

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.009

侧脑室微量注射大麻素受体拮抗剂对 orexin-A 诱导大鼠能量代谢改变的影响及潜在机制研究*

刘金政^{1,2} 王 茜¹ 冷 慧¹ 高胜利¹ 郭菲菲¹ 孙向荣¹ 徐 璐^{1Δ}

(1 青岛大学基础医学院 山东 青岛 266021; 2 临沂市沂南县人民医院 山东 临沂 276300)

摘要 目的:探讨大麻素 1 型受体(CB1)抑制剂利莫那班对下丘脑外侧区(LHA)微量注射 orexin-A 诱导的小鼠能量代谢及相关行为变化改变的影响。**方法:**通过侧脑室微量注射(icv)利莫那班,同时 LHA 微量注射 orexin-A,测量小鼠能量代谢、自主运动的变化,杏仁核(CeA)内多巴胺释放能力以及小鼠摄食量的变化。**结果:**侧脑室微量注射利莫那班可减弱因 LHA 微量注射 orexin-A 引起的小鼠能量代谢变化,降低小鼠自主运动,并且减弱小鼠 CeA 内多巴胺释放能力。注射(icv)利莫那班未改变 LHA 微量注射 orexin-A 所诱导的摄食量增多。此外,LHA 双侧注射利莫那班可阻断 LHA 内注射 orexin-A 对运动活性的促进作用,但不影响小鼠的摄食量。**结论:**大麻素受体涉及 orexin-A 诱导的小鼠中脑边缘系统多巴胺系统活化的调控,对能量代谢及自主运动也有影响,但对食物摄入的调节无明显影响。

关键词:orexin-A;大麻素受体 1 型;内源性大麻素;中脑边缘多巴胺系统;摄食量

中图分类号:R-33;R338.24 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)02-248-07

Effect of Intracerebroventricular Microinjection of Ephedrine Receptor Antagonist on Energy Metabolism Induced by Orexin-A in Rats and Its Potential Mechanism*

LIU Jin-zheng^{1,2}, WANG Qian¹, LENG Hui¹, GAO Sheng-li¹, GUO Fei-fei¹, SUN Xiang-rong¹, XU Luo^{1Δ}

(1 School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266021, China;

2 Linyi Yinan County People's Hospital, Linyi, Shandong, 276300, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of the cannabinoid type 1 receptor (CB1) inhibitor rimonabant on the energy metabolism and related behavioral changes induced by microinjection of orexin-A into the lateral hypothalamic area (LHA). **Methods:** Microinjection of rimonabant into the lateral ventricle (icv) and microinjection of orexin-A into LHA were used to measure changes in energy metabolism, autonomous movement, dopamine release in the amygdala (CeA), and changes in food intake in mice. **Results:** The results showed that microinjection of rimonabant into lateral ventricle could attenuate the changes of energy metabolism induced by microinjection of orexin-A into LHA, decrease the spontaneous movement of mice, and weaken the ability of dopamine release in CeA of mice. Rimonabant injection of (icv) did not change the increase of food intake induced by microinjection of orexin-A into LHA. In addition, it was found that bilateral injection of rimonabant into LHA could block the promoting effect of orexin-A injection into LHA on exercise activity, but did not affect the food intake of mice. **Conclusions:** Cannabinoid receptors are involved in orexin-A-induced regulation of dopaminergic system activation in the midbrain system of mice, and have an effect on energy metabolism and autonomic movement, but have no significant effect on food intake regulation.

Key words: Orexin-A; Endogenous cannabinoid; Cannabinoid receptor type 1; Midbrain marginal dopamine system; Food intake

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R338.24 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)02-248-07

前言

能量稳态的调节涉及多种信号系统之间复杂的相互作用^[1]。Orexins 可通过调控下丘脑内多个核团之间的通路增加摄食^[2,3],并与摄食启动^[4,5]和饥饿程度相关^[6]。

Orexins 涉及奖励、记忆和情绪的调控^[7]。脑室内(icv)或外

周(ip)注射 orexins 均可激活中脑边缘多巴胺系统,并增加杏仁核(CeA)多巴胺的释放,并增强其转化等情况^[8,9]。静脉注射 orexin-A 可增加多个脑区对食物的神经反应,且均涉及能量代谢^[10]。

中脑边缘多巴胺通路可介导奖励机制,该通路从下丘脑外侧区(LHA)投射到多个脑区^[11],涉及内源性阿片肽^[12]。前期发现

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470815; 81270460; 81500414)

作者简介:刘金政(1986-),硕士研究生,主要研究方向:神经内分泌,电话:0532-82991713, E-mail: ljz20170319@126.com

Δ 通讯作者:徐璐, E-mail: xu.luo@163.com

(收稿日期:2019-05-27 接受日期:2019-06-23)

LHA 内注射 orexins 可激活多巴胺能神经^[13]并增强奖赏机制^[14]。LHA 中的多巴胺能神经元可表达 orexins 受体(OX-1R)^[15],该过程涉及 LHA 中的 μ 阿片受体^[14]。内源性大麻素对 LHA 多巴胺神经元也具有调节作用^[15],且 orexins 的促食欲特性受大麻素信号调节,如大麻素 1 型(CB1)受体敲除小鼠注射 orexins 后摄食量不增加;注射 CB1 受体拮抗剂可消除由 orexins 的食欲信号传导和促食欲特性^[16]。

因此假设 LHA 内 CB1 受体可调节 orexin 激活中脑边缘多巴胺系统的能力。本研究目的为探究 CB1 拮抗剂利莫那班对 LHA 内微量注射 orexin-A 引起的能量代谢变化、自主运动改变,及 CeA 多巴胺释放能力的影响。并探究 LHA 内 CB1 受体是否调节 orexin-A 诱导的运动刺激以及摄食行为的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 NMRI 小鼠(8-12 周龄;体重 25-40 g),均在室温(20-22 °C)、昼夜循环光照(07:00 至 19:00)的环境下饲养,给予标准实验室饮食,自由进食和饮水。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。每次实验选用一组独立的小鼠,并使其在实验开始前至少适应一周。

