

• 基础研究 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.12.008

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20251016.1618.004\(2025-10-16\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20251016.1618.004(2025-10-16))

小干扰 RNA 沉默甘氨酸-tRNA 合成酶对 L6 细胞肌球
蛋白重链 II b 表达的影响*

王 猛¹,李旭灿²,王 宇²,余佳燕²,杨利霞²,吴政啸²

(遵义医科大学:1.基础医学院;2.第一临床学院,贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 利用小干扰 RNA (siRNA) 沉默大鼠骨骼肌成肌细胞 L6 甘氨酸-转运 RNA 合成酶 (GlyRS),探讨 GlyRS 对 L6 细胞肌球蛋白重链 II b(MHC-II b)表达的影响。**方法** 设计并合成 3 条 GlyRS-siRNA 序列 (GlyRS-siRNA1、2、3),分别转染 L6 细胞,qPCR 检测 GlyRS mRNA 表达,筛选干扰效率最高的 GlyRS-siRNA 序列。另取 L6 细胞,随机分为正常细胞组(不做任何处理,N 组)、阴性对照组(转染阴性对照序列,NC 组)及 GlyRS-siRNA-24 h 组、GlyRS-siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组、GlyRS-siRNA-96 h 组和 GlyRS-siRNA-120 h 组(转染干扰效率最高的 GlyRS-siRNA 序列并培养相应时间),分别在相应的时间点测量各组 L6 细胞平均直径,qPCR 和 Western blot 分别检测 GlyRS、MHC-IIb 的 mRNA 和蛋白表达情况。**结果** GlyRS-siRNA1、2、3 分别使 GlyRS mRNA 表达水平下降了 90.4%、62.0%和 78.7%,其中,GlyRS-siRNA1 干扰效率最高($P<0.001$);GlyRS-siRNA1 转染 L6 细胞 24 h,细胞平均直径较 NC 组无明显变化,转染 48 h 和 72 h,L6 细胞平均直径较 NC 组明显减小($P<0.001$),之后又逐渐增大;GlyRS-siRNA 各时间点组 GlyRS mRNA 表达水平较 NC 组均降低($P<0.05$, $P<0.01$),其中以 GlyRS-siRNA-72 h 组降低最明显;GlyRS-siRNA-各时间点组 MHC-II b mRNA 表达水平较 NC 组升高($P<0.05$, $P<0.01$),其中以 GlyRS-siRNA-48 h、-72 h、-96 h 组升高较为明显,但 3 组组间两两比较差异无统计学意义($P>0.05$);GlyRS 和 MHC-II b 的蛋白表达水平变化情况与其 mRNA 表达基本一致。**结论** 沉默 GlyRS 表达能上调 L6 细胞 MHC-II b 合成。

[关键词] 骨骼肌萎缩;甘氨酸-tRNA 合成酶;小干扰 RNA;肌球蛋白重链 II b

[中图分类号] R322 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)12-2759-07

Effect of glycyl-tRNA synthetase silencing by small interfering RNA on the
expression of myosin heavy chain II b in L6 cells*

WANG Meng¹,LI Xucan²,WANG Yu²,YU Jiayan²,YANG Lixia²,WU Zhengxiao²

(1. School of Basic Medical Sciences;2. The First Clinical College,Zunyi
Medical University,Zunyi,Guizhou 563000,China)

[Abstract] **Objective** To silencing glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) in rat skeletal muscle myoblasts by using small interfering RNA (siRNA),and to investigate the effect GlyRS on the expression of myosin heavy chain II b (MHC-II b) in L6 cells. **Methods** Three GlyRS-siRNA sequences (GlyRS-siRNA1,2,and 3) were designed,synthesized,and transfected into L6 cells. The GlyRS mRNA expression was detected by qPCR to select the most efficient siRNA sequence. Another L6 cells were randomly divided into the normal cell group (no treatment,group N) and the negative control group (transfected with the negative control sequence,group NC),the GlyRS-siRNA-24 h,-48 h,-72 h,-96 h and-120 groups (transfected with the GlyRS-siRNA sequence with the highest interference efficiency and cultured for the corresponding time),the average diameters of L6 cells in each group were measured at the corresponding time points respectively. the mRNA and protein expressions of GlyRS and MHC-IIb were detected by qPCR and Western blot respectively. **Results** Glyrs-siRNA1,2,and 3 decreased the expression level of GlyRS mRNA by 90.4%,62.0%,and 78.7% respectively. Among them,Glyrs-siRNA1 had the highest interference efficiency ($P<0.001$);the average diameter of L6 cells transfected with GlyRS siRNA1 for 24 h showed no significant change compared with the NC group. After transfection for 48 h and 72 h,the average diameter of L6 cells decreased significantly compared with the

* 基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 608);贵州省卫生健康委员会科学技术基金项目(gzkwkj2021-505);遵义医学院硕士科研启动基金项目(F-891)。

NC group ($P < 0.001$), and then gradually increased. The expression level of GlyRS mRNA in each time point group of GlyRS-siRNA was lower than that in the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), among which the reduction was most obvious in the GlyRS-siRNA-72 h group. The expression levels of MHC-II b mRNA in each GlyRS-siRNA time point group were all higher than those in the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), among which the increase was more obvious in the GlyRS-siRNA-48 h, -72 h, and -96 h groups. But there was no statistically significant difference in pairwise comparisons among the three groups ($P > 0.05$); The changes in the protein expression levels of GlyRS and MHC-II b were basically consistent with their mRNA expressions. **Conclusion** Silencing GlyRS can up-regulate the synthesis of MHC-II b in L6 cells.

