

从脑胃 ghrelin 通路探讨应激对大鼠食欲的影响

赵怡玲, 高鹏飞, 肖 茜, 张 岚, 潘丹青, 徐月妹

(复旦大学附属金山医院中医科, 上海 201508)

[摘要] 目的 从脑胃饥饿素(ghrelin)通路研究应激影响食欲的分子机制。方法 32只雄性Wistar大鼠随机分为对照组和应激组, 每组16只, 每笼2只。采用夹尾应激方法每日2次, 连续21d刺激大鼠, 监测各组大鼠的摄食量及体质量; 在实验第7、21天每组各选取8只大鼠, ELISA法检测血清酰基化 ghrelin 质量浓度; 蛋白质印迹法检测大鼠胃及下丘脑中 ghrelin 蛋白表达, 以及下丘脑中腺苷酸活化蛋白激酶 $\alpha 2$ (Amp-activated protein kinase $\alpha 2$, AMPK $\alpha 2$) 表达水平; 实时荧光定量PCR检测胃中 ghrelin、生长激素分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)、瘦素(leptin), 以及下丘脑中 ghrelin、AMPK $\alpha 2$ 、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)、刺鼠基因相关蛋白(agouti-related protein, AgRP) mRNA水平。结果 实验第7天应激组每笼大鼠的总摄食量多于对照组($P < 0.05$), 第21天两组大鼠的总摄食量未见明显差异($P > 0.05$); 在第7、21天, 两组大鼠的体质量均无明显差异($P > 0.05$)。应激可以明显上调血清中酰基化 ghrelin 水平($P < 0.01$), 胃及下丘脑中 ghrelin 蛋白($P < 0.05$)以及下丘脑中 AMPK $\alpha 2$ 蛋白($P < 0.01$)的表达也均明显上调。应激还能明显上调胃内 ghrelin 及 GHSR mRNA水平($P < 0.01$), 下调胃内 leptin mRNA水平($P < 0.01$); 同时上调下丘脑内 ghrelin、AMPK $\alpha 2$ 、NPY及AgRP mRNA水平($P < 0.01$)。结论 夹尾应激能导致大鼠中枢及外周 ghrelin 水平的上调, 可能对大鼠食欲暂时性增加有影响。

[关键词] 应激; 摄食; 饥饿素; 大鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0207-08

Effects of Stress on Appetite in Rats Through Hypothalamus and Stomach Ghrelin Pathway

ZHAO Yiling, GAO Pengfei, XIAO Qian, ZHANG Lan, PAN Danqing, XU Yuemei

(Department of Traditional Chinese Medicine, Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China)

Correspondence to: XU Yuemei, E-mail: 18930817195@163.com

[Abstract] **Objective** To study the molecular mechanism of stress on appetite through hypothalamus and stomach ghrelin pathway. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into a control group and a stress group with 16 rats in each group and 2 rats in each cage. Stress was induced by tail pinch for consecutive 21 days. Food intake and body weight of the rats in each group were recorded. Serum ghrelin concentrations of eight rats in each group were detected by ELISA on day 7 and day 21. Ghrelin protein expression in stomach and hypothalamus as well as Amp-activated protein kinase $\alpha 2$ (AMPK $\alpha 2$) protein expression in hypothalamus of rats were measured by Western blotting. The mRNA levels of ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and leptin in stomach as well as ghrelin, AMPK $\alpha 2$, neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP) in hypothalamus were measured by real-time quantitative PCR. **Results** On day 7, the total food intake of rats in each cage in the stress group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in total food intake between the

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473610); 第六周期金山区医学重点专科建设项目后备类(JSZK2019H06)

[作者简介] 赵怡玲(1991—), 女, 硕士, 中医科医师, 研究方向: 应激的中医药治疗及研究工作。

E-mail: 1032585335@qq.com

[通信作者] 徐月妹(1983—), 女, 硕士, 中医科副主任医师, 研究方向: 应激的中医药治疗及研究工作。

E-mail: 18930817195@163.com。

two groups on day 21 ($P > 0.05$). On day 7 and day 21, there was no significant difference in body weight between the two groups ($P > 0.05$). Stress upregulated the serum levels of acylated ghrelin ($P < 0.01$), the ghrelin protein expression levels in stomach and hypothalamus ($P < 0.05$), and the AMPK α 2 protein expression level in hypothalamus ($P < 0.01$). Stress also upregulated the ghrelin and GHSR mRNA expression levels in stomach ($P < 0.01$), downregulated the leptin mRNA expression level in stomach ($P < 0.01$), and upregulated the ghrelin, AMPK α 2, NPY and AgRP mRNA expression levels in hypothalamus ($P < 0.01$). **Conclusion** Tail pinch-induced stress can increase central and peripheral ghrelin levels in rats, and act as a temporary appetite enhancer.

