

自噬途径在低氧暴露诱导骨骼肌萎缩中的调节作用机制

付鹏宇^{1,2} 贾杰² 朱榕鑫³ 于加倍⁴ 邹北阳² 龚丽景^{2,5*}

(¹西北工业大学体育部, 西安 710072; 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(上海市反兴奋剂中心), 上海 200030; ⁴北京市体育科学研究所, 北京 100075;

⁵运动与体质健康教育重点实验室, 北京 100084)

摘要 该研究拟通过在体和离体实验观察低氧暴露诱导肌萎缩现象, 并探究其作用机制是否与自噬途径有关。SD大鼠进行低氧(氧浓度为12.4%)暴露干预。4周后, 测量体质量、瘦体质量、体成分、趾长伸肌(EDL)湿重, 观察肌纤维形态, 计算肌纤维横截面积(FCSA), PCR芯片分析自噬差异表达基因功能。在低氧环境下使用自噬抑制剂3-MA干预L6肌管细胞, 检测自噬关键蛋白选择性自噬接头蛋白(p62)、肌球蛋白样BCL2结合蛋白1(Beclin1)、微管蛋白轻链3(LC3)的表达, 统计肌管直径, 检测肌萎缩相关蛋白肌球蛋白重链(Myosin)、肌肉特异性环指蛋白1(MuRF1)和肌萎缩F-box蛋白(Atrgin1)的表达。结果显示, 大鼠低氧后, 体质量、瘦体质量及其百分含量、EDL湿重及其百分含量、FCSA显著降低($P<0.05$, $P<0.01$); 低氧后EDL中自噬差异基因表达以上调为主, 功能主要富集于自噬囊泡形成等过程; L6肌管细胞在低氧暴露下, 自噬关键蛋白表达增加, 肌萎缩相关蛋白表达增加, 肌管直径减小, 而在低氧条件下使用抑制剂3-MA, 可抑制自噬, 缓解肌管萎缩($P<0.05$)。结果表明, 低氧暴露可通过提高自噬水平导致肌萎缩的发生, 自噬前期的激活在其中发挥重要作用。

关键词 低氧暴露; 肌萎缩; 自噬; PCR芯片

The Regulatory Mechanism of Autophagy Pathway in Hypoxia Exposure-Induced Skeletal Muscle Atrophy

FU Pengyu^{1,2}, JIA Jie², ZHU Rongxin³, YU Jiabei⁴, ZOU Beiyang², GONG Lijing^{2,5*}

(¹Department of Physical Education, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China; ²China Institute of Sport and Health Science, Beijing Sport University, Beijing 100084, China; ³Shanghai Research Institute of Sports Science (Shanghai Anti-Doping Center), Shanghai 200030, China; ⁴Beijing Research Institute of Sports Science, Beijing 100075, China; ⁵Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Abstract This study intends to observe the phenomenon of hypoxia exposure-induced muscle atrophy through *in vivo* and *in vitro* experiments, and to explore whether its mechanism of action is related to the autophagy pathway. SD rats were exposed to hypoxia (12.4% O₂). After 4 weeks, the body weight, body composition, wet weight of EDL (extensor digitorum longus) were measured. Muscle fiber morphology was observed; muscle FCSA (fiber cross-sectional area) was calculated, and the function of autophagy differentially expressed genes was ana-

收稿日期: 2021-02-04 接受日期: 2021-04-19

西北工业大学文美文科交叉学科方向培育项目(批准号: 0201021GH0311)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2018GJ017)和国家自然科学基金(批准号: 31771317)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62989303, E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

Received: February 4, 2021 Accepted: April 19, 2021

This work was supported by the Social Science Funds for Interdisciplinary Subject, NPU (Grant No.0201021GH0311), the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Grant No.2018GJ017) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771317)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62989303, E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

lyzed by PCR array. In hypoxic environment, the autophagy inhibitor 3-MA was used to intervene in L6 myotube cells and the protein expressions of SQSTM1/p62 (sequestosome 1), Beclin1 (coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein 1), LC3 (microtubule-associated protein light chain) (key autophagy protein), Myosin (myosin heavy chain), MuRF1 (muscle-specific ring finger 1), Atrogin1 (muscle-specific F-box protein) (muscle atrophy related protein) and the myotube diameter were detected. The results showed that the body weight, lean body mass and its percentage, EDL wet weight and its percentage, FCSA were significantly reduced after hypoxia ($P<0.05$, $P<0.01$); The expression of autophagy differential genes in EDL was mainly up-regulated, and the function was mainly enriched in the process of autophagic vesicle formation after hypoxia; the expression of key autophagy and muscle atrophy-related proteins increased, and myotubes diameter decreased in L6 myotube cells after hypoxia, while the expression levels of key autophagy proteins were inhibited, and the degrees of myotube atrophy were relieved after the use of the inhibitor 3-MA under hypoxia ($P<0.05$). The results showed that hypoxia exposure can lead to muscle atrophy by increasing the level of autophagy, and the activation of the early stage of autophagy played an important role in this process.

Keywords hypoxia exposure; muscle atrophy; autophagy; PCR array

低氧环境会对骨骼肌代谢造成一系列不良影响, 诱发骨骼肌萎缩^[1], 主要表现为肌纤维横截面积 (fiber cross section area, FCSA) 减小, 肌纤维类型转变和肌肉功能下降^[2]。骨骼肌质量的维持取决于蛋白质代谢的平衡, 当分解速率高于合成速率时, 肌肉质量净损失^[3]。研究发现, 低氧暴露下骨骼肌-蛋白质的转化率提高, 表现为蛋白质合成和分解程度 (分别为1.5倍和5倍上调) 均增加, 但蛋白质分解速率远高于合成速率, 是诱发肌萎缩的主要因素^[4-5]。

