

大强度运动后骨骼肌微管蛋白对线粒体Rho GTP酶1(Miro1)的调节机制

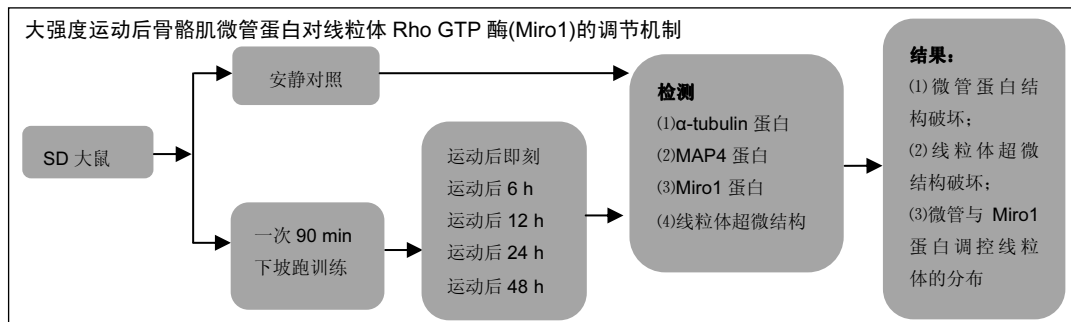
刘晓然¹, 黄涛², 王蕴红¹, 阎守扶¹, 王瑞元², 李俊平² (¹首都体育学院运动科学与健康学院, 北京市 100191; ²北京体育大学运动人体科学学院, 北京市 100084)

引用本文: 刘晓然, 黄涛, 王蕴红, 阎守扶, 王瑞元, 李俊平. 大强度运动后骨骼肌微管蛋白对线粒体Rho GTP酶1(Miro1)的调节机制[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(16):2570-2575.

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.2017.16.019

ORCID: 0000-0003-1560-1194(刘晓然)

文章快速阅读:



刘晓然, 女, 1982年生, 天津市人, 2013年北京体育大学毕业, 博士, 实验师, 主要从事运动对骨骼肌机能影响的研究。

通讯作者: 李俊平, 博士, 副教授, 北京体育大学运动人体科学学院, 北京市 100084

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2017)16-02570-06

稿件接受: 2017-05-04

文题释义:

微管: 呈笔直的管状, 是细胞内起支撑作用的主要支架, 而且对细胞内物质运输起轨道和指引方向的作用。构成微管的主要蛋白是微管蛋白(tubulin), 它具有 α 和 β 两种亚型, 以非共价键联结在一起形成二聚体。这两个亚基结合在一起并以线性排列, 形成一条微管原纤维(protofilament)。13条微管原纤维围在一起, 形成中空的管状纤维结构。组成微管原纤维的微管蛋白聚合体时刻处于动态的解聚和聚合状态, 并因此调控细胞的各项功能。

线粒体及线粒体 Rho GTP 酶 1(mitochondrial Rho-GTPase 1, Miro1): 线粒体被认为是一种高度动态的细胞器, 其形态、分布、数量时刻都处于变化中。线粒体 Rho GTP 酶 1 是 GTPase 家族成员, 存在于线粒体中, 其作用是参与细胞凋亡的调节, 参与线粒体移动的调节, 参与到了线粒体运动和动力学变化。

摘要

背景: 大强度运动可诱导骨骼肌微管蛋白的解聚或降解, 通过其与线粒体的密切联系, 从而影响线粒体的运动轨道以及分子马达, 从而改变线粒体的移动和分布。

目的: 观察一次大强度运动对骨骼肌 α -tubulin 蛋白、MAP4 蛋白和 Miro1 蛋白的影响, 以及对线粒体超微结构的影响, 分析它们之间的时序性变化, 探讨微管蛋白的解聚是否可以通过与 Miro1 蛋白的作用, 从而对骨骼肌线粒体的移动和分布产生调控作用。

方法: 56只SD大鼠经适应训练后分为安静对照组(8只)和运动组(48只), 运动模型为一次大强度跑台运动, -16° 下坡跑, 20 m/min, 90 min。将运动组大鼠分别在运动后即刻, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h 和 72 h(每个时间点8只)取比目鱼肌。Western blotting 检测 α -tubulin、MAP4 和 Miro1 的蛋白表达, 透射电镜观察线粒体的超微结构。

结果与结论: ① α -tubulin 蛋白表达在运动后 6 h 和 12 h 显著降低; ②MAP4 蛋白表达在运动后 6, 12, 48 和 72 h 均显著升高; ③Miro1 蛋白表达在运动后 6 h 和 12 h 有升高趋势, 在 72 h 下降; ④电镜下线粒体在安静状态时成对排列于 Z 线两侧, 肌膜下较少; 运动后即刻和 6 h 在肌膜下开始积聚; 12 h 后在肌膜下积聚和损伤最为严重; 24 h 和 48 h 后肌膜下肌膜减弱; 72 h 后已恢复至安静状态。⑤结果表明, 一次大强度运动可能诱导骨骼肌微管的解聚, 并可能通过对 Miro1 的作用, 从而调节线粒体的移动和分布。

