

唐婧,徐韦琳,刘蓉,等. AKT/mTOR 通路介导自噬参与肩袖撕裂相关肌肉萎缩运动康复的分子机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(1): 59-66, 126.

Tang J, Xu WL, Liu R, et al. Molecular mechanisms of autophagy mediated by AKT/mTOR pathway in exercise rehabilitation of rotator cuff tear-related muscle atrophy [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(1): 59-66, 126.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.01.006

# AKT/mTOR 通路介导自噬参与肩袖撕裂相关肌肉萎缩运动康复的分子机制

唐婧,徐韦琳,刘蓉,王洪涛\*

(武汉市东西湖区人民医院康复医学科,武汉 430040)

**【摘要】** 目的 探讨蛋白激酶 B (AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路介导自噬参与肩袖撕裂 (RCTs) 相关肌肉萎缩运动康复的分子机制。方法 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分配到假手术组、RCTs 组、RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组,每组 10 只。在分组处理后第 8 周,通过组织学分析骨-肌腱界面愈合和肌肉细胞萎缩情况。通过实时定量逆转录聚合酶链反应测量网上肌肉组织中肌肉萎缩相关基因 (*Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1*) 的 mRNA 表达水平。通过免疫蛋白印迹检测不同组网上肌组织中 LC3、AKT/mTOR 信号通路表达,通过透射电子显微镜分析各组中自噬体的产生。结果 与假手术组相比,RCTs 组网上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分、网上肌纤维横截面积显著降低 ( $P<0.001$ ),肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著增加 ( $P<0.001$ )。与 RCTs 组相比,RCTs+运动组网上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分、网上肌纤维横截面积显著增加 ( $P<0.01$ ),肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著降低 ( $P<0.01$ )。与假手术组相比,RCTs 组网上肌组织中 LC3 I/LC3 II、自噬体的数量显著增加 ( $P<0.001$ ),p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 显著降低 ( $P<0.01$ )。与 RCTs 组相比,RCTs+运动组 LC3 I/LC3 II、自噬体的数量显著降低 ( $P<0.01$ ),p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 显著增加 ( $P<0.001$ )。雷帕霉素的加入显著逆转了 RCTs+运动组的康复效果。结论 本研究确定了运动康复在 RCTs 疾病中抗萎缩作用,其作用机制与激活 AKT/mTOR 信号抑制自噬有关。

**【关键词】** 蛋白激酶 B;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;肩袖撕裂;小鼠;肌肉萎缩;自噬

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 01-0059-08

## Molecular mechanisms of autophagy mediated by AKT/mTOR pathway in exercise rehabilitation of rotator cuff tear-related muscle atrophy

TANG Jing, XU Weilin, LIU Rong, WANG Hongtao\*

(Department of Rehabilitation Medicine, Wuhan Dongxihu District People's Hospital, Wuhan 430040, China)

**【基金项目】** 湖北省卫生健康委员会科研项目 (WJ2021M039);武汉市医学科研项目 (WX20D12)。

**【作者简介】** 唐婧 (1987—),女,主治医师,研究方向:骨科康复治疗。E-mail: spwm840@163.com

**【通信作者】** 王洪涛 (1974—),男,副主任医师,研究方向:颈椎病、腰椎间盘突出、骨性关节炎等骨骼肌肉疾病的康复治疗。

E-mail: kangfu2023@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the molecular mechanism of autophagy mediated by the protein kinase B (AKT)/mammalian target protein of rapamycin (mTOR) pathway in the rehabilitation of muscle atrophy associated with rotator cuff tears (RCTs). **Methods** Forty male C57BL/6J mice were randomly assigned to the following four groups: sham group, RCTs group, RCTs + exercise group, and RCTs + exercise + rapamycin group, with 10 mice in each group. On the eighth week after grouping, healing of the bone-tendon interface and muscle cell atrophy were analyzed by histology. The mRNA expression levels of muscle-atrophy-related genes (*Atrogin-1*, *Bnip 3*, *MuRF-1*) in supraspinatus muscle tissue were measured by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The expression of LC3 and AKT/mTOR signal pathway proteins in the supraspinatus muscle tissue of the groups was detected by Western blot, and the degree of autophagy in each group was analyzed by transmission electron microscope. **Results** Compared with the sham operation group, in RCTs group's maturity score for the bone-tendon interface at the supraspinatus tendon anchorage and the cross-sectional area of the supraspinatus muscle fibers decreased significantly ( $P < 0.001$ ), while muscle loss and the expression of *Atrogin-1*, *Bnip 3*, and *MuRF-1* increased significantly ( $P < 0.001$ ). Compared with the RCTs group, the RCTs + exercise group showed a significant increase in bone-tendon interface maturity score and cross-sectional area of the supraspinatus muscle fibers ( $P < 0.01$ ) and a decrease in muscle loss and the expression of *Atrogin-1*, *Bnip 3*, and *MuRF-1* ( $P < 0.01$ ). Compared with the sham group, the RCTs group's LC3 I/LC3 II and degree of autophagy in the supraspinatus muscle increased significantly ( $P < 0.001$ ), while p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR expression decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with RCTs group, the RCTs + exercise group's LC3 I/LC3 II and degree of autophagy decreased significantly ( $P < 0.01$ ) and p-AKT/AKT and p-mTOR/mTOR expression increased significantly ( $P < 0.001$ ). The addition of rapamycin significantly reversed the rehabilitation effect of exercise in the RCTs group. **Conclusions** This study confirmed the anti-atrophy effect of exercise rehabilitation in RCT diseases and showed that its mechanism is related to AKT/mTOR signal activation, which inhibits autophagy.

