

Ghrelin-GHSR 通路在急性低氧暴露大鼠胃炎症反应中的调节作用

付鹏宇¹⁾, 龚丽景^{2)*}, 朱镕鑫¹⁾, 胡 扬³⁾

(¹⁾ 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084; (²⁾ 北京体育大学中国运动与健康研究院, 北京 100084;

(³⁾ 北京体育大学校长办公室, 北京 100084)

摘要 由胃合成分泌的食欲刺激激素(ghrelin)可通过结合并激活生长激素促分泌激素受体, (growth hormone secretagogue receptor, GHSR)在调节胃功能方面发挥重要作用。急性低氧暴露导致的消化系统营养吸收障碍和胃肠道炎症反应是否通过 Ghrelin-GHSR 通路调控尚无研究。本研究采用 Wistar 大鼠为研究对象, 随机分为 4 组: 低氧暴露 0 h 组、12 h 组、24 h 组和 48 h 组, 低氧干预在 10.2% 氧浓度的低氧房中进行。干预前后记录体重; 通过分子生物学检测指标评价胃组织炎症因子含量、胃组织食欲刺激激素和下丘脑 GHSR mRNA 相对含量和蛋白质表达水平。本研究证实, 随着低氧暴露时间的延长, 大鼠体重减少量逐渐增加(12 h: 3.73 ± 3.08 g、24 h: 8.77 ± 5.04 g、48 h: 12.53 ± 6.16 g); 胃组织炎症因子 IL-2、IL-4、IL-10、TNF α 和 MCP-1 蛋白含量在低氧 12 h 后增加(4816.9 ± 983.7 / 9074.5 ± 1107.8 / 18895.1 ± 2967.5 / 37.1 ± 9.8 / 143.5 ± 12.5 pg/mL vs. 166.1 ± 34.6 / 38.3 ± 4.2 / 1429.6 ± 123.9 / 1.7 ± 0.3 / 13.5 ± 2.1 pg/mL), 随着低氧时间延长, 炎症因子水平逐渐下降至正常水平(24 h: 846.4 ± 94.8 / 1269.8 ± 167.9 / 5769.7 ± 892.6 / 7.5 ± 2.1 / 39.3 ± 8.5 pg/mL; 48 h: 546.5 ± 97.3 / 374.9 ± 84.9 / 1889.7 ± 982.3 / 2.1 ± 0.8 / 24.6 ± 6.4 pg/mL); 低氧 12 h 后胃组织食欲刺激激素 mRNA 水平较 0 h 组下降(0.49 ± 0.06 vs. 1, $P < 0.05$), 48 h 后上升(3.79 ± 0.54 vs. 1, $P < 0.01$), 胃组织的食欲刺激激素蛋白含量在低氧 24 h 和 48 h 后均出现上升(1.23 ± 0.15 / 1.16 ± 0.12 vs. 1, $P < 0.05$); 下丘脑 GHSR mRNA 在低氧 48 h 后上升(1.99 ± 0.29 vs. 1, $P < 0.01$), 蛋白质水平在低氧 24 h 和 48 h 后均出现下降(0.35 ± 0.06 / 0.48 ± 0.04 vs. 1, $P < 0.05$)。表明急性低氧暴露会导致 Ghrelin-GHSR 通路下调, 进而促进胃组织炎症反应, 而随着低氧暴露时长的延续, Ghrelin-GHSR 通路可通过下调胃组织中炎症因子水平而避免消化系统的进一步损伤。

关键词 低氧暴露; 胃炎症; 胃食欲刺激激素-生长激素促分泌激素受体信号通路; 炎症因子
中图分类号 G804.7

Regulatory Effects of Ghrelin-GHSR Pathway on Gastric Inflammation in Rats by Acute Hypoxic Exposure

FU Peng-Yu¹⁾, GONG Li-Jing^{2)*}, ZHU Rong-Xin¹⁾, HU Yang³⁾

(¹⁾ Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing, 100084, China;

(²⁾ China Academy of Sport and Health Sciences of Beijing Sport University, Beijing, 100084, China;

(³⁾ President's Office of Beijing Sport University, Beijing, 100084, China)

收稿日期: 2018-05-25; 修回日期: 2018-07-06; 接受日期: 2018-08-25

中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(No. 2017SYS009)

* 通讯作者 Tel: 010-62989303; E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

Received: May 25, 2018; Revised: July 6, 2018; Accepted: August 25, 2018

The Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2017SYS009)

