

# 不同海拔牦牛骨骼肌中热休克蛋白 70 表达特点与定位

梁灿香 权君莲 张勤文\*

青海大学农牧学院动物医学系 西宁 810016

**摘要:** 为了阐明不同海拔牦牛 (*Bos grunniens*) 骨骼肌中热休克反应的核心诱导蛋白热休克蛋白 70 (HSP70) 的表达情况与分布特征, 以青海省化隆回族自治县 (海拔 1 900 m, 作为低海拔组)、海晏县 (海拔 3 200 m, 作为中海拔组) 及班玛县 (海拔 4 200 m, 作为高海拔组) 高原本土动物牦牛作为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测三种海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 mRNA 表达, 应用免疫印迹及免疫组织化学染色法对 HSP70 蛋白在三种海拔牦牛骨骼肌组织中的蛋白表达水平与空间分布特征进行研究。结果表明, 中海拔牦牛骨骼肌细胞中 HSP70 阳性表达量低, 肌纤维细胞核中不表达; 低、高海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 表达量上调, 阳性信号定位于骨骼肌细胞胞质, 出现核内富集; 随海拔升高, HSP70 mRNA 与蛋白的表达均呈现先降低后增加的趋势, HSP70 在三种海拔牦牛骨骼肌中的表达存在阈值, 说明 HSP70 在牦牛骨骼肌中的表达呈海拔依赖性模式, 其阈值效应优化了能量分配。本研究从分子层面阐明了牦牛适应高原低氧环境的机制, 明确了 HSP70 在该过程中的核心作用, 为后续解析高原本土动物适应性进化的分子调控网络提供了新的研究思路。

**关键词:** 热休克蛋白 70; 牦牛; 骨骼肌; 蛋白质稳态; 低氧适应机制

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2026) 02-221-09

## Characteristics and localization of HSP70 expression in skeletal muscle of Yaks at different altitudes

LIANG Can-Xiang QUAN Jun-Lian ZHANG Qin-Wen\*

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

**Abstract: [Objectives]** This study aims to clarify the expression patterns and distribution characteristics of heat shock protein 70 (HSP70), a key inducible protein in the heat shock response, in the skeletal muscle of Yaks (*Bos grunniens*) across three altitude gradients. **[Methods]** Skeletal muscle tissues of Yaks were collected from three altitude groups: Hualong Hui Autonomous County (1 900 m, low-altitude group), Haiyan County (3 200 m, mid-altitude group), and Banma County (4 200 m, high-altitude group) in Qinghai Province, China. Quantitative real-time PCR was employed to detect HSP70 mRNA expression in skeletal muscle, while

**基金项目** 青海省自然科学基金项目 (No. 2023-ZJ-722);

\* 通信作者, E-mail: 82321200@qq.com;

**第一作者介绍** 梁灿香, 女, 硕士研究生; 研究方向: 高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系; E-mail: lcx20250704@163.com。

收稿日期: 2025-07-04, 修回日期: 2025-12-29 DOI: 10.13859/j.cjz.202625126 CSTR: 32109.14.cjz.202625126

Western blotting and immunohistochemistry were utilized to analyze the expression levels and spatial distribution characteristics of HSP70 protein across three altitude gradients. **[Results]** The mid-altitude group exhibited minimal HSP70 expression and a complete absence of nuclear immunoreactivity in myofibers. In contrast, both the low- and high-altitude groups showed significantly increased HSP70 expression in Yak skeletal muscle. Immunohistochemistry further revealed that HSP70 was present in both the cytoplasm and the nucleus of muscle fibers, with notable enrichment in the nuclear compartment (Fig. 1). The quantitative real-time PCR and Western blotting revealed that with increasing altitude, both *HSP70* mRNA and protein showed a trend of first decreasing and then increasing, indicating an altitude-specific expression threshold (Figs. 4, 5). **[Conclusion]** These findings demonstrate that HSP70 expression in Yak skeletal muscle follows an altitude-dependent pattern. Furthermore, the observed pattern suggests a threshold effect that may optimize energy allocation. This study elucidates a potential molecular mechanism by which Yaks adapt to the plateau's hypoxic environment, highlighting the critical role of HSP70 in this process. Additionally, our findings establish a framework for future research into the molecular regulatory network underlying adaptive evolution in plateau-native animals.

**Key words:** Heat shock protein 70, HSP70; Yak; Skeletal muscle; Proteostasis; Hypoxia adaptation mechanism

缺氧环境在自然界中很常见，对于陆生哺乳动物来说，高原缺氧最为普遍。牦牛 (*Bos grunniens*) 主要分布在青藏高原及其周边海拔 4 000 m 以上的高山区，是能在高海拔地区繁衍并延续至今的特有牛种 (陈顺港等 2024)，已经进化出适应高原低氧环境的稳定遗传特性，是研究低氧适应性机制的良好模型 (Zheng et al. 2024)。骨骼肌具有高度可塑性，可通过响应外部刺激调整自身状态，进而精准适配生物体在不同场景下的功能需求。此外，骨骼肌的正常功能维持与氧气输送密切相关，因此它是低氧条件下反映动物整体新陈代谢状态的极佳指示器。研究表明，随着海拔升高，牦牛骨骼肌发生了从慢肌纤维向快肌纤维转化的变化 (周娟等 2022)。骨骼肌收缩功能高度依赖持续的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 供应 (Terrados et al. 1990, Hargreaves and Spriet 2020)。低氧环境下，由于 mRNA 翻译的高能量需求，细胞限制氧气消耗并从线粒体呼吸转变为糖酵解，导致 ATP 和蛋白质合成减少、蛋白质分解相关基因表达增加，造成骨骼肌萎缩 (唐舒宁等 2019, Kierans and Taylor 2021)。低氧作为氧化应激源诱导产生活性氧 (reactive