[Key words] Stress; Appetite; Ghrelin; Rats

应激会引发一系列生理和行为反应, 显著改变人类和动物的新陈代谢以及行为状态^[1]。例如, 大多数人在应激状态下摄食会发生变化, 大约有 40% 的人会表现为吃得更多, 40% 的人摄食量会少于平时^[2]。既往一项针对 133 名患有暴食症女性的调查发现, 应激与暴食行为相关^[3]。此外, 基于人群的数据表明, 应激状态会增加食物消耗量^[4]。在一种束缚应激模型大鼠的研究中发现, 应激也可以导致大鼠摄取诸如脂肪及糖类混合物等“舒适”食物的量增加^[5]。

Ghrelin 又称饥饿素或生长素, 是一种由 28 个氨基酸组成的内源性脑肠肽, 在 1999 年由日本科学家 Kojima 首先分离发现。Ghrelin 是生长激素促分泌素受体 (growth hormone secretagogue receptor, GHSR) 的内源性配体^[6], 主要由胃黏膜下层的 X/A 样细胞分泌, 具有改善能量代谢等多种生理功能^[7]。目前, ghrelin 对食欲的调节作用越来越受到学者的关注。本研究观察应激对大鼠食欲的影响, 并从脑胃 ghrelin 通路探讨应激影响大鼠食欲的具体机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

大鼠酰基化 ghrelin 检测用 ELISA 试剂盒 (货号: #EZRGRA-90K) 购自德国 Merck 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: PICPI23223) 购自德国 Thermo 公司; 兔抗鼠 ghrelin 多克隆抗体 (货号: ab129383) 和兔抗鼠腺苷酸活化蛋白激酶 α 2 (Amp-activated protein kinase α 2, AMPK α 2) 多克隆抗体 (货号: ab3760) 购自英国 Abcam 公司; 兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体 (货号: #5174) 购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (货号: A0208) 购自上海碧

云天生物技术研究; RNA 抽提试剂盒 (货号: #K0223) 购自德国 Thermo 公司; 反转录试剂盒 (货号: #K1622) 购自加拿大 Fermentas 公司; 实时荧光 PCR 试剂盒即 qPCR SYBR Green PCR 试剂盒 (货号: 11203ES08) 购自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; ghrelin、GHSR、瘦素 (leptin)、AMPK α 2、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 和刺鼠基因相关蛋白 (agouti-related protein, AgRP) 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

Real-time PCR 仪为美国 ABI 公司产品 (型号: ABI-7300); 低温冷冻离心机为上海卢湘仪离心机仪器有限公司产品 (型号: TG-16M); 旋涡振荡器为青浦沪西仪器厂产品 (型号: K30); 电动匀浆机为德国 FLUKO 公司产品 (型号: PRO200); 电泳仪购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司 (型号: Mini Protean 3 Cell); 电转仪为大连竞迈科技有限公司产品 (型号: PS-9); 酶标仪为芬兰雷勃酶标仪 (型号: MK3); 成像系统为上海天能科技有限公司产品 (型号: Tanon-5200)。

1.2 实验动物与分组

选用 32 只 SPF 级雄性 6 周龄 Wistar 大鼠, 购自上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2013-0016]。大鼠饲养于复旦大学公共卫生临床中心动物实验中心 [SYXK (沪) 2015-0008], 环境维持在 $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$, 12/12 h 光照 - 黑暗周期, 自由摄食与饮水。大鼠适应性饲养 7 d 后, 按照随机数字表法分为对照组和应激组, 每组 16 只, 每 2 只大鼠置于一笼 ($45.5\text{ cm} \times 34.5\text{ cm} \times 20.0\text{ cm}$)。每周 (即应激 7、14 和 21 d) 记录一次大鼠的体质量, 每天记录一次每笼大鼠的摄食量。在实验过程中, 实验动物的饲

养管理及使用均按照中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》执行,按照3R原则给予实验动物人道关怀。

1.3 应激造模方法

应激组大鼠采用夹尾激怒法建立应激模型,具体方式参照文献[8]的方法,并做出部分修改:将2只大鼠装于同一鼠笼内,用纱布包裹止血钳尖端后轻夹大鼠尾巴近段1/3处,每次刺激30 min,每天刺激2次,间隔3 h,连续21 d;每次刺激后大鼠在笼内自由活动。造模过程中发现,夹尾刺激期间,大鼠被激惹,会尖叫,易与同笼大鼠打斗。对照组不进行其他干预。两组大鼠均给予普通饲料,自由摄食及饮水。

