

• 论 著 •

基于转录组学研究高原低氧对小鼠 T、B 淋巴细胞信号通路的影响^{*}

许玉珍, 王嘉阳, 胡 英, 龙启福, 缪增强, 永 胜[△]

(青海大学医学部, 青海 西宁 810016)

[摘 要] **目的** 基于转录组学测序技术探究高原低氧(HST)胁迫下 T、B 淋巴细胞信号通路中枢纽基因和关键调控通路响应的分子机制。**方法** 分别在海拔 400 m[平原常氧组(PSC 组)]和 4 200 m(HST 组)处饲养 C57BL/6 小鼠 30 d 后取脾脏组织,采用 RNA-Seq 进行转录组测序,得到差异基因进行基因本体(GO)功能注释和京都基因和基因组数据库(KEGG)通路分析,使用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)验证。**结果** 相比于 PSC 组, HST 组中 1 947 个差异基因表达上调, 2 266 个差异基因表达下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且 KEGG 富集分析发现, HST 胁迫下主要通过 T、B 细胞受体、磷脂酰肌醇-3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、核因子 κ B (NF- κ B) 等信号通路调控异常引起免疫炎症的发生发展。**结论** HST 胁迫可能通过激活 PI3K-Akt 通路, 抑制 p38 MAPK 和 NF- κ B 通路, 诱导 T、B 细胞受体信号通路响应 HST 胁迫的转录调控分子机制, 引起免疫调节和炎症反应的发生。

[关键词] 高原低氧; 脾脏; 转录组学测序; T、B 细胞受体信号通路

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2023.17.002 **中图法分类号:** R392.1

文章编号: 1009-5519(2023)17-2885-08

文献标识码: A

Transcriptomics-based study of the effects of high altitude hypoxia on

T and B lymphocyte signaling pathways in mice^{*}

XU Yuzhen, WANG Jiayang, HU Ying, LONG Qifu, MIAO Zengqiang, YONG Sheng[△]

(College of Medicine, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

[Abstract] **Objective** To explore the molecular mechanism of the response of key genes and key regulatory pathways in T and B lymphocyte signaling pathways under high altitude hypoxia(HST) stress based on transcriptomic sequencing technology. **Methods** C57BL/6 mice were raised at 400 meters [the plain normoxia group(PSC group)] and 4 200 meters(the HST group) above sea level for 30 days, respectively. RNA extracted from mouse spleen tissue was used for transcriptome sequencing, and differentially expressed genes were obtained for GO functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway analysis, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) was used to verify the differentially expressed genes. **Results** Compared with the PSC group, 1 947 differentially expressed genes were up-regulated and 2 266 differentially expressed genes were down-regulated in the HST group, the differences were statistically significant($P < 0.05$). KEGG enrichment analysis showed that abnormal regulation of differentially expressed genes between the two groups under HSP stress caused the occurrence and development of immune inflammation, mainly through T cell receptor, B cell receptor, PI3K-Akt, MAPK, NF- κ B and other signaling pathways. **Conclusion** HSP stress may induce T and B cell receptor signaling pathways to respond to transcriptional regulatory molecular mechanisms by activating PI3K-Akt pathway, inhibiting p38 MAPK and NF- κ B pathways, and causing immune regulation and inflammatory response.

[Key words] High altitude hypoxia; Spleen; Transcriptomic sequencing; T and B cell receptor signaling pathway

氧对哺乳动物有氧代谢至关重要^[1]。高原地区氧含量的下降会削弱有氧代谢,引起机体循环功能下

降,导致组织、器官的营养和能量减少,造成不同程度的氧化损伤,诱导高原肺水肿^[2]和高原脑水肿^[3]等高

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82060295);青海省科技计划项目(2019-ZJ-7059);青海大学青年科研基金项目(2021-QNY-10)。

作者简介:许玉珍(1986—),硕士研究生,讲师,主要从事低氧刺激对机体免疫功能改变及适应机制的研究。 [△] 通信作者, E-mail: yongsheng@qhu.edu.cn。

原病的发生。因此,研究高原病的发病机制成为近年来高原医学备受关注的课题。有研究表明,低氧会影响免疫细胞的新陈代谢和功能,且与高原病的发生发展有密切关系,且高原低氧(HST)环境可以调节免疫基因的表达、影响机体免疫功能、诱导炎症反应发生等^[4]。此外,KIANI 等^[5]研究发现,在低氧环境下,磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)和核因子 κ B(NF- κ B)共同调控 T、B 细胞受体活化信号,在固有和适应性免疫系统中发挥重要作用。然而,HST 刺激如何调控机体免疫功能的研究仍然有限,因此深入了解低压低氧刺激如何调控机体的免疫应答过程,进而适应低氧胁迫是亟待解决的重要科学问题。

