

模拟微重力下秀丽隐杆线虫的力学感知 和肌萎缩的发生机制*

——太空飞行线虫试验地面平行对照研究部分

王 驰^{1, 2)} 桑 晨^{1)**} 杨 春¹⁾ 孙 艳¹⁾ 易宗春¹⁾ 庄逢源¹⁾

(¹⁾北京航空航天大学大学生物工程系, 北京 100083;

²⁾CGMC,CNRS-UMR 5534, University Claude Bernard Lyon-1, 69622 Villeurbanne Cedex, France)

摘要 目前, 微重力导致肌萎缩的分子机制尚不清楚, 重力感知是该事件发生的关键环节. 为了回答这一问题, 在此之前首先实施了太空线虫试验, 这部分结果已经在本刊报道过. 而本次研究主要是在地面上建立了模拟微重力环境, 观察处理后秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)体壁肌细胞结构和功能的变化, 一方面用于验证太空试验, 同时比较两种处理结果的异同, 以便于评价地面模拟微重力的有效性. 经过 14 天 19.5 h 旋转模拟微重力处理后, 对线虫生存率和运动能力进行了观察, 并检测了几个重要的肌相关基因表达和蛋白质水平. 模拟微重力下线虫生存率没有明显变化, 但运动频率显著下降, 爬行轨迹也发生了轻微改变, 运动幅度降低, 提示线虫运动功能出现障碍. 从形态学上观察发现: 肌球蛋白 A(myosin A)免疫荧光染色显示模拟微重力组肌纤维面积缩小, 而肌细胞致密体(dense-body)染色可见荧光亮度下降. 这些结果直接提示模拟微重力使线虫出现了肌萎缩. 随后 Western blotting 试验结果揭示, 模拟微重力组线虫体壁肌的主要结构蛋白——myosin A 含量减少, 进一步确证了微重力性肌萎缩发生. 在基因水平, 旋转后抗肌萎缩蛋白基因(*dys-1*)表达明显上升, 而 *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* 和 *egl-19* 的 mRNA 水平均下调, 提示 *dys-1* 在骨骼肌感知和传导力学信息方面有重要作用, 而 *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* 和 *egl-19* 则分别从结构和功能两个途径促进了微重力性肌萎缩的发生和发展. 本次试验所得到的结果同太空飞行试验结果十分相似, 一方面强化了太空试验结论, 另一方面说明在地面上模拟微重力对生物体进行研究是有效可行的, 将有助于提高太空试验的质量.

关键词 秀丽隐杆线虫, 抗肌萎缩蛋白, 肌球蛋白 A, 模拟微重力

学科分类号 Q66, Q494

微重力所致肌萎缩是太空飞行中难以避免的现象, 科学家对此提出过废用机制等推测. 在微重力下, 由于承重肌不必再抵抗重力作用, 因此破坏了肌代谢平衡, 最终导致收缩蛋白分解加速, 合成下降^[1~4]. 这一学说是合理的, 但是在细胞和分子水平导致肌萎缩的机制至今尚不完全清楚. 另外, 我们注意到肌萎缩也会发生在某些病理状况下. 人类的 Duchenne 型和 Becker 型肌营养不良症(Duchenne Muscular Dystrophy/Becker Muscular Dystrophy; DMD/BMD)是两种进行性神经肌肉退化性病变, 主要是由于抗肌萎缩蛋白(Dystrophin)基因变异引起的. 不同原因可以导致相同结果, 这使我们想到疾病引起的肌萎缩和太空飞行导致的肌萎缩可能拥有部分共同的, 或者交叉的发展途径, 而

抗肌萎缩蛋白则是其中重要的环节.

在线虫, 抗肌萎缩蛋白的编码基因 *dys-1* 是 MyoD 家族的唯一成员. 结构学研究显示, 其 N 端与细胞内肌动蛋白纤维(F-actin)相连, C 端与一组蛋白质相连, 从而形成一个被称为抗肌萎缩蛋白-糖蛋白(dystrophin-glycoprotein complex, DGC)的跨膜复合物. 复合物在细胞膜外侧的 α -dystroglycan 蛋白与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相连, 所以研究者认为 DGC 在细胞外基质和细胞内骨架之间形成联系通路, 对维持肌细胞力学稳定性

* 国家自然科学基金资助项目(10672013).

