

TTR调控骨骼肌干细胞增殖和骨骼肌再生

杨茜妮¹ 韩婉虹¹ 张潜英¹ 韩春苗¹ 高庆¹ 李虎^{1,2} 张勇^{1,2*} 朱大海^{1,2*}

(¹中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院, 北京 100005;

²生物岛实验室, 广州再生医学与健康广东省实验室, 广州 510005)

摘要 甲状腺素运载蛋白(transthyretin, TTR)主要功能是运送甲状腺素和维生素A。TTR主要在肝脏中合成, 在脉络丛和骨骼肌组织中也有表达。已有的研究主要聚焦TTR对脑和心肌功能的调控, TTR在骨骼肌中的功能并不十分清楚。为了探讨TTR对骨骼肌生长发育和再生的影响, 该研究制备了*ttr*基因敲除小鼠。与野生型小鼠相比, *ttr*基因敲除小鼠的体质量和骨骼肌质量无显著性差异。但是, *ttr*基因敲除小鼠的跑步距离和前肢抓力显著小于野生型小鼠, 说明TTR对于骨骼肌力量和运动等生理功能至关重要。进一步采用心肌毒素诱导的骨骼肌损伤再生模型, 发现*ttr*基因敲除小鼠中损伤再生肌纤维面积显著减小, 提示*ttr*对骨骼肌损伤再生具有重要的调控作用。损伤再生的骨骼肌制备冰冻切片, Pax7免疫荧光染色统计骨骼肌干细胞数量, 发现*ttr*敲除小鼠骨骼肌中Pax7阳性细胞数量显著减少, 提示TTR可能通过调控骨骼肌干细胞增殖影响骨骼肌再生。将*ttr*基因敲除小鼠与Pax7-*nGFP*小鼠杂交, 采用流式细胞仪分选GFP阳性的骨骼肌干细胞, 利用EdU掺入的方法检测细胞增殖, 发现*ttr*基因敲除显著抑制骨骼肌干细胞增殖。总之, 该研究利用*ttr*基因敲除小鼠模型, 揭示了TTR不仅调控骨骼肌力量和运动等生理功能, 而且通过影响骨骼肌干细胞增殖调控骨骼肌再生。

关键词 甲状腺素运载蛋白; 骨骼肌干细胞; 骨骼肌再生

Transthyretin Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Proliferation and Skeletal Muscle Regeneration

YANG Qianni¹, HAN Wanhong¹, ZHANG Qianying¹, HAN Chunmiao¹, GAO Qing¹,

LI Hu^{1,2}, ZHANG Yong^{1,2*}, ZHU Dahai^{1,2*}

(¹Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine, Peking Union Medical College, Beijing 100005, China;

²Bioland Laboratory (Guangzhou Regenerative Medicine and Health Guangdong Laboratory), Guangzhou 510005, China)

Abstract Primary function of TTR (transthyretin) is to transport thyroxine and vitamin A. The *ttr* gene is predominantly expressed in the liver and is also expressed in choroid plexus and skeletal muscle. Previous studies have mainly focused on TTR functions in the brain and heart. The role of TTR in skeletal muscle is not well understood. To investigate TTR function in regulating skeletal muscle development and regeneration, *ttr* KO (knockout) mice were generated in this study. There was no overt difference in body weight and skeletal muscle mass between *ttr* KO and WT (wild type) littermates. However, the *ttr* KO mice had poor skeletal muscle performance, as evidenced by smaller running exhaustion distance and weaker forelimb grip strength than that of WT littermates, suggesting that TTR played important roles for physiological function of skeletal muscle. To explore the role of TTR

收稿日期: 2024-08-26 接受日期: 2024-09-11

*通信作者。Tel: 010-65105081, E-mail: yongzhang@ibms.pumc.edu.cn; dhzhu@pumc.edu.cn

Received: August 26, 2024 Accepted: September 11, 2024

*Corresponding authors. Tel: +86-10-65105081, E-mail: yongzhang@ibms.pumc.edu.cn; dhzhu@pumc.edu.cn

in regulating skeletal muscle regeneration, the TA (tibialis anterior) muscle of *ttr* KO and WT mice were injured by CTX (cardiotoxin) and the regeneration was evaluated by quantifying size of regenerating myofibers. The data showed that the size of regenerating myofibers was significantly smaller in *ttr* KO mice than that of WT littermates, indicating that TTR played a role in regulating skeletal muscle regeneration. The number of Pax7-positive cells in the cryosection of the regenerated TA muscle from *ttr* KO mice was significantly reduced compared to that of WT mice, suggesting that TTR might implicate skeletal muscle regeneration by regulating muscle stem cell proliferation. Furthermore, EdU incorporation assay demonstrated that the proliferation of muscle stem cells FACS-sorted from *ttr* KO mice (*Pax7-nGFP;ttr*^{-/-}) was slower than that of WT mice (*Pax7-nGFP;ttr*^{+/+}). Collectively, this study reveals that TTR regulates skeletal muscle strength, exercise performance, muscle stem cell proliferation and skeletal muscle regeneration.

