论著

文章编号:1000-5404(2005)23-2328-03

模拟高原急性缺氧对大鼠下丘脑神经肽Y受体Y1 mRNA表达的影响

田秀灵, 糜漫天, 韦 娜, 周 永 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室, 重庆 400038)

提 要: 目的 探讨高原急性缺氧对大鼠食欲及其下丘脑神经肽Y受体Y1 mRNA表达的影响。**方法** 雄性Wistar大鼠随机分为平原对照组、3 000 m缺氧组、4 000 m缺氧组,5 000 m缺氧组和6 000 m缺氧组,各缺氧组设置缺氧后1、2、3 d 3个时相点,观察低氧环境下大鼠食欲的变化;采用RT-PCR方法检测大鼠下丘脑中Y1受体mRNA的表达。**结果** ①高原急性缺氧后,大鼠食欲减退。②对照组和缺氧组大鼠下丘脑中均存在Y1受体mRNA表达。高原急性缺氧后,下丘脑Y1受体mRNA表达降低,并随着海拔高度的上升和缺氧时间的延长逐渐降低。**结论** 高原急性缺氧对大鼠食欲有抑制作用;高原急性缺氧后下丘脑Y1受体mRNA表达降低,这可能是大鼠食欲减退的重要原因之一。

关键词: 急性缺氧; 下丘脑; Y1受体; RT-PCR

中图法分类号: R339.54; R341.6; R394.2 **文献标识码**: A

Effect of acute hypoxia at simulated high altitude on the appeptite and expression of Y1 receptor mRNA in rat hypothalamus

TIAN Xiu-ling, MI Man-tian, WEI Na, ZHOU Yong (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of acute hypoxia on the appetite and expression of Y1R mRNA in rat hypothalamus. Methods A total of 117 male Wistar rats were randomly divided to raise at plain (n = 9), or in the altitude chambers imitating the environment at 3 000 m, 4 000, 5 000 m and 6 000 m for respectively 1 d, 2 d and 3 d (n = 9 at each altitude for different period of time). The change of appetite was observed and the expression of Y1R mRNA in rat hypothalamus was measured by using the technique of semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Results After acute exposure to hypoxia, the appetite of rats decreased. The expression of Y1R mRNA could be detected in rat hypothalamus of hypoxia groups and control group. After acute exposure to hypoxia, the expression of Y1R mRNA decreased in rat hypothalamus with the rise of altitude and time prolonging ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion The acute hypoxia might decrease food intake of rats. After acute exposure to hypoxia, the expression of Y1R mRNA decreased in rat hypothalamus, which is one of important reasons for loss of appetite.

Key words: acute hypoxia; hypothalamus; Y1 receptor; RT-PCR

下丘脑是神经内分泌的中枢,也是食欲调节的中枢,其内存在着复杂的"食欲调节网络"。下丘脑的"食欲调节网络"通过各种食欲调节因子(包括食欲促进因子和食欲抑制因子)的信号传递作用,对哺乳动物的食欲进行综合调节[1]。神经肽Y (neuropeptide Y, NPY)是重要的食欲促进因子,与其受体Y1(Y1R)结合后对机体可产生食欲促进作用。研究表明,急进高原人员早期反应最常见的是胃肠道症状,恶心、呕吐和食欲减退可高达60%[2]。急进高原人员出现食欲减退是否与下丘脑中NPY受体Y1有关尚不清楚。本研究通过模拟高原急性缺氧条件下大鼠下丘脑NPY受体Y1 mRNA表达的变化,以初步探讨急性缺氧后食欲减退的作用机制。

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA182)
Supported by the Mandatory Scientific Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01MA182)

