

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.06.012

糖尿病大鼠下丘脑 Nesfatin-1 对胃运动的影响及机制研究 *

李 峰^{1,2} 王 程¹ 柳 洋³ 高胜利^{1Δ}

(1 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东 青岛 266021;

2 临淄区妇幼保健院 山东 淄博 255000; 3 青岛第九人民医院 山东 青岛 266000)

摘要 目的:探讨下丘脑腹内侧核 Nesfatin-1 对正常大鼠及糖尿病大鼠胃运动的影响及其潜在机制。**方法:**正常大鼠随机分为 0.08 μg , 0.8 μg , 8.0 μg / 0.5 μL Nesfatin-1 组; 30 μg /0.5 μL stressin-B 组; (0.8 μg Nesfatin-1+30 μg stressin-B)/0.5 μL 组; 0.5 μL 生理盐水 (NS) 组; 正常羊血清 + 假刺激 (NR+SS) 组; 正常羊血清 + 电刺激 (NR+ES) 组; 抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假刺激 (anti-Nn-Ab+SS) 组; 抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 电刺激 (anti-Nn-Ab+ES) 组。制作糖尿病大鼠模型, 将糖尿病大鼠随机分为 0.08 μg /0.5 μL Nesfatin-1 组; 0.8 μg /0.5 μL Nesfatin-1 组; 8.0 μg /0.5 μL Nesfatin-1 组; 0.5 μL NS 组; NR+SS 组; NR+ES 组; anti-Nn-Ab+SS 组; anti-Nn-Ab+ES 组。大鼠胃部置入感应器后腹内侧核置管, 记录清醒大鼠胃运动及电刺激海马 CA1 区后的胃运动。**结果:**与生理盐水组相比, 下丘脑腹内侧核注射不同浓度 Nesfatin-1, 大鼠胃收缩幅度和频率显著降低, 下丘脑腹内侧核注射 0.5 μL (0.8 μg Nesfatin-1+30 μg stressin-B) 混合液后, 相比单独给予 0.8 μg Nesfatin-1 组, 大鼠胃收缩幅度和频率显著升高。大鼠下丘脑腹内侧核注射 0.5 μL Nesfatin-1 (0.8 μg), 大鼠胃收缩幅度和频率显著降低, 下丘脑腹内侧核注射 0.5 μL (0.8 μg Nesfatin-1+30 μg stressin-B) 混合液后, 相比单独给予 0.8 μg Nesfatin-1 组, 大鼠胃收缩幅度和频率显著升高。下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与正常羊血清 + 电刺激组相比, 大鼠胃收缩幅度和频率进一步增强, 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与单独注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假电刺激组相比, 大鼠的胃收缩幅度和频率显著增高。下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再给予电刺激海马 CA1 区, 与正常羊血清 + 电刺激组相比, 正常大鼠和糖尿病大鼠胃运动指数均显著增加, 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与单独注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假电刺激组相比, 正常和糖尿病大鼠的胃运动指数均显著增高。与正常大鼠相比, 电刺激海马 CA1 区、下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再给予电刺激海马 CA1 区, 或下丘脑腹内侧核微量注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体, 糖尿病大鼠胃运动指数均无显著差异。**结论:**海马 - 下丘脑 Nesfatin-1 信号通路参与胃传入信息和胃运动调控, 该作用可能与 CRF 系统活动有关。

关键词:糖尿病; 海马; 腹内侧核; Nesfatin-1

中图分类号: R-33; R587.2; R338.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)06-1060-07

The Effect of Nesfatin-1 in Gastric Motility in Diabetic Rat *

Li Feng^{1,2}, WANG Cheng¹, LIU Yang³, GAO Sheng-li^{1Δ}

(1 Dept. of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China; 2 Maternal and child health care hospital of Linzi District, Zibo, Shandong, 255000, China; 3 Qingdao No.9 people's hospital, Qingdao, Shandong, 266021, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect of Nesfatin-1 on the gastric motility of normal rat and diabetic rats and its potential mechanism. **Methods:** Normal rats were randomly divided into 0.08 μg , 0.8 μg , 8.0 μg /0.5 μL Nesfatin-1 group; 30 μg /0.5 μL stressin-B group; (0.8 μg Nesfatin-1 + 30 μg stressin-B)/0.5 μL group; (NR + SS) group; normal sheep serum + stimulated (NR + ES) group; anti-NUCB2 / Nesfatin-1 antibody + anti-Nn-Ab + SS) group; anti-NUCB2/Nesfatin-1 antibody + anti-Nn-Ab + ES group. The diabetic rats were randomly divided into 0.08 μg /0.5 μL Nesfatin-1 group, 0.8 μg /0.5 μL Nesfatin-1 group, 8.0 μg /0.5 μL Nesfatin-1 group, 0.5 μL NS group, NR + SS NR + ES group; anti-Nn-Ab + SS group; anti-Nn-Ab + ES group. After the rat stomach was placed in the sensor, put a catheter into ventral medial nucleus, then observe the gastric motility of conscious rats and after electrical stimulation of hippocampal CA1 area. **Results:** Compared with the normal saline group, Nesfatin-1 was injected into the ventral nucleus of the hypothalamus, and the amplitude and frequency of gastric contraction were significantly decreased. 0.5 μL (0.8 μg Nesfatin-1 + 30 μg stressin-B) after mixed solution, the amplitude and frequency of gastric contraction were significantly increased in rats compared with 0.8 μg Nesfatin-1 alone. Rats were injected with 0.5 μL of Nesfatin-1 (0.8 μg) in the ventral medial nucleus of the hypothalamus, and the amplitude and frequency of gastric contraction were significantly decreased in the ventral medial nucleus of the hypothalamus. 0.5 μL (0.8 μg Nesfatin-1 + 30 μg stressin-B) after treatment, the amplitude and frequency of gastric contraction were significantly higher in

* 基金项目: 山东省优秀中青年科学基金项目 (BS2014YY009)

作者简介: 李峰 (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: 高胜利, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期: 2017-06-08 接受日期: 2017-07-20)

rats than 0.8 μg Nesfatin-1 alone. In the hypothalamic nucleus of the hypothalamus, the anti-NUCB2/Nesfatin-1 antibody was used to stimulate the hippocampal CA1 region, and the amplitude and frequency of gastric contraction were further enhanced compared with the normal sheep serum +/Nesfatin-1 antibody was used to stimulate the hippocampal CA1 region. Compared with the anti-NUCB2/Nesfatin-1 antibody + pseudo-electrical stimulation group, the amplitude and frequency of gastric contraction were significantly increased. The NAGB2/Nesfatin-1 antibody was injected into the ventral medial nucleus of the hypothalamus to induce the electrical stimulation of the hippocampal CA1 region. Compared with the normal sheep serum + electric stimulation group, the gastric motility index of the normal rats and diabetic rats were significantly increased, The gastric motility index of normal and diabetic rats was significantly higher than that of anti-NUCB2/Nesfatin-1 antibody + pseudo-electrical stimulation group after injection of anti-NUCB2/Nesfatin-1 antibody in the hippocampal CA1 region. Compared with normal rats, the rats were injected with anti-NUCB2/Nesfatin-1 antibody in the hippocampal CA1 region and the hypothalamic ventral nucleus. The rats were injected with anti-NUCB2 / Nesfatin-1 antibody. There was no significant difference in gastric motility index between diabetic rats. **Conclusion:** Hippocampus-hypothalamic Nesfatin-1 signaling pathway is involved in gastric afferent information and gastric motility regulation, which may be related to CRF system activity.

