

综述

亮氨酰-tRNA合成酶在调控衰老骨骼肌蛋白质合成中的作用与机制

夏志^{1, #}, 尚画雨^{2, #}, 王前进¹, 赵艳¹, 丁孝民^{1, *}

¹井冈山大学体育学院, 吉安 343009; ²成都体育学院运动医学与健康学院, 成都 610041

摘要: 蛋白质代谢平衡紊乱是诱发骨骼肌萎缩的根本原因, 蛋白质合成减少则直接导致衰老性骨骼肌萎缩的发生与发展。亮氨酰-tRNA合成酶(leucyl-tRNA synthetase, LeuRS)的经典功能是催化亮氨酸与其同工tRNA之间连接形成氨基酰, 在生物体内遗传解码过程中具有重要作用。随着近年对LeuRS蛋白研究的深入, 人们认为其可能通过行使非经典功能而在衰老骨骼肌蛋白质代谢稳态调节中发挥关键作用。本文综述了氨基酰-tRNA合成酶和LeuRS的结构与生物学特性, 并重点对LeuRS作为细胞内亮氨酸传感器调控衰老骨骼肌细胞蛋白质合成的研究进展进行总结, 分析了LeuRS响应运动与氨基酸摄入等合成代谢刺激, 活化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)信号转导通路的作用机制, 以期对衰老性骨骼肌萎缩的预防和诊治提供新的思路。

关键词: 亮氨酰-tRNA合成酶; 衰老; 骨骼肌蛋白质合成; 衰老性骨骼肌萎缩; 雷帕霉素靶蛋白复合物1

中图分类号: R3; Q4; Q5

The role and mechanism of leucyl-tRNA synthetase in the regulation of protein synthesis in aging skeletal muscle

XIA Zhi^{1, #}, SHANG Hua-Yu^{2, #}, WANG Qian-Jin¹, ZHAO Yan¹, DING Xiao-Min^{1, *}

¹College of Physical Education, Jinggangshan University, Ji'an 343009, China; ²School of Sports Medicine and Health, Chengdu Sport Institute, Chengdu 610041, China

Abstract: The imbalance of protein metabolism is the major cause of skeletal muscle atrophy, and the decrease of protein synthesis directly leads to the occurrence and development of age-related sarcopenia. The canonical role of leucyl-tRNA synthetase (LeuRS) is ligating leucine to the cognate tRNA, and thus it plays a central role in genetic coding. With the further studies of LeuRS in recent years, LeuRS has been found to control protein homeostasis in aging skeletal muscle via its non-canonical role. In this paper, we reviewed the structure and biological features of aminoacyl-tRNA synthetase and LeuRS, and summarized the recent advances in studies on the effects of LeuRS in regulating aging skeletal muscle protein synthesis as an intracellular leucine sensor. Moreover, we also analyzed the potential role of LeuRS in activation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling transduction pathway in response to anabolic stimuli such as exercise and amino acids ingestion. This paper may provide some new ideas for the prevention, diagnosis and treatment of age-related sarcopenia.

Key words: leucyl-tRNA synthetase; aging; skeletal muscle protein synthesis; age-related sarcopenia; target of rapamycin complex 1

Received 2019-09-22 Accepted 2019-12-26

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31960192, 31900842), the Natural Science Foundation of Jiangxi Province, China (No. 20192BAB205081, 20202ACBL216004), the Science and Technology Foundation of Jiangxi Provincial Department of Education, China (No. GJJ180560) and the Humanities and Social Sciences Foundation in Higher Institutions of Jiangxi Province, China (No. TY17210).

[#]These authors contributed equally to this review.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-796-8115890; E-mail: dingxiaomin@126.com

衰老性骨骼肌萎缩 (age-related sarcopenia) 是一种发生在老龄人群中的骨骼肌萎缩与功能衰退现象, 发病率随年龄增长而升高^[1]。目前临床对于衰老性肌萎缩的治疗仍无公认标准与指引, 现有药物及干预手段亦未能有效应对其发生与发展。近年来, 人们逐渐意识到其防治应考虑患者的骨骼肌合成抵抗 (age-related anabolic resistance) 特点, 即随衰老而出现的对摄食、体力活动等主要合成代谢刺激的肌肉蛋白质合成反应削弱现象, 并认为营养感应削弱是诱发合成抵抗的直接影响因素^[2]。作为临床康复的主要手段, 运动 (尤其是抗阻运动) 可显著增加肌肉蛋白质合成率。目前认为, 运动可能有效增强骨骼肌组织对氨基酸等营养刺激的敏感性并改善合成抵抗, 但相关研究方兴未艾, 其作用与机制并不清楚^[1,3,4]。

亮氨酸摄入量是骨骼肌感应营养刺激促进合成代谢反应的关键因素^[5,6]。越来越多的研究表明, 氨酰-tRNA 合成酶 (aminoacyl-tRNA synthetase, aaRS) 尤其是亮氨酰-tRNA 合成酶 (leucyl-tRNA synthetase, LeuRS) 可能通过其非经典功能调节骨骼肌营养感应, 从而对衰老骨骼肌蛋白质合成产生重要影响, 本文对相关最新研究进展进行综述, 以期探寻衰老性骨骼肌萎缩发生的新机制及防治的新策略, 并为相关靶点在临床转化医学领域的应用提供有益参考。

