

龚丽景, 贾杰, 付鹏宇. 基于 RNA 测序分析不同低氧暴露模式对大鼠胫骨前肌差异基因表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 84-91.

Gong LJ, Jia J, Fu PY. RNA sequencing analysis of differentially expressed genes of the anterior tibial muscle in rats after different modes of hypoxia exposure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 84-91.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.011

基于 RNA 测序分析不同低氧暴露模式对大鼠 胫骨前肌差异基因表达的影响

龚丽景¹, 贾杰², 付鹏宇^{3*}

(1. 北京体育大学 运动与体质健康教育部重点实验室, 北京 100084; 2. 北京体育大学 运动人体科学学院, 北京 100084; 3. 西北工业大学体育部, 西安 710072)

【摘要】 目的 筛选慢性间歇低氧暴露和急性低氧暴露对大鼠胫骨前肌差异表达基因及其相关通路分析。**方法** SD 大鼠 24 只, 分为常氧对照组(C 组)、慢性间歇低氧组(IH 组, 氧浓度为 12.4%, 每天 8 h, 共 4 周)和急性低氧组(AH 组, 氧浓度为 12.4%, 每天 24 h, 共 3 d)。干预后, 测试抓力和瘦体重, 取胫骨前肌(TA)进行 HE 染色后, 再统计肌纤维横截面积(FCSA), Western Blot 法测试 Atrogin-1 和 MuRF1 的蛋白相对含量, 并提取大鼠 TA 总 RNA 进行测序, 筛选其差异基因, 并分析相关的生物过程(BP)和通路(pathway)。**结果** (1)干预期间各时间点 IH 组体重低于 C 组, AH 组体重持续下降; 干预后, AH 组瘦体重和相对抓力显著低于 C 组($P < 0.05$)。(2)IH 组和 AH 组肌纤维形态出现损伤, 且 IH 组更加明显, 而各组 TA 的 FCSA 无显著差异。(3)IH 组 TA 中 Atrogin-1 和 MuRF1 含量显著均高于 C 组, AH 组中 MuRF1 含量显著高于 C 组($P < 0.05$)。(4)筛选差异基因发现, 在 AH/C 组上调而在 IH/C 组下调的差异基因为慢肌结构相关基因。GO 和 KEGG 分析可知, IH/C 组差异基因主要富集于 PPAR 通路; 上调差异基因功能富集在抗氧化和糖脂代谢过程, 下调基因富集在快慢肌之间转化和氧化应激过程; AH/C 组上调差异基因功能主要富集于氧化应激、炎症反应和快肌和慢肌之间的转化, 下调基因富集于 smad 蛋白信号转导和泛素蛋白连接酶结合等过程。**结论** 慢性间歇低氧和急性低氧影响大鼠胫骨前肌差异表达分别富集于影响糖脂代谢水平和促进氧化应激及炎症反应上, 说明不同低氧模式可通过不同转录途径而影响骨骼肌的代谢。

【关键词】 慢性间歇低氧; 急性低氧; 骨骼肌; RNA 测序

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0084-08

RNA sequencing analysis of differentially expressed genes of the anterior tibial muscle in rats after different modes of hypoxia exposure

GONG Lijing¹, JIA Jie², FU Pengyu^{3*}

(1. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084, China. 2. Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing 100084.

3. Department of Physical Education, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072)

Corresponding author: FU Pengyu. E-mail: 1402884452@qq.com

【Abstract】 Objective Screening for differentially expressed genes (DEGs) in anterior tibial muscle of rats and pathway analysis after chronic intermittent hypoxia and acute hypoxia exposure. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into the normoxia control group (C group), the chronic intermittent hypoxia group (IH group, 12.4% O₂, 8 h/d, 4 weeks) and the acute hypoxia group (AH group, 12.4% O₂, 24 h/d, 3 d). The grasping force and lean

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项资金资助课(2021TD012)。

Funded by the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China(2021TD012)。

[作者简介] 龚丽景(1981—), 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 运动与脂肪代谢, 低氧与骨骼肌萎缩。Email: lijing.gong@bsu.edu.cn

