

TƯƠNG TÁC GIỮA GHRELIN VÀ PACAP TRONG VIỆC ĐIỀU HÒA TÍNH THỀM ĂN QUA VÙNG NHÂN ACCUMBEN Ở CHUỘT NHẮT TRẮNG

Nguyễn Thành Trung¹, Yuki Kambe², Nguyễn Mạnh Tường¹, Nguyễn Thị Thanh Hà¹

¹*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Trường Đại học Kagoshima, Nhật Bản*

*Tác giả liên hệ: nguyenthanhtrung@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 03.09.2024

Ngày chấp nhận đăng: 27.12.2024

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là làm rõ vai trò và cơ chế ảnh hưởng của ghrelin đối với hành vi thèm ăn ở chuột nhắt trắng. Chúng tôi đã sử dụng các chất đối kháng PACAP kết hợp với theo dõi thu nhận thức ăn ở chuột nhắt. Kết quả nghiên cứu cho thấy ghrelin làm tăng lượng thức ăn nạp vào của chuột sau 1 giờ điều trị. Đáng chú ý, sự giảm lượng thức ăn càng rõ rệt hơn ở những con chuột bị knock-out gen PACAP sau khi được điều trị bằng ghrelin, so với mức giảm ở chuột nhắt trắng được điều trị với chất đối kháng PACAP6-38. Hơn nữa, sau 1 giờ điều trị bằng ghrelin, chúng tôi quan sát thấy sự giảm mức độ biểu hiện của thụ thể GLP1R trong vùng nhân accumben ở những con chuột knock-out gen PACAP, cho thấy biểu hiện của thụ thể GLP1R trong vùng này có thể bị điều chỉnh bởi ghrelin. Những phát hiện này chỉ ra rằng ghrelin và PACAP có sự tương tác trong việc điều hòa lượng thức ăn thu nhận, nhưng ghrelin cũng có thể tác động thông qua các con đường tín hiệu khác không phụ thuộc hoàn toàn vào PACAP, đồng thời cho rằng chất đối kháng GLP1R có tiềm năng ngăn ngừa tăng cân và có thể đóng vai trò như một chiến lược điều trị quan trọng chống lại bệnh béo phì trong tương lai.

Từ khóa: Ghrelin, thức ăn thu nhận, nhân accumben, thụ thể GLP1R, PACAP, chuột nhắt trắng.

Interaction between Ghrelin and PACAP in regulating appetite behavior in the nucleus accumbens of mice

ABSTRACT

The purpose of this study was to clarify the role and mechanism of ghrelin's effect on feeding behavior in mice. We used PACAP antagonist combined with monitoring food intake in mice. The study results showed that ghrelin increased food intake in mice after 1 hour of treatment. Notably, the decrease in food intake was more pronounced in PACAP knockout mice after ghrelin treatment, compared to the reduction in food intake observed in wild-type mice treated with the PACAP antagonist PACAP6-38. Furthermore, after 1 hour of ghrelin treatment, we observed a decrease in the expression level of the GLP1R receptor in the nucleus accumbens of PACAP knockout mice, suggesting that the expression of the GLP1R receptor in this region may be regulated by ghrelin. These findings provide evidence that ghrelin and PACAP interact in regulating food intake, but ghrelin may also act through other signaling pathways that are not entirely dependent on PACAP, and suggest that GLP1R antagonists may have potential in preventing weight gain and could serve as an important therapeutic strategy against obesity in the future.

Keywords: Ghrelin, food intake, nucleus accumben, glucagon-like peptide-1 receptor, PACAP, mouse.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nghiên cứu gần đây đã xác định hai loại hormone chi phối cảm giác đói và no lần lượt là ghrelin và leptin (Sitar-Tăut & cs., 2021). Cụ thể, ghrelin được biết đến như một hormone

kích thích cảm giác đói, trong khi leptin đóng vai trò trong việc duy trì cảm giác no. Ghrelin được tiết ra từ dạ dày khi bụng trống rỗng và gửi tín hiệu đến não rằng cơ thể cần ăn. Ngược lại, khi cơ thể ở trạng thái no, các tế bào mỡ giải phóng leptin để thông báo cho não rằng nên

ngừng ăn (Sitar-Tăut & cs., 2021). Một nghiên cứu được công bố vào năm 2004 cho thấy khi lượng leptin giảm 18% thì lượng ghrelin tăng lên 28%, đồng nghĩa với cảm giác thèm ăn tăng lên 24% (Spiegel & cs., 2004). Điều này nhấn mạnh sự tương tác giữa ghrelin và leptin trong việc điều chỉnh cảm giác thèm ăn và cân bằng năng lượng trong cơ thể.

Các báo cáo chỉ ra rằng ghrelin ngoại sinh có nhiều tác động nội tiết và có tiềm năng làm tăng trọng lượng cơ thể ở lợn trong thời kỳ cai sữa. Nếu ghrelin có thể làm giảm thời gian chán ăn cai sữa và tăng trọng lượng cơ thể trong thời kỳ cai sữa, lợn có khả năng chống lại các thách thức về bệnh lý và môi trường tốt hơn trong thời gian này (Salfen & cs., 2004). Nhưng ngược lại, các tác giả khác phát hiện ra rằng ghrelin ngoại sinh ở liều lượng 1 µg/ngày ở lợn có thể gây ra nhiều tác động về hành vi, nhưng không cải thiện hiệu suất của lợn con cai sữa (Wu & cs., 2008). Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng tiêm tĩnh mạch ghrelin cho chuột kích thích tiết axit dạ dày và nhu động dạ dày (Kamegai & cs., 2001). Ghrelin ảnh hưởng đến chức năng dạ dày thông qua dây thần kinh phế vị (Ueno & cs., 2005). Ghrelin bảo vệ chống lại loét dạ dày do ethanol gây ra ở chuột (thông qua cơ chế trung ương phụ thuộc oxit nitric) (Sibilia & cs., 2003). Ghrelin ở gà gây ra phản ứng co bóp ở các dải cơ trơn được phân lập từ các phần khác nhau của đường tiêu hóa (Kitazawa & cs., 2007). Ghrelin gây co thắt dạ dày ở chim cú Nhật Bản (Kitazawa & cs., 2007). Nhưng ở thỏ, ghrelin không gây co thắt (Peeters, 2005).

