

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.26.010

下丘脑腹内侧核 Orexin-1 及其受体对大鼠胃酸分泌的影响及其机制*

邹怡君^{1,2} 栾晓¹ 柳洋³ 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 威海卫人民医院 山东 威海 264200; 3 青岛市第九人民医院 山东 青岛 266000)

摘要 目的:探讨下丘脑腹内侧核 Orexin-1 及其受体对大鼠胃酸分泌的影响及其机制。**方法:**大鼠麻醉后侧脑室及 VMH 置管,大鼠分组后分别 VMH 注射 orexin-A、[Pro³⁴]-酪酪肽、[cPP¹⁻⁷、NPY¹⁹⁻²³、Ala³¹、Aib³²、Gln³⁴]胰多肽;腹腔注射 SB-334867;皮下注射阿托品;侧脑室微量注射 GR-231118、CGP-71683。给药结束后使用幽门结扎模型检测大鼠的胃酸分泌。**结果:**OXA 能够促进胃酸分泌,且呈量效依赖关系。腹腔注射 SB-334867 能够抑制胃酸分泌,且呈量效依赖关系;SB-334867 能够抑制 orexin-A 对胃酸分泌的促进作用;阿托品不但能够抑制胃酸分泌并且还能够完全阻断 OXA 的促胃酸分泌作用。侧脑室微量注射 GR-231118 或 CGP-71683 胃酸及胃液量减少,呈量效依赖关系,并且能够完全阻断 OXA 的促胃酸分泌作用。VMH 内微量注射[cPP¹⁻⁷、NPY¹⁹⁻²³、Ala³¹、Aib³²、Gln³⁴]胰多肽胃酸分泌增多,且呈量效依赖关系。**结论:**Orexin-A 能够作用于下丘脑 VMH 促进胃酸分泌,orexin 受体、Y1 和 Y5 受体以及迷走神经系统均参与该过程。

关键词:下丘脑腹内侧核; orexin; orexin 受体; NPY Y1 及 Y5 受体;胃酸分泌

中图分类号:R-33; R338 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)26-5048-06

Role of the Ventromedial Hypothalamic Orexin-1 and Orexin-1 Receptors in Regulation of Gastric Acid Secretion in Conscious Rats*

ZOU Yi-jun^{1,2}, LUAN Xiao¹, LIU Yang³, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, XU Luo^{1Δ}

(1 Dept. of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China; 2 Weihaiwei people's Hospital, Weihai, Shandong, 264200, China; 3 Qingdao NO.9 people's hospital, Qingdao, Shandong, 266000, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to explore the Ventromedial Hypothalamic Orexin-1 and Orexin-1 Receptors in Regulation of Gastric Acid Secretion in Conscious Rats. **Methods:** Rats were anaesthetized and fitted with a stainless steel cannula placed just above the VMH or paracele, after random allocation orexin-A, [Pro³⁴] - peptide YY and [CPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴] -pancreatic polypeptide were injected in the VMH; SB-334867 was intraperitoneal injection; atropine was subcutaneous injection; GR-231118 and CGP-71683 were injected in the paracele. Using pyloric ligation model, tests the effect of different drugs on rat gastric acid secretion and gastric juice volume. **Results:** OXA induced dose-dependent increase of gastric acid secretion; SB-334867 induced dose-dependent inhibition of gastric acid secretion. The stimulatory effect of OXA on acid secretion was inhibited by SB-334867; atropine induced dose-dependent increase of gastric acid secretion and block the effect of orexin-A on gastric acid secretion; the gastric acid secretion was inhibited by GR-231118 or CGP-71683, and GR-231118 or CGP-71683 were blocked the effect of orexin-A on gastric acid secretion; Intraventricular hypothalamic injections of [CPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴] -pancreatic polypeptide increased gastric acid secretion. **Conclusion:** It is suggested that endogenous orexin-A acts on the ventromedial hypothalamus to stimulates acid secretion. This stimulatory effect is probably mediated through orexin receptor, Y1 and Y5 receptor, and the vagus nerve system.

Key words: Ventromedial hypothalamus; Orexin; Orexin-1 receptor; NPY Y1 and Y5 receptors; Gastric acid secretion

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

Article ID: 1673-6273(2017)26-5048-06

前言

Orexin 主要分为两种 Orexin-A(OXA)和 Orexin-B(OXB),是能够调控摄食、觉醒、胃肠动力以及能量平衡的神经肽^[1]。Orexin 受体 1(OX1R)对 OXA 有高亲和力,而 orexin 受体 2

(OX2R)对 OXA 和 OXB 有相同亲和力^[2]。Orexin 主要分布于下丘脑外侧区(LH)以及未定带(ZI)^[3],其中 LH 能够调控摄食,orexin 也可能作用于中枢神经系统,调控摄食。侧脑室注射 orexin 能够促进摄食,而禁食动物 prepro-orexin mRNA 水平上调,表明 orexin 参与调控摄食^[2]。胃酸分泌是摄食过程的一部

