基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003556

基于FOXO3a/Nrf2信号通路探讨尿毒症骨骼肌自噬的分子机制

马 娟，郭银雪，胡茂蓉
（贵州中医药大学第一附属医院肾内科，贵阳 550002）

【摘 要】目的：探讨叉头盒（forkhead box，FOX）O蛋白3a（forkhead box O3a，FOXO3a）/转录因子NF-E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）信号通路的调节尿毒症骨骼肌自噬的机制。**方法：**24只小鼠随机分为假手术组（Sham组）、慢性肾病（chronic kidney disease，CKD）组和CKD+AST-120（AST）组，每组8只。通过5/6肾切除术建立CKD模型。在肾切除术后4周，CKD+AST组小鼠给予含AST-120粉末（尿毒毒素的木炭吸附剂）饮食，持续8周。透射电子显微镜观察腓肠肌组织中的自噬溶酶体。C2C12小鼠成肌细胞分为对照（Control，Con）组、硫酸吲哚酚（indophenol sulfate，IS）组、IS+si-FOXO3a组。实时RT-PCR和蛋白质印迹法分析FOXO3a表达情况。Giemsa染色对C2C12肌管直径进行量化。**结果：**与CKD组相比，CKD+AST组血清IS水平和腓肠肌组织中FOXO3a表达、自噬溶酶体的数量明显降低（$P<0.05$），以及腓肠肌、胫骨前肌、比目鱼肌质量明显增加（$P<0.05$）。与IS组相比，IS+si-FOXO3a组C2C12细胞中FOXO3a、肌肉萎缩盒基因（Muscle Atrophy F-box，atrogin-1）肌肉环脂蛋白1（muscle RING-finger protein-1，MuRF-1）的表达和细胞自噬通量明显降低（$P<0.05$），以及细胞直径明显增加（$P<0.05$）。与Sham组相比，CKD组小鼠腓肠肌组织中Kelch样ECH相关蛋白1（Kelch-like ECH-associated protein 1，KEAP1）表达明显升高（$P<0.05$），和NRF2表达明显降低（$P<0.05$）。AST治疗逆转了CKD小鼠腓肠肌组织中这些蛋白的变化。si-NRF2逆转了FOXO3a敲低对自噬流量的抑制作用。**结论：**IS可能通过持续刺激FOXO3a-KEAP1-NRF2轴促进骨骼肌过度自噬，参与尿毒症少肌症的发病机制。

【关键词】叉头盒O蛋白3a；转录因子NF-E2相关因子2；尿毒症；骨骼肌；自噬
【中图分类号】R730.6 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2023-07-04

The molecular mechanism of skeletal muscle autophagy in uremia: a study based on the FOXO3a/Nrf2 signaling pathway

Ma Juan，Guo Yinxue，Hu Maorong
（*Department of Nephrology，The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine*）

【Abstract】*Objective*：To explore the role of the forkhead box O3a（FOXO3a）/nuclear factor erythroid 2-related factor 2（Nrf2）signaling pathway in regulating skeletal muscle autophagy in uremia. ***Methods*：**Twenty-four mice were randomly divided into sham group，chronic kidney disease（CKD）group，and CKD+AST-120（AST）group，with eight mice in each group. A CKD model was established by using the 5/6 nephrectomy method. Four weeks after nephrectomy，the mice in the CKD+AST group were fed with powder chow containing AST-120（a charcoal adsorbent for uremic toxin）for eight weeks. Autolysosomes in the gastrocnemius muscle were observed using a transmission electron microscope. C2C12 myoblasts were divided into control group，indophenol sulfate group（IS），and IS+si-FOXO3a group. The expression of FOXO3a was determined using real-time RT-PCR and Western blot. The diameter of C2C12 myotubes was measured with Giemsa staining. ***Results*：**Compared with the CKD group，the CKD+AST group showed significant decreases in serum IS level and FOXO3a expression and the number of autolysosomes in the gastrocnemius tissue and significant increases in the masses of the gastrocnemius muscle，anterior tibial muscle，and soleus muscle（all $P<0.05$）. Compared with the IS group，the IS+si-FOXO3a group showed significant reductions in the expression of FOXO3a，atrogin-1，and muscle RING-finger protein-1 in C2C12 cells as well as the autophagic flux of the cells and a significantly increased cell diameter（all $P<0.05$）. Compared with the sham group，the CKD group showed significantly increased expression of Kelch-like ECH-associated protein 1（KEAP1）and significantly decreased Nrf2 expression in the gastrocnemius tissue（both $P<0.05$）. AST treatment reversed the changes in these proteins in the gastrocnemius tissue of CKD mice. Si-Nrf2 reversed the inhibitory effect of FOXO3a knockdown on autophagic flux. ***Conclusion*：**IS may promote skeletal muscle autophagy by continuously stimulating the FOXO3A-KEAP1-Nrf2 axis to participate in the pathogenesis of uremic sarcopenia.

【Key words】forkhead box O3a；nuclear factor erythroid 2-related factor 2；uremia；skeletal muscle；autophagy

作者介绍：马 娟，Email：tigyer2009@163.com。
研究方向：中西医结合治疗慢性肾小球肾炎、肾病综合征、慢性肾衰竭等肾内科常见病、多发病。

基金项目：贵州省卫生健康委员会科研项目（编号：WX2021P211）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240819.0903.008（2024-08-19）

目前，越来越多的流行病学证据表明，随着肾功能恶化，慢性肾病（chronic kidney disease，CKD）患者的肌减少症发病率较高[1]。尿毒症少肌症的重要性在于其对死亡率和发病率的影响，包括CKD患者骨折、心血管事件和总生存率[2]。除了先前研究指出的多种因素外，尿毒症毒素的积累也可能导致尿毒症性肌减少症[3-4]。尿毒症毒素通常由健康的肾脏过滤和排泄，但当肾功能恶化时会在体内积累。在尿毒症毒素中，与蛋白质结合的尿毒症毒素，如硫酸吲哚酚（indoxyl sulfate，IS）和硫酸对甲苯酯，被认为对肾脏、心血管系统和免疫系统等内脏系统有直接危害[5]。研究发现，IS的积累对体外成肌细胞增殖和肌管大小及体内骨骼肌质量产生负面影响[6]。然而，IS如何调节尿毒症少肌症中的萎缩相关基因仍不清楚。叉头盒（forkhead box，FOX）O蛋白，包括FOXO1、FOXO3a、FOXO4和FOXO6，在骨骼肌中表达，已知FOXO3a在肌肉萎缩过程中调节自噬途径[7]。大量证据表明自噬在骨骼肌完整性调节中发挥关键作用。由于细胞成分的不断清除，过度的自噬会减少肌肉质量[8]。因此，本研究进一步考察了FOXO3a介导的自噬在尿毒症少肌症中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物实验

