doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2026.04.040

宰后成熟期间蛋白质磷酸化对细胞凋亡和肌原纤维蛋白降解的影响机制研究

张佳莹　雷　清　宋舒楠　李聪慧　葛武鹏
（西北农林科技大学食品科学与工程学院，陕西杨凌 712100）

摘要：为研究宰后成熟期间蛋白质磷酸化对细胞凋亡和肌原纤维蛋白降解的影响机制，以经注射蛋白激酶 A（Protein kinase A，PKA）和碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase，AP）的腰大肌（*Psoas major*，PM）为研究对象，测定并分析宰后成熟期间（2、6、12、48、72 h）线粒体功能障碍、细胞凋亡、肌纤维类型以及肌原纤维蛋白降解等的变化。结果表明，宰后 12～72 h，AP 组线粒体膜通透性、细胞色素 c（Cytochrome c，Cyt-c）氧化水平以及细胞凋亡酶（Caspase）活性显著高于 PKA 组和对照组（$P<0.05$），表现出更多的细胞凋亡；宰后 2～48 h，PKA 组和 AP 组Ⅰ型肌纤维数目显著增加（$P<0.05$）；宰后 2～72 h，AP 组肌间线蛋白（desmin）、肌钙蛋白-T（troponin-T）和钙蛋白酶（calpain）降解程度显著高于 PKA 组和对照组（$P<0.05$），表现出更多的肌纤维损伤。此外，AP 组 Caspase-9 活性峰值出现时间点（宰后 6 h）先于对照组和 PKA 组（宰后 12 h），而 PKA 组 Caspase-3 活性出现峰值的时间点（宰后 48 h）在 AP 组和对照组（宰后 12 h）之后。综上，AP 处理诱导的去磷酸化能够增加宰后成熟过程中线粒体功能障碍，加快 Caspase 介导的细胞凋亡进程，促进细胞凋亡发生，进而增加宰后肌原纤维蛋白降解，加剧肌纤维损伤，最终改善宰后肌肉嫩度。

关键词：磷酸化；腰大肌；线粒体功能障碍；细胞凋亡；肌纤维类型；肌原纤维蛋白降解
中图分类号：TS251.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-1298(2026)04-0407-08　　**OSID**：

Mechanistic Insights into Phosphorylation-mediated Apoptosis and Proteolysis of Myofibrillar Proteins in Postmortem Muscle

ZHANG Jiaying　LEI Qing　SONG Shu'nan　LI Conghui　GE Wupeng
(*College of Food Science and Engineering*, *Northwest A&F University*, *Yangling*, *Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In order to investigate the effect mechanism of protein phosphorylation on apoptosis and myofibrillar protein degradation during maturation, *psoas major* (PM) muscles injected with protein kinase A (PKA) and alkaline phosphatase (AP) ware used as the experiment subjects. Mitochondrial dysfunction, apoptosis, myofiber type and the degradation of myofibrillar protein were measured and analyzed. The results showed that the AP group had higher mitochondrial membrane permeability, cytochrome c (Cyt-c) oxidation level, and caspase activity at 12～72 h postmortem compared with both the PKA and control groups ($P<0.05$), showing more apoptosis. At 2～48 h postmortem, the number of type Ⅰ muscle fiber was significantly increased in both the PKA and AP groups ($P<0.05$). At 2～72 h postmortem, the levels of desmin degradation, troponin-T degradation, and calpain autolysis in the AP group were significantly higher than those in both the PKA and control groups ($P<0.05$), indicating greater myofiber damage. In addition, the peak activity of caspase-9 occurred earlier in the AP group (at 6 h postmortem) than in both the control and PKA groups (at 12 h postmortem), and the peak activity of caspase-3 in the PKA group occurred later (at 48 h postmortem) than in the AP and control groups (both at 12 h postmortem). In conclusion, dephosphorylation induced by AP treatment during postmortem increased mitochondrial functional damage, promoted caspase-mediated apoptosis, and facilitated myofibrillar protein degradation, ultimately exacerbating myofiber damage and improving the tenderness of postmortem meat.

Key words: phosphorylation; *psoas major*; mitochondrial dysfunction; apoptosis; myofiber type; myofibrillar protein degradation

收稿日期：2025-07-25　修回日期：2025-08-17
基金项目：国家自然科学基金项目（32201949）
作者简介：张佳莹（1992—），女，副教授，博士，主要从事畜产品加工研究，E-mail：jyzhang@nwafu.edu.cn

0 引言

肌原纤维蛋白降解是影响宰后肌肉嫩化的重要过程,这一过程涉及多种内源水解酶对蛋白降解的作用,其中细胞凋亡酶系(Caspase)和细胞凋亡理论作为改善肌肉嫩度新的潜在贡献者得到广泛关注[1]。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程,不可避免地发生在宰后早期骨骼肌中[2]。动物屠宰后,肌肉组织由于长期的缺血缺氧,细胞内环境平衡被打破,线粒体膜结构被破坏,细胞色素 c(Cytochrome c,Cyt-c)从线粒体释放到胞浆中氧化,激活启动 Caspase 级联反应,诱导细胞凋亡发生[3]。研究表明 Caspase 能够通过参与细胞凋亡过程影响宰后肌间线蛋白(desmin)、肌钙蛋白-T(troponin-T)等细胞骨架关键蛋白的降解[4]。

磷酸化作为最常见的蛋白质翻译后修饰之一,能够通过蛋白激酶将磷酸基团添加到蛋白质的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基上,改变蛋白质结构影响蛋白质功能[5]。蛋白激酶 A(Protein kinase A,PKA)和碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase,AP)是哺乳动物共有酶类,能够使蛋白质磷酸化和去磷酸化[6]。目前,已有研究证实磷酸化水平与宰后成熟过程中细胞骨架蛋白降解有关。文献[7]发现去磷酸化能有效降低蛋白质磷酸化水平,促进肌原纤维蛋白降解,而磷酸化会增加蛋白质磷酸化水平,抑制 μ-calpain 活性,阻止肌原纤维蛋白降解[8]。

