

· 论 著 ·

肥胖大鼠血糖及胰岛素水平与下丘脑中 增食欲素受体 1 的表达

马冬杰^{1,2}, 赵玉岩²

1. 沈阳市第四人民医院干诊科, 辽宁 沈阳 110031;

2. 中国医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁 沈阳 110001

摘要: **目的** 研究增食欲素受体 1 (OX1R) 反义硫代磷酸化 - 脱氧寡核苷酸 (OX1R-PS-ASODNs) 对肥胖大鼠下丘脑 OX1R 蛋白表达及血糖、胰岛素代谢的影响。**方法** 40 只大鼠建立高脂饮食诱导的肥胖大鼠模型 (肥胖组), 37 只造模成功, 另选择进食普通饲料大鼠 10 只为正常组。取 32 只肥胖模型大鼠随机分为反义组、错义组、盐水组、对照组, 每组 8 只, 除对照组外, 分别于侧脑室插管注射 OX1R 反义、错义硫代磷酸化 - 脱氧寡核苷酸及生理盐水。微型血糖仪检测各组大鼠血糖, 化学发光免疫法测定血清胰岛素, 免疫组化方法分析下丘脑 OX1R 蛋白的表达。**结果** 肥胖组大鼠体重、Lee's 指数、胰岛素、血糖及体脂含量均增加, 与正常组比较均有统计学差异 ($P < 0.01$)。下丘脑 OX1R 蛋白表达肥胖组较正常组增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。大鼠侧脑室注射 OX1R-PS-ASODNs 后, 肥胖大鼠反义组较对照组、错义组及盐水组 OX1R 蛋白表达减少, 血糖及胰岛素水平下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** OX1R 与营养性肥胖相关, 参与能量平衡与代谢调节, OX1R-PS-ASODNs 可减少营养性肥胖大鼠下丘脑 OX1R 蛋白的表达, 改善血糖及胰岛素水平。

关键词: 增食欲素; 增食欲素受体; 肥胖大鼠模型; 高脂饮食; 反义脱氧寡核苷酸

中图分类号: R 589.2 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)09-1157-04

Levels of blood glucose and insulin and expression of orexin receptor 1 in hypothalamus in obese rats

MA Dong-jie*, ZHAO Yu-yan

*Department of Cadre Diagnosis and Treatment, Fourth People's Hospital of Shenyang, Shenyang, Liaoning 110031, China

Corresponding author: ZHAO Yu-yan, E-mail: G572@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of orexin receptor 1 (OX1R) antisense phosphorothioate-oligodeoxynucleotides (OX1R-PS-ASODNs) on the metabolism of blood glucose and insulin and the expression of OX1R protein in hypothalamus of obese rats. **Methods** Obese model induced by high-fat diet was established in 40 rats (obesity group), and the obese model was successfully established in 37 rats. Ten rats fed ordinary feed were served as normal control group. Twenty-four rats of 32 obese rats were randomly divided into antisense group, mismatch group, saline group and control group ($n = 8$ each). Except for control group, OX1R antisense and mismatch phosphorothioate-oligodeoxynucleotides (PS-ODNs) and normal saline were respectively given via intracerebroventricular intubation injection in the other 3 groups. Mini glucometer was used to detect blood glucose. Chemiluminescence immunoassay (DPC corporation analyzer) was used to detect serum insulin. Immunohistochemical assay was used to analyze the expression of OX1R protein in hypothalamus. **Results** Compared with normal control group, body weight, Lee's index and the expression of OX1R protein in hypothalamus in obesity group increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). After intracerebroventricular injection of OX1R-PS-ASODNs, OX1R protein expression level decreased, and the levels of blood glucose and insulin declined in obesity group compared with control group, mismatch group and saline group (all $P < 0.01$). **Conclusion** OX1R is associated with nutritional obesity and participates in energy balance and metabolic regulation, while OX1R-PS-ASODNs can decrease the expression of OX1R protein in hypothalamus and improve blood glucose and insulin levels for the nutritional obesity rats.

