

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.03.008

下丘脑 LHA-VMH Ghrelin 信号通路对肥胖大鼠摄食选择、胃肠道运动及自发活动的影响及机制研究 *

邢金磊^{1,2} 冷 慧¹ 王 茜¹ 高胜利¹ 孙向荣¹ 郭菲菲¹ 徐 璐^{1Δ}

(1 青岛大学 山东 青岛 266021; 2 海阳市人民医院 山东 海阳 265100)

摘要 目的:探究下丘脑外侧区(LHA)-腹内侧核(VMH)ghrelin 信号通路对肥胖大鼠的摄食选择、胃肠道运动及自发活动的影响。**方法:**采用免疫组织化学方法检测大鼠 LHA 中 ghrelin 受体的表达;观察 LHA 注射 ghrelin 对大鼠摄食选择胃肠道运动及自发活动的影响;电损毁 VMH,观察 LHA 注射 ghrelin 对大鼠摄食的影响。**结果:**免疫组化结果显示,大鼠下丘脑 LHA 中存在 ghrelin 受体,且 LHA-VMH 之间存在纤维投射;大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,肥胖(DIO)大鼠及肥胖抵抗(DR)大鼠的正常饮食、高脂饮食及高糖饮食均高于正常大鼠,但预注射 ghrelin 受体拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)能够阻断这种作用;而电损毁大鼠 VMH,显著减弱了 ghrelin 对正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的促摄食作用。大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的自发活动中,X 轴、Y 轴方向上的活动增加,且总活动增加,但 Z 轴方向上活动无明显改变;此外,LHA 注射 ghrelin,DIO 大鼠及 DR 大鼠的胃肠道转运速率明显加快,且 DR 大鼠胃肠道转运速率增加更为明显,而预注射 ghrelin 受体拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)显著阻断 ghrelin 的促胃肠道转运作用。**结论:**下丘脑 LHA-VMH ghrelin 信号通路参与调节正常大鼠、DIO 及 DR 大鼠的摄食选择、胃肠道运动及自发活动。

关键词:Ghrelin;下丘脑外侧区;腹内侧核;摄食选择;胃运动;自发活动

中图分类号:R-33;R338.27;R589.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)03-439-06

Effect of Hypothalamic LHA Injection of Ghrelin on the Feeding and Energy Metabolism in Rats and Its Mechanisms*

XING Jin-lei^{1,2}, LENG Hui¹, WANG Qian¹, GAO Sheng-li¹, SUN Xiang-rong¹, GUO Fei-fei¹, XU Luo^{1Δ}

(1 Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China; 2 Haiyang People's Hospital, Haiyang, Shandong, 265100, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of ghrelin signaling pathway in the lateral hypothalamic (LHA)-ventral medial nucleus (VMH) on feeding choice, gastrointestinal motility and spontaneous activity in obese rats. **Methods:** The expression of ghrelin receptor in rat LHA was detected by immunohistochemistry. To observe the effect of LHA injection of ghrelin on the movement and spontaneous activity of gastrointestinal tract in rats. The VMH was destroyed by electrical damage, and the effect of LHA injection of ghrelin on the feeding of rats was observed. **Results:** Immunohistochemistry showed that there was ghrelin receptor in the LHA, and there was fiber projection from LHA to VMH; After microinjection of ghrelin into LHA, the normal diet, high-fat diet and high-glucose diet of obese (DIO) rats and obesity-resistant (DR) rats were higher than normal rats, but pre-injected with ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS) can block this effect; The electric damage of rat VMH significantly attenuated the feeding effect of ghrelin on normal rats, DIO rats and DR rats. After microinjection of ghrelin into LHA, the activities in the X-axis and Y-axis increased in the spontaneous activities of normal rats, DIO rats and DR rats, and the total activity increased, but the activity in the Z-axis direction did not change significantly; In addition, the gastrointestinal transit rate of LHA injected ghrelin, DIO rats and DR rats was significantly accelerated, and the gastrointestinal transit rate of DR rats increased more significantly, while pre-injection of ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS) significantly blocked the gastrointestinal transit of ghrelin. **Conclusion:** The hypothalamic LHA-VMH ghrelin signaling pathway can be involved in the regulation of feeding selection, gastrointestinal motility and spontaneous activity in male SD rats.

Key words: Ghrelin; Lateral hypothalamic area; Ventromedial nucleus; Feeding selection; Gastric movement; Spontaneous activity

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R338.27; R589.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)03-439-06

前言

Ghrelin 是 Kojima 等人发现的一种唯一作用于摄食中枢(下丘脑和垂体腺)的新型脑肽,含有 28 个氨基酸,主要由胃

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470815)

作者简介:邢金磊(1981-),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: 2106916245@qq.com

Δ 通讯作者:徐璐,E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2019-06-18 接受日期:2019-07-15)

底粘膜分泌,又名生长素。ghrelin 前体转录翻译后 N 末端修饰对于其能否发挥活性至关重要^[2]。先前研究发现,其特异性受体为生长激素促分泌素受体 1a(GHSR1a^[1]),因此无论是中枢还是外周注射 ghrelin,都能显著增加生长激素(GH)的释放,提示 ghrelin 具有促进 GH 释放的作用^[1-3]。已有研究证明 ghrelin 与多种生理过程有关,包括调节睡眠/觉醒状态,能量平衡,能量稳态,奖励寻求和药物成瘾^[4-7]。Ghrelin 能够调节食欲,能量消耗和新陈代谢^[8-10]。脑室内(icv.)注射 ghrelin 能够显著增加大鼠的食物摄入量^[11-13]。因此,Ghrelin 被认为是促进食欲的信号(肠-脑),以控制健康个体的食欲及能量平衡。Ghrelin 特异性受体 GHSR1a 能够结合酰化的 ghrelin,诱导垂体前叶释放生长激素。

