

· 基础研究 ·

电针经微小核糖核酸-133a 和沉默交配型信息调节 2 同源基因 1 促进废用性肌萎缩恢复的实验研究

蔡星¹ 张亚莲¹ 李倩¹ 舒彬¹ 杨忠²

¹重庆医科大学附属大学城医院, 重庆 401331; ²陆军军医大学临床血液学教研室, 重庆 400038

通信作者: 舒彬, Email: shubin1017@163.com

【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸-133a (miR-133a) 和沉默交配型信息调节 2 同源基因 1 (SIRT1) 在电针促进废用性肌萎缩恢复中的作用。**方法** 将 C57BL/6 小鼠 30 只按随机数字表法随机分为正常组、实验对照组、实验组, 每组 10 只小鼠, 将实验对照组和实验组小鼠进行尾悬吊构建废用性肌萎缩模型, 实验组在尾悬吊的同时进行电针刺激, 刺激穴位为阳陵泉和足三里, 每日刺激 1 次, 每次 15 min, 连续治疗 14 d。正常组和实验对照组则常规饲养, 不进行任何干预。3 组大鼠均于实验组干预 14 d 后统一取材, 测定比目鱼肌、腓肠肌的湿重比和横截面积, 采用透射电镜观察其骨骼肌和线粒体结构, Western Blot 检测沉默交配型信息调节 2 同源基因 1 (SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 C 辅激活因子 1a (PGC-1a)、尼克酰胺磷酸核糖转移酶 (NAMPT)、腺苷酸活化蛋白激酶 α (AMPK- α) 以及磷酸化-AMPK- α (P-AMPK- α) 蛋白的表达, 实时荧光聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测肌肉萎缩 F 盒蛋白 (Atrogin-1)、肌肉特异性环指蛋白 1 (MuRF1)、微小核糖核酸-133a (miR-133a)、SIRT1、配对盒基因 (Pax7)、生肌调节因子 (MyoD) 和肌细胞生成素 (MyoG) 基因的表达, 试剂盒检测尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 的浓度和 NAD⁺/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH)。**结果** 干预 14 d 后, 与实验对照组比较, 实验组比目鱼肌的湿重和横截面积分别增加了 21.03%、30.25% ($P < 0.05$), 腓肠肌的湿重和横截面积与实验对照组比较, 分别增加了 5.24%、16.96% ($P < 0.05$)。实验组 Atrogin-1、MuRF1、SIRT1、PGC-1a、NAMPT、P-AMPK- α /AMPK- α 的表达和 NAD⁺ 浓度、NAD⁺/NADH 均显著低于实验对照组 ($P < 0.05$), 而实验组 miR-133a 的表达则较实验对照组干预 14 d 后增加了 163.3% ($P < 0.05$)。干预 14 d 后, 与细胞增殖相关的 Pax7、MyoD 基因在实验对照组中表达的显著上调, 与正常组和实验组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组与细胞分化相关的 MyoG 基因则呈高表达状态, 与正常组和实验对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** SIRT1 相关通路属于机体反射性保护机制之一, 参与介导骨骼肌的自然恢复; 电针刺激经 miR-133a/SIRT1 增强成肌细胞分化, 改善线粒体能量代谢, 从而促进废用性肌萎缩的恢复。

【关键词】 废用性肌萎缩; 电针; miR-133a; SIRT1; 骨骼肌

基金项目: 国家自然科学基金 (31571242); 国家科研院所研究开发专项 (HYZHXM01017)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.06.001

Electroacupuncture promotes recovery from disuse muscular atrophy through the miR-133a/SIRT1 pathway

Cai Xing¹, Zhang Yalian¹, Li Qian¹, Shu Bin¹, Yang Zhong²

¹Department of Rehabilitation Medicine, University-town Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China; ²Clinical Hematology Department of Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Shu Bin, Email: shubin1017@163.com

【Abstract】 Objective To explore the role of microRNA-133a (miR-133a) and silent mating information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) in the effects of electroacupuncture on persons with disuse muscular atrophy. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into a control group, an experimental control group and an experimental group, each of 10. Disuse muscular atrophy was induced in the mice of the experimental and experimental control groups using tail suspension. The mice in the electroacupuncture group were given 15 minutes of electroacupuncture over the Yanglingquan and Zusanli points every day for 14 days. Wet weight ratio and the cross-sectional area of the gastrocnemius and soleus were tracked, and the structure of the mitochondria in the skeletal muscles was

observed using a transmission electron microscope. The protein expressions of SIRT1, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), nicotinamide phosphoribosyl transferase (NAMPT), adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase- α (AMPK- α) and phospho-AMPK- α (P-AMPK- α) were detected using western blotting. The expressions of the muscle atrophy F-box (Atrogin-1), muscle ring finger1 (MuRF1), miR-133a, SIRT1, paired box gene 7 (Pax7), myogenic determination (MyoD) and myogenin (MyoG) genes were detected through polymerase chain reactions. The concentration of Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD $^{+}$) and the ratio of NAD $^{+}$ to reduced nicotinamide adenine dinucleotide were also measured. **Results** Compared with the experimental control group, the average wet weight increased by 21% and the cross-sectional area of the soleus increased by 30% in the experimental group. The average wet weight of the gastrocnemius increased by 5% and the area by 17%. The average expressions of Atrogin-1, MuRF1, SIRT1, PGC-1 α and NAMPT, the concentration of NAD $^{+}$, as well as the average value of P-AMPK- α /AMPK- α and NAD $^{+}$ /NADH were significantly lower in the experimental group than in the experimental control group, while the average expression of miR-133a in the experimental group was significantly (163%) higher. The average expressions of Pax7 and MyoD were significantly up-regulated in the experimental control group compared with the other two groups, while MyoG was highly expressed in the experimental group compared with the other 2 groups. **Conclusions** The SIRT1 pathway is one of the reflexive protective mechanisms that mediate in the natural recovery of skeletal muscles. Electroacupuncture enhances myoblast differentiation, improves energy metabolism in the mitochondria, and thus promotes recovery from disuse muscular atrophy.

