

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.27.007

大鼠 ARC-BMA nesfatin-1 神经通路及对 GD 神经元放电活动和胃运动的影响 *

段秋霞^{1,2} 栾 晓¹ 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 青岛市第三人民医院 山东 青岛 266021)

摘要 目的:探讨弓状核(ARC)-杏仁核(BMA)间 nesfatin-1 神经通路的构成及其对胃牵张敏感(GD)神经放电活动和胃运动的影响。**方法:**逆行追踪结合免疫组化观察 ARC-BMA 间 nesfatin-1 神经通路;细胞外放电记录,观察 nesfatin-1 对 GD 神经元放电活动的影响及电刺激 ARC 对 BMA 内 GD 神经元放电活动的影响;在体胃运动研究,观察 nesfatin-1 对胃运动及胃排空的影响及电刺激 ARC 对胃运动的影响。**结果:**大鼠 ARC-BMA 间存在 nesfatin-1 神经通路;BMA 微量注射 Nesfatin-1 能够促进 GD-E 神经元放电(4.25 ± 1.02 Hz vs. 5.32 ± 1.17 Hz, $P < 0.01$),抑制 GD-I 神经元放电(3.73 ± 0.92 Hz vs. 2.64 ± 0.86 Hz, $P < 0.01$),并且胃收缩频率及幅度下降,nesfatin-1 的这些效应可被 SHU9119 部分阻断;电刺激 ARC 后,BMA 内 nesfatin-1 反应性 GD 神经元放电频率增加(GD-E: 5.14 ± 1.32 Hz vs. 6.75 ± 1.84 Hz, $P < 0.05$; GD-I: 2.84 ± 0.86 Hz vs. 4.05 ± 1.12 Hz, $P < 0.05$),并且胃收缩频率和幅度增强。**结论:**ARC-BMA 间 nesfatin-1 通路可调控大鼠胃牵张敏感神经元放电活动和胃运动,该效应可能与黑色素信号通路有关。

关键词: Nesfatin-1; 杏仁核; 弓状核; 胃牵张敏感神经元; 胃运动

中图分类号: R-33; R338 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)27-5227-06

Nesfatin-1 Signaling in the Basomedial Amygdala Modulates the Gastric Distension-sensitive Neurons Discharge and Decreases Gastric Motility by the Arcuate Nucleus*

DUAN Qiu-xia^{1,2}, LUAN Xiao¹, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, XU Luo^{1Δ}

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

2 The third people's Hospital of Qingdao, Qingdao, Shandong, 266021, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to explore the effects of nesfatin-1 on gastric distension (GD)-sensitive neurons in the basomedial amygdala (BMA) and the potential mechanism for nesfatin-1 to regulate gastric motility through the arcuate nucleus (Arc). **Methods:** The projection of nerve fiber and expression of nesfatin-1 were observed by retrograde tracing and fluo-immunohistochemistry staining; The nuclei microinjection and nuclei electrical stimulation, extracellular discharges of single unit neuron were used to observe the effects of nesfatin-1 on the GD neurons; Gastric motility recording in vivo were used to monitor the effects of nesfatin-1 on the amplitude of constriction and frequency of gastric motility in conscious rats. **Results:** NUCB2/Nesfatin-1/fluorogold-double labeled neurons were from ARC to BMA; Nesfatin-1 could excited the firing rate of most of the GD-E neurons (4.25 ± 1.02 Hz vs. 5.32 ± 1.17 Hz, $P < 0.01$) and decreased the firing rate of most of the GD-I neurons (3.73 ± 0.92 Hz vs. 2.64 ± 0.86 Hz, $P < 0.01$), inhibited the gastric motility, amplitude and frequency, SHU9119 could weaken the responses induced by nesfatin-1; Electrical stimulation of the Arc, the firing rate of nesfatin-1-induced GD-response neurons (GD-E: 5.14 ± 1.32 Hz vs. 6.75 ± 1.84 Hz, $P < 0.05$; GD-I: 2.84 ± 0.86 Hz vs. 4.05 ± 1.12 Hz, $P < 0.05$) and the gastric amplitude and frequency were increase. **Conclusion:** It was suggested that nesfatin-1 in the BMA plays an important role in decreasing gastric motility and the Arc may be involved in this regulation process.

Key words: Nesfatin-1; Amygdala; Arcuate nucleus; Gastric distension responsive neurons; Gastric motility

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

Article ID: 1673-6273(2017)27-5227-06

前言

Nesfatin-1 是一种含有 84 个氨基酸的信号肽,来源于核连

蛋白 2(NUCB2)的水解产物^[1]。研究发现,大鼠脑室内注射 nesfatin-1 后,大鼠摄食量减少,体重降低^[2]。还有研究表明, nesfatin-1 能够作用于大脑,调控胃酸分泌,抑制胃排空及胃运

* 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:段秋霞(1986-),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:2017-03-25 接受日期:2017-04-21)

动^[2-4]。Nesfatin-1 广泛分布于大脑核团,如杏仁核,弓状核(ARC)等^[5]。

杏仁核属于大脑边缘系统,参与调控摄食、胃肠道功能、学习及记忆等多种生理过程^[6-8]。杏仁核又分为外侧杏仁核、杏仁基底外侧核、杏仁基底内侧核、杏仁内侧核及中央杏仁核,每一部分具有不同的生理功能^[9]。杏仁基底内侧核(BMA)和中央杏仁核主要参与调控摄食及胃排空。BMA 与下丘脑、丘脑以及海马间具有神经联系^[10],这些神经联系有助于 BMA 参与调控胃肠功能、内分泌及情感等生理功能。下丘脑是中枢神经系统(CNS)的重要组成部分,参与调控摄食和能量平衡^[11]。ARC 位于下丘脑底部,分布于第三脑室两侧,是非常重要的整合中心^[12]。

目前,尚未有研究表明 BMA 内 nesfatin-1 参与调控胃运动。本研究旨在观察 BMA 注射 nesfatin-1 后,胃牵张敏感神经元放电活动及胃运动的改变,证明 ARC 和 BMA 间是否存在 nesfatin-1 神经通路,探讨 ARC 是否能够调控 BMA 内 nesfatin-1 的生理作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

