

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.007

生长素对胃运动和对海马胃肠敏感神经元放电活动的影响 *

吴 琼^{1,2} 杨丹丹¹ 郭菲菲¹ 孙向荣¹ 徐 璐^{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)

摘要 目的:探讨海马 ghrelin 对 GD 敏感神经元放电和弓状核 ghrelin 对胃运动的影响。**方法:**在细胞外记录海马的放电情况,并且检测清醒大鼠的胃运动。通过 PCR 免疫印迹和免疫荧光组织化学染色等方法来测定 GHSR-1a 在海马中的表达。用逆行追踪和免疫荧光组织化学染色检测 ghrelin 神经元的投射情况。Ghrelin 况荧光金双标记的神经元以及 GHSR-1a 的表达分别可以在 ARC 和海马中观察到。**结果:**Ghrelin 或者 ARC 电刺激可以兴奋海马区的胃牵张敏感神经元。Ghrelin 受体拮抗剂[d-Lys-3]-GHRP-6 预处理可以完全或者部分阻断这种兴奋作用。海马注射 ghrelin 可以显著促进胃运动,并且呈现剂量依赖关系,而且这种作用可以被 [d-Lys-3]-GHRP-6 所阻断。电刺激 ARC 能够促进胃运动。然而,预处理时 [d-Lys-3]-GHRP-6 可以减弱这些作用。电损毁海马可以减弱胃运动的兴奋作用,这个作用通过电刺激 ARC 产生的。**结论:**通过海马促进胃运动中 ghrelin 起着重要的作用。ARC 可能参与调节海马对胃动力的影响。

关键词:生长素;下丘脑;胃运动;胃牵张敏感神经元

中图分类号:R-33;R338.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)05-832-07

The Effects of Ghrelin on Gastric Motility and the Activity of Gastrointestinal Sensitive Neurons in the Hippocampus and the Regulation of Hypothalamic Hormones*

WU Qiong^{1,2}, YANG Dan-dan¹, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, XU Luo^{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)

ABSTRACT Objective: To investigate the growth hormone secretagogue receptor 1A (GHSR-1a) expression in the hippocampus; and to explore the influence of ghrelin on hippocampus discharge GD sensitive neurons; explored the neural pathway between ARC and ghrelin neurons in the hippocampus, and the role of ARC in regulating hippocampal and gastric motility in discharge. **Methods:** The discharge of hippocampus was recorded in vitro and the gastric motility was measured in conscious rats. The expression of GHSR-1a in hippocampus was detected by PCR Western blot and immunofluorescence histochemical staining. The projection of ghrelin neurons was detected by retrograde tracing and immunofluorescence histochemical staining. Ghrelin - double labeled neurons and GHSR-1a expression were observed in ARC and hippocampus. **Results:** Ghrelin or ARC electrical stimulation could stimulate gastric stretch sensitive neurons in hippocampus. Pretreatment with the Ghrelin antagonist [d-Lys- 3]-GHRP-6 can completely or partially block the excitatory effect. Hippocampal injection of ghrelin can significantly promote gastric motility, and dose dependently, and this effect can be blocked by [d-Lys-3]-GHRP-6. Electrical stimulation of ARC can promote gastric motility. However, pretreatment with [d-Lys-3]-GHRP-6 can attenuate these effects. Electrical damage to the hippocampus can attenuate the gastric motility, which is produced by electrical stimulation of ARC. **Conclusion:** Ghrelin plays an important role in promoting gastric motility in hippocampus. ARC may be involved in the regulation of hippocampal motility.

Key words: Ghrelin; Hippocampus; Gastric motility; Gastrointestinal sensitive neurons

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

Article ID: 1673-6273(2018)05-832-07

前言

Ghrelin 是一种酰化的神经肽,含有 28 个氨基酸,首次从大鼠胃中分离提取出来^[1]。越来越多的证据表明,ghrelin 除了具

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470815;81270460;81500414);山东省优秀中青年科学基金项目(BS2014YY009);

青岛市科技局项目(14-2-3-3-nsh)

作者简介:吴琼(1986-),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,

电话:15314250683, E-mail: 985711815@qq.com

Δ 通讯作者:徐璐, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2017-05-23 接受日期:2017-06-18)

有生长激素释放肽的活性,还有许多其他代谢和内分泌的作用,主要是在调节食物摄入,促进胃肠蠕动以及能量平衡方面^[2-5]。Ghrelin 广泛分布于中枢神经系统,例如,在下丘脑 ghrelin 参与摄食,在海马区 ghrelin 参与学习和记忆,下丘脑摄食调节中心所产生的胃运动和食物摄入的作用,现在已经得到重视^[6]。下丘脑已经被视为调节食物摄入和能量平衡的中枢^[7]。在下丘脑弓状核(ARC),在养分供应和能量平衡的信息整合中起着重要的作用,例如,代谢和食物摄入^[8]。在 ARC 中发现许多 Ghrelin 样免疫反应阳性神经元,这表明 ARC 是 ghrelin 神经元在大脑中的主要区域^[9]。有研究表明,注射 ghrelin 病毒后,大鼠大脑 ghrelin 免疫反应呈阴性,并且无 ghrelin mRNA 的表达^[10]。这可能表明,目前,ghrelin 存在于 ARC 中,大脑中的其他部分主要来自外周。海马属于边缘系统,在学习和记忆功能中起着重要的作用^[11,12]。近年来海马受到了很大的关注,与其参与食物摄入和能量调节有关。Wang et al.等人发现肥胖人群海马功能比较活跃,胃刺激对摄食、胃扩张(GD)、激素分泌以及迷走神经活动都有影响^[13]。到目前为止,ghrelin 影响海马功能从而调节胃运动,特别是涉及到 ARC 和海马的认识还没有太多的研究。