* 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:邹怡君(1982-),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: 2017-03-01 接受日期:2017-03-29)

分,受下丘脑调控。已有研究表明 LH 能够调控胃酸分泌^[4],电刺激 LH 能够增加胃酸分泌^[5,6]。因此,orexin 可能作用于中枢系统调控胃酸分泌。已有研究证实侧脑室注射 OXA 能够刺激大鼠胃酸分泌,而注射 OXB 则没有该效应^[7],证明 orexin 可能是通过作用于 OX1R 调控胃酸分泌。另外,研究表明 orexin 能够通过迷走神经刺激胃酸分泌^[7,8]。由此可见,orexin 不但有促进摄食的作用,还参与调控胃酸分泌,但 orexin 具体作用于中枢的哪几个核团仍然不清楚。OX1R 高度表达于下丘脑前部和下丘脑腹内侧核,而 OX2R 则高度表达于下丘脑旁核(PVN)间位核、背内侧核、弓状核和下丘脑外侧区^[9,10]。免疫细胞化学鉴定结果显示大脑核团间含有 orexin 神经通路^[11],并且这些核团均有调控摄食的生理作用。已有研究证实下丘脑腹内侧核(VMH)和下丘脑背内侧核参与调控摄食及胃酸分泌,但是并不确定 orexin 对胃酸分泌的影响是否通过这些核团产生作用^[12,13]。

研究表明麻醉大鼠中枢注射 NPY 后胃酸及胃蛋白酶分泌增多^[14];狗侧脑室注射 NPY 后摄食量增加、胃酸胃酶及胃蛋白酶分泌增多,胰岛素水平升高^[15]。此外,研究表明 NPY 能够调控胃肠道内分泌初期的胃酸分泌^[16],orexin 和 NPY 间能够相互影响^[17],下丘脑 NPY 能够调控 orexin 神经元活动^[18],同时 orexin A 也参与调控 NPY 通路^[19]。其他的一些研究表明 Y1 和 Y5 受体也参与摄食调控^[20]。目前尚不明确 VMH 内 orexin 神经元参与调控胃酸分泌的机制。因此,本研究重点探讨下丘脑腹内侧核 orexin 及其受体对胃酸分泌的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药物

雄性 Wistar 大鼠,180-220 g,室温控制在 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$,12/12 小时昼夜循环光照条件,饮食自由。实验前 20-24 h 禁食不禁水。遵从《青岛大学实验动物保护和使用管理办法》进行所有实验。Orexin-A、阿托品、GR-231118(Y1 受体拮抗剂)、[Pro³⁴]-酪酪肽(Y1/Y5 激动剂)、[cPP¹⁻⁷、NPY¹⁹⁻²³、Ala³¹、Aib³²、Gln³⁴]胰多肽(Y5 受体激动剂)溶于生理盐水,SB-334867 和 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)溶于 DMSO。

1.2 大鼠置管与胃酸分泌检测

大鼠腹腔注射氯胺酮 70 mg/kg 和甲苯噻嗪 10 mg/kg 混合液麻醉后固定于脑立体定位仪。根据 Paxinos and Watson^[21]分别在 VMH(前囟后 2.4 mm,旁开 0.5 mm,深 8 mm)和侧脑室(前囟后 0.8 mm,旁开 1.6 mm,深 3 mm)处放置一 23 号不锈钢空心套管^[22]。使用牙托粉将套管针固定在颅骨上。套管针尾端与注射器相连。大鼠置管后给予老鼠 7 天的恢复时间。实验结束后通过套管微量注射泵安天蓝标记套管位置,取脑后固定制作 50 蓝标厚的冰冻切片,中性红染色后观察套管位置,删除套管位置不准确大鼠的实验数据。

参考已有文献,使用幽门结扎模型检测大鼠的胃酸分泌^[23]。大鼠经乙醚浅麻醉后,使用 4.0 丝线结扎幽门。实验结束后,大鼠处死取胃,收集胃内容物后离心,使用 0.01N NaOH 将上清液 pH 调至 7.0 后测量溶液体积。

1.3 实验分组

第一部分:VMH 注射 orexin-A 对胃酸分泌的影响,随机选取 80 只大鼠分为四组,A 组生理盐水组(n=30),B 组 orexin 0.5

μg/0.5 μL 组(n=10),C 组 orexin 1.0 μg/0.5 μL 组(n=10),D 组 orexin 2 μg/0.5 μL 组(n=30)。给药 1h 后,A、D 组随机选取 10 只大鼠与 B、C 组一同处死取胃,给药 2h 后,A、D 组随机选取 10 只大鼠处死取胃,给药 3h 后,处死 A、D 组剩余 10 只大鼠后取胃。

