

废用条件下大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌氧化应激和抗氧化防御能力与肌萎缩的比较研究

魏艳红^① 张洁^② 高云芳^{③*}

① 宁夏医科大学基础医学院 银川 750004; ② 山西医科大学法医学院 太原 030001;

③ 西北大学生命科学学院, 陕西省秦岭珍稀濒危动物保育重点实验室 西安 710069

摘要: 本研究采用免疫荧光组织化学染色法和蛋白免疫印迹法比较研究了后肢去负荷大鼠 (*Rattus norvegicus*) 和冬眠不活动达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 不同类型骨骼肌氧化应激水平和抗氧化防御能力及与肌萎缩之间的关系。结果显示, 后肢去负荷 14 d 后, 大鼠比目鱼肌和趾长伸肌肌萎缩程度显著升高, 过氧化氢和丙二醛水平增加, Nrf2 介导的抗氧化信号通路及下游抗氧化酶蛋白表达及活性显著下降; 而冬眠不活动达乌尔黄鼠骨骼肌中肌萎缩指标并未出现变化, 氧化应激水平维持夏季组水平, 抗氧化酶和调控因子出现不同程度升高。研究表明, 后肢去负荷导致非冬眠大鼠骨骼肌氧化应激水平升高, 抗氧化防御能力减弱, 可能是导致大鼠废用性肌萎缩的重要机制之一; 而冬眠动物达乌尔黄鼠骨骼肌在自然废用状态下, 抗氧化防御能力增强可能是防止自然冬眠不活动引起的废用性肌萎缩的重要机制。

关键词: 后肢去负荷; 冬眠; 氧化应激; 抗氧化防御; 骨骼肌

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2023) 03-420-22

Comparative Study on Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Skeletal Muscles of Rats and Daurian Ground Squirrels Under the Disuse Conditions

WEI Yan-Hong^① ZHANG Jie^② GAO Yun-Fang^{③*}

① *The School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004;*

② *The School of Forensic Medicine, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001;*

③ *The College of Life Sciences, Northwest University, Shaanxi Key Laboratory for Animal Conservation, Xi'an 710069, China*

Abstract: [Objectives] Research on oxidative stress in skeletal muscle under disuse conditions is a topic of increasing concern among physiologists. In view of the important role of elevated oxidative stress in the development of disuse muscle atrophy, we hypothesized that hibernators and non-hibernators may exhibit

基金项目 宁夏自然科学基金项目 (No. 2022AAC03157), 宁夏医科大学特殊人才项目 (No. XT2019006);

* 通讯作者, E-mail: gaoyunf@nwxu.edu.cn;

第一作者介绍 魏艳红, 女, 副教授; 研究方向: 动物生理学; E-mail: lovely_yhwei@126.com.

收稿日期: 2022-05-18, 修回日期: 2022-12-31 DOI: 10.13859/j.cjz.202303011

differences in oxidative stress levels and antioxidant defense regulation, thus constituting intrinsic differences in the mechanism of muscle atrophy. Moreover, because of the variations in their energy metabolism and function, differences should also exist in the degree of atrophy and level of oxidative stress in different skeletal muscles. For this reason, we investigated the degree of atrophy in the SOL (slow-twitch) and EDL (fast-twitch) muscles in parallel with the level of oxidative stress, antioxidant defense and underlying mechanism in non-hibernators (Rats, *Rattus norvegicus*) and hibernators (Daurian Ground Squirrels, *Spermophilus dauricus*) between artificial and natural disuse. **[Methods]** We examined changes in muscle wet weight and muscle-to-body weight ratio by electronic balance. Immunofluorescence staining was performed to measure the muscle fiber cross-sectional area (CSA) and fiber type composition. Using a hydrogen peroxide (H₂O₂) assay kit and malondialdehyde (MDA) assay kit, we measured the concentrations of H₂O₂ and MDA (level of oxidative stress) in muscle samples. The antioxidant activity was ascertained using specific superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) assay kits. We detected protein expression of the Nrf2/Keap1 signaling pathway and downstream antioxidant enzymes (SOD1, SOD2, CAT, and GPx) in hindlimb loading (HU) Rats and hibernating Daurian Ground Squirrels. Differences in body weight between HU and control Rats and between hibernating inactive (HIB) and summer active (SA) Ground Squirrels were evaluated with an independent samples *t*-test. Muscle wet weight, ratio of muscle wet weight/body weight, fiber-type distribution, fiber CSA, and all the protein expression levels were analyzed using two-way ANOVA (main effects of muscle type and disuse treatment) followed by independent samples *t*-test. **[Results]** Compared to the control Rats, muscle atrophy indices (muscle mass, muscle-to-body mass ratio and CSA) were significantly increased in the SOL and EDL after 14 d of HU. In the Daurian Ground Squirrels, however, no significant changes in these indices were observed in the muscles between the hibernation inactive and summer active groups (Fig. 1 and 2). After 14 d of HU, the proportion of fast type fiber (MyHC II) increased significantly by 206.0% ($P < 0.001$) in the SOL compared with the control Rats; however, there was no significant change in the proportion of fiber type in the EDL. In Daurian Ground Squirrels, the proportion of slow type fiber (MyHC I) and MyHC II showed no significant changes in the SOL or EDL between the hibernation inactive and summer active groups (Fig. 2). In regard to oxidative stress, H₂O₂ content increased significantly in the SOL and EDL and MDA content increased significantly in the SOL of HU rats; however, neither were increased in the hibernating Daurian Ground Squirrels, although H₂O₂ and MDA content decreased significantly in the EDL (Fig. 3). SOD2, CAT, and GPx1 expression markedly decreased in the SOL, as did GPx1 in the EDL, whereas SOD1 expression increased significantly in the SOL of HU rats. In hibernating Daurian Ground Squirrels, however, expression was maintained or increased in both muscles; for example, CAT and GPx1 protein levels increased significantly in the SOL and EDL of the hibernation group (Fig. 5 and 6). Furthermore, compared with control rats, Nrf2, p-Nrf2, and Keap1 protein levels in the SOL of the HU group demonstrated no changes, whereas the expression of Nrf2 and Keap1 in the EDL of the HU group decreased significantly, whereas Nrf2 and p-Nrf2 protein levels in the SOL and EDL of the hibernating Daurian Ground Squirrels increased markedly (Fig. 7). **[Conclusion]** These results indicate that the Nrf2/Keap1 antioxidant pathway was not activated and downstream antioxidant enzymes were down-regulated in Rats under muscle disuse conditions, which may be an important mechanism in oxidative stress (i.e., increased reactive oxygen species) and induced skeletal muscle atrophy. Conversely, activation of

the Nrf2/Keap1 signaling pathway and increase in antioxidant enzymes observed in the Daurian Ground Squirrels during hibernation undoubtedly helped prevent oxidative stress and muscle atrophy. In conclusion, oxidative stress and Nrf2-mediated antioxidant defense appear to differ in skeletal muscles of non-hibernators (Rats) and hibernators (Daurian Ground Squirrels) under disuse conditions, which may be important mechanisms for the differing degrees of muscle atrophy.

Key words: Hindlimb unloading; Hibernation; Oxidative stress; Antioxidant defense; Skeletal muscle

骨骼肌作为人体最大的器官, 维持其肌肉重量和功能对于运动和代谢稳态至关重要。然而, 诸如后肢去负荷 (hindlimb unloading)、固定或失重等肌肉废用的情况均可导致人和其他动物骨骼肌发生萎缩, 从而影响机体的运动能力和代谢稳态。关于大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的研究结果显示, 后肢去负荷 7 d 或 14 d 后, 其比目鱼肌 (soleus) 和趾长伸肌 (extensor digitorum longus) 重量明显减少, 肌纤维横截面积 (cross-sectional area, CSA) 显著下降 (Yoshihara et al. 2017, Zhang et al. 2017, Chang et al. 2018)。然而, 冬眠哺乳动物经历长达 3 或 4 个月的冬眠不活动, 却只出现非常有限的肌肉萎缩, 这与废用诱导的非冬眠动物肌肉萎缩现象截然不同 (Gao et al. 2012, Yang et al. 2014, Cotton 2016, Fu et al. 2016, Wei et al. 2018a)。

废用条件下骨骼肌发生严重的肌肉萎缩, 影响机体的运动能力和代谢稳态。而氧化应激可能是引起废用性肌萎缩的一个重要因素 (Powers et al. 2011, 2012, 2016), 对骨骼肌在废用条件下氧化应激的研究是生理学研究者多年来一直关注的课题。因此我们假设冬眠动物与非冬眠动物废用条件下骨骼肌在氧化应激水平和抗氧化防御调控机制方面可能存在差异, 这可能是导致其肌萎缩程度不同的潜在机制, 且不同类型的骨骼肌因其能量代谢方式及功能的不同而在萎缩程度和氧化应激水平上存在差异。

本研究以非冬眠动物大鼠和冬眠动物达乌尔黄鼠 (*Spermophilus dauricus*) 后肢骨骼肌比目鱼肌 (典型的慢肌) 和趾长伸肌 (典型的快

肌) 为研究材料, 分别在后肢去负荷和冬眠不活动废用条件下, 检测其肌肉重量、肌重-体重比、肌纤维类型、肌纤维横截面积, 及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平 (过氧化氢和丙二醛)、核转录相关因子 2 (NF-E2-related factor-2, Nrf2) 蛋白和下游抗氧化蛋白 (超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶) 的表达, 探究废用条件下不同类型骨骼肌的萎缩程度、氧化应激和抗氧化防御水平及其调控机制在非冬眠动物和冬眠动物中的区别。

1 材料与方法

1.1 动物获取和分组

雌性 Sprague-Dawley 大鼠, 年龄 8 周龄, 体重 (220 ± 10) g, 购买自西安交通大学医学院实验动物中心。将大鼠按照体重配对原则随机分成两组, 对照组 ($n = 8$) 饲养于鼠笼; 后肢去负荷组 ($n = 8$) 后肢去负荷 14 d。以尾部悬吊法建立大鼠废用性肌萎缩模型 (Morey-Holton et al. 2002)。

6 月中旬在陕西省渭南市大荔县捕获雌性达乌尔黄鼠, 饲养于标准动物饲养房 (日光照, 室温 $18 \sim 25$ °C), 以标准鼠粮为主, 并配合花生混合饲养。直至 11 月初, 达乌尔黄鼠逐渐进入冬眠状态时, 将其转移至冬眠屋 (室温 $5 \sim 8$ °C, 无光照)。在达乌尔黄鼠整个饲养过程中采用红外热成像仪 (Fluke, VT04, Everett, Washington, DC, USA), 对其额顶温度和环境温度进行监测并记录 (张洁 2018), 并记录其活动及进食情况。按照体重配对原则, 将实验动物分为 2 组, 夏季活跃组 ($n = 8$) 达乌尔黄鼠处于夏季活跃时期, 体温维持在 $36 \sim$

