

杜改梅, 吴结革, 胡志华, 等. 断奶前后小鼠胃 *GOAT* 基因表达及其与胃酸分泌、胃泌素和生长抑素的关系[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 626-630.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.03.022

断奶前后小鼠胃 *GOAT* 基因表达及其与胃酸分泌、胃泌素和生长抑素的关系

杜改梅¹, 吴结革¹, 胡志华¹, 罗碧平¹, 张玉红¹, 韩正强¹, 刘茂军²

(1. 金陵科技学院动物科学与技术学院, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为阐明小鼠断奶前后胃组织中生长素 (Ghrelin) 和 Ghrelin 酰基转移酶 (*GOAT*) 基因表达和蛋白质分泌与胃功能发育之间的关系, 选取新生 BALB/c 小鼠 10 窝, 分别于 14、21、28、35、42、49 和 56 日龄时随机选取 10 只小鼠 (每窝 1 只) 处死, 采集胃黏膜组织样和血液, 定量分析基因表达、蛋白质水平和 $H^+-K^+-ATPase$ 活性。结果表明, 胃 *GOAT* mRNA 表达和蛋白质水平均受到断奶的影响, 并首次发现断奶时胃 *GOAT* 基因表达和蛋白质水平显著下降, *GOAT* mRNA 表达与胃 $H^+-K^+-ATPase$ 活性成显著正相关。胃黏膜组织中生长抑素 (SS) 和胃泌素 (Gastrin) 基因 mRNA 表达在 21、28 和 35 日龄较低, 随后逐渐增加, 45 日龄时显著升高 ($P < 0.05$)。断奶前后胃可能通过自身调节 *GOAT* 水平来适应饮食的变化, 表明 *GOAT* 可能参与对胃功能发育, 生长抑素可能对 *GOAT* 有抑制作用。

关键词: 生长素; *GOAT*; 胃功能; 断奶前后; 小鼠

中图分类号: S852.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2016)03-0626-05

Expression of gastric *GOAT* mRNA and the relationship with gastric acid secretion, gastric gastrin and SS in pre- and post-weaning mice

DU Gai-mei¹, WU Jie-ge¹, HU Zhi-hua¹, LUO Bi-ping¹, ZHANG Yu-hong¹, HAN Zheng-qiang¹, LIU Mao-jun²

(1. Department of Animal Science and Technology, Jinling Technology Institution, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: To investigate how the stomach modulates ghrelin production and secretion as well as ghrelin O-acyltransferase (*GOAT*) expression in pre- and post-weaning mice, the blood and gastric mucosal tissues of mice were collected for quantifying protein content and mRNA expression as well as $H^+-K^+-ATPase$. Newborn BALB/c mice were selected at 14 d, 21 d, 28 d, 35 d, 42 d, 49 d and 56 d of age respectively. The results revealed that weaning strongly regulated gastric *GOAT* mRNA expression and protein contents. For the first time, noticeable decreases were found in protein and mRNA levels of *GOAT* on weaning age, and *GOAT* mRNA expression

was positively correlated with gastric $H^+-K^+-ATPase$ activity. The mRNA expression levels of gastric somatostatin (SS) and gastrin rose from 21 d to 45 d of age, reaching a peak on 45 d of age ($P < 0.05$). In conclusion, the stomach itself of pre- and post-weaning mice regulates ghrelin and *GOAT* production to adapt to diet change, and *GOAT* is involved in the gastric function de-

收稿日期: 2015-10-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31302054); 江苏省自然科学基金项目 (BK20131086); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(13)3076]

作者简介: 杜改梅 (1976-), 女, 山西朔州人, 博士, 教授, 主要从事营养和消化生理研究。

通讯作者: 刘茂军, (E-mail) maojunliu@163.com

velopment. SS down-regulates *GOAT* level.