* Corresponding author Tel: 010-62989303; E-mail: lijing.gong@bsu.edu.cn

Abstract Ghrelin, which is secreted by the stomach, plays an important role in regulating gastric function by binding and activating the growth hormone secretagogue receptor (GHSR). Whether nutrient absorption disorder or gastrointestinal inflammatory response of the digestive system caused by acute hypoxic exposure can be regulated by the Ghrelin-GHSR pathway is still unknown. In this study, Wistar rats were randomly divided into 4 groups with hypoxic exposure for 0 h, 12 h, 24 h and 48 h respectively. Hypoxia intervention was performed in a hypoxic chamber with 10.2% oxygen concentration. The body weight was recorded before and after intervention, the components of gastric inflammatory factors, the gastric Ghrelin and hypothalamic GHSR mRNA and protein expression levels were evaluated by molecular biological detection. This study confirmed that, with the prolongation of hypoxic exposure time, the weight loss of rats gradually increased (12 h: 3.73 ± 3.08 g, 24 h: 8.77 ± 5.04 g, 48 h: 12.53 ± 6.16 g); The levels of inflammatory factors IL-2, IL-4, IL-10, TNF α and MCP-1 in gastric tissue increased after hypoxia for 12 h ($4816.9 \pm 983.7 / 9074.5 \pm 1107.8 / 18895.1 \pm 2967.5 / 37.1 \pm 9.8 / 143.5 \pm 12.5$ pg/mL *vs.* $166.1 \pm 34.6 / 38.3 \pm 4.2 / 1429.6 \pm 123.9 / 1.7 \pm 0.3 / 13.5 \pm 2.1$ pg/mL). As the hypoxic time prolongs, the levels of inflammatory factors gradually decreased to normal levels (24 h: $846.4 \pm 94.8 / 1269.8 \pm 167.9 / 5769.7 \pm 892.6 / 7.5 \pm 2.1 / 39.3 \pm 8.5$ pg/mL; 48 h: $546.5 \pm 97.3 / 374.9 \pm 84.9 / 1889.7 \pm 982.3 / 2.1 \pm 0.8 / 24.6 \pm 6.4$ pg/mL); The mRNA levels of gastric Ghrelin decreased after hypoxia 12 h (0.49 ± 0.06 *vs.* 1, $P < 0.05$), but increased after 48 h (3.79 ± 0.54 *vs.* 1, $P < 0.01$) as compared with the control group with 0 h exposure. Ghrelin protein content increased after 24 h and 48 h of hypoxia ($1.23 \pm 0.15 / 1.16 \pm 0.12$ *vs.* 1, $P < 0.05$); GHSR mRNA in hypothalamus increased for 48 h (1.99 ± 0.29 *vs.* 1, $P < 0.01$), and protein levels decreased after 24 h and 48 h ($0.35 \pm 0.06 / 0.48 \pm 0.04$ *vs.* 1, $P < 0.05$). These data indicate that acute hypoxic exposure firstly can block Ghrelin-GHSR pathway and promote gastric inflammatory response. However, with the continuation of hypoxia, Ghrelin-GHSR pathway can prevent further damage of the digestive system by down-regulating the levels of gastric inflammatory factors.

Key words hypoxic exposure; gastric inflammation; Ghrelin-GHSR pathway; inflammatory factors

近年来,高原训练作为一种提高机体氧运输、心供血和骨骼肌代谢能力的有效训练手段,已被越来越多的运动队使用;同时,随着大众健身意识的提高,低氧减肥和高原探险旅游更是方兴未艾^[1]。海拔 5 000 ~ 5 500 m 的高度对机体维持原有体重和体成分都将是一个挑战,关键原因在于能量摄入的减少,表现为食欲下降所致的营养摄入减少和胃肠道的炎症反应所致的吸收能力减弱,但具体机体尚不明确^[2, 3]。

低氧环境所致的胃肠反应主要与胃黏膜损伤所致的胃炎症状态有关^[4],表现为食欲不振、恶心、呕吐、腹胀、乏力等消化系统障碍^[5];内镜下可见胃蠕动减慢、胆汁反流及胃黏膜呈现点片状出血或糜烂等症^[6]。其中低氧所致的机体缺血缺氧状态可能是造成这一现象的主要原因^[7]。研究发现,肢体缺血会引起远端器官(肺、肝、肾和胃肠道)缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I-R),造成胃粘膜损伤,诱发应激性溃疡^[8]。此过程中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生可能在 I-R 诱导胃粘膜损伤的发病机制中发挥重要作用^[9]。此外,胃黏膜血流减少会诱发凋亡相关基因表达,进一步增加损

伤的易感性和炎症反应发生风险^[10]。而此应激过程中,神经系统中的下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis),以及内分泌系统中的胃肠激素都将被动员以发挥防御作用^[11, 12],避免消化系统的进一步损伤。

胃分泌合成的食欲刺激激素(ghrelin)是生长激素分泌激素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)唯一的内源性配体^[13],通过结合并激活位于下丘脑和垂体细胞膜上的内源性 GHSR-1a,从而发挥调节生长激素(growth hormone, GH)释放、食欲和摄食行为、影响胃肠蠕动和能量平衡、抗炎及参与免疫系统进程的作用^[14, 15]。研究显示,食欲刺激激素可作为胃组织 I-R 的保护剂,并可抑制 ROS 的产生^[16]。那么,作为调控能量平衡和炎症反应的重要环节, Ghrelin-GHSR 通路是否参与低氧暴露所引起的胃组织炎症反应,进而调节机体体重,以及不同低氧暴露时长对该通路的影响仍鲜有研究。本文拟观察不同时长低氧暴露对大鼠下丘脑 GHSR 和胃组织食欲刺激激素及炎症因子表达变化,以探究低氧暴露对消化系统影响的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

6 周龄雄性 Wistar 大鼠 24 只[中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 许可编号 SCXK-(军)2012-0004], 常氧环境中适应性喂养 1 周, 随机分为低氧暴露 0 h 组、12 h 组、24 h 组和 48 h 组。低氧干预在氧含量 10.2% (相当于海拔 5 000 m 高度) 的常压低氧房 [低氧制造设备: 制氮机(北京创文气体有限公司), 冻干机(杭州超滤)和空气压缩机(美国英格索兰)] 中进行。干预过程中, 各组均饲喂普通维持饲料, 自由摄食饮水。动物饲养于北京体育大学动物实验室[许可证号 SYXK(京)2011-0034]。

1.2 胃组织和下丘脑的取材

低氧 0 h 组于适应性喂养 1 周称重宰杀, 其它低氧组在低氧暴露前后称重, 所有动物腹腔注射 5% 戊巴比妥钠溶液 (45 mg/kg) 麻醉后, 打开腹腔取胃底部组织, 开颅取下丘脑。一部分的胃组织和下丘脑放入 RNA 保存液, 置于 4℃ 冰箱保存待测; 另一部分的胃组织和下丘脑用锡纸包好投入液氮冷冻, 置于 -80℃ 保存。

