

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.06.0734

· 论 著 ·

## 法舒地尔阻断 ROCK1 触发 C2C12 成肌细胞呼吸功能异常介导的肌肉萎缩

郭织运, 张 杰, 董 睿, 许 静\*

第二军医大学长海医院肾内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 明确法舒地尔(fasudil)能否阻断 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(ROCK1)激活导致的 C2C12 成肌细胞呼吸功能异常介导的肌肉萎缩。**方法** 体外培养 C2C12 成肌细胞, 给予 2% 的马血清诱导分化为成熟肌小管细胞。然后根据给予不同处理将其分成 4 组: Ad-GFP 组, 仅感染 GFP 腺病毒载体; Ad-ROCK1 组, 感染 ROCK1 腺病毒载体诱导细胞过表达 ROCK1; Ad-GFPF 组, 感染 GFP 腺病毒载体, 并给予 10  $\mu\text{mol/L}$  法舒地尔刺激; Ad-ROCK1F 组, 感染 ROCK1 腺病毒载体诱导细胞过表达 ROCK1, 并给予 10  $\mu\text{mol/L}$  法舒地尔刺激。通过 Seahorse 能量代谢分析仪评估不同刺激条件下 C2C12 成肌细胞的细胞耗氧率(OCR)及胞外酸化率(ECAR), 以明确 ROCK1 过表达和法舒地尔刺激对 C2C12 成肌细胞呼吸功能的影响。采用 MitoTracker<sup>®</sup> 红色荧光探针测定线粒体裂变情况。用蛋白质印迹法检测 ROCK1、线粒体动力相关蛋白 1(Drp1)及其磷酸化蛋白 p-Drp1、肌肉萎缩相关蛋白 E3 泛素连接酶肌肉环指蛋白 1(MuRF1)和肌肉萎缩 F-box(MAFbx, 又称 Atrogin1)的表达。**结果** Seahorse 分析结果显示, 与 Ad-GFP 组比较, Ad-ROCK1 组 C2C12 成肌细胞 OCR 及 ECAR 明显增加, 细胞的基础呼吸、最大呼吸及偶联 ATP 产生所需的呼吸增加, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); MitoTracker<sup>®</sup> 荧光探针结果显示 Ad-ROCK1 组细胞线粒体裂变增加, 线粒体大小频数分布左移。Ad-ROCK1F 组 C2C12 成肌细胞 OCR 和 ECAR 较 Ad-ROCK1 组明显减少( $P < 0.05$ ), 基础呼吸和最大呼吸也降低( $P < 0.05$ )。Ad-ROCK1F 组 p-Drp1/Drp1 比例、ROCK1、MuRF1 和 Atrogin1 的表达均较 Ad-ROCK1 组减少( $P < 0.05$ )。**结论** 法舒地尔作为 ROCK1 的抑制剂, 可阻断体外培养 C2C12 成肌细胞 ROCK1 过表达导致的细胞呼吸异常, 并减少线粒体动力相关蛋白的活性和肌肉萎缩相关蛋白的表达。

**[关键词]** 肾疾病; 萎缩性肌疾病; 细胞呼吸; Rho 相关激酶类; 法舒地尔**[中图分类号]** R 692**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2017)06-0734-05

