DOI:10.16016/j.2097-0927.202109090

模拟高原低压低氧暴露小鼠记忆损伤与脑海马体磷酸化蛋白质组学分析

董华平,钟志凤,李 鹏,黄 沛,田怀军,谢佳新,周思敏 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系高原作业医学教研室,极端环境医学教育部重点实验室,全军高原医学重点实验室

[**摘要**] **目的** 观察低压低氧致小鼠记忆损伤及脑海马体蛋白磷酸化修饰水平的变化,探寻低压低氧引起记忆损伤的关键磷酸化修饰蛋白和通路。**方法** 40 只 7~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量(20±2)g,按体质量顺序编号后采用随机数字表法分为常氧组和低压低氧组(n=20)。常氧组小鼠在常氧条件下喂养,低压低氧组小鼠在模拟海拔 6 000 m 的低压舱中喂养 7 d。低压低氧暴露结束后进行 Morris 水迷宫实验和脑海马体组织磷酸化蛋白质组学检测。**结果** Morris 水迷宫实验结果显示,与常氧组相比,低压低氧组小鼠逃避潜伏期显著延长[(89.66±3.27) *vs* (38.61±4.83)s,P<0.01]、游泳距离显著增加[(959.21±99.61)*vs* (550.39±59.43)cm,P<0.01]。磷酸化蛋白质组学分析共检测到显著差异表达磷酸化肽段 136 个,其中上调 92 个,来自 79 个蛋白;下调 44 个,来自 42 个蛋白。GO 富集分析结果显示:这些差异磷酸化修饰蛋白主要分布在突触后密集区、非对称性突触和基底细胞膜,主要参与细胞连接组装、突触构成、突触中囊泡介导的运输、树突发育、认知等生物学过程。KEGG 通路富集分析显示:差异磷酸化修饰蛋白质主要富集在胰岛素分泌、胰液分泌、谷氨酸能突触、内吞和长时程抑制等信号通路。在蛋白质相互作用层面,构成以 AGAP2、SYNGAP1、DRP2、DRP3 和 PSD93 等蛋白为核心的蛋白互作网络。**结论** 低压低氧可致小鼠记忆损伤脑海马体磷酸化修饰蛋白及通路发生改变,AGAP2、SYNGAP1、DRP2、DRP3 和 PSD93 可能是关键蛋白。

[**关键词**] 低氧;海马;记忆;磷酸化蛋白质组学

[**中图法分类号**] R322.81; R339.54; R394.3 [**文献标志码**] A

Memory impairment induced by exposure to simulated hypobaric hypoxia and phosphoproteomic analysis of hippocampus in mice

DONG Huaping, ZHONG Zhifeng, LI Peng, HUANG Pei, TIAN Huaijun, XIE Jiaxin, ZHOU Simin Department of High-Altitude Operational Medicine, Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To observe the changes of protein phosphorylation levels in the hippocampus of mice with memory impairment caused by hypobaric hypoxia exposure, and to explore the key phosphorylated proteins and associated pathways involved in memory deficits. **Methods** Forty male C57BL/6 mice (7~8 weeks old, body weight 20±2 g) were randomly and equally divided into normoxic control group (Ctrl) and hypobaric hypoxic group (HH). The Ctrl group was housed under normoxic condition, while the HH group was fed for 7 d in a hypobaric chamber at simulated altitude of 6 000 m. Morris water maze (MWM) test was performed after hypoxia exposure, and the hippocampus tissues of mice were collected for phosphoproteomic

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学基金(81701854);军队医学科技青年培育计划(20QNPY003)

[**通信作者**] 周思敏,E-mail:zhousm1982@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

analysis. **Results** MWM test showed that the escape latency of mice was significantly longer in the HH group than the Ctrl group (89.66±3.27 *vs* 38.61±4.83 s, $P<0.01$), and the swimming distance was also remarkably increased in the HH group (959.21±99.61 *vs* 550.39±59.43 cm, $P<0.01$). A total of 136 phosphopeptides with significant difference in expression between the 2 groups were detected by phosphoproteomic analysis, including 92 up-regulated phosphopeptides corresponding to 79 proteins and 44 down-regulated from 42 proteins. Gene Ontology (GO) enrichment analysis revealed that these differentially phosphorylated proteins were primarily distributed in postsynaptic density, asymmetric synapse and basal plasma membrane, and were mainly involved in biological processes such as cell junction assembly, synapse organization, vesicle-mediated transport in synapse, dendrite development and cognition. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis showed that the differentially phosphorylated proteins were mainly enriched in pathways like insulin secretion, pancreatic secretion, glutamatergic synapse, endocytosis and long-term depression. Moreover, a protein-protein interaction (PPI) network with AGAP2, SYNGAP1, DRP2, DRP3 and PSD93 as the core proteins was formed. **Conclusion** Hypobaric hypoxia exposure can induce memory impairment in mice, which may be associated with the differential expression of phosphorylated proteins and changes of related pathways in the hippocampus of mice, and AGAP2, SYNGAP1, DRP2, DRP3 and PSD93 may be the key proteins during the process.

[**Key words**] hypoxia; hippocampus; memory; phosphoproteomics

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81701854) and the Youth Training Plan for Medical Science of PLA (20QNPY003). Corresponding author: ZHOU Simin, E-mail: zhousm1982@163.com

高原地区具有低压低氧的特点,可引起进入高原人员机体缺氧。脑是机体对缺氧最敏感的器官,海马是脑内对缺氧较敏感的部位之一。长期或短时间严重缺氧可引起中枢神经系统功能紊乱,表现为认知功能下降等,尤以记忆力下降更为突出,严重影响学习能力和工作效率。人群研究和动物实验均证明无论急性缺氧还是长期慢性缺氧都能够引起脑记忆功能损伤[1-2]。

Morris 水迷宫实验是应用最广泛的研究和评价动物空间学习记忆能力的经典行为学实验。空间记忆是用于表征外界环境地理位置或方向的一种记忆形式,大脑中海马及其周围脑区是支持空间记忆的重要脑区,并且在海马区发现了位置细胞,这是空间记忆形成的基础[3-5]。研究表明,小鼠暴露于模拟海拔 6 000 m 左右的低氧环境 7 d 即出现空间记忆能力的显著下降[6-7]。蛋白质是执行生物学功能的物质基础,其表达高低及翻译后修饰水平与蛋白质功能密切相关。真核生物体内大约 1/3 的蛋白质被认为是经过磷酸化修饰的,蛋白质的磷酸化和去磷酸化过程调节着细胞信号转导、细胞分化和细胞生长等几乎所有的生命活动过程。因此,蛋白质磷酸化是最重要的一种蛋白质翻译后修饰[8]。研究表明,不同程度缺氧后脑组织中 NF-κB、P38 MAPK、Tau 等蛋白磷酸化水平升高,这些蛋白的异常磷酸化修饰被认为参与缺氧诱导的认知功能损伤[9-10]。

