

短链脂肪酸干预老年大鼠肌少症的作用及机制

徐锐¹, 李燕燕², 徐红¹

<https://doi.org/10.12307/2024.512>

投稿日期: 2023-09-14

采用日期: 2023-10-21

修回日期: 2023-11-08

在线日期: 2023-11-18

中图分类号:

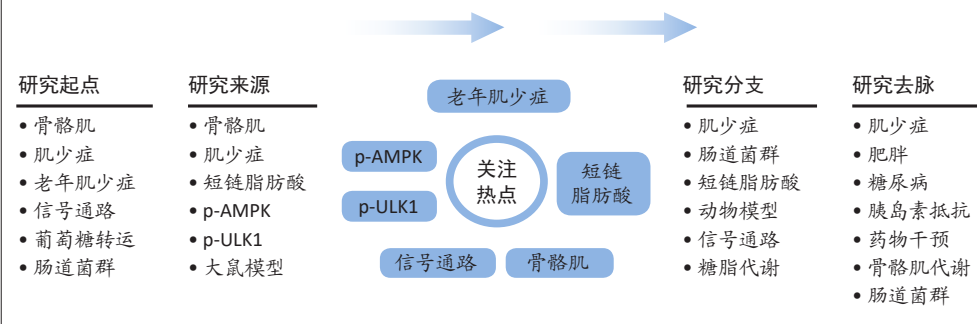
R496; R318; R446

文章编号:

2095-4344(2024)32-05172-05

文献标识码: B

文章快速阅读: 短链脂肪酸调节 AMPK/ULK1 信号通路减少老年肌少症发病



文题释义:

短链脂肪酸: 是一类碳链较短的脂肪酸, 主要由丁酸、乙酸和丙酸组成, 是一种重要的肠道菌群代谢物, 主要通过膳食纤维的发酵产生。它们在人体内具有重要的能量供给和多种生理功能, 包括维持肠道健康、调节免疫功能、降低血脂和调节血糖等作用。最近大量研究显示短链脂肪酸对肌肉的能量代谢、运动功能起到积极的作用。

AMPK: 即AMP依赖的蛋白激酶, 是生物能量代谢调节的关键分子, 为高血压、高脂血症、糖尿病等代谢性疾病的关键通路。它表达于各种代谢相关的器官中, 能被机体各种刺激激活, 包括细胞压力、运动和很多激素及能影响细胞代谢的物质。近期有研究显示短链脂肪酸可通过影响AMPK通路改善肌肉组织的炎症反应和糖脂代谢, 可作为肌少症的一个关键通路分子。

摘要

背景: 研究显示短链脂肪酸是一种潜在的骨骼肌能量代谢调节物, 但具体机制尚不明确。

目的: 探索短链脂肪酸对老年肌少症的作用及可能的相关机制。

方法: 将SD大鼠随机分为对照组、肌少症组、肌少症+短链脂肪酸组, 后2组大鼠采用摘除大鼠卵巢、1周后按体质量5 mg/kg皮下注射地塞米松、连续7 d给药的方案建立老年肌少症大鼠模型; 对照组大鼠打开腹腔找到卵巢但不摘除, 随即缝合腹腔。肌少症+短链脂肪酸组大鼠造模术后给予含有150 mmol/L短链脂肪酸的饮用水(乙酸钠600 mg/kg、丙酸钠200 mg/kg、丁酸钠200 mg/kg), 对照组及肌少症组大鼠给予等量的生理盐水, 1次/d, 连续4周。造模结束后测量大鼠双侧腓肠肌质量和体质量计算腓肠肌指数, 评估造模是否成功。于造模成功后0, 1, 2, 4周测量大鼠的摄食量、体质量及抓力; 苏木精-伊红染色观察腓肠肌形态学改变; Western blot法检测腓肠肌中p-AMPK、p-ULK1蛋白的表达。

结果与结论: 与对照组比较, 肌少症组大鼠摄食量、体质量及抓力均显著降低($P < 0.05$), 腓肠肌的湿质量显著降低($P < 0.05$), 腓肠肌中p-AMPK和p-ULK1蛋白表达均显著降低($P < 0.05$); 与肌少症组相比, 肌少症+短链脂肪酸组大鼠摄食量、体质量、抓力、腓肠肌的湿质量及腓肠肌中p-AMPK和p-ULK1蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。结果提示, 短链脂肪酸可改善老年肌少症的症状, 可能与骨骼肌中AMPK和ULK1蛋白水平增高有关。

关键词: 肌少症; AMPK; ULK1; 短链脂肪酸; 骨骼肌; 糖脂代谢

Effect and mechanism of short-chain fatty acids in aged rats with sarcopenia

Xu Rui¹, Li Yanyan², Xu Hong¹

¹Gerontology Center, ²Department of Cardiac Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Xu Rui, MD candidate, Attending physician, Gerontology Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Xu Hong, MD, Chief physician, Gerontology Center, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that short-chain fatty acids (SCFAs) are a potential regulator of skeletal muscle energy metabolism, but the exact mechanism is unclear.