38 °C, 进食排泄正常, 一般在每年 7 月 10 日前完成取样; 冬眠不活动组 ($n = 8$) 达乌尔黄鼠已冬眠 2 个月, 且从阵间觉醒再次进入新的冬眠阵, 体温降至 5 ~ 8 °C 后取样。因达乌尔黄鼠尾太细, 尾部悬吊实验中尾总是被拉断, 不足以实施吊尾诱导废用性肌萎缩, 所以采用自然状态下冬眠 2 个多月的不活动达乌尔黄鼠, 建立达乌尔黄鼠废用性肌萎缩模型。

1.2 骨骼肌样本获取

称量并记录实验动物体重, 腹腔注射 20% 的乌拉坦 (氨基甲酸乙酯, Urethane, 1.5 g/kg) 使其进入麻醉状态。将麻醉动物仰卧置于恒温解剖台上, 快速解剖分离后肢骨骼肌的比目鱼肌和趾长伸肌, 置于生理盐水洗去血渍, 滤纸吸干多余水分后置于电子天平上快速称重, 并记录肌肉湿重。随后将样本装进编好号的冻存管放入液氮, 最后将所有骨骼肌样本置于 - 80 °C 冰箱中保存备用。取样完毕后通过腹腔注射乌拉坦使动物过度麻醉, 待动物安乐死后将其进行无毒害处理。

1.3 肌纤维组成类型和肌纤维横截面积测定

免疫荧光组织化学染色法检测大鼠和达乌尔黄鼠的骨骼肌纤维分布和肌纤维横截面积。骨骼肌样本用冰冻切片在 - 20 °C 横切, 切片厚度 10 μm 。切片于 4% 多聚甲醛固定 30 min, 1% Triton X-100 通透 30 min, 5% BSA 封闭 1 h, 分别加入抗慢肌纤维抗体 (1 : 400, M8421, Sigma, 美国)、兔抗 laminin 多克隆抗体 (1 : 500, BA1761-1, 博士德, 中国) 4 °C 孵育 24 ~ 48 h, 经 PBS 洗涤后, 孵育相应的二抗 (1 : 500, Alexa Fluor 488, A-11034, Thermo Fisher Scientific, 美国; Alexa Fluor 647, A-21235, Thermo Fisher Scientific, 美国) 2 h, DAPI 复染核, PBS 洗涤后, 滴加抗淬灭剂中性树胶封片, 最后使用 Image Pro Plus 图像分析软件对肌纤维分型比例及肌纤维横截面积进行统计。

1.4 过氧化氢测定

本研究使用过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 检测试剂盒 (南京建成, 南京, 中国)

进行测定。迅速称取约 0.1 g 组织放入盛有 PBS 的破碎管, 并做好标记, 于高通量组织研磨器 (Scientz-48, 宁波新芝, 中国) 进行充分匀浆, 然后用低温高速离心机 (5415R 型, Eppendorf Centrifuge, 德国) 于 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min。然后收集上清液于冰浴中保存备用。准备 10 ml 离心管若干, 分别标记为空白管、测定管和标准管, 按照表 1 所示完成实验。

表 1 过氧化氢含量测定操作表

Table 1 An operation table of measurement of H_2O_2 content

试剂 Reagent	空白管 Blank tube	标准管 Standard tube	测定管 Measuring tube
试剂一 Reagent 1 (ml)	1.0	1.0	1.0
双蒸水 Double distilled water (ml)	0.1		
163 mmol/L 过氧化氢 标准品应用液 (ml) 163 mmol/L H_2O_2 standard application solution		0.1	
待测样本 Measuring sample (ml)			0.1
试剂二 Reagent 2 (ml)	1.0	1.0	1.0

最后将各管于紫外分光光度计 (Shimadzu UV-2550, 日本) 在光径 1 cm, 波长 405 nm 下测定吸光度值 (A)。过氧化氢含量可根据标准品的吸光度值计算得到。待测样本蛋白浓度按照说明书所示紫外法测定。

组织中过氧化氢 (H_2O_2) 含量的计算公式:
组织中 H_2O_2 含量 (mmol/g) =

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times \text{标准品浓度 (163 mmol/L)} \div$$

待测样本蛋白浓度 (g/L)。

1.5 丙二醛测定

本研究使用丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (南京建成, 南京, 中国) 进行测定。样品的准备与测定过氧化氢的过程一致。按照表 2 所示完成实验。根据试剂盒要求, 提前准备所需试剂和耗材。试剂二应用液: 将试剂二每瓶 12 ml 加 340 ml 双蒸水混匀, 4 °C 冷藏。试剂三应用液: 每支粉剂加入到 90 ~

表 2 丙二醛含量测定操作表

Table 2 An operation table of measurement of malondialdehyde content

试剂 Reagent	标准管 Standard tube	空白管 Blank tube	测定管 Measuring tube	对照管 Control tube
10 μmol/L 标准品 10 μmol/L standard solution (ml)	0.1			
无水乙醇 Absolute ethyl alcohol (ml)		0.1		
待测样本 Measuring sample (ml)			0.1	0.1
试剂一 Reagent 1 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
试剂二 Reagent 2 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0
试剂三 Reagent 3 (ml)	1.0	1.0	1.0	
50%冰醋酸 50% Acetic acid (ml)				1.0

100 °C 的热双蒸水 60 ml，再加冰醋酸 60 ml，混匀，4 °C 避光冷藏。

取上清 300 μl 在 1 cm 光径，双蒸水调零，波长 532 nm 下测各管吸光度值 (A)。丙二醛的含量可根据标准品的吸光度值计算得到。待测样本蛋白浓度按照说明书所示紫外法测定。

组织中丙二醛 (MDA) 含量的计算公式：

组织中MDA含量 (μmol/g) =

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times \text{标准品浓度 (10 } \mu\text{mol/L)} \div$$

待测样本蛋白浓度(g/L)。

1.6 抗氧化酶活性的测定

1.6.1 超氧化物歧化酶活性测定 本研究使用超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (南京建成, 南京, 中国) 进行测定。样品的准备与测定过氧化氢和丙二醛的过程一致。按照表 3 所示完成实验。根据试剂盒说明和要求, 提前配置实验所需试剂。试剂一应用液: 每瓶试剂一贮备液 10 ml 加双蒸水稀释至 100 ml, 4 °C 保存。试剂四应用液: 试剂四贮备液和稀释液按照 1 : 14 比例配制, 现用现配, 4 °C 保存。试剂五应用液: 每支粉剂加 75 ml 双蒸水充分溶解, 4 °C 避光保存。试剂六应用液: 每支粉剂加 75 ml 双蒸水充分溶解, 4 °C 避光保存。显色剂: 按照试剂五应用液: 试剂六应用液: 冰乙酸为 3 : 3 : 2 的体积比配制, 4 °C 避光保存。

充分混匀, 室温静置 10 min, 光径 1 cm, 双蒸水调零, 波长 550 nm 下测定各管吸光度值。根据公式分别计算出总超氧化物歧化酶和超氧化物歧化酶 1 的活性, 因为高等动物细胞内只有超氧化物歧化酶 1 和超氧化物歧化酶 2 这两种超氧化物歧化酶, 因此超氧化物歧化酶 2 的活性即为总超氧化物歧化酶和超氧化物歧化酶 1 的差。待测样本蛋白浓度按照说明书所示紫外法测定。

表 3 总超氧化物歧化酶和超氧化物歧化酶 1 含量测定操作表

Table 3 An operation table of measurements of total superoxide dismutase (T-SOD) and superoxide dismutase 1 (SOD1) activity

试剂 Reagent	总超氧化物歧化酶对照管 Control tube of T-SOD	总超氧化物歧化酶测定管 Measuring tube of T-SOD	超氧化物歧化酶 1 对照管 Control tube of SOD1	超氧化物歧化酶 1 测定管 Measuring tube of SOD1
试剂一应用液 Application solution of reagent 1 (ml)	1.00	1.00	1.00	1.00
双蒸水 Double distilled water (ml)	0.03			
待测样本 Measuring sample (ml)		0.03		
对照上清 Control supernatant (ml)			0.03	
样本上清 Measuring sample supernatant (ml)				0.03
试剂二 Reagent 2 (ml)	0.10	0.10	0.10	0.10
试剂三 Reagent 3 (ml)	0.10	0.10	0.10	0.10
试剂四应用液 Application solution of reagent 4 (ml)	0.10	0.10	0.10	0.10
充分混匀, 于 37 °C 恒温水浴 40 min Mix well and bathe at 37 °C for 40 min				
显色剂 Color developing agent (ml)	2.00	2.00	2.00	2.00

组织中超氧化物歧化酶活力计算公式：

组织中SOD含量 (U/mg) =

$$\frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积 (ml)}}{\text{取样量 (ml)}} \div$$

待测样本蛋白浓度(g/L)。

1.6.2 过氧化氢酶活性测定 本研究使用过氧化氢酶 (catalase, CAT) 检测试剂盒 (南京建成, 南京, 中国) 进行测定。样品的准备与测定过氧化氢和丙二醛的过程一致。按照表 4 所示完成实验。根据试剂盒说明和要求, 提前配置试剂盒所需试剂。试剂三应用液: 显色粉剂 1 支加双蒸水溶解至 100 ml, 4 °C 保存。

表 4 过氧化氢酶含量测定操作表

Table 4 An operation table of measurement of catalase content

试剂 Reagent	对照管 Control tube	测定管 Measuring tube
1%组织匀浆 1% tissue homogenates (ml)		0.1
试剂一 Reagent 1 (ml)	0.1	0.1
试剂二 Reagent 2 (ml)	3.0	3.0
充分混匀, 于 37 °C 恒温水浴 60 s Mix well and bathe at 37 °C for 60 s		
试剂三应用液 Application solution of reagent 3 (ml)	1.0	1.0
1%组织匀浆 1% tissue homogenates (ml)	0.1	

充分混匀, 光径 0.5 cm, 双蒸水调零, 波长 405 nm 下测定各管吸光度值。根据公式计算出过氧化氢酶活力。待测样本蛋白浓度按照说明书所示紫外法测定。

组织中过氧化氢酶 (CAT) 活力计算公式：
组织中CAT活力 (U/mg) =

$$(A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}) \times 271 \times \frac{1}{60 \times \text{取样量}} \div$$

待测样本蛋白浓度(g/L)。

1.6.3 谷胱甘肽过氧化物酶活性测定 本研究使用谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 检测试剂盒 (南京建成, 南京, 中国) 进行测定。样品的准备与测定过氧

化氢和丙二醛的过程一致。按照表 5 和表 6 所示完成实验。根据试剂盒说明和要求, 提前配置实验所需试剂。试剂一应用液: 取 0.1 ml 试剂一贮备液加双蒸水至 10 ml, 现配现用, 4 °C 保存。试剂二应用液: 甲粉 1 瓶加热双蒸水 170 ml 充分完全溶解后与乙液 (50 ml) 充分混合, 4 °C 保存。试剂三应用液: 每瓶粉剂加 200 ml 双蒸水充分溶解, 4 °C 保存备用。试剂四应用液: 每支粉剂中加 50 ml 双蒸水充分溶解, 4 °C 避光保存备用。试剂五应用液: 每支粉剂加 10 ml 双蒸水充分溶解, 4 °C 避光保存备用 (5 d 内有效)。标准品溶剂应用液: 按照谷胱甘肽标准品溶剂贮备液: 双蒸水为 1 : 9 的比例配制, 现配现用。1 mmol/L 谷胱甘肽溶液: 1 支 3.07 mg 的谷胱甘肽标准品粉剂加入谷胱甘肽标准品溶剂应用液定容至 10 ml, 现配现用。20 μmol/L 的谷胱甘肽标准溶液: 取 1 mmol/L 谷胱甘肽溶液 0.2 ml 加谷胱甘肽标准品溶剂应用液定容至 10 ml, 4 °C 保存备用。