关键词:

组织构建; 组织工程; 运动; 微管; Tubulin; 线粒体; Miro1; 国家自然科学基金

主题词:

运动医学; 生理学; 微管; 线粒体; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(31271277); 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201510029001); 中央高校基本科研业务费专项资金(2017YB022、2016YB041)和首都体育学院校级研究平台(分子生物学平台)

缩略语:

线粒体 Rho GTP 酶 1: mitochondrial Rho-GTPase 1, Miro1

Liu Xiao-ran, Ph.D.,
Experimentalist, School of
Kinesiology and Health,
Capital University of Physical
Education and Sports, Beijing
100191, China

Corresponding author:
Li Jun-ping, Ph.D., Associate
professor, Sport Science
College, Beijing Sport
University, Beijing 100084,
China

Effect of tubulin in skeletal muscle on mitochondrial Rho-GTPase1 protein (Miro1) after high-intensity exercise and the underlying mechanism

Liu Xiao-ran¹, Huang Tao², Wang Yun-hong¹, Yan Shou-fu¹, Wang Rui-yuan², Li Jun-ping² (¹School of Kinesiology and Health, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191, China; ²Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Abstract

BACKGROUND: High-intensity exercise can induce the depolymerization and/or degradation of tubulin in the skeletal muscle. According to the close relation with the mitochondria, tubulin may influence mitochondrial movement track and molecular motor, thereby varying the movement and distribution of mitochondria.

OBJECTIVE: To observe the effect of high-intensity exercise on α -tubulin, MAP4, Miro1 and mitochondrial ultrastructures, analyze their sequential changes and further explore whether tubular depolymerization regulates the movement and distribution of mitochondria via Miro1.

METHODS: Fifty-six Sprague-Dawley rats were divided into control ($n=8$) and exercise ($n=48$) groups. The rats in the exercise group ran on the treadmill (-16° , 20 m/minute) for 90 minutes, and the soleus samples were removed immediately, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after exercise ($n=8$ each time point). The expression levels of α -tubulin, MAP4 and Miro1 were detected by western blot assay, and the ultrastructural changes of mitochondria were observed under transmission electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression level of α -tubulin was decreased significantly at 6 and 12 hours after exercise. The expression level of MAP4 was increased significantly at 6, 12, 48 and 72 hours after exercise. The expression level of Miro1 was increased firstly at 6 and 12 hours after exercise, and decreased at 72 hours after exercise. In the control group, the paired mitochondria were arranged on the both sides of Z line, and few appeared in the myolemma. Mitochondria began to accumulate in the myolemma immediately and 6 hours after exercise; the number achieved the peak at 12 hours, reduced at 24 and 48 hours, and returned to normal at 72 hours. These results suggest that high-intensity exercise can induce the depolymerization of microtubules in the skeletal muscle, thus regulating the movement and distribution of mitochondria via Miro1.

Subject headings: Sports Medicine; Physiology; Microtubules; Mitochondria; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31271277; the General Program of Science and Technology Planning of Beijing Municipal Education Commission, No. KM201510029001; the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. 2017YB022 and 2016YB041; the Research Platform of Capital University of Physical and Education (Molecular Biology Platform)

Cite this article: Liu XR, Huang T, Wang YH, Yan SF, Wang RY, Li JP. Effect of tubulin in the skeletal muscle on mitochondrial Rho-GTPase1 protein (Miro1) after high-intensity exercise and the underlying mechanism. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2017;21(16):2570-2575.

0 引言 Introduction

微管被认为是细胞骨架的重要组分,在维持细胞形态结构,参与细胞运动、分裂及细胞器运输等方面均发挥重要作用。研究证实微管与为骨骼肌收缩活动提供能量的线粒体关系密切,线粒体的运动^[1]、形态^[2]、分布和功能都与微管相关^[3]。线粒体被认为是一种高度动态的细胞器,其形态、分布、数量时刻都处于变化中^[4]。线粒体在细胞质中以微管为运动轨道,由分子马达提供动力,向功能相对旺盛的区域运动^[1]。线粒体在以微管作为运动轨道时,需依赖于微管结合蛋白(microtubule associated proteins, MAPs),因为它不但可以调节微管的聚合或解聚^[5],而且它可以调节推动线粒体或其他细胞器沿微管运动的分子马达^[6]。常见的线粒体分子马达驱动蛋白(kinesin)和动力蛋白(dynein),均属于微管结合蛋白,驱动蛋白主要参与线粒体的顺行运动^[7],动力蛋白则主要参与线粒体的逆行运动^[2]。