### Fasudil blocks muscle atrophy and C2C12 myoblasts respiratory dysfunction triggered by ROCK1

GUO Zhi-yun, ZHANG Jie, DONG Rui, XU Jing\*

Department of Nephrology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To confirm whether fasudil can block C2C12 myoblasts respiration dysfunction triggered by Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 (ROCK1), and whether it can block the occurrence of muscle atrophy. **Methods** C2C12 myoblasts were cultured *in vitro*, and 2% horse serum was used to induce cell differentiation and maturation. The obtained mature muscle tubule cells were divided into four groups according to the different stimuli: Ad-GFP group, only transfected GFP-adenovirus vector (Adv) in C2C12 myoblasts; Ad-ROCK1 group, transfected ROCK1-Adv in C2C12 myoblasts to induce ROCK1 overexpression; Ad-GFPF group, transfected GFP-Adv and given 10  $\mu\text{mol/L}$  fasudil in C2C12 myoblasts; and Ad-ROCK1F group, transfected ROCK1-Adv and given 10  $\mu\text{mol/L}$  fasudil in C2C12 myoblasts. The oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) of C2C12 myoblasts under different stimulation conditions were evaluated by cell energy metabolism analyzer (Seahorse), so as to determine the effect of ROCK1 overexpression and fasudil stimulation on the respiratory function of C2C12 myoblasts. Mitochondrial fission was measured by MitoTracker<sup>®</sup> red fluorescent probes. The expressions of ROCK1, mitochondrial-related protein 1 (Drp1) and phosphorylated p-Drp1, E3 ubiquitin ligase muscle RING finger-1 protein (MuRF1) and muscle atrophy F-box (MAFbx, Atrogin 1) was measured by Western blotting analysis. **Results** Seahorse analysis

**[收稿日期]** 2017-04-26 **[接受日期]** 2017-05-25**[基金项目]** 国家自然科学基金(81470970). Supported by National Natural Science Foundation of China (81470970).**[作者简介]** 郭织运, 硕士生. E-mail: zhiyunguoguo@163.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31161407, E-mail: xuj1010@126.com

showed that the OCR, ECAR, basal respiration, maximal respiration and respiration required for coupling ATP of C2C12 myoblasts in the Ad-ROCK1 group were significantly increased compared with those in the Ad-GFP group ( $P < 0.01$ ); Meanwhile, MitoTracker<sup>®</sup> staining showed that the mitochondrial fission was increased and the mitochondrial size frequency distribution shifted left in the Ad-ROCK1 group. After exposed to fasudil, the OCR and ECAR of C2C12 myoblasts in the Ad-ROCK1F group were significantly decreased versus the Ad-ROCK1 group, and the basal respiration and maximal respiration were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Western blotting analysis showed that p-Drp1/Drp1 ratio, and the expressions of ROCK1, MuRF1 and Atrogin1 in Ad-ROCK1F group were significantly reduced compared with Ad-ROCK1 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Fasudil, an inhibitor of ROCK1, can block the abnormal cell respiration of C2C12 myoblasts caused by overexpressed ROCK1 *in vitro*, and can reduce the activity of mitochondrial kinetic protein and the expression of muscle atrophy-related proteins.

[**Key words**] kidney disease; atrophic muscular disorders; cell respiration; Rho-associated kinases; fasudil

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(6): 734-738]

慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)是全球重要的公共卫生问题之一。研究表明,30%~70%的CKD患者在疾病的进展过程中可出现蛋白质能量消耗不足(protein energy wasting,PEW),其最重要的特征是肌肉萎缩<sup>[1-3]</sup>。肌肉萎缩一旦发生,将严重影响CKD患者的临床预后及生活质量,同时增加心血管疾病的患病率<sup>[2]</sup>。想要攻克CKD导致肌肉萎缩这一难题,就需要探索其发生机制。有证据表明,线粒体功能异常可能参与CKD肌肉萎缩的发生<sup>[4-7]</sup>,但具体机制尚不清楚。

Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1, ROCK1)是 RhoA 激酶的下流活性调节分子,在应力纤维的形成、细胞坏死等方面发挥重要作用<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究证实,ROCK1 激活参与CKD患者肌肉萎缩的发展<sup>[9]</sup>,其具体的机制尚未明确。但有证据表明,高糖诱导 ROCK1 激活,导致足细胞和肾小管上皮细胞中线粒体的裂变,并增加糖尿病鼠蛋白尿的发生,给予 ROCK1 的抑制剂法舒地尔(fasudil)可以阻断糖尿病鼠蛋白尿的进展<sup>[10]</sup>。因此,本研究通过腺病毒感染 C2C12 成肌细胞诱导 ROCK1 过表达,探讨 ROCK1 导致肌肉萎缩的发生是否与细胞呼吸功能异常及线粒体异常相关。

