

肌源性雌二醇在C₂C₁₂成肌细胞氧化损伤中的预防作用

胡怡 尹丹阳 田旭 于芳芳 李涛 李婷婷 田向阳 史仍飞*
(上海体育大学, 运动健康学院, 上海 200438)

摘要 该文探讨低雌激素培养环境下, 机械牵张对小鼠C₂C₁₂成肌细胞内源性雌二醇(estradiol, E₂)生成的影响及潜在的抗氧化作用。研究以小鼠C₂C₁₂成肌细胞为对象, 分为对照组、牵张组(15%, 0.5 Hz, 6 h)、H₂O₂组(400 μmol/L, 4 h)、牵张+H₂O₂组和芳香化酶抑制剂(200 μg/mL, 24 h)+牵张+H₂O₂组。所有组别均使用活性炭吸附后的FBS和无酚红的DMEM高糖培养基建立低雌激素培养环境; CCK8法检测细胞活力; Elisa法检测胞内E₂水平; WST-1法测定SOD活性; 钼酸铵法测定CAT活性; 比色法测定GSH-Px活性; TBA法测定MDA生成情况; Western blot检测细胞内Akt/Nrf2/HO-1蛋白表达情况。结果显示, 牵张组较对照组芳香化酶活性及蛋白表达水平上升, 细胞内E₂生成增加($P<0.01$); H₂O₂组较对照组细胞活力下降, HO-1蛋白表达水平下调($P<0.05$); 与H₂O₂组相比, 牵张+H₂O₂组细胞活力上升($P<0.01$), SOD、CAT和GSH-Px活性升高($P<0.01$), MDA的产生降低($P<0.01$), Akt磷酸化水平和HO-1蛋白表达水平上调($P<0.05$); 芳香化酶抑制剂+牵张+H₂O₂组较牵张+H₂O₂组细胞活力下降, 细胞内SOD、GSH-Px、CAT活性下降($P<0.01$), MDA生成增加($P<0.01$), Akt磷酸化水平、Nrf2和HO-1蛋白表达下调($P<0.05$)。低雌激素培养环境下, 机械牵张可促进C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达及E₂生成, 增加细胞活力, 上调Akt/Nrf2/HO-1蛋白表达, 对细胞氧化损伤有一定保护作用。

关键词 芳香化酶; 雌二醇; 抗氧化作用; 机械牵张; C₂C₁₂成肌细胞

Preventive Role of Muscle-Derived Estrogen in C₂C₁₂ Myoblasts against Oxidative Damage

HU Yi, YIN Danyang, TIAN Xu, YU Fangfang, LI Tao, LI Tingting, TIAN Xiangyang, SHI Rengfei*
(School of Exercise and Health, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract This article aims to investigate the effect of mechanical stretch on the production of endogenous E₂ (estradiol) in mouse C₂C₁₂ myoblasts under a low estrogen culture environment and its potential antioxidant effects. In this study, the cells were divided into five groups: control group (C group), stretch group (15%, 0.5 Hz, 6 h), H₂O₂ group (400 μmol/L, 4 h), stretch + H₂O₂ group and aromatase inhibitor (200 μg/mL, 24 h) + stretch + H₂O₂ group. The low estrogen culture environment was created by using charcoal-stripped FBS and phenol red-free DMEM high-glucose medium. Changes in cell viability were detected by the CCK8 assay, while intracellular E₂ levels were measured by the Elisa method. The activities of SOD, CAT, and GSH-Px were determined by the WST-1, am-

收稿日期: 2023-04-25

接受日期: 2023-08-28

国家自然科学基金(批准号: 32171136)和上海市自然科学基金(批准号: 19ZR1452900)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65507356, E-mail: rfshi@sus.edu.cn

Received: April 25, 2023

Accepted: August 28, 2023

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32171136), and the Natural Science Foundation of Shanghai (Grant No.19ZR1452900)

*Corresponding author. Tel: +21-65507356, E-mail: rfshi@sus.edu.cn

monium molybdate, and colorimetric methods, respectively. MDA generation was measured using the TBA method. Western blot was performed to analyze changes in the expression of Akt/Nrf2/HO-1 proteins in the cells. Compared with the C group, the mechanical stretch group showed an increase in aromatase activity and protein expression ($P<0.01$) and an increase in intracellular E_2 generation ($P<0.01$). The H_2O_2 group exhibited oxidative damage, manifested by a decrease in cell viability ($P<0.01$) and a downregulation of HO-1 protein expression ($P<0.05$). Compared with the H_2O_2 group, the mechanical stretch + H_2O_2 group showed an increase in cell viability ($P<0.01$), an elevation in SOD, CAT, and GSH-Px activity ($P<0.01$), a decrease in MDA production ($P<0.01$), and an upregulation of Akt phosphorylation and HO-1 protein expression ($P<0.05$). Compared with the mechanical stretch + H_2O_2 group, the aromatase inhibitor + mechanical stretch + H_2O_2 group showed a decrease in cell viability ($P<0.01$), a decrease in SOD, GSH-Px, and CAT activity ($P<0.01$), an increase in MDA content ($P<0.01$), and downregulation of Akt phosphorylation, Nrf2, and HO-1 protein expression ($P<0.05$). Under low estrogen conditions, appropriate mechanical stretch can promote the expression of aromatase and E_2 generation in C_2C_{12} myoblasts, increase cell viability, and upregulate Akt/Nrf2/HO-1 protein expression, providing specific prevention against oxidative damage to the cells.

