

高原低氧应激导致小鼠肌肉组织核糖体蛋白表达下调

但怡¹ 董新强^{1,2} 李洪昌^{1*} 张令强^{1*}

(¹军事医学研究院, 北京 100850; ²河北大学, 生命科学学院, 保定 071002)

摘要 人体在高原低氧环境中肌肉质量下降, 肌肉质量与运动能力高度相关, 因此探究高原低氧环境对肌肉的影响及其机制非常必要。该研究模拟5 000 m海拔高度, 连续饲养3天, 构建高原低氧小鼠模型, 通过DIA无标定量蛋白质组学技术分析高原环境对小鼠骨骼肌蛋白表达的影响, 探究高原低氧环境中小鼠肌肉组织蛋白变化特征。通过生物信息学方法筛选差异蛋白, 进行富集分析, 结果如下: 蛋白质组分析共鉴定2 717个蛋白质, 以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 为标准, 共筛选出339个差异蛋白, 其中193个蛋白显著上调, 146个蛋白显著下调。GO分析显示, 差异蛋白主要参与核糖体结构组成、电子转移活性等生物过程; KEGG分析发现细胞中的肌萎缩侧索硬化症、核糖体等信号通路出现异常。对下调的差异蛋白进行分析后发现, 此部分蛋白显著富集于核糖体, Western blot检测证实核糖体蛋白表达下调。该研究解析了高原低氧环境对肌肉组织蛋白表达的影响, 进一步发掘了核糖体的生物合成和能量产生可能是影响高原环境下肌肉组织功能的关键途径, 为改善机体在高原环境下的适应以及运动训练提供了新的理论基础。

关键词 高原低氧; 肌肉组织; 蛋白质组学; 核糖体

High-Altitude Hypoxia Stress Leads to Down-Regulation of Ribosomal Protein Expression in Mouse Muscle Tissue

DAN Yi¹, DONG Xinqiang^{1,2}, LI Hongchang^{1*}, ZHANG Lingqiang^{1*}

(¹Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; ²College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract Human physical performance declines in the low-oxygen environment at high-altitude regions. Muscle mass is highly correlated with athletic performance, so it is necessary to explore the effects of high-altitude environment on muscle and their underlying mechanisms. This study constructed a hypoxic mouse model by simulating an altitude of 5 000 m and raising them for three consecutive days. The characterization protein expression of the skeletal muscle in high-altitude environments were analyzed by using DIA label-free quantitative proteomics technology. Differential proteins were screened by bioinformatics and enrichment analysis was conducted. A total of 2 717 proteins were identified by the proteome analysis. Taking $P < 0.05$ and $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ as the standards, there were a total of 339 differential proteins, among which 193 proteins were significantly up-regulated and 146 proteins were significantly down-regulated. GO analysis indicated that differentially expressed proteins were primarily involved in biological processes such as ribosomal structural assembly and electron transfer activity. KEGG analysis revealed abnormalities in signaling pathways such as amyotrophic lateral sclerosis and ribosome translation. Analysis of downregulated differentially expressed proteins revealed that this group of proteins was significantly enriched in ribosome. Western blot assay confirmed the downregulation of ribosomal protein expression. This study charac-

收稿日期: 2025-09-08 接受日期: 2025-11-10

*通信作者。Tel: 010-66931228, E-mail: lhc_lihongchang@126.com; Tel: 010-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

Received: September 8, 2025 Accepted: November 10, 2025

*Corresponding authors. Tel: +86-10-66931228, E-mail: lhc_lihongchang@126.com; Tel: +86-10-66931216, E-mail: zhanglq@nic.bmi.ac.cn

terized the protein expression of muscle tissue in high-altitude hypoxia condition, further revealing that ribosomal biosynthesis and energy conversion may be key pathways influencing muscle tissue function in high-altitude environments. It provides a new theoretical foundation for improving physiological adaptation and enhancing athletic training to high-altitude condition.

Keywords high-altitude hypoxia; muscles tissue; proteomics; ribosome

高海拔训练是目前运动员提升能力的常用辅助手段^[1]。目前存在多种训练途径, 包含低住高训、高住低训等。高原训练通过增加总血红蛋白质量、最大耗氧量提高运动员竞技表现, 但是研究表明在高海拔地区训练会对运动员的健康构成风险^[2]。短暂缺氧可能在特定的细胞过程中发挥调节作用, 例如间歇性低压缺氧暴露可提高全身氧化代谢和氧气输送的能力^[3-4]。然而, 作为对低氧的适应性反应, 研究发现慢性缺氧与骨骼肌的不利影响有关, 包括质量损失、生长障碍和再生能力丧失等^[5-6]。肌肉组织质量的获得和维持对于运动和代谢功能至关重要^[7-8], 但在低氧条件下肌肉组织的质量控制调节机制尚未完全清楚。探究肌肉响应高原低氧条件下的适应性变化, 阐述介导肌肉萎缩的信号通路及其关键调控蛋白, 有助于高原适应以及高原训练过程中维持肌肉质量。

氧气分子是线粒体氧化磷酸化过程的最终电子受体, 在细胞能量代谢中发挥不可或缺的作用, 缺氧将导致细胞能量供给由氧化磷酸化转为糖酵解。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)的发现和功能表征为缺氧细胞代谢的重编程(通常有利于糖酵解而非氧化磷酸化)提供了一种机制^[9-10]。现有研究主要将低氧条件下肌肉质量损失与功能障碍归因于线粒体密度降低、氧化还原失衡^[11-12]。研究发现, 小鼠在高原低压低氧环境应激下, 肌肉组织细胞的线粒体结构发生紊乱, 生理功能出现障碍^[13]。肌肉组织的蛋白质组分析也表明, 缺氧应激引起细胞内参与三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环、氧化磷酸化和氧化应激反应的蛋白质显著减少^[14-15], 然而具体的调节机制不清楚。从组织细胞蛋白质稳态调节的角度分析, 蛋白稳态主要受合成与降解两个过程控制。蛋白质合成是一个对代谢要求很高的过程^[16], 相对于蛋白降解, 显然蛋白质合成对细胞能量变化的响应更敏感。一项对受试志愿者的骨骼肌样本研究发现, 核糖体信号转导受损与缺氧相关条件下肌肉萎缩之间存在一定的潜在联系^[17]。我们推测机体可能通过抑制核糖体生物合

成, 增强机体对低氧环境的适应性。因此, 本研究构建高原低氧小鼠模型, 通过蛋白组学探究低氧处理下肌肉组织蛋白质表达特征, 鉴定在高原低氧条件下肌肉质量调节的关键途径和蛋白分子, 为机体高原适应和高原训练提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选择8周龄健康雄性C57小鼠24只, 体质量为(20 $\pm$ 3) g。实验动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究经军事医学研究院福利伦理委员会批准(动物实验伦理号: IACUC-DWZX-2025-533)。