虽然 ghrelin 大部分是由胃中内分泌细胞产生,但是肠、胰腺、肾脏、卵巢或脑等其他组织也可合成分泌少量的 ghrelin,有少部分在下丘脑弓状核(ARC)内合成^[14-16]。酰基化的 ghrelin 推动胃分泌和胃运动^[17-19]。一方面,ghrelin 刺激胃肠道及胃肠消化器官分泌胃酸和消化酶^[20-22]。另一方面,ghrelin 能够缩短摄入的营养物质在胃肠内的停留时间,加速胃排空,刺激小肠和结肠的运动^[23,24]。这些动力学和预分泌效应联合饮食行为的调节有助于食物的消化和吸收^[25-27]。然而,ghrelin 通过缩短流经肠道时间限制了肠道反馈,从而决定摄食停止时间^[28]。在外周组织中,ghrelin 可能影响胰岛素释放,肠道活动,激素分泌和血压调节^[29]。中枢注射 ghrelin 可能与其他神经肽相互作用共同参与调控摄食和能量平衡^[30]。最近的研究表明,ghrelin 也作用于边缘系统的多巴胺能区域。为了发挥其诱导作用,Ghrelin 以三种途径到达下丘脑:通过穿过血脑屏障,通过迷走神经反应以及通过局部下丘脑的合成分泌,从而发挥旁分泌的作用^[31-33]。此外,ghrelin 可刺激大脑关于控制饮食行为的特定区域的活动,如杏仁核和眶额叶皮质^[28]。因此,ghrelin 除了通过下丘脑回路表现出刺激食欲经典效应外,可能还参与饮食行为的调节^[34]。

本研究从大鼠 LHA 中微量注射 ghrelin,采用生理学方法观察其对大鼠食物摄入、能量代谢和体重的影响,探究其是否能够调节神经肽和受体包括神经肽 Y(NPY),阿片-促黑素细胞皮质素原(POMC),刺鼠基因相关蛋白(AgRP),可卡因和苯丙胺相关转录物(CART),促肾上腺皮质激素释放激素(CRH),MC4R(黑皮质素)的表达^[2],结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠,体质量在 180-220 g,8 周龄,购于青岛市药物检验所,均在室温(25±1℃)、昼夜循环光照为 12 h:12 h,自由饮水进食。实验开始前,大鼠禁食 24 h,但可自由饮水。所有动物遵循《青岛大学实验动物保护和和使用管理方法》。所有实验都按照青岛实验动物中心标准。

1.2 DIO 大鼠和 DR 大鼠模型的建立

大鼠适应性饲养 7 天后,大鼠给予高脂饮食(4.487 千卡/克;配方为 70%基础饲料,10%蛋黄粉,10%猪油,10%蛋黄粉,10%猪油,1%胆固醇,3%酪蛋白和 6%全脂奶粉)。喂养 7 周后,喂食高脂饮食的大鼠表现出对饮食的不同敏感性,分成两个不同的组:体重最高的 1/3 大鼠被定义为饮食诱导肥胖(diet-induced obesity, DIO)大鼠,体重最低的 1/3 大鼠被定义为肥胖抵

抗(diet-resistant, DR)大鼠,而中间 1/3 大鼠弃去不用。其余大鼠给予正常动物饲料(3.435 kcal/g)喂养 7 周,造模期间所有大鼠均自由饮水。

1.3 脑置管术

实验前大鼠禁食一夜,大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(剂量为 100 mg/kg),麻醉后固定于脑立体定位仪,根据 Paxinos & Watson 大鼠脑图谱用微量注射仪定位,以前囟为零点,定位下丘脑外侧区 LHA(前囟后 1.3-2.3 mm,旁开 1.5-2.5 mm,深 8.0-9.0 mm),植入一带有内芯的不锈钢套管,套管用自凝牙托粉固定于大鼠颅骨^[30,31]。术后大鼠给予抗生素预防术后感染。大鼠恢复一周后,进行后续实验。

最后,为了检测定位是否准确,可用微量注射仪向 LHA 中缓慢注射溴胺天蓝溶液,大鼠经心脏灌注固定,快速断头取脑,制作 50 μm 冠状冰冻切片,显微镜下观察药物注射的位置是否准确。

1.4 电损毁 VMH

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(剂量为 100 mg/kg),麻醉后固定于脑立体定位仪,根据 Paxinos & Watson 大鼠脑图谱用微量注射仪定位,以前囟为零点,定位下丘脑腹内侧核 VMH(前囟后 2.8 mm,旁开 0.4 mm,深 9.8 mm),将正常大鼠, DIO 大鼠及 DR 大鼠各分为 2 组,双侧损毁(Damage)VMH 组和假损毁(Sham)组。用电损毁法损毁双侧 VMH,将电极放置在大鼠双侧 VMH,通以 5.0 mA 直流电,持续 5 s,重复进行 3 次;假损毁组同样将电极放置在大鼠双侧 VMH,但是不通以电流。