1.2 实验药物

将 orexin-A (Sigma-Aldrich Chemical, MO, USA) 稀释于 Ringer 溶液 (NaCl 140 mM, CaCl₂ 1.2 mM, KCl 3.0 mM, MgCl₂ 1.0 mM)中稀释,用于脑室内注射(icv,侧脑室)及 LHA 注射。orexin 的实验剂量参考之前实验中可增加小鼠运动活性,并增加 CeA 内多巴胺释放及小鼠摄入量的剂量^[13,17]。CB1 受体拮抗剂(利莫那班)溶解稀释于 75% DMSO + 25% Ringer 溶解,并用于脑室注射。选用 1 mg/kg(ip)的剂量是因为第一次预实验中剂量反应最高,且对运动活动基线没有影响。剂量设定为 1 μ g/0.5 μ L。相应的对照组选用各自的稀释溶剂。

1.3 侧脑室置管

用硫代巴比妥醇(0.1 g/kg, ip, Sigma-Aldrich Chemical, MO, USA)麻醉小鼠,置于脑立体定位仪(Narashige SN-3, Tokyo, Japan)。暴露小鼠颅骨,根据 Paxinos & Franklin 小鼠脑图谱^[18],以前囟为零点,定位侧脑室(前囟后 0.3 mm;旁开:1.0 mm;颅骨下:2.5 mm,)及 LHA(前囟后:0.9 mm;旁开:1.1 mm;颅骨下:5.0 mm)。根据先前文章描述的方法向侧脑室及 LHA 内植入一个不锈钢套管。术后为小鼠注射抗生素并单笼饲养。小鼠至少恢复 7 天后方可进行后续实验。

1.4 药物注射

首先明确利莫那班对实验结果没有影响的侧脑室注射最高剂量。注射(icv)相应溶剂或利莫那班(1、2、4 μ g/ μ L, icv)并记录小鼠的自主运动活性、多巴胺释放以及摄食量。探究利莫那班(2 μ g/0.5 μ L, icv)对 orexin-A(1 μ g/0.5 μ L, LHA)诱导的小鼠自主运动刺激、多巴胺释放及摄食量的影响。在 orexin-A 或溶剂注射前 30 分钟先注射利莫那班或溶剂。

探究小鼠双侧 LHA 微量注射利莫那班(1、2、4 μ g/ μ L, icv)或相同体积的溶剂,以探究对小鼠能量代谢、自主运动刺激、多巴胺释放及摄食量的影响。在实验设计方案中,每只小鼠以 2 $\times$ 2 因子方式(溶质/溶剂,溶质/orexin-A,利莫那班/

溶质或利莫那班/orexin-A)接受一种注射组合,并且仅进行一次实验。

1.5 测定小鼠能量代谢

使用开放式呼吸测热装置(sable system, USA)测定小鼠基础代谢率(basalm etabolic rate, BMR)和静息代谢率(restingm etabolic rate, RMR)的变化,设定温度为 30 $\pm$ 0.5 °C,空气流量为 2000 mL/min。测定前小鼠禁食 12 h,放入呼吸室内适应 1 h,待小鼠活动稳定后开始记录其呼吸及代谢情况,每隔 5 min 记录 1 次,连续测定 60 min,选取 2 个连续稳定的最低值计算 BMR,1 h 测定周期内代谢率的平均值为 RMR,所有的测试工作都在 9:00 ~ 18:00 之间完成,BMR 和 RMR 经标准温度及压力校正后表示为 mL O₂/g $\times$ h。

1.6 测定小鼠自主运动

采用六个静音、通风且具照明装置的运动箱来记录此小鼠的自主运动(开放场活动系统; USA; 420 $\times$ 420 $\times$ 200 mm)。该系统底部设有 15 $\times$ 15 红外光束,通过计算机系统可记录每只小鼠在 60 分钟内行进的距离(cm/5 分钟)。在注射药物前 1 h,先将小鼠置于运动活动盒中使之习惯。在 orexin-A 或溶剂微量注射后 10 分钟开始小鼠自主运动活动记录。

1.7 测量小鼠体内的多巴胺释放情况

采用两个高效液相色谱装置,从而在有效时间内分离和定量小鼠特定脑部的多巴胺含量^[20]。两种装置均以相同的精度测量多巴胺释放量,并且样品分析随机分配于任一装置中。第一个高效液相色谱装置包括泵(UltiMate 3000 Pump, Thermo Scientific, Darmstadt, Germany),离子交换柱(Nucleosil SA, 2.0 $\times$ 150 mm, 直径 5 μ m, 孔径 100 Å; Phenomenex Scandinavia, VästraFrölunda, Sweden)和检测器(Decade, Kovalent AB, Sweden)。流动相由 58 mM 柠檬酸, 135 mM NaOH, 0.107 mM Na₂-EDTA 和 20% 甲醇组成,并以 0.3 mL/min 的速度递送。第二个高效液相色谱装置包括泵(UltiMate 3000 Pump; Thermo Scientific, Darmstadt, Germany),反相柱(2.0 $\times$ 50 mm, 直径 3 μ m; 孔径 100 Å; Phenomenex Scandinavia, VästraFrölunda, Sweden)和检测器(Dionex, VästraFrölunda, Sweden)。流动相以 0.3 mL/min 的速度递送,由 150 mM NaH₂PO₄, 4.76 mM 柠檬酸, 3 mM 十二烷基硫酸钠, 50 μ M EDTA, 10% MeOH 和 15% 乙腈组成。

