

## 研究报告

萝卜硫素通过抑制 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬  
减轻力竭运动诱导的骨骼肌损伤和疲劳国春鼎<sup>1</sup>, 杨军霞<sup>1</sup>, 李鹏程<sup>2</sup>

(1. 亳州学院, 安徽 亳州 236800; 2. 淮南师范学院体育学院, 安徽 淮南 232001)

**摘要:**目的 评价萝卜硫素(SFN)对力竭运动所致小鼠骨骼肌损伤和疲劳的影响。方法 将60只雄性昆明小鼠随机分成对照组(Control)、力竭运动组(EE)、SFN低剂量组(SFN-L, 20 mg/kg/d)、SFN中剂量组(SFN-M, 40 mg/kg/d)和SFN高剂量组(SFN-H, 60 mg/kg/d), 每组12只。共给药4周, 然后进行力竭运动。测定各组小鼠肌酸激酶(CK)、乳酸(LA)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平。苏木精-伊红染色观察组织病理学改变。透射电镜观察线粒体超微结构。通过测定柠檬酸合成酶(CS)、琥珀酸脱氢酶(SDH)及肝脏和股四头肌糖原含量来评估能量水平。用RT-qPCR和Western blot检测骨骼肌中与线粒体自噬相关的mRNA和蛋白表达水平。结果 与EE组相比, SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组的CK、LA、LDH和MDA水平显著降低, 而SOD和CAT活性显著升高( $P < 0.05$ )。SFN明显减轻了EE小鼠的骨骼肌损伤并改善了线粒体形态。与EE组相比, SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组的肝糖原和肌糖原含量、CS表达和SDH活性显著升高( $P < 0.05$ )。与EE组相比, SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组小鼠股四头肌组织中PINK1、Parkin、Lc3-II、p62和ubiquitin的蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。与EE组相比, SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组小鼠股四头肌组织中PINK1和Parkin的mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。结论 SFN通过抑制PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬来发挥抗疲劳作用。

**关键词:**萝卜硫素; 力竭运动; 骨骼肌损伤; 疲劳; 线粒体自噬; PINK1/Parkin信号通路

中图分类号: R155

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2022)06-1158-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2022.06.006

**Reduction effect of sulforaphane on skeletal muscle injury and fatigue induced by exhaustive exercise through inhibiting mitochondrial autophagy mediated by PINK1/Parkin signal pathway**GUO Chunding<sup>1</sup>, YANG Junxia<sup>1</sup>, LI Pengcheng<sup>2</sup>

(1. Bozhou University, Anhui Bozhou 236800, China; 2. Physical Education College of Huainan Normal University, Anhui Huainan 232001, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of sulforaphane (SFN) on skeletal muscle damage and fatigue in mice induced by exhaustive exercise (EE). **Methods** Sixty male Kunming mice were randomly divided into control group (Control), exhaustive exercise group (EE), SFN low-dose group (SFN-L, 20 mg/kg/d), SFN medium-dose group (SFN-M, 40 mg/kg/d) and SFN high-dose group (SFN-H, 60 mg/kg/d), each group was 12 animals. After total of 4 weeks of administration, the exhaustive exercise was done. The levels of creatine kinase (CK), lactate (LA), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in each group were determined. Histopathological changes were observed by hematoxylin-eosin staining. The ultrastructure of mitochondria was observed by transmission electron microscope. Energy levels were assessed by measuring citrate synthase (CS), succinate dehydrogenase (SDH), and liver and quadriceps glycogen content. RT-qPCR and Western blot were used to detect mRNA and protein expression levels related to mitochondrial autophagy in skeletal muscle. **Results** Compared with the EE group, the levels of CK, LA, LDH and MDA in the SFN-L, SFN-M and SFN-H groups reduced significantly, while the SOD and CAT activities increased significantly ( $P < 0.05$ ). SFN significantly reduced skeletal muscle damage in EE mice and mitochondrial morphology was improved. Compared with the EE group, the liver glycogen and muscle glycogen content, CS expression and SDH activity in the SFN-L, SFN-M and SFN-H groups increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared

with the EE group, the protein expression levels of PINK1, Parkin, Lc3-II, p62 and ubiquitin in the quadriceps femoris tissue of the SFN-L, SFN-M and SFN-H groups reduced significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the EE group, the mRNA expression levels of PINK1 and Parkin in the quadriceps femoris tissues of mice in the SFN-L, SFN-M and SFN-H groups reduced significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SFN exerts anti-fatigue effects through inhibiting mitochondrial autophagy mediated by PINK1/Parkin signaling pathway.

