤维的生长发育伴随着线粒体的生物发生。邹彬<sup>[12]</sup>研究发现电刺激会降低线粒体生物发生程度, 同时使I型肌纤维比例降低, II型肌纤维比例增加。线粒体功能障碍时, 骨骼肌中慢肌纤维的比例减少, 快肌纤维的比例增加, 证明了线粒体能够驱动肌纤维类型转化<sup>[13]</sup>。沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1) 可以通过去乙酰化激活过氧化物酶体增殖物, 激活受体 $\gamma$ 共激活因子1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ), PGC-1 $\alpha$ 进而激活一系列核基因编码的线粒体蛋白, 从而调控线粒体生物发生<sup>[14]</sup>。Li Yongguang等<sup>[15]</sup>研究发现, 白藜芦醇可以激活大鼠心肌细胞中SIRT1的表达, 同时PGC-1 $\alpha$ 和核呼吸因子的表达增强, 线粒体蛋白含量增加。本实验室前期研究发现在肉牛日粮中添加白藜芦醇 (5 g/头) 能够促进肌纤维类型由II型转化为I型, 并改善牛肉品质, 但其机制仍不明确<sup>[16]</sup>, 推测白藜芦醇可能通过SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路促进线粒体生物发生, 进而促进牛肌管细胞肌纤维类型转化。因此, 本研究以牛肌管细胞为研究对象, 通过测定肌纤维类型、相关代谢酶活力以及线粒体生物发生中关键分子表达量, 研究白藜芦醇对牛肌管细胞肌纤维类型转化的影响; 在此基础上, 进一步添加SIRT1抑制剂6-氯-2,3,4,9-四氢-1*H*-咪唑-1-甲酰胺 (1*H*-carbazole-1-carboxam, EX527), 观察其对肌纤维类型转化以及线粒体生物发生中关键分子表达量的影响, 从而分析白藜芦醇

调控牛肌管细胞肌纤维类型转化的内在机理,为改善牛肉品质提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牛成肌细胞 上海一研生物科技有限公司; 胰蛋白酶、最低必需培养基 (minimum essential medium, MEM)、双抗 (青霉素-链霉素)、马血清、噻唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 北京索莱宝公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 以色列Biological Industries公司; 白藜芦醇 (纯度 $\geq 98\%$ ) 美国MedChemexpress生物科技有限公司; EX527 美国Selleck生物科技有限公司; 琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase, MDH)、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 试剂盒 南京建成生物工程研究所; DNA提取试剂盒、RNA提取试剂盒、反转录试剂盒 北京艾科瑞公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒 江苏康为世纪生物科技股份有限公司; RIPA细胞裂解液、苯甲磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluorid, PMSF)、磷酸酶抑制剂、抗荧光猝灭封片液 (含DAPI) 上海碧云天生物技术公司; slow MyHC抗体 (M8421)、fast MyHC抗体 (M4276) 美国Sigma公司; SIRT1抗体 (8069)、PGC-1 $\alpha$ 抗体 (2178)、核呼吸因子 (nucleus respiratory factors, NRF) -1 抗体 (46743)、线粒体转录因子A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 抗体 (8076) 美国Cell Signaling Technology公司; 羊抗兔IgG、兔抗鼠IgG、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (ab8245) 英国Abcam公司。

### 1.2 仪器与设备

CFX 96实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪、1658029电泳仪、ChemiDoc MP凝胶成像仪 美国Bio-Rad公司; 3111 CO<sub>2</sub>培养箱 美国Thermo公司; Epoch2酶标仪 美国BioTek公司; 5840R高速冷冻离心机 德国ClemensBio Gmb公司; IX73P1F倒置荧光显微镜 日本Olympus公司; VCX130超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技有限公司; TU-1901紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养

将细胞培养于10% FBS和1%双抗的MEM培养基中,

置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养,待细胞汇合度达到70%左右时开始传代,进行后续实验。

#### 1.3.2 MTT法测定白藜芦醇对细胞活力的影响

将细胞接种于96孔板中,诱导分化2 d后向培养板中加入含不同浓度白藜芦醇 (10、20、30  $\mu\text{mol/L}$ 和40  $\mu\text{mol/L}$ ) 的分化培养基 (2%马血清+98% MEM)。设置不含白藜芦醇的培养基为对照组,每个浓度设置6个复孔。培养24 h后加入含0.5 mg/mL MTT的培养基培养4 h,弃掉上清液后加入100  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砷,避光振荡10 min,在酶标仪上测定OD<sub>570 nm</sub>,细胞活力根据下式计算:

$$\text{细胞活力}/\% = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100$$

式中:  $A_0$ 为细胞背景孔的吸光度;  $A_1$ 为白藜芦醇处理孔的吸光度;  $A_2$ 为空白对照孔的吸光度。

#### 1.3.3 白藜芦醇对牛肌管细胞的处理

当细胞汇合度达到70%左右时,按照 $1 \times 10^4$ 个/孔布板,用完全培养基培养并将孔板置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待细胞完全贴壁后,弃掉原来的培养基,用PBS清洗后更换含马血清的分化培养基诱导分化。诱导分化2 d后更换含有不同浓度白藜芦醇 (0、10、20  $\mu\text{mol/L}$ 和30  $\mu\text{mol/L}$ ) 的分化培养基,每2 d更换一次培养基,并在显微镜下观察细胞状态,分化5 d,收集细胞样品用于测定相关指标。为明确白藜芦醇是否通过SIRT1影响牛肌管细胞肌纤维类型转化,添加SIRT1抑制剂EX527 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞24 h后,更换含或者不含白藜芦醇 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 的分化培养基,分化5 d后收集细胞样品用于测定相关指标 ( $n=6$ )。

