

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.26.008

Orexins 对小鼠摄食和能量代谢的影响*

陈颖^{1,2} 郭菲菲¹ 孙向荣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 菏泽医学专科学校 山东 菏泽 274031)

摘要 目的:探讨 Orexins 对小鼠摄食和能量代谢的影响。**方法:**将小鼠分为摄食组和代谢组,摄食组通过中枢置管,注射不同剂量(1、3、10 nmol)的 orexin-A 和 orexin-B,观察它们对小鼠摄食以及肝柠檬酸合酶活性的影响。代谢组将小鼠置于代谢笼内,通过中枢注射 orexin-A,观察小鼠在光照条件、黑暗条件、禁食条件下呼吸商和代谢率的变化。**结果:**与对照组相比,1 nmol 和 10 nmol orexin-A 在注射后 4 小时内可显著刺激小鼠进食($P<0.05$),而 3 nmol orexin-A 对摄食量的影响并不明显,但能显著促进柠檬酸合酶活性。任何剂量的 orexin-B 对小鼠摄食都没有显示出刺激作用($P>0.05$)。在光照条件下,orexin-A 可显著降低呼吸商(RQ),代谢率显著升高($P<0.05$);而在黑暗条件下,orexin-A 对 RQ 没有任何影响,但代谢率显著升高($P<0.05$);但是给禁食小鼠中注射 orexin-A 可诱导 RQ 的短暂升高,代谢率显著升高($P<0.05$)。**结论:**Orexins 对小鼠摄食与能量代谢可能有一定的调控作用。

关键词:Orexins;摄食;能量代谢;小鼠

中图分类号:R-33; R338; R589 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)26-5038-05

Effects of Orexins on Feeding and Energy Metabolism in Mice*

CHEN Ying^{1,2}, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, XU Luo^{1Δ}

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

2 Heze Medical College, Heze, Shandong, 274031, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Orexin peptides on feeding and energy metabolism in mice. **Methods:** The mice were divided into two groups: feeding group and metabolic group. The feeding group were injected with different doses (1, 3 and 10 nmol) of orexin-A and orexin-B to observe their effects on feeding and the activity of tyrosine hydroxylase in liver. We used the metabolic cages and observed the changes of respiration rate and respiration rate of mice were under light condition, dark condition and fasting condition. **Results:** Compared with the control group, 1 nmol and 10 nmol orexin-A significantly stimulated mice to feed ($P<0.05$) within 4 hours after injection, and the effect of 3 nmol orexin-A on feeding was not obvious, but increase the activity of tyrosine hydroxylase. Any dose of orexin-B did not show a stimulating effect on mice feeding. ($P>0.05$). In the light cycle, orexin-A could significantly reduce the respiration rate (RQ), the metabolic rate was significantly increased ($P<0.05$); In the dark cycle, orexin-A had no effect on RQ, but the metabolic rate was significantly risen ($P<0.05$); But the injection of orexin-A in fasting mice induced a brief increase in RQ and a significant increase in metabolic rate ($P<0.05$). **Conclusion:** Orexins may play an important role in regulating feeding and energy metabolism in mice.

Key words: Orexins; Feeding; Energy Metabolism; Mice

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R338; R589 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)26-5038-05

前言

Orexins(OX)是来自于下丘脑外侧区(LH)神经元细胞体的 mRNA 编码的一种神经肽^[1,2],在哺乳动物 LH 主要参与调控能量代谢^[3-5]。其编码的蛋白质(Orexins, 130 个残基)经酶解生成两种产物,分别是 orexin-A(残基 33-66)和 orexin-B(残基 69-96),在人、大鼠和小鼠之间高度保守,说明 orexins 具有重要的功能^[1,2]。研究发现,orexins 具有兴奋大鼠下丘脑神经元的特性^[1],而在大鼠脑室注射 orexin-A 和 orexin-B 时,都可剂量

依赖性地刺激大鼠摄食^[2]。

研究已经证明 LH 在调控食物摄取和能量代谢方面发挥重要作用^[6-8]。刺激大鼠 LH 可诱发进食^[9,10],而损伤 LH 则会出现厌食现象^[11-14],如果不给大鼠灌胃饲养,会导致动物饥饿而死^[15-18]。更重要的是,研究证明,LH 损伤后大鼠体重明显减轻,并出现吞咽困难^[15,19]。因此,激活 LH 会导致能量代谢的增加明显高于过量摄食^[6]。

因为 LH 除了对摄食行为的调控之外,LH 在能量代谢调节中发挥重要作用,之前大量研究报道 orexins 对大鼠能量代

* 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:陈颖(1990-),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: 391002047@qq.com

