

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.006

Obestatin 对血浆 ghrelin 和 nesfatin-1 水平及胃排空的影响 *

孙全波^{1,2} 栾 晓¹ 郭菲菲¹ 孙向荣¹ 祝 海³ 逢明杰³ 王 萍³ 谷 方¹ 徐 璐^{1△}

(1 青岛大学医学院病理生理学教研室 山东 青岛 266021; 2 菏泽医学专科学校 山东 菏泽 274031;

3 青岛市立医院 山东 青岛 266042)

摘要 目的:探讨侧脑室注射 obestatin 对大鼠血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin、nesfatin-1 水平的影响以及对胃排空的调控。**方法:**侧脑室注射 obestatin, 采用酶免疫测定(EIA)法检测血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin、nesfatin-1 水平以及胃排空率的变化。**结果:**侧脑室分别注射 0.1、0.3 或 1.0 nmol obestatin, 大鼠血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 水平无显著改变($P>0.05$), 且酰基化 ghrelin 与去酰基化 ghrelin 比率无显著改变($P>0.05$); 侧脑室注射 obestatin, 大鼠摄食量无显著改变, 但胃排空率明显增加($P<0.05$); 胃排空率明显延迟($P<0.05$)。与侧脑室注射 1.0 nmol Obestatin 组相比, 注射 1.0 nmol Obestatin+CRF, 大鼠摄食量无显著改变, 胃排空率明显延迟($P<0.05$)。各组摄食量及进入十二指肠内食物量无明显差异($P>0.05$)。**结论:**中枢 obestatin 促进大鼠的胃排空, 可能与 h/rCRF 通路有关。

关键词: 胃排空; Ghrelin; Nesfatin-1; Obestatin

中图分类号: Q95-3; R338 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2015)09-1628-04

The Effects of Obestatin on Plasma acyl Ghrelin and Nesfatin-1 Levels, and on Gastric Emptying in Rats*

SUN Quan-bo^{1,2}, LUAN Xiao¹, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, ZHU Hai³, PANG Ming-jie³, WANG Ping³, GU Fang¹, XU Luo^{1△}

(1 Dept. of Pathophysiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China;

2 Heze Municipal Hospital, Heze, Shandong, 274031, China; 3 Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong, 266042, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the impact of intracerebroventricular obestatin on plasma acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 levels, and the regulation of gastric emptying in rats. **Methods:** Rats were administrated obestatin through intracerebroventricular (ICV) injection; Enzyme immunoassay (EIA) method was used to detect the plasma levels of acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, nesfatin-1 and changes in the rate of gastric emptying. **Results:** After lateral ventricle injection respectively 0.1, 0.3 or 1.0 nmol obestatin, the plasma levels of acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, nesfatin-1 had no significant change ($P>0.05$), and the ratio of acyl ghrelin and des-acyl ghrelin had no significant difference ($P>0.05$) too. Food intake of rats had no obvious difference after lateral ventricle injection of obestatin, but the gastric emptying rate increased significantly ($P<0.05$). Gastric emptying rate delayed significantly ($P<0.05$). Compared with lateral ventricle injection 1.0 nmol Obestatin group, injection 1.0 nmol Obestatin + CRF, no significant changes in food intake in rats significantly delayed gastric emptying rate ($P<0.05$). While the amount of food intake and the food into the duodenum had no obvious difference ($P>0.05$). **Conclusions:** Central obestatin promotes gastric emptying of rats, which may be associated with h/rCRF pathways.

