

白藜芦醇促进肥胖小鼠骨骼肌中 FNDC5 降解的机制

虞芳梅¹, 曹琼琼¹, 徐冬梅¹, 龙月明¹, 周恒¹, 桂丽², 鲁云霞¹

摘要 目的 研究白藜芦醇通过诱导自噬促进肥胖小鼠骨骼肌组织中纤连蛋白 III 型结构域包含 5 (FNDC5) 降解的机制。方法 将 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为标准饮食 (SCD) 组、高脂 (HFD) 组及高脂 + 白藜芦醇 (HFD + RES) 组, HFD + RES 组在 HFD 的同时胃饲白藜芦醇 (400 mg/kg · d) 共持续 20 周。测定体质量、血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白, HE 染色检测骨骼肌的病理学变化。免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 分析和纤连蛋白 III 型结构域包含 5 (FNDC5)、沉默信息调节因子 (SIRT) 1、SIRT2、微管相关蛋白 1 轻链 3 α (LC3)、选择性自噬接头蛋白 (p62)、Bcl-2 同源结构域蛋白抗体 (Beclin-1)、噬相关 5 同源物 (ATG5)、噬相关 7 同源物 (ATG7) 的表达。结果 HFD 组小鼠体质量增高, 血清 TG、TC 和 LDL-C 水平显著升高,

HDL-C 水平下降; 骨骼肌纤维间出现脂肪沉积; SIRT1、SIRT2 和 LC3 的蛋白表达水平降低, 而 FNDC5 和 p62 的蛋白表达升高。FNDC5 的表达水平升高, SIRT1、SIRT2、LC3、Atg7 和 Beclin-1 的基因表达水平降低。RES 组可逆转 HFD 的效应, 增加 SIRT1、SIRT2 和自噬相关基因的表达。结论 白藜芦醇可减少骨骼肌 FNDC5 表达的效应, 其机制可能与其增加 SIRT1 和 SIRT2 的表达, 进而促进自噬和 FNDC5 的降解有关。

关键词 白藜芦醇; SIRT1; SIRT2; 骨骼肌; FNDC5; 自噬

中图分类号 R 963; R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0412-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.011

2023-02-26 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1808085MH233)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院¹ 生物化学与分子生物学教研室、² 综合实验室, 合肥 230032

作者简介: 虞芳梅, 女, 硕士研究生;

鲁云霞, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: luyunxia@ahmu.edu.cn

高热量饮食引起的肥胖已造成全球肥胖人数从 1975 年的不到 1% 增加到 2016 年的 6%~8%^[1]。骨骼肌是人体最大的能量代谢和内分泌器官, 肥胖可造成脂肪在骨骼肌组织中的积累和肌萎缩^[2]。纤连蛋白 III 型结构域包含 5 (fibronectin type III domain-containing 5, FNDC5) 可被切割形成肌肉因子鸢尾素, 肥胖可通过增加 FNDC5 的表达来退行性地

(si-MIR22HG) and its negative control plasmid (si-NC), miR-22-5p inhibitor and its negative control (inhibitor-NC) were transfected into RA-FLSs respectively or simultaneously. The expression levels of MIR22HG and miR-22-5p were detected by qRT-PCR. CCK-8 was used to detect the proliferation activity of cells in various groups. Annexin V-FITC/PI was used to detect the apoptosis rates of cells in various groups. ELISA was used to detect the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant of cells in various groups. Western blot was used to detect the protein expression levels of Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3 of cells in various groups. The targeting relationship between MIR22HG and miR-22-5p was verified by dual luciferase reporter gene assay. **Results** Compared with joint trauma patients, the expression level of MIR22HG in synovial tissues of RA patients increased ($P < 0.05$), while the expression level of miR-22-5p decreased ($P < 0.05$). Interference with MIR22HG inhibited the proliferation activity of RA-FLSs, decreased the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in cell supernatant and the protein expression level of Bcl-2 in cells ($P < 0.05$), and increased the apoptosis rate, the expression level of miR-22-5p and the protein expression levels of Bax and Cleaved casepase-3 ($P < 0.05$). However, inhibition of miR-22-5p expression reversed the effects of MIR22HG gene silencing on proliferation, apoptosis and inflammation of RA-FLSs ($P < 0.05$). Dual luciferase reporting assay showed that miR-22-5p was a potential downstream miRNA target of MIR22HG. **Conclusion** MIR22HG is highly expressed in synovial tissues of RA patients, and it may promote the proliferation and the inflammatory response of RA-FLSs and inhibit cell apoptosis by down regulating the expression of miR-22-5p.