作者简介:田秀灵(1973-),女,重庆市人,硕士,实验师,主要从事高原营养方面的研究,现在高原军事医学系高原卫生学教研室。电话:(023)68753714

通讯作者:糜漫天,电话:(023)68752292

收稿日期:2005-06-10;**修回日期**:2005-07-24

1　材料与方法

1.1　实验动物和分组

健康雄性 Wistar 大鼠 117 只（第三军医大学大坪医院实验动物中心提供），体质量 180～200 g，分为平原对照组（$n=9$）、3 000 m 缺氧组、4 000 m 缺氧组、5 000 m 缺氧组和 6 000 m 缺氧组，每组 27 只，设置缺氧后 1、2、3 d 3 个时相点，每个时相点 9 只动物。

1.2　实验试剂

Tripure 分离试剂（Roche 公司产品），Oligo-（dT）$_{18}$、RNA 酶抑制剂、M-MuLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶（上海生工生物工程技术服务有限公司产品），DNA 分子量标准（北京鼎国生物工程技术服务有限公司产品）。

1.3　动物模型

各缺氧组大鼠于低压舱内缺氧，模拟的海拔高度分别为：3 000、4 000、5 000、6 000 m。早晨 8:00 将大鼠及称量好的饲料和水放入舱内，以 100 m/min 速度减压，到达相应的海拔高度后分别停留 1、2、3 d（其中每天返回平原 0.5 h 以清扫、喂食及称量饲料）。

1.4　检测指标与方法

1.4.1　饲料消耗量的观察　　记录对照组和各海拔高度缺氧 3 d 组大鼠每天的平均饲料消耗量。

1.4.2　RT-PCR　　①提取总 RNA：取大鼠下丘脑组织 100 mg，用 1 ml Tripure 试剂提取总 RNA，详细步骤参见试剂盒说明书。紫外分光光度计检测 RNA 的含量及 $D(260)/D(280)$ 值，并保存于 −70 ℃。②逆转录：取 3 μg 总 RNA，加入 Oligo-（dT）$_{18}$，无菌水至 11 μl，75 ℃、5 min。加入 5 × 反应缓冲液、RNA 酶抑制剂、dNTP、无菌水至 19 μl，37 ℃、5 min，加入 M-MuLV 逆转录酶至 20 μl，42 ℃、1 h 进行逆转录，70 ℃、10 min 灭活逆转录酶。③PCR 扩增引物：PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。Y1 受体的引物序列为：上游引物：5′-AAC CTC TCC TTC TCA GAC TTG C-3′，下游引物：5′-CAC AGT GTT GAA GAT GGT AAG G-3′[3]，扩增片段为 615 bp；内参照 GAPDH 的引物序列为：上游引物：5′-TGC CTT CTC TTG TGA CAA AGT GG-3′，下游引物：5′-CAT TGC TGA CAA TCT TGA GGG AG -3′[4]，扩增片段为 386 bp。④PCR 扩增条件：反应总体积 50 μl，加入模板 DNA 3 μl，扩增片段上游和下游引物终浓度为 0.3 μmol/L。扩增 Y1 受体和 GAPDH 的反应参数均为：94 ℃ × 10 min；94 ℃ × 30 s，60.2 ℃ × 30 s，72 ℃ × 1 min，39 个循环；最后延伸 72 ℃ × 3 min。PCR 产物 5 μl 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳后，紫外透射仪下观察并照相，密度扫描分析 PCR 产物带，Y1 受体 mRNA 的表达水平以 Y1R/GAPDH 比率来计算。

1.5　统计学分析

用 SPSS 10.0 统计软件对实验数据进行方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　大鼠饲料消耗量的变化

平原对照组没有明显变化，而各海拔高度缺氧 3 d 组大鼠每天的饲料消耗量组均较对照组逐渐降低（图 1）。

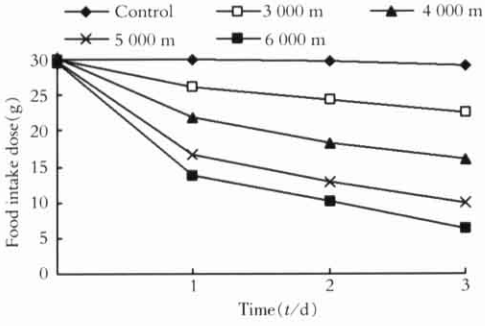
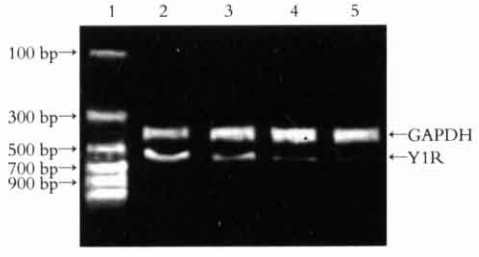


