

高原低氧通过 NOD 样受体信号通路诱导小鼠脾脏组织炎症反应

王嘉阳,胡英,许玉珍,龙启福,唐超群,永胜

摘要 目的 旨在基于代谢组学和转录组学联合分析,探究高原低氧通过 NOD 样受体信号通路诱导小鼠脾脏组织中炎症反应的潜在分子机制。方法 分别在海拔 400 m 和 4 200 m 饲养 C57BL/6 小鼠,5 只/组,30 d 后取脾脏组织,通过代谢组和转录组分析筛选差异代谢物和差异表达基因,关联 KEGG 富集分析,对关键通路中的差异代谢物和差异表达基因构建相关性网络互作图并进行 RT-qPCR 验证。结果 代谢组学分析发现,在平原常氧组(PSC 组)和高原低氧组(HST 组)中共筛选出 133 个差异代谢物,其中上调 95 个,下调 38 个,KEGG 富集分析,发现主要涉及到 NOD 样受体信号通路、HIF-1 信号通路、胆固醇代谢等多个代谢途径;转录组结果表明,在 PSC 组和 HST 组共鉴定 4 213 个差异表达基因,其中上调基因 1 947 个,下调基因 2 266 个,KEGG 共富集到 173 个信号通路,包括 NOD 样受体信号通路、MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路等多条途径;联合分析表明,差异代谢物与差异表达基因显著富集在 NOD 样受体信号通路中;因此,对 NOD 样受体信号通路中的差异代谢物 ATP 和差异表达基因构建相关性网络互作图。RT-qPCR 实验结果表明,与 PSC 组比较,HST 组 NOD 样受体信号通路中 NOD1 和 NOD2 途径相关的 DEGs(CHUK、TAB3、MAPK8)以及 NLRP1 炎症体-CASP1 途径相关的 DEGs(NLRP1b、CASP1)表达水平显著增强,且下游炎症因子 IL-6、IL-1 β 、IL-18、INF- γ 和 TNF- α 的 mRNA 表达量均出现上调差异表达。结论 基于代谢组学和转录组学联合分析发现,高原低氧刺激可能通过影响机体内 NOD 样受体信号通路,其通路中差异代谢物 ATP 与差异关键基因呈正相关,ATP 通过激活 NOD1、NOD2 途径和 NLRP1 炎症体-CASP1 两条途径介导下游炎症因子释放,致使小鼠脾脏组织炎症反应发生。

关键词 高原低氧;脾;代谢组学;转录组学;NOD 样受体信号通路

中图分类号 R 318.04;R 392.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1498-09

2023-06-14 接收

基金项目:青海省科技计划项目基金(编号:2023-ZJ-771);国家自然科学基金(编号:82060295);青海大学青年科研基金项目(编号:2021-QNY-10)

作者单位:青海大学医学部免疫教研室,西宁 810016

作者简介:王嘉阳,女,硕士研究生;

永胜,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:yongsheng@qhu.edu.cn

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.011

当人们从平原地区移居高原地区工作和生活后,机体为适应高原低氧环境,会发生一系列代偿适应性变化,包括氧化应激、炎症反应和免疫系统改变等多层调控,严重时会导致急慢性高原病^[1-2]。在高原脑水肿和高原肺水肿相关研究中发现,炎症反应发挥着重要调控作用,其作用机制与低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)调控核因子途径密切相关^[2]。炎症反应是高原低氧损伤发生、发展过程中的重要环节。通过代谢组学和转录组学联合分析不同海拔暴露下小鼠脾脏组织炎症发生的作用机制,为揭示脾脏在低氧胁迫下的炎症损伤机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 将购自西安交通大学医学部实验动物中心 6~8 周龄 C57BL/6 雄性健康小鼠随机分成 2 组,每组 5 只,分别饲养于海拔 400 m 的西安交通大学医学部实验动物中心即平原常氧组(PSC 组)和海拔 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即高原低氧组(HST 组)。期间保证小鼠生长环境和饲养条件一致,30 d 后无菌采集小鼠脾脏组织置于液氮冻存备用。该项目已通过青海大学伦理协会审查(伦理批号:2020-15),动物生产许可证号:SYXK(陕)2020-005。

1.2 试剂与仪器 TRIzol 裂解液(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(日本 Takara 公司);实时荧光定量 PCR(qPCR)试剂盒(TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II,日本 Takara 公司);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司);动物全蛋白提取试剂盒(C510003,上海 Sangon Biotech);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(P0010,上海 Beyotime Biotech);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(P1200,北京 Solarbio);SDS-PAGE 电泳液(P00148,上海 Beyotime Biotech);10 \times 电转液(D1060,北京 Solarbio);甲醇(CB/T693-1993,上海广诺化学科技有限公司);脱脂奶粉(D8340,北京

Solarbio); 10 × TBST 缓冲液(粉剂)(T1087, 北京 Solarbio); 硝酸纤维素膜(NC膜)(37412133, 美国 PALL); ECL 显影液(34095, 美国 Thermo Fisher)。

1.3 代谢组学分析 取 100 mg 液氮冻存的脾脏组织样本研磨, 置于 EP 管中, 加入 500 μl 的 80% 甲醇水溶液进行代谢产物提取。样本经涡旋震荡, 冰浴静置 5 min 后, 离心取上清加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%, 再离心后收集上清, 进样分析。

数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱与高分辨质谱联用, 即液质联用(LC-MS)技术。色谱条件: HypesilGoldcolumn-C18 色谱柱, 柱温为 40 °C, 流速为 0.2 ml/min; 正模式流动相(A: 0.1% 甲酸, B: 甲醇); 负模式流动相(A: 5 mmol 醋酸铵, PH9.0, B: 甲醇)。质谱条件: 采用正、负离子两种模式采集质谱信号, 扫描范围选择 100 ~ 1 500 m/z; ESI 源的设置如下: 喷射电压 3.2 kV, 鞘内气体流速 40 arb, 辅助气体流速 10 arb, 毛细管温度 320 °C。

1.4 转录组测序 TRIzol 法提取小鼠脾脏组织中总 RNA, 使用 Nanodrop 和 Agilent2100 生物分析仪对 RNA 的浓度、纯度测定。随后, 取检验合格的总 RNA 打断并逆转录成 cDNA, 经末端修复、PCR 扩增等过程制备 mRNA-Seq 文库进行 Illumina 测序, 测序工作由北京诺禾致源有限公司完成。

