

慢性间歇性低压低氧对糖尿病小鼠糖代谢关键酶基因表达和启动子区甲基化的影响

隋春红^{1a}, 何岩涛^{1b}, 徐亚维², 纪朋艳^{1c}, 常影^{1a}, 张东芳^{1c}, 赵东海^{1c}, 金连海^{1b}, 王程^{1c}

1. 吉林医药学院 a. 药学院 b. 临床医学院 c. 基础医学院, 吉林 吉林 132013
2. 吉林农业科技学院生物工程学院, 吉林 吉林 132019

摘要:

[背景] 慢性间歇性低压低氧(CIHH)能有效改善 2 型糖尿病(T2DM)。其过程是否与糖代谢关键酶基因启动子区域 DNA 甲基化这一表观遗传学调控机制有关尚待明确。

[目的] 研究 CIHH 对 T2DM 小鼠糖代谢关键酶基因表达和启动子区甲基化的影响, 探讨 CIHH 调节糖代谢的可能机制。

[方法] 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为常压常氧对照(NN/CON)组、慢性间歇性低压低氧干预对照(CIHH/CON)组、常压常氧糖尿病模型(NN/DM)组、慢性间歇性低压低氧干预糖尿病模型(CIHH/DM)组。高脂高糖饲料喂养 NN/DM 组和 CIHH/DM 组小鼠 7 周后, 连续 5 d 按每天 40 mg·kg⁻¹(以体重计)剂量腹腔注射 50 mmol·L⁻¹ 链脲佐菌素(STZ)建立 T2DM 小鼠模型。CIHH/DM 组和 CIHH/CON 组小鼠每天按模拟 5000 m 海拔低压低氧干预 6 h, NN/DM 组和 NN/CON 组小鼠一直处于常压常氧环境中, 连续 4 周, 期间检测血糖变化。CIHH 干预实验后评估小鼠葡萄糖耐受性和胰岛素敏感性, 测定小鼠肝中糖酵解关键酶葡萄糖激酶(GK)、丙酮酸激酶(PK)和糖异生关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G6P)的酶活力、基因 mRNA 相对表达水平和启动子区域 DNA 甲基化水平。

[结果] 与 NN/DM 组相比, CIHH/DM 组小鼠在 CIHH 干预第 25 天后血糖降低($P < 0.05$)。NN/DM 组和 CIHH/DM 组小鼠均呈现糖尿病性耐量曲线, 但 CIHH/DM 组曲线下面积(AUC)低于 NN/DM 组($P < 0.05$)。与 NN/DM 组相比, CIHH/DM 组小鼠血清胰岛素含量和胰岛素抵抗指数(HOMA-IRI)降低($P < 0.05$), 肝 GK 和 PK 酶活力升高且基因 mRNA 表达上调($P < 0.05$), PEPCK 和 G6P 酶活力下降且基因 mRNA 表达下调($P < 0.05$)。各组小鼠肝 GK、PK、PEPCK 和 G6P 基因启动子区域 DNA 平均甲基化水平的差异无统计学意义, 且与 mRNA 表达的关联性也无统计学意义。

[结论] CIHH 干预可降低 T2DM 小鼠血糖, 改善葡萄糖耐受性和缓解胰岛素抵抗, 协调调控糖代谢关键酶活力及其基因 mRNA 表达, 但上述现象与这些糖代谢关键酶基因的启动子区域 DNA 甲基化水平无关。

关键词: 慢性间歇性低压低氧干预; 糖尿病; 葡萄糖代谢; 关键酶; DNA 甲基化

Effects of chronic intermittent hypobaric hypoxia on expression and promoter region methylation of key enzyme genes related to glucose metabolism in diabetic mice SUI Chunhong^{1a}, HE Yantao^{1b}, XU Yawei², JI Pengyan^{1c}, CHANG Ying^{1a}, ZHANG Dongfang^{1c}, ZHAO Donghai^{1c}, JIN Lianhai^{1b}, WANG Cheng^{1c} (1.a. School of Pharmacy b. School of Clinical Medicine c. School of Basic Medical Sciences, Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China; 2. Institute of Biological Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin, Jilin 132019, China)

Abstract:

[Background] Chronic intermittent hypobaric hypoxia (CIHH) can effectively alleviate type 2 diabetes mellitus (T2DM). In this process, the underlying mechanism in its association with the epigenetic regulation of DNA methylation in the promoter regions of glucose metabolism key enzyme genes remains unclear yet.

[Objective] To investigate the effects of CIHH on expression and promoter region methylation of key enzyme genes related to glucose metabolism in diabetes mice, and to explore the underlying mechanism by which CIHH regulates glucose metabolism.



DOI 10.11836/JEOM24005

基金项目

吉林省教育厅科学技术研究规划项目 (JJKH20230541KJ)

作者简介

隋春红(1977—), 女, 博士, 副教授;
E-mail: 645692229@qq.com

通信作者

王程, E-mail: 21610081@qq.com

作者中包含编委会成员 无

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2024-01-04

录用日期 2024-07-01

文章编号 2095-9982(2024)08-0911-08

中图分类号 R11

文献标志码 A

引用

隋春红, 何岩涛, 徐亚维, 等. 慢性间歇性低压低氧对糖尿病小鼠糖代谢关键酶基因表达和启动子区甲基化的影响 [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(8): 911-918.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24005

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Cheng, E-mail: 21610081@qq.com

Editorial Board Members' authorship No

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2024-01-04

Accepted 2024-07-01

To cite

SUI Chunhong, HE Yantao, XU Yawei, et al. Effects of chronic intermittent hypobaric hypoxia on expression and promoter region methylation of key enzyme genes related to glucose metabolism in diabetic mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(8): 911-918.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24005

[Methods] Forty C57BL/6J male mice were divided randomly into a normobaric normoxic control (NN/CON) group, a chronic intermittent hypobaric hypoxia intervention control (CIHH/CON) group, a normobaric normoxic diabetic model (NN/DM) group, and a chronic intermittent hypobaric hypoxia intervention diabetic model (CIHH/DM) group. The mice in the NN/DM and the CIHH/DM groups were fed for 7 weeks with high-fat and high-sugar diet. Subsequently, these mice were intraperitoneally injected consecutively with 50 mmol·L⁻¹ streptozotocin (STZ) for 5 d at a dose of 40 mg·kg⁻¹ (body weight) per day to create T2DM model mice. The mice in the CIHH/DM and the CIHH/CON groups were intervened by simulating hypobaric hypoxia at 5000 m altitude for 6 h per day, while the mice in the NN/DM and the NN/CON groups were always placed in a normobaric normoxic environment. All mice were continuously treated for 4 weeks, and blood glucose were monitored during this period. After the CIHH intervention experiment, the glucose tolerance and insulin sensitivity of mice were evaluated. A set of indicators involved in key glycolytic enzymes glucokinase (GK) and pyruvate kinase (PK), as well as key gluconeogenic enzymes phosphoenolpyruvate carboxyl kinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6P) were measured in the liver of mice, including enzyme activity, relative mRNA expression level, and DNA methylation level in the gene promoter regions.