1 材料和实验方法

1.1 实验动物

实验动物:雄性 Wister 大鼠(250-300 g),购于青岛市实验动物和动物实验中心(中国,山东)。动物房室内温度 22-28℃、湿度 60-65%、昼夜循环光照。分笼饲养,自由进食饮水。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 逆行追踪和免疫组化

使用 10%的水合氯醛麻醉大鼠,剂量为 3 mL/kg(腹腔注射),实验期间使用 10%的水合氯醛用于大鼠镇静,剂量为 0.6 mL/kg(腹腔注射)。脑立体定位仪固定大鼠,使用加热板保证大鼠体温维持在 37℃左右。单侧注射 30%免疫荧光金 0.2 μL(荧光染料;使用双蒸水溶解)到海马 CA1 区(靠近背盖区,前后 3.14-3.6 mm,左右旁开 1.3-2.0 mm,深入 2.6-3.2 mm,根据 Paxinos& Watson 脑图谱)。荧光金注射七天后,10%水合氯醛麻醉大鼠,0.9%生理盐水 100 mL 灌注,之后 4%的多聚甲醛 500 mL 固定(PB;pH=7.4)。灌注固定后立即取脑,后固定于 4%的多聚甲醛中 2 h,之后转移到 30%蔗糖中 4 天。使用冰冻切片机制作脑片(Kryostat 1720; Leica, Nussloch, Germany)。

脑切片孵育在 ghrelin 一抗(多克隆抗体,1:300 稀释,Chemicon International, Temecula, CA, USA)和 ghrelin 受体抗体中 40 h(多克隆抗体,1:400 稀释,Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA),在荧光染料二抗中孵育 2 h(羊抗兔 Cy3IgG,1:500 稀释,Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA)。使用 Leica DMRB/BioRad MRC 1024 krypton-argon 显微镜观察荧光(Olympus, Tokyo, Japan)。

1.3 ghrelin 受体 1 的 RT-PCR

大鼠禁食 24 h 后,10%水合氯醛麻醉(3 mL/kg,腹腔注射),分离组织,使用 TRIzol Plus RNA Purification 盒提取海马总的 RNA(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)。单链 cDNA 合成盒逆转录总 RNA 中的一个微小片段(PharmaciaBiotech, Piscata-

way, NJ, USA)。2 μmol/L 的检测引物以及 2.5 个单位的 Pyrobest DNA 聚合酶 PCR 放大合成的 cDNA (Takara Shuzo, Shiga, Japan)。大鼠 ghrelin 受体 1a (312bp) 的 PCR 引物 5'-GAGATCGCTCAGATCAGCCAGTAC -3' (检测) and 5'-TAATCCCCAAACTGAGGTTCTGC -3'(反义检测)。25 μL 组织用于做 PCR,循环 33 次,94℃变性 60 s,64℃低温退火处理 70 s,72℃扩展 90 s。2%琼脂糖胶电泳后溴化乙锭观察 PCR 结果。

1.4 ghrelin 受体 1 的 Western blot

在 4℃环境中,1 mL 的裂解缓冲液中溶解 0.1 g 的海马组织样本 30 min,并 4℃离心 15 min。使用 Tris- 经梯度凝胶(10%-20%)分离 50 μg 的蛋白质(Bio-Rad, Hercules, CA, 美国),转移至硝酸纤维素膜(Roth, Karlsruhe, 德国),并在 Tris 缓冲液中与 5%的牛奶混合 1 h (10 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 7.5, 150 mmol/L NaCl 和 0.1%Tween-20)。4℃孵育在特定的兔抗鼠 IgGHSR-1a 中过夜(1:5000 稀释 Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, 美国)。在 Tris 缓冲生理盐水 Tween-20 中清洗五次 10 min 后,室温下孵育在辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 中 1 h (1:2000 稀释;New England Biolabs, Hitchin, 英国),再加入化学发光酶(ECL;Amersham Biosciences, Bucks, 英国),暴露于 X 射线下。

1.5 电生理

大鼠禁食 18 h 后经 10%水合氯醛麻醉(0.3 mL/100 g)。在腹部正中行矢状位切口,胃内放置一个软胶气囊。实验中向气囊内注入 37℃温生理盐水(3-5 mL,0.5 mL/s)扩张胃壁,刺激胃壁相关感受器,鉴别胃扩张敏感神经元并分类。GD 神经元的鉴别方法,在上述检测放电频率的基准上,以神经元放电频率的变化率超过 20%作为神经元兴奋或是抑制的判断标准。表现兴奋的神经元被认为是胃牵张兴奋型神经元(GD-E);表现为抑制的被认为是胃牵张抑制型神经元(GD-I)。

头部行矢状切口,使用牙科钻在大鼠颅骨钻孔,暴露脑表面,ARC 定位参考 Paxinos-Watson 大鼠脑图谱,将玻璃微电极植入 ARC (前囟后 2.12-4.30 mm,旁开 0.2-0.5 mm,深度 9.80-10.30 mm)及海马(前囟后 3.3 mm,旁开 1 mm,深度 3-3.5 mm)。ARC 置入 4 管玻璃微电极(内充 20 g/L 滂胺天蓝的记录电极、生理盐水、orexin-A 以及 orexin-A 受体拮抗剂 SB334867),海马置入 3 管玻璃微电极(内充 20 g/L 滂胺天蓝的记录电极、15 nmol L⁻¹ 的 Ghrelin、28 nmol L⁻¹ [d-lys-3]-GHRP-6)。