Keywords aromatase; estradiol; antioxidant effect; mechanical stretch; C_2C_{12} myoblasts

骨骼肌中活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增加, 抗氧化能力不足时, 可导致氧化损伤的发生, 进而影响骨骼肌的生理功能^[1-2]。雌二醇(estradiol, E_2)作为女性体内效应最强且含量最为丰富的雌激素, 近年来被报道在缓解肌肉氧化损伤和促进损伤后修复方面具有重要的作用^[3-5]。骨骼肌作为人体主要的运动器官之一, 同时具备重要的内分泌功能。研究表明, 骨骼肌中存在能够合成雌激素的限速酶——芳香化酶(aromatase), 可催化睾酮生成 E_2 ^[6]。我们前期的研究发现, 运动可以提高卵巢缺失大鼠骨骼肌的质量, 并促进骨骼肌芳香化酶表达和 E_2 生成^[7]。同时, 我们还发现适宜强度的机械牵张刺激可以增加小鼠 C_2C_{12} 细胞内 E_2 水平^[8]。然而, 目前尚不清楚机械牵张等刺激生成的肌源性 E_2 是否参与维持骨骼肌细胞的抗氧化能力, 抑制氧化损伤。该研究的开展将为肌源性雌激素的功能提供实验依据。

本研究选取小鼠 C_2C_{12} 成肌细胞为实验对象, 去除培养基中的雌激素模拟低雌激素培养环境, 采用机械牵张对细胞加载力学刺激, 并使用过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)建立细胞氧化损伤模型, 探究一次适宜机械牵张预刺激对 H_2O_2 诱导的 C_2C_{12} 成肌细胞氧化损伤模型中细胞活力、抗氧化酶活性、过氧化产物生成、抗氧化相关蛋白蛋白激酶B(protein kinase B, Akt/PKB)/核红细胞2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)

的影响。此外, 通过芳香化酶抑制剂阿那曲唑(anastrozole)抑制细胞内芳香化酶活性, 进一步探讨肌源性 E_2 对 C_2C_{12} 成肌细胞的抗氧化作用及潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

小鼠 C_2C_{12} 成肌细胞购自中国科学院上海细胞库; 高糖DMEM、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青链霉素、胰蛋白酶购自美国Gibco公司; 无酚红高糖DMEM购自上海源培生物科技股份有限公司; 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自上海博光生物科技有限公司; 3% H_2O_2 溶液、活性炭、右旋糖酐购自美国Sigma-Aldrich公司; 阿那曲唑购自美国Shelleck公司; CCK8试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)购自上海碧云天生物技术有限公司; β -actin抗体、Phospho-Akt(Ser473)抗体、Akt抗体购自Cell Signaling Technology公司; Nrf2抗体购自美国Signalway Antibody公司; HO-1抗体购自英国Abcam公司; Aromatase抗体购自美国Invitrogen公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒购自南京建成科技有限公司。CO₂细胞培养箱、机械牵张装置(Flexercell 5000)购自美国Flexcell公司。

1.2 去除FBS中的雌激素

为了明确机械牵张产生的内源性E₂对细胞抗氧化能力的影响,在细胞干预时使用活性炭吸附后的FBS和无酚红的DMEM高糖培养基培养细胞,以减少FBS和培养基中雌激素样物质的影响,去除FBS中雌激素的方案参考李苏华等^[9]、叶霞等^[10]、HAN等^[11]的实验进行,具体步骤如下:称取5 g活性炭和500 mg右旋糖酐,用去离子水定容至100 mL,充分搅拌1 h,3 000 r/min离心10 min,弃上清,目的是得到右旋糖酐包被的活性炭;沉淀物中加入50 mL FBS,在56 °C水浴中作用30 min,3 000 r/min离心10 min,取上清液;连续处理2次以除去FBS中的雌激素;使用0.22 μm过滤器过滤上清液,得到活性炭/右旋糖酐处理过的FBS。

1.3 小鼠C₂C₁₂成肌细胞培养及分组

以小鼠C₂C₁₂成肌细胞为实验对象,使用含有10% FBS、1%青链霉素的高糖DMEM培养基于恒温37 °C、含5% CO₂的细胞培养箱中培养细胞,当细胞在培养皿中生长至80%时,用胰蛋白酶进行消化(消化环境为37 °C、5% CO₂,消化时长为1 min),以1:2的比例进行传代。细胞干预前,将其消化后接种于Bioflex6孔板上(接种密度为1×10⁵/mL),使用去雌激素的培养基(90%无酚红DMEM培养液、10%去雌激素FBS、1%青链霉素)培养细胞,并分为5组:对照组(C组)、牵张组(S组)、H₂O₂(H组)、牵张+H₂O₂组(S+H组)、阿那曲唑+牵张+H₂O₂组(I+S+H组)。^①阿那曲唑干预方案:基于课题组之前的研究结果^[12],I+S+H组在牵张24 h前,培养基中加入200 μg/mL阿那曲唑,由于阿那曲唑需要用DMSO进行溶解,因此其余组加入等量的DMSO。^②机械牵张干预方案:基于课题组之前的研究结果^[12],S组、S+H组、I+S+H组细胞牵拉干预方案设为:采用15%牵张强度,牵张频率为0.5 Hz,牵张时长为6 h,其余组细胞置于同样环境的培养箱中,但不施加牵张刺激。^③H₂O₂干预方案:H组和S+H组在牵张结束后,加入含400 μmol/L H₂O₂的培养基培养4 h,其余组加入等量的去雌激素培养基。

1.4 检测芳香化酶活性

干预结束后,收集细胞,在细胞沉淀中加入混匀后的裂解液,冰水浴进行超声,4 °C、4 000 r/min离心20 min,取上清液,将上清液加入含有底物2 μg/mL 烟酰胺和3 mg/mL 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)的试管中,充分混匀,37 °C金属浴反应30 min,反应结

束后迅速用冰水终止反应;测定反应液中E₂含量及细胞中蛋白含量,以上清液中的E₂含量与工作液中E₂含量之差作为酶与底物作用所产生的E₂的量,酶活性单位以1 h内每mg蛋白中所产生的E₂的量来表示,即pmol E₂/mg protein^[13-15]。

1.5 Western blot测定蛋白表达量

使用RIPA裂解液提取细胞蛋白;BCA试剂盒进行蛋白定量;每组取25 μg蛋白上样,进行SDS-PAGE凝胶电泳;用湿转法将蛋白转到PVDF膜上,将PVDF膜置于5%脱脂奶粉溶液中,室温摇床封闭1.5 h,封闭结束后使用1× TBST进行清洗,清洗后4 °C摇床分别孵育兔抗Aromatase(1:1 000),兔抗Phospho-Akt(Ser473)(1:1 000)、兔抗Akt(1:1 000),兔抗Nrf2(1:1 000)抗体,兔抗HO-1(1:1 000)抗体和小鼠抗β-Actin(1:1 000)过夜,一抗孵育结束后,吸出一抗,1× TBST洗脱3次,每次10 min;加入相应的稀释好的二抗(1:1 000)溶液,在4 °C摇床上孵育1.5 h,孵育结束后再次使用1× TBST进行清洗,清洗后即可加入发光液进行蛋白显影,并拍照保存。使用ImageJ软件分析图像。

