

## AMPK 活化对骨骼肌中 MAFbx mRNA、MuRF1 mRNA 的表达和 3-MH 含量的影响

马廷超<sup>1</sup>, 朱荣<sup>2</sup>, 许寿生<sup>3</sup>, 王瑞元<sup>3</sup>

(1.洛阳师范学院 体育学院, 河南 洛阳 471022; 2.温州医学院, 浙江 温州 325035;  
3.北京体育大学, 北京 100084)

**摘 要:** 通过给 SD 大鼠注射 AMPK 激动剂 AICAR, 提高大鼠骨骼肌中 AMPK 的活性, 探讨 AMPK 活性变化对骨骼肌蛋白质降解的作用。采用同位素技术测定腓肠肌中 AMPK 活性的变化; 采用实时荧光定量 PCR 技术, 测定腓肠肌中 MuRF1、MAFbx 基因表达量的变化。结果显示 AICAR 注射后 1、2、7 h, AMPK 活性与对照组相比升高, 差异有显著性或非常显著性意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); AICAR 注射后 7 h, AMPK 活性开始下降。AICAR 注射后 1、2 h, MAFbx mRNA、MuRF1 mRNA 表达量与对照组相比升高, 分别升高 2.45、2.23 倍和 2.67、2.30 倍, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ); AICAR 注射后 7 h, MuRF1 mRNA 表达量升高了 2.01 倍, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); 而 MAFbx mRNA 表达有升高趋势, 但差异没有显著性。3-MH 质量摩尔浓度各组间差异没有显著性意义。结果说明: (1)大鼠一次性注射 AICAR 后, 能显著提高骨骼肌中 AMPK 的活性, AMPK 活性的升高能促进 MAFbx mRNA 和 MuRF1 mRNA 的表达, 促进骨骼肌蛋白质的降解; (2)推测在反映骨骼肌蛋白质降解方面, MAFbx mRNA 和 MuRF1 mRNA 比 3-MH 的敏感度要高。

**关键词:** 运动生物化学; 腺苷酸活化蛋白激酶; 泛素蛋白连接酶; 3-甲基组氨酸; 蛋白质降解; 大鼠

中图分类号: G804.7 文献标识码: A 文章编号: 1006-7116(2010)08-0112-06

### Effects of AMPK activation on the expression of MAFbx mRNA and MuRF1 mRNA and 3-MH content in skeletal muscles

MA Yan-chao<sup>1</sup>, ZHU Rong<sup>2</sup>, XU Shou-sheng<sup>3</sup>, WANG Rui-yuan<sup>3</sup>

(1.School of Physical Education, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China; 2.Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 3.Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** By injecting AICAR, an AMPK excitant, into SD rats to boost the activity of AMPK in the skeletal muscles of the rats, the authors probed into the effects of AMPK activity changes on the degradation of proteins in skeletal muscles. The authors measured the changes of the AMPK activity in gastrocnemius by using isotope technology, and measured the changes of the level of expression of genes MuRF1 and MAFbx in gastrocnemius by using real time fluorescence quantification PCR technology. Results: 1 h, 2 h and 7 h after AICAR was injected, the AMPK activity increased as compared with the control group, and the differences were significant or very significant ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and 7 h after AICAR was injected, the AMPK activity started to decrease; 1 h and 2 h after AICAR was injected, the levels of expression of MAFbx mRNA and MuRF1 mRNA increased respectively by 2.45 times, 2.23 times and 2.67 times, 2.30 times as compared with the control group, and the differences were very sig-

收稿日期: 2009-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971411)。

作者简介: 马廷超 (1969-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 骨骼肌蛋白质代谢。通讯作者: 王瑞元。

nificant ( $P<0.01$ ); 7 h after AICAR was injected, the level of expression of MuRF1 mRNA increased by 2.01 times, and the difference was significant ( $P<0.05$ ), while the level of expression of MAFbx mRNA increased somewhat, but the difference was not significant; there was no significant difference in the 3-MH content between various groups. The results indicated the followings: 1) after AICAR was injected into the rats once, it can significantly increase the activity of AMPK in skeletal muscles, while the increase of the AMPK activity can boost the expression of MAFbx mRNA and MuRF1 mRNA and the degradation of proteins in skeletal muscles; 2) the authors conjectured that in terms of reflecting the degradation of proteins in skeletal muscles, MAFbx mRNA and MuRF1 mRNA are more sensitive than 3-MH.

