

目 錄

目錄.....	1
圖目錄.....	2
英文摘要.....	3
中文摘要.....	4
壹、前言.....	5
貳、材料與方法.....	16
參、結果.....	25
肆、討論.....	28
伍、參考資料.....	35
作者簡歷.....	54
著作權聲明.....	55



圖目錄

圖一、腹腔注射 exendin-4 或一氧化氮提供劑 nitroprusside 引起降低大白鼠攝食行為作用的影響之流程圖.....	44
圖二、腦內注射 MC 第 3/4 型(SHU9119)或第 4 型(HS014)接受器拮抗劑與腹腔注射 exendin-4 對大白鼠食物攝取的影響之流程圖.....	45
圖三、腦部冠狀切面圖顯示弓狀核(Arc)之解剖位置.....	46
圖四、低劑量的 nitroprusside 對 exendin-4 降低攝食效果之影響....	47
圖五、高劑量的 nitroprusside 對 exendin-4 降低攝食效果之影響....	48
圖六、 MC 3/4 antagonist 對 exendin-4 降低攝食效果之影響.....	49
圖七、下視丘弓狀核 cFos 對於腹腔注射 exendin-4 之反應.....	50
圖八、腹腔注射 exendin-4 對於下視丘弓狀核 cFos 表現量的影響...	51
圖九、弓狀核中 cFos 與 a-MSH 細胞的表現.....	52
圖十、Exendin-4 對於弓狀核中 a-MSH 細胞活性的影響.....	53

英文摘要

Exendin-4 is a 39 amino acid peptide purified from *H. suspectum* venom and half of its structure is similar to GLP-1 (7-36) amide. Besides, it could compete specifically with GLP-1 for the same receptor. Exendin-4 reduces food intake, body weight and adiposity. In this study, we evaluated whether the hypophagic effect of exendin-4 may be mediated by nitric oxide (NO) or melanocortin (MC) systems. In the first experiment, 0.5 or 2 mg/ml/Kg nitroprusside (NP) was injected 5 min before injection of exendin-4 (0.5 µg/ml/Kg). The data showed that exendin-4 decreased food intake similarly in both NP and saline pre-treated animals ($p > 0.05$). Secondly, HS014 (MC 4R antagonist) or SHU9119 (MC 3/4R antagonist) was injected intracerebroventricularly before exendin-4 treatment. The data revealed that the effect of exendin-4 on food intake could be blocked by HS014 and SHU9119. Although immunohistochemical staining showed an increase in overall cFos expression in arcuate nucleus (ARC) after exendin-4 injection, the majority of this immediate early gene product was not located within the MC neurons. Thus cFos cannot be the exclusive marker to label the pathways activated by exendin-4. These results suggest that MC but not NO system mediates the anorectic effect of exendin-4.

中文摘要

Exendin-4 是一個從 Gila monster 唾液線所分離出來的 39 胺基酸，它有 53 % 胺基酸序列與胰高血糖素 -1 (glucagon like peptide-1 ; GLP-1) 相似；此外，它也與胰高血糖素 -1 共同競爭相同的接受器。周邊或中樞給予 exendin-4 皆能降低大白鼠的攝食、體重及脂肪含量，然而目前卻仍未有詳盡研究 exendin-4 在中樞神經系統的作用機轉。本論文即探討 exendin-4 在攝食上的影響是否經由一氧化氮(NO)或 Melanocortin (MC)系統作用來達成。在實驗一中，先由腹腔注射 0.5 µg/ml/Kg 的 exendin-4 後，隔五分鐘再注入 0.5 或 2 mg/ml/Kg 的一氧化氮提供劑 nitroprusside (NP)；結果顯示 exendin-4 降低攝食的效果並不能被 NP 阻斷。實驗二中，先以腦室注射 MC4 接受器的拮抗劑 HS014 或 MC 3/4 接受器的拮抗 SHU9119 後，再由腹腔注入 exendin-4。結果顯示給予高劑量的 HS014 (5 µg /ml/Kg)及 1 µg/ml/Kg 的 SHU9119 可以阻斷 exendin-4 引起的降低攝食作用。這些資料顯示 exendin-4 可以經由 MC 系統而抑制攝食行為。然而，儘管免疫化學組織染色法顯示注射 exendin-4 的大白鼠弓狀核中 cFos 的表現量有明顯增加，但絕大多數的 cFos 並不位於 MC 細胞中，故 cFos 無法當作 exendin-4 活化之神經元的唯一指標。因此，我們推論 MC 而非 NO 參與著 exendin-4 所誘發之厭食作用。

壹、 前言

近年來隨著經濟、生活的進步及社會的富足，使得國人有著趨向西化的高熱量飲食型態；另外因科技的進步造成了生活活動上的便利，使人體熱能的消耗大幅減少，因此身體活動量的不足加上過多的熱量攝取，造成國人罹患肥胖症的比例越來越高。早在 1996 年世界衛生組織已將「肥胖」列為慢性疾病之一，肥胖也和心臟病、糖尿病、高血壓等之形成有極大的相關性。然而，眾所皆知肥胖的發生又與飲食有著絕對的關係存在，所以從控制飲食開始著手，可更有效的控制體重及保持健康。

肥胖的發生主要是因熱量的攝取量高於消耗量。造成熱量不平衡因素是錯綜複雜的，包括了遺傳、環境、心理、行為反應、生理代謝及腦中不同的神經傳遞物質與荷爾蒙調節等因素，都可能造成影響。而哺乳類動物的攝食行為主要是受到腦中下視丘(hypothalamus)的控制，其中弓狀核(arcuate nucleus ; ARC)、室旁核(paraventricular nucleus ; PVN)及視上核(supraoptic nucleus ; SON)等區域都與調節攝食行為有關(Glod, 1973 ; Bernardis & Bellinger, 1996)。所以在這些區域中作用之神經傳導物便可能參與了攝食行為之調節。然而生理上對於食物攝取所產生的飽足機轉仍不是很清楚。許多胜 會在進食的時候從消化道分泌出來，當餐前給予這些胜 會抑制食物之攝取。

近幾年來在動物研究中顯示這些由腸道釋放的消化胜 (如膽囊收縮素、bombesin、胰高血糖素-1)可在餐後產生飽足感。

一、胰高血糖素-1(Glucagons like peptide-1) :

胰高血糖素基因不只是表現在胰臟亦在腸黏膜內分泌細胞中。其中有兩個高度相似胰高血糖素的片段，稱為胰高血糖素-1 和 2 (GLP-1 and -2)。胰高血糖素-1 是由 30 個胺基酸所組成的多肽，它是來自於前升糖素原(preproglucagon)裂解後的修飾片段(Kreymann et al., 1989 ; Larsen et al., 1997)。目前已知體內的胰高血糖素-1 具有兩種活化形式，即胰高血糖素-1 (7-36)醯胺與胰高血糖素-1 (9-36)，但胰高血糖素-1 (9-36)是胰高血糖素-1 (7-36) 醯胺的主要代謝產物，它會與胰高血糖素接受器(GLP-1 receptor ; GLP-1R)結合，但其親合力低於胰高血糖素-1 (7-36)醯胺。

胰高血糖素-1 是藉由腸道中的 L 內分泌細胞釋放(Eissele et al., 1992 ; Perfetti & Merkel, 2000)，而 L 細胞主要位於空腸、迴腸與結腸之中(Buffa et al., 1975 ; Eissele et al., 1992)。胰高血糖素-1 的結合部位廣泛存在於腸胃道、胰臟小島、脂肪組織以及腦中等(Barragan et al., 1996)。之前的文獻也指出，在大白鼠及人類的下視丘中，含有高密度的胰高血糖素-1 及它的接受器

(Owji et al., 2002)。胰高血糖素-1 的神經纖維也存在於下視丘的旁室核、背中央核及弓狀核(Shimizu et al., 1987 ; Sarkar et al., 2003)。

(一)胰高血糖素-1 與攝食行為之關係

早於 1990 年，胰高血糖素-1 已被發現可調控食慾 (Lambert et al.,1993)。Schick 等學者也在 1992 年首次報導出，以腦室注射胰高血糖素-1，可明顯降低大白鼠食物的攝取；在人類中以靜脈方式給予胰高血糖素-1 亦可減少攝食量 (Flint et al, 1998 ; Gutzwiller et al, 1999)。另外，胰高血糖素-1 可誘導在旁室核(PVN)、弓狀核(ARC)及杏仁核(CeA)中 cFos 蛋白的表現(Turton et al., 1996)。除此之外，由腦室注射胰高血糖素-1 可減少大白鼠血漿中葡萄糖的濃度、刺激胰島素分泌及延遲胃的排空作用(Drucker, 1998)。故由此可知，胰高血糖素-1 在調節能量平衡上可能扮演著很重要的角色。

但也有學者指出，在大白鼠身上以周邊注射胰高血糖素-1，則對攝食無明顯作用(Rodriguez de Fonseca et al., 2000)，原因可能是大白鼠血液中的 depeptidyl peptidase IV (DPP-IV) 酵素分解了胰高血糖素-1 在第 8 個丙胺酸(alanine)殘基的位置(Mentlein et al., 1993 ; Yasuda et al., 2002)，導致胰高血

糖 -1 在循環中快速地失去活性，使其半衰期大約只有 1~5 分鐘(Kieffer et al., 1995 ; Parkes et al., 2001)。為了防止這個問題的產生，本實驗中使用另一個促進劑 exendin-4 來代替胰高血糖素 -1 的作用。

二、 Exendin-4

Exendin-4 是一個 39 個胺基酸，其從 Gila monster 唾液腺所分離出來，也是一個強效的胰高血糖素 -1 接受器之促進劑 (Eng et al., 1992)。它有 53 % 胺基酸序列與胰高血糖素 -1 重疊，且比胰高血糖素 -1 更能阻抗 DPP-IV 的作用(Doyle et al., 2003)，因此在體內的 exendin-4 對於胰高血糖素 -1 接受器之親和力及半衰期時間都高過於胰高血糖素 -1(Montrose-Rafizadeh et al., 1998)。

(一) Exendin-4 與攝食行為之關係

眾多的文獻指出，周邊或中樞給予 exendin-4 皆能降低大白鼠的攝食及體重(Szayna et al., 2000 ; Al-Barazanji et al., 2000)。相同的，exendin-4 也會增加胰島素的分泌、抑制升糖素分泌及刺激胰臟小島的新生(Goke et al., 1993 ;Kolterman et al., 2003)，這些作用也都與胰高血糖素 -1 相似；另外，exendin-4 也會延遲胃的排空 (Jodka et al., 1998)。由以上結果

皆顯示出 exendin-4 確實與胰高血糖素 -1 的功能相同，可抑制攝食行為。

三、一氧化氮

一氧化氮(nitric oxide ; NO)是由 L 型-精胺酸(L-arginine)經由一氧化氮合成 (nitric oxide synthase ; NOS)的催化所產生 (Schmidt et al., 1988)。一氧化氮是個生物傳訊分子，大量存在腦及其他組織中(Bredt et al., 1991)。

