DOI:10.16016/j.2097-0927.202303072

# 去卵巢大鼠肌肉衰减症模型构建及雌激素补充治疗的实验研究

黄昱彬,凌 丽,熊正爱 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院妇产科

[摘要] **目的** 建立 SD 大鼠绝经后肌肉衰减症模型,观察雌激素补充对肌肉衰减症的治疗作用。**方法** ①44 只 12 周龄雌性 SD 大鼠(体质量 220±20 g)按体质量分层随机抽样分为假手术(SHAM)组、去卵巢(ovariectomized, OVX)组,每组 22 只。OVX 组行双侧卵巢切除术,SHAM 组行假手术,监测体质量,电子抓力仪测量大鼠前肢抓力,12 周后通过双能 X 射线分析仪(DXA)分析身体成分,通过相对瘦质量判定建模是否成功,而后每组各处死 10 只取腓肠肌,用腓肠肌质量/体质量得出肌肉衰减症指数(sarcopenia index, SI),HE 染色观察腓肠肌肌纤维横截面积,电镜下观察肌原纤维超微结构。②余下大鼠进一步分为假手术(SHAM)组、假手术+油剂注射(SHAM+O)组、去卵巢(OVX)组、去卵巢+雌激素补充(OVX+$E_2$)组,每组 6 只,OVX+$E_2$ 组每日予以 17β-雌激素腹部皮下注射,SHAM+O 组每日予以 10% DMSO+90%芝麻油皮下注射,监测体质量、前肢抓力,干预 8 周后 DXA 分析体成分,ELISA 法测量血清 $E_2$、FSH,HE 染色观察腓肠肌肌纤维横截面积,电镜下观察肌原纤维超微结构,免疫荧光染色分析 Bax、Bcl-2 的表达。**结果** ①建模 12 周后,OVX 组相对瘦质量显著降低($P<0.001$),提示建模成功,体质量($P<0.001$)、体脂率显著升高($P<0.001$),相对抓力($P<0.001$)、SI 值、肌纤维横截面积显著降低($P<0.01$),电镜下线粒体密度降低($P=0.012$)。②经雌激素补充治疗后,OVX+$E_2$ 组抓力、相对瘦质量、体质量、体脂率、肌纤维横截面积、电镜下线粒体密度均恢复到 SHAM 组水平;免疫荧光显示 OVX 组较 SHAM 与 OVX+$E_2$ 组 Bcl-2/Bax 显著降低($P<0.01$)。**结论** 成功建立了大鼠绝经后肌肉衰减症模型,雌激素补充治疗能显著改善去卵巢大鼠的肌肉衰减,可能与雌激素抑制肌细胞凋亡有关。

[关键词] 肌肉衰减症;雌激素替代疗法;大鼠模型;卵巢切除术;凋亡
[中图法分类号] R589.305; R711.51; R977.12 [文献标志码] A

# Establishment of rat model of sarcopenia by ovariectomy and estrogen replacement therapy

HUANG Yubin, LING Li, XIONG Zheng'ai Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To establish a rat model of postmenopausal sarcopenia and explore the therapeutic effect of estrogen supplementary therapy on the disease. **Methods** ① Forty-four 12-week-old female SD rats (220±20 g) were randomly divided into sham group and ovariectomized (OVX) group by stratified random sampling based on body weight, with 22 rats in each group. The rats of the OVX group were given bilateral ovariectomy, while those of the SHAM group underwent sham surgery. The body weight was monitored, and the grip strength of the forelimb was measured using an electronic grip strength meter. In 12 weeks after surgery, the body composition was analyzed by X-ray absorptiometry (DXA) to identify the model establishment by relative lean mass. Ten rats in each group were sacrificed to harvest the gastrocnemius, and then sarcopenia index (SI) was calculated as the ratio of gastrocnemius mass to body weight. HE staining and transmission electron microscopy were applied respectively to observe the cross-sectional area of the muscle fibers and the structure of myofibrils were determined. ② The remaining rats were further divided into SHAM

[通信作者] 熊正爱, E-mail: docxza@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

group, SHAM+O group, OVX group and OVX+$E_2$ group, with 6 rats in each group. 17β-estradiol was injected subcutaneously in OVX+$E_2$ group, while control solvent (10% DMSO+90%sesame oil) was injected subcutaneously in SHAM+O group. The grip strength and body composition were measured and body composition was analyzed. ELISA was used to measure the serum levels of $E_2$ and FSH, HE staining was employed to observe the cross-sectional area of gastrocnemius muscle fibers, electron microscopy was conducted to observe the ultrastructure of myofibrils, and immunofluorescence staining was applied to analyze the expression of Bax and Bcl-2. **Results** ①After 12 weeks of modeling, the rats in the OVX group had significant lower relative lean mass ($P<0.001$), indicating the successful establishment of sarcopenia model, and had obviously increased body weight ($P<0.001$) and body fat rate ($P<0.001$), but decreased relative grip ($P<0.001$), SI value, average cross sectional area of the muscle fibers ($P<0.01$), and mitochondrial density ($P=0.012$). ② Estrogen supplementary therapy resulted in similar body weight, body fat rate, grip strength, relative lean mass, SI value, average cross sectional area of the muscle fibers, and mitochondrial density in the rats in OVX+$E_2$ group when compared with those of SHAM group. Immunofluorescence assay revealed that OVX group had a notably lower Bcl-2/Bax ratio than the SHAM and OVX+$E_2$ groups ($P<0.01$). **Conclusion** A rat model of postmenopausal sarcopenia is successfully established. Estrogen supplementary therapy can significantly improve the muscle mass loss in ovariectomized rats, which may be associated with estrogen inhibiting myocyte apoptosis.

[**Key words**] sarcopenia; estrogen replacement therapy; rat model; ovariectomy; apoptosis

Corresponding author: XIONG Zheng'ai, E-mail: docxza@163.com

肌肉衰减症是一种严重危害老年人健康及生理功能的老年综合征,是当今社会重要的公共健康问题。亚洲肌少症工作组(Asian Working Group on sarcopenia,AWGS)将肌肉衰减症定义为与增龄相关的进行性、全身肌量减少和/或肌强度下降或肌肉生理功能减退[1-2]。肌肉衰减症是环境和遗传因素共同作用的复杂疾病,炎症、免疫抑制、合成代谢抵抗和氧化应激程度增加与肌肉衰减症的发生相关[3]。目前对于肌肉衰减症的研究更多聚焦于衰老因素,而绝经后性激素缺失引起女性肌肉衰减的相关研究较少,但性激素的作用不可忽视。

绝经后女性是肌肉衰减症的高危人群,老年女性比老年男性肌肉衰减症患病风险更高[4-5]。这与女性绝经后性激素的变化密切相关[6],当女性进入更年期后,由于激素水平衰退与衰老的共同作用,其肌肉质量、肌力和躯体功能会加速衰减[7],然而其潜在的分子机制仍未阐明,有研究认为雌激素在骨骼肌中能够发挥抗炎、抗凋亡、调节蛋白质合成分解、改善胰岛素抵抗、维护线粒体功能稳定的作用,并有助于肌肉卫星细胞的维持、增殖、分化,促进肌肉再生[8-9],但雌激素补充对肌肉衰减症的疗效仍有争议[10-12]。因此,研究绝经后激素变化对肌肉组织衰减的发生发展很有必要,亟需建立较为成熟的动物模型。