oxygen species, ROS)，破坏细胞能量平衡，同时活性氧通过破坏甲硫氨酸和半胱氨酸等含硫氨基酸，使蛋白质损伤、聚集或错误折叠 (Kaufman et al. 2017, Burtsscher et al. 2023, 周豪等 2024)。

热休克蛋白家族是一类在生物界高度保守的分子伴侣蛋白，广泛存在于各种生物体中，在维持细胞蛋白质稳态和应对各种环境压力中发挥核心作用 (Akerfelt et al. 2010)。热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 是热休克蛋白家族中最重要且研究最为广泛的成员之一，可作为缺氧暴露条件下的潜在生物标志物 (Dzhalilova and Makarova 2020)，是改善包括氧化应激在内的各种应激损伤的重要蛋白 (Díaz-Villanueva et al. 2015, 安洁然等 2019, Zhang et al. 2022)。同时，HSP70 是一种高度保守的 ATP 依赖型分子伴侣，可以通过识别新生或错误折叠蛋白的疏水区域，辅助蛋白质折叠成适当的天然构象，防止在应激条件下发生错误折叠和聚集 (Zhou et al. 2023)。HSP70 参与蛋白转运、复合物组装或解离、信号通路调节 (如糖皮质激素受体、肿瘤蛋白 p53) 等细胞过程调控 (Zylicz et al. 2001)。除此之外，

HSP70 还参与细胞凋亡。研究表明, HSP70 可有效抑制缺氧诱导的大鼠 (*Rattus norvegicus*) 肺微血管内皮细胞的凋亡 (Cao et al. 2021)。

既往研究表明, 在转基因小鼠 (*Mus musculus*) 中过表达诱导型 HSP70, 可促进趾长伸肌与比目鱼肌固定后肌肉质量的恢复, 提示 HSP70 能够促进废用性萎缩后骨骼肌的结构与功能修复 (Miyabara et al. 2012)。大鼠暴露于慢性缺氧时, 骨骼肌内 HSP70 水平增加了三倍, 暴露于间歇性缺氧, 骨骼肌内 HSP70 水平小幅增加, 该变化主要表现在慢肌纤维中 (Tarricone et al. 2008)。HSP70 在高原本土动物牦牛肠道中高表达 (廖博等 2018)。以上研究表明, 在低氧环境下, HSP70 在不同组织和生理条件下动态调控, 通过多途径发挥保护作用, 其表达上调相对普遍。

目前关于低氧适应的研究多为两个海拔对照, 或同海拔同一物种的不同年龄组比较, 且多聚焦于循环系统或内脏器官, HSP70 在高原本土动物骨骼肌中的空间分布模式及海拔梯度下的表达规律尚未系统揭示。为了阐明不同海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 的变化特点, 本研究对三种海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 的表达与分布情况进行研究, 以期阐述随海拔升高 HSP70 蛋白及基因表达的动态变化, 亚细胞定位与低氧应激的关联性, 深化对牦牛低氧适应机制的理解, 并为高原生物医学研究提供新视角。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物来源与处理

选取青海省化隆回族自治县 (海拔 1 900 m,

设为低海拔组)、海晏县 (海拔 3 200 m, 设为中海拔组) 及班玛县 (海拔 4 200 m, 设为高海拔组), 每组 5 头 5 岁左右雄性成年牦牛为研究对象, 均为临床健康。取化隆回族自治县、海晏县及班玛县的牦牛于放牧地屠宰后, 分别取骨骼肌 (股四头肌) 组织, 一部分置于 4% 多聚甲醛溶液固定, 另一部分组织于液氮中备用, 所有动物取材相同部位。

### 1.2 骨骼肌中 HSP70 的阳性表达与定位

4% 多聚甲醛固定, 将固定组织修剪成 1 cm × 1 cm × 1 cm 小块, 常规制备组织石蜡切片, 病理切片机 (型号 Leica RM224, 上海徕卡仪器有限公司) 切片厚 4 μm 左右备用。免疫组化实验部分参考王磊 (2022) 方法进行。抗体均购自 Abcam 公司, 一抗为山羊抗兔 IgG (货号 ab6721), 浓度为 1 : 1 000; 二抗为山羊抗小鼠 IgG (货号 ab205719), 浓度为 1 : 1 000。结果判定: 蓝色代表细胞核, 棕黄色代表 HSP70 的阳性表达; 将切片放入组织切片数字扫描仪 (型号 Panoramic MIDI, 3DHISTECH) 进行扫描, 每组选片 5 张, 每张随机截取 5 个视野, 用 Slide Viewer 软件选取目的区域进行拍照, 用平均光密度值 (integrated optical density, IOD) 来表示 HSP70 阳性表达量。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定积分光密度值。

