

LPS 通过 AKT/FOXO1 信号通路诱导 C2C12 肌管细胞 *MuRF1* 基因转录

刘妍^{1,2}, 梁辉煌¹, 刘玉兰¹, 唐中林³, 汪文俊², 张晶^{1*}

(1. 武汉轻工大学动物营养与饲料科学湖北省重点实验室, 武汉 430023;

2. 中南民族大学生命科学学院, 武汉 430074; 3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 以 C2C12 肌管细胞为试验材料, 探讨脂多糖(LPS)诱导的炎症反应对肌管蛋白降解相关基因及信号通路的影响。选取不同质量浓度(10, 100, 1 000 ng · mL⁻¹)的 LPS 分别刺激 C2C12 肌管细胞 30 min 和 3 h, 通过 RT-qPCR 检测炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的基因转录, 确定 LPS 最佳刺激浓度以建立细胞炎症模型。用最佳浓度 LPS 分别刺激 C2C12 肌管细胞 0 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, RT-qPCR 检测 *MAFbx* 基因和 *MuRF* 基因在不同时间点的转录量变化。此外, 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后, Western blot 检测 AKT/FOXO1、mTOR 和 P38 信号通路相关蛋白质的表达情况。结果表明: LPS 刺激 C2C12 肌管细胞的最佳浓度为 1 000 ng · mL⁻¹, 在作用 30 min 和 3 h 时均能显著上调 *TNF- α* 、*IL-6* 的基因转录, 而在刺激 12 和 24 h 时 *MuRF1*、*IL-1 β* 、*IL-6* 和 *TLR4* 的基因转录显著上调。此外, 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 时, 仅 AKT 和 FOXO1 蛋白磷酸化水平明显降低。基于以上结果, 推测 LPS 通过调控 AKT/FOXO1 信号通路诱导 C2C12 肌管细胞 *MuRF1* 转录。

关键词: 脂多糖; C2C12 肌管细胞; 肌肉蛋白降解; *MuRF1* 基因; *MAFbx* 基因

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)02-0374-07

LPS Induces *MuRF1* Transcription through AKT/FOXO1 Mediating Pathway in C2C12 Myotubes

LIU Yan^{1,2}, LIANG Hui-huang¹, LIU Yu-lan¹, TANG Zhong-lin³, WANG Wen-jun², ZHANG Jing^{1*}

(1. Hubei Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China; 3. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: This study was designed to investigate the effects of the inflammatory induced by lipopolysaccharide (LPS) on the genes and pathways controlling the protein degradation in C2C12 myotubes. In order to establish an inflammatory cell mode, the C2C12 myotubes were treated with graded concentrations of LPS (10, 100 and 1 000 ng · mL⁻¹) for 30 min and 3 h, and then the mRNA transcription of TNF- α and IL-6 were determined by qPCR method. The results showed that 1 000 ng · mL⁻¹ LPS was the optimal concentration. After the C2C12 myotubes were treated with 1 000 ng · mL⁻¹ LPS for 0 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h and 24 h, the mRNA transcription of *MAFbx* and *MuRF1* were determined by qPCR. And the activation of AKT/FOXO1, mTOR and p38MAPK signaling pathway was detected by western blot at 12 h after LPS treatment. The results showed that 1 000 ng · mL⁻¹ LPS significantly induced the mRNA transcription of *TNF- α* and *IL-6* at 30 min and 3 h. The transcription of *MuRF1*, *IL-1 β* , *IL-6* and *TLR4* were significantly

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 湖北省自然科学基金(2013CFA029; 2015CFB514)

作者简介: 刘妍(1990-), 女, 河南安阳人, 硕士生, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: sharonliuyan@126.com

* 通信作者: 张晶, 讲师, E-mail: judyzhang1103@163.com

up-regulated at 12 h and 24 h after LPS treatment. In addition, the phosphorylation of AKT and FOXO1 in C2C12 myotubes was significantly suppressed at 12 h after LPS treatment. Therefore, our results suggest that LPS can induce *MuRF1* expression in C2C12 myotubes through the regulation of AKT/FOXO1 signaling pathway.

