

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.03.016

侧脑室注射瘦素对 2 型糖尿病大鼠阿黑皮素原及神经肽 Agouti 相关蛋白的影响*

董 迎,吕春风[△],李文化
(天津市北辰医院内分泌科 300400)

[摘要] **目的** 研究侧脑室内注射瘦素对 2 型糖尿病大鼠阿黑皮素原(POMC)、神经肽 Agouti 相关蛋白(AGRP)及空腹血糖的影响。**方法** 选取雄性 8 周龄 SD 2 型糖尿病大鼠 80 只,分为侧脑室内注射瘦素组和侧脑室内注射赋形剂(vehicle)对照组,各 40 只。对瘦素注射组大鼠进行侧脑室 5 $\mu\text{L/kg}$ (空腹瘦素水平 15 ng/mL)侧脑室瘦素注射,分别以等剂量对对照组进行 vehicle 侧脑室注射。48 h 后进行大鼠空腹血糖监测并使用 ELISA 分析检测试剂盒对两组大鼠血清标本进行 POMC 及 AGRP 滴度测定。**结果** 注射瘦素组大鼠空腹血糖水平显著低于对照组($P<0.05$),注射瘦素组大鼠血清 POMC 较对照组表达显著增加($P<0.05$),AGRP 表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 侧脑室注射瘦素可显著降低 2 型糖尿病大鼠空腹血糖水平,增加 POMC 表达,降低 AGRP 表达。

[关键词] 糖尿病,2 型;侧脑室;瘦素;黑皮质素类;神经肽类
[中图法分类号] R781.6+3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)03-0337-03

Effect of intracerebroventricular injection of leptin on proopiomelanocortin and neuropeptide Agouti related protein in type II diabetic rats*

DONG Ying, LV Chunfeng[△], LI Wenhua
(Department of Endocrinology, Beichen Hospital, Tianjin 300400, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of intracerebroventricular injection of leptin on proopiomelanocortin(POMC) and neuropeptide Agouti related protein(AGRP) and fasting blood glucose(FBG) in rats with type 2 diabetes mellitus(T2DM). **Methods** Eighty male 8-week-age SD rats with T2DM were selected and divided into two groups;intracerebroventricular injection of leptin group($n=40$)and intracerebroventricular injection of vehicle control group($n=40$). Intracerebroventricular injection of 5 $\mu\text{L/kg}$ (fasting leptin level 15 ng/mL) leptin was performed in the leptin injection group,and the control group was injected with same amount of vehicle instead. After 48 h,the FBG level was determined,and the levels of POMC and AGRP were detected by the titer method. **Results** The level of FBG in the leptin injection group was significantly lower than that in the control group($P<0.05$),the expression of serum POMC in the leptin injection group was significantly higher than that in control group($P<0.05$),The expression of AGRP in the leptin injection group was significantly decreased than control group($P<0.05$). **Conclusion** intracerebroventricular injection of leptin can significantly reduce the FBG level in rats with T2DM,increases POMC expression and decreases AGRP associated protein expression.

[Key words] diabetes mellitus,type 2;lateral ventricles;leptin;melanocortins;neuropeptides

瘦素是一种肽类蛋白质,由白色脂肪组织细胞分泌。上世纪 50 年代至今瘦素在机体代谢方面的获益被逐步证实。随着重组瘦素技术的发展,瘦素相关的基础及临床实验也有广泛开展。近期有研究证实低剂量瘦素在不减少动物进食量及体质量的情况下仍然会降低 2 型糖尿病大鼠血糖水平^[1]。这项研究首次证实瘦素可独立于其对体质量及进食量的作用之外而调节血糖水平。在另外一项实验中未经瘦素治疗的肥胖大鼠在进食量与经瘦素治疗的大鼠相等的情况下并不能达到瘦素治疗组大鼠达到的控制血糖的水平^[2]。有趣的是在 1 型糖尿病大鼠中,瘦素同样表现出了治疗糖尿病的作用^[3-4],这表明瘦素独立于胰岛素之外的调节血糖的作用是通过中枢神经系统及其介质实现的^[5]。