[Key words] skeletal muscle atrophy; glycyl-tRNA synthetase; small interfering RNA; myosin heavy chain II b

甘氨酸-转运 RNA (transfer RNA, tRNA) 合成酶 (glycyl-tRNA synthetase, GlyRS) 是氨基酰-tRNA 合成酶家族之一, 在机体内普遍表达^[1]。在甘氨酸参与蛋白合成过程中, GlyRS 催化甘氨酸连接至对应的 tRNA 上, 生成甘氨酸-tRNA, 是合成蛋白的重要底物。GlyRS 基因突变可导致 2D 型腓骨肌萎缩综合征, 其与 GlyRS 基因突变后神经元轴突末端局部蛋白合成缺陷, 诱导肌肉失神经和感觉神经元形态缺陷有关^[2-3]。研究还发现, GlyRS 可介导氨基酸诱导的 mTOR 通路的激活, 促进牛乳腺上皮细胞中乳蛋白和脂肪的合成^[4]。

临床上, 骨骼肌废用、长期感染、衰老、失神经支配和系统性疾病 (如艾滋病、败血症、肾衰竭、心力衰竭、癌症), 很可能诱发骨骼肌萎缩^[5-7]。骨骼肌萎缩的机制可归因于蛋白分解增加与合成减少两大原因^[8]。肌细胞中表达最丰富的是构成肌原纤维粗肌丝的肌球蛋白, 其中肌球蛋白重链 (myosin heavy chains, MHC) 以重链 II b (MHC-II b) 型纤维最不稳定, 在神经损伤后 MHC-II b 减少最明显^[9]。大鼠坐骨神经注射性损伤后, 腓骨长肌内 GlyRS 和 MHC-II b 表达水平均下调, 针刺膈穴治疗后, 二者表达水平上调, 肌萎缩得到改善, 提示 GlyRS 和 MHC-II b 的表达水平下调可能与肌萎缩相关^[10]。然而, GlyRS 表达水平下调是否会直接导致 MHC-II b 合成减少而引起肌萎缩目前并不清楚。

本研究拟首先构建并筛选出高效干扰 GlyRS 的特异性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 片段, 转染 L6 细胞, 沉默 L6 细胞 GlyRS 的表达, 测量 L6 细胞的平均直径, 通过 qPCR 和 Western blot 技术检测沉默 GlyRS 表达前、后 L6 细胞内 GlyRS 和 MHC-II b 的 mRNA 和蛋白表达水平, 以期从蛋白合成途径证实骨骼肌萎缩的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

L6 细胞株 (大鼠骨骼肌成肌细胞) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。绿色荧光标记的 GlyRS-siRNA 序列、阴性对照序列及 GlyRS、MHC-II b 和 GAPDH 等基因引物由北京擎科生物科技股

份有限公司合成。TRIzol、Lipofectamine 2000 购自美国 Thermo Fisher 公司, HiScript Reverse Transcriptase (RNase H)、5× HiScript Buffer、50× ROX Reference Dye 2、SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 核糖核酸酶抑制剂购自北京全式金生物技术有限公司, dNTP、Taq Plus DNA Polymerase、DL 2000 DNA Marker 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 随机引物购自日本 TaKaRa 公司, DMEM 培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液、胰蛋白酶、酚红、Opti-MEM[®] 培养基购自美国 Gibco 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司, 蛋白 Marker ($10 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$) 购自美国 Promoton 公司, 聚偏氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自美国 Millipore 公司, 兔多抗 GAPDH 抗体购自杭州贤至生物科技有限公司, 兔多抗 MHC-II b 抗体购自美国 Thermo Fisher 公司, 兔多抗 GlyRS 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, 电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 底物液购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 GlyRS-siRNA 干扰片段的构建、筛选与实验分组

根据 NCBI 基因库中的大鼠 GlyRS 基因 (Gene ID: 297113), 共设计合成 3 条 GlyRS-siRNA 序列, 见表 1。各序列分别转染 L6 细胞进行干扰效果筛选。实验分组: 正常细胞组 (细胞不做任何处理, N 组)、阴性对照组 (细胞转染阴性对照序列, NC 组)、GlyRS-siRNA1 组 (细胞转染 GlyRS-siRNA1)、GlyRS-siRNA2 组 (细胞转染 GlyRS-siRNA2)、GlyRS-siRNA3 组 (细胞转染 GlyRS-siRNA3)。细胞转染 24 h 后直接收集细胞进行 qPCR 检测。