自噬过程是重要的蛋白质分解途径。在应激条件下, 部分细胞质或细胞器被包裹进特异性膜结构的自噬体中, 自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 大分子蛋白在此被降解为氨基酸等小分子物质^[6]。其过程主要包括: (1) 自噬的启动和成核; (2) 自噬体形成; (3) 自噬溶酶体形成; (4) 自噬溶酶体降解。其中(1)、(2)为自噬前期, (3)、(4)为自噬后期。自噬过程是一个复杂的多蛋白参与的过程^[7], 肌球蛋白样 Bcl-2结合蛋白1(coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein 1, Beclin1)可以招募自噬相关蛋白, 启动吞噬细胞成核。成核过程还需与泛素样微管蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)形成复合物, LC3I经过剪切和修饰成为LC3II, 标志着自噬体的形成。LC3II/I用于衡量自噬通量^[8-10]。选择性自噬接头蛋白1(sequestosome 1, SQSTM1/p62)可被自噬体膜特异性结合, 与LC3结合并招募泛素化蛋白转运至自噬体^[10](自噬体形成, p62表达降低^[11])。自噬水平增加可诱发肌肉萎缩^[12]。海拔5 300 m的急性

暴露可以上调热休克同源71 kDa蛋白介导的自噬, 提示急性高原暴露可激活自噬^[13]。而自噬是否参与中等海拔慢性低氧诱导的肌萎缩过程尚不明确, 了解低氧暴露影响骨骼肌自噬途径的具体阶段, 有利于选择合适的自噬抑制剂以缓解肌萎缩。

为了探究自噬途径在低氧诱导肌萎缩中的具体作用途径, 本研究对大鼠进行4周低氧暴露, 观察骨骼肌质量和形态的改变, 使用自噬PCR芯片明确自噬参与低氧诱导肌萎缩的具体过程; 在低氧环境下对L6肌管细胞施加相应自噬抑制剂, 检测自噬蛋白和肌萎缩相关蛋白质的表达, 以明确自噬在低氧诱导肌萎缩中的作用途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF级雄性SD大鼠购自北京维通利华实验动物中心, 动物使用许可证号: SCXK(京)2015-0001; 大鼠L6成肌细胞由本实验室保存。

1.2 实验试剂及仪器

仪器和试剂包括: 制氮机(北京创文气体设备有限公司), 冻干机(杭州超滤净化设备有限公司), 空气压缩机(美国Ingersoll Rand公司), 双能X射线吸收测量法(dual energy X-ray absorptiometry, DEXA)体成分分析仪(XR-46)(美国Norland公司), 自噬PCR芯片(PCR array)(spTWCPCPART-0002)(上海启因生物科技有限公司), 低氧小室(27310)(加拿大STEMCELL Technologies公司), 胎牛血清(fetal bovine serum,

FBS)、马血清(horse serum, HS)、胰酶(Tryple)(美国 Thermo Fisher Scientific公司), 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA) (HY-19312)(美国 MedChemExpress 公司), Laminin抗体(ab11575)、SQSTM1/p62抗体(ab109012)、Beclin1抗体(ab207612)、Myosin抗体(ab124205)、MuRF1抗体(ab172479)、Atrogin1抗体(ab74023)(英国 Abcam公司), LC3B抗体(NB100-2220)(美国 Novus Biologicals公司), 荧光二抗(山羊抗兔)(GB21303)(武汉赛维尔生物科技有限公司), 二抗(山羊抗兔)(926-68071)、二抗(山羊抗鼠)(926-32210)、封闭液、近红外光谱(Near Infrared, NIR)检测系统(Odyssey CLX)(美国 LI-COR Biosciences公司), 多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司), 4%~12% Bis-Tris 和 3%~8% Tris Acetate梯度胶(NW04125&EA03755)、MES/Tris-Acetate SDS Running Buffer(B0002/LA0041)、NC Regular Stack(IB23001)(美国 Invitrogen公司)。

1.3 研究对象及分组

40只健康 SPF级雄性 SD大鼠, 起始体质量约(236.40 ± 10.69) g, 随机分为: 常氧组(C组)和低氧组(H组, 置于12.4% O₂的低氧房中, 模拟海拔4 000 m高度), 每组10只共干预4周。所有实验操作过程符合北京体育大学运动科学伦理委员会实验动物伦理要求(伦理审批号: 2017009), 饲养环境为北京体育大学动物实验室(SYXK(京)2016-0034), 环境温度为(22 ± 2) °C, 湿度为50%~70%, 12 h昼/12 h夜循环照明。

大鼠L6成肌细胞复苏后, 用含10% FBS的培养基培养, 待细胞占瓶壁有效面积达到80%~90%时, 更换为含2% HS的培养基, 环境为5% CO₂、37 °C。隔天更换培养基, 分化第6~7天时于显微镜下可见细胞变长且呈现为梭形, 肌管形成, 分化完成。将分化的L6肌管细胞分为4组: (1) 常氧对照组(N组); (2) 常氧抑制剂组(I组); (3) 低氧对照组(H组); (4) 低氧抑制剂组(H+I组)。H组和H+I组在1% O₂的低氧小室中暴露6 h; I组和H+I组施加5 mmol/L 3-MA。

1.4 DEXA检测大鼠体成分、取材及称量肌肉湿重

每天称量并记录大鼠体质量; 最后一次干预禁食12 h后, 腹腔注射3%戊巴比妥钠(3 mL/kg)麻醉, DEXA检测体成分。麻醉大鼠, 腹主动脉取血处死, 分离两侧趾长伸肌(extensor digitorum longus, EDL), 称量湿重, 而后投入4%多聚甲醛固定液; 另一侧分成两份, 一份置于RNA store中, 一份于液氮速

冻后置于-80 °C冰箱保存。

1.5 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察大鼠肌纤维形态

将EDL固定24 h后, 经过浸蜡、包埋后制成蜡块, 切片机切片, 贴附于载玻片上, 对切片进行脱蜡、透明、梯度乙醇浸泡处理后, 用Harris苏木素和0.5%伊红分别染色, 封片, 最后在显微镜下观察并拍照。

1.6 染色层黏连蛋白(Laminin)免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色

石蜡切片过梯度乙醇, 蒸馏水冲洗后进行抗原修复、淬灭自发荧光、血清封闭、4 °C孵育Laminin一抗过夜、室温孵育二抗50 min, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核、封片和镜检拍照, Image Pro Plus 6.0 (IPP 6.0)软件统计FCSA。

1.7 PCR芯片检测大鼠EDL自噬差异基因的表达

Trizol法提取EDL的RNA, 紫外吸收测定法对RNA质检后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 合成cDNA, 而后用高通量荧光定量qPCR检测84个自噬基因表达。筛选H组与C组的差异表达基因, 筛选标准设定为 $P < 0.05$, 差异倍数(fold change) ≥ 1.5 。对差异基因进行后续功能分析。

