

文章编号: 1004-7220(2021)04-0612-06

负荷渐增式训练对老年小鼠骨骼肌卫星细胞 AMPK 磷酸化的影响

陈艳华¹, 卜凡², 舒彬¹, 杨忠³(1. 重庆医科大学第四临床学院, 康复中心, 重庆 401121; 2. 重庆医科大学附属康复医院 中医康复科, 重庆 400016;
3. 陆军军医大学 药学与检验医学系, 临床血液学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨负荷渐增式训练对老年小鼠骨骼肌卫星细胞腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)磷酸化的影响。**方法** 实验小鼠分为3组:青年对照组(YC组, $n=12$)、老年对照组(OC组, $n=12$)与老年运动组(OT组, $n=12$)。OT组进行负荷渐增式训练,流式细胞分选技术分离 CD45-/CD31-/Sca1-/VCAM(CD106)+ 细胞群体,分选细胞通过 desmin、Myod 肌原性染色以及成肌分化诱导培养进行肌卫星细胞鉴定,免疫组化结合 Western blotting 方法检测肌卫星细胞 p-AMPK 水平。**结果** YC 组骨骼肌卫星细胞 AMPK 及 p-AMPK 表达水平显著高于 OC 组 ($P<0.05$); OT 组与 OC 组 AMPK 表达无明显变化 ($P>0.05$), 而 OT 组 p-AMPK 表达水平显著高于 OC 组 ($P<0.05$)。**结论** 负荷渐增式训练可促进老年小鼠骨骼肌卫星细胞 AMPK 磷酸化,改善老年小鼠骨骼肌能量代谢。

关键词:骨骼肌卫星细胞; 负荷渐增式训练; 腺苷酸活化蛋白激酶; 磷酸化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2021.04.017

Effects of Incremental Load Training on Phosphorylation of AMPK in Skeletal Muscle Satellite Cells of Aged Mice

CHEN Yanhua¹, BU Fan², SHU Bin¹, YANG Zhong³

(1. Rehabilitation Center of the Fourth Clinical College, Chongqing Medical University, Chongqing 401121, China; 2. Department of Chinese Medicine Rehabilitation, the Affiliated Rehabilitation Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Clinical Hematology, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of incremental load training on AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylation in skeletal muscle satellite cells of aged mice. **Methods** Experimental mice were divided into 3 groups: young control group (YC group, $n=12$), old control group (OC group, $n=12$) and old training group (OT group, $n=12$). The mice in OT group received incremental load training, and CD45-/CD31-/Sca1-/VCAM (CD106) + cells were isolated by flow cytometry sorting. Desmin, Myod myogenic staining and myogenic differentiation culture were used for identification of muscle satellite cells, and the p-AMPK level of muscle satellite cells was detected by immunohistochemistry combined with Western blotting method. **Results** The expression levels of AMPK and p-AMPK in skeletal muscle satellite cells in YC group were significantly higher

收稿日期: 2020-07-07; 修回日期: 2020-09-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571242)

通信作者: 舒彬, 教授, E-mail: shubin1017@163.com

than those in OC group ($P < 0.05$). AMPK expression in OT group and OC group did not change significantly ($P > 0.05$), while p-AMPK expression level in OT group was significant higher than that in OC group ($P < 0.05$).

Conclusions Incremental load training can promote AMPK phosphorylation of skeletal muscle satellite cells in aged mice, and improve energy metabolism of skeletal muscle in aged mice.

Key words: muscle satellite cells; incremental load training; AMP-activated protein kinase (AMPK); phosphorylation