1.2.2 GlyRS-siRNA 干扰片段转染 L6 细胞与实验分组

选择干扰效果最佳的 GlyRS-siRNA 序列转染 L6 细胞研究干扰 GlyRS 的表达对 MHC-II b 的影响。实验分组: 将 L6 细胞随机分为正常细胞组 (N

组)、阴性对照组(NC 组)、GlyRS-siRNA 转染后培养 24 h(GlyRS-siRNA-24 h)组、GlyRS-siRNA 转染后培养 48 h(GlyRS-siRNA-48 h)组、GlyRS-siRNA 转染后培养 72 h(GlyRS-siRNA-72 h)组、GlyRS-siRNA 转染后培养 96 h(GlyRS-siRNA-96 h)组和 GlyRS-siRNA 转染后培养 120 h(GlyRS-siRNA-120 h)组,共 7 组,各组在相应的时间点收集细胞进行后续实验。

表 1 大鼠 GlyRS 基因 mRNA 的 siRNA 靶序列		
干扰片段	方向	序列(5'-3')
GlyRS-siRNA1	正向	GCC CAA AGA UGA CAU CGU ATT
	反向	UAC GAU GUC AUC UUU GGG CTT
GlyRS-siRNA2	正向	GCG CCA GCA GGG AGA CUU UTT
	反向	AAA GUC UCC CUG CUG GCG CTT
GlyRS-siRNA3	正向	CCA CCU GUU GAA AGC UCA UTT
	反向	AUG AGC UUU CAA CAG GU GGT T
阴性对照	正向	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
	反向	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

1.2.3 细胞培养及转染

L6 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件的细胞培养箱中培养,待细胞密度达到 80%时,用胰蛋白酶消化细胞,更换培养基,按照 1:3 的细胞比例进行传代。取处于对数期,生长状态良好的 L6 细胞,用 DMEM 培养基制成单细胞悬液,按 5×10⁵/孔将细胞均匀接种至 6 孔板中,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件培养过夜,转染前 2 h,换为无血清 DMEM 培养基。对于每个转染标本,均按下面的方法准备:用 90 μL 无血清 Opti-MEM®培养基分别稀释 10 μL GlyRS-siRNA 序列,用枪头轻轻混匀,室温静置 5 min;取 5 μL 的 Lipofectamine™ 2000 稀释于 95 μL Opti-MEM®中,室温静置 5 min;混合 Lipofectamine™ 2000 和干预序列稀释液(总体积为 200 μL),轻轻混匀并在室温静置 20 min。取准备好的细胞,每个培养孔加混合液 200 μL,前后轻轻摇动细胞培养板,使混合液与培养板中培养液混匀;细胞于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件的培养箱中培养 6 h 后吸出转染液换入正常培养基,根据转染后的培养时间,细胞分组同 1.2.2。

1.2.4 测量 L6 细胞的平均直径

在倒置显微镜下观察各组 L6 细胞并拍照。由于 L6 细胞贴壁时呈梭形,不利于测量细胞直径,用完全培养基悬浮 L6 细胞后,胞体形似圆形,在 400×放大倍数下随机选取 3 个视野,应用 Cellsens standard 1.11 图像分析软件(日本 Olympus 公司)测量细胞直径,统一选取细胞胞体的最宽处进行测量,然后取平均值表示 L6 细胞的平均直径。

1.2.5 qPCR 检测 GlyRS、MHC-II b mRNA 表达

根据试剂盒说明进行操作。取各组细胞,弃掉培养液,4℃预冷 PBS 清洗细胞,用 TRIzol 法提取细胞

总 RNA;逆转录合成 cDNA;以 cDNA 为模版,建立 20 μL qPCR 反应体系。反应条件:95℃ 10 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,40 个循环,以 GAPDH 作为内参;采用 ABI Prism 7500 SDS 软件根据扩增曲线的 Ct 值,应用 2^{-ΔΔCt} 方法计算目的基因的表达水平。GlyRS、MHC-II b 和 GAPDH 的引物序列见表 2。

表 2 大鼠 GlyRS、MHC-II b 和 GAPDH 基因引物序列表

基因	方向	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
GlyRS	正向	AAA GAA GAT AAA GCC CCA CAA G	190
	反向	TGA CAC CTC CAT AAA TAG CAA A	
MHC-IIb	正向	TCT CCA TGA ACC CTC CCA AGT AC	147
	反向	TGA CAG TGA CAC AGA AGA GCC CC	
GAPDH	正向	ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC	253
	反向	TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT	