** 通讯联系人.

Tel: 010-82338062, E-mail: sangchen@buaa.edu.cn

收稿日期: 2008-03-19, 接受日期: 2008-05-16

有重要作用,起到生物转换器作用,它能够将力学刺激转变为生物反应^[5-9]。哺乳动物的 DGC 复合物有 9 个不同的基因产物组成(抗肌萎缩蛋白 dystrophin、抗肌萎缩蛋白聚糖 dystroglycan、4 个肌聚多糖 sarcoglycans、肌长蛋白 sarcospan、互生蛋白 syntrophin 和异连蛋白 dystrobrevin)。由于哺乳动物基因编码的复杂性,同一家族的蛋白质常常由不同基因决定,比如,在哺乳动物有 3 种抗肌萎缩蛋白基因(dystrophin, utrophin 和 DRP2)和 2 种异连蛋白基因,他们通过不同的基因拼接可以生成

许多异构体。目前,已知在人类发现有 17 种基因编码这 9 种蛋白质^[10]。这种多编码生理现象的原因尚不完全清楚。但是无脊椎动物,包括秀丽线虫,只含有一个抗肌萎缩蛋白基因^[10, 11]。在 Hutter 等^[12]的综述里总结了线虫 DGC 复合物组成,包括 1 个抗肌萎缩蛋白,1 个抗肌萎缩聚糖,1~3 个肌聚多糖(δ/γ 之一或者 1 个 α 和 1 个 β),没有肌长蛋白,2 个互生蛋白(1 个 α/β 和 1 个 γ)和 1 个异连蛋白(图 1)。可见线虫的 DGC 复合物要比脊椎动物的简单得多,功能上更具保守性。

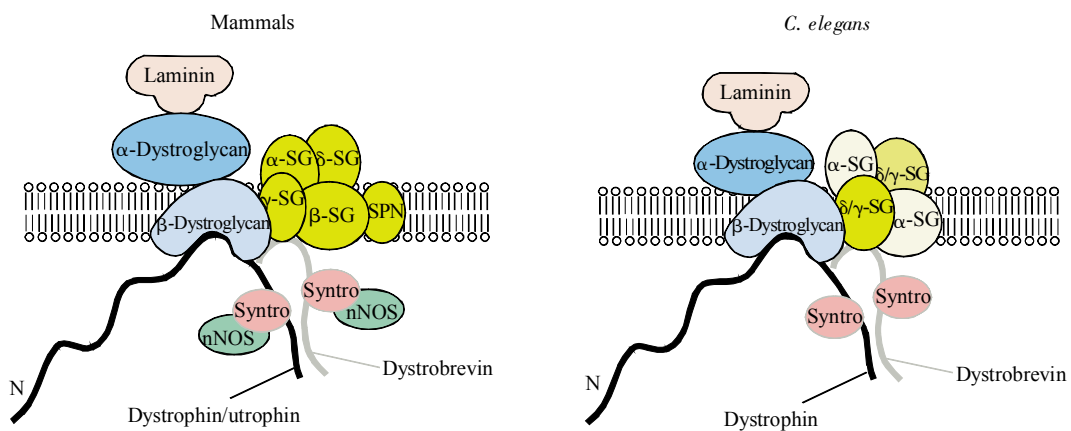


Fig. 1 Model of the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in mammals and in *C. elegans*

The *C. elegans* model is built by analogy to the mammalian model. Most of the components of the DGC are found in *C. elegans* with the exception of sarcospan (SPN) and nitric oxide synthase (nNOS). α - and β -sarcoglycan are shown in pale because the existence of functional homologues in *C. elegans* is unclear. The *C. elegans* γ/δ -sarcoglycan homologue may form dimers. SG, sarcoglycans; N, N-terminus end of dystrophin.

