

ROLES OF OPIOID RECEPTORS IN SWEET FOOD INTAKE IN RATS EXPOSED TO
CHRONIC RESTRAINT STRESS

Miss Suwaporn Daendee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Physiology
(Inter-Disciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

บทบาทของตัวรับไอปียอดต่อพฤติกรรมการกินหวาน
ในหนูขาวที่ได้รับความเครียดเป็นเวลานาน

นางสาว สุวรรณ แคนดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสรีรวิทยา (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title ROLES OF OPIOID RECEPTORS IN SWEET FOOD INTAKE IN
 RATS EXPOSED TO CHRONIC RESTRAINT STRESS

By Miss Suwaporn Daendee

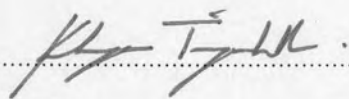
Field of study Physiology

Thesis Advisor Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti

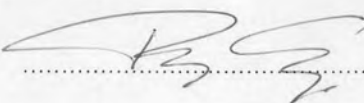
Thesis Co-advisor Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial

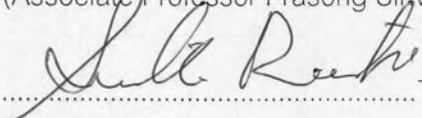
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R.Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

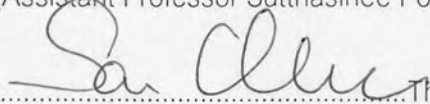
THESIS COMMITTEE

.....Chairman

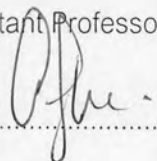
(Associate Professor Prasong Siriviriyakul, M.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, Ph.D.)

.....Member

(Professor Anan Srikiatkhachorn, M.D.)

.....Member

(Assistant Professor Thongchai Sooksawate, Ph.D.)

สุวรรณี แดนดี : บทบาทของตัวรับโอปิออยด์ต่อพฤติกรรมการกินหวานในหนูขาวที่ได้รับความเครียดเป็นเวลานาน. (ROLES OF OPIOID RECEPTORS IN SWEET FOOD INTAKE IN RATS EXPOSED TO CHRONIC RESTRAINT STRESS.) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. สพ.ญ. ดร. สุทธาสินี ปุญญโชติ: อ. ที่ปรึกษาร่วม ผศ. สพ.ญ. ดร. สฤณี กลั่นทกานนท์ ทองทรง, 83 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อ ศึกษาบทบาทของตัวรับโอปิออยด์ต่อพฤติกรรมการกินหวานในหนูที่ได้รับความเครียดเป็นเวลานานด้วยวิธีจำกัดการเคลื่อนไหว โดยวิธีการในการศึกษาใช้วิธีวัดพฤติกรรมการกินหวานและวัดระดับของสารสื่อประสาทโดปามีนและเมตาบอไลต์ในสมองส่วน mesolimbic system ในหนูที่ได้รับหรือไม่ได้รับสารที่ยับยั้งการทำงานของตัวรับโอปิออยด์ ในการศึกษาใช้หนูเพศผู้พันธุ์ Wistar นำมาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มเครียด โดยหนูถูกทำให้เครียดโดยการจำกัดการเคลื่อนไหว วันละ 1 ชม.เป็นเวลา 14 วัน หลังจากนั้นทั้ง 2 กลุ่มถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ได้รับสารและไม่ได้รับสารยับยั้งการทำงานของตัวรับโอปิออยด์ (แบบไม่จำเพาะและจำเพาะต่อตัวโอปิออยด์ชนิด μ , δ และ κ) ในขนาด 0.5-1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ก่อนการทดสอบพฤติกรรมการกินหวาน 30 นาที ทดสอบพฤติกรรมการกินหวานโดยหนูใส่ในกรงที่มีอาหารหวาน (Froot loops®) จำนวน 10 เม็ด และนับจำนวนเม็ดที่กินใน 6 นาที

ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มเครียดมีการกินหวานมากกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของการกินอาหารปกติ นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักร่างกายต่อมหมวกไตและระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอนในหนูกลุ่มเครียด ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักร่างกายต่อมหมวกไตและระดับของฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอรอน เป็นการยืนยันว่าการถูกจำกัดการเคลื่อนไหวทำให้หนูเกิดความเครียด เป็นที่น่าสนใจว่าพฤติกรรมการกินหวานที่เกิดจากความเครียดดังกล่าวสามารถถูกยับยั้งได้โดย naloxone ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของตัวรับโอปิออยด์ชนิดไม่จำเพาะ ในขณะที่สารยับยั้งการทำงานของตัวรับโอปิออยด์ชนิดจำเพาะ (ชนิด μ , δ และ κ) ไม่สามารถยับยั้งผลดังกล่าวได้

การศึกษาการทำงานของ dopaminergic system ในสมองส่วนต่างๆ ที่สัมพันธ์กับพฤติกรรมการกินหวาน โดยการวัดระดับสารสื่อประสาท ด้วยวิธี HPLC-EC พบว่าการเปลี่ยนแปลงของโดปามีนและเมตาบอไลต์ในสมองส่วน nucleus accumbens โดยพบว่าระดับสารสื่อประสาทโดปามีนในหนูกลุ่มที่เครียดมีระดับสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่การทำงานของระบบประสาทโดปามีน (DOPAC/DA และ HVA/DA ratios) ในกลุ่มเครียดมีระดับลดลง โดยการกินหวานมีแนวโน้มที่จะเพิ่มระดับของสารสื่อประสาทโดปามีน นอกจากนี้พบว่าความเครียดมีผลลดระดับของโดปามีนเมตาบอไลต์ (HVA) ในสมองส่วน hippocampus และลดการทำงานของระบบประสาทโดปามีน (DOPAC/DA และ HVA/DA ratios) ในสมองส่วน amygdala อีกด้วย เมื่อให้สารที่มีความจำเพาะและไม่จำเพาะกับตัวรับโอปิออยด์พบว่า หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร nor-BNI (จำเพาะต่อตัวรับชนิด κ) นั้นระดับของสารสื่อประสาทโดปามีนมีแนวโน้มลดลง ในขณะที่สารชนิดอื่นไม่มีผล สำหรับหนูที่เครียดพบว่า เมื่อได้รับสารnaltridole (จำเพาะต่อตัวรับชนิด δ) พบว่าระดับสารสื่อประสาทโดปามีนลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ nor-BNI ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเครียดมีผลทำให้กินหวานเพิ่มขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงนี้มี opioid เข้ามามีบทบาทร่วมด้วย นอกจากนี้ความเครียดยังไปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของสมองส่วนที่ตอบสนองต่อความเครียดและส่วนที่ควบคุมพฤติกรรมความพึงพอใจ โดยอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงการทำงานของตัวรับชนิด δ หรือ κ ในระบบประสาทโอปิออยด์ โดยสังเกตจากการที่ระบบประสาทโดปามีนมีการตอบสนองแตกต่างกันเมื่อได้รับสารยับยั้งการทำงานและความเครียด อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างความเครียดกับระบบประสาทโอปิออยด์ต่อการทำงานของระบบประสาทโดปามีนและส่งผลต่อพฤติกรรมการกินหวาน

สาขาวิชา.....สิรินวิทยา(สหสาขาวิชา).....ลายมือชื่อนิสิต..... กนกพร 11๓๖๕

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4789154520 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : CHRONIC RESTRAINT STRESS/ OPIOID RECEPTOR/ SWEET FOOD INTAKE

SUWAPORN DAENDEE: ROLES OF OPIOID RECEPTORS IN SWEET FOOD INTAKE IN RATS EXPOSED TO CHRONIC RESTRAINT STRESS. THESIS ADVISOR: ASSIST.PROF.SUTTHASINEE POONYACHOTI, D.V.M., M.S., Ph.D.: THESIS CO-ADVISOR SARINEE KALANDAKANOND-THONGSONG, D.V.M., Ph.D. 83 pp.

