

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.05.006

下丘脑腹内侧核损毁对大鼠 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响*

张 婵^{1,2} 王巧玲¹ 逢明杰³ 祝 海³ 郭菲菲¹ 孙向荣¹ 公衍玲⁴ 徐 璐^{1,Δ}

(1 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东 青岛 266021; 2 菏泽医学专科学校 山东 菏泽 274031;

3 青岛市立医院 山东 青岛 266011; 4 青岛科技大学化工学院 山东 青岛 266042)

摘要 目的:观察下丘脑腹内侧核(VMH)损毁对大鼠脂肪组织 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响及其机制。**方法:**电损毁 VMH, 观察大鼠体重和脂肪组织变化, 采用 Western blot 检测脂肪组织中 nesfatin-1/NUCB2 表达改变。腹腔注射 6-羟多巴胺(50 mg/kg)以阻断交感神经; 持续外周注射卡巴胆碱(180 μ g/kg)用以模拟 VMH 损毁, 观察其对大鼠皮下脂肪 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响。**结果:**与对照组和假手术组比较, VMH 损毁后大鼠体重明显增加($P<0.05$), 皮下脂肪($P<0.05$)和肠系膜脂肪($P<0.05$)也显著增多; Western blot 分析结果显示, nesfatin-1/NUCB2 在胰腺和肝脏中表达较多, 但皮下、肠系膜脂肪和肩胛间棕色脂肪组织(iBAT)中表达较少, 骨骼肌(腓肠肌)中鲜有表达; 与对照组和假手术组比较, VMH 损毁组大鼠 nesfatin-1/NUCB2 在肝脏、胰腺、骨骼肌和 iBAT 中表达无显著差异($P>0.05$), 皮下脂肪($P<0.05$)和肠系膜脂肪($P<0.05$) nesfatin-1/NUCB2 表达显著增多与对照组相比, 6-羟多巴胺组 nesfatin-1/NUCB2 表达显著升高($t=3.43, P<0.05$), 而卡巴胆碱组 nesfatin-1/NUCB2 表达无显著差异($t=0.37, P=0.72$)。**结论:**VMH 损毁后大鼠脂肪组织 nesfatin-1/NUCB2 表达改变可能通过抑制交感神经活动介导。

关键词: Nesfatin-1/NUCB2; 下丘脑腹内侧核; 脂肪组织; 自主神经系统

中图分类号: Q95-3; R589 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)05-818-04

The Effects of Hypothalamic Ventromedial Nucleus Lesion on Nesfatin-1/NUCB2 Expression in Rats*

ZHANG Chan^{1,2}, WANG Qiao-ling¹, PANG Ming-jie³, ZHU Hai³, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, GONG Yan-ling⁴, XU Luo^{1,Δ}

(1 Dept. of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China;

2 Heze Municipal Hospital, Heze, Shandong, 274031, China;

3 Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong, 266011, China;

4 College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong, 266042, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of ventromedial hypothalamus nuclear lesion on nesfatin-1/NUCB2 expression of white adipose tissue in rats, and to explore its underlying mechanism. **Methods:** The hypothalamic ventromedial nucleus (VMH) of rats was damaged by electrical stimulation. The changes of weight and adipose tissues of rats were observed. And the expression of nesfatin-1/NUCB2 in adipose tissues was detected by Western blot analysis. Intraperitoneal injection of 6-hydroxy dopamine (50 mg/kg) was used to block the sympathetic nerve; continuous peripheral injection of kappa choline (180 μ g/kg) was used to simulate VMH damaged to observe the nesfatin-1/NUCB2 expression in subcutaneous fat of rats. **Results:** Compared with the control group and sham-operated group, the weight ($P<0.05$), subcutaneous fat ($P<0.05$) and mesenteric fat ($P<0.05$) of VMH-lesioned rats increased significantly. The results of Western blot analysis showed that nesfatin-1/NUCB2 was mainly expressed in the pancreas and liver, less in subcutaneous, mesenteric fat and interscapular brown adipose tissues (iBAT), little in skeletal muscle (calf). Compared with the control group and sham-operated group, the expression of nesfatin-1/NUCB2 in liver, pancreas, skeletal muscles and iBAT in VMH-lesioned group had no significant differences, but in subcutaneous fat ($P<0.05$) and mesenteric fat ($P<0.05$) it significantly increased. Compared with that in the control group, the expression of nesfatin-1/NUCB2 in 6-hydroxy dopamine group increased significantly ($t=3.43, P<0.05$), but was reduced in carbachol group ($t=0.37, P=0.72$). **Conclusions:** These results show that after VMH lesion, the increased expression of nesfatin-1/NUCB2 in white adipose tissues may be mediated via inhibition of the sympathetic nerve activity.

