

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003779

基于泛素化修饰组学研究高原低氧抑制 PLCG2 表达的分子机制

陈晓晨, 李积东, 汪晓筠, 胡英, 许玉珍, 永胜

(青海大学医学院基础医学部, 西宁 810016)

【摘要】目的:利用泛素化修饰组学研究低氧暴露导致小鼠脾脏组织蛋白质表达水平的变化,阐明高原低氧环境对小鼠脾脏免疫炎症反应的影响机制。**方法:**将 C57BL/6 小鼠分别置于 400 m 和 4 200 m 的海拔饲养,30 d 后无菌取出脾脏进行泛素化修饰组学研究,通过鉴定泛素化蛋白质、泛素化肽段、泛素化位点,分析差异表达泛素化肽段并进行生物信息学分析。**结果:**泛素化修饰组学共鉴定到的泛素化蛋白质、泛素化肽段、泛素化位点的数目分别为 1 457、2 982、3 373,其中 1 100 个修饰蛋白上有 2 089 条可定量泛素化肽段,2 255 个可定量泛素化位点。在显著性差异修饰肽段筛选中共鉴定出 69 个差异表达泛素化肽段,其中 46 个修饰肽段表达上调,23 个修饰肽段表达下调。通过对差异表达泛素化肽段对应的蛋白质做 GO 功能注释分析发现高原低氧组中差异表达蛋白质多与细胞进程、生物调节和免疫过程等相关,京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析发现差异表达蛋白质显著富集到丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路、RAS 基因家族(rat sarcoma viral oncogene homolog, RAS)信号通路和神经内分泌肿瘤(neuroendocrine tumor, NET)信号通路中,因此对通路中关键蛋白进行验证,发现磷脂酶 C γ 2(phospholipase C γ 2, PLCG2)蛋白表达显著下调($P=0.022$),血小板衍生生长因子受体 α (platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide, PDGFRA)蛋白表达水平上调($P=0.045$)、磷脂酶 A2 IVA 组(phospholipase A2 group IVA, PLA2G4A)蛋白表达水平显著上调($P=0.015$);炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β ($P=0.009$)、IL-6($P<0.001$)、IL-12($P=0.014$)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)($P<0.001$)的 mRNA 表达量显著上调。**结论:**通过泛素化修饰组学分析低氧暴露导致小鼠脾脏组织中蛋白表达差异的分子机制,借助生物信息学分析,发现高原低氧环境可通过改变 MAPK 信号通路、RAS 信号通路和 NET 信号通路中蛋白修饰水平,抑制小鼠脾脏组织中 PLCG2 的表达,进而导致机体免疫系统功能障碍以及炎症反应的发生。

【关键词】泛素化修饰组学;低氧;脾脏;免疫反应;炎症**【中图分类号】**R392.1**【文献标志码】**A

Molecular mechanism of high altitude hypoxia-induced PLCG2 expression inhibition: a study based on ubiquitination modification omics study

Chen Xiaochen, Li Jidong, Wang Xiaojun, Hu Ying, Xu Yuzhen, Yong Sheng

(Department of Basic Medical Sciences, Qinghai University Medical College)

【Abstract】Objective: To explore the changes in protein expression levels in mouse spleen tissues caused by hypoxic exposure using ubiquitination modification omics, and to elucidate the mechanism of the impact of high altitude hypoxia environment on immune inflammatory response in the mouse spleen. **Methods:** C57BL/6 mice were raised at an altitude of 400 m and 4 200 m, respectively. After 30 days, the spleen was removed aseptically for ubiquitination modification omics study. By identifying ubiquitinated proteins, ubiquitinated peptides, and ubiquitinated sites, the differentially expressed ubiquitinated peptides were analyzed, and bioinformatics analysis was conducted. **Results:** The total counts of ubiquitinated proteins, ubiquitinated peptides, and ubiquitinated sites identified by ubiquitination modification omics were 1 457, 2 982, and 3 373, respectively. There were 2 089 quantifiable ubiquitinated peptides and 2 255 quantifiable ubiquitinated sites identified across 1 100 modified proteins. A total of 69 differentially expressed ubiquitinated peptides

were detected during the screening for significantly differentially modified peptides, of which, 46 modified peptides exhibited up-regulated expression and 23 modified peptides showed down-regulated expression. The gene ontology functional annotation analysis on proteins corresponding to the differentially expressed ubiquitinated peptides revealed that the differentially expressed proteins in the high altitude hypoxia group predominantly involved in the cel-

作者介绍:陈晓晨, Email: 2044819712@qq.com,

研究方向:高原低氧环境对机体免疫功能影响。

通信作者:永胜, Email: yongsheng@qhu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:82060295);青海省科技计划项目基金资助项目(编号:2023-ZJ-771)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250225.1752.009>
(2025-02-26)

ular process, biological regulation, and immune response. The KEGG pathway enrichment analysis indicated significant enrichment of differentially expressed proteins within MAPK signaling pathway, RAS signaling pathway, and NET formation pathway. Consequently, validation of key proteins in these pathways revealed that platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide (PDGFRA) ($P=0.045$) and (phospholipase A2 group IVA, PLA2G4A) ($P=0.015$) protein expression levels were significantly up-regulated, while (phospholipase C γ 2, PLCG2) ($P=0.022$) protein expression level was significantly down-regulated; the mRNA expression levels of inflammatory factors interleukin (IL)-1 β ($P=0.009$), IL-6 ($P<0.001$), IL-12 ($P=0.014$), and tumor necrosis factor- α ($P<0.001$) were significantly up-regulated. **Conclusion:** The ubiquitination modification omics analysis, with the aid of bioinformatics analysis, found that high altitude hypoxia environment inhibits the expression of PLCG2 in the mouse spleen by changing the protein modification levels in MAPK signaling pathway, RAS signaling pathway, and NET formation pathway. This in turn leads to dysfunction of the body's immune system and inflammation.