Key words: ghrelin; ghrelin O-acyltransferase (*GOAT*); gastric function; pre- and post-weaning; mouse

生长素(Ghrelin)酰基转移酶(*GOAT*)是新发现的一种高度特异性催化 Ghrelin 酰基化的酶^[1-2],高度保守。*GOAT*与 Ghrelin 均主要表达于胃底部,也分布于 Ghrelin 作用的靶组织下丘脑和垂体。*GOAT* mRNA 水平与血液中酰基化 Ghrelin 水平成正相关^[3]。生长素主要由胃黏膜的 X/A 样细胞分泌^[4]。被 *GOAT* 酰基化的 Ghrelin 可以与其特异性受体结合促进摄食和脂肪合成,增加体重,并对胃肠道运动等具有重要的调节作用^[5]。诸多研究者发现酰基化 Ghrelin 和去酰基化 Ghrelin 都主要分布于胃底泌酸区,切除胃中产酸区域,血清 Ghrelin 浓度显著下降^[6-8]。仔猪胃底部 Ghrelin 基因表达丰度明显高于胃窦部^[9],提示 Ghrelin 与胃黏膜的分泌功能,特别是胃酸分泌关系密切。Ghrelin C 末端的 P-R 结构(脯氨酸-精氨酸)为识别部位,疏水的 *n*-辛酰基(*n*-octanoyl group)修饰了 N 端第 3 位的丝氨酸残基,辛酰基是维持 Ghrelin 活性,并使其与受体结合并发挥生物学作用所必需^[5,10]。研究发现 *GOAT* 基因缺失小鼠缺乏酰基化 Ghrelin^[11]。*GOAT* 基因敲除小鼠试验结果表明,*GOAT*/Ghrelin 系统在调控胆酸代谢中起着非常重要的作用^[12]。这些都提示 *GOAT* 可能在 Ghrelin 调节胃酸分泌关系中扮演着重要角色,但迄今为止,*GOAT* 与胃酸分泌之间的复杂关系,国内外尚未见研究报道。而这些信息对揭示仔猪内源性胃酸分泌机理有着极其重要的价值。胃黏膜中含有许多内分泌和外分泌细胞,在这些细胞中壁细胞分泌胃酸,主细胞分泌胃蛋白酶原,G 细胞和 D 细胞分别分泌胃泌素(Gastrin)和生长抑素(SS)^[13-14],这些内分泌激素相互作用共同调节胃功能的发育。胃泌素可以促进胃酸和胃蛋白酶分泌,而生长抑素具有抑制胃酸分泌的作用。

本研究对小鼠断奶前后胃黏膜组织中 *GOAT* 基因的表达和血清含量的变化,以及胃酸分泌功能相关的质子泵($H^+-K^+-ATPase$)活性和胃内分泌激素水平进行检测和分析,以探讨 *GOAT* 基因与胃酸分泌之间的相互复杂关系及其调节机制。

1 材料和方法

1.1 材料及试验设计

1.1.1 材料 反转录酶(*M-MLV*)、DNA 聚合酶

(*Taq E*)、RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor)、随机引物(Random hexamer primers)、Trizol 试剂盒均购自 TaKaRa 公司。胃泌素(Gastrin)、*GOAT* 和生长抑素(SS)的蛋白质含量检测试剂盒购于上海骞亿生物科技有限公司。 $H^+-K^+-ATPase$ 检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.1.2 试验设计 选取 10 窝新生 BALB/c 雌性小鼠,自由吮乳和饮水,在 21 d 断奶。分别于 14、21、28、35、42、49 和 56 日龄时从每窝中随机选取小鼠各 1 只,共 10 只小鼠,采血,处死,称体质量、胃质量。并迅速取胃黏膜组织样,置液氮速冻后, $-70^{\circ}C$ 冷冻保存。

1.2 荧光定量 RT-PCR

1.2.1 总 RNA 提取 采用 Trizol 试剂盒提取小鼠胃黏膜组织中总 RNA。测定总 RNA 的浓度和纯度,并通过 1.4% 的琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳检测总 RNA 的质量。若条带清晰,28S 和 18S rRNA 条带的灰度比约为 2:1,无拖尾现象,表明 RNA 无降解,质量可靠。

