

电刺激对过氧化氢诱导衰老肌管细胞能量代谢的影响

苏艳红^{1*}, 毕亮¹, 龚文翰¹, 宋涛², 李婷婷¹, 张世超³

摘要:目的:运用电刺激肌管细胞收缩模拟骨骼肌收缩,并观察其对过氧化氢(H₂O₂)诱导的C₂C₁₂细胞衰老模型能量代谢相关指标表达的影响,以此研究体外肌管收缩对衰老骨骼肌细胞能量代谢影响的分子机制。方法:使用不同浓度的H₂O₂诱导肌管细胞建立衰老模型,并用β-半乳糖苷酶染色检测衰老水平;电刺激干预培育成功的衰老肌细胞,并分为对照组(C组)、H₂O₂诱导衰老组(H组)、对照+电刺激组(CE组)、H₂O₂诱导衰老+电刺激组(HE组)。各组细胞通过Western blot法对PGC-1α蛋白表达进行检测,ATP水平试剂盒测量ATP水平。结果:经过浓度为100 μmol/L H₂O₂诱导肌管细胞24 h后成功构建骨骼肌细胞衰老模型。与C组比较,H组的ATP水平表达呈非常显著性的下降($P < 0.01$);CE组的ATP水平较C组呈非常显著性升高($P < 0.01$);HE组的ATP水平虽低于C组,但高于H组,且呈非常显著性差异($P < 0.01$);与C组相比,H组PGC-1α蛋白表达下降,呈非常显著性差异($P < 0.01$);HE组PGC-1α蛋白表达虽低于C组,但较H组呈非常显著性升高($P < 0.01$)。结论:H₂O₂是诱导骨骼肌肌管细胞衰老的一种有效方式,衰老肌管细胞的ATP和PGC-1α蛋白表达水平显著下降,进行电刺激干预后可以有效提高衰老肌管细胞ATP水平和PGC-1α蛋白表达。

关键词:电刺激;衰老肌管细胞;过氧化氢;能量代谢

中图分类号:G804 文献标志码:A 文章编号:1006-1207(2024)02-0067-06

DOI:10.12064/ssr.2023060601

Effect of Electrical Stimulation on Energy Metabolism of Senescent Myotube Cells Induced by Hydrogen Peroxide

SU Yanhong^{1*}, BI Liang¹, GONG Wenhan¹, SONG Tao², LI Tingting¹, ZHANG Shichao³

(1.College of Physical Education, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2.School of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China; 3. Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective: Muscle tube cell contraction was simulated by electrical stimulation, and its effect on the expression of energy metabolism related indicators in C₂C₁₂ cell aging model induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) was observed, so as to study the molecular mechanism of the effect of muscle tube contraction on energy metabolism of aging skeletal muscle cells in vitro. Methods: The senescence model was established by inducing myotube cells with different concentrations of H₂O₂, and the senescence level was detected by SA-β-galactosidase staining. Electrical stimulation interfered with the successful growth of senescent muscle cells which were divided into control group (group C), H₂O₂-induced group (group H), control + electrical stimulation group (group CE), and H₂O₂-induced + electrical stimulation group (group HE). For cells in each group, PGC-1α protein expression was measured by Western blot and ATP level was measured by ATP level test kit. Results: Myotube cells were treated with 100 μmol/L H₂O₂ for 24 hours, and the aging model of skeletal muscle cells was successfully established. Compared

收稿日期:2023-06-06

基金项目:辽宁省教育厅项目(L2014430);校高端科研成果培育资助项目(203070142207)。

第一作者简介:苏艳红,女,博士,教授,博士生导师。主要研究方向:骨骼肌机能评定。E-mail:suyh0703@163.com。

作者单位:1. 辽宁师范大学 体育学院,辽宁 大连 116029;2. 遵义医科大学 基础医学院,贵州 遵义 563000;

3. 北京体育大学,北京 100084。



with group C, ATP level in group H was significantly decreased ($P < 0.01$); The ATP level in CE group was significantly higher than that in C group ($P < 0.01$). The ATP level in HE group was lower than that in C group, but higher than that in H group, and the difference was very significant ($P < 0.01$). Compared with group C, the expression of PGC-1 α in group H was significantly decreased ($P < 0.01$). Although the expression of PGC-1 α in HE group was lower than that in C group, it was significantly higher than that in H group ($P < 0.01$). Conclusion: H₂O₂ is an effective way to induce senescence of skeletal muscle myotube cells. The protein expression levels of ATP and PGC-1 α in senescent C₂C₁₂ cells decreased significantly. After electrical stimulation intervention, ATP level and PGC-1 α protein expression in senescent C₂C₁₂ cells could be effectively increased.