表 5 谷胱甘肽过氧化物酶含量测定操作 1

Table 5 An operation table of measurement of glutathione peroxidase content 1

试剂 Reagent	非酶管 Non-enzymatic tube	酶管 Enzymatic tube
1 mmol/L 谷胱甘肽 1 mmol/L glutathione (ml)	0.2	0.2
组织匀浆 Tissue homogenates (ml)		0.2
试剂一 Reagent 1 (ml)	0.1	0.1
充分混匀, 于 37 °C 恒温水浴 5 min Mix well and bathe at 37 °C for 5 min		
试剂二 Reagent 2 (ml)	2.0	2.0
组织匀浆 Tissue homogenates (ml)	0.2	
充分混匀, 4 000 r/min 离心 10 min, 取 1 ml 上清液 Mix well, centrifugation (10 min, 4 000 r/min), and take 1 ml of supernatant		

充分混匀, 在 412 nm 波长, 光径 1 cm, 双蒸水调零, 测定各管吸光度值。根据公式计算出谷胱甘肽过氧化物酶活力。待测样本蛋白浓度按照说明书所示紫外法测定。

表 6 谷胱甘肽过氧化物酶含量测定操作 2

Table 6 An operation table of measurement of glutathione peroxidase content 2

试剂 Reagent	空白管 Blank tube	标准管 Standard tube	测定管 Measuring tube	对照管 Control tube
10 μmol/L 谷胱甘肽标准品溶液应用液 10 μmol/L standard application solution (ml)	0.1			
无水乙醇 Absolute ethyl alcohol (ml)		0.1		
待测样本 Measuring sample (ml)			0.1	0.1
试剂一 Reagent 1 (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1
试剂二 Reagent 2 (ml)	3.0	3.0	3.0	3.0
试剂三 Reagent 3 (ml)	1.0	1.0	1.0	
50%冰醋酸 50% Acetic acid (ml)				1.0

组织中谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 活力计算公式:

$$\text{组织中GPx活力 (U/mg)} = \frac{(A_{\text{非酶管}} - A_{\text{酶管}})}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times \text{标准品浓度 (20 μmol/L)} \times \text{稀释倍数} \div \text{反应时间} \div$$

[取样量 × 待测样本蛋白浓度(g/L)]。

1.7 总抗氧化能力测定

本研究使用总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, TAC) 检测试剂盒 (南京建成, 南京, 中国) 进行测定。样品的准备与测定过氧化氢和丙二醛的过程一致。按照表 7 所示完成实验。根据试剂盒说明和要求, 提前配置实验所需试剂。试剂二应用液: 每支粉剂加双蒸水 120 ml 充分溶解, 4 °C 保存备用。试剂三应用液: 用前按照贮备液: 稀释液为 1:19 的比例配制, 现配现用。

充分混匀, 室温静置 10 min, 双蒸水调零, 光径 1 cm, 在 520 nm 处测各管吸光度值。根据公式计算出总抗氧化能力活力。待测样本蛋白浓度按照说明书所示紫外法测定。

组织中总抗氧化能力 (TAC) 计算公式:

$$\text{组织中TAC能力 (U/mg)} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}}{0.01 \times 30} \times$$

$$\frac{\text{反应液总体积 (ml)}}{\text{取样量 (ml)}} \times \text{样本测试前稀释倍数} \div$$

待测样本蛋白浓度(g/L)。

表 7 总抗氧化能力测定操作表

Table 7 An operation table of measurement of total anoxidant capacity

试剂 Reagent	对照管 Control tube	测定管 Measuring tube
试剂一 Reagent 1 (ml)	1.0	
10%组织匀浆 10% tissue homogenates (ml)		0.1
试剂二 Reagent 2 (ml)	2.0	2.0
试剂三应用液 Application solution of reagent 3 (ml)	0.05	0.05
充分混匀, 于 37 °C 恒温水浴 30 min Mix well and bathe at 37 °C for 30 min		
试剂四 Reagent 4 (ml)	0.2	0.2
10%组织匀浆 10% tissue homogenates (ml)	0.1	
试剂五 Reagent 5 (ml)	0.2	0.2

1.8 抗氧化酶和转录因子的蛋白免疫印迹

为了进一步研究废用条件对大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌氧化应激的影响, 本研究采用蛋白免疫印迹法对废用条件下大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌 (比目鱼肌和趾长伸肌) 中 4 种抗氧化酶 (超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1) 的蛋白表达水平进行了检测。同时采用蛋白免疫印迹法对 Nrf2/Keap1 抗氧化信号通路中关键因子在废用诱导的氧化应激防御中的蛋白表达水平进行了检测。

将动物麻醉后, 分离出骨骼肌组织, 提取蛋白并采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取等量蛋白, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后, 将分离胶置于电泳凝胶成像仪中扫描拍照, 并用 Image J 软件分析整个泳道总蛋白的净光密度值, 以此总蛋白的量作为内参, 对目的蛋白进行校准。

将蛋白转移到硝酸纤维素膜,膜封闭2 h, TBST洗3次,兔抗大鼠超氧化物歧化酶1(SOD1)一抗(1:5 000, ab13498, Abcam, 英国)、超氧化物歧化酶2(SOD2)一抗(1:1 000, 13141S, Cell Signaling Technology, 美国)、过氧化氢酶(CAT)一抗(1:1 000, 14097S, Cell Signaling Technology, 美国)、谷胱甘肽过氧化物酶1(GPx1)一抗(1:1 000, ab22604, Abcam, 英国)、Nrf2一抗(1:500, ab137550, Abcam, 英国)、磷酸化Nrf2(pNrf2)一抗(1:5 000, ab76026, Abcam, 英国)、Keap1一抗(1:1 000, ab139729, Abcam, 英国)中孵育过夜, TBST洗3次,室温下二抗中孵育2 h,显影。采用图像分析系统对蛋白条带进行灰度值分析。

1.9 数据统计分析

数据为平均值 ± 标准误 (Mean ± SE), 采用SPSS 19.0软件独立样本 t 检验用于分析两组数据间的差异。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结果

2.1 体重、肌重和肌重-体重比

取样时对照组和后肢去负荷组大鼠的体重没有显著差异,冬眠不活动组达乌尔黄鼠与夏季活跃组相比,取样时体重也没有显著差异(表8)。

正常对照组和后肢去负荷组大鼠以及夏季活跃组和冬眠不活动组达乌尔黄鼠骨骼肌(比目鱼肌和趾长伸肌)肌重和肌重-体重比的变化见图1。

在大鼠骨骼肌中,对照组大鼠比目鱼肌肌肉湿重为105.91 mg,后肢去负荷组大鼠比目鱼肌肌肉湿重为73.41 mg;对照组大鼠趾长伸肌肌肉湿重为118.41 mg,后肢去负荷组大鼠趾长伸肌肌肉湿重为103.6 mg。统计结果表明,与对照组大鼠相比,后肢去负荷组大鼠经过14 d后肢去负荷后,比目鱼肌肌肉湿重显著降低了30.7% ($P < 0.001$),趾长伸肌肌重显著下降了12.5% ($P < 0.05$) (图1a)。在达乌尔黄鼠骨骼肌中,夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌肉湿重为120.65 mg,冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌肉湿重为109.93 mg;夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌肌肉湿重为132.66 mg,冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌肌肉湿重为117.32 mg。统计结果表明,达乌尔黄鼠在冬眠不活动组和夏季活跃组之间并没有观察到比目鱼肌和趾长伸肌肌肉湿重的显著变化(图1b)。

在大鼠骨骼肌中,对照组大鼠比目鱼肌肌重-体重比为0.50,后肢去负荷组大鼠比目鱼肌肌重-体重比为0.36;对照组大鼠趾长伸肌肌重-体重比为0.56,后肢去负荷组大鼠趾长伸肌肌重-体重比为0.50。统计结果表明,与对照组大鼠相比,后肢去负荷组大鼠比目鱼肌肌重-体重比显著降低了27.7% ($P < 0.001$),趾长伸肌肌重-体重比显著降低了10.7% ($P < 0.05$) (图1c)。在达乌尔黄鼠骨骼肌中,夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌重-体重比为0.54,冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌重-体重比为0.47;夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌肌重-体

表8 动物体重

Table 8 Body weight for all groups

组别 Group	分组时的体重 (g) Body weight at grouping time	取样时的体重 (g) Body weight at sampling time
大鼠对照组 Control Rats	220.0 ± 9.5	211.0 ± 5.2
大鼠后肢去负荷组 Hindlimb unloading Rats	210.3 ± 13.2	193.1 ± 29.0
达乌尔黄鼠夏季活跃组 Summer active Daurian Ground Squirrels	261.3 ± 41.7	267.0 ± 27.4
达乌尔黄鼠冬眠不活动组 Hibernation inactive Daurian Ground Squirrels	323.3 ± 22.1	242.0 ± 13.8