1.8 蛋白免疫印迹(Western blot, WB)检测L6细胞蛋白表达

加入裂解液, 刮刀收集细胞, 于滤柱中过滤离心, 得到细胞原液。BCA(bicinchoninic acid)法检测蛋白浓度, 制备WB样品。梯度胶电泳分离蛋白, 转膜后根据Marker条带及目的蛋白的分子量裁膜, 封闭后, 4 °C孵育一抗过夜, TBST(Tris Buffered saline Tween)洗涤, 室温孵育二抗1 h, 洗涤后, 用近红外光谱检测系统检测条带信号值, Image Studio Ver 5.2软件进行相对定量分析。

1.9 免疫荧光染色检测LC3积分光密度值(integrated option density, IOD)

用4%多聚甲醛固定肌管细胞15 min, 完成细胞爬片。细胞破膜后, 室温封闭30 min, 4 °C孵育一抗过夜, 洗涤后, 室温孵育二抗50 min, DAPI复染细胞核后封片。荧光显微镜下观察并采集图像, IPP 6.0软件分析计算IOD。

1.10 统计学分析

$\Delta\Delta Ct$ 法计算差异基因的差异表达倍数: t 检验计算 P 值, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异。 P 值使用相对表达

倍数fold值进行分析, fold change的计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, 其中以 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因})$, $-\Delta\Delta Ct = -[\Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})] \geq 1.5$ 为标准。结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。SPSS 19.0软件分析数据, 用Graph Pad Prism 8.0软件作图。采用Shapiro-Wilk检验对数据进行正态分布检验。动物实验两组间比较使用独立样本 t 检验; 细胞实验各组间比较使用双因素方差分析, 若两因素间有交互作用, 使用简单效应检验; 若无则采用最小显著性差异法(least significant difference, LSD)进行组间检验。 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 表示具有显著性差异。

2 结果

2.1 4周低氧暴露降低大鼠瘦体质量和EDL湿重

通过检测4周干预后大鼠的体成分和EDL湿重, 判断低氧诱导肌萎缩的程度。发现与C组相比, H组大鼠体质量和瘦体质量极显著降低(减少12.9%) ($P < 0.01$), 脂肪含量没有显著性差异, 瘦体质量百分比(瘦体质量/体质量)显著降低($P < 0.05$), EDL湿重(减少13%)及其百分含量(湿重/瘦体质量)显著降低($P < 0.05$)(表1)。

2.2 4周低氧暴露改变大鼠EDL肌纤维形态且降低FCSA

为了观察低氧对肌纤维的微观影响, 本研究观察了肌纤维形态, 并检测FCSA以进一步证明肌萎缩的发生。发现H组EDL肌纤维的肌间隔增加, 肌纤维横截面积缩小, 呈现不规则的多边形, 同一视野的肌纤维形状大小不一, 肌纤维开始出现分裂, 细胞核内移^[4](如红色箭头标识, 图1A)。大鼠EDL的Laminin免疫荧光染色(图1B), 统计后发现, H组FCSA显著低

于C组(下降12%)($P < 0.05$)(图1C)。

2.3 大鼠EDL自噬差异基因以上调为主且功能富集于自噬前期

为了明确自噬是否参与低氧诱导肌萎缩的具体作用途径, 本研究用自噬PCR芯片分析低氧干预后发生改变的自噬差异基因, 并分析差异基因所富集的功能。发现H组与C组相比, 自噬差异表达基因共有29个, 上调基因21个, 下调基因8个(图2)。差异基因表达以上调为主。

自噬差异基因的功能主要集中于两部分, 分别为自噬机制组分(直接参与自噬过程)包括: 参与自噬囊泡形成、负责蛋白靶向膜/液泡、负责蛋白转运、连接自噬体和溶酶体、蛋白泛素化、蛋白酶活性相关基因; 以及自噬调节组分(调节自噬过程)包括: 自噬与凋亡共调节、自噬与细胞周期共调节、胞内病原体诱导的自噬、胞内其他信号的自噬反应、分子伴侣介导的自噬相关基因。对差异基因功能进行富集分析发现, H组与C组相比, 对ALP的调控作用主要表现在上调自噬相关基因的表达, 上调基因的功能主要集中在自噬囊泡的形成(自噬机制组分)(9个)、自噬和凋亡共调节因子(自噬调节组分)(5个)和自噬对其他细胞内信号的应答(自噬调节组分)(5个)(图3)。

2.4 低氧下使用3-MA抑制L6肌管自噬水平

通过检测自噬关键的三个蛋白, 明确低氧对离体肌细胞自噬水平的影响, 以进一步验证在体实验结果。H组p62蛋白表达量显著低于N组, H+I组p62蛋白表达量显著高于H组($P < 0.05$); H组Beclin1蛋白表达量显著高于N组, I组Beclin1蛋白表达量显著低于N组, H+I组Beclin1蛋白表达量显著低于H组($P < 0.05$); H组LC3I蛋白表达量显著低于N组, I组显

表1 4周低氧暴露降低大鼠瘦体质量和EDL湿重

Table 1 Lean body mass and EDL wet weight of rats were reduced by 4-week hypoxic exposure

检测指标 Index	C组 Group C	H组 Group H
Body weight /g	377.50 $\pm$ 10.75	341.20 $\pm$ 16.75**
Fat mass /g	108.33 $\pm$ 18.04	105.67 $\pm$ 5.32
Lean body mass /g	260.50 $\pm$ 9.35	226.83 $\pm$ 8.33**
Percentage of lean body mass /%	69.19 $\pm$ 4.67	67.08 $\pm$ 2.55*
EDL wet weight /mg	165.33 $\pm$ 10.59	143.83 $\pm$ 7.85**
Percentage of EDL wet weight /%	6.55 $\pm$ 0.23	6.12 $\pm$ 0.24*

低氧暴露可降低大鼠体质量、瘦体质量、瘦体质量百分比、EDL湿重及其百分含量。 $n=10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与C组相比。The body weight, lean body mass, percentage of lean body mass, EDL wet weight and its percentage content were decreased under hypoxia exposure. $n=10$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group C.