1.1.2 主要试剂 TCEP(货号: C4706)、CAA(货号: 22790)、碳酸氢氨(货号: A6141)购自Sigma-Aldrich公司; Tris-Base(货号: VA15832)购自北京康润诚业生物科技有限公司; BCA蛋白定量试剂盒(货号: P0010)、磷酸酶抑制剂(货号: P1045)、脲素(货号: ST1731)购自上海碧云天生物技术有限公司; TFA(货号: 28904)购自ThermoFisher Scientific公司; Trypsin(货号: JE1001)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; RPS14单克隆抗体(货号: 67566-1-Ig)、RPL11重组抗体(货号: 84670-3-RR)、RPL7A多克隆抗体(货号: 15340-1-AP)、 β -actin单克隆抗体(货号: 60008-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -Tubulin单克隆抗体(货号: AC021)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 鼠与兔二抗均购自Jackson Immuno Research Laboratories公司。

1.2 实验方法

1.2.1 构建高原低氧小鼠模型 实验分为低氧组(3天, $n=4$; 30天, $n=4$)与常氧组($n=4$), 小鼠适应性饲养5天, 随后将低氧组小鼠放于低压低氧舱中模拟5 000 m海拔高度(氧气浓度为11.2%)分别连续饲养3天和30天, 其间12 h光照/黑暗循环, 可自由获取食物和水。在实验结束后通过颈椎脱臼对小鼠实施安乐死, 快速取组织样本并将其转移至液氮中保存, 用于后续

的实验测定。

1.2.2 蛋白质组学前处理 分别取常氧饲养小鼠,低氧处理3天的小鼠大腿骨骼肌,加入SDC裂解液,使用组织匀浆仪研磨,结束后超声以彻底裂解组织,取上清进行还原烷基化。采用BCA法进行蛋白质定量,每个样品取适量蛋白裂解液做FASP酶切,洗脱后Nanodrop测量肽段浓度,取100 µg冻干后用于后续实验。

1.2.3 蛋白质组数据采集与分析 样本上机检测将0.5 µg混和肽段溶于A液(0.1%甲酸水溶液),用A液将肽段加载于1 cm自装预柱(150 µm内径;1.9 µm C18-AQ填料并使用150 µm内径,30 cm柱长的自制分析柱(ReproSilPur C18-AQ填料;1.9 µm; Dr Maisch)进行分离。液相型号为EASYNLC1200(ThermoFisher Scientific公司),液相梯度为90 min(流动相A: 0.1%甲酸水溶液;流动相B: 0.08%甲酸、80%乙腈溶液),流速为600 nL/min(0~4 min, 7%~12%流动相B; 4~64 min, 12%~30%流动相B; 64~84 min, 30%~42%流动相B; 84~85 min, 42%~95%流动相B; 85~90 min, 95%流动相B)。质谱型号为Orbitrap Q Exactive HF(ThermoFisher Scientific公司),质谱扫描方法为正离子扫描模式,离子传输管温度设定为320 °C,喷雾电压2.2 kV。使用DIA模式采集质谱数据,具有33个固定窗口,覆盖质量范围为400~1 650 *m/z*,分辨率设置为一级120 000,二级30 000。自动增益控制(automatic gain control, AGC)一级、二级均为 3×10^6 。一级最大注入时间60 ms,二级设置为自动(auto),能量级设定为27%。质谱分析原始数据采用软件MaxQuant(2.4.7.0)搜库分析,搜索使用默认参数进行。使用UniProt小鼠蛋白质数据库检索,酶切位点设置为胰蛋白酶,半胱氨酸氨基酸烷基化为固定修饰,N-端蛋白乙酰化、甲硫氨酸氧化为可变修饰。最多允许2个漏切位点。蛋白质和肽段的假发现率(false discovery rate, FDR)均小于1%,肽段最小长度设为7个氨基酸。肽段鉴定的允许前体离子质量偏差最高为0.007 Da,允许的碎片离子质量偏差为0.02 Da。蛋白质组所有原始数据与检索结果已上传到iProX数据库(<http://www.iprox.org>),获取编号为: IPX0013649000。

1.2.4 生物信息学分析 基于质谱搜库后的蛋白质定量数据,过滤组内缺失率大于50%的蛋白,对数据进行log₂转换后进行缺失值插补。随后使用Sangerbox计算常氧与低氧组间与组内所有样本间

皮尔逊(Pearson)相关系数。在R语言的Stats(3.6.0)包中,先对表达谱进行Z-score标准化,进一步通过prcomp函数执行PCA降维,输出降维后的矩阵。使用R软件limma(3.40.6)包筛选差异蛋白,基于其线性模型分析方法统计分析常氧组与低氧组间显著差异表达的蛋白。对于差异蛋白,使用Metascape对目标蛋白进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路注释分析。STRING分析差异蛋白相互作用后通过Cytoscape绘制相互作用网络。

1.2.5 Western blot检测核糖体蛋白表达情况 取常氧、高原低氧饲养3天以及30天的小鼠骨骼肌,取一定量组织加入RIPA裂解液(50 mg/500 µL),使用组织匀浆仪充分裂解组织,于4 °C、12 000 r/min离心10 min后取上清,加入等体积的2× SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,沸水浴10 min。取10 µL样品加入12%分离胶上样孔中,并加入蛋白分子量标准作为参照;蛋白电泳参数设置为恒压120 V、1 h。转膜参数为冰浴湿转、恒流240 mA、2 h。取出NC膜用TBST洗5 min,放置于摇床上常温封闭1 h。一抗(RPS14, 1:5 000; RPL11, 1:2 000; RPL7A, 1:1 000)4 °C孵育过夜,次日以TBST洗膜,10 min/次,共3次。加入HRP标记的二抗(以1:4 000稀释)常温慢摇1 h。二抗结合后,TBST洗膜,10 min/次,共3次。膜晾干后加入ECL发光液进行曝光,使用ImageJ 2.0软件分析条带灰度值。

1.2.6 统计学分析 蛋白质组中的蛋白表达定量分析使用双尾、非配对*t*检验分析低氧与常氧组的差异。使用GraphPad Prism 10.0进行统计分析和作图,统计结果采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)展示,当 $P < 0.05$ 时具有统计学差异。

2 结果

2.1 蛋白质组学分析

蛋白质组学技术可以定量分析组织细胞内蛋白的表达差异,以便了解细胞生物过程变化。数据独立采集(data-independent acquisition, DIA)蛋白质组学技术能对样本中所有肽段进行系统性、无偏性的采集,是筛选差异分子的理想工具。PCA分析通过主成分体现数据特征,如图1所示,常氧与低氧两组明显分散,体现低氧与常氧组蛋白表达具有一定

差异。使用相关性热图表征蛋白样本的相关性, 相关性越强代表相似程度越大, 如图2所示, 计算每两个样本间所有定量蛋白表达量的Pearson相关系数后通过热图展示。

小鼠肌肉组织蛋白质组数据经前处理和质量控制共鉴定到2 717个蛋白分子。以常氧小鼠为对照进行差异分析, 取 $P<0.05$ 且 $|\log_2(\text{fold change})|\geq 1$ 为标准筛选差异蛋白。结果如图3所示, 共分析出339个差异蛋白分子, 其中193个分子显著上调, 146