Key words: LPS; C2C12 myotubes; skeletal muscle protein degradation; *MuRF1*; *MAFbx*

骨骼肌作为机体内主要的代谢活动中心,是氨基酸和能量的最大储备库^[1]。肌肉蛋白质合成和降解之间的平衡是维持肌肉总量和功能的基础。骨骼肌萎缩是肌肉蛋白质合成减少和(或)分解代谢加快的结果,可发生于多种疾病状态下,如严重感染、创伤、脓毒症等^[2]。

目前研究表明炎症反应在肌肉蛋白质降解过程中扮演重要角色。脂多糖(LPS)是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,通过识别 Toll 样受体 4(TLR4)激活天然免疫系统^[3-4]。R. A. Orellana 等^[5]利用 LPS 注射新生仔猪导致仔猪背最长肌和腓肠肌中蛋白质合成分别降低了 11% 和 15%。此外,细胞水平的研究证实了 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞导致细胞蛋白质合成率显著降低^[6-7]。研究发现,两个 E3 泛素连接酶肌肉环状指基因 1 (*MuRF1*) 和肌肉萎缩盒 F 基因 (*MAFbx*) 是导致肌肉萎缩的关键因子。文献报道,炎性细胞因子(TNF- α 、IL-1、IL-6)可通过上调 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达从而加快肌肉蛋白质降解^[7-9]。LPS 也可通过激活 P38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路直接诱导 *MAFbx* 和 *MuRF1* 表达上调^[10-11]。相反,激活 PI3K/AKT 信号通路导致转录因子 FOXOs 磷酸化无法进入细胞核,从而抑制 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达^[12]。此外,激活 PI3K/AKT/mTOR 途径在促进肌肉蛋白质合成中起重要作用^[13]。

炎症介导的肌肉蛋白质降解,其具体机制仍存在争论。本试验以 C2C12 肌管细胞为材料,用不同质量浓度梯度的 LPS 刺激建立细胞炎症模型。利用 RT-qPCR 检测 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 0~24 h 的 *MAFbx* 和 *MuRF1* 转录量;以及 Western blot 检测 LPS 刺激 12 h 后 AKT/FOXO1、mTOR 和 P38 信号通路相关蛋白质的磷酸化水平,从而研究 LPS 对 *MAFbx* 和 *MuRF1* 基因转录的影响及其调控机制,为进一步阐明炎症介导肌肉蛋白降解的具体机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料、主要试剂及仪器

C2C12 细胞(小鼠成肌细胞,华中农业大学赵

书红教授惠赠);胎牛血清(Gibco);马血清(Gibco);DMEM 高糖培养基(Hyclone);胰酶(Gibco);LPS (026; B6 脂多糖, Sigma); TRIzol 试剂 (Invitrogen); PrimeScript[®] RT reagent Kit With gDNA Eraser 反转录试剂盒 (TaKaRa); SYBR[®] Premix ExTaq[™] RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa); 凯基全蛋白质提取试剂盒 KGP2100(购自南京凯基生物发展有限公司); ECL 试剂 (Pierce)、FOXO1 (Cell Signaling)、pFOXO1 (Cell Signaling)、AKT (Cell Signaling)、pAKT (Cell Signaling)、HRP-Goat Anti-Mouse IgG (AntGene Biotech)、HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (AntGene Biotech)。RT-PCR 仪 (7500 Real-time PCR System, ABI 公司); Nanodrop2000 超微量分光光度计 (Thermo); 电泳仪及电泳槽 (BIO); 紫外分光光度计。

1.2 C2C12 成肌细胞培养及诱导分化

小鼠 C2C12 细胞株常规复苏后,用 DMEM 高糖培养基(含 10% 的胎牛血清,1% 谷氨酰胺,1% 双抗),在体积分数 5% CO₂, 37 °C 的培养箱中培养。细胞传至第 2 代时,用含 0.25% 的胰酶消化约 2 min,加入培养基终止消化,用吸管反复吹打制成 C2C12 单细胞悬液,用 DMEM 高糖培养基调节细胞浓度为 $5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$,接入 6 孔培养板。当细胞增殖融合至 90%~100% 时,更换为含 2% 马血清的 DMEM 分化培养基继续培养。每 24 h 换液,持续 6 天诱导分化为肌管细胞。

1.3 细胞总 RNA 的提取

按照 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 说明书提取细胞总 RNA,用 Nanodrop2000 检测总 RNA 浓度和纯度,并用 1% 的琼脂糖凝胶对 RNA 进行电泳检测,无明显降解且 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 为 1.8~2.1 的 RNA 置于 -80 °C 冷冻备用。