1.4 行为学观察

造模第1、7、21天,每组随机选取8只大鼠,观察其拒俘反应性。实验人员手戴全新的手套抓捕大鼠,观察大鼠的拒俘反应并记分。记分标准:很容易抓取动物,记0分;尖叫或回避,记1分;尖叫并回避,记2分;逃脱,记3分;逃脱并尖叫,记4分;咬或试图撕咬手套,记5分;主动跃起攻击,记6分。

1.5 ELISA法检测血清ghrelin水平

造模第7及第21天,每组随机取8只大鼠,用20%乌拉坦以5 mL/kg剂量腹腔注射麻醉大鼠后,心脏采血,收集于4 mL EDTA抗凝管中,以3 000 r/min转速离心15 min后,取上层血清,储存在-80℃冰箱中待检。已知ghrelin在血清中主要以高活性的酰基化和有限生物活性的去酰基化形式存在。因此,采用酰基化ghrelin的ELISA试剂盒测定大鼠血清中活性ghrelin蛋白水平。

1.6 蛋白质印迹法测定胃内ghrelin蛋白以及下丘脑组织内ghrelin和AMPK α 2蛋白的表达

造模第7及第21天,每组随机取8只大鼠,按1.5节方法行心脏采血后,取脏器标本胃及下丘脑组织。取一份组织先充分裂解后抽提蛋白,然后使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。每孔按蛋白量25 μ g上样,进行10% SDS-PAGE。电泳结束后,将凝胶上的蛋白条带转移至纤维素膜上,5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h或4℃过夜。分别加入按照1:250稀释的ghrelin一抗、1:2 000稀释的AMPK α 2一抗和1:2 000稀释的

GAPDH一抗,4℃水平摇床上孵育过夜。TBST漂洗3次后,加入按照1:1 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,与膜37℃孵育1 h。继续用TBST洗涤3次,ECL化学发光法检测:取ECL发光液A和B等量混匀,加在膜的正面,暗室避光5 min,倒掉显色液,用纸吸取显色液,在上面盖上一层平整的透明纸,将其放入成像系统中进行扫描。

1.7 实时荧光定量PCR法检测胃及下丘脑内ghrelin通路相关mRNA表达

按照RNA试剂盒说明,从胃及下丘脑组织中提取总RNA。然后按照反转录试剂盒说明配制反转录反应体系,总体积为25 μ L,其中含RNA-Primer Mix 12 μ L、5 $\times$ RT Reaction Buffer 5 μ L、25 mmol/L dNTPs 1 μ L、25 U/ μ L RNase Inhibitor 1 μ L、200 U/ μ L M-MLV RTase 1 μ L、Oligo(dT)18 Primer 1 μ L、ddH₂O (DNase-free) 4 μ L。反转录反应条件为:37℃ 60 min,85℃ 5 min,4℃ 5 min。RNA反转录成cDNA后,取2 μ L cDNA模板,使用SYBR Green PCR试剂盒进行目的基因的PCR扩增。PCR体系总体积为25 μ L,其中含SYBR Green Mix 12.5 μ L、上下游引物各0.5 μ L、ddH₂O 9.5 μ L和cDNA模板2 μ L。PCR反应条件:95℃初始化10 min;然后95℃ 15 s,60℃ 45 s,连续40个循环;最后60℃退火15 s。PCR所用引物的序列见表1。以GAPDH作为内参基因,测得循环阈值(cycle threshold, Ct),用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[9]计算ghrelin、GHSR、leptin、AMPK α 2、NPY和AgRP mRNA的相对表达量。

1.8 统计分析

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析。计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 应激对大鼠拒俘反应的影响

在实验过程中,观察到夹尾刺激会导致大鼠易于被激怒,出现互相打斗的现象。在造模第1、7、21天,每组随机选取8只大鼠观察其拒俘反应。结果显示:应激组大鼠在第1、7、21

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

基因名称	引物序列	引物长度 /bp
Ghrelin	上游: 5'-GGTGTCTTCAGCGACTATCTGC-3' 下游: 5'-TCCTCCTCTGCCTCTTCTGC-3'	210
GHSR	上游: 5'-ACCACCACCAACCTCTAC-3' 下游: 5'-CAGCTCTCGCTGACAAAC-3'	152
AMPK α 2	上游: 5'-ATGAGGTGGTGGAGCAGAGG-3' 下游: 5'-AACGGGCTAAAGCAGTGATAAG-3'	237
Leptin	上游: 5'-TCACCCATTCTGAGTTTGTCC-3' 下游: 5'-TCTCGCAGGTTCTCCAGGTC-3'	120
NPY	上游: 5'-TCGCTCTATCCCTGCTCGTG-3' 下游: 5'-GGGGCATTCTCTGTGCTTTC-3'	220
AgRP	上游: 5'-GCTGACTGCAATGTTGCTGAG-3' 下游: 5'-GACTCGCGGTTCTGTGGATC-3'	228
GAPDH	上游: 5'-GGAGTCTACTGGCGTCTTCAC-3' 下游: 5'-ATGAGCCCTTCCACGATGC-3'	237

