DOI:10.16016/j.1000-5404.202003281

FoxO1 磷酸化对低氧下大鼠骨骼肌细胞蛋白质合成和分解的影响

贾 杰[1,2],付鹏宇[2],朱镕鑫[2,3],许春艳[2],龚丽景[1] 100084 北京,北京体育大学:中国运动与健康研究院[1],运动人体科学学院[2];200030 上海,上海体育科学研究所[3]

[摘要] **目的** 探究 FoxO1 不同磷酸化位点在低氧暴露下大鼠 L6 成肌细胞蛋白质合成和分解中的调节作用。**方法** 构建 FoxO1 过表达、FoxO1$^{T24A/D}$、FoxO1$^{S250A/D}$、FoxO1$^{S313A/D}$ 位点的质粒,使用腺病毒作为载体,分别感染分化后的大鼠 L6 骨骼肌细胞 6 h,将细胞分别命名为 rFoxO1、T24A、T24D、S250A、S250D、S313A、S313D,并对应分为 7 个转染组,以转染空白对照质粒作为对照组(EGFP),随后将各转染组再分为常氧组(normoxic group,C)和低氧组(hypoxic group,H)。采用荧光共聚焦显微镜观察腺病毒转染情况;采用 Western blot 对嘌呤霉素(puromycin)结合多肽进行分析,并对泛素(ubiquitin)标记蛋白和分解相关蛋白表达进行检测。**结果** 与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组 puromycin 结合多肽(1.38±0.06)、mTOR(1.54±0.21)和 p-mTOR(1.57±0.34)表达显著增加($P<0.05$)。与 C-EGFP 组相比,C-T24D 组 mTOR(1.33±0.35)和 p-mTOR(1.60±0.44)表达显著上升($P<0.01$);与 C-T24D 组相比,H-T24D 组 mTOR 表达显著降低($P<0.01$)。与 C-EGFP 组相比,C-S250A 组蛋白质积累显著上升($P<0.01$),与 C-S250A 组相比,H-S250A 组蛋白质积累显著下降($P<0.05$)。与 EGFP 组相比,S313A 和 S313D 组蛋白质积累差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** FoxO1 通过上调 mTOR 活性来增加蛋白质合成,但受低氧调控;低氧下 FoxO1 经 Thr24 和 Ser250 两个位点磷酸化来抑制机体中蛋白质合成。

[关键词] FoxO1;磷酸化位点;蛋白质合成;蛋白质分解;翻译表面感应

[中图法分类号] R322.74; R329.26; R341 [文献标志码] A

Effects of phosphorylation sites of FoxO1 on protein synthesis and proteolysis in rat skeletal muscle cells exposure to hypoxia

JIA Jie[1,2], FU Pengyu[2], ZHU Rongxin[2,3], XU Chunyan[2], GONG Lijing[1] [1]China Institute of Sport and Health Science, [2]Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing, 100084; [3]Shanghai Research Institute of Sport Sciences, Shanghai, 200030, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of different phosphorylation sites of FoxO1 on protein synthesis and proteolysis in rat skeletal muscle L6 cells under the condition of hypoxia. **Methods** Adenoviral vectors (FoxO1, FoxO1$^{T24A/D}$, FoxO1$^{S250A/D}$, and FoxO1$^{AS313A/D}$) were constructed, and then used to infect the differentiated rat skeletal muscle cells respectively with appropriate multiples of infection (MOI). These L6 cells were corresponding named to 8 groups: EGFP, rFoxO1, T24A, T24D, S250A, S250D, S313A and S313D, and then each transfection group was divided into normoxic group (C) and hypoxic group (H). Adenovirus transfection was observed using a fluorescence confocal microscope. Puromycin-binding peptides, ubiquitin labeling protein, synthesis and decomposition-related proteins were detected using Western blotting. **Results** Compared with the C-EGFP group, the expression levels of puromycin-binding polypeptide (1.38±0.06), mTOR (1.54±0.21) and p-mTOR (1.57±0.34) were significantly increased in the C-rFoxO1 group (all $P<0.05$). The levels of mTOR (1.33±0.35) and p-mTOR (1.60 ± 0.44) were also elevated in the C-T24D group than the C-EGFP group ($P<0.01$). The level of mTOR in the H-T24D group was notably reduced when compared with the C-T24D group ($P<0.01$). Protein accumulation was remarkably increased in the C-S250A group than the C-EGFP group ($P<0.01$), and was statistically decreased in the H-S250A group than the C-S250A group ($P<0.05$). But no such differences were seen in the protein accumulation in the

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金(2019PT003);国家自然科学基金面上项目(31771317)

[通信作者] 龚丽景,E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

S313A and S313D groups when compared with that in the C-EGFP group ($P>0.05$). **Conclusion** FoxO1 can improve protein synthesis by enhancing the activity of mTOR, but this process is strictly regulated by hypoxia. Under hypoxic condition, FoxO1 inhibits protein synthesis *via* phosphorylation sites Thr24 and Ser250.

[**Key words**] FoxO1; phosphorylation site; protein synthesis; protein proteolysis; SUnSET

Supported by the Fundamental Research Fund for the Central Universities of China (2019PT003) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (31771317). Corresponding author: GONG Lijing, E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

高海拔地区具有高寒缺氧特征,大气中氧含量低,人体暴露在高原低氧环境中易诱发心、脑、肺等多种脏器损伤,也诱发骨骼肌萎缩[1]。随着社会发展进步,进入高原旅游和工作的人越来越多,高原低氧对人体的损害逐步受到重视。其中低氧暴露后机体中骨骼肌丢失,运动能力下降,不仅困扰高原训练的运动员和教练员[2],还影响高原地区生活和工作人群的生产、生活。近来研究发现,低氧下骨骼肌蛋白质合成分解失衡可能是骨骼肌丢失的主要原因[1]。

叉头状转录因子 O1(forkhead transcription factor O1,FoxO1)作为核转录因子,参与调节细胞增殖、凋亡以及代谢等多种生理病理过程[3]。FoxO1 在骨骼肌蛋白质合成分解调控中发挥着关键作用。FoxO1 结合肌肉环状指基因 1(muscle ring finger 1,MuRF1)和肌肉萎缩盒 F 基因(muscle atrophy F-box,MAFbx,Atrogin-1)两个基因的启动子区域,增强两者表达[4];同时这两个基因是机体主要的降解系统[5]——泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system,UPS)中重要的限速酶。FoxO1 还直接或者间接作用于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR),与细胞外调节蛋白激酶 1 和 2(extracellular regulated protein kinases 1 and 2,ERK1/2)以及真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1(e IF4E-binding protein 1,4E-BP1)等蛋白一起调节骨骼肌蛋白质合成[6-7]。FoxO1 活性受到自身磷酸化/去磷酸化水平的调控,如 FoxO1 蛋白中 3 个高度保守的磷酸化位点:Thr24、Ser256 和 Ser319(其中大鼠为 Thr24、Ser250 和 Ser313 位点)[8]。磷酸化 FoxO1 与 14-3-3 蛋白相互作用,使 FoxO1 被锚定在细胞质中,阻止其向核内转位,从而抑制其转录激活作用[9]。

FoxO1 是否参与低氧暴露下骨骼肌蛋白质合成分解的调控尚不清楚,低氧下 FoxO1 状态的改变是否与其磷酸化/去磷酸状态有关,哪个磷酸化位点可能发挥更重要的调节作用也不清楚。因此,本研究通过腺病毒介导 FoxO1 三种磷酸化位点突变质粒到大鼠骨骼肌细胞中表达,比较低氧和常氧下骨骼肌蛋白质合成和分解情况,探讨 FoxO1 磷酸化位点对低氧诱导的骨骼肌蛋白质合成分解的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠 L6 细胞购于上海中桥新舟生物科技有限公司;腺病毒由广州云舟生物科技有限公司提供;DMEM 培养基、胎牛血清、马血清和 puromycin 购自 Gibco;抗体信息:puromycin antibody(Thermo Fisher,A1113802)和 p-ERK1/2 antibody(Thermo Fisher,44-680G);ERK1/2 antibody(Abcam,ab47326)、mTOR antibody(Abcam,ab131339)、MuRF1 antibody(Abcam,ab172479)和 Atrogin-1 antibody(Abcam,ab168372);p-4E-BP1 antibody(Cell Signaling Technology,2855)、p-mTOR antibody(Cell Signaling Technology,5536T);uniquitin antibody(Santa,sc-8017)、FoxO1 antibody(Santa,sc-374427);4E-BP1 antibody(Proteintech,60246-1-Ig);α-tubulin antibody(Sigma,T6074)。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建与腺病毒包装 从 NCBI 数据库中检索大鼠 FoxO1 基因序列,构建 rFoxO1(FoxO1 过表达)、$FoxO1^{T24A}$、$FoxO1^{T24D}$、$FoxO1^{S250A}$、$FoxO1^{S250D}$、$FoxO1^{S313A}$ 和 $FoxO1^{S313D}$ 等质粒(其中位点数字前 T 表示苏氨酸、S 表示丝氨酸,数字后 A 表示突变为丙氨酸——使位点丧失磷酸化;数字后 D 表示突变为天冬氨酸——使位点保持磷酸化)。质粒转染至 HEK293 细胞中,整合重组腺病毒,收获细胞进行腺病毒扩增、纯化和滴度检测。

