

· 论 著 ·

腺苷一磷酸活化蛋白激酶在严重烫伤大鼠骨骼肌萎缩中的作用

邓虎平¹ 蔡建华¹ 柴家科¹ 申传安¹ 李利根¹ 孙天骏¹ 陈晶晶² 李东杰¹
董宁³ 刘玲英¹

¹解放军总医院第四医学中心烧伤整形医学部,全军烧伤研究所,北京 100048;²航天中心医院皮肤科,北京 100049;³解放军总医院第四医学中心、医学创新研究部转化医学研究中心,北京 100048

通信作者:柴家科,Email:cjk304@126.com



【摘要】 目的 探讨严重烫伤大鼠骨骼肌中腺苷一磷酸活化蛋白激酶(AMPK)的表达和磷酸化水平变化及其在严重烫伤大鼠骨骼肌萎缩中的作用。**方法** 采用实验研究方法。将100只6周龄雄性Wistar大鼠按随机数字表法分为假伤组和烫伤组,每组50只。测量2组大鼠体重后,烫伤组背部造成30%体表总面积Ⅲ度烫伤,假伤组模拟致烫伤。伤后6h及1、3、5、7d,每组各取10只大鼠,测量体重及趾长伸肌和比目鱼肌重量。伤后6h及1、3、5、7d,收集2组大鼠胫骨前肌,采用实时荧光定量反转录PCR法检测肌肉萎缩盒F蛋白(MAFbx)和肌肉特异性环指蛋白1(MuRF1)mRNA表达;采用高效液相色谱法检测腺苷一磷酸(AMP)、腺苷二磷酸和ATP含量,并计算AMP/ATP比值及能荷;采用蛋白质印迹法检测AMPK- α 及磷酸化AMPK- α (p-AMPK- α)蛋白表达,并计算p-AMPK- α /AMPK- α 比值;2组各时间点样本数均为4。对数据行析因设计方差分析及LSD检验。**结果** 伤前及伤后各时间点,2组大鼠体重相近($P>0.05$)。伤后6h,烫伤组大鼠趾长伸肌重量为(0.107 \pm 0.007)g,明显重于假伤组的(0.086 \pm 0.007)g($P<0.01$);伤后3d,烫伤组大鼠趾长伸肌重量为(0.083 \pm 0.016)g,明显轻于假伤组的(0.102 \pm 0.005)g($P<0.01$)。2组大鼠伤后各时间点比目鱼肌重量相近($P>0.05$)。与假伤组比较,烫伤组大鼠伤后6h胫骨前肌MAFbx mRNA及伤后6h和1d胫骨前肌MuRF1 mRNA表达明显上调($P<0.01$)。与假伤组比较,烫伤组大鼠伤后6h和7d胫骨前肌AMP/ATP比值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),能荷明显下降($P<0.01$)。伤后各时间点,2组大鼠胫骨前肌AMPK- α 蛋白表达相近($P>0.05$)。伤后6h和7d,烫伤组大鼠胫骨前肌p-AMPK- α /AMPK- α 比值明显高于假伤组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 严重烫伤后大鼠骨骼肌能荷下降,AMP/ATP比值升高,激活AMPK;伤后早期AMPK的活化与MAFbx和MuRF1表达上调和骨骼肌重量下降一致,可能是严重烫伤大鼠骨骼肌萎缩发生的分子机制之一。

【关键词】 烧伤; 肌,骨骼; 腺苷一磷酸活化蛋白激酶; 蛋白分解代谢

基金项目:解放军总医院临床重大创新预研项目(2012FC-CXYY-3009)

Roles of adenosine monophosphate activated protein kinase in skeletal muscle atrophy in rats with severe scald

Deng Huping¹, Cai Jianhua¹, Chai Jiako¹, Shen Chuan'an¹, Li Ligen¹, Sun Tianjun¹, Chen Jingjing², Li Dongjie¹, Dong Ning³, Liu Lingying¹

¹Department of Burns and Plastic Surgery, Burns Institute of PLA, the Fourth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China; ²Department of Dermatology, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China; ³Translational Medicine Research Center, Medical Innovation Research Division and the Fourth Medi-

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200416-00227

本文引用格式:邓虎平,蔡建华,柴家科,等.腺苷一磷酸活化蛋白激酶在严重烫伤大鼠骨骼肌萎缩中的作用[J].中华烧伤杂志,2021,37(7):640-646. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200416-00227.