瘦素在大脑中调节抗 2 型糖尿病作用的特定区域在 2005

年首次被确定,该研究证实仅在下丘脑的弓状核(ARH)恢复瘦素表达可以降低肥胖,高胰岛素血症和严重高血糖大鼠的血糖水平,而不影响其进食量和体质量^[6]。并且,仅在下丘脑的弓状核(ARH)的阿黑皮素原(POMC)分泌神经元选择性表达瘦素的情况下对瘦素缺乏的糖尿病大鼠便可达到显著的血糖控制效果^[7]。这些结果证实 ARH 的 POMC 的表达是瘦素在 2 型糖尿病大鼠中抗糖尿病作用的重要途径^[7]。另外,在野生型大鼠中选择性消除 POMC 的表达并未出现预期的严重高血糖表现^[8]。这表明除 POMC 之外的其他分泌性神经元同样参与瘦素介导的血糖控制作用。ARH 同时包含有与 POMC 类似的神经肽 Agouti 相关蛋白(AGRP)分泌神经元^[6]。AGRP 是中枢黑皮素系统中的重要的神经肽成分具有拮抗 α -促黑素细胞激素与黑皮素受体 4(MC4R)结合的作用^[9]。这些受体在

* 基金项目:天津市北辰区科学技术委员会(BC2014-20)。 作者简介:董迎(1969—),副主任医师,本科,主要从事内分泌临床研究。
[△] 通信作者,E-mail:3530058761@qq.com。

中枢神经体用的神经元中广泛表达,这些神经元通过轴突与 POMC 和 AGRP 表达神经元广泛连接,作为瘦素表达神经元的二阶神经元^[10-11],MC4R 的缺失在大鼠及人体都会引起肥胖^[9]。本研究通过对 2 型糖尿病大鼠进行侧脑室瘦素注射,并随后进行空腹血糖、POMC 及 AGRP 的测定,以观察瘦素在中枢神经系统对上述神经递质的影响,进一步明确瘦素对 2 型糖尿病大鼠血糖控制作用的上游通路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 周龄 2 型糖尿病 SD 雄性大鼠 80 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[实验动物机构许可证号 SCXK(京)2014-0004],平均体质量为(200±20)g。

1.1.2 主要试剂 重组瘦素购自美国 R&D Systems 公司;链脲佐菌素(STZ)美国 SIGMA 公司生产;大鼠 POMC ELISA 分析检测试剂盒及 AGRP ELISA 分析检测试剂盒购自德赛诊断(上海)有限公司。

1.2 方法

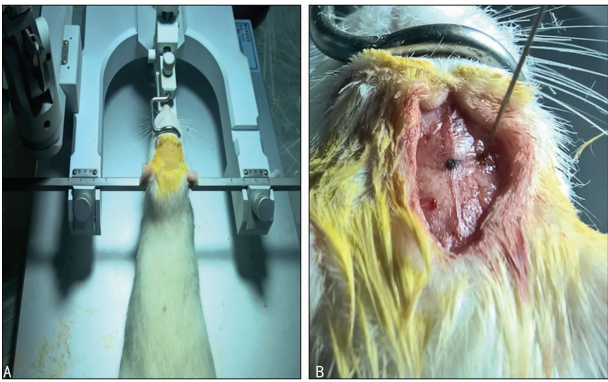
1.2.1 2 型糖尿病 SD 大鼠模型制备 健康雄性 SD 大鼠以高糖高脂饲料(10%猪油、20%蔗糖、10%蛋黄粉、0.5%胆酸钠、59.5%基础饲料)喂养,4 周后腹腔注射 STZ 30 mg/kg,继续高糖高脂饮食。4 周以后断尾,便携式血糖仪测定大鼠尾尖血糖,选取空腹血糖持续 1 周稳定大于或等于 16.7 mmol/L 作为 2 型糖尿病模型,并同时观察大鼠是否出现多饮、多食、尿量增多、生长迟缓、身体消瘦等糖尿病症状^[12]。

1.2.2 实验分组 将大鼠分为侧脑室内注射瘦素组($n=40$)和侧脑室内注射 vehicle 对照组($n=40$)。

1.2.3 侧脑室定位 以 40 mg/kg 剂量腹腔注射 2%戊巴比妥钠,使各组大鼠麻醉。平整放好麻醉后大鼠,将其牙齿扣在齿杆上并扭紧鼻夹,耳杆插入双耳外耳道中,使两边耳杆刻度一致,固定好头部。适当调节大鼠身体高度,使大鼠身体和头部保持水平,并将其固定好。用棉球蘸取聚维酮碘消毒头部皮肤,眼科剪剪开头部皮肤并用手术刀片剥离骨膜,并用 3%过氧化氢灼烧骨膜使冠状缝和矢状缝的交点(前囟)充分暴露,并用记号笔将此点标记^[13]。根据 Paxinos-Watson 鼠脑定位图谱,以前囟为中心定好坐标,读取立体定位仪上读数并记录。调节 XYZ 轴至指定位点,使用记号笔将此点标记,见图 1A。