实验结束后,将大鼠 VMH 核团做冰冻切片,片厚 50 μm,用中性红染色,盖上盖玻片,并在光学显微镜下观察,位置不在 VMH 的数据弃之不用。

1.5 荧光金逆行追踪和免疫组化

将大鼠(n=5)用硫代巴比妥醇(100 mg/kg,腹膜内)麻醉并固定在立体定位装置(Narashige SN-3, Tokyo, Japan)上。将 0.2 μL 的 3% (w/v) 荧光金(FG;溶解在蒸馏水中)注射至 VMH 中。7 天后,用硫代巴比妥醇(100 mg/kg)麻醉大鼠并通过断头处死。大鼠腹腔注射 10%的水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g),将麻醉的大鼠固定于操作台上,先后给予 250 mL 0.9%的生理盐水和 250 mL 4%的多聚甲醛灌注固定。将大鼠断头取脑后,置于 4%多聚甲醛中 4-6 h,进行后固定,再置于 30%蔗糖溶液脱水(4℃)。采用冰冻切片机将大鼠脑组织切成 15 μm 的切片。将所需部位的切片小心放于涂胶载片上,展平,晾干。显微镜下观察注射位置,位置不在下丘脑外侧区的弃去不用。所有切片放于 -20℃ 冰箱避光冻存,以备下一步做免疫组织化学染色。

选取 LHA 区域较大的切片,先后用双蒸水和 0.01M PBS 洗涤各 3 次,洗涤后浸于柠檬酸缓冲液中进行微波修复,修复后滴加正常羊血清封闭非特异性抗原,每个脑片 30-50 μL,保持避光操作,室温孵育 1 h。微量移液器滴加一抗,即抗 ghrelin 受体抗体(兔来源多克隆抗体,1:400 稀释),将加好一抗的标本置于湿盒中,4℃过夜(避光操作)。PBS 溶液洗涤 3 次,然后滴加荧光素 Cy3 标记的二抗(山羊抗兔,1:500 稀释),室温孵育 2 h(避光操作)。淬灭油封片后,荧光显微镜下观察并计数细胞。

1.6 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠摄食选择及自发活动的影响

为了观察 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠正常饮食、高脂饮

食、高糖饮食及自发活动的影响,将正常大鼠,DIO大鼠及DR大鼠各分为4组,每组5只:(1)vehicle组;(2)ghrelin组;(3)ghrelin受体拮抗剂([D-Lys3]-GHRP-6 (DLS))组;(4)[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)+ ghrelin组。将大鼠转移至综合实验室动物监测系统(CLAMS; Columbus Instruments, Ohio)笼中以适应环境,并在第一次研究之前监测饲养和代谢参数4天。CLAMS系统中的单个笼子可用于测定食物摄入量以及活动(水平,垂直)和动态运动。注射药物或生理盐水后立即给予大鼠定量食物,连续监测4小时。

1.7 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠胃肠道转运的影响

为了观察大鼠 LHA 注射 ghrelin 对胃肠道转运速率(GITT)的影响,我们通过观察标记粪便颗粒排出的时间进行监测。将大鼠转移到单独的笼子中,通过管饲法施用 0.3 mL 6%

的不可吸收染料(胭脂红,溶于 0.5%甲基纤维素)。笼底用白纸覆盖,便于检测粪便中的胭脂红。强行管饲后,开始记录时间,大鼠随意饮食,直至第一个红色粪便排出,记录时间。

1.8 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($\bar{x} \pm SD$)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 结果

2.1 下丘脑 LHA 中 ghrelin 受体免疫阳性细胞的表达

荧光免疫染色显示在下丘脑 LHA 内可见 ghrelin 受体免疫阳性细胞的表达,且向 VMH 注射 FG,可在 LHA 中观察到荧光免疫阳性神经元(图 1)。

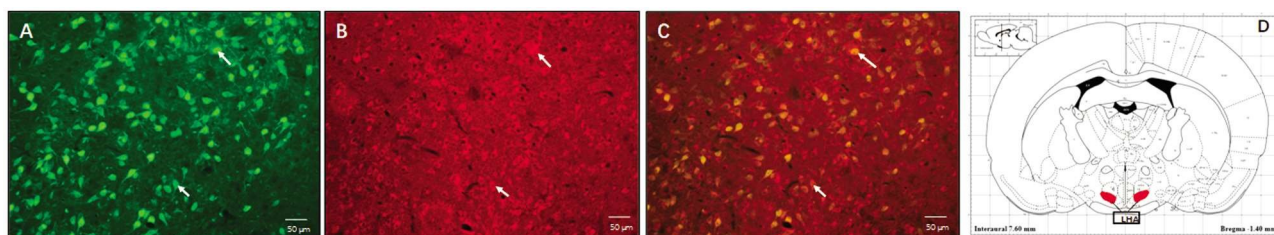


图 1 LHA 内 ghrelin 受体免疫阳性细胞的表达

A: LHA 内荧光金免疫阳性细胞; B: LHA 内 ghrelin 受体免疫阳性细胞; C: 荧光金与 ghrelin 受体免疫阳性双染神经元; D: 大鼠脑图谱中 LHA 位置(红色区域)

Fig.1 Expression of ghrelin receptor immunoreactive cells in LHA of hypothalamus

A: FG-labeled neurons in LHA; B: ghrelin-IR neurons in LHA; C: Double visualization of FG-labeled and ghrelin-IR neurons; D: Diagram for the sites of the LHA (red area) according to the Paxinos and Watson

2.2 Ghrelin 对大鼠摄食选择性的影响

大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,与正常饮食组相比,高脂饮食及高糖饮食均高于正常饮食,且高脂饮食摄入量增高显著($P < 0.05$,图 2A,B 和 C)。在正常饮食组中,大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,DIO 大鼠及 DR 大鼠摄食量显著高于正常大鼠($P < 0.05$,图 2A);同样,在高脂饮食组及高糖饮食组中,大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,DIO 大鼠及 DR 大鼠的摄食量均高于正常大鼠($P < 0.05$,图 2B,C)。而大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 受体拮抗剂 [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)后,对大鼠的摄食作用与 ghrelin 恰好相反 ($P < 0.05$,图 2A,B 和 C);且预注射 [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS),ghrelin 对大鼠的促摄食作用明显减弱($P < 0.05$,图 2A,B 和 C)。