262 只雄性 Wistar 大鼠,250-300 g,室温控制在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,12 h 昼夜循环光照,饮食自由。

1.2 大鼠置管

实验开始前 3 天,大鼠经腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/Kg)麻醉后置于脑立体定位仪(Narashige SN-3)。参考 Paxinos & Watson 脑图谱^[13](图 1G)分别向 ARC(前囟后 2.12-4.3 mm,旁开 0.2-0.5 mm,深 9.8-10.3 mm),BMA(前囟后 1.8-2.8 mm,旁开 3.6-4.6 mm,深 8.8-9.5 mm),腹内侧核(VMH,前囟后 2.26-3.00 mm,旁开 0.1-1.2 mm,深 8.6-10.0 mm),RChL(前囟后 1.80-2.52 mm,旁开 0.5-1.6 mm,深 9.8-10.2 mm)植入一不锈钢套管,使用牙托粉将套管固定于颅骨。

1.3 逆行追踪和荧光免疫组化

随机选取 6 只大鼠,经腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/Kg)麻醉后置于脑立体定位仪,定位 BMA 后使用牙科钻钻透颅骨挑破硬脑膜,用微量进样器缓慢注入 0.2 μL 3% FG。饲养 7 天后灌注固定取脑,制作 14 μm 厚的冰冻切片。选取合适脑切片进行 nesfatin-1 免疫荧光染色,在 BX50 型显微镜下用 DP50 型相机对染色结果进行拍照。

1.4 细胞外放电记录

向胃内植入气球以及颅脑手术步骤参照前文描述^[14]。向 BMA 植入一 4 管玻璃微电极(尖端直径 3-10 μm ,阻抗 5-15 M Ω),向 ARC 植入一单电极刺激器,电刺激 ARC 参数:0.5 ms 波宽,20 μA 强度,50 Hz 频率,持续 10 s。对照组给予假电刺激,即只埋藏电极不通电。

4 管玻璃微电极分别用作细胞外电生理记录和微量注射,作为记录用的电极内充满 2.0%的滂胺天蓝和 0.5 M 乙酸钠,另外 3 管分别充以 10 nmol nesfatin-1、25 nmol SHU9119 以及生理盐水,与三通液压推进泵相连,药物使用短脉冲气压(1500 ms, 5.0-15.0 psi)喷洒至细胞表面^[15]。

在预实验中,为了测试 nesfatin-1 对神经元放电的影响,我们使用了不同浓度的 nesfatin-1 (0.1,1.0,10.0,30,50 或 100

nmol/L),最终选择最大效应浓度的一半(Pec50,10 nmol/L)作为实验浓度。为了测试 SHU9119 对 10 nmol/L nesfatin-1 的拮抗作用,我们使用不同浓度的 SHU9119 (5,10,20,25,30,35,40 nmol/L),实验数据表明,SHU9119 浓度为 10-40 nmol/L 时能够部分拮抗 nesfatin-1 的效应,其中在 25,30,35 以及 40 nmol/L 浓度下,SHU9119 对 nesfatin-1 的拮抗作用没有明显差异。最终实验室中选用 25 nmol/L 作为 SHU9119 的实验浓度。

使用液压推进器将微电极送至 BMA 区域后,开始采集信号,信号经微电极放大器(MEZ-8201 型)输入 VC-11 双道示波器后再经 SUMP-PC 生物信号系统进行放电频率处理与分析。以 20%为判断标准,刺激后神经元放电频率增加 20%以上确定为 GD 兴奋型神经元(GD-E),而刺激后神经元放电频率减弱 20%以上确定为 GD 抑制型神经元(GD-I)。

1.5 清醒大鼠胃运动记录

禁食 18 h 后,大鼠经腹腔注射 10%水合氯醛(3 mL/Kg)麻醉后置于脑立体定位仪(Narashige SN-3),在 BMA 植入注射用不锈钢套管,在 ARC 植入刺激用套管。根据已有文献,大鼠行腹正中切口,植入应力传感器^[16],术后大鼠恢复三天再进行下一步实验。胃运动实验开始前,大鼠禁食 18 h 但不限制饮水,给药前先记录 30 min 大鼠胃收缩波幅度与频率,给药后记录 60 min。

随机选取 48 只大鼠,分为 6 组每组 8 只,分别给予 0.5 μL nesfatin-1 (0.05,0.5,5.0 μg),0.5 μL SHU9119 (0.25 μg),0.5 μL 混合液(0.5 μg nesfatin-1+0.25 μg SHU9119)以及生理盐水 0.5 μL 。

1.6 组织学检查

实验结束后通过微电极微量注射滂胺天蓝标记微电极位置,大鼠灌注固定后取脑,制作 50 μm 厚的冰冻切片,中性红染色后观察电极位置,删除电极位置不准确大鼠的实验数据。

1.7 胃排空实验

根据已有文献配置苯酚红溶液^[17]。随机选择 30 只大鼠,分为 6 组每组 5 只,在胃排空实验前 18 h 禁食,分别向 BMA 注射 0.5 μL nesfatin-1 (0.05,0.5,5.0 μg),0.5 μL SHU9119 (0.25 μg),0.5 μL 混合液(0.5 μg nesfatin-1+0.25 μg SHU9119)以及生理盐水 0.5 μL 。给药后大鼠灌胃 1.5 mL 苯酚红溶液,灌胃后 20 min,处死大鼠。采集胃内容物,根据苯酚红浓度计算大鼠胃排空率。

$$20 \text{ min 内胃排空率}(\%) = (1 - \text{胃内容物}) \times 100\%$$

1.8 统计学分析

实验中数据以 $\bar{X} \pm \text{SEM}$ 表示,数据的统计分析使用 Prism5.0,两组间使用 T 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 ARC-BMA nesfatin-1 神经通路

