

网络出版时间:2025-02-06 15:08:14 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1138.014

血管内皮生长因子 B 与成纤维生长因子 在维持骨骼肌质量中的作用

赵衍朴,杨小雨,于惠康,杨雪玲,杨春华,田 梗

(滨州医学院药学院,山东省分子靶向智能诊疗技术创新中心,烟台 264000)

摘要 目的 研究正常和高脂饮食情况下血管内皮生长因子 B(VEGFB)在维持骨骼肌质量中的作用,并探讨 VEGFB 与成纤维生长因子(FGF)信号通路之间的串扰在这一过程中发挥的作用。方法 设置 4 个实验组:正常饮食 VEGFB^{+/+}及 VEGFB^{-/-}组,高脂饮食 VEGFB^{+/+}及 VEGFB^{-/-}组;获取 24 周龄小鼠骨骼肌,称重;采用基因表达关联分析和 qPCR 实验探究骨骼肌中 FGFs 的表达水平。结果 两种饮食条件下 VEGFB 缺失均会导致小鼠骨骼肌质量下降;正常饮食条件下,VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌中 8 个 FGFs 表达水平下调,其中 6 个为旁分泌 FGFs;高脂饮食条件下,VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌中 11 个 FGFs 表达水平下调,其中 8 个为旁分泌 FGFs。结论 骨骼肌中 VEGFB 可通过 FGFs 网络参与维持骨骼肌质量。

关键词 骨骼肌;血管内皮生长因子 B;成纤维生长因子;基因敲除小鼠;高脂饮食;FGF6

中图分类号 Q 593.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0293-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.015

血管内皮生长因子 B (vascular endothelial growth factor B, VEGFB) 是一种在骨骼肌中高表达的生长因子^[1]。正常环境下,VEGFB 能促进成肌细胞增殖分化并阻止细胞凋亡^[2-3]。而在高脂环境下,VEGFB 在骨骼肌中的作用存在争议。高脂饮食会导致骨骼肌中异位脂质积累,引起骨骼肌功能障碍和萎缩^[4]。研究^[5]显示,VEGFB 会导致小鼠骨骼肌的脂质积累。也有研究^[6]表示,外源添加 VEGFB 可抑制高脂环境下成肌细胞中的脂质积累。因此高脂环境下 VEGFB 对于骨骼肌的作用仍有待进一步明确。

成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是一种由内皮细胞、平滑肌细胞等分泌的参与个体发育的重要生长因子,分为旁分泌、内分泌以及胞内分泌三个亚家族^[7]。FGF 在骨骼肌再生和分化中具有重要作用^[8],且与 VEGFB 信号通路之间存在密切的相互关系^[9]。该研究建立 VEGFB^{+/+}和 VEGFB^{-/-}小鼠模型,进行正常和高脂饮食饲养,并检测小鼠骨骼肌的质量及骨骼肌中 FGFs 表达水

平,拟明确不同饮食条件下 VEGFB 对骨骼肌的作用,并探讨 VEGFB 与 FGF 信号通路之间的串扰在调控骨骼肌质量过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 VEGFB^{-/-}小鼠委托赛业生物科技公司利用 CRISPR/Cas9 技术获得,小鼠品系背景是 C57BL/6。小鼠饲养于滨州医学院 SPF 级动物房内,昼夜节律,自主饮水和进食,控制环境温度为(22±4)℃,湿度为(55±5)%。所有实验操作均遵守动物伦理准则和动物福利要求。

1.1.2 主要试剂与仪器 鼠尾直接 PCR 试剂盒、2×M-PCR OPTI™ Mix (Dye Plus) (货号:B40013、B45012,美国 Selleck 生物科技有限公司);逆转录试剂盒、qPCR 试剂盒、RNA 提取试剂(货号:R312-01、Q711-02、R401,南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。普通饲料购自江西协同生物科技有限公司;高脂饲料购自美国 Researchdiets 公司;三氯甲烷购自烟台三和化学试剂有限公司;异丙醇购自天津市致远化学有限公司;75%乙醇购自天津市永大化学试剂有限公司。使用的反转录 PCR 仪器品牌是 Bio-RAD (T100™ Thermal Cycler),荧光定量 PCR 仪品牌是 Thermofisher (QuantStudio 3)。

1.2 方法

1.2.1 VEGFB^{-/-}小鼠基因型鉴定 取小鼠尾尖,

2024-10-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31771284);山东省泰山学者项目(编号:tstp20221145)

作者简介:赵衍朴,男,硕士研究生;

田 梗,女,教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: tiangeng@live.se

加入 100 μl 的 Buffer L 以及 2 μl 的 Protease Plus, 涡旋混匀, 置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中消化 15 min, 之后转入 95 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴, 处理 5 min 终止消化反应。获得样本于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液 90 μl 至新的 EP 管中, 此上清液中含有小鼠基因组。以此为模板进行 PCR 鉴定反应, 反应体系 20 μl : 模板 2 μl , 上游引物 0.5 μl , 下游引物 0.5 μl , ddH₂O 7 μl , 2 $\times$ M-PCR Mix 10 μl ; PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 重复 35 个循环。反应结束后取 10 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。相关引物序列见表 1。

