

中图分类号: R965; R971 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)03-0053-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.03.012



食欲肽对缺血性脑卒中模型大鼠的神经保护作用*

倪秀娟, 王莉, 乔丽娜, 孟智敏, 刘晓文

(河北省张家口市宣钢医院, 河北 张家口 075100)

摘要:目的 探讨食欲肽对缺血性脑卒中(CIS)模型大鼠的神经保护作用及其机制。方法 将15只大鼠分为假手术组(A组)、CIS组(B组)和食欲肽组(C组),各5只。建模前,C组大鼠腹腔注射30 g/kg食欲肽,A组、B组大鼠灌胃等量生理盐水,每日1次,连续7 d。B组和C组大鼠构建短暂性大脑中动脉闭塞(t-MCAO)再灌注模型。采用连续脑电图评估大鼠的睡眠功能,采用转棒实验及爬梯实验评估行为学功能,采用氧化三苯四氮唑(TTC)染色法评估大鼠的脑梗死面积,采用免疫荧光染色法评估大鼠的海马神经元凋亡情况。结果 与B组比较,C组大鼠清醒时脑电 α 波幅度、快速眼动睡眠(REM)期 θ 波幅、非快速眼动睡眠(NREM)期 θ 波幅均增高,REM期平均持续时长明显缩短($P < 0.01$);C组大鼠的脑梗死面积明显缩小($P < 0.01$);C组大鼠的海马区神经元数量明显增加($P < 0.01$),凋亡神经元数量明显减少($P < 0.01$);C组大鼠的爬行错误步数评分明显降低($P < 0.01$),转棒停留时间明显延长($P < 0.01$)。结论 食欲肽对CIS模型大鼠的神经元有保护作用,且可改善运动功能及运动-感觉功能。

关键词:食欲肽;缺血性脑卒中;快动眼睡眠;非快动眼睡眠;神经保护作用

Neuroprotective Effect of Orexin on Cerebral Ischemic Stroke Model Rats

NI Xiujian, WANG Li, QIAO Lina, MENG Zhimin, LIU Xiaowen

(Zhangjiakou Xuangang Hospital, Zhangjiakou, Hebei, China 075100)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of orexin on cerebral ischemic stroke (CIS) model rats. **Methods** Fifteen rats were divided into the sham operation group (group A), CIS group (group B), and orexin group (group C), with five rats in each group. Before establishing the models, rats in group C were intraperitoneally injected with 30 g/kg of orexin, while rats in groups A and B received intragastric administration of an equal volume of physiological saline. The rats in groups B and C were used for establishing transient middle cerebral artery occlusion (t-MCAO) reperfusion models. Continuous electroencephalogram (EEG) was used to evaluate the sleep function of rats, and the rotating rod test and climbing ladder test were used to evaluate behavioral function. TTC staining was used to evaluate the infarct area of rats, and immunofluorescence staining was used to evaluate the apoptosis of hippocampal neurons. **Results** Compared with those in group B, the amplitude of EEG α waves, rapid eye movement (REM) phase θ waves, and non-rapid eye movement (NREM) phase θ waves in group C increased during wakefulness, while the average duration of REM phase in group C was significantly shorter ($P < 0.01$). Compared with those in group B, the cerebral infarction area in group C significantly decreased ($P < 0.01$), the number of neurons in the hippocampus in group C significantly increased ($P < 0.01$), the number of apoptotic neurons in group C significantly decreased ($P < 0.01$); the crawling error step count score in group C significantly decreased ($P < 0.01$), while the stick turning dwell time in group C significantly prolonged ($P < 0.01$). **Conclusion** Orexin has a protective effect on neurons in CIS model rats, which can improve motor function and motor-sensory function.

