

肺脾两虚型 COPD 模型大鼠下丘脑、胃组织 Ghrelin 及其受体的表达变化

孙杰^{1,2*}, 桑凯¹, 王东晓¹, 马泉¹, 柳志清¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730020)

[摘要] **目的:**观察肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠下丘脑组织、胃组织中生长激素释放肽(Ghrelin)及其受体 GHS-R 的变化,结合脑肠轴调节作用探究其在 COPD 肺脾两虚型大鼠模型中的作用。**方法:**48 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、肺脾两虚型 COPD 观察组(根据造模时间不同,分为 28,35,42 d 组),每组 12 只。空白组大鼠吸入空气+气管内注射等量生理盐水+灌服等量生理盐水;观察组烟熏+气管内滴注脂多糖(造模第 1,14 天)+灌服冰冷番泻叶浸液至造模结束。于造模 28,35,42 d 末将大鼠处死,取大鼠胃组织及下丘脑组织,分别采用蛋白免疫印迹法(Western blot),免疫组化法及实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测大鼠各组织中脑肠肽 Ghrelin 及其受体 GHS-R 的蛋白含量及 mRNA 水平,观察其在疾病过程中的动态表达。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠随着造模时间的增长,其下丘脑、胃组织中 Ghrelin 及其受体 GHS-R 的蛋白表达逐渐减少($P < 0.05$);同时,模型组各组大鼠下丘脑、胃组织 Ghrelin 及 GHS-R 的平均吸光度呈不同程度减少($P < 0.05$);另外,模型组大鼠下丘脑组织、胃组织的 mRNA 表达水平也不同程度降低($P < 0.05$)。**结论:**Ghrelin 及其受体在下丘脑组织、胃组织中的表达变化或许是引起 COPD 合并营养不良的原因之一,脑肠轴的调节作用在 COPD 营养状况不良状况中起着重要作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;生长激素释放肽;生长激素释放肽受体(GHS-R)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R256.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)04-0124-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018040124

Expressions of Ghrelin and Its Receptors in Hypothalamus and Gastrointestinal Tract of Lung and Spleen Deficiency-type Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats

SUN Jie^{1,2*}, SANG Kai¹, WANG Dong-xiao¹, MA Quan¹, LIU Zhi-qing¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730020, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes in Ghrelin and GHS-R in hypothalamus, gastric tissue of model rats with lung and spleen deficiency-type chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and study the regulatory effect of the brain and intestine axis to explore its role in the rat model of COPD. **Method:** Totally 48 Wistar rats were randomly divided into blank control group, lung and spleen deficiency-type COPD observation group (28, 35, 42 d according to different modeling time). The rats in the control group were provided with air, intratracheally injected with the same amount of normal saline, and orally administered with the same amount of normal saline. The rats in the observation group were smoked and intratracheally instilled with lipopolysaccharide (on the 1st day, the 14th day) and gavaged with diarrhea leaves to the end of modeling. Rats were put to death at the 28th, 35th and 42th days after modeling, and their gastric tissues and hypothalamus were collected. Western blot, immunohistochemistry and Real-time PCR were used to detect protein and mRNA expressions of Ghrelin and GHS-R in rat tissues, and the dynamic expressions of Ghrelin and GHS-R were observed. **Result:** Compared with

[收稿日期] 20170626(011)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81360539);甘肃省财政厅科研业务费项目(2013-9);兰州市科技局项目(2012-1-56)

[通信作者] *孙杰,博士,主任医师,从事中西医结合呼吸病教学与临床研究, E-mail: 245518228@qq.com

the blank control group, the expressions of Ghrelin and GHS-R in the hypothalamus and gastric tissue of the model group decreased gradually ($P < 0.05$), with statistically significant differences ($P < 0.05$). The mean optical densities of Ghrelin and GHS-R in hypothalamus and gastric tissues of the model group were significantly decreased ($P < 0.05$), with statistically significant differences. In the model group, mRNA expressions of hypothalamus and gastric tissues were also decreased ($P < 0.05$), with statistically significant differences. **Conclusion:** The expressions of Ghrelin and its receptors in hypothalamus and gastric tissues may be one of the causes of COPD complicated with malnutrition. The regulatory effect of brain stem axis plays an important role in the poor nutritional status of COPD.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Ghrelin; GHS-R