【Key words】 Disuse muscular atrophy; Electroacupuncture; microRNA-133a; Silent mating type information regulation 2 homolog 1; Skeletal muscles

Funding: National Natural Science Foundation of China (31571242), Special Fund for Research and Development of the National Research Institutes (HYZHXM01017)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.06.001

临床上,各种原因导致的废用性肌萎缩十分常见,严重影响患者的功能恢复和生活质量,是临床医学亟待解决的问题之一。废用性肌萎缩的产生不仅与肌纤维质量下降相关,还与线粒体能量代谢失调具有一定关系^[1]。电针刺激是临床上治疗肌萎缩的常用方法之一,可以改善线粒体氧化应激并增加骨骼肌质量^[2],但具体机制尚不十分明确。

肌肉特异性微小核糖核酸 (MicroRNA-133a, miR-133a) 与沉默交配型信息调节 2 同源基因 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 在骨骼肌增殖、萎缩和线粒体能量代谢方面均具有重要作用,且 SIRT1 mRNA 3'非编码区 (3' Untranslated Region, 3'UTR) 具有 miR-133a 结合序列,与超载导致的肌肉肥大的作用非常吻合^[3-4],但两者在废用性肌萎缩中的作用机制并不明确。因此,本研究观察了 miR-133a 和 SIRT1 在电针治疗尾悬吊诱导的废用性肌萎缩中的作用,以期临床中废用性肌萎缩的防治提供新的思路。

材料和方法

一、实验动物

健康雄性清洁级 C57BL/6 小鼠 30 只,体重 (25 $\pm$ 4)g, 10 周龄,由第三军医大学动物实验中心提供。实验过程中对动物的处理完全符合第三军医大学医学研究伦理委员会标准。

二、主要试剂和仪器

SIRT1 一抗、过氧化物酶体增植物激活受体 C 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 一抗 (购自美国 Abcam 公司); 尼克酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyl transferase, NAMPT) 一抗 (购自美国 SAB 公司); 腺苷酸活化蛋白激酶 α (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase- α , AMPK- α) 一抗 (购自武汉市博士德公司); 磷酸化 AMPK- α (Phospho-AMPK- α , P-AMPK- α) 一抗 (购自美国 CST 公司); 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液 (购自武汉市博士德公司); 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD $^{+}$) / 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH) 检测试剂盒 (购自上海市碧云天); microRNA 提取试剂盒、TaqMan[®] MicroRNA 逆转录试剂盒、TaqMan[®] Universal Master Mix & MicroRNA Assay (聚合酶链式反应试剂盒) (购自美国 ABI 公司); 针灸针 0.25 mm $\times$ 13 mm (购自苏州市华佗医疗器械有限公司); 6805C 型电针仪 (购自汕头市医用设备厂有限公司); CFX Connect Real-time PCR 仪 (购自美国 Bio-Rad 公司); IX73 荧光倒置显微镜 (购自日本 Olympus 公司)。

三、动物分组和模型制备

将雄性 C57BL/6 小鼠 30 只按随机数字表法分为

正常组、实验对照组和实验组,每组 10 只小鼠。实验对照组、实验组小鼠均按照 Morey-Holton^[5-6]的方法造模,先行尾部悬吊,使其后肢离地,前肢着地,身体长轴与地面呈 30°,持续 14 d,构建废用性肌萎缩模型。造模后,小鼠后腿肌肉明显萎缩,尾部放下,后肢着地后,小鼠身体重心前移,活动量减少,主要依靠前肢移动和活动,以此为造模成功标准。

四、干预方法

从造模第一天开始,每日 9:00 将实验组小鼠固定于四肢外露型固定器上,参照 Hu 等^[8]的研究方法对小鼠进行电针刺激,采用 20 Hz 的连续波,电流强度 1 mA(以小鼠双下肢轻微抽动为宜),每日 1 次,每次 15 min,连续刺激 14 d。穴位定位则参照《大鼠穴位图谱的研制》以及李忠仁版的《实验针灸学》^[7],正极(阳陵泉,GB34)位于腓骨前头以下 6 mm;负极(足三里,ST36)位于膝关节外侧,腓骨下 7 mm。正常组和实验对照组不做任何干预,与实验组于相同的环境下常规饲养。