[通信作者] 付鹏宇(1991—), 女, 助理教授, 博士, 研究方向: 低氧与骨骼肌萎缩。Email: 1402884452@qq.com

body weight were examined after the interventions. The anterior tibial muscle (TA) fiber cross-sectional area (FCSA) was examined by hematoxylin/eosin staining. Relative protein expression levels of Atrogin-1 and muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) were examined by western blotting. Total RNA of TA was extracted and sequenced, DEGs were screened, and the biological process (BP) and pathways enriched by DEGs were analyzed. **Results** (1) During the intervention, body weights of the IH group were lower than those of the C group at each time point, and the body weight of AH group continued to decrease. After the intervention, the lean body weight and relative grip in the AH group were significantly lower than in the C group ($P < 0.05$). (2) The morphology of muscle fibers of the TA was destroyed in the IH and AH groups, and was more obvious in the IH group, but there were no significant differences in FCSA. (3) The levels of Atrogin-1 and MuRF1 in TA in the IH group were significantly higher than those in the C group, and the MuRF1 level in the AH group was significantly higher than the C group ($P < 0.05$). (4) The DEGs up-regulated in AH/C group comparison but down-regulated in the IH/C group comparison were slow muscle structure-related genes. Gene Ontology and KEGG analysis showed that the DEGs in the IH/C group were mainly enriched in peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathway and other pathways. The function of up-regulated DEGs was mainly concentrated in the process of antioxidant and glycolipid metabolism, and for down-regulated genes were concentrated in the processes of transformation between fast and slow muscles and oxidative stress. The functions of up-regulated DEGs in the AH/C group were mainly concentrated in oxidative stress, inflammatory response and transformation between fast and slow muscles, and for the down-regulated DEGs were concentrated in Smad protein signal transduction and ubiquitin protein ligase binding. **Conclusions** The DEGs of AT of rats affected by chronic intermittent hypoxia and acute hypoxia were enriched for processes in glycolipid metabolism and promoting oxidative stress and inflammatory responses, respectively, suggesting that different hypoxia modes affect skeletal muscle metabolism through different pathways.

【Keywords】 chronic intermittent hypoxia; acute hypoxia; skeletal muscle; RNA sequencing

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨骼肌是人体内最大的器官,是蛋白质储存和糖代谢的重要场所,在维持姿势、运动、呼吸、能量和代谢稳态、体温维持和调节及内分泌等方面都发挥着重要的作用^[1]。同时,骨骼肌也是高耗能组织,氧气不足会明显影响骨骼肌代谢,促进肌肉蛋白质代谢率增加,诱导肌萎缩,常见于缺氧性疾病如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)等,或见于世居平原者进入高原环境旅游、训练或从事军事活动。骨骼肌萎缩会导致肌肉质量减少、功能下降,从而威胁缺氧性疾病患者健康,减弱运动员和士兵高原训练的效果,或影响高原旅游大众的生产生活^[2]。

骨骼肌在缺氧时会经历 3 个时期:预警期、抵抗/适应期和失适应期^[3]。预警期中骨骼肌突然受到低氧刺激,会出现一系列应激反应,导致肌肉蛋白分解增加和一系列肌肉功能相关蛋白表达的改变;而在适应期内骨骼肌会发生解剖和生理上的过度补偿,随着低氧暴露时间的延长,又会进入失适应阶段,肌萎缩程度进一步加重。提示不同模式的低氧暴露诱导肌萎缩可能经历不同的生理过程。数日的急性低氧暴露可模拟初上高原的情况。研

究发现,8%氧浓度环境下暴露 2 d 和 4 d 均可导致小鼠骨骼肌蛋白质分解增加,诱导骨骼肌萎缩^[4]。慢性间歇低氧暴露可模拟生理性缺氧疾病的病理过程或运动员的低住高练(living low-training high, LoHi)的训练环境。研究显示,慢性间歇低氧暴露可降低大鼠的骨骼肌指数(骨骼四肢骨骼肌质量之和/身高²),促进大鼠骨骼肌组织和成肌细胞的衰老^[5]。上述研究证实急性低氧和慢性间歇低氧可诱导骨骼肌萎缩。

不同类型的肌纤维在形态、代谢和收缩特性等方面存在较大差异^[6]。低氧暴露所致的肌萎缩具有肌纤维选择性。本实验室前期研究对比了慢肌、快肌和混合肌对 4 周连续低氧(氧浓度 12.4%)的适应情况,发现快肌对低氧更为敏感^[7],因此本研究选择了快肌——胫骨前肌作为研究对象。有关低氧诱导肌萎缩的分子作用机制尚存在争议,多数研究以骨骼肌蛋白的合成和分解相关蛋白的表达入手,难以深入探究该过程的机制,且不同低氧暴露模式可能诱导不同的基因信号以参与肌萎缩的发生,因此本研究拟通过采用 RNA 测序的研究方法,探究急性低氧暴露和慢性间歇低氧暴露对大鼠胫骨前肌的差异基因表达影响及其富集通路,为治疗缺氧性疾病和防治高原肌萎缩提供可能的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24 只 10 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,初始体重为 (333.56 ± 6.35) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2015-0001】,随机分为常氧对照组(C组, $n=16$)和慢性间歇低氧组(IH组, $n=8$),IH组大鼠每天在氧浓度为 12.4% 的低氧房内暴露 8 h,共 4 周。在干预的第 25 天(干预结束前 3 d),将 C 组大鼠按体重随机均分为 2 组,一组继续维持 C 组常氧环境饲养,另一组命名为急性低氧组(AH组, $n=8$),AH 组大鼠置于低氧房,干预方案为每天 24 h,氧浓度为 12.4%,共干预 3 d,分组情况如图 1。动物饲养在北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】内进行。本项目获得北京体育大学运动科学伦理审查委员会的批准(批准号:2019038A)。每天记录大鼠体重和摄食量。

1.1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠(Merck, P8410), Anti-Atrogin1/Fbx32 (Abcam, ab74023), Anti-MuRF1 (Abcam, ab172479), Anti- α -tubulin (Sigma, T6074), 山羊抗兔二抗(LI-COR, 926-68071), RNA 保存液等为国产试剂。