#### 1.3.4 mRNA相对表达量的测定

##### 1.3.4.1 总RNA提取及引物序列

将细胞板中的液体弃掉,用PBS收集培养好的细胞,按照试剂说明书提取总RNA,核酸蛋白分析仪检测所提取RNA的浓度和纯度,所有样品的OD<sub>260 nm/280 nm</sub>均在1.8~2.0之间。按照反转录试剂说明书将RNA反转录为cDNA。表1为实时PCR (real-time PCR) 引物序列,由湖南艾科瑞生物技术有限公司设计合成。

表1 real-time PCR引物序列  
Table 1 Primer sequences used for real-time PCR

基因	引物序列	产物长度/bp
Myf5	F: GCGTCTACTGCTCTGATGTACC	110
	R: AGGTTGCTCTGAGTTGGTGAT	
Myf6	F: TCCAGTGGCCAAGTGTTC	87
	R: CGAGGCCGATGAATCAATGC	
MyoG	F: TGTAAGAGGAAGTCGGTGTCTGT	84
	R: GGCTTCAATCACCTTCTGAGTCT	
MyoD	F: AACTGTTCCGACGGCATGATG	84
	R: GCTGTAGTAAGTGCGGTCGTA	
MyHC I	F: ATCGCTGAATCCCAGGTCAA	148
	R: ACCAAGATGTGGCACGGCTA	

续表1

基因	引物序列	产物长度/bp
<i>MyHC IIa</i>	F: CACCCTGGAGCAGACAGAGA R: TCCCTGGATTGCGTGATG	84
<i>MyHC IIx</i>	F: AGGGCATCGCTGGAACAGAC R: CAGAAAGCTGCACACGCTCAC	96
<i>MyHC IIb</i>	F: TTCCAGACCCTGTCTGCTC R: GGGATGATGCAGCGTACAAAG	100
<i>SIRT1</i>	F: AACTTTGCTGTAACCCCTGTGAA R: CTGGTGAACCTTGAGCCTTCTG	129
<i>PGC-1α</i>	F: GGAGCAATAAAGCGAAGAGCA R: TGTGGGTTTGGTGTGAGGAG	113
<i>NRF-1</i>	F: CTGATGGCACTGTCTCGCTTAT R: TGACTGTGGTTGGCAATTCTGA	87
<i>TFAM</i>	F: TGGGAAAGTCAGGAGCGGATC R: TGGGCTTCTTTGGATAACCACTCA	120
<i>GAPDH</i>	F: GATGGTGAAGTCCGGAGTGAAC R: GTCATTGATGGCGACGATGT	100

#### 1.3.4.2 real-time PCR

以cDNA为模板, 采用SYBR法对其进行扩增。荧光定量反应体系20 μL: 2×SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS Premix 10 μL, cDNA模板2 μL, 上、下游引物各0.4 μL, 无核酸ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL。real-time PCR条件: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性5 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸60 s, 循环40次; 65 °C 5 s, 5 s一循环, 每个循环升温0.5 °C, 直到95 °C。用2<sup>-ΔΔCT</sup>计算各基因的mRNA相对表达量, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 基因作为内参。

#### 1.3.5 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达

处理好的细胞中加入RIPA细胞裂解液 (含1 mmol/L PMSF), 冰上裂解20 min, 4 °C、12 000×g离心后取上清液, 用BCA试剂盒测定蛋白浓度, 加入适量的蛋白上样缓冲液, 100 °C变性10 min。取适量样品上样, 经SDS-PAGE分离, 使用0.45 μm PVDF膜湿转, 用5%脱脂奶粉封闭1.5 h, 4 °C冰箱孵育对应的一抗过夜, 第二天孵育对应的二抗1.5 h, 用化学发光显影液显影, 用Image Lab软件分析条带灰度值并进行统计学分析。

#### 1.3.6 代谢酶活性的测定

使用超声波细胞破碎仪将收集的细胞破碎, 按照试剂盒说明书对牛肌管中的SDH、LDH和MDH活性进行测定。

#### 1.3.7 细胞免疫荧光

24孔板中细胞用PBS冲洗3次后加入500 μL的4%多聚甲醛溶液, 室温固定10 min, 结束后用PBS冲洗3次。用含0.2%曲拉通X-100的PBS通透10 min, PBS洗3次。用含5%牛血清白蛋白封闭液室温封闭1.5 h。用抗体稀释液稀释抗体, 室温孵育1.5 h, 结束后PBS