Key words: Diabetes; Hippocampus; Ventromedial nucleus; Nesfatin-1

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R587.2; R338.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)06-1060-07

前言

糖尿病是血糖显著升高的一种代谢性疾病,糖尿病胃轻瘫属于糖尿病的一种常见并发症,且发病率呈逐年升高趋势。研究显示,约有 50% 的糖尿病患者伴发糖尿病胃轻瘫病症。糖尿病胃轻瘫的发病机制非常复杂,至今还不明确。研究表明糖尿病胃轻瘫的发生与多种因素相关,包括高血糖、遗传因素、自主神经病变等。很多学者针对糖尿病胃轻瘫发病多关注于外周胃肠激素分泌、平滑肌变性等的研究,而对于其中枢机制少有报道。

Nesfatin-1 是核组蛋白 2(NUCB2)的裂解产物^[1],含有 82 个氨基酸,能够在中枢和外周系统均可发挥多种作用。Nesfatin-1 广泛存在于摄食相关的下丘脑区域^[2]。有报道 Nesfatin-1 可抑制小鼠夜间摄食及其胃运动,中枢注射 Nesfatin-1 可剂量依赖性的抑制大鼠胃排空及其胃酸分泌^[3]。NUCB2/Nesfatin-1 可与多种肽类物质共同表达以发挥调控摄食能量平衡及其他生理作用^[4]。有研究显示注射促肾上腺皮质激素释放激素受体 CRF1 和 CRF2 拮抗剂 astressin-B 后, Nesfatin-1 抑制摄食的作用明显下降,因此推测 Nesfatin-1 可能通过 CRF 受体机制发挥厌食效应。

研究发现下丘脑腹内侧核病变会导致多种生物体摄食增多、肥胖,因此下丘脑腹内侧核被称为大脑的 " 饱中枢 " ^[5]。下丘脑腹内侧核之所以参与摄食功能调控,是因为它能合成并分泌很多参与食欲调节的神经肽,如与摄食作用有关的 Nesfatin-1、CRF、leptin 等^[2]。下丘脑腹内侧核 Nesfatin-1 对大鼠胃运动的作用至今还未曾报道。

本文拟采用核团微量注射及在体胃运动记录等方法,探讨下丘脑腹内侧核微量注射 Nesfatin-1 对正常大鼠及糖尿病大鼠胃运动的影响及其机制,并研究电刺激海马对这一过程是否有调控作用。

1 实验材料和方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 Wistar 大鼠 200 只,体重 250-300 g,购自青岛市药检所。大鼠分笼饲养,每笼 5 只,实验处理后单笼饲养。大鼠食物皆为标准颗粒饲料,自由饮水进食。动物房保持 22 ± 3 °C 左右的温度, 60 ± 5 % 的相对湿度,昼夜循环光照为 12 h:12 h。实验前适应性饲养 1 周。所有动物实验均按照 " 青岛大学实验动物保护和使用管理办法 " 严格进行。

1.2 糖尿病大鼠模型制备

参考已有文献制作糖尿病大鼠模型^[6,7],选取 54 只大鼠制备糖尿病大鼠模型,造模前大鼠禁食 12 小时,不禁水。给予模型组大鼠腹腔注射 35 mg/kg 1% 的链脲佐霉素 (STZ) 溶液,第一次注射后饲养一周,第 8 天以同样的方式同等剂量进行第二次腹腔注射。采取大鼠尾尖的血液来测量大鼠空腹血糖值,实验选取空腹血糖 ≥ 7.8 mmol/L,或者餐后血糖 ≥ 11.1 mmol/L 的大鼠作为糖尿病模型,实验中共筛选出糖尿病模型大鼠 48 只。

1.3 动物分组

下丘脑腹内侧核微量注射不同浓度的 Nesfatin-1,观察 Nesfatin-1 对正常大鼠及糖尿病大鼠胃运动的影响及其潜在机制。正常大鼠 42 只,随机分为 6 组,每组 7 只:(1)0.08 $\mu\text{g}/0.5$ μL Nesfatin-1 组;(2)0.8 $\mu\text{g}/0.5$ μL Nesfatin-1 组;(3)8.0 $\mu\text{g}/0.5$ μL Nesfatin-1 组;(4)30 $\mu\text{g}/0.5$ μL astressin-B 组;(5)(0.8 μg Nesfatin-1+30 μg astressin-B)/0.5 μL 组;(6)0.5 μL 生理盐水 (NS)组。糖尿病大鼠 40 只,随机分为 4 组,每组 10 只:(1)0.08 $\mu\text{g}/0.5$ μL Nesfatin-1 组;(2)0.8 $\mu\text{g}/0.5$ μL Nesfatin-1 组;(3)8.0 $\mu\text{g}/0.5$ μL Nesfatin-1 组;(4)0.5 μL NS 组。

1.4 动物手术

大鼠在进行在体胃运动记录前禁食 18 h,给予自由饮水。禁食后的大鼠 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 腹腔注射麻醉后固定于鼠板上,打开腹腔暴露胃组织。距胃幽门部 0.5 cm 的地方,沿胃环形肌的方向分别将应力传感器和双极银丝电极缝贴于胃窦腹侧和背侧浆膜面^[8],导线经皮下引至大鼠颈部固定,露出大约 2-3 cm,最后将腹部切口缝合。术后给予动物正常饮食 3 天。术后大鼠分笼喂养,每天给予大鼠腹腔注射 8 万单位青霉素以预防感染。

大鼠胃部手术后进行头部手术。大鼠腹腔注射 10%水合氯醛麻醉 (0.3 mL/100 g), 固定于脑立体定位仪上, 参照 Paxinos-Watson 大鼠脑图谱将不锈钢套管置入下丘脑腹内侧核, 并置入针灸针作为套管内芯以防止套管阻塞, 用 502 胶和自凝牙托粉固定套管。微量注射器用硅胶管与不锈钢内套管相连。