Deng HP, Cai JH, Chai JK, et al. Roles of adenosine monophosphate activated protein kinase in skeletal muscle atrophy in rats with severe scald[J]. Chin J Burns, 2021, 37(7): 640-646. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200416-00227.

cal Center of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

Corresponding author: Chai Jiake, Email: cjk304@126.com

【 Abstract 】 Objective To investigate the expression and phosphorylation level change of adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) in skeletal muscle of severely scald rats and its roles in skeletal muscle atrophy in severely scalded rats. **Methods** The experimental research method was applied. Totally 100 6-week-old male Wistar rats were divided into sham injury group and scald group according to the random number table, with 50 rats in each group. After weighing the body weight, rats in scald group were inflicted with full-thickness scald of 30% total body surface area on the back, and rats in sham injury group were simulated with scald. At 6 h and on 1, 3, 5, and 7 d post injury, 10 rats in each group were taken to measure their body weights and weights of extensor digitorum longus and soleus muscle. At 6 h and on 1, 3, 5, and 7 d post injury, the tibialis anterior muscles were collected, the mRNA expressions of muscle atrophy F-box protein (MAFbx) and muscle-specific RING finger protein 1 (MuRF1) were detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; the content of adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate, and adenosine triphosphate (ATP) were detected by high performance liquid chromatography, and AMP/ATP ratio and energy charge were calculated; the protein expressions of AMPK- α and phosphorylated AMPK- α (p-AMPK- α) were detected by Western blotting, and the p-AMPK- α /AMPK- α ratio was calculated, with sample number of 4 in each time point of each group. Data were statistically analyzed with analysis of variance for factorial design and least significant difference test. **Results** The body weights of rats in 2 groups before injury and at each time point post injury were close ($P > 0.05$). At 6 h post injury, the weight of extensor digitorum longus of rats in scald group was (0.107 ± 0.007) g, which was significantly heavier than (0.086 ± 0.0607) g of sham injury group ($P < 0.01$). On 3 d post injury, the weight of extensor digitorum longus of rats in scald group was (0.083 ± 0.016) g, which was significantly lighter than (0.102 ± 0.005) g of sham injury group ($P < 0.01$). The weight of soleus of rats in 2 groups were close at each time point post injury ($P > 0.05$). Compared with those of sham injury group, the mRNA expression of MAFbx in tibialis anterior muscle of rats in scald group was significantly up-regulated at 6 h post injury ($P < 0.01$), and the mRNA expressions of MuRF1 in tibial anterior muscle of rats in scald group were significantly up-regulated at 6 h and on 1 d post injury ($P < 0.01$). At 6 h and on 7 d post injury, compared with those of false injury group, the AMP/ATP ratios of the tibial anterior muscle of rats in scald group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and energy charges of the tibial anterior muscle of rats in scald group were significantly decreased ($P < 0.01$). At each time point post injury, the protein expressions of AMPK- α of the tibial anterior muscle of rats in 2 groups were close ($P > 0.05$). The p-AMPK- α /AMPK- α ratios of the tibial anterior muscle of rats in scald group at 6 h and on 7 d post injury were significantly higher than those in sham injury group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusions** The decrease in energy charge and increase in AMP/ATP ratio of skeletal muscle of rats after severe scald activate AMPK. The activation of AMPK in the early stage of injury is consistent with the up-regulation of MAFbx and MuRF1 expressions and down-regulation of skeletal muscle weight. The above-mentioned changes may be one of the molecular mechanisms of skeletal muscle atrophy in rats with severe scald

【 Key words 】 Burns; Muscle, skeletal; Adenosine monophosphate activated protein kinase; Protein catabolism

Fund program: Clinical Major Innovation Pre-research Project of PLA General Hospital (2012FC-CXYY-3009)

危重烧伤骨骼肌萎缩的发生与骨骼肌高分解代谢密切相关,骨骼肌蛋白分解代谢是烧伤高代谢的重要特征,导致机体负氮平衡^[1],创面愈合延迟,免疫力下降,甚至和 MODS 密切相关,威胁患者生命^[2]。骨骼肌泛素-蛋白酶体表达上调导致骨骼肌细胞内蛋白降解^[2]。研究表明,糖皮质激素、多种细胞因子促进骨骼肌蛋白降解的关键环节是上调肌肉萎缩盒 F 蛋白 (MAFbx) 和肌肉特异性环指蛋白 1 (MuRF1) 的表达^[3]。然而,骨骼肌蛋白分解代谢的上游分子机制尚需进一步研究。

腺苷一磷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 是机体能量

稳态的关键调节分子,其基本生理功能是“能量开关”^[4]。在低能量状态,即腺苷一磷酸 (AMP)/ATP 比值升高时,AMPK 被激活,活化的 AMPK 促进 ATP 生成,以补充机体的能量需求。然而,最近研究表明,AMPK 参与蛋白代谢,活化的 AMPK 在体内外可抑制大鼠心肌蛋白合成^[5]。本课题组体外研究表明,AMPK 活化剂 5-氨基咪唑-4-羧基酰胺核糖核苷 (AICAR) 可促进 MAFbx 和 MuRF1 的蛋白表达^[6];在体外 C2C12 肌管细胞中,AMPK 的活化同样可促进蛋白分解关键分子 MAFbx 和 MuRF1 的蛋白表达^[7]。危重烧伤后患者体内 AMPK 活性的变化是骨骼肌萎

缩的可能机制之一,而危重烧伤后体内能量状态及 AMPK 的活性和表达变化少有研究。本研究团队拟通过烫伤大鼠的体内实验,探讨烫伤后骨骼肌分解代谢增强与 AMPK 活化的相关机制。