**【Keywords】** protein kinase B; mammalian target protein of rapamycin; rotator cuff tears; mice; muscle atrophy; autophagy

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

肩袖撕裂(rotator cuff tears, RCTs)是最常见的导致肩部疼痛、肌肉萎缩和肌腱断裂的原因<sup>[1]</sup>。在小鼠肩袖撕裂模型中,肩袖肌肉上的撕裂大小和伴随的神经损伤会导致肌肉萎缩<sup>[2]</sup>。肌肉萎缩可导致肌肉重量和肌肉长度减少,它是影响肩袖修复效果的决定性因素,即使在成功修复的微环境中也是不可逆的<sup>[3]</sup>。肌肉萎缩的特征是蛋白质降解增强和蛋白质合成减少,过度的肌肉蛋白质降解可能导致肌肉坏死<sup>[4]</sup>。自噬-溶酶体系统是细胞的主要蛋白水解途径,在肌肉萎缩过程中被协同激活。研究表明,一些指定的萎缩相关基因也属于自噬-溶酶体系统,如 LC3,表明自噬参与萎缩过程<sup>[5-6]</sup>。研究发现,在自噬体形成和自噬中至关重要的蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路在萎缩的肌肉中被阻断<sup>[7]</sup>。此外,肌肉细胞中 AKT/mTOR 通路的激活也抑制了禁食期间自噬体形成和蛋白质降

解<sup>[8]</sup>。众所周知,禁食可诱导肌肉萎缩,提示激活 AKT/mTOR 信号通路可能通过抑制自噬来改善肌肉萎缩。值得注意的是,多项研究显示,运动康复能激活肌肉细胞中 AKT/mTOR 通路,并有助于改善肌肉萎缩<sup>[9-10]</sup>。由于术后运动是影响 RCTs 愈合过程的重要因素,有必要探索适当的运动康复计划是否有助于改善 RCTs 相关肌肉萎缩。本研究评估了运动康复在小鼠 RCTs 模型中的抗肌肉萎缩作用,并深入探讨其作用机制是否与 AKT/mTOR 通路介导的自噬抑制有关。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重(22±1)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011]。动物饲养在华中科技大学实验动物中心[SYXK(鄂)2023-1075]。饲养环境为:12 h/12 h 光/暗循环,湿度、

温度保持在 $(55\pm 5)\%$ 、 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$ ,自由获取食物和水。食物由碳水化合物、水、蛋白质、脂肪和粗纤维的混合物组成,比例分别为 50%、9%、18%、6%和 4%。实验方案由武汉市东西湖区人民医院伦理研究委员会批准(SC2021-1024),按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

## 1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(批号:WS201101)、苏木精-伊红(HE)(批号:C1005)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;PDS 缝线购自美国 Ethicon 公司;雷帕霉素(mTOR 抑制剂,批号:P130825)购自美国 MCE 公司;RNeasy 试剂盒(批号:227047290)购自德国 Qiagen 公司;逆转录酶试剂盒(批号:2707A)、qPCR 试剂盒(批号:T210127Y)购自美国 Promega 公司;乙酸铀酰(批号:20190-605)购自美国 Merck 公司;BCA 试剂盒(批号:MSTr100T)购自北京沃比森科技有限公司;聚偏二氟乙烯膜购自美国 Millipore 公司;抗-LC3(批号:2059)、mTOR(批号:2559)、DAPDH(批号:3561)均购自美国 Proteintech 公司;抗 p-mTOR(批号:2448)、AKT(批号:1059)、p-AKT(批号:3021)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

ABI PRISM 7900HT 系统购自美国 Applied Biosystems 公司;15 号刀片购自杭州华威医疗用品有限公司;RM2125 切片机购自德国 Leica 公司;CX31 透射光显微镜购自日本 Olympus 公司;DigiGait 系统购自美国 Mouse Specifics 公司;超灵敏荧光/化学发光成像系统 chemiscope 6300 购自上海勤翔科学仪器有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 动物分组

将动物随机分配为假手术组、RCTs 组、RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组,每组 10 只。在手术前 1 周,RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组小鼠在跑步机接受适应训练计划:5 m/min(第 1 天)、10 m/min(第 2 天)、15 m/min(第 3 天)、20 m/min(第 4~5 天),每天运动 20 min,第 6 天休息,第 7 天手术。