目前,还缺乏对低压低氧引起记忆损伤时脑海马体蛋白质磷酸化修饰改变的整体认识和系统研究。本研究通过建立低压低氧小鼠记忆损伤模型,比较常氧组和低压低氧组小鼠脑海马差异磷酸化修饰蛋白并对其所参与的生物学过程和信号通路等进行分析,探寻关键差异磷酸化修饰蛋白和通路,分析其在低压低氧导致记忆损伤中的潜在调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器和试剂 高原低压低氧环境模拟舱(陆军军医大学高原军事医学系),Morris 水迷宫(中国医学科学院药物所),Q-Exactive 质谱仪(Thermo 公司)。TMT 标记试剂盒和 High-Select™ Fe-NTA 磷酸肽富集试剂盒购自 Thermo 公司。

1.1.2 动物建模及取材 40 只雄性 C57BL/6 小鼠购自陆军军医大学实验动物中心,SPF 级,体质量(20±2)g,按体质量顺序编号后采用随机数字表法分为常氧组(Ctrl 组)和低压低氧组(HH 组),每组 20 只。将 HH 组小鼠暴露在模拟海拔 6 000 m 低压氧舱中饲养 7 d,Ctrl 组在平原环境(海拔 300 m)饲养。低压低氧

暴露结束后,每组取 11 只用于 Morris 水迷宫实验,9 只用于海马组织取材。麻醉小鼠,每只小鼠用约 30 mL 生理盐水灌注,取脑海马,迅速冻于液氮,用于磷酸化蛋白质组学测定分析。

1.2 方法

1.2.1 Morris 水迷宫实验 缺氧第 3 天开始对小鼠进行水迷宫实验。在开始训练前取出平台,小鼠在水中适应 20 s,再进行学习训练,连续训练 4 d,每天 4 次,记录小鼠寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果时间超过 120 s 小鼠仍未寻找到平台,则引导小鼠至平台停留 20 s,第 5 天行 120 s 的空间探索实验,记录小鼠逃避潜伏期、游泳距离、游泳速度、穿越平台次数、目标象限停留时间。

1.2.2 小鼠脑海马组织磷酸化蛋白质组学检测与分析 小鼠脑海马组织磷酸化蛋白质组学检测与分析由中科新生命公司(上海)完成。对脑海马组织进行蛋白提取、胰蛋白酶消化、磷酸化肽段富集和质谱检测后,分析筛选差异表达磷酸化肽段,然后对差异表达磷酸化肽段对应蛋白进行通路分析和蛋白质互作分析。

1.2.2.1 质谱分析 小鼠脑海马组织加入裂解液提取蛋白质,然后采用 BCA 法进行蛋白质定量。每个样品取适量蛋白质采用过滤辅助的蛋白组样本制备方法进行胰蛋白酶酶解,然后采用 C18 柱对酶解肽段进行脱盐,肽段冻干后加入 40 μL 溶解缓冲液复溶,用 $D(280)$ 检测肽段的含量。各样品分别取 100 μg 肽段,按照 Thermo 公司 TMT 标记试剂盒说明书进行标记,然后进行磷酸化肽段富集。样品经色谱分离后用 Q-Exactive 质谱仪进行质谱分析。采用 MaxQuant 软件(版本号 1.5.5.1)对质谱分析数据进行查库鉴定及定量分析。

1.2.2.2 生物信息学分析 筛选至少满足在 HH 组或 Ctrl 组任一组的质谱检测值 2 次及以上不为空值的磷酸化肽段纳入差异分析。为了便于后续分析,将筛选后数据中的空值赋值为 0。对于某一磷酸化肽段,若 HH 组表达量均值不为 0,而 Ctrl 组为 0 时,将该磷酸化肽段在 HH/Ctrl 组间比值赋值为 100;若 HH 组表达量均值为 0,而 Ctrl 组不为 0 时,将该磷酸化肽段在 HH/Ctrl 组间比值赋值为 0.01。采用两组独立样本 t 检验,以质谱检测值倍数变化>1.2 倍(上调>1.2 倍或者下调<0.83 倍)且 $P<0.05$ 的标准筛选差异表达磷酸化肽段。使用 ggplot2 和 pheatmap R 包绘制火山图和聚类热图对差异表达磷酸化肽段进行可视化。使用 clusterProfiler 4 R 包[11]对差异表达磷酸化肽段对应的蛋白进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,使用该 R 包中的 simplify 函数对 GO 富集的结果进行去冗余,校正后 $P<0.05$ 的条目被定义为富集显著,使用 ggplot2 R 包对富集分析的结果进行可视化。基于 STRING(http://string-db.org/)[12]数据库中的信息查找目标蛋白质间的相互作用关系,网络类型参数设置为物理网络,最低相互作用评分参数设定为 0.4。使用 CytoScape 软件[13](版本号:3.7.1)对蛋白质互作(protein and protein interaction, PPI)网络进行可视化和分析,使用 CytoScape 中的 cytoHubba 插件基于 MCC 算法筛选核心蛋白。MCC 算法得分排名前 5 的蛋白被认定为核心蛋白。

1.3 统计学分析

实验数据均为计量资料。Morris 水迷宫行为学数据由 Panlab Smartbasic 软件记录,采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。水迷宫实验训练期的逃避潜伏期、游泳距离、游泳速度指标采用重复测量的双因素方差分析(时间×处理因素),水迷宫实验测试期的检测指标采用两独立样本 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。使用 R 语言中的 t.test 函数对磷酸化肽段表达量进行两组独立样本 t 检验,倍数变化>1.2 倍且 $P<0.05$ 的肽段被认定为差异磷酸化肽段。使用 clusterProfiler 4 R 包进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,校正后 $P<0.05$ 的条目被认定为富集显著的条目。