1 aaRS概述

aaRS 是维持生物体稳态所不可或缺的一类关键酶^[7]。aaRS 结构复杂, 通常分为 α_1 、 α_2 、 α_4 和 $\alpha_2\beta_2$ 四种分子形式, 单链分子量介于 30 000~110 000 之间^[8]。根据一级序列中的特征结构基序与催化功能域拓扑结构, 可将 20 种 aaRS 分为两类, 分别特异性催化 20 种天然氨基酸在其对应 tRNA 3'-端的氨基酰化^[9]。第一类 aaRS 的催化活性中心由专门结合核苷酸的 Rossmann 折叠组成, 含“HIGH”和“KMSKS”两段保守的标签序列, 且通常拥有较大的、具有编校功能的 CP1 结构域 (约含 250~275 个氨基酸残基)^[10]; 第二类 aaRS 则由 7 股反向平行的 β -折叠组成, 共享 3 个特征基序^[11]。通常认为, 在高等真核生物中 LeuRS 与异亮氨酰-、蛋氨酰-、谷氨酰胺酰-、赖氨酰-、精氨酰-、天冬氨酰-、谷氨酰-和脯氨酰-tRNA 合成酶共计 9 种及 AIMP1/p43、AIMP1/p38 和 AIMP1/p18 共 3 种非酶蛋白质辅助因子共同构成多 tRNA 合成酶复合体 (multi-

tRNA synthetase complex, MSC) 而发挥调节功能^[12,13]。最近, Zhou 等通过酵母双杂交和免疫共沉淀实验确证, 一种与苏氨酰-tRNA 合成酶高度类似的蛋白 ThrRS-L 也是 MSC 的成员之一, 可与 p43 及精氨酰-tRNA 合成酶互作^[14]。

长期以来, 关于 aaRS 的研究主要集中于对其经典生物学功能的探讨, 即其在生物体遗传解码中的作用。一般而言, aaRS 可精确地催化含有三联反密码子的 tRNA 与其对应氨基酸发生氨酰化反应, 使有确定序列的蛋白质在多聚核糖体上形成, 生物体遗传信息得以准确传递。除精氨酰-tRNA 合成酶、谷氨酰-tRNA 合成酶与谷氨酰胺酰-tRNA 合成酶之外, 其它 aaRS 所催化的氨酰化反应均包括了 aaRS 催化特异性氨基酸活化及活化后氨基酸向对应 tRNA 转移这两个步骤^[8], 这是蛋白质合成的起始环节, 可以确保后续反应的高度精确性, 在蛋白质合成的质量控制中具有重要作用。具体反应如下: (1) 氨基酸活化: 氨基酸 + 酶 + ATP \rightleftharpoons 氨基酸·酶 - AMP + 焦磷酸; (2) 氨基酸转移: 氨基酸·酶 - AMP + tRNA \rightleftharpoons 氨基酸-tRNA + AMP。

尽管有这一精确控制的翻译机制, 但由于环境中往往存在一些与同源氨基酸具有相似结构的氨基酸和/或代谢产物, 因此 aaRS 亦有可能难以准确识别对应氨基酸, 从而导致合成蛋白质时在多肽链中掺入错误氨基酸, 合成序列与构象异常甚至不能折叠的蛋白质, 最终诱发细胞凋亡^[15]。为确保翻译的精确, aaRS 进化出了一种“双筛 (double-sieve)”机制用于清除非特异性氨基酸: 在氨基酸活化步骤中即可通过催化结构域识别不同氨基酸, 尽量避免氨基酸的误活化; 而对于结构高度相似的氨基酸 (如亮氨酸与正缬氨酸等), aaRS 则可通过 CP1 结构域水解这些误活化 (转移前编校) 和/或误氨酰化 (转移后编校) 的氨基酸, 进一步确保翻译的准确^[16,17]。

自 2012 年起, 人们逐渐认识到 aaRS 除了将特异性氨基酸连接至其同工 tRNA 这一经典功能之外, 还可能通过行使非经典功能而在细胞调节过程中发挥多种作用, 如: rRNA 合成、翻译与转录调控、信号转导、炎症反应、癌症的发生与发展等^[12,18]。尽管近年兴起的 aaRS 非经典功能研究极大地丰富了对这一类生物进化过程中的“化石”分子的理解, 但由于相关研究工作起步较晚, 因此目前对于此类功能的认知仍然极为有限。在国内, 主要有中国科学院生物化学与细胞生物学研究所王恩多院士团队

致力于此方面的探讨，而国际上则主要有韩国汉城大学 Kim 教授与瑞士弗里堡大学 De Virgilio 等学者进行相关研究，目前关注的热点之一是 LeuRS 作为胞内亮氨酸传感器 (leucine sensor) 的功能与机制。

2 LeuRS的结构与生物学特性

LeuRS 是 aaRS 家族成员之一，其国际酶分类编号为 EC 6.1.1.4，通过催化生成蛋白质合成底物亮氨酸酰而参与生物体遗传信息的翻译。LeuRS 基因 (亦称 AW536573、2310045K21Rik 或 3110009L02Rik 等) 定位于染色体 5q32，编码胞浆和核体中广泛表达的对应蛋白 (图 1)^[19]。

LeuRS 分子量仅有 134 kDa，是质量较小的蛋白质。但是，由于其属于 aaRS 分类中第 1 类的 A 亚类，因此含有一个由 264 个氨基酸残基组成的较大 CP1 结构域作为编校活性中心插入合成活性中心，行使转移后编校功能，水解误活化的氨酰 -AMP 与氨酰 -tRNA。此外，LeuRS 还拥有氨酰化结构域用于氨基酸活化和转移，一个靠近 C 末端的 tRNA 结合域用于识别并结合其特异性 tRNA^[20, 21]。在真核生物中，LeuRS 的 N 末端与 C 末端还拥有一个延伸结构，而在大肠杆菌等原核生物中则不存在此结构^[21]。