向 BMA 注射 FG 后 7 天,大鼠灌注固定取脑,制作冰冻切片,在 ARC 发现 FG 标记的神经元(图 1A)。在同一切片上进行 nesfatin-1 免疫荧光染色,荧光显微镜下可见红色荧光 nesfatin-1 免疫阳性神经细胞(图 1B),其中,部分部分 nesfatin-1 免疫阳性神经细胞也被 FG 标记(图 1C)。

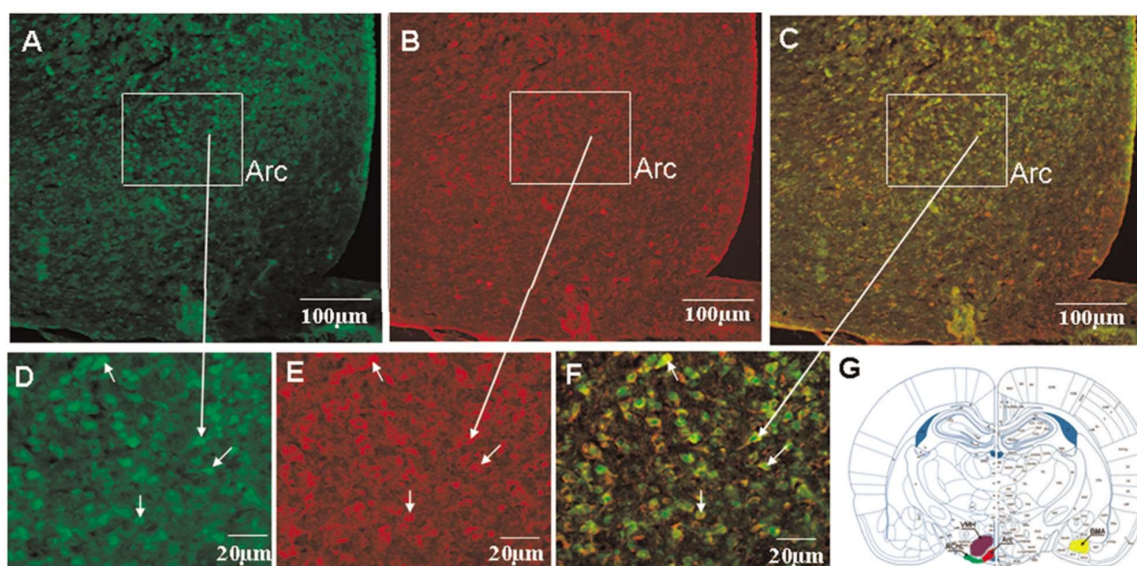


图1 ARC内FG和nesfatin-1双标神经元。BMA微量注射FG后,被FG标记的神经元(A,D)及nesfatin-1阳性神经元(B,E)在ARC的同一切片发现(C,F)。在ARC同一张切片发现nesfatin-1阳性神经元被FG标记。(G)BMA, Arc, VMH以及RChL在大鼠脑图谱中的位置。

Fig.1 The expression of FG- and nesfatin-1-immunoreactive neurons in the Arc. After FG injection to the BMA, FG-labeled cells (A, D) and nesfatin-1 neurons (B, E) were found in the Arc in the same slice. (C, F) Double visualization of FG-labeled cells and nesfatin-1-containing neurons in the Arc in the same section. (G) Exhibited a schematic diagram for the sites of the BMA, Arc, VMH and RChL^[13].

2.2 Nesfatin-1 和 SHU9119 对 BMA 内 GD 神经元放电活动的影响

胃牵张刺激后,在 58 只大鼠的 BMA 共记录到 106 个 GD 敏感神经元,其中有 62 个 GD-E 神经元,44 个 GD-I 神经元。向 BMA 微量注射 nesfatin-1 后,BMA 内的 62 个 GD-E 神经元中,有 30(30/62,48.4%)的 GD-E 神经元放电频率增强($4.25 \pm 1.02\text{Hz}$ vs. $5.32 \pm 1.17\text{Hz}$, $P < 0.01$,图 2),增幅 $25 \pm 6.8\%$,另有 17 个 GD-E 神经元放电频率降低和 15 个 GD-E 神经元放电频率无变化;44 个 GD-I 神经元中,有 23(23/44,52.3%)的 GD-I 神经元放电频率降低 ($3.73 \pm 0.92\text{Hz}$ vs. $2.64 \pm 0.86\text{Hz}$, $P < 0.01$,图 2),减幅 $21 \pm 5.7\%$,另有 13 个 GD-I 神经元放电频率增加和 8 个 GD-I 神经元放电频率无变化。以上结果表明,nesfatin-1 能够影响约 50% 的 GD 神经元放电频率,另一些 GD 神经元可能受其他的神经递质调控,这与已有文献结果相符^[14,18,19]。实验中,我们还研究了 SHU9119(黑皮质素 3/4 受体拮抗剂)对 BMA 内 nesfatin-1 反应的 GD 神经元放电活动的影响,预先注射 SHU9119 后,nesfatin-1 对 GD 神经元放电活动的影响被部分阻断($P < 0.05$,图 2),单独注射 SHU9119 并不能引起 GD 神经元放电活动改变。

2.3 BMA 微量注射 nesfatin-1 和 SHU9119 对胃运动的影响

由于 nesfatin-1 能够影响 GD 神经元放电活动,所以我们推测 nesfatin-1 可能也能够影响胃运动,故在实验中,我们向 BMA 内注射不同剂量的 nesfatin-1(0.05,0.5,5.0 μg),与生理盐水组相比,胃收缩频率及幅度下降($P < 0.05-0.01$,图 3),且量效依赖关系。给药后约 5 min 后胃收缩幅度开始发生变化,胃收缩幅度下降分别持续 5-10 min,10-15 min,10-20 min。与单独注射 0.5 μg nesfatin-1 组相比,注射 0.5 μg nesfatin-1 和 0.25 μg SHU9119 混合液后,胃收缩频率和收缩幅度上升($P < 0.05$,图 3)。单独给予生理盐水或 SHU9119 胃收缩频率和幅度不发生明显改变。

