

·基础研究·

急性离心运动后恢复期大鼠骨骼肌微管形态及自噬体降解特征研究*

王 祯¹ 雷槟恺¹ 于 亮² 李俊平^{1,3} 王瑞元^{1,3}

摘要

目的:观察急性离心运动后恢复期大鼠骨骼肌微管形态变化及自噬体降解特征。

方法:SD大鼠随机分为安静组、急性离心运动组,于运动后0h、12h、24h、48h、72h取材。分离单根肌纤维检测微管形态,Western Blot检测LC3、p62蛋白表达,腹腔注射秋水仙碱检测恢复前期(12h内)骨骼肌自噬流。

结果:①急性离心运动后恢复期内骨骼肌微管形态改变,恢复12h大量横向微管丢失且纵向微管束密度降低;②恢复12h肌纤维中多见自噬体,24h与48h自噬溶酶体增多;③微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)Ⅱ型蛋白表达在恢复12h、24h、48h显著增加($P<0.05$),0h、72h显著降低($P<0.05$),p62蛋白表达呈先增加后降低趋势,于恢复12h最高($P<0.05$);④急性离心运动组运动后恢复前期(12h内)骨骼肌自噬流显著低于安静组($P<0.05$)。

结论:急性离心运动后恢复期内骨骼肌自噬体降解存在“瓶颈”,恢复前期(12h内)自噬流降低,可能与骨骼肌横向、纵向微管丢失有关。

关键词 急性离心运动;恢复;自噬体降解;微管

中图分类号:R743.3,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-02-0148-07

Study on the morphology of microtubules and the characteristics of autophagosome degradation in rats skeletal muscle during the recovery period after acute eccentric exercise/WANG Zhen, LEI Bingkai, YU Liang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(2): 148—154

Abstract

Objective: To observe the morphological changes of microtubules and the characteristics of autophagosome degradation in rat skeletal muscle following eccentric exercise.

Method: SD rats were randomly divided into control group and eccentric exercise group. The muscles were taken at 0h, 12h, 24h, 48h, 72h postexercise. Single muscle fiber was isolated to detect the morphology of microtubules. Western Blot was used to detect the expression of LC3 and p62. Moreover, autophagy flux in the first 12h after exercise was detected via intraperitoneal injection colchicine.

Result: The results showed that eccentric exercise changed the morphology of muscle microtubules. Transverse microtubules were lost at 12h postexercise, and the density of longitudinal microtubule bundles also decreased at this time point. The results of transmission electron microscope showed that there were more autophagosomes at 12h postexercise, while autophagolysosomes were more at 24h and 48h. The results of Western Blot showed that the level of autophagy marker protein LC3-Ⅱ increased significantly at 12h, 24h, and 48h postexercise($P<0.05$), and significantly decreased at 0h, 72h($P<0.05$), and p62 protein level increased at first then decreased, the expression was the highest at 12h postexercise($P<0.05$). Furthermore, autophagy flux of skeletal

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.02.002

*基金项目:国家自然科学基金项目(31471133);北京体育大学2019年中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2019PT013)

1 北京体育大学运动人体科学学院,北京市,100084; 2 北京体育大学体能训练学院; 3 通讯作者

第一作者简介:王祯,女,博士研究生; 收稿日期:2021-04-27

muscle in the first 12h after exercise was significantly lower than that in control group($P<0.05$).

Conclusion: These results indicate that there is a "bottleneck" in autophagosome degradation of muscle after eccentric exercise, the autophagy flux was decreased in the early stage of recovery(first 12h), which may be related to the loss of muscle transverse and longitudinal microtubules.