### 1.3 骨骼肌中 HSP70 mRNA 表达

GenBank 查询到牦牛 *HSP70* 基因 (XM\_005911810.2) 及 *TUBB* 内参基因 (XM\_005906954) 序列, 利用 Oligo 7 软件选择其 CDS 保守区序列设计特异性引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 牦牛骨骼肌 HSP70 和 TUBB 基因引物序列

Table 1 Sequence of primers for HSP70 and TUBB genes in *Bos grunniens* skeletal muscle

基因 Gene	引物类型 Primer type	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	产物大小 (bp) Product size	退火温度 (°C) Annealing temperature
HSP70	上游引物 Forward	GACTCCGCTCATCAAAGG	80	57
	下游引物 Reverse	TGCTCTGGTTGCTGAGTATG		
TUBB	上游引物 Forward	CCCTCGTGCTATCTTGGT	155	52
	下游引物 Reverse	GCTCGGCTCCCCTGTAT		

称取 100 mg 的骨骼肌组织,加入液氮充分研磨,使用 RNA Easy Fast 动物组织/细胞总 RNA 提取试剂盒[货号 DP451, 天根生化科技(北京)有限公司]按照说明书操作,依次加入裂解液、氯仿和异丙醇溶液提取总 RNA。取 1  $\mu\text{g}$  RNA 用核酸蛋白检测仪(型号 Nano Photometer-N50, Lifes Biological 公司)测定浓度后,取  $A_{260}/A_{280}$  值介于 1.8~2.0 之间的 RNA 样品 3  $\mu\text{g}$ ,用 1%琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 的完整性。反转录体系为 20  $\mu\text{l}$ , 5  $\times$  FastKing-RT SuperMix 预混液 4  $\mu\text{l}$ , 总 RNA 1.2  $\mu\text{g}$ , 无 RNA 酶双蒸水补足至 20  $\mu\text{l}$ 。反应程序:42  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  3 s, 4  $^{\circ}\text{C}$   $\infty$ 。按照反转录试剂盒[货号 KR118, 天根生化(北京)科技有限公司]反转录出 cDNA, 备用。

以合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,并对扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,以验证产物大小及引物的特异性。为比较三个海拔牦牛中 *HSP70* mRNA 表达水平变化,选用 TB Green Premix Ex Taq II [货号 RR420Q, 宝生物工程(大连)有限公司]进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 反应。反应体系为 20  $\mu\text{l}$ , TB Green Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{l}$ , cDNA 模板 2  $\mu\text{l}$  (300 mg/L), 上下游引物各 0.6  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 灭菌水补足至 20  $\mu\text{l}$ 。反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 70  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40  $^{\circ}\text{C}$  30 s。将 *TUBB* 作为内参基因, 目的基因和内参基因分别设 3 个平行。以上操作在实时荧光定量仪 PCR LightCycler<sup>®</sup> 96 (Roche 公司) 中进行。

#### 1.4 骨骼肌中 HSP70 表达

称量 1.2~1.3 g 肌肉组织, 研磨, 匀浆后离心提取上清液。利用全蛋白提取试剂盒(货号 KGP250, 江苏凯基生物技术有限公司)提取骨骼肌组织总蛋白, 并采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号 P0012S, 碧云天生物技术有限公司)测定蛋白吸光度值。采用 BCA 法计

算蛋白浓度, 计算方法是牛血清白蛋白为标准品, 配制系列浓度标准溶液并测定吸光度值, 绘制标准曲线, 将样品吸光度值代入标准曲线方程, 计算得到样品中蛋白浓度。然后将蛋白样品与 4  $\times$  十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(货号 P0015, 碧云天生物技术有限公司)以 3:1 的比例混合, 将其加热 100  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 变性蛋白。取 7  $\mu\text{g}$  变性后的骨骼肌组织总蛋白上样。经过 SDS-PAGE 电泳(5%浓缩胶, 8%、10%和 15%分离胶)跑胶、转膜, 转膜完成后, 转膜液清洗 PVDF 膜, 然后用 5%的脱脂牛奶封闭 2 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下一抗孵育 14 h, 热休克蛋白 70 一抗为兔抗鼠热休克蛋白 70 (货号 bs-0244R, 北京博奥森生物技术有限公司), 浓度 1:1 000; 内参蛋白  $\beta$ -tubulin 一抗为小鼠抗  $\beta$ -tubulin (货号 bsm-33034M, 北京博奥森生物技术有限公司), 浓度 1:1 000; 一抗孵育后用 1  $\times$  TBST 洗涤 2 次, 5 min/次; 再将 PVDF 膜与二抗进行孵育, 二抗为山羊抗兔 IgG (货号 ab6721, Abcam 公司), 浓度 1:20 000; 内参二抗为山羊抗小鼠 IgG (货号 ab205719, Abcam 公司), 浓度 1:10 000, 25  $^{\circ}\text{C}$  条件二抗孵育 90 r/min 2 h; 1  $\times$  TBST 洗涤 6 次, 5 min/次; 最后使用 ECL 试剂进行曝光, 待条带清晰呈现, 拍照。使用 ImageJ-win64 软件测得灰度值, 对目的蛋白条带进行量化, 每个样品进行 3 次重复。