雄性C57BL/6小鼠（体质量：22~25 g）购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号：SCXK（京）2021-0011]。动物饲养在一个12∶12 h光/暗循环和湿度、温度保持在55%、23 ℃的环境中，在金属饲养笼中自由获取食物和水。体内实验分为2个方案，方案一中24只小鼠随机分为假手术组（Sham组）和CKD组，每组12只；方案二中24只小鼠随机分为假手术组、CKD组和CKD+AST-120（AST）组，每组8只。除Sham组外，其余组在异氟烷麻醉下分两步进行5/6肾切除术[9]。在手术过程中，小鼠在充满1.5%异氟醚[异氟醚在O_2和N_2（50%/50%）的混合物中，流速为0.9~1.0 L/min]的麻醉室中维持麻醉。在第一阶段，进行左侧切口，移除左肾囊以避免损伤输尿管和肾上腺，然后部分切除上下极。两周后，进行右侧切口和右肾切除术。Sham组在第一阶段进行左侧腹侧切口，然后在确定肾的上下极后关闭腹侧切口。两周后，进行右侧腹切口，然后在确定右肾动脉后关闭侧切口。血清肌酐（SCr）和血尿素氮（Blood urea nitrogen，BUN）水平用作肾功能指标。方案一中，各组小鼠分别在肾切除术后4周、8周、12周随机处死4只小鼠，分离血清和骨骼肌组织，用于评估肾功能、骨骼肌中肌肉重量和FOXO3a、KEAP1、转录因子NF-E2相关因子2（NF-E2-related factor 2，NRF2）蛋白表达。方案二中，在肾切除术后4周CKD+AST组小鼠给予含AST-120粉末（尿毒毒素的木炭吸附剂，日本Kremezin公司）饮用8%（w/w）水，持续8周。AST的剂量选择和时间点选择参照文献方法[10]。

1.2 方法

1.2.1 血清尿素氮、肌酐和硫酸吲哚酚水平 通过7060型自动分析仪（日本日立公司）酶法测定血清BUN和Scr水平。参照文献方法[11]，通过HPLC测定IS的血清浓度。HPLC系统由CBM-20A通信总线模块、SPD-20A、脱气器和LC-20AD泵（日本SHIMADZU公司）组成。

1.2.2 苏木精-伊红染色和免疫荧光 从每组小鼠中收集腓肠肌组织，固定在4%多聚甲醛中，包埋在石蜡中，切成4 μm厚的切片，用HE溶液染色，并在光学显微镜（广州市明美光电技术有限公司）下检查。Image J用于计算肌纤维的横截面积。

脱蜡后，对包埋在石蜡中的腓肠肌进行抗原修复和BSA封闭。然后在4 ℃下用FOXO3a（1∶100）和Nrf2（1∶50）一级抗体处理切片。第2天，用1∶300稀释的Cy3荧光二级抗体处理1 h。然后用DAPI对切片进行染色，并拍照。

1.2.3 透射电子显微镜法 在透射电子显微镜下观察腓肠肌组织中的自噬溶酶体。腓肠肌组织被切成超薄切片，并置于固定液中。用PBS洗涤切片，然后用1.0% OsO_4在4 ℃固定90 min。切片用铀酰和柠檬酸铅染色，并在TM-3000透射电子显微镜（日本Hitachi公司）观察切片。

1.2.4 细胞培养 C2C12小鼠成肌细胞购自美国ATCC，并维持在生长培养基（美国Sigma-Aldrich公司）中，该培养基由DMEM杜氏改良Eagle培养基（Dulbecco's Modified Eagle Medium，DMEM）、10%胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS）、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素组成。将C2C12成肌细胞接种在96孔板中（每孔1×10^4个细胞）。为了诱导肌管形成，在细胞贴壁和半铺满（约80%~90%）后，将生长培养基转换为分化培养基（含2%热灭活马血清的DMEM）中。

为了测试IS对C2C12的FOXO3a mRNA表达、增殖和脂质积聚影响，将细胞以每孔5×10^3的密度接种到96孔板中，加入不同浓度IS（0 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L；美国Sigma-Aldrich公司）孵育24 h、36 h、48 h。IS溶解在0.1%二甲基亚砜（DMSO，美国Invitrogen公司）。

为了研究FOXO3a敲低在IS诱导的骨骼肌萎缩中的作用，将细胞分为对照（Con）组、IS组、IS+si-FOXO3a组。Con组用0.1 %DMSO处理24 h，IS组加入1 mmol/L IS处理24 h，IS+si-FOXO3a组细胞在用IS处理前，使用Lipofectamine 2000（美国Invitrogen公司）将si-FOXO3a转染细胞48 h，然后将这些细胞与1 mmol/L IS一起孵育24 h。

为了研究NRF2的作用，将C2C12细胞分为IS+si-FOXO3a+si-NC组和IS+si-FOXO3a+si-NRF2组。2组细胞在用IS处理前，使用Lipofectamine 2000将si-FOXO3a、si-NC、si-NRF2转染细胞48 h，然后将这些细胞与1 mmol/L IS一起孵育24 h。由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成了靶向FOXO3a（si-FOXO3a）、NRF2（si-NRF2）和siRNAs阴性对照（si-NC）。

1.2.5 实时RT-PCR分析 通过Trizol方法提取总RNA，并通过cDNA逆转录试剂盒（美国Invitrogen公司）逆转录成cDNA。使用SYBR Green qPCR Mix（德国Qiagen公司）在LightCycler 96仪器对RNA水平进行定量，反应条件为：第