**Key words:** sports biochemistry; AMPK; MAFbx mRNA; MuRF1 mRNA; 3-MH; protein degradation; rat

腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)在真核细胞生物中广泛存在,属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。2005年 Thomson<sup>[1]</sup>研究报道 AMPK 可能抑制骨骼肌蛋白质的合成,其采用老年大鼠和成年大鼠为实验对象,进行机械刺激促使大鼠肌肉肥大,观察到随着年龄增大大鼠快肌肥大情况随之下降,快肌中 AMPK 活性反而增加;大鼠慢肌纤维随着年龄增大肥大情况没有差异,慢肌中 AMPK 的活性也没有差异。研究者认为年龄造成的 AMPK 活性的升高可能是造成快肌肥大程度减弱的原因。

泛素蛋白酶体系统是一个主要的蛋白质降解系统,对动物的研究逐渐显示:在肌肉萎缩过程中,泛素蛋白酶体系统促使蛋白质降解。Muscle Ring Finger 1(MuRF1)和 Atrophy F-box(MAFbx 也称为 Atrogin-1)均属于泛素蛋白连接酶,是目前发现的与骨骼肌蛋白质分解代谢关系最为密切的泛素蛋白连接酶。有证据表明 MuRF1 和 MAFbx 仅在骨骼肌中表达,在肌肉处于分解代谢过程中 MuRF1 和 MAFbx 表达增加。目前研究认为 MuRF1 和 MAFbx 是骨骼肌蛋白质降解的标志。测定其表达量的变化可反映骨骼肌蛋白质的降解情况。

3-甲基组氨酸(3-methylhistidine, 3-MH)是一种微量氨基酸,主要存在于骨骼肌的肌动蛋白和肌凝蛋白内(约 91.1%),是组氨酸在形成组氨酰-tRNA 后发生甲基化的产物,且蛋白质分解代谢释放的 3-MH,不能作为 tRNA 的底物被重复利用合成肽链,而从尿液中定量排出。因此,测定 3-MH 的释放量可间接反映肌纤维蛋白的降解率,是追踪骨骼肌蛋白质分解代谢状况的良好指标<sup>[2-4]</sup>。3-MH 排出增多主要见于外伤、感染等应激情况。有报道在烧伤病人骨骼肌中,观察到 3-MH 含量升高<sup>[5]</sup>。2008 年检测悬吊引起的肌肉萎缩中,发现悬吊后肌组织间隙渗透的 3-MH 含量增多 44%<sup>[6]</sup>。

有报道运动过程中,AMPK 活性显著升高,能抑制蛋白质的合成<sup>[7]</sup>。而关于 AMPK 活性升高促进骨骼肌

蛋白质的降解研究较少,2007 年有报道用 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, AICAR)处理 C2C12 肌管,观察到基质中 3-MH 的含量升高和 MAFbx mRNA、MuRF1 mRNA 的表达,认为 AMPK 活化刺激了 C2C12 肌管中肌纤维蛋白的降解<sup>[8]</sup>。目前,还没有见到在大鼠活体组织上注射 AICAR,以探讨 AMPK 活性变化对骨骼肌蛋白质降解的研究。本研究拟采用大鼠一次性注射 AMPK 激活剂 AICAR,提高骨骼肌中 AMPK 活性,观察大鼠腓肠肌中 MuRF1、MAFbx 基因表达量和 3-MH 含量的变化,探讨 AMPK 活性升高对骨骼肌蛋白质降解的作用,以及探讨 MuRF1、MAFbx 基因表达量和 3-MH 含量在反映骨骼肌蛋白质降解中的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

8 周龄健康雄性 SD 大鼠(SPF 级,许可证号:SCXK(京)2007-0001,动物编号:0068277),购于北京维通利华实验动物技术有限公司,体重 180~200 g,屏障环境饲养,温度(23±2)℃,相对湿度(65±5)%,昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h。每笼 4 只,自由饮食与饮水(饲料购于北京维通利华实验动物技术有限公司)。

