

伏隔核微注射 orexin-A 对大鼠摄食和活动的影响 *

张丽娜¹ 冯彩华² 柴 薪¹ 王丛丛¹ 董海龙^{1△}

(1 第四军医大学附属西京医院麻醉科 陕西 西安 710032 2 第四军医大学口腔医院麻醉科 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨伏隔核微注射 orexin-A 后,大鼠摄食和活动的变化。方法 采用 SD 大鼠(250-280g),用脑立体定位仪在伏隔核植入微量注射管。大鼠随机分组,分别微注射乳酸格林液(Ringer's),orexin-A 100pmol 和 500pmol。观察微注射后大鼠 0-1h, 1-2h,2-4h 摄食和 0-30min,30-60min,60-90min,90-120min 活动性变化。结果 Orexin-A 微注射后,大鼠 0-1h, 1-2h 摄食量增加; 30-60min,60-90min,90-120min 的活动性显著增加($P < 0.05$ vs 对照组)。结论 伏隔核是 orexin-A 刺激大鼠增加摄食量,提高其活动性的作用点。

关键词 伏隔核 orexin-A 摄食

中图分类号: Q95-3 R338.2 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)09-1621-03

The Effect of Orexin-A on Feeding and Locomotor Activity in the Accumbens*

ZHANG Li-na¹, FENG Cai-hua², CHAI-Xin¹, WANG Cong-cong¹, DONG Hai-long^{1△}

(1 Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2 Department of Anesthesiology, Kouqiang Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of orexin-A on feeding and locomotor activity in the accumbens shell (Accsh). **Methods:** SD rats (250-280) were used and implanted a guide cannulae into the accumbens shell (AccSh) by stereotaxic instrument. Then rats were randomly divided into three group and microinjected Ringer's solution, 100 pmol and 500 pmol orexin-A respectively. The feeding were recorded in 0-1h, 1-2h, 2-4h and locomotor activity were recorded in 0-30 min, 30-60min, 60-90min, 90-120min after microinjection. **Results:** Orexin-A augmented feeding in the 0-1 h and 1-2 h and stimulated locomotor activity in the 30-60 min, 60-90 min, and 90-120 min post-infusion ($P < 0.05$ vs control group). **Conclusion:** AccSh is a site of orexin A modulation of feeding behavior and locomotor activity.

Key words: Accumbens; Orexin-A; Feeding

Chinese Library Classification: Q95-3, R338.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1621-03

前言

Orexin 是一种新型神经肽,其神经元位置局限,但其纤维却投射到几乎整个中枢神经系统^[1]。Orexin 的 G 蛋白偶联受体分布广泛,提示与参与内环境的稳定有关^[2],大量研究表明其与人和动物的摄食有关^[3-5]。Orexin 同时参与调解睡眠和觉醒,研究表明人的昏睡病与 orexin 神经元的缺失有关,而犬类动物昏睡病的发生与 orexin-2 受体突变有关^[6,7]。侧脑室注射 Orexin-A 可以抑制快速动眼睡眠(rapid eye movement, REM),增加动物活动^[8]。

Orexin 神经元投射向伏隔核(the accumbens shell, Accsh)和被盖腹侧区(ventral tegmental area, VTA),这两个区域都是与进食有关的核团^[6-7]。伏隔核区神经元表达 orexin 受体^[9],其摄食作用可以被 orexin-A 抑制^[10],而 orexin-A 可激活 VTA 区中脑缘的 orexin 受体,促进动物摄食^[5]。多巴胺系统和阿片能系统是高脂饮食的主要调节体系,而伏隔核的阿片能体系被誉为

"享乐摄食调节中枢"^[11]。因此,本实验我们拟通过在伏隔核微注射 orexin-A,探讨 orexin-A 调节动物摄食和活动的的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

实验采用 SD 大鼠(由第四军医大学实验动物中心提供),体重 250~280g。参照随机数字表将其分为乳酸格林液(Ringer's)对照组,orexin-A 100 pmol 组和 orexin-A 500 pmol 组($n=8$)。