衰老进程中骨骼肌发生进行性改变,主要表现为骨骼肌质量和功能的下降,严重影响老年人生活质量,这一现象被称为肌肉减少症^[1]。肌卫星细胞是一种存在于骨骼肌纤维与基底膜之间的干细胞群体,常处于静止状态,但是在饥饿、运动、损伤等多种生理和病理刺激时能迅速活化,从静息到活化的转变过程中,细胞代谢方式发生重编程改变,由氧化磷酸化代谢转向糖酵解代谢^[2]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为极为重要的能量代谢感受器,在运动适应过程中具有关键的调控作用,特异性调控骨骼肌糖脂代谢及线粒体产生等。AMPK也是整个衰老相关信号通路网络的重要组成部分^[3]。然而老年小鼠运动训练后,骨骼肌卫星细胞 AMPK 信号如何应答运动适应性改变,目前尚不清楚。本文通过对老年小鼠进行负荷渐增式训练干预,探讨在肌肉减少症发生过程中,运动对骨骼肌卫星细胞 AMPK 信号的影响,以为运动激活老年肌卫星细胞能量代谢机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 选取雄性 C57BL/6 小鼠 36 只,均购于苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司[合格证号: SCXK(苏) 2014-0007]。其中,6 周龄青年雄性 C57BL/6 小鼠 12 只,体质量(17.8±5.0) g,作为青年对照组;17 月龄老年雄性 C57BL/6 小鼠 24 只,体质量(30.5±0.4) g,随机分为老年对照组和老年运动组,每组 12 只。老年组小鼠单笼饲养,室温(21±2)℃,相对湿度 45%~55%,自由饮水,标准饲料喂养,自然光照。适应性喂养 1 周后,进行实验。为提高原代卫星细胞产量,本文将 2 只小鼠作为 1 个样本提取卫星细胞^[4-5],最终各组小鼠样本量均为 6 只。

1.1.2 实验材料 兔单克隆 p-AMPK α 抗体、兔单克隆 AMPK α 抗体,羊抗兔 FITC 标记二抗(Cell Signaling 公司,美国);胎牛血清(Gibco 公司,美国),马血清,DMEM 高糖培养基(HyClone 公司,美国),胶原酶 Collagenase II(Worthington 公司,美国),分散酶 Dispase(Life Technologies 公司,美国),抗小鼠 CD45 抗体,抗小鼠 CD31 抗体(Biolegend 公司,美国),小鼠 Sca-1 藻红蛋白(eBioscience 公司,美国),抗小鼠 VCAM-1(CD106)抗体抗(R&D Systems 公司,美国), α 平滑肌肌动蛋白 Desmin(博奥森公司,北京),肌分化因子 MyoD(Developmental Studies Hybridoma Bank 公司,美国),40 μ m 细胞滤网(BD 公司,美国)。RIPA 裂解液、苯甲基磺酰氟化物及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所),4%多聚甲醛、PBS 缓冲液、免疫组化试剂盒(SV-0002)、DAB 显色试剂盒(博士德公司,武汉)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠运动方案及分组 采用疲劳式转棒仪(型号: YLS-4C);老年运动组小鼠首先进行 1 周适应性训练,5 min/r,15 min/次。参照文献[6]中的训练方案进行运动,见表 1。

表 1 负荷渐增式训练方案

Tab.1 Program of incremental load training

星期	运动时长/min	转数/(r·min ⁻¹)	运动距离/m
一	15	16	48
二	30	16	96
三	30	20	120
四	45	20	180
五	60	20	240
六	90	24	280

1.2.2 分离小鼠骨骼肌卫星细胞 参照文献[7-8]中的方法,无菌条件下分离小鼠双后肢肌肉,PBS 冲洗,去除结缔组织;机械剪碎肌肉后,采用 700~800 U/mL Colleagease II 和 Dispase 分散酶进行 37℃

水浴振荡消化, $500\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, $40\text{ }\mu\text{m}$ 细胞筛过滤后得到骨骼肌组织单细胞悬液, 依次加入 CD31-PE、CD45-PE (1:200)、sca-1-PE (1:100)、VCAM-1-APC (1:100) 抗体, 对离散细胞进行免疫标记染色, 冰上避光孵育 40 min 后行流式细胞分选 (CD45-/CD31-/Sca1-/VCAM-1+ 细胞群体), 分选细胞进行骨骼肌卫星细胞特异性分子标记 Desmin 及 MyoD 肌原性分子染色鉴定和成肌诱导分化培养。

1.2.3 免疫组化 将接种到 24 孔板细胞爬片上的细胞, 原代培养 30 min, 待细胞完全贴壁后, 用预冷的 4% 多聚甲醛进行固定, 3% H_2O_2 去离子水室温孵育 5 min, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次。滴加 5% BSA 封闭液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 滴加兔抗 p-AMPK 抗体 (1:100), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次。滴加聚合 HRP 标记抗兔 IgG, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 冲洗后进行 DAB 显色, 显色后蒸馏水冲洗, 甘油封片, 镜下观察。