众所周知,脾脏是机体最大的免疫器官,含有大量的淋巴细胞,在细胞免疫和体液免疫应答过程中都发挥着不可或缺的作用。据报道,HST 胁迫下,低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)通过抑制雷帕霉素复合物 1(mTORC1)介导的骨髓细胞瘤病毒癌基因同源物(Myc)相关通路调节 Tfh 与 Th1 细胞的发育,促进生发中心 B 细胞的增殖^[6]。此外,LI 等^[7]研究发现,HIF-1 α 是前 B 细胞中 miR-582 的靶点,敲除 miR-582 后,激活 mTORC2,增强 HIF-1 α 的表达和 Akt 磷酸化,促进前 B 细胞增殖,调节早期 B 细胞的分化发育。进一步研究发现,新型冠状病毒感染患者 B 细胞中出现低氧有关的转录变化,引起 B 细胞发育异常,包括 B 细胞减少、抗体类别的转换和亲和力成熟等,诱导炎症反应加剧和自身免疫反应的发生,提示在新型冠状病毒感染中,适当的早期氧疗会改善免疫反应,利于疾病的恢复^[8]。上述研究提示低氧与 T、B 细胞分化发育密切相关,探究 T、B 细胞响应低氧应激的分子机制为临床免疫疗法提供新思路。

随着测序技术的发展,高通量测序技术成为了解低氧胁迫影响免疫反应及其通路和基因表达的有力工具。RNA 测序(RNA-seq)的转录组分析技术可以从大量转录信息中识别差异表达基因(DEGs),分析核心调控通路,成为探究低氧胁迫机体各个组织系统响应免疫应答机制不可或缺的工具^[9]。有研究发现,低压低氧环境下大鼠肠道模型中 PPAR 信号通路、矿物质吸收、甘油三酯代谢、脂肪消化和吸收等消化相关代谢途径在京都基因和基因组数据库(KEGG)通路分析中显著富集,为大鼠在低氧环境下胃肠道调节的潜在分子机制提供新的理论依据^[10]。ZHOU 等^[11]研究发现,低压低氧暴露的幼年鳙鱼心脏模型中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号、细胞凋亡和肾上腺素信号等相关代谢途径在 KEGG 通路分析中得到了高度富集,为幼年鳙鱼在低氧环境下的应激分子机制提供线索。这些研究提示,转录组测序技术在探究低氧胁迫适

应的分子机制中发挥着重要作用。

因此,本实验采用转录组测序技术研究 HST 胁迫对小鼠脾脏 T、B 细胞的影响,挖掘与 T、B 细胞受体相关通路和关键基因,明确其在 HST 条件下 T、B 细胞的调控机制,为揭示低氧胁迫下免疫细胞调控机制的相关研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄的 SPF 级 C57BL/6 小鼠,购自西安交通大学医学部实验动物中心,动物许可证号:SYXK 2020-005,饲养于温度为 18~22℃、湿度为 45%~55%的实验动物房中,自由饮水、进食,保持环境卫生。待小鼠适应周围环境后,将小鼠随机分成 2 组,每组 5 只。对照组即平原常氧组(PSC 组),在西安交通大学医学部实验动物中心(海拔 400 m)饲养 30 d;实验组即 HST 组,在青海省果洛藏族自治州玛多县人民医院实验动物房(海拔 4 200 m)。30 d 后无菌采集小鼠脾脏组织置于液氮冻存备用。

1.2 主要试剂 逆转录聚合酶链反应(qPCR)试剂盒(TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus,RR820A,Takara,日本);逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent kit with gDNA Eraser,RR047A,Takara,日本);Trizol 裂解液(美国 Invitrogen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取和 Illumina 测序 从各组小鼠脾脏中提取总 RNA(常规 Trizol 法),将总 RNA 中纯化的 mRNA 打断并逆转录成 cDNA,经末端修复、PCR 扩增过程制备 mRNA-Seq 文库进行 Illumina 测序。

1.3.2 RNA-Seq 质量评估和序列比对 为了保证数据分析的质量及可靠性,对高通量测序得到的原始数据(raw reads)进行过滤,主要包括去除原始数据中有测序接头(adapter)的 reads 或测序质量较低的 reads,对 clean data 进行后续高质量分析。使用 HISAT2 软件构建索引,将配对末端 clean reads 与参照基因组比对,采用皮尔逊相关性检测对样本的基因表达水平进行精确分析。

1.3.3 DEGs 分析 对 PSC 组和 HST 组通过 DESeq2 统计软件,基于负二项式分布模型进行差异基因表达数据分析。用 FPKM(Fragments Per Kilobase per Million)对基因长度和深度校正其表达水平。以 $|\log_2FC| \geq 0$ 作为显著差异表达的阈值。

1.3.4 基因本体(GO)注释、KEGG 分析和基因富集分析 采用 clusterProfiler (3.4.4)富集分析,找出 DEGs 显著富集的 GO 条目并计算 P 值。GO(<http://www.geneontology.org/>)即基因本体数据库,

包括生物过程(BP)、细胞组成(CC)和分子功能(MF) 3 个部分。

KEGG(<http://www.kegg.jp/>)是分子水平的数据库资源,通过高通量数据库,了解细胞、生物体和生态系统的高级功能和效用。采用 clusterProfiler (3.4.4)软件分析计算 KEGG 通路中 DEGs 即 $P < 0.05$ 视为显著富集。基因集富集分析 GSEA (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>):从基因集富集分析的角度出发,针对有重要生物学意义但差异表达较小的基因进行功能富集分析,作为