Key words rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocyte; LncRNA MIR22HG; miR-22-5p; cell proliferation; cell apoptosis; Inflammatory response

减少肌肉的质量和功能^[3]。

白藜芦醇(resveratrol, RES) 又称芪三酚, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤和延缓衰老等功效^[4]。代谢组学研究揭示白藜芦醇在腹部肌肉组织中通过调节多条代谢途径和代谢物的水平来降低饮食诱导的代谢风险^[5]。已知由白藜芦醇介导的自噬流恢复可防止骨骼肌细胞衰老和改善胰岛素抵抗^[6], 其作用的靶标除经典的 SIRT1 外, 还包括 SIRT2-7^[7-8] 等。推测白藜芦醇促进 FNDC5 的降解可能与自噬及 SIRT 家族有关, 参考文献^[9] 选取单一剂量白藜芦醇 [400 mg/(kg·d)] 在高脂饮食的同时灌胃治疗, 实验共持续 20 周, 以研究白藜芦醇在骨骼肌中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 18 只 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠, 清洁级, 购自安徽医科大学实验动物中心 [编号: SCXK(皖) 2011-001], 12 h 日/夜交替, 自由进食, 相对湿度 40% ~ 60%, 适应性喂养一周后随机分组进行动物实验。

1.1.2 主要药物与试剂 高脂饲料购自北京博泰宏达生物技术有限公司 (HD001, 蛋白质 19.6%, 碳水化合物 46.4%, 脂肪 34.0%)。白藜芦醇购自阿拉丁公司 (R107315); RNA 保存液、Trizol 试剂和逆转录试剂盒 Revert™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自宝日医生生物技术(北京)有限公司; 微管相关蛋白 1 轻链 3 α (Microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、自噬相关 5 同源物 (autophagy related 5 homolog, ATG5)、自噬相关 7 同源物 (autophagy related 7 homolog, ATG7)、纤连蛋白 III 型结构域包含 5 (Fibronectin Type III Domain Containing Protein 5, FNDC5) 引物购自上海生工生物工程有限公司。FNDC5 抗体购于 Proteintech 公司; SIRT1、LC3、Atg5、Atg7、Beclin-1 鼠或兔单抗购自 CST 公司, p62 抗体购自 Millipore 公司; β -actin、SIRT2 抗体、羊抗兔或羊抗鼠酶标二抗购自 Affinity 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型制备 将 C57 BL/6 小鼠随机分为标准饮食组 (SCD)、高脂组 (HFD) 和高脂 + 白藜芦醇组 (HFD + RES)。后两组均为 HFD 喂养, HFD + RES 组在 HFD 的同时用白藜芦醇 (400

mg/kg·d) 灌胃, 治疗 20 周。所有操作均遵守安徽医科大学实验动物伦理委员会 (批号: LLSC20200932) 要求。

1.2.2 血清脂代谢指标检测 所有小鼠禁食 12 h 后称取体质量 2% 戊巴比妥腹腔麻醉, 腹主动脉负压采血, 5 000 r/min 离心 10 min 后吸取上层血清, Roche 自动生化分析仪分析小鼠血清 TG, TC, LDL-C 和 HDL-C 水平。完全剥离小鼠后腿的骨骼肌组织, 其中 1/3 固定于 4% 多聚甲醛溶液; 1/3 用 DEPC 水清洗后置于 RNA 保护液中过夜, 剩余 1/3 于液氮中暂存过夜, 均转入 -80 °C 保存备用。

1.2.3 骨骼肌组织的 HE 染色 固定好的骨骼肌组织脱水、包埋, 常规 5 μ m 切片, HE 染色, 光镜下观察并拍照 (OLYMPUS 显微镜)。

1.2.4 免疫组化分析 骨骼肌组织蜡块行连续 4 μ m 切片, 脱蜡复水处理后行 FNDC5 (1 : 400), SIRT1 (11 : 400), SIRT2 (11 : 200), LC3 (11 : 400), p62 (11 : 200) 的一抗 4 °C 孵育过夜, 滴加 100 μ l 酶标山羊抗小鼠/抗兔 IgG 聚合物室温孵育 2 h, DAB 显色后终止反应, 制片后光镜下拍照并使用 Image J 软件分析各组织积分光密度值 (integral optical density, IOD)。