[Key words] ubiquitination modification omics; hypoxia; spleen; immune response; inflammation

高海拔地区地形起伏大、紫外线较强、气候干燥、气温变化大、气压低、氧气含量少,这种极端恶劣的地理环境对人体生活和生存造成巨大的威胁。而高原地区特殊的地形优势形成了大量的山脉、湖泊和独特的地域环境,吸引了众多游客前来驻足感受高原环境的魅力。当人们第一次进入高原地区时,低压低氧环境会引起身体出现一系列不适症状,如头痛、头晕、胸闷、气短、呕吐、腹泻等,这些症状被称为高原反应^[1]。这种特殊地理环境对临时进驻者和当地居民是一个巨大的压力和挑战,持续低氧刺激导致缺氧诱导因子 (hypoxia inducible factors, HIFs) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生增加^[2-3],使机体各器官系统受到不同程度影响,导致高原肺水肿 (high-altitude pulmonary edema, HAPE)、高原脑水肿 (high-altitude cerebral edema, HACE)、急性高山病 (acute mountain sick, AMS) 等高原病的发生^[4]。

脾脏是机体最大的外周免疫器官,对机体的免疫调节起着重要的作用,通过免疫调节和免疫监视等功能帮助机体抵御各种细菌和病毒的感染。在某些情况下,脾脏还可以分泌抗炎因子、释放抗原抗体复合物,帮助控制炎症反应,减轻疾病症状,是机体抵御外界感染的重要防线。外界环境的急剧变化导致脾脏微环境及其功能受到影响,从而引发炎症反应、免疫失衡等问题^[5]。

泛素化修饰,作为一种重要的蛋白质翻译后修饰 (protein post-translational modification, PTMs) 机制,利用共价修饰的方法,将特定的小分子官能团引入到蛋白质的氨基酸侧链中,调控其活性、结构、定位及相互作用,进而实现对其生物功能的动态变化进行精细调控。泛素化修饰作为真核细胞内主要的蛋白质翻译后修饰之一,介导细胞内蛋白质的

特异性降解^[6],广泛参与并调控细胞内基因转录、信号转导、DNA 损伤与修复、细胞周期调控、应激反应甚至个体的免疫应答等几乎所有的生命活动过程^[7-8]。近年来,基于蛋白质泛素化富集及质谱分析快速发展,利用质谱技术以确定来自蛋白质的泛素化位点,使泛素化蛋白质组学研究取得了重大进展。因此,本研究利用泛素化修饰组学分析低氧暴露对小鼠脾脏组织中蛋白的变化,探究高原低氧条件下炎症相关通路的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 本研究以 6~8 周龄的 SPF 级 C57BL/6 雄性健康小鼠 (购自西安交通大学医学部实验动物中心,动物许可证号:SYXK2020-005) 为研究对象,将小鼠随机分为 2 组 (每组 5 只),其中 1 组饲养于海拔 400 m 的西安交通大学医学部实验动物中心,作为本次实验的对照组即平原常氧组 (plain spleen control, PSC); 另 1 组饲养于海拔 4 200 m 的青海省果洛藏族自治州玛多县人民医院实验动物房,作为实验组即高原低氧组 (high-altitude spleen test, HST)。在此期间,始终保持 2 组间温度、湿度及饮水、进食一致的饲养条件。造模 30 d 后,无菌采集小鼠脾脏组织,一部分保存于液氮中备用,另一部分置于 4% 多聚甲醛中固定保存。

1.1.2 实验试剂与仪器 4% 多聚甲醛 (Servicebio 公司,武汉); 苏木精-伊红染色法 (hematoxylin and eosin staining, HE) 染色试剂盒 (Solarbio 公司,北京); 中性树胶 (Solarbio 公司,北京); 动物全蛋白提取试剂盒 (Sangon Biotech 公司,上海); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Beyotime Biotech 公司,上海); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Solarbio 公司,北京); 硝酸纤维素 (NC) 膜 (Pall Corporation 公司,美国); 鼠源 HIF-1 α (货号:66730-1-Ig) 蛋白抗体、鼠源 PLA2G4A (货号:68133-1-IG) 蛋白抗体、鼠源 PLCG2 (67011-1-IG) 蛋白抗体、辣根

过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗均购自 Proteintech 公司;兔源 PDGFRA (货号: AF0241) 蛋白抗体 (Affinity 公司);增强化学发光液 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国)。电泳仪、转膜仪 (Bio-Rad 公司, 美国);生物显微镜 (来宝公司, 济南);凝胶成像系统 (VILBER 公司, 法国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脾脏组织病理学检查 用 4% 多聚甲醛固定小鼠脾脏组织,乙醇脱水处理,随后将脾脏组织用石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡,使用 HE 染色,最后显微镜下观察组织切片。

1.2.2 泛素化修饰组学 ①蛋白质提取:从-80 °C 冰箱中取出组织进行低温研磨至粉末,采用尿素 (8 M 尿素, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5) 缓冲液,用于样品裂解和蛋白提取。用 Bradford 蛋白检测试剂盒定量测定蛋白的量,并用裂解液将体积调整一致。②肽段酶解:加入 DB 蛋白溶解液将蛋白样品补足体积至 100 μ L,加入胰酶和 100 mmol/L TEAB 缓冲液,37 °C 酶切 4 h 后,加胰酶和 CaCl₂ 酶切过夜。然后加 100 μ L TEAB 缓冲液和 41 μ L 乙腈溶解的 TMT 标记试剂复溶,室温下颠倒混匀反应 2 h。最后加入终浓度 8% 氨水终止反应,取等体积标记后的样品混合,除盐后冻干。③泛素化肽段富集:样品在 1.4 mL 预冷 IAP 缓冲液中重组,加入预处理的 anti-K- ϵ -GG 抗体珠 PTMScan 泛素残留基序 (anti-K- ϵ -GG) 试剂盒,细胞信号技术,4 °C 孵育 1.5 h, 2 000 \times g 离心 30 s,弃上清液。anti-K- ϵ -GG 抗体珠用 1 mL 预冷的 IAP 缓冲液洗涤 3 次,然后用预冷水洗涤 3 次。加入 40 μ L 0.15% TFA,室温孵育 10 min,再加入 0.15% TFA, 2 000 \times g 离心 30 s,用 C18 级 Tips 脱盐。④液质联用 (LC-MS) 技术检测:取 20 μ L 互作蛋白,加入 1 \times SDSPAGE Sample Loading Buffer 进行 SDS-PAGE。待蛋白电泳至分离胶约 5 cm 时,将目的胶条切下移至 1.5 mL 离心管,-20 °C 保存。⑤生物信息学分析:采用 MaxQuant 软件对质谱分析原始数据进行查库鉴定及定量分析,并对定量信息进行归一化处理;利用 Blast2GO 对目标蛋白质集合进行 GO 注释;利用 KEGG 自动注释服务器 (KEGG automatic annotation server, KAAS) 软件对目标蛋白质集合进行 KEGG 通路注释,从蛋白质协调作用的角度阐述变化规律。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 和蛋白免疫印迹 (Western blot) 将 RNA 逆转录为 cDNA。以 β -actin 作为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因的 mRNA 相对表达量,各引物序列详见表 1。反应体系包括 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μ L, ddH₂O 6.4 μ L, cDNA 2 μ L, 前后引物各 0.8 μ L。经过 45 个循环扩增,检测 HIF-1 α 、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-12、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的 mRNA 表达量。

提取小鼠脾脏组织蛋白,采用 BCA 法对所提取蛋白进行浓度测定,调整上样浓度至 30 μ g/孔,然后经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白质分离,加样后进行电泳