1.6 Elisa检测胞内E₂水平

细胞干预结束后使用RIPA裂解液裂解细胞,Elisa试剂盒检测C₂C₁₂小鼠成肌细胞中E₂水平。具体方法如下:配制1 000 pg/mL,333.33 pg/mL,111.11 pg/mL,37.04 pg/mL,12.35 pg/mL标准品;将各浓度的标准品、标准品稀释液(0 pg/mL)及待测样品依次加入酶标板中,每孔50 μL,随后每孔加检测溶液A工作液50 μL,37 °C温育1 h;弃去孔内液体,洗板3次;每孔加检测溶液B工作液100 μL,37 °C温育30 min,结束后弃去孔内液体,洗板5次;每孔加底物溶液90 μL,混匀后37 °C避光显色20 min;加终止溶液50 μL,酶标仪450 nm处检测各孔D值。

1.7 CCK8检测细胞活力

将对数生长良好的C₂C₁₂小鼠成肌细胞接种于96孔培养板,细胞悬液密度为2×10⁴/mL,设置空白对照组与H₂O₂处理组(100 μmol/L、200 μmol/L、300 μmol/L、400 μmol/L、500 μmol/L),每个浓度重复5次,培养4 h后每孔加入10 μL CCK8试剂,37 °C孵育2 h,通过酶标仪于450 nm波长下测定各孔D值,计算细胞存活率,确定H₂O₂适宜浓度。细胞存活率计算公式为:细胞存活率×(100%)=[(D_{加药}-D_{空白})/(D_{对照}-D_{空白})]×100%。

1.8 细胞免疫荧光检测HO-1蛋白质表达

细胞干预结束后,吸去培养液,PBS轻洗2~3次,

并弃去液体,加入4%多聚甲醛37 °C固定10 min,用1× TBSTx清洗,每次5 min,共3次;加入10%驴血清,37 °C封闭1 h;弃去封闭液,加入一抗(1:100),4 °C摇床孵育过夜;第二天复温后使用1× TBSTx清洗细胞3次,每次5 min;加入按比例稀释的二抗(驴抗兔,1:500),37 °C避光孵育1 h,孵育结束后用1× TBSTx清洗,每次5 min,共3次;加入适量DAPI后,在激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.9 测定细胞内SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA生成

采用WST-1法测定SOD活力,钼酸铵法测定CAT活力,比色法测定GSH-Px活力,TBA法测定MDA生成。严格按照检测试剂盒(南京建成生物科技)说明书操作,酶标仪测量。

1.10 统计学分析

实验数据用均数±标准差表示,使用SPSS 20.0软件进行统计学分析,两组比较采用Student's *t*检验,多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),LSD法进行事后多重检验,以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 机械牵张促进C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达及E₂生成

本课题组前期研究表明,参数为15%,0.5 Hz,6 h的牵张方案可以促进小鼠C₂C₁₂成肌细胞表达类固醇合成酶,包括3β-羟类固醇脱氢酶(hydroxysteroid dehydrogenase, HSD)、17β-HSD和芳香化酶^[12]。为了验证低雌激素培养环境下,该牵张干

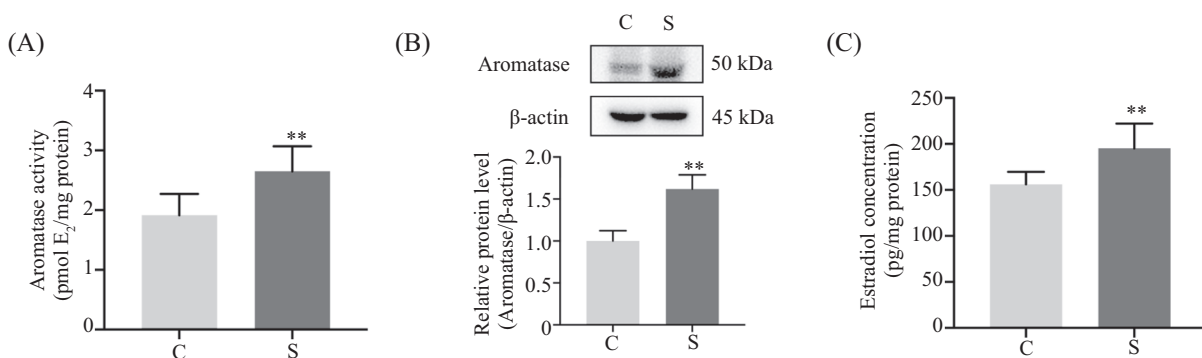
预方案对C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达及E₂生成的影响,我们提取细胞蛋白测试了芳香化酶活性,采用蛋白质免疫印迹法检测了芳香化酶的表达情况,并且使用Elisa法检测了胞内E₂水平。如图1所示,低雌激素培养环境下,与C组相比,S组细胞芳香化酶活性($P<0.01$)及蛋白表达能力($P<0.01$)显著增强,胞内E₂浓度显著增加($P<0.01$),提示该牵张方案可以促进C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达,生成肌源性E₂。

2.2 不同浓度H₂O₂对C₂C₁₂成肌细胞活力的影响

为确定H₂O₂的合理干预浓度,用100、200、300、400和500 μmol/L的H₂O₂分别处理C₂C₁₂细胞4 h。结果如图2所示,与0 μmol/L组细胞相比,在100和200 μmol/L H₂O₂作用下细胞活力存在下降趋势但无统计学意义;当300、400、500 μmol/L H₂O₂干预4 h后,细胞增殖受到抑制,其中400、500 μmol/L H₂O₂作用下细胞活力极显著下降($P<0.01$),因而选用400 μmol/L进行后续实验。