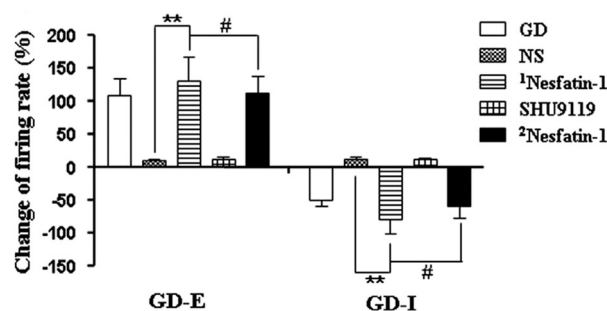


图2 Nesfatin-1 和 SHU9119 对 BMA 内 GD 神经元放电活动的影响。

** $P < 0.01$ vs. NS and # $P < 0.05$ vs. 1nesfatin-1.

Fig.2 The change of firing rate (%) of GD-responsive neurons in the BMA induced by nesfatin-1 and SHU9119.

** $P < 0.01$ vs. NS and # $P < 0.05$ vs. 1nesfatin-1.

2.4 电刺激 ARC 对 BMA 内 GD 神经元放电频率的影响

逆行追踪和荧光免疫组化结果表明,ARC 中有向 BMA 投射的 nesfatin-1 阳性神经元,为了验证 ARC 是否参与调控 BMA 内 nesfatin-1 反应的 GD 神经元放电活动,在实验中分别电刺激 ARC 观察 BMA 内 nesfatin-1 反应的 GD 神经元放电活动,向 BMA 注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC 观察 BMA 内 nesfatin-1 反应的 GD 神经元放电活动。

在 63 只大鼠中记录到的 185 个神经元中有 114 个(61.62%)GD 神经元,其中有 GD-E 神经元 68 个,GD-I 神经元 46 个。

注射 nesfatin-1 后,68 个 GD-E 神经元中有 35 个(35/68,51.5%)放电频率增加,标记为 nesfatin-1 反应的 GD-E 神经元,电刺激 ARC 后,24 个(24/35,68.6%)nesfatin-1 反应的 GD-E 神经元放电频率增加 ($5.14 \pm 1.32\text{Hz}$ vs. $6.75 \pm 1.84\text{Hz}$, $P < 0.05$,图 4),增幅 $36 \pm 8.5\%$,另有 6 个神经元放电频率降低和 5 个神经元放电频率无明显改变。预先向 BMA 内注射抗

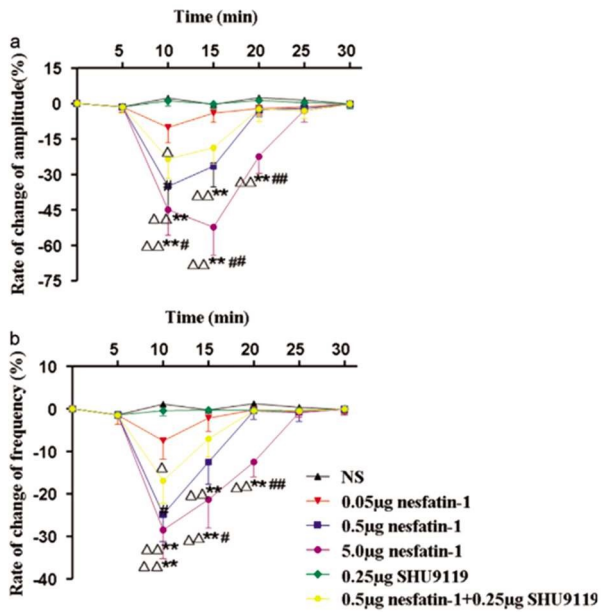


图3 BMA 微量注射 nesfatin-1 和 SHU9119 对胃运动的影响。

a:胃运动幅度。b:胃运动频率

Δ P<0.05, ΔΔ P<0.01 vs. NS group; *P<0.05, **P<0.01 vs. 0.05 μg nesfatin-1 group; #P<0.05, ##P<0.01 vs. 0.5 μg nesfatin-1 group

Fig.3 Effects of nesfatin-1 and SHU9119 injection at the BMA on gastric motility.

a: the amplitude. b: the frequency

Δ P<0.05, ΔΔ P<0.01 vs. NS group; *P<0.05, **P<0.01 vs. 0.05 μg nesfatin-1 group; #P<0.05, ##P<0.01 vs. 0.5 μg nesfatin-1 group

NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC, 12 个 (12/24, 50%) 神经元放电频率降低 (6.54 ± 1.92 Hz vs. 5.73 ± 1.24 Hz, $P < 0.05$, 图 4)。

注射 nesfatin-1 后, 46 个 GD-I 神经元中有 21 个 (21/46, 45.7%) 放电频率降低, 标记为 nesfatin-1 反应的 GD-I 神经元, 电刺激 ARC 后, 15 个 (15/21, 71.4%) nesfatin-1 反应的 GD-I 神经元放电频率增加 (2.84 ± 0.86 Hz vs. 4.05 ± 1.12 Hz,

$P < 0.05$, 图 4), 增幅 $157 \pm 43.8\%$, 另有 4 个神经元放电频率降低和 2 个神经元放电频率无明显改变。预先向 BMA 内注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC, 7 个 (7/15, 46.7%) 神经元放电频率增加 (3.92 ± 0.87 Hz vs. 5.11 ± 1.23 Hz, $P < 0.05$, 图 4)。单独注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体并不能引起 nesfatin-1 反应 GD 神经元放电活动改变。

为了研究 ARC 对 BMA 内 GD 神经元放电活动的调控是否具有特异性, 实验中还电刺激了 ARC 周边核团, 如 VMH 或 RChL。随机选取 15 只大鼠, 分为 3 组: 电刺激 ARC 组 ($n=5$), 电刺激 VMH 组 ($n=5$) 以及电刺激 RChL 组 ($n=5$)。结果表明, 与假电刺激组相比, 电刺激 VMH 后 BMA 内 nesfatin-1 反应 GD 神经元放电频率增加 ($P < 0.05$), 但是增加幅度小于电刺激 ARC 组 ($P < 0.05$); 而电刺激 RChL 不引起 BMA 内 nesfatin-1 反应 GD 神经元放电频率改变 ($P > 0.05$)。

