

有氧运动对小鼠主动脉自噬相关因子表达的影响

郑园园¹, 孙大康¹, 李 洋¹, 魏景迅¹, 丁荣晶², 程艳丽¹

1. 滨州医学院附属医院, 山东 滨州 256600

2. 北京大学人民医院, 北京 100000

摘要: **目的** 研究有氧运动对小鼠主动脉自噬相关因子表达及自噬活化的影响。**方法** 将8周龄C57BL/6雄性小鼠40只随机分为安静对照组($n=20$)与有氧运动组($n=20$), 其中10只用于Real-Time PCR实验, 10只用于Western-blot实验, 有氧运动组小鼠进行6周的游泳运动(60 min/d, 5 d/周), 对照组小鼠自由活动。6周后取小鼠胸腹主动脉, 采用Real-Time PCR方法检测自噬相关因子ULK1、Beclin1、LC3B mRNA水平; Western-blot方法检测主动脉LC3B蛋白中LC3B-II/LC3B-I比值及p62蛋白水平。**结果** 与对照组相比, 有氧运动组小鼠主动脉ULK1、Beclin1、LC3B mRNA水平明显升高($P<0.05$); 有氧运动组小鼠主动脉LC3B-II/LC3B-I比值增大($P<0.05$), p62蛋白降解增加($P<0.05$)。**结论** 有氧运动能够使主动脉ULK1、Beclin1、LC3B自噬相关因子表达增强, 进而增强主动脉自噬活性。

关键词: 有氧运动; 自噬; 主动脉

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)12-2382-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.12.017

Effect of aerobic exercise on expression of autophagy related factors in aorta of mice

ZHENG Yuanyuan¹, SUN Dakang¹, LI Yang¹, WEI Jingxun¹, DING Rongjing², CHENG Yanli¹

1. Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, China

2. Peking University People's Hospital, Beijing 100000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of aerobic exercise on the levels of autophagy-related markers and Autophagy activation in mouse aorta. **Methods** Twenty C57BL/6 male mice aged 8 weeks were randomly divided into sedentary control group and aerobic exercise group. The aerobic exercise group were subjected to swimming for 6 weeks, 60 min/d, 5 days a week. The Thoracic and abdominal aorta of mice were isolated and detected after 6 weeks. Real-Time PCR was adopted to measure the mRNA levels of autophagy-related markers, including ULK1, Beclin1 and LC3B. Western-blot was applied to measure the expression level of autophagy-related protein including the ratio of LC3B-II/LC3B-I and p62. **Results** Compared with the control group, in the aerobic exercise group, the mRNA levels of ULK1, Beclin1 and LC3B and the ratio of LC3B-II/LC3B-I were significantly increased ($P < 0.05$), the protein degradation of p62 was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Aerobic exercise can increase the expression of ULK1, Beclin1 and LC3B in the aorta, and then enhance the aortic autophagy activity.

Key words: aerobic exercise; autophagy; aorta

自噬(Autophagy)是通过溶酶体途径降解细胞内衰老或受损的细胞器以及错误折叠的蛋白质等成分的过程。自噬在促进物质、能量的循环使用以及维持细胞稳态和生长发育等方面发挥关键作用^[1-2]。研究发现适度激活自噬能有效抑制动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块的发生和发展。用哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的经典抑制剂雷

帕霉素激活自噬,能够改善AS斑块中巨噬细胞的功能,减小AS斑块面积。在自噬基因敲除小鼠中,内皮型一氧化氮合酶的磷酸化增加,一氧化氮产生明显减少,而内皮细胞活性氧(ROS)和一些细胞炎症因子产生增加^[3]。

研究表明,有氧运动可促进骨骼肌、心肌细胞的自噬活性。高强度跑台训练后,小鼠骨骼肌细胞

收稿日期: 2019-05-31

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(J18KB117);滨州医学院附属医院青年科研基金(2013QNKYJJ02)

