

病转化为大病的防治中。

综上所述,本研究通过对西部 4 省市城乡居民医疗消费数据的分析,得出影响居民就医选择的因素和影响居民医疗支出的因素。农村居民的就医概率以及医疗支出高于城镇居民,这就要求加大农村的医疗资源投入,提高农村的医疗卫生条件,实现农村和城镇卫生事业的协调发展。从文化程度对就医选择的影响来看,提高居民的受教育程度,对于降低居民的患病概率,提高居民的健康水平也有重要意义。从年龄来看,年龄越大,居民的就医概率越高、医疗支出越多。在未来几十年内,我国的人口结构老龄化问题会越来越明显,如何筹措医保基金、分担日益沉重的医疗费用负担,是我国政府需要思考和积极应对的问题^[5]。

参考文献

- 1 张娜. 农村居民就医行为研究—对江苏省淮安市 X 镇的调查[D]. 南京:南京农业大学,2007
- 2 吴晶. 中国患者就医行为研究[R]. 北京大学中国医药研究中心, 2005:1
- 3 王敏,张开金. 中国城乡患者就医行为影响因素模型研究[J]. 中国全科医学,2010,13(7A):2127-2129
- 4 李萍,宋长爱. 中国居民就医行为研究进展[J]. 护理研究,2010,24(6):1507-1508
- 5 林相森,艾春荣. 我国居民医疗需求影响因素的实证研究[J]. 统计研究,2008,25(11):40-45

(收稿日期:2013-11-05)

(修回日期:2013-11-22)

肥胖大鼠模型脑组织中 GIRK4 的表达研究

杨 海 胡燕荣 李南方 张向阳 高 莉 周 玲 洪 静

摘 要 **目的** 研究饮食诱导肥胖大鼠 G-蛋白偶联(门控)内向整流钾离子通道(GIRK4)基因在脑组织中的表达,探讨 GIRK4 与肥胖的相关性。**方法** 30 只 SD 大鼠,雌雄各半,对照组($n=10$)予以普通饲料饲喂作为,实验组($n=20$)以高脂肪高热量饮食饲喂 8 周,建立肥胖大鼠模型,肥胖大鼠体重超过正常饮食饲喂大鼠 20% 以上为成功模型,处死大鼠,提取两组大鼠的脑组织,提取脑组织中的总蛋白,应用 Western blot 法检测 GIRK4 蛋白表达,Quantity One 软件处理实验结果。**结果** (1)15 只大鼠进入肥胖组(体重大于正常对照组 20%)。(2)肥胖组血清总胆固醇及甘油三酯水平高于对照组($P<0.05$),高脂高糖饮食饲喂建立大鼠模型,肥胖大鼠脑中表达 GIRK4 蛋白较正常饲喂大鼠低,两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** GIRK4 在肥胖大鼠脑组织中表达水平降低,且在肥胖大鼠中表达,可能与饮食诱导肥胖的发生相关。

关键词 肥胖大鼠 GIRK4 脑组织

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Expression of GIRK4 in Brain Tissue in Diet-Induced Obesity Rats. Yang Hai, Hu Yanrong, Li Nanfang, et al. Xinjiang Medical University, Xinjiang 830001, China

Abstract Objective To investigate GIRK4(G protein-coupled inward rectifier K^+ channels 4 gene) expression in brain tissue of diet induced obesity rat model, and speculate the correlation between GIRK4 and obesity. **Methods** Thirty SD rats were randomly assigned to obesity group($n=20$) as fed by high-fat and high-sugar diet for establishment of obesity model and normal control group($n=10$) as fed by normal diet. The rats were sacrificed followed by separation of brain tissue. Protein of brain tissue was extracted for detection of GIRK4 expression via Western-blotting. The weight, length and fat coefficient were compared. **Results** Obese rats yielded markedly higher weight(381.78 ± 73.58 vs 285.57 ± 59.17), length(24.87 ± 2.23 vs 22.40 ± 2.01), fat coefficient(3.17 ± 1.06 vs 1.10 ± 0.43), ($P<0.05$, respectively), yet significantly suppressed GIRK4 expression in brain tissue($P<0.05$). **Conclusion** The down-regulation of GIRK4 expression in brain tissue may be related to fat metabolism and obesity induced by diet.

