

网络出版时间:2024-11-18 16:00:12 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241115.1542.014

基于代谢组学探究高原低氧对甲状腺激素合成的影响

戴重阳¹,林雪²,王雅轩¹,蒲小燕¹(¹ 青海大学医学部,西宁 810016; ² 四川大学华西医院,成都 610044)

摘要 目的 通过类靶向代谢组学技术探究高原低氧对甲状腺激素(TH)合成的影响。方法 20只SPF级雄性SD大鼠随机分为对照组(Control)和低氧组(Hypoxia)。通过模拟海拔6km低压氧舱低氧胁迫48h构建SD大鼠急性低氧损伤模型,检测大鼠体质量、动脉血氧分压(PaO₂)、血氧饱和度(SaO₂);利用类靶向代谢组学技术检测两组大鼠血清代谢产物后进行KEGG富集分析;RT-PCR和Western blot法检测TH合成通路中关键基因钠碘转运体(NIS)、甲状腺过氧化物酶(TPO)、甲状腺球蛋白(TG)表达水平;ELISA法检测大鼠动脉血清甲状腺素(T₄)含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)表达水平;RT-PCR、Western blot及ELISA法检测炎症指标Toll样受体4(TLR4)、白细胞介素-6(IL-6)、磷酸化细胞核因子κB(NF-κB/p65)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达水平;RT-PCR和Western blot法检测大鼠甲状腺组织中促凋亡蛋白Bcl-2关联X蛋白(Bax)和凋亡抑制蛋白B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)表达水平。结果 与Control组相比,Hypoxia组大鼠体质量、PaO₂、SaO₂明显降低(P<0.01);Hypoxia组大鼠动脉血清差异代谢物显著富集在TH合成通路中(P<0.01),通路终产物T₄含量明显下降(P<0.01),且大鼠甲状腺组织NIS、TPO、TG mRNA与蛋白表达水平均降低(P<0.05);ELISA验证结果显示T₄含量变化与上述结果完全一致。与Control组相比,Hypoxia组大鼠血清SOD、GSH-Px酶活性下降,MDA含量增加(P<0.01);TLR4、IL-6、NF-κB/p65、TNF-α mRNA、蛋白表达水平及含量均升高(P<0.05),甲状腺组织中Bax mRNA与蛋白表达水平明显升高,Bcl-2则明显降低(P<0.05)。结论 高原低氧环境暴露加剧机体氧化应激和炎症反应,促进甲状腺滤泡上皮细胞凋亡,从而影响甲状腺功能,最终导致T₄合成量降低。

关键词 低氧;类靶向代谢组学;氧化应激;炎症;甲状腺激素**中图分类号** R 335+.2;R 339.5+.4;R 339.6**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2024)11-1989-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.014

青藏高原自然环境恶劣,以低压低氧、寒冷、强辐射为主要气候特点。当人类从平原急进高原后会出现不同程度的组织细胞缺氧,器官功能障碍,甚至诱发急性高原病(acute mountain sickness, AMS),同时还伴随着内分泌系统紊乱和代谢功能的复杂变化。甲状腺激素(thyroid hormone, TH)由人体最大的内分泌腺产生,几乎作用于所有细胞的新陈代谢,具有多种生物学效应。研究^[1]表明,高海拔低氧导致甲状腺功能和结构改变,然而,以往关于低氧引起TH变化的研究结果^[2-3]并不一致。如今代谢组学技术作为研究代谢物与内源性或外源性刺激之间密切联系的工具,为医学研究提供了另一条途径^[4]。课题组前期实验结果显示急性低氧损伤模

型大鼠生理指标和代谢组学数据异常,因此该文通过对低氧大鼠与正常大鼠的类靶向代谢组学数据比较分析后验证TH合成的关键基因与蛋白表达水平并检测其氧化应激指标、炎症因子及凋亡因子表达水平以探究AMS的发病机制和代谢变化,进而对AMS的防治提供临床指导。

1 材料与方法

1.1 主要材料 健康SPF级雄性SD大鼠20只,8~10周龄,体质量200~300g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号SCXK(京)2021-0011]。总RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;Premix Ex Taq Version试剂盒、TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒均购自日本Takara公司;β-actin蛋白抗体购自武汉abclonal公司;Bcl-2关联X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)蛋白抗体均购自美国abcam公司;Toll样受体4(toll-like receptors 4, TLR4)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、甲状

2024-06-04 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82160322);青海省科学技术厅应用基础研究基金项目(编号:2023-ZJ-746)

作者简介:戴重阳,女,博士研究生;