Key words: Nesfatin-1/NUCB2; Ventromedial hypothalamus; White adipose tissues; Autonomic nerve system

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R589 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)05-818-04

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31071014; 81100260; 81270460; 81300281); 青岛市科技局项目(13-1-4-170-jch, 11-2-3-3-(2)-nsh)

作者简介: 张婵(1982-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 能量代谢障碍基础与临床, 电话: 0532-82991713,

E-mail: bihaiyunbo2006@126.com

Δ 通讯作者: 徐璐, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期: 2014-08-11 接受日期: 2014-09-08)

前言

Nesfatin-1 是新近发现的表达于大鼠下丘脑和脑干的厌食肽^[1],禁食可选择性的减少下丘脑室旁核(PVN)nesfatin-1 的表达,重新摄食可恢复其表达^[1]。PVN 催产素能神经元的激活可介导脑干 nesfatin-1 厌食信号,激活阿黑皮素原神经元(POMC)^[2]。此外,nesfatin-1 前体蛋白 nesfatin-1/NUCB2 在体内广泛表达^[1,3,4],经激素原转化酶(PC)的作用而释放 nesfatin-1 至体循环中^[1]。健康个体循环系统中 nesfatin-1 浓度与体重指数呈反比,肥胖个体中 nesfatin-1 浓度显著降低^[5]。有文献报道,循环系统中 nesfatin-1 来源于外周组织,可能在厌食信号从外周至大脑的传输中起作用^[6]。外周注射 nesfatin-1 可抑制自由进食小鼠摄食,可能通过激活脑干孤束核内 POMC、可卡因及苯丙胺相关转录物(CART)的表达发挥作用^[7]。摄食及口服葡萄糖不影响人类血循环 nesfatin-1 水平^[8],提示 nesfatin-1 可能是脂肪组织的一种肥胖信号,而不是胃肠道中的饱感信号^[8]。至今为止,外周血液中 nesfatin-1 起源及其调控还不清楚。

肥胖模型中交感神经系统兴奋性降低;下丘脑腹内侧核(VMH)损毁的大鼠显示肩胛间棕色脂肪组织(iBAT)内交感神经活性降低^[9],而内脏器官副交感神经活性增强^[10]。许多研究显示,交感神经参与白色脂肪组织的代谢调控^[11]。最近临床研究显示,迷走神经切断术可导致内脏脂肪减少,提示迷走神经参与人内脏脂肪的代谢调控^[12]。下丘脑可调节自主神经系统活动,其可能在调控脂肪组织代谢中起关键作用。本实验旨在探讨下丘脑腹内侧核损毁是否影响外周自主神经系统的平衡及腹内侧核损毁对脂肪组织 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

43 只雌性 SD 大鼠(雌性大鼠比雄性大鼠对电刺激 VMH 损毁更敏感^[13]),平均 13 周龄。实验动物接受 12 h 循环光照(光照时间 07:00-19:00),室温维持在 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$,湿度 50%。大鼠自由进食和饮水。

