

内质网应激在间歇低氧所致肝脏胰岛素抵抗中的作用

靳欢欢¹, 孙婷婷¹, 任丽珏¹, 何忠明², 陈新洁¹, 胡佳玉¹, 韩芳³, 魏翠英¹

摘要 目的 探讨大鼠内质网应激在间歇低氧所致肝脏胰岛素抵抗中的作用。方法 将24只SD大鼠随机分为对照组(NC组)及间歇低氧组(CIH组), NC组置于常氧环境12周, CIH组先予间歇低氧8周, 随后恢复常氧饲养至第12周。两组均于基线、第8周、第12周测定空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、及肝脏肌醇依赖酶1 α (IRE1 α)、剪切型X-box结合蛋白1(XBP1s)、叉形头转录因子1(FoxO1)、活化转录因子6(ATF6)、环腺苷酸反应元件结合蛋白(CREB)、CREB调控转录辅激活因子-2(CRTC2)、内质网膜上的I型跨膜激酶(PERK)、真核翻译起始因子2 α (eIF2 α)、蛋白激酶B(AKT)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖6磷酸酶(G6Pase)mRNA的表达水平。结果 两组基线时各观察指标差异无统计学意义; 8周时, CIH组FBG、FINS及IRE1 α 、XBP1s、ATF6、PERK、eIF2 α 、PEPCK、G6Pase mRNA水平较NC组增高($P < 0.05$), CREB、CRTC2、AKT mRNA水平较NC组降低($P < 0.05$); 12周时, 两组各观察指标差异无统计学意义。Pearson相关性分析显示(间歇低氧组第8周): 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)与FoxO1、CREB、CRTC2及PERK、eIF2 α mRNA水平呈正相关($r = 0.172, 0.595, 0.183, 0.702, 0.608; P < 0.05$), 与IRE1 α 、XBP1s、ATF6、AKT mRNA水平呈负相关($r = -0.422, -0.327, -0.309, -0.399; P < 0.05$)。结论 间歇低氧可以导致胰岛素抵抗的发生, 内质网应激可能介导了该效应的发生。

关键词 间歇低氧-复氧; 胰岛素抵抗; 内质网应激; 未折叠蛋白反应

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)12-1880-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.12.006

睡眠呼吸暂停综合征和2型糖尿病均是严重危害健康的疾病, 两病共病患者致残致死率高, 明确两

者间的关系及其机制有助于疾病的防治。慢性间歇低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)是睡眠呼吸暂停的基本病理生理特征, 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)贯穿于2型糖尿病的全程。CIH可以导致大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)增高, IR增强, 而复氧干预可以逆转, 提示CIH是IR与糖代谢异常的直接原因。内质网应激与糖代谢密切相关^[1-2], 推测其可能介导了CIH所致的IR, 但目前鲜有文献报道。因此, 该研究通过对照观察慢性间歇低氧-复氧下内质网应激与IR的变化, 探讨内质网应激在间歇低氧所致IR中的作用, 以丰富睡眠呼吸暂停与糖代谢的相关机制, 为疾病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 5周龄雄性SD大鼠24只, 体质量约180~200g, 由包头医学院实验动物中心提供。大鼠胰岛素ELISA试剂盒购自洛阳华美生物工程有限公司。超纯TMM分子生物级水购自美国Hy-Clone公司, Servicebio[®] RT第一链cDNA合成试剂盒、 $\times 2$ 实时定量PCR扩增预混溶液、RNA提取液均购自武汉Servicebio科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 按随机数字表法将24只SD大鼠分为对照组(NC组)及间歇低氧组(CIH组), 每组各12只。室温维持在22~23℃, 湿度调节至42%~45%, 可自由饮食、进水, 维持适宜的饲养环境, 隔日更换垫料, 垫料为干锯沫, 鼠笼定期消毒, 分3阶段处理: ①基线阶段: 每组随机选取4只处死并取样, 剩余大鼠进入间歇低氧阶段; ②间歇低氧阶段: CIH组大鼠置于间歇低氧舱内循环充入氮气和空气, 在间歇低氧舱内不予饮食, 其余时间自由进食水, NC组大鼠置于常氧下正常饲养, 共持续8周。每组随机选取4只处死并取样, 剩余大鼠进入复氧阶段; ③复氧阶段: CIH组剩余4只大鼠进行复氧干预处理, NC组一直处于常氧环境, 持续4周后处死并取样。