1.5 在体胃运动记录

胃运动记录前大鼠禁食 18 h, 放于特制鼠笼内, 动物清醒状态下将应力传感器与桥式放大器相连, 台式生理记录仪记录大鼠胃收缩幅度及频率。各组在给药前稳定记录胃收缩运动 30 min, 给药后记录 60 min, 观察给药前后胃收缩频率和幅度的变化, 并计算变化率。每只大鼠每天记录 1-2 h, 至少持续 2 天。

1.6 电刺激

本实验中选用正常大鼠 28 只, 随机分为 4 组, 每组 7 只: 正常羊血清 + 假刺激(NR+SS)组; 正常羊血清 + 电刺激(NR+ES)组; 抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假刺激(anti-Nn-Ab+SS)组; 抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 电刺激(anti-Nn-Ab+ES)组。

本实验中选用糖尿病大鼠 24 只, 随机分为 4 组, 每组 6 只: NR+SS 组; NR+ES 组; anti-Nn-Ab+SS 组; anti-Nn-Ab+ES 组。

单极刺激电极置入海马 CA1 区诱发电刺激。单极刺激电极(RH NE-100 01950 mm, 环氧树脂绝缘, 露出尖端 200 μ m)垂直进入海马 CA1 区(前囟后 3.14-3.6 mm, 旁开 1.3-2.0 mm, 深 2.6-3.2 mm, 图 5), 通过高频方波电流脉冲(20 μ A, 持续 0.5 ms)传入刺激器, 进而产生电流刺激。假刺激组与刺激组所有手术程序都相同, 但是刺激电极无电流通过。实验中清醒大鼠在

体位胃运动记录 60 min。

1.7 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 实验结果

2.1 糖尿病大鼠的一般情况

造模前, 大鼠状态良好反应灵敏, 血糖值在正常范围内 (4~6 mmol/L), 而造模成功的大鼠摄食量增多, 饮水量上升, 并且表现出体重下降, 尿量增多, 消瘦, 皮毛枯黄等情况, 其空腹血糖均 > 7.8 mmol/L, 餐后血糖 > 11.1 mmol/L。

2.2 下丘脑腹内侧核注射 Nesfatin-1 对正常大鼠胃运动的影响

大鼠下丘脑腹内侧核分别注射 NS, 0.5 μ L Nesfatin-1 (0.08, 0.8, 8.0 μ g), 0.5 μ L astressin-B (30 μ g), 0.5 μ L (0.8 μ g Nesfatin-1+30 μ g astressin-B) 混合液, 观察在体胃运动的改变。与生理盐水组相比, 下丘脑腹内侧核注射不同浓度 Nesfatin-1, 大鼠胃收缩幅度和频率显著降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$, 图 1)。下丘脑腹内侧核注射 Nesfatin-1 约 5 min 后, 大鼠胃收缩幅度开始下降, 约在 10-15 min 下降幅度达到峰值(图 1)。下丘脑腹内侧核注射 0.5 μ L (0.8 μ g Nesfatin-1+30 μ g astressin-B) 混合液后, 相比单独给予 0.8 μ g Nesfatin-1 组, 大鼠胃收缩幅度 ($P < 0.05$, 图 1) 和频率 ($P < 0.05$, 图 1) 显著升高。单独给予 astressin-B 或生理盐水, 大鼠胃收缩幅度和频率无明显变化 ($P > 0.05$, 图 1)。

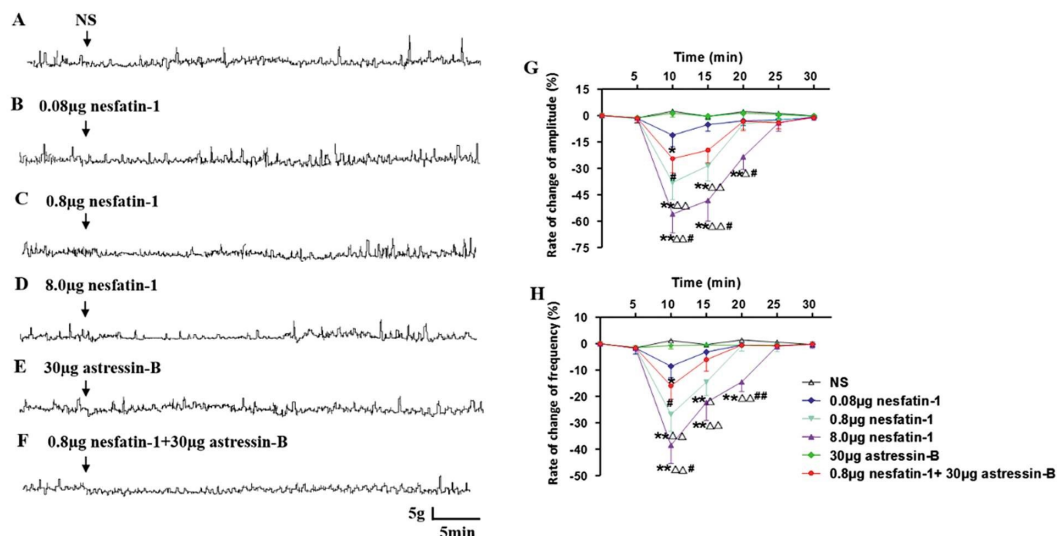


图 1 下丘脑腹内侧核注射 Nesfatin-1 对正常大鼠胃运动的影响

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 NS 组相比; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, 与 0.08 μ g Nesfatin-1 相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, 与 0.8 μ g Nesfatin-1 组相比

Fig.1 The effect of nesfatin-1 on gastric motility in normal rats

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. NS group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs. 0.08 μ g Nesfatin-1 group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$ vs. 0.8 μ g Nesfatin-1 group

2.3 下丘脑腹内侧核注射 Nesfatin-1 对糖尿病大鼠胃运动的影响

大鼠下丘脑腹内侧核注射 0.5 μ L Nesfatin-1 (0.8 μ g), 大鼠胃收缩幅度和频率显著降低 ($P < 0.05$, 图 2)。下丘脑腹内侧核注射 0.5 μ L (0.8 μ g Nesfatin-1+30 μ g astressin-B) 混合液后, 相比单独给予 0.8 μ g Nesfatin-1 组, 大鼠胃收缩幅度 ($P < 0.05$, 图 2)

和频率 ($P < 0.05$, 图 2) 显著升高。单独给予 astressin-B 或生理盐水, 大鼠胃收缩幅度和频率无明显变化 ($P > 0.05$, 图 2)。

与正常大鼠相比, 糖尿病大鼠下丘脑腹内侧核注射 0.8 μ g Nesfatin-1, 大鼠胃运动指数降低程度更为显著, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