### 1.2 注射方案

大鼠安静饲养 3 d,以适应新环境。24 只大鼠分为 4 组,每组 6 只。根据大鼠用药后的取材时间分:AICAR 注射后 1 h 组(A1)、AICAR 注射后 2 h 组(A2)、AICAR 注射后 7 h 组(A3)、生理盐水对照组(C2)。C2、A1、A2、A3 组大鼠的体重分别为(200.4±8.0)、(200.0±11.0)、(200.0±9.0)、(198.3±9.0) g。注射组以 0.5 mg/g 剂量在大鼠后肢大腿外侧皮下一次性注射 AICAR 溶液(质量浓度为 75 mg/mL,在 37℃水浴中溶解),生理盐水注射部位、剂量同 AICAR。

### 1.3 样品制备

大鼠分别于 AICAR 注射后 1、2、7 h 时间点称重,

用质量分数 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,注射剂量为 0.002 5 mL/g。腹主动脉取血后,迅速分离大鼠右后肢肌肉,取等量的红、白腓肠肌,用锡纸包好,投入液氮中保存。取材完成后把标本转移至 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

#### 1.4 3-甲基组氨酸测定

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测骨骼肌 3-甲基组氨酸(3-MH)含量<sup>[9]</sup>。

##### 1)肌肉组织的处理。

称取 50 mg 左右的腓肠肌组织,加入到有 500  $\mu\text{L}$  预冷高氯酸溶液(质量分数为 3.0%)的 1.5 mL 离心管内,用眼科剪迅速剪碎,冰浴中高速匀浆(32 000 r/min)10 s, 14 000  $g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ 离心 25 min,沉淀蛋白,提取上清液。注意肌肉匀浆一定要充分。

##### 2)柱前衍生。

取 50  $\mu\text{L}$  上清液至 1.5 mL 离心管内,加入 125  $\mu\text{L}$  0.2 mmol/L 硼酸钠(先配制 0.2 mmol/L 硼酸,用氢氧化钠将 pH 值调至 12.2),旋涡振荡,缓慢加入 125  $\mu\text{L}$  乙睛(含荧光胺 1.6 g/L)混匀,静置 5 min 后,加入质量分数为 70%高氯酸 18  $\mu\text{L}$ ,盖紧离心管, $80^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h。冷却至室温后,加入中和剂 3 mol/L 的 NaOH(MOPS 浓度 0.5 mol/L) 50  $\mu\text{L}$ ,使标本液终 pH 在 6.0 左右,即上机分离、检测。

##### 3)色谱条件。

流动相采用 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液,缓冲液中含有乙睛(缓冲液中乙睛的体积分数为 30%,pH 7.5),等速洗脱,流速 1.0 mL/min,进样量 100  $\mu\text{L}$ ,经 Zorbax SB-C18 柱(4.6 min  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ,柱温常温)分离,荧光分光光度计检测波长。激发 365 nm/发射 460 nm 发射。外标法定量。注意乙睛要选用光谱纯,降低本底值。

##### 4)色谱分离。

3-MH 的出峰时间约是 5.2 min。

##### 5)标准曲线和最低检测浓度。

配制 3-MH 标准液的浓度分别为 2.5、5.0、7.5、10.0、15.0  $\mu\text{mol/mL}$ ,按样品处理方法进行测定。利用 3-MH 标准品的不同浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )与各自对应的积分面积(S)建立回归方程,通过回归方程计算出各个样品中 3-MH 的量。

#### 1.5 AMPK 活性的测定方法

##### 1)AMPK 的提取。

将 $-70^{\circ}\text{C}$ 冻存的骨骼肌在液氮中研磨粉碎、匀浆;称取 100 mg 匀浆样品,加入预冷样品匀浆液 1.2 mL,超声波间断破碎 3 次,每次 3 s,间隔 6 s(破碎过程中样品冰浴);破碎后,立即将样品转移入预冷离心管中,

于  $4^{\circ}\text{C}$ 、48 000  $g$  条件下离心 30 min;收集上清液,每 mL 上清液中加入质量分数为 280  $\mu\text{g}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,冰浴上振荡 30 min; $4^{\circ}\text{C}$ 、48 000  $g$  条件下离心 30 min;弃上清液,向沉淀中加入预冷样品缓冲液(初始体积的 1/10),溶解沉淀;于  $4^{\circ}\text{C}$ 、48 000  $g$  条件下离心 30 min,收集上清液置于 $-70^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

##### 2)AMPK 活性的测定。

根据 AMPK 使特异性肽底物 SAMS(HMRSAMSGHLVKRR)磷酸化的原理,以 $[\gamma-32\text{P}]\text{ATP}$ 作为磷供体检测酶的活性<sup>[10-12]</sup>。

