

誌謝

當完成這本畢業論文時，實在無法以筆墨完全形容出此刻心中的喜悅。回想起當初是個沒有自信、不善言語表達及缺乏思考的自己，但在老師們的教導及鼓勵之下，重新拾獲了正向的自我價值觀並調整了對問題的思考模式及觀念的角度，在這 2 年的研究生生涯中真的讓我獲益良多！更衷心感謝王慧如老師總是不厭其煩的耐心教導及引導正確思考方向，並在老師的身上學習到了對於研究應有的態度及精神！同時也感謝口試委員楊齊生老師、林靜茹老師在論文上的指導與建議。在整個論文完成的過程中謝謝佩珊學姊、蕙郁、典妮、竹菀、玲瑜在實驗上的指導及協助，及在我壓力變大及心情不好時給予最多精神支持與鼓勵的家人與同學，由於你們讓我能順利的完成學業，於此衷心感謝！

中文摘要

本研究室之前結果得知，腺核 γ 並非經由催產素神經元來達到抑制食之行為。因此，本論文欲探討神經勝 γ 神經元在腺核 γ 接受器致效劑所誘導之厭食行為中所扮演得角色。先將大白鼠食物剝奪 24 小時，並在腦室注射藥物後立即讓大白鼠恢復進食，並記錄第 1、2、3、4 小時的攝食量。結果指出給予 $10\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 神經勝 γ 無法阻斷 $10\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ N^6 -cyclopentyladenosine (CPA, A_1 接受器致效劑) 或 $1\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ CGS21680 (CGS, A_{2a} 接受器致效劑) 所引起大白鼠之攝食量降低的作用 ($P > 0.05$)。在免疫化學染色結果顯示，食物剝奪 24 小時的大白鼠在腦室注射 1、5、 $10\ \mu\text{g}$ CPA 或 CGS 2 小時後，下視丘弓形核和室旁核神經勝 γ 的表現量並不受到影響 ($P > 0.05$)，這些證據表示腺核 γ 抑制攝之作用應與神經勝 γ 無關。接著利用雙重組織免疫化學在經腦室內注射秋水仙素的大白鼠腦中觀察神經勝 γ 細胞是否表現腺核 γ 接受器，結果發現神經勝 γ 與腺核 γ 接受器表現的位置非常接近，但無明確的證據顯示兩者共同存於同一神經元，因此更支持了前面之實驗結果，亦即腺核 γ 厭食之作用並不經由抑制神經勝 γ 神經元而達成。為更進一步探討內生性腺核 γ 對於攝食的調節作用，故在正常情形下由腦室給予 1、5 及 $10\ \mu\text{g}$ DPCPX (A_1 接受器拮抗劑) 或 ZM-2413851 (ZM, A_{2a} 接受器拮抗劑)，結果顯示注射 $10\ \mu\text{g}$

DPCPX 能顯著增加攝食 ($P < 0.05$), 但是 ZM 並不影響攝食量 ($P > 0.05$)。本研究顯示雖然內生性腺核 γ A₁接受器致效劑為一飽食因子, 且在形態學上亦發現神經 γ Y 神經元附近有腺核 γ 接受器; 然而, 神經 γ Y 神經元並不媒介外生性腺核 γ 所誘導的厭食作用。

目錄

誌謝.....	1
中文摘要.....	2
圖目錄.....	5
壹、前言.....	6
貳、材料與方法.....	16
參、結果.....	24
肆、討論.....	28
伍、參考文獻.....	34
英文摘要.....	53

圖目錄

圖一、腦室內注射神經胜? Y 對腺核? 接受器致效劑引起降低大白鼠攝食行為作用的影響之流程圖。	43
圖二、腦室內注射腺核? A ₁ (DPCPX) 或 A _{2a} (ZM) 接受器拮抗劑對大白鼠食物攝取的影響之流程圖。	44
圖三、神經胜? Y (NPY) 對腺核? A ₁ 接受器致效劑 CPA 引起之厭食行為的影響。	45
圖四、神經胜? Y (NPY) 對腺核? A _{2a} 接受器致效劑 CGS 引起之厭食行為的影響。	46
圖五、腺核? A ₁ 接受器致效劑 CPA 對神經胜? Y 表現量的調節作用。	47
圖六、腺核? A _{2a} 接受器致效劑 CGS 對神經胜 Y 表現量的調節作用。	48
圖七、腺核? 接受器與神經胜? Y 神經元分佈之分佈。	49
圖八、腦室內注射腺核? A ₁ 接受器拮抗劑對大白鼠攝食行為的影響。	51
圖九、腦室內注射腺核? A _{2a} 接受器拮抗劑對大白鼠攝食行為的影響。	52

壹、前言

隨著國人生活水準提高、飲食方式日趨西化影響，許多文明病也因此相繼發生。而精緻化、高熱量、高油脂飲食，使國人在食物熱量攝取方面超過消耗所需的熱量，又因繁忙的生活步驟無法維持規律性的運動，進而導致肥胖的產生。且於 2000 年有文獻指出，在美國，肥胖（BMI > 30）的盛行率男性有 31.4 % 女性有 35.5 %；加拿大，肥胖的盛行率男性有 35 % 女性有 27 %；在台灣肥胖的盛行率（男性 14.6 %，女性 15.8 %）約為美國、加拿大之半，且有逐年增加的趨勢（郭清輝，2000^b）。肥胖者身體會累積了過多的脂肪組織，這是導致很多疾病的危險因子之一，包括：糖尿病、高血壓、心血管疾病、血脂肪異常、膽囊疾病以及一些癌症，例如：乳癌、大腸癌等都與肥胖有關，其所帶給病患的痛苦和社會的負擔相當大，所以我們必須很嚴肅的把肥胖看成一種慢性疾病，因此減肥便被視為重要的課題。然而，肥胖又與飲食有著絕對關係，所以若想維持其正常體重，便要設法在能量的攝取與消耗之間達一平衡，如此一來，便能擁有健康的身體。

一、腺核？：

曾有文獻指出，腺核？（Adenosine）能有效抑制攝食的發生（Levine & Morley, 1982）。腺核？是屬於一種嘌呤類核？（Purine nucleoside），是由含氮鹽基與五碳糖組成，若在其五碳糖之 5'端接

上 1 至 3 個磷酸以進行磷酸化時，則分別形成單磷酸腺核糖（ Adenosine monophosphate , AMP ）、二磷酸腺核糖（ Adenosine diphosphate , ADP ）、三磷酸腺核糖（ Adenosine triphosphate , ATP ）等核糖酸（ Nucleotides ）。腺核糖可作為生理能量來源的主要分子結構（例如：三磷酸腺核糖），亦可擔任細胞內第二傳訊分子 cAMP 主要成分（ Linden , 1994 ），更是構成核酸或輔酶的材料。且腺核糖存在於身體各個細胞中，可由部分神經末梢分泌，故可視為神經傳導物質。此外，細胞外腺核糖的濃度會受到腺核糖脫胺基酵素（ Adenosine deaminase ）及腺核糖運送蛋白（ Adenosine transporter ）調控，當細胞消耗較多 ATP 時，釋放出的代謝產物腺核糖也會伴隨增加，當細胞處於缺氧、缺血（ Ischemic ）或受到壓力時，腺核糖會藉由腺核糖運送蛋白自細胞內快速地釋放出來（ Baynes & Dominiczak , 2001 ; Williams , 1990 ）；而釋放出的腺核糖，在腺核糖脫胺基酵素作用之下胺基轉變成羧基而形成肌核糖（ Inosine ），然後在黃嘌呤氧化酶（ Xanthine oxidase , XO ）的催化下轉成亞黃嘌呤（ Hypoxanthine ），並在同一酵素的催化之下進一步轉成尿酸（ Uric acid ）。除此，腺核糖也可由腺核糖運送蛋白再吸收回細胞（ Baynes & Dominiczak , 2001 ; Linden , 1994 ）。腺核糖對生理功能的影響相當廣泛，包括神經、心血管、腸胃、呼吸、泌尿生殖與淋巴系統均接受其調節。腺核糖

？在周邊 (Peripheral) 可抑制心跳、心臟收縮力、脂肪分解、糖質新生以及促進血管擴張 (Lavoine et al., 1987 ; Mills, 1999) ; 在中樞神經系統可止痛、抗抽搐、鎮靜、降低運動活性 (Locomotor activity) 保護神經活性 (Neuroprotection) 減少多巴胺神經元之活性 (Dopaminergic activity)(Linden, 1994), 此外腺核？還具有抑制食物攝取的功能。

(一) 腺核？與攝食行為之關係

經由皮下或靜脈注射腺核？或肌核？皆能有效抑制攝食行為 (Capogrossi et al., 1979; Levine & Morley, 1982; Levine & Morley, 1983), 於周邊或中樞腦室注射腺核？、腺嘌呤或單磷酸腺核？皆能減少攝食量 (Levine & Morley, 1982), 也可抑制鴉片類藥物所誘導的攝食增加 (Capogrossi et al., 1979); 本實驗室先前研究顯示由靜脈或腦室給予腺核？致效劑的確能有效降低攝食行為 (劉佳宜, 2000 ; 林佩珊, 2001), 腺核？亦可從脂肪組織產生與釋放, 並調節脂肪組織之代謝, 故在下視丘攝食調節中樞與脂肪組織之能量儲存間, 腺核？可能扮演為一回饋信號角色 (Capogrossi et al., 1979)。

(二) 腺核？接受器的作用

腺核？必須透過細胞膜上和 G-蛋白連結的接受器產生作用。目前已有四種腺核？接受器被發現, 包括: A₁、A_{2a}、A_{2b}、A₃ 等 (Collis

& Honrani, 1994)。

1、腺核? A₁ 接受器

腺核? A₁ 接受器可經由 G_i-蛋白抑制腺核? 環化 (Adenylate cyclase) 而降低細胞內 cAMP 的產生。在中樞腺核? A₁ 接受器廣泛分佈在脊髓 (Spinal cord)、三叉神經節 (Trigeminal ganglia)、海馬迴 (Hippocampus)、大腦皮質 (Cerebral cortex)、視丘 (Thalamus)、下視丘 (Hypothalamus)、延腦 (Medulla) 等區域 (Deuchars et al., 2001; Glass et al., 1996; Linden, 1994; Schindler et al., 2001); 在周邊則廣泛分佈在睪丸 (Testis)、脂肪 (Fat)、心臟 (Heart)、腎臟 (Linden, 1994)。位於脂肪組織之腺核? A₁ 接受器, 可抑制腺核? 環化 及增加胰島素促進葡萄糖運輸之作用 (Insulin-stimulated glucose transport), 而腎臟之腺核? A₁ 接受器會降低腎絲球過濾壓 (Glomerular filtration pressure) 並產生抗利尿 (Antidiuresis) 之效果; 於中樞之腺核? A₁ 接受器可降低體溫 (Hypothermia) 及抑制鈣離子依賴 (Ca⁺⁺ dependent) 的興奮性傳導物質釋放 (Anderson et al., 1994; Linden, 1994)。

2、腺核? A₂ 接受器

其作用與腺核? A₁ 接受器相反, 可透過 G_s-蛋白的作用進而活化

腺核？環化，在中樞腺核？ A_2 接受器廣泛分佈在被殼（Putamen）、尾核（Caudate nucleus）、蒼白球（Globus pallidus）、小腦（Cerebellum）、下視丘、海馬迴等區域，在周邊則廣泛分佈在大腸（Large intestine）、盲腸（Cecum）、膀胱（Bladder）（Christofi et al., 2001；Linden, 1994）。另外，有文獻指出腺核？ A_2 接受器和 D_2 多巴胺接受器會一同表現在紋狀體的神經元（Striatal neurons）中，然而，這兩種接受器，對於腺核？環化的調控是扮演著相反機制；活化腺核？ A_2 接受器會促進cAMP形成，活化 D_2 多巴胺接受器則會抑制cAMP形成（Fink et al., 1992；Linden, 1994）。且活化多巴胺接受器時大白鼠會產生旋轉行為（Turning behavior），於紋狀體直接給予腺核？ A_2 接受器致效劑後，則可抑制大白鼠旋轉情形（Mally & Stone, 1996）。