1 材料与方法

本实验中动物饲养及处置均符合动物伦理标准,本研究经解放军总医院福利伦理委员会批准(批号:2012-X6-63)。

1.1 动物及主要试剂与仪器来源

健康清洁级 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重 180~220 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。TRIzol 裂解液购自美国 Invitrogen 公司,快速 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Applied Biosystems 公司,二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒和蛋白检测化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司,AMP、腺苷二磷酸(ADP)、ATP 标准品购自美国 Amresco 公司,兔抗大鼠 AMPK- α 单克隆抗体、兔抗大鼠磷酸化 AMPK- α (p-AMPK- α , 苏氨酸 172)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。5415R 型低温台式高速离心机购自德国 Eppendorf 公司,DIAX 900 型高速组织匀浆机购自德国 Heidolph 公司,高效液相色谱仪和 Eclipse XDB-C18 型色谱分析柱购自德国 Agilent 公司, Spectra MR 型酶标仪购自美国 Dynex 公司, Mini-PROTEIN 型蛋白电泳槽和蛋白转膜系统购自美国 Bio-Rad 公司,DU-800 型紫外分光光度仪购自美国 Beckman 公司,7500 FAST 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 严重烫伤模型制备及分组处理

100 只大鼠购进后适应性饲养 1 周以上,室温维持在 25~28 °C。按随机数字表法将大鼠分为假伤组、烫伤组,每组 50 只。测量 2 组大鼠体重后,按 0.8 mL/kg 腹腔内注射氯胺酮和速眠新 II 的混合液(体积比 1:1)麻醉大鼠,去除背部毛发。烫伤组大鼠背部浸入 94 °C 热水中 12 s 造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实),假伤组大鼠背部置于 37 °C 温水中 12 s 模拟致烫伤。伤后即刻,烫伤组大鼠按 40 mL/kg 腹腔注射生理盐水抗休克,假伤组大鼠不补液;2 组大鼠均予碘伏消毒背部皮肤,单笼饲养。

1.3 体重测量及骨骼肌标本收集

伤后 6 h 及 1、3、5、7 d,每组各取 10 只大鼠测量体重后,同前麻醉,去除后肢毛发,生理盐水浸湿双后肢皮肤,依次剪开皮肤、肌膜、肌腱,收集胫骨前肌、趾长伸肌和比目鱼肌。无菌纱布拭去趾长伸肌和比目鱼肌表面血液、去除肌腱后称重,将胫骨前肌迅速置入冻存管,-196 °C 液氮冻存。

1.4 胫骨前肌 MAFbx 和 MuRF1 mRNA 水平检测

采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测。任取 2 组 4 只大鼠伤后各时间点胫骨前肌组织约 50 mg,加入 1 mL TRIzol,按照操作说明提取总 RNA。常规测定 RNA 纯度和浓度,按照 20 μ L 反转录体系合成互补 DNA,采用实时荧光定量 PCR 仪检测 MAFbx 和 MuRF1 的 mRNA 表达。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。MAFbx 上游引物为 5'-CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT-3',下游引物为 5'-GCTTCCCCAAAGTGCAGTA-3',产物大小为 75 bp; MuRF1 上游引物为 5'-TGA CCAAGGAAA ACAGCCACCAG-3',下游引物为 5'-CTCACTCTTCT TCTCGTCCAGGATGG-3',产物大小为 89 bp; GAPDH 上游引物为 5'-TGCACCACCAACTGCTTA-3',下游引物为 5'-GGATGCAGGGATGATGTTC-3',产物大小为 177 bp^[6]。以 GAPDH 作为内参照,基于 Δ 循环阈值(Ct)的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对 MAFbx 和 MuRF1 的 mRNA 表达进行定量。以假伤组伤后 6 h 的 mRNA 表达量为 1,假伤组其余时间点及烫伤组各时间点 mRNA 表达量与其比值为相应蛋白 mRNA 表达量的相对值。

1.5 胫骨前肌 AMP/ATP 比值及能荷检测

采用高效液相色谱法(HPLC)检测。任取 2 组 4 只大鼠伤后各时间点胫骨前肌 100 mg,置于 1 mL 质量分数 5% 高氯酸溶液中,0 °C 冰浴下迅速剪碎,高速机械匀浆机完全匀浆,静置 30 min 后,4 °C 下以 13 000 \times g 离心 8 min。取上清液约 1 mL,加入 2 mol/L 的碳酸氢钾溶液 500 μ L,中和至 pH 值为 6~8。同前再次离心 8 min 后收集上清液,分装冻存于 -70 °C 冰箱中,HPLC 检测 AMP、ADP 和 ATP 含量^[6,8],计算 AMP/ATP 比值及能荷。能荷=(1/2ADP+ATP) \div (ATP+ADP+AMP)。