根据文献报道<sup>[11]</sup>,小鼠接受了单侧冈上肌腱脱离和左肩修复。手术后 3 d,RCTs+运动组和 RCTs+运动+雷帕霉素组中的所有小鼠按指定的跑步机速度,5 m/min(第 0~2 周)、10 m/min(第

3~4 周)、15 m/min(第 5~8 周),运动 20 min/d,每周运动 5 d。此外,RCTs+运动+雷帕霉素组在术后用雷帕霉素(0.1 mg/100 g,mTOR 抑制剂)经尾静脉注射治疗 2 周。雷帕霉素用 PBS 稀释,其余 3 组用等容载体(PBS)尾静脉注射处理。在手术后第 8 周采集冈上肌腱-肱骨复合体标本,在去除肌腱和疤痕组织后立即分析冈上肌的湿重。

### 1.3.2 组织学分析

将冈上肌腱-肱骨复合体标本用 HE 染色。使用透射光显微镜捕获所有组织学图像。使用先前研究的改良腱骨成熟评分对组织学图像进行半定量评分<sup>[12]</sup>,该评分包括细胞性、血管性、连续性、纤维软骨细胞和疤痕组织,按 1~4 的等级进行评分。得分越高表示骨-肌腱界面愈合越好,得分为 20 分表示接近健康或成熟良好。

对于肌肉组织分析,将肌肉组织切割成合理大小(0.5~1 cm),并在 4%多聚甲醛中固定超过 24 h,用 HE 染色。通过显微镜鉴定冈上肌的形态和组织学,并使用 Image J 1.8.0 软件进行分析。

### 1.3.3 实时定量逆转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)检测

使用显微镜收集每组麻醉小鼠的再生骨-肌腱界面愈合组织。暴露冈上肌腱和肱骨后,小心地剥离不相关的组织,如疤痕组织,并在大结节上的插入位置分离冈上肌腱。用 15 号刀片收集愈合的骨-肌腱界面愈合组织(直到海绵骨暴露出来)。使用 RNeasy 试剂盒提取愈合组织总 RNA。然后,使用 1  $\mu\text{g}$  总 RNA 和逆转录酶试剂盒合成互补 DNA。使用 qPCR 试剂盒进行 qRT-PCR,然后在 ABI PRISM 7900HT 系统上扩增。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法分析基因表达值。用于扩增的引物序列如下: *Atrogin-1*: F-5'-CCCTGAACTCTGCACCAAGT-3', R-5'-TGGAGTGGATGGATGGGGA T-3'; *Bnip 3*: F-5'-GAGCCGATCTGAAGAGGG A-3', R-5'-GCTTGACGTGTGGCTTGTTTC-3'; *MuRF-1*: F-5'-GGACCCGCTTTCTTCCACAG-3'; R-5'-TCGAATCGCCGTCTTTCTGT-3'; *GAPDH*: F-5'-TGGTCTCAGTGTAGCCCAAG-3', R-5'-CTGCCAGAACATCATCCCT-3'。

### 1.3.4 步态数据分析

在手术后 8 周,使用 DigiGait 系统进行步态数据分析以测量的前肢功能。所有小鼠在 DigiGait 系统上以 10 cm/s 的速度行走 10 s。选择步幅长度、站立宽度、最大站立时的爪子面积、步幅频率和站立时间作为评估前肢功能的参数。

### 1.3.5 自噬体测量

在 4 °C 下将冈上肌切成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块,并用固定液在 4 °C 下固定 24 h。然后,在 1% 锇酸中再固定 2 h。采用乙酸铀酰染色 3 h,包埋、切片,用乙酸铀酰和柠檬酸铅对切片进行染色,并进行自噬体染色,在透射电子显微镜下观察自噬体并拍照。

### 1.3.6 免疫蛋白印迹法

对冈上肌总蛋白提取和免疫印迹。在含蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟的 RIPA 裂解液中对冈上肌样品匀浆。将匀浆在 4 °C 下以 15 000 r/min 离心 10 min。将上清液在 95 °C 水浴中煮沸 5 min。使用 10%~12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离可溶性蛋白质,然后转移到聚偏二氟乙烯膜上。分别使用针对 LC3、AKT、p-AKT、

mTOR、p-mTOR 和 GAPDH(1 : 1000) 的一级抗体检测蛋白质水平。GAPDH 用于内部控制。将膜与 HRP 偶联的第二抗体(1 : 3000)一起孵育 2 h。使用增强化学发光试剂显现蛋白质条带,并使用超灵敏荧光/化学发光成像系统 chemiscope 6300 成像。基于 Quantity One 4.6.2 软件对蛋白质表达进行相对定量分析。

