

## 研究论文

## 高频电刺激小鼠坐骨神经促进骨骼肌自噬

杨映娟<sup>1,2</sup>, Jeffrey E. Pessin<sup>2</sup>, 王兰<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>山西大学生命科学学院, 太原 030006; <sup>2</sup>爱因斯坦医学院医学与分子药理学系, 纽约 10461, 美国

**摘要:** 本研究旨在探讨运动对骨骼肌自噬的调控作用。以小鼠为研究对象, 通过高频(100 Hz)电刺激单侧坐骨神经的方法使同侧骨骼肌收缩, 以对侧肌肉作为未刺激对照组。分别收集电刺激完成后0、30和60 min的腓肠肌肌肉组织, 迅速投入液氮冷冻备用。采用实时荧光定量PCR和Western blot检测自噬相关基因mRNA与蛋白的表达水平。研究结果显示, 在电刺激完成后0 min, 相比对侧未刺激骨骼肌, 电刺激一侧的骨骼肌腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活性升高, 自噬标志蛋白LC3-II/I比率显著升高, 蛋白酶体泛素连接酶基因(*atrogen-1*和*MuRF-1*)和自噬相关基因(*CathepsinL*、*Bnip3*和*Bnip3l*) mRNA表达均显著上调, 自噬相关蛋白ULK1活性升高。上述结果提示, 电刺激引起的骨骼肌收缩可促进骨骼肌自噬水平升高, 该过程可能通过AMPK/ULK1介导的信号途径调控。

**关键词:** 电刺激; 骨骼肌; 衰老; 自噬; LC3**中图分类号:** R329

## High frequency electrical stimulation of sciatic nerve enhances skeletal muscle autophagy in mice

YANG Ying-Juan<sup>1,2</sup>, Jeffrey E. Pessin<sup>2</sup>, WANG Lan<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; <sup>2</sup>Department of Medicine and Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, NY 10461, USA

**Abstract:** The aim of the present study was to investigate the effects of exercise on skeletal muscle autophagy. Trains of high-frequency electrical stimulation (pulses frequency: 100 Hz) were used to stimulate sciatic nerve and consequently induce muscle contraction of the left hindlimb. The unstimulated right hindlimb muscles were taken as control. The mice were sacrificed immediately (0), 30 or 60 min after the electrical stimulation by cervical dislocation, and gastrocnemius muscles were rapidly dissected and freeze-clamped in liquid nitrogen. AMP-activated protein kinase (AMPK) and the autophagy marker protein LC3 were detected by Western blotting, and muscle atrophy related genes including *atrogen-1*, *MuRF-1*, *Bnip3*, *Bnip3l* and *CathepsinL* were detected by using real-time qPCR. The results showed that, at 0 min after the electrical stimulation, the activity of AMPK and LC3-II/I ratio were significantly increased in left gastrocnemius muscles, compared with those of the muscles in the right hindlimb. The levels of *atrogen-1*, *MuRF-1*, *Bnip3*, *Bnip3l* and *CathepsinL* mRNA expressions were up-regulated by electrical stimulation. Meanwhile, the activity of autophagy related protein, ULK1 was significantly enhanced by electrical stimulation. These results suggest that electrical stimulation of sciatic nerve may induce the skeletal muscle autophagy, and this may be regulated through AMPK/ULK1-mediated signaling pathway.

**Key words:** electrical stimulation; skeletal muscle; aging; autophagy; LC3

肌肉占人体总重的40%~50%, 并且是机体蛋白质的主要贮存器官。肌肉含量的稳定受蛋白质的

合成与降解之间的平衡调控。许多病理情况下以及衰老的过程中会发生肌肉萎缩<sup>[1,2]</sup>, 而肌肉的萎缩

Received 2016-12-29 Accepted 2017-03-14

This work was supported by grants from the National Institutes of Health, USA (No. DK020541) and Shanxi University, Shanxi Province, China (No. 113545023).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-351-7011429; E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

主要是由于蛋白质的降解速率超过其合成。蛋白质的降解主要通过两条途径, 蛋白酶体的泛素化途径和溶酶体的自噬途径。以往大多数研究主要集中在蛋白酶体途径的研究, 对于溶酶体自噬途径研究较少, 而近年来越来越多的研究将焦点集中在细胞自噬。