Key words: orexin; cerebral ischemic stroke; rapid eye movement sleep; non-rapid eye movement sleep; neuroprotective effect

缺血性脑卒中(CIS)为发展中国家患者的第三大死因,也是致残的首要原因^[1]。尽管CIS的病理生理学治疗研究已取得了较大进展,但针对CIS的治疗首选方法仍为溶栓疗法,仅3%~5%的患者可接受这种治疗^[2-3]。因此,开发治疗CIS的有效新药物势在必行。目前,国际上广泛认可的大脑中动脉栓塞模型(MCAO)的发病机理与人类CIS表现相似,制作模拟人脑缺血模型对脑缺血发病机制及药物筛选有重要意义,且该模型的线栓法具有无须开颅、创伤较小、操作相对简单、缺血部位相对固定、可控性好、可实现脑缺血后再灌注等

优点,是理想的标准局灶性脑缺血动物模型。食欲肽最初被认为是可刺激食物摄入的一类神经肽类^[4]。最近研究发现,其有多种生理学作用,包括维持能量平衡^[5]、调节神经内分泌^[6]、调节自主神经^[7]、疼痛感知及睡觉-觉醒^[8]等。PEYRON等^[9]发现嗜睡患者体内的食欲肽产量减少,而在小鼠体内食欲肽基因的缺失会产生与人类嗜睡的相似症状,且食欲肽信号通路与麻醉清醒有关。而CIS患者主要表现为睡眠障碍、能量代谢异常、自主神经功能失调及神经内分泌异常^[10],提示食欲肽与CIS存在潜在关系。本研究中探讨了食欲肽在CIS模型大鼠中发

*基金项目:河北省医学科学研究课题计划项目[20200497]。

第一作者:倪秀娟,大学本科,主治医师,研究方向为神经内科学,(电子信箱)30957626@qq.com。

挥神经保护作用的机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:RZ-8200型小动物脑电记录系统(美国Pinnacle公司);Eclipse Ti2型显微镜(日本Nikon公司)。

试剂:Fluoro-Jade C试剂盒(美国Chemicon公司,货号为FJ15489);抗NeuN抗体(美国Cell Signaling Technology公司,货号为9845);氧化三苯四氮唑(TTC)染色试剂盒(武汉默沙克生物公司,货号为mo0125);食欲素A(MedChemExpress公司,批号为HY-106224);戊巴比妥钠(美国Sigma-Aldrich公司,批号为P4569)。

动物:成年SD大鼠40只,8~10周龄,体质量250~300 g,购于河北北方学院实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK2018-1240。饲养于相对湿度为45%~55%和光照周期12 h/12 h明暗交替的环境中,SPF动物房标准饲养1周。

1.2 方法

分组、给药与建模:将15只大鼠分为假手术组(A组)、模型组(B组)和食欲肽组(C组)^[11],各5只。建模前,C组大鼠腹腔注射30 g/kg食欲肽,A组、B组大鼠灌胃等量生理盐水,每日1次,连续7 d。B组和C组大鼠禁食12 h后,腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉,分离右侧颈内动脉、颈外动脉及颈总动脉,采用6.0号尼龙线插入右侧颈总动脉至颈内动脉的大脑中动脉分支处,30 min后拔出缝线,缝合动脉及颈部皮肤,术后回笼并作抗炎处理,以构建短暂性大脑中动脉闭塞(t-MCAO)模型模拟CIS。

大鼠脑电记录:对脑电波(EEG)进行标准化评分,觉醒时期以快速低电压 α 波评估。非快速眼动睡眠(NREM)模式根据出现高电压低频率 θ 波(0.5~4 Hz)及鼠活动消失来确定,快速眼动睡眠(REM)根据出现低电压高频率 θ 波(6~9 Hz)来确定。

TTC染色:大鼠处死后,收集脑组织,并在-20℃下冷冻30 min,制作4 mm切片,在TTC溶液(pH 7.4)中染色30 min,室温下用10%多聚甲醛固定20 min,正常脑组织为红色,梗死区域为白色,并用Image-Pro Plus 6.0软件计算脑梗死面积。脑梗死面积(%)=(左大脑半球面积-右大脑梗死面积)/(左大脑半球面积 \times 2) \times 100%。