注: Ghrelin 即饥饿素, AMPK α 2 即腺苷酸活化蛋白激酶 α 2, GHSR 即生长激素促分泌素受体, Leptin 即瘦素, NPY 即神经肽 Y, AgRP 即刺鼠基因相关蛋白。

天拒俘反应记分明显高于对照组 ($P < 0.01$, 图 1A), 表现为尖叫、回避、挣脱, 甚至有攻击和撕咬行为, 提示应激大鼠表现出明显的抵抗性。

2.2 应激对大鼠体质量与摄食的影响

在应激 7 d 后, 应激组每笼大鼠的总摄食量为 (308.90 ± 14.34) g, 较对照组的 (296.55 ± 7.54) g 明显增加, 两组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1B); 而在应激 14 d 及 21 d 时两组大鼠的每笼总摄食量差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1B)。每周对两组大鼠体质量进行监测, 结果显示应激 7、14、21 d 时的大鼠体

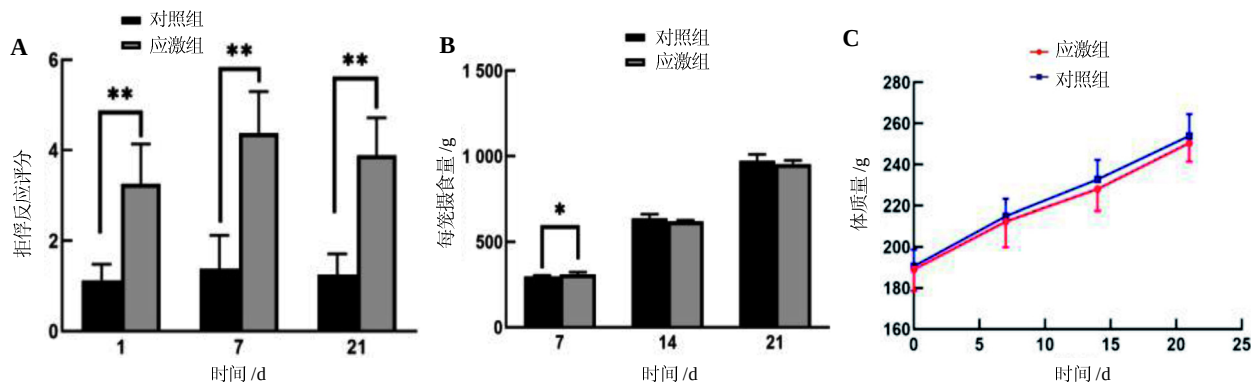
量与对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1C)。

2.3 应激对大鼠血清酰基化 ghrelin 水平的影响

用 ELISA 法测定两组大鼠第 7 及第 21 天时血清中酰基化 ghrelin 水平, 结果如图 2 所示。应激 7 d 及 21 d 时大鼠血清酰基化 ghrelin 水平均较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 应激对大鼠胃内 ghrelin 蛋白表达及下丘脑内 ghrelin、AMPK α 2 蛋白表达的影响

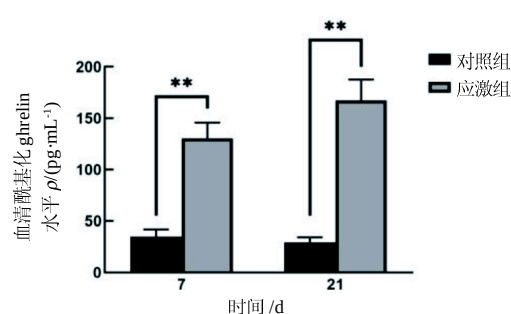
用蛋白质印迹法测定两组大鼠胃内及下丘脑



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 每组 8 只大鼠。

图 1 各组大鼠拒俘反应 (A)、摄食量 (B) 和体质量 (C) 比较

Figure 1 Capture-resistance (A), food intake (B) and body weight (C) of rats in two groups



