

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.03.004

模拟外湿环境探讨外湿对正常及类风湿关节炎大鼠线粒体自噬的影响 *

宋雨萱 王佳丽 郑智礼 魏伟莉 张卫平 封 婷 钟相根[△]

(北京中医药大学中医学院 北京 100029)

摘要 目的:观察外湿干预下,正常及胶原诱导性类风湿关节炎(CIA)大鼠骨骼肌线粒体自噬水平的变化,研究外湿对线粒体自噬的影响。**方法:**将 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:正常大鼠组(Con 组)、湿邪干预正常大鼠组(Damp 组)、CIA 大鼠组(CIA 组)、湿邪干预 CIA 大鼠组(CIA+Damp 组)。采用二次免疫法建立牛 II 型胶原乳化剂诱导性关节炎模型,自造模次日起,将 Damp 组和 CIA+Damp 组大鼠置于人工气候箱内进行湿邪干预。60 d 后取骨骼肌组织,透射电镜观察线粒体形态,ELISA 法检测骨骼肌三磷酸腺苷(ATP)和反应性氧簇(ROS)含量,RT-PCR 和 Western blot 检测骨骼肌组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、微管相关蛋白轻链 3B(LC3B)、线粒体外膜转位酶 20(TOMM20)的 mRNA 表达量,过氧化物酶体增殖激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)的表达,并计算 LC3-II/LC3-I 比值。**结果:**随着湿邪干预天数增加,与 Con 组相比,各组大鼠关节指数均上升。Damp 组关节骨质破坏较轻;线粒体轻微变形;骨骼肌 ATP 含量减少,ROS 含量上升;在 mRNA 水平上,AMPK、LC3B 表达升高,TOMM20 表达降低;在蛋白水平上,PGC-1 α 、TOMM20 表达下调,LC3-II/LC3-I 比值上升。与 CIA 组相比,CIA+Damp 组关节指数上升,关节骨质破坏加重;线粒体数量增多、形态损伤严重;骨骼肌 ATP 含量减少,ROS 含量上升;在 mRNA 水平上,AMPK、LC3B 的 mRNA 表达降低,TOMM20 的 mRNA 表达升高;在蛋白水平上,PGC-1 α 表达下调,TOMM20 表达升高,LC3-II/LC3-I 比值上升。**结论:**外湿会引起细胞中的线粒体损伤,导致正常大鼠线粒体自噬代偿性上升,CIA 大鼠线粒体自噬障碍、损伤线粒体堆积。

关键词:外湿干预;类风湿关节炎;痹证;线粒体自噬

中图分类号:R-33;R593.22;R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)03-417-06

The Effect of External Humidity on Mitochondrial Autophagy in Normal and Rheumatoid Arthritis Rats - Discussed by Simulating the External Wet Environment*

SONG Yu-xuan, WANG Jia-li, ZHENG Zhi-li, WEI Wei-li, ZHANG Wei-ping, FENG Ting, ZHONG Xiang-gen[△]

(School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China)

ABSTRACT Objective: To observe the changes of mitophagy level in skeletal muscle of normal and collagen-induced rheumatoid arthritis (CIA) rats under external wetness intervention, and to study the effects of external wetness on mitochondrial autophagy. **Methods:** Twenty-four SPF male SD rats were divided into 4 groups randomly: normal rat group (Con group), damp pathogen intervention normal rat group (Damp group), CIA rat group (CIA group), damp pathogen intervention CIA rat group (CIA+Damp group). The bovine type II collagen emulsifier-induced arthritis model was established by the method of secondary immunization. From the day after the model was established, the rats in Damp group and CIA+Damp group were placed in an artificial climate incubator, carry out dampness intervention. After 60 days, the skeletal muscle tissue was collected, and the morphology of mitochondria was observed by transmission electron microscope. The contents of adenosine triphosphate (ATP) and reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle were detected by ELISA. RT-PCR and western blot detected the expression of AMP-activated protein kinase (AMPK), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3B), translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20) and PGC-1 α in skeletal muscle tissue, and the LC3-II/LC3-I ratio was calculated. **Results:** With the increase of dampness intervention, the joint index of rats in each group was increased compared with the Con group. In the Damp group, the joint bone injuries and the mitochondrial deformation were slight. The ATP levels were decreased, while the ROS levels were rose in the skeletal muscle. In terms of mRNA level, the expression of AMPK and LC3B were increased, while the TOMM20 was decreased. In terms of protein expression levels, TOMM20 and PGC-1 α were decreased, LC3-II/LC3-I ratio was increased. Compared with the CIA group, the joint index of rats in CIA+Damp group increased, the joint bone destruction was aggravated and the morphological deformation were serious. The ATP levels were decreased, while the ROS levels were

* 基金项目:北京中医药新奥基金奖励课题(2019-XAJLJJ-004);北京中医药大学校级科研纵向发展基金课题(2019-ZXFZJJ-024)

作者简介:宋雨萱(1995-),女,硕士研究生,主要研究方向:仲景诊疗学纲要,E-mail: 1018302254@qq.com

[△] 通讯作者:钟相根(1974-),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向:仲景诊疗学纲要,E-mail: zhongxg@bucm.edu.cn

(收稿日期:2022-06-28 接受日期:2022-07-24)

rose in the skeletal muscle. At the mRNA level, the expression of AMPK and LC3B were decreased, the TOMM20 was increased. At the protein level, the PGC-1 α was declined, the TOMM20 was increased, and the ratio of LC3-II/LC3-I was increased. **Conclusion:** The intervention of dampness could cause mitochondrial damage, lead to increasement of compensatory mitochondrial autophagy in normal rats, as well as develop mitochondrial autophagy disorders and damage mitochondrial accumulation in CIA rats.