一步 37 ℃（15 min），第二步 50 ℃（5 min），最后一步 98 ℃（5 min）。使用 GAPDH 作为内部参考基因，和使用标准的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对 mRNA 表达。本研究中使用的引物序列如下，FOXO3a（F）：5'-AGCAGGGTCCCACTGCGAGTG-3'；FOXO3a(RT):5'-GCTGTCAACGACACCGCTTTTA-3',GAPDH（F）：5'-ACAGCCTCAAGATCATCAGC-3'，GAPDH（RT）：5'-GGTCATGAGTCCTTCCACGAT-3'。

1.2.6　Giemsa 染色试验　使用 Giemsa 染色对肌管直径进行量化。用冰冷的 PBS 洗涤 C2C12 肌管，并在 4% 多聚甲醛中固定 10 min。肌管与 10%Giemsa 染色溶液（上海 Beyotime 公司）一起孵育 40 min。对于每个实验组，使用光学显微镜随机获取 6 幅图像。使用 Image J 软件在 3 个不同的位置测量每个肌管的直径。测量每个孔中至少 100 个肌管。

1.2.7　自噬通量分析　将 C2C12 细胞接种到 24 孔板后，用 mCherry-GFP-LC3 腺病毒（MOI=50）转导它们，固定，并通过共 TCS-SP8 聚焦显微镜（德国 Leica 公司）观察细胞。

1.2.8　蛋白质印迹法　通过使用高速和低温离心，提取蛋白质。将来自不同样品的蛋白质等量置于 10% 或 12.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上。之后，样品在 250 mA 下转移到 PVDF 膜（美国 Millipore 公司）上 90 min。封闭后将下列初级抗体施加到膜上：FOXO3a、肌肉萎缩盒基因(Muscle Atrophy F-box，atrogin-1)、肌肉环脂蛋白 1（muscle RING-finger protein-1，MuRF-1）、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1，KEAP1)、NRF2 和 GAPDH（均为 1∶1 000，购自美国 Proteintech 公司）。3 次 TBST 溶液洗涤后，将膜与 HRP 偶联的第二抗体（1∶3 000）一起孵育 2 h。最后，使用 Bio-rad ChemiDoc 触摸成像系统观察膜。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 23.0 进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组间比较采用 t 检验，使用单向方差分析比较多组的数据。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　CKD 小鼠骨骼肌肌动蛋白表达的变化

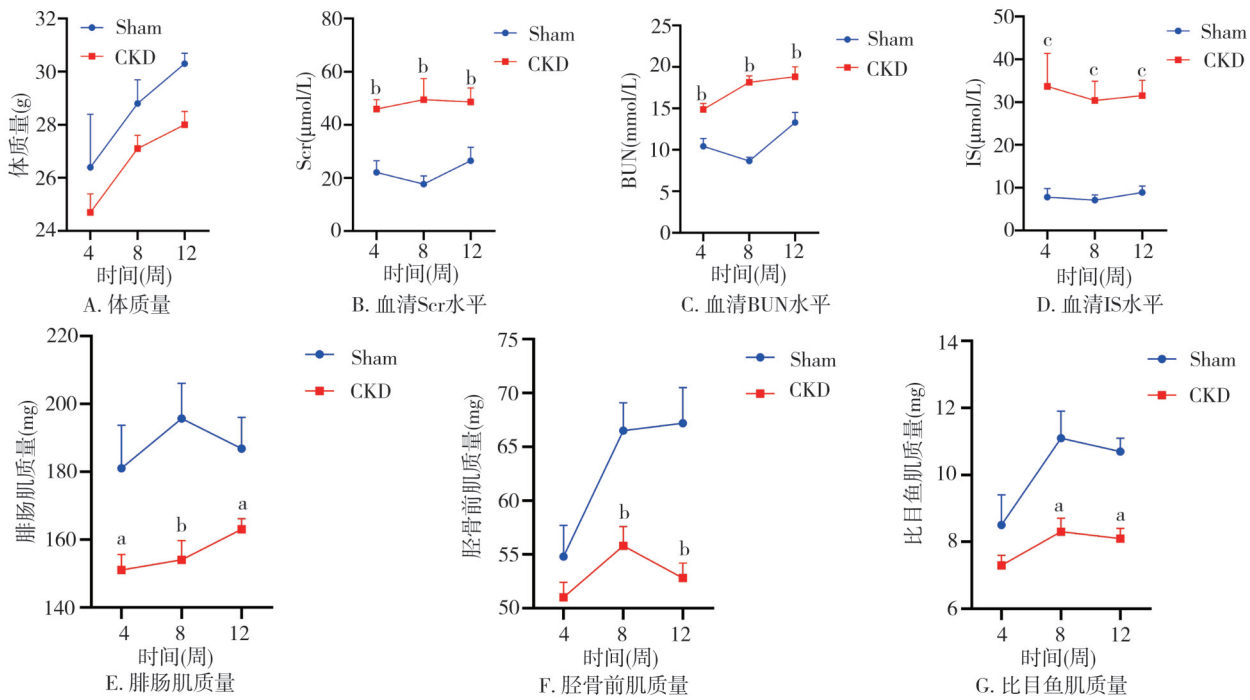
图 1 显示了 CKD 条件下肾功能和骨骼肌中肌肉质量表达的变化。在研究期间，Sham 组和 CKD 组在研究期间体质量无差异。与 Sham 组相比，CKD 组在 5/6-Nx 后 4 周、8 周、12 周时血清 Scr、BUN、IS 水平增加（F=19.26、14.83、25.76，均 P<0.05），表明肾功能在 5/6-Nx 后 4 周下降，并在 12 周之前受损。此外，与 Sham 组相比，CKD 小鼠腓肠肌、胫骨前肌、比目鱼肌质量在 5/6-Nx 后 4 周出现下降，并在 8~12 周时下降（F=15.06、9.53、8.62，均 P<0.05）。与骨骼肌质量的减少一致，CKD 组骨骼肌组织中 FOXO3a 的蛋白表达在 5/6-Nx 后 4 周、8 周、12 周时较 Sham 组增加（t=4.45、5.03、5.46，均 P<0.05，图 2）。

