

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.006

Ghrelin 对糖尿病大鼠下丘脑弓状核胃扩张敏感神经元和胃运动的影响*

杨 哲^{1,2} 吴小优³ 杨丹丹¹ 郭菲菲¹ 徐 璐^{1Δ}

(1 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东 青岛 266021;

2 青州市人社局居民医保管理中心 山东 潍坊 261000; 3 潍坊益都中心医院 山东 潍坊 261000)

摘要 目的:探讨 Ghrelin 对糖尿病大鼠下丘脑弓状核胃扩张敏感神经元和胃运动的影响。**方法:**逆行追踪结合免疫组化观察 ARC 中 GHSR-1 的表达,细胞外放电记录,观察 ghrelin 对 GD 神经元放电活动的影响及电刺激 ARC 对 GD 神经元放电活动和胃运动的影响。**结果:**电生理实验结果表明,在 ARC Ghrelin 能够能激发 GD 兴奋性神经元(GD-E)和 GD 抑制性神经元(GD-I)。然而,ghrelin 可以兴奋更少的 GD-E 神经元,在正常大鼠中 ghrelin 对于 GD-E 的兴奋作用比在 DM 大鼠中的作用弱。在体胃运动研究表明,在 ARC 中微量注射 ghrelin 可以明显的增强胃运动,并且呈现剂量依赖关系。Ghrelin 在糖尿病大鼠促胃动力作用低于正常大鼠。Ghrelin 诱导的效应可被生长激素促分泌素受体(GHSR)拮抗剂阻断[d-lys-3] - GHRP-6 或 bim28163。放射免疫法和实时荧光定量 PCR 数据表明胃血浆 ghrelin 水平,在 ARC ghrelin mRNA 的表达水平先上升后下降,糖尿病大鼠(DM)中,在 ARC 中 GHSR-1a mRNA 表达保持在一个比较低的水平。**结论:**ghrelin 可以调节 GD 敏感神经元以及胃运动,通过 ARC 中 ghrelin 受体。在糖尿病大鼠中,Ghrelin 促进胃运动作用减弱可能与 ARC 中 ghrelin 受体表达减少有关。

关键词:Ghrelin;弓状核;胃牵张敏感神经元;胃运动**中图分类号:**R-33;R587.1;R338 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)04-627-07

Effect of Ghrelin on Hypothalamic Arcuate Nucleus Gastric Stretch Sensitive Neurons and Gastric Motility in Diabetic Rats*

YANG Zhe^{1,2}, WU Xiao-you³, YANG Dan-dan¹, GUO Fei-fei¹, XU Luo^{1Δ}

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

2 Qingzhou Municipal Bureau of human resources and social health insurance management center, Weifang, Shandong, 261000, China;

3 Weifang Yidu Central Hospital, Weifang, Shandong, 261000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Ghrelin on gastric diabetic rat hypothalamic arcuate nucleus expansion sensitive neurons and gastric motility. **Methods:** Retrograde tracing combined with immunohistochemistry to observe the expression of ARC in GHSR-1, extracellular discharge records, the effect of ghrelin effect on the firing activities of GD neurons and GD neurons to electrical stimulation of the ARC activity and gastric motility. **Results:** electrophysiological experiments showed that ARC Ghrelin could stimulate GD excitatory neurons (GD-E) and GD inhibitory neurons (GD-I). However, ghrelin could be less excited by GD-E neurons, and the effect of ghrelin on GD-E in normal rats was weaker than that in DM rats. In vivo gastric motility studies showed that microinjection of ghrelin into ARC significantly enhanced gastric motility and showed dose-dependent. The effect of Ghrelin on gastric motility in diabetic rats was lower than that in normal rats. Ghrelin induced effects may be blocked by the growth hormone receptor (GHSR) antagonist (d-lys-3) - GHRP-6 or bim28163. Radioimmunoassay and quantitative real-time PCR data showed that gastric plasma ghrelin levels increased in the expression level of ARC ghrelin decreased after mRNA, diabetic rats (DM), in ARC GHSR-1a mRNA expression remained at a relatively low level. **Conclusion:** Ghrelin can regulate GD sensitive neurons and gastric motility via ghrelin receptor in ARC. In diabetic rats, Ghrelin may be associated with decreased expression of ghrelin receptor in the gastric mucosa by ARC.

Key words: Ghrelin; Arcuate nucleus; Gastric distension responsive neurons; Gastric motility**Chinese Library Classification (CLC):**R-33;R587.1; R338 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2018)04-627-07

前言

糖尿病(DM)是一组以高血糖为特征的代谢性疾病。如果不及治疗,长期高血糖会导致并发症。胃轻瘫是糖尿病常见

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470815;81270460;81500414);山东省优秀中青年科学基金项目(BS2014YY009);

青岛市科技局项目(14-2-3-3-nsh)

作者简介:杨哲(1988-),硕士研究生,主要研究方向:能量代谢障碍基础与临床,电话:0532-82991713,15314250683,

E-mail: 985711815@qq.com

Δ 通讯作者:徐璐, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2017-04-30 接受日期:2017-05-26)

的并发症,发生率在最近几年一直在上升。以往的研究表明,大约 50%的糖尿病患者有胃轻瘫症状^[1]。糖尿病胃轻瘫(DGP)的发病机制比较复杂,至今仍没有得到明确解释。研究表明,它可能与各种因素相关,包括相关的高血糖、自主神经病变、遗传因素、抑制性一氧化氮神经和 Cajal 间质细胞损害^[1-5]。但这些研究主要集中在外周机制上,较少关注中央调控机制。