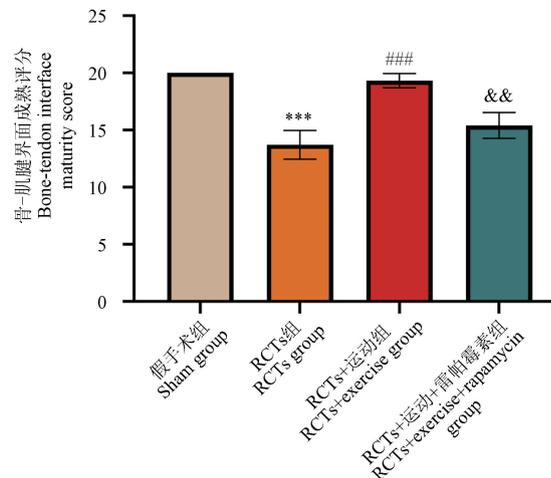
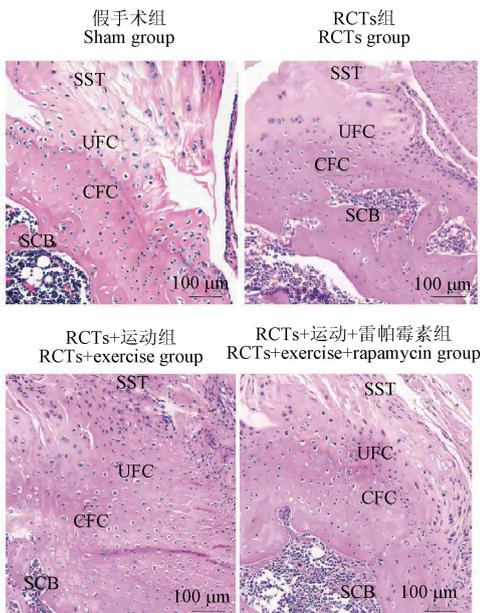
### 1.4 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件对数据进行统计分析。所有数据均以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。然后,对于参数数据,使用单因素方差分析(ANOVA)来分析多组之间差异显著性。对于所有测试, $P<0.05$  表示具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 组织学评估小鼠骨-肌腱界面愈合情况

本实验中没有动物意外死亡。如图 1 所示,在术后 8 周,RCTs 组、RCTs+运动组、RCTs+运动+雷帕霉素组在冈上肌腱和肱骨之间的损伤界面出现明显的纤维软骨层。其中,RCTs+运动组纤维软骨细胞成熟,呈串珠状分布,与应力方向一



注:CFC:钙化纤维软骨;SCB:软骨下骨;SST:冈上肌腱;UFC:未钙化纤维软骨。与假手术组相比,\*\*\* $P<0.001$ ;与 RCTs 组相比,### $P<0.001$ ;与 RCTs+运动组相比,&& $P<0.01$ 。

图 1 各组冈上肌腱-肱骨复合体标本的 HE 染色代表图及评分

Note. CFC, Calcified fibrocartilage. SCB, Subchondral bone. SST, Supraspinatus tendon. UFC, Uncalcified fibrocartilage. Compared with sham group, \*\*\* $P<0.001$ . Compared with RCTs group, ### $P<0.001$ . Compared with RCTs+ exercise group, && $P<0.01$ .

Figure 1 HE staining representative diagram and score of supraspinatus tendon-humerus complex specimens in each group

致。与假手术组相比, RCTs 组冈上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分显著降低 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组冈上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分显著增加 ( $P < 0.001$ ), 而 RCTs+运动+雷帕霉素组冈上肌腱止点骨-肌腱界面成熟评分较 RCTs+运动组显著降低 ( $P < 0.01$ )。

## 2.2 运动减轻肌腱横断诱导的 RCTs 冈上肌萎缩

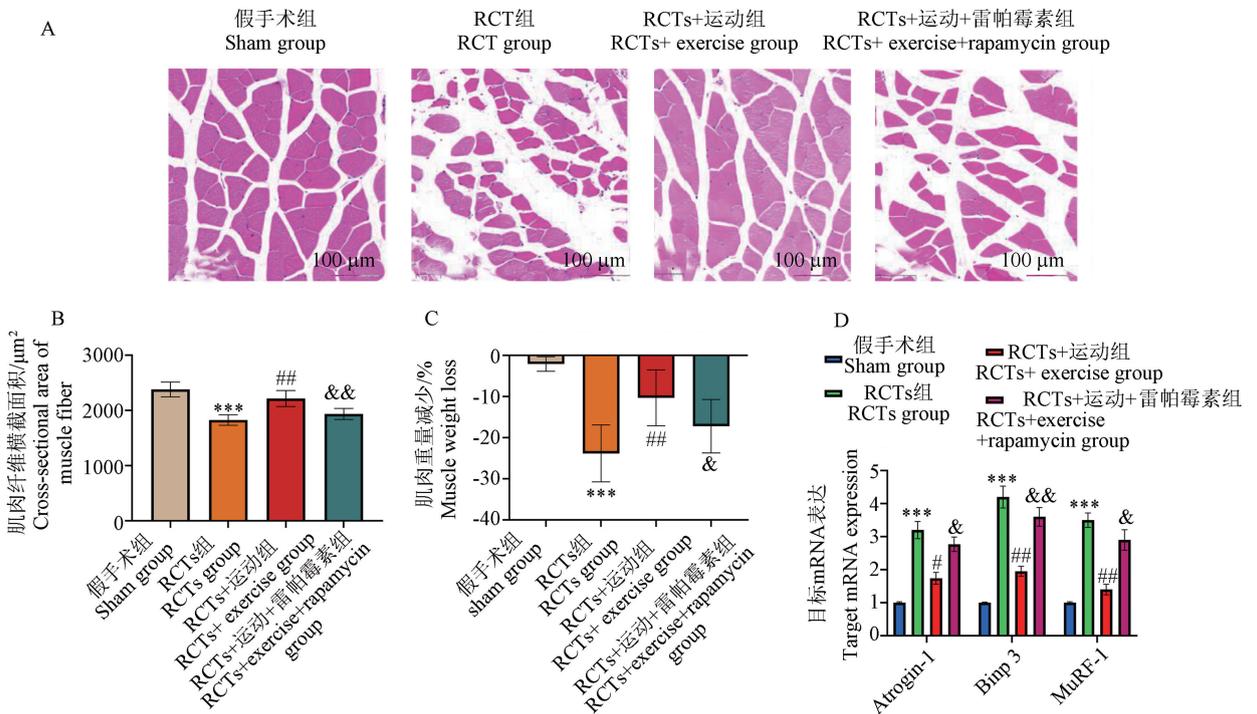
HE 染色评价肌肉病理变(图 2)。在术后 8 周, 与假手术组相比, RCTs 组冈上肌纤维横截面积显著降低 ( $P < 0.001$ ), 和肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著增加 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组冈上肌纤维横截面积显著增加 ( $P < 0.01$ ), 和肌肉损失以及 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导肌肉萎缩和损失的改善作用 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 运动步态分析