The present study aimed to investigate the roles of the endogenous opioid system and its receptors (OR) in the development of sweet food intake in rats exposed to chronic restraint stress. The sweet food intake behavioral paradigm and the measurement of dopaminergic neurotransmitter levels in mesocorticolimbic system of rat treated with or without opioid receptor blockers were assessed. Male adult Wistar rats were divided into two groups: control (CON) and stress (ST) which rat were restraint 1 h/day, for 14 days. Both groups were subdivided into two groups; treated with or without non-selective or selective μ -, δ - or κ -OR blockers (naloxone; NX, CTOP, naltridole; NT or nornalorphimine dihydrochloride; nor-BNI, 0.5-1 mg/ml, s.c., 30 min before the behavioral test). In the sweet food intake test, the rats were placed in the cage and allowed to consume sweet food (Froot loops® pellets), the number of ingested pellets during a period of 6 min was then recorded.

Sweet food consumption was increased in chronic restraint stress-rats compared to control rats. Even though, there were no differences in the consumption of standard rat chow between groups. Adrenal gland mass associated with serum corticosterone level significantly increased in restraint stress-rats. These changes of adrenal gland mass and serum corticosterone confirmed the effective of stress model. Interestingly, the increase of sweet food consumption induced by restraint stress was inhibited by non-selective OR blocker (NX, 0.5 mg/ml) but not by any of selective OR blockers.

To assess dopaminergic system, brain dopamine (DA) and its metabolites (DOPAC or HVA) level in amygdala, frontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens were measured by HPLC-EC. The dopamine levels were significantly increased in nucleus accumbens of chronic stressed-rat. Moreover, the sweet food consumption tended to increase the DA levels in nucleus accumbens in both stress and non-stress rats. On the other hand, dopaminergic activity (DOPAC/DA and HVA/DA ratios) of chronic stress-rats was lower than control rats. Additionally, the HVA levels in the hippocampus and the dopaminergic activity, shown by DOPAC/DA and HVA/DA ratios in the amygdala were significantly decreased in chronic stressed-rats. Further, nor-BNI tended to decrease dopamine levels in control rats, while other opioid antagonist did not affect. In contrast, naltridole could suppress DA level in nucleus accumbens in chronic stress rats while nor-BNI has no effect.

These results suggested that chronic stress causes an increase in sweet food intake, and opioid system partially regulated stress induced-sweet food intake. Moreover, chronic stress may cause adaptation of δ - and κ -OR in opioid systems as they differentially affected dopaminergic activity in mesolimbic system following OR antagonists administration. Nevertheless, this study has established the relationship between stress and opioid system in modulating mesolimbic dopamine system that affected sweet food intake.

Field of study...Physiology (Inter-department)...Student's signature.....*S. Daendee*
 Academic year.....2006.....Advisor's signature.....*Sutin Choti*
 Co-advisor's signature.....*Sarinee Kalandakanond-Thongsong*.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deep gratitude and appreciation to my kind advisor, Assistant Professor Sutthasinee Poonyachoti, and my co-advisor, Assistant Professor Sarinee Kalandakanond-Thongsong, for their excellent instruction, guidance, encouragement and support during the working process, which understanding my problems and support my mind to carry out this study. Their kindness will be forever remembered.

I would like to express my sincere thanks to the chairman, Associate Professor Prasong Siriviriyakul and my thesis committee, Professor Anan Srikiatkhachorn and Assistant Professor Thongchai Sooksawate, for their valuable comments, suggestions and corrections of this thesis.

I wish to express my sincere thanks to all my teachers in Inter-department of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University for all their loving helps during the time I was studying.

My appreciations are also devoted to my dear family and all of my friends for their love, kindness and support my mind throughout this study.

Finally, my thanks go to the financial support from THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund).