1.2.4 Western blotting 检测骨骼肌卫星细胞 p-AMPK 蛋白表达 收集分选细胞 (1×10^6 个/mL), 加入适量蛋白裂解液蛋白酶抑制剂匀浆后, 提取细胞中总蛋白, 进行变性, SDS-PAG 电泳分离, 湿转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h, TBST 洗膜,

滴加 p-AMPK (1:100) 和 GAPDH (1:5 000) 一抗孵育, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, TBST 洗膜, 加入二抗, 摇床常温反应 2 h, TBST 洗膜, 二抗孵育 1 h, ECL 显影液 A 和 B 等体积混合滴于 PVDF 膜上, AI600 成像系统显影, Image J 软件定量分析, GAPDH 作内参, 以目的条带光密度值和内参条带光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 统计学分析 使用 Graphpad 6.0 软件对所有数据进行统计学分析处理, 计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组组间比较使用 t 检验, 两组以上组间比较使用 ANOVA 单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 FACS 分选小鼠骨骼肌卫星细胞

抗小鼠 CD45 /CD31/Sca-1 占据藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 通道, 目的细胞阴性表达; 抗小鼠 VCAM-1 (CD106) 占据别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC) 通道, 目的细胞呈阳性表达。具体分群见图 1。图 1 中, P1 和 P2 是在 FSC/SSC 散点图中设门圈活细胞群, 排除凋亡细胞和碎片; P3 黑框内细胞群是表面标记 CD45-/CD31-/Sca1-/VCAM+ 的细胞群, 即骨骼肌卫星细胞。

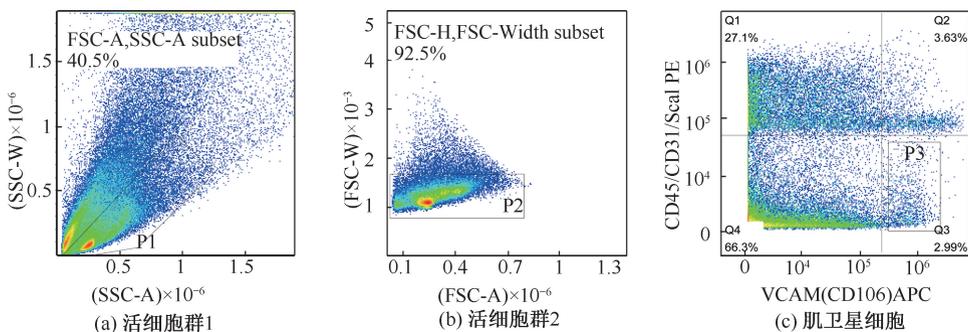


图 1 肌卫星细胞细胞流式分选策略

Fig.1 Flow sorting strategy for muscle satellite cells (a) Living cell population 1, (b) Living cell population 2, (c) Muscle satellite cells

2.2 肌卫星细胞免疫荧光鉴定及成肌诱导分化培养

分选细胞阳性表达中间丝蛋白 Desmin, 确认其为肌卫星细胞 (见图 2)。分选细胞在 24 孔板内培养 1 d 后完全贴壁 [见图 3(a)], 进行 3 d 诱导分化培养 (培养基为含 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ BFGF、20% 马血清

DMEM), 细胞呈长梭形, 漩涡状生长 [见图 3(b)], 分化培养 7 d 后, 大量肌管形成, 可见部分肌卫星细胞融合成长管状肌管, 部分肌管可观察到自发性跳动 [见图 3(c)], 分选细胞经成肌诱导分化培养后阳性表达成肌分化因子 Myod, 进一步确认分选出的细胞为肌卫星细胞 [见图 3(d)~(f)]。

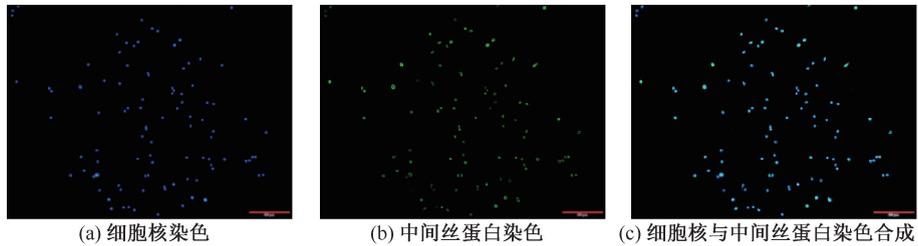


图2 肌卫星细胞特异性标记蛋白 Desmin 染色结果(标尺 200 μm ,放大倍数 10 \times)