人类的抗肌萎缩蛋白缺失会导致整个 DGC 消失,并与肌萎缩发生相关^[13]。但是在线虫,仅 *dys-1* 基因突变并不会导致肌结构的明显改变。如果同时伴有 L-型电压依赖性钙通道蛋白基因(*egl-19*, 编码一种 Ca^{2+} 离子通道蛋白)或螺旋-环-螺旋转录因子-1(*hlh-1*, 编码调节肌肉结构基因表达的转录因子)突变,线虫体壁肌结构会发生显著变化^[14-16],提示在这些基因之间存在协同作用,均不同程度地参与了线虫肌萎缩发生发展的过程。体壁肌中 *hlh-1* 表达直接调节肌浆球蛋白重链水平(*unc-54* 和 *myo-3* 的表达),进而影响肌球蛋白含量。而 *egl-19* 则通过调节 Ca^{2+} 代谢途径影响肌发育。所以,为了揭示这些基因的功能和相互作用关系,本研究检测了 *dys-1*, *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* 和 *egl-19* 基因表达在模拟微重力下的变化。

旋转细胞培养系统(rotating cell culture system, RCCS)在探索模拟微重力对细胞功能影响上取得了很大的成功,很多细胞学适应性反应与真实的空间

飞行有相似结果。同时,在应用 RCCS 研究植物发育中也得到了许多有启发性的结果,说明重力对植物的发育也有重大影响。但是对于多细胞的生物体线虫,模拟微重力是否对它的生长发育有影响还是一个没有解决的问题。从线虫的生长发育形态来说,它存在腹侧和背侧,也就是说在线虫发育过程中,虽然线虫体积如此之小,腹背部由于重力产生的静水压力之差也很小,但是它对于线虫的形态发生学有很大影响。秀丽线虫在 RCCS 旋转下进行培养时重力方向在不断变化,不存在一个恒定方向的静水压力,这是否会产生类似于太空微重力性肌肉萎缩,是一个很值得探讨的问题。为此我们进行了旋转模拟微重力的研究,主要观察了线虫体壁肌结构和功能变化,同时利用它对基因和蛋白质的影响推导出力学刺激变化是通过哪些环节导致肌萎缩的,并以此来验证太空实验结果。当然,这种模拟的微重力环境与真正的太空环境仍存在差别,但是大量研究结果显示,旋转模拟微重力下细胞等生命

体会发生与太空实验非常相似的反应, 所以它对空间生命科学有一定启示和验证作用.

1 方 法

1.1 材料和仪器

CeMM 线虫培养液 (Szewczyk N J, 2003); optiCell™ 细胞培养板 (1100, Biocrystal, USA); SYBR premix Ex Taq real time PCR 试剂盒 (Takara, Japan); *dys-1*, *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* 和 *egl-19* 线虫基因引物 (Takara, Japan); BA83 nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell); 胶原蛋白酶 (Sigma, Chicago, USA); 若丹明 - 鬼笔环肽染料 (Invitrogen, California, USA); MH24 抗致密斑单克隆抗体和 5.6 抗肌球蛋白 A 单克隆抗体 (Iowa City, USA); FluoProbes 546 抗鼠 IgG 和 FluoProbes 488 抗鼠 IgG (Interchim, Montlucon, France); ABI PRISM 7000 Real-time PCR 仪 (Foster City, USA), 激光共聚焦显微镜 (Leica, Germany; ZEISS, Germany), 旋转培养模拟微重力仪 (Synthecon, USA).

1.2 试验过程

Bristol N2 野生型秀丽线虫株在 20℃ 下 optiCell™ 细胞培养板中繁殖 19 天, 然后将其放在旋转培养模拟微重力仪上旋转培养 14 天 19.5 h, 转速为 20 r/min. 模拟微重力期间温度保持在 (21±4)℃. 旋转后, 取少量线虫用于计算生存率、运动频率和观察爬行轨迹波. 剩余线虫于液氮中速冻, -85℃ 冰箱中保存. 在形态学上, 根据以往文献采用了若丹明 - 鬼笔环肽染色和肌球蛋白 / 致密体免疫荧光染色^[17, 18].

Real-time PCR 用于检测 5 种重要肌相关基因表达. Primer Express 软件 (Version 2.0, Applied Biosystems, USA) 设计的引物序列: *dys-1* (F, GTGA-ATCCGCCGCATTTG; R, AGCGCCTTCCGATAT-TGTTG); *hlh-1* (F, ACGGATTCGGACGACGATA-G; R, CGCGACAATCTGTCCAAAGAG); *unc-54* (F, GATGCCGAATCCCAAGTCAA; R, CGGCTTC-GTGTGTTAGTTCT); *myo-3* (F, AAAGGTCAAG-CCAATGCTCAA; R, TCTTCAACCAAATCGGC-AAC); *egl-19* (F, TGCACTGGACGATTCAACATC; R, CTTGCCAGGCTTCTCCAGTT); 内参基因 *gpd-2* (F, CCGTCAACGATCCATTCATCT; R, GGTAGT-CTCCCTCGTGAGCAA).

