

生长激素释放肽-6 对大鼠心率昼夜节律的影响

周 岚 曹济民

摘 要 **目的** 探讨 GHRP-6 对心率昼夜节律的影响。**方法** 给大鼠在体植入 E-Mitter 传感器,实时监测心率,观察 GHRP-6 对大鼠心率昼夜节律的影响。**结果** 作为昼伏夜出动物,Wistar 大鼠正常时夜间的心率较白天快。GHRP-6 (100 µg/kg)可使大鼠夜间心率显著减慢,而对白天的心率影响不大,导致心率的昼夜节律性降低。**结论** GHRP-6 使大鼠心率变化的日节律明显减弱,因此 GHS-R 信号通路可能对心脏活动日节律有调节作用。

关键词 GHRP-6 昼夜节律 心率

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.009

Effect of GHRP-6 on the Circadian Rhythm of Heart Rate in Wistar Rats. Zhou Lan, Cao Jimin. Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of GHRP-6 on the circadian rhythm of heart rate. **Methods** E-Mitter, a heart rate (HR) sensor, was implanted subcutaneously by surgery in Wistar rats. Continuous real-time monitoring of HR was performed. **Results** As nocturnal animals, rats showed faster HR at night than during the day. GHRP-6 (100 µg/kg) significantly decreased the HR at night, but did not significantly affect the HR in the day time. Therefore, GHRP-6 decreased the circadian variation of HR in this species. **Conclusion** GHRP-6 blunted the circadian oscillation of HR in Wistar rats, suggesting a role of GHSR in the regulation of cardiac activities.

Key words GHRP-6; Circadian rhythm; Heart rate

在哺乳动物中,视交叉上核(SCN)是控制生理及行为昼夜节律的核心结构,它通过整合一些光刺激和非光刺激,引起动物运动活性和其他生理活动昼夜节律的改变。腹内侧弓状核(ventromedial arcuate nucleus, vmARC)内含有瘦素、胰岛素、糖皮质激素以及 ghrelin 等激素的受体,可直接感受外周血液的激素信息,并将其传入中枢^[1]。Ghrelin 是一种主要由胃肠道分泌的含 28 个氨基酸的多肽。它是生长素促泌素受体(GHSR)的内源性配体,其主要作用是促进生长激素分泌、增加食欲和增强胃动力。在中枢和大多数外周组织均发现有 GHS-R 的表达。生长激素释放肽-6(growth hormone releasing peptide-6, GHRP-6)是一种人工合成的含 D 型氨基酸残基的 6 肽,可作用于脑垂体的 GHSR 促进生长激素释放^[2],而且比 ghrelin 更容易通过血脑

屏障发挥作用。由于 GHSR 存在于大多数外周组织(包括心脏),GHRP-6 也可直接作用于外周组织,引起不依赖生长素分泌的外周作用。在中枢作用方面,已有证据表明,腹腔注射 GHRP-6 以后,在弓状核可以检测到 Fos 蛋白的免疫活性,而且通过外周注入 GHRP-6 以及 SCN 的示踪技术证明,ARC 与 SCN 间存在直接的神经突触传递^[3]。既然 GHRP-6 可以通过弓状核作用于 SCN,因此受 SCN 调节的睡眠、运动、摄食等行为节律就有可能受 GHRP-6 的影响。但 GHRP-6 对心脏活动昼夜节律影响的研究较少。本研究重点探讨 GHRP-6 对大鼠心率昼夜节律的影响。

对象与方法

1. 对象:Wistar 大鼠由中国医学科学院动物研究中心提供。分为 GHRP-6 给药组($n=3$)和盐水对照组($n=3$)两组。

2. 方法:(1)在体心率节律检测的动物准备:Wistar 大鼠生活在恒温($25 \pm 1^\circ\text{C}$)、密闭的房间。大鼠分笼饲养。动物接受 E-Mitter 心率传感器置入术(下述)。每笼对应放置在一个 ER-4000 心率监测接收器,各个接收器相互串连,最后与 VitalView 电脑记录系统相连接,记录大鼠心率变化。人工