最初观察内源性生长激素分泌素受体的天然配体是 Ghrelin。1999 年 12 月, Kojima 等人^[6]首次报道了在大鼠和人胃中分离纯化这种神经肽。由于 ghrelin 关键的作用在刺激 GH 分泌,调节能量代谢,调节胃肠功能^[7],在消化功能和能量代谢方面, ghrelin 成为热点话题之一。下丘脑是调节能量平衡的一个综合中心^[8,9]。免疫组化的结果显示,大量的 ghrelin 以及 ghrelin 受体在 ARC 中表达^[10-12],参与调节食物摄入和能量平衡^[8,13,14]。然而到目前为止,在糖尿病状态下 ghrelin 在消化功能中所起的作用尚未进行研究。在本研究中我们观察到,在正常大鼠和糖尿病大鼠中 ghrelin 对于 GD 敏感神经元的放电活性以及胃运动的影响。Ghrelin 受体在 ARC 中的表达也可以被观察到。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠(320-350 g)360 只,购于青岛市实验动物和动物实验中心(中国,山东)。动物房室内温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 60-65%、昼夜循环光照。分笼饲养,自由进食饮水。所有动物遵循《青岛大学实验动物保护和和使用管理方法》。存活 107 只糖尿病大鼠,其中 53 只观察细胞外电位活性,48 只观察胃运动活力,6 只用于免疫组化染色。

1.2 糖尿病大鼠模型

将大鼠随机分为对照组和 DM 组。DM 组大鼠喂高脂饲料 20 周,自由饮水。经过 8 周的饮食干预,大鼠接受小剂量 STZ 腹腔注射(30 mg/kg, Sigma 公司),对照组腹腔注射柠檬酸盐缓冲液(pH 4.4, 1 mL/kg)。STZ 注射后四周,大鼠禁食 12 小时。大鼠空腹血糖浓度 $\geq 7.8 \text{ mmol/L}$,餐后血糖浓度 $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$ 即为造模成功^[15,16]。

1.3 电生理实验

麻醉大鼠(100 mg/kg, Sigma 公司,美国)腹腔注射 10%的水合氯醛 0.6 mL/kg。气管插管维持开放气道。大鼠核心温度维持在 37°C 。无菌条件下按下列顺序进行外科手术。

胃扩张是由外科手术放置在胃内的气囊引起的。在中线剖腹探查术后,胃内容物通过一个小切口在眼底壁被移除^[17,18]。乳胶气球(3-4 cm)连接于聚乙烯管,通过切口插入胃腔,结扎固定于切口边缘。气球比胃膨胀的容积更大,我们依此来检测胃膨胀是否对 GD 神经元敏感。3-5 mL 热水(37°C)以每秒 0.5 mL 的速度扩张气球,并持续 20 s,之后关闭腹腔。

腹部手术后,大鼠被放置在立体定位仪上(narashige sn-3)。在颅骨上钻一个小洞暴露大脑皮层,并切断硬脑膜。大脑暴露的部分被覆着温琼脂(3%生理盐水)改善神经元记录稳定性。五通道玻璃微电极提前放置到弓状核(前囟后 2.12-4.30 mm,中线右侧 0.2-0.5 mm,颅骨表面下 9.80-10.30 mm)^[33]。玻璃微电极注入 0.5 mol/L 醋酸钠和 2%蒽胺天蓝,其他四通道与一

个四通道压力注射器相连(PM2000B; 美国),分别灌满 15 nmol/L 的 ghrelin 或 28 nmol 去酰基化 ghrelin, 28 nmol/L 的 [d-lys-3]-GHRP-6, 45 nmol/L BIM28163 和生理盐水。

所有的信号均采用 sump-pc 生物信号处理系统进行分析,直方图分析仪记录神经元放电频率密度直方图序列。当神经元放电趋于稳定,记录神经元放电活动,以确定机械刺激胃是否刺激 GD 神经元。如果一个神经元的放电频率改变至少 20%,就被确定为 GD 敏感神经元。依据其自发放电频率增加或减少, GD 敏感神经元进一步分为 GD 兴奋(GD-E)神经元和 GD 抑制(GD-I)神经元。

1.4 记录胃运动

多聚甲醛麻醉大鼠(100 mg/kg IP, Sigma, 美国),放置于脑立体定位仪上。弓状核植入不锈钢导向套管(位置如上所描述),以及贴骨螺钉和牙科水泥。实验后大脑进行冰冻切片 50 μm ,注射部位脱离弓状核的数据不被记录。暴露腹腔将压力传感器固定在胃浆膜层(幽门下 0.5 cm),测量环形肌收缩。压力传感器的导线放置于皮下,经背部在颈部穿出,在肩胛骨突出一个 2-3 cm 小切口。然后缝合腹部,单笼饲养大鼠三天。

64 例正常成年雄性 Wistar 大鼠和 48 例糖尿病成年雄性 Wistar 大鼠禁食 1 h,在记录区进行驯化。胃运动被记录在一个多导生理记录仪上(3066-23;成都精密仪器,四川,中国)。记录基线运动 30 min 后,分别经颅插管缓慢注入 0.5 μL 的生长素(0.025 pmol, 0.25 pmol 或 2.5 pmol, 每组 $n=8$), 0.5 μL [d-lys-3]-GHRP-6(2.5 pmol, $n=8$), 0.5 μL 1.25 pmol BIM28163 ($n=8$, 正常大鼠组)或 0.5 μL 2.5 pmol [d-lys-3]-GHRP-6 的混合溶液(每组 $n=8$)或 1.25 pmol BIM28163 + 0.25 pmol ghrelin ($n=8$, 正常大鼠组)。注射时间为 2 min 并且保留 3 min,为了确保药物全部扩散到弓状核。对照组($n=8$)注射等量的 0.9%生理盐水。测量胃运动的幅度和频率。使用胃运动指数百分比(MI = 注射生长素后的压力曲线面积)/(注射生长素前的压力曲线面积) $\times 100\%$ 来评估正常大鼠和糖尿病大鼠注射生长素前后胃运动的改变。对于每只动物,每天记录为 1-2 h,并持续几天,最少 2 天。