2 结果

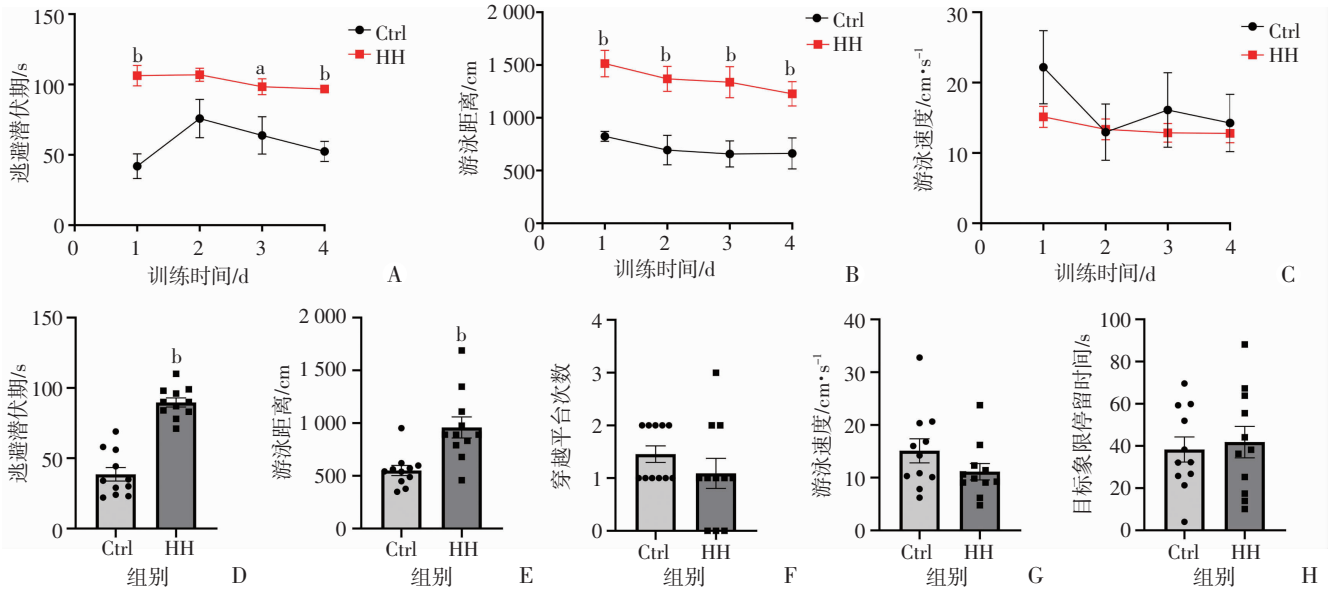
2.1 模拟高原低压低氧暴露导致小鼠学习和空间记忆能力下降

采用 Morris 水迷宫实验检测低压低氧对小鼠学习和空间记忆能力的影响。在前 4 d 的学习测试中,处理方法与实验天数之间无交互作用($P>0.05$)。与 Ctrl 组比较,训练期间 HH 组小鼠逃避潜伏期显著延长(1、3、4 d,$P<0.05$,图 1A),游泳距离显著增加(1~4 d,$P<0.01$,图 1B),游泳速度无明显差别(图 1C)。第 5 天的空间记忆测试结果显示,与 Ctrl 组比较,HH 组小鼠逃避潜伏期和游泳距离显著延长($P<0.01$,图 1D、E),而两组之间穿越平台次数、游泳速度和目标象限停留时间无显著差异(图 1F~H)。

2.2 差异表达磷酸化肽段筛选

分别对 Ctrl 组、HH 组进行磷酸化蛋白组学分析,每组 3 个技术重复,共 6 组数据。质谱共检测出磷酸化蛋白质 2 910 个,磷酸化肽段 7 785 个,磷酸化位点 9 923 个。在鉴定到的磷酸化修饰位点中,丝氨酸、苏氨

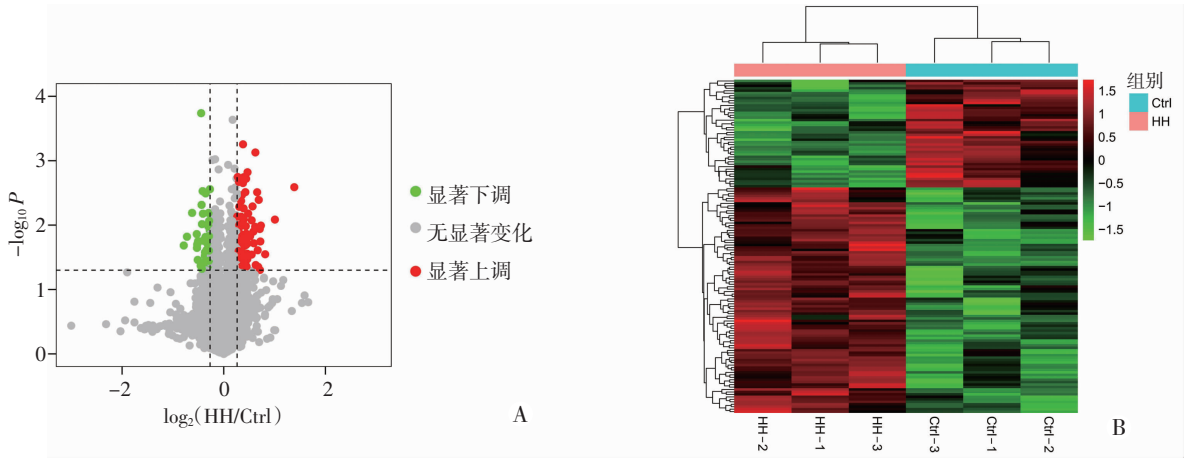
酸和酪氨酸的分布比例分别为85.6%、13.3%和1.1%。筛选至少在Ctrl组或HH组的质谱丰度值中有效值数目≥2个的数据纳入差异分析,共获得7 562个磷酸化肽段。以倍数变化>1.2倍(上调>1.2倍或者下调<0.83倍)且$P<0.05$的标准筛选得到差异表达磷酸化肽段共136个,其中上调92个,下调44个,绘制火山图(图2A)和聚类热图(图2B)。上调或下调变化倍数最大的前10个肽段序列和修饰位点信息见表1。差异表达磷酸化肽段共对应121个蛋白,其中上调79个,下调42个。111个蛋白检测到1个差异磷酸化肽段,6个蛋白检测到2个差异磷酸化肽段,3个蛋白检测到3个差异磷酸化肽段,1个蛋白检测到4个差异磷酸化肽段。检测到多个差异磷酸化肽段(≥3)的蛋白信息见表2。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与Ctrl组比较

A~C:水迷宫实验训练期小鼠逃避潜伏期、游泳距离、游泳速度的比较;D~H:水迷宫实验测试期小鼠逃避潜伏期、游泳距离、穿越平台次数、游泳速度、目标象限停留时间的比较

图1　水迷宫实验检测低压低氧对小鼠学习和空间记忆能力的影响　($n=11$, $\bar{x}\pm s$)



A:差异表达磷酸化肽段绘制的火山图　每个点代表一个磷酸化肽段,与Ctrl组比较,红色代表表达显著上调的磷酸化肽段,绿色代表表达显著下调的磷酸化肽段,灰色代表表达无显著差异的磷酸化肽段;B:差异表达磷酸化肽段绘制的聚类热图　色阶代表磷酸化肽段表达量,与Ctrl组比较,红色代表相对高表达,绿色代表相对低表达