2.2　尿毒症毒素与 CKD 小鼠骨骼肌中 FOXO3a 表达的关系

与 CKD 组相比，CKD+AST 组血清 IS 水平降低（F=16.75，P<0.05），和腓肠肌、胫骨前肌、比目鱼肌质量增加（F=8.32、7.64、7.93，P<0.05）。CKD 组和 CKD+AST 组体质量和血清 Scr、BUN 水平无差异（图 3A~G）。同样，HE 染色显示，CKD 组小鼠腓肠肌肌纤维的横截面积低于 Sham 组（F=15.13，P<0.05）。但经 AST 处理后，上述现象得到改善（图 3H）。此外，通过免疫荧光和免疫印迹证实，CKD+AST 组小鼠腓肠肌组织中 FOXO3a 表达较 CKD 组明显降低（F=20.42，P<0.05）（图 3I~J）。

2.3　FOXO3a 敲低在 IS 诱导的骨骼肌萎缩中的抑制作用

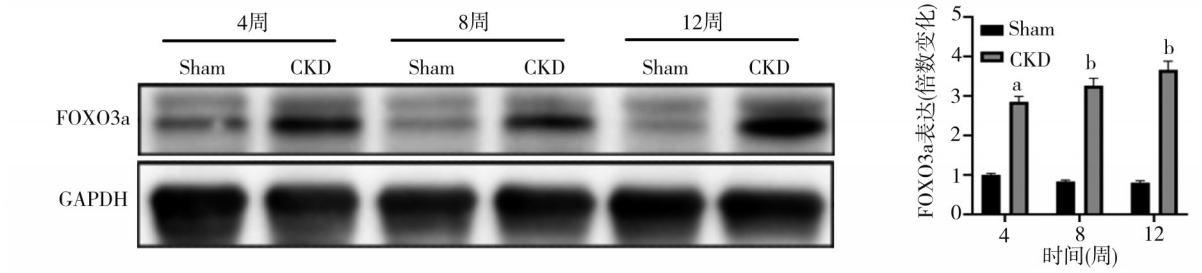
为了进一步研究尿毒症毒素和 FOXO3a 上调之间的关



注：a，与 Sham 组比较，P<0.05；b，与 Sham 组比较，P<0.01；c，与 Sham 组比较，P<0.001

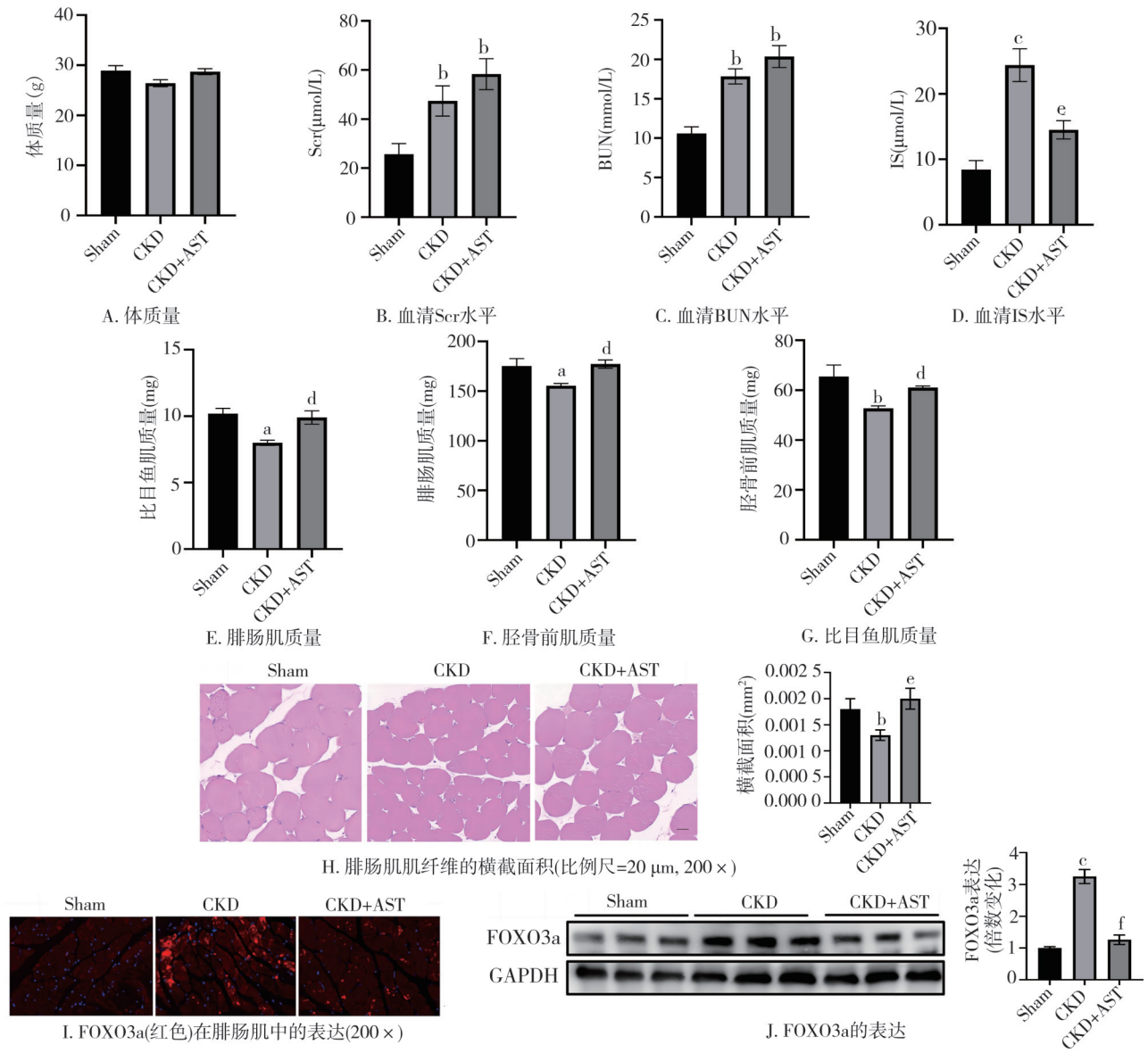
图 1　小鼠肾功能和骨骼肌中肌肉质量的变化

系，在体外细胞培养实验中评估了它的作用，并发现C2C12肌管中FOXO3a mRNA表达的上调呈IS剂量依赖性（F=42.76，P<0.001，图4A）。还使用C2C12细胞评估了FOXO3a在IS诱导的骨骼肌萎缩中的作用机制。与IS组相比，IS+si-FOXO3a组C2C12细胞中FOXO3a、Atrogin-1和肌肉环脂蛋白1（MuRF-1）的表达降低（F=30.16、18.36、21.00，均 P<0.05）（图4B）。Giemsa染色证实了FOXO3a敲低逆转了IS诱导的C2C12细胞直径降低（F=11.47，P<0.001，图4C）。