#### 1.5 统计分析

采用相对  $\Delta\Delta\text{Ct}$  法( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ )计算相对 mRNA 水平, Image-Pro Plus 6.0 测量平均光密度, 并使用 SPSS 27.0 软件进行数据分析, 数据以平均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SE) 表示。对骨骼肌中 *HSP70* mRNA 水平和蛋白印记结果进行统计分析, 若数据符合正态分布, 使用单因素方差分析与多重比较, 若不符合正态分布, 采用非参数检验。  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P \geq 0.05$  表示差异不显著。

## 2 结果

### 2.1 三种海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 的阳性表达与定位

肌纤维细胞核呈现蓝色, 阳性表达区域呈棕黄色。中海拔组牦牛骨骼肌肌纤维细胞质中 HSP70 阳性着色面积小, 肌纤维细胞核内不着色。相较于中海拔组, 低、高海拔组牦牛骨骼肌中 HSP70 的阳性表达量上调, 分布在肌纤维的细胞质内, 并且在肌纤维细胞核内出现富集 (图 1)。三种海拔牦牛之间, 骨骼肌中 HSP70 的阳性表达变化明显, 随着海拔的升高, HSP70 的阳性表达呈现先降低后增加的趋势 (图 2)。三种海拔牦牛 HSP70 蛋白的表达量差异显著 ( $F_{2,12} = 145.775$ ,  $P < 0.001$ )。多重比较表明,

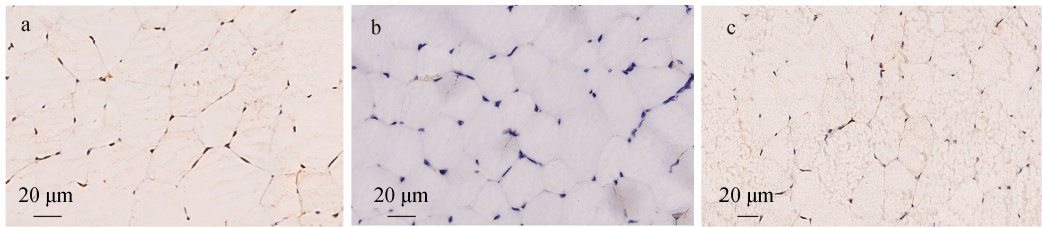


图 1 HSP70 在牦牛骨骼肌中的阳性表达 (400 ×)

Fig. 1 Positive expression of HSP70 in Yak (*Bos grunniens*) skeletal muscle (400 ×)

a. 低海拔; b. 中海拔; c. 高海拔。棕黄色为骨骼肌 HSP70 阳性表达, 蓝色为肌细胞核。

a. Low-altitude; b. Mid-altitude; c. High-altitude. Brown color stands for positive HSP70 expression in skeletal muscle; blue shows muscle cell nucleus.

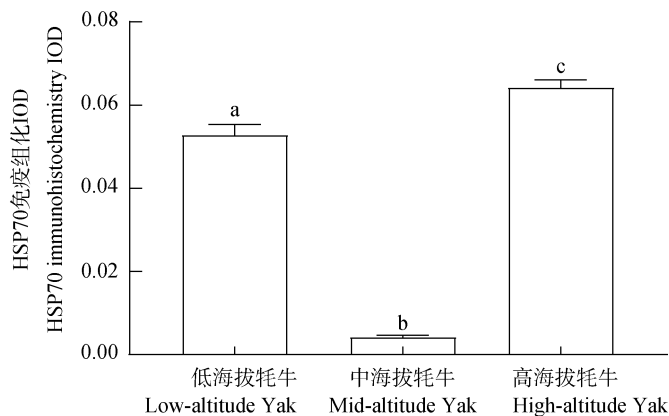


图 2 HSP70 在牦牛骨骼肌中的平均光密度值 (IOD)

Fig. 2 Integral optical density (IOD) values of HSP70 in Yak (*Bos grunniens*) skeletal muscle

不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母代表差异不显著 ( $P \geq 0.05$ )。

Different letters mean that the difference is significant ( $P < 0.05$ ), the same letter means that the difference is not significant ( $P \geq 0.05$ ).

