

研究论文

离心跑台运动促进大鼠腓肠肌适应性肥大

戴志强^{1, #}, 柯余^{2, 3, #}, 赵艳^{2, 3}, 阳颖^{2, 3}, 吴慧雯^{2, 3}, 尚画雨⁴, 夏志^{2, 3, *}

¹南昌大学体育学院, 南昌 330031; ²温州大学体育与健康学院, 温州 325035; ³温州市生物健康材料与化学重点实验室, 温州 325035; ⁴成都体育学院运动医学与健康学院, 成都 610041

摘要: 本研究旨在探讨离心跑台运动对大鼠骨骼肌适应性肥大的影响及其机制。选取3月龄 Sprague Dawley (SD) 大鼠32只, 据体重随机分为四组: 2周安静对照组(2C)、2周下坡跑运动组(2E)、4周安静对照组(4C)和4周下坡跑运动组(4E)。运动组大鼠下坡跑方案为: 坡度-16°, 跑速16 m/min, 训练时间90 min, 每周训练5 d。末次训练24 h后让4组大鼠均进行一次力竭跑台运动, 休息48 h后处死所有大鼠, 取腓肠肌待测。用HE染色测量肌纤维横截面积与直径, 用透射电镜观察肌纤维超微结构变化, 用嘌呤霉素表面标记翻译法测定蛋白质合成率, 用免疫荧光双标法检测溶酶体关联膜蛋白2 (lysosomal-associated membrane protein 2, Lamp2)-亮氨酸-tRNA合成酶(leucyl-tRNA synthetase, LARS)、Lamp2-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)共定位情况, 用免疫印迹法测定肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC) IIb和LARS蛋白表达及mTOR、p70核糖体蛋白S6激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)和真核翻译起始因子4E结合蛋白1(eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1)磷酸化水平。结果显示, 与2C组大鼠相比, 2E组大鼠腓肠肌湿重、腓肠肌湿重/体重比值、跑距、运动时间、运动前与运动后血乳酸水平、肌原纤维蛋白质含量、Lamp2-LARS和Lamp2-mTOR共定位水平和LARS蛋白表达显著提高; 除了上述变化外, 与4C组大鼠相比, 4E组大鼠还表现出肌纤维横截面积、直径、蛋白质合成率、mTOR、p70S6K及4E-BP1磷酸化水平显著提高; 与安静对照组相比, 运动组大鼠腓肠肌表现出超微结构损伤, 其中4E组更为明显。以上结果表明, 离心跑台运动可能通过上调LARS表达促进mTOR转位至溶酶体膜而活化, 并经mTOR-p70S6K-4E-BP1信号转导通路上调蛋白质合成速率, 促进蛋白质沉积, 从而诱发适应性骨骼肌肥大。尽管骨骼肌超微结构变化更为明显, 但短期运动期限内相对较长的训练周期所产生的促腓肠肌蛋白质合成与适应性肥大效果更为显著。

关键词: 下坡跑; 骨骼肌; 蛋白质合成; 亮氨酸-tRNA合成酶; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

Eccentric treadmill exercise promotes adaptive hypertrophy of gastrocnemius in rats

DAI Zhi-Qiang^{1, #}, KE Yu^{2, 3, #}, ZHAO Yan^{2, 3}, YANG Ying^{2, 3}, WU Hui-Wen^{2, 3}, SHANG Hua-Yu⁴, XIA Zhi^{2, 3, *}

¹School of Physical Education, Nanchang University, Nanchang 330031, China; ²College of Physical Education and Health, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China; ³Key Lab of Biohealth Materials and Chemistry of Wenzhou, Wenzhou 325035, China; ⁴School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport University, Chengdu 610041, China

Abstract: The present study aimed to investigate the effects of eccentric treadmill exercise on adaptive hypertrophy of skeletal muscle in rats. Thirty-two 3-month-old Sprague Dawley (SD) rats were selected and randomly assigned to one of the four groups based on their body weights: 2-week quiet control group (2C), 2-week downhill running exercise group (2E), 4-week quiet control group (4C), and 4-week downhill running exercise group (4E). The downhill running protocol for rats in the exercise groups involved

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31960192), the Jiangxi Provincial Science Fund for Distinguished Young Scholars (No. 20202ACBL216004), the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. LY23C110001), the Natural Science Foundation of Sichuan Province, China (No. 2023NSFSC1524), the Scientific Research Project of Zhejiang Provincial Education Department (No. Y202352718), the Basic Scientific Research Project of Wenzhou (No. Y20220209, Y20240518) and the Wenzhou University Graduate Student Innovation Fund Project (No. 3162024003022).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: xiazhi1982@163.com

slope of -16° , running speed of 16 m/min, training duration of 90 min, and 5 training sessions per week. Twenty-four hours after the final session of training, all the four groups of rats underwent an exhaustion treadmill exercise. After resting for 48 h, all the rats were euthanized and their gastrocnemius muscles were harvested for analysis. HE staining was used to measure the cross-sectional area (CSA) and diameter of muscle fibers. Transmission electron microscope was used to observe the ultrastructural changes in muscle fibers. Purithromycin surface labeling translation method was used to measure protein synthesis rate. Immunofluorescence double labeling was used to detect the colocalization levels of lysosomal-associated membrane protein 2 (Lamp2)-leucyl-tRNA synthetase (LARS) and Lamp2-mammalian target of rapamycin (mTOR). Western blot was used to measure the protein expression levels of myosin heavy chain (MHC) IIb and LARS, as well as the phosphorylation levels of mTOR, p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), and eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1). The results showed that, compared with the 2C group rats, the 2E group rats showed significant increases in wet weight of gastrocnemius muscle, wet weight/body weight ratio, running distance, running time, pre- and post-exercise blood lactate levels, myofibrillar protein content, colocalization levels of Lamp2-LARS and Lamp2-mTOR, and LARS protein expression. Besides these above changes, compared with the 4C group, the 4E group further exhibited significantly increased fiber CSA, fiber diameter, protein synthesis rate, and phosphorylation levels of mTOR, p70S6K, and 4E-BP1. Compared with the quiet control groups, the exercise groups exhibited ultrastructural damage of rat gastrocnemius muscle, which was more pronounced in the 4E group. These findings suggest that eccentric treadmill exercise may promote mTOR translocation to lysosomal membrane, activating mTOR signaling via up-regulating LARS expression. This, in turn, increases protein synthesis rate through the mTOR-p70S6K-4E-BP1 signaling pathway, promoting protein deposition and inducing adaptive skeletal muscle hypertrophy. Although the ultrastructural changes of skeletal muscle are more pronounced, the relatively long training cycles during short-term exercise periods have a more significant effect on promoting gastrocnemius muscle protein synthesis and adaptive hypertrophy.

Key words: downhill running; skeletal muscle; protein synthesis; leucyl-tRNA synthetase; mammalian target of rapamycin

骨骼肌的肌肉蛋白质合成(muscle protein synthesis, MPS)和降解(muscle protein breakdown, MPB)之间的差异指示着净蛋白质平衡(net protein balance, NPB)状态,其动态平衡对于骨骼肌质量的维持与增长具有关键影响^[1]。若MPS昼夜波动与MPB相当,肌肉质量得以保持;而当MPS水平超过MPB导致NPB呈正值时,骨骼肌蛋白质沉积增加并继发导致肌纤维体积增长;反之,若MPB水平超过MPS使NPB呈负值,则会诱发骨骼肌蛋白质含量减少并使萎缩加剧^[2]。除恶病质与糖尿病等慢性消耗性疾病患者外,普通健康人群骨骼肌的维持与增长主要取决于MPS的变化^[3]。因此,如何有效地维持较高水平的MPS,始终是学界关注的重点研究课题。

运动是强有力的MPS刺激,在促进骨骼肌肥大和防治骨骼肌萎缩方面均具有重要潜力^[4]。运动可根据分类标准的不同而分为有氧运动、无氧运动、抗阻运动及高强度间歇运动等多种形式。其中,抗阻运动是学界用于诱导适应性骨骼肌肥大的常用方法,但近年来有研究显示,有氧运动亦可诱导MPS的增加,从而产生骨骼肌适应性肥大与功能促进^[5]。运动过程往往包含向心与离心运动两个时相,离心运动不等同于骨骼肌的单纯离心收缩^[6],越来越多

的研究表明,离心性运动诱导骨骼肌肥大与力量促进的效果较向心性运动可能更为显著^[7–13]。然而,亦有报道表明,长时间和/或高强度的离心运动可能会导致肌肉损伤和运动能力的下降^[11, 14]。就下坡跑等离心运动模式而言,学界主要致力于探讨其与骨骼肌微细结构损伤及延迟性肌肉酸痛之间的关联,其对于骨骼肌MPS的影响却仍不清楚,相关分子机理也不明了。此外,考虑到健康骨骼肌对机械刺激的适应能力,通过离心运动究竟是否能够诱发骨骼肌MPS与适应性肥大?离心运动对骨骼肌功能的影响是否最终表现为积极的促进效应?这些问题有待进一步研究。

在离心运动期间,骨骼肌会受到牵拉和超负荷的影响,促使骨骼肌发生离心收缩和微细结构损伤^[16],进而诱发一系列分子事件,包括激活控制MPS的关键信号通路,即哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号转导通路^[17]。mTOR在响应运动与氨基酸营养等合成代谢刺激时,能够从胞质内转位至溶酶体表面而活化,从而介导调节位于其下游的靶蛋白p70核糖体蛋白S6激酶(p70 ribosomal protein S6 kinase, p70S6K)与真核翻译起始因子4E结合蛋白1(eukaryotic

translation initiation factor 4E binding protein 1, 4E-BP1)表达, 控制翻译的起始与延伸, 在蛋白质合成的调节机制中发挥重要作用^[18]。尽管mTOR对机械运动刺激与营养水平的变化高度敏感, 其本身却并不具有营养感应的作用, 其上游蛋白质作为限速环节参与其中^[19]。研究表明, 氨基酰-tRNA合成酶尤其是亮氨酸-tRNA合成酶(leucyl-tRNA synthetase, LARS)可能通过其非经典功能调节骨骼肌营养感应, 促进mTOR的溶酶体转位活化, 从而对骨骼肌MPS产生重要影响^[19]。

为探究离心跑台运动对骨骼肌MPS的影响, 本研究对大鼠分别进行2周或4周下坡跑离心运动干预(设置2周和4周是为了观察是否存在不同时间变化), 检测运动后骨骼肌MPS、MBP、适应性肥大反应及LARS/mTOR信号通路相关蛋白表达的差异性变化, 以期对相关运动干预模式在运动训练实践及临床转化医学领域的应用提供可参考的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