Keywords transthyretin; skeletal muscle stem cells; skeletal muscle regeneration

甲状腺素运载蛋白 (transthyretin, TTR) 主要功能是转运甲状腺素, 同时也是视黄醇的结合蛋白^[1]。TTR是一种同源四聚体蛋白, 主要在肝脏和脉络丛中合成, 分别从肝脏和脉络丛分泌到血浆和脑脊液中^[2]。在血浆中, TTR能与甲状腺素(thyroxine, T4)结合并转运, 除了TTR, 血浆中的甲状腺素结合球蛋白和白蛋白也能结合T4, TTR结合的T4约占总结合T4的15%^[2]。血浆中T4的其他转运蛋白还有甲状腺素结合球蛋白和白蛋白。相比之下, 在脑脊液中, TTR是主要的T4载体, 运输80%的T4^[2]。TTR将T4运输到功能位点后, T4脱离TTR经脱碘成为活性形式的T3发挥生理功能。此外, TTR还通过与视黄醇结合蛋白4(retinol-binding protein 4, RBP4)结合进而介导维生素A的转运^[2]。

人和小鼠的*ttr*基因均位于18号染色体, 编码成熟的单体127个氨基酸, 4个相同的单体构成同源四聚体。KELLY等^[3-4]发现, 在病理条件下, 四聚体TTR解离成单体之后, 单体会迅速错误折叠并组装成淀粉样凝聚体。在生理条件下, 丝氨酸蛋白酶对淀粉样蛋白前体的高度特异性切割对于引发TTR纤维生成具有重要调控作用^[5]。在已鉴定的多种TTR变体中^[6], 绝大多数是致病性的, 有利于四聚体解离^[7]; 而少数良性TTR变体可提高四聚体稳定性, 因此具有保护作用^[8]。TTR淀粉样凝聚体与神经系统和心血管相关疾病密切相关^[9-10]。

尽管TTR主要在肝脏和脉络丛中合成, 其他组织中也发现有*ttr*基因表达^[11]。比如, 在心脏、骨骼肌中检测到有*ttr*表达^[12]。TTR在心血管相关疾病发生发展中的作用研究较多, 但是TTR在骨骼肌生长发育和骨骼肌再生中的功能尚不十分清楚。为了

探讨TTR对骨骼肌生长发育和再生的影响, 本研究制备了*ttr*基因敲除小鼠。通过小鼠表型分析, 发现TTR对于骨骼肌力量和运动等生理功能至关重要。与野生型小鼠相比, *ttr*基因敲除小鼠的跑步成绩较差、抓力显著减弱。同时, 采用心肌毒素(cardiotoxin, CTX)诱导的骨骼肌损伤再生模型, 揭示了TTR调控骨骼肌干细胞增殖和骨骼肌损伤再生。总之, 本研究发现了TTR不仅调节骨骼肌力量和运动等生理功能, 而且对骨骼肌损伤再生具有重要调控作用。

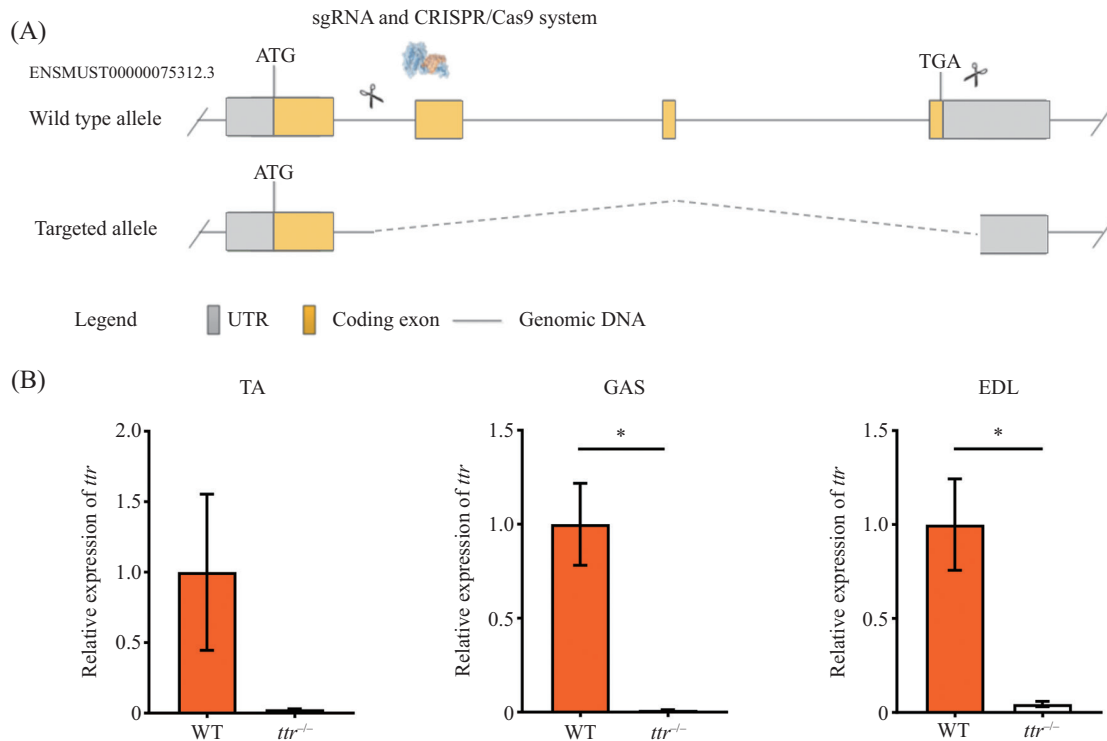
1 材料与方法

1.1 实验动物

*ttr*基因敲除小鼠的设计方案详见图1所示, 敲除小鼠是C57BL/6j遗传背景, 由江苏集萃药康有限公司制备。获得的F1代杂合子与C57BL/6j品系配繁。*Pax7-nGFP*转基因小鼠由法国巴斯德研究所SHAHRAGIM TAJBAKHSI教授馈赠^[13]。所有实验用小鼠均在中国医学科学院基础医学研究所实验动物中心SPF级动物房饲养、繁殖, 室内温度控制在19~24℃, 湿度50%~60%, 12 h明暗交替。小鼠饲料、垫料均经高温消毒处理, 饮水经高温高压灭菌处理。饲养过程中, 密切观察小鼠生长情况, 垫料每周换一次, 饲料和饮水每日补充。所有动物操作程序均获中国医学科学院基础医学研究所动物伦理委员会批准(批准号: ACUC-A01-2019-012)。