中海拔的牦牛表达水平 ( $0.004 \pm 0.001$ ) 显著低于低海拔牦牛 ( $0.053 \pm 0.003$ , 95% CI: 0.046 ~ 0.051,  $P < 0.001$ ) 和高海拔牦牛 ( $0.990 \pm 0.158$ , 95% CI: -0.063 ~ -0.057,  $P < 0.001$ ); 低海拔牦牛与高海拔牦牛的表达水平差异不显著 (95% CI: -0.014 ~ -0.009,  $P < 0.001$ )。

### 2.2 三种海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 mRNA 表达水平

目的基因和内参基因条带单一且清晰, 说明 HSP70 引物特异性良好, 可用于 qRT-PCR 实验 (图 3)。

HSP70 mRNA 相对表达水平随海拔的升高呈先降低后升高的走向 (图 4)。单因素方差分析显示, HSP70 基因表达水平在三个海拔组

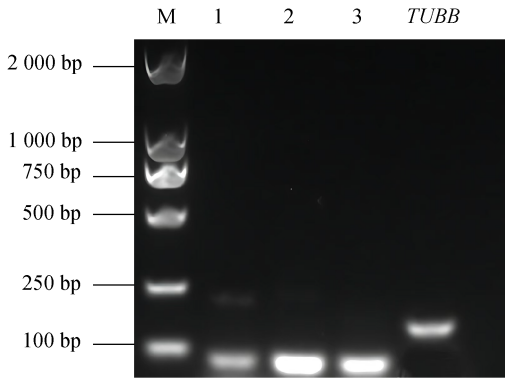


图3 *HSP70* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 3 Results of common PCR amplification of *HSP70* gene

M. DL 2 000 DNA 分子量标准; 1~3 分别为低、中、高海拔牦牛 *HSP70* 基因的 PCR 扩增产物, *TUBB* 为内参基因。

M. DL 2 000 DNA marker; 1~3 show the PCR amplification products of the *HSP70* gene in Yaks at low-, mid-, and high-altitudes, while *TUBB* was used as a reference gene.

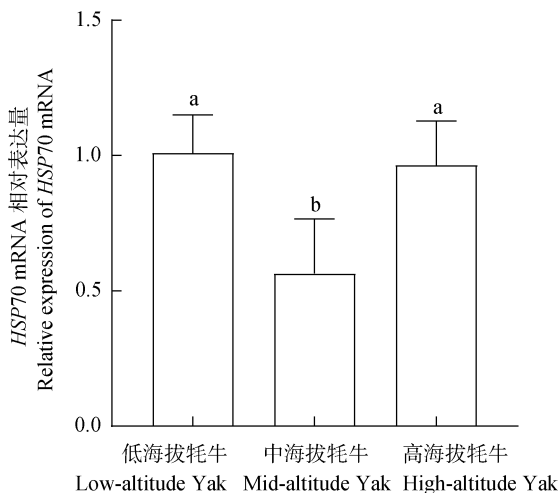


图4 牦牛骨骼肌 *HSP70* mRNA 相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *HSP70* mRNA in Yak (*Bos grunniens*) skeletal muscle

不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母代表差异不显著 ( $P \geq 0.05$ )。

Different letters mean that the difference is significant ( $P < 0.05$ ) and the same letter means that the difference is not significant ( $P \geq 0.05$ ).

牦牛骨骼肌中存在显著差异 ( $F_{2, 42} = 30.83, P < 0.05$ )。多重比较表明, 中海拔的牦牛表达水平

( $0.632 \pm 0.218$ ) 显著低于低海拔牦牛 ( $1.028 \pm 0.137, 95\% \text{ CI: } 0.290 \sim 0.600, P < 0.05$ ) 和高海拔牦牛 ( $0.990 \pm 0.158, 95\% \text{ CI: } -0.556 \sim -0.244, P < 0.05$ ); 低海拔牦牛的表达水平与高海拔牦牛差异不显著 ( $95\% \text{ CI: } -0.201 \sim 0.110, P > 0.05$ )。

### 2.3 三种海拔牦牛骨骼肌中 *HSP70* 蛋白的表达量

三种海拔牦牛骨骼肌中 *HSP70* 蛋白表达量随着海拔的升高表现出先降低后升高的趋势 (图5), 且差异显著 ( $F_{2, 6} = 135.836, P < 0.05$ )。多重比较表明, 中海拔的牦牛表达水平 ( $0.322 \pm 0.013$ ) 显著低于低海拔牦牛 ( $1.611 \pm 0.016, 95\% \text{ CI: } 1.225 \sim 1.352, P < 0.01$ ) 和高海拔牦牛 ( $0.591 \pm 0.050, 95\% \text{ CI: } -0.333 \sim -0.206, P < 0.01$ ); 低海拔牦牛的表达水平显著高于高海拔牦牛 ( $95\% \text{ CI: } 0.955 \sim 1.083, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

生理稳定条件下, *HSP70* 的表达主要位于细胞质中, 然而在应激时会在细胞核中积累并发挥功能 (Singh et al. 2025)。以往研究表明, *HSP70* 蛋白在牦牛的不同组织器官, 如肺、小脑、肾、肝、心以及脾中均有基础表达, 提示 *HSP70* 蛋白在牦牛机体生理功能维持中的普遍作用 (Cui et al. 2022)。*HSP70* 在低氧条件下在骨骼肌中发挥的作用主要包括抑制低氧诱导的肌萎缩 (Srivastava et al. 2024)、抑制肌细胞凋亡 (Zhai et al. 2019)、维持蛋白质稳态 (Attaway et al. 2023)。