1.3 蛋白质芯片测定胃中炎症因子含量

胃组织使用碧云天裂解液提取总蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度, 进行膜芯片封闭和孵育: 孵育板中每个孔加入 2 mL 的 1 × 封闭缓冲液, 将膜芯片浸没其中, 室温振荡孵育 30 min; 抽去封闭液, 每张膜芯片加入 1 mL 的胃组织样品, 室温振荡孵育 1 ~ 2 h; 抽去样品, 每孔加入 2 mL 的 1 × 洗液 I 清洗 3 次, 每次 5 min, 室温摇床震荡, 用去离子水稀释 20 × 洗液 I; 抽取洗液 I, 每孔加入 2 mL 的 1 × 洗液 II 重复上述步骤洗膜; 抽空后加入 2 mL 用封闭液 1 000 倍稀释的生物素标记抗体, 室温振荡孵育 1 ~ 2 h, 清洗; 每张膜加入 2 mL 的 1 000 倍稀释的 HRP-链霉亲和素, 室温振荡孵育 2 h, 清洗。加入 500 μL 终止液 (检测缓冲液 C 和 D 等体积混合), 孵育 2 min, 使用化学发光成像仪曝光显影。生物素标记芯片检测数据及图像的采集: 按照 RayBiotech 大鼠炎症膜芯片 1AAH-CYT-1-2 试剂盒说明书操作, 检测的细胞因子包括白细胞介素-1α/1β/2/4/10/13 (interleukin-1α/1β/2/4/10/13, IL-1α/1β/2/4/10/13)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor α, TNF-α)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant

protein-1, MCP-1) 和 γ-干扰素 (Interferon-γ, IFN-γ), 使用红外荧光扫描仪扫描芯片, 将信号强度转换为灰度 TIFF 格式的图片文件保存。采用仪器自带 QAR-INF-1 的分析软件提取数据。

1.4 RT-PCR 测定胃组织食欲刺激激素和下丘脑 GHS-R mRNA 相对含量

使用总 RNA 提取试剂盒提取胃和下丘脑总 RNA, 用 Nano Drop 超微量分光光度计检测总 RNA 浓度, 再用逆转录试剂盒获得 cDNA 后进行实时荧光定量 PCR 扩增。使用 Premier 5.0 软件设计扩增引物, 引物由上海生工生物工程有限公司代为合成。Ghrelin 上游引物 5'-AAAGGAATCCAAGAAGCC ACC-3', 下游引物 5'-GCCTCTTCTGCTTGTCCTCT GT-3'; GHSR 上游引物 5'-TTCGCCATCTGCTTC CCTC-3', 下游引物 5'-TCTCCGCCACAGCTTCCTC-3'; 选择 18S 作为内参基因 (德国 QIAGEN QT01036875), 上游引物 5'-ACACGGACAGGATT GACAGA-3', 下游引物 5'-GGACATCTAAGGGCA TCACAG-3'。使用天根生物公司 Super Real Pre Mix Plus (SYBR Green) 预混试剂盒进行 RT-PCR 反应, 反应条件为 95℃ 变性 3 min, 循环扩增 95℃ 3 s → 60℃ 20 s (循环 40 次), 添加溶解曲线。实时荧光定量数值由仪器 (ABI7500 实时荧光定量仪) 自带软件读取并进行分析。采用比较阈值法对目的基因的相对表达量进行分析。

1.5 Western 印迹测定胃组织食欲刺激激素和下丘脑 GHSR 蛋白含量

提取胃、下丘脑总蛋白质, BCA 法测定总蛋白质浓度, 将定量后的总蛋白质用 10% SDS-PAGE 电泳分离, 硝酸纤维素膜转膜, 3% BSA 封闭 1 h, 4℃ 孵育抗食欲刺激激素、Anti-GHSR 抗体 (1: 400/1: 300, 美国 Abbiotec; 内参为 β-肌动蛋白 (β-actin), 浓度: 1: 1 000) 过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min (后 TBST 冲洗依此标准进行), 室温孵育山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗 (1: 1 000, 北京中杉金桥生物技术有限公司) 1 h, TBST 冲洗, ECL 发光, 于暗室曝光, 用 Quantity One 软件对各条带进行定量。

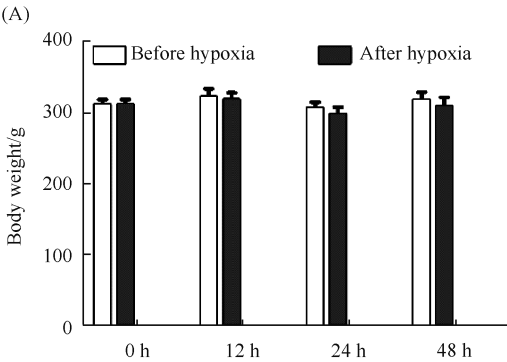
1.6 统计学分析

所有数据均以平均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。数据的统计分析使用 SPSS19.0 软件分析, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 体重随低氧暴露时长增加而下降

本研究于低氧暴露 0 h, 12 h, 24 h 和 48 h 称量大鼠体重, 并对比不同低氧暴露时长下大鼠体重的差异, 结果见 Fig. 1。不同时长的低氧暴露造成大鼠体重不同程度下降, 且随低氧暴露时间的延长, 体重降幅[(低氧前体重-低氧后体重)/低氧前体重] 逐渐增加 (12 h 组: 1.1%; 24 h 组: 2.8%; 48 h 组: 3.0%)。其中 24 h 组和 48 h 组的体重差值 (低氧前体重-低氧后体重) 较 0 h 组上调非常显著 (24 h: 8.77 ± 5.04 g, 48 h: 12.53 ± 6.16 g, $P < 0.01$), 48 h 组较 12 h 组显著上调 (12.53 ± 6.16 g vs. 3.73 ± 3.08 g, $P < 0.05$)。



