DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.11.003
第26卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 11
2004年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2004

文章编号:1000-5404(2004)11-0943-03

论著

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

田秀灵,糜漫天,许红霞 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨急性缺氧对大鼠下丘脑组织神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)mRNA 表达的影响。方法 78 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组和缺氧组。缺氧组大鼠被置于低压氧舱内模拟高原急性缺氧,其海拔高度分别为 3 000、4 000、5 000、6 000 m,同一海拔高度观察的时相点分别为 1、2、3 d。采用 RT-PCR(逆转录-聚合酶链式反应)方法,检测急性缺氧条件下大鼠下丘脑组织中 NPY mRNA 的表达。结果 ① 缺氧组和对照组大鼠下丘脑组织中均存在 NPY mRNA 的表达;② 在相同缺氧时间下,大鼠下丘脑组织中 NPY 的 mRNA 表达随着海拔高度的上升呈逐渐下降的趋势;③ 在相同海拔高度下,大鼠下丘脑组织中 NPY 的 mRNA 表达随着缺氧时间的增加呈逐渐下降的趋势。结论 急性缺氧可降低大鼠下丘脑组织中 NPY mRNA 的表达。

关键词:神经肽 Y;急性缺氧;RT-PCR
中图法分类号:R338.27;R339.54;R845.22 文献标识码:A

Effects of different altitudes and acute hypoxia for different time on the expression of NPY mRNA in the rat hypothalamus

TIAN Xiu-ling, MI Man-tian, XU Hong-xia (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of acute hypoxia on the expression of neuropeptide Y (NPY) mRNA in the rat hypothalamus. Methods A total of 78 Wistar rats were randomly divided into 13 groups ($n=6$ in each group): control group and 12 experimental groups. Rats in the experimental groups were exposed to hypoxia in the hypobaric chamber simulating the altitudes of 3 000, 4 000, 5 000, and 6 000 m for 1, 2, and 3 d, respectively. The expression of NPY mRNA in the rat hypothalamus under the condition of acute hypoxia was detected by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results ① Expression of NPY mRNA was detected in the rat hypothalamus in the experimental groups and the control group. ② Under the condition of acute hypoxia for the same time, the expression of NPY mRNA in the rat hypothalamus showed the tendency of decrease at increasing altitudes; ③ At the same altitude, expression of NPY mRNA in the rat hypothalamus decreased gradually with the increasing time for acute hypoxia. Conclusion Acute hypoxia can decrease the expression of NPY mRNA in the rat hypothalamus.

Key words: neuropeptide Y; acute hypoxia; RT-PCR

研究显示,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%[1]。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"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[2]。神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)作为该网络中的一种食欲促进因子,在机体的摄食活动中发挥了重要的食欲促进作用。急进高原人员出现食欲减退是否与缺氧后下丘脑组织中 NPY 分泌减少有关尚不清楚。为此,本研究在模拟高原急性缺氧条件下采用 RT-PCR 方法对下丘脑组织 NPY mRNA 的表达情况做半定量研究,以初步探讨 NPY 表达的变化与急性缺氧的关系。

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA182)
Supported by the Madatory 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,助理实验师,主要从事高原营养方面的研究。电话:(023)68752291
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2004-02-27;修回日期:2004-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 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、TagDNA 聚合酶(上海生工生物工程技术服务有限公司产品), 100 bp DNA Marker(北京鼎国生物工程技术服务有限公司产品)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作及分组 健康雄性 Wistar 大鼠 78 只(大坪医院实验动物中心提供), 体质量 180~200 g, 随机分为 13 组(每组 6 只)。其中 1 组作平原对照组, 另 12 组作实验组。自由进食(普通饲料)、饮水。实验组大鼠被置于低压氧舱(第三军医大学高原军事医学系提供)内模拟高原急性缺氧。海拔高度分别为 3 000、4 000、5 000、6 000 m; 各海拔高度观察的时相点又分为 1、2、3 d 组。

1.2.2 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 A_{260}/A_{280} 比值, 并保存于 -70 ℃。

1.2.3 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。

1.2.4 PCR 扩增引物 PCR 引物由上海生工生物工程技术公司合成。NPY 的引物序列为: 上游引物: 5′-GCT AGG TAA CAA ACG AAT GGG G-3′, 下游引物: 5′-CAC AGT GTT GAA GAT GGT AAG-3′[3], 扩增片段为 288 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′[3], 扩增片段为 386 bp。