2.3 H₂O₂干预降低C₂C₁₂成肌细胞HO-1蛋白表达

HO-1属于热休克蛋白家族的成员,是Nrf2靶基因的代表之一,其特点是能够逆转氧化应激和损伤,发挥抗氧化作用^[16]。细胞免疫荧光结果显示,HO-1在C₂C₁₂中表达,显示为红色荧光,细胞核显示为蓝色荧光(图3A)。细胞免疫荧光统计分析显示(图3B),与对照组(0 μmol/L)相比,H₂O₂(400 μmol/L)组HO-1蛋白质表达量显著降低。Western blot结果与细胞免疫荧光统计分析结果类似,400 μmol/L H₂O₂干预使细胞HO-1蛋白表达下调(图3C和图3D)。这提示细胞氧化损伤模型建立成功。

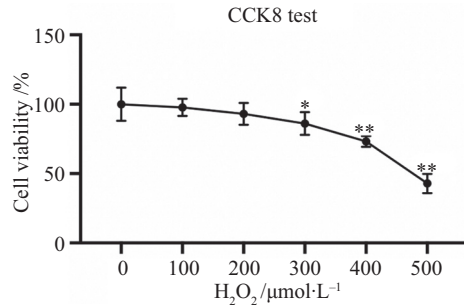


A: 芳香化酶活性; B: 机械牵张刺激后C₂C₁₂细胞芳香化酶表达情况; C: C₂C₁₂成肌细胞内E₂水平。* $P<0.05$, ** $P<0.01$,与C组比较。

A: aromatase activity; B: expression of aromatase in C₂C₁₂ cells after mechanical stretch stimulation; C: E₂ level in C₂C₁₂ myoblasts. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with group C.

图1 机械牵张对C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达和E₂水平的影响

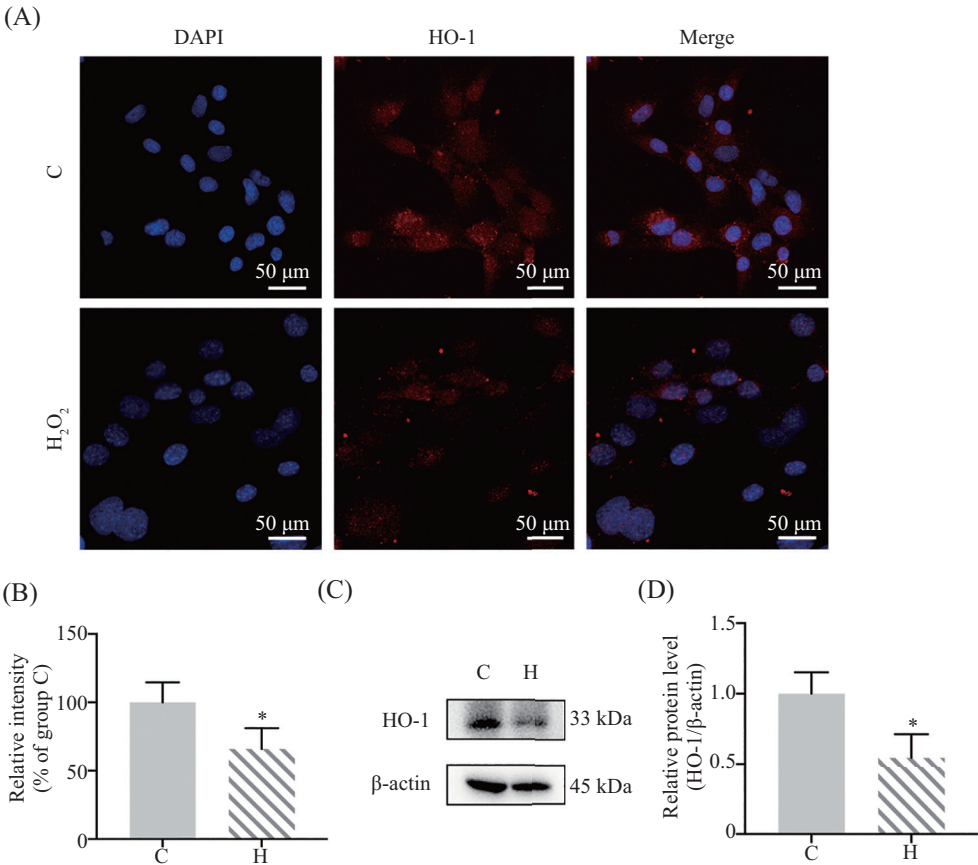
Fig.1 Effect of mechanical stretch on aromatase expression and E₂ level in C₂C₁₂ myoblasts



P*<0.05, *P*<0.01, 与0 μmol/L组比较。
P*<0.05, *P*<0.01 compared with group 0 μmol/L.

图2 不同浓度H₂O₂对C₂C₁₂成肌细胞活力的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of H₂O₂ on the viability of C₂C₁₂ myoblasts



A: 免疫荧光检测HO-1表达; B: 相对荧光强度分析; C: H₂O₂干预后C₂C₁₂成肌细胞HO-1表达情况; D: 条带灰度值分析。**P*<0.05, 与C组比较。
A: immunofluorescence detection of HO-1 expression; B: relative fluorescence intensity analysis; C: HO-1 expression in C₂C₁₂ myoblasts after H₂O₂ intervention; D: gray value analysis of bands. **P*<0.05 compared with group C.

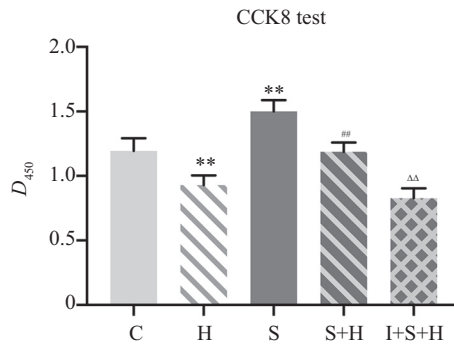
图3 H₂O₂对C₂C₁₂成肌细胞HO-1表达的影响

Fig.3 Effect of H₂O₂ on the expression of HO-1 in C₂C₁₂ myoblasts

2.4 机械牵张促进肌源性E₂生成抑制H₂O₂造成的C₂C₁₂细胞活力下降

芳香化酶是雌激素合成的限速酶, 加入芳香化酶抑制剂阿那曲唑, 可抑制胞内E₂生成, 明确肌源性E₂发挥的作用^[17]。CCK8细胞活力测试结果显示, 与C组相比, H组C₂C₁₂成肌细胞活力显著下降