蒲小燕,女,副教授,博士生导师,通信作者,E-mail: puxiaoyan1975@163.com

腺过氧化物酶 (thyroid peroxidase, TPO) 蛋白抗体均购自北京 Bioss 公司;磷酸化细胞核因子 p65 亚基 (nuclear factor kappa-B, NF- κ B/p65)、甲状腺钠碘转运体 (sodium iodide symporter, NIS) 蛋白抗体均购自武汉 proteintech 公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 蛋白抗体购自武汉 boster 公司;甲状腺球蛋白 (thyroglobulin, TG) 抗体购自美国 zen-bio 公司;TLR-4、IL-6、TNF- α 、NF- κ B 和 T₄ ELISA 测定试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司;超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) ELISA 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。实时荧光定量 (RT-PCR) 仪, 型号 Quant Studio TM3, 美国 Thermo Fisher 仪器有限公司生产;低温高速组织研磨仪, 型号 KZ-III-F, 武汉 Servicebio 公司生产;电泳电源, 型号 PW-600, 武汉 Servicebio 公司生产;垂直电泳槽, 型号 JY-SCZ4+, 北京君意东方电泳设备有限公司生产;台式高速冷冻离心机, 型号 H2050R, 湖南湘仪集团生产;荧光图像分析系统, 型号 5200 Multi, 上海 Tanon 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和急性低氧损伤模型的建立 20 只 SD 大鼠平均分为对照组 (Control) 和低氧组 (Hypoxia) 两组, 所有动物于青海大学医学院实验动物房适应性饲养 1 周, 饲养条件为温度 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度 50% ~ 60%, 自由饮食、水, 定期更换垫料, 清理消毒鼠笼。适应性饲养结束后将 Hypoxia 组大鼠置于模拟海拔 6 km 低氧环境的低压氧舱内饲养 48 h (大鼠进舱后以 10 m/s 速度减压上升, 10 min 后达到模拟海拔 6 km, 此时氧含量为 9.8%), 之后维持氧含量在 9.7% ~ 9.9% 之间, 舱内大气压维持在 46.57 ~ 49.02 kPa, 湿度维持在 49% ~ 55%, 室内温度由中央空调统一控制, 白天保持在 22 ~ 24 $^{\circ}$ C, 夜间保持在 16 ~ 18 $^{\circ}$ C。Control 组大鼠置于青海大学医学院实验动物房饲养 48 h。在饲养过程中, 每天测定各组大鼠的体质量。饲养结束后, 所有大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉, 无菌条件下解剖取材。本研究经青海大学医学院实验动物伦理委员会批准 (PJ202201-24), 所有实验操作均严格按照还原、细化、替代的 3R 原则进行。本研究实施过程中所涉及到处理动物的措施均按照国家《实验动物福利伦理审查指南 (GB/T35892-

2018)》执行。

1.2.2 血气指标检测 大鼠麻醉后切开腹部皮肤, 经腹主动脉抽取全血 1 ml, 使用 Sysmex 全自动血气分析仪 (Sysmex, 日本) 测定 PaO₂ 和 SaO₂。

1.2.3 代谢产物的提取及 LC-MS/MS 分析 取大鼠动脉血 100 μ l 放入 EP 管中, 加入 400 μ l 的 80% 甲醇水溶液进行涡流震荡。冰浴静置 5 min, 3 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 后取一定量的上清液加质谱级水稀释至甲醇含量为 53%, 3 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 收集上清液注入 LC-MS/MS 系统分析。LC-MS/MS 分析采用北京诺禾股份有限公司的 Exion LCTM AD 系统 (SCIEX) 和 QTRAP[®] 6500 + 质谱仪 (SCIEX) 进行。基于诺禾致源自建数据库 (novogene database, novoDB), 采用多反应监测模式 (multiple-reaction monitoring, MRM) 对实验样本进行检测, 采用 SCIEX OS Version 1.4 对 HPLC-MS/MS 生成的数据文件进行积分校正。使用 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/brite.html>) 对差异代谢物进行注释。在 meta X 上进行偏最小二乘法判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)。采用独立样本 *t* 检验计算统计学显著性 (*P* 值), 满足 VIP > 1、*P* < 0.05 和 fold change \geq 2 或 FC \leq 0.5 的代谢物被认为是差异代谢产物^[5-6]。聚类热图, 利用 R 语言 Pheatmap 包进行绘制, 使用 z-score 对代谢物数据进行归一化; 气泡图用 ggplot2 包进行绘制, 利用 KEGG 数据库比对差异代谢物的功能和代谢途径, 当满足比值 $x/n > y/n$ 时, 代谢途径被认为是富集, 当 *P* < 0.05 时, 认为代谢途径富集有统计学意义。

1.2.4 ELISA 检测 取大鼠动脉血清, 建立标准品孔和样本孔, 参考 ELISA 试剂盒说明书进行加标准品、加样、加酶、洗板、显色、终止操作后, 在 10 min 内, 使用酶标仪在 450 nm 波长处测量吸光度 (optical density, OD) 值, 绘制标准曲线的线性回归方程式计算甲状腺素 T₄ 含量、氧化应激指标 SOD、GSH-Px、MDA 以及炎症指标 TLR-4、IL-6、NF- κ B、TNF- α 表达水平。

1.2.5 RT-PCR 检测 在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中搜索基因全序列, 使用 Primer Premier 引物设计软件设计并筛选各基因特异性引物。所有引物均交由上海生工生物工程技术有限公司设计合成, 并以 ULTRAPAGE 纯化, 见表 1。

利用总 RNA 提取试剂盒提取 SD 大鼠甲状腺

组织总 RNA 后逆转录合成 cDNA。荧光定量 PCR 按照 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Til RNaseH Plus) 试剂盒体系加样: 10.0 μ l 2 \times Real PCR Easy™ Mix-SYBR; 上、下游特异引物各 0.8 μ l; 2 μ l cDNA; 加 dd H₂O 至总体积 20 μ l。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环。使用 Thermo Scientific PikoReal 软件 (美国 Thermo 公司) 分析 PCR 过程各检测样本的阈值循环数 (threshold cycle, C_T) 值。本实验通过 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算 X 相对 mRNA 表达水平: $\Delta C_T = C_T$ 目的基因 - C_T 内参; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ 实验 - ΔC_T 对照; X mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示。

表 1 本次检测所用引物及碱基序列(5'-3')

Tab.1 Primers and base sequences used in the detection(5'-3')

Gene name	Forward primer	Reverse primer
NIS	atgccgctgcttgcctggac	atggcgttgatgctggtggalg
TPO	caccacagagcaccagcacag	ggaagcalcaaggaaggaggtcaag
TG	agatggaaggcctggaggctcag	ggagctggtaggctggtgatgag
TLR-4	ctgccaccatttacagttcgtc	atccagcactgaagttgtgag
IL-6	actccagcagttgccttcttg	tggctgtgtgggtggtatcctc
NF- κ B	gtcaccactgtgcacccttg	gcttcagctggaaaaggcatcttc
TNF- α	caccacgctcttctgtactgaac	tggctacgggctgtgcactc
Bax	gaagcaccaccaagaagctgag	gctgccacacggaagaagacc
Bcl-2	tggagagcgtcaacagggagatg	gggtgtcagatgccggttcag
β -actin	gggaaatcgtgcgtgacatt	gctggcagtgccatctc