3、腺核？ A_3 接受器

在大白鼠中，腺核？ A_3 接受器表現在睪丸中；人類的腺核？ A_3 接受器最主要分佈在松果體（Pineal）、肺臟（Lung）、脾臟（Spleen）；至於，腺核？經由腺核？ A_3 接受器對於中樞的調控作用仍尚未清楚（Linden, 1994）。

（三）、腺核？抑制攝食的機轉

腺核？各個接受器分佈的位置及作用雖然非常的廣泛，然而，至

今仍無法釐清腺核？抑制攝食之行為究竟經由何種接受器調控。曾有文獻報告，經由腦室給予腺核？致效劑 N^6 -R-phenylisopropyladenosine (R-PIA) 反而會刺激攝食，而在給予腺核？拮抗劑 caffeine 後，仍無法阻斷 R-PIA 所誘導的攝食增加情形；但 R-PIA 所誘導的增加攝食之行為則可被鴉片類之拮抗劑 (Naloxone) 阻斷，所以 R-PIA 為一非專一性致效劑 (Levine et al., 1989)，故在本實驗中將給予動物，專一性較高的腺核？致效劑 N^6 -cyclopentyladenosine (A_1 接受器致效劑, CPA) 與 CGS-21680 (A_{2a} 接受器致效劑, CGS)，以探討腺核？抑制攝食之作用機轉。

二、中樞與攝食行為調控之關係

身體是個複雜結構，正常人之所以能維持正常體重是由於能量的攝取與消耗達到平衡；而能量的攝取與消耗則靠下視丘來調控 (郭清輝, 2000^a)，傳統觀念中腹內側核 (Ventromedial Hypothalamus; VMH) 即為所謂的飽食中樞；當興奮刺激此部位時，會有飽食感並減少食物的攝取，若破壞此區域則會過度攝食進而導致肥胖；而外側區 (Lateral Hypothalamus; LH) 為一進食中樞，當破壞此區域會減少攝食和飲水並降低體重，若興奮此部位時，則會增加食物的攝取進而導致肥胖。另外，近年來的研究指出下視丘的弓形核 (Arcuate nucleus; ARC)、視上核 (Supraoptic nucleus; SON) 與室旁核

(Paraventricular nucleus ; PVN) 等亦是調控攝食行為的重要區域 (Anand & Brobeck, 1951 ; Bernardis & Bellinger, 1996 ; Gold, 1973 ; Swanson & Sawchenko, 1983 ; 吳崇榮, 2002)。當破壞室旁核時, 會導致過度攝食及增加體重 (Cox & Sims, 1988); 而給予神經毒素 (Neurotoxins) 例如: 秋水仙素 (Colchicine) 或 MSG (Mono sodium glutamate) 破壞大白鼠之弓形核後, 其攝食型態與節律會產生變化, 即進食次數減少與攝食時間增長 (Stricker-Krongrad et al., 1998), 因此推論這些區域製造或作用之神經傳導物質可能參與了攝食行為的調控。

三、神經胜? Y :

1980 年代即有研究指出, 神經胜? Y 能有效的刺激食慾增加攝食 (Clark et al., 1984 ; Clark et al., 1987), 神經胜? Y 為一 36 個胺基酸所組成的胜? (Peptide), 廣泛地存在中樞與周邊神經系統, 下視丘的神經胜? Y 主要由位於弓形核之神經細胞所合成, 再投射至室旁核與其它神經核, 例如: 外側區、背側核 (Dorsomedial nucleus) 以及下視丘其它區域 (Billington et al., 1994 ; Inui, 2000 ; Kalra et al., 1999); 當給予注射秋水仙素至腹內側核 (Ventromedial nucleus) 或以 MSG 破壞弓形核後, 會抑制下視丘神經胜? Y (neuropeptide Y) 基因表現及降低下視丘神經胜? Y 濃度

或釋放至室旁核的 NPY 量 (Bergen & Mobbs, 1996 ; Hideki et al., 2002 ; Inui, 2000 ; Jain et al., 1998 ; Stricker-Krongrad et al., 1996) ; 位於弓形核的神經胜? Y 的表現會受瘦體素 (Leptin) 所調控, 瘦體素是由 169 個胺基酸所組成蛋白質, 由脂肪組織合成, 可降低下視丘弓形核中神經胜? Y 的作用 (Inui, 1999 ; Kalra et al., 1997 ; 郭清輝, 2000^a) 。而在缺乏瘦體素 (leptin deficiency) 的 ob/ob 小鼠、或缺乏瘦體素接受器之 db/db 小鼠, 其下視丘弓形核神經胜? Y mRNA 的表現量會增加, 且釋放至室旁核的 NPY 量也會伴隨著增加 (Dryden et al., 1995^a ; Erickson et al., 1996) 。當能量缺乏 (例如: 在禁食情況之下) 或能量代謝增加時, 神經胜? Y 神經元會受到活化, 神經胜? Y 的合成和分泌也會增加 (Baskin et al., 1999 ; Chance et al., 1994) , 且下視丘之神經胜? Y 對於許多生理功能皆有影響, 包括參與血壓、心跳、抽搐 (Seizure) 、焦慮 (Anxiety) 的調節作用 (Balasubramania, 1997) , 但最顯著的作用是刺激進食與能量攝取 (Sahu & Kalra, 1993 ; Inui, 1999) 。神經胜? Y 必須透過細胞膜上和 G-蛋白連結的接受器產生作用, 目前已有六種神經胜? Y 接受器被發現, 包括: Y₁、Y₂、Y₃、Y₄、Y₅、Y₆ 除了 Y₃ 之外其餘皆已被純株化 (Cloned) 出來 (Balasubramania, 1997 ; Balasubramania, 2002) 。

神經胜? γ 與攝食行為及能量調節之關係

經由腦室或室旁核注射神經胜? γ 後，會減少棕色脂肪 (Brown adipose tissue ; BAT) 的產熱作用 (Thermogenesis)、降低能量消耗 (Energy expenditure) 及增加食物之攝取，因而促進脂肪儲存最後導致肥胖 (Billington et al., 1991 ; Egawa et al., 1991 ; Zarjevski et al., 1993) ; 此外，中樞給予神經胜? γ Y_1 或 Y_5 受器之拮抗劑後，則會抑制自發性及神經胜? γ 所誘導的攝食行為 (Dube et al., 1995 ; Ishihara et al., 1998 ; Kanatani et al., 1996 ; Polidori et al., 2000) 。在剔除神經胜? γ Y_1 接受器 (Knock-out) 的大白鼠中，攝食量、體重、活動力 (Locomotor) 都明顯降低，棕色脂肪中去偶合蛋白 (Uncoupling protein ; UCP-1) 的含量則顯著增加 (Pedrazzani et al., 1998 ; Polidori et al., 2000) ; 在神經胜? γ Y_5 接受器剔除的大白鼠中也有攝食量及體重降低之情形 (Inui, 2000 ; Michel et al., 1998) , 所以， Y_1 、 Y_5 接受器在神經胜? γ 所誘導的增加攝食調控作用中扮演其重要角色。下視丘的神經胜? γ 也會影響某些激素的釋放，例如：皮質固醇 (Corticosterone)、胰島素 (Insulin)、泌乳素 (Prolactin)、生長激素 (Growth hormone ; GH) 等，而這些激素皆參與能量的代謝 (Aravich & Sladek, 1986 ; Billington et al., 1991 ; Devenport et

al., 1987 ; Leibowitz et al., 1988)。

由前述得之，腺核 δ 為一有效抑制大白鼠攝食之行為，且由本實驗室之前實驗結果亦發現，經由腦室給予催產素接受器拮抗劑後，並無法有效阻斷 CPA 或 CGS 所誘導之攝食量降低，顯示腺核 δ 並非經由催產素神經元，來達抑制攝食之行為（林佩珊，2001）；然而，神經勝 δ Y 與催產素扮演著相反之作用，且有文獻指出，給予血清胺神經元（Serotonin, 5-HT）之拮抗劑 Methysergide 後，可顯著增加下視丘神經勝 δ Y mRNA 含量以及增加室旁核神經勝 δ Y 的分泌，亦即血清胺神經元抑制攝食之作用可經由抑制神經勝 δ Y 來而達成（Dryden et al., 1995^b）；故推論腺核 δ 抑制攝食行為之效果亦可能經由抑制神經勝 δ Y 神經元而達成。

實驗目的：

1. 給予神經勝 δ Y 是否可阻斷腺核 δ 致效劑所誘導的降低攝食行為？
2. 腺核 δ 對神經勝 δ Y 神經元活性的調節作用。
3. 利用雙重免疫組織化學染色以觀察腺核 δ 接受器與神經勝 δ Y 神經元之關係。
4. 腦室注射腺核 δ 接受器拮抗劑對大白鼠食物攝取之影響。

貳、材料與方法

一、實驗藥物

一般藥物均購自 Sigma、USB、Merck 等公司。腺核 α 接受器致效劑 CPA、CGS 購自 Sigma；腺核 α 接受器拮抗劑 DPCPX、ZM 與神經胜 α 接受器拮抗劑 L-152,804 則購自 Tocris。

二、實驗動物

所有的實驗動物為購自國科會的 Sprague-Dawley (SD) 品系雄性大白鼠，體重介於 300 - 350 g。飼養室光照週期控制於 12 小時光照 (0700 開始)、12 小時黑暗 (1900 開始)，室溫維持在 21 \pm 之間。除了依實驗所需剝奪食物外，其餘時間皆不限制飲水和食物。

三、右側腦室插管手術

將雄性大白鼠以腹腔注射 (Intraperitoneal injection; I.P.) chloral hydrate (3.6 g/kg, Merck) 麻醉之後，固定於立體定位儀上，並剔除頭部毛髮，縱切皮層後使頭骨暴露出，以立體定位儀將留置針 (22 G) 置於頭骨 Bregma 右側 0.14 cm、及後方 0.08 cm 處，插入腦膜下方約 0.38 cm 的右側腦室位置 (Paxinos & Watson, 1986)，此時若有腦脊髓液 (Cerebral spinal fluid, CSF) 流出，即可確定

留置針已在右側腦室中，之後在留置針周圍鎖上小螺絲，再以牙科膠（dental cement）將其完全固定，使留置針不會滑動，以利於日後注射藥物時能將藥物正確的打入右側腦室中，之後將傷口以 3-0 的縫線給於縫合，並於傷口縫合後，連續給予 5 天皮下注射（Subcutaneous injection, S.C.）Penicilline 3000 IU/rat，以防止傷口感染。

四、實驗流程及步驟

動物施行腦室插管手術後，單獨飼養於塑膠籠中，並給於 5 天的恢復期，於恢復期間每日監測大白鼠攝食量、及傷口癒合狀況，以淘汰狀況不佳的大白鼠。並且每日以細針（26 G）探入留置針，以確保留置針的通暢。所有腦室內注射的實驗皆在 1100 - 1200h 間完成。

實驗一、腦室內注射神經胜? Y 對於腺核? 致效劑所誘導之 厭食行為的影響

本實驗室先前研究顯示，由中樞腦室給予 N⁶-cyclopentyladenosine (CPA) 10 μg/5 μl 或 CGS-21680 (CGS) 1 μg/5 μl，可顯著降低大白鼠經食物剝奪所引起之攝食行為 (林佩珊, 2001); 故此實驗採用此劑量。