(*P*<0.01), S组细胞活力显著上升(*P*<0.01); 与H组相比, S+H组细胞活力也存在显著上升(*P*<0.01); 与S+H组相比, I+S+H组细胞活力则显著下降(*P*<0.01) (图4)。这表明, 低雌激素培养条件下, 机械牵张可促进肌源性E₂生成, 抑制H₂O₂造成的C₂C₁₂细胞活力下降。

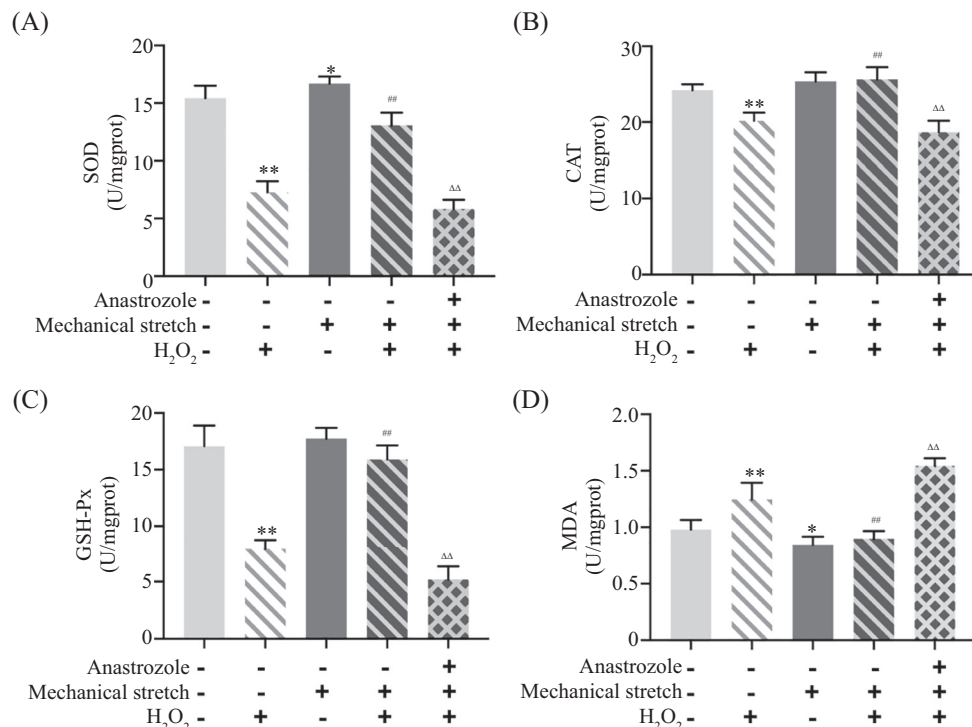


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与C组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与H组比较; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, 与S+H组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with group C; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with group H; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$ compared with group S+H.

图4 各组细胞活力的变化

Fig.4 Changes of cell viability in each group



A: SOD活性; B: CAT活性; C: GSH-Px活性; D: MDA含量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与C组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与H组比较; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$, 与S+H组比较。

A: SOD activity; B: CAT activity; C: GSH-Px activity; D: MDA content. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with group C; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with group H; Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$ compared with group S+H.

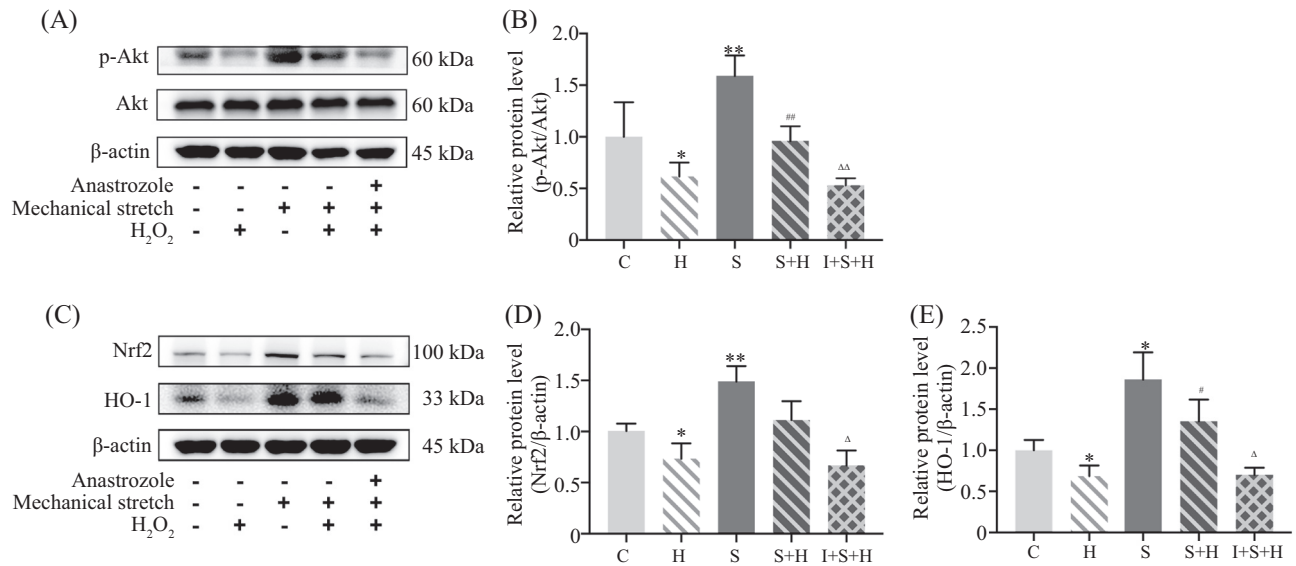
图5 各组SOD、CAT、GSH-Px活性和MDA水平

Fig.5 SOD, CAT, GSH-Px activity and MDA level in each group

2.5 机械牵张促进肌源性E₂生成抑制H₂O₂造成的C₂C₁₂细胞抗氧化能力下降

细胞内存在维持氧化还原平衡的抗氧化体系以应对氧化损伤, 其中主要包括SOD、CAT、GSH-Px等抗氧化酶, MDA则是氧自由基攻击生物膜后产生的过氧化产物。因此本实验通过试剂盒测定细胞内SOD、CAT、GSH-Px活性及MDA水平, 评价阿那