本研究结果显示, 低海拔牦牛骨骼肌中 *HSP70* 蛋白表达显著高于中海拔组, 并在肌纤维细胞核内出现富集, 提示低海拔组牦牛骨骼肌中肌纤维核保护功能被激活。牦牛作为高原本土动物, 即使生活在较低海拔, 其遗传背景仍保留对缺氧的预适应机制。因此 *HSP70* 在低海拔组牦牛骨骼肌中的表达可能是遗传固化, 维持细胞稳态, 日常代谢所需的结果。裸鼯鼠 (*Heterocephalus glaber*) 是已发现的耐缺氧

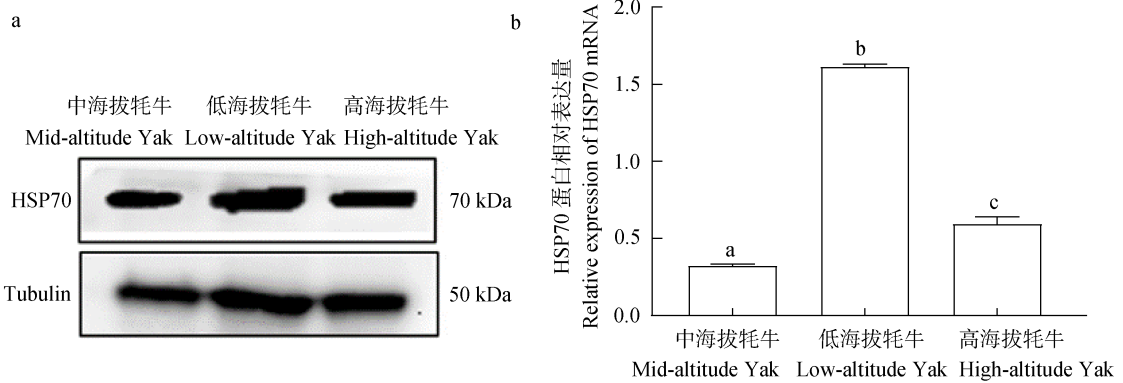


图 5 牦牛骨骼肌中 HSP70 蛋白印迹结果 (a) 及相对表达量 (b)

Fig. 5 Western blot results (a) and relative expression (b) of HSP70 in Yak (*Bos grunniens*) skeletal muscle

不同字母代表差异显著 ( $P < 0.05$ ), 相同字母代表差异不显著 ( $P \geq 0.05$ )。

Different letters mean that the difference is significant ( $P < 0.05$ ), the same letter means that the difference is not significant ( $P \geq 0.05$ ).

哺乳动物之一, 裸鼯鼠在 5%氧浓度下可以存活 5 h 且对自身无不良影响, 并且可以在 18 min 的完全缺氧中存活 (Park et al. 2017)。裸鼯鼠在缺氧暴露后, 肌肉中 HSP70 蛋白水平显著降低, HSP70 与 HSP90 等 ATP 依赖性热休克蛋白急性缺氧 24 h 内在所有器官中的表达整体降低 (Nguyen et al. 2019)。同时, 高达 85% 的新陈代谢被抑制, 抑制代谢减少了 ATP 需求 (Pamenter et al. 2018)。本研究的中海拔组牦牛骨骼肌 HSP70 表达降低与裸鼯鼠缺氧研究结果保持一致。本课题组前期研究表明, 随海拔升高, 牦牛骨骼肌线粒体呼吸链复合酶 I~V 活性均表现为逐渐降低的趋势, 产生 ATP 的能力逐渐降低 (李琳等 2023), 而 HSP70 需要 ATP 才能发挥作用, 因此机体在 ATP 缺陷环境 (如缺氧) 中 HSP70 下调将有助于为其他更重要的细胞过程节省能量。即在中海拔组 (3 200 m) 中, 节能优先于细胞保护蛋白伴侣, 使机体能够最大限度地减少能量消耗, 以维持蛋白质稳态或者降低对蛋白质折叠/修复的需求。在正常环境中, HSP70 可能与调节蛋白热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 结合, 以防止热休克蛋白转录所需的 HSF 修剪体形成。环境压力超过适应机制缓冲范围, 面临严重的蛋白质损伤风险, 正常蛋白基因的表达