Author's address School of Sports Science, Beijing Sport University, Beijing, 100084

Key word acute eccentric exercise; recovery; autophagosome degradation; microtubules

剧烈或非习惯性运动,尤其是离心运动,易引起运动性骨骼肌损伤(exercise-induced muscle damage, EIMD),造成肌肉酸痛、肌力下降。EIMD不仅影响竞技体育中运动周期的正常推进,还会阻碍全民健身的顺利开展。因此,了解EIMD发生机制一直是体育界与医学界的研究热点。

自噬是细胞利用溶酶体降解自身胞质成分的过程^[1],包括自噬体生成与降解两个阶段。研究表明,EIMD发生时,骨骼肌非选择性自噬^[2]与选择性自噬(线粒体自噬^[3]、内质网自噬^[4]和聚集体自噬^[5])水平均显著提高,揭示自噬在EIMD中具有重要作用。然而,近年有文献报道骨骼肌损伤后自噬过程通常存在“瓶颈”,即自噬体降解速率慢于受损内容物的积累,制约后续肌纤维修复^[6]。但EIMD恢复进程中是否存在自噬体降解“瓶颈”尚未明确,由此从自噬体降解角度探究EIMD发生机制对寻找骨骼肌损伤修复手段具有关键的理论意义。

自噬体依赖与溶酶体的融合完成自身内容物的降解,因此在多数细胞中,闭合后的自噬体需移动至核周,与溶酶体空间相遇,才能实现融合与降解^[7-8]。微管作为真核细胞中细胞骨架的架构主干,在这一运输过程中具有重要作用^[9]。课题组前期研究发现,急性离心运动使骨骼肌微管解聚,影响线粒体分布与功能^[10],由此推测EIMD恢复进程中微管损伤可能同样影响自噬体运输与降解。本研究在前期研究基础上,建立急性离心运动模型,分离单根肌纤维并利用免疫荧光技术检测急性离心运动后不同恢复时相大鼠骨骼肌微管形态变化,结合透射电镜观察自噬体与自噬体溶酶体形成,此后使用免疫印迹技术(Western Blot)检测自噬相关蛋白表达,并通过在体注射秋水仙碱检测骨骼肌自噬流变化,为后续深入探究EIMD机制、寻找损伤修复手段提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

60只SPF级8周龄雄性SD大鼠,购于北京维通利华实验动物有限公司,于北京体育大学SPF级动物实验室进行饲养,温度 $22\pm2^{\circ}\text{C}$,相对湿度55%—75%,昼夜周期12h。所有大鼠预适应3天后随机分为:安静组(C)、急性离心运动组(E),其中,急性离心运动组根据运动后不同恢复时相分为0h、12h、24h、48h、72h 5个亚组,10只/组。

1.2 运动方案

参照Armstrong的离心运动模型^[11],所有大鼠正式实验前进行2天预适应训练(第一天训练速度16m/min,时间5min,坡度 0° ;第二天训练速度16m/min,时间10min,坡度 0°),休息一天后进行正式实验(速度16m/min,时间90min,坡度 -16°)。

1.3 动物取材

大鼠在运动后不同恢复时相点取材。腹腔注射25%乌拉坦麻醉大鼠(5ml/kg),腹主动脉取血致死,分离双侧比目鱼肌。一侧比目鱼肌放入消化液,以分离单根肌纤维;另一侧比目鱼肌切取米粒大小放入戊二醛,制备电镜样本;剩余肌肉锡纸包裹于液氮速冻,而后转移至 -80°C 冰箱保存,以测定蛋白表达。

1.4 免疫印迹技术

取50mg比目鱼肌放入2ml EP管中,加入500 μl 裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上剪碎并匀浆,冰浴静置30min。将EP管对称放入提前预冷的高速离心机, 4°C 离心10min,吸取上清。使用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,调蛋白浓度一致后加入 $5\times$ 上样缓冲液, 100°C 煮10min,分装备用。采用10%分离胶浓度,SDS-PAGE凝胶电泳,300mA转膜90min,5%脱脂奶粉封闭1h,一抗:LC3(1:2000, Abcam, UK), p62(1:5000, Abcam, UK), GAPDH(1:2000, ZSGB-BIO, CHN) 4°C 过夜。次日,TBST清洗一抗(5min $\times$ 3次),室温孵育二抗(LC3、p62二抗浓度

1:2000, GAPDH 二抗浓度 1:4000)1.5h, TBST 清洗二抗(5min×3次)后曝光,使用 Image J 软件分析蛋白灰度值。

1.5 单根肌纤维的分离及免疫荧光技术

比目鱼肌分离后迅速放入预热的消化液中,37℃消化3h,每30min轻轻晃动一次。时刻观察比目鱼肌状态,待肌纤维开始松散后转移至预热的洗液(含有青霉素链霉素的DMEM)中终止消化。解剖镜下使用胶头滴管轻轻吹打,将分离的单根肌纤维转移至另一预热的洗液中,该过程重复3次,以清除杂质。