近年研究报道线粒体 Rho GTP 酶 1(mitochondrial Rho-GTPase 1, Miro1)与驱动蛋白连接,调控线粒体沿微管的运动^[8-9]。Miro1 是一种定位于线粒体外膜的 GTP 酶,可通过与接头蛋白(Milton)、驱动蛋白重链(kinesin heavy chain, KHC)等蛋白结合,形成功能性复合体,调控线粒

体的运动。Fransson 等^[10]的研究报道 Miro1 的突变抑制了线粒体的运动,导致线粒体聚集成簇,形成丝状线粒体。Wang 等^[11]的研究观察到线粒体受损时, Miro1 会产生泛素化,促使 Miro1 通过蛋白酶体途径降解,最终会导致线粒体的转运停止。本课题组先前的实验已观察到一次大强度(离心跑)运动可导致骨骼肌骨架蛋白一过性表达下调,提示发生了骨架蛋白的解聚或降解^[12]。本研究在此运动模型的基础上,进一步观察骨骼肌 Miro1 蛋白表达的变化,以及电镜下线粒体的分布状态,试图发现微管蛋白、Miro1 蛋白以及线粒体分布在时序上的变化趋势,从而探究作为线粒体运动导轨的微管在大强度运动后是否会通过解聚事件影响到线粒体在细胞质中的分布,以及探析微管蛋白对骨骼肌线粒体分布的可能调节机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 分组对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于2016年9月至2017年1月在北京体育大学运动人体科学学院骨骼肌实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 雄性 SD 大鼠 56 只, SPF 级, 体质量

(196.16±6.96) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证编号: SCXK(京)2002-003, 在北京体育大学科研实验中心小动物房内进行饲养和运动训练。分笼饲养, 自由饮食和饮水, 室温(22±2)℃, 相对湿度30%-60%, 12 h光照/12 h熄灯模拟日昼交替。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 根据运动后不同时间点, 将实验动物随机分为7个组, 即: 安静对照组、运动后即刻组、运动后6 h组、运动后12 h组、运动后24 h组、运动后48 h组和运动后72 h组, 每组8只。

1.4.2 运动方案 运动模型为一次中大强度离心跑台运动, 正式实验前对运动组大鼠进行适应性跑台训练3 d, 第1天坡度0°, 16 m/min, 10 min; 第2天坡度-5°, 16 m/min, 15 min; 第3天坡度-10°, 16 m/min, 30 min; 第4天休息; 第5天正式实验, 坡度-16°, 20 m/min, 90 min。

1.4.3 取材 运动组的取材时间点设为运动后即刻, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h和72 h点。取材大鼠经腹腔注射2%戊巴比妥钠(2.5 mL/kg), 腹主动脉取血, 快速分离出比目鱼肌, 用锡纸包好, 保存于液氮中, 取材完成后将样本全部保存至-80℃冰箱备用。

1.5 主要测试指标

1.5.1 Western Blot检测α-tubulin、MAP4和Miro1蛋白表达 取适量样品置于液氮研磨, 称取0.1 g组织, 以1:9加入预冷的裂解液, 匀浆, 冰上孵育20 min, 4℃离心, 12 000 r/min, 20 min, 取上清。采用BCA测试法定量蛋白浓度。取20 μg总蛋白配制成上样体系, 置95℃沸水中5 min, 上样前离心。配制分离胶8%(MAP4)、10%(α-tubulin、Miro1和GAPDH), 以及5%积层胶。积层胶90 V, 40 min; 分离胶120 V, 通过预染蛋白Marker来确定电泳停止时间。电泳后采用湿法进行蛋白质电转印, 300 mA, 90-120 min。5% BSA封闭液室温孵育2 h。以5% BSA封闭液稀释一抗α-tubulin(1:4 000, abcam公司)、MAP4(1:1 000, Santa Cruz公司)、Miro1(1:1 000, abcam公司)和GAPDH(1:1 000, abcam公司), 4℃过夜。以5% BSA封闭液稀释二抗(1:5 000, 中杉金桥公司), 室温孵育2 h。用ECL发光试剂与膜在暗室中反应、曝光。X射线片进行扫描后经ipp6.0软件对目的蛋白质进行光密度相对定量分析, 将每个条带与相应样品的GAPDH条带吸光度值进行比较, 计算出目的条带的相对含量值。