Key words: Orexin; Orexin receptor; Obese rat model; High-fat diet; Antisense oligodeoxynucleotides

肥胖是一种由多种因素引起的慢性代谢性疾病。肥胖可能引发很多其他疾病,对人体的健康造成严重威胁。增食欲素(Orexin, OX)是 1998 年发现的全新的两种神经肽,通过下丘脑的增食欲素受体 1, 2 (Orexin receptor 1, OX1R; Orexin receptor 2, OX2R) 参与能量代谢平衡、睡醒周期、自主神经系统、生长生殖、神经内分泌等过程^[1]。本研究对膳食诱导营养性肥胖型大鼠模型中 OX1R 的表达情况进行检测,并干扰下丘脑 OX1R 表达,观察肥胖大鼠侧脑室注射反义硫代磷酸化-脱氧寡核苷酸(OX1R-PS-ASODNs)对肥胖大鼠血清胰岛素含量、血糖及 OX1R 水平的影响,以探讨下丘脑中 OX1R 的表达与血糖及胰岛素的相关性。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立 成年雄性 Wistar 大鼠共 50 只,体重 180 ~ 200 g,由中国医科大学动物部提供。随机分为高脂肪膳食组(A 组,40 只),进食高脂肪饲料,配方参考文献[2]。正常组(B 组,10 只)进食普通饲料。

1.2 动物模型鉴定 大鼠体重超过标准体重的 120% 即达到了肥胖的标准^[3],10 周后共有 37 只大鼠达到标准。随机选取 5 只肥胖大鼠, Lee's 指数、体重、体脂含量较正常组增加,差异有统计学意义,提示肥胖模型制备成功。

1.3 标本采集 每组大鼠随机抽取 5 只,行颈动脉穿刺取血,采血后立即取血 1 滴,微型血糖仪测定血糖,其余血样 3 000 rpm 离心 10 min 分离血清,化学发光免疫法(DPC 公司分析仪)检测血清胰岛素水平。上述操作均按试剂盒说明书进行。宰杀大鼠,取其附睾周围脂肪、肾周脂肪并称重。分离下丘脑(视交叉与乳头体之间)作为免疫组化检测 OX1R 蛋白标本,置于固定液中。

1.4 侧脑室插管与给药方法

1.4.1 脱氧寡核苷酸的合成 OX 受体基因 mRNA 起始子反义脱氧寡核苷酸序列为 5'-ACT AGC AGT GGG GAA CCC TT-3', 错义寡核苷酸序列为 5'-TGC GAA GAC CAT AGG TCT CG-3'由大连宝生物技术有限公司合成,末端硫代磷酸化修饰,用前以生理盐水稀释。

1.4.2 动物分组与插管 取 32 只肥胖模型大鼠随机分为错义组、盐水组、反义组、对照组,每组 8 只。具体步骤如下:10%水合氯醛(3 mg/kg 鼠重)腹腔

麻醉;将头部固定于立体定位仪上,沿头中线剪开皮肤,暴露前囟,于前囟向后 1.5 mm、矢状缝旁右侧 1.5 mm 处,插入一根不锈钢管,垂直插入颅骨下 4.0 mm,见有脑脊液流出,表明插入位置正确,用牙科水泥将导管固定,局部注射青霉素预防感染;缝合伤口。大鼠恢复 3 d 后,每日 09:00、15:00 时在大鼠清醒状态下,给对照组以外的反义组、错义组、盐水组三组大鼠从导管分别注入 OX1R 反义的 OX1R-PS-ASODNs、错义的磷酸化-脱氧寡核苷酸(OX1R-PS-ODNs) 50 μ g (5 μ g/ μ l) 及等容积生理盐水,每天 2 次,连续 2 d;2 d 后麻醉下心脏取血,分离血清。处死大鼠,分离下丘脑作为免疫组化标本置于固定液中。