小动物抓力仪(DB-YLS-13 A,北京智鼠多宝), 双能 X 射线骨密度仪(dual energy X-ray absorptiometer, DEXA; Lunar Idxa, 美国), 电子天平(Sartorius, 美国), 倒置光学显微镜(Leica, DMI3000, 德国), 电泳槽和干转转膜系统(Life Technologies, 美国), 近红外光谱(Near Infrared)检测系统(LI-COR, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 抓力仪测试抓力

每周训练大鼠练习 1 次抓力仪,干预结束即刻测试抓力,测量 3 次,取最大值,并计算相对抓力(最大抓力/体重)。

1.2.2 DEXA 法测量瘦体重

低氧干预结束后,所有大鼠禁食 12 h,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg 体重)麻醉,DEXA 测量体成分,计算瘦体重百分比(瘦体重/体重)。

1.2.3 取材

干预 4 周后,麻醉取材,心脏取血处死,取胫骨前肌(musculi tibialis anterior, TA),分成 3 份,1 份置于 RNA 保存液中,用于提取 RNA 和测序;1 份置于液氮冷冻后转移至 -80°C 保存,用于蛋白检测;第 3 份置于 4% 多聚甲醛中固定,后续石蜡包埋、切片和 HE 染色。

1.2.4 胫骨前肌肌纤维形态和面积计算

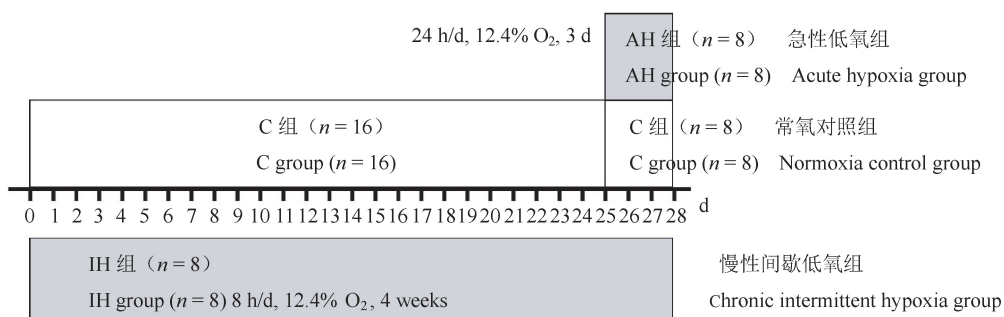
TA 组织 HE 染色后,在 10×40 倍镜下观察并拍照。肌纤维横截面积(fiber cross sectional area, FCSA)用软件 Image-Pro Plus(IPP)6.0 计算。

1.2.5 Western Blot 法检测蛋白质表达

TA 总蛋白质提取后,用聚丙烯酰胺梯度胶电泳分离蛋白,转膜至 NC 膜上,明胶溶液封闭,孵育 Atrogin1 和 MuRF1 抗体, 4°C 过夜,室温孵育山羊抗兔 IgG 抗体,最后使用 Image Studio Ver 5.2 软件曝光,对条带的信号值进行相对定量分析,以 α -tubulin 为内参。

1.2.6 骨骼肌 RNA 测序和功能分析

TA 的 RNA 提取后进行片段化处理,然后进行 cDNA 的合成,PCR 富集文库片段,基于华大基因 BGISEQ 平台进行 RNA 测序。对测序数据进行过



注:大鼠分组及干预情况示意图;白色框表示常氧环境,灰色框表示低氧环境。

图 1 大鼠分组及干预示意图

Note. The diagram of rats grouping and intervention. Normoxic environment in white box, hypoxic environment in grey box.

Figure 1 Diagram of rats grouping and intervention

滤、质量评估和比对结果评估,然后进行表达量计算,分析差异表达基因,并使用基因本体论数据库 (Gene Ontology, GO) 分析、基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 对差异基因进行富集分析和 Pathway 分析。

1.3 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 22.0 软件进行分析,各组间比较采用单因素方差分析,显著性差异以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示;采用 DESeq 对基因表达进行差异分析,筛选差异倍数 Fold Change > 2 ,显著性 P value < 0.05 被认为富集分析具有统计学意义。