如前所述，aaRS 的经典功能是催化氨基酸与其同工 tRNA 之间的氨酰化反应而生成相应的氨

酰 -tRNA，从而为蛋白质合成提供原料。就 LeuRS 而言，就是负责催化亮氨酸与 tRNA^{Leu} 反应生成 L-亮氨酸酰 -tRNA^{Leu}。鉴于这一反应在遗传信息精确翻译中的重要作用，此前关于 LeuRS 的基础研究均集中于对其遗传解码功能的探讨。异亮氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、正缬氨酸及 α -氨基丁酸等的结构均与亮氨酸相似。尽管 LeuRS 对蛋氨酸、正缬氨酸和 α -氨基丁酸的米氏常数值 (酶促反应达最大速度一半时的底物浓度) 较亮氨酸高 28 倍之多，但 Chen 等此前的报道表明包括异亮氨酸、蛋氨酸、正缬氨酸和 α -氨基丁酸在内的多种其它氨基酸均可被 LeuRS 错误氨酰化从而影响其催化的特异性^[22]。若蛋白质合成过程中在亮氨酸密码子上掺入错误氨基酸，可使其通过蛋白质翻译系统整合进入新生多肽链，并在核糖体上合成序列与构象异常甚至不能折叠的蛋白质，大量此类蛋白质在胞内的生成与集聚将使得细胞生长滞缓，并最终导致细胞凋亡^[15, 23]。正是由于存在这一错误识别和错误氨酰化的可能性，LeuRS 在漫长的进化过程中形成了可执行编校功能的编校结构域。误活化氨基酸在氨酰化活性中心内转移至 tRNA 3'-端生成相应的误活化氨酰 -tRNA，随后通过 tRNA 3'-端的分子内摆动将其从合成活性中心转移至编校活性中心进行进一步的校验，误活化氨酰 -tRNA 将直接被编校活性中心水解^[20]。

LeuRS 是真核细胞生物 MSC 的成员之一。Park 等在 2008 年撰文指出，除参与蛋白质合成之外，MSC 中的成员均拥有其各自的非经典功能。由于在正常生理条件下不需行使此类功能，因此在进化中将其聚集形成复合物而限制非经典功能的发挥。但是，在特殊环境刺激下各成员仍可从复合物中游离出来继续行使其非经典功能^[13]。直至 2012 年，Kim 研究组的 Han 博士与 De Virgilio 研究组的 Bonfils 博士分别在 *Cell*^[24] 与 *Molecular Cell*^[25] 期刊上撰文，不仅首次提出 LeuRS 是人雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (target of rapamycin complex 1, TORC1) 胞内亮氨酸的传感器，而且解析了 LeuRS 与 TORC1 的互作位点，认为其可通过编校结构域的不同构象感应亮氨酸水平进而调控 TORC1 通路。中国科学院生物化学与细胞生物学研究所林其谁院士迅速在《生命科学》以快报形式报道了此两项进展^[26]，并由谭敏博士对 LeuRS 的非经典功能进行了系统综述^[21]。自此，学术界掀起了探究 LeuRS 经 TORC1 途径调控蛋白质合成作用与机制的热潮。

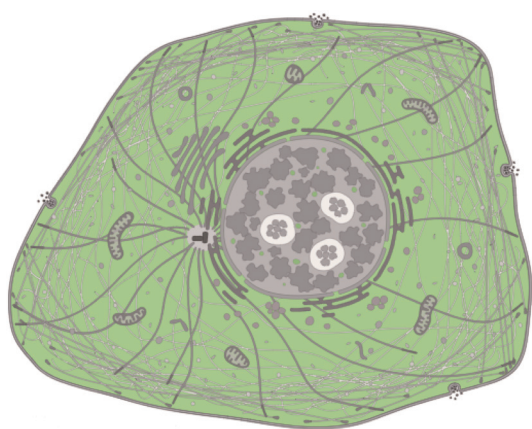


图 1. LeuRS的胞内定位与表达

Fig. 1. The intracellular location and expression of LeuRS. The green color represents the distribution of LeuRS in the cytosol and nuclear bodies. The figure was reproduced from Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org) with permission^[19]. Image available at the following URL: v19.proteinatlas.org/EN-SG00000133706-LARS/cell.

3 LeuRS介导调节衰老骨骼肌蛋白质合成的作用与机制

3.1 调节骨骼肌蛋白质合成的关键分子与途径

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是存在于哺乳动物中的一种结构与功能均高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 与多种亚基一同形成两种复合体形式, 即 mTORC1 与 mTORC2。其中, mTORC1 由 mTOR、Raptor (regulatory associated protein of TOR)、mLST8/Gβ1 (mammalian ortholog of LST8) 及几个非核心亚基构成, 是骨骼肌响应合成代谢刺激、调节蛋白质合成与适应性肥大的关键信号分子^[27]。mTORC1 可协调包括生长因子、胞内氨基酸可利用率以及能量状态变化等多种上游信号的刺激, 直接参与蛋白质合成、细胞自噬与生长等正常生理过程^[28, 29], 同时亦在癌症、肥胖、糖尿病、衰老性肌萎缩等病理过程的发生与发展中发挥重要作用^[30, 31]。

衰老性骨骼肌萎缩由骨骼肌蛋白质代谢平衡的紊乱所致, 主要表现为蛋白质合成水平的下降。就衰老骨骼肌蛋白质合成而言, mTORC1 可响应营养 (尤其是亮氨酸) 及机械信号 (如运动) 刺激, 并通过磷酸化或抑制磷酸酶而直接或间接活化其下游靶蛋白真核翻译起始因子 4E 结合蛋白 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4E-BP1) 与 p70s6k (phosphorylated 70-kDa ribosomal S6 kinase)。作为 eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) 的抑制剂, 4E-BP1 被活化后可使其解离并结合 eIF4G (eukaryotic translation initiation factor 4G) 与 eIF4A (eukaryotic translation initiation factor 4A), 形成对蛋白质翻译至关重要的 eIF4F 复合物。p70s6k 的活化则会导致核糖体蛋白 S6 的磷酸化激活, 进而促进 5'-端含末端寡聚嘧啶结构的一类特殊 mRNAs 的翻译能力增强^[32]。因此, mTORC1/p70s6k/4E-BP1 通路对运动与亮氨酸刺激的响应性直接影响着其抗衰老性肌萎缩效应^[33, 34]。