1.2.6 Western blot 检测 收集各组大鼠甲状腺组织,在冰浴条件下进行裂解与蛋白提取,12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 后收集上清液,使用 BCA 试剂盒进行蛋白质相对定量,每个样本按 100 mg 蛋白量进行凝胶电泳,电泳后在 200 mA 稳流下电转 1.5

h,将蛋白转移到 PVDF 膜上,转膜结束后用 1 \times TBST 缓冲液震荡洗膜 5 min,将膜完全浸没在 5% 脱脂奶粉中封闭,37 $^{\circ}$ C 水平摇床上轻摇 3 h。密封袋里加入按一定比例稀释好的一抗溶液 (NIS 1 : 1 000; TPO 1 : 2 000; TG 1 : 1 000; TLR-4 1 : 2 000; IL-6 1 : 2 000; NF- κ B/p65 1 : 5 000; TNF- α 1 : 2 000; Bax 1 : 2 000; Bcl-2 1 : 2 000; β -actin 1 : 50 000), 封闭结束后将 PVDF 膜放入密封袋内,弹出气泡后密封,4 $^{\circ}$ C 冰箱内静置孵育过夜。次日上午将 PVDF 膜取出后用 1 \times TBST 缓冲液水平摇床上洗膜 (90 r/min, 7 min/次, 洗 10 次), 洗掉未结合的一抗后将膜转移至 HRP 二抗溶液中室温下水平摇床孵育 2 h,再次按上述条件洗膜后使用特超敏 ECL 发光液进行显色处理,最后使用全功能成像仪拍照分析。

1.3 统计学处理 所有资料均采用 SPSS 22.0 (美国 IBM) 统计软件进行数据分析,计量资料正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高原低氧对大鼠生理指标的影响 通过对各组大鼠体质量的对比分析,Control 组大鼠体质量随喂养时间的增加而增加 ($P < 0.01$), Hypoxia 组大鼠体质量随喂养时间的增加呈下降趋势,3 d 内体质量差异无统计学意义;但与 Control 组相比, Hypoxia 组 DAY1 大鼠体质量降低 ($P < 0.05$), DAY2 大鼠体质量显著降低 ($P < 0.01$), 见图 1A。同时 Hypoxia 组大鼠 PaO₂ 和 SaO₂ 显著降低 ($P < 0.01$), 见图 1B、C。

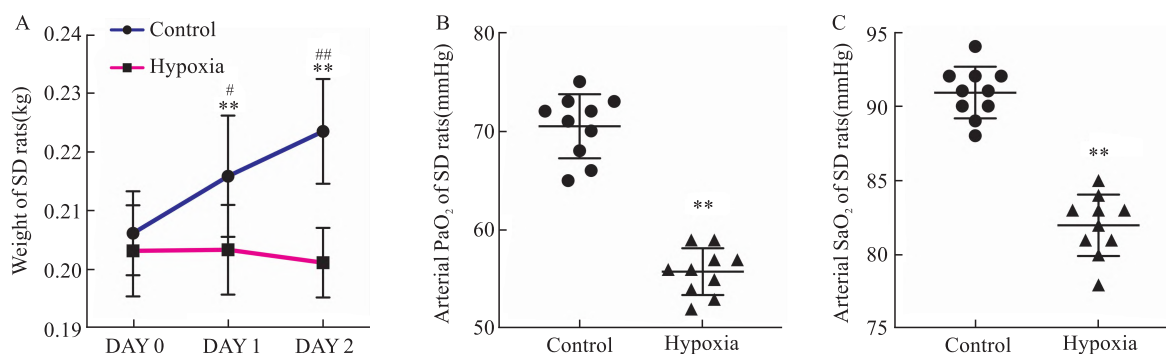


图 1 高原低氧环境下大鼠生理指标的变化

Fig. 1 Changes of physiological indicators of rats under high-altitude hypoxia environment

A: Weight changes of two groups of rats exposed to hypoxia for different durations; B: Changes in oxygen partial pressure in rats under high-altitude hypoxia environment; C: Changes in oxygen saturation in rats under high-altitude hypoxia environment; * $P < 0.01$ vs Control group DAY 0; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs Control group on the same day.

2.2 高原低氧胁迫后大鼠动脉血清类靶向代谢组学分析 PLS-DA 提示 Control 组 (CA) 与 Hypoxia 组 (HA) 两组间对比方式可信度高,代谢物组成存在明显的组间差异,见图 2A。热图可视化提示 Control 组和 Hypoxia 组之间代谢物的变化差异显著,可进行后续分析,见图 2B。根据 Hypoxia 组与 Control 组差异代谢物采用气泡图可视化前 20 条 KEGG 富集途径,显示差异代谢通路显著富集在 TH 合成通路中 ($P < 0.01$),见图 2C。关于 TH 合成的具体途径 (map: 04918), 见图 3。

2.3 高原低氧对大鼠甲状腺激素合成通路中关键基因和终产物 (T_4) 的影响 RT-PCR 结果显示,与 Control 组相比,Hypoxia 组大鼠甲状腺组织中 NIS, TPO mRNA 表达显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),TG mRNA 表达降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 4A;Western blot 结果显示,与 Control 组相比,Hypoxia 组大鼠甲状腺组织中 NIS、TG、TPO 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$), 见图 4B;ELISA 结果显示,与 Control 组相比, T_4 含量在 Hypoxia 组大鼠动脉血清中显著下降 ($P < 0.01$), 见图 4C。

2.4 高原低氧对大鼠氧化应激指标的影响 ELISA 结果显示,Hypoxia 组大鼠动脉血清中 SOD、GSH-Px 酶活性较 Control 组显著下降 ($P < 0.01$), 见图 5A、B;而 MDA 含量较 Control 组显著升高 ($P < 0.01$), 见图 5C。