2 结果

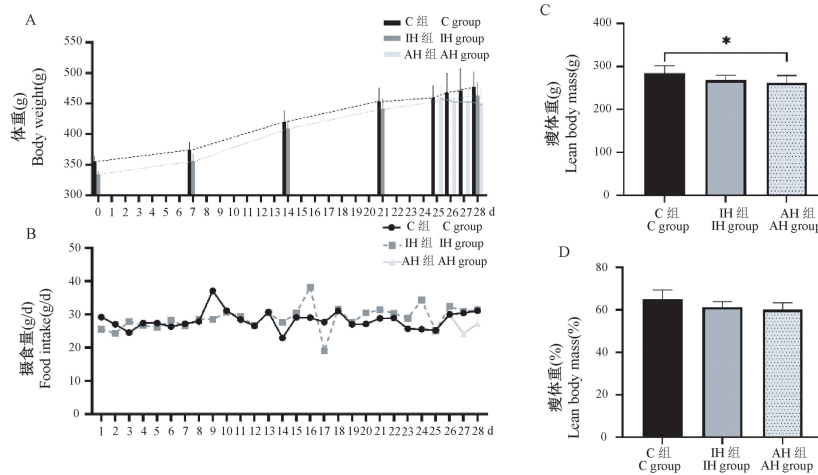
2.1 干预期间大鼠的体重、摄食量和瘦体重

干预期间,IH 组体重在各时间点均低于 C 组,

但无显著性差异;AH 组干预 3 d 期间呈下降趋势,且随着干预时间的延长,AH 组较 C 组的体重差值逐渐增加(各时间点下降率分别为 2.99%、3.76% 和 5.88%),但各时间点较 C 组无显著差异,如图 2A。IH 组摄食量在干预前 3 d 低于 C 组,但在干预后期逐渐与 C 组接近;AH 组摄食量干预期间持续低于 C 组,如图 2B。干预后测试各组大鼠瘦体重,AH 组大鼠瘦体重显著低于 C 组($P < 0.05$),IH 较 C 组也有下降趋势,但无显著性差异,如图 2C;各组间瘦体重百分比无显著性差异,如图 2D。

2.2 干预后大鼠抓力

干预末次测试大鼠抓力,与 C 组相比,IH 组和 AH 组大鼠抓力均有下降,且 AH 组下降更为明显,但各组间无显著性差异,如图 3A;用抓力/体重表示相对抓力,比较各组大鼠的相对抓力结果显示,AH 组抓力较 C 组显著下降($P < 0.01$),如图 3B。

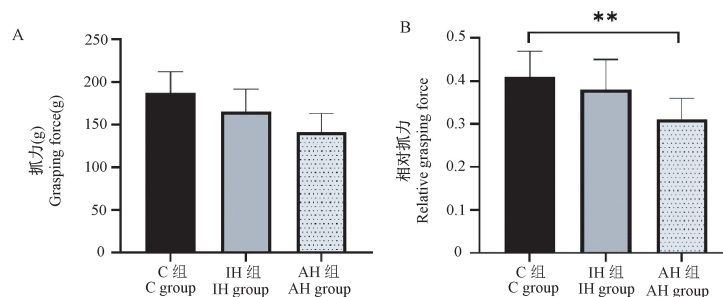


注:A:干预期间体重(g);B:干预期间摄食量(g/d);C:干预后瘦体重(g);D:干预后瘦体重百分比(瘦体重/体重);与C组相比,* $P < 0.05$ 。

图2 各组大鼠体重、摄食量变化和瘦体重

Note. A. Body weight during intervention (g). B. Food intake during intervention (g/d). C. Lean body mass after intervention (g). D. Percent of lean body weight after intervention (lean body weight/body weight). Compared with C group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Changes of body weight, food intake and body mass in the rats



注:A:抓力(g);B:相对抓力(抓力/体重);与C组相比,** $P < 0.01$ 。

图3 干预后各组大鼠抓力和相对抓力

Note. A. Grasping force (g). B. Relative grasping force (grasping force/weight). Compared with C group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Grasping force and relative grasping force of the rats after intervention

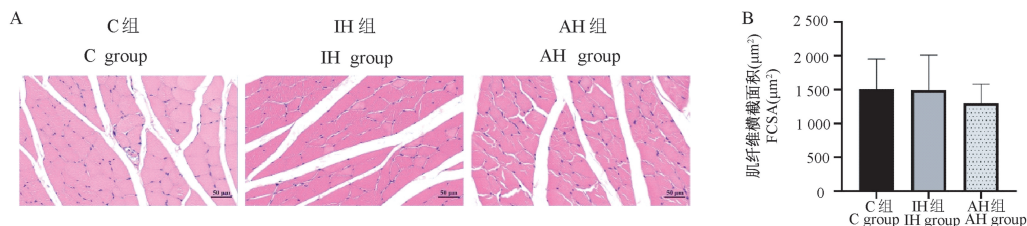
2.3 干预后大鼠胫骨前肌 FCSA

HE 染色观察大鼠 TA 肌纤维形态发现, AH 组和 IH 组较 C 组肌纤维形态呈现不规则状, 肌纤维面积大小不一, 肌间隔增加, 肌纤维出现裂痕, IH 组较 AH 组更加明显, 如图 4A; 统计 FCSA 结果显示, IH 组和 AH 组 FCSA 均低于 C 组, 但均无显著性差异, 如图 4B。

2.4 干预后大鼠肌萎缩蛋白 Atrogin1 和 MuRF1

含量

干预后, IH 组大鼠 TA 中肌萎缩相关蛋白肌萎缩 F-box 蛋白 (muscle-specific F-box protein, Atrogin1) 和肌肉特异性环指蛋白 1 (muscle-specific ring finger 1, MuRF1)^[8] 相对含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$), AH 组大鼠肌萎缩蛋白 Atrogin1 相对含量显著高于 C 组 ($P < 0.05$), 如图 5。

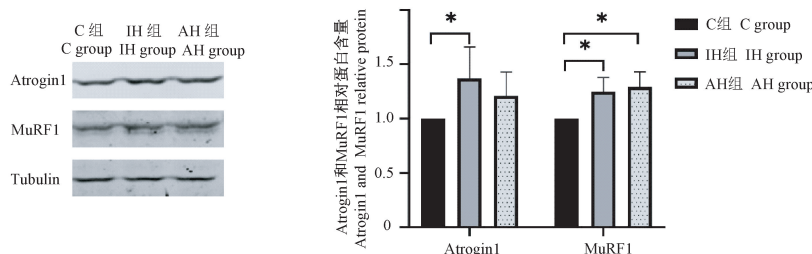


注: A: TA 的 HE 染色图; B: TA 的 FCSA (μm²)。

图 4 干预后各组大鼠肌纤维形态和 FCSA

Note. A. HE staining diagram of TA. B. FCSA of TA (μm²).