[Results] Compared with the mice in the NN/DM group, the blood glucose levels of the mice in the CIHH/DM group decreased after the 25th day of the CIHH intervention ($P < 0.05$). Regarding the diabetic glucose tolerance curves, the area under the curve (AUC) of the mice in the CIHH/DM group was lower than that of the NN/DM group ($P < 0.05$). Compared with the mice in the NN/DM group, the mice in the CIHH/DM group showed that the serum insulin content and HOMA of insulin resistance index (HOMA-IRI) decreased ($P < 0.05$), the enzyme activities of GK and PK increased and the relative mRNA expression levels of their genes were up-regulated ($P < 0.05$), while the enzyme activities of PEPCK and G6P decreased and the relative mRNA expression levels of their genes were down-regulated ($P < 0.05$) in liver. The average DNA methylation levels in the promoter regions of *GK*, *PK*, *PEPCK*, and *G6P* genes in liver of mice in each group were not significantly different ($P > 0.05$), and their correlations with mRNA expression levels were also not statistically significant ($P > 0.05$).

[Conclusion] CIHH intervention may reduce blood glucose level, improve glucose tolerance, alleviate insulin resistance, and regulate the key enzyme activities of glucose metabolism and the relative mRNA expression of their corresponding genes in T2DM mice, but the above phenomena are not related to the DNA methylation levels in the promoter regions of these key enzymes.

Keywords: chronic intermittent hypobaric hypoxia intervention; diabetes mellitus; glucose metabolism; key enzyme; DNA methylation

慢性间歇性低压低氧(chronic intermittent hypobaric hypoxia, CIHH)干预是指对人或实验动物采用一定程度的高原低压低氧模拟环境进行长期间断性的暴露^[1]。CIHH 干预可诱导低氧诱导因子-1 α 上调,提高机体组织的低氧耐受性,加强大脑、肝、肾等多种组织器官功能,发挥多种有益作用,如改善患者血糖血脂异常,纠正心律失常,对抗心肌缺血再灌注损伤等^[2],因其经济、简便、安全等优点,已被临床用作重要的非药物性辅助治疗措施^[3]。流行病学调查发现,长期生活在高海拔地区的居民,如南美洲智利北部高原的艾马拉人和中国青藏高原的藏族人,其罹患 II 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的风险相对较低^[4-5]。其机制可能是低压低氧应刺激诱导机体的糖酵解能力增强,促进机体在低氧环境下优先利用糖进行供能^[6],或通过诱发神经反射、激素分泌等相应的应激变化降低糖尿病患者高血糖症状并改善其糖耐量^[7]。进一步研究证明 CIHH 能显著增强葡萄糖转运蛋白的表达,使葡萄糖转运速率增加,提高胰岛素敏感性^[8]。因此利用 CIHH 模拟高原低氧环境作为辅助治疗手段改善 T2DM 代谢紊乱逐渐成为一个重要的研究方向,CIHH 改善血糖异常的机制成为新热点。

表观遗传学是研究某些因素在不改变 DNA 分子核苷酸序列的情况下诱导基因表达水平产生变化的科学,揭示表观遗传学现象的机制,可在疾病的防治

领域发挥巨大的应用价值^[9]。DNA 甲基化是重要的表观遗传机制之一,实验证明 DNA 甲基化与基因转录活性呈负相关^[10]。本研究以 T2DM 小鼠模型为研究对象,模拟 5000 m 海拔低压低氧环境进行 CIHH 干预,判定 CIHH 对 T2DM 小鼠糖代谢的影响,并初步探讨 CIHH 对 T2DM 小鼠糖代谢关键酶的表观遗传学调控机制,为 CIHH 在控制血糖和 T2DM 治疗方面的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养

40 只雄性 C57BL/6J 小鼠(4 周龄,体重 17~19 g, SPF 级)以及饲养所需的维持饲料、高脂高糖饲料(脂肪热量比 58%)均购于长春亿斯实验动物技术有限公司[SCXK(吉)2022-0003]。小鼠于吉林医药学院实验动物中心所属 SPF 级鼠类实验室[SCXK(吉)2022-0001]饲养,饲养环境设定温度 22~26 °C,相对湿度 50%~60%,并采用 12 h 间隔循环照明模拟昼夜,自由饮食、饮水。实验方案经过吉林医药学院实验动物中心伦理委员会审批(2022-KJT-013, 2022-JYT-043),所有操作均符合动物实验的 3R 原则。

1.2 主要试剂和仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ; 美国 Sigma),血糖检测试剂盒、血清胰岛素检测试剂盒、考马斯亮蓝

G-250(中国北京索莱宝), 糖代谢关键酶 GK、PK、PEPCK、G6P 活力测定试剂盒(上海优选), 2×SYBR Green qPCR Mix 荧光定量 PCR 试剂盒、SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR 逆转录试剂盒、SPAReasy 组织 RNA 提取试剂盒(中国山东思科捷), DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒、组织 DNA 提取试剂盒、特异性甲基化 PCR 试剂盒(中国北京天根), 引物合成(中国上海生工)。低压低氧环境模拟舱(ZS-DY-HP, 中国北京众实迪创), 血糖仪(590, 中国江苏鱼跃), 超微量分光光度计(NanoDrop One, 美国 Thermo), 实时荧光定量 PCR 仪(C6, 中国北京新舜), 酶标仪(680, 美国 Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 糖尿病小鼠模型的构建 采用维持饲料适应性喂养 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠 1 周。随机选取 20 只小鼠构建 T2DM 模型, 先采用高脂高糖饲料喂养 7 周, 随后每天按 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以体重计) 剂量腹腔注射 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ STZ ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 预冷柠檬酸缓冲液, 避光, 现用现配) 1 次, 连续 5 d, 每次注射前禁食 4 h, 期间给予小鼠饮用 10% 蔗糖水, 末次注射后恢复为普通饮用水^[11], 此后每天尾尖采血 1 次测定血糖, 连续 3 d 空腹血糖浓度均 $> 11.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为判定 T2DM 模型小鼠的成模标准^[12]。另设正常小鼠 20 只, 采用维持饲料和普通饮用水喂养 7 周, 随后每天按 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (bw) 腹腔注射 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液 1 次, 连续 5 d, 作为平行对照。

