

付鹏宇,胡扬,李燕春,等. 低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制[J].中国实验动物学报, 2019, 27(4): 423 - 432.

Fu PY, Hu Y, Li YC, et al. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 423 - 432.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.002

低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制

付鹏宇¹, 胡扬², 李燕春², 于加倍¹, 朱镕鑫^{1,3}, 贾杰¹, 龚丽景^{2*}

(1. 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084; 2. 北京体育大学中国运动与健康研究院, 北京 100084;
3. 上海体育科学研究所, 上海 200030)

【摘要】 目的 对比低氧暴露和常氧下配对低氧摄食干预(半饥饿状态)下大鼠骨骼肌蛋白质合成和分解相关基因表达的差异,以探讨低氧暴露诱导骨骼肌萎缩发生的可能机制。**方法** SD大鼠分为:①常氧正常饮食组(C组);②低氧正常饮食组(H组),氧气浓度为12.4%;③常氧配对饮食组(P组),投食量即为H组前一天摄食量。4周干预后测量大鼠体成分,取比目鱼肌(SOL)和趾长伸肌(EDL),称量湿重;HE染色观察肌纤维形态,计算肌纤维横截面积(FCSA);WB测试骨骼肌中HIF1α、Akt、p-Akt及骨骼肌蛋白合成和分解相关基因蛋白含量。**结果** 1)H组大鼠体重较C组持续下降,P组与C组间无显著性差异;干预初期H组(P组同)摄食量较C组显著下降,后期两组间无差异;2)干预后,H组大鼠体质量和肌肉总量较C组和P组显著性降低,P组与C组间无差异;H组两肌肉湿重较C组显著下降;H组EDL的FCSA显著低于C组和P组;3)H组EDL中HIF1α蛋白含量显著高于C组;H组和P组SOL中p-Akt/Akt比值显著低于C组;H组EDL中mTOR、4EBP1蛋白含量显著低于C组,atrogen 1、MuRF1、beclin 1蛋白含量及LC3Ⅱ/I比值显著高于C组,H组SOL中MuRF1蛋白含量显著高于C组和P组。**结论** 低氧所致的骨骼肌萎缩由低氧特异性因素诱发,表现为以快肌为主的骨骼肌蛋白合成减少和分解增加,而非低氧下摄食量减少引起。

【关键词】 低氧暴露;骨骼肌萎缩;半饥饿状态;骨骼肌蛋白转化调节;肌肉类型;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0423-010

Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia

FU Pengyu¹, HU Yang², LI Yanchun², YU Jiabei¹, ZHU Rongxin^{1,3}, JIA Jie¹, GONG Lijing^{2*}

(1. College of Human Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100084, China.

2. China Institute of Sport and Health Science, Beijing Sport University, Beijing 100084.

3. Shanghai Research Institute of Sports Science, Shanghai 200030)

Corresponding author: GONG Lijing. E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

【Abstract】 Objective The aim of this study was to identify the mechanism underlying skeletal muscle atrophy induced by hypoxia exposure. To this aim, expression levels of different types of skeletal muscle protein synthesis- and degradation-related genes were compared between rats that had experienced hypoxic exposure and normoxia in a hypoxic feeding intervention (semi-starvation state). **Methods** SD rats were divided into a normoxic normal diet group (group C), a hypoxic normal diet group (group H; oxygen concentration of 12.4%), or a normoxia-matched diet group (group P;

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(2017SYS009);国家自然科学基金(31771317)。
Funded by Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2017SYS009) and National Natural Science Foundation of China (31771317).

[作者简介] 付鹏宇(1991—),女,在读博士研究生,研究方向:运动生物化学。Email:1402884452@qq.com

[通信作者] 龚丽景(1981—),女,助理研究员,博士,主要研究方向为运动与脂肪代谢;低氧与胃肠道、骨骼肌萎缩。Email:lijing.gong@bsu.edu.cn

the food intake was matched to that of group H). The body composition of rats was tested by DEXA after the 4-week intervention. The soleus (SOL) and the extensor digitorum longus (EDL) muscles were collected and weighed. Muscles fiber histology was observed using HE staining, and the muscle fiber cross-sectional area (FCSA) was calculated. The protein contents of HIF1 α , Akt, p-Akt, and skeletal muscle protein synthesis- and degradation-related genes were detected using Western blot. **Results** (1) Body weight was lower in the group H than group C, but there was no significant difference between the groups P and C during the intervention period. At the beginning of the intervention, the food intake of group H (which was the same as group P) was significantly lower than that of the group C, and there was no significant difference between the two groups. (2) After the intervention, the body weight and muscle mass were significantly lower in the group H compared to groups C and P; the wet weights of SOL and EDL muscles in the group H were significantly lower than those of the group C; and the FCSA of the EDL muscle was significantly lower in the group H than in groups C and P. (3) HIF1 α protein contents of the EDL muscle was significantly higher in the group H than group C; the ratio of p-Akt/Akt of the SOL muscle in the groups H and P was significantly lower than that of the group C; mTOR and 4EBP1 protein levels in the EDL muscle of group H was significantly lower than group C; atrogin1, MuRF1, and Beclin1 protein levels and the ratio of LC3II/I in EDL of the group H were significantly higher than those of the group C, and MuRF1 protein level in the SOL muscle of group H was significantly higher than that of the groups C and P. **Conclusions** Skeletal muscle atrophy caused by hypoxia is induced by hypoxia-specific factors, showing that decreased synthesis and decomposition of skeletal muscle proteins, which is manifested by a decrease in skeletal muscle protein synthesis and a decrease in decomposition of fast muscle fibers, rather than a decrease in food intake under hypoxia.