1.5.2 透射电镜观察线粒体的超微结构 将2.5%戊二醛固定的比目鱼肌, 用0.1 mol磷酸缓冲液冲洗, 以1%锇酸固定, 再用丙酮系列脱水, 环氧树脂Spurr包埋, LEICAUC6I型切片机纵切超薄切片, 用醋酸双氧铀, 柠檬酸铅双染色。JEM-1230透射电子显微镜观察骨骼肌线粒体超微结构变化。

1.6 统计学分析 所有数据用SPSS 13.0统计软件包处理, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。采用单因素方差分析, $P <$

0.05和 $P < 0.01$ 分别表示相差显著和非常显著。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠56只, 分为7组, 实验过程中无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 一次大强度运动对骨骼肌α-tubulin蛋白表达的影响 研究结果显示, α-tubulin蛋白表达在运动后即刻开始下调, 运动后6 h和12 h分别比安静对照组显著降低了54.0%和60.3%, 并且在运动后12 h出现表达最低值。运动后24 h α-tubulin蛋白表达开始回升, 运动后48 h和72 h已基本恢复至安静对照水平(表1, 图1)。

表1 大鼠一次大强度运动后不同时间点 α-tubulin、MAP4 和 Miro1 蛋白表达的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, 相对表达量)
Table 1 Expression levels of α-tubulin, MAP4 and Miro1 in the rats at different time after high-intensity exercise

组别	α-tubulin	MAP4	Miro1
安静对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
运动后即刻组	0.711±0.186	2.130±0.805	0.891±0.092
运动后 6 h 组	0.460±0.107 ^b	5.485±0.804 ^b	1.143±0.275
运动后 12 h 组	0.397±0.074 ^b	7.009±1.309 ^b	1.211±0.338
运动后 24 h 组	0.680±0.115	1.759±0.265	1.169±0.405
运动后 48 h 组	1.060±0.068	3.393±1.572 ^a	0.993±0.043
运动后 72 h 组	0.950±0.202	5.072±0.918 ^b	0.822±0.265

表注: 与安静对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

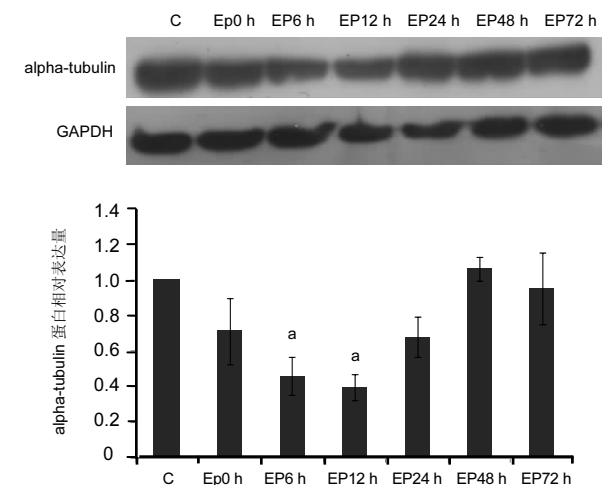


图1 大鼠一次大强度运动后不同时间点 α-tubulin 蛋白表达的变化
Figure 1 Expression level of α-tubulin in the rats at different time after high-intensity exercise

图注: C 为安静对照组; Ep0 h: 运动后即刻组; Ep6 h: 运动后 6 h 组; Ep12 h: 运动后 12 h 组; Ep24 h: 运动后 24 h 组; Ep48 h: 运动后 48 h 组; Ep72 h: 运动后 72 h 组。与安静对照组相比, ^a $P < 0.01$ 。

2.3 一次大强度运动对骨骼肌MAP4蛋白表达的影响 研究结果显示, MAP4蛋白表达在运动后即刻、6 h和12 h分别显著升高了1.13倍、4.49倍和6.01倍, 并且在运动后12 h出现表达峰值, 但在运动后24 h表达迅速回落, 而在运动后48 h和72 h蛋白表达分别显著升高了2.39倍和4.04倍(表1, 图2)。

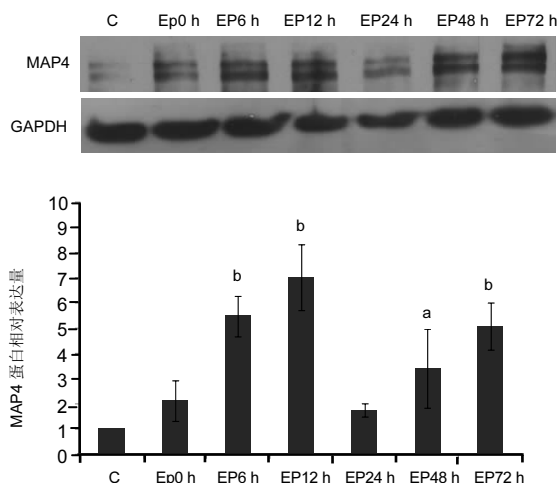


图2 大鼠一次大强度运动后不同时间点 MAP4 蛋白表达的变化
Figure 2 Expression level of MAP4 in the rats at different time after high-intensity exercise