1.3.2 实验动物分组及干预 将 20 只 T2DM 模型小鼠随机平均分为 2 组, 分别为常压常氧糖尿病组(NN/DM 组)和慢性间歇性低压低氧干预糖尿病组(CIHH/DM 组), 另将 20 只用于平行对照的正常小鼠随机平均分为 2 组, 分别为常压常氧对照组(NN/CON 组)和慢性间歇性低压低氧干预对照组(CIHH/CON 组)。将 CIHH/DM 组和 CIHH/CON 组小鼠每天按模拟 5000 m 海拔低压低氧环境干预 6 h (低压低氧环境模拟舱参数: 舱内气压 54 kPa, 氧气含量 10.9%, 氮气流量 0.4 SLPM), 其余时间处于常压常氧环境中, NN/CON 组和 NN/DM 组小鼠一直处于常压常氧环境中, 连续 28 d^[13]。

1.3.3 血糖和葡萄糖耐受性的检测 每 3 d 在低压低氧干预后 1 h 内尾尖采血测定小鼠血糖。末次低压低氧干预后小鼠禁食 6 h, 然后进行口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT), 用 $400 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖溶液按 $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以体重计) 剂量灌胃, 分别在 0、0.25、0.5、1、1.5、2 h 时测定血糖含量, 根据梯形公式计算 OGTT 曲线下面积(areas under curve, AUC)^[14]。

1.3.4 胰岛素敏感性相关指标的检测 采用 1% (质量体积比) 戊巴比妥钠, 按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以体重计) 剂量麻醉禁食 18 h 的小鼠, 眼球取新鲜全血, $1000 \times g$ 离心 15 min 获得血清。葡萄糖氧化酶法测定血糖含量, 酶联免疫法测定血清胰岛素含量, 采用梅斯医学在线胰岛素敏感性评分软件(<http://m.medsci.cn/scale>) 计算胰岛素抵抗指数(HOMA of insulin resistance index, HOMA-IRI)、胰岛素敏感性指数(HOMA of insulin sensitivity index, HOMA-ISI) 和胰岛 β 细胞功能指数(HOMA of islet β cell function index, HOMA- β)。

1.3.5 糖代谢关键酶活力的检测 取小鼠肝组织, 用 9 倍重量的生理盐水匀浆并在冰水浴中超声破碎, 4°C 下 $10000 \times g$ 离心 30 min 取上清液, 即为肝组织总蛋白。将 $10 \mu\text{L}$ 上清液分别加入葡萄糖激酶(glucokinase, GK)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK)、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 和葡萄糖-6-磷酸酶(glucose 6 phosphatase, G6P) 酶活力测定反应体系中检测光密度值, 并依据考马斯亮蓝法测定的肝组织总蛋白含量计算酶活力。

1.3.6 糖代谢关键酶基因 mRNA 表达水平的检测 以 β -肌动蛋白(β -actin) 基因为内参, 检测肝组织中 GK、PK、PEPCK 和 G6P 基因的 mRNA 表达水平, 所需引物的序列及参数见表 1。提取小鼠肝组织中的总 RNA, 采用紫外分光光度法测定总 RNA 含量。以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 逆转录反应体系 ($20 \mu\text{L}$) 包含总 RNA $1 \mu\text{L}$ 、gDNA 清除剂 $1 \mu\text{L}$ 、qRT 反应混合液 $10 \mu\text{L}$ 、无核酸酶水 $8 \mu\text{L}$ 。逆转录反应程序为 50°C 反应 15 min, 85°C 终止 5 s。定量扩增目的片段, 扩增反应体系 ($20 \mu\text{L}$) 包含 cDNA $1 \mu\text{L}$ 、上下游引物各 $0.5 \mu\text{L}$ 、2×qPCR 反应混合液 $10 \mu\text{L}$ 、无核酸酶水 $8 \mu\text{L}$ 。扩增反应程序为 94°C 预变性 5 min, 之后循环反应包括 94°C 变性 20 s, 55°C 退火 20 s, 72°C 延伸 30 s, 循环 35 个反应后 72°C 终末延伸 5 min。采用熔解曲线分析确定扩增产物单一性, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算待测基因 mRNA 的相对表达水平, 式中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$, 各组 $\Delta Ct = Ct_{\text{待测基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, Ct 值为 PCR 反应临界循环数。

1.3.7 糖代谢关键酶基因 DNA 甲基化水平的检测 提取小鼠肝基因组 DNA, 经超微量分光光度计检测 DNA 含量和纯度均符合要求, 用重亚硫酸盐将小鼠基因组 DNA 未甲基化修饰的胞嘧啶(cytosine, C) 转化为胸腺嘧啶(thymine, T), $120 \mu\text{L}$ 反应体系包含 DNA 样品 $2 \mu\text{L}$ ($500 \sim 1000 \text{ ng}$)、 ddH_2O $18 \mu\text{L}$ 、杜氏磷酸缓冲液 $10 \mu\text{L}$ 、重亚硫酸盐混合液 $90 \mu\text{L}$ 。转化反应程序为