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 每个时间点两组各取 8 只大鼠。

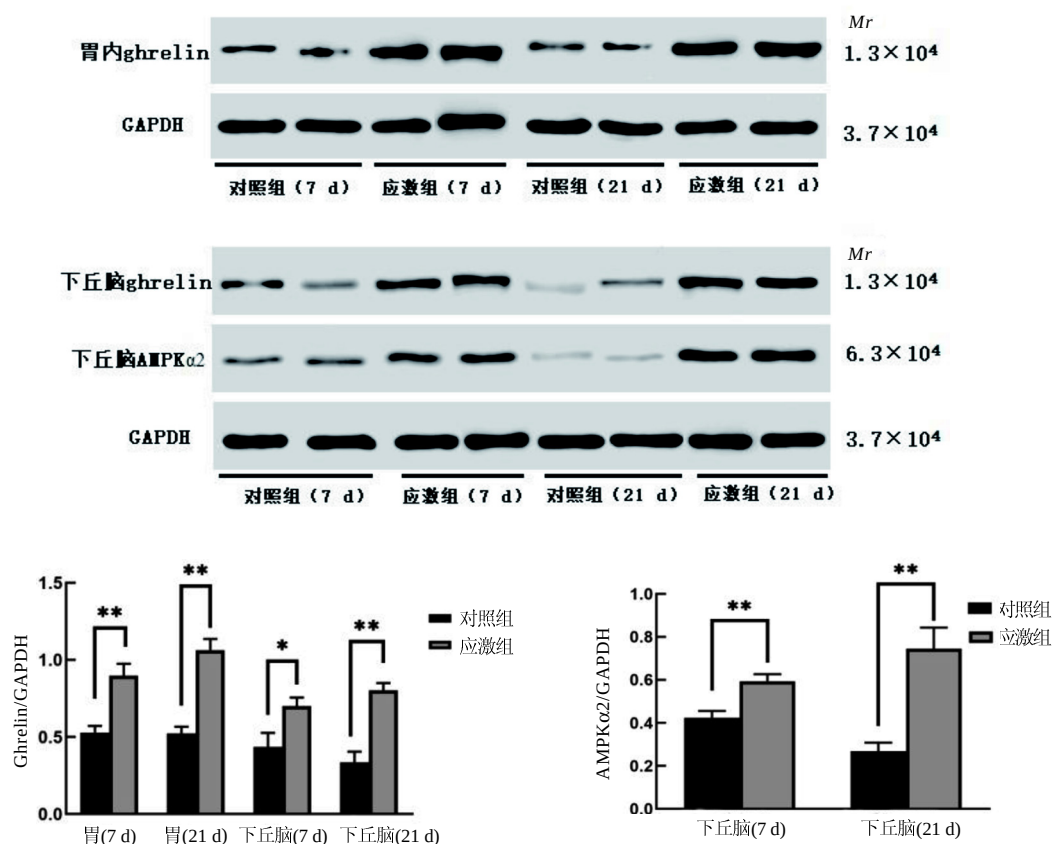
图 2 ELISA 法检测各组大鼠血清酰基化 ghrelin 水平
Figure 2 Serum levels of acylated ghrelin in two groups of rats detected by ELISA

内 ghrelin 蛋白表达水平, 结果如图 3 所示。应激 7 d 和 21 d 时大鼠胃及下丘脑内总 ghrelin 蛋

白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$), 而且下丘脑内 AMPK $\alpha 2$ 蛋白表达水平也明显高于对照组 ($P < 0.01$)。

2.5 应激对大鼠胃内及下丘脑内食欲相关基因表达的影响

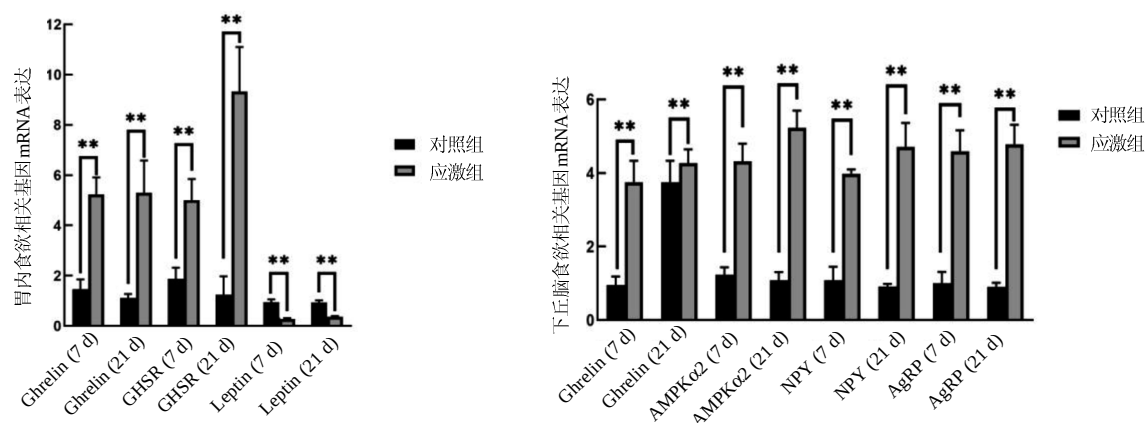
实时荧光定量 PCR 法检测两组大鼠食欲相关基因的表达水平, 包括胃内 ghrelin、GHSR、leptin 以及下丘脑内 ghrelin、AgRP、NPY、AMPK $\alpha 2$ 。结果如图 4 所示, 应激 7 d 和 21 d 后大鼠胃内 ghrelin 及 GHSR 的 mRNA 水平明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而应激组胃内 leptin 的 mRNA 水平明显低于对照组 ($P < 0.01$); 另外, 应激组大鼠下丘脑中 ghrelin、AgRP、NPY、AMPK $\alpha 2$ 的 mRNA 水平均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。