由于 mTORC1 复合物可以调节蛋白质合成与核糖体生物发生, 且两个过程均需大量氨基酸参与, 因此氨基酸可利用率很可能是 mTORC1 信号转导的限速环节。然而, 尽管早在十年前即已提出这一假说, 但氨基酸 (尤其是亮氨酸) 活化 mTORC1 复合物的分子机制迄今仍未阐明。

3.2 LeuRS介导的mTORC1活化与蛋白质合成

骨骼肌感应营养刺激的合成代谢反应取决于摄

入的亮氨酸含量, 因其不仅是蛋白质合成底物, 同时也作为信号分子直接参与合成代谢调节^[5], 且这一作用比其它氨基酸强 10 倍^[35]。mTORC1 信号的胞内诱导与传递功能障碍是诱发衰老骨骼肌营养感应衰退的关键机制^[2], 活化的 mTORC1 可刺激骨骼肌蛋白质合成与适应性肥大, 且其活化水平直接影响衰老性肌萎缩的干预效应^[33, 34]。

Rag GTPases (ras-associated GTPases) 已被证明是 mTORC1 响应氨基酸刺激的调节介质^[36, 37]。Rag GTPases 是一类催化鸟苷二磷酸 (guanosine diphosphate, GDP) 向鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 转化的小 G 蛋白。哺乳动物细胞可表达四种 Rag GTPases, 分别为 RagA、RagB、RagC 和 RagD^[38, 39]。RagA-RagC、RagB-RagD 二聚体调节不同氨基酸诱导的 mTORC1 活化。响应氨基酸尤其是亮氨酸刺激时, mTORC1 将从胞质内转位至溶酶体表面, 与装载 GTP 的 RagB 和装载 GDP 的 RagD 所形成的活化态二聚体在溶酶体产生互作 (图 2A)^[40, 41]。GTPases 需结合 GTP 方具有活性, 结合 GDP 时则处于非活性状态, 不能控制胞内信号转导通路。因此, 鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) 因为能够促进 GDP 向 GTP 转化, 从而正性调节此类小 G 蛋白; 而 GTP 酶活化蛋白 (GTPase-activating protein, GAP) 则刺激 GTP 水解, 具有负性调节作用。此外, 鸟苷酸解离抑制因子 (guanine nucleotide dissociation inhibitor, GDI) 由于能够和此类小 G 蛋白形成稳定的复合物, 因此同样发挥负性调节效应^[42]。但是, Rag GTPases 的 GTP-GDP 转化循环究竟如何协同调节亮氨酸活化的 mTORC1 信号转导, 一直仍未彻底阐明, 直至 2018 年 Lee 等发现 Rag 二聚体在亮氨酸信号传递过程中存在如下动力学变化: RagD GTP-RagB GDP → RagD GDP-RagB GDP → RagD GDP-RagB GTP → RagD GDP-RagB GDP → RagD GTP-RagB GDP, 从而提出 RagB-D 动态模型 (图 2B)^[43]。尽管 mTORC1 对亮氨酸水平的变化高度敏感, 其本身却并非亮氨酸传感器, 不能感应骨骼肌细胞内亮氨酸含量高低, 从而说明在 mTORC1 响应亮氨酸等营养刺激, 促进骨骼肌蛋白质合成并诱导适应性肥大的过程中, 亮氨酸传感器必然作为限速环节参与其中, 但究竟何种蛋白作为衰老骨骼肌亮氨酸传感器参与调节? 如何参与调节? 以上问题尚没有答案。

迄今, 已经鉴定出 LeuRS^[24] 与 Sestrin2^[44] 两种

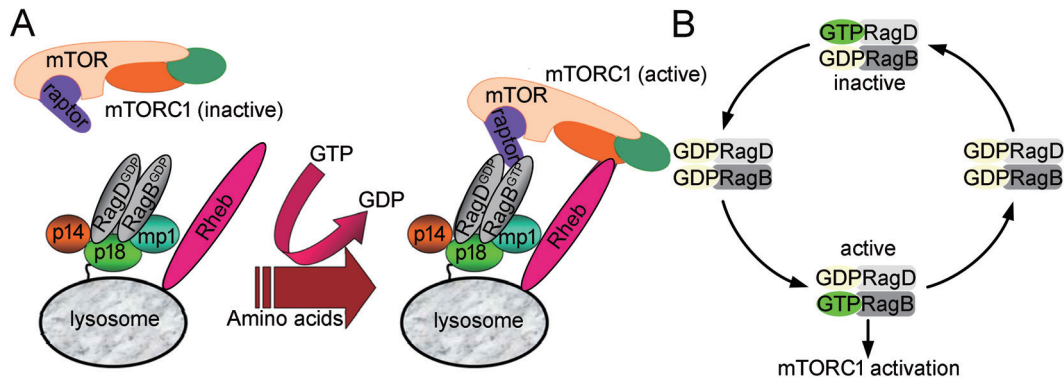


图 2. 氨基酸经Rag GTPases诱导mTORC1溶酶体转位和活化以及RagB-D动态模型

Fig. 2. Amino acids induced lysosomal translocation and activation of mTORC1 mediated by Rag GTPases (A). B: The kinetic model of the RagD-RagB GTPase cycle during amino acids signaling. Amino acids stimulate the formation of RagB GTP-RagD GDP heterodimers, and, in turn, stimulate the association of the Raptor subunit of mTORC1 with the Rag-Ragulator complex. The resulting complex promotes the interaction of mTORC1 with active Rheb GTP, which stimulates mTORC1 kinase activity. The inset A was reproduced from reference^[41] with permission.