图2　差异表达磷酸化肽段火山图和聚类热图

表 1 上调或下调变化倍数最大的前 10 个磷酸化修饰肽段序列和修饰位点信息

肽段序列	数据库编号	蛋白名称	编码基因	在肽段中的修饰位点	在蛋白中的修饰位点	*P* 值	HH/Ctrl
SQsSQRGEDGAK	Q920P5	Adenylate kinase isoenzyme 5	*Ak5*	S3	S503	0.002 6	2.616 1
HNsLHR	Q6PEV3	WAS/WASL-interacting protein family member 2	*Wipf2*	S3	S282	0.008 2	2.009 3
EttGSESDGGDSSSTK	Q8R550	SH3 domain-containing kinase-binding protein 1	*Sh3kbp1*	T2; T3	T222; T223	0.028 3	1.759 4
GYsFTTTAEREIVR	P63260	Actin, cytoplasmic 2	*Actg1*	S3	S199	0.010 2	1.659 5
NLTSSsLNDISDKPEKDQLK	O88343	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	Slc4a4	S6	S257	0.018 0	1.647 1
EIHDVAGDGDsLGSPGPTR SPSLGNVPNTPASTISAR	Q80U49	Centrosomal protein of 170 kDa protein B	*Cep170b*	S11	S1338	0.049 7	1.637 8
sRsGPsSPR	Q8C115	Pleckstrin homology domain-containing family H member 2	*Plekhh2*	S1; S3; S6	S642; S644; S647	0.011 5	1.634 5
NLTSSsLNDISDKPEK	O88343	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	Slc4a4	S6	S257	0.004 1	1.611 9
EGsLGDELLPLGYAEPEP QEGASAGAPsPTLELASR	Q6WVG3	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	*Kctd12*	S3; S28	S153; S178	0.044 5	1.599 6
ARQsSEDVR	Q03145	Ephrin type-A receptor 2	*Epha2*	S4	S571	0.024 6	1.588 4
GSDNDSDsGSDGGGQR	Q8K2T8	RNA polymerase Ⅱ-associated factor 1 homolog	*Paf1*	S8	S484	0.020 7	0.579 6
RAsSESDsDDNQNK	Q62018	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	*Ctr9*	S3; S8	S1052; S1057	0.015 1	0.605 7
GSDNDSDsGsDGGGQR	Q8K2T8	RNA polymerase Ⅱ-associated factor 1 homolog	*Paf1*	S8; S10	S484; S486	0.006 5	0.649 5
DSGLEDGREsPsFDTPSQR	Q5DTL9	Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger	*Slc4a10*	S10; S12	S89; S91	0.013 8	0.692 2
TsSTVNTK	Q8BTY2	Sodium bicarbonate cotransporter 3	*Slc4a7*	S2	S30	0.022 6	0.694 1
SGSAHGsGK	P62996	Transformer-2 protein homolog beta	*Tra2b*	S7	S26	0.019 9	0.696 3
ASQDTEDEESGASGSDSGs PAR	Q8K3W3	Protein CASC3	*Casc3*	S19	S27	0.034 7	0.701 7
SSLsSAQADFNQLAELDR	P16546	Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1	*Sptan1*	S4	S2141	0.017 8	0.704 9
SVsEDSPLGYSHTEGNSR	Q3UQI9	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase MINDY-4	*Mindy4*	S3	S340	0.042 9	0.730 6
KLAAGAEsPQPASGNsPS EDDRSK	P16054	Protein kinase C epsilon type	*Prkce*	S8; S16	S329; S337	0.040 7	0.732 4

“数据库编号”为 Uniprot 数据库中蛋白的 ID;“蛋白名称”为 Uniprot 数据库中的蛋白名称;“*P* 值”为两组间 *t* 检验的 *P* 值;HH/Ctrl 为该磷酸化肽段的质谱检测值在 HH 组和 Ctrl 组之间的差异表达倍数

2.3 差异磷酸化肽段对应蛋白的 GO 富集分析

对上述差异表达磷酸化肽段对应的蛋白进行 GO 富集分析,每个 GO 分类中富集最显著的前 10 个条目如图 3 所示。在生物过程(biological process, BP)富集分析中,*P* 值最小即富集最显著的生物学过程是蛋白质定位到突触和蛋白质定位到细胞连接,富集因子最高的生物学过程是组蛋白 H2B 泛素化,涉及差异磷酸化蛋白数量最多的生物学过程是细胞连接组装和突触构成。分子功能(molecular function, MF)富集分析结果显示,无机阴离子交换活性是富集最显著同时也是富集因子最高的 MF 条目,肌动蛋白结合和 mRNA 结合是涉及差异磷酸化蛋白数量最多的 MF 条目。细胞成分(cellular component, CC)富集分析结果显示,上述差异磷酸化蛋白主要定位于突触后密集区、非对称性突触、基底细胞膜、微管等部位。

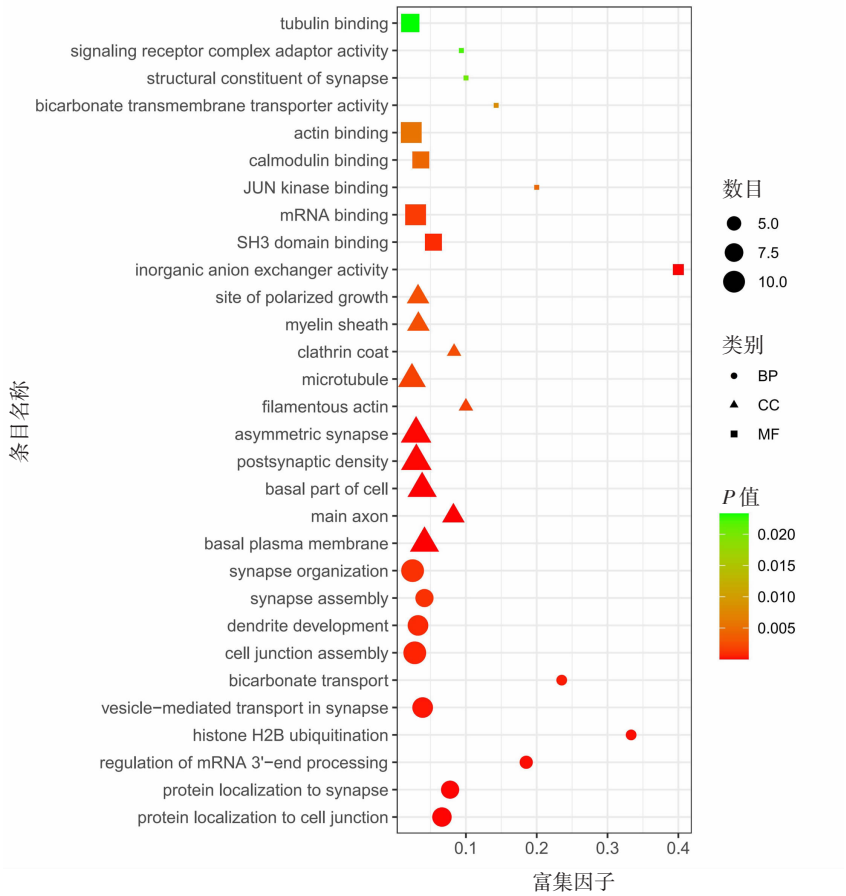
2.4 差异磷酸化肽段对应蛋白的 KEGG 通路富集分析

对上述差异表达磷酸化肽段对应的蛋白进行 KEGG 通路分析,富集最显著的前 15 条通路如图 4 所示。差异磷酸化蛋白主要参与到胰岛素分泌、胰液分泌、谷氨酸能突触、内吞作用等信号通路,其中 *P* 值最小即富集最显著且富集因子最高的信号通路是胰岛素分泌,涉及差异磷酸化蛋白数量最多的信号通路是内吞作用。