1.2.6 Western blot 技术检测 GlyRS 和 MHC-II b 表达

采用 RIPA 裂解液充分裂解细胞并提取细胞总蛋白,离心后,吸取上清液,BCA 法测定样品蛋白浓度后分装保存。以 GAPDH 作为内参,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)电泳分离,湿转法转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h,一抗 4℃孵育过夜(GlyRS、MHC-II b、GAPDH 抗体稀释比均为 1:1 000),TBST 洗膜 5~6 次,5 min/次,辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释比为 1:50 000)37℃摇床孵育 2 h,TBST 洗膜 5~6 次,5 min/次,ECL 显影,用 Band-Scan 软件分析条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS29.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GlyRS-siRNA 转染 L6 细胞干扰 GlyRS 的 mRNA 表达的效果评价

3 种 GlyRS-siRNA 片段转染 L6 细胞后,qPCR 结果显示,与 N 组比较,NC 组 GlyRS mRNA 表达水平无明显变化(*P*>0.05);与 NC 组比较,GlyRS-siRNA1、GlyRS-siRNA2 和 GlyRS-siRNA3 组 GlyRS mRNA 表达水平分别下降了 90.4%、62.0%和 78.7%(*P*<0.001),见图 1。说明 GlyRS-siRNA1 的干扰效率最高,因此采用 GlyRS-siRNA1 序列进行后续实验。

2.2 GlyRS-siRNA1 沉默 GlyRS 表达对 L6 细胞平均直径的影响

GlyRS-siRNA1 成功转染 L6 细胞后,倒置显微

镜下分别测量各组 L6 细胞的平均直径,结果显示,N 组与 NC 组比较,细胞平均直径无明显变化($P>0.05$);与 NC 组比较,GlyRS-siRNA-24 h 组、GlyRS-siRNA-120 h 组细胞平均直径差异无统计学意义($P>0.05$),GlyRS-siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组、GlyRS-siRNA-96 h 组细胞平均直径明显降低($P<0.001$);与 GlyRS-siRNA-24 h 组比较,GlyRS-siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组细胞平均直径明显降低($P<0.001$);除与 GlyRS-siRNA-48 h 组和 GlyRS-siRNA-72 h 组比较,GlyRS-siRNA-120 h 组细胞平均直径明显增大($P<0.001$),与 GlyRS-siRNA-48 h 组比较,GlyRS-siRNA-96 h 组增大外($P<0.05$),GlyRS-siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组、GlyRS-siRNA-96 h 组、GlyRS-siRNA-120 h 组两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$),转染 72 h 后细胞平均直径逐渐增大,见图 2。

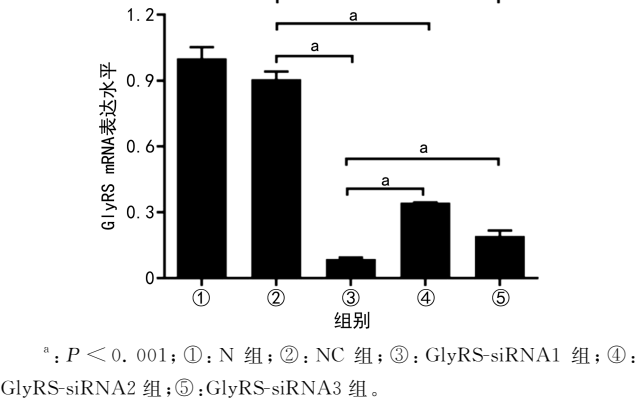


图 1 各组 L6 细胞 GlyRS 的 mRNA 表达水平 ($n=3$)

2.3 GlyRS-siRNA1 沉默 GlyRS 表达对 GlyRS 和 MHC-Ⅱ b 的 mRNA 及蛋白表达水平的影响

qPCR 结果显示,与 N 组比较,NC 组 GlyRS、MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);与 NC 组比较,GlyRS-siRNA-24 h 组、GlyRS-

siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组、GlyRS-siRNA-96 h 组、GlyRS-siRNA-120 h 组 GlyRS mRNA 表达水平均明显降低($P<0.05$),其中,GlyRS-siRNA-72 h 组 GlyRS mRNA 表达水平降低最明显;与 GlyRS-siRNA-72 h 组比较,GlyRS-siRNA-24 h 组、GlyRS-siRNA-48 h 组 GlyRS mRNA 表达水平明显升高,GlyRS-siRNA-96 h 组和 GlyRS-siRNA-120 h 组也明显升高($P<0.001$);与 NC 组比较,GlyRS-siRNA-24 h 组、GlyRS-siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组、GlyRS-siRNA-96 h 组和 GlyRS-siRNA-120 h 组 MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平均明显升高($P<0.05$),其中,以 GlyRS-siRNA-48 h 组、GlyRS-siRNA-72 h 组、GlyRS-siRNA-96 h 组升高较为明显,但此 3 组间两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与 GlyRS-siRNA-72 h 组比较,GlyRS-siRNA-24 h 组、GlyRS-siRNA-120 h 组 MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平明显下降($P<0.05$)。总体而言,转染 GlyRS-siRNA 序列后,GlyRS mRNA 表达水平先降低,72 h 后开始升高,而 MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平先升高,72 h 后开始下降,见图 3。GlyRS 和 MHC-Ⅱ b 的蛋白表达水平变化情况与其 mRNA 表达情况基本一致,见图 4。