1.2.2 细胞分化与分组 L6 细胞复苏后,用 DMEM 完全培养基(含 10%胎牛血清),在 5%CO_2、37 ℃下培养。数次传代之后,将 L6 细胞按照 1×10^5/mL 传代到 9.5 cm^2 培养皿,待细胞生长到 80%左右,更换至 DMEM 分化培养基(含 2%马血清)中,当细胞逐渐长为梭形,呈肌管形态时表明分化成功。分化完成后将细胞分为 8 个转染组:EGFP(空白对照质粒)、rFoxO1、T24A、T24D、S250A、S250D、S313A 和 S313D 组。

1.2.3 腺病毒转染 待细胞分化完成后,根据病毒滴度以及感染复数(multiplicity of infection,MOI),现配置培养基。弃去培养皿中原有培养基,向细胞加入 1 mL 含有病毒的培养基,轻轻摇匀培养基,放置培养箱中培养。病毒转染 6 h 后即刻、12 h 和 24 h 均更换

新鲜培养基。

1.2.4　腺病毒转染效果观察　　使用 DAPI 工作液对感染腺病毒 2 d(目的蛋白表达峰值)后的细胞进行细胞核染色,并置于激光共聚焦显微镜下观察转染效果。

1.2.5　低氧干预　　各转染组再分为低氧组(H 组,37 ℃,1%O_2)和常氧组(C 组),培养 6 h 后收细胞进行检测。

1.2.6　蛋白质合成检测　　翻译表面感应(surface sensing of translation, SUnSET)手段依靠嘌呤霉素(puromycin)实现快速、准确测定机体蛋白质合成[10]。puromycin 具有与 tRNA 分子末端类似的结构,能同氨基酸结合,替代氨酰化 tRNA 同核糖体 A 位点结合,并掺入到生长的肽链中。收细胞 30 min 前,向培养基中加入 puromycin(终浓度为 40 mmol/L),因为 puromycin 不参与蛋白质合成的后续反应,从而导致蛋白质合成中断,释放出 C 末端含有 puromycin 的不成熟多肽。方法是对样本中 puromycin 进行检测,能反映出 puromycin 结合多肽情况,从而反映出蛋白质的合成情况。

1.2.7　蛋白质分解检测　　UPS 是一个复杂的多步骤反应过程,蛋白质先被泛素(ubiquitin)标记,随后被蛋白酶体识别,从而进一步降解[11-12]。方法是检测标有 ubiquitin 的蛋白质相对含量,即反映出蛋白质的分解情况。

1.2.8　Western blot 测定蛋白表达含量　　低氧干预结束后,使用加入裂解液提取细胞蛋白,随后用 BCA 法计算蛋白质浓度。蛋白样品使用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用干转法转膜后,进行封闭(封闭液 Odyssey Blocking Buffer, LI-COR),分别孵育相应抗体 4 ℃过夜,然后用 TBST 洗涤,再孵育二抗、洗涤,用近红外光谱检测系统(Odyssey CLX, LI-COR)检测条带信号值,Image Studio 进行分析。

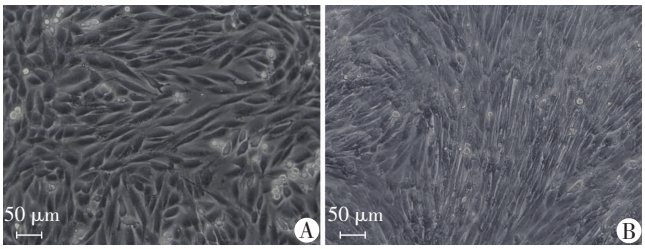
1.3　统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用双因素方差分析对是否低氧干预和腺病毒干预进行主效应和交互效应分析。交互效应显著,组间多重比较采用简单效应分析;交互效应不显著,分别对单独主效应进行分析。对腺病毒干预主效应的组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane's T2 检验;对是否低氧干预主效应的组间比较,满足正态分布采用独立样本 t 检验,非正态分布采用 Mann-Whitney U 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　细胞分化过程

L6 细胞诱导分化前细胞界限清晰,可见不规则三角形、多角形等,立体感较强,未见肌型结构出现。诱导分化后细胞边界模糊,以细梭形为主,细胞生长方向趋于一致,细胞中有肌型结构出现。见图 1。

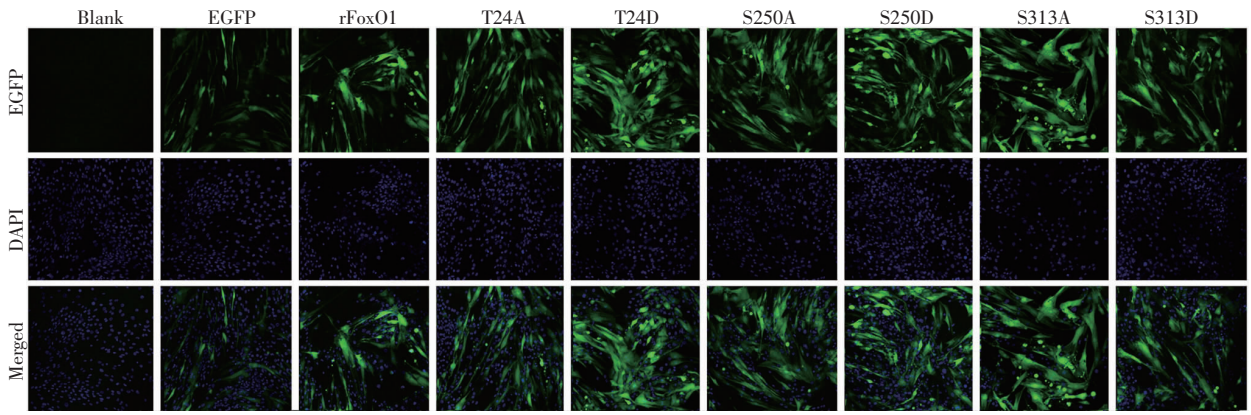


A:分化前;B:分化后

图 1　L6 细胞分化过程

2.2　腺病毒感染

目的基因表达量与绿色荧光蛋白基因表达量基本一致,因此通过绿色荧光蛋白(GFP)表达情况来反映目的蛋白表达情况。结果发现所有转染腺病毒的细胞中都有 GFP 表达,并且表达丰富(图 2),说明细胞中目的蛋白表达成功,腺病毒转染效果好。