1.6 大鼠胃运动

大鼠实验前至少禁食 18 h,但可自由饮水。腹腔注射 10%水合氯醛 0.3 mL/100 g 麻醉大鼠,打开腹腔,距幽门十二指肠连接处 0.5 cm 的位置沿环形肌方向,将张力传感器缝贴于胃窦浆膜面,导线经皮下引至颈部露出 2-3 cm,进行固定,缝合腹部切口。术后大鼠恢复 14 d。大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉后固定于脑立体定位仪上,48 只大鼠随机分为六组,每组八只(n=8)。每只大鼠,溶液经颅内插管缓慢注入海马 CA1。1-3 组分别给予不同浓度的生长素 1 μL(30, 300 或 3000 nmol/L),第 4 组注射 1 μL [d-lys-3]-GHRP-6(600 nmol/L),第 5 组注射 1 μL 的混合溶液(300 nmol/L 生长素 + 600 nmol/L [d-lys-3]-GHRP-6)。第 6 组,对照组注射等量生理盐水。实验前大鼠禁食

18 h,自由饮水。实验前先将大鼠置于笼中 1 h 适应环境,大鼠清醒状态时进行胃运动实验,将大鼠胃部传感器与桥式放大器相连,记录大鼠胃收缩的频率和幅度,各组大鼠给药前先稳定记录胃收缩 30 min。

1.7 电刺激损伤神经元

一个绝缘环氧树脂包裹单极刺激电极 (RH NE-100 1 mm× mm;David Kopf 仪器,图洪加,CA,美国),插入弓状核(位置如上文所述)。一个方波电流脉冲射频输出器发出 50 HZ 电刺激(20 激交付强度和持续时间 0.5 ms)10 s。为了研究海马 CA1 在胃运动中的作用,电损伤海马 CA1,单侧电刺激 1Ma 海马 CA1 区 20s,诱导发生病变,大鼠电损失 5 天后记录胃运动。

1.8 统计学分析

实验中数据以 $\bar{X} \pm \text{SEM}$ 表示,数据的统计分析使用 Prism5.0,两组间使用 T 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠海马 ghrelin 受体 1a 的表达

海马 GHSR-1a PCR 电泳产物分析显示出现如预期一般大小的 312 bp 带 (图 1A)。在海马表达的 GHSR-1a 蛋白,经 Western blot 的频带为 44 kDa(图 1B)。免疫荧光结果显示在海马 CA1 区表达 GHSR-1a(图 1C)。

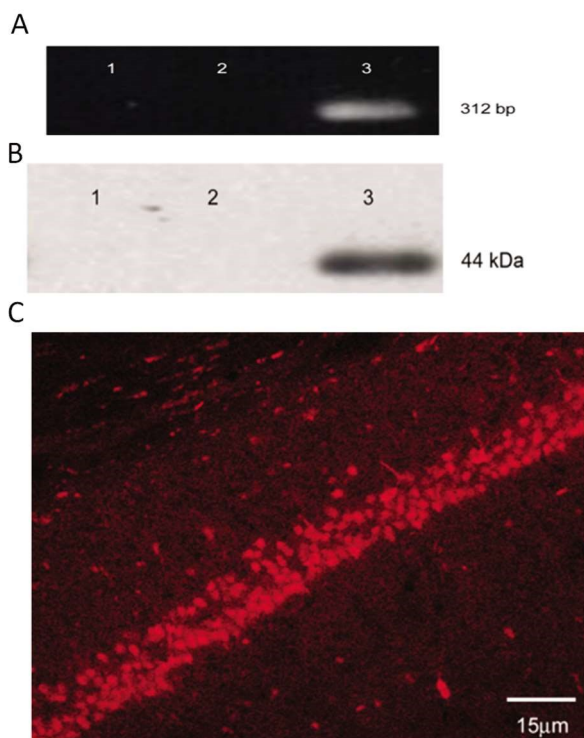


图 1 海马生长素受体 -1 的表达。海马生长素受体 -1a 的 PCR (A)、Western blot (B) 和免疫组化。1: 阴性对照; 2: 内参照; 3: 海马组织
Fig.1 Expression of growth hormone secretagogue receptor-1a in the hippocampus. Expression of growth hormone secretagogue receptor-1a (GHSR-1a) in the hippocampus of rats assessed by PCR (A), Western blot (B) and immunohistochemistry (C). 1, negative control; 2, loading control; 3, hippocampus tissue

2.2 ghrelin 对海马 GD 神经元放电活动的影响

92 只大鼠海马 CA1 区共记录到 282 个神经元,有 146 个神经元(51.77%)对胃扩张有反应,被确定为 GD 敏感神经元。其中,95 个 GD 响应神经元的放电频率明显增加(从 7.69 ± 2.33 Hz 到 12.54 ± 3.14 Hz,放电频率明显增加),被归类为兴奋性神经元($P < 0.01$,图 2A);51 个 GD 响应神经元的放电频率明显下降(从 8.24 ± 2.58 Hz 到 5.36 ± 1.97 Hz,放电频率明显降低),被归类为抑制性神经元($P < 0.01$,图 2B)。注射 ghrelin 到海马 CA1 区 GD 敏感神经元。注射 ghrelin 后,在 95 个兴奋性神经元中,其中有 58 个神经元(61.05%)被激活,22 个神经元被抑制,15 个神经元没有改变;在 51 个抑制性神经元中,26 个神经元(50.98%)被激活,14 个神经元被抑制,11 个神经元没有变化。这些数据表明,生长素对海马 CA1 区 GD 神经元具有兴奋作用。使用生长素受体拮抗剂 d-lys-3 GHRP-6 预处理后,生长素诱导的反应被抵消(图 2)。但是,单一注射 d-lys-3 GHRP-6 对海马 CA1 区 GD 神经元没有影响。对照组注射 0.9% 的氯化钠以验证生长素的特异性。