2.2 低氧暴露导致胃组织炎症因子水平上调

本研究采用蛋白质芯片检测胃组织炎症因子水平, 其中炎症因子 IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 和 MCP-1 的蛋白质含量出现显著变化, 结果见 Fig. 2, 其余炎症因子变化水平甚微。低氧 12 h 组炎症因子 IL-2、IL-4、IL-10、TNF- α 和 MCP-1 的蛋白质含量较 0 h 组非常显著性增高 (4816.9 ± 983.7 / 9074.5 ± 1107.8 / 18895.1 ± 2967.5 / 37.1 ± 9.8 / 143.5 ± 12.5 pg/mL vs. 166.1 ± 34.6 / 38.3 ± 4.2 / 1429.6 ± 123.9 / 1.7 ± 0.3 / 13.5 ± 2.1 pg/mL, $P < 0.01$); 24 h 组 TNF- α 和 MCP-1 蛋白水平显著低于 0 h 组 (7.5 ± 2.1 / 39.3 ± 8.5 pg/mL vs. 1.7 ± 0.3 / 13.5 ± 2.1 pg/mL, $P < 0.05$), 其他炎症因子有下降趋势; 48 h 组炎症因子水平逐渐下降, 但仍高于 0 h 组。

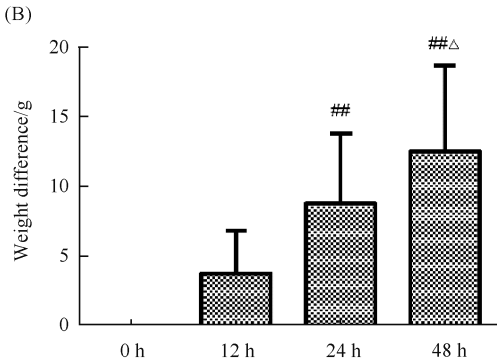


Fig.1 Body weight (A) and differences in body weight (B) of rats under different hypoxia intervention time Rats were placed under normoxic (21%) (0 h group) or hypoxic conditions (10.2%) for 12 hours (12 h group), 24 hours (24 h group) or 48 hours (48 h group) and the body weights were measured at the end of hypoxic exposure respectively and the 0 hour group weighed after one week of adaptive feeding. (A) Changes in body weight before and after hypoxic intervention; (B) Differences in body weights before and after hypoxic intervention. The differences in body weight between the 24 h group and the 48 h group (difference in body weight before and after hypoxia) were significantly higher than that in 0 h group, and it significantly increased in the 48 h group compared with the 12 h group. Data present mean \pm SD ($n = 6$). $^{##}P < 0.01$ vs. 0 h group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs. 12 h group

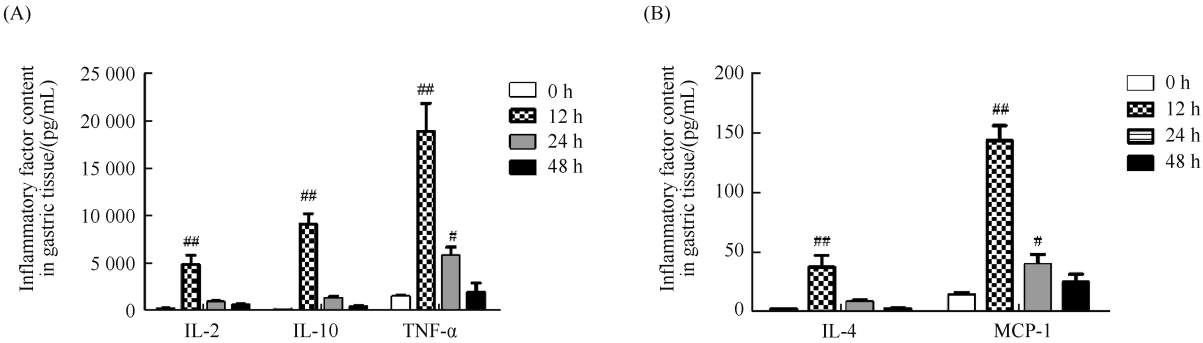


Fig.2 Protein levels of gastric inflammatory factors IL-2, IL-10, TNF α , IL-4 and MCP-1 The levels of gastric inflammatory factors of four groups were detected by protein microarray. The protein contents of inflammatory factors IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α and MCP-1 were significantly changed. The protein levels of IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α and MCP-1 in 12 h group were significantly higher than those in 0 h group. The levels of TNF- α and MCP-1 in 24 h group were significantly higher than 0 h group. The levels of IL-2, IL-4 and IL-10 in 24 h group and all the inflammatory factors were gradually lower than that in 12 h group, but still higher than that in 0 h group. Data present mean \pm SD ($n = 6$). $^{#}P < 0.05$ vs. 0 h group; $^{##}P < 0.01$ vs. 0 h group

2.3 低氧暴露导致胃组织食欲刺激激素和下丘脑 GHSR mRNA 相对水平上升

利用 RT-PCR 检测胃组织中食欲刺激激素 mRNA 和下丘脑中 GHSR mRNA 相对表达量,结果见 Fig. 3。胃组织中,低氧暴露 12 h,食欲刺激激素 mRNA 水平较 0 h 组显著下降(0.49 ± 0.06 vs. 1, $P < 0.05$),而暴露 24 h 较 0 h 组的食欲刺激激素 mRNA 水平出现显著上升(1.45 ± 0.14 vs. 1, $P < 0.05$),暴露 48 h 较 0 h 组非常显著性上升(3.79 ± 0.54 vs. 1, $P < 0.01$);下丘脑中,低氧暴露 12 h 和 24 h 后 GHSR mRNA 水平较 0 h 组下降,但无显著性差异,而 48 h 后较 0 h 组出现非常显著性上升(1.99 ± 0.29 vs. 1, $P < 0.01$)。