自噬是机体通过溶酶体降解自身受损废弃细胞器和蛋白质的过程。另外, 当机体处于过度饥饿情况时, 通过自噬途径将细胞内受损蛋白质或其他大分子物质降解为可被细胞利用的小分子物质, 供给细胞营养, 因此自噬对于维持细胞体内环境稳定有着重要的作用。自噬在许多肌病中被持续激活, 例如 Pompe 和 Danon 疾病模型, 失神经性肌萎缩等<sup>[3-7]</sup>。有研究表明抑制自噬会引起肌病以及肌肉萎缩<sup>[8]</sup>。电刺激能够抵抗或缓解肌肉萎缩, 因此有很多临床病例采取电刺激疗法, 例如脊柱损伤, 衰老等<sup>[9-13]</sup>。自噬受一系列基因的调控, 目前研究已知的包括自噬相关基因 *atg*、*LC3b*<sup>[14]</sup>、*Gabrarpl1* 和 *BNIP3*<sup>[15]</sup> 等。

运动锻炼对机体有诸多益处, 例如寿命的延长、心血管病、糖尿病以及神经退行性病变的预防等<sup>[16, 17]</sup>。而运动对自噬的影响机理, 目前相关研究报道较少。为了研究自噬与急性运动之间的关系, 本研究采用高频 (100 Hz) 电刺激小鼠坐骨神经的方式来促进后肢骨骼肌运动, 利用 Western blot 和实时定量 PCR 检测自噬标志蛋白 LC3 以及其他自噬调控基因的表达, 以期能为骨骼肌萎缩的临床治疗提供理论依据和实践支持。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** C57BL/6 雄性小鼠购自美国 Jackson 实验室。实验小鼠以标准日粮饲喂并自由饮水, 饲养在 12 h 光照和 12 h 黑暗交替的无菌动物房。所有动物实验程序均按照并符合美国爱因斯丹医学院动物保护协会的要求。

**1.2 主要仪器和设备** 701C stimulator 电刺激仪购自加拿大 Aurora Scientific Inc.。Dynamic Muscle Control (DMC) 软件编辑和控制整个电刺激程序。

**1.3 电刺激参数设置以及实验步骤** 实验开始前, 按照仪器使用说明连接电刺激仪和电脑, 调整电压等参数, 开启 DMC 程序。用浓度 5% 的异氟醚麻醉 (吸入式) 小鼠, 同时供给 1% 的氧气。待小鼠麻醉之后将异氟醚浓度调整至 3%, 并在后续整个

实验操作过程中一直保持该剂量。麻醉 20~30 min 之后开始电刺激程序。将小鼠待刺激的一侧后肢毛发剔除干净, 固定小鼠, 消毒后打开皮肤暴露出坐骨神经, 连接电刺激针头。本实验设 10 组脉冲刺激, 每组含 6 次脉冲刺激, 每次刺激之间间隔 10 s 的恢复时间, 每组间隔 1 min。电压 10 V, 脉冲频率为 100 Hz。

**1.4 骨骼肌样本的收集** 将 2 月龄小鼠分为 3 组, 电刺激完成后让小鼠分别恢复 0、30 和 60 min, 然后断颈处死, 收集腓肠肌作为样本, 同时收集对侧未刺激腓肠肌肌肉作为对照。迅速投入液氮中冷冻保存备用。每组设 5 次重复。

**1.5 Western blot** 在盛有液氮的研钵中研磨冻存的组织样本, 将研碎的组织样本迅速转移至预先加好预冷蛋白裂解液的 1.5 mL Eppendorf 离心管。蛋白裂解液采用商品化的 ProteoJET™ Mammalian Cell Lysis Reagent (#K0301, Fermentas), 并加入蛋白酶体抑制剂 (EMD Chemicals Inc.) 和磷酸化酶抑制剂 (Sigma-Aldrich Co., LLC.)。在 4 °C、13 000 r/min 条件下离心细胞裂解产物 30 min, 收集上清液并转移至新管。用 BCA 试剂盒 (Thermo Scientific, Rockford, USA) 测定蛋白质浓度。准备 20 μg 蛋白质样品, 加入 5 × 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 7 min, 8% SDS-PAGE 进行电泳分离蛋白质, 半干法转至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入兔来源的抗 pThr172-AMPK、LC3-II、LC3-I、p62、pSer555-ULK1 与 GAPDH 多克隆一抗 (1:1 000, Cell Signaling, Boston, USA), 4 °C 摇床孵育过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入山羊抗兔二抗 (1:10 000, Pierce, Pittsburgh, USA) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显色。采用 ImageJ 软件对蛋白条带进行定量分析, 用 GAPDH 作为内参进行校准。