1.2 VMH 损毁

大鼠经乙醚吸入麻醉,头部固定于脑立体定位仪,参照 Paxinos-Watson 大鼠脑立体定位图谱^[14]电损毁双侧 VMH(定位

坐标:前囟后 2.8 mm,旁开 0.7 mm,颅骨基线以上 0.5 mm)。将环氧树脂绝缘(去除针尖部 0.8 mm)的不锈钢针(0.4 mm)植入 VMH,接正极电流 2 mA 20 s。假手术组除不通电流外,其余与手术组相同。术后大鼠放回笼中,自由进食饮水。所有大鼠术后 5 天处死,断头取脑,10%福尔马林溶液中固定,冰冻切片,显微镜下观察 VMH 损毁部位。双侧 VMH 未损毁的不计入统计分析。取出皮下和内脏脂肪,称重^[15]。

1.3 6-羟多巴胺和卡巴胆碱处理

腹腔注射 6-羟多巴胺以阻断交感神经;持续外周注射卡巴胆碱用以模拟 VMH 损毁,观察其对大鼠皮下脂肪 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响。将卡巴胆碱溶解于生理盐水中,大鼠腹腔注射 $180 \mu\text{g/kg}$,持续 5 天^[16]。6-羟多巴胺溶于生理盐水中第 1 天和第 4 天腹腔注射 50 mg/kg ^[17]。对照组大鼠注射等量的生理盐水。所有大鼠在第 5 天处死。

1.4 Western blot 分析

大鼠处死后,分离肝脏、胰腺、腓肠肌、皮下脂肪、肠系膜脂肪和 iBAT,并在 -80°C 下冻存以备用。组织在含有 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的冰冻蔗糖溶液 (0.32 M) 中均质化。匀浆用离心机 $1000 \times g$ 4°C 离心 10 min。取上清液 $20000 \times g$ 4°C 离心 10 min,再取上清液 $100,000 \times g$ 4°C 离心 60 min,收集上清液即为蛋白样本。用 BCA 法测定蛋白总量,蛋白样本电泳缓冲液稀释,10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,转移至聚二氟乙烯(PVDF)膜上,脱脂牛奶室温下封闭 2 h,nesfatin-1/NUCB2(1:2000,美国 Phoenix 公司)探测蛋白印迹, β -actin 作为内参。辣根过氧化物酶结合二抗施行免疫印迹技术,化学荧光试剂和 LAS-3000 光成像分析系统进行检测。

1.5 统计学分析

所有统计数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数的比较采用 t 检验,多个样本均数的比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重和脂肪变化

与对照组和假手术组相比,大鼠 VMH 损毁 5 天后体重明显增加($P < 0.05$),皮下脂肪($P < 0.05$)和肠系膜脂肪($P < 0.05$)显著增多。对照组和假手术组相比无明显差异($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 VMH 损毁对大鼠体重和脂肪影响($\text{g}, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes in body weight and fat in VMH-lesioned rats ($\text{g}, \bar{x} \pm s$)

Group	n	Body weight	Visceral fat	Subcutaneous fat
Control group	10	2.0 ± 4.1	3.3 ± 0.5	1.4 ± 0.6
sham-operated group	11	2.1 ± 4.2	3.2 ± 0.4	1.4 ± 0.5
VMH-lesioned group	18	$59.7 \pm 11.5^{*\Delta}$	$6.3 \pm 0.8^{*\Delta}$	$2.3 \pm 0.9^{*\Delta}$

注:* $P < 0.05$,与对照组比较; Δ $P < 0.05$,与假手术组比较。

Notes:* $P < 0.05$ vs. control group; Δ $P < 0.05$ vs. sham-operated group.

2.2 VMH 损毁对 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响

Western blot 分析结果显示,对照组和假手术组 nesfatin-1/NUCB2 在胰腺和肝脏中表达较多,但皮下脂肪、内脏脂

肪和 iBAT 中表达较少,骨骼肌(腓肠肌)中鲜有表达,且两组结果无明显差异($P > 0.05$)(表 2)。

与对照组和假手术组比较,VMH 损毁组大鼠的肝脏、胰

腺、骨骼肌和 iBAT 中 nesfatin-1/NUCB2 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), 但 VMH 损毁组大鼠皮下脂肪 ($P<0.05$) 和肠系膜