**Key words:** Sulforaphane; exhaustive exercise; skeletal muscle injury; fatigue; mitochondrial autophagy; PINK1/Parkin signaling pathway

疲劳一般与职业和年龄有关,如果不加以控制,疲劳不仅会降低生产力和生活质量,还会造成机体损伤。线粒体是重要的细胞内细胞器,负责产生哺乳动物骨骼肌收缩所需的三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)。长期适当的运动可以增加骨骼肌的可塑性和线粒体的生物合成。骨骼肌中的线粒体在无氧条件下也可以表现出从有氧依赖的有氧糖酵解到氧化磷酸化的生理适应<sup>[1]</sup>。骨骼肌占人体体质量的30%,它是氨基酸和碳水化合物的储藏库,同时也负责化学能到机械能的转换<sup>[2]</sup>。为保持健康,骨骼肌中需要足够数量的线粒体。增加线粒体的数量可以提高专业运动员的运动表现和普通人的健康。早期一项研究报告称,适当强度的运动可以促进健康人骨骼中线粒体的生物生成和融合<sup>[3]</sup>。值得注意的是,高强度运动可通过自噬溶酶体复合物清除受损的线粒体,从而导致骨骼肌线粒体过度自噬。然而,过度自噬导致的线粒体数量减少可能引起骨骼肌无力<sup>[3]</sup>。因此,了解导致运动性线粒体功能障碍的机制可以为疲劳治疗提供新的方向。

萝卜硫素(Sulforaphane, SFN)又称莱菔硫烷,是十字花科植物天然产物。SFN可诱导机体产生Ⅱ型解毒酶,如血红素加氧酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H:醌氧化还原酶1(NAD(P)H:quinone oxidoreductase, NQO1)、谷胱甘肽S-转移酶(Glutathione-S-transferase, GSH)、UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)等。这些酶主要通过结合反应参与有毒分子或活性氧的解毒过程,保护细胞和外周免受损害,并降低癌症和其他由氧化应激或炎症引起的退行性疾病的风险<sup>[4]</sup>。SFN通过多种信号途径对癌症、炎症等多种病理过程起到干预作用<sup>[5]</sup>。摄入富含SFN的饮食可以通过增加抗氧化酶的活性来减少运动性肝衰竭所致的肝脏氧化损伤<sup>[6]</sup>。但关于SFN对急性运动诱发的骨骼肌损伤和疲劳的保护作用知之甚少。因此,本研究探讨了SFN对力竭运动小鼠的抗疲劳作用及其相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

SFN,纯度>98%(上海宝曼生物科技有限公司),PTEN诱导激酶(PTEN-Induced putative kinase, PINK1)、Parkin、Ubiquitin、LC3-II/LC3-I、p62、柠檬酸合成酶(Citrate synthase, CS)、GAPDH一抗(美国Cell Signaling Technology公司),乳酸(Lactic acid, LA)、肌酸磷酸激酶(Creatine phosphokinase, CK)、乳酸脱氢酶(Actate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、琥珀酸脱氢酶(Succinate dehydrogenase, SDH)活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),糖原含量检测试剂盒(北京伊塔生物科技有限公司),苏木精、伊红(H&E)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),FastPrep-24样品快速处理系统(美国MP Biomedicals公司),BCA蛋白检测试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司),ECL电化学发光液(北京伊塔生物科技有限公司),TRIzol购自美国Invitgen公司,Maxima SYBR Green Real-time PCR试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。SYBR Green Realtime PCR Master Mix(美国Applied Biosystems公司)。

### 1.2 动物

60只无特定病原体(SPF)级的5~6周龄雄性昆明小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司(生产许可证:SCXK(京)2021-0006),体质量为25~30g。动物饲养地点为阜阳师范大学躬行E楼六楼,使用许可证为SYXK(皖)2021-002。将所有小鼠在 $23 \pm 2$  °C和50%~60%湿度、12h的明暗循环的标准条件下饲养。给予小鼠蒸馏水和标准饲料,不限制饮食。

### 1.3 动物分组及处理

将60只小鼠随机分成对照组(Control)、力竭运动组(EE)、SFN低剂量组(SFN-L, 20 mg/kg/d)、SFN中剂量组(SFN-M, 40 mg/kg/d)和SFN高剂量组(SFN-H, 60 mg/kg/d),每组12只。应用蒸馏水将SFN配置成不同浓度的SFN液。SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组小鼠分别按照20、40和60 mg/kg/d的剂量

灌胃 SFN 液(0.2 mL)。Control 组和 EE 组灌胃等体积的蒸馏水。5 组小鼠连续灌胃 4 周。

#### 1.4 力竭运动

力竭运动方案在李灵杰等<sup>[7]</sup>的基础上进行改良。给药的最后 1 周,即力竭运动之前 1 周,所有小鼠每天以 15 m/min 的速度在 BW-TDM709 型大小鼠平台式跑步机(上海软隆科技发展有限公司)上运动 10 min(0°倾斜)。在力竭实验当天,SFN 给药 2 h 后开始在跑步机上运动(7°倾斜)。将 EE 组、SFN-L 组、SFN-M 组和 SFN-H 组小鼠以 15 m/min 的速度运动 10 min,然后以 20 m/min 的速度运动 10 min,最后以 24 m/min 的速度持续运动至疲劳。疲劳状态定义为对小鼠尾部进行电刺激仍无法继续跑动。Control 组小鼠不进行运动。在运动结束时,通过颈脱位法处死小鼠。随后,从眼球收集约 0.3 mL 血样,收集肝脏和股四头肌组织进行进一步的实验。