各组运动步态分析结果见表 1 所示。在术后 8 周, 与假手术组相比, RCTs 组步幅长度、触地宽度、最高站立爪面积、站立时间显著降低 ( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ ), 步频显著增加 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组步幅长度、触地宽度、最高站立爪面积、站立时间显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 步频显著降低 ( $P < 0.05$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导运动步态的改善作用 ( $P < 0.05$ )。

## 2.4 运动对 AKT/mTOR 信号通路介导的自噬影响

在术后 8 周, 如图 3 所示与假手术组相比, RCTs 组冈上肌组织中 LC3 I/LC3 II 显著增加 ( $P < 0.001$ ), p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组 LC3 I/LC3 II 显著降低 ( $P < 0.05$ ), p-AKT/AKT、p-



注: A、B; 术后 8 周各组冈上肌切片的 HE 染色及纤维横截面积的定量分析; C; 肌肉重量损失情况的定量分析; D: 各组冈上肌组织中 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达。与假手术组相比, \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 RCTs 组相比, #  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ ; 与 RCTs+运动组相比, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ 。

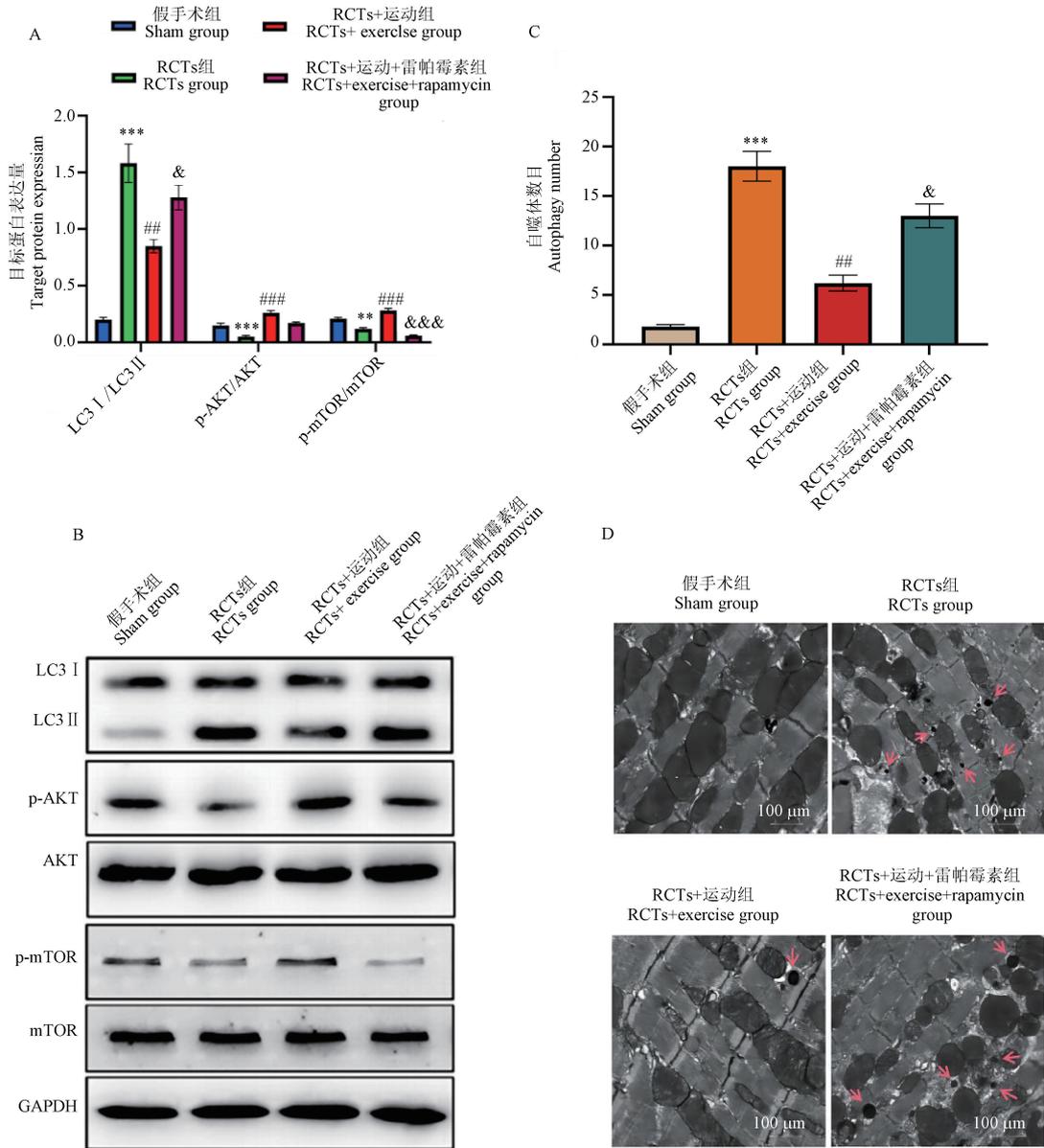
图 2 运动减轻肌腱横断诱导的 RCTs 冈上肌萎缩

Note. A, B, 8 weeks after operation, HE staining of supraspinatus muscle sections in each group and quantitative analysis of fiber cross-sectional area. C, Quantitative analysis of muscle weight loss. D, *Atrogin-1*, *Bnip 3* and *MuRF-1* gene expression in supraspinatus muscle tissue of each group. Compared with sham group, \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with RCTs group, #  $P < 0.05$ , #  $P < 0.01$ . Compared with RCTs+exercise group, &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$ .

Figure 2 Exercise relieves RCTs supraspinatus muscular atrophy induced by tendon transection

mTOR/mTOR 显著增加 ( $P < 0.001$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导 AKT/mTOR 信号通路的改善作用 ( $P < 0.001$ ) (图 3A、3B)。随后研究进行了透射电子显微镜分析以评估各组中自噬体的产生。与假手术组相比, RCTs 组冈

上肌组织中自噬体的数量显著增加 ( $P < 0.001$ )。与 RCTs 组相比, RCTs+运动组冈上肌组织中自噬体的数量显著减少 ( $P < 0.01$ )。而雷帕霉素的加入显著抑制了运动对 RCTs 诱导自噬体数目的改善作用 ( $P < 0.05$ ) (图 3C、3D)。