Western blotting 用于检测两组线虫中肌球蛋

白 A 含量. 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SPSS 软件进行统计学分析, 组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结 果

2.1 生存率和运动功能变化

从统计分析结果看, 模拟微重力组和对照组线虫的生存率没有显著差异. 但是, 经过近 15 天旋转处理后线虫运动频率明显下降 ($P < 0.01$ vs 地面对照组, 表 1). 线虫爬行轨迹也发生了改变, 但两组比较没有显著性 ($P > 0.05$, 图 2).

Table 1 Summary of survival rate, movement rate and crawl wave ratio of worms after simulated microgravity

Groups	Survival rate /%	Movement rate/min	Ratio (height/width) of crawl trace wave
Microgravity	77.44 ± 11.43	21.6 ± 8.1*	0.39 ± 0.08
Ground control	83.53 ± 9.99	82.40 ± 18.21	0.44 ± 0.07

$\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ simulated microgravity vs ground control.



Fig. 2 The crawl wave of *C. elegans* in simulated microgravity group and ground control group

G: Ground control group; M: Simulated microgravity group.

2.2 形态学观察

大量微重力实验中, 已经发现大鼠和人类肌肉结构有明显改变^[19, 20], 但至今尚无微重力导致的线虫肌萎缩的形态学证据. 因此, 本实验对线虫体壁肌细胞中肌动蛋白纤维, 肌球蛋白 A 和致密体进行了荧光染色和显微镜下观察, 其中肌动蛋白纤维是体壁肌细肌丝的主要成分, 肌球蛋白 A 是体壁肌粗肌丝主要重链之一, 而致密体则是细肌丝锚定在线虫体表的固定点. 结果发现: 肌球蛋白 A 免疫荧光染色显示微重力组肌纤维面积缩小, 同时细胞长度没有明显改变, 致密体染色可见经微重力处理后荧光强度普遍下降. 但是, 两组线虫 F-actin 的荧光染色未见明显差异 (图 3).

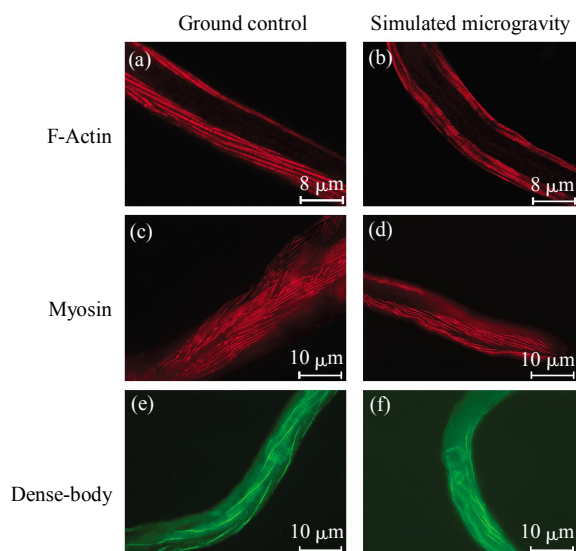


Fig. 3 The effects of simulated microgravity on muscular structure

Fluorescence microscopy of nematodes body-wall muscles after staining with phalloidin-rhodamine [(a) and (b)], anti-myosin A antibodies [(c) and (d)] or anti-dense-body antibodies [(e) and (f)]. Striated body-wall muscles of (a), (c) and (e) are the photos in ground control animal and (b), (d) and (f) are the photos in simulated microgravity animals.

Genes	Microgravity	Ground	Microgravity/Ground
dys-1	0.0298 ± 0.0049	0.0176 ± 0.0050	1.7241 ± 0.1803
hlh-1	0.0139 ± 0.0010	0.0395 ± 0.0018	0.3512 ± 0.0167
unc-54	0.4754 ± 0.0306	0.7010 ± 0.0093	0.6786 ± 0.0511
myo-3	0.0111 ± 0.0016	0.0210 ± 0.0039	0.5342 ± 0.0759
egl-19	0.0236 ± 0.0005	0.0823 ± 0.0390	0.3253 ± 0.1232

Fig. 4 Real-time quantitative PCR analysis of muscle-related genes of worms in microgravity group