Figure 4 Muscle fiber morphology and FCSA of TA in the rats after intervention



注: Atrogin1 和 MuRF1 的 Western Blot 结果; 与 C 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 干预后各组大鼠 TA 中 Atrogin1 和 MuRF1 蛋白条带和相对含量

Note. Western Blot of Atrogin1 and MuRF1. Compared with C group, * $P < 0.05$.

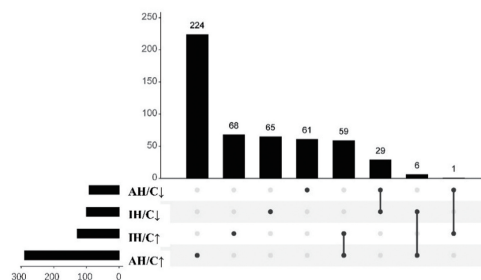
Figure 5 Atrogin1 and MuRF1 protein bands and relative content of TA in the rats after intervention

2.5 干预后大鼠 TA 测序结果

2.5.1 IH/C 组和 AH/C 组的差异基因筛选

IH/C 组差异基因共有 228 个, 其中上调基因 128 个, 下调基因 100 个; AH/C 组差异基因共有 380 个, 其中上调基因 289 个, 下调基因 91 个。

在 IH/C 组和 AH/C 组中均上调的基因有 59 个; 均下调的基因有 29 个; 在 AH/C 组中上调而在 IH/C 组中下调的基因有 6 个, 分别为: 慢肌肌钙蛋白 I1 (troponin I type 1, slow skeletal, TNNI1), 肌球蛋白轻链 2 (myosin light chain 2, MYL2), 慢肌肌钙蛋白 C1 (troponin C type 1, slow, TNNC1), 慢肌肌钙蛋白 T1 (troponin T type 1, slow skeletal, TNNT1), 锌指蛋白 385B (zinc finger protein 385B, ZFP385B) 和 LOC501116; 在 AH/C 组中下调而在 IH/C 组中上调的基因有 1 个, 为磷脂酶 A2 IIA (phospholipase A2, group IIA, PLA2G2A), 如图 6。



注: IH/C ↑ 表示 IH/C 组上调基因, IH/C ↓ 表示 IH/C 组下调基因; AH/C ↑ 表示 AH/C 组上调基因, AH/C ↓ 表示 AH/C 组下调基因。连线表示有交集。

图 6 IH/C 组和 AH/C 组上/下调差异基因 UpSet 图

Note. IH/C ↑ means up-regulated genes between IH groups and group C, IH/C ↓ means down-regulated genes between IH groups and group C. AH/C ↑ means up-regulated genes between AH groups and group C, AH/C ↓ means down-regulated genes between AH groups and group C. Lines represent intersections.