2.3 电损毁 VMH 对大鼠摄食量的影响

为了探究大鼠 LHA 注射 ghrelin 后是否通过激活 VMH 中神经元发挥作用,本实验通过电损毁大鼠 VMH 后,向大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,观察对正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠摄食量的影响。结果显示在正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠中,与假损毁+ghrelin 组相比,电损毁+ghrelin 组大鼠的摄食量显著减少 ($P < 0.05$,图 3A,B,C),且与假损毁+[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)组相比,电损毁+[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)组大鼠摄食量同样显著减少($P < 0.05$,图 3A,B,C)。

2.4 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠自发活动的影响

大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠 X 轴、Y 轴方向上的活动增加($P < 0.05$,4A,B),且总活动增

加($P < 0.05$,4D),但 Z 轴方向上活动无明显改变($P > 0.05$)。且 DR 大鼠自发活动显著增高($P < 0.05$,图 4A,B,C 和 D),这表明 DR 大鼠抵抗肥胖的可能原因是自发活动量增加。

2.5 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠胃肠道转运速率的影响

为了探究大鼠摄食诱导的肥胖是否与大鼠胃肠道转运速率相关,因此通过测定大鼠有色粪便颗粒排出时间,比较大鼠胃肠道转运速率。结果显示与正常大鼠相比,LHA 注射 ghrelin,DIO 大鼠及 DR 大鼠的胃转运速率明显加快($P < 0.05$,图 5),且 DR 大鼠胃转运速率增加更为明显($P < 0.05$,图 5);LHA 微量注射 [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS),与 NS 注射组相比,正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的胃转运速率明显减慢($P < 0.05$,图 5)。这表明大鼠摄食诱导的肥胖可能与胃转运速率相关。

3 讨论

本实验主要目的是探究大鼠下丘脑 LHA-VMH ghrelin 信号通路是否参与正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的摄食选择、胃肠道转运速率及自发活动的调节。结果显示,大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,DIO 大鼠及 DR 大鼠的正常饮食、高脂饮食及高糖饮食均高于正常大鼠,且高脂饮食摄入量增高显著;预注射 ghrelin 受体拮抗剂 [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)显著阻断了这种作用;电损毁大鼠 VMH 显著减弱了 ghrelin 的促摄食作用。大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的自发活动中,X 轴、Y 轴方向上的活动增加,且总活动增加,但 Z 轴方向上活动无明显改变;LHA 微量注射 ghrelin,DIO 大鼠

及 DR 大鼠的胃转运速率明显加快,且 DR 大鼠胃转运速率增加更为明显,而预注射 ghrelin 受体拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6

(DLS)显著阻断 ghrelin 的促胃肠道转运作用。

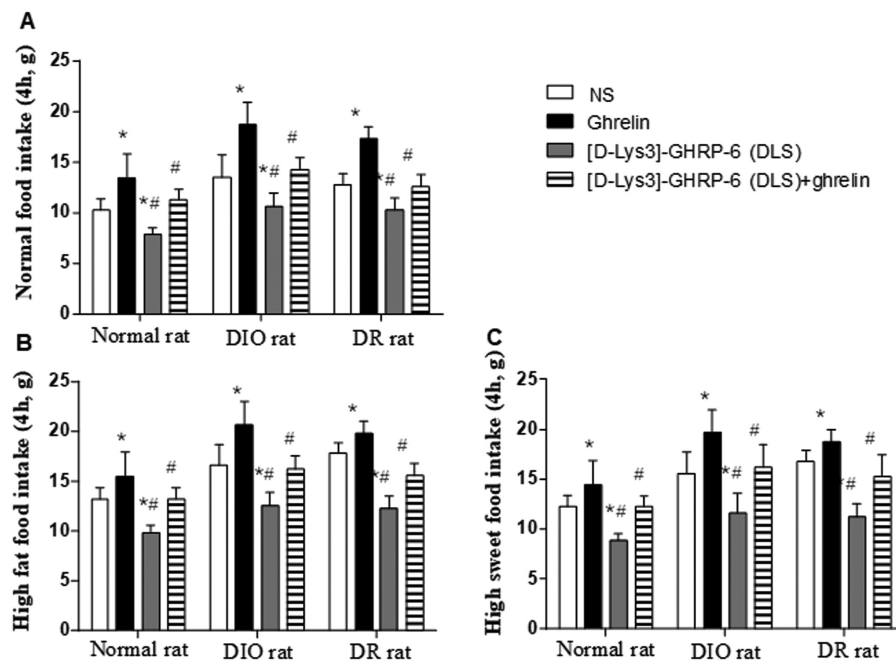


图2 Ghrelin 对大鼠摄食选择的的影响

A:LHA 注射 ghrelin,对正常大鼠,DIO 大鼠及 DR 大鼠正常饮食摄入量的影响;B:LHA 注射 ghrelin,对正常大鼠,DIO 大鼠及 DR 大鼠高脂饮食摄入量的影响;C:LHA 注射 ghrelin,对正常大鼠,DIO 大鼠及 DR 大鼠高糖饮食摄入量的影响。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,n=5 只大鼠/组