第二部分:腹腔注射 SB-334867 对胃酸分泌的影响,随机选取 60 只大鼠,分为五组,A 组生理盐水组(n=10);B 组 SB-334867 2.5 mg/kg 组(n=10);C 组 SB-334867 5 mg/kg 组(n=10);D 组 SB-334867 10.0 mg/kg 组(n=10);E 组 DMSO 组(n=10);F 组 SB-334867+orexin 2 μg/0.5 μL 组(n=10),先腹腔注射 SB-334867 2.5 mg/kg,30 min 后再向 VMH 微量注射 2 μg/0.5 μL orexin。所有大鼠在注射 1h 后处死取胃。

第三部分:阿托品对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响,随机选取 40 只大鼠,皮下注射阿托品(5 mg/Kg)30 min 后,分为两组每组 20 只,每组分别在注射后 1h 和 2h 时处死 10 只大鼠取胃。

第四部分:侧脑室微量注射 GR-231118(Y1 受体拮抗剂)和 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)对胃酸分泌和胃液量的影响,随机选取只大鼠,分为 9 组,第 1-4 组分别为侧脑室注射 GR-231118 (5、7.5、15、30 μg/0.5 μL) 组,第 5-7 组分别为 CGP-71683(5、15、30 μg/0.5 μL)组,第 8 组为 0.5 μL 生理盐水组,第 9 组为 0.5 μL DMSO 组。本部分大鼠均于给药 1h 后处死取胃。

第五部分:侧脑室微量注射 GR-231118(Y1 受体拮抗剂)和 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响,随机选取 60 只大鼠,分为 6 组每组 10 只,第 1 组侧脑室注射 GR-231118(5 μg)5 min 后 VMH 注射 orexin-A 2 μg/0.5 μL,第 2 组侧脑室注射生理盐水 5 min 后 VMH 注射 orexin-A 2 μg/0.5 μL,第 3 组侧脑室注射生理盐水 5 min 后 VMH 注射生理盐水,第 4 组侧脑室注射 DMSO 5 min 后 VMH 注射 orexin-A 2 μg/0.5 μL,第 5 组侧脑室注射 DMSO 5 min 后 VMH 注射生理盐水,第 6 组侧脑室注射 GR-231118 (5 μg) 5 min 后 VMH 注射 orexin-A 2 μg/0.5 μL。本部分大鼠均于给药 1h 后处死取胃。

第六部分:[Pro³⁴]-酪酪肽(Y1/Y5 激动剂)及[cPP¹⁻⁷、NPY¹⁹⁻²³、Ala³¹、Aib³²、Gln³⁴]胰多肽(Y5 受体激动剂)对胃酸分泌的影响,随机选取 60 只大鼠,分为 6 组,第 1、2 组分别为 VMH 内微量注射[Pro³⁴]-酪酪肽(1.5,3 μg)组,第 3-5 组分别为 VMH 内微量注射[cPP¹⁻⁷、NPY¹⁹⁻²³、Ala³¹、Aib³²、Gln³⁴]胰多肽(6,12,24 μg)组,第 6 组为生理盐水组。本部分大鼠均于给药 1h 后处死取胃。

1.4 统计学分析

实验中数据以 $\bar{X}\pm SD$ 表示,数据的统计分析使用 Prism5.0,用双因素方差分析(ANOVA)进行组间两两比较, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 VMH 注射 orexin-A 对胃酸分泌和胃液量的影响

给药 1h 后,与生理盐水组相比,下丘脑腹内侧核注射低剂量 OXA 大鼠胃酸分泌和胃液量均增多,但差异无统计学意

义($P>0.05$),注射中高剂量 OXA 大鼠胃酸分泌和胃液量增多, μL)对胃酸分泌的促进作用长达 2 h($P<0.05$,表 1b),且注射后且呈量效依赖关系($P<0.01\sim 0.05$,表 1a)。

与生理盐水组相比,下丘脑腹内侧核注射 orexin-A($2\text{ }\mu\text{g}/5$

1 h 作用最强($P<0.01$,表 1b)。

表 1a VMH 注射 orexin-A 对胃酸分泌和胃液量的影响

Table 1a Influence of orexin-A on the gastric acid secretion and juice volume

	NS	OXA		
		0.5 μg	1.0 μg	2.0 μg
gastric acid secretion($\mu\text{Eq}/\text{h}$)	82.47 $\pm$ 15.37	102.47 $\pm$ 29.43	149.73 $\pm$ 19.35*	253.17 $\pm$ 31.43** [#]
Juice volume(mL/h)	0.97 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.27	1.79 $\pm$ 0.24*	2.43 $\pm$ 0.31** [#]

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. NS; [#] $P<0.05$ vs. OXA 1.0 μg group.

