

利用基因敲除小鼠研究雄激素受体对骨骼肌影响的研究进展

鲁林 王晓慧*

(上海体育学院运动科学学院, 上海 200438)

摘要 雄激素除了促进男性性器官成熟和维持男性第一、第二性征之外, 在提高肌肉质量和力量方面也具有非常重要的作用。雄激素主要通过雄激素受体(androgen receptor, AR)结合来发挥其生物学功能。近年来, 雄激素/AR在骨骼肌肥大、肌纤维类型以及老年性肌肉丢失中的重要作用已得到广泛关注。尽管有睾丸切除动物模型, 但雄激素及AR的作用机制远未被完全阐明。利用Cre/loxP系统建立的组织特异性、细胞特异性和诱导性的AR条件性敲除小鼠为研究雄激素/AR在骨骼肌中的作用及机制提供了更好的动物模型。该文就AR敲除小鼠(AR knockout, ARKO)骨骼肌质量、肌纤维类型、结构和力量的改变和机制以及正确解释ARKO小鼠表型需要注意的问题等作一综述。

关键词 雄激素受体; Cre/loxP系统; 基因敲除小鼠; 骨骼肌

Advance in the Influences of Androgen Receptor on Skeletal Muscle Based on AR Gene Knockout Mice

Lu Lin, Wang Xiaohui*

(School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Abstract Apart from producing and maintaining primary and secondary sexual characteristics, androgen plays a pivotal role in regulating the mass and strength of skeletal muscles. Androgen mainly exerts its biological role through binding the androgen receptor (AR). Though the studies in the model animals of orchietomy and *in vitro* culture of skeletal muscles and cells, androgen/AR signal pathway is still far from fully elucidated. In recent years, global AR knockout (ARKO) mice and tissue-specific, cell-specific or inducible ARKO mice established by Cre/loxP system provided a better platform to elucidate the effects and mechanisms of androgen/AR signal pathway in regulating the mass and strength of skeletal muscles. This review focuses on the changes and underlying mechanisms of mass, fiber type, structure and strength of skeletal muscles that have been gained from ARKO mice, as well as the attentions that should be paid to accurately interpretate the phenotypes of Cre-loxP mouse models.

Keywords androgen receptor; Cre/loxP system; gene knockout mice; skeletal muscle

除了产生和维持第一、第二性征和促进骨骼生长, 雄激素在提高肌肉质量和力量上也具有非常重

要的作用^[1-2]。很早就证实, 雄激素对肌肉质量和力量的发展和维持是必需的; 补充外源性雄激素既能

收稿日期: 2016-12-14 接受日期: 2017-01-03

国家自然科学基金(批准号: 31271274)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-51253246, E-mail: wangpan96@126.com

Received: December 14, 2016 Accepted: January 3, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271274)

*Corresponding author. Tel: +86-21-51253246, E-mail: wangpan96@126.com

网络出版时间: 2017-03-21 15:44:50

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170321.1544.006.html>

增强雄激素水平较低男性,也能增强正常雄激素水平男性的肌肉质量和力量^[3];且该作用与骨骼肌卫星细胞的增加^[4]和肌肉肥大有关^[5]。

雄激素主要通过与其受体(androgen receptor, AR)结合来发挥其生物学功能。AR属于核受体超家族成员,由8个外显子编码3个主要功能结构域:外显子1编码N-端可变区,外显子2和3编码DNA结合区(识别并结合靶基因上的雄激素反应元件),外显子4~8编码配体结合区。AR在会阴部骨骼肌主要是在提肛肌和球海绵体肌中高表达,但在其他骨骼肌的多种细胞中表达水平较低,且主要表达在肌卫星细胞、成肌细胞、肌管以及成纤维细胞中。

近年来,雄激素/AR在骨骼肌肥大、肌纤维类型以及老年性肌肉丢失中的重要作用已得到广泛关注。尽管有睾丸切除动物模型,但雄激素/AR的作用机制远未完全阐明。自2002年报道首例AR基因全敲小鼠^[6]后,用Cre/loxP系统陆续建立的组织特异性、细胞特异性和诱导性的AR条件性敲除小鼠为研究雄激素/AR在骨骼肌中的作用及机制提供了更好的动物模型。本文就AR敲除(AR knockout, ARKO)小鼠骨骼肌质量、肌纤维类型、结构和力量的改变及机制以及正确解释ARKO小鼠表型需要注意的问题等作一综述。

1 制备AR敲除小鼠的Cre/loxP系统

AR基因位于X染色体上,用传统的基因敲除方法敲除AR基因对动物的生育能力影响很大(雄性动物不育,雌性动物的生育能力显著下降),无法繁殖下一代继续研究。Cre/loxP系统解决了这个问题,它是目前最灵活、使用最广泛的基因敲除方法。Cre/

loxP系统包括2种转基因小鼠:全身或特定阶段、特定组织或细胞中表达Cre重组酶的转基因小鼠和在拟敲除靶基因(如AR)中插入loxP序列的floxed小鼠。LoxP的插入不影响AR的功能,只有当Cre小鼠和floxed小鼠交配后,Cre识别loxP位点,并将2个loxP位点中的序列删除,从而可在子代鼠中获得AR敲除小鼠。