OBJECTIVE: To observe the effect of SCFAs on aged rats with sarcopenia and to explore the underlying mechanism.

新疆维吾尔自治区人民医院, ¹老年医学中心, ²心脏外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

第一作者: 徐锐, 男, 1986年生, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 汉族, 在读博士, 主治医师, 主要从事老年肌少症、衰弱的基础研究。

通讯作者: 徐红, 博士, 主任医师, 新疆维吾尔自治区人民医院老年医学中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

<https://orcid.org/0000-0002-6264-4536> (徐锐)

基金资助: 新疆自然科学基金 2021 年 (2021D01C163), 项目负责人: 徐锐

引用本文: 徐锐, 李燕燕, 徐红. 短链脂肪酸干预老年大鼠肌少症的作用及机制 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(32):5172-5176.



METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, sarcopenia group, and sarcopenia+SCFAs group (SCFAs group). In the latter two groups, rat models of sarcopenia were established using ovariectomized rats injected with 5 mg/kg dexamethasone for 7 days. In the control group, the abdominal cavity was only exposed but not removed, and then sutured. Rats in the SCFAs group were administered drinking water containing 150 mmol/L short-chain fatty acids, 600 mg/kg sodium acetate, 200 mg/kg sodium propionate, and 200 mg/kg sodium butyrate for 4 weeks. Rats in the control and sarcopenia groups were given the same volume of normal saline. Successful modeling was assessed by measuring the bilateral gastrocnemius muscle mass and body mass to calculate the gastrocnemius index after modeling. Food intake, body mass and grip strength of rats were measured at 0, 1, 2 and 4 weeks after successful modeling; morphological changes of gastrocnemius muscle were observed by hematoxylin-eosin staining; and the expression of p-AMPK and p-ULK1 proteins in gastrocnemius muscle was detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the sarcopenia group showed significantly decreased body mass, food intake, forelimb grip strength ($P < 0.05$), wet mass of gastrocnemius muscle ($P < 0.05$), and protein levels of p-AMPK and p-ULK1 ($P < 0.05$). Compared with the sarcopenia group, the SCFAs group showed a significant increase in food intake, body mass, grip strength, wet mass of gastrocnemius muscle, and protein levels of p-AMPK and p-ULK1 in gastrocnemius muscle ($P < 0.05$). All these findings indicate that SCFAs improve symptoms of sarcopenia in the elderly and may be associated with the upregulation of AMPK and ULK1 proteins in skeletal muscle.

Key words: sarcopenia; AMPK; ULK1; short-chain fatty acids; skeletal muscle; glucolipid metabolism

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2021D01C163 (to XR)

How to cite this article: XU R, LI YY, XU H. Effect and mechanism of short-chain fatty acids in aged rats with sarcopenia. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2024;28(32):5172-5176.

0 引言 Introduction

人类随着增龄逐渐出现骨骼肌力量、质量、功能下降,这种在老年人中普遍存在而又极易被忽视的临床病征被称为老年骨骼肌减少症,简称肌少症。老年肌少症患者活动耐力下降,平衡能力下降,易出现跌倒甚至骨折,严重威胁到老年人的生活质量^[1]。作为重要的肠道菌群代谢物,短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)被证实在骨骼肌稳态平衡的调控中发挥重要作用^[2-4]。短链脂肪酸主要成分为丁酸、乙酸和丙酸,约占90%以上^[5]。丁酸在骨骼肌中被证实具有抗炎特性,包括调节中性粒细胞迁移、减少促炎细胞因子产生、影响NF- κ B通路活性^[6-7];乙酸和丙酸促进骨骼肌胰岛素敏感性,增加葡萄糖利用及摄取,并促进脂肪分解,改善骨骼肌能量代谢^[8-10]。然而短链脂肪酸能否改善老年肌少症的临床症状,目前研究较少。

此项研究通过建立大鼠肌少症模型,给予外源性短链脂肪酸干预,进行为期4周的实验,观察大鼠的摄食量、抓力、体质量变化情况,比较大鼠的双侧腓肠肌质量,测量骨骼肌组织中腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)/失调51样激酶1(uncoordinated 51 like kinase-1, ULK1)蛋白的水平,分析短链脂肪酸对老年肌少症的影响,并从AMPK/ULK1通路的角度探讨其内在机制。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。组间整体比较采用重复测量方差分析,两两比较进行t检验。