2.3 海马注射 ghrelin 对胃运动的影响

正如预期的那样,注射 ghrelin 后胃收缩频率和振幅剂量依赖的方式增加,与注射生理盐水对照组相比($P < 0.05 - 0.01$)。注射生长素大约 5 min 后,胃收缩幅度有延迟,注射生长素大约 10-15 min 后,胃收缩幅度达到平台期(图 3B-D)。注射 1 射 L 混合液对胃收缩没有影响(图 3F)。当灌胃 [d-lys-3]-GHRP-6 或生理盐水时,胃收缩幅度没有变化($P > 0.05$,图 3A 和 E)。

2.4 弓状核荧光金双标的 ghrelin 神经元

大脑海马 CA1 区注射 0.5 μl 金标荧光金。注射七天后,弓状核 FG 标记的神经元胞浆呈黄色(图 4A)。使用 ghrelin 受体抗体免疫标记 ghrelin 神经元,胞浆出现红色荧光(图 4B)。弓状核发现一些 FG 双标的 ghrelin 神经元(图 4C)。推测弓状核的一些 ghrelin 神经元轴突可能延伸到海马 CA1 区。

2.5 电刺激弓状核对海马响应 GhrelinGD 敏感神经元放电的影响

电刺激 ARC 神经元的,观察海马 CA1 区 GD 敏感神经元的放电活动。58 个 GD 兴奋性神经元,38 个神经元兴奋(65.52%),12 个神经元抑制,8 个神经元没有变化。26 个 GD 抑制性神经元,18 个神经元兴奋(69.23%),3 个神经元抑制,5 个神经元没有变化。海马 CA1 区预注射生长素受体拮抗剂 [D-Lys-3]-GHRP-6 消除电刺激弓状核对 GD 敏感神经元的兴奋作用,GD 兴奋性神经元 (9.58 ± 3.5 比 7.72 ± 2.90 Hz, $P < 0.05$) 和 GD 抑制性性神经元 (8.01 ± 2.99 比 6.11 ± 2.23 Hz, $P < 0.05$)。

3 讨论

目前的研究表明,海马 CA1 区注射 ghrelin 可以兴奋大多数的 GD 神经元,并且在海马区通过其 ghrelin 受体促进胃运动。此外,电刺激 ARC 可以产生相同的作用,在海马区注射 [D-Lys-3]-GHRP-6 能够部分阻断这种作用。电损毁海马 CA1 区可以减弱对胃运动的兴奋作用,这种兴奋作用是电刺激 ARC 产生的。逆行追踪实验和免疫荧光化学染色实验显示当 FG 注入海马 CA1 区时,能够观察到 FG-ghrelin 的双标记的神

神经元在 ARC 中表达。在海马区,可以通过 PCR,蛋白印迹,免疫荧光染色检测 ghrelin 受体 GHSR-1a。这表明 ghrelin 神经元在 ARC 和海马之间有神经通路,并且参与胃运动的调节。

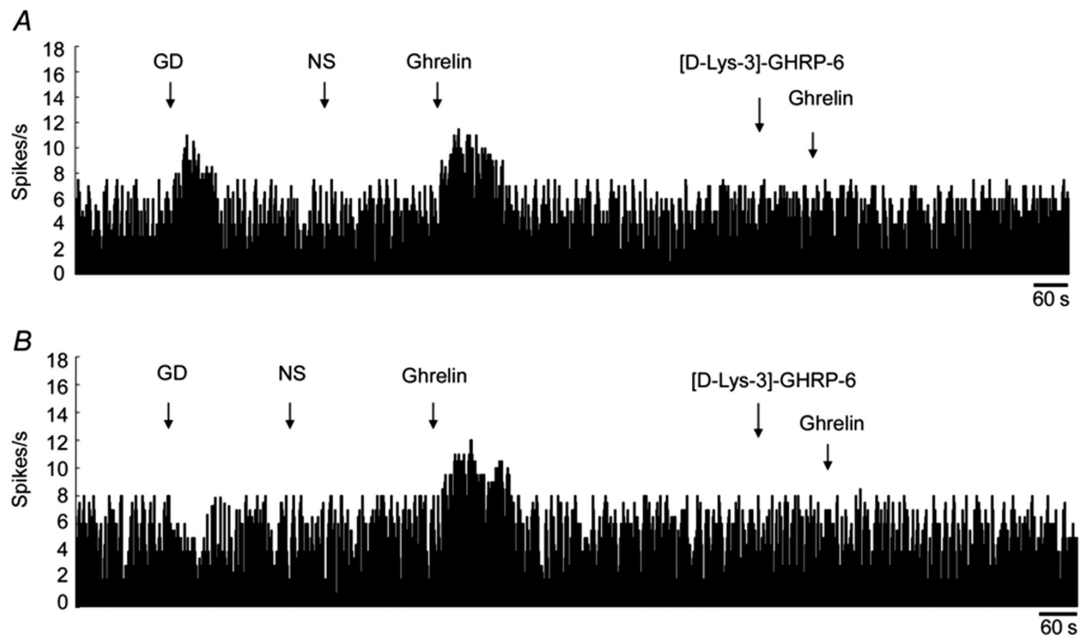


图2 海马 CA1 区注射 ghrelin 和 ghrelin 受体拮抗剂[d-lys-3] GHRP-6 对胃牵张神经元放电频率的作用。Ghrelin 能显著增加胃牵张神经元的放电频率,不管是胃牵张兴奋性神经元还是胃牵张抑制性神经元(B),单独注射生理盐水或[d-lys-3] GHRP-6 对胃牵张神经元没有作用。注射[d-lys-3] - GHRP-6 预处理后,ghrelin 的作用消失。

Fig.2 Effects of ghrelin and the ghrelin receptor antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6 on firing frequency of gastric-distension (GD)-responsive neurons in the CA1 region of the hippocampus. Application of ghrelin caused a significant increase of neuronal firing frequency in both GD-excitatory(GD-E) neurons (A) and GD-inhibitory (GD-I) neurons (B); administration of either NaCl (NS) or [D-Lys-3]-GHRP-6 alone had no effect on the firing frequency of neurons. After [D-Lys-3]-GHRP-6 pretreatment, the ghrelin-induced excitatory response was abolished.