注:A、B:通过免疫蛋白印迹评估不同组小鼠冈上肌组织中 LC3 和 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达及定量分析;C、D:通过透射电镜扫描冈上肌中自噬体囊泡及囊泡数量的定量分析,红色箭头表示自噬体。与假手术组相比, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ;与 RCTs 组相比, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ ;与 RCTs+运动组相比, &  $P < 0.05$ , &&&  $P < 0.001$ 。

图 3 运动对 AKT/mTOR 信号通路介导的自噬影响

Note. A, B. Expression and quantitative analysis of LC3 and AKT/mTOR signaling pathway proteins in supraspinatus muscle of different groups of mice were evaluated by Western blot. C, D. Quantitative analysis of autophagy vesicles and vesicles in supraspinatus muscle by transmission electron microscope scanning. The red arrow indicates autophagy. Compared with sham group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Compared with RCTs group, ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$ . Compared with RCTs+exercise group, &  $P < 0.05$ , &&&  $P < 0.001$ .

Figure 3 Effects of exercise on autophagy mediated by AKT/mTOR signaling pathway

表 1 各组运动步态分析

Table 1 Analysis of gait of mice in each group

组别 Groups	步幅长度/cm Stride length	触地宽度/cm Stance width	最高站立爪面积/cm <sup>2</sup> Paw area peak stance	步频/(steps/s) Stride frequency	站立时间/s Stance time
假手术组 Sham group	2.98±0.83	2.41±0.86	0.29±0.13	3.42±0.40	0.25±0.01
RCTs 组 RCTs group	1.67±0.48 <sup>***</sup>	1.27±0.27 <sup>***</sup>	0.15±0.01 <sup>***</sup>	5.61±0.26 <sup>***</sup>	0.11±0.01 <sup>***</sup>
RCTs+运动组 RCTs+exercise group	2.66±0.55 <sup>##</sup>	2.07±0.32 <sup>##</sup>	0.26±0.04 <sup>##</sup>	4.08±0.62 <sup>#</sup>	0.20±0.04 <sup>#</sup>
RCTs+运动+雷帕霉素组 RCTs+exercise+rapamycin group	1.82±0.53 <sup>&amp;</sup>	1.38±0.42 <sup>&amp;</sup>	0.16±0.03 <sup>&amp;</sup>	5.62±0.25 <sup>&amp;</sup>	0.12±0.01 <sup>&amp;</sup>
<i>F</i>	13.97	22.56	16.84	11.42	14.58
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ;与 RCTs 组相比, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ ;与 RCTs+运动组相比, & $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham group, \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ . Compared with RCTs group, # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ . Compared with RCTs+exercise group, & $P<0.05$ .