95 °C 反应 10 min, 然后 64 °C 反应 45 min。通过 Gene Bank 数据库查询 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区域序列, 利用 Meth Primer 在线软件(<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>) 预测 CpG 岛和设计扩增片段的 PCR 引物^[15]。预测 CpG 岛参数为岛计数(island size) > 100, 鸟嘌呤和胞嘧啶(guanine and cytosine, GC)含量 > 50%, 观察与期望比值(observed/ expected ratio, Obs/Exp) > 0.6, 设计的引物序列及参数见表 2。对扩增片段 CpG 位点进行分析后, 以重亚硫酸盐转化前后小鼠基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增反应体系(20 μL) 包含 DNA 模板 2 μL、上下游引物各 0.5 μL、dNTPs 2 μL、甲基化特异性 PCR DNA 聚合酶 1 μL、10×PCR 缓冲液 2 μL、ddH₂O 12 μL。扩增反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 之后循环反应包括 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环 35 个反应后 72 °C 终末延伸 5 min。扩增产物测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。利用 EM-BOSS Needle 在线软件将转化前后小鼠扩增产物序列与小鼠基因组参考序列进行比对。CpG 位点甲基化水平=该位点 C 未转化为 T 的样本数/全部样本数, 扩增片段平均甲基化水平=片段内所有 CpG 位点甲基化水平的平均值。

表 1 mRNA 表达检测所需的引物序列

Table 1 Primer sequences for mRNA expression detection

基因名称	引物序列
<i>GK</i>	正向引物: 5'-TCCCTGTAAGGCACGAAGA-3'
	反向引物: 5'-GAGAAGTCCACGATGTTGT-3'
<i>PK</i>	正向引物: 5'-ATGATGTGGATCGAAGGGTC-3'
	反向引物: 5'-TGCGTTGAAAGAAATAGGGT-3'
<i>PEPCK</i>	正向引物: 5'-AGTGCATAATGGTCTGGACT-3'
	反向引物: 5'-GCCGTCGAGATGTGAATA-3'
<i>G6P</i>	正向引物: 5'-AGCAGTTCCTGTCACCTGT-3'
	反向引物: 5'-CGTTGGCTTTTCTTTCTCTC-3'
<i>β-actin</i>	正向引物: 5'-TACCCAGGCATTGCTGACAG-3'
	反向引物: 5'-AGCCACCAATCCACACAGAG-3'

表 2 甲基化检测所需的引物序列

Table 2 Primer sequences for methylation detection

基因名称	引物序列
<i>GK</i>	正向引物: 5'-AAGAAAAGGTTTTATGTTAGAGAGGG-3'
	反向引物: 5'-ATTATATTTCCCAACAAATACAACCTCA-3'
<i>PK</i>	正向引物: 5'-TAGTTTAGGGTTATTTGGGATATGG-3'
	反向引物: 5'-TCCTTTTCTCTCTAAACAAATTTCT-3'
<i>PEPCK</i>	正向引物: 5'-TTGAAGAGGAAGTTATTTTGTAT-3'
	反向引物: 5'-TAAACACCATCACCCTTAAACTAC-3'
<i>G6P</i>	正向引物: 5'-TTGTTTTTTAGAGGATTAGATTTAATTT-3'
	反向引物: 5'-CAAAGGGATGGGAAGGGGAC-3'

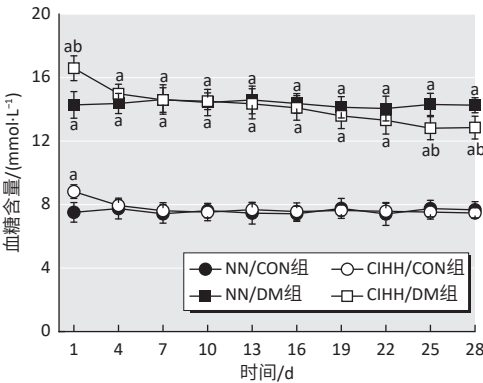
1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计软件对实验数据进行处理, 计量资料数据以均数±标准差表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 计数资料数据采用卡方检验, 双变量 Pearson 检验分析相关性, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血糖和葡萄糖耐量的变化

各组小鼠血糖检测结果见图 1。CIHH 干预第 1 天, CIHH/CON 组小鼠血糖高于 NN/CON 组($P < 0.05$), 其他时间点血糖差异无统计学意义。NN/DM 组小鼠在干预期间第 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28 天的血糖均高于 NN/CON 组($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠第 1 天血糖高于 NN/DM 组($P < 0.05$), 第 25、28 天血糖低于 NN/DM 组($P < 0.05$), 其他时间点血糖差异无统计学意义。



[注] 空腹血糖。a: 与 NN/CON 组相比, $P < 0.05$; b: 与 NN/DM 组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 CIHH 干预对小鼠血糖的影响 (n=10)

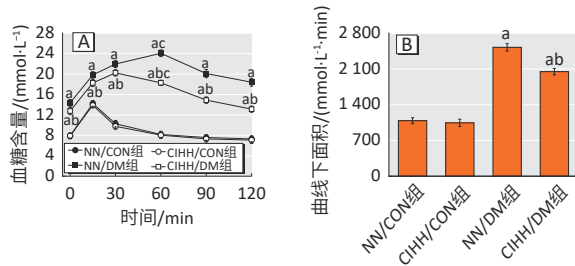
Figure 1 Effect of CIHH intervention on blood glucose in mice (n=10)

各组小鼠 OGTT 检测结果见图 2。NN/CON 组和 CIHH/CON 组小鼠均呈现正常糖耐量曲线, 且两组小鼠 AUC 差异无统计学意义。NN/DM 组和 CIHH/DM 组小鼠均呈现糖尿病性糖耐量曲线。NN/DM 组小鼠 AUC 高于 NN/CON 组($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠 AUC 低于 NN/DM 组($P < 0.05$)。

2.2 小鼠血清胰岛素含量和胰岛素敏感性相关指标的变化

CIHH 干预后各组小鼠血清胰岛素含量和胰岛素敏感性相关指标检测结果见图 3。与 NN/CON 组相比, CIHH/CON 组小鼠的血清胰岛素和各胰岛素敏感性相关指标差异均无统计学意义。NN/DM 组小鼠的血清胰岛素含量和 HOMA-IRI 值高于 NN/CON 组($P < 0.05$)。NN/DM 组小鼠的 HOMA-ISI 值和 HOMA-β 值均低于 NN/CON 组($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠的血清胰岛素