表1 大鼠海马注射不同浓度 ghrelin 对胃收缩幅度的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of ghrelin on amplitude of gastric motility in hippocampus of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
NS	-4.23 $\pm$ 0.92	3.36 $\pm$ 0.86	2.65 $\pm$ 0.78	3.02 $\pm$ 0.92	2.16 $\pm$ 0.56	1.03 $\pm$ 0.26
Ghrelin (30 nmol/L)	-3.03 $\pm$ 0.84	15.32 $\pm$ 3.29*	5.17 $\pm$ 0.99	4.69 $\pm$ 1.03	2.49 $\pm$ 0.67	0.98 $\pm$ 0.22
Ghrelin (300 nmol/L)	-3.36 $\pm$ 0.96	60.32 $\pm$ 16.23** Δ Δ	45.69 $\pm$ 11.32** Δ Δ	5.38 $\pm$ 0.87	3.58 $\pm$ 0.81	1.16 $\pm$ 0.29
Ghrelin (300 nmol/L)	-4.37 $\pm$ 1.09	85.51 $\pm$ 19.36** Δ Δ Δ Δ	90.09 $\pm$ 25.54** Δ Δ Δ Δ	35.46 $\pm$ 10.98** Δ Δ Δ Δ	4.88 $\pm$ 1.06	1.33 $\pm$ 0.27

Note: *P<0.05, **P<0.01, VS saline(NS) group; Δ P<0.05, Δ Δ P<0.01 VS. 30 nmol /Lghrelin group; Δ Δ Δ Δ P<0.05, Δ Δ Δ Δ Δ P<0.01 与 300 nmol/L ghrelin group.

表2 大鼠海马注射不同浓度 ghrelin 对胃收缩频率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of ghrelin on frequency of gastric motility in hippocampus of rats($\bar{x} \pm s$)

Group	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
NS	-3.21 $\pm$ 0.96	3.57 $\pm$ 0.81	2.58 $\pm$ 0.61	3.88 $\pm$ 0.89	2.03 $\pm$ 0.69	0.96 $\pm$ 0.24
Ghrelin (30 nmol/L)	-4.39 $\pm$ 1.03	11.32 $\pm$ 2.21*	5.44 $\pm$ 1.05	2.66 $\pm$ 0.72	1.09 $\pm$ 0.25	1.04 $\pm$ 0.21
Ghrelin (300 nmol/L)	-3.59 $\pm$ 0.84	25.36 $\pm$ 3.69** Δ Δ	18.48 $\pm$ 4.65* Δ Δ	4.63 $\pm$ 1.11	0.89 $\pm$ 0.28	1.25 $\pm$ 0.27
Ghrelin (300 nmol/L)	-3.26 $\pm$ 0.91	35.51 $\pm$ 9.23** Δ Δ Δ	36.22 $\pm$ 8.31** Δ Δ Δ Δ	14.01 $\pm$ 2.98** Δ Δ Δ Δ	1.05 $\pm$ 0.29	1.36 $\pm$ 0.21

Note: *P<0.05, **P<0.01, VS saline(NS) group; Δ P<0.05, Δ Δ P<0.01 VS. 30 nmol /Lghrelin group; Δ Δ Δ Δ Δ P<0.05, Δ Δ Δ Δ Δ P<0.01 与 300 nmol/L ghrelin group.