将分离出的单根肌纤维移至装有4%多聚甲醛(37℃预热)的培养皿中固定5min,使用PBS清洗2次,而后用1%甘氨酸(PBS稀释)孵育10min。使用0.1% Triton X-100(PBS稀释)破膜10min,加入含有10%马血清与0.1% Triton X-100的PBS室温封闭1h。小心吸出肌纤维放于载玻片上,组化笔画圈后滴加一抗,湿盒内4℃过夜。次日PBS清洗一抗,于室温避光孵育二抗1h, PBS清洗二抗后滴加含有DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片,4℃放置24h后拍摄。抗体均使用封闭液进行配置:一抗 α -tubulin(1:1000, Abcam, UK), 二抗(1:1000, Bioss, CHN)。

1.6 透射电镜

从比目鱼肌肌腹中切取约1mm³组织块,于2.5%戊二醛固定2h,磷酸缓冲液冲洗后1%锇酸4℃固定2h,双蒸水冲洗后梯度酒精脱水(50%、70%、90%、100%),环氧丙烷置换,环氧树脂(EPON 812)浸透、包埋、聚合,制作半超薄切片,染色后于光镜下定位观察,切取超薄切片,醋酸双氧铀、枸橼酸铅染色后在JEM-1400电镜下(30000倍)观察比目鱼肌自噬体、自噬溶酶体形态,每组检测3只。

1.7 自噬流检测

腹腔注射秋水仙碱是目前检测大鼠骨骼肌自噬流的最佳手段,其毒性小,可有效抑制自噬降解^[12]。因此,为更准确地检测离心运动后大鼠骨骼肌自噬流变化,另选取8周龄雄性SD大鼠12只,分为安慰剂组(VEH+CON)、安慰剂+运动组(VEH+EXE)、秋水仙碱组(COL+CON)、秋水仙碱+运动组(COL+EXE),3只/组。运动前连续3天腹腔注射生理盐水或秋水仙碱(剂量0.4mg/kg),于运动后恢复12h取

材,分离双侧比目鱼肌,免疫印迹技术检测LC3-II、p62蛋白表达,计算自噬抑制前后LC3-II差值(COL-VEH)反映自噬流。

1.8 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行分析,数据以均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析(方差齐使用LSD法,方差不齐使用Tamhane's T2法),两两比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 急性离心运动后恢复期骨骼肌微管形态变化

为明确急性离心运动后不同恢复时相大鼠骨骼肌微管形态变化,本研究分离单根肌纤维并使用免疫荧光技术标记 α -tubulin(图1),C组大鼠骨骼肌微管呈纵向(平行于肌纤维长轴)与横向(垂直于肌纤维长轴)交织分布,展现出规律的“网格”状,同时纵向微管相互汇合呈束,且多集中于相邻细胞核之间,而横向微管独立分布,为非束状;急性离心运动后即刻微管形态未见明显改变,而恢复12h后大量横向微管缺失(如白色箭头所示),且纵向微管束密度降低,之后,随恢复时间延长,微管形态逐渐恢复至规律的网格状。

2.2 急性离心运动后恢复期骨骼肌自噬体、自噬溶酶体形成特征

为观察急性离心运动后大鼠骨骼肌自噬体、自噬溶酶体形态与数量,本研究使用透射电镜进行定性分析(图2)。C组大鼠骨骼肌肌节排列整齐,线粒体分布于Z线两侧且体积均一,肌纤维中可见少数自噬体与自噬溶酶体;E0组肌节排列未见明显改变,可见少量双层膜结构的自噬体(如白色方框所示);E12组Z线出现小幅扭曲,且视野内自噬体数量增加;E24组肌节发生严重扭曲,可见大量自噬体与单层膜结构的自噬溶酶体;E48组肌节扭曲程度有所恢复,视野内自噬体数量减少,而自噬溶酶体数量增加;E72组肌节恢复规律的排布,自噬体与自噬溶酶体数量减少,Z线两侧完整线粒体数量减少,可见大量降解碎片(如白色箭头所示)。