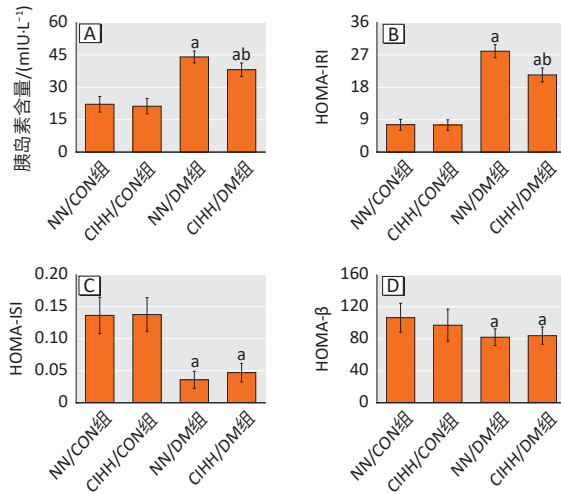
含量和 HOMA-IRI 值均低于 NN/DM 组 ($P < 0.05$)。CIHH/DM 组和 NN/DM 组小鼠的 HOMA-ISI 值和 HOMA- β 值差异无统计学意义。



[注] A: 口服葡萄糖耐量试验; B: 曲线下面积。a: 与 NN/CON 组相比, $P < 0.05$; b: 与 NN/DM 组相比, $P < 0.05$; c: 30 min 时与 60 min 时相比, $P < 0.05$ 。

图 2 CIHH 干预对小鼠口服葡萄糖耐量的影响 ($n=10$)

Figure 2 Effect of CIHH intervention on OGTT in mice ($n=10$)



[注] A: 血清胰岛素含量; B: 胰岛素抵抗指数 (HOMA-IRI); C: 胰岛素敏感性指数 (HOMA-ISI); D: 胰岛 β 细胞功能指数 (HOMA- β)。a: 与 NN/CON 组相比, $P < 0.05$; b: 与 NN/DM 组相比, $P < 0.05$ 。

图 3 CIHH 干预对小鼠血清胰岛素含量和胰岛素敏感性相关指标的影响 ($n=10$)

Figure 3 Effects of CIHH intervention on serum insulin level and insulin sensitivity indexes in mice ($n=10$)

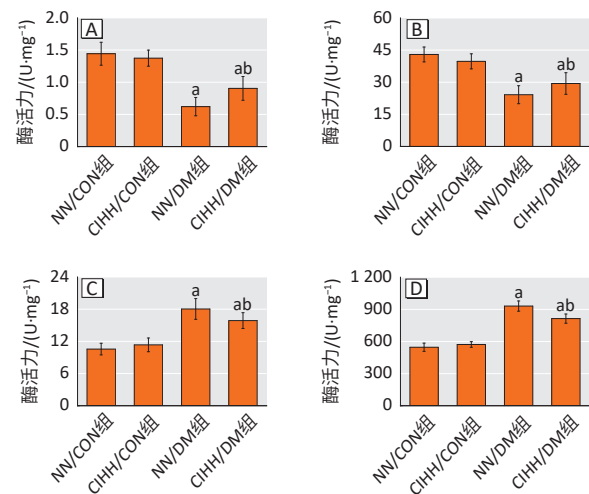
2.3 小鼠肝葡萄糖代谢关键酶活力的变化

CIHH 干预后各组小鼠肝葡萄糖代谢关键酶活力检测结果见图 4。与 NN/CON 组相比, CIHH/CON 组小鼠肝中 GK、PK、PEPCK、G6P 活力差异均无统计学意义。NN/DM 组小鼠肝中 GK、PK 活力均低于 NN/CON 组 ($P < 0.05$)。NN/DM 组小鼠肝中 PEPCK、G6P 活力高于 NN/CON 组 ($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠肝中 GK、PK 活力高于 NN/DM 组 ($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠肝中 PEPCK、G6P 活力低于 NN/DM 组 ($P < 0.05$)。

2.4 小鼠肝葡萄糖代谢关键酶基因 mRNA 表达水平

CIHH 干预后各组小鼠肝葡萄糖代谢关键酶基因 mRNA 相对表达水平检测结果见图 5。与 NN/CON 组

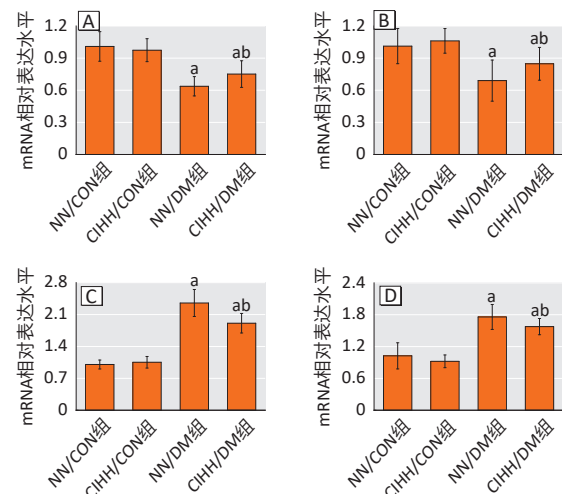
相比, CIHH/CON 组小鼠肝中 GK、PK、PEPCK、G6P 基因的 mRNA 相对表达水平差异均无统计学意义。NN/DM 组小鼠 GK、PK 基因的 mRNA 相对表达水平低于 NN/CON 组 ($P < 0.05$)。NN/DM 组小鼠 PEPCK、G6P 基因的 mRNA 相对表达水平高于 NN/CON 组 ($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠 GK、PK 基因的 mRNA 相对表达水平高于 NN/DM 组 ($P < 0.05$)。CIHH/DM 组小鼠 PEPCK、G6P 基因的 mRNA 相对表达水平低于 NN/DM 组 ($P < 0.05$)。



[注] A: 葡萄糖激酶; B: 丙酮酸激酶; C: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; D: 葡萄糖-6-磷酸酶的酶活力。a: 与 NN/CON 组相比, $P < 0.05$; b: 与 NN/DM 组相比, $P < 0.05$ 。

图 4 CIHH 干预对小鼠肝 GK、PK、PEPCK 和 G6P 酶活力的影响 ($n=10$)

Figure 4 Effects of CIHH intervention on enzyme activities of GK, PK, PEPCK, and G6P in liver of mice ($n=10$)



[注] A: 葡萄糖激酶; B: 丙酮酸激酶; C: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; D: 葡萄糖-6-磷酸酶基因 mRNA 的相对表达水平。a: 与 NN/CON 组相比, $P < 0.05$; b: 与 NN/DM 组相比, $P < 0.05$ 。