【Keywords】 hypoxic exposure; skeletal muscle atrophy; semi-starvation state; protein turnover-regulatory pathways; muscle types; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

高原是指海拔超过 2400 m 的环境^[1]。急进高原会给机体的生理和代谢系统带来多种不利影响,骨骼肌萎缩就是其中之一^[2]。高原低氧暴露可造成运动员肌肉力量和耐力丢失,影响高原训练效果。低氧所致的肌萎缩还表现出快慢肌的差异,不同类型的骨骼肌可能对低氧刺激产生不同的应答,从而影响运动员相应运动素质的发挥;随着高原旅游的兴起,世居平原者进入高原可能会发生的肌肉丢失和肌力下降,从而影响其体力活动和健康状况^[3]。低氧下机体组织器官会发生功能改变或释放出各种调节因子以直接和/或间接调控骨骼肌质量。低氧环境下食欲和消化吸收能力会受到抑制,使能量摄入不足,导致机体处于负能量平衡状态,诱发骨骼肌蛋白代谢失衡,影响肌肉质量的维持^[4]。相反观点认为低氧诱导的肌萎缩与摄食行为无关,营养良好情况下的低氧暴露仍会使肌肉质量无法维持,可能与低氧特异性因素对骨骼肌蛋白转化(蛋白合成和分解间的动态平衡)的改变有关^[5]。

低氧下骨骼肌蛋白的转化过程由多基因协同发挥作用^[6]。其中低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF1 α) 是关键的低氧调节因子,参与调控低氧应激下蛋白质代谢;丝氨酸/苏氨酸

激酶 (RAC- α serine/threonine-protein kinase, Akt), 又称作蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt), 是蛋白合成和分解的中枢因子,磷酸化后有活性^[7];哺乳动物雷帕霉素靶向基因 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 可整合细胞外多种信号刺激,影响基因转录及蛋白质合成^[8]。其下游的真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1, 4EBP1) 和核糖体蛋白 S6 激酶 β -1 (ribosomal protein S6 kinase beta-1, P70S6K1/S6K1) 参与蛋白合成的调控^[9];叉头框蛋白 O1 (forkhead box O1, FoxO1) 是调控蛋白分解两条重要通路的关键基因,包括泛素蛋白酶途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 和自噬溶酶体途径 (autophagy-lysosome pathway, ALP), 其中肌萎缩 F-box 1 (muscle atrophy F-box 1, Fbx32/atrogin1) 和肌肉特异性环指蛋白 1 (muscle-specific ring finger 1, MuRF1) 是 UPP 的重要基因^[10];微管相关蛋白 3 (microtubule associated protein light chain 3, Map1lc3/LC3) 和 B 细胞淋巴瘤-2 相互作用蛋白 1 (B-cell lymphoma-2 interacting protein 1, Beclin1) 是 ALP 的重要基因^[11]。

目前,关于低氧暴露所致肌萎缩的发生机制和肌肉类型的选择性尚不清楚,是否与低氧下摄食量

减少有关还存在争议。低氧暴露与摄食量不足所致的半饥饿状态下骨骼肌蛋白转化的差异还有待于进一步的探究。因此,本研究中通过低氧暴露和常氧配对低氧摄食干预大鼠后,对比不同类型骨骼肌蛋白转化调节的差异,以探明低氧暴露诱导骨骼肌萎缩发生的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

21 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重约为 230 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2015-0004】。饲养于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0034】。饲养期间各组大鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。所有操作均符合北京体育大学运动科学实验伦理学要求(审批号:IACUC 2017009 A)。

1.1.2 实验试剂

Anti-HIF1 α (Novusbio, NB100-479), Anti-pan-Akt (Abcam, ab8805), Anti-pSer473-Akt (Cell Signaling, 4060), Anti-mTOR (Abcam, ab2732), Anti-4EBP1 (Abcam, ab2606), Anti-p70S6K1 (Abcam, ab32529), Anti-FoxO1 (Abcam, ab52857), Anti-pSer256-FoxO1 (Abcam, ab131339), Anti-atrogin1/Fbx32 (Abcam, ab74023), Anti-MuRF1 (Abcam, ab172479), Anti-LC3B (Novusbio, NB100-2220), Anti-beclin1 (Abcam, ab207612)。

1.1.3 实验仪器

双能 X 射线骨密度仪 (dual energy X-ray absorptiometer, DEXA; Lunar Idxa, 美国),天平 (Sartorius, 美国),正置光学显微镜 (尼康, Nikon Eclipse E100, 日本),电泳槽和干转转膜系统 (Life Technologies, 美国),近红外光谱检测系统 (LI-COR, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

大鼠随机分为 3 组:①常氧正常饮食组 (C 组):常氧环境中自由饮食;②低氧正常饮食组 (H 组):置于氧浓度为 12.4% 的低氧房中 (模拟海拔 4000 m 高度),自由饮食;③常氧配对饮食组 (P 组):常氧环境中,控制其摄食量与 H 组配对 (H 组

前一天的摄食量,即为 P 组当天的投食量)。每组 7 只。

1.2.2 形态指标测试及取材

记录各组大鼠的摄食量和体重。4 周后,DEXA) 扫描大鼠体成分 (包括肌肉和脂肪总量);麻醉后取两侧比目鱼肌 (soleus, SOL) 和趾长伸肌 (extensor digitorum longus, EDL),称量湿重。一侧肌肉投入多聚甲醛固定液中固定,另一侧肌肉置于 -80℃ 保存,用于蛋白含量的测试。

1.2.3 HE 染色观察肌纤维形态及肌纤维横截面积 (muscle fiber cross-sectional area, FCSA) 的计算

骨骼肌组织在多聚甲醛中固定 24 h 后,修剪为约 5 mm³ 的组织块,石蜡包埋切片,HE 染色,封片后,10×40 倍镜下拍照,用 Image J 软件分析计算 FCSA。

1.2.4 Western Blot (WB) 测试骨骼肌蛋白含量

分别提取各肌肉蛋白后,BCA 法测定蛋白浓度,调整上样量为 20 μ g。使用梯度胶电泳分离蛋白,转至 NC 膜,封闭液封闭 1 h,4℃ 孵育一抗过夜,洗去未结合的一抗,室温孵育二抗 1 h,洗去未结合的二抗,近红外光谱检测系统检测条带信号值,Image Studio 软件对结果进行相对定量分析。

1.3 统计学分析

结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。所有数据均用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5 软件处理,多组间比较使用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠体重变化

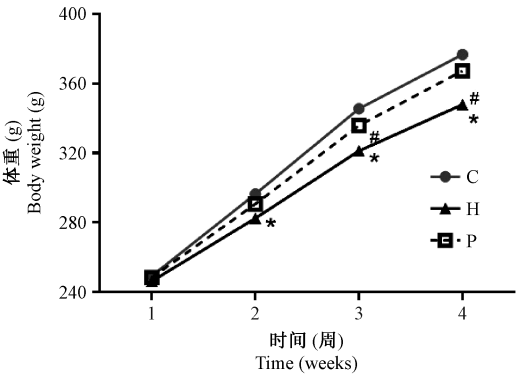
大鼠初始体重无明显差异,从第 2 周时,H 组体重较 C 组均显著下降 ($P < 0.05$),P 组与 C 组差别不大;干预 3 周、4 周时,H 组较 C 组和 P 组均显著下降 ($P < 0.05$),P 组较 C 组差异无显著性 (图 1)。