线粒体作为氧化磷酸化和线粒体途径细胞凋亡的主要场所,对于宰后肌肉磷酸化和细胞凋亡有重要意义。研究表明线粒体途径细胞凋亡过程中一些关键性蛋白(Cyt-c、Caspase-9)是磷蛋白,容易被磷酸化,进而影响细胞凋亡发生[9-10]。文献[9]发现磷酸化的 Cyt-c 不太可能从线粒体中释放并激活细胞凋亡,而去磷酸化的 Cyt-c 能通过 Bax/Bak 孔道从线粒体中释放到胞浆中并启动激活 Caspase-9 和下游 Caspase 级联反应,执行细胞凋亡。文献[10]发现磷酸化能够阻止 Caspase-9 与底物的结合,抑制细胞凋亡发生。此外,课题组前期研究也证实宰后早期肌原纤维蛋白磷酸化水平与线粒体功能障碍引起的嫩度变化之间存在联系[11-12]。然而,关于磷酸化如何调控宰后线粒体途径细胞凋亡影响肌原纤维蛋白降解的研究相对较少。

因此,本研究通过分别向腰大肌(*Psoas major*,PM)中注射 PKA 和 AP 使宰后肌肉磷酸化和去磷酸化,分析其在宰后成熟期间(2、6、12、48、72 h)线粒体功能障碍、细胞凋亡、肌纤维类型以及肌原纤维蛋白降解等指标的变化,探究蛋白质磷酸化对细胞凋亡和肌原纤维蛋白降解的影响机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

随机选取经统一饲养管理条件下发育良好、健康无病、平均体质量为 120 kg 的(伯克郡×巴美×内江)猪 6 只,参照 GB 12694—2016《畜禽屠宰加工卫生规范》要求,在无菌操作车间进行屠宰后,立即取腰大肌,剔除表面筋膜和脂肪组织,并切分成均匀大小的肉块,置于 4℃条件下保存,采自杨凌本香农业产业集团有限公司;蛋白激酶 A(P5511),美国 Sigma 公司;碱性磷酸酶(APMB-RO),瑞士 Roche 公司;0.9% 生理盐水,上海碧云天生物技术公司;乙二胺四乙酸(EDTA)、牛血清白蛋白(BSA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)、乙基苯基聚乙二醇(NP-40),二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3-氯氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐(CHAPS)、苯甲基磺酰氟(PMSF)等,以上试剂均为分析纯;Caspase-3 活性检测试剂盒、Caspase-9 活性检测试剂盒,上海碧云天生物技术公司;肌纤维 ATPase 染色液,上海酶联生物科技有限公司;desmin 抗体、troponin-T 抗体、calpain 抗体、辣根过氧化氢酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G,美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

RF 5301-PC 型荧光分光光度计,日本岛津公司;UV2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司;Spectramax M2 型多功能酶标仪,美国美谷分子仪器有限公司;冰冻切片机,德国 Leica 公司;JEM 1200EX 型透射电子显微镜,日本电子株式会社;Tocan 240 型凝胶成像系统,上海领成生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品处理

将肉样切分为尺寸一致的肉块(约 5.0 g),随机分为 3 组。PKA 组(蛋白激酶 A,用于上调磷酸化水平):肉样(5.0 g)+100 U 蛋白激酶 A,溶于 10 mL 生理盐水;对照组:肉样(5.0 g)+与 A 组等体积 0.9% 生理盐水;AP 组(碱性磷酸酶,用于下调磷酸化水平):肉样(5.0 g)+50 U 碱性磷酸酶[6]。在尽可能模拟工厂化宰后成熟条件的基础上,3 组肉样经 2、6、12、48、72 h 成熟(4℃)后测定线粒体功能障碍、细胞凋亡、肌纤维类型组成和肌原纤维蛋白降解等。

1.3.2 线粒体提取

参照文献[13]的方法,1.0 g 肌肉样本与 10 mL

线粒体提取液(220 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖和 2.0 mmol/L EDTA,5.0 mmol/L 4-丙磺酸基吗啉和 0.5% BSA,pH 值为 7.4)混合均质。匀浆液在 4℃、1 000 *g* 条件下离心 10 min 后取上清液,然后在相同条件下重复离心一次,最后取上清液于 4℃、8 000 *g* 离心 20 min,所得沉淀即为线粒体,上清液为胞浆,使用 BCA 法测定蛋白浓度。

1.3.3　线粒体膜通透性的测定

参照文献[12]的方法,分离得到的线粒体沉淀用测试介质(230 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖和 3 mmol/L HEPES,pH 值为 7.4)进行稀释,并用 BCA 试剂盒测定线粒体蛋白浓度。调节线粒体蛋白质量浓度至 0.3 mg/mL 用于测试线粒体膜通透性,取 3 mL 样品在 25℃条件下孵育 3 min,等体积的测定介质作为对照,使用紫外分光光度计于 540 nm 波长下测定吸光度 A_{540}。

1.3.4　Cyt-c 氧化还原状态测定

参照文献[14]的方法,提取得到富含 Cyt-c 的上清液,采用 BCA 法测定胞浆 Cyt-c 中蛋白浓度。利用紫外分光光度计在波长 550 nm 和 535 nm 测定上清液吸光度 A_{550}、A_{535},Cyt-c 氧化还原状态表示为 A_{550}与 A_{535}之间的差值和 Cyt-c 蛋白浓度的比值。

1.3.5　Caspase-9 和 Caspase-3 活性测定

参照文献[14]的方法,使用 3 倍体积预冷的裂解缓冲液(100 mmol/L HEPES,10% 蔗糖,0.1% NP-40,10 mmol/L DTT,pH 值为 7.5)对肉样进行破碎、匀浆。匀浆液在 -20℃冷冻 1 h 后于 4℃解冻 3 h,重复 3 次破碎细胞。适量上清液在反应缓冲液(10% 蔗糖,0.1% CHAPS,100 mmol/L HEPES,pH 值为 7.5)中稀释 10 倍后分别与 5 μL Caspase-9(Ac-LEHD-AMC)以及 Caspase-3(Ac-DEVD-AMC)荧光底物混合均匀,混合液于 37℃孵育 1 h,利用荧光分光光度计测定荧光强度,激发波长 360 nm,发射波长 460 nm。酶活力单位用每 min、每 mg 样本的荧光强度表示。