1.2.5 RT-PCR 分析 称取 0.1 g 骨骼肌组织, 提取 Total RNA, 定量后根据所测浓度逆转录合成 cDNA, 在 PCR 仪上进行扩增, 产物经电泳分离后, 拍照并分析灰度值, 以目的基因灰度值/GAPDH 灰度值来表示 mRNA 水平。目的基因及引物序列见表 1。

表 1 靶基因引物序列

基因名称	参考序列	序列 (5'-3')	PCR 长度 (bp)
LC3	NM_025735.3	F: CTTGCCCGACCCCTGTAA R: GCCGGATGATCTTGACCAACT	170
FNDC5	XM_006503212.4	F: TTGCCATCTCTCAGCAGAAGA R: GGCCTGCACATGGACGATA	128
Atg5	NM_001358596.1	F: GCAGCCACAGGACGAAAC R: AAGCAACTCTGG ATGGGATT	78
Atg7	NM_001253717.1	F: TTGAGCGCGCAGCAGCATT R: TGAGGAAAGCCTCATGGCAG	135
GAPDH	XM_011241214.1	F: TGTGTCCGTGGATCTGA R: CCTGCTCACCACCTTCTTGAT	77

1.2.6 Western blot 称取 0.1 g 骨骼肌组织, 裂解提取骨骼肌组织的蛋白质, 测定其浓度后调整上样量, 电泳分离, 转膜, 与相应一抗 1 : 1 000 4 °C 摇床孵育过夜, 二抗 1 : 5 000 室温 2 h, 漂洗后化学发光法成像, Image J 软件分析灰度值, 以目的蛋白/ β -ac-

tin 来表示目的蛋白水平,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 数据分析统计采用 SPSS 21.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析(ANOVA),两两之间的比较采用最小显著差异法(LSD法)分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠体质量和血脂指标的变化 结果如表 2 所示,与 SCD 组比较,HFD 诱导小鼠体质量显著增加,血 HDL-C 水平降低($P < 0.05$),TC、TG、LDL-C 水平明显升高;与 HFD 组相比,HFD + RES 组血 TC、TG、LDL-C 水平均降低($P < 0.05$),而 HDL-C 水平明显升高($P < 0.05$)。

2.2 小鼠骨骼肌的病理学分析 HE 染色结果显示:与 SCD 组相比,HFD 组小鼠的骨骼肌组织中肌纤维间有脂质沉积。而 HFD + RES 组小鼠骨骼肌组织的脂质沉积消失,说明白藜芦醇可改善 HFD 组小鼠骨骼肌脂质沉积现象(图 1)。

2.3 小鼠骨骼肌蛋白免疫组化的结果 与 SCD 组相比,HFD 组骨骼肌中 FNDC5 和 p62 的表达增高($F = 31.6, P < 0.05; F = 368.87, P < 0.001$),LC3、SIRT1 和 SIRT2 表达水平相对较低($F = 618.21, P < 0.001; F = 68.32, P < 0.05; F = 13.94, P < 0.05$)。表明高脂饮食可降低自噬水平和 SIRT1、SIRT2 的表达。与 HFD 组比较,HFD + RES 组小鼠骨骼肌中 FNDC5 和 p62 表达降低($F = 104.72, P < 0.001; F = 227.93, P < 0.001$),而 LC3、SIRT1 和 SIRT2 的表达水平增高($F = 273.79,$

$P < 0.001; F = 85.54, P < 0.05; F = 39.41, P < 0.05$)。表明白藜芦醇可升高自噬水平,促进 SIRT1、SIRT2 的蛋白表达。见图 2。

2.4 小鼠骨骼肌相关基因 mRNA 的表达 与 SCD 组相比,HFD 组骨骼肌中 LC3、Atg5、Atg7 的 mRNA 表达降低($F = 312.78, P < 0.001; F = 35.34, P < 0.05; F = 26.51, P < 0.05$),而 FNDC5 的 mRNA 表达升高($F = 49.09, P < 0.05$);与 HFD 组相比,HFD + RES 组骨骼肌中 LC3、Atg5、Atg7 的 mRNA 表达升高($F = 28.59, P < 0.001; F = 17.88, P < 0.05; F = 12.55, P < 0.05$),FNDC5 的 mRNA 表达降低($F = 72.49, P < 0.05$),见图 3,其中 LC3 作为自噬的代表分子之一,其 mRNA 表达水平与免疫组化结果相一致。