表 2 检测到多个差异磷酸化肽段(≥3)的蛋白信息

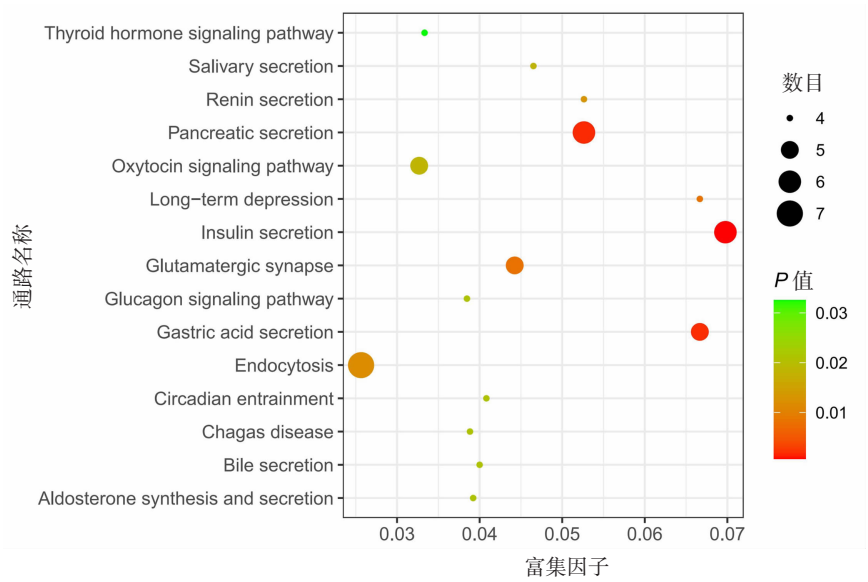
肽段序列	数据库编号	蛋白名称	编码基因	在肽段中的修饰位点	在蛋白中的修饰位点	*P* 值	HH/Ctrl
GMYDGPVFDLTTtPKGGtPAGSTR	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	*Dpysl3*	T13; T18	T509; T514	0.005 1	1.481 2
GMYDGPVFDLTTtPKGGtPAGsTR GSPTRPNPPVR	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	*Dpysl3*	T13; T18; S22	T509; T514; S518	0.001 8	1.310 6
GGTPAGsTR	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	*Dpysl3*	S7	S518	0.000 6	1.300 6
GGTPAGsTRGsPTRPNPPVR	Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	*Dpysl3*	S7; S11	S518; S522	0.043 6	1.202 9
TVTPAssAK	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	*Dpysl2*	S6; S7	S517; S518	0.019 3	1.383 1
TVTPASSAKtsPAK	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	*Dpysl2*	T10; S11	T521; S522	0.037 0	1.348 0
GLYDGPVCEVSVtPKTVTPAssAK	O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	*Dpysl2*	T13; S21; S22	T509; S517; S518	0.032 6	1.299 3
TASGSSVTSLEGTRsR	Q62433	Protein NDRG1	*Ndrg1*	S15	S342	0.003 4	1.280 8
SRtAsGSSVTSLEGTR	Q62433	Protein NDRG1	*Ndrg1*	T3; S5	T328; S330	0.007 4	1.268 6
TASGSsVTsLEGTR	Q62433	Protein NDRG1	*Ndrg1*	S6; S9	S333; S336	0.031 1	1.255 1
NLTSSsLNDISDKPEKDQLK	O88343	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	*Slc4a4*	S6	S257	0.018 0	1.647 1
NLTSSsLNDISDKPEK	O88343	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	*Slc4a4*	S6	S257	0.004 1	1.611 9
KGSLDsDNDDsDCPYSEK	O88343	Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1	*Slc4a4*	S6; S11	S1029; S1034	0.017 4	1.352 8

数据库编号为 Uniprot 数据库中蛋白的 ID;蛋白名称为 Uniprot 数据库中的蛋白名称;*P* 值为两组间 *t* 检验的 *P* 值;HH/Ctrl 为该磷酸化肽段的质谱检测值在 HH 组和 Ctrl 组之间的差异表达倍数



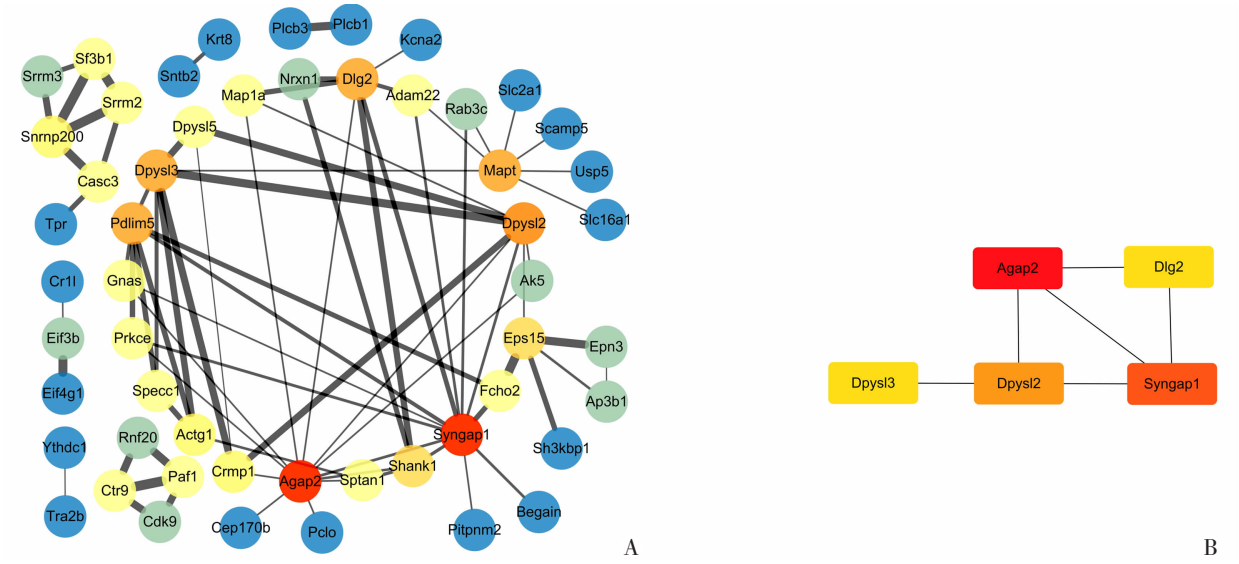
正方形、三角形和圆形分别代表 MF、CC 和 BP 3 个 GO 条目类别;图形的大小代表富集到该条目的蛋白数目的多少,图形越大代表蛋白数量越多;图形的颜色代表 *P* 值大小,颜色越接近红色代表 *P* 值越小,差异越显著

图 3 差异磷酸化肽段对应蛋白的 GO 富集分析



图形符号的大小代表富集到该通路的蛋白数目的多少,图形符号越大代表富集到该通路的蛋白数量越多;图形符号的颜色代表校正后的 *P* 值大小,图形符号的颜色越接近红色代表 *P* 值越小,差异越显著