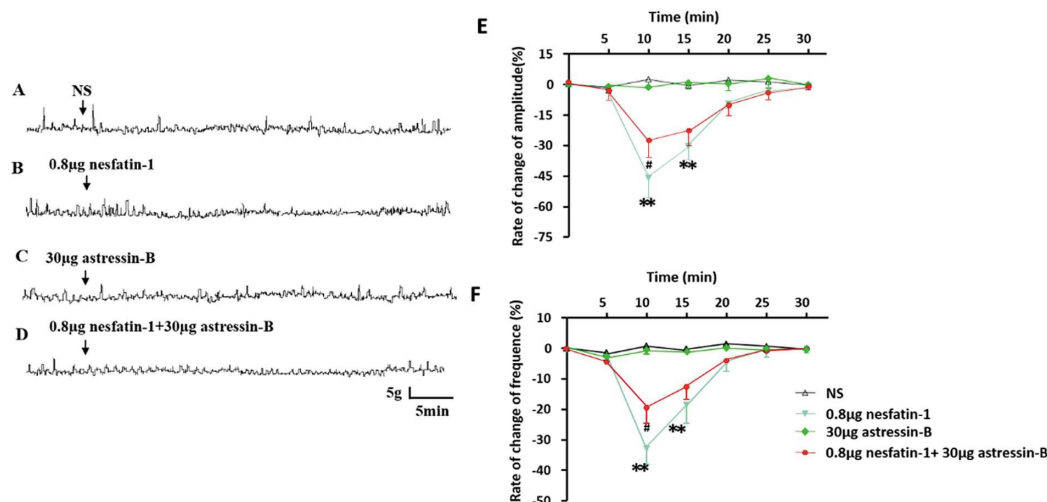


图2 下丘脑腹内侧核注射 Nesfatin-1 对糖尿病大鼠胃运动的影响

** $P < 0.01$, 与 NS 组相比; # $P < 0.05$, 与 $0.8 \mu\text{g}$ Nesfatin-1 组相比

Fig.2 The effect of nesfatin-1 on gastric motility in diabetic rat

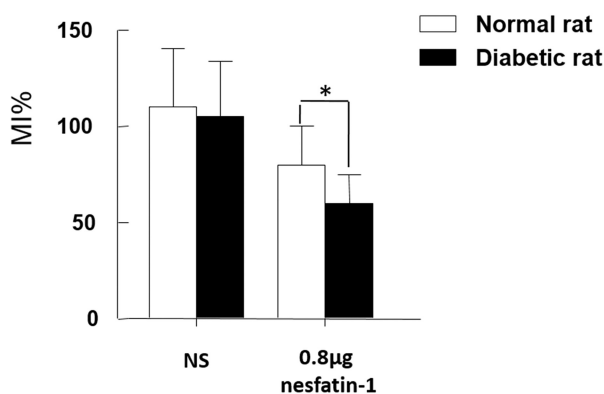
** $P < 0.01$, vs. NS group; # $P < 0.05$ vs. $0.8 \mu\text{g}$ Nesfatin-1 group

图3 Nesfatin-1 对大鼠胃运动指数的影响

* $P < 0.05$, 与正常大鼠相比

Fig.3 The effect of nesfatin-1 on MI in rat

* $P < 0.05$, vs. normal rat

2.4 电刺激海马 CA1 区对正常大鼠胃运动的影响

结果显示, 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 则与正常羊血清 + 电刺激组相比, 大鼠胃收缩幅度和频率进一步增强, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4); 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与单独注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假电刺激组相比, 大鼠的胃胃收缩幅度和频率显著增高 ($P < 0.05$, 图 4)。单独下丘脑腹内侧核注射正常羊血清或抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体对大鼠胃运动不产生显著影响 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 电刺激海马 CA1 区对糖尿病大鼠胃运动的影响

实验结果显示, 大鼠下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与正常羊血清 + 电刺激组相比, 大鼠胃收缩幅度和频率进一步增强, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05 \sim 0.01$, 图 5); 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与单独注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假电刺激组相比, 大鼠的胃收缩幅度

和频率显著增高 ($P < 0.05$, 图 5)。

进一步统计学研究发现, 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再给予电刺激海马 CA1 区, 与正常羊血清 + 电刺激组相比, 正常大鼠和糖尿病大鼠胃运动指数也显著增加, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 6); 下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再电刺激海马 CA1 区, 与单独注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体 + 假电刺激组相比, 正常和糖尿病大鼠的胃运动指数均显著增高 ($P < 0.05$, 图 6)。单独下丘脑腹内侧核注射正常羊血清或抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体, 正常或糖尿病大鼠胃运动指数均不产生显著改变 ($P > 0.05$, 图 6)。

但与与正常大鼠相比, 电刺激海马 CA1 区、下丘脑腹内侧核注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体后再给予电刺激海马 CA1 区, 或下丘脑腹内侧核微量注射抗 NUCB2/Nesfatin-1 抗体, 糖尿病大鼠胃运动指数均无显著差异 ($P > 0.05$, 图 6)。

3 讨论

本实验研究结果显示给予正常大鼠下丘脑腹内侧核注射 Nesfatin-1 可剂量依赖性的降低胃运动, 促肾上腺皮质激素受体拮抗剂 astressin-B 可部分中和 Nesfatin-1 的作用, 提示 Nesfatin-1 在大鼠下丘脑腹内侧核可能通过促肾上腺皮质激素受体系统介导发挥作用。与正常大鼠相比, 糖尿病大鼠胃运动减弱, 给予下丘脑腹内侧核注射不同剂量的 Nesfatin-1 后, 糖尿病大鼠胃运动指数较生理盐水组显著降低, 且呈现剂量依赖关系。糖尿病大鼠下丘脑腹内侧核给予 $0.8 \mu\text{g}$ 和 $8.0 \mu\text{g}$ Nesfatin-1 后, 胃运动指数降低程度更大。提示, 糖尿病胃轻瘫的发生发展可能与 Nesfatin-1 作用有关。由以上的研究结果可知, 给予下丘脑腹内侧核注射相同剂量的 Nesfatin-1 后, 与正常大鼠相比, 糖尿病大鼠的胃运动指数降低更为明显。电刺激海马 CA1 区可促进胃运动, 预先给予下丘脑腹内侧核注射抗 Nesfatin-1 抗体, 可部分阻断电刺激海马 CA1 区对胃运动的促进