(一)一氧化氮與攝食行為之關係

在大白鼠、小鼠及雞身上，若抑制一氧化氮合成 則會降低食物的攝取(Squadrito et al., 1993 ; Morley & Flood, 1991 ; Choi et al., 1994)；相似的，在小白鼠身上若以腹腔注射一氧化氮合成促進劑 L 型-精胺酸(L-arginine)其會增加食物的攝取 (Bredt et al., 1991)。以腹腔或腦室注射一氧化氮提供劑 nitroprusside (NP)可以增加食物與水的攝取(Monda et al., 1998)。根據以上的結果可知一氧化氮可能扮演著調控食物攝取的角色。

四、Melanocortin

在許多的哺乳類動物中(包括靈長類), 其中樞神經系統中皆有 melanocortin (MC)存在(Koegler et al., 2001)。眾多研究也證明出下視丘 MC 系統是扮演著一個調控攝食行為及能量代謝的重要角色(Ollmann et al., 1997 ; Fan et al., 1997)。

Melanocortins 是一群多胜 荷爾蒙的總稱, 其成員均是從 pro-opiomelanocortin (POMC)前驅蛋白分裂的片段(Alvaro et al., 1997), 包含了 ACTH 及甲型、乙型、丙型-促黑激素(α 、 β 、 γ -melanocyte stimulating hormone); 其中甲型-促黑激素(α -MSH)為一個含有 13 個胺基酸的多肽, 當其中樞的與 MC 接受器結合會抑制攝食行為(Grill et al., 1998)。POMC 的基因表現在腸、胎盤、胰臟等等周邊組織中, 而在腦下垂體前葉及中間亦大量表現(Alvaro et al., 1997); 在中樞神經系統中, POMC 的細胞本體主要位於於下視丘弓狀核及腦幹尾部的孤立核(nucleus of solitary tract ; NTS)中(Watson et al., 1978), 而 POMC 的神經纖維也廣泛投射到許多腦區域, 包括室旁核、背中央核、腹側核等調控能量平衡的區域(Vergoni & Bertolini, 2000 ; Starowicz & Przewlocka, 2003 ; Mountjoy & Wong, 1997)。

然而在中樞注射 MC 接受器的促進劑 α -MSH 則會減少食物

的攝取量、降低腹內脂肪與體重，以及增加梳理時間(grooming) (Argiolas et al.,2000); 相反的，在弓狀核中也有個 agouti 相關蛋白(agouti-related protein ; AgRP)，它是內生性 MC 接受器的拮抗劑，當攝食受限制時會上升，而且在 AgRP 基因過度表現的轉植鼠中會產生肥胖及過度攝食的現象(Ollmann et al., 1997)。

(一) MC 接受器的作用

至今已有 5 種 MC 接受器被發現，包括了 MC 1、MC 2、MC 3、MC 4、MC 5。它們為 G 蛋白偶合接受器中的家族，且這 5 種 MC 接受器有 40% ~ 60% 序列的相似性(MacNeil et al., 2002)。另外，MC 接受器會與 MC 結合而活化，進而將訊號經由 Gαs 傳遞而增加細胞內的 cAMP (Wikberg et al., 1999)。

1. MC 1 接受器

MC 1 接受器首先在黑色素瘤細胞中被確認，但它也表現在正常的黑色素細胞及角質細胞中(Chhajlani and Wikberg, 1992 ; Chakraborty et al., 1999)。有報導也指出 MC 1 接受器亦表現在腦下垂體、胎盤、睪丸、黃體、吞噬細胞、內皮細胞、神經膠細胞及星狀細胞(Wikberg et al., 1999)。減少 MC 1 接受器之作用會使 eumelanin(棕色/黑色)成為phaeomelanin

(黃色/紅色)色素，造成人類紅髮及皮膚缺乏色素沉著 (Schaffer & Bologna, 2001)。

2. MC 2 接受器

MC 2 接受器充份表現在腎上腺皮質，包括在成束的區域 (zona fasciculate)及腎絲球區域(zona glomerulosa)，其主要調節促腎上腺皮質分泌荷爾蒙 (adrenocorticotropic hormone ; ACTH)的作用(Xia & Wikberg, 1996)。MC 2 接受器的 mRNA 也在腎上腺髓質發現，但功能仍不清楚。另外，MC 2 接受器亦表現在白色脂肪組織、皮膚、單核白血球中(Wikberg et al., 2000)。

3. MC 3 接受器

高密度的 MC 3 接受器表現在中樞神經系統中的下視丘區域及邊緣系統，如腹中下視丘核、弓狀核、preoptic 核及下視丘側邊與尾部區域(Roselli-Rehfuss et al., 1993)。另外，MC 3 接受器也在心、胃、胰、肌肉、腎臟及卵巢和睪丸發現 (Gantz et al., 1993 ; Chhajlani, 1996)。上述腦部區域的分布暗示著 MC 在調控攝食行為上扮演著一個重要的角色 ;另有文獻指出 MC 3 接受器亦能調節體溫及心血管功能(Low et al., 1994)。

4. MC 4 接受器

在啮齒類動物的腦中，MC 4 接受器 mRNA 表現量較 MC 3 接受器少，但分布區域較為廣泛。MC 4 接受器分布在腦的皮質、下視丘、視丘、腦幹及脊髓中(Mountjoy and Wild, 1998 ; Cowley et al., 1999)；特別在下視丘的旁室核與腦幹尾部的背側運動核(dorsal motor nucleus)有很高的表現量(Mountjoy et al., 1994)。MC 4 接受器調控著攝食與能量代謝(Kim et al., 2000 ; Williams et al., 2000)，且以在腦部區域分布來看，也顯示出 α -MSH 調節食物攝取作用(Williams et al., 2000)。

5. MC 5 接受器

極多的組織都有 MC 5 接受器，其 mRNA 也存在脂肪、肺、乳腺、肌肉骨骼、皮膚、卵巢、子宮、睪丸、白血球、前列腺、腎上腺等等組織中(Labbe et al., 1994 ; Chen et al., 1997 ; Akbulut et al., 2001)。MC 5 接受器也有少量表現在腦中(Labbe et al., 1994 ; Fathi et al., 1995)，但其在腦中的生理功能仍不清楚。

(二) MC 3/4 接受器與攝食行為之關係

中樞神經的 MC 3 與 4 接受器在下視丘中扮演著一個調節攝食的重要角色(Mountjoy et al., 1994)。在大鼠身上以腦室注射非選擇性 MC 3/4 接受器(MC 3/4 R)的拮抗劑 SHU9119, 會造成增加食物的攝取(Giraudo et al., 1998; Grill et al., 1998); 而非選擇性 MC 接受器的促進劑 MT II 則會降低食物的攝取(Fan et al., 1997)。相同的, 若腦室注入一個選擇性 MC 4 接受器的拮抗劑 HS014 則會增加攝食量(Kask et al., 1998)。由上述可知, 由腦室給予 MC 3/4 接受器拮抗劑的確能有效降低攝食行為。

由前述得知, Exendin-4 與 GLP-1 相似且兩者作用皆可降低大白鼠的攝食及體重, 並可調控能量平衡。此外, 我們也得知抑制中樞 NOS 的產生會明顯使攝食量下降; 而刺激中樞的 MC 系統則會抑制進食, 反之會增加食物的攝取。因此 Exendin-4 抑制攝食的效果是否可能經由抑制 NO 的合成或是刺激 MC 系統而來達成, 是值得去深入探討的問題。

本實驗目的在探討：

1. 周邊給予 exendin-4 降低攝食行為的作用是否可被 nitroprusside 阻斷。
2. 腹腔注射 exendin-4 對大白鼠食物攝取之影響是否經由中樞之 MC 路徑而達成。
3. 利用單一免疫組織化學染色觀察 exendin-4 對 cFos 蛋白表現量的影響。
4. 利用雙重免疫組織化學染色以觀察注射 exendin-4 之後是否會影響 α -MSH 神經元中 cFos 的表現量。

貳、材料與方法

一、實驗藥物

exendin-4 購自 American peptide ; Na nitroprusside 購自 Sigma; MC 接受器拮抗劑 SHU9119、HS014 均購自於 Phoenix Pharmaceuticals, Inc ; 且所有藥物均溶解於 0.9 % 生理食鹽水中。

二、實驗動物

本實驗採用購自國科會動物中心之成熟 Sprague-Dawley (SD)品系的雄性大白鼠作為實驗動物，並以實驗鼠專用飼料餵食。動物在適應期間以 5 隻為一籠飼養，手術後則個別飼養於 37 ×25 ×17 公分的長方形塑膠籠中。除了依實驗所需剝奪食物外，其餘時間皆供給充分的食物與水，而飼養室溫度維持於 22 ± 1 ，溼度維持於 65-75 % ，採用日間、黑夜各 12 小時之光暗循環的時間控制。

三、外科手術

(1) 頸靜脈插管手術：

實驗動物以腹腔注射 (intraperitoneal injection ; I.P.) chloral hydrate (360 mg/Kg , Merck)進行麻醉，以 PE-50 導管進行單側頸靜脈(jugular vein)插管，以供在清醒狀態下給藥。傷口

縫合後於皮下注射盤尼西林(3000 IU/rat) , 以防止感染。

(2) 右腦室插管手術 :

將實驗大白鼠以腹腔注射 chloral hydrate (360 mg/Kg , Merck) 進行麻醉 , 並固定於立體定位儀上。首先將動物頭部上方的毛髮剔除 , 再縱切皮層並向兩側拉開後使頭骨露出 , 以立體定位儀將 22-gauge 的滯留針插入頭骨 Bregma 右側 0.14 cm 後方 0.08 cm 及腦模下方約 0.38 cm 的位置 , 當此時有腦脊髓液(cerebral spinal fluid , CSF) 流出時即可確定滯留針已插入腦室內 , 之後以小螺絲固定於滯留針周圍 , 再以牙科膠(dental cement) 將其完全固定於頭骨上 , 使滯留針不會滑動 , 以利於日後能將藥物正確的注入右側腦室內。最後將傷口縫合並於皮下注射(subcutaneous injection , S.C.) Penicilline 3000 IU/rat , 以防止感染。

四、灌流與腦組織處理

大白鼠經腹腔注射過量的 sodium pentobarbital 深度麻醉後，先將胸腔切開露出心臟，再以止血鉗夾住下腔靜脈，並且由左心室注入 1000 IU 的肝素 (heparin)，接著以 18 號軟針刺穿經過左心室至主動脈出口後，依序注入含 2 % 亞硝酸鈉 (Na nitrite) 之生理食鹽水以及 4 % 副福馬林 (paraformaldehyde) 以施行全身灌流。

將灌流完畢後的腦組織取出，並置於 4 % paraformaldehyde 中，隔夜再浸潤於 30 % 的蔗糖溶液中保存，直至組織完全沉澱為止。隨後置於冷凍切片機中以 40 μ m 的厚度做連續冠狀切片，並將腦組織切片保存於含有 0.1M 磷酸氫鈉緩衝液、30 % sucrose、30 % ethylene glycol 與 1 % polyvinylprolidone 的抗凍液中。

五、免疫組織化學染色法 (immunocytochemistry , ICC)

(1) 單一免疫組織化學染色步驟 :