Key words Obesity; GIRK4; Brain tissue

基金项目:国家自然科学基金地区科学项目(81160109)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆医科大学(杨海、张向阳);新疆维吾尔自治区人民医院高血压中心、新疆高血压研究所(胡燕荣、李南方、高莉、周玲、洪静)

通讯作者:李南方,电子信箱:lnanfang2010@sina.com

目前已知肥胖是能量代谢失衡状态,也是糖尿病、高血压、高脂血症、冠状动脉粥样硬化性心脏病及脑血管疾病等的重要危险因素^[1]。机体能量代谢主要由下丘脑调节。另外,研究发现脂肪组织分泌的脂肪因子瘦素、脂联素在神经中枢调节能量代谢中发挥。瘦素能通过其在下丘脑中的受体(leptin receptor B,LRb)调节下丘脑胰岛素信号通路中的有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase,ERK)、磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase,PI₃K)、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(serine threonine protein kinase,AKT)活性^[2]。脂联素(adiponectin)通过下丘脑弓状核的 AdipoR1 受体加强 AMPK 活性,从而刺激了食物摄取,并减少能量消耗,也可通过激活胰岛素通路中的 PI₃K-Akt 通路调节能量代谢^[3]。

内向整流型钾离子通道蛋白(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels 4 gene,GIRK4)在下丘脑中表达丰富。并且 Cydne 等研究发现,基因敲除 GIRK4-/-小鼠容易出现迟发型肥胖,体重及脂肪含量增长,并与代谢综合征相关,证实 GIRK4 参与了中枢神经系统能量代谢调节^[4,5]。

在以往的研究中,笔者发现肥胖大鼠脂肪组织中 GIRK4 低表达^[6,7]。本研究通过建立肥胖大鼠模型,检测 GIRK4 在脑组织表达水平,初步探讨 GIRK4 基因在脑组织中的表达与肥胖的关系,从而为阐明 GIRK4 参与肥胖相关的分子机制提供依据。

对象与方法

1. 研究对象:选取 30 只 SD 大鼠(由新疆医科大学实验动物中心提供),雌雄对半,其中 20 只作为肥胖模型,给予高脂饮食(食物组成:基础饲料 60%、花生 5%、猪油 10%、盐 2%、蛋黄粉 5%、全脂奶粉 8%、豆粉 5%、蔗糖 5%),10 只作为对

照,给予正常饮食。共饲喂 8 周每周称量体重体长,肥胖大鼠体重超过正常饮食饲喂大鼠 20% 以上为成功模型,第 8 周处死大鼠取材。

2. 脂肪和棕色脂肪提取:动物处死前禁食,称体重和测体长后,乙醚麻醉。取出脑组织速置于液氮保存,用于后续实验。所有大鼠均收集心脏全血分离血清以检测血脂、血糖。称取腹膜后及睾丸、子宫及肾周围脂肪垫湿重,计算脂肪重量系数。脂肪重量系数=脂肪重量(g)/体重×100%。Lee's 系数= $\sqrt[3]{\text{体重(g)} \times 10^3} / \text{体长(cm)}$ 。血清指标测试:血糖、血清甘油三酯、血清总胆固醇通过全自动生化分析仪测定。