表 1 小鼠基因型鉴定引物序列

Tab.1 Primer sequences for mouse genotyping

Name	Primer sequence
F1	5'-TCTCAAGGTTGGCGGAAGTGG-3'
R1	5'-CAAACCTCACCATGTCACCAAGGAG-3'
R2	5'-TTGGGATCACGCAAGATAAGGG-3'

1.2.2 小鼠分组喂养 将已完成基因型鉴定小鼠(4 周龄)设置为 4 个实验组, 包括正常饮食 VEGFB^{+/+} 小鼠组及 VEGFB^{-/-} 小鼠组, 高脂饮食 VEGFB^{+/+} 小鼠组及 VEGFB^{-/-} 小鼠组; 分别饲喂普通饲料和高脂饲料, 持续喂养 20 周。

1.2.3 小鼠骨骼肌组织取材 称量小鼠体质量, 处死小鼠, 分离小鼠骨骼肌(股四头肌/腓肠肌/比目鱼肌)组织并进行称重, 计算小鼠骨骼肌质量/体质量的值。将骨骼肌组织储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.4 荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR) 将小鼠骨骼肌组织剪碎, 使用 TRIzol 试剂提取总 mRNA, 利用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒将 2 μg mRNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行 qPCR, 该反应使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行。反应体系为: cDNA 1 μl , 上下游引物各 1 μl , 2 $\times$ Mix 10 μl , ddH₂O 7 μl 。反应条件为: ① 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性, 循环数 1, 时间 30 s, ② 循环反应, 循环数 40, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, ③ 溶解曲线, 循环数 1, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。相关引物序列见表 2。

1.2.5 基因表达关联分析 基因表达关联分析所使用相关数据可以在 Gene Network (<https://genenetwork.org/>) 网站公开访问获得。该网站所包含的小鼠转录组数据来自于美国田纳西大学健康科学中心所繁育的超过 150 多个 BXD 品系(由

表 2 qPCR 引物序列

Tab.2 Primer sequences of qPCR

Gene Name	Forward primer	Reverse primer
VEGFB	5'-GCTGGGCACTAGTTGTTG-3'	5'-AGCCACCAGAAGAAAGTGG-3'
FGF1	5'-CCCTGACCGAGAGGTTCAAC-3'	5'-GTCCCTTGTCCCATCCACG-3'
FGF2	5'-GGGACCCACACGTCAAACTA-3'	5'-TCCCTTGATAGACACAACCTC-3'
FGF6	5'-CAGGCTCTCGTCTTCTTAGGC-3'	5'-TTCACACCGAAATCTCTCCA-3'
FGF7	5'-CTCTACAGGTCATGCTTCCACC-3'	5'-ACAGAACAGTCTTCTCACCC-3'
FGF9	5'-ATGGCTCCCTTAGGTGAAGTT-3'	5'-TCATTAGCAACACCGGACTG-3'
FGF10	5'-TTTGTGTCTTCTGTTCCCTGT-3'	5'-TAGCTCCGACATGCTCTC-3'
FGF11	5'-TAGCCTGATCCGACAGAAGC-3'	5'-TTCGCTGATGTTGTTGACG-3'
FGF13	5'-CTCATCCGGCAAAAGAGACAA-3'	5'-TTGGAGCCAAAGAGTTTACG-3'
FGF18	5'-CTGCACTTGCCTGTGTTAG-3'	5'-TGCTCCGACTCAGATCATCT-3'
FGF22	5'-CTCTGTGACTGTAGGTTCCG-3'	5'-GAGCGGTATGTGTGTAGCC-3'
GAPDH	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	5'-TGTAGACCATGTAGTTAGGTC-3'
Actin	5'-GCCTTCCTTCTTGGGTATGGA-3'	5'-CTGTACGAATGCCTGGGTA-3'

C57BL/6J 和 DBA/2J 作为亲本杂交, 并经近 20 代配繁所获得的小鼠品系)。登陆网站, 物种选择“Mouse(mm10)”, 组别选择“BXD Family”, 类型选择“Muscle mRNA”, 数据集分别选择正常饮食小鼠的肌肉转录组数据集“EPFL/LISP BXD CD Muscle Affy Mouse Gene 1.0 ST (Dec11) RMA”和高脂饮食小鼠的肌肉转录组数据集“EPFL/LISP BXD HFD Muscle Affy Mouse Gene 1.0 ST (Dec11) RMA”, 分别在两组数据集下搜索 VEGFB 和 FGF 家族相关基因, 获得基因表达量数值, 并利用 Genenetwork 中“Correlation Matrix”工具对基因之间的相关性进行分析, 获得皮尔逊相关系数(r)进行作图。 r 越高, 表示相关性越强。

1.2.6 Western blot 检测 称取小鼠股四头肌组织 10 mg, 加入 120 μl RIPA 裂解液, 利用组织破碎仪进行破碎, 冰上裂解 30 min 后, 12 000 r/min 离心 20 min, 提取上清液即为总蛋白。将蛋白样本用 5 $\times$ 蛋白 loading buffer 处理后, 煮沸变性 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 200 mA 恒定电流转膜 1 h, 5% 脱脂牛奶封闭后, 加入一抗孵育过夜, FGF6 一抗购自武汉华美生物工程有限公司, 稀释比例均为 1:1 000, TBST 漂洗后, 二抗孵育 1 h, TBST 漂洗后, 用 ECL 试剂盒进行化学发光检测。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 至少重复 3 次。两组数据之间比较采用未配对的 t 检验, 对多组数据比较采用单因素方差分析(One-way Anova)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGFB^{-/-} 小鼠基因型检测 VEGFB^{-/-} 小鼠