KEGG 数据集的补充工具。

1.3.5 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)验证

将 RNA 逆转录为 DNA, cDNA 合成是按照制造商的说明使用 PrimeScript™ RT 试剂盒进行。以 β -actin 作为内参,检测 PD-1、CTLA4、CD45、CD4、CD8a、CD8b1、CD3e、ICOS、CD28、CD40L、PIR-B、CD22、CD72、Ig α 、Ig β 、Fc γ RIIB、LEU13、CD81、CD19、CD21、SHP1、GRB2、SOS、Ras、Raf、MEK1/2、p38、NFAT、PI3K、Akt、GSK-3 β 、NIK、IKK α 、NF- κ B、I κ B、TNF- α 、IFN- γ 的 mRNA 表达量,引物序列详见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物信息

基因	引物序列	长度(bp)
β -actin	F:CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	25
	R:ATGGAGCCACCGATCCACA	19
PD-1	F:GGTATCCCTGTATTGCTGCTGCTG	24
	R:CTTCAGAGTGTCTGCTCTTGCTTCC	24
CTLA4	F:GCGGCAGACAAATGACCAAATGAC	24
	R:CAACAGCTCTCAGTCCTTGATGG	24
CD45	F:GTTATCCACGCTGCTGCCTCAC	22
	R:TTGGCTGCTGAATGTCTGAGTGTC	24
CD4	F:CTCCTTCGGCTTTCTGGGTTTCC	23
	R:GCACTGGCAGGTCTTCTTCTCAC	23
CD8a	F:GGCACCCGAACCTCCGAATCTTTC	23
	R:CCAACACTTCACATACCAGGTCCAC	25
CD8b1	F:GCTGACTGTGGTTGATGTCTCTTCC	24
	R:GAACGGGCATTGCTTCTTCTTCTTC	25
CD3e	F:CCAGGACGATGCCGAGAACATTG	23
	R:CCAGGTGCTTATCATGCTTCTGAGG	25
ICOS	F:GAAGTCCTCTGCGAACTCACCAAG	24
	R:CTGGGAGCTGTCTGGGTTGTTTAG	24
CD28	F:CAGGCTGCTGTTCTTGGCTCTC	22
	R:AGGCTGACCTCGTTGCTATCTACC	24
CD40L	F:AAGGCGGCAAATACCCACAGTTC	23
	R:TGGATCACTTGGCTTGCTTCAGTC	24
PIR-B	F:CTGCTTTTCTCATCCTCATCG	22
	R:CATAGGTTACATCCTGGGTCTC	22
CD22	F:TGAGCTGTACCTTTCTAAGCAA	22
	R:GATGTAAGGTTGGAACGGTTTC	22
CD72	F:CTCAGGGAGAAGATAAGTCAGC	22
	R:TCTGCTTCTCCTGTAATGTGTC	22
Ig α	F:TACCAAGAACCGCATCATCACAGC	24
	R:GGCATGTCCACCCCAAACCTTCTC	23
Ig β	F:AAGCGGCGGAACACACTGAAAG	22
	R:AAGTAGCAGGAAGATGGGCACAATG	25
Fc γ RIIB	F:TGCTAAATCTTGCTGCTGGGACTC	24

续表 1 RT-qPCR 引物信息

基因	引物序列	长度(bp)
LEU13	R:GTCAGTGTACCGTGTCTTCCTTG	24
	F:TAGCCTATGCCTACTCCGTGAAGTC	25
CD81	R:GCCGTGAGGATGGTGAAGAACAG	23
	F:GGATGATGATGCCAACAATGCCAAG	25
CD19	R:TGGTGGTAGTCAGTGTGGTCAGTG	24
	F:CTCCCTGTCTCCTTCCTCCTTTC	25
CD21	R:CACAACATTGCCTCCCTCTTCTACC	25
	F:GACTCATTGGTGACTCGTCTGCTAC	25
SHP1	R:GCTGTCTCTGCTGCTGCTGTAG	22
	F:GGGCTAGACTGTGACATTGATA	22
GRB2	R:TTTCTTCTTGGTCGTTTCGATG	22
	F:CGGGACATAGAACAGATGCCACAG	24
SOS	R:TGAATGAAGTCTCCTCTGCGAAAGC	25
	F:CGTGTATCACTGTTGGCATTAC	22
Ras	R:GCAGTTATAGCCTGATTCAAGC	22
	F:AAGCGTGTGAAAGATTCTGATG	22
Raf	R:GGTCTCAATGAATGGAATTCCG	22
	F:GCTTCCCTACGCCCACATCAAC	22
MEK1/2	R:CACAGTCAGCCACCAACCTCTTC	23
	F:CATCAGTGTAAGTCATGGGATG	22
p38	R:GTGGCTCGTTCACTATGTAGTC	22
	F:GCAAGAGCTGAACAAAACAGTA	22
NFAT	R:TCCAAAAGTCCTATGACGTTCT	22
	F:CATCCTTGCTGCCCCTGACTG	22
PI3K	R:TGAGCCCTGTGGTGAGACTTGG	22
	F:AAACAAAGCGGAGAACCTATTG	22
Akt	R:TAATGACGCAATGCTTGACTTC	22
	F:TCGATTATCTCAAACCTCCTCGG	22
GSK-3 β	R:CGACTTCATCCTTTGCAATGAT	22
	F:TGGTAGCATGAAAGTTAGCAGA	22
NIK	R:CTCTCGGTTCTTAAATCGCTTG	22
	F:GCCACCAGACCCTACCTACTCC	22
IKK α	R:TGCCAGACTCCTCCTTGCTCAG	22
	F:ACATTAGCAGACCGTGAACATCCTC	25
NF- κ B	R:TGGTCCTCATTTGCTTCACGAATA	24
	F:CAAAGACAAAGAGGAAGTGCAA	22
I κ B	R:GATGGAATGTAATCCCACCGTA	22
	F:CAGAGCCAGGCAGACAGCTT	20
TNF- α	R:TGCAATGTGGCAATGTGGAG	20
	F:ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC	22
INF- γ	R:GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA	22
	F:CTTGAAAGACAATCAGGCCATC	22
	R:CTTGGAATACTCATGAATGCA	22