1.6 胫骨前肌 AMPK- α 蛋白表达及磷酸化水平检测

采用蛋白质印迹法进行检测。任取 2 组 4 只大鼠伤后各时间点胫骨前肌 50~70 mg,按照蛋白检测化学发光试剂盒说明书提取总蛋白,进行十二烷基

硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿法电转至聚偏氟乙烯膜上,用 50 g/L 脱脂牛奶封闭。加入一抗兔抗大鼠 AMPK- α 单克隆抗体(稀释比为 1:1 000)、兔抗大鼠 p-AMPK- α 单克隆抗体(稀释比为 1:1 000)、小鼠抗大鼠 GAPDH 单克隆抗体(稀释比为 1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加入二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:5 000)和 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体(稀释比为 1:1 000),室温孵育 1 h,化学发光显影。采用 Image J 1.42 软件(美国国立卫生研究院)分析目标条带,以 GAPDH 为内参照,对 p-AMPK- α 与 AMPK- α 的蛋白表达进行定量,并计算 p-AMPK- α /AMPK- α 比值。将假伤组伤后 6 h AMPK- α 的蛋白表达和 p-AMPK- α /AMPK- α 比值设为 1,假伤组其余时间点和烫伤组各时间点 2 个指标与其比值为 2 个指标的相对结果。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行分析,计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间总体比较行析因设计方差分析,各时间点上组间两两比较行 LSD 检验(软件自动略去该统计量值)并行 Bonferroni 校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重及趾长伸肌和比目鱼肌重量

假伤组大鼠伤前体重为(195 \pm 7)g,与烫伤组的(195 \pm 10)g 相近($P > 0.05$)。伤后 6 h,假伤组大鼠趾长伸肌重量明显低于烫伤组($P < 0.01$);伤后 3 d,假伤组大鼠趾长伸肌重量明显高于烫伤组($P < 0.01$)。伤后各时间点,2 组大鼠体重、比目鱼肌重量相近

($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 胫骨前肌 MAFbx 和 MuRF1 mRNA 表达水平

烫伤组大鼠伤后 6 h 胫骨前肌 MAFbx mRNA 表达水平及伤后 6 h 和 1 d 胫骨前肌 MuRF1 mRNA 表达水平明显高于假伤组($P = 0.006, 0.001, 0.001$)。见图 1。

2.3 胫骨前肌 AMP/ATP 比值及能荷

伤后 6 h 和 7 d,烫伤组大鼠胫骨前肌 AMP/ATP 比值明显高于假伤组($P = 0.017, 0.002$),能荷明显低于假伤组($P = 0.008, 0.004$)。见图 2。

2.4 胫骨前肌 AMPK- α 蛋白表达及磷酸化水平

伤后各时间点,假伤组和烫伤组大鼠胫骨前肌 AMPK- α 蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。伤后 6 h 和 7 d,烫伤组大鼠胫骨前肌 p-AMPK- α /AMPK- α 比值明显高于假伤组($P = 0.001, 0.022$)。见图 3。

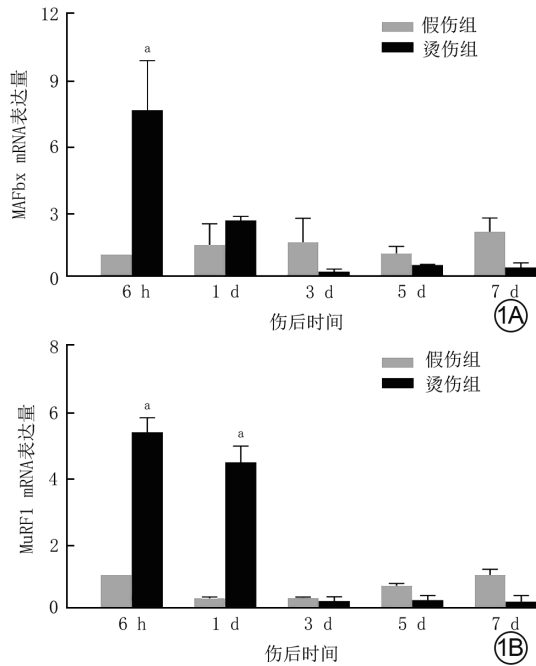
3 讨论

严重烧伤后骨骼肌蛋白的高代谢状态主要表现为高分解代谢^[9-10],骨骼肌包括快肌和慢肌,胫骨前肌和趾长伸肌是快肌,比目鱼肌为慢肌。一般情况下,大鼠烫伤后体重有减轻,但本研究检测到 30%TBSA III 度烫伤大鼠伤后各时间点体重与假伤大鼠相近,可能与烫伤面积偏小有关。本研究结果显示,伤后 3 d,烫伤组大鼠趾长伸肌重量明显低于假伤组,说明本研究中的烫伤过程诱导了快肌重量的减轻。伤后 6 h,烫伤组大鼠趾长伸肌重量较假伤组增加,可能与趾长伸肌水肿相关,此时处于休克期,血管通透性增加是水肿的原因。而伤后各时间

表 1 2 组大鼠伤后各时间点体重及趾长伸肌和比目鱼肌重量比较(g, $\bar{x} \pm s$)