1.5 转录组和代谢组联合分析 使用 DESeq2 获得组间差异表达结果, 并校正 *P* 值(*P*-adjust), 以 *P*-adjust < 0.05 且 |log2foldchange| > 0 为筛选标准, 得到差异表达基因(DEGs)。采用 clusterProfiler (3.4.4) 软件中 GSEA 函数, 针对 KEGG 数据库进行的富集, 并计算 KEGG 通路中差异表达基因即 *P* < 0.05 视为显著富集。

差异代谢物的筛选主要参考 VIP、FC 和 *P*-value 三个参数, VIP 是指 PLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度; FC 指差异倍数, 为每个代谢物在比较组中所有生物重复定量值的均值的比值; *P*-value 是通过 T-test 计算得到, 表示差异显著性水平, 以 VIP > 1.0, FC > 1.5 且 *P*-value < 0.05 为条件筛选差异代谢物。采用超几何检验方法, 得到通路富集的 *P*-value 值, 其中以 *P*-value ≤ 0.05 为阈值, 筛选差异代谢物中显著富集的 KEGG 通路。采用 clusterProfiler (3.4.4) 软件对 KEGG 数据库差异表达基因和差异代谢物进行通路富集分析, 利用 R 语言 cor 函数计算两者的斯皮尔曼(Spearman)相关性系数, 之后用 STITCH 构建基因-代谢物网络互作图。

1.6 RT-qPCR 与 Western blot 实验 提取 RNA

逆转录为 cDNA 后, RT-qPCR 反应体系为 20 μl, 分别包括: TB Green® Premix Ex Taq™ II 10 μl, RNase Free H₂O 6.4 μl, cDNA 2 μl, 前后引物各 0.8 μl。以 β-Actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法分析 RT-qPCR 检测结果, 引物序列详见表 1。

取出小鼠脾脏样品放入已配置好 Lysis Buffer 的离心管中, 在离心管中使用无菌手术剪将脾脏剪碎后进行超声破碎, 离心机提前预冷至 4 °C。12 000 r/min, 10 min 离心后吸取上清液转移至新的无菌无酶离心管中。BCA 法检测蛋白浓度, 经过计算加入对应体积的无酶水和上样缓冲液定量蛋白上样浓度。统一 50 μg 的蛋白上样量, 加样后进行电泳(恒压 90 V)和转膜(横流 200 mA)。使用 TBST 洗液将 NC 膜清洗一次后, 用 5% 的脱脂牛奶封闭 NC 膜 2 h, 期间按照对应比例稀释一抗抗体, 置于 4 °C 备用。封闭完成后将膜拿出, TBST 洗液清洗 3 次, 孵育一抗(4 °C, 过夜), 次日将膜取出。TBST 洗液洗膜(5 min/次, 6 次 + 10 min/次, 1 次)后, 孵育二抗(室温, 90 min)。再次洗膜(6 min/次, 5 次)后, 配 ECL 显影液(避光), 并使用法国 VILBER Fusion solo 成像分析系统成像。

表 1 RT-qPCR 引物信息

基因	序列(5'-3')	bp
β-Actin	F: CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	25
	R: ATGGAGCCACCGATCCACA	19
HIF-1α	F: GGACGATGAACATCAAGTCAGCA	23
	R: AGGAATGGGTTTACAAAATCAGCA	23
CHUK	F: ACATTAGCAGACCGTGAACATCCTC	25
	R: TGGTCCTCATTTGCTTACCAATA	24
TAB3	F: GCAGCACCAGAACCTATT	18
	R: TCTTGCTCGCTGATGTAA	18
MAPK8	F: TTGAAAACAGGCCTAAATACGC	22
	R: GTTGTATTATGCTCTGAGTCAGC	22
NLRP1B	F: AGACAACAATCAGGAGCCGAACAC	24
	R: GTCAACCATCTCAGCAGTCACAGG	24
CASP1	F: AGAGGATTTCTTAACGGATGCA	22
	R: TCACAAGACCAGGCATATICTT	22
IL-6	F: CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	23
	R: TGCAAGTGCATCATCGTTGTTC	22
IL-1β	F: TCCAGGATGAGGACATGAGCAC	22
	R: GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	23
INF-γ	F: CTTGAAAGACAATCAGGCCATC	22
	R: CTTGGCAATACTCATGAATGCA	22
TNF-α	F: ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC	22
	R: GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA	22
IL-18	F: AGACCTGGAATCAGACAACCTTT	22
	R: TCACTCATATCTCGAACACAG	22

1.7 统计学处理 通过 GraphPad Prism 9 统计软

件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧标志物 HIF-1 α 表达水平的检测

高原低氧暴露 30 d 后,检测 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白表达量,HST 组较 PSC 组小鼠脾脏组织的 HIF-1 α 表达升高(图 1A-C),提示构建高原低氧小鼠动物模型成功。

2.2 低氧胁迫下小鼠脾脏组织代谢组 PCA 分析

基于高分辨质谱检测技术结合高质量 mzCloud 数据库搭配 mzVault 及 MassList 数据库,对样品代谢物进行质谱定性定量分析。在使用 MetaX 软件对数据进行对数转换及标准化处理后进行主成分分析(principal component analysis, PCA),结果提示(图 2),图中 PC1、PC2 和 PC3 分别表示排名第一、第二和第三的主成分的得分,不同颜色的散点表示不同实验分组的样本。PSC 组和 HST 组在正、负离子模式下均有效分成两类,表明两组之间代谢物存在显著差异,生物学重复的平行性较好。

2.3 低氧胁迫下小鼠脾脏组织代谢产物分析

进一步对不同海拔下的差异代谢物进行分析,筛选出的差异代谢物,在正、负两种离子模式下共检测出 955 种具有已知结构的代谢物。相比于 PSC 组,HST 组中差异显著的代谢物共计 133 个差异代谢物。图中横坐标表示代谢物在不同分组中的差异倍数变化(log2FoldChange)纵坐标表示差异显著性水平(-log10*P*-value),火山图中每个点代表一个代谢物,显著上调的代谢物用红色点表示,显著下调的代谢物用绿色点表示,圆点的大小代表 VIP 值。其中正离子模式下 81 个(图 3A),包括上调代谢物 56 个,下调代谢物 25 个;负离子模式下 52 个(图 3B),包括上调代谢物 39 个,下调代谢物 13 个。