Figure 6 UpSet diagram of differential genes in groups IH/C and AH/C

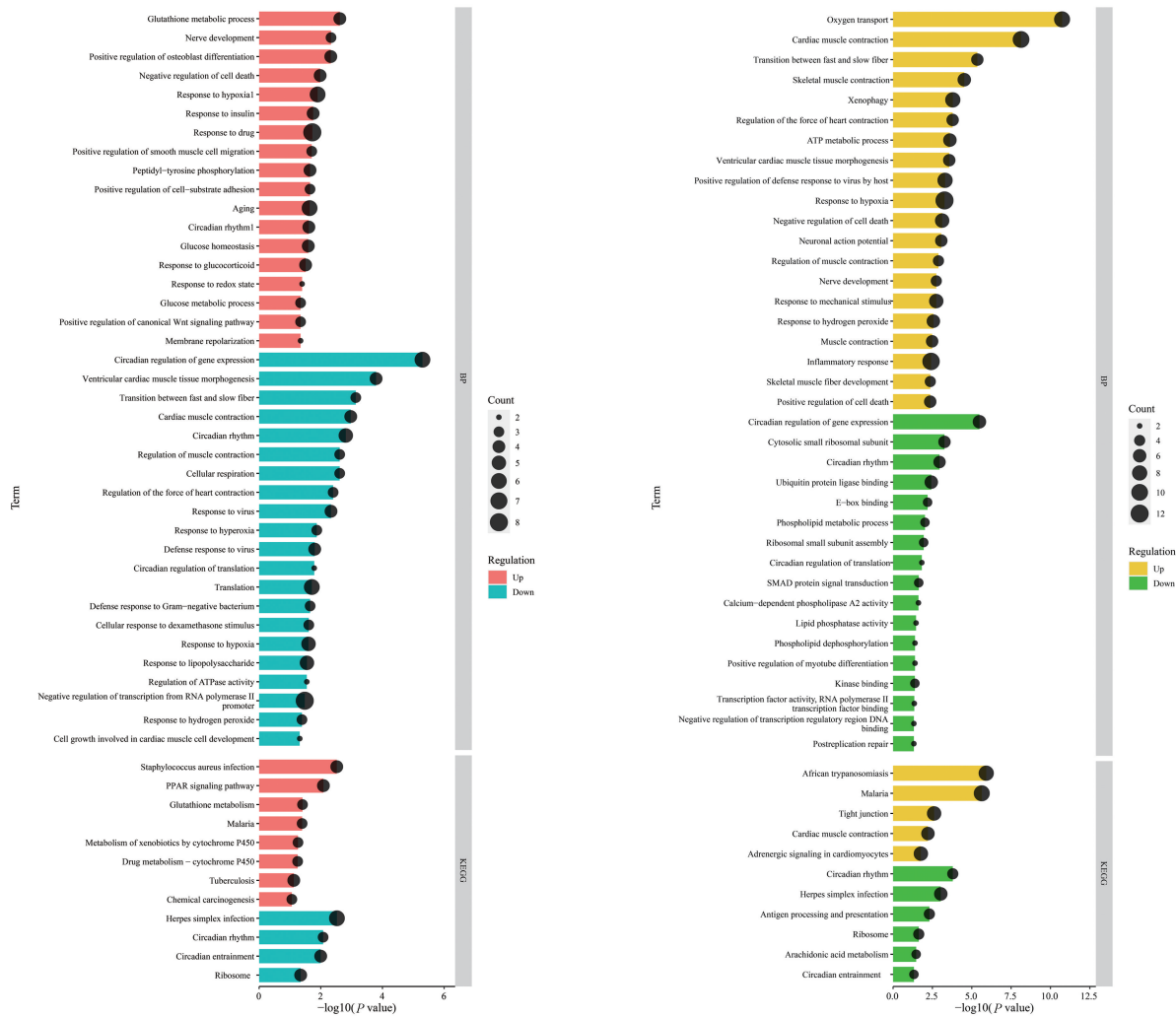
2.5.2 GO 分析差异基因所富集的生物过程

根据 *P* value 值大小排序,列出各组排名前 20 的上/下调差异基因所富集的生物过程 (biological process, BP) (从上至下 *P* value 值依次增加)。

IH/C 组上调差异基因所富集的 BP 主要为:谷胱甘肽代谢,细胞死亡的负性调节,低氧应答,胰岛素应答,葡萄糖稳态状态,对糖皮质激素的反应,对氧化还原状态的反应和葡萄糖代谢过程;IH/C 组下调差异基因 BP 主要为:快慢肌之间的转化,调节骨骼肌收缩,对过度缺氧的反应,对低氧的反应和对过氧化氢的反应。根据 *P* value 值大小排序,列出各组差异基因所富集的通路(从上至下 *P* value 值依次增加)。IH/C 组上调差异基因所富集的通路主

要为过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 信号通路和谷胱甘肽代谢通路 (glutathione metabolism),如图 7A。其中,PPAR 信号通路所富集的差异基因包括:脂联素 (adiponectin, ADIPOQ), 血管生成素样蛋白 4 (angiopoietin-like factor 4, ANGPTL4), 外周脂蛋白 1 (perilipin 1, PLIN1), 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, PCK1)。

AH/C 组上调差异基因所富集的 BP 主要为:氧气运输,快肌和慢肌之间的转化,骨骼肌收缩,ATP 代谢,低氧应答,神经元动作电位,肌肉收缩,对过氧化氢的反应,炎症应答,骨骼肌纤维发育和细胞死亡的调节;AH/C 组下调差异基因 BP 主要为:磷



注:A:IH/C 组差异基因所富集的 BP 及 Pathway;B:AH/C 组差异基因所富集的 BP 及 Pathway。

图 7 IH/C 组和 AH/C 组差异基因所富集的 BP 及 Pathway

Note. A. The enriched biological-process and pathway of differential genes in group IH/C. B. The enriched BP and pathway of differential genes in AH/C group.

Figure 7 Enriched BP and pathway of differential genes in groups IH/C and AH/C

脂代谢过程, smad 蛋白信号转导, 肌管分化的正向调节, 泛素蛋白连接酶结合, 脂质磷酸酶活性, 如图 7B。

3 讨论

生理性缺氧疾病和高原/低氧环境造成的骨骼肌萎缩都会给机体健康带来巨大风险。许多研究采用不同的低氧暴露时长和低氧浓度(海拔高度)均观察到了骨骼肌萎缩的现象, 其中在海拔 3700 ~ 4300 m 时, 瘦体重的减少最为明显^[9], 因此本研究选择了海拔 4000 m 所对应的氧浓度作为低氧干预浓度。但有关不同低氧暴露方式导致肌萎缩的作用机制尚无定论。