2.2 大鼠摄食量变化

干预期前 2 周,H 组大鼠 (P 组同) 日平均摄食量较 C 组显著下降 ($P < 0.05$),干预期后 2 周,H 组和 C 组间差异无显著性 (图 2)。

2.3 干预后大鼠体质量、肌肉质量和脂肪质量

4 周干预后,H 组大鼠体质量和肌肉总量较 C 组和 P 组显著性降低 ($P < 0.05$),P 组与 C 组间无差异;各组间脂肪量差异无显著性 (图 3)。

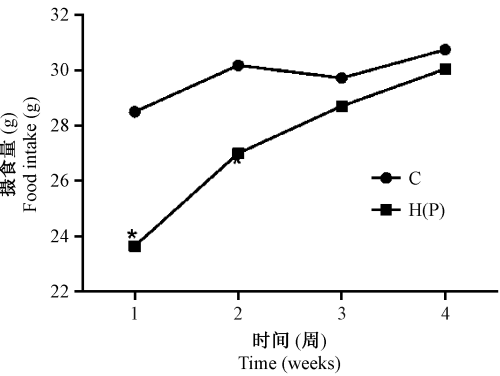


注:干预 2,3,4 周后,H 组体重与 C 组相比差异具有显著性, * $P < 0.05$ 。干预 3,4 周后,H 组体重与 P 组相比差异具有显著性, # $P < 0.05$ 。

图 1 体重变化

Note. After 2, 3, and 4 weeks of intervention, the difference in body weight between the groups H and C was significant, * $P < 0.05$. After 3 and 4 weeks of intervention, the difference in body weight between the groups H and P was significant, # $P < 0.05$.

Figure 1 Changes in body weight of the rats



注:干预 1,2 周时,H 组与 C 组相比具有显著性差异, * $P < 0.05$ 。

图 2 摄食量变化

Note. At 1 and 2 weeks of intervention, there was a significant difference between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 2 Changes in food intake of the rats

2.4 干预后大鼠骨骼肌湿重

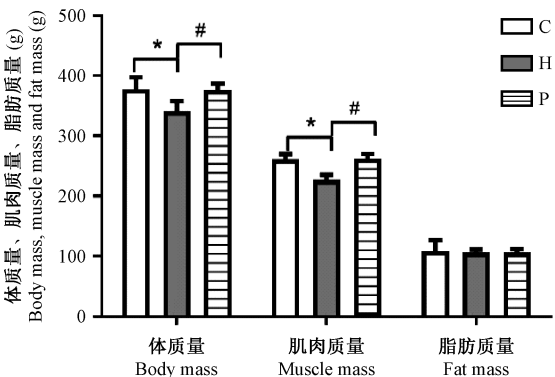
H 组 SOL 和 EDL 湿重较 C 组显著下降 ($P < 0.05$), P 组各肌肉湿重与 C 组接近 (图 4)。

2.5 干预后大鼠 FCSA

各组 SOL 的 FCSA 没有显著性差异;H 组 EDL 的 FCSA 较 C 组显著下降 ($P < 0.05$), H 组 EDL 的 FCSA 较 P 组显著下降 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.6 干预后大鼠骨骼肌 HIF1 α 蛋白含量

H 组大鼠 EDL 中 HIF1 α 蛋白含量较 C 组显著



注:H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。H 组与 P 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 干预后大鼠体重、肌肉质量和脂肪质量的变化

Note. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$. Compared between the groups H and P, # $P < 0.05$.

Figure 3 Changes in body weight, muscle mass and fat mass of the rats after intervention

增加 ($P < 0.05$), P 组与 C 组间无显著性差异;SOL 各组间 HIF1 α 蛋白含量无显著差异 (图 6)。

2.7 干预后大鼠骨骼肌 p-Akt 和 Akt 蛋白含量及两者比值

H 组大鼠 SOL 和 EDL 中 p-Akt 蛋白含量较 C 组显著下降, P 组 EDL 中 p-Akt 蛋白含量较 C 组显著下降 ($P < 0.05$) (图 7A, B); Akt 蛋白含量各组间无显著性差异 (图 7A, C); H 组和 P 组 SOL 中 p-Akt/Akt 显著低于 C 组 ($P < 0.05$), 而 EDL 中两者比值较 C 组无明显变化 (图 7D)。

2.8 干预后大鼠蛋白合成相关基因 (mTOR、4EBP1、p70S6K1) 蛋白含量

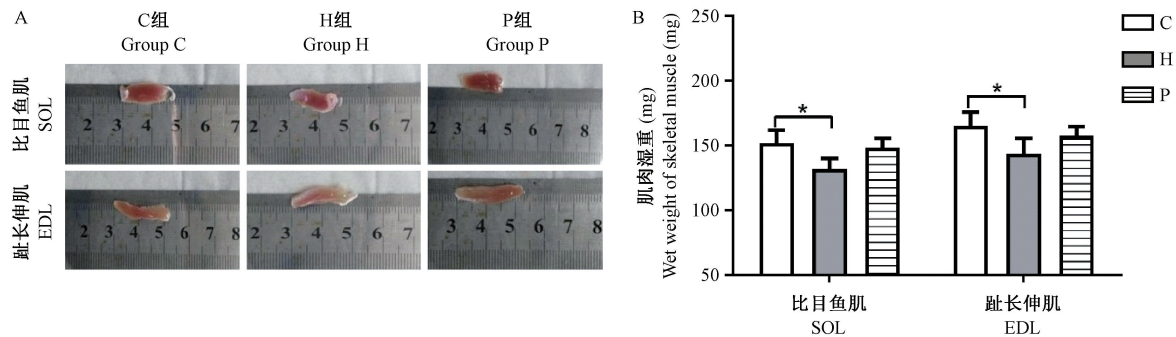
H 组大鼠 EDL 中 mTOR 蛋白含量较 C 组显著下降 ($P < 0.05$), P 组较 C 组无显著差异 (图 8A, B); H 组大鼠 EDL 中 4EBP1 蛋白含量较 C 组显著下降 ($P < 0.05$) (图 8C, D), 两肌肉中各组间 p70S6K1 蛋白含量无显著差异 (图 8C, E)。