Keywords: electrical stimulation; C₂C₁₂ muscle tube; H₂O₂; energy metabolism

衰老使机体组织、器官及细胞功能随年龄增长逐渐降低,骨骼肌质量、力量和功能下降,使老年人易跌倒和骨折,造成严重的不良后果,威胁老年人的健康及生活质量^[1]。因此,建立体外衰老骨骼肌细胞模型,并对其进行电刺激干预建立体外骨骼肌收缩模型,对探究运动改善衰老骨骼肌功能的分子生物学机制具有重要的推动意义。

线粒体是细胞有氧呼吸的重要场所,也是负责骨骼肌代谢的关键细胞器,细胞衰老进程中线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 容易受到氧化损伤并引起线粒体功能障碍,导致 ATP 产生减少,进一步增加自由基(Reactive Oxygen Species, ROS),损害细胞稳态及功能。衰老骨骼肌中能够检测到过氧化物酶体增殖受体 γ 共激活因子 1 α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α , PGC-1 α) 蛋白表达降低,说明在衰老进程中线粒体生成减少。研究证实,适度的运动能上调 PGC-1 α 蛋白表达促进线粒体合成及线粒体生物发生,使 ATP 产出水平增加^[2]。电刺激体外衰老骨骼肌细胞引起的肌管收缩,是否也具有相类似的效果需进一步的实验证明。由此,本研究通过过氧化氢(H₂O₂)氧化应激诱导骨骼肌 C₂C₁₂ 细胞衰老建立快速、可靠的衰老骨骼肌细胞模型,为研究体外骨骼肌功能提供研究基础,并通过低强度的电刺激使肌管细胞收缩模拟骨骼肌运动,探讨其对衰老肌管细胞能量代谢的作用,以期探究运动改善骨骼肌衰老提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

CO₂ 孵育箱(Thermo, 细胞培养箱 371), 酶标仪(Spectramax i3), 超净工作台(S-SW-CJ-IFD), 高内涵显微镜(Nikon SMZ18), 电刺激器(RM6240), 低温离心机(HC-3618R), 垂直电泳仪(DYY-6C), 凝胶成像系统(Amersham Imager 600), 单道可调移液器

(P10、P100、P1000), MV-II A 双垂直板式电泳槽(MV-IIA), 快速混匀器(SK-1)。

1.2 主要试剂

马血清(碧云天生物公司, C0251), β -半糖苷酶染色试剂盒(碧云天生物公司, C0602), DMEM 培养基(HyClone), 30% 浓度 H₂O₂(广州生工生物科技有限公司, AMRESKO), 胎牛血清(FBS, 碧云天生物公司, C0257), 胰蛋白酶(碧云天生物公司, C0201), 细胞活力检测试剂盒(碧云天生物公司, C0009), PGC-1 α 抗体(Abcam 公司, Ab54481), ATP 检测试剂盒(碧云天生物公司, S0026)。

1.3 实验细胞及分组

使用骨骼肌 C₂C₁₂ 细胞株(凯基生物公司), 通过 H₂O₂ 诱导分化后的肌管细胞构建衰老骨骼肌细胞模型, 通过电刺激仪进行体外细胞电刺激干预, 分为对照组(C组)、H₂O₂ 诱导衰老组(H组)、对照+电刺激组(CE组)、H₂O₂ 诱导衰老+电刺激组(HE组)。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞复苏

将解冻复苏的 C₂C₁₂ 细胞加入 DMEM 培养基中[含 10% 胎牛血清(FBS)、0.1 mg/mL 青霉素和 0.1 mg/mL 链霉素], 并置于温度为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培育; 用 0.25% 胰蛋白酶将细胞融合度达到 70%~80% 的细胞消化, 并移到 2% 马血清培养基中进行分化, 进行模型建立时用分化 4 d 的肌管细胞。

1.4.2 建立衰老细胞模型

用 DMEM 完全培养液稀释的不同浓度 H₂O₂ (0 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.2 mmol/L, 0.3 mmol/L, 0.4 mmol/L, 0.5 mmol/L, 0.6 mmol/L, 0.7 mmol/L, 0.8 mmol/L, 0.9 mmol/L, 1.0 mmol/L, 1.2 mmol/L, 1.4 mmol/L, 1.6 mmol/L) 加入 96 孔板中, 再分别加