五、标本采集

造模成功后和干预 14 d 后分别将 3 组小鼠各随机分为两部分,统一称重并记录。一部分小鼠断颈处死后快速分离并切取双侧比目鱼肌、腓肠肌用电子天平称重,取其中一部分放入液氮中速冻后转入-80℃超低温冰箱储存待测,另一部分快速修剪后放入戊二醛送往实验中心电镜制样室;另一部分小鼠用 5%水合氯醛(0.1 ml/1 g 体重)注射麻醉后,心脏灌注固定,取双侧比目鱼肌、腓肠肌放入 4%多聚甲醛溶液内固定,脱水待石蜡及聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物(optimal cutting temperature compound,OTC)包埋剂包埋,并制作成 3 μm 的切片各 20 张,45℃水浴贴片。

六、干预 14 d 后的指标检测

1. 下肢骨骼肌湿重称量:取材后用电子天平称取比目鱼肌、腓肠肌湿重(取材以近端于股骨内、外髁起点剪下,远端从跟腱止点处剪断为准)。

2. 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色:取 3 组石蜡切片,二甲苯 I、II 液脱蜡和梯度酒精脱水,苏木素染色 3 min,蒸馏水洗后伊红染色 3 min,二甲苯 I、II 液透明,中性树胶封片后在 40×光学显微镜下观察,每张切片随机选取 5 个视野的图像,通过 Image Pro Plus 6.0 版图像分析软件分析图像并计算肌纤维的横截面积。

3. 透射电镜观察:每组取 3 块 1 mm³ 组织,纵切制成电镜样本后,在透射电镜下观察,最后选取 1 μm 的视野进行两两比较。

4. 组织 SIRT1 免疫荧光染色:取 3 组冰冻切片,用

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 次,透膜并封闭后,一抗稀释液(SIRT1, 1:100)4℃孵育过夜,次日用 PBS 漂洗后加入异硫氰酸素(tetramethyl-rhodamine, TRITC)标记的荧光二抗(1:100),37℃孵育 1 h, DAPI 染核,漂洗、晾干、封片后在倒置荧光显微镜下观察。

5. NAD⁺/NADH 检测:取 3 组骨骼肌样本 30 mg,加入 400 μl 提取液低温快速匀浆并提取总 NAD,以 NAD⁺标准品制备标准曲线,按照 NAD⁺/NADH 检测试剂盒检测步骤对三组样本进行检测,以酶标仪在 450 nm 波长读取 OD 值,通过标准曲线计算样本中每 μg 蛋白所含总 NAD 及 NADH 的量,从而算出 NAD⁺的浓度、NAD⁺/NADH 比值。

6. SIRT1、PGC-1α、NAMPT、AMPK-α 及 P-AMPK-α 蛋白表达检测:蛋白免疫印迹法(Western Blot):取三组骨骼肌样本 100 mg 左右,低温快速匀浆并提取总蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转膜及封闭,一抗(1:1000)4℃孵育过夜,次日吐温-20 羟甲基氨甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween 20, TBST)漂洗,加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:3000)室温孵育 1 h, TBST 漂洗,条带曝光,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参,最后凝胶成像系统分析图像并计算光密度值。

7. miR-133a、肌肉萎缩 F 盒蛋白(muscle atrophy F-box, Atrogin-1)、肌肉特异性环指蛋白 1(muscle ringfinger1, MuRF1)、SIRT1、PGC-1α、配对盒基因(paired box gene 7, Pax7)、生肌调节因子(myogenic determination, MyoD)和肌细胞生成素(myogenin, MyoG)基因表达的检测:取 3 组骨骼肌样本 100 mg,加入 1 ml Lysis Solution 低温快速匀浆并提取 small RNAs,采用紫外分光光度计检测所提取的 small RNAs 浓度,进行逆转录及实时荧光定量聚合酶链式反应(real time-quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR),以 U6 基因为内参,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出样品 miR-133a 的相对表达量。取 3 组骨骼肌样本 100 mg,加入 TRNzol 低温快速匀浆并提取总 RNA,采用紫外分光光度计检测所提取的 RNA 浓度,进行逆转录及 RT-qPCR 反应,以 GAPDH 基因为内参,根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出样品 Atrogin-1、MuRF1、SIRT1、PGC-1α、Pax7、MyoD 和 MyoG 的相对表达量。上下游引物由上海生工合成,序列如表 1。

七、数据处理

本研究采用 SPSS 19.0 版统计学软件进行数据,

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
GAPDH	CAAGGCTGTGGCAAGGTCATC	TCTCCAGGCGGCACGTCAG
SIRT1	CGCTGTGGCAGATTGTTATTAA	TTGATCTGAAGTCAGGAATCCC
MyoD	ACTTCTATGATGACCCGTGTTT	ACATGCTCATCCTCACGAG
MyoG	AACCCAGGAGATCATTTGCTC	GAAGGCAACAGACATATCCTCC
Pax-7	TGGAAGTGTCACCCCTCTTGCC	ATCCAGACGGTTCCCTTTGTCCG
MuRF1	CTGCCCTGCCAACACAACCTC	GCAACGGAACGACCTCCAGAC
Atrogin-1	TTCACAAAGGAAGTACGAAGGA	GCTGGTCTTCAAGAACTTTTCAG

数据用($\bar{x}\pm s$)表示。使用单因素方差分析组间差异显著性,两两比较则采用最小显著性差异法(least-significant difference,LSD)。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、造模成功后和干预 14 d 后 3 组小鼠体重和骨骼肌湿重变化