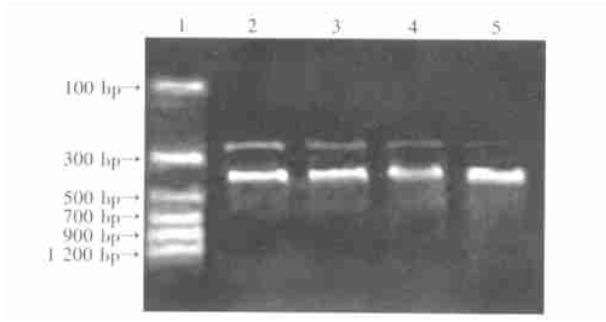
1.2.5 PCR 扩增条件 反应总体积 50 μl, 加入模板 DNA 3 μl, 扩增片段上游和下游引物终浓度为 0.3 μmol/l。扩增 NPY 和 GAPDH 的反应参数均为: 94 ℃× 10 min; 94 ℃× 30 s, 60.5 ℃× 30 s, 72 ℃× 1 min, 39 个循环; 最后延伸 72 ℃× 3 min。PCR 产物 5 μl 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳后, 紫外透射仪下观察并照相, 密度扫描分析 PCR 产物带, NPY m RNA 的表达水平以 NPY/GAPDH 比率来计算。

1.4 统计学分析

实验数据用 SPSS 10.0 统计软件包行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

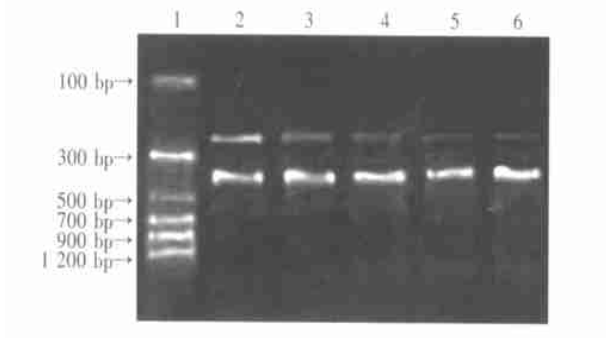
RT-PCR 结果显示, 缺氧组和对照组大鼠下丘脑组织中均存在 NPY mRNA 的表达, 缺氧组 NPY mRNA 表达均低于对照组。在相同缺氧时间下, 大鼠下丘脑组织中 NPY 的 mRNA 表达随着海拔高度的上升呈逐渐下降的趋势; 在相同海拔高度下, 大鼠下丘脑组织中 NPY 的 mRNA 表达随着缺氧时间的增加呈逐渐下降的趋势。3 000 m 组, 缺氧 3 d 的表达明显低于对照组($P<0.05$); 4 000 m 组, 缺氧 2 d 和 3 d 的表达明显低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$); 5 000 m 组和 6 000 m 组, 缺氧 1、2 和 3 d 的表达均明显低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$)(图 1~3)。



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

图 1 模拟 5 000 m 海拔高度持续性急性缺氧对大鼠下丘脑 NPY mRNA 表达的影响

Fig 1 Effects of continuous acute hypoxia on the expression of NPY mRNA in hypothalamus of rats at 5 000 m altitude



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

图 2 模拟不同海拔高度持续性急性缺氧 3 d 对大鼠下丘脑 NPY mRNA 表达影响

Fig 2 Effects of continuous acute hypoxia for 3 days at different altitude on the expression of NPY mRNA in hypothalamus of rats

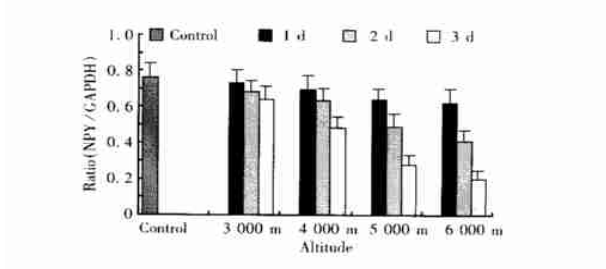


图 3 模拟不同海拔高度急性缺氧对大鼠下丘脑 NPY mRNA 表达的影响

Fig 3 Effects of acute hypoxia on NPY mRNA expression in rat hypothalamus at different altitude