先將腦組織從抗凍液中取出 , 以 0.05M 磷酸氫鈉緩衝液(potassium phosphate buffered saline , KPBS)清洗 , 之後浸泡於 1 % H_2O_2 中 15 分鐘 , 以減少內生性過氧化 反應 , 再以 0.05M KPBS 清洗以終止其反應。接著於室溫下將組織與 cFos 的初級抗體(1: 8000 , Santa Cruz Biotechnology)反應 1 小時 , 再置於 4 °C 冰箱中反應 48 小時。

以 0.05M KPBS 清洗後 , 加入稀釋 600 倍之次級抗體 (biotin-conjugated anti-rabbit IgG)於室溫下反應 1 小時 ; 組織再度以 KPBS 清洗並加入與過氧化 (Horse-radish peroxidase ; HRP)結合之卵白素 -生物素複合物溶液中 (avidin-biotin complex ; Vector Laboratories, Burlingame, USA)於室溫下反應 1 小時。

最後在將組織切片浸泡於呈色溶液(含 175 mM 的醋酸鈉、2.5 mg/ml $NiSO_4$ 、0.025 % 的過氧化氫與 0.2 mg/ml diaminobenzidine)中反應 , 使 cFos 核蛋白呈現藍黑色。

(2) 雙重免疫組織化學染色步驟：

其步驟與前述方法相同，唯獨在完成單一免疫組織化學染色(cFos 染色)後，組織尚須與 α -MSH 初級抗體(1:50000) 以及稀釋 600 倍之次級抗體(biotin-conjugated anti-sheep IgG) 於室溫下反應 1 小時，之後再進行第二次 ICC 染色，其組織浸泡於含有 0.025 % 的過氧化氫、0.2 mg/ml diaminobenzidine 與 0.05M Tris buffer (pH 7.5) 中呈色，使反應物為褐色。

六、實驗步驟

所有實驗動物皆於腦室插管手術後給予 5-7 天的恢復期，期間則每日以 27-gauge 的細針探入滯留針中，以確保滯留針的通暢，並且每日觀察大白鼠的攝食以及頭部傷口的癒合情形，當狀況不佳的大白鼠則予以淘汰。各實驗步驟分述如下：

實驗一：腹腔注射 GLP-1 類似物 exendin-4 與一氧化氮提供劑

Na nitroprusside 對雄性大白鼠攝食的影響

大白鼠(500-600 克)於腹腔注射藥物前，先剝奪食物二十四小時，並經隨機方式分組。每隻動物均給予兩次腹腔注射，首先施予 GLP-1 類似物 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g/ml/Kg}$)或生理食鹽水(1 ml/Kg)，五分鐘後再給予一氧化氮提供劑 Na nitroprusside (500 μg 或 2 mg/ml/Kg)或生理食鹽水(1 ml/Kg)，隨後讓大白鼠恢復進食，並記錄第 1、2、4 和 6 小時的食物攝取量(實驗流程見圖一)。

各組結果以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示，並且採用雙項變方分析(two way ANOVA)與 Tukey's test 來檢驗其結果，當 $p < 0.05$ 時即視為有顯著差異性。

實驗二：腦室內注射 MC 第 3/4 型(SHU9119)或第 4 型(HS014)接受器拮抗劑對周邊給予 exendin-4 下降攝食之影響

體重 250-350 克的大白鼠在腦室插管手術後 5-7 天的恢復期間，於每日在腦室內注射 5 μ l 的生理食鹽水，使其能適應腦內注射的方式及確保滯留針通暢。

大白鼠於腦室內注射藥物前，先剝奪食物二十四小時，並經隨機方式分組。首先以腦室內注射 MC 第 3/4 型接受器拮抗劑 SHU9119 (1 μ g/5 μ l)或第 4 型接受器拮抗劑 HS014 (1.5 μ g 或 5 μ g/5 μ l)，而對照組給予 5 μ l 的生理食鹽水；經 5 分鐘後再進行腹腔注射 exendin-4 (0.5 μ g/ml/Kg) 或 1 ml/Kg 的生理食鹽水。隨後再讓大白鼠恢復進食，並記錄第 1、2、3 和 4 小時的食物攝取量(實驗流程見圖二)。

各組結果以 mean \pm SEM 表示，並且採用雙項變方分析(two way ANOVA)與 Tukey's test 來檢驗其結果，當 $p < 0.05$ 時即視為有顯著差異性。

實驗三：exendin-4 對 cFos 蛋白表現量的影響

在實驗一結束後，使其動物休息 2 至 3 天，在將以 chloral hydrate 麻醉後進行單側頸靜脈埋管。於二十四小時的食物剝奪後，再分別以頸靜脈(I.V.)給予 exendin-4 (0.5 µg/ml/Kg)或生理食鹽水(1 ml/Kg)，並於 4 小時後進行全身灌流取腦組織。

隨後將腦組織切片，組織以每隔 6 片取一片的方式，以進行 cFos 核蛋白單一免疫組織化學染色(步驟如前所述)。所有完成染色之組織切片，置於生理食鹽水中並依序排列至載玻片上，再以蒸餾水、70%、95%、100%之酒精及 histoclear，使組織洗出鹽分和脫水後封片。玻片置於放大 100 倍的光學顯微鏡下，依據 Paxinos & Watson 提供的位置(1986)分析下視丘弓狀核(A-P：Bregma -2.30 ~ -3.30mm，D-V：dura + 9.6 ~ 10.2 mm，M-L：±0.2 ~ 0.8 mm；圖三)之 cFos 總數與平均數。

各組結果以 mean ± SEM 表示，並且採用 t 檢定來檢驗其結果，當 p < 0.05 時即視為有顯著差異性。

實驗四：利用雙重免疫組織化學染色法觀察 Exendin-4 對於 α -MSH 細胞中 cFos 蛋白表現量之影響

在實驗一結束後，使動物休息 2 至 3 天，以 chloral hydrate 麻醉後進行單側頸靜脈埋管。於二十四小時的食物剝奪後，再分別以頸靜脈 (I.V.) 給予 exendin-4 (0.5 μ g/ml/Kg) 或生理食鹽水 (1 ml/Kg)，並於 4 小時後進行全身灌流取腦組織。

隨後將腦組織切片，組織以每隔 6 片取一片的方式，以進行 cFos 核蛋白與 α -MSH 雙重免疫組織化學染色法(步驟如前所述)。於所有完成染色之組織切片，置於生理食鹽水中並依序排列至載玻片上，再以蒸餾水、70%、95%、100%之酒精及 histoclear，使組織洗出鹽分和脫水後封片。玻片置於放大 100 倍的光學顯微鏡下，分析下視丘弓狀核之 α -MSH 細胞總數以及 α -MSH 細胞中所表現 cFos 之比例。

各組結果以 mean \pm SEM 表示，並且採用 t 檢定來檢驗其結果，當 $p < 0.05$ 時即視為有顯著差異性。

參、結果

實驗一：腹腔注射 GLP-1 類似物 exendin-4 與一氧化氮提供劑

Na nitroprusside 對雄性大白鼠攝食的影響

在食物剝奪 24 小時的大白鼠中，腹腔注射 saline + 一氧化氮提供劑 Na nitroprusside (500 $\mu\text{g/ml/Kg}$)之組別，和注射 saline + saline 組相較，其兩組間的攝食量在第 1、2、4 和 6 小時並無明顯差異($p > 0.05$, 圖四)；此外給予 2 mg/ml/Kg 的 nitroprusside 也亦有相同的情況($p > 0.05$, 圖五)。

而腹腔注射 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g/ml/Kg}$) + saline 組，其第 1、2、4 和 6 小時的攝食量皆顯著低於對照組(saline + saline)($p < 0.01$)。

當同時給予 exendin-4 與 nitroprusside 後，大白鼠攝食量仍然和 Exendin-4 + saline 組一樣低，亦即是只要注射 exendin-4，不論有無外給 nitroprusside，大白鼠的攝食量皆會顯著的降低(圖四、五)。

實驗二：腦室內注射 MC 第 3/4 型 (SHU9119) 或第 4 型 (HS014)

接受器拮抗劑對周邊給予 exendin-4 下降攝食之影響

在食物剝奪 24 小時的大白鼠中，腦室內注射 MC 第 3/4 型接受器拮抗劑 SHU9119 (1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$) 或第 4 型接受器拮抗劑 HS014 (1.5 或 5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$)，其攝食量與給予 5 μl 生理食鹽水的對照組相比較之下並無顯著的變化 ($p > 0.05$ ，圖六)，但在第 4 小時的攝食量卻比對照組來的低且有顯著性的差異。

當腹腔注射 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{Kg}$) 的大白鼠，其第 1 小時的攝食量有顯著的降低 ($p < 0.01$)，且維持到第 4 小時。然而，同時給予 exendin-4 與 MC 第 3/4 型接受器拮抗劑 SHU9119 後，在第 1 到 4 小時的攝食量顯著的高於 saline + exendin-4 組 ($p < 0.01$)，且和 saline + saline 組之間無顯著差異。

另外，給予 exendin-4 與 MC 第 4 型接受器拮抗劑 HS014 組中，可見給予高劑量的 HS014 可以阻斷 exendin-4 所引起大白鼠攝食量降低的作用，且在第 1、2、3、4 小時的攝食量有顯著的上升 ($p < 0.01$ ，圖六)。

實驗三：exendin-4 對 cFos 蛋白的影響

當大白鼠接受頸靜脈給予 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{Kg}$)處理後，下視丘弓狀核 cFos 的表現量顯著增加(圖七)。而且，將其量化統計來看，不論弓狀核全部的 cFos 含量或每個切片平均的 cFos 含量，注射 exendin-4 後都有顯著性的增加($p < 0.05$ ，圖八)。

實驗四：利用雙重免疫組織化學染色法觀察 Exendin-4 對於 α -MSH 細胞中 cFos 蛋白表現量之影響

經二十四小時剝奪食物的大白鼠，在清醒狀態下由頸靜脈注射 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)或 saline 後，大部份的 α -MSH 細胞皆未表現 cFos (圖九)。弓狀核全部的 α -MSH 細胞含量或平均的 α -MSH 細胞含量，都無顯著性的差異($p > 0.05$ ，圖十 A、B)。另外，弓狀核中 cFos 在 α -MSH 細胞之表現量也無統計上的差異($p > 0.05$ ，圖十 C)。

肆、討論

Exendin-4 是個強效的胰高血糖素 -1 接受器致效劑，且其結構與作用也與 GLP-1 相似，主要的不同在於 exendin-4 有較長的半衰期。Doyle 學者在 2003 年的研究指出，exendin-4 C 端的九個胺基酸對於結合至胰高血糖素 -1 接受器能力以及生物活性是很重要的(Doyle et al., 2003)。

Exendin-4 與一氧化氮提供劑 Na nitroprusside 降低攝食的效果：

在 1999 年 Young 等學者的研究指出，當持續六週每天腹腔注射兩次 exendin-4 (0.1、1、10、100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)，會有明顯降低食物攝取的效果，且隨著劑量的增加其抑制攝食的作用亦越顯著。由實驗一中得知，腹腔注射 exendin-4 明顯造成大白鼠攝食量降低。2003 年有文獻指出腹腔注射 0.5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 的 exendin-4 確實能夠有效降低食物攝取量 (Aziz & Anderson., 2003)，這與本實驗所得到之結論相同。