Cơ chế hoạt động của ghrelin trong việc kích thích lượng thức ăn ăn vào ban đầu được cho là thông qua các mạch vùng dưới đồi, đặc biệt là vùng nhân cung (ARC) (Willesen & cs., 1999; Nakazato & cs., 2001; Kageyama & cs., 2010). Sự biểu hiện của thụ thể ghrelin, thụ thể duy nhất được biết đến của ghrelin, đã được xác nhận trong vùng nhân cung bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm phương pháp lai tại chỗ, RT-PCR, hóa mô miễn dịch và phân tích Western blot (Howard & cs., 1996; Guan & cs., 1997; Willesen & cs., 1999; Zigman & cs., 2006). Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng ghrelin

có khả năng liên kết thụ thể trên các tế bào thần kinh NPY/AgRP ở vùng nhân cung, dẫn đến sự kích hoạt của ghrelin và tăng cường các hành vi thèm ăn (Willesen & cs., 1999; Nakazato & cs., 2001; Wren & cs., 2001; Kageyama & cs., 2010; Schaeffer & cs., 2013). Bên cạnh đó, ghrelin cũng tương tác với một số tế bào thần kinh và các vị trí khác ở não bộ, góp phần làm tăng lượng thức ăn thu nhận, cho thấy rằng cơ chế tác động của ghrelin là phức tạp và đa dạng. Cụ thể, các tế bào thần kinh sản xuất orexin của vùng dưới đồi đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh cảm giác đói do ghrelin gây ra (Olszewski & cs., 2003; Toshinai & cs., 2003). Một số báo cáo cũng chỉ ra rằng tính toàn vẹn của dây thần kinh phế vị là cần thiết cho việc thu nhận thức ăn do ghrelin gây ra (Date & cs., 2002; Date, 2012). Cùng với đó, ghrelin còn liên kết với các tế bào thần kinh trong vùng bụng tegmental (VTA), làm tăng hoạt động của tế bào thần kinh dopamine và sự chuyển hóa dopamine trong nhân accumbens (Abizaid & cs., 2006). Bên cạnh đó, peptide giống glucagon-1 (GLP-1) là một peptide được tiết ra từ các tế bào L ở ruột xa và từ các tế bào thần kinh trong nhân tractus solitarius (NTS) của thân não. GLP-1 làm giảm lượng thức ăn nạp vào thông qua thụ thể liên kết với protein G, thụ thể GLP-1 (GLP-1R). Cả ghrelin và GLP-1 đều ảnh hưởng đến lượng thức ăn thu nhận và quá trình trao đổi chất thông qua nhiều con đường sinh học, bao gồm con đường thần kinh phế vị cận tiết (Davis & cs., 2020), tín hiệu từ máu đến não và trong trường hợp của GLP-1, các dự báo từ các tế bào thần kinh tiền chất proglucagon sản xuất GLP-1 trong NTS trên toàn bộ trục thần kinh (Kanoski & cs., 2016).

Đáng lưu ý, peptit kích hoạt adenylate cyclase tuyến yên (PACAP) là một polypeptit thần kinh có liên quan đến nhiều chức năng sinh lý khác nhau, bao gồm sinh nhiệt, hoạt động vận động, huy động dự trữ năng lượng và cảm giác thèm ăn (Rudecki & Gray, 2016). Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng thao tác biểu hiện gen PACAP dẫn đến thay đổi hành vi ăn uống ở chuột (Nguyen & cs., 2020). Tuy nhiên, cơ chế tương tác giữa ghrelin và PACAP trong

việc ảnh hưởng đến cảm giác thèm ăn vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm làm rõ vai trò và cơ chế ảnh hưởng của ghrelin trong hành vi thèm ăn ở chuột và khám phá sự tương tác giữa ghrelin và PACAP trong điều hòa cảm giác thèm ăn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Đối tượng: Chuột nhắt trắng bình thường và chuột bị knock-out gen PACAP được điều trị với ghrelin nuôi tại Bộ môn Nội - Chấn - Dược lý, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và Bộ môn Dược lý, Trường Đại học Kagoshima, Nhật Bản. Tất cả chuột thí nghiệm được nuôi riêng lẻ trong điều kiện chu kỳ sáng/tối 12 giờ tiêu chuẩn (bật đèn lúc 7:00 sáng và tắt đèn lúc 7:00 tối) trong ít nhất 1 tuần trước và trong suốt quá trình thí nghiệm.

Hóa chất dùng gây phụ thuộc vào ghrelin: Để gây ra sự phụ thuộc vào ghrelin, những con chuột nhắt được tiêm xoang phúc mạc (IP.) nước muối sinh lý saline (đối chứng) hoặc ghrelin (AS-24159, Anaspec, Fremont, Hoa Kỳ) với liều lượng 400 µg/kg.

Chất đối kháng PACAP6-38 (4286-v) được mua từ Peptide Institute Inc. (Osaka, Nhật Bản) với liều lượng sử dụng 4 nmol/chuột (IP.).

Hóa chất dùng tách và tinh sạch ARN tổng số gồm: (i) dung dịch ly giải mẫu có chứa 27% sucrose, 15mM trisodium citrate, 0,15M NaCl, 1mM ethylene diaminetetraacetic acid, 1% sodium dodecyl sulphate, 200 µg/ml proteinase K; (ii) phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1); (iii) isopropyl; (iv) cồn 70%; (v) dung dịch đệm TE (pH 8).