图 5 CIHH 干预对小鼠肝 GK、PK、PEPCK 和 G6P 基因 mRNA 表达的影响 ($n=10$)

Figure 5 Effects of CIHH intervention on mRNA expression of GK, PK, PEPCK, and G6P genes in liver of mice ($n=10$)

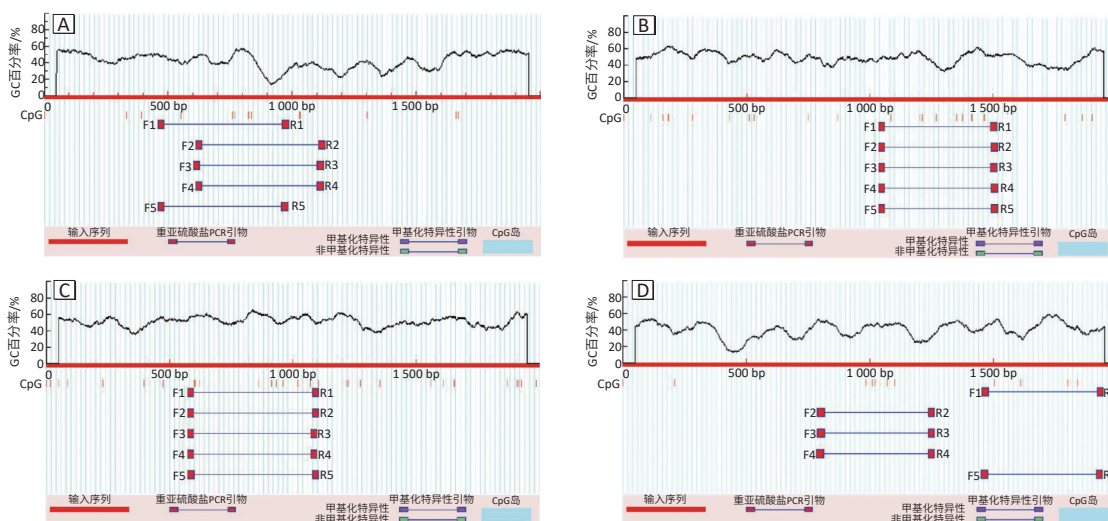
2.5 小鼠肝葡萄糖代谢关键酶基因启动子区 DNA 甲基化水平

小鼠肝 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区域 CpG 岛预测见图 6, 结果均未发现符合设定参数的 CpG 岛。CpG 位点分析发现 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区域扩增片段中分别含有 7、9、10、5 个 CpG 位点, 根据 CpG 位点所处扩增片段上的位置进行编号, 各 CpG 位点甲基化水平和平均甲基化水平检测结果见图 7。各组小鼠 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因扩增片段中各 CpG 位点甲基化水平和平均甲基化水平

差异均无统计学意义。

2.6 相关性分析

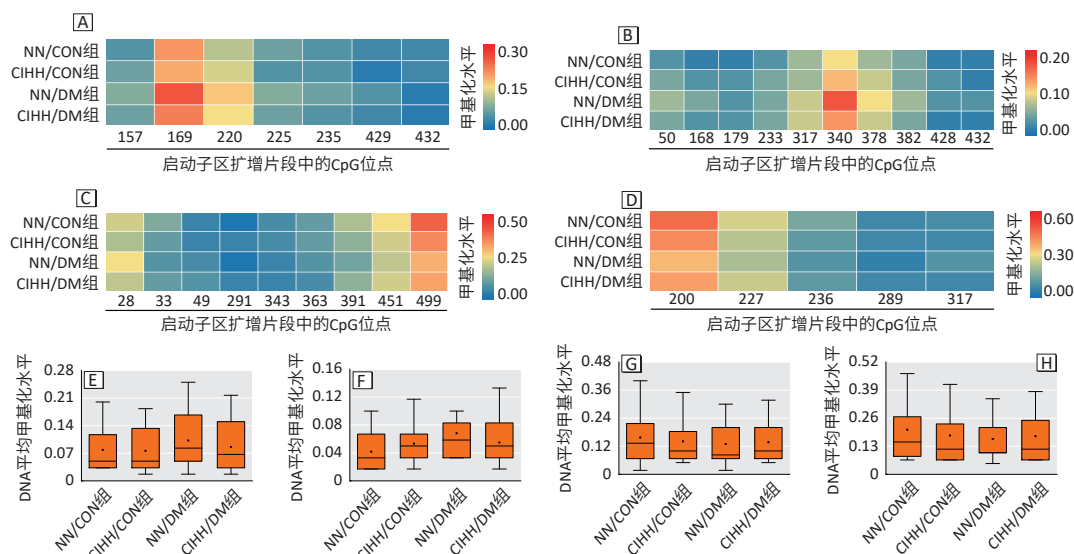
小鼠肝 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 酶活力及其基因 mRNA 相对表达水平和启动子区 DNA 甲基化水平三者之间的相关性见图 8。双变量 Pearson 检验分析结果发现, 肝 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 酶活力与其基因 mRNA 相对表达水平的相关系数分别为 0.684、0.648、0.869 和 0.830, 相关性有统计学意义 ($P < 0.05$), 而肝 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区 DNA 甲基化水平与 mRNA 相对表达水平的相关性无统计学意义。



[注] A: 葡萄糖激酶; B: 丙酮酸激酶; C: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; D: 葡萄糖-6-磷酸酶基因启动子区域 CpG 岛预测和 PCR 引物设计结果。红色粗线: 输入的基因序列; 红色方块: 正向(F)和反向(R)的重亚硫酸盐 PCR 引物。