2.4 低氧胁迫下小鼠脾脏组织差异代谢物相关性分析

不同代谢物之间具有协同或互斥关系,当两个代谢物的线性关系增强时,正相关趋于 1,负相关则趋于 -1。为了研究高原低氧和平原常氧处理的脾脏差异代谢物之间的相关性,通过 pearson 相关系数,选用 P -value < 0.05 为显著相关的阈值,构建正负离子模式下差异代谢物两两之间的相关性(图 4)。相关性最高为 1,为完全的正相关(红色),相关

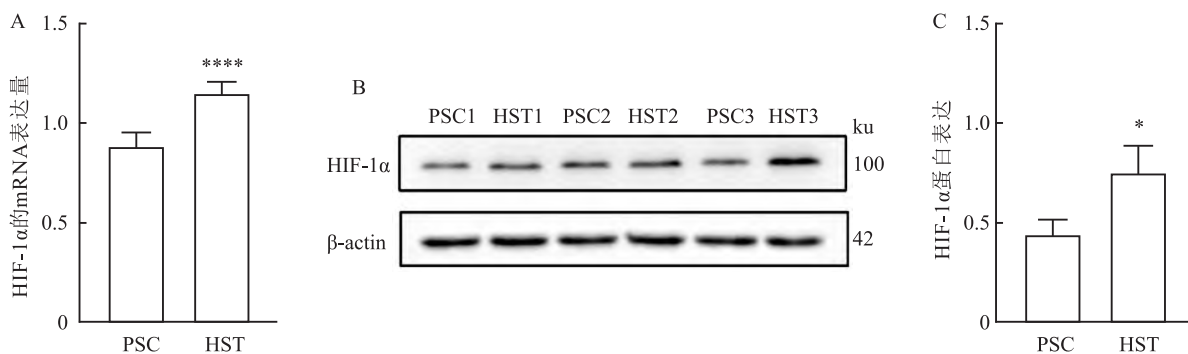


图 1 低氧暴露对小鼠脾脏组织的影响

A: HIF-1 α 的 mRNA 表达量分析;B: Western blot 分析 HIF-1 α 的蛋白表达;C: HIF-1 α 蛋白表达的定量分析;与 PSC 组比较: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$