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071072)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com

照明, L:D = 12:12, [即光照(L) 12h, 黑暗(D) 12h] 的循环光制(早 6:00 灯亮, 晚 18:00 灯熄)。食物和水按需供给。(2) 节律检测系统: VitalView 动物行为节律记录仪、ER-4000 心率信号接收器、ActiView 节律数据分析软件, 购于美国 Mini Mitter 公司。(3) E-Mitter 心率传感器置入术: ①电极的预处理: HR E-Mitter 心率传感器带有正负两个电极, 需要剪裁成合适的长度。一般用于大鼠的负电极长 75mm, 正电极长 45mm。电极的管身由软塑管包绕, 远端裸露金属丝; ②采用 10% 的水合氯醛(0.3ml/100g) 经腹腔注射麻醉。将麻醉后的大鼠固定在鼠台上, 腹部及胸部消毒备皮; ③剑突下 1cm 做 < 2cm 的纵向切口, 再沿腹白线切开腹膜, 将感受器主体插入腹膜内, 电极留在切口外。在腹膜切口上端两侧分做两个小口, 使电极线能够穿过即可。正电极在左边, 负电极在右边, 最后将腹膜缝合; ④负电极的埋置: 在大鼠右侧锁骨附近做 0.5cm 切口, 将套管针从皮下插入, 通过皮下筋膜直到腹部切口, 拔出套管芯, 将负电极插入, 直到锁骨下, 用金线将电极头端与胸大肌缝合固定后缝皮; ⑤正电极的埋置: 沿右侧最后一肋下缘做 0.5cm 切口, 按上述方法将正电极从皮下穿过, 用金线将电极头端与肋部肌肉缝合固定后缝皮; ⑥信号检测: 将手术后大鼠放在 ER-4000 心率信号接收器上, 打开心率信号检测系统, 能看到 1.5~2.0 个网格高度的规律心电图曲线, 证明手术成功, 可以开始正常监测。(4) 给药方案: Wistar 大鼠在 L:D = 12:12 的正常光制下生活 14 天后, 在 14:00 时腹腔注射 GHRP-6(100μg/kg), 每天 1 次, 连续 9 天, 对照组注射同等容量的生理盐水。

4. 统计学方法: 实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 GB-STAT 软件进行统计学处理。组间对照用分组 *t* 检验, 自身对照用配对 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. GHRP-6 对大鼠心率节律影响的原始记录结果: 通过大鼠皮下 E-Mitter 心率传感器的植入手术实现了对大鼠心率节律的长期实时监测, 将大鼠每天 24h 内心率的实际变化如实地记录下来。图 1A 为大鼠心率的原始记录图, 黑色箭头为腹腔注射 GHRP-6 开始的当天, 连续注射 9 天后停药, 白色箭头为停药开始当天。为了观察方便, 笔者将给药前任意 1 天(记录的第 5 天) 及给药后第 9 天的 24h 记录放大, 比较 GHRP-6 干预前后心率节律的变化。结果发现 GHRP-6 干预前, 大鼠昼夜心率差异较大。由于鼠类为夜行动物, 因此夜间心率明显高于白天(图 1B), 而 GHRP-6 干预后第 9 天, 大鼠心率变化的昼夜差别明显减弱(图 1C)。

2. GHRP-6 对大鼠心率节律影响的统计分析结果: 利用 ActiView 数据分析系统对大鼠给药前后

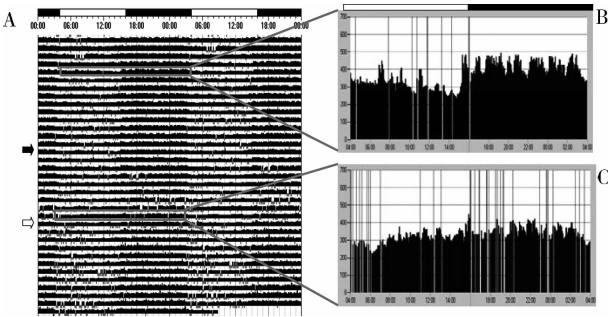


图 1 GHRP-6 腹腔注射对大鼠心率昼夜节律的影响

A. 大鼠腹腔注射 GHRP-6 前后心率节律变化的原始记录图, 黑色箭头代表给药的开始, 白色箭头代表给药的停止; B. 大鼠给药前任意一天(选取记录的第 5 天) 心率的 24h 变化; C. 大鼠给药后第 9 天心率的 24h 变化, B 和 C 图顶端白色条棒代表白天, 黑色条棒代表黑夜; B 和 C 图中纵向线条为心率脱漏记录的伪信号