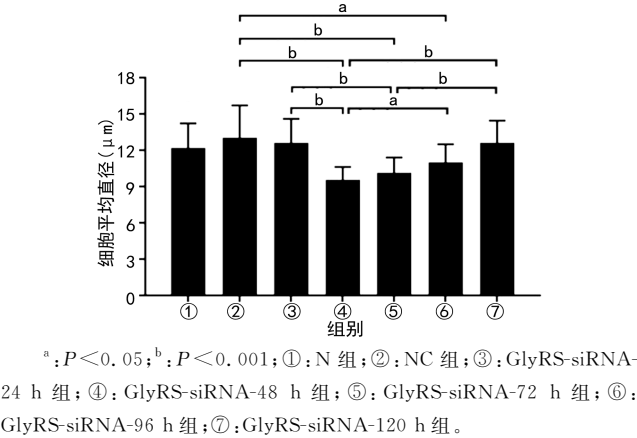


图 2 各组 L6 细胞平均直径比较 ($n=3$)

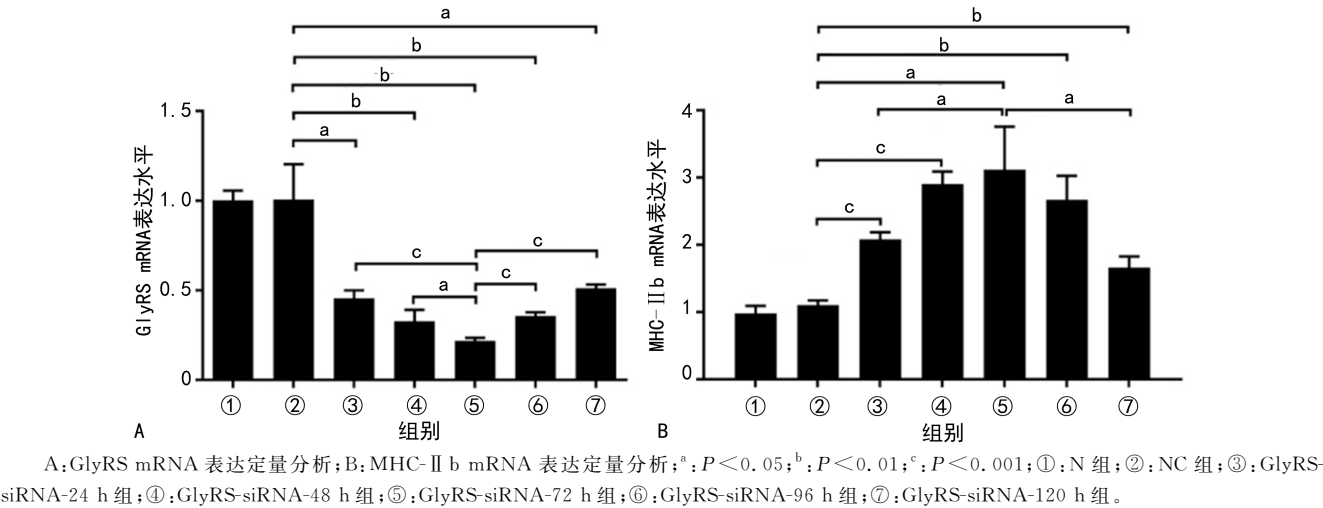
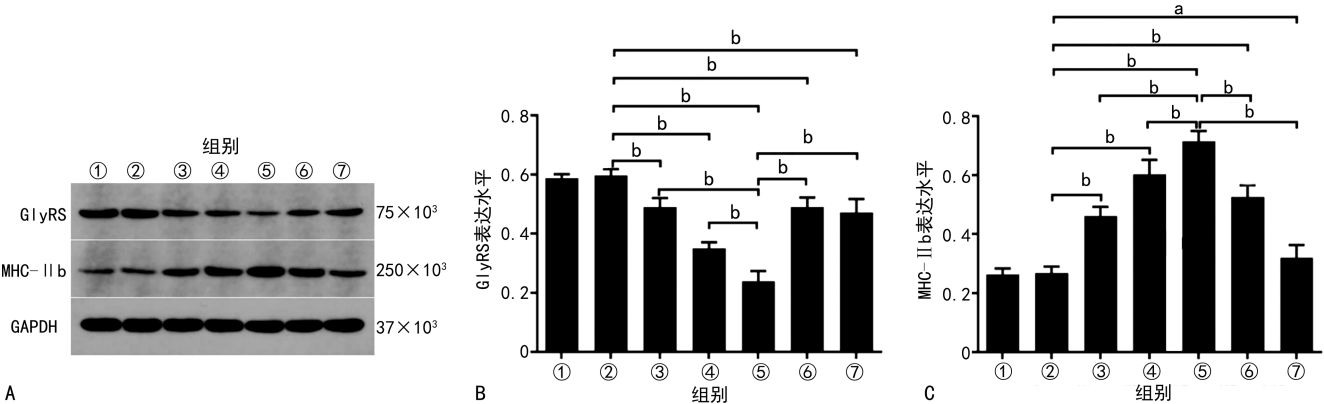


