

慢性能量限制对小鼠下丘脑食欲调节神经肽 mRNA 表达的影响

曹 怡¹, 陈 榕², 邹大进²¹中国人民解放军北京军区总医院内分泌科, 北京 100700; ²第二军医大学附属长海医院内分泌科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨小鼠下丘脑弓状核促进食欲和抑制食欲神经肽在慢性能量限制饮食后的变化。**方法:**将 24 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为两组(每组 12 只),分别给予高脂和普通饲料喂养,8 周后每组各取 6 只给予能量限制饮食(正常饮食量的 85%),另 6 只继续给予高脂或普通饲料自由饮食,6 周后处死。喂养过程中监测小鼠体重,处死后取下丘脑组织检测 4 种神经肽 mRNA 表达水平。**结果:**6 周的能量限制逆转了小鼠的体重增加、脂肪蓄积。且肥胖逆转后,下丘脑弓状核促进食欲的神经肽 Y(NPY)和刺鼠色蛋白相关蛋白(AgRP)mRNA 的表达较肥胖小鼠显著增高($P < 0.001$),而抑制食欲的前阿片黑素细胞皮质激素(POMC)和可卡因苯丙胺调节转录物(CART)mRNA 没有明显变化。**结论:**慢性能量限制饮食能够引起体重减轻,但同时上调下丘脑促进食欲的神经肽,而后者可能是节食减重后体重反弹的一个重要促成因素。

[关键词] 肥胖;体重反弹;下丘脑;神经肽;能量限制**[中图分类号]** R338.27**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2013)09-1196-06**doi:**10.7655/NYDXBNS20130905

Effects of chronic energy restricted diet on the mRNA expression of hypothalamic neuropeptides in mice

Cao Yi¹, Chen Rong², Zou Dajin²¹Department of Endocrinology, General Hospital Affiliated to Beijing Military Area Command, Beijing 100700;²Department of Endocrinology, the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of orexigenic and anorectic neuropeptides in hypothalamic arcuate nucleus in chronic energy restricted mice. **Methods:** Twenty-four C57BL/6J male mice were randomly divided into high fat diet group and normal diet group. After 8 weeks, 6 mice of each group were given energy restricted diet (85% of normal or high fat diet). The mice were sacrificed after another 6 weeks. The body weight was determined every week during the 14 weeks feeding study. The neuropeptides mRNA expression levels from hypothalamic tissue were analyzed after sacrifice. **Results:** The energy restricted diet reversed obesity, and increased NPY and AgRP mRNA expression of hypothalamic arcuate nucleus after 6 weeks ($P < 0.001$). POMC and CART mRNA expression were not changed significantly. **Conclusion:** Chronic energy restriction leads to weight loss, but it also up-regulates hypothalamic orexigenic peptides, which may be an important contributing factor to weight regain after the energy restricted diet.

[Key words] obesity; weight regain; hypothalamus; neuropeptide; energy restrict**[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1196-1201]**

减少过度的能量摄入是逆转肥胖的主要途径。然而,肥胖患者通过节食减轻体重后复发率较高^[1-2],在人类和啮齿类动物的研究中都发现,肥胖个体减重后食欲的增加是体重反弹的主要促成因素之一^[3-4]。

食欲的调控涉及到中枢神经系统(CNS)中不同区域的多种神经元的相互作用,从而组成复杂的网

路^[5-6]。已知位于下丘脑正中隆起附近的弓状核(ARC)是调节进食和能量代谢的主要区域。弓状核包含两组相互关联的一级神经元,它们能够感受外周能量储存信号和饱食信号^[7-8],并通过分泌一系列神经肽调节食欲及能量平衡,其中刺鼠色蛋白相关蛋白(AgRP)神经元释放的 AgRP 和神经肽 Y(NPY)具有促进食欲的作用;前阿片黑素细胞皮质激素(POMC)神经元释放的 POMC 和可卡因苯丙胺

△共同第一作者(Co-first authors)

