

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.01.007

侧脑室注射 Orexins 对大鼠摄食的影响及机制*

张莉^{1,2} 张孟玲¹ 郭菲菲¹ 孙向荣¹ 高胜利¹ 徐璐^{1Δ}

(1 青岛大学医学部基础学院 病理生理教研室 山东 青岛 266021; 2 高密市人民医院 麻醉科 山东 高密 261500)

摘要 目的:探讨侧脑室注射 orexins(食欲素)、NPY(神经肽 Y)、MCH(黑色素聚集激素)和甘丙肽对大鼠摄食的影响及其机制。**方法:**将成年雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、侧脑室注射组和室旁核(PVN)注射组。通过套管将 orexin-A、orexin-B、NPY、MCH 和甘丙肽分别注射至侧脑室和 PVN 内,随后测量大鼠食物摄入量,并检测 PVN、弓状核(ARC)和 VMH 内 c-fos 的表达。**结果:**与对照组比较,侧脑室注射 NPY、MCH 和 orexin-B 2 h 后,大鼠摄食量显著增多($P<0.05$)。相较于 orexin-B 和 MCH,NPY 对摄食的影响更显著($P<0.05$)。与 NS 对照组比较,侧脑室注射甘丙肽和 orexin-A 1 h 后,大鼠摄食量显著增多($P<0.05$)。与 NS 对照组比较,侧脑室注射 orexin-A 可显著增加 c-fos 在 PVN 和 ARC 中的表达,在 VMH 中效应较弱($P<0.05$)。与 NS 对照组比较,PVN 注射 NPY 能显著增加大鼠 2 h 摄食量($P<0.05$),PVN 注射 orexin-A 能显著增加大鼠 2 h 和 4 h 摄食量($P<0.05$)。**结论:**orexins 与可促进大鼠摄食,此效应可能通过下丘脑参与摄食调控中枢 PVN 和 ARC 而实现的。

关键词:Orexins;NPY;MCH;甘丙肽;摄食

中图分类号:R-33;R338.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)01-28-04

Effects of Orexins on the Food Intake of Rats and Its Mechanism*

ZHANG Li^{1,2}, ZHANG Meng-ling¹, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, GAO Sheng-li¹, XU Luo^{1Δ}

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

2 Department of Anesthesia, Gaomi people Hospital, Gaomi, Shandong, 261500, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of the orexins, NPY, melanin-concentrating hormone (MCH) and galanin in food intake in rats and their mechanism. **Methods:** Male wistar rats were randomly divided into sham group, lateral ventricle (ICV) group and PVN group. Orexin-A, orexin-B, NPY, MCH and galanin were respectively injected into ICV and PVN through the cannula, then measured the food intake of rats to compared their effect. Also the expression of c-fos was detected in PVN, ARC and VMH. **Results:** Compared with sham group, the 2 h food intake of rats following injected NPY, MCH and orexin-B into ICV had significantly increased ($P<0.05$). The effect of NPY in food intake was more obviously than orexin-B and MCH ($P<0.05$). Compared with sham group, the 1 h food intake of rats following inject galanin and orexin-A into ICV had significantly increased ($P<0.05$). C-fos was expressed in PVN and ARC markedly ($P<0.05$). Compared with sham group, the expression of c-fos was greatly enhanced after orexin-A administered into ICV, weakly in VMH ($P<0.05$). Compared with sham group, the 2 h food intake of rats following injected NPY into PVN had significantly increased ($P<0.05$), orexin-A markedly increased the food intake of rats at 2 h and 4 h ($P<0.05$). **Conclusions:** Orexin-A can stimulated food intake of rats, and it may related to its physiology role in appetite regulation.