2.5 高原低氧对大鼠炎症相关指标的影响 ELISA 结果显示,见图 6A - D,与 Control 组相比,Hypoxia 组大鼠动脉血清中 TLR-4、NF- κ B、TNF- α 浓度升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),IL-6 浓度明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。RT-PCR 结果显示,与 Control 组相比,Hypoxia 组大鼠甲状腺组织中 TLR-4、TNF- α mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), IL-6、NF- κ B mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$),见图 6E。Western blot 结果显示,与 Control 组相比,Hypoxia 组大鼠甲状腺组织中 TLR-4 蛋白表达升高 ($P < 0.05$),IL-6、NF- κ B/p65、TNF- α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 见图 6F。

2.6 高原低氧对大鼠细胞凋亡相关因子的影响 RT-PCR 结果显示,与 Control 组相比,Hypoxia 组大鼠甲状腺组织中凋亡因子 Bax mRNA 表达升高,

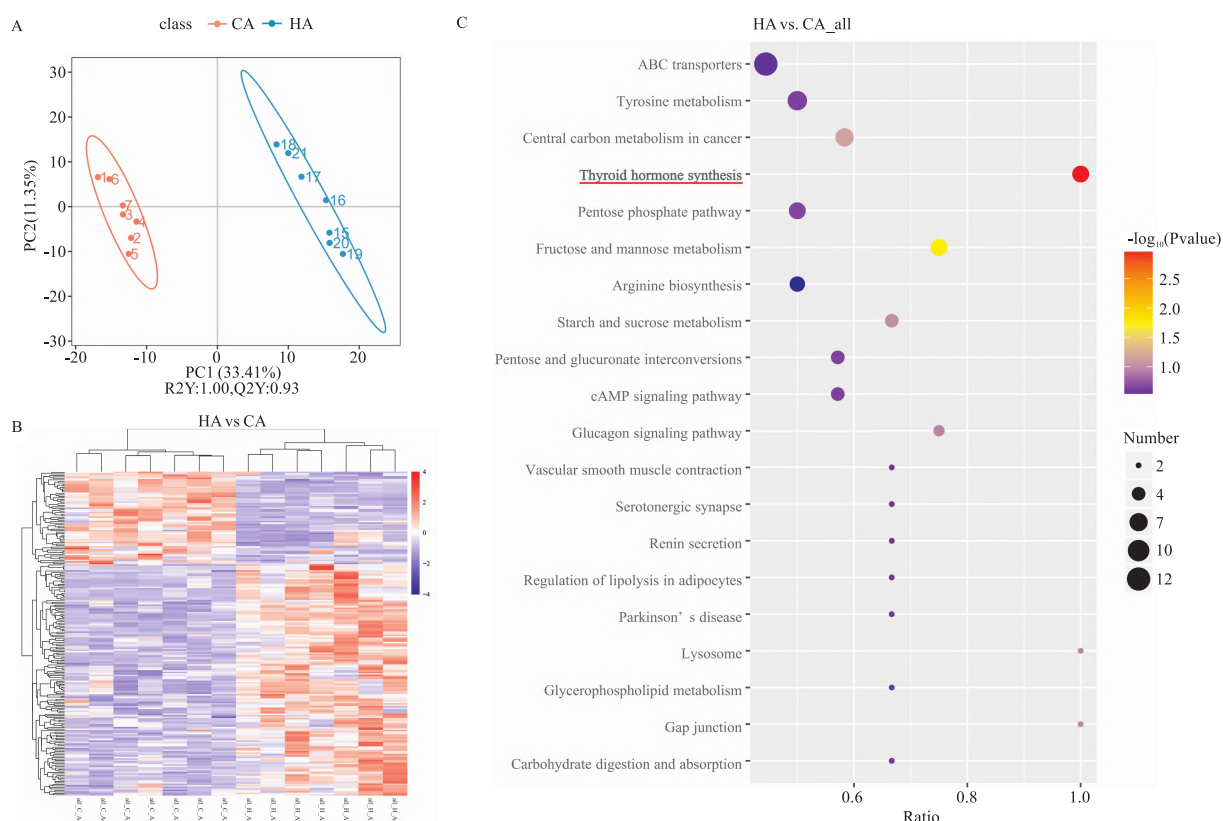


图 2 高原低氧环境下大鼠动脉血清代谢组学差异分析结果

Fig. 2 Differential analysis of arterial serum metabolomics of rats under high-altitude hypoxia environment

A: Total sample PLS-DA analysis; B: Heatmap of differential metabolites clustering; C: KEGG enrichment bubble plot of differential metabolites.