2.5 电刺激 ARC 对胃运动的影响

随机选取 42 只大鼠, 分为 6 组每组 7 只: 假电刺激组 (SS); 电刺激组 (ES), 兔血清 + 假电刺激组 (NR+SS); 兔血清 + 电刺激组 (NR+ES); 抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体 + 假电刺激组 (anti-Nn-Ab+SS); 抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体 + 电刺激组 (anti-Nn-Ab+ES)。

共记录 60 min 清醒大鼠胃运动情况。实验结果表明, 电刺激 ARC 后 3 min 胃收缩频率增加, 收缩幅度增强, 并且在刺激后的第 13 min 胃收缩频率和幅度达到最大。与 NR+ES 组相比, anti-Nn-Ab+ES 组大鼠胃收缩频率及胃收缩幅度增强 ($P < 0.05$, 图 5)。单独给予生理盐水或抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体不能引起胃运动改变。

2.6 BMA 注射 nesfatin-1、SHU9119 对胃排空的影响

与生理盐水组相比, BMA 内注射 nesfatin-1 (0.05, 0.5, 5.0 μg) 后胃排空率降低, 且呈量效依赖关系 ($P < 0.05-0.01$, 图 6)。与 0.5 μg nesfatin-1 组相比, BMA 内注射 0.5 μL 0.5 μg nesfatin-1 和 0.5 μg SHU9119 混合液组胃排空增强 ($P < 0.05$, 图 6)。

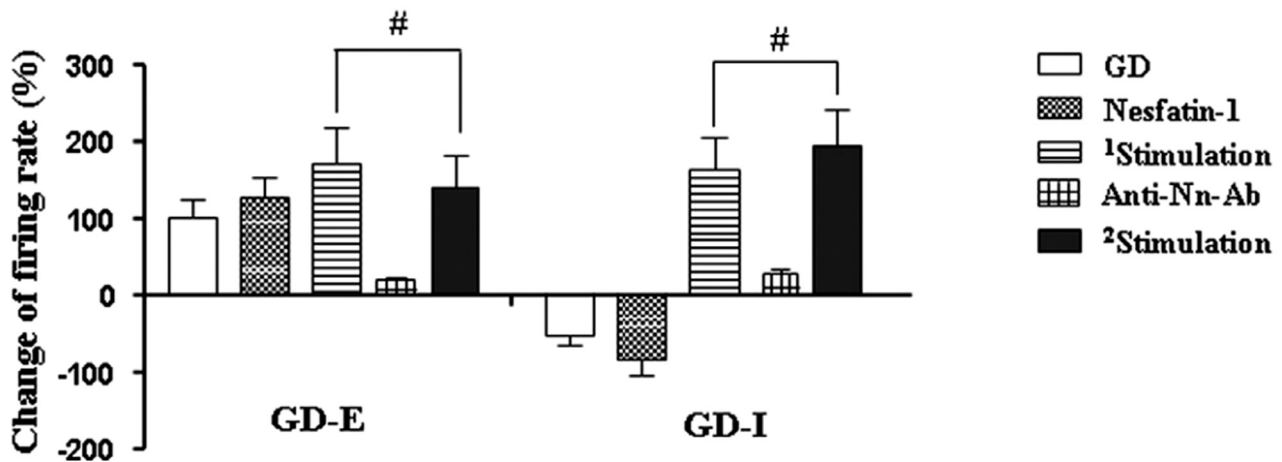


图4 电刺激 ARC 对 BMA 内 GD 神经元放电频率的影响

#P<0.05 vs. 1stimulation.

Fig.4 Effects of electrical stimulation of the Arc on the discharges of nesfatin-1-responsive GD neurons in the BMA

#P<0.05 vs. 1stimulation.

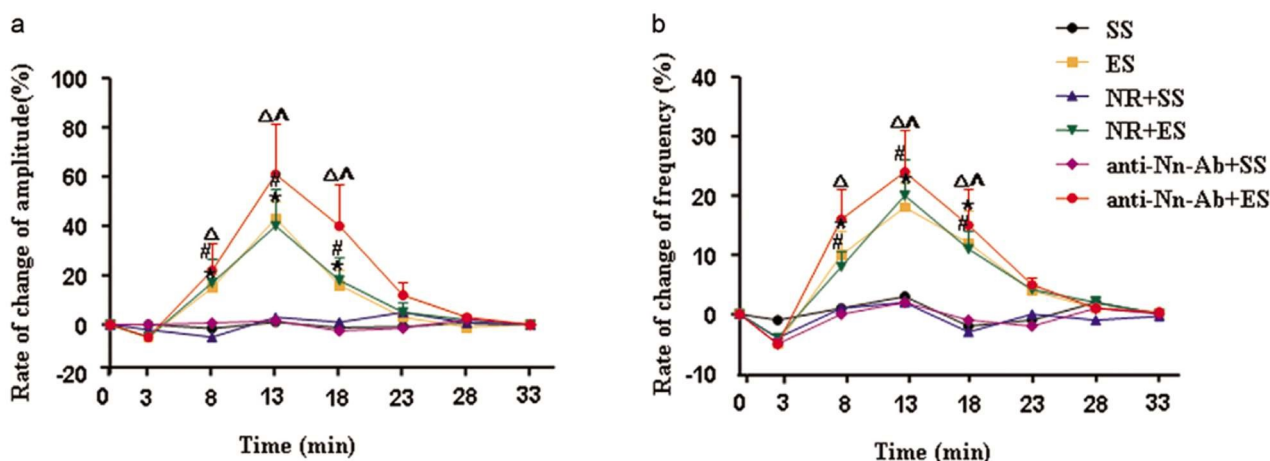


图5 电刺激 ARC 对胃运动的影响

a:胃运动幅度。b:胃运动频率

*P<0.01 vs. SS group. #P<0.01 vs. NR+SS group. Δ P<0.01 vs. anti-Nn-Ab+SS group. ^P<0.05 vs. NR+ES group.