构建和鉴定策略如图 1A 所示,其中红色为基因敲除区域。采用鼠尾基因组 PCR 检测,使用 F1 和 R1 引物进行 PCR 扩增可得基因敲除小鼠特征 PCR 产物条带(1 094 bp),采用 F1 和 R2 引物进行 PCR 扩增可得野生型小鼠特征 PCR 产物条带(616 bp)。在 1 094 bp 处仅有一个条带的为 VEGFB^{-/-} 小鼠, 616 bp 和 1 094 bp 处分别具有条带的是 VEGFB^{+/-} 小鼠, 在 616 bp 处仅有一个条带的为 VEGFB^{+/+} 小鼠(图 1B)。处死小鼠后,分离小鼠的肝、股四头肌、白色脂肪和褐色脂肪组织,使用 qPCR 检测组织中 VEGFB 的表达水平,结果发现 VEGFB^{+/-} 小鼠中各组织中 VEGFB 表达水平下降,而 VEGFB^{-/-} 小鼠各

组织中的 VEGFB 几乎检测不到(图 1C)。以上显示 VEGFB^{-/-} 小鼠构建成功。

2.2 检测 VEGFB^{-/-} 小鼠骨骼肌质量变化 将 VEGFB^{+/+} 小鼠和 VEGFB^{-/-} 小鼠分别进行正常和高脂饮食饲养。小鼠饲养至 24 周龄时,称重后处死,分离骨骼肌(股四头肌/腓肠肌/比目鱼肌)组织,称重,计算骨骼肌质量及骨骼肌质量/体质量的值。高脂饮食导致 VEGFB^{+/+} 小鼠和 VEGFB^{-/-} 小鼠体质量上调(图 2A、B)。在正常饮食和高脂饮食条件下,与 VEGFB^{+/+} 小鼠相比,VEGFB^{-/-} 小鼠的体质量均上调(图 2C、D),但小鼠骨骼肌的质量,以及小鼠骨骼肌质量/体质量的值均下调(图 3)。

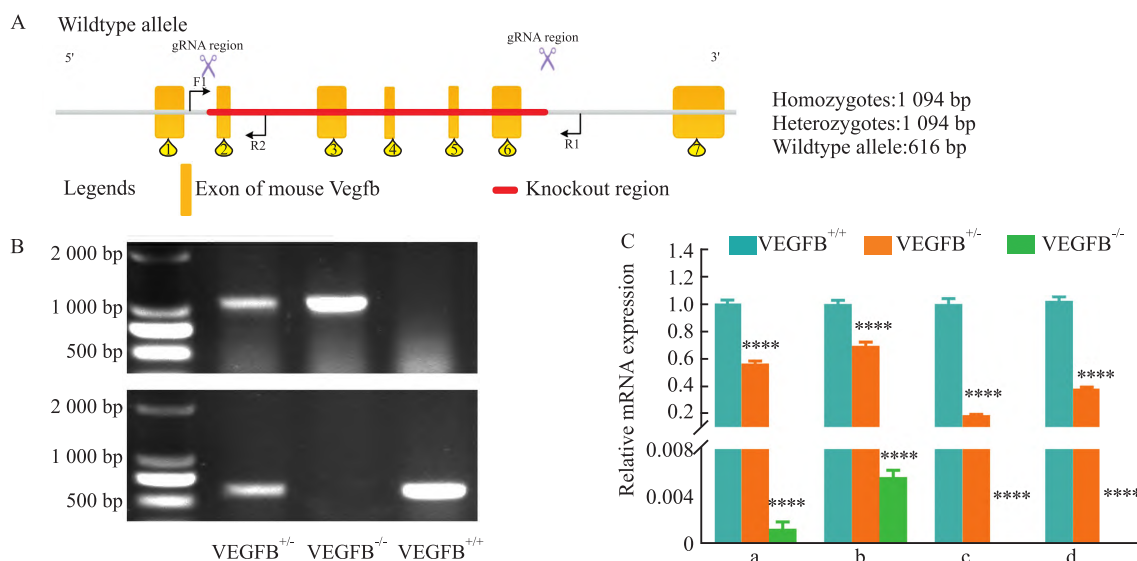


图 1 VEGFB^{-/-} 小鼠基因型鉴定

Fig. 1 VEGFB^{-/-} mouse genotype identification

A: Schematic diagram of VEGFB^{-/-} mouse construction and identification strategy; B: Mouse genotype identified by PCR, VEGFB^{+/+} for wild-type mouse, VEGFB^{-/-} for homozygous gene knockout mouse, and VEGFB^{+/-} for heterozygous gene knockout mouse; C: VEGFB levels in liver, quadriceps femoris, white adipose and brown adipose tissues quantified by qPCR; a: liver; b: quadriceps femoris; c: white adipose; d: brown adipose; **** $P < 0.0001$ vs VEGFB^{+/+}.