数据以平均值 ± 标准误表示, $n = 8$ 。Data are expressed as Mean ± SE, $n = 8$ 。

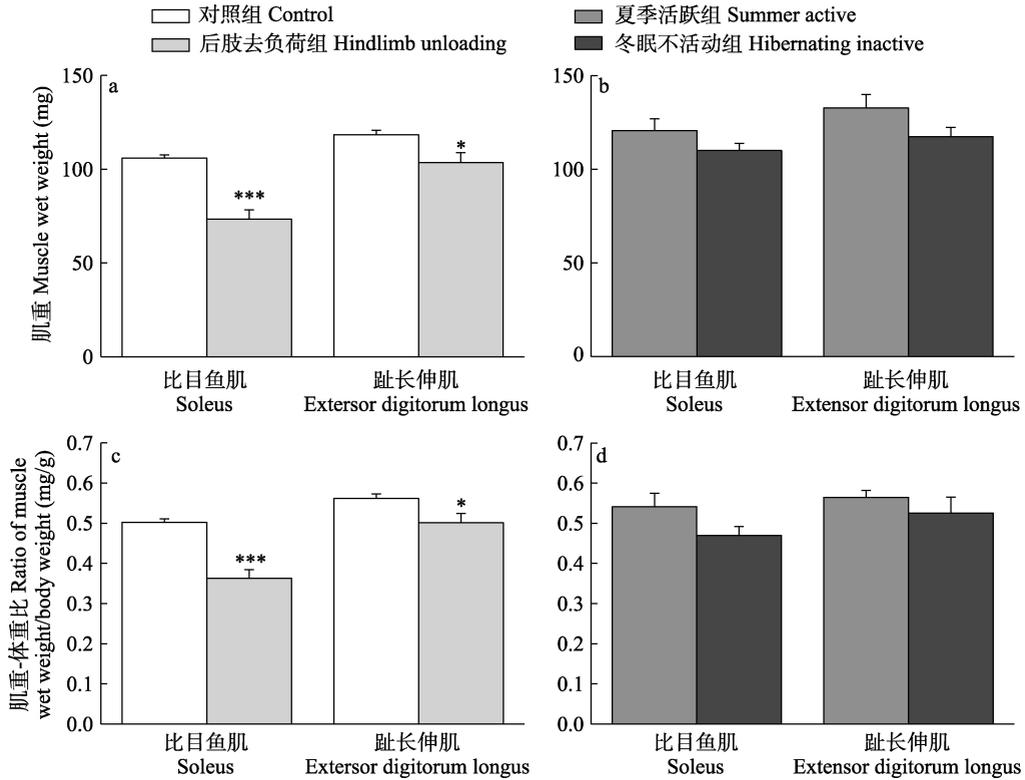


图 1 骨骼肌肌重和肌重-体重比

Fig. 1 Skeletal muscle wet weight and the ratio of muscle wet weight/body weight

a. 大鼠骨骼肌肌重; b. 达乌尔黄鼠骨骼肌肌重; c. 大鼠骨骼肌肌重-体重比; d. 达乌尔黄鼠骨骼肌肌重-体重比。数据为平均值 ± 标准误, n = 8。大鼠后肢去负荷组与对照组相比, * P < 0.05, *** P < 0.001。

a. Changes of muscle wet weight in Rats; b. Changes of muscle wet weight in Daurian Ground Squirrels; c. Changes of the ratio of muscle wet weight/body weight in Rats; d. Changes of the ratio of muscle wet weight/body weight in Daurian Ground Squirrels. Data are shown as Mean ± SE, n = 8. * P < 0.05, *** P < 0.001, compared with control Rats.

重比为 0.56, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌肌重-体重比为 0.53。统计结果表明, 与夏季活跃组相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌肌重-体重比未发生显著变化(图 1d)。

2.2 骨骼肌纤维类型组成和肌纤维横截面积

正常对照组和后肢去负荷组大鼠以及夏季活跃组和冬眠不活动组达乌尔黄鼠骨骼肌(比目鱼肌和趾长伸肌)纤维类型组成和肌纤维横截面积变化见图 2。

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌中快缩型纤维(MyHC II)的比例为 9.6%, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中快缩型纤维(MyHC II)的比例为 33.6%; 对照组大鼠趾长伸肌中快

缩型纤维(MyHC II)为 88.2%, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中快缩型纤维(MyHC II)为 89.6%。统计结果表明, 经过 14 d 后肢去负荷, 与对照组相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中快缩型纤维(MyHC II)的比例显著增加了 206.0% (P < 0.001), 但大鼠趾长伸肌中肌纤维类型的比例没有明显变化(图 2b, d)。在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中快缩型纤维(MyHC II)的比例为 7.8%, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中快缩型纤维(MyHC II)的比例为 10.1%; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中快缩型纤维(MyHC II)的比例为 92.1%, 冬眠不活动组

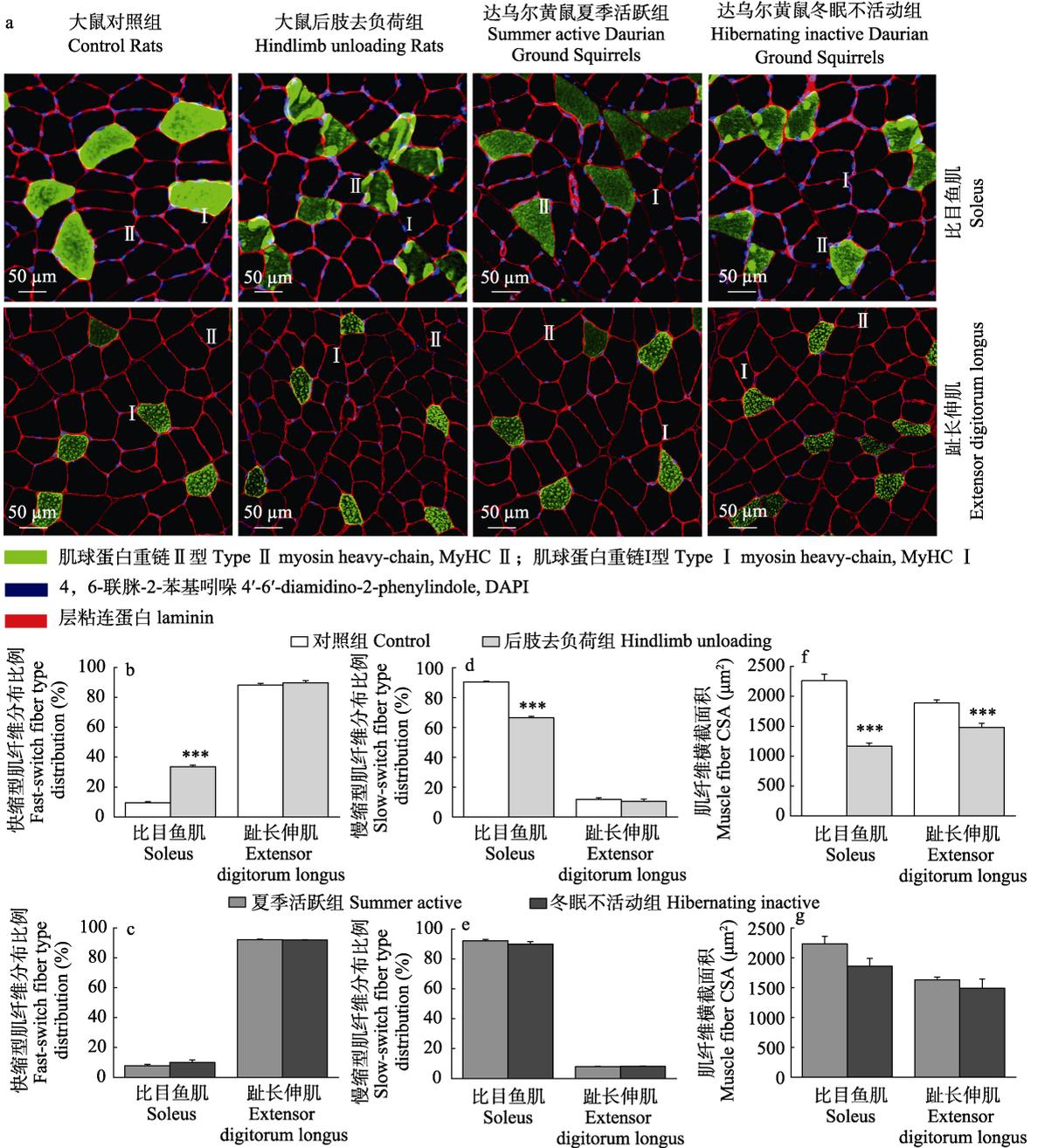


图 2 骨骼肌纤维比例和横截面积

Fig. 2 Fiber-type distribution and muscle fiber cross-sectional area (CSA)

a. 骨骼肌横切免疫荧光染色代表图 (40 ×); b. 大鼠快缩型肌纤维分布比例; c. 达乌尔黄鼠快缩型肌纤维分布比例; d. 大鼠骨骼肌慢缩型肌纤维分布比例; e. 达乌尔黄鼠慢缩型肌纤维分布比例; f. 大鼠肌纤维横截面积; g. 达乌尔黄鼠肌纤维横截面积; 数据为平均值 ± 标准误差, $n = 8$ 。大鼠后肢去负荷组与对照组相比, $*** P < 0.001$ 。

a. Representative immunofluorescent images of MHC I and MHC II fibers in soleus and extensor digitorum longus in each group (40 ×); b. Changes of fast-twitch fiber distribution in Rats; c. Changes of fast-twitch fiber distribution in Daurian Ground Squirrels; d. Changes of slow-twitch fiber distribution in Rats; e. Changes of slow-twitch fiber distribution in Daurian Ground Squirrels; f. Changes of muscle fiber CSA in Rats; g. Changes of muscle fiber CSA in Daurian Ground Squirrels. Data are shown as Mean ± SE, $n = 8$. $*** P < 0.001$, compared with control Rats.

达乌尔黄鼠趾长伸肌中快缩型纤维 (MyHC II) 的比例为 91.9%。统计结果表明, 与夏季活跃组相比, 冬眠不活动达乌尔黄鼠中, 比目鱼肌和趾长伸肌中慢缩型纤维 (MyHC I) 和快缩型纤维 (MyHC II) 的比例都没有显著变化 (图 2c, e)。

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌肌纤维横截面积为 $2\,261.0\ \mu\text{m}^2$, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌肌纤维横截面积为 $1\,167.0\ \mu\text{m}^2$; 对照组大鼠趾长伸肌肌纤维横截面积为 $1\,888.6\ \mu\text{m}^2$, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌肌纤维横截面积为 $1\,479.8\ \mu\text{m}^2$ 。统计结果表明, 与对照组大鼠相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌和趾长伸肌肌纤维横截面积分别显著降低了 48.4% ($P < 0.001$) 和 21.7% ($P < 0.001$) (图 2f)。在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌纤维横截面积为 $2\,236.1\ \mu\text{m}^2$, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌纤维横截面积为 $1\,862.8\ \mu\text{m}^2$; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌肌纤维横截面积为 $1\,629.6\ \mu\text{m}^2$, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌肌纤维横截面积为 $1\,489.4\ \mu\text{m}^2$ 。统计结果表明, 与夏季活跃组相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌肌纤维横截面积下降了 16.7% ($P > 0.05$), 趾长伸肌肌纤维横截面积没有显著变化 (图 2g)。

2.3 两种骨骼肌中过氧化氢和丙二醛水平

过氧化氢 (H_2O_2) 是一种重要的活性氧 (ROS), 活性氧可以降解多不饱和脂肪酸形成丙二醛, 丙二醛作为膜脂过氧化的终产物, 是脂质氧化损伤的指标。本研究对废用条件下大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌 (比目鱼肌和趾长伸肌) 中过氧化氢和丙二醛水平的检测结果见图 3。

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌中过氧化氢浓度为 $40.26\ \text{mmol/g}$, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中过氧化氢浓度为 $60.64\ \text{mmol/g}$; 对照组大鼠趾长伸肌中过氧化氢浓度为 $33.06\ \text{mmol/g}$, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中过氧化氢浓度为 $46.02\ \text{mmol/g}$ 。统计结果表明, 与对照组大鼠相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼

肌和趾长伸肌中过氧化氢浓度分别显著增加了 50.7% ($P < 0.05$) 和 39.2% ($P < 0.05$) (图 3a)。在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢浓度为 $114.49\ \text{mmol/g}$, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢浓度为 $111.86\ \text{mmol/g}$; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中过氧化氢浓度为 $90.52\ \text{mmol/g}$, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中过氧化氢浓度为 $71.15\ \text{mmol/g}$ 。统计结果表明, 与夏季活跃组相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢浓度没有显著变化, 甚至在趾长伸肌中显著降低了 21.4% ($P < 0.05$) (图 3b)。