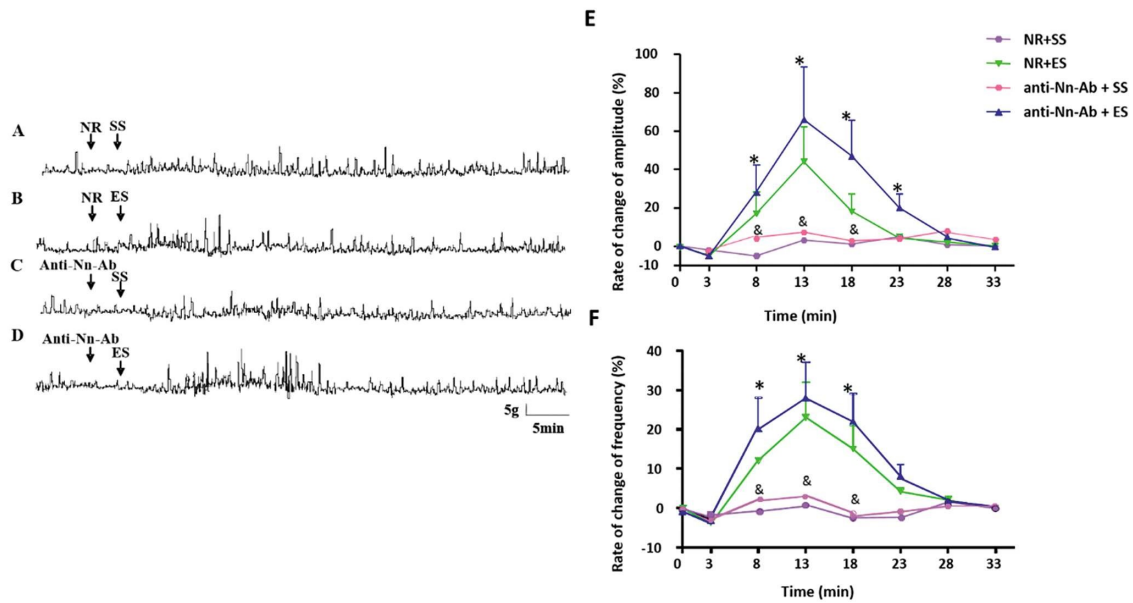


图4 电刺激海马CA1区对正常大鼠胃运动的影响

*P<0.05 vs. NR+ES 组; &P<0.01 vs. NR+SS 组

Fig. 4 The effects of electrical stimulation CA1 region on gastric motility in normal rats

*P<0.05 vs. NR+ES group; &P<0.01 vs. NR+SS group

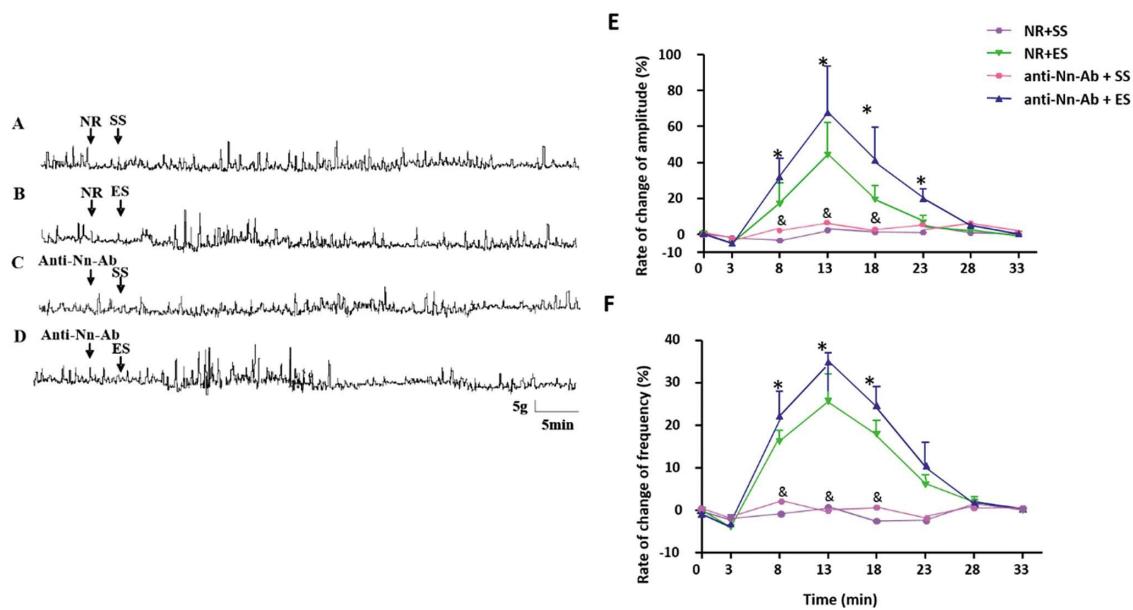


图5 电刺激海马CA1区对糖尿病大鼠胃运动的影响

*P<0.05 vs. NR+ES 组; &P<0.01 vs. NR+SS 组

Fig. 5 The effects of electrical stimulation CA1 region on gastric motility in diabetic rat

*P<0.05 vs. NR+ES group; &P<0.01 vs. NR+SS group

效应。而对于糖尿病大鼠,电刺激海马CA1区可促进胃运动,预先给予下丘脑腹内侧核注射抗Nesfatin-1抗体,可部分阻断电刺激海马CA1区对胃运动的促进效应。

2006年,Oh-I等人在HTB185脑髓母细胞瘤和3T3-L1脂肪细胞中发现一种对曲格列酮高度敏感的基因-过氧化物酶增殖激活受体 γ 的配体^[1]。这种基因可编码核组蛋白2^[1]。核组蛋白2(NUCB2)由24个氨基酸N端信号肽和396个氨基酸组成,与哺乳动物及非哺乳脊椎动物间有高度同源性^[1]。第3脑室注射Nesfatin-1可减少大鼠摄食量,因其来源于核组蛋白2

(NUCB2)编码饱食因子将其命名为nesfatin,是含有82个氨基酸的肽类物质^[1]。有研究显示大鼠禁食后下丘脑室旁核Nesfatin-1表达显著降低。NUCB2通过前激素转化酶(PC)-1/3裂解后可生成3个片段:Nesfatin-1(aa, 1-82),nesfatin-2(aa, 85-163),nesfatin-3(aa, 166-396)^[1]。至今为止,只有Nesfatin-1有抑制摄食作用,nesfatin-2和nesfatin-3无生物学效应。RT-qPCR及Western Blot基因芯片分析显示,相比心脏和脑,Nesfatin-1前体NUCB2 mRNA和蛋白水平在大鼠胃泌酸腺粘膜表达更为显著^[3,4]。NUCB2 mRNA在胃泌酸腺小内分泌细胞

