

# 有氧运动对糖尿病大鼠自噬性肌萎缩的影响\*

高前进<sup>1</sup> 柏海平<sup>1</sup> 王彦伟<sup>1,2</sup>

## 摘要

**目的:**通过观察有氧运动对糖尿病大鼠自噬作用引起的肌萎缩的影响,探讨高血糖和胰岛素缺乏引起肌肉量减少的机制及运动的防治作用。

**方法:**成年雄性Wistar大鼠采用腹腔内注射链脲菌素的方法诱导糖尿病,然后随机分为糖尿病对照组(diabetic control, DCG),糖尿病运动组(diabetic exercise group, DEG),同时设立正常对照组(control group, CG)和正常运动组(control exercise group, CEG)。有氧运动采用跑台跑训练,采用中等强度每天1h,每周5天共训练4周,4周后所有大鼠测量体重并进行糖耐量测试,取腓肠肌称重,使用组织化学法检测腓肠肌肌肉降解的变化,使用蛋白免疫印迹法检测自噬相关蛋白LC3和肌动蛋白actin变化。

**结果:**糖尿病运动组(DEG)与糖尿病对照组(DCG)比较,DEG血糖水平显著降低( $276.91 \pm 18.69$  mg/dl vs.  $310.75 \pm 16.54$  mg/dl,  $P < 0.05$ ),体重和腓肠肌重量显著增加(体重  $303 \pm 17.87$  g vs.  $185.44 \pm 20.27$  g,  $P < 0.05$ ; 肌重  $1.80 \pm 0.29$  g vs.  $0.92 \pm 0.20$  g,  $P < 0.05$ )。DEG的自噬性蛋白LC3表达水平比DCG显著降低( $225 \pm 27$  vs.  $435 \pm 31$ )。

**结论:**由于糖尿病过度的分解代谢激活了过度自噬作用,导致骨骼肌肌萎缩。4周跑台训练提高了糖尿病大鼠的肌肉量,说明有氧运动通过抑制自噬作用,可以防治糖尿病患者的骨骼肌肌萎缩。

**关键词** 有氧运动;糖尿病;大鼠;自噬作用;肌萎缩

中图分类号:R587.1,R746.4 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2016)-07-0739-07

Effects of aerobic exercise on autophagy-induced muscle atrophy in diabetic rats/GAO Qianjin, BAI Haiping, WANG Yanwei//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(7): 739—745

## Abstract

**Objective:** To investigate the mechanism by which hyperglycemia and insulin deficiency decrease muscle mass, and the exercise therapeutic effect through observing the effect of aerobic exercise training on autophagy-induced muscle atrophy.

**Method:** Adult male Wistar rats were injected intraperitoneally with Streptozotocin (60mg/kg body weight) to induce diabetes. All rats were divided into four groups randomly: diabetic control group(DCG), diabetic exercise group(DEG), normal control group(CG) and normal control exercise group(CEG). Aerobic exercise training was performed on a treadmill at a low-moderate intensity(50%—60% of the initial maximum speed), 1 hour per day, 5 days per week. After 4 weeks, we performed intraperitoneal glucose test and measured body weight and gastrocnemius muscle mass. The protein degradation and the level of autophagy were examined by histochemistry. At the same time, we also examined the level of LC3 and actin in isolated gastrocnemius by western blot analysis.

**Result:** The body weight and gastrocnemius muscle mass were higher in the diabetic exercise group rats than that in the diabetic control group rats( $303 \pm 17.87$  g vs.  $185.44 \pm 20.27$  g,  $P < 0.05$ ; muscle weight  $1.80 \pm 0.29$  g vs.  $0.92 \pm$

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.07.005

\*基金项目:石家庄学院科研平台启动基金项目(xJpT005)

1 石家庄学院体育学院运动人体科学实验中心,石家庄,050035; 2 通讯作者

作者简介:高前进,男,副教授; 收稿日期:2015-08-07

0.20g,  $P<0.05$ ). Compared with the diabetic control group, the diabetic exercise group had the lower blood glucose level ( $276.91\pm18.69$  mg/dl vs.  $310.75\pm16.54$  mg/dl,  $P<0.05$ ), the increased intracellular contractile protein expression, and the decreased autophagic protein expression ( $225\pm27$  vs.  $435\pm31$ ).