1.4 统计学处理 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PSC 组和 HST 组脾脏 DEGs 30 d 的 HST 处理后,以 $|\log_2FC| \geq 0$ 和 P -校正 < 0.05 为筛选条件,共鉴定出 4 213 个 DEGs,其中 1 947 个基因表达上调,2 266 个基因表达下调(图 1)。为了研究 PSC 和 HST 下脾脏转录组数据之间的样本异质性,对各组样品进行 Pearson 相关系数分析(图 2),结果表明各样本间基因表达量的相关系数 $R^2 > 0.95$,提示生物学重复样本间基因表达情况较为一致,实验数据可靠,且小鼠脾脏组织在不同海拔高度下对低氧诱导反应有差异。

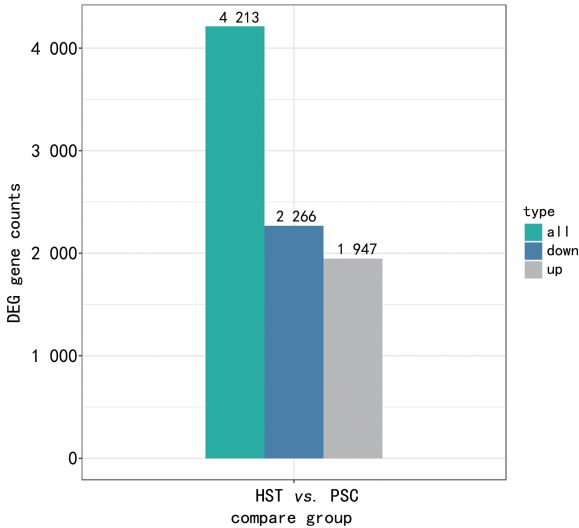


图 1 DEGs 柱

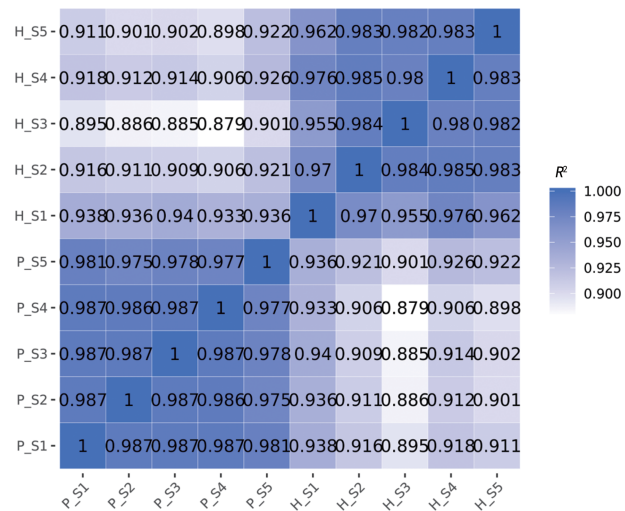


图 2 Pearson 相关性系数分析