入已分化好的肌管细胞, 干预 2 h 后洗 3 遍, 加 DMEM 完全培养液培养 24 h。

1.4.3 检测 H_2O_2 诱导的衰老肌管细胞模型

SA- β -半乳糖苷酶染色检测: 先吸去 96 孔板中的培养液, 用[1×磷酸缓冲液(PBS)]洗 2 次后吸净 PBS; 加 100 μ L 的 1×固定液室温固定 15 min 后, 1×PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 逐个孔中加 100 μ L 配置好的染色液, 并置于温度为 37℃ 且无 CO_2 条件下孵育(染色时间常为 12~48 h)。

衰老细胞形态观察: 使用高内涵显微镜(Nikon SMZ18)观察不同浓度梯度的 H_2O_2 诱导的骨骼肌肌管细胞结构和形态变化并拍照纪录。

1.4.4 MTT 比色法检测 H_2O_2 诱导的衰老肌管细胞活性

将经过 H_2O_2 干预 2 h 后的肌管细胞, 弃去原液用 DMEM 培养基洗 3 次, 逐个孔中加 100 μ L 的 MTT 检测试剂, 培育 4 h 去上清液, 加 DMSO 充分溶解, 酶标仪 OD 490 nm 处测其吸光值。

1.4.5 电刺激模拟肌管收缩方案

使用电刺激仪(RM6240), 强度设定为 100 μ A、2.5 Hz、20 ms, 时间 20 min。将消毒干净的正负电极放入肌管细胞的培养皿中, 电极穿过培养液接触壁底, 且正负电极分别置于培养皿的两端, 进行电刺激。

1.4.6 ATP 水平表达测定

吸出培养基, 逐个孔中加入 20 μ L 的裂解液, 置于冰上进行裂解细胞后, 4℃ 12 000 g, 离心 5 min, 每孔取 15 μ L 上清。将 100 μ L 稀释的 ATP 检测试剂加入检测孔内, 在室温下静置 3~5 min。每个孔中加 10 μ L 样品, 迅速混匀, 至少间隔 2 s 使用酶标仪检测, 并按比例算最终值。

1.4.7 Western blot 法检测 PGC-1 α 蛋白表达

取 5×10^6 的细胞接种于 100 mm 培养皿, 经处理后提取总蛋白, 用转速 14 000 r/min, 时间 30 min 进行离心, 取上清液并测量体积, 加入 1/4 上清液体积的考马斯亮蓝, 并进行沸水加热 10 min; 依据目标蛋白分子量, 制备 SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%, 电泳完成按顺序夹凝胶和聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜, 恒压 5 V 转膜 50 min; 5% 脱脂牛奶封闭后, 加入一抗摇床孵育 3 h, TBST 摇洗 15 min×3 次, 加二抗摇床孵育 1 h, TBST 摇洗 15 min×3 次, 化学发光液(E-CL)显影, 扫描定量相对灰度值。

1.4.8 显微镜观察细胞状态

高内涵显微镜观察骨骼肌细胞增殖及分化过程

中的细胞结构和形态, 并拍照记录。

1.5 数据处理

使用 SPSS21.0 对数据进行正态性及方差齐性的检验后进行双因素方差分析。将所得结果用平均数±标准差表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 C_2C_{12} 细胞分化过程

从形态学上观察, C_2C_{12} 细胞经过 4 d 的分化培育后, 由呈纺锤形细胞形态(图 1)增殖分化为含多个细胞核的长条形肌管细胞(图 2), 取分化后的肌管细胞进行后续实验。



图 1 C_2C_{12} 细胞增殖情况 (20×)

Figure1 C_2C_{12} skeletal muscle cell proliferation (20×)