Key words: Orexins; NPY; MCH; Galanin; Food intake

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R338.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)01-28-04

前言

食欲素最初在背侧下丘脑和外侧下丘脑区的神经元胞体内发现,因其位于下丘脑及与分泌素具有序列同源性,故而得名,其纤维投射至包括脑干在内的多个区域^[1]。后来经识别被命名为 orexin-A 和 orexin-B,这些肽类被报道能够强有力的刺激摄食^[2]。研究表明,与生理盐水组相比,给予 3 nmol 的 orexin-B 能够在 2 h 内 5 倍的刺激摄食,同样的 orexin-A 能够 6 倍的刺

激摄食。在禁食 48 h 后,这两种肽类的基因前体,即食欲素前体能够被上调 2.4 倍,大于 NPY mRNA 的上调水平。Orexin 包含有两种受体,OX1 和 OX2,二者仅在脑内表达。但迄今为止这两种受体的分布仍未曾有研究报道。研究表明 orexin 作为介质在调控摄食行为中的中央反馈机制^[3]。我们对两个单独的个体分别给予 orexinA 和 orexinB,并对其促食效应进行了对比,即早基因 C-fos 作为一种神经元激活的标记物^[4],我们也评估了 orexinA 在其感应现象中的效应。最后,我们通过对室旁核

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470815,81270460,81300281,81500414);

山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2014YY009);青岛市科技局基金项目(13-1-4-170-jch;14-2-3-3-nsh)

作者简介:张莉(1987-),女,硕士研究生,电话:0532-82991713,E-mail: 450848749@qq.com

Δ 通讯作者:徐璐,研究方向:能量代谢基础与临床,E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2016-05-06 接受日期:2016-05-27)

直接注射 orexins, 研究了 orexins 是否是通过室旁核发挥其效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

成年雄性 Wistar 大鼠, 体重约为 250-300 g, 饲养温度为 21-23 °C, 每天 12-12 h 昼夜循环光照, 自由摄取食物和水分。Orexin-A, Orexin-B, NPY, MCH, 甘丙肽购买于美国 sigma 公司。

1.2 脑室内置管

将永久 22 规格的不锈钢套管置入大鼠第三脑室内, 按照先前的方法注射 orexinA, orexinB, NPY, MCH 和甘丙肽^[4]。正确置入套管时, 机体产生血管紧张素 II, 引起阳性致渴反应。将永久 23 规格的不锈钢套管置入大鼠侧脑室内, 然后按照之前的方法注射 c-fos^[5]。将永久 26 规格的不锈钢套管置入 PVN(前囟后 1.8 mm, 中线旁开 0.5 mm, 颅骨下 7 mm)中。在 PVN 注射时给予 25 nmol 去甲肾上腺素以确定套管正确位置^[6]。所有动物被随机分组, 测量各组平均食物摄入量和平均体重。

1.3 侧脑室注射 orexins, MCH, NPY 和甘丙肽

1.3.1 侧脑室注射 orexin-B, MCH 和 NPY 大鼠侧脑室分别注射 10 或 30 nmol Orexin-B, 3 nmol MCH 和 3 nmol NPY^[4,7], 以及生理盐水(NS)。共 4 组, 每组 9 只。分别于注射后 2 h 和 4 h 测量每组大鼠的食物摄入量。

1.3.2 侧脑室注射 orexin-A 和 orexin-B 以及 NPY 和甘丙肽大鼠侧脑室内分别注射 3 nmol orexin-A, orexin-B, NPY, 甘丙肽和 NS, 共 5 组, 每组 9 只。分别于注射后 1 h, 2 h 和 4 h 测量每组大鼠的食物摄入量。

1.4 Orexin-A 对 c-fos 表达的影响

侧脑室内分别注射 3nmol orexin-A 和 NS, 共 2 组, 每组 4 只。

1.5 PVN 内注射 orexin-A 和 NPY

PVN 内分别注射 0.3 nmol NPY 和 NS, 共 2 组, 每组 12 只。注射后 2 h 测量每组大鼠的摄食量。7 日之后, 给予 0.03 nmol 和 0.3 nmol orexin-A 以及 NS 对照, 每组 15 只大鼠。分别于注射后 2 h 和 4 h 测量大鼠的摄食量。

给予 PVN 内注射 3 日后, 每只大鼠都给予 0.5 μ L 蓝色染料, 并且断头取脑。4 %多聚甲醛灌注固定, 脑片为 15 μ m 横截面, 甲酚紫染色, 光学显微镜下观察。