目前肌肉衰减症动物模型常采用衰老模型、去神经支配模型、免疫系统异常模型、废用模型、转基因模型等[13-14],系统描述肌肉衰减症的去卵巢动物模型的研究较少。为了建立绝经后肌肉衰减症的动物模型,探讨雌激素对肌肉衰减症的影响,本研究通过双侧卵巢切除术建立育龄期 SD 大鼠绝经模型,观察低雌激素状态对育龄期大鼠肌肉力量、质量、肌原纤维超微结构的影响;建模成功后进行雌激素补充治疗,观察其对绝经后肌肉衰减症的改善作用,为进一步的机制研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

44 只 10 周龄 SPF 级雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体质量 (220±20) g,购于重庆医科大学动物实验中心[动物合格证号:SCXK (渝) 2018-0003]。喂养及手术于重庆医科大学动物实验中心 SPF 屏障设施内。实验室温度为(22±2) ℃, 湿度 60%, 光照 12 h (8:00~20:00)。本研究获得重庆医科大学附属第二医院伦理委员会批准(2023-11)。适应性喂养至 12 周龄时建模,期间通过阴道涂片确定大鼠动情周期是否正常。

### 1.2 实验试剂与仪器

17β-雌二醇购自美国 Med Chem Express 公司。FSH ELISA 试剂盒、$E_2$ ELISA 试剂盒购自上海江莱生物科技有限公司。苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、Bax 兔单克隆抗体、Bcl-2 兔单克隆抗体、HRP 标记山羊抗

兔 IgG、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG、CY3、EDTA 抗原修复液(pH8.0)、BSA、DAPI 染液均购自武汉赛维尔生物公司。酶标分析仪(Rayto RT-6100)购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。大小鼠抓力测量仪(SA415)购自安徽赛昂斯医疗科技有限公司,双能 X 射线(DXA)分析仪购自美国 Hologic 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立 将 44 只大鼠按体质量分层随机抽样,分为假手术(SHAM)组、去卵巢(ovariectomized, OVX)组,每组各 22 只。OVX 组行双侧卵巢切除术:用2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉后,将大鼠取仰卧位置于手术台上,固定四肢,备皮,消毒,沿腹正中线切开皮肤,逐层进腹,沿 Y 字形子宫找到双侧呈黄豆大小的粉红色卵巢,结扎韧带和血管后切除卵巢,缝合皮肤。SHAM 组:相同方法麻醉、进腹,暴露与模型组相似手术时间后缝合皮肤。术后给予青霉素预防感染,手术后每周监测体质量及摄食量,在术后 12 周行抓力测量及 DXA 检查,而后 2 组大鼠各处死 10 只称取腓肠肌湿质量,透射电镜观察腓肠肌超微结构改变,以相对瘦质量为判定绝经后肌肉衰减症模型是否成功建立的金标准,以肌肉衰减指数(sarcopenia index,SI)、抓力为辅助判定指标。SI 值定义为靶骨骼肌的质量(mg)/体质量(g)。

1.3.1.1 前肢抓力测量 将大鼠前肢平放在抓力测量仪感应杆上,当大鼠抓牢感应杆后,平行向后拖拽大鼠尾巴直至其松开抓力杆为止,抓力测量仪自动记录最大抓力。重复测量 3 次,记录最大值为绝对抓力。通过相对抓力(绝对抓力/体质量)判断大鼠肌力变化。

1.3.1.2 体成分分析 大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉后,将其俯卧置于 DXA 设备上进行全身扫描及体成分分析,获得大鼠体脂率与瘦质量。通过相对瘦质量(瘦质量/体质量)差异评估肌肉质量变化,判定肌肉衰减症建模效果。

1.3.1.3 样本收集与处理 大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g)麻醉后,心脏取血处死大鼠后迅速分离双侧腓肠肌组织,称取湿质量计算 SI 值,作为判断大鼠肌肉衰减症模型是否成功以及判断雌激素补充治疗效果的辅助指标[15];取部分腓肠肌固定于戊二醛液中,透射电镜下进行结构观察;剩余腓肠肌放入多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋后切片、HE 染色后显微镜下观察,通过 Image-pro-plus 软件测量肌纤维横截面积,每个标本测量 600~800 个肌纤维,计算平均肌纤维横截面积。留存血清,利用 ELISA 试剂盒测定血清 $E_2$、FSH 水平,450 nm 波长下依序测量各孔光密度值。

1.3.1.4 透射电镜观察腓肠肌超微结构 每组随机选择 4 只大鼠进行实验,于腓肠肌中段表面切取约 2 mm×2 mm 且尽量薄的组织固定于戊二醛液中,进一步行脱水、包埋、固化与超薄切片,通过透射电子显微镜(日本日立)观察肌原纤维超微结构;每个标本随机拍摄 9 张图(×7 000),在单位视野下计数线粒体,线粒体密度=线粒体个数/44.443 6 $\mu m^2$,统计得出总体的线粒体密度;另外,每个标本随机选择 3 张图,每张图随机选取 3 个肌节单位,测量肌小节、明带、暗带、H 带等肌原纤维超微结构的长度。

1.3.2 建模后雌激素补充疗效观察 判断建模成功后,将所剩的 24 只大鼠进一步分为假手术(SHAM)组、假手术+油剂注射(SHAM+O)组、去卵巢(OVX)组、去卵巢+雌激素补充(OVX+$E_2$)组。其中,OVX+$E_2$ 组进行连续 8 周的 17β-雌二醇腹部皮下注射,20 μg/(kg/d)[16-17],雌二醇溶于 10% DMSO 与 90%芝麻油的混合溶剂中。SHAM+O 组每日予以相同剂量的对照溶剂(10% DMSO+90%芝麻油)皮下注射。

治疗期间每周监测体质量及摄入量,治疗 8 周后,行抓力测量及 DXA 检查,而后处死所有大鼠,比较各组肌肉质量及超微结构的差异,判断治疗效果。具体方法除 1.3.1 所述外,每组各随机取 3 只大鼠对腓肠肌石蜡切片行免疫荧光染色,显微镜下观察。

1.3.3 同源免疫荧光双标技术检测腓肠肌 Bax、Bcl-2 表达 石蜡切片脱蜡至水,置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,中火 8 min,停火 8 min,转中低火 7 min,PBS 洗涤后放入 3%双氧水溶液,室温避光孵育 25 min,封闭内源性的过氧化物酶;PBS 洗涤后 3% BSA 封闭 30 min;滴加 PBS 按 1∶5 000 配好的兔 Bax 抗体,湿盒内 4 ℃孵育过夜;洗涤后滴加 HRP 标记山羊抗兔 IgG,室温孵育 50 min;洗涤后滴加 CY3,避光室温孵育 10 min;洗涤后进行抗原修复,滴加 PBS 按 1∶200 配好的兔 Bcl-2 抗体,湿盒内 4 ℃孵育过夜;洗涤后滴加 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG,避光室温孵育 50 min;洗涤后滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10 min,洗涤后荧光淬灭剂封片,正置荧光显微镜下采图。Bax 显红色荧光,Bcl-2 显绿色荧光,细胞核显蓝色荧光。未活化的 Bax 主要位于细胞质中,收到凋亡信号时被活化,改变构象并转移到线粒体外膜上;Bcl-2 一般位于线粒体、内质网及核膜上[18];骨骼肌线粒体主要集中于肌膜下,因而红色荧光主要集中于肌膜,并弥散分布于细胞浆,绿色荧光主要集中于细胞核与肌膜,并弥散分布于细胞浆。每个标本随机采 5 张图进行分析。