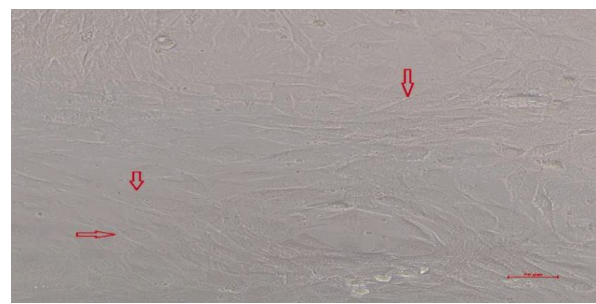
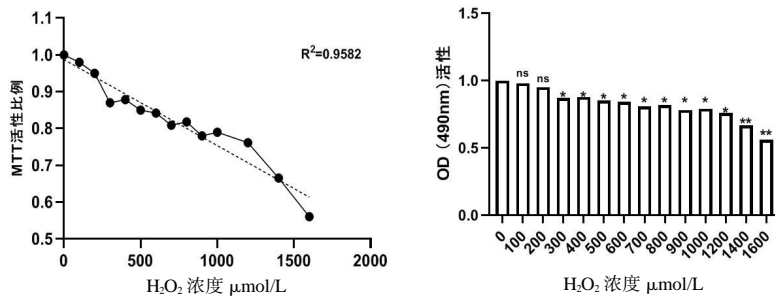


图 2 C_2C_{12} 肌管细胞分化情况 (20×)

Figure2 C_2C_{12} skeletal muscle myotube cells differentiation (20×)

2.2 MTT 检测细胞活性

如图 3 所示, 骨骼肌肌管细胞 MTT 活性比随 H_2O_2 浓度的升高而下降; 当 H_2O_2 浓度 $\leq 200 \mu$ mol/L 时, MTT 活性较 C 组无显著差异($P > 0.05$); 当 H_2O_2 浓度 $> 200 \mu$ mol/L 且 $< 1\ 200 \mu$ mol/L 时, MTT 活性与 C 组相比呈显著性差异($P < 0.05$); 当 H_2O_2 浓度 $\geq 1\ 200 \mu$ mol/L 时, MTT 活性与 C 组比较, 呈非常显著性差异($P < 0.01$)。本实验取 100 μ mol/L 浓度的 H_2O_2 干预细胞建立衰老模型。



注: * 表示与 0 μmol/L 浓度相比, 差异具有显著性意义, $P < 0.05$, ** 表示差异具有极显著性意义, $P < 0.01$; ns 为 no significant, 无显著性差异, $P > 0.05$ 。

图 3 MTT 检测各浓度梯度 H_2O_2 干预骨骼肌肌管细胞的活性

Figure3 MTT was used to detect the activity of myotube cells under various concentrations of H_2O_2

2.3 H_2O_2 诱导衰老结果

经过 β -半乳糖苷酶染色后, H 组细胞胞浆呈青绿色, 染色率达 $(81.82 \pm 0.64)\%$ (图 4、图 5)。图 6 显示 C 组细胞胞浆无青绿色, 且以上两组染色比呈非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

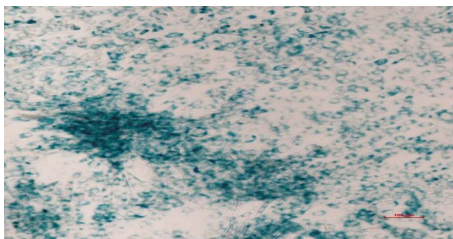


图 4 β -半乳糖苷酶染色 H_2O_2 干预组细胞 (10 \times)

Figure4 The cells of H_2O_2 intervention group were stained with SA- β -galactosidase (10 \times)

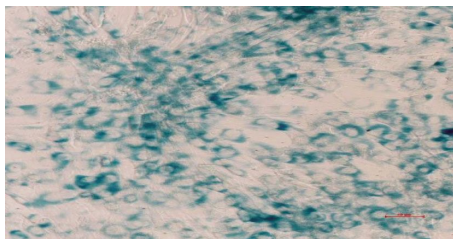


图 5 β -半乳糖苷酶染色 H_2O_2 干预组细胞 (20 \times)

Figure5 The cells of H_2O_2 intervention group were stained with SA- β -galactosidase (20 \times)



图 6 β -半乳糖苷酶染色对照组细胞 (10 \times)

Figure6 Control cells were stained with SA- β -galactosidase (10 \times)

2.4 电刺激干预后细胞 MTT 活性值

经电刺激干预后, 各组骨骼肌肌管细胞活性值与 C 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (图 7)。

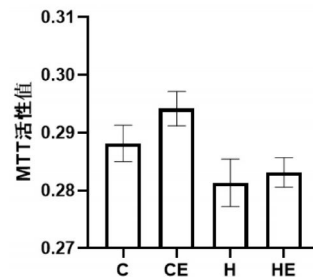
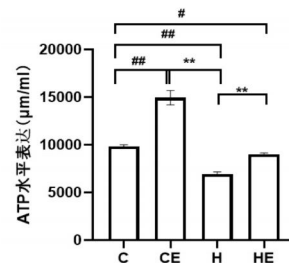