1.2 手术操作伏隔核置管

采用脑立体定位仪定位。大鼠在戊巴比妥(60mg/kg)麻醉下左右耳杆固定,眼科剪剪开皮肤暴露颅骨,碘伏消毒后调整三维脑立体定位仪,距大鼠脑前囟向后 3.0 mm,向右 1.0 mm,向腹侧 6.0 mm 定位伏隔核中心核团,植入微量注射管(公司)。用自制管芯封闭微注射管以防堵塞,微注射管外围放置外保护套(高于微注射针 5mm)牙胶固定,防止大鼠搔扒。

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30772075)

作者简介 张丽娜,硕士研究生,电话 15891755136, E-mail: linazhang3032002208@yahoo.com.cn

△通讯作者 董海龙,副教授,主任医师,电话(029) 84775337, E-mail: donghl@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2011-12-25 接受日期 2012-01-20)

1.3 伏隔核微注射及观察指标

乳酸格林液(Ringer's),Orexin-A 100 pmol 和 500 pmol (由公司提供)各 0.3 μ l,用微量注射泵(由公司提供)微注射到伏隔核(微注射时间 5min,注射针停留 5min),注射后大鼠分笼饲养。称量每只大鼠鼠槽中鼠粮的重量,并记录 0-1h,1-2h,2-4h 后鼠粮的摄食情况。Ringer's,Orexin-A 100pmol 和 500pmol 各 0.3 μ l 微注射到伏隔核后,将大鼠分别放入 40 $\times$ 40cm 的正方体监测箱内(由公司提供),利用红外监测记录大鼠 X,Y,Z 轴的活动痕迹,记录注射后 0-30min,30-60min,60-90min,90-120min 大鼠的总活动距离。

1.4 统计分析

数据资料采用 SPSS13.0 进行统计分析,大鼠各时间段的摄食量以及个时间段的活动总路程都用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm S$)表示,并进行 One-way ANOVA 检验。 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠摄食量的变化

Orexin-A 100 pmol 和 500 pmol 微注射到伏隔核后,大鼠 0-1h 的摄食量分别为(2.4 $\pm$ 0.4)g、(1.3 $\pm$ 0.1)g,与 Ringer's 微注射相比(0.6 $\pm$ 0.1)g,摄食量显著增加且 100 pmol 的 orexin-A 效果更明显。1-2h 时,500 pmol 的 orexin-A 发挥主要作用,摄食量为(0.5 $\pm$ 0.1)g,与 Ringer's(0.2 $\pm$ 0.1)g、100 pmol 的 orexin-A (0.3 $\pm$ 0.1)g 相比均有显著差异。但注射后 2-4h,注射 orexin-A 组摄食量较 Ringer's 组下降(如图 1)。

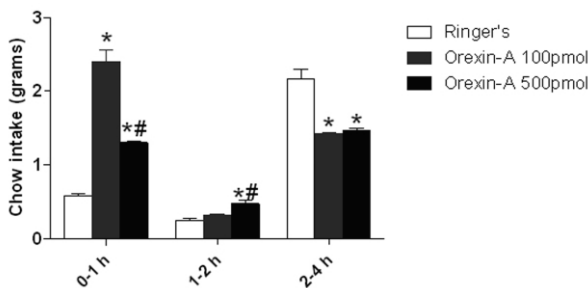


图 1.Orexin-A 微注射后各时间段大鼠摄食量变化(n=8,* $P<0.05$, vs 乳酸格林液组 # $P<0.05$, vs Orexin-A100pmol 组)

Fig.1 Microinjection of orexin-A changed feeding behavior in different time of rats (n=8,* $P<0.05$, vs Ringer's group; # $P<0.05$, vs Orexin-A100pmol group)