1.2 小鼠跑步成绩测试

小鼠跑步实验在平板跑步机(Exer3/6 Columbus Instruments)上进行。实验分为训练和正式测试, 使用10°下坡倾斜角。在正式测试前训练两次, 训练之后开始正式测试, 总共测试4次, 每次都是隔天进行。跑步



A: *ttr*基因敲除小鼠制备方案。B: 实时荧光定量RT-PCR方法检测WT和*ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌组织中*ttr* mRNA相对表达量。*gapdh*作为内参基因。TA: 胫骨前肌; GAS: 腓肠肌; EDL: 趾长伸肌。WT (*n*=3), *ttr*^{-/-} (*n*=3)。**P*<0.05。

A: design of the *ttr* knockout mice. B: relative expression of *ttr* mRNA in skeletal muscle of WT and *ttr*^{-/-} mice, determined by real-time RT-PCR. The *gapdh* served as an internal control. TA: tibialis anterior; GAS: gastrocnemius; EDL: extensor digitorum longus. WT (*n*=3), *ttr*^{-/-} (*n*=3). **P*<0.05.

图1 *ttr*基因敲除小鼠制备成功

Fig.1 Generation of the *ttr* knockout mice

成绩测试的参数设置如下: 起始速度 10 m/min, 3 min 后, 以1 m/min的速度加速到20 m/min, 然后以20 m/min 匀速运动。程序设好后打开跑步机的电刺激开关, 开始运行程序, 电脑自动记录小鼠跑步时间及距离, 以小鼠在电刺激条件下持续 10 s 仍不能跳到传送带上为小鼠疲劳的标准。

1.3 小鼠前肢抓力测定

将抓力仪 (BioSEB GS3) 放在平稳的位置, 把网格配件安装到抓力传感器上, 按住开始键使仪器自检, 至屏幕上显示 0.0 时开始实验。将小鼠前肢搭在网格上, 抓住小鼠尾部匀速平稳地顺着网格方向向后拉小鼠至前肢脱离网格, 记录数值后按 ZERO 键清零。每只小鼠每天测量十次, 取最大值记为该小鼠当天的抓力数值。每隔一天测试一次, 共测量 3 天, 3 天的成绩取平均值记作该个体的前肢抓力。

1.4 小鼠骨骼肌损伤再生

8~10 周龄雄性小鼠, 胫骨前肌 (tibialis anterior, TA) 注射 20 μL 心肌毒素 CTX (溶于 PBS 稀释至终浓度为 10 μmol/L), 诱导骨骼肌急性损伤再生修复模型。

骨骼肌损伤 3.5 天或 7 天后, 断颈处死小鼠, 用剪刀将后肢左右两腿皮毛剪开, 找到小腿胫骨, 用钝镊子撕开胫骨前肌表面的肌膜, 从肌腱处剪断取下整块胫骨前肌。损伤 3.5 天的胫骨前肌采用 OCT 包埋置于液氮, 用于制备冰冻切片; 损伤 7 天的胫骨前肌置于 4% 甲醛固定液中用于石蜡包埋做 HE 染色。具体步骤: 经 70%、80%、95%、100% 乙醇各浸泡 1 h 至完全脱水; 脱水后转移至二甲苯透明两次各 30 min; 在 50~60 °C 透蜡和包埋 (Leica EG1150 全自动包埋机); 修整蜡块样品, 切片 3~4 μm (Leica RM2255 全自动轮转切片机); 切片在二甲苯中浸泡 2 次每次 10 min 进行脱蜡, 在 100%、95%、70% 乙醇中浸泡去除二甲苯并逐级水化, 分别处理 5 min, 蒸馏水浸泡 2 min; 然后进行苏木精-伊红染色, 采用中性树脂封片。

1.5 流式细胞仪分选骨骼肌干细胞

Pax7-nGFP 小鼠与 *ttr*^{-/-} 小鼠杂交, 用于分选骨骼肌干细胞。8 周龄小鼠, 断颈处死, 剥离骨骼肌, PBS 清洗剪碎。加入新鲜配制的消化液 (12.8 mg II 型胶原酶和 20 mg 分散酶溶于 10 mL PBS), 37 °C 消

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	用途 Application	序列(5'→3') Sequences (5'→3')
<i>ttr</i> -F	RT-PCR	GGT TTT CAC AGC CAA CGA CT
<i>ttr</i> -R	RT-PCR	TAG GAG CAG GGG AGA AAA ATG AG
<i>gapdh</i> -F	RT-PCR	AAT GTG TCC GTC GTG GAT CTG
<i>gapdh</i> -R	RT-PCR	TAG CCC AAG ATG CCC TTC AGT