1.5 免疫荧光组织化学染色

多聚甲醛(100 mg/kg ip)深度麻醉大鼠(每组 6 个,糖尿病组和对照组),100 mL 生理盐水和 400 mL 4%多聚甲醛溶液灌注固定 2 h,然后断头取脑放入 4%多聚甲醛溶液中 2 h,之后转移到 4°C 30%的蔗糖溶液中 72 h。蔗糖脱水后,使用冰冻切片机制作 20 μm 的脑片,在光学显微镜下观察^[19]。在 0.1 M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤脑片,使用孵育在 4°C 的 0.5%的 Triton X-100 和 4%山羊血清染色 2 h,然后用原代兔 anti-ghsr-1a 抗体孵育(多克隆抗体,稀释 1:400;Phoenix Pharmaceutical, CA, 美国), 4°C 保存过夜后, 0.1 M 的磷酸盐缓冲溶液洗涤脑片,使用孵育在 4°C 的荧光染料标记的第二抗体染色(FITC 标记的羊抗兔 IgG, 稀释 1:50; Jackson, immunoresearch),之后在光学显微镜下观察脑片。细胞计数法是利用激光共聚焦显微镜和图像分析系统(吉达科技公司,南京,中国)。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 18.0 和 PPMS 1.5 软件分析数据,所有数据均以

($\bar{x} \pm s$)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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ghrelin 对正常大鼠弓状核 GD 敏感神经元放电活动的影响

93 只正常大鼠记录到 196 个神经元有自发放电。在 196 个神经元中,有 123 个神经元对胃扩张有反应(62.8%)其中 68 个被确定为兴奋性神经元,55 个被确定为抑制性神经元。注射生长素后,在 68 个兴奋性神经元中,有 47 个神经元的放电频率从 1.83 ± 0.38 Hz 增加到 3.26 ± 0.75 Hz ($P < 0.05$),平均增加 $40.2 \pm 5.2\%$;55 个抑制性神经元,有 33 个神经元收到抑制,放电频率从 1.57 ± 0.39 Hz 下降到 0.97 ± 0.34 Hz ($P < 0.05$),平均下降 $57.7 \pm 5.7\%$ (图 1A 和 B)。

为了明确所涉及的受体,我们进一步探讨了 Ghrelin 受体拮抗剂 [d-lys-3] GHRP-6 和 GHSR-1a 特异性拮抗剂 BIM28163 对生长素效应^[20]的影响。研究表明,注射生长素受体拮抗剂 d-lys-3 GHRP-6 和 GHSR-1a 特异性拮抗剂 BIM28163 能消除生长素的作用。然而,d-lys-3 GHRP-6 和 BIM28163 对 GD 反应神经元的活性没有影响(图 1A-D)。另一方面,我们观察到去酰基化 ghrelin 对 21 只正常大鼠 GD 神经元电活动的影响。然而,15 nmol/L 去酰基化 ghrelin 对 GD 敏感神经元没有明显的影响($P > 0.05$,GD 兴奋性神经元, 1.92 ± 0.56 Hz 到 2.04 ± 0.65 Hz, $n = 25$;GD 抑制性神经元,从 1.45 ± 0.39 Hz 到 1.31 ± 0.42 Hz, $n = 26$)。

2.2 Ghrelin 对糖尿病大鼠弓状核 GD 敏感神经元放电活动的影响

糖尿病大鼠弓状核中也发现有 GD 反应神经元。53 只糖尿病大鼠记录到 98 个自发性放电神经元。当胃扩张时,有 66 个神经元放电活动有变化。在 66 个 GD 神经元中,有 37 个神经元的放电频率增加(GD 兴奋性神经元),29 个神经元的放电频率减少(GD 抑制性神经元)。正常大鼠和糖尿病大鼠 GD 兴奋性神经元和 GD 抑制性神经元的比率没有变化($P > 0.05$)。

注射生长素后,弓状核的 13 个 GD 兴奋性神经元(13/37,35.1%)放电频率从 1.98 ± 0.35 Hz 上升到 2.45 ± 0.61 Hz ($P < 0.01$),平均增幅为 $21.7 \pm 4.3\%$,与生理盐水对照组($6.05 \pm 2.02\%$)相比,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1C)。与正常大鼠相比,注射生长素后 GD 兴奋性神经元放电活动的增加比例明显下降(35.1% vs 71.2% , $P < 0.05$),放电频率的平均增长也显著下降($21.7 \pm 4.3\%$ vs $37.2 \pm 5.8\%$, $P < 0.05$)。注射生长素受体拮抗剂 d-lys-3 GHRP-6 能消除生长素对糖尿病大鼠 GD 兴奋性神经元的作用(图 1E)。弓状核的 18 个 GD 抑制性神经元(18/29,62.1%)放电频率从 1.26 ± 0.42 Hz 下降到 0.62 ± 0.21 Hz ($P < 0.01$),平均下降 $53.7 \pm 8.7\%$,差异显著高于生理盐水组($4.69 \pm 1.10\%$, $P < 0.01$)。正常大鼠和糖尿病大鼠的 GD 抑制性神经元的比率(62.1% vs 60.9% , $P > 0.05$)和平均放电频率降低($53.7 \pm 8.7\%$ vs $53.3 \pm 8.9\%$, $P > 0.05$)有明显的差异。注射生长素受体拮抗剂 d-lys-3 GHRP-6 能消除生长素对糖尿病大鼠 GD 抑制性神经元的作用(图 1F)。