2.2 大鼠活动性的变化

Orexin-A 100 pmol 和 500 pmol 微注射到伏隔核后,大鼠 0-30 min 的活动总路程分别为 (3161 $\pm$ 206.4)cm、(3211 $\pm$ 223.4)cm,与 Ringer's 微注射相比(3036 $\pm$ 238.8)cm 无统计学差异。30-60 min 时,orexin-A 100 或 500 pmol 微注射的活动总路程分别为 (1166 $\pm$ 182.7)cm、(2266 $\pm$ 223.8)cm,与 Ringer's (680 $\pm$ 163.3)cm 相比均有显著差异且 500 pmol 的 orexin-A 效果更显著。但注射后 60-90 min,90-120min 时,orexin-A 100 pmol 微注射与 Ringer's 组相比活动总路程无差异,但 500 pmol 的 orexin-A 微注射后,大鼠活动总路程仍显著增加(如图 2)。

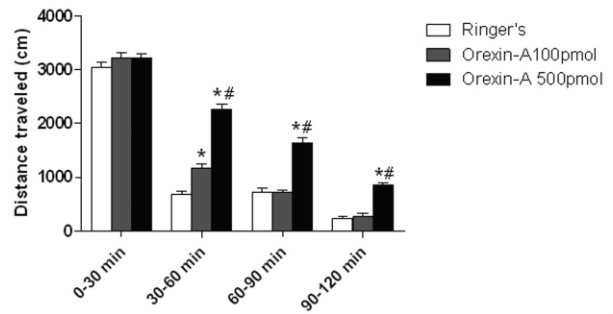


图 2.Orexin-A 微注射后各时间段大鼠活动总路程的变化(n=8,* $P<0.05$, vs 乳酸格林液组 # $P<0.05$, vs Orexin-A100pmol 组)

Fig.2 Microinjection of orexin-A changed locomotor activity in different time of rats (n=8,* $P<0.05$, vs Ringer's group; # $P<0.05$, vs Orexin-A100pmol group)

3 讨论

Orexin 作为一种神经肽,参与调节多种生理功能如调解进食和能量代谢^[12,13],调节心血管活动并参与觉醒机制^[14,15]。伏隔核被认为是满足欲望行为的控制中枢^[16],可以推论 orexin-A 促进大鼠摄食可能通过伏隔核部位的 orexin-1 受体实现。已有文献报道,给予 orexin-1 受体拮抗剂 SB-334867A 后,大鼠的摄食行为明显降低^[17]。更多的研究表明,orexin-A 持续刺激动物的摄食摄水行为而不是 orexin-B^[3,18]。给雄性大鼠侧脑室快速注入 orexins,发现在 1 h 内 orexin-A 呈剂量依赖性促进动物摄食,3 nmol 的 orexin-A 使摄食量增加 6 倍,30 nmol 使之增加 10 倍,该效应可持续 4 h,侧脑室注入 3 nmol,30 nmol 的 orexin-B,则大鼠的摄食量分别增加 5 倍和 12 倍,但其效应只持续 2 h。其效应持续较短可能因为 orexin-B 为一线性多肽,有一个自由的氨基端,而 orexin-A 蛋白经修饰形成二硫键^[19]。因此,本研究选择 orexin-A 做伏隔核微注射,进一步验证了伏隔核微注射 orexin-A 后,大鼠摄食行为和活动性可显著增(图 1,2)。

在观察大鼠活动性的实验中我们看到,虽然在 orexin-A 微注射 30-60 min 后,大鼠总活动路程显著增加,但是在随后的 60-90 min,90-120 min 中,剂量较小时(100 pmol)不能增加其活动性(图 2)。这可能与大鼠反复多次注射 orexin-A 后,其对 orexin-A 的敏感性下降有关,或者小剂量 orexin-A 作用时间较大剂量(500 pmol)短,orexin 发挥作用有剂量依赖性。其他实验证明,给清醒大鼠脑室注射 orexin-A 可剂量依赖性增加肾交感神经活动,而相同剂量的 orexin-B 无明显作用,仅大剂量(30 pmol)时才增加肾交感神经系统活动^[12]。在我们研究研究 orexin 和吸入麻醉剂异氟醚和七氟醚的作用关系中同样发现,小剂量(30 pmol)对大鼠的觉醒时间影响较小或无影响,而大剂量(100 pmol)明显缩短了大鼠麻醉觉醒时间^[20,21]。