1.4 RT-PCR 检测基因转录及分析

Real-time PCR 引物(表 1),以 *β actin* 为内参基因进行 Real-time PCR 进行检测。按照 TaKaRa 公司提供的 SYBR[®] Premix ExTaq[™] 试剂盒说明书,采用 10 μ L 反应体系,在冰上配制,体系包括:

SYBR®Premix ExTaq™ (2×) 5 μL, PCR Forward (Reverse)Primer (10 μmol·L⁻¹)各 0.2 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.2 μL, DNA 模板 1 μL, dH₂O 3.4 μL; 反应条件为 95 °C 预变性 30 s, 而后进行 40 个循环(95 °C 5 s, 60 °C 34 s)。mRNA 相对转录量计算采用 K. J. Livak 等的 2^{-ΔΔC_t} 法^[14]。采用 SPSS17.0 统计软件进行 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 表示差异显著, 以 *P* < 0.01 表示差异极显著。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Information of primer sequences for Real-time PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>TNF-α</i>	F: AGTCCGGGCAGGTCTACTTT R: CAGGTCAGTCCCAGCATC
<i>βactin</i>	F: CAGCCTTCCTTCTTGCGTAT R: TGGCATAGAGGTCTTTACGG
<i>Myd88</i>	F: CGAGGTTTGCATCTTCTTATTC R: CACTTGACCCAGGTTGCTTTA
<i>IL-1β</i>	F: GGCTGGACTGTTTCTAATGC R: ATGGTTTCTTGTGACCCTGA
<i>IL-6</i>	F: TAAGCTGGAGTCACAGAAGGAG R: GCAGTGGTTTGCAGTAGAT
<i>TLR4</i>	F: AATCTGGTGGCTGTGGAGAC R: TTCCCTGAAAGGCTTGGTCT
<i>MuRF1</i>	F: AGTTTGACACCCCTACGCC R: AGGATCAGAGCCTCGATGAA
<i>MAFbx</i>	F: AACCGAAGAATCGTTTGACG R: TCTGTTGCTCCCACCCTAA

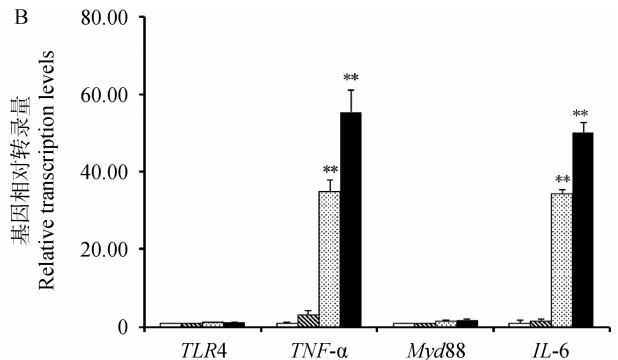
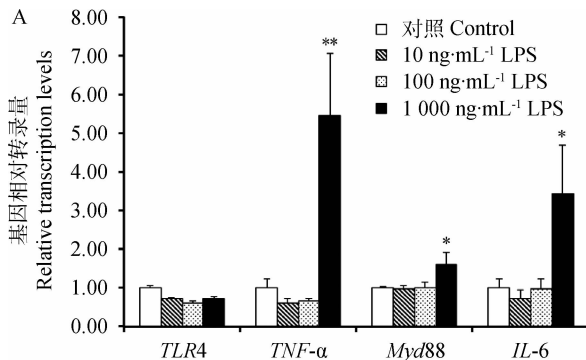
1.5 Western blot

待细胞培养至预定时间, 弃培养基, 冰上用 PBS 清洗细胞。然后用凯基全蛋白质提取试剂盒 KGP2100 裂解细胞, 离心(4 °C, 12 000 r·min⁻¹ × 15 min), 收集上清, 采用考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。加等体积凝胶上样缓冲液混合, 100 °C 加热 8 min 使蛋白质变性。制备好的蛋白质样品置 4 °C 冰箱保存备用。采用 BIO-RAD 的 Mini-PROTEAN3 电泳系统进行常规 SDS-PAGE 电泳。电泳后, 采用 BIO-RAD 的 Mini Trans-Blot 将样品转移至 PVDF 膜, 将膜置于封闭液(5% 脱脂乳的 PBST)室温封闭 3 h, 加一抗, 4 °C 冰箱过夜。洗膜后将膜孵育在含二抗的 PBST 溶液中, 室温下孵育 3 h, 用 ECL 试剂进行荧光显色, 于 Alpha Innotech 成像系统中检测及分析条带强度。