### 3 讨论

目前认为 RCTs 是不可自行修复的,需要通过手术治疗为 RCTs 提供了愈合的机会。术后康复对于实现高水平的功能恢复非常重要<sup>[13]</sup>。肌肉萎缩是导致手术修复后临床效果不佳的主要障碍之一。因此,肌肉萎缩的改善可能为手术修复后的 RCTs 患者带来良好的结局。在本研究中发现小鼠 RCTs 模型中,运动康复能通过激活 AKT/mTOR 信号通路和调节肌细胞自噬来改善冈上肌萎缩。由于成本高且管理复杂,很少使用大型动物模型,例如牛、山羊和绵羊等,来模拟 RCTs 损伤。兔子性情温和且相对容易控制,常用于模拟 RCTs 损伤,但它们不能像啮齿动物一样耐受手术和传染病的压力<sup>[14]</sup>。小鼠模型可用于各种 RCTs 病理学研究,因为它们的细胞和组织生理学与人类相似;此外,小鼠模型比大鼠模型更有优势,因为可以利用基因改造的菌株来测试特定信号通路和分子变化对骨-肌腱界面发育和修复的影响<sup>[15]</sup>。

RCTs 模型中的肌肉萎缩涉及复杂的蛋白质网络和分子机制。肌肉萎缩盒 Fbox-1 蛋白 (muscle atrophy Fbox, Atrogin-1)、BCL2/腺病毒 E1B 19 kDa 蛋白相互作用蛋白 3 (BCL2/Adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3, Bnip3) 和肌环指蛋白-1 (muscle ring finger protein-1, MuRF-1) 已被证明与骨骼肌萎缩的调节过程有关<sup>[16]</sup>。LC3-II 是自噬体形成的最广泛使

用的标志,被确定参与肩袖肌腱疾病的进展<sup>[17]</sup>。这些基因受 AKT/mTOR 信号通路调节,该通路是泛素-蛋白酶体和自噬-溶酶体系统中的关键控制器,提示自噬系统在骨骼肌萎缩的进展中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。新的研究已经证实,自噬是肩袖损伤发展中的一个重要过程<sup>[4]</sup>。同样,本研究在 RCTs 组萎缩的冈上肌中发现 *Atrogin-1*、*Bnip 3*、*MuRF-1* 基因表达、LC3-II 蛋白表达和自噬体的产生数量较假手术组显著增加。然而,在接受运动干预的 RCTs 小鼠中,RCTs 诱导的这些变化均得到显著改善,表明运动干预可能通过抑制过度自噬减轻肌肉萎缩。骨骼肌中的蛋白质合成主要受 AKT/mTOR 途径的调节<sup>[19]</sup>。此外,AKT/mTOR 途径是骨骼肌自噬的关键负调节因子。因此,AKT 及其下游信号 mTOR 的快速激活有助于成年小鼠或肌肉细胞培养物中的蛋白质合成、自噬体抑制和细胞生长<sup>[20]</sup>。这些数据表明 AKT/mTOR 信号通路负调节肌细胞中自噬体形成和蛋白质的降解过程。本研究发现运动干预上调了 RCTs 受损骨骼肌中 AKT/mTOR 信号。此外,mTOR 抑制剂减弱了运动对骨骼肌的抗萎缩作用,提示在肩袖撕裂疾病期间,运动通过激活 AKT/mTOR 信号抑制自噬,进而改善了肌肉萎缩。

先前的研究证实,骨-肌腱界面愈合过程包括“骨折”界面和肌腱界面之间的病理和生理相互作用,通常包括初始反应期的炎症、新骨和纤维软骨形成以及骨重塑和纤维软骨成熟<sup>[21]</sup>。机

械刺激是影响骨-肌腱界面愈合的重要因素<sup>[22]</sup>。研究表明,通过使用肉毒杆菌毒素注射麻痹冈上肌来减少机械刺激有利于骨-肌腱界面的早期愈合<sup>[23]</sup>。然而,完全去除负荷是有害的,会导致修复效果不佳<sup>[24]</sup>。最近一项研究比较了不同运动强度对 RCTs 骨-肌腱界面愈合的影响,结果强调了适当的机械刺激对骨-肌腱界面愈合的重要性,其中高强度机械刺激是最有害的术后康复计划,相比之下,递增强度运动对骨-肌腱界面愈合的修复效果最好<sup>[25]</sup>。本研究借鉴先前的递增强度运动康复方案,并证实了该方案有效促进了骨-肌腱界面愈合过程。我们认为,早期的低强度运动不仅保持了手术治疗所确定的愈合界面的解剖连续性,而且提供了适当低的机械刺激以促进早期骨-肌腱界面修复过程。随着机械刺激强度的增加,新形成骨的性质逐渐改善。在骨-肌腱界面愈合的中期和晚期,有必要加强机械刺激,以促进骨和纤维软骨的愈合、重建和成熟。本研究通过步态分析证实了递增强度运动康复改善了小鼠的前肢功能。因此,在临床 RCTs 康复中选择递增强度的运动康复方案可能有助于促进患者康复。