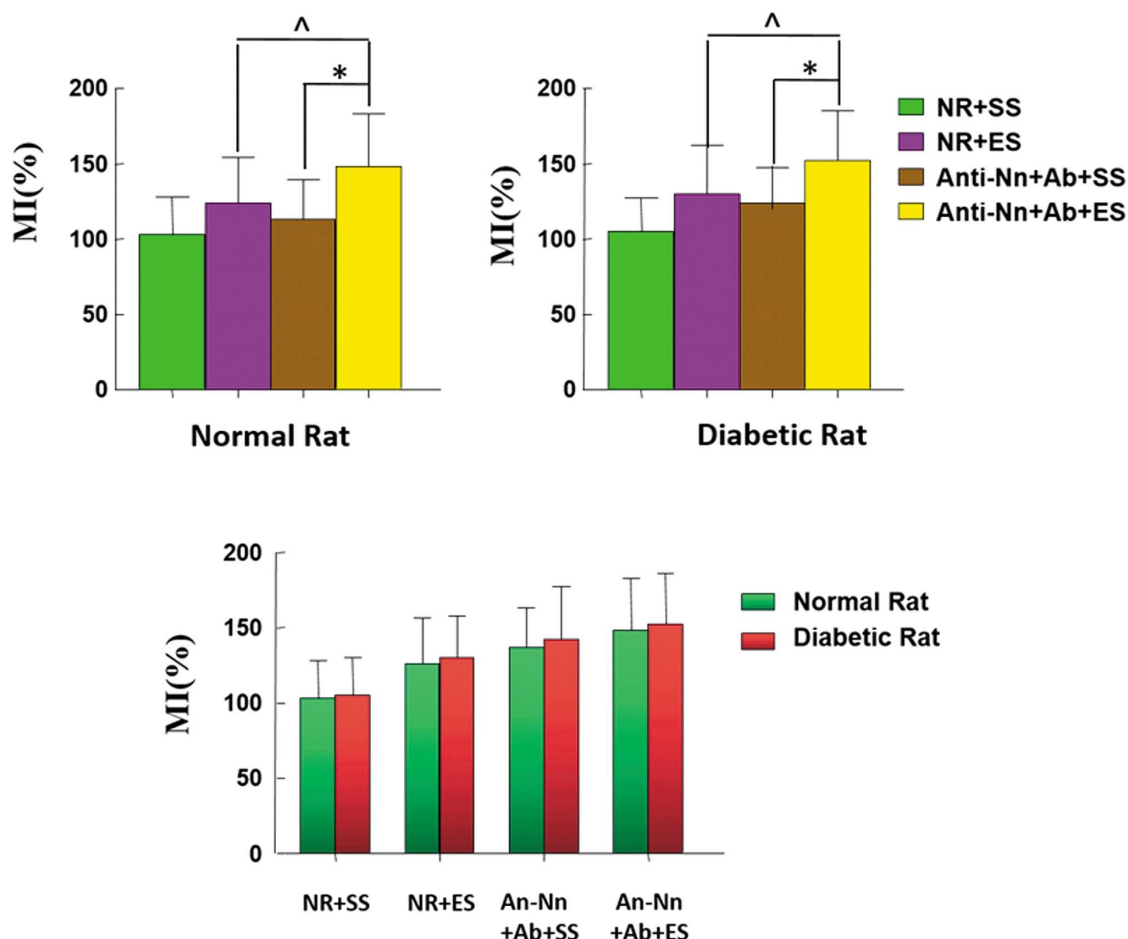


图6电刺激海马CA1区对大鼠胃运动的影响

#P<0.05,与SS组相比; &P<0.05,与NR+SS组相比; ^P<0.05,与NR+ES组相比; *P<0.05,与anti-Nn-Ab+SS组相比; #P<0.05,与ES组相比;

Fig. 6 The effects of electrical stimulation CA1 region on gastric motility in diabetic rat

#P<0.05, vs. SS group; &P<0.05, vs. NR+SS group; ^P<0.05, vs. NR+ES group; *P<0.05, vs. anti-Nn-Ab+SS group; #P<0.05, vs. ES group

中含量丰富^[34]。此外,胰腺、睾丸和垂体腺也能检测到 Nesfatin-1 免疫活性,但是这些部位功能还不明确,可能通过自身分泌或旁分泌发挥作用。最近研究显示 Nesfatin-1 可以简单扩散方式通透血脑屏障,具有不饱和性^[9],因此推断给予脑核团注射 Nesfatin-1 可能影响大鼠胃肠功能。Nesfatin-1 注入不同核团所引发效应不同,注入 PVN 后 1 至 4 小时夜间摄食减少^[10]。注入下丘脑外侧区与 PVN 相似,但需要更高剂量。但是注入下丘脑腹内侧核 Nesfatin-1 的作用还未曾有过报道。侧脑室注入 Nesfatin-1 可抑制小鼠^[2]和大鼠^[3]胃排空,降低小鼠胃肠活动^[11]。几种调控摄食的肽类也可影响胃排空等消化功能,通过增加与胃扩张有关的迷走传入来减少摄食^[12]。胃停滞状态是否与侧脑室注入 Nesfatin-1 有关可为 Nesfatin-1 持续厌食作用提供进一步的研究思路。

血糖水平可调控胰腺内分泌细胞 NUCB2 的表达,与血糖正常的 Wistar 大鼠^[13]和人类胰岛移植所致的 2 型糖尿病^[14]相比,2 型糖尿病 Goto-Kakizaki 大鼠 NUCB2 蛋白水平表达降低。同样 Goto-Kakizaki 大鼠循环 NUCB2/Nesfatin-1 水平与血糖水平呈负相关^[13]。在血糖正常但伴有胰岛素抵抗的大鼠也可观察到 NUCB2/Nesfatin-1 水平降低,可能与胰岛素相互作用有关^[14]。本研究发现糖尿病大鼠下丘脑腹内侧核注射 Nes-

fatin-1 后与正常大鼠相比,糖尿病大鼠胃运动有所减弱,给予下丘脑腹内侧核注射不同剂量的 Nesfatin-1 后,糖尿病大鼠胃运动指数较生理盐水组显著降低,且呈现剂量依赖关系。糖尿病大鼠下丘脑腹内侧核给予相同剂量的 Nesfatin-1 后,胃运动降低程度更大。提示,糖尿病胃轻瘫的发生发展可能与 Nesfatin-1 作用有关。