1.2.2 反转录 用随机引物对所有样品的 RNA 进行反转录,获得各样品 RNA 的 cDNA(RT 产物)。反转录反应总体积 25 μl ,包括 2 μg 总 RNA、0.4 $\mu mol/L$ 随机引物、0.4 mmol/L dNTP,加 ddH₂O 至 10 μl ,70 $^{\circ}C$ 变性 5 min,立即放冰上冷却,再加 8 U RNA 酶抑制剂、100 U M-MLV 反转录酶、5 μl 5 \times RT buffer(含 250 mmol/L pH8.3 Tris-HCl、15 mmol/L MgCl₂、375 mmol/L KCl、50 mmol/L DTT),补充 DEPC 处理水至 25 μl ,37 $^{\circ}C$ 反应 60 min,95 $^{\circ}C$ 反应 5 min。同时用不加反转录酶的反转录体系作为阴性对照(C1),用于检测总 RNA 样品中是否有基因组 DNA 污染。反转录产物(RT 产物) $-20^{\circ}C$ 保存备用。

1.2.3 引物设计及 Real-time PCR 目的基因引物序列由大连宝生物工程公司根据 GenBank 上小鼠的相关 cDNA 序列设计(表 1)与合成。采用荧光定量 PCR 对目的基因的表达进行相对定量,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对有效性数据进行统计分析。 $\Delta\Delta Ct$ 是以 β -actin 为内标基因,以 14 日龄时的目标基因和内标基因 *Ct* 差值的平均值为参照,计算每个时间点每个

样本目标基因的表达相对于 14 日龄目标基因表达平均值的倍数。每个样品至少重复 3 次,同时用 ddH₂O 和 RNA 样品分别取代 RT 产物作对照,以检验是否有外源基因组 DNA 污染。

表 1 Real-time PCR 的引物

Table 1 Primers for real-time PCR analysis

目标基因	引物序列(5'→3')
GOAT	F: CTGGGTCTTCACTACACCGA
	R: TCCAGTGAGAGGGATGTGACT
Gastrin	F: GCCACAACAGCCAACTATTCC
	R: GAGCCAGCACTAAGACCAGC
SS	F: GACCCAGACTCCGTCAGTT
	R: TCATTCTCTGTCTGGTTGGGC

1.2.4 激素水平和酶活性测定 血清中 Gastrin、GOAT 和 SS 含量以及 H⁺-K⁺-ATPase 活性均根据试剂盒说明书进行测定。

1.2.5 数据处理 所有数据用平均值±标准误差表示。采用 SPSS 11.0 统计软件统计,差异显著性检验采用单因子方差分析(One-way ANOVA, LSD)。

2 结果与分析

2.1 断奶前、后小鼠胃黏膜组织中 GOAT mRNA 表达的发育性变化

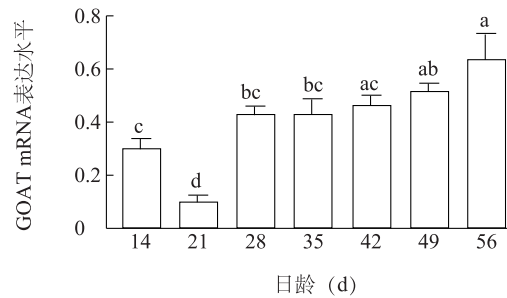
小鼠胃粘膜组织中 GOAT mRNA 的表达在 21 日龄时显著降低($P<0.05$), 28~56 日龄保持稳定升高(图 1)。56 日龄时 GOAT mRNA 的表达显著高于 14~35 日龄($P<0.05$)。

2.2 胃黏膜组织中 H⁺-K⁺-ATPase 活性的发育性变化

断奶前后小鼠胃黏膜组织中 H⁺-K⁺-ATPase 活性在 28 日龄时开始上升, 56 日龄时胃 H⁺-K⁺-ATPase 活性显著高于 14 和 21 日龄(图 2)。

2.3 胃 H⁺-K⁺-ATPase 活性与 GOAT mRNA 表达的相关性

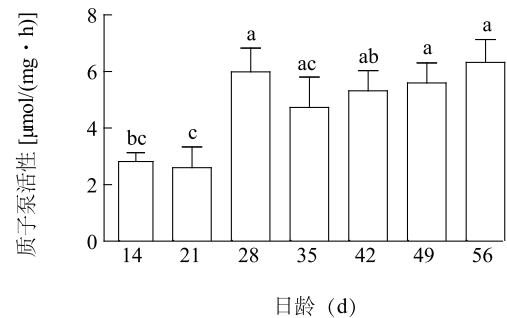
分析结果表明,胃粘膜组织 H⁺-K⁺-ATPase 活性与 GOAT mRNA 表达的发育性变化成正相关,相关系数为 0.391, $P=0.044$ (图 3),说明 GOAT 可能与胃酸分泌有着非常重要的关系。