Fig.2 Effect of ghrelin on feeding selectivity in rats

A: A: The effect of LHA injection of ghrelin on normal dietary intake of normal rats, DIO rats and DR rats; B: LHA injection of ghrelin, high fat diet intake of normal rats, DIO rats and DR rats The effect of C: LHA injection of ghrelin on high glucose intake in normal rats, DIO rats and DR rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n=5 rats/group

* $P<0.05$, compared to vehicle group; # $P<0.05$, compared to ghrelin group

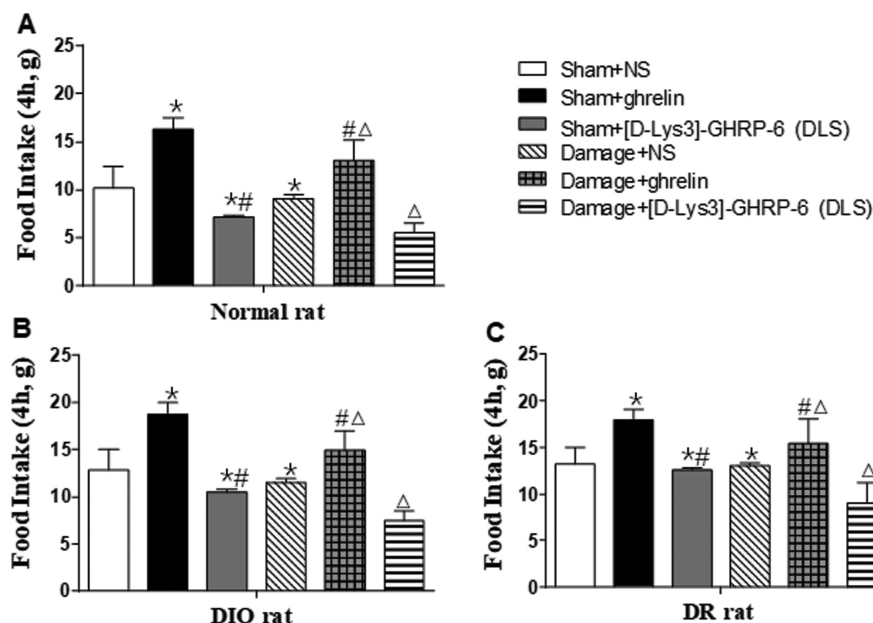


图3 电损毁 VMH 或 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠摄食量的影响

A:电损毁 VMH 或 LHA 微量注射 ghrelin 对正常大鼠摄食量的影响;B:电损毁 VMH 或 LHA 微量注射 ghrelin 对 DIO 摄食量的影响;C:电损毁 VMH 或 LHA 微量注射 ghrelin 对 DR 大鼠摄食量的影响。数据表示为平均值 $\pm$ SEM,n=5 只大鼠/组

Fig.3 Effect of electrical damage of VMH or ghrelin administered into the LHA on the food intake

A: Electrical damage VMH or LHA microinjection ghrelin on normal rats food intake; B: Electrical damage VMH or LHA microinjection ghrelin on DIO food intake; C: Electrical damage VMH or LHA microinjection ghrelin on DR rats The effect of food intake. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, n=5 rats/group

* $P<0.05$, compared to sham+NS group; # $P<0.05$, compared to sham+ghrelin group; Δ $P<0.05$, compared to damage+NS group

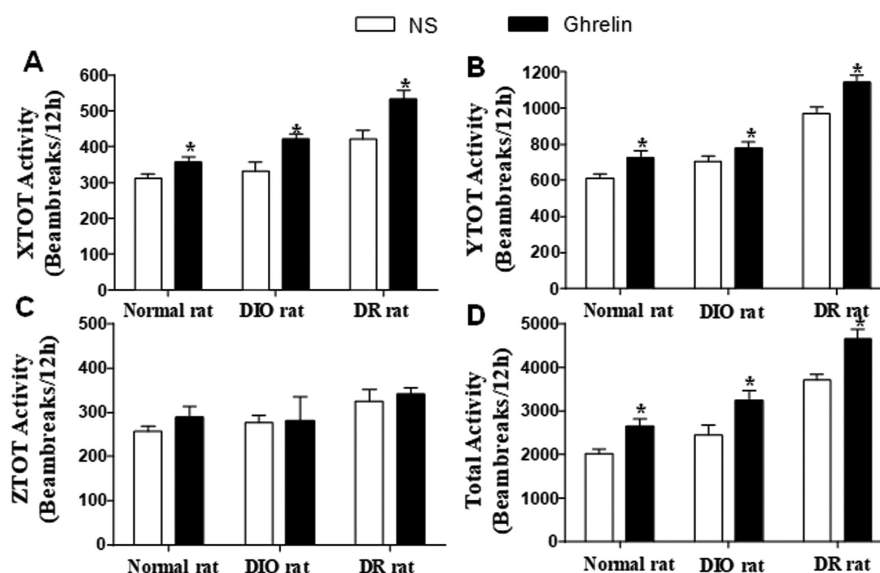


图4 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠自发活动的影响

A: LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠 XTOT 活动的影响; B: LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠 YTOT 活动的影响; C: LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠 ZTOT 活动的影响; D: LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠总活动的影响。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=5$ 只大鼠 / 组

Fig.4 Effect of ghrelin microinjection into LHA on the spontaneous activity of rat

A: effect of microinjection of ghrelin on XTOT activity in rats; B: effect of microinjection of ghrelin on YTOT activity in rats; C: effect of microinjection of ghrelin on ZTOT activity in rats; D: microinjection of ghrelin into LHA The impact of total mouse activity. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, $n=5$ rats/group