當單獨外給一氧化氮提供劑 nitroprusside (500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 或 2 mg/Kg)，其攝食量與對照組相較並無明顯差異。此實驗結果也與 Racotta 等學者在 1998 年的結果相同(Racotta et al., 1998)，但他們發現同樣劑量的 nitroprusside 卻可阻斷 epinephrine 抑制攝食的作用；本實驗同時注射 exendin-4 與 nitroprusside 後，大白鼠攝食量仍和 exendin-4 + saline 組一樣的低。故我們推論，胰高血糖素 -1 類似物 exendin-4

並非經由抑制一氧化氮而達到降低攝食之作用，亦即只要注射 exendin-4，不論有無外給 nitroprusside 情況之下，大白鼠的攝食量皆會顯著的降低。

腦內注射 MC 接受器拮抗劑對周邊給予 exendin-4 下降攝食之影響：

為了證實 exendin-4 抑制攝食的作用是否經由活化 MC 系統而達成，在本實驗中分別給予 MC 第 3/4 型 (SHU9119) 或第 4 型 (HS014) 接受器之拮抗劑來觀察其攝食量的變化。由實驗二中得知，腦室內注射 MC 第 3/4 型接受器拮抗劑 SHU9119 (1 μ g/5 μ l) 或第 4 型接受器拮抗劑 HS014 (1.5 和 5 μ g/5 μ l)，其攝食量與給予 5 μ l 生理食鹽水的對照組相比較之下並無顯著的變化。但之前文獻指出在正常進食的大鼠身上以腦室注射 SHU9119 或 HS014 皆則會增加食物的攝取 (Grill et al., 1998; Kask et al., 1998)，而本實驗的動物為食物剝奪二十四小時的大鼠，因此可能在禁食飢餓的狀態下 MC 系統不活化，所以給予 MC 的拮抗劑並不影響攝食變化。然而在第四小時，單獨給予 MC 接受器拮抗劑 SHU9119 或 HS014 的攝食量明顯降低，且與對照組間有顯著差異，但原因不是很清楚仍需再進一步做探討。

當同時給予 exendin-4 與 MC 第 3/4 型接受器拮抗劑 SHU9119，其攝食量顯著高於單獨給予 exendin-4 組，並與對照組 (saline + saline) 間並無顯著差異。雖然給予 1.5 μ g 的 HS014 後無法防止 exendin-4

所引起大白鼠攝食量降低的效果，但高劑量(5 μ g)的 HS014，卻可以阻斷 exendin-4 的作用。由於 HS014 對於 MC4 接受器的親和力分別為 MC 1 MC 3 MC 5 接受器的 34 17 220 倍(Schioth et al., 1998)，因此本實驗證實中樞的 MC 4 接受器的確參與了 exendin-4 對攝食的效果。

另有文獻指出，不僅 MC 4 接受器與攝食調節有關，MC 3 接受器亦對於能量代謝的調控扮演著一個重要的角色(Williams et al., 2000)。在 MC 4 接受器剔除(MC 4R -/-)的小鼠會有過度攝食的現象發生(Butier et al., 2001)；而 MC 3 接受器剔除(MC 3R -/-)的小鼠則無過度攝食或明顯體重增加的現象，但會增加脂肪量及攝食的效能(Chen et al., 2000 ; Butier et al., 2000)。這也顯示出 MC 4 接受器主要負責調控食物攝取，而 MC 3 接受器則調控食物效能與脂肪儲存。由於本實驗利用 MC 3/4 接受器的拮抗劑亦可以阻斷 exendin-4 的抑制攝食作用，所以我們無法排除中樞 MC 3 接受器亦參與其中的可能性。但因 MC 3 接受器剔除的小鼠並不會增加攝食量，因此中樞的 MC 3 接受器應該也未參與 exendin-4 抑制攝食行為之作用。Cone 在 1999 年提出位在下視丘弓狀核的 POMC 細胞本體會投射到室旁核、背中央核、腹側核等區域，且這些腦區域上都有著 MC 3 及 MC 4 接受器的存在(Cone., 1999)，相同的在下視丘這些區域也有 GLP-1 及其接

受器的存在(Shimizu et al., 1987 ; Sarkar et al., 2003)。故我們推測 ,
exendin-4 抑制攝食的效果可能經由下視丘的 MC 系統而達成 , 實驗
的結果亦支持我們的假說。

然而在 2000 年 Edwards 等學者卻指出中樞的 GLP-1 並不透過
MC 4 接受器的作用路徑來達成減少食物攝取的效果(Edwards et al.,
2000)。這結果和我們的實驗數據有所差異 , 也許因為動物模式不同
而造成相異 ; Edwards 等是直接將胰高血糖素 -1(GLP-1) 注射至第
三腦室並利用 AgRP 阻斷 MC 接受器的作用 , 而本實驗是以腹腔注射
exendin-4 來達到抑制攝食的效果 , 中樞則使用特異性較高的 MC 接
受器拮抗劑 SHU9119 和 HS014。另外 Seeley 等在第三腦室注射 GLP-1
所誘發的抑制攝食作用則無法被 0.5 nmol (相當等於 0.5 μ g)SHU9119
所阻斷(Seeley et al., 1997) , 本實驗使用的 SHU9119 則為 1 μ g , 約為
Seeley 等人的 2 倍劑量 , 所以可能所使用的動物模式、藥物、劑量及
注射的途徑不同而導致上述之差異。

Eexendin-4 對 cFos 蛋白表現量的影響 :

本實驗中以 cFos 作為神經活性的指標 , 觀察在下視丘弓狀核中的
cFos 是否受到頸靜脈注射 exendin-4 而改變。cFos 為 *c-fos* 原始致
癌基因的產物 , 也是核蛋白的一種。但至今在中樞神經系統中所扮演
的角色及功能仍不是很清楚 , 其除了可以作為第三傳訊因子之外 , 當

動物受到某些刺激，像是：壓力、滲透壓改變、給予特定的藥物時，會使 cFos 在許多神經腦細胞中產生短暫且快速的表現(Curran & Morgan., 1987 ; Bonaz & Tache., 1994)。此外，在 1994 年 Mistry 等人研究指出進食與食物的剝奪都會影響下視丘 cFos 的表現；所以在本實驗中先剝奪食物二十四小時後才注射藥物，且給予藥物後就不再供給任何食物，並於四小時後立即灌流，以避免上述之進食問題所導致的 cFos 表現量差異。而在本篇實驗二中結果顯示當大白鼠接受頸靜脈給予 exendin-4 (0.5 µg/ml/Kg)處理後，下視丘弓狀核 cFos 的表現顯著增加，且將其量化統計可看見不論是弓狀核全部或每個切片平均的 cFos 含量都有顯著增加，因此可見周邊 exendin-4 之處理的確可以活化弓狀核的細胞。

Exendin-4 對於 α -MSH 神經元中 cFos 蛋白表現量之影響：

由本篇研究結果顯示頸靜脈注射 exendin-4，對於下視丘弓狀核 α -MSH 細胞的表現量與對照組並無顯著性的差異。這可能是因為短期的 exendin-4 作用並不影響到 α -MSH 細胞的總量。此外，弓狀核 cFos 在 α -MSH 細胞之表現與對照組也無差異 儘管 exendin-4 在弓狀核可誘導較多的 cFos 表現，但顯然這些 cFos 蛋白並不存在於 α -MSH 細胞中。在 2004 年 Sebastien 等人指出以腹腔注射 leptin 可明顯誘導弓狀核 α -MSH 細胞的 cFos 表現(Sebastien et al., 2004)。顯示弓狀核

的 α -MSH 細胞的確具有表現 cFos 蛋白的能力，但顯然由周邊注射 exendin-4 並不足以誘導這些蛋白的表現，而腦室注射 exendin-4 是否又會影響 α -MSH 神經元 cFos 蛋白的表現則需更進一步的去探討。因此我們也可以推論周邊注射 Exendin-4 會誘導其他非 α -MSH 細胞 cFos 的表現，但由於在行為上我們觀察到 Exendin-4 抑制攝食作用的確需經 MC 受器而達成，因此推測 α -MSH 的釋放量不一定和弓狀核 α -MSH 神經中 cFos 的表現量有正相關。

在大白鼠或小鼠中給予 exendin-4 能刺激胰島素分泌及產生低血糖現象(Baggio et al., 2000 ; Parkes et al., 2001)；也會促使胰臟內分泌細胞分化 增生與 β 細胞的擴充(Xu et al., 1999)並改善胰島素的敏感性(Young et al., 1999)。另外，若中樞給予外生性胰島素則會降低食物的攝取(Schwartz et al., 1992)，而同時注射 SHU9119 (0.1 nmol ，相當等於 0.1 μ g)與胰島素則對攝食量沒有影響(Stephen et al., 2002)，顯示胰島素於中樞抑制攝食的作用必須透過 MC 系統。亦有文獻指出在禁食的大白鼠中以中樞注射胰島素會增加 POMC (α -MSH 前驅物質)的表現，且有大多數(90%)的 POMC 細胞會表現胰島素接受器- β (Stephen et al., 2002)。由此，我們推測 exendin-4 在攝食的影響亦有可能透過胰島素的上升作用而刺激 MC 系統來達到抑制食物攝取的效果，但詳細的路徑仍需進一步的實驗來證實。

綜合以上的研究結果，得知腹腔注射 exendin-4 確實能顯著抑制實驗動物之攝食量且增加下視丘弓狀核 cFos 蛋白的表現，而 exendin-4 是經由 MC 系統而非一氧化氮系統來誘發厭食行為。

伍、參考文獻

Akbulut S., Byersdorfer CA., Larsen CP., Zimmer SL., Humphreys TD., Clarke BL. Expression of the melanocortin 5 receptor on rat lymphocytes. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2001; 281: 1086-1092.

Al-Barazanji KA., Arch JRS., Buckingham RE., Tadayyon M. Central exendin-4 infusion reduces body weight without altering plasma leptin in (*fa/fa*) Zucker rats. *Obes Res.* 2000; 8: 317-323.

Alvaro JD., Tatro JB., Duman RS. Minireview : melanocortins and opiate addiction. *Life Sci.* 1997; 61: 1- 9.

Argiolas A., Melis M.R., Murgia S., Schioth HB. ACTH and alpha-MSH-induced grooming, stretching, yawning and penile erection in male rats: site of action in the brain and role of melanocortin receptors. *Brain Res Bull.* 2000; 51: 425-433.

Aziz A., Anderson GH. Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, interacts with proteins and their products of digestion to suppress food intake in rats. *J Nutr.* 2003; 133: 2326-2330.

Baggio L., Adatia F., Bock T., Brubaker PL., Drucker DJ. Sustained expression of exendin-4 does not perturb glucose homeostasis, β -cell mass, or food intake in metallothionein-preproexendin transgenic mice. *Biol Chem.* 2000; 275: -34471-34477.

Barragan JM., Rodriguez RE., Eng J., Blazquez E. Interaction of exendin-(9-39) with the effects of glucagons-like peptide-1-(7-36) amide and of exendin-4 on arterial blood pressure and heart rate in rats. *Regul Pept.* 1996; 67: 63-68.