### 1.4　统计学分析

实验数据由 Excel、SPSS 25.0 和 Graphpad Prism 7.0 统计软件处理。结果均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并用单尾 $t$ 检验与单因素方差分析比较组间差异。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　绝经后肌肉衰减症模型的建立

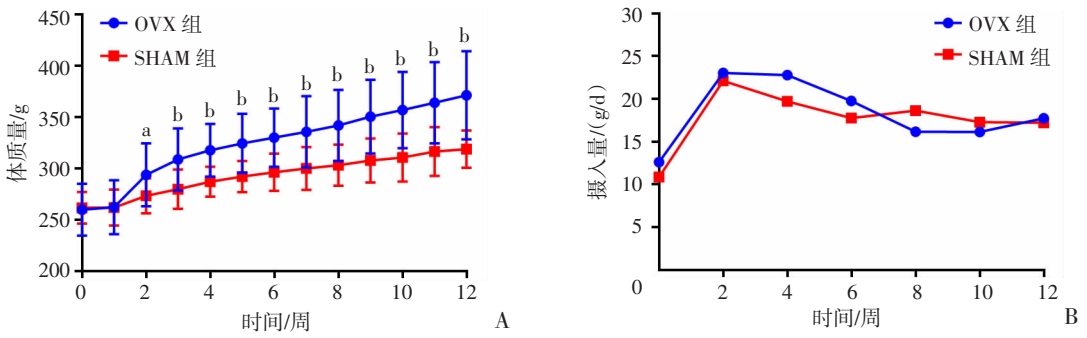
2.1.1　体质量及摄食变化　　如图 1 所示,建模后,随年龄增长,两组大鼠体质量均逐渐增长,但 OVX 组大鼠的体质量增长速度明显高于 SHAM 组,建模 2 周后即有统计学差异,3 周后差异更加显著($P<0.001$)。而两组摄入量并无明显差异,在建模手术后 1 周内,大鼠处在麻醉与手术创伤恢复期,摄入量一过性下降,而后波动在 20 g/d 左右。

2.1.2　抓力测量　　如表 1 所示,在建模 12 周后,OVX 组大鼠较 SHAM 组绝对抓力显著降低($P<0.001$),经体质量校正后,相对抓力降低更加明显($P<0.001$)。

2.1.3　体成分分析　　如表 1 所示,在建模 12 周后,OVX 组大鼠相对瘦质量显著低于 SHAM 组($P<0.001$),且 OVX 组相对瘦质量低于 SHAM 组 2 个标准差以上,符合肌肉衰减症大鼠肌肉量减少的诊断标准。同时,OVX 组大鼠体脂率显著高于 SHAM 组($P<0.001$)。

2.1.4　腓肠肌质量的变化　　如表 1 所示,与假手术组相比,在建模 12 周后模型组大鼠腓肠肌 SI 值显著降低($P=0.003$)。

2.1.5　腓肠肌肌纤维横截面积　　HE 染色的腓肠肌横切面显示,SHAM 组平均肌纤维横截面积显著高于 OVX 组($P=0.002$,图 2)。

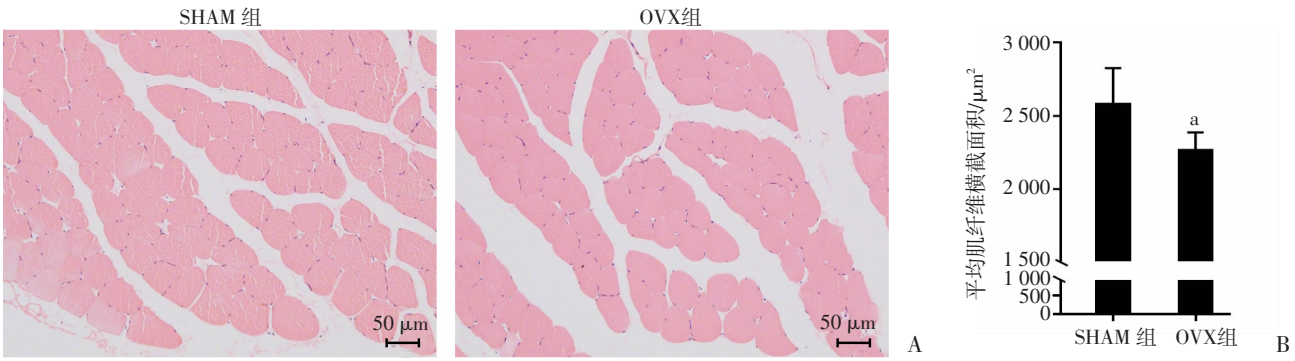



a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 SHAM 组比较

**图 1　建模期间两组大鼠体质量(A)、摄入量(B)变化**

**表 1　建模终点两组大鼠抓力、体成分、SI 值比较**　($\bar{x}\pm s$, $n=22$)

| 组别 | 绝对抓力/gf | 相对抓力/(gf/g) | 相对瘦质量 | 体脂率/% | SI 值/(mg/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| SHAM 组 | 1 303±49.22 | 4.01±0.28 | 0.783±0.026 | 10.81±2.96 | 6.095±0.322 |
| OVX 组 | 1 152±76.07 | 3.17±0.17 | 0.686±0.059 | 21.11±7.34 | 5.585±0.392 |
| $t$ 值 | 5.277 | 8.231 | 4.781 | 4.114 | 3.179 |
| $P$ 值 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | <0.001 | 0.003 |