1.2.2 间歇低氧大鼠模型的构建 氧舱分两部分, 舱体上部为操作平台, 舱体下部为间歇低氧舱, 采用

2022-09-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81660020); 内蒙古自治区自然科学基金(编号: 2019MS08192); 内蒙古自治区科技计划项目(编号: 2021GG0219)

作者单位: ¹ 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院老年医学科, 包头 014000

² 新疆克拉玛依市中心医院呼吸科, 克拉玛依 834000

³ 北京大学人民医院呼吸科睡眠中心, 北京 100000

作者简介: 靳欢欢, 女, 硕士研究生;

魏翠英, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: weicuiying9@163.com

封闭式抽屉设计,以便于抓取实验大鼠及更换垫料。在舱体上部安装固定式气体检测仪并实时监测氧舱内氧浓度变化情况。舱体的左侧壁为全自动电控系统板面,右侧壁为 AR2000 减压阀,氮气由压力表控制后进入氧舱内。舱体的下壁为电磁阀系统,调节氮气与空气的进入,要依据设置的时间控制电磁阀开关。调节气体输入时间可控制在一定时间内达到不同程度的间歇低氧,由单向电磁阀门控制气体切换;舱体后壁安装风机,以便于快速交换舱内气体,维持舱内氧浓度。充入氮气 20 s,使氧浓度由 21% 降至最低氧浓度(8.0±0.5)% 维持 10 s,再充入空气 80 s,使氧舱内浓度逐渐恢复至 21% 后再维持 10 s,使每个循环维持 2 min,使大鼠发生间歇低氧事件为 30 次/h,暴露时间为每日 9:00—17:00(共 8 h),共 8 周,模拟人类重度阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OS-AHS)事件。测氧仪监控舱内氧浓度,铺干燥垫料吸收舱内水分。在间歇低氧舱内部氧浓度达到最低点(氧浓度 8%)及恢复至最高点(氧浓度 21%)时,同步经颈动脉置管采血进行血气分析,动脉血氧饱和度分别为 99%、76%、99% 提示间歇低氧造模成功。

1.3 取材 分别在置于氧舱前(即 0 周)、第 8 周、第 12 周末禁食 12 h 后,3% 水合氯醛腹腔麻醉,取内眦静脉血,离心后取上清液保存于 -20 °C 冰箱以备测定血浆 FINS 水平,取肝脏组织用于后续 RT-PCR 实验。

1.4 生化检测 将各组大鼠用碘伏棉球消毒大鼠眼眶周部位,用毛细玻璃管吸取大鼠微量内眦静脉血滴于血糖仪配套试纸上,迅速读取并记录 FBG;采用酶联免疫吸附法,应用全自动酶标分析仪检测 FINS 水平;采用血清稳态模型评估胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance, HOMA-IR) = (FBG × FINS) / 22.5。

1.5 RT-PCR 法检测内质网应激相关指标及糖异生关键酶 采用 RT-PCR 法检测大鼠肝脏组织中肌醇依赖酶 1α(inositol-requiring enzyme-1α, IRE1α)、剪切型 X-box 结合蛋白 1(X-box binding protein 1s, XBP1s)、叉形头转录因子 1(forkhead box transcription factor O1, FoxO1)、活化转录因子 6(activating transcription factor-6, ATF6)、环腺苷酸反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、CREB 调控转录辅激活因子-2(CREB-regulated transcription coactivator-2, CRTC2)、内质网膜上的 I 型跨膜激酶(double-stranded RNA-dependent

protein kinase-like ER kinase, PERK)、真核翻译起始因子 2α(eukaryotic initiation factor 2α, eIF2α)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEP-CK)、葡萄糖 6 磷酸酶(glucose-6-phosphat-ase, G6Pase) mRNA 的表达,用 RNA 抽提试剂盒提取肝脏组织总 RNA,经过 RNA 纯度、完整性鉴定后,将其反转录为 cDNA,IRE1α、XBP1s、FoxO1、ATF6、CREB、CRTC2、PERK、eIF2α、AKT、PEPCK、G6Pase,以 GAPDH 作为内部参照。PCR 反应参数:95 °C 预变性 10 min,随后 95 °C 变性 15 s,60 °C 退火、延伸 60 s,进行 40 个循环。实验重复 3 次,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验;两因素之间的关系用 Pearson 相关方法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。