Key words: Dampness intervention; Rheumatoid arthritis; Arthromyodynia; Mitochondrial autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R593.22; R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)03-417-06

前言

外湿属六淫之一,作为气候性致病因素,是中医病因学的重要内容。新冠疫情的爆发让人们重新认识到气候性致病因素对于疾病发生、发展的重要作用,湿邪作为新冠的重要病因病机^[1]也重新引起大家的关注。湿邪是痹证的重要病因,类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)属于中医痹证范畴。大量研究显示寒冷潮湿的气候变化及潮湿环境会加重类风湿关节炎的病情^[23]。RA可引起继发性肌少症等重要疾病,研究表明类风湿关节炎可引起病人骨骼肌质量下降^[4],出现肌力下降,肌肉功能减退^[5];肌少症与RA患者的骨侵蚀呈正相关性^[6],增加RA患者肢体活动障碍及骨折的发生风险^[7]。因此,探讨外湿对类风湿关节炎、关节肌肉病变的影响,对于类风湿关节炎的临床管理具有重要意义。线粒体自噬是线粒体通过清除已损伤线粒体,维持线粒体功能与稳态的重要途径,与骨骼肌线粒体功能障碍密切相关^[8]。本文主要通过观察骨骼肌线粒体氧化应激水平及自噬关键蛋白表达变化,观察湿邪对骨骼肌线粒体自噬水平的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠,雄性,24只,体质量 180 ± 20 g,动物合格证号:SCXK(京)2019-0010,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。饲养条件:室温 $25\pm 0.5^{\circ}\text{C}$,采用12h/12h循环昼夜光照,自由摄食饮水。动物实验方案已通过北京中医药大学伦理委员会审核。

1.2 仪器与试剂

RXZ-500D智能型人工气候箱(新江南仪器有限公司,容积500L,温度 $0-50^{\circ}\text{C}$,相对湿度50-95%RH);JEM-1011透射电镜(日本电子);Synergy H1型全波长酶标仪(美国Bio Tex公司);电泳仪(Bio-Rad,型号:1658034);PCR仪(Bio-rad,型号:580BR10905);台式高速离心机(Eppendorf,型号:Centrifuge 5418);牛II型胶原(Chondrex,美国);弗式不完全佐剂(Sigma-Aldrich,德国);ATP检测试剂盒(酶标生物,MB-6913A);反应性氧簇(Reactive oxygen species, ROS);检测试剂盒(酶标生物,MB-6608A);RNA提取液(Servicebio, G3013);三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司,10006818);异丙醇(国药集团化学试剂有限公司,80109218);HyPure TM-Molecular Biology Grade Water (HyClone, SH30538.02);Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit (Servicebio, G3330);2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX) (Servicebio, G3320);LC3B抗体、TOMM20抗体、PGC-1 α 抗体(Abcam)。

2 方法

2.1 分组及造模

SPF级SD大鼠,雄性,24只,体质量 (180 ± 20) g,适应性喂养7d后,采用随机数字表法分为正常大鼠组(Con组)、湿邪干预正常大鼠组(Damp组)、类风湿关节炎大鼠组(CIA组)、湿邪干预类风湿关节炎大鼠组(CIA+Damp组),每组6只。关节炎模型制备:CIA组与CIA+Damp组采用二次免疫的方法建立牛II型胶原乳化剂诱导性关节炎模型,将牛II型胶原与不完全弗氏佐剂按1:1的比例充分乳化,得到牛II型胶原乳化剂,浓度为2g/L。在无菌条件下,于大鼠左后足进行皮内注射,每只大鼠注射剂量为0.2mL,一周后使用同样方法等剂量加强免疫1次。

2.2 外湿干预

自造模次日起,将Damp组、CIA+Damp组每日置于人工气候箱内,分别接受湿邪刺激1次,每次持续6-8h。干预条件为常温、常压、相对湿度(RH)为 $(95\pm 4)\%$,连续干预60d。

2.3 标本采集

湿邪干预60d后,所有大鼠禁食不禁水24h,次日腹腔注射10%水合氯醛(0.5mL/100g)麻醉,取左后肢膝关节组织、右下肢股直肌组织。

2.4 指标检测

2.4.1 关节炎指数(AI)评分 肉眼观察大鼠四肢,参考关节炎评分与计数的标准^[9],对大鼠关节炎指数进行积分法评定。采用4分制的评分标准,以0-4分记录。于初次免疫前观察1次,以后每10d观察1次足爪肿胀情况,对足爪炎症进行评分,累积得分即为每只大鼠的关节炎指数。AI评分方法如下:0分,足爪正常,无明显症状;1分,踝关节或脚掌中部有红斑或轻度肿胀;2分,踝关节至脚掌中部有红斑和肿胀;3分,踝关节和足跖关节有红斑和中度肿胀;4分,踝关节至脚有红斑和严重肿胀,或踝关节变形、强直。