#### 1.5 小鼠血清和股四头肌中的抗疲劳生物标志物和糖原的测定

取小鼠血样标本,在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,取血清,测定血清 CK 和股四头肌组织中与疲劳和抗氧化相关的生物标志物(LA、LDH、MDA、SOD、CAT)水平。通过测量肝脏和股四头肌组织中的糖原水平来评估糖原合成能力。此外,测定股四头肌组织中 SDH 活性。所有的指标测定方法均根据试剂盒说明进行。

#### 1.6 股四头肌的组织病理学评估

解剖各处理组小鼠股四头肌组织,于 25 °C 固定于 4% 多聚甲醛中,脱水(75% 乙醇 6 h,85% 乙醇 10 h,95% 乙醇 4 h,无水乙醇 I 和 II 2 h)、透明(二甲苯 I 和二甲苯 II 分别 20 min 和 15 min)和浸蜡 3 h 后制成石蜡切片。在二甲苯中脱蜡,用去离子水在 25 °C 复水 20 min,苏木精染色 30 min,25 °C 伊红染色 5 min。然后将股四头肌切片用奥林巴斯 CX22 显微镜(200×)观察并拍照。

#### 1.7 股四头肌线粒体的透射电镜超微结构分析

将股四头肌解剖成 1 mm<sup>3</sup> 的标本,用 2.5% 谷氨酸透射电镜标本固定剂(pH 7.2~7.4)在 4 °C 下固定 4 h,然后用 0.1 mol/L 磷酸盐溶液冲洗 3 次,每次 15 min。样品在 25 °C 下用 1% 锇酸固定 3 h,然后再用 0.1 mol/L 磷酸盐溶液冲洗 3 次,每次 15 min。然后,使用以下脱水程序在 4 °C 下脱水样品:50% 乙醇脱水 15~20 min;70% 乙醇脱水 15~20 min;90% 乙醇脱水 15~20 min;90% 乙醇和 90% 丙酮(1:1)脱水 15~20 min;90% 丙酮脱水 15~20 min;100% 丙酮在室温下 3 次脱水 15~20 min。然后使用 SPI-PON812 包埋试剂盒进行包埋。在 37 °C 下

过夜,然后在 45 °C 下孵育 12 h,最后在 60 °C 下孵育 24 h,然后使用 EMUC7 超微切片机切割 50~60 nm 超薄切片,在 25 °C 下用 3% 醋酸铀酰和柠檬酸铅染色 5 min,然后用蒸馏水洗涤,并在 JEM1230 透射电子显微镜(10 000×)下观察肌肉组织。

#### 1.8 Western blot 分析

使用 FastPrep-24 样品快速处理系统从股四头肌组织中获得组织匀浆。用全细胞裂解液分离总蛋白。BCA 蛋白检测试剂盒评估每个样品的蛋白质浓度。用 10%SDS-PAGE 凝胶对等量(40 μg/泳道)的蛋白质样品进行分离,然后转移到 0.45 μm 聚偏氟乙烯膜。在 25 °C 下用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,然后在 4 °C 下分别与抗 CS、PINK1、Parkin、LC3 I / II、p62、ubiquitin 和 GAPDH 的一抗(均为 1:1 000 稀释度)孵育过夜。然后将膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000 稀释度)在 25 °C 下孵育 2 h,用含 0.1% 吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。ECL 电化学发光液用于蛋白质条带的可视化。使用 Image-Pro Plus 软件版本 6.0 计算条带的密度值,并归一化为 GAPDH。

#### 1.9 RT-qPCR

根据制造商的方案使用 TRIzol 从股四头肌组织中提取总 RNA。随后根据制造商的说明用 Maxima SYBR Green Real-time PCR 试剂盒反转录合成 cDNA。使用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 在 ABI7300 实时荧光定量 PCR 系统中进行 RT-qPCR。PCR 采用以下热循环条件:95 °C 30 s 的预变性;95 °C 5 s 变性、60 °C 30 s 退火和 72 °C 30 s 延伸,40 个循环;72 °C 下最后延伸 5 min。PINK1 和 Parkin mRNA 的表达归一化为 GAPDH。所使用的引物序列如下: PINK1-F:5'-AGCTGCTTTAAGCGTATTCGGG-3',PINK1-R:5'-GGATGGTTCAGGCAGCGCTCGTCGTC-3'。Parkin-F:5'-ATCGTCGACCAGTGACAGGACTTTG-3',Parkin-R:5'-TTACGCGATGAACTGACACTCCTGA-3'。GAPDH-F:5'-TGAGTCGCGCTCAACGCGGAA CCT-3',GAPDH-R:5'-CCCCTATGCCAGTTCCAACA AGT-3'。