亮氨酸传感器，二者均经 Rag GTPases 介导调节 mTORC1。其中，LeuRS 与无活性的 RagD-GTP 直接结合并作为其 GAP 将 GTP 水解为 GDP，使处于失活态的 GTP RagD-GDP RagB 复合物转化为活化前期二聚体 GDP RagD-GDP RagB，进而由 LAMTOR1-5 所构成的 Ragulator 复合物作为 GDP RagB 的 GEF 促使其释放 GDP 并结合 GTP，形成活化态二聚体 GDP RagD-GTP RagB，激活 mTORC1 并使其转位至溶酶体表面。Sestrin2 功能则与 LeuRS 相反，其通过对 Rag GTPases 二聚体行使 GDI 或

GAP 功能负向调节 mTORC1 活性 (图 3)。由于 LeuRS 的亮氨酸米氏常数与 Sestrin2 的亮氨酸解离常数相近，LeuRS 与 Sestrin2 究竟是独立还是协同调节 Rag GTPases？目前尚不清楚。但需要指出的是，近期采用衰老小鼠骨骼肌^[45]与心肌^[46]所进行的研究报道均显示，Sestrin2 在两种组织中的功能表达随衰老而降低。鉴于 Sestrin2 对 mTORC1 的负向调节作用^[44, 47]，若 Sestrin2 在衰老机体亮氨酸感应与蛋白质代谢调节过程中发挥重要的协同调节作用，则显然应在骨骼肌与心肌中观察到更为显

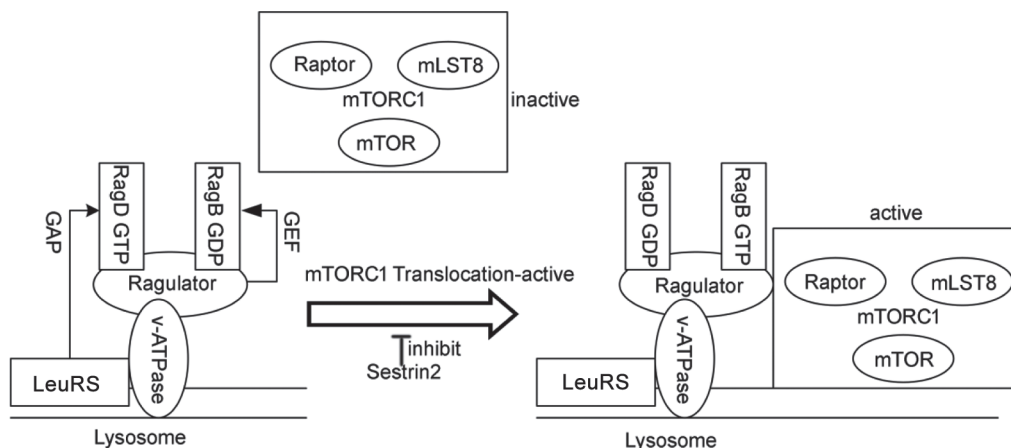


图 3. LeuRS在mTORC1活化中的可能性作用

Fig. 3. Potential role of LeuRS in mTORC1 activation. The schematic representation shows the coordination model of the Rag GTPase cycle by LeuRS, Ragulator, and Sestrin2. LeuRS appears to be the active regulator for the formation of RagB GTP-RagD GDP heterodimers in active state, while Sestrin2 appears to be the negative regulator.

著的 mTORC1 功能活性, 但实际并非如此。因此, 我们推测 Sestrin2 与 LeuRS 可能是在哺乳动物生命周期中的不同阶段发挥作用。Sato 等在 C2C12 肌管细胞上的研究显示, 采用 siRNA 敲减 LeuRS 后, 尽管下调了 LeuRS 的基因与蛋白表达, 但对于 mTOR 的磷酸化水平却并无影响^[48]。因此该研究组亦认为这一现象可能反映了 Sestrin2 作为另外一种细胞内亮氨酸传感器介导了分化期肌管感应亮氨酸的补偿机制。如前所述, LeuRS 与 Sestrin2 对亮氨酸的亲合力接近, 尽管目前尚未明确这两种亮氨酸传感蛋白究竟如何协调或协同进行组织内亮氨酸水平感应进而活化 mTORC1 信号转导, 但就目前的研究证据而言, 有理由相信这两种蛋白可在骨骼肌细胞的不同发育阶段分别发挥作用。

骨骼肌 LeuRS 功能表达随衰老而发生的变化迄今未见报道。但 Takahashi 研究组早期的系列研究表明: BDF1 小鼠和 Fischer 344 大鼠的脑、肾脏与肝脏中 LeuRS 的不耐热酶 (heat-labile enzymes) 比例会随衰老而由 0~20% 增长至 25%~40%^[49, 50]。这一变化可能是由氧化损伤所致, 此类耐热性发生改变的蛋白质大量集聚, 将使 LeuRS 功能活性下降^[51]。该研究组亦提出, 在某组织中只要有一种酶成为不耐热酶则其它酶可发生相同变化, 且该酶在其它组织中亦会表现出不耐热特性^[50]。因此, 我们认为 LeuRS 的功能表达可能是随衰老而呈降低的趋势。若 LeuRS 与 Sestrin2 分别在老年期与青年期作为主要的亮氨酸传感器调控 mTORC1 信号转导, 则 LeuRS 功能表达的下降在理论上是可信的, 即: 衰老骨骼肌 LeuRS 功能表达下调导致 mTORC1 底物磷酸化水平下调, 从而使得蛋白质代谢失衡, 最终诱发骨骼肌萎缩。而通过运动和 / 或营养干预刺激 LeuRS 功能表达则可能改善这一变化, 增强衰老骨骼肌营养感应, 削弱合成抵抗, 进而维持骨骼肌质量甚至诱导肥大性变化。但是, LeuRS 增龄性变化究竟如何, 是否经此机制诱发下游分子事件, 尚有待直接实验证据予以证实。

3.3 运动与营养支持对衰老骨骼肌 LeuRS 功能表达的影响

目前, 结合康复运动与营养支持的多模式、非药物干预手段在衰老性骨骼肌萎缩防治领域中倍受关注^[2, 52]。运动与营养支持 (尤其是蛋白质与氨基酸补剂) 是强有力的蛋白质合成刺激^[53], 抗阻力量训练可使衰老骨骼肌体积增长高达 21%, 肌力增幅