(恒压 90 V) 和转膜 (横流 200 mA)。将 TBST 洗液清洗后的 NC 膜在室温下用无蛋白快速封闭液封闭 10 min。加入一抗 HIF-1 α (1:2 000)、PLA2G4A (1:1 000)、PLCG2 (1:5 000)、PDGFRA (1:500)、 β -actin (1:10 000), 4 °C 孵育过夜。TBST 洗液洗膜 (5 min/次, 6 次+10 min/次, 1 次) 后,加入羊抗兔二抗 (1:1 000), 羊抗鼠二抗 (1:5 000), 室温孵育 1 h。再次洗膜 (6 min/次, 5 次) 后,用 ECL 化学发光液进行显色,凝胶成像系统观察分析。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,符合正态分布的计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组间比较采用两独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

表 1 RT-qPCR 引物信息

基因名称	引物序列 5'~3'	bp
β -ACTIN	F: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	25
	R: ATGGAGCCACCGATCCACA	19
HIF-1 α	F: GGACGATGAACATCAAGTCAGCA	23
	R: AGGAATGGGTTACAAATCAGCA	23
IL-1 β	F: TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	22
	R: GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	23
IL-6	F: CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	23
	R: TGCAAGTGCATCATCGTTGTTC	22
IL-12	F: ATGTGGAATGGCGTCTCTGTCTG	23
	R: CAGTTCAATGGCAGGCTCTCC	22
TNF- α	F: ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTTC	22
	R: GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA	22

注: F, 前引; R, 后引; bp, 碱基对

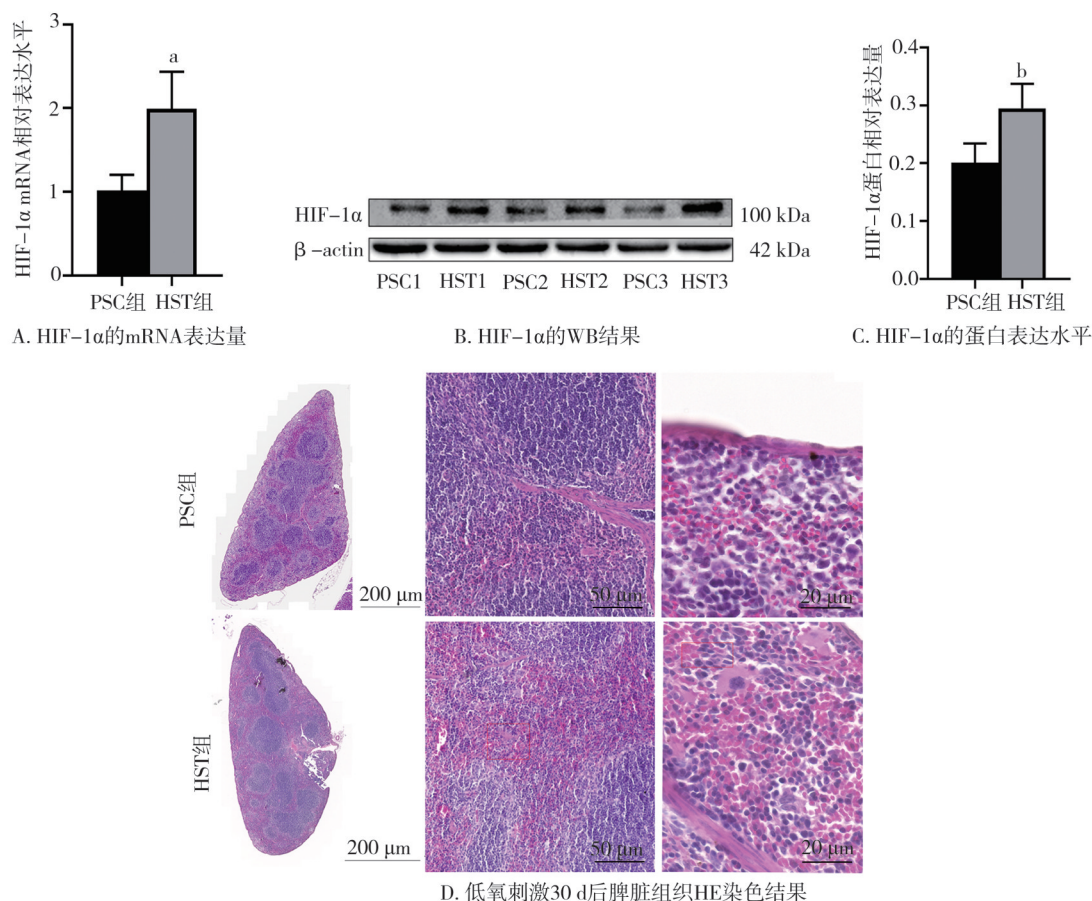
2 结果

2.1 小鼠脾脏组织 HIF-1 α 的表达与病理学检测

为了验证高原低氧小鼠建模是否成功,检测 HIF-1 α 的 mRNA 与蛋白表达量,结果显示,低氧诱导小鼠脾脏组织的 HIF-1 α 表达量明显上调 (图 1A~C)。在组织学分析 HE 染色结果显示, HST 组小鼠脾脏组织白髓减少,生发中心范围扩大,分界模糊,并伴有静脉充血;此外,可见部分细胞凋亡、核固缩、核碎裂等 (图 1D)。提示,高原低氧环境下小鼠脾脏组织发生炎症性病理学改变。

2.2 泛素化修饰组学质量评估

为了评估数据可靠性,使用 Andromeda 分析工具对质谱图谱数据进行分析,获得质谱图谱的得分。所有鉴定泛素化肽段的质量偏差均在 10 ppm 以内 (图 2A),说明鉴定结果准确可靠;泛素化肽段离子质量偏差分布结果显示 67.06% 的修饰肽段得分在 60 分以上,肽段得分中位数为: 74.85 分 (图 2B)。以肽段错误发现率和蛋白质错误发现率结合质量偏差作为筛选标准,结合肽段得分分布,表明质谱数据质量较高,可用于后续分析。