1.3.6　肌肉组织学形态观察

将肌肉样本沿着肌肉纤维方向切成 1 cm×1 cm×1 cm 肉块。在每个成熟时间点收集肉样,置于 4%(V/V)多聚甲醛中固定 24 h。经脱水、透明、包埋后切分成尺寸为 3 μm 切片。切片经二甲苯脱蜡、乙醇脱水和再水化后用苏木精-伊红(H&E)染色,在荧光显微镜下放大 200 倍观察染色切片,收集图像观察分析肌细胞细胞核形态变化[15]。

1.3.7　肌纤维类型组成

采用徕卡冰冻切片机连续切片,制备 8 μm 厚的新鲜切片,室温晾干。参照文献[16]的方法在酸性条件下进行 ATPase 组织化学染色。切片加入 ATP 孵育液,37℃培育 2 h 后除去 ATP 酶工作液,然后在 1% 氯化钙溶液中孵育 6 min。除去氯化钙溶液,置于 2% 氯化钴溶液中,蒸馏水洗 3 次,每次 5 min;硫化铵溶液显色约 1 min;蒸馏水洗 3 次,然后使用无水乙醇脱水 3 次,每次 5 min,最后置于二甲苯中透明,封固。封固后的切片用全景切片扫描仪进行照相,以 Image-Pro Plus 图像分析软件进行数据分析Ⅰ型和Ⅱ型肌纤维。

1.3.8　蛋白免疫印迹分析

适量肌肉样本加入 2 倍体积裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl,50 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L EDTA,1% NP-40,1% SDS,1% 脱氧胆酸钠,1 mmol/L PMSF,pH 值为 7.5),经匀浆、离心后所得上清液为较纯的全蛋白提取物,用于测定 desmin、troponin-T、calpain 的蛋白降解。电泳分离后,将目标蛋白转印到 PVDF 膜后封闭 1 h。按照比例 1∶10 000 稀释 desmin、troponin-T、calpain 一抗以及辣根过氧化物酶二抗。将封闭后的膜分别浸于稀释的一抗中,置于 4℃条件下反应 24 h。PVDF 膜漂洗后加入稀释的二抗,室温孵育 1 h,DBA 试剂盒显色[17]。使用扫描仪获取凝胶图像,Quantity One 分析软件进行定量分析并计算目的条带光密度。

1.3.9　透射电子显微镜观察

参照文献[18]的方法稍作修改,将尺寸约为 1 mm×1 mm×1 mm 的样品在 4℃下浸入 3% 戊二醛溶液中过夜,进行初始固定。然后将样品固定在 2% 四氧化锇溶液中 2 h。固定后,用 2% 乙酸钠溶液快速冲洗样品,并用 2% 乙酸铀酰水溶液染色。将染色的样品用箔纸密封,置通风橱中放置 1 h。随后通过分级乙醇系列对样品进行脱水,制备超薄切片。使用 80 kV JEM 1200EX 透射电子显微镜放大 8 000 倍观察,以检查肌肉组织的超微结构变化。

1.4　数据处理

数据使用 Microsoft Excel 2021 进行整理与计算,IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行方差分析(ANOVA),$P<0.05$ 为差异显著,Origin 8.0 软件作图。每个试验至少重复 3 次,结果表示为平均值±标准差。

2　结果与分析

2.1　磷酸化对腰大肌成熟期间 MMP 的影响

线粒体膜通透性是评价线粒体膜结构完整性的重要指标,吸光值越低,表示透过线粒体膜的光越多,线粒体膜通透性越大[17]。宰后成熟过程不可避免地产生活性氧(Reactive oxygen species,ROS),引

起线粒体膜蛋白损伤及理化特性的改变,导致线粒体渗透压平衡被打破,线粒体膜通透性增大,诱导细胞凋亡[14-15]。图 1 为 PM 不同处理组成熟期间线粒体膜通透性。其中,纵轴为 A_{540},不同大写字母表示同一处理组不同成熟时间点之间差异显著($P<0.05$),不同小写字母表示同一成熟时间点不同处理组之间差异显著($P<0.05$),下同。由图 1 可知,宰后成熟过程中不同处理组的线粒体膜通透性显著增加($P<0.05$)。宰后 12 ~ 72 h,AP 组线粒体膜通透性显著高于 PKA 组和对照组($P<0.05$)。结果表明,与对照组和磷酸化组相比,去磷酸化组线粒体膜通透性更高。这可能与 Cyt-c 的磷酸化水平有关。研究表明,Cyt-c 磷酸化水平的下降会导致电子呼吸链过度活跃以及线粒体膜电位的超极化,致使 ROS 过度产生,破坏线粒体膜结构,使线粒体膜通透性增加[19]。

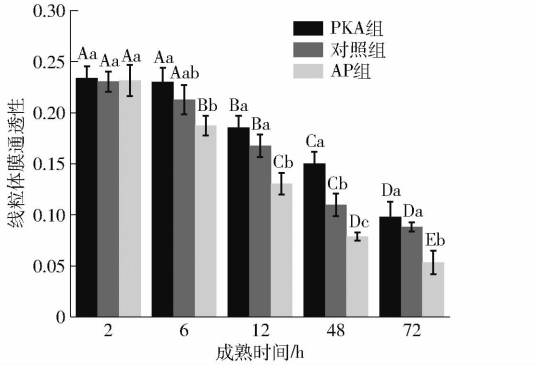

图 1 不同处理对 PM 成熟期间线粒体膜通透性的影响

Fig. 1 Effects of different treatments on mitochondrial membrane permeability of PM during maturation