Sinh phẩm, hóa chất dùng cho phản ứng qPCR: (i) HighCapacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA); (ii) Bộ kit Thunderbird SYBR qPCR kit (Toyobo Life Science, Osaka, Japan); (iii) Cặp mồi đánh giá định lượng mức độ biểu hiện mARN của GLP1R, GLP1, AgRP, POMC ở não chuột sau khi điều trị với ghrelin được thực hiện theo các công bố trước đây và trình tự mồi đặc hiệu được trình bày ở bảng 1.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Xác định lượng thức ăn thu nhận ở chuột nhắt trắng và chuột knock-out gen PACAP sau khi tiêm với ghrelin.
- Xác định vai trò của ghrelin trong cảm giác thèm ăn ở chuột thông qua các peptide thần kinh và xác định cơ chế ảnh hưởng và sự tương tác giữa ghrelin và PACAP trong việc kiểm soát tính thèm ăn ở chuột bị knock-out gen PACAP.

Bảng 1. Trình tự mồi đánh giá định lượng mức độ biểu hiện mARN của GLP1R, GLP1, AgRP và POMC ở não chuột sau khi điều trị với ghrelin

Gen	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nguồn
GLP1R	F	GCC CTC AAG TGG ATG TAT AGC	Kambe & cs. (2023)
	R	CCA GTC GGC AGC CTA GAG A	
GLP1	F	GAG AAC CCC AGA TCA TTC CC	
	R	CCT GTG AGT GGC GTT TGT C	
AgRP	F	AAGACAACCTGCAGACCGAGC	
	R	GCTAGGTGCGACTACAGAGG	
POMC	F	ATAGATGTGTGGAGCTGGTGC	
	R	ACTTCCGGGGGTTTTCAGTC	
GAPDH	F	GAAGGTCGGTGTGAACGGAT	Kambe & cs. (2021)
	R	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	

Ghi chú: Peptide giống glucagon-1 receptor (GLP-1R), Peptide giống glucagon-1 (GLP-1), Agouti-related protein (AgRP), Pro-opiomelanocortin (POMC), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp lấy mẫu

Để gây ra sự phụ thuộc vào ghrelin, những con chuột nhắt được tiêm xoang phúc mạc (IP.) nước muối sinh lý saline (đối chứng) hoặc ghrelin (AS-24159, Anaspec, Fremont, Hoa Kỳ) với liều lượng 400 µg/kg. Sau đó, lượng thức ăn thu nhận được đo theo các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ và 24 giờ để đánh giá ảnh hưởng của ghrelin đến lượng thức ăn thu nhận. Tiếp đến, vùng nhân accumbens của não chuột được thu thập theo công bố trước đây (Nguyen & cs., 2020) để làm rõ cơ chế tác động của ghrelin.

Để tiếp tục đánh giá ảnh hưởng ghrelin và PACAP trong việc kiểm soát tính thèm ăn, chuột bị knock-out gen PACAP và chuột bình thường sẽ được tiêm ghrelin (400 µg/kg). Sau đó, lượng thức ăn thu nhận sẽ được định lượng.

2.3.2. Phương pháp tách và tinh sạch ARN

ARN được tách từ vùng nhân accumbens ở não chuột, với các bước thực hiện chính như sau:

(1) Ly giải mẫu: mẫu não chuột được trộn đều trong 250µl dung dịch Sepasol. Vortex trong 5 phút. Sau đó thêm 50µl Chloroform và ủ trong vòng 3 phút ở nhiệt độ phòng. Dung dịch ly tâm 12.000 vòng/15 phút, ở nhiệt độ 4°C.

(2) Thu 150µl dịch nổi và thêm vào 2µl linear acrylamide và 220µl isopropanol. Vortex và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm 15.000 vòng/10 phút

(3) Cặn thu được thêm 250µl 75% ethanol và ly tâm 15.000 vòng/5 phút

(4) Cặn thu được tiếp tục được bổ sung 8µl nước với 1µl DNase và 1µl DNase buffer. Ủ 37°C/30 phút. Sau đó, thêm vào 45µl vào cặn thu được.

(5) Tách pha ARN bằng PCI (phenol-chloroform-isoamyl, 25:24:1): Bổ sung 55µl dung dịch PCI vào ống mẫu sau khi ly giải. Vortex hỗn hợp rồi ly tâm 15.000 vòng/5 phút, ở nhiệt độ 4°C

(6) Tủa ARN: Dùng ống Eppendorf mới, trộn 5µl 3M Kali acetat + 125µl 100% ethanol + 50µl dịch nổi phía trên. Tủa ARN ở 37°C/10 phút. Ly tâm, 15.000 vòng/10 phút.

(7) Rửa tủa ARN: Rửa mẫu bằng 150µl ethanol 75% (pha trong nước cất đã xử lý DEPC). Ly tâm, 12.000 vòng/5 phút, ở nhiệt độ 4°C. Loại bỏ hết cồn. hong khô ở nhiệt độ phòng trong 15 phút

(8) Hòa tan tủa ARN: Tủa ARN được hòa tan trong 15µl nước, ủ ở 55°C/10 phút.

(9) Đo nồng độ tổng số ARN.