每隻動物在腦室插管手術之後 4 - 5 天的恢復期間，每天於腦室內注射 5 μl 生理食鹽水，使其能適應腦室內注射方式，及確保留置針的通暢。

大白鼠於腦室注射藥物前，先剝奪食物 24 小時，並經由隨機方式分配組別，每隻動物均給予 2 次注射 (每組各 10 隻)，先施予生理食鹽水 5 μl 或 10 μg/5 μl 神經胜? Y (NPY, Tocris)，5 分鐘後再給予 10 μg/5 μl 腺核? A₁ 接受器致效劑 CPA 或 1 μg/5 μl 腺核? A_{2a} 接受器致效劑 CGS，對照組則給予 5 μl 生理食鹽水。隨後讓大白鼠恢復進食，並記錄第 1、2、3、和 4 小時的食物攝取量 (實驗之流程圖見圖一)。

各組結果以 mean ±SD 表示，並採用單項變方分析 (ANOVA) 與 Tukey's test 來檢驗，當機率 < 0.05 時 (p < 0.05) 即視為有顯著差異性。

實驗二、腺核 γ 對神經胜 γ Y神經元活性的調節作用

採用本實驗室之前腦組織切片 (林佩珊, 2001), 其動物實驗方式是在食物剝奪 24 小時後, 分別由腦室給予不同劑量的 CPA 或 CGS (1 μ g/5 μ l、5 μ g/5 μ l、10 μ g/5 μ l) 或生理食鹽水 5 μ l 並於 2 小時之後由腹腔給予 35 mg/kg 戊基巴比妥鹽 (Sodium pentobarbital) 深度麻醉後, 在呼吸及心跳尚未停止之前將胸腔切開, 並以止血鉗夾住下腔靜脈, 接著由左心室注射 1000 IU 肝素 (Heparin), 以 18 號靜脈留置針穿刺左心室至主動脈出口後, 依序注入含 2% 亞硝酸鈉 (Na nitrite) 之生理食鹽水及 4% 副福馬林 (Paraformaldehyde)。完成灌流後將腦組織取出, 浸泡於 4% 副福馬林中 4 小時後, 再保存於 4 $^{\circ}$ C 的 30% 的蔗糖 (Sucrose) 溶液, 至腦組織完全沉澱為止。將腦組織置於 -20 $^{\circ}$ C 的冷凍切片機中, 以 40 μ m 的厚度作連續冠狀切片, 並將腦組織切片保存於含 0.1M 磷酸氫鈉緩衝液、30% 蔗糖、30% ethylene glycol、1% polyvinylprolidone 的抗凍液 (Cryoprotectant) 中。

組織以每隔 6 片取一片的方式, 以進行神經胜 γ Y 免疫組織化學染色之染色; 於染色前將組織由抗凍液中取出, 以 0.05M Potassium phosphate buffered saline (KPBS) 緩衝液清洗組織後, 再浸泡於 1% H_2O_2 15 分鐘, 以減少內生性過氧化反應, 之後再以 0.05M KPBS

終止其反應。接著將組織切片與神經胜? Y 初級抗體 (1 : 100,000) 於 4 °C 中反應 48 小時後，以 0.05M KPBS 清洗，並加入稀釋的 600 倍之次級抗體 (Biotin - conjugated anti - rabbit IgG ; Jackson Immuno Research Laboratories , West Grove , USA) 於室溫下反應 1 小時；經過 0.05M KPBS 清洗組織切片後，加入與過氧化 (Horse-radish peroxidase ; HRP) 結合的卵白素 - 生物素複合體 (Avidin - biotin complex ; Vector laboratories, Burlingame, USA)，放置室溫下 1 小時後，再以 0.05M KPBS 清洗，並將組織切片置於呈色溶液中反應(包含 175mM 醋酸鈉、2.5mg/ml NiSO₄、0.2mg/ml Diaminobenzidine 與 0.025 % 過氧化氫) 使神經胜? Y 呈現藍黑色。

於染色步驟完成後，將下視丘弓形核 (Arcuate nucleus , ARC) 及室旁核 (Paraventricular , PVN) 之區域置於光學顯微鏡下以影像分析系統 (Optimas) 量化二處之神經胜? Y 含量，神經胜? Y 量以每單位面積中有多少 % 含量表示。

各組結果以 mean \pm SD 表示，並採用單項變方分析 (ANOVA) 與 Tukey's test 來表示，當機率 < 0.05 時 (p < 0.05) 即視為有顯著差異性。

實驗三、利用雙重免疫組織化學染色觀察腺核？接受器與神經胜？ γ 神經元之關係。

在正常進食的情況之下，給予腦室內注射 100 μ g/10 μ l 秋水仙素 (Colchicine)，48 小時後給於灌流犧牲。組織以每隔 12 片取一片的方式進行雙重免疫組織化學染色 (Double label immunocytochemistry, ICC)。

於染色前將組織由抗凍液中取出，以 0.05M KPBS 緩衝液清洗組織，再浸泡於 1% NaBH_4 ，之後將組織切片與神經胜？ γ 初級抗體 (1:25,000) 置於 4 $^\circ\text{C}$ 中反應 48 小時後，再以 0.05M KPBS 清洗終止其反應，並加入稀釋 600 倍之次級抗體 (Alkaline phosphatase-conjugated IgG) 於室溫下反應 1h，並於 0.05M KPBS 清洗後，在避光情況之下將組織切片置於呈色劑 (Red substrate; VECTOR Laboratories, USA) 中反應 40 分鐘，使神經胜？ γ 神經元呈現紅色螢光。

在完成神經胜？ γ 染色後，再度將組織與 A_1 或 A_{2a} 初級抗體 (1:5000) 反應 48 小時，其後的步驟同前述，但次級抗體為 (Biotin-conjugated IgG) 且最後與 5 μ g/ml 結合上 Alexa 488 的 streptavidin (Molecular probes) 於 37 $^\circ\text{C}$ 中反應 3 小時，使 A_1 或 A_{2a} 接受器呈現綠色螢光。

所有完成的組織切片，置於生理食鹽水中並依序排列至載玻片上，再以蒸餾水清洗使組織洗去鹽分並以 50 % glycerol 封片。將玻片置於螢光顯微鏡下，觀察神經元？ Y 神經元上是否有腺核？ A₁ 或 A_{2a} 接受器表現。

實驗四、腦室注射腺核？接受器拮抗劑對大白鼠食物攝取之影響

每隻大白鼠於正常進食行況之下，於腦室內注射不同劑量的腺核？ A_1 接受器拮抗劑 (DPCPX) ($1\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ 、 $5\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ 、 $10\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$) 或 A_{2a} 接受器拮抗劑 (ZM-241385, ZM) ($1\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 、 $5\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 、 $10\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$) 或 DMSO，隨後立即恢復進食並記錄第 1、2、3 和 4 小時的食物攝取量。每隻大白鼠經由隨機順序重複接受 DMSO 和不同劑量的腺核？ A_1 或 A_{2a} 接受器拮抗劑，每次注射後至少間隔 48 小時才給予下一次藥物。

各組結果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示並採用重複取樣單項變方分析與 Tukey's test 來檢定，當機率 < 0.05 ($p < 0.05$) 即視為具有顯著差異。(實驗流程見圖二)。

參、結果

實驗一、腦室內注射神經胜? Y 對於腺核? 致效劑所誘導之 厭食行為的影響

在食物剝奪 24 小時的大白鼠中，腦室內注射 $10\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 神經胜? Y 可顯著增加第一小時及 4 小時內的總攝食量(圖三、分別增加為對照組的 1.9 倍與 1.5 倍)(圖四、分別增加為對照組的 2.1 倍及 2 倍)($p < 0.01$)。

而腺核? 接受器致效劑對攝食行為則有抑制作用。腦室內注射 $10\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 腺核? A_1 接受器致效劑 (CPA) 或 $1\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 腺核? A_{2a} 接受器致效劑 (CGS) 的動物，其攝食量皆顯著降低，(分別為對照組 2 % 與 10%)($p < 0.01$)。

然而，同時給予 $10\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 神經胜? Y 和腺核? 接受器致效劑後，CPA 或 CGS 所引起大白鼠攝食量降低的作用並未被阻斷。亦即只要注射腺核? 接受器致效器，不論有無外給神經胜? Y 情況之下，其大白鼠的攝食量皆會顯著性降低。

實驗二、腺核 γ 對神經勝 γ Y 神經元活性的調節作用

神經勝 γ Y在下視丘室旁核與弓形核主要以神經纖維分布為主，故藉助電腦影像分析系統來計算此二區域的含量。

當大白鼠接受腦室內給予不同劑量的 CPA 處理之後，其下視丘室旁核與弓形核神經勝 γ Y 的表現量與控制組相比較之下，並不具有顯著性統計的差異 ($p > 0.05$) (圖五)；相同的，給予腦室內不同劑量的 CGS 後，其室旁核與弓形核神經勝 γ Y 的表現量與控制組互相比較之下，仍不具顯著性統計的差異 ($p > 0.05$) (圖六)。

實驗三、利用雙重免疫組織化學染色觀察腺核？接受器與神經元？ Y 神經元之關係

腦室給予 100 μ g/10 μ l 秋水仙素後，藉由雙重免疫組織化學染色則觀察到，弓形核（圖七，A, B，紅色螢光）中含有非常豐富的神經元？ Y 細胞本體（）及纖維（），有少部分細胞本體顯現 A₁ 接受器（圖七，A，綠色螢光，），但 A_{2a} 受器則全部位於神經纖維上（圖七，B，綠色螢光，），弓形核之神經元？ Y 細胞本體中無 A₁ 或 A_{2a} 接受器表現，但其附近有腺核？ A₁ 與 A₂ 接受器末梢的分佈（圖七，A, B，），而表現 A₁ 受器的細胞也和神經元？ Y 的纖維非常接近（圖七，A，）。

於室旁核（圖七，C, D）則觀察到，神經元？ Y（）與 A₁ 接受器末梢（圖七，C，）分佈區域有重疊，且有少數神經細胞本體可表現腺核？ A₁ 接受器，而其周圍有神經元？ Y 末梢的分佈（圖七，C，），但此區域 A_{2a} 接受器（圖七，D，）的分佈則只在神經纖維上，而其區域和神經元？ Y 神經末梢有部分重疊，但兩者並不位於同一條纖維。（圖七，D）。

經秋水仙素處理後，於下視丘無 A_{2a} 細胞本體表現，但於尾核有 A_{2a} 細胞本體的分佈（圖七，E，），表示於弓形核、室旁核只有 A_{2a} 纖維。

實驗四、腦室注射腺核 δ 接受器拮抗劑對大白鼠食物攝取之影響

腦室內注射 $1\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 、 $5\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 、DPCPX 的大白鼠，其攝食量與控制組互相比較之下並無顯著變化 ($P > 0.05$)。但給予 $10\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ DPCPX 後大白鼠第 1 小時之攝食量則顯著增加 (增加為對照組的 5.36 倍, $P < 0.01$)，且此現象維持到第 4 小時 (增加為對照組的 2.95 倍, $P < 0.05$)。(圖八)

腦室內注射 $1\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 、 $5\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ 、 $10\ \mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ ZM 的動物，其攝食量與控制組互相比較之下並無顯著改變 ($P > 0.05$)。(圖九)