2.3 弓状核 Ghrelin 对正常大鼠胃运动的影响

正常大鼠弓状核注射 $0.5 \mu\text{L}$ 生长素($n = 8$),与生理盐水

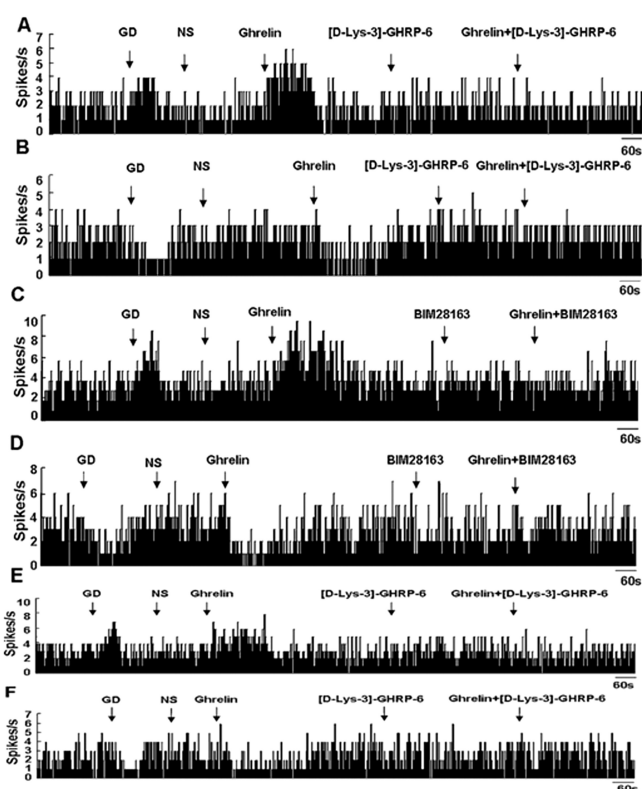


图 1 弓状核注射 Ghrelin 对 GD 敏感神经元放电活动的影响。Ghrelin 可明显增加兴奋神经元的自发放电率(A,C 和 E),但降低抑制神经元的自发放电率(B,D 和 F);[d-lys-3]-GHRP-6 或 bim28163 单独使用效果不显著,[d-lys-3]-GHRP-6 或 bim28163 可以完全阻断 Ghrelin 对正常大鼠(A-D)和 DM 大鼠(E 和 F)的影响

Fig. 1. Effects of ghrelin on firing activity of GD sensitive neurons in Arc. Ghrelin could markedly increase the spontaneous firing rate of GD-E neurons significantly (A, C and E), but reduce the spontaneous firing rate of GD-Ineurons (B, D and F); [d-Lys-3]-GHRP-6 or BIM28163 used alone had no significant effect and either [d-Lys-3]-GHRP-6 or BIM28163 could completely block the effect of ghrelin in normal (A-D) and DM rats (E and F)

组相比($n = 8$),每个剂量都能增加胃收缩的幅度和频率(图 2A-D)。增加延迟了 5 min,并且分别持续了约 5,15 和 20 min。变化程度呈剂量依赖性。注射生长素 5 min 后,2.5 pmol 生长素组胃运动增加的幅度比 0.025 pmol Ghrelin 更大($P < 0.01$)(表 1A)。同时,注射生长素 15 分钟后 2.5 pmol 生长素组胃运动增加的频率比 0.025 pmol 生长素更大($P < 0.01$,表 1B)。然而,0.25 pmol 去酰基化生长素不能显著改变弓状核胃动力($n = 8$, $P > 0.05$, $98.48 \pm 21.32\text{MI}$ 和 $112.31 \pm 33.09\text{MI}$)。注射 2.5 pmol [d-lys-3]-GHRP-6 或 1.25 pmol BIM28163 后,无论是胃收缩振幅和胃收缩频率都没有变化(图 2I 和 J,每组 $n = 8$)。混合注射 2.5 pmol [d-lys-3]-GHRP-6 或 1.25 pmol BIM28163 和 0.25 nmol 生长素(稀释于 0.5L 生理盐水),生长素对胃肠蠕动的的作用被完全消除($P > 0.05$,表 1A 和 B 每组 $n = 8$)。

2.4 弓状核 Ghrelin 对糖尿病大鼠胃运动的影响

体内研究发现糖尿病大鼠胃收缩性明显减弱,收缩频率(1.81 ± 0.23 Hz vs 5.18 ± 1.58 Hz, $P < 0.05$)和振幅(2.21 ± 0.89 g/min vs 8.14 ± 1.58 g/min, $P < 0.05$ 图 2E 和表 1 和 2)。糖尿病