图 3 各组 L6 细胞 GlyRS、MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平比较 ($n=3$)



A: Western blot 图; B: GlyRS 表达定量分析; C: MHC-Ⅱ b 表达定量分析; ^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$; ①: N 组; ②: NC 组; ③: GlyRS-siRNA-24 h 组; ④: GlyRS-siRNA-48 h 组; ⑤: GlyRS-siRNA-72 h 组; ⑥: GlyRS-siRNA-96 h 组; ⑦: GlyRS-siRNA-120 h 组。

图 4 各组 L6 细胞 GlyRS、MHC-Ⅱ b 表达水平比较 (n=3)

3 讨 论

GlyRS 是生物体内蛋白合成的关键酶之一,在细胞质和线粒体中蛋白翻译之前将甘氨酸与其相应的 tRNA 连接起来^[11]。GlyRS 除了经典的氨酰化作用外,还可以刺激生物体的内部核糖体进入位点的翻译起始^[12]、影响 mRNA 3'末端的形成^[13]、催化四磷酸二腺苷的合成^[14]等。研究显示,注射损伤大鼠坐骨神经后,腓骨长肌萎缩,肌内 GlyRS 和 MHC-Ⅱ b 表达水平降低,针刺腓穴治疗后,GlyRS 和 MHC-Ⅱ b 表达水平增加,腓骨长肌萎缩得到改善^[10],但是,GlyRS 是否会通过调控 MHC-Ⅱ b 的表达来影响肌萎缩需进一步证实。

RNA 干扰是对目的基因表达进行有效阻断的技术,siRNA 是 RNA 干扰技术的中心环节,其中,化学合成的特异性 siRNA 片段是实现 RNA 干扰的重要工具之一,具有易合成、成本较低、转染效率高等优点^[15]。实验中,先根据大鼠 GlyRS 基因序列,构建并筛选出 3 条针对 GlyRS 的特异性 siRNA 序列,即 GlyRS-siRNA1、GlyRS-siRNA2 和 GlyRS-siRNA3,然后分别转染 L6 细胞。结果发现,3 个 GlyRS-siRNA 序列均能成功转染并沉默 L6 细胞中 GlyRS 基因的表达,其中,GlyRS-siRNA1 的干扰效率最高。因此,后续实验采用 GlyRS-siRNA1 转染 L6 细胞。

本实验结果显示,GlyRS-siRNA1 转染 L6 细胞后,L6 细胞在转染后 48 h 和 72 h 时平均直径较 NC 组明显变小,而转染 96 h 和 120 h 后,L6 细胞平均直径又逐渐恢复至接近正常水平;GlyRS-siRNA1 转染 L6 细胞后各时间点 GlyRS mRNA 表达水平较 NC 组降低,其中转染后 72 h 后达到最低,转染后 96 h 和 120 h GlyRS 的 mRNA 表达水平又逐渐回升,但 GlyRS-siRNA1 转染 L6 细胞后各时间点 MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平较 NC 组均升高,其中,在转染后 48、72 和 96 h,MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平较 NC 组升高较为明显,三者之间无明显差异,转染 120 h 后,

MHC-Ⅱ b mRNA 表达水平下降;GlyRS、MHC-Ⅱ b 的蛋白表达水平变化与其 mRNA 表达水平基本一致。这些结果说明,L6 细胞 GlyRS 沉默表达后,L6 细胞形态变小,出现萎缩,MHC-Ⅱ b 表达水平升高,表明 GlyRS 表达水平降低并未使 MHC-Ⅱ b 表达水平减少而导致肌细胞萎缩。