脂肪 ($P<0.05$) nesfatin-1/NUCB2 表达显著增多。对照组和假手术组相比无明显差异 ($P>0.05$) (表 2)。

表 2 VMH 损毁对 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Nesfatin-1/ NUCB2 expression in various tissues (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	Subcutaneous fat	Visceral fat	iBAT	Liver	Pancreas	Skeletal muscle
Control group	10	0.40 $\pm$ 0.13	0.14 $\pm$ 0.22	0.49 $\pm$ 0.35	1.48 $\pm$ 0.52	1.03 $\pm$ 0.50	0.02 $\pm$ 0.53
Sham-operated group	11	0.41 $\pm$ 0.12	0.13 $\pm$ 0.24	0.51 $\pm$ 0.36	1.49 $\pm$ 0.53	1.02 $\pm$ 0.51	0.02 $\pm$ 0.52
VMH-lesioned group	18	0.91 $\pm$ 0.21* Δ	2.35 $\pm$ 0.96* Δ	0.62 $\pm$ 0.23	1.52 $\pm$ 0.47	0.93 $\pm$ 0.44	0.01 $\pm$ 0.64

注: * $P<0.05$, 与对照组比较; Δ $P<0.05$, 与假手术组比较。

Notes: * $P<0.05$ vs. control group; Δ $P<0.05$ vs. sham-operated group.

2.3 6-羟多巴胺及卡巴胆碱对 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响

结果显示, 与对照组相比, 6-羟多巴胺组 nesfatin-1/NUCB2 表达显著升高 ($t=3.43$, $P<0.05$, 图 1A), 而卡巴

胆碱组 nesfatin-1/NUCB2 表达无显著差异 ($t=0.37$, $P=0.72$; 图 1B)。

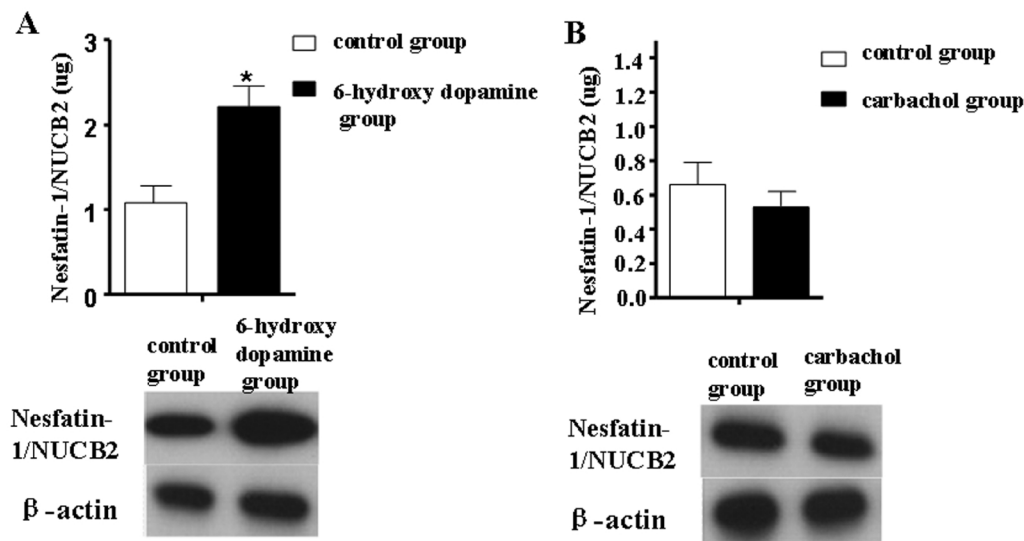


图 1 6-羟多巴胺和卡巴胆碱对 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响

Fig.1 Changes in nesfatin/ NUCB2 expression in rats treated with administration of 6-hydroxydopamine and carbachol.