第一作者: 郑园园(1991—),女,硕士生,研究方向为心脏康复。

*通信作者: 程艳丽 E-mail:chengyanli0217@163.com

自噬反应持续增强,从而有助于运动后肌纤维重塑及增强组织修复,并能够延缓由多种因素所致的肌肉质量的丧失^[4]。通过6周的有氧运动,老龄大鼠心肌细胞中自噬相关基因 Becline 1 和 ATG 5 两者显著上升,并且 LC3-I 向 LC3-II 转变增加^[5]。目前,有氧运动是否影响血管平滑肌为主的主动脉自噬活性尚不明确。本文对小鼠有氧运动训练后,通过 Real time-PCR 检测自噬相关因子 ULK1、Beclin1、LC3B mRNA 表达变化,同时 Western Blot 检测自噬激活情况,以期有氧运动改善 AS 提供一定的前期理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

SPF 级雄性 8 周龄小鼠(C57BL/6)40 只,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(鲁)2014-0007。利用随机数字表根据体质量进行随机分为安静对照组与有氧运动组,室内饲养,通风条件良好,室温(22±1)℃,每天 12 h 轮换照明,所有小鼠自由进食饮水。RNAiso Plus 试剂(AK6502)、RNA 逆转录试剂盒(AK4602)和 SYBR 荧光试剂盒(AKA903)均购自日本 TaKaRa

公司;兔抗人 β -action、兔抗人 LC3B 多克隆抗体(3868)、兔抗人 p62 抗体(23214)购自美国 Cell signaling Technology 公司;PCR 扩增仪(德国 eppendorf 公司),逆转录 PCR 仪、电泳槽、转膜槽、曝光仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 有氧运动诱导自噬

有氧运动组小鼠进行无负重游泳运动,水温(32±1)℃,第 1 天为 10 min,每天递增 10 min,最终增加至 60 min,并维持该运动量,每周训练 5 d,共 6 周。对照组小鼠自由活动。

1.3 标本采集与处理

完成 6 周有氧运动训练,末次运动后 24 h,小鼠 ip 4% 水合氯醛(0.01 mL/g)麻醉后,迅速分离胸腹主动脉,生理盐水冲洗,-80℃冰箱保存以备实验用。

1.4 Real-Time PCR 分析

取小鼠主动脉,玻璃匀浆器匀浆,采用 RNAiso Plus 试剂提取组织总 RNA 并逆转录合成 cDNA。用 CFX96 实时 PCR 检测系统(bio-rad)记录荧光强度,数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达量,自噬相关基因引物序列见表 1。

表 1 自噬相关基因引物序列

Table 1 Primer sequences of autophagy-related genes

基因名称	引物序列(5'→3')
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: GGGGTCGTTGATGCAACA
ULK 1	F: ATCGTGGCGCTGTATGACTT R: GCAGGTAGTCAGCCAGGTCT
Beclin1	F: CCAGGAACCTCACAGCTCCAT R: GGCGAGTTTCAATAAATGGC
LC3B	F: CCCACCAAGATCCCAGTAG R: CCAGGAACCTTGGTCTTGTCCA

1.5 Western blot 分析

取小鼠主动脉,加入 RIPA 裂解液、PMSF,用玻璃匀浆器匀浆,充分裂解后离心(4℃、14 000 r/min, 5 min)提取上清,BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度,按照 4:1 加入 5×蛋白上样缓冲液,98℃煮沸 10 min,SDS-PAGE 胶电泳分离,300 mA 转膜 1 h,5%脱脂奶粉封闭 1 h,4℃孵育一抗过夜,TBS-T 洗涤 3 次,室温孵育二抗 1 h,TBS-T 洗涤 3 次,ECL 发光剂显影,采用 ChemiScope 6000Pro 仪器采集结果。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态方差齐性资料组间比较,采用独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 有氧运动对主动脉 ULK1、Beclin1、LC3B mRNA 表达水平的影响

通过 Real-Time PCR 检测小鼠主动脉 ULK1、Beclin1、LC3B mRNA 的相对表达,结果显示,小鼠

运动 6 周后,与对照组相比,有氧运动组小鼠主动脉自噬相关基因 ULK1、Beclin1、LC3B mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。见图 1。