个分子显著下调。

2.2 差异蛋白GO功能注释分析

差异蛋白进行GO富集分析, 如图4所示, 在分子功能(molecular function, MF)中, 差异蛋白显著富集于核糖体的结构、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸结合、电子传递、NADH脱氢酶活性、前mRNA结合等; 细胞组分(cell components, CC)集中分布于胞质核糖体、胞质大核糖体亚基、胞质小核糖体亚基、角蛋白丝、小核糖体亚基等; 在生物学过程(biological

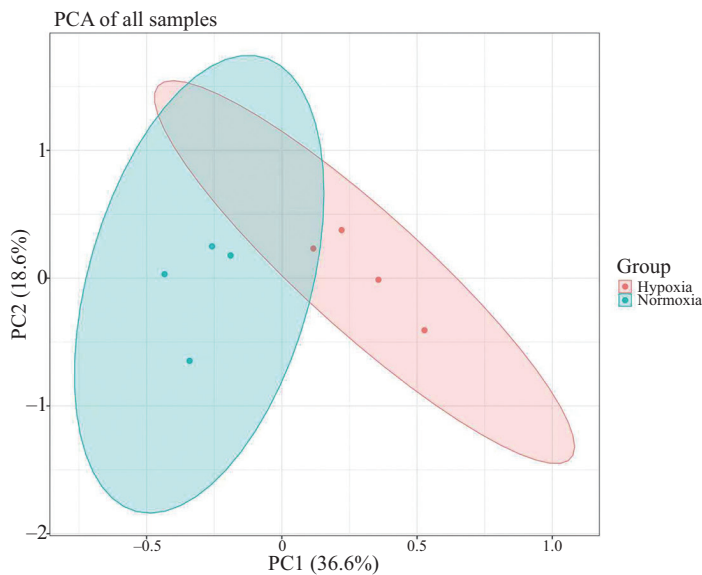


图1 PCA分析
Fig.1 PCA analysis

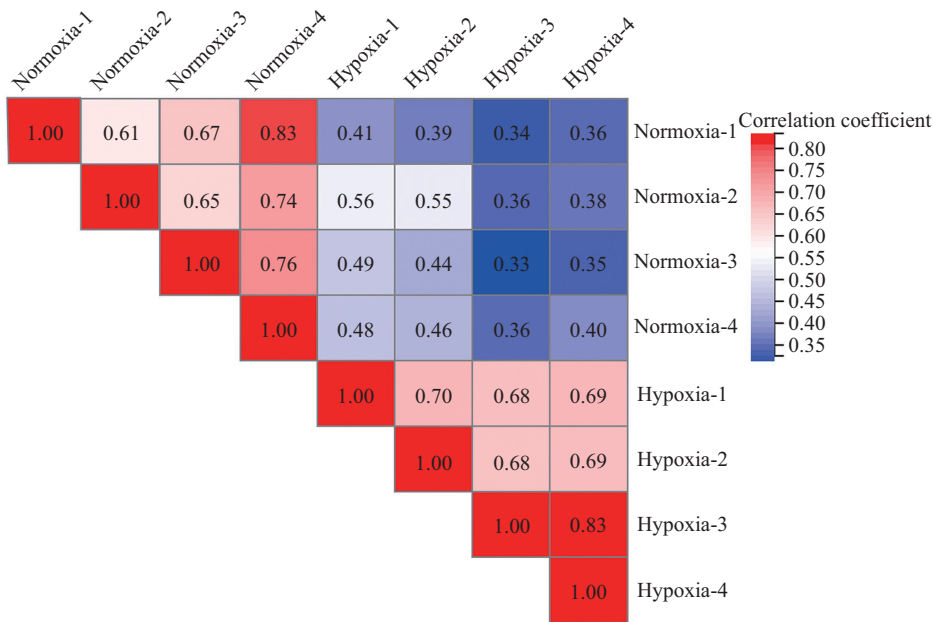


图2 相关性分析
Fig.2 Correlation analysis

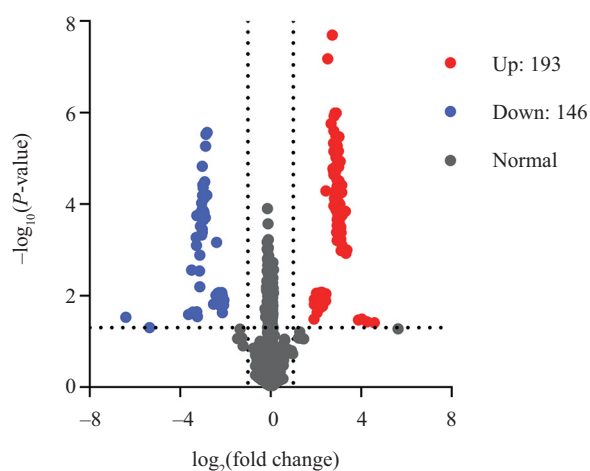


图3 火山图

Fig.3 Volcano map

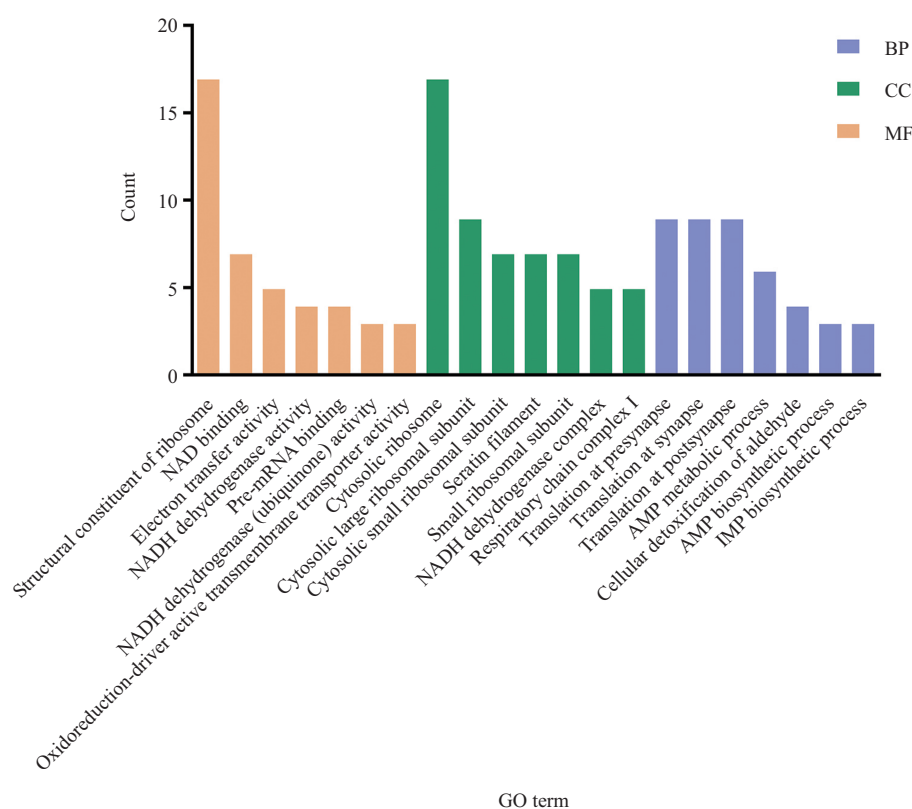


图4 差异蛋白GO功能富集分类统计图

Fig.4 GO function enrichment analysis of differentially expressed proteins

processes, BP)中, 差异蛋白主要参与突触的蛋白质翻译、单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)代谢、肌苷酸(inosine monophosphate, IMP)合成、细胞内醛解毒等过程。