2.2 腹腔注射 SB-334867 对胃酸分泌和胃液量的影响

给药 1 h 后,与生理盐水组和 DMSO 组相比,腹腔注射低剂量 SB-334867 大鼠胃酸分泌和胃液量减少,但差异无统计学意义($P>0.05$),注射中高剂量 SB-334867 大鼠胃酸分泌和胃液量减少,且呈量效依赖关系($P<0.01\sim 0.05$,表 2a)。

与 orexin-A+DMSO 组相比,大鼠腹腔注射 SB-334867($2.5\text{ mg}/\text{kg}$)30 min 后,再向 VMH 内微量注射 OXA($2\text{ }\mu\text{g}$),大鼠胃酸分泌减少($P<0.05$,表 2b)。

2.3 阿托品对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响

与 NS+NS 组相比,阿托品 +NS 组给药后第 1 h 和第 2 h 胃酸分泌量减少($P<0.01\sim 0.001$,表 3),表明 VMH 注射阿托品后胃酸分泌受抑制。与 NS+OXA 组相比,阿托品 +OXA 组胃酸分泌量减少($P<0.0001$,表 3)且与阿托品 +NS 组相比,胃酸分泌量无明显改变($P>0.05$,表 3),表明阿托品不但能够抑制胃酸分泌,并且还能够完全拮抗 OXA 对胃酸分泌的促进作用。

表 2a SB-334867 对胃酸分泌和胃液量的影响

Table 2a Effect of SB-334867 on the gastric acid secretion and juice volume

	NS	DMSO	SB-334867(mg/kg)		
			2.5	5	10
Gastric acid secretion ($\mu\text{Eq}/\text{h}$)	69.85 $\pm$ 11.37	66.43 $\pm$ 5.21	74.93 $\pm$ 18.32	47.21 $\pm$ 6.48*	23.28 $\pm$ 3.92** ⁺
Juice volume(mL/h)	1.29 $\pm$ 0.27	1.18 $\pm$ 0.13	1.16 $\pm$ 0.32	0.65 $\pm$ 0.14*	0.484 $\pm$ 0.12** ⁺

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. NS; ⁺ $P<0.05$ vs. SB-334867 5 mg/kg .

表 2b SB-334867 对胃酸分泌和胃液量的影响

Table 2b Effect of SB-334867 on the gastric acid secretion and juice volume

	NS	OXA+DMSO	OXA+SB334867
Gastric acid secretion($\mu\text{Eq}/\text{h}$)	82.51 $\pm$ 13.28	259.63 $\pm$ 37.49	113.76 $\pm$ 41.57****

Note: * $P<0.05$ vs. OXA+DMSO group.

表 3 阿托品对 orexin-A 促胃酸分泌作用的抑制作用

Table 3 Effect of atropine on the orexin-A-induced gastric acid secretion

	NS s.c.		atropine(5 mg/Kg , s.c.)	
	NS(VMH)	OXA (2 $\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{L}$)	NS(VMH)	OXA (2 $\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{L}$)
1 h	79.57 $\pm$ 12.04	256.74 $\pm$ 13.49***	22.47 $\pm$ 2.39**	25.18 $\pm$ 3.27****
2 h	346.75 $\pm$ 87.25	504.29 $\pm$ 76.27*	23.46 $\pm$ 2.57***	25.73 $\pm$ 5.41****

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. NS s.c. +NS VMH group, **** $P<0.0001$ vs. NS s.c. +orexin VMH group.

表 1b Orexin-A 注射后 3 h 胃酸分泌的改变

Table 1b The effects of orexin-A (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) on gastric acid secretion in rats over a 3 h period

	NS(0.5 μL)	OXA(2 $\mu\text{g}/0.5\text{ }\mu\text{L}$)
0 h	0	0
1 h	71.67 $\pm$ 2.59	256.13 $\pm$ 23.71***
2 h	340.26 $\pm$ 49.82	473.24 $\pm$ 38.71*
3 h	514.59 $\pm$ 64.37	539.07 $\pm$ 43.57

Note: * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs. NS group.

2.4 侧脑室微量注射 GR-231118(Y1 受体拮抗剂)对胃酸分泌和胃液量的影响

给予 5 μg GR-231118 的大鼠胃酸分泌和胃液量较对照组减少,但差异无统计学意义($P>0.05$);给予 7.5 μg 、15 μg 和 30

μg GR-231118 的大鼠胃酸分泌和胃液量降低,呈量效依赖关系 ($P<0.05\sim 0.01$,表 4),其中 $15\ \mu\text{g}$ 为 GR-231118 最大效应浓度。

表 4 侧脑室微量注射 GR-231118(Y1 受体拮抗剂)对胃酸分泌和胃液量的影响

Table 4 Effects of ICV-micro injected GR-231118 (Y1 receptor antagonist) on the gastric acid secretion and juice volume

	NS	GR-231118(μg)			
		5	7.5	15	30
Gastric acid secretion ($\mu\text{Eq/h}$)	105.36 $\pm$ 10.96	101.12 $\pm$ 9.32	82.29 $\pm$ 9.47*	75.62 $\pm$ 6.42***	73.62 $\pm$ 6.42***
Juice volume(mL/h)	1.01 $\pm$ 0.23	1.05 $\pm$ 0.17	0.62 $\pm$ 0.21*	0.45 $\pm$ 0.19***	0.63 $\pm$ 0.13*

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. NS, * $P<0.05$ vs. GR-231118 $7.5\ \mu\text{g}$.