绿色表示绿色荧光蛋白 GFP、蓝色表示 DAPI 染色后细胞核,Merge 表示两张图片重合

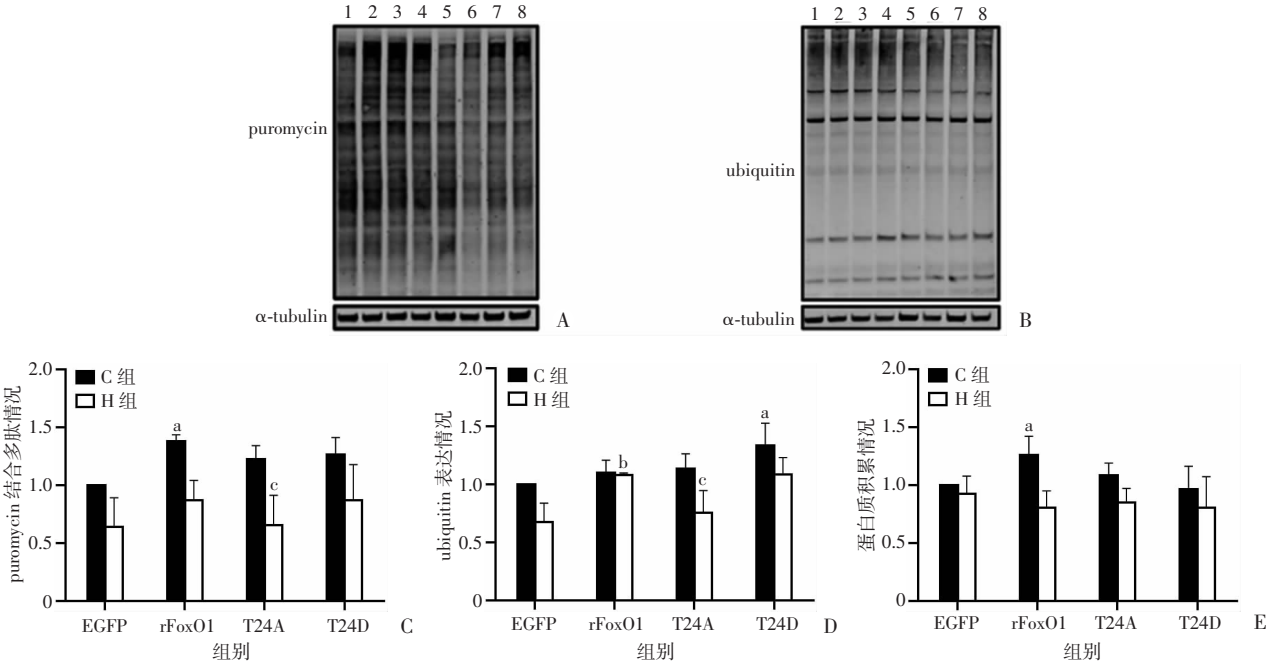
图 2　免疫荧光检测 L6 细胞中绿色荧光蛋白(GFP)表达

2.3　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质合成分解影响

2.3.1　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质积累的影响　常氧下,C-rFoxO1 组 puromycin 结合多肽量较 C-EGFP 组显著上升($P<0.05$)。与 C-T24A 组相比,H-T24A 组 puromycin 结合多肽量显著下降($P<0.05$)。与 C-EGFP 组相比,C-T24D 组 ubiquitin 表达显著升高($P<0.05$);与 H-EGFP 组相比,H-rFoxO1 组 ubiquitin 表达显著上升($P<0.01$);与 C-T24A 组相比,H-T24A 组 ubiquitin 表达显著降低($P<0.05$)。与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组 puromycin/ubiquitin 比值显著升高($P<0.05$)。见图 3。

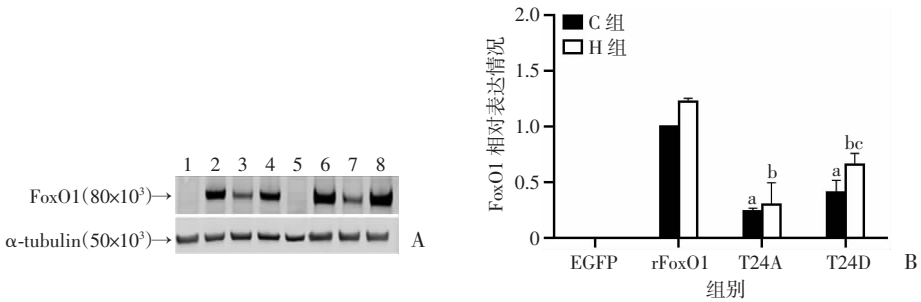
2.3.2　Thr24 磷酸化位点对骨骼肌中 FoxO1 表达的影响　与 C-rFoxO1 组相比,C-T24A 和 C-T24D 两组 FoxO1 表达均显著下降($P<0.01$);与 H-rFoxO1 组相比,H-T24A 和 H-T24D 组 FoxO1 表达显著下降($P<0.01$);与 C-T24D 组相比,H-T24D 组 FoxO1 表达显著上升($P<0.05$)。见图 4。

2.3.3　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞合成相关蛋白质表达的影响　与 H-EGFP 组和 C-T24D 组相比,H-T24D 组的 p-ERK1/2 表达显著上升($P<0.01$);与 C-EGFP 组相比,H-EGFP 组 p-ERK1/2/ERK1/2 比值显著升高($P<0.01$)。与 C-EGFP 组相比,H-EGFP 组 4E-BP1 表达显著下降($P<0.01$);与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组和 C-T24D 组 mTOR 表达显著上升($P<0.01$);与 H-EGFP 组相比,H-rFoxO1 组 mTOR 表达显著上升($P<0.01$);与 C-T24D 组相比,H-T24D 组 mTOR 表达显著降低($P<0.01$)。见图 5。



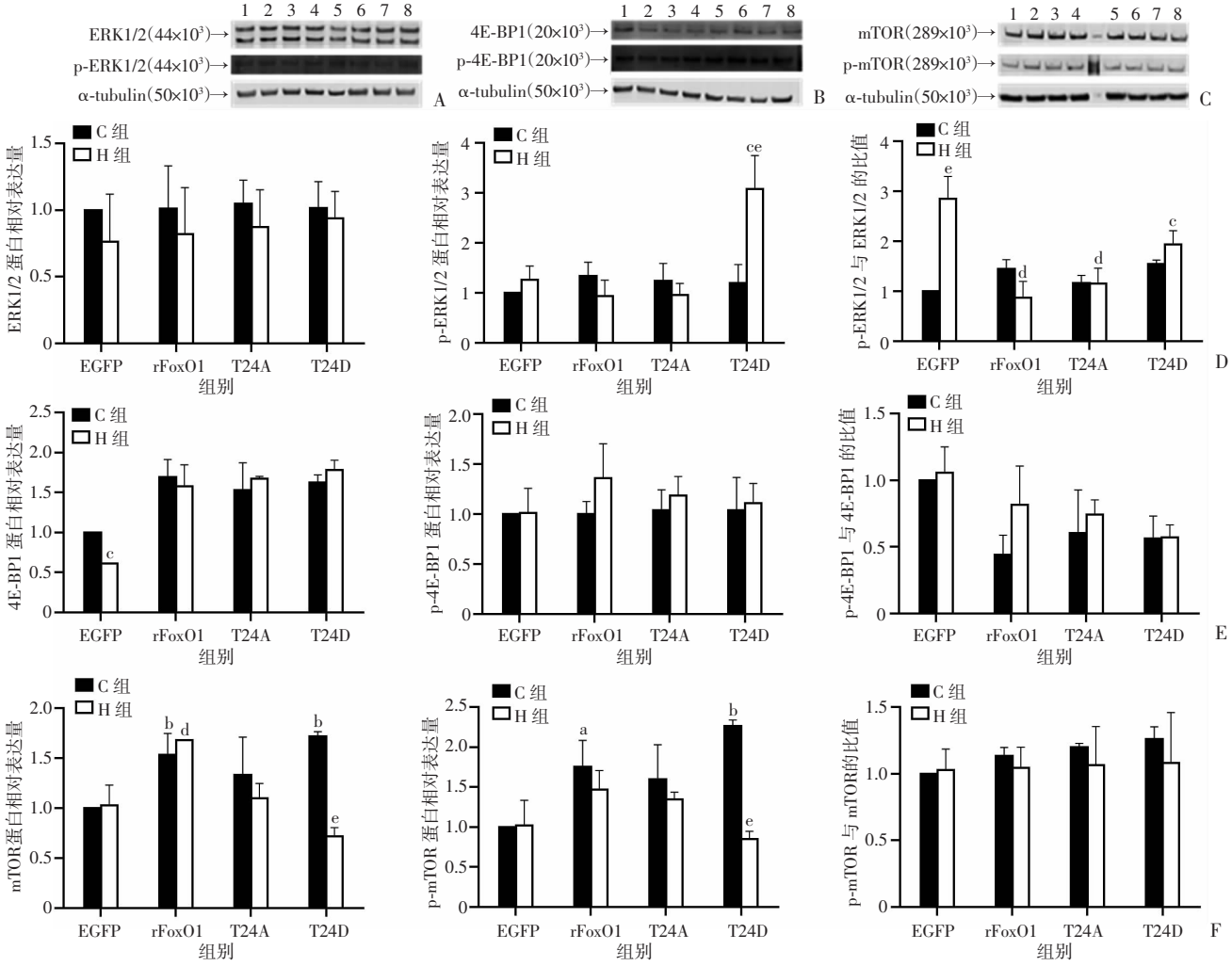
A:Western blot 检测 puromycin 结合多肽情况;B:Western blot 检测 ubiquitin 表达情况;C:puromycin 结合多肽情况;D:ubiquitin 表达情况;E:蛋白质积累情况;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,与 C-EGFP 组比较;b:$P<0.01$,与 H-EGFP 组比较;c:$P<0.05$,与 C-T24A 组比较

图 3　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质积累的影响



A:Western blot 检测 FoxO1 蛋白表达情况;B:FoxO1 表达情况;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较;b:$P<0.01$,与 H-EGFP 组比较;c:$P<0.05$,与 C-T24D 组比较