2.4.2 病理学检测 分离大鼠左后肢膝关节组织,置于4%多聚甲醛溶液固定24h,随后置于EDTA脱钙液(15%,pH 8.0)脱钙20d,每隔3d换液1次,采用番红固绿染色确定软骨损伤情况。

2.4.3 骨骼肌线粒体电镜观察 取右下肢腓肠肌组织,在 4°C 下切成约 1mm^3 小块后放入锡纸包裹的电镜固定液中,进行透射电镜样品制备,在透射电镜下观察肌原纤维和线粒体形态。

2.4.4 骨骼肌ATP、ROS含量的测定 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),具体步骤按照试剂盒说明书进行。

2.4.5 大鼠骨骼肌线粒体自噬关键基因的mRNA相对表达量检测 采用RT-PCR法检测,每组随机取大鼠右下肢股直肌组

织,充分研末后取上清液,依次加入三氯甲烷、异丙醇等提取总 RNA。取 PCR 管,加入 10 μ L RNA 作为模板逆转录,逆转录程序设置条件 25 $^{\circ}$ C,保温 5 min;42 $^{\circ}$ C,保温 30 min;结束后 85 $^{\circ}$ C 保温 5 s 灭活反转录酶。PCR 扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性

10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共循环 40 次。熔解曲线 65 $^{\circ}$ C $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C,每 15 s 升温 0.3 $^{\circ}$ C。以大鼠 GAPDH 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分别计算骨骼肌中 AMPK、LC3B 的 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence table

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length
GAPDH	Forward Primer:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	Reverse Primer:GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	
LC3B	Forward Primer:TCCGAGAAGACCTTCAAACAGC	233
	Reverse Primer:AAGAAGGCTTGTTAGCATTGAG	
AMPK	Forward Primer:CACTGGATGCACTCAACACAAC	153
	Reverse Primer:TCACTACCTTCCATTCAAAGTCC	
TOMM20	Forward Primer:GGGCTTTCCAAGTTACCTGATT	194
	Reverse Primer:GGTGGTGAAGAGTCTGTTGT	

2.4.6 Western-blot 检测大鼠骨骼肌组织中 PGC-1 α 、LC3 I、LC3 II、TOMM20 的蛋白表达 每组随机选取 5 只大鼠,取大鼠右下肢股直肌组织,提取总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳分离,110 v-60 min,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 PGC-1 α (1:3000)、LC3B (1:2000)、TOMM20 (1:3000)、GAPDH (1:5000)各 4 mL,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 冲洗,加入二抗 (1:5000 稀释),室温摇床 1 h,TBST 冲洗,用曝光机曝光,Image J 进行蛋白条带灰度值分析。

2.5 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件处理数据。计量资料满足正态性和方差齐性并以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验;计量数据不满足正态分布或方差不齐或为等级资料数据,采用非参数统计的多个独立样 Kruskal-Wallis H 检验进行统计分析,组间比较采用 Nemenyi 法检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 外湿对各组大鼠关节炎指数影响

如图 1 所示,与 Con 组相比,各组大鼠关节炎指数均升高;在造模第 30 天后 CIA 组关节指数显著升高 ($P < 0.05$),造模 40 天后 CIA 组关节指数极显著增加 ($P < 0.01$),差异有统计学意义。随着湿邪干预天数增加,Damp 组、CIA+Damp 组大鼠关节炎指数升高。与 Con 组相比,Damp 组关节炎指数上升,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);与 CIA 组相比,CIA+Damp 组关节炎指数上升,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.2 大鼠关节软骨病理组织学变化

大鼠关节软骨番红固绿染色病理组织学变化见图 2。Con 组大鼠关节软骨层次清晰,软骨表面平整,软骨基质着色均匀、颜色较深,软骨细胞数量丰富,排列规则,形态结构正常;Damp 组大鼠关节软骨层次欠清晰,软骨着色度较低,软骨细胞数量丰富,排列较规则,形态结构基本正常;CIA 组大鼠关节软骨细胞层次紊乱,软骨表面凹凸不平,软骨陷窝减少,软骨细胞

数量减少,可见软骨细胞形态改变,部分软骨着色能力重度减弱;CIA+Damp 组大鼠关节软骨层次紊乱,软骨组织红染几乎消失,可见大量关节软骨不着色,软骨基质破坏严重,软骨细胞大量减少,出现无细胞区。

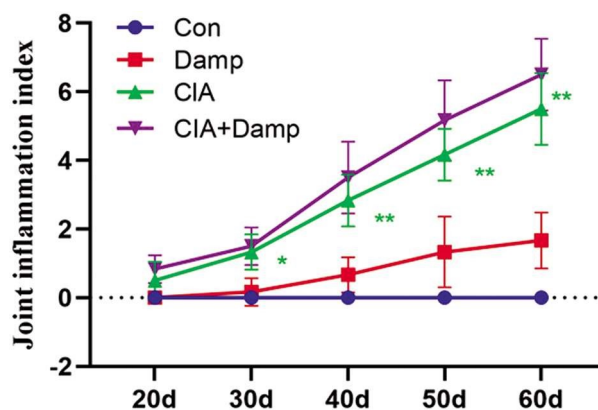


图 1 大鼠关节炎指数评价

注:与 Con 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Fig.1 Rat joint inflammation index evaluation

Note: compared with Con groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3 大鼠骨骼肌线粒体电镜观察