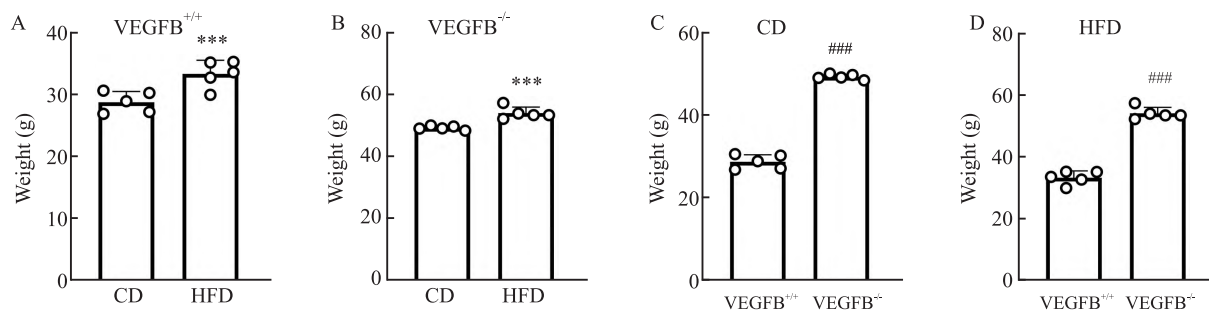
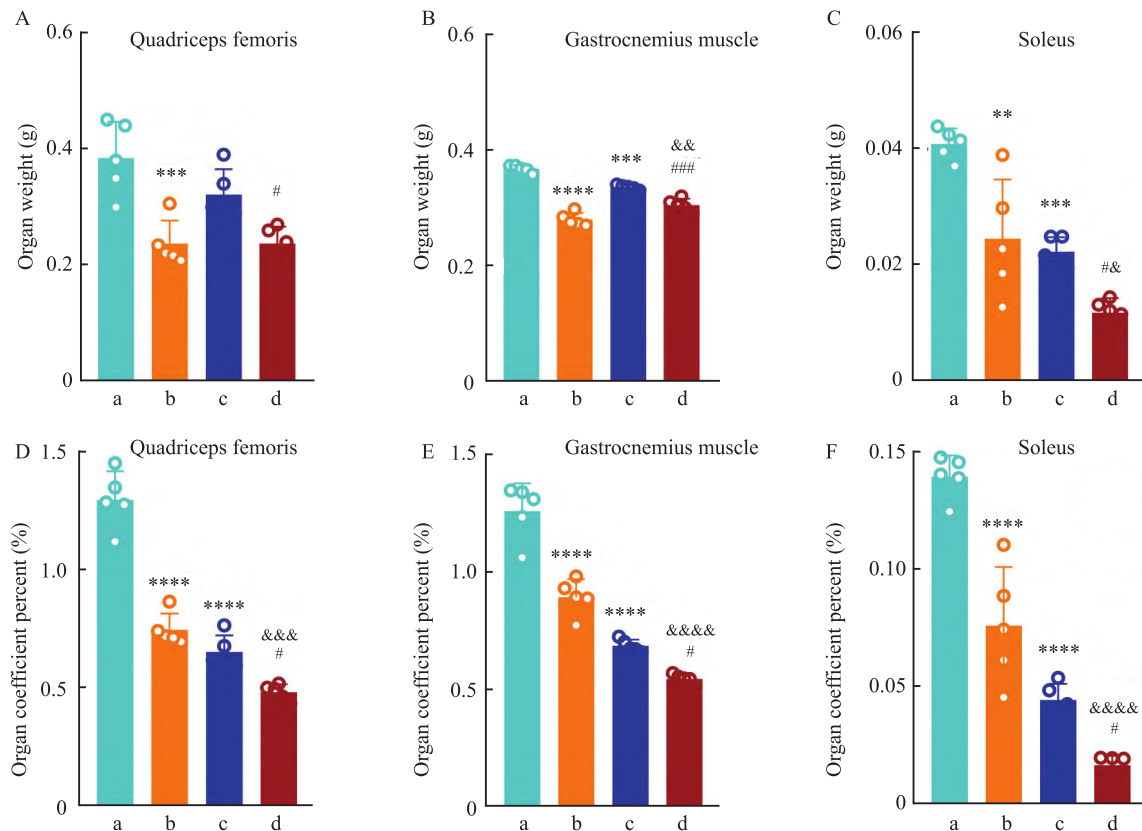


图 2 VEGFB^{+/+} 和 VEGFB^{-/-} 小鼠体质量分析

Fig. 2 Body weight analysis of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice

A: Body weight of VEGFB^{+/+} mice on chow-fed diet and high-fed diet; B: Body weight of VEGFB^{-/-} mice on chow-fed diet and high-fed; C: Body weight of VEGFB^{+/+} mice and VEGFB^{-/-} mice on chow-fed diet; D: Body weight of VEGFB^{+/+} mice and VEGFB^{-/-} mice on high-fed diet; CD: chow-fed diet; HFD: high-fed diet; *** $P < 0.001$ vs CD; ### $P < 0.001$ vs VEGFB^{+/+}.