2.5 侧脑室微量注射 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)对胃酸分泌和胃液量的影响

给予 CGP-71683 $5\ \mu\text{g}$ 的大鼠胃酸分泌和胃液量较对照组减少,但差异无统计学意义($P>0.05$)。给予 CGP-71683 $15\ \mu\text{g}$ 和 $30\ \mu\text{g}$ 的大鼠胃酸分泌和胃液量降低,呈量效依赖关系($P<0.05\sim 0.01$,表 5),其中 $15\ \mu\text{g}$ 为 CGP-71683 最大效应浓度。

2.6 GR-231118 对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响

与对照组相比,VMH 微量注射 orexin-A $2\ \mu\text{g}$ 后,胃酸分泌和胃液量增多($P<0.05$,表 6),VMH 注射 orexin-A $2\ \mu\text{g}$ 前 5 min 侧脑室注射 GR-231118($5\ \mu\text{g}$),orexin-A 对胃酸分泌和胃液量的促进作用被完全阻断($P<0.05$,表 6)。

表 5 侧脑室微量注射 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)对胃酸分泌和胃液量的影响

Table 5 Effects of ICV-micro injected CGP-71683 (Y5 receptor antagonist) on the gastric acid secretion and juice volume

	NS	DMSO	GR-231118(μg)		
			5	15	30
Gastric acid secretion ($\mu\text{Eq/h}$)	104.38 $\pm$ 11.32	99.84 $\pm$ 6.54	94.13 $\pm$ 7.49	71.54 $\pm$ 7.93*	42.31 $\pm$ 5.41***
Juice volume(mL/h)	1.03 $\pm$ 0.27	0.97 $\pm$ 0.14	0.49 $\pm$ 0.15*	0.39 $\pm$ 0.07***	0.39 $\pm$ 0.12**

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. NS, * $P<0.05$ vs. GR-231118 $7.5\ \mu\text{g}$.

表 6 GR-231118 对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响

Table 6 Effects of GR-231118 on the orexin A-induced acid secretion and juice volume

	NS(ICV)	GR-231118(ICV)+orexin(VMH)	
	NS(VMH)	Orexin(VMH)	
Gastric acid secretion($\mu\text{Eq/h}$)	97.83 $\pm$ 12.46	132.67 $\pm$ 14.39*	101.39 $\pm$ 20.74 [#]
Juice volume(mL/h)	0.96 $\pm$ 0.14	2.67 $\pm$ 0.59*	1.69 $\pm$ 0.42 [#]

Note: * $P<0.05$ vs. NS(ICV)+NS(VMH) group, [#] $P<0.05$ vs. NS(ICV)+orexin(VMH) group.

2.7 CGP-71683 对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响

与对照组相比,VMH 微量注射 orexin-A $2\ \mu\text{g}$ 后,胃酸分泌和胃液量增多 ($P<0.05$,表 7),VMH 注射 orexin-A $2\ \mu\text{g}$ 前 5min 侧脑室注射 CGP-71683($5\ \mu\text{g}$),orexin-A 对胃酸分泌和胃液量的促进作用被完全阻断($P<0.05$,表 7)。

2.8 [Pro³⁴]-酪酪肽(Y1/Y5 激动剂)及[cPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹,Aib³²,

Gln³⁴]-胰多肽(Y5 受体激动剂)对胃酸分泌的影响

VMH 内微量注射[Pro³⁴]-酪酪肽($1.5, 3\ \mu\text{g}$)不引起胃酸分泌改变($P>0.05$)。VMH 内微量注射[cPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹,Aib³², Gln³⁴]-胰多肽($6, 12, 24\ \mu\text{g}$)胃酸分泌增多,且呈量效依赖关系($P<0.001\sim 0.05$,表 8)。

表 7 CGP-71683 对 orexin-A 促胃酸分泌作用的影响

Table 7 Effects of CGP-71683 on the orexin A-induced acid secretion and juice volume

	DMSO(ICV)	CGP-71683(ICV)+orexin(VMH)	
	NS(VMH)	Orexin(VMH)	
Gastric acid secretion($\mu\text{Eq/h}$)	99.32 $\pm$ 16.32	131.27 $\pm$ 15.17*	95.19 $\pm$ 9.79 [#]
Juice volume(mL/h)	0.93 $\pm$ 0.19	2.54 $\pm$ 0.21*	0.73 $\pm$ 0.14 [#]

Note: * $P<0.05$ vs. DMSO(ICV)+NS(VMH), [#] $P<0.05$ vs. CGP-71683(ICV)+orexin(VMH).