造模成功后和干预 14 d 后,3 组小鼠体重组间和组内比较,差异均未见统计学意义($P>0.05$)。干预 14 d 后,实验对照组比目鱼肌湿重、湿重比均明显低于正常组和实验组($P<0.05$);与实验对照组比较,实验组比目鱼肌和腓肠肌的湿重分别增加了 21.03%,5.24%,差异均具有统计学意义($P<0.05$),详见表 2。

二、3 组间组织学和超微结构比较

HE 染色显示,干预 14 d 后,实验对照组骨骼肌萎缩明显,比目鱼肌、腓肠肌的肌纤维和横截面积较正常组与实验组明显缩小,实验组比目鱼肌和腓肠肌横截面积较实验对照组分别增加了 30.25%,16.96%,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见图 1a、c。与正常组相比,实验对照组比目鱼肌线粒体严重破坏,出现明显水肿及空泡化,肌节紊乱可见明显萎缩;实验对照组腓肠肌细胞膜下有大量线粒体积聚,轻微空泡化,Z 线断裂。实验组线粒体虽受到损伤,但其整体结构完整,肌节清晰可见,详见图 1b。

三、干预 14 d 后 3 组 NAD⁺和 NAD⁺/NADH 水平的组间比较

干预 14 d 后,正常组和实验组的组织 NAD⁺浓度、NAD⁺/NADH 均明显低于实验对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见图 2。

四、干预 14 d 后 3 组间 miR-133a 与 SIRT1 分子基

因和蛋白表达比较

干预 14 d 后,实验对照组小鼠骨骼肌中的 miR-133a 与正常组相比增加了 31.03%,但差异不具有统计学意义($P>0.05$),而实验组的 miR-133a 与正常组相比则增加了 194.33%($P<0.05$),详见图 3a。结果表明,尾悬吊可能不会对骨骼肌 miR-133a 产生影响,而电针刺激则会使骨骼肌 miR-133a 表达显著增高。干预 14 d 后,实验对照组 SIRT1 的基因和蛋白表达均高于正常组和实验组($P<0.05$),实验组的 SIRT1 表达稍高于正常组($P<0.05$),实验对照组的 SIRT1 表达则显著高于正常组和实验组($P<0.05$),详见图 3a。荧光显微镜观察发现,正常组和实验组比目鱼肌、腓肠肌 SIRT1 的组织荧光表达均显著弱于实验对照组($P<0.05$),详见图 3b、c。

五、干预 14 d 后 3 组间 Atrogin-1、MuRF1 基因和 SIRT1 相关通路分子蛋白表达比较

干预 14 d 后,与正常组相比,实验组的 Atrogin-1、MuRF1 基因荧光强度无明显变化($P>0.05$),实验对照组则显著增高($P<0.05$),见图 4a。干预 14 d 后,实验组的 PGC-1 α 、NAMPT 蛋白表达和 P-AMPK- α /AMPK- α 均稍高于正常组,实验对照组则显著高于正常组和实验组($P<0.05$),详见图 4b、c。

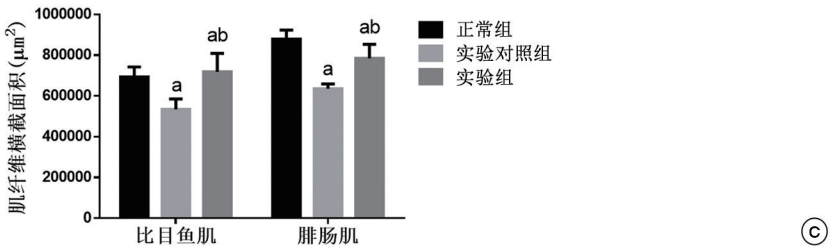
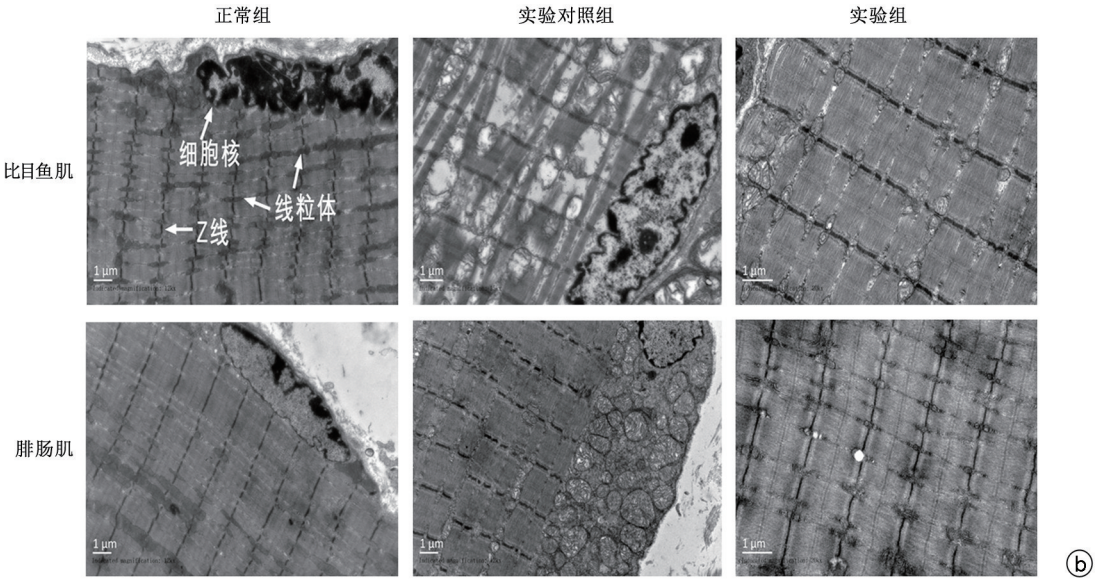
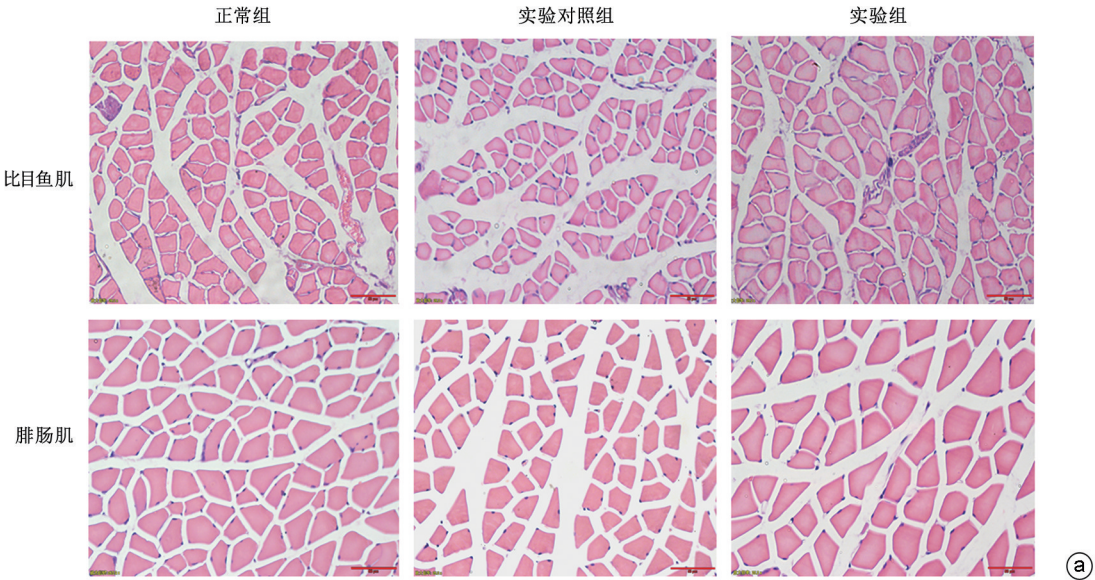
六、干预 14 d 后 3 组间 Pax7、MyoD 及 MyoG 基因表达的比较