AR基因是完全还是条件性(特定组织、细胞或特定阶段)敲除取决于Cre重组酶,若是全身广泛表达的Cre酶如巨细胞病毒Cre(MCV-Cre)或ACTB-Cre(β -actin Cre)等,则产生AR全敲小鼠;若是局部组织或细胞表达的Cre酶(如骨骼肌特异表达的成肌调节因子Myf5-Cre决定骨骼肌AR被敲除)或可诱导的Cre酶(如在特定阶段使用雌激素他莫昔芬来诱导雌激素受体ER-Cre酶的活性,实现阶段性地敲除AR基因的目的)则产生条件性AR敲除小鼠^[7-9]。

用传统同源重组的基因打靶技术将loxP插入到胚胎干细胞的AR基因中,或用目前最新、使用最广泛的CRISPR/Cas9基因编辑技术^[10]将loxP导入到受精卵或组织、细胞的AR基因中,后者因为避开了繁琐的打靶载体构建和阳性胚胎干细胞筛选,从而使基因敲除小鼠的建立从数年之久缩短至一年以内^[10]。目前已制备了5种在AR基因中插入了一对loxP的floxed AR小鼠(表1)^[7]。

2 ARKO小鼠骨骼肌质量、肌纤维类型、结构和力量的改变

2.1 ARKO小鼠骨骼肌质量的改变

AR全敲的雄性小鼠的体重和瘦体重(去脂体重)

表1 已建立的floxed AR小鼠

Table 1 Established floxed AR mouse

Floxed小鼠名称	LoxP插入的外显子	突变类型	参考文献
Name of floxed mouse	Exon of inserted loxP	Mutation type	Reference
AR ^{L2}	Exon 1	A frameshift mutation→no AR expression	[7]
AR ^{flox(ex1-neo)}	Exon 1	A frameshift mutation→no AR expression	[7]
fAR	Exon 2	A frameshift mutation→no AR expression	[6]
AR ^{flox}	Exon 2	A frameshift mutation→no AR expression	[7]
AR ^{lox} (now refer to AR ^{ΔZF2} for the C57BL/6 background)	Exon 3	An in-frame deletion→expression of AR without DNA binding activity	[7]

减轻, 肛提肌和海绵体肌的质量减少, 但其他部位的骨骼肌质量的改变不尽相同。基于AR^{fl^{ox}}的AR敲除的雄性小鼠仅股四头肌的质量显著降低^[11]; 基于AR^{AZF2}的AR全敲雄性小鼠, 后肢多种骨骼肌如胫骨前肌、趾长伸肌、腓肠肌和比目鱼肌的质量均显著降低, 且降低了15%~22%^[7,12]。以上结果表明, AR在骨骼肌质量的产生和维持上具有重要作用。但也有报道认为, AR全敲的雄性小鼠(基于fAR)的四肢骨骼肌没有显著改变^[6,13]。

为明确骨骼肌质量增加的AR依赖发生在骨骼肌形成的哪个阶段, 建立了成熟骨骼肌细胞条件性AR敲除(muscle-specific ARKO, mARKO)和骨骼肌干细胞即肌卫星细胞条件性AR敲除(satellite cell-specific AR knockout, satARKO)的小鼠。结果发现, mARKO雄性小鼠的肛提肌和海绵体肌的质量均降低, 但四肢骨骼肌的改变不同。其中基于AR^{fl^{ox}}, 用骨骼肌肌酸激酶Cre(MCK-Cre)实现肌纤维特异性AR敲除的这种mARKO雄性小鼠, 体重和瘦体重减少, 趾长伸肌的质量降低了14%左右, 但其他骨骼肌如股四头肌、腓肠肌、比目鱼肌的质量均没有改变^[14]。但基于AR^{L2}, 用骨骼肌肌动蛋白Cre特异敲除肌纤维AR^[15]和基于AR^{AZF2}, 用MCK-Cre特异敲除肌纤维AR^[7]的另2种mARKO雄性小鼠, 没有发现上述后肢肌肉质量有变化。而satARKO雄性小鼠的后肢肌肉, 包括趾长伸肌、胫骨前肌、比目鱼肌和腓肠肌的质量也没有发现显著改变^[16]。以上结果提示, AR对四肢骨骼肌质量的作用可能是通过肌细胞和肌卫星细胞之外的骨骼肌细胞如多能间充质干细胞AR实现, 或者通过其他机制如不需要AR的雄激素非基因机制实现。

此外, 所有全敲除和条件性敲除小鼠的会阴部骨骼肌肛提肌和海绵体肌的质量均显著降低, 降低50%左右, 但四肢骨骼肌的质量却大多没变化, 即便有降低, 降低幅度也较小。这表明, 这2类骨骼肌可能通过不同的途径产生和维持骨骼肌的质量, 四肢骨骼肌对雄激素/AR作用的反应不能用肛提肌和海绵体肌的反应来替代。

2.2 ARKO小鼠骨骼肌肌纤维类型的改变

肌纤维分为快肌(白肌)和慢肌(红肌)纤维。慢肌纤维主要为I型肌纤维; 快肌纤维有IIa、IIb、IIx这3种肌纤维。AR敲除对肌纤维类型的影响无论对AR全敲小鼠^[7,11-13], 还是对AR条件性敲除小鼠^[14,16]