Fig.2 Desmin staining results of muscle satellite cell specific marker protein (a) Cell nuclear by Dapi staining, (b) Desmin staining, (c) Fusion image formed by Dapi and Desmin staining

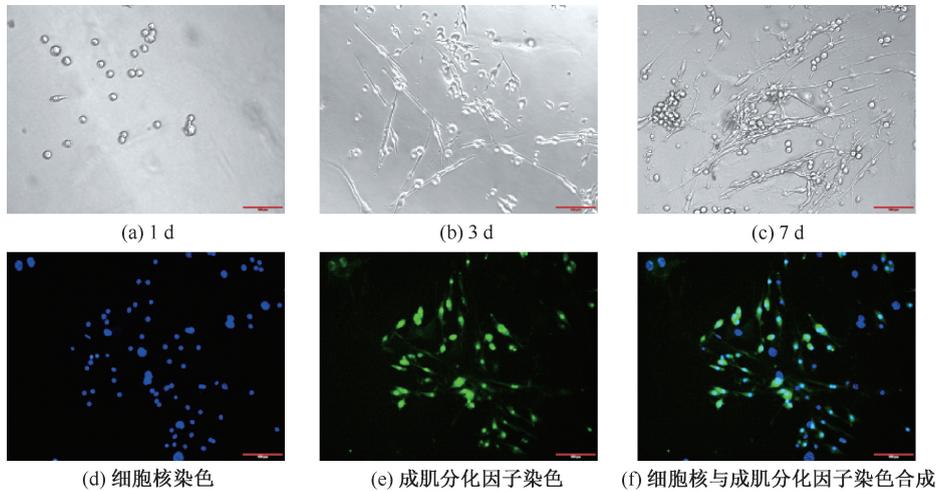


图3 肌卫星细胞成肌管诱导分化培养及 Myod 染色结果(标尺 100 μm ,放大倍数 20 \times)

Fig.3 Induced differentiation of muscle satellite cells into myoblasts and Myod staining results

(a) 1 day, (b) 3 day, (c) 7 day, (d) cell nuclear by Dapi staining, (e) Myod staining, (f) Fusion image formed by Dapi and Myod staining

2.3 骨骼肌卫星细胞免疫组化染色结果

免疫组化染色结果显示,骨骼肌卫星细胞 p-AMPK蛋白在青年对照组(YC组)、老年运动组(OT组)、老年对照组(OC组)中的阳性表达率呈逐

渐下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与OC组相比,OT组小鼠骨骼肌卫星细胞 p-AMPK阳性率显著增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图4、表2。

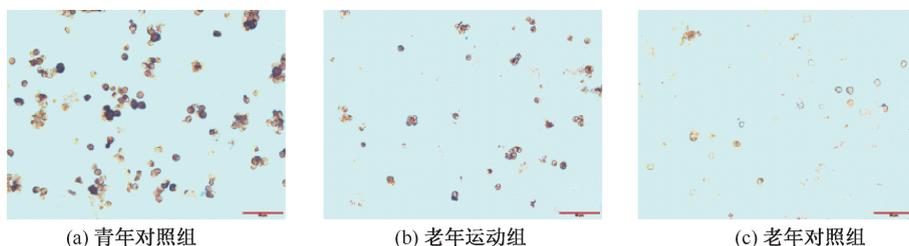


图4 肌卫星细胞 p-AMPK 蛋白免疫组化染色(标尺 50 μm ,放大倍数 40 \times)

Fig.4 Immunohistochemical staining of p-AMPK protein in muscle satellite cells

(a) Youth control group, (b) Old training group, (c) Old control group

表2 各组小鼠肌卫星细胞 p-AMPK 阳性细胞率比较

Tab.2 Comparison of p-AMPK positive cell rate of mouse muscle satellite cells in each group

组别	样本量	p-AMPK 阳性细胞 百分比/%	P	t
青年对照	3	15.730±1.438 ^a	0.012 1	4.354
老年对照	3	4.333±2.186		
老年运动	3	10.530±0.318 ^b	0.048 5	2.807