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是呼吸系统常见病、多发病, 严重危害着人类健康^[1], 常伴有复杂的肺外表现和并发症^[2], 营养不良是其常见并发症, 是导致 COPD 患者预后不良及病死率高的原因之一。生长激素释放肽 (Ghrelin) 是一种新型的脑肠肽, 是已知唯一的外周促食激素, 在能量稳态的控制中起着重要作用^[3]。Ghrelin 与其受体 GHS-R 结合后具有促进生长激素 (GH) 释放, 促进食欲和脂肪沉积、增加体重, 增强胃肠动力, 参与调节能量平衡等多种生理作用^[4]。研究发现 Ghrelin 作为体内调节摄食与能量稳态控制的重要胃肠激素, 和 COPD 合并营养不良的发病有着密切关系^[5-6]。Ghrelin 与 GHS-R 以何种方式参与其发病, 又以何种方式影响其疾病过程, 目前还没有相关研究, 本研究基于分子层面研究 Ghrelin 与 GHS-R 对 COPD 合并营养不良的影响, 以期找到其参与 COPD 合并营养不良的证据。

中医学中并没有 COPD 的病名, 但是根据其临床表现及发展过程来看, 其属于中医学“咳嗽、喘证、肺胀”等范畴。中医认为本病病机为咳喘日久, 肺气受损, 肺气亏虚。肺虚日久, 子盗母气, 使得脾气虚弱, 水谷精微不能运化, 从而导致肺脾气虚。本团队前期研究^[7]认为脾气虚是 COPD 合并营养不良的关键环节, 肺脾两虚是 COPD 营养不良发病中的主要病机, 本实验通过建立肺脾两虚型 COPD 大鼠模型以研究 COPD 合并营养不良的发病机制, 利用烟熏 + 气管内滴注脂多糖 + 番泻叶泻下法建立肺脾两虚型 COPD 大鼠模型, 观察 Ghrelin 与 GHS-R 在下丘脑、胃组织的表达, 基于脑肠轴的调节作用以从分子层面探索 COPD 合并营养不良的发病机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 48 只, 体质量 (200 ± 20) g, 购于甘肃中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK(甘) 2015-0002。实验动物的开展取得了

甘肃中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (编号 2013-004)。

1.2 试剂 脂多糖 (LPS, 10 mg 分装, 美国 Sigma 公司, 批号 044M4004V); 兰州牌香烟 (兰州卷烟厂, 焦油量 14 mg, 烟气烟碱量 1.1 mg, 烟气一氧化碳量 14 mg); trizol RNA 提取试剂盒 (美国 Ambion 公司, 批号 94206); 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司, 批号 0000098465); SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司, 批号 AK6803); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 PC0020); β -肌动蛋白 (β -actin, 美国 Immuno 公司, 批号 B722KA0820); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (北京中山金桥生物技术有限公司, 批号 109525); 高效 RIPA 裂解液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 P0010); 蛋白免疫印迹 (Western blot) Ghrelin, GHS-R 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 GR228900-1, GR195336-1); 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (美国 Immuno 公司, 批号 B4501); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 P1200); PVDF 膜 (密理博中国有限公司, 批号 PR02531); 番泻叶浸液 (番泻叶购于甘肃中医药大学附属医院门诊中药房; 由甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任药师鉴定为豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* 的干燥小叶。浸泡 12 h, 绞汁过滤, 装入烧杯, 浓缩至含生药 1 g · mL⁻¹, 4 °C 冰箱保存)。

1.3 仪器 C1000 型荧光定量 PCR 仪, Mini Protean Tetra Cell and Mini Trans-blot cell 蛋白核酸凝胶电泳转印系统, 041BR 109973 型电泳仪, ChemiDoc 型凝胶成像分析系统, Universal Hood II 型医学图像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); PN 000A3747 型 Hallowell EMC 气管插管工具盒 (美国 Braintree Scientific, Inc 公司); IX81 型倒置荧光显微镜 (日本 Oiympus 公司)。

2 方法

2.1 肺脾两虚型 COPD 大鼠模型制备 参照文献 [8-9], 本研究采用烟熏 + 气管内滴注脂多糖 + 番泻叶泻下法建立肺脾两虚型 COPD 大鼠模型。将 SPF 级 Wistar 大鼠正常饲养 1 周后, 分别于第 1, 14 天进行气管内滴注 LPS, 将大鼠用 10% 水合氯醛 ($0.003 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$) 麻醉, 固定于鼠台上, 用小动物喉镜抵住大鼠舌头, 进入咽腔暴露声门, 待大鼠声门张开时迅速将套管针的金属丝插入声门, 于下次呼吸时顺势插下气管插管, 拔下套管针。固定好气管插管, 用小圆镜接近气管插管末端, 看是否有随呼吸运动产生的水蒸气以确定插管是否成功。确定插管成功后迅速向气管内滴注 LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 拔出气管插管, 直立并左右旋转, 置于安静处, 待其自然清醒后常规饲养, 空白组大鼠气管滴注生理盐水。除气管内注入脂多糖当天, 其余每日上午将观察组大鼠置于气溶胶烟雾动物染毒系统, 持续烟熏 30 min。