肆、討論

在 Levine 與 Morley (1982) 的研究指出，腺核 δ 或其代謝產物肌核 δ ，經由皮下、腹腔或靜脈注射皆可有效抑制攝食行為，而他們更進一步指出，不論經由中樞注射至腦室或周邊給予腺核 δ ，皆可有效抑制食物剝奪之攝食量。

經由本實驗室之前實驗結果發現得知，腺核 δ 並非經由催產素神經元，達到抑制攝食行為之作用 (林佩珊, 2001)。因此，本論文欲探討腺核 δ 中樞抑制攝食之機制是否經由神經勝 δ Y 神經元而達成。

神經勝 δ Y 對腺核 δ 接受器致效劑降低攝食之影響

由實驗一得知，腦室內注射神經勝 δ Y 並無法有效防止腺核 δ 接受器致效劑 CPA 或 CGS 所造成之大白鼠攝食量降低的作用。1997 年有文獻指出腦室內給予 $10\mu\text{g}$ 神經勝 δ Y 確實能夠有效增加攝食量 (Gunn et al., 1997)，且本實驗結果亦顯示同一劑量的神經勝 δ Y 可顯著增加攝食行為，故我們推論，腺核 δ 接受器致效劑並非經由降低中樞神經勝 δ Y 神經元之活性而達到抑制攝食之作用。亦即只要注射腺核 δ 接受器致效器，不論有無外給神經勝 δ Y 情況之下其大白鼠之攝食量皆會顯著降低。有文獻指出引起厭食的勝 δ (Anorectic neuropeptide) 例如：glucagon-like peptide 1 (GLP-1) 可經由 Gs 蛋白質活化 adenylylate cyclase 而增加 cAMP 的合成 (Sheriff et

al., 2003), 相對促進食慾的胜? (orexigenic neuropeptide) 如 : 神經胜? γ 會活化 G_i 蛋白質進而抑制 adenylate cyclase 活化的合成 (Sheriff et al., 2003)。而將可通過細胞膜的 cAMP (membrane-permeable cAMP) 致效劑 adenosine-3',5'-cyclic monophosphorothioate Sp-iosmer (Sp-cAMP) 注射至穹窿核 (perifornical hypothalamus , PFA), 則可顯著降低自發性或神經胜? γ 所誘導的攝食量增加 (Sheriff et al., 2003), 雖然腺核? A_1 接受器可經由 G_i 蛋白降低 cAMP 的形成, 但由實驗一以及本實驗室之前的研究得知, 中樞單獨注射腺核? A_1 接受器致效劑後大白鼠攝食量並無增加反而受到抑制, 因此 cAMP 在調節攝食作用的角色可能因神經核的區域不同而不一樣。相似的矛盾關係也存於紋狀體 (Striatum) 中, 神經胜? γ 能增加紋狀體中多巴胺的轉換及釋放 (Aoki & Pickel, 1990), 而腺核? A_1 接受器則可降低紋狀體中多巴胺的分泌 (Cass & Zahniser, 1991 ;), 故於紋狀體中, 刺激神經胜? γ 與腺核? A_1 接受器對於多巴胺神經元有互相拮抗的結果。雖然腺核? A_1 接受器與神經胜? γ 皆可降低 cAMP 的形成, 顯然兩者不可能作用到同一細胞上。相反地腺核? A_{2a} 接受器則可增加 cAMP 的合成且中樞單獨注射腺核? 的確可顯著抑制大白鼠的攝食量; 因此, 神經胜? γ 和 A_{2a} 接受器似乎可能作用至同一路徑而影響攝食, 但以本

文的研究結果顯示事實並非如此，因為神經胜？ γ 並無法拮抗 A_{2a} 接受器致效劑的作用，故推測，神經胜？ γ 與腺核？會作用至腦部不同區域而影響攝食行為。

腺核？對神經胜？ γ 神經元活性的影響

神經元的活性往往可以反應在其神經傳導物質的製造率，因此我們利用神經胜？ γ 的表現量，來評估腺核？對神經胜？ γ 神經元活性之影響電腦影像分析的結果顯示，不論是弓形核或室旁核其神經胜？ γ 表現量，並不受腺核？接受器致效劑之影響，因此推論，腺核？抑制攝食之作用，並非經由改變神經胜？ γ 活性所產生。雖然藥物注射 2 小時內可能蛋白質表現量的變化幅度較小，不易以免疫組織化學染色的方法偵測，但實驗一的結果亦顯示，腺核？接受器致效劑抑制攝食的作用，無法被神經胜？ γ 所阻斷；所以，腺核？在中樞抑制攝食之機制，可能是經由調節其它神經元活性而達成。

腺核？接受器與神經胜？ γ 神經元之分佈

由於免疫組織化學染色法只能觀察到正常動物下視丘室旁核與弓形核的神經胜？ γ 神經纖維分佈，為了確認神經胜？ γ 細胞本體是否表現腺核？接受器，實驗中利用腦室內注射秋水仙素破壞神經元之微小管，降低其神經傳導物質傳送到神經末梢而增加細胞本體的蛋白質含量，以利分析觀察腺核？接受器與神經胜？ γ 神經元之間的關

係。過去只發現到腺核？ A_1 及 A_{2a} 接受器廣泛分佈在下視丘區域，然而尚不知分佈於下視丘何處；由實驗三首次發現到腺核？ A_1 與 A_{2a} 接受器分佈於弓形核、室旁核，且弓形核之神經胜？ γ 細胞本體附近有腺核？ A_1 及 A_{2a} 接受器之分佈，因此神經胜？ γ 神經元之活性有可能會受腺核？ 接受器之調控，至於兩者是否真正共同位於同一細胞中，則有賴電子顯微鏡或共軛交顯微鏡作進一步的分析。於室旁核則觀察到腺核？ A_{2a} 接受器與神經胜？ γ 神經末梢分佈的區域有部分重疊，但似乎未共同表現於同一神經纖維中，因在此區域中腺核？ 可能不經由 A_{2a} 接受器直接影響神經胜？ γ 的釋放；於室旁核中也觀察到，表現腺核？ A_1 接受器的細胞本體周圍有神經胜？ γ 之分佈末梢，因此推論，腺核？ 與神經胜？ γ 可能作用在同一個細胞上，至於這些細胞的真正身份仍然未知。在室旁核中可受神經胜？ γ 調節的細胞有促腎上腺皮質激素釋放因子 (Corticotropin-releasing factor, CRF)，當中樞給予神經胜？ γ 時，室旁核之 c-Fos 及 CRF 表現量皆有顯著增加，且於血漿中 ACTH 含量也會伴隨增加 (Haas & George, 1987; Herinerich et al., 1993; Wang et al., 2001)，因此在這些細胞中有部份可能也會表現腺核？ A_1 接受器，不過其生理意義必須再加以釐清，儘管在形態上面發現神經胜？ γ 與腺核？ 接受器表現的位置非常接近，但在實驗一中，神經胜？ γ 無法有效防止外給之腺核？ 接受

器致效劑所誘導的厭食行為，且於實驗二得知神經胜 γ 神經元之活性亦不受腺核 δ 接受器致效劑所調控；故外生性腺核 δ 的厭食作用顯然是無法被神經胜 γ 所調節。

腺核 δ 接受器拮抗劑對大白鼠食物攝取之影響

外生性的腺核 δ 固然具有抑制攝食的作用，然而中樞內生性腺核 δ 對於攝食的調節作用卻不是非常清楚，DPCPX 為一種對於腺核 δ A_1 接受器具有高度選擇性的拮抗劑，DPCPX 經由腹腔內注射即能有效阻斷中樞給予腺核 δ A_1 接受器致效劑所引發的低體溫(Anderson et al., 1994)；ZM 是一種對於腺核 δ A_{2a} 接受器具有高度選擇性的拮抗劑(Poucher et al., 1996)，ZM 不論經由口服、靜脈或十二指腸內注射，皆能有效抑制腺核 δ 引發的低血壓情形(Poucher et al., 1996)；故本實驗中選用 DPCPX、ZM 這兩種藥物來探討內生性腺核 δ 與攝食之關係。由實驗四得知，在飽食狀態下由腦室給予 $10 \mu\text{g}$ DPCPX 後，於第 1 及 4 小時總累積攝食量皆顯著增加，亦即在正常的生理情況之下內生性的腺核 δ 經由 A_1 接受器抑制了攝食行為，此證據說明了在大白鼠非攝食時段(白天)中，體內的腺核 δ 可能扮演了飽食因子的角色。然而本實驗之結果亦顯示，中樞給予不同劑量的 ZM 時，其攝食量與控制組相較之下並無顯著之差異，表示在正常的狀況之下，腺核 δ A_{2a} 接受器不參與攝食行為之調控。

本研究結果顯示，最先觀察到腺核 γ A_1 及 A_{2a} 接受器分佈於弓形核和室旁核，且腺核 γ A_1 接受器參與了內生性與外生性腺核 γ 的抑制攝食之作用，但腺核 γ A_{2a} 接受器則只在額外給予致效劑的刺激之下才具有抑制攝食的功能，儘管在形態上發現神經勝 γ Y與腺核 γ 接受器表現的位置相當接近，但以藥物活化中樞 A_1 或 A_{2a} 受器所誘發之厭食作用顯然和下視丘的神經勝 γ Y神經元無關，所以腺核 γ 在中樞抑制攝食之機制應是經由其它神經元所達成。

伍、參考文獻

吳崇榮，治療肥胖症藥物之現況，台灣醫學雜誌，45：31-36，2002

林佩嫻，腦室內注射腺核？致效劑對於攝食行為與催產素神經元活性之影響，中國醫藥學院，碩士論文，2001

郭清輝，瘦體素與體重，臨床醫學，45：321-3，2000^a

郭清輝，肥胖症，臨床醫學，46：200-4，2000^b

劉佳宜，腺核？對於下視丘與腦幹神經元活性的影響：自由進食與食物剝奪大白鼠之比較，中國醫藥學院，碩士論文，2000

Anand BK., Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale Journal of Biology & Medicine* 24: 123-40. 1951.

Anderson R., Sheehan MJ., Strong P. Characterization of the adenosine receptors mediating hypothermia in the conscious mouse. *British Journal of Pharmacology*. 113: 1386-90, 1994.

Aoki C., Pickel VM. Neuropeptide Y in the cortex and striatum. ultrastructural distribution and coexistence with classical neurotransmitters and neuropeptides. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 611: 186-205, 1990.

Aravich PF., Sladek CD. Vasopressin and glucoprivic-feeding behavior : a new perspective on an old peptide. *Brain Research*. 385: 245-52, 1986.

Balasubramaniam A. Neuropeptide Y family of hormones : Receptor subtypes and antagonists. *Peptides*. 18: 445-57,1997.

Balasubramaniam A. Clinical potentials of neuropeptide Y family of hormones. *The American Journal of Surgery*. 183: 430-4, 2002.

Baskin DG., Breininger JF., Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes*. 48: 828-33, 1999.

Baynes J., Dominiczak MH. 醫學生物化學, 潘淑芬譯, 藝軒, 台北, 2001

Bergen HT., Mobbs CV. Ventromedial hypothalamic lesions produced by gold thioglucose do not impair induction of NPY mRNA in the arcuate nucleus by fasting. *Brain Research*.707: 266-71, 1996.

Bernardis LL., Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited : Ingestive behavior. *Neuroscience and Biobehavior Review*. 20: 189-287. 1996.

Billington CJ., Briggs JE., HarkerS., Grace M., Levine AS. Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus : A center coordinating energy metabolism. *American Journal of Physiology*. 266: R1765-70, 1994.

Billington CJ., Briggs JE., Grace M., Levine AS. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *American Journal of Physiology*. 260: R321-7, 1991.

Capogrossi MC., Francendese A., Digirolamo M. Suppression of food intake by adenosine and inosine. *American Journal of Clinical Nutrition*. 32: 1762-8, 1979.