**Conclusion:** Four weeks treadmill running improves the muscle mass in the diabetes-induced skeletal muscle atrophy, suggesting the activation of autophagy in diabetes contributes to muscle atrophy through hypercatabolic metabolism. Moreover, that aerobic exercise modifies or reverses skeletal muscle atrophy may be mediated by suppressing autophagy in diabetic patients.

**Author's address** Human Movement Science Experimental Center of Shijiazhuang College' Sport College, Shijiazhuang, 050035

**Key word** aerobic exercise training; diabetes; rat; autophagy; muscle atrophy

糖尿病是一组由多病因引起的以慢性高血糖为特征的终身性代谢性疾病。糖尿病本身不一定造成危害,但长期血糖增高,大血管、微血管受损并危及心、脑、肾、周围神经、眼睛、肌肉等,据世界卫生组织统计,糖尿病并发症高达100多种,是目前已知并发症最多的一种疾病。糖尿病的发生发展虽然是多因素的,但受胰岛素作用的骨骼肌对该病的发展进程有非常大的影响<sup>[1]</sup>。

骨骼肌占体重的40%左右,是人体最大的器官,骨骼肌肌肉量减少是很多慢性疾病的特征,包括糖尿病、癌症、心衰等。虽然进食减少在骨骼肌废用的发展方面起到一定作用,但普遍认为代谢方面的改变诸如合成代谢减少,分解代谢增加,激素的影响和肌细胞因子稳态的变化在肌肉萎缩的病因学中起关键作用<sup>[2]</sup>。肌萎缩是由于肌细胞内的蛋白合成率和蛋白降解率之间的平衡遭到破坏所致。尤其,从实验和临床研究表明肌细胞内增加的蛋白分解是肌萎缩的最主要原因。存在于骨骼肌中的蛋白分解途径包括:自噬溶酶体系统、胞浆  $\text{Ca}^{2+}$ -激活系统和ATP-泛素依赖的蛋白水解途径<sup>[3]</sup>。这些系统在引起肌细胞蛋白分解中各自所起的作用仍不很清楚。自噬溶酶体系统在肌细胞内蛋白质的转化和降解中起重要作用<sup>[4]</sup>。

自噬 (autophagy) 是由 Ashford 和 Porter 在 1962 年发现细胞内有“自己吃自己”的现象后提出的,是指从粗面内质网的无核糖体附着区脱落的双层膜包裹部分胞质和细胞内需降解的细胞器、蛋白质等成分形成自噬体 (autophagosome), 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新<sup>[5]</sup>。自噬在机

体的生理和病理过程中都能见到,其所起的作用是正面还是负面的尚未完全阐明。虽然基础水平的自噬对细胞是一种保护性作用,但是过度自噬也会引起自噬性细胞死亡甚至加速疾病的进展,如血管平滑肌细胞自噬,会导致胶原合成减少,纤维帽变薄,最终导致急性心血管事件的发生<sup>[6]</sup>。最近,研究显示微管相关蛋白1轻链3 (LC3) 参与自噬作用的过程<sup>[7]</sup>。LC3 在自噬体形成的过程中与自噬体膜相连接,并且在自噬体的形成过程中起关键作用<sup>[8]</sup>。LC3 广泛存在于哺乳动物的细胞,包括肌细胞。LC3 有两种形式,LC3- I 和 LC3- II, LC3- I 弥散分布于胞浆,而 LC3- II 分布于自噬体膜。LC3- II 是首个被发现的与自噬体膜相关的蛋白,LC3- II 的数量与自噬体形成的程度相关。虽然自噬作用在其他很多疾病中已有很多的研究,但是自噬作用在链脲菌素 (STZ) 诱导的糖尿病肌萎缩中是否起作用,或者说糖尿病引起的肌萎缩是否与自噬作用有关并不清楚。

运动被公认对糖尿病有重要的健康益处。运动改善糖尿病患者骨骼肌的适应能力的分子机制还未阐明。有氧运动对肌肉的结构和功能产生的有益影响,可能是通过激活各种各样的信号机制来实现的<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究目的是通过观察有氧运动对糖尿病大鼠肌萎缩的影响,探讨高血糖和胰岛素缺乏引起肌肉量减少的机制及运动的防治作用机制。

## 1 材料与方法

为了使实验结果真实可靠,指标检测及数据统计过程使用双盲实验法,对各实验组进行编号后聘请不知情实验员检测和统计。

### 1.1 动物及饲料

清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重  $200 \pm 10\text{g}$ ,由河北医科大学实验动物学部提供[实验动物生产许可证号:SCXK(冀)2008-1-003,使用许可证号:SYXK(冀)2008-0026],分笼饲养,每笼 5 只,室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ,相对湿度 40%—60%,自然光照,保持通风。国家标准啮齿类动物饲料,自由饮食饮水。