模型复制成功出现脾气虚证评估标准依据卫生部药政局颁布的《中药治疗脾虚证的临床研究指导原则》拟定。脾气虚证评估标准, ①蜷缩、扎堆、眯眼、弓背; ②食量减少、体重减轻; ③便形质软或溏稀; ④肛温下降、毛无光泽; ⑤游泳耐力下降。评分标准, ①蜷缩扎堆 1 分; ②眯眼弓背 1 分; ③食量减少 1 分; ④体重减轻 1 分; ⑤变形质软 1 分; ⑥便形稀溏 2 分; ⑦肛温下降 2 分; ⑧游泳耐力下降 2 分。

2.2 分组与给药 48 只大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为 4 组, 空白组、肺脾两虚 28, 35, 42 d 组。除空白组灌胃生理盐水外, 其余自造模第 7 天起在熏烟前 0.5 h 给予质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 冰冷番泻叶浸液, 按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续灌胃至造模结束。

2.3 病理组织学观察 取左肺、下丘脑及胃组织在常规多聚甲醛溶液中固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 观察其病理形态学改变。HE 染色步骤, ①二甲苯脱蜡 15 min, 2 次; 二甲苯和 100% 乙醇 (1:1) 混合液中 5 min 左右; 经各级乙醇至水洗, 无水乙醇 5 min, 2 次, 95% 乙醇 2 min, 2 次, 80%, 70% 乙醇中浸泡 2 min, 2 次, 最后泡于蒸馏水后转入染液; ②苏木素染色 5 min, 自来水清洗; ③ 1% 盐酸乙醇分化 5 s, 自来水返蓝; ④自来水冲洗 1 min, 促蓝液返蓝 15 min; ⑤伊红染色 2 min, 自来水清洗; ⑥乙醇梯度脱水, 70% 乙醇 2 min, 2 次, 在 80% 乙醇中浸泡 2 次, 每次 2 min 后, 依次在 95% 乙醇和无水乙醇中各泡 2 次, 每次 2 min; ⑦透明, 在二甲苯液中浸泡 5 min, 2 次; ⑧封固, 中性树胶封片。

保存切片, 光学显微镜下观察实验结果。

2.4 Western blot 法检测下丘脑、胃组织 Ghrelin 和 GHS-R 蛋白表达 分别于造模的第 28, 35, 42 天将大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 取出大脑、胃组织液氮冻存储备用。利用 Western blot 法检测各组织中蛋白表达。采用蛋白提取试剂盒提取蛋白质, 用 BCA 法测定样品浓度。于电泳、转膜、封闭后孵育一抗 (内参 1:1 500; Ghrelin 1:500; GHS-R 1:1 000), 二抗, 化学发光法检测, 经 X 胶片曝光显影。用 Bio-Rad 全自动凝胶成像系统成像保存, 结果用 ImageJ 图像分析软件分析灰度, 目的蛋白灰度值除以内参灰度值以校正误差, 将算得样品目的蛋白相对含量进行统计分析。

2.5 免疫组化法检测下丘脑、胃组织 Ghrelin 和 GHS-R 蛋白表达 分别取大鼠下丘脑、胃组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, Leita 石蜡切片机行石蜡切片, 厚 $3 \mu\text{m}$ 。采用 SABC 进行免疫组化染色, 切片常规脱蜡至水, 0.3% H_2O_2 室温 25 min 灭活内源性酶, 微波炉加热修复。用 5% BSA 封闭液室温封闭 20 min, 加入一抗 (抗体浓度为 Ghrelin 1:5 000; GHS-R, 胃 1:100, 下丘脑 1:150) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜, 滴加生物素化山羊抗兔 IgG $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 min, 滴加试剂 SABC $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 min, 以上各步骤均用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 漂洗 3 次, DAB 显色后苏木精淡染胞核, 常规脱水、透明、封片, 光学显微镜下观察染色情况。选用 Image-Pro Plus 6.0 软件检测, 每张切片选取 5 个视野, 免疫阳性呈棕黄色分别读取每个视野阳性表达区域的积分吸光度 IA , IA 越大, 表示阳性表达量越高, 蛋白表达越强。