#### 1.10 统计学分析

使用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。数据以平均值±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,采用 Tukey 检验进行两两比较。 $P<0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SFN 对小鼠体质量的影响

各组小鼠的基线体质量和实验结束时的体质量

差异均无统计学意义( $P>0.05$ ,表1)。

### 2.2 SFN对血清和股四头肌组织中疲劳和抗氧化相关生物标志物水平的影响

与Control组相比,EE组的CK、LA、LDH和MDA

水平显著升高,而SOD和CAT活性显著降低( $P<0.05$ )。与EE组相比,SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组的CK、LA、LDH和MDA水平显著降低,而SOD和CAT活性显著升高( $P<0.05$ )。见表2。

表1 各组小鼠前后体质量变化/g

Table 1 The change of body weight before and after the mice experiment of each group

时间	Control	EE	SFN-L	SFN-M	SFN-H
n	12	12	12	12	12
基线体质量	27.42±2.11	27.37±2.05	27.11±1.93	27.80±1.74	26.86±2.21
实验4周后体质量	41.36±2.76	41.74±2.54	41.65±2.50	42.05±1.95	41.53±2.64

表2 小鼠血清和股四头肌组织中疲劳相关生物标志物水平

Table 2 Fatigue-related biomarkers levels in mouse serum and quadriceps muscle tissue

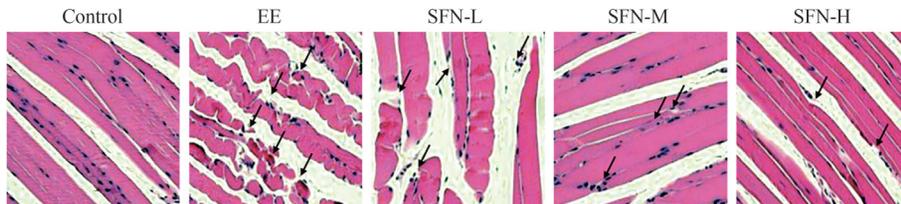
参数	Control	EE	SFN-L	SFN-M	SFN-H
n	12	12	12	12	12
CK, U/mL	0.90±0.07	2.53±0.18*	2.09±0.15*#	1.81±0.13*#	1.49±0.11*#
LA/(mmol/g prot)	0.60±0.04	1.51±0.11*	1.17±0.08*#	0.88±0.06*#	0.81±0.06*#
LDH/(U/g prot)	1.47±0.11	2.32±0.17*	2.06±0.15*#	1.87±0.14*#	1.81±0.13*#
MDA/(nmol/mg prot)	3.45±0.25	7.06±0.51*	5.74±0.42*#	5.24±0.38*#	4.60±0.33*#
SOD/(U/mg prot)	185.76±13.48	102.80±7.46*	129.67±9.41*#	142.37±10.33*#	164.26±11.92*#
CAT/(U/mg prot)	21.65±1.57	4.89±0.35*	7.82±0.57*#	9.02±0.65*#	16.90±1.23*#

注: \*与Control组相比,  $P<0.05$ ; #与EE组相比,  $P<0.05$

### 2.3 SFN对小鼠股四头肌组织病理学和超微结构的影响

骨骼肌形态学分析显示,EE组局部肌肉间质轻度水肿,结缔组织排列疏松,局部肌纤维排列不规则,形态不规则(图1)。同时,肌纤维面积明显减少,间距略增宽。相反,与EE组相比,SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组的上述病理损害明显减少。

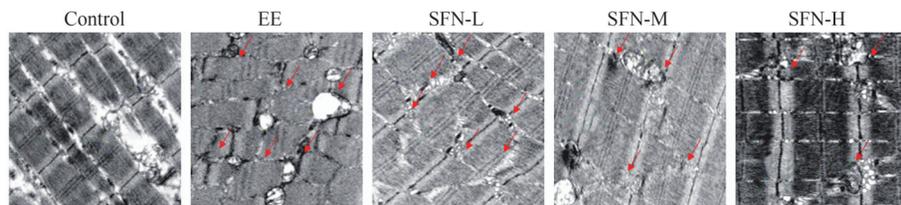
透射电镜对小鼠股四头肌的超微结构分析进一步证实了SFN对EE诱导的损伤有保护作用(图2)。与对照组相比,EE组股四头肌的肌原纤维明显受损、肌节的A带和H带变薄或缺失,线粒体嵴部分或完全解体,线粒体肿胀,甚至出现空泡。与EE组相比,SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组的上述超微结构损伤明显减少。