免疫荧光染色:在黑暗中将脑组织切片与溶解在0.1%醋酸中的Fluoro-Jade C工作溶液在室温下孵育20 min,用蒸馏水清洗3次后,脑组织切片用封片介质覆盖,以进行共聚焦显微镜检查,采用脑组织切片与NeuN的双重染色来标记凋亡神经元。采用Image J软件及其MorphoLibJ插件和ROI管理器测量和评估染色的强度和共定位。

跑梯实验:在起点处放置水平梯子至终点,大鼠从起点处开始爬行,腹侧面放置照相机,镜头向上记录大鼠四肢的活动,对大鼠爬行错误步数进行评分。0分为无障碍通过;1分为四肢前后放置;2分为抓住横撑但马上脱落;3分为试图抓住但方向错误;4分为试图抓住但脱落,但保持平衡;5分为抓横撑时失去平衡;6分为完全脱落。

转棒实验:利用LE8200系统对大鼠进行转棒实验,每只大鼠处理前进行4次实验,速度为4 r/min,选取转棒上停留30 s大鼠入组。转棒的速度由4 r/min逐渐增至40 r/min,持续5 min,分别记录各组大鼠的转棒停留时间。

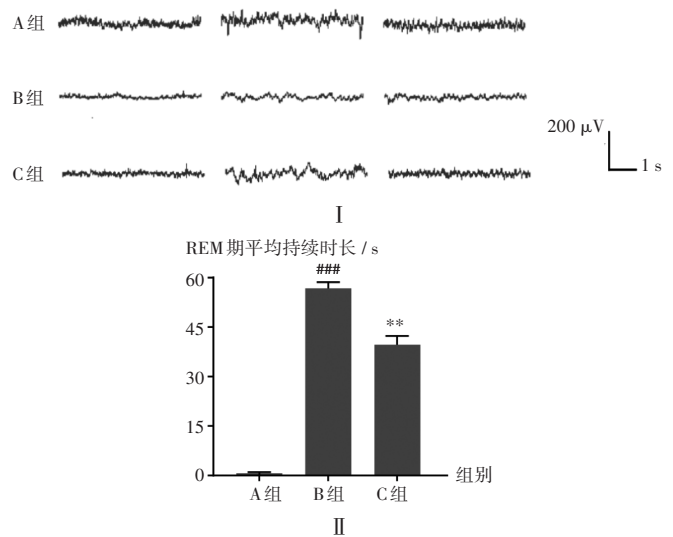
1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 7.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态分布和方差齐时,两组间比较行双侧 t 检验,多组间比较采用One Way ANOVA分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 清醒与睡眠脑电图

与B组比较,C组大鼠清醒时脑电 α 波幅度、REM期与NREM期 θ 波幅度均增高,详见图1 I。与A组比较,B组大鼠REM期平均持续时长明显延长($P < 0.001$);与B组比较,C组大鼠REM期平均持续时长明显缩短($P < 0.01$)。详见图1 II。



注:与A组比较,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$;与B组比较,** $P < 0.01$ 。

图2至图4同。

I. 脑电图 II. 柱状图

图1 各组大鼠清醒、睡眠脑电图及REM期平均持续时长
($n = 5$)

Note: Compared with those in group A, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with those in group B, ** $P < 0.01$ (for Fig. 1 - 4).

I. Electroencephalogram II. Bar chart

Fig. 1 EEGs during wakefulness and sleep, and average duration of REM phase in each group ($n = 5$)

2.2 脑梗死面积

TTC染色结果显示,未缺血部分呈玫瑰红色,脑梗死灶呈苍白色。与A组比较,B组大鼠的脑梗死面积明显增大($P < 0.001$);与B组比较,C组大鼠的脑梗死面积明显缩小($P < 0.01$)。详见图2。