的影响比较一致, 均是减少快肌比例和增加慢肌比例。Altuwajri等^[13]最先用Western blot的方法证实, ARKO全敲雄性小鼠股四头肌的肌球蛋白和肌钙蛋白I(慢肌纤维特异蛋白)的蛋白质水平显著增加, 而肌钙蛋白-T(快肌纤维特异蛋白质)显著减少。在条件性敲除AR的mARKO雄性小鼠中, 免疫荧光显微镜证实了I型肌纤维的增加和IIa型肌纤维的减少, 改变的幅度均在10%左右^[16]。

2.3 ARKO小鼠骨骼肌结构的改变

Altuwajri等^[13]用HE染色和免疫组化结蛋白(desmin)的方法证实AR全敲(基于fAR)的雄性小鼠的股四头肌的结构没有改变。但Chambon等^[15]使用分辨率更高的电镜检测mARKO(基于AR^{L2}, 骨骼肌肌动蛋白Cre)的多个骨骼肌时, 发现快肌(如趾长伸肌)、中间态骨骼肌(如腓肠肌和胫骨前肌)的肌小节约10%被破坏, 出现肌纤维的丢失、Z线的破坏和肌浆网的扩大, 但慢肌(如比目鱼肌)没有出现上述改变。这表明, AR对快肌、中间态骨骼肌的肌纤维的正确排列是必需的, 而肌纤维的排列紊乱可能是该mARKO小鼠趾长伸肌、腓肠肌和胫骨前肌收缩力下降的原因之一。

2.4 ARKO小鼠骨骼肌力量和抗疲劳能力的改变

多数研究认为, ARKO小鼠的快肌收缩力下降、慢肌收缩力增加^[7,12,15-16]。例如, 在AR全敲小鼠(基于AR^{AZF2}), 不仅多个后肢骨骼肌如趾长伸肌、胫骨前肌、腓肠肌和比目鱼肌的质量显著降低, 且快肌趾长伸肌的收缩力下降, 但慢肌比目鱼肌的收缩力增加, 且抗疲劳能力也有较小幅度的增加^[7,12]。

而在条件性AR敲除小鼠中, 也多支持握力下降的结果。如satARKO小鼠被证实尽管趾长伸肌、胫骨前肌、比目鱼肌和腓肠肌的肌肉质量没有变化, 但在多个时间点上(12周、16周、20周、32周和52周)后肢握力均比对照小鼠低, 其中12周时下降了7%^[16]。Chambon等^[15]运用mARKO小鼠(基于AR^{L2}, 骨骼肌肌动蛋白Cre)也发现, 即使肌肉质量不改变, 其后肢握力也下降, 且该mARKO小鼠丧失了后肢握力在青春期随年龄增加而增加。到24周时最大的特性, 即后肢握力始终保持低水平(尽管肌肉质量在青春期有增加)。进一步体外研究发现, 20周龄的mARKO小鼠的快肌(如趾长伸肌)和介于快、慢肌之间的中间态骨骼肌(如腓肠肌和胫骨前肌)的最大强直张力下降20%~25%, 但慢肌(如比目鱼肌)的

最大强直张力和抗疲劳能力没有改变, 此结果表明, AR对控制快肌和中间态骨骼肌的内在收缩力是必需的。然而, Ophoff等^[14]运用mARKO小鼠得到了不同的结果, 该小鼠趾长伸肌的肌肉质量尽管下降, 但内在的肌肉力量没有变化。

骨骼肌的收缩力与多种因素有关, 包括肌肉质量, 肌纤维的比例、结构, 肌肉蛋白质含量以及肌肉内在收缩力等。ARKO小鼠的快肌收缩力下降、慢肌收缩力的增加或不变可能与上述原因有关, 但确切的机制仍需研究。

3 ARKO小鼠骨骼肌质量降低的机制

作为转录因子, AR在未被激活时位于胞质, 与热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)结合, 当它与雄激素结合后, AR与HSP解离, 继而二聚化, 通过核定位信号的介导入核。在核内, AR与其靶基因的雄激素反应原件(androgen response element, ARE)结合, 在共调节因子的作用下调控靶基因的表达而发挥作用, 这是经典的基因调控途径。除了该途径, 近年来又证实了AR可与其他分子[如胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等]通过交互对话(crosstalk)来发挥作用。此外, 不依赖AR的快速雄激素作用也被报道。然而, 对雄激素作用机制的认识多来自肌肉、骨骼肌细胞的离体实验或睾丸切除小鼠模型, 因此对机制的理解不是很确定, 且还有许多尚未阐明的环节, 而ARKO小鼠, 尤其是AR条件性敲除小鼠为阐明雄激素/AR的作用机制提供了合适的动物模型。