3. 蛋白提取:使用 RIPA 细胞裂解液提取脑组织官蛋白,提取液中额外添加蛋白酶抑制剂(武汉博士德产品)及 PMSF(BD 公司产品)。

4. 垂直凝胶电泳分析 GIRK4 在肥胖大鼠、正常大鼠脂肪组织和棕色脂肪组织的表达情况:(1)BCA 试剂盒(武汉博士德公司产品)检测膜蛋白浓度。(2)电泳:配制 SDS-PAGE 电泳胶,分离胶为 8%,浓缩胶 5%(武汉博士德公司产品)。上样量为 10μg 左右。SDS-PAGE 电泳,浓缩胶中电压 80V 电泳,分离胶电压 100V 电泳。电泳时间 1~2h 之间。电泳结束,9V 电压半干转移 30min,将凝胶条带转至 PVDF 膜上(购自 Millipore 公司),转膜前 PVDF 膜置于甲醇溶液中预处理 2min。转膜结束,用 5% 脱脂奶粉(由碧迪医疗器械(上海)过夜封闭)。(3)抗体孵育-抗孵育:GIRK4(1:3000);内参 GADPH(分子质量 37kDa,浓度 1:2000),孵育时间为 2h,室温。洗涤:TBST 洗涤 5 次,每次 10min。二抗孵育:GIRK4 二抗为羊抗兔,使用浓度 1:5000。GADPH 二抗为羊抗小鼠,使用浓度为 1:5000(以上抗体由北京中杉金桥公司提供)。洗膜:TBST 洗涤 5 次,每次 10min。显色:暗室显色,ECL 试剂(Pierce 公司)。压片:暗盒压片,时间按显色亮度定。Quantity one 软件处理实验结果。

结 果

1. 肥胖模型结果:肥胖组和正常组大鼠的体长、体重、脂肪垫、脂肪系数比较,差异存在统计学意义,见表 1。

表 1 肥胖和正常组比较

组别	n	体长(cm)	体重(g)	脂肪垫(g)	脂肪系数	Lee's 系数
正常	9	22.4 ± 2.01	285.57 ± 59.17	3.09 ± 1.15	1.10 ± 0.43	292.75 ± 8.31
肥胖	15	24.87 ± 2.23	381.78 ± 73.53	12.09 ± 4.33	3.17 ± 1.06	291.14 ± 8.91
P		0.014	0.003	0.000	0.000	0.665

2. 生化指标:肥胖组大鼠甘油三酯和总胆固醇水平较体重正常大鼠高,两组间差异有统计学意义(P<0.05),肥胖和正常大鼠血糖水平比较,差异无统计学意义(P>0.05),具体见表 2。

表 2 肥胖大鼠与正常饮食大鼠生化指标比较

组别	n	血糖	甘油三酯	总胆固醇
肥胖	21	6.82 ± 1.42	0.74 ± 0.16	1.40 ± 0.29
正常	10	5.92 ± 1.95	0.51 ± 0.11	1.07 ± 0.28
P		0.152	0.000	0.005

3. GIRK4 表达结果: Western blot 结果经 Quantity one 软件计算条带灰度, 并计算 GIRK4/GADPH 比值, 结果表明肥胖大鼠与正常大鼠相比, 脑组织中 GIRK4 表达降低, 且此差异有显著性统计学差异 ($P < 0.05$), 详见图 1、图 2。

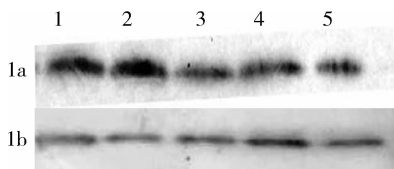


图 1 大鼠大脑组织 GIRK4 表达 Western blot 检测结果
1a 为大脑组织 GIRK4 表达 Western blot 检测结果, 1b 为心脏 GADPH 表达 Western blot 检测结果。其中条带 1~2 为正常大鼠, 条带 3~5 为肥胖大鼠表达条带

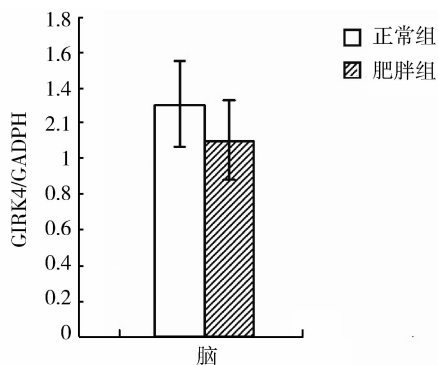


图 2 Quantity one 计算 Western blot 条带灰度结果

讨 论

本实验通过高脂饮食诱导, 成功建立了肥胖大鼠模型。与正常对照大鼠比较发现, 肥胖大鼠的脑组织中, GIRK4 表达下调, 这与 Cydne 等研究结果相一致。下丘脑是机体能量代谢调节的主要区域, 且 GIRK4 在下丘脑表达丰富, 并参与了能量代谢调节, 证实 GIRK4 参与了中枢神经系统中能量代谢的调节。