注:样本量为每组小鼠细胞爬片数;与老年对照组比较,

^aP<0.05; ^bP<0.05。

2.4 Western blotting 结果

如图5所示,老化进程中,小鼠骨骼肌卫星细胞 AMPK 及 p-AMPK 蛋白表达呈逐渐下降趋势,6周负荷渐增式训练可促进 p-AMPK 蛋白表达,对 AMPK 蛋白的表达无明显影响,运动训练后,YC 组较 OC 组、OT 组 AMPK 及 p-AMPK 蛋白表达显著增高,OT 组与 OC 组相比,AMPK 蛋白表达无显著变化(P>0.05);OT 组较 OC 组 p-AMPK 蛋白表达显著上升,差异有统计学意义(P<0.05)。

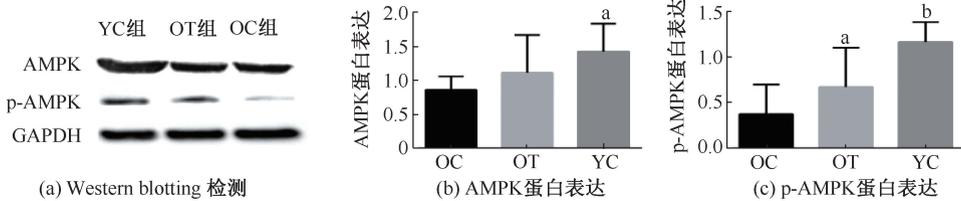


图5 各组骨骼肌卫星细胞 AMPK 及 p-AMPK 蛋白表达 Western blotting 结果(^aP<0.05; ^bP<0.05,与 OC 组比较)

Fig.5 Western blotting results of AMPK and p-AMPK protein expression in skeletal muscle satellite cells of each group (a) Western blotting detection, (b) AMPK protein expression, (c) p-AMPK protein expression

3 讨论

肌肉减少症在世界范围内的发病率显著上升,肌肉质量和功能下降是引起或加重老年退行性疾病并导致伤残失能的重要原因^[9]。研究显示,衰老严重影响人类肌卫星细胞的功能,其数量和功能的下降是老年骨骼肌再生能力减退的核心细胞学基础^[10-13]。但对导致骨骼肌卫星细胞老化的原因和细胞分子机制,迄今了解甚少。

AMPK 是一种高度保守的细胞能量代谢调控器,在调节机体组织细胞生长及能量代谢中起着重要作用。缺血、缺氧、运动等均可导致 AMP/ATP 比例升高,进而激活 AMPK 或刺激其表达^[14]。研究发现,运动可通过 AMPK 信号改善老年骨骼肌线粒体功能及能量代谢,肌卫星细胞作为骨骼肌内最主要干细胞群体,是骨骼肌组织损伤再生及可塑性的主要细胞来源;AMPK 作为运动敏感型信号,其在老年骨骼肌卫星细胞细胞运动适应过程中的改变目前尚不清楚。因此,本文选用 17 月龄老年小鼠建立负荷渐增式训练模型(6 周龄小鼠作为青年对照组,不运动),观察 AMPK 信号老年小鼠骨骼肌卫星细胞内的表达,并探讨负荷渐增式训练对老年小鼠骨骼肌卫星细胞 AMPK 蛋白磷酸化的表达影响。

本文在完成 6 周负荷渐增式运动训练后,应用流式细胞分选技术,通过表面标记 CD45-/CD31-/Sca1-/VCAM-1+ 细胞分选方案,获取高纯度的肌卫星细胞,最后利用结合免疫印迹及免疫组化技术检测骨骼肌卫星细胞内 AMPK 及 P-AMPK 信号的改变。结果表明,伴随年龄的增长,骨骼肌 AMPK 及 P-AMPK 信号蛋白呈逐渐下降趋势,负荷渐增式训练可激活老年骨骼肌卫星细胞 AMPK 信号并促使其磷酸化;AMPK 不仅是能量代谢的枢纽,同时也参与对老化过程的调节,作为 SIRT1、PGC-1 α 、MTOR 等能量敏感信号蛋白重要的上游调控分子,AMPK 信号的磷酸化,对下游信号的调节可促进细胞线粒体的生物发生及氧化磷酸化及线粒体自噬等,进而改善衰老细胞功能^[15]。Bengal 等^[16] 研究发现,运动引起老年小鼠骨骼肌卫星细胞数量的增加,与细胞代谢重新编程相关,其中氧化磷酸化水平的提高是导致线粒体质量和功能改变的关键。因此,本文推测,负荷渐增式训练引起的老年骨骼肌卫星细胞 AMPK 磷酸化增强可能通过 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 等线粒体相关信号途径调节老年骨骼肌卫星细胞线粒体功能,参与肌卫星细胞能量代谢,改善衰老骨骼肌卫星细胞的功能。