本研究显示, 慢性间歇低氧暴露后, 大鼠体重在干预期间持续低于常氧组, 4 周干预结束后, 虽然大鼠骨骼肌已对低氧产生一定的适应(表现为瘦体重、抓力、FCSA 无显著改变), 但 HE 染色可见 TA 肌间隔增加, 肌纤维呈现不规则状, 且肌萎缩相关蛋白 Atrogin1 和 MuRF1 表达均显著增加, 提示慢性间歇低氧暴露仍对肌纤维产生了一定程度的损伤^[10]; 急性低氧暴露后, 大鼠体重在干预期间持续降低, 且降低率随低氧暴露时间的延长而增加, 干预 3 d 后, 瘦体重和相对抓力较常氧组显著下降。其中, 急进低氧环境造成的食欲抑制及胃肠功能障碍造成的摄食量下降可能是诱因之一; 此外, TA 肌间隔也有所增加, 但肌纤维损伤程度不及间歇低氧干预, 且肌萎缩蛋白 MuRF1 表达较常氧组增加。此研究结果提示, 慢性间歇和急性低氧暴露均可导致大鼠骨骼肌出现一定程度的萎缩, 但不同的低氧模式对大鼠骨骼肌的影响不同, 慢性间歇低氧主要从微观结构和分子层面影响 TA, 而急性低氧主要从质量和功能层面影响 TA, 说明不同的低氧模式可能通过不同途径影响骨骼肌。

因此, 本研究通过骨骼肌 RNA 测序探究不同低氧模式对 TA 差异基因表达的富集通路, 发现慢性间歇低氧可上调骨骼肌的抗氧化过程(谷胱甘肽代谢)、糖代谢(胰岛素应答、葡萄糖稳态状态和葡萄糖代谢过程)和 PPAR 通路。研究发现, 葡萄糖利用障碍和脂代谢紊乱可损害骨骼肌质量和功能, 而谷胱甘肽(glutaredoxin, Grx)是氧化还原稳态的重要代谢调节因子, 骨骼肌中含有丰富的 Grx, Grx 缺失小鼠可出现肌萎缩, 并伴随有骨骼肌葡萄糖利用障碍和脂质沉积^[11]。本研究中, IH/C 组差异通

路——PPAR 通路中所富集的脂代谢基因全部为上调基因(ADIPOQ、PLIN1、PCK1), 且在 IH/C 组中上调而在 AH/C 组下调的差异基因为 PLA2G2A, 这些基因均与糖脂代谢密切相关^[12]。研究发现, 间歇低氧可影响骨骼肌中脂质的含量。中重度 OSAHS 患者循环系统中棕榈酸(palmitic acid, PA)和游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)在过夜后增肌, 并可异位至股外侧肌中并导致胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 导致肌肉中脂质增加, 且增加程度与呼吸暂停低通气指数(apnea-hypopnea index, AHI)呈正相关^[13]。提示慢性间歇低氧可通过损害 TA 的糖脂代谢功能而导致骨骼肌功能受损, 而此过程中伴随着以 Grx 为主的抗氧化能力增强, 说明骨骼肌在损伤同时也逐步对低氧环境产生习服, 并表现为骨骼肌质量的恢复。

急性低氧可上调骨骼肌的肌纤维类型的转化(快慢肌之间的转化)、氧化应激反应(对过氧化氢的反应)和炎症反应过程。急性低氧主要对肌纤维类型的转化作用主要表现为促进快肌向慢肌的转化, 表现为调节慢肌结构的相关基因(TNNI1、TNNC1、TNNT1 和 ZFP385B^[14])表达增加。研究发现, 急性低氧干预(氧浓度 6.5%, 暴露 4 h)可降低甘肃酚鼠骨骼肌中糖酵解相关酶的活性, 增加肌红蛋白的含量, 说明在急性低氧的应激刺激下, 机体可通过向慢肌转变, 利用慢肌特征以保持肌肉较充分的氧供应, 从而减少或避免低氧对骨骼肌造成的损伤^[15]。而急性低氧还可造成骨骼肌炎症和氧化应激水平增加, 从而造成肌萎缩的发生。研究发现急性低氧可增加脯氨酰羟化酶 3(prolyl hydroxylase 3, PHD3)的表达, 进而增加低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的转录^[16]。而 PHD3 高表达可以促进肌萎缩的发生, 其发挥作用的机制与介导炎症信号通路而影响骨骼肌中蛋白质的转运密切相关^[17]。此外, 急性低氧暴露还可增加骨骼肌的氧化应激水平, 该过程可能受到核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)-过氧化氢酶通路的调控^[18-20]。提示急性低氧可促进快肌纤维向慢肌纤维转变, 以适应低氧应激对肌肉的损伤, 但仍不敌该过程中伴随着的炎症反应和氧化应激水平的增加, 最终导致肌萎缩的发生, 并降低肌肉力量^[21]。

4 结论

不同低氧模式对大鼠胫骨前肌基因表达产生

不同的影响。慢性间歇低氧可能通过影响骨骼肌的糖脂代谢基因水平以促进肌肉的损伤,但该过程伴随着抗氧化能力的提高,可能由此促进肌肉对低氧的适应;急性低氧虽可促进胫骨前肌肌纤维向慢肌的转化,但不敌急性低氧激活氧化应激和炎症反应,这可能是肌萎缩的诱因。