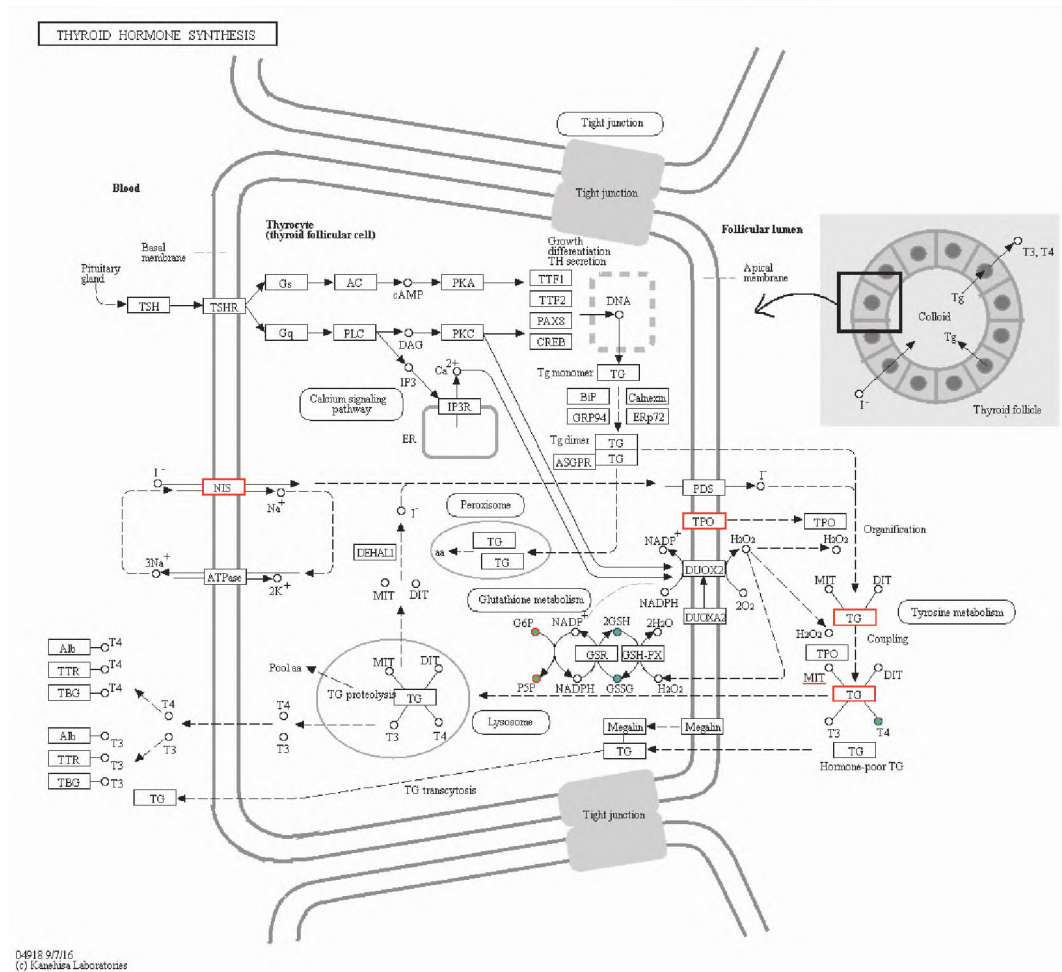


图3 甲状腺激素合成的KEGG通路图
Fig. 3 KEGG pathway diagram of thyroid hormone synthesis

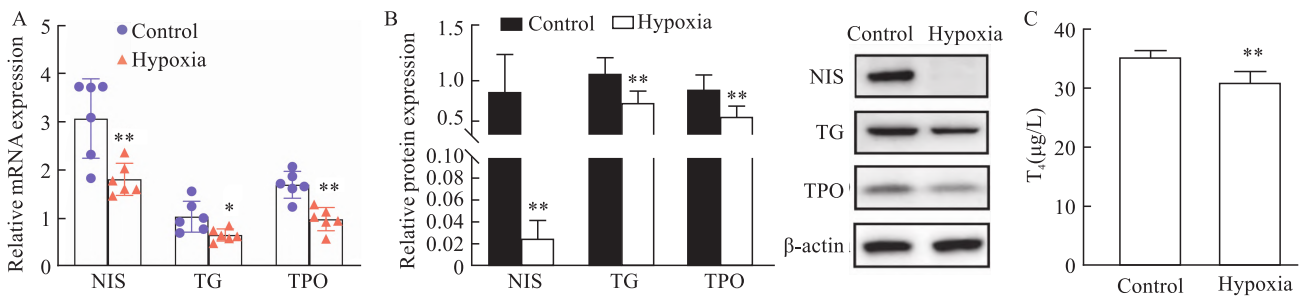


图4 高原低氧环境下大鼠甲状腺组织 TH 合成通路关键基因和蛋白表达水平及血清 T₄ 含量
Fig. 4 The expression levels of key genes and proteins in thyroid tissue TH synthesis pathway and the content of T₄ in serum of rats under high-altitude hypoxia environment

A: The mRNA relative expression levels of NIS, TG and TPO detected by RT-PCR in thyroid tissue of two groups of rats; B: The protein relative expression levels of NIS, TG and TPO detected by Western blot in thyroid tissue of two groups of rats; C: The T₄ content detected by ELISA in arterial serum of two groups of rats; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Control group.

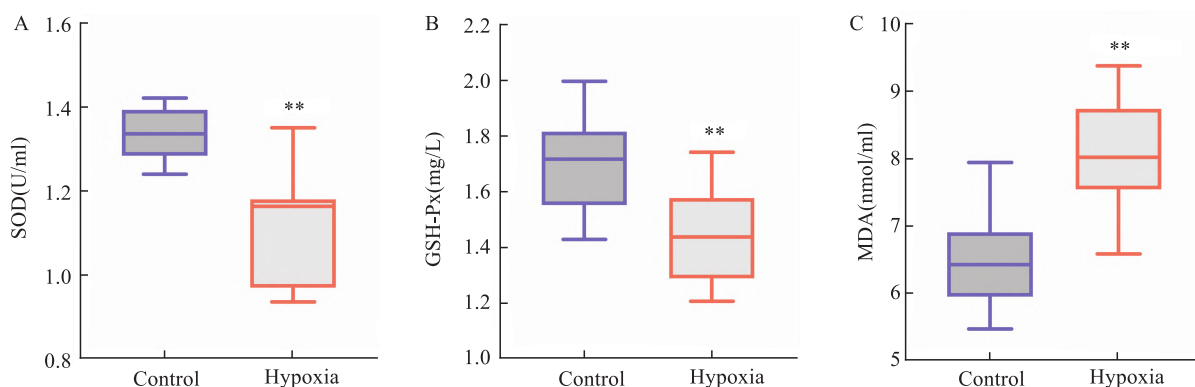


图5 高原低氧环境下大鼠动脉血清氧化应激指标的表达水平

Fig. 5 The expression levels of oxidative stress indicators in arterial serum of rats under high-altitude hypoxia environment

A: SOD enzyme activity in arterial serum of two groups of rats; B: GSH-Px enzyme activity in arterial serum of two groups of rats; C: MDA content in arterial serum of two groups of rats; ** $P < 0.01$ vs the Control group.