1.2 时间及地点 实验于2022年5-10月在新疆医科大学动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6月龄健康雌性SD大鼠20只,体质量(285.5 $\pm$ 35.2)g,由新疆医科大学动物实验中心提供,动物实验许可证号:SYXK(新)2018-0001。大鼠饲养环境:湿度50%-60%,温度20-25℃,昼夜各12h。购买7d后开始实验。研究已通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审批(批准号为KY20220722231)。

1.3.2 主要仪器、试剂及药品 抓力计(型号:47200,意大利UGO);酶标仪(北京凯奥科技发展有限公司);垂直电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司);化学发光成像仪(北京六一生物科技有限公司);双能X射线吸光测定仪(Hologic Inc);p-AMPK和p-ULK1一抗(兔抗鼠,Bioss公司,编号:bs-5575R,bs-3464R),辣根酶标记山羊抗兔IgG(中杉金桥,编号:ZB-2301);BCA蛋白浓度测定试剂盒(Solarbio公司,编号:PC0020)。2%戊巴比妥钠(北京赛博润特科技发展中心,P11011);乙酸钠(索莱宝公司,批准文号A1070);丙酸钠(源叶生物公司,批准文号C1434005);丁酸钠(麦克林公司,批准文号C14314005);氨基甲酸乙脂溶液(上海麦克林生化科技股份有限公司,批准文号C13058926)。

1.4 实验方法

1.4.1 肌少症大鼠造模 采用大鼠卵巢摘除+地塞米松给药法制备肌少症模型^[11]。术前腹腔注射2%戊巴比妥钠2 mL/kg麻醉大鼠。取15只麻醉后大鼠仰卧固定,碘伏消毒腹部后用无菌纱布覆盖。由尾部向头方向第三对乳头偏背侧1 cm打开腹腔,卵巢两端结扎,剪除双侧卵巢,逐层关腹,大鼠自然苏醒后自由进食和饮水。大鼠卵巢摘除7d后腹部皮下注射地塞米松5 mg/kg,连续给药7d。剩余5只大鼠作为对照组,打开腹腔找到卵巢却不摘除,然后缝合腹腔。

肌少症模型构建成功的标准为:腓肠肌指数(双侧腓肠肌质量/体质量)低于对照组2倍SD则判定为造模成功;腓肠肌质量采用双能X射线吸光测定仪器测量^[12]。

1.4.2 实验分组 造模过程中大鼠死亡5只,最终将大鼠分为对照组5只、肌少症组5只、肌少症+短链脂肪酸组5只。肌少症+短链脂肪酸组大鼠给予含有150 mmol/L短链脂肪酸的饮用水(乙酸钠600 mg/kg、丙酸钠200 mg/kg、丁酸钠200 mg/kg)^[13],对照组及肌少症组大鼠给予等量的生理盐水,1次/d,实验时间为4周。

1.4.3 大鼠抓力及体质量测量 造模成功后0,1,2,4周,将实验鼠放置在抓力计上,让其前肢抓住探头,轻轻拉动实验鼠的尾巴,使其用力抓住探头。当实验鼠施加最大力量时,记录抓力计上的读数。进行3次测量,以获得较为稳定的结果。用电子秤测量体质量。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题

造模目的	探索短链脂肪酸对老年肌少症的作用及可能的相关机制
模型与所研究疾病的关系	大鼠卵巢摘除+地塞米松给药建立的肌少症模型，可以模拟人雌激素水平下降后引起的骨质疏松症，导致骨骼肌的代谢水平随之发生变化，出现肌肉质量和功能的减退，与肌少症的特征高度相似
动物品系	雌性 SD 大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供
造模技术描述	大鼠麻醉后仰卧固定，由尾部向头方向第三对乳头偏背侧 1 cm 打开腹腔，结扎卵巢两端，剪除双侧卵巢，逐层关腹。7 d 后大鼠腹部皮下注射地塞米松 5 mg/kg，连续给药 7 d
造模主要诱导用药	地塞米松
动物数量及分组方法	存活的 15 只大鼠分为对照组 5 只、肌少症组 5 只、肌少症+短链脂肪酸组 5 只
造模成功评价指标	腓肠肌指数低于对照组 2 倍 SD 判定为造模成功
造模后实验观察指标	①大鼠摄食量、抓力、体质量；②腓肠肌质量；③骨骼肌形态结构变化；④骨骼肌中 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白的表达
造模后动物处理	实验完成后，麻醉大鼠心脏取血后处死大鼠，取出完整的腓肠肌
伦理委员会批准	研究已通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会审批（批准号为 KY20220722231）