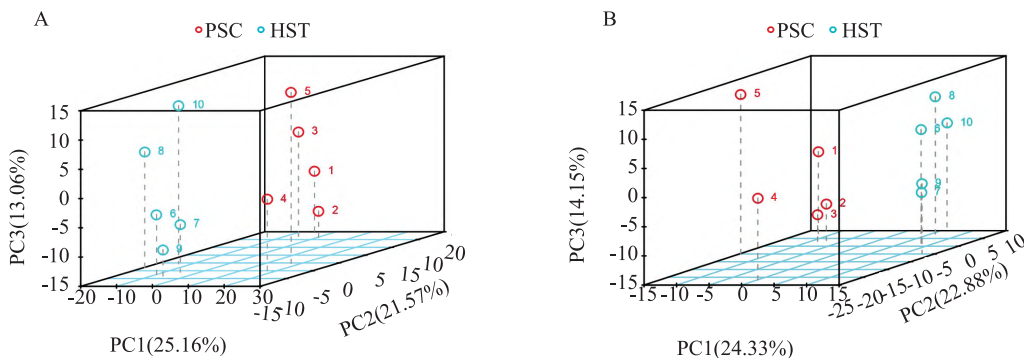


图 2 总样本 PCA 分析

A: 正离子模式;B: 负离子模式

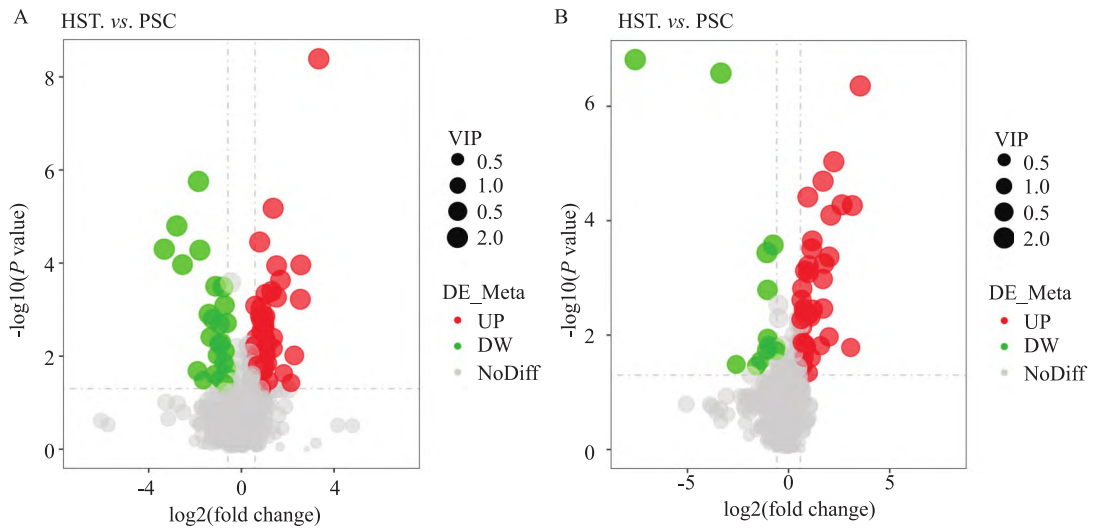


图3 正、负离子模式差异代谢物火山图

A: 正离子模式下差异代谢物火山图; B: 负离子模式下差异代谢物火山图; 红色点: 上调的代谢物; 绿色点下调的代谢物; 圆点的大小: VIP 值

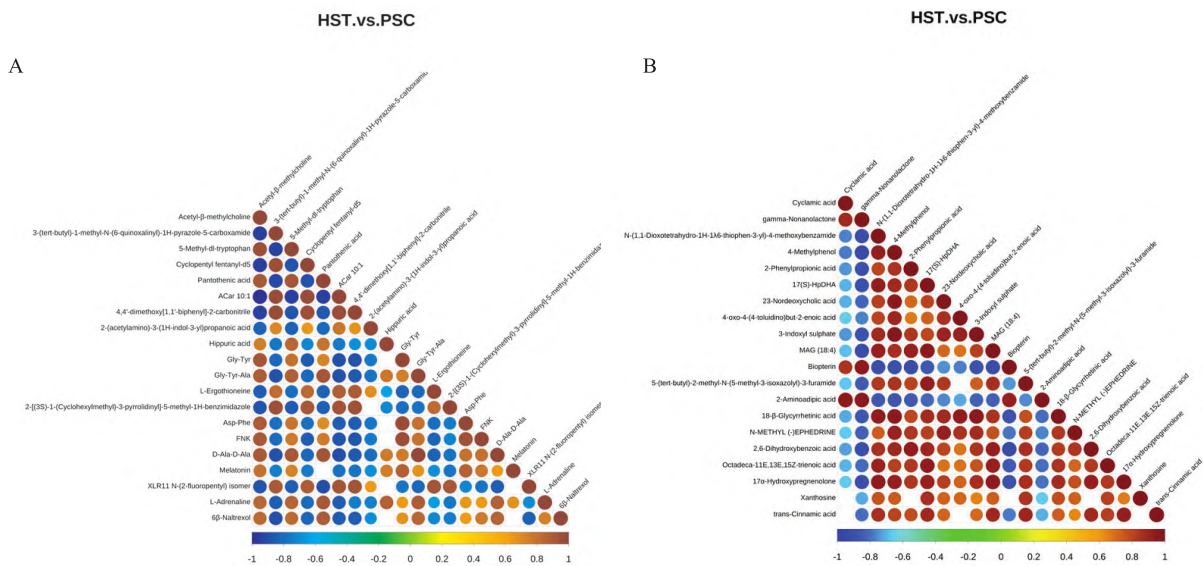


图4 差异代谢物相关性图

A: 正离子模式下差异代谢物相关性图; B: 负离子模式下差异代谢物相关性图; 蓝色: 负相关; 红色: 正相关

性最低为 -1, 为完全的负相关(蓝色), 没有颜色的部分表示 $P\text{-value} > 0.05$, 图中展示的是按 $P\text{-value}$ 值从小到大排序的 Top20 的差异代谢物的相关性。其中正离子模式下, L-肾上腺素与 5-甲基色氨酸、泛酸、马尿酸、甘氨酸-酪氨酸-丙氨酸、D-丙氨酸、褪黑素都有显著正相关; 负离子模式下, 黄嘌呤与甲氧基苯甲酰胺、4-甲基苯酚、23-诺脱氧胆酸、18- β -甘草酸、三烯酸、17 α -羟基孕烯醇酮均有正相关, 说明在高原低氧胁迫下, 脾脏组织中不同代谢物之间相互联系、密切相关。

2.5 低氧胁迫下小鼠脾脏组织差异代谢物 KEGG 富集分析 为了解差异代谢物在低氧胁迫下的生物学功能, 将差异代谢物富集到 KEGG 数据库, 以 $P\text{-value} < 0.05$ 为阈值, 结果共富集到 120 条信号通路(图 5)。将差异代谢物映射到 KEGG 通路富集一级分类中, 结果提示主要富集在新陈代谢、生物系统中(图 5A)。随后, 进一步对 KEGG 通路富集二级注释, 发现差异代谢物主要分布在新陈代谢的核苷酸代谢、氨基酸代谢和脂质代谢; 环境信息处理的信号分子互作; 细胞过程的细胞生长和死亡; 生物系统的

神经和免疫系统;人类疾病的心血管、内分泌和代谢疾病等分类(图 5B)。KEGG 通路富集一级和二级分类结果提示高原低氧环境下,与免疫系统相关的通路有 6 条发生了重要变化。

为了进一步探讨机体免疫系统响应低氧应激的分子机制,对富集到的差异代谢物进行三级分类,其中显著富集的前 20 条信号通路如下图所示(图 5C),结果显示,差异代谢物在 NOD 样受体信号通路、氧化磷酸化、色氨酸代谢、HIF-1 信号通路、嘌呤代谢以及胆固醇代谢等炎症相关信号通路中高度富集,说明在高原低氧环境下,小鼠脾脏组织可能发生了炎症反应、嘌呤代谢和脂代谢等变化。

2.6 低氧胁迫下小鼠脾脏组织差异表达基因分析

与 PSC 组比较,在 HST 组中共鉴定出 4 213 个差异表达基因(|log2FC| ≥ 0 和 p-adjust < 0.05),其中上调的基因共有 1947 个,下调的基因共有 2 266 个,分别占差异基因总数的 46.20% 和 53.80%。

2.7 低氧胁迫下小鼠脾脏组织差异基因 KEGG 富

集分析 进一步将差异基因进行 KEGG 富集分析,结果共富集到 178 个信号通路(P < 0.05),从 KEGG 富集结果中,以显著富集的前 20 条 KEGG 信号通路绘制圈图(图 6),其中差异基因在 NOD 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、B 细胞受体信号通路、MAPK 信号通路、NF-κB 信号通路以及 TOLL 样受体信号通路等多个炎症相关信号通路中富集,提示高原低氧诱导机体发生了炎症反应和免疫失衡。

2.8 低氧胁迫下小鼠脾脏组织代谢组和转录组

KEGG 通路联合分析 为深入了解高原低氧诱导小鼠脾脏组织炎症反应发生的作用机制,本研究对所有差异代谢物与差异基因共同富集,获得共同通路信息,从而明确差异代谢物和差异基因共同参与的主要信号转导途径。结果表明,正离子模式下(图 7A),共同富集在 NOD 样受体信号通路、HIF-1 信号通路、肾素-血管紧张素以及 TRP 通道的炎症介质调节等多个炎症反应相关的通路中显著富集;负离子模式下(图 7B),共同富集在类固醇激素生物