2.2 DEGs 的 GO 富集分析 通过 GO 富集分析对 DEGs 进行 BP、CC、MF 富集(图 3)。主要参与 B 细胞激活、适应性免疫应答、淋巴细胞激活的正向调节信号通路等 GO 生物过程;并在免疫球蛋白复合体和

免疫球蛋白复合体循环等细胞组分的构成方面起作用;参与抗原结合和免疫球蛋白受体结合等分子功能。提示免疫系统在 HST 胁迫下发生了重要变化。

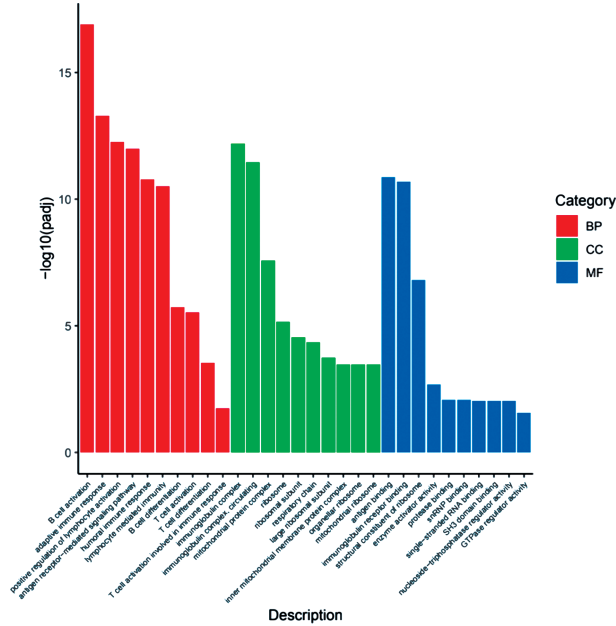


图 3 DEGs 的 GO 注释图

2.3 DEGs 的 KEGG 富集分析 在 HST 胁迫下得到 DEGs 进行 KEGG 富集分析发现,主要参与 T、B 细胞受体,PI3K-Akt,MAPK,NF- κ B 等多个免疫炎症相关信号通路调控,见图 4。

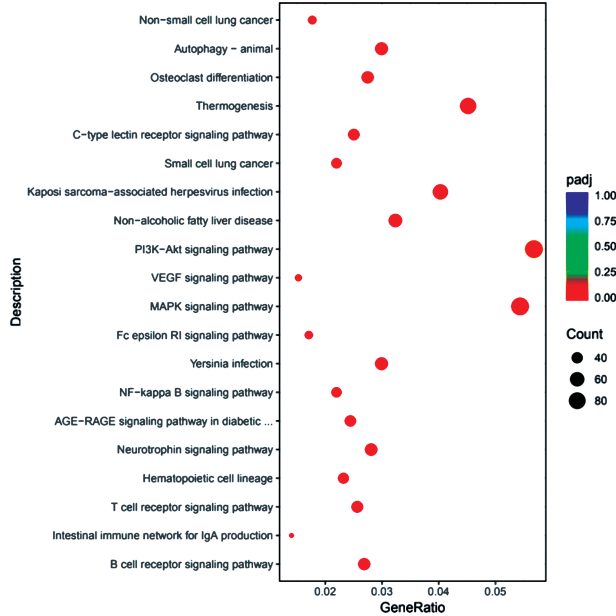
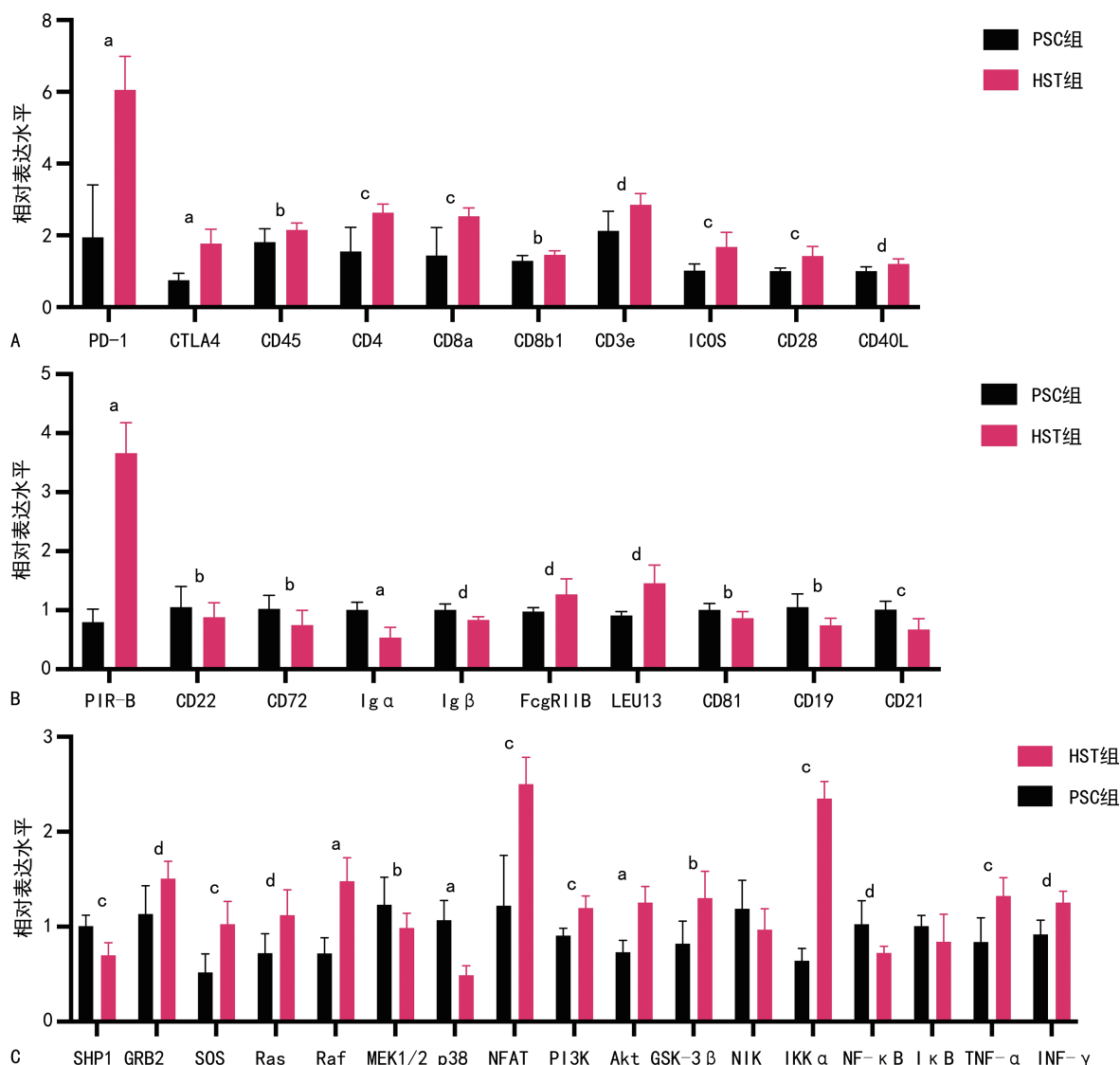