大鼠骨骼肌线粒体结构和骨骼肌线粒体自噬体电镜见图 3。Con 组大鼠骨骼肌肌丝排列整齐,Z 线清晰连续,M 线、明暗带较清晰且区域明确。线粒体数量丰富,颗粒完整,呈卵圆形,外膜完整,内嵴清晰,基质均匀;Damp 组大鼠骨骼肌横纹明暗带差异变化不明显,线粒体数量略减少,个别线粒体肿胀变形、线粒体嵴断裂缺失;CIA 组大鼠骨骼肌线粒体分布不均,部分线粒体变长、肿胀变形、有空泡变性,线粒体膜完整性破坏,部分内嵴断裂不清晰;CIA+Damp 组大鼠骨骼肌肌节排列略紊乱,线粒体数量明显增多,但正常线粒体形态较少,大量肿胀变形的线粒体堆积,线粒体内嵴紊乱断裂。

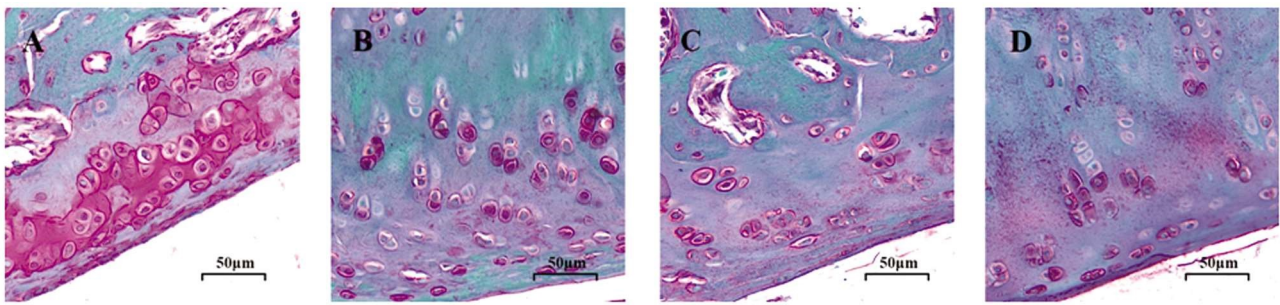


图 2 大鼠膝关节软骨组织病理变化(番红-固绿染色, × 400, 标尺: 50 μm)

Fig. 2 Pathological changes in the cartilage tissue of the knee joint in rats
(Safranin-Fast green staining, × 400, scale bar = 50 μm)

Note: A Con groups, B Damp groups, C CIA groups, D CIA+Damp groups.

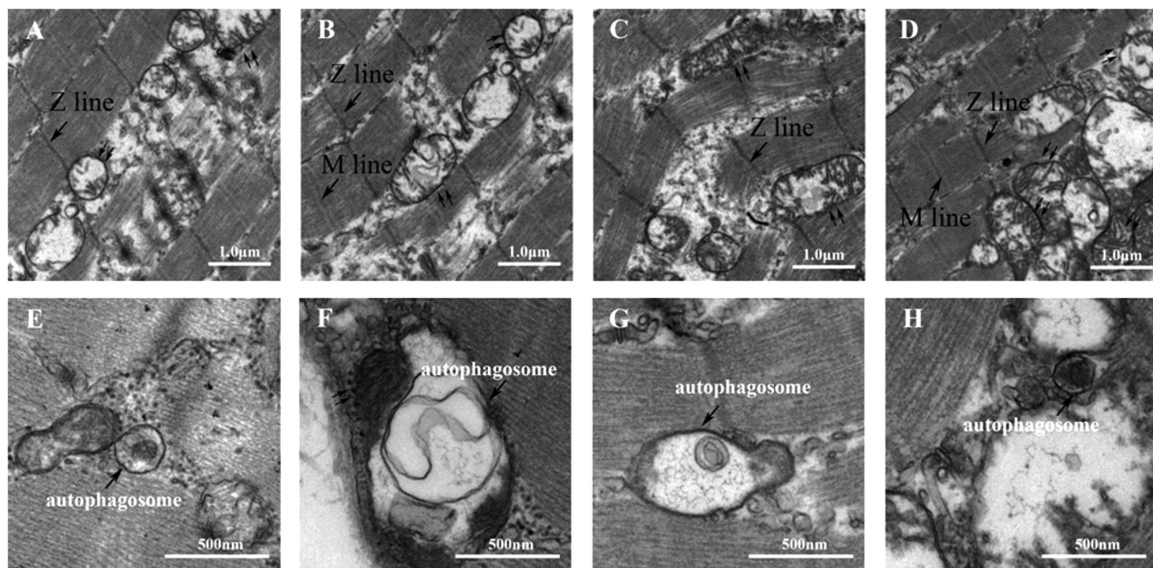


图 3 各组大鼠电镜下骨骼肌线粒体结构(A-D, × 3000, 标尺: 1 μm)和自噬体结构(E-H, × 10000, 标尺: 500 nm)

Fig. 3 Morphological structure of skeletal muscle mitochondria and autophagosomes in the rats of different groups
(A-D, × 3 000, scale bar = 1 μm; × 10 000, scale bar = 500 nm)

Note: A and E: Con groups, B and F: Damp groups, C and G: CIA groups, D and H: CIA+Damp groups; ↑ ↑ (Double arrows): Mitochondria.