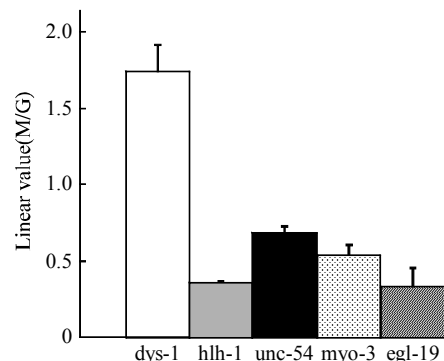
Expressions of *dys-1*, *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* and *egl-19* are showed. The mRNA expression of each gene was adjusted by that of GAPDH (*gpd-2*) mRNA, which was used as internal standard. M: Simulated microgravity group; G: Ground control group.

2.3 5种重要肌相关基因的表达

为了比较两组基因表达的差异, 研究采用了半定量 PCR 技术. 结果显示模拟微重力组 *dys-1* 的线性数值从 0.0176 ± 0.0050 升至 0.0298 ± 0.0049 , 增加了 72.41%. 而 *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* 和 *egl-19* 基因的线性数值分别下降了 64.88%, 32.14%, 46.58% 和 67.47% (图 4).

2.4 Western blotting 检测肌球蛋白 A 含量

为了测量线虫肌球蛋白 A 水平, 研究采用了 Western blotting 方法进行定量. 从底片观察, 250 ku 处条带为肌球蛋白 A, 经过 Image J 图像分析软件计算, 模拟微重力组肌球蛋白 A 条带灰度为 187.688, 与地面对照组相比 (灰度值 189.906) 水平略有下降, 提示模拟微重力组线虫体壁肌细胞中肌球蛋白 A 有轻微丢失.



3 讨 论

以往模拟微重力研究主要以细胞和组织微块为研究对象, 极少用整体动物进行实验, 本研究采用了最简单的多细胞动物线虫进行了模拟微重力研究, 得到了一些和真实航天飞行实验类似的结果. 说明在线虫发育过程中恒定的重力刺激, 以及由于重力引起的静水压对线虫肌肉发育有重要影响. 但是对于模拟微重力下产生肌肉萎缩的机理还有很多工作要做. 线虫的神经感觉系统以及可能存在于线虫体壁的细胞感受器对重力的响应都是非常值得研

究的课题^[21]. 由于模式生物线虫的自身特点及培养的简易性, 使其可以方便地用于这种模拟微重力研究, 也为该类研究打开了一个新的局面. 本次旋转模拟微重力处理将近 15 天, 之后首先观察了线虫的生存率、运动频率和爬行轨迹. 线虫生存率在旋转后略有下降, 运动频率变慢, 在琼脂板上爬行轨迹波的高度和宽度比率下降, 说明线虫运动能力明显减弱. 这些生存及运动功能方面的表现与太空飞行后线虫变化极为相似, 而且有些变化 (如运动频率下降) 更为显著, 进一步支持了空间研究的结果,

也说明本次模拟微重力试验是成功的。

利用免疫荧光染色对秀丽线虫体壁肌的主要组成蛋白——肌动蛋白、肌球蛋白 A 和致密体结构进行了直接的形态学观察。在模拟微重力组中, 线虫肌球蛋白荧光染色显示, 体壁肌细胞面积明显缩小, 但长度并无变化, 为模拟微重力下线虫肌萎缩提供了直观证据。而反映线虫体壁肌细肌丝锚定结构的致密体在形态结构上并无显著变化, 但与地面对照组相比, 其荧光染色强度普遍下降, 提示致密体含量减少, 提示细肌丝与其连接强度减弱。但是若丹明-鬼笔环肽荧光染色显示两组线虫的 F-actin 结构和含量并无改变。肌动蛋白, 肌球蛋白 A 和致密体实际上代表了 3 种体壁肌的主要结构——细肌丝, 粗肌丝和(细肌丝的)肌丝锚定点。无论是在太空实验, 还是本次模拟微重力实验中我们发现它们的变化并不一致, 首先粗肌丝较细肌丝更容易受重力影响, 说明粗肌丝在重力感知, 传导和维持肌细胞内外力学平衡方面起主要作用, 其次微重力下细肌丝基本不变, 其锚定点(致密体)含量却减少, 提示外环境力的变化同样可以改变细胞内部生物力学结构。正如大量太空飞行和模拟微重力处理后可以观察到细胞骨架结构的巨大变化一样^[22~25]。