2.6 下丘脑、胃组织 Ghrelin 和 GHS-R 基因的检测 采用 trizol 试剂盒说明书提取下丘脑、胃组织总 RNA, 用分光光度仪测量 RNA 的纯度和浓度, 要求 $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ 1.8 ~ 2.0。β-actin 作为内参。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列 Ghrelin: 上游 5'-ATCCAAGAAGCCA CCAGCTA-3', 下游 5'-gAAGGGAGCATTGAACCTGA-3' (20 bp), GHS-R: 上游 5'-CTCGGATCTGC TCATCTTCC-3', 下游 5'-CAGCTCTCGCTGACAAA CTG-3' (20 bp); β-actin: 上游 5'-TGTCACCAACT GGGACGATA-3', 下游 5'-GGGGTG TTGAAGGTC TCAA-3' (165 bp)。将 RNA 逆转录成 cDNA, 采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒进行 PCR 反应, 具体反应条件 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min 预变性, 然后按 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s 重复, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 退火, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s 延伸, 共 40 个

循环。

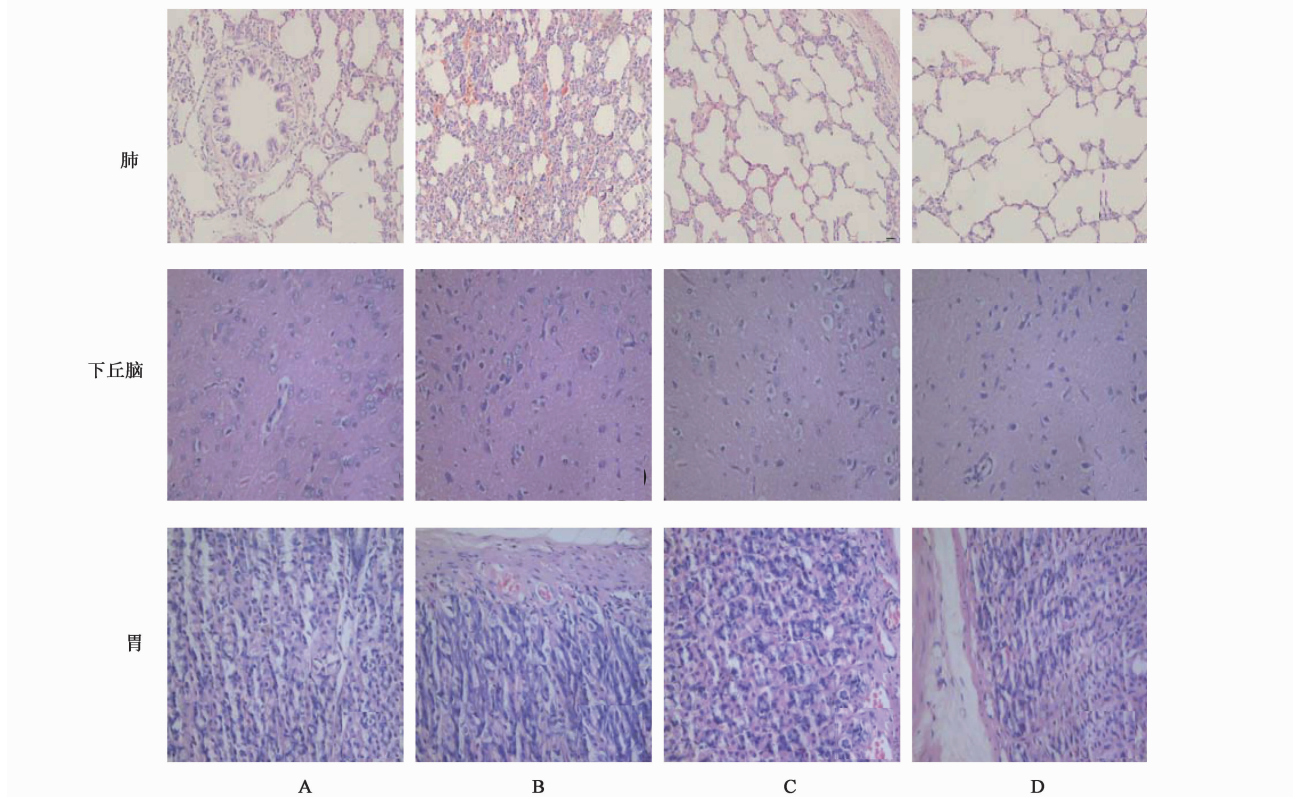
2.7 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,实验资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组进行方差齐性检验后,组间差异比较用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

3 结果

3.1 肺脾两虚型 COPD 大鼠模型的一般情况 空白组大鼠活泼好动,毛发柔顺光泽,食量正常,便质正常。模型 28 d 组大鼠活动量减少,毛发欠光泽,食量偏少,出现蜷缩,弓背。模型 35 d 组大鼠行动迟缓,弓背蜷卧,毛发干枯无光泽,咳嗽,气道分泌物略多,偶可闻及气道痰鸣音,食量减少,便质稍软。模型 42 d 组大鼠扎推眯眼,精神倦怠不喜动,体型明显消瘦,毛发干枯直立,咳嗽,喷嚏,呼吸不均匀,气道分泌物多,可闻及气道痰鸣,音食量少,便质稀。