化1 h, 300目滤膜过滤, 300 ×g室温离心10 min, 弃上清。PBS重悬细胞, 300 ×g室温离心10 min, 弃上清。PBS重悬细胞, 先后采用70 μm和40 μm细胞滤器过滤, 然后使用FACS Aria III流式分选GFP阳性细胞。将分选到接收管中的细胞300 ×g室温离心10 min, 弃上清。增殖培养基重悬细胞沉淀, 转移至提前用鼠尾胶原包被的培养皿中培养。增殖培养基配方: F-10培养基(Macgene公司)、20%胎牛血清(Ausbian公司)、1%青霉素和链霉素、1%谷氨酰胺、10 ng/mL成纤维细胞生长因子2(FGF2)(Sino biological公司)。

1.6 免疫荧光染色

骨骼肌组织冰冻切片, 4%多聚甲醛室温固定15 min, PBS洗三次。-20 °C预冷的甲醇中透膜6 min, PBS洗三次。0.01 mol/L柠檬酸钠缓冲液75 °C孵育10 min, 抗原修复。4%无IgG的牛血清白蛋白中室温封闭2~3 h, 加入Pax7抗体(DSHB, 1:20), 4 °C过夜。室温平衡1 h, PBS洗三次, FITC标记的荧光二抗(1:1 000)室温孵育1 h, PBS洗三次。最后, DAPI染色, PBS洗三次, 封片, 显微镜观察照相。对于EdU掺入实验, 在终止细胞培养之前2 h加入EdU进行标记, 根据EdU试剂盒(Invitrogen公司)的说明书进行检测。

1.7 RNA提取和实时荧光定量PCR

采用TRIzol试剂(Invitrogen公司)提取骨骼肌组织总RNA, 利用NanoDrop 2000测RNA浓度。采用逆转录酶(ThermoFisher Scientific公司)逆转录获得cDNA。然后, 采用SYBR Green试剂(Bio-Rad Laboratories公司)经Roche384仪器进行实时荧光定量PCR分析。实时荧光定量PCR反应条件: 首先在95 °C预变性5 min; 然后, 95 °C变性15 s, 60 °C退火和延伸30 s, 以上两步进行40个循环。实验中设置3个重复孔, 以*gapdh*基因表达水平作为内参, 引物序列见表1所示。

1.8 软件及统计学分析

实验结果采用GraphPad Prism软件分析, 组

间数据差异分析采用配对样本*t*检验。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001。NS表示无显著性差异。

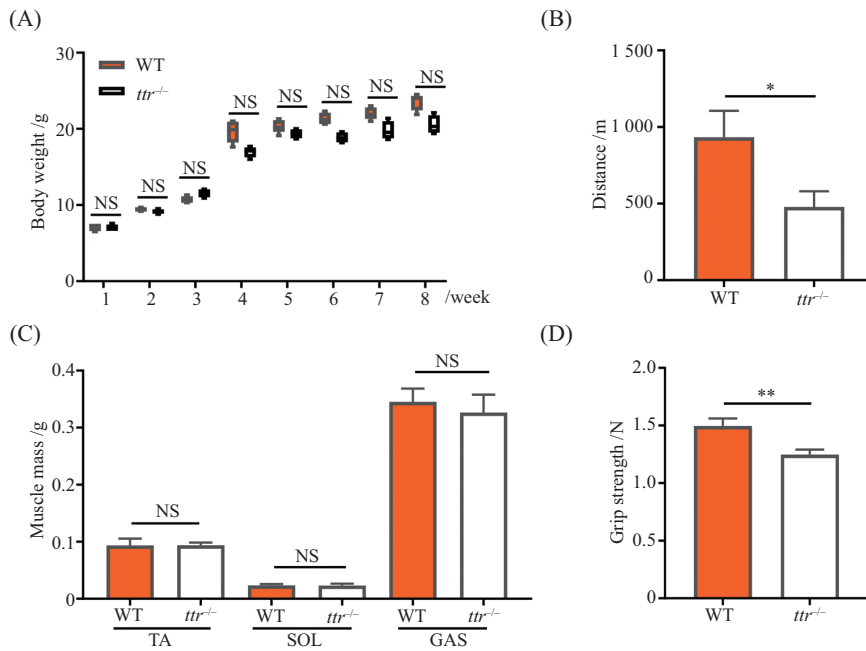
2 结果

2.1 *ttr*基因敲除小鼠设计方案和敲除小鼠验证

小鼠*ttr*基因位于18号染色体, 由4个外显子组成。敲除小鼠的设计思路是: 采用CRISPR/Cas9技术, 分别在小鼠*ttr*基因第二个外显子上游和第四个外显子3'UTR区设计特异的gRNAs, 引导Cas9切割产生双链DNA断裂, 通过非同源末端连接, 敲除*ttr*基因中位于两个gRNAs之间的片段, 如图1A所示。设计方案完成以后, 该敲除小鼠由江苏集萃药康有限公司制备, 为C57BL/6j遗传背景。获得的F1代杂合子与C57BL/6j品系配繁, 杂合子与杂合子交配产生1/4纯合子(*ttr*^{-/-})和1/4野生型(wild type, WT)小鼠, 符合孟德尔比例。雌雄比例1:1, 生育力正常。分别取WT和*ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌, 提取总RNA, 采用实时荧光定量PCR方法检测*ttr*基因是否被敲除。结果表明, *ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌组织中几乎检测不到*ttr* mRNA(图1B), 说明*ttr*基因敲除小鼠制备成功。