1.6 免疫组织化学法

c-fos 的测定方法参照以往文献^[5,8]。麻醉大鼠, 断头取脑, 4 %多聚甲醛固定 4 h, 15 %蔗糖溶液浸泡过夜, 冰冻切片机切为 40 μ m 冠状横截面的脑片, c-fos 染色。在 4 °C 下, 脑片加一抗(1:15000)在 TBS(12 g/L 三羟甲基氨基甲烷, 0.3 % Triton-X 和 5 %酪蛋白)中孵育 48 h。酪蛋白可以降低非特异性物质表达^[9]。一抗(羊抗兔)购买于美国 Sigma 公司。之后加二抗(1:200), 在 1 mg/mL 二氨基联苯胺盐酸盐中孵育 3-10 min。中性树脂封片, 过夜晾干。

1.7 c-fos 阳性神经元的定量

采用光学显微镜检测脑片中 c-fos 阳性神经元。Orexin-A 和生理盐水在腹内侧核(VMH)、PVN 和弓状核中的效应不同。

采用图像分析系统计算这些区域的 c-fos 阳性神经元数量。计算每个脑片所含 c-fos 阳性神经元的平均数量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。所有数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 两组间样本均数比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 侧脑室注射 orexin-B, NPY 和 MCH 对大鼠摄食量的影响

如图 1a 所示, 与注射 NS 组(2.4 ± 0.7 g)相比, 侧脑室注射 NPY 组大鼠 2 h 和 4 h 摄食量 (3 nmol, 8.3 ± 1.2 g) 明显增多 ($P < 0.05$), 侧脑室注射 MCH 组大鼠 2 h 摄食量 (3 nmol, 3.8 ± 1.1 g) 也显著增多 ($P < 0.05$)。orexin-B 虽然也使得大鼠 2 h 摄食量 (30 nmol, 3.6 ± 0.8 g) 增加, 但此效应并没有统计学意义 ($P > 0.05$)。相较于 orexin-B 和 MCH, NPY 对摄食的影响更显著 ($P < 0.05$)。与两种剂量的 orexin-B 相比 (10 nmol, 2.8 ± 0.9 g), 虽然 MCH 刺激摄食更明显, 但并没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 侧脑室注射 orexin-A 和 orexin-B 以及 NPY 和甘丙肽对大鼠摄食量的影响

如图 1b 所示, 与对照组相比, NPY 和 Orexin-A 在 1 h, 2 h, 4 h 时都使得大鼠摄食量显著增加 (2 h: NPY 3 nmol, 8.2 ± 0.9 g 比 NS, 1.8 ± 0.4 g, $P < 0.05$; 1 h: orexin-A, 2.5 ± 0.6 g 比 NS, 1.1 ± 0.3 g, 2 h: orexin-A, 3.5 ± 0.9 g 比 NS, $P < 0.05$)。甘丙肽在最初的 4 h 内能够使摄食量增加 (甘丙肽 3 nmol, 2.3 ± 0.6 g 比 NS, 1.1 ± 0.3 g, $P < 0.05$), 此后效应减弱。Orexin-B 在 2 h 时使得大鼠摄食量增加 (Orexin-B, 2.9 ± 0.5 g 比 NS, 1.8 ± 0.4 g, $P < 0.05$), 在 1 h 和 4 h 时的差异没有统计学意义。Orexin-A、orexin-B 和甘丙肽在任何时间点的效应差异都没有显著意义, 但都没有 NPY 的促食效应强 ($P < 0.05$)。Orexin-A 似乎比 orexin-B 的促食效应强, 但没有统计学意义。

2.3 orexin-A 对 c-fos 表达的影响

侧脑室注射 orexin-A 能够极大地增强 c-fos 在 PVN 和弓状核的表达, 在 VMH 中效应较弱。与对照组比较, c-fos 阳性神经元在 PVN 中增多 342 % (orexin-A: 526 ± 45 vs NS: 154 ± 42 , $P < 0.05$, 图 2); c-fos 阳性神经元在弓状核中增多 285 % (orexin-A: 232 ± 31 vs NS: 81 ± 12 , $P < 0.05$, 图 2); c-fos 阳性神经元在 VMH 中增多 146 % (orexin-A: 135 ± 25 vs NS: 92 ± 14 , $P < 0.05$, 图 2)。