2.3 急性离心运动后恢复期骨骼肌LC3、p62蛋白表达

为检测急性离心运动后大鼠骨骼肌自噬水平变

图1 急性离心运动后不同恢复时相骨骼肌微管形态变化

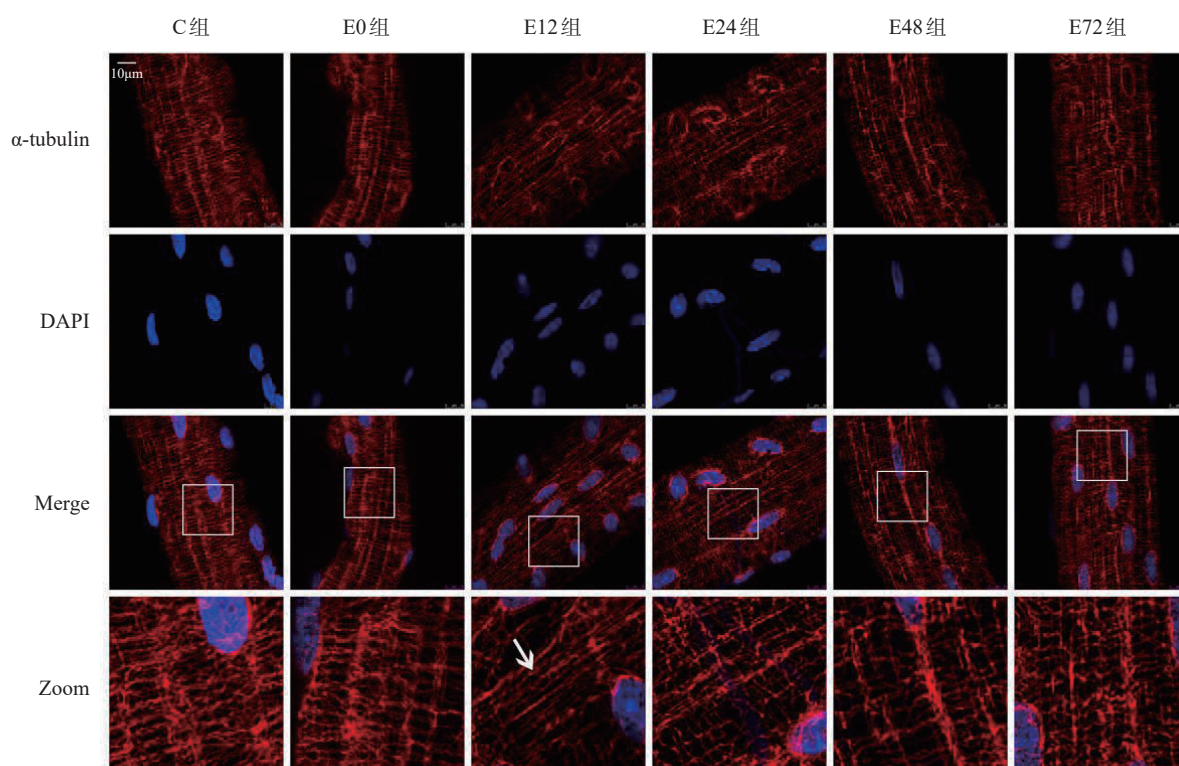
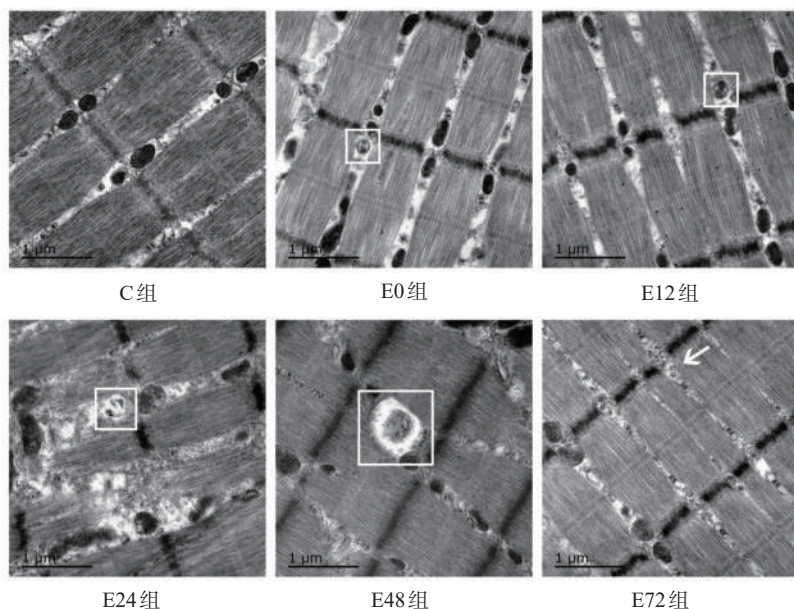