2.5 小鼠骨骼肌相关蛋白质的表达 与 SCD 组小鼠相比,HFD 组骨骼肌中 Atg7、Beclin-1、LC3-II/LC3 I 比值、SIRT1、SIRT2 蛋白的表达降低($F = 569.57, P < 0.001; F = 7.25, P < 0.05; F = 502.434, P < 0.001; F = 306.062, P < 0.001; F = 86.516, P < 0.001$),同时 FNDC5 表达降低($F = 133.666, P < 0.001$);与 HFD 组相比,HFD + RES 组骨骼肌中 Atg7、Beclin-1、LC3-II/LC3 I 比值、SIRT1、SIRT2 蛋白质表达升高($F = 795.345, P < 0.001; F = 5.442, P < 0.05; F = 7476.648, P < 0.001; F = 100.318, P < 0.001; F = 14.802, P < 0.05$),FNDC5 蛋白质表达降低($F = 199.862, P < 0.001$)。与 SCD 组相比,HFD 组骨骼肌中 Atg5 蛋白表达降低($F = 8.348, P < 0.05$)。与 HFD 组相比,HFD + RES 组骨骼肌中 Atg5 蛋白表达无差异($F = 5.803$)。

表 2 RES 对肥胖小鼠体质量和血脂的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体质量(g)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)
SCD	29.1 ± 0.53	3.36 ± 0.02	1.07 ± 0.03	2.36 ± 0.02	0.26 ± 0.02
HFD	47.2 ± 6.44***	5.92 ± 0.16***	1.34 ± 0.04*	1.4 ± 0.02*	1.16 ± 0.16***
HFD + RES	33.83 ± 1.94#	3.62 ± 0.28##	1.07 ± 0.01#	2.91 ± 0.27##	0.31 ± 0.08###

与 SCD 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 HFD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

