

# 慢性束缚应激大鼠下丘脑弓状核食欲 调控因子的变化\*

王霞<sup>1,2</sup>, 王少贤<sup>1,2△</sup>, 方朝义<sup>1,2</sup>, 王杰鹏<sup>1</sup>, 旷湘楠<sup>1</sup>, 赵丹<sup>1</sup>, 王一旭<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>河北中医学院中医诊断教研室, <sup>2</sup>河北省心脑血管病中医药防治重点实验室, 河北 石家庄 050200)

**[摘要]** **目的:** 观察慢性束缚应激大鼠血清中瘦素(leptin)及下丘脑弓状核(arcuate nucleus, ARC)中瘦素受体(leptin receptor, LEPR)、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY)、刺鼠相关蛋白(agouti-related protein, AgRP)、阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)和可卡因苯丙胺调节转录物(cocaine amphetamine-regulated transcript, CART)的表达变化,探讨慢性束缚应激大鼠出现摄食减少和体重减轻等表现的中枢机制。**方法:** 90只SD健康雄性大鼠随机分为空白对照(BC)组、7d应激(7-S)组和21d应激(21-S)组。7-S组和21-S组大鼠每天接受连续3h束缚应激,分别持续7d和21d;BC组正常饲养21d,不予应激干预。观察各组大鼠摄食量和体重变化,ELISA方法测定血清中leptin和下丘脑ARC中LEPR含量;Western blot和RT-qPCR法分别检测下丘脑ARC中LEPR、NPY、AgRP、POMC和CART的蛋白和mRNA表达水平;并用Pearson相关系数法探究21-S组大鼠体重/摄食量变化与ARC中上述食欲因子mRNA表达的关系。**结果:** 与同一时点BC组相比,7-S组和21-S组大鼠的摄食量减少,体重增长延缓。7-S组和21-S组大鼠血清leptin水平,以及ARC中LEPR、POMC和CART的蛋白和mRNA表达较BC组有不同程度升高( $P < 0.05$ ),而NPY和AgRP的蛋白和mRNA表达则显著降低( $P < 0.05$ ),且21-S组变化最为明显。Pearson相关分析表明,21-S组大鼠体重与其ARC中LEPR和CART的mRNA表达呈显著负相关( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),与NPY的mRNA呈显著正相关( $P < 0.05$ );摄食量与POMC的mRNA表达呈显著负相关( $P < 0.05$ );体重与摄食量的相关性分析无统计学显著性。**结论:** 慢性束缚应激大鼠下丘脑ARC内部食欲因子表达与其体重/摄食变化存在一定关联性,但其作用机制有待进一步探讨。

**[关键词]** 慢性束缚应激;弓状核;瘦素;瘦素受体;食欲

**[中图分类号]** R749; R363

**[文献标志码]** A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.03.015

## Changes of appetite regulation factors in hypothalamic arcuate nucleus of rats after chronic immobilization stress

WANG Xia<sup>1,2</sup>, WANG Shao-xian<sup>1,2</sup>, FANG Chao-yi<sup>1,2</sup>, WANG Jie-peng<sup>1</sup>, KUANG Xiang-nan<sup>1</sup>, ZHAO Dan<sup>1</sup>, WANG Yi-xu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Diagnostics of Chinese Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, <sup>2</sup>Key Laboratory of Cardio-cerebrovascular Diseases Treated with Chinese Medicine of Hebei Province, Shijiazhuang 050200, China. E-mail: muhudie@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To observe the changes of serum leptin, and leptin receptor (LEPR), neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP), proopiomelanocortin (POMC) and cocaine amphetamine-regulated transcript (CART) in hypothalamic arcuate nucleus (ARC), and to explore the central mechanism of loss of appetite and body weight in the rats after chronic immobilization stress. **METHODS:** Sprague-Dawley (SD) rats ( $n = 90$ ) were randomly divided into the following groups: blank control (BC) group, 7-d stress (7-S) group and 21-d stress (21-S) group. The rats in 7-S group and 21-S group were subjected to 3 h of immobilization stress each day for 7 d and 21 d, respectively. The rats in BC group were kept for 21 d without stress intervention. The food intake and body weight were observed. The levels of serum leptin and LEPR in ARC were detected by ELISA, and the expression of LEPR, NPY, AgRP, POMC and CART at