图 7 电刺激后各组细胞 MTT 活性值

Figure7 MTT activity of each group was electrically stimulated

2.5 ATP 水平测定结果

H 组和 C 组相比, 细胞中 ATP 水平表达下降, 且具有非常显著性差异 ($P < 0.01$); 而经电刺激干预后细胞 ATP 水平均有所升高, 其中 CE 组和 C 组比较, 升高情况呈非常显著性差异 ($P < 0.01$); HE 组升高后虽仍然低于 C 组, 但与 H 组比较, 其升高呈非常显著性差异 ($P < 0.01$) (图 8)。



注: # 表示与 C 组相比, 差异具有显著性意义, $P < 0.05$, ## 表示差异具有极显著性意义, $P < 0.01$; * 表示与 H 组相比差异具有显著性意义, $P < 0.05$, ** 表示差异具有极显著性意义, $P < 0.01$ 。

图 8 实验各组 ATP 水平

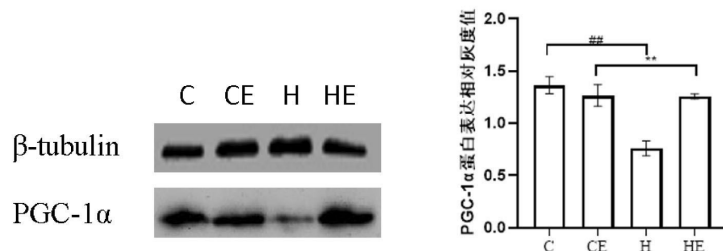
Figure8 Experimental group ATP levels



2.6 PGC-1 α 蛋白表达结果

H 组和 C 组相比,PGC-1 α 蛋白表达下降,呈非常显著性差异 ($P < 0.01$); 经电刺激干预后,HE 组

PGC-1 α 蛋白表达上升情况虽不如 C 组,但与 H 组比较其上升情况呈非常显著性差异 ($P < 0.01$) (图 9)。



注: # 表示与 C 组相比,差异具有极显著意义, $P < 0.01$; ** 表示与 H 组相比,差异具有极显著意义, $P < 0.01$ 。

图 9 各组 PGC-1 α 蛋白表达相对灰度值

Figure 9 Relative gray values of PGC-1 α protein expression in each group

3 讨论

3.1 建立衰老骨骼肌细胞模型

细胞在衰老过程中会出现形状变平, 体积增加等形态结构变化^[3], 而检测细胞衰老最敏感的指标是 β -半乳糖苷酶染色比率的增加^[4], 当出现上述的变化时, 证明细胞出现衰老。目前, 对衰老细胞模型建立的研究显示, 不同来源的细胞建立衰老模型, 需使用不同浓度梯度 H_2O_2 处理。郭淑军等^[5]用 $600 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 H_2O_2 诱导人体内皮细胞, 经过 96 h 后得到衰老细胞模型。有研究使用不同浓度 H_2O_2 诱导 NIH-3T3 细胞建立衰老模型, 当其浓度增加至 $300 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞代谢能力开始出现显著变化, 随着 H_2O_2 的浓度增加, 细胞的代谢能力下降越发明显^[6]。徐舜等^[7]使用 $800 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 H_2O_2 , 经过 2 h 的刺激后培育 5 d, 观察 NIH-3T3 细胞有明显衰老结构特征变化。本研究使用浓度为 2% 的马血清培养基培育 C_2C_{12} 细胞, 发现在其分化 4 d 形成肌管细胞时用浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 干预实验细胞, 细胞活性未出现明显改变, 与他人研究相符, 继续培养上述细胞 24 h 后, 衰老组 β -半乳糖苷酶染色率高且出现衰老细胞的形态结构特征, 证明衰老肌管细胞模型成功构建。

3.2 建立电刺激肌管细胞收缩模拟运动的细胞模型

根据资料显示, 骨骼肌收缩的体外模型根据不同的电刺激模式可以明显诱导肌管收缩和类似运动的效果, 并促进骨骼肌细胞分泌的肌肉因子的表达, 强度不同其效果也不同^[8]。有研究发现, 低频电刺激已被证明可以增加 AMP 依赖蛋白激酶 (AMPK) 活性, 可以理解为增加了骨骼肌细胞的能量代谢^[9]。同