调节转录物(CART)具有抑制食欲、减少食物摄入的作用。

在体重正常的动物中发现,弓状核调节食欲的神经肽对急性食物剥夺有反应。例如,小鼠禁食 48 h 后 NPY 和 AgRP mRNA 表达增加^[9],POMC mRNA 表达减少^[10];而大鼠禁食 24~48 h 后 CART mRNA 表达减少^[11]。同时这些神经肽的变化程度也存在着显著差异,在大鼠禁食后 NPY mRNA 表达增加 251%,而 POMC mRNA 仅减少 22.6%^[12]。然而,这些神经肽在慢性能量限制后是如何变化的,以及它们在肥胖个体减重后体重反弹中起着怎样的作用,目前还了解的不多。由此,设计了以下实验进一步探求下丘脑神经肽在肥胖治疗中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

选用 8 周龄的 C57BL/6J 雄性小鼠,体重(21.78 ± 1.10)g,单笼饲养,自由摄取食物和水,饲养环境:温

度 22~24℃,白昼 6:00~18:00,黑夜 18:00~6:00,普通饮食饲料(74%碳水化合物、10%脂肪、16%蛋白质),高脂饮食饲料(20.1%碳水化合物、59.9%脂肪、20.0%蛋白质,Research Diets 公司,美国)。能量限制饮食给予的饲料,相当于自由饮食所给能量的 85%。限制饮食期间每周监测 24 h 食物摄入量。称量好的新鲜食物在黑夜开始(18:00)给予,24 h 后收集剩余的食物并称重。喂养过程中每 1 周称量体重 1 次。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

24 只小鼠第 1 周给予普通饲料饮食以适应环境,1 周后,12 只小鼠给予高脂饮食,12 只小鼠给予普通饮食。8 周后,将高脂饮食和普通饮食小鼠各分为两组,每组 6 只,分别给予高脂饲料自由饮食(A)、高脂饲料能量限制饮食(B)、普通饲料自由饮食(C)和普通饲料能量限制饮食(D)组,共 6 周(图 1)。

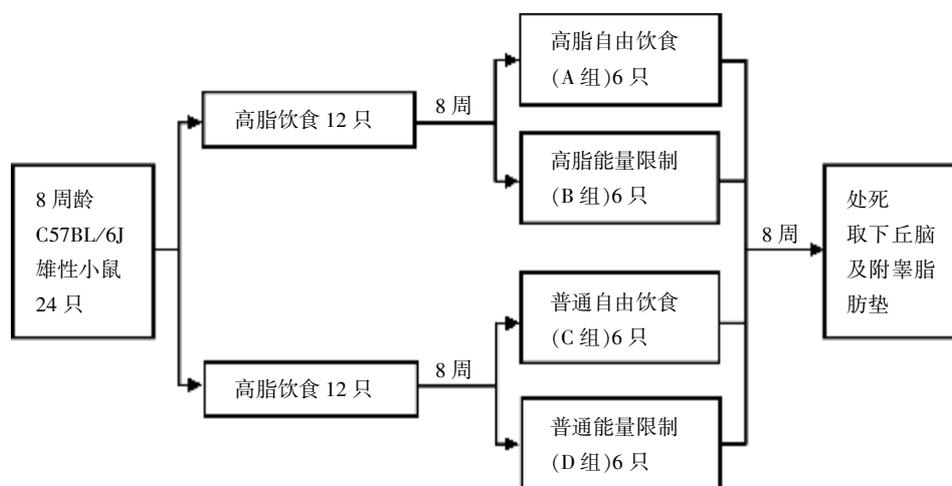


图 1 实验分组

Figure 1 Grouping method

1.2.2 组织制备

14 周实验结束后,小鼠饥饿 16 h,经腹腔注射 5%乌拉坦麻醉(按体重 30 μl/g)。取下丘脑组织并迅速置于液氮中速冻。取附睾脂肪垫并称重。所有小鼠在 7:00~9:00 处死以减少昼夜节律变化对 mRNA 表达的影响。

1.2.3 下丘脑神经肽 mRNA 表达水平测定

1.2.3.1 总 RNA 抽提及质量鉴定

取下丘脑组织约 50 mg 置于 500 μl TRIzol 试剂中,经匀浆、组织成分分层、总 RNA 分离、清洗、干燥、溶解后,放入紫外分光光度检测仪中检测 RNA

的浓度和纯度,判断样品抽提质量,本实验室中 D(260 nm)/D(280 nm)都在 1.8~2.0 之间,表示 RNA 纯度好。将提取好的 mRNA 置于-80℃冰箱保存备用