曲唑、机械牵张及H₂O₂干预对C₂C₁₂成肌细胞抗氧化能力的影响。结果如图5所示, 与H组相比, S+H组细胞内SOD、GSH-Px和CAT活性显著上升($P < 0.01$), MDA的产生水平显著降低($P < 0.01$)。加入阿那曲唑后, C₂C₁₂成肌细胞抗氧化能力显著下降, 即与S+H组相比, I+S+H组胞内SOD、GSH-Px和CAT活性显著降低($P < 0.01$), MDA的产生水平显著增加($P < 0.01$)。



A: p-Akt/Akt蛋白质印迹图像; B: p-Akt蛋白表达定量分析结果; C: Nrf2和HO-1蛋白质印迹图像; D: Nrf2蛋白表达定量分析结果; E: HO-1蛋白表达定量分析结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与C组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与H组比较; ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$, 与S+H组比较。

A: p-Akt/Akt western blot image; B: p-Akt protein expression quantitative analysis results; C: Nrf2 and HO-1 western blot images; D: Nrf2 protein expression quantitative analysis results; E: HO-1 protein expression Quantitative analysis results. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with group C; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with group H; ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$ compared with group S+H.

图6 各组p-Akt、Nrf2和HO-1蛋白表达情况

Fig.6 The protein expression of p-Akt, Nrf2 and HO-1 in each group

以上结果表明, H₂O₂干预使C₂C₁₂成肌细胞抗氧化能力下降, 而适宜的牵张干预缓解了H₂O₂造成的细胞抗氧化下降, 加入阿那曲唑造成肌源性E₂生成减少后, C₂C₁₂成肌细胞抗氧化能力进一步下降, 提示牵张干预促进C₂C₁₂成肌细胞抗氧化能力提升的原因可能与生成的肌源性E₂有关。

2.6 机械牵张促进肌源性E₂生成抑制H₂O₂造成的C₂C₁₂细胞抗氧化蛋白表达降低

PI3K/Akt信号通路可促进Nrf2从细胞质转移到细胞核, 以促进解毒酶和抗氧化酶蛋白基因的转录^[18-19]。各组细胞干预完成后, 采用Western blot测定细胞中p-Akt/Akt、Nrf2、HO-1蛋白表达水平, 结果见图6。与C组相比, S组Akt磷酸化(p-Akt/Akt比值, $P<0.01$)及Nrf2($P<0.01$)、HO-1($P<0.05$)蛋白表达显著提高, H组Akt磷酸化及Nrf2、HO-1蛋白表达显著降低($P<0.05$)。与H组相比, 机械牵张缓解了H₂O₂造成的Akt磷酸化水平降低($P<0.01$)和HO-1蛋白表达下调($P<0.05$)。在加入阿那曲唑后, 与S+H组相比, I+S+H组Akt磷酸化程度显著降低($P<0.01$)、Nrf2蛋白量显著降低($P<0.05$)、HO-1表达显著降低($P<0.05$)。以上结果表明, 机械牵张可以激活Akt来诱导Nrf2入核转运, 随后上调下游

抗氧化蛋白HO-1的表达, 进而减轻C₂C₁₂成肌细胞氧化损伤的程度, 加入芳香化酶抑制剂造成C₂C₁₂成肌细胞内E₂生成减少后, 细胞抗氧化相关蛋白表达进一步降低。

3 讨论

女性进入围绝经期后, 由于卵巢功能下降, 体内雌激素水平逐渐降低, 机体抗氧化能力减弱, 导致肌少症和骨质疏松症等疾病的患病风险增加^[20-21]。研究表明, 外源性补充雌激素能够有效提高血清总抗氧化能力, 减少活性氧的生成, 改善骨骼肌功能^[22-23]。然而, 外源性补充雌激素存在一些潜在的副作用, 如增加心血管疾病和乳腺癌的风险^[24-25]。因此, 研究内源性E₂的潜在作用可以为绝经后女性低雌激素症状提供一种更为安全和有效的治疗选择。此外, 了解骨骼肌中内源性E₂的作用机制和影响因素, 对于深入理解与缺乏E₂相关的骨骼肌功能障碍同样具有重要意义。

小鼠C₂C₁₂成肌细胞来源于骨骼肌卫星细胞系, 可为肌肉生长、修复和再生提供肌核。C₂C₁₂细胞在人类骨骼肌细胞中具有代表性, 并且具有类似于人类肌管分化肌肉组织的特征, 这使得这种细胞系能够用

于与运动或压力相关的肌肉收缩研究^[26-27]。本研究发现低雌激素培养环境下,幅度15%、频率为0.5 Hz、持续6 h的机械牵张预刺激可促进C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达及肌源性E₂生成,增加细胞活力,上调Akt/Nrf2/HO-1蛋白表达,对H₂O₂诱导的细胞氧化损伤有一定预防作用。

骨骼肌细胞内氧化还原稳态对于维持正常的骨骼肌生理功能至关重要^[28]。骨骼肌作为高度活跃的运动器官,在氧化代谢过程中可产生较多的ROS,使其成为氧化应激的主要靶标器官^[2,22]。在正常情况下,骨骼肌细胞内的氧化还原状态保持平衡,以维持正常的细胞代谢和功能。当氧化还原平衡被破坏,自由基和其他氧化应激产物积累,可引起氧化损伤,导致蛋白质、DNA、脂质等生物分子结构和功能受损,造成细胞凋亡^[23]。H₂O₂是一种常见的氧化剂,常用于构建细胞氧化损伤模型^[29-30]。我们的结果显示,400 μmol/L H₂O₂处理C₂C₁₂细胞4 h,可导致细胞内抗氧化酶SOD、CAT、GSH-Px活性明显降低,脂质过氧化物MDA含量明显增加,细胞活力下降约40%,表明H₂O₂诱导了细胞的氧化损伤,并影响了细胞的生理状态。