2.2 磷酸化对腰大肌成熟期间 Cyt-c 氧化还原状态的影响

Cyt-c 是一种存在于线粒体内膜外侧的促凋亡蛋白,在受到凋亡刺激时,Cyt-c 从线粒体释放到细胞质中介导细胞凋亡发生[20]。只有氧化型 Cyt-c 能够介导凋亡小体形成,诱导细胞凋亡的发生,而还原型 Cyt-c 不能诱导细胞凋亡发生[21]。如图 2 所示,宰后 6 ~ 48 h 各组 Cyt-c 氧化还原状态降低,表明成熟期间 Cyt-c 发生了氧化。这可能是宰后成熟过程中骨骼肌线粒体完整性遭到破坏,线粒体膜通透性增大,促使 Cyt-c 从线粒体释放到胞浆中迅速氧化[16]。此外,宰后 2 ~ 12 h,AP 组的 Cyt-c 氧化还原水平显著低于 PKA 组和对照组($P<0.05$),而 PKA 组和对照组之间无显著差异($P>0.05$)。结果表明,与磷酸化组相比,去磷酸化组 Cyt-c 氧化水平高。此前,文献[9]的研究中证实磷酸化的 Cyt-c 不易从线粒体中释放,凋亡潜力低,而去磷酸化会增加线粒体膜通透性,促进 Cyt-c 的释放,使 Cyt-c 氧化水平增加。

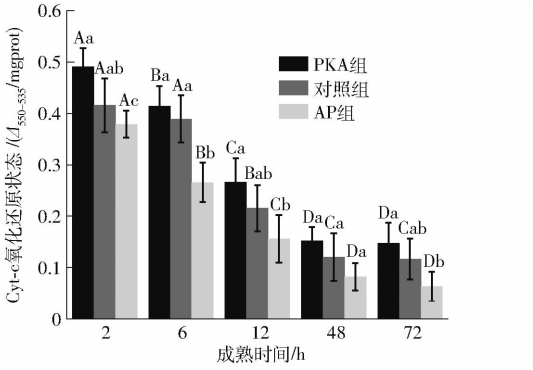

图 2 不同处理对 PM 成熟期间 Cyt-c 氧化还原状态影响

Fig. 2 Effect of different treatments on Cyt-c redox state of PM during maturation

2.3 磷酸化对腰大肌成熟期间 Caspase-9 和 Caspase-3 活性的影响

Caspase 属于半胱氨酸酶家族,在细胞凋亡中起关键作用。与细胞凋亡相关 Caspase 主要分两类:上游起始酶(如 Caspase-9)和下游效应酶(如 Caspase-3)。Caspase-3 通常以无活性酶原形式存在,需激活才能参与凋亡。因此,上游起始酶的核心作用是激活下游效应酶[22]。宰后成熟过程中线粒体释放的 Cyt-c 发生氧化,与 Apaf-1、dATP 结合形成凋亡小体,激活 Caspase-9,Caspase-9 进一步切割并激活 Caspase-3 启动级联反应,促使细胞凋亡的发生[21]。由图 3 可知,宰后 6 ~ 72 h,不同处理组 Caspase-9 和 Caspase-3 活性均呈先升高后降低趋势($P<0.05$),其中 AP 组 Caspase-9 和 Caspase-3 活性分别于宰后 6 h 和 12 h 达到峰值,而 PKA 组分别在宰后 12 h 和 48 h 达到峰值,表明 Caspase-9 先于 Caspase-3 被激活。值得注意的是,对照组 Caspase-9 和 Caspase-3 活性均在宰后 12 h 达到峰值,这与 Caspase-9 作为上游起始酶激活下游效应酶 Caspase-3 的现象不符合,这可能与试验选取的测试时间点有关。此外,AP 组 Caspase-9 活性峰值出现时间早于对照组和 PKA 组,并且峰值高于对照组和 PKA 组,PKA 组峰值低于对照组($P<0.05$)。同时,PKA 组 Caspase-3 活性出现峰值的时间点在 AP 组和对照组之后,且活性低于 AP 组和对照组($P<0.05$)。结果表明,与对照组比较,去磷酸化处理能够加快 Caspase 激活的进程同时增加活性,而磷酸化处理则会延迟 Caspase 的激活并抑制活性。研究表明 Caspase-9 存在磷酸化的主要位点,磷酸根与磷酸化位点的结合会阻断 Caspase-9 与底物的结合,抑制 Caspase-9 活性,进而抑制 Caspase-3 诱导的细胞凋亡。相反,去磷酸化能够阻断 Caspase-

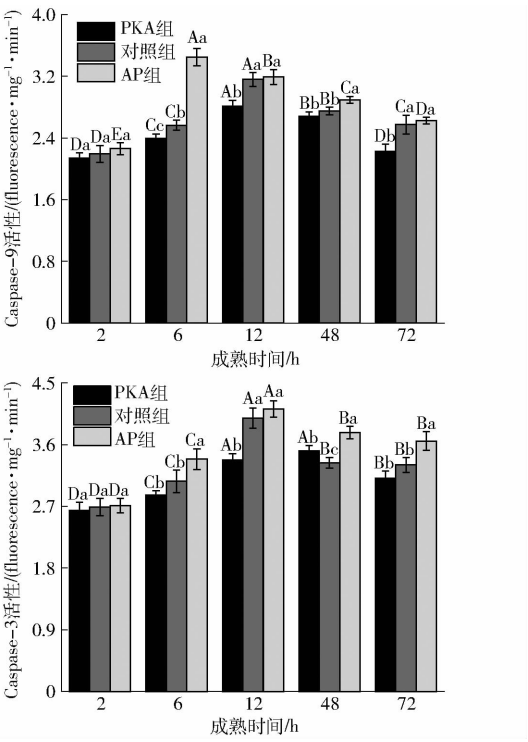

图 3　不同处理对 PM 成熟期间 Caspase－9 和 Caspase－3 活性的影响

Fig. 3　Effect of different treatments on Caspase－9 and Caspase－3 activities of PM during maturation