Δ 通讯作者:徐璐,E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2017-04-01 接受日期:2017-04-30)

谢的调控^[3,5],但是尚不明确 orexin 调控摄食的机制,并且也未能明确 LH 在 orexin 调控摄食过程中扮演何种角色,因此本研究主要探讨 orexins 对小鼠摄食和能量代谢的调控机制,以及这一过程中是否有 LH 的参与。

1 材料与方法

1.1 实验动物

将成年雄性 C57BL/6J 小鼠 70 只分别置于具有不锈钢盖的塑料笼中饲养,室温控制在 $(22\pm 2^{\circ}\text{C})$,光照周期 12 h,光照时间(06:00-18:00)。小鼠给予实验室标准饮食,可随意饮水。

1.2 实验分组及中枢置管

将小鼠随机分为摄食组($n=40$)和代谢组($n=30$),摄食再分 A、B 两组,A 组 20 只,随机分为 4 小组,即:对照组(NS),orexin-A 1 nmol 组(1 nmol),orexin-A 3 nmol 组(3 nmol),orexin-A 10 nmol 组(10 nmol);同理,B 组 20 只也分为 4 组,即:对照组(NS),orexin-B 1 nmol 组(1 nmol),orexin-B 3 nmol 组(3 nmol),orexin-B 10 nmol 组(10 nmol)。代谢组随机分为 3 组,每组 10 只,即:光照组,黑暗组和禁食组。

采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠(剂量为 50 mg/kg),待小鼠麻醉后,将小鼠置于脑立体定位仪上,维持前、后脑在同一水平面上。小鼠头部去毛,消毒,纵向切开头皮,暴露前囟门。剥离骨膜,使颅骨干燥。根据小鼠脑定位图谱,以前囟为零点,定位第三脑室(前囟后 1.8-2.0 mm,旁开 0.1 mm,深度 5.0-6.0 mm),标记此处,牙科钻钻孔,将一套管置于第三脑室,用螺钉和牙科粘固剂固定在硬膜上,用不锈钢管探针封闭导管,缝合切口,分笼饲养,自由饮食饮水,术后小鼠给予抗生素预防术后感染。小鼠恢复一周后,取出探针,将注射套管固定在导管上。其上端通过聚乙烯管连接到微量注射器。注射套管的下端通过硬质套管延伸至第三脑室(i3vt)。

1.3 中枢给药

小鼠进入光照周期 3 h 后,即每天上午 9:00 开始进行第三脑室注射不同剂量(1、3、10 nmol)的 orexin-A 和 orexin-B。我们研究了在光照周期和黑暗周期第三脑室注射 3 nmol orexin-A 对小鼠能量代谢的影响,但小鼠进入黑暗周期前可自由获取食物。另外,给在整个实验过程中禁食的小鼠注射同等剂量的 orexin-A,观察其对能量代谢的影响。

1.4 小鼠呼吸熵和代谢率的检测

将每只小鼠单独放于代谢笼内,适应一天后开始检测。可监视小鼠所在的代谢笼内氧气和二氧化碳的气体浓度,用来计算耗氧量(VO_2)、二氧化碳生成量(VCO_2)和呼吸商(RQ, VCO_2 与 VO_2 的比率),通过耗氧量和呼吸商计算总代谢率,连续检测 6 小时。与此同时,该代谢笼还监测小鼠的摄食情况。

1.5 组织线粒体的提取

小鼠麻醉后取肝脏用预冷 PBS 漂洗后滤纸吸干残余液体,称取 100 mg 样品加入 2 mL MIM+BSA 后匀浆, $600\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取上清液 $8000\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,弃去上清液留沉淀,沉淀为线粒体沉淀,在沉淀中加入 1 mL MIM+BSA 混匀后 $8000\times g$ 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,弃去上清液加入 500 μL MIM,冰上静置 5 min 后弃去上清液加入 MIM 混匀后制成线粒体悬浊液 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.6 线粒体柠檬酸合酶活性测定

1.01 mM DTNB 12.5 μL , 10% Triton X-100 3.125 μL , 10 mM 草酰乙酸 6.25 μL , 12.2 mM 乙酐辅酶 A 3.125 μL , 0.1 M Tris-HCl (pH7.0) 100 μL 。混匀后 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 12.5 μL 线粒体悬浊液,混匀后每 20 s 检测一次 412 nm 波长处吸光值,共检测 3 min,以生理盐组吸光值做为标准值,计算 orexin 各组柠檬酸合酶活性。