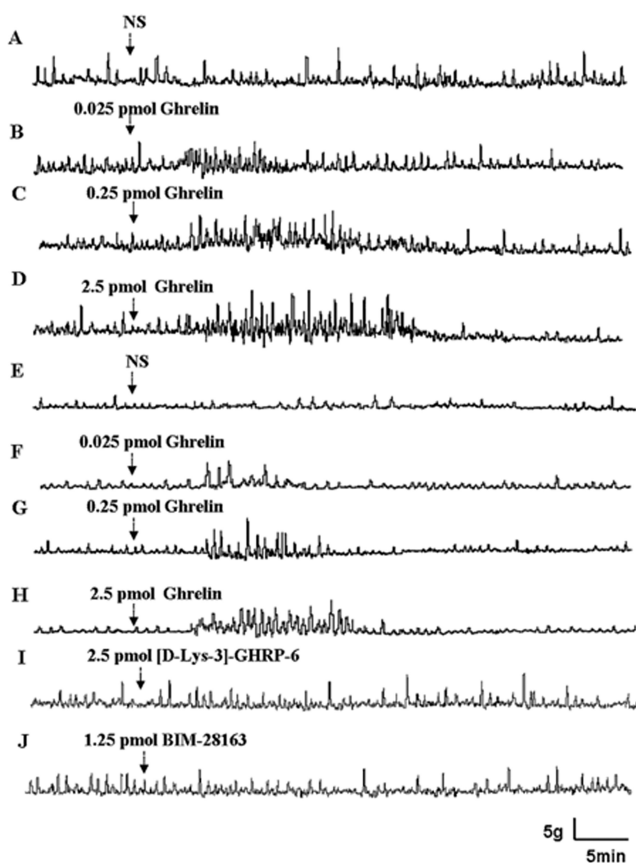


图2 弓状核注射不同浓度的生长素对胃动力的影响。弓状核注射 Ghrelin,在正常大鼠组,大约有 5 min 的延迟。注射 0.5 L 生理盐水对胃运动的影响不显著(A)。然而,注射 0.025 pmol(溶解于 0.5 L 生理盐水)Ghrelin 胃收缩幅度明显增加(B)。增加注射 Ghrelin 的量,胃收缩幅度进一步增加(C和D)。糖尿病大鼠(E-H)也可观察到类似的效果。DM 大鼠胃收缩能力明显减弱。无论是 2.5pmol[d-lys-3] - GHRP-6 还是 1.25 pmol BIM28163(J)都不能改变正常大鼠的胃蠕动机。Fig. 2 Effects of different concentrations of ghrelin microinjected into Arc on gastric motility. In normal rats, there were around 5 min of latency after the microinjection of ghrelin into the Arc. Microinjection of 0.5 L normal saline had no significant effect on the gastric motility (A). However, after administration of 0.025 pmol (in 0.5 L normal saline) ghrelin into Arc, the amplitude of the gastric contractions markedly increased (B). Increasing the dose of injected ghrelin led to further increase in gastric motility (C and D). The similar effects could be observed in DM rats (E-H). However, the gastric contractility became obviously weak in DM rats. Neither 2.5 pmol [d-Lys-3]-GHRP-6 (I) nor 1.25 pmol BIM28163 (J) could significantly alter gastric motility in normal rats.

大鼠弓状核分别注射生长素 0.025 pmol、0.25 pmol 或 0.5 pmol (稀释于 0.5 μ L 生理盐水中), 每个剂量都能增加胃收缩的幅度和频率,变化程度呈剂量依赖性($P<0.01-0.05$,图 2E-H 表 1 和 2)。但是注射 0.25 pmol 或 0.5 pmol 生长素后,糖尿病大鼠胃运动增加的幅度低于正常大鼠($P<0.05$,表 1)。 $[d\text{-lys-3}]$ -GHRP-6 能完全阻断生长素对糖尿病大鼠胃运动的影响($P>0.05$,表 1 和 2)。

2.5 Ghrelin 对弓状核 GHSR-1a 的影响

荧光免疫组织化学研究表明,腹腔注射 STZ 后正常大鼠和糖尿病大鼠弓状核出现 GHSR-1a 免疫阳性细胞。然而,糖尿

病大鼠与正常大鼠相比 GHSR-1a 表达明显降低,弓状核($10\pm 2.1/\text{mm}^2$ vs $3\pm 0.7/\text{mm}^2$, $N=6$, $P<0.05$;图 3A 和 B)。

3 讨论

目前的研究的目的:在糖尿病大鼠中,ghrelin 对于下丘脑 ARC 中胃扩张敏感神经元以及胃运动中的作用。本研究的主要发现如下:(1)在 ARC 中,ghrelin 可以通过 ghrelin 受体调节 GD 敏感神经元的活性。(2)ghrelin 对糖尿病大鼠 GD-E 神经元放电的作用以及促进胃运动的作用减弱。(3)在 ARC 中,0.25 pmol 或 2.5 pmol DES 酰基 ghrelin 不能明显地改变 GD 神经元的放电频率以及胃运动。(4)胃 ghrelin 的血浆水平以及 ARC 中 ghrelin 的表达水平在 STZ 7 天后开始升高,随后在接下来 7 周逐渐下降。相反,在注射 STZ 后的 1-8 周,在 ARC 中 GHSR-1a mRNA 的表达始终保持在一个相对较低的水平。(5)在 ARC 中,GHSR-1a 拮抗剂或 D-Lys3-GHRP-6 bim28163 不能显著改变 GD 敏感神经元放电活动和胃运动。总的来说,我们的研究支持了我们最初的假设,外源性的 ghrelin 可以通过 GHS-R 促进神经元放电和胃运动,在糖尿病大鼠中,ARC ghrelin 受体表达减少可以导致 Ghrelin 对 GD 敏感神经元和胃动力的作用减弱。糖尿病大鼠胃运动的降低(注射 STZ 后第八周)可能是由于 ghrelin 胃血浆水平的降低,或者可能是由于疾病过程的延长导致胃中 ghrelin 细胞耗尽^[21]。

下丘脑是重要的中间处理站,可以处理来自肠道和脑干的信号,调节食物摄入和能量消耗。在调节食欲、胃运动和能量代谢方面,ARC 是一个重要的下丘脑核团。在中枢神经系统中,ARC 高度表达的受体包括胰岛素受体 and ghrelin 受体^[22,23]。中枢注射 ghrelin 已经被证明可以提高食欲和食物摄入量^[24,25]。清醒大鼠,经外周静脉(IV)和中枢(ICV)注射 Ghrelin 可以增加 ARC 中即刻早期基因 c-fos 的表达,这是神经元活动的标志。我们的研究表明,ARC 神经元对 GD 敏感。这表明外周躯体感觉以及胃感受器信号输送至下丘脑 ARC 神经元,并且可以影响 ARC 神经元的放电活动通过下核中继通路。

这些 ARC 神经元会在下丘脑发挥最终的作用,以对这些刺激做出反应。此外,我们电生理实验数据表明,在 ARC 中注射 ghrelin 可以增加神经元的放电频率。它也证实了 ghrelin 可以影响与胃运动相关的 ARC 神经元的活性。另一方面,我们的研究表明,在清醒大鼠中枢注射 ghrelin 可能会增加胃运动幅度,其有效持续时间与 ghrelin 呈现剂量依赖关系,但是,该作用可以被 D-Lys3-GHRP-6 或 bim28163 GHSR-1a 拮抗剂阻断。这表明 Ghrelin 诱导作用可能是通过激活 GHS-R 实现。然而,dllys3 - GHRP-6 或 bim28163 单独使用,既没有影响神经元放电,也没有影响胃运动。这表明是外源性的 ghrelin,而不是内源性的 ghrelin,参与调节 ARC 和胃中的神经元放电。

目前,糖尿病胃轻瘫的治疗方法包括药物治疗、胃电刺激、手术治疗及营养支持。药物治疗胃轻瘫包括甲氧氯普胺、多潘立酮、西沙必利、红霉素。虽然这些药物被用于治疗胃轻瘫,但是据报道,它们的疗效是有限的,许多患者不能耐受其副作用。由于 ghrelin 的发现,大量的分子相似的受体激动剂已被用于在胃肠动力紊乱^[26,27]临床试验。tzp-101 选择性兴奋 Ghrelin 受体部位,主要通过静脉注射。这似乎可以有效地提高糖尿病胃