图 4 差异磷酸化肽段对应蛋白的 KEGG 通路富集分析



A:差异磷酸化肽段对应蛋白的 PPI 网络图 每个圆形代表一个蛋白质,颜色代表与其相互作用的蛋白质数目,圆形颜色越接近红色代表与其相互作用的蛋白质数目越多;两个圆形之间的连线代表蛋白质之间存在直接相互作用,连线的粗细代表相互作用的可信程度,连线越粗代表相互作用越可信; B:Top 5 核心蛋白网络 每个长方形代表一个蛋白质,两个长方形之间的连线代表蛋白质之间存在直接相互作用,图形颜色代表其 MCC 得分的大小,越接近红色,MCC 得分越大

图 5 差异磷酸化肽段对应蛋白的互作网络

2.5 差异磷酸化肽段对应蛋白 PPI 网络构建与分析

通过 String 11.0 对差异表达磷酸化肽段对应的 121 个蛋白质进行 PPI 网络构建,使用 CytoScape 3.7.1 软件对得到的互作网络进行可视化,使用 CytoScape 软件的 cytoHubba 插件中的 MCC 算法筛选核心蛋白,具体结果如图 5A 所示。高度聚集的蛋白质可能具有相同或相似的功能,连接度高的蛋白质可能是影响整个系统代谢或信号转导途径的关键点。我们将 MCC 算法得分排名前五的蛋白定义为核心蛋白,筛选到 *Agap2*、*Syngap1*、*Dpysl2*、*Dpysl3* 和 *Dlg2* 共 5 个核心基因编码的蛋白(图 5B)。这些核心蛋白的名称、编码基因见表 3。

表 3 通过 cytoHubba 插件筛选出的核心蛋白信息

数据库编号	蛋白名称	编码基因	MCC 得分
Q3UHD9	Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	*Agap2*	24
F6SEU4	Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP	*Syngap1*	23
O08553	Dihydropyrimidinase-related protein 2	*Dpysl2*	15
Q62188	Dihydropyrimidinase-related protein 3	*Dpysl3*	13
Q91XM9	Disks large homolog 2	*Dlg2*	13

“数据库编号”为 Uniprot 数据库中蛋白的 ID;“蛋白名称”为 Uniprot 数据库中的蛋白名称;MCC 得分采用 cytoHubba 插件中的 MCC 算法计算

3 讨论

高原低压低氧是威胁进入高原人员健康的最主要环境因素。大脑对缺氧十分敏感,高原低压低氧可引起人的学习、记忆功能受损[1,14],在动物实验也得到类似结果[6-7]。高原低压低氧暴露致记忆损伤的发生机制较为复杂,与氧化应激、钙超载、兴奋性神经递质毒性和神经炎症等有关[15]。目前针对低压低氧导致的认知功能损伤仍缺乏有效的干预措施,原因在于我们对其发生机制的理解尚不全面。本研究通过建立模拟高原环境低压低氧暴露致小鼠记忆损伤模型,采用磷酸化蛋白质组学技术,筛选了小鼠脑海马组织差异磷酸化修饰蛋白,提高了对模拟高原暴露时脑海马体蛋白质磷酸化修饰改变的整体认识。Morris 水迷宫实验结果显示,低压低氧暴露后小鼠空间记忆能力显著下降,提示记忆损伤模型造模成功。磷酸化蛋白组学结果显示,低压低氧处理后有 79 个蛋白存在磷酸化修饰明显上调的位点,42 个蛋白存在磷酸化修饰明显下调的位点,提示低压低氧组和常氧组小鼠脑海马蛋白磷酸化谱之间存在明显差异。

GO 富集分析结果显示,上述差异磷酸化修饰蛋白分布在突触后密集区、非对称性突触和基底细胞膜等细胞组分,主要发挥肌动蛋白结合、mRNA 结合、SH3 结构域结合、钙调素结合等分子功能,主要参与细胞连接组装、突触构成、突触中囊泡介导的运输、树突发育、认知等生物学过程。突触是神经元之间在功能上发生联系的部位,也是信息传递的关键部位。低氧暴露大鼠海马组织电镜观察的结果显示,低氧暴露可导致突触数量减少和突触结构发生改变,表现为突触的界面小,突触间隙模糊不清[16]。此外,低氧可通过诱导某些离子通道的表达增加来调节突触的可塑性,进而参与低压低氧导致的学习记忆损伤[17]。近来研究显示,组蛋白修饰可通过调节突触形成和突触可塑性参与记忆的形成与巩固[18]。本研究显示低压低氧引起的差异磷酸化修饰蛋白在多条组蛋白修饰相关的生物学过程显著富集,包括组蛋白 H2B 泛素化、组蛋白单泛素化和组蛋白甲基化正调控等。定位于突触的多个蛋白磷酸化水平在低压低氧后发生了明显变化,这些蛋白也多参与突触功能调控相关的生物学过程,提示突触结构改变和(或)功能障碍是急性高原缺氧引起记忆损伤的重要原因。

KEGG 通路富集分析显示,上述差异磷酸化修饰蛋白在某些与认知相关的信号通路显著富集,包括谷氨酸能突触、长时程抑制、内吞作用以及钙信号途径等。低氧引起的能量代谢改变导致大脑中 ATP 产生减少和 ROS 产生增加,进而引起细胞膜去极化、细胞钙超载以及细胞外兴奋性谷氨酸积累等不利事件的发生[15]。缺氧处理海马 CA1 锥体神经元 20 min 可引起谷氨酸 AMPAR 的 GluA1 和 GluA2 亚基在细胞表面表达降低。这种降低与网格蛋白介导的内吞作用有关[19]。缺乏 GluA2 亚基的 AMPAR 具有 Ca^{2+} 通透性,可导致兴奋性毒性[20]。此外,本研究发现差异磷酸化蛋白在胰岛素分泌信号通路显著富集。胰岛素信号可能通过影响神经递质合成和能量代谢参与调控认知功能。大脑胰岛素/胰岛素受体失调和胰岛素信号级联被报道与阿尔茨海默病的发病机制有关,影响脑认知功能[21]。在 PC12 细胞中,胰岛素被报道可以通过 HIF1α 和核受体 Nur77 促进酪氨酸羟化酶的表达,酪氨酸羟化酶是脑内神经递质多巴胺合成的限速酶[22]。葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1)是显著富集的胰岛素分泌信号通路中的一个蛋白。该蛋白是一种在脑组织中高表达的葡萄糖转运体,GLUT1 某些位点的磷酸化修饰对于调控其葡萄糖摄取速度和细胞表面定位具有重要作用[23]。本研究显示,低压低氧

处理后有一个来源于 GLUT1 蛋白的磷酸化肽段出现明显上调。胰岛素在脑内的非代谢功能主要与脑血管生成有关,血管生成通路中参与激活 HIF 的 PI3K 和 MAPK 通路可被胰岛素信号通路激活,PI3K 和 MAPK 通路可能在脑内胰岛素信号通路和血管生成通路之间起交互作用[24]。