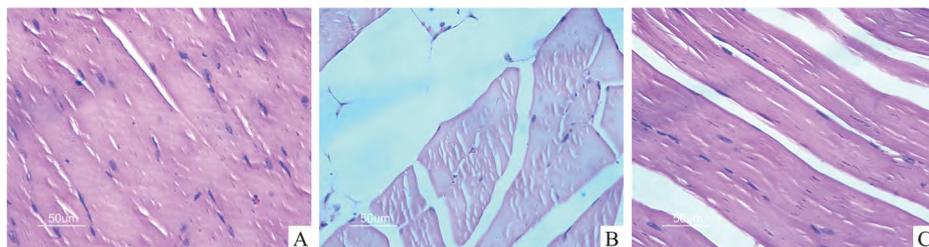


图 1 小鼠骨骼肌的病理学分析 HE × 400
A: SCD 组; B: HFD 组; C: HFD + RES 组

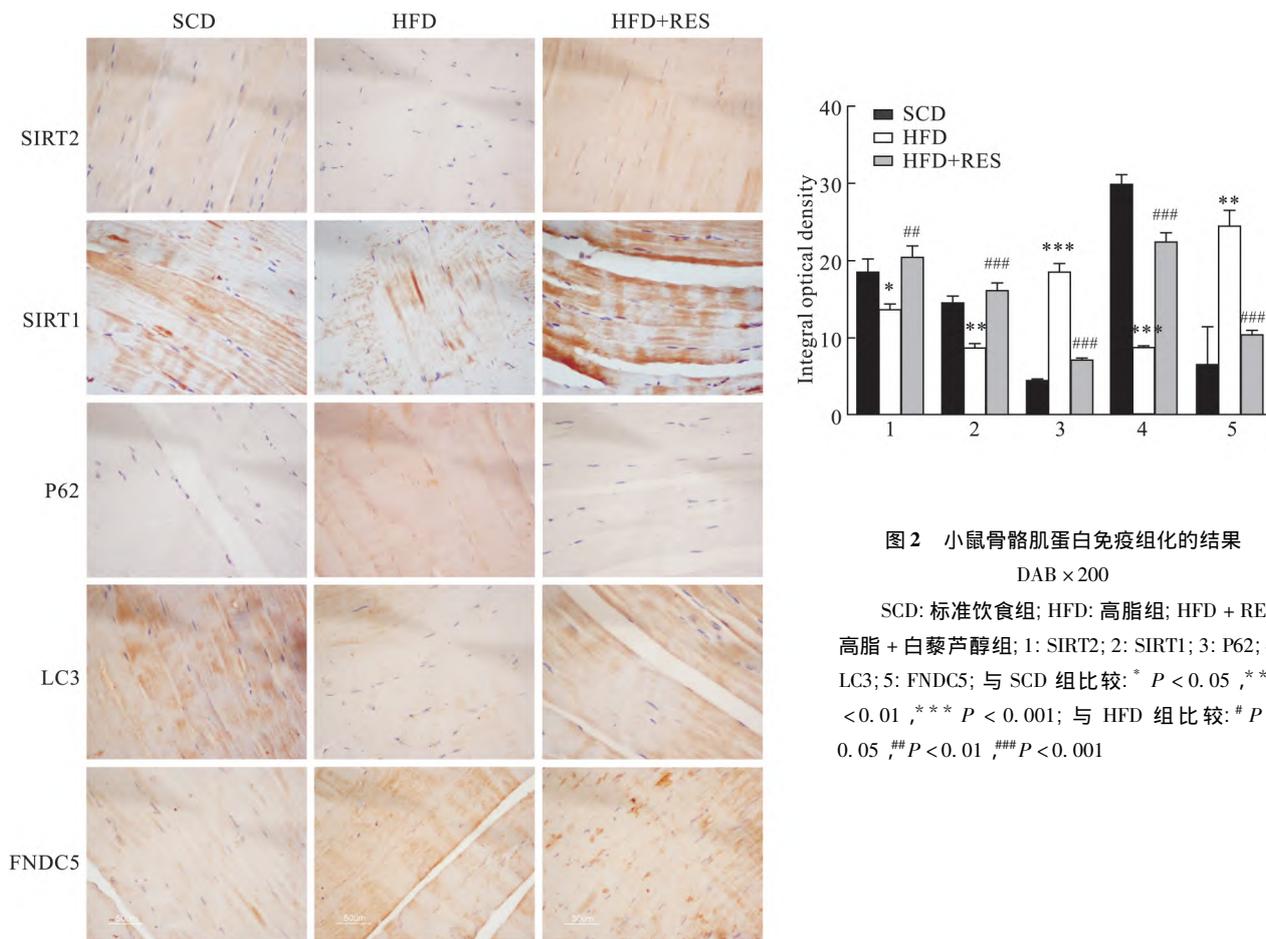


图2 小鼠骨骼肌蛋白免疫组化的结果
DAB × 200

SCD: 标准饮食组; HFD: 高脂组; HFD + RES: 高脂 + 白藜芦醇组; 1: SIRT2; 2: SIRT1; 3: P62; 4: LC3; 5: FNDC5; 与 SCD 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HFD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