2 结果

2.1 大鼠的一般状态 NC 组大鼠精神状态良好、呼吸平稳、皮毛光亮、活动自如、反应灵敏;CIH 组大鼠在进入间歇低氧舱后首先出现烦躁不安、四处窜动,逐渐出现活动迟缓、呼吸急促、口唇及四肢发绀等缺氧现象,随实验时间延长逐渐表现为皮毛灰暗、精神萎靡等,复氧干预后行为表现逐渐恢复至与对照组相近。

2.2 两组大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR 水平变化 两组基线时 FBG、FINS、HOMA-IR 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);8 周时,CIH 组 FBG、FINS、HOMA-IR 水平较 NC 组增高($P < 0.05$);12 周时,两组各观察指标水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组大鼠 FBG、FINS 及 HOMA-IR 变化比较($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

项目	组别	0 周	8 周	12 周
HOMA-IR	NC	9.00 ± 1.53	10.15 ± 1.02	9.39 ± 1.97
	CIH	9.10 ± 2.05	13.42 ± 1.41**	10.62 ± 1.38
FBG(mmol/L)	NC	5.49 ± 0.50	6.05 ± 0.55	6.84 ± 0.86
	CIH	5.85 ± 0.77	6.71 ± 0.51*	6.99 ± 0.45
FINS(mU/L)	NC	37.15 ± 7.30	39.30 ± 4.16	30.82 ± 4.91
	CIH	34.62 ± 3.68	45.08 ± 4.38**	33.43 ± 2.64

与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 两组大鼠内质网应激相关指标的 mRNA 水平变化

2.3.1 两组大鼠 IRE1 α 、XBP1s、FoxO1 mRNA 水平变化 两组基线时 IRE1 α 、XBP1s、FoxO1 mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; 8 周时 ,CIH 组 IRE1 α 、XBP1s mRNA 水平较 NC 组增高 [(1.43 \pm 0.16) vs (1.00 \pm 0.00) 、(1.14 \pm 0.06) vs (1.00 \pm 0.00) 均 $P < 0.05$] ; 12 周时 ,两组各观察指标水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见图 1。

2.3.2 两组大鼠 ATF6、CREB、CRTC2 mRNA 水平变化 两组基线时 ATF6、CREB、CRTC2 mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; 8 周时 ,CIH 组 ATF6 mRNA 水平较 NC 组增高 (1.13 \pm 0.06) vs (1.00 \pm 0.00) ($P < 0.05$) ,CREB、CRTC2 mRNA 水平较 NC 组降低 [(0.58 \pm 0.19) vs (1.00 \pm 0.00) 、(0.76 \pm 0.15) vs (1.00 \pm 0.00) 均 $P < 0.05$] ; 12 周时 ,两组各观察指标水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见图 2。

2.3.3 两组大鼠 PERK、eIF2 α 、AKT mRNA 水平变化 两组基线时 PERK、eIF2 α 、AKT mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; 8 周时 ,CIH 组 PERK、eIF2 α mRNA 水平较 NC 组增高 [(1.24 \pm 0.10) vs (1.00 \pm 0.00) 、(1.19 \pm 0.10) vs (1.00 \pm 0.00) 均 $P < 0.05$] ,AKT mRNA 水平较 NC 组降低 (0.79 \pm

0.10) vs (1.00 \pm 0.00) ($P < 0.05$) ; 12 周时 ,两组各观察指标水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见图 3。

2.4 两组大鼠糖异生关键酶 PEPCK、G6Pase mRNA 水平变化 两组基线时 PEPCK、G6Pase mRNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ; 8 周时 ,CIH 组 PEPCK、G6Pase mRNA 水平较 NC 组增高 [(1.34 \pm 0.19) vs (1.00 \pm 0.00) 、(1.35 \pm 0.12) vs (1.00 \pm 0.00) 均 $P < 0.05$] ; 12 周时 ,两组各观察指标水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 。见图 4。