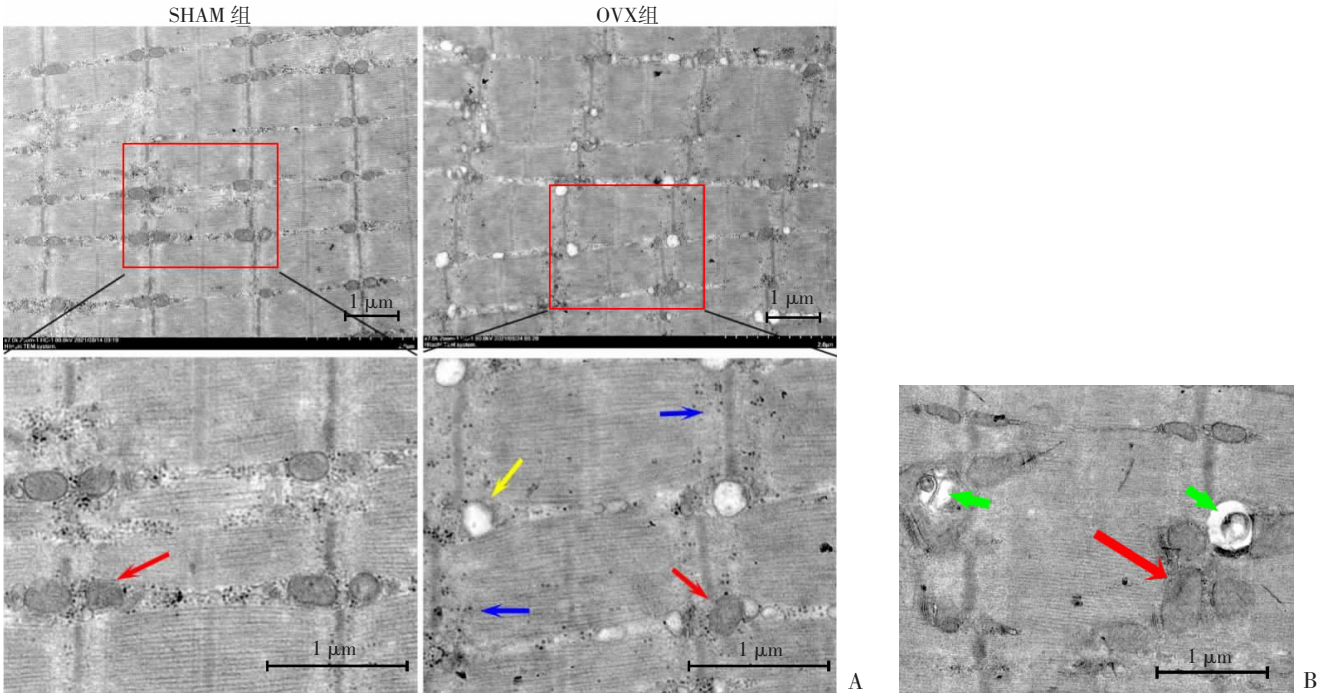

A:HE 染色观察大鼠腓肠肌横切面;B:腓肠肌平均肌纤维横截面积　a:$P=0.002$,与 SHAM 组比较

**图 2　建模终点两组大鼠腓肠肌肌纤维横截面积的改变**

2.1.6　腓肠肌超微结构　　如图3所示,在建模12周时,与SHAM组相比,OVX组大鼠骨骼肌肌纤维间线粒体大小不一、数量减少、分布不均,部分线粒体肿胀、双膜结构模糊或消失,核糖体弥散、减少,部分视野见肌浆网大量扩张,部分视野可见线粒体自噬小体,这是肌细胞清除受损线粒体的标志。如表2所示,OVX组大鼠线粒体密度显著降低($P=0.012$),而肌小节、明带、暗带、H带长度无明显改变。

2.2　建模后雌激素补充疗效观察

2.2.1　体质量及摄食变化　　如图4所示,雌激素补充期间,SHAM组、SHAM+O组体质量稳定,OVX组体质量缓慢上升,OVX+$E_2$组体质量在用药2周内快速下降,在第7周时降至SHAM组水平,与OVX组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。摄入量除OVX+$E_2$组在用药5周内有所下降,其余各组摄入量均稳定且无明显差异。

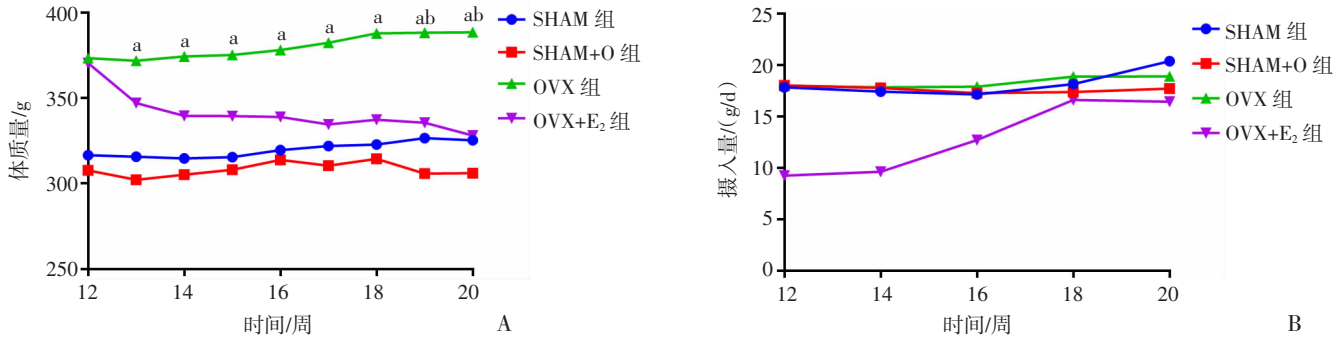



A:电镜下两组大鼠腓肠肌的典型表现;B:OVX组部分视野下可见自噬小体　红色箭头:线粒体;红色大箭头:肿胀、膜结构模糊的线粒体;黄色箭头:肌浆网;蓝色箭头:弥散的核糖体;绿色箭头:自噬小体

**图3　透射电镜观察建模终点两组大鼠腓肠肌超微结构**

**表2　建模终点两组大鼠腓肠肌肌原纤维超微结构定量分析**($\bar{x}\pm s$,$n=36$)

| 组别 | 线粒体密度/44.443 6 μm$^2$ | 肌小节长度/μm | 明带长度/μm | 暗带长度/μm | H带长度/μm |
|---|---|---|---|---|---|
| SHAM组 | 27.73±10.23 | 1.895±0.116 | 0.477±0.105 | 1.490±0.079 | 0.147±0.022 |
| OVX组 | 21.60±13.46 | 1.872±0.146 | 0.472±0.109 | 1.461±0.118 | 0.145±0.022 |
| $t$值 | 2.291 | 0.739 | 0.200 | 1.235 | 0.403 |
| $P$值 | 0.012 | 0.463 | 0.842 | 0.221 | 0.688 |




a:$P<0.05$,与SHAM组比较;b:$P<0.05$,与OVX+$E_2$组比较

**图4　治疗期间各组大鼠体质量(A)、摄入量(B)变化**

2.2.2　抓力、身体成分及腓肠肌质量　　如表3所示,OVX组较SHAM组绝对抓力、相对抓力、相对瘦质量明显降低($P<0.01$),体脂率明显升高($P<0.01$),SI值降低。OVX+$E_2$组抓力、相对瘦质量、体脂率均恢复到SHAM组水平,且SI值显著高于OVX组($P<0.01$)。说明雌激素补充能有效改善卵巢切除后大鼠的肌力和肌肉量的丢失。

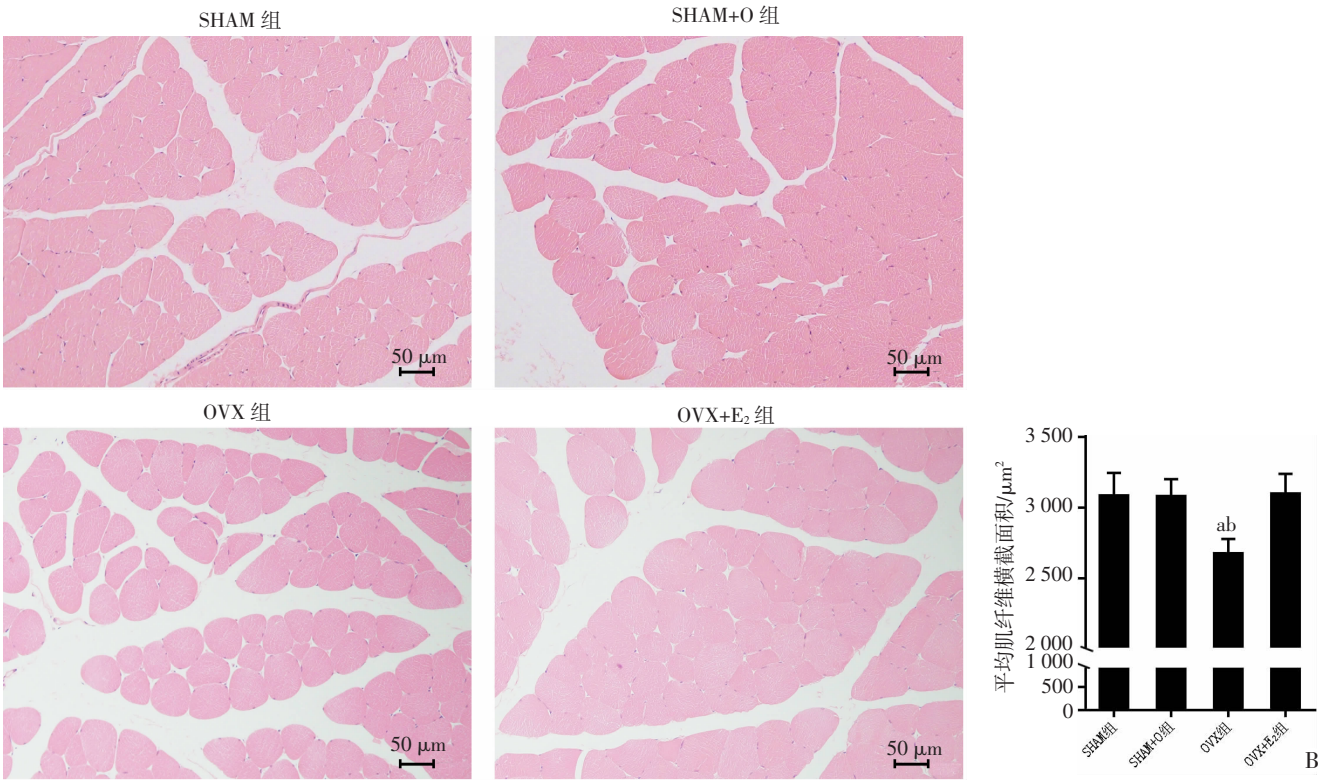
2.2.3　腓肠肌肌纤维横截面积　　HE染色的腓肠肌横切面显示,SHAM组与OVX+$E_2$组平均肌纤维横截面积显著高于OVX组($P<0.01$,图5)。