1.2.3.2 反转录反应

取 RNA 样本 1 μg,按测得的浓度计算所需的体积 1/(浓度×35)μl,经 DNA 酶处理后,以 Oligo(dT)(1 μl)为引物进行反转录,反应体系为 20 μl,反应条件为 42℃ 20 min,99℃ 5 min,4℃ 5 min;反应结束后,迅速短暂离心,每管加入 80 μl 10 mmol/L Tris-HCl(pH = 8.0),-20℃保存。

1.2.3.3 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)

本研究中选用 SYBR Green I 为荧光染料。反应体系为 10 μ l, cDNA 样品 1.5 μ l, Primer 0.25 μ l, SYBR Green 5 μ l, ddH₂O 补足。反应程序依据不同引物而定。反应结束后建立 real-time PCR 熔解曲线证实扩增的特异性并分析结果, 读取 C_T 值, 数据分析采用相对定量法, 内参基因为 36B4 基因。目标基

因 mRNA 量 = 2^{- Δ CT}, Δ C_T = C_{Ttarget} - C_{T36B4} (表 1)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示, 采用方差分析和 t 检验, 以 P \leq 0.05 认为差异有统计学意义。

表 1 实验所用引物及其序列
Table 1 Real-time RT-PCR primers

| 基因 | 上游引物(5'→3') | 下游引物(5'→3') |
|------|--------------------------|---------------------------|
| CART | GATGCGTCCCATGAGAAGG | TCCGAATGCGTTTACTCTTGAG |
| POMC | AGCAACCCGCCCAAGG | GCGTCTGGCTCTTCTCGG |
| AgRP | AGGGCATCAGAAGGCCTGACCAGG | CATTGAAGAAGCGGCAGTAGCACGT |
| NPY | TCATCCCCTGAAACCAGTCTG | GGCGCGAGTCCAGCCTAG |
| 36B4 | GCATGTCGCTCCGAGGG | CTTGCGCATCATGCTGTCT |

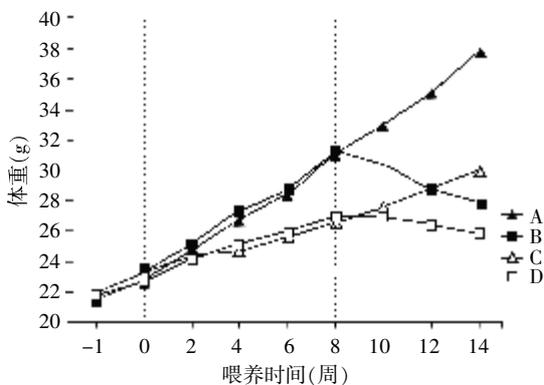
2 结果

2.1 体重及附睾脂肪重量

体重变化如图 2 所示, 小鼠在高脂饲料喂养 8 周后体重显著高于普通饲料喂养的小鼠, 高脂饲料喂养 8 周后的小鼠再给予 6 周的能量限制饮食(B 组), 体重较高脂自由喂养的小鼠(A 组)呈现明显的下降趋势。普通饲料喂养的小鼠也观察到同样的现象。此外, 无论是高脂饲料喂养小鼠还是普通饲料喂养小鼠限制其能量摄入后, 附睾脂肪垫重量均较自由饮食组小鼠显著降低 (B 组与 A 组相比, P < 0.001; D 组与 C 组相比, P < 0.001, 图 3)。

2.2 下丘脑弓状核神经肽 mRNA 的表达

无论是高脂饲料还是普通饲料喂养的小鼠, 在

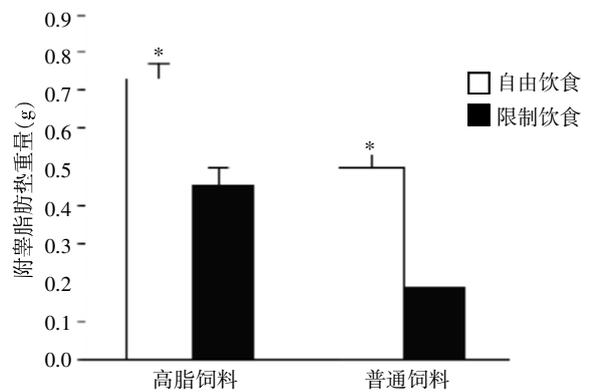


A: 高脂饲料喂养 8 周 + 自由饮食 6 周; B: 高脂饲料喂养 8 周 + 能量限制饮食 6 周; C: 普通饲料喂养 8 周 + 自由饮食 6 周; D: 普通饲料喂养 8 周 + 能量限制饮食 6 周。