3.2 各组大鼠肺组织、下丘脑及胃组织病理形态学改变 肺组织,空白组的支气管管壁未见增厚,支气

管管壁及肺泡结构完整,肺泡腔及支气管腔内无渗出物,间质未见炎性细胞浸润。模型 28 d 组可见肺泡壁轻度充血水肿,肺泡腔大小不一,肺泡上皮细胞有变性、坏死和脱落。模型 35 d 组可见支气管管壁增厚,管腔狭窄,肺泡上皮细胞坏死脱落,肺泡结构破坏,肺泡壁充血水肿,肺泡腔及支气管腔内有渗出物。模型 42 d 组可见支气管管壁明显增厚,管腔狭窄,肺泡结构破坏,融合形成肺大疱,上皮细胞大量脱落,肺泡腔及支气管腔内有渗出物,支气管壁及血管周围可见炎性细胞浸润。模型组的肺组织改变符合 COPD 的病理表现,并且随着造模时间的增加呈现出逐渐加重的状态。下丘脑组织,空白组下丘脑神经细胞结构完整,排列整齐,各种细胞清晰可见且分布均匀;模型组大鼠下丘脑组织变化不大。胃组织,空白组大鼠胃黏膜层结构完整,肺脾两虚组大鼠随着造模时间的增长出现了不同程度的黏膜充血与水肿,固有层与黏膜下层可见炎性细胞浸润。见图 1。



A. 空白组;B. 肺脾两虚 28 d 组;C. 肺脾两虚 35 d 组;D. 肺脾两虚 42 d 组(图 2~4 同)

图 1 不同组别大鼠肺、下丘脑、胃组织病理形态变化(HE, ×400)

Fig. 1 Morphological changes of lung tissue, hypothalamus, gastric tissue in different groups of rats(HE, ×400)

3.3 各组大鼠下丘脑及胃组织中 Ghrelin 和 GHS-R 蛋白水平表达变化 与空白组比较,各模型组大鼠下

丘脑及胃组织中 Ghrelin 及 GHS-R 蛋白表达均减少 ($P < 0.05$),其差异具有统计学意义。见表 1,图 2。

表 1 各组大鼠下丘脑及胃组织中 Ghrelin, GHS-R 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Ghrelin, GHS-R protein expression in hypothalamus and gastric tissue of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	时间/d	下丘脑		胃	
		Ghrelin/GAPDH	GHS-R/GAPDH	Ghrelin/GAPDH	GHS-R/GAPDH
空白	-	1.327 ± 0.017	1.331 ± 0.031	0.874 ± 0.062	0.958 ± 0.141
脾脾两虚	28	0.889 ± 0.016 ^{1,2)}	0.943 ± 0.033 ^{1,2)}	0.653 ± 0.034 ^{1,2)}	0.781 ± 0.043 ¹⁾
	35	0.841 ± 0.018 ¹⁾	0.903 ± 0.026 ¹⁾	0.730 ± 0.037 ^{1,2)}	0.758 ± 0.047 ¹⁾
	42	0.818 ± 0.021 ¹⁾	0.863 ± 0.041 ¹⁾	0.404 ± 0.056 ¹⁾	0.742 ± 0.098 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与脾两虚 42 d 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

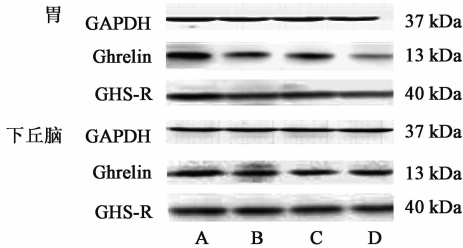


图 2 不同组别大鼠下丘脑及胃组织中 Ghrelin, GHS-R 蛋白表达蛋白条带

Fig. 2 Expression of Ghrelin and GHS-R protein in hypothalamus and gastric tissue of different groups

3.4 各组大鼠胃、下丘脑组织 Ghrelin, GHS-R 蛋白表达 空白组大鼠下丘脑 Ghrelin 与 GHS-R 蛋白强阳性表达呈高密度密集,染色为棕褐色颗粒,胞质染色为主,模型组各组免疫阳性细胞少量散在,着色较浅,为浅黄色或无色颗粒。空白组胃组织 Ghrelin 阳性细胞遍布黏膜各层,胃壁细胞浆或全细胞深染色,呈强阳性表达,模型组各组 Ghrelin 免疫阳性细胞于胃底腺区黏膜故有层见阳性细胞着色,上皮及肌层无着色,下层偶见着色细胞,呈弱阳性表达。空白组胃组织 GHS-R 阳性细胞富集,胞质胞膜棕褐色颗粒沉积,呈强阳性表达,各模型组黏膜下层阳性细胞散在分布,胞质胞膜为浅色或无色颗粒。见图 3,4。