为了测量细胞外多巴胺水平,于小鼠 CeA 中植入微透析探针。探针以平衡方式随机交替置于大脑左侧或右侧。用硫代巴比妥醇(0.1 g/kg, ip, Sigma-Aldrich Chemical, MO, USA)麻醉小鼠,置于脑立体定位仪(Narashige SN-3, Tokyo, Japan)。暴露小鼠颅骨,根据 Paxinos & Franklin 小鼠脑图谱^[18],以前囟为零点,定位 CeA(前囟后 0.8 mm;旁开:2.0 mm;颅骨下:4.8 mm)。除探针外,在第三脑室植入引导套管,以注射 orexin-A 或溶剂,其坐标如前所述。将探针连接到微灌注泵(U-864 Syringe Pump; Agn Tho's AB)并以 1.5 μ L/min 的速率用 Ringer 溶液灌注。收集瓶中的流体体积由自动注射器测量,进而检测流量下降情况。

使小鼠先适应微透析装置 1 小时,然后在整个实验设置中以 20 分钟的间隔收集灌注样品。多巴胺水平基线定义为时间点 -40 分钟和 -20 分钟获得的两个连续样品的平均值。在 -20 分钟微量注射利莫那班(2 μ g/0.5 μ L, icv)或溶剂

(0.5 μ L, icv), 且在 10 分钟注射 orexin-A (1 μ g/0.5 μ L, icv) 或溶剂 (0.5 μ L, icv)。

1.8 测量普通食物和可口食物摄入量

小鼠优选的可口食物为花生酱, 小鼠标准饲料摄入量为食物消耗指标^[6]。在测试前一周提前使小鼠熟悉花生酱味道。实验当天, 让小鼠提前 1 小时适应新的空笼子, 然后进行药物注射。将食物和花生酱放入空的塑料杯中, 在开始实验之前称重。在最后一次注射后 10 分钟放置装有标准饲料和花生酱的杯子, 记录 4 小时内小鼠摄食量。

1.9 组织学检查

每次实验后, 探针 (位于 CeA) 和 / 或套管 (位于第三脑室或双侧 LHA) 的位置根据脑图谱进行验证^[18]。将小鼠断头并取脑。将脑切成 50 μ m 切片, 并通过使用光学显微镜观察确定位置^[18]。正确放置探针和 / 或套管的小鼠计入统计分析中。排除注射位置错误的小鼠, 其实验结果不计入统计分析。本实验中无疾病致死小鼠。

1.10 统计学分析

采用 SPSS15.0 统计软件进行分析, 数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用单向或双向 ANOVA 分析实验数据, Tukey's 实验后检验以进行多重比较。通过重复测量双向 ANOVA, 并进行 Bonferroni 事后检验, 评估不同注射组之间和给定时间点之间的比较, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 利莫那班对小鼠 orexin-A 诱导的能量代谢的影响

与溶剂组相比, 侧脑室注射 2 μ g/0.5 μ L 或 4 μ g/0.5 μ L 利莫那班可显著降低小鼠基础代谢率 (BMR) 和静息代谢率 (RMR) ($P < 0.05$, 图 1), 提示小鼠能量代谢受侧脑室注射利莫那班的影响。

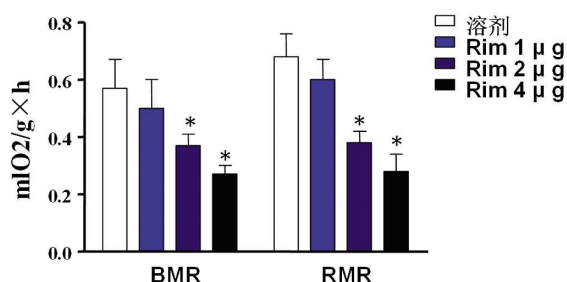


图 1 侧脑室注射利莫那班对小鼠能量的代谢的剂量反应研究。

* $P < 0.05$, 与溶剂组相比。

Fig. 1 Dose response study on the metabolism of energy in mice by rimonabant injected into the lateral ventricle. * $P < 0.05$ compared to the vehicle group.

如图 2 所示, 能量代谢受注射 orexin-A ($F_{1,28} = 20.06, P = 0.001$) 和组合注射利莫那班 - orexin-A ($F_{1,28} = 6.86, P = 0.0143$) 的影响, 但不受单独注射利莫那班 ($F_{1,28} = 1.91, P = 0.1771$) 的影响。预先单次侧脑室注射利莫那班可显著阻断 orexin-A 诱导的能量代谢增强 ($P < 0.05$), 其剂量与溶剂组相比对运动活性没有显著影响。溶剂组小鼠和利莫那班 - orexin-A 组小鼠的运动活动反应差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以上结果提示提示利莫那班可有效逆转小鼠 orexin-A 诱导的能量代谢增强。

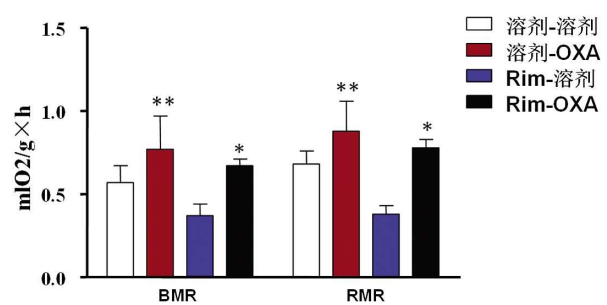


图 2 侧脑室注射利莫那班 (2 μ g/0.5 μ L, icv) 对小鼠 orexin-A (1 μ g, LHA) 诱导的基础代谢率 (BMR) 和静息代谢率 (RMR) 的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。溶剂 - 溶剂组与溶剂 - Orexin-A (OXA) 组相比。Fig.2 Effect of lateral ventricle injection of rimonabant (2 μ g/0.5 μ L, icv) on basal metabolic rate (BMR) and resting metabolic rate (RMR) induced by mouse orexin-A (1 μ g, LHA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Vehicle (Veh) - Veh is compared to Veh-Orexin (Ore).