2.3 差异蛋白KEGG通路注释分析

使用整体的差异蛋白进行KEGG通路富集分析, 结果如图5所示, 差异蛋白主要富集到肌萎缩侧

索硬化症、核糖体、叶酸碳池、化学致癌-活性氧、肌动蛋白细胞骨架调节、氧化磷酸化等代谢通路。

2.4 差异蛋白相互作用网络分析

使用差异蛋白构建蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络, 如图6所示, 连接度最高的差异蛋白主要为核糖体蛋白, 其次是mRNA加工以及线粒体蛋白, 表明核糖体与线粒体蛋白响应低

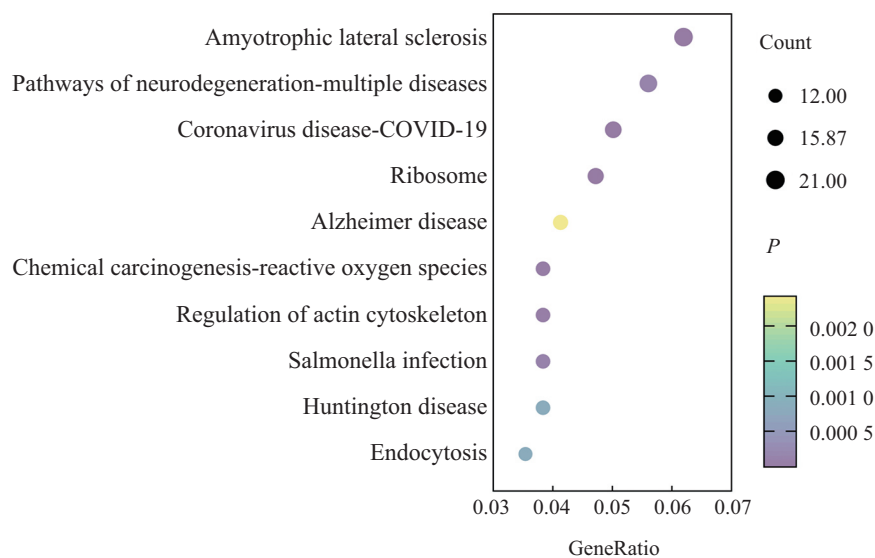


图5 差异蛋白KEGG富集分析气泡图

Fig.5 Bubble diagram of differentially expressed protein KEGG pathway enrichment

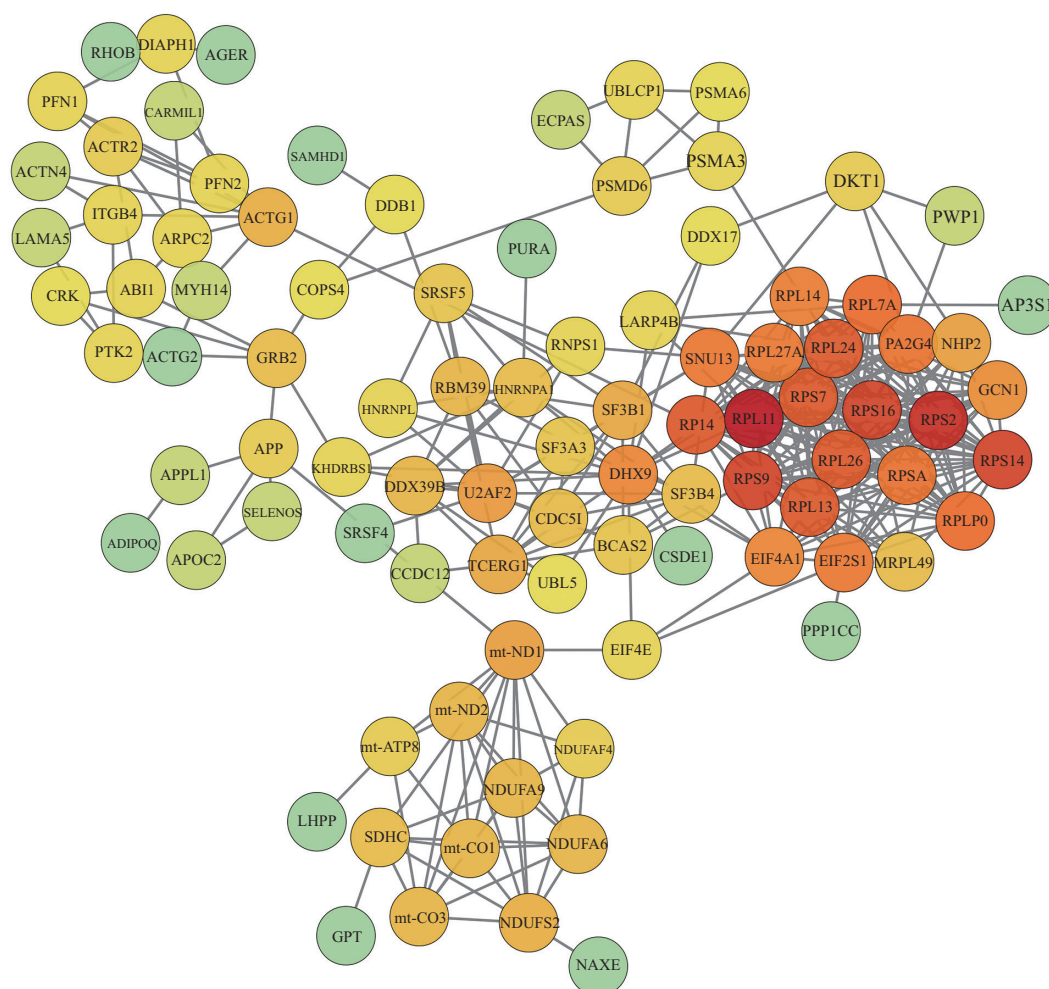


图6 差异蛋白相互作用

Fig.6 PPI analysis of differentially expressed proteins

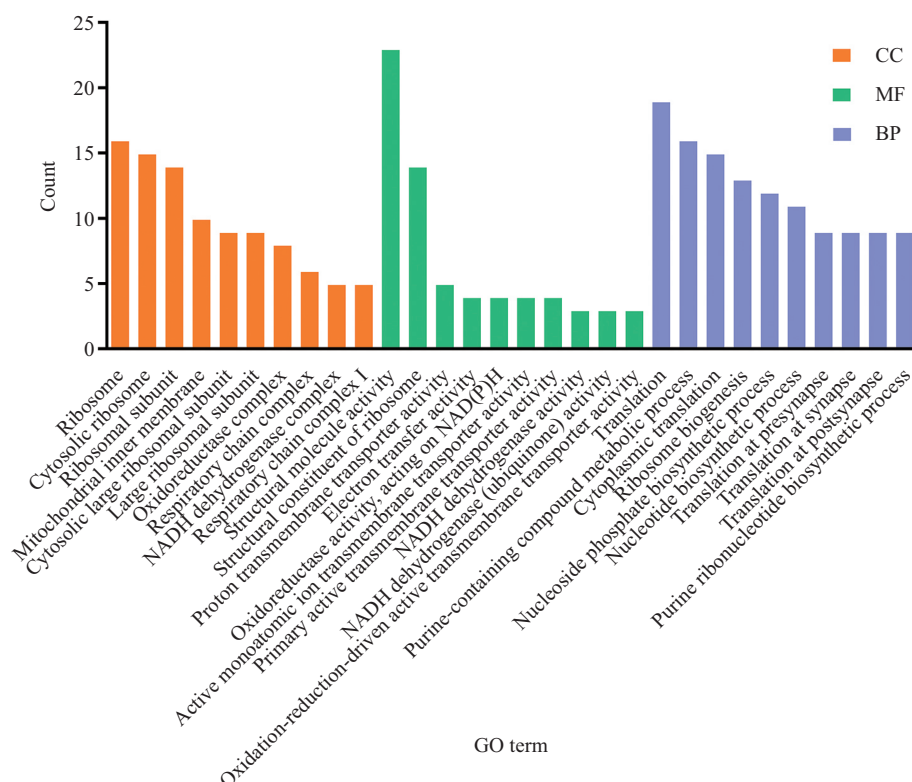


图7 下调蛋白GO功能富集分类

Fig.7 GO functional enrichment analysis of down-regulated proteins

氧胁迫。

2.5 下调蛋白GO功能注释分析

以上的分析结果显示,高原低氧引起小鼠肌肉组织蛋白质翻译以及代谢异常。由于细胞在正常状态下主要通过摄取氧气,进行氧化磷酸化产生ATP供给细胞正常活动,我们推测高原低氧环境因能量产生不足将引起细胞蛋白质翻译失衡。