图 4 DEGs 的 KEGG 通路富集

2.4 RT-qPCR 验证结果 对 T、B 细胞受体信号通路中的 DEGs 及相关炎症因子进行了 mRNA 表达量的检测,结果发现,T 细胞表面膜分子:PD-1、CTLA4、CD45、CD4、CD8a、CD8b1、CD3e、ICOS、CD28、CD40L 在 PSC 组与 HST 组之间均表现出显著上调差异表达;B 细胞表面膜分子:PIR-B、CD22、CD72、Ig α 、Ig β 、Fc γ RIIB、LEU13、CD81、CD19、CD21 均表现

出显著差异变化; T、B 细胞受体信号通路共有基因: PI3K-Akt 途径中 PI3K、Akt、GSK-3 β 、NIK、IKK α 基因, p38 MAPK 和 NF- κ B 途径中 SHP1、GRB2、SOS、Ras、Raf、MEK1/2、p38、NF- κ B、I κ B 基因均出现差异

表达。此外, 相比于 PSC 组, HST 组的 INF- γ 和 TNF- α 等炎性细胞因子出现显著上调差异表达。因此, 上述结果提示, 在 HST 胁迫下通过影响 T、B 细胞受体信号通路介导炎症反应发生。见图 5。



注: A. T 细胞表面膜分子; B. B 细胞表面膜分子; C. T、B 细胞受体信号通路共有基因。与 PSC 组相比, ^a $P < 0.0001$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.001$, ^d $P < 0.01$ 。

图 5 T、B 细胞受体信号通路差异基因的 RT-qPCR 结果

3 讨 论

经过 30 d HST 暴露后, 发现 HST 组相较于 PSC 组小鼠脾脏组织多个基因发生了显著差异表达。有研究发现, 缺氧抑制白细胞介素-2 诱导的 T 细胞增殖过程, 同时抑制抗原诱导的细胞毒性 T 细胞中促炎性细胞因子的产生^[12]。据报道, 低氧暴露会引起机体对伤害性刺激做出防御性反应, 在免疫应答过程中, 免疫细胞被激活、分裂和分化, 通过诱导炎症消除危险信号以保护机体免受伤害^[13]。本研究通过比较暴露于不同海拔的小鼠脾脏组织转录组谱, 探讨低氧对小鼠 T、B 细胞信号通路的影响机制。

为了解 HST 胁迫对小鼠脾脏 T 细胞膜受体激活

机制, 本实验对 T 细胞膜受体的 10 个基因进行 RT-qPCR 实验验证, 结果发现基因均出现了显著性上调变化(图 5), 提示 TCR 识别活化信号后, 经 CD3 和共受体 CD4 或 CD8 传递 T 细胞活化的第一信号, 启动 T 细胞激活, 其次 CD28、ICOS、CD40L 共刺激分子相互作用下提供第二信号诱导 T 细胞完全活化, 共抑制分子 PD-1 和 CTLA4 基因表达也显著上调, 提示机体同时启动免疫抑制信号, 下调或中止了免疫应答。

此外, HST 胁迫对小鼠脾脏 B 细胞膜受体的激活与 T 细胞相似, 也需要双信号活化。BURROWS 等^[14]研究发现小鼠 B 细胞中 HIF-1 α 激活后, BCR 编辑减少和未成熟 B 细胞的发育停止, 导致外周 B 细胞

数量减少, HIF-1 α 的动态调节对正常的 B 细胞发育至关重要。本研究结果发现, B 细胞膜受体中的 Ig α 、Ig β 、CD19、CD21、CD81 基因显著下调, 提示激活 BCR 后, 与 Ig α / β 胞内区相关联的酪氨酸激酶 LYN 活化, 使 Ig α / β 、CD19/CD21/CD81 胞内段的 ITAM 酪氨酸残基被磷酸化后发生负调节, 随后募集并活化 SYK, 进而启动 B 细胞内信号转导的级联反应。