9 与磷酸根的结合，使 Caspase－9 暴露更多的活性位点，加快凋亡进程[9]。

2.4　磷酸化对腰大肌成熟期间细胞凋亡的影响

H&E 染色是最为常见的组织和细胞染色方法，用于观察组织学形态和细胞核形态学变化，评价细胞凋亡[15]。如图 4 所示，细胞质被染成粉红色，细胞核染成蓝色。宰后 2 ~ 48 h，不同处理组骨骼肌细胞核形态存在一定差异。宰后 2 h 猪肉骨骼肌细胞核结构基本完整，轮廓清晰，核质分布均匀，各组之间无显著差异。宰后 12 h 和 48 h，各组中部分骨骼肌细胞核逐渐边缘化，细胞核形态结构发生变化，呈现半月状。文献[23]也发现这一现象，研究显示猪骨骼肌细胞在宰后 12 ~ 48 h，

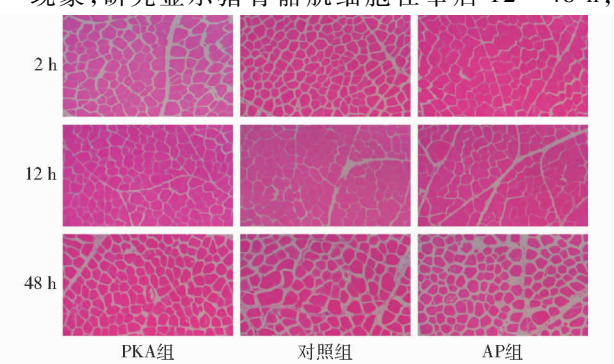

图 4　不同处理对 PM 成熟期间细胞凋亡的影响

Fig. 4　Effect of different treatments on apoptosis of PM during maturation

细胞核和细胞质的某些部分会逐渐迁移到边缘，形成半月状的凋亡小体。这些现象表明宰后早期 PM 发生了细胞凋亡。此外，宰后细胞间距的增大也是细胞凋亡的另一个典型特征[24]。由图 4 可知，宰后 48 h 各组骨骼肌细胞细胞质皱缩，细胞间隙增大，其中 AP 组细胞间距大于对照组，对照组细胞间距大于 PKA 组。结果表明，与对照组相比，磷酸化处理的肌细胞不易发生细胞凋亡，去磷酸化处理的肌细胞易发生细胞凋亡，这与本研究中观察到的线粒体功能障碍结果基本一致。另外，在宰后 48 h，各组骨骼肌肌细胞 H&E 染色观察到碎片化，其中 AP 组碎片化程度最为严重，对照组次之，PKA 组最轻，说明去磷酸化处理的肌纤维更容易降解。结合上述试验现象，发现磷酸化水平与宰后线粒体功能障碍诱发的细胞凋亡之间存在联系，这与此前观察到的宰后 12 h 在具有较低磷酸化水平的肌肉中容易发生线粒体损伤和氧化应激诱导细胞凋亡的结果相似[11-12]。因此，推测磷酸化介导的线粒体途径细胞凋亡与宰后成熟过程中肌原纤维蛋白降解之间存在潜在联系。

2.5　磷酸化对腰大肌成熟期间肌纤维类型的影响

酸性条件下，不同处理组宰后成熟过程 ATPase 组织化学染色如图 5a 所示，其中Ⅰ型肌纤维肌球蛋白中 ATPase 活性高被染为深褐色，Ⅱ型肌纤维肌球蛋白中 ATPase 活性被抑制呈浅褐色。对Ⅰ型和Ⅱ型肌纤维分别进行计数，如图 5b、5c 所示。由图 5 可知，PM 是由Ⅰ型和Ⅱ型肌纤维组成，其中Ⅰ型肌纤维数量占比高。Ⅰ型肌纤维富含线粒体，耗氧量高，产生的 ROS 多，更易发生细胞凋亡，Ⅱ型肌纤维中线粒体含量相对较少，更容易发生糖酵解[25]。由图 5b 所示，宰后 2 ~ 48 h，PKA 组和 AP 组中Ⅰ型肌纤维数量显著增加（$P < 0.05$），对照组无显著性差异。正常情况下，宰后肌纤维类型不会发生变化，但本研究结果中发生了变化，这可能是由于宰后外界因素引起的。宰后成熟过程中肌纤维类型变化主要与肌球蛋白 ATPase 活性有关，而 ATPase 活性易受宰后 pH 值和肌球蛋白结构变化影响。宰后早期肌肉 pH 值是下降的，在低 pH 值条件下，Ⅰ型肌纤维中肌球蛋白 ATPase 活性可以保持在一个较高的水平，而Ⅱ型肌纤维中 ATPase 活性因 pH 值的快速下降而失活[25-26]，因此会出现Ⅰ型肌纤维增加的情况。此外，AP 组Ⅰ型肌纤维数量显著高于 PKA 组和对照组，而 PKA 组与对照组之间无显著性差异，说明宰后Ⅰ型肌纤维变化与磷酸化水平存在联系。这