2 结果

2.1 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞最佳浓度的确定

利用 q-PCR 检测不同质量浓度(10、100 和 1 000 ng·mL⁻¹) LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 30 min 和 3 h 时, *TLR4*、*TNF-α*、*Myd88* 和 *IL-6* 基因的转录情况。结果显示, LPS 质量浓度为 1 000 ng·mL⁻¹ 时, 刺激 C2C12 肌管细胞 30 min 后显著提高了细胞中 *TNF-α*、*Myd88* 和 *IL-6* 的 mRNA 转录量(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01, 图 1A); 并且刺激 C2C12 肌管细胞 3 h 后极显著提高了细胞中 *TNF-α* 和 *IL-6* 的 mRNA 转录量(*P* < 0.01, 图 1B)。因此, LPS 刺激 C2C12 肌管细胞的最佳质量浓度为 1 000 ng·mL⁻¹。



*. 差异显著(*P* < 0.05); *. 差异极显著(*P* < 0.01)。下同

*. Means differ significantly (*P* < 0.05); *. Means highly differ significantly (*P* < 0.01). The same as below

图 1 不同质量浓度 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 30 min(A)和 3 h(B)后 *TLR4*、*TNF-α*、*Myd88* 和 *IL-6* 基因转录情况
Fig. 1 Dose-dependent effect of LPS on the mRNA transcription of *TLR4*, *TNF-α*, *Myd88* and *IL-6* genes at 30 min (A) and 3 h (B) in C2C12 myotubes

2.2 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞对 *MAFbx* 和 *MuRF1* 基因转录的影响

利用 RT-qPCR 方法分析 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞不同时间点时(0 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h)对 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6*、*TLR4*、*MAFbx* 和 *MuRF1* 基因转录的影响。结果显示,1 000 ng · mL⁻¹ 的 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 3 h 时极显著提高细胞中 *TNF-α* 和 *IL-6* 的 mR-

NA 转录($P < 0.01$, 图 2), *IL-1β* 和 *TLR4* 的 mRNA 转录量在刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后也出现显著上调($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 2), 说明 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞引起了细胞炎症反应。同时, 1 000 ng · mL⁻¹ 的 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后, *MuRF1* 的 mRNA 转录量则出现极显著上调($P < 0.01$, 图 3), 但 *MAFbx* mRNA 转录量无显著性差异。