图 6 小鼠 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区域 CpG 岛预测和 PCR 引物设计

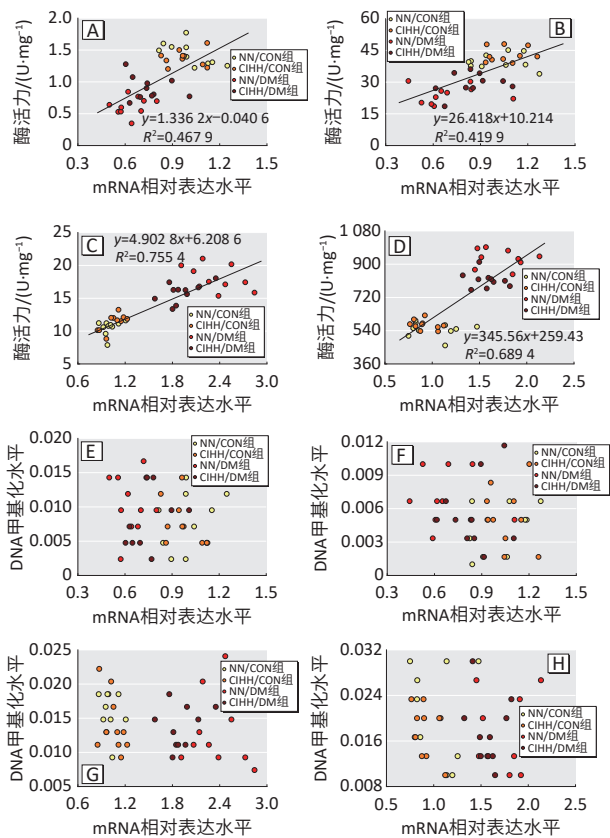
Figure 6 Prediction of CpG islands and design of PCR primers in the promoter regions of *GK*, *PK*, *PEPCK*, and *G6P* genes in mice



[注] A: 葡萄糖激酶; B: 丙酮酸激酶; C: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; D: 葡萄糖-6-磷酸酶基因启动子区域扩增片段中 CpG 位点的甲基化水平; E: 葡萄糖激酶; F: 丙酮酸激酶; G: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; H: 葡萄糖-6-磷酸酶基因启动子区域扩增片段 DNA 平均甲基化水平。

图 7 CIHH 干预对小鼠肝 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区域 DNA 甲基化水平的影响 ($n=10$)

Figure 7 Effects of CIHH intervention on DNA methylation in promoter regions of *GK*, *PK*, *PEPCK*, and *G6P* genes in liver of mice ($n=10$)



[注] A: 葡萄糖激酶; B: 丙酮酸激酶; C: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; D: 葡萄糖-6-磷酸酶的酶活力与其基因 mRNA 相对表达水平相关性散点图; E: 葡萄糖激酶; F: 丙酮酸激酶; G: 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶; H: 葡萄糖-6-磷酸酶基因启动子区 DNA 甲基化水平与 mRNA 相对表达水平相关性散点图。回归曲线($y=ax+b$, R^2 为决定系数)表示存在相关性, $P<0.05$ 。

图8 小鼠肝 GK、PK、PEPCK 和 G6P 酶活力及其基因启动子区 DNA 甲基化水平与 mRNA 相对表达水平的相关性分析 ($n=10$)

Figure 8 Correlation analysis of enzyme activities, promoter region DNA methylation levels, and relative mRNA expression levels of GK, PK, PEPCK, and G6P in liver of mice ($n=10$)

3 讨论

本研究通过高脂高糖饮食联合腹腔注射 STZ 方法诱导 T2DM 小鼠模型验证 CIHH 对血糖的调节。小鼠 T2DM 模型构建中, 高脂高糖饮食可降低葡萄糖的利用, STZ 造成胰岛 β 细胞损伤, 胰岛素分泌功能障碍, 导致糖耐量异常。随后经 CIHH 干预发现, CIHH 对正常小鼠血糖、糖耐量和胰岛素敏感性指标没有影响, 却可以使 T2DM 小鼠的血糖有所下降, 糖耐量异常也有一定恢复, 这与以往的研究结果一致, 其机制可能是低压低氧环境诱导葡萄糖转运蛋白 GLUT-4 表达上调, 增强了组织细胞对葡萄糖的摄取利用能力, 进而对血糖产生调控作用^[5]。此外, 本研究还发现 CIHH 干预降低 T2DM 小鼠血清胰岛素含量, 缓解胰岛素抵抗, 但胰岛素敏感性和胰岛 β 细胞功能并没有得到有效

的恢复, 说明 CIHH 干预只能调节机体胰岛素分泌和改善胰岛素抵抗状态, 而并不能修复组织细胞的器质性损伤。本实验中还发现 CIHH 干预首日正常小鼠和 T2DM 小鼠血糖均有升高, 这可能与首次 CIHH 干预时环境改变产生的应激反应有关^[16]。

促进糖酵解和抑制糖异生是改善 T2DM 葡萄糖代谢紊乱的常用手段。有研究发现 CIHH 可提高果糖磷酸激酶、乳酸脱氢酶的含量及活性, 使机体优先利用糖进行供能, 降低血糖^[5]。糖酵解关键酶 GK、PK 和糖异生关键酶 PEPCK、G6P 在维持血糖平衡中发挥重要作用。本实验中发现, T2DM 小鼠 GK、PK 活力较正常小鼠降低, PEPCK、G6P 活力较正常小鼠升高。CIHH 干预后, 正常小鼠糖代谢相关关键酶的活力均无变化, 而 T2DM 小鼠糖代谢相关关键酶的活力向正常值恢复。进一步检测 GK、PK、PEPCK 和 G6P 基因 mRNA 相对表达水平, 结果发现糖代谢相关关键酶的表达变化与其对应关键酶活力高低相一致, 具有密切的相关性。说明 CIHH 可从转录水平调控糖代谢相关关键酶基因表达而提高酶活力, 通过增强胞内糖酵解, 抑制糖异生, 有效调控血糖的下降, 进而能降低胰岛素代偿性增高, 有助于缓解胰岛素抵抗。其机制与低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)在调节肝脏葡萄糖稳态中的有益作用关系密切, HIF-1 α 可上调糖酵解基因表达, 促进糖的分解代谢, HIF-2 α 有利于降低肝脏胰高血糖素信号传导, 改善葡萄糖耐量, 增加胰岛素敏感性^[17]。

表观遗传现象与 T2DM 发生存在密切的相互作用, 其中 DNA 甲基化修饰研究最多^[18]。研究发现 T2DM 患者 DNA 甲基化水平与正常人群存在显著差异, 该差异是 T2DM 在不同人群中罹患率不同的重要关键因素^[19]。DNA 甲基化水平的改变可能在海拔低氧环境适应过程中发挥重要作用, 低压低氧诱导 DNA 低甲基化状态可能是其重要的调控机制之一^[20]。CpG 位点是 DNA 分子中以胞嘧啶后接鸟嘌呤为特征的二核苷酸碱基序列, 经常是甲基化修饰的目标。而富含大量 CpG 位点的特定 DNA 区域片段称为 CpG 岛, DNA 分子甲基化程度通常与 CpG 岛的分布密度呈正相关, 对基因表达和调控起重要的作用^[21]。CpG 岛通常位于基因启动子区域, 本实验首先检测 GK、PK、PEPCK 和 G6P 基因启动子区域 CpG 岛分布情况, 结果未发现 CpG 岛存在, 进一步检测重亚硫酸盐转化后 PCR 扩增启动子区域片段中 CpG 二核苷酸位点甲基化水平, 结果各 CpG 位点甲基化水平和平均甲基化水平均无明显变化, 而且与对应基因 mRNA 表达水平也无相关性,