EP 管中加入 AMPK 反应缓冲液 10  $\mu\text{L}$ 、底物 SAMS 肽液 10  $\mu\text{L}$ (2  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ )和 $[\gamma-32\text{P}]\text{ATP}$ 混合液 10  $\mu\text{L}$ (0.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ ), $30^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min。取出,加入 AMPK 样品酶液 10  $\mu\text{L}$ , $30^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。反应结束后,吸取 30  $\mu\text{L}$  反应液吸附于 Whatman P81 滤纸(1 $\text{cm}^2$ )上,待滤纸干燥后,放入 500 mL 质量分数为 1%磷酸中漂洗 3 次,每次 5 min。最后将滤纸放入加有 200 mL 丙酮的培养皿中漂洗 5 min。

自然干燥后,放入已编号的闪烁瓶中,加入 5 mL 闪烁液,立即用 PACKARD TRI-CARB 2000CA 型液闪计数器计数。同时做两种对照,即不加酶源对照(AMPK 样品酶液替换为样品缓冲液)和不加 $[\gamma-32\text{P}]\text{ATP}$ 对照( $[\gamma-32\text{P}]\text{ATP}$ 混合液替换为不含 $[\gamma-32\text{P}]\text{ATP}$ 的 ATP 液),操作同上。

AMPK 活力单位: $30^{\circ}\text{C}$ 条件下,每分钟将 1 nmol 磷催化转入 SAMS 的酶量即 1 个单位酶活。AMPK 活性计算方法是:样品 CPM 减去空白对照 CPM 的差除以 1 nmol 磷的 CPM 的商,再除以样品酶液的蛋白含量与反应时间的积,再除以测定反应液体积与反应液总体积的比值。

#### 1.6 用实时荧光定量聚合酶链式反应技术测定腓肠肌 MAFbx 和 MuRF1 基因的表达

##### 1)RNA 的提取方法。

用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取腓肠肌中的总 RNA。在提取过程中,加入了 DNA 酶,专门去除总 RNA 中 DNA 的杂质,保证 RNA 的纯度。提取结束后,取 1  $\mu\text{L}$  提取的总 RNA,用核酸浓度测定仪(德国),分别测定波长为 260 和 280 nm 的吸光度值,计算  $A_{260}/A_{280}$  的值,以鉴定所提取的 RNA 的纯度,各个样  $A_{260}/A_{280}$  值都在 1.9 以上左右,可认为所提取的 RNA 较纯,可进行下一步实验。

##### 2)反转录。

采用 TOYOBO 公司提供的反转录试剂盒。在 0.2 mL 离心管中加入  $5 \times \text{RTbuffer}$  4  $\mu\text{L}$ 、10 mmol/L dNTP Mixture 2  $\mu\text{L}$ 、RNase inhibitor 1  $\mu\text{L}$ 、Oligo(dT) 1  $\mu\text{L}$ 、

Reverse Tra Ace 1  $\mu$ L、1  $\mu$ g RNA(0.7~1.4  $\mu$ L), 加水至 20  $\mu$ L。涡旋混匀, 稍微离心, 42  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 85  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 4  $^{\circ}$ C 培育 5 min, 然后逆转录产物, -20  $^{\circ}$ C 保存待用。

### 3) 实时荧光定量聚合酶链式反应。

实时荧光定量聚合酶链式反应的条件: 在 0.2 mL 离心管中加入 cDNA 0.5  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 水 8.5  $\mu$ L, 94  $^{\circ}$ C 预热变性 4 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 62  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 扩增 40 个循环, 末次循环 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存 5 min。MAFbx 75 bp (GeneBank accession AY059628, 5' TCC TGG ATT CCA GAA GAT TCA AC 3', 5' TCA GGG ATG TGA GCT GTG ACT T 3'); MuRF1 167 bp (GeneBank accession AY059627, 5' ACA ACC TCT GCC GGA AGT GT 3', 5' CCG CGG TTG GTC CAG TAG 3'); GAPDH 177 bp (GeneBank accession BC059110, 5' gga tgc agg gat gat gtt c 3', 5' tgc acc acc aac tgc tta 3)。

## 1.7 统计学处理

数据以均数  $\pm$  标准差表示, 采用 SPSS 统计软件包进行单因素方差分析。以  $P < 0.05$  表示差异有显著性水平, 以  $P < 0.01$  表示差异有非常显著性。