注:a,与PSC组比较, $P<0.001$;b,与PSC组比较, $P<0.05$

图1 小鼠脾脏组织HIF-1α的表达与病理学检测

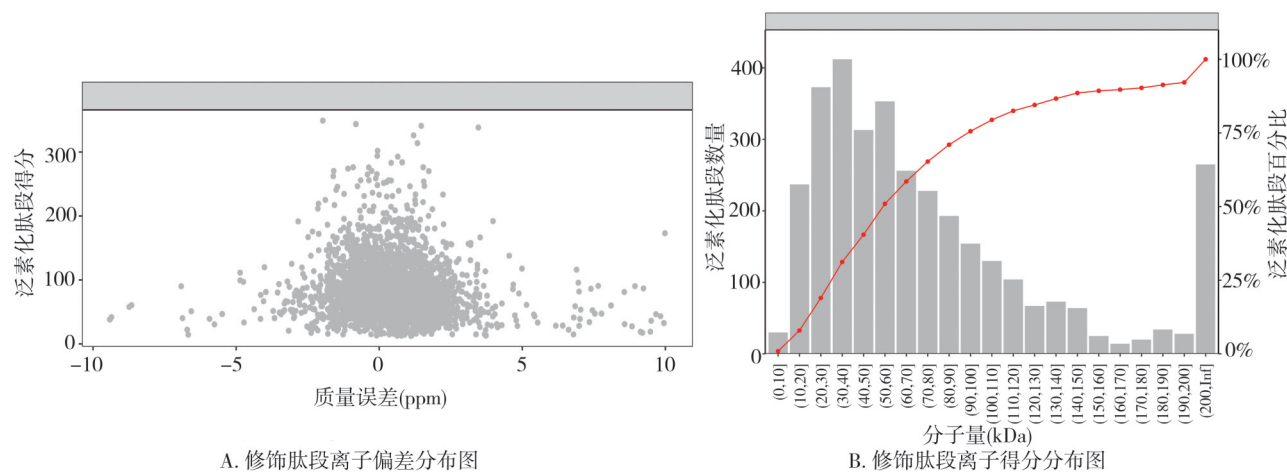


图2 泛素化修饰组学数据质量评估

2.3 修饰肽段鉴定数量与差异分析

共鉴定到的泛素化蛋白质、泛素化肽段、泛素化位点的数目分别为1 457、2 982、3 373,其中1 100个修饰蛋白上有2 089条可定量泛素化肽段,2 255个可定量泛素化位点(图3A)。为了分析组内样本之间泛素化修饰鉴定的重复性,采用韦恩图分析组内样本重复情况。HST组和PSC组内所有生物学重复鉴定到的泛素化肽段集合的重叠情况(图3B)。

在明显性差异修饰肽段筛选中,以表达倍数(Fold Change, FC) >2.0 倍(上调大于2.0倍或下调小于0.5倍)且 $P<0.05$ 为标准,共鉴定出69个差异表达泛素化肽段,其中46个修饰肽段表达上调,23个修饰肽段表达下调(图3C)。以 $FC>2.0$ 倍且 $P<0.05$ 的筛选标准得到的显著差异表达泛素化肽段对应的蛋白质可以有效地把比较组分开,说明差异表达泛素化肽段筛选能够代表生物学处理对样本影响(图3D)。其中红色

代表明显性上调的肽段,蓝色代表明显性下调的肽段,灰色部分代表无肽段定量信息。

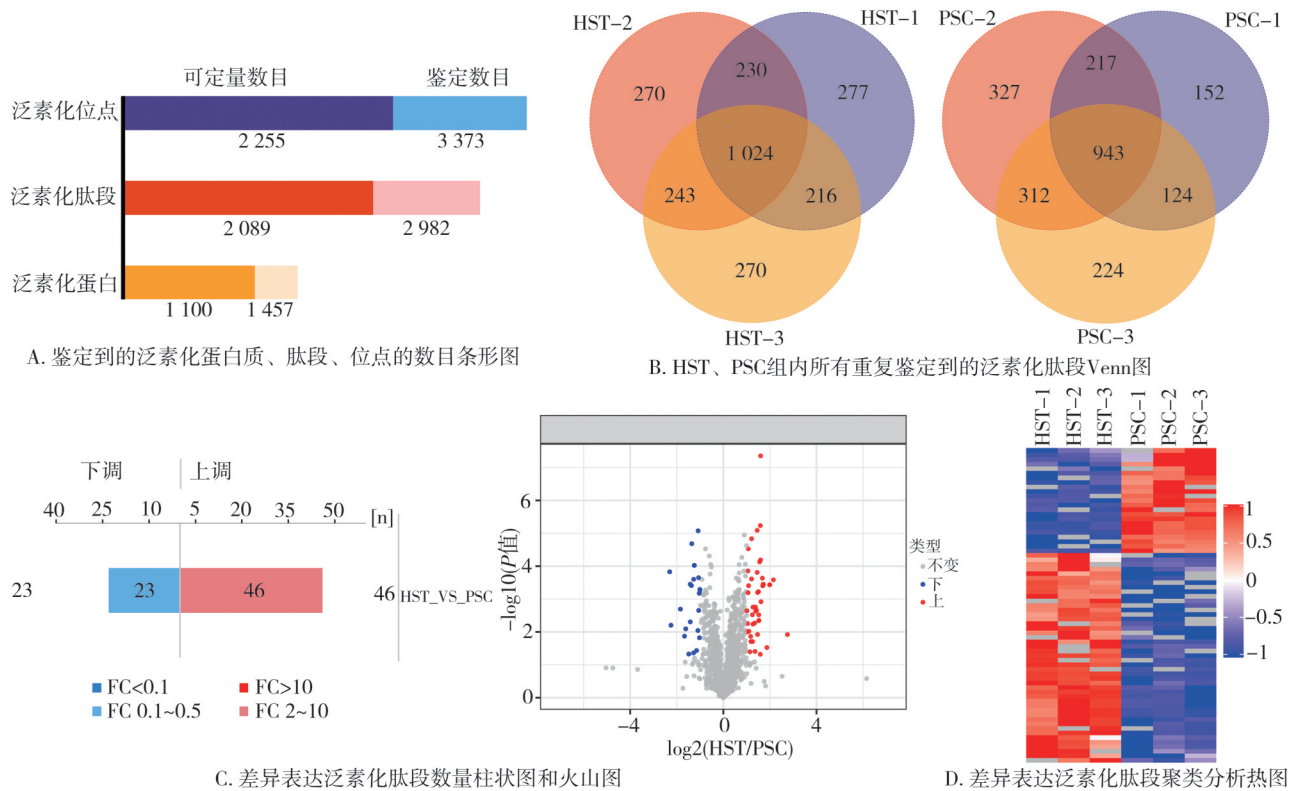
2.4 泛素化肽段功能分析

通过统计修饰肽段上泛素化修饰位点的上下游各 6 个氨基酸出现次数,从而找到氨基酸出现频率分布规律,获得具有保守性的氨基酸基序,鉴定到泛素化肽段的前 6 位 motif 序列形式如图 4A 所示,所有鉴定到泛素化修饰肽段在不同保守 motif 中的数量分布(图 4B),结果表明赖氨酸(K)、精氨酸(R)及其 motif 序列在泛素化肽段中明显分布;亚细胞定位分析表明修饰蛋白主要分布在细胞核、细胞质、线粒体、质膜等亚细胞结构(图 4C),有助于进一步探究蛋白质在细胞中