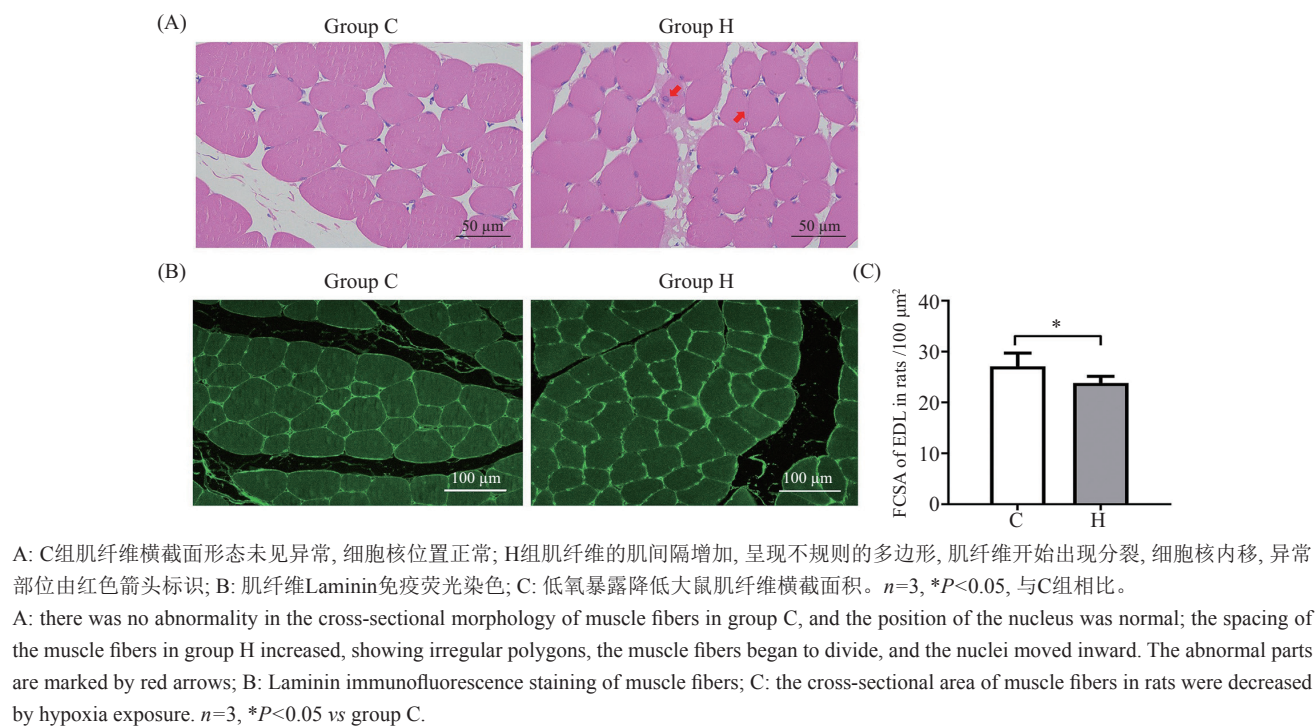
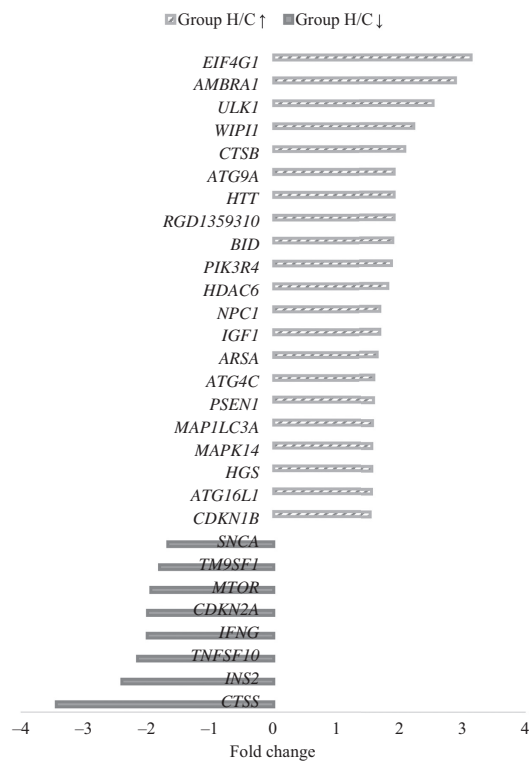


图1 4周低氧暴露降低大鼠EDL的FCSA
Fig.1 FCSA of EDL in rats were reduced by 4-week hypoxic exposure



筛选H/C组上下调差异表达基因(标准设定为P<0.05, 差异倍数≥1.5), 条纹矩形长度表示上调基因的差异倍数, 灰色表示下调基因差异倍数。H/C组自噬差异基因表达以上调为主。n=3。

The differentially expressed genes in H/C group were screened (the standard setting was P<0.05, fold change≥1.5), the striped rectangle length indicates the difference multiple of up-regulated genes, and the grey indicates the difference multiple of down-regulated genes. The autophagic differential genes expression of group H/C were mainly up regulated. n=3.

图2 H/C组大鼠EDL自噬差异基因表达以上调为主
Fig.2 The autophagic differential genes expression in EDL of H/C group was mainly up-regulated

著高于N组, I组LC3II蛋白表达量显著低于N组, H组LC3II/I比值显著高于N组, I组LC3II/I比值显著低于N组, H+I组LC3II/I比值显著低于H组($P<0.05$)(图4)。