* $P<0.05$, 与对照组相比

* $P<0.05$ vs. control group

3 讨论

本研究显示 VMH 损毁大鼠皮下和内脏脂肪组织中 nesfatin-1/NUCB2 表达均显著升高, 体重增加体脂累积明显, 但是在肝脏、胰腺和骨骼肌中 nesfatin-1/NUCB2 表达无改变。6-羟多巴胺阻断交感神经, 注射卡巴胆碱模拟 VMH 损毁研究首次显示, 大鼠白色脂肪组织 nesfatin-1/NUCB2 特异性表达增多。研究显示, 皮下脂肪组织 NUCB2 mRNA 和 nesfatin-1/NUCB2 蛋白表达明显高于其它脂肪组织^[6]。有文献报道, nesfatin-1/NUCB2 显著表达于肝脏^[6]和胰腺^[7]中。脂肪细胞的 PCs 和弗林蛋白酶可能参与 3T3-L1 细胞变异^[18], 提示 nesfatin-1/NUCB2 在脂肪细胞中可能转变成了 nesfatin-1。Nesfatin-1/NUCB2 在皮下脂肪中的改变可能归因于循环 nesfatin-1 的改变, 至今为止 ELISA 抗鼠 nesfatin-1 还未研发, 因此还不能测定 nesfatin-1 的浓度。

本研究发现, 大鼠白色脂肪组织中 nesfatin-1/NUCB2 表达显著升高, VMH 损毁可使大鼠皮下和内脏脂肪块增大。体外研究发现, 3T3-L1 细胞变异处理后 NUCB2 mRNA 和 nesfatin-1/NUCB2 蛋白表达显著升高^[9], 提示脂肪细胞肥大可能导致 nesfatin-1/NUCB2 表达升高。VMH 损伤后脂肪细胞肥大可解释皮下和内脏脂肪 nesfatin-1/NUCB2 表达增强。6-羟多巴胺阻断交感神经也可升高皮下脂肪 nesfatin-1/NUCB2 的表达, 除了明显的体重降低, 脂肪细胞肥大可能更能解释 VMH 损毁引起的 nesfatin-1/NUCB2 表达增强。

有文献报道, VMH 参与自主神经系统调控, VMH 损毁可改变交感和副交感神经系统的平衡^[9]。中枢注射 nesfatin-1 可增加心血管系统和肾脏交感神经系统兴奋性^[20], 脂肪组织受交感神经系统支配^[10,11]。皮下和内脏脂肪可能都含有副交感神经终端^[21]。6-羟多巴胺阻断交感神经模拟 VMH 损毁对皮下脂肪组织中 nesfatin-1/NUCB2 表达的影响, 显示 VMH 损毁作用可

能是抑制交感神经活性的结果。研究显示交感神经可调控白色脂肪组织中一些脂肪因子的释放^[1]。另有文献报道,循环 ghrelin 可通透血脑屏障^[21], 辣椒素阻断迷走神经可消除外周注射 nesfatin-1 的厌食作用^[22], 因为外周 nesfatin-1 可激活大脑交感神经兴奋性^[20], 外周 nesfatin-1/NUCB2 表达增强可能恢复脑 VMH 损毁所致的交感神经活性降低。

本实验结果表明, VMH 损毁大鼠皮下和内脏脂肪组织中 nesfatin-1/NUCB2 表达增加, 可能通过抑制交感神经活动介导。

参考文献(References)