2.5 HOMA-IR 与内质网应激各因子的 Pearson 相关性分析

2.5.1 HOMA-IR 与 IRE1 α 、XBP1s、FoxO1 各因子的 Pearson 相关性分析 HOMA-IR 与 IRE1 α 、XBP1s mRNA 水平呈负相关 ($r = -0.422$ 、 -0.327 , $P < 0.05$) 与 FoxO1 mRNA 水平呈正相关 ($r = 0.172$, $P < 0.05$) 。

2.5.2 HOMA-IR 与 ATF6、CREB、CRTC2 各因子的 Pearson 相关性分析 HOMA-IR 与 ATF6 mRNA 水平呈负相关 ($r = -0.309$, $P < 0.05$) ,与 CREB、CRTC2 mRNA 水平呈正相关 ($r = 0.595$ 、 0.183 , $P < 0.05$) 。

2.5.3 HOMA-IR 与 PERK、eIF2 α 、AKT 各因子的

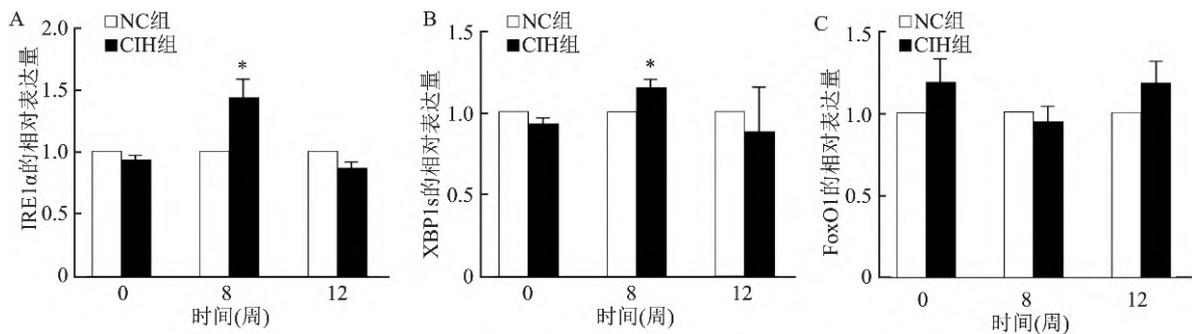


图1 两组大鼠 IRE1 α 、XBP1s、FoxO1 mRNA 水平比较与 NC 组比较: * $P < 0.05$

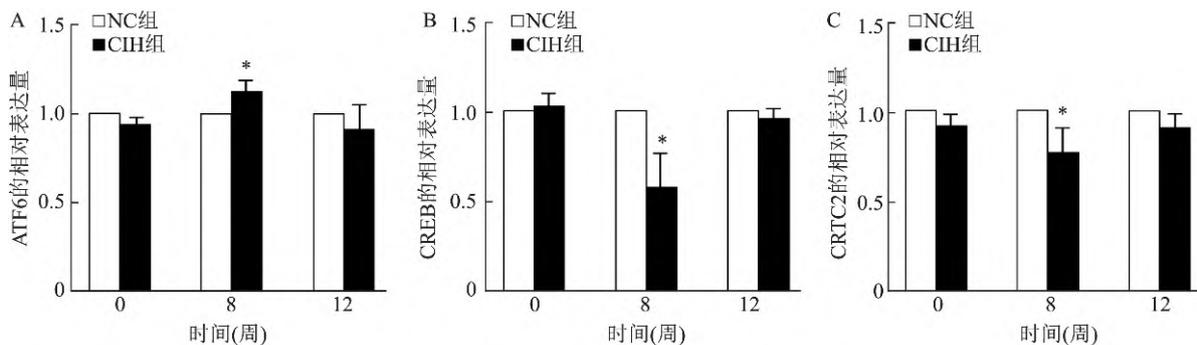