本研究动物实验方案获得温州大学动物福利与伦理委员会批准(WZU-2022-053号)。同批次3月龄SPF级雄性Sprague Dawley (SD)大鼠32只由成都达硕实验动物科技有限公司提供, 使用许可证号: SYXK(川)2018-211。大鼠按组别分笼饲养, 自由摄食饮水。动物饲养环境: 通风, 室温20~25℃, 湿度40%~70%, 室内灯光照明按照12 h光暗周期节律切换。所有大鼠适应性喂养3 d后, 据体重随机纳入2周安静对照组(2-week control, 2C, $n=8$)、2周下坡跑离心运动组(2-week eccentric treadmill, 2E, $n=8$)、4周安静对照组(4-week control, 4C, $n=8$)和4周下坡跑离心运动组(4-week eccentric treadmill, 4E, $n=8$)。

在正式干预前, 2E和4E组大鼠均在小动物跑台进行5 d适应性训练。具体适应方案为: 第1天跑台坡度为0°, 跑速16 m/min, 运动10 min; 第2天坡度为-5°, 跑速和运动时间不变; 第3~5天则将坡度调整为-10°。适应结束并休息3天后, 参考Armstrong等^[20]的报道施加2周或4周正式离心跑台运动干预, 运动方案为: 坡度-16°, 跑速16 m/min, 训练时间90 min, 每周训练5天。2C和4C组大鼠不安排运动, 任其自由活动。

本研究中, 2C与2E组大鼠、4C与4E组大鼠分

别完成2周与4周干预后处死取材。具体而言, 2E与4E组大鼠在完成各自末次训练后24 h, 全部4组大鼠均进行1次力竭跑台运动(跑台坡度8.5°, 初始速度11 m/min, 每5 min跑速增加3 m/min, 最大跑速26 m/min), 为避免力竭运动对蛋白质代谢的急性影响, 所有大鼠休息48 h后腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)进行麻醉, 15 min后腹腔注射嘌呤霉素(40 nmol/g)进行MPS标记, 35 min后处死全部大鼠。快速分离双侧腓肠肌, 剪净筋膜和肌腱后进行称重, 剪取部分肌样投入4%中性多聚甲醛进行固定, 其余肌肉样品经液氮速冻后-80℃保存待测。

1.2 主要实验仪器与试剂

主要实验仪器: 小动物跑台(江苏赛昂斯SA101), 电泳槽(美国Bio-Rad 1658001), 电泳仪(美国Bio-Rad 1658001), 凝胶成像系统(美国Bio-Rad GelDoc EZ), 冰冻切片机(德国Leica CM 1850), 激光共聚焦显微镜(德国Leica TCS SP8)。主要实验试剂: 组织裂解液、4%多聚甲醛、PBS及TBS均购自广州白鲨; 5% BSA购自德国BioFroxx; 戊巴比妥钠购自福州飞净; 嘌呤霉素购自美国TopScience; 抗嘌呤霉素抗体购自美国Kerafast; 抗溶酶体关联膜蛋白2 (lysosomal-associated membrane protein 2, Lamp2)抗体购自美国Invitrogen; 抗LARS、mTOR、p-mTOR^{Ser2448}、p70S6K、p-p70S6K^{Thr389}、4E-BP1、p-4E-BP1^{Thr37/46}抗体均购自美国CST; 抗GAPDH抗体购自美国Santa Cruz; 山羊抗小鼠IgG H&L (HRP)与山羊抗兔IgG H&L (HRP)均购自北京中杉金桥; 肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC) IIb蛋白抗体购自武汉三鹰; BCA蛋白定量试剂盒与苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, H&E)染色试剂盒均购自上海碧云天。

1.3 力竭跑距、时长及测试前后血乳酸水平

在力竭测试前与测试后即刻取尾静脉血, 采用h/p/Cosmos Sirius便携式乳酸测试仪及配套试剂条测定血乳酸值, 记录各组大鼠力竭跑距与时长。

1.4 肌纤维横截面积与直径

剪取腓肠肌样放入4%中性多聚甲醛中进行固定, 常规石蜡包埋后切片, 厚度为7~8 μm。行HE染色, 光镜拍照, Image Pro Plus 6.0软件测量肌纤维横截面积与直径。

1.5 腓肠肌纤维超微结构

取各组大鼠腓肠肌制备电镜样品, 戊二醛固定, 四氧化锇再固定。丙酮溶液脱水, 环氧树脂包埋

后, 制备超薄切片。醋酸铀和枸橼酸铅染色液染色, 采用透射电镜观察骨骼肌纤维超微结构并采集图像。

1.6 肌原纤维蛋白定量

定量方法参考已发表文献^[21], 将待测腓肠肌样在 5% 预冷缓冲液中进行匀浆后以 600 g 转速离心 20 min, 分离并收集富含肌原纤维蛋白的沉淀物。BCA 法进行蛋白定量。蛋白含量采用蛋白(mg)/湿重(g)表示。

1.7 腓肠肌蛋白质合成率

取肌肉样品匀浆, 匀浆 4 °C 离心, 并将含 20 µg 蛋白质的样品转移至 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。将蛋白质从凝胶转移至 PVDF 膜, 封闭后 4 °C 条件下用抗嘌呤霉素抗体孵育过夜, 抗体稀释比为 1:2000。TBS-T 洗膜, 并在 HRP 二抗中孵育 1 h。使用 ECL 试剂化学发光, ImageJ 分析条带灰度值, 蛋白质合成率 = 目的蛋白表达/内参(GAPDH)。

1.8 Lamp2-LARS 与 Lamp2-mTOR 共定位

腓肠肌样品在 4% 多聚甲醛中固定后再使用 PBS 漂洗, 切片 7~8 µm, 免疫组化笔标记样本范围。分别滴加 5% 山羊血清稀释的抗 Lamp2、LARS 和 mTOR 抗体(均 1:100)和二抗(1:200)进行孵育。激光共聚焦显微镜下激发样本, 在相同参数下, 每张切片随机采集 8 个视野形成免疫荧光双标图像, 随后使用 Image Pro Plus 6.0 进行分析, 得到图片的 IOD 值后, 再用 Pearson's 相关性分析对红-绿共定位参数进行统计检验。

1.9 免疫印迹

对腓肠肌样品进行蛋白抽提后, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。配制 8% 和 12% 的分离胶以及 5% 的浓缩胶。待测蛋白样品放入电泳槽中后据预染 Marker 确定电泳停止时间。随后转膜, 待转膜完成后, 再将膜浸入含浓度为 3% BSA 的 TBST 中, 并在室温条件下轻摇 60 min, 然后在 TBST 中洗膜 10 min, 重复 3 次。一抗孵育过夜, 各抗体的稀释比分别为: mTOR 1:1000、p-mTOR 1:500、p70S6k 1:10000、p-p70S6k 1:500、4E-BP1 1:10000、p-4E-BP1 1:10000、MHC IIb 1:1000、LARS 1:1000、GAPDH 1:20000。二抗孵育, 山羊抗兔 IgG H&L (HRP) 稀释比为 1:20000, 山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP) 稀释比为 1:10000。使用 ECL 试剂化学发光, ImageJ 分析条带灰度值, 以 GAPDH 为内参蛋白, 计算目的蛋白的相对表达水平。

1.10 数据处理与统计检验

所有实验数据均使用 SPSS 28.0 进行处理, 采用图形法(直方图和 Q-Q 图)与算法法(Shapiro-Wilk 检验)进行正态分布检验。若数据呈严重偏态, 对数据进行转换后再次统计。对运动方式因素(安静对照组、下坡跑离心运动组)和时长因素(2周运动、4周运动)的主效应及两者的交互效应进行双因素方差分析。各组间单独效应采用单因素方差分析进行统计: Levene 分析进行方差齐性检验, 若方差齐性, 组间多重比较采用 LSD 法; 若方差不具齐性, 则将数据进行转换后再作齐性检验。若数据经转换后方差已具齐性, 同上采用 LSD 法进行事后检验; 若转换后仍不具齐性, 则接受方差不齐假设, 直接采用 Tamhane's T2 基于 *t* 检验的保守成对比较结果。所有数据均采用 mean ± SD 表示, 当 $P < 0.05$ 时认为数据差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 力竭跑距、时间及血乳酸的比较

各组大鼠力竭跑距、时间与血乳酸的变化及比较如图 1 所示。运动和时长因素的主效应检验结果显示, 两因素对力竭跑距和运动时间均有显著影响($P < 0.01$)。此外, 时长因素对力竭运动前后血乳酸水平亦有显著影响($P < 0.05$)。对两因素的交互效应进行检验, 结果显示二者交互对于力竭跑距及运动后血乳酸水平具有显著影响($P < 0.05$), 即运动和时长因素对力竭跑距及力竭运动后血乳酸水平产生显著的联合作用。单独效应分析结果显示: 与 2C 组相比, 2E 组力竭跑距、时间及力竭运动前和运动后血乳酸水平均显著提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 4C 组相比, 4E 组力竭跑距和时间亦显著提高($P < 0.01$), 而力竭运动前和运动后血乳酸水平没有明显变化; 此外, 4E 组力竭跑距、时间及力竭运动前后血乳酸水平较 2E 组则显著降低($P < 0.01$) (图 1)。

2.2 腓肠肌湿重和湿重/体重比值的变化

如图 2 所示, 就运动方式和运动时长的主效应检验而言, 结果显示两因素仅对腓肠肌湿重有显著影响($P < 0.05$), 运动方式因素亦仅对湿重/体重比值具有显著影响($P < 0.01$)。对两因素交互效应进行检验发现, 二者交互并不显著($P > 0.05$), 即不同干预方式(运动或安静)对大鼠腓肠肌湿重和湿重/体重比值影响不明显。单独效应分析结果显示: 与 2C 组相比, 2E 组大鼠腓肠肌湿重和湿重/体重比值显著

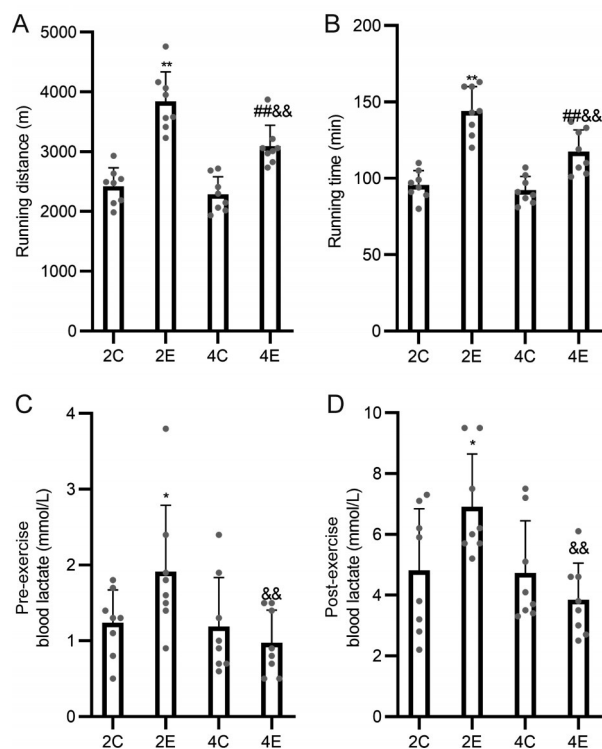


图 1. 离心跑台运动后各组力竭跑距、时间及血乳酸的变化
Fig. 1. Exhaustive exercise distance, exercise duration, and blood lactate changes after eccentric treadmill exercise in different groups. A: Exhaustive exercise distance. B: Exhaustive exercise duration. C: Blood lactate level before exhaustive exercise. D: Blood lactate level after exhaustive exercise. Mean ± SD, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 2C group; ### $P < 0.01$ vs 4C group; && $P < 0.01$ vs 2E group. 2C: 2-week quiet control group; 2E: 2-week downhill running exercise group; 4C: 4-week quiet control group; 4E: 4-week downhill running exercise group.