2.4 低氧暴露导致胃组织食欲刺激激素蛋白含量增加

采用 Western 印迹法检测不同时长低氧暴露下胃底部食欲刺激激素蛋白的水平。以食欲刺激激素为目的蛋白质,β-肌动蛋白为内参蛋白质,灰度值见 Fig. 4 A;统计各组蛋白质的相对表达量发现,低氧 12 h 组胃食欲刺激激素蛋白水平较 0 h 组有出现下降,但无显著性差异;而 24 h 和 48 h 组较 0 h 组均显著上升($1.23 \pm 0.15 / 1.16 \pm 0.12$ vs. 1, $P < 0.05$),较 12 h 组(0.63 ± 0.09 , $P < 0.05$)也显著上升,结果见 Fig. 4B。

2.5 低氧暴露导致下丘脑 GHSR 蛋白含量减少

采用 Western 印迹检测不同时长低氧暴露下下丘脑 GHSR 蛋白水平。以 GHSR 为目的蛋白,β-Actin 为内参蛋白,灰度值见 Fig. 5 A;统计各组蛋白质的相对表达量发现,低氧干预各组下丘脑 GHSR

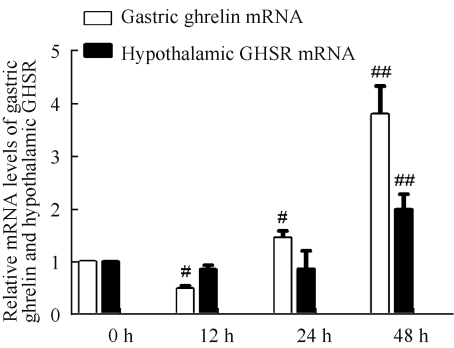


Fig. 3 The levels of Ghrelin mRNA in the gastric tissue and GHSR mRNA in the hypothalamus In gastric tissue, the level of ghrelin mRNA in 12 h group was significantly lower, while the levels of ghrelin mRNA in 24 h and 48 h groups were significantly higher as compared with 0 h group. In the hypothalamus, there was no difference in the levels of GHSR mRNA of the 12 h and 24 h groups, whereas it showed an significant increase in the 48 h as compared with the 0 h group. Data present mean ± SD (n = 6). #P < 0.05 vs. 0 h group; ##P < 0.01 vs. 0 h group

蛋白水平较 0 h 组均下降,其中 24 h 和 48 h 组下降显著($0.35 \pm 0.06 / 0.48 \pm 0.04$ vs. 1, $P < 0.05$),且 24 h 组和 48 h 组较 12 h 组也下降显著($0.35 \pm 0.06 / 0.48 \pm 0.04$ vs. 0.74 ± 0.12 , $P < 0.05$),但 48 h 组较 24 h 组有上升的趋势,见 Fig. 5B。

3 讨论

世居平原者急进高原后,出现胃肠不适症状的可达 60%^[17]。此类急性消化系统症状,常在发病初期急骤^[18]。高原环境首先造成中枢神经系统缺氧水肿,进而影响下丘脑,引起植物性神经功能紊

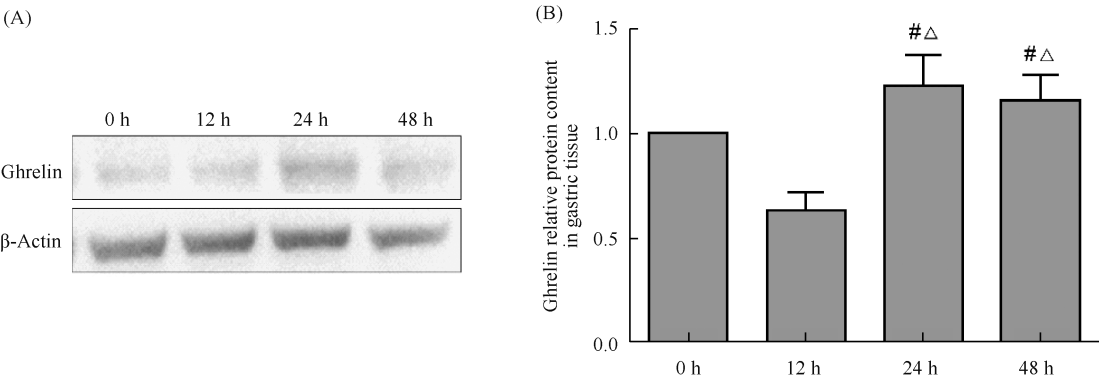


Fig. 4 Ghrelin protein levels in gastric tissue The levels of ghrelin protein in gastric tissue shown in Western blot (A) and bar graph (B). The protein levels of gherlin in 12 h group were lower than that of 0 h group, but there was no significant difference. The levels of ghrelin protein in the 24 h and 48 h groups showed a significant increase as compared with the 0 h group and 12 h groups. β-Actin was used as a loading control. Data present mean ± SD (n = 6). #P < 0.05 vs. 0 h group; ΔP < 0.05 vs. 12 h group.

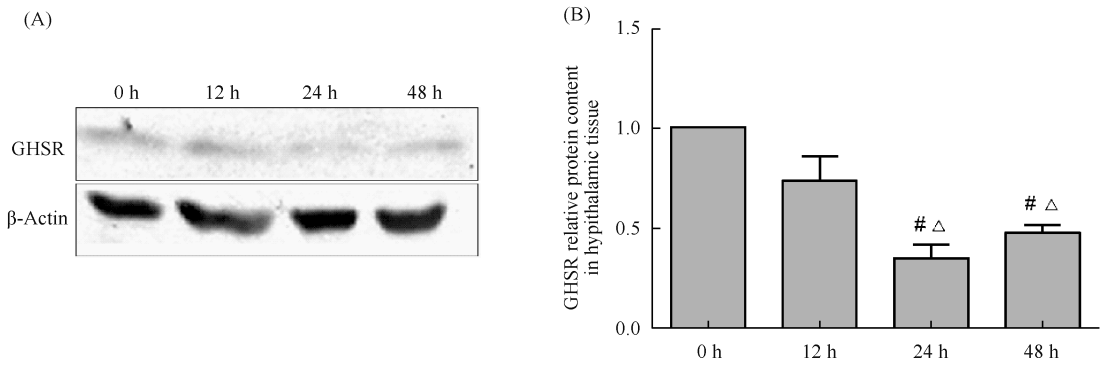


Fig. 5 GHSR protein levels in hypothalamus The levels of ghrelin protein in hypothalamus lysates shown in Western blot (A) and bar graph (B). The levels of GHSR protein in hypothalamus of 24 h and 48 h groups were lower as compared with 0 h group and 12 h group. There was an upward trend of GHSR level in 48 h group as compared to the 24 h group. β -Actin was used as a loading control. Data present mean \pm SD (n = 6). [#] $P < 0.05$ vs. 0 h group; $\Delta P < 0.05$ vs. 12 h group.