注:箭头表示损伤部位,放大倍数:200×

图1 小鼠股四头肌组织HE染色

Figure 1 HE staining of mouse quadriceps tissue



注:箭头表示损伤部位,放大倍数:×10 000

图2 小鼠线粒体的透射电镜观察

Figure 2 Transmission electron microscope observation of mouse mitochondria

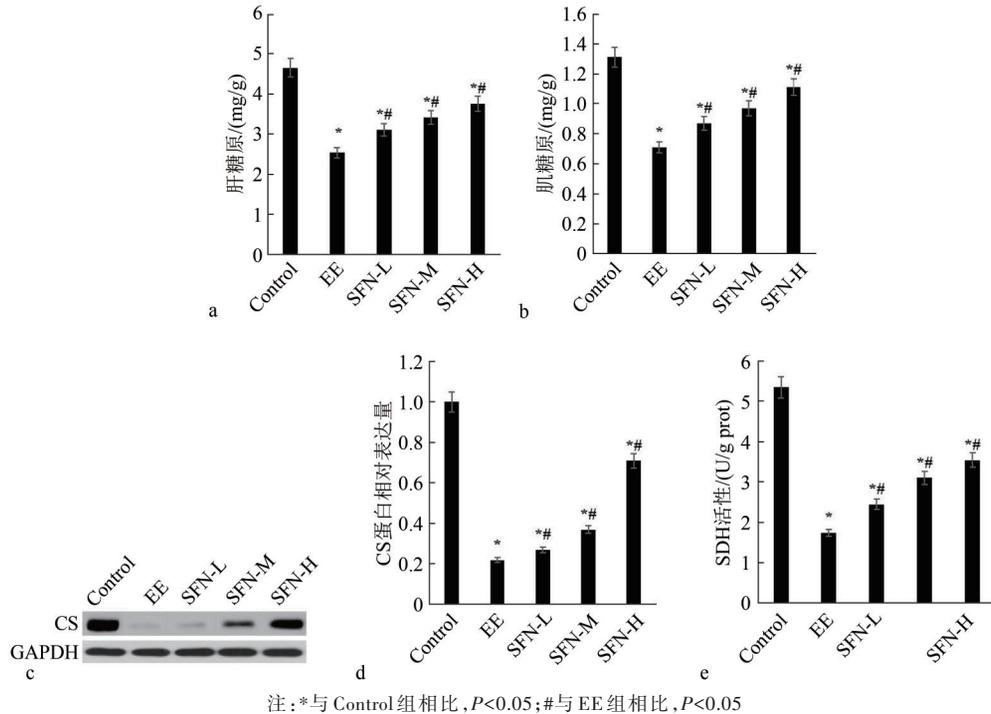
### 2.4 SFN对小鼠能量产生的影响

与Control组相比,EE组的肝糖原和肌糖原含量、CS表达和SDH活性显著降低( $P<0.05$ )。与EE组相比,SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组的肝糖原和肌糖原含量、CS表达和SDH活性显著升高( $P<$

0.05)。见图3。

### 2.5 SFN对PINK1/Parkin信号通路成分表达的影响

与Control组相比,EE组小鼠股四头肌组织中PINK1、Parkin、Lc3-II、p62和ubiquitin的蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与EE组相比,SFN-L组、



注: \*与Control组相比,  $P < 0.05$ ; #与EE组相比,  $P < 0.05$

图3 小鼠体内的能量变化

Figure 3 Energy changes of mice

SFN-M组和SFN-H组小鼠股四头肌组织中PINK1、Parkin、Lc3-II、p62和ubiquitin的蛋白表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。见图4。

此外,与Control组相比,EE组小鼠股四头肌组织中PINK1和Parkin的mRNA表达水平显著升高( $P < 0.05$ )。与EE组相比,SFN-L组、SFN-M组和SFN-H组小鼠股四头肌组织中PINK1和Parkin的mRNA表达水平显著降低( $P < 0.05$ )。见图5。