2.4 PVN 内注射 orexin-A 和 NPY 对大鼠摄食量的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, PVN 注射 NPY 能够显著增加大鼠 2 h 摄食量 (NPY 0.3 nmol, 6.8 ± 0.9 g vs NS, 2.3 ± 0.5 g, $P < 0.05$); PVN 注射 orexin-A 能够显著增加大鼠 2 h 和 4 h 摄食量 (2 h: orexin-A 0.03 nmol, 2.5 ± 0.6 g vs NS 0.9 ± 0.4 g, $P < 0.05$)。增加 orexin-A 剂量并不能使摄食量增加 (2 h: orexin-A 0.3 nmol, 2.1 ± 0.5 g, $P > 0.05$)。

3 讨论

Orexin-A 和 orexin-B 被认为是调节食欲的生理性介质^[2]。本研究比较了这两种肽类和已知的具有促食效应的物质对摄

食的影响。NPY 具有最强效的促食效应,能够强有力的促进摄食并使体重增加^[10]。MCH 也被发现能够刺激摄食^[11]。与野生型大鼠相比,MCH 敲除的大鼠体重下降,这说明 MCH 在对鼠类

的体重调节中具有重要的生理学作用^[12]。甘丙肽对摄食量的影响较 NPY 减弱,但是在摄食调节中仍然具有一定的作用^[13]。

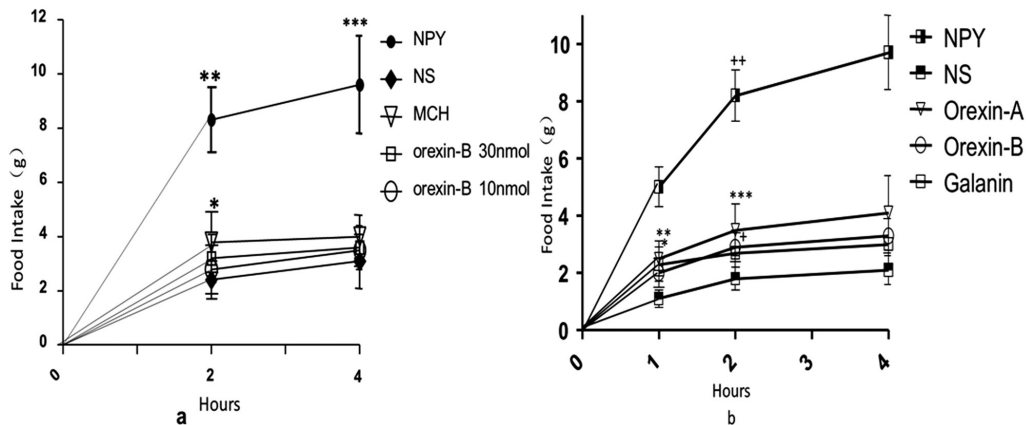


图 1 侧脑室注射 orexin-B、NPY 和 MCH 对摄食量的影响

Fig.1 Effect of orexin-B, NPY and MCH administered ICV to rats on the food intake

Note: * $P < 0.05$, compared with NS group; ** $P < 0.05$, compared with NS group; *** $P < 0.05$, compared with NS group; + $P < 0.05$, compared with NS group; ++ $P < 0.05$, compared with NS group.

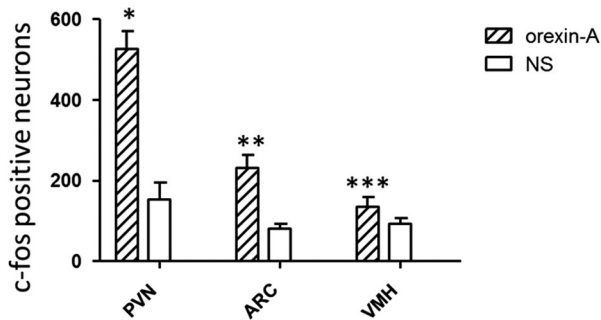


图 2 侧脑室注射 orexin-A 和 NS 之后 PVN、ARC 和 VMH 中 c-fos 阳性神经元数量

Fig.2 The number of c-fos positive neurons in the PVN,ARC and VMH after ICV orexin-A or NS

Note: * $P < 0.05$, compared with NS group; ** $P < 0.05$, compared with NS group; *** $P < 0.05$, compared with NS group.