乱;持续低氧暴露诱发全身缺血缺氧状态^[7],直接或间接导致胃部 I-R,并伴随氧化应激状态和凋亡基因表达增加,致使胃黏膜屏障功能受损,导致炎症反应发生^[8-10]。同时,随着暴露时长的增加,机体逐渐启动保护机制以促进低氧服习,HPA 轴和胃肠激素都将被动员^[11, 12],以抵抗低氧对消化系统的进一步损伤。

其中,由胃黏膜 X/A 样内分泌细胞分泌的肽类激素食欲刺激激素被认为在胃 I-R 损伤中发挥保护剂的作用,它是由日本学者 Kojima 于 1999 年在大鼠胃部发现的 GHSR 的唯一内源性配体^[13]。食欲刺激激素发挥作用有赖于与 GHSR 结合,后者作为一种 G 蛋白偶联受体,广泛表达于中枢神经系统(主要为下丘脑)和周围免疫细胞中^[19]。食欲刺激激素被熟知的是其食欲调节功能^[20],此外,它还是一种免疫调节激素,有助于减少促炎因子、增加抗炎因子的水平^[21],可在消化系统障碍中发挥保护作用。

3.1 低氧暴露对 Ghrelin-GHSR 信号通路的影响

食欲刺激激素由胃分泌后进入血液,在下丘脑弓状核与 GHSR 结合后刺激神经元合成神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY),后者再进一步与其受体结合后发挥作用^[22]。低氧刺激会诱发下丘脑双侧室旁核和 HPA 轴损伤,进而影响 Ghrelin-GHSR 通路和食欲刺激激素的表达^[23]。大鼠在模拟海拔 3 000 m 和 5 000 m 低压低氧环境下暴露 24 h,血清食欲刺激激素水平和胃黏膜食欲刺激激素阳性细胞密度显著降低^[18]。本研究中胃食欲刺激激素 mRNA 和蛋白质水平在低氧暴露 12 h 时急剧下降,随着低氧暴露时间的延长,食欲刺激激素水平逐渐上调,且高

于正常水平;下丘脑 GHSR mRNA 水平在低氧暴露 12 h 和 24 h 时均出现下降,48 h 时开始上调,蛋白质水平在低氧 12 h 和 24 h 后逐步下调,48 h 后出现回升,但仍未回归正常水平。食欲刺激激素和 GHSR 随低氧暴露时长的变化趋势基本一致,先下降再上升的变化趋势可能与机体对低氧环境的适应有关。大鼠暴露于模拟海拔 5 000 m 的低氧舱中暴露 1、3 个月,下丘脑和血管内皮食欲刺激激素基因表达较常氧组无显著差异^[24],提示长期低氧暴露不再造成食欲刺激激素下调。此外,外源性食欲刺激激素可抵抗缺氧/复氧所致的胃上皮细胞损伤, GHSR-磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 信号通路可能参与其修复过程^[25]。故胃中食欲刺激激素在低氧暴露后期上调水平超过常氧,可能与其参与低氧前期所造成的胃损伤修复有关;而低氧暴露后期下丘脑 GHSR 水平虽出现上调但仍未回到正常水平,提示中枢神经系统可能对低氧暴露刺激更为敏感。

3.2 Ghrelin-GHSR 信号通路介导低氧暴露所致的胃部炎症反应

胃肠道在发挥消化功能的同时,也充当了细菌及其他有害物质进入机体的主要途径。低氧环境是一种严重的外界应激刺激,极易造成胃肠消化系统损伤,进而影响机体的食欲和吸收机能,导致消化系统乃至全身处于炎症反应状态,加剧了高原急性期的不适症状^[26, 27]。其中胃肠应激反应、激素分泌失调、运动功能紊乱、氧自由基损伤及缺血缺氧可能是导致急性低氧暴露下胃黏膜损伤的主要原因^[28]。

食欲刺激激素作用于先天性和适应性免疫系

统,通过发挥抗炎作用而直接影响免疫应答机能^[29]。在先天性免疫系统中,食欲刺激激素作用于巨噬细胞以诱导抗炎状态(M2 特征)并抑制促炎状态(M1 特征)。在适应性免疫系统中,食欲刺激激素表现出抗炎作用,抑制辅助性 T 细胞 1(helper T cell 1,Th1)细胞、增加 Th2 细胞并调节 T 细胞极化,有助于减少促炎因子和提高抗炎因子水平,示意图见 Fig. 6^[21]。模拟海拔 4 000 m 的低氧暴露,导致大鼠小肠核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)、TNF- α 和 IL-6 水平上调^[30],而食欲刺激激素可降低细胞分泌 IL-8 和 MCP-1 的能力,并抑制 TNF- α 刺激下 NF- κ B 的活化^[31]。食欲刺激激素可在结肠炎发挥抗炎作用,表现为降低结肠黏膜炎性因子 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-15、IL-17 和 IL-18 的表达,提高抗炎因子 IL-10 的表达,从而提高存活率^[29]。食欲刺激激素的这种保护作用是由其特异性受体 GHSR 结合所介导的,而 GHSR 正逐步被当作治疗急慢性炎症反应的新靶点^[21]。

