

- 2007,357(18):1841-1854
- 6 马秀玲,陈蕊君,王飞,等. 吸光度法快速确定菌悬液浓度及其适用范围[J]. 微生物学杂志, 2014,4:90-92
- 7 Guirado E, Schlesinger L S, Kaplan G. Macrophages in tuberculosis: friend or foe[J]. *Semin Immunopathol*, 2013,35(5):563-583
- 8 Morris D, Nguyen T, Kim J, *et al.* An elucidation of neutrophil functions against mycobacterium tuberculosis infection[J]. *Clin Dev Immunol*, 2013,2013:959650
- 9 Kisich KO, Higgins M, Diamond G, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of mycobacterium tuberculosis by human neutrophils[J]. *Infect Immun*, 2002,70(8):4591-4599
- 10 Hilda JN, Selvaraj A, Das SD. Mycobacterium tuberculosis H37Rv is more effective compared to vaccine strains in modulating neutrophil functions: an in vitro study [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2012,66(3):372-381
- 11 Russo DM, Kozlova N, Lakey DL, *et al.* Naive human T cells develop into Th1 effectors after stimulation with mycobacterium tuberculosis - infected macrophages or recombinant Ag85 proteins[J]. *Infect Immun*, 2000,68(12):6826-6832
- 12 Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P, *et al.* tuberculosis RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence[J]. *Tuberculosis: Edinb*, 2008,88(6):510-517
- 13 Munoz S, Hernandez-Pando R, Abraham SN, *et al.* Mast cell activation by mycobacterium tuberculosis: mediator release and role of CD48[J]. *J Immunol*, 2003,170(11):5590-5596
- 14 He ZL, Du FW, Du XZ. The viable Mycobacterium tuberculosis H37Ra strain induces a stronger mouse macrophage response compared to the heat-inactivated H37Rv strain [J]. *Mol Med Rep*, 2013,7(5):1597-1602
- 15 Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, *et al.* LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis [J]. *Dev Cell*, 2012,22(5):1079-1091
- 16 Tavares NM, Araujo-Santos T, Afonso L, *et al.* Understanding the mechanisms controlling leishmania amazonensis infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils[J]. *J Infect Dis*, 2014,210(4):656-666
- 17 Balderramas HA, Penitenti M, Rodrigues DR, *et al.* Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to paracoccidioides brasiliensis. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1[J]. *Cytokine*, 2014,67(1):36-43
- 18 Okamoto F, Saeki K, Sumimoto H, *et al.* Leukotriene B4 augments and restores Fc gammaRs-dependent phagocytosis in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2010,285(52):41113-41121
- 19 Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, *et al.* Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections [J]. *Cell*, 2012,148(3):434-446
- 20 Tobin DM, Vary JJ, Ray JP, *et al.* The lta4h locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans[J]. *Cell*, 2010,140(5):717-730
- 21 Lowe DM, Redford PS, Wilkinson RJ, *et al.* Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? [J]. *Trends Immunol*, 2012,33(1):14-25

(收稿日期:2014-11-24)

(修回日期:2014-12-05)

慢性给予 GHRP-6 对小鼠跑轮运动日节律的影响

郝 维 周 岚 谷婧丽 曹济民

摘 要 **目的** 本研究探讨慢性给予 GHRP-6 对小鼠日运动节律的影响。**方法** 利用 MiniMitter 鼠类跑轮活动监测系统实时记录 C57BL6/J 小鼠在全黑暗条件下跑轮运动的昼夜节律;在不同时间点(CT6、CT12、CT14、CT18、CT22 和 CT24)每日腹腔注射 GHRP-6(100 μg/kg),观察 GHRP-6 对小鼠跑轮运动昼夜节律和运动活性的影响。**结果** 在 CT12 给予 GHRP-6 引起明显的跑轮运动日节律时相延迟,而在其他时间点不引起明显的时相位移。GHRP-6 同时引起一定程度的运动活性降低,但该效应与给药时间没有明显关系。**结论** GHRP-6 可引起 C57BL6/J 小鼠的跑轮运动日节律时相的时间依赖性延迟和时间非依赖性运动活性降低,该研究提示 GHSR 信号通路对生物钟有调节作用。

关键词 生长激素释放肽 生长激素促分泌素受体 昼夜节律 相移 生物钟

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.007

Effects of Chronic GHRP-6 Administration on the Circadian Wheel-running Rhythm in Mice. Hao Wei, Zhou Lan, Gu Jingli, *et al.*
Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81071072,31471126)