1.2.4 侧脑室注射瘦素 在上述指定的位点处使用电动颅骨钻将颅骨钻开一个直径约 0.5 mm 的小孔,见图 1B。将已固定好位置的装有瘦素的微量进样器缓缓地插入到 4.5 mm 深度时停止。观察大鼠的呼吸情况,若没有异常情况把药物缓缓地注射完毕。瘦素注射剂量为 5 μ L/kg,对照组注射等剂量 vehicle。注射完毕后停顿 2 min,使得微量进样器中所有药物进入到大鼠脑内。慢慢地取出微量进样器,并使用聚酸锌水门汀封闭伤口,并以肌肉注射 3.2 万单位/鼠青霉素进行抗感染治疗^[14]。将已注射大鼠清醒后进行独笼饲养,术后 12 h 对其禁食但不禁水。

1.2.5 血液样本 各组分别在造模后 48 h 并禁食 4 h 后剪尾取血 4 mL,用 Surestep Life scan 血糖仪检测大鼠静脉血糖水平,剩余血样室温放置 1 h 后,以 2 000 r/min 离心 10 min,分离血清,放置于-80 $^{\circ}$ C 的超低温冰箱中保存。按相应的血液指标检测试剂盒说明书测定各组 POMC 及 AGRP。



A:使用脑立体定位仪将大鼠头部固定;B:使用微量进样器将瘦素注入大鼠侧脑室部位

图 1 侧脑室定位及注射瘦素

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与对照组相比,侧脑室注射瘦素组大鼠平均空腹血糖为(35.40±3.02) mmol/L,显著低于对照组大鼠空腹血糖(39.62±2.66) mmol/L($t=1.548, P<0.05$),侧脑室注射瘦素组大鼠血清 POMC 表达显著高于对照组($P<0.05$),侧脑室注射瘦素组大鼠血清神经肽 Agouti 相关蛋白(AGRP)表达显著低于对照组($P<0.05$),见图 2、3。

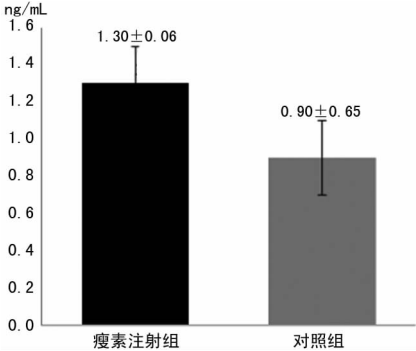


图 2 两组大鼠 POMC 水平比较

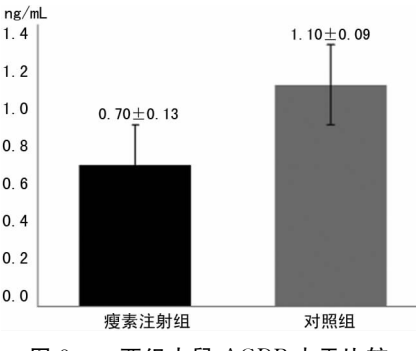


图 3 两组大鼠 AGRP 水平比较

3 讨论

尽管近年来糖尿病的治疗药物及手段都有了发展,且其就医渠道也得到了改善,但糖尿病患者仍面临血糖控制不理想、并发症较多、生活质量较差的问题^[15-16],其心血管事件仍呈高发状态^[17-18],美国有报道指出 40% 的糖尿病患者血糖没有得到良好控制^[19]。尽管胰岛素的发展使 1、2 型糖尿病得到了良