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌中丙二醛浓度为 $12.19\ \text{nmol/g}$, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中丙二醛浓度为 $25.12\ \text{nmol/g}$; 对照组大鼠趾长伸肌中丙二醛浓度为 $51.93\ \text{nmol/g}$, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中丙二醛浓度为 $70.54\ \text{nmol/g}$ 。统计结果表明, 与对照组大鼠相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中丙二醛含量显著增加了 74.0% ($P < 0.01$), 趾长伸肌中虽然有升高趋势, 但无统计学意义 (图 3c)。在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中丙二醛浓度为 $17.85\ \text{nmol/g}$, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中丙二醛浓度为 $23.99\ \text{nmol/g}$; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中丙二醛浓度为 $29.20\ \text{nmol/g}$, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中丙二醛浓度为 $15.74\ \text{nmol/g}$ 。统计结果表明, 与夏季活跃组相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中丙二醛水平虽然有升高趋势, 但无统计学意义, 而趾长伸肌中却显著下降了 46.1% ($P < 0.05$) (图 3d)。

2.4 两种骨骼肌中抗氧化酶的蛋白表达水平

图 4 是总蛋白定量显色图。在相同的总蛋白浓度下, 目的蛋白在不同样本的检测条带之间的相对变化即为该目的蛋白在不同样本组织中表达量的相对变化。

图 5 显示废用条件下大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌 (比目鱼肌和趾长伸肌) 中超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘

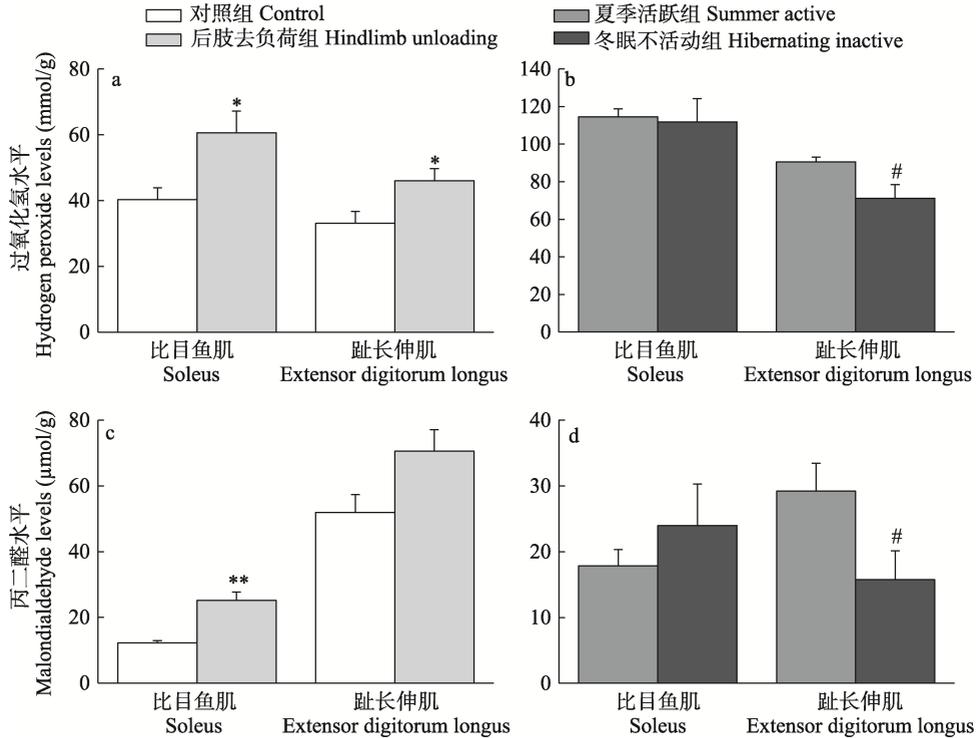


图 3 骨骼肌中过氧化氢和丙二醛水平

Fig. 3 Levels of hydrogen peroxide and malondialdehyde in skeletal muscles

a. 大鼠骨骼肌中过氧化氢水平变化；b. 达乌尔黄鼠骨骼肌中过氧化氢水平变化；c. 大鼠骨骼肌中丙二醛水平变化；d. 达乌尔黄鼠骨骼肌中丙二醛水平变化。数据为平均值 ± 标准误，n = 8。大鼠后肢去负荷组与对照组相比，* P < 0.05，** P < 0.01；达乌尔黄鼠冬眠不活动组与夏季活跃组相比，# P < 0.05。

a. Changes in hydrogen peroxide levels in SOL and EDL in each group of Rats; b. Changes in hydrogen peroxide levels in SOL and EDL in each group of Daurian Ground Squirrels; c. Changes in malondialdehyde levels in SOL and EDL in each group of Rats; d. Changes in malondialdehyde levels in SOL and EDL in each group of Daurian Ground Squirrels. Data are shown as Mean ± SE, n = 8. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control Rats. # P < 0.05, compared with summer active Daurian Ground Squirrels.

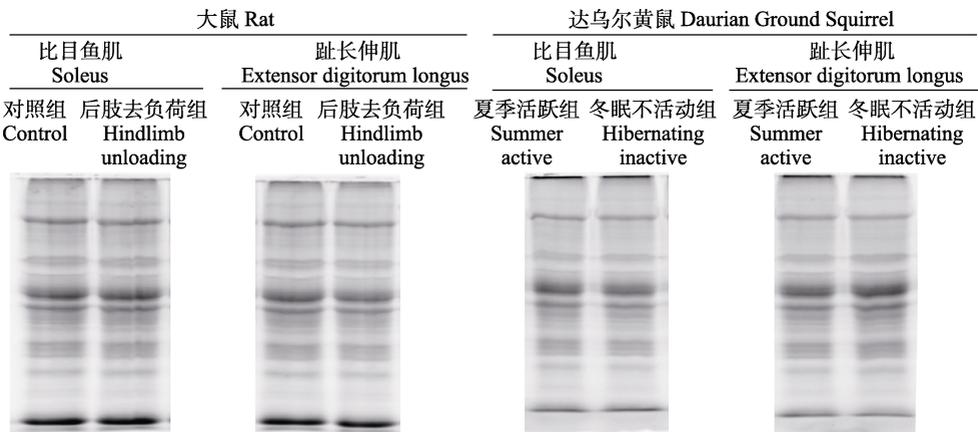


图 4 总蛋白定量显色图

Fig. 4 Stain-free imaging of the separation gel

肽过氧化物酶 1 这 4 种抗氧化酶的相对蛋白表达水平。

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.46, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.60; 对照组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.36, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.32。对照组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.50, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.37; 对照组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.26, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.28。对照组大鼠比目鱼肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.39, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.36; 对照组大鼠趾长伸肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.68, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.63。对照组大鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.75, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.63; 对照组大鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.68, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.58。统计结果表明, 与对照组大鼠相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平显著增加了 29.8% ($P < 0.05$), 而超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平分别显著降低了 27.0% ($P < 0.05$)、6.3% ($P < 0.05$) 和 15.7% ($P < 0.05$); 在趾长伸肌中, 除了谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平显著降低了 14.6% ($P < 0.01$) 之外, 其他蛋白的表达水平并没有显著差异 (图 5)。

在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.51, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼

肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.58; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.52, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 蛋白表达水平为 0.46。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.46, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.57; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.32, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平为 0.40。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.47, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.61; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.34, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中过氧化氢酶蛋白表达水平为 0.52。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.43, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.65; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.46, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平为 0.57。统计结果表明, 与夏季活跃组达乌尔黄鼠相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 和超氧化物歧化酶 2 蛋白表达水平均无显著变化。但是, 在比目鱼肌和趾长伸肌中, 过氧化氢酶蛋白表达水平分别显著增加了 31.5% ($P < 0.05$) 和 53.0% ($P < 0.01$), 且谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达水平也显著增加了 51.8% ($P < 0.05$) 和 25.0% ($P < 0.05$) (图 5)。

2.5 两种骨骼肌中抗氧化酶活性的变化

为进一步研究抗氧化酶对氧化应激的影响, 测定了超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性以及总抗氧化能力。

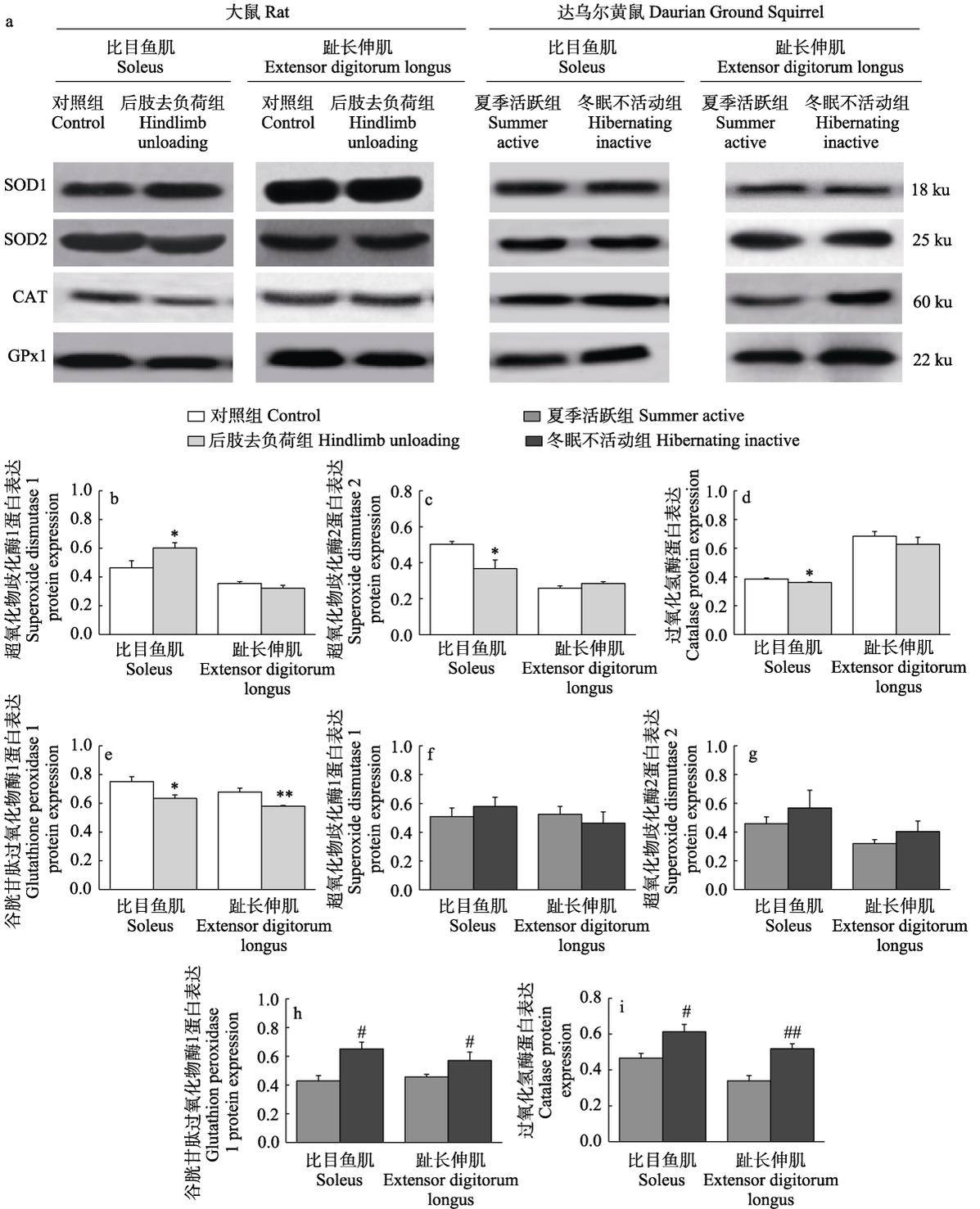


图5 抗氧化酶超氧化物歧化酶1 (SOD1)、超氧化物歧化酶2 (SOD2)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶1 (GPx1) 蛋白表达水平变化