Key words: Gastric emptying; Ghrelin; Nesfatin-1; Obestatin

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R338 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1628-04

前言

Obestatin 是 23 个氨基酸的脑肠肽, 是胃促生长素前原肽转录翻译产物^[1], 在中枢 obestatin 神经元主要分布于下丘脑摄食相关中枢, 如下丘脑外侧区(LHA)、背内侧核、室旁核(PVN)和弓状核(Arc)也有分布。Obestatin 具有抑制渴觉^[2]、抗焦虑^[3]、促进学习记忆^[3]、增加快速动眼睡眠和减少睡眠延迟^[4]等功能。有研究表明, 肥胖患者血浆 obestatin 水平较低^[5], 而消瘦者则较高^[6]。另有文献报道, obestatin 可促进食欲, 参与能量代谢调

控^[7], 但目前对 obestatin 的促摄食作用仍有争议。因此, 本研究采用侧脑室注射 obestatin, 观察大鼠血浆与摄食和胃运动密切相关的脑肠肽, 如 ghrelin 和 nesfatin-1 水平改变, 并同时观察其对胃排空的影响, 目的是进一步验证 obestatin 在调控摄食和胃肠动力中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物

体重 250-320g 的雄性 SD 大鼠, 购自青岛市动物检疫中

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(31071014; 81100260; 81300281; 81470815; 81270460); 青岛市科技局项目(13-1-4-170-jch; 14-2-3-3-nsh)

作者简介: 孙全波(1980-), 男, 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: hzyzsqb@163.com

△通讯作者: 徐璐, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期: 2014-09-07 接受日期: 2014-09-30)

心,置于循环光照下(8:00-20:00 光照),温湿度恒定($22.5 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$),自由饮水、摄食。实验均在 8:00Am 开始。

1.2 侧脑室植入套管

戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠(50 ng/kg),将大鼠置于立体定位仪上,在右侧脑室植入一同芯套管(定位:前囟后 0.8 mm ,旁开 1.4 mm ,深 4.5 mm)。将植入后的导管固定于头骨表面。为了验证导管是否植入侧脑室,实验结束后经导管向大鼠脑室注射 $100\text{ }\mu\text{L}$ 0.05% 甲苯基紫色^[8]。

1.3 血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 的检测

随机选取 40 只大鼠,分为 4 组(每组 10 只):对照组,侧脑室注射 NS;obestatin 低剂量组:侧脑室注射 0.1 nmol obestatin;obestatin 中剂量组:侧脑室注射 0.3 nmol obestatin;obestatin 高剂量组:侧脑室注射 1.0 nmol obestatin。侧脑室注药 2 小时后采集血液。将血样放入含有乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(1 mg/ml)和抑肽酶(500 U/ml)的冰冻玻璃管内,离心分离血浆。酶免疫测定(ELISA)法测量血浆中酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 的含量。实验用 ELISA 试剂盒均购自上海劲马实验设备有限公司,严格按说明书操作:

1) 试剂配制:

1× 洗涤液:将 5× 洗涤液与 dH_2O 以 1:4 进行稀释;

1× 稀释液:5× 稀释液与 dH_2O 以 1:4 进行稀释;

1× 检测液:以 1× 稀释液稀释 100× 检测液 100 倍,检测液应在使用前 1h 内配制;

2) 标准品配制:分别向酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 标准品试管内加 dH_2O 1 mL ,终浓度为 500 ng/mL (酰基化 ghrelin), 1200 ng/mL (去酰基化 ghrelin), 12 ng/mL (nesfatin-1);取 8 个离心管,每只离心管加 $300\text{ }\mu\text{L}$ 的 1× 稀释液,向 #7 离心管中加 $300\text{ }\mu\text{L}$ 标准品溶液,倒置混合,浓度为 10 ng/mL ;#0 离心管不加标准品,从 #6~1 开始依次倍释标准品浓度;

3) ELISA:血浆标本以 1× 稀释液按 1:50 进行稀释;取 $100\text{ }\mu\text{L}$ #0~7 离心管内标准品、稀释的血浆加入到抗体包埋的板孔内; 37°C 下孵育 1 h ;以 $300\text{ }\mu\text{L}$ 1× 洗涤液洗涤 3 次;向各孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 二抗, 37°C 下孵育 1 h ;以 $300\text{ }\mu\text{L}$ 1× 洗涤液洗涤 3 次;向各孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 1× 检测液, 37°C 下孵育 1 h ;以 $300\text{ }\mu\text{L}$ 1× 洗涤液洗涤 5 次;向各孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 1× 底物反应液,室温下避光下孵育 10 min ;使用排刷向各孔加 $100\text{ }\mu\text{L}$ 反应终止液; 450 nm 紫外线下检测,并建立标准曲线(图 1),计算各样本蛋白数值乘以稀释倍数,取得蛋白的血浆浓度。