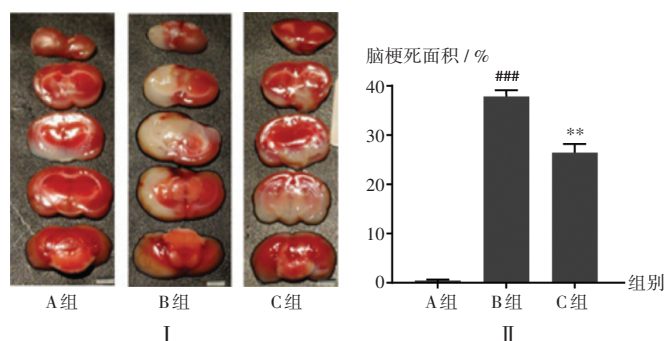


图2 各组大鼠脑梗死面积($n = 5$)
I. TTC staining II. Bar chart

Fig. 2 Cerebral infarction area in each group ($n = 5$)

2.3 海马神经元凋亡情况

Fluoro - Jade C染色结果显示,与A组比较,B组大鼠海马区域神经元数量明显减少($P < 0.001$),凋亡神经元数量明显增多($P < 0.01$);与B组比较,C组大鼠海马区域神经元数量明显增多($P < 0.001$),凋亡神经元数量明显减少($P < 0.01$)。详见图3。

2.4 行为学功能障碍

跑梯实验结果显示,与A组比较,B组大鼠的爬行错误步数评分明显升高($P < 0.001$);与B组比较,C组大鼠的爬行错误步数评分明显降低($P < 0.01$)。详见图4 I。转棒实验结果显示,与A组比较,B组大鼠的转棒停留时间明显缩短($P < 0.01$);与B组比较,C组大鼠的转棒停留时间明显延长($P < 0.01$)。详见图4 II。

3 讨论

食欲肽是一种新型神经肽,可产生食欲肽的神经元广泛分布于大脑中^[12],食欲肽与脑的多种生理功能相关,包括睡眠觉醒、食欲及代谢功能。食欲肽的生理功能主要由OX1R及orexin2受体介导,这2类受体均属G蛋白偶联受体家族,通过激活异三聚体转导信号,激活此受体可在不同神经元中产生不同的生物学效应^[13]。RAMANJANEYA等^[14]发现,orexin - A与orexin - B主要导致Gq介导的细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)与p38的活化来产生效应,而食欲肽来源于其前体prepro - orexin,其基因位于与神经退行性疾病相关的染色体上,故推测食欲肽可能参与神经元的存活及保持大脑神经连接的完整性。研究表明,脑缺血可导致皮质OX1R表达上调,表明食欲肽信号与CIS有关^[15-17]。IRVING等^[18]报道,CIS模型大鼠脑的OX1R表达上调,

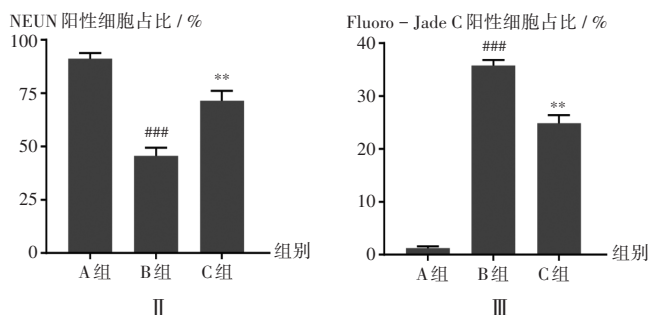
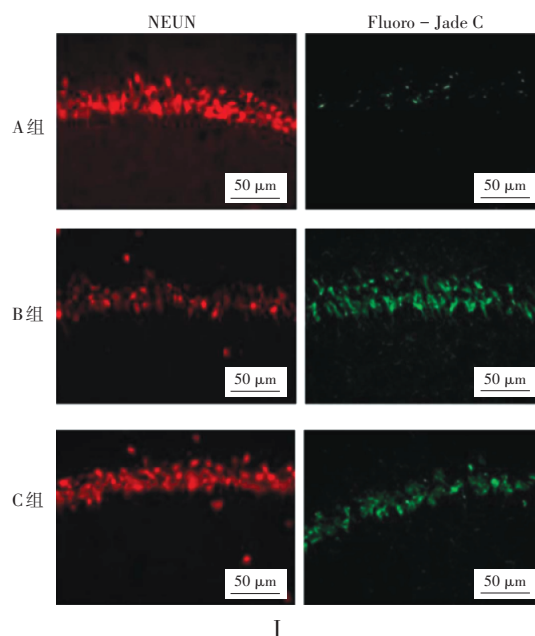