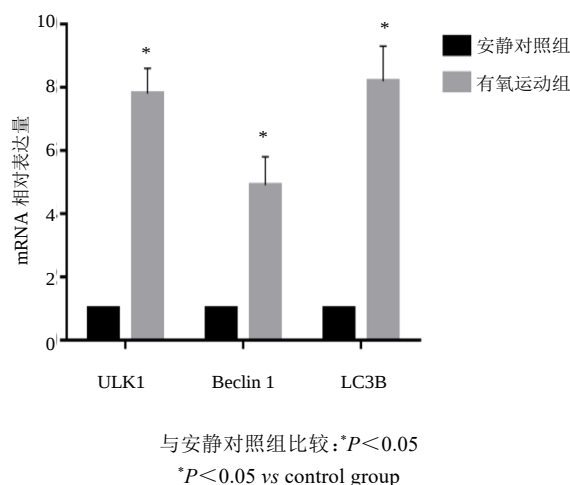


图 1 有氧运动诱导自噬相关基因 mRNA 的表达水平
Fig. 1 Expression of autophagy-related gene mRNA induced by aerobic exercise

2.2 有氧运动对主动脉LC3B-II/LC3B-I比值影响

为了探讨有氧运动对主动自噬水平的影响,采用 Western blot法测定主动脉自噬标志物 LC3B 蛋白水平,并计算 LC3B-II/LC3B-I 比值。结果显示,有氧运动组小鼠主动脉 LC3B-II/LC3B-I 比值大于对照组 ($P < 0.05$)。见图 2。

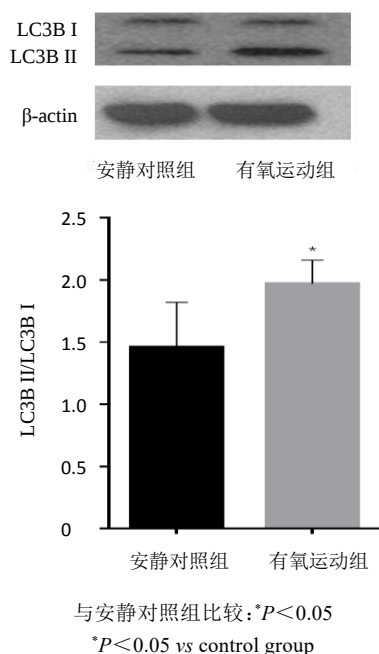


图2 有氧运动诱导自噬相关蛋白LC3B-II/LC3B-I比值变化

Fig. 2 Changes of LC3B-II/LC3B-I ratio induced by aerobic exercise

2.3 有氧运动对主动脉p62蛋白的影响

为了探讨有氧运动对主动自噬水平的影响,采用 Western blot法测定主动脉自噬标志物 p62 蛋白表达量,结果显示有氧运动组小鼠主动脉 p62 蛋白表达水平低于对照组 ($P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

自噬过程由一系列自噬相关蛋白介导,其中 ULK、Beclin1、LC3 分别在自噬的激活、成核、延伸成熟过程中起到重要的作用,是检测自噬活性的重要指标^[6]。LC3 是自噬的标志性蛋白,包含 LC3-I 和 LC3-II 两种形式。LC3 由自噬相关基因 Atg4 切割形成 LC3-I,继而与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3-II。LC3-II 结合并定位于胞内自噬体的膜上,因此其含量与自噬泡数量成正比,LC3-II/LC3-I 的含量变化在某种程度上与细胞的自噬活性呈正相关性^[7]。哺乳动物有 3 种 LC3 亚型,包括 LC3A、LC3B 和 LC3C,3 种亚型在不同组织分布不同,Western 检测 LC3 一般选择 LC3B。p62 是重要的选择性自噬受体,作为自噬底物,p62 含量的变化反映了自噬流的活化情况^[8]。自噬发生时,p62 首先与细胞质中的泛