2.2.4　腓肠肌超微结构　　如图6所示,在建模20周时,与SHAM组相比,OVX组大鼠骨骼肌肌原纤维间线粒体大小不一、数量减少、分布不均,部分双膜结构模糊或消失,核糖体弥散、减少,部分视野见肌浆网扩张。OVX+$E_2$组肌纤维间线粒体数量较OVX组明显增加,恢复到SHAM组水平,多个视野下可见数个线粒体融合成长条状的现象,提示线粒体融合代谢旺盛;核糖体与肌浆网等蛋白质合成相关器官较SHAM组无变化。如表4所示,OVX组较SHAM组线粒体密度降低($P<0.01$),肌小节、明带、H带显著变长($P<0.01$),暗带无明显变化,而OVX+$E_2$组较SHAM组无明显改变。

**表3　治疗终点各组大鼠抓力、体成分、SI值比较**($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

| 组别 | 绝对抓力/gf | 相对抓力/(gf/g) | 相对瘦质量 | 体脂率/% | SI值/(mg/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| SHAM组 | 1 457±132.10 | 4.53±0.70 | 0.784±0.042 | 14.93±5.71 | 5.842±0.235 |
| SHAM+O组 | 1 426±103.70 | 4.67±0.35 | 0.829±0.039 | 8.08±3.61 | 5.777±0.491 |
| OVX组 | 1 293±16.63$^{ab}$ | 3.39±0.47$^{ac}$ | 0.648±0.064$^{ac}$ | 27.65±7.12$^{ac}$ | 5.288±0.428$^{c}$ |
| OVX+$E_2$组 | 1 416±55.98 | 4.41±0.63 | 0.794±0.102 | 13.85±8.05 | 6.278±0.751 |

a:$P<0.01$,与SHAM组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与OVX+$E_2$组比较



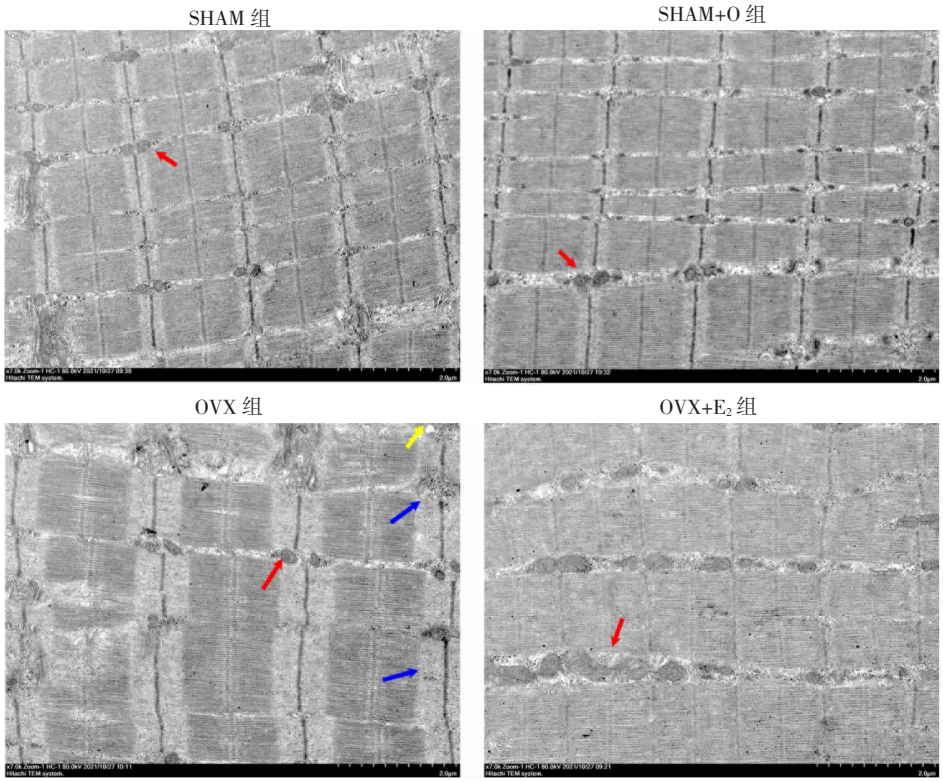

A:HE染色观察各组大鼠腓肠肌;B:腓肠肌平均肌纤维横截面积　a:$P<0.01$,与SHAM组比较;b:$P<0.01$,与OVX+$E_2$组比较

**图5　治疗后各组大鼠腓肠肌肌纤维横截面积的改变**

**表4　治疗后各组大鼠腓肠肌肌原纤维超微结构定量分析**($\bar{x}\pm s$,$n=27$)

| 组别 | 线粒体密度/44.443 6 μm$^2$ | 肌小节长度/μm | 明带长度/μm | 暗带长度/μm | H带长度/μm |
|---|---|---|---|---|---|
| SHAM组 | 18.30±7.15 | 1.846±0.129 | 0.416±0.105 | 1.438±0.057 | 0.137±0.018 |
| SHAM+O组 | 16.59±5.84 | 1.808±0.369 | 0.496±0.140 | 1.385±0.043 | 0.175±0.076 |
| OVX组 | 12.00±4.51$^{ab}$ | 2.147±0.196$^{ab}$ | 0.647±0.174$^{ab}$ | 1.510±0.052 | 0.226±0.112$^{ab}$ |
| OVX+$E_2$组 | 17.81±9.12 | 1.766±0.267 | 0.382±0.177 | 1.389±0.135 | 0.143±0.008 |

a:$P<0.01$,与SHAM组比较;b:$P<0.01$,与OVX+$E_2$组比较




红色箭头:线粒体;黄色箭头:肌浆网;蓝色箭头:弥散的核糖体

**图 6 透射电镜观察治疗后各组大鼠腓肠肌超微结构** (透射电镜×7 000)

2.2.5 性激素水平 如表 5 所示,卵巢切除术后大鼠 $E_2$ 水平显著降低,FSH 升高,经过雌激素补充后,$E_2$ 水平与 SHAM 组一致,FSH 有所降低。