众所周知, 蛋白复合物 DGC 镶嵌在细胞膜内, 将细胞外基质与细胞内骨架相连, 不断探测外环境的力学刺激, 指导肌组织作出适应性反应^[13, 26]。抗肌萎缩蛋白是蛋白质复合物 DGC 的重要组成蛋白, 在人类编码该蛋白质的基因 *dys-1* 突变会导致整个复合物缺失。而于秀丽线虫中 *dys-1* 只在体壁肌内特异性表达, 但是仅此基因突变并没有肌萎缩表现, 说明它在线虫体内的功能与人体的略有不同, 说明, 人类经过长期进化后该基因功能大大加强, 肌肉组织对其依赖性更大, 即使小小的结构变化也能导致整个人瘫痪, 并且发病很早(一般在 30 岁之前)。可见 *dys-1* 在肌肉功能方面起到非常重要的作用, 而我们进行的线虫研究更体现了该基因在功能上的保守性。我们的试验结果显示, 编码 DGC 中抗肌萎缩蛋白的 *dys-1* 基因表达明显上升, 该结果与太空组线虫基因变化是一致的, 分析认为这一结果进一步揭示了在生物体内需要将其接受的力学刺激维持在一定范围内以保证肌肉组织正常功能, 所以在重力刺激减弱时, 只有 DGC 这种感知重力变化的结构增加才能达到接受更多力学刺激的目的。既然已知 DGC 在力学传导上的特殊作用, 本研究结果则进一步证明, 该基因在微重力诱导性

肌萎缩中起重力感知、传导和调控作用, 而且 *dys-1* 基因表达在转录水平就受微重力影响。

在线虫体壁肌细胞中, 螺旋-环-螺旋转录调节因子 -1 基因 *hlh-1* 属于肌源调节因子家族成员(myogenic regulatory factor family, MRFs), 控制两种肌球蛋白重链合成, 即分别由 *myo-3* 和 *unc-54* 编码的 MHC A 和 MHC B^[27, 28]。MHC A 和 MHC B 蛋白是体壁肌粗肌丝的主要组成部分, 形成肌球蛋白重链, 是线虫运动所必需的。转录调节因子 *hlh-1* 属于 MyoD 家族, 主要在横纹肌内表达, 其表达产物能够跟 DNA 结合调节其表达, 在人类该家族有 4 个成员(*myoD*, *myogenin*, *myf-5* 和 *mrf4*), 而线虫 *hlh-1* 则是唯一的该家族成员, 只在成虫的体壁肌细胞内特异性表达。序列同源性和相似表达模式提示, 脊椎动物和无脊椎动物的 *hlh-1* 均在肌肉形成过程中起关键作用, 实际上 *hlh-1* 因子能够使大鼠的成纤维细胞转化成肌细胞, 并能表达肌肉特异性蛋白, 可见它在肌肉发育过程中的重要作用^[29]。本研究发现 *hlh-1*, *unc-54* 和 *myo-3* 基因在模拟微重力处理后同时下降, 而且 Western blotting 检测发现线虫肌球蛋白 A(Myosin A)显著流失, 进一步确证了微重力性肌萎缩的发生。这些变化与我们的太空飞行试验和其他文献报道是一致的^[1], 说明在模拟微重力下线虫转录调节因子基因 *hlh-1* 下降使转录调节蛋白减少, 从而影响肌源性基因(*unc-54* 和 *myo-3* 等)表达, 最终导致肌结构蛋白 Myosin A 含量减少, 从结构上直接导致了肌肉萎缩, 这可能是微重力性肌萎缩发生的直接原因。

基因 *egl-19* 编码线虫电压依赖 L-型 Ca^{2+} 离子通道 $\alpha 1$ 亚单位蛋白。基因 *egl-19* 突变是致命的, 然而其功能减退会导致肌肉收缩功能下降, 提示该离子通道在体壁肌细胞功能中起重要作用^[30, 31]。本实验发现, *egl-19* 表达在模拟微重力组下调, 说明它通过减弱体壁肌细胞的收缩功能而间接促进了微重力性肌萎缩, 这部分结果揭示了导致微重力性肌萎缩的另一个影响途径。