注：a，与Sham组比较，P<0.01；b，与Sham组比较，P<0.001

图2　小鼠骨骼肌中FOXO3a的蛋白表达变化

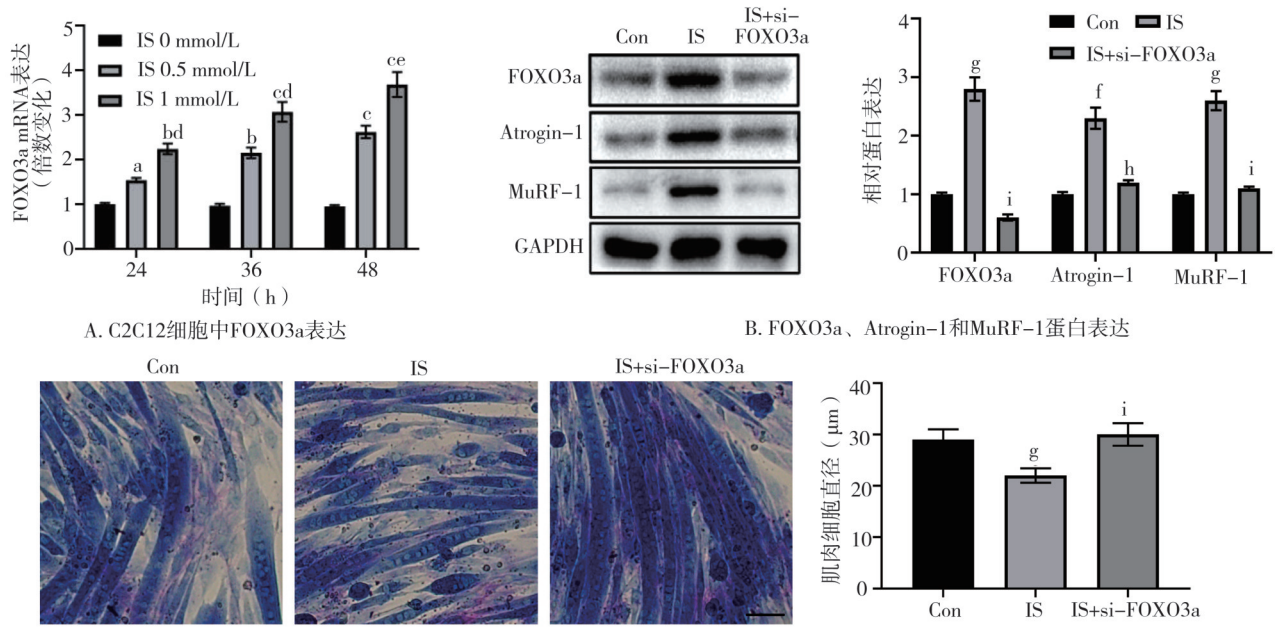


注：a，与Sham组比较，P<0.05；b，与Sham组比较，P<0.01；c，与Sham组比较，P<0.001；d，与CKD组相比，P<0.05；e，与CKD组相比，P<0.01；f，与CKD组相比，P<0.001

图3　尿毒症毒素与CKD小鼠骨骼肌中FOXO3a表达的关系

2.4　FOXO3a介导的自噬在尿毒症少肌症中的作用

为了评估FOXO3a介导的自噬在尿毒症少肌症中的作用，利用透射电镜证实了自噬过程。与Sham组相比，CKD组小鼠腓肠肌中自噬溶酶体的积累增加（F=18.84，P< 0.05）。CKD+AST组小鼠腓肠肌中自噬溶酶体的积累较CKD组减少（F=18.84，P<0.05）（图5A）。用GFP-mRFP-LC3腺病毒转导C2C12细胞，并通过计数红色（代表自噬溶酶体）和黄色斑点（代表自噬体）的数量来分析自噬的变化。在Con组中，细胞的自噬水平较低。在IS组中，C2C12细胞中黄色和红色斑点数均较Con组增加（F=13.26、16.72，P<0.05），表明细胞自噬通量增加。IS+si-FOXO3a组C2C12细胞中黄色和红色斑点数均较IS组减少（F=13.26、16.72，P<0.05）（图5B、C）。