3.4 大鼠骨骼肌 ATP、ROS 水平

如图 4 所示:与空白组比较,湿邪干预组大鼠骨骼肌 ATP 含量减少($P<0.01$),ROS 含量上升($P<0.05$),差异有统计学意义。

与 CIA 模型组比较,湿邪干预 CIA 模型组大鼠骨骼肌 ATP 含量减少($P<0.05$),ROS 含量上升($P<0.01$),差异有统计学意义。

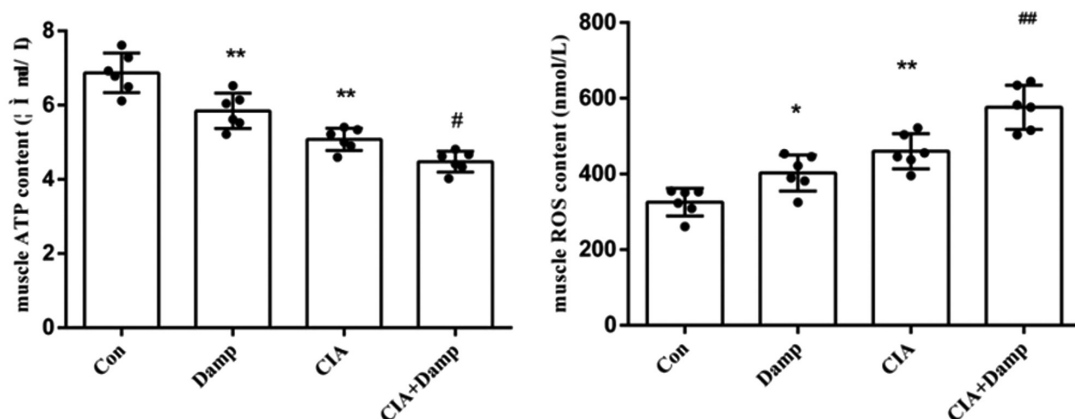


图 4 大鼠骨骼肌 ATP 和 ROS 含量比较($\bar{x} \pm s$, n=6)

Fig. 4 Comparison of ATP and ROS contents of skeletal muscle in rats ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Note: compared with Con groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with CIA groups, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

3.5 大鼠骨骼肌线粒体自噬标志蛋白的 mRNA 相对表达量

由表 2 可见:与 Con 组比较,Damp 组大鼠骨骼肌 LC3B 的 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$),AMPK 的 mRNA 相对表达量升高($P<0.01$),差异有统计学意义;CIA 组大鼠骨骼肌 LC3B 的 mRNA 相对表达量升高($P<0.01$),AMPK 的 mRNA

相对表达量升高($P<0.01$),差异有统计学意义。与 CIA 组比较,CIA+Damp 组大鼠骨骼肌 LC3B 的 mRNA 相对表达量降低($P<0.05$),AMPK 的 mRNA 相对表达量降低($P<0.05$),TOMM20 的 mRNA 表达升高($P<0.01$),差异有统计学意义。

表 2 AMPK、LC3B、TOMM20 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 AMPK, LC3B, TOMM20 Relative expression quantity($\bar{x} \pm s, n=6$)

Groups	AMPK	LC3B	TOMM20
Con	1.01 $\pm$ 0.15	1.01 $\pm$ 0.17	1.02 $\pm$ 0.19
Damp	1.43 $\pm$ 0.26**	1.33 $\pm$ 0.28*	0.88 $\pm$ 0.32
CIA	1.84 $\pm$ 0.25**	1.45 $\pm$ 0.28**	0.88 $\pm$ 0.39
CIA+Damp	1.50 $\pm$ 0.28 [#]	1.14 $\pm$ 0.27 [#]	1.57 $\pm$ 0.40 ^{##}

Note: compared with Con groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with CIA groups, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.

3.6 骨骼肌组织 PGC-1 α 、LC3B、TOMM20 蛋白表达

如图 5 所示,与 Con 组比较,Damp 组大鼠骨骼肌 PGC-1 α 蛋白相对表达量降低($P<0.01$),LC3- II/LC3- I 比值升高($P<0.05$),TOMM20 蛋白相对表达量降低($P<0.05$),差异有统计学意义;CIA 组大鼠骨骼肌 PGC-1 α 蛋白相对表达量降低($P<0.01$),

LC3- II/LC3- I 比值升高($P<0.05$),TOMM20 蛋白相对表达量降低($P<0.01$),差异有统计学意义。与 CIA 组比较,CIA+Damp 组大鼠骨骼肌大鼠骨骼肌 PGC-1 α 蛋白表达降低($P<0.05$),LC3- II/ I 比值降低($P<0.05$),TOMM20 蛋白相对表达量升高($P<0.01$),差异有统计学意义。

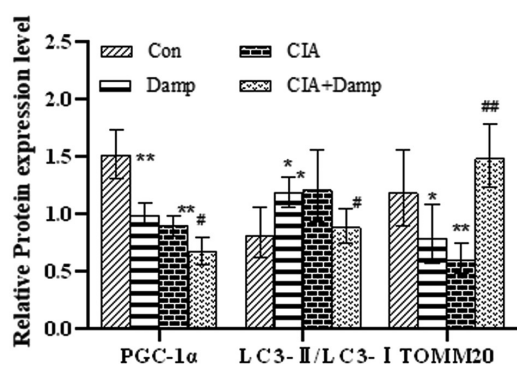
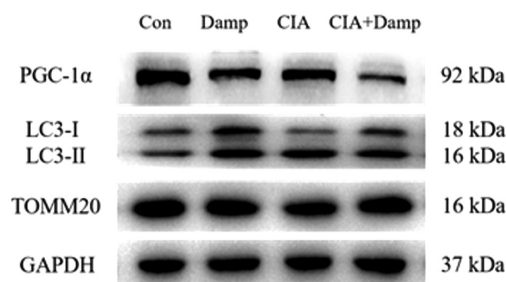