总之, 本研究结果显示 *dys-1* 所在的 DGC 蛋白复合物参与了感知, 传导和调节微重力刺激的反应, *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* 和 *egl-19* 基因表达分别通过结构和功能两个途径促进了模拟微重力性肌萎缩, 但这只是微重力性肌萎缩的分子机制之一。本次模拟微重力实验的结果基本上和我们太空实验的数据一致, 有力地支持了空间研究的结论^[32]。重力感知和传导是一个非常复杂的过程, 沿着我们已有

的研究成果追踪, 可望找到更多的线索, 以完善人们对这一问题的认识。

致谢 本次模拟微重力试验是中国北京航空航天大学(BUAA)与法国里昂第一大学(CGMC)共同合作完成。我们衷心感谢法国里昂第一大学 CGMC 实验室的 L. Segalat 教授, G. Laure 和 L. Claire 为我们实验提供宝贵的线虫抗体和进行长达一年的技术指导和合作。感谢国家留学基金委中法博士生院联合培养项目的大力资助。本次实验使用的线虫株是美国研究资源中心资助的线虫基因中心赠予的, 对此深表感谢!

参 考 文 献

- Akira H, Nathaniel J S, Catharine A C, *et al.* Decreased expression of myogenic transcription factors and myosin heavy chains in *Caenorhabditis elegans* muscles developed during spaceflight. *J Exp Biol*, 2006, **209**(Pt16): 3209~3218
- Taylor W E, Bhasin S, Lalani R, *et al.* Alteration of gene expression profiles in skeletal muscle of rats exposed to microgravity during a spaceflight. *J Gravit Physiol*, 2002, **9**(2): 61~70
- Harrison B C, Allen D L, Girtan B, *et al.* Skeletal muscle adaptations to microgravity exposure in the mouse. *J Appl Physiol*, 2003, **95**(6): 2462~2470
- Stein T P, Wade C E. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *J Nutr*, 2005, (Suppl): 1824s~1828s
- Ahn A H, Kunkel L M. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*, 1995, **3**(4): 283~291
- Matsumura K, Campbell K P. Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 1994, **17**(1): 12~15
- Michalak M, Opas M. Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Curr Opin Neurol*, 1997, **10**(5): 436~442
- Kim H, Rogers M J, Richmond J E, *et al.* SNF-6 is an acetylcholine transporter interacting with the dystrophin complex in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2004, **430**(7002): 891~896
- Rando T A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 2001, **24**(12): 1575~1594
- Greener M J, Roberts R G. Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*. *FEBS Lett*, 2000, **482**(1~2): 13~18
- Gieseler K, Grisoni K, Segalat L. Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2000, **10**(18): 1092~1097
- Hutter H, Vogel B E, Plenefisch J D, *et al.* Conservation and novelty in the evolution of cell adhesion and extracellular matrix genes. *Science*, 2000, **287**(5455): 989~994
- Barton E R. Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **290**(2): C411~419
- Gieseler K, Grisoni K, Mariol M C, *et al.* Overexpression of dystrobrevin delays locomotion defects and muscle degeneration in a dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord*, 2002, **12**(4): 371~377
- Gieseler K, Grisoni K, Segalat L. Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*, 2000, **10**(18): 1092~1097
- Mariol M C, Segalat L. Muscular degeneration in the absence of dystrophin is a calcium-dependent process. *Current Biology*, 2001, **11**(21): 1691~1694
- Waterston R H, Hirsh D, Lane T R. Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J Mol Biol*, 1984, **180**(3): 473~496
- Benian G M, Tinley T L, Tang X, *et al.* The *Caenorhabditis elegans* gene unc-89, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J Cell Biol*, 1996, **132**(5): 835~848
- Fitts R H, Riley D R, Widrick J J. Microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2002, **89**(2): 823~839
- Riley D A, Ellis S, Slocum G R, *et al.* In-flight and postflight changes in skeletal muscles of SLS-1 and SLS-2 spaceflown rats. *J Appl Physiol*, 1996, **81**(1): 133~144
- Chen Z X, Chen S Y, Dickson D W. Nematology. Sensory Structure and Function. Beijing: CABI publishing, 2004. 226~236
- Klein-Nulend J, Bacabac R G, Veldhuijzen J P, *et al.* Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Adv Space Res*, 2003, **32**(8): 1551~1559
- Lewis M L, Reynolds J L, Cubano L A, *et al.* Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat). *FASEB J*, 1998, **12**(11): 1007~1018
- Schatten H, Lewis M L, Chakrabarti A. Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. *Acta Astronautica*, 2001, **49**(3~10): 399
- Tabony J, Pochon N, Papaseit C. Microtubule self-organisation depends upon gravity. *Adv Space Res*, 2001, **28**(4): 529~535
- Batchelor C L. Sparks, signals and shock absorbers: how dystrophin loss causes muscle dystrophy. *Trends Cell Biol*, 2006, **16**(4): 198~205
- Dibb N J, Brown D M, Karn J, *et al.* Sequence analysis of mutations that affect the synthesis, assembly and enzymatic activity of the Unc-54 myosin heavy chain of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol*, 1985, **183**(4): 543~551
- Miller D M, Stockdale F E, Karn J. Immunological identification of the genes encoding the four myosin heavy chain isoforms of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(8): 2305~2309
- Lihsia C, Michael K, Michael S, *et al.* The *Caenorhabditis elegans* MYOD homologue HLH-1 is essential for proper muscle function and complete morphogenesis. *Development*, 1994, **120**(6): 1631~1641