干预 14 d 后,与细胞增殖相关的 Pax7、MyoD 基因在实验对照组中表达的显著上调,与正常组和实验组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);实验组与细胞分化相关的 MyoG 基因则呈高表达状态,与正常组和实验对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见图 5。

表 2 造模成功后和干预 14 d 后 3 组小鼠体重和骨骼肌湿重变化

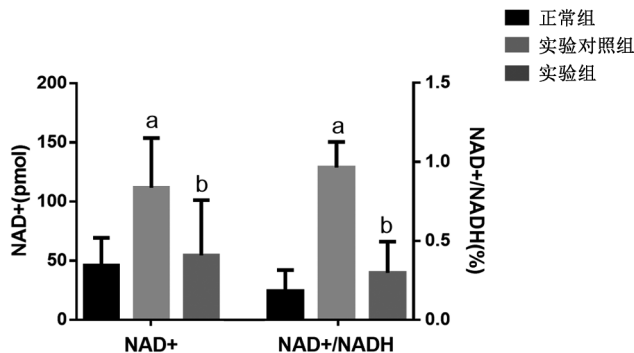
组别	只数	造模成功后 体重(g)	干预 14 d 后 体重(g)	干预 14 d 后 比目鱼肌 湿重(mg)	干预 14 d 后 比目鱼肌湿 重比(mg/g)	干预 14 d 后 腓肠肌湿重 (mg)	干预 14 d 后 腓肠肌湿重 比(mg/g)
正常组	10	25.04±1.58	25.92±1.41	11.51±1.82	0.44±0.06	186.24±14.36	7.20±0.20
实验对照组	10	26.36±2.46	25.34±1.83	6.13±1.54 ^a	0.24±0.06 ^a	136.18±10.80 ^a	5.39±0.41 ^a
实验组	10	26.18±1.72	25.48±2.06	8.55±3.57 ^{ab}	0.34±0.12 ^{ab}	145.93±8.20 ^{ab}	5.98±0.39 ^{ab}

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与实验对照组比较,^b $P<0.05$



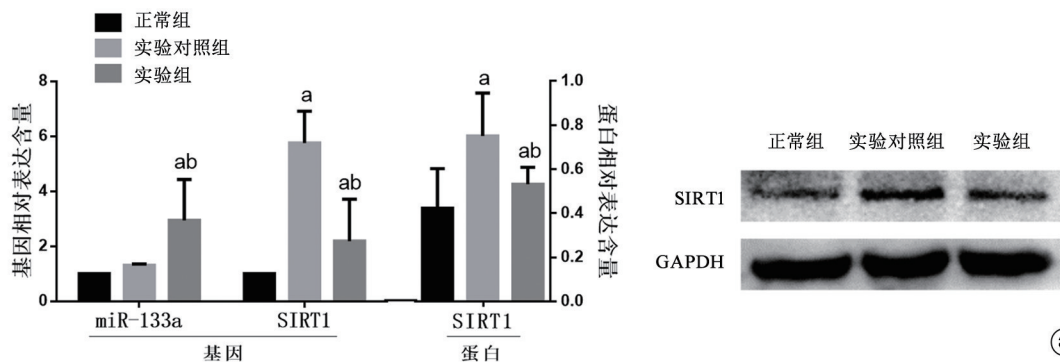
注:a 为骨骼肌组织横切面图(HE 染色,×40),b 为骨骼肌线粒体透射电镜图(×200),c 为骨骼肌肌纤维横截面积定量分析,与正常组比较,^a $P<0.05$;与实验对照组比较,^b $P<0.05$