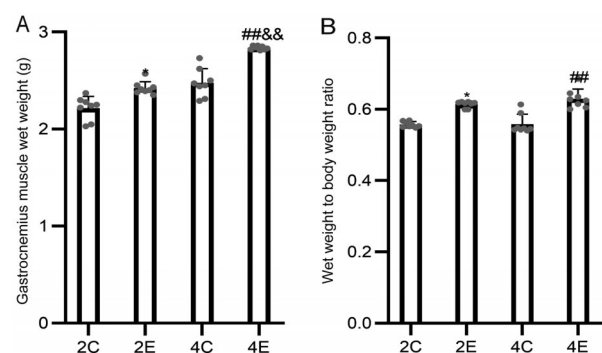


图 2. 离心跑台运动后各组腓肠肌湿重及湿重/体重比值
Fig. 2. Gastrocnemius wet weight (A) and wet weight to body weight ratio (B) after eccentric treadmill exercise in different groups. Mean ± SD, $n = 8$. * $P < 0.05$ vs 2C group; ### $P < 0.01$ vs 4C group; && $P < 0.01$ vs 2E group. Group names shown in Fig. 1.

增加($P < 0.05$); 4E组较4C组亦观察到相同组间变

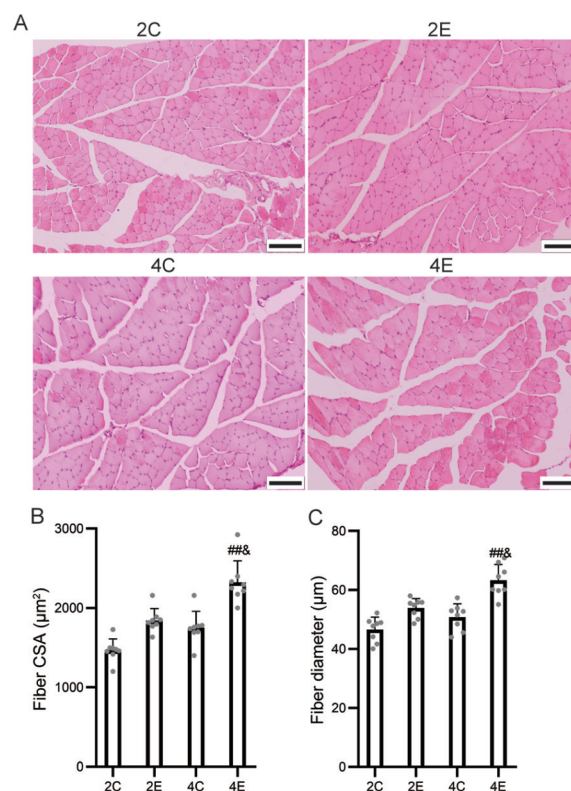


图 3. 离心跑台运动后各组腓肠肌形态学的变化
Fig. 3. Morphological changes of gastrocnemius after eccentric treadmill exercise in different groups detected by HE staining. A: Representative microscopic images. Scale bar, 100 μm . B: Cross-sectional area (CSA) of gastrocnemius muscle fibers; C: Fiber diameter of gastrocnemius muscle. Mean ± SD, $n = 8$. ### $P < 0.01$ vs 4C group; & $P < 0.05$ vs 2E group. Group names shown in Fig. 1.

化趋势($P < 0.01$); 此外, 4E组大鼠腓肠肌湿重较2E组亦见显著增加($P < 0.01$)。

2.3 腓肠肌形态学的变化

各组大鼠腓肠肌纤维横截面积和直径如图3所示。就运动方式因素和时长因素的主效应检验而言, 结果显示两因素对大鼠腓肠肌纤维横截面积和直径均有显著影响($P < 0.05$), 但两因素的交互效应并不显著($P > 0.05$)。单独效应分析结果显示, 与4C组相比, 4E组大鼠腓肠肌纤维横截面积和直径显著增加($P < 0.01$), 且4E组腓肠肌纤维横截面积和直径较2E组亦见显著增加($P < 0.05$)。

2.4 腓肠肌超微结构的变化

用透射电镜观察各组大鼠腓肠肌结构, 结果显示, 2C组和4C组大鼠腓肠肌肌原纤维均排列整齐, 肌节排列规律、结构及形态均完整正常, Z线连续、清晰且完整, I带与A带界限区域清晰可见, M线、

H带亦清晰可见。2E组和4E大鼠腓肠肌超微结构与形态发生改变,肌原纤维排列不齐,肌节排列不规律,Z线不连续、发生断裂,I带与A带对比度下降、界限模糊不清,此外,4E组较2E组微细结构变化更为明显(图4)。

2.5 腓肠肌肌原纤维蛋白质含量的变化

各组大鼠腓肠肌蛋白质含量如图5所示。运动方式因素和时长因素的主效应检验结果显示,两因素对大鼠腓肠肌肌原纤维蛋白质含量具有显著影响($P < 0.01$),但两因素交互效应对其未见显著影响($P > 0.05$)。单独效应分析结果显示,与2C组相比,2E组大鼠腓肠肌肌原纤维蛋白质含量显著增加($P < 0.01$);4E组腓肠肌肌原纤维蛋白质含量显著高于4C组($P < 0.01$)与2E组($P < 0.01$)。

2.6 腓肠肌蛋白质合成率的变化

经2周或4周不同处理,各组大鼠腓肠肌蛋白

质部分合成率(fractional synthesis rates of proteins, FSR)如图6所示。MPS通常由FSR所反映,FSR指特定时间内新合成蛋白质占总蛋白质池比例,MPS则是对肌肉组织中蛋白质合成过程的整体描述。由于嘌呤霉素可整合至新合成的多肽链中阻止肽链延长,因此其结合蛋白质数量可反映骨骼肌FSR。就运动方式因素和时长因素的主效应检验而言,结果显示仅运动方式因素对FSR具有显著影响($P < 0.01$),且两因素交互并不显著($P > 0.05$)。单独效应分析结果显示(图6B):与4C组相比,4E组FSR显著增加($P < 0.05$)。此外,与2E组相比,4E组FSR亦见显著增加($P < 0.05$)。

2.7 腓肠肌 Lamp2-LARS 和 Lamp2-mTOR 的共定位变化

运动方式和时长因素的主效应检验结果显示,两因素对大鼠腓肠肌中 Lamp2-LARS 和 Lamp2-

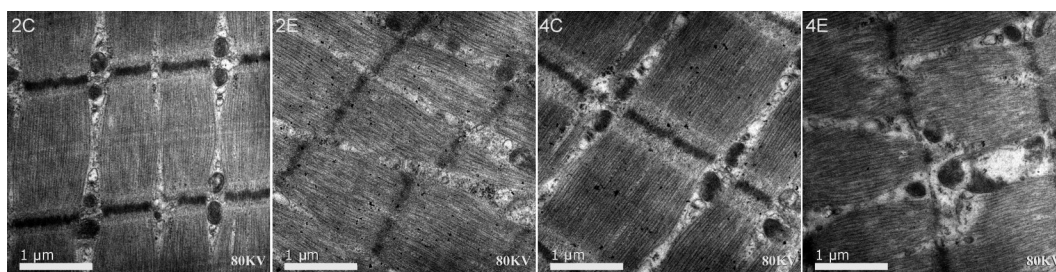


图 4. 离心跑台运动后各组腓肠肌超微结构的变化

Fig. 4. Changes of the ultrastructure of gastrocnemius after eccentric treadmill exercise in different groups detected by transmission electron microscope. Scale bar, 1 μ m. Group names shown in Fig. 1.

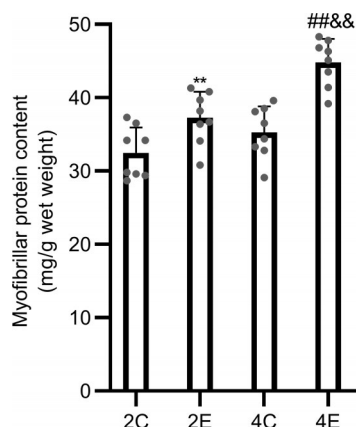


图 5. 离心跑台运动后各组腓肠肌蛋白质含量

Fig. 5. Protein contents in gastrocnemius after eccentric treadmill exercise in different groups. Mean $\pm$ SD, $n = 8$. ** $P < 0.01$ vs 2C group; ## $P < 0.01$ vs 4C group; && $P < 0.01$ vs 2E group. Group names shown in Fig. 1.

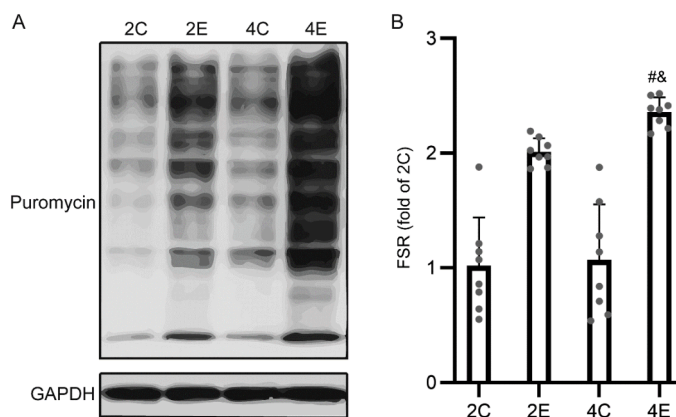


图 6. 离心跑台运动后各组腓肠肌蛋白质部分合成率(FSR)

Fig. 6. Changes of fractional synthesis rates of proteins (FSR) in gastrocnemius after eccentric treadmill exercise detected by Western blot. A: Representative blot images. B: Statistical result of FSR. Mean $\pm$ SD, $n = 3$. # $P < 0.05$ vs 4C group; & $P < 0.05$ vs 2E group. Group names shown in Fig. 1.

mTOR 共定位水平均具有显著影响($P < 0.01$), 但两因素的交互效应对其产生的影响均不显著。单独效应分析结果显示: 免疫荧光双标染色结果显示, 相对 2C 组, 2E 组大鼠腓肠肌 Lamp2-LARS 和 Lamp2-mTOR 共定位水平显著升高; 而 4E 组大鼠腓肠肌 Lamp2-LARS 和 Lamp2-mTOR 共定位水平显著高于 2E 组和 4C 组(图 7)。