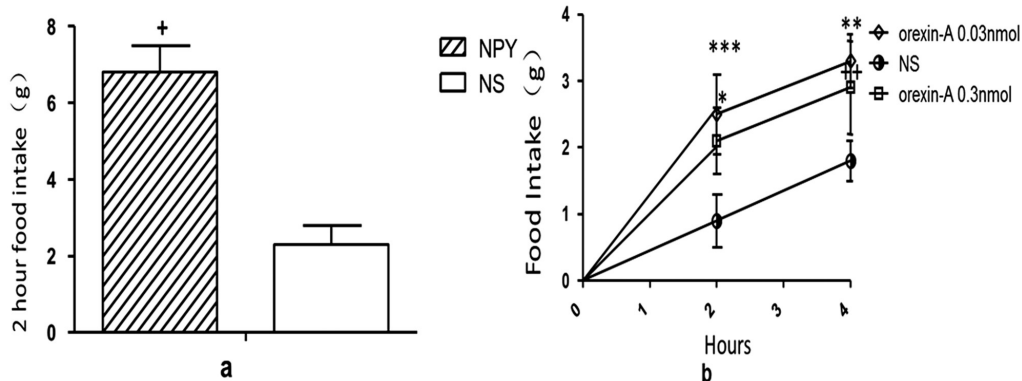


图 3 PVN 内注射 orexin-A 和 NPY 对大鼠摄食的影响

Fig.3 Effect of orexin-A and PVN injected IPVN to rats on food intake

Note: * $P < 0.05$, compared with NS group; ** $P < 0.05$, compared with NS group; *** $P < 0.05$, compared with NS group; + $P < 0.05$, compared with NS group; ++ $P < 0.05$, compared with NS group.

PVN 是调节摄食的重要区域^[15],也是许多促食肽的作用部位,如 NPY^[16]和甘丙肽^[13]。内生的 NPY 主要在弓状核和 PVN

表达^[17,18]。VMH 也是参与摄食调节的重要区域^[19],尤其是其损伤之后能够引起肥胖^[20]。本实验中,侧脑室注射 orexins 引起的

促食效应较弱,仅具有统计学上的显著意义。注射 orexin-A 能够激活 PVN 中的许多神经元,大量促食肽都在 PVN 中表达。我们把 orexin-A 直接注射至 PVN,进一步确定此区域是否是 orexin-A 发挥促食效应的敏感区域。NPY 能够显著的增加摄食量。侧脑室注射 orexin-A 似乎能够增强 Orexin-A 自身的促食效应。Orexin-A 在剂量为 0.03 nmol 时能够最大的发挥其促食效应。本研究也采用 c-fos 的表达来确定其中央活性^[21],orexin-A 也许不能直接作用于 PVN 或弓状核,而是投射至这些区域以发挥其活性作用。本研究结果显示侧脑室注射 orexin-A 后,c-fos 在 PVN 和弓状核中呈现大量高表达,在 VMH 中表达量较少,结果提示 orexin-A 促进大鼠摄食效应可能主要通过下丘脑摄食相关中枢,如 PVN 和 ARC 而发挥效应的。

总之,orexin-A 和 orexin-B 比 NPY 的促食效应弱,可能也比 MCH 的促食效应弱。而且,orexin-B 并不能立即刺激大鼠摄食。注射 orexin-A 能够激活 PVN 和弓状核中的大量神经元活性。PVN 直接注射 orexin-A 能够刺激摄食,虽然此效应较弱。Orexins 在 PVN 中也许不仅仅发挥其促食效应,也可能具有其它的一些功能。C-fos 在弓状核的表达表明 orexins 和 NPY 之间可能具有相互作用。

在 orexins 发挥食欲调节的作用部位被确定之前,检测长期注射之后的影响以及它们与已知促食肽之间的相互作用有待进一步研究。本研究发现在大鼠中,orexins 并不是强效的促食肽类。Orexin 前体在禁食时强有力地上调,c-fos 在 PVN 和弓状核中的表达大大增强,尤其是在注射 orexin-A 时,加之对摄食的效应,这些现象表明刺激摄食并不是 orexins 最主要的生理学作用。