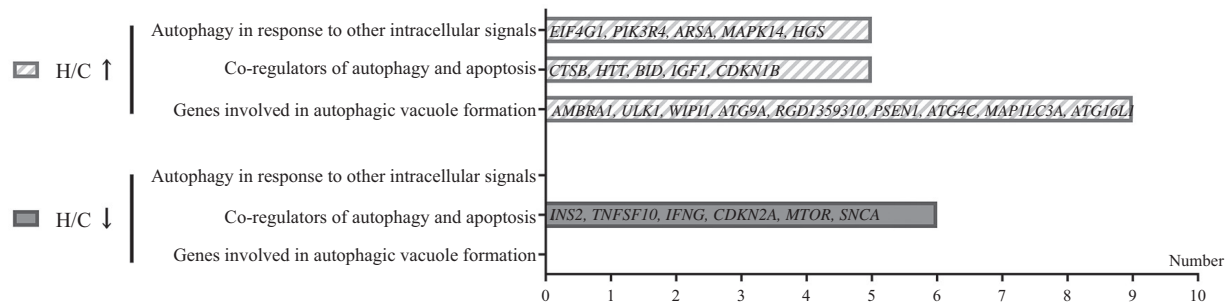
2.5 低氧下使用3-MA抑制L6肌管直径的减少和肌萎缩蛋白表达

通过检测肌管直径和肌萎缩蛋白的表达, 明确低氧对离体肌管萎缩水平的影响, 以进一步验证在体实验结果。

2.5.1 低氧下使用3-MA抑制L6肌管细胞直径减少 肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC/Myosin)是肌细胞的骨架蛋白, 与肌肉力量相关, 染色后可用于统计肌管直径^[15]。Myosin阳性表达为荧光素标记的绿光(图5A)。H组肌管直径显著低于N组($P<0.05$), I

组与N组相比无差异, H+I组肌管直径显著高于H组($P<0.05$)(图5B)。

2.5.2 低氧下使用3-MA抑制L6肌管肌萎缩蛋白表达 检测Myosin蛋白表达量可用来反映肌管萎缩情况, 肌管萎缩伴随着明显的Myosin蛋白表达降低^[16]。MuRF1和Atrogin1作为E3泛素蛋白连接酶, 其功能在于对骨骼肌特定的蛋白质进行泛素化标记, 使这些蛋白靶向被26S蛋白酶识别水解, 被认为是骨骼肌萎缩的标志性蛋白^[17]。H组Myosin蛋白表达量显著低于N组, I组显著高于N组($P<0.05$)(图6A); H组MuRF1(muscle-specific ring finger 1)蛋白表达量显著高于N组, I组显著低于N组, H+I组显著低于H组($P<0.05$); I组肌萎缩F-box蛋白(muscle-specific F-box

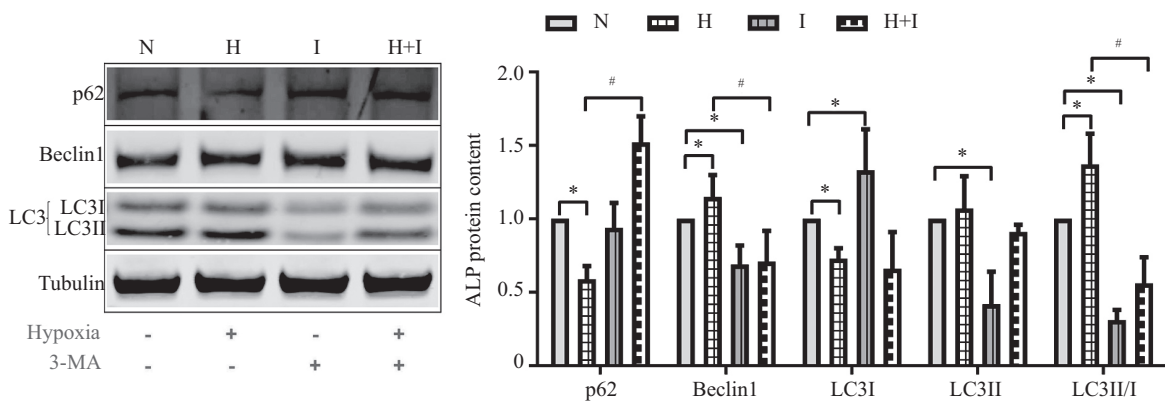


H/C组上下调差异表达基因功能富集分析。条纹矩形长度表示富集于各功能的上调基因个数和名称, 灰色矩形长度表示下调基因个数和名称。H/C组差异基因以上调为主, 功能主要富集于自噬囊泡的形成过程。n=3。

Functional enrichment analysis of differentially expressed genes in group H/C. The striped rectangle length indicates the number and name of up-regulated genes enriched in each function, while the grey rectangle length indicates the down-regulated genes. Group H/C differential genes were mainly up-regulated, and their functions were mainly enriched in the autophagic vacuole formation. n=3.

图3 H/C组大鼠EDL上调自噬差异基因功能富集于自噬前期

Fig.3 The autophagic differential genes expression in EDL of H/C group was enriched in the early stage of autophagy

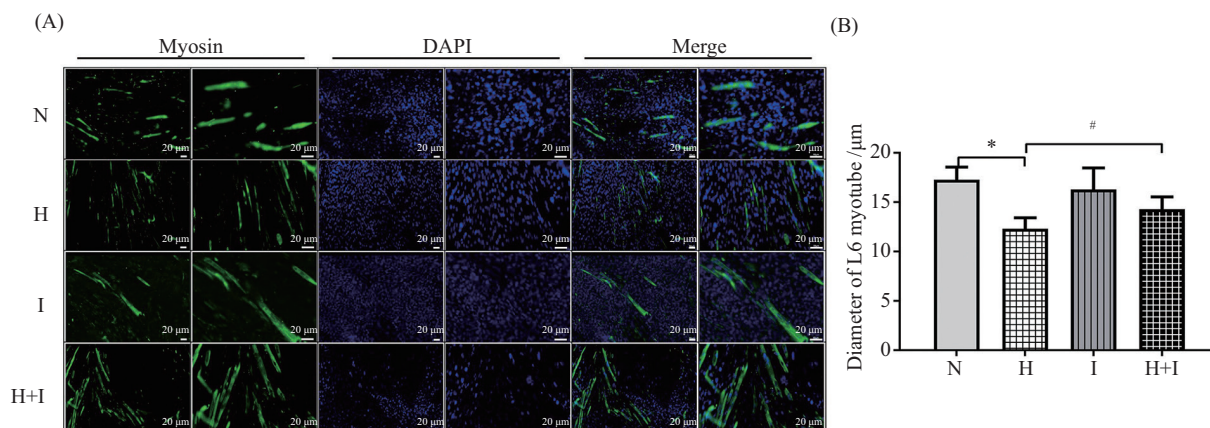


低氧暴露降低L6细胞中p62蛋白表达, 增加Beclin1蛋白表达, 使用3-MA增加p62表达, 降低Beclin1表达; 低氧暴露增加LC3II/I比值, 使用3-MA降低LC3II/I比值。* $P<0.05$, 与N组相比; # $P<0.05$, 与H组相比。

The protein expression of p62 decreased and Beclin1 increased by hypoxia, the protein expression of p62 increased and Beclin1 decreased by 3-MA in L6 myotube; The ratio of LC3II/I increased by hypoxia, but decreased by 3-MA. * $P<0.05$ vs group N; # $P<0.05$ vs group H.