T、B 细胞受体信号通路参与免疫应答、炎症反应及细胞生长、凋亡等生物事件的发生。为了进一步明确 HST 胁迫对小鼠脾脏 T、B 细胞内信号通路影响的机制, 对 T、B 细胞受体信号通路中的 DEGs 进行了分析, 提示低氧激活 T、B 细胞, 启动信号级联反应将活化信号转入 T、B 细胞内, 一方面活化信号激活 PI3K 后, 催化 PIP2 的 3 位羟基磷酸化生成 PIP3 为第二信使, 招募 PDK1 和 Akt 到质膜上, 磷酸化 Akt 蛋白的第 308 号苏氨酸, 导致 Akt 活化, 进一步激活下游 GSK-3 β 和 IKK α 。Akt 磷酸化 GSK3 β 后, 导致 β -catenin 在胞浆内大量聚集, 进入细胞核激活 T、B 细胞分裂、生长调控及炎症相关基因 (如 IFN- γ 、TNF- α 等); IKK α 被 Akt 磷酸化激活后, IKK α 进一步磷酸化能够抑制 NF- κ B 途径的转录因子 I κ B。以上结果提示, HST 胁迫引起 PI3K-Akt 信号轴激活, 导致免疫调节和炎症因子的产生 (如 IFN- γ 、TNF- α 等)。有研究表明, PI3K-Akt 是各种细胞表面受体激活的脂质激酶家族, PI3K-Akt 可以控制 T、B 细胞从淋巴结的进出, 以及炎症组织中 T、B 细胞的招募和扩增^[15]。据报道, HST 暴露的大鼠脑组织中 HIF、血管内皮生长因子 (VEGF)、PI3K 和 Akt 的磷酸化显著增强, 激活大鼠脑组织中 PI3K-Akt 信号通路, 参与脑组织炎症损伤和凋亡^[16]。有研究发现, PI3K-Akt 和 HIF-1 α 通路是介导小鼠卵巢癌的关键致癌通路, 其中, 盐诱导激酶 2 (SIK2) 可以激活 PI3K-Akt、HIF-1 α 和线粒体动力相关蛋白 1 (Drp1) 磷酸化引起线粒体裂变, 导致免疫平衡失调, 进而诱发癌症^[17]。此外, 有研究报道, IFN- γ 刺激促炎巨噬细胞的活化, 抑制肿瘤组织中的血管生成, 诱导调节性 T 细胞凋亡, 进而克服肿瘤的进展^[18]。同时, 慢性炎症与 TNF- α 的过度激活密切相关, 并最终可能导致自身免疫性疾病^[19]。结合以上研究结果, HST 胁迫通过激活 T、B 细胞受体信号通路内 PI3K-Akt 信号途径, 促进炎症细胞因子的成熟和分泌, 从而发挥炎症和免疫效应。

另一方面活化信号转入 T、B 细胞内, 通过抑制性共受体 (PIR-B、CD22、CD72) 向免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 招募磷酸酶来负调节 BCR 信号传导, 抑制 SHP1 基因表达, 进一步磷酸化 SOS 和 Ras, 导致 MEK1/2、p38、NF κ B 基因显著下调, 抑制 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 对免疫应答产生抑制作

用, 从而在清除抗原的同时保持机体的免疫平衡。如, ZHU 等^[20] 研究发现, 通过抑制缺血缺氧性脑损伤 (HIBI) 模型大鼠的 p38 MAPK 信号通路, 减少海马组织中的神经元凋亡, 从而提高 HIBI 大鼠的学习记忆能力和运动功能。KAUPPINEN 等^[21] 研究还发现, NF- κ B 信号传导在固有免疫防御中起着重要作用, 通过激活沉默信息调节因子 (SIRT1) 可抑制 NF- κ B 信号传导, 发挥抗炎、抗氧化和抗损伤, 维持内环境的稳态。此外, 有报道称, 异丙酚通过抑制 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路来减少炎症因子的释放并缓解肠道水肿, 从而减轻和治疗大鼠的肠道缺血/再灌注损伤^[22]。牛磺酸通过下调 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号通路, 抑制炎症反应和氧化应激, 从而缓解肺损伤, 恢复呼吸功能并降低炎症因子水平^[23]。结合上述研究提示, 30 d HST 暴露小鼠通过抑制 p38 MAPK 和 NF- κ B 信号途径, 引起 T、B 细胞受体信号通路有效地执行宿主防御响应的分子机制^[24-25]。

T、B 细胞受体信号通路是复杂的细胞内网络。因此, 本研究基于转录组测序结果对 T、B 细胞受体信号通路相关基因进行分析和 RT-qPCR 的验证。本实验发现, T、B 细胞受体信号通路中显著性 DEGs 在 PI3K-Akt、p38 MAPK 和 NF- κ B 通路中。结果提示, HST 胁迫通过激活 PI3K-Akt 通路, 抑制 p38 MAPK 和 NF- κ B 通路, 诱导脾脏组织 T、B 细胞受体信号通路发生改变, 致使机体内部免疫调节和炎症反应的发生。因此, 这一结果将为研究 HST 对小鼠 T、B 淋巴细胞的调控机制提供新的见解, 也为高原医学在医学免疫学领域的发展提供新的理论依据。