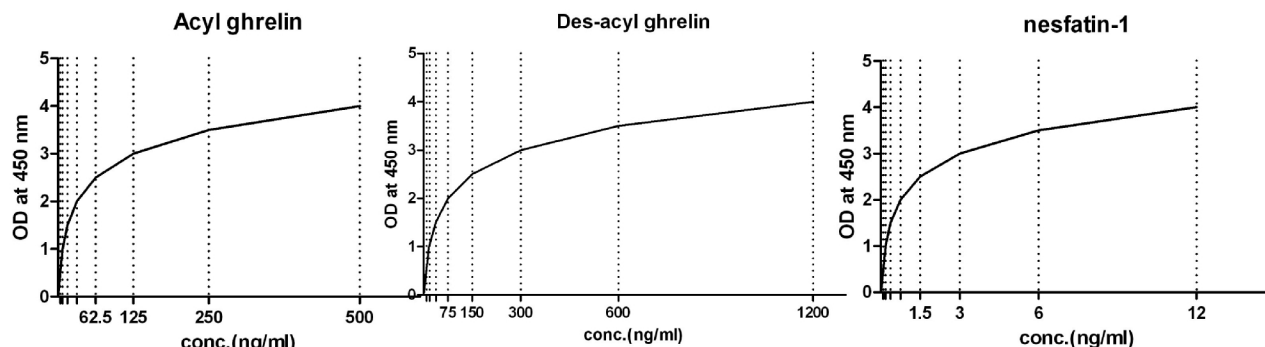


图 1 酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 和 nesfatin-1 的标准曲线

Fig. 1 Acyl ghrelin, dis-acyl ghrelin and nesfatin-1 standard curve

1.4 胃排空实验

随机选取 60 只大鼠,分为 6 组,每组 12 只。实验前大鼠禁食 16 小时,随后给予大鼠 $350\text{ kcal}/100\text{ g}$ 固体食物,1 小时后侧脑室注射药物。对照组注射 $10\text{ }\mu\text{L}$ NS,实验组分为 5 组,分别注射 0.1 nmol obestatin、 0.3 nmol obestatin、 1.0 nmol obestatin、 1 nmol h/rCRF 、 $1.0\text{ nmol obestatin+h/rCRF}$,注药后禁食 2 小时。

摄食量计算方式:固体食物总量 - 剩余固体食物量^[9]。

实验结束后,大鼠断颈处死,开腹、夹闭食管、胃及十二指肠,将胃完整取出,胃内容物干燥后称量。

胃排空率 = $[1 - (\text{干燥的胃内容物重量} / \text{摄食量})] \times 100\%$ 。

十二指肠内容物 = 摄食量 - 干燥的胃内容物重量。

1.6 统计学分析

应用 PPMS 1.5 统计软件进行数据分析。以 ANOVA 对多样本数据进行分析,两样本均数的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 侧脑室注射 obestatin 对血浆 ghrelin 和 nesfatin-1 水平的影响

大鼠侧脑室注射不同剂量的 obestatin(0.1 nmol 、 0.3 nmol 、 1.0 nmol),2 小时后测量血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 含量。与对照组相比,血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin、nesfatin-1 水平以及酰基化 ghrelin 与去酰基化 ghrelin 的比值均没有明显改变(表 1)。

表 1 侧脑室注射 obestatin 对血浆 ghrelin 和 nesfatin-1 水平的影响

Table 1 Effect of obestatin on plasma ghrelin and nesfatin-1 levels

	Acyl ghrelin (pg/mL)	Des-acyl ghrelin (pg/mL)	Acyl ghrelin/ Des-acyl ghrelin ratio	Nesfatin-1 (pg/mL)
Saline(n=10)	194.2± 50.5	654.4± 161.1	0.3± 0.09	4.4± 1.2
0.1nmol Obestatin (n=6)	163.8± 42.3	781.5± 184.2	0.2± 0.05	4.9± 1.5
0.3nmol Obestatin (n=6)	227.1± 60.4	948.5± 304.0	0.22± 0.06	6.2± 1.8
1.0nmol Obestatin (n=6)	111.8± 25.7	792.5± 231.0	0.14± 0.04	5.1± 1.3