图4 低氧暴露下使用3-MA抑制L6肌管自噬水平

Fig.4 The autophagy level of L6 myotubes was inhibited by 3-MA under hypoxic exposure

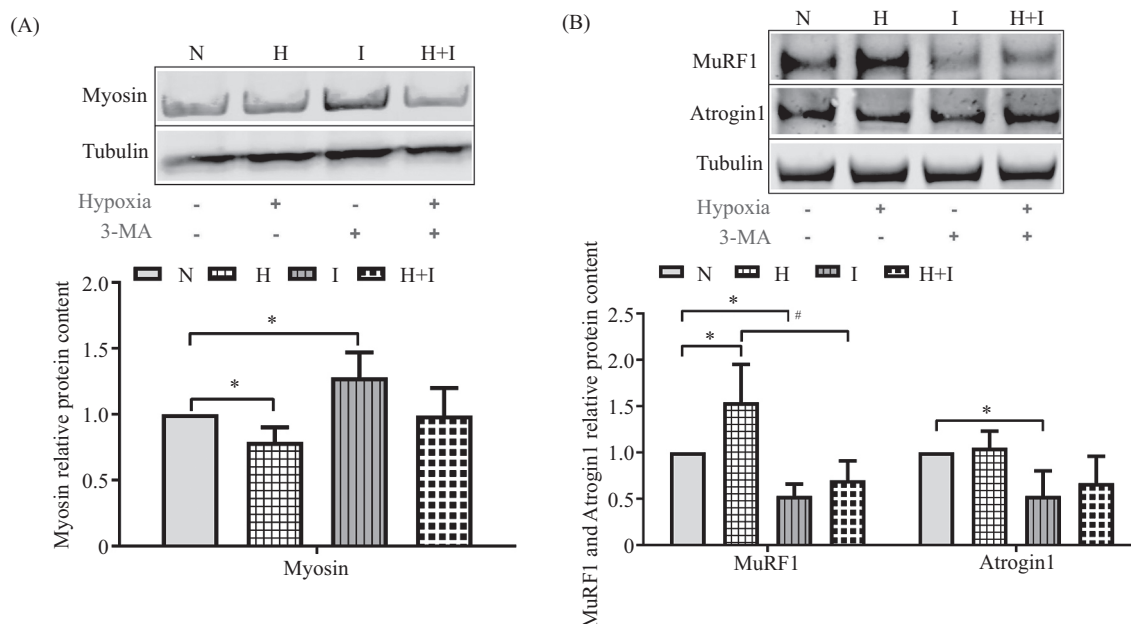


A: 对分化的L6肌管细胞进行Myosin免疫荧光染色。Myosin阳性表达为荧光素标记的红色, DAPI染细胞核为蓝色, Merge为两者融合; B: 低氧暴露降低L6肌管细胞直径, 使用3-MA增加肌管直径。* $P < 0.05$, 与N组相比; # $P < 0.05$, 与H组相比。

A: Myosin immunofluorescence staining in differentiated L6 myotube. The positive expression of Myosin was fluorescein-labeled green light, DAPI stained nucleus was blue, merge was fusion; B: the diameter of L6 myotube were decreased by hypoxia, and were increased by 3-MA. * $P < 0.05$ vs group N; # $P < 0.05$ vs group H.

图5 低氧下使用3-MA抑制L6肌管细胞直径减少

Fig.5 The decrease of L6 myotube diameter was inhibited by 3-mA under hypoxic exposure



A: 低氧暴露降低L6细胞中Myosin蛋白表达; B: 低氧暴露增加MuRF1蛋白表达量, 使用3-MA降低MuRF1蛋白表达量。* $P < 0.05$, 与N组相比; # $P < 0.05$, 与H组相比。

A: the protein expression of Myosin decreased by hypoxia; B: the protein expression of MuRF1 increased by hypoxia, and decreased by 3-MA. * $P < 0.05$ vs group N; # $P < 0.05$ vs group H.

图6 低氧下使用3-MA抑制L6肌管肌萎缩蛋白表达

Fig.6 The expression of atrophy related proteins in L6 myotube was inhibited by 3-mA under hypoxic exposure

protein, MAFbx, 又称Atrogin1)表达量显著低于N组 ($P < 0.05$)(图6B)。

3 讨论

低氧训练、高原旅游、低氧减肥和生理性缺氧

疾病会给机体造成一系列不良影响, 骨骼肌萎缩就是其中之一, 这不仅会降低运动员高原训练效果, 也会影响普通大众的生产生活, 还会加速慢性疾病的发生发展。低氧暴露初期食欲下降、胃肠消化功能障碍, 不足以造成肌萎缩, 低氧后期骨骼肌蛋白的转

化效率增加可能是造成肌萎缩的重要原因^[18-19]。自噬是一条重要的多基因参与的蛋白分解途径,参与肌萎缩的发生发展,本研究重点探讨自噬途径在低氧诱导肌萎缩中的作用。

低氧诱导肌萎缩的发生与低氧剂量(低氧浓度和低氧暴露时长)密切相关。在海拔4 000 m处(O_2 浓度为12.4%),氧分压降至40 mmHg,此处氧离曲线斜率急剧增加,曲线形状开始发生变化,海拔4 000 m被认为是与肌萎缩发生密切相关海拔高度^[20],故本研究以12.4% O_2 作为在体实验干预的氧浓度;低氧4周的干预时长符合高原训练周期,且可以诱发肌萎缩^[21-22]。研究显示,成肌细胞在1%~5%氧浓度环境中可发生肌管萎缩^[23],对比1%、3%和5%氧浓度下肌管的萎缩情况,发现1%氧浓度下肌管萎缩程度最为明显^[24],且1%的氧浓度可以显著增加肌细胞中低氧关键基因低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达^[25],故本研究离体实验选取1%氧浓度。肌管细胞分别低氧暴露6、12和24 h,发现6 h的肌管直径减小最为明显^[26];另有研究显示,低氧模拟剂氯化钴($CoCl_2$)干预视网膜神经元细胞6 h后HIF-1 α 的表达量最高^[27],因此,本研究选择6 h作为离体实验的低氧干预时长。此外,低氧诱导肌萎缩还具有肌纤维选择性,快肌可能对低氧刺激更为敏感^[28]。本研究中,大鼠EDL湿重及其百分含量和FCSA均显著降低,肌纤维形态也出现损伤。在不同肌纤维类型的肌肉中,低氧促进快肌萎缩的效果最为明显,这可能与其对循环皮质醇浓度变化更为敏感,故可降低血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,减少血管生成,对缺氧的适应能力较差有关^[29]。