图3 VEGFB^{+/+}和VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌质量分析Fig. 3 Skeletal muscle mass analysis of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mouse

A - C: Comparison of the quadriceps femoris, gastrocnemius and soleus muscle mass of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice at 24 weeks of age both on chow-fed diet and high-fat diet; D - F: The ratios of quadriceps femoris, gastrocnemius and soleus muscle mass to body weight of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice at 24 weeks of age were compared on both chow-fed diet and high-fat diet; a; CD-VEGFB^{+/+}; b; CD-VEGFB^{-/-}; c; HFD-VEGFB^{+/+}; d; HFD-VEGFB^{-/-}; CD: chow-fed diet; HFD: high-fat diet; * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ vs CD-VEGFB^{+/+} group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs HFD-VEGFB^{+/+} group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$, &&&& $P < 0.0001$ vs CD-VEGFB^{-/-} group.

2.3 VEGFB与FGF相关性分析 为了探讨VEGFB调控小鼠骨骼肌质量的机制是否与FGF相关,使用Genenetwork进行小鼠骨骼肌中VEGFB和FGF的相关性分析。结果显示,在正常饮食条件下,VEGFB表达水平与19个FGFs表达水平呈正相关,与3个FGFs表达水平呈负相关(包括2个旁分泌FGFs与1个胞内分泌FGF),见图4A。类似的,在高脂饮食条件下,VEGFB表达水平与19个FGFs表达水平呈正相关,与3个FGFs表达水平呈负相关(包括2个胞内分泌FGFs与1个旁分泌FGF),见图4B。

2.4 正常饮食下VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌中8个FGFs表达水平下调 为验证基因表达关联分析结果,本研究采用qPCR实验对VEGFB^{+/+}小鼠和VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌(股四头肌和腓肠肌)中FGFs表达水平进行验证。经初步qPCR实验检测发现,部分FGFs在小鼠骨骼肌中的表达水平极低,因此本研究重点检测其他13个FGFs在小鼠骨骼肌中

的表达水平(FGF1/2/6/7/9/10/11/12/13/14/16/18/22)。与基因表达关联分析结果相类似,当VEGFB缺失后,在正常饮食条件下,小鼠骨骼肌中8个FGFs表达水平发生下调,其中6个是旁分泌FGFs;5个FGFs表达水平发生上调,包括2个胞内分泌FGFs(图5)。

2.5 高脂饮食下VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌中FGFs表达情况 本研究还分析了高脂饮食条件下13个FGFs在小鼠骨骼肌中的表达水平。与基因表达关联分析结果相类似,当VEGFB缺失后,在高脂饮食环境下,小鼠骨骼肌中11个FGFs表达水平发生下调,其中8个是旁分泌FGFs;2个FGFs表达水平发生上调,其中包括旁分泌FGF6(图6)。

2.6 Western blot验证股四头肌中FGF6的表达水平 qPCR结果显示,在正常饮食和高脂饮食条件下FGF6在VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌中表现出相反的趋势,为了对该结果进行验证,提取小鼠股四头肌

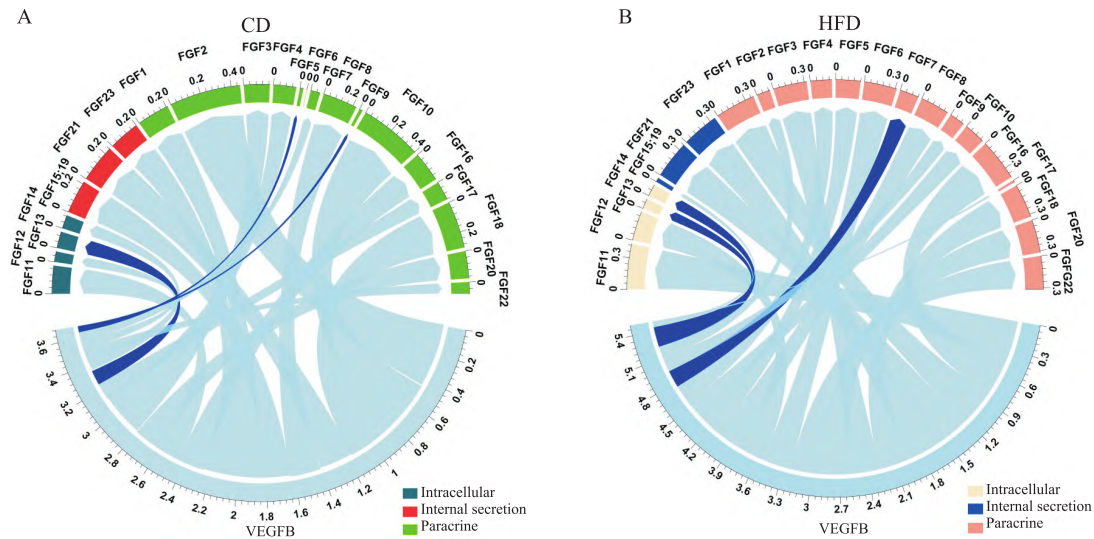
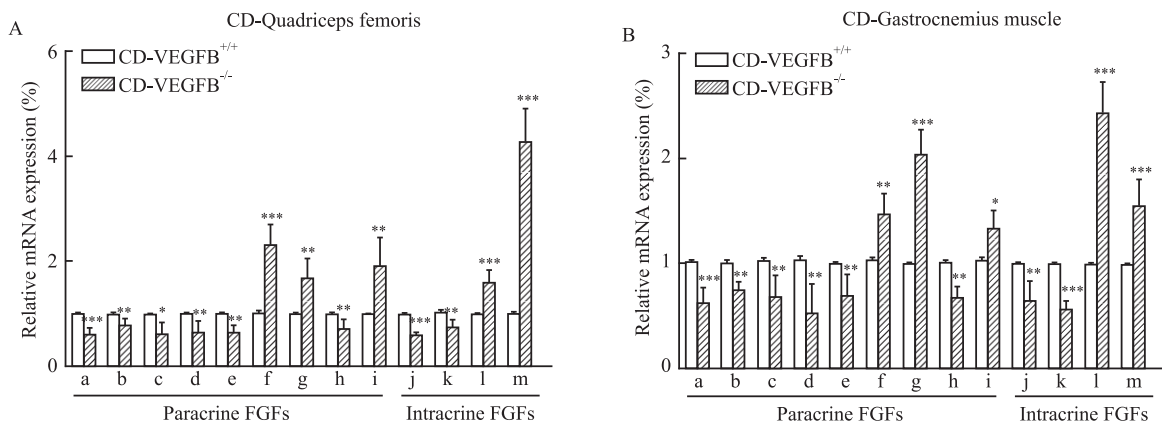