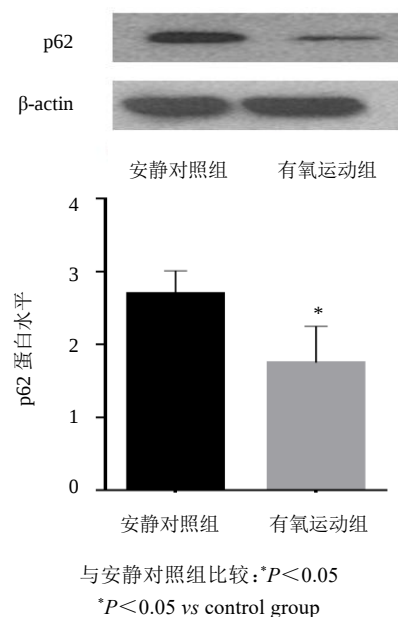


图3 有氧运动对自噬相关蛋白p62蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effects of aerobic exercise on the expression of autophagy-related protein p62

素化蛋白质结合,再与定位于自噬体内膜上的 LC3-II 形成复合物,将泛素化蛋白质转运至自噬溶酶体,同时自身也被降解。通常自噬激活时,p62 被消耗,含量降低;在自噬被抑制时 p62 降解减少,含量增加^[9]。

自噬调节机制复杂,其通路包括依赖 mTOR 的自噬和不依赖 mTOR 的自噬。mTOR 是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在自噬过程中发挥负性调控作用。mTOR 及其下游分子对自噬的调节:mTOR 通过与 ULK 复合物 (ULK1-Atg13-FIP200) 相互作用,将外界信息转化为自噬信号,在机体能量充足的情况下,活化的 mTOR 可使 Atg13 和 ULK1 高度磷酸化,从而抑制自噬的发生。当机体处于饥饿、氧化应激等状态时,mTOR 与 ULK 复合物分离,Atg13 去磷酸化后与 ULK1 及 FIP200 形成复合体,诱导自噬的发生。mTOR 上游分子对自噬的调节:其下游信号通路主要包括 PI3K-AKT-mTOR 及 AMPK-mTOR,其中 AMPK 是代谢和能量传感器,当能量需求增加时 AMPK 被激活,活化的 AMPK 进一步抑制 mTOR,进而诱导自噬的发生。

有氧能力是指人在进行体力工作时,把大气中的氧气输送至细胞线粒体的综合能力。2016 年美国心脏病协会在《循环》杂志中指出有氧能力应划为临床生命体征,低下的有氧能力使心血管疾病发病率增加^[10]。有氧运动是提高有氧能力的重要方式。本研究发现有氧运动组小鼠主动脉 ULK1、Beclin1、LC3B mRNA 水平升高,提示有氧运动能促进主动脉自噬相关基因的表达。本实验还发现运

动组 LC3B-II/LC3B-I 比值升高, p62 蛋白水平降低, 表明有氧运动使自噬流水平升高, 增强主动脉自噬活性。小鼠进行有氧运动时, 能量消耗增加, mTOR 上下游信号通路抑制 mTOR 活性, 进而激活自噬。既往研究显示, 有氧运动还可以增强骨骼肌、心肌等器官的自噬活性。Vito 等^[11]使 C57BL/6 小鼠进行 28 d 的自主运动, 发现趾肌部位的自噬活性增强。Chen 等^[12]将心肌梗死兔子进行 4 周的有氧运动, 证实有氧运动可以增强心肌自噬活性, 提高损伤蛋白的降解速率, 进而减轻细胞损伤, 增强心脏功能。张昊等^[5]发现运动可以通过上调老龄大鼠心肌细胞自噬, 抑制细胞凋亡, 改善老龄大鼠心脏功能。然而赵永军等^[13]发现, 16 周耐力运动可降低衰老小鼠骨骼肌细胞过度自噬, 抵抗骨骼肌衰减症。Zhang 等^[14]研究发现运动能够减少脑梗死部位自噬相关蛋白的表达, 进而起到改善神经功能的作用。因此, 运动对于自噬活性的影响, 可能与运动方式、运动强度、研究器官及研究对象的生理状态有关。