图3 各组大鼠海马神经元数量与凋亡情况($n = 5$)
I. NeuN及Fluoro - Jade C染色($\times 40$) II - III. 柱状图

Fig. 3 Number and apoptosis of hippocampal neurons in each group ($n = 5$)
I. NeuN and Fluoro - Jade C staining ($\times 40$) II - III. Bar charts

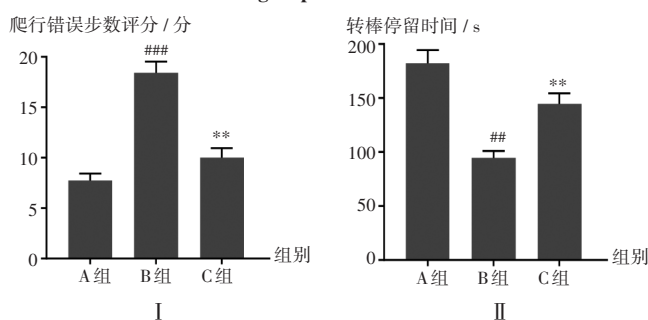


图4 各组大鼠跑梯实验与转棒实验结果($n = 5$)
I. Crawling error step score II. Rotating rod dwell time

Fig. 4 Results of ladder running test and baton turning test in each group ($n = 5$)

但orexin 2受体并无改变,在神经退行性病变及脑创伤患者中食欲肽A的水平降低。因此,探讨食欲肽对CIS模型大鼠的睡眠促进及神经保护作用十分必要。

尽管许多脑卒中患者有嗜睡现象,但脑卒中患者也有失眠症状^[19]。王丽娜^[20]研究发现,脑梗死后睡眠

障碍可使患者记忆功能、执行能力、情绪认知功能受损,急性脑梗死若合并睡眠障碍,可使认知功能进一步损害。张业敏等^[21]研究发现,CIS睡眠障碍患者与睡眠-觉醒周期中的睡眠参数相关,可能与睡眠障碍患者存在神经内分泌紊乱,导致激素分泌或分布异常,以及脑部结构和功能连接的变化有关。由于食欲肽在睡眠调节过程中起重要作用,故脑卒中患者脑的缺血再灌注过程可能影响食欲肽信号的激活^[22]。本研究结果显示,CIS模型大鼠清醒时脑电 α 波幅度降低,经食欲肽治疗后波幅增高;CIS模型大鼠REM期与NREM期的 θ 波幅度降低,经食欲肽治疗后波幅增高。表明食欲肽可缓解CIS模型大鼠的睡眠障碍。

梗死区域的大小与大脑的功能密切相关。研究表明,食欲肽对CIS模型大鼠梗死面积的改善在10~30 g/kg范围内呈剂量依赖性,但100 g/kg食欲肽的作用与30 g/kg相当,因此,食欲肽的改善作用存在“天花板效应”^[23]。本研究中选择30 g/kg剂量,结果显示,食欲肽可明显改善CIS模型大鼠的脑梗死面积($P < 0.05$)。

食欲肽主要通过胱天蛋白酶3/7(caspase 3/7)通路来发挥抗凋亡作用^[24]。因此,为评价食欲肽对CIS模型大鼠海马神经元的抗凋亡作用,本研究中对脑梗死区域周围半暗带进行了NeuN及Fluoro-Jade C染色。结果显示,食欲肽可显著增加CIS模型大鼠的海马神经元数量,并可减少凋亡神经元数量($P < 0.05$)。