图 1　模拟高原急性缺氧对大鼠饲料消耗量的影响

Fig 1　Effect of acute hypoxia at imitated high altitude on food intake of rats

2.2　RT-PCR

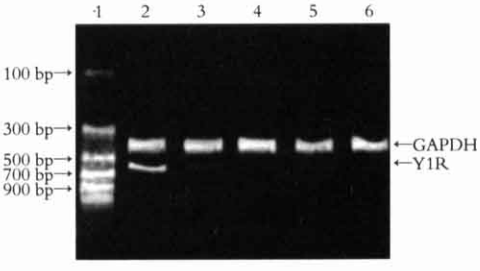
结果显示，缺氧组和对照组大鼠下丘脑中均存在 Y1 受体 mRNA 的表达。高原急性缺氧后，大鼠下丘脑 Y1 受体 mRNA 表达低于对照组（$P<0.05$，$P<0.01$）。相同海拔高度，Y1 受体 mRNA 表达随缺氧时间的延长逐渐降低；相同缺氧时间，Y1 受体 mRNA 表达随海拔高度的升高逐渐降低（图 2～4）。



1：PCR marker；2：Control group；3：1 d；4：2 d；5：3 d

图 2　模拟 5 000 m 海拔高度急性缺氧对大鼠下丘脑 Y1R mRNA 表达的影响

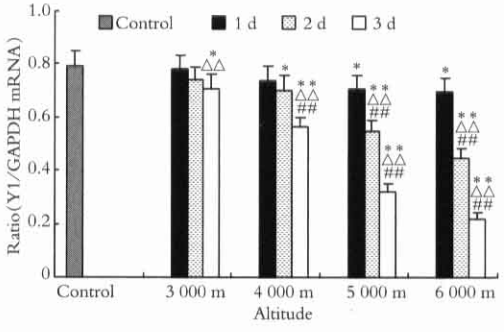
Fig 2　Effect of continuous acute hypoxia on the expression of Y1R mRNA in hypothalamus of rats at 5 000 m altitude



1：PCR marker；2：Control group；3：3 000 m group；4：4 000 m group；5：5 000 m group；6：6 000 m group

图 3　模拟不同海拔高度急性缺氧 3 d 对大鼠下丘脑 Y1R mRNA 表达的影响

Fig 3　Effect of continuous acute hypoxia for 3 d at different altitudes on the expression of Y1R mRNA in hypothalamus of rats



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △△: $P<0.01$, *vs* 1 d; ##: $P<0.01$, *vs* 3 000 m

图4 模拟高原急性缺氧对大鼠下丘脑 Y1 受体 mRNA 表达的影响

Fig 4 Effect of acute hypoxia at imitated high altitude on the expression of Y1R mRNA in rat hypothalamus