图1 干预 14 d 后 3 组间骨骼肌组织学与超微结构比较

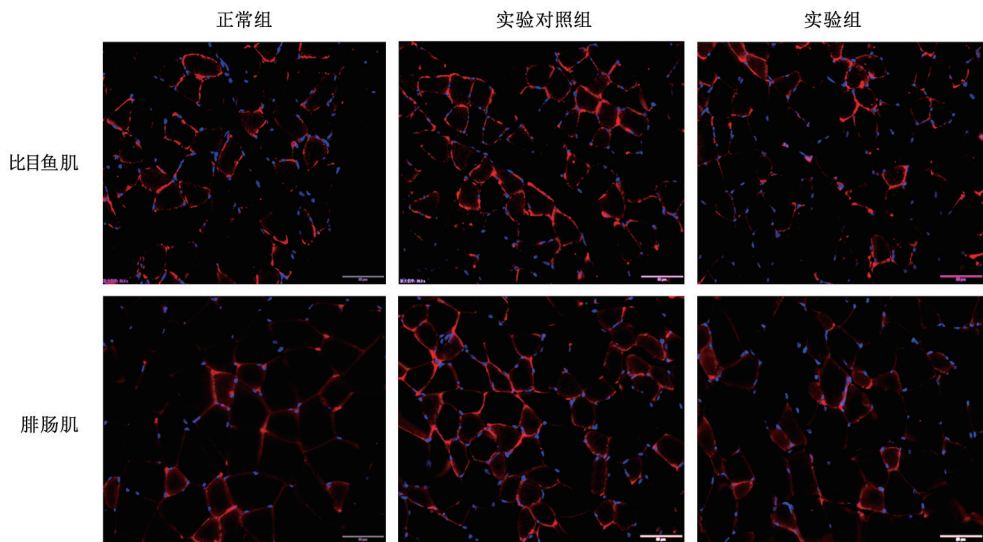


注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与实验对照组比较,^b $P<0.05$

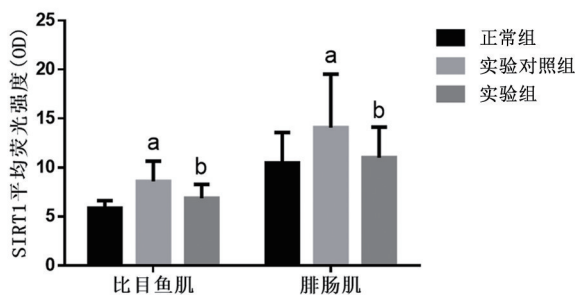
图2 干预 14 d 后 3 组间 NAD⁺浓度和 NAD⁺/NADH 水平的比较



(a)



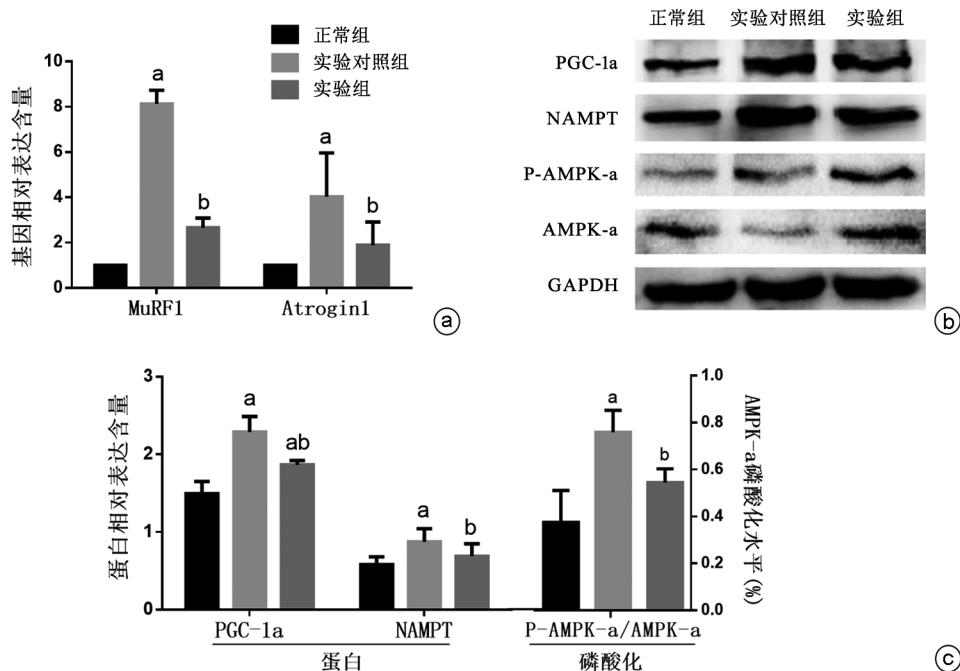
(b)