1.4.4 腓肠肌质量及组织形态观察 实验完成后，用 20% 氨基甲酸乙脂溶液 50 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠，心脏取血后将大鼠处死，取出完整的大鼠腓肠肌，测量大鼠双侧腓肠肌质量。取出部分肌肉组织，PBS 清洗干净后，放在体积分数 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h。包埋组织标本、切片并进行苏木精-伊红染色。

1.4.5 Western blot 法检测腓肠肌组织 p-AMPK、p-ULK1 蛋白相对表达量 取适量的大鼠腓肠肌组织用 PBS 清洗 3 次，用剪刀将其剪碎。将肌肉组织加入至 200 μ L 蛋白裂解液中，冰上碾磨、裂解 20 min，提取组织的总蛋白。BVA 法定量组织总蛋白的浓度，取 10 μ L 蛋白样品，加入至 2 $\times$ 聚丙烯酰胺 (SDS) 凝胶加样缓冲液中，煮沸充分变性蛋白，通过电泳法分离蛋白质，再使用电转法把蛋白质转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。将 PVDF 膜浸泡于 5% 脱脂牛奶溶液中，室温下孵育 2 h，完全封闭非特异性的抗原。加入一抗工作液 (TBST 稀释一抗，各抗体均采用 1 : 10 000 浓度稀释)，4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。洗膜后加入辣根酶标记的二抗工作液，4 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。ECL 试剂曝光、显影、定影后，显影在胶片上，凝胶图像分析系统对胶片进行扫描，内参照为 β -actin，对目的蛋白的表达水平进行分析。

1.5 主要观察指标 ①大鼠摄食量、抓力、体质量；②腓肠肌质量；③骨骼肌形态结构变化；④骨骼肌中 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白的表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 26 统计软件进行数据处理，GraphPadPrism 7 作图，结果数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间不同时间点的各指标的整体比较采用重复测量方差分析，组间及不同时间点两两比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章的统计学方法已经新疆医科大学统计学老师审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验共购买 20 只大鼠，造模过程中死亡 5 只，剩余 15 只大鼠分为 3 组，每组以 5 只的数量进

入结果分析。

2.2 肌少症大鼠的确定 结果显示，与对照组相比，肌少症组、肌少症+短链脂肪酸组大鼠腓肠肌指数显著降低 ($P < 0.05$)，而肌少症组与肌少症+短链脂肪酸组之间差异无显著性意义，见表 1。结果证实大鼠肌少症模型造模成功。

表 1 | 各组大鼠腓肠肌质量、腓肠肌指数对比 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 1 | Comparison of gastrocnemius muscle mass and gastrocnemius index of rats among groups

指标	对照组	肌少症组	肌少症+短链脂肪酸组
左侧腓肠肌质量 (g)	1.784 $\pm$ 0.042	1.528 $\pm$ 0.027 ^a	1.522 $\pm$ 0.032 ^a
右侧腓肠肌质量 (g)	1.790 $\pm$ 0.034	1.370 $\pm$ 0.015 ^a	1.356 $\pm$ 0.017 ^a
腓肠肌总质量 (g)	3.574 $\pm$ 0.064	2.898 $\pm$ 0.028 ^a	2.878 $\pm$ 0.045 ^a
体质量 (g)	283.40 $\pm$ 17.79	283.80 $\pm$ 11.91	289.20 $\pm$ 20.09
腓肠肌指数 (%)	1.284 $\pm$ 0.092	1.029 $\pm$ 0.044 ^a	1.011 $\pm$ 0.061 ^a

表注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ 。

2.3 短链脂肪酸对老年肌少症大鼠摄食量、抓力、体质量的影响 结果符合球对称性 ($P > 0.05$)，根据主体内效应检验，时间效应显著 ($P < 0.05$)，组别的主效应显著 ($P < 0.05$)，时间与组别的交互作用显著 ($P < 0.05$)，见表 2。

表 2 | 短链脂肪酸对老年肌少症大鼠摄食量、体质量和抓力的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)
Table 2 | Effects of short-chain fatty acids on food intake, body mass and grip strength in aged rats with sarcopenia

组别	每天摄食量 (g/只)			
	0 周	1 周	2 周	4 周
对照组	22.60 $\pm$ 0.81	25.00 $\pm$ 1.05 ^a	27.20 $\pm$ 0.97 ^{ab}	28.80 $\pm$ 0.74 ^{abc}
肌少症组	21.80 $\pm$ 1.16	20.80 $\pm$ 1.02 ^d	24.20 $\pm$ 0.74 ^{abd}	22.80 $\pm$ 1.24 ^{abcd}
肌少症+短链脂肪酸组	21.60 $\pm$ 1.25	24.40 $\pm$ 1.08 ^{ae}	26.40 $\pm$ 0.51 ^{abe}	27.20 $\pm$ 1.32 ^{bce}