综上,本研究确定了递增强度运动康复在 RCTs 疾病中抗萎缩作用,其作用机制与激活 AKT/mTOR 信号抑制自噬有关。本研究结果支持在 RCTs 手术后使用一个简单渐进的运动康复计划促进患者康复。

#### 参考文献:

[ 1 ] LIU Y, FU S C, LEONG H T, et al. Evaluation of animal models and methods for assessing shoulder function after rotator cuff tear: a systematic review [J]. *J Orthop Translat*, 2021, 26: 31-38.

[ 2 ] CHEN C, ZHOU H, YIN Y, et al. Rotator cuff muscle degeneration in a mouse model of glenohumeral osteoarthritis induced by monoiodoacetic acid [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2023, 32(3): 500-511.

[ 3 ] SCHANDA J E, HEHER P, WEIGL M, et al. Muscle-specific micro-ribonucleic acids miR-1-3p, miR-133a-3p, and miR-133b reflect muscle regeneration after single-dose zoledronic acid following rotator cuff repair in a rodent chronic defect model [J]. *Am J Sports Med*, 2022, 50(12): 3355-3367.

[ 4 ] PRASETIA R, PURWANA S Z B, LESMANA R, et al. The pathology of oxidative stress-induced autophagy in a chronic rotator cuff enthesis tear [J]. *Front Physiol*, 2023,

14: 1222099.

[ 5 ] LAUTHERBACH N, GONÇALVES D A P, SILVEIRA W A, et al. Urocortin 2 promotes hypertrophy and enhances skeletal muscle function through cAMP and insulin/IGF-1 signaling pathways [J]. *Mol Metab*, 2022, 60: 101492.

[ 6 ] AOYAMA S, NISHIDA Y, UZAWA H, et al. Monitoring autophagic flux *in vivo* revealed its physiological response and significance of heterogeneity in pancreatic beta cells [J]. *Cell Chem Biol*, 2023, 30(6): 658-671.

[ 7 ] YIN D, LIN D, XIE Y, et al. Neuregulin-1 $\beta$  alleviates sepsis-induced skeletal muscle atrophy by inhibiting autophagy via AKT/mTOR signaling pathway in rats [J]. *Shock*, 2022, 57(3): 397-407.

[ 8 ] DETHLEFSEN M M, BERTHOLDT L, GUDIENSEN A, et al. Training state and skeletal muscle autophagy in response to 36 h of fasting [J]. *J Appl Physiol*, 2018, 125(5): 1609-1619.

[ 9 ] HORII N, HASEGAWA N, FUJIE S, et al. Resistance exercise-induced increase in muscle 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone contributes to the activation of muscle Akt/mTOR/p70S6K- and Akt/AS160/GLUT4-signaling pathways in type 2 diabetic rats [J]. *FASEB J*, 2020, 34(8): 11047-11057.

[ 10 ] YIN L, LU L, LIN X, et al. Crucial role of androgen receptor in resistance and endurance trainings-induced muscle hypertrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt-mTOR pathway [J]. *Nutr Metab*, 2020, 17: 26.

[ 11 ] LIU Y, WANG L, LI S, et al. Mechanical stimulation improves rotator cuff tendon-bone healing via activating IL-4/JAK/STAT signaling pathway mediated macrophage M2 polarization [J]. *J Orthop Translat*, 2022, 37: 78-88.

[ 12 ] YOUNG B L, SHEPPARD E D, PHILLIPS S, et al. Caffeine intake does not appear to impair tendon-to-bone healing strength in a rat rotator cuff repair model [J]. *JSES Int*, 2022, 6(3): 463-467.

[ 13 ] PIERRE P S, MILLETT P J, ABBOUD J A, et al. Consensus statement on the treatment of massive irreparable rotator cuff tears: a Delphi approach by the near Circle of the American shoulder and elbow surgeons [J]. *J Shoulder Elbow Surg*, 2021, 30(9): 1977-1989.

[ 14 ] 许博洋, 庞小娟, 曾禹铭, 等. 肩袖肌腱损伤诱导性动物模型构建评价及研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(4): 545-550.

XU B Y, PANG X J, ZENG Y M, et al. Evaluation and progress of the construction of a rotator cuff tendon injury-induced animal model [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2020, 28(4): 545-550.

[ 15 ] MOSER H L, ABRAHAM A C, HOWELL K, et al. Cell lineage tracing and functional assessment of supraspinatus tendon healing in an acute repair murine model [J]. *J Orthop Res*, 2021, 39(8): 1789-1799.