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

Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the effect of GHRP-6 on the circadian locomotor rhythm of mice. **Methods** The circadian wheel-running activities of C57BL6/J mice were monitored with the MiniMitter Data Acquisition System under constant darkness (DD). GHRP-6 (100 μg/kg) was injected (ip) daily for 14 days at different circadian times (CT6, CT12, CT14, CT18, CT22 and CT24). **Results** Repeated GHRP-6 injection at CT12 induced significant phase delay of the circadian rhythm, but not at other CTs. Repeated GHRP-6 injection also suppressed the activity intensities, but this effect was not strictly time-dependent. **Conclusion** GHRP-6 can induce time-dependent phase delay of the circadian rhythms and time-independent suppression of activity intensities in mice. The study suggests that GHSR signaling has a regulatory role in the circadian rhythm.

Key words Growth hormone releasing peptides; Growth hormone secretagogue receptor; Circadian rhythm; Phase shift; Biological clock

生长激素分泌素 (growth hormone secretagogues, GHS) 是一类可促进脑腺垂体生长激素释放的物质 (含肽类和非肽类), 其受体 GHSR 分布于中枢和外周的大部分组织。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 型氨基酸的肽类 GHS。GHS 有广泛的中枢和外周效应, 包括刺激食欲、增加体重和改善恶液质、促进慢波睡眠和器官保护等^[1-6]。由于 GHRP-6 可影响睡眠, 并且哺乳动物的生物钟中枢视交叉上核 (SCN) 有丰富的 GHSR 表达, 由此推测 GHRP-6 可通过激动 SCN 的 GHSR 而发挥调节生物钟的作用^[7]。

SCN 不仅主要接受来源于视网膜-下丘脑通路传来的光刺激信号, 也接受一些非光刺激信号 (如进食、某些药物等) 的刺激, 通过整合光刺激和非光刺激信号, 引起动物运动活性和其他生理活动昼夜节律的改变。这些光和非光信号作为授时因子 (zeitgeber), 可使生物钟活动的时相移位 (相移, phase shift), 包括时相前移 (phase advance) 和时相后移 (phase delay)^[8]。授时因子对生物钟的调节有严格的时间依赖性, 在一天 24h 内只有在某些时间段发挥授时作用, 而在另一些时间段则基本没有作用^[9]。就 GHS 对生物钟的效应而言, 有报道在 CT6 时间点 (相当于主观白天) 给予 GHRP-6 可使小鼠的跑轮运动节律向前漂移^[10]。但这一研究的不足之处是只检测了一个时间点的作用, 不能完全揭示 GHRP-6 对生物节律的影响。笔者最近报道, GHRP-6 单次腹腔注射给药只有在 CT12 时间点 (相当于主观黑夜的开始点) 可引起时相漂移, 且这种时相漂移不是前移而是后移^[7]。连续多次给予 GHRP-6 对生物钟的影响目前还未见报道。本研究慢性给予小鼠腹腔注射 GHRP-6 (每天 1 次, 连续 14 天), 观察在不同时间点慢性给药对生物钟的影响有何不同, 借以分析激动 GHS 对生物钟调节作用的时间依赖性, 为时间

治疗学提供一定的实验依据。

材料与方法

1. 实验动物: 7 周龄 C57BL6/J 小鼠, 购于中国医学科学院基础医学研究所实验动物中心。

2. 小鼠跑轮运动日节律的观察: C57BL6/J 小鼠分笼饲养于装有转轮的塑料笼内。安装于转轮上的磁感应器监测到的轮转信号通过 QA-4 信号接收系统和 DP-24 信号输出系统与 VitalView 数据采集系统 (美国 MiniMitter 公司制造) 相连接, 构成完整的跑轮运动数据采集分析系统。动物先在 L:D = 12:12, 即 12h 光照 (L)、12h 黑暗 (D) 的光制下生活 14 天, 再转入 24h 全黑暗 (DD) 的环境中达 30 天左右, 在此环境下小鼠仍能表现出近 24h 节律。在黑暗环境下, 由于动物仍保持生物钟的内源性节律, 因此以 CT (circadian time) 时间作为整个实验的观察时间, 其中 CT12 相当于小鼠内源性生物钟记忆的“黑夜”刚开始的时间 (即主观昼夜交替时间), 也往往是小鼠开始跑轮运动的时刻, 因 C57BL6/J 小鼠是夜行动物。CT18 相当于主观午夜, CT6 相当于主观白天。小鼠在笼中自由摄食和饮水。