组别	体质量 (g)			
	0 周	1 周	2 周	4 周
对照组	283.4 $\pm$ 17.8	306.4 $\pm$ 13.1 ^a	340.0 $\pm$ 13.7 ^{ab}	357.8 $\pm$ 10.1 ^{abc}
肌少症组	283.8 $\pm$ 11.9	258.4 $\pm$ 15.4 ^{ad}	278.0 $\pm$ 16.5 ^{abd}	300.4 $\pm$ 13.2 ^{abcd}
肌少症+短链脂肪酸组	289.2 $\pm$ 20.1	307.8 $\pm$ 13.3 ^{ae}	330.4 $\pm$ 15.5 ^e	352.4 $\pm$ 17.6 ^e

组别	抓力 (g)			
	0 周	1 周	2 周	4 周
对照组	307.8 $\pm$ 22.4	327.6 $\pm$ 14.6 ^a	336.0 $\pm$ 12.0 ^{ab}	349.0 $\pm$ 12.7 ^{abc}
肌少症组	298.0 $\pm$ 13.2	271.1 $\pm$ 17.2 ^{ad}	284.0 $\pm$ 14.2 ^{abd}	296.0 $\pm$ 18.9 ^{abcd}
肌少症+短链脂肪酸组	297.4 $\pm$ 24.2	324.4 $\pm$ 13.1 ^{ae}	337.0 $\pm$ 15.6 ^{abe}	358.2 $\pm$ 10.8 ^{bce}

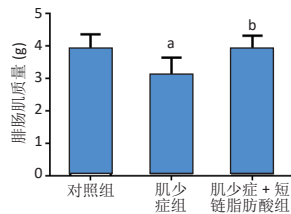
表注：组内与 0 周比较，^a $P < 0.05$ ；组内与 1 周比较，^b $P < 0.05$ ；组内与 2 周比较，^c $P < 0.05$ ；同一时间点与对照组比较，^d $P < 0.05$ ；同一时间点与肌少症组比较，^e $P < 0.05$ 。

2.3.1 组间比较 在第 1, 2, 4 周对照组、肌少症+短链脂肪酸组大鼠的摄食量、体质量及抓力均高于肌少症组 ($P < 0.05$)，而对照组与肌少症+短链脂肪酸组相比差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.3.2 组内比较 对照组、肌少症+短链脂肪酸组大鼠的摄食量、体质量及抓力各时间点依次增加 ($P < 0.05$)。肌少症组摄食量第 2 周高于其他时间点 ($P < 0.05$)，各时间点体质量由高至低依次为：4 周 $>$ 0 周 $>$ 2 周 $>$ 1 周 ($P < 0.05$)，抓力 0 周最大，4 周 $>$ 2 周 $>$ 1 周 ($P < 0.05$)。

2.4 短链脂肪酸对老年肌少症大鼠腓肠肌质量的影响 对照组、肌少症组和肌少症+短链脂肪酸组大鼠腓肠肌质量分别

为 (3.902 ± 0.205) g、 (3.108 ± 0.237) g 和 (3.880 ± 0.197) g。与对照组比较, 肌少症组大鼠腓肠肌的质量显著降低 ($P < 0.05$), 与肌少症组比较, 肌少症 + 短链脂肪酸组大鼠腓肠肌的质量显著性增加 ($P < 0.05$), 与对照组比较, 肌少症 + 短链脂肪酸组大鼠腓肠肌的质量无明显改变 ($P > 0.05$), 见图 1。

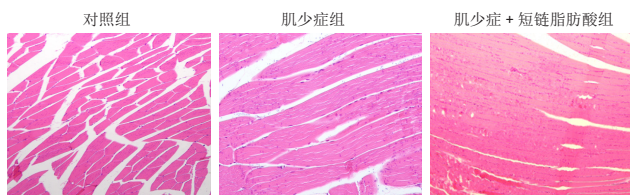


图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与肌少症组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 1 | 各组大鼠腓肠肌质量

Figure 1 | Gastrocnemius muscle mass of rats in each group

2.5 短链脂肪酸对老年肌少症大鼠骨骼肌形态结构的影响 对照组大鼠的腓肠肌细胞排列规则整齐, 无明显萎缩的肌细胞, 未见肌细胞的水肿、肌纤维的断裂和坏死; 肌少症组大鼠的腓肠肌细胞排列紊乱, 可发现明显萎缩的肌细胞, 细胞水肿明显, 可见大量的炎性细胞浸润, 少量肌细胞自溶和破裂现象; 肌少症 + 短链脂肪酸组大鼠的腓肠肌细胞较肌少症组排列较整齐, 肌细胞的萎缩和水肿明显减轻, 炎性细胞的浸润明显减少, 见图 2。