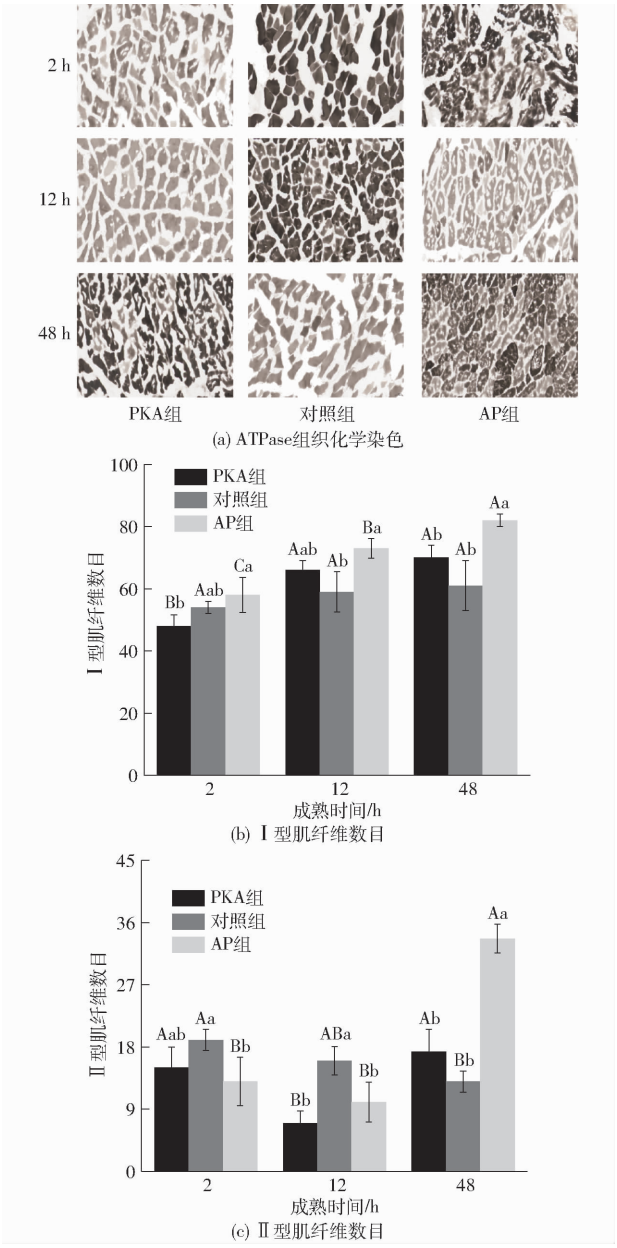

图 5 不同处理对 PM 成熟期间肌纤维类型的影响

Fig. 5 Effect of different treatments on myofiber type of PM during maturation

与文献[27]观察到的磷酸化水平与肌球蛋白 ATPase 活性负相关结果一致。值得注意的是,本试验中Ⅱ型肌纤维数目变化差异较大,统计学意义不明显,这可能与Ⅱ型肌纤维中线粒体含量相对较少,更易发生糖酵解有关,具体原因还需进一步探讨。

2.6 磷酸化对腰大肌成熟期间肌原纤维蛋白降解的影响

嫩度是决定肉食用品质最重要指标之一,与宰后成熟过程中肌原纤维蛋白降解密切相关[28]。动物屠宰后 Caspase 级联反应诱导的细胞凋亡能够裂解细胞骨架并导致肌原纤维蛋白降解[29]。desmin、troponin－T 作为肌肉成熟过程中嫩化的关键蛋白,其降解程度与肌肉嫩度正相关[30],calpain 作为导致肌原纤维蛋白降解的主要内源酶,能够靶向切割 desmin 和 troponin－T[17]。此外,宰后肌原纤维蛋白的降解由 calpain 参与破坏线粒体膜触发的线粒体途径细胞凋亡和 calpain 控制的蛋白水解共同调控[31]。PM 不同处理组成熟过程肌原纤维蛋白降解变化如图 6a 所示。由图 6b～6d 可知,PM 不同处理组的 desmin、troponin－T、calpain 表达水平在宰后 2～72 h 均显著降低($P<0.05$),表明宰后成熟过程 desmin、troponin－T、calpain 发生了降解,细胞骨架被破坏,calpain 被激活。以往研究已经证实 μ-calpain 的自动降解是 μ-calpain 激活的标志,宰后初期 μ-calpain 活性随着降解程度的增强而降低[32]。由图 6b、6c 可知,PM 在宰后成熟过程中 AP 组 desmin 和 troponin－T 表达水平显著低于对照组,对照组显著低于 PKA 组($P<0.05$)。由图 6d 可知,宰后 12～72 h,AP 组 calpain 表达水平显著低于 PKA 组和对照组。以上结果表明,与对照组相比,去磷酸化促进 desmin 和 troponin－T 的降解以及 calpain 的激活,而磷酸化抑制 desmin 和 troponin－T 降解。这与文献[33]观察到的去磷酸化促进 μ-calpain 自溶,增加其活性并加快肌原纤维蛋白降解现象一致。此外,desmin、troponin－T 的磷酸化水平与这 2 种蛋白的降解程度高度负相关[8],进一步证实了本试验研究结果。

2.7 磷酸化对腰大肌成熟期间肌纤维微观结构的影响

肌纤维是肌肉的组成单位,其降解程度与宰后肉质变化有关[4]。通过扫描电子显微镜观察肌纤维微观结构变化,PM 不同处理组成熟过程中肌纤维微观结构变化如图 7 所示。由图 7 可知,PM 的肌节长度较长,线粒体含量丰富,是典型的 PM 部位肌纤维特征[25]。宰后 2 h,各组 PM 肌纤维排列有序,暗带、明带、Z 线和 M 线清晰可见,线粒体结构未被破坏,肌节完整。随着成熟时间增加,各组肌纤维微观结构受到不同程度破坏,肌纤维组织变得更为松散。宰后 48 h,PKA 组中肌纤维结构松散,肌节完整,部分线粒体结构受到破坏但外膜未破裂;对照组中明带和 Z 线部分消失,肌节受到部分破坏但能够识别,大部分线粒体结构完整;AP 组中 Z 线、M 线完全消失,明带破坏严重,肌纤维松散程度高,依稀能够识别到暗带,肌节几乎无法识别,大部分线粒体破裂。整体而言,AP 组肌纤维受损最为严重,对照组次之,PKA 组最轻。值得注意的是线粒体结构完整性表现出不同趋势,对照组完整性最好,PKA 组次之,AP 组最差。这