表 8 [Pro³⁴]-酪酪肽(Y1/Y5 激动剂)及[cPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴]胰多肽(Y5 受体激动剂)对胃酸分泌的影响

Table 8 Effects of Y1/Y5 agonist, [Pro³⁴]-peptide YY, and selective Y5 receptor agonist, [CPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴]-pancreatic polypeptide on the gastric acid secretion

NS	[CPP ¹⁻⁷ , NPY ¹⁹⁻²³ , Ala ³¹ , Aib ³² , Gln ³⁴]-pancreatic polypeptide					[Pro ³⁴]-peptide YY	
		6 μg	12 μg	24 μg		1.5 μg	3 μg
Gastric acid secretion (μEq/h)	91.76± 8.49	128.39± 8.74*	141.26± 16.39** [#]	164.85± 19.27*** [#] △		92.86± 7.93	92.14± 9.32

Note: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. NS group, [#]P<0.05, ^{##}P<0.01 vs. [CPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴]-pancreatic polypeptide 6 μg, △ P<0.05 vs. [CPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴]-pancreatic polypeptide 12 μg.

3 讨论

下丘脑参与摄食及胃酸分泌调控。本研究为了探究 VMH 内的 orexin 神经是否参与调控胃酸分泌,向大鼠 VMH 内注射 orexin-A 后检测大鼠胃酸分泌和胃液量的变化,结果显示 VMH 内注射 orexin-A 2h 后,大鼠胃酸分泌和胃液量增加,呈量效依赖关系。但是给药 3 h 后,大鼠胃酸分泌和胃液量降至正常水平,表明 orexin-A 能够作用于 VMH(饱食中枢)调控胃酸分泌。为了探究 orexin-A 作用于 VMH 促进胃酸分泌的机制,还给予 orexin 与腹腔注射 SB-334867、皮下注射阿托品、侧脑室微量注射 GR-231118 (Y1 受体拮抗剂)、侧脑室微量注射 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)、[Pro³⁴]-酪酪肽(Y1/Y5 激动剂)及[cPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴]胰多肽(Y5 受体激动剂)联合给药,观察大鼠胃酸分泌和胃液量改变。

研究表明 VMH 对胃酸分泌具有抑制作用,如 VMH 损毁大鼠胃酸分泌量明显高于假损毁大鼠^[24],在本研究中采用多种神经通路受体拮抗剂及激动剂证明 VMH 对胃酸分泌的调控作用依赖于神经通路的激活和抑制。orexin-A 高度表达于下丘脑区域,并且参与调控摄食,侧脑室注射 orexin 能够促进摄食^[2,25]。中枢注射 orexin-A 能够促进胃酸分泌^[7],而外周注射 orexin-A 对胃酸分泌没有影响^[26]。在本研究中所获得的结果显示下丘脑腹内侧核是参与 orexin 刺激胃酸分泌作用的脑区之一,VMH 内注射 orexin-A 能够促进胃酸分泌,且呈量效依赖关系。

Orexin 的受体广泛分布于脑内,并且下丘脑前部和腹内侧核表达最多^[9,10]。由于 orexin 的受体分布广泛,为了证明 VMH 中 orexin-A 具有特异性,实验中还给予 SB-334867 非肽类选择性 OX1R 拮抗剂^[27]。研究表明腹腔注射 SB-334867 10mg/kg 能够降低胃酸分泌^[26],但尚不明确 SB-334867 是否仅通过作用于 OX1R 影响胃酸分泌^[27]。OX1R 拮抗剂外周注射可能阻断了内源性 OXA 与 OX1R 在大脑中的结合。结构-功能研究表明 OXA 诱导胃酸分泌增多需要激活 OX1R,OXA 的二硫键可能在受体激活上发挥关键作用^[8]。本研究结果显示预先腹腔注射中高剂量 SB-334867 能够完全阻断 VMH 微量注射 OXA 刺激引起的胃酸分泌(腹腔注射 SB-334867 10 2.5 mg/kg 对胃酸分泌无影响),表明在 VMH 中 OXA 通过 OX1R 促进胃酸分泌。还有研究显示 SB-334867 在中枢神经系统中作用于 OX1R,表明 OX1R 拮抗剂外周注射能够阻断内源性 orexin 与 OX1R 在大脑中的结合^[28,29]。由此可见,内源性 OXA 可能是通过激活 VMH 中的 OX1R 促进胃酸分泌。