**1.6 实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, real-time qPCR)** 采用 QIAzol 试剂 (Qiagen, CA, USA) 提取肌肉组织总 RNA。用 SuperScript VILO 第一链 cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen, CA, USA) 进行反转录。用 TaqMan RT-PCR 系统 (Applied Biosystem, Branchburg, NJ, USA) 检测 *atrogen 1* (引物编号: Mm00499523\_m1)、*MuRF-1* (引物编号: Mm01185221\_m1)、自噬调节因子 *Bnip3* (引物编号: Mm01275601\_g1) 和 *Bnip3l* (引物编号: Mm00786306\_s1) 以及溶酶体酶 *CathepsinL* (引物编号: Mm00515597\_m1) 的 mRNA 表达, 每个样品设置 3 个重复, 将 *gapdh*

(引物编号: Mm99999915\_g1) 作为内参。Real-time qPCR 反应体系:  $2 \times$  Taqman Universal Master Mix  $10 \mu\text{L}$ , TaqMan 引物  $1 \mu\text{L}$ , cDNA  $4 \mu\text{L}$ , DNase-Free 水  $5 \mu\text{L}$ , 总体积为  $20 \mu\text{L}$ 。PCR 循环反应参数:  $94^\circ\text{C}$ , 2 min;  $94^\circ\text{C}$ , 30 s;  $65^\circ\text{C}$ , 30 s;  $72^\circ\text{C}$ , 30 s, 重复 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$ , 5 min。用未刺激肌肉样本 cDNA 作为标准品, DNase-Free 水设空白对照, 并对标准品分 4 次进行 5 倍梯度稀释。通过对每个特定基因绘制标准曲线, 采用  $\Delta\Delta\text{Ct}$  的方法来测定其相对基因表达变化。

**1.7 统计学分析** 数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 用 SPSS 22.0 统计软件进行统计检验, 多组之间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  时认为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 电刺激骨骼肌收缩增加 AMPK 激酶活性

AMPK 属于丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 电刺激骨骼肌能够使其活化<sup>[18]</sup>, 其活性主要取决于 AMP 和 ADP 调控的 Thr172 位点的磷酸化<sup>[19]</sup>。用 Western blotting 检测电刺激骨骼肌收缩对 AMPK 活性的影响, 结果显示, 经过电刺激促使骨骼肌收缩, AMPK 的活性显著上调。如图 1 所示, 与对侧未刺激对照骨骼肌相比, 电刺激恢复 0 min 组骨骼肌 AMPK 172 位苏氨酸残基的磷酸化水平显著上调, 而电刺激恢复 30、60 min 组骨骼肌 AMPK 172 位苏氨酸残基的磷酸化水平没有显著变化。

### 2.2 电刺激促进蛋白酶体泛素连接酶基因的表达

采用 real-time qPCR 的方法检测了电刺激对蛋白酶体泛素化两个主要连接酶 *atrogen-1* 和 *MuRF-1* mRNA 表达的影响, 结果如图 2 所示, 与对侧未刺激对照相比, 电刺激 (恢复 0 min) 可以显著促进小鼠骨骼肌 *atrogen-1* 和 *MuRF-1* mRNA 表达。

### 2.3 电刺激促进自噬相关基因的表达

取对侧对照组和电刺激一侧的小鼠骨骼肌, 提取总 RNA, real-time qPCR 检测自噬相关基因的表达, 其中包括 *CathepsinL*、*Bnip3* 和 *Bnip3l*。结果显示, 与对侧未刺激骨骼肌相比, 电刺激侧恢复 0 min 的骨骼肌中上述基因的 mRNA 水平较对侧未刺激组均有显著升高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ) (图 3)。