- [1] Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus[J]. *Nature*, 2006,443 (25): 709-712
- [2] Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, et al. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway [J]. *Cell Metab*, 2009, 10(5): 355-365
- [3] Cao X, Liu XM, Zhou LH. Recent progress in research on the distribution and function of NUCB2/nesfatin-1 in peripheral tissues [J]. *Endocr J*, 2013,60(9):1021-1027
- [4] Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, et al. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity [J]. *Endocrinology*, 2010,151 (24): 3169-3180
- [5] Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, et al. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males[J]. *Clinical Endocrinology*, 2010,73 (43): 484-490
- [6] Scotece M, Conde J, Abella V, et al. NUCB2/nesfatin-1: a new adipokine expressed in human and murine chondrocytes with pro-inflammatory properties, an in vitro study[J]. *J Orthop Res.*, 2014,32(5): 653-660
- [7] Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, et al. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism[J]. *Endocrinology*, 2009,150 (42):662-671
- [8] Anwar GM, Yamamah G, Ibrahim A, et al. Nesfatin-1 in childhood and adolescent obesity and its association with food intake, body composition and insulin resistance[J]. *Regul Pept*, 2014,188(10):21-24
- [9] Holper L, Scholkmann F, Wolf M. The relationship between sympathetic nervous activity and cerebral hemodynamics and oxygenation: A study using skin conductance measurement and functional near-infrared spectroscopy[J]. *Behav Brain Res*, 2014,270:95-107
- [10] Paes AM, Carniatio SR, Francisco FA, et al. Acetylcholinesterase activity changes on visceral organs of VMH lesion-induced obese rats [J]. *International Journal of Neuroscience*, 2006, 116 (47): 1295-1302
- [11] Bartness TJ, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue[J]. *Journal of Lipid Research*, 2007, 48 (32):1655-1672
- [12] Zhou Q, Zhang L, Wang K, et al. Effect of interconnection between cervical vagus trunk, epicardial fat pad on sinus node function, and atrial fibrillation[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2014, 37(3):356-363
- [13] Segi-Nishida E, Sukeno M, Imoto Y. Electroconvulsive seizures activate anorexigenic signals in the ventromedial nuclei of the hypothalamus[J]. *Neuropharmacology*, 2013, 71:164-173
- [14] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed[J]. Academic Press Inc New York, 1986,76(15):98-105
- [15] Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, et al. Weight loss and melatonin reduce obesity-induced oxidative damage in rat testis [J]. *Adv Urol*, 2013,20(13): 836-838
- [16] Zhang AQ, Li XL, Jiang CY. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system[J]. *World J Gastroenterol*, 2010,16(14):1735-1741
- [17] Nakata M, Yada T. Role of NUCB2/nesfatin-1 in glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain[J]. *Curr Pharm Des.*, 2013,19(39):6960-6965
- [18] Croissandeau G, Basak A, Seidah NG, et al. Proprotein convertases are important mediators of the adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells[J]. *Journal of Cell Science*, 2002,115 (64): 1203-1211
- [19] Báez-Ruiz A, Luna-Moreno D, Carmona-Castro A, et al. Hypothalamic expression of anorexigenic and orexigenic hormone receptors in obese females *Neotomodon alstoni*: effect of fasting [J]. *Nutr Neurosci*, 2014 ,17(1):31-36
- [20] Tanida M, Mor M. Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats[J]. *Neuroreport*, 2011, 22(13): 309-312
- [21] PAN W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation[J]. *Peptides*, 2007, 28 (13):2223-2228
- [22] Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, et al. A new anorexigenic protein, nesfatin-1[J]. *Peptides*, 2009, 30(12): 995-998

(上接第 814 页)

- [16] Hsiang JN, Wang JY, Ip SM, et al. The time course and regional variations of lipid peroxidation after diffuse brain injury in rats [J]. *Acta neurochir Wien*, 1997,139(5):464-468
- [17] 荆俊杰,王守森,杨庆武,等.大鼠二次脑损伤后脑内 c-fos 基因表达和血浆 β -内啡肽的变化及意义 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2007,12(1):34-38
Jing Jun-jie, Wang Shou-sen, Yang Qing-wu, et al. Expression of c-fos gene and changes in plasma level of β -endorphin after secondary

- brain insults and their significance in rats [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2007,12(1):34-38
- [18] 荆俊杰,王守森,杨庆武,等.纳洛酮对弥漫性脑损伤合并二次脑损伤大鼠 c-fos 表达和 β -内啡肽水平的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(9): 26-29
Jing Jun-jie, Wang Shou-sen, Yang Qing-wu, et al. Effect of naloxone hydrochloride on c-fos protein expression in brain and plasma β -endorphin level in rats with diffuse brain injury and secondary brain insult[J]. *Med J Chin PLA*, 2012,37(9):26-29