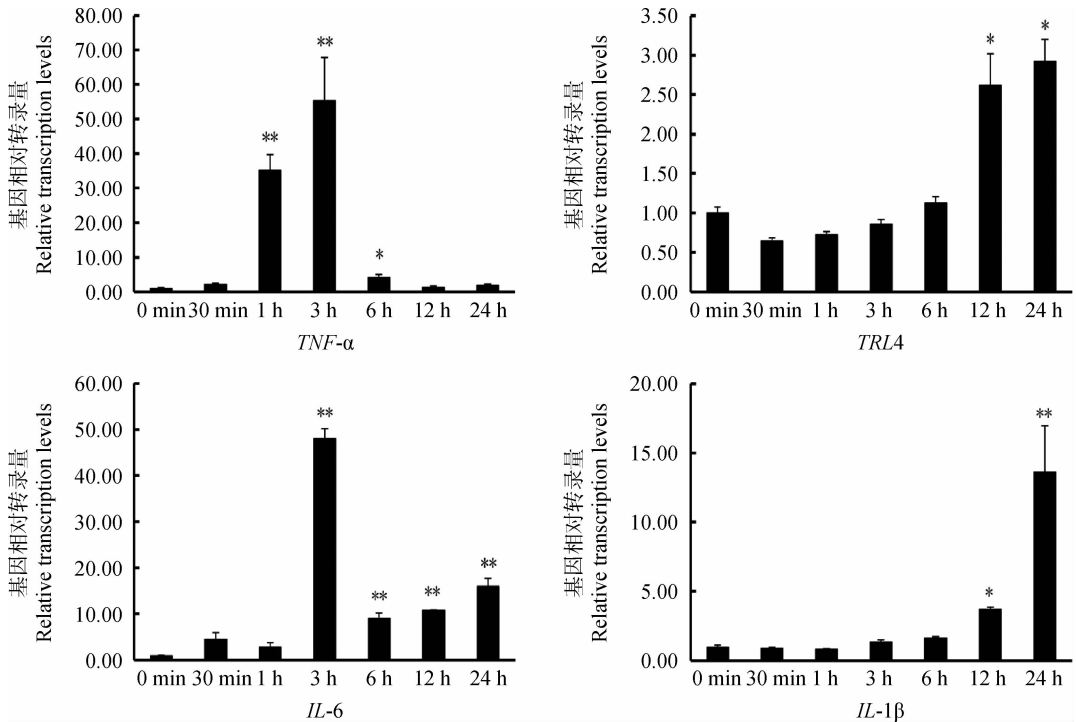


图 2 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞不同时间点对 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* 和 *TLR4* 基因转录的影响
Fig. 2 Time effects of 1 000 ng · mL⁻¹ LPS on the mRNA transcription of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6* and *TLR4* in C2C12 myotubes

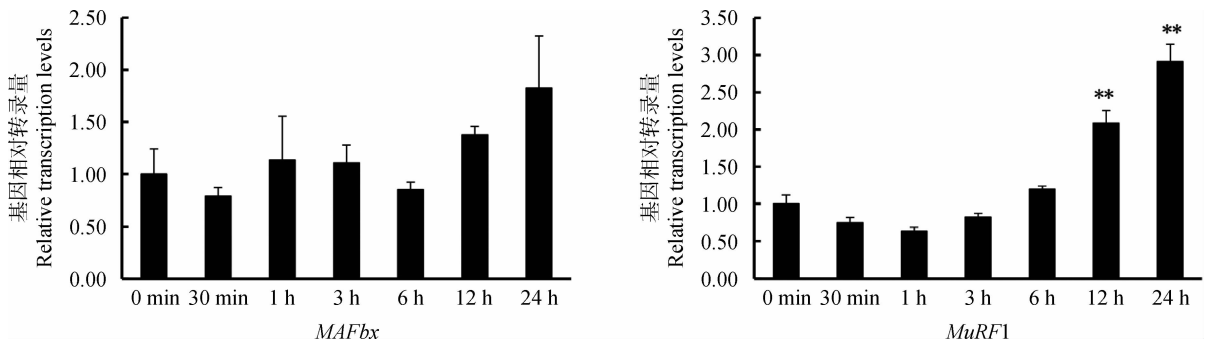


图 3 1 000 ng · mL⁻¹ 的 LPS 刺激 C2C12 细胞不同时间点对 *MAFbx* 和 *MuRF1* 基因转录影响
Fig. 3 Time effects of 1 000 ng · mL⁻¹ LPS on the mRNA transcription of *MAFbx* and *MuRF1* in C2C12 myotubes

2.3 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞对 AKT/FOXO1、mTOR 和 P38 信号通路的影响

本试验为了进一步探究 LPS 刺激 C2C12 肌管

细胞引起 *MuRF1* 上调的机制, 采用 Western blot 方法检测 1 000 ng · mL⁻¹ LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后对 AKT/FOXO1、P38 和 mTOR 信号通

路相关蛋白磷酸化的影响。结果显示, LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后, AKT 和 FOXO1 蛋白的磷酸化水平均显著低于对照组(图 4A)。然而, P38

蛋白和 mTOR 通路相关蛋白(mTOR、4E-BP1、p70^{S6K})磷酸化水平与对照组相比无明显差异(图 4B 和 C)。

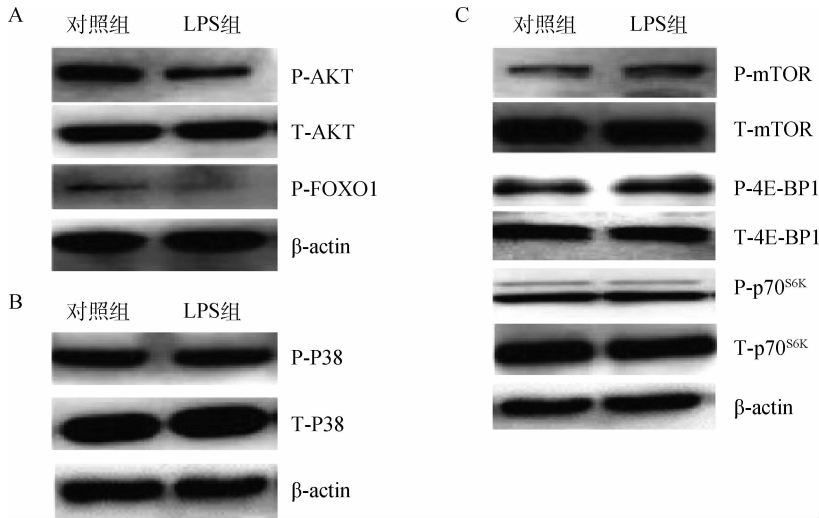


图 4 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞对 AKT、FOXO1、P38、mTOR、4E-BP1 和 p70^{S6K} 蛋白磷酸化的影响