早期对 GIRK4 功能研究表明, 该钾离子通道通过与 GIRK1 构成异四聚体, 由 G 蛋白的 β/γ 亚基来完成激活其活性的调控, 从而对高级脑功能进行调控, 而这一过程主要通过依赖 cAMP 的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的磷酸化及磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 的去磷酸化调节 GIRK4 活性来完成^[8]。进一步研究发现, GIRK4 在中枢神经系统可调节神经元的兴奋性。因 GIRK4 具有内向整流作用, 其生理作用是在静息电位和引起神经元产生动作电位的膜电位之间允许 K^+ 外流。这种超极化的外向 K^+ 电流可降低细胞的兴奋性, 在中枢神经

系统, 主要是调节突触后神经元的兴奋性 (慢突触后抑制作用), 最终抑制神经元的放电频率, 从而完成对神经元兴奋性的调节^[9]。

目前认为, GIRK4 在下丘脑表达丰富, 其参与肥胖的机制, 可能与以下途径有关: GIRK4 参与了摄食调节: GIRK4 -/- 鼠比野生杂合子鼠摄食增多。研究显示 GIRK4 基因表达在腹背盖区及伏核含量较高, 考虑出现迟发型肥胖可能与 GIRK4 间接调整黑质多巴胺系统上的摄食整合相关信号有关 (奖赏信号通路)。推测 GirK4 -/- 小鼠因缺乏内向整流钾离子通道对阿片受体、D2 多巴胺受体超极化作用, 导致奖赏信号通路激活, 摄食增加^[10]。此外, 如前所述, GIRK4 具有慢突触后抑制神经元活性, 当 GIRK4 通道缺失, 可出现“饱中枢” VMN 神经元 (ventromedial nucleus of hypothalamus, VMN) 及 POMC 神经元 (Pro-opiomelanocortin, POMC) 抑制食欲作用减弱, 导致食物摄取增多、能量消耗减少; 也可能通过改变神经内分泌细胞的分泌功能, 调节下丘脑释放神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 增加。而 NPY 主要生理作用是在饥饿、胰岛素缺乏的糖尿病、泌乳和剧烈运动状态下, 刺激摄食和能量的高效贮存, 体现为饮食亢进和棕色脂肪组织产热减少, 这对于恢复能量平衡和生存具有重要的意义。另外下丘脑调控位点上的 $PI_3K - Akt - mTOR$ 和 $mTOR - 4EBP1/p70S6K - NPY/AgRP$ 信号通路在能量代谢调节中非常重要^[11]。机体神经体液因子中的体脂信号瘦素和胰岛素通过 NPY 刺激鼠相关蛋白和阿片黑皮质素原/可卡因苯丙胺调节转录肽神经元调节机体能量代谢^[12]。主要作用在外周脂肪细胞的调节因子有肿瘤坏死因子 α 、解偶联蛋白, 还可通过激活或抑制脂肪细胞上的 β_3 -肾上腺素受体和过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR- γ) 调节体脂含量, 其作用部位在中枢主要是下丘脑, 外周在脂肪细胞^[13]。

虽然已经证实 GIRK4 参与了机体能量代谢的调节, 但是该过程的具体分子机制尚未阐明。已有的研究证实, 体内有诸多调节 GIRK4 表达及活性的物质, 例如氢离子、ATP、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 等。脂肪细胞分泌的瘦素能通过其在下丘脑中的受体 LRb 调节下丘脑胰岛素信号通路中的 IRS-1、IRS-2、MAPK、ERK、Akt 和 PI_3K 活性^[2]。脂联素通过下丘脑弓状核的 AdipoR1 受体加强 AMPK 活性, 从而刺激了食物摄取, 并减少能量消耗, 也可通过激活胰岛素通路中的 $PI_3K - Akt$ 通路

调节能量代谢^[3]。

由此发现,外周脂肪组织分泌的瘦素、脂联素等因子与下丘脑表达的 GIRK4 均通过 Akt 和 PI_3K 等信号通路参与能量代谢的调节。笔者的研究证实肥胖时,大鼠脑组织中 GIRK4 表达下调,脂肪因子很可能参与了对 GIRK4 表达的调节,继而影响摄食中枢神经元的兴奋性,调节能量代谢。