### 2.4 电刺激促进骨骼肌自噬

LC3-II 存在于自噬体的内膜里, 直至与溶酶体融合之后才被降解, 因此 LC3-II 改变被当作衡量细

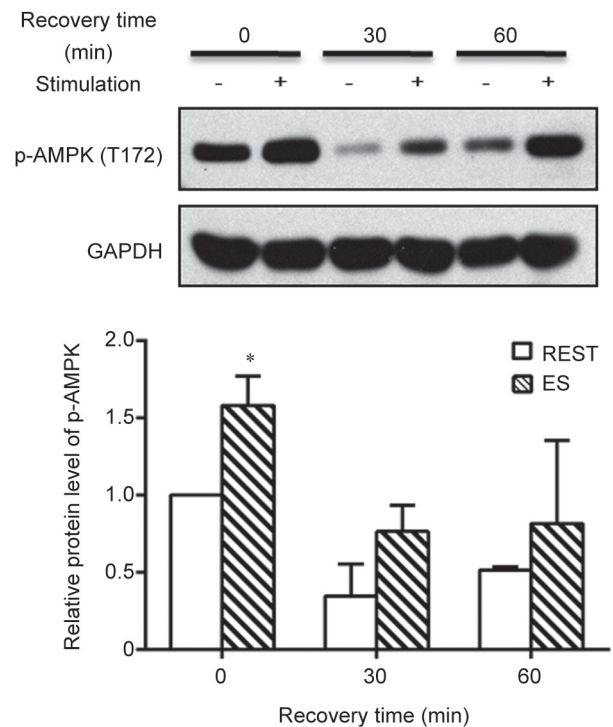


图 1. 电刺激促进骨骼肌 AMPK 活性升高

Fig. 1. Enhanced activity of AMPK in gastrocnemius muscle at different recovery time after electrical stimulation, evidenced by phosphorylation of AMPK. The protein expressions were detected by Western blot, and GAPDH was used as internal control. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs REST. REST: un-stimulated control; ES: electrical stimulation.

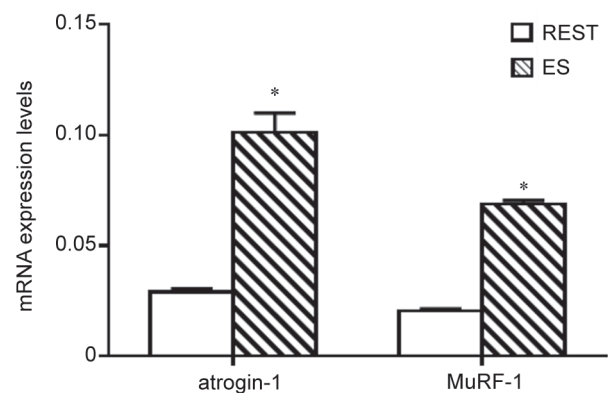


图 2. 电刺激促进蛋白酶体泛素连接酶基因的 mRNA 表达上调  
Fig. 2. Upregulation of atrophy-related and muscle specific genes in mice gastrocnemius muscle following electrical stimulation. The levels of mRNA expressions were detected by real-time qPCR. Data were normalized with *gapdh* content. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs REST. REST: un-stimulated control; ES: electrical stimulation.

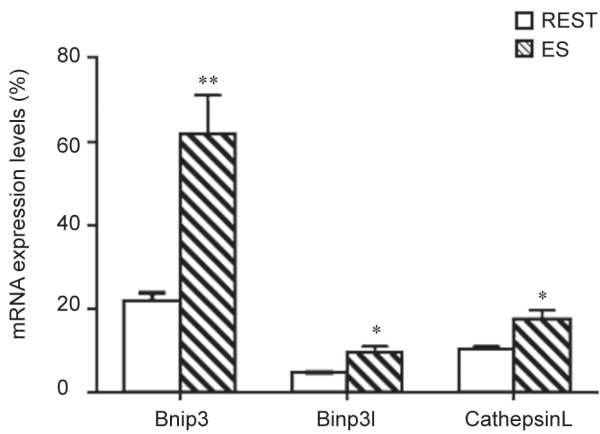


图 3. 电刺激促进自噬相关基因的mRNA表达上调  
 Fig. 3. Upregulation of autophagy-regulatory genes in mice gastrocnemius muscle following electrical stimulation. The levels of mRNA expressions were detected by real-time qPCR. Data were normalized with *gapdh* content. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs REST. REST: un-stimulated control; ES: electrical stimulation.

