

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.21.005

下丘脑弓状核 PYY 对大鼠摄食、胃运动和能量代谢的影响及机制*

薛秀菊^{1,2} 聂文波^{1,3} 冷慧¹ 王茜¹ 孙向荣¹ 郭菲菲¹ 徐璐^{1Δ}

(1 青岛大学 山东 青岛 266021; 2 菏泽市单县中心医院 山东 菏泽 274000; 3 菏泽市单县中心医院骨科 山东 菏泽 274000)

摘要 目的:探究 YY 肽(PYY)对雄性 Wistar 大鼠的摄食、胃运动和能量代谢的影响及潜在机制。**方法:**采用免疫组织化学实验方法观察大鼠下丘脑弓状核(ARC)中 Y2 受体的表达;通过 ARC 微量注射 PYY,观察其对下丘脑中编码摄食相关代谢激素的 mRNA 表达以及 ARC 中 PYY 反应性神经元的放电频率、食物摄入量及水摄入量、氧气消耗(VO_2)、 CO_2 产生(VCO_2)及能量代谢的影响。**结果:**免疫组化结果显示大鼠 ARC 内存在 Y2 受体;大鼠 ARC 注射 PYY 能够兴奋 PYY 反应性神经元,上调可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART)及促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)等抑食肽 mRNA 的表达,下调神经肽 Y(NPY)及下丘脑泌素(HCRT)等促食肽 mRNA 的表达;且抑制大鼠食物摄入量,并参与调控大鼠呼吸、能量代谢及胃运动的改变。**结论:**ARC 微量注射 PYY 可减少食物摄入并调节全身能量平衡,PYY 可能是一种新型代谢肽。

关键词:YY 肽;弓状核;摄食;胃运动;能量代谢

中图分类号:R-33;Q593.2;R338.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)21-4020-06

Effects of Hypothalamic ARC PYY on the Feeding, Gastric Motility and Energy Metabolism in Rats and its Potential Mechanism*

XUE Xiu-ju^{1,2}, NIE Wen-bo^{1,3}, LENG Hui¹, WANG Qian¹, SUN Xiang-rong¹, GUO Fei-fei¹, XU Luo^{1Δ}

(1 Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China; 2 Heze City Single County Central Hospital, Heze, Shandong, 274000, China;

3 Heze City Single County Central Hospital, Department of orthopaedics, Heze, Shandong, 274000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and potential mechanisms of YY peptide (PYY) on the feeding, gastric motility and energy metabolism in male Wistar rats. **Methods:** The expression of Y2 receptor in the arcuate nucleus (PYY) of rat hypothalamus was observed by immunohistochemistry. The expression of metabolic hormone mRNA in the hypothalamus and the PYY response in ARC were observed by microinjection of PYY into ARC. Sexual neuron discharge frequency, rat food intake and water intake, oxygen consumption (VO_2), CO_2 production (VCO_2) and energy metabolism. **Results:** Immunohistochemistry showed that Y2 receptor was present in rat ARC; PYY in rats with ARC could stimulate PYY-reactive neurons; ARC microinjection of PYY could up-regulate the expression of anti-peptide peptides such as (cocaine amphetamine-regulated transcript) CART and (corticotropin releasing hormone) CRH, and down-regulate Neuropeptide Y (NPY) and hypocretin (HCRT). The expression of the peptide peptide mRNA; and PYY can participate in the regulation of changes in rat respiration, energy metabolism and gastric motility. **Conclusion:** ARC microinjection of PYY can reduce food intake and regulate systemic energy balance. PYY may be a new metabolic peptide in rats.

Key words: PYY; Arcuate nucleus; Feeding; Gastric movement; Energy metabolism

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.2; R338.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)21-4020-06

前言

脑肠肽在体重和能量代谢平衡的调节中起关键作用,作为治疗肥胖的靶标具有重要意义。肽 YY(PYY)是脑肠肽中的一种,被认为是饱腹感的重要介质,在肥胖的病因学中发挥重要作用^[1]。PYY 属于神经肽 Y(NPY)家族,包括 NPY 和胰多肽(PP)^[2]。这三种肽都通过一组 G 蛋白偶联的 Y 受体(Y1, Y2, Y4, Y5 和 y6)向其它神经元投射信号,这些受体在中枢和外周都存在广泛的表达^[3,4]。PYY 主要从胃肠道的内分泌 L 细胞释

放,与摄入的卡路里量成比例。最近的一项研究表明 PYY 也可由舌味蕾中的细胞合成,这对诱导饱腹感有重要意义^[5-8]。在体内循环中,存在两种形式的 PYY;全长 PYY1-36 和截短形式 PYY3-36,通过特异性细胞表面酶二肽基肽酶-IV(DPP-IV)从 PYY1-36 切割^[9,10]。在摄食后,PYY1-36 向 PYY3-36 的转化增强,PYY3-36 在禁食状态下占循环总 PYY 的约 37%,在进食状态下占 63%。重要的是,PYY1-36 与所有已知的 Y 受体结合,尽管与每种受体具有不同的亲和力,而 PYY3-36 优先与 Y2 结合,在较小程度上也与 Y5 受体结合^[11]。研究已证明