2.3.3. Phương pháp realtime PCR định lượng mức độ biểu hiện mRNA của GLP1, GLP1R AgRP và POMC sau khi tiêm ghrelin

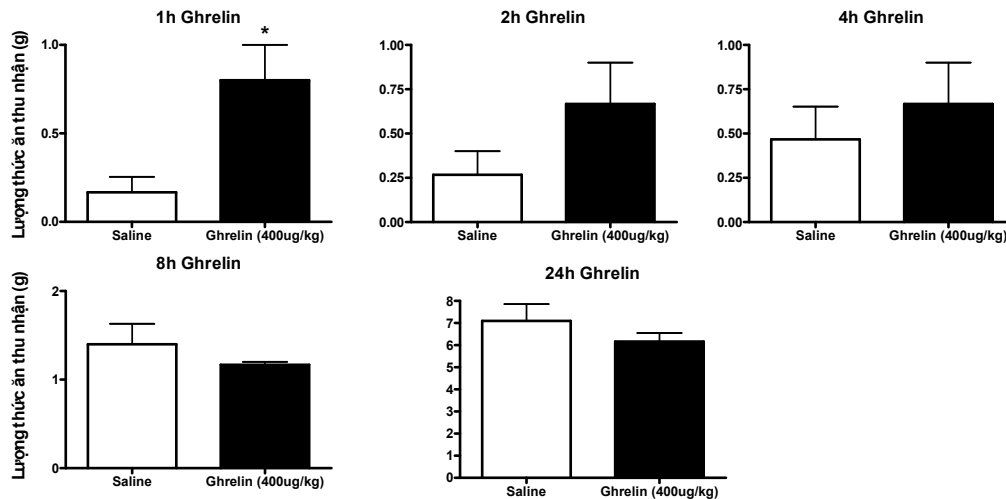
Complementary DNA (cDNA) được tổng hợp bằng HighCapacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). qPCR được thực hiện bằng bộ kit Thunderbird SYBR qPCR (Toyobo Life Science, Osaka, Nhật Bản) trong máy chu trình nhiệt Thermal Cycler Dice (Real Time System TP800, Takara Bio Inc., Shiga, Nhật Bản). Thành phần phản ứng qPCR được phối trộn theo hướng dẫn của nhà sản xuất, trong đó: 1µl mỗi xuôi (5pmol) mỗi loại + 1µl mỗi ngược mỗi loại (5pmol) + 5µl cDNA mẫu tách chiết + 10µl master mix + và cho nước để tổng thể tích cuối là 20µl. Mức độ biểu hiện của mỗi gen đã được chuẩn hóa bởi housekeeping gen GAPDH và được biểu thị dưới dạng đơn vị biểu hiện tương đối (%). Trình tự mỗi đặc hiệu được trình bày ở bảng 1.

2.3.4. Đánh giá lượng thức ăn thu nhận

Lượng thức ăn thu nhận được đánh giá theo nghiên cứu đã được công bố trước đây (Nguyen & cs., 2020).

2.3.5. Xử lý số liệu

Tính toán số liệu và phân tích được thực hiện bằng phần mềm PrismGraph 4.0 (GraphPad, La Jolla, CA, Mỹ). Việc xử lý mức độ biểu hiện của các gen sau khi chạy qPCR theo phương pháp định lượng tương đối $2^{-\Delta\Delta C_t}$ của Livak (Livak & Schmittgen, 2001). So sánh sự khác biệt giữa hai nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng student's *t* test. Sự khác biệt với *P* < 0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê (**P* < 0,05; ***P* < 0,01).



Ghi chú: So sánh sự khác biệt giữa 2 nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng student's t test của các kết quả.

Hình 1. Đánh giá lượng thức ăn thu nhận ở chuột nhắt trắng khi điều trị với ghrelin (n = 4)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá lượng thức ăn thu nhận sau khi điều trị với ghrelin ở chuột nhắt trắng bình thường

Kết quả lượng thức ăn thu nhận được đo lường để đánh giá ảnh hưởng của ghrelin đến lượng thức ăn thu nhận được thể hiện ở hình 1.

Kết quả ở hình 1 cho thấy lượng thức ăn thu nhận ở chuột nhắt trắng tăng dần sau khi tiêm ghrelin. Đặc biệt, tác dụng của ghrelin làm tăng lượng thức ăn thu nhận rõ rệt nhất với liều lượng 400 µg/kg sau 1 giờ. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây, cho thấy ghrelin có thể làm tăng lượng thức ăn thu nhận (Egecioglu & cs., 2011; Skibicka & cs., 2011). Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra rằng lượng thức ăn thu nhận không chỉ tăng sau 1 giờ mà còn có xu hướng tiếp tục tăng đến 4 giờ điều trị. Điều này cung cấp thêm bằng chứng về hiệu quả kéo dài của ghrelin trong việc kích thích sự thèm ăn và mở rộng hiểu biết về cơ chế tác động của ghrelin trong điều chỉnh lượng thức ăn thu nhận.

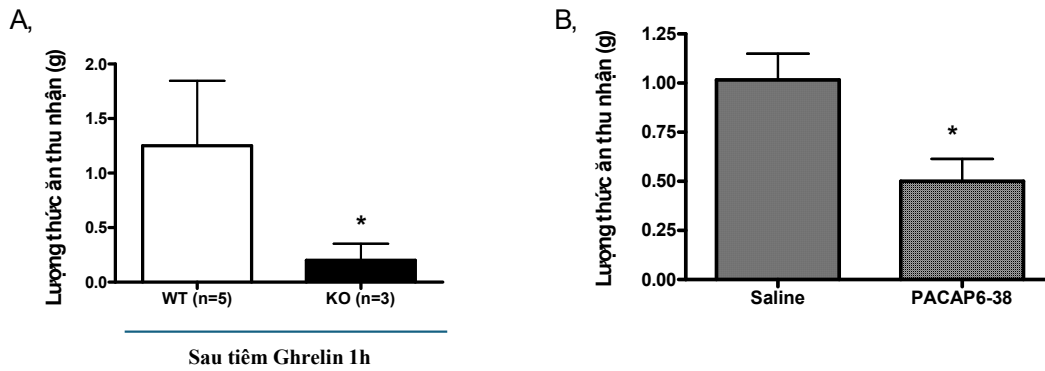
Như vậy, việc ghrelin điều hòa các hành vi ăn uống có vẻ phức tạp hơn so với những gì các báo cáo trước đây đã chỉ ra. Các nghiên cứu gần đây cho thấy tác động hai chiều của ghrelin đối với lượng thức ăn nạp vào có liên quan đến sự

tích hợp của các tế bào thần kinh AgRP/NPY trong vùng nhân cung của não. Các tế bào thần kinh này dường như thể hiện sự kích hoạt kéo dài sau khi ghrelin được tiêm một lần (Cornejo & cs., 2021). Điều này cho thấy ghrelin không chỉ làm tăng lượng thức ăn nạp vào trong ngắn hạn mà còn có tác động kéo dài đối với hệ thống thần kinh điều khiển cảm giác đói và điều tiết lượng thức ăn. Sự kích hoạt kéo dài của các tế bào thần kinh AgRP/NPY có thể giúp giải thích cơ chế đằng sau hiệu ứng kéo dài của ghrelin trong việc tăng cường sự thèm ăn và điều chỉnh lượng thức ăn thu nhận.