图2 急性离心运动后不同恢复时相骨骼肌自噬体、自噬溶酶体形成特征($\times 30000$)



化,本研究使用免疫印迹技术检测LC3、p62蛋白表达(图3)。与C组相比,LC3- I 蛋白表达在急性离心运动后恢复12h、24h、48h增加,但未见显著性意义($P>0.05$);LC3- II 蛋白表达在急性离心运动后恢复12h、24h、48h显著增加($P<0.05$),恢复0h、72h显著降低($P<0.05$);LC3- I /LC3- II 比值在急性离心运动后恢复24h、48h显著增加($P<0.05$),恢复72h显著降低($P<0.01$);p62蛋白表达在急性离心运动后恢复期内呈先增加后降低趋势,于恢复12h表达最高($P<0.01$)。

2.4 急性离心运动后骨骼肌自噬流变化

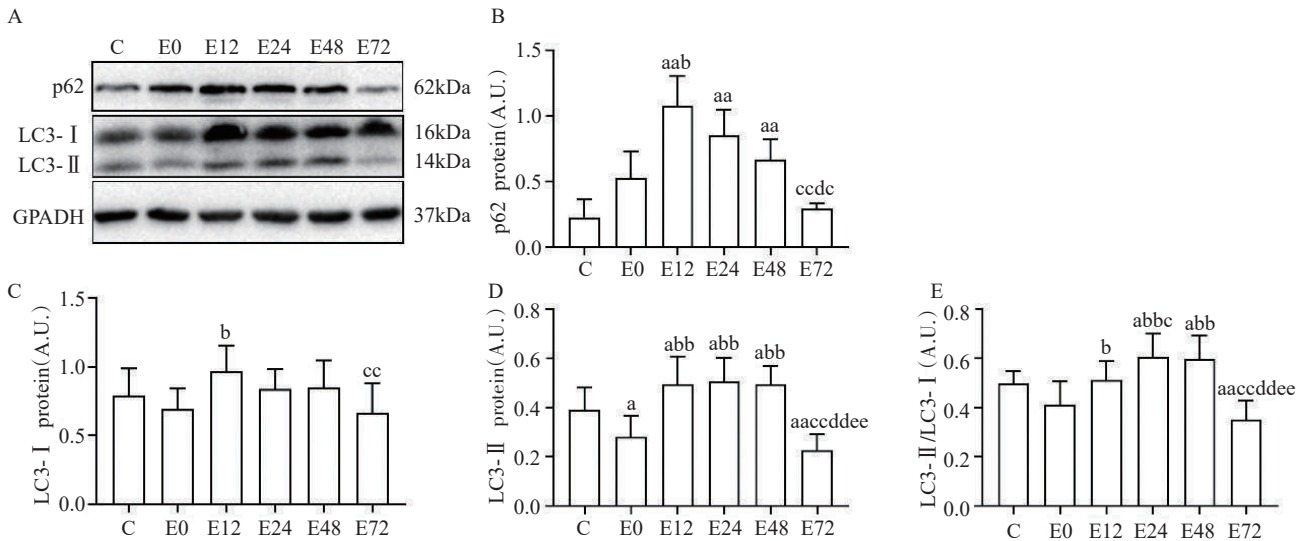
为检测急性离心运动后大鼠骨骼肌自噬流变化情况,本研究在急性离心运动前连续3天对大鼠进行