## 1 材料和方法

1.1 细胞培养与腺病毒感染 体外培养 C2C12 成肌细胞(购自 ATCC 细胞库,货号 CRL-177<sup>TM</sup>),培养于含 10%胎牛血清(Gibco,美国,货号 1082147),200 U/mL 青霉素、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素(Life Technologies)的 DMEM 培养液(HyClone)。当 C2C12 成肌细胞融合度达 90%时,替换培养液为添加 2%马血清(Gibco,新西兰,货号 26050088)、200

U/mL 青霉素、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 DMEM 培养液,诱导 C2C12 成肌细胞分化成熟为肌小管细胞。将分化成熟的 C2C12 成肌细胞分为以下 4 组并给予不同处理:(1) Ad-GFP 组,给予绿色荧光蛋白(GFP)腺病毒载体(AAV-GFP,2 nmol/L)感染细胞;(2) Ad-ROCK1 组,给予 ROCK1 腺病毒载体(AAV-ROCK1,5 nmol/L)感染细胞;(3) Ad-GFP 组,给予 2 nmol/L AAV-GFP 感染同时用 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  法舒地尔刺激细胞;(4) Ad-ROCK1F 组,给予 5 nmol/L AAV-ROCK1 感染同时用 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  法舒地尔刺激细胞。各组腺病毒感染或同时与法舒地尔共刺激均持续 48 h。实验所用 AAV-ROCK1、AAV-GFP 由美国 Dr. Chang 实验室提供。

1.2 细胞能量代谢分析 Seahorse 是体外通过外通量分析精确检测细胞耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)及胞外酸化率(extracellular acidification rate, ECAR)的方法,可一定程度地反映细胞呼吸情况。具体方法:(1)利用胰酶消化 C2C12 成肌细胞,按  $2.5 \times 10^4$ /孔接种到 Seahorse 测量专用细胞培养板(货号 100777004,美国),待细胞融合度达 90%时诱导分化成熟。按照前文描述的分组给予相应刺激。(2)各组细胞完成不同的处理后进行上机测量,在测量前 1 d,每孔均添加 1 mL 的 Seahorse 探头校准液进行水化,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、无  $\text{CO}_2$  的温箱中过夜。(3)按照线粒体应激(Mito-Stress)测定要求,使用相应培养液洗细胞后加入上机检测所需培养液,置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、无  $\text{CO}_2$  的温箱中 45~60 min 后,在 Seahorse 测量板 A 孔中加入寡霉素[oligomycin,是线粒体电子呼吸链中复合体 V-ATP 合酶的抑制剂,可降低 OCR],B 孔中加入羰基-氰-对-三氟甲氧基苯胺[carbonyl cyanide-*p*(trifluoromethoxy) phenylhydrazone, FCCP;线粒体

呼吸链解偶联剂,作用于线粒体内膜,去除线粒体内外膜之间的质子势能,使 OCR 增加,但不产生 ATP,使得能量均以热能的形式释放,产生大量热量, C 孔中加入抗霉素 A (antimycin A, 线粒体电子呼吸链中复合体 III 的抑制剂,可减少 OCR)。(4)将 Seahorse 测量板放在 Seahorse 测量仪上校准后,放入处理好的细胞培养板,设定程序为 Mito-Stress, 执行相应的步骤。检测结束后,按照所得数据计算细胞呼吸能力,其中基础呼吸是细胞在加寡霉素刺激之前的 OCR 值;最大呼吸是加入 FCCP 之后、抗霉素 A 之前 OCR 最大值与加入寡霉素之后 OCR 最低值之差;偶联 ATP 产生的呼吸是基础呼吸 OCR 值和加入 FCCP 刺激之前的 OCR 值之差。