图 4　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌中 FoxO1 表达的影响



A:Western blot 检测 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达;B:Western blot 检测 4E-BP1 和 p-4E-BP1 蛋白表达;C:Western blot 检测 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达;D:ERK1/2、p-ERK1/2 和 p-ERK1/2/ERK1/2 表达;E:4E-BP1、p-4E-BP1 和 p-4E-BP1 表达;F:mTOR、p-mTOR 和 p-mTOR/mTOR 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 H-EGFP 组比较;e:$P<0.01$,与相同转染的 C 组比较

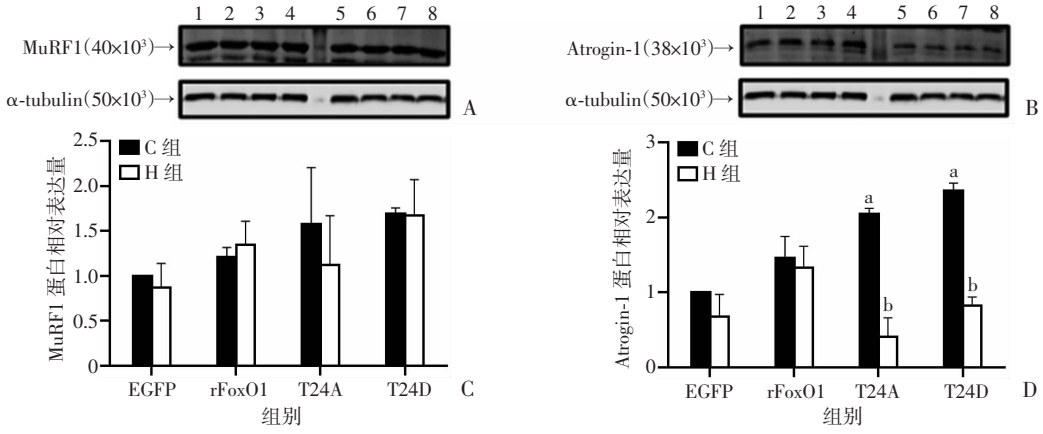
图 5　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞合成相关蛋白质表达的影响

2.3.4　FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞分解相关蛋白质表达的影响　　各组间 MuRF1 表达差异均无统计学意义($P>0.05$);与 C-EGFP 组相比,C-T24A 和 C-T24D 组 Atrogin-1 表达显著上升($P<0.01$);与 C-T24A 组相比,H-T24A 组的 Atrogin-1 表达显著降低($P<0.01$);与 C-T24D 相比,H-T24D 组的 Atrogin-1 表达显著降低($P<0.01$)。见图 6。

2.4　FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质合成分解影响

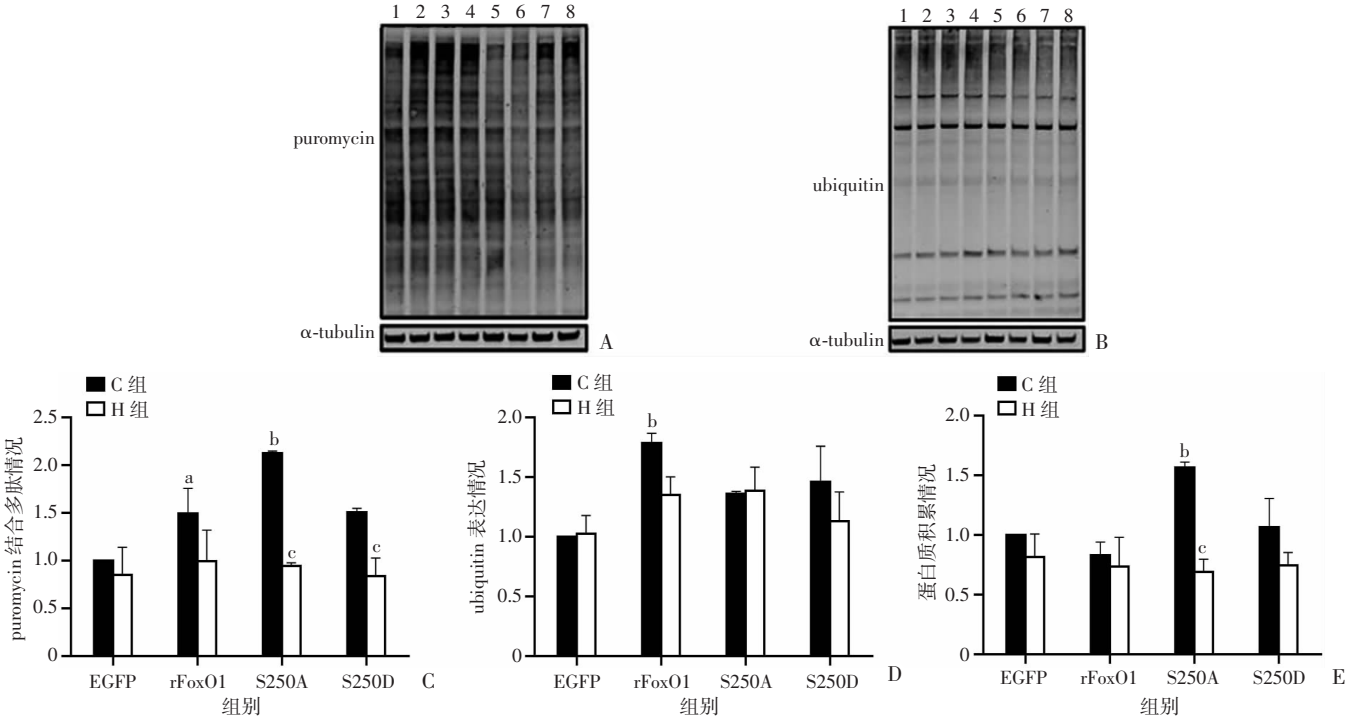
2.4.1　FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质积累的影响　　与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组和 C-S250A 组 puromycin 结合多肽量显著上升($P<0.05$)。与 C-S250A 组相比,H-S250A 组 puromycin 结合多肽量显著下降($P<0.01$);与 C-S250D 组相比,H-S250D 组 puromycin 结合多肽量显著下降($P<0.01$)。与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组的 ubiquitin 表达显著升高($P<0.01$)。与 C-EGFP 组相比,C-S250A 组 puromycin/ubiquitin 比值显著增加($P<0.01$);与 C-S250A 组相比,H-S250A 组 puromycin/ubiquitin 比值显著减少($P<0.01$)。见图 7。

2.4.2　Ser250 磷酸化位点对低氧下骨骼肌中 FoxO1 表达的影响　　与 C-rFoxO1 组相比,C-S250A 组 FoxO1 表达显著下降($P<0.05$);与 C-rFoxO1 组相比,H-rFoxO1 组 FoxO1 表达显著下降($P<0.05$);与 H-rFoxO1 组相比,H-S250A 组 FoxO1 表达显著降低($P<0.05$);与 C-S250A 组相比,H-S250A 组 FoxO1 表达显著下降($P<0.05$)。见图 8。



A:Western blot 检测 MuRF1 蛋白表达;B:Western blot 检测 Atrogin-1 蛋白表达;C:MuRF1 表达;D:Atrogin-1 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较;b:$P<0.01$,与相同转染的 C 组比较

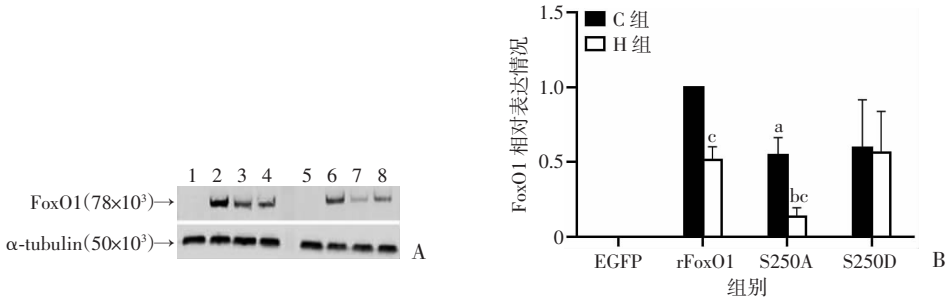
图 6 FoxO1 Thr24 磷酸化位点对骨骼肌细胞分解相关蛋白质表达的影响



A:Western blot 检测 puromycin 结合多肽情况;B:Western blot 检测 ubiquitin 的表达;C:puromycin 结合多肽情况;D:ubiquitin 表达;E:puromycin/uniquitin 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较;c:$P<0.01$,与相同转染的 C 组比较