迷走神经复合体(DVC)中的神经反射通路接收来自下丘脑 PVN 和 LH 的信号,参与调控胃、胰腺的分泌,并且调控胃肠蠕动^[30,31]。有研究显示脑池内注射 OXA 能够刺激清醒大鼠胃酸分泌,表明 orexin 可能也参与 DVC 对胃肠功能的调控。此外,阿托品能够阻断 OXA 对胃酸分泌的促进作用,并且切断迷走神经后 OXA 对胃酸分泌的促进作用也被阻断^[7],本研究结果与此相吻合,本研究结果发现阿托品不但能够抑制胃酸分泌,而且能够完全拮抗 OXA 对胃酸分泌的促进作用。这表明 orexin-A 的促胃酸作用依赖于迷走神经的传出神经。然而,尚不明确 VMH 注射 OXA 是否通过迷走神经发挥对胃酸分泌的刺激作用。神经肽 Y 是大脑中表达最多的肽类,并且在周围神经系统中也有表达^[32]。哺乳动物下丘脑 NPY 的表达水平最高,特别是室旁核、弓状核、视交叉上核,正中隆起及背内侧核等^[33]。有研究表明侧脑室或下丘脑核团注射 NPY 后摄食量增加^[34],NPY 对摄食的刺激作用受 Y1 和 Y5 受体调节^[35]。本研究结果显示清醒大鼠侧脑室注射 GR-231118(肽 Y1 受体拮抗剂)和/或 CGP-71683(Y5 受体拮抗剂)能够抑制胃酸分泌,表明 NPY Y1 和 Y2 受体参与胃酸分泌的调节,推断 NPY 对摄食的刺激作用可能是通过促进胃酸分泌产生的。此外,GP-71683 5 μg 虽然不影响胃酸分泌,但是能够减少胃液量,表明 CGP-71683 可能参与胃肠道粘膜分泌的调节,能够抑制胃肠道粘膜的分泌作用。侧脑室注射 GR-231118 和 CGP-71683 能够通过脑脊液进入细胞外液,并被转运到附近的核团^[36]。在下丘脑 VMH 中微量注射 Y1/Y5 受体激动剂([Pro³⁴]-酪酪肽)不影响胃酸分泌,而注射 Y5 受体激动剂([cPP¹⁻⁷, NPY¹⁹⁻²³, Ala³¹, Aib³², Gln³⁴]胰多肽)能够增加胃酸分泌,且呈量效依赖关系,表明 NPY 可能是通过作用于 Y5 受体促进胃酸分泌,但是并不能完全排除 Y1 受体不参与胃酸分泌。

综上所述,orexin-A 能够作用于下丘脑 VMH 促进胃酸分泌,orexin 受体、Y1 和 Y5 受体以及迷走神经系统均参与了该过程。

参考文献(References)

- [1] Kirchgeßner AL. Orexin in the brain-gut axis [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23(4): 1-15
- [2] Baimel C, Lau BK, Qiao M, et al. Projection-Target-Defined Effects of Orexin and Dynorphin on VTA Dopamine Neurons [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(6): 1346-1355
- [3] Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, et al. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area[J]. *J Comp Neurol*, 1998, 402(5): 442-459
- [4] Kawami N, Takenouchi N, Umezawa M, et al. Pathogenesis of