蛋白质芯片技术是将已知的蛋白质分子探针(酶、抗原抗体、受体配体、细胞因子等)固定在载体上,形成高密度排列的蛋白质点阵,通过与未知蛋白质液体(体液、细胞和组织提取液)特异性结合,经过特定的扫描后转化为相应的数据,通过分析比较蛋白质表达情况,以并行、高通量地检测、分析和处理蛋白质样品^[32, 33]。本研究中蛋白质芯片结果显示,促炎因子 IL-2、TNF α 和 MCP-1 和抗炎因子 IL-4、IL-10 蛋白质水平在低氧暴露 12 h 后均出现显著上调,随着低氧时间的延长下调至正常水平。此变化趋势与食欲刺激激素和 GHSR 的变化趋势相异,体现出 Ghrelin-GHSR 的抗炎作用。

总体而言,模拟海拔 5 000 m 的低氧暴露 12 h 时,大鼠胃组织中食欲刺激激素和下丘脑 GHSR 含量出现显著下降,伴随着促炎因子水平的增加、抗炎因子水平反馈性的上调和体重的降低;随着低氧时间的延长,机体对低氧刺激逐渐适应,表现为食欲刺激激素和 GHSR 含量增加及炎症因子水平下调,进而保护胃和下丘脑免受低氧进一步损伤。但体重仍表现出继续下调的趋势,可能是由于低氧对机体除消化系统和能量平衡外的因素(如低氧暴露所致的肌萎缩等)所致。

急性低氧刺激可导致 Ghrelin-GHSR 通路下调大鼠胃组织的炎症状态,促使体重下降;随着低氧暴露时间的延长,Ghrelin-GHSR 通路可通过降低炎症

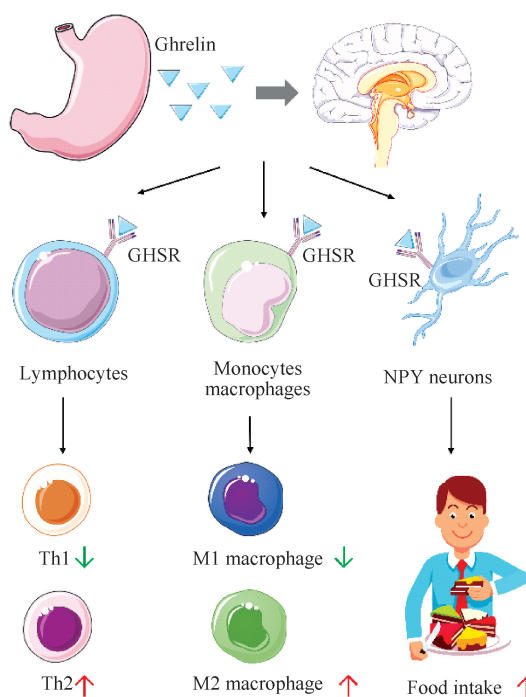


Fig. 6 The orexigenic and immune roles of ghrelin

Ghrelin, secreted by gastric X/A like cells, binds to its receptor GHSR in the hypothalamus and activates NPY neurons in the mediobasal hypothalamus. In the innate immune system, Ghrelin acts on macrophages and induces an anti-inflammatory state (M2 profile) and inhibits proinflammatory macrophages (M1 profile). In the adaptive immune system, Ghrelin exhibits an anti-inflammatory role. Ghrelin inhibits Th1 cells and increases the polarization of Th2 and regulatory T cells. These actions contribute to the reduced levels of proinflammatory cytokines and increased levels of anti-inflammatory cytokines

因子水平而减轻胃组织损伤,提高消化系统对低氧刺激的适应。

参考文献 (References)

- [1] 高欢, 高炳宏, 冯连世, 等. 长时间高原训练对优秀赛艇运动员免疫功能及血浆瘦素的影响[J]. 中国运动医学杂志 (Gao H, Gao BH, Feng LS, *et al.* Effects of long-term altitude training on immune function and plasma leptin of elite rowers[J]. Chin J Sports Med), 2011, **30**(11): 986-991
- [2] Westerterp KR, Kayser B. Body mass regulation at altitude[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, **18**(1): 1-3
- [3] Kayser B, Verges S. Hypoxia, energy balance and obesity: from pathophysiological mechanisms to new treatment strategies[J]. Obes Rev, 2013, **14**(7): 579-592
- [4] 邵珂, 单体栋, 张方信. 高原低氧致胃肠应激性溃疡的研究进展[J]. 胃肠病学 (Shao W, Shan TD, Zhang FX. Progress in study on gastrointestinal stress ulcer caused by high altitude hypoxia[J]. Chin J Gastroenterol), 2011, **16**(1): 57-59
- [5] Wiseman C, Freer L, Hung E. Physical and medical characteristics of successful and unsuccessful summiteers of Mount Everest in 2003[J]. Wilderness Environ Med, 2006, **17**(2): 103-108
- [6] 张久聪, 耿闻男, 张方信, 等. 不同海拔高度官兵 519 例胃镜临床分析[J]. 西北国防医学杂志 (Zhang JC, Ge WN,