### 3 讨论

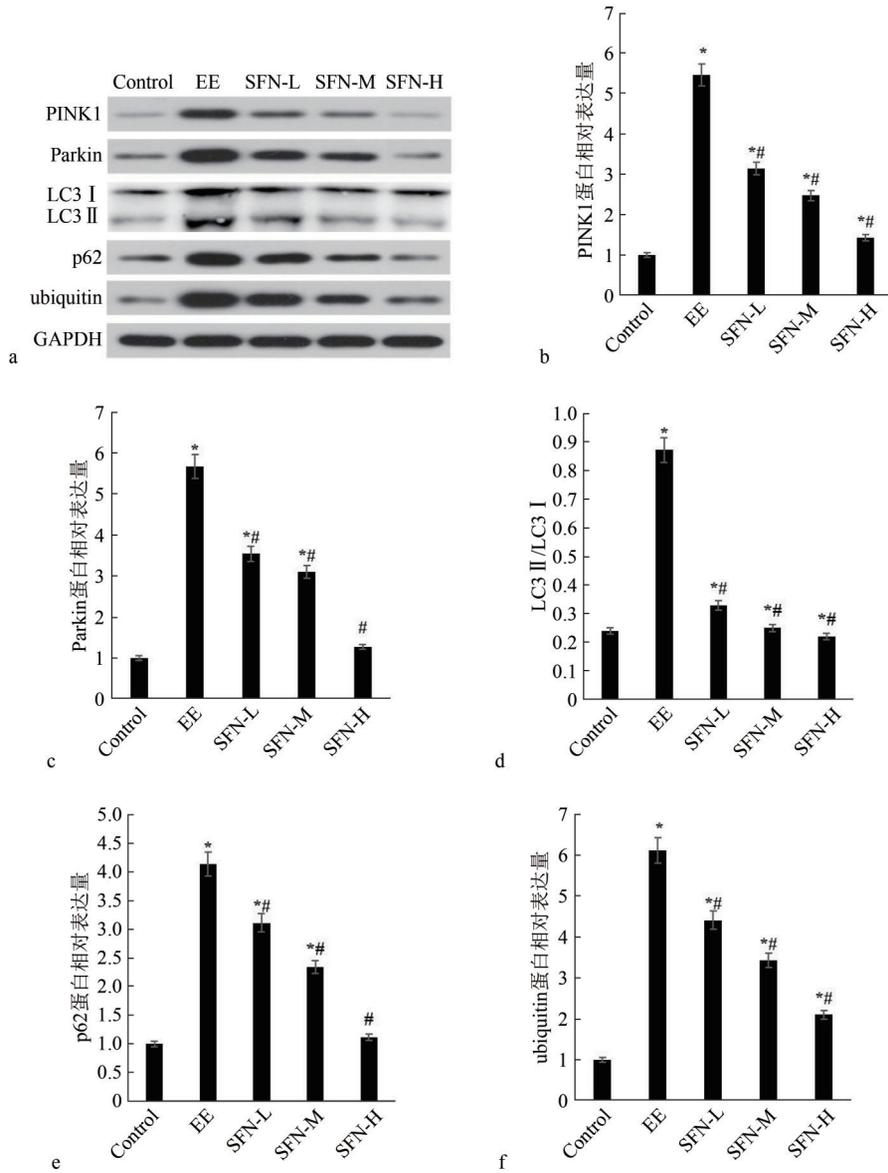
SFN是Ⅱ型解毒酶非常强的诱导剂,SFN通过激活依赖Nrf2的Ⅱ型解毒酶对肌肉损伤具有显著的保护作用<sup>[8]</sup>。另外,运动相关肌肉损伤与炎症和氧化应激加剧密切相关<sup>[9]</sup>。LEE等<sup>[10]</sup>研究表明,SFN可能通过调节炎症途径来抑制肝损伤,并有助于肝脏疾病的治疗。Nrf2信号通路是重要的抗氧化通路<sup>[11]</sup>,激活可抑制促炎性细胞因子的过度产生,而SFN可以通过Nrf2/HO-1信号通路抑制lipopolysaccharide诱导的炎症<sup>[12]</sup>。SFN可以抑制NF- $\kappa$ B信号通路并诱导Nrf2信号通路,降低肝组织中白细胞介素(Interleukin, IL)6和IL-1 $\beta$ 的mRNA表达<sup>[13]</sup>。这些研究提示SFN可能有助于缓解疲劳所致的肌肉损伤。

力竭运动可以通过产生活性氧自由基来诱导损伤,不平衡的还原-氧化状态导致肌肉虚弱和疲劳。乳酸是在骨骼肌中发现的一种代谢物,在骨骼

肌中的快速积累会对机体造成损害。CK在能量转移、肌肉收缩和ATP生成中起重要作用。有报道称CK水平与组织LDH表达呈正相关<sup>[14]</sup>。已发现力竭运动可以破坏氧化还原状态,增加MDA的水平,降低SOD和CAT的含量,加剧骨骼肌的氧化损伤。因此,本研究选择LA、CK、LDH、MDA、SOD和CAT和作为评价力竭运动疲劳后骨骼肌疲劳和氧化程度的生物标志物。在本研究中,观察到SFN可抑制血清中CK和股四头肌组织中LA、LDH和MDA的水平,而增加SOD和CAT的表达。其他文献报道,SFN预处理可通过降低血清AST、ALT和LDH水平来减轻肝脏损伤<sup>[15]</sup>。SFN可以显著增加SOD1和CAT的mRNA表达,从而保护细胞免受氧化应激的影响<sup>[16]</sup>。这些发现表明,SFN的抗疲劳作用至少部分与其抗氧化作用有关。

在本研究中,细胞形态学和超微结构分析表明,力竭运动可以破坏骨骼肌细胞的正常排列,导致肌膜不完整、界限不清、肌纤维的不规则排列(如肌纤维扭曲、断裂和溶解等)以及肌间质水肿。力竭运动还导致肌原纤维和细胞骨架结构的破坏,包括肌丝断裂、肌浆网扩张、线粒体结构紊乱、线粒体肿胀和空泡化。本研究表明,SFN可减轻力竭运动诱导的骨骼肌损伤,保护线粒体的形态和功能,恢复健康肌纤维的数量和面积,改善超微结构损伤。