2.2 利莫那班对小鼠 orexin-A 诱导的运动刺激和 CeA 内多巴胺释放的影响

如图 3 所示, 与溶剂组相比, 侧脑室注射 2 μ g/0.5 μ L 或 4 μ g/0.5 μ L 利莫那班可显著降低小鼠自主运动活距离。

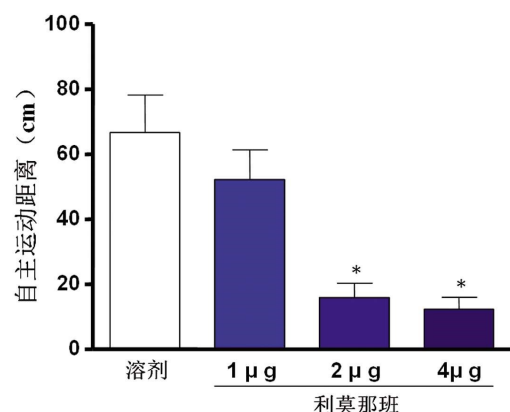


图 3 侧脑室注射利莫那班对小鼠运动活动的剂量反应研究

* $P < 0.05$, 与溶剂组相比。

Fig. 3 Dose response of lateral ventricle injection of rimonabant to exercise activity in mice. * $P < 0.05$ compared to the vehicle group

如图 4A 所示, 运动活性受组合注射 orexin-A ($F_{1,28} = 20.06, P = 0.0001$) 和利莫那班 - orexin-A ($F_{1,28} = 6.86, P = 0.0143$) 的影响, 但不受单独注射利莫那班 ($F_{1,28} = 1.91, P = 0.1771$) 的影响。预先单次侧脑室注射利莫那班可显著逆转 orexin-A 诱导的能量代谢增强 ($P < 0.05$), 其剂量与溶剂组相比对运动活性没有显著影响。溶剂组小鼠和利莫那班 - orexin-A 组小鼠的运动活动反应没有差异 ($P > 0.05$)。以上结果提示利莫那班可降低小鼠 orexin-A 诱导的运动刺激。

如图 4B 所示, CeA 内多巴胺释放受到注射处理因素的影响 ($F_{3,288} = 30.59, P < 0.001$), 注射处理因素与时间因素之间存在相互作用 ($F_{33,288} = 1.66, P = 0.0155$)。但单独的时间因素没有影响 ($F_{11,96} = 0.76, P = 0.6817$)。与溶剂组相比, orexin-A (1 μ g, LHA) 在 120-140 分钟 ($P < 0.01$)、160 分钟 ($P < 0.001$) 和 180 分钟 ($P < 0.05$) 可增加 CeA 内多巴胺的释放。预先注射利莫那班 (2 μ g, icv) 可显著减弱 orexin-A (1 μ g, icv) 诱导的 CeA 内多

巴胺的释放,时间间隔为 120-140 分钟($P < 0.001$)和 160-180 分钟($P < 0.01$)。在任何时间点,利莫那班 -orexin-A 和溶剂 - 溶剂组与任何时间间隔的溶剂组相比均没有差异 ($P > 0.05$),所

选利莫那班的剂量对 CeA 内多巴胺的释放没有显著影响 ($P > 0.05$)。以上结果提示利莫那班可降低小鼠 orexin-A 诱导的 CeA 内多巴胺的释放。

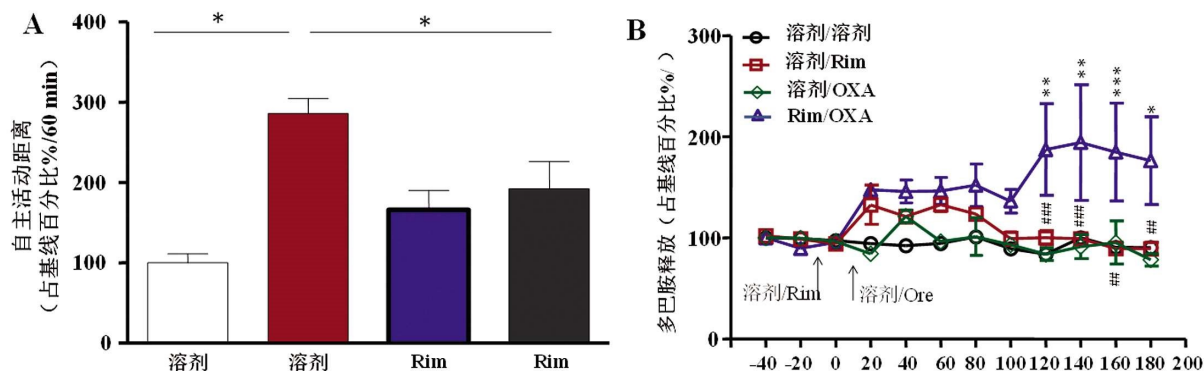


图4 侧脑室注射利莫那班(2 μg /0.5 μL , icv)对小鼠 orexin-A(1 μg , LHA)诱导的自主运动刺激(A)和 CeA 内多巴胺释放(B)的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 溶剂 - 溶剂组与溶剂 - Orexin-A(OXA)组相比; # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$, 溶剂 - OXA 组与利莫那班(Rim)-Ore 组相比。

Fig.4 The effect of intracerebroventricular injection of rimonabant (2 μg /0.5 μL , icv) on autonomic motor stimulation (A) induced by mouse orexin-A (1 μg , LHA) and dopamine release (B) in CeA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Vehicle(Veh)-Veh compared with Veh- Orexin(Ore); # $P < 0.01$, ## $P < 0.001$, Veh- Ore Compared with rimonabant (Rim)-Ore.