- 30 Lee R Y, Lobel L, Hengartner M, *et al.* Mutations in the $\alpha 1$ subunit of an L-type voltage-activated Ca^{2+} channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. EMBO J, 1997, **16**(20): 6066~6076
- 31 Jospin M, Jacquemond V, Mariol M C, *et al.* The L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol, 2002, **159** (2): 337~348
- 32 Wang C, Sang C, Akira H, *et al.* Changes of muscle-related genes and proteins after spaceflight in *Caenorhabditis elegans*. Prog Biochem Biophys, 2008, **35**(10): 1195~1201
- 王 驰, 桑 晨, Akira H, 等. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(10): 1195~1201

Mechanisms of Muscular Atrophy and Gravisensing After Simulated Microgravity in *Caenorhabditis elegans*: Parallel Control to Spaceflight Research in *C. elegans**

WANG Chi^{1,2}, SANG Chen^{1**}, YANG Chun¹, SUN Yan¹, YI Zong-Chun¹, ZHUANG Feng-Yuan¹

⁽¹⁾Bioengineering Department, Beijing University of Aeronautics & Astronautics, Beijing 100083, China;

⁽²⁾CGMC,CNRS-UMR 5534, University Claude Bernard Lyon-1, 69622 Villeurbanne Cedex, France)

Abstract At present, the molecular mechanism underlying microgravity-induced muscular atrophy is still unknown, and gravisensing is the key point in this process. In order to answer these questions a research project of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) in spaceflight was carried out, which had been reported in this journal before. An environment of simulated microgravity on ground was established, and its major effects on body-wall muscles of *C. elegans* in the structures and functions were examined, which further confirmed the results from spaceflight studies, and comparing between these two different treatments was benefit for valuing the validity of simulated microgravity. Firstly, the survival rate and movement ability of *C. elegans* were observed, and five important muscle-related genes and three proteins were measured after 14 days 19.5 h rotation. The animals displayed reduced rates of movement with a lower ratio (height/width) in crawl trace wave in simulated microgravity, indicating a functional defect. In morphological observation decreased muscle fiber size in myosin immunofluorescence and duller dense-body staining were found in microgravity group, suggesting muscular atrophy had happened in *C. elegans*. Meantime the result of Western blotting showed the quantity of myosin A decreased significantly in simulated microgravity group, further confirming muscular atrophy. In genes transcription, it was noted that *dys-1* increased significantly in body-wall muscles, while *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* and *egl-19* mRNA levels declined after rotation. This study provided evidence that *dys-1* are involved in the transduction of mechanical information in skeletal muscle, potentially play a vital role in gravisensing. Genes of *hlh-1*, *unc-54*, *myo-3* and *egl-19* induced the muscular atrophy in simulated microgravity from the structures and functions ways respectively. Data of this study consolidated the results in our spaceflight researches. On the other hand, it is implied that simulated microgravity is an effective ways for improving the quality of space studies.

Key words *Caenorhabditis elegans*, dystrophin, myosin A, simulated microgravity

*This project was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(10672013).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-82338062, E-mail: sangchen@buaa.edu.cn

Received: March 19, 2008 Accepted: May 16, 2008