

糖皮质激素对肥胖大鼠和普通大鼠 下丘脑神经肽 Y mRNA 的影响

范艳萍¹, 石建华¹, 项平², 胡小磊¹, 苗艳君¹, 黄咏齐¹

[摘要] 目的: 研究糖皮质激素对肥胖大鼠和普通大鼠下丘脑中神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) mRNA 表达的影响。方法: 高脂饲料构建肥胖大鼠模型, 肥胖大鼠和普通大鼠分别随机分为生理盐水组、小剂量组和大剂量组, 分别连续 20 天腹腔注射生理盐水 0.2 ml/100 g, 琥珀酸氢化可的松 5 mg/kg 和 15 mg/kg。并观察其摄食变化, 用实时荧光定量 PCR 方法, 检测大鼠下丘脑中 NPY mRNA 的表达水平。结果: 应用大剂量糖皮质激素后普通大鼠和肥胖大鼠的摄食量低于盐水组 ($P < 0.05$); 应用大剂量糖皮质激素后普通大鼠和肥胖大鼠的下丘脑中 NPY mRNA 的表达水平低于盐水组 ($P < 0.01$); 应用小剂量糖皮质激素后普通大鼠的下丘脑中 NPY mRNA 的表达水平低于盐水组 ($P < 0.01$)。结论: 大剂量糖皮质激素使普通大鼠和肥胖大鼠食欲下降, 抑制肥胖大鼠和普通大鼠 NPY mRNA 的表达; 小剂量糖皮质激素抑制普通大鼠 NPY mRNA 的表达, NPY 在食欲调节中起重要作用。

[关键词] 肥胖; 糖皮质激素类; 神经肽 Y; 食欲; 大鼠

[中国图书资料分类号] R 589.2; Q 577

[文献标识码] A

Influence of glucocorticoids on neuropeptide Y mRNA expression in hypothalamus of obese and nonobese rats

FAN Yan-ping¹, SHI Jian-hua¹, XIANG Ping², HU Xiao-lei¹, MIAO Yan-jun¹, HUANG Yong-qi¹

(1. Department of Endocrinology, 2. Department of Central Laboratories,

The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of glucocorticoid on neuropeptide Y (NPY) gene expression of the hypothalamus in obese and nonobese rats. **Methods:** Obese rat model was established by high-fat diet. Both the obese and nonobese rats were randomly assigned to normal saline (NS) group, low dose and high dose of glucocorticoid groups, and were administered intraperitoneal injection with normal saline 0.2 ml/100 g, hydrocortisone sodium succinate 5 mg/kg and 15 mg/kg, respectively, for 20 days. Their food intake was measured. Real-time quantitative PCR was used to measure the expression of NPY mRNA in the hypothalamus of the rats. **Results:** After high dose of glucocorticoid injection, the food intake of the obese and nonobese rats was lower than that of the NS group ($P < 0.05$); the mRNA expressions of NPY in the hypothalamus of the obese and nonobese rats was lower than that of the NS group ($P < 0.01$); the expression of NPY mRNA of the nonobese rats in the low dose group was significantly lower than that of the NS group ($P < 0.01$). **Conclusions:** High dose of glucocorticoid may inhibit the appetite and the NPY mRNA expression in the hypothalamus of the obese and nonobese rats; low dose of glucocorticoid can inhibit the NPY mRNA expression in the hypothalamus of nonobese rats. NPY plays an important role in regulation of the appetite of rats.

[Key words] obesity; glucocorticoids; neuropeptide Y; appetite; rats

神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 是下丘脑中参与食欲及能量平衡调节的重要介质, 与多种食欲调节因子有密切关系^[1-4]。NPY 主要来源于弓状核 (arcuate nucleus, ARC) 和背内侧核, 其中 ARC NPY 神经元可投射到同侧的室旁核。空腹时下丘脑 NPY mRNA 表达和 NPY 释放增加, 进食后减少。中枢注射 NPY 可刺激动物的摄食活动、降低能量消