1.5 应用免疫组化方法分析下丘脑 OX1R 的变化

采用免疫组化 SABC 法制备下丘脑组织石蜡切片,切片脱蜡、脱水,滴加 3% H₂O₂ 1 滴,消除内源性过氧化物酶活性,高压修复抗原,5% BSA 封闭,滴加 1:150 稀释的兔抗大鼠 OX1R 抗体, PBS 浸泡 5 min \times 3 次;滴加生物素标记的第二抗体(1:100) 37 $^{\circ}$ C 20 min, PBS 冲洗 5 min, 3 次。滴加 100 μ l SABC(1:100) 37 $^{\circ}$ C 20 min, PBS 冲洗 5 min, 3 次, DAB 显色 3 ~ 5 min, 自来水冲洗,阴性对照用 PBS 替代一抗,苏木素复染、乙醇脱水、透明、封片。图像采集:通过显微镜、图像采集卡、数码相机采集数字图像,先在 4 倍镜下找组织及其范围,然后确定阳性部位,显色结果在 10 \times 40 高倍镜下进行半定量分析。随机抽取 5 个视野,测量图像中阳性区域面积和阳性比率,将结果输入 Image-Pro-Plus 细胞图像分析系统测定 OX1R 蛋白表达的平均光密度(AOD)与综合积分光密度(IOD)。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计。数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用独立样本 *t* 检验; *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体重及 Lee's 指数变化 正常组与高脂肪膳食达肥胖大鼠体重及 Lee's 指数差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。见表 1。

2.2 体脂含量的变化 肾周脂肪、附睾脂肪、体脂含量肥胖大鼠均显著高于正常组大鼠 (*P* < 0.01)。见表 2。

2.3 血糖及胰岛素水平变化 肥胖大鼠血糖及胰岛素水平较对照组明显增高,差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。见表 3。

2.4 肥胖大鼠各亚组血糖、胰岛素水平比较 反义组较对照组血糖及胰岛素水平有统计学差异 ($P < 0.01$)。错义组及盐水组与对照组比较血糖、胰岛素均无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 4。

2.5 免疫组化结果 OX1R 蛋白在大鼠下丘脑中细胞的胞浆中显示为棕黄色着色颗粒。见图 1。

2.6 图像分析结果 正常组下丘脑 OX1R 阳性染色的 IOD 与肥胖大鼠总体比较明显降低 ($P < 0.05$)。肥胖大鼠反义组较对照组 OX1R 阳性染色的综合 IOD 明显减少 ($P < 0.05$)；错义组及盐水组与对照组比较 OX1R 综合 IOD 无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 5。

表 1 正常组与高脂肪膳食达肥胖大鼠体重及 Lee's 指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	体重(g)	Lee's 指数(g/cm)
正常组	10	350.80 ± 16.00	297.24 ± 3.32
高脂肪膳食达肥胖大鼠	37	436.40 ± 12.40*	305.10 ± 2.28*

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

表 2 正常组与肥胖大鼠体脂含量比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	肾周(g)	附睾(g)	体脂含量(%)
正常组	4.64 ± 0.14	3.90 ± 0.24	2.40 ± 0.04
肥胖大鼠	6.61 ± 0.21*	5.88 ± 0.52*	2.85 ± 0.14*

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

表 3 正常组与肥胖大鼠血糖及胰岛素水平比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	空腹血糖(mmol/L)	胰岛素水平(mIU/L)
正常组	6.66 ± 1.08	11.19 ± 1.28
肥胖大鼠	9.14 ± 1.12*	14.98 ± 2.51*

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

表 4 各亚组血糖及胰岛素水平比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	空腹血糖(mmol/L)	胰岛素水平(mIU/L)
错义组	9.64 ± 1.26	15.20 ± 1.90
反义组	7.10 ± 0.46*	12.45 ± 1.71*
盐水组	9.12 ± 1.00	15.07 ± 1.94
对照组	9.16 ± 0.97	15.11 ± 2.25