各 10 天的心率节律进行了分析, 发现在 L:D = 12:12 的正常光制下, Wistar 大鼠的心率表现明显的昼夜节律。经统计大鼠白天平均心率是 326.0 ± 31.5 次/分, 夜间的平均心率是 413.0 ± 35.8 次/分。由于大鼠是夜行动物, 因此表现出白天心率慢, 夜间心率快的昼夜变化特点。与给药前相比, GHRP-6 注射 9 天后白天平均心率是 318.0 ± 25.9 次/分, 夜间的平均心率是 327.0 ± 31.4 次/分, 夜间心率比给药前明显降低 (*P* < 0.05, *n* = 3), 白天心率变化不明显, 心率的昼夜差别显著减弱(图 2A)。盐水对照组在干预前后心率比较差异无统计学意义(图 2B)。

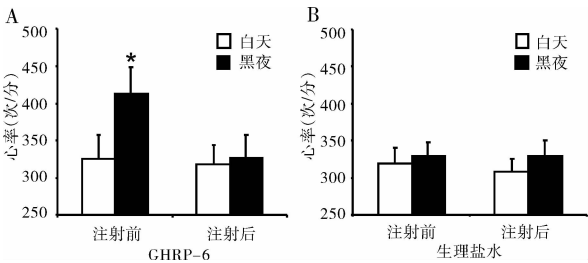


图 2 GHRP-6 腹腔注射对大鼠心率昼夜节律影响的统计图

A. GHRP-6 注射组; B. 盐水对照组; 与注射后黑夜相比, * *P* < 0.05, 每组 *n* = 3

讨 论

本研究观察了 GHRP-6 对大鼠心率昼夜节律的影响, 发现大鼠在正常光照环境下, 心率表现出明显的昼夜节律。GHRP-6 在 14:00 时连续注射 9 天后, 夜间心率明显降低, 白天心率变化不明显。心率

昼夜节律显著减弱。这些结果提示 GHSR 信号通路可能影响大鼠心脏活动的日节律。

笔者的前期研究发现, GHRP-6 有抗心力衰竭、抑制心肌细胞凋亡、抑制动脉粥样硬化形成等心血管保护作用^[4-6]。本研究发现 GHRP-6 还可以明显减弱心率的昼夜节律, 这有助于更全面地了解 GHRP-6 对心脏节律的影响。但 GHRP-6 钝化心率昼夜节律的效应是否也有心肌保护作用, 还有待于进一步研究。GHRP-6 钝化心率昼夜节律的作用主要是通过减慢大鼠夜间心率(此时心率最快)实现的, 其作用机制较为复杂。已有研究发现, ghrelin 的分泌存在明显的昼夜节律, 夜间分泌量明显增加, 而且其分泌与进食密切相关^[7]。也有报道 ghrelin 能抑制促甲状腺素在夜间的分泌^[8]。所以 ghrelin 在不同时间发挥得功能也是不同的。

GHRP-6 是人工合成的 ghrelin 拟似物, 具有与 ghrelin 类似的生物效应。因此当人为给动物体内注射 GHRP-6 后, 客观上改变了 ghrelin 的分泌节律, 也就改变了其在不同时间发挥的生理功能。已有研究表明外周血中注射放射性标记的 ghrelin, 可检测到下丘脑 ghrelin 水平的增高, 说明 ghrelin 可以通过血脑屏障进入脑组织^[9]。ghrelin 在脑组织中最先作用的细胞就是弓状核内的神经肽 Y/刺鼠相关蛋白表达的神经元细胞。一些摄食行为对中枢的影响就是通过 ghrelin 把相关信息首先传给弓状核内的神经肽 Y/刺鼠相关蛋白神经元来完成其调节作用的^[10-12]。