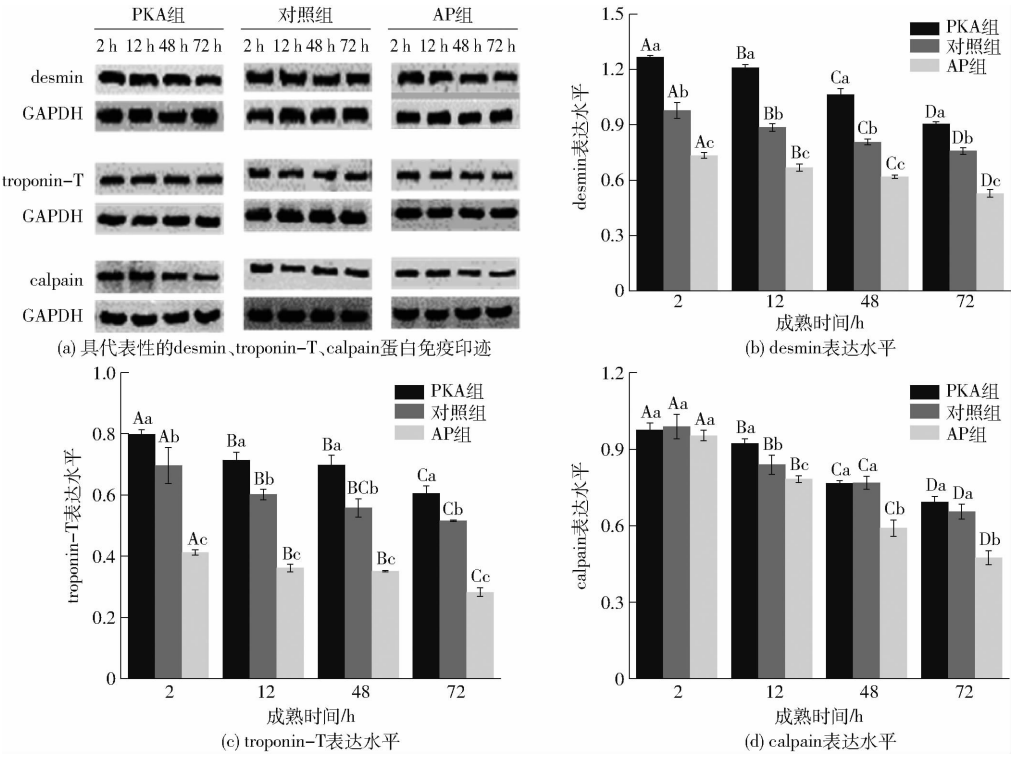

图 6　不同处理对 PM 成熟期间肌原纤维蛋白降解的影响

Fig. 6　Effect of different treatments on myofibrillar protein degradation of PM during maturation

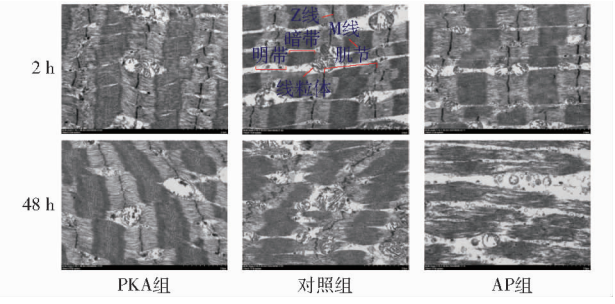

图 7　不同处理对 PM 成熟期间肌纤维微观结构的影响

Fig. 7　Effect of different treatments on microstructure of muscle fibers of PM during maturation

可能与试验观察到的 PKA 组线粒体外膜相对完整以及 PKA 磷酸化 Caspase－9 并抑制其活性不利于凋亡发生有关。以上结果表明，与对照组相比，去磷酸化促进宰后成熟期间肌纤维的损伤，而磷酸化会抑制肌纤维损伤。

3　结束语

研究发现，去磷酸化能够通过介导线粒体途径细胞凋亡促进肌原纤维蛋白降解。宰后成熟过程中，去磷酸化可能通过加剧肌细胞的线粒体功能障碍，增加线粒体膜通透性和 Cyt-c 氧化水平，直接或者间接影响 Caspase－9 活性，加快 Caspase 激活进程，促进细胞凋亡的发生，并进一步促进 desmin、troponin－T 的降解和 calpain 的激活，最终导致肌原纤维骨架蛋白被破坏，加剧肌纤维损伤。相反，磷酸化不利于线粒体途径细胞凋亡的发生，会抑制宰后成熟过程中肌纤维的损伤。此外，研究发现宰后成熟过程中肌纤维类型与磷酸化存在联系，但具体原因需进一步研究。本研究为宰后成熟过程中磷酸化介导肌原纤维蛋白降解改善肉质研究提供了新的研究思路和理论依据。

参　考　文　献

[1] YAMAMOTO S, SUZUKI A, NISHIUMI T. Stability of proteasomes extracted from pressurized, aged skeletal muscles[J]. Asian Australasian Journal of Animal Sciences, 2009, 22(2): 282－288.

[2] DIRKS A, LEEUWENBURGH C. Apoptosis in skeletal muscle with aging[J]. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2002, 282(2): 519－527.

[3] ZHAO Y, XIANG C, ROY B C, et al. Apoptosis and its role in postmortem meat tenderness: a comprehensive review[J]. Meat Science, 2025, 219: 109652.

[4] 吴佳琪，熊欣，罗永康. Caspase－3 的调控因素及其对宰后肌肉嫩化影响的研究进展[J]. 肉类研究，2024，38(10)：59－65.
WU Jiaqi, XIONG Xin, LUO Yongkang. Research progress on the regulatory factors of caspase－3 and its impact on postmortem muscle tenderization[J]. Meat Research, 2024, 38(10): 59－65. (in Chinese)

[5] 黄琳琳，张一敏，朱立贤，等. 蛋白质氧化和翻译后修饰对肉品质的影响及机制研究进展[J]. 食品科学，2021，42(9)：241－247.
HUANG Linlin, ZHANG Yimin, ZHU Lixian, et al. Advances in research of the effects and mechanisms of protein oxidation