2.2 *ttr*基因敲除小鼠的跑步耐力和抓力显著减弱

获得纯合子*ttr*基因敲除小鼠*ttr*^{-/-}以后, 进行表型评估。结果表明, 与WT小鼠相比, *ttr*^{-/-}小鼠的出生质量没有差异。4周龄以后, *ttr*^{-/-}小鼠体质量比WT小鼠体质量有降低的趋势, 但无统计学差异(图2A)。进一步评估小鼠的骨骼肌功能, 发现*ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌运动耐力显著减弱, *ttr*^{-/-}小鼠跑步力竭的距离显著减小(图2B)。与WT小鼠相比, 8周龄*ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌质量有一定程度减少(图2C)。同时, *ttr*^{-/-}小鼠骨骼肌爆发力显著减小, 表现为前肢抓力显著小于WT小鼠的抓力(图2D)。以上结果表明, TTR对骨骼肌力量和运动等生理功能具有重要调控作用。雄性比雌性小鼠的表型更显著, 因此, 本文采用雄性小鼠开展研究。



A: 雄性野生型(WT)和*ttr*基因敲除(*ttr*^{-/-})小鼠的体重。每周称量小鼠体重, WT (*n*=7), *ttr*^{-/-} (*n*=7)。B: 8周龄雄性WT和*ttr*^{-/-}小鼠跑步力竭的距离。WT (*n*=5), *ttr*^{-/-} (*n*=7)。C: 8周龄雄性WT和*ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌质量。TA: 胫骨前肌; SOL: 比目鱼肌; GAS: 腓肠肌。WT (*n*=6), *ttr*^{-/-} (*n*=7)。D: 8周龄雄性WT和*ttr*^{-/-}小鼠抓力。WT (*n*=8), *ttr*^{-/-} (*n*=10)。NS: 无显著性差异。**P*<0.05, ***P*<0.01。

A: body weight of male *ttr*^{-/-} mice and WT littermates. The mice were weighted every week. WT (*n*=7), *ttr*^{-/-} (*n*=7). B: treadmill performance of 8-week-old male *ttr*^{-/-} mice and WT littermates. WT (*n*=5), *ttr*^{-/-} (*n*=7). C: muscle mass of 8-week-old male *ttr*^{-/-} mice and WT littermates. TA: tibialis anterior; SOL: soleus; GAS: gastrocnemius. WT (*n*=6), *ttr*^{-/-} (*n*=7). D: grip strength of 8-week-old male *ttr*^{-/-} mice and WT littermates. WT (*n*=8), *ttr*^{-/-} (*n*=10). NS: not significant. **P*<0.05, ***P*<0.01.

图2 *ttr*基因敲除小鼠的跑步耐力和抓力显著减弱

Fig.2 Reduced running distance and grip strength in *ttr*^{-/-} mice compared to WT littermates

2.3 *ttr*基因敲除小鼠的骨骼肌损伤再生能力减弱

为了探讨TTR是否对骨骼肌损伤再生具有调控作用,采用心肌毒素CTX诱导骨骼肌损伤再生模型。8周龄雄性WT和*ttr*^{-/-}小鼠,胫骨前肌单次注射CTX诱导骨骼肌损伤,损伤7天后取材,采用HE染色,观察胫骨前肌损伤修复情况。HE结果显示,WT和*ttr*^{-/-}小鼠的骨骼肌都有一定程度的修复,表现为炎症细胞消退,形成具有中央核特征的再生肌纤维,但是*ttr*^{-/-}小鼠的再生肌纤维横截面积明显比WT小鼠的再生肌纤维小(图3A)。进一步统计HE染色切片上的中央核再生肌纤维的横截面积,发现*ttr*^{-/-}小鼠的再生肌纤维横截面积显著小于WT小鼠(图3B),提示*ttr*基因敲除小鼠的骨骼肌损伤再生能力减弱。以上结果说明TTR参与骨骼肌损伤再生的调控。

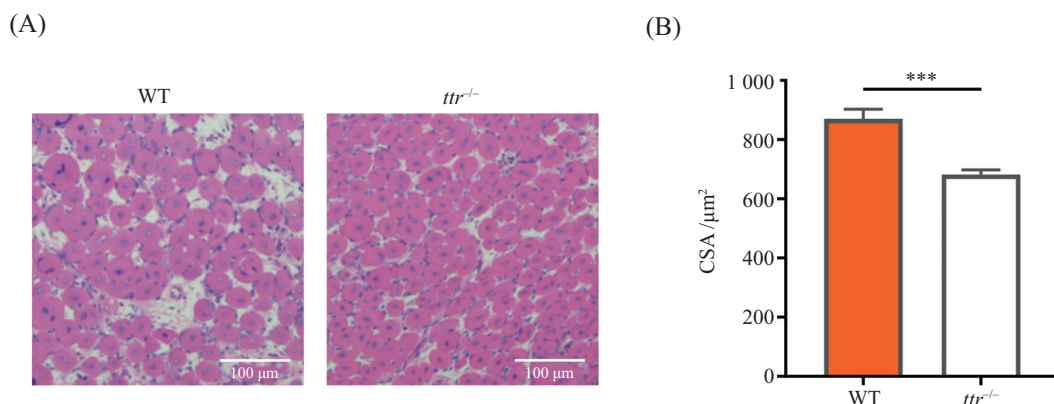
2.4 *ttr*基因敲除显著抑制骨骼肌干细胞增殖

骨骼肌损伤再生的结果表明,TTR参与调控骨骼肌损伤修复。骨骼肌干细胞是骨骼肌再生的种子细胞,那么TTR是否通过调节骨骼肌干细胞增殖进而调控骨骼肌再生呢?为此,CTX诱导损伤3.5天的