在摄食行为和体重的调节方面,下丘脑腹内侧核(VMH)一度成为研究的焦点。研究发现下丘脑腹内侧核病变会导致多种生物体摄食增多、肥胖,包括人类在内,因此下丘脑腹内侧核被称为大脑的"饱中枢"^[15]。下丘脑腹内侧核外侧或内侧部分损伤的大鼠可出现体重过度增加,但是下丘脑腹内侧核直接损伤导致肥胖作用更为明显。有学者称下丘脑腹内侧核双侧损伤常会导致过度肥胖^[16]。还有研究显示下丘脑腹内侧核双侧损伤时摄食过多、体重增加的比率增大,体重增加与腹内侧核损伤的程度相关^[15]。后来研究也发现^[18]下丘脑腹内侧核损伤的面积大小和损伤后体重增加量呈现高度相关性。最近研究表明,进食时无论下丘脑腹内侧核还是室旁核神经元都处于激活状态,但是它们在功能上有一定差异^[16,19]。下丘脑腹内侧核还能分泌多种肽类物质或激素,如 Nesfatin-1、CRF、多巴胺^[18]、血清素^[20]、GABA^[21]、组胺^[22]等,这些物质共同参与下丘脑腹内侧核对摄食

行为的调节。

NUCB2/Nesfatin-1 免疫活性神经元可与其他几种肽类及神经递质共同表达以调控摄食,包括尿皮素 1,黑色素浓集激素(MCH),前黑素细胞皮质素原(POMC),可卡因和安非他命相关转录物, α -黑色素细胞刺激激素(α -MSH),血管加压素,神经肽 Y(NPY),催产素,生长激素释放激素,促肾上腺皮质激素释放激素(CRF),促甲状腺激素释放激素(TRH),生长抑素或神经降压素和 5-羟色胺(5-HT)^[34]。神经解剖学研究也可证明 Nesfatin-1 与上述神经递质共存。CRF 受体信号系统也可产生抑制摄食作用^[23],研究表明 CRF 信号系统可能参与 Nesfatin-1 抑制摄食作用。Nesfatin-1 注入第三脑室可增加下丘脑室旁核 CRF 的含量^[24]。外源性 Nesfatin-1 注入下丘脑室旁核可增强 CRF 兴奋神经元的活性^[25]。此外,侧脑室注射 Nesfatin-1 可升高 ACTH 和皮质酮的血浆水平,但是外源性 Nesfatin-1 不改变培养垂体细胞 ACTH 的释放^[26]。这些资料有力的证明 Nesfatin-1 通过下丘脑室旁核 CRF 释放激活下丘脑-垂体-肾上腺轴。此外,药理学研究显示侧脑室注射 CRF2 选择性受体拮抗剂 astressin2-B 可消除 CRF2 受体作用,第三脑室注射 CRF1/CRF2 拮抗剂 α -helicalCRF9-41 可部分阻断 Nesfatin-1 的厌食效应^[27]。Nesfatin-1 注入小脑延髓池,astressin2-B 对大鼠夜间摄食抑制无影响^[25]。本研究显示 CRF 非选择性受体拮抗剂 astressin-B 可部分阻断大鼠下丘脑腹内侧核 Nesfatin-1 对胃运动的作用,提示 Nesfatin-1 和 CRF 信号系统可能相互作用,共同参与胃肠功能的调节。

海马属于脑边缘系统的一部分,主要参与学习和认知等功能的调控^[28]。近年来,海马通过奖赏系统对摄食和能量平衡的调控越来越受到关注^[29],主要因为海马中存在很多摄食和能量调节有关的激素受体,有研究显示海马损毁的大鼠摄食行为发生明显改变^[29]。本研究显示电刺激海马 CA1 区可促进胃运动,预先给予下丘脑腹内侧核注射抗 Nesfatin-1 抗体,可部分阻断电刺激海马 CA1 区对胃运动的促进效应。而对于糖尿病大鼠,电刺激海马 CA1 区可促进胃运动,预先给予下丘脑腹内侧核注射抗 Nesfatin-1 抗体,可部分阻断电刺激海马 CA1 区对胃运动的促进效应,提示海马可调控下丘脑腹内侧核神经元的功能活动。

综上所述,本研究证明下丘脑腹内侧核给予 Nesfatin-1 可调控大鼠胃运动,该作用可能与 CRF 系统有关,且海马参与下丘脑腹内侧核 Nesfatin-1 对胃运动的调控作用。本研究为糖尿病胃肠功能紊乱相关疾病的诊断和治疗提供了理论依据和治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Cao X, Zhou X, Cao Y, et al. Expression of NUCB2/Nesfatin-1 in the taste buds of rats[J]. *Endocr J*, 2016, 63(1): 37-45
- [2] Ramesh N, Gawli K, Pasupuleti V, et al. Metabolic and Cardiovascular Actions of Nesfatin-1 [J]. *Implications in Health and Disease Curr Pharm Des*, 2017, 23(10): 1453-1464
- [3] Prinz P, Goebel-Stengel M, Teuffel P, et al. Peripheral and central localization of the Nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2016, 470(3): 521-527
- [4] Theodorakis PE, Müller EA, Craster RV, et al. Physical insights into the blood-brain barrier translocation mechanisms[J]. *Phys Biol*, 2017, 14(4): 041001-041007
- [5] Ramesh N1, Gawli K1, Pasupuleti VK et al. Metabolic and Cardiovascular Actions of Nesfatin-1: Implications in Health and Disease[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(10): 1453-1464
- [6] Wang Y, Qi X, Wang C, et al. Effects of propofol on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats with type-2 diabetes mellitus[J]. *Biomed Rep*, 2017, 6(1): 69-74
- [7] Dai Y, Yang F, Zhou N, et al. A post-weaning fish oil dietary intervention reverses adverse metabolic outcomes and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in postnatal overfed rats[J]. *Br J Nutr*, 2016, 116(9): 1519-1529
- [8] Prinz P, Teuffel P, Lembke V. Nesfatin-130-59 Injected Intracerebroventricularly Differentially Affects Food Intake Microstructure in Rats Under Normal Weight and Diet-Induced Obese Conditions[J]. *Front Neurosci*, 2015, 23: 9442-9448
- [9] Shimizu H1, Mori M. Nesfatin-1: its role in the diagnosis and treatment of obesity and some psychiatric disorders [J]. *Methods MolBiol*, 2013, 963: 327-338
- [10] Ye L1, Liddle RA. Gastrointestinal hormones and the gut connectome[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2017, 24(1): 9-14
- [11] 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(3): 255-263
- [12] Basar O, Akbal E, Koklu S, et al. A novel appetite peptide, Nesfatin-1 in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(6): 479-483
- [13] Liu Y, Gold MS. Human functional magnetic resonance imaging of eating and satiety in eating disorders and obesity [J]. *Psychiatr Ann*, 2003, 33(5): 127-132
- [14] Graff H, Stellar E. Hyperphagia, obesity, and finickiness [J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1962, 55: 418-424
- [15] Lee EY, Hwang YG, Lee HS. Hypothalamic neuronal origin of neuropeptide Y (NPY) or cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) fibers projecting to the tuberomammillary nucleus of the rat[J]. *Brain Res*, 2017, 15(1-2): 16-28
- [16] Jastreboff AM, Sinha R, Arora J, et al. A Altered Brain Response to Drinking Glucose and Fructose in Obese Adolescents [J]. *Diabetes*, 2016, 65(7): 1929-1939
- [17] Noble EE, Billington CJ, Kotz CM et al. Oxytocin in the ventromedial hypothalamic nucleus reduces feeding and acutely increases energy expenditure [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2014, 307(6): R737-R745
- [18] Hajizadeh Moghaddam A, Roohbakhsh A, Rostami P, et al. GABA and histamine interaction in the basolateral amygdala of rats in the plus-maze test of anxiety-like behaviors [J]. *Pharmacology*, 2008, 82(2): 55-66
- [19] Chiba S, Moriwaki C, Ina K, et al. Histaminergic neural clusters and those physiological roles [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2016, 147(1): 48-57