2.3 利莫那班对 orexin-A 诱导的小鼠摄食量增加的影响

如图 5A 所示,侧脑室注射利莫那班(2 μg , icv)且 LHA 注射 orexin-A(1 μg , icv)后,小鼠的普通食物摄食量受 orexin-A 影响($F_{1,41} = 24.97$, $P < 0.0001$; 1 μg , icv)。注射利莫那班($F_{1,41} = 0.51$, $P = 0.4788$)和注射利莫那班 - orexin-A 组合($F_{1,41} = 0.47$, P

$= 0.4993$)对小鼠普通食物摄入量没有影响。Orexin-A 诱导的摄食增加不受预先单次注射利莫那班的影响($P > 0.05$)。与溶剂组相比,实验中选择利莫那班剂量对食物摄入量没有显著影响($P > 0.05$)。与溶剂组小鼠相比,利莫那班 -orexin-A 组小鼠的食物摄入量显著升高($P < 0.05$)。

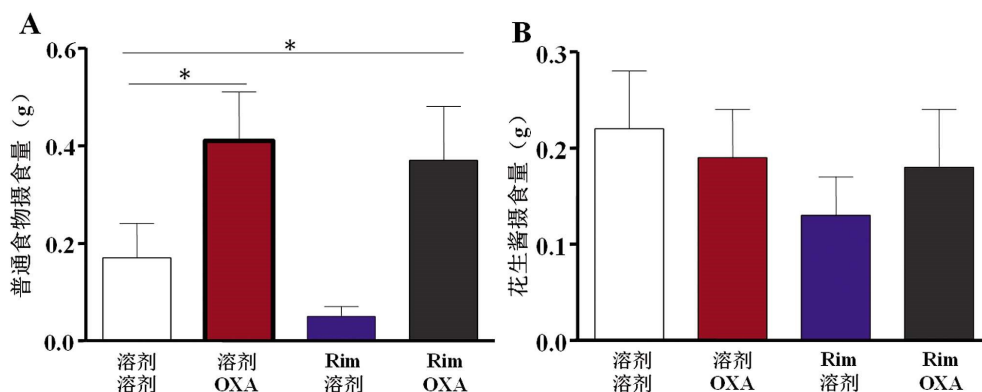


图5 外周注射利莫那班(2 μg , icv)对 orexin-A(1 μg , LHA)诱导小鼠普通食物(A)和可口食物(B)摄入量的影响。

* $P < 0.05$, 与溶剂 - 溶剂组相比。

Fig.5 Effect of peripheral injection of rimonabant (2 μg , icv) on the intake of normal food (A) and palatable food (B) induced by orexin-A (1 μg , LHA) in mice. * $P < 0.05$ compared to the Veh-Veh group.

如图 5B 所示,注射 orexin-A($F_{1,37} = 0.75$, $P = 0.3937$)、利莫那班($F_{1,37} = 0.86$, $P = 0.3597$)或组合注射利莫那班(2 μg , icv) -orexin-A(1 μg , LHA)($F_{1,37} = 3.53$, $P = 0.0682$)对小鼠花生酱摄入量没有影响。提示利莫那班对 orexin-A 诱导的小鼠可口食物摄入量增加无明显影响。

2.4 LHA 注射利莫那班对小鼠 orexin-A 诱导的运动刺激及摄食量的影响

如图 6 所示,与溶剂组相比,单侧注射 2 μg 或 1 μg 利莫那班的小鼠的运动活性相似。因此,选择 LHA 每侧 2 μg 的剂

量作为没有运动效果的最高剂量,并用于以下实验。

实验结果显示,小鼠 LHA 双侧注射利莫那班(每侧 2 μg)和 orexin-A(每侧 1 μg),小鼠运动活动受 orexin-A($F_{1,53} = 7.33$, $P = 0.0091$)的影响。且注射利莫那班($F_{1,53} = 4.85$, $P = 0.0321$),以及组合注射利莫那班 -orexin-A($F_{1,53} = 4.16$, $P = 0.0464$)也有影响。如图 7 所示,溶剂组小鼠和利莫那班 -orexin-A 组小鼠的运动活动反应没有差异($P > 0.05$)。以上结果提示 LHA 内注射利莫那班可降低小鼠 orexin-A 诱导的运动刺激。

如图 8A 所示,orexin-A 可显著增加小鼠普通食物摄入量

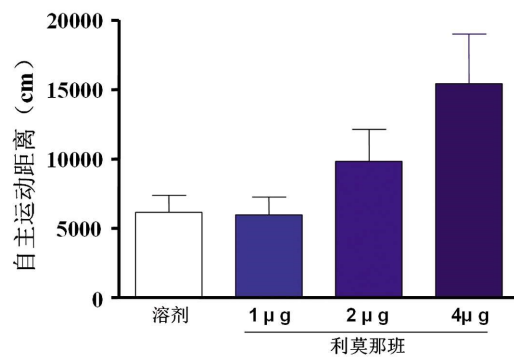


图 6 LHA 内注射利莫那班对小鼠运动活动的剂量反应研究

Fig.6 Dose response study of rimonabant in LHA on exercise activity in mice

($F_{1,25} = 8.32, P = 0.0079$), 但利莫那班对小鼠普通食物摄入量没有影响($F_{1,25} = 0.74, P = 0.3991$), 且利莫那班-orexin-A 组合注射对小鼠普通食物摄入量也没有影响($F_{1,25} = 0.33, P = 0.5725$)。如图 8B 所示, 注射利莫那班、orexin-A 或两者组合对小鼠的花生酱摄入量没有明显影响($P > 0.05$)。提示 LHA 内注射利莫那班对小鼠 orexin-A 诱导的普通食物摄入量增加没有明显影响, 且 LHA 内注射 orexin-A 和/(或)利莫那班对小鼠的可口食物摄入量没有明显影响。