### 1.2 造模方法、实验分组

所有大鼠适应性喂养一周后,禁食 12h,随机分为糖尿病模型组和正常对照组。模型组按  $60\text{mg/kg}$  腹腔内一次性注射 STZ(美国,shima 公司)。STZ 临用前用枸橼酸钠缓冲液( $0.1\text{mol/L}$ ,  $\text{pH}4.5$ )配置。正常对照组则注射等量枸橼酸钠溶液。注射 STZ 溶液 8 天后两组大鼠尾静脉采血,测血糖(美国强生稳豪型微量血糖仪及配套血糖试纸),模型组血糖水平高于  $200\text{mg/dl}$  者造模成功纳入实验,血糖水平低于  $200\text{mg/dl}$  者剔除。正常对照组不剔除。然后糖尿病模型组分为糖尿病对照组(diabetic control group, DCG),糖尿病运动组(diabetic exercise group, DEG),正常对照组分为正常对照组(control group, CG)和正常对照运动组(control exercise group, CEG),每组各 8 只大鼠<sup>[11-12]</sup>。

### 1.3 运动方案

有氧运动采用跑台跑训练。所有运动组大鼠先在跑台上进行  $10\text{m/min}$ ,  $30\text{min/d}$  的适应性训练 3 天。然后,进入正式训练,跑台跑速  $15\text{m/min}$ ,坡度  $5^\circ$ ,  $1\text{h/d}$ ,  $5\text{d/周}$ ,训练 4 周。所有对照组安静饲养,正常饮食饮水,不加任何运动干预<sup>[13]</sup>。大鼠跑台为杭州段氏制作 BCPT-98 型。

### 1.4 腹膜内糖耐量测试

4 周跑台训练最后一次训练后休息 48h,开始禁食 16h,所有组别大鼠进行糖耐量实验,腹腔注射葡萄糖  $2\text{g/kg}$  体重,然后在 0min、30min、60min、90min、120min 每间隔半个小时尾静脉采血测血糖。

### 1.5 骨骼肌测试样本的采集

葡萄糖耐量测试完毕开始取材。各组大鼠用 2%的戊巴比妥钠腹腔麻醉,断头取血置于离心管中,倾斜静置 3—4h 后进行常规血清分离( $2000\text{r/min}$ ,  $15\text{min}$ ), $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存待测。取血后速取腓肠肌,快速吸干表面血迹,进行肌肉称重。左侧腓肠肌

外侧头切约为  $4\text{mm} \times 4\text{mm} \times 4\text{mm}$  放入冰冻浴槽冷冻后,置于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存待测。右侧腓肠肌外侧头,剔除筋膜,液氮冻干, $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存,留做匀浆用。

### 1.6 腓肠肌冰冻切片 HE 染色

取材过程中,快速将约  $4\text{mm} \times 4\text{mm} \times 4\text{mm}$  的腓肠肌投入用液氮预冷的装有正己烷( $-70^\circ\text{C}$ )的小烧杯中速冻,之后转移至  $-20^\circ\text{C}$  的恒冷箱冰冻切片机备用。在  $-20^\circ\text{C}$  的 SLEE 恒冷切片机内进行切片,厚度为  $10\mu\text{m}$ ,冷风机下吹干,固定液 A 固定 30—60s,水冲洗 30s,固定液 B 固定 60s,加入苏木精染色,水冲洗,1%盐酸乙醇 5s(方法:放进去,取出来,重复 5 次,使得细胞核与细胞质分化)分色,放入水中 10min,1%伊红染色 5min,然后 80%,95%,100%乙醇依次洗过,每隔 2s 将伊红洗净,放入二甲苯 1—2s 透明,中性树胶封片。

固定液 A 配制方法:80%中性福尔马林+75%乙醇+1%冰醋酸;固定液 B 配制方法:75%无水乙醇+25%冰醋酸。

组织切片染色后,显微镜观察,通过 Panasonic WV-CP410/G 摄像头和 BOSER BS602A 图像采集卡进行图像采集,之后用 Scion Image (National Institutes of Health, USA)进行分析。每样本测量 5 个随机视野。