秋水仙碱腹腔注射,并于运动后 12h 取材。腹腔注射秋水仙碱使各状态下(安静、急性离心运动)骨骼肌 LC3- II、p62 蛋白表达均增加;此外,以各状态下 COL 与 VHE 组 LC3- II 差值反映自噬流,结果显示急性离心运动后恢复前期(12h 内)骨骼肌自噬流显著低于安静组($P<0.05$),见图 4。

3 讨论

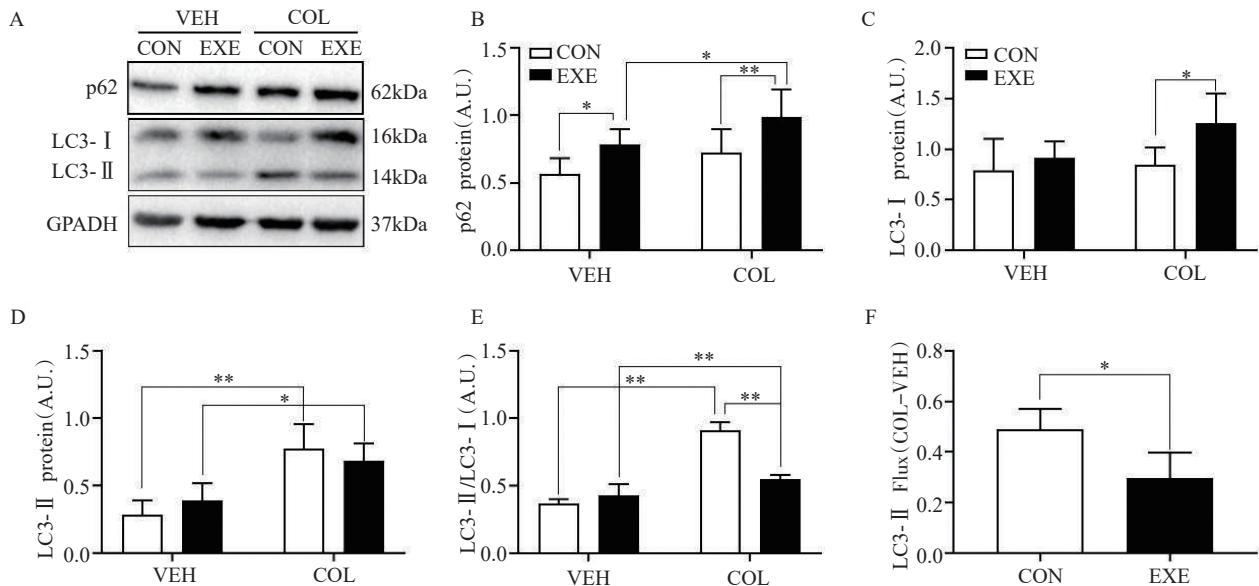
骨骼肌是生物体运动的动力源,但在经历长时间、大负荷运动,尤其是离心运动时,易出现损伤,严重制约运动表现。自噬是细胞利用溶酶体降解自身胞质成分的过程^[1],可大致分为自噬体生成与降解两个阶段。现已证实,自噬在骨骼肌损伤后被激

图3 急性离心运动后不同恢复时相骨骼肌LC3、p62蛋白表达



注:A:LC3、p62蛋白印迹条带图;B-E:各组LC3、p62蛋白表达变化。与C组比较,a: $P<0.05$,aa: $P<0.01$;与E0组比较,b: $P<0.05$,bb: $P<0.01$;与E12组比较,c: $P<0.05$,cc: $P<0.01$;与E24组比较,d: $P<0.05$,dd: $P<0.01$;与E48组比较,e: $P<0.05$,ee: $P<0.01$ 。

图4 急性离心运动后骨骼肌自噬流变化



注:A:LC3、p62蛋白印迹条带图;B-F:各组LC3、p62蛋白表达变化。* $P<0.05$;** $P<0.01$ 。

活^[13-15],以清除肌肉中受损的细胞器、蛋白质,避免毒性损伤,且可通过回收利用降解产物进行肌纤维重塑。课题组前期对多种自噬形式的发生阶段进行了研究,观察到急性离心运动后骨骼肌非选择性自噬^[2]、线粒体自噬^[3]、内质网自噬^[4]、聚集体自噬^[5]水平均显著提高,提示自噬在运动性骨骼肌损伤中扮演着重要角色。