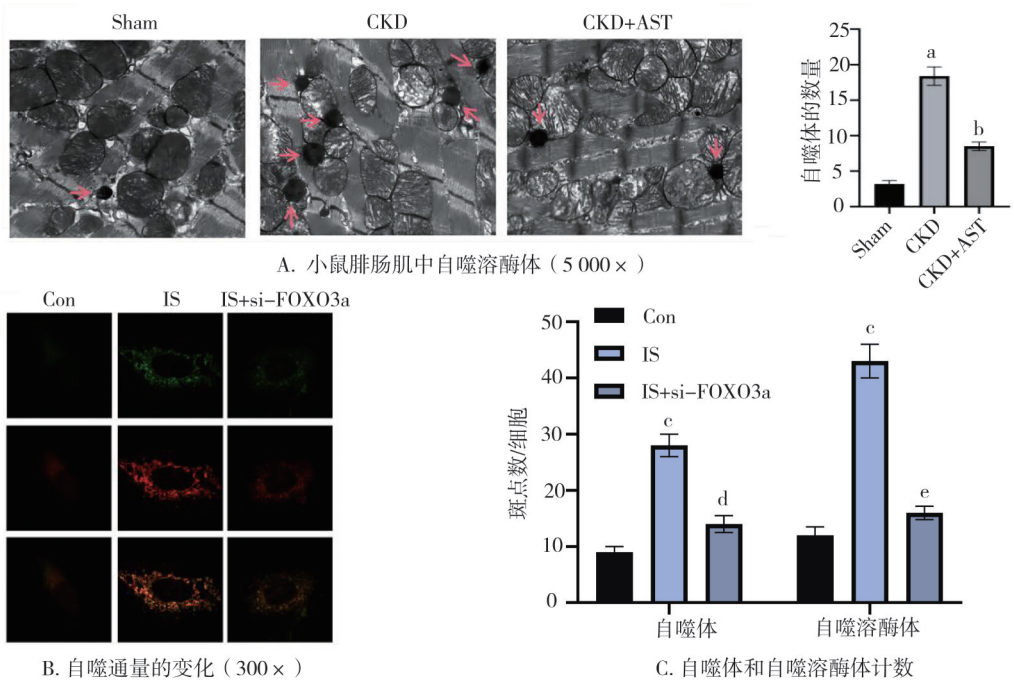
A. C2C12细胞中FOXO3a表达

B. FOXO3a、Atrogin-1和MuRF-1蛋白表达

C. 肌细胞大小及直径的量化（比例尺=20 μm, 200×）

注：a，与IS 0 mmol/L组比较，P<0.05；b，与IS 0 mmol/L组比较，P<0.01；c，与IS 0 mmol/L组比较，P<0.001；d，与IS 0.5 mmol/L组相比，P<0.05；e，与IS 0.5 mmol/L组相比，P<0.01；f，与Con组比较，P<0.01；g，与Con组比较，P<0.001；h，与IS组比较，P<0.01；i，与IS组相比，P<0.001

图4　尿毒症毒素与CKD小鼠骨骼肌中FOXO3a表达的关系



A. 小鼠腓肠肌中自噬溶酶体（5 000×）

B. 自噬通量的变化（300×）

C. 自噬体和自噬溶酶体计数

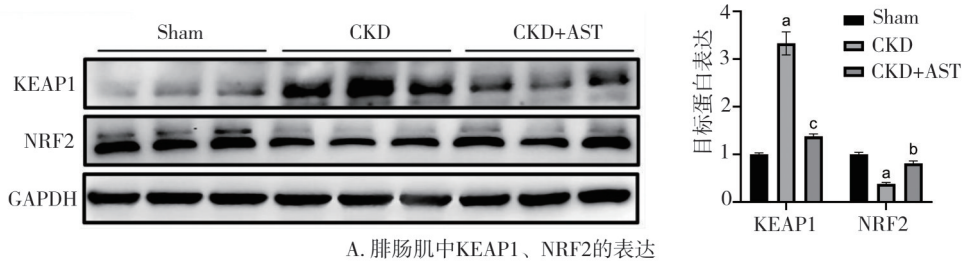
注：a，与Sham组比较，P<0.001，b，与CKD组比较，P<0.01；c，与Con组比较，P<0.001；d，与IS组比较，P<0.01；e，与IS组相比，P<0.001

图5　FOXO3a介导的自噬在尿毒症少肌症中的作用

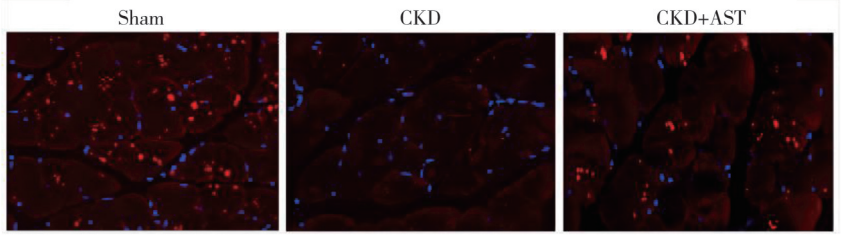
2.5 FOXO3a/NRF2信号轴在尿毒症少肌症中的作用

FOXO3a作为转录因子直接结合到KEAP1的启动子区域，从而影响KEAP1的转录。KEAP1作为NRF2的负调节因子，NRF2是氧化应激的重要保护因子，并介导自噬功能障碍。通过蛋白质印迹分析检测了上述指标体内表达情况。与Sham组相比，CKD组小鼠腓肠肌组织中KEAP1表达升高（F=15.26，P<0.05），和NRF2表达降低（F=16.75，P<0.05）。AST治疗逆转了CKD小鼠腓肠肌组织中这些蛋白的变化（图6A）。此外，通过免疫荧光证实CKD小鼠腓肠肌组织中NRF2表达降低（图6B）。

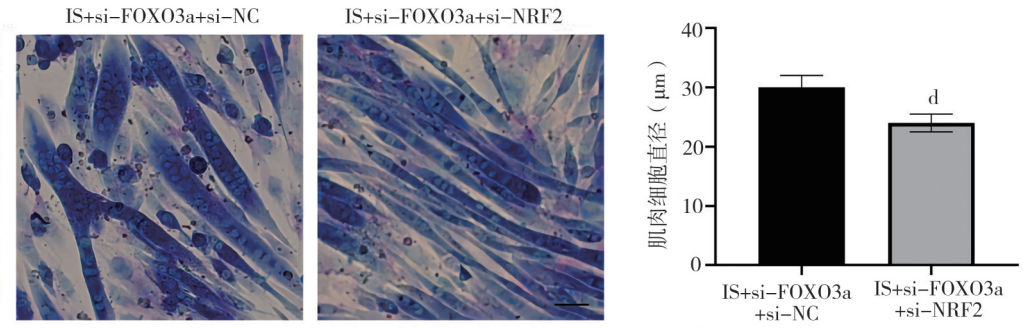
为了进一步研究NRF2的作用，用si-NRF2转染FOXO3a敲低的C2C12细胞。与IS+si-FOXO3a+si-NC组相比，IS+si-FOXO3a+si-NRF2组C2C12细胞直径降低（t=4.36，P<0.05），褐黄色和红色斑点数增加（t=6.72、8.95，均P<0.05）（图6C~D）。这些数据表明si-NRF2逆转了FOXO3a敲低对自噬流量的抑制作用。



