

· 实验研究 ·

长期迷走神经电刺激对肥胖鼠摄食和体重的影响

于亭亭 陈霞 李昌阳 高兴亚 范志宁*

(南京医科大学第二附属医院消化医学中心 南京医科大学消化内镜研究所, 南京 210011)

【摘要】 目的 观察膈下迷走神经刺激(vagal nerves stimulation, VNS)对肥胖鼠摄食、体重、摄食神经肽的影响。 **方法** 将 18 只雄性营养性肥胖鼠(dietary induced obesity, DIO)随机分 3 组:对照组、假手术组、VNS 组。VNS 组大鼠体内植入自主研发的闭环芯片并高脂饲养 90 天,芯片电刺激膈下迷走神经;假手术组体内植入不工作的芯片;对照组不做手术。术后每天测量所有动物体重、日进食量。90 天后处死所有动物,分离并称重双侧附睾脂肪垫。反转录 PCR 法(RT-PCR)半定量检测摄食神经肽:重组人刺鼠色蛋白相关蛋白(AgRP)、神经肽 Y(NPY)、可卡因-苯丙胺调节转录因子编码的肽(CART)、阿片促黑色素原(POMC)的含量。 **结果** VNS 组大鼠体重增加量[(124.3 ± 15.5) g vs. (263.1 ± 16.8) g, $P = 0.013$],总摄食量[(1998.7 ± 37.2) g vs. (3312.6 ± 40.9) g, $P = 0.021$]以及附睾脂肪垫重量[(15.9 ± 2.3) g vs. (22.7 ± 2.6) g, $P = 0.035$]明显低于假手术组。VNS 组大鼠下丘脑促摄食神经肽 AgRP($P = 0.027$)、NPY 的含量($P = 0.019$)低于假手术组,而抑制摄食的神经肽 POMC 高于假手术组($P = 0.011$)。 **结论** 膈下迷走神经电刺激可显著减少大鼠摄食量,减轻体重。

【关键词】 肥胖; 迷走神经电刺激; 体重; 摄食; 摄食神经肽

中图分类号:R-332

文献标识:A

文章编号:1009-6604(2012)01-0079-04

Effect of Long-term Vagal Stimulation on Food Intake and Body Weight of Dietary-induce Obesity in Rats Yu Tingting, Chen Xia, Li Changyang, et al. Gastroenterology Center, Second Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210011, China

【Abstract】 Objective To assess the effects of vagal nerve stimulation (VNS) on the food intake, body weight and level of ingestion neuropeptides in obesity rats. **Methods** Eighteen male dietary-induced obesity (DIO) rats were randomly divided into control, pseudo-surgery and VNS groups. In the VNS group, all the animals underwent implantation of a vagal nerve stimulator at the gastro-esophageal junction and received high-fat dietary for 90 days at the mean time of the stimulation. Pseudo-surgery group underwent the same procedure but without implanting the stimulator. And the control received no surgery. After the surgery, the body weight and daily food intake were measured every day, and we killed the animals on day 90 to separate and weigh the bilateral epididymal fat pads. RT-PCR was employed to determined the levels of ingestion neuropeptides, AgRP, NPY, CART, and POMC. **Results** VNS group showed significantly lower body weight gain [(124.3 ± 15.5) g vs. (263.1 ± 16.8) g, $P = 0.013$], weight of epididymal fat pad [(15.9 ± 2.3) g vs. (22.7 ± 2.6) g, $P = 0.035$], and food consumption [(1998.7 ± 37.2) g vs. (3312.6 ± 40.9) g, $P = 0.021$]; VNS group showed significantly lower level of AgRP ($P = 0.027$) and NPY ($P = 0.019$), but higher level of POMC ($P = 0.011$) than the pseudo-surgery group. **Conclusion** VNS can significantly reduce the food intake of obesity rats and thus decrease body weight.