3 讨论

本研究证实可通过测量运动刺激和 CeA 内多巴胺释放程度来衡量 orexin-A 激活中脑边缘多巴胺系统的能力, 且 LHA 内 CB1 受体参与其中。而小鼠外周或 LHA 内注射利莫那班不影响 orexin-A 诱导的普通食物摄入或可口食物摄入, 提示在饱食且没有动机的状态下, CB1 受体对 orexin-A 介导的小鼠行为具有不同的影响。

前期研究显示 orexin-A 和内源性大麻素信号在摄食^[16]、促进肽类释放^[19]以及 AMP 激活蛋白激酶活化^[16]等方面存在相互作用。这些信号系统共同调节中脑边缘多巴胺系统的激活, 且中脑边缘多巴胺系统的激活有赖于 LHA 内的依赖性物质, 例如阻断 orexin-A 诱导的运动刺激。内源性大麻素在中脑边缘多巴胺系统激活中具调节作用, 腹侧被盖 CB1 受体可调节可卡

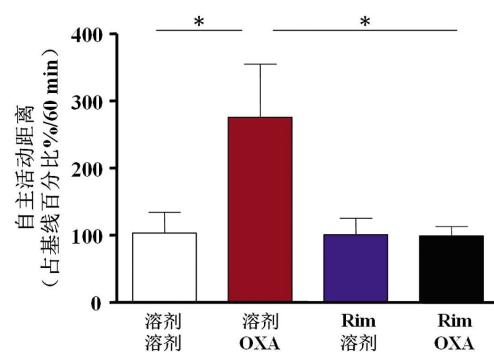


图 7 LHA 内注射利莫那班(Rim, 2 μg/侧)对小鼠 orexin-A (OXA, 1 μg/侧)诱导的运动刺激的影响。* $P < 0.05$, 溶剂-溶剂与溶剂-OXA 相比; 溶剂-OXA 与 Rim-OXA 相比

Fig.7 Effect of LHA injection of rimonabant (Rim, 2 μg/side) on motor stimulation induced by orexin-A (OXA, 1 μg/side). * $P < 0.05$, Veh-Veh compared to Veh-OXA; Veh-OXA compared to Rim-OXA

因诱导的奖赏机制^[20], 并且药理学抑制 LHA 中 CB1 受体可减少大鼠酒精摄入的偏好^[21]。此外, LHA 注射利莫那班可阻碍吗啡诱导的条件性位置偏好^[22]。中脑边缘多巴胺系统的激活可以充分反映奖励机制, 因为这是大脑中的主要奖励系统之一。但是奖励行为很复杂, 并且与许多其他神经通路协调处理。

CB1 信号调节 orexin-A 激活中脑边缘多巴胺系统的机制尚不清楚, 且有待进一步研究。目前已知: 1) CB1 受体激动剂可诱导 LHA 内多巴胺神经元活性增加, 并促进 NAc 内多巴胺释放^[23]; 2) LHA 中的突触前 CB1 受体调节 GABA 和谷氨酸在多巴胺神经元附近的释放^[24], 我们的研究结果显示 LHA 内 CB1 受体可调节 orexin-A 增加运动活性的能力, 提示利莫那班通过增强 CB1 依赖性 GABA 抑制, 从而减弱 orexin-A 激活中脑边缘多巴胺系统的能力。CB1 受体之所以能够调节 orexin-A 激活中脑边缘多巴胺系统的能力, 是由于 LHA 内两种受体的异二聚化。但研究数据表明, 内源性大麻素和 orexin-A 的促食欲特性需两种受体功能双向依赖^[16], 且两种受体可形成具有多种其他受体的异二聚体^[25]。orexin-A 和 CB1 受体在整个大脑中共定位并影响各种生理功能^[26]。因此, 其他脑区的 CB1 可能参与 orexin-A 诱导的中脑边缘多巴胺系统激活。下丘脑可能是潜在

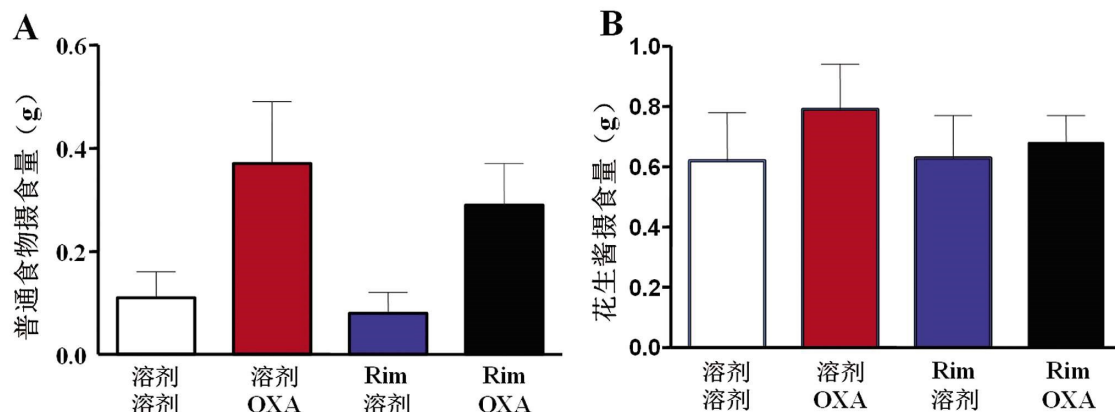


图 8 LHA 内注射利莫那班(Rim, 2 μg/侧)对小鼠 orexin-A (OXA, 1 μg/侧)诱导的普通食物(A)和可口食物摄取量的影响

Fig.8 Effect of LHA injection of rimonabant (Rim, 2 μg/side) on the induction of normal food (A) and palatable foods induced by mouse orexin-A (OXA, 1 μg/side).