1.3 蛋白质印迹法检测线粒体动力相关蛋白活性和肌肉萎缩相关蛋白的表达 使用添加有蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Thermo Fisher) 的 RIPA 裂解和提取液 (G-Biosciences, 货号 786-490) 提取 C2C12 成肌细胞蛋白,使用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Thermo Scientific) 测定蛋白质浓度。如前期研究<sup>[9]</sup>所述方法进行蛋白质印迹实验。使用抗体 ROCK1 (CST, 货号 4035S, 稀释比例 1 : 1 000)、动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1; CST, 货号 8570, 稀释比例 1 : 1 000)、磷酸化 Drp1 (p-Drp1; CST, 货号 3455S, 稀释比例 1 : 1 000)、E3 泛素连接酶肌肉环指蛋白 1 (muscle RING finger-1, MuRF1; Santa Cruz, 货号 sc-398608, 稀释比例 1 : 500)、肌肉萎缩 F-box (muscle atrophy F-box, MAFbx, 又称 Atrogin1<sup>[11]</sup>; Santa Cruz, 货号 sc-121485, 稀释比例 1 : 100)、β-肌动蛋白 (β-actin; CST, 货号 3700, 稀释比例 1 : 1 000)。

1.4 细胞线粒体染色 实验过程中,使用线粒体形态特异性染色试剂 MitoTracker<sup>®</sup> Red CMXRos 红色荧光探针 (Thermo Scientific, 货号 M7512) 进行线粒体形态染色。实验步骤按照试剂说明书进行操作。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。实验所得数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组样本比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 ROCK1 过表达引起 C2C12 成肌细胞呼吸异常 根据 Seahorse 中 Mito-Stress 结果 (图 1), ROCK1 过表达引起 C2C12 成肌细胞 OCR 和 ECAR 增加。ROCK1 过表达能够增加 C2C12 成肌细胞的基础呼吸 ( $P < 0.01$ )、细胞最大呼吸 ( $P < 0.01$ ) 及电子呼吸链偶

联参与产生 ATP 的呼吸 ( $P < 0.01$ )。

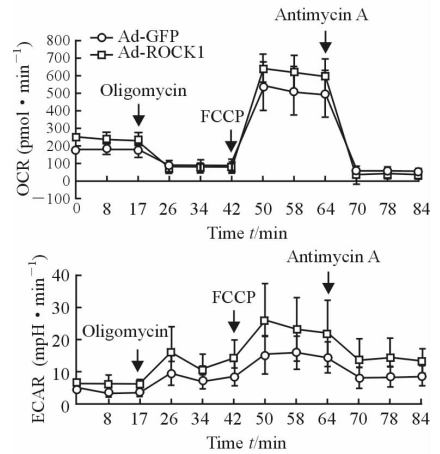


图 1 ROCK1 过表达对 C2C12 成肌细胞呼吸功能的影响  
Fig 1 Effect of ROCK1 overexpression on respiratory functions of C2C12 myoblasts

Seahorse Mito-Stress results. OCR: Oxygen consumption rate; ECAR: Extracellular acidification rate; ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; GFP: Green fluorescent protein; FCCP: Carbonyl cyanide-*p* (trifluoromethoxy) phenylhydrazone.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.2 ROCK1 过表达导致 C2C12 成肌细胞线粒体裂变增加 使用 MitoTracker<sup>®</sup> Red MXRos 红色荧光探针针对 C2C12 成肌细胞进行染色,结果显示,与 Ad-GFP 组相比,ROCK1 过表达可使 C2C12 成肌细胞线粒体裂变增加,体积变小,线粒体大小频数分布左移 (图 2)。