2.2 侧脑室注射 obestatin 和 h/rCRF 对大鼠胃排空率、摄食量及十二指肠食物量的影响

本研究发现,大鼠摄食量与胃排空率呈负相关($r=-0.741$,

$P<0.001$ 图 2A);但进入十二指肠的食物量与胃排空率无显著相关性($P=0.07$,图 2B)。

与生理盐水对照组相比,注射不同剂量 obestatin,大鼠摄

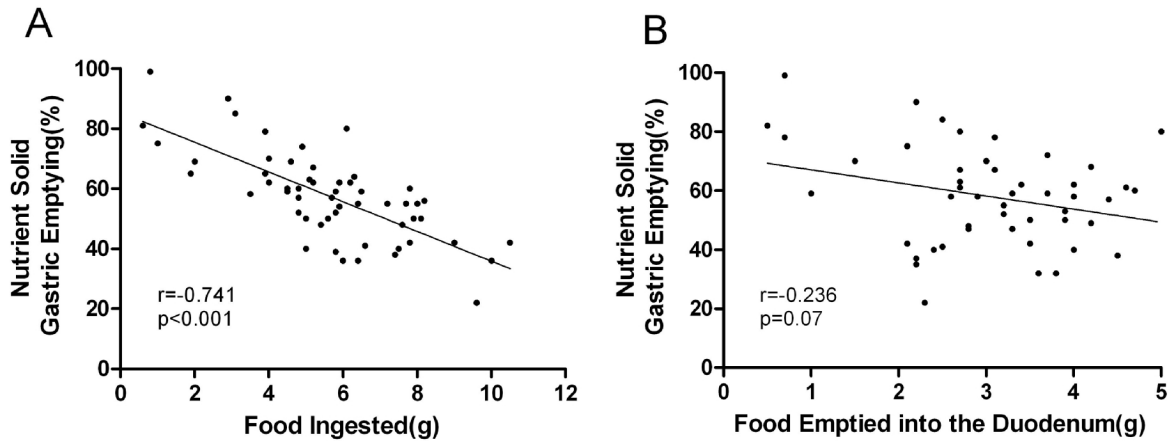


图 2 侧脑室注射 obestatin 对大鼠摄食量及胃排空的影响

Fig. 2 The effect of food intake and gastric emptying in rat after Lateral ventricle injection obestatin

注:A:侧脑室注射 obestatin 对摄食量与胃排空率关系($r=-0.741$, $P<0.001$);

B:侧脑室注射 obestatin 后 2 小时,进入十二指肠食物量与胃排空率关系($r=-0.236$, $P=0.07$); $n=60$

Note: There was (A) a significant negative correlation between the gastric emptying of a solid nutrient meal and the weight of food ingested at 1 h before intracerebroventricular (ICV) injection ($r=-0.741$, $P<0.001$), and (B) a tendency of negative correlation observed between the gastric emptying of a solid nutrient meal and the weight of food emptied into the duodenum 2 h after ICV injection ($r=-0.236$, $P=0.07$); $n=60$ rats total.