[收稿日期] 2018-04-23

[修回日期] 2018-07-21

\*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81673881; No. 81202644); 河北省自然科学基金资助项目 (No. H2016423049)

△通讯作者 Tel: 0311-89926262; E-mail: muhudie@163.com

mRNA and protein levels in ARC was determined by RT-qPCR and Western blot. The correlations of between body weight/food intake and the mRNA expression of appetite factors in ARC of the rats in 21-S group were observed by Pearson correlation analysis. **RESULTS:** The food intake was less and the growth of body weight was slower in the rats in 7-S group and 21-S group than those in BC group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with BC group, the serum level of leptin, and the expression of LEPR, POMC and CART at mRNA and protein levels were all increased in 7-S group and 21-S group, while NPY and AgRP were significantly reduced, especially in 21-S group ( $P < 0.05$ ). The results of Pearson correlation analysis indicated that the mRNA expression of LEPR and CART were negatively correlated with the body weight of the rats in 21-S group significantly ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the mRNA expression of NPY was positively correlated with the body weight significantly ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of POMC was negatively correlated with the food intake significantly ( $P < 0.05$ ). No obvious correlation between body weight and food intake was observed. **CONCLUSION:** Under chronic stress condition, there are certain correlations between appetite factors in ARC and body weight/food intake, but the specific signaling pathways still need further study.

[**KEY WORDS**] Chronic immobilization stress; Arcuate nucleus; Leptin; Leptin receptor; Appetite

伴随着社会竞争日益激烈和生活节奏不断加快,紧张的工作环境、复杂的人际关系和沉重的经济压力等长期、慢性心理应激已成为威胁人类健康的重要因素。机体体重增长缓慢和饮食量下降,则是常见的慢性应激反应。本研究动态观察了慢性束缚应激大鼠摄食量及体重变化,并采用 ELISA、Western blot 和 RT-qPCR 方法分别测定其血清瘦素(leptin)水平及下丘脑弓状核(arcuate nucleus, ARC)中食欲调控因子瘦素受体(leptin receptor, LEPR)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)、刺鼠相关蛋白(agouti-related protein, AgRP)、阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)和可卡因苯丙胺调节转录物(cocaine amphetamine-regulated transcript, CART)的表达情况,以探讨应激状态下机体出现摄食和能量代谢异常的中枢机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物

雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号为 SCXK(京)2012-0001。动物饲养于清洁级动物房,光照明暗各 12 h(明 7:00 ~ 19:00,暗 19:00 ~ 7:00),恒温、恒湿[室温( $21 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度 40% ~ 60%],自由摄食,饮水。

### 2 试剂与仪器

**2.1 主要试剂** Leptin 和 LEPR ELISA 试剂盒购自 Phoenix Pharmaceuticals;RIPA 裂解液购自 Pierce Biotechnology;兔抗 AgRP 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology;兔抗 LEPR 抗体购自 Invitrogen;兔抗 POMC 抗体购自 Signalway Antibody;兔抗 NPY 和兔抗 CART 抗体购自 Cell Signaling Technology;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗

兔 IgG 购自北京中杉金桥生物公司;TRIzol 购自 Invitrogen;M-MLV 反转录试剂盒购自 Promega;SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Fementas。

**2.2 主要仪器** T10 型手持电动匀浆器购自 IKA;SpectraMax<sup>®</sup> Plus 384 读板机(酶标仪)购自 MD;ND2000 型微量分光光度计购自 Thermo;ABI 7300 型荧光定量 PCR System 购自 ABI;DYY-III 型电泳仪、DYY-III40B 型转膜槽和 DYCZ-24D 型垂直电泳槽购自北京六一生物科技有限公司;凝胶成像系统购自 UVP;3K15 低温离心机购自 Sigma。