GlyRS 在人类皮肤角质形成细胞中高表达,敲低角质形成细胞的 GlyRS 可通过核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)/丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)通路抑制细胞增殖并促进细胞凋亡^[1]。在体外肝癌细胞中,耗竭 GlyRS 可抑制癌细胞增殖和细胞周期进程,并促进细胞凋亡^[16]。GlyRS 作为伴侣蛋白与泛素样蛋白 NEDD8、E1 和 E2 等组分直接相互作用进行泛素化修饰,从而调节细胞周期进展^[17]。GlyRS 是甘氨酸参与细胞质和线粒体内蛋白合成所必需的,GlyRS 的异常可导致线粒体呼吸链功能障碍^[18],而线粒体的功能障碍也是骨骼肌萎缩的重要因素^[19]。因此,GlyRS 沉默表达后,L6 细胞变小、萎缩,可能与 GlyRS 表达水平降低导致线粒体的功能障碍、抑制 L6 细胞的增殖和细胞周期进展有关。哺乳动物骨骼肌的 MHC 分为 4 个亚型:MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱ a、MHC-Ⅱ x、MHC-Ⅱ b,其中,MHC-Ⅱ b 属于快收缩酵解型纤维^[20],各肌纤维类型可因骨骼肌在不同状态下发生相互转换^[21]。黄金秀等^[22]进行猪骨骼肌卫星细胞体外培养时发现,随着培养时间的变化,MHC-Ⅱ b 的比例逐渐增加,其余 3 种类型肌纤维逐渐减少。因此,初步推测 GlyRS 沉默表达后,可能会影响 L6 细胞线粒体蛋白合成,致使线粒体功能障碍,导致 L6 细胞能量代谢方式改变,MHC-Ⅱ b 升高。但 MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱ a、MHC-Ⅱ x 的水平变化由于本实验未检测而尚不清楚。有研究表明,缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor,HIF)与骨骼肌纤维类型的转换、生长发育及能量代谢密切相关,缺氧暴露会诱导由 HIF- α 介导的骨骼肌纤维类

型分布的改变^[23]。肌肉生成抑制素(myostatin, MSTN)是转化生长因子- β 超家族成员之一,对肌肉量起负调节作用^[24],阻断成肌细胞 MSTN 信号传导后,MHC-Ⅱb 的表达水平上升^[25]。但 GlyRS 是否会通过作用于 HIF 和 MSTN 来调控 MHC-Ⅱb 的表达,并影响 MHC 各亚型的转换,需进一步研究证实。

本研究还发现,GlyRS-siRNA1 转染 L6 细胞后,GlyRS 表达水平下降,MHC-Ⅱb 表达水平升高,这些变化在转染后 72 h 最明显,之后有不同程度的回升或回降。说明 GlyRS-siRNA1 干扰效率最高的时间点是在转染后 72 h,之后其干扰效率逐渐下降,这可能与特异性 siRNA 片段易受核酸酶介导的降解有关^[26],使 GlyRS-siRNA 的干扰作用不能持续较长时间。因此,利用特异性 siRNA 分子片段进行实验研究时需要注意这一点。

综上所述,本研究利用 siRNA 干扰技术成功构建并筛选出干扰效率最高的 GlyRS-siRNA1 序列,使 L6 细胞 GlyRS 表达沉默,确定了 GlyRS-siRNA1 发挥最佳干扰作用的时间点,明确 GlyRS 能调控 L6 细胞 MHC-Ⅱb 的合成,为后续进一步研究 GlyRS 在 L6 细胞蛋白合成中的作用及机制奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] ZHENG Y X, CHEN X B, XU F, et al. Glycyl-tRNA synthetase induces psoriasis-like skin by facilitating skin inflammation and vascular endothelial cell angiogenesis[J]. *J Invest Dermatol*, 2024, 144(4): 774-785.
- [2] CHILDERS M C, REGNIER M, BOTHWELL M, et al. Conformational sampling of CMT-2D associated GlyRS mutations [J]. *Brain Multiphys*, 2022, 3: 100054.
- [3] NIEHUES S, BUSSMANN J, STEFFES G, et al. Corrigendum: impaired protein translation in *Drosophila* models for Charcot-Marie-Tooth neuropathy caused by mutant tRNA synthetases [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10497.
- [4] LUO C C, QI H, HUANG X, et al. GlyRS is a new mediator of amino acid-induced milk synthesis in bovine mammary epithelial cells[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(3): 2973-2983.
- [5] BONALDO P, SANDRI M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy [J]. *Dis Model Mech*, 2013, 6(1): 25-39.
- [6] SZENTESI P, CSERNOCH L, DUX L, et al. Changes in redox signaling in the skeletal muscle with aging [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4617801.
- [7] YIN L, LI N, JIA W, et al. Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 172: 105807.
- [8] YANG S B, YUE N, TANG Q, et al. Expression and regulation of MuRF-1 and Atrogin-1 are required for skeletal muscle atrophy [J]. *Austin J Anat*, 2015, 2(1): 1028.
- [9] 杨胜波, 龙胜, 易晓东, 等. 注射性坐骨神经损伤后针刺对家兔腓肠肌内 NADH-TR 和胶原纤维的影响 [J]. *遵义医学院学报*, 2014, 37(1): 62-66.
- [10] WANG M, ZHANG X M, YANG S B. Electroacupuncture on the expression of glycyl-trna synthetase and ultrastructure changes in atrophied rat peroneus longus muscle induced by sciatic nerve injection injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 7536234.
- [11] OPRESCU S N, CHEPA-LOTREA X, TAKASE R, et al. Compound heterozygosity for loss-of-function GARS variants results in a multi-system developmental syndrome that includes severe growth retardation [J]. *Hum Mutat*, 2017, 38(10): 1412-1420.
- [12] NIKONOVA E Y, MIHAYLINA A O, NEMCHINOVA M S, et al. Glycyl-tRNA synthetase as a potential universal regulator of translation initiation at IRES-I [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2018, 52(1): 10-18.
- [13] JOHANSON K, HOANG T, SHETH M, et al. GRS1, a yeast tRNA synthetase with a role in mRNA 3' end formation [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 35923-35930.
- [14] GUO R T, CHONG Y E, GUO M, et al. Crystal structures and biochemical analyses suggest a unique mechanism and role for human glycyl-tRNA synthetase in Ap4A homeostasis [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(42): 28968-28976.
- [15] ZHOU Z, ZHU J, GAO C, et al. siRNA targeting YAP gene inhibits gastric carcinoma growth and tumor metastasis in SCID mice [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(4): 2806-2814.