3.1 对靶基因(如生肌调节因子和叉头蛋白O)的直接调控

骨骼肌的形成以及损伤后的修复、再生等是

由骨骼肌的前体细胞分化成骨骼肌卫星细胞后进行增殖并分化成多核肌管的过程。肌卫星细胞通常处于静息状态, 当肌肉受到激素或运动刺激以及损伤时, 肌卫星细胞便被激活。激活后的肌卫星细胞在成肌调节因子(myogenic regulatory factor, MRF)的调控下进行细胞增殖并表达成肌细胞的标志物, 成为成肌细胞。当成肌细胞增殖停止后分化成多核肌管, 融合并进入原有的骨骼肌纤维中而发展成新的肌纤维。MRF包括成肌分化抗原(myogenic differentiation antigen, MyoD)、Myf-5(myogenic factor-5)、肌细胞生成蛋白(myogenin)和MRF4。MyoD和Myf-5是早期表达的成肌调节因子, 在成肌细胞分化前表达。MyoD是骨骼肌分化的决定基因, 它促进成肌细胞的分化, 以表达肌细胞生成蛋白为分化标志。除了肌细胞生成蛋白, MRF4也在分化中表达, 诱导成肌细胞融合成肌管(图1)^[14]。此外, 另一些MRF也被陆续证实在肌肉的生成中起作用, 如MyoG在分化末期表达, 是肌管和肌纤维形成的必需因子; Myf6在成肌细胞的融合和肌管的分化中起作用^[17]。MRF(如MyoD、Myf5、Myf6和MyoG, 特别是MyoD)能激活Tceal7[transcription elongation factor A (SII) like 7]的活性, 通过调控细胞周期蛋白如p27等, 实现抑制成肌细胞的增殖, 促进其向肌管分化和融合的作用^[18]。

肌肉质量除了取决于骨骼肌的增殖和分化外, 还受骨骼肌降解的影响。骨骼肌的降解是在泛素连接酶的作用下, 通过泛素-蛋白酶体途径降解。肌肉特异性的泛素连接酶有2种, Fbxo32(F-box only protein 32)又称为MAFbx(muscle atrophy F-box)或肌肉萎缩相关基因-1(atrogin-1)和MuRF1(muscle ring finger 1), 它们的上调导致肌肉蛋白的泛素化而被降

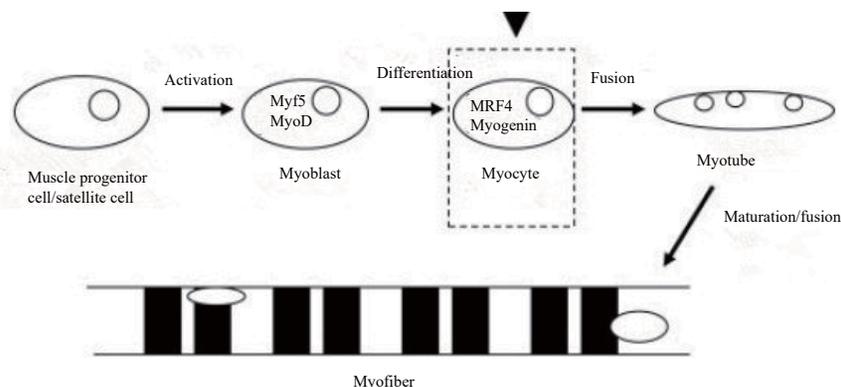


图1 骨骼肌的增殖、分化和融合过程

Fig.1 The proliferation, differentiation and fusion of skeletal muscle

解^[9,19]。而Fbxo32和MuRF1的活性则受高度保守的叉头蛋白O(forkhead box O, FoxO)这种转录因子的调控^[9,19]。

ARKO小鼠骨骼肌质量的降低是否与上述MRF和泛素连接酶有关呢? 已证明大多数的MRF都是AR的靶基因, 其基因序列中都有ARE。AR全敲(基于AR^{ΔF2})成年雄性小鼠的肛提肌和后肢骨骼肌中多个上述相关分子的表达都增加, 包括肌细胞生成蛋白, 促进成肌细胞从增殖向分化转化的基因, 如Tceal7、胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor-2, Igf-2)和钙依赖磷酸酶A2(calcineurin A2)^[12,20], 且该AR全敲小鼠的泛素连接酶Fbxo32增加, 表明肌肉降解的增强^[20], 这可能是该AR全敲小鼠肛提肌、后肢多种骨骼肌的肌肉质量下降的主要原因。以上结果表明, AR通过促进肌细胞保持增殖、延迟分化以及抑制泛素酶介导的肌萎缩, 来保留成年男性的肌肉质量。此外, satARKO的雄性小鼠肛提肌的肌细胞生成蛋白、Myf5增加以及肌卫星细胞特异标记分子Pax7(paired box factor 7)减少, 这可能是肛提肌质量减少50%的原因, 提示AR不仅通过延迟分化, 还通过增加肌卫星细胞数来增加肌肉质量^[16]。