图注: C 为安静对照组; Ep0 h: 运动后即刻组; Ep6 h: 运动后 6 h 组; Ep12 h: 运动后 12 h 组; Ep24 h: 运动后 24 h 组; Ep48 h: 运动后 48 h 组; Ep72 h: 运动后 72 h 组。与安静对照组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

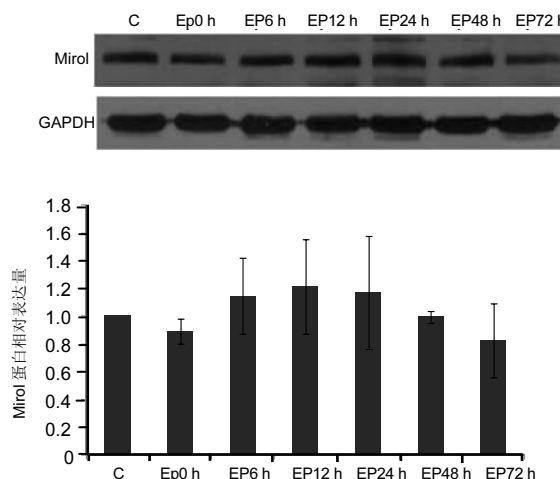


图3 大鼠一次大强度运动后不同时间点 Miro1 蛋白表达的变化
Figure 3 Expression level of Miro1 in the rats at different time after high-intensity exercise

图注: C 为安静对照组; Ep0 h: 运动后即刻组; Ep6 h: 运动后 6 h 组; Ep12 h: 运动后 12 h 组; Ep24 h: 运动后 24 h 组; Ep48 h: 运动后 48 h 组; Ep72 h: 运动后 72 h 组。Miro1 蛋白表达在运动后没有显著变化。

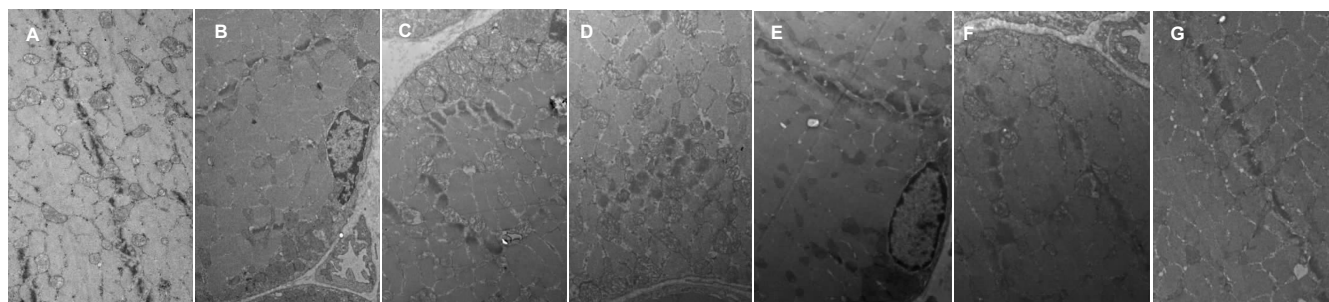


图4 大鼠一次大强度运动后不同时间点线粒体超微结构($\times 10\,000$)

Figure 4 Ultrastructural changes of mitochondria in the rats at different time after high-intensity exercise ($\times 10\,000$)

图注: 图 A 为安静对照组, Z 线整齐排列, 线粒体分布较为均匀, 肌膜下有少量线粒体积聚; B 为运动后即刻组, Z 线附近线粒体数目较少, 肌膜下线粒体大量积聚; C 为运动后 6 h 组, 已不能清晰地看到 Z 线, Z 线附近线粒体分布不均匀, 肌膜下线粒体积聚严重; D 为运动后 12 h 组: Z 线依然模糊不清, 肌膜下线粒体积聚减少; E 为运动后 24 h 组: 能清晰看到 Z 线, 肌膜下线粒体数量减少; F 为运动后 48 h 组: Z 线出现部分断裂, 肌膜下线粒体再次积聚; G 为运动后 72 h 组: Z 线整齐排列, 肌膜下线粒体少量积聚。

2.4 一次大强度运动对骨骼肌 Miro1 蛋白表达的影响 研究结果显示, Miro1 蛋白表达在运动后即刻有下调趋势, 运动后 6 h 和 12 h 有表达升高趋势, 并且在运动后 12 h 出现表达最高值。运动后 24 h Miro1 蛋白表达开始回落, 运动后 48 h 和 72 h 已基本恢复至安静对照水平(表1, 图3)。