耗, 减少棕色脂肪耗能, 抑制交感神经及甲状腺轴活动, 增高血浆瘦素 (leptin)、胰岛素和清晨皮质醇的水平^[5,6]。因此, NPY 在食欲调节和肥胖的发生、发展中起重要作用。本文就糖皮质激素对肥胖大鼠和普通大鼠下丘脑 NPY mRNA 的影响作一研究。

1 材料与方 法

1.1 肥胖大鼠模型构建 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司的雄性 SD 大鼠 125 只 [许可证号: SCXK(沪)2003-0003], 体重 180 ~ 200 g, 放入清洁房间, 室温 18 ~ 22 °C, 自然光照, 适应性喂养 1 周后随机分笼分组, 每笼 ≤ 5 只。对照组 38 只, 给予普通饮食, 实验组 87 只, 给予高脂饮食。两组饮用水

[收稿日期] 2008-07-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30440026)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 内分泌科, 2. 中心实验室, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 范艳萍 (1980 -), 女, 硕士研究生。

[通讯作者] 石建华, 研究生导师, 主任医师, 教授。

及饲料见文献[7],均不限制进饮及进食量,饲养80天后,利用实验组体重>对照组平均体重+1.5倍标准差和实验组Lee's指数>对照组平均Lee's指数+1.5倍标准差的双重标准界定肥胖大鼠{Lee's指数=[体重(g)/体长(cm)]^{1/3}×10},共得40只肥胖大鼠,剩余大鼠淘汰。对照组随机分为生理盐水组(n=12),小剂量组(n=13),大剂量组(n=13);实验组也随机分为生理盐水组(n=13),小剂量组(n=13)和大剂量组(n=14);连续20天于清晨7~9时分别腹腔注射0.2 ml/100 g生理盐水、5 mg/kg琥珀酸氢化可的松和15 mg/kg琥珀酸氢化可的松(天津市生物化学制药厂生产,生产批号为20060314)。所用溶液均于临用前配制。

1.2 取材 断颈处死大鼠后即刻取出下丘脑,液氮速冻后-80℃保存备用。

1.3 扩增引物 由上海生物工程有限公司合成。NPY上游引物:5'-CAA GAG ATC CAG CCC TGA GAC A-3';下游引物:5'-CAT CAC CAC ATG GAA GGG TCT TC-3',β-actin上游引物:5'-GAC GGT CAG GTC ATC ACT ATC G-3';下游引物:5'-ACG GAT GTC AAC GTC ACA CTT C-3'。

1.4 下丘脑总RNA的抽提和质量鉴定 取大鼠下丘脑,加TRIZOL(GIBCO/BRL)试剂提取总RNA。通过变性琼脂糖凝胶电泳确定RNA完整性,并在紫外分光光度计下测定RNA浓度及纯度。

1.5 逆转录反应 取1μg RNA,以oligo(dT)为引物进行反转录及cDNA合成。20μl体系,RNA 1μg,oligo(dT)引物1μl,加RNAase-free ddH₂O至12μl,70℃孵育15min,置冰上冷休克2min,短暂离心后,加入5×first stand Buffer 4μl,dNTP混合液1μl,0.1mmol/L DTT 2μl,混匀置42℃2min后,加入Superscript II反转录酶1μl,混匀,置42℃60min,70℃15min,-20℃保存。

1.6 荧光定量PCR反应 反应前模板稀释30倍,SYBR Green I染料原液稀释500倍。反应体系:cDNA 2μl;forward primer(10μmol/L)0.4μl;reverse primer(10μmol/L)0.4μl;20×SYBR Green I dye 0.5μl;Hostart Taq DNA聚合酶(5u/μl)0.2μl;10×buffer 2.0μl;MgCl₂(50mmol/L)1.2μl;dNTP Mix(10mmol/L)0.5μl;ddH₂O补足至总体积20μl,同时每对引物设一阴性对照。反应条件:94℃15s,60℃60s,80℃2s,44个循环。所有基因扩增前95℃预变性10min,扩增后72℃延伸10min。用Opticon实时荧光定量PCR仪(MJ Research)检测荧光,反应结束后通过Opticon Monitor 3软件建立Real Time PCR融解曲线证实扩