则可达 90%^[54]; 越来越多的研究指出有氧运动与同期训练 (concurrent training, 一种将有氧与抗阻运动安排在相同训练时期的训练模式) 亦可诱导衰老骨骼肌蛋白质合成与肥大^[55], 本研究组前期的研究结果亦佐证了这一观点^[4, 56, 57]。就营养支持而言, 乳清蛋白与必需氨基酸则均具有改善衰老骨骼肌蛋白质平衡的重要潜力^[58]。相比之下, 运动联合营养支持可最大化衰老骨骼肌合成反应, 产生较单一运动干预或营养支持更为显著的正性蛋白质平衡、骨骼肌肥大及功能促进作用^[4, 59–61]。

目前未见运动对于 LeuRS 功能表达影响的研究报道, 而关于蛋白质和 / 或氨基酸营养干预对其影响的报道亦仅见两项。Carlin 等研究显示, 青年被试经彻夜禁食后摄入 13 g 必需氨基酸 (含 2.4 g 亮氨酸), 1 和 3 h 后 LeuRS 的基因表达与蛋白表达较基线水平均无变化, RagB 表达水平在摄入 3 h 后显著上调, 而 mTOR^{ser2448} 磷酸化表达与蛋白质合成率则均在摄入后 1 h 达峰值, 在一定程度上佐证了 LeuRS 在青年骨骼肌中并非主要亮氨酸传感器这一观点^[62]。有趣的是, Zeng 等对 26 名老年男性被试分别给予 10 周每天 0.8 和 1.6 g/kg 剂量膳食蛋白质干预, 发现膳食干预导致 LeuRS 基因表达出现下调趋势 ($P = 0.055$), 对 mTORC1 信号转导没有明显作用; 膳食干预还导致 RPS6 (ribosomal protein S6) 蛋白总量增加, 他们认为这表明被试骨骼肌蛋白质翻译能力增强, 从而能够维持肌肉质量^[63]。Zeng 等的研究是目前唯一一项衰老骨骼肌 LeuRS 响应蛋白质营养干预的研究, 其结果与公认的推论相悖, 但需要指出的是, 该研究客观上亦存在一定的不足: (1) 所选取的被试习惯性摄入高蛋白质膳食, 平均剂量约为每天 1.1~1.2 g/kg, 不仅超过目前 19 岁以上成人蛋白质每日建议摄入量 (0.8 g/kg), 且已超过了新西兰老年男性公民每天 1.0 g/kg 的平均摄入量, 与近年所提出的老年人每日建议摄入量相当^[64]; (2) 未明确所采用的高蛋白质膳食中完全蛋白质和不完全蛋白质的结构比例; (3) 研究并未检测骨骼肌蛋白质合成速率, 仅通过 RPS6 蛋白表达量间接推测骨骼肌蛋白质翻译能力增强。因此, 此项研究结果的客观性和准确性需要进一步验证。

在后续相关研究中, 亟待探明 LeuRS 蛋白表达对一次性和慢性有氧运动、抗阻运动、高强度间歇运动、同期训练等不同类型运动干预, 及蛋白质与必需氨基酸等营养干预的适应性反应, 并采用同位

素示踪手段评估被试的蛋白质合成水平变化, 从而确证运动和 / 或营养干预靶向 LeuRS 的蛋白质合成调控效应。此类研究不仅有望揭示衰老性骨骼肌萎缩发生的新机制, 同时亦可为相关靶点在临床转化医学领域的应用提供可参考的理论依据。

4 总结与展望

蛋白质代谢平衡紊乱是诱发骨骼肌萎缩的根本原因^[33], 蛋白质合成减少则直接导致衰老性肌萎缩的发生与发展^[34]。改善衰老骨骼肌净蛋白质平衡, 促进蛋白质沉积, 是防治衰老性骨骼肌萎缩的重要研究方向。然而, 由于营养感应削弱及后续合成抵抗现象随衰老进程的加剧而愈发明显, 可能直接影响运动和 / 或营养支持通过促进蛋白质合成而改善衰老性骨骼肌萎缩的干预效果, 并使得现有基础研究结果往往相互矛盾。因此, 如何增强衰老骨骼肌对运动与营养支持等合成代谢类刺激的响应与感应, 进而改善或逆转合成抵抗, 将是后续研究的关键领域。

理论上而言, Sestrin2 可能并非衰老骨骼肌响应蛋白质合成刺激的传感器, 该作用应主要由 LeuRS 执行或由 LeuRS 与 Sestrin2 共同执行、协同整合。鉴于目前的相关研究仍近乎于空白, 若能在衰老骨骼肌中证实 LeuRS 可以通过活化态 RagD-B 二聚体介导诱发 mTORC1 溶酶体转位与活化, 则可能为衰老性骨骼肌萎缩的防治提供新的干预靶点, 并有助于开发新的干预手段。未来研究可通过基因技术条件性敲除、敲减、抑制和过表达相关基因, 观察衰老骨骼肌响应合成代谢刺激时的蛋白质合成水平变化, 探明 LeuRS 在运动和 / 或营养支持干预衰老性骨骼肌萎缩中的具体作用与分子机制。