洗3次。避光室温孵育二抗1 h, PBS洗3次。滴加抗荧光猝灭剂 (含DAPI), 孵育10 min后于荧光显微镜下观察拍照。

#### 1.4 数据处理与分析

利用SPSS 26.0软件进行数据统计分析, 多组间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 和最小显著性差异法 (least significant difference, LSD) 进行多重比较, 两组间的比较采用*t*检验。实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 白藜芦醇对牛成肌细胞活力的影响

如图1所示, 随着白藜芦醇浓度的增加, 牛成肌细胞活力逐渐降低。在0~40 μmol/L浓度范围内, 细胞存活率均大于80%, 表明其对牛成肌细胞增殖没有明显影响, 无细胞毒性。在0~40 μmol/L浓度范围内, 随着白藜芦醇浓度增加, 牛成肌细胞活力与对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 当白藜芦醇浓度达到40 μmol/L时, 与对照组 (0 μmol/L) 相比, 其活力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 故后续实验采用0~30 μmol/L白藜芦醇处理细胞。

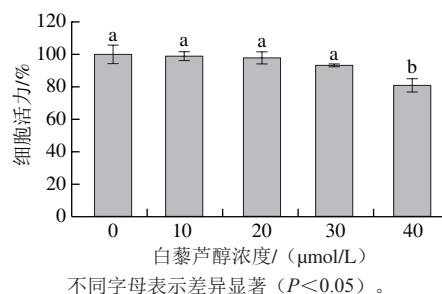


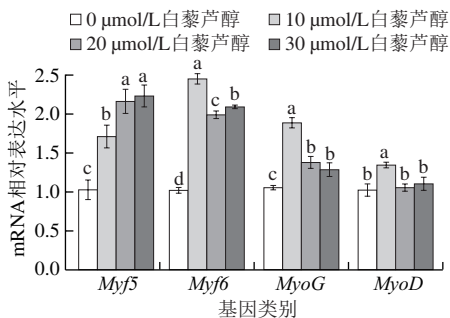
图1 不同浓度白藜芦醇处理对牛成肌细胞活力的影响  
Fig. 1 Effect of resveratrol at different concentrations on cell viability of bovine myotube

### 2.2 白藜芦醇对牛肌管细胞分化的影响

为研究白藜芦醇对牛肌管细胞分化的影响, 用含0、10、20 μmol/L和30 μmol/L白藜芦醇的分化培养基诱导牛成肌细胞分化。在细胞发育过程中存在控制原始干细胞向成肌细胞转化的调控因子, 这些调控因子被称为成肌决定因子。生肌调节因子 (myogenic regulatory factors, MRFs) 家族包括成肌分化抗原 (myogenic differentiation, MyoD)、生肌因子5 (myogenic factor 5, Myf5)、MRF4 (或Myf6) 和肌细胞生成素 (myogenin, MyoG) 这4个转录因子, 具有将非成肌细胞转化为具有成肌细胞特性并能融合形成肌管细胞的能力<sup>[17]</sup>。MyoD和Myf5是细胞进入成肌细胞系的起始, 构

成肌肉细胞决定和分化的调控核心；Myf6和MyoG对于成肌细胞正常分化以及MyHC的表达具有重要作用<sup>[18]</sup>。

由图2可知，白藜芦醇能显著增加Myf5、Myf6和MyoG mRNA表达水平 ( $P < 0.05$ )，10  $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇显著增加MyoD mRNA表达水平 ( $P < 0.05$ )，因此，后续采用10  $\mu\text{mol/L}$ 的白藜芦醇处理细胞。白藜芦醇是一种促分化剂，有研究表明白藜芦醇具有促进造血干细胞、癌细胞和成纤维细胞分化的作用<sup>[19]</sup>。曹君等<sup>[20]</sup>研究发现白藜芦醇促进C2C12成肌细胞分化，上调肌肉分化的相关转录因子，并增加肌球蛋白的表达。Montesano等<sup>[21]</sup>研究发现在小鼠成肌细胞中添加白藜芦醇后，早期肌形成阶段的重要标志物Myf5和MyoD蛋白表达水平显著增加。以上结果与本研究类似，说明白藜芦醇能够促进牛肌管细胞分化。



组间字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )，下同。

图2 不同浓度白藜芦醇处理对牛肌管细胞生肌调节因子相关基因相对表达水平的影响

Fig. 2 Effect of resveratrol at different concentrations on the relative gene expression level of myogenic regulatory factor in bovine myotube

### 2.3 白藜芦醇对牛肌管细胞肌纤维类型的影响

为研究白藜芦醇对肌纤维类型的影响，本实验采用real-time PCR和蛋白免疫印迹法检测10  $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理后牛肌管细胞中肌纤维类型相关基因和蛋白的表达量。由图3可知，与对照组相比，白藜芦醇显著增加了MyHC I和MyHC IIa mRNA的表达 ( $P < 0.05$ )，降低了MyHC IIx和MyHC IIb mRNA的表达 ( $P < 0.05$ )。由图4可知，白藜芦醇显著上调了慢肌纤维蛋白 (slow MyHC) 表达 ( $P < 0.05$ )，下调了快肌纤维蛋白 (fast MyHC) 表达 ( $P < 0.05$ )。进一步用细胞免疫荧光检测牛肌管中不同肌纤维类型的数量，荧光染色面积越大，说明肌纤维数量越多，由图5可知，与对照组相比，白藜芦醇显著增加了牛肌管细胞中慢肌纤维的数量，同时减少了快肌纤维的数量。本实验室之前研究发现，在肉牛日粮中添加白藜芦醇显著提高牛肉中氧化型肌纤维的比例<sup>[16]</sup>，与本研究结果一致。Wen Wanxue等<sup>[22]</sup>