注: Ghrelin 即饥饿素, AMPK $\alpha 2$ 即下丘脑内腺苷酸活化蛋白激酶 $\alpha 2$ 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 每个时间点两组各取 8 只大鼠。

图 3 蛋白质印迹法检测两组大鼠胃及下丘脑内 ghrelin、AMPK $\alpha 2$ 蛋白表达

Figure 3 Expressions of ghrelin and AMPK $\alpha 2$ proteins in stomach and hypothalamus in two groups of rats detected by Western blotting



注: Ghrelin 即饥饿素, GHSR 即生长激素促分泌素受体, Leptin 即瘦素, AMPKα2 即下丘脑内腺苷酸活化蛋白激酶 α2, NPY 即神经肽 Y, AgRP 即刺鼠基因相关蛋白。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 每个时间点两组各取 8 只大鼠。

图 4 实时荧光定量 PCR 法测定两组大鼠食欲相关基因 mRNA 表达水平

Figure 4 mRNA expressions of appetite-related genes in two groups of rats measured by real-time fluorescent quantitative PCR

3 讨论

Ghrelin 与食欲的调节相关。本研究中检测了大鼠血清酰基化 ghrelin 水平, 以及胃和下丘脑组织中 ghrelin 蛋白表达水平, 同时测定了食欲反馈通路上一些相关基因的表达, 如胃内 GHSR、leptin, 以及下丘脑内 AMPKα2、NPY、AgRP mRNA 水平。研究结果表明, 应激能上调大鼠血清酰基化 ghrelin 水平, 上调大鼠胃及下丘脑中 ghrelin 蛋白表达; 也能导致与食欲促进相关的胃内 ghrelin、GHSR mRNA 水平以及下丘脑内 ghrelin、AgRP、NPY、AMPKα2 mRNA 的水平明显升高, 下调与食欲抑制相关的胃内 leptin 水平。本研究也监测了大鼠摄食量及每周的体重。在 21 d 的实验过程中发现, 第 7 天应激组每笼大鼠总摄食量增加, 提示 7 d 应激状态下大鼠食物摄入量的增加可能与其血清酰基化 ghrelin、胃及下丘脑内 ghrelin 表达水平的升高相关。本研究结果提示, ghrelin 参与了应激大鼠食欲反馈通路的调节, 应激能上调大鼠体内 ghrelin 水平, 进而导致摄食量的增加。

既往研究已经证明, ghrelin 是一种参与食欲调节的因子, 能增加实验动物对食物摄入的渴望^[10-11]。位于下丘脑的 ghrelin 神经元能通过激活下丘脑 NPY/AgRP 信号、阿片促黑素皮质激素原 (proopiomelanocortin, POMC) 和促肾上腺

皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH) 神经元, 向大脑传递饥饿信号, 从而增强食欲, 进而调节机体能量自稳态^[12]。而在食欲调节反馈通路上, NPY/AgRP 信号、AMPK 也是喂养-能量稳态控制系统的关键因素^[13-15]。Ghrelin 具有促进胃酸分泌、调节胃肠运动、增进食欲等重要生理功能^[16], 在 GHSR 基因敲除小鼠中发现其胃排空时间延迟^[17], 提示 ghrelin 是一种内源性的食物摄入调节因子。在对人群纵向随访中也发现, 高水平的 ghrelin 与高度的食物渴望相关^[18-19]。

本研究还检测了对食欲有抑制作用的胃内 leptin mRNA 水平。Leptin 是一种脂肪细胞来源的激素, 参与调节食物摄入与能量代谢, 具有抑制食欲、减少摄食的作用^[20]。7 d 应激虽然会增加大鼠总食物摄入量, 但对其体重没有明显影响。本研究还发现大鼠 AMPK 水平上调。研究显示, 激活的 AMPK 通过对脂肪、蛋白质和糖类代谢的调控, 维持体内能量平衡^[21]。笔者推测, 摄食增加, 而体重未增加, 可能与压力激活交感神经系统导致的代谢增加有关; 应激状态下, 交感神经系统的激活会增加呼吸频率、血压和心率, 并激活分解代谢通路, 这时糖原被水解, 葡萄糖异生作用被刺激, 为需要大量能量的组织 (主要是大脑、骨骼和心肌) 提供葡萄糖; AMPK 也对脂肪、糖类代谢进行调控, 以应对体