Cass WA., Zahniser NR. Potassium channel blockers inhibit D₂ dopamine, but not A₁ adenosine, receptor-mediated inhibition of striatal dopamine release. *Journal of Neurochemistry*. 57: 147-52, 1991.

Chance WT., Balasubramaniam A., Dayal R. Hypothalamic concentration and release of neuropeptide Y into the microdialysates is reduced in anorectic tumor-bearing rats. *Life Sciences*. 54: 1869-74, 1994.

Christofi FL., Zhang H., Yu JG., Guzman J., Xue J., Kim M., Wang YZ., Cooke HJ. Differential gene expression of adenosine A₁, A_{2a}, A_{2b}, and A₃ receptors in the human enteric nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 439: 46-64, 2001.

Clark JT., Kalra PS., Crowley WR., Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*. 115: 427-9, 1984.

Clark JT., Sahu A., Kalra PS., Balasubramaniam A., Kalra SP. Neuropeptide Y-induced feeding behavior in female rats : comparison with human NPY ([Met17]NPY) , NPY analog ([norLeu4]NPY) and peptide YY. *Regulatory Peptides*. 17: 31-9, 1987.

Collis MG., Hourani SMO. Adenosine receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*. 14: 360-6, 1994.

Cox JE., Sims JS. Ventromedial hypothalamic and paraventricular nucleus lesions damage a common system to produce hyperphagia. *Behavioural Brain Research*. 28: 297-308, 1988.

Deuchars SA., Brooke RE. and Deuchars J. Adenosine A₁ receptors reduce release from excitatory but not inhibitory synaptic inputs onto lateral horn neurons. *Journal of Neuroscience*. 21: 6308-20, 2001.

Devenpor L. Manes G. Thomas T. Mena S. Kem D. Knehans A. Aldosterone and the mobilization of energy. *Appetite*. 8: 81-90, 1987.

Dryden S., Pickavance L., Frankish HM., Williams G. Increased neuropeptide Y secretion in the hypothalamic paraventricular nucleus of obese (*fa/fa*) Zucker rats. *Brain Research*. 690: 185-8, 1995^a.

Dryden S., Wang Q., Frankish HM., Pickavance L., Williams G. The serotonin (5-HT) antagonist methysergide increases neuropeptide Y (NPY) synthesis and secretion in the hypothalamus of the rat. *Brain Research*. 699: 12-8, 1995^b.

Dube MG., Kalra PS., Crowley WR., Kalra SP. Evidence of physiological role for neuropeptide Y in ventromedial hypothalamic lesion-induced hyperphagia. *Brain Research*. 690: 275-8, 1995.

Egawa M., Yoshimatsu H., Bray G. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *American Journal of Physiology*. 260: R328-34, 1991.

Erickson JC., Hollopeter C., Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*. 274: 1704-7, 1996.

Fink JS., Weaver DR., Rivkees SA., Peterfreund RA., Pollack AE., Adler EM., Reppert SM. Molecular cloning of the rat A₂ adenosine receptor:

selective coexpression with D₂ dopamine receptors in rat striatum. *Molecular Brain Research*. 14: 186-95, 1992.

Glass M., Faull RLM., Dragunow M. Localisation of the adenosine uptake site in the human brain: a comparison with the distribution of adenosine A₁ receptors. *Brain Research*. 710: 79-91, 1996.

Glod RM. Hypothalamic obesity: The myth of the ventromedial nucleus. *Science*. 182: 488-90, 1973.

Gunn I., O'Shea D., Bloom SR. Control of appetite-the role of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide. *Journal of Endocrinology*. 155: 197-200, 1997.

Haas DA., George SR. Neuropeptide Y administration acutely increases hypothalamic corticotropin-releasing factor immunoreactivity : lack of effect in other rat brain regions. *Life Sciences*. 41: 2725-31, 1987.

Heinrichs SC., Menzaghi F., Pich EM., Hauger RL., Koob GF. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Research*. 611: 18-24, 1993.

Inui A. Neuropeptide Y feeding receptors-Are multiple subtypes involved? *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 43-46, 1999.

Inui A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. *Pharmacological Reviews*. 52: 35-55, 2000.

Ishihara A., Tanaka T., Kanatani A., Fukami T., Ihara M., Fukuroda T. A potent neuropeptide Y antagonist, 1229U91, suppressed spontaneous food

intake in Zucker fatty rats. *American Journal of Physiology*. 274: R1500-4, 1998.

Jain MR., Dube MG., Kalra SP., Kalra PS. Neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus is decreased during transient hyperphagia induced by microinjection of colchicine into the ventromedial nucleus of rats. *Neuroscience Letters*. 256: 21-4, 1998.

Kalra SP., Bube MG., Pu S., Xu B., Horvath TH., Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Review*. 20: 68-100, 1999.

Kalra PS., Bube MG., Xu B., Kalra SP. Increased receptor sensitivity to neuropeptide Y in the hypothalamus may underlie transient hyperphagia and body weight gain. *Regulatory Peptides*. 72: 121-30, 1997.

Kanatani A., Ishihara A., Asahi S., Tanaka T., Ozaki S., Ihara M. A potent neuropeptide Y Y1 receptor antagonist, 1229U91 : blockade of neuropeptide Y-induced and physiological food intake. *Endocrinology*. 137: 3177-82, 1996.

Lavoine A., Buc HA., Claeysens S., Pinosa M., Matray F. The mechanism by which adenosine decreases gluconeogenesis from lactate in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Journal*. 246: 449-54, 1987.

Leibowitz SF., Sladek C., Spencer L., Tempel D. Neuropeptide Y, epinephrine, and norepinephrine in the paraventricular nucleus : stimulation of feeding and release of corticosterone, vasopressin, and glucose. *Brain Research*. 21: 905-12, 1988.

Levine AS., Morley JE. Purinergic regulation of food intake. *Science*. 217: 77-9,1982.

Levine AS., Morley JE. Effect of intraventricular adenosine on food intake in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 19: 23-6, 1983.

Levine AS., Grace M., Krahn DD., Billington CJ. The adenosine agonist N6-R-phenylisopyladenosine (R-PIA) stimulates feeding in rat. *Brain Research*. 477: 280-5, 1989.

Linden J. *Basic Neurochemistry* , Raven Press , New York , 1994.

Mally J., Stone TW. Potential role of adenosine antagonist therapy in pathological tremor disorder. *Pharmacology and Therapeutics*. 72: 243-50, 1996.

Michel M., Beck-Sickinger A., Cox H., Doods HN., Herzog H., Larhammar D., Quiroon R., Schwartz T., Westfall T. International of pharmacology recommendations for the nomenclature of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide receptors. *Pharmacological Reviews*. 50: 143-9, 1998.

Mills SE. Regulation of porcine adipocyte metabolism by insulin and adenosine. *Journal of Animal Science*. 77: 3201-7, 1999.

Paxinos G., Watson C. *The rat brain stereotaxic coordinates* , Academic Press , London , 1986.

Pedrazzani T., Seydoux J., Kunstner P., Aubert JF., Grouzmann E.,

Beermann F., Brunner HR. Cardiovascular response, feeding behavior and locomotor activity in mice lacking the NPY Y1 receptor. *Nature Medicine*. 4: 722-6, 1998.

Polidori C., Ciccocioppo R., Regoli D., Massi M. Neuropeptide Y receptors mediating feeding in the rat: characterization with antagonists. *Peptides*. 21: 29-35, 2000.

Poucher SM., Keddie JR., Brooks R., Shaw G.R., Mckillop D. Pharmacodynamic of ZM 241385, a potent A_{2a} adenosine receptor antagonist, after enteric administration in rat, cat and dog. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 48: 601-6, 1996.

Sahu A., Kalra SP. Neuropeptidergic regulation of feeding behavior, Neuropeptide Y. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 4: 217-24, 1993.

Schindler M., Harris CA., Hayes B., Papotti M., Humphrey PP. Immunohistochemical localization of adenosine A1 receptors in human brain regions. *Neuroscience Letters*. 297: 211-5, 2001.

Sheriff S., Chance WT., Iqbal S., Rizvi TA., Xiao C., Kasckow JW., Balasubramaniam A. Hypothalamic administration of cAMP agonist/PKA activator inhibits both schedule feeding and NPY-induced feeding in rats. *Peptides*. 24: 245-54, 2003.

Stricker-Krongrad A., Beck B., Burlet C. Enhanced feeding response to neuropeptide Y in hypothalamic neuropeptide Y-depleted rats. *European Journal of Pharmacology*. 295: 27-34, 1996.

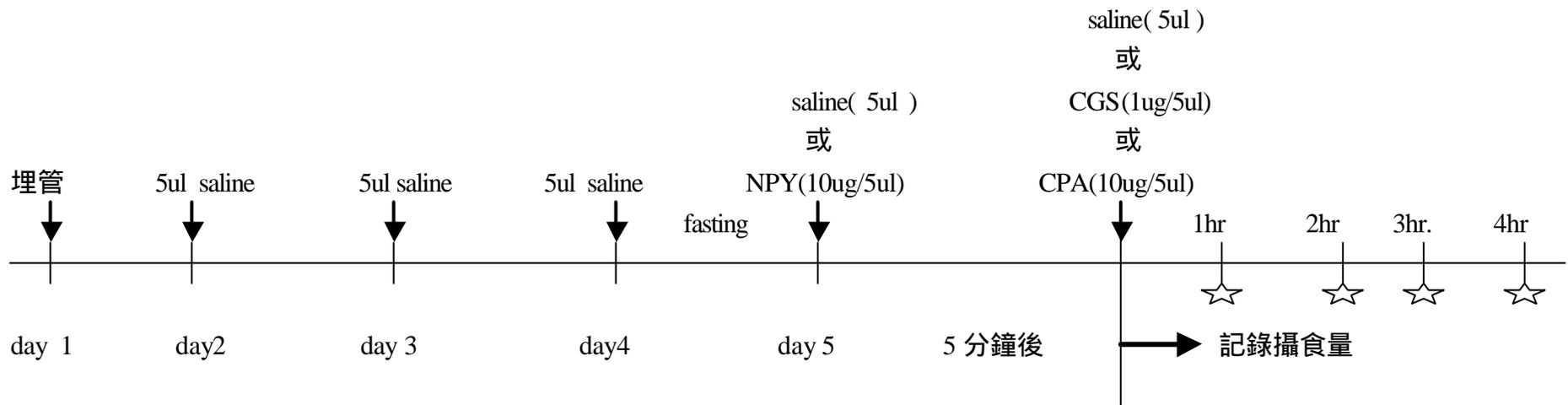
Stricker-Krongrad A., Burlet C., Beck B. Behavioral deficits in monosodium glutamate rats : specific changes in the structure of feeding behavior. *Life Sciences*. 62: 2127-32, 1998.

Swanson LW., Sawchenko PE. Hypothalamic integratio: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annual Review of Neuroscience*. 6: 269-324, 1983.