注:与对照组比较, * $P < 0.01$ 。

表 5 各组下丘脑 OX1R 阳性表达的综合 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	IOD
正常组	10	50.40 ± 11.44
肥胖大鼠	32	66.30 ± 13.98 ^a
对照组	8	69.10 ± 11.87
反义组	8	39.50 ± 12.66 ^b
错义组	8	68.34 ± 13.12
盐水组	8	66.04 ± 12.09

注:与正常组比较, ^a $P < 0.05$;与对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

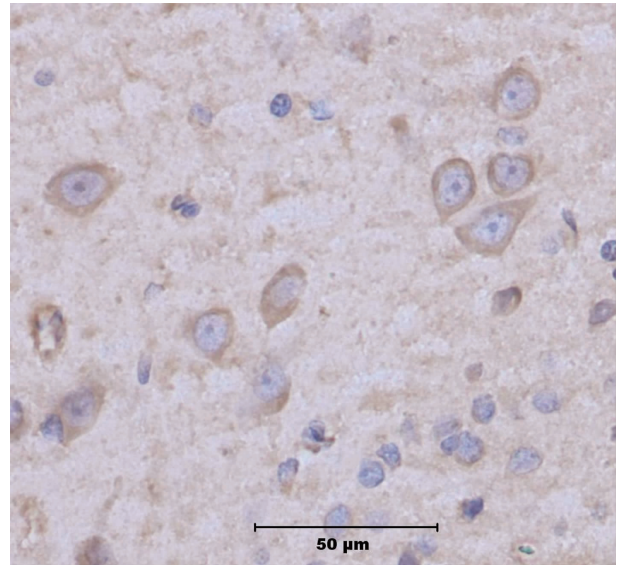


图 1 OX1R 蛋白在大鼠下丘脑细胞中的表达 (免疫组化染色, ×400)

3 讨论

近 40 年来, 糖尿病患病率升至 10.4%, 肥胖人群中糖尿病又升高了 2 倍, 有研究显示肥胖儿童糖尿病发病率也明显升高^[3]。肥胖是一种由多种因素引起的慢性代谢性疾病。肥胖的发病机制有多种学说, 可能与遗传、营养过剩、内分泌紊乱、中枢神经系统异常等因素有关^[4], 治疗起来更具挑战性。目前很多研究表明 OX 系统参与肥胖的发病过程。OX A 和 B 是 1998 年发现的两个神经肽, 神经肽研究机构利用现代分子生物学技术进行研究和分析, 发现它们起源于前增食欲素原, 多表达于下丘脑外侧区并延伸至丘脑后部, 也表达于肾脏、肾上腺、甲状腺、睾丸、卵巢、空肠、肺等外周组织, OX 可以作为一个循环激素和 (或) 自分泌及旁分泌物质, 通过 OX1R、OX2R 这两种受体发挥作用, 参与机体能量平衡、激素代谢、睡眠/唤醒、心血管功能、生殖等多方面的调控^[5]。OX 特异性的由下丘脑分泌, 下丘脑外侧区是经典的摄食中枢, 已经有多种研究表明 OX A 与肥胖相关, OX 通过促进摄食、调节自发运动、调节胃肠功能、影响能量平衡等多方面参与肥胖的发生^[6], 且摄食行为是由 OX1R 介导的。OX1R 主要分布在下丘脑腹外侧核和肾上腺髓质中。选择性 OX1R 拮抗剂可以减少肥胖大鼠食物摄入量, 减轻体重, 有研究表明 OX2R 激动剂可以减少高脂饲料喂养的大鼠进食量, 对正常饮食大鼠进食量却没有影响^[7]。本实验结果肥胖组大鼠下丘脑 OX1R 表达明显增加, 与正常组有明显差异, 证实 OX 系统参与机体能量平衡系统的调节, OX 系统调节动物的进食过程可能与其本身能量状态相关。