参考文献

- 1 Liao Y, Peng Z, Chen L, Zhang Y, Cheng Q, Nussler AK, Bao W, Liu L, Yang W. Prospective views for whey protein and/or resistance training against age-related sarcopenia. *Ageing Dis* 2019; 10(1): 157–173.
- 2 Wilkinson DJ, Piasecki M, Atherton PJ. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing Res Rev* 2018; 47: 123–132.
- 3 Holwerda AM, Paulussen KJM, Overkamp M, Goessens JPB, Kramer IF, Wodzig W, Verdijk LB, van Loon LJC. Dose-dependent increases in whole-body net protein balance and dietary protein-derived amino acid incorporation into myofibrillar protein during recovery from resistance exercise in older men. *J Nutr* 2019; 149(2): 221–230.
- 4 Xia Z, Cholewa JM, Zhao Y, Yang Y, Shang H, Jiang H, Su Q, Zanchi NE. A potential strategy for counteracting age-related sarcopenia: preliminary evidence of combined exercise training and leucine supplementation. *Food Funct* 2017; 8(12): 4528–4538.
- 5 Devries MC, McGlory C, Bolster DR, Kamil A, Rahn M, Harkness L, Baker SK, Phillips SM. Leucine, not total protein, content of a supplement is the primary determinant of muscle protein anabolic responses in healthy older women. *J Nutr* 2018; 148(7): 1088–1095.
- 6 Xia Z (夏志), Zhao Y, Shang HY, Ye JF, Yang LY, Xiong WP, Su QS. Effect of dietary leucine supplementation on protein synthesis of gastrocnemius muscle in aging mice. *J Beijing Sport Univ (北京体育大学学报)* 2014; 37(11): 79–85 (in Chinese with English abstract).
- 7 Ibba M, Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 617–650.
- 8 Miao F (缪枫), Shi JP, Wang YL. Study on the restriction enzymatic hydrolysis and active fragment of leucyl-tRNA synthetase. *Sci Chin Ser B (中国科学B辑)* 1988; 18(11): 1154–1160 (in Chinese).
- 9 Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J, Moras D. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 1990; 347(6289): 203–206.
- 10 Arnez JG, Moras D. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci* 1997; 22(6): 211–216.
- 11 Cusack S. Sequence, structure and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases: an update. *Biochimie* 1993; 75(12): 1077–1081.
- 12 Park SG, Ewalt KL, Kim S. Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(10): 569–574.
- 13 Park SG, Schimmel P, Kim S. Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(32): 11043–11049.
- 14 Zhou XL, Chen Y, Zeng QY, Ruan ZR, Fang P, Wang ED. Newly acquired N-terminal extension targets threonyl-tRNA synthetase-like protein into the multiple tRNA synthetase complex. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(16): 8662–8674.
- 15 Nangle LA, De Crecy Lagard V, Doring V, Schimmel P. Genetic code ambiguity. Cell viability related to the severity of editing defects in mutant tRNA synthetases. *J Biol Chem* 2002; 277(48): 45729–45733.
- 16 Nureki O, Vassylyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T,

- Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P, Yokoyama S. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* 1998; 280(5363): 578–582.
- 17 Ji QQ (纪泉泉), Wang ED. The diseases induced by the editing deficient aminoacyl-tRNA synthetase. *Chin Bull Life Sci (生命科学)* 2017; 29(6): 521–526 (in Chinese with English abstract).
- 18 Guo M, Schimmel P. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat Chem Biol* 2013; 9(3): 145–153.
- 19 Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347(6220): 1260419.
- 20 Tukalo M, Yaremchuk A, Fukunaga R, Yokoyama S, Cusack S. The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} in the post-transfer-editing conformation. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12(10): 923–930.
- 21 Tan M (谭敏), Wang ED. Noncanonical function of leucyl-tRNA synthetase — regulating TORC1-signaling pathway through sensing intracellular leucine. *Chin Bull Life Sci (生命科学)* 2012; 24(6): 511–517 (in Chinese with English abstract).
- 22 Chen X, Ma JJ, Tan M, Yao P, Hu QH, Eriani G, Wang ED. Modular pathways for editing non-cognate amino acids by human cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(1): 235–247.
- 23 Lee JW, Beebe K, Nangle LA, Jang J, Longo-Guess CM, Cook SA, Davisson MT, Sundberg JP, Schimmel P, Ackerman SL. Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature* 2006; 443(7107): 50–55.
- 24 Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, Ha SH, Ryu SH, Kim S. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 2012; 149(2): 410–424.
- 25 Bonfils G, Jaquenoud M, Bontron S, Ostrowicz C, Ungermann C, De Virgilio C. Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell* 2012; 46(1): 105–110.
- 26 Lin QS (林其谁). The newly discovered nonclassical function of aminocyl-tRNA synthetase. *Chin Bull Life Sci (生命科学)* 2012; 24(6): 501 (in Chinese).
- 27 Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. *Nat Cell Biol* 2001; 3(11): 1014–1019.
- 28 Gonzalez A, Hall MN. Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J* 2017; 36(4): 397–408.
- 29 Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol* 2014; 24(7): 400–406.
- 30 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* 2017; 169(2): 361–371.
- 31 Crino PB. The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nat Rev Neurol* 2016; 12(7): 379–392.
- 32 Xia Z (夏志), Xu F, Huang T, Wang QX, Shu ZL. The role of mammalian target of rapamycin in promoting muscle growth. *Chin J Sports Med (中国运动医学杂志)* 2009; 28(4): 474–477 (in Chinese).
- 33 Martin NRW, Turner MC, Farrington R, Player DJ, Lewis MP. Leucine elicits myotube hypertrophy and enhances maximal contractile force in tissue engineered skeletal muscle *in vitro*. *J Cell Physiol* 2017; 232(10): 2788–2797.
- 34 Ogasawara R, Arihara Y, Takegaki J, Nakazato K, Ishii N. Relationship between exercise volume and muscle protein synthesis in a rat model of resistance exercise. *J Appl Physiol (1985)* 2017; 123(4): 710–716.
- 35 Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS, Kimball SR. Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* 2000; 130(10): 2413–2419.
- 36 Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind rapTOR and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; 320(5882): 1496–1501.
- 37 Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008; 10(8): 935–945.
- 38 Schurmann A, Brauers A, Massmann S, Becker W, Joost HG. Cloning of a novel family of mammalian GTP-binding proteins (RagA, RagBs, RagB1) with remote similarity to the Ras-related GTPases. *J Biol Chem* 1995; 270(48): 28982–28988.
- 39 Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Ii M, Nishimoto T. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 7246–7257.
- 40 Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; 141(2): 290–303.
- 41 Abraham RT. Lysosomal Rag-ulation of mTOR complex 1 activity. *Cell Metab* 2010; 11(5): 341–342.
- 42 Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by

- GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 2013; 93(1): 269–309.
- 43 Lee M, Kim JH, Yoon I, Lee C, Fallahi Sichani M, Kang JS, Kang J, Guo M, Lee KY, Han G, Kim S, Han JM. Coordination of the leucine-sensing Rag GTPase cycle by leucyl-tRNA synthetase in the mTORC1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(23): E5279–E5288.
- 44 Peng M, Yin N, Li MO. Sestrins function as guanine nucleotide dissociation inhibitors for Rag GTPases to control mTORC1 signaling. *Cell* 2014; 159(1): 122–133.
- 45 Lenhare L, Crisol BM, Silva VRR, Katashima CK, Cordeiro AV, Pereira KD, Luchessi AD, da Silva ASR, Cintra DE, Moura LP, Pauli JR, Ropelle ER. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. *Exp Gerontol* 2017; 97: 17–21.
- 46 Quan N, Sun W, Wang L, Chen X, Bogan JS, Zhou X, Cates C, Liu Q, Zheng Y, Li J. Sestrin2 prevents age-related intolerance to ischemia and reperfusion injury by modulating substrate metabolism. *FASEB J* 2017; 31(9): 4153–4167.
- 47 Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, Sabatini DM. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science* 2016; 351(6268): 43–48.
- 48 Sato Y, Suzuki R, Obeng K, Yoshizawa F. Leucyl-tRNA synthetase is required for the myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, but not for hypertrophy or metabolic alteration of myotubes. *Exp Cell Res* 2018; 364(2): 184–190.
- 49 Takahashi R, Mori N, Goto S. Alteration of aminoacyl tRNA synthetases with age: accumulation of heat-labile enzyme molecules in rat liver, kidney and brain. *Mech Ageing Dev* 1985; 33(1): 67–75.
- 50 Takahashi R, Goto S. Age-associated accumulation of heat-labile aminoacyl-tRNA synthetases in mice and rats. *Arch Gerontol Geriatr* 1987; 6(1): 73–82.
- 51 Takahashi R, Goto S. Alteration of aminoacyl-tRNA synthetase with age: heat-labilization of the enzyme by oxidative damage. *Arch Biochem Biophys* 1990; 277(2): 228–233.
- 52 Sun JQ (孙建琴), Zhang J, Chang CQ, Zhu HL, Huang CY, Cao WX, Jiang YG, He GS, Mo BQ, Fu P. Chinese expert consensus on nutrition and exercise intervention for sarcopenia (excerpt). *Acta Nutr Sin (营养学报)* 2015; 37(4): 320–324 (in Chinese).
- 53 Xia Z, Cholewa J, Zhao Y, Shang HY, Yang YQ, Araujo Pessoa K, Su QS, Lima-Soares F, Zanchi NE. Targeting inflammation and downstream protein metabolism in sarcopenia: a brief up-dated description of concurrent exercise and leucine-based multimodal intervention. *Front Physiol* 2017; 8: 434.
- 54 Borde R, Hortobagyi T, Granacher U. Dose-response relationships of resistance training in healthy old adults: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 2015; 45(12): 1693–1720.
- 55 Konopka AR, Harber MP. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. *Exerc Sport Sci Rev* 2014; 42(2): 53–61.
- 56 Xiong WP (熊伟平), Xia Z. Aerobic exercise promotes protein synthesis in fast-twitch skeletal muscle of pre-senile mice. *Chin J Rehab Med (中国康复医学杂志)* 2016; 31(12): 1311–1317 (in Chinese with English abstract).
- 57 Xia Z (夏志), Zhao Y, Shang HY, Yang LY, Fu Y, Sun JZ, Su QS. Effects of aerobic training in combination with leucine supplementation on protein metabolism in skeletal muscle of pre-senescent mice. *Chin Sport Sci (体育科学)* 2018; 38(3): 57–66 (in Chinese with English abstract).
- 58 Perry RA Jr, Brown LA, Lee DE, Brown JL, Baum JI, Greene NP, Washington TA. Differential effects of leucine supplementation in young and aged mice at the onset of skeletal muscle regeneration. *Mech Ageing Dev* 2016; 157: 7–16.
- 59 Hidayat K, Chen GC, Wang Y, Zhang Z, Dai X, Szeto IMY, Qin LQ. Effects of milk proteins supplementation in older adults undergoing resistance training: a meta-analysis of randomized control trials. *J Nutr Health Aging* 2018; 22(2): 237–245.
- 60 Phillips SM, Martinson W. Nutrient-rich, high-quality, protein-containing dairy foods in combination with exercise in aging persons to mitigate sarcopenia. *Nutr Rev* 2019; 77(4): 216–229.
- 61 Xia Z, Cholewa J, Zhao Y, Yang YQ, Shang HY, Guimaraes-Ferreira L, Naimo MA, Su QS, Zanchi NE. Hypertrophy-promoting effects of leucine supplementation and moderate intensity aerobic exercise in pre-senescent mice. *Nutrients* 2016; 8(5): E246.
- 62 Carlin MB, Tanner RE, Agergaard J, Jalili T, McClain DA, Drummond MJ. Skeletal muscle Ras-related GTP binding B mRNA and protein expression is increased after essential amino acid ingestion in healthy humans. *J Nutr* 2014; 144(9): 1409–1414.
- 63 Zeng N, Prodhan U, D'Souza RF, Ramzan F, Mitchell SM, Sharma P, Knowles SO, Roy NC, Sjodin A, Wagner KH, Milan AM, Cameron-Smith D, Mitchell CJ. Regulation of amino acid transporters and sensors in response to a high protein diet: a randomized controlled trial in elderly men. *J Nutr Health Aging* 2019; 23(4): 354–363.
- 64 Traylor DA, Gorissen SHM, Phillips SM. Perspective: protein requirements and optimal intakes in aging: are we ready to recommend more than the recommended daily allowance? *Adv Nutr* 2018; 9(3): 171–182.