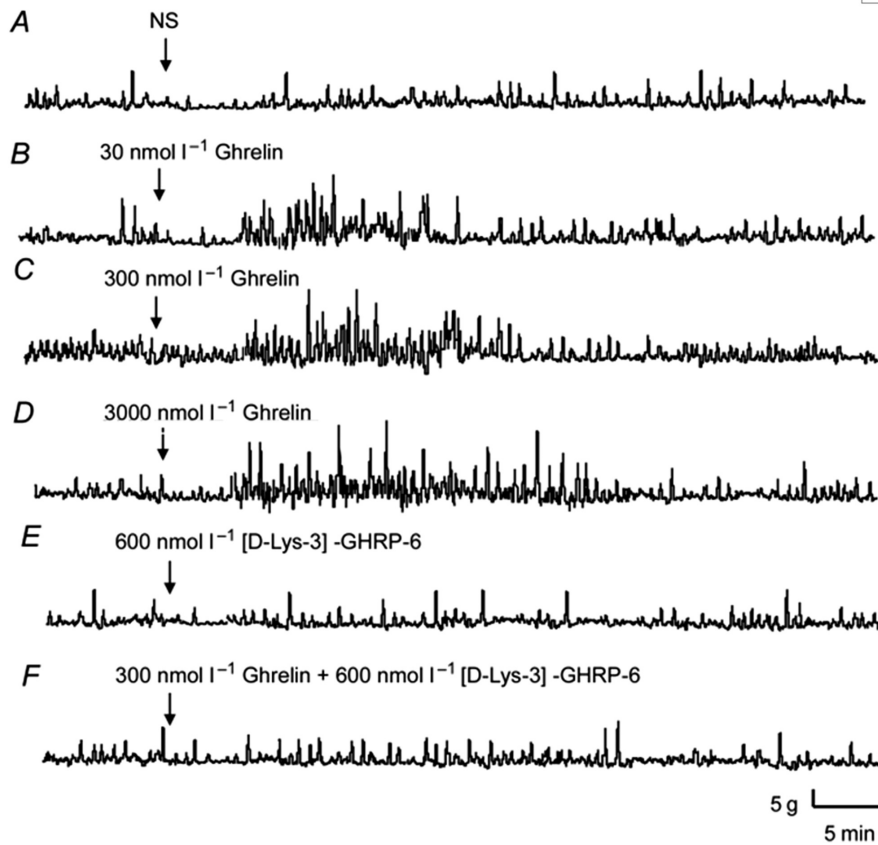


图3 大鼠海马CA1区注射不同浓度的生长素和[d-lys-3] GHRP-6对胃运动的影响。作用效应有5分钟的延迟。在海马CA1区注射Ghrelin后胃收缩幅度增加(B)。增加生长素剂量导致胃运动的进一步增加(C和D)。与生理盐水(NS)组比较单独注射[d-lys-3]-GHRP-6或ghrelin共同注射,胃运动改变没有显著差异(A)。

Fig.3 Effects of different concentrations of ghrelin and [D-Lys-3]-GHRP-6 on gastric motility in theCA1 region of hippocampus. There was 5 min latency after administration of ghrelin in the CA1 region of the hippocampus. After administration of ghrelin in the hippocampal CA1 region, the amplitude of the gastric contractions increased (B). Increasing the dose of ghrelin administered led to a further increase in gastric motility(C and D). There were no significant differences after the administration of [D-Lys-3]-GHRP-6 (E) or amixture of ghrelin and [D-Lys-3]-GHRP-6 (F) compared with the saline (NS) group (A).

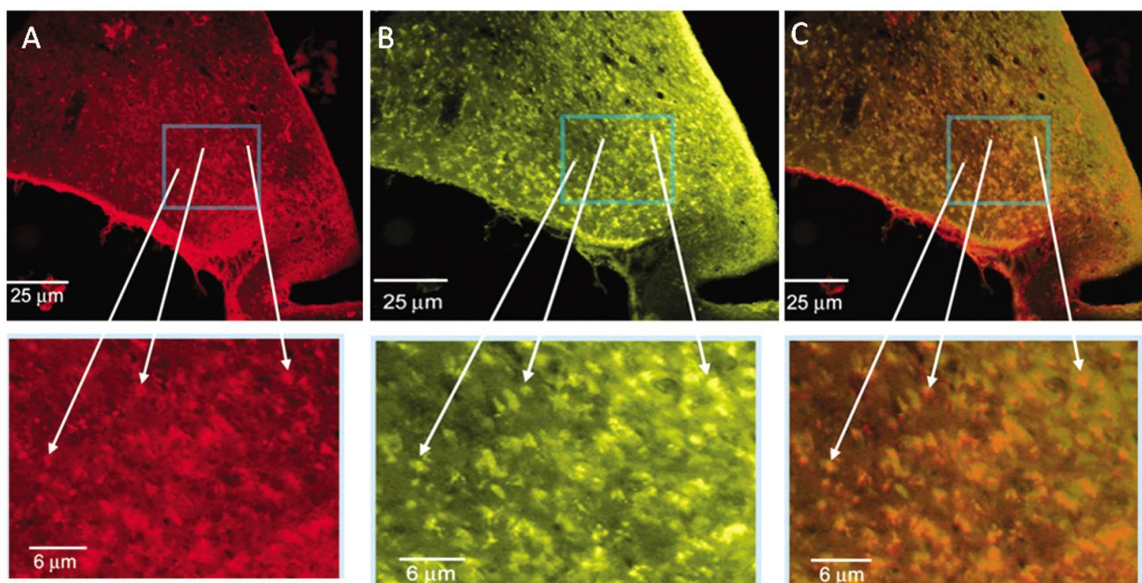


图4 弓状核荧光和 ghrelin 免疫阳性神经元的表达。海马CA1区注射FG后,ghrelin 阳性神经元(A)和荧光标记细胞(B),荧光标记神经元和 ghrelin 神经元在同一脑片中观察到(C)。

Fig.4 The expression of FG- and ghrelin-immunoreactive neurons in the ArcAfter FG injection to the CA1 region of the hippocampus, ghrelin-IR neurons (A) and FG-labelled cells (B) were found in the Arc in the same slice. C, double visualization of FG-labelled cells and ghrelin-containingneurons in the Arc in the same section.

Ghrelin 是糖皮质激素受体激动剂以及促食欲因子的内源性的激动剂。Ghrelin 大多数是在胃中合成然后释放进入循环系统。在中枢或者在外周注射 ghrelin 都可以刺激生长激素的分泌,促进食物摄入和体重的增加^[14,15]。作为一种脑肠肽,ghrelin 主要存在于胃内分泌细胞中,分泌到血流中,这表明它可能对胃肠道功能有作用。由于 ghrelin 的结构与胃动素的结构相似,ghrelin 对于胃肠动力的作用也被发现了。研究表明在啮齿类动物中,ghrelin 可以加速胃排空^[16-18],这个作用可以被阿托品或者切断迷走神经所阻断^[19]。内源性的 ghrelin 是由胃粘膜细胞释放,并且调节胃三期收缩。一种完整的结构对于 ghrelin 调节消化间期胃运动和摄食行为来说是必不可少的^[20,21]。尽管大多数的 ghrelin 受体在外周合成,ghrelin 在中枢也有表达。当前的研究表明,Ghrelin 受体 GHSR-1A 在海马区也有表达。