研究发现在C2C12细胞中，白藜芦醇增加了慢肌纤维蛋白表达以及MyHC I和MyHC IIa氧化型肌纤维基因的表达，降低了快肌纤维蛋白表达以及MyHC IIx和MyHC IIb糖酵解型肌纤维基因的表达。在猪肌管细胞中也得到类似的结果，白藜芦醇增加了慢肌纤维蛋白的表达，降低了快肌纤维蛋白的表达<sup>[23]</sup>，上述结果与本研究相似，表明添加白藜芦醇促进牛肌管肌纤维类型由快肌向慢肌转化。

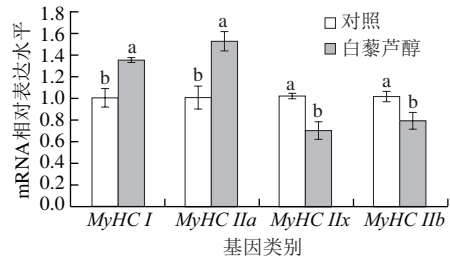


图3 白藜芦醇对牛肌管细胞中MyHC基因相对表达水平的影响

Fig. 3 Effect of resveratrol on the relative gene expression level of MyHC in bovine myotube

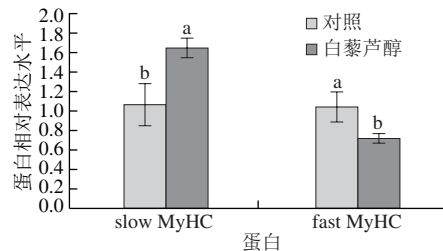
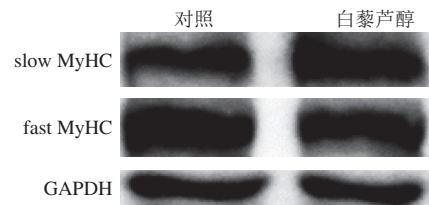
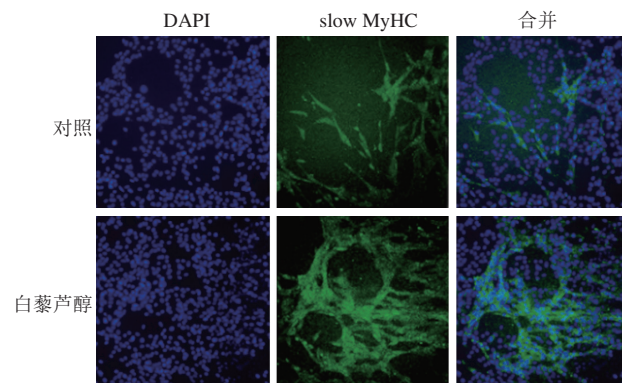


图4 白藜芦醇对牛成肌细胞中快肌和慢肌蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of resveratrol on protein expression of slow and fast MyHC in bovine myotube



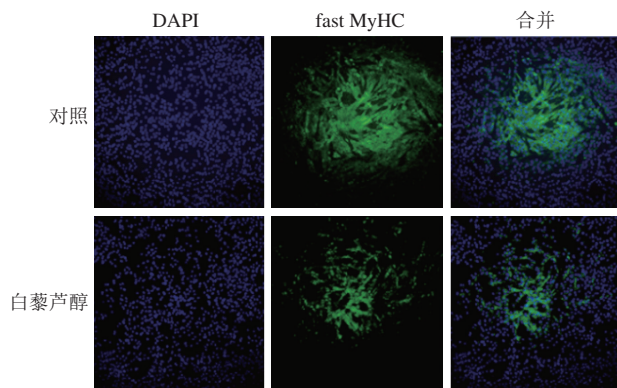


图5 白藜芦醇对牛肌管细胞中快慢肌表达的影响

Fig. 5 Effect of resveratrol on the expression of fast and slow MyHC in bovine myotube