图2 两组大鼠 ATF6、CREB、CRTC2 mRNA 水平比较与 NC 组比较: * $P < 0.05$

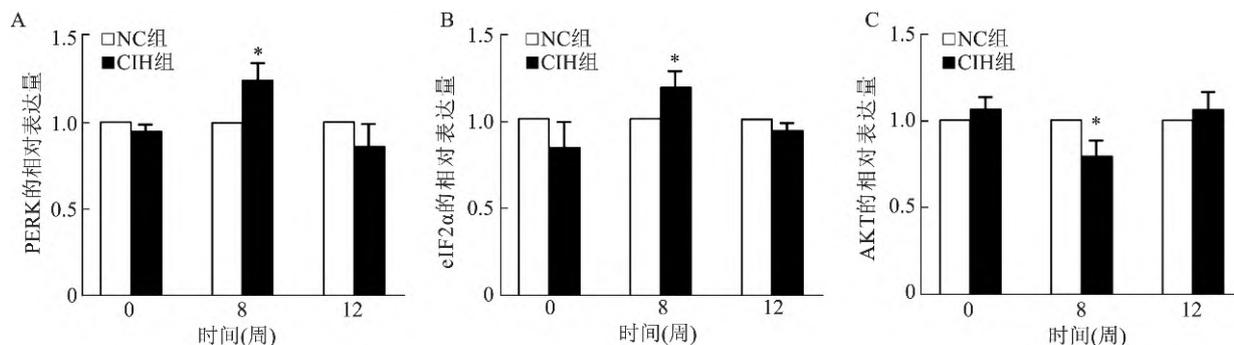


图3 两组大鼠 PERK、eIF2 α 、AKT mRNA 水平比较
与 NC 组比较: * $P < 0.05$

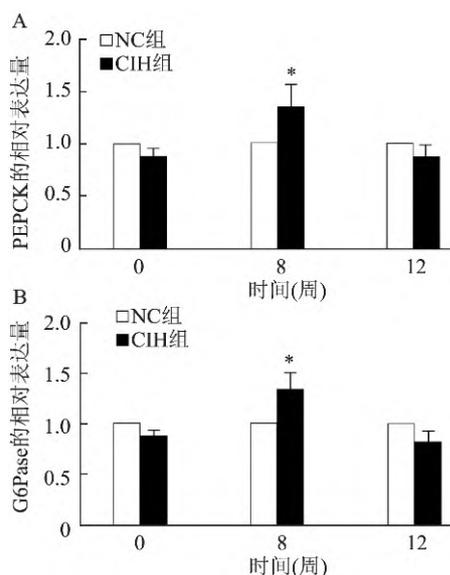


图4 两组大鼠 PEPCK、G6Pase mRNA 水平比较
与 NC 组比较: * $P < 0.05$

Pearson 相关性分析 HOMA-IR 与 PERK、eIF2 α mRNA 水平呈正相关 ($r = 0.702, 0.608, P < 0.05$), 与 AKT mRNA 水平呈负相关 ($r = -0.399, P < 0.05$)。

3 讨论

OSAHS 是 IR 的独立危险因素。该课题组前期研究^[3]表明, CIH 可致大鼠 FBG、FINS 增高, IR 增强, 而复氧干预可以逆转, 提示 CIH 是 IR 的直接原因, 与文献^[4-5]报道一致。内质网应激是 IR 的重要机制。未折叠蛋白反应是最典型的内质网应激, 包含 3 条经典信号通路^[6], 分别是 IRE1、ATF6 及 PERK。内质网应激可能是 CIH 致 IR 的机制之一, 但少有文献报道。