### 1.7 免疫印记 Western-blotting 检测腓肠肌 LC3 和 actin 蛋白表达

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离肌肉匀浆中的蛋白组分和 Western-blotting:称取腓肠肌肉样品,迅速剪碎后放入玻璃匀浆器中,以 1:10 的比例加入匀浆液进行匀浆。匀浆液为 TE 缓冲液( $50\text{mM}$  Tris·HCl,  $\text{pH} 7.4$ ,  $5\text{mM}$  EDTA)。将 10%匀浆液  $4^\circ\text{C}$ 、 $12000\text{g}$  离心 20min,收集上清液。上清液蛋白浓度用考马斯亮蓝 G250 法(Bradford 法)测定。然后用上样缓冲液调整蛋白浓度至  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,然后在沸水中煮 5min,制备好的蛋白样品晾至室温直接用于电泳,使用瑞典 LKB 2301 电泳仪,每孔加样量  $20\mu\text{l}$ ,电泳条件为: $82\text{mm} \times 82\text{mm}$  微型垂直板电泳槽,凝胶厚度  $0.75\text{mm}$ 。分离胶浓度为 12%。样品通过浓缩胶时电压  $60\text{V}$ ,分离胶时为  $90\text{V}$ 。当溴酚蓝泳出凝胶下缘,取胶,进行电转移。

在转移缓冲液中浸泡、平衡海绵垫、滤纸和硝酸



纤维素膜(NC膜)。打开转移框架,依次铺上海绵垫、滤纸、NC膜、凝胶、滤纸、海绵垫,用玻璃棒排去气泡,夹好后插入转移槽;将NC膜一侧朝向正极,浸于转移缓冲液中,将槽放于冰浴中,100V电压转移1h。

电转移完成后,取出NC膜,用3%的脱脂奶粉封闭,摇床摇1h;用封闭液稀释一抗(1:200),将NC膜放于小塑料袋内,浸于稀释的一抗(LC3,1:1000; actin, 1:1000; GAPDH,1:1000)中,4℃摇床过夜;取出NC膜,用TTBS缓冲液浸洗4次,每次摇10—15min;用封闭液稀释羊抗小鼠IgG-HRP(1:200)二抗,将NC膜放于另一塑料袋内,浸于稀释的二抗中,室温摇3h;之后洗膜,以免疫印迹化学发光法(ECL)检测蛋白区带。所有试剂和一抗,二抗均购自华美生物科技有限公司。

免疫印迹及结果分析:使用YLN-2000凝胶影像分析系统进行定量分析。

## 1.8 统计学分析

应用SPSS11.5统计分析软件,以单因素方差分析各组别之间的差异;数值以平均数±标准差表示。

## 2 结果

### 2.1 血糖、体重和腓肠肌重量

随机分组时,所有动物的血糖各组之间无显著差异,STZ注射1周后,糖尿病大鼠的血糖显著增高,比正常对照组高近3倍( $305.72 \pm 15.78 \text{ mg/dl}$  vs.  $104.64 \pm 13.43 \text{ mg/dl}$ ),呈显著性差异( $P < 0.05$ )。运动干预4周后进行糖耐量测试,糖尿病运动组比糖尿病对照组血糖水平呈显著下降( $276.91 \pm 18.69$

$\text{mg/dl}$  vs.  $310.75 \pm 16.54 \text{ mg/dl}$ ,  $P < 0.05$ ),然而糖尿病运动组(DEG)血糖水平仍显著性高于正常对照组CG( $276.91 \pm 18.69 \text{ mg/dl}$  vs.  $105.28 \pm 14.44 \text{ mg/dl}$ ,  $P < 0.05$ );总之,糖尿病运动组血糖水平虽然有所下降,但是与正常对照组(CG)相比较仍处于较高水平。见图1。

随机分组时,各组大鼠体重无显著差异。STZ注射4周后糖尿病对照组体重呈显著下降( $185.44 \pm 20.27 \text{ g}$ )。运动干预4周后,DEG体重比DCG显著增加( $303 \pm 17.87 \text{ g}$  vs.  $185.44 \pm 20.27 \text{ g}$ ,  $P < 0.05$ )。但是DEG体重仍显著低于正常对照组(CG)和正常运动组(CEG)( $303 \pm 17.87 \text{ g}$  vs.  $415.06 \pm 24.38 \text{ g}$  和  $414.25 \pm 16.99 \text{ g}$ )。见图2。