2.8 蛋白合成代谢关键蛋白表达和/或磷酸化表达的变化

各组大鼠腓肠肌 MHC IIb、LARS 蛋白表达水

平和 mTOR、p70S6K 及 4E-BP1 磷酸化水平如图 8 所示。运动方式和时长两因素对 LARS 的蛋白表达均具有显著影响($P < 0.01$), 但仅运动方式因素对 MHC IIb 蛋白表达水平和 mTOR、p70S6K 及 4E-BP1 磷酸化水平有显著影响($P < 0.05$)。对两因素的交互效应进行检验, 结果显示二者交互作用并不显著($P > 0.05$)。单独效应分析结果显示: 与 2C 组相比, 2E 组仅 LARS 蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$), 其它各蛋白质的蛋白表达或磷酸化水平均无明显变化; 与 4C 组相比, 4E 组 MHC IIb 蛋白表达的差异

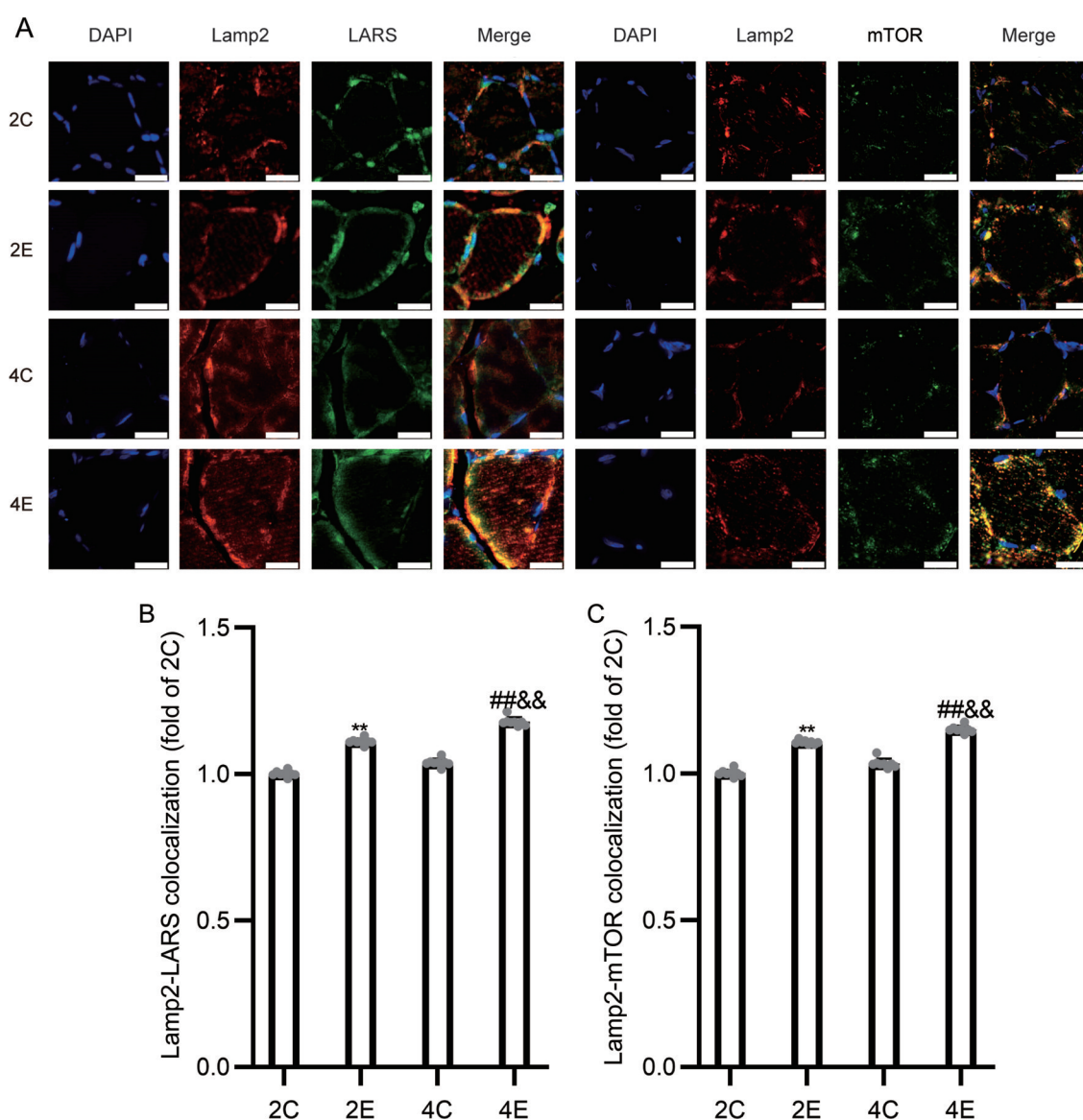


图 7. 各组离心跑台运动后腓肠肌中 Lamp2-LARS 和 Lamp2-mTOR 共定位

Fig. 7. Colocalization of lysosomal-associated membrane protein 2 (Lamp2)-leucyl-tRNA synthetase (LARS) and Lamp2-mammalian target of rapamycin (mTOR) in the gastrocnemius after eccentric treadmill exercise detected by immunofluorescence staining. A: Representative immunofluorescent images. B: Lamp2-LARS colocalization. C: Lamp2-mTOR colocalization. Mean $\pm$ SD. $n = 4$. ** $P < 0.01$ vs 2C group; ## $P < 0.01$ vs 4C group; && $P < 0.01$ vs 2E group. Scale bar, 5 μ m. Group names shown in Fig. 1.

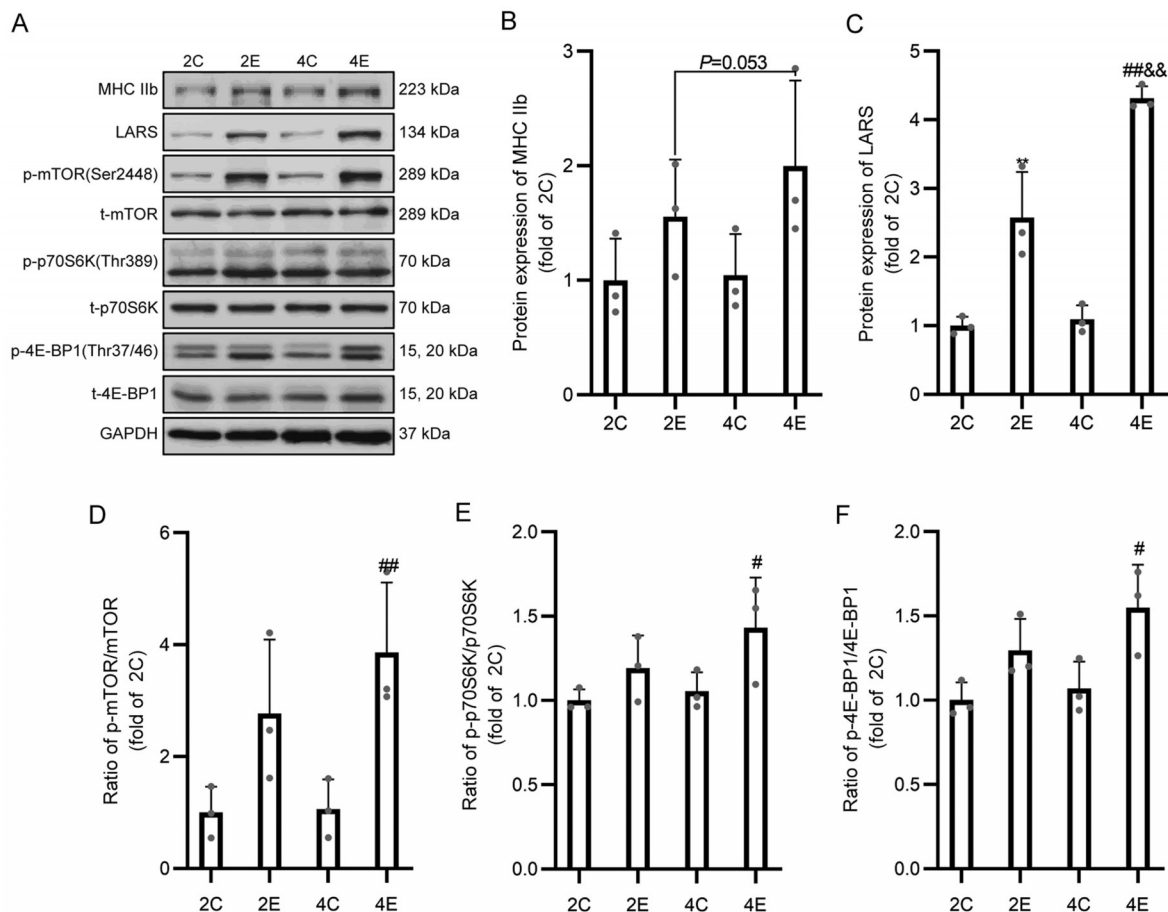


图 8. 各组离心跑台运动后蛋白质合成相关蛋白表达或磷酸化水平

Fig. 8. Expression levels or phosphorylation ratios of protein synthesis related proteins after eccentric treadmill exercise in different groups detected by Western blot. A: Representative blot images. B, C: Protein expression levels of myosin heavy chain (MHC) IIb (B) and leucyl-tRNA synthetase (LARS, C). D-F: Phosphorylation levels of mammalian target of rapamycin (mTOR, D), p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K, E) and eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 (4E-BP1, F). Mean $\pm$ SD. $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs 2C group; # $P < 0.05$ vs 4C group; ## $P < 0.01$ vs 4C group; && $P < 0.01$ vs 2E group. Group names shown in Fig. 1.