- [11] 徐海燕,熊敏,袁占占. 血液超滤联合持续泵入呋塞米对利尿剂抵抗的顽固性心力衰竭患者心功能及炎症因子的影响[J].河北医药, 2017, 39(9): 1395-1397
Xu Hai-yan, Xiong Min, Yuan Zhan-zhan. Ultrafiltration combined with continuous infusion of furosemide on diuretic resistance in patients with refractory heart failure cardiac function and inflammatory factors[J]. Hebei medicine, 2017, 39 (9): 1395-1397
- [12] 黎晓磊,孔耀中,肖观清,等. 应用生物电阻抗法评估血液透析患者残余肾功能[J].实用医学杂志, 2015, 26(5): 770-774
Li Xiao-lei, Kong Yao-zhong, Xiao Guan-qing, et al. Evaluation of residual renal function in hemodialysis patients by bioelectrical impedance spectroscopy [J]. Journal of practical medicine, 2015, 25 (5): 770-774
- [13] Radziszewsky E, Salman N, Paz H, et al. First experience in ambulatory ultrafiltration therapy for congested heart failure patients in Israel: a feasibility study [J]. Israel Medical Association Journal Imaj, 2015, 17(1): 24-26
- [14] Lu R, Muciñobermejo M, Ribeiro L C, et al. Peritoneal Dialysis in Patients with Refractory Congestive Heart Failure: A Systematic Review[J]. Cardioresenal Medicine, 2015, 5(2): 145-149
- [15] 李文宏,王晋文,陈浩,等. 高频超滤对抗利尿性肾性水肿的疗效评价[J].临床肾脏病杂志, 2015, 15(2): 98-101
Li Wen-hong, Wang Jin-wen, Chen Hao, et al. Evaluation of high frequency ultrafiltration in the treatment of diuretic renal edema[J]. Journal of clinical nephrology, 2015, 15 (2): 98-101
- [16] Wehbe E, Patarroyo M, Talierecio J J, et al. Renal failure requiring dialysis complicating slow continuous ultrafiltration in acute heart failure: importance of systolic perfusion pressure [J]. Journal of Cardiac Failure, 2015, 21(2): 108-115
- [17] Quirós-Ganga P L, Remón-Rodríguez C, Tejuca-Marengo M, et al. Peritoneal dialysis allows successful cardiac transplantation in patients with refractory heart failure [J]. Nefrologia, 2015, 35 (1): 121-124
- [18] 王静,鄢艳,闵宝妹. 缓慢连续性超滤治疗 30 例重度浮肿患者的观察及心理干预[J].中国保健营养, 2016, 26(3): 387-388
Wang Jing, Yan Yan, Min Bao-mei. Slow continuous ultrafiltration treatment of 30 cases of severe edema were observed and the psychological intervention [J]. Chinese health nutrition, 2016, 26 (3): 387-388
- [19] Gin S, Jollivet P, Fournier M, et al. The fate of silicon during glass corrosion under alkaline conditions: A mechanistic and kinetic study with the International Simple Glass[J]. Geochimica Et Cosmochimica Acta, 2015, 151(5): 68-85
- [20] 姚建东. 血液透析超滤加传统药物治疗顽固性心力衰竭 36 例体会[J].武警后勤学院学报(医学版), 2012, 21(7): 555-556
Yao Jian-dong. Hemodialysis, ultrafiltration and traditional drugs in the treatment of 36 cases of refractory heart failure [J]. Journal of Military Logistics College (Medical Edition), 2012, 21(7): 555-556
- [21] Nongnuch A, Assanatham M, Panorchan K, et al. Strategies for preserving residual renal function in peritoneal dialysis patients [J]. Clinical Kidney Journal, 2015, 8(2): 202-209
- [22] Schutyser M A I, Pelgrom P J M, Goot A J V D, et al. Dry fractionation for sustainable production of functional legume protein concentrates [J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 45(2): 327-335

(上接第 1066 页)

- [20] Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, et al. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis[J]. Eur J Neurosci, 2007, 26(8): 2303-2314
- [21] Gotoh K, Masaki T, Chiba S, et al. Nesfatin-1, corticotropin releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior [J]. J Neurochem, 2013, 124(1): 90-99
- [22] Price CJ, Hoyda TD, Samson WK, et al. Nesfatin-1 influences the excitability of paraventricular nucleus neurons[J]. J Neuroendocrinol, 2008, 20(8): 245-250
- [23] Konczol K, Bodnar I, Zelena D, et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats[J]. NeurochemInt, 2010, 57(3): 189-197
- [24] Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Central Nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor 2 receptor [J]. Endocrinology, 2009, 150(23): 4911-4919
- [25] Pilly PK, Grossberg S. How do spatial learning and memory occur in the brain? Coordinated learning of entorhinal grid cells and hippocampal place cells[J]. J CognNeurosci, 2012, 24(11): 1031-1054
- [26] Wang GJ, Yang J, Volkow ND, et al. Gastric stimulation in obese subjects activates the hippocampus and other regions involved in brain reward circuitry [J]. Proc Natl AcadSci USA, 2006, 103 (2): 15641-15645
- [27] Davidson TL, Chan K, Jarrard LE, et al. Benoit 4 Contributions of the Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex to Energy and Body Weight Regulation[J]. Hippocampus, 2009, 19(5): 235-252
- [28] Cenquizca LA, Swanson LW. Analysis of direct hippocampal cortical field CA1 axonal projections to diencephalon in the rat [J]. Journal of Comparative Neurology, 2006, 497(16): 101-114
- [29] Rolls BJ. Creativity needs some serendipity: Reflections on a career in ingestive behavior[J]. PhysiolBehav, 2016, 162: 186-195