增的特异性并分析结果,读取C_T值,以管家基因β-actin为内参,校正每个样品的C_T值得ΔC_T值,通过2^{-ΔΔC_T}方法^[8]分析实验组与对照组之间基因表达差异,ΔC_T=C_{T,target}-C_{T,β-actin},ΔΔC_T=ΔC_{T,treated}-ΔC_{T,control}。

1.7 统计学方法 采用方差分析和q检验。

2 结果

2.1 应用糖皮质激素后大鼠的摄食变化 大剂量糖皮质激素处理后,普通大鼠20天内的平均摄食量明显低于生理盐水组(P<0.05);小剂量组的平均摄食量和生理盐水组差异无统计学意义(P>0.05)。大剂量糖皮质激素处理肥胖大鼠平均摄食量较生理盐水组减少(P<0.05);而肥胖大鼠的小剂量组和生理盐水组相比,差异无统计学意义(P>0.05)(见表1)。

2.2 应用糖皮质激素后大鼠下丘脑NPY mRNA表达水平比较 普通大鼠下丘脑NPY mRNA表达水平在应用小剂量、大剂量琥珀酸氢化可的松后较应用生理盐水组分别下降了30%、42%(P<0.05)。肥胖大鼠应用小剂量琥珀酸氢化可的松后较应用生理盐水组下降了36%,但无统计学意义(P>0.05),应用大剂量琥珀酸氢化可的松后较应用生理盐水组下降了59%(P<0.01)(见表1)。

表1 不同大鼠给予糖皮质激素后摄食量和NPY mRNA表达水平比较(̄x±s)

分组	n	摄食量(g/d,每只)	NPY mRNA 表达水平(2 ^{-ΔC_T})
普通大鼠			
生理盐水组	12	28.02±3.22	0.40±0.08
小剂量组	13	25.61±4.52	0.28±0.07**
大剂量组	13	23.91±1.89*	0.24±0.11**
F	-	4.62	10.93
P	-	<0.05	<0.01
MS _{组内}	-	11.488	0.008
肥胖大鼠			
生理盐水组	13	25.87±3.56	0.32±0.11
小剂量组	13	24.66±2.95	0.23±0.18
大剂量组	14	22.64±2.60*	0.14±0.08**
F	-	3.88	6.55
P	-	<0.05	<0.01
MS _{组内}	-	9.308	0.017

q检验:与生理盐水组比较*P<0.05,**P<0.01

3 讨论

糖皮质激素对NPY基因的表达有直接效应,大鼠NPY基因上游存在糖皮质激素反应元件^[9],并且

弓状核 NPY 神经元上存在糖皮质激素受体。注射地塞米松(2 mg/kg, 10 d)可以使大鼠下丘脑-垂体系统的 NPY 表达上调^[10]。Doyon 等^[11]发现糖皮质激素可以刺激虹鳟鱼脑部视前区 NPY mRNA 的表达。而 Sainsbury 等^[12]给正常大鼠脑室注射 NPY 后可以增加摄食、体重和胰岛素水平,但对肾上腺切除的大鼠注射 NPY 后上述现象未出现。Zakrzewska 等^[13]分别给大鼠脑室和腹腔注射糖皮质激素后发现,脑室注射糖皮质激素使大鼠摄食及体重增加,下丘脑 NPY 的含量增加,而腹腔注射糖皮质激素的结果恰恰相反,即大鼠食欲和体重下降,下丘脑 NPY 的含量减少;本文研究结果与此相符,即外周注射糖皮质激素后,下丘脑 NPY mRNA 的表达下降。中枢和外周应用糖皮质激素引起的这种矛盾现象可能原因是:中枢注射糖皮质激素可以持续的刺激 NPY 的合成,并抑制胰岛素和 leptin 对 NPY 合成的影响;而腹腔注射糖皮质激素在引起胰岛素和 leptin 分泌增加的同时,中枢中糖皮质激素的浓度却达不到刺激 NPY 合成和阻滞胰岛素和 leptin 抑制 NPY 合成的水平。研究发现,血浆胰岛素和 leptin 可以抑制 NPY 的合成,一些学者认为胰岛素可以通过增加抑制性神经递质或减少兴奋性神经递质(谷氨酸)来下调 NPY mRNA 的表达^[14]。leptin 则通过结合弓状核 NPY 神经元上的受体诱导 SOCS3 基因的表达,而 SOCS3 可以直接抑制 NPY 基因启动子的转录^[15],从而下调 NPY 基因的表达。糖皮质激素降低 NPY 的表达是否还与其他途径有关尚需进一步研究。