内平衡的威胁^[22]。

除了促进食欲以外, ghrelin 具有减少胰岛素分泌、调节葡萄糖稳态^[23]、抗肌肉萎缩^[24]等作用。另外, ghrelin 与抑郁的相关性也是目前的研究热点之一。多项研究发现, 抑郁症患者的血清 ghrelin 水平较健康人升高, 在抗抑郁治疗后血清 ghrelin 水平下降^[25-27]; 在抗抑郁药耐药患者中, 血清 ghrelin 水平也维持稳定^[28]。编码 ghrelin 的核苷酸多态性已被证实与人类抑郁症发生风险有关^[29]。在一些动物实验中发现, 食物剥夺、足部电击、社交失败、强迫制动或慢性不可预测温和应激等生理或心理应激源均能刺激啮齿类动物的 ghrelin 释放^[30]; 这与本实验结果相吻合。因此, 笔者推测暴露于应激源下, 大鼠外周及中枢 ghrelin 的水平升高可能是为了应对压力的一种稳态适应, 与其负性情绪相关。

另一方面, 本研究还发现, 应激组大鼠虽然血清、脑、胃 ghrelin 水平持续高于对照组, 但至第 14、21 天统计两组大鼠的总摄食量无明显差异, 两组大鼠的体质量也无明显差异。已知啮齿类动物暴露于急性和慢性应激源对食物摄取量和体质量有影响, 而且胃 ghrelin 系统在应激相关的进食行为中发挥作用, 但这一机制尚未完全探明。在亚慢性和慢性束缚应激模型中, 食物摄入通常会受到负面影响, 同时伴随体质量下降或对体质量无影响^[31-33]。已有研究证实, 慢性压力是人类抑郁形成的主要因素。对动物的慢性应激能够引起类似临床症状的行为变化, 如快感缺乏、体质量减轻和运动/活动不足。在 21 d 应激状态下, ghrelin 水平升高但摄食量并未增加, 推测可能与大鼠负性情绪相关。研究表明, 2 周慢性应激足以诱发类似抑郁的行为^[34]。在持续性应激状态下, 大鼠摄食从以增加食物为代价来缓解类似焦虑和抑郁症状, 转变为逐渐摄食减少, 这可能与抑郁状态下行为绝望有关。

本研究尚存在一定的局限性, 如本次研究未观察大鼠行为学与应激及摄食的相关性。下一步研究拟结合动物行为学持续动态观察应激对大鼠脑胃 ghrelin 通路的影响, 进一步研究 ghrelin 异常与应激导致的负性情绪及摄食行为的相关性。

综上所述, 应激会导致大鼠外周及中枢

ghrelin 水平的升高, 以及 ghrelin 通路中食欲相关因子的异常表达, 但 ghrelin 系统在应激相关的进食行为中的作用及其机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] DALLMAN M F, PECORARO N, AKANA S F, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food"[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20):11696-11701. DOI:10.1073/pnas.1934666100.
- [2] OLIVER G, WARDLE J. Perceived effects of stress on food choice[J]. *Physiol Behav*, 1999, 66(3):511-515. DOI:10.1016/S0031-9384(98)00322-9.
- [3] KLATZKIN R R, GAFFNEY S, CYRUS K, et al. Stress-induced eating in women with binge-eating disorder and obesity[J]. *Biol Psychol*, 2018, 131:96-106. DOI:10.1016/j.biopsycho.2016.11.002.
- [4] SINHA R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1141:105-130. DOI: 10.1196/annals.1441.030.
- [5] PECORARO N, REYES F, GOMEZ F, et al. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(8):3754-3762. DOI:10.1210/en.2004-0305.
- [6] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762):656-660. DOI:10.1038/45230.
- [7] DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(11):4255-4261. DOI:10.1210/endo.141.11.7757.
- [8] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [9] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [10] CHAO A M, JASTREBOFF A M, WHITE M A, et al. Stress, cortisol, and other appetite-related hormones: Prospective prediction of 6-month changes in food cravings and weight[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2017, 25(4):713-720. DOI:10.1002/oby.21790.
- [11] CAHILL S, TUPLIN E, HOLAHAN M R. Circannual changes in stress and feeding hormones and their effect on food-seeking behaviors[J]. *Front Neurosci*, 2013, 7:140.