3.2 与其他生肌调控分子(如IGF-1R、Mstn和Odc1等)的交互对话

3.2.1 ARKO小鼠IGF-1R降低, mTOR和p70^{S6K}活性降低 IGF-1对骨骼肌的增殖和肥大有重要的调节作用。IGF-1过表达的转基因小鼠的肌肉质量明显提高; 相反, 由于营养不良、疾病以及年龄增长等原因导致的肌肉质量减少时IGF-1表达水平也会显著下降。IGF-1与其受体IGF-1R结合后, 主要通过激活磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/Akt-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)-核糖体S6蛋白激酶(ribosomal protein kinase S6, p70^{S6K}, mTOR主要的下游靶蛋白)信号通路, 来促进骨骼肌增殖和肥大^[21]。巨噬细胞迁移抑制因子促进心肌细胞增殖的作用也是通过活化PI3K/Akt/mTOR实现的^[22]。Akt活化后除了激活mTOR和p70^{S6K}, 增加骨骼肌蛋白质合成之外, 还能磷酸化和抑制转录因子FoxO, 进而通过降低泛素连接酶Fbxo32和MuRF1来抑制骨骼肌降解^[23]。

IGF-1/IGF-1R基因上均有ARE, 它们是AR的靶基因。雄激素/AR与IGF-1/IGF-1R在调控骨骼肌增殖和肥大过程中关系密切。对性腺机能减退的老年

男性补充外源性的睾酮, 在增加肌肉蛋白质合成和肌肉力量的同时, 肌肉中IGF-1/IGF-1R增加。在体外, 雄激素对人骨骼肌细胞的促增殖作用能被阻断IGF-1R表达所抑制, 即雄激素/AR通过激活IGF-1/IGF-1R通路, 再通过PI3K/Akt-mTOR通路, 实现对骨骼肌细胞的促增殖作用^[24]。

ARKO小鼠的血清IGF-1水平与对照组小鼠相比, 没有显著性变化^[12,25], 这与目前认为骨骼肌的增生和肥大是与组织中而非血清IGF-1关系密切的认识一致。平滑肌细胞特异的AR敲除小鼠中发现前列腺中IGF-1水平下降, 这可能是前列腺增殖受抑制的原因^[26]。骨骼肌细胞特异的mARKO小鼠肛提肌的IGF-1表达水平降低, 且与肛提肌的显著萎缩有关^[15], 而该mARKO小鼠的四肢骨骼肌质量没有变化的同时, 也未检测到四肢骨骼肌IGF-1水平的改变。

3.2.2 ARKO小鼠骨骼肌Mstn减少, Mstn受体、Myf5和肌细胞生成蛋白增加 肌生成抑制蛋白(myostatin, Mstn)是转化生成因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)家族的成员, 在骨骼肌特异表达, 是调控骨骼肌生长、肌肉肥大的唯一负性调控因子。使Mstn失活的Mstn突变是1个4岁小男孩肌力异常增加的原因, 也是比利时蓝牛和皮尔蒙特牛这两种著名“双肌”牛的原因。siRNA阻断成肌细胞Mstn的表达后, 细胞的增殖能力增强, 分化被延迟^[27]。Mstn基因中有2个ARE, 所以有学者曾认为, 雄激素的促肌肉肥大作用是通过抑制Mstn的转录实现的^[23]。但在satARKO小鼠中却发现, Mstn水平不是增加, 而是6倍以上的减少; 而雄激素促进肌肉肥大的作用在Mstn基因敲除小鼠中更显著^[16]。进一步的研究发现, 该satARKO小鼠的Mstn受体actin受体IIB(actin-related protein 2b, Actr2b)、Smad3(SMAD family member 3)、Myf5和肌细胞生成蛋白的水平均增加, 提示雄激素经AR介导可直接抑制Mstn受体水平, 通过经典的TGF-β/Smad3途径抑制Myf5和肌细胞生成蛋白的水平, 继而延迟成肌细胞的分化来促进肌肉肥大; 而同时促进Mstn表达的作用, 则是限制肌肉过度肥大^[16]。

3.2.3 ARKO小鼠骨骼肌Odc1、Amd1和多胺表达均减少 多胺包括腐胺、精胺和精脒, 是一类多聚阳离子脂肪族化合物。阳离子电荷使得多胺可与细胞内的含有多聚阴离子的大分子, 如DNA和

RNA发生反应,从而参与调控细胞周期、细胞的增殖、分化等重要的生理过程。已证实,骨骼肌的肥大与多胺水平包括腐胺、精脒和精胺的增加有关,而骨骼肌萎缩模型大鼠的骨骼肌中多胺降低^[23]。哺乳动物细胞中多胺的内源性合成主要受鸟氨酸脱羧酶1(ornithine decarboxylase 1, Odc1)和s-腺苷甲硫氨酸脱羧酶1(s-adenosylmethionine decarboxylase 1, Amd1)这两个限速酶调控。Odc1催化鸟氨酸脱羧形成腐胺,而Amd1催化s-腺苷甲硫氨酸脱羧形成丙氨基,丙氨基再在精脒合成酶和精胺合成酶的作用下使腐胺逐级形成精脒和精胺^[28]。

AR全敲小鼠的骨骼肌Odc1和Amd1水平显著下降^[12],而satARKO小鼠的骨骼肌Odc1也降低,且降低幅度超过对照小鼠的60%^[29]。睾丸切除小鼠骨骼肌萎缩的同时,Odc1和Amd1也减少,而睾酮的治疗促进肌肉增生、肥大的同时,Odc1和Amd1的水平也恢复正常。已明确Odc1基因是AR的靶基因,成肌细胞中的AR直接上调Odc1^[23]。以上结果表明,雄激素/AR促进肌肉肥大的作用与其上调多胺合成的限速酶Odc1、Amd1,进而上调多胺水平有关。有研究发现,抑制Odc1、Amd1能通过抑制细胞周期蛋白D1(cyclin D1)的表达使细胞周期停滞于G₁期,从而抑制大肠癌细胞的增殖^[28]。Odc1、Amd1对骨骼肌的促增殖作用是否与也细胞周期蛋白有关,有待证实。