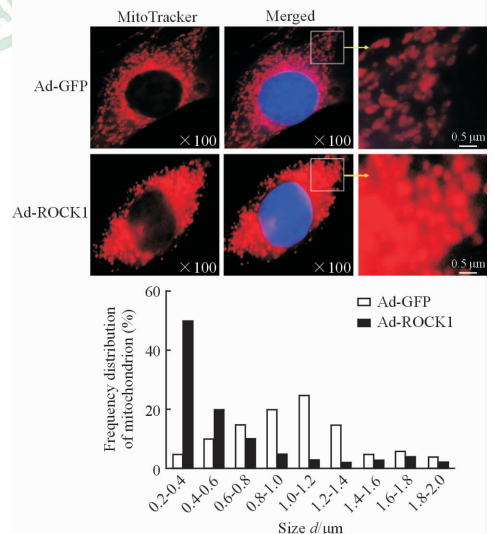


图 2 ROCK1 过表达对 C2C12 成肌细胞线粒体形态的影响  
Fig 2 Effect of ROCK1 overexpression on mitochondrial morphology of C2C12 myoblasts

MitoTracker staining results showed the mitochondrial fragment number in Ad-ROCK1 group was increased, and the frequency distribution of mitochondrial size shifted to the left in comparison to Ad-GFP group. ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; GFP: Green fluorescent protein

2.3 法舒地尔改善 ROCK1 过表达导致的 C2C12 成肌细胞呼吸异常 Seahorse Mito-stress 结果 (图 3) 示: 法舒地尔在一定程度上降低了 ROCK1 过表达时 C2C12 成肌细胞在 Mito-stress 过程中增加的 OCR 和 ECAR; 同时, 法舒地尔能够减弱 ROCK1 过表达导致的基础呼吸、最大呼吸的增加程度, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Ad-ROCK1F 和 Ad-GFPF 组相比细胞基础呼吸和最大呼吸无明显改变 ( $P > 0.05$ )。

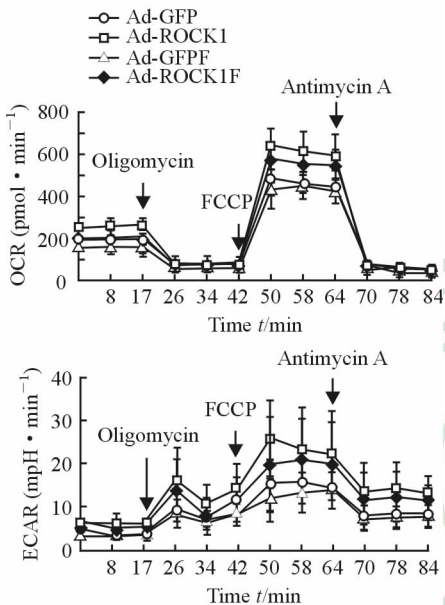


图 3 法舒地尔改善 ROCK1 过表达导致的 C2C12 成肌细胞呼吸异常

Fig 3 Fasudil reducing respiratory dysfunction of C2C12 myoblasts caused by ROCK1 overexpression

Seahorse Mito-Stress results. OCR: Oxygen consumption rate; ECAR: Extracellular acidification rate; ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; GFP: Green fluorescent protein; FCCP: Carbonyl cyanide-*p* (trifluoromethoxy) phenylhydrazone.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.4 法舒地尔对线粒体动力相关蛋白活性和肌肉萎缩相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹分析结果显示, 法舒地尔能够降低 ROCK1 过表达引起的促进线粒体裂变的 Drp1 激活 (p-Drp1/Drp1 增加), 以及 ROCK1 过表达引起的肌肉萎缩相关蛋白 MuRF1 和 Atrogin1 表达的增加 (图 4)。

### 3 讨论

CKD 时机体蛋白合成减少、蛋白降解增加导致了肌肉萎缩的发生<sup>[12-16]</sup>。体内蛋白的降解主要依靠激活 ATP-依赖的泛素蛋白酶系统<sup>[12]</sup>, 这一系统的激活需要消耗大量能量。线粒体作为机体能量产生

的主要场所, 其形态、数量及细胞内分布都反映了机体的代谢状态。生理状态下, 线粒体裂变和聚变维持相对平衡, 共同抵抗外界的有害刺激, 这一平衡一旦被打破, 就会导致线粒体发生功能紊乱, 进而导致机体能量供应异常<sup>[17]</sup>。