1.7 统计学分析

所有实验结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 PPMS1.5 软件对实验数据进行分析,方差分析用于多组数据之间比较,t 检验用于两组数据间比较。

2 结果

2.1 不同剂量 orexin-A 和 orexin-B 对小鼠摄食量的影响

进入光照周期 3 小时后,在小鼠第三脑室注射不同剂量 orexin-A 和 orexin-B,观察对小鼠摄食量的影响。与 NS 组相比,低剂量和高剂量 orexin-A 在注射后 4 小时内小鼠摄食量显著增加(20.47 ± 7.34 vs. 61.97 ± 51.03 , 60.47 ± 13.18 , $P<0.05$,图 1),而 3 nmol orexin-A 对摄食量的影响并不明显($P>0.05$,图 1)。任何剂量的 orexin-B 都没有显示出任何刺激摄食的作用($P>0.05$,图 2)。

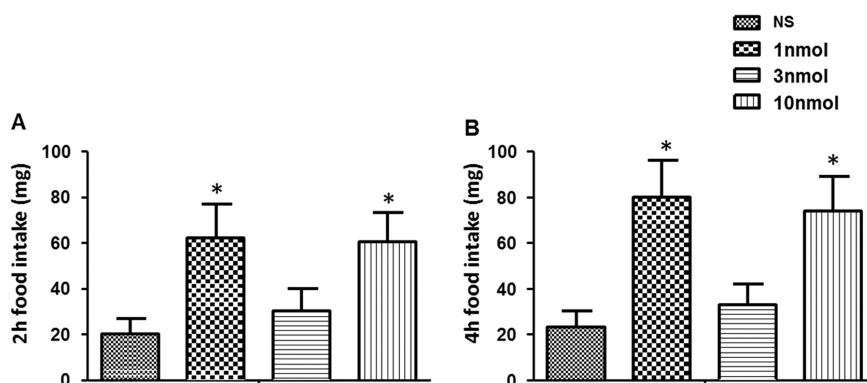
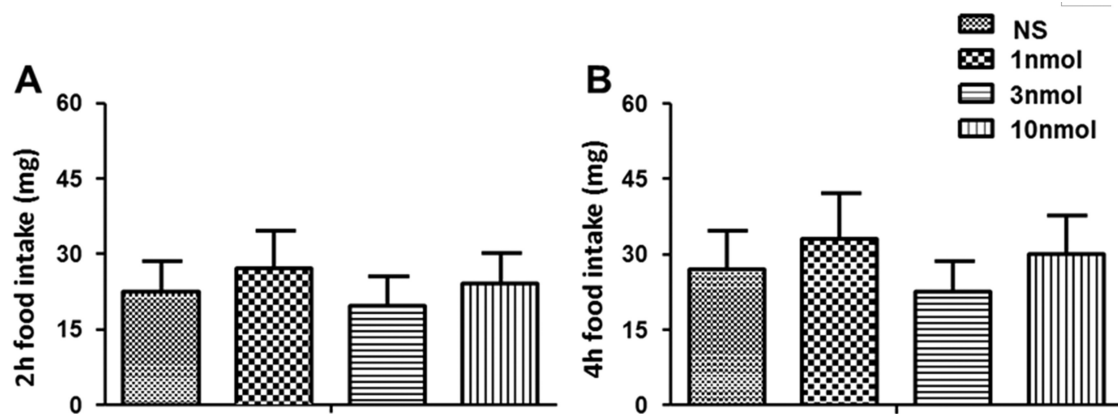


图 1 不同剂量 orexin-A 对小鼠摄食量的影响(mg, $\bar{x}\pm s$)

Fig.1 Effects of different doses of orexin-A on food intake in mice (mg, $\bar{x}\pm s$)

(A) 2h food intake, (B) 4h food intake.

Notes: * $P<0.05$ vs. NS group.

图2 不同剂量 orexin-B 对小鼠摄食量的影响(mg, $\bar{x} \pm s$)Fig.2 Effects of different doses of orexin-B on food intake in mice (mg, $\bar{x} \pm s$)

(A) 2 h food intake, (B) 4 h food intake.