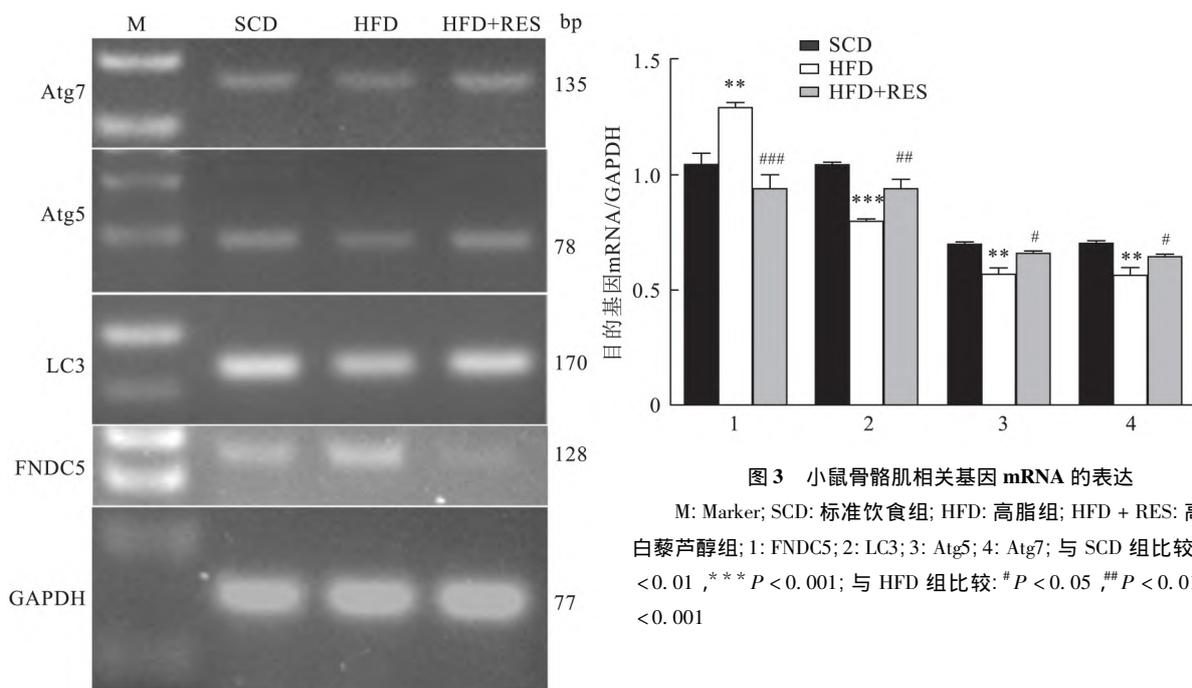


图3 小鼠骨骼肌相关基因 mRNA 的表达

M: Marker; SCD: 标准饮食组; HFD: 高脂组; HFD + RES: 高脂 + 白藜芦醇组; 1: FNDC5; 2: LC3; 3: Atg5; 4: Atg7; 与 SCD 组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HFD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3 讨论

骨骼肌组织中的自噬可用于维持肌肉组织的质

量和强度,肥胖时由于自噬的减少而降低骨骼肌的强度,但导致自噬减少的上游分子尚未明确。本实验结果显示高脂饮食可导致脂肪在骨骼肌组织中的

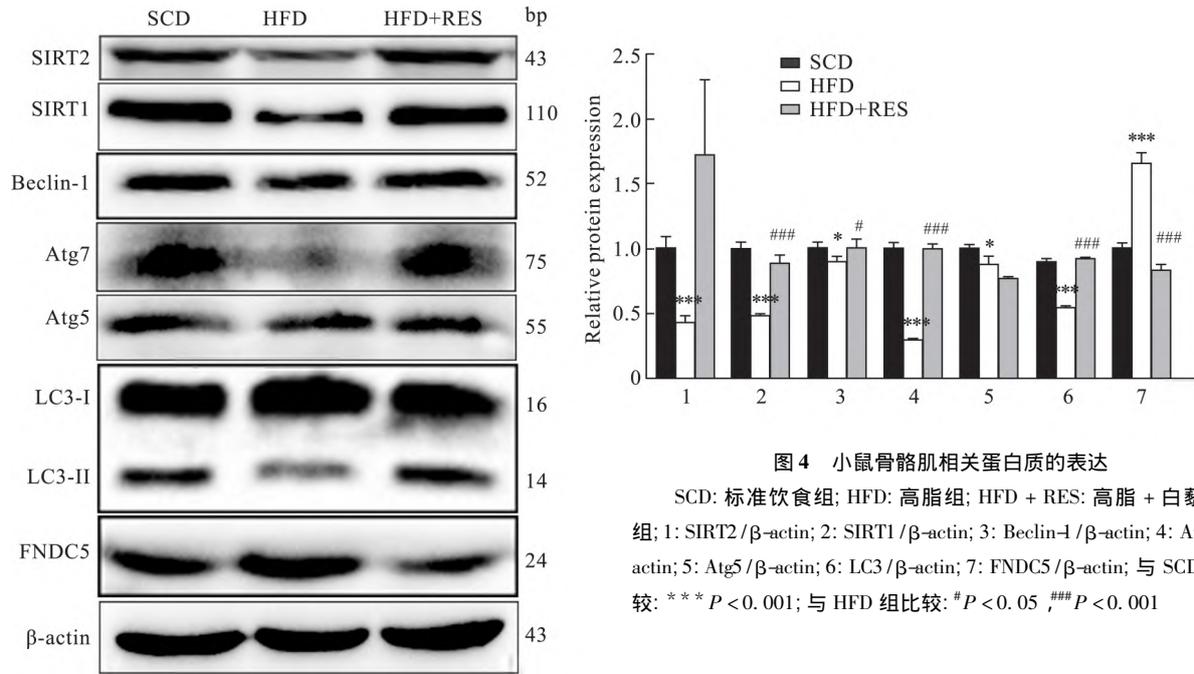


图4 小鼠骨骼肌相关蛋白质的表达

SCD: 标准饮食组; HFD: 高脂组; HFD + RES: 高脂 + 白藜芦醇组; 1: SIRT2/β-actin; 2: SIRT1/β-actin; 3: Beclin-1/β-actin; 4: Atg7/β-actin; 5: Atg5/β-actin; 6: LC3/β-actin; 7: FNDC5/β-actin; 与 SCD 组比较: *** P < 0.001; 与 HFD 组比较: # P < 0.05, ### P < 0.001