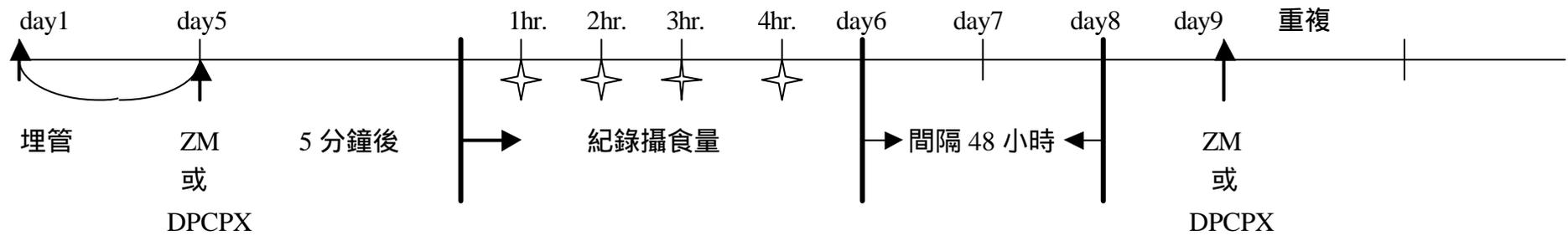
Wang C., Mullet MA., Glass MJ., Billington CJ., Levine AS., Kotz CM. Feeding inhibition by urocortin in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *American Journal of Physiology*. 280: R473-80, 2001.

Williams M. Purine nucleosides and nucleotides as central nervous system modulators. Adenosine as the prototypic paracrine neuroactive sudstance. *Annals of the New York Academy of Sicience*. 603: 93-107, 1990.

Zarjevski N., Cusin I., Vettor R., Rohner-Jeanrenaud F., Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology*. 133: 1753-8, 1993.

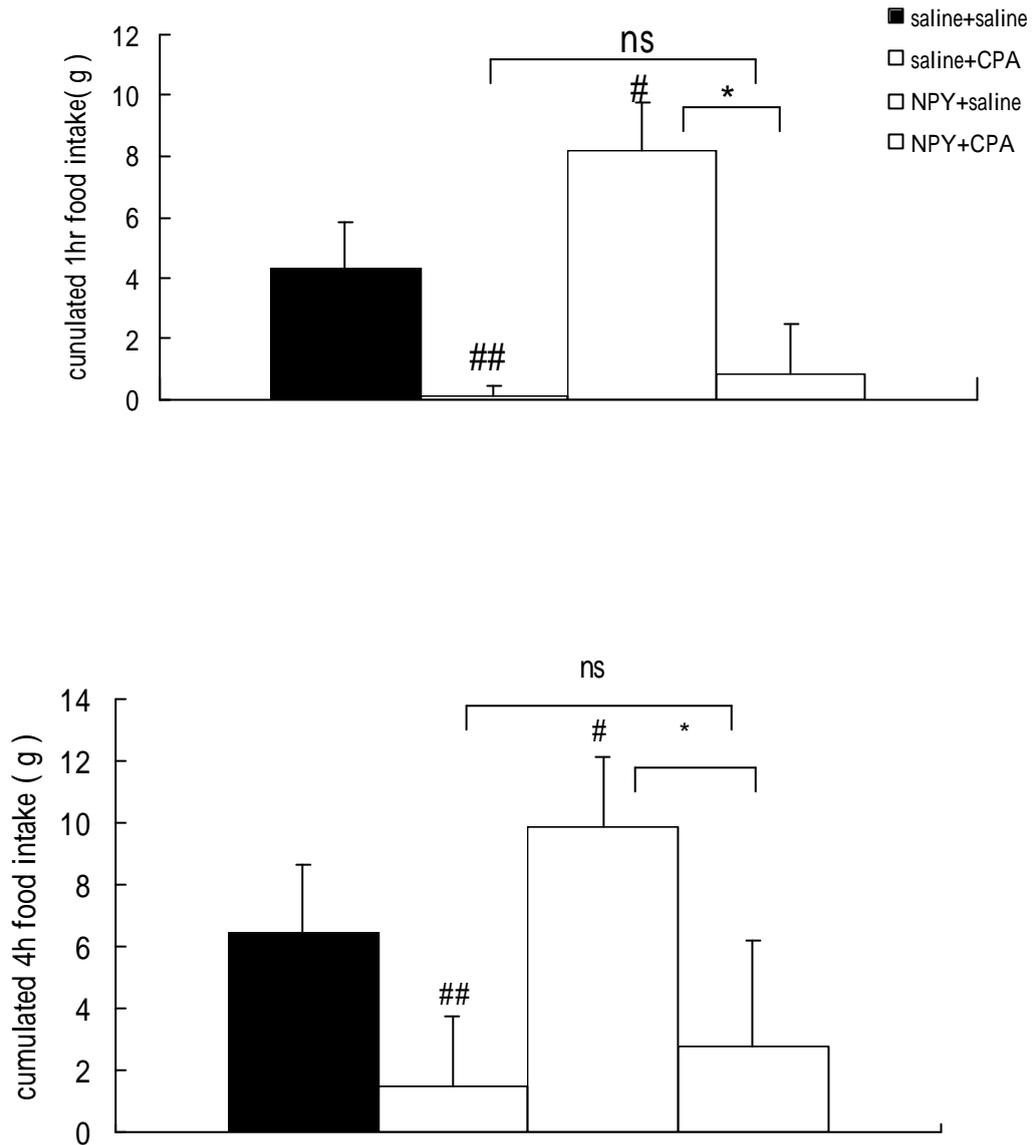


圖一、腦室內注射神經胜? Y 對腺核? A_1 (CPA) 或 A_{2a} (CGS) 接受器致效劑引起降低大白鼠攝食行為作用的影響之流程圖。☆ 攝食量紀錄時間。

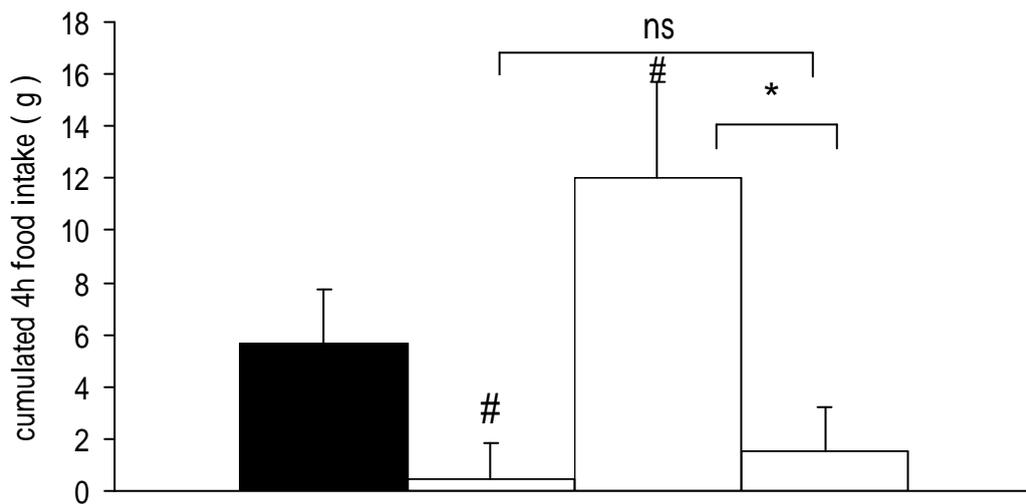
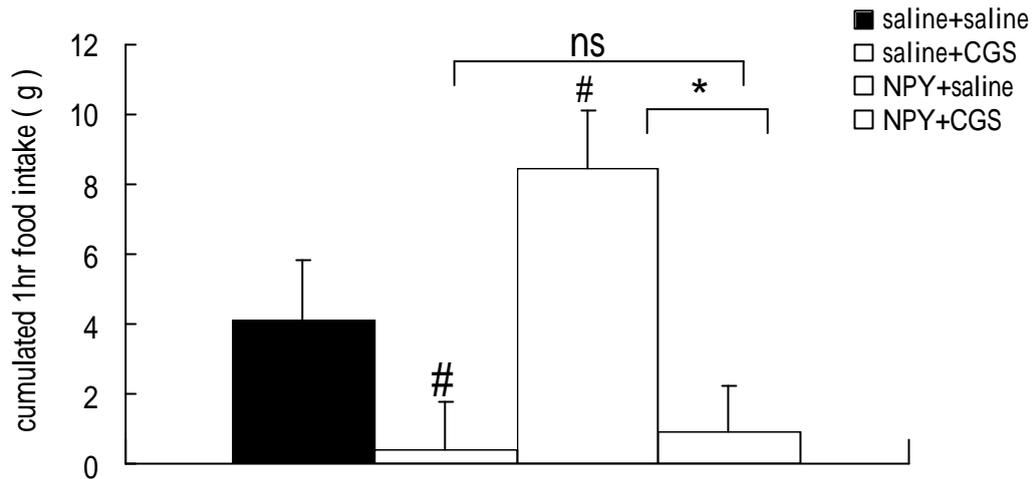


圖二、腦室內注射 1、5、10 μ g 腺核? A_1 (DPCPX) 或 A_{2a} (ZM) 接受器拮抗劑對大白鼠食物攝取的影響之流程圖。

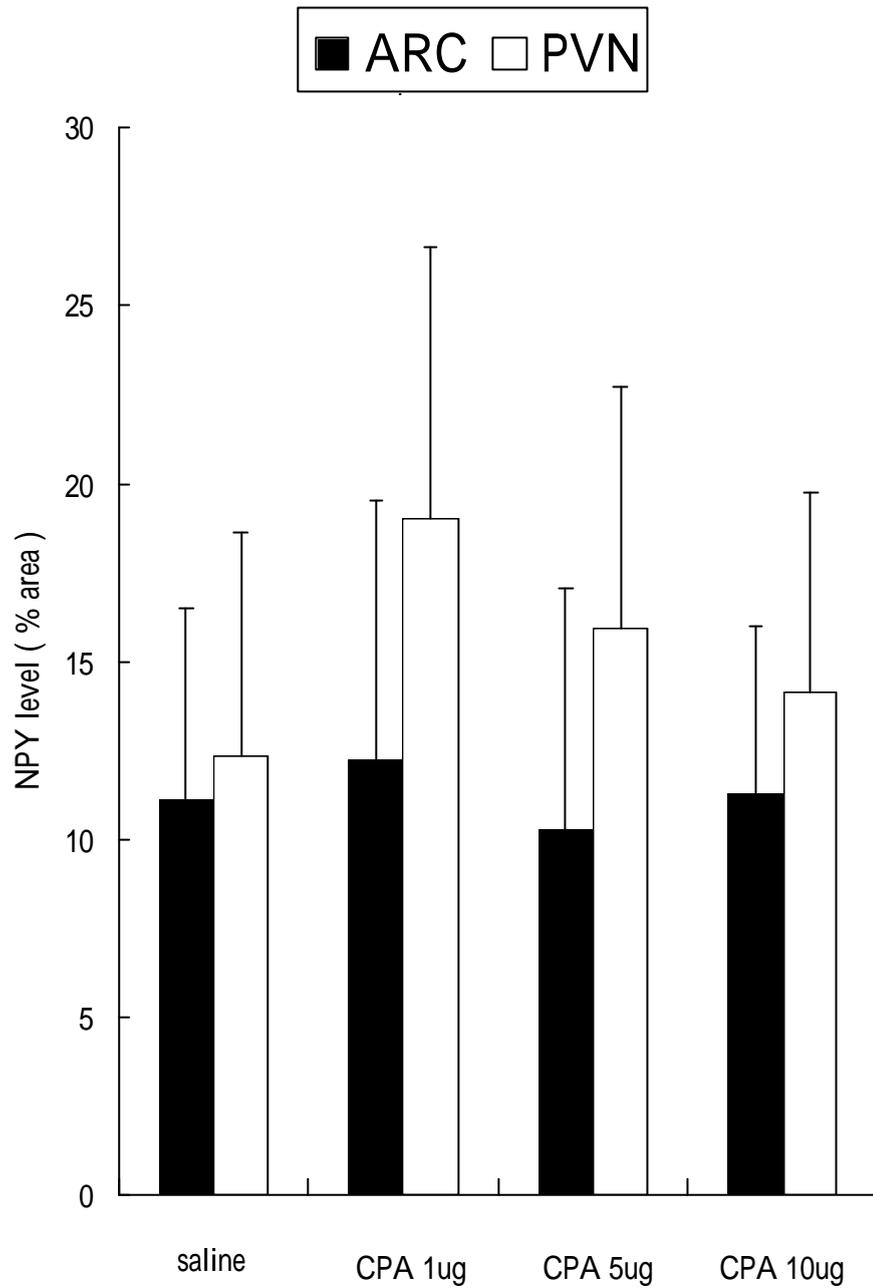
✧ 攝食量紀錄時間。



圖三、神經胜? Y (NPY) 對腺核? A₁ 接受器致效劑 CPA 引起之厭食行為的影響 (n = 10)。同時由腦室內注射神經胜? Y (10 μ g / 5 μ l) 與 CPA (10 μ g / 5 μ l) , 對於大白鼠攝食量之影響。各組以 mean ±SD 表示 , # # p < 0.01 , # p < 0.05 vs. saline + saline ; * p < 0.01 ; ns (not significant)。上圖為累積 1h 之攝食量 ; 下圖為累積 4h 之攝食量。