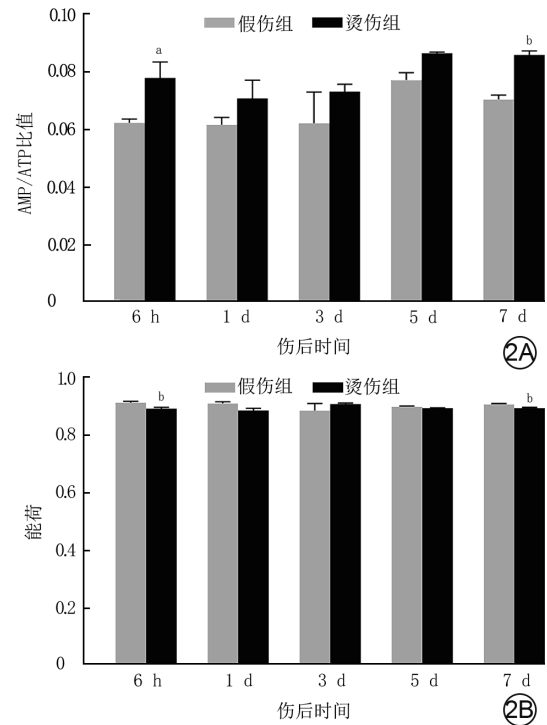
组别与指标	鼠数(只)	6 h	1 d	3 d	5 d	7 d
假伤组	50					
体重		194 \pm 6	199 \pm 11	208 \pm 10	216 \pm 16	232 \pm 32
趾长伸肌重量		0.086 \pm 0.007	0.097 \pm 0.004	0.102 \pm 0.005	0.096 \pm 0.014	0.115 \pm 0.015
比目鱼肌重量		0.079 \pm 0.006	0.078 \pm 0.010	0.087 \pm 0.008	0.085 \pm 0.008	0.095 \pm 0.015
烫伤组	50					
体重		194 \pm 10	199 \pm 11	201 \pm 15	207 \pm 26	229 \pm 22
趾长伸肌重量		0.107 \pm 0.007	0.083 \pm 0.007	0.083 \pm 0.016	0.090 \pm 0.009	0.107 \pm 0.013
比目鱼肌重量		0.071 \pm 0.010	0.084 \pm 0.011	0.083 \pm 0.015	0.080 \pm 0.013	0.086 \pm 0.010
P_1 值		>0.999	>0.999	>0.999	>0.999	>0.999
P_2 值		<0.001	0.391	<0.001	>0.999	>0.999
P_3 值		>0.999	>0.999	>0.999	>0.999	>0.999

注:各组各时间点鼠数均为 10 只;体重、趾长伸肌重量、比目鱼肌重量处理因素主效应, $F = 1.740, 6.442, 2.273, P = 0.189, 0.012, 0.073$;时间因素主效应, $F = 12.892, 6.442, 6.102, P = < 0.001, 0.012, < 0.001$;两者交互作用, $F = 0.688, 11.647, 1.479, P = 0.601, < 0.001, 0.213$; P_1 值、 P_2 值、 P_3 值分别为 2 组间体重、趾长伸肌重量、比目鱼肌重量各时间点比较所得



注:2组各时间点样本数为4;MAFbx为肌肉萎缩盒F蛋白, MuRF1为肌肉特异性环指蛋白1;MAFbx和MuRF1 mRNA表达的处理因素主效应, $F=2.086, 71.163, P=0.166, < 0.001$;时间因素主效应, $F=4.077, 44.575, P=0.016, < 0.001$;两者交互作用, $F=5.524, 45.565, P=0.004, < 0.001$;与假伤组比较, $^aP<0.01$

图1 2组大鼠伤后不同时间点胫骨前肌MAFbx和MuRF1 mRNA表达量($\bar{x} \pm s$)。1A. MAFbx mRNA表达量;1B. MuRF1 mRNA表达量



注:2组各时间点样本数为4;腺苷一磷酸(AMP)/ATP比值和能荷的处理因素主效应, $F=38.064, 4.497, P=<0.001, 0.047$;时间因素主效应, $F=10.219, 0.297, P=0.016, 0.876$;两者交互作用, $F=0.575, 4.408, P=0.684, 0.011$;与假伤组比较, $^aP<0.05, ^bP<0.01$