Fig.5 Effects of electrical stimulation of the arc on gastric motility

a: the amplitude. b: the frequency

*P<0.01 vs. SS group. #P<0.01 vs. NR+SS group. Δ P<0.01 vs. anti-Nn-Ab+SS group. ^P<0.05 vs. NR+ES group.

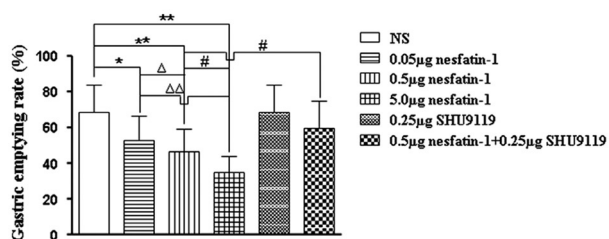


图6 BMA 注射 nesfatin-1、SHU9119 对胃排空的影响

*P<0.05, **P<0.01 vs. NS group. Δ P<0.05, Δ Δ P<0.01 vs. 0.05 μg nesfatin-1. #P<0.05 vs. 0.5 μg nesfatin-1.

Fig.6 Effects of nesfatin-1 and SHU9119 administration to the BMA on gastric emptying

*P<0.05, **P<0.01 vs. NS group. Δ P<0.05, Δ Δ P<0.01 vs. 0.05 μg nesfatin-1. #P<0.05 vs. 0.5 μg nesfatin-1.

3 讨论

本研究发现,BMA 内分布有 GD 敏感神经元。向 BMA 微量注射 nesfatin-1 后,BMA 内 GD-E 神经元放电频率增强而 GD-I 神经元放电频率降低,预先注射 SHU9119 后,nesfatin-1 对 GD 神经元放电活动的影响被部分阻断。BMA 内注射 nesfatin-1 大鼠胃收缩频率及幅度下降,且呈量效依赖关系,nesfatin-1 对胃运动的影响同样能够被 SHU9119 部分阻断。电刺激 ARC 后,nesfatin-1 反应性 GD-E 神经元放电频率增加并且 nesfatin-1 反应性 GD-I 神经元放电频率也增加。预先向 BMA 内注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC,nesfatin-1 反应性 GD 神经元放电频率进一步增加。电刺激 ARC 后 3 min 胃收缩频率增加,收缩幅度增强,并且在刺激后的第 13 min 胃收缩频率和幅度达到最大。预先向 BMA 内注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC 大鼠胃收缩频率及胃收缩幅度进一步增强。BMA 内注射 nesfatin-1 后胃排空率降低,且呈量效依赖关系。BMA 内注射 nesfatin-1 和 SHU9119 混合液组胃排空增强。逆行追踪和荧光免疫组化结果表明,ARC

和 BMA 间存在 nesfatin-1 神经通路。以上结果表明,ARC 内有投射至 BMA 的 nesfatin-1 神经通路,该通路参与调控胃运动。Nesfatin-1 是一种具有 82 个氨基酸的抑食肽^[1]。Nesfatin-1 的氨基酸序列在人类和老鼠间具有高度保守性,广泛表达于下丘脑的核团中,如室旁核、视上核、ARC 等^[1,20]。Nesfatin-1 还表达于大脑的其他一些重要脑区,如杏仁核、孤束核、迷走神经背核等^[5,21]。还有研究发现,除了大脑以外,外周循环系统也能够表达 NUCB2/nesfatin-1,如啮齿动物的胃肠道和胰腺等^[22-24]。NUCB2 共有三种水解产物,分别是 nesfatin-1、nesfatin-2 和 nesfatin-3,其中只有 nesfatin-1 具有抑食作用^[1]。最初为了研究 nesfatin-1 的抑食作用与瘦素的关系,使用具有瘦素缺陷的 Zucker 大鼠,研究发现,nesfatin-1 的抑食作用不依赖于瘦素系统^[1],研究还发现瘦素不影响下丘脑 NUCB2 mRNA 的表达^[1]。还有研究表明,脑室内注射黑皮质素 3/4 受体拮抗剂 SHU9119 能够部分阻断 nesfatin-1 的抑食效应^[1,25]。最近研究发现,小鼠中枢注射 nesfatin-1 能够抑制胃及十二指肠运动^[26]。本研究发现,BMA 微量注射 nesfatin-1 后,BMA 内 GD-E 神经元放电频率增加,GD-I 神经元放电频率降低,而且胃运动也减弱,并且呈量效依赖关系,但是 SHU9119 能够部分阻断 nesfatin-1 的这些效应。以上结果表明,nesfatin-1 可能通过激活 BMA 内的黑皮质素神经通路调控胃运动。

杏仁核主要参与记忆和情感过程,在奖赏通路、学习以及胃肠道功能调控过程中也具有重要作用^[19,27]。还有研究发现,杏仁核能够与下丘脑、间脑、边缘系统协同调控摄食^[28]。BMA 神经元能够表达包括 nesfatin-1、黑皮质素以及促肾上腺皮质激素释放因子(CRF)在内的多种肽类^[29],已经证明这些肽类参与调控胃运动及分泌^[30,31]。但是关于 nesfatin-1 在 BMA 内作用的研究较少。杏仁核是大脑重要的脑区,参与情感因素引起的胃肠功能障碍^[32]。BMA 内的 nesfatin-1 可能也参与压力引起的胃肠功能紊乱过程。本研究发现,BMA 内分布有 GD 敏感神经元。向 BMA 微量注射 nesfatin-1 后,BMA 内 GD-E 神经元放电频

率增强而 GD-I 神经元放电频率降低, 预先注射 SHU9119 后, nesfatin-1 对 GD 神经元放电活动的影响被部分阻断。BMA 内注射 nesfatin-1 大鼠胃收缩频率及幅度下降, 且呈量效依赖关系, nesfatin-1 对胃运动的影响同样能够被 SHU9119 部分阻断。BMA 内注射 nesfatin-1 后胃排空率降低, 且呈量效依赖关系。BMA 内注射 nesfatin-1 和 SHU9119 混合液组胃排空增强。