### 3 方法

**3.1 动物分组及模型制备** 90 只实验大鼠适应饲养 1 周,随机分为空白对照(blank control, BC)组、7 d 应激(7-d stress, 7-S)组和 21 d 应激(21-d stress, 21-S)组,每组 30 只。应激方法同参考文献<sup>[1]</sup>,将大鼠束缚于特制的 T 型束缚架上,每日 3 h,束缚时点随机。7-S 组和 21-S 组分别持续束缚应激 7 d 和 21 d;BC 组大鼠常规饲养 21 d,不予束缚应激干预。

**3.2 摄食量和体重检测** 称量大鼠应激前 1 d(day 0)的体重和摄食量及应激后连续 21 d(day 1 ~ day 21)的体重和摄食量。摄食量计算以前 1 d 给食量减去当天剩余食量。

**3.3 检测标本制备** 7-S 组于实验第 8 天、BC 组和 21-S 组于实验第 22 天,以 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,断头取血 2 mL 分离血清备用;冰盘上快速取脑,液氮速冻,抠取 ARC 组织, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**3.4 ELISA 法测定大鼠血清 leptin 及下丘脑 ARC LEPR 的含量** 根据 ELISA 试剂盒操作说明,于酶标仪上检测血清 leptin 含量。另取脑组织 ARC 置 1 mL NaCl 溶液中煮沸 3 min,加 0.5 mL 1 mol/L 冰醋酸,手持电动匀浆器匀浆,以 0.5 mL 1 mol/L NaOH 中和混匀,离心,取上清,根据试剂盒说明检测 ARC 组织

中 LEPR 蛋白含量。

**3.5 Western blot 法测定下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART 的蛋白表达** ARC 组织置 EP 管,加 RIPA 缓冲液 1 mL 进行匀浆,冰浴反应,充分裂解,离心,取上清,提取总蛋白,采用分光光度计测定蛋白含量。每个蛋白样本取 30  $\mu\text{g}$  进行 SDS-PAGE,转至 PVDF 膜。用蒸馏水振荡洗膜 3 次,每次 5 min,然后以 5% 脱脂奶粉,脱色摇床摇动封闭 1 h;TBST 振荡洗膜 3 次,每次 5 min,加兔源性 I 抗( $\beta$ -actin、LEPR、NPY、POMC 和 CART 抗体的稀释度均为 1:300,AgRP 抗体的稀释度为 1:200),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;TBST 振荡洗膜 3 次,每次 5 min,加入 1:3 000 的 II 抗(山羊抗兔 IgG-HRP),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;TBST 室温洗膜 3 次,每次 10 min,然后用 TBS 洗膜 5 min,化学发光法获得目标条带。Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带积分吸光度(IA), $\beta$ -actin 为内参照,分别计算 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART 蛋白表达相对含量。

**3.6 RT-qPCR 法测定下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC、CART 的 mRNA 表达** 每样本 50  $\mu\text{g}$ ,TRIzol 法提取 ARC 组织总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定  $A_{260}$  与  $A_{280}$ ,结果 28S 和 18S 条带清晰可见,5S 条带较弱弥散,表明所提取总 RNA 降解较少,完整性良好; $A_{260}/A_{280}$  比值在 1.8 ~ 2.0 之间,纯度较高,可用于后续反转录反应。

根据 M-MLV 反转录试剂盒说明操作,20  $\mu\text{L}$  反应体系(总 RNA 1  $\mu\text{g}$ )于 PCR 仪上 42  $^{\circ}\text{C}$  50 min,95  $^{\circ}\text{C}$  5 min,灭活反转录酶,逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,根据试剂盒说明操作,进行荧光定量 PCR 扩增:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min;DNA 变性 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,退火 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s,引物延伸 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环,于每个循环引物延伸时收集荧光信号。以  $\beta$ -actin 作为内参照,空白对照组第 1 号样品设定为标准 1,SDSV1.3 软件分析获得各样本目的基因 Ct 值, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{实验组}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}}) - (\text{Ct}_{\text{对照组}} - \text{Ct}_{\beta\text{-actin}})$ ,根据公式  $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  计算各样本 LEPR、AgRP、NPY、POMC 和 CART mRNA 表达量,用于统计分析。