2.2 Orexin-A 对小鼠呼吸熵和代谢率的影响

因为进入光照周期3小时后第三脑室注射3 nmol orexin-A 并没有增加摄食量 ($P > 0.05$, 图1), 所以我们选择了3 nmol orexin-A 观察其对能量代谢的影响。但是, 在光照条件下 orexin-A 可通过降低呼吸熵(3 h vs. 4-6 h: 0.92 ± 0.03 vs. 0.84 ± 0.02 , 0.83 ± 0.03 , 0.84 ± 0.01 , $P < 0.05$, 图3A), 来增加代谢率(3 h vs. 4-5 h: 0.28 ± 0.03 vs. 0.41 ± 0.04 , 0.38 ± 0.03 , 0.32 ± 0.03 ,

$P < 0.05$, 图3B)。而在入黑暗周期时第三脑室注射3 nmol orexin-A 诱导代谢率的增加更持久(3 h vs. 4-6 h: 0.29 ± 0.03 , 0.41 ± 0.05 , 0.37 ± 0.03 , 0.39 ± 0.04 , $P < 0.05$, 图4B), 但是RQ没有发生任何变化($P > 0.05$, 图4A)。给禁食的小鼠中注射3 nmol orexin-A, 其RQ会短暂升高, 但是代谢率的增加不太显著(图5)。

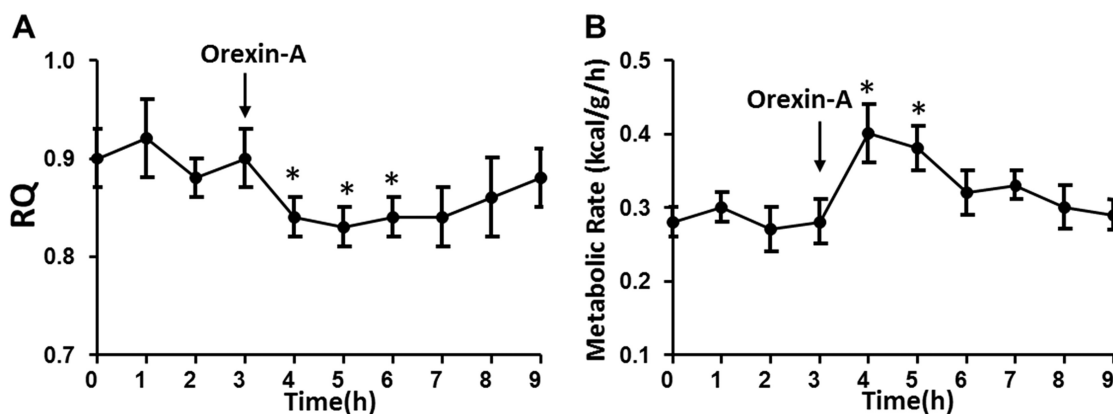


图3 光照条件下 orexin-A 对小鼠 RQ 和代谢率的影响

Fig.3 Effects of orexin-A on RQ and metabolic rate of mice in the light cycle

(A) RQ, (B) metabolic rate

Notes: * $P < 0.05$ vs. 3 h.

2.3 不同剂量 Orexin 对肝脏线粒体功能的影响

为了进一步研究 orexin 对机体主要代谢器官线粒体功能的影响, 实验中还检测了肝脏线粒体中柠檬酸合酶活性。与 NS 组相比, 低剂量和高剂量 orexin-a 组小鼠肝脏线粒体柠檬酸合酶活性增强($P < 0.05$, 图6), 3 nmol orexin-a 组小鼠活性明显增强($P < 0.01$, 图6)。与 NS 组相比, orexin-B 不引起肝脏线粒体柠檬酸合酶活性改变。表明 orexin-A 能够促进能量代谢。

3 讨论

本研究发现, 雄性 C57BL/6J 小鼠在进入光照期注射 orexin-A 后摄食量增加, 注射 orexin-B 后摄食量无明显改变, 这与 Sakurai 等人所观察到大鼠注射 orexin 后摄食量明显增加的结

果相反^[2]。可能是由于我们选择小鼠为研究对象。尽管小鼠和大鼠 orexin 前体序列存在高度同源性, 但 orexin-B 对摄食无明显刺激作用, 表明在小鼠 orexins 对食欲的影响主要由 orexin-1 受体介导。使用与 Sakurai 等人选择研究的不同品系的大鼠也报道了 orexin-B 对食欲无明显刺激作用(分别为雄性 SD 和 Wistar 大鼠)^[20-23]。这将表明种内或种间变异性可能发生在受体功能水平。

研究中 orexin-A 采用 3 nmol 剂量研究对能量代谢的影响, 该剂量已被证明对摄取食物没有影响。进入光照周期3小时 i3vt 注射 orexin-A 没有增加小鼠食物摄入量, 也没有产生与摄食相关的活动。但是它导致代谢率的增加, 并不依赖于活动的增加。该代谢率的增加在1小时达到峰值并持续2小时。这