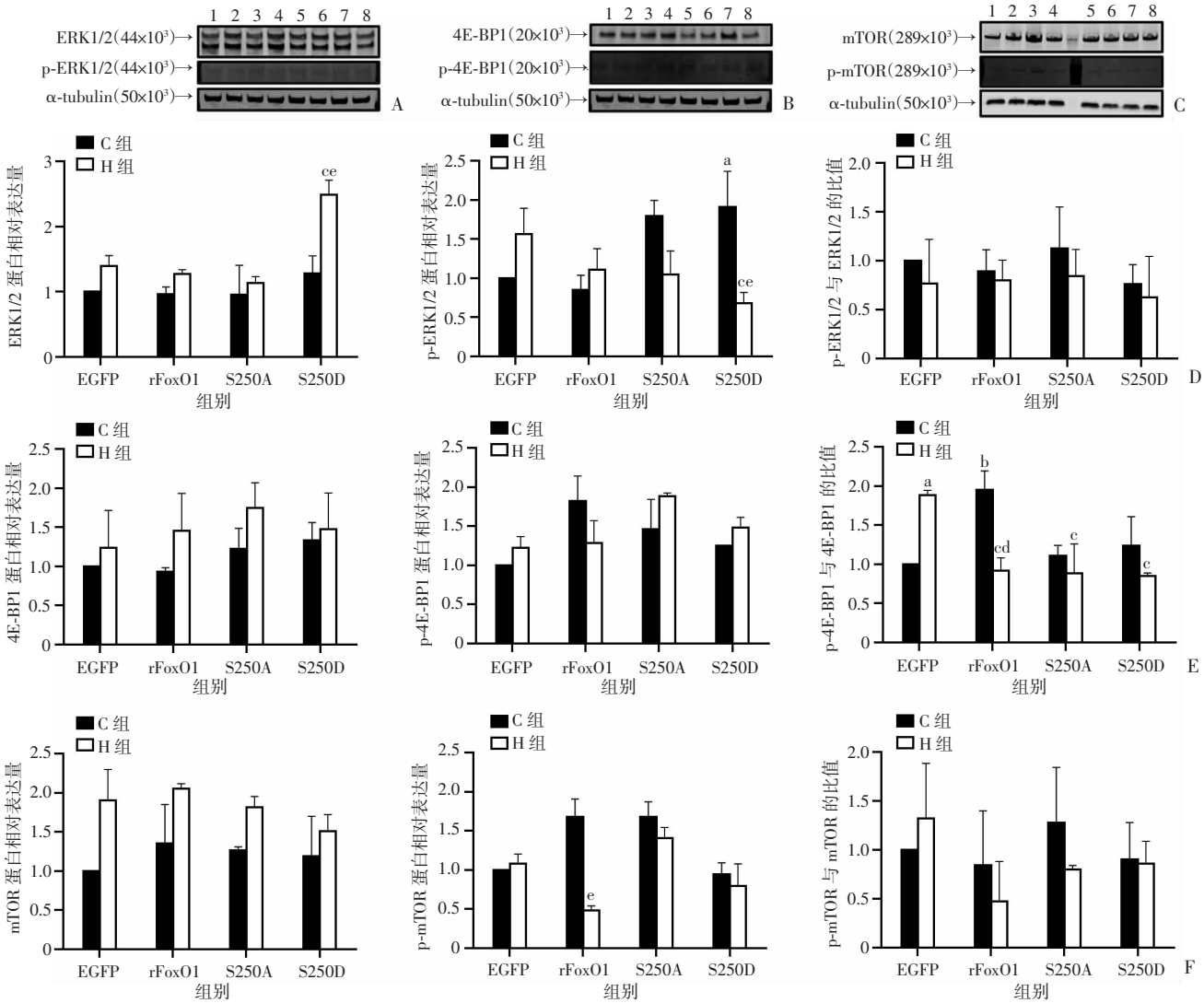
图 7 FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质积累的影响

2.4.3 FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞合成相关蛋白质表达的影响 与 H-EGFP 组相比,H-S250D 组 ERK1/2 表达显著上升($P<0.05$);与 C-S250D 组相比,H-S250D 组 ERK1/2 表达显著上升($P<0.01$)。与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组 p-4E-BP1/4E-BP1 比值显著升高($P<0.01$);与 C-EGFP 组相比,H-EGFP 组 p-4E-BP1/4E-BP1 比值显著升高($P<0.05$);与 H-EGFP 组相比,H-rFoxO1 组、H-S250A 组和 H-S250D 组 p-4E-BP1/4E-BP1 比值显著降低($P<0.05$);与 C-rFoxO1 组相比,H-rFoxO1 组 p-4E-BP1/4E-BP1 比值显著降低($P<0.05$)。见图 9。



A:Western blot 检测 FoxO1 蛋白表达;B:FoxO1 表达情况;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,与 C-EGFP 组比较;b:$P<0.05$,与 H-EGFP 组比较;c:$P<0.05$,与相同转染的 C 组比较

图 8 FoxO1 Ser250 磷酸化位点对低氧下骨骼肌中 FoxO1 表达的影响



A:Western blot 检测 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达;B:Western blot 检测 4E-BP1 和 p-4E-BP1 蛋白表达;C:Western blot 检测 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达;D:ERK1/2、p-ERK1/2 和 p-ERK1/2/ERK1/2 表达;E:4E-BP1、p-4E-BP1 和 p-4E-BP1 表达;F:mTOR、p-mTOR 和 p-mTOR/mTOR 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较;c:$P<0.05$,与 H-EGFP 组比较;d:$P<0.05$,e:$P<0.01$,与相同转染的 C 组比较

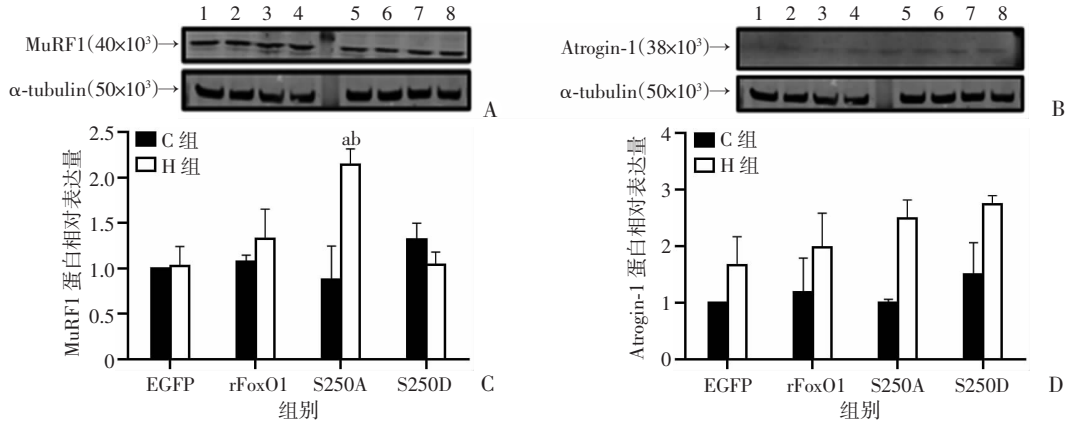
图 9 FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞合成相关蛋白质表达的影响

2.4.4 FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞分解相关蛋白质表达的影响 与 H-EGFP 组相比,H-S250A 组 MuRF1 表达显著增加($P<0.05$);与 C-S250A 组相比,H-S250A 组 MuRF1 表达显著增加($P<0.01$)。见图 10。