- DOI:10.3389/fnins.2013.00140.
- [12] STANLEY S, WYNNE K, MCGOWAN B, et al. Hormonal regulation of food intake[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(4): 1131-1158. DOI:10.1152/physrev.00015.2004.
- [13] ANDREWS Z B, LIU Z W, WALLLINGFORD N, et al. UCP₂ mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals[J]. *Nature*, 2008, 454(7206):846-851. DOI:10.1038/nature07181.
- [14] BLASIAK A, GUNDLACH A L, HESS G, et al. Interactions of circadian rhythmicity, stress and orexigenic neuropeptide systems: implications for food intake control [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11:127. DOI:10.3389/fnins.2017.00127.
- [15] LIM C T, KOLA B, KORBONITS M. AMPK as a mediator of hormonal signalling[J]. *J Mol Endocrinol*, 2010, 44(2): 87-97. DOI:10.1677/JME-09-0063.
- [16] AKAMIZU T, KANGAWA K. The physiological significance and potential clinical applications of ghrelin[J]. *Eur J Intern Med*, 2012, 23(3):197-202. DOI:10.1016/j.ejim.2011.12.001.
- [17] YANG C G, WANG W G, YAN J, et al. Gastric motility in ghrelin receptor knockout mice[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1):83-88. DOI:10.3892/mmr.2012.1157.
- [18] CHAO A, GRILO C M, WHITE M A, et al. Food cravings, food intake, and weight status in a community-based sample [J]. *Eat Behav*, 2014, 15(3):478-482. DOI:10.1016/j.eatbeh.2014.06.003.
- [19] VOIGT J P, FINK H. Serotonin controlling feeding and satiety[J]. *Behav Brain Res*, 2015, 277:14-31. DOI:10.1016/j.bbr.2014.08.065.
- [20] ZHANG Y, CHUA S. Leptin function and regulation[J]. *Compr Physiol*, 2017, 8(1):351-369. DOI:10.1002/cphy.c160041.
- [21] TAMARGO-GÓMEZ I, MARIÑO G. AMPK: regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12):E3812. DOI:10.3390/ijms19123812.
- [22] LAMBERT G W, STRAZNICKY N E, LAMBERT E A, et al. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome: causes, consequences and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126(2):159-172. DOI:10.1016/j.pharmthera.2010.02.002.
- [23] VERHULST P J, DEPOORTERE I. Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(25):3183-3195. DOI:10.3748/wjg.v18.i25.3183.
- [24] PORPORATO P E, FILIGHEDDU N, REANO S, et al. Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2):611-622. DOI:10.1172/JCI39920.
- [25] BARIM A O, AYDIN S, COLAK R, et al. Ghrelin, paraoxonase and arylesterase levels in depressive patients before and after citalopram treatment[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(10-11):1076-1081. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2009.02.020.
- [26] OZSOY S, BESIRLI A, ABDULREZZAK U, et al. Serum ghrelin and leptin levels in patients with depression and the effects of treatment[J]. *Psychiatry Investig*, 2014, 11(2):167-172. DOI:10.4306/pi.2014.11.2.167.
- [27] KURT E, GULER O, SERTESER M, et al. The effects of electroconvulsive therapy on ghrelin, leptin and cholesterol levels in patients with mood disorders[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 426(1):49-53. DOI:10.1016/j.neulet.2007.08.018.
- [28] ISHITOBI Y, KOHNO K, KANEHISA M, et al. Serum ghrelin levels and the effects of antidepressants in major depressive disorder and panic disorder[J]. *Neuropsychobiology*, 2012, 66(3):185-192. DOI:10.1159/000339948.
- [29] NAKASHIMA K, AKIYOSHI J, HATANO K, et al. Ghrelin gene polymorphism is associated with depression, but not panic disorder[J]. *Psychiatr Genet*, 2008, 18(5): 257. DOI:10.1097/YPG.0b013e328306c979.
- [30] FRITZ E M, SINGEWALD N, DE BUNDEL D. The good, the bad and the unknown aspects of ghrelin in stress coping and stress-related psychiatric disorders[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2020, 12:594484. DOI:10.3389/fnsyn.2020.594484.
- [31] JEONG J Y, LEE D H, KANG S S. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2013, 28(4):288-296. DOI:10.3803/EnM.2013.28.4.288.
- [32] JIANG S Z, EIDEN L E. Activation of the HPA axis and depression of feeding behavior induced by restraint stress are separately regulated by PACAPergic neurotransmission in the mouse[J]. *Stress*, 2016, 19(4):374-382. DOI:10.1080/10253890.2016.1174851.
- [33] LI B, XU Y M, PAN D Q, et al. Effect of immobilization stress on the appetite and stomach ghrelin expression in maternal mice[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12):15993-15999.
- [34] PATTERSON Z R, DUCHARME R, ANISMAN H, et al. Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 32(4):632-639. DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07310.x.

(收稿日期: 2020-11-14 修回日期: 2021-03-16)