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470815)

作者简介:薛秀菊(1984-),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: XXJQDYXY@126.com

Δ 通讯作者:徐璐, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2019-05-18 接受日期:2019-06-13)

PYY3-36 的急性外周给药可减少正常和肥胖动物及人的食物摄入。在饮食诱导的肥胖啮齿动物中, PYY3-36 也被证明可促进脂质氧化和 / 或减少脂肪生成, 以及增强胰岛素介导的葡萄糖转化^[12]。PYY3-36 对脂质代谢和葡萄糖稳态的这些作用的潜在机制仍有待阐明^[13-15]。

与研究 PYY3-36 作用的大量研究工作相反, 很少关注 PYY1-36 在摄食及能量代谢方面的作用, 或 PYY1-36 和 PYY3-36 之间可能的相互作用, 以调节能量平衡和葡萄糖稳态^[16]。PYY1-36 具有更广泛和更复杂的效应特征, 因为除了对 Y2 受体具有比 PYY3-36 更高的亲和力外, 还对其他 Y 受体具有高亲和力, 例如 Y1 受体^[17,18]。基于 Y1 和 Y2 信号传导对能量和葡萄糖稳态的不同影响, 并考虑到 PYY1-36 和 PYY3-36 在不同比例的循环中共存, PYY1-36 和 PYY3-36 可以以协同方式调节禁食和餐后状态中的能量和葡萄糖代谢^[19,21]。因此, 探究 PYY 对能量平衡的调控作用十分必要。有趣的是, 之前的一项研究表明适度的种系 PYY 过表达会导致饮食诱导的肥胖的显著抵抗, 并显著减弱遗传性肥胖 ob / ob 小鼠的代谢综合征^[22-24]。因此, 胚胎发生过程中高水平的 PYY 实际上是致命的^[25]。为了探究 PYY 的能量平衡中的生理作用, 我们通过向大鼠弓状核直接微量注射 PYY 及其它不同药物以观察 PYY 对大鼠摄食及其它摄食相关基因 mRNA 表达的影响, 以提供关于 PYY 参与调节食物摄入, 能量代谢等生理作用的更确定的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 Wistar 大鼠, 体质量在 220-250 g, 均在室温 (25±2℃)、12 h:12 h 昼夜循环光照、实验室标准饮食及自由进食和饮水的环境中饲养。实验开始前, 大鼠禁食 24 h, 但可自由饮水。ARC 内注射药物后, 大鼠自由摄食和饮水。所有动物实验均严格按《青岛大学实验动物保护和使用管理办法》执行。

1.2 免疫组织化学染色

大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 后, 俯卧位固定于操作台上, 先后给予 250 mL 0.9% 的生理盐水和 250 mL 4% 的多聚甲醛灌注固定。将大鼠断头取脑后, 置于 4% 多聚甲醛中 4-6 h 进行后固定, 再置于 30% 蔗糖溶液脱水 (4℃)。冰冻切片连续冠状切片 (Kryostat 1720, Leica, Germany), 片厚 15 μm, 所有切片放于 -20℃ 冰箱冻存。

选取 ARC 区域较大的切片, 先后用双蒸水和 0.01M PBS 洗涤各 3 次, 每次 5 min, 之后浸入柠檬酸修复液中微波修复 5 min, 至气泡逸出。用正常羊血清封闭非特异性抗原 (室温孵育 1 h), 滴加一抗, 即抗 -Y2 受体抗体 (兔来源, 1:200 稀释, Abcam, London, UK), 将加好一抗的标本置于湿盒中, 4℃ 过夜。PBS 溶液洗涤 3 次, 然后滴加荧光素 Cy3 标记的二抗 (山羊抗兔, 1:500 稀释, Abcam, London, UK), 室温孵育 2 h (避光操作)。在 BX50 荧光显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan) 下观察实验结果并拍照。省略一抗作为阴性对照。

1.3 大鼠脑核团置管

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (剂量为 50 mg/kg) 麻醉后固定于脑立体定位仪, 根据 Paxinos & Watson 大鼠脑图谱用微量注射仪定位, 以前囟为零点, 定位 ARC (前囟后: 3.0 mm; 旁开: 0.3 mm;

颅骨下: 10.0 mm), 用牙科钻钻孔, 将一不锈钢套管置于 ARC, 用牙科粘固剂固定, 不锈钢管探针封闭导管, 缝合头皮切口。大鼠分笼饲养, 自由饮食饮水。手术结束后大鼠连续 3 天给予腹腔注射 8 万 U 青霉素以防止术后感染。大鼠恢复 1 周后开始实验。

为了检测核团或侧脑室定位是否准确, 实验结束后经套管向大鼠 ARC 内缓慢注射溴胺天蓝溶液, 随后麻醉大鼠, 经心脏灌注固定, 断头取脑, 50 μm 冠状冰冻切片, 显微镜下观察药物注射的位置是否准确。