3.2. Đánh giá lượng thức ăn thu nhận ở chuột sau khi điều trị với ghrelin ở chuột knock-out gen PACAP

Kết quả đánh giá lượng thức ăn thu nhận của chuột knock-out gen PACAP sau khi điều trị với ghrelin được thể hiện ở hình 2.

Hình 2A cho thấy lượng thức ăn thu nhận ở chuột knock-out gen PACAP không tăng sau khi tiêm ghrelin, gợi ý rằng PACAP đóng vai trò quan trọng trong việc trung gian hóa tác động của ghrelin lên lượng thức ăn. Điều này cho thấy ghrelin có thể kích thích cảm giác thèm ăn thông qua sự tương tác với tế bào thần kinh có liên quan đến PACAP.



Ghi chú: *: $P < 0,05$; So sánh sự khác biệt giữa hai nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng student's t test của các kết quả. WT: Chuột nhắt trắng bình thường, KO: Chuột knock-out gen PACAP, chất đối kháng PACAP (PACAP6-38).

Hình 2. Đánh giá lượng thức ăn thu nhận (A) ở chuột knock-out gen PACAP sau điều trị 1h với Ghrelin và (B) ở chuột nhắt trắng sau khi điều trị với PACAP6-38

Ngoài ra, hình 2B xác nhận rằng việc điều trị bằng chất đối kháng PACAP (PACAP6-38) làm giảm lượng thức ăn thu nhận. Đáng chú ý, ở chuột knock-out PACAP, tác dụng giảm ăn của ghrelin mạnh hơn so với tác dụng của PACAP6-38, cho thấy ghrelin có thể điều chỉnh cảm giác thèm ăn thông qua các cơ chế bổ sung, độc lập với PACAP.

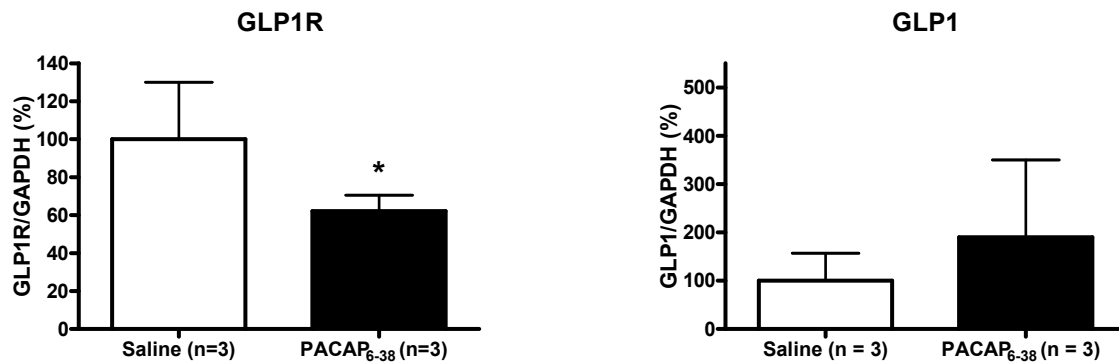
Những phát hiện này cung cấp bằng chứng rằng ghrelin và PACAP có sự tương tác trong việc điều hòa lượng thức ăn thu nhận, nhưng ghrelin cũng có thể tác động thông qua các con đường tín hiệu khác không phụ thuộc hoàn toàn vào PACAP.

Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây đã báo cáo rằng việc sử dụng phương pháp di truyền để xóa gen thụ thể ghrelin trong các tế bào thần kinh AgRP có thể ngăn chặn việc tăng lượng thức ăn thu nhận do ghrelin gây ra, củng cố thêm vai trò quan trọng của ghrelin trong việc điều hòa sự thèm ăn (So & cs., 2023). Những kết quả này được hỗ trợ bởi các nghiên cứu cho thấy rằng các tế bào thần kinh AgRP là một mục tiêu quan trọng của ghrelin huyết tương. Ví dụ, phần lớn các tế bào thần kinh AgRP chứa thụ thể ghrelin (Willesen & cs., 1999) và các tế bào thần kinh AgRP đóng vai trò chính trong việc tăng lượng thức ăn nạp vào và ảnh hưởng đến quá trình tiêu hao năng lượng do ghrelin và nhện ăn (Mani & cs., 2017; Wu & cs., 2017). Hơn

nữa, các nghiên cứu về tác động của thiếu thức ăn đối với các hành vi ở chuột cho thấy các tế bào thần kinh AgRP cảm nhận được cơn đói trong khi ghrelin huyết tương báo hiệu cơn đói. Do đó, các thụ thể ghrelin trên các tế bào thần kinh AgRP là một thành phần quan trọng trong các phản hồi tiêu cực của ghrelin đối với cơn đói. Một nghiên cứu gần đây của nhóm chúng tôi cũng chỉ ra việc tăng thức ăn thu nhận của PACAP thông qua AgRP (Nguyen & cs., 2020). Do vậy, những kết quả này cho thấy có sự tương tác giữa ghrelin và PACAP trong việc kiểm soát tính thèm ăn ở chuột nhắt trắng. Tựu chung lại, ghrelin có thể điều chỉnh lượng thức ăn thông qua nhiều cơ chế khác nhau, trong đó PACAP chỉ là một trong các yếu tố góp phần. Các thí nghiệm tiếp theo bổ sung với các chất ức chế khác (ví dụ: đối kháng ghrelin receptor như GHSR-1a) có thể giúp làm rõ cơ chế này.

3.3. Đánh giá mức độ biểu hiện của GLP1, GLP1R, AgRP, POMC ở chuột nhắt trắng sau khi nhện đói 48 giờ sau khi điều trị với 1nmol chất đối kháng PACAP6-38

Để làm rõ vai trò của PACAP6-38 và GLP1 trong việc làm giảm lượng thức ăn thu nhận, chúng tôi tiến hành đánh giá lượng mức độ biểu hiện của GLP1 và GLP1R ở chuột nhắt ở vùng nhân accumben, kết quả được trình bày ở hình 3.



Ghi chú: *: $P < 0,05$; Student's *t*-test được sử dụng để đánh giá ý nghĩa thống kê.