IRE1 α -XBP1s 信号通路: Yang et al^[7]报道, CIH 可导致 IRE1 α 蛋白水平明显上调, 但未报道该通路

其他标志物的变化及糖代谢的情况; Sun et al^[8]报道, XBP1s 通过降解 FoxO1 因子, 抑制肝脏中糖异生基因的表达, 提高糖耐量, 但该研究条件不是 CIH。该研究首次在 CIH 条件下, 同步观察了 IRE1 α -XBP1s 信号通路的 3 个重要标志物和 IR 的变化, 结果显示, CIH 条件下, IRE1 α 、XBP1s mRNA 水平上调, 而 FoxO1 mRNA 下调, 复氧后以上因子则表达相反, 均恢复至基线水平, 且 HOMA-IR 与 IRE1 α 、XBP1s mRNA 水平呈负相关, 与 FoxO1 mRNA 水平呈正相关, 提示 CIH 可以激活 IRE1 α -XBP1s 信号通路, 并可能介导肝脏 IR 的发生。其机制可能为: IRE1 α mRNA 水平上调, 其下游的 XBP1s mRNA 因子水平也上调, 直接促进转录因子 FoxO1 mRNA 降解, 导致糖异生的两个关键酶 G6Pase、PEPCK mRNA 水平下降, 抑制肝糖异生, 改善了 IR。

ATF6 信号通路: ATF6 信号通路与糖代谢密切相关, 有文献^[9-11]从基因角度研究了 ATF6 通路对糖代谢的影响, 结果显示, 靶向敲除小鼠的 CRTC2、CREB 基因, 会减弱肝脏糖异生作用, 改善胰岛素敏感性, 而若加强两者的活性, 则会升高血糖, 但 CIH 条件下其是否参与糖代谢的调节, 未见文献报道。Jia et al^[12]报道, CIH 条件可致 ATF6 蛋白水平升高, 但未同步观察该通路其他标志物及糖代谢的情况; 康晶等^[13]报道, CIH 可引起 CREB mRNA 的表达水平明显降低, 但未同步观察糖代谢的情况。该研究在间歇低氧条件下同步观察 ATF6 信号通路和 IR 变化, 结果显示: CIH 条件下, 肝脏 ATF6 mRNA 水平显著增高, CREB、CRTC2 mRNA 水平显著降低, 复氧 4 周后, 以上因子表达则相反, 均恢复至对照组水平, 且 HOMA-IR 与 ATF6 mRNA 水平呈负相关, 与 CREB、CRTC2 mRNA 水平呈正相关。结果显示: CIH 可以激活 ATF6 信号通路, 并可能介导肝脏 IR 的发生。其机制可能为 CIH 条件下 ATF6 通路

被激活,ATF6 mRNA 水平上调,使 CREB、CRTC2 mRNA 因子的水平下调,减少了 CRTC2 对糖异生基因的占用,使肝葡萄糖输出减少,改善了 IR。

关于 PERK 信号通路的讨论: Yi et al^[14] 从蛋白水平进行研究,结果显示,CIH 可致 PERK 信号通路激活,eIF2 α 表达上调、AKT 表达抑制,使糖异生的两个关键酶 PEPCK、G6Pase 水平增高,肝脏糖异生增加,促进了 IR。该研究从基因水平观察 PERK 信号通路各因子 mRNA 水平的变化,结果同样显示,CIH 激活了 PERK 信号通路。该研究表明复氧 4 周后 PERK、eIF2 α mRNA 水平回落、AKT mRNA 水平回升,激活了的 PERK 信号通路在复氧后发生了逆转,进一步表明 CIH 可以激活内质网应激的 PERK 信号通路,并介导了 IR 的发生。

IRE1 α -XBP1s 信号通路、ATF6 信号通路的激活均有助于糖稳态的维持^[8,15],而 PERK 信号通路激活则可致 IR 增加^[14]。该研究首次同步观察了内质网应激的 3 条经典途径,在 CIH 条件下均呈激活状态,复氧后逆转;由此推测,在 CIH 所致 IR 中,PERK 信号通路占据了主导作用。