自噬水平增加会使细胞质和细胞器内蛋白质的丢失,进而造成肌肉萎缩。而自噬水平不足也会导致骨骼肌中吞噬体和线粒体异常,引起肌肉疾病,但自噬不足对骨骼肌的威胁往往是一种慢性的损耗(数周至数月),而过量的自噬则会导致肌肉质量的快速丢失(数天至数周)。在多种肌萎缩和肌营养不良症等肌肉相关疾病皆出现自噬的积累,但低氧对骨骼肌自噬的作用尚存在争议^[30]。本研究在体研究发现,低氧干预后大鼠EDL发生萎缩,其自噬差异基因中约72.41%为上调基因,提示该过程中自噬被激活;离体实验验证,低氧暴露诱导L6肌管萎缩中伴随着自噬关键蛋白Beclin1、LC3的表达增加,p62的表

达降低,说明自噬参与低氧诱导的肌萎缩过程。比如小鼠低氧(8%氧浓度)暴露12天后,自噬相关基因mRNA和蛋白表达增加,伴随腓肠肌和胫骨前肌萎缩^[31];低氧后(10.7%氧浓度)同卵双胞胎的肌肉自噬通量显著增加,表现为LC3II的表达和LC3II/LC3I比值增加,p62表达降低^[32]。对C2C12肌管细胞施加 $CoCl_2$,LC3和Beclin1的表达增加,而使用自噬抑制剂可显著增加肌细胞生成素(myogenin)的表达,促进肌管的形成^[33];甲基莲心碱(neferine, Nef)作为低氧下骨骼肌细胞的保护剂,可通过抑制低氧诱导的肌细胞自噬而发挥作用^[34]。本研究离体实验抑制自噬后,肌管萎缩情况得到改善,进一步说明自噬在低氧诱导下对肌萎缩起到促进作用。

细胞自噬作为复杂的分解过程^[6],由多步骤参与其中。不同的自噬阶段受到不同的细胞途径和自噬相关基因(autophagy-related genes, ATGs)的调控^[8],不同干预对自噬的影响也表现为对不同阶段的调控。自噬在低氧诱导肌萎缩中具体作用阶段尚不明确。本研究发现,低氧干预后大鼠EDL中上调自噬差异基因功能主要富集于前期的自噬囊泡形成阶段,说明低氧暴露对骨骼肌的影响以激活自噬前期为主。为了进一步证明自噬前期的作用,本研究对低氧暴露下的L6肌管施加自噬前期抑制剂3-MA^[35],且该抑制剂被证明可抑制低氧诱导的C2C12肌管细胞萎缩^[36],其作用机制是通过抑制磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)调控的自噬启动和自噬体形成而实现的^[37]。低氧下施加3-MA后降低自噬蛋白表达,可显著抑制肌管直径的缩小和肌萎缩相关蛋白的表达,说明抑制自噬前期可缓解低氧诱导的肌萎缩程度。比较自噬前期抑制剂3-MA和后期抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)的作用,发现与 $CoCl_2$ 模拟低氧干预比,3-MA合并 $CoCl_2$ 作用后显著降低C2C12细胞的LC3II/I比值,而CQ合并 $CoCl_2$ 则显著增加LC3II/I比值^[33],说明抑制自噬前期更有助于缓解低氧诱导的肌萎缩。

综上,低氧暴露可导致大鼠骨骼肌和离体肌细胞发生萎缩,自噬相关基因参与该过程。抑制自噬前期可显著降低低氧诱导肌萎缩的程度。自噬前期的激活可能是导致低氧诱导肌萎缩的关键。

参考文献 (References)