Nrf2是内源性抗氧化防御系统的关键调节蛋白,在氧化应激条件下,Nrf2被释放并结合抗氧化剂应答元件结合蛋白1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1),随后Nrf2迁移至细胞核并与抗氧化应答元件(antioxidant response element, ARE)结合启动一系列抗氧化蛋白,如HO-1、SOD等的表达。Keap1/Nrf2信号通路受到磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt通路、AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等多种激酶的调控^[31-32]。Akt磷酸化会抑制GSK3β(glycogen synthase kinase 3 beta)的活性,从而促进Nrf2脱离Keap1的抑制,进入细胞核^[33]。我们的结果显示,机械牵张可以缓解H₂O₂造成的C₂C₁₂细胞氧化损伤,这可能与Akt/Nrf2/HO-1信号通路蛋白表达上调有关。

骨骼肌是对运动或机械牵张刺激高度敏感的器官,运动时,骨骼肌纤维受到力学刺激,激活细胞内的信号转导通路,进而引发一系列生物化学反应^[34-36]。C₂C₁₂成肌细胞是一种常用的小鼠骨骼肌细胞系,广

泛应用于骨骼肌体外研究中,研究人员通过对C₂C₁₂成肌细胞施加机械牵张,可探究细胞对力学刺激的响应和反应机制。在机械牵张作用下,C₂C₁₂成肌细胞形态、活力、增殖、分化、蛋白质合成等多方面均会发生变化^[37]。我们的研究发现,15%、0.5 Hz、6 h的机械牵张刺激可以提高C₂C₁₂成肌细胞的活力,这与前期的研究结果类似^[8]。该强度的刺激促进C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达、E₂生成及抗氧化能力的提高,可能是机械牵张提高细胞活力的原因之一。

体外培养的C₂C₁₂成肌细胞表达多种类固醇合成酶,例如3β-HSD、17β-HSD和芳香化酶。3β-HSD和17β-HSD参与了脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone, DHEA)向睾酮的转化,而睾酮在芳香化酶的催化下可进一步转化为E₂^[8]。本课题组前期的研究表明,15%、0.5 Hz、6 h的机械牵张刺激可增加小鼠C₂C₁₂成肌细胞3β-HSD、17β-HSD和芳香化酶表达,促进睾酮代谢为E₂^[8]。在本实验中,我们也得到了类似结果,即机械牵张可增强C₂C₁₂成肌细胞芳香化酶表达和活性,促进肌源性E₂生成。为明确通过机械牵张生成的肌源性E₂在氧化损伤预防方面的作用,我们使用活性炭吸附后的FBS和无酚红的DMEM高糖培养基培养细胞,以减少FBS和培养液中雌激素样物质的影响,在此基础上,观察机械牵张产生的肌源性E₂对细胞抗氧化能力的影响,结果发现肌源性E₂生成减少后,细胞活力和抗氧化能力显著降低,提示肌源性E₂在C₂C₁₂成肌细胞氧化损伤中发挥了一定的预防作用。

鉴于实验的局限性,本文仅采用C₂C₁₂细胞系进行了体外的细胞学实验,该细胞系是体外探讨骨骼肌细胞生物学特征的公认的成肌细胞,而它是否能代表体内绝大多数已终末分化的肌肉细胞,仍需进一步探讨^[38]。小鼠原代细胞、原代人类骨骼肌细胞(primary human skeletal muscle cells, HSMCs)等,也通常用于研究骨骼肌的生物过程,但这类细胞的分类庞杂,无法进行相对精确的分析评价。后续可进行原代细胞实验、在体动物的研究,进一步探究牵张力学刺激下细胞行为的改变及相关生物学特征的探讨。

鉴于上述的结果及分析,本研究发现机械牵张可促进C₂C₁₂成肌细胞E₂生成,缓解细胞氧化损伤,其机制可能与肌源性E₂增强抗氧化酶活性和Akt/Nrf2/HO-1通路表达有关。该实验为肌源性E₂对骨骼肌的抗氧化

作用及运动改善骨骼肌抗氧化能力提供了相关依据。

参考文献 (References)