参考文献

- [1] Lu J, Shen H, Li Q et al. Effect of KCNH6 on hepatic endoplasmic reticulum stress and glucose metabolism [J]. *Horm Metab Res* 2020, 52(9): 669–75.
- [2] Zhang Y, Mo F F, Zhang D W et al. Jiangtang Xiaoke granule attenuates glucose metabolism disorder via regulating endoplasmic reticulum stress in the liver of type 2 diabetes mellitus mice [J]. *J Tradit Chin Med* 2018, 38(4): 570–8.
- [3] 陈新洁,刘宏飞,田稼葵,等. 大鼠 *Sesn2*/AMPK 信号介导肝脏的自噬在间歇低氧和复氧致糖代谢异常中的作用 [J]. *安徽医科大学学报* 2022, 57(3): 344–8.
- [4] 余维,刘霞,骆小华,等. 慢性间歇性低氧对大鼠肾脏 GLUT2 和 IRS-2 表达的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(2): 206–10.
- [5] 王洪,任寿安. 慢性间歇低氧对大鼠糖代谢及肝脏 TRB3、P-AKT 表达的影响 [J]. *国际呼吸杂志*, 2016, 36(7): 524–9.
- [6] 程涵博,吕颂雅,刘勇. 内质网应激在肝脏糖脂代谢及代谢性肝病中的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(11): 2209–19.
- [7] Yang Y Y, Yu H H, Jiao X L, et al. Angiotensin-like proteins 8 knockout reduces intermittent hypoxia-induced vascular remodeling in a murine model of obstructive sleep apnea [J]. *Biochem Pharmacol* 2021, 186: 114502.
- [8] Sun H L, Wei G, Liu H et al. Inhibition of XBP1s ubiquitination enhances its protein stability and improves glucose homeostasis [J]. *Metabolism* 2020, 105: 154046.
- [9] Dentin R, Hedrick S, Xie J, et al. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2 [J]. *Science* 2008, 319(5868): 1402–5.
- [10] Cui A, Ding D, Li Y. Regulation of hepatic metabolism and cell growth by the ATF/CREB family of transcription factors [J]. *Diabetes* 2021, 70(3): 653–64.
- [11] Wang Y, Inoue H, Ravnskjaer K, et al. Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107(7): 3087–92.
- [12] Jia W K, Jian Z, Li J W, et al. Upregulated ATF6 contributes to chronic intermittent hypoxia-afforded protection against myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5): 1199–208.
- [13] 康晶,王月华,何静雅,等. 慢性间歇低氧对大鼠认知功能及大脑环磷酸腺苷反应单元结合蛋白表达的影响 [J]. *武汉大学学报(医学版)* 2011, 32(1): 5–7 55.
- [14] Yi H H, Gu C J, Li M et al. PERK/eIF2 α contributes to changes of insulin signaling in HepG2 cell induced by intermittent hypoxia [J]. *Life Sci* 2017, 181: 17–22.
- [15] Wang Y, Vera L, Fischer W H, et al. The CREB coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluco-neogenesis [J]. *Nature* 2009, 460(7254): 534–7.

The role of endoplasmic reticulum stress in hepatic insulin resistance caused by intermittent hypoxia

Jin Huanhuan¹, Sun Tingting¹, Ren Lijue¹, He Zhongming², Chen Xinjie¹, Hu Jiayu¹, Han Fang³, Wei Cuiying¹

(¹Dept of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014000;

²Dept of Respiratory Medicine, Karamay Central Hospital, Xinjiang Karamay 834000;

³Sleep Center, Dept of Respiratory Medicine, Peking University People's Hospital, Beijing 100000)

Abstract Objective To investigate the role of endoplasmic reticulum stress in hepatic insulin resistance induced by intermittent hypoxia in rats. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into control group (NC group) and intermittent hypoxia group (CIH group). The NC group was placed in a normoxia environment for 12 weeks, and the CIH group was given intermittent hypoxia for 8 weeks, and then returned to normoxia until the 12th week. In both groups, fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), and liver inositol-requiring enzyme-1 α (IRE1 α), X-box binding protein 1s (XBP1s), forkhead box transcription factor O1 (FoxO1), activating tran-

巨噬细胞中与原肌球蛋白调节蛋白 1 相互作用的 迁移相关蛋白质分析

江思瑜^{1,2}, 马 杉^{1,2}, 袁 博¹, 谢利德¹, 姚伟娟², 郭丽娜³

摘要 目的 利用质谱联合 GeneCards 数据库挖掘分析 Raw264.7 小鼠单核巨噬细胞系中与原肌球蛋白调节蛋白 1 (TMOD1) 相互作用且与迁移相关的蛋白质。方法 使用 TMOD1-DDK 质粒在 Raw264.7 细胞中过表达 TMOD1, 免疫共沉淀联合质谱寻找巨噬细胞中与 TMOD1 存在相互作用的蛋白质, GeneCards 数据库检索巨噬细胞迁移已知蛋白质, Bioinformatics & Systems Biology 在线工具对已知蛋白质与质谱蛋白质进行关联分析找到共同差异蛋白 (CO-DEPs), WoLF PSORT 预测 CO-DEPs 亚细胞定位, EggNOG 数据库对 CO-DEPs 进行真核生物同源类群 (KOG) 注释, DAVID 数据