图 5 PGC-1 α 、LC3- II/LC3- I、TOMM20 相对表达水平($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.5 Relative Protein expression levels of PGC-1 α , LC3- II/LC3- I, and TOMM20($\bar{x} \pm s, n=5$)

Note: compared with Con groups, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with CIA groups, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$.



4 讨论

湿邪作为六淫之一,侵袭肌表易导致痹、痿、痿多种以肌肉无力、疼痛、痉挛为主要表现的疾病。线粒体作为细胞执行生物学功能的物质基础,在功能上与中医概念中的气具有高度相似性,是构成人体和维持人体生命活动的物质基础,负载了各种生命现象。线粒体自噬是维持线粒体网络平衡的机制之一,而线粒体自噬这一过程如同气的运动,发挥气的推动、防御、转化作用,为机体提供能量,保护机体不受损伤。研究表明,肌肉活动功能下降引起疲劳、身重、乏力等症状与线粒体功能密切相关^[10]。

ATP 是人体的直接能量来源,而线粒体是氧化代谢产生 ATP 的主要场所。当 ATP 含量下降时,提示线粒体产能功能受损。ROS 是线粒体氧化磷酸化的产物,在线粒体受到外界刺激时,ROS 显著增加,造成线粒体电子传递链解耦连,上调促凋亡

蛋白 Bax,最后使线粒体外膜破裂^[11]。自噬活性不足或降低可导致有害蛋白质聚集体的形成和受损线粒体的积累,从而导致 ROS 增加。PGC-1 α 是细胞内调节能量代谢与线粒体氧化磷酸化的重要转录共激活因子^[12],对维持线粒体结构和功能完整性至关重要^[13]。研究表明 PGC-1 α 可以调节线粒体氧化应激和线粒体功能^[14],PGC-1 α 表达上调提示线粒体生物发生和线粒体功能的增强^[15]。此外有报道显示,PGC1 α 可以缓解了老年小鼠骨骼肌中线粒体自噬和线粒体紊乱的失调^[16]。外湿干预下,正常及 CIA 大鼠股四头肌 ATP 含量下降,ROS 含量上升,PGC-1 α 蛋白表达下降,电镜下可见线粒体结构异常,提示线粒体损伤,功能异常,说明外湿干预会引起正常及 CIA 大鼠骨骼肌线粒体损伤。

线粒体自噬是细胞自噬装置对线粒体的靶向吞噬和破坏,以清除功能失调或多余的线粒体,是线粒体质量控制的主要机制之一^[17]。受损伤的线粒体以类似受体依赖的方式募集胞浆中

的自噬小体包裹,转运到溶酶体进行降解^[18]。LC3B-II能结合自噬小体膜结构,LC3-II含量或LC3-II/LC3-I比值常常作为一种检测细胞自噬的标志物^[19]。LC3B-II与下游自噬相关受体结合,启动自噬过程,因此,LC3B-II表达上调提示自噬体的数量增多。TOMM20是线粒体外膜标志蛋白,其降解情况指示受损线粒体的降解^[20]。本文结果显示,与Con组相比,CIA组与Damp组LC3B的mRNA相对表达量升高,LC3-II/LC3-I比值上调,提示自噬体数量增多;TOMM20蛋白表达量降低提示线粒体降解增多,Con组与Damp组大鼠骨骼肌线粒体自噬水平提高。而CIA+Damp组LC3B的mRNA相对表达量和LC3-II/LC3-I比值与CIA组相比下降,TOMM20的mRNA相对表达量和蛋白表达量均上升,提示CIA+Damp组线粒体自噬受到抑制。在外湿干预下,CIA大鼠的骨骼肌线粒体损伤严重,受损线粒体大量堆积,自噬水平下降。湿邪干预和CIA疾病模型均会造成骨骼肌线粒体损伤,细胞通过代偿性提高线粒体自噬水平,以维持线粒体网络平衡。外湿加重了CIA大鼠的线粒体损伤,而线粒体自噬的代偿保护作用是有限的,增强的线粒体自噬并不能对抗过强或持久应激,因此,与CIA组大鼠相比,CIA+Damp组大鼠线粒体自噬水平下降,线粒体降解受阻。

