

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

Y 神經胜太刺激之攝食行為與下視丘室旁核中 Dynorphin
基因表現之關係

Relationship between neuropeptide Y-induced feeding behavior and dynorphin gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

計畫編號：NSC 87-2314-B-039-025

執行期限：86 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人：王慧如 中國醫藥學院醫學系生理科

† 八十六年度及以前的一般國科會專題計畫(不含產學合作研究計畫)亦可選擇適用，惟較特殊的計畫如國科會規劃案等，請先洽得國科會各學術處同意。

一、中文摘要

肥胖已成為已開發國家中最常見的文明病之一，如何有效控制體重以促進身體健康已成為近年來熱門的話題。肥胖的原因之一可能為過量攝取食物，下視丘弓狀核中的 Y-神經胜太(Neuropeptide Y; NPY)是一種刺激攝食行為的神經傳導物質，其作用的部位主要在弓狀核與室旁核。本計畫目的在證明 NPY 引起之攝食行為乃介由興奮室旁核中之類嗎啡神經元---Dynorphin 神經元而產生。實驗首先以不同劑量之 NPY 注射至雄性大白鼠腦室中，再以放射性本位雜交配合電腦影像分析，以測定室旁核中 Dynorphin mRNA 的量作為 Dynorphin 神經元活性之指標。第二實驗則以節食增加弓狀核中 NPY 細胞的合成及分泌，同樣再以放射性本位雜交測定室旁核中 Dynorphin mRNA 的量。兩實驗皆預期下視丘 NPY 增加時，室旁核中 Dynorphin mRNA 的量也相對增加。

關鍵詞：類嗎啡神經元、Y-神經生太、攝食行為、室旁核、弓狀核、本位雜交

Abstract

Obesity has been a problem in developed countries, thus weight control becomes an important issue in the public health in these countries. One of the causes for Obesity is overeating. Neuropeptide Y (NPY) from the arcuate nucleus of the hypothalamus is a strong stimulant for feeding behavior. The primary sites of its action is at the arcuate

nucleus and the paraventricular nucleus. The present study is aimed to investigate whether neuropeptide Y stimulates feeding behavior via the dynorphin neuron in the paraventricular nucleus. The first experiment investigates the effect of exogenous NPY administered into the cerebral ventricle of male rats on the gene expression of dynorphin neurons in the paraventricular nucleus using radioactive in situ hybridization for dynorphin mRNA. The second experiment utilizes food-restriction as a physiological mean to raise endogenous NPY levels. Dynorphin mRNA levels in the paraventricular nucleus are also detected by in situ hybridization. With the assistance of a computerized image analysis system, levels of mRNA can be measured by counting the silver grain numbers precipitated during the autoradiography of the radioactive in situ hybridization. I expect that when NPY levels is high, there will be an increase in dynorphin mRNA levels in the paraventricular nucleus.

Keywords : Dynorphin neurons, Neuropeptide Y, Feeding behavior, Paraventricular nucleus, Arcuate nucleus, *In situ* hybridization

二、緣由與目的

肥胖已成為已開發國家中最常見的文明病之一，而肥胖引起的各種心血管及其它相關合併症也是眾所皆知的事實。由本校因應設立的體重控制中心可見，在臺灣地區肥胖的人口也逐年在增加之中。因此如何有效控制體重以促進

身體健康已成為近年來熱門的話題。

一般認為肥胖主要的成因是吃得多動得少，但是為什麼有人喜歡吃、有人不喜歡吃，卻不是僅由心理學的角度即可令人得到滿意的答案。此外有些天生非常肥胖的人可能生理上即異於常人，導致體重容易失控。所以了解攝食功能的機轉將有助於更有效的控制體重。

由動物研究結果顯示：攝食行為主要由腦中下視丘(hypothalamus)控制。兩年前肥胖基因的發現[Zhang et al, 1994]使我們了解中樞神經系統如何和周邊系統聯繫而達到調控飲食的效果。肥胖基因的產物 Leptin 是一種游走於血液循環中的激素。正常 Leptin 是作用到下視丘掌管攝食行為的神經核，以調節進食的功能。如果 Leptin 異常則攝食行為失調，因而體重便失控。目前證據顯示 Leptin 主要作用在下視丘中的 Y-神經生太(Neuropeptide Y；NPY)細胞上以調節攝食行為[Craft et al, 1995]。