* $P < 0.05$, compared to vehicle group

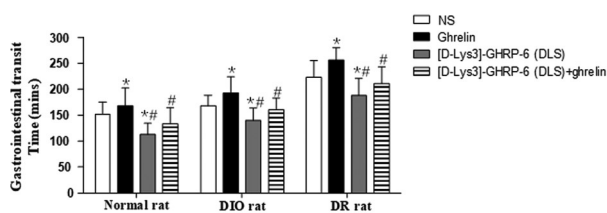


图5 LHA 微量注射 ghrelin 对大鼠胃肠道转运的影响

数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=5$ 只大鼠 / 组

图5 Effect of ghrelin microinjection into the LHA on gastrointestinal emptying in rats

Data are expressed as mean $\pm$ SEM, $n=5$ rats/group

* $P < 0.05$, compared to vehicle group; # $P < 0.05$, compared to ghrelin group

本研究首先通过免疫组织化学染色的方法证实了 LHA 中存在 ghrelin 受体的表达,且通过向大鼠 VMH 中注射荧光金,利用荧光金逆行追踪的特性,证实了 LHA 与 VMH 之间存在信号通路,这为接下来的实验提供了生理学及解剖学基础。LHA 主要参与摄食和能量平衡的调控,在饱腹状态下,电刺激 LHA 可促进大鼠摄食^[35-37]。本实验通过向正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠下丘脑 LHA 直接注射 ghrelin(3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)或其受体拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)(5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),观察 ghrelin 是否能够调节大鼠的正常饮食、高脂饮食及高糖饮食的摄入量,以及 LHA 中 ghrelin 受体是否参与 ghrelin 对大鼠代谢的调控,结果发现大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,与正常饮食组相比,高脂饮食及高糖饮食均高于正常饮食,且高脂饮食摄入量增高显著。在正常饮食组中,大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,DIO 大鼠及 DR 大鼠摄食量显著高于正常大鼠;同样,在高脂饮食组及高糖饮食组中,大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,DIO 大鼠及 DR

大鼠的摄食量均高于正常大鼠。而大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 受体拮抗剂[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS)后,对大鼠的摄食改变与 ghrelin 恰好相反;且预注射[D-Lys3]-GHRP-6 (DLS),ghrelin 对大鼠的促摄食作用明显减弱,表明 LHA 中的 ghrelin 受体在 ghrelin 调控摄食过程中发挥重要作用。先前研究表明 ghrelin 参与多种生理过程,包括调节睡眠/觉醒状态、能量平衡、能量稳态、奖励寻求和药物成瘾^[3-5]。Ghrelin 能够调节食欲、能量消耗和新陈代谢^[24]。因此,在本研究中,除了观察 ghrelin 对大鼠摄食的改变,还观察了对大鼠自发活动的影响。大鼠 LHA 微量注射 ghrelin 后,正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的自发活动中,X 轴,Y 轴方向上的活动增加,且总活动增加,但 Z 轴方向上活动无明显改变,且 DR 大鼠自发活动显著增高。先前研究表明,肥胖和肥胖抵抗的产生于发展因素诸多,包括代谢和遗传因素,并且遗传因素可能也因此影响代谢及能量利用^[38-40]。因此,在本研究中,尽管 DR 大鼠摄食量高于正常大鼠及 DIO 大鼠,但是却不肥胖,原因可能是其自发活动量增多,也就是说在 DR 大鼠中,ghrelin 诱导的自发活动增加产生的负能量明显超过 ghrelin 诱导的摄食增多产生的正能量。

既往研究表明 VMH 是下丘脑基底最大的核团,且其最重要的功能是调控哺乳动物的摄食行为^[41],本研究通过荧光金逆行追踪的方法证实了 LHA 与 VMH 之间存在信号通路,因此猜测大鼠极有可能存在 LHA-VMH ghrelin 信号通路。在正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠中,显著减弱了 ghrelin 的促摄食作用,这表明 LHA-VMH ghrelin 信号通路可能参与调控正常大鼠、DIO 大鼠及 DR 大鼠的摄食行为。

本实验为进一步探究 ghrelin 对大鼠摄食调节的潜在机制,通过测定大鼠有色粪便颗粒排出时间,以探究大鼠摄食诱

导的肥胖是否与大鼠胃肠道转运速率相关。结果显示与正常大鼠相比, LHA 注射 ghrelin, DIO 大鼠及 DR 大鼠的胃转运速率明显加快, 且 DR 大鼠胃转运速率增加更为明显; 而预注射 [D-Lys3]-GHRP-6 (DLS) 阻断了 ghrelin 的促大鼠的胃转运速率作用。这表明 DIO 大鼠及 DR 大鼠摄食量高于正常大鼠有可能是因为 DIO 大鼠及 DR 大鼠的胃转运速率高于正常大鼠。

总之, 大鼠的摄食选择性、胃肠道运动及大鼠自发活动的调控需由多个方面共同协调完成。同样, 人类肥胖相关疾病与摄食行为也具有很大关系, 本研究表明大鼠下丘脑 LHA 微量注射 ghrelin 能够诱导大鼠摄食选择性的改变, 以及大鼠胃肠道转运率和大鼠的自发活动的改变, 并且电损毁大鼠 VMH 后, 能够显著影响 LHA 注射 ghrelin 后引发的一系列改变。因此, 接下来的研究需要进一步的探究 ghrelin 与其它神经元或相关肽的相互作用, 以探讨治疗肥胖相关疾病的新的药理学策略。

参考文献(References)