的重要相互作用区域,至少在食物摄入调节方面参与调控。Orexin-A 可增加野生型小鼠下丘脑内源性大麻素的含量,但不会增加 CB1 基因敲除或利莫那班注射小鼠下丘脑内源性大麻素的含量^[16],利莫那班可减少丘脑 orexin-A 的促食欲特性^[27]。外周 CB1 受体拮抗可减弱 icv 注射 orexin-A 所引起的摄食量增加^[10],表明除腹侧被盖区内 orexin 和内源性大麻素系统之间的相互作用外,外周机制也可能影响 icv 注射 orexin-A 作用于中脑边缘系统多巴胺的能力。此外,现已证明 GHS-R1 的激活以及拮抗作用可改变伏隔核注射吗啡引起内源性大麻素水平改变^[28];因此,GHS-R1 在调节内源性大麻素水平中的作用不容忽视。

在本研究中,我们发现 LHA 中 CB1 受体拮抗剂不会削弱 icv 注射 orexin-A 所致摄食量增加的能力,提示 orexin-A 调节摄食的能力不涉及内源性大麻素回路。然而,目前的数据与以前的研究相矛盾,前期研究表明 orexin-A 的促食欲特性依赖于 CB1 受体^[16]。这种差异可能由于实验设置不同,以及所用动物的能量状态不同。在本研究中,动物是饱食状态并且没有进食动机,而且 orexin-A 增加的食物消耗受到其他信号系统的调节,包括神经肽 Y 受体 1 型和阿片受体^[29]。因此,还应该考虑除多巴胺之外的其他信号系统对 LHA-orexin-A 的食物奖励的调节。LHA 注入低剂量的 orexin-A 不会增加 NAc 的多巴胺峰值^[10]并且不会增加运动活性^[30]。

研究证实 icv 注射 orexin-A 给药不会增加小鼠的可口食物(花生酱)摄入量。这些数据与先前研究的一致,表明 orexin-A 对自由摄食的小鼠食物摄入量没有影响^[16]。第三脑室中央注射 orexin-A 可增加摄食,但提供可口食物,小鼠没有出现可能的奖励性摄食^[31]。本实验证明内源性大麻素系统在调节 orexin-A 介导不同行为方面的影响,即食物摄取和中脑边缘多巴胺系统的激活作用之间并不完全重叠。为了支持行为和神经通路之间存在差异,数据显示 orexin-A 可调节食物奖励、经食物诱发多巴胺峰值^[32]以及以依赖食欲素的方式促进摄食^[33],但似乎不参与 orexin-A 诱导的运动刺激^[14]。

与享乐机制相反,orexin-A 并不依赖多巴胺的热量效应,并且能够增加普通食物的摄入量^[34];然而侧脑室微量注射 orexin-A 对饱食小鼠的作用不包括摄入可口食物的享乐机制。有研究表明,LHA 中儿茶酚胺能神经元的选择性表达 GHSR 可恢复 orexin-A 诱导的高脂肪饮食条件性位置偏好^[35]。然而,该研究使用特殊动物并且 orexin-A 全身给药,这与本研究使用的实验范例不同,不能完全作为参考。此外,目前研究发现利莫那班不会改变饱食小鼠对食物或花生酱摄入量的摄入量基线。数据显示利莫那班对自主摄食小鼠的摄食量没有明显影响,但会减少禁食时小鼠的食物摄入量^[29]。高剂量利莫那班可能会导致食物摄入的不良反应。此外,实验中发现较高剂量的利莫那班可改变小鼠的运动行为,这可能是通过利莫那班的非选择性效应,从而导致食物摄入量存在差异。总之,这些数据表明,就食物摄入的影响而言,CB1 和 orexin-A 信号传导之间的相互作用取决于动物当前的能量状态。

人类和啮齿动物的研究结果共同表明 orexin-A 通路是成瘾行为的重要调节信号,因为 orexin-A 可激活中脑边缘多巴胺

系统,这是大脑中的主要奖励途径之一^[13]。目前的数据共同表明 orexin-A 可激活中脑边缘多巴胺系统而非食物摄入,这种效果取决于腹侧被盖区的 CB1 受体,提示小鼠 orexin-A 介导的奖励行为和摄食行为的机制之间并非完全重合。

参考文献(References)