表 1 弓状核 Ghrelin 对正常大鼠胃运动的影响($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effects of ghrelin on gastric motility in the Arc of normal rats($\bar{x} \pm s$)

Times(min)	NS	0.025 pmol ghrelin	0.25 pmol ghrelin	2.5 pmol ghrelin	0.25 pmol ghrelin + [d-lys-3] - GHRP-6	0.25 pmol ghrelin+ BIM28163
0	7.24± 1.69	7.42± 1.43	7.41± 1.41	7.39± 2.16	7.24± 2.25	7.26± 1.27
5	7.23± 1.43	8.53± 1.62	7.74± 2.34	7.71± 1.34	7.25± 1.67	7.25± 1.84
10	7.22± 1.67	14.81± 2.32*	12.35± 1.06*	8.77± 2.43	7.26± 1.03	7.27± 1.51
15	7.23± 1.31	22.04± 1.26**#	16.82± 1.13*	14.06± 2.74*	7.35± 1.23	7.32± 1.36
20	7.24± 1.73	16.64± 1.27*	15.63± 1.47*	13.24± 1.88*	7.18± 1.46	7.30± 2.22
25	7.21± 2.03	15.53± 2.47*	13.34± 2.03*	8.52± 2.42*	7.22± 1.01	7.21± 1.76
30	7.16± 1.71	8.13± 1.21	8.11± 3.47	8.02± 1.84	7.21± 1.66	7.20± 1.73
35	7.25± 2.31	7.92± 1.06	7.88± 2.05	8.17± 1.26	7.23± 1.31	7.24± 1.28

*P < 0.05, **P < 0.01 与生理盐水组相比, #P < 0.01, 0.025 pmol ghrelin 相比。

*P < 0.05, **P < 0.01 vs saline group, #P < 0.01, 0.025 vspmol ghrelin.

表 2 弓状核 Ghrelin 对糖尿病大鼠胃运动的影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of ghrelin on gastric motility in the Arc of DM rats($\bar{x} \pm s$)

Times(min)	NS	0.025 pmol ghrelin	0.25 pmol ghrelin	2.5 pmol ghrelin	0.25 pmol ghrelin+ [d-lys-3] - GHRP-6
0	2.51± 0.21	2.42± 0.44	2.41± 0.32	2.42± 0.38	2.53± 0.17
5	2.52± 0.43	2.44± 0.34	2.43± 0.27	2.43± 0.31	2.52± 0.57
10	2.53± 0.55	3.32± 0.44	2.64± 0.38	2.53± 0.15	2.51± 0.26
15	2.50± 0.15	5.86± 0.12*#	4.32± 0.14	4.21± 0.22	2.55± 0.27
20	2.51± 0.49	4.54± 0.32	3.78± 0.33	3.75± 0.28	2.54± 0.53
25	2.52± 0.21	3.87± 0.18	3.72± 0.36	3.71± 0.26	2.53± 0.25
30	2.51± 0.42	2.52± 0.26	2.53± 0.24	2.51± 0.35	2.52± 0.15
35	2.52± 0.36	2.53± 0.39	2.54± 0.42	2.52± 0.45	2.54± 0.32

*P < 0.05 与生理盐水组相比, #P < 0.01 与 0.025 pmol ghrelin 组相比

*P < 0.05 vs saline group, #P < 0.01 vs 0.025 pmol ghrelin.

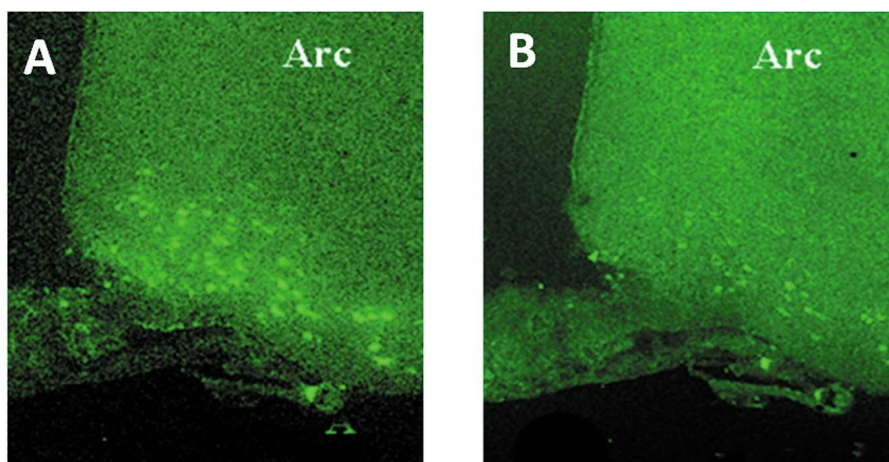


图 3 弓状核 GHSR-1a 免疫阳性细胞的变化

GHSR-1a 免疫阳性细胞在正常大鼠弓状核的表达(A),DM 大鼠弓状核的 GHSR-1a 免疫阳性细胞表达明显减少(B)。

Fig.3 The changes of GHSR-1a immunopositive cells in the Arc

The expression of GHSR-1a immunopositive products in the Arc of normal rats is shown in (A) and the expression of GHSR-1a immunopositive products obviously decreased in Arc of DM rats (B).