图 2 各组小鼠体重变化趋势

Figure 2 The body weight changing trends of mice in four groups

慢性能量限制后下丘脑弓状核 NPY mRNA 表达水平较自由饮食组显著增加 (B 组与 A 组相比, P < 0.001; D 组与 C 组相比, P < 0.001, 图 4)。高脂饲料喂养的小鼠在限制能量摄入后, 其下丘脑弓状核 AgRP mRNA 表达水平显著增加 (B 组与 A 组相比, P = 0.000 3, 图 5), 而普通饲料喂养的小鼠限制摄入量后 AgRP mRNA 表达水平没有明显改变。高脂饲料自由饮食的小鼠较普通饲料自由饮食小鼠其下丘脑 POMC mRNA (A 组与 C 组相比, P < 0.001, 图 6) 和 CART mRNA (A 组与 C 组相比, P < 0.001, 图 7) 表达水平明显降低。而无论是高脂饲料喂养小鼠还是普通饲料喂养小鼠, 在能量限制饮食后其下丘脑 POMC 和 CART mRNA 的表达水平变化均不明显, 在普通饲料能量限制后 (D 组) POMC mRNA 和 CART mRNA 表达水平甚至表现为较自由饮食 (C 组) 降低的趋势。



自由饮食组与限制饮食组相比, *P < 0.001, n = 6。

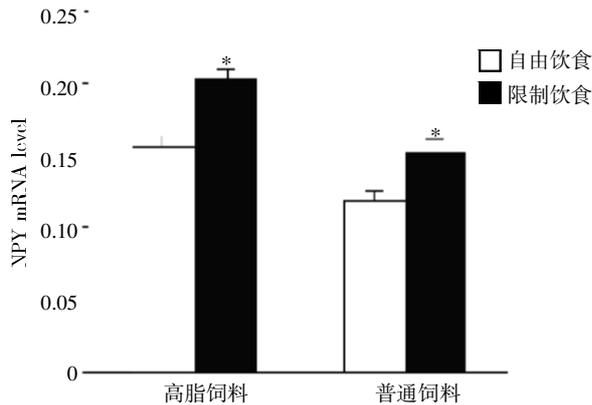
图 3 各组小鼠附睾脂肪垫重量

Figure 3 The weight of epididymal fat pads in four groups

表 2 定量 PCR 所得各组下丘脑神经肽 mRNA 量(power 值)

Table 2 The results of Real-time RT-PCR in four groups

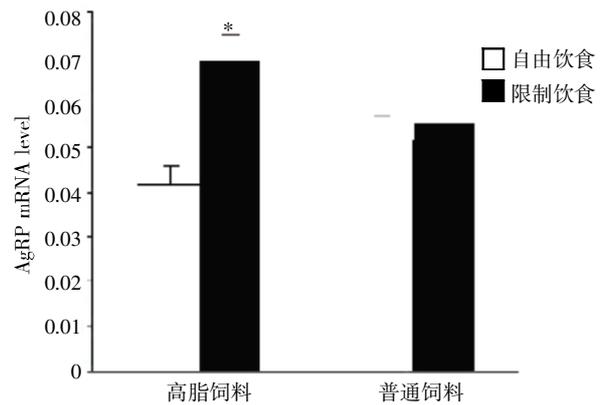
| 下丘脑神经肽 | 高脂自由饮食 | 高脂限制饮食 | 普通自由饮食 | 普通限制饮食 |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| NPY | 0.156 2 ± 0.010 1 | 0.203 2 ± 0.018 0 | 0.118 5 ± 0.008 8 | 0.153 9 ± 0.011 6 |
| AgRP | 0.041 7 ± 0.004 4 | 0.069 0 ± 0.005 8 | 0.051 6 ± 0.006 0 | 0.055 6 ± 0.003 7 |
| POMC | 0.148 6 ± 0.008 6 | 0.164 5 ± 0.009 3 | 0.185 3 ± 0.013 6 | 0.171 1 ± 0.011 2 |
| CART | 0.183 1 ± 0.012 4 | 0.202 1 ± 0.013 3 | 0.245 1 ± 0.019 0 | 0.211 6 ± 0.016 1 |