LEPR 的上游引物序列为 5'-GCCAAAGTCAAC-TACGCTCTT-3',下游引物序列为 5'-CTTCCAT-ACGCAAACCCA-3';NPY 的上游引物序列为 5'-CGTGTGTTTGGGCATTCT-3',下游引物序列为 5'-CAGTGTCTCAGGGCTGGAT-3';AgRP 的上游引物序列为 5'-CTGCCGCTTCTTCAATACC-3',下游引物序列为 5'-CTTTGCCAACATCCGTT-3';POMC 的上游引物序列为 5'-TGCTTCAGACCTCCATAGACG-3',

下游引物序列为 5'-AGGGCTGTTTCATCTCCGTT-3';CART 的上游引物序列为 5'-GACATCTACTCTGC-CGTGGA-3',下游引物序列为 5'-CGGAAT GCGTT-TACTCTTGA-3'; $\beta$ -actin 的上游引物序列为 5'-GGT-CATCACCATTGGCAA-3',下游引物序列为 5'-GAGTTGAAGGTAGTTTTCGTGGA-3'。

#### 4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。数据以均值  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示,采用一般线性模型的重复测量过程对体重和摄食量数据进行单变量方差分析,并用多因素方差分析 LSD 法进行相同时点上的两组间比较;其它数据进行单因素方差分析,多组间比较采用 SNK-*q* 法。21-S 组大鼠体重/摄食量和下丘脑弓状核食欲因子表达的相关性采用 Pearson 相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 慢性束缚应激对大鼠体重和摄食量的影响

从表 1 可以看出,束缚应激前,BC 组和 21-S 组大鼠体重和摄食量的差异无统计学显著性。从束缚应激第 2 天开始,在相同时点内 21-S 组大鼠的体重明显低于 BC 组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );从束缚第 1 天开始,在相同时点内 21-S 组大鼠摄食量始终低于 BC 组,尤其在应激第 1、7、8、10、11 及 13~21 天,2 组间的差异最为明显( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见表 1。

### 2 慢性束缚应激对大鼠血清 leptin 及下丘脑 ARC 中 LEPR 含量的影响

大鼠血清中 leptin 含量 7-S 组和 21-S 组较 BC 组均明显增加( $P < 0.05$ );7-S 组和 21-S 组相比差异无统计学显著性,见表 2。

大鼠下丘脑 ARC 中 LEPR 含量 7-S 组和 21-S 组较 BC 组均有所增加,尤其 21-S 组增加更为明显( $P < 0.05$ ),见表 2。

### 3 慢性束缚应激对大鼠下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART 蛋白表达的影响

与 BC 组比较,7-S 组和 21-S 组大鼠下丘脑的 ARC 中 NPY 和 AgRP 蛋白表达水平均显著下降( $P < 0.05$ ),LEPR、POMC 和 CART 的蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ );21-S 组较 7-S 组 ARC 中 NPY 和 AgRP 的蛋白表达水平明显减少( $P < 0.05$ ),而 LEPR 和 POMC 表达则有所增高( $P < 0.05$ ),7-S 组和 21-S 组大鼠下丘脑 ARC 中 CART 蛋白表达虽然也有所变化,但组间比较差异无统计学显著性,见图 1、表 3。

表1 慢性束缚应激对大鼠体重和摄食量的影响

Table 1. The effects of chronic immobilization stress on body weight and food intake of the rats (g. Mean ± SD. n = 25)