有關下視丘中的 NPY 神經對於攝食行為之研究非常多：注射 NPY 到腦室中可刺激攝食行為[Catzefflis et al, 1993]；以 NPY 的 antisense oligonucleotides 抑制下視丘 NPY 的合成後也抑制老鼠的攝食行為[Akabayashi et al, 1994]。此外在限制飲食的動物中 NPY 基因的表現也大為提高[Swartz et al, 1993]。這些證據皆顯示 NPY 神經的活化與攝食行為的產生有極密切的關係，因此本實驗室即希望進一步探討 NPY 如何達到促進攝食之機轉。

下視丘中的 NPY 主要有兩種來源(1)由腦幹發出、投射至下視丘視旁核(paraventricular nucleus；PVN)的正腎上腺素(norepinephrine)細胞同時也合成 NPY[Chronwall et al, 1985]。(2)位於下視丘弓狀核(arcuate nucleus；ARC)的 NPY 神經元可作用到 ARC 本身及 PVN [Bai et al, 1985]。

PVN 中含有許多神經生太都可調節攝食行為。PVN 破壞後的老鼠食量減少、體重減輕；而將 NPY 直皆注射入

PVN 可立即引發攝食的動作，因此 NPY 對於攝食行為的調控可能主要經由 PVN 的神經元來達成。在 PVN 中含有一種類嗎啡(opioid) 細胞 --- dynorphin (DYN) [Meister et al, 1990]。DYN 由 Prodynorphin 基因製造，主要作用在 kappa-受體。有許多研究證實 DYN 對於攝食具有重要之影響。在腦室中注射入 DYN 可促進攝食[Gosnell et al, 1986]，而此處理只在中樞神經有效，由靜脈注射的 DYN 則對攝食毫無影響[Hoskin & Ho, 1986]，因此中樞的 DYN 可能是刺激進食的種要因子之一。然而至目前為止並無直接證據顯示大腦本身的 DYN 是真正參與攝食行為的引發，這可能是受限於缺乏高專一性之 DYN 受體(即 kappa-受體) 的拮抗劑以及 DYN 可能也作用到 kappa 以外的受體。但有一實驗顯示 NPY 引發之攝食行為需經由 kappa-受體的作用[Lambert et al, 1993]，因此 NPY 可能介由刺激 PVN 中之 DYN 神經元而促進攝食行為的產生。

本實驗希望證明 NPY 引起之攝食行為乃介由興奮 PVN 中之 DYN 神經元而產生；本實驗中將以 DYN 基因表現量作為神經元活性之指標。

如果證實攝食行為的確經由 DYN 細胞之活化，則日後在治療肥胖症時應考慮到 DYN 所可能扮演之角色，或許可依此進一步研發出與 DYN 機轉有關之療法。

三、材料與方法

A. 動物實驗

本計畫分兩部分進行，皆取 200-250 克重成熟之大白鼠(Sprague-Dawley rats)為實驗動物。由於 PVN 位於腦部深層且含有許多不同的神經元，因此欲以電生理的方式測得 DYN 神經元的活性在技術上與時間上皆不切實際，故本實驗中將以 DYN 基因表現量作為神經元活性

之指標。

1. 長期腦部 NPY 注射對於 DYN 基因表現及體重之影響：

由於肥胖是一種長期的現象且基因表現的差異通常需一段時間才分辨得出，因而此實驗以長期 NPY 注射，模擬 DYN 細胞在肥胖動物中可能接受到的訊息。

動物分為三組 (1)對照組 (2)NPY-1 μ g (3)NPY-5 μ g，每組各 10 隻。

所有動物皆接受第三腦室導管埋植手術，休息一週待其恢復後，連續七天每天上午先測量體重之後，於老鼠清醒的狀態下由腦室導管注射入腦脊髓液(對照組)、1 μ g 之 NPY (NPY-1 μ g) 或 5 μ g 之 NPY (NPY-5 μ g)。第八天上午測量體重之後以 4% paraformaldehyde 將動物灌流固定，取出大腦並保存於-80°C 中等待切片。PVN 中 DYN 基因表現將以放射性本位雜交偵測。