因此,针对高原低氧处理后表达水平下降的蛋白分子,选取 $P < 0.05$ 且fold change < 0.5 的蛋白质进行GO富集分析。如图7所示,在细胞组分中,表达下调的蛋白集中分布于核糖体与线粒体,前十条富集条目中与核糖体有关的细胞组分有核糖体、胞质核糖体、核糖体亚基、核糖体大亚基、胞质大核糖体亚基;与线粒体有关的组分包含线粒体内膜、氧化还原酶复合物、呼吸链复合体、NADH脱氢酶复合物、呼吸链复合体I。在分子功能中,表达下调蛋白显著富集于结构分子活性、核糖体结构成分等条目,前十条通路中存在三条通路与线粒体能量代谢有关,分别为质子跨膜转运活性通路、NADH脱氢酶(泛醌)活性通路、氧化还原驱动的活性跨膜转运蛋白活性通路。在生物学过程中,表达下调的蛋白主要参与蛋

白质翻译、含嘌呤的复合代谢过程、核糖体生物发生过程。核糖体生物发生途径的蛋白下调,可能是导致核糖体蛋白减少的直接因素。

2.6 下调蛋白KEGG通路注释分析

针对下调蛋白进行KEGG细胞通路富集分析,结果如图8所示,低氧条件下核糖体与代谢通路最为显著,且富集蛋白质数量最多。

2.7 下调蛋白相互作用网络分析

分析下调蛋白分子间相互作用,并构建相互作用网络,图9表明连接度较高的蛋白聚焦于细胞中的核糖体和线粒体。这提示在低氧条件下,细胞中线粒体与核糖体存在动态交互,协同适应低氧胁迫。

2.8 富集分析中重要通路信息

聚焦于KEGG与GO富集分析中CC、MF、BP中最显著的前三条通路,如表1所示,列出具体参与通路的蛋白质名称。经相关文献检索,结合GO功能、KEGG代谢通路与下调蛋白相互作用结果,选出RPS14、RPL11、RPL7A 3个核糖体亚基蛋白进行蛋白水平表达验证。Western blot结果显示,不论是短时间的急性适应阶段(3天),还是长时间的慢性适应阶段(30天),低氧应激后小鼠肌肉组织的RPS14、