【Key Words】 Obesity; Vagal nerve stimulation; Body weight; Food intake; Ingestion neuropeptides

肥胖是许多疾病的发病基础,也是肿瘤的危险因素,已被列为一种疾病^[1],且成为全球性的公共卫生问题^[2]。手术是目前有效的治疗方法,但因其并发症限制了临床广泛应用。非手术治疗的长期效果不理想并存在反弹^[3]。因此,迫切需要有效微创的手段解决肥胖问题。研究表明,摄食调节的通路是:外周信号传入摄食中枢,中枢处理这些信息从而调控摄食行为,迷走神经作为其重要通路成为潜在治疗靶点^[4~6]。因副作用较小,效果较显著,刺激迷走神经的位置多数在膈下迷走神经^[7,8]。肥胖的重

要特征是脂肪堆积,哺乳动物的一个特别的内脏脂肪储藏点位于附睾脂肪垫,且易于分离。虽然附睾脂肪垫只反映了总体重的小部分,但研究表明附睾脂肪垫反映了总的体脂重量并且受激素和神经调节^[9~11]。本研究以食物所致肥胖鼠(dietary induced obesity, DIO)为模型,采用闭环植入式芯片迷走神经调控系统,选择刺激参数,进行膈下迷走神经刺激(vagal nerves stimulation, VNS),评估其对肥胖鼠体重、摄食、脂肪代谢(以附睾脂肪垫为指标)以及摄食神经肽表达量的影响。

* 通讯作者, E-mail: fanzhining@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 电刺激芯片

见图 1。由南京医科大学生理学教研室提供,芯片大小约 2 cm × 2 cm × 1 cm,重 8 g。刺激电极凹槽内表面经抛光处理,且两端呈喇叭口状。此设计可防止神经损伤,同时也避免刺激邻近其他神经。整个芯片外包装与组织相容性较好的硅胶。不工作的芯片制作相同,仅仅电池不发放电刺激。



图 1 电刺激芯片

1.2 实验动物

SD 大鼠:SPF 级,20 只,雄性,体重(100 ± 15) g,南京青龙山动物实验中心提供,合格证号:SC * K(苏)2009 - 0001。

高脂饲料:由南京青龙山动物实验中心配制。饲料热量分布:蛋白质 29.5%,脂肪 45.6%,糖类 24.9%。总热量 349 kcal/100 g(1 cal = 4.18 J)。成分:面粉 32 g,玉米粉 25.6 g,小麦 4.8 g,大豆粕 20 g,植物油 3.0 g,鱼粉 6.0 g,骨粉 2.8 g,草粉 2.4 g,酵母 2.0 g,食盐 1.0 g,赖氨酸 0.2 g,蛋氨酸 0.2 g。

动物适应性饲养 5 d 后,每只大鼠单笼饲养并喂以高脂饲料。体重增加超过正常同龄大鼠 20% 的为 DIO 鼠。饲养 90 天后,淘汰 2 只未达到肥胖标准的大鼠。18 只体重(600 ± 50) g 的大鼠纳入实验。将大鼠随机分为 VNS 组、假手术组、对照组 3 组,每组 6 只。

1.3 实验方法

术前 1 天将芯片置于戊二醛中熏蒸 12 h。VNS 组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 4 ml/kg,全麻下施行开腹手术,于膈肌脚下胃食管交界处将膈下迷走神经干分离出 1 cm。电极末端缠绕在迷走神经上。导联通过皮下隧道置于左上腹部皮下小囊内。刺激器置于皮下袋中并与导联相连。根据前期实验^[12,13],电刺激脉冲参数:单级矩形脉冲持续时间 0.75 ms,振幅 6 V,频率 2 Hz,波形为方波。手术后当天开始,VNS 组的电刺激仪 5 min 开,5 min 停,工作 12 h,待机 12 h,持续 90 d。假手术组植入不工作的芯片,手术全过程与 VNS 组相同,仅仅不发放电刺激。术后当天 VNS 组与假手术组肌肉注射抗生素预防感染,术后恢复饮食。对照组不做手术。