不同字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)。

图 1 断奶前、后小鼠胃 GOAT mRNA 的表达

Fig.1 Gastric GOAT mRNA expression in pre- and post-weaning mice



不同字母表示差异达到显著水平($P<0.05$)。

图 2 断奶前、后小鼠胃 H⁺-K⁺-ATPase 活性的变化

Fig.2 Change of gastric H⁺-K⁺-ATPase activity in pre- and post-weaning mice

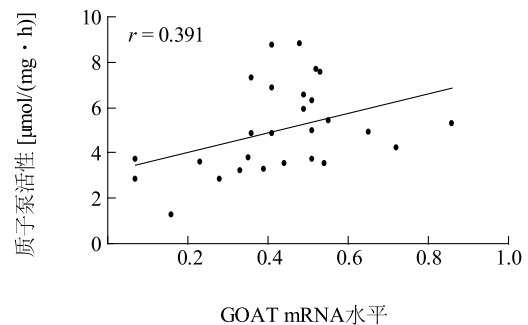


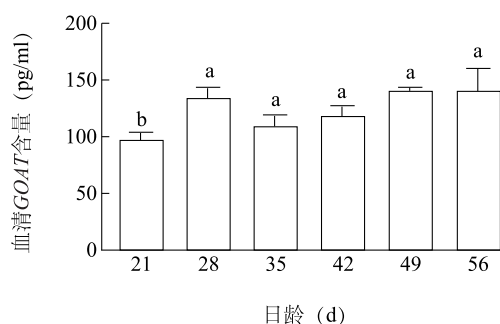
图 3 胃粘膜组织 H⁺-K⁺-ATPase 活性与 GOAT mRNA 表达量的相关性

Fig.3 Correlation between gastric GOAT mRNA expression and gastric H⁺-K⁺-ATPase activity

2.4 断奶前、后小鼠血清中 GOAT 含量的发育性变化

断奶前后小鼠血清中 GOAT 含量与 mRNA 表达变化趋势相一致,在 49 和 56 日龄时达到高峰,显著

高于 21 日龄 ($P < 0.05$) (图 4)。



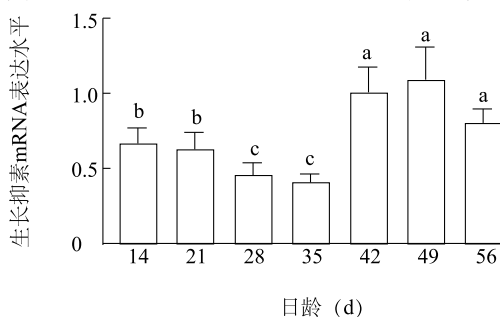
不同字母表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

图 4 断奶前、后小鼠血清中 *GOAT* 含量的发育性变化

Fig. 4 Change of serum *GOAT* content in pre- and post-weaning mice

2.5 断奶前、后小鼠胃黏膜 *Gastrin* 和 *SS* mRNA 的表达

小鼠胃黏膜组织中 *SS* mRNA 表达在 14~35 日龄逐渐下降,42 日龄时开始显著上升 ($P < 0.05$) (图 5)。*Gastrin* mRNA 的表达在 21 日龄显著降低 ($P < 0.05$),42~56 日龄保持稳定升高趋势 (图 6)。



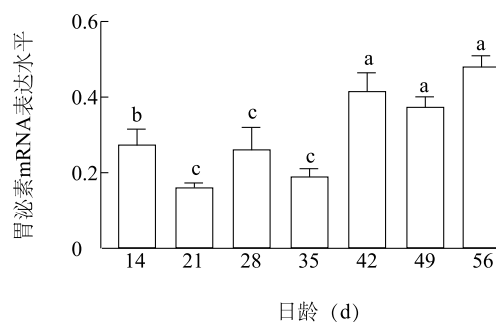
不同字母表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