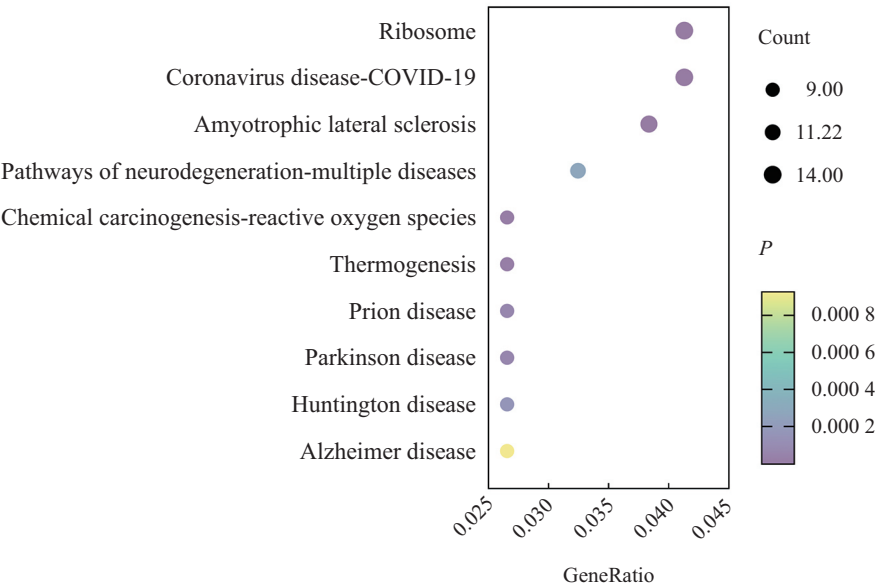


图8 下调蛋白KEGG通路富集气泡图

Fig.8 Bubble plot of KEGG pathway enrichment for down-regulated proteins

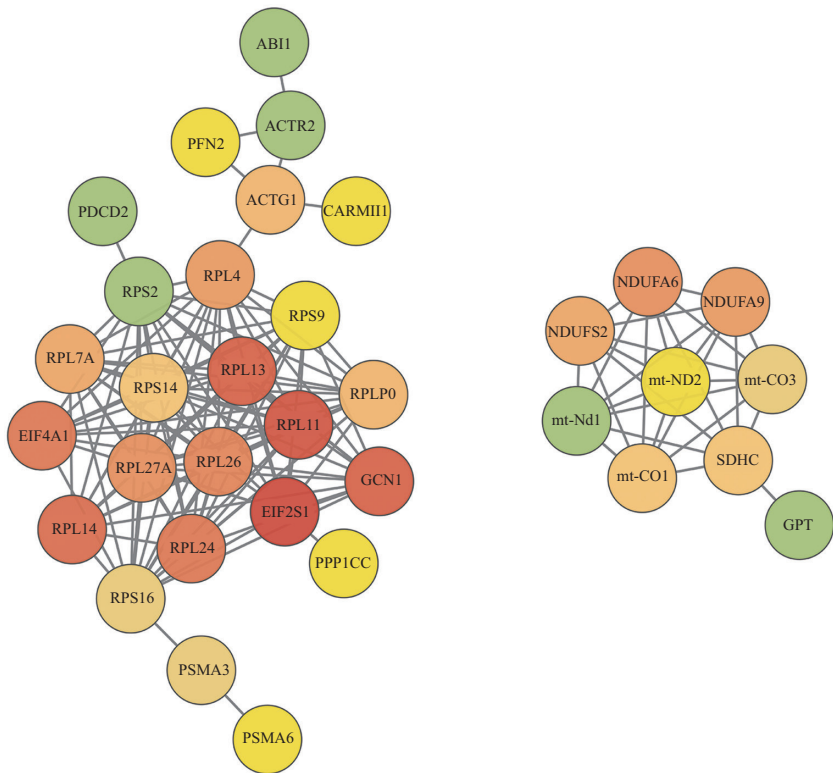


图9 下调蛋白相互作用网络

Fig.9 PPI analysis of down-regulated proteins

RPL11、RPL7A蛋白表达水平均出现显著下调(图10)。

3 讨论

大气中的氧浓度维持在21%左右,但随海拔升

高,氧分压下降,机体摄入的氧气减少导致全身缺氧。慢性缺氧与肌肉组织的质量控制密切相关,高海拔暴露会诱发肌肉质量损失和功能下降,最终导致肌肉萎缩^[6,18-20]。基于蛋白质组学对蛋白质表达变化的高通量检测,有利于发掘响应低氧条件的关

表1 富集分析中重要通路信息
Table 1 Specific information on important pathways in enrichment analysis

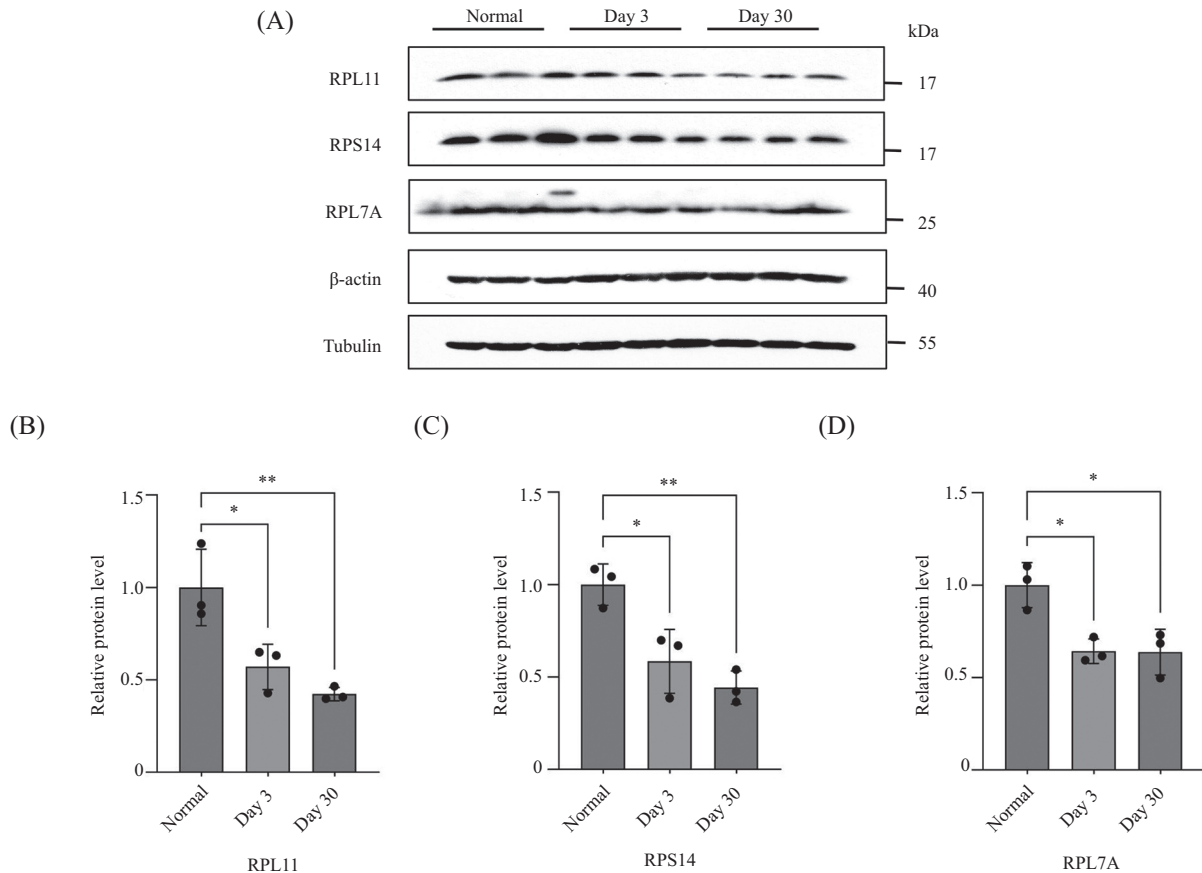
通路编号 Map ID	通路名称 Map name	参与通路的蛋白质名称 Protein names
0022626	Cytosolic ribosome	RPLP0, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, GCN1, RPL13
0005840	Ribosome	RPLP0, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, PSMA6, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, GCN1, RPL13
0044391	Ribosomal subunit	RPLP0, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, RPL13
0002181	Cytoplasmic translation	RPLP0, Eif4a1, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, RPL13
0140236	Translation at presynapse	RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL14, RPL4, RPL24, RPL13
0140241	Translation at synapse	RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL14, RPL4, RPL24, RPL13
0003735	Structural constituent of ribosome	RPLP0, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, RPL13
0005198	Structural molecule activity	ADIPOQ, ACTG1, RPLP0, COMP, FAU, KRT15, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, SNB2, RPL27A, RPL7A, DPT, ACTR2, RPL11, RPL14, VWA5A, RPL4, RPL24, RPS9, EPPK1, RPL13
0003954	NADH dehydrogenase activity	ND1, NDUFA9, NDUFS2
mmu03010	Ribosome	RPLP0, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, RPL13
mmu05171	Coronavirus disease-COVID-19	RPLP0, FAU, RPS2, RPL26, RPS14, RPS16, RPL27A, RPL7A, RPL11, RPL14, RPL4, RPL24, RPS9, RPL13
mmu05014	Amyotrophic lateral sclerosis	ACTG1, EIF2S1, ND1, ND2, PFN2, PAMA3, RAB1A, PSMA6, ACTR1A, SDHC, NDUFA9, NDUFA6, NDUFS2