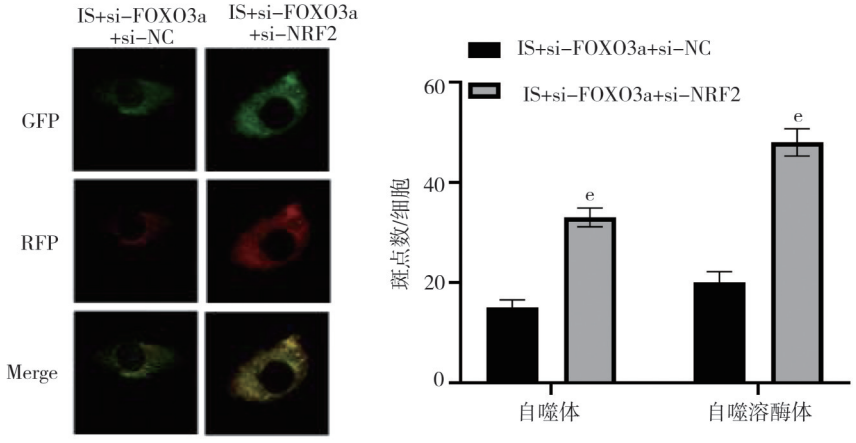
A. 腓肠肌中KEAP1、NRF2的表达



B. NRF2（红色）在腓肠肌中的表达（200×）



C. 肌细胞大小及直径的量化（比例尺=20 μm，200×）



D. 细胞自噬通量的变化（300×）

注：a，与Sham组相比，P<0.001；b，与CKD组相比，P<0.01；c，与CKD组相比，P<0.001；d，与IS+si-FOXO3a+si-NC组相比，P<0.01；e，与IS+si-FOXO3a+si-NC组相比，P<0.001

图6 6FOXO3a/NRF2信号轴在尿毒症少肌症中的作用

3 讨 论

CKD 发病机制的一个关键方面是进行性肌肉消耗。在 CKD 中观察到的肌肉功能减少可能导致早期 CKD 患者耐力锻炼减少和肌肉无力。本研究在 CKD 小鼠中观察到腓肠肌、胫骨前肌、比目鱼肌重量在 5/6-Nx 后 4 周出现持续下降。与此一致的是，这项研究在 CKD 小鼠骨骼肌组织中观察到 FOXO3a 的持续激活。FOXO3a 是自噬过程中的一个关键转录因子调节因子，位于平衡反馈环的中心[12]。当基础自噬被抑制时，FOXO3a 通过使自噬靶失活来纠正自噬扰动[13]。CARM1-Pontin-FOXO3a 信号轴作用于远端区域，通过增强子激活自噬基因。抑制 AKT 导致核 FOXO3a 水平降低，并减弱自噬调节基因的表达[14]。正常的基础自噬水平对于防止各种分解代谢状况下（包括饥饿、癌症恶病质、去神经和败血症）的肌肉萎缩至关重要，然而肌肉中的异常自噬导致细胞改变，如线粒体损伤、内质网应激、肌节蛋白周转受损和细胞死亡，从而导致各种类型的骨骼肌疾病的发生。众所周知，自噬/溶酶体系统是降解受损或错误折叠蛋白质的主要机制。研究发现，自噬溶酶体系统受 FoxO3 蛋白的控制，导致骨骼肌蛋白质丢失[15]。本研究通过电子显微镜观察到 CKD 小鼠骨骼肌中自噬溶酶体数量明显增加，证实了 FOXO3a 介导的骨骼肌自噬在 CKD 肌肉萎缩中的重要作用。

IS 是一种众所周知的蛋白结合性尿毒症毒素，难以用透析除去，且 IS 水平随着肾功能下降而增加。IS 与 CKD 患者的不良结果相关，包括心血管并发症和死亡率[16]。最近的体外和体内研究报道，IS 通过有机阴离子转运蛋白在肌肉细胞中积累，并通过氧化应激的激活和炎性细胞因子的递增，导致肌生长抑制素和 Atrogen-1 的产生[17]。最后，肌纤维的线粒体功能障碍可能会诱发骨骼肌分解代谢增加以及线粒体功能和生物合成减少[18]。本研究评估了 AST 给药的 CKD 小鼠中尿毒症毒素和 FOXO3a 蛋白表达之间的关系。AST 是一种活性炭吸附剂，可通过吸附肠道中的尿毒症毒素及其前体来减少 CKD 中的尿毒症毒素，并用于评估尿毒症毒素的相关性。结果显示，服用 AST 可明显抑制 IS 的累积、降低骨骼肌组织中 FOXO3a 表达以及骨骼肌重量和肌纤维尺寸的减少，但不会影响肾功能，证实了 IS 的累积、FOXO3a 表达上调可能诱发了骨骼肌分解代谢增加。值得注意的是，体外研究证实了 C2C12 肌管中 FOXO3a mRNA 表达的上调呈 IS 剂量依赖性，并且 FOXO3a 敲低逆转了 IS 诱导的 C2C12 细胞萎缩。FOXO 家族在骨骼肌的维持和流失中起着重要的作用。肌肉中 FOXO 家族的缺失可防止肌肉萎缩，并降低对进食和去神经支配的反应[19]。FOXO3a 敲低可防止糖皮质激素诱导的肌肉细胞萎缩[7]。因此，IS 可能通过持续刺激 FOXO3a 激活参与尿毒症少肌症发病机制。

先前的研究证实了 FOXO3a-KEAP1-NRF2 轴提供了 FOXO3a 和自噬之间的重要分子联系。在静止条件下，NRF2 通过泛素-蛋白酶体途径组成性降解，KEAP1 作为靶向 Nrf2 的泛素连接酶复合物的衔接子，是 FOXO3a 调节自噬的关键靶点[20]。过表达的 FOXO3a 激活 KEAP1，随后 KEAP1 介导 Nrf2 泛素化受到阻碍，将 Nrf2 释放到细胞核，在细胞核中与 sMaf 结合，并位于其靶基因（如 HO-1、CAT、NQO1 和其他抗氧化酶）的启动子中[21]。应该注意的是，Nrf2 的激活依赖于泛素结合蛋白 FOXO3a 介导的自噬刺激，而自噬又由 Nrf2 驱动，因此与 Nrf2 形成了正反馈环[22]。在这方面，本研究观察到 CKD 组小鼠腓肠肌组织中 KEAP1 表达显著升高和 NRF2 表达明显降低，而 AST 治疗逆转了 CKD 小鼠腓肠肌组织中这些蛋白的变化，表明 FOXO3a-KEAP1-NRF2 轴参与了 IS 介导的尿毒症少肌症发病机制。此外，NRF2 敲低逆转了 FOXO3a 敲低对细胞大小、自噬流量的恢复作用，证明 FOXO3a 诱导的肌病表型可以通过上调 NRF2 信号通路来挽救，至少是部分挽救。先前研究已经表明 FOXO3a/Nrf2 信号通路在库欣综合征骨骼肌萎缩中发挥作用[7]。因此，FOXO3a/Nrf2 信号通路可作为防止 IS 诱导的骨骼肌萎缩的潜在治疗靶点。