- [1] E Egecioglu, KP Skibicka, C Hansson, et al. Hedonic and incentive signals for body weight control [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011, 12(4): 141-151
- [2] Santiago JCP, Otto M, Kern W, et al. Relationship between cerebrospinal fluid concentrations of orexin A/hypocretin-1 and body composition in humans[J]. *Peptides*, 2018, 102(8): 26-30
- [3] Messina A, Monda M, Valenzano A, et al. Functional Changes Induced by Orexin A and Adiponectin on the Sympathetic/Parasympathetic Balance[J]. *Front Physiol*, 2018, 22(9): 259
- [4] Sahafzadeh M, Karimi-Haghighi S, Mousavi Z, et al. Role of the orexin receptors within the nucleus accumbens in the drug priming-induced reinstatement of morphine seeking in the food deprived rats[J]. *Brain Res Bull*, 2018, 137(8): 217-224
- [5] Zink AN, Bunney PE, Holm AA, et al. Neuromodulation of orexin neurons reduces diet-induced adiposity [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2018, 42(4): 737-745
- [6] Mahler SV, Smith RJ, Moorman DE, et al. Multiple roles for orexin/hypocretin in addiction [J]. *Prog Brain Res*, 2012, 198 (4): 79-121
- [7] Luan X, Sun X, Guo F, et al. Lateral hypothalamic Orexin-A-ergic projections to the arcuate nucleus modulate gastric function in vivo [J]. *J Neurochem*, 2017, 143(6): 697-707
- [8] Qi K1, Wei C, Li Y, et al. Orexin receptors within the nucleus accumbens shell mediate the stress but not drug priming-induced reinstatement of morphine conditioned place preference [J]. *Front Behav Neurosci*, 2013, 10(7): 144
- [9] Baimel C, Lau BK, Qiao M, et al. Projection-Target-Defined Effects of Orexin and Dynorphin on VTA Dopamine Neurons [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(6): 1346-1355
- [10] Campbell EJ, Barker DJ, Nasser HM, et al. Cue-induced food seeking after punishment is associated with increased Fos expression in the lateral hypothalamus and basolateral and medial amygdala [J]. *Behav Neurosci*, 2017, 131(2): 155-167
- [11] N.D. Volkow, T.K. Li, et al. Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone away, *Nat. Rev[J]. Neurosci*, 2004, 5(1): 963-970
- [12] J.M. Van Ree, R.J. Niesink, L. Van Wolfswinkel, et al. Endogenous opioids and reward[J]. *Eur. J. Pharmacol*, 2000, 405(3): 89-101
- [13] Luna SL, Brown DI, Eghlidi DH, et al. Locomotor activity and the expression of orexin A and orexin B in aged female rhesus macaques [J]. *Neurobiol Aging*, 2017, 50(8): 1-4
- [14] Choi DL, Davis JF, Magrissio IJ, et al. Orexin signaling in the paraventricular thalamic nucleus modulates mesolimbic dopamine and hedonic feeding in the rat [J]. *Neuroscience*, 2012, 210 (8): 243-248
- [15] N D Volkow, A J Hampson, R Baler, et al. Don't worry, be happy: endocannabinoids and cannabis at the intersection of stress and reward[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2016, 57(8): 285-308

- [16] B Kola, I Farkas, M Christ-Crain, et al. The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system[J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): 154
- [17] Simmons SJ, Gentile TA, Mo L, et al. Nicotinic receptor blockade decreases fos immunoreactivity within orexin/hypocretin-expressing neurons of nicotine-exposed rats [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 314(3): 226-233
- [18] K B J Franklin, G Paxinos. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*[M]. Academic Press, San Diego, 1997
- [19] H Wang, T Treadway, D P Covey, et al. Cocaine-induced endocannabinoid mobilization in the ventral tegmental area [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(6): 1997-2008
- [20] H Malinen, P Hyttia. Ethanol self-administration is regulated by CB1 receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in alcohol-preferring AA rats [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2008, 32(3): 1976-1983
- [21] A Rashidy-Pour, P Pahlevani, A Vaziri, et al. Involvement of CB1 receptors in the ventral tegmental area in the potentiation of morphine rewarding properties in acquisition but not expression in the conditioned place preference model [J]. *Behav. Brain Res*, 2013, 247(6): 259-267
- [22] E B Oleson, M V Beckert, J T Morra, et al. Endocannabinoids shape accumbal encoding of cue-motivated behavior via CB1 receptor activation in the ventral tegmentum[J]. *Neuron*, 2012, 73(5): 360-373
- [23] C Kortleven, C Fasano, D Thibault, et al. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits long-term potentiation of glutamatergic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons in mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 33(6): 1751-1760
- [24] CS Kearns, K Blake-Palmer, E Daniel, et al. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk [J]. *Mol. Pharmacol*, 2005, 67(6): 1697-1704
- [25] Blais A, Drouin G, Chaumontet C, et al. Impact of Orexin-A Treatment on Food Intake, Energy Metabolism and Body Weight in Mice[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169908
- [26] S.A. Tucci, E.K. Rogers, M. Korbonits, et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 blocks the orexigenic effects of intrahypothalamic ghrelin[J]. *Br. J. Pharmacol*, 2004, 143(6): 520-523
- [27] Łupina M, Tarnowski M, Baranowska-Bosiacka I, et al. SB-334867 (an Orexin-1 Receptor Antagonist) Effects on Morphine-Induced Sensitization in Mice-a View on Receptor Mechanisms [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 20
- [28] Zheng H, Townsend RL, Shin AC, et al. High-fat intake induced by mu-opioid activation of the nucleus accumbens is inhibited by Y1R-blockade and MC3/4R- stimulation [J]. *Brain Res*, 2010, 1350(8): 131-138
- [29] Gentile TA, Simmons SJ, Watson MN, et al. Effects of Suvorexant, a Dual Orexin/Hypocretin Receptor Antagonist, on Impulsive Behavior Associated with Cocaine[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2018, 43(5): 1001-1009
- [30] Zink AN, Bunney PE, Holm AA, et al. Neuromodulation of orexin neurons reduces diet-induced adiposity [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2018, 42(4): 737-745
- [31] Reichelt AC, Westbrook RF, Morris MJ. Integration of reward signalling and appetite regulating peptide systems in the control of food-cue responses[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(22): 5225-5238
- [32] K. Toshinai, Y. Date, N. Murakami, et al. Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(7): 1506-1512
- [33] M. Moehlecke, L.H. Canani, L.O. Silva, et al. Determinants of body weight regulation in humans [J]. *Arch. Endocrinol. Metab*, 2016, 60(7): 152-162
- [34] Martin-Fardon R, Cauvi G, Kerr TM, et al. Differential role of hypothalamic orexin/hypocretin neurons in reward seeking motivated by cocaine versus palatable food[J]. *Addict Biol*, 2018, 23(1): 6-15
- [35] J.E. Blevins, B.G. Stanley, R.D.D.M.S.O. Reidelberger. As a vehicle for central injections: tests with feeding elicited by norepinephrine injected into the paraventricular nucleus [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 71(7): 277-282