Benoit SC., Air EL., Coolen LM., Strauss R., Jackman A., Clegg DJ., Seeley RJ., Eoods SC. The catabolic action of insulin in brain is mediated by melanocortins. *Neuroscience.* 2002; 22: 9048-9052.

Bernardis LL., Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited : Ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996; 20: 189-287.

Bonaz B, Tache Y. Induction of Fos immunoreactivity in the rat brain after cold-restraint induced gastric lesions and fecal excretion. *Brain Res.* 1994; 652: 56-64.

Bredt DS., Snyder SH. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12: 125-128.

Buffa B., Polak JM., Pearse AGE., Solcia E., Grimelius L., Capella C. Identification of the intestinal cell storing gastric inhibitory polypeptide. *Histochemistry.* 1975; 43: 249-255.

Butler AA., Kesterson RA., Khong K., Cullen MJ., Pellemounter MA., Dekoning J., Baetscher M., Cone RD. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptordeficient mouse. *Endocrinology.* 2000; 141: 3518-3521.

Butler, AA., Marks DL., Fan W., Kuhn CM., Bartolome M., Cone RD. Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci.* 2001; 4: 605- 611.

Chakraborty AK., Funasaka Y., Pawelek JM., Nagahama M., Ito A., Ichihashi M. *J Invest Dermatol.* 1999; 112: 853- 860.

Chen AS., Marsh DJ., Trumbauer ME., Frazier EG., Guan XM., Yu H., Rosenblum CI., Vongs A., Feng Y., Cao L., Metzger JM., Strack AM., Camacho RE., Mellin TN., Nunes CN., Min W., Fisher J., Gopal-Truter S., MacIntyre DE., Chen HY., Van der Ploeg LHT. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet.* 2000; 26: 97- 102.

Chen W., Kelly MA., Opitz-Araya X., Thomas RE., Low MJ., Cone RD. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell.* 1997; 91: 789-798.

Chhajlani V. Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int.* 1996; 38: 73-80.

Chhajlani V., Wikberg JE. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* 1992; 309: 417- 420.

Choi YH., Furuse M., Okumura J., Denbow DM. Nitric oxide controls feeding behavior in the chicken. *Brain Res.* 1994; 654: 163-166.

Cone RD. The central melanocortin system and energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 10: 211-216.

Cowley MA., Pronchuk N., Fan W., Dinulescu DM., Colmers WF., Cone RD. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron.* 1999; 24: 155-163.

Curran T., Morgan JI. Memories of *fos*. *Bioessays.* 1987; 7: 225-228.

Doyle ME., Theodorakis MJ., Holloway HW., Bernier M., Greig NH., Egan JM. The importance of the nine-amino acid C-terminal sequence of exendin-4 for binding to the GLP-1 receptor and for biological activity. *Regul Pept.* 2003; 114: 153-158.

Drucker DJ. Glucagon-like peptides. *Diabetes.* 1998; 47: 159-69.

Edwards CMB., Abott CR., Sunter D., Kim MS., Dakin CL., Murphy KG., Abusnana S., Taheri S., Rossi M., Rossi M., Bloom SR. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagons-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Res.* 2000; 866: 128-134.

Eissele R., Goke R., Willemer S., Harthus HP., Vermeer H., Arnold R., Goke B. Glucagon-like peptide-1 cell in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22: 283-291.

Eng J., Kleinman WA., Singh L., Singh G., Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue from *Heloderma suspectum* venom. *J Biol Chem.* 1992; 267: 7402-7405.

Fan W., Boston BA., Kesterson RA., Hruby VJ., Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the Agouti obesity syndrome. *Nature.* 1997; 385: 165-168.

Fathi Z., Iben LG., Parker EM. Cloning, expression, and tissue distribution of a fifth melanocortin receptor subtype. *Neurochem Res.* 1995; 20: 107-113.

Flint A., Raben A., Astrup A., Holst JJ. Glucagon like peptide-1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest.* 1998; 101: 515-520.

Gantz I., Konda Y., Tashiro T., Shimoto Y., Miwa H., Munzert G., Watson SJ., DelValle J., Yamada T. Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 1993; 268: 8246-8250.

Giraud SQ., Billington CJ., Levine AS. Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res.* 1998; 809: 302-306.

Glod RM. Hypothalamus obesity : The myth of the ventromedial nucleus. *Science.* 1973; 182: 488-490.

Goke R., Fehmarm HC., Lirm T., Schmidt H., Krause M., Eng J., Goke B. Exendin-4 is a high potency agonist and truncated exendin-(9-39)-amide receptor of insulin-secreting β -cells. *J Biol Chem.* 1993; 268: 19650-19655.

Grill HJ., Ginsberg AB., Seeley RJ., Kaplan JM. Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *Neurosci.* 1998; 18: 10128-10135.

Gutzwiller JP., Goke B., Drewe J., Hildebrand P., Ketterer S., Handschin D., Winterhalder R., Conen D., Beglinger C. Glucagon like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut.* 1999; 44: 81-86.

Jodka C., Gedulin B., Young A. Exendin-4 potently regulates gastric emptying in rats. *Diabetes.* 1998; 47: 403A. (Abstract)

Kask A., Rgo L., Phkla R., Wikber JES., Schioth HB. Selective antagonist for the melanocortin 4 receptor (HS014) increase food intake in free-feeding rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245: 90-93.

Kieffer TJ., McIntosh CH., Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 1995; 136: 3585-3596.

Kim MS., Rossi M., Abusnana S., Sunter D., Morgan DG., Small CJ., Edwards CM., Heath MM., Stanley SA., Seal LJ., Bhatti JR., Smith DM., Ghatei MA., Bloom SR. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*. 2000; 49: 177-182.

Koegler FH., Grove KL., Schiffmacher A., Smith MS., Cameron JL. Central melanocortin receptors mediate changes in food intake in the rhesus macaque. *Endocrinology*. 2001; 142: 2586-2592.

Kolterman OG., Buse JB., Fineman MS., Gaines E., Heintz S., Bicsak TA. Synthetic exendin-4 (AC2993) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 3082- 3089.

Kreymann B., Ghatei MA., Burnet P., Williams G., Kanse S., Diani AR., Bloom SR. Characterization of glucagonlike peptide-1- (7–36)amide in the hypothalamus. *Brain Res*. 1989; 502: 325-331.

Labbe O., Desarnaud F., Eggerickx D., Vassart G., Parmentier M. Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry*. 1994; 33: 4543-4549.

Lambert PD., Wilding JPH., Ghatei MA., Bloom SR. Arole for GLP-1(7-36) NH2 in the central control of feeding behavior. *Digestion*. 1993; 54: 360-361.

Larsen PJ., Tang-Christensen M., Holst JJ., Orskov C. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*. 1997; 77: 257-270.

Low MJ., Simerly R., Cone RD. Receptors for the melanocortin peptides in the central nervous system. *Current Opinion in Endocrinol Diab*. 1994; 1: 79-88.

MacNeil DJ., Howard AD., Guan X., Fong TM., Nargund RP., Bednarek MA., Goulet MT., Weinberg DH., Strack AM., Marsh DJ et al. The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol*. 2002; 440: 141-157.

Mentlein R., Gallwitz B., Schmidt WE. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur J Biochem.* 1993; 214: 829-835.

Mistry AM., Helferich W., Romsos DR. Elevated neuronal c-Fos-like immunoreactivity and messenger ribonucleic acid (mRNA) in genetically obese (*ob/ob*) mice. *Brain res.* 1994; 666: 53-60.

Monda M., Viggiano A., Sullo A., De Luca V. Nitric oxide reduces hypophagia induced by threonine free diet in the rat. *Brain Res.* 1998; 808: 129-133.

Montrose-Rafizadeh C., Yang H., Pritchette LA., Eng J. Distinct activation of GLP-1 receptor by exendin-4 and GLP-1. *Diabetes.* 1998; 47: 192A. (Abstract)

Morley JE., Flood JF. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Sci.* 1991; 49: 707-711.

Mountjoy KG., Mortrud MT., Low MJ., Simerly RB., Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 1298-1308.

Mountjoy KG., Wild JM. Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. *Dev Brain Res.* 1998; 107: 309-314.

Mountjoy KG., Wong J. Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 128: 171- 177.

Ollmann MM., Wilson BD., Yang YK., Kerns JA., Chen Y., Gantz I., et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by Agouti-related protein. *Science.* 1997; 178:135-138.

Owji AA., Khoshdel Z., Sanea F., Panjehshahin MR., Shojaee Fard M., Smith DM., Coppock HA., Ghatei MA., Bloom SR. Effect of intracerebroventricular injection of glucagon like peptide-1 and its related peptide on serotonin metabolism and on levels of amino acids in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 2002; 929: 70-75.

Parkes D., Jodka C., Smith P., Nayak S., Rinehart L., Gingerich R., Chen K., Young A. Pharmacokinetic actions of exendin-4 in the rat: comparison with glucagon-like peptide-1. *Drug Dev Res.* 2001; 53: 260-267.

Parkes DG., Pittner R., Jodka C., Smith P., Young A. Insulinotropic actions of exendin-4 and glucagon-like peptide-1 in vivo and in vitro. *Metabolism.* 2001; 50: 583- 589.

Perfetti R., Merkel P. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic beta-cell function. *Eur J Endocrinol.* 2000; 143: 717-725.

Racotta R., Soto-Mora LM., Pinon-Lopez MJ., Quevedo L. Effect of intraperitoneal nitroprusside and adrenergic agonists on food and water intake. *Physiol Behav.* 1998; 63: 455-461.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd Ed. Academic press Inc; 1986.

Rodriquez de Fonseca F., Navarro M., Alvarez E., Roncero I., Chowen JA., Maestre O., Gomez R., Munoz RM., Eng J., Blazquez E. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. *Metabolism.* 2000; 49: 709-717.

Roselli-Reh fuss L., Mountjoy KG., Robbins LS., Mortrud MT., Low MJ., Tatro JB., Entwistle ML., Simerly RB., Cone RD. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 8856-8860.

Sarkar S., Fekete C., Legradi G., Lechan RM. Glucagon like peptide-1(7-36) amide (GLP-1) nerve terminals densely innervate corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 2003; 985: 163-168.

Schaffer JV., Bologna JL. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch. Dermatology.* 2001; 137: 1477- 1485.

Schick RR., Zimmermann JP., Vorm Walde T., Schusdziarra V., Classen M. Glucagon-like peptide (GLP)-1-(7-36)-amide: A central suppressor of food intake in fasted rats. *Gastroenterology.* 2002; 102: 756A. (Abstract)

Schioth HB., Mutulis F., Muceniece R., Prusis P., Wikberg JE. Discovery of novel melanocortin 4 receptor selective MSH analogues. *Br J Pharmacol.* 1998; 124: 75- 82.

Schmidt HH., Nau H., Wittfoht W., Gerlach J., Prescher KE., Klein MM., Niroomand F., Bohme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1988; 154: 213-216.

Schwartz MW., Figlewicz DP., Baskin DG., Woods SC., Porte Jr D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 1992; 13: 387-414.

Sebastien GB., Shin JD., Richard BS. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *Neuroscience.* 2004; 24: 2797-2805.