PPI 网络分析筛选出由 *Agap*2 基因编码的 Arf 类 GTP 酶激活蛋白 2(Arf-GAP with GTPase, ANK repeat and PH domain-containing protein 2, AGAP2)、由 *Syngap*1 基因编码的突触 Ras/Rap GTP 酶激活蛋白 1(Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP, SYNGAP1)、由 *Dpysl*2 基因编码的二氢嘧啶酶相关蛋白 2(dihydropyrimidinase-related protein 2, DRP2)、由 *Dpysl*3 基因编码的二氢嘧啶酶相关蛋白 3(dihydropyrimidinase-related protein 3, DRP3)和由 *Dlg*2 基因编码的圆盘大同源物 2(disks large homolog 2, DLG2)共 5 个核心蛋白。AGAP2 蛋白是控制 PI3K/Akt 信号通路激活的重要分子开关。它将轴突导向因子、谷氨酸和神经营养因子等细胞外刺激与 PI3K/Akt 的内在活性连接起来[25]。低氧可通过上调 AGAP2 的表达来激活粘附斑激酶,进而增加 HIF1α 的表达[26]。SYNGAP1 蛋白是兴奋性谷氨酸神经元突触后致密区的重要组成部分,通过负调控 Ras、Rap 和 AMPAR 转运至突触后膜,以调节突触可塑性和神经元稳态。人类 SYNGAP1 基因的突变被证明与神经发育障碍有关,例如自闭症和精神分裂症[27]。SYNGAP1 能被低氧引起的钙超载和钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(calcium-calmodulin dependent protein kinase Ⅱ, CaMKⅡ)激活,其可通过激活 Ras 的 GTPase 活性抑制 Ras-ERK 通路,抑制 CaMKⅡ/SAP102/SynGAP 信号通路能够改善慢性间歇缺氧引起的大鼠学习记忆损伤[28]。CaMKⅡ和细胞周期依赖性蛋白激酶 5 对 SYNGAP1 的差异磷酸化能够改变突触中激活的 Ras 和 Rap 的比例,进而影响由这两种 GTPases 调控的细胞过程[29]。DRP2 蛋白和 DRP3 蛋白均属于坍塌反应调节蛋白家族成员,在轴突导向、延伸和特化中发挥作用[30]。去磷酸化状态为 DRP2 蛋白的活性形式,其磷酸化后即失去调节神经突起生长的活性[31]。在 AD 患者及 AD 小鼠模型中均观察到 DRP2 的过度磷酸化,使用基因干预或是抑制剂干预等手段抑制 DRP2 的磷酸化能够减轻某些神经退行性疾病小鼠模型的病理损伤和改善认知功能[30-31]。DRP3 蛋白的过度磷酸化在某些神经损伤小鼠疾病模型中被观察到,*Dpysl*3 基因敲除能够减轻神经炎症[32-33]。DLG2 蛋白也被叫做突触后致密部蛋白 93(postsynaptic density protein, PSD93),属于膜相关鸟苷酸激酶(membrane associated guanylate kinase, MAGUK)家族[34]。MAGUKs 的主要功能是结合并稳定突触上的蛋白质,能够调节突触上谷氨酸受体的表达[35]。PSD93 可通过 NMDAR/nNOS 信号通路参与 NMDAR 引发的神经毒性[36]。鉴于上述蛋白在认知功能调控中的重要作用,它们可能在低压低氧导致的认知功能损伤中具有一定作用。目前,关于上述蛋白的磷酸化修饰在低压低氧导致的认知功能损伤中的作用相关研究报道较少,低压低氧引起海马组织中这些蛋白磷酸化修饰水平发生改变的生物学意义有待进一步研究。

综上所述,本研究发现低压低氧暴露后,小鼠空间记忆功能下降,小鼠脑海马体 79 个蛋白存在磷酸化修饰显著上调的位点,42 个蛋白存在磷酸化修饰显著下调的位点。上述差异磷酸化蛋白主要定位于突触相关的细胞结构,多参与神经递质释放、内分泌功能调节、突触功能调节等相关的信号通路。蛋白质互作分析结果显示,AGAP2、SYNGAP1、DRP2、DRP3 和 PSD93 可能是缺氧引起记忆损伤的关键蛋白。本研究结果对进一步了解高原低氧以及缺氧相关疾病引起记忆损伤的机制、寻找干预靶点,从而提高高原环境下的记忆功能、改善临床脑缺氧性疾病预后具有一定意义。

参考文献:

[1] ZHANG G, ZHOU S M, YUAN C, *et al*. The effects of short-term and long-term exposure to a high altitude hypoxic environment on neurobehavioral function[J]. High Alt Med Biol, 2013, 14(4): 338-341. DOI: 10.1089/ham.2012.1091.

[2] XU G, SHI Y K, SUN B D, *et al*. DL-3-n-butylphthalide improved physical and learning and memory performance of rodents exposed to acute and chronic hypobaric hypoxia[J]. Mil Med Res, 2021, 8(1): 23. DOI: 10.1186/s40779-021-00314-7.

[3] KILLIAN N J, JUTRAS M J, BUFFALO E A. A map of visual space in the primate entorhinal cortex[J]. Nature, 2012, 491(7426): 761-764. DOI: 10.1038/nature11587.

[4] JACOBS J, WEIDEMANN C T, MILLER J F, *et al*. Direct recordings of grid-like neuronal activity in human spatial navigation[J]. Nat Neurosci, 2013, 16(9): 1188-1190. DOI: 10.1038/nn.3466.

[5] 张艺元, 朱楠, 杨佳佳, 等. 空间记忆中海马神经元集群的序列编码特性与机制研究进展[J]. 生理学报, 2020, 72(6): 793-803. DOI: 10.13294/j.aps.2020.0081.

ZHANG Y Y, ZHU N, YANG J J, *et al*. Progress in the encoding characteristics and mechanisms of hippocampal neural assemble sequences in spatial memory[J]. Acta Physiol Sin, 2020, 72(6): 793-803. DOI: 10.13294/j.aps.2020.0081.

[6] ZHOU Y, LU H, LIU Y, *et al*. Cirbp-PSD95 axis protects against hypobaric hypoxia-induced aberrant morphology of hippocampal dendritic spines and cognitive deficits[J]. Mol Brain, 2021, 14(1): 129. DOI: 10.1186/s13041-021-00827-1.

[7] ZHENG H, SU Y, SUN Y, *et al*. Echinacoside alleviates hypobaric hypoxia-induced memory impairment in C57 mice [J]. Phytother Res, 2019, 33(4): 1150-1160. DOI: 10.1002/ptr.6310.

[8] COHEN P. The origins of protein phosphorylation[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(5): E127-E130. DOI: 10.1038/ncb0502-e127.

[9] WANG C, YAN M, JIANG H, *et al*. Mechanism of aquaporin 4 (AQP 4) up-regulation in rat cerebral edema under hypobaric hypoxia and the preventative effect of puerarin[J]. Life Sci, 2018, 193: 270-281. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.10.021.