Time point	Body weight		Food intake	
	BC	21-S	BC	21-S
Day 0	256.90 ± 5.16	257.80 ± 4.49	22.91 ± 1.44	23.69 ± 1.50
Day 1	264.75 ± 7.26	261.15 ± 6.60	23.00 ± 1.57	20.66 ± 1.74 *
Day 2	270.50 ± 7.39	265.10 ± 7.66 *	25.19 ± 2.57	22.73 ± 2.04
Day 3	277.10 ± 7.63	268.00 ± 8.06 **	24.83 ± 1.51	23.03 ± 2.33
Day 4	283.80 ± 7.37	271.60 ± 7.96 **	24.98 ± 1.36	22.71 ± 2.48
Day 5	291.95 ± 8.00	275.00 ± 8.00 **	25.83 ± 1.40	23.71 ± 3.95
Day 6	297.00 ± 8.96	278.65 ± 9.72 **	25.04 ± 1.53	23.27 ± 2.19
Day 7	304.85 ± 9.50	281.40 ± 10.85 **	25.08 ± 1.76	22.92 ± 1.57 *
Day 8	308.20 ± 10.53	277.10 ± 10.35 **	23.89 ± 1.41	20.77 ± 2.43 *
Day 9	310.40 ± 10.20	280.45 ± 11.81 **	24.41 ± 1.24	23.07 ± 1.67
Day 10	314.65 ± 10.91	284.70 ± 11.97 **	25.19 ± 1.41	23.02 ± 1.91 *
Day 11	318.75 ± 11.00	287.75 ± 12.14 **	25.29 ± 1.13	22.82 ± 1.35 **
Day 12	324.40 ± 11.41	291.70 ± 13.32 **	26.01 ± 2.11	24.06 ± 2.38
Day 13	325.30 ± 11.56	295.05 ± 13.26 **	27.10 ± 1.25	23.26 ± 1.53 **
Day 14	330.90 ± 11.37	298.20 ± 13.28 **	26.07 ± 1.24	23.63 ± 1.79 *
Day 15	331.35 ± 12.92	296.70 ± 14.32 **	24.33 ± 1.26	22.36 ± 1.62 *
Day 16	338.10 ± 12.10	301.25 ± 14.79 **	26.13 ± 1.48	23.25 ± 2.47 *
Day 17	341.55 ± 11.58	307.25 ± 14.43 **	26.39 ± 2.07	22.75 ± 1.65 **
Day 18	345.50 ± 10.95	312.90 ± 14.92 **	26.05 ± 1.59	23.61 ± 2.06 *
Day 19	349.35 ± 11.58	316.75 ± 15.64 **	25.67 ± 1.16	22.55 ± 1.72 **
Day 20	351.96 ± 10.54	321.75 ± 15.52 **	26.15 ± 1.67	22.04 ± 1.62 **
Day 21	356.50 ± 10.68	323.55 ± 15.65 **	26.32 ± 1.12	21.47 ± 2.64 **

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs BC group at the same time point.

表2 慢性束缚应激对大鼠血清 leptin 和 ARC 中 LEPR 含量的影响

Table 2. The effects of chronic immobilization stress on serum leptin and LEPR in ARC of rats (Mean ± SD. n = 10)

Group	Leptin (μg/L)	LEPR (μg/L)
BC	3.58 ± 1.31	7.53 ± 2.95
7-S	6.40 ± 1.81 *	9.10 ± 1.46 *
21-S	6.71 ± 1.42 *	11.69 ± 2.14 *#

\* P < 0.05 vs BC group; #P < 0.05 vs 7-S group.

#### 4 慢性束缚应激对大鼠下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART mRNA 表达的影响

7-S 组和 21-S 组大鼠下丘脑 ARC 中 NPY 和 AgRP 的 mRNA 表达较 BC 组均显著减少 (P < 0.05), 而 LEPR 和 POMC 的 mRNA 表达则不同程度增加 (P < 0.05); 21-S 组与 7-S 组比较, 大鼠下丘脑 ARC 中 NPY 和 AgRP 的 mRNA 表达下降 (P < 0.05), 而 LEPR 和 POMC 的 mRNA 表达明显增加 (P < 0.05)。3 组比较, 大鼠下丘脑 ARC 中 CART 的 mRNA 表达差异无统计学显著性, 见表 4。