轻瘫^[29]胃动力。此外,口服制剂(次)已经制定,目前正在2期临床试验。这些新的 ghrelin 受体激动剂保证,特别是在当前促进胃运动的治疗副作用相对较差的方面。然而,很少有研究探讨在中枢注射 ghrelin 对于预防糖尿病胃轻瘫的作用。在这项研究中,我们发现,在糖尿病大鼠中注射 ghrelin 可以显著增加 ARC 神经元的兴奋性,促进糖尿病大鼠的胃动力。然而,与正常大鼠相比,ghrelin 对于糖尿病大鼠胃动力的增加作用降低。结果表明,在糖尿病大鼠中,ARC ghrelin 受体的功能和/或数量可能降低。我们进一步的免疫荧光组织化学染色和实时定量 PCR 研究表明免疫反应阳性神经元 ghrelin 受体的表达以及 ARC 中 ghrelin 受体 mRNA 的表达在糖尿病大鼠中显著降低。

当然,在糖尿病大鼠中 ARC ghrelin 对胃运动指数的影响降低,可能与其他证据有关,例如,内脏自主神经病变^[28,29],Cajal 间质细胞的丢失(ICCS)^[30],神经纤维组织学异常,肠肌间神经丛静脉曲张^[31,32],神经肌肉传递障碍^[33,34],平滑肌对神经递质的反应性受损^[35],胃肠道内容和神经递质释放的异常^[36,37],等都被报道。在 STZ 诱导的糖尿病大鼠中,糖尿病的神经效应可以涉及胃肠道的神经丛^[38,39]或者在不同的区域之间,糖尿病的这种神经效应常有神经递质的参与^[37,40]。

这些研究结果为 Ghrelin 在糖尿病大鼠中的作用提供了确凿的证据,对胃中 ghrelin 的血浆水平,以及 ARC 中 ghrelin mRNA 的表达水平进行了检测。我们的数据表明,胃中 ghrelin 的血浆水平,以及 ARC 中 ghrelin mRNA 的表达水平显著升高在 STZ-1 周的大鼠,然后尽管在最初两周的水平高于正常大鼠,但是注射 STZ8 周后逐渐降低。这表明,注射 STZ2 周后可以增加 ghrelin 的血浆水平与胃粘膜中 ghrelin-IR 细胞数量增加有关^[41]。疾病过程的延长可能或耗尽 ghrelin 细胞,因此,在注射 STZ 的后期会出现 ghrelin 水平的下降。另一方面,我们的数据表明,在腹腔内注射 STZ 第四周后,血浆 ghrelin 水平显著升高,而胃中 ghrelin 显著减少。研究结果与 Masaoka T 报道的研究结果一致,胃中 ghrelin 水平的增加可能与胃中 ghrelin-IR 细胞增加有关^[21]。

在 DM 大鼠中,Ghrelin 对 GHS-R 表达的影响是最有趣的。一般来说,Ghrelin 水平与 GHS-R 表达呈负相关。正如 Dass 报道的一样,GHS-R 有很强的免疫反应与胃腺有关,在细胞中,用 ghrelin 受体拮抗剂阻断 ghrelin 受体可以刺激 ghrelin 合成细胞自分泌 ghrelin。然而,我们的研究表明,与正常大鼠相比,腹腔注射 STZ 后,糖尿病大鼠的 ARC 中 GHS-R 的表达保持在较低的水平。然而,这种现象仍然是未知的。

总之,目前的研究结果表明,ghrelin 可以参与胃运动的调节从而影响 ARC 神经元的放电,在糖尿病大鼠中,ghrelin 促进胃动力作用作用减弱可能与 ARC 中 ghrelin 受体表达减少有关。关于糖尿病胃动力障碍中 ghrelin 作用,我们的研究结果为此提供了新的实验证据。

参考文献(References)

- [1] Abrahamsson H. Gastrointestinal motility disorders in patients with diabetes mellitus[M]. J Intern Med, 1995, 237(4): 403-409
- [2] Gentilecore D, O'Donovan D, Jones KL, et al. Nutrition therapy for diabetic gastroparesis[J]. Curr Diab Rep, 2003, 3(5): 418-426
- [3] Mazzone A, Bernard CE, Strege PR, et al. Altered expression of Anol variants in human diabetic gastroparesis [J]. J Biol Chem, 2011, 286(15): 13393-13403
- [4] Punkkinen J, Farkkila M, Matzke S, et al. Upper abdominal symptoms in patients with Type 1 diabetes: unrelated to impairment in gastric emptying caused by autonomic neuropathy [J]. Diabet Med, 2008, 25(5): 570-577
- [5] Shakil A, Church RJ, Rao SS. Gastrointestinal complications of diabetes[J]. Am Fam Physician, 2008, 77(12): 1697-1702
- [6] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660
- [7] Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, et al. Structure, regulation and function of ghrelin[J]. J Biochem, 2012, 151(2): 119-28
- [8] Kirchner H, Heppner KM, Tschop MH. The role of ghrelin in the control of energy balance [J]. Handb Exp Pharmacol, 2012, 209(2): 161-184
- [9] Sam AH, Troke RC, Tan TM, et al. The role of the gut/brain axis in modulating food intake[J]. Neuropharmacology, 2012, 63(1): 46-56
- [10] Guan JL, Wang QP, Kageyama H, et al. Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus[J]. Peptides, 2003, 24(12): 1921-1928
- [11] Hori Y, Kageyama H, Guan JL, et al. Synaptic interaction between ghrelin- and ghrelin-containing neurons in the rat hypothalamus[J]. Regul Pept, 2008, 145(1-3): 122-127
- [12] Perello M, Scott MM, Sakata I, et al. Functional implications of limited leptin receptor and ghrelin receptor coexpression in the brain [J]. J Comp Neurol, 2012, 520(2): 281-294
- [13] Borner T, Pinkernell S, Lutz TA, et al. Lipopolysaccharide inhibits ghrelin-excited neurons of the arcuate nucleus and reduces food intake via central nitric oxide signaling[J]. Brain Behav Immun, 2012, 26(6): 867-879
- [14] Gao S, Casals N, Keung W, et al. Differential effects of central ghrelin on fatty acid metabolism in hypothalamic ventral medial and arcuate nuclei[J]. Physiol Behav, 2013, 118(4): 165-170
- [15] Srinivasan KVB, Asrat L, Kaul CL, et al. Combination of high-fat diet fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. Pharmacol Res, 2005, 52(4): 313-320
- [16] Zhang M, Lv XY, Li J, et al. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model [J]. Exp Diabetes Res, 2008, 2008: 704045
- [17] Feng X, Peeters TL, Tang M. Motilin activates neurons in the rat amygdala and increases gastric motility [J]. Peptides, 2007, 28(3): 625-631
- [18] Zhang J, Tang M, Chen JD. Gastric electrical stimulation for obesity: the need for a new device using wider pulses [J]. Obesity (Silver Spring), 2009, 17(3): 474-480
- [19] Paxinos GWC. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. New York: Academic Press, 1986, 27(2): 121-143
- [20] Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, et al. A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain[J]. Neuroendocrinology, 2005, 81(5): 339-349