Hình 3. Đánh giá lượng mức độ biểu hiện gen mRNA của các GLP1R, GLP1 ở chuột nhắt trắng sau khi sử dụng chất đối kháng của PACAP (PACAP6-38)

Kết quả ở hình 3 cho thấy, sau khi điều trị với PACAP6-38, mức độ biểu hiện của thụ thể GLP1R có xu hướng giảm, trong khi mức độ biểu hiện gen GLP1 không thay đổi ở chuột nhắt trắng. Điều này dẫn đến hoạt động của GLP1 trở nên kém hiệu quả. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng PACAP có thể liên kết trực tiếp với GLP1R để làm giảm lượng thức ăn thu nhận ở chuột nhắt trắng, mặc dù vấn đề này cần được làm rõ hơn trong các nghiên cứu tiếp theo. Nhìn chung, các kết quả này ủng hộ quan điểm rằng việc kích hoạt tín hiệu PACAP trong vùng nhân accumben dẫn đến giảm lượng thức ăn thu nhận. Tuy nhiên, nghiên cứu hiện tại có một số hạn chế, chẳng hạn như tất cả các động vật thí nghiệm đều là chuột đực. Các nghiên cứu trong tương lai nên được thực hiện để khám phá tác động của các yếu tố này ở chuột cái và để làm rõ hơn cơ chế tương tác giữa PACAP, GLP1R và các yếu tố điều hòa sự thèm ăn khác.

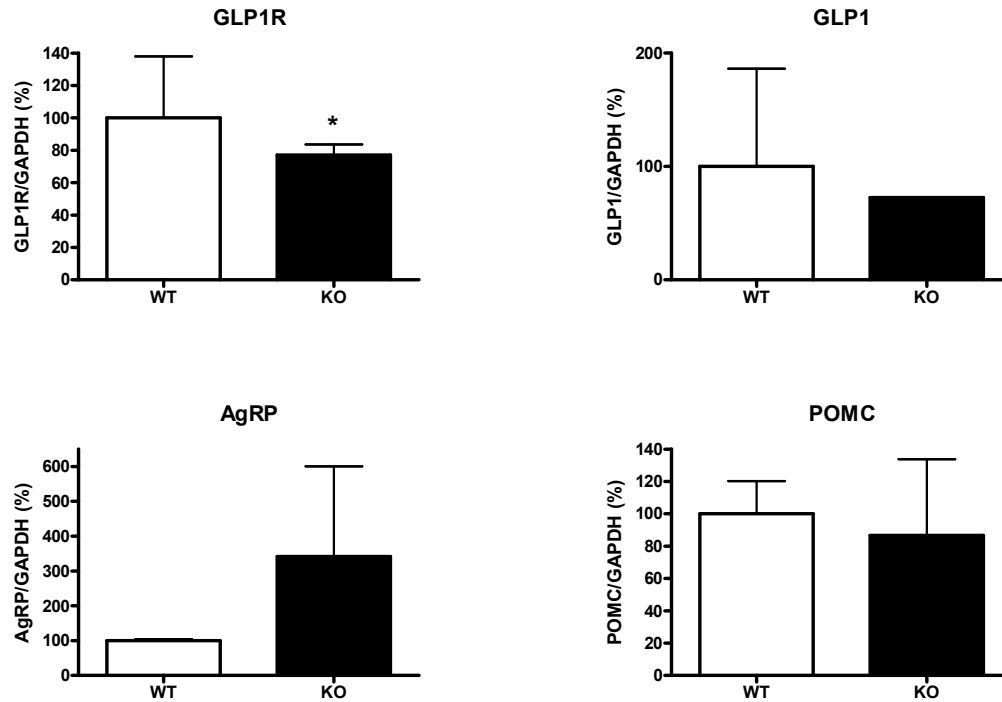
3.4. Đánh giá mức độ biểu hiện của GLP1R, GLP1, AgRP và POMC ở vùng nhân accumben ở chuột nhắt trắng sau khi điều trị 1h với ghrelin

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của các GLP1R, GLP1, AgRP và POMC sau khi điều trị ghrelin ở chuột nhắt trắng và chuột knock-out PACAP sau 1h điều trị ghrelin trình bày ở hình 4.

Kết quả trong hình 4 cho thấy sự biểu hiện mRNA của thụ thể GLP1R có xu hướng giảm ở chuột knock-out gen PACAP sau 1 giờ điều trị với ghrelin. Trong khi đó, mức độ biểu hiện mRNA của các thụ thể khác không có sự thay đổi đáng kể, hoặc những thay đổi này không đạt ý nghĩa thống kê. Do đó, chúng tôi đưa ra giả thuyết rằng các tế bào thần kinh PACAP trong vùng nhân accumben có thể kiểm soát sự thèm ăn thông qua thụ thể GLP1R sau khi điều trị với ghrelin.

Trên thực tế, ghrelin cũng làm tăng tần số điện thế hoạt động ở các tế bào thần kinh vùng bụng tegmental và gây ra sự giải phóng dopamine vào nhân accumben (Jerlhag & cs., 2006). Hơn nữa, vi tiêm ghrelin ở vùng bụng tegmental làm tăng lượng thức ăn thu nhận trong khi vi tiêm chất đối kháng GHSR vào vùng bụng tegmental làm giảm lượng thức ăn khi đáp ứng với ghrelin (Naleid & cs., 2005).

Nghiên cứu này đã chỉ ra thêm một cơ chế khác mà ghrelin tương tác với tế bào thần kinh PACAP, từ đó làm giảm tính thèm ăn thông qua thụ thể GLP1R trong vùng nhân accumben ở chuột knock-out gen PACAP. Điều này cho thấy rằng ngoài vai trò kích thích sự thèm ăn thông thường, ghrelin còn có thể đóng vai trò trong việc điều hòa các tín hiệu liên quan đến cảm giác no và hành vi ăn uống thông qua sự tương tác phức tạp với các thụ thể và tế bào thần kinh trong não.