2.5 一次大强度运动对骨骼肌线粒体分布的影响 本实验使用透射电镜观察了安静和运动后不同时间点骨骼肌线粒体分布的变化(图4)。安静状态下 Z 线整齐排列, 线粒体均匀地、成对地排列在 Z 线两侧, 而肌膜下少见线粒体。运动后即刻 Z 线附近的线粒体数目减少, 而肌膜下线粒体大量积聚。运动后 6 h, Z 线已模糊不清, 其附近的线粒体分布不均, 肌膜下线粒体大量积聚。运动后 12 h, 几乎看不到完整的 Z 线片段, 积聚在肌膜下的线粒体数量增多。运动后 24 h 出现了部分完整的 Z 线片段, 线粒体也沿 Z 线分布, 肌膜下线粒体大量积聚减少。运动后 48 h 能清晰看到 Z 线, Z 线附

近线粒体分布均匀, 肌膜下线粒体数量减少。运动后 72 h, Z 线整齐排列, 线粒体均匀地、成对地排列在 Z 线两侧, 已经恢复到安静状态。

3 讨论 Discussion

3.1 一次大强度运动对微管蛋白及其结合蛋白的影响 骨骼肌中的微管位于肌原纤维之间, 以螺旋式包绕肌原纤维, 向四周扩散。微管是细胞内起支撑作用的主要的细胞骨架, 是由 α 和 β 两种亚型的微管蛋白以非共价键联结形成二聚体结构, 它时刻处于动态的解聚/聚合状态, 并因此调控细胞的各项功能^[13]。

研究发现, 骨骼肌 α -tubulin 蛋白表达在运动后即刻就开始下调, 至运动后 12 h 出现表达最低值, 显著降低了 60.3%, 而在运动后 24 h 开始回升, 至运动后 72 h 已基本恢复到安静水平。提示, 一次大强度运动诱导骨骼肌 α -tubulin 解聚, 在

运动后即刻 α -tubulin即做出快速应答, 呈现解聚状态, 而后解聚加速, 在运动后12h成为解聚向聚合的转折点, 在运动后48 h和72 h已基本恢复聚合状态。在相关研究报道中发现, 免疫荧光定位观察到比目鱼肌纤维损伤后, 肌膜下微管的结构不完整, 部分区域会出现长而尖的板样微管插入到肌纤维中间去^[14]。Hein等^[15]的研究证实心肌细胞骨架的变化先于心肌缺血的其他超微结构的变化, 并且该损伤明显影响心肌细胞的结构和功能。Sakurai等^[16]的研究显示, 大鼠下肢悬垂导致比目鱼肌中tubulin含量显著下降, 经过5 d的恢复, tubulin含量基本恢复到对照水平。

此外, 本研究还检测了MAP4的蛋白表达水平。MAP4是构成非神经细胞骨架中微管的主要结合蛋白, 它包被在微管外壁, 其功能是使微管蛋白亚单位不能脱离微管的末端, 从而起到稳定微管的作用^[17]。MAP4的过表达在一部分细胞中能刺激微管蛋白二聚体总量增加, 增强细胞骨架的刚性效应^[18]。Hu等^[5]的研究发现, 在心肌细胞缺氧15min后, MAP4磷酸化显著增强; 缺氧30 min后, MAP4磷酸化进一步增强, 并一直维持到缺氧60 min。另有文献显示心肌缺氧后MAP4蛋白表达也会出现上调^[19]。研究结果显示, 运动后骨骼肌MAP4蛋白表达变化明显, 运动后即刻、6 h和12 h分别显著升高了1.13倍、4.49倍和6.01倍。MAP4作为稳定微管结构的伴侣因子, 在一次大强度运动诱导微管解聚的事件中, 通过MAP4蛋白含量的增加, 尽可能维系微管的稳定, 减小微管破坏的程度。因而在实验中MAP4蛋白变化的趋势与 α -tubulin蛋白表达正好相反, 并且在运动12 h处出现了 α -tubulin和MAP4蛋白表达的拐点。

3.2 一次大强度运动对线粒体超微结构和线粒体移动相关蛋白Miro1表达的影响

3.2.1 一次大强度运动对线粒体分布的影响 运动可导致线粒体超微结构的改变。研究报道大鼠经7 d下坡跑后, 观察到末次训练后24 h的大鼠肌丝杂乱, 断裂溶解, 无明显完整的肌节结构, 附近线粒体大量增生, 近圆形, 水肿, 在损伤的肌原纤维周围肌浆网消失^[20]。本研究中, 在安静状态下, 骨骼肌线粒体均匀的、成对的排列在Z线两侧, 肌膜下少见。但在运动后呈现出Z线两侧的线粒体数目减少, 而肌膜下线粒体大量积聚的现象, 尤其在运动后12 h, 几乎看不到完整的Z线片段, 积聚在肌膜下的线粒体数量增多。于滢^[21]在本研究的基础上进一步统计肌膜下和肌原纤维间线粒体的面积和数目的变化, 分析得到运动后各时间点肌膜下线粒体的面积较安静对照组均显著增加, 而肌原纤维间线粒体的面积没有明显变化; 运动后不同时间点肌膜下线粒体的数目较安静对照组均有不同程度的增加, 相反, 肌原纤维间线粒体的数目均显著降低。