图4 VEGFB与FGFs的相关性分析

Fig.4 Correlation analysis of VEGFB and FGFs

A: Correlation analysis between VEGFB and FGF family members in mouse skeletal muscle on chow-fed diet; B: Correlation analysis between VEGFB and FGF family members in mouse skeletal muscle on high-fat diet; The scale represented the r -value of the correlation coefficient, with larger width representing the larger r -value; The light blue represented the positive correlation, and the dark blue represented the negative correlation; CD: chow-fed diet; HFD: high-fat diet.

图5 qPCR检测正常饮食条件下 VEGFB^{+/+}和 VEGFB^{-/-}小鼠骨骼肌中 FGFs 的表达水平($n=5$)Fig.5 FGFs expression levels in skeletal muscle of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice detected by qPCR on chow-fed diet ($n=5$)

A: FGFs expression in the quadriceps femoris of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on chow-fed diet; B: FGFs expression in the gastrocnemius muscle of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on chow-fed diet; a: FGF1; b: FGF2; c: FGF6; d: FGF7; e: FGF9; f: FGF10; g: FGF16; h: FGF18; i: FGF22; j: FGF11; k: FGF12; l: FGF13; m: FGF14; CD: chow diet; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs CD-VEGFB^{+/+}.

总蛋白,使用 Western blot 实验检测 FGF6 的蛋白表达水平。与 qPCR 结果一致,在正常饮食条件下,与 VEGFB^{+/+} 小鼠相比,VEGFB^{-/-} 小鼠股四头肌中 FGF6 蛋白表达水平下调(图 7A);在高脂饮食条件下,与 VEGFB^{+/+} 小鼠相比,VEGFB^{-/-} 小鼠股四头肌中 FGF6 蛋白表达水平呈现上调趋势(图 7B)。

3 讨论

VEGFB 在保护骨骼肌功能中发挥重要作用。

如在成肌细胞 C2C12 中,外源 VEGFB 可通过 VEGFR1-PI3K/Akt 信号通路促进 C2C12 细胞增殖和分化,还可抑制肿瘤坏死因子- α 处理诱导的 C2C12 肌管凋亡^[2-3]。在小鼠肌肉中定点注射 VEGFB 能够挽救肌肉质量损伤^[10]。但在高脂环境下,VEGFB 对于骨骼肌的作用并不明确。有研究显示 VEGFB 可通过上调内皮细胞中脂肪酸转运蛋白的表达促进骨骼肌中的脂质积累^[5],但在细胞中,VEGFB 又能够促进脂质的分解并减少脂质的异位沉积^[6]。本