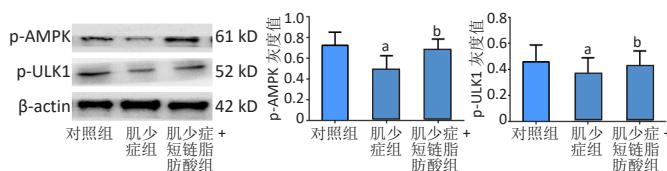


图注: 肌少症组可见腓肠肌细胞排列紊乱, 肌细胞明显萎缩、水肿明显, 炎性细胞浸润; 肌少症 + 短链脂肪酸组可见腓肠肌细胞排列较整齐, 肌细胞的萎缩和水肿明显减轻, 炎性细胞的浸润明显减少。

图 2 | 各组大鼠骨骼肌形态结构 (苏木精 - 伊红染色, $\times 20$)

Figure 2 | Pathological changes of rat skeletal muscle tissue in each group (hematoxylin-eosin staining, $\times 20$)

2.6 短链脂肪酸对老年肌少症大鼠骨骼肌中 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白表达的影响 对照组、肌少症组、肌少症 + 短链脂肪酸组 p-AMPK 的相对灰度值分别为 0.72 ± 0.13 , 0.49 ± 0.13 , 0.68 ± 0.15 ; p-ULK1 在 3 组的灰度值分别为 0.45 ± 0.13 , 0.37 ± 0.12 , 0.43 ± 0.11 。与对照组比较, 肌少症组大鼠 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白相对表达量明显降低 ($P < 0.05$); 与肌少症组比较, 肌少症 + 短链脂肪酸组大鼠腓肠肌组织中 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白相对表达量增高 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 肌少症 + 短链脂肪酸组大鼠腓肠肌的 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白相对表达量无明显改变 ($P > 0.05$), 见图 3。



图注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与肌少症组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 3 | 各组大鼠腓肠肌 p-AMPK、p-ULK1 的蛋白表达

Figure 3 | The expression of p-AMPK and p-ULK1 proteins in rat gastrocnemius muscle tissue in each group

3 讨论 Discussion

肠道菌群及其代谢物参与机体的许多生理和病理过程, 在老年肌少症的发生和发展进程中也发挥着重要的作用^[14-16]。短链脂肪酸作为一种重要的肠道菌群代谢终产物, 具有较强的生物活性。有研究显示短链脂肪酸可完全或部分改善 C57Bl/6 雌性小鼠肌肉的萎缩、增加肌纤维横截面积、防止肌肉脂肪堆积^[17]。另有研究显示短链脂肪酸在调节骨骼肌能量和基质代谢方面具有关键作用^[2, 18-19]。但短链脂肪酸对老年肌少症患者骨骼肌影响研究相对较少, 故此次研究构建肌少症大鼠模型, 观察短链脂肪酸对老年肌少症大鼠的影响, 为进一步探究防治老年肌少症提供一定的理论基础。

此次研究结果显示, 与对照组比较, 肌少症组大鼠摄食量、体质量及抓力明显降低, 大鼠的腓肠肌质量也明显降低; 与肌少症组大鼠相比, 肌少症 + 短链脂肪酸组大鼠的摄食量、体质量及抓力有所改善, 大鼠的腓肠肌质量有明显增加; 组内比较肌少症 + 短链脂肪酸组随着时间的延长, 大鼠的摄食量、体质量及抓力明显增加, 而肌少症组组内大鼠的摄食量、体质量、抓力随着时间延长无明显增加, 甚至出现倒退现象, 考虑可能与肌少症大鼠糖脂代谢紊乱、食欲减退、活动能力下降有关; 肌少症组相对于其他 2 组, 腓肠肌肌纤维排列紊乱, 肌纤维轻度萎缩、少量自溶, 纤维束膜轻度破裂, 肌纤维间少量淋巴细胞浸润。此次实验提示短链脂肪酸处理明显增加了老年肌少症大鼠的摄食量、抓力、腓肠肌的湿质量, 减轻了肌细胞的萎缩和水肿以及炎性细胞的浸润、明显改善了肌细胞的形态结构, 这些结果表明外源性短链脂肪酸也对老年肌少症具有抑制作用。