3.3 快速、不依赖于AR的雄激素非经典途径

Chambon等^[15]发现,切除mARKO小鼠与对照组小鼠的睾丸后,快肌和中间态肌肉均出现萎缩,且萎缩程度无区别,提示在ARKO小鼠中,雄激素的作用除了通过AR之外还有不依赖于AR的作用。体外细胞的研究也证实了雄激素不依赖于AR的作用,如睾酮促进不表达AR的大鼠L6成肌细胞系的增殖和分化,结合了牛血清白蛋白而不能通过细胞膜的睾酮和游离雄激素对L6细胞有相同的作用等^[30]。雄激素促进L6细胞增殖的作用能被百日咳毒素抑制,提示与G蛋白偶联受体有关^[30]。但该作用在体外的肌肉组织和动物骨骼肌中是否存在,及其确切机制仍待研究。

总之,雄激素与AR结合后,通过对靶基因(如MRF、FoxO)的直接调控或与其他生肌调控分子(如IGF-1R、Mstn、Odc1等)的交互对话来发挥其生理功能。此外,细胞水平上不依赖AR的雄激素快速作

用如增加肌细胞内的Ca²⁺摄取,是否在在体水平也存在值得研究(图2)。

4 ARKO小鼠骨骼肌肌纤维类型、结构和力量改变的机制

ARKO小鼠肌纤维类型、肌肉结构和力量改变机制的研究不是很多。关于肌纤维类型的转化,体外的研究发现,FoxO转录因子不仅是肌肉萎缩中I型肌纤维相关基因的负调节因子,还会导致肌纤维类型由慢氧化型向快酵解型的转变^[19]。TGF-β-Smad3通路在降解肌肉蛋白质的同时,还能促进肌纤维由I型向II转化^[21]。而ARKO小鼠中,FoxO、Smad3等信号通路也有改变,推测AR可能利用相同的通路在调控肌肉质量的同时,也调控肌纤维类型的转化。

已发现ARKO小鼠出现线粒体的合成异常,导致供能量障碍^[31]。AR对骨骼肌力量的影响,除了与肌肉质量、肌纤维类型、结构的改变有关之外,是否还与线粒体的合成异常致供能障碍有关,仍需进一步研究。

5 正确解释ARKO小鼠表型需要注意的问题

如前所述,尽管都是用Cre/loxP系统针对AR外显子1~3进行AR敲除,然而制备出的AR全敲小鼠之间或AR条敲小鼠之间的表型却并不完全相同,有时甚至是相反。究其原因,与Cre/loxP系统的局限性有关,而这些局限性的存在使AR敲除小鼠的制备过程以及正确解释ARKO小鼠的表型都需要注意某些问题^[7,9,32]。其原因主要包括以下三个方面。一是loxP插入的位置和新霉素盒(neomycin cassette)的作用(插入含新霉素盒的loxP到AR基因的原因是利用新霉素盒进行阳性胚胎干细胞的筛选)。正常情况下,floxed小鼠的表型与对照小鼠一致,但loxP插入AR外显子3所建立的floxed AR小鼠却出现了高度雄激素化的表型^[33];去除该新霉素盒后,则该floxed AR小鼠就表现出正常的表型^[34]。二是Cre的水平和组织表达的特异性。Cre的表达水平有时候不是很高,不能导致靶基因100%敲除,从而影响靶基因的敲除效果。另外,Cre上的启动子通常也不是100%的组织 and 细胞特异性,从而导致其他组织的靶基因敲除。三是Cre/loxP系统的特点就是2种品系小鼠的杂交,存在2种小鼠的遗传背景,敲除小鼠出现的表型受这