1.4 观察指标及统计方法

①进食量及体重:术后每天早晨测量日进食量,计算实验期间 90 d 总摄食量。②附睾脂肪垫重量:90 d 实验结束后所有动物称重并处死,切取附睾尾和睾丸末端之间的双侧附睾脂肪垫称重,计算附睾脂肪垫与体重的比率。③摄食神经肽含量:包括促进摄食的重组人刺鼠色蛋白相关蛋白(AgRP)和神经肽 Y(NPY),抑制摄食的可卡因 - 苯丙胺调节转录因子编码的肽(CART)和阿片促黑色素原(POMC)。剪断大鼠头部,沿中线剪开颅骨,从延髓向后方剥离至视交叉部位,剪断视交叉,沿下丘脑菱形边缘切取下丘脑。下丘脑的定位为:前缘视交叉,外侧沟,乳突尾侧。深度 2 mm。快速取出下丘脑并储存于 - 80 ℃ 冰箱。Trizol 法提取大鼠下丘脑总 RNA,提取出的 RNA 用 RNA 反转录试剂盒(由 Fermentas 公司提供)反转录成 cDNA,再将反转录后的 cDNA 做 PCR 扩增(试剂盒由上海捷瑞生物工程有限公司提供)。基因引物由 Invitrogen 公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 36 个循环;72 ℃ 终末延伸 7 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下摄片,凝胶成像分析系统扫描定量。

表 1 基因引物序列及退火温度和产物 bp 值

基因	序列	退火温度(℃)	产物(bp)
AgRP - Forward	AGAGTTCTCAGGTCTAAGTCT	62	210
AgRP - Reverse	CTTGAAGAAGCGGCAGTAGCACGT		
NPY - Forward	TGGACTGACCCCTCGCTCTAT	59	188
NPY - Reverse	GTGTCTCAGGGCTGGATCTC		
POMC - Forward	CCTGTGAAGGTGTACCCCAATGTC	55	266
POMC - Reverse	CACGTTCTTGATGATGGCGTTC		
CART - Forward	AGAAGAAGTACGGCCAAGTCC	62	84
CART - Reverse	CACACAGCTTCCCGATCC		
GAPDH - Forward	CAAGTTCAACGGCACAGTCAA	54	159
GAPDH - Reverse	TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC		

AgRP,重组人刺鼠色蛋白相关蛋白;NPY,神经肽 Y;CART,可卡因 - 苯丙胺调节转录因子编码的肽;POMC,阿片促黑色素原;GAPDH,甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶

用 SPSS11.0 软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 one-way-ANOVA 方差分析,组内两两比较用 LSD。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 摄食量、体重及附睾脂肪垫的重量比较

表 2 3 组体重、摄食量及附睾脂肪垫重量的比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	实验期间总摄食量 (g)	术后体重增加量 (g)	附睾脂肪垫重量 (g)	附睾脂肪垫/体重
VNS 组①	1998.7 ± 37.2	124.3 ± 15.5	15.9 ± 2.3	0.0215
假手术组②	3312.6 ± 40.9	263.1 ± 16.8	22.7 ± 2.6	0.0257
对照组③	3438.2 ± 42.9	284.5 ± 17.8	23.1 ± 3.1	0.0256
<i>F, P</i> 值	38.21, 0.005	47.93, 0.009	23.07, 0.022	40.14, 0.012
<i>P</i> ₁₋₂ 值	0.021	0.013	0.035	0.017
<i>P</i> ₁₋₃ 值	0.024	0.016	0.028	0.026
<i>P</i> ₂₋₃ 值	0.691	0.783	0.547	0.632

2.2 下丘脑摄食神经肽含量

见表 3。VNS 组与假手术组相比,促进摄食的神经肽 AgRP、NPY 的表达量较低 ($P = 0.027, 0.019$),而抑制摄食的神经肽 POMC 表达量较高

见表 2。VNS 组实验期间总摄食量、术后体重增加量、附睾脂肪垫重量及附睾脂肪垫/体重均明显低于假手术组和对照组 ($P < 0.05$),假手术组和对照组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