1.4 基因表达分析及血液中代谢相关激素的水平

确定外源性 PYY 给药是否对下丘脑编码 mRNA 的代谢激素的表达有任何影响。收集下丘脑组织。在实验结束后, 大鼠 (n=3) 腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 断头处死。快速取脑, 分离下丘脑组织置于液氮内, 并储存在 -80℃ 冰箱。组织收集在 2 小时内完成, 并在液氮中快速冷冻并储存在 -80℃。根据制造商的说明, 使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen Canada Inc., Ontario, Canada) 或 Aurum 总 RNA 试剂盒 (Bio-Rad Laboratories Inc., Ontario, Canada) 从 10mg 组织匀浆中提取总 RNA。使用 Nano Drop 2000c (Thermo, Vantaa, Finland) 测定 RNA 的浓度和纯度, 并使用 iScript cDNA 合成试剂盒 (Bio-Rad laboratories, Inc., Ontario, Canada) 合成互补 DNA, 并通过实时 RT-PCR 定量。

用于定量 mRNA 表达的引物序列有: NPY: F: CCGCC-CGCCATGATGCTAGGTA, R: CCCTCAGCCAGAATGCCCA-A; HCRT: F: GCGGCCTCAGACTCCT, R: AGGGAGAGGCAA-TCCGGAGAG; CART: F: CCGAGCCCTGGACATCTACT, R: C-CGCCTTGGCAGCTCCTT; CRH: F: TGGATCTCACCTTCCAC-CTTCTG, R: CCGATAATCTCCATCAGTTTCCTG。PCR 条件: 95℃ (30 s), 35 cycles of 95℃ (10 s)。使用具有 SYBR Green Master Mix 的 RT-定量 PCR 和 CFX Connect 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 测量基因表达, 并且使用 Livak 方法将作为管家基因的 β-肌动蛋白的表达标准化^[21]。在样品分析之前, 通过验证和优化退火温度实现引物的高效率转录。样品一式两份进行, 阴性对照反应混合物中不存在模板 DNA。

1.5 PYY 对大鼠 ARC 中神经元放电的影响

大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (100 mg/kg, Sigma 公司, 美国) 后。将大鼠放置固定于脑立体定位仪 (Narashige SN-3, Tokyo, Japan)。在开颅术后, 将 4 管玻璃微电极 (总尖端直径: 3-10 μm, 电阻: 5-20 MΩ) 立体定位在 ARC (前囟后: 3.0 mm; 旁开: 0.3 mm; 颅骨下: 10.0 mm), 用于单个神经元记录和药物喷射。电信号采集电极内充以 0.5 mol/L 醋酸钠和 2% 溴胺天蓝, 其余 3 管电极与一个三通压力注射器相连 (PM2000B; 美国), 分别充以 0.5 nmol PYY (American Peptide Company, INC), 1 nmol Y2 受体拮抗剂 (SF-11, Sigma) 以及生理盐水。

一旦微电极进入 ARC, 记录单个单元的细胞外动作电位。使用 MEZ8201 放大器 (Nihon Kohden, Tokyo, Japan) 放大记录的信号, 并通过示波器 (VC-II, Nihon Kohden, Tokyo, Japan) 显示。来自放大器的电信号输入到 SUMP-PC 生物电信号处理系统中, 所有数据都存储在计算机中用于后续分析。

在每个单一单元记录结束时, 通过离子电渗疗法 (10 μA, 20 分钟) 将溴胺天蓝从微电极注入记录部位。先后给予 250 mL

0.9%的生理盐水和 250 mL 4%的多聚甲醛灌注固定。然后将大鼠脑冷冻并切成 50 μm 。所有记录位点在光学显微镜下可视化。如果记录位点不在 ARC 中,则数据弃之不用。

1.6 大鼠 ARC 微量注射 PYY 对大鼠摄食及相关代谢参数的影响

大鼠禁食 18 小时,自由饮水。实验时,首先将大鼠(平均体重 = $205 \pm 3 \text{ g}$)置于记录用鼠笼内 1 小时使其适应环境。在核团给药之前记录大鼠的体重。将大鼠转移至综合实验室动物监测系统(CLAMS; Columbus Instruments, Ohio)笼中以适应环境。在监测代谢参数之前,根据制造商的指南校准 CLAMS 气体传感器和天平。将药物或生理盐水注射至大鼠 ARC,通过 CLAMS 系统检测药物对大鼠代谢的影响。CLAMS 系统中的单个笼子连接到开路热量计,用于测定大鼠食物摄入量及水摄入量,氧气消耗(VO_2), CO_2 产生(VCO_2)及热量产生(Heat)。使用与第一组大鼠体重匹配的第二组大鼠重复进行实验,获得相似的结果。

1.7 大鼠 ARC 微量注射 PYY 对胃运动的影响

大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 (100 mg/kg, Sigma 公司, 美国),腹部备皮。剑突下行腹部正中切口,切口长约 1 厘米,暴露胃部。在幽门向上 0.3 厘米处,沿胃环形肌方向将应力传感器缝贴于胃窦的浆膜外,传感器导线由皮下行至后颈部,经皮肤切口穿出体外(留置 2-3 厘米导线用于连接记录仪)并固定。逐层缝合腹壁肌肉和皮肤。术后每日腹腔注射青霉素 2 万单位,预防感染。3 天后大鼠恢复正常饮食且无任何疼痛或应激反应,即可实验。