好控制,但这些药物并未重建糖尿病患者的代谢平衡,且随着治疗时间延长,还会带来严重的并发症,所以,探讨一种新的平衡代谢的药物是很有必要的。

瘦素作为一种由脂肪组织产生、分泌的激素,可与中枢神经系统中的瘦素受体相结合激发一系列的下流效应以达到调节机体代谢的作用^[20-21],位于第 3 脑室底部的弓状核在瘦素的能量代谢调节过程中发挥主要作用。弓状核含有两类不同的瘦素反应性一级神经元,即分泌神经肽 Y(NPY)/AGRP 神经元和 POMC 神经元,前者能增强食欲、抑制能量消耗,后者所分泌的 POMC 的降解产物 α -黑色素细胞刺激素(α -MSH)可起到抑制食欲和促进能量消耗的作用。瘦素可抑制 NPY/AGRP 神经元产生和释放 NPY、AGRP,另一方面则可促进 POMC 神经元产生和释放 POMC,从而调节机体的能量代谢。本研究通过对进行脑室注射瘦素大鼠的 2 型糖尿病大鼠 POMC 及 AGRP 的测定,观察到瘦素在中枢神经系统对上述神经递质的影响,进一步明确瘦素对 2 型糖尿病大鼠血糖控制作用的上游通路。进一步的分析瘦素-中枢神经系统-血糖通路相关分子机制显然是必要的,以进一步明确瘦素作用从而使其有机会开发为抗糖尿病治疗的新途径。

参考文献

- [1] PELLEYMOUNTER M A,CULLEN M J,BAKER M B,et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice[J]. Science,1995,269(5223):540-543.
- [2] SCHWARTZ M W,BASKIN D G,BUKOWSKI T R,et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice[J]. Diabetes,1996,45(4):531-535.
- [3] LIN C Y,HIGGINBOTHAM D A,JUDD R L,et al. Central leptin increases insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2002,282(5):1084-1091.
- [4] CHINOOKOSWONG N,WANG J L,SHI Z Q. Leptin restores euglycemia and normalizes glucose turnover in insulin-deficient diabetes in the rat[J]. Diabetes,1999,48(7):1487-1492.
- [5] FUJIKAWA T,CHUANG J C,SAKATA I,et al. Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice[J]. Proc Nati Acad Sci USA,2010,107(40):17391-17396.
- [6] COPPARI R,ICHINOSE M,LEE C E,et al. The hypothalamic arcuate nucleus:A key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity[J]. Cell Metab,2005,1(1):63-72.
- [7] HUO LIHONG,GAMBER K,GREELEY S,et al. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor

- activity by POMC neurons[J]. Cell Metab,2009,9(6):537-547.
- [8] BALTHASAR,NINA,COPPARI,et al. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis[J]. Neuron,2004,42(6):983-991.
- [9] CONE R D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system[J]. Nat Neurosci,2005,8(5):571-578.
- [10] BAGNOL D,LU X Y,KAELIN C B,et al. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain[J]. J Neurosci,1999,19(18):RC26.
- [11] KISHI T,ASCHKENASI C J,LEE C E,et al. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat[J]. J Comp Neurol,2003,457(3):213-235.
- [12] 段薇,张学梅,于萌,等. 2 型糖尿病大鼠急性心肌缺血对心肌新生血管的影响[J]. 中华糖尿病杂志,2012,4(6):361-364.
- [13] 刘清忠,王大斌,韩丽梅,等. 侧脑室注射丹参酮对脑瘫模型大鼠神经行为学的影响[J]. 中国中医急症,2016,25(7):1281-1284.
- [14] 李聃丹. 侧脑室注射 CART 对 T2DM 大鼠胰岛素调节作用及机制初步研究[D]. 重庆:第三军医大学,2014.
- [15] WISLICKI L. Diabetes mellitus and cancer[J]. Eur J Int Med,1971,1(5744):245-252.
- [16] MAZZONE T,CHAIT A,PLUTZKY J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies[J]. Lancet,2008,371(9626):1800-1809.
- [17] LARSEN J,BREKKE M,SANDVIK L,et al. Silent coronary atheromatosis in type 1 diabetic patients and its relation to long-term glycemic control[J]. Diabetes,2002,51(8):2637-2641.
- [18] ORCHARD T J,OLSON J C,ERBEY J R,et al. Insulin resistance-related factors, but not glycemia, predict coronary artery disease in type 1 diabetes: 10-year follow-up data from the pittsburgh epidemiology of diabetes complications study[J]. Diabetes Care,2003,26(5):1374-1379.
- [19] HOERGER T J,SEGEL J E,GREGG E W,et al. Is glycemic control improving in U. S. adults? [J]. Diabetes Care,2008,31(1):81-86.
- [20] FRIEDMAN J M. Leptin at 14 years of age: an ongoing story[J]. Am J Clin Nutr,2009,89(3):973-979.
- [21] FLIER J S,MARATOS-FLIER E. Lasker lauds leptin [J]. Cell,2010,143(1):9-12.