AMPK 是一个关键的能量感受器, 参与自噬、凋亡和蛋白合成等多种病理生理机制, 被认为是调节骨骼肌代谢的重要因素。AMPK 通过磷酸化 ULK1 的 Ser317 和 Ser777 位点, 激活 ULK1, 直接促进自噬^[20]。ULK1 是酵母自噬相关基因 ATG1 的同源物。活化的 AMPK 还可以抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白以降低 ULK1 Ser757 位点的磷酸化, AMPK 进而磷酸化 Ser317 上的 ULK1, 最终诱导自噬^[21]。AMPK/ULK1 信号通路是关键自噬通路。有研究显示自噬与肌少症发病、发展具有相关^[22-24]。国内学者发现短链脂肪酸可能通过激活 AMPK 并上调轴抑制因子 1 (Axisinhibitor, Axin1) 和 T 淋巴瘤侵袭转移诱导因子 1 (T lymphoma invasion and metastasis inducing factor1, Tiam1) 的蛋白表达促进骨骼肌葡萄糖摄取, 同时可抑制骨骼肌炎症分子的表达, 减轻胰岛素抵抗所致的慢性炎症^[25]。张春雪等^[26]发现短链脂肪酸可通过激活 G 蛋白偶联受体 43 (GPR43) 上调 AMPK 通路减少小鼠胰腺 β 细胞凋亡, 改善 1 型糖尿病胰岛素抵抗。有研究显示胰岛素抵抗可以促进肌少症发生, 目前存在肥胖型肌少症、糖尿病型肌少症^[27-29]。由此推断短链脂肪酸可能通过影响 GPR43 上调 AMPK 通路改善胰岛素抵抗进一步改善肌少症。另一项研究显示短链脂肪酸可通过改变 AMPK 通路降低过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARγ) 改善小鼠脂质代谢从而减少肥胖的发

生^[30],提示短链脂肪酸可能通过 AMPK 通路影响骨骼肌的脂质代谢。但目前关于短链脂肪酸调节老年肌少症 AMPK/ULK1 信号通路的研究还未见报道。此次研究发现,与对照组比较,肌少症组大鼠 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白明显减低,而肌少症+短链脂肪酸组 p-AMPK 和 p-ULK1 蛋白水平较肌少症组有所上升;显示老年肌少症模型组 AMPK/ULK1 的磷酸化水平被抑制,短链脂肪酸可以上调 AMPK/ULK1 的磷酸化水平,减少肌少症的发生。

综上所述,短链脂肪酸可抑制老年肌少症的发生,其机制可能与上调骨骼肌中 AMPK/ULK1 的磷酸化水平、激活 AMPK/ULK1 信号通路有关。短链脂肪酸靶向调控 AMPK/ULK1 通路可能为肌少症的防治策略提供新的方向。但此次研究仍存在一定的局限性:①实验动物数量较少,后期大鼠死亡数较多,进一步影响样本量;②未建立体外模型进一步验证结论;③仅发现 AMPK/ULK1 增高,只能得出短链脂肪酸可能与 AMPK/ULK1 通路有关,但无法确定是否因为短链脂肪酸靶向调控所致通路水平改变,即无法做出因果关系判断。未来将在体内外对 AMPK/ULK1 通路进行干预,进一步验证短链脂肪酸是否可以通过靶向调控 AMPK/ULK1 通路对骨骼肌产生作用。

作者贡献:徐锐负责课题设计、文章撰写、动物和组织学实验的操作、质控及统计学分析,李燕燕负责动物实验、组织学实验的操作,徐红对总体实验操作及文章撰写进行质控。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”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。

版权转让:文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范:文章撰写遵守了《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 刘盼,李耘,马丽娜.《初级保健机构中衰弱筛查和管理:国际衰弱和肌肉减少症研究会议工作组指南》解读[J].中国全科医学,2021,24(25):3141-3147.
- [2] FRAMPTON J, MURPHY KG, FROST G, et al. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab*. 2020;2(9):840-848.
- [3] OTSUKA R, ZHANG S, FURUYA K, et al. Association between short-chain fatty acid intake and development of muscle strength loss among community-dwelling older Japanese adults. *Exp Gerontol*. 2023;173:112080.
- [4] RIOS-MORALES M, VIEIRA-LARA MA, HOMAN E, et al. Butyrate oxidation attenuates the butyrate-induced improvement of insulin sensitivity in myotubes. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2022;1868(11):166476.
- [5] IKEDA T, NISHIDA A, YAMANO M, et al. Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases. *Pharmacol Ther*. 2022;239:108273.
- [6] SALVI PS, COWLES RA. Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease. *Cells*. 2021;10(7):1775.