自由饮食组与限制饮食组相比, * $P < 0.001, n = 6$ 。

图 4 各组小鼠下丘脑 NPY mRNA 表达水平

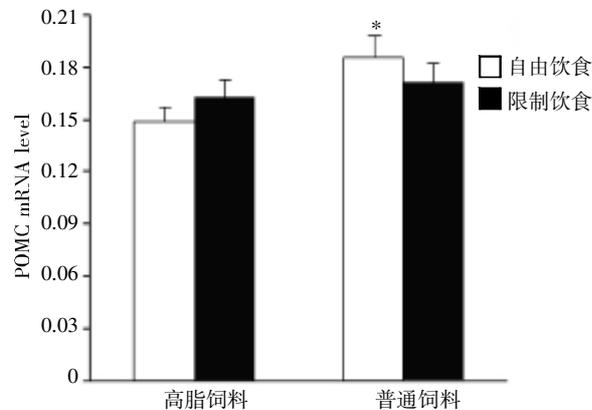
Figure 4 The mRNA expression of NPY from hypothalamic arcuate nucleus in four groups



自由饮食组与限制饮食组相比, * $P = 0.000 3, n = 6$ 。

图 5 各组小鼠下丘脑 AgRP mRNA 表达水平

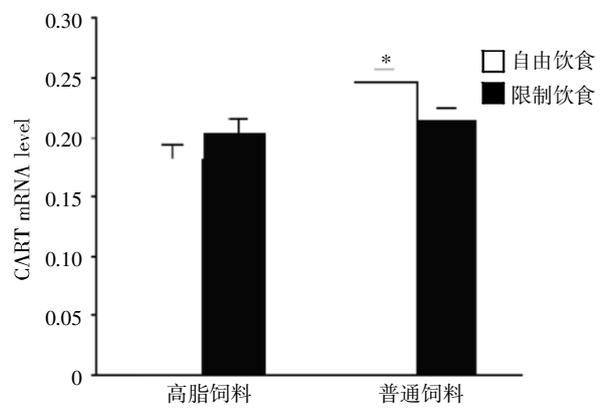
Figure 5 The mRNA expression of AgRP from hypothalamic arcuate nucleus in four groups



高脂饲料组与普通饲料组相比, * $P < 0.001, n = 6$ 。

图 6 各组小鼠下丘脑 POMC mRNA 表达水平

Figure 6 The mRNA expression of POMC from hypothalamic arcuate nucleus in four groups



高脂饲料组与普通饲料组相比, * $P = 0.000 1, n = 6$ 。

图 7 各组小鼠下丘脑 CART mRNA 表达水平

Figure 7 The mRNA expression of CART from hypothalamic arcuate nucleus in four groups

3 讨论

本研究主要探讨了能量限制饮食逆转肥胖后,小鼠下丘脑弓状核促进食欲和抑制食欲神经肽(NPY/AgRP与POMC/CART)mRNA表达水平的变化。结果发现,高脂饲料喂养的小鼠在限制能量摄入后体重明显减轻,其下丘脑弓状核促食欲神经肽NPY和AgRP mRNA的表达水平均显著增加,而抑

制食欲神经肽POMC和CART mRNA的表达水平则没有显著的改变。普通饲料喂养的小鼠,在慢性能量限制后体重也明显下降,其下丘脑弓状核促食欲神经肽NPY mRNA的表达水平较自由饮食组显著增加,而抑制食欲的神经肽POMC和CART mRNA表达水平却表现为较自由饮食小鼠降低的趋势。这些结果说明,慢性能量限制饮食的确能够减轻体重,逆转肥胖,但是同时也刺激了下丘脑食欲调节中枢,

引起弓状核促食欲神经肽 NPY 和 AgRP mRNA 表达的增加,一旦能量限制饮食中止,这可能是促进食物摄入增加和体重反弹的一个重要因素。此外,在肥胖逆转后,小鼠弓状核 POMC 和 CART mRNA 表达并没有显著变化,甚至在普通饲料能量限制后,还表现为下降的趋势,也就是说在能量限制饮食中下丘脑弓状核抑制食欲神经肽并没有发挥太大作用,在能量限制中止后也不能有效地抑制食欲,这又更进一步促进了体重的重新增加。此外,本研究中高脂自由饮食喂养的小鼠其下丘脑 POMC 和 CART mRNA 的表达水平较普通饮食喂养的小鼠显著降低,说明高脂饮食本身不仅增加了能量摄入,同时也通过减少中枢抑制食欲的神经肽,间接增加了食欲,从而更进一步促进了肥胖的发生。