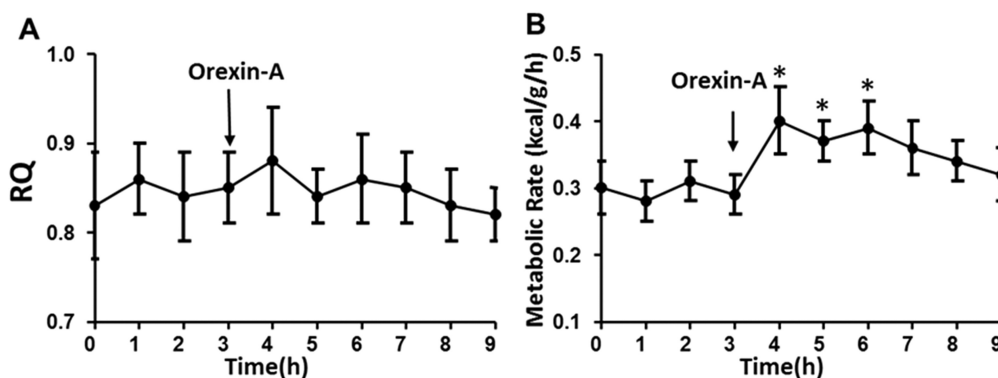


图4 黑暗条件下 orexin-A 对小鼠 RQ 和代谢率的影响

Fig.4 Effects of orexin-A on RQ and metabolic rate of mice in the dark cycle

(A) RQ, (B) metabolic rate.

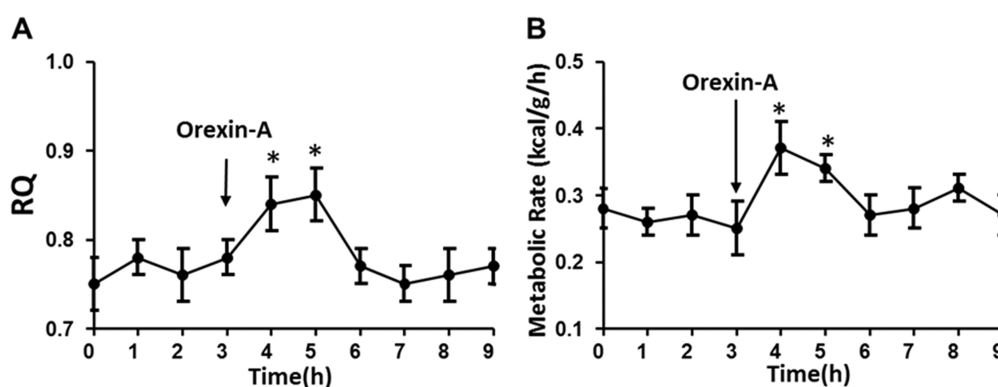
Notes: * $P < 0.05$ vs. 3h.

图5 禁食条件下 orexin-A 对小鼠 RQ 和代谢率的影响

Fig.5 Effects of orexin-A on RQ and metabolic rate in fasted mice

(A) RQ, (B) metabolic rate.

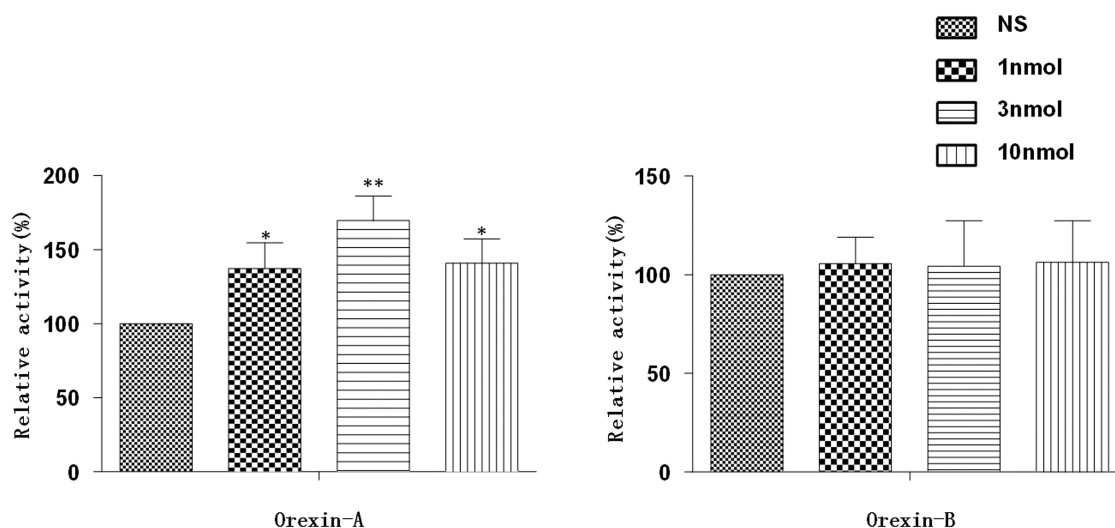
Notes: * $P < 0.05$ vs. 3h

图6 不同剂量 orexin 对小鼠肝脏线粒体功能的影响

Fig.6 Effects of different doses of orexin on tyrosine hydroxylase activity in liver (mg, $\bar{x} \pm s$)Notes: * $P < 0.05$ vs. NS group, ** $P < 0.05$ vs. NS group.