ARC, 位于下丘脑底部, 分布于第三脑室两侧, 是下丘脑调控摄食的重要核团。由于 ARC 临近正中隆起, 所以 ARC 具有收集并且整合中枢神经和外周血液信号的功能。ARC 内有具有内分泌作用的神经元, 不但能够分泌促食欲, 如 ghrelin^[33]、神经肽 Y^[34], 还能够表达抑制摄食的 nesfatin-1 和阿片-促黑素细胞皮质素原^[35]。根据逆行追踪和荧光免疫组化结果, 我们发现 ARC 内分布有向 BMA 投射的 nesfatin-1 神经元。本研究发现, 电刺激 ARC 后, BMA 内 nesfatin-1 反应性 GD-E 神经元放电频率增加并且 nesfatin-1 反应性 GD-I 神经元放电频率也增加。预先向 BMA 内注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC, nesfatin-1 反应性 GD 神经元放电频率进一步增加。电刺激 ARC 后 3 min 胃收缩频率增加, 收缩幅度增强, 并且在刺激后的第 13 min 胃收缩频率和幅度达到最大。预先向 BMA 内注射抗 NUCB2/nesfatin-1 抗体后再电刺激 ARC 大鼠胃收缩频率及胃收缩幅度进一步增强。逆行追踪和荧光免疫组化结果表明, ARC 和 BMA 间存在 nesfatin-1 神经通路。以上结果表明, ARC 内有投射至 BMA 的 nesfatin-1 神经通路, 该通路参与调控胃运动。

综上所述, ARC 内 NUCB2/nesfatin-1 神经元可能参与胃运动, BMA 可能参与这个调控过程。

参考文献(References)

- [1] Oh-IS, ShimizuH, SatohT, et al. Identification of NUCB2/nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus [J]. Nature, 2006, 443(7112): 709-712
- [2] Bertucci JI, Blanco AM, Canosa LF, et al. Glucose, amino acids and fatty acids directly regulate ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 in the intestine and hepatopancreas of goldfish (Carassius auratus) in vitro[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2017, 206(1): 24-35
- [3] Feng H, Wang Q, Guo F, et al. Nesfatin-1 influences the excitability of gastric distension-responsive neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus of rats[J]. Physiol Res, 2016[Epub ahead of print]
- [4] Xia ZF, Fritze D M, Li JY, et al. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats [J]. Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver, 2012, 303(4): G570-G577
- [5] Goebel-Stengel M, Wang LX, Stengel A, et al. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication [J]. Brain Res, 2011b, 1396(C): 20-34
- [6] Wellman LL, Fitzpatrick ME, Machida M, et al. The basolateral amygdala determines the effects of fear memory on sleep in an animal model of PTSD[J]. Exp. Brain Res, 2014, 232(6): 1555-1565
- [7] Mátyás F, Lee J, Shin HS, et al. The fear circuit of the mouse forebrain: connections between the mediodorsal thalamus, frontal cortices and basolateral amygdala [J]. Eur. J. Neurosci, 2014, 39 (4): 1810-1823
- [8] Shaylor LA, Hwang SJ, Sanders KM, et al. Convergence of inhibitory neural inputs regulate motor activity in the murine and monkey stomach [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016, 311 (5): G838-G851
- [9] Pitkanen A, Savander V, LeDoux JE. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(11): 517-523
- [10] Gouw AM, Efe G, Barakat R, et al. Roles of estrogen receptor-alpha in mediating life span: the hypothalamic deregulation hypothesis[J]. Physiol Genomics, 2017, 49(2): 88-95
- [11] Snowball RK, Semenenko FM, Lumb. BMVisceral inputs to neurons in the anterior hypothalamus including those that project to the periaqueductal gray: a functional anatomical and electrophysiologic study [J]. Neuroscience, 2000, 99(5): 351-361
- [12] Bromek E, Wójcikowski J, Daniel WA. Involvement of the paraventricular (PVN) and arcuate (ARC) nuclei of the hypothalamus in the central noradrenergic regulation of liver cytochrome P450 [J]. Biochem. Pharmacol, 2013, 86(4): 1614-1620
- [13] Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates[M]. Academic Press Inc, 2007
- [14] Xu L, Sun X, Depoortere I, et al. Effect of motilin on the discharge of rat hippocampal neurons responding to gastric distension and its potential mechanism[J]. Peptides, 2008, 29(4): 585-592
- [15] Chen CY, Tsai CY. Ghrelin and motilin in the gastrointestinal system [J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(31): 4755-4765
- [16] Lu Y, Zhong F, Wang X, et al. Mechanism of motilin-mediated inhibition on voltage-dependent potassium currents in hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 2015, 284(1): 374-380
- [17] Hellström PM, Samuelsson B, Al-Ani AN, et al. Normal gastric emptying time of a carbohydrate-rich drink in elderly patients with acute hip fracture: a pilot study[J]. BMC Anesthesiol, 2017, 17(1): 23-29
- [18] Kohno D, Koike M, Ninomiya Y, et al. Sweet Taste Receptor Serves to Activate Glucose- and Leptin-Responsive Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and Participates in Glucose Responsiveness[J]. Front Neurosci, 2016, 10(1): 502-506
- [19] Feng X, Peeters TL, Tang M. Motilin activates neurons in the rat amygdala and increases gastric motility [J]. Peptides, 2007, 28 (5): 625-631
- [20] Nakata M, Gantulga D, Santoso P, et al. Paraventricular NUCB2/Nesfatin-1 Supports Oxytocin and Vasopressin Neurons to Control Feeding Behavior and Fluid Balance in Male Mice [J]. Endocrinology, 2016, 157(6): 2322-2332
- [21] Imbrogno S, Angelone T, Cerra MC. Nesfatin-1 and the Cardiovascular System: Central and Peripheral Actions and Cardioprotection[J]. Curr Drug Targets, 2015, 16(8): 877-883
- [22] Foo KS, Brauner H, Ostenson CG, et al. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state[J]. J Endocrinol, 2010, 204(4): 255-263
- [23] Størling J, Pociot F. Type 1 Diabetes Candidate Genes Linked to Pancreatic Islet Cell Inflammation and Beta-Cell Apoptosis [J]. Genes (Basel), 2017, 8(2)
- [24] Kim J, Chung Y, Kim H, et al. The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse[J]. Dev Reprod, 2014, 18(4): 301-309