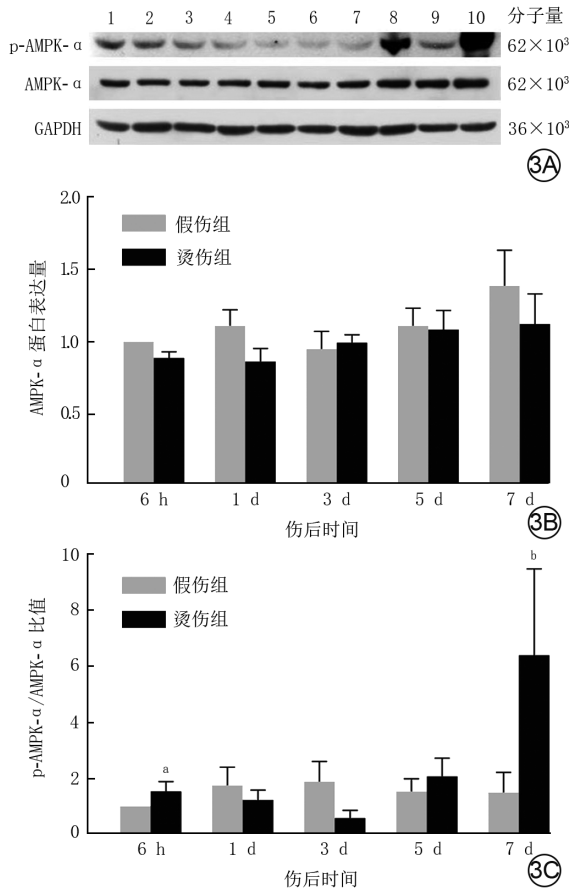
图2 2组大鼠伤后不同时间点胫骨前肌AMP/ATP比值和能荷水平($\bar{x} \pm s$)。2A. AMP/ATP比值;2B. 能荷水平

点2组大鼠比目鱼肌重量相近,其原因尚不清楚^[11]。与伤后6h比较,烫伤组大鼠伤后1、3、5d趾长伸肌重量下降,而比目鱼肌重量变化不明显,说明快肌纤维蛋白丢失是严重烫伤后骨骼肌萎缩发生的重要原因。

多种蛋白酶系统参与骨骼肌萎缩的过程,在最近20余年的研究中,研究者观察到蛋白酶体参与了80%~90%胞内蛋白质的更新,通过蛋白酶体中的26S蛋白酶,以ATP依赖的方式分解与泛素连接的靶蛋白^[12],因此,泛素-蛋白酶体系统是骨骼肌蛋白分解代谢的主要酶解系统^[13-14]。研究表明,骨骼肌蛋白分解代谢过程中MAFbx和MuRF1表达增加^[15]。本研究对严重烫伤大鼠胫骨前肌中的MAFbx和MuRF1基因表达水平进行了动态观察,结果表明烫伤组大鼠伤后6h胫骨前肌MAFbx mRNA表达水平及伤后6h和1d胫骨前肌MuRF1 mRNA表达水平明显高于假伤组,与既往研究结果^[15]一致,说明伤后早期MAFbx和MuRF1表达增加促使烫伤后骨骼肌分解增强,表现为烫伤组大鼠伤后3d趾长伸肌

重量低于假伤组。可见MAFbx和MuRF1 mRNA表达上调与骨骼肌萎缩发生存在着时间上的一致性。MAFbx和MuRF1表达变化是大鼠骨骼肌萎缩的启动因素,造成后续骨骼肌蛋白分解,随着时间的积累,骨骼肌重量下降。导致MAFbx和MuRF1 mRNA表达增加的机制复杂,本课题组前期研究表明,MAFbx和MuRF1蛋白表达增加与蛋白氧化应激反应^[16]、内质网应激反应^[17]等相关。

骨骼肌蛋白的合成和分解代谢离不开能量代谢的调节,AMPK是能量代谢调节的枢纽分子^[4,18],AMPK在骨骼肌中含有 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 异构体,但以 $\alpha 2$ 为主。体外研究表明,作为合成激素的胰岛素通过蛋白激酶B抑制AMPK- α 磷酸化和AMPK- $\alpha 2$ 蛋白表达,使得MAFbx和MuRF1表达下调^[6]。研究表明,骨骼肌强化训练也可通过AMPK通路抑制糖尿病大鼠MAFbx和MuRF1的表达,改善骨骼肌萎缩^[19],这些结果与本文中严重烫伤后出现AMPK的活化和MAFbx、MuRF1 mRNA的表达上调一致。AMPK广泛受到多种代谢性应激因素的调节,这些刺激因素



注:2组各时间点样本数为4;AMPK-α为腺苷一磷酸活化蛋白激酶α,p-AMPK-α为磷酸化AMPK-α,GAPDH为3-磷酸甘油醛脱氢酶;条带图上方1、3、5、7、9分别为假伤组伤后6h及1、3、5、7d,2、4、6、8、10分别为烫伤组伤后6h及1、3、5、7d;AMPK-α蛋白表达和p-AMPK-α/AMPK-α比值的处理因素主效应, $F=1.273, 3.636, P=0.263, 0.067$;时间因素主效应, $F=2.882, 5.459, P=0.029, 0.002$;两者交互作用, $F=0.465, 6.082, P=0.761, 0.001$;与假伤组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$

图3 蛋白质印迹法检测2组大鼠伤后不同时间点胫骨前肌p-AMPK-α、AMPK-α蛋白表达并计算p-AMPK-α/AMPK-α比值。3A.条带图;3B.AMPK-α蛋白表达条图($\bar{x} \pm s$);3C.p-AMPK-α/AMPK-α比值条图($\bar{x} \pm s$)