会自动关闭或减少, 热休克基因被激活产生热休克蛋白, 具体过程为, 当机体受到低氧胁迫时, HSF1 先在细胞质中形成三聚体, 随后转移至细胞核内与 HSP70 启动子区域的热休克元件相结合, 接着 HSF1 发生丝氨酸残基磷酸化修饰, 激活 HSF1 的转录调控活性, 最终, 转录生成的 HSP70 mRNA 通过核糖体翻译, 生成 HSP70 蛋白 (Storti et al. 1980)。本研究发现, 高海拔环境下牦牛骨骼肌可维持 HSP70 高表达, 这与 Li 等 (2019) 报道的 SD 大鼠脑组织在缺氧环境中的 HSP70 表达特征一致。研究表明, 在血细胞中过表达 HSP70 会降低缺氧条件下果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的活性氧水平, 提高其存活率 (Azad et al. 2011)。在高原低氧条件下, 线粒体氧化磷酸化受阻导致活性氧积累, 造成肌纤维内蛋白质变性错误折叠 (Strazdauskas et al. 2024)。已有研究证实, HSP70 能有效保护细胞免受缺氧诱导的氧化应激损伤, 通过识别并结合暴露的疏水氨基酸残基, 参与骨骼肌蛋白质稳态的维持 (Genest et al. 2019)。因此, 当达到一定程度缺氧时, HSP70 代偿性上调, 以对抗氧化应激, 维持蛋白质稳态。既往研究表明, 当海拔超过 6 000 m 时, 因能量耗竭与细胞功能失代偿, 牦牛组织中 HSP70 表达再度下降 (Wang et al. 2006)。随海

拔增加, HSP70 在牦牛骨骼中先降低后增加的表达趋势提示, 不同海拔牦牛骨骼肌中 HSP70 的表达存在一定阈值。

综上所述, HSP70 在牦牛骨骼肌中的表达随海拔升高呈双向调控: 在低海拔组(1 900 m)中的表达可能是高原本土动物维持细胞稳态, 日常代谢所需; 在中海拔组(3 200 m)则是在最大限度地减少能量消耗以维持蛋白质稳态或降低对蛋白质折叠/修复的需求; 高海拔组(4 200 m)是通过应激通路激活代偿性上调。当海拔超过特定阈值后, 牦牛骨骼肌中 HSP70 的代偿性上调, 是其适应极端高海拔环境的一种关键适应性机制, 对于维持骨骼肌在严重低氧下的功能稳态至关重要。

## 参 考 文 献

- Åkerfelt M, Morimoto R I, Sistonen L. 2010. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8): 545–555.
- Attaway A H, Bellar A, Mishra S, et al. 2023. Adaptive exhaustion during prolonged intermittent hypoxia causes dysregulated skeletal muscle protein homeostasis. *The Journal of Physiology*, 601(3): 567–606.
- Azad P, Ryu J, Haddad G G. 2011. Distinct role of Hsp70 in *Drosophila* hemocytes during severe hypoxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2): 530–538.
- Burtscher J, Hohenauer E, Burtscher M, et al. 2023. Environmental and behavioral regulation of HIF-mitochondria crosstalk. *Free Radical Biology and Medicine*, 206: 63–73.
- Cao J, Yang L J, Wang L, et al. 2021. Heat shock protein 70 attenuates hypoxia-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells isolated from neonatal rats. *Molecular Medicine Reports*, 24(4), 690.
- Cui Y, Liu P G, Yu S J, et al. 2022. Expression analysis of molecular chaperones Hsp70 and Hsp90 on development and metabolism of different organs and testis in cattle (cattle-yak and yak). *Metabolites*, 12(11): 1114.
- Diaz-Villanueva J F, Diaz-Molina R, García-González V. 2015. Protein folding and mechanisms of proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8): 17193–17230.
- Dzhalilova D, Makarova O. 2020. Differences in tolerance to hypoxia: physiological, biochemical, and molecular-biological characteristics. *Biomedicines*, 8(10): 428.
- Genest O, Wickner S, Doyle S M. 2019. Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 294(6): 2109–2120.
- Hargreaves M, Spriet L L. 2020. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism*, 2(9): 817–828.
- Kaufman D M, Wu X, Scott B A, et al. 2017. Ageing and hypoxia cause protein aggregation in mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, 24(10): 1730–1738.
- Kierans S J, Taylor C T. 2021. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *The Journal of Physiology*, 599(1): 23–37.
- Li W H, Li Y X, Ren J. 2019. High altitude hypoxia on brain ultrastructure of rats and Hsp70 expression changes. *British Journal of Neurosurgery*, 33(2): 192–195.
- Miyabara E H, Nascimento T L, Rodrigues D C, et al. 2012. Overexpression of inducible 70-kDa heat shock protein in mouse improves structural and functional recovery of skeletal muscles from atrophy. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, 463(5): 733–741.
- Nguyen V C, Deck C A, Pamenter M E. 2019. Naked mole-rats reduce the expression of ATP-dependent but not ATP-independent heat shock proteins in acute hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, 222(Pt 22): jeb211243.
- Pamenter M E, Lau G Y, Richards J G, et al. 2018. Naked mole rat brain mitochondria electron transport system flux and H<sup>+</sup> leak are reduced during acute hypoxia. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Pt 4): jeb171397.
- Park T J, Reznick J, Peterson B L, et al. 2017. Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science*, 356(6335): 307–311.
- Singh M K, Han S, Ju S, et al. 2025. Hsp70: a multifunctional chaperone in maintaining proteostasis and its implications in human disease. *Cells*, 14(7): 509.
- Srivastava S, Mondal S, Rathor R, et al. 2024. Increased expression of miRNA-1 contributes to hypobaric hypoxia-induced skeletal muscle loss. *Advanced Biology*, 8(3): e2300573.
- Storti R V, Scott M P, Rich A, et al. 1980. Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D. melanogaster* cells. *Cell*, 22(3): 825–834.
- Strazdauskas A, Trumbeckaite S, Jakstas V, et al. 2024. *In vitro*