## 2 结果及分析

### 2.1 AICAR 一次性注射后各组 AMPK 活性变化

AICAR 注射后, C2、A1、A2、A3 组中 AMPK 的活性分别是(0.34  $\pm$  0.16)、(0.89  $\pm$  0.14)、(0.98  $\pm$  0.21)、(0.58  $\pm$  0.22) nmol/(g  $\cdot$  min)。AMPK 活性与生理盐水对照组相比升高, A1、A3 组与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ), A2 组与对照组比较差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。AICAR 注射后 7 h, AMPK 活性开始下降, 但仍高于对照组。

### 2.2 AICAR 一次性注射后各组 MuRF1 mRNA、MAFbx mRNA 表达量变化

与生理盐水对照组相比, AICAR 注射后 1、2 h, MAFbx mRNA 表达量升高(2.45  $\pm$  0.80)、(2.23  $\pm$  0.59) 倍, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ), AICAR 注射后 7 h, 升高(1.46  $\pm$  0.65)倍, 但差异没有显著性意义。

与生理盐水对照组比较, AICAR 注射后 1、2 h, MuRF1 mRNA 表达量分别升高(2.67  $\pm$  0.64)、(2.30  $\pm$  0.30)倍, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ); AICAR 注射后 7 h, MuRF1 mRNA 表达量升高(2.01  $\pm$  0.69)倍, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 AICAR 一次性注射后各组 3-MH 质量摩尔浓度的变化

与生理盐水对照组比较, 注射 AICAR 后, 各组

3-MH 的表达量有下降趋势, C2、A1、A2、A3 组中 3-MH 的质量摩尔浓度分别是: (0.53  $\pm$  0.12)、(0.40  $\pm$  0.20)、(0.32  $\pm$  0.18)、(0.42  $\pm$  0.21)  $\mu$ mol/mg。但是差异没有显著性意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

AICAR 是目前应用较多的 AMPK 激活剂, 它是腺苷的类似物, 进入细胞后在腺苷激酶的作用下转化为单磷酸核苷(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranosyl-5-monophosphate, ZMP), ZMP 是 AMP 的类似物, 它能够变构激活 AMPK 和其上游激酶 AMPKK(AMPK kinases), 后者继而激活 AMPK。

AICAR 是 AMPK 的有效激活剂, 这已经被大量实验所证实<sup>[7, 13-15]</sup>。本研究观察到大鼠注射 AICAR 后 1、2、7 h, AMPK 活性显著升高, 在注药后 7 h, AMPK 活性开始下降, 说明注射 AICAR 后, 促进了 AMPK 活性的升高, 证明建立的实验动物模型成功, 满足本实验要求。

MuRF1 和 MAFbx 均属于泛素蛋白连接酶, 主要在骨骼肌中表达, 是目前发现的与骨骼肌蛋白质分解代谢关系最为密切的泛素蛋白连接酶, 它们表达量的升高可反映骨骼肌蛋白质的降解。有报道称在制动、去神经、后肢悬吊、饥饿以及病理(糖尿病、肿瘤、脓毒症)等情况下诱导骨骼肌萎缩的模型中, MuRF1、MAFbx 表达量均明显增高<sup>[16-18]</sup>。另有报道 MuRF1 与 MAFbx 基因缺失的小鼠, 表现型均是正常, 但 2 种小鼠在去神经诱导的骨骼肌萎缩时, 骨骼肌萎缩程度较轻, 这些发现证明抑制 MuRF1 与 MAFbx 基因的表达, 可减轻诱导肌肉萎缩因素引起的肌肉萎缩。

本研究显示, AICAR 注射后 1、2 h, MAFbx mRNA、MuRF1 mRNA 表达量升高, 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ ); AICAR 注射后 7 h, MuRF1 mRNA 表达量升高, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 而 MAFbx mRNA 表达只有升高趋势, 但差异没有显著性意义。这与 Nakashima<sup>[8]</sup>的研究结论相一致, 即 AICAR 注射后 MAFbx mRNA 和 MuRF1 mRNA 表达量升高。本研究观察到: AICAR 注射后, 各时相点 AMPK 活性升高与 MAFbx mRNA 和 MuRF1 mRNA 表达量升高的变化趋势相一致, 推测 AMPK 活性升高, 可能促进了 MAFbx mRNA 和 MuRF1 mRNA 的表达, 促进了骨骼肌蛋白质的降解。