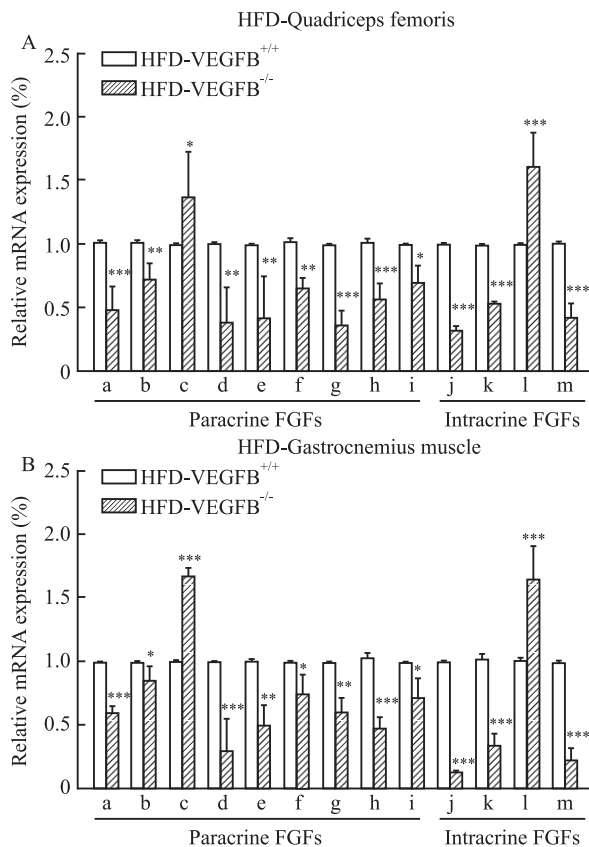


图6 qPCR检测高脂饮食条件下 VEGFB^{+/+} 和 VEGFB^{-/-} 小鼠骨骼肌中 FGFs 的表达水平 ($n=5$)

Fig. 6 FGFs expression levels in skeletal muscle of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice were detected by qPCR on high-fat diet ($n=5$)

A: FGFs expression levels in the quadriceps femoris of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on high-fat diet; B: FGFs expression levels in the gastrocnemius muscle of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on high-fat diet; a: FGF1; b: FGF2; c: FGF6; d: FGF7; e: FGF9; f: FGF10; g: FGF16; h: FGF18; i: FGF22; j: FGF11; k: FGF12; l: FGF13; m: FGF14; HFD: high-fat diet; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs HFD-VEGFB^{+/+}.

研究建立 VEGFB^{+/+} 和 VEGFB^{-/-} 小鼠, 分别进行正常和高脂饮食饲养, 并对比分析了在不同饲养条件下小鼠骨骼肌的质量。结果显示, 在正常和高脂饮食条件下, 当 VEGFB 基因被敲除后, 小鼠的体质量均有所增加, 这与 VEGFB 敲除会诱导白色脂肪体积膨大和脂肪积累的研究结果相吻合^[11]。另外, 在正常和高脂饮食条件下, 当 VEGFB 基因被敲除后, 小鼠骨骼肌质量及骨骼肌质量/体质量的值均有所下调。这表明无论在正常还是高脂饮食情况下, VEGFB 都在维持骨骼肌质量中发挥重要作用。

FGF 与 VEGFB 信号通路之间存在串扰关系, 且也在骨骼肌再生和分化中具有重要作用^[8-9]。本

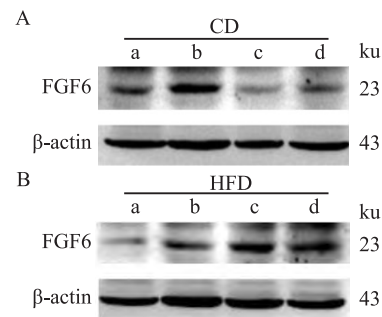


图7 Western blot检测正常和高脂饮食条件下 VEGFB^{+/+} 和 VEGFB^{-/-} 小鼠股四头肌中 FGF6 的表达水平

Fig. 7 Western blot analysis of FGF6 expression in the quadriceps femoris of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on both chow-fed diet and high-fat diet

A: The expression of FGF6 in the quadriceps femoris of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on chow-fed diet; B: The expression of FGF6 in the quadriceps femoris of VEGFB^{+/+} and VEGFB^{-/-} mice on high-fat diet; a, b: VEGFB^{+/+} mice group; c, d: VEGFB^{-/-} mice group; CD: chow-fed diet; HFD: high-fat diet.

研究随后探讨了 VEGFB 发挥骨骼肌保护作用是否与 FGF 有关。基因表达关联分析显示小鼠骨骼肌中几乎所有的旁分泌 FGFs 以及内分泌 FGFs 均和 VEGFB 的表达水平呈正相关 (CD 和 HFD 组)。鉴于该分析结果显示的 FGF 和 VEGFB 之间的相关性大部分为弱相关 ($r < 0.3$), 本研究又利用 qPCR 实验对 VEGFB^{+/+} 小鼠和 VEGFB^{-/-} 小鼠骨骼肌中 FGFs 的表达水平进行了分析。与基因表达关联分析结果相类似, 在正常饮食和高脂饮食条件下, VEGFB 被敲除后, 大部分的旁分泌 FGFs 表达水平下调。这可能是因为当 VEGFB 被敲除后, 内皮细胞功能受到削弱, 进而导致旁分泌 FGFs 水平下调。由此可见, VEGFB 能通过调控旁分泌 FGFs 表达水平从而在维持骨骼肌质量中发挥作用。

此外, 尽管在正常饮食条件下, FGF6 的表达水平伴随着 VEGFB 敲除而下调, 但是在高脂饮食条件下, VEGFB 被敲除后, 小鼠骨骼肌中 FGF6 的表达水平上调。Western blot 实验也证实了同样的结果。FGF6 在调节肌肉再生和重塑中发挥重要作用^[12-13]。有研究^[14]显示通过给小鼠骨骼肌靶向递送 FGF6 能够防止高脂肪饮食喂养的小鼠体质量增加和胰岛素抵抗的发展。由此猜测, 在高脂饮食条件下 FGF6 的表达水平上调很可能是机体在高脂环境下产生的保护性应激作用。而高脂条件下 VEGFB 敲除未能抑制 FGF6 的表达水平上调, 这很可能与 FGF6 可由快缩肌纤维分泌相关^[8]。