作为边缘系统的一部分,海马对于从短期记忆到长期记忆以及空间导航的整合中起着重要的作用^[22,23]。然而这一地区也参与感觉运动处理和情感行为^[24]。一项研究显示,ghrelin 对于处理情绪相关的信号是至关重要的,还有对于依赖海马的学习和习惯性对食物做出反应也是必须的^[25]。在电刺激胃治疗肥胖期间,在海马最大的变化是发生在大脑奖赏回路中的新陈代谢变化^[26]。当 ghrelin 传送到海马区,摄食显著升高。Ghrelin 输送到这个区域也可以增加蔗糖工作的意愿,自由大鼠可以自发性进餐^[27]。在海马区,Ghrelin 可以直接诱导成年神经前体细胞的增殖与分化,并且能够在海马突触可塑性的过程中激活 Ca^{2+} 介导的信号通路^[28]。

我们先前的研究证明,海马 CA1 区神经元是胃牵张敏感神经元^[29]。在我们目前的研究中,电生理数据表明,在海马 CA1 区有 GD 敏感神经元,在海马区注射 ghrelin 可以兴奋这些神经元,包括 GD-E 和 GD-I 神经元,并且促进胃运动,[D-Lys-3]-GHRP-6 可以消除这种作用。这些数据表明海马可以接受来自胃肠道的信号,在海马区,外源性的 ghrelin 可通过其受体促进胃运动。目前尚不清楚是 GD-E 或者 GD-I 神经元可以直接参与为运动。胃运动和 GD 敏感神经元之间的联系可在未来的研究中进一步探索。Ghrelin 免疫阳性神经元广泛存在于中枢神经系统中,特别是邻近第三脑室下丘脑背内侧核、下丘脑腹内侧核、下丘脑室旁核、下丘脑弓状核之间^[30]。为了检测是否有神经通路来自下丘脑核团来调节海马的功能,例如 ARC,从海马到 ARC,我们进行了逆行追踪。

ARC 是神经元的聚集体,位于下丘脑内侧基底部,毗邻第三脑室正中隆起。由于它得位置靠近正中隆起,ARC 可以处理一些神经血液传播信号。ARC 很容易受到循环因素的影响,如葡萄糖、瘦素、胰岛素和皮质酮^[8,31,32]。ARC 是接受激素,代谢信号和神经元信号的重要结构,能够反映身体的能量代谢状态。在 ARC 中两个初级神经元群可以处理信息,这反映营养状态,进而影响能量平衡。ARC 内侧的神经元亚群可以表达促食欲神经肽,如神经肽 Y,刺鼠相关蛋白,而其他神经元的表达则抑制摄食,例如可卡因和安非他明调节转录和阿黑皮素原。Schwartz et al. (2000)等人提出了食欲调节模型,其中下丘脑是外周激素作用的主要位点,这些激素有胰岛素,瘦素。这些激素可以调整 ARC 神经元的活性,这些反过来可以投射到下丘脑核,例如,下丘脑室旁核,下丘脑外侧区。稍后释放的厌食或者

促食欲神经肽可以调节能量的摄入和消耗从而维持平稳的体重。我们以前的研究表明,外源性的胃动素在调节 ARC 神经元的放电以及胃运动中起着重要的作用^[33]。Ghrelin,促进食欲的激素称为促胃动素相关肽,直接激活神经肽 Y 神经元,从而刺激食物摄入^[34]。累计证据显示 ARC 是 ghrelin 调控摄食和胃运动的中心位点^[30]。非常低剂量的 ghrelin 注射到 ARC 中可以直接刺激摄食,然而在 ARC 损毁的大鼠中,外源性注射 ghrelin 不能够增加食物摄入^[35,36]。Kinzig et al. (2006)报道在侧脑室和第三脑室中 ghrelin 可以显著增加摄食,在过度摄食的程度和时间进程上没有任何的心室方面的差异。在侧脑室或者第四脑室注射 ghrelin (1 nmol/L)会与在 ARC 神经肽 YmRNA 的表达增加产生相似的作用。这项研究还表明,中枢 ghrelin 在调控大鼠食物摄入中起着主要作用,血液传送的 ghrelin 是有效的,仅仅相对于其到达 ARC 的能力。一些研究表明,在 ARC 中有 ghrelin-样免疫反应细胞,ghrelin-IR,或者 ghrelin mRNA 的存在^[37,30,38,39,9],但是在 ARC 中 ghrelin 的表达程度是值得商榷的。我们目前的数据表明,ghrelin 起始于 ARC 并且投射到海马 CA1 区。电刺激 ARC,可以激发大多数 GD 敏感神经元对海马区 ghrelin 的反应,同时促进胃运动,在海马区 [D-Lys-3]-GHRP-6 阻断这种作用。电损毁海马区可以减弱对胃运动的兴奋作用。

总之,在海马注射外源性的 ghrelin 或者电刺激 ARC 调节 GD 反应神经元的放电活动并且可以促进胃运动。再加上逆行追踪和免疫组织化学染色,我们提出,ghrelin 神经元在 ARC 和海马区之间有着神经通路,海马参与胃运动的调节。关于海马通过 ghrelin 参与消化功能的调节,我们的研究提供了深刻的见解。

参考文献 (References)

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660
- [2] Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, et al. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(3): 426-457
- [3] Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, et al. Ghrelin- a hormone with multiple functions[J]. *Front Neuroendocrinol*, 2004, 25(1): 27-68
- [4] Harada Y, Ro S, Ochiai M, et al. Ghrelin enhancer, rikkunshito, improves postprandial gastric motor dysfunction in an experimental stress model[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2015, 27(8): 1089-1097
- [5] Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, et al. Structure, regulation and function of Ghrelin[J]. *J Biochem* 151, 2012, 151(2): 119-128
- [6] Abizaid A, Horvath TL. Ghrelin and the central regulation of feeding and energy balance[J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012, 16(Suppl 3): S617-S626
- [7] Shioda S, Takenoya F, Yagi M, et al. Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation [J]. *Nutrition*, 2008, 24(9): 848-853
- [8] Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, et al. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2014, 28(5): 725-737
- [9] Yanai M, Mochiki E, Ogawa A, et al. Intragastric administration of rikkunshito stimulates upper gastrointestinal motility and gastric emp-