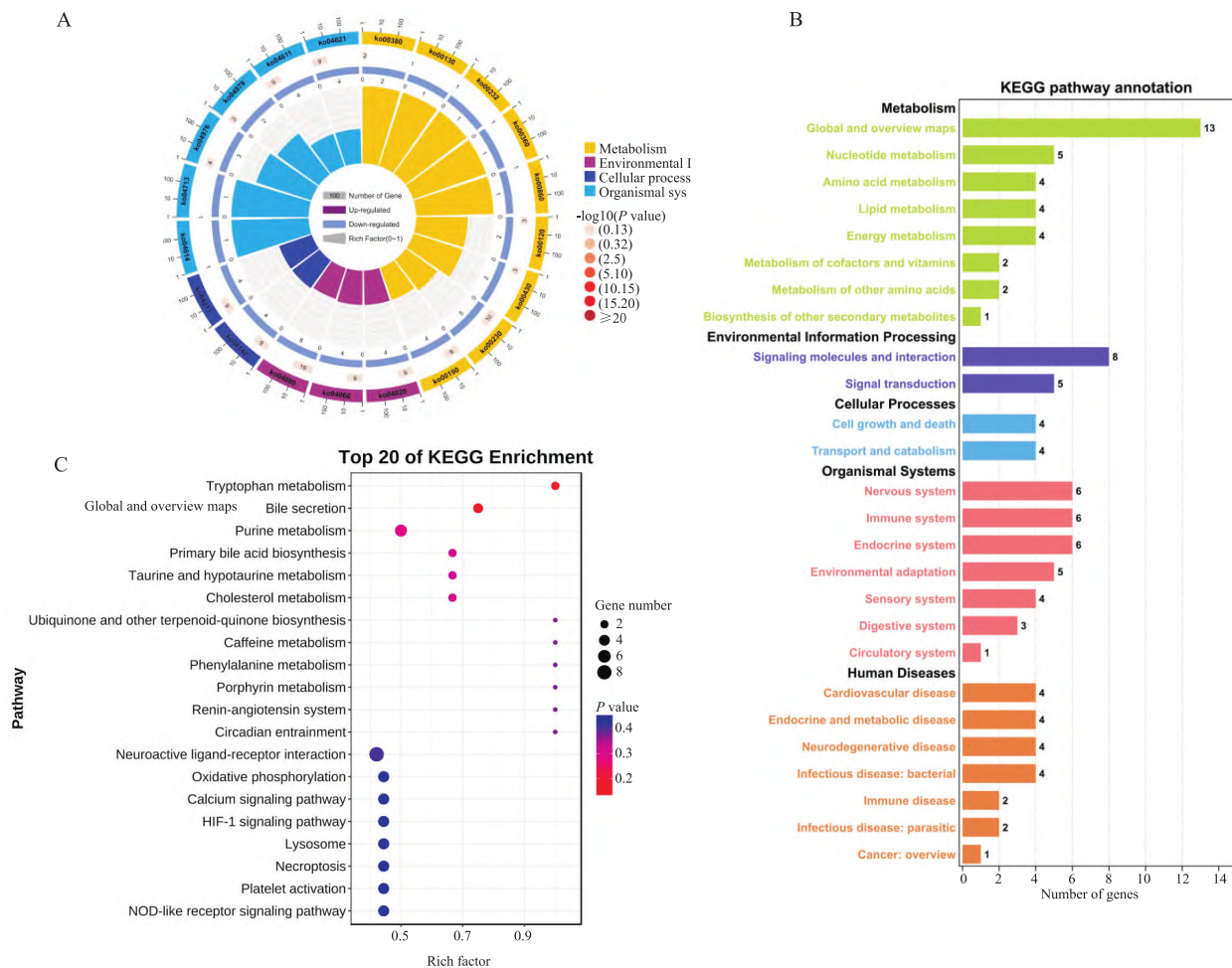


图 5 差异代谢物 KEGG 富集图

A: 差异代谢物富集圈图; B: 差异代谢物富集条形图; C: 差异代谢物富集气泡

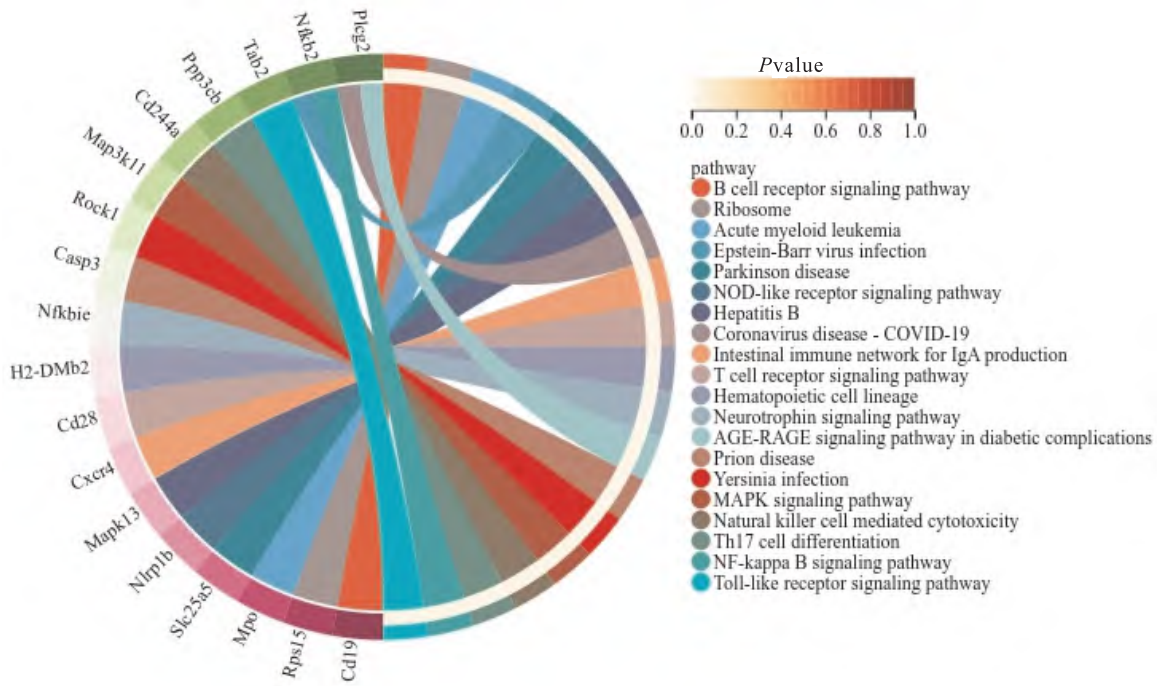


图6 KEGG 富集分析圈图

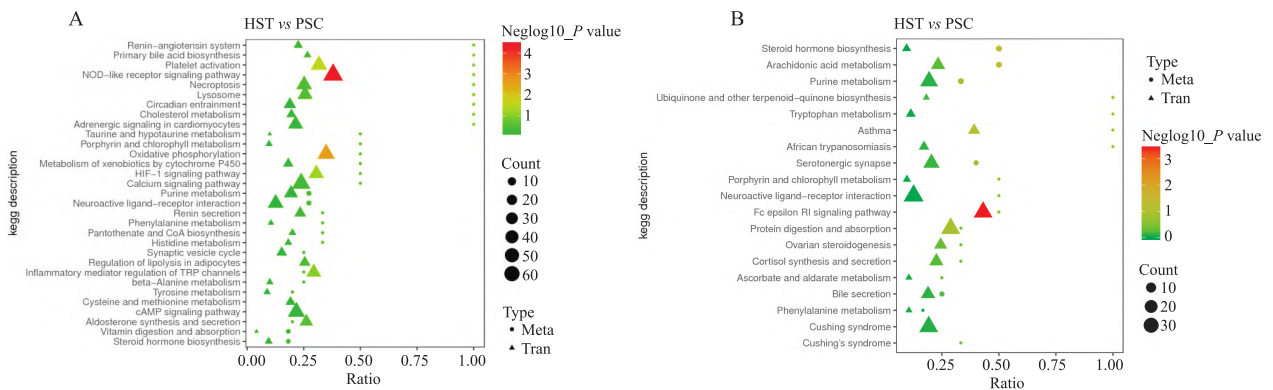


图7 差异基因与差异代谢物 KEGG 通路关联分析

A: 正离子模式; B: 负离子模式; 横坐标: 通路中富集到的差异代谢物或差异基因与该通路中注释到的代谢物或基因个数的比值 (Ratio); 纵坐标: 代谢组 - 转录组共同富集到的 KEGG 通路; Count: 通路中富集的代谢物或基因的个数

合成、嘌呤代谢、皮质醇的合成与分泌以及胆汁分泌等多种与脂代谢相关的信号通路中高度富集。因此,代谢组和转录组联合 KEGG 富集分析结果提示,在高原低氧胁迫下,机体在炎症反应和脂代谢方面发生了重要变化。

2.9 NOD 样受体信号通路相关性分析和 DEGs 的表达量检测 基于上述研究结果发现,NOD 样受体信号通路在代谢组和转录组 KEGG 通路联合分析中高度富集,因此,我们重点关注 NOD 样受体信号通路,并对该通路中的差异代谢物 ATP 和差异基因 CHUK、TAB3、MAPK8、NLRP1B、CASP1 在 STITCH 数据库构建相关性网络图(图 8)。结果表明,NOD

样受体信号通路中差异代谢物与差异基因的相关性值均为正值,即差异代谢物 ATP 与 5 个关键差异基因呈正相关(表 2),此外 STITCH 数据库还预测了 10 个相关靶基因,如 Rela、Nfk2、Ikbkb、Fos、Jun 等均与炎症相关的基因。

表 2 NOD 样受体信号通路中差异代谢物与差异基因相关性值