2.5 FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质合成分解影响

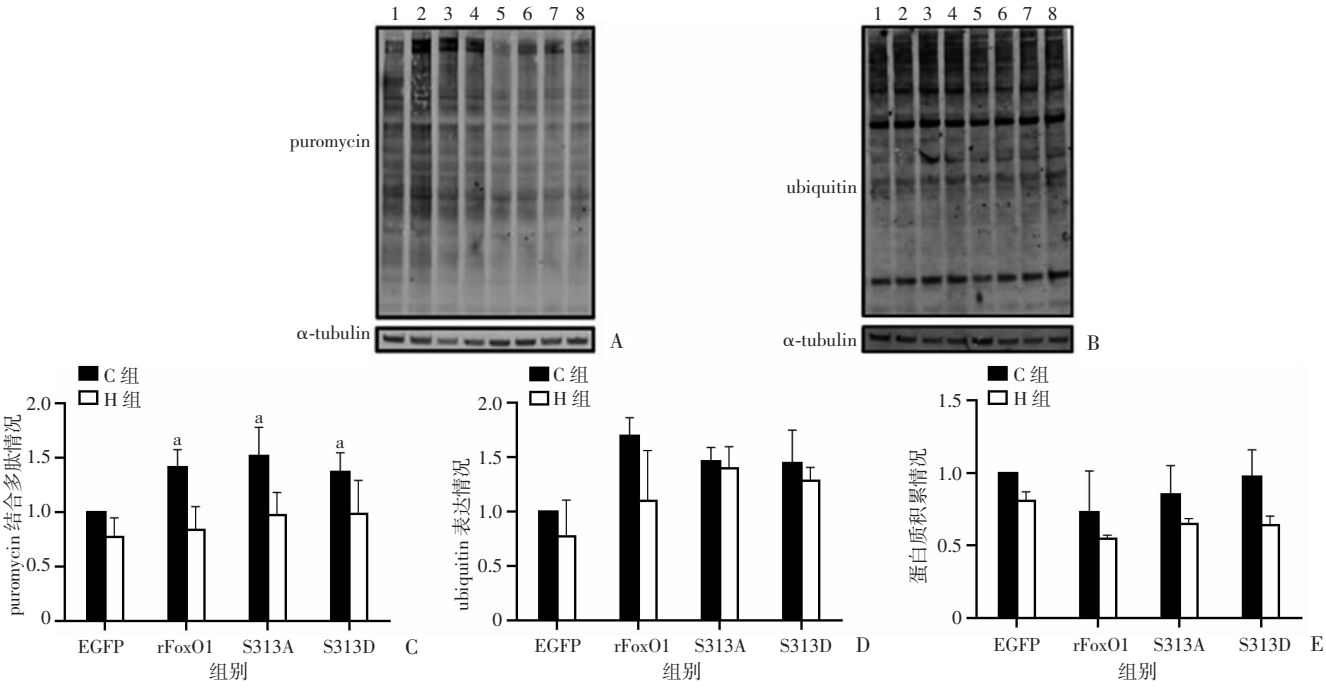
2.5.1 FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质积累的影响 与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组、C-S313A 组和 C-S313D 组 puromycin 结合多肽量显著上升($P<0.05$)。各组之间 ubiquitin 表达均没有统计学差异。各组之间 puromycin/ubiquitin 比值均无统计学差异,见图 11。

2.5.2 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞中 FoxO1 表达的影响 与 C-rFoxO1 组相比,C-S313A 组和 C-S313D 组 FoxO1 表达显著降低($P<0.01$);与 H-rFoxO1 组相比,H-S313A 组和 H-S313D 组 FoxO1 表达显著降低($P<0.01$)。见图 12。



A:Western blot 检测 MuRF1 蛋白表达;B:Western blot 检测 Atrogin-1 蛋白表达;C:MuRF1 表达情况;D:Atrogin-1 表达情况;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,与 H-EGFP 组比较;b:$P<0.01$,与相同转染的 C 组比较

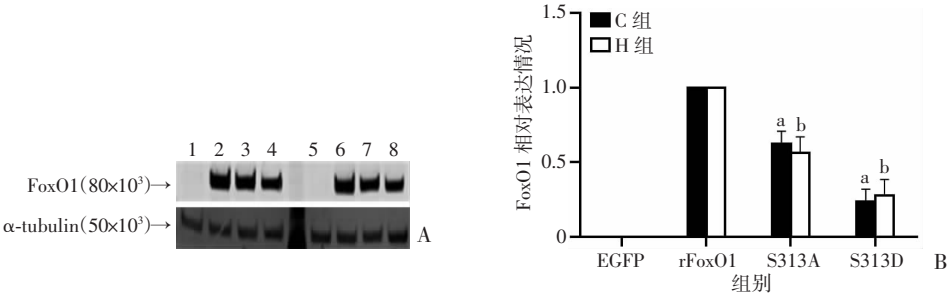
图 10 FoxO1 Ser250 磷酸化位点对骨骼肌细胞分解相关蛋白质表达的影响



A:Western blot 检测 puromycin 结合多肽情况;B:Western blot 检测 ubiquitin 的表达;C:puromycin 结合多肽情况;D:ubiquitin 表达;E:puromycin/uniquitin 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,与 C-EGFP 组比较

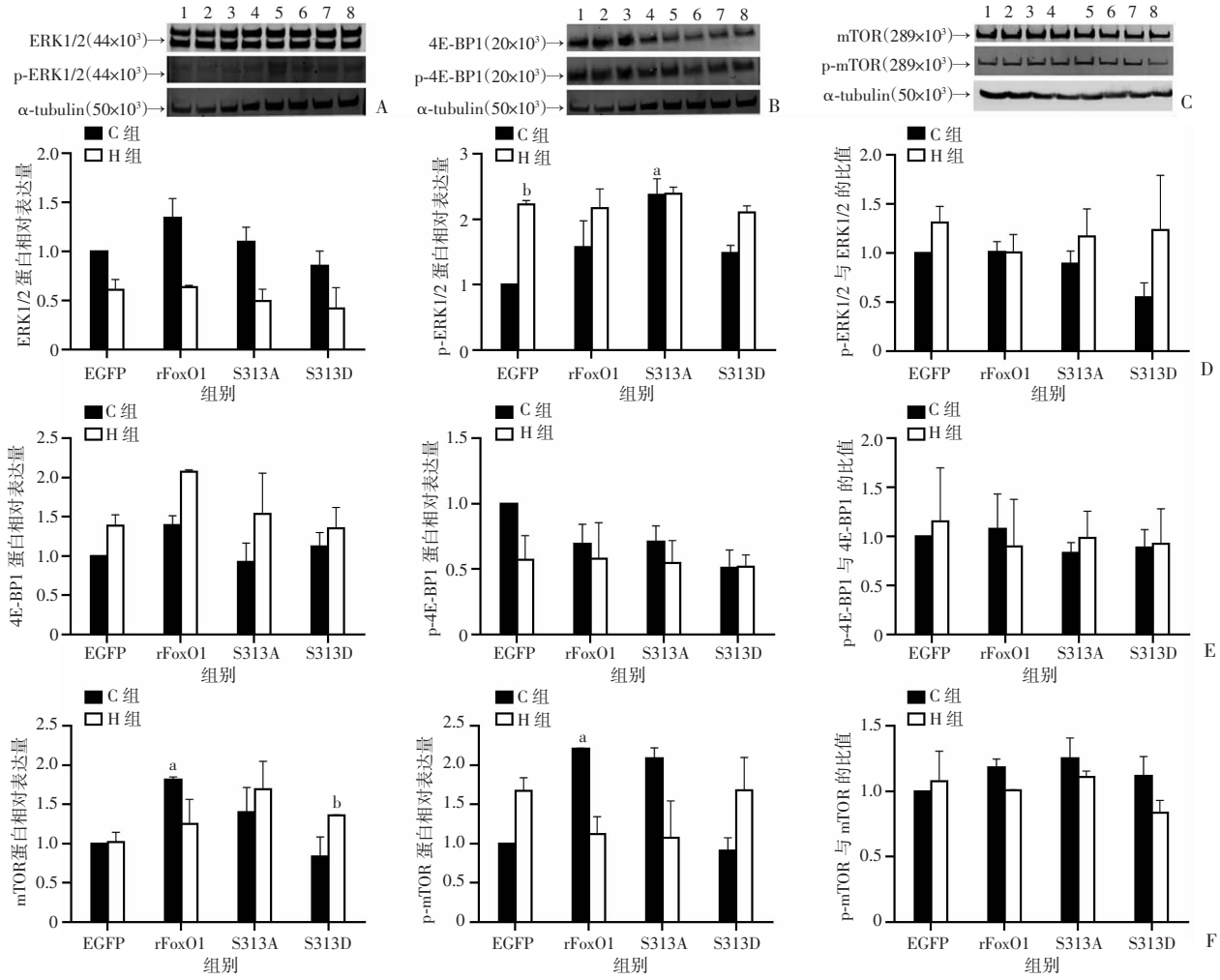
图 11 FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞蛋白质积累的影响

2.5.3　FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞合成相关蛋白质表达的影响　　与 C-EGFP 组相比,C-S313A 组 p-ERK1/2 表达显著上升($P<0.01$);与 C-EGFP 组相比,H-EGFP 组 p-ERK1/2 表达显著升高($P<0.01$)。与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 组 mTOR 表达显著上升($P<0.05$);与 C-S313D 组相比,H-S313D 组 mTOR 表达显著升高;与 C-EGFP 组相比,C-rFoxO1 p-mTOR 表达显著升高($P<0.05$)。见图 13。