时, 高频电刺激可增加 p70 核糖体 S6 激酶 1 的磷酸化, 具有类似于抗阻训练和增加肌肉肥大的效果。孙景权等^[10]在研究中指出, 当电压为 11.5 V、频率为 1 Hz、脉冲为 2 ms, 持续时间 2~24 h 时, 能够使细胞的骨架重组并伴随细胞的明显收缩, 并且反映线粒体功能的相关指标 (Cyt C、PGC-1 α 以及 IL-6 mRNA) 表达均显著增加, 提示该条件下的电刺激能够有效增强线粒体功能。Burch 等^[11]研究证明, 通过急性高频电刺激、慢性低频电刺激和间歇性的电刺激 C_2C_{12} 细胞后, 急性的电刺激方案并不能诱导 PGC-1 α 表达增加, 而间歇性和慢性电刺激方案分别促进 PGC-1 α 表达 2.4 倍和 2.9 倍。本研究使用的电刺激强度对建立好的细胞模型进行干预, 结果表明在该强度下衰老 C_2C_{12} 肌管细胞明显收缩且未失去细胞活性, 此电刺激方案属于低强度的电刺激模型, 具有类似耐力运动的效果, 证明电刺激衰老肌管细胞收缩模型在该强度下成功建立。然而, 力量训练主要以机械应力为主, 而能量代谢在耐力训练中更加突出, 直接比较体外运动方案与不同类型的在体运动方案是非常困难的, 不同的体外刺激模式和强度会引起不同的细胞反应, 其与相对应的在体运动强度的关系将在未来的研究更进一步探讨。

3.3 电刺激对衰老骨骼肌细胞 ATP 水平表达的影响

线粒体经有氧呼吸产生的 ATP 为机体的生命活动提供源源不断的能量, 也是骨骼肌在运动收缩时的能量来源, 衰老时骨骼肌线粒体功能明显下降。王华等^[12]实验结果显示, 大鼠细胞的结构出现衰老变化, 且功能出现降低时, 衰老细胞线粒体 ATP 表达水平同样降低。Kolesar 等^[13]在研究中发现衰老大



鼠线粒体 DNA 发生突变且 PGC-1 α 蛋白表达下降,线粒体生物合成能力降低使线粒体功能下降,ATP 合成减少。有研究显示,运动能够有效促进线粒体抗氧化酶活性,抑制活性氧(ROS)持续的过度生成,迅速清除氧化损伤和蛋白质聚集体,是促进衰老骨骼肌线粒体功能、ATP 生成的有效方法^[14]。有研究证明,有氧运动能促进机体的抗氧化能力,改善衰老线粒体功能,但衰老是不可逆的,运动训练只能起到延缓的作用^[15]。有研究显示,体育活动可以增加老年人抗氧化应激能力,但急性运动的信号转导可能会随着年龄的增长而受损,其提高 SOD 活性的效果不如年轻人明显,老年人更适合长期适当的运动锻炼,以更好地增加氧化应激抵抗力^[16]。本研究结果显示,当衰老发生时 H 组较 C 组骨骼肌肌管细胞中 ATP 产生水平显著降低。经过电刺激干预后的 HE 组细胞 ATP 水平较 H 组显著上升,但仍然不如 C 组;同时 CE 组细胞 ATP 水平与 C 组相比较升高非常明显。由此可以证明,对细胞进行适当电刺激能有效提升骨骼肌线粒体 ATP 水平,改善衰老细胞线粒体功能,但不能完全逆转由衰老所带来的功能损失。

3.4 电刺激对衰老骨骼肌细胞 PGC-1 α 蛋白表达影响

PGC-1 α 蛋白在调节线粒体生物发生中起关键作用,在不同组织中的自噬、抗炎、抗氧化等功能中也具有广泛生物学效应^[17]。有研究显示,PGC-1 α 蛋白可以通过阻断 NF κ B 和 FoxO₃ 的蛋白活性减弱泛素-蛋白酶体系统对肌肉蛋白的降解,在能量代谢过程中也可与其下游的多种信号分子进行结合并发挥生理功能,对骨骼肌质量控制有关键作用。