胞自噬流量的一个标准<sup>[20]</sup>。因此，我们分别检测了电刺激后骨骼肌不同恢复时间(0、30和60 min) LC3 的表达。结果显示，电刺激恢复 0 min 组的电刺激一侧骨骼肌 LC3-II/I 的比值显著高于对侧未刺激组 ( $P < 0.05$ ) (图 4A)。另外，我们也检测了自噬信号通路相关蛋白 p62 和 ULK1 的表达。结果显示，与对侧未刺激对照组相比，电刺激恢复 0 min 组小鼠电刺激一侧骨骼肌中自噬底物 p62 的蛋白表达水平虽有少量降低，但未有显著统计差异；而 pSer555-ULK1 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ) (图 4B)，表明 ULK1 的活性显著升高。

### 2.5 不同月龄小鼠的骨骼肌自噬水平

我们通过 Western blot 方法检测了不同月龄(2、7和24月龄)小鼠骨骼肌中 LC3 的表达。结果如图 5 所示，LC3-II/I 随年龄增长而呈现降低的趋势，但各月龄之间未见显著差异。

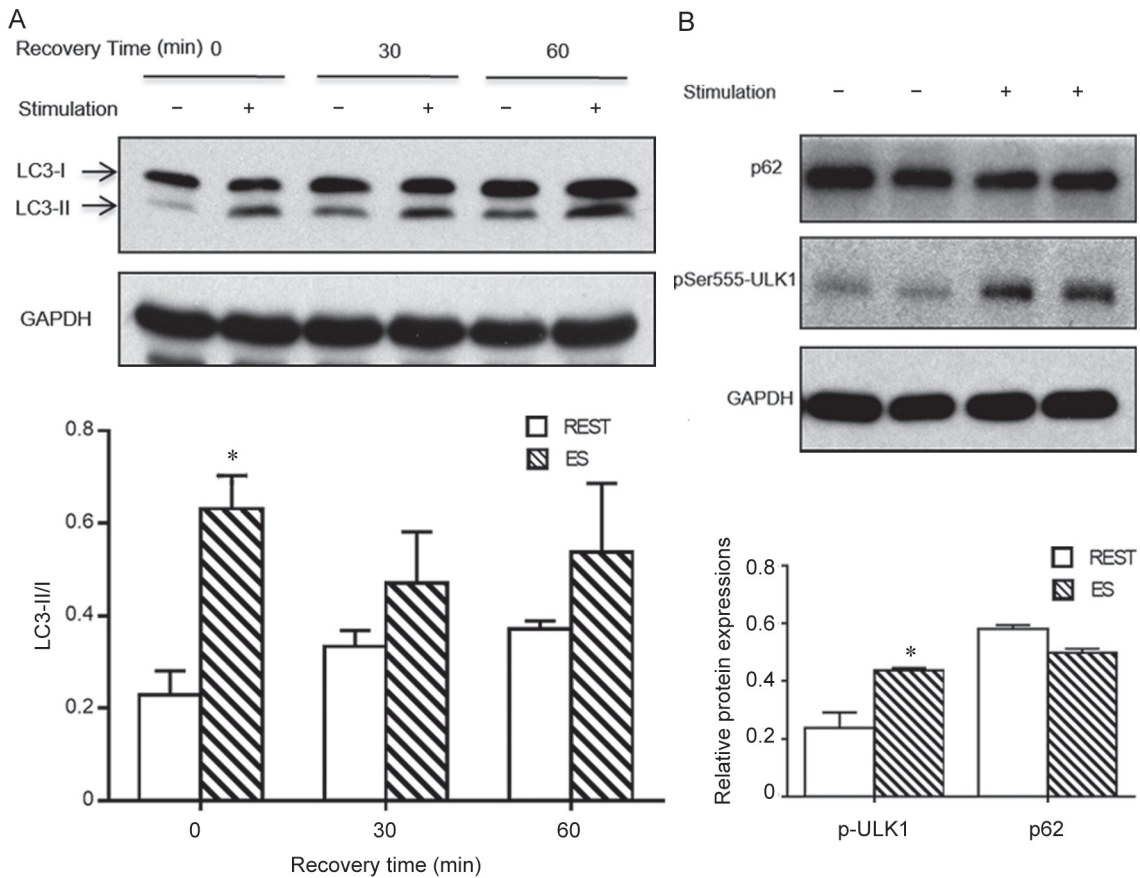


图 4. 电刺激促进骨骼肌自噬  
 Fig. 4. Increased autophagy activity induced by muscle contraction following electrical stimulation. The protein expressions were detected by Western blot. A: Ratio of LC3-II to LC3-I. B: p62 and pSer555-ULK1 protein expressions. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs REST. REST: un-stimulated control; ES: electrical stimulation.