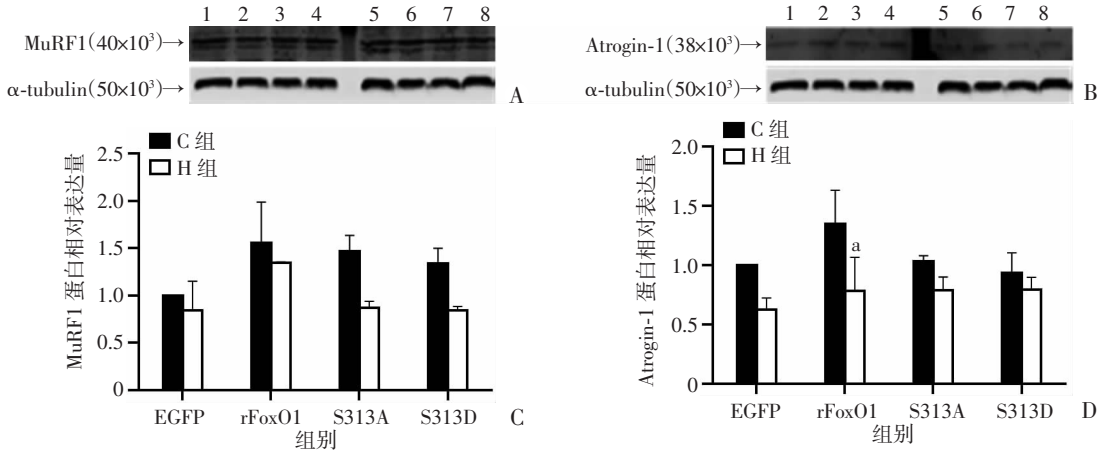
A:Western blot 检测 FoxO1 蛋白表达;B:半定量分析;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较;b:$P<0.01$,与 H-EGFP 组比较

图 12　FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞中 FoxO1 表达的影响



A:Western blot 检测 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达;B:Western blot 检测 4E-BP1 和 p-4E-BP1 蛋白表达;C:Western blot 检测 mTOR 和 p-mTOR 蛋白表达;D:ERK1/2、p-ERK1/2 和 p-ERK1/2/ERK1/2 表达;E:4E-BP1、p-4E-BP1 和 p-4E-BP1 表达;F:mTOR、p-mTOR 和 p-mTOR/mTOR 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 C-EGFP 组比较

图 13　FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞合成相关蛋白质表达的影响



A:Western blot 检测 MuRF1 蛋白表达;B:Western blot 检测 Atrogin-1 蛋白表达;C:MuRF1 表达;D:Atrogin-1 表达;1:C-EGFP;2:C-rFoxO1;3:C-T24A;4:C-T24D;5:H-EGFP;6:H-rFoxO1;7:H-T24A;8:H-T24D;a:$P<0.05$,与相同转染的 C 组比较

图 14 FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞分解相关蛋白质表达的影响

2.5.4 FoxO1 Ser313 磷酸化位点对骨骼肌细胞分解相关蛋白质表达的影响 与 C-rFoxO1 组相比,H-rFoxO1 组 Atrogin-1 表达显著降低($P<0.05$)。见图 14。

3 讨论

3.1 FoxO1 对低氧下骨骼肌细胞蛋白质合成分解的影响

骨骼肌因其蛋白质占机体蛋白质总量的一半以上,是机体中重要的蛋白质储备器官。正常生理条件下,骨骼肌中蛋白质合成和分解处于动态平衡过程,这种动态平衡对生命活动的正常维持具有重要意义[13]。该平衡被打破,尤其是向蛋白质分解方向偏移,大多是由生理病理状态以及外界环境的改变所导致的[14]。

低氧暴露能降低机体中蛋白质合成和分解水平,而整个平衡过程向分解方向移动,机体中总蛋白质含量减少,这在人体和动物实验中都得到了证实[15-16]。本研究发现过表达 FoxO1 既能使大鼠骨骼肌细胞中蛋白质合成增加,也能使蛋白质分解增加。这一现象说明过表达 FoxO1 能加快骨骼肌细胞中蛋白质代谢的速度。从 puromycin/ubiquitin 比值来看,无论是常氧还是低氧下过表达 FoxO1 并不能改变大鼠骨骼肌细胞中蛋白质的积累。那么 FoxO1 过表达是如何影响大鼠骨骼肌细胞中蛋白质合成和分解的?本研究显示,常氧下 FoxO1 过表达能显著增加大鼠骨骼肌细胞中 mTOR 和 p-mTOR 表达,但对 p-mTOR/mTOR 比值没有影响。p-mTOR 上调对骨骼肌合成具有重要的促进作用[17]。FoxO1 能通过 miR-3188 调控 mTOR 的活性,从而对蛋白质合成产生影响[18]。过表达 FoxO1 能激活 PI3K/Akt 通路活性,并且 FoxO1 和 Akt 在抑制细胞凋亡方面具有协同作用[19]。mTOR 作为 PI3K/Akt 的下游因子,受到 FoxO1 的调控。以上现象表明,FoxO1 过表达是通过影响 mTOR 的活性来使骨骼肌细胞中蛋白质合成增加。FoxO1 过表达并不能显著增加骨骼肌细胞中 MuRF1 和 Atrogin-1 表达。综上 FoxO1 过表达能显著增加大鼠骨骼肌细胞中蛋白质的合成,这种促进蛋白质合成的作用是通过上调 mTOR 和 p-mTOR 表达来实现的。

3.2 FoxO1 磷酸化位点对低氧下骨骼肌细胞蛋白质合成分解的影响

Thr24 磷酸化位点是影响 FoxO1 活性的重要磷酸化位点。该位点磷酸化后,FoxO1 被 14-3-3 蛋白结合,并移位出细胞核,被锚定在细胞质中等待降解[8, 20]。本研究显示,$FoxO1^{T24A}$ 在低氧环境中显著下调骨骼肌细胞中蛋白质合成和分解,但不影响蛋白质的积累。ERK1/2 通路能协同 mTOR 通路促进蛋白质合成[21]。低氧环境中 $Thr24^{T24D}$ 能显著增加 p-ERK1/2 表达,且低氧环境中 $FoxO1^{T24A/D}$ 会使骨骼肌细胞中 p-ERK1/2/ERK1/2 比值降低,说明 p-ERK1/2/ERK1/2 比值的降低主要是由低氧干预造成。常氧环境中 $FoxO1^{T24D}$ 能显著升高骨骼肌细胞中 mTOR 和 p-mTOR 表达,相反在低氧条件下 $FoxO1^{T24D}$ 显著降低 mTOR 和 p-mTOR 表达,且不论常氧还是低氧,p-mTOR/mTOR 比值不变。说明 FoxO1 Thr24 位点磷酸化对 mTOR 的调节是通过上调 mTOR 和 p-mTOR 表达来实现的,而非增加 mTOR 的磷酸化程度。$FoxO1^{T24D}$ 对 mTOR 的调节受低氧干预的影响,说明低氧能显著抑制 FoxO1 Thr24 位

点的磷酸化作用。常氧下,FoxO1^{T24A} 和 FoxO1^{T24D} 均显著增加 Atrogin-1 表达,但在 6 h 低氧干预环境下 Atrogin-1 表达显著下降,推测可能在低氧暴露初期(6 h),有另外的通路影响 Atrogin-1 的活性,需要进一步的证实。

Ser250 磷酸化位点是 FoxO1 主要门控位点,该位点磷酸化后促进 FoxO1 其他位点磷酸化,使整个 FoxO1 处于磷酸化状态[22-23]。本研究中,常氧下 FoxO1^{S250A} 能显著增加大鼠骨骼肌细胞中蛋白质合成;低氧下 FoxO1^{S250A} 对蛋白质合成的促进作用消失。因此,低氧干预能抑制 FoxO1 Ser250 位点去磷酸化所带来的蛋白质增加效应。进一步研究发现,低氧干预下 FoxO1^{S250D} 能显著增加骨骼肌细胞中 ERK1/2 表达;低氧干预下 FoxO1^{S250A} 和 FoxO1^{S250D} 均能显著降低 p-4E-BP1/4E-BP1 比值。4E-BP1 是 mTOR 直接作用底物之一,属翻译抑制蛋白家族。mTOR 能直接磷酸化 4E-BP1,阻止其抑制翻译,促进翻译的起始和蛋白质合成[24]。表明 FoxO1 Ser250 位点促进骨骼肌蛋白质合成作用受到低氧的严格调控,且低氧下该位点对骨骼肌细胞蛋白质合成的影响与常氧下截然相反。FoxO1 Ser250 位点去磷酸化能在低氧下显著增加 MuRF1 表达,这一现象与之前研究 FoxO1 能增加 MuRF1 表达相一致[25]。