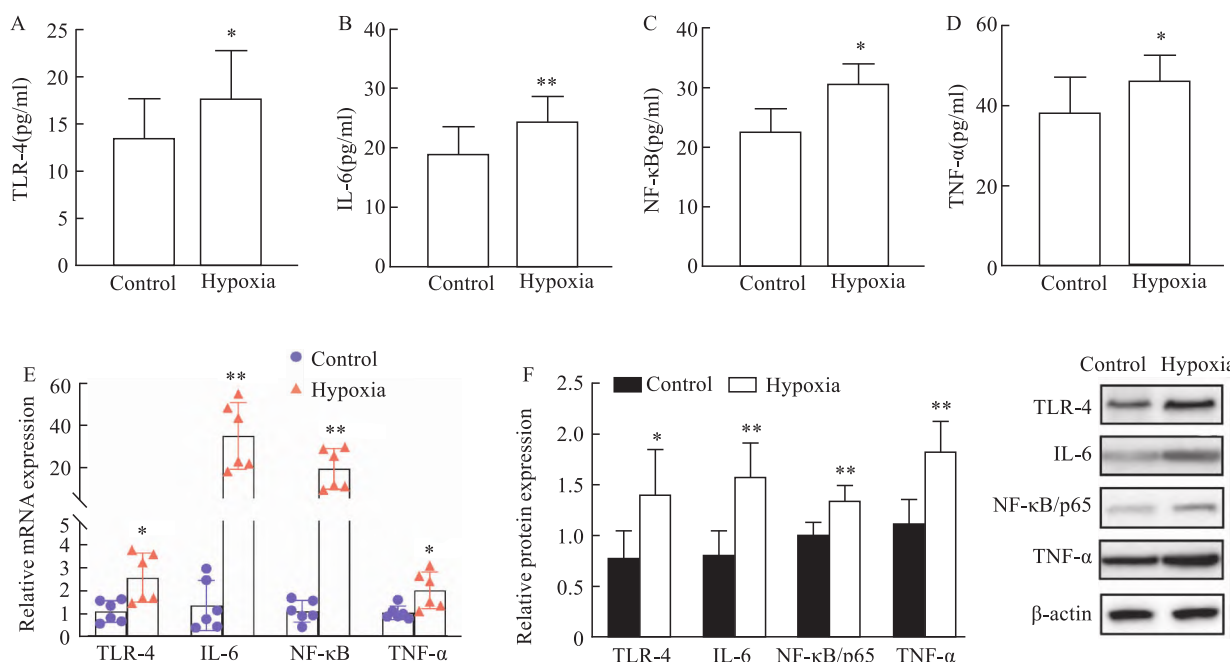


图6 高原低氧环境下大鼠甲状腺组织中炎症相关因子的表达水平

Fig. 6 The expression levels of inflammation related factors in thyroid tissue of rats under high-altitude hypoxia environment

A - D: The expression levels of TLR-4, IL-6, NF- κ B, and TNF- α detected by ELISA in arterial serum of two groups of rats; E: The mRNA relative expression levels of TLR-4, IL-6, NF- κ B, and TNF- α detected by RT-PCR in thyroid tissue of two groups of rats; F: The protein relative expression levels of TLR-4, IL-6, NF- κ B/p65 and TNF- α detected by Western blot in thyroid tissue of two groups of rats; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Control group.

Bcl-2 mRNA 表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 7A。Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, Hypoxia 组大鼠甲状腺组织中 Bax 蛋白表达显著升高, Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 见图 7B。

3 讨论

AMS 是一种在短时间内上升到 2 500 m 以上的

海拔高度后, 机体由于急性缺氧导致的潜在致死性疾病^[7]。AMS 发生的同时不仅伴有低氧血症^[8], 还会导致机体内分泌系统紊乱及相应代谢产物随之改变。甲状腺作为人体最大的内分泌腺, 依靠制造 TH 来调控机体能量代谢、体温平衡和生长发育等重要过程。既往研究^[9]表明, NIS 和 TG 是 TH 合成的必需原料, TPO 则是 TH 合成的关键酶。NIS 依赖钠泵活动提供的势能, 将血液内的碘主动转运至细胞内,

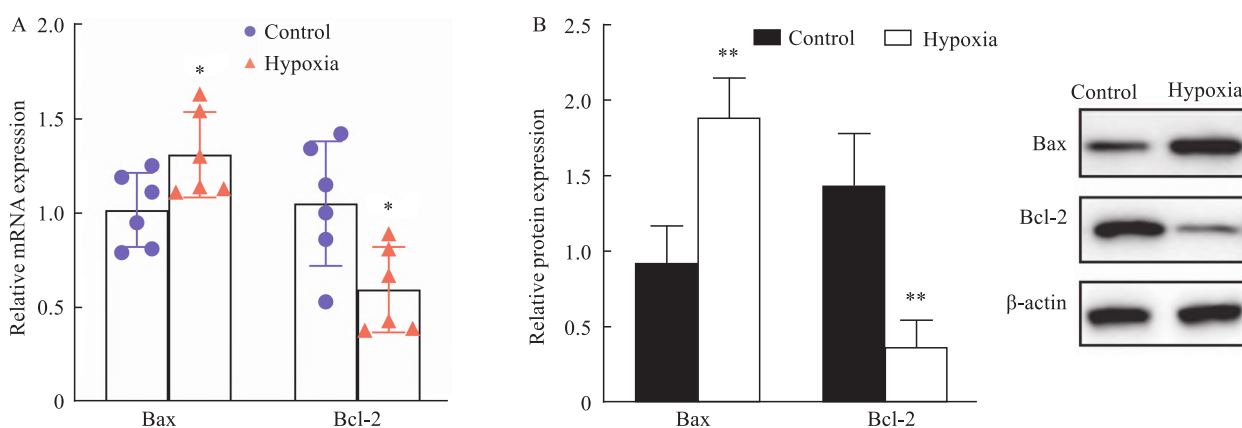


图7 高原低氧环境下大鼠甲状腺组织凋亡相关因子表达水平

Fig. 7 The expression levels of apoptosis related factors in thyroid tissue of rats under high-altitude hypoxia environment

A: The mRNA relative expression levels of apoptosis factors Bax and Bcl-2 detected by RT-PCR in thyroid tissue of two groups of rats; B: The protein relative expression levels of apoptosis factors Bax and Bcl-2 detected by Western blot in thyroid tissue of two groups of rats; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the Control group.