研究表明,骨骼肌中的 PGC-1 α 蛋白在长时间运动期间有所增加,并在运动后 24 h 保持上调^[18]。张媛等^[19]对成熟的骨骼肌肌管细胞进行急性电刺激结果显示,PGC-1 α 的转录活性提高,说明电刺激与运动对骨骼肌的影响有相似效果。Russell 等^[20]对受试者进行 2 h 的急性耐力自行车运动后取其股外侧肌进行检测发现 PGC-1 α 蛋白表达立即升高至安静时的 4.8 倍,运动后 1 h 内持续上升至 12 倍,运动后 4 h 逐渐恢复到基础水平。刘奔^[2]的实验证明,随着年龄的增长大鼠骨骼肌线粒体中的 PGC-1 α 蛋白表达会逐渐下降,机体衰老时下降更加明显。以上证据说明,电刺激与运动都可以促进老龄大鼠骨骼肌 PGC-1 α 表达的升高,从而改善机体的能量代谢。本研究发现 H 组与 C 组相比,PGC-1 α 蛋白表达水平下降,且呈极其显著性差异,这与上述几项研究结果保持一致。相

关研究发现,进行终身有氧运动干预直至衰老的大鼠,可以提高骨骼肌中 PGC-1 α 蛋白表达,并通过与上游分子 AMPK 的相互作用诱导自噬发生和抑制细胞过度凋亡,减少蛋白质降解,进而预防或延缓肌肉减少症发病率^[21]。本研究发现经电刺激后 H₂O₂ 干预的衰老细胞中 PGC-1 α 蛋白表达显著提高,与 H₂O₂ 干预的衰老对照组相比存在非常显著性差异,这表明电刺激同运动刺激一样能够有效提升衰老细胞线粒体 PGC-1 α 蛋白的含量,进而促进线粒体生物发生,且本研究中,衰老细胞在进行电刺激后其 ATP 水平和 PGC-1 α 蛋白含量都有所升高也证实了这一点。

4 结论

使用 H₂O₂ 成功构建衰老骨骼肌肌管细胞模型,建立电刺激模拟肌管收缩的体外细胞模型,证明电刺激可以有效提高衰老骨骼肌肌管细胞中 ATP 水平和 PGC-1 α 蛋白表达水平。

参考文献:

- [1] NASCIMENTO C M, INGLES M, SALVADOR-PASCUAL A, et al. Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 132:42-49.
- [2] 刘奔.骨骼肌线粒体 ROS 和 PGC-1 α 在运动改善炎症衰老中的作用[D].北京:北京体育大学,2013.
- [3] 潘长伟,赵峰,郎宏鑫,等.过氧化氢诱导人皮肤成纤维细胞衰老模型的建立[J].*解剖科学进展*,2019,25(2):193-195,199.
- [4] CAI Y S, ZHOU H H, ZHU Y H, et al. Elimination of senescent cells by β -galactosidase-targeted prodrug attenuates inflammation and restores physical function in aged mice[J]. *Cell Research*, 2020, 30:574-589.
- [5] 郭淑军,吴国艺,王海龙,等.诱导型衰老细胞模型的建立及 Klotho 启动子截短型突变体的构建和活性检测[J].*暨南大学学报(自然科学与医学版)*,2017,38(2):143-149.
- [6] 黄厚才,钟荣玲,曹鹏,等.钩藤散对 NIH-3T3 细胞衰老模型增殖与凋亡的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2012,18(3):160-163.
- [7] 徐舜,黄海姣,李南红,等.MicroRNA-33 在过氧化氢诱导 NIH/3 T3 细胞衰老模型中的表达及作用[J].*牡丹江医学院学报*,2015,36(5):1-4.
- [8] MIYATAKE S, BILAN P J, PILLON N J, et al. Contracting C₂C₁₂ myotubes release CCL₂ in an NF- κ B-dependent manner to induce monocyte chemoattraction[J].