图 5 断奶前、后小鼠胃 *SS* mRNA 的表达

Fig. 5 Gastric *SS* mRNA expression in pre- and post-weaning mice

3 讨论

GOAT 的 mRNA 主要分布于胃肠道,也分布于 Ghrelin 作用的靶组织下丘脑和垂体。*GOAT* 与酰基化 Ghrelin 共表达于胃底泌酸腺 X/A 样细胞,*GOAT* mRNA 水平与血液中酰基化 Ghrelin 水平成正相关^[15]。目前有关断奶前后胃粘膜组织中 *GOAT* 基因表达的发育性变化研究报道甚少,我们研究发现断奶前后小鼠胃粘膜组织中 *GOAT* mRNA 表达呈年龄依赖性变化趋势,且血清蛋白含量的变化趋势与



不同字母表示差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

图 6 断奶前、后小鼠胃 *Gastrin* mRNA 的表达

Fig. 6 Gastric *gastrin* mRNA expression in pre- and post-weaning mice

基因表达的发育性变化相一致,均在断奶日龄显著下降,这提示断奶对胃 *GOAT* 基因的表达和蛋白质水平均有显著影响,这与以前的研究结果^[16]相一致。不同种别的动物胃 *GOAT* mRNA 表达出现峰值的时间可能与许多因素有关,如胃生长发育规律的品种差异、断奶时间不同、断奶前后食物物理形状和化学组分不同等。

Kirchner 等研究发现 *GOAT* 基因缺失型小鼠缺乏酰基化 Ghrelin,饲喂富含中链三酸甘油酯饲料时,体重和体脂适度下降,受到饮食限制时,血糖水平出现不正常,甚至导致死亡,而野生型小鼠可维持正常血糖水平^[11]。腹膜内注射 *GOAT* 抑制剂可有效改善野生型小鼠的葡萄糖耐受性^[17]。*GOAT* 基因敲除小鼠试验结果表明,*GOAT*/Ghrelin 系统在调控胆酸代谢中起着非常重要的作用^[11]。这些都提示 *GOAT* 可能在 Ghrelin 与胃酸分泌关系中扮演着重要角色,但迄今为止,*GOAT* 与胃酸分泌的关系国内外尚未见研究报道。本研究通过荧光定量 RT-PCR 方法检测到小鼠断奶前后胃 *GOAT* mRNA 表达和血清蛋白含量均呈现年龄依赖性变化趋势,且胃 *GOAT* mRNA 表达的发育性变化与胃 $H^+-K^+-ATPase$ 活性的变化成正相关,这提示 *GOAT* 与胃酸分泌具有密切的关系,*GOAT* 可能在调节胃功能的发育过程中起着重要的介导作用。

胃酸分泌主要由胃壁细胞的 $H^+-K^+-ATPase$ 来完成,它通过自身磷酸化和去磷酸化,将细胞外液中的 K^+ 转运入壁细胞内,同时逆浓度梯度将细胞内 H^+ 泵出细胞外,从而完成胃酸分泌。胃组织中的生长抑素主要由胃体和幽门部的 D 细胞分泌,对体内