- tying in conscious dogs[J]. *J Gastroenterol*, 2013, 48(5): 611-619
- [10] Sakata I, Nakano Y, Osborne-Lawrence S, et al. Characterization of a novel ghrelin cell reporter mouse [M]. *Regul Pept*, 2009, 155(1-3): 91-98
- [11] Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2004, 82(3): 171-177
- [12] Eichenbaum H. Remembering: functional organization of the declarative memory system[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(16): R643-R645
- [13] 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 Acad Sci U S A*, 2006, 103(42): 15641-15645
- [14] Nahata M, Muto S, Oridate N, et al. Impaired ghrelin signaling is associated with gastrointestinal dysmotility in rats with gastroesophageal reflux disease [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(1): G42-53
- [15] Van der Plasse G, Merckstein M, Luijendijk MC, et al. Food cues and ghrelin recruit the same neuronal circuitry [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2013, 37(7): 1012-1019
- [16] Greenwood-Van Meerveld B, Tyler K, Mohammadi E, et al. Efficacy of ipamorelin, a ghrelin mimetic, on gastric dysmotility in a rodent model of postoperative ileus [J]. *J Exp Pharmacol*, 2012, 4(3): 149-155
- [17] Kuroda K, Hequing H, Mondal A, et al. Ghrelin Is an Essential Factor for Motilin-Induced Gastric Contraction in *Suncus murinus* [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(12): 4437-4447
- [18] Chen CY, Lee WJ, Chong K, et al. Impact of intracerebroventricular obestatin on plasma acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 levels, and on gastric emptying in rats [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 191-196
- [19] Wang L, Murphy NP, Stengel A, et al. Ghrelin prevents levodopa-induced inhibition of gastric emptying and increases circulating levodopa in fasted rats [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(5): e235-245
- [20] Fu RG, Ge H, Yao GL, et al. Uremic anorexia and gastrointestinal motility dysfunction correlate with the changes of ghrelin system in hypothalamus[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2013, 18(2): 111-116
- [21] Yang CG, Wang WG, Yan J, et al. Gastric motility in ghrelin receptor knockout mice[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1): 83-88
- [22] 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 Cogn Neurosci*, 2012, 24(5): 1031-1054
- [23] Buzsáki G, Moser EI. Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(2): 130-138
- [24] Miyamoto K, Adachi Y, Osada T, et al. Dissociable memory traces within the macaque medial temporal lobe predict subsequent recognition performance[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(5): 1988-1997
- [25] Kanoski SE, Fortin SM, Ricks KM, et al. Ghrelin signaling in the ventral hippocampus stimulates learned and motivational aspects of feeding via PI3K-Akt signaling [J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(9): 915-923
- [26] Thanos PK, Michaelides M, Subrize M, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass Alters Brain Activity in Regions that Underlie Reward and Taste Perception[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0125570
- [27] Kanoski SE, Fortin SM, Ricks KM. Ghrelin signaling in the ventral hippocampus stimulates learned and motivational aspects of feeding via PI3K-Akt signaling[J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(9): 915-923
- [28] Isokawa M. Cellular signal mechanisms of reward-related plasticity in the hippocampus[J]. *Neural Plast*, 2012, 945373
- [29] Xu L, Sun X, Depoortere I, et al. Effect of motilin on the discharge of rat hippocampal neurons responding to gastric distension and its potential mechanism[J]. *Peptides*, 2008, 29(4): 585-592
- [30] Tena-Sempere M. Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis [J]. *Horm Metab Res*, 2013, 45(13): 919-927
- [31] Habeeballah H, Alsuhaymi N, Stebbing MJ, et al. Central Administration of Insulin and Leptin Together Enhance Renal Sympathetic Nerve Activity and Fos Production in the Arcuate Nucleus [J]. *Front Physiol*, 2017, 9(2): 672
- [32] Douros JD, Baltzegar DA, Mankiewicz J, et al. Control of leptin by metabolic state and its regulatory interactions with pituitary growth hormone and hepatic growth hormone receptors and insulin like growth factors in the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2017, 240(2): 227-237
- [33] Xu L, Gao S, Guo F, et al. Effect of motilin on gastric distension sensitive neurons in arcuate nucleus and gastric motility in rat[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(3): 265-270
- [34] Kang S, Moon NR, Kim da S, et al. Central acylated ghrelin improves memory function and hippocampal AMPK activation and partly reverses the impairment of energy and glucose metabolism in rats infused with β -amyloid[J]. *Peptides*, 2015, 71(2): 84-93
- [35] Khatib N, Gaidhane S, Gaidhane AM, et al. Ghrelin: ghrelin as a regulatory Peptide in growth hormone secretion [J]. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8(8): MC13-17
- [36] Currie PJ, Mirza A, Fuld R, et al. Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei [M]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289(2): R353-R358
- [37] Lu S, Guan JL, Wang QP, et al. Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 321(3): 157-160
- [38] Pirnik Z, Majercikova Z, Holubova M, et al. Effect of ghrelin receptor agonist and antagonist on the activity of arcuate nucleus tyrosine hydroxylase containing neurons in C57BL/6 male mice exposed to normal or high fat diet[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(4): 477-486
- [39] Fekete C, Zséli G, Singru PS, et al. Activation of anorexigenic pro-opiomelanocortin neurones during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs[J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(11): 1423-1431