Ser313 是 FoxO1 典型的磷酸化位点,该位点磷酸化状态能显著影响 FoxO1 的活性[26]。Ser313 位点的磷酸化状态不仅与 FoxO1 的转录活性有关,还与 FoxO1 的核定位有关。PI3K/Akt 催化的 Ser313 磷酸化令 FoxO1 的局部结构发生变化,使 Ser316 位点被进一步磷酸化。磷酸化的 Ser316 位点进一步磷酸化 Ser319 位点。由 Ser313、Ser316、Ser319 和 Ser323 磷酸化形成的高酸性补丁能促进 FoxO1 核输出[27]。S313A 能消除该位点 PI3K/Akt 介导的磷酸化作用,但不阻止 Thr24 或 Ser250 的磷酸化作用。S313A 能降低 FoxO1 的核排斥率,使 FoxO1 靶向细胞核并增强反式激活作用[28]。本研究显示,FoxO1^{S313A} 和 FoxO1^{S313D} 均能显著增加大鼠骨骼肌细胞中蛋白质的合成,但对蛋白质分解没有显著影响;FoxO1^{S313A} 能显著增加骨骼肌细胞中 p-ERK1/2 表达,但并没有增加 p-ERK1/2/ERK1/2 比值。FoxO1$^{S313A/D}$ 对 MuRF1 和 Atrogin-1 表达都没有影响。

综上所述,FoxO1 能通过上调 mTOR 和 p-mTOR 的活性来增加蛋白质合成,但是这一现象严格受到低氧环境调控,低氧下 FoxO1 能抑制机体中蛋白质合成。FoxO1 促进蛋白质合成和/或低氧下 FoxO1 抑制蛋白质合成主要是通过影响 FoxO1 Thr24 和 Ser250 两个磷酸化位点状态来实现的。

参考文献:

[1] 唐舒宁, 龚丽景, 赵小雅, 等. 低氧影响蛋白质合成和分解的平衡诱导骨骼肌萎缩[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(12): 1352-1360. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.10.1292.
TANG S N, GONG L J, ZHAO X Y, *et al*. Hypoxia induces skeletal muscle atrophy by affecting the balance of protein synthesis and decomposition[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2019, 35(12): 1352-1360. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2019.10.1292.

[2] 于加倍, 胡扬, 李燕春, 等. 4 周爬梯抗阻训练对低氧诱导大鼠骨骼肌萎缩的影响[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 448-453. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.007.
YU J B, HU Y, LI Y C, *et al*. Effects of 4-week resistance training on hypoxia-induced skeletal muscle atrophy in rats[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2018, 26(4): 448-453. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.007.

[3] O'NEILL B T, BHARDWAJ G, PENNIMAN C M, *et al*. FoxO transcription factors are critical regulators of diabetes-related muscle atrophy[J]. Diabetes, 2019, 68(3): 556-570. DOI:10.2337/db18-0416.

[4] HANDAYANINGSIH A E, IGUCHI G, FUKUOKA H, *et al*. Reactive oxygen species play an essential role in IGF-I signaling and IGF-I-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes[J]. Endocrinology, 2011, 152(3): 912-921. DOI: 10.1210/en.2010-0981.

[5] 张聪聪, 陈博雅, 程乃萱, 等. AKT/FOXO1 信号通路在心力衰竭小鼠骨骼肌萎缩中的作用[J]. 心肺血管病杂志, 2018, 37(1): 60-65. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5062.2018.01.016.
ZHANG C C, CHEN B Y, CHENG N X, *et al*. Role of AKT/FOXO1 signaling pathway in skeletal muscle atrophy in heart failure mouse[J]. J Cardiovasc Pulm Dis, 2018, 37(1): 60-65. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5062.2018.01.016.

[6] CHEN C C, JEON S M, BHASKAR P T, *et al*. FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor[J]. Dev Cell, 2010, 18(4): 592-604. DOI:10.1016/j.devcel.2010.03.008.

[7] HAY N. Interplay between FOXO, TOR, and akt[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(11): 1965-1970. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.03.013.

[8] MAO W K, YOU T, YE B, *et al*. Reactive oxygen species suppress cardiac NaV1.5 expression through Foxo1[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e32738. DOI:10.1371/journal.pone.0032738.

[9] WILHELM K, HAPPEL K, EELEN G, *et al*. FOXO1 cou-

ples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium[J]. Nature, 2016, 529(7585): 216-220. DOI: 10.1038/nature16498.

[10] SCHMIDT E K, CLAVARINO G, CEPPI M, *et al*. SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis [J]. Nat Methods, 2009, 6(4): 275-277. DOI:10.1038/nmeth.1314.

[11] MALYNN B A, MA A. Ubiquitin makes its mark on immune regulation[J]. Immunity, 2010, 33(6): 843-852. DOI:10.1016/j.immuni.2010.12.007.

[12] ZHAO H, SHU L Y, HUANG W L, *et al*. Resveratrol affects hepatic gluconeogenesis via histone deacetylase 4 [J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019, 12: 401-411. DOI:10.2147/DMSO.S198830.

[13] LAMON S, ZACHAREWICZ E, ARENTSON-LANTZ E, *et al*. Erythropoietin does not enhance skeletal muscle protein synthesis following exercise in young and older adults[J]. Front Physiol, 2016, 7: 292-301. DOI: 10.3389/fphys.2016.00292.

[14] D'HULST G, DELDICQUE L. Human skeletal muscle wasting in hypoxia: a matter of hypoxic dose? [J]. J Appl Physiol, 2017, 122(2): 406-408. DOI: 10.1152/japplphysiol.00264.2016.

[15] DE THEIJE C C, SCHOLS A M W J, LAMERS W H, *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.

[16] 贾杰, 付鹏宇, 朱镕鑫, 等. 低氧经 mTOR/4E-BP1 和 FoxO1/Atrogin-1 通路影响骨骼肌蛋白质积累[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(3): 300-309. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2020.01.1446.
JIA J, FU P Y, ZHU R X, *et al*. Hypoxia affects skeletal muscle protein accumulation *via* mTOR/4E-BP1 and FoxO1/atrogin-1 pathways[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2020, 36(3): 300-309. DOI:10.13865/j.cnki.cjbmb.2020.01.1446.

[17] YOON M S. mTOR as a key regulator in maintaining skeletal muscle mass[J]. Front Physiol, 2017, 8: 788. DOI:10.3389/fphys.2017.00788.

[18] ZHAO M Y, LUO R C, LIU Y Y, *et al*. MiR-3188 regulates nasopharyngeal carcinoma proliferation and chemosensitivity through a FOXO1-modulated positive feedback loop with mTOR-p-PI3K/AKT-c-JUN[J]. Nat Commun, 2016, 7: 11309. DOI:10.1038/ncomms11309.

[19] PARK J, KO Y S, YOON J, *et al*. The forkhead transcription factor FOXO1 mediates cisplatin resistance in gastric cancer cells by activating phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. Gastric Cancer, 2014, 17(3): 423-430. DOI:10.1007/s10120-013-0314-2.

[20] 王孝强, 李荀, 曾凡星. 运动骨骼肌 ERK1/2 与 mTOR 通路关系的研究[J]. 沈阳体育学院学报, 2016, 35(5): 49-55.
WANG X Q, LI X, ZENG F X. Relationship between mTOR and ERK1/2 pathway in rat's skeletal muscle during exercise[J]. J Shenyang Sport Univ, 2016, 35(5): 49-55.

[21] ZHOU P X, BLAIN A E, NEWMAN A M, *et al*. Sporadic and endemic Burkitt lymphoma have frequent FOXO1 mutations but distinct hotspots in the AKT recognition motif[J]. Blood Adv, 2019, 3(14): 2118-2127. DOI:10.1182/bloodadvances.2018029546.

[22] ZHANG K B, GUO X Q, YAN H, *et al*. Phosphorylation of forkhead protein FoxO1 at S253 regulates glucose homeostasis in mice[J]. Endocrinology, 2019, 160(5): 1333-1347. DOI:10.1210/en.2018-00853.

[23] JU Y H, XU T J, ZHANG H K, *et al*. FOXO1-dependent DNA damage repair is regulated by JNK in lung cancer cells [J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1284-1292. DOI:10.3892/ijo.2014.2269.

[24] HORI Y, OZEKI M, HIROSE K, *et al*. Analysis of mTOR pathway expression in lymphatic malformation and related diseases[J]. Pathol Int, 2020. [Epub ahead of print]. DOI:10.1111/pin.12913

[25] 付鹏宇, 胡扬, 李燕春, 等. 低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 423-432. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.002.
FU P Y, HU Y, LI Y C, *et al*. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2019, 27(4): 423-432. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.04.002.

[26] KANAO T, SAWADA T, DAVIES S A, *et al*. The nitric oxide-cyclic GMP pathway regulates FoxO and alters dopaminergic neuron survival in Drosophila [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e30958. DOI: 10.1371/journal.pone.0030958.

[27] RENA G, WOODS Y L, PRESCOTT A R, *et al*. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion[J]. EMBO J, 2002, 21(9): 2263-2271. DOI:10.1093/emboj/21.9.2263.

[28] ZHANG X H, GAN L X, PAN H Y, *et al*. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding[J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45276-45284. DOI:10.1074/jbc.M208063200.

(收稿:2020-03-22;修回:2020-05-15)
(编辑 汪勤俭)