(c)

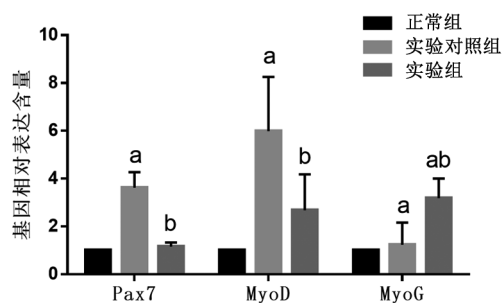
注:a 为 miR-133a 和 SIRT1 的基因和蛋白表达,b 为骨骼肌 SIRT1 免疫荧光图($\times 40$),c 为 SIRT1 平均光密度值分析,与正常组比较,^a $P<0.05$;与实验对照组比较,^b $P<0.05$

图3 干预 14 d 后 3 组间 miR-133a、SIRT1 基因和蛋白表达的比较



注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与实验对照组比较,^b $P<0.05$

图4 干预14 d后3组间 Atrogin-1、MuRF1 基因和 SIRT1 相关通路分子蛋白表达的比较



注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与实验对照组比较,^b $P<0.05$

图5 干预14 d后3组间 Pax7、MyoD 和 MyoG 基因表达的比较

讨论

本研究结果显示,尾悬吊诱导的废用性肌萎缩会导致骨骼肌尤其是比目鱼肌质量显著降低,肌纤维横截面积明显缩小,与有关文献报道^[9-10]结果一致。除此之外,本研究还发现,在废用性肌萎缩的电针治疗中,比目鱼肌的敏感性也远高于腓肠肌。经电针治疗14 d后,比目鱼肌的湿重和横截面积分别增加了21.03%、30.25%,肌纤维和线粒体的超微结构也显著改善,而腓肠肌的湿重和横截面积仅分别增加了5.24%、16.96%。比目鱼肌作为典型的慢肌纤维,线粒体有氧化能力明显高于腓肠肌,在废用性肌萎缩中更容易受到影响^[11],电针刺激有可能是通过改善肌肉组织氧化能力,从而提高肌肉重量和肌纤维横截面积。

本研究结果显示,实验对照组骨骼肌明显萎缩的同时线粒体严重受损,SIRT1、NAD⁺、NAMPT 较正常

组有上调的趋势,P-AMPK-a/AMPK-a、Pax7、MyoD 表达升高。SIRT1 是细胞内信号转导网络的关键节点,参与介导机体的多种生理过程,其中与 PGC-1a、NAMPT、AMPK-a 等分子相关的通路在骨骼肌增殖分化及其能量代谢方面占有重要作用。SIRT1 是一种 NAD⁺依赖性去乙酰化酶,其活性受 NAD⁺与 NAMPT 调节^[12],而 NAD⁺/NADH 比率的升高会促进其蛋白表达。SIRT1 是 AMPK-a 的下游分子,是机体内的能量感受器,同时又通过调控 AMPK-a、PGC-1a 等关键分子介导细胞增殖、线粒体生物合成、能量代谢等生理过程^[13]。研究发现,在多种原因(铸型固定化、食物剥夺、去神经支配和下肢卸载)诱导的肌萎缩中,骨骼肌 SIRT1 表达增加,可防止肌肉质量的快速丧失^[14-15]。此外,细胞受到外界刺激后细胞内环境改变,SIRT1 表达增高,导致 PGC-1a 下游通路激活,以适应细胞环境的改变^[12]。SIRT1 过表达可以促进肌肉前体细胞的增殖,降低成纤维细胞 G1 期的阻滞。本研究结果提示尾悬吊诱导废用性肌萎缩过程中,SIRT1 的表达和活性增加,从而参与调节线粒体的能量代谢和肌细胞增殖,以介导骨骼肌的自我修复。因此,SIRT1 相关通路可能属于机体反射性保护机制之一,在骨骼肌的自然恢复过程中发挥重要作用。

本研究结果还显示,实验组骨骼肌 miR-133a 显著升高,SIRT1、NAD⁺、NAMPT 较实验对照组明显下降,MyoG 表达升高,骨骼肌萎缩明显改善。骨骼肌受损后干细胞下降导致激活标记物 Pax7 等分子升高,

MyoD 表达增加,进入增殖周期,随着肌肉前体细胞的增加,MyoG 激活,成肌细胞迅速退出细胞周期,肌肉分化随之增加^[16-17],而分化是骨骼肌肥大的必要条件。故在促进肌萎缩恢复的过程中,肌细胞的分化是很重要的一个环节。miR-133a 在成肌细胞增殖、分化期表现出上升趋势,过表达 miR-133a 可显著促进肌管的形成^[18]。此外,研究证实,miR-133a 介导的线粒体代谢成熟对于骨骼肌干细胞的分化必不可少^[19-20]。SIRT1 表达下降会导致骨骼肌细胞分化增加。有研究发现,miR-133a 与 NAMPT 水平负相关,可抑制心肌细胞中 SIRT1 的表达,而 miR-133a/SIRT1 是心脏发育过程中心肌细胞终末分化和成熟的关键调控因子^[4,21],两者在骨骼肌中可能存在相同的作用机制。本研究结果提示 miR-133a 可能通过抑制 SIRT1 的表达,从而促进肌细胞的分化;另一方面 miR-133a 显著增高以介导肌细胞分化过程中线粒体的代谢成熟,从而维持细胞分化过程中的能量代谢。此外,本研究结果显示,电针治疗后 SIRT1、PGC-1α 的表达明显降低,线粒体结构近乎正常,P-AMPK-α/AMPK-α 下调,表明此时线粒体能量代谢已得到有效改善,可保证肌肉正常的能量供给。本研究结果提示,尾悬吊后 SIRT1 增高是机体的自我保护性反应,经电针治疗后 miR-133a 会显著增高,即电针刺激会抑制 SIRT1 的表达,促进线粒体代谢的成熟,增强骨骼肌的细胞分化,保证此过程中的能量代谢,缩短损伤骨骼肌的修复进程。