食量无显著改变,但胃排空率明显增加($P<0.05$);但侧脑室注射 1 nmol 促肾上腺皮质激素释放激素(CRF),胃排空率明显延迟($P<0.05$)。但各组摄食量及进入十二指肠内食物量无明显差异($P>0.05$)。与侧脑室注射 1.0 nmol Obestatin 组相比,注射 1.0 nmol Obestatin+CRF,大鼠摄食量无显著改变,胃排空率明显延迟($P<0.05$,表 2)。

表 2 Obestatin 和 h/rCRF 对胃排空率、摄食量以及排入十二指肠食物量的影响($n=12$)

Table 2 The gastric emptying of a solid nutrient meal, food ingested and food emptied into the duodenum in groups treated with intracerebroventricular injection of either obestatin, or corticotropin-releasing factor ($n=12$)

3 讨论

	Gastric Emptying (%)	Food Ingested (g/h)	Food Emptied into Duodenum (g/h)
NS	58.1± 18.2	5.7± 1.7	3.5± 1.1
0.1nmol Obestatin	65.4± 17.3	5.2± 1.5	3.2± 1.4
0.3 nmol Obestatin	82.3± 21.1*	5.5± 1.6	3.1± 1.0
1.0 nmol Obestatin	87.1± 20.2*	5.0± 1.1	2.8± 0.8
CRF	41.5± 10.3*	6.1± 2.5	2.5± 0.8
1.0 nmol Obestatin+CRF	51.2± 14.3#	5.6± 1.6	2.6± 0.7

注:与 NS 组相比,* $P<0.05$;与 1.0 nmol Obestatin 组相比,# $P<0.05$ 。

Notes:* $P<0.05$ vs. NS group;# $P<0.05$ vs. 1.0 nmol Obestatin group.

以往研究显示,静脉或脑室注射 obestatin,血浆中生长激素、促甲状腺激素以及促肾上腺皮质激素表达均没有显著改变,脑内神经肽 Y、刺鼠色蛋白相关蛋白、苯丙胺调节转录因子

以及类吗啡样神经肽 mRNA 表达也无显著变化^[7]。本研究也发现,侧脑室注射不同剂量 obestatin,血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 水平均无明显改变。Ghrelin 主要以酰基化和去酰基化的形式调控摄食,影响肠蠕动和机体能量平衡^[8]。去酰基化 ghrelin 主要存在于循环血中^[9],在胃、小肠和胰腺,去酰基化 ghrelin 经 O-酰基转移酶催化生成酰基化 ghrelin^[10]。

Nesfatin-1 是含有 82 个氨基酸的肽类,是由核连蛋白-2 所编码的饱感信号肽^[11]。最近研究发现,nesfatin-1 和 ghrelin 在胃内共表达,推测 nesfatin-1 可能与 ghrelin 共同或协同调控摄食和体重^[11]。但是目前还没有研究表明 obestatin 与酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 间有相互作用。但有文献报道,厌食症患者,其能量平衡及摄食受 obestatin、nesfatin-1、酰基化 ghrelin 及去酰基化 ghrelin 的调控^[12]。本研究首次脑室给药观察了 obestatin 对 nesfatin-1、酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 等多肽的影响。但侧脑室注射不同剂量的 obestatin 并不影响血浆中上述肽类水平。

以前对胃排空的研究主要围绕观察食物的排空率,而对食物排空进入十二指肠研究较少。本研究显示,摄入的食物量与胃排空率呈显著负相关;且摄入的食物量与进入十二指肠量也呈负相关趋势;因此将来我们研究胃排空影响应该考虑进食量。

Ghrelin 前体基因主要有三种基因产物,一是能够促进胃排空的酰基化 ghrelin^[13],二是能抑制胃排空的去酰基化 ghrelin^[14],三则是在本研究中研究的 obestatin。与前两种基因产物相比,obestatin 也促进大鼠胃的排空。在大鼠杏仁核、海马以及听觉皮层含有丰富的 GPR39 mRNA,并且 obestatin 能靶向与 GPR39 结合^[15],因此 obestatin 促进胃的排空可能与 ghrelin 信

号通路有关。

已有研究表明,obestatin 可与 CRF 受体结合,进而改变胃和十二指肠动力^[16]。因此,本研究观察了脑室内注射 CRF 为胃排空的影响。结果显示,侧脑室注射 CRF 可显著抑制胃的排空率,这与已有的相关研究结果相吻合^[17]。尽管在人类脑脊液中 CRF 的半衰期不到 10 分钟^[18],但是我们研究结果表明,脑室内注射 1nmol 的 CRF 能有效抑制大鼠胃的排空。