线粒体自噬受到多种途径调节,Pink1/Parkin、Nix/BNIP3、FUNDC1、AMPK、ULK1、HMGB1等蛋白均可介导线粒体自噬的发生^[21]。AMPK是骨骼肌能量代谢的重要感受器和效应器,对调节能量代谢的与线粒体自噬有重要影响。线粒体自噬机制启动前,线粒体损伤严重,AMPK能够使MFF磷酸化^[22],促使DRP1定位损伤严重的线粒体使其碎裂,然后通过自噬途径降解线粒体^[23]。AMPK可以促进线粒体自噬,及时清除受损的线粒体,维持其代谢平衡^[24]。Laker等研究发现AMPK基因敲除小鼠,运动后线粒体自噬信号明显削弱,证实AMPK促进急性运动后线粒体自噬的发生^[25]。此外,AMPK被AICAR激活后可上调线粒体自噬,清除有缺陷的线粒体从而改善进行性肌营养不良症状,提高肌肉收缩能力^[26]。而且AMPK是提高骨骼肌Pink1/Parkin和Nix线粒体自噬信号的关键因子^[27]。研究表明,运动可以通过AMPK-ULK1通路影响FUNDC1的表达从而诱导骨骼肌线粒体自噬^[28]。本次研究中,与Con组相比,Damp组AMPK mRNA相对表达量上升,提示AMPK被激活,从而线粒体自噬水平上升。与CIA组相比,CIA+Damp组AMPK mRNA相对表达量下降,线粒体自噬水平也下调。AMPK mRNA相对表达量与线粒体自噬表达水平一致。

综上,外湿干预会导致正常大鼠线粒体功能受损,加重CIA大鼠线粒体受损情况。在Con与Damp组中,AMPK mRNA表达量升高,LC3-II/LC3-I比值升高,TOMM20 mRNA表达量和蛋白表达量均降低,提示细胞启动AMPK介导的线粒体自噬以实现能量和物质的代偿。而CIA大鼠在外湿干预下,线粒体损伤严重,线粒体质量调控体系失衡,AMPK激活不足,从而使大鼠骨骼肌线粒体自噬在高水平上下调。本文研究提示外湿是诱导关节、肌肉组织发病的重要病因,从线粒体自噬的角度对外湿致病机制提进行了阐释,为类风湿性关节炎的临床管理与治疗提供了新视角。

参考文献(References)

[1] 支勇,马雷雷,林燕,等.新型冠状病毒肺炎中医病因及辨证研究进

展[J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(02): 213-216

- [2] 祁建华,张会择,杨斐,等.基于《黄帝内经》中“气象医学观”探讨类风湿性关节炎的发病规律[J]. 中医临床研究, 2020, 12(19): 51-53
- [3] 张逢,戴宗顺,林也,等.“风寒湿”外邪影响Th17/Treg失衡促进类风湿关节炎炎症发生的分子机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(11): 1657-1662
- [4] 汪珊,姚寿林,阮圣霆,等.类风湿关节炎患者血清激活素A、鸢尾素水平与疾病活动度、骨密度和骨骼肌质量的相关性研究[J]. 疑难病杂志, 2022, 21(1): 50-54
- [5] 蔡静,徐胜前,童辉,等.肌少症与类风湿关节炎患者病情间的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(9): 1417-1421
- [6] Ngeuleu A, Allali F, Medrere L, et al. Sarcopenia in rheumatoid arthritis: prevalence, influence of disease activity and associated factors[J]. Rheumatol Int, 2017, 37(6): 1015-1020
- [7] Lin JZ, Liang JJ, Ma JD, et al. Myopenia is associated with joint damage in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(2): 355-367
- [8] Mito T, Vincent AE, Faitg J, et al. Mosaic dysfunction of mitophagy in mitochondrial muscle disease[J]. Cell Metab, 2022 (2), 34: 197-208
- [9] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1269-1275
- [10] Cantó-Santos J, Grau-Junyent JM, Garrabou G. The Impact of Mitochondrial Deficiencies in Neuromuscular Diseases [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(10): 964-992
- [11] Pietrosimone KM, Jin M, Poston B, et al. Collagen-induced Arthritis: A Model for Murine Autoimmune Arthritis [J]. Bio Protoc, 2015, 5(20): e1626
- [12] Slavin MB, Memme JM, Oliveira AN, et al. Regulatory networks coordinating mitochondrial quality control in skeletal muscle [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 322(5): 913-926
- [13] Sharma A, Smith HJ, Yao P, et al. Causal roles of mitochondrial dynamics in longevity and healthy aging [J]. EMBO Rep, 2019, 20(12): e48395
- [14] Wang D, Cao L, Zhou X, et al. Mitigation of honokiol on fluoride-induced mitochondrial oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and cognitive deficits through activating AMPK/PGC-1 α /Sirt3[J]. J Hazard Mater, 2022, 437: 129381
- [15] Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(5): 267-284
- [16] Yeo D, Kang C, Gomez-Cabrera MC, et al. Intensified mitophagy in skeletal muscle with aging is downregulated by PGC-1 α overexpression in vivo[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 130: 361-368
- [17] Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance [J]. Curr Biol, 2018, 28(4): 170-185
- [18] Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. Autophagy, 2021, 17: 1-382
- [19] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. EMBO J, 2000, 19(21): 5720-5728

(下转第 493 页)