众所周知, 线粒体是真核细胞的“动力站”, 常常分布在能耗和氧耗需求量较高的部位^[22]。一次大强度运动导致骨骼肌肌膜下线粒体面积和数目明显增多, 而肌原纤维间线粒体数目则明显减少。线粒体数目的显著变化, 提示线

粒体产生了移动。线粒体移动的诱因来自于运动过程中细胞对能量和氧的需求量增多。推测一次大强度运动过程中, 位于细胞核周内质网上的核糖体需合成蛋白质参与肌肉收缩活动, 更需线粒体提供大量能量, 致使线粒体由肌原纤维间向肌膜下的细胞核移动, 从而保证供能的即时和充足。

3.2.2 一次大强度运动后微管蛋白对线粒体移动相关蛋白Miro1的调节作用 线粒体在细胞质中的分布和移动与细胞骨架有密切联系, 线粒体是以细胞骨架蛋白为轨道进行运动的, 同时, 驱动蛋白^[23]、动力蛋白^[24]、肌球蛋白等分子马达为线粒体运动提供动力^[2-25]。Miro是线粒体外膜的GTPase 家族成员, 是线粒体移动相关的重要蛋白, 对维持线粒体的分布、形态、结构都具有重要意义。目前的研究发现, 哺乳动物中驱动蛋白的潜在接头蛋白是接头蛋白, 其受体蛋白正是Miro^[26], Miro与接头蛋白形成复合物与驱动蛋白的肌球蛋白重链连接, 调控线粒体沿微管的移动^[27]。

本研究检测了Miro1在运动后不同时间点的蛋白表达变化。实验结果显示, Miro1蛋白表达在运动后6 h和12 h有升高趋势, 并在12 h达到表达峰值, 与其他相关研究报道一致。C57小鼠在中等强度负荷跑台运动中, 运动30 min时Miro1 mRNA及蛋白表达开始增高, 120 min时Miro1 mRNA及蛋白表达与安静对照组相比显著增加^[28]。还有研究认为, Miro可感知细胞变化, 可直接与马达蛋白KIF5结合^[29]。本研究发现, 大负荷强度运动后, Miro1蛋白的过表达提示骨骼肌线粒体移动增加, 线粒体可能通过移动及动态分布的改变对机体能量需求的急剧变化进行早期快速应答。同时, 线粒体移动被认为是线粒体融合与分裂介导的网络结构变化的基础, 从而诱发线粒体的融合或分裂, 进而影响线粒体的能量代谢。值得注意的是, 运动后12 h是一个特别的时间点, α -tubulin、MAP4和Miro1蛋白均在这个时间点出现表达峰值, 而且线粒体损伤最为明显而严重也是出现在运动后12 h。它们在时序上的变化是一致的。提示运动诱导微管的解聚可能对线粒体的分布具有一定的影响。一次大强度运动可能诱导微管蛋白解聚, 同时电镜下观察到线粒体在安静状态下整齐的排列在Z线两侧, 而在运动后12 h, Z线的位置已迷糊不清, 为线粒体提供运动轨道的微管结构发生了破坏, 产生了线粒体分布上的变化。此外, 还观察到, 线粒体自运动后即刻开始向肌膜下运动, 在运动后12 h在肌膜下积聚最为严重。线粒体在分布上的变化可能需要Miro1、接头蛋白以及其他分子马达提供动力, 使得线粒体通过融合-分裂实现重塑。

总之, 一次大负荷运动后, 大鼠骨骼肌微管蛋白通过其结合蛋白的结构损伤, 使微管的二聚体的聚合能力降低, 产生微管的解聚。同时, 微管的解聚导致线粒体相关蛋白Miro1的蛋白过表达, 引发线粒体在分布上的变化, 从而进一步影响线粒体的功能以及线粒体的动态重塑。