参考文献

- [1] SINGER M, YOUNG P J, LAFFEY J G, et al. Dangers of hyperoxia [J]. Crit Care, 2021, 25 (1): 440.
- [2] WANG Y, HUANG X, PENG F, et al. Association of variants m. T16172C and m. T16519C in whole mtDNA sequences with high altitude pulmonary edema in Han Chinese lowlanders [J]. BMC Pulm Med, 2022, 22(1): 72.
- [3] ZUBIETA-CALLEJA G, ZUBIETA-DEURIOSTE N. Acute mountain sickness, high altitude pulmonary edema, and high altitude cerebral edema: A view from the high andes [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2021, 287: 103628.
- [4] MCGETTRICK A F, O'NEILL L A J. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. Cell Metab, 2020, 32(4): 524-536.
- [5] KIANI A A, ELYASI H, GHOREYSHI S, et

- al. Study on hypoxia-inducible factor and its roles in immune system[J]. Immunol Med, 2021, 44(4): 223-236.
- [6] HUANG B, PHELAN J D, PREITE S, et al. In vivo CRISPR screens reveal a HIF-1 α -mTOR-network regulates T follicular helper versus Th1 cells[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 805.
- [7] LI X, ZHANG Y, ZHENG M, et al. MiR-582 negatively regulates pre-B cell proliferation and survival through targeting Hif1 α and rictor[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(2): 107.
- [8] KOTAGIRI P, MESCIA F, HANSON A L, et al. The impact of hypoxia on B cells in COVID-19[J]. EBioMedicine, 2022, 77: 103878.
- [9] AYTURK U. RNA-seq in skeletal biology[J]. Curr Osteoporos Rep, 2019, 17(4): 178-185.
- [10] TIAN L, JIA Z, XU Z, et al. Transcriptional landscape in rat intestines under hypobaric hypoxia[J]. Peer J, 2021, 9: e11823.
- [11] ZHOU Y, LUO W, YU X, et al. Cardiac transcriptomics reveals that MAPK pathway plays an important role in hypoxia tolerance in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. Animals (Basel), 2020, 10(9): 1483.
- [12] ROSS S H, ROLLINGS C M, CANTRELL D A. Quantitative analyses reveal how hypoxia reconfigures the proteome of primary cytotoxic lymphocytes[J]. Front Immunol, 2021, 12: 712402.
- [13] CARDOSO D, PERUCHA E. Cholesterol metabolism: A new molecular switch to control inflammation[J]. Clin Sci (Lond), 2021, 135(11): 1389-1408.
- [14] BURROWS N, BASHFORD-ROGERS R J M, BHUTE V J, et al. Dynamic regulation of hypoxia-inducible factor-1 α activity is essential for normal B cell development[J]. Nat Immunol, 2020, 21(11): 1408-1420.
- [15] JOHANSEN K H, GOLEC D P, THOMSEN J H, et al. PI3K in T cell adhesion and trafficking[J]. Front Immunol, 2021, 12: 708908.
- [16] ZHANG Z, YAO L, YANG J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia(review)[J]. Mol Med Rep, 2018, 18(4): 3547-3554.
- [17] GAO T, ZHANG X, ZHAO J, et al. SIK2 promotes reprogramming of glucose metabolism through PI3K/AKT/HIF-1 α pathway and Drp1-mediated mitochondrial fission in ovarian cancer[J]. Cancer Lett, 2020, 469: 89-101.
- [18] JORGOVANOVIC D, SONG M, WANG L, et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review[J]. Biomark Res, 2020, 8: 49.
- [19] JANG D I, LEE A H, SHIN H Y, et al. The role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(5): 2719.
- [20] ZHU Z, GE M, LI C, et al. Effects of p38 MAPK signaling pathway on cognitive function and recovery of neuronal function after hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats[J]. J Clin Neurosci, 2020, 78: 365-370.
- [21] KAUPPINEN A, SUURONEN T, OJALA J, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders[J]. Cell Signal, 2013, 25(10): 1939-1948.
- [22] LI L, SHU F, WANG X Q, et al. Propofol alleviates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats through p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(3): 1574-1581.
- [23] CHEN J, XUE X, CAI J, et al. Protective effect of taurine on sepsis-induced lung injury via inhibiting the p38/MAPK signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(3): 653.
- [24] TSUBATA T. Inhibitory B cell co-receptors and autoimmune diseases[J]. Immunol Med, 2019, 42(3): 108-116.
- [25] CHEN J, CHEN J, CHENG Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect beta cells against hypoxia-induced apoptosis via miR-21 by alleviating ER stress and inhibiting p38 MAPK phosphorylation[J]. Stem Cell Res Ther, 2020, 11(1): 97.

(收稿日期: 2023-01-06 修回日期: 2023-06-08)