基因 ID	基因名	相关系数
ENSMUSG00000025199	CHUK	0.806
ENSMUSG00000035476	TAB3	0.745
ENSMUSG00000021936	MAPK8	0.818
ENSMUSG00000070390	NLRP1B	0.818
ENSMUSG00000025888	CASP1	0.673

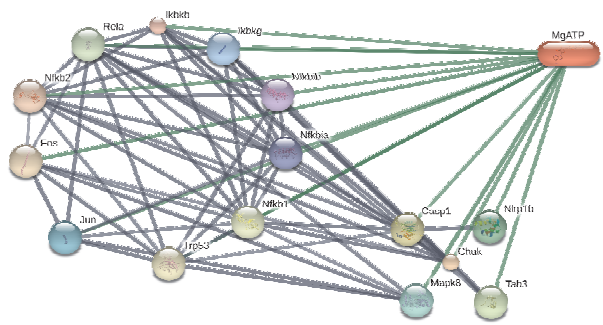


图8 NOD样受体信号通路中差异代谢物和差异表达基因相关性网络图

球形: 基因; 椭圆: 代谢物; 灰色: 基因-基因相互作用; 绿色: 基因-代谢物相互作用

随后, 进一步对 NOD 样受体信号通路中的 DEGs 及相关炎症因子进行了 mRNA 表达量的检测。结果发现, NOD1/NOD2 途径的 CHUK、TAB3、MAPK8 基因以及 NLRP1 炎症体-CASP1 途径的 NLRP1B、CASP1 基因在 PSC 组与 HST 组之间均表现出显著上调差异变化(图 9)。并且, 对 NOD 样受体信号通路下游炎症因子 IL-6、IL-1β、INF-γ 以及 TNF-α 的 mRNA 表达量进行检测(图 10), 5 个炎症因子均出现显著上调差异表达; 其中 IL-18 虽然没有统计学差异, 但从基因表达水平可以看出, HST 组的 IL-18 因子表达有升高趋势。因此, 上述结果提示, 高原低氧环境下可能通过影响 NOD 样受体信号

通路介导炎症反应发生。

3 讨论

高原低氧环境会导致机体组织和细胞携氧能力下降, 引起机体免疫系统发生生理、病理改变。脾脏是感受高原低氧胁迫下, 快速调节适应性免疫应答发生的主要场所, 同时也是机体最大的外周免疫器官^[3]。因此, 本研究以小鼠脾脏组织为研究对象, 从代谢组学和转录组学水平共同探究低氧胁迫下小鼠脾脏组织炎症反应发生的分子机制。