大鼠禁食 18 小时,自由饮水。实验时,首先将大鼠置于记录用鼠笼内适应环境 1 小时。胃运动由应力感受器传至胃肠运动换能器,在此转变为电信号输入计算机,由 Powerlab 多道生物信号采集处理系统对胃肠运动数据进行处理。刺激前稳定记录大鼠胃运动 30~60 分钟。同一只大鼠两次记录至少间隔一天。

1.8 统计学分析

应用 SPSS 18.0 和 PPMS 1.5 软件分析数据,所有数据均以 ($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组间样本均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 ARC 中 PYY 受体表达

免疫荧光组织化学实验结果表明在 ARC 内观察到 Y2 受体的表达。

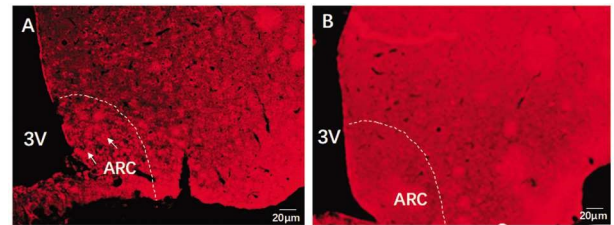


图 1 下丘脑 ARC 内 Y2 受体免疫阳性细胞的表达

A: ARC 内 Y2 受体免疫阳性细胞; B: 阴性对照

Fig1 Expression of Y2 receptor immunoreactive cells in hypothalamic ARC

A: Y2-IR neurons in ARC; B: Negative control group

2.2 PYY 影响下丘脑编码代谢激素的 mRNA 表达

与对照组的大鼠相比, PYY 组的大鼠的 CART 和 CRH 的 mRNA 表达在下丘脑中显著上调 ($P < 0.05$, 图 2A 和 2B), 而 NPY 和 HCRT 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$, 图 2C 和 2D)。此外, SF-11 组大鼠的 CART 和 CRH 的 mRNA 表达在下丘脑中显著下降 ($P < 0.05$, 图 2A 和 2B), 而 NPY 和 HCRT 的 mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$, 图 2C 和 2D)。预注射 SF-11 后 PYY 对 NPY 及 HCRT 的上调作用明显减弱 ($P < 0.05$, 图 2A, B, C, D)。以上结果说明 PYY 能够增加 CART 及 CRH 等抑食欲 mRNA 的表达, 降低 NPY 及 HCRT 等促食欲 mRNA 的表达, 且 ARC 中的 Y2 受体参与 PYY 对大鼠摄食的调控。

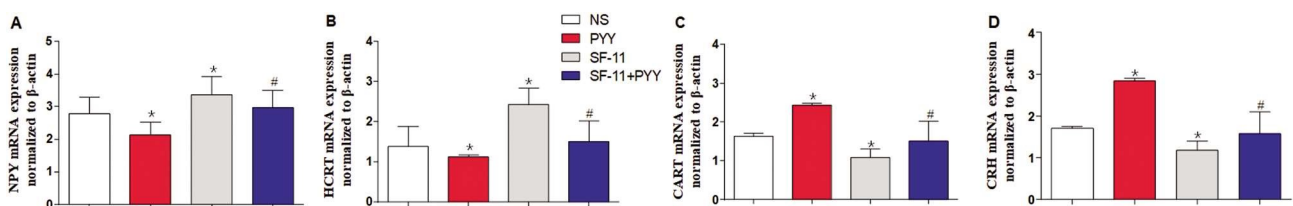


图 2 ARC 注射 0.5 nmol PYY 显著改变下丘脑中不同代谢激素表达

数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n = 6$ 只大鼠 / 组

Fig.2 ARC administration of 0.5 nmol PYY significantly regulated the mRNA expression of metabolic hormones in Hypothalamus.

All data are represented as mean $\pm$ SEM with $n = 6$ rats/group

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PYY 组相比

* $P < 0.05$, compared to NS group; # $P < 0.05$, compared to PYY group

2.3 ARC 微量注射 PYY 对 ARC 中神经元放电的影响

由于 PYY 可通过 ARC 中 Y2 受体免疫反应阳性神经元发挥作用, 因此我们通过向 ARC 微量注射 PYY, 观察 ARC 中神经元放电的改变。结果显示 ARC 微量注射 PYY 后, ARC 内 43 个 PYY 反应性神经元中有 21 个 (21/43, 48.84%) 放电频率显著增加 (PYY-E, $4.51 \pm 1.43 \text{ Hz}$ vs. $8.59 \pm 1.34 \text{ Hz}$, $P < 0.001$, 图 3), 平均增加 $90.47 \pm 12.33\%$; 16 个 (16/43, 37.21%) PYY 反应

性神经元抑制 (PYY-I), 6 个 (6/43, 13.95%) 无明显变化。ARC 内预先注射 SF-11, PYY 对 PYY-E 神经元的兴奋作用大部分被抑制。ARC 单独注射生理盐水或 SF-11 对 PYY 反应性神经元的放电活动无明显影响 ($P > 0.05$, 图 3)。