作为 TH 合成的第一个关键步骤;TG 是甲状腺滤泡上皮细胞分泌的大分子糖蛋白,不仅作为 TH 合成的重要原料,还可以维持 TH 水平稳定;TPO 由甲状腺滤泡细胞合成,在滤泡腔面微绒毛处的分布最为丰富,是催化 TH 合成的关键酶。既往研究^[10-11]表明,NIS、TG、TPO 作为甲状腺激素合成的重要物质,其表达水平的降低可能与碘代谢和甲状腺功能减退密切相关。

大量文献^[12]报道,动物和人类的甲状腺功能的减退与氧化应激有关。而 AMS 的发生也与氧化应激和炎症相关,低氧应激可诱导全身氧化应激,导致内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)增加和氧化应激损伤。ROS 非常活跃且不稳定,因此通过检测 SOD、GSH-Px 酶活性和 MDA 含量,间接反映氧化应激水平和低氧损伤程度^[13]。氧化应激还可诱导炎症因子的产生^[14],NF- κ B 与炎症反应关系最为密切,各种炎症介质基因的启动子和增强子如 IL-1、IL-8、IL-6、TNF- α 均含有 1 个或多个 κ B 序列。TLR-4 作为炎症反应的关键因素,通过与内源性配体结合并激活 NF- κ B,激活的 NF- κ B 可单独或联合其他转录因子参与上述介质基因的诱导表达。近年来,多项研究发现 TLR-4/NF- κ B 信号通路是与炎症免疫应答密切相关的信号转导通路,在炎症的发生发展中起重要作用。NF- κ B 级联反应一旦被激活,可诱导多种细胞反应,不但增加炎症因子 TNF- α 、IL-6 的分泌和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的产

生^[15],还可以诱导细胞凋亡或坏死,最终导致不可逆的损伤。本实验得到的结果表明,低氧组大鼠动脉血清氧化应激水平极显著升高,提示氧化应激可能是 AMS 的重要致病因素之一,同时急性低氧暴露会增加大鼠血液中 TLR-4、IL-6、NF- κ B、TNF- α 的浓度,提示氧化应激下 TLR-4/NF- κ B 信号通路过度激活,大量炎症因子在体内蓄积,参与 AMS 的发生和发展^[16]。另一方面,高原低氧还促进甲状腺滤泡上皮细胞的凋亡加快,导致甲状腺功能受损,从而影响 TH 合成通路中关键基因 NIS、TG、TPO 的表达,最终导致 T_4 合成不足,提示甲状腺功能和结构改变导致的 T_4 水平降低可能与氧化应激水平和炎症反应有关。Tani et al^[17] 研究显示甲状腺相关激素是急性全身性低氧/缺血的标志。本研究显示低氧胁迫后大鼠的代谢变化, T_4 水平下降可能是一种细胞在低氧环境下降低基础代谢率的适应性调节方法,TH 水平与低氧严重程度及疾病预后密切相关,即 TH 循环水平越低,机体氧化应激加强,缺氧损伤愈严重^[18]。综上所述,AMS 发生后最终导致 T_4 水平下降,改进 TH 的检测水平可进一步明确 AMS 患者低氧的严重程度,然而,国内外在此方面的研究甚少,相关机制尚不清楚,本文实验也存在一定的局限性,因此,AMS 与 TH 水平的关系还有待于进一步研究。