- Double-Dose Proton Pump Inhibitor-Resistant Non-Erosive Reflux Disease, and Mechanism of Reflux Symptoms and Gastric Acid Secretion-Suppressive Effect in the Presence or Absence of *Helicobacter pylori* Infection[J]. *Digestion*, 2017, 95(2): 140-145
- [5] Yoon G, Kim HS. Gastric acid response to acute exposure to hypergravity[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 64-69
- [6] Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC, Grundy D. Gastrointestinal Physiology and Function [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2017, [Epub ahead of print]
- [7] Smolinska N, Kiezun M, Dobrzyn K, et al. Adiponectin, orexin A and orexin B concentrations in the serum and uterine luminal fluid during early pregnancy of pigs[J]. *Anim Reprod Sci*, 2017, 178(3): 1-8
- [8] Blais A, Drouin G, Chaumontet C, et al. Impact of Orexin-A Treatment on Food Intake, Energy Metabolism and Body Weight in Mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169908
- [9] Nagase H, Yamamoto N, Yata M, et al. Design and Synthesis of Potent and Highly Selective Orexin 1 Receptor Antagonists with a Morphinan Skeleton and Their Pharmacologies [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(3): 1018-1040
- [10] Kim TK, Han PL. Functional Connectivity of Basolateral Amygdala Neurons Carrying Orexin Receptors and Melanin-concentrating Hormone Receptors in Regulating Sociability and Mood-related Behaviors[J]. *Exp Neurobiol*, 2016, 25(6): 307-317
- [11] Sun H, Wang N, Cang Z, et al. Modulation of Microbiota-Gut-Brain Axis by Berberine Resulting in Improved Metabolic Status in High-Fat Diet-Fed Rats[J]. *Obes Facts*, 2016, 9(6): 365-378
- [12] Shiraishi T. Gastric related properties of rat paraventricular neurons [J]. *Brain Res Bull*, 1987, 18(3): 315-323
- [13] Shiraishi T. Hypothalamic control of gastric acid secretion [J]. *Brain Res Bull*, 1988, 20(6): 791-797
- [14] Muroi Y, Ishii T. A novel neuropeptide Y neuronal pathway linking energy state and reproductive behavior [J]. *Neuropeptides*, 2016, 59(4): 1-8
- [15] Gao S, Zhang J, He C, et al. Molecular characterization of neuropeptide Y (NPY) receptors (Y1, Y4 and Y6) and investigation of the tissue expression of their ligands (NPY, PYY and PP) in chickens[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2017, 240(5): 46-60
- [16] Jeppsson S, Srinivasan S, Chandrasekharan B. Neuropeptide Y (NPY) promotes inflammation-induced tumorigenesis by enhancing epithelial cell proliferation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 312(2): G103-G111
- [17] Tsuneki H, Kon K, Ito H, et al. Timed Inhibition of Orexin System by Suvorexant Improved Sleep and Glucose Metabolism in Type 2 Diabetic db/db Mice[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(11): 4146-4157
- [18] Tan EM, Blackwell MG, Dunne JC, et al. Neuropeptide Y receptor 1 is expressed by B and T lymphocytes and mast cells in infantile haemangiomas[J]. *Acta Paediatr*, 2017, 106(2): 292-297
- [19] Esmaili MH, Reisi Z, Ezzatpanah S, et al. Functional interaction between orexin-1 and CB1 receptors in the periaqueductal gray matter during antinociception induced by chemical stimulation of the lateral hypothalamus in rats[J]. *Eur J Pain*, 2016, 20(10): 1753-1762
- [20] Rasmusson AM. The gut peptide neuropeptide Y and post-traumatic stress disorder [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24(1): 3-8
- [21] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 4th edn[M]. Orlando, FL: Academic Press, 2003
- [22] Waljit SD, Small CJ, Jethwa PH, et al. Paraventricular nucleus administration of calcitonin gene-related peptide inhibits food intake and stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(5): 1420-1425
- [23] Date Y, Nakazato M, Murakami N, et al. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(3): 904-907
- [24] Tominaga S, Satoh S, Nagase HH, et al. Hypergastric acid secretion in rats with ventromedial hypothalamic lesions [J]. *Physiol Behav*, 1993, 53(4): 1177-1182
- [25] Yan P, Jia J, Yang G, et al. Duplication of neuropeptide Y and peptide YY in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and their roles in food intake regulation[J]. *Peptides*, 2017, 88(8): 97-105
- [26] Ehrstrom M, Levin F, Kirchgessner AL, et al. Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin[J]. *Regul Pept*, 2005, 132(4): 9-16
- [27] Gao XB, Horvath TL. Feeding Behavior: Hypocretin/Orexin Neurons Act between Food Seeking and Eating [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(18): R845-R847
- [28] Martin EJ, Hernandez ME, Hayward LF. Blockade of orexin receptors attenuates the cardiovascular response to air-jet stress in spontaneously hypertensive rats[J]. *Auton Neurosci*, 2016, 201(2): 8-16
- [29] Opperhuizen AL, Wang D, Foppen E, et al. Feeding during the resting phase causes profound changes in physiology and desynchronization between liver and muscle rhythms of rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2016, 44(10): 2795-2806
- [30] Loewy AD. Central autonomic pathways. In: Loewy AD, Spyer KM, eds. *Central Regulation of Autonomic Function* [M]. New York, NY: Oxford University Press, 1990: 88-103
- [31] Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1996, 20(3): 189-287
- [32] Domin H, Przykaza Ł, Jantas D, et al. Neuropeptide Y Y2 and Y5 receptors as promising targets for neuroprotection in primary neurons exposed to oxygen-glucose deprivation and in transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neuroscience*, 2017, 344(4): 305-325
- [33] White SL, Volkoff H, Devlin RH. Regulation of feeding behavior and food intake by appetite-regulating peptides in wild-type and growth hormone-transgenic coho salmon[J]. *Horm Behav*, 2016, 84(4): 18-28
- [34] Khan D, Vasu S, Moffett RC, et al. Influence of neuropeptide Y and pancreatic polypeptide on islet function and beta-cell survival [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861(4): 749-758
- [35] Bost A, Shaib AH, Schwarz Y, et al. Large dense-core vesicle exocytosis from mouse dorsal root ganglion neurons is regulated by neuropeptide Y[J]. *Neuroscience*, 2017, 346(3): 1-13
- [36] Kapritsou M, Papathanassoglou ED, Bozas E, et al. Comparative Evaluation of Pain, Stress, Neuropeptide Y, ACTH, and Cortisol Levels Between a Conventional Postoperative Care Protocol and a Fast-Track Recovery Program in Patients Undergoing Major Abdominal Surgery[J]. *Biol Res Nurs*, 2017, 19(2): 180-189