2.4 ARC 注射 PYY 对大鼠食物及水摄入量的影响

为了探究 PYY 是否能够调控大鼠食物及水的摄入量, 本实验通过向大鼠下丘脑 ARC 微量注射 NS, 0.5 nmol PYY 或 1

nmol SF-11, 观察大鼠 1-4 h 的食物及水摄入量。结果显示, PYY 注射组大鼠摄食量显著减少, 且从第 2 h 开始明显减少 ($P<0.05$, 图 4A); 而 SF-11 组大鼠摄食量显著增多 ($P<0.05$, 图 4A)。但水摄入量无明显改变 ($P>0.05$, 图 4B)。

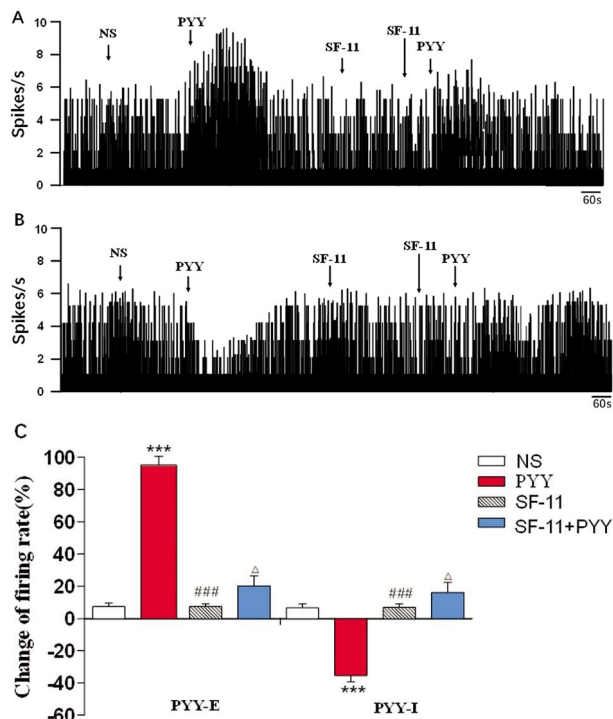


图 3 ARC 注射 PYY 对大鼠 ARC PYY 反应性神经元放电频率的影响
数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=6$ 只大鼠 / 组

Fig.3 Effect of ARC injection of PYY on the discharge frequency of ARC PYY-responsive neurons in rats

Data are expressed as mean $\pm$ SEM, $n=6$ rats/group

*** $P<0.001$ 与对照组相比, ### $P<0.001$ 与 PYY 组相比, $^{\Delta}P<0.05$ 与 SF-11+PYY 组相比

*** $P<0.001$, compared with vehicle group, ### $P<0.001$, compared with PYY group, $^{\Delta}P<0.05$, compared with SF-11+PYY group

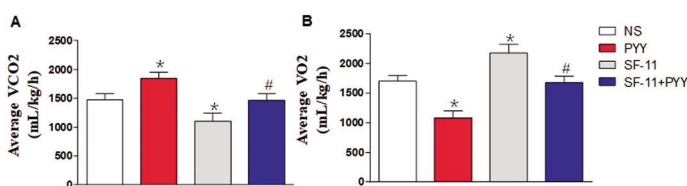


图 5 ARC 注射 PYY 对大鼠呼吸及能量代谢的影响

A: ARC 注射 PYY 对大鼠 VCO_2 的影响; B: ARC 注射 PYY 对大鼠 VO_2 的影响; C: ARC 注射 PYY 对大鼠体重的影响; D: ARC 注射 PYY 对大鼠热量的影响。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=6$ 只大鼠 / 组

Fig.5 Effect of APN injection of PYY on respiration and energy metabolism in rats

A: The effect of APN injection of PYY on VCO_2 in rats; B: The effect of APN injection of PYY on VO_2 in rats; C: The effect of APN injection of PYY on body weight of rats; D: The effect of APN injection of PYY on heat of rats. Data are represented as mean $\pm$ SEM with $n=6$ rats/group

* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与 PYY 组相比

* $P<0.05$, compared to NS group; # $P<0.05$, compared to PYY group

3 讨论

肽 YY(PYY) 是脑肠肽中的一种, 被认为是饱腹感的重要介质, 可能在肥胖的病因学中发挥重要作用^[3]。既往大量研究对

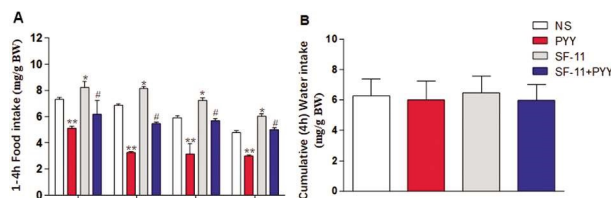


图 4 ARC 注射 PYY 对大鼠食物及水摄入量的影响

A: 大鼠 1-4 h 摄食量; B: 大鼠 1-4 h 水摄入量。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=6$ 只大鼠 / 组

Fig.4 Effect of ARC injection of PYY on food and water intake in rats

A: 1-4h food intake in rats; B: 1-4 h water intake in rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, $n=10$ rats/group