发挥的具体功能。

2.5 差异表达泛素化肽段对应蛋白质的 GO 注释分析和 KEGG 通路富集分析

为了进一步了解差异表达泛素化肽段在高原低氧胁迫下的生物学功能和富集通路,对差异表达泛素化肽段对应的蛋白质进行 GO 功能注释分析发现其主要富集在应激、细胞增殖、分化等生物过程(图 5A),KEGG 通路富集分析结果显示,差异表达泛素化肽段对应的蛋白质显著富集在 MAPK 信号通路、Ras 信号通路、PI3K-AKT 信号通路等信号转导通路以及中性粒细胞胞外陷阱形成(NET)、趋化因子信号通路等免疫系统相关通路中(图 5B)。



注:图 3C 右部分为火山图,横坐标为差异倍数(以 2 为底的对数变换),纵坐标为差异的显著性 P-value(以 10 为底的对数变换),图中红色点为上调的显著性差异表达泛素化肽段,蓝色点为下调的显著性差异表达泛素化肽段,灰点为无差异变化的泛素化肽段

图 3 修饰肽段鉴定数量与差异分析

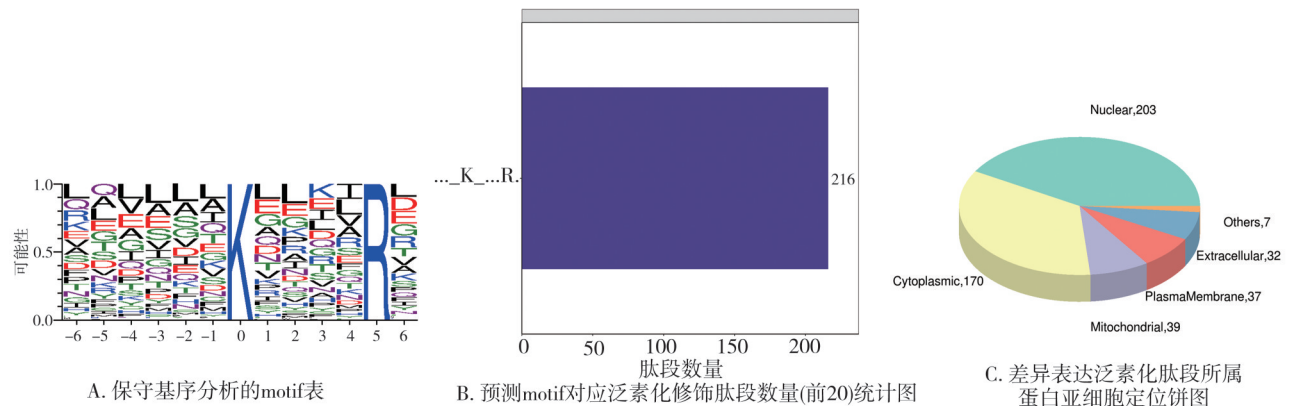
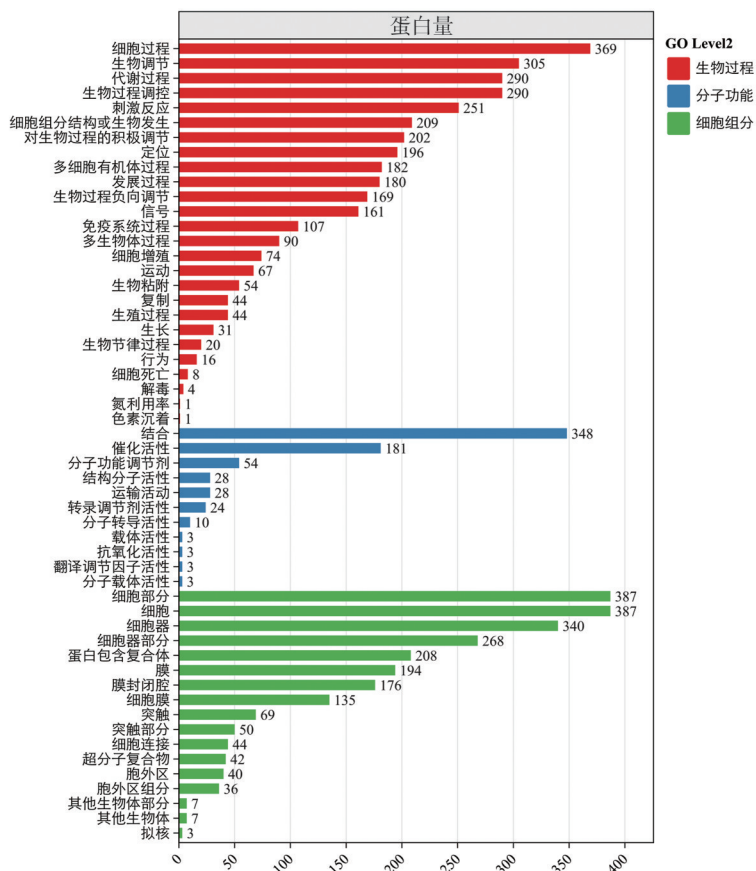
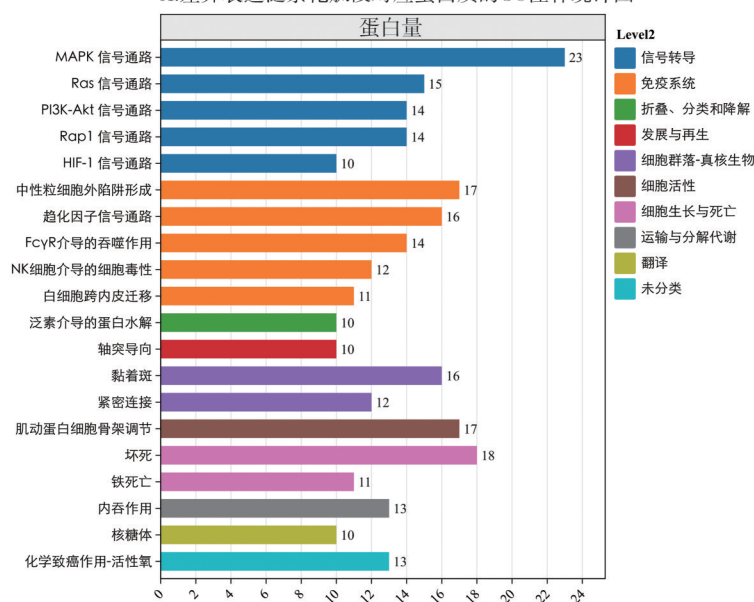