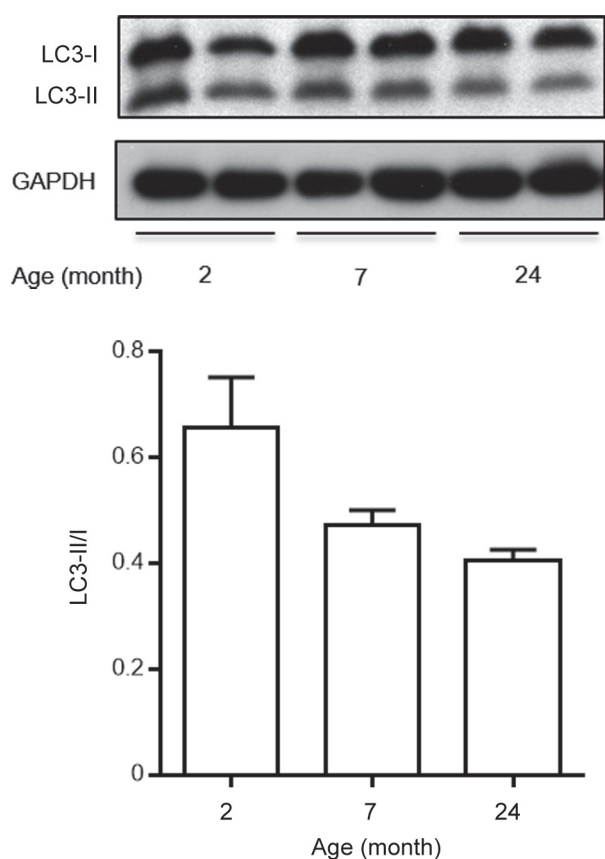


图 5. 不同月龄小鼠骨骼肌的自噬水平

Fig. 5. Activity of skeletal muscle autophagy (LC3-II/I ratio) in mice with different ages. The protein expressions were detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD,  $n = 5$ . \* $P < 0.05$  vs REST.

### 3 讨论

本研究采用 100 Hz 的高频电刺激小鼠坐骨神经的方式使后肢肌肉收缩, 检测骨骼肌的蛋白质分解变化。蛋白质的分解在很大程度上影响肌肉量及肌肉生理功能。电刺激的效果取决于萎缩的形式和电刺激的参数设置(主要是频率以及持续时间)。例如低频率(20 Hz)电刺激后肢悬挂 14 天的小鼠比目鱼肌, 能够通过增加肌卫星细胞的增殖并抑制其凋亡来改善肌肉萎缩时肌卫星细胞减少的现象, 恢复肌肉萎缩时肌卫星细胞的肌肉重塑能力<sup>[21]</sup>。

本研究结果显示, 与对照组相比, 100 Hz 的高频电刺激能够上调骨骼肌蛋白酶体泛素化连接酶基因 *atrogen-1* 和 *MuRF-1* 的 mRNA 表达, 该研究结果与之前报道的在急性运动 24 h 后人骨骼肌蛋白质降解速率增加的结果相一致<sup>[22, 23]</sup>。调控肌肉泛素化连接酶的主要有两条信号途径: 叉头转录因子 FoxO 介导的 Akt/PKB 抑制的信号通路, 当 Akt 水

平降低或者缺失时, FoxO 发生去磷酸化, 并由细胞质移位到细胞核, 从而激活 *atrogen-1* 和 *MuRF-1* 转录活性<sup>[24, 25]</sup>; 另外, 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 诱导的 p38 MAPK 信号通路也能促进 *atrogen-1* 基因表达<sup>[26]</sup>。最近有研究证明 Akt/FoxO3 途径能够调控自噬相关基因 LC3 和 Gabarap 的表达<sup>[27]</sup>。同时, 本研究结果显示, 电刺激骨骼肌之后, 自噬的相关调控基因 *Bnip3*、*Bnip3l* 和 *CathepsinL* 的表达量以及自噬的标志 LC3-II/I (细胞质微管相关蛋白 LC3-I 向自噬体膜相关蛋白 LC3-II 的转化情况) 都显著上调, 该结果与 Levine 小组小鼠跑步机运动所得结果一致: Levine 等<sup>[20]</sup> 研究显示运动能够促进代谢调控过程中多个组织器官的自噬, 其中包括肝脏, 胰脏, 脂肪组织以及骨骼肌。BNIP3 是一个 Bcl-2 相关蛋白, 在体外培养的缺氧心肌细胞中表达量很高; 体内高表达 BNIP3 和 BNIP3l 基因能够促进肌肉自噬作用。并且 FoxO3/BNIP3 信号通路是调控体内骨骼肌自噬的一个主要途径<sup>[28]</sup>。人的肌耐力训练能够上调自噬相关基因以及自噬调节因子的基因表达<sup>[29]</sup>。但是, 也有研究显示小鼠通过跑步机运动 50 min 后骨骼肌 LC3-II 的表达量降低, 但是 *MuRF-1* 的表达量变化与本研究结果一致, 呈显著升高<sup>[30]</sup>。另外, 本研究检测了不同月龄小鼠中的自噬水平, 结果显示自噬水平随年龄增长呈逐渐降低的趋势(图 5), 而促进自噬可以延缓衰老过程, 延长寿命<sup>[31, 32]</sup>, 并且自噬能够改善肌营养不良<sup>[33]</sup>, 因此, 本研究或为衰老伴生的骨骼肌肌肉减少症 (sarcopenia) 的预防与延缓发生提供思路。