键分子。已有研究通过蛋白质组学技术证明，缺氧会导致肌肉结构破坏、能量代谢受阻、参与氧化应激保护的蛋白丰度降低^[14,21]，暗示肌肉组织通过代谢转换应对缺氧条件，并增强肌肉组织抵抗活性氧所致损伤的能力，但并未揭示低氧条件下肌肉质量改变的直接途径。本研究构建高原低氧小鼠模型，通过蛋白质组学技术检测常氧与低氧条件下蛋白表达差异，使用生物信息学分析发现差异基因主要富集到核糖体。

研究表明核糖体蛋白稳态高度响应低氧应激，且与核糖体结构、功能相关的蛋白普遍下调。在质谱鉴定到的45种核糖体亚基蛋白中，RPLP0、RPL7A、RPS14、RPS2、RPL24、RPL26等14个分子在高原低氧小鼠肌肉组织中显著下调。KEGG和GO富集分析发现，低氧对肌肉组织的影响主要体现在核糖体上，涵盖核糖体生物合成、组装与生物学功能的发挥。在细胞中，核糖体的主要功能是将遗传密码翻译成蛋白质。真核生物的核糖体由60S大亚基和40S小亚基组成，含有4种核糖体RNA(rRNA，大亚基中的5S、5.8S和28S rRNA，小亚基中的18S

rRNA)和79种核糖体蛋白。RPS14是核糖体小亚基蛋白，RPL11、RPL7A是核糖体大亚基蛋白。小亚基作为一个“解码位点”，与互补tRNA上反密码子互补配对，将mRNA上密码子中包含的信息翻译成氨基酸序列，大亚基具有肽基转移酶活性，负责将氨基酸连接成肽链^[22-24]。二者协同完成从遗传信息到蛋白质的转化。本研究通过Western blot检测了RPS14、RPL11、RPL7A蛋白的表达水平，三者在低氧条件下均呈现下调趋势，与蛋白质组分析结果共同证明在高原环境下，小鼠肌肉组织中核糖体蛋白是响应低氧胁迫的关键分子。

肌肉质量增加主要取决于翻译效率和翻译能力，即蛋白质合成速率和支持蛋白质合成的核糖体数量^[25-29]。大量文献表明，慢性和急性低氧均可导致机体蛋白质代谢失衡，其特征是蛋白质合成速率减慢与分解速率加快，最终引发骨骼肌萎缩^[6,18-20]。核糖体蛋白是RNA结合蛋白，主要参与蛋白质翻译调节^[30]，核糖体生物合成通过改变细胞的翻译能力成为骨骼肌生长和维持的重要调节因子^[31]，研究发现，高原低氧应激可下调核糖体亚基蛋白的表达水



A: 低氧3天、30天处理小鼠后, Western blot法检测核糖体蛋白表达水平的变化; B~D: Western blot相对定量结果, 以 β -actin与Tubulin为内参, Tubulin为定量分析标准内参, 与常氧组相比。图B~图D使用非配对 t 检验, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns: 无显著性差异。

A: mice were treated with hypoxia for 3 days and 30 days, Western blot was used to check the level of ribosomal protein expression. B-D: quantitative analysis of Western blot results. β -actin and Tubulin was used as the internal reference, Tubulin is used for standard quantitative analysis, compared with the normoxia group. Figures B-D use two-sided Student's t test, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns: no significant difference.

图10 高原低氧小鼠核糖体蛋白表达变化

Fig.10 The expression change of ribosomal proteins in high-altitude hypoxic mice

平, 从而将核糖体蛋白减少与低氧诱导的肌肉萎缩联系起来。

在缺氧条件下, 线粒体氧化磷酸化过程受阻, 产生的ATP减少, 缺氧诱导因子HIF-1 α 通路激活糖酵解代谢途径使细胞在不依赖氧气的情况下产生能量^[32]。在本研究中, 小鼠骨骼肌低氧应激表达下调的蛋白还富集到线粒体及能量产生途径, 表明低氧导致细胞能量生成减少。细胞对缺氧应激的适应性反应涉及抑制高能量消耗过程, 如核糖体生物合成和蛋白质合成^[33], 提示核糖体生成的减少并非一个被动的后果, 而是细胞在能量压力下主动实施的、代价高昂的适应性策略。哺乳动物肌肉组织中储存大量蛋白质, 对组织发挥运动功能至关重要。我们推测, 肌肉组织这种在低氧条件下减少蛋白质合成维持细胞活力的适应策略, 虽然在短时间内能使肌肉组织发

挥正常功能, 但长时间的核糖体减少最终会导致肌肉萎缩。基于此, 后续的研究方向主要有: 使用转录组、蛋白质组、代谢组等多组学技术系统分析低氧应激对组织核糖体功能的影响; 低氧条件下细胞生物过程与能量代谢的再分配机制; 低氧诱发的线粒体与核糖体交互调节等。

肌肉组织是一种高度特化的组织类型, 高丰度蛋白含量极高, 前10种最丰富的蛋白质(肌动蛋白、肌球蛋白、肌联蛋白等)约占总蛋白质质量的50%^[34-35]。在质谱鉴定过程中, 高丰度蛋白酶解后产生的肽段质谱检测信号对低丰度蛋白肽段的信号会产生掩盖效应, 这整体上限制了肌肉组织蛋白鉴定的深度, 因此肌肉组织的质谱鉴定深度通常为4 000种左右。本研究对骨骼肌的质谱鉴定深度为2 717种蛋白, 与已报道的其他研究肌肉组织质谱鉴定量存在差距^[36-38]。

除了肌肉组织特性限制了蛋白鉴定深度外, 本研究中使用的质谱仪(Orbitrap Q Exactive HF)与目前主流的质谱仪(Orbitrap Exploris 480)存在代差也是本研究蛋白鉴定量低的主要原因。肌肉组织的蛋白丰度特性限制了质谱鉴定深度, 提示目前肌肉组织的质谱鉴定技术能力以及基于质谱的肌肉组织知识发现仍有很大的提升空间。

本研究构建高原低氧小鼠模型, 通过蛋白质组学技术与Western blot证明高原低氧环境导致核糖体蛋白表达下调, 提示在超过5 000 m的高原低氧条件下, 肌肉适应性变化不利于维持肌肉质量, 可能损害高原条件下的运动能力。在运动训练中, 适当的高原训练有助于提升训练者的运动能力^[39-40], 但仍旧存在威胁运动员肌肉质量的因素。因此, 核糖体响应低氧的适应性变化及其调控机制值得深入探究, 为优化高原训练策略提供理论基础。

参考文献 (References)