研究表明, 适度自噬可以通过降解细胞内受损结构, 使细胞适应炎症、氧化应激、缺氧等环境, 进而抑制 AS 的发生、发展。在血管内皮细胞中, 自噬可以对抗氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 导致的血管内皮细胞损伤, 减少凋亡^[15]。平滑肌细胞自噬还可以抑制平滑肌细胞增殖阻碍粥样斑块的形成^[16]。巨噬细胞自噬能减少泡沫细胞的聚集、减少斑块中的炎症反应进而维持斑块稳定^[17]。本实验说明有氧运动能够有效增强小鼠主动脉自噬活性, 因此猜测有氧运动可以通过增强自噬活性调节细胞功能状态, 从而在 AS 的发生、发展中起到保护作用。在后续工作中将通过 ApoE^{-/-}小鼠建立的 AS 模型, 探讨有氧运动对 AS 斑块的形成或转归的生物学效应。

参考文献

- [1] Miale-Perez J, Vindis C. Autophagy in health and disease: focus on the cardiovascular system [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 721-732.
- [2] Halling J F, Pilegaard H. Autophagy-dependent beneficial effects of exercise [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(8): a029777.
- [3] Yang Q, Li X H, Li R Q, et al. Low shear stress inhibited endothelial cell autophagy through TET2 downregulation [J]. *Ann Biomed Eng*, 2016, 44(7): 2218-2227.
- [4] Jiao J Q, Demontis F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2017, 34: 1-6.
- [5] 张昊, 王伟伟, 薛过, 等. 运动训练通过诱导自噬、抑制凋亡改善老龄大鼠心脏功能 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(1): 11-17.
- [6] Molino D, Zemirli N, Codogno P, et al. The journey of the autophagosome through mammalian cell organelles and membranes [J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(4): 497-514.
- [7] Antonioli M, di Rienzo M, Piacentini M, et al. Emerging mechanisms in initiating and terminating autophagy [J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(1): 28-41.
- [8] Liu W J, Ye L, Huang W F, et al. P62 links the autophagy pathway and the ubiquitin - proteasome system upon ubiquitinated protein degradation [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21: 29.
- [9] Yoshii S R, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1865.
- [10] Ross R, Blair S N, Arena R, et al. Importance of assessing cardiorespiratory fitness in clinical practice: a case for fitness as a clinical vital sign: A scientific statement from the American heart association [J]. *Circulation*, 2016, 134(24): e653-e699.
- [11] Lira V A, Okutsu M, Zhang M, et al. Increased contractile activity induces autophagy in skeletal muscle [J]. *FASEB*, 2010, 4: 646.
- [12] Chen C, Hsu H, Lee B, et al. Exercise training improves cardiac function in infarcted rabbits: involvement of autophagic function and fatty acid utilization [J]. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12(4): 323-330.
- [13] 赵永军, 戴玉洲, 陈彩珍, 等. 耐力、抗阻运动对骨骼肌衰减症小鼠腓肠肌细胞自噬相关基因表达的影响 [J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(5): 449-455.
- [14] Zhang L Y, Hu X Q, Luo J, et al. Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats [J]. *BMC Neurosci*, 2013, 14(1): 46.
- [15] Ding Z F, Wang X W, Khaidakov M, et al. Degradation of heparan sulfate proteoglycans enhances oxidized-LDL-mediated autophagy and apoptosis in human endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426(1): 106-111.
- [16] Ho-Tin-noé B, Vo S, Bayles R, et al. Cholesterol crystallization in human atherosclerosis is triggered in smooth muscle cells during the transition from fatty streak to fibroatheroma [J]. *J Pathol*, 2017, 241(5): 671-682.
- [17] Shpilka T, Welter E, Borovsky N, et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis [J]. *EMBO J*, 2015, 34(16): 2117-2131.