[16] WANG J H, YANG B, WANG D X, et al. GARS is implicated in poor survival and immune infiltration of hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Signal*, 2022, 94: 110302.

[17] MO Z, ZHANG Q, LIU Z, et al. Neddylation requires glycyl-tRNA synthetase to protect activated E2 [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23 (8): 730-737.

[18] NAFISINIA M, RILEY L G, GOLD W A, et al. Compound heterozygous mutations in glycyl-tRNA synthetase (GARS) cause mitochondrial respiratory chain dysfunction [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0178125.

[19] KUBAT G B, BOUHAMIDA E, ULGER O, et al. Mitochondrial dysfunction and skeletal muscle atrophy: causes, mechanisms, and treatment strategies [J]. *Mitochondrion*, 2023, 72: 33-58.

[20] NORDIN M, FRANKEL V H. Basic biomechanics of the musculoskeletal system [M]. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

[21] 史姗姗, 卢淑卿, 刘师宇, 等. 痉挛型瘫痪大鼠骨骼肌肌球蛋白重链亚型的蛋白表达研究[J]. *中国康复医学杂志*, 2019, 34(6): 631-635.

[22] 黄金秀, 杨飞云, 刘作华, 等. 共轭亚油酸对体外培养的猪骨骼肌纤维类型组成的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(3): 295-300.

[23] SHIN J, NUNOMIYA A, KITAJIMA Y, et al. Prolyl hydroxylase domain 2 deficiency promotes skeletal muscle fiber-type transition via a calcineurin/NFATc1-dependent pathway [J]. *Skelet Muscle*, 2016, 6: 5.

[24] ESPOSITO P, PICCIOTTO D, BATTAGLIA Y, et al. Myostatin: basic biology to clinical application [J]. *Adv Clin Chem*, 2022, 106: 181-234.

[25] WANG M, YU H, KIM Y S, et al. Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426(1): 83-88.

[26] ALSHAER W, ZUREIGAT H, KARAKI A A, et al. siRNA: mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 905: 174178.

(收稿日期: 2025-04-28 修回日期: 2025-08-28)

(编辑: 姚 雪)

(上接第 2758 页)

于多模态 MRI 探讨高血压相关脑体积及脑白质信号改变的临床研究[J]. *磁共振成像*, 2024, 15(8): 90-96.

[19] KELLER J A, KANT I M J, SLOOTER A J C, et al. Different cardiovascular risk factors are related to distinct white matter hyperintensity MRI phenotypes in older adults[J]. *Neuroimage Clin*, 2022, 35: 103131.

[20] DONGHOON K, M. T H, JEONGCHUL K, et al. The relationship between vascular risk factors and white matter structural and vascular imaging metrics[J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2022, 18(1):

[21] YOU Z, MA S, XU H, et al. Comorbidity of white matter lesions in Parkinson's disease: a study on risk factors and phenotypic differences[J]. *Neurol Sci*, 2025, 46(1): 175-183.

[22] LI J, TIAN Y, SHI Y, et al. Association of vulnerable plaques with white matter hyperintensities on high-resolution magnetic resonance imaging[J]. *Quant Imaging Med Surg*, 2024, 14 (5): 3606-3618.

[23] KOOHI F, HARSHFIELD E L, MARKUS H S. Contribution of conventional cardiovascular risk factors to brain white matter hyperintensities [J]. *J Am Heart Assoc*, 2023, 12 (14): e030676.

[24] 任腊梅, 郭爱红, 高春燕, 等. 脑白质病变危险因素及发病机制的研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2022, 25(7): 916-919.

[25] DOLUI S, DETRE J A, GAUSSOIN S A, et al. Association of intensive *vs.* standard blood pressure control with cerebral blood flow: secondary analysis of the sprint mind randomized clinical trial [J]. *JAMA Neurol*, 2022, 79 (4): 380-389.

(收稿日期: 2025-04-28 修回日期: 2025-08-28)

(编辑: 成 卓)