3.5 各组大鼠下丘脑及胃组织中 Ghrelin 和 GHS-R 蛋白水平表达变化 与空白组比较,模型组各组大鼠下丘脑、胃组织 Ghrelin 及 GHS-R 的 IA 呈不同程度减少 ($P < 0.05$);并且模型组 28 与 42 d 组相比,其 IA 明显减少 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.6 各组大鼠下丘脑、胃组织 Ghrelin 和 GHS-R 基因水平表达变化 与空白组组比较,各模型组大鼠下丘脑组织中 Ghrelin, GHS-R mRNA 表达减少 ($P < 0.05$);与空白组比较,模型组大鼠胃组织中 Ghrelin, GHS-R mRNA 随着造模时间的增长逐渐减少 ($P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

Ghrelin 在人体的胃、十二指肠、结肠和大脑皮层都有表达,且部分产生于下丘脑弓状核、垂体、肾脏、胎盘等组织^[10],其在下丘脑和胃底部的表达量最多^[11], Ghrelin 细胞在胃体的分布密度是下段小肠的十几乃至上百倍,在十二指肠、回肠、盲肠、结肠腺管上皮细胞间及绒毛内也散在分布 Ghrelin 细胞^[12],本研究中空白组大鼠下丘脑 Ghrelin 与 GHS-R 蛋白强阳性表达呈高密度密集,模型组各组免疫阳性细胞少量散在分布;空白组胃组织 Ghrelin 阳性细胞遍布黏膜各层呈强阳性表达,模型组各组 Ghrelin 免疫阳性细胞于胃底腺区黏膜故有层见阳性细胞着色呈弱阳性表达,胃组织中 GHS-R 空白组阳性细胞富集呈强阳性表达,各模型组黏膜下层阳性细胞散在分布,其定位与表达与前人研究相符。Ghrelin 作为体内调节摄食与能量稳态控制的重要胃肠激素,和 COPD 合并营养不良的发病有着密切关系。研究^[5]显示 COPD 患者血中 Ghrelin 的含量水平能够反映其营养不良的状态,而且可能通过影响患者的营养状况而参与 COPD 的发病,并且 Ghrelin 与肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6 (IL-6)呈正相关。陆昊等^[6]研究发现 Ghrelin 可能通过影响机体的能量代谢而参与了 COPD 急性加重期合并营养不良的发生与发展。本实验中,与空白组比较,模型组大鼠随着造模时间的增长体型逐渐消瘦,可能与其下丘脑、胃组织中 Ghrelin 及其受体 GHS-R 的蛋白与 mRNA 表达水平减少有关。

Ghrelin 作为脑肠肽,其发挥作用通过脑肠轴的调节来实现,脑肠轴是人体中连接中枢神经系统与胃肠道的神经-内分泌的双向通路,也称神经-内分泌网络。其双向调节的相互作用对机体许多关键功能的调节发挥着重要的作用。脑肠轴正常的相互作用对消化过程的调节、与肠相关的免疫系统的调节、机体整体协调以及情绪状态的调节都具有重要作

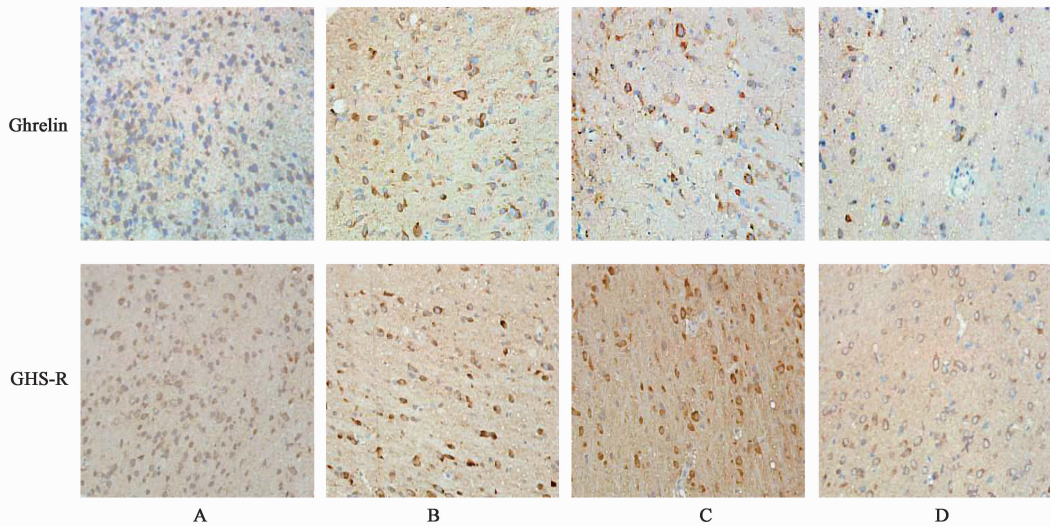


图 3 不同组别大鼠胃组织 Ghrelin, GHS-R 阳性细胞表达 (IHC, ×400)