- using the Charlson index. Findings from the RIETE [J]. J Thromb Thrombolysis, 2020, 51(4): 1017-1025
- [13] Nishimura T, Guyette F X, Naito H, et al. Comparison of direct oral anticoagulant and vitamin K antagonists on outcomes among elderly and nonelderly trauma patients [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2020, 89(3): 514-522
- [14] 李庆勇, 汤宝鹏, 牛锁成, 等. 非维生素K拮抗剂口服抗凝药治疗心房颤动合并急性冠状动脉综合征患者经皮冠状动脉介入治疗后有效性和安全性的荟萃分析 [J]. 中华心律失常学杂志, 2020, 24(4): 366-371
- [15] Ghukasyan R, Donahue T R. Cancer-Related Venous Thromboembolism as a Complication and Negative Prognostic Factor - ScienceDirect[J]. Gastroenterology, 2020, 158(5): 1214-1215
- [16] McCarthy S, Garland J, Wong C X, et al. Coronary artery thromboembolism from left appendage mural thrombus- a rare complication from atrial fibrillation [J]. Forensic Sci Med Pathol, 2021, 17(3): 1-4
- [17] Lang I M, Campean I A, Sadushi-Kolici R, et al. Chronic Thromboembolic Disease and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension[J]. Clin Chest Med, 2021, 42(1): 81-90
- [18] Andreas H, Sebastian S, Alexander N, et al. The personalized antithrombotic management of atrial fibrillation with intermediate thromboembolic risk: a case report [J]. Eur Heart J Case Rep, 2020, 4(5): 1-4
- [19] Yamato H, Osumi S, Yanagisawa D, et al. Mo1254 - Gastrointestinal Bleeding During Direct Oral Anticoagulant Therapy for Atrial Fibrillation in Very Elderly Patients Aged 85 Years and Older[J]. Gastroenterology, 2019, 156(6): 735
- [20] Inokoshi M, Kubota K, Yamaga E, et al. Postoperative bleeding after dental extraction among elderly patients under anticoagulant therapy [J]. Clin Oral Investig, 2020, 25(4): 1-9
- [21] Jsaa B. Bleeding Risk in Elderly Patients Receiving Anticoagulant Therapy: Should Dosage Be Reduced?[J]. Am J Med, 2020, 133(5): 523-524
- [22] Yuen H L A, Williams T J, McGiffin D, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension from synchronous idiopathic upper extremity deep vein thrombosis and pulmonary embolism[J]. Ann Hematol, 2020, 99(3): 667-669
- [23] Steffel J, Verhamme P, Potpara TS, et al. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation [J]. Eur Heart J, 2018, 39(16): 1330-1393
- [24] Wu C C, Wang C L, Lee C H, et al. Novel oral anticoagulant vs. warfarin in elderly atrial fibrillation patients with normal, mid-range, and reduced left ventricular ejection fraction [J]. ESC Heart Fail, 2020, 7(5): 2862-2870
- [25] Gee B, Rpw A, Bc A. Reply to Standard Versus Higher Intensity Anticoagulation for Patients With Mechanical Aortic Valve Replacement and Additional Risk Factors for Thromboembolism[J]. Am J Cardiol, 2022, 168(2): 172-173
- [26] Cohen H, CJ Doré, Clawson S, et al. Rivaroxaban in antiphospholipid syndrome (RAPS) protocol: a prospective, randomized controlled phase II/III clinical trial of rivaroxaban versus warfarin in patients with thrombotic antiphospholipid syndrome, with or without SLE[J]. Lupus, 2021, 24(10): 1087-1094
- [27] Kang F, Ma Y, Cai A, et al. Meta-Analysis Evaluating the Efficacy and Safety of Low-Intensity Warfarin for Patients >65 Years of Age With Non-Valvular Atrial Fibrillation[J]. Am J Cardiol, 2020, 142(2): 74-82
- [28] 李茜, 严思敏, 葛卫红, 等. 不同剂量利伐沙班对非瓣膜性房颤患者血栓栓塞与出血事件影响的研究 [J]. 中南药学, 2021, 19(3): 534-538
- [29] 吴宣, 许雪清, 汪家淑, 等. 不同剂量利伐沙班与华法林对高龄非瓣膜性心房颤动患者的抗凝治疗效果及安全性比较[J]. 中国当代医药, 2021, 28(3): 90-94
- [30] Rowena, Brook, Oranut, et al. Real-World Direct Oral Anticoagulants Experience in Atrial Fibrillation: Falls Risk and Low Dose Anticoagulation are Predictive of both Bleeding and Stroke Risk[J]. Int med J, 2019, 50(11): 1359-1366

(上接第 422 页)

- [20] 赵菲, 徐广, 陈佳意, 等. 阿司咪唑对宫颈癌细胞 HeLa 自噬的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(4): 522-532
- [21] 李凤娇, 顾雯, 俞捷, 等. 线粒体自噬机制、相关疾病及中药对其调节作用的研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2865-2871
- [22] Hung CM, Lombardo PS, Malik N, et al. AMPK/ULK1-mediated phosphorylation of Parkin ACT domain mediates an early step in mitophagy[J]. Sci Adv, 2021, 7(15): 4544
- [23] Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, et al. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress[J]. Science, 2016, 351(6270): 275-281
- [24] 杨鑫宇, 高树新, 贾振伟. AMPK 对线粒体质量的调控作用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(05): 881-887
- [25] Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 548 -560
- [26] Pauly M, Daussin F, Burelle Y, et al. AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm[J]. Am J Pathol, 2012, 181(2): 583-592
- [27] 赵永才. AMPK 在低氧训练干预骨骼肌线粒体更新及微循环变化中的作用[D]. 上海体育学院, 2020
- [28] 于亮, 史霄雨, 刘子铭, 等. 运动时长和强度对大鼠骨骼肌线粒体自噬的影响及其机制[J]. 生理学报, 2020, 72(05): 631-642