虽不具有统计学意义，但就均值而言亦有增长 (0.132 vs 0.253, $P = 0.053$)，具有边缘显著特征；LARS 蛋白表达水平、mTOR、p70S6K 及 4E-BP1 磷酸化水平均显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外，就 LARS 蛋白表达水平而言，4E 组较 2E 组亦见显著上调 ($P < 0.01$)。

3 讨论

3.1 下坡跑离心运动诱发的骨骼肌适应性变化

离心运动会致骨骼肌超微结构发生改变，如肌原纤维断裂和肌肉功能受损等^[22]。前人早期的大量报道^[20, 23–26]及近年研究结果^[27, 28]均表明，因离心运动而受损的肌肉发生了显著的超微结构变化，最常见的变化包括：Z 线的流动和变宽、肌节间相互

错位、肌节过度伸展或半肌节区域以及肌丝的区域性紊乱。本研究亦通过电镜观察到 2E 组和 4E 组大鼠腓肠肌微细结构受损，且 4E 组较 2E 组微细结构变化更为明显，提示所采用的下坡跑运动较好地模拟了骨骼肌离心运动，导致大鼠腓肠肌超微结构损伤与紊乱，且较长运动周期所造成的损伤更为明显。

骨骼肌湿重在研究骨骼肌代谢、MPS 和肌肉疾病诊断等方面均具有重要意义^[29, 30]。研究显示，电刺激诱导的离心运动组大鼠骨骼肌(包括比目鱼肌、胫骨前肌和腓肠肌内侧头)湿重均显著高于安静对照组^[31–33]，但鲜见下坡跑离心运动模式对于骨骼肌湿重影响方面的报道。Chen 等^[34]将小鼠随机纳入安静对照组、游泳组和下坡跑离心运动组，每周训练 6 d，共计 8 周，游泳组小鼠每天训练 50 min，下坡跑离

心运动组小鼠的训练方案为0.8 km/h, 50 min, 坡度-9°, 结果显示, 与安静对照组相比, 游泳组小鼠腓肠肌内侧头湿重无显著差异, 而下坡跑离心运动组小鼠的腓肠肌内侧头湿重显著增加($P < 0.01$)。上述研究结果均提示, 离心运动对于骨骼肌湿重的增加具有促进作用, 间接反映了骨骼肌的适应性肥大变化。本研究结果与前述报道一致。不仅各运动组大鼠腓肠肌湿重与湿重/体重比值均较各自对照组大鼠显著增长, 且4E组较2E组大鼠腓肠肌湿重增长亦有统计学意义, 提示下坡跑离心运动具有促进腓肠肌适应性肥大的作用。

骨骼肌纤维横截面积与直径是判断骨骼肌适应性肥大发生与否的关键指标^[35, 36]。Carter等^[37]让小鼠在跑台以20°倾角进行上坡或下坡跑至力竭, 在运动结束后第0、3和7天取样检测, 结果显示, 上坡跑后, 小鼠的比目鱼肌纤维横截面积显著增加, 而趾长伸肌仅在运动后第0天显示纤维横截面积增加; 下坡跑后, 小鼠比目鱼肌未见明显变化, 而趾长伸肌则没有观察到任何形态学上的差异。Lueders等^[38]让野生型小鼠进行7 d下坡跑离心运动(-20°, 17 m/min, 60 min)后取腓肠肌与比目鱼肌进行检测, 亦未见平均肌纤维横截面积改变。且Zou等人^[39]的4周动物实验亦观察到了类似结果。但是, Bontemps等^[40]让12名未经训练的健康年轻人参加为期4周且总计为10次的下坡跑离心运动(倾斜角度分为三个不同斜率: -5°、-10°和-15°, 60%~65% VO_2max 匹配其倾斜角度)后, 结果显示, 股外侧肌的解剖学横截面积和体积在第2周和第4周显著增加, 而且生理学横截面积在第4周运动后亦显著增加。上述研究结果的差异可能是运动干预方案的差异所致, 如研究采用的倾角、跑速、时长、干预周期及骨骼肌采样部位有所差异。急性运动所观察到的横截面积增加, 可能是细胞肿胀所致的假阳性结果。理论上而言, 急性干预难以产生组织形态学方面的适应性变化。慢性离心运动对骨骼肌组织形态的影响仍有待深入研究。

综上, 本研究观察到4周下坡跑离心运动较2周运动产生了更为显著的腓肠肌微细结构损伤, 但结合腓肠肌湿重、湿重/体重比值、肌纤维横截面积与直径的组间差异, 我们认为离心运动具有诱导骨骼肌适应性肥大的重要潜力。尽管本研究所采用的干预周期已相当于人体被试的2~3年, 但由于骨骼

肌微细结构损伤与受益并存, 因此在未来的研究中尚待进行更长时间的运动干预(如8周或16周)。随着机体对离心运动这一干预模式的适应, 在不改变运动干预方案的前提下, 可能更为准确地评价下坡跑离心运动的应用潜力。

3.2 下坡跑离心运动对运动能力的影响

离心运动可使机体运动能力产生多种适应性变化, 如力量、速度与耐力等^[41]。但是, 目前鲜见下坡跑离心运动干预对力竭运动能力影响的研究报道。近年, Psarakis等人^[42]和Barreto等人^[43]的研究均采用一项名为6 min步行测试的项目, 要求被试者在不跑动的前提下于6 min内尽可能多地移动距离, 虽然该测试不能完全代替力竭运动跑距, 但笔者认为其亦反映了最大运动能力的差异, 从而具备参考价值。这两项研究均显示离心运动对于6 min步行运动表现具有促进作用, 且Barreto等人的研究显示离心运动的干预效果较向心运动更为显著。本研究的结果亦显示, 相对对照组大鼠, 离心运动组大鼠力竭跑距和时间显著增长, 但4周训练却导致力竭跑距和时间降低, 这可能是微细结构损伤的混杂影响所致。

血乳酸浓度亦常用于机体运动能力的评价^[44]。骨骼肌中的肌糖原在机体运动过程中会迅速分解, 从而产生大量乳酸。随着乳酸不断堆积, 血乳酸浓度亦随之增加^[45]。近年的报道指出, 离心运动后骨骼肌和血液中的乳酸浓度显著升高^[46-48], 且下坡跑离心运动后血乳酸浓度显著高于水平跑甚至上坡跑向心运动^[49-51]。值得一提的是, 高强度下坡跑离心运动中血乳酸浓度与运动的持续时间呈负相关^[52-54], 即随着运动时间的增加, 血乳酸浓度反而下降。同时亦有研究表明, 血乳酸浓度与骨骼肌MPS代谢之间存在着正相关联系^[46]。在过去几十年中, 学界对于乳酸的观点已从将其视为一种诱发机体疲劳的代谢废物逐渐转变为重要代谢底物^[55], 甚至是诱导代谢适应的信号分子^[56]。迄今, 已有多项研究表明, 乳酸不仅能快速激活mTORC1信号传导^[57-59], 还能够以细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)依赖的方式诱导肌管分化和肥大^[60], 并加速骨骼肌生成^[61, 62]。研究显示, 小鼠经2周口服乳酸干预后胫骨前肌质量及纤维横截面积显著增加^[63]。以上研究均提示了乳酸参与骨骼肌组织细胞信号转导, 并在一定程度上佐证了血乳酸浓

度增加对于骨骼肌 MPS 的促进作用。本研究结果显示, 各组大鼠力竭运动后血乳酸浓度均有显著增加, 这与前人的报道^[40–42]一致, 但 4E 组运动前和运动后血乳酸水平较 2E 组均显著降低, 提示 4 周下坡跑离心运动组大鼠可能进一步增强了清除乳酸的能力。如前所述, 血乳酸浓度的增加通常被认为是肌肉代谢应激的标志, 而乳酸清除能力的增强则反映了机体对运动应激的适应性反应。我们认为这两者之间可能并非简单的线性关系。一方面, 血乳酸浓度的增加可能通过激活 mTORC1 信号通路等机制促进骨骼肌 MPS; 另一方面, 乳酸清除能力的增强亦可能有助于维持骨骼肌内的乳酸平衡, 减少乳酸堆积对肌肉功能的潜在负面影响。

本研究未观察到 4E 组较 2E 组大鼠表现出更长的力竭跑距与时间, 但乳酸清除能力的显著增强仍可在一定程度上佐证其运动能力的改善。由于无法对大鼠进行组织疼痛水平的评价, 因此我们推测骨骼肌微细结构的损伤可能对其运动表现产生了混杂影响, 在后续研究中采用人体被试的探讨将有助于厘清这一分歧。

3.3 下坡跑离心运动对腓肠肌 MPS 的影响

FSR 被广泛用于将放射或稳定同位素示踪剂掺入肌肉蛋白中而定量 MPS^[64, 65]。由于健康机体的骨骼肌质量变化主要取决于骨骼肌 MPS^[66–68], 因此当 FSR 值超过蛋白质部分分解率(fractional breakdown rates of proteins, FBR)时, 则会诱发适应性骨骼肌肥大。为探讨离心运动对于 MPS 的影响, Cuthbertson 等^[69]让 8 名健康男性重复上台阶(向心)和下台阶(离心)运动 12 min 后对股四头肌进行肌肉活检, 结果观察到了 FSR 的增加。Jameson 等人^[70]则让 21 名健康年轻男性接受 7 d 的单侧下肢固定, 然后随机将受试者分为两组, 其中一组受试者进行 300 次双侧股四头肌离心收缩, 而另一组为安静对照组, 结果显示, 进行离心运动组受试者的股四头肌肌原纤维 FSR 显著高于对照组。为了研究下坡跑离心运动对骨骼肌 FSR 的影响, Lepley 等^[71]将 40 只健康成年大鼠随机分配到安静对照组、上坡跑运动组和下坡跑离心运动组进行运动干预(倾斜角度为 -16° , 速度为 16 m/min, 每组 5 min, 组间休息 2 min, 共计 3 组), 结果显示, 下坡跑离心运动后 24 h 股外侧肌 FSR 显著高于其它组, 提示下坡跑离心运动能更好地促进骨骼肌 FSR。

蛋白质含量作为蛋白质沉积水平的评价指标可间接反映蛋白质合成水平的高低。研究表明, 离心运动可显著增加混合肌肉蛋白质(包括肌原纤维蛋白和肌浆蛋白)合成, 且联合膳食补充可增强这一反应^[72–76]。该反应是肌肉蛋白质库扩张的基础, 而随着时间的推移, 肌肉蛋白质库扩张将进一步诱导骨骼肌适应性肥大反应的发生^[76]。迄今, 鲜见关于下坡跑离心运动对于肌肉蛋白含量影响的报道, 最早的一篇相关报道可追溯至上世纪 80 年代, 研究者通过对大鼠进行一次急性(非力竭)下坡跑离心运动(-16° , 16 m/min, 90 min)干预后取其肱三头肌长头检测, 结果显示, 运动后肌原纤维蛋白含量较运动前呈降低趋势, 但差异没有统计学意义^[77]。Touchberry 等采用相同倾角以 18 m/min 跑速对大鼠进行下坡跑离心运动干预后取其比目鱼肌检测, 结果显示, 离心运动组总蛋白含量与安静对照组没有显著差异^[78]。但是, Zou 等人^[39]研究显示, 4 周下坡跑离心运动(-20° , 17 m/min, 30 min)虽未能显著提高小鼠肌肉质量与力量, 但却显著提高其肌原纤维蛋白含量显著。以上研究结果之间存在差异, 一方面可能是由于运动方案不同所导致的, 另一方面则可能与取样不同骨骼肌有关, 可采用不同离心跑台方案探讨其对工作肌 MPS 水平的影响, 并进一步研究不同类型骨骼肌纤维对离心跑台运动刺激的潜在应答差异。

骨骼肌 MHC 的适应性改变亦可佐证 MPS 水平的变化。Wang 等人^[79]研究显示, 大鼠在 -16° 倾角跑台以 16 m/min 跑速完成一次力竭性下坡跑离心运动后, 骨骼肌总 MHC 基因表达在 48 h 出现延迟性超量表达。Macaluso 等人^[80]的人体实验结果亦显示, 受试者以 80% VO_2max 强度完成 5 组 8 min 急性 -10° 下坡跑离心运动后, 骨骼肌 MHC II 含量增加。最近, Shi 等^[81]让大鼠进行急性下坡跑离心运动, 结果显示, MHC II 相对表达量在运动后即刻及运动后 6 h 均显著高于运动前水平。值得注意的是, Azad 等人^[82]的动物实验研究显示, 无论是慢性(-4° 递减至 -16° 倾角, 每周 3 次, 每次 15~90 min, 持续 9 周)还是急性(-16° 倾角, 16 m/min)下坡跑运动干预, 均可使大鼠腓肠肌中 MHC II 含量增加。以上研究均表明, 离心运动对于骨骼肌 FSR 与蛋白质沉积具有促进作用。