另外, 本研究结果显示, 电刺激侧骨骼肌 AMPK 的活性在电刺激之后也比未刺激对照骨骼肌显著升高。AMPK 存在于所有真核生物中, 是 AMP/ATP 能量敏感效应器, 参与调控能量或营养改变时的葡萄糖和脂质代谢。当营养不足或者能量匮乏时, AMPK 被其上游激酶 LKB1 激活<sup>[34]</sup>, 活化的 AMPK 随之磷酸化 ULK1 介导的自噬复合物中的 raptor, 抑制自噬负调节信号通路 mTORC1, 从而诱导自噬<sup>[21]</sup>。此外, 当 mTOR 被抑制, 活化的 ULK1 磷酸化下游信号分子 Beclin-1, 使得自噬复合物 ATG14/PIK3C3/VPS34 活性升高, 最终导致自噬水平升高<sup>[35]</sup>。Sanchez 等的研究证明, AMPK 能够通过激活叉头转录因子 FoxO3 与 ULK1 之间的相互作用从而促进骨骼肌自噬<sup>[36]</sup>。另有研究表明

运动一方面能够通过激活 AMPK, 进而抑制 mTORC1 通路, 从而最终促进自噬; 另一方面, 运动通过抑制 Akt 对 FoxO3 的磷酸化, 使 FoxO3 活性升高, 最终上调其靶基因包括自噬相关基因和泛素化连接酶基因的表达<sup>[29]</sup>。

综上所述, 本研究结果显示, 电刺激方法可使骨骼肌收缩, 引起 AMPK 激酶活性升高, 进而激活下游靶基因及自噬相关蛋白的表达, 最终导致骨骼肌自噬增加。本研究为将来治疗肌病或者延缓衰老伴生的骨骼肌肌肉减少症提供了新靶点和理论参考。