- [21] Jensen KB, Forcada Y, Church DB, et al. Evaluation and diagnostic potential of serum ghrelin in feline hypersomatotropism and diabetes mellitus[J]. *J Vet Intern Med*, 2015, 29(1): 14-20
- [22] Zhang L1, Pi J, Shi Q, et al. In situ single molecule detection of insulin receptors on erythrocytes from a type 1 diabetes ketoacidosis patient by atomic force microscopy [J]. *Analyst*, 2015, 140 (21): 7407-7416
- [23] Sakurazawa N1, Mano-Otagiri A, Nemoto T, et al. Effects of intracerebroventricular ghrelin on food intake and Fos expression in the arcuate nucleus of the hypothalamus in female rats vary with estrous cycle phase[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 29(541): 204-208
- [24] Siegl D, Midura EF, Annecke T, et al. The effect of ghrelin upon the early immune response in lean and obese mice during sepsis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0122211
- [25] Hsu TM, Hahn JD, Konanur VR, et al. Hippocampus ghrelin signaling mediates appetite through lateral hypothalamic orexin pathways[J]. *Elife*, 2015, 4. pii: e11190
- [26] McCallum RW, Lembo A, Esfandiyari T, et al. Phase 2b, randomized, double-blind 12-week studies of TZP-102, a ghrelin receptor agonist for diabetic gastroparesis[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2013, 25(11): e705-717
- [27] Beck DE, Sweeney WB, McCarter MD. Prospective, randomized, controlled, proof-of-concept study of the Ghrelin mimetic ipamorelin for the management of postoperative ileus in bowel resection patients [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2014, 29(12): 1527-1534
- [28] Peleli M, Carlstrom M. Adenosine signaling in diabetes mellitus and associated cardiovascular and renal complications [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 12
- [29] Devaraj S, Venkatachalam A, Chen X. Metformin and the Gut Microbiome in Diabetes[J]. *Clin Chem*, 2016, 62(12): 1554-1555
- [30] Barbaresi P, Mensà E, Lariccia V, et al. Intracallosal neuronal nitric oxide synthase neurons colocalize with neurokinin 1 substance P receptor in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 2015, 523(4): 589-607
- [31] Nascimento RD, Martins PR, de Souza Lisboa A, et al. An imbalance between substance P and vasoactive intestinal polypeptide might contribute to the immunopathology of megaesophagus after *Trypanosoma cruzi* infection[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(2): 269-276
- [32] Bódi N, Talapka P, Poles MZ, et al. Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus [J]. *Microcirculation*, 2012, 19(4): 316-326
- [33] D Garella R, Baccari MC. Endocannabinoids modulate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in strips from the mouse gastric fundus[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2012, 206(1): 80-87
- [34] Mani V, Ramasamy K, Ahmad A, et al. Effects of the total alkaloidal extract of *Murraya koenigii* leaf on oxidative stress and cholinergic transmission in aged mice[J]. *Phytother Res*, 2013, 27(1): 46-53
- [35] Alrefaie Z, Alhayani A. Vitamin D. improves decline in cognitive function and cholinergic transmission in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 287 (1): 156-162
- [36] Yoon H, Thakur V, Isham D, et al. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats[J]. *Exp Neurol*, 2015, 267(2): 107-114
- [37] Hansen CF, Vrang N, Sangild PT, et al. Novel insight into the distribution of L-cells in the rat intestinal tract [J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5(3): 347-358
- [38] Lopes CR1, Ferreira PE, Zanoni JN, et al. Neuroprotective effect of quercetin on the duodenum enteric nervous system of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(12): 3106-3115
- [39] Ma J1, Checklin HL, Wishart JM, et al. A randomised trial of enteric-coated nutrient pellets to stimulate gastrointestinal peptide release and lower glycaemia in type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(6): 1236-1242
- [40] Andrew Vosko, Hester van Diepen, Dika Kuljis, et al. Role of vasoactive intestinal peptide in the light input to the circadian system [J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 42(2): 1839-1848
- [41] Kristy M. Heppner, Carolin L. et al. Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via central nervous system ghrelin receptors[J]. *Diabetes*, 2014, 63(1): 122-131

(上接第 620 页)

- Lian Yu-yin, Wang Jia-ji. Expression, Purification and Identification of Recombinant Early Pregnancy Factor (EPF) [J]. *Reproduction and Contraception*, 2012, 32(3): 156-160
- [21] Hill H Z, Halcrow M B. Expression of galactose genes in mammalian cells Galactose enzymes in Chinese hamster ovary cell hybrids[J]. *Biochem Genet*, 1972, 7(2): 117-126
- [22] Lueking A, Holz C, Gotthold C, et al. A system for dual protein expression in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2000, 20(3): 372-378
- [23] 万晶宏, 贺福初. 蛋白质组技术的研究进展 [J]. *科学通报*, 1999, (09): 904-911
- Wan Jing-hong, He Fu-chu. Progress in Research of Proteomics technology[J]. *Science Bulletin*, 1999, (09): 904-911
- [24] 谢彦博. 蛋白质抗原的免疫原性和特异性的分子基础(综述)[J]. *国外医学. 生物制品分册*, 1979, (02): 7-11
- Xie Yan-bo. The Protein antigen's immunogenicity and specificity molecular basis (review)[J]. *Foreign Medicine Biologics Volume*, 1979, (02): 7-11
- [25] Yamamoto D, Ando T. Chaperonin GroEL-GroES Functions as both Alternating and Non-Alternating Engines [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428 (15): 3090-3101