Damas 等人^[83]研究表明, 离心运动所导致的

MPS 增加可能具有两个阶段的作用: 前期主要用于受损骨骼肌微细结构损伤的修复, 而后期则主要用于骨骼肌蛋白质的沉积, 从而诱发适应性骨骼肌肥大。本研究结果显示, 离心跑台运动不仅增强腓肠肌 FSR, 而且促进蛋白质沉积, 表现为肌原纤维蛋白质含量和 MHC IIb 表达水平的升高。虽然本研究未涉及对不同阶段蛋白质合成水平变化的探讨, 但由于处死大鼠取材的时点在其末次离心跑台训练后 72 h, 因此我们认为本研究结果可能主要反映了后期骨骼肌蛋白质沉积方面的变化。

3.4 下坡跑离心运动诱发骨骼肌适应性肥大的潜在分子机制

LARS 作为近年鉴定出的 mTOR 上游调控蛋白之一, 可通过感应亮氨酸水平变化而影响 mTOR 的溶酶体转位活化, 但运动(尤其是下坡跑运动)对其表达的影响目前尚不清楚。近期, Zhao 等^[84]采用跑台有氧运动与爬梯抗阻运动对大鼠进行 4 周干预, 发现抗阻运动后腓肠肌湿重、横截面积、直径、蛋白质浓度、LARS 蛋白表达水平以及腓肠肌 mTOR、4E-BP1 与 p70S6K 磷酸化水平均显著上调, 但有氧运动没有显著作用。此外, D'Hulst 等人^[85]的研究显示, 急性运动干预后比目鱼肌 LARS 的表达和 mTORC1 活性均显著上调。以上研究均提示抗阻运动可能增加 MPS 和蛋白质沉积, 并经 LARS/mTOR 信号途径诱导肌肉肥大。

mTOR-p70S6K-4E-BP1 信号通路控制翻译的起始与延伸, 在蛋白质合成的调节机制中发挥着极其重要的作用^[86]。就下坡跑离心运动对该通路(尤其是对于 mTOR)的影响而言, 目前尚存在争议: Zou 等人^[39]对小鼠进行 4 周下坡跑离心运动干预后取腓肠肌与比目鱼肌混合物检测, 发现干预前后 mTOR 磷酸化水平保持不变。Zhu^[87]将大鼠随机纳入安静对照组、力竭运动即刻组、力竭运动后 24 h 和 48 h 组, 力竭运动组小鼠进行递增负荷下坡跑离心运动(0~10°, 8.2~19.3 m/min, 5~10 min)至力竭后取股四头肌检测, 结果显示, 力竭运动即刻组骨骼肌和血清中 mTOR 含量较安静对照组明显下降。此外, Ma^[88]给予大鼠下坡跑离心运动(-16°, 16 m/min, 90 min)干预, 结果显示, 与安静对照组相比, 离心运动组大鼠比目鱼肌 mTOR 磷酸化水平在运动后即刻和 12 h 均显著下降, 且以运动后 12 h 下降更为明显。值得注意的是, Yoshihara 等人^[89]将雄性和雌性大鼠各 9

只纳入安静对照组、水平跑组和下坡跑组(-16°)干预后采集比目鱼肌检测, 结果显示, 无论雄性或雌性大鼠骨骼肌 mTOR 磷酸化水平均显著高于安静对照组; 且该研究组进一步发现下坡跑离心运动干预后大鼠腓肠肌中 mTOR 磷酸化水平亦显著上调^[90]。上述下坡跑离心运动对 mTOR 通路影响的研究结果存在差异, 可能主要是由离心运动方案不同所致, 主要包括倾角、跑速与运动时间; 此外, mTOR 在典型快肌(如胫骨前肌)、慢肌(如比目鱼肌)与混合肌(如腓肠肌)中是否存在差异性表达, 从而对不同类型的运动干预产生差异性应答, 目前亦不清楚。

本研究结果显示, 下坡跑离心运动上调大鼠腓肠肌 LARS 蛋白表达水平, 提高 Lamp2-LARS 和 Lamp2-mTOR 共定位水平, 并显著提高 mTOR、p70S6K 与 4E-BP1 磷酸化水平, 表明下坡跑离心运动可促进 LARS 和 mTOR 的溶酶体转位, 进而激活 mTOR-p70S6K-4E-BP1 信号通路活性。此外, 鉴于 mTOR 的活化水平直接影响骨骼肌蛋白质沉积, 因此 LARS/mTORC1 途径可能是下坡跑离心运动刺激骨骼肌 MPS 并诱发适应性骨骼肌肥大的重要机制。

4 结论

目前, 鲜见下坡跑离心运动对骨骼肌 MPS 影响的相关研究报道, 其可能的作用机制亦不明确。因此, 本研究在前人研究基础上进行拓展与深入, 观察到了 2 周和 4 周离心跑台运动对骨骼肌 MPS、肌纤维结构和功能的积极影响, 亦初步明确了 LARS 经 mTOR 介导刺激腓肠肌 MPS 与适应性肥大的作用与机制(图 9)。但是, 本研究未能涉及对腓肠肌内 LARS 的过表达或低表达处理, 因此对于确切机制的探讨仍尚待后续的研究予以补充。尽管 4 周离心运动可能因其更为显著的骨骼肌超微结构紊乱与损伤而对运动能力产生消极影响, FSR 的增长亦可能是由于损伤的修复与重建所诱发, 但鉴于 FSR 增长的两阶段理论以及健康骨骼肌本身对于机械刺激的适应能力, 这一运动模式(尤其是更长周期的运动干预)对骨骼肌质量与功能的作用仍可能是临床转化医学领域评估其应用价值的重要因素之一, 有待后续研究予以明确。此外, LARS 在经 mTOR 介导骨骼肌 MPS 过程中, 其它营养传感蛋白是否发挥协同促进和/或竞争抑制的作用, 也是本领域亟待深入探讨的问题。

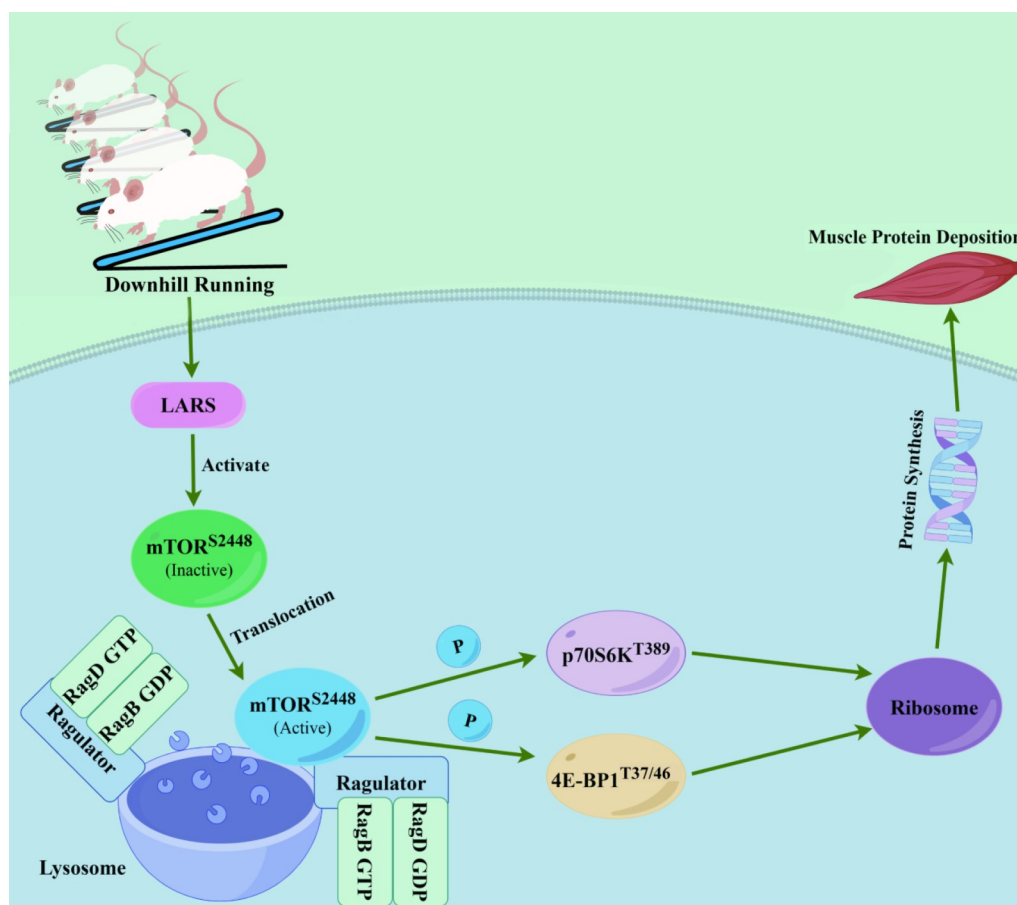


图 9. 离心跑台运动促进骨骼肌适应性肥大的可能性机制

Fig. 9. Potential mechanism of eccentric treadmill exercise promoting adaptive hypertrophy of skeletal muscles. Eccentric treadmill exercise up-regulates protein expression of leucyl-tRNA synthetase (LARS), thus promoting skeletal muscle adaptive hypertrophy through the mTOR-p70S6K-4E-BP1 signaling pathway. mTOR, mammalian target of rapamycin; p70S6K, p70 ribosomal protein S6 kinase; 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1.

参考文献

- Nunes EA, Stokes T, McKendry J, Currier BS, Phillips SM. Disuse-induced skeletal muscle atrophy in disease and non-disease states in humans: mechanisms, prevention, and recovery strategies. *Am J Physiol Cell Physiol* 2022; 322(6): C1068-C1084.
- Chaillou T, Montiel-Rojas D. Does the blunted stimulation of skeletal muscle protein synthesis by aging in response to mechanical load result from impaired ribosome biogenesis? *Front Aging* 2023; 4: 1171850.
- Tian Y (田苑), Zhong W, Yang Y. Effect of Shenqi compound on protein synthesis and metabolism and mTOR signal pathway in skeletal muscle of aging diabetes model rats. *J Shandong Univ Traditional Chin Med* (山东中医药大学学报) 2023; 47(3): 317-322 (in Chinese).
- Xia Z (夏志), Zhao Y, Ding XM, Shang HY, Su QS, Wang QQ. Identification of key genes and signaling pathways involved in resistance training to improve skeletal muscle aging. *Chin Sport Sci Technol* (中国体育科技) 2021; 57(12): 92-100 (in Chinese).
- Feng L, Li B, Xi Y, Cai M, Tian Z. Aerobic exercise and resistance exercise alleviate skeletal muscle atrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt pathway in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2022; 322(2): C164-C176.
- Tecchio P, Raiteri BJ, Hahn D. Eccentric exercise ≠ eccentric contraction. *J Appl Physiol* (1985) 2024; 136(4): 954-965.
- Sato S, Yoshida R, Murakoshi F, Sasaki Y, Yahata K, Kasahara K, Nunes JP, Nosaka K, Nakamura M. Comparison between concentric-only, eccentric-only, and concentric-eccentric resistance training of the elbow flexors for their effects on muscle strength and hypertrophy. *Eur J Appl Physiol* 2022; 122(12): 2607-2614.
- Higbie EJ, Cureton KJ, Warren GR, Prior BM. Effects of concentric and eccentric training on muscle strength, cross-sectional area, and neural activation. *J Appl Physiol* (1985) 1996; 81(5): 2173-2181.