- [1] Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302(2): 822-882
- [2] Janiuk I, Kaleczyc J, Kasacka I. Ghrelin-immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of hypertensive rats[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2016, 54(4): 181-185
- [3] Thomas MA, Ryu V, Bartness TJ. Central ghrelin increases food foraging/hoarding that is blocked by GHSR antagonism and attenuates hypothalamic paraventricular nucleus neuronal activation [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2016, 310(3): R275-285
- [4] Drott CJ, Franzén P, Carlsson PO. Ghrelin in rat pancreatic islets decreases islet blood flow [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, 7(8): 7-9
- [5] Aguinaga D, Medrano M, Cordero A, et al. Cocaine Blocks Effects of Hunger Hormone, Ghrelin, Via Interaction with Neuronal Sigma-1 Receptors[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(2): 1196-1210
- [6] Xu HC, Pang YC, Chen JW, et al. Systematic Review and Meta-analysis of the Change in Ghrelin Levels After Roux-en-Y Gastric Bypass [J]. *Obes Surg*, 2019, 29(4): 1343-1351
- [7] Hougland JL. Ghrelin octanoylation by ghrelin O-acyltransferase: Unique protein biochemistry underlying metabolic signaling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47(1): 169-178
- [8] Al Massadi O, Nogueiras R, Dieguez C, et al. Ghrelin and food reward [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 148(7): 131-138
- [9] Li G, Ji G, Hu Y, et al. Reduced plasma ghrelin concentrations are associated with decreased brain reactivity to food cues after laparoscopic sleeve gastrectomy [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2019, 100(6): 229-236
- [10] Rau TT, Sonst A, Rogler A, et al. Gastrin mediated down regulation of ghrelin and its pathophysiological role in atrophic gastritis [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2013, 64(6): 719-725
- [11] Even PC, Nadkarni NA. Indirect calorimetry in laboratory mice and rats: principles, practical considerations, interpretation and perspectives [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 303(4): R459-476
- [12] Geisel O, Hellweg R, Wernecke KD, et al. Total and acylated ghrelin plasma levels as potential long-term response markers in alcohol-dependent patients receiving high-dose of the GABA-B receptor agonist baclofen[J]. *Psychiatry Res*, 2019, 272(6): 431-437
- [13] Zhou G, Du R. Dynamic Ghrelin and GH serum levels during combined simultaneous arginine clonidine stimulation test in children with dwarfism[J]. *Ital J Pediatr*, 2019, 45(1): 17
- [14] Sales KMO, Cavalcanti RF, Nobre E Souza MA, et al. Gastrointestinal Symptoms in Inflammatory Bowel Disease Are Correlated with Gastric Emptying and Serum Levels of Active Ghrelin [J]. *Dig Dis*, 2019, 37(3): 226-233
- [15] Sharko AC, Fadel JR, Kaigler KF, et al. Activation of orexin/hypocretin neurons is associated with individual differences in cued fear extinction[J]. *Physiol Behav*, 2017, 178(7): 93-102
- [16] Lappano R, Maggiolini M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(2): 47-60
- [17] Orlova EG, Shirshov SV, Loginova OA. Mechanisms of Leptin and Ghrelin Action on Maturation and Functions of Dendritic Cells[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2019, 84(1): 1-10
- [18] Eraslan N, Elgin U, Şen E, et al. Comparison of total/active ghrelin levels in primary open angle glaucoma, pseudoexfoliation glaucoma and pseudoexfoliation syndrome [J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(5): 823-827
- [19] Popelová A, Kákonová A, Hrubá L, et al. Potential neuroprotective and anti-apoptotic properties of a long-lasting stable analog of ghrelin: an in vitro study using SH-SY5Y cells [J]. *Physiol Res*, 2018, 67(2): 339-346
- [20] Hsu TM, Noble EE, Reiner DJ, et al. Hippocampus ghrelin receptor signaling promotes socially-mediated learned food preference [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 131(4): 487-496
- [21] Han JE, Frasnelli J, Zeighami Y, et al. Ghrelin Enhances Food Odor Conditioning in Healthy Humans: An fMRI Study[J]. *Cell Rep*, 2018, 25(10): 2643-2652
- [22] Bagińska JO, Liszewska A, Wasilewska A, et al. The role of appetite-regulating hormones: Ghrelin and leptin in the nutritional status of children with neurogenic bladder due to myelomeningocele [J]. *J Paediatr Child Health*, 2018, 28(6)[Epub ahead of print]
- [23] Li D, Li S, Pan Q, et al. Gastric Mammalian Target of Rapamycin Signaling Contributes to Inhibition of Ghrelin Expression Induced by Roux-En-Y Gastric Bypass [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 664-680
- [24] Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors [J]. *Circulation*, 2001, 104(6): 2034-2038
- [25] Helmling S, Maasch C, Eulberg D, et al. Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(2): 13174-13179
- [26] Hukla AP, Mauer E, Igel LI, et al. Effect of Food Order on Ghrelin Suppression[J]. *Diabetes Care*, 2018, 41(5): e76-e77
- [27] Zhang W, Zhang Z, Chen J, et al. Ghrelin is expressed in the pregnant mammary glands of dairy goats and promotes the cell proliferation of mammary epithelial cells [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2018, 260(8): 115-124