- [1] GIRARD O, LEVINE B D, CHAPMAN R F, et al. "Living high-training low" for olympic medal performance: what have we learned 25 years after implementation [J]? *Int J Sports Physiol Perform*, 2023, 18(6): 563-72.
- [2] BERGERON M F, BAHR R, BÄRTSCH P, et al. International Olympic Committee consensus statement on thermoregulatory and altitude challenges for high-level athletes [J]. *Br J Sports Med*, 2012, 46(11): 770-9.
- [3] YIN A, FU W, ELENGICKAL A, et al. Chronic hypoxia impairs skeletal muscle repair via HIF-2 α stabilization [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2024, 15(2): 631-45.
- [4] SANTOCILDES G, VISCOR G, PAGÈS T, et al. Simulated altitude is medicine: intermittent exposure to hypobaric hypoxia and cold accelerates injured skeletal muscle recovery [J]. *J Physiol*, 2023, 602(21): 5855-78.
- [5] CHAILLOU T, KOULMANN N, SIMLER N, et al. Hypoxia transiently affects skeletal muscle hypertrophy in a functional overload model [J]. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 2012, 302(5): R643-R54.
- [6] FAVIER F B, COSTES F, DEFOUR A, et al. Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia [J]. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 2010, 298(6): R1659-R66.
- [7] SARTORI R, ROMANELLO V, SANDRI M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 330.
- [8] COHEN S, NATHAN J A, GOLDBERG A L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 14(1): 58-74.
- [9] KIM J W, TCHERNYSHYOV I, SEMENZA G L, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia [J]. *Cell Metabolism*, 2006, 3(3): 177-85.
- [10] SEMENZA G L, ROTH P H, FANG H M, et al. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(38): 23757-63.
- [11] RATHOR R, SURYAKUMAR G, SINGH S N. Diet and redox state in maintaining skeletal muscle health and performance at high altitude [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 174: 305-20.
- [12] MURRAY A J. Metabolic adaptation of skeletal muscle to high altitude hypoxia how new technologies could resolve the controversies [J]. *Genome Med*, 2009, 1(12): 117.
- [13] WANG C, CHEN W G, CHEN H, et al. Exercise improves hypobaric hypoxia-induced skeletal muscle dysfunction via Sirt1-Mediated myotube and mitochondrial remodeling [J]. *J Adv Res*, 2025, doi: 10.1016/j.jare.2025.08.022.
- [14] VIGANÒ A, RIPAMONTI M, DE PALMA S, et al. Proteins modulation in human skeletal muscle in the early phase of adaptation to hypobaric hypoxia [J]. *Proteomics*, 2008, 8(22): 4668-79.
- [15] LEVETT D Z H, VIGANÒ A, CAPITANIO D, et al. Changes in muscle proteomics in the course of the Caudwell Research Expedition to Mt. Everest [J]. *Proteomics*, 2014, 15(1): 160-71.
- [16] MARCHINGO J M, CANTRELL D A. Protein synthesis, degradation, and energy metabolism in T cell immunity [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(3): 303-15.
- [17] HORWATH O, NORDSTRÖM F, VON WALDEN F, et al. Acute hypoxia attenuates resistance exercise-induced ribosome signaling but does not impact satellite cell pool expansion in human skeletal muscle [J]. *FASEB J*, 2023, 37(3): e22811.
- [18] ETHERIDGE T, ATHERTON P J, WILKINSON D, et al. Effects of hypoxia on muscle protein synthesis and anabolic signaling at rest and in response to acute resistance exercise [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 301(4): E697-E702.
- [19] FU P, ZHU R, GAO W, et al. Effects of resistance training on alleviating hypoxia-induced muscle atrophy: focus on acetylation of FoxO1 [J]. *J Cell Mol Med*, 2023, 28(3): e18096.
- [20] MACDOUGALL J D, GREEN H J, SUTTON J R, et al. Operation everest II: structural adaptations in skeletal muscle in response to extreme simulated altitude [J]. *Acta Physiol Scand*, 1991, 142: 421-7.
- [21] CECILIA GELFI S D P, MARILENA RIPAMONTI. New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach [J]. *FASEB J*, 2004, 18(3): 612-4.
- [22] MOORE P B. The structural basis of large ribosomal subunit function [J]. *Annu Rev Biochem*, 2003, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.110601.135450.
- [23] SHEN P S P, JOSEPH QIN, YIDAN LI X P, et al. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains [J]. *Science*, 2015, 347(6217): 75-8.
- [24] WILSON D N, DOUDNA CATE J H. The structure and function of the eukaryotic ribosome [J]. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2012, 4(5): a011536.
- [25] FIGUEIREDO V C. Revisiting the roles of protein synthesis during skeletal muscle hypertrophy induced by exercise [J]. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 2019, 317(5): R709-R18.
- [26] KIRBY T J, LEE J D, ENGLAND J H, et al. Blunted hypertrophic response in aged skeletal muscle is associated with decreased ribosome biogenesis [J]. *J Appl Physiol*, 2015, 119(4): 1194-1204.

- 321-7.
- [27] SMITH M A, SEXTON C L, SMITH K A, et al. Molecular predictors of resistance training outcomes in young untrained female adults [J]. *J Appl Physiol*, 2023, 134(3): 491-507.
- [28] WEST D W D, MARCOTTE G R, CHASON C M, et al. Normal ribosomal biogenesis but shortened protein synthetic response to acute eccentric resistance exercise in old skeletal muscle [J]. *Front Physiol*, 2019, doi: 10.3389/fphys.2018.01915.
- [29] WEN Y, ALIMOV A P, MCCARTHY J J. Ribosome biogenesis is necessary for skeletal muscle hypertrophy [J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2016, 44(3): 110-5.
- [30] XU X, XIONG X, SUN Y. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(7): 656-72.
- [31] ROBERTS M D, MCCARTHY J J, HORNBERGER T A, et al. Mechanisms of mechanical overload-induced skeletal muscle hypertrophy: current understanding and future directions [J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(4): 2679-757.
- [32] THOMAS L W, ASHCROFT M. Exploring the molecular interface between hypoxia-inducible factor signalling and mitochondria [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(9): 1759-77.
- [33] STAUDACHER J J, NAARMANN-DE VRIES I S, UJVARI S J, et al. Hypoxia-induced gene expression results from selective mRNA partitioning to the endoplasmic reticulum [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(6): 3219-36.
- [34] DOWLING P, SWANDULLA D, OHLENDIECK K. Mass spectrometry-based proteomic technology and its application to study skeletal muscle cell biology [J]. *Cells*, 2023, 12(21): 2560.
- [35] WONG J P H, NG Y K, KJÆRGAARD J, et al. Skeletal muscle proteomics: considerations and opportunities [J]. *NPJ Metab Health Dis*, 2025, 3(1): 30.
- [36] DE VRIES GEERT M, ASSELBERGH B, MONTICELLI A, et al. Ageing signatures and disturbed muscle regeneration in muscle proteome of inclusion body myositis [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2025, 16(3): e13845.
- [37] WANG Q, DING X, XU Z, et al. The mouse multi-organ proteome from infancy to adulthood [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 5752.
- [38] WANG Y, LI X, LI N, et al. Integrated proteomic and metabolomic analysis of muscle atrophy induced by hindlimb unloading [J]. *Biomolecules*, 2024, 15(1): 14.
- [39] RAMOS-CAMPO D J, SCOTT B R, ALCARAZ P E, et al. The efficacy of resistance training in hypoxia to enhance strength and muscle growth: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Sport Sci*, 2017, 18(1): 92-103.
- [40] SCOTT B R, SLATTERY K M, DASCOMBE B J. Intermittent hypoxic resistance training: is metabolic stress the key moderator [J]? *Med Hypotheses*, 2015, 84(2): 145-9.