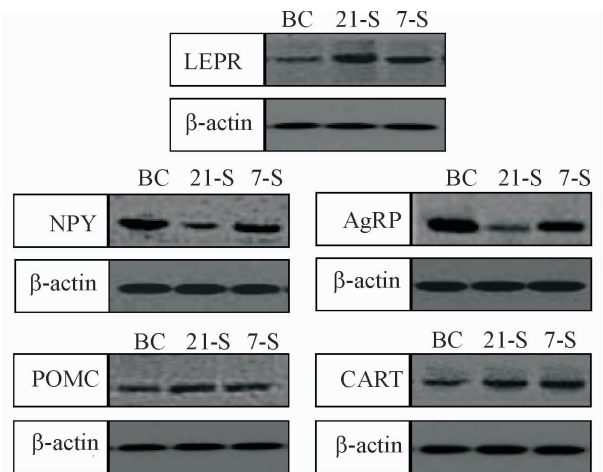


Figure 1. The images of Western blot showed the effects of chronic immobilization stress on the protein expression of LEPR, NPY, AgRP, POMC and CART in ARC of the rats.

图1 Western blot 检测慢性束缚应激对大鼠下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART 蛋白表达的影响

表3 慢性束缚应激对大鼠下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART 蛋白表达的影响

Table 3. The effects of chronic immobilization stress on the protein expression of LEPR, NPY, AgRP, POMC and CART in ARC of rats (Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ )

Index	BC	7-S	21-S
LEPR	0.22 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.05 *	0.60 $\pm$ 0.07 **
NPY	0.97 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.03 *	0.27 $\pm$ 0.01 **
AgRP	1.81 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.03 *	0.58 $\pm$ 0.03 **
POMC	1.40 $\pm$ 0.07	1.62 $\pm$ 0.04 *	1.78 $\pm$ 0.11 **
CART	1.63 $\pm$ 0.08	1.98 $\pm$ 0.02 *	2.05 $\pm$ 0.08 *

\*  $P < 0.05$  vs BC group; #  $P < 0.05$  vs 7-S group.

## 5 21-S 组大鼠体重/摄食量与下丘脑 ARC 中食欲因子表达的相关性

21-S 组大鼠体重与其 ARC 中 LEPR 和 CART 的 mRNA 表达呈显著负相关 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 与

表5 21-S 组大鼠体重、摄食量及下丘脑弓状核食欲因子 mRNA 表达的相关性

Table 5. Correlations of body weight/food intake and the mRNA expression of appetite factors in ARC of rats

Index	Body weight	Food intake	LEPR	NPY	AgRP	POMC
Food intake	0.53					
LEPR	-0.93 **	-0.59				
NPY	0.86 *	0.79	-0.83 *			
AgRP	0.76	0.73	-0.58	0.85 *		
POMC	-0.69	-0.85 *	0.73	-0.91 *	-0.69	
CART	-0.86 *	-0.76	0.87 *	-0.98 **	-0.79	0.86 *

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

## 讨 论

应激是机体整个适应、保护机制的一个重要组成部分。适度应激有利于机体在内外环境中保持自身稳态, 而过强或持久、频繁的应激则可能诱发多种慢性疾病<sup>[2-4]</sup>。目前, 束缚应激是研究动物心理应激反应最常用的模型之一<sup>[5]</sup>。束缚制动使动物躯体活动受限, 并由此产生挣扎、愤怒、焦虑、无助和抑郁等一系列情绪变化及皮毛无光, 耳廓淡白, 食欲下降和体重减轻等躯体症状, 这既很好地模拟了机体在应激状态下心理和生理的变化, 又避免了造模本身对躯体的直接病理损伤<sup>[6-7]</sup>。本研究结果证实, 束缚应激大鼠摄食量和体重较同期空白对照组大鼠明显下降, 且应激时间越长, 对体重增长影响越大, 与前期研究结果一致<sup>[8]</sup>, 说明慢性束缚应激是影响机体能量储备的不利因素之一。

目前普遍认为, 下丘脑是机体中枢维持能量平衡的核心, 包含多个与食欲调控有关的神经核团, 其中紧邻第三脑室的 ARC 作为一个食欲调节和能量

表4 慢性束缚应激对大鼠下丘脑 ARC 中 LEPR、NPY、AgRP、POMC 和 CART mRNA 表达的影响

Table 4. The effects of chronic immobilization stress on the mRNA expression of LEPR, NPY, AgRP, POMC and CART in ARC of rats (Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ )

Index	BC	7-S	21-S
LEPR	1.01 $\pm$ 0.21	2.57 $\pm$ 0.57 *	3.82 $\pm$ 0.73 **
NPY	0.90 $\pm$ 0.07	0.41 $\pm$ 0.05 *	0.31 $\pm$ 0.03 **
AgRP	0.97 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.08 *	0.42 $\pm$ 0.09 **
POMC	0.43 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.08 *	0.86 $\pm$ 0.08 **
CART	0.34 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.07

\*  $P < 0.05$  vs BC group; #  $P < 0.05$  vs 7-S group.

NPY 的 mRNA 表达呈显著正相关 ( $P < 0.05$ ); 摄食量与 POMC 的 mRNA 表达呈显著负相关 ( $P < 0.05$ )。体重与摄食量无显著相关性 ( $P > 0.05$ ), 见表 5。

平衡的综合体已成为广大研究人员关注的焦点<sup>[9-10]</sup>。ARC 包含 2 组与摄食相关但作用相反的一级神经元 NPY/AgRP 和 POMC/CART<sup>[11]</sup>, 这些神经元接收外周传入的营养信息后, 协同调控 NPY、AgRP、POMC 和 CART 等食欲因子的合成和分泌, 并通过神经纤维投射实现不同神经核团之间的信号传递, 最终维持下丘脑“食欲调节网”的平衡。

瘦素是一种能感知自身能量状态的蛋白质类激素。作为食欲调节链上关键的一环, 瘦素由白色脂肪细胞分泌后, 通过外周和中枢 (主导作用) 2 条途径参与机体能量代谢的调控。下丘脑 ARC 是瘦素中枢作用的关键部位。作为主要参与介导瘦素调节体重作用的功能性受体 LEPR, 在弓状核促食欲 NPY/AgRP 神经元及抑食欲 POMC/CART 神经元均显著表达<sup>[12-13]</sup>。经血液循环进入下丘脑的瘦素, 通过与 LEPR 特异性结合, 将饱食信号传递给该处的瘦素反应性食欲调控神经元, 激活食欲调节网, 从而全面启动摄食及能量平衡的瘦素调控通路。

下丘脑 ARC 的各种食欲因子是瘦素循环作用

的直接靶点<sup>[14]</sup>。以往研究表明, NPY 通过与 ARC 内广泛分布的 NPY 受体特异性结合, 激发机体的摄食效应<sup>[15-16]</sup>。AgRP 是一种较 NPY 更为强效和长效的食欲刺激素。表达于 ARC 的 POMC 在前转变素酶 1 的作用下释放其剪切产物  $\alpha$ -促黑素细胞激素 ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH) 和促肾上腺皮质激素, 前者通过激活与机体新陈代谢密切相关的黑皮质素受体 3/4 (MC3-R/MC4-R), 使机体产生饱腹感, 并向其它脑区传达饱食的信号, 以减少摄食行为<sup>[17]</sup>。同时对 MC3-R 和 MC4-R 高度敏感的 AgRP 可通过与之竞争性结合, 从而抑制黑皮质素受体信号, 拮抗  $\alpha$ -MSH 的抑制摄食作用<sup>[18]</sup>。CART 广泛存在于与摄食及体重密切相关的脑区, 与瘦素具有相互调节作用<sup>[19-20]</sup>, 其强大的抑食功能已在啮齿类动物和部分水生动物研究中被初步验证<sup>[21-23]</sup>。

本研究结果表明, 应激因素对大鼠摄食行为及体重增长具有消极影响, 并能显著提高其血清瘦素水平, 下调 ARC 中促食欲因子 NPY 和 AgRP 表达, 上调抑食欲因子 POMC 和 CART 表达。进一步的 Pearson 相关分析结果提示以 NPY/AgRP 和 POMC/CART 为代表的 2 类食欲因子表达失衡可能是慢性束缚应激大鼠出现摄食减少、体重增长缓慢的关键中枢神经内分泌基础之一, 但具体作用机制及通路的研究有待进一步开展。本研究同时发现, 应激大鼠体重与摄食量之间并无显著相关性, 提示摄食量减少并非其体重增长延缓的唯一原因, 很可能还与机体代谢水平有关, 这已在本课题组基于代谢组学的相关研究中得到初步证实<sup>[24]</sup>, 并将成为我们下一步深入研究的关注点之一。

[参 考 文 献]

[1] Wang SX, Chen JX, Yue GX, et al. Xiaoyaosan decoction regulates changes in neuropeptide Y and leptin receptor in the rat arcuate nucleus after chronic immobilization stress[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012;381278.