许多与生长代谢有关的激素有广泛的抑制作用。幽门部的G细胞(分泌胃泌素)和胃泌酸区域的X/A样细胞(分泌 Ghrelin 和 GOAT)直接接触,G细胞分泌的 Gastrin 能促进胃酸和胃蛋白酶分泌。Yakabi 等^[18]和 Fukumoto 等^[19]研究发现,Ghrelin 和 Gastrin 在促进胃酸分泌中具有协同作用。Somatostatin 是胃酸分泌的强抑制剂,可直接抑制壁细胞,也可通过抑制G细胞分泌 Gastrin 而间接地抑制胃酸的分泌^[20-21]。本研究发现,断奶前后胃泌素基因表达的变化规律和 Ghrelin、GOAT 相一致,均在断奶日龄 21 d 出现下降,之后维持稳定升高趋势。提示胃泌素可能在 GOAT 介导的 Ghrelin 调节的胃酸分泌中有一定的协调作用。而胃 SS 基因表达的变化规律可能与 SS 可以抑制其 mRNA 的表达^[22-23] 相关。GOAT 抑制 SS 后,SS 浓度的下降可能部分解除了这种抑制作用,促进了 SS mRNA 的表达。但 GOAT 介导调节的胃酸分泌机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] YANG J, BROWN M S, LIANG G, et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone[J]. Cell, 2008, 132 (3): 387-396.
- [2] GUTIERREZ J A, SOLENBERG P J, PERKINS D R, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105 (17): 6320-6325.
- [3] SAKATA I, YANG J, LEE C E, et al. Colocalization of ghrelin oacyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009, 297 (1): 134-141.
- [4] HAYASHIDA T, NAKAHARA K, MONDAL M S, et al. Ghrelin in neonatal rats; distribution in stomach and its possible role[J]. J Endocrinol, 2002, 173 (2): 239-245.
- [5] ZHAO T J, LIANG G, LI R L, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorierestricted mice[J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107 (16): 7467-7472.
- [6] SCHUBERT M L. Gastric secretion[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2010, 26 (6): 598-603.
- [7] SAKATA I, SAKAI T. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract[J]. Int J Pept, 2010 (1687-9767): 5869-5873.
- [8] MIZUTANI M, ATSUCHI K, ASAKAWA A, et al. Localization of acyl ghrelin-and des-acyl ghrelin-immunoreactive cells in the rat stomach and their responses to intragastric pH[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297 (5): 974-980.
- [9] 杜改梅,石志敏,韦习会,等.断奶前后仔猪胃组织中 ghrelin 基因表达及内源性生长抑素的作用[J].世界华人消化杂志, 2005, 13(5): 604-607.
- [10] YI C X, HEPPNER K M, KIRCHNER H, et al. The GOAT-ghrelin system is not essential for hypoglycemia prevention during prolonged calorie restriction[J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e32100.
- [11] KIRCHNER H, GUTIERREZ J A, SOLENBERG P J, et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance[J]. Nat Med, 2009, 15 (7): 741-745.
- [12] KANG K, SCHMAHL J, LEE J M, et al. Mouse ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) plays a critical role in bile acid reabsorption[J]. FASEB J, 2012, 26 (1): 259-271.
- [13] 高永渝,高静涛. 生长抑素: 机体消化功能的重要调节因子[J].生理科学进展, 1995(26): 65-68.
- [14] DORNONVILLE C, LINDSTROM E, NORLEN P, et al. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells[J]. Regul Pept, 2004, 120(1-3): 23-32.
- [15] WESTBROOK S L, MCDOWELL G H, HARDY K J, et al. Active immunization against somatostatin alters regulation of gastrin in response to gastric acid secretagogues[J]. Am J Physiol, 1998, 274(4): 751-756.
- [16] GUALILLO O, CAMINOS J E, KOJIMA M, et al. Gender and gonadal influences on Ghrelin mRNA levels in rat stomach[J]. Eur J Endocrinol, 2001, 144(6): 687-690.
- [17] BARNETT B P, HWANG Y, TAYLOR M S, et al. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor[J]. Science, 2010, 330 (6011): 1689-1692.
- [18] YAKABI K, RO S, ONOUE T, et al. Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51 (8): 1313-1321.
- [19] FUKUMOTO K, NAKAHARA K, KATAYAMA T, et al. Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374 (1): 60-63.
- [20] SCHUBERT M L. Gastric exocrine and endocrine secretion[J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2009, 25 (6): 529-536.
- [21] ZUB-POKROWIECKA A, REMBIASZ K, KONTUREK P C, et al. Ghrelin and gastrin in advanced gastric cancer before and after gastrectomy[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17 (4): 449-458.
- [22] PAPACHRISTOU D N, LIU J L, PATEL Y C. Cysteamine-induced reduction in tissue somatostatin immunoreactivity is associated with alterations in somatostatin mRNA[J]. Regul Pept, 1994, 49(3): 237-247.
- [23] DU G, SHI Z, XIA D, et al. Cysteamine improves growth performance and gastric ghrelin expression in preweaning piglets[J]. Domest Anim Endocrinol, 2012, 42 (4): 203-209.

(责任编辑:张震林)