#### 2.4 白藜芦醇对牛肌管细胞代谢酶活性的影响

肌纤维类型不同其能量代谢特征也不同，氧化型肌纤维中含有丰富的线粒体和氧化代谢酶，具有较强的氧化能力，主要依靠有氧代谢途径供能；糖酵解型肌纤维中线粒体和氧化代谢酶少，含有大量的酵解相关酶，主要依靠糖酵解方式供能。LDH催化糖酵解产生乳酸，可以反映细胞内无氧酵解的活跃度<sup>[24]</sup>。MDH存在于线粒体上，参与三羧酸循环，是合成苹果酸的关键酶<sup>[25]</sup>。SDH与其他参与三羧酸循环的酶类不同，是结合到线粒体内膜上的酶，可为真核细胞线粒体呼吸链提供电子<sup>[26]</sup>。SDH和MDH均为三羧酸循环中的关键酶，其活性在一定程度上反映了肌肉中有氧代谢的水平，与肌纤维类型组成存在一定的关系<sup>[27]</sup>。由表2可知，白藜芦醇显著降低了LDH活性 ( $P < 0.05$ )，显著提高了SDH和MDH活性 ( $P < 0.05$ )。该结果说明白藜芦醇能够提高氧化代谢水平，这与添加白藜芦醇后氧化型肌纤维比例升高，糖酵解型肌纤维比例下降的结果一致。温万雪<sup>[27]</sup>研究发现，番茄红素增加了C2C12肌细胞中慢肌纤维的比例，同时增加了SDH和MDH活性，降低了LDH活性，这与本研究结果相似。多酚化合物可以增加慢肌纤维比例，具体表现为多酚类物质能够显著增加慢肌纤维蛋白表达水平，增加SDH活性，同时降低LDH活性<sup>[28-29]</sup>。

表2 白藜芦醇对牛肌管细胞中代谢酶活性的影响

Table 2 Effect of resveratrol on metabolic enzyme activities of bovine myotube

指标	对照组	白藜芦醇组
MDH活性/ (U/mg)	1.69 ± 0.23 <sup>b</sup>	2.25 ± 0.03 <sup>a</sup>
SDH活性/ (U/mg)	33.21 ± 1.28 <sup>b</sup>	56.44 ± 6.20 <sup>a</sup>
LDH活性/ (U/mg)	2 019.70 ± 268.94 <sup>a</sup>	1 402.52 ± 168.67 <sup>b</sup>

注：同行字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 白藜芦醇对牛肌管细胞线粒体生物发生的影响

线粒体生物发生过程极其复杂，线粒体是半自主遗传细胞器，其生物发生受线粒体DNA和核DNA的共同调控<sup>[10]</sup>。SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 是调控线粒体生物发生的重要信号通路之一。SIRT1是NAD<sup>+</sup>依赖性去乙酰酶，作为PGC-1 $\alpha$

的上游信号分子可以诱导激活PGC-1 $\alpha$ ，从而增加线粒体相关基因的表达。小鼠敲除SIRT1基因后肌肉中线粒体含量减少，线粒体功能受到影响<sup>[30]</sup>。PGC-1 $\alpha$ 是一种转录共激活因子，PGC-1 $\alpha$ 直接激活其下游参与线粒体生物发生的多个转录因子，包括NRFs、TFAM和过氧化物酶体增殖剂激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)<sup>[14]</sup>。在特异性敲除PGC-1 $\alpha$ 基因的小鼠中发现线粒体体积减小，线粒体相关蛋白的表达下降，影响了线粒体生物发生<sup>[31]</sup>。因此，本研究对SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路以及线粒体相关基因的表达量进行测定，研究白藜芦醇对牛肌管细胞线粒体生物发生的影响。

如图6所示，与对照组相比，白藜芦醇组SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM mRNA表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。蛋白表达水平如图7所示，白藜芦醇组SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM蛋白表达量显著升高 ( $P < 0.05$ )。SIRT1是细胞的重要能量感受器，当骨骼肌中SIRT1的表达量增加时，线粒体生物发生增加，肌纤维类型发生转化<sup>[32]</sup>。Li Yongguang等<sup>[15]</sup>研究发现，在心肌细胞中添加白藜芦醇可以促进基因SIRT1和PGC-1 $\alpha$ 的表达，这与本实验研究结果一致，说明白藜芦醇是SIRT1的诱导激活因子。此外SIRT1也是介导线粒体生物发生的关键因子，杨坤<sup>[33]</sup>研究发现白藜芦醇可以通过激活SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路促进线粒体生物发生。PGC-1 $\alpha$ 是SIRT1的下游因子，诱导线粒体编码基因的转录，是衔接肌纤维类型转化和线粒体功能的重要枢纽。在PGC-1 $\alpha$ 过表达的转基因小鼠骨骼肌中观察到线粒体含量增加，抗疲劳能力增强，I型肌纤维含量增加<sup>[34]</sup>。在本研究中，与对照组相比，白藜芦醇处理组中PGC-1 $\alpha$ 的表达量显著增加。因此，白藜芦醇可能作用于SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路。NRF-1位于PGC-1 $\alpha$ 的下游，是线粒体生成程序中的起始靶点，可以与TFAM相互作用，从而驱导线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的转录和复制<sup>[35]</sup>。因此，本研究对NRF-1和TFAM的表达量进行测定，结果显示白藜芦醇处理组中NRF-1和TFAM的表达量显著高于对照组，表明牛肌管细胞中添加白藜芦醇对于提高线粒体生物发生有积极作用。

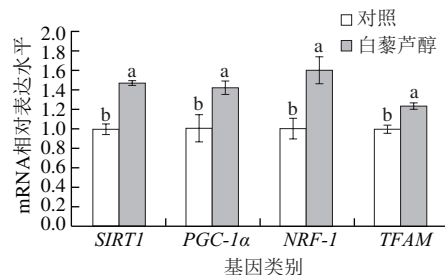


图6 白藜芦醇对牛肌管细胞中SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM基因相对表达水平的影响

Fig. 6 Effect of resveratrol on the relative gene expression levels of SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 and TFAM in bovine myotube