3-甲基组氨酸(3-MH)只存在于肌纤维蛋白中, 肌纤维蛋白质被降解后, 释放的 3-甲基组氨酸不再参与新蛋白质的合成, 故其释放量可间接反映肌纤维蛋白的降解。在外伤、感染、烧伤等应激情况下, 3-MH 排出

增多,故在医学界常用测定尿、血和骨骼肌组织中 3-MH 的含量,以检测骨骼肌蛋白质的降解情况。有报道称在烧伤病人骨骼肌中 3-MH 含量显著升高<sup>[19]</sup>。

本研究观察到大鼠注射 AICAR 后,骨骼肌中 3-MH 没有升高,且有下降趋势,但差异没有显著性意义。这与 Nakashima<sup>[8]</sup>报道不完全一致,其用 AICAR 处理 C2C12 肌管,观察到基质中 3-MH 均升高,研究者认为 AMPK 活化刺激了 C2C12 肌管中肌纤维蛋白质的降解。本研究用 AICAR 直接注射到大鼠大腿外侧肌肉,观察到 AICAR 注射后大鼠腓肠肌中 3-MH 没有变化。我们认为:AICAR 注射后,3-MH 没有升高可能有两种原因:(1)目前 3-MH 测定方法的敏感度可能不高,在骨骼肌蛋白质降解较弱时,3-MH 的变化不能被检测到。2009 年 Hansen 等<sup>[20]</sup>报道,受试者进行 210 次高速最大离心收缩运动,一条腿自愿运动,另一条腿采用电刺激被动运动,观察到自愿运动腿骨骼肌间隙中 3-MH 量在运动后即刻没有明显变化,但是电刺激腿运动后即刻骨骼肌间隙中 3-MH 量比自愿运动腿显著升高。认为电刺激的刺激部位仅限制于骨骼肌的局部,对局部骨骼肌的刺激作用较强,而自愿运动机体对骨骼肌的作用是交替的、多样的,可能对骨骼肌的刺激作用较弱,所以没有观察到骨骼肌内 3-MH 量的变化。2008 年, Vary 等<sup>[5]</sup>在研究酒精中毒对骨骼肌蛋白质降解的影响时,观察到 MAFbx mRNA 和 MuRF1mRNA 基因表达量增加,却没有观察到 3-MH 量的变化,同样有关运动后 6 h 内,骨骼肌蛋白质降解的一些报道,也没有观察到骨骼肌内 3-MH 量的变化<sup>[21-22]</sup>。说明骨骼肌蛋白质降解较强时,才可能观察到骨骼肌中 3-MH 量的增加。本研究在体一次性注射 AICAR 提高 AMPK 活性与骨骼肌出现脓毒症和烧伤的病理情况相比,其促进骨骼肌蛋白质降解的作用可能要弱些,所以检测不到 3-MH 的变化。(2)在体组织的血液循环可能是影响骨骼肌中 3-MH 测定的另一个重要原因。Nakashima<sup>[8]</sup>研究结果观察到 C2C12 肌管中 3-MH 量升高,可能是由于其研究的材料是 C2C12 肌管,不存在血液循环作用,故随着时间延长,肌管中 3-MH 的堆积可能较多,便于检测。本研究的材料是骨骼肌活体,骨骼肌产生的 3-MH 可能被血液循环清除,使骨骼肌中积累的 3-MH 较少,所以本研究没有检测到骨骼肌中 3-MH 量的变化,但血中或尿中 3-MH 的量可能会升高。本研究没有检测大鼠血中或尿中的 3-MH 量,所以还不能确定 AICAR 注药后,骨骼肌中 3-MH 量的变化,因此对一次 AICAR 注射后在体骨骼肌中 3-MH 量的变化还需要进一步的研究。

本研究观察到 MAFbx mRNA、MuRF1 mRNA 表达

量在 AICAR 注射后显著升高,而 3-MH 量却没有变化,结合 Vary<sup>[5]</sup>的研究检测到 MAFbx mRNA、MuRF1 mRNA 表达量升高,3-MH 量没有变化,作者认为在反映骨骼肌蛋白质降解方面,MuRF1 mRNA、MAFbx mRNA 表达量与 3-MH 量变化不一致,或者说明在反映骨骼肌蛋白质降解方面 MuRF1 mRNA、MAFbx mRNA 比 3-MH 可能更敏感。测定骨骼肌中 3-MH 的量反映骨骼肌蛋白质降解的方法还需要进一步完善,提高其测定的敏感度和减少血液循环对其测定结果的影响。