Fig. 3 Expression of Ghrelin, GHS-R positive cells in hypothalamus of rats in different groups (IHC, ×400)

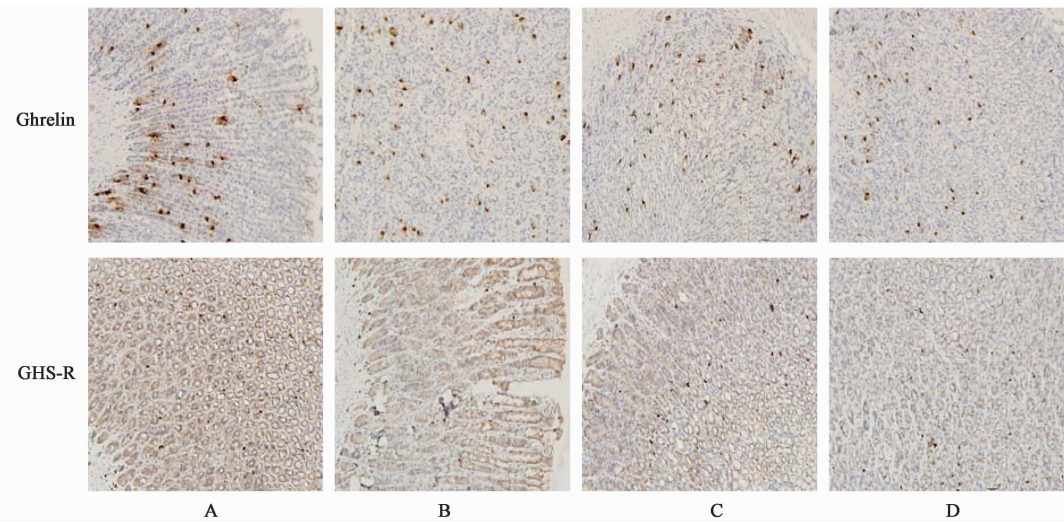


图 4 不同组别大鼠胃组织 Ghrelin, GHS-R 阳性细胞表达 (IHC, ×400)

Fig. 4 Expression of Ghrelin, GHS-R positive cells in gastric tissue of rats in different groups (IHC, ×400)

表 2 不同组别中大鼠下丘脑及胃组织中 Ghrelin, GHS-R IA 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Ghrelin, GHS-R IA in hypothalamus and gastric tissue of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	时间/d	下丘脑		胃	
		Ghrelin	GHS-R	Ghrelin	GHS-R
空白	-	0.218 ± 0.015	0.242 ± 0.014	0.446 ± 0.015	0.311 ± 0.015
肺脾两虚	28	0.185 ± 0.016 ^{1,2)}	0.191 ± 0.022 ^{1,2)}	0.373 ± 0.016 ¹⁾	0.276 ± 0.014 ¹⁾
	35	0.175 ± 0.013 ¹⁾	0.181 ± 0.014 ¹⁾	0.358 ± 0.012 ¹⁾	0.266 ± 0.014 ¹⁾
	42	0.165 ± 0.013 ¹⁾	0.168 ± 0.013 ¹⁾	0.345 ± 0.015 ¹⁾	0.257 ± 0.012 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与脾两虚 42 d 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

用^[13]。该系统的紊乱涉及广泛的疾病,包括功能性和炎性胃肠道病症,肥胖症和进食障碍^[14]等。Ghrelin 作为一种促食欲的脑肠肽,主要作用于中枢神经中的下丘脑及其边缘系统调节摄食,同时

Ghrelin 代表外周和中心组织之间的连接,沟通间接通过其他神经或厌食的神经元因素^[15],在本实验中,下丘脑组织、胃组织及小肠组织中的 Ghrelin 同时减少,在脑肠轴的调节作用下,当胃肠道 Ghrelin