- interleukin-7 receptor expression via NF- κ B and Notch1 pathway to facilitate proliferation and migration of hepatitis B virus-related hepatoma cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 172
- [20] Yu LX, Zhou L, Li M, et al. The Notch1/cyclooxygenase-2/Snail/E-cadherin pathway is associated with hypoxia-induced hepatocellular carcinoma cell invasion and migration [J]. Oncol Rep, 2013, 29(1): 362-370
- [21] 刘建中, 胡广军, 时玲玲, 等. Notch 信号通路在肝癌细胞迁移过程中的作用及机制[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(19): 2730-2733
Liu Jian-zhong, Hu Guang-jun, Shi Ling-ling, et al. The mechanism of Notch signaling pathway in the migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. Journal of Modern Oncology, 2015, 23(19): 2730-2733
- [22] Zhou L, Wang DS, Li QJ, et al. The down-regulation of Notch1 inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by inactivating the cyclooxygenase-2/Snail/ E-cadherin pathway in vitro [J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(4): 1016-1025
- [23] Favaretto RL, Bahadori A, Mathieu R, et al. Prognostic role of decreased E-cadherin expression in patients with upper tract urothelial carcinoma: a multi-institutional study [J]. World J Urol, 2017, 35(1): 113-120
- [24] 倪卓然, 谢坤, 赵红川, 等. 肝细胞癌组织中 Shh、Gli1、Snail、E-cadherin 表达的临床研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(4): 536-540, 541
Ni Zhuo-ran, Xie Kun, Zhao Hong-chuan, et al. Clinical research of Shh, Gli1, Snail, E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma tissues [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2016, 51 (4): 536-540, 541
- [25] Majumder M, Xin X, Liu L, et al. COX-2 Induces Breast Cancer Stem Cells via EP4/PI3K/AKT/NOTCH/WNT Axis [J]. Stem Cells, 2016, 34(9): 2290-2305
- [26] 王颢, 刘宏斌, 韩晓鹏, 等. siRNA 靶向沉默胃癌 MKN45 细胞 COX-2 基因对 Notch 基因表达的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(9): 2010-2013
Wang Jing, Liu Hong-bin, Han Xiao-peng, et al. The effect of silencing COX -2 genes on Notch signaling pathway of human gastric cancer MKN45 cell line [J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(9): 2010-2013
- [27] Brzozowa M, Mielańczyk L, Michalski M, et al. Role of Notch signaling pathway in gastric cancer pathogenesis [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2013, 17(1): 1-5
- [28] Yang JJ, Tao H, Liu LP, et al. miR-200a controls hepatic stellate cell activation and fibrosis via SIRT1/Notch1 signal pathway[J]. Inflamm Res, 2017, 66(4): 341-352
- [29] 黄建强, 常瑞明, 温立强, 等. E-cadherin 在肝癌组织中的表达及其对肝癌患者预后的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(22): 2301-2303
Huang Jian-qiang, Chang Rui-ming, Wen Li-qiang, et al. E-cadherin expression in hepatocellular carcinoma and its effect on patients' prognosis and survival: report of 79 cases[J]. Journal of third military medical university, 2014, 36(22): 2301-2303
- [30] Yang HJ, Jiang JH, Yang YT, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with initiation of hepatocellular carcinoma, while prostaglandin receptor-1 expression predicts survival [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(39): 8798-8805
- (上接第 5232 页)
- [25] Dore R, Levata L, Lehnert H, et al. Nesfatin-1: functions and physiology of a novel regulatory peptide [J]. J Endocrinol, 2017, 232(1): R45-R65
- [26] Goebel-Stengel M, Stengel A. Role of Brain NUCB2/nesfatin-1 in the Stress-induced Modulation of Gastrointestinal Functions [J]. Curr Neuropharmacol, 2016, 14(8): 882-891
- [27] Argue KJ, VanRyzin JW, Falvo DJ, et al. Activation of Both CB1 and CB2 Endocannabinoid Receptors Is Critical for Masculinization of the Developing Medial Amygdala and Juvenile Social Play Behavior [J]. eNeuro, 2017, 4(1): 344-346
- [28] Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system[J]. Cell Mol Life Sci, 2017[Epub ahead of print]
- [29] Ilić IR, Petrović A, Živković VV, et al. Immunohistochemical features of multifocal and multicentric lobular breast carcinoma [J]. Adv Med Sci, 2017, 62(1): 78-82
- [30] Hegde ML, Bohr VA, Mitra S. DNA damage responses in central nervous system and age-associated neurodegeneration [J]. Mech Ageing Dev, 2017, 161(Pt A): 1-3
- [31] Tang M, Su HL, Li CL. Inhibition of gastric motility by microinjection of CCK-8 into rat amygdala [J]. Sheng Li Xue Bao, 1997, 49(8): 569-574
- [32] Fukudo S, Suzuki J. Colonic motility, autonomic function, and gastrointestinal hormones under psychological stress on irritable bowel syndrome[J]. Tohoku J. Exp. Med, 1987, 151(3): 373-385
- [33] Wang Q, Liu C, Uchida A, et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin [J]. Mol Metab, 2013, 3(3): 64-72
- [34] Baver SB, Hope K, Guyot S, et al. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus[J]. J. Neurosci, 2014, 34(4): 5486-5496
- [35] Guzmán-Ruiz M, Sadari N, Cazarez-Márquez F, et al. The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus α -MSH neurons in male rats [J]. Endocrinology, 2014, 155 (4): 525-535