Ghi chú: *: $P < 0,05$; Student's *t*-test được sử dụng để đánh giá ý nghĩa thống kê của các kết quả. WT: Chuột nhắt trắng bình thường, KO: Chuột knock-out gen PACAP.

Hình 4. Đánh giá lượng mức độ biểu hiện của GLP1, PLP1R, AgRP, POMC sau khi điều trị 1h với Ghrelin ở vùng nhân accumben ở chuột nhắt trắng

Điều quan trọng là, ở những con chuột bị knock-out gen PACAP, khi mức ghrelin ngoại sinh tăng lên, việc chặn thụ thể GLP1R trong vùng nhân accumben có thể đủ để làm giảm động lực ăn nhiều hơn. Hơn nữa, giảm mức độ biểu hiện của thụ thể GLP1R trong vùng nhân accumben cũng đủ để giảm chứng ăn quá mức ở những con chuột knock-out gen PACAP. Những dữ liệu này xác định rằng vùng nhân accumben là vị trí mục tiêu trực tiếp, cần thiết và đủ cho tác động của ghrelin lên động lực tăng lượng thức ăn thông qua tương tác với thụ thể GLP1R. Điều này cho thấy sự liên quan giữa ghrelin và thụ thể GLP1R trong việc điều chỉnh lượng thức ăn và có thể giúp mở rộng các chiến lược điều trị mới để kiểm soát chứng ăn uống quá mức.

Một số nghiên cứu chỉ ra rằng mức ghrelin trong huyết thanh tăng lên sau khi tiếp xúc với stress ở loài gặm nhấm (Kristensson & cs., 2006; Lutter & cs., 2008). Các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng căng thẳng hạn chế cấp

tính gây ra phản ứng stress mạnh mẽ (Sun & cs., 2019; Li & cs., 2023). Quan trọng hơn, dữ liệu của chúng tôi cho thấy rằng sự gia tăng tín hiệu ghrelin trong vùng nhân accumben là đủ để cải thiện các hành vi liên quan đến tính thèm ăn ở chuột nhắt trắng sau 1 giờ điều trị với ghrelin. Mặc dù nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng ghrelin có trong huyết tương hoặc dịch não tủy không thể tiếp cận vùng não trung tâm một cách cấp tính và/hoặc không ảnh hưởng đến các hành vi liên quan đến phần thưởng (Perello & cs., 2019). Trong mọi trường hợp, ghrelin cũng không được sản xuất trong não chuột (Cabral & cs., 2017), ít nhất là không ở mức có thể phát hiện được (Uriarte & cs., 2021). Do đó, các kết quả trong nghiên cứu này cho thấy rằng ghrelin có thể tương tác với PACAP trong vùng nhân accumben, hoạt động thông qua sự hiệp đồng với các thụ thể liên kết với protein G, như GLP1R, để tăng lượng thức ăn nạp vào ở chuột nhắt trắng. Điều này chỉ ra rằng ghrelin không

chỉ đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa phản ứng căng thẳng mà còn có thể ảnh hưởng đến các cơ chế kiểm soát sự thèm ăn và cân nặng thông qua các con đường tương tác phức tạp trong não bộ.

4. KẾT LUẬN

Đây là nghiên cứu đầu tiên xác định cơ chế ảnh hưởng và sự tương tác giữa ghrelin và PACAP trong việc kiểm soát tính thèm ăn ở chuột nhắt trắng, có khả năng thông qua thụ thể GLP1R tại vùng nhân accumben. Kết quả này cho thấy thụ thể GLP1R đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh hành vi ăn uống và có thể là mục tiêu tiềm năng cho các liệu pháp điều trị sự thèm ăn và các rối loạn chuyển hóa liên quan. Chất đối kháng GLP1R có thể giúp kiểm soát việc ăn uống quá mức và hỗ trợ trong việc quản lý cân nặng và sức khỏe trao đổi chất.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung được thực hiện trong nghiên cứu này có sử dụng một phần kinh phí của đề tài khoa học công nghệ cấp Học viện “Đánh giá tác dụng của ghrelin đến cảm giác thèm ăn trên chuột nhắt trắng”, mã số T2024-09-32.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abizaid A., Liu Z.W., Andrews Z.B., Shanabrough M., Borok E., Elsworth J.D., Roth R.H., Sleeman M.W., Picciotto M.R., Tschöp M.H., Gao X.B. & Horvath T.L. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest.* 116(12): 3229-39.
- Cabral A., López Soto E.J., Epelbaum J. & Perelló M. (2017). Is Ghrelin Synthesized in the Central Nervous System? *Int J Mol Sci.* 18(3).
- Cornejo M.P., Denis R.G.P., García Romero G., Fernández G., Reynaldo M., Luquet S. & Perello M. (2021). Ghrelin treatment induces rapid and delayed increments of food intake: a heuristic model to explain ghrelin's orexigenic effects. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 78(19): 6689-6708.
- Davis E.A., Wald H. S., Suarez A.N., Zubcevic J., Liu C.M., Cortella A.M., Kamitakahara A.K., Polson J.W., Arnold M., Grill H.J., de Lartigue G. & Kanoski S.E. (2020). Ghrelin Signaling Affects Feeding Behavior, Metabolism, and Memory through the Vagus Nerve. *Curr Biol.* 30(22): 4510-4518.e6.
- Egecioglu E., Skibicka K.P., Hansson C., Alvarez-Crespo M., Friberg P. A., Jerlhag E., Engel J.A. & Dickson S.L. (2011). Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev Endocr Metab Disord.* 12(3): 141-51.
- Jerlhag E., Egecioglu E., Dickson S.L., Andersson M., Svensson L. & Engel J.A. (2006). Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol.* 11(1): 45-54.
- Kambe Y., Nguyen T.T., Yasaka T., Nguyen T.T., Sameshima Y., Hashiguchi K., Shintani N., Hashimoto H., Kurihara T. & Miyata A. (2023). The Pivotal Role of Neuropeptide Crosstalk from Ventromedial-PACAP to Dorsomedial-Galanin in the Appetite Regulation in the Mouse Hypothalamus. *Mol Neurobiol.* 60(1): 171-182.
- Kambe Y., Yamauchi Y., Thanh Nguyen T., Thi Nguyen T., Ago Y., Shintani N., Hashimoto H., Yoshitake S., Yoshitake T., Kehr J., Kawamura N., Katsuura G., Kurihara T. & Miyata A. (2021). The pivotal role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide for lactate production and secretion in astrocytes during fear memory. *Pharmacol Rep.* 73(4): 1109-1121.
- Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H. & Oikawa S. (2001). Regulation of the ghrelin gene: growth hormone-releasing hormone upregulates ghrelin mRNA in the pituitary. *Endocrinology.* 142(9): 4154-7.
- Kanoski S.E., Hayes M.R. & Skibicka K.P. (2016). GLP-1 and weight loss: unraveling the diverse neural circuitry. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 310(10): R885-95.
- Kitazawa T., Kaiya H. & Taneike T. (2007). Contractile effects of ghrelin-related peptides on the chicken gastrointestinal tract *in vitro*. *Peptides.* 28(3): 617-24.
- Kristensson E., Sundqvist M., Astin M., Kjerling M., Mattsson H., Dornonville de la Cour C., Håkanson R. & Lindström E. (2006). Acute psychological stress raises plasma ghrelin in the rat. *Regul Pept.* 134(2-3): 114-7.
- Li B., Chang L. & Zhuang Q.X. (2023). Histamine signaling in the bed nucleus of the stria terminalis modulates stress-induced anxiety. *J Affect Disord.* 335: 195-203.
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* 25(4): 402-408.