- [7] ALI I, LI C, KUANG M, et al. Nrf2 Activation and NF- κ B & caspase/bax signaling inhibition by sodium butyrate alleviates LPS-induced cell injury in bovine mammary epithelial cells. *Mol Immunol*. 2022;148:54-67.
- [8] HU Q, CUI H, MA C, et al. Lipidomic metabolism associated with acetic acid priming-induced salt tolerance in *Carex rigescens*. *Plant Physiol Biochem*. 2021;167:665-677.
- [9] ZHAO ZH, WANG ZX, ZHOU D, et al. Sodium Butyrate Supplementation Inhibits Hepatic Steatosis by Stimulating Liver Kinase B1 and Insulin-Induced Gene. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(3):857-871.
- [10] CHENG L, SHI L, HE C, et al. Rutin-activated adipose tissue thermogenesis is correlated with increased intestinal short-chain fatty acid levels. *Phytother Res*. 2022;36(6):2495-2510.
- [11] 李聪,高泽林,方碧青,等.肌少症动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2021,29(1):85-90.
- [12] EDSTROM E, ULFHAKE B. Sarcopenia is not due to lack of regenerative drive in senescent skeletal muscle. *Aging Cell*. 2005;4(2):65-77.
- [13] 向小琴,张婷婷,钟江珊,等.短链脂肪酸对脂多糖诱导的大鼠急性呼吸窘迫综合征的影响及其作用机制[J].解放军医学杂志,2022,47(6):561-568.
- [14] TOMCZYK-WARUNEK A, DUBIEL A, POLESZAK E, et al. Disorders of the intestinal flora and its effect on skeletal system diseases. *Wiad Lek*. 2020;73(9 cz. 1):1835-1839.
- [15] PROKOPIDIS K, CHAMBERS E, NI LOCHLAINN M, et al. Mechanisms Linking the Gut-Muscle Axis With Muscle Protein Metabolism and Anabolic Resistance: Implications for Older Adults at Risk of Sarcopenia. *Front Physiol*. 2021;12:770455.
- [16] LAHIRI S, KIM H, GARCIA-PEREZ I, et al. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med*. 2019;11(502):eaan5662.
- [17] 吕晓婷,洪宇桁,牛文彦.短链脂肪酸对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞 AMPK 的作用研究[J].天津医科大学学报,2019,25(1):1-4.
- [18] CHEN F, LI Q, CHEN Y, et al. Association of the gut microbiota and fecal short-chain fatty acids with skeletal muscle mass and strength in children. *FASEB J*. 2022;36(1):e22109.
- [19] LV WQ, LIN X, SHEN H, et al. Human gut microbiome impacts skeletal muscle mass via gut microbial synthesis of the short-chain fatty acid butyrate among healthy menopausal women. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021;12(6):1860-1870.
- [20] CHEN GQ, GONG RH, YANG DJ, et al. Halofuginone dually regulates autophagic flux through nutrient-sensing pathways in colorectal cancer. *Cell Death Dis*. 2017;8(5):e2789.
- [21] WANG W, JIANG J, HUANG Y, et al. Aconitine induces autophagy via activating oxidative DNA damage-mediated AMPK/ULK1 signaling pathway in H9c2 cells. *J Ethnopharmacol*. 2022;282:114631.
- [22] ZENG Z, LIANG J, WU L, et al. Exercise-Induced Autophagy Suppresses Sarcopenia Through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a Signal Pathways and AMPK-Mediated Mitochondrial Quality Control. *Front Physiol*. 2020;11:583478.
- [23] WIEDMER P, JUNG T, CASTRO JP, et al. Sarcopenia- Molecular mechanisms and open questions. *Ageing Res Rev*. 2021;65:101200.
- [24] JIAO J, DEMONTIS F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;34:1-6.
- [25] 邓邦利.钙信号和短链脂肪酸调节糖代谢机制研究[D].天津:天津医科大学,2018.
- [26] 张春雪,王晨菲,靳瑾.短链脂肪酸通过激活 GPR43 上调 AMPK 信号通路抑制小鼠胰岛 β 细胞凋亡[J].国际检验医学杂志,2023,44(9):1110-1115+1120.
- [27] GIHA HA, ALAMIN O, SATER MS. Diabetic sarcopenia: metabolic and molecular appraisal. *Acta Diabetol*. 2022;59(8):989-1000.
- [28] TAN Y, LIU X, YANG Y, et al. Metabolomics analysis reveals serum biomarkers in patients with diabetic sarcopenia. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1119782.
- [29] KALINKOVICH A, LIVSHITS G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev*. 2017;35:200-221.
- [30] DEN BESTEN G, BLEEKER A, GERDING A, et al. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes*. 2015;64(7):2398-2408.

(责任编辑: LCH, WZH, ZN, WL)