图 4 泛素化肽段功能分析



A. 差异表达泛素化肽段对应蛋白质的GO注释统计图



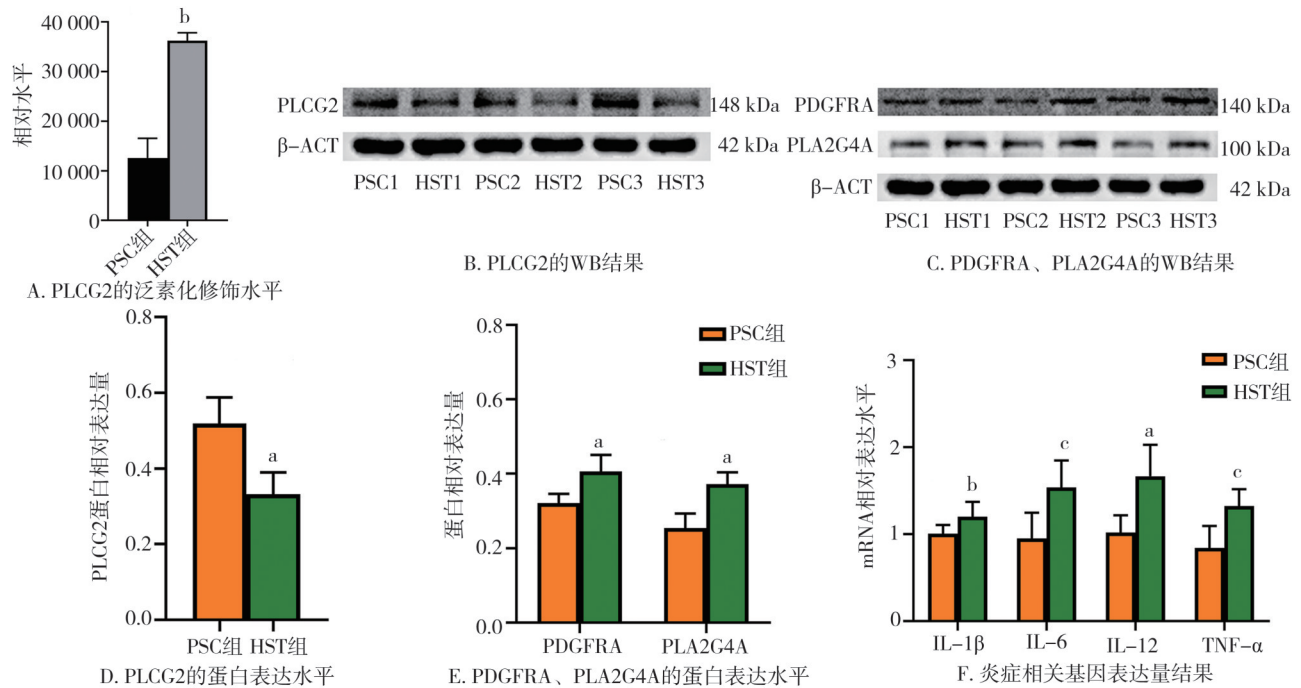
B. 差异表达泛素化肽段对应蛋白质的KEGG通路二级分类图

图5 差异表达泛素化肽段对应蛋白质的GO注释图和KEGG二级分类注释图

2.6 关键蛋白及炎症相关基因定量分析

通过 Western blot 检测明显富集的 MAPK 信号通路、RAS 信号通路和 NET 信号通路中关键蛋白的表达量, 结果表明, HST 组 PLCG2 泛素化修饰水平明显升高 ($P=0.004$) (图 6A), 蛋白表达水平呈现下调趋势 ($P=0.022$) (图 6B、D), 与 PSC 组相比, PDGFRA ($P=0.045$) 和 PLA2G4A ($P=0.015$) 蛋白表达量

上调(图 6C、E)。以上结果表明低氧暴露导致小鼠脾脏组织蛋白表达水平发生显著变化。随后通过 RT-qPCR 技术检测了炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-12 和 TNF- α 的 mRNA 表达量。结果显示, 炎症因子 IL-1 β ($P=0.009$), IL-6 ($P<0.001$), IL-12 ($P=0.014$), TNF- α ($P<0.001$) 表达量均显著上调(图 6F), 进一步表明, 低氧暴露诱导小鼠脾脏组织发生炎症反应。



注:a,与PSC组比较, $P<0.05$;b,与PSC组比较, $P<0.01$;c,与PSC组比较, $P<0.001$

图6 关键蛋白和炎症因子表达量验证

3 讨论

高原低氧刺激会导致细胞内多种物质发生一系列变化,其中包括炎症因子、氧自由基和氧合血红蛋白的增加。研究表明,HIF-1 α 是维持氧稳态的关键调节因子^[9],在调节细胞代谢、信号转导和转录活化等过程中发挥重要作用。低氧刺激使HIF-1 α 高表达,通过调节多种信号通路和下游基因来介导内源性适应性程序,使机体产生一系列适应性改变,包括免疫功能改变、抗感染能力下降、凝血功能异常等^[10]。此外,HIF-1 α 参与免疫反应和炎症反应的调节^[11-12]。本研究将小鼠低氧暴露30d后,发现与PSC组相比,HE染色结果显示HST组小鼠脾脏组织白髓减少,生发中心范围扩大,HST组小鼠脾脏组织HIF-1 α 表达量明显升高,表明低氧刺激导致小鼠脾脏组织结构破坏,使机体免疫功能和炎症反应受到重要影响。因此,本实验通过泛素化修饰组学进一步分析,旨在深入了解高原低氧条件下小鼠脾脏组织变化的分子机制。

本研究采用泛素化修饰组学技术分析小鼠脾脏组织蛋白,发现高原低氧条件下共鉴定出69个差异表达泛素化肽段,并且这些差异表达泛素化肽段明显富集在MAPK信号通路、Ras信号通路和NET形成通路中。据报道,MAPK信号通路在炎症、细胞

增殖、凋亡、免疫反应以及细胞周期调控中发挥重要作用^[13-14]。MAPK信号通路由Ras-Raf-MEK-ERK信号级联组成,协同调控细胞的生长、分化、应激和炎症反应等一系列重要的细胞生理与病理过程^[15]。由于ERK级联的重要性,ERK紊乱对细胞有害,并最终对机体造成损伤。ERK通路中上游蛋白和激酶的过度激活与癌症、炎症、发育障碍和神经系统疾病等密切相关^[16]。在ERK通路中,Ras充当上游激活蛋白,Ras信号通路调控着人体众多的生理机能,与心血管疾病、类风湿关节炎等疾病的发生发展有关^[17]。NET形成与补体激活、膜攻击复合物以及自身免疫性疾病有关,并且NETs通过上调巨噬细胞IL-1 β 的产生和间接激活Th17细胞促进炎症反应发生^[18]。提示高原低氧环境刺激导致脾脏组织发生明显泛素化富集的MAPK、Ras和NET形成3条通路均与免疫炎症相关。为了进一步探究低氧胁迫导致MAPK、Ras和NET形成通路发生泛素化异常的分子机制,选取通路中关键蛋白PLCG2及其上下游蛋白PDGFRA和PLA2G4A进行蛋白表达量检测。