这说明 *GK*、*PK*、*PEPCK* 和 *G6P* 基因启动子区域的甲基化水平并未对它们的 mRNA 转录产生影响,其原因可能与这些基因启动子区域本身 CpG 岛分布少,甲基化程度低有关。本研究仅从代谢酶活力变化和 DNA 甲基化角度对 CIHH 对肝糖代谢调控进行初步的探索,而调控代谢酶活力的相关信号通路以及其他表观遗传调控机制,如 RNA 甲基化、组蛋白化学修饰、非编码 RNA 的调控以及染色质重塑等,也是重要的研究方向。因此 CIHH 对肝糖代谢复杂而精密的调控机制尚需进一步更全面的深入研究。

综上所述,CIHH 作为一种非药物干预手段,能有效降低 T2DM 小鼠的血糖水平,改善葡萄糖耐受性和缓解胰岛素抵抗,调控糖酵解和糖异生关键酶的活力及基因 mRNA 表达,在 T2DM 治疗方面展现出了潜在的应用前景。尽管 CIHH 对 T2DM 小鼠糖代谢的调控可能不依赖糖代谢关键酶基因启动子区的 DNA 甲基化状态的变化,但这仍然从表观遗传学角度为探索 CIHH 影响 T2DM 的分子机制研究积累了坚实的科学数据。

参考文献

- [1] ALCANTARA-ZAPATA DE, BANGDIWALA SI, JIMÉNEZ D, et al. Effects of chronic intermittent hypobaric hypoxia on prostate-specific antigen (PSA) in Chilean miners[J]. *Occup Environ Med*, 2021, 78(10): 753-760.
- [2] ZHANG Y, ZHOU ZN. Beneficial effects of intermittent hypobaric hypoxia on the body[J]. *Chin J Appl Physiol*, 2012, 28(6): 504-509.
- [3] YUAN H, LIU J, GU Y, et al. Intermittent hypoxia conditioning as a potential prevention and treatment strategy for ischemic stroke: Current evidence and future directions[J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 1067411.
- [4] SANTOS JL, PÉREZ-BRAVO F, CARRASCO E, et al. Low prevalence of type 2 diabetes despite a high average body mass index in the Aymara natives from Chile[J]. *Nutrition*, 2001, 17(4): 305-309.
- [5] 张泽鑫, 罗樱樱, 刘林, 等. 拉萨地区藏族成年人群糖尿病前期及糖尿病患病率初步调查分析[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 27(8): 567-571.
ZHANG ZX, LUO YY, LIU L, et al. Preliminary investigation on prevalence of pre-diabetes and diabetes among Tibetan adults in Lhasa[J]. *Chin J Diabetes*, 2019, 27(8): 567-571.
- [6] KOUFAKIS T, KARRAS SN, MUSTAFA OG, et al. The effects of high altitude on glucose homeostasis, metabolic control, and other diabetes-related parameters: from animal studies to real life[J]. *High Alt Med Biol*, 2019, 20(1): 1-11.
- [7] WOOLCOTT OO, ADER M, BERGMAN RN. Glucose homeostasis during short-term and prolonged exposure to high altitudes[J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(2): 149-173.
- [8] TIAN YM, LIU Y, WANG S, et al. Anti-diabetes effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia through improving liver insulin resistance in diabetic rats[J]. *Life Sci*, 2016, 150: 1-7.
- [9] LI Y. Modern epigenetics methods in biological research[J]. *Methods*, 2021, 187: 104-113.
- [10] VILLICAÑA S, BELL JT. Genetic impacts on DNA methylation: research findings and future perspectives[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1): 127.
- [11] 李金成, 纪敏涛, 王帅, 等. 镉染毒对糖尿病小鼠胫骨影响的Micro-CT研究[J]. *环境与职业医学*, 2018, 35(6): 531-535.
LI JC, JI MT, WANG S, et al. Micro-CT study on tibia of diabetic mice post cadmium exposure[J]. *J Environ Occup Med*, 2018, 35(6): 531-535.
- [12] DU Y, LI D, CHEN J, et al. Lactoferrin improves hepatic insulin resistance and pancreatic dysfunction in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Nutr Res*, 2022, 103: 47-58.
- [13] SALYHA N, OLIYNYK I. Hypoxia modeling techniques: a review[J]. *Heliyon*, 2023, 9(2): e13238.
- [14] SMALL L, EHRLICH A, IVERSEN J, et al. Comparative analysis of oral and intraperitoneal glucose tolerance tests in mice[J]. *Mol Metab*, 2022, 57: 101440.
- [15] LI LC, DAHIYA R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(11): 1427-1431.
- [16] NIRUPAMA R, RAJARAMAN B, YAJURVEDI HN. Stress and glucose metabolism: a review[J]. *Imaging J Clin Med Sci*, 2018, 5(1): 8-12.
- [17] RAMAKRISHNAN SK, SHAH YM. A central role for hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α in hepatic glucose homeostasis[J]. *Nutr Healthy Aging*, 2017, 4(3): 207-216.
- [18] LING C, RÖNN T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(5): 1028-1044.
- [19] AHMED SA H, ANSARI SA, MENSAH-BROWN EP K, et al. The role of DNA methylation in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus[J]. *Clin Epigenetics*, 2020, 12(1): 104.
- [20] KUMAR R, JAIN V, KUSHWAH N, et al. Role of DNA methylation in hypobaric hypoxia-induced neurodegeneration and spatial memory impairment[J]. *Ann Neurosci*, 2018, 25(4): 191-200.
- [21] GALBRAITH K, SNUDELM. DNA methylation as a diagnostic tool[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2022, 10(1): 71.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 顾心怡, 汪源)