($P = 0.011$)。但抑制摄食的神经肽 CART 表达量差异无统计学意义 ($P = 0.058$)。半定量分析结果见图 2。

表 3 3 组下丘脑摄食神经肽 mRNA 表达量的比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	促进摄食		抑制摄食	
	AgRP	NPY	POMC	CART
VNS 组①	0.866 ± 0.012	0.832 ± 0.028	1.174 ± 0.054	0.786 ± 0.016
假手术组②	1.182 ± 0.023	1.196 ± 0.049	0.942 ± 0.061	0.779 ± 0.039
对照组③	1.154 ± 0.022	1.187 ± 0.037	0.970 ± 0.043	0.701 ± 0.021
<i>F, P</i> 值	89.72, 0.013	93.15, 0.007	98.39, 0.005	12.88, 0.067
<i>P</i> ₁₋₂ 值	0.027	0.019	0.011	0.058
<i>P</i> ₁₋₃ 值	0.038	0.023	0.031	0.084
<i>P</i> ₂₋₃ 值	0.193	0.232	0.289	0.31

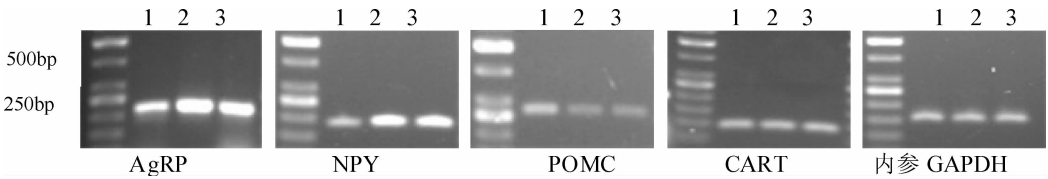


图 2 各组摄食神经肽 mRNA 表达量 (1 - VNS 组; 2 - 假手术组; 3 - 对照组), 提示刺激摄食的神经肽 AgRP 和 NPY 在 VNS 组中表达量显著减少, 而抑制摄食的神经肽 POMC 显著增多

2.3 术后情况

VNS 组和假手术组均未出现与芯片植入及电刺激相关的死亡及明显副作用,大鼠术后直至处死的饲养期间未出现饮水、摄食困难,手术切口感染或裂开,行为异常或生活习性的改变。

3 讨论

模仿人类肥胖我们用高脂饮食诱导使大鼠成为 DIO。芯片刺激膈下迷走神经导致肥胖鼠的进食减

少,体重增加量减少。这些作用可以解释为:迷走神经刺激能模拟由食物引起的胃机械感受器和空肠化学感受器所发出的饱感传入信号,传入下丘脑的摄食整合中心,导致进食减少从而体重增加量减少。然而有人认为迷走神经传递刺激进食的饥饿信号^[14]。但迷走神经刺激的结果是与其相反的, Burneo 等^[15]报道,迷走神经刺激治疗癫痫的病人出现了体重下降。这种矛盾可能是由于刺激迷走神经的不同参数、部位或副作用引起。迷走神经主要由

传递来自胃肠机械和化学感受器信号的传入纤维组成^[16,17],外周饱感信号主要通过迷走传入纤维传到下丘脑摄食中枢,从而影响进食。大脑调控摄食的信息整合中心包括下丘脑的弓状核、腹外侧核及腹内侧核,弓状核内至少有 2 个相反作用的调控摄食活动的关键神经核团:表达刺激摄食神经肽 NPY 和 AgRP 的神经元(NPY/AgRP 神经元)和表达抑制摄食的神经肽 CART 和 POMC 的神经元(POMC/CART 神经元)^[18],90% 的 CART 与 POMC 神经元在弓状核上共定位。NPY/AgRP 与 POMC/CART 在弓状核中有联系,在弓状核上 NPY/AgRP 神经元通过抑制性信号调节 POMC 神经元^[19]。下丘脑通过摄食行为和能量利用来调节能量平衡。而作为反馈,外周循环信号也能调节 NPY/AgRP 与 POMC/CART 神经元的表达^[20]。在本实验中,我们通过 RT-PCR 半定量检测,结果表明,与对照组和假手术组相比,VNS 组大鼠下丘脑中促摄食神经肽 AgRP、NPY 的表达量较低,而抑制摄食神经肽 POMC 的表达量较高。由此可以推断出,长期膈下迷走神经刺激可模拟由进食引起的饱足感信号并传送至下丘脑摄食调节中心,调节促进和抑制摄食神经肽的表达,使大鼠进食减少,从而导致体重增加量减小。我们观察到与对照组和假手术组相比,VNS 组的大鼠体重增加量和进食量都较低。体重减轻是以脂肪组织的更迭为特征的。实验结果得出:VNS 组的大鼠附睾脂肪垫与体重的比值明显低于对照组与假手术组。推测 VNS 组大鼠摄食减少,从而脂肪储存减少。