积累和 FNDC5 的表达升高,其原因可能与 SIRT1、SIRT2 的表达降低进而减少自噬有关,白藜芦醇则通过激活骨骼肌组织中 SIRT1、SIRT2 的表达来促进以 LC3-II、Atg7、Beclin-1 表达升高、p62 表达降低为代表的自噬体形成,以降解高脂饮食时诱导生成的过多 FNDC5。

高脂饮食对骨骼肌组织自噬的具体影响争议颇大,可能与制作肥胖模型时选用的高脂饲料成分和比例有关^[10];研究^[11]表明 16 周的高脂饮食不改变雌性大鼠骨骼肌组织中的自噬相关基因 Atg7、Atg4B、Beclin-1、BNIP3、p70(s6k) 以及组织蛋白酶的活性,提示性别对自噬也有影响。本研究选用的是雄性小鼠,综合免疫组化、RT-PCR 和 Western blot 结果显示 20 周高脂饮食可降低肥胖时骨骼肌中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin1、Atg7 的表达水平,同时增加肥胖时骨骼肌中 FNDC5 和 p62 的蛋白表达,二者的表达呈正相关,充分说明了高脂饮食可降低骨骼肌组织中的自噬水平;至于具体是巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬中的哪一种,还有待后续研究来确定。

天然产物是临床上重要的药物来源库,在许多疾病的治疗中有着悠久的历史。白藜芦醇在改善肥胖、糖尿病、脂肪肝和动脉粥样硬化等疾病中的作用机制报道较多,因此有望成为防治多种疾病的天然药物;但白藜芦醇能否改善肥胖或饱和脂肪酸诱导的骨骼肌萎缩仅见本课题组的报道^[12];另外白藜芦

醇也可抑制 HeLa 细胞增殖,诱导其凋亡,其机制可能与诱导 HeLa 细胞自噬增强有关^[13]。有文献报道白藜芦醇促进 2 型糖尿病肾病大鼠自噬的机制可能与激活 SIRT1,上调 Atg5 和 Atg12 的基因表达和增加 LC3 脂化有关^[14]。本研究结果表明白藜芦醇可增加肥胖时骨骼肌中 LC3 II/LC3 I 比值、Beclin-1、Atg7 的表达水平,同时降低骨骼肌中 p62 表达水平;同时本研究结果提示白藜芦醇除了激活 SIRT1 外,还可激活 SIRT2。在骨骼肌细胞中 SIRT1 和 SIRT2 能否通过同样的机制激活自噬体,有待后续实验证实。

研究^[15]表明在肥胖/糖尿病前期的 OLETF 大鼠骨骼肌组织中 FNDC5 的 mRNA 水平升高,伴随着血液中的鸢尾素浓度降低,提示有其他组织来源的因子上调 FNDC5 的表达或抑制骨骼肌中从 FNDC5 到鸢尾素的翻译后加工过程。本实验中因为小鼠血清标本较少,故未能测定肥胖小鼠血液中的鸢尾素浓度,也未探讨除自噬以外的其他机制如何调节 FNDC5 的 mRNA 表达,后续实验将予以证实。

综上所述,白藜芦醇对高脂饮食诱导肥胖小鼠的骨骼肌组织有保护作用,其机制可能与促进 SIRT1 和 SIRT2 的表达,协同改善高脂饮食导致的自噬流受损,进而诱导 FNDC5 的降解有关。经数据库检索,此研究尚未见文献报道。本实验结果可为白藜芦醇预防高脂饮食下骨骼肌萎缩的具体作用机