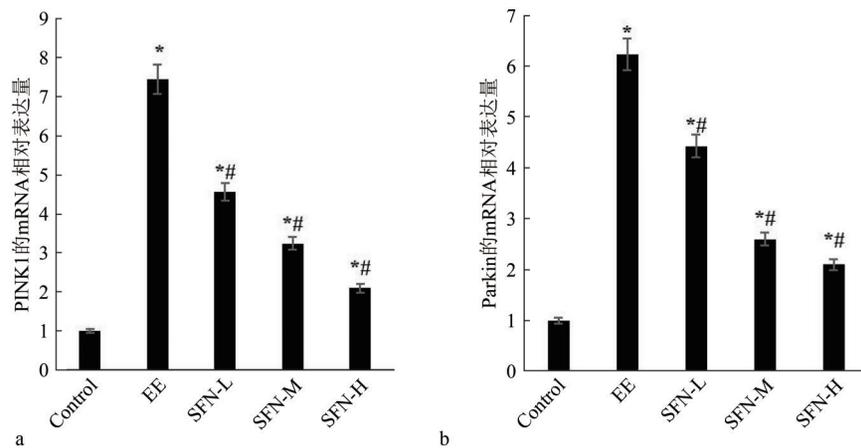
CS和SDH是参与三羧酸循环的两种重要的催化酶。线粒体较多的骨骼肌中CS和SDH活性较



注: \*与 Control 组相比,  $P < 0.05$ ; #与 EE 组相比,  $P < 0.05$

图 4 小鼠股四头肌组织中 PINK1/Parkin 信号通路成分表达

Figure 4 Expression of PINK1/Parkin signaling pathway components in mouse quadriceps muscle tissue



注: a: PINK1; b: Parkin; 与 Control 组相比,  $*P < 0.05$ ; 与 EE 组相比,  $*P < 0.05$

图 5 小鼠股四头肌组织中 PINK1 和 Parkin 的 mRNA 表达

Figure 5 mRNA expression of PINK1 and Parkin in mouse quadriceps muscle tissue

高,从而提供更多 ATP<sup>[17]</sup>。为确定 SFN 对力竭运动诱导的疲劳小鼠能量产生的影响,本研究评估了肝脏和股四头肌组织中糖原的含量,结果显示 SFN 提高了两个组织中的糖原水平,可能是促进了糖异生过程。此外,与力竭运动组相比,SFN 组小鼠的股四头肌组织中 CS 和 SDH 活性明显升高。这些发现表明 SFN 增加了肝脏和肌肉组织中的糖原含量,从而增加了 ATP 的产生。因此,小鼠的运动能力和行为表现都得到了改善,主要表现为能量产生的增加和疲劳相关指标的改善。

研究表明,自噬和线粒体自噬参与了骨骼肌细胞线粒体质量控制的生理和病理动态平衡<sup>[18]</sup>。Parkin 是一种细胞质 E3 泛素连接酶,在动物体内由 *park2* 基因编码,具有广泛的生理功能。它在骨骼肌和其他组织中高度表达,包括大脑、心脏、肝脏和睾丸<sup>[18]</sup>。PINK1 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,只有一个蛋白激酶结构域,在骨骼肌线粒体外膜中高表达。PINK1 和 Parkin 被认为是从细胞中移除受损线粒体过程中线粒体自噬的关键介质,PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬与机体抗疲劳能力有直接的关联<sup>[19]</sup>。本研究 Western blot 结果显示,SFN 可抑制 PINK1、Parkin 的蛋白表达。RT-qPCR 分析表明,SFN 可下调 PINK1 和 Parkin mRNA 的表达。据报道,在线粒体膜电位受损和失衡的情况下,PINK1 从胞浆移位到线粒体<sup>[20]</sup>。PINK1 在线粒体外膜上积累,然后磷酸化丝氨酸 65 上的 Parkin,激活 Parkin 的连接酶活性,导致线粒体自噬增加<sup>[21]</sup>。因此,PINK1 蛋白浓度的变化可以用来衡量线粒体的健康状态。本研究还显示,SFN 可抑制 Lc3-II、p62 和 ubiquitin 的蛋白表达。Parkin 结合位于线粒体外膜上的蛋白质上的 ubiquitin 链,导致信号放大和自噬小体的募集以启动线粒体自噬<sup>[20]</sup>。p62 是一种普遍表达的支架蛋白,也是自噬小体的标志,自噬小体在线粒体自噬的调节中起着重要作用<sup>[20]</sup>。p62 通过直接与 LC3 结合来调节线粒体自噬过程,从而维持其自身的细胞内水平,形成 LC3/p62 复合物<sup>[22]</sup>。PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬也被发现与 ubiquitin 和 p62 相关<sup>[23]</sup>。因此,本文结果首次证明 SFN 可以抑制力竭运动诱导后骨骼肌中线粒体自噬相关蛋白的表达,包括 PINK1/Parkin 信号通路中的蛋白。