### 参考文献

- 1 Del Roso A, Vittorini S, Cavallini G, Donati A, Gori Z, Masini M, Pollera M, Bergamini E. Ageing-related changes in the *in vivo* function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol* 2003; 38(5): 519–527.
- 2 Scelsi R, Marchetti C, Poggi P. Histochemical and ultrastructural aspects of m. vastus lateralis in sedentary old people (age 65–89 years). *Acta Neuropathol* 1980; 51(2): 99–105.
- 3 De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, Sandri M, Clementi E. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* 2012; 3: e418.
- 4 Shea L, Raben N. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009; 47 Suppl 1: S42–S47.
- 5 Ng KM, Mok PY, Butler AW, Ho JC, Choi SW, Lee YK, Lai WH, Au KW, Lau YM, Wong LY, Esteban MA, Siu CW, Sham PC, Colman A, Tse HF. Amelioration of X-Linked related autophagy failure in Danon disease with DNA methylation inhibitor. *Circulation* 2016; 134(18): 1373–1389.
- 6 Rowland TJ, Sweet ME, Mestroni L, Taylor MR. Danon disease - dysregulation of autophagy in a multisystem disorder with cardiomyopathy. *J Cell Sci* 2016; 129(11): 2135–2143.
- 7 Shemesh A, Wang Y, Yang Y, Yang GS, Johnson DE, Backer JM, Pessin JE, Zong H. Suppression of mTORC1 activation in acid-alpha-glucosidase-deficient cells and mice is ameliorated by leucine supplementation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 307(10): R1251–R1259.
- 8 Masiero E, Sandri M. Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy* 2010; 6(2): 307–309.
- 9 Astokorki AHY, Mauger AR. Transcutaneous electrical nerve stimulation reduces exercise-induced perceived pain and improves endurance exercise performance. *Eur J Appl Physiol* 2017; 117(3): 483–492.
- 10 Gorgey AS, Dolbow DR, Dolbow JD, Khalil RK, Gater DR. The effects of electrical stimulation on body composition and metabolic profile after spinal cord injury--Part II. *J Spinal Cord Med* 2015; 38(1): 23–37.
- 11 Possover M. The LION procedure to the pelvic nerves for recovery of locomotion in 18 spinal cord injured peoples - A case series. *Surg Technol Int* 2016; XXIX: 19–25.
- 12 Zampieri S, Mammucari C, Romanello V, Barberi L, Pietrangelo L, Fusella A, Mosole S, Gherardi G, Hofer C, Lofler S, Sarabon N, Cvecka J, Krenn M, Carraro U, Kern H, Protasi F, Musaro A, Sandri M, Rizzuto R. Physical exercise in aging human skeletal muscle increases mitochondrial calcium uniporter expression levels and affects mitochondria dynamics. *Physiol Rep* 2016; 4(24). pii: e13005. doi: 10.14814/phy2.13005.
- 13 Kern H, Barberi L, Lofler S, Sbardella S, Burggraf S, Fruhmant H, Carraro U, Mosole S, Sarabon N, Vogelauer M, Mayr W, Krenn M, Cvecka J, Romanello V, Pietrangelo L, Protasi F, Sandri M, Zampieri S, Musaro A. Electrical stimulation counteracts muscle decline in seniors. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 189.
- 14 Ju JS, Varadhachary AS, Miller SE, Weihl CC. Quantitation of “autophagic flux” in mature skeletal muscle. *Autophagy* 2010; 6(7): 929–935.
- 15 Hamacher-Brady A, Brady NR, Logue SE, Sayen MR, Jinno M, Kirshenbaum LA, Gottlieb RA, Gustafsson AB. Response to myocardial ischemia/reperfusion injury involves Bnip3 and autophagy. *Cell Death Differ* 2007; 14(1): 146–157.
- 16 Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 2010; 167(3): 588–597.
- 17 Booth FW, Gordon SE, Carlson CJ, Hamilton MT. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *J Appl Physiol* (1985) 2000; 88(2): 774–787.
- 18 Derave W, Ai H, Ihlemann J, Witters LA, Kristiansen S, Richter EA, Ploug T. Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes* 2000; 49(8): 1281–1287.
- 19 Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 2007; 449(7161): 496–500.
- 20 He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, An Z, Loh J, Fisher J, Sun Q, Korsmeyer S, Packer M, May HI, Hill JA, Virgin HW, Gilpin C, Xiao G, Bassel-Duby R,

- Scherer PE, Levine B. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature* 2012; 481(7382): 511–515.
- 21 Guo BS, Cheung KK, Yeung SS, Zhang BT, Yeung EW. Electrical stimulation influences satellite cell proliferation and apoptosis in unloading-induced muscle atrophy in mice. *PLoS One* 2012; 7(1): e30348.
- 22 Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundersen DM, Timmerman KL, Walker DK, Volpi E, Rasmussen BB. Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68(5): 599–607.
- 23 Phillips SM, Tipton KD, Aarsland A, Wolf SE, Wolfe RR. Mixed muscle protein synthesis and breakdown after resistance exercise in humans. *Am J Physiol* 1997; 273(1): E99–E107.
- 24 Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; 294(5547): 1704–1708.
- 25 Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004; 117(3): 399–412.
- 26 Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005; 19(3): 362–370.
- 27 Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; 18(1): 39–51.
- 28 Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. *Cell Metab* 2007; 6(6): 458–471.
- 29 Jamart C, Benoit N, Raymackers JM, Kim HJ, Kim CK, Francaux M. Autophagy-related and autophagy-regulatory genes are induced in human muscle after ultraendurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 2012; 112(8): 3173–3177.
- 30 Kim YA, Kim YS, Song W. Autophagic response to a single bout of moderate exercise in murine skeletal muscle. *J Physiol Biochem* 2012; 68(2): 229–235.
- 31 Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011; 146(5): 682–695.
- 32 Madeo F, Tavernarakis N, Kroemer G. Can autophagy promote longevity? *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 842–846.
- 33 Grumati P, Coletto L, Sandri M, Bonaldo P. Autophagy induction rescues muscular dystrophy. *Autophagy* 2011; 7(4): 426–428.
- 34 Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(8): 563–575.
- 35 Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013; 15(7): 741–750.
- 36 Sanchez AM, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Gay S, Bernardi H, Candau R. AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem* 2012; 113(2): 695–710.