3. 给药方案: 动物分为 6 组, 分别在 CT6、CT12、CT14、CT18、CT22 和 CT24 给小鼠腹腔注射 GHRP-6 (100 μg/kg), 每天 1 次, 共 14 天。每组的对照组用同样方案给予等容积的生理盐水注射。停药后再继续观察 14 天。

4. 统计学方法: 用 VitalView 软件采集数据, 用 ActiView 软件进行数据分析, 用 Excel 软件进行统计学检验和做图。(1) 相移的测量: 按照文献^[11]报道的方法测量逐日的相移。在 DD 环境下, 小鼠跑轮运动节律呈现典型的逐日相位前移 (phase advance) 或称“自由节律” (free-running rhythms)。将给药前 14 天和 1 次给药后 14 天各自跑轮运动的开始时刻分别作连线 (通常是两条平行的直线), 这两条回归直线的水平距离 (时间差) 即为相移值。连续给药的相移情况略复杂, 相移呈逐日累积状态。(2) 运动活性的计算: 这里的“运动活性”是指跑轮运动的强度, 即 1 天内 (不同时间) 跑轮的圈数。将 VitalView 软件采集的跑轮数据转换为 ASCII 文件, 再输入 Excel 软件进行定量分析。将每 5min 的跑轮次数作为一个数据单元, 共统计给药前、给药后和停药后各 14 天每天的跑轮圈数, 然后进行统计学比较并作图。运动强度表示为每天跑轮的圈数。(3) 统计学检验: 数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 t

检验进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 慢性注射 GHRP-6 对 C57BL6/J 小鼠跑轮运动昼夜节律的影响: 在 CT12 给予 GHRP-6 (每天 1 次, 14 天) 使小鼠转轮运动的日节律时相逐渐后移, 每天相位后移约 40min (图 1A), 且停药后跑相位仍不能完全恢复, 而继续向后漂移, 只是相位后移值逐

渐减小 (图 1A)。这些结果说明在 CT12 连续给予 GHRP-6 可使处在全黑暗环境下的小鼠逐日“晚醒”并延迟进入活动时间。在其他时间点 (CT6、CT14、CT18、CT22 和 CT24) 给药则不能引起相移 (图 1A)。盐水对照组不论盐水注射时间点位于何处, 均不能引起相移 (图 1B)。

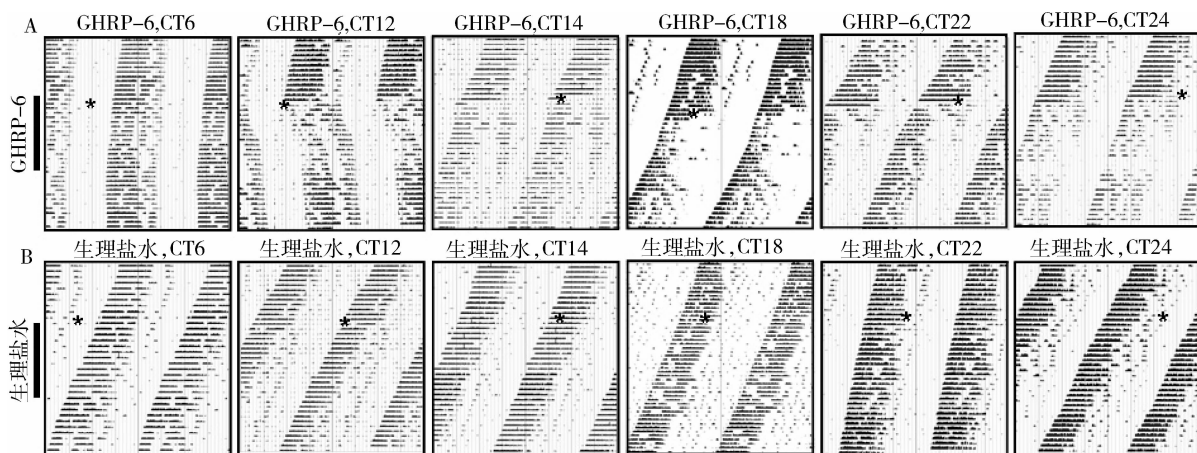


图 1 在不同时间点慢性腹腔注射 GHRP-6 对 C57BL6/J 小鼠跑轮运动节律相位的影响

A. 在不同时间点腹腔注射 GHRP-6 前后小鼠的典型跑轮图, 显示只有在 CT12 注射 GHRP-6 可引起明显相位后移, 而在其他时间点注射药物则不能引起相移; B. 生理盐水对照组, 在不同时间点腹腔注射等量生理盐水前后小鼠的跑轮图, 显示生理盐水在任何时间点都不能引起相移。* 表示 GHRP-6 或生理盐水第 1 次注射时间点。图左侧的黑色竖棒表示药物注射持续时间