- Zhang FX, *et al.* Clinical analysis of 519 cases of officers and soldiers at different altitudes[J]. *Med J Natl Defending Forces Northwest Chin*, 2016, **37**(1): 37-40
- [7] 吴天一. 关注高原胃肠道出血症[J]. 高原医学杂志 (Wu TY. Concerning the hemorrhage of the gastrointestinal tract in the high altitude[J]. *J High Alt Med*), 2000, **10**(1): 1-3
- [8] Wang T, Leng YF, Zhang Y, *et al.* Oxidative stress and hypoxia-induced factor 1alpha expression in gastric ischemia[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, **17**(14): 1915-1922
- [9] Sasaki M, Joh T. Oxidative stress and ischemia-reperfusion injury in gastrointestinal tract and antioxidant, protective agents [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2007, **40**(1): 1-12
- [10] Tarnawski A, Pai R, Deng X, *et al.* Aging gastropathy-novel mechanisms: hypoxia, up-regulation of multifunctional phosphatase PTEN, and proapoptotic factors [J]. *Gastroenterology*, 2007, **133**(6): 1938-1947
- [11] Bouchoucha M, Hejnar M, Devroede G, *et al.* Anxiety and depression as markers of multiplicity of sites of functional gastrointestinal disorders: A gender issue? [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2013, **37**(4): 422-430
- [12] Crona D, Maclaren R. Gastrointestinal hormone concentrations associated with gastric feeding in critically ill patients[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2012, **36**(2): 189-196
- [13] Kojima M, Hosoda H, Date Y, *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, **402**(6762): 656-660
- [14] Chopin LK, Seim I, Walpole CM, *et al.* The ghrelin axis——does it have an appetite for cancer progression? [J]. *Endocr Rev*, 2012, **33**(6): 849-891
- [15] Heppner KM, Piechowski CL, Müller A, *et al.* Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors[J]. *Diabetes*, 2014, **63**(1): 122-131
- [16] Eter EE, Tuwaijiri AA, Hagar H, *et al.* *In vivo* and *in vitro* antioxidant activity of ghrelin: Attenuation of gastric ischemic injury in the rat[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, **22**(11): 1791-1799
- [17] Lipp F J, Neubauer S, Schipfer S, *et al.* Hypobaric hypoxia causes body weight reduction in obese subjects [J]. *Obesity* (Silver Spring), 2010, **18**(4): 675-681
- [18] 孙正启, 廉会娟, 赵洁, 等. 模拟高原低压低氧对大鼠血清和胃黏膜 Ghrelin 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志 (Sun ZQ, Lian HJ, Zhao J, *et al.* Effects of simulated low altitude hypoxia on serum and gastric mucosal ghrelin expression in rats [J]. *World Chin J Digestol*), 2011, **19**(16): 1726-1730
- [19] Baatar D, Patel K, Taub DD. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, **340**(1): 44-58
- [20] Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, *et al.* Central nervous system control of food intake[J]. *Nature*, 2000, **404**(6778): 661-671
- [21] Pereira JADS, da Silva FC, de Moraes-Vieira PMM. The Impact of Ghrelin in Metabolic Diseases: An Immune Perspective[J]. *J Diabetes Res*, 2017, **2017**: 4527960
- [22] Xu L, Depoortere I, Tomasetto C, *et al.* Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus[J]. *Regul Pept*, 2005, **124**(1-3): 119-125
- [23] Harada Y, Oga T, Chin K, *et al.* Differences in relationships among sleep apnoea, glucose level, sleep duration and sleepiness between persons with and without type 2 diabetes [J]. *J Sleep Res*, 2012, **21**(4): 410-418
- [24] 陈雷, 孙晓, 王实, 等. 慢性间歇低氧对大鼠血脂和 Ghrelin 表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志 (Chen L, Sun X, Wang S, *et al.* Effects of chronic intermittent hypoxia on serum lipid and Ghrelin expression in rats [J]. *Chin J Geriatr Heart Brain Ves Dis*), 2014, **16**(7): 747-750
- [25] Yang D, Liu Z, Zhang H, *et al.* Ghrelin protects human pulmonary artery endothelial cells against hypoxia-induced injury via PI3-kinase/Akt[J]. *Peptides*, 2013, **42**(4): 112-117
- [26] 欧阳荣键, 路延之, 周其全. 参芪花粉片对低氧暴露下大鼠胃肠黏膜屏障损伤的保护作用观察[J]. 湖南中医药大学学报 (OuYang RJ, Lu YZ, Zhou QQ. Protective effects of Shenqi pollen tablets on gastrointestinal mucosal barrier injury in rats exposed to hypoxia[J]. *J Tradit Chin Med Univ Hunan*), 2018, **38**(2): 154-159
- [27] 张世范, 吴天一. 全身炎症反应综合征与急性高原反应综合征的关联性研究和思考[J]. 西北国防医学杂志 (Zhang SF, Wu TY. Research and thinking on the relationship between systemic inflammatory response syndrome and acute altitude sickness syndrome[J]. *Med J Natl Defending Forces Northwest Chin*), 2007, **28**(2): 81-83
- [28] 唐颖, 王亚平, 马颖才. 高原低氧致急性胃黏膜损伤及其机制的研究进展[J]. 高原医学杂志 (Tang Y, Wang YP, Ma YC. Research Progress of Acute Gastric Mucosal Injury Induced by Low Altitude in Plateau and Its Mechanism[J]. *J High Alt Med*), 2016, **26**(4): 61-64
- [29] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Therapeutic Action of Ghrelin in a Mouse Model of Colitis[J]. *Gastroenterology*, 2006, **130**(6): 1707-1720
- [30] 韩天雨, 胡扬, 李燕春, 等. 模拟高原训练损伤小肠黏膜屏障引发 NF-κB 等炎症因子水平上调[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Han TY, Hu Y, Li YC, *et al.* Up-regulation of NF-κB and other inflammatory factors induced by simulated plateau injury in small intestinal mucosa[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2017, **33**(10): 1054-1061
- [31] Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, *et al.* Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells[J]. *J Clin Invest*, 2004, **114**(1): 57-66
- [32] Templin MF, Stoll D, Schrenk M, *et al.* Protein microarray technology[J]. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**(4): 160-166
- [33] 于前进, 孔佩艳, 曾东风, 等. 蛋白芯片检测高原红细胞增多症患者血清炎症细胞因子表达的探索研究[J]. 中国输血杂志 (Yu Q, Kong PY, Zeng DF, *et al.* Exploring the expression of serum inflammatory cytokines in patients with high altitude polycythemia by protein chip[J]. *Chin J Blood Transfus*), 2015, **28**(3): 251-255