胫骨前肌做冰冻切片,对骨骼肌干细胞标志物Pax7进行免疫荧光染色(图4A)。统计结果表明,与WT相比,*ttr*^{-/-}小鼠损伤3.5天的胫骨前肌中Pax7阳性细胞数量显著减少(图4B),提示TTR可能通过调控骨骼肌干细胞增殖影响骨骼肌再生。为了进一步确定TTR调控骨骼肌干细胞增殖,采用流式细胞仪分选骨骼肌干细胞,利用EdU掺入的方法检测细胞增殖。转基因小鼠Pax7-*nGFP*可以标记Pax7阳性的骨骼肌干细胞。将*ttr*^{-/-}小鼠与Pax7-*nGFP*配繁,即可采用流式细胞仪分选GFP阳性的细胞,利用EdU掺入的方法检测GFP阳性细胞的增殖情况(图5A)。统计结果表明,*ttr*^{-/-}小鼠来源的GFP阳性细胞中EdU阳性的比例显著少于WT小鼠(图5B),说明TTR调控骨骼肌干细胞增殖。总之,以上结果说明,TTR通过调节骨骼肌干细胞增殖进而调控骨骼肌再生。

3 讨论

TTR在人体内具有十分重要的生理作用,作为甲状腺素分子和维生素A的载体,其主要功能是在

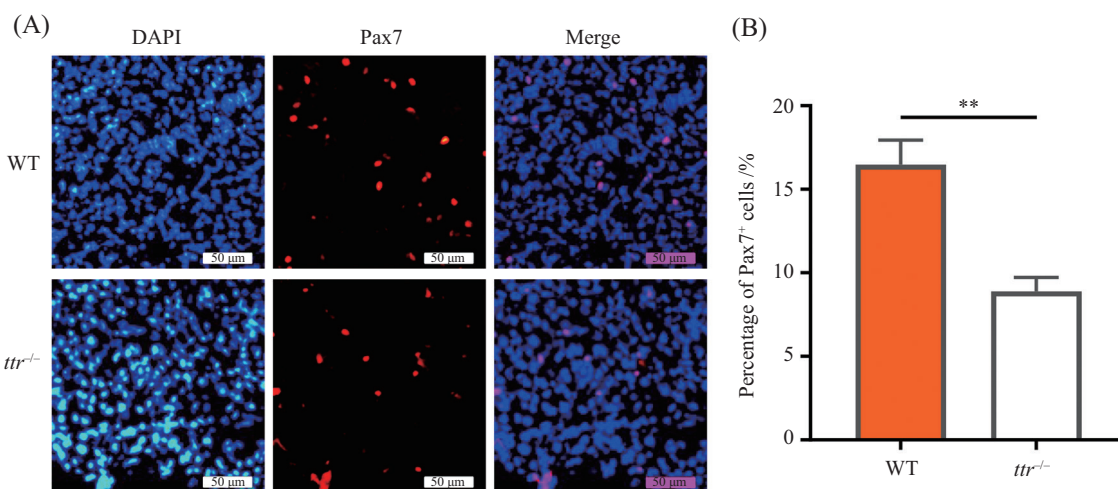


A: HE染色代表性视野, 8周龄雄性WT和*ttr*^{-/-}小鼠的胫骨前肌经CTX损伤7天后横切面HE染色图。B: 统计A图中描述的HE染色切片上的再生肌纤维(即中央核肌纤维)的横截面积。WT (*n*=10), *ttr*^{-/-} (*n*=9)。****P*<0.001。

A: representative images of HE-stained cross-sections of TA muscle from 8-week-old male *ttr*^{-/-} mice and WT littermates on day 7 after CTX-induced injury. B: CSA (cross-sectional areas) of the regenerated myofibers with centralized nuclei on the HE-stained TA sections described in panel A. WT (*n*=10), *ttr*^{-/-} (*n*=9)。****P*<0.001。

图3 *ttr*基因敲除小鼠的骨骼肌损伤再生能力减弱

Fig.3 Skeletal muscle regeneration is compromised in *ttr*^{-/-} mice compared to WT littermates



A: 冰冻切片Pax7免疫荧光染色(红色)代表性视野, 8周龄雄性WT和*ttr*^{-/-}小鼠的胫骨前肌经CTX损伤3.5天后横切面冰冻切片免疫荧光染色。DAPI染色(蓝色)显示细胞核。B: 统计A图中描述的免疫荧光染色切片Pax7阳性细胞比例。WT (*n*=10), *ttr*^{-/-} (*n*=9)。***P*<0.01。

A: representative images of Pax7-immunostained (red) cryosections of CTX-injured TA muscle from 8-week-old male *ttr*^{-/-} mice and WT littermates after 3.5 days post injury (dpi). DAPI (blue) served to visualize nuclei. B: percentage of Pax7⁺ cells on cryosections described in panel A. WT (*n*=10), *ttr*^{-/-} (*n*=9)。***P*<0.01。