[2] 唐典俊. 应激与疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012;121-123.

[3] 陈卓锋, 王剑彬, 李民华, 等. 胃肠功能性疾病患者应激反应水平和心理健康状况研究[J]. 社区医学杂志, 2017, 15(18):4-7.

[4] 王 岚. 早年应激对个体成年后心身健康的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

[5] 翟亚南, 陈柏安, 郭 萌, 等. 束缚应激的研究进展[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4):56-58, 61.

[6] 吴佳欣. 慢性应激肝郁脾虚模型大鼠下丘脑弓状核摄食相关神经肽变化机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.

[7] 林文青. NMDA-nNOS-JNK 通路介导的 Vc 中神经星形胶质细胞间通讯在心理应激致大鼠咬肌痛敏中的作用[D]. 西安: 第四军医大学, 2017.

[8] 旷湘楠, 王少贤, 方朝义, 等. 逍遥散调节慢性应激肝郁脾虚模型大鼠下丘脑弓状核 ob-R、 $\alpha$ -MSH 变化机制[J]. 世界中医药, 2017, 12(3):488-493.

[9] 王 建. 食欲肽与其它食欲调节肽相互作用的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2004, 31(2):96-100.

[10] 张毅敏, 连 辉, 宋海岩, 等. 6-羟多巴损伤黑质导致弓状核离子钙接头蛋白 1 和阿片-促黑素皮质素原表达的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(6):975-980.

[11] Song ZG, Everaert N, Wang YF, et al. The endocrine control of energy homeostasis in chickens[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013, 190:112-117.

[12] Li SF, Li X. Leptin in normal physiology and leptin resistance[J]. Sci Bull, 2016, 61(19):1480-1488.

[13] Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin [J]. Metabolism, 2015, 64(1):13-23.

[14] 郭春丽. 瘦素与其他摄食信号在肥胖调节中的相互作用[J]. 安徽医药, 2010, 14(9):1098-1110.

[15] 贾 敏, 贺 媛, 张晓辉, 等. 肥胖相关性神经肽 Y 研究现状[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33(1):107-110.

[16] 王国文, 邵宝平, 丁艳平. 神经肽 Y 的促摄食作用及其调控机制[J]. 动物营养学报, 2016, 28(2):385-391.

[17] Mountjoy KG. Pro-opiomelanocortin (POMC) neurons, POMC-derived peptides, melanocortin receptors and obesity: how understanding of this system has changed over the last decade [J]. J Neuroendocrinol, 2015, 27(6):406-418.

[18] 吕 亮, 张 丹, 贝雪艳, 等. 小鼠相关蛋白在能量代谢及生殖方面研究 [J]. 河北医学, 2014, 20(10):1750-1753.

[19] Niimi M. The role of anorectic and orexigenic peptides (CART, NPY etc) [J]. Nihon Rinsho, 2001, 59(3):443-448.

[20] Elmquist JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin [J]. Physiol Behav, 2001, 74(4-5):703-708.

[21] 彭焕文, 杨 雁, 尹传龙, 等. 可卡因-苯丙胺调节转录肽研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(3):981-984.

[22] 旷湘楠. 慢性应激肝郁脾虚模型大鼠下丘脑弓状核 ob-R、CART、 $\alpha$ -MSH 变化及逍遥散调节作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

[23] 袁登越. 齐口裂腹鱼 leptin、CCK、PYY 和 CART 基因的克隆、组织表达及摄食功能研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2014.

[24] 王坤红. 逍遥散对慢性心理应激大鼠行为学及代谢组学的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.