本研究表明长期膈下迷走神经刺激的肥胖鼠的进食量和体重增长量减少。这些数据支持我们的假设,中枢神经系统可被芯片发出的人工电信号所欺骗,这种信号被迷走神经传入纤维当作饱感信号传递。此研究通过迷走神经电刺激的治疗方式,模仿生理饱感信号,影响了大鼠下丘脑摄食肽的表达量,使肥胖鼠摄食减少,体重增长量减少,并摸索出有效的电刺激参数,评估了其结果及安全性,从而为迷走神经电刺激治疗肥胖的可行性提供实验依据。

参考文献

- Ahima RS. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat Med*, 2009, 15(9):996-997.
- Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, et al. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*, 2007, 132(5):2087-2102.
- Finer N. Pharmacotherapy of obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2002, 16(4):717-742.
- Treasure J, Claudino AM, Zucker N. Eating disorders. *Lancet*, 2010, 375:583-593.
- Chisuwa N, O' Dea JA. Body image and eating disorders amongst Japanese adolescents. A review of the literature. *Appetite*, 2010, 54:5-15.
- Magni P, Dozio E, Ruscica M, et al. Feeding behavior in mammals including humans. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1163:221-232.
- Díaz-Güemes I, Sánchez FM, Luis L, et al. Continuous vagus nerve stimulation effects on the gut-brain axis in swine. *Neuromodulation*, 2007, 10(1):52-58.
- Val-Laillet D, Biraben A, Randuineau G, et al. Chronic vagus nerve stimulation decreased weight gain, food consumption and sweet craving in adult obese minipigs. *Appetite*, 2010, 55(2):245-252.
- Bartness TJ. Dual innervation of white adipose tissue: some evidence for parasympathetic nervous system involvement. *J Clin Invest*, 2002, 110(9):1235-1237.
- Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, et al. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat-functional implications. *J Clin Invest*, 2002, 110(9):1243-1250.
- Giordano A, Song CK, Bowers RR, et al. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(5):R1243-R1255.
- Gao XY, Wang HJ, Zhang Y, et al. Resetting blood pressure by a closed-loop implanted chip system in normotensive rats. *Life Sci*, 2006, 78(10):1129-1134.
- Zhou Y, Yuan Y, Gao J, et al. An implanted closed-loop chip system for heart rate control: system design and effects in conscious rats. *Journal of Biomedical Research*, 2010, 24(2):107-114.
- Furness JB, Koopmans HS, Robbins HL, et al. Effects of vagal and splanchnic section on food intake, weight, serum leptin and hypothalamic neuropeptide Y in rat. *Autonom Neurosci Basic Clin*, 2001, 92:28-36.
- Burneo JG, Faught E, Knowlton R, et al. Weight loss associated with vagus nerve stimulation. *Neurology*, 2002, 59(3):463-464.
- Berthoud HR, Neuhuber WL. Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Autonom Neurosci Basic Clin*, 2000, 85:1-17.
- Powley TL, Phillips RJ. Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vagovagal reflexes I. Morphology and topography of vagal afferents innervating the GI tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(6):G1217-G1225.
- Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008, 18:158-168.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 2001, 411:480-484.
- Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2002, 16:623-637.

(收稿日期:2011-04-30)

(修回日期:2011-09-06)

(责任编辑:王惠群)