2.9 干预后大鼠蛋白分解相关基因 (FoxO1、p-FoxO1、UPP 和 ALP 基因) 蛋白含量

P 组 SOL 中 p-FoxO1 蛋白含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$) (图 9A, B); 两肌肉中各组间 FoxO1 含量无显著差异 (图 9A, C); 两肌肉中各组间 p-FoxO1/FoxO1 比值间无显著差异 (图 9D)。

2.9.1 UPP 相关基因 (atrogin1、MuRF1) 蛋白含量

H 组大鼠 EDL 中 atrogin1 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$), P 组与 C 组间无显著差异 (图 10A, B); H 组两肌肉中 MuRF1 蛋白含量显著高于

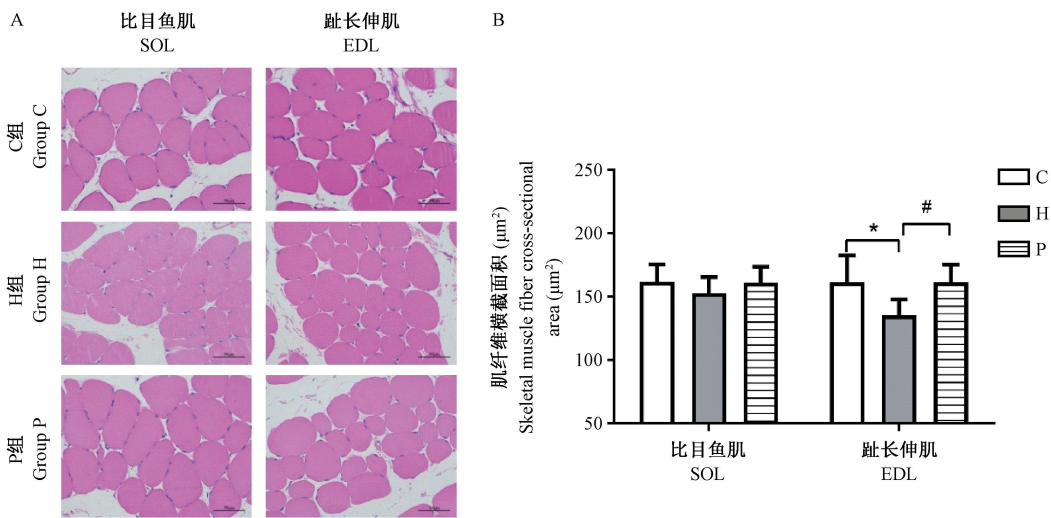


注:A. 各组大鼠 SOL 和 EDL 图片。B. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 干预后大鼠骨骼肌湿重

Note. A. Images of SOL and EDL muscles of the rats in each group. B. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 4 Wet weight of skeletal muscle in the rats after intervention



注:A. 肌纤维的组织学结构(HE 染色, $\times 400$, 标尺 = 50 μm)。B. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$; H 组与 P 组相比, # $P < 0.05$ 。

图 5 肌纤维形态与 FCSA

Note. A. Histological structure of muscle fibers ($\times 400$, HE staining. Bar = 50 μm). B. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$. Compared between the groups H and P, # $P < 0.05$.

Figure 5 Muscle fiber morphology and muscle fiber cross-sectional area of the rats

C 组, P 组 SOL 中 MuRF1 蛋白含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$) (图 10A, C)。

2.9.2 ALP 相关基因(LC3、beclin1)蛋白含量

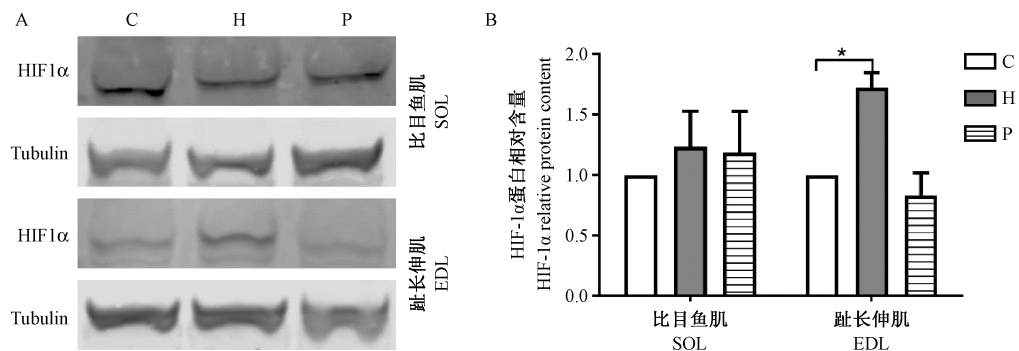
H 组大鼠 EDL 中 LC3 II 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$) (图 11A, B); H 组 SOL 中 LC3 I 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$) (图 11A, C); H 组 EDL 中 LC3 II / I 比值较 C 组显著上升 ($P < 0.05$), P 组与 C 组间无显著差异 (图 11D); H 组 EDL 中 beclin1 蛋白含量较 C 组显著上升 ($P < 0.05$), P 组与 C 组间无显著差异 (图 11A, E)。

3 讨论

世居平原者初上高原时常会出现骨骼肌质量的丢失。本研究,发现大鼠暴露在模拟海拔 4000 m 的低氧环境中,体重、肌肉总量、肌肉湿重和 FCSA 均出现下降,证明低氧暴露确可诱导肌萎缩的发生。