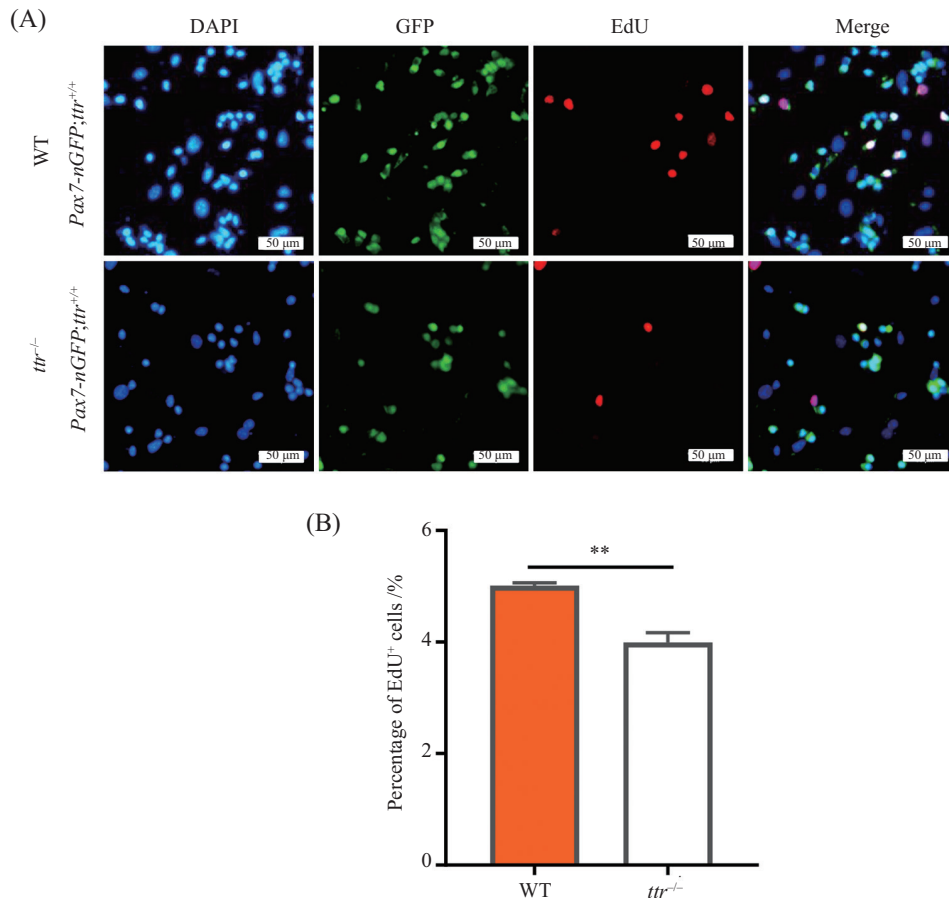
图4 *ttr*基因敲除小鼠损伤再生3.5天的胫骨前肌中, 骨骼肌干细胞数量显著减少

Fig.4 Reduced number of Pax7⁺ cells in the CTX-injured TA muscle (3.5 dpi) of *ttr*^{-/-} mice

血浆和脑脊液中转运甲状腺素和与视黄醇结合的视黄醇蛋白。TTR以同型四聚体的形式执行其生理功能, 通过β折叠相互联系形成二聚体, 进而两个二聚体再聚合成四聚体。这种结构使得TTR能够在体内有效地运输甲状腺素和视黄醇, 确保这些重要物质在身体各部分的适当分布。当四聚体结构的稳定性丧失时, 该蛋白就会分解为TTR单体, 然后聚集成不溶性的纤维, 这可能导致遗传性淀粉样神经系统疾

病和老年相关淀粉样疾病的发生, 它们被称为转甲状腺素蛋白淀粉样变性病(transthyretin amyloidosis, ATTR), 主要影响心脏和神经系统^[9-10]。最近的研究表明, 骨骼肌组织中也会发生ATTR, 表现为肌肉力量减弱^[14]。

尽管TTR的主要功能是转运甲状腺素和维生素A, 最近的研究表明, TTR也参与调控行为、认知、神经肽酰胺化、神经发育、神经再生、轴突生长等重



A: EdU掺入法检测细胞增殖。DAPI标记细胞核(蓝色), GFP标记Pax7阳性的骨骼肌干细胞(绿色), EdU标记S期的增殖细胞(红色)。B: 统计图A中展示的GFP阳性的细胞中EdU阳性的细胞比例。** $P < 0.01$ 。

A: representative images of EdU incorporation assay to evaluate proliferation of muscle stem cells FACS-sorted from 8-week-old WT (*Pax7-nGFP;ttr*^{+/+}) or *ttr*^{-/-} (*Pax7-nGFP;ttr*^{-/-}) mice. DAPI (blue) serves to visualize nuclei. GFP (green) indicates Pax7 positive muscle stem cells. EdU (red) indicates S phase cells. B: percentage of EdU positive (EdU⁺) cells in total GFP⁺ (Pax7⁺) cells described in panel A. ** $P < 0.01$.

图5 TTR调控骨骼肌干细胞增殖

Fig.5 TTR regulates skeletal muscle stem cell proliferation

要的生理功能^[11]。TTR主要由肝脏和脑脉络丛合成,最近研究发现,在骨骼肌、胎盘、胰腺、卵黄囊和视网膜色素上皮中也有少量的TTR表达^[11]。但是,TTR在这些组织中的功能并不十分清楚。TTR更广泛的生理功能有待进一步揭示。

本文聚焦TTR在骨骼肌发育和骨骼肌再生中的功能开展研究,制备了*ttr*基因敲除小鼠。8周龄年轻小鼠的表型分析,发现*ttr*基因敲除小鼠骨骼肌质量有降低的趋势,骨骼肌力量显著减弱,运动成绩下降,说明*ttr*基因敲除影响了骨骼肌发育和生理功能。与此一致,MONK等^[15]研究表明,*ttr*敲除小鼠影响发育。在个体发育过程中,TTR表达水平跟年龄密切相关。比如,血浆中TTR水平随年龄变化,新生儿水平较低,成年人TTR水平较高,50岁以后TTR水平开始下降^[11]。这些结果提示:*ttr*基因敲除小鼠的表型