在中枢作用方面, 已有证据表明, 腹腔注射 GHRP-6 以后, 在弓状核可以检测到 Fos 蛋白的免疫活性, 而且通过外周注入 GHRP-6 以及 SCN 的示踪技术证明, ARC 与 SCN 间存在直接的神经突触传递^[13]。Yi 等^[3]报道, GHSR mRNA 在 SCN 也有高浓度的表达。说明外周血中的 GHRP-6 可能通过血脑屏障后直接作用于弓状核内的神经肽 Y 能神经元, 通过弓状核与 SCN 之间的神经投射再影响 SCN 的节律振荡, 也可能直接作用于 SCN 发挥作用。GHSR 是 ghrelin、GHS 和 GHRP 的受体, 在下丘脑和脑垂体前叶都有表达, 这与其调节生长激素释放的作用相一致。它与 ghrelin 和其他的 GHS 和 GHRP 亲和力极强, 易被激活。ghrelin 和其他人工合成的 GHS 以及 GHRP 都可直接作用于下丘脑的 GHSR 来调节神经内分泌。Kluge 等^[14,15]也证明 ghrelin 可抑制黄体生成素和甲状腺刺激素在夜间

的分泌。

由于 SCN 对自主神经前神经元、促甲状腺激素释放激素、促生长激素释放激素都有直接的神经投射, 因此 GHRP-6 有可能直接作用于 SCN, 改变 SCN 钟基因的震荡节律。而通过直接自主神经投射作用于心脏, 将 SCN 震荡节律的改变传达给心脏, 从而改变其相关的生理功能。另外由于心脏也有 GHSR 的表达, GHRP-6 还可能直接作用于心脏, 引起相应的改变。因此 GHRP-6 的作用机制有待于今后进一步探索, 从而明确其究竟通过中枢还是外周发挥作用。本研究发现 GHRP-6 可通过减慢大鼠的夜间心率, 而钝化心率的昼夜节律, 但这种效应的生理学和病理生理学意义有待于进一步阐明。

参考文献

- Hewson AK, Tung LYC, Connell DW, *et al.* The rat arcuate nucleus integrates peripheral signals provided by leptin, insulin, and a ghrelin mimetic [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 3412-3419
- Van der Lely AJ, Tschoop M, Heiman ML, *et al.* Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin [J]. *Endocrine Reviews*, 2004, 25(3): 426-457
- Yi CX, Van der vliet J, Dai J, *et al.* Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(1): 283-294
- Xu XB, Cao JM, Pang JJ, *et al.* The positive inotropic and calcium-mobilizing effects of growth hormone-releasing peptides on rat heart [J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 5050-5057
- Pang JJ, Xu RK, Xu XB, *et al.* Hexarelin protects rat cardiomyocytes from angiotensin ii-induced apoptosis in vitro [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286(3): H1063-1069
- Xu XB, Pang JJ, Cao JM, *et al.* GH-releasing peptides improve cardiac dysfunction and cachexia and suppress stress-related hormones and cardiomyocyte apoptosis in rats with heart failure [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(4): H1643-1651
- Tsujino N, Sakurai T. Circadian rhythm of leptin, orexin and ghrelin [J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(7): 1121-1125
- Kluge M, Schmidt D, Uhr M, *et al.* Ghrelin suppresses nocturnal secretion of luteinizing hormone (LH) and thyroid stimulating hormone (TSH) in patients with major depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2013, 47(9): 1236-1239
- Diano S, Farr SA, Benoit SC, *et al.* Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance [J]. *Nat Neurosci*, 2006, 9: 381-388
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, *et al.* Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression [J]. *Endocrinology*, 2000, 141: 4797-4800
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, *et al.* Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agoutirelated pro-