3.1 低氧暴露下摄食量变化对骨骼肌质量的调节作用

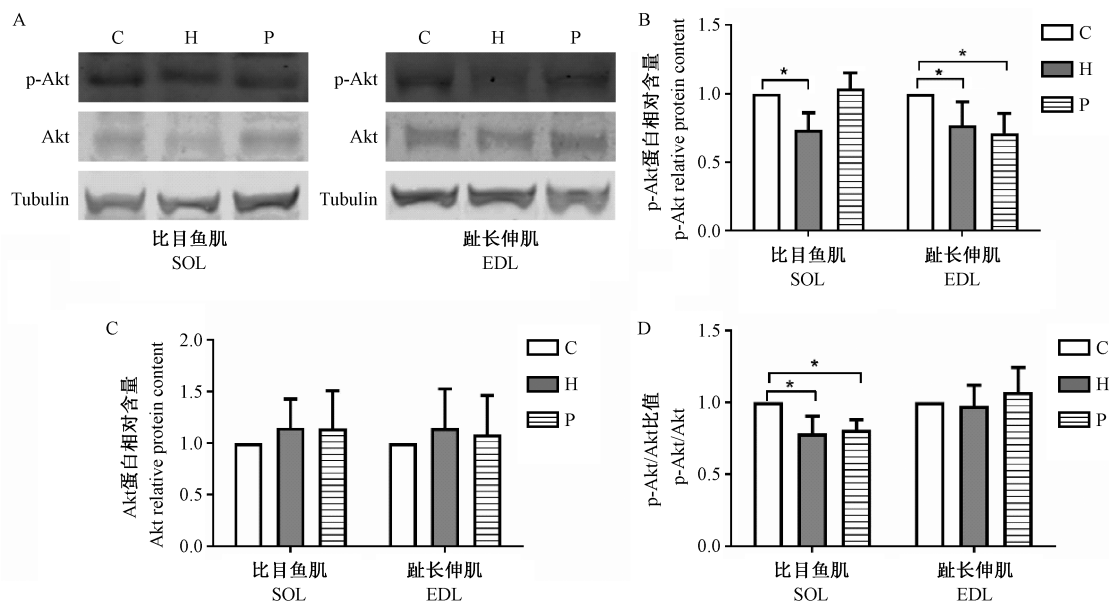
本研究观察到大鼠摄食量在低氧暴露初期下降,后期恢复正常;P 组体重随着干预时间延长逐渐接近 C 组,其肌肉质量、湿重和 FCSA 与 C 组均差异不大,提示低氧所致肌萎缩可能并非因摄食量减少



注:A. HIF1α 的 WB 结果。B. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。
图 6 HIF1α 蛋白条带(A)和相对含量(B)

Note. A. Western Blot of HIF1α. B. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 6 HIF1α protein bands (A) and relative content (B) of skeletal muscles of the rats



注:A. p-Akt 和 Akt 的 WB 结果。B&C&D. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。
图 7 p-Akt 和 Akt 蛋白条带(A)和相对含量(B&C)以及两者比值(D)

Note. A. Western Blot results of p-Akt. B, C and D. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

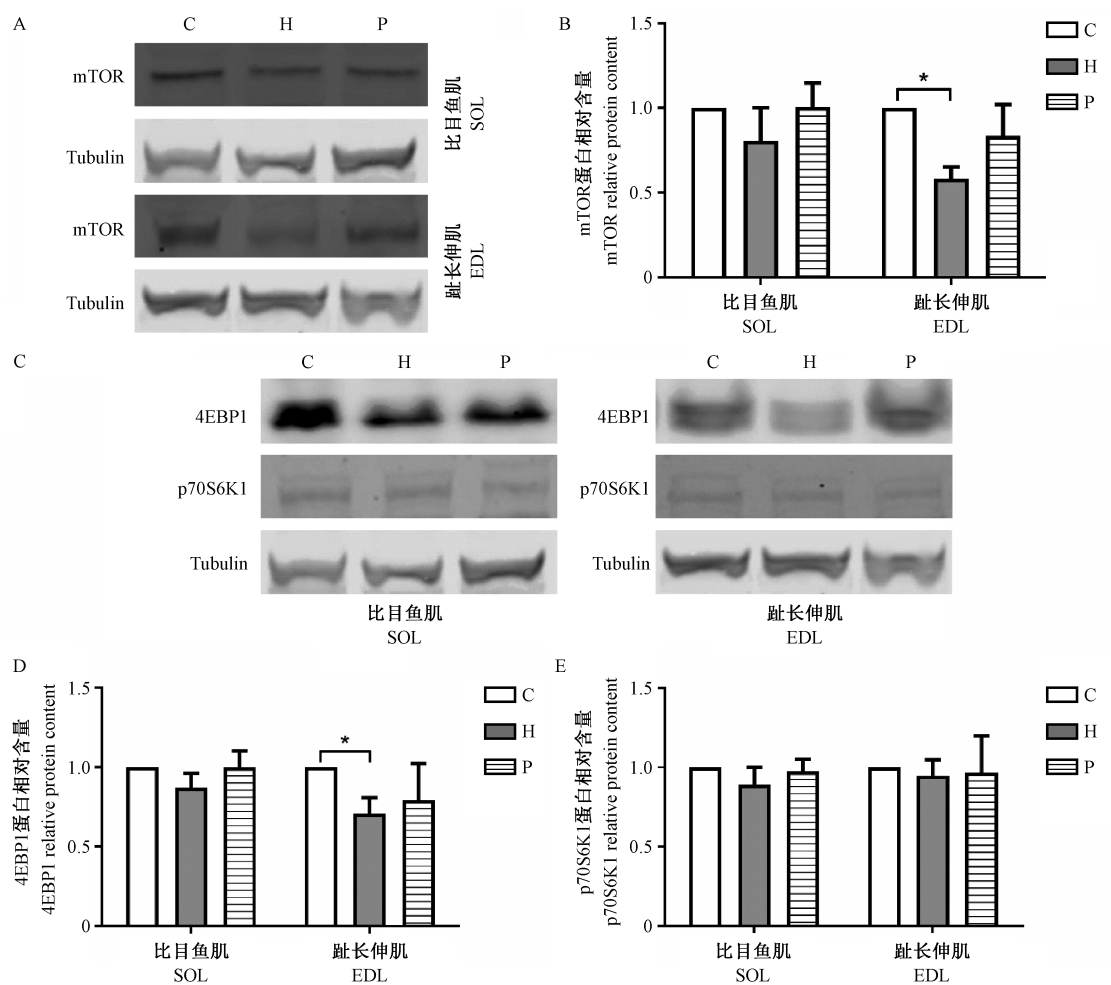
Figure 7 Protein bands (A), relative content (B, C) and p-Akt/Akt (D) ratio of the rat skeletal muscles