总之，本研究确定 IS 可能通过持续刺激 FOXO3a-KEAP1-NRF2 轴促进骨骼肌过度自噬，参与尿毒症少肌症的发病机制。虽然 FOXO3a 敲低可防止 IS 诱导的骨骼肌萎缩，但是目前的研究尚不清楚体内抑制 FOXO3a-KEAP1-NRF2 轴是否有助于

延缓尿毒症毒素诱导的骨骼肌萎缩，需要进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] 王蕤婷，黄新忠. 慢性肾脏病肌萎缩的发病机制及诊疗进展[J]. 上海医学，2022，45(12)：862-867.

Wang RT，Huang XZ. Progress in pathogenesis，diagnosis and treatment of muscular atrophy in chronic kidney disease[J]. Shanghai Med J，2022，45(12)：862-867.

[2] 马迎春. 慢性肾脏病患者运动康复的管理[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2022，31(4)：353-354.

Ma YC. Management of implement exercise rehabilitation training in patients with chronic kidney disease[J]. Chin J Nephrol Dial Transplant，2022，31(4)：353-354.

[3] Lee SM，Han MY，Kim SH，et al. Indoxyl Sulfate Might Play a Role in Sarcopenia，While Myostatin Is an Indicator of Muscle Mass in Patients with Chronic Kidney Disease：analysis from the RECOVERY Study[J]. Toxins，2022，14(10)：660.

[4] Hou YC，Liu YM，Liao MT，et al. Indoxyl sulfate mediates low handgrip strength and is predictive of high hospitalization rates in patients with end-stage renal disease[J]. Front Med，2023，10：1023383.

[5] Caldiroli L，Armelloni S，Eskander A，et al. Association between the uremic toxins indoxyl-sulfate and p-cresyl-sulfate with sarcopenia and malnutrition in elderly patients with advanced chronic kidney disease[J]. Exp Gerontol，2021，147：111266.

[6] Troutman AD，Arroyo E，Lim K，et al. Skeletal muscle complications in chronic kidney disease[J]. Curr Osteoporos Rep，2022，20(6)：410-421.

[7] Kang SH，Lee HA，Kim M，et al. Forkhead box O_3 plays a role in skeletal muscle atrophy through expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogin-1 in Cushing's syndrome[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2017，312(6)：495-507.

[8] Alcalde-Estévez E，Sosa P，Asenjo-Bueno A，et al. Uraemic toxins impair skeletal muscle regeneration by inhibiting myoblast proliferation，reducing myogenic differentiation，and promoting muscular fibrosis[J]. Sci Rep，2021，11(1)：512.

[9] Radloff J，Latic N，Pfeiffenberger U，et al. A phosphate and calcium-enriched diet promotes progression of 5/6-nephrectomy-induced chronic kidney disease in C57BL/6 mice[J]. Sci Rep，2021，11(1)：14868.

[10] Li LC，Chen WY，Chen JB，et al. The AST-120 recovers uremic toxin-induced cognitive deficit via NLRP3 inflammasome pathway in astrocytes and microglia[J]. Biomedicines，2021，9(9)：1252.

[11] Fujita K，Nonaka T，Kutsuno R，et al. Electrochemical sensing of the secretion of indoxyl sulfate in a rat intestinal loop using a self-assembled monolayer-modified gold bead electrode[J]. Talanta，2022，247：123551.

[12] Lu CH，Yu R，Zhang C，et al. Protective autophagy decreases lorlatinib cytotoxicity through Foxo3a-dependent inhibition of apoptosis in NSCLC[J]. Cell Death Discov，2022，8(1)：221.

[13] Ali T，Rahman SU，Hao Q，et al. Melatonin prevents neuroinflammation and relieves depression by attenuating autophagy impairment through FOXO3a regulation[J]. J Pineal Res，2020，69(2)：e12667.

[14] Jin H，Zhang L，He J，et al. Role of FOXO3a transcription factor in the regulation of liver oxidative injury[J]. Antioxidants，2022，11(12)：2478.

[15] Xia QH，Huang XB，Huang JR，et al. The role of autophagy in skeletal muscle diseases[J]. Front Physiol，2021，12：638983.

[16] Takkavatakarn K，Phannajit J，Udomkarnjananun S，et al. Association between indoxyl sulfate and dialysis initiation and cardiac outcomes in chronic kidney disease patients[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis，2022，15：115-126.

[17] Hamza E，Vallejo-Mudarra M，Ouled-Haddou H，et al. Indoxyl sulfate impairs erythropoiesis at BFU-E stage in chronic kidney disease[J]. Cell Signal，2023，104：110583.

[18] Lai S，Muscaritoli M，Andreozzi P，et al. Sarcopenia and cardiovascular risk indices in patients with chronic kidney disease on conservative and replacement therapy[J]. Nutrition，2019，62：108-114.

[19] Milan G，Romanello V，Pescatore F，et al. Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy[J]. Nat Commun，2015，6：6670.

[20] Jang DE，Song JB，Park JW，et al. Protein kinase CK2 activates Nrf2 via autophagic degradation of Keap1 and activation of AMPK in human cancer cells[J]. BMB Rep，2020，53(5)：272-277.

[21] Lu Q，Zhang Y，Zhao C，et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis of hippocampal neuron via pCREB/BDNF/and Nrf2/HO-1/NQO1 pathway[J]. J Appl Toxicol，2022，42(4)：694-705.

[22] Shekh-Ahmad T，Eckel R，Dayalan Naidu S，et al. KEAP1 inhibition is neuroprotective and suppresses the development of epilepsy[J]. Brain，2018，141(5)：1390-1403.

（责任编辑：曾 玲）