Fig. 4 Effects of LPS on the phosphorylation of AKT, FOXO1, P38, mTOR, 4E-BP1 and p70^{S6K} in C2C12 myotubes

3 讨论

肌肉降解主要是肌肉蛋白质含量的减少, 主要涉及到泛素-蛋白酶体途径、自噬溶酶体降解途径, 以及 PI3K/AKT、P38/MAPK、NF- κ B 等多条信号通路。目前有研究表明, LPS 可通过识别 TLR4 介导激活炎性细胞因子从而导致肌肉蛋白的降解。R. A. Frost 等^[6]用 LPS 与 IFN- γ 同时处理 C2C12 小鼠成肌细胞, 导致细胞蛋白质的合成率显著降低了 80%。而 S. T. Russell 等^[7]的研究证实仅用 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞可使蛋白质合成率降低 60%。同时, A. Doyle 等通过试验发现 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞导致肌管直径减小了 20% 并引起了结构蛋白质表达量明显降低^[15]。

本试验首先成功诱导 C2C12 成肌细胞分化为肌管细胞, 之后用不同质量浓度(10、100 和 1 000 ng \cdot mL⁻¹)的 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞建立细胞炎症模型。通过利用 q-PCR 检测 TLR4、TNF- α 、Myd88 和 IL-6 的基因转录量, 确定 LPS 最佳刺激浓度为 1 000 ng \cdot mL⁻¹。随后, 1 000 ng \cdot mL⁻¹ 的 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞, TNF- α 、IL-1、IL-6 和 MuRF1 mRNA 转录均呈现极显著上调, 提示 LPS 成功诱导细胞炎症反应并加快肌管细胞的蛋白质降解。然而, MAFbx mRNA 转录只有升高趋势, 但没

有显著性差异。Y. P. Li 等^[11]研究发现 TNF- α 通过激活 P38 MAPK 信号通路上调 MAFbx 基因表达。因此, 作者进一步检测了 LPS 对 P38 蛋白磷酸化水平的影响, 但未发现显著性差异。这一结果表明 MAFbx 基因表达主要受 P38 MAPK 信号通路的调控。

PI3K/AKT 信号通路在肌肉蛋白质代谢过程中起重要作用, 通过调控下游 mTOR、p70^{S6K} 和 4E 结合蛋白 1(4E-BP1)控制蛋白质的合成^[16]。同时, 在饥饿或缺乏生长因子条件下, AKT 失活会导致 FOXO 去磷酸化而被激活释放, 使其靶基因 MAFbx 和 MuRF1 上调表达从而促进蛋白质的降解^[12, 17]。为了进一步探究 LPS 引起 C2C12 肌管细胞中 MuRF1 上调表达的机制, 作者检测了 AKT/mTOR 和 AKT/FOXO1 信号通路相关蛋白质的变化。结果表明 LPS 刺激后 mTOR、4E-BP1 和 p70^{S6K} 蛋白磷酸化水平与对照组相比无明显差异, 提示 LPS 对 PI3K/AKT/mTOR 信号通路无影响。但 AKT 和 FOXO1 磷酸化水平与对照组相比显著降低。因此, 推测在 C2C12 肌管细胞中 LPS 是通过直接抑制 PI3K/AKT/FOXO1 信号通路, 导致 FOXO 去磷酸化激活释放, 引起其下游基因 MuRF1 的转录上调, 从而促进了肌管蛋白的降解。与我们的前期研究结果相一致, 仔猪注射 LPS 后 AKT 和 FOXO1 磷酸化水平均明显降低, 导致

MAFbx 和 *MuRF1* 表达上调,从而促进蛋白质的降解^[18]。此外,H. Crossland 等^[19]研究发现炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 可以通过调节 AKT/FOXO/泛素-蛋白酶体蛋白水解途径,诱导肌肉蛋白质降解。