种延迟类似于刺激 LH 后增加代谢率的延迟^[6]。它是由长时间的呼吸商减少来维持,说明小鼠在使用脂质作为能量底物。在上升阶段或下降阶段,我们观察到代谢反应与进食活动无关。

研究已经证明,代谢率的下降可以刺激进食^[6]。Orexins 肽前体主要局限于下丘脑外侧区(LH)的神经元细胞体。众所周知 LH 在能量调节中起重要作用^[3-5]。在下丘脑中 orexins 除了在控制

啮齿类动物摄食的功能之外, orexins 可能具有其它功能。研究证明, 电刺激 LH 表现出周期依赖性^[6], 对代谢底物利用的影响取决于在光照阶段或黑暗阶段期间施加的刺激^[6]。为了验证这个假设, 我们观察了 3 nmol orexin-A 对小鼠周期转换过程中能量利用的影响。在刚进入黑暗周期时单独 i3vt 注射 orexin-A 会诱导代谢率的长时间增加。该增加在 1 小时时达到峰值, 并持续超过 2 小时。与在光照周期观察到的效应相比, 在黑暗期观察到的效应不是很明显。它不是由 RQ 的任何变化来维持, 但是与此同时记录的对照小鼠相比, 其食物摄取量减少。这些结果与长期和连续输注 orexin-A 可减少大鼠的夜间摄食的一个报告相符合^[20]。

肝脏作为脂类代谢的主要器官, 研究中还探讨 orexin 对肝脏代谢的影响。柠檬酸合酶是三羧酸循环的关键酶, 是线粒体功能的标志物。研究发现 orexin-A 3 nmol 组小鼠酶活性明显增强, 表明小鼠代谢明显增强。

本实验表明, 在光照期间 orexin-A 增强了利用脂质为底物的代谢反应, 但在黑暗阶段开始时没有转向以碳水化合物为代谢底物。为了验证 orexin-A 可能触发碳水化合物为底物的假设, 我们研究了 3nmol orexin-A 对轻度禁食小鼠的能量利用的影响(禁食 4 h)。这种轻度禁食可促进脂质底物的利用, 如在实验的第一部分显示的低水平的 RQ。注射 orexin-A 可诱导禁食小鼠代谢率的增加。但是不如在其他实验条件下观察到的增加显著, 并且延迟会缩短(少于 15 min), 并持续 1 h。它与 RQ 的瞬时升高相关, 表明小鼠在使用碳水化合物作为能量底物, 然后 RQ 降低。这表明 orexin-A 刺激也可以将能量代谢底物转向为碳水化合物。

因此, 在光照和黑暗阶段以及轻度禁食期间, orexin-A 引起的代谢率增强似乎使用不同的内源储存。这些效应可能通过葡萄糖和游离脂肪酸利用的变化体现, 因为研究已经证明刺激 LH 对血糖和游离脂肪酸水平的影响不同^[24]。

总之, 本研究结果提供了 orexins 可能参与能量代谢的控制多于对食物摄入的控制的直接证据。在本实验中观察到的反应使人想起由刺激或损害 LH 引起的快速代谢变化及其对昼夜循环的依赖性。这表明 orexins 水平的变化与营养状态相关, 而不是与饥饿或饱腹感状态相关, 并且它们在这些状态期间促进代谢底物的可利用性。

参考文献(References)