据报道,食欲肽可通过增加皮层神经元的数量及与锥体系的联系来改善CIS的运动功能^[25-26]。因此,本研究中采用转棒实验及跑梯实验评估了食欲肽对CIS模型大鼠运动功能及感觉-运动功能的改善作用。结果显示,食欲肽对CIS模型大鼠的运动功能有显著改善作用($P < 0.05$)。

综上所述,食欲肽对CIS模型大鼠的神经元有保护作用,且可改善运动功能及运动-感觉功能。

参考文献

[1] 樊文香. 缺血性脑卒中的机制研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2018, 5(6): 751 - 759.
[2] 周锦霞. 重组组织型纤溶酶原激活剂急诊溶栓联合丹红注射液对急性脑梗死患者神经功能缺损程度评分和Barthel评分的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(12): 1574 - 1577.
[3] 陈晓娟, 陈勇, 邵素花, 等. rt-PA动脉内溶栓治疗急性脑梗死的临床疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018, 16(21): 3201 - 3203.
[4] AN VDP, GAO XB, OBRIETAN K, et al. Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin / orexin [J]. Journal of Neuroscience, 1998, 18(19): 7962 - 7971.
[5] MARTINS L, SEOANE - COLLAZO P, CONTRERAS C, et al.

A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance [J]. Cell Reports, 2016, 16(8): 2231 - 2242.

[6] TSUJINO N, SAKURAI T. Orexin / hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system [J]. Pharmacological Reviews, 2009, 61(2): 162 - 176.
[7] FOKIDIS HB, MA C, RADIN B, et al. Neuropeptide Y and orexin immunoreactivity in the sparrow brain coincide with seasonal changes in energy balance and steroids [J]. The Journal of Comparative Neurology, 2019, 527(2): 347 - 361.
[8] CARÚS - CADAVIECO M, DE ANDRÉS I. Adenosine and homeostatic control of sleep. Actions in target structures of the sleep - wake circuits [J]. Revista de Neurologia, 2012, 55(7): 413 - 420.
[9] PEYRON C, KILDUFF TS. Mapping the Hypocretin / Orexin Neuronal System: An Unexpectedly Productive Journey [J]. The Journal of Neuroscience, 2017, 37(9): 2268 - 2272.
[10] VONDERBRELIE C, SEIFERT M, ROT S, et al. Sedation of patients with acute aneurysmal subarachnoid haemorrhage with Ketamine is safe and might influence the occurrence of cerebral infarctions associated with delayed cerebral ischemia [J]. World Neurosurgery, 2017, 97: 374 - 382.
[11] KITAMURA E, HAMADA J, KANAZAWA N, et al. The effect of orexin - A on the pathological mechanism in the rat focal cerebral ischemia [J]. Neuroscience Research, 2010, 68(2): 154 - 157.
[12] KAZUHIRO N. Neural circuit for psychological stress - induced hyperthermia [J]. Temperature, 2015, 2(3): 352 - 361.
[13] 郭景明. 与睡眠调节相关的三种G蛋白偶联受体探针对化合物活性的筛选研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017.
[14] RAMANJANEYA M, CONNER AC, CHEN J, et al. Orexin - stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G - protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B [J]. Journal of Endocrinology, 2009, 202(2): 249 - 261.
[15] HARADA S, FUJITAHAMABE W, TOKUYAMA S. Effect of orexin - A on post - ischemic glucose intolerance and neuronal damage [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2011, 115(2): 155 - 163.
[16] XIONG X, WHITE RE, XU L, et al. Mitigation of Murine Focal Cerebral Ischemia by the Hypocretin / Orexin System is Associated with Reduced Inflammation [J]. Stroke, 2013, 44(3): 764 - 770.
[17] DENTESANO G, STRACCIA M, EJARQUE ORTIZ A, et al. Inhibition of CD200R1 expression by C / EBP beta in reactive microglial cells [J]. Journal of Neuroinflammation, 2012, 9(1): 165.
[18] IRVING EA, HARRISON DC, BABBS AJ, et al. Increased cortical expression of the orexin - 1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. Neuroscience Letters, 2002, 324(1): 53 - 56.