2. 慢性注射 GHRP-6 对 C57BL6/J 小鼠跑轮运动活性的影响: 图 2 显示 GHRP-6 给药前、给药期间 (在 CT12 给药) 和停药后各 14 天内逐日跑轮运动的活性差异。给药前运动活性较高, 给药期间运动活性明显降低, 停药后运动活性并没有很快恢复, 而是保持较低活性较长时间。此外, GHRP-6 对运动活性的影响并没有严格的时间依赖性, 此特点明显不同于该药对相位的影响。图 3 为在不同时间点给予 GHRP-6 对跑轮运动活性影响的统计图, 可见在所观察的 6 个时间点给予 GHRP-6 均不同程度地使运动活性降低 (与生理盐水对照组相比)。

讨 论

本研究观察了 GHRP-6 外周慢性给药对 C57BL6/J 小鼠跑轮运动的节律时相和运动活性的影响, 发现此种方法给药导致小鼠跑轮运动的时相发生时间依赖性后移, 即只有在 CT12 给药会产生这种效应, 而在其他观察时间点不导致相移。这与以往的报道不同^[10]。笔者最近报道了 GHRP-6 单次给药也引起 C57BL6/J 小鼠跑轮运动的节律时相的时间 (CT12) 依赖性后移, 并进一步分析了其机制, 发现

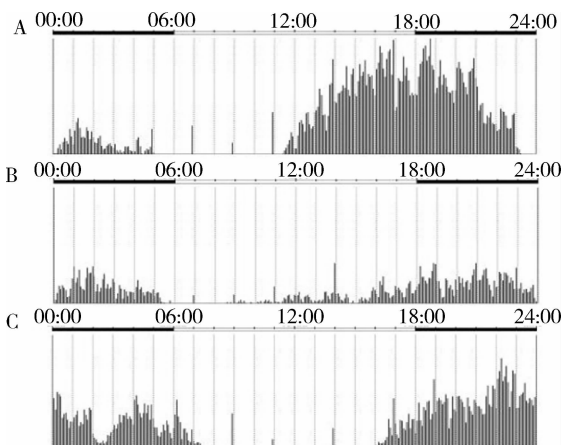


图 2 在 CT12 给予 GHRP-6 对小鼠转轮运动活性的影响

A. 给药前 14 天的逐日平均运动活性。B. 给药期间 14 天的逐日平均运动活性, 显示运动活性明显降低; C. 停药后 14 天的逐日平均运动活性, 与给药前相比, 运动活性仍然较低

GHRP-6 在 CT12 使 SCN 神经元的钙动员增强、神经递质谷氨酸和 γ -氨基丁酸释放改变、SCN 神经元放电增加、CaMKII - CREB - Per1 - CLOCK/Bmal1 - PK2 信号通路激活, 从而引起运动时相后移^[7]; 而在

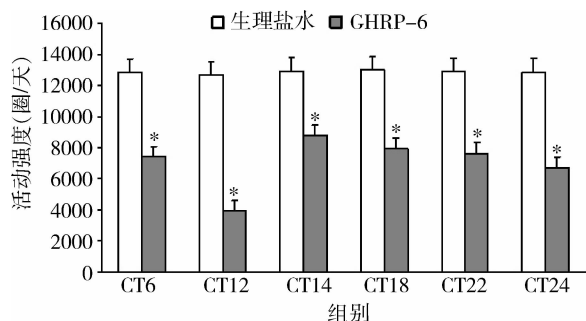


图 3 不同时间点慢性给予 GHRP-6 对小鼠跑轮运动活性(以每天的转轮圈数表示)影响统计图

GHRP-6 在任何时间点均使运动活性降低。与相应的生理盐水对照组相比, * $P < 0.01$; GHRP-6 组每个时间点 ($n = 8$); 生理盐水对照组每个时间点 ($n = 4$)