[10] CAI J, RUAN J Y, SHAO X, *et al*. Oxygen enrichment mitigates high-altitude hypoxia-induced hippocampal neurodegeneration and memory dysfunction associated with attenuated tau phosphorylation[J]. High Alt Med Biol, 2021, 22(3): 274-284. DOI: 10.1089/ham.2020.0218.

[11] WU T, HU E, XU S, *et al*. clusterProfiler 4.0: a universal enrichment tool for interpreting omics data[J]. Innovation (N Y), 2021, 2(3): 100141. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100141.

[12] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, *et al*. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(d1): D607-D613. DOI: 10.1093/nar/gky1131.

[13] SMOOT M E, ONO K, RUSCHEINSKI J, *et al*. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization[J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 431-432. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq675.

[14] LI P, ZHANG G, YOU H Y, *et al*. Training-dependent cognitive advantage is suppressed at high altitude[J]. Physiol Behav, 2012, 106(4): 439-445. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.03.002.

[15] WANG X Y, CUI L L, JI X M. Cognitive impairment caused by hypoxia: from clinical evidences to molecular mechanisms[J]. Metab Brain Dis, 2021: 1-16. DOI: 10.1007/s11011-021-00796-3.

[16] 薛忠星. 低氧和运动训练对大鼠学习记忆的影响及其与海马突触可塑性的关系[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
XUE Z X. The effect of hypoxia and exercise training on learning and memory and its relationship to hippocampal synaptic plasticity in rats[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014.

[17] KUSHWAH N, JAIN V, DHEER A, *et al*. Hypobaric hypoxia-induced learning and memory impairment: elucidating the role of small conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels[J]. Neuroscience, 2018, 388: 418-429. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.07.026.

[18] GENG H X, CHEN H Y, WANG H Y, *et al*. The histone modifications of neuronal plasticity[J]. Neural Plast, 2021, 2021: 6690523. DOI: 10.1155/2021/6690523.

[19] QIN X, ZAKI M G, CHEN Z, *et al*. Adenosine signaling and clathrin-mediated endocytosis of glutamate AMPA receptors in delayed hypoxic injury in rat hippocampus: role of casein kinase 2[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(5): 1932-1951. DOI: 10.1007/s12035-020-02246-0.

[20] NOH K M, YOKOTA H, MASHIKO T, *et al*. Blockade of calcium-permeable AMPA receptors protects hippocampal neurons against global ischemia-induced death[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(34): 12230-12235. DOI: 10.1073/pnas.0505408102.

[21] MECHLOVICH D, AMIT T, BAR-AM O, *et al*. The novel multi-target iron chelator, M30 modulates HIF-1α-related glycolytic genes and insulin signaling pathway in the frontal cortex of APP/PS_1 Alzheimer's disease mice[J]. Curr Alzheimer Res, 2014, 11(2): 119-127. DOI: 10.2174/1567205010666131212112529.

[22] FIORY F, MIRRA P, NIGRO C, *et al*. Role of the HIF-1α/Nur77 axis in the regulation of the tyrosine hydroxylase expression by insulin in PC12 cells[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11861-11870. DOI: 10.1002/jcp.27898.

[23] LEE E E, MA J, SACHARIDOU A, *et al*. A protein kinase C phosphorylation motif in GLUT1 affects glucose transport and is mutated in GLUT1 deficiency syndrome[J]. Mol Cell, 2015, 58(5): 845-853. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.04.015.

[24] ZENG Y, ZHANG L, HU Z. Cerebral insulin, insulin signaling pathway, and brain angiogenesis[J]. Neurol Sci, 2016, 37(1): 9-16. DOI: 10.1007/s10072-015-2386-8.

[25] CHAN C B, LIU X, ZHAO L, *et al*. PIKE is essential for oligodendroglia development and CNS myelination[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(5): 1993-1998. DOI: 10.1073/pnas.1318185111.

[26] YU L, GUI S, LIU Y, *et al*. Long intergenic non-protein coding RNA 00475 silencing Acts as a tumor suppressor in glioma under hypoxic condition by impairing microRNA-449b-5p-dependent AGAP2 up-regulation[J]. Ther Adv Med Oncol, 2020, 12: 1758835920940936. DOI: 10.1177/1758835920940936.

[27] GAMACHE T R, ARAKI Y, HUGANIR R L. Twenty years of SynGAP research: from synapses to cognition[J]. J Neurosci, 2020, 40(8): 1596-1605. DOI: 10.1523/jneurosci.0420-19.2020.

[28] HUO X L, MIN J J, PAN C Y, *et al*. Efficacy of lovastatin on learning and memory deficits caused by chronic intermittent hypoxia-hypercapnia: through regulation of NR2B-containing NMDA receptor-ERK pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94278. DOI: 10.1371/journal.pone.0094278.

[29] WALKUP W G IV, WASHBURN L IV, SWEREDOSKI M J IV, *et al*. Phosphorylation of synaptic GTPase-activating protein (synGAP) by Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ (CaMK Ⅱ) and Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) alters the ratio of its gap activity toward ras and rap GTPases[J]. J Biol Chem, 2015, 290(8): 4908-4927. DOI: 10.1074/jbc.M114.614420.

[30] MOUTAL A, WHITE K A, CHEFDEVILLE A, *et al*. Dysregulation of CRMP2 post-translational modifications drive its pathological functions[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(10): 6736-6755. DOI: 10.1007/s12035-019-1568-4.

[31] HENSLEY K, KURSULA P. Collapsin response mediator protein-2 (CRMP2) is a plausible etiological factor and potential therapeutic target in Alzheimer's disease: comparison and contrast with microtubule-associated protein tau[J]. J Alzheimers Dis, 2016, 53(1): 1-14. DOI: 10.3233/jad-160076.

[32] NAGAI J, KITAMURA Y, OWADA K, *et al*. Crmp4 deletion promotes recovery from spinal cord injury by neuroprotection and limited scar formation[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8269. DOI: 10.1038/srep08269.

[33] LI W T, GOSHIMA Y, OHSHIMA T. Loss of collapsin response mediator protein 4 attenuates 6-hydroxydopamine-induced impairments in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Neurochem Res, 2020, 45(10): 2286-2301. DOI: 10.1007/s11064-020-03086-z.

[34] ZHANG Q X, YANG H, GAO H, *et al*. PSD-93 interacts with SynGAP and promotes SynGAP ubiquitination and ischemic brain injury in mice[J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(5): 1137-1147. DOI: 10.1007/s12975-020-00795-z.

[35] WON S, LEVY J M, NICOLL R A, *et al*. MAGUKs: multifaceted synaptic organizers[J]. Curr Opin Neurobiol, 2017, 43: 94-101. DOI: 10.1016/j.conb.2017.01.006.

[36] RONG R, YANG H, RONG L, *et al*. Proteomic analysis of PSD-93 knockout mice following the induction of ischemic cerebral injury[J]. Neurotoxicology, 2016, 53: 1-11. DOI: 10.1016/j.neuro.2015.12.005.

(收稿:2021-09-22;修回:2021-10-22)

(编辑 栾 嘉)