* $P<0.05$, ** $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与 PYY 组相比

* $P<0.05$, ** $P<0.05$, compared to NS group; # $P<0.05$, compared to PYY group

2.5 ARC 注射 PYY 对大鼠呼吸及能量代谢的影响

为了探究 PYY 对大鼠呼吸及能量代谢的影响, 本实验部分通过大鼠脑置管向 ARC 微量注射 NS, 0.5 nmol PYY 或 1 nmol SF-11, 观察大鼠 VCO_2 、 VO_2 、体重和热量的改变。结果显示, 与 NS 组相比, 大鼠 ARC 微量注射 PYY 后, 大鼠 VCO_2 升高 ($P<0.05$, 图 5A), VO_2 含量显著降低 ($P<0.05$, 图 5B); 同样, 与 NS 组相比, PYY 组大鼠体重显著下降 ($P<0.05$, 图 5C), 其热量产生显著减少 ($P<0.05$, 图 5D); 而预注射 Y_2 受体拮抗剂 SF-11 显著减弱了 PYY 对大鼠呼吸及热量的改变 ($P<0.05$, 图 5A, B, C 和 D)。

2.6 下丘脑 ARC 微量注射 PYY 对胃运动的影响

实验结果表明, ARC 内直接注射生理盐水, 大鼠胃收缩的幅度和频率无明显改变 ($P>0.05$, 图 6A); 与对照组相比 ($n=8$), 大鼠 ARC 微量注射 PYY 能够显著抑制大鼠胃收缩的幅度和频率 ($P<0.05$, 图 6B, C); 大鼠 ARC 中预注射 SF-11, PYY 对胃运动的抑制作用大部分可被阻断 ($P<0.05$, 图 6A, B 和 C)。

PYY 片段在大鼠能量代谢等方面的功能进行了探究, 这对于探究 PYY 与肥胖及能量代谢之间的关系具有重要意义^[7]。本研究通过直接向大鼠下丘脑 ARC 中注射 PYY, 进一步验证了 PYY 在大鼠摄食、胃运动及能量代谢方面的重要作用。

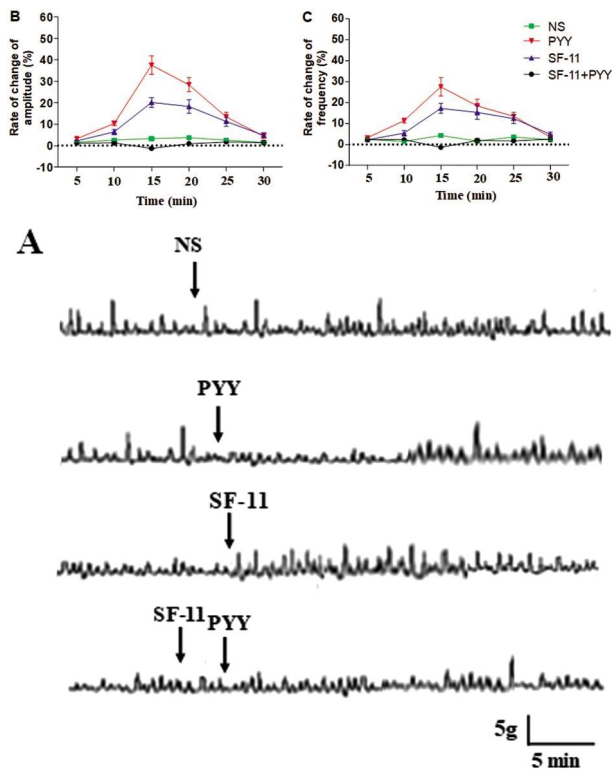


图6 正常大鼠 ARC 注射不同药物对胃运动的影响

A: ARC 微量注射不同药物, 对大鼠胃运动的影响; B: ARC 微量注射不同药物, 对大鼠胃运动幅度变化的影响; C: ARC 微量注射不同药物, 对大鼠胃运动频率变化的影响。数据表示为平均值 $\pm$ SEM, $n=8$ 只大鼠/组

Fig.6 Effect of different drugs on gastric motility in normal rats with ARC injection

A: ARC microinjection of different drugs, the effect on gastric motility in rats; B: ARC microinjection of different drugs, the effect on the amplitude of gastric motility in rats; C: ARC microinjection of different drugs, the effect on the gastric motility frequency of rats. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, $n=8$ rats/group

PYY 属于神经肽 Y(NPY)家族, 包括 NPY 和胰多肽(PP)^[2]。NPY 家族可通过多种受体发挥作用, 包括 Y1, Y2, Y4 及 Y5 受体等^[26-28], 本研究主要探究 PYY 是否通过 Y2 受体发挥与代谢相关的一系列作用。首先, 我们发现大鼠 ARC 中存在 Y2 受体, 且通过省略一抗作为阴性对照, 这为后续实验奠定了解剖学基础。为了探究 PYY 对大鼠 ARC 中 PYY 反应性神经元的影响, 以进一步解释是否中枢神经系统参与下丘脑 PYY 对大鼠摄食和能量代谢的调节。本实验通过向大鼠 ARC 微量注射 PYY, 观察 ARC 中 PYY 反应性神经元的影响, 结果显示 PYY 能够增加大部分 ARC 中的 PYY 反应性神经元的放电频率, 且 ARC 内预先注射 Y2 受体拮抗剂 SF-11, PYY 对 PYY-E 神经元的兴奋作用几乎完全消失。这说明 PYY 可能通过改变 ARC 中的 PYY 反应性神经元的放电活动影响一系列代谢过程。