致谢: 特别感谢国家自然科学基金项目(82160322)、青海省科技厅应用基础研究项目

(2023-ZJ-746) 为本研究提供了必要的经费支持,以及为研究工作的开展做出的重要贡献。感谢青海大学基础医学研究中心提供的实验条件和仪器设备,保证了实验的顺利进行。在此向项目组和所有工作人员表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Naeije R. Physiological adaptation of the cardiovascular system to high altitude[J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52(6): 456–66. doi:10.1016/j.pcad.2010.03.004.
- [2] Savourey G, Launay J C, Besnard Y, et al. Control of erythropoiesis after high altitude acclimatization[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2004, 93(1–2): 47–56. doi:10.1007/s00421-004-1159-5.
- [3] Barnholt K E, Hoffman A R, Rock P B, et al. Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4, 300 meters): modulating effects of caloric restriction[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 290(6): E1078–88. doi:10.1152/ajpendo.00449.2005.
- [4] 黄文洁, 吴绍文, 刘蕊, 等. 基于质谱的代谢组学数据分析技术研究进展[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(11): 96–109. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.11.011.
- [4] Huang W J, Wu S W, Liu R, et al. Progress in mass spectrometry-based metabolomics data analysis techniques[J]. *Guangdong Agric Sci*, 2022, 49(11): 96–109. doi:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.11.011.
- [5] Liao J C, Li C Y, Teng F M, et al. Integrated analysis of comprehensive metabolomics and network pharmacology to reveal the mechanisms of *abelmoschus manihot* (L.) medik. in the treatment of cisplatin-induced chronic kidney disease[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1064498. doi:10.3389/fphar.2022.1064498.
- [6] Zhang R, Yang M, Hou X, et al. Characterization and difference of lipids and metabolites from Jianhe White Xiang and Large White pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Res Int*, 2022, 162 (Pt A): 111946. doi:10.1016/j.foodres.2022.111946.
- [7] 魏冠平, 黄煜, 何庆. 高原疾病的种类、发病机制及治疗药物[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(5): 830–2. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.037.
- [7] Wei G P, Huang Y, He Q. Types, pathogenesis and therapeutic drugs of plateau diseases[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2019, 54(5): 830–2. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.037.
- [8] Jia Z, Zhao X, Liu X, et al. Impacts of the plateau environment on the gut microbiota and blood clinical indexes in Han and Tibetan individuals[J]. *mSystems*, 2020, 5(1): e00660–19. doi:10.1128/mSystems.00660-19.
- [9] 聂鹤颖, 李明, 孙殿军. 甲状腺激素合成基因与碘代谢和甲状腺疾病的相关性研究进展[J]. *中华地方病学杂志*, 2020, 39(8): 619–24. doi:10.3760/cma.j.cn231583-20200312-00038.
- [9] Nie G Y, Li M, Sun D J. Research progress of thyroid hormone synthesis related genes and iodine metabolism and thyroid diseases[J]. *Chin J Endem*, 2020, 39(8): 619–24. doi:10.3760/cma.j.cn231583-20200312-00038.
- [10] De la Vieja A, Santisteban P. Role of iodide metabolism in physiology and cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(4): R225–45. doi:10.1530/ERC-17-0515.
- [11] Godlewska M, Banga P J. Thyroid peroxidase as a dual active site enzyme: Focus on biosynthesis, hormonogenesis and thyroid disorders of autoimmunity and cancer[J]. *Biochimie*, 2019, 160: 34–45. doi:10.1016/j.biochi.2019.02.003.
- [12] Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, et al. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6757154. doi:10.1155/2016/6757154.
- [13] Balan D J, Rajavel T, Das M, et al. Thymol induces mitochondrial pathway-mediated apoptosis via ROS generation, macromolecular damage and SOD diminution in A549 cells[J]. *Pharmacol Rep*, 2021, 73(1): 240–54. doi:10.1007/s43440-020-00171-6.
- [14] Zi Y, Jiang B, He C, et al. Lentinan inhibits oxidative stress and inflammatory cytokine production induced by benzo(a) Pyrene in human keratinocytes[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19(2): 502–7. doi:10.1111/jocd.13005.
- [15] Xiong R, Jiang W, Li N, et al. PM2.5-induced lung injury is attenuated in macrophage-specific NLRP3 deficient mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 221: 112433. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112433.
- [16] Pu X, Li F, Lin X, et al. Oxidative stress and expression of inflammatory factors in lung tissue of acute mountain sickness rats[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(2): 49. doi:10.3892/mmr.2021.12565.
- [17] Tani N, Ishikawa M, Watanabe M, et al. Thyroid-related hormones as potential markers of hypoxia/ischemia[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(3): 545–58. doi:10.1007/s13577-020-00341-x.
- [18] Zeng B, Liu L, Liao X, et al. Cardiomyocyte protective effects of thyroid hormone during hypoxia/reoxygenation injury through activating of IGF-1-mediated PI3K/Akt signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(7): 3205–15. doi:10.1111/jcmm.16389.

To explore the effect of high-altitude hypoxia on thyroid hormone synthesis based on metabolomics

Dai Chongyang¹, Lin Xue², Wang Yaxuan¹, Pu Xiaoyan¹

(¹Medical Department of Qinghai University, Xining 810016;

²West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610044)

Abstract Objective To explore the effects of high-altitude hypoxia on thyroid hormone (TH) synthesis by quasi-targeted metabolomics technology. **Methods** Twenty SPF male SD rats were randomly divided into Control group and Hypoxia group. An acute hypoxia injury model was established in SD rats by simulating hypoxia stress in a hypobaric oxygen chamber at an altitude of 6 km for 48 hours. The body weight, arterial oxygen partial pressure (PaO₂) and blood oxygen saturation (SaO₂) were detected. KEGG enrichment analysis was performed after the metabolites in the blood of two groups were detected by quasi-targeted metabolomics technology. The expression levels of sodium iodide symporter (NIS), thyroid peroxidase (TPO) and thyroglobulin (TG) were detected by RT-PCR and Western blot in TH synthesis pathway. The content of serum thyroxine (T₄) and the expression levels of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected by ELISA. The expression levels of toll-like receptors-4 (TLR-4), interleukin-6 (IL-6), nuclear factor-κB/p65 (NF-κB/p65) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were detected by RT-PCR, Western blot and ELISA. The expression levels of Pro apoptotic protein Bcl-2 associated X protein (Bax) and inhibitor of apoptosis protein B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) were detected by RT-PCR and Western blot in rats thyroid tissue. **Results** Compared with the Control group, the body weight, PaO₂ and SaO₂ of rats in the Hypoxia group significantly decreased ($P < 0.01$). The differential metabolites in arterial serum of hypoxia group rats were significantly enriched in the TH synthesis pathway, and the content of the pathway end product T₄ decreased significantly ($P < 0.01$). In addition, the mRNA and protein expression levels of NIS, TPO, TG in rats thyroid tissue significantly decreased ($P < 0.05$). The ELISA validation results showed that the changes of T₄ content were completely consistent with the above results. Compared with the Control group, the enzyme activities of SOD and GSH-Px in the serum of rats in the hypoxia group decreased, while the content of MDA increased ($P < 0.01$); the mRNA, protein expression levels and contents of TLR-4, IL-6, NF-κ B/p65, TNF-α significantly increased ($P < 0.05$), while the mRNA and protein expression levels of Bax in thyroid tissue significantly increased, Bcl-2 significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypoxia stress at high altitude leads to apoptosis of thyroid follicular epithelial cells by promoting oxidative stress and inflammatory response, which effects thyroid function and ultimately reduces thyroid hormone synthesis.

Key words hypoxia; quasi-targeted metabolomics; oxidative stress; inflammation; thyroid hormone

Fund programs National Natural Science Foundation of China(No. 82160322); Applied Basic Research Fund of Science and Technology of Department Qinghai Province (No. 2023-ZJ-746)

Corresponding author Pu Xiaoyan, E-mail: puxiaoyan1975@163.com