然而,近期有文献报道,在骨骼肌损伤后,自噬流常出现“瓶颈”,此阶段自噬体清除速率低于受损细胞器与蛋白质的积累,严重影响损伤后肌纤维修复^[6],由此提示关注骨骼肌损伤后恢复期内自噬体降解特征对寻找肌纤维修复手段具有重要的理论意义。LC3 是关键的自噬调节因子,在合成后可被 ATG4 切割形成胞浆定位的 LC3- I,而后与磷脂酰乙醇胺共价结合形成 LC3- II,定位于自噬体膜,现如今越来越多的研究认为自噬水平应使用 LC3- II 进行评价,而非 LC3- II/LC3- I 比值^[15-16];p62 是自噬底物蛋白,在自噬体与溶酶体融合后会立刻降解,可间接反映自噬流,目前认为 p62 积累是自噬流降低的表现^[16]。本研究结果显示急性离心运动后即刻 LC3- II 蛋白表达降低,p62 蛋白表达增加,推测运动时机体能量消耗较大,故通过降解现存自噬体回补缺失的能量,但运动造成异常细胞器出现,p62 进行标记以使其后续发生降解;恢复 12h 后骨骼肌 LC3- II、p62 蛋白表达均显著增加,提示该时相自噬体数量增多,且未与溶酶体融合,存在堆积;恢复 24h、48h、72h 后 LC3- II、p62 蛋白表达逐渐下降,说明自噬溶酶体形成增加,堆积的自噬体得到降解。然而,自噬是一个连续、动态的过程,仅从蛋白表达分析自噬流强弱具有一定局限,因此目前研究中常通过在体抑制自噬体降解并比较自噬抑制前后 LC3- II 变化差值反映自噬流^[12, 17-18]。腹腔注射秋水仙碱(0.4mg/kg, 3 天)可有效抑制自噬体降解,且该剂量毒性小,不造成肌病,是现阶段检测骨骼肌自噬流的最佳手段^[11]。结合上述研究结果,本研究推测急性离心运动后恢复前期(12h 内)骨骼肌自噬体降解存在“瓶颈”,故以运动后恢复 12h 为研究时相,在大鼠急性离心运动前连续 3 天对其进行秋水仙碱腹腔注射,结果显示 COL 组大鼠骨骼肌 LC3- II、p62 蛋白表达均高于 VEH 组,说明成功抑制自噬体降解,进

一步比较各状态下 COL 与 VEH 组 LC3- II 差值发现,恢复前期(12h 内)后急性离心运动组骨骼肌自噬流显著低于安静组,提示急性离心运动引起的骨骼肌损伤恢复进程中自噬体降解存在“瓶颈”,且有必要对其机制进行探讨。

微管是真核细胞中细胞骨架的架构主干,主要由 α -微管蛋白(α -tubulin)与 β -微管蛋白(β -tubulin)构成^[19]。微管参与维持细胞形态,并调控诸多细胞器,如线粒体、自噬体、核糖体等的定向运输。研究表明,微管在自噬体运输过程中发挥重要作用^[20],并且是影响自噬体降解的关键因素,长春花碱、秋水仙碱等微管解聚类药物处理均使自噬体降解发生抑制^[21]。近期,有研究报道离心收缩使 mdx 小鼠骨骼肌横向微管丢失^[22],同时课题组前期研究发现急性离心运动后微管解聚,并影响线粒体分布与功能^[10],由此推测,微管损伤可能是造成急性离心运动后自噬流“瓶颈”的原因之一。鉴于微管主要存在于肌纤维表面,且易在低温下解聚,于是本研究利用单根肌纤维分离技术对急性离心运动后不同恢复时相下的微管形态进行了检测,发现运动后即刻骨骼肌微管形态未见显著变化,而恢复 12h 时大量横向微管丢失,且纵向微管束密度降低,提示在急性离心运动后恢复期中,微管存在滞后性损伤,且这可能是影响自噬体运输、阻碍自噬体降解的原因之一,但这种形态改变是由微管解聚引起,还是断裂导致? 仍有待进一步研究。