Seeley RJ., Yagaloff KA., Fisher SL., Burn P., Thiele TE., Van Dijk G., Baskin DG., Schwartz MW. Melanocortin receptor in leptin effects. *Nature.* 1997; 390: 349.

Shimizu I., Hirota M., Ohboshi C., Shima K. Identification and localization of glucagon like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology.* 1987; 121:1076-7082.

Squadrito F., Calapai G., Cucinotta D., Altavilla D., Zingarelli B., Ioculano M., Urna G., Sardella A., Campo GM., Caputi AP. Anorectic activity of NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1993; 230: 125-128.

Starowicz K., Przewlocka B. The role of melanocortins and their receptor in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci.* 2003; 73: 823-847.

Szayna M., Doyle ME., Betkey JA., Holloway HW., Spencer RGS., Greig NH., Egan JM. Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology.* 2000; 141: 1936-1941.

Turton MD., O' Shea D., Gunn, I., Beak SA., Edwards CM., Meeran K., Choi SJ., Taylor GM., Heath MM., Lambert PD., Wilding JP., Smith DM., Ghatei MA., Herbert J., Bloom SR. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding . *Nature.* 1996; 379: 69-72.

Vergoni AV., Bertolini A. Role of melanocortin in the central control of feeding. *Eur J Pharmacol.* 2000; 405: 25-32.

Watson SJ., Akil H., Richard III CW., Barchas JD. Evidence for two separate opiate peptide neuronal systems. *Nature.* 1978; 275: 226-228.

Wikberg JES. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur J Pharmacol.* 1999; 375: 295-310.

Wikberg JES., Muceniece R., Mandrika I., Prusis P., Lindblom J., Post C., Skottner A. New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res.* 2000; 42: 393-420.

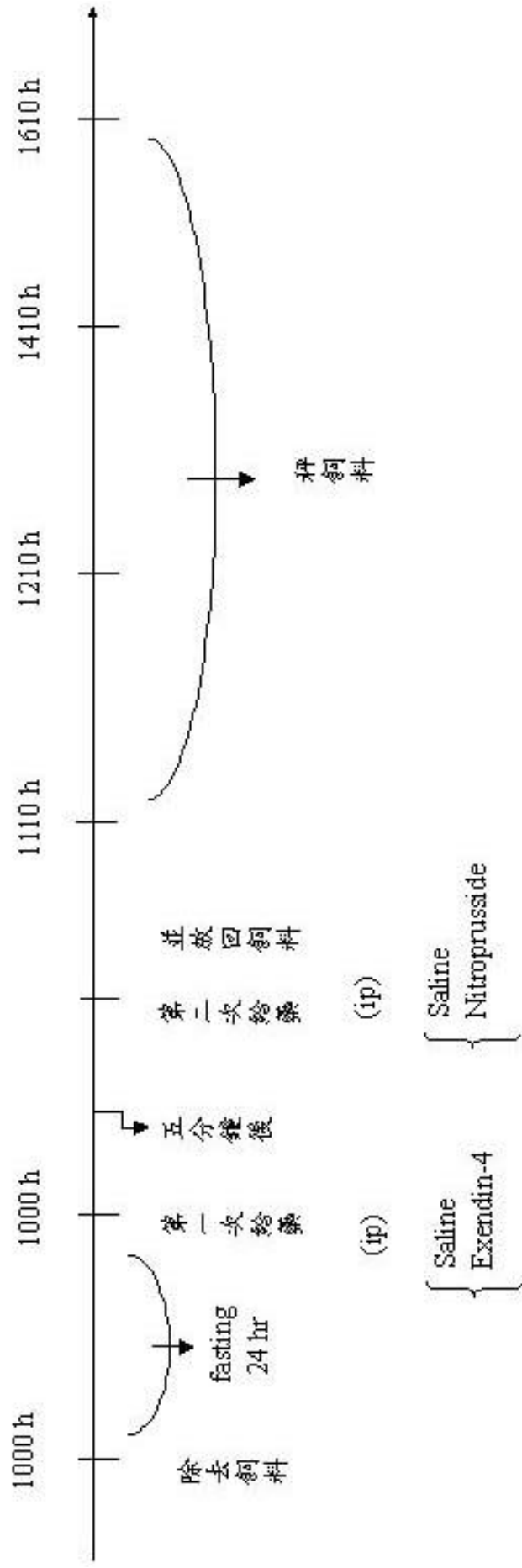
Williams DL., Kaplan JM., Grill HJ. The role of the dorsal vagal complex and the vagus nerve in feeding effects of melanocortin-3/4 receptor stimulation. *Endocrinology.* 2000; 141: 1332- 1337.

Xia Y., Wikberg JE. Localization of ACTH receptor mRNA by in situ hybridization in mouse adrenal gland. *Cell Tissue Res.* 1996; 286: 63- 68.

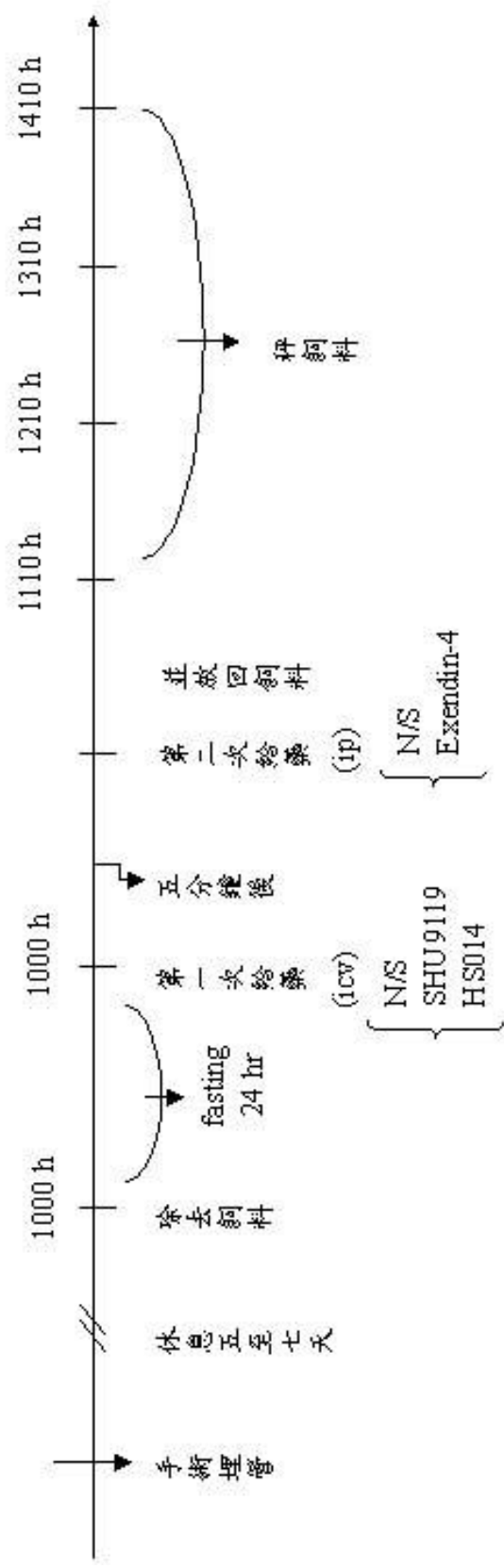
Xu G., Stoffers DA., Habener JF., Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes.* 1999; 48: 2270- 2276.

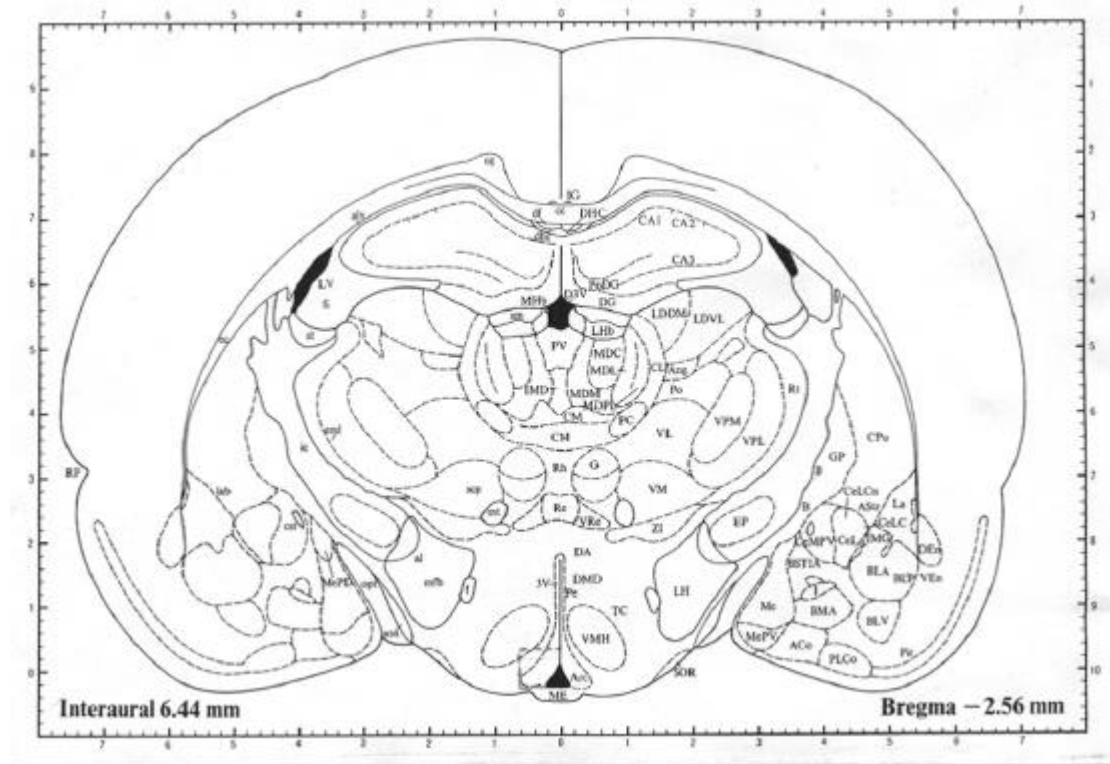
Yasuda N., Nagakura T., Yamazaki K., Inoue T., Tanaka I. Improvement of high fat-diet-induced insulin resistance in dipeptidyl peptidase IV-deficient Fischer rats. *Life Sci.* 2002; 71: 227-238.

Young AA., Gedulin BR., Bhavsar S., Bodkin N., Jodka C., Hansen B., et al. Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (*ob/ob*, *db/db*) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes.* 1999; 48: 1026-1034.