- Lutter M., Sakata I., Osborne-Lawrence S., Rovinsky S.A., Anderson J.G., Jung S., Birnbaum S., Yanagisawa M., Elmquist J.K., Nestler E.J. & Zigman J.M. (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci.* 11(7): 752-3.
- Mani B.K., Osborne-Lawrence S., Mequinion M., Lawrence S., Gautron L., Andrews Z.B. & Zigman J. M. (2017). The role of ghrelin-responsive mediobasal hypothalamic neurons in mediating feeding responses to fasting. *Mol Metab.* 6(8): 882-896.
- Naleid A.M., Grace M.K., Cummings D.E. & Levine A.S. (2005). Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides.* 26(11): 2274-9.
- Nguyen T.T., Kambe Y., Kurihara T., Nakamachi T., Shintani N., Hashimoto H. & Miyata A. (2020). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the Ventromedial Hypothalamus Is Responsible for Food Intake Behavior by Modulating the Expression of Agouti-Related Peptide in Mice. *Molecular Neurobiology.* 57(4): 2101-2114.
- Peeters T.L. (2005). Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut.* 54(11): 1638.
- Perello M., Cabral A., Cornejo M.P., De Francesco P.N., Fernandez G. & Uriarte M. (2019). Brain accessibility delineates the central effects of circulating ghrelin. *J Neuroendocrinol.* 31(7): e12677.
- Rudecki A.P. & Gray S.L. (2016). PACAP in the Defense of Energy Homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 27(9): 620-632.
- Salfen B.E., Carroll J.A., Keisler D.H. & Strauch T.A. (2004). Effects of exogenous ghrelin on feed intake, weight gain, behavior, and endocrine responses in weanling pigs. *J Anim Sci.* 82(7): 1957-66.
- Sibilia V., Rindi G., Pagani F., Rapetti D., Locatelli V., Torsello A., Campanini N., Deghenghi R. & Netti C. (2003). Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action. *Endocrinology.* 144(1): 353-9.
- Sitar-Tăut A.V., Cozma A., Fodor A., Coste S.C., Orasan O.H., Negrean V., Pop D. & Sitar-Tăut D.A. (2021). New Insights on the Relationship between Leptin, Ghrelin, and Leptin/Ghrelin Ratio Enforced by Body Mass Index in Obesity and Diabetes. *Biomedicines.* 9(11).
- Skibicka K. P., Hansson C., Alvarez-Crespo M., Friberg P.A. & Dickson S.L. (2011). Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. *Neuroscience.* 180: 129-37.
- So W.L., Hu J., Jeffs L., Dempsey H., Lockie S.H., Zigman J.M., Stark R., Reichenbach A. & Andrews Z.B. (2023). Ghrelin signalling in AgRP neurons links metabolic state to the sensory regulation of AgRP neural activity. *Molecular Metabolism.* 78: 101826.
- Spiegel K., Tasali E., Penev P. & Van Cauter E. (2004). Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med.* 141(11): 846-50.
- Sun F., Lei Y., You J., Li C., Sun L., Garza J., Zhang D., Guo M., Scherer P. E., Lodge D. & Lu X.Y. (2019). Adiponectin modulates ventral tegmental area dopamine neuron activity and anxiety-related behavior through AdipoR1. *Mol Psychiatry.* 24(1): 126-144.
- Ueno H., Yamaguchi H., Kangawa K. & Nakazato M. (2005). Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regul Pept.* 126(1-2): 11-9.
- Uriarte M., De Francesco P.N., Fernández G., Castrogiovanni D., D'Arcangelo M., Imbernon M., Cantel S., Denoyelle S., Fehrentz J.A., Praetorius J., Prevot V. & Perello M. (2021). Circulating ghrelin crosses the blood-cerebrospinal fluid barrier via growth hormone secretagogue receptor dependent and independent mechanisms. *Mol Cell Endocrinol.* 538: 111449.
- Willesen M. G., Kristensen P. & Rømer J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* 70(5): 306-16.
- Wu C.-S., Bongmba O.Y.N., Yue J., Lee J.H., Lin L., Saito K., Pradhan G., Li D.-P., Pan H.-L., Xu A., Guo S., Xu Y. & Sun Y. (2017). Suppression of GHS-R in AgRP Neurons Mitigates Diet-Induced Obesity by Activating Thermogenesis. *International Journal of Molecular Sciences.* 18(4): 832.
- Wu X., Tang M., Ma Q., Hu X. & Ji C. (2008). Effects of Exogenous Ghrelin on the Behaviors and Performance of Weanling Piglets. *Asian-Australas J Anim Sci.* 21(6): 861-867.