- hypoxia/reoxygenation induces mitochondrial cardiolipin remodeling in human kidney cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(11): 6223.
- Tarricone E, Scapin C, Vitadello M, et al. 2008. Cellular distribution of Hsp70 expression in rat skeletal muscles. Effects of moderate exercise training and chronic hypoxia. *Cell Stress & Chaperones*, 13(4): 483–495.
- Terrados N, Jansson E, Sylvén C, et al. 1990. Is hypoxia a stimulus for synthesis of oxidative enzymes and myoglobin? *Journal of Applied Physiology*, 68(6): 2369–2372.
- Wang X L, Xu C S, Wang X J, et al. 2006. Heat shock response and mammal adaptation to high elevation (hypoxia). *Science in China Series C, Life Sciences*, 49(5): 500–512.
- Zhai C Y, Lv J L, Wang K K, et al. 2019. HSP70 silencing aggravates apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation *in vitro*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(2): 1013–1020.
- Zhang H, Gong W B, Wu S, et al. 2022. Hsp70 in redox homeostasis. *Cells*, 11(5): 829.
- Zheng Q B, Wu X Y, Ma X M, et al. 2024. Genetic structure analysis of yak breeds and their response to adaptive evolution. *Genomics*, 116(5): 110933.
- Zhou L, Fang L, Tamm M, et al. 2023. Extracellular heat shock protein 70 increases the glucocorticoid receptor and dual-specificity phosphatase 1 via Toll-like receptor 4 and attenuates inflammation in airway epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14): 11700.
- Zylicz M, King F W, Wawrzynow A. 2001. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *The EMBO Journal*, 20(17): 4634–4638.
- 安洁然, 江清英, 李福宏, 等. 2019. 诱导型 Hsp70 在外源性甲醛对小鼠肝肾氧化损伤中的保护作用. *生态毒理学报*, 14(2): 222–230. [An J R, Jiang Q Y, Li F H, et al. 2019. Inducible Hsp70 protected liver and kidney of mice from the oxidative damage induced by exogenous formaldehyde. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 14(2): 222–230.]
- 陈顺港, 高玉, 陈宁博, 等. 2024. 青藏高原牦牛驯化的考古学与遗传学研究进展及展望. *科学通报*, 69(11): 1417–1428. [Chen S G, Gao Y, Chen N B, et al. 2024. Review and prospect of archaeological and genetic research on yak domestication on the Tibetan Plateau. *Chinese Science Bulletin*, 69(11): 1417–1428.]
- 李琳, 郭怡婷, 秦鸿楠, 等. 2023. 不同海拔牦牛骨骼肌线粒体呼吸链复合酶活性及氧化应激指标的差异分析. *黑龙江畜牧兽医* (11): 121–125, 130. [Li L, Guo Y T, Qin H N, et al. 2023. Differential analysis of mitochondrial complex enzyme activity and oxidative stress indexes of yak skeletal muscle at different altitudes. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, (11): 121–125, 130.]
- 廖博, 崔燕, 杨雪, 等. 2018. HSP70 在牦牛肠道中的分布与变化规律. *畜牧兽医学报*, 49(8): 1735–1742. [Liao B, Cui Y, Yang X, et al. 2018. Distribution and change rule of HSP70 in yak intestine. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 49(8): 1735–1742.]
- 唐舒宁, 龚丽景, 赵小雅, 等. 2019. 低氧影响蛋白质合成和分解的平衡诱导骨骼肌萎缩. *中国生物化学与分子生物学报*, 35(12): 1352–1360. [Tang S N, Gong L J, Zhao X Y, et al. 2019. Hypoxia induces skeletal muscle atrophy by affecting the balance of protein synthesis and decomposition. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(12): 1352–1360.]
- 王磊. 2022. 基于代谢组学的优化溃结方治疗溃疡性结肠炎临床观察及机制研究. 沈阳: 辽宁中医药大学博士学位论文. [Wang L. 2022. Clinical observation and mechanism study of optimized Kuijie formula in the treatment of ulcerative colitis based on metabolomics. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Doctoral dissertation.]
- 周豪, 陈涛, 吴爱悯. 2024. 氧化应激对线粒体功能及椎间盘细胞的影响. *四川大学学报: 医学版*, 55(2): 249–255. [Zhou H, Chen T, Wu A M. 2024. Effects of oxidative stress on mitochondrial functions and intervertebral disc cells. *Journal of Sichuan University: Medical Sciences*, 55(2): 249–255.]
- 周娟, 孟祥琼, 秦鸿楠, 等. 2022. 不同海拔牦牛骨骼肌肌纤维类型和 MYHC 基因表达的比较. *中国兽医学报*, 42(6): 1263–1269. [Zhou J, Meng X Q, Qin H N, et al. 2022. Comparative on skeletal muscle fiber types and MYHC gene expression in yaks at different altitudes. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 42(6): 1263–1269.]