- disease in age-, sex- and BMI-matched normo-glycemic adults [J]. *Metabolism*, 2018, 83: 120-127
- [19] Wu KT, Kuo PL, Su SB, et al. Nonalcoholic fatty liver disease severity is associated with the ratios of total cholesterol and triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol [J]. *J Clin Lipidol*, 2016, 10(2): 420-425
- [20] Pareja-Galeano H, Santos-Lozano A, Sanchis-Gomar F, et al. Circulating leptin and adiponectin concentrations in healthy exceptional longevity[J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 162: 129-132
- [21] Goodale T, Sadhu A, Petak S, et al. Testosterone and the Heart[J]. *Methodist Debakey Cardiovasc J*, 2017, 13(2): 68-72
- [22] Wang Z, Xu M, Peng J, et al. Prevalence and associated metabolic factors of fatty liver disease in the elderly [J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(8): 705-709
- [23] Huang F, Del-Río-Navarro BE, Torres-Alcántara S, et al. Adipokines, asymmetrical dimethylarginine, and pulmonary function in adolescents with asthma and obesity[J]. *J Asthma*, 2017, 54(2): 153-161
- [24] Brovin DL, Belyaeva OD, Pchelina SN, et al. Common Carotid Intima-Media Thickness, Levels of Total and High-Molecular Weight Adiponectin in Women With Abdominal Obesity [J]. *Kardiologiya*, 2018, 58(6): 29-36
- [25] Wang YX, Xu H, Liu X, et al. Studies on mechanism of free Nε - (carboxymethyl)lysine-induced toxic injury in mice [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 29: e22322
- [26] Bianchi G, Bugianesi E, Frystyk J, et al. Adiponectin isoforms, insulin resistance and liver histology in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Dig Liver Dis*, 2011, 43(1): 73-77
- [27] Zhang L, Yin Y, Zhang H, et al. Association of asthma diagnosis with leptin and adiponectin: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Invest Med*, 2017, 65(1): 57-64
- [28] Li P, Yang L, Ma CL, et al. Low-molecular-weight adiponectin is more closely associated with disease activity of rheumatoid arthritis than other adiponectin multimeric forms[J]. *Clin Rheumatol*, 2015, 34(6): 1025-1030
- [29] Liu Y, Retnakaran R, Hanley A, et al. Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(11): 4313-4318
- [30] Burgert TS, Taksali SE, Dziura J, et al. Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(11): 4287-4294
- [31] Chang Y, Ryu S, Sung E, et al. Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(4): 686-692
- [32] Lian K, Guo X, Huang Q, et al. Reduction Levels and the Effects of High-Molecular-Weight Adiponectin via AMPK/eNOS in Chinese Type 2 Diabetes [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2016, 124(9): 541-547
- [33] Saisho Y, Hirose H, Roberts R, et al. C-reactive protein, high-molecular-weight adiponectin and development of metabolic syndrome in the Japanese general population: a longitudinal cohort study[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73430

(上接第 444 页)

- [28] Charron CL, McFarland MS, Dhanvantari S, et al. Development of a [68Ga]-ghrelin analogue for PET imaging of the ghrelin receptor (GHS-R1a)[J]. *Medchemcomm*, 2018, 9(10): 1761-1767
- [29] Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure [J]. *J Pharmacol Exp Therap*, 2002, 302(2): 822-882
- [30] Ge T, Yang W, Fan J, et al. Preclinical evidence of ghrelin as a therapeutic target in epilepsy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35): 59929-59939
- [31] Yoshino Y, Funahashi Y, Nakata S, et al. Ghrelin cascade changes in the peripheral blood of Japanese patients with Alzheimer's disease[J]. *J Psychiatr Res*, 2018, 107(3): 79-85
- [32] Fernandez G, Cabral A, Andreoli MF, et al. Evidence Supporting a Role for Constitutive Ghrelin Receptor Signaling in Fasting-Induced Hyperphagia in Male Mice [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(2): 1021-1034
- [33] Kasanen I, Inhilä K, Savontaus E, et al. Diurnal rhythms of blood glucose, serum ghrelin, faecal IgA and faecal corticosterone in rats subjected to restricted feeding using the diet board [J]. *Lab Anim*, 2018, 52(1): 29-37
- [34] Fang C, Xu H, Guo S, et al. Ghrelin Signaling in Immunometabolism and Inflamm-Aging[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1090(4): 165-182
- [35] Chung H, Choi J, Park S. Ghrelin protects adult rat hippocampal neural stem cells from excessive autophagy during oxygen-glucose deprivation[J]. *Endocr J*, 2018, 65(1): 63-73
- [36] Rodriguez JA, Bruggeman EC, Mani BK, et al. Ghrelin Receptor Agonist Rescues Excess Neonatal Mortality in a Prader-Willi Syndrome Mouse Model[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(12): 4006-4022
- [37] Witjaksono F, Simadibrata M, Lukito W, et al. Profiles of peptide YY and ghrelin, levels of hunger and satiety, and ad libitum intake in obese and non-obese Indonesian women[J]. *Rom J Intern Med*, 2019, 57(1): 15-22
- [38] Szczesna M, Kirszt K, Misztal T, et al. Downregulation of LRb in VMH/DMH during the second half of gestation and upregulation of SOCS-3 in ARC in late-pregnant ewes - Implications for leptin resistance[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2019, 274(8): 73-79
- [39] Solomon A, De Fanti BA, Martí nez JA. Peripheral ghrelin participates in the glucostatic signaling mediated by the ventromedial and lateral hypothalamus neurons[J]. *Peptides*, 2006, 27(7): 1607-1615
- [40] Chen X, Ge YL, Jiang ZY, et al. Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats [J]. *Brain Res*, 2005, 1055(1-2): 131-136
- [41] Stevenson RJ, Francis HM. The hippocampus and the regulation of human food intake[J]. *Psychol Bull*, 2017, 143(10): 1011-1032