圖四、神經胜? Y (NPY) 對腺核? A_{2a} 接受器致效劑 CGS 引起之厭食行為的影響 (n = 10)。同時由腦室內注射神經胜? Y (10 μ g/5 μ l) 與 CGS (10 μ g/5 μ l), 對於大白鼠攝食量之影響。各組以 mean \pm SD 表示, # # p < 0.01, # p < 0.05 VS. saline + saline; * p < 0.01; ns (not significant)。上圖為累積 1h 之攝食量; 下圖為累積 4h 之攝食量。

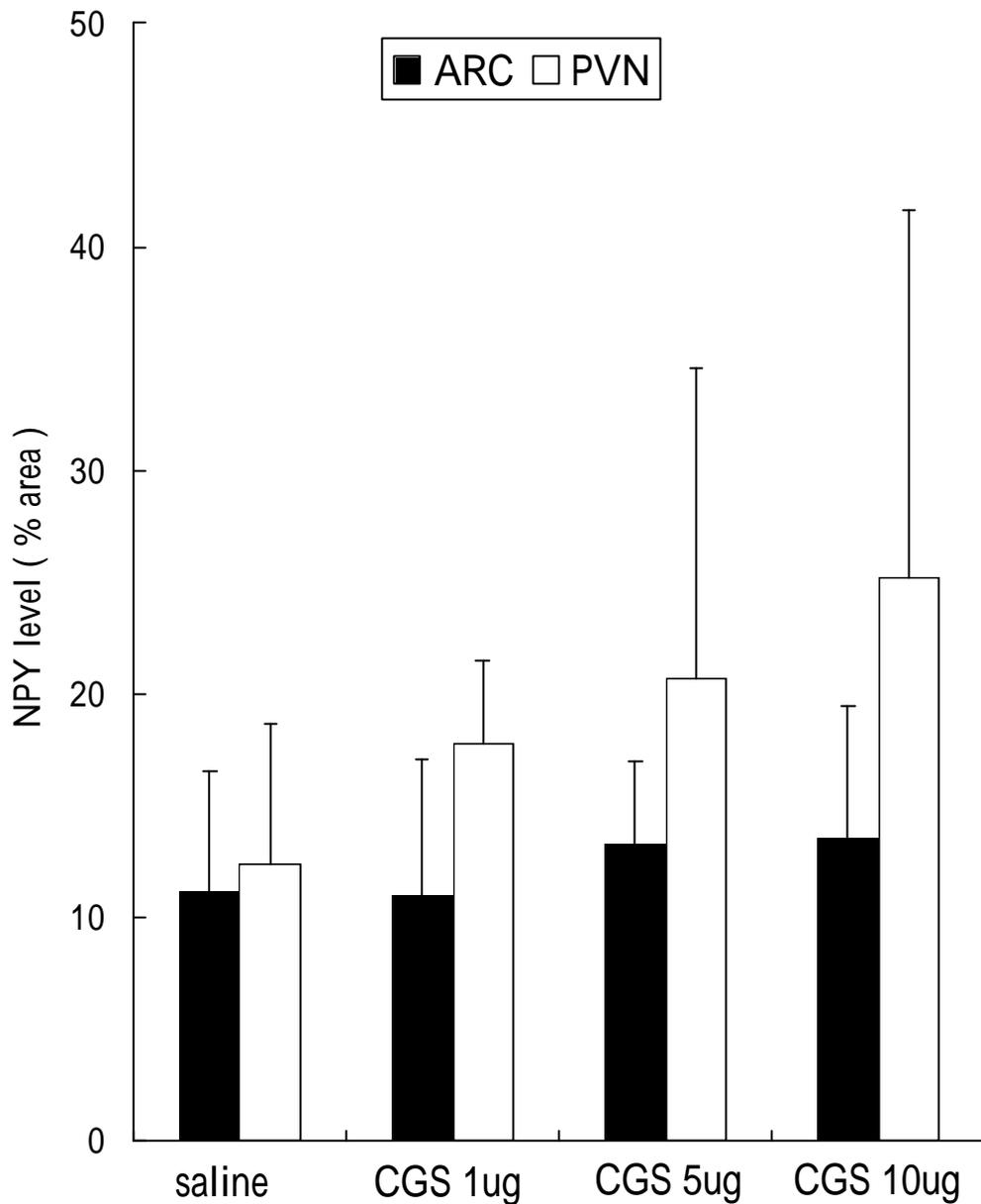


圖五、腺核對神經胜 Y 表現量的調節作用 (n = 6-10)。

由腦室內注射 1、5、10 μ g CPA 或 saline 後，對弓形核

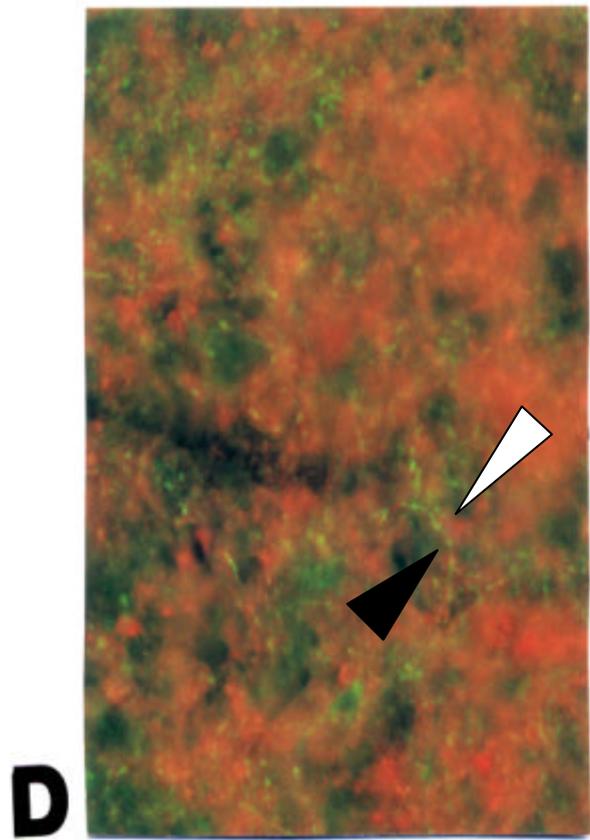
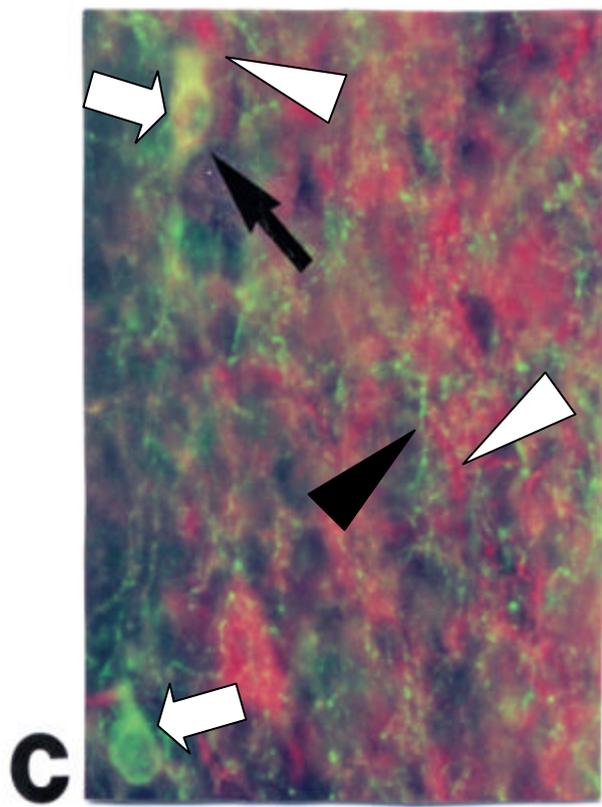
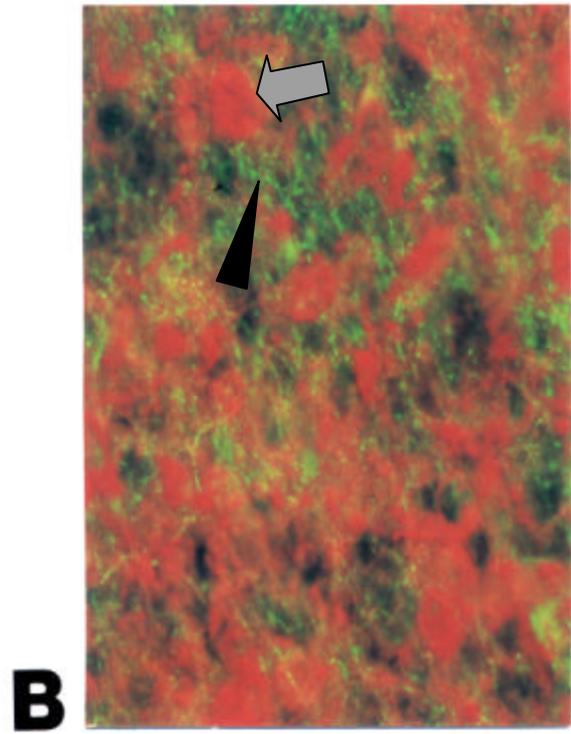
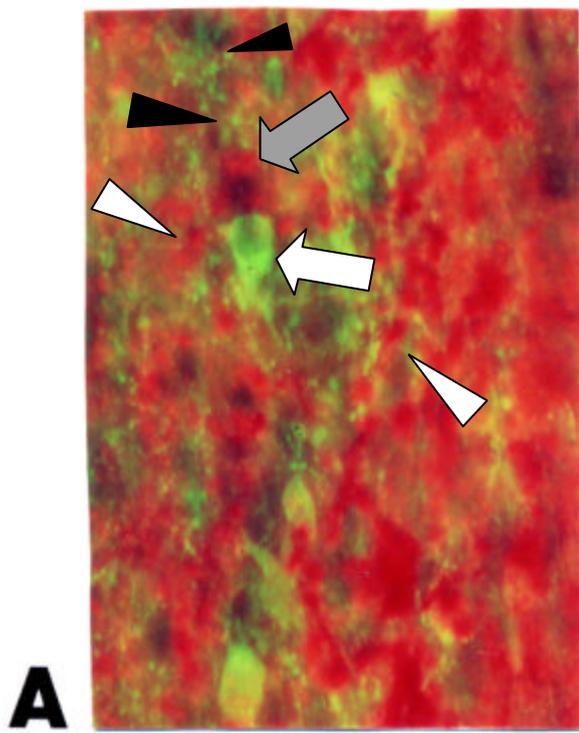
(ARC) 室旁核 (PVN) 之神經胜 Y 含量之影響。各