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

NPY 是 Tatemoto 等[4] 于 1982 年首次从猪脑中提取的一种含 36 个氨基酸的单链多肽, 属胰多肽家族。NPY 广泛分布于哺乳动物的中枢和外周神经系统中, 在摄食、体温、血压、情绪、生殖等许多方面发挥着生理调节作用。NPY 在下丘脑的含量很高, 主要分布于下丘脑的弓状核(ARC)神经元, 少部分分布于室旁核(PVN)、背中核(DMN)等区域, 并形成相互投射的神经环路[5]。本实验用 RT-PCR 方法观察到大鼠下丘脑组织中有 NPY mRNA 存在, 证实下丘脑组织中有 NPY 合成。研究表明[6], NPY 通过与受体 Y1 和 Y5 相互作用, 在动物的摄食活动中发挥了十分重要的食欲促进作用。持续中枢注入 NPY 可使大鼠产生特征性的夜间阵发性进食行为, 这种行为与正常大鼠的进食行为非常相似, 提示正常大鼠的夜间阵发性进食行为是 NPY 释放所引起的[2]; 将非修饰的磷酸二酯寡聚脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)序列注入大鼠大脑脑室内, 可使 NPY 的合成受到阻碍。将 ODNs 显微注入 ARC 中, 发现能减弱与 NPY 相关的动物进食活动。但要想完全阻碍 NPY 在进食活动中的作用, 则必须长期抑制 NPY 的基因表达[7]; Flynn 等[8] 还发现, 大鼠脑室(ICV)给予 NPY、NPY-36 或 PP, 可使大鼠下丘脑组织其产生 2 h 的短期进食行为。本研究显示, 模拟不同海拔高度及不同缺氧时间, 各缺氧组大鼠与对照组相比, 其下丘脑组织中 NPY mRNA 表达均有不同程度的降低。提示, 急性缺氧使下丘脑组织中 NPY 合成减少, 导致 NPY 水平降低, 从而使下丘脑组织中 NPY 的食欲促进作用减弱, 这可能是急性缺氧后机体食欲减退的重要因素之一。另外, 本研究中实验组大鼠下丘脑组织中 NPY mRNA 表达随缺氧时间的延长或海拔高度的增加逐渐降低, 进一步提示, 急性缺氧条件下, 下丘脑组织中 NPY 的食欲促进作用可随缺氧时间的延长或海拔高度的增加而逐渐减弱。

目前对急性缺氧导致下丘脑 NPY 表达下调的原因尚不完全清楚, 推测与以下因素有关: ①高原急性缺氧作为一个强烈刺激作用于机体, 可导致丘脑下部大量分泌促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)[9]。研究表明[10], CRH 是一种食欲抑制因子, 其限制食欲的作用位点在下丘脑室旁核(PVN)内。向 PVN 中注入 CRH, 能抑制 NPY 诱导的摄食行为。急性缺氧时, CRH 的大量分泌, 可能使下丘脑 NPY 的表达受到抑制。②研究表明[11], 下丘脑弓状核(ARC)存在葡萄糖-敏感神经元, 该神经元同时有 NPY 存在。这些神经元可通过感应脑组织中血糖水平的升高或降低来抑制或促进 NPY 的分泌。急性缺氧时, 交感神经-肾上腺髓质系统和下丘脑-腺垂体-肾上腺皮质轴兴奋, 可使血糖浓度升高, 这可能导致 NPY 的表达降低。③有研究表明[2], 瘦素(Leptin)可以降低 ARC 中 NPY 的基因表达, 并能抑制 NPY 的食欲促进作用, 而急性缺氧后它是否也同样抑制了 NPY 的表达, 还有待于进一步的研究。

参考文献:

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

[2] 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.

[3] Liu M, Shen L, Doi D, *et al*. Neuropeptide Y and Lipid increase apolipoprptein AIV gene expression in rat hypothalamus[J]. Brain Research, 2003, 971(2): 232－238.

[4] Tatemoto K, Carlquist M, Mutt V. Neuropeptide Y－a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide[J]. Nature, 1982, 296(5858): 659－660.

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

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

[7] Kalra P S, Kalra S P. Use of antisense oligodeoxynucleotides to study the physiological functions of neuropeptide Y[J]. Methods, 2000, 22(3): 249－254.

[8] Flynn M C, Turrin N P, Plata-Salaman C R, *et al*. Feeding response to neuropeptide Y-related compounds in rats treated with Y5 receptor antisense or sense phosphothio-oligodeoxynucleotide[J]. Physiol Behav, 1999, 66(5): 881－884.

[9] Kant G J, Oleshansky M A, Walczak D D, *et al*. Comparison of the effects of CRF and stress on levels of pituitary AMP and plasma ACTH *in vivo*[J]. Peptides, 1986, 7(6): 1153－1158.

[10] Heinrichs S C, Menzaghi F, Pich E M, *et al*. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y[J]. Brain Res, 1993, 611(11): 18－24.

[11] Shinji Muroya, Toshihiko Yoda, Seiji Shioda, *et al*. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y[J]. Neurosci Lett, 1999, 264(1-3): 113－116.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net