Fig. 5 Changes in levels of superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT), and glutathione peroxidase 1 (GPx1) proteins in skeletal muscles

a. 大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌中抗氧化酶蛋白免疫印迹代表图; b、c、d、e 分别为大鼠骨骼肌中超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达变化; f、g、h、i 分别为达乌尔黄鼠骨骼肌中超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白表达变化。数据为平均值 \pm 标准误, $n = 8$ 。大鼠后肢去负荷组与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 达乌尔黄鼠冬眠不活动组与夏季活跃组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

a. Representative immunoblots of superoxide dismutase 1, superoxide dismutase 2, catalase, and glutathione peroxidase 1 proteins in the SOL and EDL in each group; b, c, d, and e represent relative protein expressions of superoxide dismutase 1, superoxide dismutase 2, catalase, and glutathione peroxidase 1 in the Rats; f, g, h, and i represent relative protein expressions of superoxide dismutase 1, superoxide dismutase 2, catalase, and glutathione peroxidase 1 in the Daurian Ground Squirrels. Data are Means \pm SE, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control Rats; # $P < 0.05$, ## $P < 0.05$, compared with summer active Daurian Ground Squirrels.

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 709.96 U/mg, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 669.74 U/mg; 对照组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 916.45 U/mg, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 687.43 U/mg。对照组大鼠比目鱼肌肌肉中超氧化物歧化酶 2 活性为 229.82 U/mg, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 184.11 U/mg; 对照组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 99.27 U/mg, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 52.20 U/mg。对照组大鼠比目鱼肌中过氧化氢酶活性为 48.08 U/mg, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中过氧化氢酶活性为 54.91 U/mg; 对照组大鼠趾长伸肌中过氧化氢酶活性为 38.29 U/mg, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中过氧化氢酶活性为 31.29 U/mg。对照组大鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 804.76 U/mg, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 678.35 U/mg; 对照组大鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 661.24 U/mg, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 517.46 U/mg。对照组大鼠比目鱼肌中总抗氧化能力为 7.35 U/mg, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中总抗氧化能力为 5.20 U/mg; 对照组大鼠趾长伸肌中总抗氧化能力为 2.43 U/mg, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中总抗氧化能力为 2.57 U/mg。统计结果表明, 与对照组大鼠相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 和谷胱甘肽过氧化物酶活性以及总抗氧化能

力分别显著下降了 38.6% ($P < 0.01$), 15.7% ($P < 0.05$) 和 29.1% ($P < 0.05$); 在趾长伸肌中, 后肢去负荷组大鼠超氧化物歧化酶 1, 超氧化物歧化酶 2, 过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性分别显著下降了 25.0% ($P < 0.05$), 47.45% ($P < 0.05$), 18.35% ($P < 0.05$) 和 21.75% ($P < 0.05$) (图 6)。

在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 1 014.89 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 1 105.67 U/mg; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 876.14 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1 活性为 739.63 U/mg。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 106.16 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 140.87 U/mg; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 114.00 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中超氧化物歧化酶 2 活性为 84.08 U/mg。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢酶活性为 23.68 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中过氧化氢酶活性为 47.35 U/mg; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中过氧化氢酶活性为 28.45 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中过氧化氢酶活性为 45.03 U/mg。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 201.30 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 301.73 U/mg; 夏季活跃组达乌尔

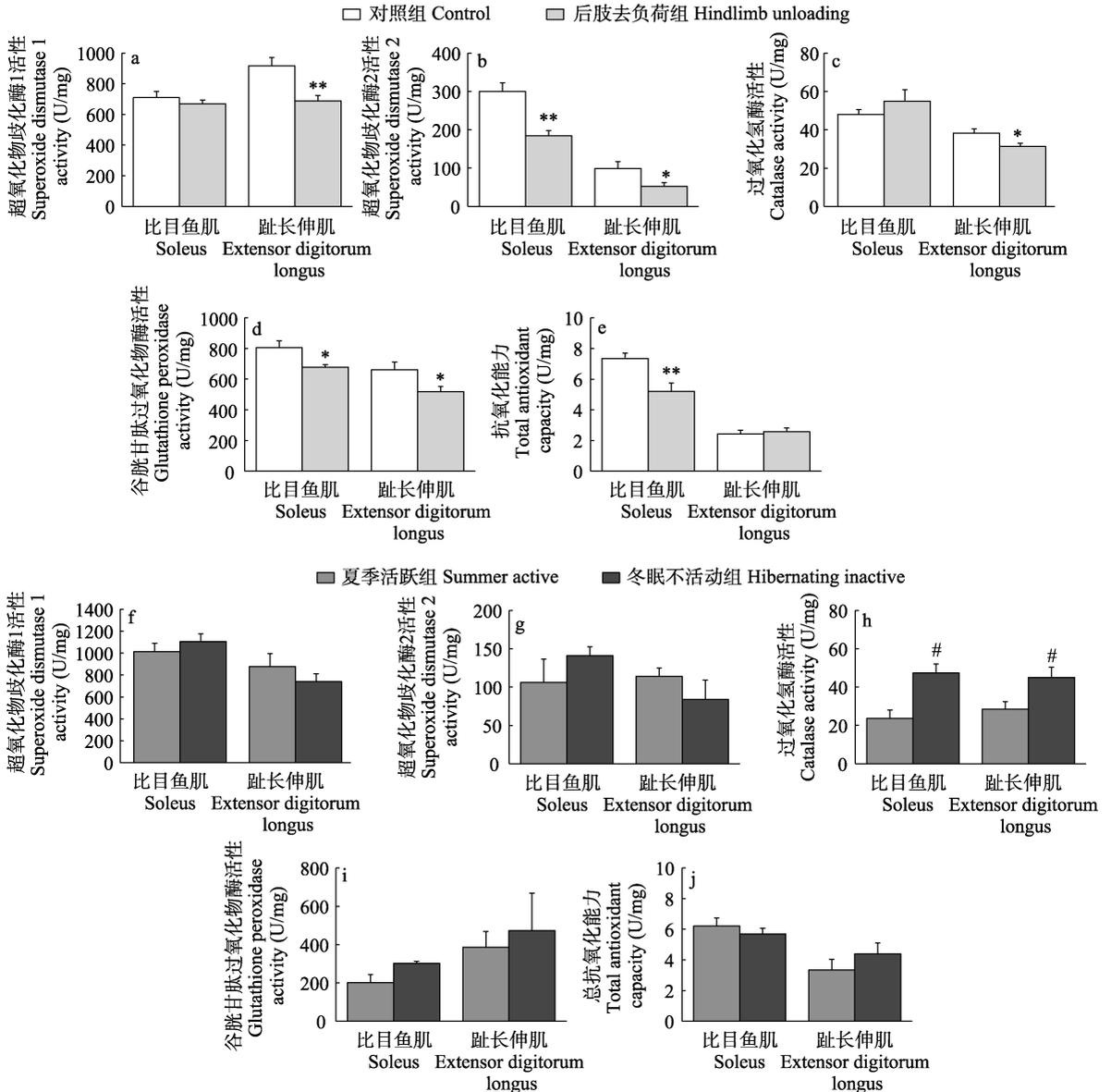


图6 抗氧化酶超氧化物歧化酶1、超氧化物歧化酶2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性以及总抗氧化能力变化

Fig. 6 Changes in activities of superoxide dismutase 1, superoxide dismutase 2, catalase, glutathione peroxidase and total antioxidant capacity in skeletal muscles

大鼠骨骼肌中超氧化物歧化酶1 (a)、超氧化物歧化酶2 (b)、过氧化氢酶 (c)、谷胱甘肽过氧化物酶 (d) 酶活性变化及总抗氧化能力变化 (e)；达乌尔黄鼠骨骼肌中超氧化物歧化酶1 (f)、超氧化物歧化酶2 (g)、过氧化氢酶 (h)、谷胱甘肽过氧化物酶 (i) 酶活性变化及总抗氧化能力变化 (j)。数据为平均值 ± 标准误，n = 8。大鼠后肢去负荷组与对照组相比，* P < 0.05，** P < 0.01；达乌尔黄鼠冬眠不活动组与夏季活跃组相比，# P < 0.05。

Activity of superoxide dismutase 1 (a), superoxide dismutase 2 (b), catalase (c), glutathione peroxidase (d), and total antioxidant capacity in the skeletal muscles of Rats; activity of superoxide dismutase 1 (f), superoxide dismutase 2 (g), catalase (h), glutathione peroxidase (i), and total antioxidant capacity (j) in the skeletal muscles of Daurian Ground Squirrels. Data are shown as Means ± SE, n = 8. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with control Rats; # P < 0.05, compared with summer active Daurian Ground Squirrels.