综上所述,本研究结果显示 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞显著提高炎症细胞因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)和 *MuRF1* 基因转录,同时 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后 AKT 和 FOXO1 磷酸化水平明显降低。因此,结合文献与试验结果,推测 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞导致大量炎症细胞因子(如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β)的产生,可通过抑制 AKT/FOXO1 信号通路,导致 *MuRF1* 转录上调,从而促进了肌管蛋白的降解。

4 结 论

在 C2C12 肌管细胞中进行炎症反应对肌管蛋白降解基因 *MAFbx* 和 *MuRF1* 转录量的影响及其调控机制的研究,发现采用 1 000 ng · mL⁻¹ 的 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞引起了炎症因子显著上调,且 *MuRF1* 基因的转录量极显著上调,同时 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞 12 h 后,导致 AKT 和 FOXO1 蛋白的磷酸化水平转录量显著降低。本研究的结果表明 LPS 刺激 C2C12 肌管细胞通过抑制 AKT/FOXO1 信号通路上调 *MuRF1* 表达,从而加快蛋白质的降解,为进一步研究炎症反应介导肌肉蛋白质降解的机制提供了有益参考。

参考文献(References):

- [1] LECKER S H, GOLDBERG A L, MITCH W E. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(7):1807-1819.
- [2] PALUS S, VON HAEHLING S, SPRINGER J. Muscle wasting; an overview of recent developments in basic research[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 176(3):640-644.
- [3] FRISARD M I, MCMILLAN R P, MARCHAND J, et al. Toll-like receptor 4 modulates skeletal muscle substrate metabolism [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298(5):988-998.
- [4] FROST R A, LANG C H. Regulation of muscle growth by pathogen-associated molecules[J]. *J Anim Sci*, 2008, 86(14 Suppl):E84-E93.
- [5] ORELLANA R A, O'CONNOR P M, NGUYEN H V, et al. Endotoxemia reduces skeletal muscle protein synthesis in neonates[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283(5):E909-E916.
- [6] FROST R A, NYSTROM G J, LANG C H. Endotoxin and interferon-gamma inhibit translation in skeletal muscle cells by stimulating nitric oxide synthase activity[J]. *Shock*, 2009, 32(4):416-426.
- [7] RUSSELL S T, SIREN P M, SIREN M J, et al. Mechanism of attenuation of protein loss in murine C2C12 myotubes by D-myo-inositol 1, 2, 6-triphosphate[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(2):286-295.
- [8] PHILIPPOU A, MARIDAKI M, THEOS A, et al. Cytokines in muscle damage[J]. *Adv Clin Chem*, 2012, 58:49-87.
- [9] ZOICO E, ROUBENOFF R. The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function [J]. *Nutr Rev*, 2002, 60(2):39-51.
- [10] MOYLAN J S, REID M B. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting[J]. *Muscle Nerve*, 2007, 35(4):411-429.
- [11] LI Y P, CHEN Y, JOHN J, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle [J]. *FASEB J*, 2005, 19(3):362-370.
- [12] STITT T N, DRUJAN D, CLARKE B A, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors[J]. *Mol Cell*, 2004, 14(3):395-403.
- [13] DUAN C, REN H, GAO S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins; roles in skeletal muscle growth and differentiation[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2010, 167(3):344-351.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2^{- $\Delta\Delta Ct$} method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [15] DOYLE A, ZHANG G, ABDEL FATTAH E A, et al. Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways[J]. *FASEB J*, 2011, 25(1):99-110.
- [16] GLASS D J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(10):1974-1984.

- [17] SACHECK J M, OHTSUKA A, MCLARY S C, et al. IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(4): E591-E601.
- [18] 陈 逢. 鱼油通过 TLR4 和 NOD 信号通路对脂多糖诱导的仔猪肠道、肝脏损伤和肌肉蛋白质降解的调控作用[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2013.
- CHEN F. Regulative role of fish oil on intestinal and liver injury, and muscle protein degradation of piglets after lipopolysaccharide challenge through TLR4 and NOD signaling pathway [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2013. (in Chinese)
- [19] CROSSLAND H, CONSTANTIN-TEODOSIU D, GARDINER S M, et al. A potential role for Akt/FOXO signalling in both protein loss and the impairment of muscle carbohydrate oxidation during sepsis in rodent skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 22): 5589-5600.

(编辑 白永平)