**表 5 治疗终点各组大鼠性激素对比** ($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

| 组别 | $E_2$/(pmol/L) | FSH/(IU/L) |
|---|---|---|
| SHAM 组 | 12.69±1.25 | 1.26±0.26 |
| SHAM+O 组 | 13.00±0.81 | 1.34±0.25 |
| OVX 组 | 7.74±1.88$^{bc}$ | 1.78±0.34$^{a}$ |
| OVX+$E_2$ 组 | 12.71±1.76 | 1.47±0.22 |

a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与 SHAM 组比较;c:$P<0.001$,与 OVX+$E_2$ 组比较

2.2.6 腓肠肌 Bax、Bcl-2 免疫荧光 荧光强度显示,与 SHAM 组、OVX+$E_2$ 组相比,OVX 组 Bax 表达增多($P<0.01$),Bcl-2/Bax 降低($P<0.01$)。见图 7、表 6。

**表 6 免疫荧光染色组间相对荧光强度对比** ($\bar{x}\pm s$,$n=15$)

| 组别 | Bax | Bcl-2 | Bcl-2/Bax |
|---|---|---|---|
| SHAM 组 | 9.911±1.575$^{b}$ | 11.486±1.265 | 1.170±0.104$^{b}$ |
| OVX 组 | 17.461±2.060 | 11.240±0.802 | 0.652±0.089 |
| OVX+$E_2$ 组 | 12.121±1.894$^{bc}$ | 12.840±1.542$^{ac}$ | 1.080±0.181$^{b}$ |

a:$P<0.001$,与 OVX 组比较;b:$P<0.01$,与 SHAM 组比较

## 3 讨论

随着平均寿命的增加,全球人口老龄化已经成为一个严峻的挑战,肌肉衰减症是一种严重危害老年人健康及生理功能的老年综合征,是当今社会重要的公共健康问题。中老年女性因绝经后性激素缺乏更易引发肌肉衰减症[6],因而女性激素相关的肌肉衰减症值得更多的关注。既往研究发现,雌激素在骨骼肌中能够发挥抗炎、抗凋亡、调节蛋白质合成分解、维护线粒体功能稳定的作用,并有助于肌肉卫星细胞的维持、增殖、分化,促进肌肉再生[8-9];雌激素能促进能量内稳态,改善体脂分布,减少胰岛素抵抗和炎症发生[19],而胰岛素抵抗与炎症环境被认为是肌肉衰减症发病机制汇总的核心环节[3],但雌激素在肌肉衰减症发生发展中的具体作用机制尚未完全阐明,亟需建立较为成熟的动物模型,以研究绝经后激素变化对肌肉组织的作用。目前肌肉衰减症动物模型常采用衰老模型、去神经支配模型、免疫系统异常模型、内分泌系统异常模型、废用模型、转基因模型等[13-14],鲜有研究整体系统地报道肌肉衰减症的去卵巢动物模型。本研究为绝经后肌肉衰减症的动物模型提供参考,为探索绝经后肌肉衰减症的发生机制与治疗方法提供基础。

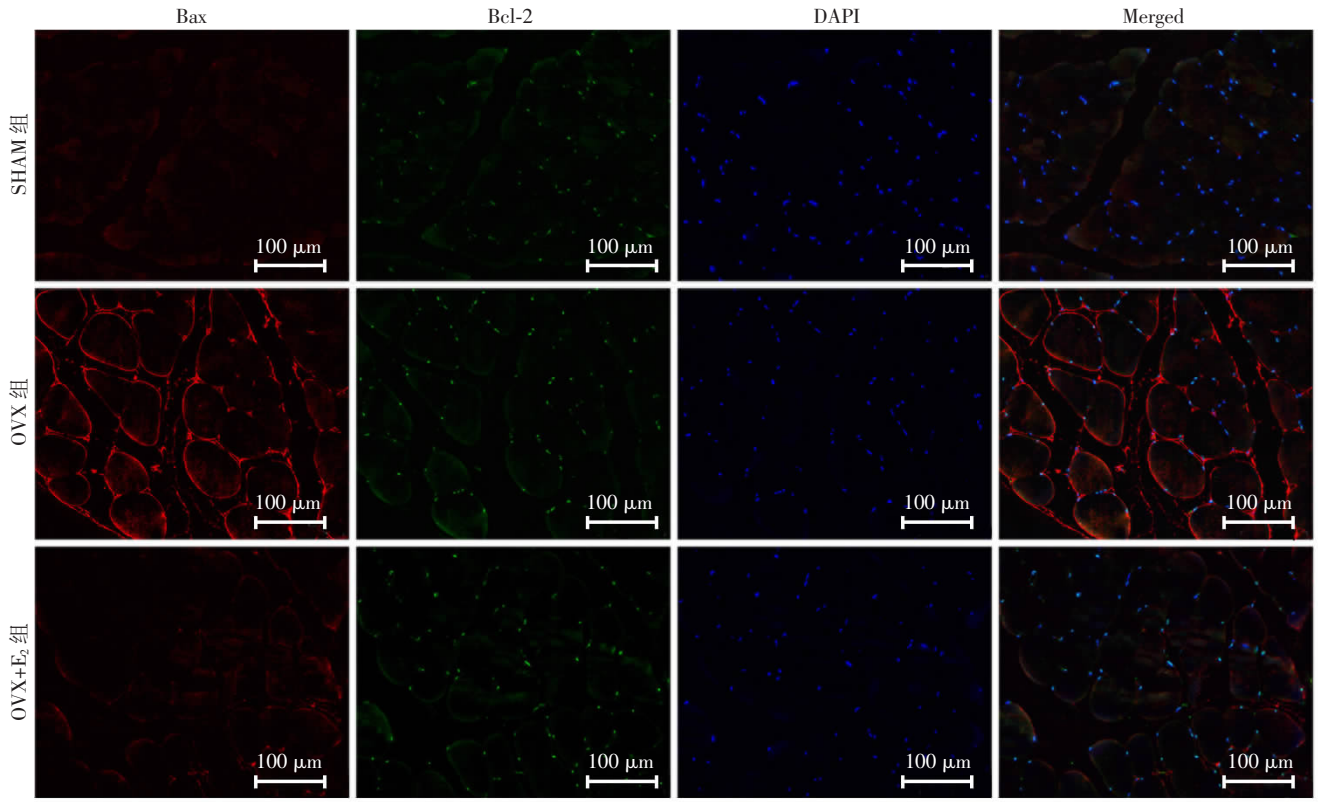



**图 7 各组大鼠腓肠肌 Bax、Bcl-2 免疫荧光观察**

本研究中雌激素补充能够有效缓解去卵巢大鼠的肌肉衰减,在一定程度上表明去卵巢大鼠肌肉衰减的发生是雌激素变化的结果,而不是去卵巢后其他继发因素的影响。本研究对 12 周龄育龄期大鼠行去势手术模拟绝经状态,目的是排除衰老对绝经后肌肉的影响,同时尽量避免大鼠生长发育对肌肉衰减的干扰。建模时机与建模周期对绝经后肌肉衰减症模型的构建十分关键[14],在快速生长发育期建模可能观察不到肌肉萎缩的现象;肌肉衰减是个累积的过程,建模周期过短同样无法出现肌肉萎缩改变。本实验在去势手术 12 周后成功建立了大鼠绝经后肌肉衰减症模型,在此基础上也可以对模型进行优化,如选择月龄更大但未衰老的动物或延长建模时间,更容易观察到肌肉衰减症的典型变化。此外,本研究中大鼠自由活动,但未记录大鼠活动量,以后的研究中可以对此进行改进以排除大鼠运动量因素对肌肉衰减模型的干扰。