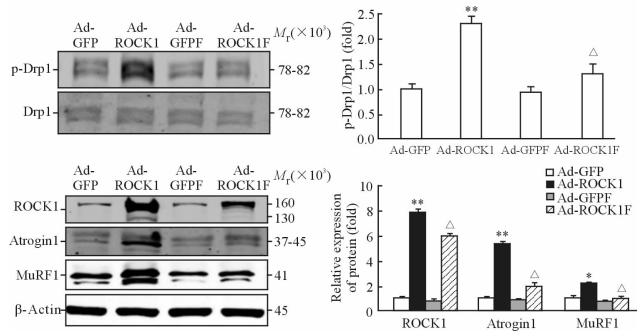


图 4 法舒地尔对线粒体动力相关蛋白活性和肌肉萎缩相关蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of fasudil stimulation on activity of mitochondrial dynamin-related protein and expression of muscle atrophy-related proteins

Western blotting results. ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; GFP: Green fluorescent protein; Drp1: Dynamin-related protein 1; p-Drp1: Phosphorylated Drp1; Atrogin1: MAFbx, Muscle atrophy F-box; MuRF1: Muscle RING finger-1. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ad-GFP group;  $\triangle P < 0.05$  vs Ad-ROCK1 group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

本实验为探究 ROCK1 过表达的 C2C12 成肌细胞是否存在线粒体功能异常, 通过 Seahorse 检测细胞呼吸。首先测定 OCR, 在加入寡霉素之前显示的 OCR 值代表细胞的基础耗氧率, 可认为是基础呼吸, 主要包括线粒体氧化磷酸化及质子漏所消耗的氧 (即质子经线粒体膜上的呼吸链传递形成一侧高电势, 趋使一部分质子回流, 通过 ATP 合酶形成 ATP, 将势能转化为 ATP 能量; 另一部分质子通过线粒体膜后只是发生氧化, 将势能转化为热量, 并没有用于合成 ATP)。寡霉素是 ATP 合酶抑制剂, 加入后, OCR 降低值代表机体用于 ATP 合成的耗氧量, 间接反映细胞此时的 ATP 产量。实验中发现, ROCK1 过表达不仅增加细胞的基础呼吸, 而且增加细胞 ATP 的产生, 但这种 ATP 的增加以缩短细胞寿命为代价 (Seahorse 检测结束后发现 ROCK1 过表达组的细胞大量死亡)。FCCP 是一种线粒体电子呼吸链解偶联剂, 其作为一种质子载体, 可以使大量质子回流, 大量耗氧, 但这种质子回流不能产生 ATP。加入 FCCP 后 OCR 的增加值代表线粒体的最大耗氧能力, 间接反映最大的呼吸能力, 而与其与基础呼吸的差值代表细胞的呼吸潜力。本实验中, ROCK1 过表达组细胞最大呼吸能力增加。最后加入的抗毒素 A, 其作为呼吸链抑制剂, 完全阻止线粒

体耗氧。因此,结合 Seahorse 结果,可认为 ROCK1 过表达能够导致细胞基础呼吸、最大呼吸及 ATP 的产生增加,但在一定程度上,这种高代谢的呼吸消耗加速了细胞的死亡。为进一步验证实验结果,我们对各组细胞线粒体进行形态和功能的特异性染色,结果表明,ROCK1 过表达后细胞线粒体裂变增加,呈现碎片化,线粒体大小频数分布左移。

法舒地尔作为 ROCK1 抑制剂,目前临床上用于改善心脑血管循环,但并没有应用于改善肌肉萎缩的报道。我们的研究结果显示,法舒地尔可在一定程度上改善 ROCK1 过表达后造成细胞高耗氧的状态,且对细胞的基础呼吸无明显影响。同时,法舒地尔减弱了 ROCK1 过表达对线粒体裂变所需 p-Drp1 蛋白的表达的影响,也降低了肌肉萎缩相关蛋白 MuRF1 和 Atrogin1 蛋白的高表达。法舒地尔作为目前已在临床应用的药物,给未来应用于临床治疗肌肉萎缩提供了新的可能,但仍需要在动物实验中进一步证实。