包括缺血、缺氧、锻炼^[20]、低葡萄糖等,AMPK还受激素、细胞因子和其他胞外受体的调节^[18]。研究表明,AMPK参与了危重烧伤SD大鼠心功能不全的发生^[21]。在骨骼肌中,AMPK的激活^[5]受AMP/ATP比值及丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶11、钙离子/钙调蛋白依赖性蛋白激酶β的调节^[22]。有研究表明,深度烧伤大鼠肾脏能荷水平明显低于假伤大鼠^[23];40%TBSA烧伤小鼠伤后72h肝脏ATP、ADP和能荷水平明显低于假伤小鼠^[24];能荷水平的下降与患者烧伤后出现休克、缺血及再灌注损伤^[25]、线粒体氧化能力损害、ATP合成减少有关^[26]。本研究中

30%TBSA III度烫伤大鼠AMP/ATP比值于伤后6h较假伤组明显升高,相应时间点骨骼肌能荷下降,进而通过p-AMPK激活AMPK。因此,烫伤后胫骨前肌AMPK的激活是AMP/ATP比值增高的必然结果,AMPK的激活促进ATP合成,这一变化的意义在于改善骨骼肌的能量状态,同时促进蛋白分解代谢^[6]。本研究中烫伤组大鼠胫骨前肌AMP/ATP比值于伤后7d升高,其原因和机制尚不清楚,需在将来的研究中延长观察时间来确定其出现的原因和意义。

AMPK在能量代谢调节的基础上,还有促进脂质降解、抑制脂质合成、调节肿瘤生长中的血管化过程^[27]等功能。激活的AMPK可抑制骨骼肌蛋白合成,机制是AMPK磷酸化激活结节性硬化症复合体2(TSC2),激活的TSC2进一步抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),从而下调mTOR相关的蛋白合成途径^[28]。另一方面,AMPK的激活促进骨骼肌萎缩的发生是独立于mTOR分子途径的,AMPK的激活通过上调MAFbx和MuRF1表达,激活蛋白酶体系统^[29]。AMPK受抑制剂作用后,在体外抑制C6胶质瘤细胞核因子κB的DNA结合和转录活性^[30],而核因子κB同样在烧伤后骨骼肌中高表达,与蛋白质分解代谢增高和炎症反应失控有关。AMPK/mTOR参与烧伤后自噬过程^[31],也可能是骨骼肌萎缩的发生机制之一^[32]。本研究结果表明,伤后3d是烫伤大鼠骨骼肌重量变化、MAFbx和MuRF1 mRNA表达变化、AMPK磷酸化激活的转折点。伤后6h,烫伤大鼠AMP/ATP比值、AMPK磷酸化水平、MAFbx和MuRF1的mRNA表达水平均较假伤组升高,几个指标变化一致,表现为骨骼肌蛋白分解增加,骨骼肌重量下降。这提示烫伤后早期,大鼠骨骼肌AMPK的激活与MAFbx和MuRF1的mRNA表达具有密切相关性,而烫伤后AMPK激活调节骨骼肌蛋白分解代谢的具体分子机制尚待进一步研究。

总之,严重烫伤早期大鼠出现骨骼肌消耗,快肌重量下降,MAFbx和MuRF1 mRNA表达上调;在烫伤后早期ATP消耗致AMP/ATP比值升高,AMPK激活,说明严重烫伤后AMPK的活化可能是促进骨骼肌分解代谢的重要分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Singer P. Protein metabolism and requirements in the ICU[J]. Clin Nutr ESPEN, 2020, 38: 3-8. DOI: 10.1016/j.clnesp.2020.03.026.