引起。低氧暴露初期体重和摄食量下降,可能原因是下丘脑、胃肠及脂肪组织中的胃促生长素(ghrelin)、多肽 YY 激素(peptide YY, PYY)、胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 和瘦素(Leptin) 等食欲调节激素的水平在低氧下发生改变^[12],但随时间延长,机体肠道通透性和葡萄糖摄取量不再发生改变,机体主观食欲和摄食量逐渐回升,体重和肌肉质量恢复至常氧水平^[13]。

3.2 低氧暴露和半饥饿状态下骨骼肌蛋白转化调节的变化

低氧暴露下骨骼肌蛋白转化效率提高是诱导

肌萎缩发生的关键,表现为蛋白合成速率低于分解速率。HIF1α 是转录调控的关键因子,参与低氧适应性反应过程,在骨骼肌蛋白的转化调节中发挥重要作用^[14]。本研究 H 组 EDL 中 HIF1α 含量显著增加,而 P 组较 C 组则无明显变化。HIF1α 的稳定表达是其在低氧环境中发挥生理效应的关键。HIF1α 的靶基因碳酸酐酶 9 (carbonic anhydrase IX, Ca-9) 仅在持续低氧暴露 (21 d) 后显著增加,而常氧控食则不会诱导 Ca-9 的表达增加^[15]。Akt 是蛋白合成和分解的中枢调节因子。本研究中 P 组 p-Akt/Akt 比值较 C 组无明显变化。Akt 被磷酸化激活后,可



注:A&C. mTOR、4EBP1 和 p70SK61 的 WB 结果。B&D&E. H 组与 C 组相比, **P* < 0.05。

图 8 mTOR、4EBP1 和 p70SK61 蛋白条带 (A&C) 和相对含量 (B&D&E)

Note. A&C. Western Blot. Protein bands of mTOR, 4EBP1 and p70SK61. B, D and E. Compared between the groups H and C, **P* < 0.05.

Figure 8 Protein bands (A&C) and relative content of mTOR, 4EBP1 and p70SK61 (B&D&E) in skeletal muscles of the rats

进一步激活 mTOR 及下游 mTOR 复合物 1/2(mTOR complex 1/2,mTORC1/2),抑制结节性硬化复合物 1 和 2(tuberous sclerosis complex 1/2,TSC1/2)表达以促进蛋白质合成;p-Akt 还可通过促进 FoxO1 蛋白磷酸化而抑制蛋白质分解。HIF1 α 可抑制 Akt 的表达,急性低氧可降低 Akt 磷酸化水平,持续低氧会增加 Akt 总量,导致 p-Akt/Akt 下降^[16]。

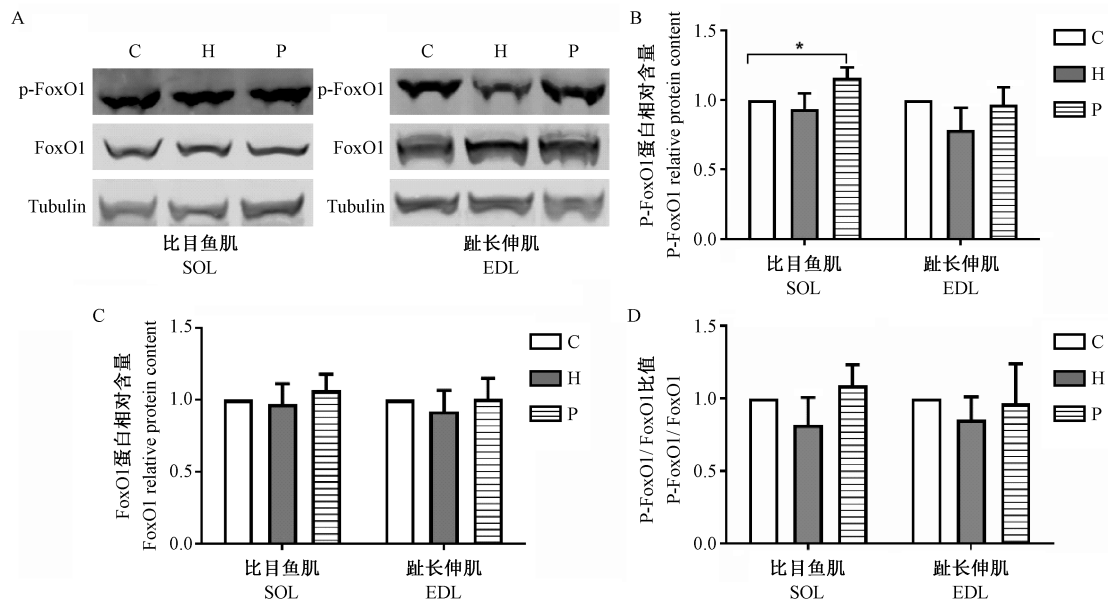
3.2.1 蛋白合成相关基因的变化

mTOR 可调节下游 4EBP1 和 p70SK61 促进骨骼肌蛋白质合成。4EBP1 激活后,与 eIF4E 分离;p70SK61 在磷酸肌醇激酶 1 催化下活化,两者共同促进 mRNA 的翻译^[16]。本研究 H 组 EDL 中 mTOR、4EBP1 含量较 C 组显著下降,P 组相关蛋白水平无明显变化。低氧可通过 AMP 依赖蛋白激酶 (Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated

protein kinase,AMPK)进一步激活 TSC2,阻碍 mTOR 及其下游 4EBP1 和 p70S6K1 的表达,抑制骨骼肌蛋白合成。有研究显示,mTOR 通路相关基因在低氧暴露 4 d 并未发生显著变化,21 d 后显著降低,而半饥饿干预初期和末期,机体 mTOR 通路均未发生显著变化^[5]。

3.2.2 蛋白分解相关基因的变化

FoxO1 作为调节骨骼肌质量的关键转录因子,可介导 UPF 和 ALP 以促进骨骼肌蛋白分解。它受 p-Akt 调节,p-FoxO1 出核失活^[17]。本研究 P 组 p-FoxO1/FoxO1 比值较 C 组无显著差异。低氧通过抑制 Akt 活性而减少 p-FoxO1,间接促进蛋白分解相关基因表达;同时直接增加 FoxO1 的表达,促进骨骼肌萎缩发生。E3 泛素连接酶 atrogin1 和 MuRF1—骨骼肌蛋白分解途径中重要的限速酶,其