(下转第 96 页)



- Relationship between throwing mechanics and elbow valgus in professional baseball pitchers[J]. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 2002, 11(2):151-155.
- [34] POST E G, LAUDNER K G, MCLODA T A, et al. Correlation of shoulder and elbow kinetics with ball velocity in collegiate baseball pitchers[J]. *Journal of Athlete Training*, 2015, 50(6):629-633.
- [35] 马秀杰,韩志磊,梁占锁. 棒球投手投球动作的运动生物力学研究综述[J]. *中国体育科技*, 2010, 46(2):115-122.
- [36] 王祥茂. 影响棒球投手投球速度的关键因素研究[J]. *河北体育学院学报*, 2017, 31(4):92-96.
- [37] 刘卉,于冰. 动作技术的生物力学分析方法[J]. *体育科研*, 2020, 41(5):64-70.
- [38] 刘卉. 上肢鞭打动作技术原理的生物力学研究[J]. *体育科学*, 2004, 24(11):30-36.
- [39] 王星明,陈斌. 我国优秀男子标枪运动员从交叉步到出手技术的转动力学分析[J]. *体育科研*, 2009, 30(2):71-73.
- [40] 刘卉. 三维摄影解析中人体关节角度的计算方法[J]. *北京体育大学学报*, 2004, 27(6):767-769.
- [41] WERNER S L, FLEISIG G S, DILLMAN C J, et al. Biomechanics of the elbow during baseball pitching[J]. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 1993, 17(6):274-278.
- [42] SABICK M B, TORRY M R, KIM Y K, et al. Humeral torque in professional baseball pitchers[J]. *American Journal of Sports Medicine*, 2004, 32(4):892-898.
- [43] SABICK M B, TORRY M R, LAWTON R L, et al. Valgus torque in youth baseball pitchers: A biomechanical study[J]. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 2004, 13(3):349-355.
- [44] AGUINALDO A L, CHAMBERS H. Correlation of throwing mechanics with elbow valgus load in adult baseball pitchers[J]. *The American Journal of Sports Medicine*, 2009, 37(10):2043-2048.
- [45] HIRASHIMA M, KUDO K, WATARAI K, et al. Control of 3D limb dynamics in unconstrained overarm throws of different speeds performed by skilled baseball players[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2007, 97(1):680-691.

(责任编辑:刘畅)

(上接第72页)

- American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2016, 310(2):E160-E170.
- [9] SCHELER M, IRMLER M, LEHR S, et al. Cytokine response of primary human myotubes in an in vitro exercise model[J]. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 2013, 305(8):C877-C886.
- [10] 孙景权,上官若男,李松波,等. 长时间不同频率电刺激对 C₂C₁₂ 肌管细胞代谢指标和基因表达的影响[J]. *首都体育学院学报*, 2019, 31(5):459-466.
- [11] BURCH N, ARNOLD A S, ITEM F, et al. Electric pulse stimulation of cultured murine muscle cells reproduces gene expression changes of trained mouse muscle[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6):e10970.
- [12] 王华,刘静,刘建民,等. “双固一通”电针对老年阳虚大鼠抗疲劳能力及肝脏线粒体呼吸功能的影响[J]. *针刺研究*, 2013, 38(4):259-264.
- [13] KOLESAR J E, SAFDAR A, ABADI A, et al. Defects in mitochondrial DNA replication and oxidative damage in muscle of mtDNA mutator mice[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 75(75):241-251.
- [14] NILSSON M I, TARNOPOLSKY M A. Mitochondria and aging—the role of exercise as a countermeasure[J]. *Biology(Basel)*, 2019, 8(2):E40.
- [15] 谈文博. 适度运动对增龄大鼠骨骼肌线粒体能量代谢及自由基代谢的影响[D]. 兰州:西北师范大学, 2014.
- [16] NORDIN T C, DONE A J, TRAUSTADÓTTIR T. Acute exercise increases resistance to oxidative stress in young but not older adults[J]. *AGE*, 2014, 36(6):9727.
- [17] SUNTAR I, SUREDA A, BELWAL T, et al. Natural products, PGC-1 α , and Duchenne muscular dystrophy[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2020, 10(5):734-745.
- [18] COMBES A, DEKERLE J, WEBBORN N, et al. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle[J]. *Physiological Reports*, 2015, 3(9):e12462.
- [19] 张媛,张念云,丁树哲. AMPK, p38 MAPK 信号通路参与调控电刺激诱导骨骼肌细胞 PGC-1 α 基因表达[J]. *西安体育学院学报*, 2018, 4(1):88-95.
- [20] RUSSELL A P, HESSELINK M K, LO S K, et al. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise[J]. *FASEB Journal*, 2005, 19(8):986-988.
- [21] LIANG J, ZHANG H, ZENG Z, et al. Lifelong aerobic exercise alleviates sarcopenia by activating autophagy and inhibiting protein degradation via the AMPK/PGC-1 α signaling pathway[J]. *Metabolites*, 2021, 11(5):323.

(责任编辑:刘畅)