PDGFRA编码受体酪氨酸激酶蛋白家族的成员,与相应配体结合触发PDGFRA二聚化和自磷酸化,激活下游信号通路,即RAS/MAPK/ERK通路、PI3K/AKT通路、JAK/STAT通路和PLC-PKC^[19],导致癌细胞增殖、存活和侵袭。PDGFRA通过与其同源

配体结合来发挥其酪氨酸激酶活性,在与其相应的配体 PDGF(s) 结合时被激活,并调节细胞分裂和增殖^[20]。研究表明,PDGFRA 是一种经典的原癌基因,在神经胶质瘤中高度表达、扩增、突变,可以调节神经胶质瘤的进展^[21],并且是胶质母细胞瘤的一个预后标志物和潜在治疗靶点^[22]。本次研究结果显示,低氧胁迫导致 PDGFRA 蛋白表达水平上调,提示 PDGFRA 对下游的 PLCG2、RasGRPs 等蛋白的激活作用增强,并促进 Ras 信号通路的作用。

PLCG2 是一种跨膜信号转导酶,参与免疫反应调节的信号通路,能够识别细胞膜上的配体,可催化磷脂 PIP2(1-磷脂酰基-1D-肌醇-4,5-二磷酸) 转化为 1D-肌醇-1,4,5-三磷酸和二酰基甘油,在细胞表面受体信号转导中起关键作用。PLCG2 催化的 IP3 和随后的钙信号可确保 B 淋巴细胞具有正确的发育结果和抗原特异性反应^[23]。研究发现,PLCG2 是一种重要的 B 细胞调节因子,在 BCR 信号转导时,B 细胞受体刺激 PLCG2 与 B 细胞接头蛋白相互作用^[24],CD19 是 BCR/PLCG2 信号转导复合体的重要组成部分,其在 B 细胞介导的自身免疫性和炎症性疾病中起着关键作用^[25]。此外,PLCG2 对 NK 细胞对恶性和病毒感染细胞的反应至关重要,还参与许多癌症的增殖和迁移^[26]。已有研究表明,PLCG2 参与肿瘤微环境重塑,并被确定为软组织肉瘤和结肠癌的免疫相关基因^[27]。Chan JM 等^[28]发现小细胞肺癌 (small-cell lung cancer, SCLC) 中 PLCG2 的表达与总生存期呈负相关,PLCG2 高表达的肿瘤患者的总体生存期较差,并且在 SCLC 肿瘤中鉴定出一个促纤维化、免疫抑制性的单核细胞/巨噬细胞群,该群体与复发性 PLCG2 高表达亚群特别相关。PLCG2 功能障碍与免疫缺陷病、自身免疫、癌症和神经退行性疾病等一系列疾病有关^[29-30],研究发现,PLCG2 缺陷小鼠虽然具有正常数量的肥大细胞,但 FcεRI 刺激的钙通量、1D-肌醇-1,4,5-三磷酸生成、脱颗粒和细胞因子反应受损,靶向 PLCG2 有助于治疗过敏反应相关疾病^[31]。此外,PLCG2 对早期 B 细胞发育至关重要,PLCG2 缺失可造成 B 细胞发育和功能的障碍,引起血清免疫球蛋白水平降低,导致机体适应性免疫功能异常^[25],并且 PLCG2 的异常表达会导致自身炎症性疾病的发生^[32]。本研究发现低氧暴露下 PLCG2 泛素化修饰水平明显上调,蛋白表达水平下调,提示高原低氧环境通过泛素化修饰明显降低了 PLCG2 的表达,影响免疫细胞活化、增殖和分化等过程,导致机体免疫系统功能障碍和

炎症性疾病。

PLCG2 经过 Ras-Raf-MEK-ERK 途径最终激活 PLA2G4A,PLA2G4A 水解膜磷脂,从而释放多不饱和脂肪酸花生四烯酸,进一步代谢为白三烯、血栓素和前列腺素,在调节炎症反应、膜和肌动蛋白动力学以及肿瘤发生等多种生物过程中发挥重要作用,其表达由促炎细胞因子和脂多糖诱导^[33]。PLA2G4A 是脂质代谢重编程的关键调节因子,研究表明,聚合酶 1 和转录释放因子触发细胞质磷脂酶 A2 介导的磷脂重塑途径,促进胶质母细胞瘤肿瘤细胞增殖并抑制肿瘤免疫反应^[34]。而磷脂酶 A2/环氧化酶途径紊乱表明花生四烯酸水解和代谢的激活,导致膜脂质稳态和免疫功能异常,进一步增加了精神分裂症的风险^[35]。有研究发现,PLA2G4A 的表达和活性使神经元细胞对自噬敏感,并在缺血再灌注诱导的 ROS 生成后,促进线粒体脂质过氧化及铁死亡^[36]。Sarkar C 等^[37]发现,在神经退行性疾病、创伤性脑损伤和缺血性中风中,PLA2G4A 的活性和表达水平均增加,并与神经元细胞死亡有关,使其成为治疗干预的一个有吸引力的靶点。本研究发现,高原低氧条件下,小鼠脾脏组织中 PLA2G4A 蛋白表达水平上调,提示高原低氧条件下免疫系统紊乱和炎症反应发生。因此,本研究进一步检测了炎症因子表达水平,发现低氧诱导炎症因子 IL-1β、IL-6、IL-12 和 TNF-α 的 mRNA 表达量显著上调,提示低氧暴露下小鼠脾脏组织出现炎症反应。

综上所述,本研究通过泛素化修饰组学研究高低海拔暴露下的小鼠脾脏组织,发现差异表达泛素化肽段对应的蛋白质显著富集在 MAPK 信号通路和 Ras 信号通路和 NET 信号通路中,提示低氧胁迫导致信号转导通路和免疫系统相关通路发生重要变化,进一步对通路中关键蛋白进行定量验证,结果提示高原低氧环境通过泛素化修饰改变 PLCG2 及其上下游蛋白 (PDGFRA 和 PLA2G4A) 的蛋白表达量,影响免疫细胞活化、增殖和分化等过程,从而介导机体免疫炎症性疾病的发生;通过对炎症因子表达量的验证,同样提示低氧暴露导致脾脏组织炎症反应发生。本研究为深入探讨高海拔缺氧对脾脏组织免疫功能的影响及炎症反应的形成机理提供新的思路。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈晓晨:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;李积东:数据收集;汪晓筠:实验技术指导;胡英:分析数据;许玉珍:论文修改;永胜:研究方案设计、论文修改