- tein [J]. *Endocrinology*, 2004, 145:2607 – 2612
- 12 Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, *et al.* Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus [J]. *Regul Pept*, 2005, 126:55 – 59
- 13 Zigman JM, Jones JE, Lee CE, *et al.* Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 494:528 – 548
- 14 Kluge M, Schüssler P, Schmidt D *et al.* Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in women [J]. *J Clin Endocrinol Metab* [J]. 2012, 97(3): E448 – 451
- 15 Kluge M, Schmidt D, Uhr M, *et al.* Ghrelin suppresses nocturnal secretion of luteinizing hormone (LH) and thyroid stimulating hormone (TSH) in patients with major depression [J]. *J Psychiatr Res*, 2013, 47(9):1236 – 1239
- (收稿日期:2014 – 03 – 26)
- (修回日期:2014 – 06 – 10)

液质联用多反应监测法定量肝纤维化非实质细胞中的 ATPA 蛋白质

张姣丽 贾小芳 尹 林 刘晓茜 吕建新 张丽军

摘 要 **目的** 建立液质联用多反应监测方法定量复杂样品中的蛋白质。**方法** 合成标准多肽,建立较通用的蛋白质多肽定量方法;挑选目标蛋白质及其定量离子对。采用 SDS – PAGE 方法分离复杂样品中的蛋白质,切取目标蛋白质条带进行胶内酶解和液质联用 MRM 定量,运用定量 PCR 方法分析目标蛋白在蛋白质和 mRNA 水平的一致性。**结果** 选择在二维凝胶电泳中具有 3 倍差异的 ATPA 蛋白质进行了 MRM 定量分析,ATPA 的 4 条多肽 513.8、586.4、644.5 和 777.3 对应的 10 个离子对均能特异地被质谱 MRM 方法检测,与正常对照相比,酒精性肝纤维化样本中 ATPA 的 10 个离子的曲线下面积变化基本一致,均表现为上调。MRM 定量结果也表明 ATPA 在酒精性肝纤维化样品中上调了 3.19 倍,与二维凝胶电泳检测结果一致。进一步的定量 PCR 分析结果显示,该蛋白质的表达变化同步发生在 mRNA 和蛋白质水平。**结论** 本研究构建了一种简单有效的液质联用 MRM 定量 SDS – PAGE 分离的复杂样品中蛋白质的方法。

关键词 蛋白质 多反应监测 定量 液相色谱串联质谱

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.010

MRM Quantifying ATPA in Nonparenchymal Cell from Liver Fibrosis. Zhang Jiaoli, Jia Xiaofang, Yin Lin, *et al.* College of Medical Laboratory Science, Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To establish mass spectrometer with multiple reaction monitoring quantification (MRM) method for target protein in complex samples. **Methods** By synthesis of polypeptide standards, we established a general quantitative method. According to the requirements, we selected the target protein and its quantitative ion pair. The complex protein samples was separated by SDS – PAGE. Then the target protein bands were cut and digested. the quantification of target protein was detected by mass spectrometry with MRM method. we used quantitative PCR method to analyze the consistency of target proteins in the protein and mRNA levels. **Results** Four polypeptides of ATPA were specifically detected by MRM method. Compared with the normal control, the areas under the curve which represented 10 ion pairs of ATPA in alcoholic liver fibrosis were basically the same. MRM quantitative results that ATPA was up to 3.19 times were consistent with 2DE's in the sample of alcoholic liver fibrosis. The results of quantitative PCR analysis further showed that the changes of ATPA occurred simultaneously at mRNA and protein levels. **Conclusion** We successfully established a simple and effective MRM quantitative method for complex protein samples.

Key words Protein; Multiple reaction monitoring (MRM); Quantification; Liquid chromatography – mass spectrometry (LC – MS)

基金项目:国家科技重大专项课题(2012ZX09303013)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(张姣丽、吕建新、张丽军);201508 上海市公共卫生临床中心(张姣丽、贾小芳、尹林、刘晓茜、张丽军)

通讯作者:张丽军,博士,教授,硕士生导师,电子信箱:zhanglijun1221@163.com;吕建新,教授,博士生导师,电子信箱:jxlu313@163.com