NOD 样受体信号通路在介导应激与炎症损伤等免疫应答过程中发挥着重要的作用, 当机体暴露在高原低氧条件下, 通过激活 NOD 样受体经一系列的信号传导, 诱导各种炎症因子的释放。因此, 本研究重点关注 NOD 样受体信号通路在低氧暴露下小鼠脾脏组织炎症反应发生的分子机制。已有研究^[4]发现, 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 除了作为供能物质之外, 在介导炎症反应中起着重要作用。比如, 虾青素通过降低 ATP 与嘌呤受体 P2X7 (purinergic receptor 2X7, P2X7R) 结合来下调炎症因子在小胶质细胞中的表达, 继而减轻癫痫大鼠的神经炎症^[5]。Li et al^[6]对 ATP-P2X7R 轴通过诱导 NLRP3 炎症小体的组装和 pro-Caspase-1 活化为 Caspase-1, 催化炎症因子的活化释放, 从而介导哮喘炎症反应发生^[6]。本研究发现, 在 NOD 样受

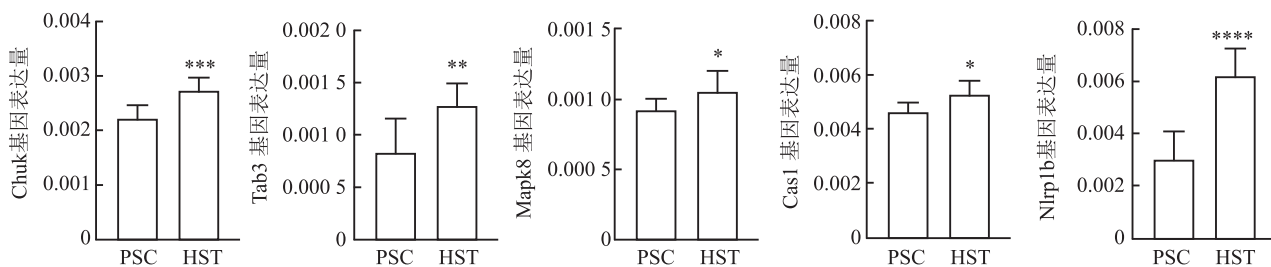


图9 NOD样受体信号通路差异基因的 RT-qPCR 结果

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

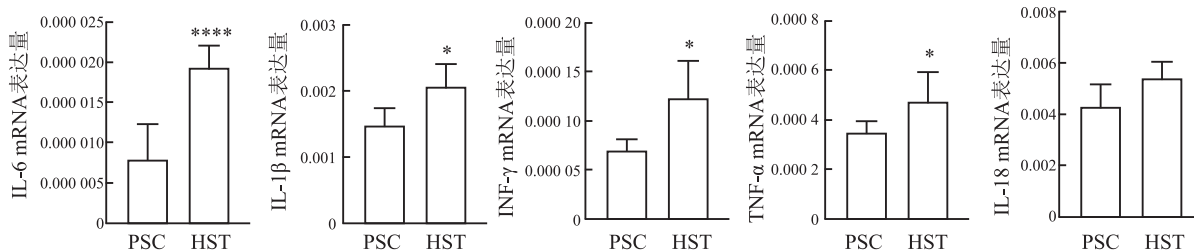


图10 NOD样受体信号通路炎症因子的 RT-qPCR 结果

与对照组比较: * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$

体信号通路中 ATP 与 CHUK、TAB3、MAPK8、NLRP1B、CASPI 基因的正相关性高,提示高原低氧环境可能激活 ATP-P2X7R 途径产生嘌呤能信号后,诱导 CHUK、TAB3、MAPK8、NLRP1B、CASPI 基因高度表达,从而介导炎症反应的发生。

NOD 样受体蛋白家族是一组模式识别受体 (PRR),位于细胞质内的核苷酸结合寡聚化结构域,NOD 样受体分为 5 个亚家族分别为 NLRA、NLRB、NLRC、NLRP 和 NLRX,其中 NLRC 和 NLRP 亚家族是其主要两种类型,而 NOD1 和 NOD2 又是 NLRC 亚家族中的主要代表。低氧刺激激活 NOD 样受体,通过 CARD6-CARD9 相互作用募集下游的受体作用丝氨酸苏氨酸蛋白 2 (RIP2),一方面活化 CHUK 基因表达的 IKK α/β 复合体,激活 NF- κ B 的转录^[7];另一方面活化下游 TAB3 和 MAPK8 基因,激活 MAPK 通路^[8],共同介导免疫反应和促炎因子的释放^[9]。本研究中,高原低氧环境下小鼠脾脏组织中 CHUK、TAB3 和 MAPK8 的 mRNA 表达上调,提示 NOD 样受体信号通路中通过激活 NOD1、NOD2 途径诱导炎症反应的发生。

NOD 样受体信号通路在炎症反应、肿瘤发生、癌细胞分化及衰老过程中起着关键调节作用。Wang et al^[10]等研究表明在高原低氧胁迫下,通过 NOD 样受体介导的信号通路会诱发损伤性肺部炎症;有报道称,NOD 样受体信号通路在慢性间歇性缺氧诱导线粒体损伤,从而引起血管内皮损伤过程中发挥重要作用^[11]。NLRP1 作为 NOD 样受体家族中的重要成员,能识别多种危险信号,且 NLRP1 炎症小体也是人们发现的第一个 NLR 炎症小体。Tye et al^[12]研究发现,NLRP1 的缺失可以使肠道内梭状芽孢杆菌的数量增加,从而导致丁酸盐的水平升高,改善溃疡性结肠炎的发生。通常情况下,NLRP1 在识别到危险信号后,自身抑制状态被激活,随即招募耦联接头蛋白 ASC、pro-caspase1 并组装形成 NLRP1 炎症小体,活化 caspase1 从而促进炎症因子 (IL-1 β 、IL-18 等) 成熟和分泌,从而引起炎症反应的发生^[13]。NLRP1b 是炎症体 NLRP1 家族一员,当机体受到外界刺激后,NLRP1b 炎症体信号激活,分泌炎症因子诱发炎症,严重时甚至会导致自体炎症反应调节障碍^[14]和自身免疫性疾病^[15]的发生。本研究结果显示 NLRP1b、CASPI 的 mRNA 表达量在 HST 组显著升高,提示高原低氧环境下 NOD 样受体信号通路通过 NLRP1 炎症体-CASPI 途径,介导小鼠脾脏组织炎症反应的发生。