- 9 Farthing JP, Chilibeck PD. [The effects of eccentric and concentric training at different velocities on muscle hypertrophy](#). *Eur J Appl Physiol* 2003; 89(6): 578-586.
- 10 Vikne H, Refsnes PE, Ekmark M, Medbo JJ, Gundersen V, Gundersen K. Muscular performance after concentric and eccentric exercise in trained men. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38(10): 1770-1781.
- 11 Roig M, O'Brien K, Kirk G, Murray R, McKinnon P, Shadgan B, Reid WD. [The effects of eccentric versus concentric resistance training on muscle strength and mass in healthy adults: a systematic review with meta-analysis](#). *Br J Sports Med* 2009; 43(8): 556-568.
- 12 Coratella G, Schena F. [Eccentric resistance training increases and retains maximal strength, muscle endurance, and hypertrophy in trained men](#). *Appl Physiol Nutr Metab* 2016; 41(11): 1184-1189.
- 13 Zhou J (周进), Xu Z. The possibility of circulating miRNAs as biomarkers for skeletal muscle response and adaptation to exercise. *J Clin Rehabil Tis Eng Res (中国组织工程研究)* 2023; 27(14): 2257-2265 (in Chinese).
- 14 Clarkson PM, Hubal MJ. [Exercise-induced muscle damage in humans](#). *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81(11 Suppl): S52-S69.
- 15 Nosaka K, Clarkson PM. [Changes in indicators of inflammation after eccentric exercise of the elbow flexors](#). *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28(8): 953-961.
- 16 Ding HL (丁海丽), Huang ZH, Ren ZF, Sun ZX, Li JP, Wang RY. Interventional effect and mechanism of acupuncture on endoplasmic reticulum stress in rats with exercise-induced skeletal muscle injury. *Chin J Appl Phys (中国应用生理学杂志)* 2021; 37(4): 359-364 (in Chinese).
- 17 Levitt DE, Luk HY, Vingren JL. [Alcohol, resistance exercise, and mTOR pathway signaling: An evidence-based narrative review](#). *Biomolecules* 2022; 13(1): 2.
- 18 Xia Z (夏志), Xu F, Chen JF, Huang T, Wang QX. The role of mTOR signal transduction in muscle resistance training. *Prog Physiol Sci (生理科学进展)* 2009; 40(4): 375-377 (in Chinese).
- 19 Xia Z (夏志), Shang HY, Wang QJ, Zhao Y, Ding XM. The role and mechanism of leucyl-tRNA synthetase in regulating protein synthesis in aging skeletal muscle. *Acta physiol Sin (生理学报)* 2020; 72(4): 523-531 (in Chinese).
- 20 Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwan JA. [Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle](#). *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1983; 54(1): 80-93.
- 21 Wang SX (王世香), Zhao Y, Shang HY, Wang QQ, Ding XM, Liu SS, Xia Z. The effects of simultaneous aerobic and resistance training on protein synthesis in rapidly contracting skeletal muscles of elderly mice. *Chin J Sports Med (中国运动医学杂志)* 2023; 42(9): 712-722 (in Chinese).
- 22 Kanzaki K, Watanabe D, Shi J, Wada M. [Mechanisms of eccentric contraction-induced muscle damage and nutritional supplementations for mitigating it](#). *J Muscle Res Cell Motil* 2022; 43(3): 147-156.
- 23 Fridén J, Sjöström M, Ekblom B. Myofibrillar damage following intense eccentric exercise in man. *Int J Sports Med* 1983; 4(3): 170-176.
- 24 Newham DJ, McPhail G, Mills KR, Edwards RH. [Ultrastructural changes after concentric and eccentric contractions of human muscle](#). *J Neurol Sci* 1983; 61(1): 109-122.
- 25 Ogilvie RW, Armstrong RB, Baird KE, Bottoms CL. [Lesions in the rat soleus muscle following eccentrically biased exercise](#). *Am J Anat* 1988; 182(4): 335-346.
- 26 Armstrong RB, Warren GL, Warren JA. [Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury](#). *Sports Med* 1991; 12(3): 184-207.
- 27 Morais GP, da Rocha AL, Neave LM, de A Lucas G, Leonard TR, Carvalho A, da Silva ASR, Herzog W. [Chronic uphill and downhill exercise protocols do not lead to sarcomerogenesis in mouse skeletal muscle](#). *J Biomech* 2020; 98: 109469.
- 28 Zeng Z, Liang J, Wu L, Zhang H, Lv J, Chen N. [Exercise-induced autophagy suppresses sarcopenia through Akt/mTOR and Akt/FoxO3a signal pathways and AMPK-mediated mitochondrial quality control](#). *Front Physiol* 2020; 11: 583478.
- 29 Tokinoya K, Ono S, Aoki K, Yanazawa K, Shishikura Y, Sugawara T, Takekoshi K. [Gene expression level of renalase in the skeletal muscles is increased with high-intensity exercise training in mice on a high-fat diet](#). *Physiol Int* 2021; 108(2): 274-284.
- 30 Wen PT (温佩彤), Xu P, Hu L, Zhang WB, Gao Y. Effect of electroacupuncture combined with aerobic exercise on IGF-I/Akt pathway in skeletal muscle of aging rats. *Chin J Orthopa Trauma (中国骨伤)* 2021; 34(3): 275-281 (in Chinese).
- 31 Kirby CR, Ryan MJ, Booth FW. Eccentric exercise training as a countermeasure to non-weight-bearing soleus muscle atrophy. *J Appl Physiol* (1985) 1992; 73(5): 1894-1899.
- 32 Ochi E, Nakazato K, Ishii N. [Effects of eccentric exercise on joint stiffness and muscle connectin \(titin\) isoform in the rat hindlimb](#). *J Physiol Sci* 2007; 57(1): 1-6.
- 33 Kato H, Miura K, Nakano S, Suzuki K, Bannai M, Inoue Y. [Leucine-enriched essential amino acids attenuate inflammation in rat muscle and enhance muscle repair after eccentric contraction](#). *Amino Acids* 2016; 48(9): 2145-2155.
- 34 Chen X, Yang K, Sun P, Zhao R, Liu B, Lu P. [Exercise improves bone formation by upregulating the Wnt3a/β-catenin signalling pathway in type 2 diabetic mice](#). *Diabetol Metab Syndr* 2021; 13(1): 116.
- 35 Lundberg TR, Martínez-Aranda LM, Sanz G, Hansson B,

- von Walden F, Tesch PA, Fernandez-Gonzalo R. [Early accentuated muscle hypertrophy is strongly associated with myonuclear accretion](#). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2020; 319(1): R50-R58.
- 36 Thomas ACQ, Brown A, Hatt AA, Manta K, Costa-Parke A, Kamal M, Joannis S, McGlory C, Phillips SM, Kumbhare D, Parise G. [Short-term aerobic conditioning prior to resistance training augments muscle hypertrophy and satellite cell content in healthy young men and women](#). *FASEB J* 2022; 36(9): e22500.
- 37 Carter GT, Kikuchi N, Abresch RT, Walsh SA, Horasek SJ, Fowler WM Jr. [Effects of exhaustive concentric and eccentric exercise on murine skeletal muscle](#). *Arch Phys Med Rehabil* 1994; 75(5): 555-559.
- 38 Lueders TN, Zou K, Huntsman HD, Meador B, Mahmassani Z, Abel M, Valero MC, Huey KA, Boppart MD. [The \$\alpha 7\beta 1\$ -integrin accelerates fiber hypertrophy and myogenesis following a single bout of eccentric exercise](#). *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301(4): C938-C946.
- 39 Zou K, Meador BM, Johnson B, Huntsman HD, Mahmassani Z, Valero MC, Huey KA, Boppart MD. [The \$\alpha 7\beta 1\$ -integrin increases muscle hypertrophy following multiple bouts of eccentric exercise](#). *J Appl Physiol* (1985) 2011; 111(4): 1134-1141.
- 40 Bontemps B, Gruet M, Louis J, Owens DJ, Miric S, Erskine RM, Vercruyssen F. [The time course of different neuromuscular adaptations to short-term downhill running training and their specific relationships with strength gains](#). *Eur J Appl Physiol* 2022; 122(4): 1071-1084.
- 41 Jukic I, Castilla AP, Ramos AG, Van Hooren B, McGuigan MR, Helms ER. [The acute and chronic effects of implementing velocity loss thresholds during resistance training: A systematic review, meta-analysis, and critical evaluation of the literature](#). *Sports Med* 2023; 53(1): 177-214.
- 42 Psarakis M, Lord SR, Hoang PD. [Safety, feasibility, and efficacy of an eccentric exercise intervention in people with multiple sclerosis with ankle contractures](#). *Int J MS Care* 2021; 23(1): 31-36.
- 43 Barreto RV, de Lima LCR, Borszcz FK, de Lucas RD, Denadai BS. [Chronic adaptations to eccentric cycling training: A systematic review and meta-analysis](#). *Int J Environ Res Public Health* 2023; 20(4): 2861.
- 44 Yoshikawa A, Iizuka M, Kanamaru M, Kamijo S, Ohtaki H, Izumizaki M. [Exercise evaluation with metabolic and ventilatory responses and blood lactate concentration in mice](#). *Respir Physiol Neurobiol* 2023; 318: 104163.
- 45 Kitaoka Y, Takahashi K, Hatta H. [Inhibition of monocarboxylate transporters \(MCT\) 1 and 4 reduces exercise capacity in mice](#). *Physiol Rep* 2022; 10(17): e15457.
- 46 Vargas-Molina S, Martín-Rivera F, Bonilla DA, Petro JL, Carbone L, Romance R, deDiego M, Schoenfeld BJ, Benítez-Porres J. [Comparison of blood lactate and perceived exertion responses in two matched time-under-tension protocols](#). *PLoS One* 2020; 15(1): e0227640.
- 47 Penailillo L, Santander M, Zbinden-Foncea H, Jannas-Vela S. [Metabolic demand and indirect markers of muscle damage after eccentric cycling with blood flow restriction](#). *Res Q Exerc Sport* 2020; 91(4): 705-712.
- 48 Mang ZA, Realzola RA, Ducharme J, Bellissimo GF, Beam JR, Mermier C, de Castro Magalhaes F, Kravitz L, Amorim FT. [The effect of repetition tempo on cardiovascular and metabolic stress when time under tension is matched during lower body exercise](#). *Eur J Appl Physiol* 2022; 122(6): 1485-1495.
- 49 Tsuchiya Y, Mizuno S, Goto K. [Irisin response to downhill running exercise in humans](#). *J Exerc Nutrition Biochem* 2018; 22(2): 12-17.
- 50 De Lima LCR, Bueno Junior CR, De Oliveira Assumpção C, De Menezes Bassan N, Barreto RV, Cardozo AC, Greco CC, Denadai BS. [The impact of ACTN3 gene polymorphisms on susceptibility to exercise-induced muscle damage and changes in running economy following downhill running](#). *Front Physiol* 2021; 12: 769971.
- 51 Lima LCR, Nosaka K, Chen TC, Pinto RS, Greco CC, Denadai BS. [Decreased running economy is not associated with decreased force production capacity following downhill running in untrained, young men](#). *Eur J Sport Sci* 2021; 21(1): 84-92.
- 52 Aguiar AS Jr, Tuon T, Pinho CA, Silva LA, Andreazza AC, Kapczynski F, Quevedo J, Streck EL, Pinho RA. [Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training](#). *Neurosci Lett* 2007; 426(3): 171-174.
- 53 Da Silva LA, Pinho CA, Rocha LG, Tuon T, Silveira PC, Pinho RA. [Effect of different models of physical exercise on oxidative stress markers in mouse liver](#). *Appl Physiol Nutr Metab* 2009; 34(1): 60-65.
- 54 Divito B, McLaughlin M, Jacobs I. [The Effects of L-citrulline on blood-lactate removal kinetics following maximal-effort exercise](#). *J Diet Suppl* 2022; 19(6): 704-716.
- 55 Brooks GA. [The science and translation of lactate shuttle theory](#). *Cell Metab* 2018; 27(4): 757-785.
- 56 Shirai T, Kitaoka Y, Uemichi K, Tokinoya K, Takeda K, Takemasa T. [Effects of lactate administration on hypertrophy and mTOR signaling activation in mouse skeletal muscle](#). *Physiol Rep* 2022; 10(16): e15436.
- 57 Cerda-Kohler H, Henríquez-Olguín C, Casas M, Jensen TE, Llanos P, Jaimovich E. [Lactate administration activates the ERK1/2, mTORC1, and AMPK pathways differentially according to skeletal muscle type in mouse](#). *Physiol Rep* 2018; 6(18): e13800.
- 58 Wang ZH, Peng WB, Zhang P, Yang XP, Zhou Q. [Lactate in](#)