参 考 文 献 (References)

- [1] Kupr B, Schnyder S, Handschin C. Role of nuclear receptors in exercise-induced muscle adaptations [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(6): a029835.
- [2] Edwards LM, Murray AJ, Tyler DJ, et al. The effect of high-altitude on human skeletal muscle energetics: 31P-MRS results from the caudwell xtreme everest expedition [J]. PLoS One, 2010, 5(5): e10681.
- [3] Millet GP, Debevec T, Brocherie F, et al. Commentaries on viewpoint: human skeletal muscle wasting in hypoxia: a matter of hypoxic dose? [J]. J Appl Physiol (1985), 2017, 122(2): 409-411.
- [4] de Theije CC, Langen RC, Lamers WH, et al. Distinct responses of protein turnover regulatory pathways in hypoxia- and semistarvation-induced muscle atrophy [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(1): L82-L91.
- [5] Guo H, Zhang Y, Han T, et al. Chronic intermittent hypoxia aggravates skeletal muscle aging by down-regulating Klc1/grx1 expression via Wnt/ β -catenin pathway [J]. Arch Gerontol Geriatr, 2021, 96: 104460.
- [6] Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions [J]. Microsc Res Tech, 2000, 50(6): 500-509.
- [7] 付鹏宇, 胡扬, 李燕春, 等. 低氧暴露所致大鼠骨骼肌萎缩的蛋白转化调节机制 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 423-432.
- Fu PY, Hu Y, Li YC, et al. Protein turnover regulation mechanism of rat skeletal muscle atrophy induced by hypoxia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 423-432.
- [8] Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1 [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014, 307(6): E469-E484.
- [9] 周瑾. 白藜芦醇和精氨酸对高住低训大鼠骨骼肌萎缩的影响及机制研究 [D]. 北京: 北京体育大学; 2016.
- Zhou J. Effect and mechanism of resveratrol and arginine on muscle atrophy of HiLo rats [D]. Beijing: Beijing Sport University; 2016.
- [10] Chaudhary P, Sharma YK, Sharma S, et al. High altitude mediated skeletal muscle atrophy: Protective role of curcumin [J]. Biochimie, 2019, 156: 138-147.
- [11] Yang Y, Liao Z, Xiao Q. Metformin ameliorates skeletal muscle atrophy in Grx1 KO mice by regulating intramuscular lipid accumulation and glucose utilization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(4): 1226-1232.
- [12] Hara Y, Watanabe N. Changes in expression of genes related to glucose metabolism in liver and skeletal muscle of rats exposed to acute hypoxia [J]. Heliyon, 2020, 6(7): e04334.
- [13] Koenig AM, Koehler U, Hildebrandt O, et al. The effect of obstructive sleep apnea and continuous positive airway pressure therapy on skeletal muscle lipid content in obese and nonobese men [J]. J Endocrinol Soc, 2021, 5(8): bvab082.
- [14] Lina LS, Yang YG, Liu W, et al. Zinc finger protein-activating transcription factor up-regulates vascular endothelial growth factor- α expression *in vitro* [J]. Chin Med Sci J, 2012, 27(3): 171-175.
- [15] 山萌, 王文静, 葛宝, 等. 甘肃鼯鼠适应低氧的肌纤维类型和代谢特征 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(10): 18-24.
- Shan M, Wang WJ, Ge B, et al. Muscle fiber types and metabolic characteristics of Gansu zokor (*Myospalax cansus*) in adaptation to hypoxia [J]. J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed), 2016, 44(10): 18-24.
- [16] Fujita N, Markova D, Anderson DG, et al. Expression of prolyl hydroxylases (PHDs) is selectively controlled by HIF-1 and HIF-2 proteins in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: distinct roles of PHD2 and PHD3 proteins in controlling HIF-1 α activity in hypoxia [J]. J Biol Chem, 2012, 287(20): 16975-16986.
- [17] Li F, Yin C, Ma Z, et al. PHD3 mediates denervation skeletal muscle atrophy through Nf- κ B signal pathway [J]. Faseb J, 2021, 35(4): e21444.
- [18] Gallego-Selles A, Martin-Rincon M, Martinez-Canton M, et al. Regulation of Nrf2/Keap1 signalling in human skeletal muscle during exercise to exhaustion in normoxia, severe acute hypoxia and post-exercise ischaemia: Influence of metabolite accumulation and oxygenation [J]. Redox biol, 2020, 36: 101627.
- [19] Ji W, Wang L, He S, et al. Effects of acute hypoxia exposure with different durations on activation of Nrf2-ARE pathway in mouse skeletal muscle [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0208474.
- [20] 杨根梦, 洪世君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎性小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 103-107.
- Yang GM, Hong SJ, Wang YH, et al. Progress of research in the regulation of Nrf2/keap1/p62, NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 103-107.
- [21] Schmidt CA, Goldberg EJ, Green TD, et al. Effects of fasting on isolated murine skeletal muscle contractile function during acute hypoxia [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0225922.

[收稿日期] 2021-08-12