黄鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 386.22 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中谷胱甘肽过氧化物酶活性为 473.99 U/mg。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中总抗氧化能力为 6.21 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中总抗氧化能力为 5.69 U/mg; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 TAC 总抗氧化能力为 3.34 U/mg, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中总抗氧化能力为 4.39 U/mg。统计结果表明, 与夏季活跃组达乌尔黄鼠相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌中超氧化物歧化酶 1, 超氧化物歧化酶 2 和谷胱甘肽过氧化物酶活性及总抗氧化能力并没有显著变化, 但是过氧化氢酶活性在比目鱼肌和趾长伸肌中分别显著增加了 99.9% ($P < 0.05$) 和 58.3% ($P < 0.05$) (图 6)。

2.6 两种骨骼肌中抗氧化防御的调控

为了探讨 Nrf2/Keap1 信号通路对废用诱导的氧化应激的影响, 通过蛋白质免疫印迹分析了不同骨骼肌中 Nrf2、磷酸化 Nrf2 (p-Nrf2) 和 Keap1 的蛋白表达水平。

在大鼠骨骼肌中, 对照组大鼠比目鱼肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.61, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.56; 对照组大鼠趾长伸肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.37, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.29。对照组大鼠比目鱼肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.33, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.39; 对照组大鼠趾长伸肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.34, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.32。对照组大鼠比目鱼肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.35, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.34; 对照组大鼠趾长伸肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.68, 后肢去负荷组大鼠趾长伸肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.61。统计结果表明, 与对照组大鼠相比, 后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中 Nrf2, p-Nrf2 和 Keap1 蛋白表达水平无显著变化, 但趾长伸

肌中 Nrf2 和 Keap1 的蛋白表达水平分别显著降低了 23.0% ($P < 0.05$) 和 10.6% ($P < 0.05$) (图 7)。

在达乌尔黄鼠骨骼肌中, 夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.39, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.57; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.30, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 Nrf2 蛋白表达水平为 0.54。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.47, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.62; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.34, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 p-Nrf2 蛋白表达水平为 0.65。夏季活跃组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.48, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.47; 夏季活跃组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.54, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠趾长伸肌中 Keap1 蛋白表达水平为 0.69。统计结果表明, 与夏季活跃组达乌尔黄鼠相比, 冬眠不活动组达乌尔黄鼠比目鱼肌中 Nrf2 和 p-Nrf2 蛋白水平分别显著增加了 46.2% ($P < 0.05$) 和 32.7% ($P < 0.05$), 趾长伸肌中分别显著增加了 81.9% ($P < 0.01$) 和 90.1% ($P < 0.01$) (图 7)。

3 讨论

本研究揭示了废用条件下非冬眠动物和冬眠动物两种类型骨骼肌中氧化应激水平和 Nrf2 介导的抗氧化防御的差异。大鼠后肢去负荷两周后骨骼肌中氧化应激水平显著升高, 而在冬眠期不活动两个多月的达乌尔黄鼠骨骼肌中维持正常水平, 表明非冬眠动物在骨骼肌废用条件下会发生氧化应激, 而冬眠动物则具有维持氧化还原稳态的能力; Nrf2/Keap1 信号通路及其下游抗氧化酶的表达在后肢去负荷大鼠中维持不变甚至降低, 而在冬眠不活动达乌尔

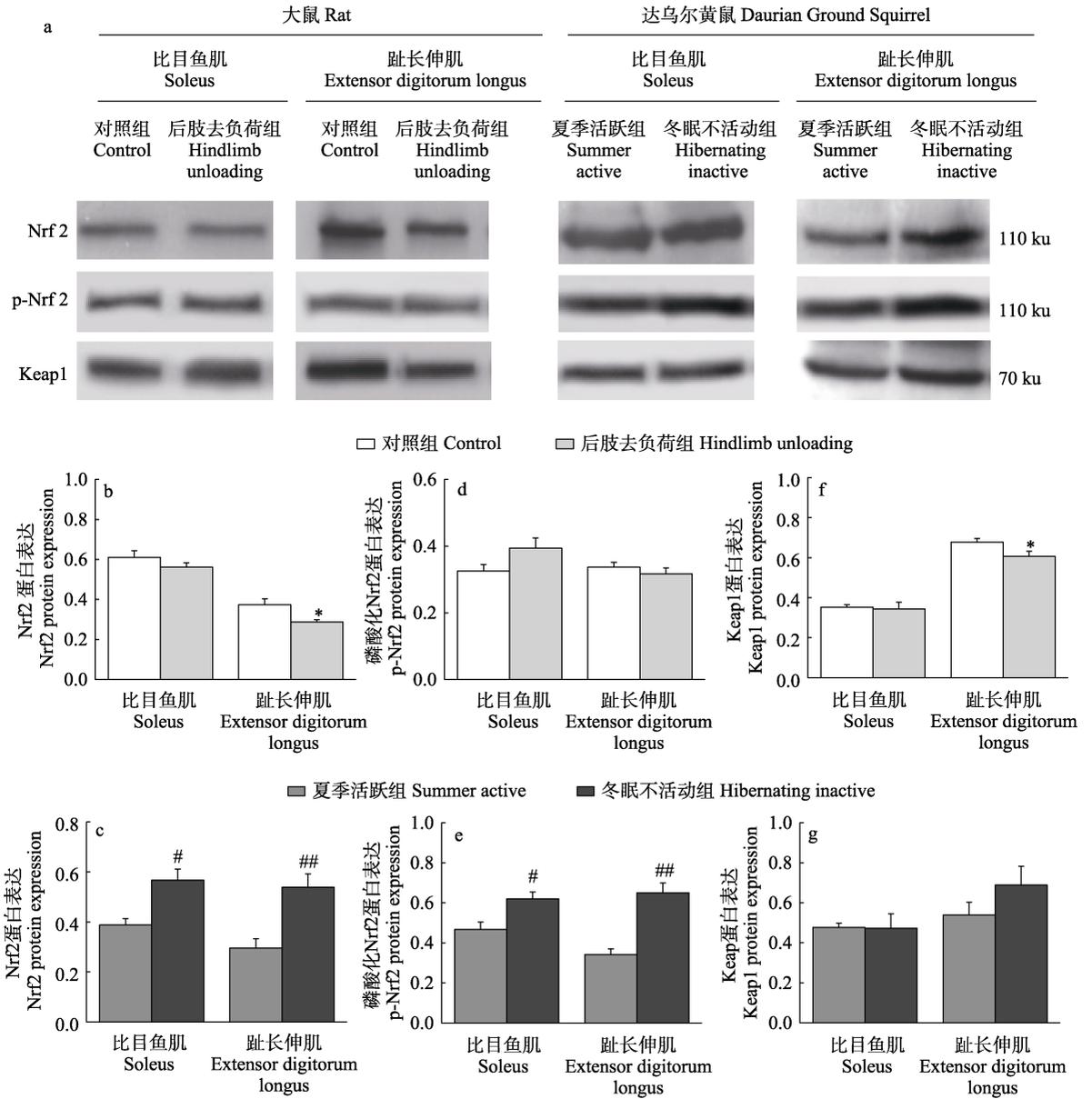


图7 Nrf2、p-Nrf2 和 Keap1 蛋白表达变化

Fig. 7 Changes in levels of Nrf2, p-Nrf2, and Keap1 proteins in skeletal muscles

a. 大鼠和达乌尔黄鼠骨骼肌中 Nrf2, p-Nrf2 和 Keap1 蛋白免疫印迹代表图; b. 大鼠骨骼肌中 Nrf2 蛋白表达变化; c. 达乌尔黄鼠骨骼肌中 Nrf2 蛋白表达变化; d. 大鼠骨骼肌中 p-Nrf2 蛋白表达变化; e. 达乌尔黄鼠骨骼肌中 p-Nrf2 蛋白表达变化; f. 大鼠骨骼肌中 Keap1 蛋白表达变化; g. 达乌尔黄鼠骨骼肌中 Keap1 蛋白表达变化。数据为平均值 ± 标准误, $n = 8$ 。大鼠后肢去负荷组与对照组相比, $* P < 0.05$; 达乌尔黄鼠冬眠不活动组与夏季活跃组相比, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$ 。

a. Representative immunoblots of Nrf2, p-Nrf2, and Keap1 in the SOL and EDL in each group; b. Relative Nrf2 protein expression in the Rats; c. Relative Nrf2 protein expression in the Daurian Ground Squirrels; d. Relative p-Nrf2 protein expression in the Rats; e. Relative p-Nrf2 protein expression in the Daurian Ground Squirrels; f. Relative Keap1 protein expression in the Rats; g. Relative Keap1 protein expression in the Daurian Ground Squirrels. Data are shown as Means ± SE, $n = 8$. $* P < 0.05$, compared with control Rats; $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.05$, compared with summer active Daurian Ground Squirrels.

黄鼠中却显著升高,表明非冬眠动物在人工废用条件下抗氧化防御能力降低,从而诱导氧化应激和废用性肌萎缩,而自然冬眠不活动哺乳动物骨骼肌抗氧化能力的升高保护骨骼肌免受氧化损伤,可能是其抗废用性肌萎缩的重要机制。

后肢去负荷 14 d 后大鼠慢缩肌比目鱼肌肌重、肌重-体重比和肌纤维横截面积均极显著下降,快缩肌趾长伸肌虽然萎缩程度小于比目鱼肌,但也表现出明显的萎缩。先前许多研究指出,在后肢去负荷 14 d 后,大鼠比目鱼肌的肌重显著减少 34%~50%,横截面积减少 49%左右 (Zhang et al. 2017, Chang et al. 2018)。趾长伸肌是一种典型快缩肌,虽然没有比目鱼肌对废用性肌萎缩反应敏感,但也表现出明显的萎缩 (Chang et al. 2018),本研究结果与先前的研究一致。然而,与大鼠相比,冬眠达乌尔黄鼠在经历长达两个月左右的不活动,比目鱼肌和趾长伸肌均未出现明显的肌萎缩现象,肌重和肌纤维横截面积均未出现明显下降,这与本实验室先前对冬眠达乌尔黄鼠的研究结果一致 (Fu et al. 2016, Wei et al. 2018a)。因此,在骨骼肌废用条件下,自然冬眠不活动哺乳动物不同类型骨骼肌的萎缩程度均明显低于人工后肢去负荷非冬眠动物的萎缩程度,且不同类型的骨骼肌萎缩程度也不同。

氧化应激会扰乱肌肉蛋白合成和蛋白降解之间的平衡,从而成为导致肌肉萎缩的一个重要原因 (Moylan et al. 2007, Powers et al. 2007, Powers 2014, Zuo et al. 2015)。在本研究中,后肢去负荷组大鼠比目鱼肌和趾长伸肌中过氧化氢的含量与对照组大鼠相比均显著增加,后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中丙二醛水平显著增加,表明人工废用条件会导致大鼠骨骼肌中活性氧水平显著增加,即人工废用会导致大鼠骨骼肌产生明显的氧化应激。前人对后肢去负荷大鼠骨骼肌氧化应激的研究显示,后肢去负荷大鼠比目鱼肌中过氧化氢水平显著高于对照组 (Lawler et al. 2003, Cannavino et al. 2014)。

然而,与非冬眠动物不同的是,在自然冬眠期间经历了两个月的不活动或骨骼肌废用后,冬眠达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌中的过氧化氢浓度却维持夏季组水平,丙二醛水平也没有显著变化。这一结果与有关冬眠动物内脏组织的研究结果相近,Wei 等 (2018b) 发现冬眠达乌尔黄鼠肝和肾组织中过氧化氢水平在冬眠期未见升高,Yin 等 (2016) 对冬眠期大足鼠耳蝠 (*Myotis ricketti*) 和马铁菊头蝠 (*Rhinolopus ferrumequinum*) 脑组织的研究表明,其冬眠时期活性氧水平并未升高,甚至比夏季活跃组的还要低。基于上述研究,本研究表明,后肢去负荷 14 d,大鼠骨骼肌在人工废用条件下发生过度的氧化应激,氧化应激水平升高可能是诱发肌萎缩的一个重要原因,而自然冬眠不活动达乌尔黄鼠骨骼肌具有稳定可控的氧化应激水平可能是冬眠动物免受氧化应激损伤和肌肉萎缩的一个重要因素。

氧化应激的发生不仅与活性氧的产生增加有关,也与抗氧化防御能力的显著降低相关。因此,我们进一步研究了废用条件下大鼠和达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌中抗氧化酶 (超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1) 的蛋白表达和酶活性。研究结果显示,后肢去负荷大鼠比目鱼肌中除了超氧化物歧化酶 1 蛋白水平显著增加外,其他抗氧化酶 (超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1) 表达均显著降低,趾长伸肌中四种抗氧化酶均显著降低;抗氧化酶的活性在骨骼肌中也不同程度的下降,这些结果表明,后肢去负荷会导致大鼠骨骼肌中抗氧化酶表达显著下降。这一结果与前人研究结果一致,如 Lawler 等 (2003) 报道,后肢去负荷 28 d 大鼠比目鱼肌中超氧化物歧化酶 1 活性显著增加了 71.2%,而超氧化物歧化酶 2 活性下降 10.1%,过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性也分别显著下降了 54.5% 和 16.1%。后肢去负荷 7 d 的大鼠比目鱼肌中过氧化氢酶 mRNA 表达急剧减少 (Cannavino et al.