库对 CO-DEPs 进行基因本体 (GO) 注释与京都基因组学和基因组学百科全书 (KEGG) 通路注释, String 数据库对 CO-DEPs 进行蛋白互作网络分析, CytoScape 软件绘图。结果 质谱与 GeneCards 数据库分析共获得 CO-DEPs 41 个, CO-DEPs 亚细胞定位主要分布于细胞骨架、细胞质、细胞核, KOG 注释主要为 O: 翻译后修饰、Z: 细胞骨架、J: 翻译, GO 分析显示 CO-DEPs 主要参与了 poly(A) RNA 结合、蛋白质折叠、黏着斑等过程, KEGG 分析显示 CO-DEPs 富集到的通路主要为致心律失常性右心室心肌病 (ARVC)、紧密连接。β-肌动蛋白 (ACTB) 为蛋白交互作用最大的蛋白质。结论 巨噬细胞内与 TMOD1 发生相互作用的蛋白主要包括肌球蛋白重链-9 (MYH9)、α-辅肌动蛋白 1 (ACTN1) 与 ACTB 等, 提示 TMOD1 与巨噬细胞运动有关。

关键词 巨噬细胞; TMOD1; 相互作用; 质谱分析; GeneCards 数据库

中图分类号 R 33

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2022) 12 - 1885 - 06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2022.12.007

2022 - 10 - 18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31771280、31570938); 河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目(编号: CXZZSS2021135)

作者单位: ¹承德医学院基础医学院, 承德 067000

²北京大学医学部基础医学院, 生理系与病理生理系, 血液流变学研究中心, 北京 100083

³曹县人民医院康复科, 菏泽 274400

作者简介: 江思瑜, 女, 硕士研究生;

谢利德, 男, 博士后, 教授, 责任作者, E-mail: xielide65@163.com;

姚伟娟, 女, 博士后, 副教授, 责任作者, E-mail: wei-juan.yao@bjmu.edu.cn

血液内的巨噬细胞被吸引至炎症部位发挥生物学功能的过程称为巨噬细胞迁移。有学者研究^[1]显示, 当巨噬细胞迁移能力下降时, 细胞内纤维状肌动蛋白 (filamentous actin, F-actin) 的含量增加。原

scription factor-6 (ATF6), cAMP-response element binding protein (CREB), CREB-regulated transcription coactivator-2 (CRTC2), double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER kinase (PERK), eukaryotic initiation factor 2α (eIF2α), protein kinase B (AKT), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G6Pase) mRNA were measured at baseline, week 8, and week 12. **Results** There was no significant difference in each observation index between the two groups at baseline; at 8 weeks, the levels of FBG, FINS and the mRNA levels of IRE1α, XBP1s, ATF6, PERK, eIF2α, PEPCK and G6Pase in the CIH group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$), while the mRNA levels of CREB, CRTC2 and AKT were lower than those in the NC group ($P < 0.05$); at 12 weeks, there was no significant difference in each observation index between the two groups. Pearson correlation analysis showed (8th week of intermittent hypoxia group): homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) was positively correlated with FoxO1, CREB, CRTC2 and PERK, eIF2α mRNA levels ($r = 0.172, 0.595, 0.183, 0.702, 0.608$; $P < 0.05$) while it was negatively correlated with IRE1α, XBP1s, ATF6, AKT mRNA levels ($r = -0.422, -0.327, -0.309, -0.399$; $P < 0.05$). **Conclusion** Intermittent hypoxia can lead to insulin resistance, and endoplasmic reticulum stress may mediate this effect.

Key words intermittent hypoxia-reoxygenation; insulin resistance; endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response