综上所述,SIRT1 相关通路可能属于机体反射性保护机制之一,介导骨骼肌的自然恢复;电针刺激通过 miR-133a/SIRT1 促进肌细胞分化成熟,有效改善线粒体能量代谢,从而促进废用性肌萎缩的恢复。

参 考 文 献

- [1] Miller SG, Hafen PS, Brault JJ. Increased adenine nucleotide degradation in skeletal muscle atrophy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(1): 88. DOI: 10.3390/ijms21010088.
- [2] 王欣,胡川,卢秀艳,等.功能性电刺激联合电针拮抗肌治疗脑卒中后痉挛型足下垂的疗效观察[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2021, 43(5): 396-400. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2021.05.003.
- [3] Forterre A, Jalabert A, Chikh K, et al. Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(1): 78-89. DOI: 10.4161/cc.26808.
- [4] Koltai E, Bori Z, Chabert C, et al. SIRT1 may play a crucial role in overload induced hypertrophy of skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2017, 595(11): 3361-3376. DOI: 10.1113/JP273774.
- [5] Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, et al. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data[J]. *Adv Space Biol Med*, 2005, 10: 7-40. DOI: 10.1016/S1569-2574(05)10002-1.
- [6] Globus RK, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: rodent analog for

- microgravity[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2016, 120(10): 1196-206. DOI: 10.1152/jappphysiol.00997.2015.
- [7] Lim S. WHO standard acupuncture point locations[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010, 7(2): 167-168. DOI: 10.1093/ecam/nep006.
- [8] Hu L, Klein JD, Hassounah F, et al. Low-frequency electrical stimulation attenuates muscle atrophy in CKD-a potential treatment strategy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(3): 626-635. DOI: 10.1681/ASN.2014020144.
- [9] Matsumoto T, Ono T, Ishikura H, et al. Effects of joint immobilization and hindlimb unloading on collagen fibers of soleus muscles in rats[J]. *J Phys Ther Sci*, 2017, 29(7): 1192-1195. DOI: 10.1589/jpts.29.1192.
- [10] Chacon-Cabrera A, Gea J, Barreiro E. Short- and long-term hindlimb immobilization and reloading: profile of epigenetic events in gastrocnemius[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(6): 1415-1427. DOI: 10.1002/jcp.25635.
- [11] Zhang S, Yuan M, Cheng C, et al. Chinese herbal medicine effects on muscle atrophy induced by simulated microgravity[J]. *Aerosp Med Hum Perf*, 2018, 89(10): 883-888. DOI: 10.3357/AMHP.5079.2018.
- [12] Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase[J]. *Science*, 2004, 303(5666): 2011-2015. DOI: 10.1126/science.1094637.
- [13] Hwang ES, Song SB. Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(18): 3347. DOI: 10.1007/s00018-017-2527-8.
- [14] Beharry AW, Judge AR. Differential expression of HDAC and HAT genes in atrophying skeletal muscle[J]. *Muscle Nerve*, 2015, 52(6): 1098-1101. DOI: 10.1002/mus.24912.
- [15] Onda A, Jiao Q, Nagano Y, et al. Acupuncture ameliorated skeletal muscle atrophy induced by hindlimb suspension in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(3): 434-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.152.
- [16] Guitart M, Lloreta J, Mañas-García L, et al. Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4360-4372. DOI: 10.1002/jcp.26282.
- [17] 杨志金,舒彬,曾登芬,等.不同强度脉冲超声波促进大鼠骨骼肌挫伤修复的实验研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32(11): 811-815. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.11.003.
- [18] Horak M, Novak J, Bienertova-Vasku J, et al. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development[J]. *Dev Biol*, 2016, 410(1): 1-13. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.12.013.
- [19] Wüst S, Dröse S, Heidler J, et al. Metabolic maturation during muscle stem cell differentiation is achieved by miR-1/133a-mediated inhibition of the Dlk1-Dio3 mega gene cluster[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(5): 1026-1039. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.02.022.
- [20] Wang Y, Ma J, Qiu W, et al. Guanidinoacetic acid regulates myogenic differentiation and muscle growth through miR-133a-3p and miR-1a-3p Co-mediated Akt/mTOR/S6K signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 837. DOI: 10.3390/ijms19092837.
- [21] Shin AN, Han L, Dasgupta C, et al. SIRT1 increases cardiomyocyte binucleation in the heart development[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(8): 7996-8010. DOI: 10.18632/oncotarget.23847.

(修回日期:2021-03-20)

(本文编辑:阮仕衡)