致谢: 感谢北京体育大学运动科学学院骨骼肌实验室周越教授、

汪军副教授、刘阳博士、于亮博士等以及科研中心龚丽景博士对本研究的大力帮助,感谢首都体育学院运动科学与健康学院阎守扶教授和王蕴红教授对本研究的大力支持。

作者贡献: 第一作者负责实验设计、实验实施和实验评估, 第一作者成文并对文章负责。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验通过北京体育大学科研中心伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对于研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Guzun R, Varikmaa MK, Granillo MG, et al. Mitochondria-cytoskeleton interaction: Distribution of β -tubulin in cardiomyocytes and HL-1 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1807: 458-469.
- [2] Cai Q, Sheng ZH. Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol*. 2009;218(2): 257-267.
- [3] Maldonado EN, Patnaik J, Mullins MR, et al. Free tubulin modulates mitochondrial membrane potential in cancer cells. *Cancer Res*. 2010;70:10192-10201.
- [4] Otera H, Mihara K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem*. 2011; 149(3): 241-251.
- [5] Hu JY, Chu ZG, Han J, et al. The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells. *Cell Mol Life Sci*. 2010; 67: 321-323.
- [6] Nogales E. Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001; 30: 397-420.
- [7] Wang Zai, Cui Ju, Wong WaiMan, et al. Kif5b controls the localization of myofibril components for their assembly and linkage to the myotendinous junctions. *Development*. 2013; 140: 617-626.
- [8] Fransson Å, Ruusala A, Aspenström P. A typical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem*. 2003; 278: 6495-6502.
- [9] Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, et al. Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol*. 2006;173(4): 545-557.
- [10] Fransson Å, Ruusala A, Aspenström P. The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(2): 500-510.
- [11] Wang X, Winter D, Ashrafi G, et al. PINK1 and parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*. 2011;147(11): 893-906.
- [12] 刘晓然, 李俊平, 王蕴红, 等. 大负荷运动及针刺干预对骨骼肌微管蛋白的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(33): 4949-4956.
- [13] 周丽娟, 韩磊, 李力. 细胞骨架与人滋养细胞迁移关系的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(7): 599-602.
- [14] Boudriau S, Vincent M, Cote CH, et al. Cytoskeletal structure of skeletal muscle: identification of an intricate exosarcomeric microtubule lattice in slow- and fast- twitch muscle fibers. *J histochem & cytochem*. 1993; 41(7): 1013-1021.
- [15] Heins DC. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovas Surg*. 1995; 110(1): 89.
- [16] Sakurai T, Fujita Y, Ohto E, et al. The decrease of the cytoskeleton tubulin follows the decrease of the associating molecular chaperone α B-crystallin in unloaded soleus muscle atrophy without stretch. *FASEB J*. 2005; 19(9):1199-1201.
- [17] 张庆, 张慧琳. MAP4K1 与其接头蛋白的相互作用[J]. *中南大学学报:医学版*, 2015, 40(3): 326-335.
- [18] Cheng GM, Takahashi M, Shunmugavel A, et al. Basis for MAP4dephosphorylation-related microtubule network densification in pressure overload cardiac hypertrophy. *J Bio Chem*. 2010;49(285):38125-38140.
- [19] 褚志刚. 微管相关蛋白4在缺氧心肌细胞线粒体通透性转换孔开放和凋亡中的作用及机制研究[D]. 第三军医大学博士学位论文, 2010.
- [20] 金其贯, 刘霞, 李淑艳, 等. 反复离心运动对大鼠骨骼肌损伤和蛋白质降解机制的影响[J]. *体育科学*, 2010, 30(6): 76-80.
- [21] 于滢. 一次大负荷运动对大鼠骨骼肌线粒体分布和功能影响及针刺干预作用[D]. 北京体育大学博士学位论文, 2015.
- [22] Gamboa JL, Andrade FH. Mitochondrial content and distribution changes specific to mouse diaphragm after chronic normobaric hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 ;298(3):R575-583.
- [23] 于晓伟, 解玉珍, 顾博雅等. 有氧运动调节驱动蛋白改善AD模型皮层线粒体轴突转运[J]. *北京体育大学学报*, 2016, 39(6): 63-68.
- [24] Morlino G, Barreiro O, Baixaui F, et al. Miro-1 links mitochondria and microtubule dynein motors to control lymphocyte migration and polarity. *Mol Cell Biol*. 2014;34(8): 1412-1426.
- [25] Korobova F, Gauvin TJ, Higgs HN. A role for myosin 2 in mammalian mitochondrial fission. *Curr Biol*. 2014;17(24): 409-414.
- [26] Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, et al. Axonal transport of mitochondria requires Milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol*. 2006; 173(4):545-57.
- [27] Leidel CP. Measuring molecular motor forces to probe transport regulation in vivo. 2013;103(3):492-500.
- [28] 刘慧君, 霍克敏, 赵斐, . 线粒体移动相关基因 miro1 在急性运动中的表达特征[J]. *中国运动医学杂志*, 2010 (2): 173-176.
- [29] Macaskill AF, Rinholm JE, Twelvetrees AE, et al. Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron*. 2009;61(4):541-555.