糖尿病对照组大鼠腓肠肌重量显著低于正常对照组大鼠和正常运动组(CEG)的腓肠肌重量( $0.92 \pm 0.20 \text{ g}$  vs.  $2.15 \pm 0.24$  和  $2.27 \pm 0.21 \text{ g}$ )。然而,运动干预4周后,糖尿病运动组大鼠腓肠肌重量比DCG有显著的提高( $1.80 \pm 0.29 \text{ g}$  vs.  $0.92 \pm 0.20 \text{ g}$ ),但DEG腓肠肌重量仍显著低于CG组和CEG组(见图3)。CEG组腓肠肌重量比CG组有上升趋势,但无显著性差异,( $2.15 \pm 0.24 \text{ g}$  vs.  $2.27 \pm 0.21 \text{ g}$ )。

### 2.2 腓肠肌HE染色组织化学变化

从HE染色的腓肠肌横切面观察到,CG大鼠肌细胞呈不同形状的块状,排列紧密,核位于细胞边缘(图4),CEG肌细胞排列紧密,偶见小部分炎症细胞浸润现象(图5);DCG肌纤维排列疏松,大部分肌纤维直径缩小呈圆形,有个别肌细胞肿大,细胞间质水肿,间质中可见大量炎症细胞(图6),而CEG的肌纤维直径增大呈不同形状,细胞排列较紧密,间质水肿

图1 运动干预后各组大鼠糖耐量血糖水平

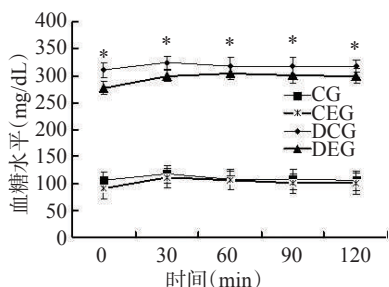


图2 运动干预后各组大鼠体重变化

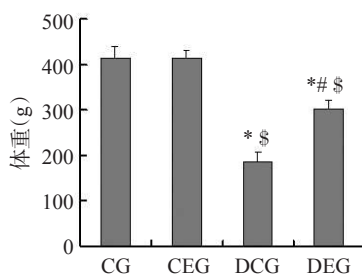
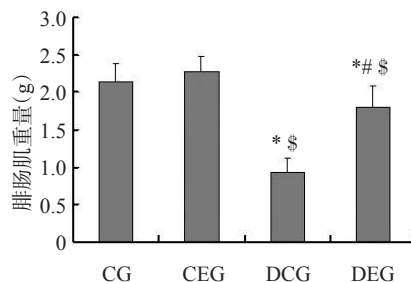


图3 运动干预后各组大鼠腓肠肌重量



注:\*表示与正常对照组CG比较 $P < 0.05$ ;#表示与糖尿病对照组DCG比较 $P < 0.05$ ;\$表示与正常运动组CEG比较 $P < 0.05$

减少(图7)。说明STZ诱导糖尿病使大鼠肌纤维直径减小,肌肉萎缩,运动干预可以减少这种肌萎缩。

### 2.3 自噬作用相关蛋白表达

为了进一步探讨糖尿病大鼠肌肉量下降和肌纤维萎缩的机制。我们检测了腓肠肌细胞内LC3和actin的蛋白水平,LC3是一个关键的自噬体分子,actin是肌动蛋白,是收缩蛋白的关键成分。GAPDH作为内参。腓肠肌Western-blotting蛋白表达结果见图8。蛋白条带用光密度(optical density, OD)值量化。对照组OD值平均数作为基数,其他组OD值除以基数,乘以100%作为蛋白变化的结果<sup>[14]</sup>。结果发现,4周后LC3的蛋白条带在糖尿病对照组(DCG)显著增加,几乎是CG的4.5倍,DEG蛋白条带密度比DCG组下降2倍多,说明糖尿病过度自噬作用显著,而运动大大抑制了这种过度自噬。

图4 CG组腓肠肌横切面 (10×40, HE染色)

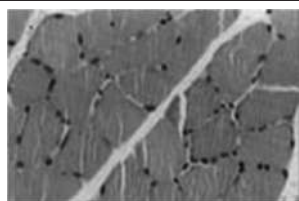


图5 CEG组腓肠肌横切面 (10×40, HE染色)

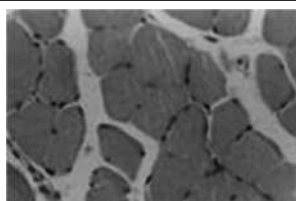


图6 DCG腓肠肌横切面 (10×40, HE染色)