- the tumour microenvironment: From immune modulation to therapy. *EBioMedicine* 2021; 73: 103627.
- 59 Bao S, Zhang C, Luo S, Jiang L, Li Q, Kong Y, Cao J. Autophagy induces mTOR-dependent glucose uptake and mTOR-independent lactate utilization in cadmium-treated A549 cells. *Toxicol In Vitro* 2023; 86: 105513.
 - 60 Tsukamoto S, Shibasaki A, Naka A, Saito H, Iida K. Lactate promotes myoblast differentiation and myotube hypertrophy via a pathway involving MyoD *in vitro* and enhances muscle regeneration *in vivo*. *Int J Mol Sci* 2018; 19 (11): 3649.
 - 61 Oishi Y, Tsukamoto H, Yokokawa T, Hirotsu K, Shimazu M, Uchida K, Tomi H, Higashida K, Iwanaka N, Hashimoto T. Mixed lactate and caffeine compound increases satellite cell activity and anabolic signals for muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985) 2015; 118(6): 742 - 749.
 - 62 Ohno Y, Oyama A, Kaneko H, Egawa T, Yokoyama S, Sugura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K. Lactate increases myotube diameter via activation of MEK/ERK pathway in C2C12 cells. *Acta Physiol (Oxf)* 2018; 223(2): e13042.
 - 63 Ohno Y, Ando K, Ito T, Suda Y, Matsui Y, Oyama A, Kaneko H, Yokoyama S, Egawa T, Goto K. Lactate stimulates a potential for hypertrophy and regeneration of mouse skeletal muscle. *Nutrients* 2019; 11(4): 869.
 - 64 Wilkinson DJ, Brook MS, Smith K. Principles of stable isotope research - with special reference to protein metabolism. *Clin Nutr Open Sci* 2021; 36: 111-125.
 - 65 Pavis GF, Abdelrahman DR, Murton AJ, Wall BT, Stephens FB, Dirks ML. Short-term disuse does not affect postabsorptive or postprandial muscle protein fractional breakdown rates. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2023; 14(5): 2064-2075.
 - 66 Koopman R, Gehrig SM, Léger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, Lynch GS. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic β -adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol* 2010; 588(Pt 23): 4811-4823.
 - 67 Howard EE, Shankaran M, Evans WJ, Berryman CE, Margolis LM, Lieberman HR, Karl JP, Young AJ, Montano MA, Matthews MD, Bizieff A, Nyangao E, Mohammed H, Harris MN, Hellerstein MK, Rood JC, Pasiakos SM. Effects of testosterone on mixed-muscle protein synthesis and proteome dynamics during energy deficit. *J Clin Endocrinol Metab* 2022; 107(8): e3254-e3263.
 - 68 Wang J, Mogensen AG, Thybo F, Brandbyge M, Brorson J, van Hall G, Agergaard J, de Paoli FV, Miller BF, Bøtker HE, Farup J, Vissing K. Low-load blood flow-restricted resistance exercise produces fiber type-independent hypertrophy and improves muscle functional capacity in older individuals. *J Appl Physiol* (1985) 2023; 134(4): 1047-1062.
 - 69 Cuthbertson DJ, Babraj J, Smith K, Wilkes E, Fedele MJ, Esser K, Rennie M. Anabolic signaling and protein synthesis in human skeletal muscle after dynamic shortening or lengthening exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290(4): E731-E738.
 - 70 Jameson TSO, Kilroe SP, Fulford J, Abdelrahman DR, Murton AJ, Dirks ML, Stephens FB, Wall BT. Muscle damaging eccentric exercise attenuates disuse-induced declines in daily myofibrillar protein synthesis and transiently prevents muscle atrophy in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2021; 321(5): E674-E688.
 - 71 Lepley LK, Davi SM, Hunt ER, Burland JP, White MS, McCormick GY, Butterfield TA. Morphology and anabolic response of skeletal muscles subjected to eccentrically or concentrically biased exercise. *J Athl Train* 2020; 55(4): 336-342.
 - 72 Børsheim E, Tipton KD, Wolf SE, Wolfe RR. Essential amino acids and muscle protein recovery from resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(4): E648-E657.
 - 73 Tipton KD, Børsheim E, Wolf SE, Sanford AP, Wolfe RR. Acute response of net muscle protein balance reflects 24-h balance after exercise and amino acid ingestion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284(1): E76-E89.
 - 74 Wilkinson SB, Tarnopolsky MA, Macdonald MJ, Macdonald JR, Armstrong D, Phillips SM. Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(4): 1031-1040.
 - 75 Dreyer HC, Drummond MJ, Pennings B, Fujita S, Glynn EL, Chinkes DL, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(2): E392-E400.
 - 76 Moore DR, Tang JE, Burd NA, Reracich T, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Differential stimulation of myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis with protein ingestion at rest and after resistance exercise. *J Physiol* 2009; 587(Pt 4): 897-904.
 - 77 Snyder AC, Lamb DR, Salm CP, Judge MD, Aberle ED, Mills EW. Myofibrillar protein degradation after eccentric exercise. *Experientia* 1984; 40(1): 69-70.
 - 78 Touchberry CD, Gupte AA, Bomhoff GL, Graham ZA, Geiger PC, Gallagher PM. Acute heat stress prior to downhill running may enhance skeletal muscle remodeling. *Cell Stress Chaperones* 2012; 17(6): 693-705.
 - 79 Wang RY (王瑞元), Feng WQ, Yuan YH. The expression of MHC gene in skeletal muscle of rats after an exhaustive centrifugal exercise and the effect of acupuncture on it. *Chin Sport Sci (体育科学)* 2002; 22(3): 103-106 (in

- Chinese).
- 80 Macaluso F, Brooks NE, Niesler CU, Myburgh KH. [Satellite cell pool expansion is affected by skeletal muscle characteristics](#). *Muscle Nerve* 2013; 48(1): 109-116.
 - 81 Shi YL (石云龙). The effect of BCAA supplementation on the transcriptional levels of KLF-15 and related protein degradation pathways in skeletal muscle of centrifugal exercise rats [D]. Beijing: Beijing Sport University (北京体育大学) 2021, 29-33 (in Chinese).
 - 82 Azad M, Khaledi N, Hedayati M. [Effect of acute and chronic eccentric exercise on FOXO1 mRNA expression as fiber type transition factor in rat skeletal muscles](#). *Gene* 2016; 584(2): 180-184.
 - 83 Damas F, Phillips SM, Libardi CA, Vechin FC, Lixandrão ME, Jannig PR, Costa LA, Bacurau AV, Snijders T, Parise G, Tricoli V, Roschel H, Ugrinowitsch C. [Resistance training-induced changes in integrated myofibrillar protein synthesis are related to hypertrophy only after attenuation of muscle damage](#). *J Physiol* 2016; 594(18): 5209-5222.
 - 84 Zhao Y, Cholewa J, Shang H, Yang Y, Ding X, Liu S, Xia Z, Zanchi NE, Wang Q. [Exercise may promote skeletal muscle hypertrophy via enhancing leucine-sensing: Preliminary evidence](#). *Front Physiol* 2021; 12: 741038.
 - 85 D'Hulst G, Masschelein E, De Bock K. [Resistance exercise enhances long-term mTORC1 sensitivity to leucine](#). *Mol Metab* 2022; 66: 101615.
 - 86 Xia Z (夏志), Zhao Y, Shang HY, Yang LY, Fu Y, Sun JZ, Su QS. The effect of aerobic training combined with supplementation of leucine on protein metabolism in skeletal muscle of aging mice. *Chin Sport Sci (体育科学)* 2018; 38(3): 57-66 (in Chinese).
 - 87 Zhu C (朱超). The effects of exhaustive exercise and blunt injury on the proliferation of rat skeletal muscle satellite cells in vitro and AMPK/TSC2/mTOR [D]. Yangzhou: Yangzhou University (扬州大学), 2015 (in Chinese).
 - 88 Ma RG (马穰桂). The mechanism of FKBP8 in high load exercise induced mitochondrial autophagy in rat skeletal muscle [D]. Chengdu: Chengdu Sport University (成都体育学院), 2022 (in Chinese).
 - 89 Yoshihara T, Chang SW, Tsuzuki T, Natsume T, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. [Sex-specific differences in rat soleus muscle signaling pathway responses to a bout of horizontal and downhill running](#). *J Physiol Biochem* 2019; 75(4): 585-595.
 - 90 Yoshihara T, Dobashi S, Naito H. [Effects of preconditioning with heat stress on acute exercise-induced intracellular signaling in male rat gastrocnemius muscle](#). *Physiol Rep* 2024; 12(1): e15913.