- [2] Clark A, Imran J, Madni T, et al. Nutrition and metabolism in burn patients[J/OL]. *Burns Trauma*, 2017, 5: 11[2020-04-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28428966/>. DOI: 10.1186/s41038-017-0076-x.
- [3] 申传安, 柴家科, 姚咏明, 等. 地塞米松对骨骼肌细胞蛋白降解的调节及其机制研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(3): 129-131. DOI: 10.3760/j.issn:1003-0603.2006.03.001.
- [4] Lin SC, Hardie DG. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2):299-313. DOI:10.1016/j.cmet.2017.10.009.
- [5] Browne GJ, Finn SG, Proud CG. Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13):12220-12231. DOI:10.1074/jbc.M309773200.
- [6] Deng HP, Chai JK, Shen CA, et al. Insulin down-regulates the expression of ubiquitin E3 ligases partially by inhibiting the activity and expression of AMP-activated protein kinase in L6 myotubes[J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(4): e00242. DOI: 10.1042/BSR20150017.
- [7] Krawiec BJ, Nystrom GJ, Frost RA, et al. AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(6): E1555-E1567. DOI: 10.1152/ajpendo.00622.2006.
- [8] López JM, Santidrián AF, Campàs C, et al. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide riboside induces apoptosis in Jurkat cells, but the AMP-activated protein kinase is not involved[J]. *Biochem J*, 2003, 370(Pt 3):1027-1032. DOI:10.1042/BJ20021053.
- [9] Ogunbileje JO, Porter C, Herndon DN, et al. Hypermetabolism and hypercatabolism of skeletal muscle accompany mitochondrial stress following severe burn trauma[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311(2): E436-E448. DOI: 10.1152/ajpendo.00535.2015.
- [10] Wise AK, Hromatka KA, Miller KR. Energy expenditure and protein requirements following burn injury[J]. *Nutr Clin Pract*, 2019, 34(5):673-680. DOI:10.1002/ncp.10390.
- [11] Fang CH, Li BG, Tiao G, et al. The molecular regulation of protein breakdown following burn injury is different in fast- and slow-twitch skeletal muscle[J]. *Int J Mol Med*, 1998, 1(1): 163-169. DOI:10.3892/ijmm.1.1.163.
- [12] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction[J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2):373-428. DOI:10.1152/physrev.00027.2001.
- [13] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy[J]. *Science*, 2001, 294(5547):1704-1708. DOI:10.1126/science.1065874.
- [14] Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression[J]. *FASEB J*, 2004, 18(1): 39-51. DOI: 10.1096/fj.03-0610com.
- [15] Arya R, Kedar V, Hwang JR, et al. Muscle ring finger protein-1 inhibits PKC[epsilon] activation and prevents cardiomyocyte hypertrophy[J]. *J Cell Biol*, 2004, 167(6):1147-1159. DOI:10.1083/jcb.200402033.
- [16] 段红杰, 何延奇, 陈晨, 等. 严重烧伤大鼠膈肌蛋白氧化应激及抗氧化酶表达的变化[J]. *中华烧伤杂志*, 2019, 35(7): 507-511. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.07.006.
- [17] 褚万立, 柴家科, 王晓腾, 等. 胰岛素治疗对严重烫伤大鼠骨骼肌消耗的作用及相关机制[J]. *中华烧伤杂志*, 2019, 35(5): 333-340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.05.003.
- [18] Steinberg GR, Carling D. AMP-activated protein kinase: the current landscape for drug development[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(7):527-551. DOI:10.1038/s41573-019-0019-2.
- [19] 王继, 杨中亚, 张龙, 等. AMPK/PGC-1 α 在有氧运动改善2型糖尿病大鼠骨骼肌萎缩中的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(20):3180-3185. DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1913.
- [20] Liu HW, Chang SJ. Moderate exercise suppresses NF- κ B signaling and activates the SIRT1-AMPK-PGC1 α axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice[J]. *Front Physiol*, 2018, 636(9):1-9. DOI: 10.3389/fphys.2018.00636.
- [21] Wen JJ, Cummins CB, Szczesny B, et al. Cardiac dysfunction after burn injury: role of the AMPK-SIRT1-PGC1 α -NFE2L2-ARE pathway[J]. *J Am Coll Surg*, 2020, 230(4):562-571. DOI:10.1016/j.jamcollsurg.2019.12.029.
- [22] Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase[J]. *Science*, 2011, 332(6036): 1433-1435. DOI:10.1126/science.1200094.
- [23] Ogawa Y, Matsumoto K, Ofuji S. Changes in adenine nucleotide and mitochondrial metabolism of the kidney of burned rats and their relation to insulin[J]. *J Lab Clin Med*, 1977, 90(3):457-465.
- [24] Gore DC, Rinehart A, Asimakis G. Temporal changes in cellular energy following burn injury[J]. *Burns*, 2005, 31(8): 998-1002. DOI:10.1016/j.burns.2005.06.005.
- [25] Camici M, Garcia-Gil M, Tozzi MG. The inside story of adenosine [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3):784. DOI:10.3390/ijms19030784.
- [26] Malagaris I, Herndon DN, Polychronopoulou E, et al. Determinants of skeletal muscle protein turnover following severe burn trauma in children[J]. *Clin Nutr*, 2019, 38(3): 1348-1354. DOI: 10.1016/j.clnu.2018.05.027.
- [27] Neill T, Chen CG, Buraschi S, et al. Catabolic degradation of endothelial VEGFA via autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(18): 6064-6079. DOI:10.1074/jbc.RA120.012593.
- [28] de Theije CC, Schols AMWJ, Lamers WH, et al. Hypoxia impairs adaptation of skeletal muscle protein turnover- and AMPK signaling during fasting-induced muscle atrophy[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9):e0203630. DOI:10.1371/journal.pone.0203630.
- [29] Thomson DM. The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10):3125. DOI:10.3390/ijms19103125.
- [30] Yoon H, Oh YT, Lee JY, et al. Activation of AMP-activated protein kinase by kainic acid mediates brain-derived neurotrophic factor expression through a NF-kappaB dependent mechanism in C6 glioma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(3): 495-500. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.04.102.
- [31] Yu Y, Sun B. Autophagy-mediated regulation of neutrophils and clinical applications[J/OL]. *Burns Trauma*, 2020, 8:tkz00[2021-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32341923/>. DOI: 10.1093/burnst/tkz001.
- [32] García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguer E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence[J]. *Nature*, 2016, 529(7584):37-42. DOI:10.1038/nature16187.

(收稿日期:2020-04-16)