可能在老年时期表现更加显著,随着年龄增长骨骼肌质量可能会有显著性减少,与野生型小鼠相比,可能会更早出现肌少症表型。

利用*ttr*基因敲除小鼠,采用骨骼肌损伤再生修复模型,本研究发现*ttr*基因敲除显著影响骨骼肌损伤再生,*ttr*基因敲除显著抑制骨骼肌干细胞增殖,提示TTR可能通过调控骨骼肌干细胞增殖调控骨骼肌再生。LEE等^[16]报道的实验数据支持本研究的结果,他们发现在骨骼肌损伤再生过程中,*ttr*基因表达水平显著上调,进一步采用小鼠成肌细胞系C2C12的研究发现TTR调控成肌细胞增殖。LEE等^[17]另一项研究表明,在C2C12细胞分化过程中,*ttr*表达水平显著上调,siRNA敲低*ttr*基因表达显著抑制C2C12细胞分化,提示TTR也可能参与调控成肌细胞分化进而影响骨骼肌再生。

骨骼肌功能受到复杂而精细的调控。当机体代谢失调或骨骼肌自身代谢类型发生变化时,骨骼肌的功能会出现异常。甲状腺素参与机体的能量代谢,同时还有报道发现甲状腺素可以改变肌纤维的代谢类型^[18]。甲状腺素的重要功能是调节代谢,*ttr*基因缺失导致的代谢改变也可能是*ttr*^{-/-}小鼠骨骼肌质量下降和再生肌纤维面积减小的原因。关于TTR调控骨骼肌发育和骨骼肌再生的分子机制,是否与甲状腺素及其介导的信号通路有关,值得进一步的深入研究。

参考文献 (References)

- [1] ALSHEHRI B, D'SOUZA D G, LEE J Y, et al. The diversity of mechanisms influenced by transthyretin in neurobiology: development, disease and endocrine disruption [J]. *J Neuroendocrinol*, 2015, 27(5): 303-23.
- [2] RUBERG F L, GROGAN M, HANNA M, et al. Transthyretin amyloid cardiomyopathy: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(22): 2872-91.
- [3] KELLY J W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1996, 6(1): 11-7.
- [4] KELLY J W, COLON W, LAI Z, et al. Transthyretin quaternary and tertiary structural changes facilitate misassembly into amyloid [J]. *Adv Protein Chem*, 1997, 50: 161-81.
- [5] MANGIONE P P, PORCARI R, GILLMORE J D, et al. Proteolytic cleavage of Ser52Pro variant transthyretin triggers its amyloid fibrillogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1539-44.
- [6] GRIFFIN J M, ROSENBLUM H, MAURER M S. Pathophysiology and therapeutic approaches to cardiac amyloidosis [J]. *Circ Res*, 2021, 128: 1554-75.
- [7] NIRLAULA T N, HARAOKA K, ANDO Y, et al. Decreased thermodynamic stability as a crucial factor for familial amyloidotic polyneuropathy [J]. *J Mol Biol*, 2002, 320(2): 333-42.
- [8] ALMEIDA M R, DAMAS A M, LANS M C, et al. Thyroxine binding to transthyretin Met 119. Comparative studies of different heterozygotic carriers and structural analysis [J]. *Endocrine*, 1997, 6(3): 309-15.
- [9] ADAMS D, KOIKE H, SLAMA M, et al. Hereditary transthyretin amyloidosis: a model of medical progress for a fatal disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(7): 387-404.
- [10] AIMO A, CASTIGLIONE V, RAPEZZI C, et al. RNA-targeting and gene editing therapies for transthyretin amyloidosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(10): 655-67.
- [11] VIEIRA M, SARAIVA M J. Transthyretin: a multifaceted protein [J]. *Biomol Concepts*, 2014, 5: 45-54.
- [12] LEE E J, LEE H J, KAMLI M R, et al. Depot-specific gene expression profiles during differentiation and transdifferentiation of bovine muscle satellite cells, and differentiation of preadipocytes [J]. *Genomics*, 2012, 100(3): 195-202.
- [13] LI H, CHEN Q, LI C, et al. Muscle-secreted granulocyte colony-stimulating factor functions as metabolic niche factor ameliorating loss of muscle stem cells in aged mice [J]. *EMBO J*, 2019, 38(24): e102154.
- [14] XU J, ZHOU X, WANG Y, et al. Skeletal muscle involvement in systemic amyloidosis is often overlooked [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2024, 50(4): e12996.
- [15] MONK J A, SIMS N A, DZIEGIELEWSKA K M, et al. Delayed development of specific thyroid hormone-regulated events in transthyretin null mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 304(1): E23-E31.
- [16] LEE E J, POKHAREL S, JAN A T, et al. Transthyretin: a transporter protein essential for proliferation of myoblast in the myogenic program [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 115.
- [17] LEE E J, BHAT A R, KAMLI M R, et al. Transthyretin is a key regulator of myoblast differentiation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63627.
- [18] VADÁSZOVÁ A, ZACHAROVÁ G, MACHÁCOVÁ K, et al. Influence of thyroid status on the differentiation of slow and fast muscle phenotypes [J]. *Physiol Res*, 2004, 53(Suppl 1): S57-61.