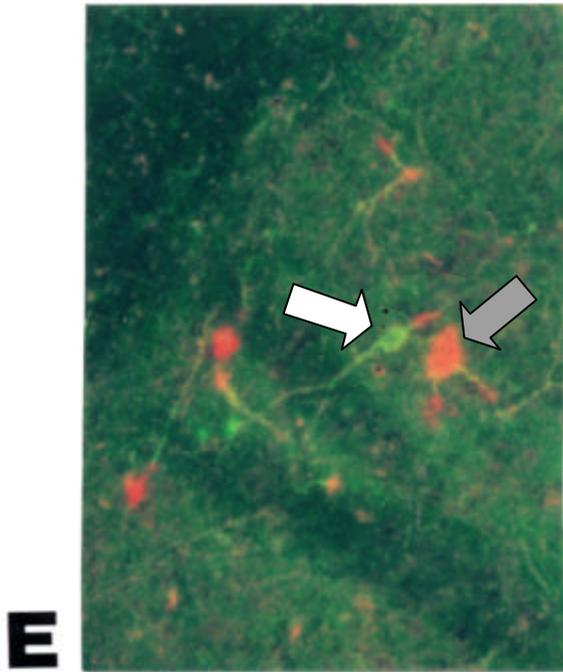
組以 mean \pm SD 表示，各組間無顯著性差異。



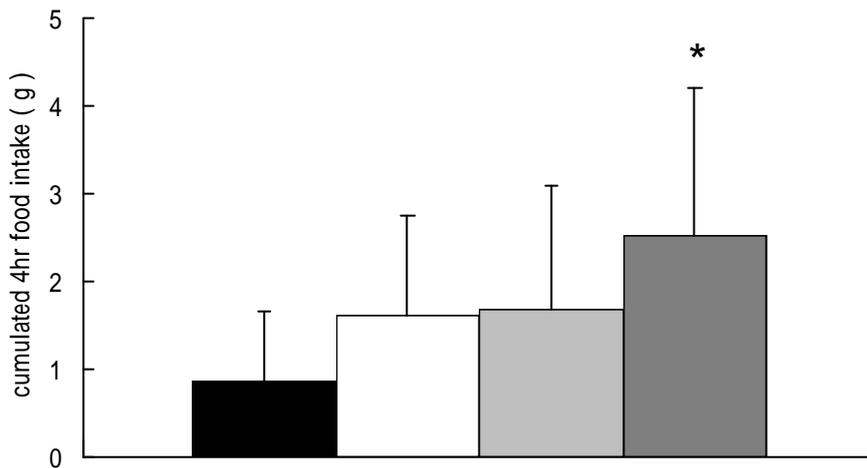
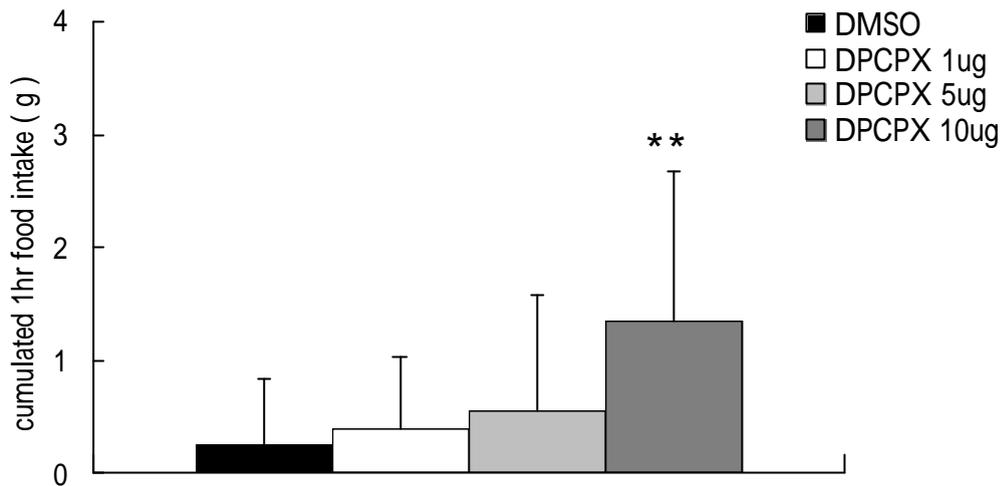
圖六、腺核對神經胜 Y 神經元活性的調節作用(n = 3-7)

由腦室內注射 1、5、10 μ g CGS 或 saline 後，對弓形核 (ARC) 室旁核 (PVN) 之神經胜 Y 含量之影響。各組以 mean \pm SD 表示，各組間無顯著性差異。

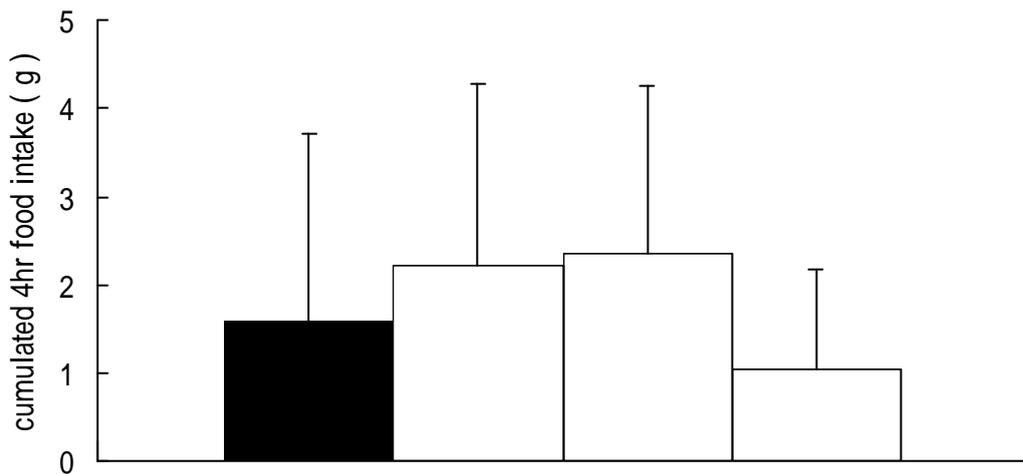
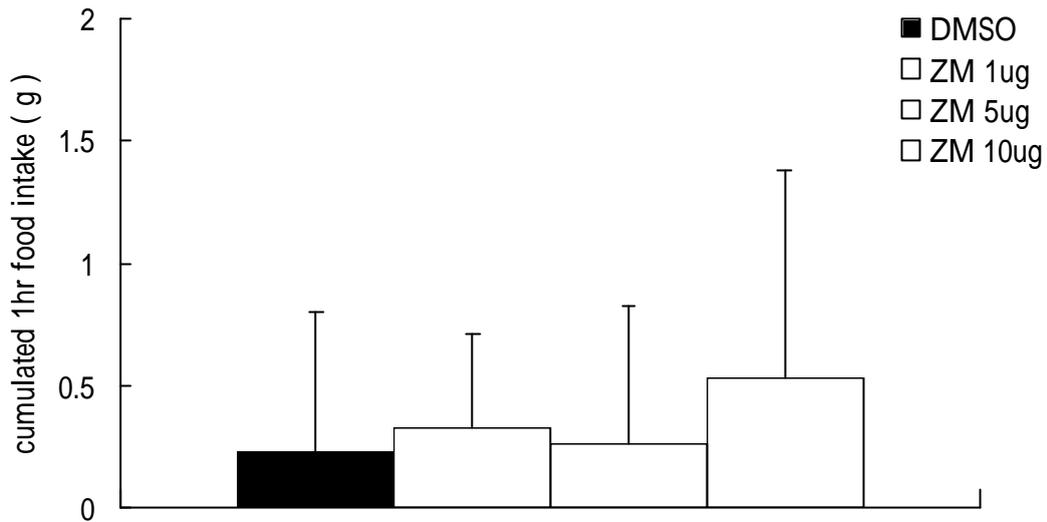




圖七、腺核？接受器與神經胜？Y神經元之分佈。雙重免疫組織化學染色顯示弓形核 ARC (A,B)、室旁核 PVN (C,D) 與尾核 (E) 中腺核？A₁ 接受器 (綠色;A,C) 或腺核？A_{2a} 接受器 (綠色;B,D,E) 以及神經胜？Y (紅色) 的位置。◻→可表現腺核？A₁ 或 A_{2a} 接受器的細胞本體；◼→ 神經胜？Y 細胞本體；▶ 腺核？A₁ 或 A_{2a} 接受器末梢；▷ 神經胜？Y 纖維；➡ 表示腺核？A₁ 接受器附近有神經胜？Y 末梢的分佈。



圖八、腦室內注射腺核 A_1 接受器拮抗劑對大白鼠攝食行為的影響 (n=9)。由腦室內注射 ($5\mu l$) DMSO 或 1、5、 $10\mu g$ DPCPX 對於大白鼠攝食量之影響。各組以 mean \pm SD 表示, * $P < 0.05$ VS. DMSO ; ** $P < 0.01$ VS. DMSO。上圖為累積 1h 之攝食量 ; 下圖為累積 4h 之攝食量。



圖九、腦室內注射腺核 A_{2a} 接受器拮抗劑對大白鼠攝食行為的影響(n=6)。由腦室內注射(5 μ l)DMSO或1、5、10 μ g ZM對大白鼠攝食量之影響。各組以 mean \pm SD表示,各組間無顯著性差異。上圖為累積1h之攝食量;下圖為累積4h之攝食量。

英文摘要

Our previously study indicated that the inhibitory effect of adenosine on feeding is not mediated by oxytocin neurons. The purpose of the present study was to investigate the role of NPY neurons in adenosine receptor agonist-induced anorexia. We found that intracerebral co-administration of 10 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ N⁶-cyclopentyladenosine (CPA, A₁ receptor agonist) or 1 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ CGS21680 (CGS, A_{2a} receptor agonist) with 10 $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ NPY did not block the inhibitory effect of CPA or CGS-on food intake in overnight fasted rats ($P > 0.05$). Another set of animals were sacrificed 2h after icv injection of CPA or CGS(1, 5 and 10 μg)and brain tissues were subjected to immunocytochemistry of NPY . The results showed that adenosine failed to alter NPY levels in the hypothalamic Arcuate (ARC) and Paraventricular (PVN) nuclei. These data reveal that the anorectic effect of adenosine is not mediated by NPY neurons. In order to investigate whether NPY cell bodies express adenosine receptors, double-label immunocytochemistry was performed in brain tissues obtained from icv cholchicin-treated animals. The result showed that although NPY was in close apposition with adenosine receptor immunoreactivity, there was no evidence of colocalization of both antigens. To further investigate the role of endogenous adenosine in the modulation of food intake, satiated rats were treated icv with 1, 5 or 10 μg DPCPX (A₁ receptor antagonist) or ZM-2413851 (ZM, A_{2a} receptor antagonist) . I found that 10 μg DPCPX significantly increased food intake ($P < 0.05$) , but ZM failed to alter the feeding behavior ($P > 0.05$) . The data suggest that endogenous adenosine A₁ receptor plays a role in normal feeding behavior and adenosine via A₁ receptors may have the same target as NPY in PVN. However, exogenous adenosine-induced anorexia is not mediated by orexigenic NPY neurons.

作者簡歷

姓名：葉玫真

出生日：66.7.10

出生地：台灣省彰化縣

學歷：

私立輔英醫事護理專科學校（已改制為輔英科技大學）畢業

私立弘光技術學院護理系（已改制為弘光科技大學）肄業

經歷：

彰化秀傳區域醫院外科加護病房二年