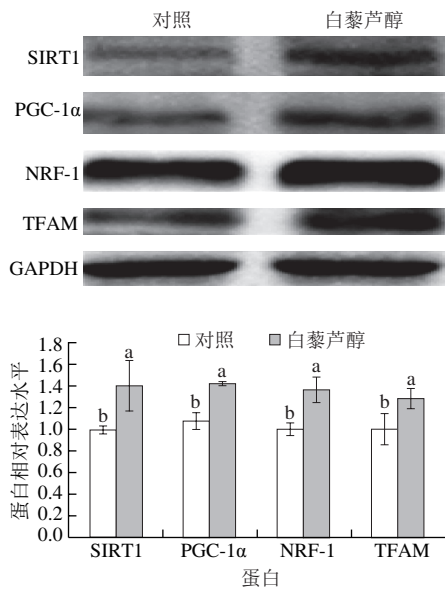


图7 白藜芦醇对牛肌管细胞中SIRT1、PGC-1α、NRF-1和TFAM蛋白表达水平的影响

Fig. 7 Effect of resveratrol on the protein expression of SIRT1, PGC-1α, NRF-1 and TFAM in bovine myotube

为研究白藜芦醇是否通过SIRT1/PGC-1α信号通路增强线粒体生物发生，本研究利用SIRT1抑制剂EX527处理细胞。EX527对肌纤维类型表达的影响如图8所示，real-time PCR结果表明，EX527显著削弱了白藜芦醇对*MyHC I*和*MyHC IIa* mRNA表达的促进作用 ( $P < 0.05$ )，此外，EX527显著削弱了白藜芦醇对*MyHC IIx*和*MyHC IIb* mRNA表达的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。蛋白免疫印迹结果如图9所示，与对照组相比，添加EX527后，EX527显著削弱了白藜芦醇对slow MyHC蛋白表达的促进作用 ( $P < 0.05$ )，同时显著削弱了白藜芦醇对fast MyHC蛋白表达的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。如图10、11所示，白藜芦醇明显促进了SIRT1、PGC-1α、NRF-1和TFAM基因的转录和表达，而加入EX527后可以明显抑制白藜芦醇的上述作用 ( $P < 0.05$ )。杨越<sup>[36]</sup>发现在大鼠软骨细胞中抑制SIRT1活性后可明显抑制NRF-1、NRF-2和TFAM的mRNA表达水平，并且线粒体合成功能下降，与本研究结果类似。在氧化型肌纤维中线粒体含量丰富，通过增加mtDNA含量可以促进线粒体编码基因的表达 (NRF-1和TFAM)，提高线粒体生物发生，同时促进I型肌纤维的形成<sup>[37]</sup>。线粒体生物发生与肌纤维类型转化密切相关，氧化型肌纤维比例越高其线粒体生物发生程度也越高。综上所述，白藜芦醇通过SIRT1/PGC-1α信号通路促进线粒体生物发生，进而促进牛肌管细胞中肌纤维类型由糖酵解型转化为氧化型。

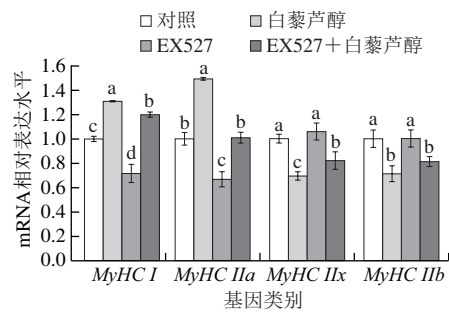


图8 EX527对牛肌管细胞中MyHC基因相对表达水平的影响

Fig. 8 Effect of EX527 on the relative gene expression levels of MyHC in bovine myotube

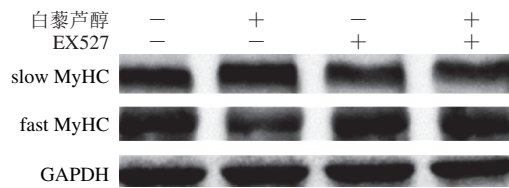


图9 EX527对牛肌管细胞slow MyHC和fast MyHC蛋白表达水平的影响

Fig. 9 Effect of EX527 on protein expression of slow and fast MyHC in bovine myotube

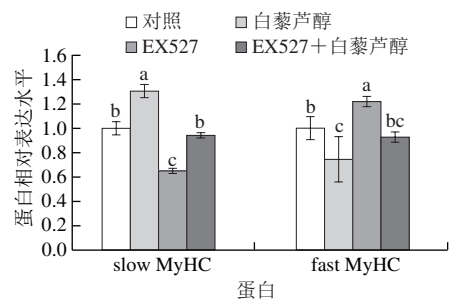
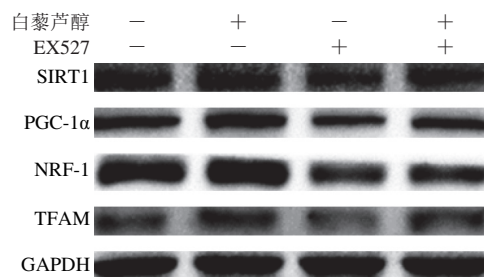