为了进一步探究外源性 PYY 给药是否对摄食相关代谢激素 mRNA 的表达有影响。本实验观察了 PYY 注射至 ARC 后, 对抑食肽 CART 及 CRH 和促食肽 NPY 及 HCRT mRNA 表达的影响。在 PYY 注射后, CART 及 CRH 等抑食肽 mRNA 的表达增加, 而 NPY 及 HCRT 等促食肽 mRNA 的表达下降, 这表明 PYY 对大鼠摄食及能量代谢的作用极有可能是与其它抑食

肽或促食肽之间相互拮抗或协同从而发挥作用, 具体的潜在机制需要进一步的探究。

为了探究 PYY 对大鼠食物及水的摄入量的影响, 本实验通过大鼠脑置管向大鼠下丘脑 ARC 中直接微量注射 PYY, 观察大鼠食物及水摄入量的改变。结果显示 ARC 微量注射 PYY 后 4 h 内, 大鼠摄食量呈持续性下降, 且在第 2 h 开始下降明显, 但是大鼠水摄入量未发生明显改变。下丘脑 ARC 可参加调控机体多种生理过程, 是大脑中十分重要的脑区^[29-31], 尤其是在调控摄食及能量代谢功能中占有重要地位^[32-34]。既往研究大多通过腹腔给药或鼻内给药探究 PYY 对大鼠摄食及代谢的改变^[35], 而本实验通过向大鼠 ARC 直接注射 PYY 观察其对大鼠的影响, 这说明脑肠之间存在广泛且重要的信号传递, 这可能对将来靶向药物的研发具有重要的意义。为了进一步说明 PYY 对大鼠摄食方面的影响, 本实验还探究了 PYY 对大鼠胃运动的影响。结果显示大鼠 ARC 微量注射 PYY 能够显著抑制大鼠胃收缩的幅度和频率, 并且大鼠 ARC 中预注射 SF-11, PYY 对胃运动的抑制作用大部分可被阻断, 表明 PYY 抑制大鼠摄食也可能通过抑制大鼠胃运动进行调节, 且这一过程同样依赖于 ARC 中的 Y2 受体。

总之, 本研究为深入理解 PYY 对大鼠摄食、胃运动和能量代谢调节的机制提供了重要的基础依据, 但需要进一步的研究以探究 PYY 如何与其它摄食相关神经肽协同或抑制作用来共同参与调节大鼠食物摄入, 以维持体重和能量平衡。因此, 当前的研究对于肥胖症及暴食症的治疗及临床药物的研发具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Sureshchandra S, Marshall NE, Wilson RM. Inflammatory Determinants of Pregravid Obesity in Placenta and Peripheral Blood[J]. Front Physiol, 2018, 9(2): 1089
- [2] Mills JG, Thomas SJ, Larkin TA, et al. Problematic eating behaviours, changes in appetite, and weight gain in Major Depressive Disorder: The role of leptin[J]. J Affect Disord, 2018, 240(9): 137-145
- [3] Sainsbury A, Baldock P.A., Schwarzer C, et al. Synergistic effects of Y2 and Y4 receptors on adiposity and bone mass revealed in double knockout mice[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(15): 5225-5233
- [4] Shabana, Shahid SU, Hasnain S. Use of a gene score of multiple low-modest effect size variants can predict the risk of obesity better than the individual SNPs[J]. Lipids Health Dis, 2018, 17(1): 155
- [5] Lin H.C, Zhao X.T, Wang L. Fat-induced ileal brake in the dog depends on peptide YY[J]. Gastroenterology, 1996, 110(5): 1491-1495
- [6] Shao J, Chen MJ, Kuehl PJ, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of gut hormone peptide YY (3-36) after pulmonary delivery[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2019, 45(7): 1101-1110
- [7] Roth C.L, Enriori P.J, Harz K. Peptide YY is a regulator of energy homeostasis in obese children before and after weight loss [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(12): 6386-6391
- [8] Petersson U, Somogyi E, Reinholt FP, et al. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation[J]. Bone, 2004, 34(6): 949-960
- [9] Mahany EB, Han X, Borges BC. Obesity and High-Fat Diet Induce Distinct Changes in Placental Gene Expression and Pregnancy Out-