2014)。这些结果表明, 废用条件会导致大鼠骨骼肌中抗氧化防御能力显著下降, 而且, SOD 亚型在不同骨骼肌中的表达模式也不同。然而, 本研究中, 在冬眠组达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌中, 不仅 SODs 的表达没有出现明显下降, 过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1 的表达水平还出现显著增加; 抗氧化酶的活性基本都维持在夏季组水平。冬眠组动物经历了两个月的不活动期, 且许多生理功能被抑制, 谷胱甘肽过氧化物酶 1 和过氧化氢酶的表达模式表明, 这些抗氧化酶有助于细胞在低代谢过程和废用状态下增强骨骼肌对氧化应激的抵御, 保护其免受氧化损伤。Wei 等 (2018b) 报道冬眠达乌尔黄鼠心、肝、脑和肾组织中超氧化物歧化酶 1、超氧化物歧化酶 2、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1 蛋白和活性水平在冬眠季显著增加。Allan 等 (2012) 报道了多纹黄鼠 (*S. tridecemlineatus*) 骨骼肌中抗氧化酶 (超氧化物歧化酶 2 和血红素加氧酶 1) 的表达在整个冬眠-阵间觉醒周期中显著上调。抗氧化酶蛋白表达和活性的上调可以及时消除过量的活性氧, 使得冬眠达乌尔黄鼠骨骼肌中过氧化氢和丙二醛浓度维持较低水平。因此, 以上结果表明, 后肢去负荷大鼠骨骼肌在人工废用条件下, 其抗氧化防御能力减弱, 氧化应激发生, 可能是诱导废用性肌萎缩的原因之一; 而冬眠达乌尔黄鼠在低代谢状态和自然废用状态下, 骨骼肌抗氧化防御能力增强, 可能是防止冬眠自然废用引起的废用性肌萎缩的重要机制之一。

机体的抗氧化防御能力受许多信号通路和转录因子的调控, 其中, Nrf2/Keap1 信号通路是非常重要的抗氧化损伤通路 (Motohashi et al. 2004, Baird et al. 2011)。在正常条件下, Nrf2 以非活化状态存在于细胞质中。当受到活性氧等刺激时, Nrf2 易位至细胞核与抗氧化应答元件结合, 启动下游抗氧化靶基因的表达 (Sun et al. 2007, Espinosa-Diez et al. 2015)。在本研究中, 尽管后肢去负荷组大鼠骨骼肌中活性氧

水平升高, 提示氧化应激发生, 但是并没有检测到后肢去负荷组大鼠比目鱼肌中 Nrf2 蛋白水平的变化, 而趾长伸肌中 Nrf2 蛋白水平甚至显著降低。根据先前的研究报道, 后肢去负荷 7 d 的大鼠比目鱼肌和小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 心肌组织中 Nrf2 和 p-Nrf2 的表达没有显著变化 (Cannavino et al. 2014, Seawright et al. 2017)。然而, 冬眠组达乌尔黄鼠比目鱼肌和趾长伸肌中 Nrf2 和 p-Nrf2 蛋白水平均显著增加。这一结果与有关冬眠动物内脏组织的研究结果相近, 我们实验室之前对达乌尔黄鼠内脏的研究表明, 冬眠过程中达乌尔黄鼠的心、肝、脑和肾组织中 Nrf2 和 p-Nrf2 蛋白表达显著增加 (Wei et al. 2018b)。这些结果表明, 冬眠动物在自然冬眠不活动期间 Nrf2/Keap1 信号通路被激活。结合前面的研究结果, 大鼠骨骼肌在人工废用条件下, 活性氧水平升高并未激活 Nrf2/Keap1 抗氧化信号通路和下游抗氧化酶的表达, 这一结果提示, 氧化应激可能是诱发人工废用性肌萎缩的重要原因之一; 但是冬眠达乌尔黄鼠骨骼肌在自然废用条件下, Nrf2/Keap1 抗氧化信号通路被激活, 上调抗氧化酶的表达, 表明冬眠动物骨骼肌的抗氧化防御能力在冬眠期间增强, 可能是防止冬眠自然废用引起肌萎缩的重要机制。

综上所述, 人工后肢去负荷 14 d 后大鼠骨骼肌中氧化应激水平升高, 而 Nrf2/Keap1 抗氧化信号通路及其下游多种抗氧化酶的表达维持不变甚至降低; 但是在自然冬眠不活动两个多月的达乌尔黄鼠骨骼肌中, 氧化应激维持正常水平, Nrf2/Keap1 抗氧化信号通路被激活, 多种抗氧化酶表达显著增加。本研究结果表明, 骨骼肌在废用条件下, 非冬眠动物和冬眠动物骨骼肌氧化应激水平及抗氧化防御能力完全不同, 而且不同类型的肌纤维也显示不同的调控策略。大鼠人工后肢去负荷导致其骨骼肌氧化应激水平升高, 抗氧化防御能力减弱, 可能是诱导废用性肌萎缩的原因之一; 达乌尔黄鼠在自然冬眠废用状态下抗氧化防御能力增强可

能是防止冬眠废用引起废用性肌肉萎缩的重要机制。

参 考 文 献

- Allan M E, Storey K B. 2012. Expression of NF- κ B and downstream antioxidant genes in skeletal muscle of hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Cell Biochemistry and Function*, 30(2): 166–174.
- Baird L, Dinkova-Kostova A T. 2011. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Archives of Toxicology*, 85(4): 241–272.
- Cannavino J, Brocca L, Sandri M, et al. 2014. PGC1- α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded Mice. *The Journal of Physiology*, 592(20): 4575–4589.
- Chang H, Lei T, Ma X, et al. 2018. Muscle-specific activation of calpain system in hindlimb unloading Rats and hibernating Daurian Ground Squirrels: A comparison between artificial and natural disuse. *Journal of Comparative Physiology B*, 188(5): 863–876.
- Cotton C J. 2016. Skeletal muscle mass and composition during mammalian hibernation. *Journal of Experimental Biology*, 219(2): 226–234.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6: 183–197.
- Fu W, Hu H, Dang K, et al. 2016. Remarkable preservation of Ca²⁺ homeostasis and inhibition of apoptosis contribute to anti-muscle atrophy effect in hibernating Daurian Ground Squirrels. *Scientific Reports*, 6: 27020.
- Gao Y F, Wang J, Wang H P, et al. 2012. Skeletal muscle is protected from disuse in hibernating Daurian Ground Squirrels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 161(3): 296–300.
- Lawler J M, Song W, Demaree S R. 2003. Hindlimb unloading increases oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(1): 9–16.
- Morey-Holton E R, Globus R K. 2002. Hindlimb unloading rodent model: Technical aspects. *Journal of Applied Physiology*, 92(4): 1367–1377.
- Motohashi H, Yamamoto M. 2004. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends in Molecular Medicine*, 10(11): 549–557.
- Moylan J S, Reid M B. 2007. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle & Nerve*, 35(4): 411–429.
- Powers S K. 2014. Can antioxidants protect against disuse muscle atrophy? *Sports Medicine*, 44 (Suppl 2): 155–165.
- Powers S K, Kavazis A N, McClung J M. 2007. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 102(6): 2389–2397.
- Powers S K, Morton A B, Ahn B, et al. 2016. Redox control of skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology and Medicine*, 98: 208–217.
- Powers S K, Smuder A J, Criswell D S. 2011. Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxidant Redox Signaling*, 15(9): 2519–2528.
- Powers S K, Smuder A J, Judge A R. 2012. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: Cause or consequence? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(3): 240–245.
- Seawright J W, Samman Y, Sridharan V, et al. 2017. Effects of low-dose rate gamma-irradiation combined with simulated microgravity on markers of oxidative stress, DNA methylation potential, and remodeling in the mouse heart. *PLoS ONE*, 12(7): e0180594.
- Sun Z, Zhang S, Chan J Y, et al. 2007. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18): 6334–6349.
- Wei Y, Gong L, Fu W, et al. 2018a. Unexpected regulation pattern of the IKK β /NF- κ B/MuRF1 pathway with remarkable muscle plasticity in the Daurian Ground Squirrel (*Spermophilus dauricus*). *Journal of Cellular Physiology*, 233(11): 8711–8722.
- Wei Y, Zhang J, Xu S, et al. 2018b. Controllable oxidative stress and tissue specificity in major tissues during the torpor-arousal cycle in hibernating Daurian Ground Squirrels. *Open Biology*, 8(10): 180068.
- Yang C, He Y, Gao Y, et al. 2014. Changes in calpains and calpastatin in the soleus muscle of Daurian Ground Squirrels during

- hibernation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 176: 26–31.
- Yin Q, Ge H, Liao C C, et al. 2016. Antioxidant defenses in the brains of Bats during hibernation. *PLoS ONE*, 11(3): e0152135.
- Yoshihara T, Yamamoto Y, Shibaguchi T, et al. 2017. Dietary astaxanthin supplementation attenuates disuse-induced muscle atrophy and myonuclear apoptosis in the Rat soleus muscle. *The Journal of Physiological Sciences*, 67(1): 181–190.
- Zhang J, Li Y, Li G, et al. 2017. Identification of the optimal dose and calpain system regulation of tetramethylpyrazine on the prevention of skeletal muscle atrophy in hindlimb unloading Rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96: 513–523.
- Zuo L, Pannell B K. 2015. Redox characterization of functioning skeletal muscle. *Frontiers in Physiology*, 6: 338.
- 张洁. 2018. 冬眠不同时期达乌尔黄鼠骨骼肌中内质网应激介导的 PERK 信号通路的作用研究. 西安: 西北大学博士学位论文.

(上接第 419 页)



图 1 北椋鸟

Fig 1 *Agropsar sturninus*

范丽卿^① 赵璐璐^① 伊剑锋^② 刘威^②

① 西藏农牧学院高原生态研究所, 西藏高原森林生态教育部重点实验室/西藏林芝高山森林生态系统国家野外科学观测研究站
林芝 860000; ② 生态环境部南京环境科学研究所 南京 210042