3 讨论

低氧是高原环境的主要特征,高原缺氧可引起机体食欲减退。本研究模拟高原急性缺氧后,大鼠的饲料消耗量减少,提示高原急性缺氧可使大鼠食欲减退。

NPY 自 1982 年 Tatemoto 等首先从猪脑中分离提纯并报道其氨基酸顺序后,已引起许多科研工作者的关注,并进行了大量的研究。现已知道, NPY 是含量最为丰富的神经肽之一,广泛分布于中枢神经系统和多种外周组织,作用十分复杂。在中枢神经系统, NPY 可增加摄食,抑制呼吸,降低血压和调节体温,调节下丘脑激素的合成和释放等[5]。NPY 有多种受体亚型,其中 Y1 受体亚型是介导 NPY 引起食欲促进作用的受体亚型[6],本实验应用 RT-PCR 的方法观察到大鼠下丘脑组织中有 NPY Y1 受体 mRNA 存在,证实下丘脑组织中有 NPY Y1 受体合成,即有 NPY Y1 受体分布。用 RT-PCR 方法观察到急性缺氧后,大鼠下丘脑中 Y1 受体 mRNA 表达低于对照组,并随海拔高度的上升和缺氧时间的延长逐渐减弱,提示急性缺氧可使大鼠下丘脑组织中 NPY Y1 受体合成减少,进而可导致 NPY Y1 受体水平降低。已有大量文献报道,运用 Y1 受体激动剂能有效刺激动物进食,反义基因或拮抗剂则抑制进食;将 NPY 注入 Y1 受体缺陷(Y1 -/-)小鼠的脑室后,其摄食活动明显减少;在饥饿状态下,Y1 受体的基因表达增加;将 Y1 受体拮抗剂 BIBO3304 和 SR120562A 分别注入大鼠第 3 脑室(3V)后,由 NPY 诱导的进食行为明显受到抑制,而由禁食所诱导的进食行为只受到轻微的抑制[7-9],由此推测,急性缺氧后下丘脑 Y1 受体水平降低,可能是大鼠食欲减退的重要因素之一。

本研究结果显示急性缺氧后下丘脑组织表达 Y1 受体与 NPY 的变化趋势一致,提示 NPY 对其功能性受体 Y1 受体的表达调节有重要作用。高原急性缺氧导致下丘脑组织中 NPY 合成水平降低[10],NPY 对其功能性受体 Y1 受体的表达调节作用也随之下降,由于 NPY 对食欲和能量平衡具有重要调节作用,因此急性缺氧引起 NPY 水平及其受体 Y1 受体的表达降低,不利于急性缺氧后机体维持正常的摄食活动。通过上调其功能性受体 Y1 受体的表达,可能对高原急性缺氧后食欲的恢复具有重要意义。

参考文献:

[1] Kalra S P, Dube M G, Pu S, *et al*. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight[J]. Endocr Rev, 1999, 20(1): 68-100.

[2] 方允中, 顾景范. 高原营养[M]. 北京:解放军出版社,1989. 153-156.

[3] Ferrier L, Segain J P, Bonnet C, *et al*. Functional mapping of NPY/PYY receptors in rat and human gastro-intestinal tract[J]. Peptides, 2002, 23(10): 1765-1771.

[4] Liu M, Shen L, Doi T, *et al*. Neuropeptide Y and lipid increase apolipoprotein AIV gene expression in rat hypothalamus[J]. Brain Res, 2003, 971(2): 232-238.

[5] Bina K G, Cincotta A H. Dopaminergic agonists normalize elevated hypothalamic neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone, body weight gain, and hyperglycemia in ob/ob mice[J]. Neuroendocrinology, 2000, 71(1): 68-78.

[6] Zimanyi I A, Fathi Z, Poindexter G S. Central control of feeding behavior by neuropeptide Y[J]. Curr Pharm Des, 1998, 4(4): 349-366.

[7] Kanatani A, Mashiko S, Murai N, *et al*. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice[J]. Endocrinology, 2000, 141(3): 1011-1016.

[8] Xu B, Kalra P S, Moldawer L L, *et al*. Increased appetite augments hypothalamic NPY Y1 receptor gene expression: effects of anorexigenic ciliary neurotropic factor[J]. Regul Pept, 1998, 75-76: 391-395.

[9] Polidori C, Ciccocioppo R, Regoli D, *et al*. Neuropeptide Y receptor(s) mediating feeding in the rat: characterization with antagonists[J]. Peptides, 2000, 21(1): 29-35.

[10] 田秀灵,糜漫天,许红霞. 模拟不同海拔高度和缺氧时间对大鼠下丘脑中神经肽 Y mRNA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(11): 943-945.

(编辑 薛国文)