临床上肌肉衰减症诊断标准主要包括两个方面:骨骼肌质量的下降与骨骼肌肌力的减退[1],这也是建立肌肉衰减症动物模型的依据[13]。利用 DXA 测定肌肉质量是目前临床上首选用于评估肌肉衰减的方法[20]。因为个体体型差异,直接测得的瘦质量并不能准确反映肌量的多少,临床上需要用身高或体质量指数(BMI)校正[2],而动物实验中则以体质量校正得到相对瘦质量。在动物实验中尚无统一的肌肉衰减症诊断标准,在既往研究中常用肌肉衰减指数(SI 值)粗略判定肌肉衰减症的模型[15],本研究选用 DXA 检测肌量,参考亚洲肌少症工作组(AWGS)临床肌少症诊断标准之一,即肌量较青年成人降低 2 个标准差[2],以相对瘦质量在组间存在统计学差异且模型组平均值低于对照组平均值 2 个标准差为诊断依据,同时 SI 值作为辅助指标也可部分反映全身肌量。本研究还通过抓力检测评估肌肉功能。2018 年欧洲老年人肌少症工作组(EWGSOP)发布的共识强调,低肌力是肌肉衰减症的关键特征,肌肉数量和质量降低是其诊断依据;在预测不良后果方面,肌力比肌量更重要[21]。此外,通过 HE 染色进一步发现 OVX 大鼠骨骼肌肌纤维平均横截面积减少,经雌激素补充治疗后得以改善。本实验结果显示对育龄期 SD 大鼠行双侧卵巢切除术 12 周后成功建立了绝经后肌肉衰减症模型,验证了雌激素缺乏对于育龄期大鼠肌力、肌量的明显损害作用,且通过雌激素补充能显著改善绝经后肌肉衰减大鼠肌力、肌量,甚至接近绝经前水平。

肌力反映的是肌肉收缩功能,肌原纤维是骨骼肌细胞的收缩单位,由构成暗带的粗肌丝(肌球蛋白)和构成明带的细肌丝(肌动蛋白)组成,肌原纤维的组成成分直接影响着肌肉的生物学功能。研究发现,当老年性肌肉衰减症发生时,肌原纤维出现相应的老化改变,表现为肌小节长度增加、暗带不变、明带长度增加[22];

本研究中大鼠在切除卵巢 12 周时并没有观察到肌小节、明暗带发生改变,而在切除卵巢 20 周后出现了腓肠肌肌小节、明带、H 带变长,暗带不变的现象,符合老年性肌肉衰减症的表现,而雌激素补充阻止了此改变。说明雌激素对肌肉的影响虽低于衰老带来的影响,但这一影响可随建模时间的延长而出现积累效应,达到与衰老相似的萎缩性改变。这表明绝经后肌肉衰减症不仅仅是衰老引起的肌肉衰减症的一部分,雌激素的缺乏会额外增加老年女性患肌肉衰减症的风险。

线粒体是细胞产生能量和细胞信号传递的关键细胞器,在广泛的细胞生理过程中起着至关重要的作用。线粒体功能障碍在肌肉衰减症的发生中起着重要作用。所有含有线粒体的细胞,包括骨骼肌细胞,通过以下途径来维持线粒体的健康,如线粒体生物发生、线粒体衍生囊泡、线粒体动力学(线粒体的融合和分裂过程)和线粒体自噬(通过自噬负责清除线粒体的过程)[23]。研究表明,线粒体动力学异常及线粒体自噬异常参与了肌肉衰减症的发生[23]。CAPLLONCHAMER 等[19]的实验证明,雌激素可以通过上调 PGC-1α 的表达促进大鼠骨骼肌线粒体的生物合成。RIBAS 等[24]发现在肌肉特异性 ERα 敲除(MERKO)小鼠中骨骼肌线粒体形态异常、线粒体动力学受损、肌肉氧化代谢能力下降。本研究中,去卵巢大鼠骨骼肌的线粒体密度下降、自噬小体出现表明线粒体受损,肌浆网、核糖体等蛋白质合成器官受损,经雌激素补充治疗后可以改善,且雌激素补充治疗后去卵巢大鼠出现明显的线粒体融合现象,而线粒体的融合与线粒体功能恢复密不可分[23]。通过对腓肠肌超微结构的观察,本研究发现雌激素缺乏会引起肌肉能量代谢与蛋白质合成功能障碍,解释了去卵巢大鼠的显著肥胖、肌肉衰减改变,而雌激素补充可改善以上损伤。

雌激素可以在各种组织中发挥抗凋亡作用[25],但在骨骼肌组织中雌激素如何发挥抗凋亡作用尚不明确。研究发现雌激素可以通过 p53、Bcl-2 和 FoxO 家族抑制 $H_2O_2$ 诱导的 C2C12 成肌细胞凋亡[26]。B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)家族主要通过线粒体途径调控细胞凋亡。在骨骼肌中,Bcl-2 家族蛋白通过联合细胞内 $Ca^{2+}$信号、JNK 通路、p53 基因、泛素蛋白 Atg12,以及 Caspase 酶等对细胞内的自噬和凋亡进行双向调控[27],Bcl-2 是家族中的抗凋亡蛋白,Bax 是家族中的促凋亡蛋白,二者的比值是反映组织细胞凋亡的敏感指标。本实验通过免疫荧光染色发现 OVX 组骨骼肌中 Bcl/Bax 显著降低,经雌激素补充治疗后改善,提示雌激素补充可以抑制绝经后大鼠的骨骼肌细胞凋亡。

综上所述,对育龄期 SD 大鼠去势 12 周后成功建立了绝经后肌肉衰减症模型,雌激素补充治疗能显著改善去卵巢大鼠的肌量、肌力、骨骼肌超微结构以及骨骼肌能量代谢功能,这可能与雌激素抑制肌细胞凋亡有关。本研究结果为进一步研究雌激素在绝经后肌肉衰减症的发生中的作用机制提供了实验基础。

**参考文献:**


[1] 姜珊, 康琳, 刘晓红. 2019 亚洲肌少症诊断及治疗共识解读[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(4): 373-376. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2020.04.002.
JIANG S, KANG L, LIU X H. Interpretation of Asian Working Group for sarcopenia: 2019 consensus update on sarcopenia diagnosis and treatment[J]. Chin J Geriatr, 2020, 39(4): 373-376. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2020.04.002.

[2] CHEN L K, WOO J, ASSANTACHAI P, *et al*. Asian Working Group for Sarcopenia: 2019 consensus update on sarcopenia diagnosis and treatment[J]. J Am Med Dir Assoc, 2020, 21(3): 300-307.e2. DOI: 10.1016/j.jamda.2019.12.012.

[3] 李春微, 于康. 肌肉衰减症发病机制研究进展及其对临床诊断的指导意义[J]. 中国科学(生命科学), 2021, 51(8): 1170-1179. DOI: 10.1360/SSV-2021-0188.
LI C W, YU K. Research progress on pathogenesis of muscular dystrophy and its guiding significance for clinicaldiagnosis[J]. Sci Sin Vitae, 2021, 51(8): 1170-1179. DOI: 10.1360/SSV-2021-0188.