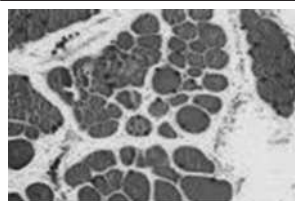


图7 DEG腓肠肌横切面 (10×40, HE染色)

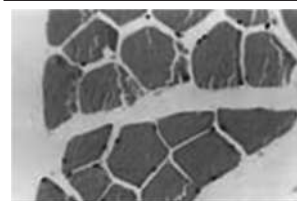
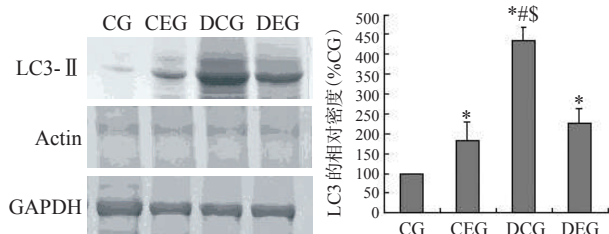


图8 腓肠肌 Western-blotting 蛋白表达结果



注: \*表示与CG有显著性差异  $P<0.05$ ; #表示与CEG有显著性差异  $P<0.05$ ; \$表示与DEG有显著性差异  $P<0.05$

### 3 讨论

肌肉萎缩是人类慢性糖尿病的并发症,而且对下肢肌肉影响较大<sup>[16]</sup>。然而,对于糖尿病引起肌肉萎缩的分子机制人们至今了解甚少。本研究我们使用STZ腹膜内注射的办法复制糖尿病大鼠模型,然后在动物跑台上采用中等强度上坡跑的方法对糖尿病大鼠运动干预4周,观察有氧运动对糖尿病大鼠

CEG LC3比CG也有显著的增加,但是正常运动组大鼠4周运动后体重没有明显变化,腓肠肌有增大趋势,说明正常运动组大鼠体内代谢旺盛,自噬作用增加是为了满足实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新,是生理性的<sup>[15,4]</sup>。然而,各组腓肠肌actin蛋白水平没有任何变化,说明自噬作用的过度反应没有引起actin的降解。

### 2.4 各组LC3-II蛋白含量变化与腓肠肌重量变化相关性分析

CEG LC3-II蛋白含量变化与腓肠肌重量变化相关系数  $r=0.541$ ,  $P=0.166>0.05$ , 呈不显著相关。而DCG LC3-II蛋白含量变化与腓肠肌重量变化相关系数  $r=-0.743$ ,  $P=0.035<0.05$ , 呈显著性负相关; DEG LC3-II蛋白含量变化与腓肠肌重量变化相关系数  $r=-0.746$ ,  $P=0.033<0.05$ , 呈显著性负相关。

血糖、体重、肌肉重量,肌纤维组织学变化,以及对细胞内自噬相关蛋白表达的影响。通过实验研究比较,我们发现糖尿病引发肌萎缩与自噬相关蛋白LC3表达增加相关,而运动干预通过抑制这种过度自噬作用减轻了肌萎缩。我们采用上坡跑的运动方案,主要观察了下肢的腓肠肌,腓肠肌是小腿后面浅层的大块肌肉,俗称小腿肚子,有氧运动使各运动组大鼠肌肉量增加,尤其使糖尿病运动组大鼠腓肠肌重量显著增加,肌萎缩显著改善。

长期以来,人们普遍认为身体活动对糖尿病患者有重要的健康益处。有规律的运动导致骨骼肌产生大量的适应,使肌肉更有效的利用细胞内的能源物质去合成ATP,从而更持久的对抗疲劳<sup>[17]</sup>。长期的身体活动增加葡萄糖转运蛋白4的水平,增加线粒体酶活性,改变肌肉的肌纤维类型<sup>[18-19]</sup>。与胰岛素的作用途径不同,运动不是通过影响胰岛素受体和胰岛素受体底物1的磷酸化,以及磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3-K)的活动<sup>[20]</sup>

来增加肌肉能量摄入的,很明显,运动和胰岛素刺激骨骼肌 GLUT4 转运的信号机制是不一样的。运动是一个多种因素参与的过程,例如涉及肌肉能量状态的改变(例如 ATP/AMP 比率增高),细胞内钙离子水平增加,蛋白激酶 C 激活,以及其他改变等<sup>[21]</sup>,例如有研究支持 ROS 和 NO 在调节肌肉收缩引起的葡萄糖转运中的作用<sup>[22-23]</sup>,这些研究数据建议各种各样的信号参与在运动过程中。因此,运动干预引起糖尿病大鼠血糖降低也许就是这些信号机制的结果。