总之,本研究发现肥胖大鼠 GIRK4 基因在脑组织的表达被抑制,但 GIRK4 表达受抑制的确切机制,留待今后更深入的研究。

参考文献

- 1 祝之明. 重视肥胖的心血管危险及其适当干预[J]. 中华内分泌代谢杂志,2011,27(9): 707-710
- 2 李小英,温俊平. 脂肪因子与中枢对话[J]. 中国糖尿病杂志,2008,16(7): 441-443
- 3 Wang C, Mao X, Wang L, *et al.* Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1[J]. J Biol Chem, 2007, 282(11): 7991-7996
- 4 Perry CA, Pravetoni M, Teske JA, *et al.* Predisposition to late-onset obesity in GIRK4 knockout mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(23): 8148-8153
- 5 Li N, Zhang D, Zhang J, *et al.* Influence of age on the association of GIRK4 with metabolic syndrome[J]. Ann Clin Biochem, 2012, 49(4): 369-376

- 6 杨海,胡燕荣,李南方,等. GIRK4 在肥胖大鼠脂肪组织中的表达[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2012, 32(6): 369-371
- 7 胡燕荣,高莉,杨海,等. 饮食诱导肥胖大鼠模型下丘脑、胰、肝脏 G 蛋白耦联的内向整流型 K 离子通道蛋白 4 的表达[J]. 中华生物医学工程杂志,2012,18(6): 441-444
- 8 Mullner C, Yakubovich D, Dessauer CW, *et al.* Single channel analysis of the regulation of GIRK1/GIRK4 channels by protein phosphorylation[J]. Biophys J, 2003, 84(2): 1399-1409
- 9 Ehrenguber MU, Doupnik CA, Xu Y, *et al.* Activation of heteromeric G protein-gated inward rectifier K⁺ channels overexpressed by adenovirus gene transfer inhibits the excitability of hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(13): 7070-7075
- 10 Kloukina V, Herzer S, Karlsson N, *et al.* G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel 4 (GIRK4) immunoreactivity in chemically defined neurons of the hypothalamic arcuate nucleus that control body weight[J]. J Chem Neuroanat, 2012, 44(1): 14-23
- 11 刘磊,宋志刚. 动物食欲调节的中枢信号通路[J]. 动物营养学, 2012, 24(2): 226-231
- 12 余芝,鞠传慧,徐斌. 脂肪组织的两种神经调控途径及其相互关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(37): 7373-7376
- 13 雷帆,邢东明,孙虹,等. 肥胖相关生物因子的研究[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(1): 5-8

(收稿日期:2013-11-14)

(修回日期:2013-11-25)

骨诱导活性材料用于牙槽嵴保存的动物实验研究

张晓倩 尼加提·吐尔逊 王 艳 吴佩玲

摘 要 **目的** 研究骨诱导活性材料引导犬前牙区拔牙窝新骨形成的能力。**材料及方法** 将 Beagle 犬随机分为 A、B、C 3 组,每组两只。微创拔除犬下颌双侧第一侧切牙,A 组填入骨诱导活性材料,B 组填入羟基磷灰石生物陶瓷,C 组空置(对照)。在术后 4、12 周制取实验样本,进行标本测量及组织学分析。**结果** 术后 4 周,AB 两组新骨形成量较 C 组多,A 组与 B 组宽度及高度骨量吸收程度均低于对照组,且 A 组低于 B 组,差异有统计学意义;术后 12 周,AB 两组新骨形成量明显多于 C 组,牙槽嵴宽度 A 组较 B 组吸收程度低,差异有统计学意义,但 AB 两组间高度吸收无统计学意义。**结论** 骨诱导活性材料(OAM)具有良好的位点保存效果。

关键词 牙槽嵴保存 骨诱导活性材料(OAM) 羟基磷灰石生物陶瓷

[中图分类号] R78

[文献标识码] A

Experimental Research of Animal on Alveolar Ridge Preservation with Osteoinduction Active Material. Zhang Xiaoqian, Nijati · Tuerxun, Wang Yan, *et al.* Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Xinjiang 830000, China

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2012211A029)

作者单位:830063 乌鲁木齐,新疆医科大学第二附属医院口腔科

通讯作者:吴佩玲,主任医师,博士,硕士生导师,电子信箱:wplkq@sina.com