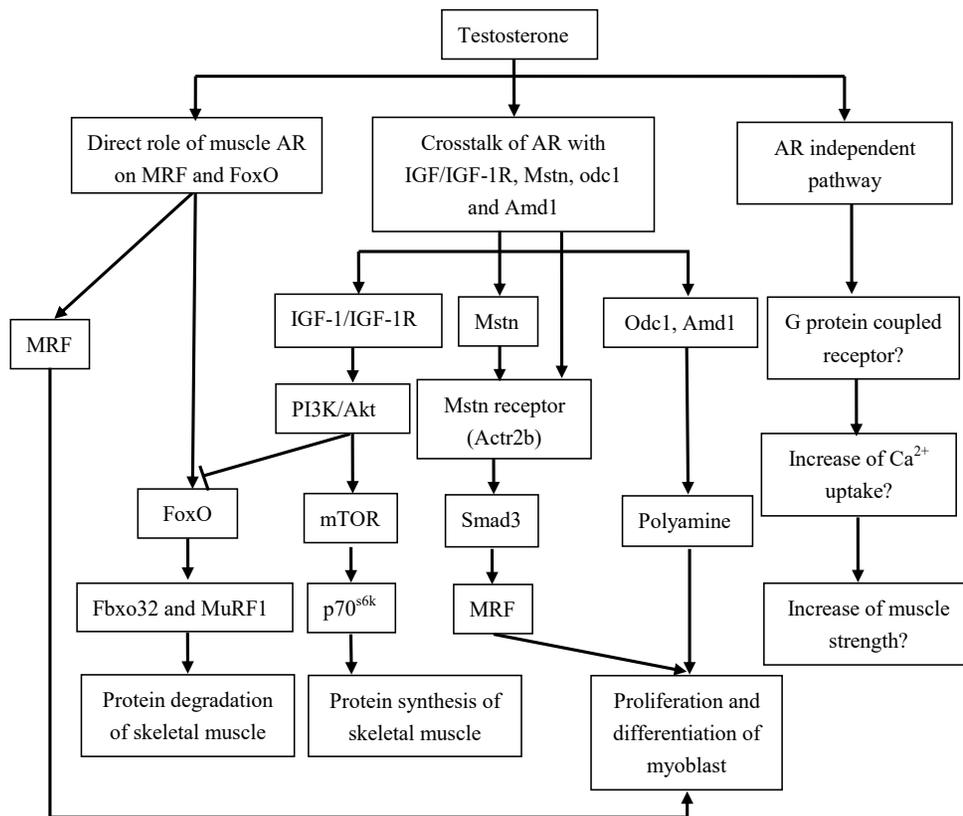


图2 雄激素/AR调控骨骼肌增殖、分化和降解的途径

Fig.2 The pathways of proliferation, differentiation and degradation of skeletal muscle regulated by androgen/AR

2种遗传背景影响, 所以Cre/loxP小鼠后代必须回交数代, 以统一遗传背景^[7,9]。

综上所述, AR全敲和条敲小鼠模型证实了雄激素对骨骼肌的肌肉质量、肌纤维类型、肌肉结构和肌肉力量等有非常重要的作用; 该作用可能是通过AR对靶基因(如MRF和FoxO)的直接调控, 也可能是通过AR与其他生肌调控分子(如IGF-1R、Mstn、Odc1等)的交互对话实现。AR的组织特异性、细胞特异性和诱导性敲除小鼠为研究AR作用的分子机制提供合适的动物模型, 但在正确理解Cre/loxP系统制备的ARKO小鼠的表型时还需谨慎。

参考文献 (References)

- Shukla GC, Plaga AR, Shankar E, Gupta S. Androgen receptor-related diseases: What do we know? *Andrology* 2016; 4(3): 366-81.
- Chang C, Yeh S, Lee SO, Chang TM. Androgen receptor (AR) pathophysiological roles in androgen-related diseases in skin, bone/muscle, metabolic syndrome and neuron/immune systems: Lessons learned from mice lacking AR in specific cells. *Nucl Recept Signal* 2013; 11: e001.
- Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP, Lee M, *et al.* Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2): 678-88.
- Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285(1): E197-205.
- Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, *et al.* Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(1): E154-64.
- Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, *et al.* Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An *in vivo* model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(21): 13498-503.
- Rana K, Davey RA, Zajac JD. Human androgen deficiency: Insights gained from androgen receptor knockout mouse models. *Asian J Androl* 2014; 16(2): 169-77.
- Lin TH, Yeh S, Chang C. Tissue-specific knockout of androgen receptor in mice. *Methods Mol Biol* 2011; 776: 275-93.
- de Gendt K, Verhoeven G. Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 352(1/2): 13-25.
- 孙昊, 杨辉. 基因修饰小鼠构建的革命: CRISPR/Cas9技术. *生命科学*(Sun Hao, Yang Hui. The revolutionary establishment