当细胞不能从外界吸收营养时,会引起营养缺乏、生长因子剥夺,从而刺激过度自噬作用发生<sup>[24]</sup>。PI3K/mTOR 途径已被鉴别为哺乳动物细胞自噬作用的调节机制<sup>[25]</sup>。研究证明,当细胞能量贫乏时,mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,是一个细胞营养状态的感受器)被抑制,而 mTOR 的抑制可刺激过度自噬作用的发生<sup>[26]</sup>。AMP 激活的蛋白激酶信号通路是运动刺激葡萄糖转运的关键信号机制,研究证实,当葡萄糖缺乏或缺血引起的过度自噬作用发生时,运动引起的 AMP 激酶信号通路可快速减少自噬作用发生<sup>[27]</sup>。这些研究提示,运动可通过增加葡萄糖的摄取或激活糖代谢的信号机制来抑制骨骼肌细胞的过度自噬作用。本研究采用 4 周的运动干预使糖尿病大鼠肌肉量显著增加,同时自噬相关蛋白 LC3 表达降低,过度自噬作用被抑制。这些结果建议糖尿病引起的肌萎缩是受过度自噬作用影响的。

由胰岛素缺乏引起的骨骼肌萎缩的机制是复杂的,可能涉及几个机制,包括过度自噬作用,代谢紊乱,运动终板降解和肌细胞蛋白合成受损等<sup>[28]</sup>。本研究清楚地显示 STZ-糖尿病大鼠的腓肠肌肌肉量显著下降,肌纤维萎缩,跑台跑运动减轻了这些症状。我们发现糖尿病的形成刺激了过度自噬作用,糖尿病大鼠腓肠肌 LC3 表达增加,跑台跑运动通过降低血糖和抑制自噬的过度活动发挥了保护作用。运动可能通过反复的肌肉收缩改进葡萄糖摄取,使肌细胞能量状态得到改善,肌细胞能量状态改善可减少过度自噬作用,从而防止了骨骼肌肌纤维的破坏,改进糖尿病性肌萎缩。

自噬相关蛋白 LC3 变化与肌肉重量变化呈负相关关系,STZ-糖尿病引起的肌肉萎缩与 LC3 的增加有关,而 4 周的有氧运动干预显著降低了 LC3 的

蛋白表达,增加体重和肌肉量,防止了肌萎缩的发生。所以,有氧运动减轻糖尿病性肌萎缩与自噬相关蛋白 LC3 的降低有关。

## 参考文献

- [1] Perez-Schindler J, Philp A. Regulation of skeletal muscle mitochondrial function by nuclear receptors: implications for health and disease[J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129(7): 589—599.
- [2] Dutt V, Gupta S, Dabur R, et al. Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanisms of action [J]. Pharmacol Res, 2015, 99(6):86—100.
- [3] Pasiakos SM, Carbone JW. Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise[J]. IUBMB Life, 2014, 66(7):478—484.
- [4] Sanchez AM, Bernardi H, Py G, et al. Autophagy is essential to support skeletal muscle plasticity in response to endurance exercise[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2014, 307(8):R956—969.
- [5] Vainshtein A, Grumati P, Sandri M, et al. Skeletal muscle, autophagy, and physical activity: the ménage à trois of metabolic regulation in health and disease[J]. J Mol Med (Berl), 2014, 92(2):127—137.
- [6] Marunouchi T, Tanonaka K. Cell Death in the Cardiac Myocyte[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(8):1094—1097.
- [7] Mehta P, Henault J, Kolbeck R, et al. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity[J]. Curr Opin Immunol, 2014, 26:69—75.
- [8] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720—5728.
- [9] Kwak HB. Statin-induced Myopathy in Skeletal Muscle: the Role of Exercise[J]. J Lifestyle Med, 2014,4(2):71—79.
- [10] Carter HN, Chen CC, Hood DA. Mitochondria, muscle health, and exercise with advancing age[J]. Physiology (Bethesda), 2015, 30(3):208—223.
- [11] 潘秋,韩静,余俊达. STZ 诱发性糖尿病大鼠表征及其征候特征研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(10):1644—1647.
- [12] 柏海平,高前进. 游泳运动对 2 型糖尿病大鼠炎症和氧化应激状态的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(8):708—713.
- [13] 李宁. 有氧运动对糖尿病 SD 大鼠血清视黄醇结合蛋白-4 的影响[J]. 武汉体育学院学报, 2012, 46(3): 16—20.
- [14] Koh TJ, Escobedo J. Cytoskeletal disruption and small heat shock protein translocation immediately after lengthening contractions[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286:



- C713—C722.
- [15] 钱帅伟. 运动对骨骼肌氧化应激及自噬相关基因表达的影响[D]. 华东师范大学, 2012.
  - [16] Trujillo-Santos AJ. Diabetic muscle infarction: an underdiagnosed complication of long-standing diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(1): 211—215.
  - [17] Catoire M, Kersten S. The search for exercise factors in humans[J]. *FASEB J*, 2015, 29(5): 1615—1628.
  - [18] Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle[J]. *Adv Physiol Educ*, 2014, 38(4): 308—314.
  - [19] Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CW, et al. Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men[J]. *J Appl Physiol*, 1972, 33(3): 312—319.
  - [20] Goodyear LJ, Giorgino F, Balon TW, et al. Effects of contractile activity on tyrosine phosphoproteins and PI3-kinase activity in rat skeletal muscle[J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(5): E987—995.
  - [21] Röckl KS, Witczak CA, Goodyear LJ. Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise[J]. *IUBMB Life*, 2008, 60(3): 145—153.
  - [22] Sandström ME, Zhang SJ, Bruton J, et al. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2006, 575(Pt 1): 251—262.
  - [23] Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*, 1997, 82(1): 359—363.
  - [24] Dodson M, Redmann M, Rajasekaran NS, et al. KEAP1-NRF2 signalling and autophagy in protection against oxidative and reductive proteotoxicity[J]. *Biochem J*, 2015, 469(3): 347—355.
  - [25] Moore MN. Do airborne biogenic chemicals interact with the PI3K/Akt/mTOR cell signalling pathway to benefit human health and wellbeing in rural and coastal environments?[J]. *Environ Res*, 2015, 140: 65—75.
  - [26] Pujhari S, Kryworuchko M, Zakhartchouk AN. Role of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathways in porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication[J]. *Virus Res*, 2014, 194: 138—144.
  - [27] Qi D, Young LH. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(8): 422—429.
  - [28] Ryter SW, Koo JK, Choi AM. Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2014, 17(4): 329—337.

## (上接第738页)

- [5] Kraegen EW, James DE, Bennet SP, et al. In vivo insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp[J]. *Physiol*, 1983, 245(1): E1—E4.
- [6] Haffner SM, Kennedy E, Gonzalez C, et al. A prospective analysis of the HOMA model: the Mexico City Diabetes Study[J]. *Diabetes Care*, 1996, 19(10): 1138—1141.
- [7] 李光伟. 胰岛素敏感性评价及其在临床研究中的应用[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2000, 16(3): 198—200.
- [8] Lastra G, Dhuper S, Johnson MS, et al. Salt, aldosterone, and insulin resistance: impact on the cardiovascular system[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2010, 7(10): 577—584.
- [9] Dyck DJ. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2009, 34(3): 396—402.
- [10] Deepa R, Pradeepa R, Shanthirani CS, et al. Association of hypertension with cluster of insulin resistance syndrome factors[J]. *Acta Diabetol*, 2004, 41(2): 49—55.
- [11] Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, et al. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(6): E1231—1238.
- [12] 殷俊, 陈名道, 周丽斌, 等. 长程高脂饮食对实验大鼠糖尿病形成的影响[J]. *中国医师杂志*, 2004, 6: 47—49.
- [13] Stoppani E, Rossi S, Meacci E, et al. Point mutated caveolin-3 form (P104L) impairs myoblast differentiation via Akt and p38 signalling reduction, leading to an immature cell signature[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(4): 468—479.
- [14] Murfitt L, Whiteley G, Iqbal MM, et al. Targeting caveolin-3 for the treatment of diabetic cardiomyopathy[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 151: 50—71.
- [15] Ohno Y, Sugiura T, Ohira Y, et al. Loading-associated expression of TRIM72 and caveolin-3 in antigravitational soleus muscle in mice[J]. *Physiol Rep*, 2014, 2(12): e12259.
- [16] Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, et al. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(41): 26962—26968.
- [17] Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Zhan L, et al. Resveratrol enhances GLUT-4 translocation to the caveolar lipid raft fractions through AMP/Akt/eNOS signalling pathway in diabetic myocardium[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6A): 2350—2361.