总之,伏隔核接受来自双侧下丘脑、被盖腹侧区、杏仁核等多处投射纤维,是调节摄食、活动的重要神经解剖部位。而 orexin-A 作为一种具有多种生物功能的新型神经肽,其微注射实验进一步揭示,伏隔核也是 orexin 能神经元刺激大鼠摄食量,提高其活动性的重要作用核团。

参考文献(References)

[1] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: a

- family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior [J]. *Cell*, 1998, 92(4):573-585
- [2] Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, et al. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness, *Annu [J]. Rev. Neurosci*, 2001, 24: 429-458
- [3] Dube MG, Kalra SP, Kalra PS. Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action [J]. *Brain Res*, 1999, 842(2): 473-477
- [4] Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, et al. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin [J]. *J. Endocrinol*, 1999, 160 (3):R7-R12
- [5] Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, et al. Feeding response to central orexins [J]. *Brain Res*, 1999, 821(2): 535-538
- [6] Lin L, Faraco J, Li R, et al. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene [J]. *Cell*, 1999, 98(3): 365-376
- [7] Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, et al. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy [J]. *Neuron*, 2000, 27(3): 469-474
- [8] Bourgin P, Huitron-Resendiz S, Spier AD, et al. Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons [J]. *Neurosci*, 2000, 20 (20): 7760-7765
- [9] Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ. Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system [J]. *Regul. Pept*, 2002, 104(1-3):131-144
- [10] Carr KD. Augmentation of drug reward by chronic food restriction: behavioral evidence and underlying mechanisms [J]. *Physiol. Behav*, 2002, 76(3): 353-364
- [11] Glass MJ, Billington CJ, Levine AS. Opioids, food reward, and macronutrient selection, in: H.-R. Berthoud, & R.J. Seeley (Eds.), *Neural and Metabolic Control of Macronutrient Intake* [J]. CRC Press, Boca Raton, FL, 2000:407-423
- [12] Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC, et al. Orexins and appetite regulation [J]. *Neuropeptides*, 2002, 36(5): 303-325
- [13] Stricker-krongrad A, Richy S, Beck B. Orexins/hypocretins in the ob/ob mouse: hypothalamic gene expression peptide content and metabolic effects [J]. *Regulatory Peptides*, 2002, 104: 11-20
- [14] Chen CT, Hwang LL, Chang JK, et al. Receptor effects of Orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rat [J]. *Am J Physiol*, 2000, 278: 692-697
- [15] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al. Narcolepsy in orexin knock-out mice : molecular genetics of sleep regulation [J]. *Cell*, 1999, 98 (4) :437-451
- [16] Kelley AE. Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning [J]. *Neurosci. Biobehav. Rev*, 2004, 27(8):765-776
- [17] Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, et al. Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats [J]. *Regul. Pept*, 2000, 96(1-2): 71-84
- [18] Haynes AC, Jackson B, Overend P, et al. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat [J]. *Peptides*, 1999, 20(9): 1099-1105
- [19] Flier TS, Maratos-Flier YJ. Obesity and the hypothalamus: Novel peptides for new pathways [J] *Cell*, 1998, 92:437-440
- [20] Dong HL, Fukuda S, Murata E, et al. Orexins increase cortical acetylcholine release and electroencephalographic activation through orexin-1 receptor in the rat basal forebrain during isoflurane anesthesia [J]. *Anesthesiology*, 2006, 104(5):1023-1032
- [21] Dong HL, Niu JY, Su BX, et al. Activation of orexin signal in basal forebrain facilitates the emergence from sevoflurane anesthesia in rat [J]. *Neuropeptides*, 2009, (43):179-185