2. 節食對於 DYN 基因表現之影響：

節食能引起 ARC 中 NPY 細胞的合成及分泌，本實驗以生理的方式增加體內 NPY 之釋放，以觀察內生性 NPY 是否能增加 DYN 細胞的活性。由於目前並無理想之 NPY 拮抗劑，因此本實驗只觀察 NPY 增加後的影響。

動物分為兩組，每組各 10 隻

(1)對照組：飲食不予限制

(2)節食組：給予正常食量之半量飲食

所有動物在實驗前一星期皆不予限制飲食，但每天須計錄其食量並取其平均值作為正常食量。對照組與節食組給予飲食處理一星期，每天上午皆測量體重，第八天上午測量體重之後以 4% paraformaldehyde 將動物灌流固定，取出大腦並保存於-80°C 中等待切片。ARC

中之 NPY 與 PVN 中 DYN 基因表現將以放射性本位雜交偵測。

B. Prodynorphin cDNA 之篩選

將大鼠下視丘 total RNA 萃取出後以 reverse transcriptase 將之轉換為 cDNA，再依據文獻 [Civelli et al 1995] 設計 primers，以 PCR 之方式將大鼠 Prodynorphin cDNA 篩選出來。篩選出的 cDNA 植入 pGEM-11Zf(+) phagemid. 以做為合成 cRNA probe 之 template.

C. 組織切片

將組織從超低溫冰庫取出放入冷凍切片機中，組織切片以 20 μ m 的厚度切片，各取前後六個單位的切片以便進行本位雜交組織法。

D. 本位雜交組織化學法 (in situ hybridization histochemistry) :

Probe 之標定

Oligonucleotide probe 之標定

人工合成與 prodynorphin mRNA 互補之 48mer 的 antisense oligonucleotide [Baker & Herkenham, 1995] 以 terminal transferase 之方式在 3' 端標定 digoxigenin-dUTP.

CRNA probes 之標定

與 mRNA 互補之 antisense RNA，由 cDNA 在體外合成，轉錄反應中含 [³⁵S] α -thio-UTP 先驅物質合成，最後放射性活力為 1×10^9 dpm/ μ g。

本位雜交組織化學法方法如下：

組織切片以 4% paraformaldehyde 固定五分鐘後於 0.1M 的磷酸緩衝溶液 (pH7.4) 清洗兩次，然後放進含有 0.25% 無水醋酸的 triethanolamine (0.1M, pH8.0) 中 10 分鐘。接下來以兩倍的 SSC 清洗並於酒精中 (70%、95%、100%) 脫水風乾後，以 100 μ l 含有探針 (0.3 μ g/ml) 的雜交溶液覆蓋在組織上，並將玻片置於緊密之置物盒中放入溫箱，在 45

°C下培養 12 小時。雜交完成後多餘的探針先以含有 2.0mM DTT 的 4 倍 SSC 溶液清洗。以 cRNA 作為 probe 之組織需放入核糖核酸分解酶(RNase)溶液中將其分解。最後玻片以高溫、低濃度的 SSC 清洗並脫水。

結果之觀察

Digoxigenin 標定之 probe 先與 1:2000 之抗體(Anti-digoxigenin-alkaline phosphate conjugate)反應(4C, 24 hr)，之後與 BCIP+NBT 之混合物反應(37 C, ~120 min)。

³⁵S 標定之 probe 必須以自動顯像步驟 (autoradiography)觀察，因此玻片風乾後塗上薄層之攝影溶液(Kodak NTB-2 emulsion)，再置於緊密不透光之黑色玻片盒中，於 4°C 中曝光 5 天後取出以沖洗 X 光底片的方式顯影。組織須以 0.5% 的 cresyl violet 作對比染色以便觀察形態。完成之玻片以電腦影像處理系統 (Image Analysis System) 在暗視野顯微鏡中分析 mRNA 之含量。

mRNA 含量之測定---電腦影像分析：

以放射性本位雜交偵測之 mRNA 經自動顯像步驟觀察到的是銀粒子的沉積，由於放射性強度與銀粒子數成一定比之關係，因此測量組織上銀粒子的數目即可代表 mRNA 之相對含量。然而吾人之肉眼即使在顯微鏡協助下亦很難計算出確實之銀粒子數，故須借助特殊之電腦程式與設備將顯微鏡中之影像擷取下來，再計算其中銀粒子之含量。此腦影像處理系統不僅更為精確同時也大為提高結果分析之速度。