普通饲料喂养的小鼠在慢性能量限制后 AgRP mRNA 表达水平没有明显改变,考虑存在两种可能,其一是由于在高脂饮食条件下,体重的改变更加明显,因此对下丘脑神经肽的刺激作用也更加显著,而普通饲料饮食引起的体重变化幅度相对较小,因此 AgRP 的改变也不明显,这与本实验中的结果相符,即高脂饲料喂养的小鼠在能量限制后其体重下降幅度要大于普通饲料喂养的小鼠(图 2)。其二可能受到样本量较小的影响,小鼠间存在的个体差异影响试验结果。

关于这种慢性能量限制引起的下丘脑弓状核促食欲神经肽表达增加的机制还不是十分清楚。已知瘦素(leptin)和胰岛素(insulin)是参与机体能量代谢调控的重要激素,两者均能够穿越血脑屏障,激活 POMC/CART 神经元,抑制 NPY/AgRP 神经元,从而调节食欲及能量平衡。当体重增加时,胰岛素分泌增多从而活化分解代谢通路减少能量摄入。在动物模型中,中枢给予胰岛素能够显著减少进食量并增加能量消耗^[13-14]。神经元特异性胰岛素受体(IR)破坏的小鼠(NIRKO 小鼠)表现为饮食敏感性的肥胖,并伴有轻度的高瘦素血症、胰岛素抵抗和高甘油三酯血症^[15]。以往的研究发现,急性食物剥夺后大鼠血浆胰岛素水平较自由饮食显著降低,但慢性能量限制后血浆胰岛素水平较自由进食者并没有显著改变^[12,16]。也就是说胰岛素在慢性能量限制后机体的代谢改变中可能并未发挥太大作用。

因此,本文推测这一改变可能与瘦素的作用相关。已知 AgRP 和 POMC 神经元均表达瘦素受体,在瘦素信号转导中起着十分重要的作用^[1,17]。这些弓状核神经肽对循环中瘦素水平敏感,在瘦素缺乏的

ob/ob 小鼠中 NPY 和 AgRP mRNA 表达增加而 POMC mRNA 表达减少^[18-20]。在人类和啮齿类动物的研究中均发现体重减轻时机体处于一种低瘦素水平。急性食物剥夺能够降低啮齿类动物的血浆瘦素水平,并且增加弓状核促进食欲的神经肽,减少抑制食欲的神经肽;而在慢性能量负平衡状态下,血浆瘦素水平降低也与体重减轻一致。本研究中在给予慢性能量限制后,弓状核 NPY 和 AgRP mRNA 表达增加可能也与瘦素水平改变有关。然而,也有研究发现,大鼠通过运动转轮减轻体重后其弓状核 NPY 和 AgRP 并没有发生改变^[21]。也就是说这一推测仍有待于进一步证实。

已知 POMC 和 CART 具有抑制食物摄入的作用^[22-23]。理论上认为能量限制饮食应减少 POMC 和 CART 的表达。本研究中普通饲料喂养的小鼠限制能量摄入后下丘脑 POMC 和 CART mRNA 表达水平表现为减低的趋势。然而,高脂喂养的小鼠通过慢性能量限制减轻体重后其弓状核 POMC 和 CART mRNA 表达并没有发生明显改变。以往的研究发现,饮食诱导的肥胖动物其下丘脑弓状核 POMC 和 CART mRNA 的表达是减低的^[24-25]。本研究中也发现高脂喂养的小鼠弓状核 POMC 和 CART mRNA 表达水平显著低于普通饲料喂养的小鼠,可能正是这一改变限制了这两种抑制食欲的神经肽在能量限制饮食后的进一步降低。

综上所述,慢性能量限制能够引起体重减轻,脂肪量减少,但同时上调下丘脑促进食欲的神经肽,而后者可能是引起体重反弹的一个重要因素。因此,进一步探讨下丘脑能量调节中枢在肥胖治疗过程中的作用及其具体机制,可能为今后攻克肥胖开辟一条新途径。