## 志 谢

感谢美国贝勒医学院胡兆永教授对本实验的帮助。

## [参考文献]

- [1] LEVEY A S, CORESH J. Chronic kidney disease[J]. *Lancet*, 2012, 379: 165-180.
- [2] TAMAKI M, MIYASHITA K, WAKINO S, MITSUISHI M, HAYASHI K, ITOH H. Chronic kidney disease reduces muscle mitochondria and exercise endurance and its exacerbation by dietary protein through inactivation of pyruvate dehydrogenase [J]. *Kidney Int*, 2013, 85: 1330-1339.
- [3] JHA V, GARCIA-GARCIA G, ISEKI K, LI Z, NAICKER S, PLATTNER B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives[J]. *Lancet*, 2013, 382: 260-272.
- [4] ELGASS K, PAKAY J, RYAN M T, PALMER C S. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833: 150-161.
- [5] DECLÈVES A E, SHARMA K. Novel targets of antifibrotic and anti-inflammatory treatment in CKD [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10: 257-267.
- [6] HAGMANN H, BRINKKOETTER P T. ROS and oxidative stress in CKD patients: is it the mitochondria that keeps CKD patients in bed?[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30: 867-868.
- [7] GRANATA S, DALLA GASSA A, TOMEI P, LUPO A, ZAZA G. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease [J/OL]. *Nutr Metab*

(Lond), 2015, 12: 49. doi: 10.1186/s12986-015-0044-z. eCollection 2015.

- [8] GAO H, HOU F, DONG R, WANG Z, ZHAO C, TANG W, et al. Rho-Kinase inhibitor fasudil suppresses high glucose-induced H9c2 cell apoptosis through activation of autophagy[J]. *Cardiovasc Ther*, 2016, 34: 352-359.
- [9] PENG H, CAO J, YU R, DANESH F, WANG Y, MITCH W E, et al. CKD stimulates muscle protein loss via Rho-associated protein kinase 1 activation[J/OL]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27: 509-519. doi: 10.1681/ASN.2014121208.
- [10] WANG W, WANG Y, LONG J, WANG J, HAUDEK S B, OVERBEEK P, et al. Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells [J]. *Cell Metab*, 2012, 15: 186-200.
- [11] FOLETTA V C, WHITE L J, LARSEN A E, LÉGER B, RUSSELL A P. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy[J]. *Pflugers Arch*, 2011, 461: 325-335.
- [12] WORKENEH B T, MITCH W E. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease[J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91: 1128S-1132S.
- [13] YOKOI H, YANAGITA M. Decrease of muscle volume in chronic kidney disease: the role of mitochondria in skeletal muscle[J]. *Kidney Int*, 2014, 85: 1258-1260.
- [14] WANG X H, MITCH W E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10: 504-516.
- [15] CARRERO J J, STENVINKEL P, CUPPARI L, IKIZLER T A, KALANTAR-ZADEH K, KAYSSEN G, et al. Etiology of the protein-energy wasting syndrome in chronic kidney disease—a consensus statement from the International Society of Renal Nutrition and Metabolism (ISRNM)[J]. *J Ren Nutr*, 2013, 23: 77-90.
- [16] IKIZLER T A, CANO N J, FRANCH H, FOUQUE D, HIMMELFARB J, KALANTAR-ZADEH K, et al. Prevention and treatment of protein energy wasting in chronic kidney disease patients: a consensus statement by the International Society of Renal Nutrition and Metabolism[J]. *Kidney Int*, 2013, 84: 1096-1107.
- [17] ROMANELLO V, GUADAGNIN E, GOMES L, RODER I, SANDRI C, PETERSEN Y, et al. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy[J]. *EMBO J*, 2010, 29: 1774-1185.

[本文编辑] 杨亚红