完成之玻片置於暗視野顯微鏡中，將含有 ARC 或 PVN 之部位置於視野中心，利用電腦程式計算擷取影像中銀粒子總數，可代表 mRNA 之相對含量。

統計方法：

PVN 部位 DYN 的 mRNA 以平均每個切片含有銀粒子總數(total silver grains per

section) 表示，每組之平均值以單向變方分析測驗是否有組間差異。ARC 中 NPY 的 mRNA 也以相同之方式分析，以確定節食動物的確有 NPY 上升之現象。

四、結果與討論

Oligonucleotide probe

由於無法取得已發表之 dynorphin cDNA，因此實驗之 in situ hybridization 無法以 cRNA probe 進行，故實驗執行期間的前半段時間決定以 oligonucleotide 取代 [Baker & Herkenham, 1995]。考慮減少無謂的放射線費料，初步試以非放射線的 digoxigenin 作為標定物質試驗其可行性。由於 oligonucleotide 及 digoxigenin 標定靈敏度分別較 cRNA 及放射線為低，因而無法有效顯示出下視丘含 dynorphin mRNA 的位置。為求實驗能繼續進行，乃徵求本校生化學科吳世祿老師之建議及協助，自行篩選大鼠之 prodynorphin cDNA。

Prodynorphin cDNA 之篩選

參考已發表文獻之方法 [Civelli et al 1995]，我們篩選出大鼠之 prodynorphin cDNA，其序列與 GeneBank 中發表之序列完全穩吻合，我們將之植入 plasmid 中以利 cRNA probe 之合成。我們將以 EcoRI 切割之 plasmid 利用 SP6 RNA polymerase 轉錄 antisense cRNA 後，在膠片(gel)上得到一相當完整之 band，顯示可順利合成 cRNA probe。

由於之前 oligonucleotide probe 之測試及 dynorphin cDNA 之篩選均花費大量的時間與精力以致 in situ hybridization 部分之工作未全部完成故資料分析亦尚未完工預計約於 88 年底可完成全部之實驗

五、參考文獻

1. Akabayashi A, Wahlestedt C, Alexander JT, Leibowitz SF. (1994) Specific inhibition of endogenous neuropeptide Y synthesis in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides

- suppresses feeding behavior and insulin secretion. *Molecular Brain Research* 21:55-61.
2. Bai FL, Yamado M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M. (1985) An arcuo-paraventricular and dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenalin in the rat. *Brain Research* 331: 172-177.
 3. Baile CA, McLaughlin CL, Della-Fera MA (1986) Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake. *Physiological Reviews* 66:172-234.
 4. Baker RA & Herkenham M (1995) Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 358:518-530.
 5. Catzeflis C, Pierroz DD, Rohner-Jeanrenaud F, Rivier JE, Sizonenko PC, Auber ML. (1993) Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and somatotrophic axis in intact adult female rats. *Endocrinology* 132: 224-234.
 6. Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. (1985) The anatomy of neuropeptide Y containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15: 1159-1181.
 7. Civelli O et al. (1985) Sequence and expression of the rat prodynorphin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82:4291-4295.
 8. Craft L, Hale J, Hoffman J, Hsing HM, Kriauciunas A, et al.(1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377: 530-532.
 9. Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. (1986) The stimulation of food intake by selective agonists of mu, kappa and delta opioid receptors. *Life Sciences* 38:1081-1088.
 10. Hoskins B, Ho IK.(1986) Lack of effect of dynorphin on sunsummatory behaviors in obese and normal rats. *Life Sciences* 39: 589-593.
 11. Lambert PD, Wilding JP, al-Dokhayel AA, Gilbey SG, Bloom SR. (1993) The effect of central blockade of kappa-opioid receptors on neuropeptide Y-induced feeding in the rat. *Brain Research* 629: 146-148.
 12. Meister B, Villar MJ, Ceccatelli S, Hokfelt T. (1990) Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37: 603-633.
 13. Swartz MW, Sipols AJ, Grubin CE, Baskin DG. (1993) Differential effect of fasting on hypothalamic expression of genes encoding neuropeptide Y, galanin and glutamic acid decarboxylase. *Brain research Bulletin* 31: 361-367.
 14. Zhang Y et al. (1994) positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue *Nature* 342:425-431.