本次研究发现,小剂量糖皮质激素对大鼠摄食的影响和盐水组相比无统计学意义,而大剂量糖皮质激素使普通大鼠和肥胖大鼠的摄食下降。应用实时荧光定量方法对下丘脑促进食欲调节肽 NPY 基因的定量分析发现,大剂量糖皮质激素抑制肥胖大鼠和普通大鼠下丘脑促进食欲调节肽 NPY mRNA 的表达,这可能就是大剂量糖皮质激素干预后肥胖大鼠和普通大鼠食欲下降的原因。此外,注射小剂量糖皮质激素使普通大鼠下丘脑 NPY mRNA 表达较盐水组下降,而对肥胖大鼠却无影响,这可能与大鼠的营养状态相关。

[参 考 文 献]

- [1] Bi S, Scott KA, Hyun J, *et al.* Running wheel activity prevents hyperphagia and obesity in otsuka long-evans tokushima fatty rats: role of hypothalamic signaling[J]. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1676 - 1685.
- [2] Kohno D, Gao HZ, Muroya S, *et al.* Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin[J]. *Diabetes*, 2003, 52(4): 948 - 956.
- [3] Tebbe JJ, Tebbe CG, Mronga S, *et al.* Central neuropeptide Y receptors are involved in 3rd ventricular ghrelin induced alteration of colonic transit time in conscious fed rats [J]. *BMC Gastroenterology*, 2005, 5: 5 - 12.
- [4] Hohmann JC, Teklemichael DN, Weinschenker D, *et al.* Obesity and endocrine dysfunction in mice with deletions of both neuropeptide Y and galanin[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(7): 2978 - 2985.
- [5] Raposinho PD, Pedrazzini T, White RB, *et al.* Chronic neuropeptide Y infusion into the lateral ventricle induces sustained feeding and obesity in mice lacking either Npy1r or Npy5r expression[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(1): 304 - 310.
- [6] Baran K, Preston E, Wilks D, *et al.* Chronic central melanocortin-4 receptor antagonism and central neuropeptide-Y infusion in rats produce increased adiposity by divergent pathways[J]. *Diabetes*, 2002, 51(1): 152 - 158.
- [7] 杜文华, 石建华, 项平, 等. 营养性肥胖大鼠模型的建立与血糖、血脂变化[J]. 蚌埠医学院学报, 2007, 32(4): 379 - 381.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [9] Misaki N, Higuchi H, Yamagata K, *et al.* Identification of glucocorticoid responsive elements (GREs) at far upstream of rat NPY gene [J]. *Neurochem Int*, 1992, 21(2): 185 - 189.
- [10] Konno J, Yoshida S, Ina A, *et al.* Upregulated expression of neuropeptide Y in hypothalamic-pituitary system of rats by chronic dexamethasone administration [J]. *Neurosci Res*, 2008, 60(3): 259 - 296.
- [11] Doyon C, Leclair J, Trudeau VL, *et al.* Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA level are modified by glucocorticoids in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, 146(2): 126 - 135.
- [12] Sainsbury A, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, *et al.* Adrenalectomy prevents the obesity syndrome produced by chronic central neuropeptide Y infusion in normal rats [J]. *Diabetes*, 1997, 46(2): 209 - 214.
- [13] Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad A, *et al.* Induction of obesity and hyp-erleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat [J]. *Diabetes*, 1999, 48(2): 365 - 370.
- [14] Sato I, Arima H, Ozaki N, *et al.* Insulin inhibits Neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(38): 8657 - 8664.
- [15] Higuchi H, Hasegawa A, Yamaguchi T. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: transcriptional regulation of neuropeptide Y gene by leptin and its effect on feeding [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 98(3): 225 - 231.