[4] GAO J X, QIU Y D, HOU Y F, *et al*. Influencing factors for the decline of limb muscle strength and the association with all-cause mortality: evidence from a nationwide population-based cohort study[J]. Aging Clin Exp Res, 2022, 34(2): 399-407. DOI: 10.1007/s40520-021-01940-w.

[5] 夏晓妹, 王红, 姬艳博, 等. 中国社区老年人肌肉衰减症影响因素的 Meta 分析[J]. 现代预防医学, 2022, 49(5): 946-950, 960. DOI: 10.16821/j.cnki.hsjx.2021.04.010.
XIA X M, WANG H, JI Y B, *et al*. A meta-analysis of the influencing factors of sarcopenia among the elderly in Chinese community[J]. Mod Prev Med, 2022, 49(5): 946-950, 960. DOI: 10.16821/j.cnki.hsjx.2021.04.010.

[6] 常建英, 黄蓓, 蒋铁建. 绝经后女性肌少症[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(9): 1345-1350. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2019.09.028.
CHANG J Y, HUANG B, JIANG T J. Sarcopenia in postmenopausal women[J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(9): 1345-1350. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2019.09.028.

[7] HANSEN M. Female hormones: do they influence muscle and tendon protein metabolism?[J]. Proc Nutr Soc, 2018, 77(1): 32-41. DOI: 10.1017/S0029665117001951.

[8] ENNS D L, TIIDUS P M. The influence of estrogen on skeletal muscle[J]. Sports Med, 2010, 40(1): 41-58. DOI: 10.2165/11319760-000000000-00000.

[9] GERACI A, CALVANI R, FERRI E, *et al*. Sarcopenia and menopause: the role of estradiol [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 682012. DOI: 10.3389/fendo.2021.682012.

[10] KENNY A M, DAWSON L, KLEPPINGER A, *et al*. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in nonobese women who are long-term users of estrogen-replacement therapy[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2003, 58(5): M436-M440. DOI: 10.1093/gerona/58.5.m436.

[11] PINGEL J, LANGBERG H, SKOVGÅRD D, *et al*. Effects of transdermal estrogen on collagen turnover at rest and in response to exercise in postmenopausal women[J]. J Appl Physiol (1985), 2012, 113(7): 1040-1047. DOI: 10.1152/japplphysiol.01463.2011.

[12] RONKAINEN P H, PÖLLÄNEN E, ALÉN M, *et al*. Global gene expression profiles in skeletal muscle of monozygotic female twins discordant for hormone replacement therapy [J]. Aging Cell, 2010, 9(6): 1098-1110. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2010.00636.x.

[13] 周晓宁, 袁帅, 赵启, 等. 肌少症造模方法的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(9): 1365-1368. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2022.09.022.
ZHOU X N, YUAN S, ZHAO Q, *et al*. Research progress in modeling methods of sarcopenia[J]. Chin J Osteoporos, 2022, 28(9): 1365-1368. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2022.09.022.

[14] 杨璇, 王玉波, 于佳. 肌少症动物模型研究进展[J]. 脑与神经疾病杂志, 2022, 30(5): 328-330, F0003, 324. DOI: 10.1002/jcsm.12460.
YANG X, WANG Y B, YU J. Research progress of animal models ofsarcopenia[J]. J Brain Nerv Dis, 2022, 30(5): 328-330, F0003, 324. DOI: 10.1002/jcsm.12460.

[15] EDSTRÖM E. Sarcopenia [M]. Stockholm: Karolinska Institutet, 2005: 12-24.

[16] 沈丽晓, 袁博云, 王丽, 等. 17β-雌二醇/微小核糖核酸-21信号通路抑制低氧性肺动脉高压肺血管重构的机制研究[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(11): 1118-1123. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2018.11.017.
SHEN L X, YUAN B Y, WANG L, *et al*. 17β-estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling via downregulating miRNA-21 signaling pathway[J]. Chin Circ J, 2018, 33(11): 1118-1123. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2018.11.017.

[17] 辛薇, 祁珊珊, 曾海涛. 雌激素对去卵巢骨质疏松大鼠子宫组织形态的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(8): 220-222, 299.
XIN W, QI S S, ZENG H T. Effect of estrogen on uterine tissue morphology in ovariectomized osteoporosis rats[J]. Heilongjiang Animal Sci Vet Med, 2016(8): 220-222, 299.

[18] SZEGEZDI E, MACDONALD D C, NÍ CHONGHAILE T, *et al*. Bcl-2 family on guard at the ER[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(5): C941-C953. DOI: 10.1152/ajpcell.00612.2008.

[19] CAPLLONCH-AMER G, SBERT-ROIG M, GALMÉS-PASCUAL B M, *et al*. Estradiol stimulates mitochondrial biogenesis and adiponectin expression in skeletal muscle [J]. J Endocrinol, 2014, 221(3): 391-403. DOI: 10.1530/JOE-14-0008.

[20] 黄驰欢, 刘静, 徐道明, 等. 肌肉质量测定方法的研究新进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(9): 1385-1389. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2022.09.026.
HUANG C H, LIU J, XU D M, et al. New research advances in muscle mass determination methods[J]. Chin J Osteoporos, 2022, 28(9): 1385-1389. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2022.09.026.

[21] CRUZ-JENTOFT A J, BAHAT G, BAUER J, *et al*. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis[J]. Age Ageing, 2019, 48(4): 601. DOI: 10.1093/ageing/afz046.

[22] SAYED R K, DE LEONARDIS E C, GUERRERO-MARTÍNEZ J A, *et al*. Identification of morphological markers of sarcopenia at early stage of aging in skeletal muscle of mice[J]. Exp Gerontol, 2016, 83: 22-30. DOI: 10.1016/j.exger.2016.07.007.

[23] LEDUC-GAUDET J P, HUSSAIN S N A, BARREIRO E, *et al*. Mitochondrial dynamics and mitophagy in skeletal muscle health and aging[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 8179. DOI: 10.3390/ijms22158179.

[24] RIBAS V, DREW B G, ZHOU Z Q, *et al*. Skeletal muscle action of estrogen receptor α is critical for the maintenance of mitochondrial function and metabolic homeostasis in females [J]. Sci Transl Med, 2016, 8(334): 334ra54. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad3815.

[25] VASCONSUELO A, PRONSATO L, RONDA A C, *et al*. Role of 17β-estradiol and testosterone in apoptosis [J]. Steroids, 2011, 76(12): 1223-1231. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.08.001.

[26] COLLA A L, VASCONSUELO A, MILANESI L, *et al*. 17β-estradiol protects skeletal myoblasts from apoptosis through p53, bcl-2, and FoxO families[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(1): 104-115. DOI: 10.1002/jcb.25616.

[27] 程金娜, 张林, 耿雪, 等. Bcl-2家族对骨骼肌细胞运动适应性的调控机制研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2019, 38(1): 74-80. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6710.2019.01.012.
CHENG J N, ZHANG L, GENG X, *et al*. Research progress on the regulatory mechanism of Bcl-2 family on the exercise adaptability of skeletal muscle cells[J]. Chin J Sports Med, 2019, 38(1): 74-80. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6710.2019.01.012.

(**收稿**:2023-03-14;**修回**:2023-05-30)
(编辑 张 维)