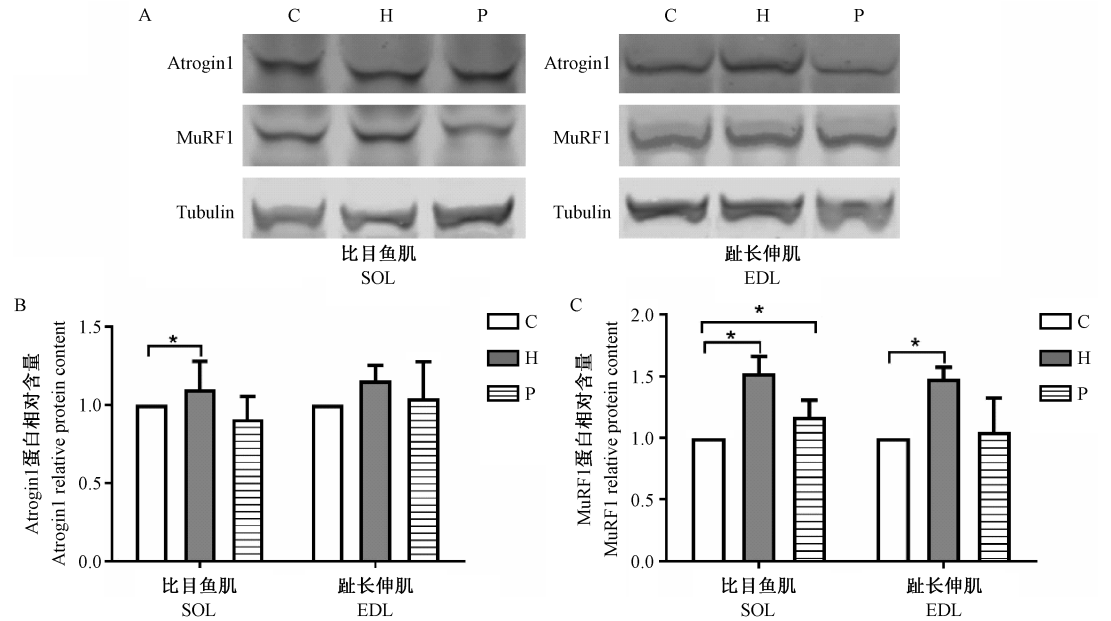


注: A. p-FoxO1 和 FoxO1 的 WB 结果。B&C&D. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 9 p-FoxO1 和 FoxO1 蛋白条带 (A) 和相对含量 (B&C) 及两者比值 (D)

Note. A. Western Blot analysis of p-FoxO1 and FoxO1. B, C and D. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 9 Protein bands (A), relative contents (B, C) and p-FoxO1/FoxO1 ratio (D) in skeletal muscles of the rats



注: A. atrogin1 和 MuRF1 的 WB 结果; B&C. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

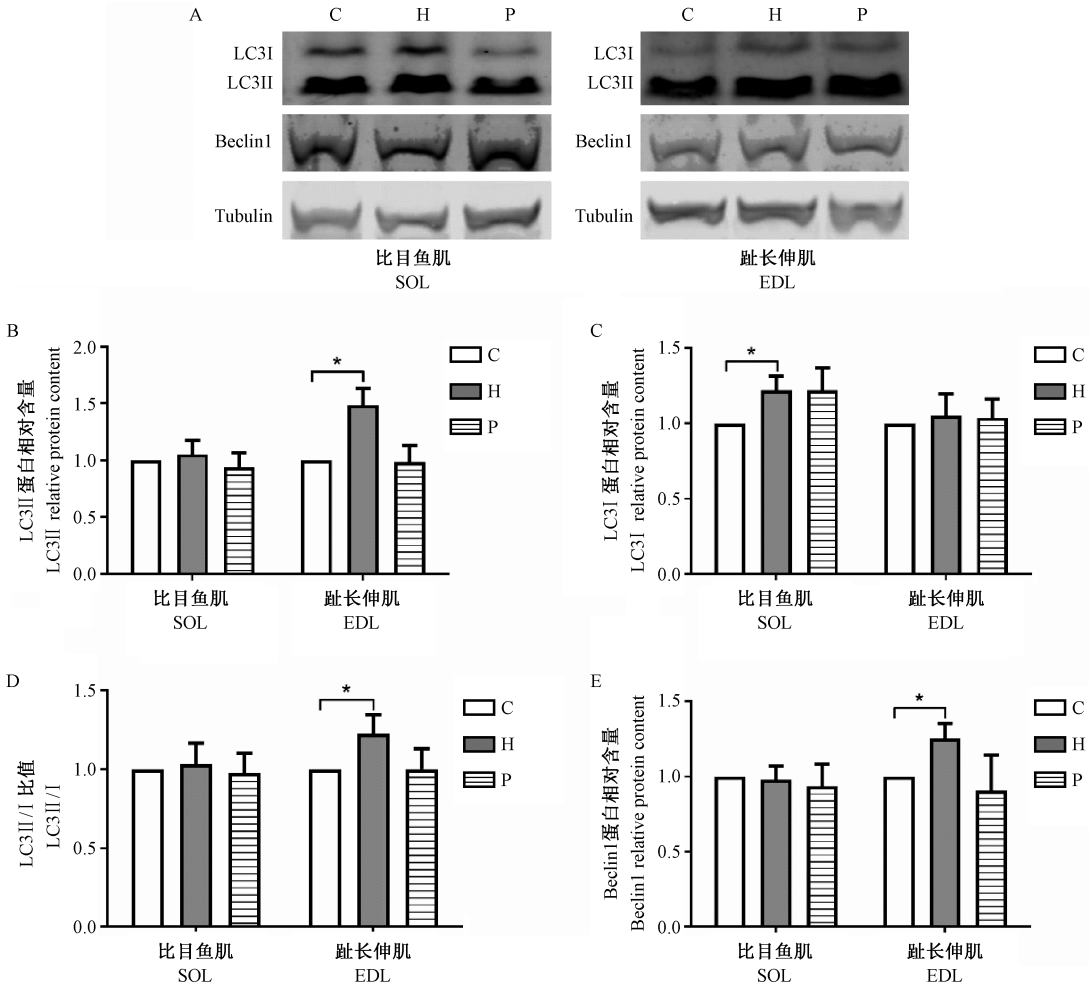
图 10 atrogin1 和 MuRF1 蛋白条带 (A) 和相对含量 (B&C)