- [1] 首健, 陈佩杰, 肖卫华. 线粒体在骨骼肌老化中的作用及运动的改善效应[J]. 中国康复医学杂志(SHOU J, CHEN P J, XIAO W H. The role of mitochondria in skeletal muscle aging and the improvement effect of exercise [J]. Chin J R Rehabil Med), 2021, 36(4): 499-504.
- [2] GOMES M J, MARTINEZ P F, PAGAN L U, et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise [J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 20428-40.
- [3] TIAN X, GAO Z, YIN D, et al. 17beta-estradiol alleviates contusion-induced skeletal muscle injury by decreasing oxidative stress via SIRT1/PGC-1α/Nrf2 pathway [J]. Steroids, 2023, 191: 109160.
- [4] PELLEGRINO A, TIIDUS P M, VANDENBOOM R. Mechanisms of estrogen influence on skeletal muscle: mass, regeneration, and mitochondrial function [J]. Sports Med, 2022, 52(12): 2853-69.
- [5] ANDERSON L J, LIU H, GARCIA J M. Sex differences in muscle wasting [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1043: 153-97.
- [6] SATO K, IEMITSU M. Exercise and sex steroid hormones in skeletal muscle [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 145: 200-5.
- [7] SHI R, TIAN X, FENG Y, et al. Expression of aromatase and synthesis of sex steroid hormones in skeletal muscle following exercise training in ovariectomized rats [J]. Steroids, 2019, 143: 91-6.
- [8] FENG Y, WU J, CHENG Z, et al. Mechanical stretch enhances sex steroidogenesis in C₂C₁₂ skeletal muscle cells [J]. Steroids, 2019, 150: 108434.
- [9] 李苏华, 邓华瑜, 陈黎. 细胞外调节蛋白激酶在雌激素促乳腺癌细胞MCF-7增殖中的作用[J]. 第二军医大学学报(LI S H, DENG H Y, CHEN L. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in estrogen-induced proliferation of breast cancer cell line MCF-7 [J]. Acad J Sec Mil Med Univ), 2009, 30(4): 395-9.
- [10] 叶霞, 邓华瑜, 张力, 等. 雌激素促乳腺癌细胞MCF-7增殖中组蛋白乙酰化的作用及其意义[J]. 重庆医科大学学报(YE X, DENG H Y, ZHANG L, et al. Role and significance of histone acetylation in proliferation of breast cancer cell line MCF-7 induced by estrogen [J]. J Chongqing Med Univ), 2014, 39(3): 318-23.
- [11] HAN D, DENISON M S, TACHIBANA H, et al. Effects of estrogenic compounds on immunoglobulin production by mouse splenocytes [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25(10): 1263-7.
- [12] FENG Y, ZHANG J, TIAN X, et al. Mechanical stretch activates glycometabolism-related enzymes via estrogen in C₂C₁₂ myoblasts [J]. J Cell Physiol, 2020, 235(7/8): 5702-10.
- [13] 马海田, 韩正康, 王国杰, 等. 异黄酮对雄性大鼠芳香化酶活性及骨骼肌生长的影响[J]. 南京农业大学学报(MA H T, HAN Z K, WANG G J, et al. Effects of isoflavone on aromatase activity and muscle growth in male rats [J]. J Nanjing Agric Univ), 2005, (1): 76-9.
- [14] GEORGE F W, WILSON J D. Developmental pattern of increased aromatase activity in the Sebright bantam chicken [J]. Endocrinology, 1982, 110(4): 1203-7.
- [15] DI FIORE M M, ASSISI L, BOTTE V. Aromatase and testosterone receptor in the liver of the female green frog, *Rana esculenta* [J]. Life Sci, 1998, 62(21): 1949-58.
- [16] HE M, PAN H, CHANG R C, et al. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84800.
- [17] CAIRNS J, INGLE J N, DUDENKOV T M, et al. Pharmacogenomics of aromatase inhibitors in postmenopausal breast cancer and additional mechanisms of anastrozole action [J]. JCI Insight, 2020, 5(16): e137571.
- [18] ZHAO M, TANG X, GONG D, et al. Bungeanum improves cognitive dysfunction and neurological deficits in d-galactose-induced aging mice via activating PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00071.
- [19] ZHUANG Y, WU H, WANG X, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress-induced intestinal barrier injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, doi: 10.1155/2019/7591840.
- [20] CRUZ-JENTOF A J, BAHAT G, BAUER J, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis [J]. Age Ageing, 2019, 48(4): 601.
- [21] ASPRAY T J, HILL T R. Osteoporosis and the ageing skeleton [J]. Subcell Biochem, 2019, 91: 453-76.
- [22] UNFER T C, FIGUEIREDO C G, ZANCHI M M, et al. Estrogen plus progestin increase superoxide dismutase and total antioxidant capacity in postmenopausal women [J]. Climacteric, 2015, 18(3): 379-88.
- [23] PERSKY A M, GREEN P S, STUBLEY L, et al. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle *in vivo* and *in vitro* [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 2000, 223(1): 59-66.
- [24] CANONICO M, OGER E, PLU-BUREAU G, et al. Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: impact of the route of estrogen administration and progestogens: the ESTHER study [J]. Circulation, 2007, 115(7): 840-5.
- [25] ROSSOUW J E, ANDERSON G L, PRENTICE R L, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial [J]. JAMA, 2002, 288(3): 321-33.
- [26] 刘利, 马蓓蓓, 李梦俊, 等. 环黄茛醇通过Nrf2/HO-1信号通路在t-BHP诱导的C2C12细胞损伤中的保护作用[J]. 中国细胞生物学学报(LIU L, MA B B, LI M J, et al. Cycloastragenol prevents the oxidative damage induced by t-BHP in C2C12 cells through Nrf2/HO-1 pathway [J]. Chin J Cell Biol), 2021, 43(11): 2134-41.
- [27] WONG C Y, AL-SALAMI H, DASS C R. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72(12): 1667-93.
- [28] MUKUND K, SUBRAMANIAM S. Skeletal muscle: a review of molecular structure and function, in health and disease [J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2020, 12(1): e1462.
- [29] 陈祥兴, 李蛟龙, 邢通, 等. 过氧化氢对成肌细胞的氧化损伤作用研究[J]. 畜牧兽医学报(CHEN X X, LI J L, XING T, et al.

- Effects of H₂O₂ on oxidative damage of C2C12 cells [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2019, 50(5): 1016-25.
- [30] SIES H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 180-3.
- [31] KUNDU J, CHAE I G, CHUN K S. Fraxetin induces heme oxygenase-1 expression by activation of Akt/Nrf2 or AMP-activated protein kinase α /Nrf2 pathway in HaCaT cells [J]. *J Cancer Prev*, 2016, 21(3): 135-43.
- [32] XU Y, LIN H, WANG H, et al. Fraxetin attenuates ferroptosis in myocardial infarction via AKT/Nrf2/HO-1 signaling [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(9): 10315-27.
- [33] FARHAT F, NOFAL S, RAAFAT E M, et al. Akt/GSK3 β /Nrf2/HO-1 pathway activation by flurbiprofen protects the hippocampal neurons in a rat model of glutamate excitotoxicity [J]. *Neuropharmacology*, 2021, 196: 108654.
- [34] 尹利军, 王晓慧. 核受体在骨骼肌运动适应性变化中的作用及机理 [J]. *中国细胞生物学学报* (YIN L J, WANG X H. Research advance in the effects of nuclear receptor on exercise-induced skeletal muscle adaptation and its mechanisms [J]. *Chin J Cell Biol*), 2019, 41(1): 132-40.
- [35] DRAKE J C, WILSON R J, YAN Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle [J]. *FASEB J*, 2016, 30(1): 13-22.
- [36] MCARDLE A, VASILAKI A, JACKSON M. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms [J]. *Ageing Res Rev*, 2002, 1(1): 79-93.
- [37] KOOK S H, SON Y O, CHOI K C, et al. Cyclic mechanical stress suppresses myogenic differentiation of adult bovine satellite cells through activation of extracellular signal-regulated kinase [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 309(1/2): 133-41.
- [38] ABDELMOEZ A M, SARDÓN PUIG L, SMITH J A B, et al. Comparative profiling of skeletal muscle models reveals heterogeneity of transcriptome and metabolism [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(3): C615-c26.