参考文献(References)

- [1] De-Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1998, 95: 322-327
- [2] Boss C, Roch C. Recent trends in orexin research--2010 to 2015[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(15): 2875-2887
- [3] McClain JA, Nixon K. Alcohol Induces Parallel Changes in Hippocampal Histone H3 Phosphorylation and c-Fos Protein Expression in Male Rats[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2016, 40 (1): 102-112
- [4] Chu SC, Chen PN, Ho YJ, et al. Both neuropeptide Y knockdown and Y1 receptor inhibition modulate CART-mediated appetite control[J]. Horm Behav, 2015, 67: 38-47
- [5] Fan S, Dakshinamoorthy J, Kim ER, et al. An Indirect Action Contributes to C-Fos Induction in Paraventricular Hypothalamic Nucleus by Neuropeptide Y[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19980
- [6] McMahon LR, Wellman PJ. PVN infusion of GLP-1- (7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats[J]. American Journal of Physiology, 1998, 274: R23-R29
- [7] Rossi M, Choi SJ, O'Shea D, et al. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight[J]. Endocrinology, 1997, 138: 351-355
- [8] Mendez M, Arias N, Uceda S, et al. c-Fos expression correlates with performance on novel object and novel place recognition tests [J]. Brain Res Bull, 2015, 117: 16-23
- [9] Tacha DE, McKinney LA. Casein reduces nonspecific background staining in immunolabeling techniques[J]. Journal of Histotechnology, 1992, 15: 127-132
- [10] Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, et al. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neuro chemical inducer of hyperphagia and obesity[J]. Peptides, 1986, 7: 1189-1192
- [11] Tuziak SM, Volkoff H. Melanin-concentrating hormone (MCH) and gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in Atlantic cod, *Gadus morhua*: tissue distributions, early ontogeny and effects of fasting[J]. Peptides, 2013, 50: 109-118
- [12] Chee MJ, Pissios P, Prasad D, et al. Expression of melanin-concentrating hormone receptor 2 protects against diet-induced obesity in male mice[J]. Endocrinology, 2014, 155(1): 81-88
- [13] Yu M, Fang P, Shi M, et al. Galanin receptors possibly modulate the obesity-induced change in pain threshold [J]. Peptides, 2013, 44: 55-59
- [14] Kyrkouli SE, Stanley BG, Leibowitz SF. Galanin: stimulation of feeding by medial hypothalamic injection of this novel peptide[J]. European Journal of Pharmacology, 1986, 122: 159-160
- [15] Lagerlöf O, Slocumb JE, Hong I, et al. The nutrient sensor OGT in PVN neurons regulates feeding [J]. Science, 2016, 351 (6279): 1293-1296
- [16] Kageyama H, Takenoya F, Hirako S, et al. Neuronal circuits involving neuropeptide Y in hypothalamic arcuate nucleus-mediated feeding regulation[J]. Neuropeptides, 2012, 46(6): 285-289
- [17] McDonald AJ, Zaric V. Extrinsic origins of the somatostatin and neuropeptide Y innervation of the rat basolateral amygdala [J]. Neuroscience, 2015, 294: 82-100
- [18] Lin X, Qi Q, Zheng Y, et al. Neuropeptide Y genotype, central obesity, and abdominal fat distribution: the POUNDS LOST trial [J]. Am J Clin Nutr, 2015, 102(2): 514-519
- [19] Gaur A, Pal GK, Ananthanarayanan PH, et al. Role of Ventromedial hypothalamus in high fat diet induced obesity in male rats: association with lipid profile, thyroid profile and insulin resistance [J]. Ann Neurol, 2014, 21(3): 104-107
- [20] Turner RT, Dube M, Branscum AJ, et al. Hypothalamic leptin gene therapy reduces body weight without accelerating age-related bone loss[J]. J Endocrinol, 2015, 227(3): 129-141
- [21] Dela Cruz JA, Coke T, Karagiorgis T, et al. c-Fos induction in mesotelencephalic dopamine pathway projection targets and dorsal striatum following oral intake of sugars and fats in rats [J]. Brain Res Bull, 2015, 111: 9-19