表 3 各组大鼠下丘脑及胃组织中 Ghrelin, GHS-R mRNA 的相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Ghrelin, GHS-R mRNA expression levels in hypothalamus and gastric tissue of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	时间/d	下丘脑		胃	
		Ghrelin	GHS-R	Ghrelin	GHS-R
空白	-	1.000 ± 0.021	1.000 ± 0.018	1.000 ± 0.025	1.000 ± 0.014
肺脾两虚	28	0.365 ± 0.061 ^{1,2)}	0.453 ± 0.106 ^{1,2)}	0.416 ± 0.028 ^{1,3)}	0.396 ± 0.041 ^{1,3)}
	35	0.247 ± 0.038 ¹⁾	0.231 ± 0.048 ¹⁾	0.255 ± 0.022 ^{1,3)}	0.233 ± 0.037 ^{1,2)}
	42	0.172 ± 0.035 ¹⁾	0.150 ± 0.059 ¹⁾	0.148 ± 0.023 ¹⁾	0.157 ± 0.031 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与脾两虚 42 d 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

分泌减少时,其位于脊髓后角的神经元兴奋不足,不能在下丘脑弓状核与 GHS-RIa 结合并刺激 NPY/AgRP 神经元合成神经肽 Y(NPY) 和 agouti 基因相关蛋白(AgRP),从而不能发挥促进食欲、加强胃动力等生物学效应^[16],同时,研究发现中枢 Ghrelin 是由其受体介导,通过下丘脑室旁核-延髓迷走神经复合体-迷走神经轴来实现其促进胃肠运动的中枢调控^[17],本实验中下丘脑组织中 GHS-R 的表达减少,其介导作用减弱,从而导致中枢调控的 Ghrelin 胃肠运动降低,因而本课题组认为 Ghrelin 及其受体在 COPD 疾病过程中的表达变化可能是导致 COPD 营养不良发病的机制之一,尤其是在造模后期,Ghrelin 及其受体明显减少,可以认为在 COPD 疾病后期会发生营养不良与 Ghrelin 及其受体表达减少有关。

综上所述,Ghrelin 作为已知唯一的外周促食激素,维持着组织稳态,其在 COPD 合并营养不良的发病中起着重要作用,Ghrelin 及其受体在肺脾两虚型 COPD 大鼠中的表达变化可以认为是此证型形成的因素之一,对于其在营养不良中具体作用我们还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(4):484-491.

[2] Couillard A, Muir J F, Veale D. COPD recent findings: impact on clinical practice [J]. COPD, 2010, 7(3):204-213.

[3] Bewick G A, Kent A, Campbell D, et al. Mice with hyperghrelinemia are hyperphagic and glucose intolerant and have reduced leptin sensitivity[J]. Diabetes, 2009, 58(4):840-846

[4] 王业,文富强. Ghrelin 的生理功能以及在 COPD 中研究现状[J]. 临床肺科杂志,2013,18(2):322-324.

[5] 徐志松,包子予,王志英,等. 慢性阻塞性肺疾病患者生长激素释放肽、生长激素、生长激素释放激素的变

化及其临床意义[J]. 中华内科杂志,2012,51(7):536-539.

[6] 陆昊,王春,林勇. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者营养状态与血浆生长激素释放肽水平的研究[J]. 临床荟萃,2010,25(19):1684-1687.

[7] 孙杰,韩敏娟,曹鹏鹏. 基于肺脾两虚的慢性阻塞性肺疾病营养不良理论探析[J]. 新中医, 2014, 40(8):3-5.

[8] 宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000,139(8):556-557.

[9] 张伟,宫静,张靖轩,等. 一种肺脾两虚型慢阻肺动物模型的建立[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(1):142-143.

[10] Inhff T, Mönnikes H, Noetzel S, et al. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats [J]. Peptides, 2008, 29(12):2159-2168.

[11] 付荣国,袁浩铮,王莉,等. 慢性肾功能不全大鼠下丘脑、胃肠道 Ghrelin 及其受体表达变化[J]. 南方医科大学学报,2011,31(1):96-99.

[12] 张维. FD 患者血浆 Ghrelin 和 Obestatin 水平及精神心理因素的研究[D]. 衡阳:南华大学, 2014.

[13] Mayer E A, Naliboff B D, Chang L, et al. V. Stress and irritable bowel syndrome[J]. Am J Physiol-Gastr L, 2001, 280(4):G519-G524

[14] Mayer E A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. [J]. Nat Rev Neurosci, 2011, 12(8):453-466.

[15] Kirsz K, Zieba D A. Ghrelin-mediated appetite regulation in the central nervous system[J]. Peptides, 2011, 32(11):2256-2264.

[16] 周吕,柯美云. 胃肠动力学基础与临床[M]. 北京:科学出版社,1999:652-662.

[17] 张静. 下丘脑室旁核 Ghrelin 对大鼠胃运动的中枢调节作用与相关神经肽类神经元对中枢 Ghrelin 作用的表达特点[D]. 青岛:青岛大学, 2004.

[责任编辑 邹晓翠]