- [1] Lee YS, Muthu D, Hall SM, et al. Discovery of amphipathic dynorphin A analogues to inhibit the neuroexcitatory effects of dynorphin A through bradykinin receptors in the spinal cord [J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(18): 6608-6616
- [2] Mori T, Uzawa N, Iwase Y, et al. Narcolepsy-like sleep disturbance in orexin knockout mice are normalized by the 5-HT1A receptor agonist 8-OH-DPAT[J]. Psychopharmacology (Berl), 2016, 233(12): 2343-2353
- [3] Ujita K, Kinoshita K, Muroi Y, et al. The effects of unilateral lesion of the tuberomammillary nucleus E2 sub-region on nocturnal feeding and related behaviors in mice[J]. Life Sci, 2016, 162(1): 70-76
- [4] Lee S, Choe SJ, Ahn SK. Almost Unilateral Focal Dermal Hypoplasia [J]. Ann Dermatol, 2017, 29(1): 91-94
- [5] Hsieh LC, Lin HC, Lee GS. Saccadic entropy of head impulses in acute unilateral vestibular loss[J]. J Formos Med Assoc, 2016[Epub ahead of print]
- [6] Golden SA, Heshmati M, Flanigan M, et al. Basal forebrain projections to the lateral habenula modulate aggression reward [J]. Nature, 2016, 534(7609): 688-692
- [7] González JA, Iordanidou P, Strom M, et al. A wake dynamics and brain-wide direct inputs of hypothalamic MCH and orexin networks [J]. Nat Commun, 2016, 7(1): 11395-11398
- [8] Vercruysse P, Sinniger J, El Oussini H, et al. Alterations in the hypothalamic melanocortin pathway in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Brain, 2016, 139(Pt 4): 1106-1122
- [9] Sweeney P, Yang Y. An Inhibitory Septum to Lateral Hypothalamus Circuit That Suppresses Feeding [J]. J Neurosci, 2016, 36 (44): 11185-11195
- [10] Tataranni PA, DelParigi A. Functional neuroimaging: a new generation of human brain studies in obesity research [J]. Obes Rev, 2003, 4(4): 229-238
- [11] Martins L, Seoane-Collazo P, Contreras C, et al. A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance[J]. Cell Rep, 2016, 16(8): 2231-2242
- [12] López-Ferreras L, Richard JE, Anderberg RH, et al. Ghrelin's control of food reward and body weight in the lateral hypothalamic area is sexually dimorphic [J]. Physiol Behav, 2017, [Epub ahead of print]
- [13] Gong Y, Liu Y, Liu F, et al. Ghrelin fibers from lateral hypothalamus project to nucleus tractus solitaries and are involved in gastric motility regulation in cisplatin-treated rats[J]. Brain Res, 2017, 1659(3): 29-40
- [14] Perez-Leighton C, Little MR, Grace M, et al. Orexin signaling in rostral lateral hypothalamus and nucleus accumbens shell in the control of spontaneous physical activity in high- and low-activity rats [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2017, 312 (3): R338-R346
- [15] Barbano MF, Wang HL, Morales M, et al. Feeding and Reward Are Differentially Induced by Activating GABAergic Lateral Hypothalamic Projections to VTA [J]. J Neurosci, 2016, 36 (10): 2975-2985
- [16] Reiner DJ, Miettlicki-Baase EG, Olivos DR, et al. Amylin Acts in the Lateral Dorsal Tegmental Nucleus to Regulate Energy Balance Through Gamma-Aminobutyric Acid Signaling [J]. Biol Psychiatry, 2017[Epub ahead of print]
- [17] Blancas-Velazquez A, Mendoza J, Garcia AN, et al. Diet-Induced Obesity and Circadian Disruption of Feeding Behavior [J]. Front Neurosci, 2017, 11(2): 23-29
- [18] Berland C, Cansell C, Hnasko TS, et al. Dietary triglycerides as signaling molecules that influence reward and motivation [J]. Curr Opin Behav Sci, 2016, 9(3): 126-135
- [19] Stamatakis AM, Van Swieten M, Basiri ML, et al. Lateral Hypothalamic Area Glutamatergic Neurons and Their Projections to the Lateral Habenula Regulate Feeding and Reward [J]. J Neurosci, 2016, 36(2): 302-311