OX 系统对血糖的影响可能通过中枢及外周机制,中枢机制包括下丘脑外侧存在大量对葡萄糖敏感的神经元,下丘脑中神经元对葡萄糖即使是微弱的变化也非常敏感^[8]。目前有研究表明急性低血糖会诱导大鼠下丘脑 OX A 的 mRNA 表达增加^[9],另外 OXR 通过刺激肾上腺受体信号相关的交感神经调节血糖^[10],有研究表明皮下注射 ORA 会引起动物血糖水平升高。另外 OXR 受体也通过外周组织胰腺、肝脏、肾上腺等对血糖调节^[11],目前已有很多实验证明大鼠皮下注射 OX 可引起胰岛素水平升高,且增食欲素在胰岛内分泌腺也有表达,可刺激胰腺液体和酶的分泌^[12]。本研究给肥胖大鼠注射仅有 OX1R-PS-ASODNs 后,OX1R 蛋白表达明显减少、血糖降低、胰岛素水平下降,可以推断 OXR 通过下丘脑中枢神经系统参与血糖及胰岛素水平的调节。OXR 影响血糖及胰岛素的机制还需进一步研究,也可能与大鼠体重减轻、进食减少及活动增加有关。

高脂肪膳食会导致机体营养性肥胖,肥胖大鼠体内 OXR 表达增加,OR 系统肥胖发展过程中起重要作用,并与机体血糖及胰岛素水平相关。干扰肥胖大鼠 OXR 的表达,可以改善血糖及胰岛素水平,或许可以为治疗肥胖及糖尿病提供一个新的研究方向。血糖及胰岛素代谢与 OX 更深层次的关系尚需进一步研究。

参考文献

[1] 张靓,赵玉岩,常晓岑,等. 增食欲素系统及其功能的研究进展[J]. 中国糖尿病杂志,2017,25(9):847-850.

- [2] Park ES, Yi SJ, Kim JS, et al. Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high-fat diet fed rats[J]. *J Vet Sci*, 2004, 5(4):295-302.
- [3] 刘晶,李彩英,高哲,等. 青少年儿童糖尿病临床分析[J]. 河北医药,2013,35(7):987-988.
- [4] 米成林,贾刚,邓秋红,等. 增食欲素 A 在动物糖脂代谢平衡中的作用和机制[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(9):2491-2498.
- [5] Russo F, Pavone LM, Tafuri S, et al. Expression of orexin A and its receptor 1 in the bovine urethroprostatic complex [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008, 291(2):169-174.
- [6] 郝圆圆,张婷婷,袁红网,等. 增食欲素干预单纯性肥胖的作用及机制[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2014, 34(5):324-326.
- [7] Funato H, Tsai AL, Willie JT, et al. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity [J]. *Cell Metab*, 2009, 9(1):64-76.
- [8] Inutsuka A, Yamanaka A. The regulation of sleep and wakefulness by the hypothalamic neuropeptide orexin/hypocretin[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2013, 75(1/2):29-36.
- [9] 赵琳,贾鲲鹏,王璐,等. 胰岛素诱导的低血糖大鼠下丘脑增食欲素 A 的表达[J]. *中国应用生理学杂志*, 2014, 30(3):212-213, 217.
- [10] Russo F, Maruccio L, Calamo A, et al. Orexin 1 receptor in the seminiferous tubules of boar testis: an immunohistochemical study [J]. *Acta Histochem*, 2014, 116(1):286-288.
- [11] 常晓岑,赵玉岩,郑德禄,等. 增食欲素对肾上腺功能的调节作用及其机制的研究进展[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29(5):435-437.
- [12] Heinonen MV, Purhonen AK, Mäkelä KA, et al. Functions of orexins in peripheral tissues [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2008, 192(4):471-485.

收稿日期:2018-04-12 编辑:王国品