图10 EX527对牛肌管细胞中SIRT1、PGC-1α、NRF-1和TFAM基因相对表达水平的影响

Fig. 10 Effect of EX527 on the relative gene expression levels of SIRT1, PGC-1α, NRF-1 and TFAM in bovine myotube



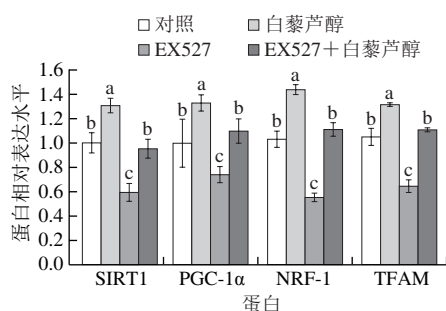


图 11 EX527对牛肌管细胞中SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM蛋白表达水平的影响

Fig. 11 Effect of EX527 on protein expression of SIRT1, PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 and TFAM in bovine myotube

### 3 结论

白藜芦醇能够促进牛肌管细胞分化，使牛肌管细胞中肌纤维类型由糖酵解型转化为氧化型。白藜芦醇使SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM的mRNA和蛋白表达升高，促进线粒体生物发生，这可能是导致肌纤维类型转化的原因。进一步添加EX527抑制SIRT1活性后，白藜芦醇对肌纤维类型的转化作用被削弱，同时EX527使白藜芦醇诱导的SIRT1、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1和TFAM mRNA和蛋白表达水平减弱。因此，本研究表明白藜芦醇可通过SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 激活线粒体生物发生进而促进牛肌管肌纤维类型转化（图12）。

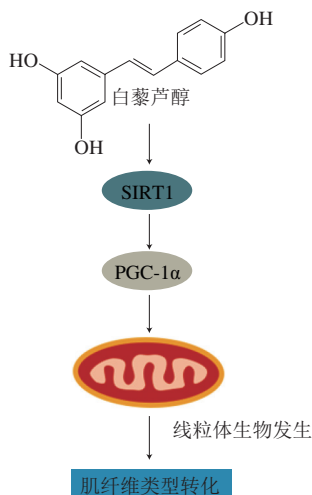


图 12 白藜芦醇调控牛肌管肌纤维类型转化

Fig. 12 Schematic diagram for the regulation of skeletal muscle fiber type conversion in bovine myotube by resveratrol

### 参考文献:

[1] CHO E J. Overview of muscle metabolism, muscle fiber characteristics, and meat quality[J]. Korean Journal of Agricultural Science, 2018, 45(1): 50-57. DOI:10.1016/j.livsci.2008.08.015.

[2] SUN Y J, WANG Z J, NIE C Z P, et al. Hydroxysafflor yellow A triggered a fast-to-slow muscle fiber-type conversion via regulating FoxO1 in myocytes[J]. Food & Function, 2022, 13. DOI:10.1039/d1fo03612b.

[3] XUE Y H, HUANG Z Q, CHEN X L, et al. Naringin induces skeletal muscle fiber type transformation via AMPK/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway in mice and C2C12 myotubes[J]. Nutrition Research, 2021, 92: 99-108. DOI:10.1016/j.nutres.2021.06.003.

[4] GUO Z Y, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. Effect of dietary dihydromyricetin supplementation on lipid metabolism, antioxidant capacity and skeletal muscle fiber type transformation in mice[J]. Animal Biotechnology, 2022, 33(3): 555-562. DOI:10.1080/10495398.2021.2006204.

[5] 侯普馨, 侯艳茹, 白艳苹, 等. 日粮添加亚麻籽对苏尼特羊肌纤维特性及肉品质的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 36-42. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190625-319.

[6] MENG T T, XIAO D F, MUHAMMED A, et al. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol[J]. Molecules, 2021, 26(1): 229. DOI:10.3390/molecules26010229.

[7] LI H G, XIA N, HASSELWANDER S, et al. Resveratrol and vascular function[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2155. DOI:10.3390/ijms20092155.

[8] 马玉静, 何荣香, 杨玲, 等. 白藜芦醇的生物学功能及其在动物生产中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(11): 3234-3243. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.11.012.

[9] JORNAYVAZ F R, SHULMAN G I. Regulation of mitochondrial biogenesis[J]. Essays in Biochemistry, 2010, 47(24): 69-84. DOI:10.1042/bse0470069.

[10] POPOV L D. Mitochondrial biogenesis: an update[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(9): 4892-4899. DOI:10.1111/jcmm.15194.

[11] LI P A, HOU X, HAO S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration[J]. Journal of Neuroscience Research, 2017, 95(10): 2025-2029. DOI:10.1002/jnr.24042.

[12] 邹彬. 电刺激干预对废用性肌萎缩大鼠线粒体生物合成和呼吸功能的影响[D]. 北京: 北京体育大学, 2011: 65-66.

[13] VENHOFF N, LEBRECHT D, PFEIFER D, et al. Muscle-fiber trans-differentiation in an experimental model of respiratory chain myopathy[J]. Arthritis Research & Therapy, 2012, 14(5): R233. DOI:10.1186/AR4076.