- [8] Loria F, Loria G, Basile S, et al. Contrast-enhanced ultrasound of hepatocellular carcinoma: correlation between enhancement pattern and cellular differentiation on histopathology [J]. *Updates Surg*, 2012, 64(4): 247-255
- [9] Wu W, Zhao JN, Guo DJ, et al. The application of 3D liver acquisition volume acceleration integrated with array spatial sensitivity encoding technique in liver dynamic-enhancement scanning[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2008, 16(4): 294-297
- [10] 阳宁静, 黄子星, 宋彬. 1.5T 磁共振增强扫描和弥散加权成像诊断复发微小肝癌的价值[J]. *西部医学*, 2015, 27(4): 545-549
Yang Ning-jing, Huang Zi-xing, Song Bin. The value of contrast-enhanced 1.5T MR and DWI in diagnosing recurrent micro-hepatocellular carcinoma [J]. *Medical Journal of West China*, 2015, 27(4): 545-549
- [11] 郭启勇, 辛军, 张新, 等. MRI 水扩散加权成像分子机理研究进展[J]. *中国临床医学影像杂志*, 2013, 24(7): 496-500
Guo Qi-yong, Xin Jun, Zhang Xin, et al. Progress in the study of molecular mechanism in water diffusion weighted MRI [J]. *J Chin Clin Med Imaging*, 2013, 24(7): 496-500
- [12] Gluskin JS, Chegai F, Monti S, et al. Hepatocellular carcinoma and diffusion-weighted MRI: detection and evaluation of treatment response[J]. *Journal of Cancer*, 2016, 7(11): 1565-1570
- [13] Muhi A, Ichikawa T, Motosugi U, et al. High-b-value diffusion-weighted MR imaging of hepatocellular lesions: estimation of grade of malignancy of hepatocellular carcinoma [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2009, 30(5): 1005-1011
- [14] Nasu K, Kuroki Y, Tsukamoto T, et al. Diffusion-weighted imaging of surgically resected hepatocellular carcinoma: imaging characteristics and relationship among signal intensity, apparent diffusion coefficient, and histopathologic grade [J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 193(2): 438-444
- [15] 江婷, 许杰华, 王劲, 等. 磁共振弥散加权成像信号强度评价肝细胞癌组织分化程度的价值 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2015, 21(2): 76-80
- Jiang Ting, Xu Jie-hua, Wang Jin, et al. Value of diffusion weighted imaging signal intensity in evaluating histopathological differentiation of hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2015, 21(2): 76-80
- [16] 朱长富, 杨光, 王聪. 超声造影对原发性肝细胞癌的诊断及与病理分化程度的关系[J]. *大连医科大学学报*, 2015, 37(4): 388-391, 394
Zhu Chang-fu, Yang Guang, Wang Cong. Contrast-enhanced ultrasonography in the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma and correlation with pathology [J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2015, 37(4): 388-391, 394
- [17] 郑汉朋, 项剑瑜, 邱乾德. 原发性巨块型肝癌 CT 表现与肿瘤细胞分化程度对照分析[J]. *医学影像学杂志*, 2013, 23(4): 536-538
Zheng Han-peng, Xiang Jian-yu, Qiu Qian-de. Comparative analysis of the correlation between CT finding and cell differentiation in massive type of primary hepatic carcinoma[J]. *J Med Imaging*, 2013, 23(4): 536-538
- [18] 柏根基, 张建淮, 王书中, 等. 微小肝癌的 MDCT 和 MRI 诊断比较研究[J]. *实用医学杂志*, 2012, 28(16): 2762-2763
Bo Gen-ji, Zhang Jian-huai, Wang Shu-zhong, et al. Comparative analysis of the MDCT and MRI in micro-hepatocellular carcinoma[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2012, 28(16): 2762-2763
- [19] Kierans AS, Kang SK, Rosenkrantz AB. The Diagnostic performance of dynamic contrast-enhanced MR imaging for detection of small hepatocellular carcinoma measuring up to 2 cm: a meta-analysis[J]. *Radiology*, 2016, 278(1): 82-94
- [20] Shiozawa K, Watanabe M, Ikehara T, et al. Therapeutic evaluation of sorafenib for hepatocellular carcinoma using contrast-enhanced ultrasonography: Preliminary result [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12 (1): 579-584

(上接第 5042 页)

- [20] Hao H, Luan X, Guo F, et al. Lateral hypothalamic area orexin-A influence the firing activity of gastric distension-sensitive neurons and gastric motility in rats[J]. *Neuropeptides*, 2016, 57(1): 45-52
- [21] Luna SL, Brown DI, Eghlidi DH, et al. Locomotor activity and the expression of orexin A and orexin B in aged female rhesus macaques [J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 50(4): 1-4
- [22] Sun S, Xu L, Sun X, et al. Orexin-A affects gastric distention sensitive neurons in the hippocampus and gastric motility and regulation by the perifornical area in rats [J]. *Neurosci Res*, 2016, 110 (2): 59-67
- [23] Alò R, Avolio E, Mele M, et al. Role of Leptin and Orexin-A Within the Suprachiasmatic Nucleus on Anxiety-Like Behaviors in Hamsters [J]. *MolNeurobiol*, 2016[Epub ahead of print]
- [24] Routh VH, Hao L, Santiago AM, et al. Hypothalamic glucose sensing: making ends meet [J]. *Front SystNeurosci*, 2014, 8 (3): 236-241