参 考 文 献

- [1] Luks AM, Swenson ER, Bärtsch P. Acute high-altitude sickness [J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26(143): 160096.
- [2] Pham K, Parikh K, Heinrich EC. Hypoxia and inflammation: insights from high-altitude physiology[J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 676782.
- [3] Li K, He CH. Gastric mucosal lesions in tibetans with high-altitude polycythemia show increased HIF-1A expression and ROS production[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 6317015.
- [4] Mallet RT, Burtcher J, Pialoux V, et al. Molecular mechanisms of high-altitude acclimatization[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1698.
- [5] Nazarov K, Perik-Zavodskii R, Perik-Zavodskaja O, et al. Phenotypic alterations in erythroid nucleated cells of spleen and bone marrow in acute hypoxia[J]. *Cells*, 2023, 12(24): 2810.
- [6] Liang ZX, Liu HS, Xiong L, et al. A novel NF- κ B regulator encoded by circPLCE1 inhibits colorectal carcinoma progression by promoting RPS3 ubiquitin-dependent degradation[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 103.
- [7] van Wijk SJ, Fulda S, Dikic I, et al. Visualizing ubiquitination in mammalian cells[J]. *EMBO Rep*, 2019, 20(2): e46520.
- [8] Faktor J, Pječová M, Hernychová L, et al. Protein ubiquitination research in oncology[J]. *Klin Onkol*. 2019;3(1):56-64.
- [9] Yuen VWH, Wong CCL. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5052-5062.
- [10] Zhao Y, Xing C, Deng YT, et al. HIF-1 α signaling: Essential roles in tumorigenesis and implications in targeted therapies[J]. *Genes Dis*, 2023, 11(1): 234-251.
- [11] Chen XY, Zhang X, Chen T, et al. Inhibition of immunoproteasome promotes angiogenesis via enhancing hypoxia-inducible factor-1 α abundance in rats following focal cerebral ischaemia[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73: 167-179.
- [12] McGettrick AF, O'Neill LAJ. The role of HIF in immunity and inflammation[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(4): 524-536.
- [13] Hepworth EMW, Hinton SD. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(22): 12595.
- [14] Lee S, Rauch J, Kolch W. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1102.
- [15] Dillon M, Lopez A, Lin E, et al. Progress on ras/MAPK signaling research and targeting in blood and solid cancers[J]. *Cancers*, 2021, 13(20): 5059.
- [16] Guo YJ, Pan WW, Liu SB, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [17] Sadeghi Shaker M, Rokni M, Mahmoudi M, et al. Ras family signaling pathway in immunopathogenesis of inflammatory rheumatic diseases[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1151246.
- [18] Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil extracellular trap formation: physiology, pathology, and pharmacology[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(8): 365.
- [19] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling[J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 355-365.
- [20] Soliman H, Paylor B, Scott RW, et al. Pathogenic potential of Hic1-expressing cardiac stromal progenitors[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3): 459-461.
- [21] Chen SM, Zhang ZY, Zhang BX, et al. CircCDK14 promotes tumor progression and resists ferroptosis in glioma by regulating PDGFRA [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2): 841-857.
- [22] Gai QJ, Fu Z, He J, et al. EPHA2 mediates PDGFA activity and functions together with PDGFRA as prognostic marker and therapeutic target in glioblastoma[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 33.
- [23] Hikida M, Kurosaki T. Regulation of phospholipase C- γ 2 networks in B lymphocytes[J]. *Adv Immunol*, 2005, 88: 73-96.
- [24] Bernal-Quirós M, Wu YY, Alarcón-Riquelme ME, et al. BANK1 and BLK act through phospholipase C gamma 2 in B-cell signaling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59842.
- [25] Jackson JT, Mulazzani E, Nutt SL, et al. The role of PLC γ 2 in immunological disorders, cancer, and neurodegeneration[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(2): 100905.
- [26] Qiu CJ, Shi WX, Wu HL, et al. Identification of molecular subtypes and a prognostic signature based on inflammation-related genes in colon adenocarcinoma[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 769685.
- [27] Li ZT, Zhao R, Yang WK, et al. PLGG2 as a potential indicator of tumor microenvironment remodeling in soft tissue sarcoma[J]. *Medicine*, 2021, 100(11): e25008.
- [28] Chan JM, Quintanal-Villalonga Á, Gao VR, et al. Signatures of plasticity, metastasis, and immunosuppression in an atlas of human small cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(11): 1479-1496.
- [29] Giannelou A, Zhou Q, Kastner DL. When less is more: primary immunodeficiency with an autoinflammatory kick[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2014, 14(6): 491-500.
- [30] Welzel T, Oefelein L, Holzer U, et al. Variant in the *PLGG2* gene may cause a phenotypic overlap of APLAID/PLAID: case series and literature review[J]. *J Clin Med*, 2022, 11(15): 4369.
- [31] Wen RR, Jou ST, Chen YH, et al. Phospholipase C gamma 2 is essential for specific functions of Fc epsilon R and Fc gamma R[J]. *J Immunol*, 2002, 169(12): 6743-6752.
- [32] Zhou Q, Lee GS, Brady J, et al. A hypermorphic missense mutation in *PLGG2*, encoding phospholipase C γ 2, causes a dominantly inherited autoinflammatory disease with immunodeficiency[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 91(4): 713-720.
- [33] Murakami M, Sato H, Taketomi Y. Updating phospholipase A₂ biology[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(10): 1457.
- [34] Yi KK, Zhan Q, Wang QX, et al. PTRF/cavin-1 remodels phospholipid metabolism to promote tumor proliferation and suppress immune responses in glioblastoma by stabilizing cPLA2[J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(3): 387-399.
- [35] Yang XH, Li MH, Jiang J, et al. Dysregulation of phospholipase and cyclooxygenase expression is involved in Schizophrenia[J]. *EBio-Medicine*, 2021, 64: 103239.
- [36] Cao CC, Zhou J, Wu XL, et al. Activation of CRHR1 contributes to cerebral endothelial barrier impairment via cPLA2 phosphorylation in experimental ischemic stroke[J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109467.
- [37] Sarkar C, Jones JW, Hegdekar N, et al. PLA2G4A/cPLA2-mediated lysosomal membrane damage leads to inhibition of autophagy and neurodegeneration after brain trauma[J]. *Autophagy*, 2020, 16(3): 466-485.

(收稿:2024-07-24;修回:2024-10-21;录用:2024-11-30)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

陈晓晨,李积东,汪晓筠,等.基于泛素化修饰组学研究高原低氧抑制 PLGG2 表达的分子机制[J].重庆医科大学学报,2026,51(1): 84-92.