综上所述,在急性离心运动后恢复期内骨骼肌自噬流存在“瓶颈”现象,自噬体降解受阻,其机制可能与横向、纵向微管丢失有关。

参考文献

- [1] Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms[J]. Autophagy, 2018, 14(2): 207—215.
- [2] 张欣,王瑞元. 大负荷运动诱导大鼠骨骼肌损伤对其自噬超微结构及 Beclin1 和 LC3- II / I 的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(4): 296—300+I0001.
- [3] Shang H, Xia Z, Bai S, et al. Downhill running acutely elicits mitophagy in rat soleus muscle[J]. Med Sci Sports Exerc, 2019, 51(7): 1396—1403.
- [4] 丁海丽. 运动及针刺干预对骨骼肌内质网应激—自噬反应的影响机制研究[D]. 北京体育大学, 2017.

- [5] 高扬,梁孝天,王博,等.聚集体自噬在运动性骨骼肌损伤中的特征[J].中国组织工程研究,2020,24(5):720—725.
- [6] Call JA, Nischenko AS. Autophagy: an essential but limited cellular process for timely skeletal muscle recovery from injury[J]. Autophagy,2020,16(7):1344—1347.
- [7] Vainshtein A, Desjardins EM, Armani A, et al. PGC-1 α modulates denervation-induced mitophagy in skeletal muscle [J]. Skelet Muscle,2015(5)9.
- [8] Oyarzún JE, Lagos J, Vázquez MC, et al. Lysosome motility and distribution: relevance in health and disease[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(6): 1076—1087.
- [9] Sørensen K, Neufeld TP, Simonsen A. Membrane trafficking in autophagy[J]. Int Rev Cell Mol Bio,2018(336)1—92.
- [10] 刘晓然,黄涛,王蕴红,等.大强度运动后骨骼肌微管蛋白对线粒体Rho GTP酶1(Miro1)的调节机制[J].中国组织工程研究,2017,21(16):2570—2575.
- [11] Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle[J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol,1983,54(1):80—93.
- [12] Ju JS, Varadhachary AS, Miller SE, et al. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle[J]. Autophagy,2010,6(7):929—935.
- [13] Nischenko AS, Southern WM, Atuan M, et al. Mitochondrial maintenance via autophagy contributes to functional skeletal muscle regeneration and remodeling[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2016,311(2):C190—C200.
- [14] Call JA, Wilson RJ, Laker RC, et al. Ulk1-mediated autophagy plays an essential role in mitochondrial remodeling and functional regeneration of skeletal muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2017,312(6):C724—C732.
- [15] Nischenko AS, Southern WM, Tehrani KF, et al. Mitochondrial-specific autophagy linked to mitochondrial dysfunction following traumatic freeze injury in mice[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2020,318(2):C242—C252.
- [16] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy,2012,8(4):445—544.
- [17] König J, Grune T, Ott C. Assessing autophagy in murine skeletal muscle: current findings to modulate and quantify the autophagic flux[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2019,22(5):355—362.
- [18] Carter HN, Kim Y, Erlich AT, et al. Autophagy and mitophagy flux in young and aged skeletal muscle following chronic contractile activity[J]. J Physiol, 2018, 596(16): 3567—3584.
- [19] Akhmanova A, Steinmetz MO. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2008,9(4):309—322.
- [20] Mohan N, Sorokina EM, Verdeny IV, et al. Detyrosinated microtubules spatially constrain lysosomes facilitating lysosome-autophagosome fusion[J]. J Cell Biol, 2019, 218(2): 632—643.
- [21] Xie R, Nguyen S, McKeehan WL, et al. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes[J]. BMC Cell Biol,2010(11)89.
- [22] Nelson DM, Fasbender EK, Jakubiak MC, et al. Rapid, redox-mediated mechanical susceptibility of the cortical microtubule lattice in skeletal muscle[J]. Redox Biol,2020(37) 101730.