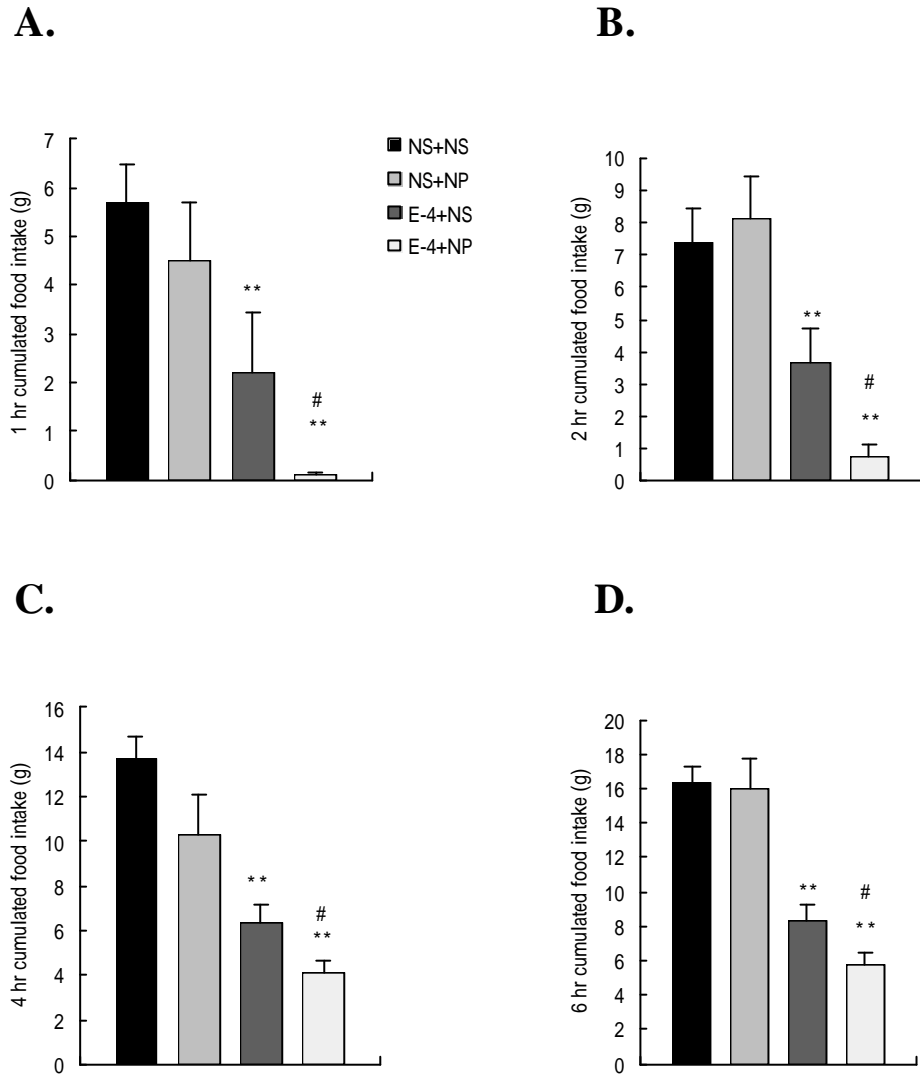
圖一、腹腔注射 exendin-4 或一氧化氮提供劑 nitroprusside 引起降低大白鼠攝食行為作用的影響之流程圖。



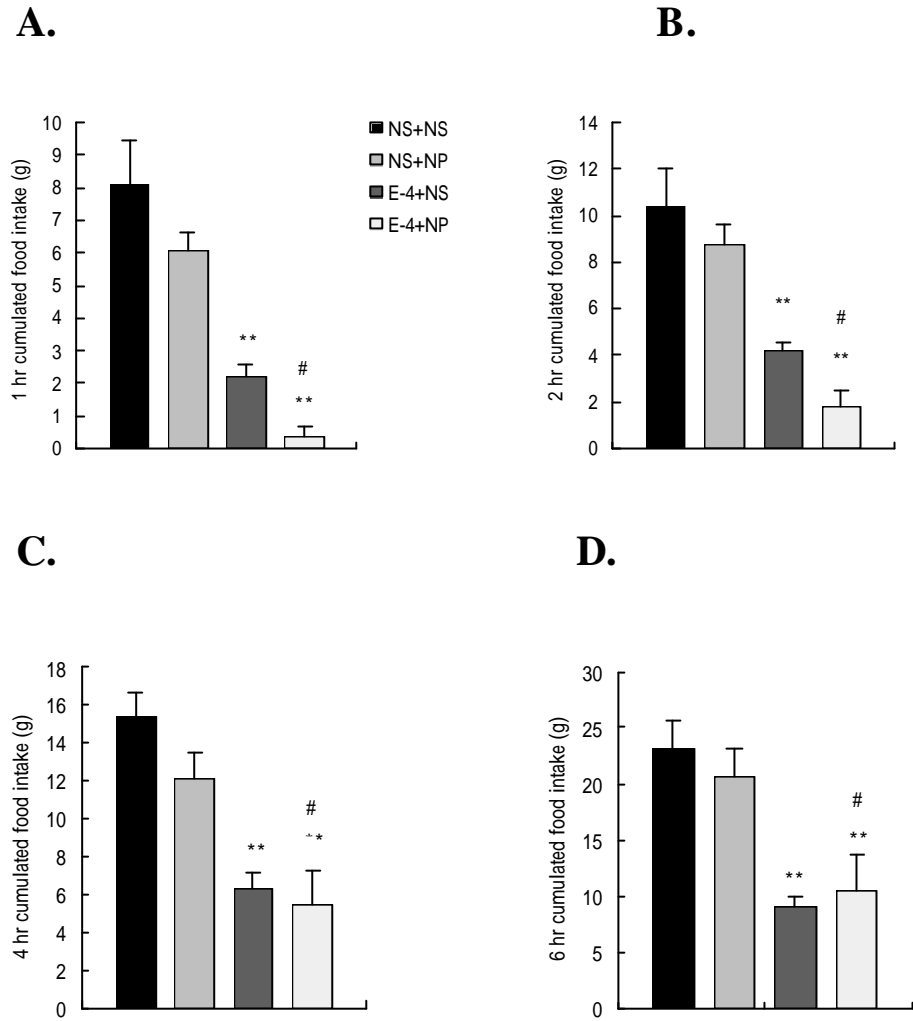


圖三、腦部冠狀切面圖顯示弓狀核(Arc)之解剖位置。3V：第三腦室；

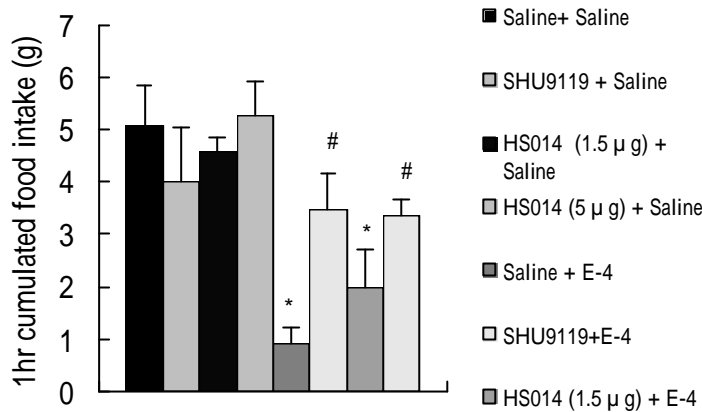
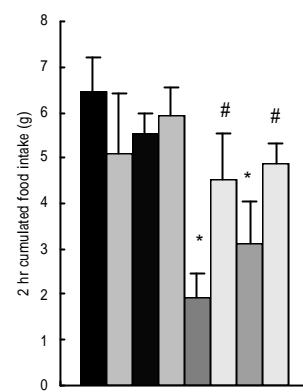
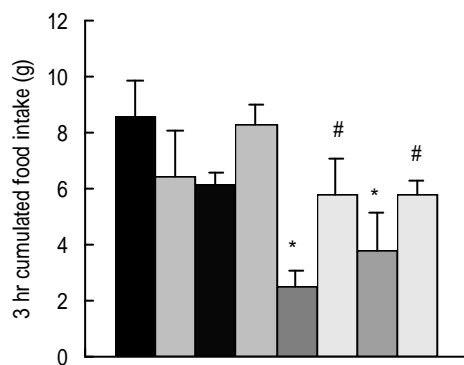
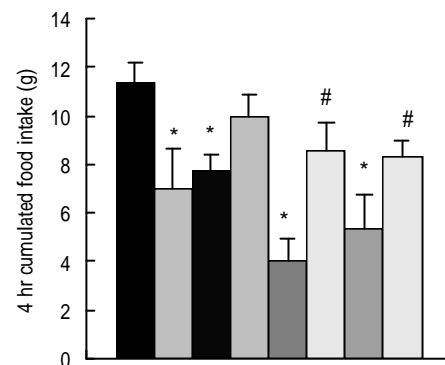
ME：median eminence，中突處。方框處為分析部位。



圖四、給予低劑量的 nitroprusside 對 exendin-4 降低攝食效果之影響(n = 4~5)。同時以腹腔注射 nitroprusside (500 $\mu\text{g/ml/Kg}$)與 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g/ml/Kg}$) , 對於大白鼠攝食量之影響。各組以 mean \pm SEM 表示 , **p < 0.01 v.s NS + NS ; # p < 0.05 v.s NS + NP。A 圖為累積 1 小時之攝食量 ; B 圖為累積 2 小時之攝食量 ; C 圖為累積 4 小時之攝食量 ; D 圖為累積 6 小時之攝食量。(NS : saline ; NP : nitroprusside ; E-4 : exendin-4)

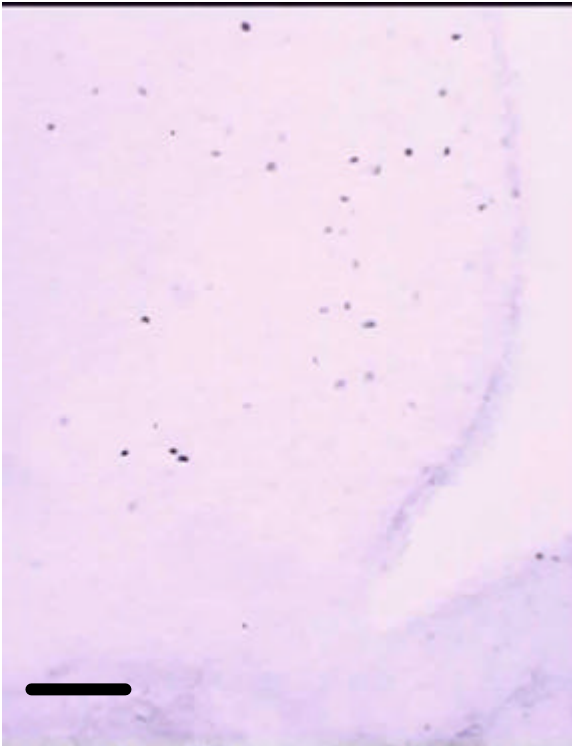


圖五、給予高劑量的 nitroprusside 對 exendin-4 降低攝食效果之影響(n = 4~5)。同時以腹腔注射 nitroprusside (2 mg/ml/Kg)與 exendin-4 (0.5 µg/ml/Kg) , 對於大白鼠攝食量之影響。各組以 mean ± SEM 表示 , **p < 0.01 v.s NS + NS ; # p < 0.05 v.s NS + NP。A 圖為累積 1 小時之攝食量 ; B 圖為累積 2 小時之攝食量 ; C 圖為累積 4 小時之攝食量 ; D 圖為累積 6 小時之攝食量。(NS : saline ; NP : nitroprusside ; E-4 : exendin-4)