[参考文献]

- [1] Klem ML, Wing RR, Lang W, et al. Does weight loss maintenance become easier over time? [J]. *Obes Res*, 2000, 8(6): 438-444
- [2] MacLean PS, Higgins JA, Johnson GC, et al. Enhanced metabolic efficiency contributes to weight regain after weight loss in obesity-prone rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 287(6): R1306-1315
- [3] Dokken BB, Tsao TS. The physiology of body weight regulation: are we too efficient for our own good? [J]. *Diab Spectr*, 2007, 20(3): 166-170
- [4] Tremblay A, Doucet E. Obesity: a disease or a biological adaptation? [J]. *Obes Rev*, 2000, 1(1): 27-35
- [5] Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, et al. Central ner-

- vous system control of food intake [J]. *Nature*,2000,404(6778):661-671
- [6] Flier JS. Obesity wars;molecular progress confronts an expanding epidemic[J]. *Cell*,2004,116(2):337-350
- [7] Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity[J]. *Neuropeptides*,2006,40(6):375-401
- [8] Badman MK,Flier JS. The gut and energy balance;visceral allies in the obesity wars [J]. *Science*,2005,307(5719):1909-1914
- [9] Hahn TM,Breining JF,Baskin DG,et al. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons[J]. *Nat Neurosci*,1998,1(4):271-272
- [10] Schwartz MW,Seeley RJ,Woods SC,et al. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus [J]. *Diabetes*,1997,46(12):2119-2123
- [11] Kristensen P,Judge ME,Thim L,et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin[J]. *Nature*,1998,393(6680):72-76
- [12] Bi S,Robinson BM,Moran TH. Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,2003,285(5):R1030-1036
- [13] Vettor R,Fabris R,Pagano C,et al. Neuroendocrine regulation of eating behaviour [J]. *J Endocrinol Invest*,2002,25(10):836-854
- [14] Morton GJ,Cummings DE,Baskin DG,et al. Central nervous system control of food intake and body weight[J]. *Nature*,2006,443(7109):289-295
- [15] Bruning JC,Gautam D,Burks DJ,et al. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction [J]. *Science*,2000,289(5487):2122-2125
- [16] Yu Y,Deng C,Huang XF. Obese reversal by a chronic energy restricted diet leaves an increased Arc NPY/AgRP,but no alteration in POMC/CART,mRNA expression in diet-induced obese mice [J]. *Behav Brain Res*,2009,205(1):50-56
- [17] Jequier E. Leptin signaling,adiposity,and energy balance [J]. *Ann NY Acad Sci*,2002,967:379-388
- [18] Ebihara K,Ogawa Y,Katsuura G,et al. Involvement of agouti-related protein,an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor,in leptin action [J]. *Diabetes*,1999,48(10):2028-2033
- [19] Mizuno TM,Kleopoulos SP,Bergen HT,et al. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and corrected in ob/ob and db/db mice,but is stimulated by leptin[J]. *Diabetes*,1998,47(2):294-297
- [20] Mizuno TM,Makimura H,Silverstein J,et al. Fasting regulates hypothalamic neuropeptide Y,agouti-related peptide,and proopiomelanocortin in diabetic mice independent of changes in leptin or insulin [J]. *Endocrinology*,1999,140(10):4551-4557
- [21] Levin BE,Dunn-Meynell AA. Chronic exercise lowers the defended bodyweight gain and adiposity in diet-induced obese rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*,2004,286(4):R771-778
- [22] Thim L,Kristensen P,Larsen PJ,et al. CART,a new anorectic peptide [J]. *Int J Biochem Cell Biol*,1998,30(12):1281-1284
- [23] Tung YCL,Piper SJ,Yeung D,et al. A comparative study of the central effects of specific Proopiomelanocortin (POMC)-derived melanocortin peptides on food intake and body weight in Pomc null mice [J]. *Endocrinology*,2006,147(12):5940-5947
- [24] Huang XF,Han M,South T,et al. Altered levels of POMC,AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity[J]. *Brain Res*,2003,992(1):9-19
- [25] Tian DR,Li XD,Shi YS,et al. Changes of hypothalamic alpha-MSH and CART peptide expression in diet-induced obese rats[J]. *Peptides*,2004,25(12):2147-2153

[收稿日期] 2013-04-17