[14] HOOD D A, TRYON L D, CARTER H N, et al. Unravelling the mechanisms regulating muscle mitochondrial biogenesis[J]. Biochemical Journal, 2016, 473(15): 2295-2314. DOI:10.1042/BCJ20160009.

[15] LI Y G, ZHU W, TAO J P, et al. Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 438(2): 270-276. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.07.042.

[16] LI J Q, LIANG R R, MAO Y W, et al. Effect of dietary resveratrol supplementation on muscle fiber types and meat quality in beef cattle[J]. Meat Science, 2022, 194: 108986. DOI:10.1016/j.meatsci.2022.108986.

[17] VICENTE-GARCÍA C, HERNÁNDEZ-CAMACHO J D, CARVAJAL J J. Regulation of myogenic gene expression[J]. Experimental Cell Research, 2022, 419: 113299. DOI:10.1016/j.yexcr.2022.113299.

[18] BERKES C A, TAPSCOTT S J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2005, 16(4/5): 585-595. DOI:10.1016/j.semdb.2005.07.006.



- [19] CASTINO R, PUCER A, VENERONI R, et al. Resveratrol reduces the invasive growth and promotes the acquisition of a long-lasting differentiated phenotype in human glioblastoma cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(8): 4264-4272. DOI:10.1021/jf104917q.
- [20] 曹君, 黄晓雷, 刘晓里. 白藜芦醇诱导小鼠C2C12成肌细胞分化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(8): 3757-3762. DOI:10.13417/j.gab.039.003757.
- [21] MONTESANO A, LUZI L, SENESI P, et al. Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2013, 11(1): 310. DOI:10.1186/1479-5876-11-310.
- [22] WEN W X, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. Resveratrol regulates muscle fiber type conversion via miR-22-3p and AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 77: 108297. DOI:10.1016/j.jnutbio.2019.108297.
- [23] WEN W X, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. Resveratrol regulates muscle fiber type gene expression through AMPK signaling pathway and miR-22-3p in porcine myotubes[J]. *Animal Biotechnology*, 2022, 33(3): 579-585. DOI:10.1080/10495398.2022.2046599.
- [24] TOKINOYA K, ISHIKURA K, YOSHIDA Y, et al. LDH isoenzyme 5 is an index of early onset muscle soreness during prolonged running[J]. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 2020, 60(7): 1020-1026. DOI:10.23736/S0022-4707.20.10278-0.
- [25] NASERI N, BONICA J, XU H, et al. Novel metabolic abnormalities in the tricarboxylic acid cycle in peripheral cells from Huntington's disease patients[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(9): e0160384. DOI:10.1371/journal.pone.0160384.
- [26] WANG Z Q, REN X Y, GAO B Q, et al. Comparison of carbohydrate metabolism key enzymes in different generations of growth-selected *Portunus trituberculatus* families[J]. *Aquaculture*, 2017, 477: 6-14. DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.04.026.
- [27] 温万雪. 番茄红素对肌纤维类型转化和猪肉品质的影响及其机制研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2020: 67-68.
- [28] XU M, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. Grape seed proanthocyanidin extract promotes skeletal muscle fiber type transformation via AMPK signaling pathway[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2020, 84: 108462. DOI:10.1016/j.jnutbio.2020.108462.
- [29] XU M, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. Procyanidin B2 promotes skeletal slow-twitch myofiber gene expression through the AMPK signaling pathway in C2C12 myotubes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(5): 1306-1314. DOI:10.1021/acs.jafc.9b07489.
- [30] MENZIES K J, SINGH K, SALEEM A, et al. Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(10): 6968-6979. DOI:10.1074/jbc.M112.431155.
- [31] HANDSCHIN C, CHIN S, LI P, et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 $\alpha$  muscle-specific knock-out animals[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(41): 30014-30021. DOI:10.1074/jbc.M704817200.
- [32] CHALKIADAKI A, IGARASHI M, NASAMU A, et al. Muscle-specific SIRT1 gain-of-function increases slow-twitch fibers and ameliorates pathophysiology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy[J]. *PLoS Genetics*, 2014, 10(7): e1004490. DOI:10.1371/journal.pgen.1004490.
- [33] 杨坤. 白藜芦醇激活SIRT1/PGC-1 $\alpha$ 信号通路减轻新生大鼠高氧性肺损伤[D]. 泸州: 西南医科大学, 2022: 65-69.
- [34] STPIERRE J, DRORI S, ULDRY M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators[J]. *Cell*, 2006, 127(2): 397-408. DOI:10.1016/j.cell.2006.09.024.
- [35] 姜旭佳. 白藜芦醇对运动性疲劳大鼠线粒体能量代谢的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2022: 41-45.
- [36] 杨越. AMPK/SIRT-1/PGC-1 $\alpha$ 在人类关节软骨和大鼠软骨细胞中的作用研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2016: 55-56.
- [37] ZHANG Y, YU B, YU J, et al. Butyrate promotes slow-twitch myofiber formation and mitochondrial biogenesis in finishing pigs via inducing specific microRNAs and PGC-1 $\alpha$  expression[J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(8): 3180-3192. DOI:10.1093/jas/skz187.