综上,SFN 可以改善力竭运动诱导的小鼠骨骼肌疲劳,减轻骨骼肌损伤,提高抗氧化能力和糖原合成。SFN 通过抑制 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬来发挥抗疲劳作用。然而,SFN 抗疲劳特性的确切分子机制还需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] JAMMES Y, STEINBERG J G, MAMBRINI O, et al. Chronic fatigue syndrome: Assessment of increased oxidative stress and altered muscle excitability in response to incremental exercise [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2005, 257(3): 299-310.
- [2] BARBALHO S M, FLATO U A P, TOFANO R J, et al. Physical exercise and myokines: Relationships with sarcopenia and cardiovascular complications [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(10): 3607.
- [3] ARRIBAT Y, BROSKEY N T, GREGGIO C, et al. Distinct patterns of skeletal muscle mitochondria fusion, fission and mitophagy upon duration of exercise training [J]. *Acta Physiologica*, 2019, 225(2): e13179.
- [4] RUSSO M, SPAGNUOLO C, RUSSO G L, et al. Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(8): 1391-1405.
- [5] JUGE N, MITHEN R F, TRAKA M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: A comprehensive review [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 2007, 64(9): 1105-1127.
- [6] CARDENIA V, RODRIGUEZ-ESTRADA M T, LORENZINI A, et al. Effect of broccoli extract enriched diet on liver cholesterol oxidation in rats subjected to exhaustive exercise [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 169: 137-144.
- [7] 李灵杰,张靓,陈雪飞.跑台运动对肥胖小鼠骨骼肌CHI3L1表达的影响及其机制[J].*中国运动医学杂志*, 2018, 37(7): 581-587. LI L J, ZHANG J, CHEN X F. Effects of treadmill running on CHI3L1 expression in skeletal muscles of high-fat diet mice and its underlying mechanism [J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 2018, 37(7): 581-587.
- [8] OH S, KOMINE S, WARABI E, et al. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12902.
- [9] 刘晓光,陈佩杰,赵淋淋,等.巨噬细胞剔除可通过调控损伤骨骼肌炎症和氧化应激水平损害骨骼肌再生[J].*生理学报*, 2018, 70(1): 23-32. LIU X G, CHEN P J, ZHAO L L, et al. Macrophages depletion impairs skeletal muscle regeneration by regulating inflammation and oxidative stress levels [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2018, 70(1): 23-32.
- [10] LEE C H, YANG S M, LEE B S, et al. Hepatic protective effects of sulforaphane through the modulation of inflammatory pathways [J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2020, 22(4): 386-396.
- [11] 陈光海,刘晓平.Keap1-Nrf2信号通路与细胞氧化应激反应相关性研究进展[J].*医学理论与实践*, 2016, 29(15): 2012-2015. CHEN G H, LIU X P. Progress in the study of the keap1-Nrf2 signaling pathway in relation to the cellular oxidative stress response [J]. *The Journal of Medical Theory and Practice*, 2016, 29(15): 2012-2015.
- [12] RUHEE R T, MA S H, SUZUKI K. Sulforaphane protects cells

- against lipopolysaccharide-stimulated inflammation in murine macrophages [J]. *Antioxidants*: Basel, Switzerland, 2019, 8 (12): 577.
- [13] TOWNSEND B E, JOHNSON R W. Sulforaphane reduces lipopolysaccharide-induced proinflammatory markers in hippocampus and liver but does not improve sickness behavior[J]. *Nutritional Neuroscience*, 2017, 20(3): 195-202.
- [14] ASSUNÇÃO CARVALHO L, DE FREITAS M C, SILVA A S, et al. *Syzygium cumini* nectar supplementation reduced biomarkers of oxidative stress, muscle damage, and improved psychological response in highly trained young handball players[J]. *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 1508.
- [15] ZHAO H D, ZHANG F, SHEN G, et al. Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16(24): 3002-3010.
- [16] CHEN X, LIU J, CHEN S Y. Sulforaphane protects against ethanol-induced oxidative stress and apoptosis in neural crest cells by the induction of Nrf2-mediated antioxidant response[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2013, 169(2): 437-448.
- [17] RATKEVICIUS A, CARROLL A M, KILIKVICIUS A, et al. H55N polymorphism as a likely cause of variation in citrate synthase activity of mouse skeletal muscle [J]. *Physiological Genomics*, 2010, 42A(2): 96-102.
- [18] GOUSPILLOU G, GODIN R, PIQUEREAU J, et al. Protective role of Parkin in skeletal muscle contractile and mitochondrial function[J]. *The Journal of Physiology*, 2018, 596(13): 2565-2579.
- [19] BOTELLA J, SANER N, GRANATA C. Guardian of mitochondrial function: An expanded role of Parkin in skeletal muscle[J]. *The Journal of Physiology*, 2018, 596(24): 6139-6140.
- [20] ZHANG H Q, XU Y, FOHLEROVA Z, et al. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 113: 44-53.
- [21] YOULE R J, NARENDRA D P. Mechanisms of mitophagy[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(1): 9-14.
- [22] ICHIMURA Y, KUMANOMIDOU T, SOU Y S, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(33): 22847-22857.
- [23] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M ", SKUJAT D, et al. PINK<sub>1</sub>/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(2): 119-131.