制奠定基础。

参考文献

- [1] Roy B, Curtis M E, Fears L S, et al. Molecular mechanisms of obesity-induced osteoporosis and muscle atrophy [J]. *Front Physiol* 2016, 7: 439.
- [2] Abrigo J, Rivera J C, Aravena J, et al. High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation, and myonuclear apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016 2016: 9047821.
- [3] Cao R Y, Zheng H, Redfearn D, et al. FNDC5: A novel player in metabolism and metabolic syndrome [J]. *Biochimie*, 2019, 158: 111–6.
- [4] Wei Y, Yu-cai F, Wei W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and diseases [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113 (3): 752–9.
- [5] Chen G, Ye G, Zhang X, et al. Metabolomics reveals protection of resveratrol in diet-induced metabolic risk factors in abdominal muscle [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018 45(3): 1136–48.
- [6] Chang Y C, Liu H W, Chen Y T, et al. Resveratrol protects muscle cells against palmitate-induced cellular senescence and insulin resistance through ameliorating autophagic flux [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(3): 1066–74.
- [7] Pan Y, Zhang H, Zheng Y, et al. Resveratrol exerts antioxidant effects by activating SIRT2 To deacetylate Prx1 [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(48): 6325–28.
- [8] Tang X, Shi L, Xie N, et al. SIRT7 antagonizes TGF- β signaling and inhibits breast cancer metastasis [J]. *Nat Commun*, 2017, 8 (1): 318.
- [9] Wang D, Sun H, Song G, et al. Resveratrol improves muscle atrophy by modulating mitochondrial quality control in STZ-induced diabetic mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(9): e1700941.
- [10] Herrenbruck A R, Bollinger L M. Role of skeletal muscle autophagy in high-fat-diet-induced obesity and exercise [J]. *Nutr Rev*, 2020, 78(1): 56–64.
- [11] Campbell T L, Mitchell A S, McMillan E M, et al. High-fat feeding does not induce an autophagic or apoptotic phenotype in female rat skeletal muscle [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240: 657–68.
- [12] 费云飞, 陈莉, 徐冬梅, 等. 白藜芦醇通过诱导自噬减少肥胖小鼠骨骼肌组织 GDF8 表达的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(2): 226–31.
- [13] 孙传名, 方文秀, 周荣生, 等. 白藜芦醇在体外通过自噬作用抑制宫颈癌细胞增殖的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53 (5): 664–7.
- [14] Ma L, Fu R, Duan Z, et al. Sirt1 is essential for resveratrol enhancement of hypoxia-induced autophagy in the type 2 diabetic nephropathy rat [J]. *Pathol Res Pract*, 2016 212(4): 310–8.
- [15] Roberts M D, Bayless D S, Company J M, et al. Elevated skeletal muscle irisin precursor FNDC5 mRNA in obese OLETF rats [J]. *Metabolism*, 2013, 62(8): 1052–6.

The mechanism of resveratrol promoting FNDC5 degradation in skeletal muscle of male obese mice

Yu Fangmei¹, Cao Qiongqiong¹, Xu Dongmei¹, Long Yueming¹, Zhou Heng¹, Gui Li², Lu Yunxia¹

(¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, ²Comprehensive Laboratory, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the mechanism of resveratrol promoting fibronectin type III domain-containing 5 (FNDC5) degradation in skeletal muscle of male obese mice. **Methods** Six-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: standard control diet (SCD), high-fat diet (HFD) and high-fat diet treated with resveratrol (HFD + RES). HFD + RES group was intervened with resveratrol *via* gavage [400 mg/kg · d] while fed HFD for 20 weeks. The body mass, serum TG, TC, LDL-C and HDL-C levels were detected. The pathological changes in skeletal muscle were detected by HE staining. The expression of FNDC5, SIRT1, SIRT2, LC3, p62, Beclin-1, ATG5, ATG7 was assessed by immunohistochemistry, RT-PCR and Western blot respectively. **Results** The body mass, serum TG, TC and LDL-C levels increased significantly, meanwhile HDL-C levels decreased in HFD group. Lipid deposition between skeletal muscle fibers were obvious in HFD group. The immunohistochemistry results showed that protein expression levels of SIRT1, SIRT2 and LC3 obviously decreased, while the protein levels of FNDC5 and p62 obviously increased. The expression levels of FNDC5 significantly increased, while the gene expression levels of SIRT1, SIRT2, LC3, Atg7 and Beclin-1 obviously decreased. All these responses were attenuated by treatment with RES. **Conclusion** RES has obvious effects of lipid-lowering and promoting FNDC5 degradation in skeletal muscle tissues, which may be related with SIRT1 and SIRT2-induced autophagy, thus resulting in degradation of FNDC5.

Key words resveratrol; Sirtuin1; Sirtuin2; skeletal muscle; fibronectin type III domain-containing 5; autophagy