其他时间点单次给药,则上述效应不明显^[7]。本工作进一步研究了 GHRP-6 外周慢性给药的生物钟效应,并获得了新的结果:与单次给药相比,在 CT12 多次给药也引起相位后移,而且这种相位后移可以累积,于是产生逐日相位后移,是相位后移愈加明显。

一个疑问是,本工作是在固定时间(例如 CT12、CT6 等)给药,而由于相位的移动,可能使下一次给药时间点不能准确“落”在上一次给药的应该时间点(即动物刚醒的时间点),于是对结论产生一定影响。但有报道指出,生物钟在短时间内重复接受某种授时因子的刺激时,首次授时因子的作用时间点至关重要,而随后的授时因子作用则相对不明显^[8]。其他研究者在观察某种授时因子重复作用时,也用固定时间给予的方法^[12]。基于这些考虑,本研究的结论是可信的,即 GHRP-6 慢性重复给药对生物钟时相的影响也有严格的时间依赖性。

本研究的另一个发现是 GHRP-6 慢性给药可明显抑制小鼠的运动活性,但这种抑制作用没有明显的时间依赖性,这也说明 GHRP-6 引起日节律相位后移并不是由其对运动活性的影响所导致的,因为在不引起相位后移的时间点(如 CT6),GHRP-6 同样引起运动活性抑制。至于 GHRP-6 为何抑制运动活性,可能与其使 prokineticin 2 (PK2)表达节律的相位后移有关,因为 PK2 是一种钟控蛋白,可抑制小鼠的跑轮运动^[7,13]。最近有研究者发现 PK2 在体温和能量代谢调节中也发挥作用,而体温和能量代谢也存在明显的日节律,这些现象提示 GHS 可能通过影响 PK2 而发挥对机体多种日节律可能具有调节作用^[14]。

综合以上分析,GHRP-6 慢性给药引起严格的时间依赖性日节律时相后移,并导致运动活性降低,

这种效应在应用药物调整生物钟的实践中有重要参考价值:给药时间的选择对于药物效应有明显影响。另一方面,由于 GHRP-6 是通过激动 GHSR 起作用的,这也提示 GHSR 信号系统不仅调节生长激素释放、食欲和摄食、物质代谢和能量平衡、胃酸分泌和器官保护,也通过调节生物钟而影响睡眠。因此,深入揭示 GHSR 信号系统的生物钟效应,对于睡眠医学也有重要意义。GHSR 信号系统参与日节律的调节是一个新发现。

参考文献

- Cordido F, Isidro ML, Nemiña R, *et al.* Ghrelin and growth hormone secretagogues, physiological and pharmacological aspect [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2009, 6(1): 34-42
- 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-H1651
- Weikel JC, Wichniak A, Ising M, *et al.* Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284(2): E407-E415
- Xu X, Ding F, Pang J, *et al.* Chronic administration of hexarelin attenuates cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 303(6): H703-H711
- Pang J, Xu Q, Xu X, *et al.* Hexarelin suppresses high lipid diet and vitamin D3-induced atherosclerosis in the rat[J]. *Peptides*, 2010, 31(4): 630-638
- Guo S, Gao Q, Jiao Q, *et al.* Gastric mucosal damage in water immersion stress: mechanism and prevention with GHRP-6[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(24): 3145-3155
- Zhou L, Gao Q, Zhang P, *et al.* Activation of growth hormone secretagogue receptor induces time-dependent clock phase delay in mice [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307(6): E515-E526
- Golombek DA, Rosenstein RE. Physiology of circadian entrainment [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 1063-1102
- Challet E. Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(12): 5648-5655
- Yannielli PC, Molyneux PC, *et al.* Ghrelin effects on the circadian system of mice[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(11): 2890-2895
- Jud C, Schmutz I, Hampf G, *et al.* A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions[J]. *Biol Proced Online*, 2005, 7(1): 101-116
- Iijima M, Nikaido T, Akiyama M, *et al.* Methamphetamine-induced, suprachiasmatic nucleus-independent circadian rhythms of activity and mPer gene expression in the striatum of the mouse[J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16(5): 921-929
- Cheng MY, Bullock CM, Li C, *et al.* Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus [J]. *Nature*, 2002, 417(6887): 405-410
- Beale K, Gardiner JV, Bewick GA, *et al.* Peripheral administration of prokineticin 2 potently reduces food intake and body weight in mice via the brainstem[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(2): 403-410

(收稿日期:2014-10-08)

(修回日期:2014-10-18)