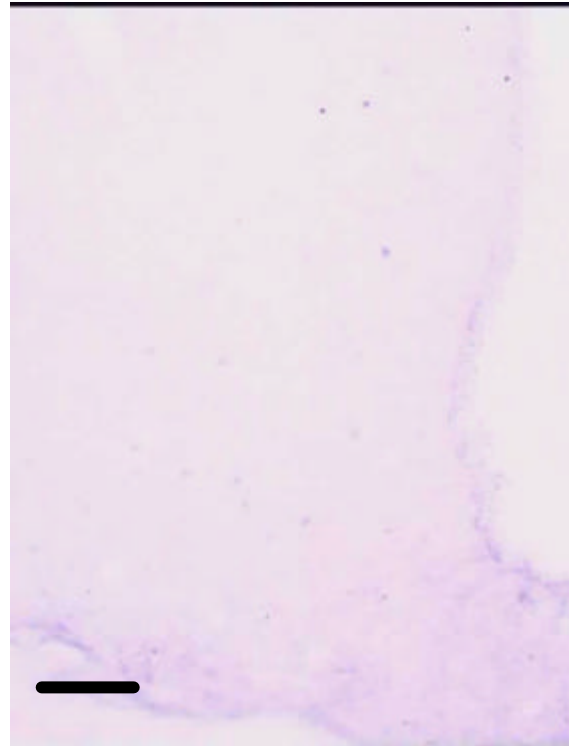
A.**B.****C.****D.**

圖六 給予 MC 3/4 antagonist 對 exendin-4 降低攝食效果之影響(n = 7 ~ 10)。由腦室內注射 MC 3/4 antagonist SHU9119 (1 μg/5μl) 或 MC 4 antagonist HS014 (1.5 或 5 μg/5μl) 與腹腔注射 exendin-4 (0.5 μg/ml/Kg) , 對於大白鼠攝食量之影響。各組以 mean ± SEM 表示 , # p < 0.05 v.s NS + E-4 ; * p < 0.01 v.s NS + NS。A 圖為累積 1 小時之攝食量 ; B 圖為累積 2 小時之攝食量 ; C 圖為累積 3 小時之攝食量 ; D 圖為累積 4 小時之攝食量。(E-4 : exendin-4)。

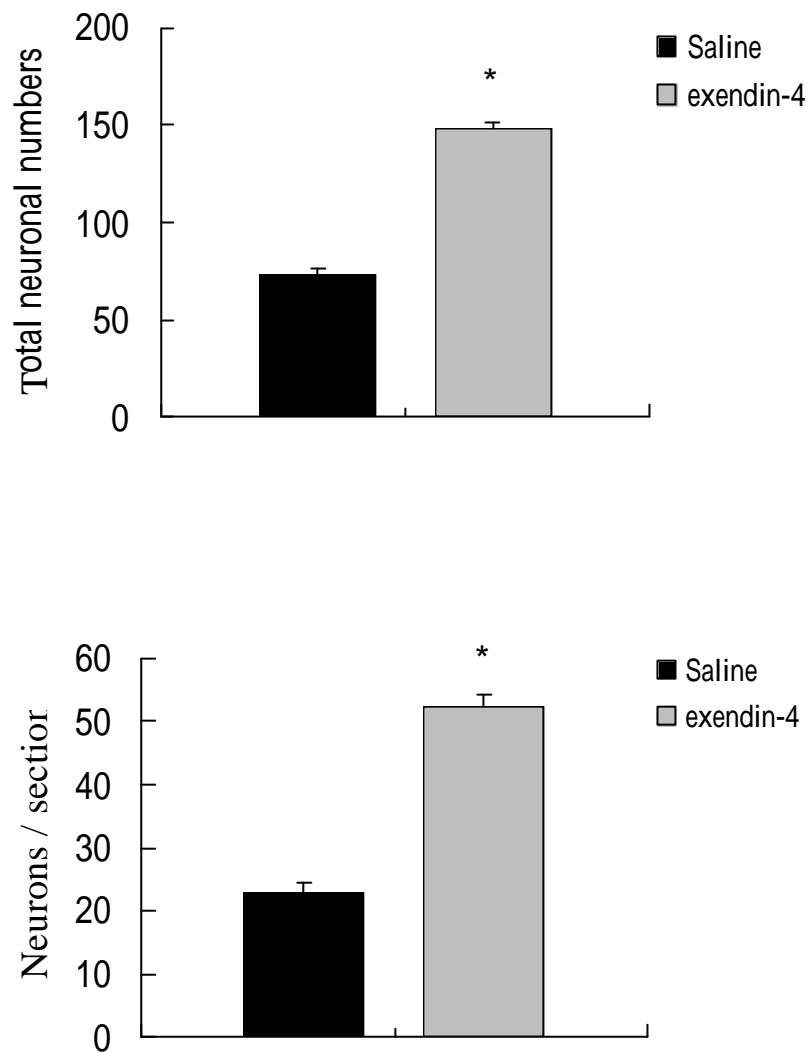
Exendin-4



Control

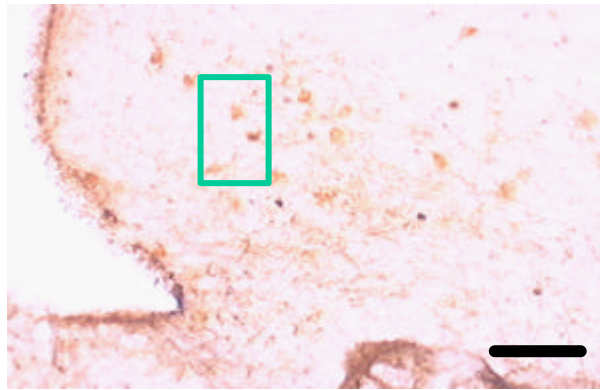


圖七、下視丘弓狀核 cFos 對於腹腔注射 exendin-4 之反應。左圖：頸靜脈注射 exendin-4 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{Kg}$); 右圖：頸靜脈注射 saline(1 ml/Kg)。黑色橫線(—)相當於 80 μm 。

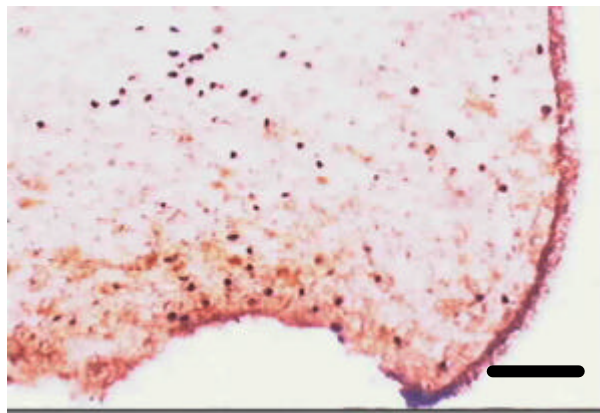


圖八、腹腔注射 exendin-4 對於下視丘弓狀核 cFos 表現量的影響。上圖：全部弓狀核 cFos 的含量；下圖：平均每片組織上弓狀核 cFos 的含量(*p < 0.01 v.s saline)。

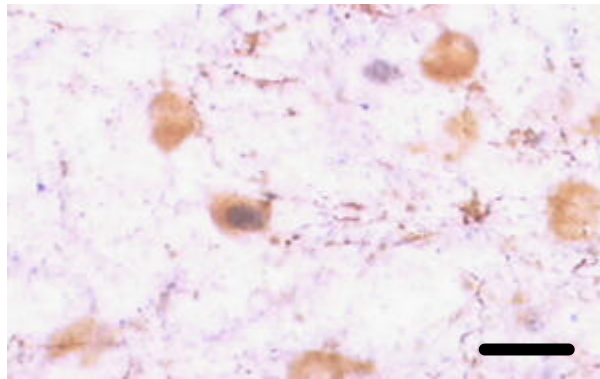
A.



B.

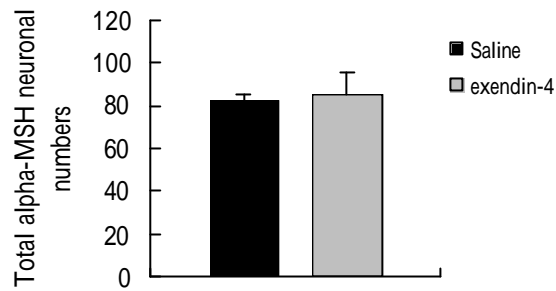


C.

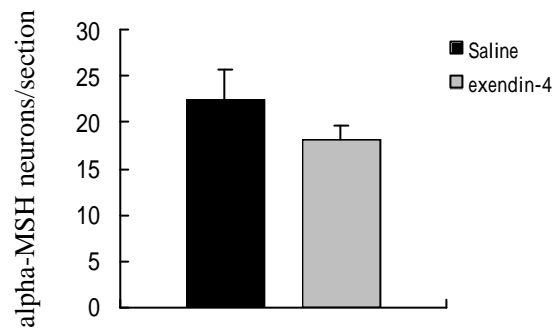


圖九、弓狀核中 cFos (藍色細胞核)與 a-MSH 細胞(褐色細胞核)的表現。A 圖：對照組；B 圖：注射 exendin-4；C 圖：A 圖方框部份放大。黑色橫線(—)相當於 80 μm (A、B 圖)或 20 μm (C 圖)。

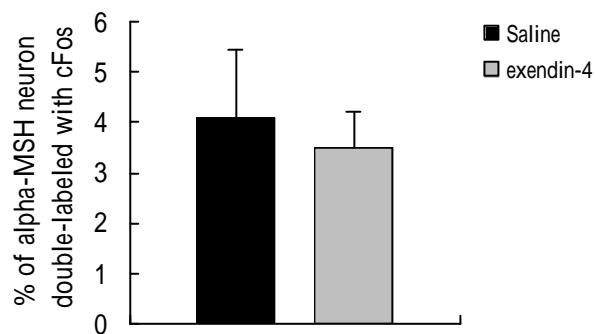
A.



B.



C.



圖十、Exendin-4 對於弓狀核中 α -MSH 細胞活性的影響。A 圖：弓狀核全部的 α -MSH 細胞含量；B 圖：平均每片組織上弓狀核的 α -MSH 細胞含量；C 圖： α -MSH 表現 cFos 蛋白的百分比，兩組間並無顯著差異。

作者簡歷

姓名：李竹菡

出生日：68.11.23

出生地：台灣省屏東縣

學歷：私立中華醫事專科學校護理科（以改制為中華醫事技術學院）

私立弘光技術學院護理系（以改制為弘光科技大學）

私立中國醫藥大學基礎醫學研究所

期刊論文：

1. Yang C-S J., Lee J-W., Chou P-Y., Wang H-J. (2002): Effect of guanosine 5'-monophosphate, GMP on food and water intake in male rats. 弘光學報 39 : 125-128.

會議論文：

1. J.W. Lee, L.Y. Yeh, Y.S. Chen, C.S.J Yang, H-J. Wang. (2004): Roles of nitric oxide and melanocortin pathways in the anorectic effect of exendin-4. 生物醫學聯合學術年會 (Abstract) .
2. M.J. Yeh, L.Y. Yeh, J.W. Lee, C.S.J Yang, H.J. Wang. (2004): The effect of adenosine receptor antagonists on feeding. 生物醫學聯合學術年會 (Abstract) .