- come[J]. *Endocrinology*, 2018, 159(4): 1718-1733
- [10] Kleinridders A, Pothos EN. Impact of Brain Insulin Signaling on Dopamine Function, Food Intake, Reward, and Emotional Behavior [J]. *Curr Nutr Rep*, 2019, 8(2): 83-91
- [11] Unniappan S, McIntosh CH, Demuth HU, et al. Effects of dipeptidyl peptidase IV on the satiety actions of peptide YY [J]. *Diabetologia*, 2006, 49(8): 1915-1923
- [12] Unniappan S, Kieffer TJ. Leptin extends the anorectic effects of chronic PYY (3-36) administration in ad libitum-fed rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 295(1): R51-58
- [13] Sloth B, Holst JJ, Flint A, et al. Effects of PYY1-36 and PYY3-36 on appetite, energy intake, energy expenditure, glucose and fat metabolism in obese and lean subjects [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(4): E1062-1068
- [14] Stergaard S, Kofoed J, Paulsson JF, et al. Design of Y2 Receptor Selective and Proteolytically Stable PYY3-36 Analogues [J]. *J Med Chem*, 2018, 61(23): 10519-10530
- [15] Witte AB, Grybäck P, Holst JJ, et al. Differential effect of PYY1-36 and PYY3-36 on gastric emptying in man [J]. *Regul Pept*, 2009, 158(1-3): 57-62
- [16] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [17] Stanley S, Wynne K, McGowan B, et al. Hormonal regulation of food intake[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(4): 1131-1158
- [18] Blundell JE, Gibbons C, Caudwell P, et al. Appetite control and energy balance: impact of exercise[J]. *Obes Rev*, 2015, 16(1): 67-76
- [19] Holliday A, Blannin A. Appetite, food intake and gut hormone responses to intense aerobic exercise of different duration [J]. *J Endocrinol*, 2017, 235(3): 193-205
- [20] Reidelberger R, Haver A, Anders K, et al. Role of capsaicin-sensitive peripheral sensory neurons in anorexic responses to intravenous infusions of cholecystokinin, peptide YY- (3-36), and glucagon-like peptide-1 in rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307(8): E619-629
- [21] Rangwala SM, D'Aquino K, Zhang YM, et al. A Long-Acting PYY3-36 Analog Mediates Robust Anorectic Efficacy with Minimal Emesis in Nonhuman Primates[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(4): 837-843
- [22] Franco-Sena AB, de Oliveira LC, de Jesus Pereira Pinto T. Factors associated with prospective leptin concentrations throughout pregnancy in pregestational normal weight, overweight and obese women[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, 82(1): 127-135
- [23] Kassis A, Godin JP, Moille SE, et al. Effects of protein quantity and type on diet induced thermogenesis in overweight adults: A randomized controlled trial[J]. *Clin Nutr*, 2019, 38(4): 1570-1580
- [24] Pellonperä O, Koivuniemi E, Vahlberg T, et al. Dietary quality influences body composition in overweight and obese pregnant women[J]. *Clin Nutr*, 2019, 38(4): 1613-1619
- [25] Haghiac M, Basu S, Presley L, et al. Patterns of adiponectin expression in term pregnancy: impact of obesity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99(9): 3427-3434
- [26] Zhang L, Lee NJ, Nguyen, et al. Additive actions of the cannabinoid and neuropeptide Y systems on adiposity and lipid oxidation [J]. *Diabetes Obes. Metab*, 2010, 12(7): 591-603
- [27] Cheng HL, Sainsbury A, Garden F, et al. Ghrelin and Peptide YY Change During Puberty: Relationships With Adolescent Growth, Development, and Obesity [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(8): 2851-2860
- [28] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene [J]. *Science*, 1995, 269(5223): 543-546
- [29] Rahat-Rozenbloom S, Fernandes J, Cheng J, et al. Acute increases in serum colonic short-chain fatty acids elicited by inulin do not increase GLP-1 or PYY responses but may reduce ghrelin in lean and overweight humans[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2017, 71(8): 953-958
- [30] Dardzińska JA, Kaska Ł, Wiśniewski P, et al. Fasting and post-prandial peptide YY levels in obese patients before and after mini versus Roux-en-Y gastric bypass[J]. *Minerva Chir*, 2017, 72(1): 24-30
- [31] Burcelin R. When gut fermentation controls satiety: A PYY story[J]. *Mol Metab*, 2016, 21: 6(1): 10-11
- [32] Berg AH, Combs TP, Du X, et al. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action [J]. *Nat Med*, 2001, 7(8): 947-953
- [33] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(4): 2005-2010
- [34] Kang SJ, Kim JH, Gang Z, et al. Effects of 12-week circuit exercise program on obesity index, appetite regulating hormones, and insulin resistance in middle-aged obese females[J]. *J Phys Ther Sci*, 2018, 30(1): 169-173
- [35] Lowell BB, V SS, Hamann A, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue [J]. *Nature*, 1993, 366(6457): 740-742

(上接第 4016 页)

- [26] Havelund J F, Heegaard N, Faergeman N, et al. Biomarker Research in Parkinson's Disease Using Metabolite Profiling [J]. *Metabolites*, 2017, 7(3): E42
- [27] G. Nagesh Babua M G V K, Royb R. Serum metabolomics study in a group of Parkinson's disease patients from northern India [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2018, 480: 214-219
- [28] Zhao H, Wang C, Zhao N, et al. Potential biomarkers of Parkinson's disease revealed by plasma metabolic profiling [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1081-1082: 101-108
- [29] Okuzumi A, Hatano T, Ueno S I, et al. Metabolomics-based identification of metabolic alterations in PARK2 [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2019, 6(3): 525-536
- [30] Willkommen D, Lucio M, Moritz F, et al. Metabolomic investigations in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease [J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e208752