Note. A. Western Blot results of atrogin1 and MuRF1. B, C. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 10 Protein bands (A) and relative content of atrogin1 and MuRF1 (B, C) of the rat skeletal muscles

表达的増加可作为 UPP 激活的标志,受 FoxO1 调控;LC3 和 beclin1 表达増加是溶酶体蛋白被激活的标志。其中 LC3 是自噬体形成阶段的标志,经剪切修饰变成胞质蛋白 LC3-I,LC3-I 与磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamines, PE) 共价结合形成 LC3-

II,有助于自噬体双层膜闭合,LC3-II/I 常作为衡量自噬通量的关键指标;beclin1 是自噬执行者,调控自噬前体形成,引导部分自噬相关蛋白定位于自噬体膜。两者表达受 FoxO1 正调控。本研究 H 组 EDL 中 atrogin1、MuRF1、beclin1 蛋白含量及 LC3 II/



注:A. LC3 和 beclin1 的 WB 结果。B&C&D&E. H 组与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 11 LC3 和 beclin1 蛋白条带(A)和相对含量(B&C&D&E)

Note. A. Western Blot results of LC3 and beclin1. B, C. Compared between the groups H and C, * $P < 0.05$.

Figure 11 Protein bands (A), relative content and ratio of LC3 and beclin1 in skeletal muscles of the rats (B, C, D and E)

I 比值显著高于 C 组,而 P 组与 C 组间无显著差异,这与其他研究类似。低氧不仅可通过调节 FoxO1 以促进下游 UPP 和 ALP 相关蛋白表达,也可直接作用于分解蛋白,如 beclin1 的启动子包含一个功能性低氧反应元件(hypoxia response element, HRE),可在低氧状态下直接促进蛋白分解^[18]。

3.3 低氧暴露诱导骨骼肌萎缩的肌肉类型差异

低氧所致肌萎缩常伴有肌肉类型差异。本研究中 H 组 SOL 和 EDL 湿重均出现显著下降,但 SOL 的 FCSA 较 C 组未出现减少,提示低氧所致骨骼肌萎缩可能选择性发生于快肌。不同类型骨骼肌可通过不同的途径参与对慢性低氧暴露的适应性改变。EDL 对低氧的反应主要表现在 UPP 和 ALP 相关基因的表达增加,而 SOL 则对低氧特异性因素的反应较小,对摄食量减少较为敏感。本研究低氧下

EDL 中 HIF1 α 、4EBP1、atrogen1、beclin1 水平和 LC3 II/I 比值显著增加,而这些基因在 SOL 中则没有显著变化。研究认为,atrogen1 的表达增加可能是快肌对皮质酮和糖皮质激素受体信号的敏感性增加的结果,E3 泛素连接酶表达的增加可能更多的依赖于低氧刺激,而非摄食量的变化;HIF1 α 靶基因 beclin 1 是 bcl-2 家族中的低氧诱导成员,低氧诱导的 EDL 中 beclin1 的增加独立于摄食量的影响^[19]。

参 考 文 献(References)

[1] Askew EW. Nutrition and performance in hot, cold and high altitude environments [J]. Nutr Exercise Sport, 1998, 597-619.
[2] Chaudhary P, Sharma YK, Sharma S, et al. High altitude mediated skeletal muscle atrophy: Protective role of curcumin [J]. Biochimie, 2019, 156: 138-147.
[3] Hoppeler H, Kleinert E, Schlegel C, et al. Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia[J]. Int J

- Sports Med, 1990, 11(S1): S3-S9.
- [4] Millet GP, Debevec T, Brocherie F, et al. Commentaries on Viewpoint: Human skeletal muscle wasting in hypoxia: a matter of hypoxic dose? [J]. J Appl Physiol, 2017, 122(2): 409-411.
- [5] Edwards LM, Murray AJ, Tyler DJ, et al. The effect of high-altitude on human skeletal muscle energetics: 31P-MRS results from the Caudwell Xtreme Everest Expedition [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10681.
- [6] 赵建文, 银欢, 苏秋香. 大鼠肌卫星细胞移植失神经骨骼肌的形态学观测[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(3): 50-52+56+90.
- Zhao JW, Yin H, Su QX. Morphological observation on denervated skeletal by transplantation of skeletal muscle by transplantation of satellite cell in rats[J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(3): 50-52+56+90.
- [7] de Theije C, Costes F, Langen RC, et al. Hypoxia and muscle maintenance regulation: implications for chronic respiratory disease [J]. Cur Opin Clin Nutr Metab Care, 2011, 14(6): 548-553.
- [8] Ren H, Accili D, Duan C. Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(13): 5857-5862.
- [9] Koritzinsky M, Rouschop KM, van den Beucken T, et al. Phosphorylation of eIF2alpha is required for mRNA translation inhibition and survival during moderate hypoxia [J]. Radiother Oncol, 2007, 83(3): 353-361.
- [10] Razeghi P, Baskin KK, Saumya S, et al. Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(2): 361-364.
- [11] Sandri M. Autophagy in skeletal muscle [J]. FEBS Lett, 2010, 584(7): 1411-1416.
- [12] Debevec T, Simpson EJ, Mekjavic IB, et al. Effects of prolonged hypoxia and bed rest on appetite and appetite-related hormones [J]. Appetite, 2016, 107(12): 28-37.
- [13] Debevec T. Hypoxia-related hormonal appetite modulation in humans during rest and exercise: mini review [J]. Front Physiol, 2017, 8(5): 366.
- [14] Ren H, Accili D, Duan C. Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(13): 5857-5862.
- [15] Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases [J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 7075-7083.
- [16] Arsham AM, Howell JJ, Simon MC. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets [J]. J Biol Chem, 2003, 278(32): 29655-29660.
- [17] McLoughlin TJ, Smith SM, DeLong AD, et al. FoxO1 induces apoptosis in skeletal myotubes in a DNA-binding-dependent manner [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297(3): C548-555.
- [18] Al-Qusairi L, Prokic I, Amoasii L, et al. Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways [J]. FASEB J, 2013, 27(8): 3384-3394.
- [19] de Theije CC, Langen RC, Lamers WH, et al. Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy [J]. J Appl Physiol, 2015, 118(2): 200-211.

[收稿日期] 2019-03-01