综上所述,本研究通过代谢组学和转录组学对不同海拔暴露下的小鼠脾脏组织进行研究,发现差异代谢物和差异基因显著富集于 NOD 样受体信号通路,提示在高原低氧胁迫下激活 NOD 样受体信号通路诱导炎症反应发生;进一步对 NOD 样受体信号通路中差异代谢物 ATP 与差异基因进行相关性分析,结果提示 ATP 大量释放后激活 P2X7R,P2X7R 通过诱导 NOD1、NOD2 途径中的 NF- κ B 和 MAPK 轴以及 NLRP1 炎症体-CASPI 途径,促进下游炎症因子 (IL-6、IL-1 β 、IL-18、INF- γ 和 TNF- α) 表达上调,从而介导小鼠脾脏组织炎症反应发生。总之,本研究为进一步探索高原低氧环境对脾脏组织炎症反应发生发展机制提供理论依据。

参考文献

- [1] Doutreleau S. Physiological and pathological responses to altitude [J]. *Rev Mal Respir*, 2021, 38(10): 1013–24.
- [2] McGettrick A F and O'Neill L A J. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(4): 524–36.
- [3] Lewis S M, Williams A, Eisenbarth S C. Structure and function of the immune system in the spleen [J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(33): eaau6085.
- [4] Nuka E, Ohnishi K, Terao J, et al. ATP/P2X7 receptor signaling as a potential anti-inflammatory target of natural polyphenols [J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0204229.
- [5] Wang M, Deng X, Xie Y, et al. Astaxanthin attenuates neuroinflammation in status epilepticus rats by regulating the ATP-P2X7R signal [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 1651–62.
- [6] Li R, Shang Y, Hu X, et al. ATP/P2X7r axis mediates the pathological process of allergic asthma by inducing M2 polarization of alveolar macrophages [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 386(1): 111708.
- [7] Li Y, Xia Y, Yin S, et al. Targeting microglial alpha-Synuclein/TLRs/NF-kappaB/NLRP3 inflammasome axis in Parkinson's disease [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 719807.
- [8] Zhao W, Ma L, Cai C, et al. Caffeine inhibits NLRP3 inflammasome activation by suppressing MAPK/NF-kappaB and A2aR signaling in LPS-induced THP-1 macrophages [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(8): 1571–81.
- [9] Pei G, Dorhoi A. NOD-like receptors: guards of cellular homeostasis perturbation during infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6714.
- [10] Wang H, Lin X, Pu X. NOD-like receptors mediate inflammatory lung injury during plateau hypoxia exposure [J]. *J Physiol Anthropol*, 2020, 39(1): 32.
- [11] Yan Y R, Zhang L, Lin Y N, et al. Chronic intermittent hypoxia-induced mitochondrial dysfunction mediates endothelial injury via the TXNIP/NLRP3/IL-1beta signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 165: 401–10.

- [12] Tye H, Yu C H, Simms L A, et al. NLRP1 restricts butyrate producing commensals to exacerbate inflammatory bowel disease[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3728.
- [13] Yu C H, Moecking J, Geyer M, et al. Mechanisms of NLRP1-mediated autoinflammatory disease in humans and mice[J]. *J Mol Biol*, 2018, 430(2): 142–52.
- [14] Krainer J, Siebenhandl S, Weinhausel A. Systemic autoinflammatory diseases[J]. *J Autoimmun*, 2020, 109: 102421.
- [15] Tarte S, Kanneganti T D. Inflammasomes in the pathophysiology of autoinflammatory syndromes[J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 107(3): 379–91.

Hypoxia at high altitude induces inflammation in the spleen of mice through NOD-like receptor signaling pathway

Wang Jiayang, Hu Ying, Xu Yuzhen, Long Qifu, Tang Chaoqun, Yong Sheng
(Dept of Immunology, Faculty of Medicine, Qinghai University, Xining 810016)

Abstract Objective Based on metabolomics and transcriptomics analysis, to explore the molecular mechanism of spleen inflammation induced by high altitude hypoxia in mice through NOD-like receptor signaling pathway. **Methods** C57BL/6 mice were raised at an altitude of 400 m and 4 200 m respectively, with five mice in each group, and spleen tissues were collected after 30 days. Differential metabolites and differentially expressed genes in key pathways were screened by metabolomics and transcriptome analysis and correlation KEGG enrichment analysis, and the related network interaction diagram of differential metabolites and differentially expressed genes in key pathways was constructed and verified by RT-qPCR. **Results** Metabolomics analysis showed that 133 differential metabolites were screened from in the plain spleen control group (PSC group) and the plateau spleen test group (HST group), 95 of which were up-regulated while 38 of which were down-regulated. KEGG enrichment analysis showed that they were mainly involved in NOD-like receptor signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, cholesterol metabolism and other metabolic pathways. The results of transcriptome analysis showed that a total of 4213 differentially expressed genes were identified in PSC group and HST group, including 1947 up-regulated genes and 2266 down-regulated genes. KEGG was enriched in 173 signaling pathways, including NOD-like receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway, NF- κ B signaling pathway and other pathways. Comprehensive analysis showed that the differential metabolites and differentially expressed genes were obviously enriched in NOD-like receptor signaling pathway. Therefore, the correlation network interaction map was constructed for the differential metabolites ATP and differentially expressed genes in NOD-like receptor signaling pathway. RT-qPCR results showed that compared with PSC group, the expression levels of DEGs related to NOD1 and NOD2 (CHUK, TAB3, MAPK8) in the signaling pathway of NOD-like receptor and NLRP1-CASP1 pathway (NLRP1b, CASP1) in HST group were significantly enhanced. The mRNA expression levels of downstream inflammatory factors IL-6, IL-1 β , IL-18, INF- γ and TNF- α were up-regulated and differentially expressed. **Conclusion** Based on the combined analysis of metabolomics and transcriptomics, it was found that hypoxia stimulation at high altitude may affect the NOD-like receptor signaling pathway *in vivo*, and the differential metabolite ATP is positively correlated with the differential key genes in the pathway. ATP mediates the release of downstream inflammatory factors by activating NOD1, NOD2 pathways and NLRP1 inflammable-CASP1 pathways. Inflammatory response occurred in spleen tissue of mice.

Key words plateau hypoxia; spleen; metabolomics; transcriptomics; NOD-like receptor signaling pathway