- [1] PARALIKAR S J. High altitude pulmonary edema-clinical

- features, pathophysiology, prevention and treatment [J]. *J Occup Environ Med*, 2013, 16(2): 59-62.
- [2] EDWARDS L M, MURRAY A J, TYLER D J, 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.
- [3] POWERS S K. Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy [J]? *Sports Med*, 2014, 44(2): 155-65.
- [4] CHAUDHARY P, SURYAKUMAR G, PRASAD R, et al. Effect of acute hypobaric hypoxia on skeletal muscle protein turnover [J]. *Al Ameen J Med Sci*, 2012, 5(4): 355-61.
- [5] CHAUDHARY P, SURYAKUMAR G, PRASAD R, et al. Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy: role of ubiquitin-proteasome pathway and calpains [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1/2): 101-13.
- [6] PAPANDREOU M E, TAVERNARAKIS N. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health and disease [J]. *Biotechnol J*, 2017, 12(1): 160-75.
- [7] ASHKENAZI A, BENTO C F, RICKETTS T, et al. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy [J]. *Nature*, 2017, 545(7652): 108-11.
- [8] HUANG R, LIU W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 852-3.
- [9] NAKATOGAWA H, ICHIMURA Y, OHSUMI Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion [J]. *Cell*, 2007, 130(1): 165-78.
- [10] FASS E, AMAR N, ELAZAR Z. Identification of essential residues for the C-terminal cleavage of the mammalian LC3: a lesson from yeast Atg8 [J]. *Autophagy*, 2007, 3(1): 48-50.
- [11] MASIERO E, AGATEA L, MAMMUCARI C, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(6): 507-15.
- [12] D'HULST G, FERRI A, NASLAIN D, et al. Fifteen days of 3 200 m simulated hypoxia marginally regulates markers for protein synthesis and degradation in human skeletal muscle [J]. *Hypoxia (Auckl)*, 2016, 4(3): 1-14.
- [13] D'HULST G, JAMART C, VAN THIENEN R, et al. Effect of acute environmental hypoxia on protein metabolism in human skeletal muscle [J]. *Acta physiol (Oxf)*, 2013, 208(3): 251-64.
- [14] CHAUDHARY P, SHARMA Y K, SHARMA S, et al. High altitude mediated skeletal muscle atrophy: protective role of curcumin [J]. *Biochimie*, 2019, 156(1): 38-47.
- [15] ASAI R, HANEDA Y, SEYA D, et al. Amniogenic somatopleure: a novel origin of multiple cell lineages contributing to the cardiovascular system [J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7(1): 8955.
- [16] PETERS E L, VAN DER LINDE S M, VOGEL I S P, et al. IGF-1 attenuates hypoxia-induced atrophy but inhibits myoglobin expression in C2C12 skeletal muscle myotubes [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1889.
- [17] BODINE S C, BAEHR L M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307(6): E469-84.
- [18] 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*(FU P Y, HU Y, LI Y C, et al. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(4): 423-32.
- [19] 付鹏宇, 龚丽景, 朱镭鑫, 等. Ghrelin-GHSR通路在急性低氧暴露大鼠胃炎症反应中的调节作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(FU P Y, GONG L J, ZHU R X, et al. Regulatory effects of Ghrelin-GHSR pathway on gastric inflammation in rats by acute hypoxic exposure [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2018, 34(10): 74-81.
- [20] FAVIER F B, BRITTO F A, FREYSSINET D G, et al. HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(24): 4681-96.
- [21] WANG J, JI Y, ZHOU L, et al. A new method to improve running economy and maximal aerobic power in athletes: endurance training with periodic carbon monoxide inhalation [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 701.
- [22] AGRAWAL A, RATHOR R, KUMAR R, et al. Role of altered proteostasis network in chronic hypobaric hypoxia induced skeletal muscle atrophy [J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0204283.
- [23] MARTIN N R W, AGUILAR-AGON K, ROBINSON G P, et al. Hypoxia impairs muscle function and reduces myotube size in tissue engineered skeletal muscle [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2599-605.
- [24] 于加倍. 低氧环境下抗阻练习对骨骼肌萎缩的影响及Akt-FoxO1-MuRF1/Atrogen-1通路调控机制[D]. 北京: 北京体育大学(YU J B. Resistance training alleviated skeletal muscle atrophy that induced by hypoxia and the regulational role of Akt-FoxO1-MuRF1/Atrogen-1 signaling pathway [D]. Beijing: Beijing Sport University), 2019.
- [25] 李海洲, 刘玉倩, 王海涛, 等. 低氧暴露对大鼠骨骼肌L6细胞铁代谢的影响[J]. *生理学报*(LI H Z, LIU Y Q, WANG H T, et al. Effects of hypoxia on iron metabolism of rat L6 skeletal muscle cells [J]. *Acta Physiol Sin*), 2011, 63(4): 347-52.
- [26] 贾杰, 付鹏宇, 朱镭鑫, 等. FoxO1磷酸化对低氧下大鼠骨骼肌细胞蛋白质合成和分解的影响[J]. *第三军医大学学报*(JIA J, FU P Y, ZHU R X, et al. Effects of phosphorylation sites of FoxO1 on protein synthesis and proteolysis in rat skeletal muscle cells exposure to hypoxia [J]. *Journal of Third Military Medical University*), 2020, 42(15): 1519-30.
- [27] 周娟平, 苏刚, 陈丽霞, 等. 线粒体相关内质网膜在神经退行性疾病中的研究进展[J]. *中国细胞生物学报*(ZHOU J P, SU G, CHEN L X, et al. Research progress of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane in neurodegenerative disorders [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(8): 1465-71.
- [28] DE THEIJE C C, LANGEN R C, LAMERS W H, et al. Differential sensitivity of oxidative and glycolytic muscles to hypoxia-induced muscle atrophy [J]. *J Appl Physiol*, 2015, 118(2): 200-11.
- [29] JOBIN J, MALTAIS F, DOYON J F, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: capillarity and fiber-type characteristics of skeletal muscle [J]. *J Cardiopulm Rehabil*, 1998, 18(6): 432-7.
- [30] SANDRI M. Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy [J]. *AM J Physiol Cell Physiol*, 2010, 298(6): C1291-7.
- [31] DE THEIJE C C, SCHOLS A, LAMERS W H, et al. Hypoxia impairs adaptation of skeletal muscle protein turnover- and AMPK signaling during fasting-induced muscle atrophy [J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203630.
- [32] MASSSCHELEIN E, VAN THIENEN R, D'HULST G, et al.

- Acute environmental hypoxia induces LC3 lipidation in a genotype-dependent manner [J]. *FASEB J*, 2014, 28(2): 1022-34.
- [33] CHEN R, JIANG T, SHE Y, et al. Effects of cobalt chloride, a hypoxia-mimetic agent, on autophagy and atrophy in skeletal C2C12 myotubes [J]. *BioMed Res Int*, 2017, 2017(6): 1-9.
- [34] BASKARAN R, POORNIMA P, PRIYA L B, et al. Neferine prevents autophagy induced by hypoxia through activation of Akt/mTOR pathway and Nrf2 in muscle cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83(1): 407-13.
- [35] 张芳, 包广洁, 唐玉尧, 等. 低氧对血清剥夺后山羊颞下颌关节盘细胞凋亡和自噬的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(ZHANG F, BAO G J, TANG Y Y, et al. Effects of hypoxia on the apoptosis and autophagy of the goat temporomandibular joint disc cells after serum deprivation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(8): 1295-302.
- [36] 陈睿, 余燕玲, 江婷, 等. 二氯化钴诱导缺氧对肌细胞萎缩的调控机制研究[J]. *中国运动医学杂志*(CHEN R, SHE Y L, JIANG T, et al. The mechanisms of cobaltous chloride-induced hypoxia on muscle atrophy [J]. *Chin J Sports Med*, 2018, 37(5): 414-9.
- [37] WU Y, WANG X, GUO H, et al. Synthesis and screening of 3-MA derivatives for autophagy inhibitors [J]. *Autophagy*, 2013, 9(4): 595-603.