- of mice with specific gene modifications: CRISPR/Cas9 technolog. Chinese Bulletin of Life Sciences) 2015; 27(1): 36-44.
- 11 Ophoff J, Callewaert F, Venken K, de Gendt K, Ohlsson C, Gayan-Ramirez G, *et al.* Physical activity in the androgen receptor knockout mouse: Evidence for reversal of androgen deficiency on cancellous bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378(1): 139-44.
 - 12 MacLean HE, Chiu WS, Notini AJ, Axell AM, Davey RA, McManus JF, *et al.* Impaired skeletal muscle development and function in male, but not female, genomic androgen receptor knockout mice. *FASEB J* 2008; 22(8): 2676-89.
 - 13 Altuwajri S, Lee DK, Chuang KH, Ting HJ, Yang Z, Xu Q, *et al.* Androgen receptor regulates expression of skeletal muscle-specific proteins and muscle cell types. *Endocrine* 2004; 25(1): 27-32.
 - 14 Ophoff J, Van Proeyen K, Callewaert F, de Gendt K, de Bock K, Vanden Bosch A, *et al.* Androgen signaling in myocytes contributes to the maintenance of muscle mass and fiber type regulation but not to muscle strength or fatigue. *Endocrinology* 2009; 150(8): 3558-66.
 - 15 Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Malivindi R, *et al.* Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14327-32.
 - 16 Dubois V, Laurent MR, Sinnesael M, Cielen N, Helsen C, Clinckemalie L, *et al.* A satellite cell-specific knockout of the androgen receptor reveals myostatin as a direct androgen target in skeletal muscle. *FASEB J* 2014; 28(7): 2979-94.
 - 17 刘宁, 邓雪娟, 王建平, 邓庆庆, 徐廷生. 生肌调节因子及肌生成调控因素研究进展. *中国畜牧兽医*(Liu Ning, Deng Xuejuan, Wang Jianpin, Deng Qingqin, Xu Tingshen. Research progress on regulation factors of myogenic regulatory factors and myogenesis. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*) 2015; 42(10): 2644-9.
 - 18 Shi X, Garry DJ. Myogenic regulatory factors transactivate the Tceal7 gene and modulate muscle differentiation. *Biochem J* 2010; 428(2): 213-21.
 - 19 张庆, 丁树哲. FoxO转录因子在骨骼肌稳态中的作用及运动训练调控. *沈阳体育学院学报*(Zhang Qing, Ding Shuzhe. Functions of FoxO transcription factors in skeletal muscle homeostasis and exercise-related regulation. *Journal of Shenyang Sport University*) 2015; 31(1): 91-7.
 - 20 Rana K, Lee NK, Zajac JD, MacLean HE. Expression of androgen receptor target genes in skeletal muscle. *Asian J Androl* 2014; 16(5): 675-83.
 - 21 于亮, 陈晓萍, 王瑞元. 骨骼肌纤维类型转化的分子调控机制研究进展. *中国运动医学杂志*(Yu Liang, Cheng Xiaoping, Wang Ruiyuan. Advances in molecular regulation mechanism of skeletal muscle fiber type transformation. *Chin J Sports Med*) 2014; 33(5): 470-5.
 - 22 Cui J, Zhang F, Wang Y, Liu J, Ming X, Hou J, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor promotes cardiac stem cell proliferation and endothelial differentiation through the activation of the PI3K/Akt/mTOR and AMPK pathways. *Int J Mol Med* 2016; 37(5): 1299-309.
 - 23 Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F. Androgens and skeletal muscle: Cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(10): 1651-67.
 - 24 Serra C, Bhasin S, Tangherlini F, Barton ER, Ganno M, Zhang A, *et al.* The role of GH and IGF-I in mediating anabolic effects of testosterone on androgen-responsive muscle. *Endocrinology* 2011; 152(1): 193-206.
 - 25 Callewaert F, Venken K, Ophoff J, de Gendt K, Torcasio A, van Lenthe GH, *et al.* Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor-alpha. *FASEB J* 2009; 23(1): 232-240.
 - 26 Yu S, Zhang C, Lin CC, Niu Y, Lai KP, Chang HC, *et al.* Altered prostate epithelial development and IGF-1 signal in mice lacking the androgen receptor in stromal smooth muscle cells. *Prostate* 2011; 71(5): 517-24.
 - 27 孙顺昌, 彭运生, 贺敬波, 林志坚. siRNA阻断鼠成肌细胞myostatin表达对细胞增殖及分化能力的影响. *基础医学与临床*(Sun Shunchang, Peng Yunsheng, He Jingbo, Lin Zhijian. Effect of myostatin silence mediated by mouse siRNA on cell proliferation and differentiation in myoblasts. *Basic & Clinical Medicine*) 2011; 31(2): 187-91.
 - 28 刘贤锡, 龚姜, 张胡王. 鸟氨酸脱羧酶和S-腺苷甲硫氨酸脱羧酶双反义腺病毒对大肠癌细胞生长的抑制作用. *中国现代普通外科进展*(Liu Xixian, Gong Jing, Zhang Huwang. Inhibitory effect of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethioninedecarboxylase biantisense adenovirus on colorectal cancer cells. *Chin J Curr Adv Gen Surg*) 2007; 10(1): 21-5.
 - 29 Lee NK, Skinner JP, Zajac JD, MacLean HE. Ornithine decarboxylase is upregulated by the androgen receptor in skeletal muscle and regulates myoblast proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301(1): E172-9.
 - 30 Fu R, Liu J, Fan J, Li R, Li D, Yin J, *et al.* Novel evidence that testosterone promotes cell proliferation and differentiation via G protein-coupled receptors in the rat L6 skeletal muscle myoblast cell line. *J Cell Physiol* 2012; 227(1): 98-107.
 - 31 Wang RS, Chang HY, Kao SH, Kao CH, Wu YC, Yeh S, *et al.* Abnormal mitochondrial function and impaired granulosa cell differentiation in androgen receptor knockout mice. *Int J Mol Sci* 2015; 16(5): 9831-49.
 - 32 O'Hara L, Smith LB. Development and characterization of cell-specific androgen receptor knockout mice. *Methods Mol Biol* 2016; 1443: 219-48.
 - 33 MacLean HE, Chiu WS, Ma C, McManus JF, Davey RA, Cameron R, *et al.* A floxed allele of the androgen receptor gene causes hyperandrogenization in male mice. *Physiol Genomics* 2008; 33(1): 133-7.
 - 34 Rana K, Clarke MV, Zajac JD, Davey RA, MacLean HE. Normal phenotype in conditional androgen receptor (AR) exon 3-floxed neomycin-negative male mice. *Endocr Res* 2014; 39(3): 130-5.