4 结论

负荷渐增式训练能有效提高老年小鼠骨骼肌卫星细胞内 p-AMPK 的表达, AMPK 信号作为调控体组织细胞生长及能量代谢的关键, 有助于认识运动中细胞能量代谢的变化机制。充分认识运动对肌卫星细胞的积极影响, 有助于为骨骼肌卫星细胞衰老的延迟提供潜在的分子靶点, 并为代谢疾病的预防和治疗提供防治方案。

参考文献:

- [1] MARZETTI E, CALVANI R, TOSATO M, *et al.* Sarcopenia: An overview [J]. *Aging Clin Exp Res*, 2017, 29(1): 11-17
- [2] ALESSIO R, MARCO R, NATALIE K, *et al.* Metabolic reprogramming of fibro/adipogenic progenitors facilitates muscle regeneration [J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3(3): 106-113.
- [3] AMARINE T, LINDA G, BETHANY S, *et al.* MPK α 1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis [J]. *EMBO J*, 2017, 36(13): 1946-1962.
- [4] 薄海, 王逊, 陈啟祥, 等. 耐力运动促进骨骼肌卫星细胞线粒体能量代谢及其对成肌分化的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2012, 31(5): 402-408.
- [5] BARBARA C, MARZIA G, MANUELA C, *et al.* Adapted physical exercise enhances activation and differentiation potential of satellite cells in the skeletal muscle of old mice [J]. *Anat J*, 2016, 228(5): 771-783.
- [6] BELLAFFIORE M, SIVVERINI G, PALUMBO D, *et al.* Increased cx43 and angiogenesis in exercised mouse hearts [J]. *Int J Sports Med*, 2007, 28(9): 749-755.
- [7] LIU L, TOM H, CHEUNG GW, *et al.* Isolation of skeletal muscle stem cells by fluorescence-activated cell sorting [J]. *Nat Protocol*, 2015, 10(10): 1612-1624.
- [8] MARIA G, JOSEP L, LAURA MG, *et al.* Muscle regeneration potential and satellite cell activation profile during recovery following hindlimb immobilization in mice [J]. *Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4360-4372.
- [9] ILSE B, CALUM S, CYRUS C, *et al.* Diet quality and sarcopenia in older adults: A systematic review [J]. *Nutrients*, 2018, 10(3): 2018, 10(3): 308-336.
- [10] SOUSA-VICTOR P, MUNOZ-CANOVES P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia [J]. *Mol Aspects Med*, 2016, 8(50): 109-117.
- [11] SSOPHIE JO, JOSHUA P, TIM S, *et al.* Skeletal muscle regeneration, repair and remodelling in aging: The importance of muscle stem cells and vascularization [J]. *Gerontology*, 2017, 63(1): 91-100.
- [12] ISHIMOTO S, GOTO I, OHTA M, *et al.* A quantitative study of the muscle satellite cells in various neuromuscular disorders [J]. *Neurol Sci*, 1983, 62(1-3): 303-314.
- [13] DUMONT NA, BENTZINGER CF, SINCENNES MC, *et al.* Satellite cells and skeletal muscle regeneration [J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(3): 1027-1059.
- [14] GARCÍA-PRAT L, MARTÍNEZ-VICENTE M, Muñoz-Cánoves P. Methods for mitochondria and mitophagy flux analyses in stem cells of resting and regenerating skeletal muscle [M]//*Methods in Molecular Biology*. New York: Springer, 2016, 1460: 223-240.
- [15] GUADALUPE-GRAU A, RODRIGUEZ-GARCIA L, TORRES-PERALTA R, *et al.* Greater basal skeletal muscle AMPK alpha phosphorylation in men than in women: Associations with anaerobic performance [J]. *Eur J Sport Sci*, 2016, 16(4): 455-464.
- [16] BENGAL E, PERDIGUERO E, SERRANO AL, *et al.* Rejuvenating stem cells to restore muscle regeneration in aging [J]. *F1000Res*, 2017, 6: 76.