总之,本研究认为大鼠一次性注射 AICAR 后,能显著提高其腓肠肌中 AMPK 的活性,AMPK 活性的升高又能促进 MAFbx mRNA 和 MuRF1 mRNA 的表达,促进骨骼肌蛋白质的降解。

### 参考文献:

- [1] Thomson D M, Gordon S E. Diminished overload-induced hypertrophy in aged fast-twitch skeletal muscle is associated with AMPK hyperphosphorylation[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 98(2): 557-564.
- [2] Emery P W, Preedy V R. Measuring muscle protein turnover in vivo: what can 3-methylhistidine production tell us? [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2003, 104(6): L557-558.
- [3] Safford K M, Hicok K C, Safford S D, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 294(2): 371-379.
- [4] Chambrier C, Aouifi A, Bon C, et al. Effects of intraoperative glucose administration on circulating metabolites and nitrogen balance during prolonged surgery[J]. *J Clin Anesth*, 1999, 11(8): 646-651.
- [5] Vary T C, Frost R A, Lang C H. Acute alcohol intoxication increases atrogin-1 and MuRF1 mRNA without increasing roteolysis in skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(6): R1777-1789.
- [6] Tesch P A, Walden F, Gustafsson T, et al. Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 105(3): 902-906.
- [7] 张国华. 不同运动骨骼肌 AMPK 的变化特点及对 mTOR 和下游信号的调控[D]. 北京: 北京体育大学, 2008.
- [8] Nakashima K, Yakabe Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes[J]. *Biosci Biotech-*

nol Biochem, 2007, 71(7): 1650-1656.

[9] 申传安, 柴家科, 廖杰, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定大鼠骨骼肌组织内微量三甲基组氨酸[J]. 军医进修学院学报, 2003, 24(2): 120-122.

[10] Shin T, Masahide Go, Miyuki K, et al. Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 296: 350-354.

[11] Wim D, Hua A, Jacob I, et al. Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle[J]. Diabetes, 2000, 49(8): 1281-1286.

[12] Seung Hun Cha, Zhiyuan Hu, Shigeru Chohnan, et al. Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle[J]. PNAS, 2005, 102(41): 14557-14562.

[13] Niels J, Rasmus P, Esben S B. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles[J]. J Appl Physiol, 2003, 94: 1373-1379.

[14] Miguel A I, Stuart M F, Gregory J. AMP-Activated protein kinase activation by AICAR increases both muscle fatty acid and glucose uptake in white muscle of insulin-resistant rats in vivo[J]. Diabetes, 2004, 53: 1949-1654.

[15] Bolster D R, Crozier S J, Kimball S R, et al. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mam-

malian target of rapamycin (mTOR) signaling[J]. J Biol Chem, 2002, 277(27): 23977-23980.

[16] Dehoux M, Van B R, Pasko N, et al. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogen-1/MAF<sub>bx</sub> during fasting and diabetes[J]. Endocrinology, 2004, 145(11): 4806-4812.

[17] Wray C J, Mammen J M, Hershko D D, et al. Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(5): 698-705.

[18] Dehoux M J, Van B R, Fernández-Celemín L, et al. Induction of MAF<sub>bx</sub> and MuRF1 ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection[J]. FEBS Lett, 2003, 544(1-3): 214-217.

[19] Varrik E, Viru A, Oopik V, et al. Exercise-induced catabolic responses in various muscle fibres[J]. Can J Sport Sci, 1992, 17(2): 125-128.

[20] Hansen M, Trappe T, Cramer R M, et al. Myofibrillar proteolysis in response to voluntary or electrically stimulated muscle contractions in humans[J]. Scand J Med Sci Sports, 2009, 19(1): 75-82.

[21] Trappe T, Williams R, Carrithers J, et al. Influence of age and resistance exercise on human skeletal muscle proteolysis: a microdialysis approach[J]. J Physiol, 2004, 554(3): 803-881.

[22] Haus J M, Miller B F, Carroll C C, et al. The effect of strenuous aerobic exercise on skeletal muscle myofibrillar proteolysis in humans[J]. Scand J Med Sci Sports, 2007, 17(3): 260-266.