总之,侧脑室注射 obestatin 2 小时后,血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 水平无显著改变;大鼠摄食量与胃排空率呈负相关;侧脑室注射 obestatin 可使大鼠胃排空率增加;但侧脑室注射 CRF,大鼠胃排空率明显延迟。

参考文献(References)

- [1] Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake [J]. *Science*, 2005, 310(5750): 996-999
- [2] Samson WK, White MM, Price C, et al. Obestatin acts in brain to inhibit thirst [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 292(1): R637-R643
- [3] Carlini VP, Schiöth HB, Debarioglio SR. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(4): 907-912
- [4] Trovato L, Gallo D, Settanni F, et al. Obestatin: is it really doing something?[J]. *Front Horm Res*, 2014, 42(9):175-185
- [5] Zhang N, Yuan C, Li Z, et al. Meta-analysis of the relationship between obestatin and ghrelin levels and the ghrelin/obestatin ratio with respect to obesity[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 341(1): 48-55
- [6] Mafra D, Guebre-Egziabher F, Cleaud C, et al. Obestatin and ghrelin interplay in hemodialysis patients [J]. *Nutrition*, 2010, 26(11-12): 1100-1104
- [7] Li JB, Asakawa A, Cheng K, et al. Biological effects of obestatin[J]. *Endocrine*, 2011, 39(3): 205-211
- [8] Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, et al. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility [J]. *Pharmacol Rev*, 2009, 61(4): 430-481
- [9] Gullett NP, Mazurak VC, Hebbar G, et al. Nutritional interventions for cancer-induced cachexia[J]. *Curr Probl Cancer*, 2011, 35(2): 58-90
- [10] Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17): 6320-6325
- [11] Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight[J]. *Peptides*, 2010, 31(2): 357-369
- [12] Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, et al. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa[J]. *Peptides*, 2011, 32(1): 150-153
- [13] Chen CY, Tsai CY. Ghrelin and motilin in the gastrointestinal system [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(31):4755-4765
- [14] Asakawa A, Ataka K, Fujino K, et al. Ghrelin family of peptides and gut motility[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 3(1): 73-74
- [15] Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin[J]. *Gut*, 2005, 54(1): 18-24
- [16] Fujimiya M, Asakawa A, Ataka K, et al. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: regulatory roles on the gastrointestinal motility [J]. *Int J Pept*, 2010, 29(2): 227-234
- [17] Coin I, Katritch V, Sun T, et al. Genetically encoded chemical probes in cells reveal the binding path of urocortin-I to CRF class B GPCR [J]. *Cell*, 2013, 155(6):1258-1269
- [18] Kellner M, Salzwedel C, Wortmann V, et al. No acute suppression of cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone in man by cortisol administration[J]. *Psychiatry Res*, 2013, 210(2): 662-664
- [14] Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update[J]. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2014, 20(23): 7260-7276
- [15] McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 357-371
- [16] Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(4): 765-783
- [17] Nie Y, Erion DM, Yuan Z, et al. STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1 [J]. *Nature cell biology*, 2009, 11(4): 492-500
- [18] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase [J]. *The EMBO journal*, 2004, 23(12): 2369-2380
- [19] El-Karef A, Yoshida T, Gabazza EC, et al. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice [J]. *The Journal of pathology*, 2007, 211(1): 86-94
- [20] Liu J, Wang CY, Chen YP, et al. Dynamic expression of tropomyosin 1 in rat model of hepatic fibrosis and hepatic stellate cells[J]. *Chinese journal of hepatology*, 2011, 19(11): 848-852
- [21] Zhang Y, Xu N, Xu J, et al. E2F1 is a novel fibrogenic gene that regulates cholestatic liver fibrosis through the Egr-1/SHP/EID1 network [J]. *Hepatology*, 2014, 60(3): 919-930
- [22] Wang C, Chen L, Hou X, et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage [J]. *Nature cell biology*, 2006, 8(9): 1025-1031

(上接第 1612 页)