参考文献

- [1] Lal N, Puri K, Rodrigues B. Vascular endothelial growth factor B and its signaling[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2018, 5: 39. doi: 10.3389/fcvm.2018.00039.
- [2] Ling M, Quan L, Lai X, et al. VEGFB promotes myoblasts proliferation and differentiation through VEGFR1-PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13352. doi: 10.3390/ijms222413352.
- [3] Guo L, Li Y, Xing Z, et al. Role of VEGFB in electrical pulse stimulation inhibits apoptosis in C2C12 myotubes[J]. *Peptides*, 2022, 154: 170823. doi: 10.1016/j.peptides.2022.170823.
- [4] Sun Y N, Huang J Q, Chen Z Z, et al. Amyotrophy induced by a high-fat diet is closely related to inflammation and protein degradation determined by quantitative phosphoproteomic analysis in skeletal muscle of C57BL/6 J mice[J]. *J Nutr*, 2020, 150(2): 294–302. doi: 10.1093/jn/nxz236.
- [5] Hagberg C E, Falkevall A, Wang X, et al. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake[J]. *Nature*, 2010, 464: 917–21. doi: 10.1038/nature08945.
- [6] Li L J, Ma J, Li S B, et al. Vascular endothelial growth factor B inhibits lipid accumulation in C2C12 myotubes incubated with fatty acids[J]. *Growth Factors*, 2019, 37(1/2): 76–84. doi: 10.1080/08977194.2019.1626851.
- [7] Xie Y, Su N, Yang J, et al. FGF/FGFR signaling in health and disease[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 181. doi: 10.1038/s41392-020-00222-7.
- [8] Pawlikowski B, Vogler T O, Gadek K, et al. Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors[J]. *Dev Dyn*, 2017, 246(5): 359–67. doi: 10.1002/dvdy.24495.
- [9] Song M, Finley S D. Mechanistic characterization of endothelial sprouting mediated by pro-angiogenic signaling[J]. *Microcirculation*, 2022, 29(2): e12744. doi: 10.1111/micc.12744.
- [10] Li P, Feng J, Jiang H, et al. Microbiota derived D-malate inhibits skeletal muscle growth and angiogenesis during aging *via* acetylation of Cyclin A[J]. *EMBO Rep*, 2024, 25(2): 524–43. doi: 10.1038/s44319-023-00028-y.
- [11] Chen Y, Zhao M, Wang C, et al. Adipose vascular endothelial growth factor B is a major regulator of energy metabolism[J]. *J Endocrinol*, 2020, 244(3): 511–21. doi: 10.1530/JOE-19-0341.
- [12] Cai Q, Wu G, Zhu M, et al. FGF6 enhances muscle regeneration after nerve injury by relying on ERK1/2 mechanism[J]. *Life Sci*, 2020, 248: 117465. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117465.
- [13] Floss T, Arnold H H, Braun T. A role for FGF-6 in skeletal muscle regeneration[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(16): 2040–51. doi: 10.1101/gad.11.16.2040.
- [14] Xu B, Liu C, Zhang H, et al. Skeletal muscle-targeted delivery of FGF6 protects mice from diet-induced obesity and insulin resistance[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(19): e149969. doi: 10.1172/jci.insight.149969.

Role of vascular endothelial growth factor B and fibroblast growth factor in maintenance of skeletal muscle mass

Zhao Yanpu, Yang Xiaoyu, Yu Huikang, Yang Xueling, Yang Chunhua, Tian Geng

(Shandong Technology Innovation Center of Molecular Targeting and Intelligent Diagnosis and Treatment, College of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264000)

Abstract Objective To verify the role of vascular endothelial growth factor B (VEGFB) in maintenance of skeletal muscle mass under chow-fed and high-fat diet, and to investigate the role of crosstalk between VEGFB and fibroblast growth factor (FGF) signaling pathways in the process. **Methods** Four experimental groups were designed: VEGFB^{+/+} chow-fed diet group, VEGFB^{-/-} chow-fed diet group, VEGFB^{+/+} high-fat diet group, VEGFB^{-/-} high-fat diet group. Skeletal muscles from 24 weeks mice were isolated and weighed. Gene expression association analysis and qPCR experiments were conducted to assess FGFs expression levels. **Results** Under both dietary conditions, VEGFB ablation resulted in reduced muscle mass. Under chow-fed diet condition, 8 FGFs level reduced including 6 paracrine FGFs in the skeletal muscle from VEGFB^{-/-} mice. Under high-fat diet condition, 11 FGFs level decreased including 8 paracrine FGFs in VEGFB^{-/-} mice. **Conclusion** VEGFB may participate in regulating skeletal muscle mass through FGF networks in the skeletal muscles.

Key words skeletal muscle; vascular endothelial growth factor B; fibroblast growth factor; gene-knockout mice; high-fat diet; FGF6

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 31771284); The Taishan Scholar Program of Shandong (No. tstp20221145)

Corresponding author Tian Geng, E-mail: tiangeng@live.se