and post-translational modification on meat quality[J]. Food Science, 2021, 42(9): 241 - 247. (in Chinese)
[6] DU M T, LI X, LI Z, et al. Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ-calpain activity[J]. Food Chemistry, 2018, 252: 33 - 39.
[7] LI Z, LI M, DU M T, et al. Dephosphorylation enhances postmortem degradation of myofibrillar proteins[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 233 - 239.
[8] LI Z, LI X, GAO X, et al. Phosphorylation prevents in vitro myofibrillar proteins degradation by μ-calpain[J]. Food Chemistry, 2017, 218: 455 - 462.
[9] KALPAGE H A, WAN J, MORSE P T, et al. Cytochrome c phosphorylation: control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2020, 121: 105704.
[10] SERRANO B P, SZYDIO H S, ALFANDARI D, et al. Active site-adjacent phosphorylation at Tyr - 397 by c-Abl kinase inactivates caspase - 9[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(52): 21352 - 21365.
[11] MA G Y, ZHANG J Y, WANG Z, et al. Effects of muscle-specific oxidative stress on protein phosphorylation and its relationship with mitochondrial dysfunction, muscle oxidation, and apoptosis[J]. Food Chemistry, 2023, 427: 136737.
[12] ZHANG J Y, WANG S S, GE W P. Mechanisms of mitochondrial apoptosis-mediated meat tenderization based on quantitative phosphoproteomic analysis[J]. Foods, 2022, 11(23): 3751.
[13] 王琳琳, 陈炼红, 韩玲, 等. 茶多酚对宰后牦牛肉线粒体细胞凋亡和肌肉嫩度的影响[J]. 农业机械学报, 2019, 50(10): 352 - 359,366.
WANG Linlin, CHEN Lianhong, HAN Ling, et al. Effects of tea polyphenols on mitochondrial apoptosis and meat tenderness in post-mortem yak meat[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(10):352 - 359,366. (in Chinese)
[14] 张佳莹. 线粒体通路信号介导细胞凋亡机制及对宰后牛肉嫩化影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.
ZHANG Jiaying. The mechanism of effects of mitochondrial pathway signaling mediated apoptosis on bovine muscle tenderization during postmortem aging[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020. (in Chinese)
[15] 王琳琳, 马君义, 余群力, 等. 宰后牦牛肉细胞凋亡对肌肉内环境与嫩度的影响[J]. 农业机械学报, 2017, 48(7): 317 - 324.
WANG Linlin, MA Junyi, YU Qunli, et al. Effects of apoptosis on muscle internal environment and tenderness during yak meat postmortem aging[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(7): 317 - 324. (in Chinese)
[16] ZOU B, SHAO L L, LIU Y N, et al. Muscle fiber characteristics and apoptotic factor differences in beef *Longissimus lumborum* and *Psoas major* during early postmortem[J]. Meat Science, 2023, 198: 109092.
[17] ZHANG J Y, MA D Y, KIM Y H B. Mitochondrial apoptosis and proteolytic changes of myofibrillar proteins in two different pork muscles during aging[J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126571.
[18] XIONG X, ZHANG H J, ZHUANG S A, et al. From texture to structure: the key role of caspase - 3 on grass carp myofibrillar protein during postmortem storage[J]. Food Bioscience, 2024, 61: 104858.
[19] MORSE P T, ARROUM T, WAN J M, et al. Phosphorylations and acetylations of cytochrome c control mitochondrial respiration, mitochondrial membrane potential, energy, ROS, and apoptosis[J]. Cells, 2024, 13(6):493.
[20] SANTUCCI R, SINIBALDI F, COZZA P, et al. Cytochrome c: an extreme multifunctional protein with a key role in cell fate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 136: 1237 - 1246.
[21] MORSE P T, PASUPATHI V, VULJAJ S, et al. Cardiac tyrosine 97 phosphorylation of cytochrome c regulates respiration and apoptosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26(3): 1314.
[22] PONDER K G, BOISE L H. The prodomain of caspase - 3 regulates its own removal and caspase activation[J]. Cell Death Discovery, 2019, 5: 56.
[23] LI C M, YIN X L, XUE P P, et al. Apoptosis and autophagy of muscle cell during pork postmortem aging[J]. Animal Bioscience, 2024, 37(2): 284 - 294.
[24] OUALI A, HERRERA-MENDEZ C H, COULIS G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms[J]. Meat Science, 2006, 74(1): 44 - 58.
[25] SAWANO S, MIZUNOYA W. History and development of staining methods for skeletal muscle fiber types[J]. Histology and Histopathology, 2022, 37(6): 493 - 503.
[26] BOWKER B C, BOTREL C, SWARTZ D R, et al. Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers[J]. Meat Science, 2004, 68(4): 587 - 594.
[27] GAO X, LI X, LI Z, et al. Dephosphorylation of myosin regulatory light chain modulates actin-myosin interaction adverse to meat tenderness[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2017, 52(6): 1400 - 1407.
[28] 狄雨晗, 廖博群, 李加慧, 等. 宰后肌肉嫩度检测技术研究进展[J]. 肉类研究, 2023, 37(7): 52 - 59.
DI Yuhan, LIAO Boqun, LI Jiahui, et al. Advances in techniques for testing postmortem muscle tenderness[J]. Meat Research, 2023, 37(7): 52 - 59. (in Chinese)
[29] 李胜杰, 胡忠良, 郭向莹, 等. 细胞凋亡对肌肉宰后嫩化的贡献[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 395 - 398.
[30] CHAI Y W, CHEN L, XIANG S Y, et al. Endoplasmic reticulum stress improved chicken tenderness, promoted apoptosis and autophagy during postmortem ageing[J]. Food Science and Human Wellness, 2024, 13(4): 2141 - 2151.
[31] MA Y H, WANG Y, WANG Z M, et al. New perspective for calpain-mediated regulation of meat quality: unveiling the impact on mitochondrial pathway apoptosis in post-mortem[J]. Food Chemistry, 2024, 441: 138287.
[32] 马逸峤, 巴吐尔·阿不力克木. 宰后不同成熟时间对羊肉肌原纤维蛋白降解及钙激活酶活性变化的影响[J]. 食品科技, 2016, 41(7): 130 - 134.
MA Yiqiao, BATUER Abulikemu. Effect of different time on the autolysis of muscle fiber protein and the activity of calpain in lamb during postmortem ageing[J]. Food Science and Technology, 2016,41(7): 130 - 134. (in Chinese)
[33] 李铮, 李欣, 杜曼婷, 等. 肌原纤维蛋白磷酸化对其被 μ-钙蛋白酶降解的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(15): 1 - 6.
LI Zheng, LI Xin, DU Manting, at al. Effect of phosphorylation on the degradation of myofibrillar proteins by μ-calpain[J]. Food Science, 2017, 38(15): 1 - 6. (in Chinese)