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEWS.....	4
A. Stress.....	4
B. Reward system.....	9
C. Biology of opioids.....	13
III MATERIALS AND METHODS.....	18
A. Animals.....	18
B. Chemicals.....	18
C. Experimental protocols.....	19
D. Methods.....	21
E. Summary of experimental design.....	30

CHAPTER	PAGE
IV RESULTS.....	32
1. To determine the effect of chronic restraint stress on the sweet food intake and dopaminergic neurotransmission.....	33
2. To examine the types of selective opioid receptor antagonist to inhibit sweet food intake in rats exposed to chronic restraint stress.....	49
V DISCUSSION.....	64
REFERENCES.....	72
BIOGRAPHY.....	83

LIST OF TABLES

	PAGE
Table 4-1 Summary of the mean \pm S.E.M. of physiological changes of average of daily weight gain, % change of body weight, average daily feed intake, adrenal gland weight ratio of control (CON), stress (ST), and sweet food training rats (CON + FL or ST + FL).....	35
Table 4-2 Summary of the mean \pm S.E.M of the value hematology analysis of control, stress, control+FL and stress+FL rat groups.....	39
Table 4-3 Table represents mean \pm S.E.M. of number of froot loops® intake after chronic restraint stress.....	41
Table 4-4 DA, DOPAC, HVA, DOPAC/DA and HVA/DA in amygdala, frontal cortex, hippocampus and nucleus accumbens of control, stress, control+FL and stress+FL rats.....	44
Table 4-5 Table represents mean \pm S.E.M. of numbers of froot loops intake after applied opioid receptor antagonist (A) ethanol vehicle group (B) H ₂ O vehicle.....	50
Table 4-6 Table represents mean \pm S.E.M. of locomotor activity after applied opioid receptor antagonists in (A) ethanol vehicle group (B) H ₂ O vehicle group.....	51
Table 4-7 Effect of naloxone, naltridole and nor- binaltorphimine on DA and its metabolites in mesolimbic system in chronic restraint stress-induced sweet food intake rats.....	54
Table 4-8 Effect of naloxone, naltridole and nor- binaltorphimine on DA and its metabolites in mesolimbic system in control rats.....	55

LIST OF FIGURES

	PAGE
Figure 2-1	Schematic drawing depicts the location of the reward system in a sagittal section of the rat central nervous system.....10
Figure 2-2	Diagram depicts the biosynthesis pathway for dopamine.....11
Figure 3-1	Diagram of the experimental protocol.....20
Figure 3-2	Photograph and diagram of open field apparatus.....24
Figure 3-3	Diagrammatic representation of brain cutting block illustrating orientation of brain and placement of razor blades to obtain coronal brain sections.....26
Figure 3-4	Diagrammatic representation of coronal brain sections from which brain regions are dissected.....26
Figure 3-5	The chromatogram represents peaks of standard DHBA, DOPAC, DA and HVA measured by HPLC-EC.....28
Figure 4-1	Histograms illustrate mean \pm S.E.M. of average of daily weight gain and % of body weight change of control, stress, control+FL and stress+FL groups.....36
Figure 4-2	Histogram illustrates mean \pm S.E.M. of average daily feed intake of control, stress, control+FL and stress+FL groups.....37
Figure 4-3	Histograms illustrate mean \pm S.E.M. of percent adrenal mass index and serum corticosterone in ng/ml of control, stress, control+FL and stress+FL groups.....38
Figure 4-4	Histogram illustrates mean \pm S.E.M. of number of froot loops intake affected by chronic restraint stress on behavioral test day.....42
Figure 4-5	The chromatograms represent DA, DOPAC and HVA levels in nucleus accumbens of control, stress, control +FL and stress + FL rats measured by HPLC-EC.....43
Figure 4-6	Histograms illustrate mean \pm S.E.M. of (A) DA, DOPAC and HVA (B) DOPAC/DA and HVA/DA ratios in amygdala of control, stress, control+FL and stress+FL.....45

	PAGE	
Figure 4-7	Histograms illustrate mean \pm S.E.M. of (A) DA, DOPAC and HVA (B) DOPAC/DA and HVA/DA ratios in frontal cortex of control, stress, control+FL and stress+FL.....46	46
Figure 4-8	Histograms illustrate mean \pm S.E.M. of (A) DA, DOPAC and HVA (B) DOPAC/DA and HVA/DA ratios in hippocampus of control, stress, control+FL and stress+FL.....47	47
Figure 4-9	Histograms illustrate mean \pm S.E.M. of (A) DA, DOPAC and HVA (B) DOPAC/DA and HVA/DA ratios in nucleus accumbens of control, stress, control+FL and stress+FL.....48	48
Figure 4-10	Effect of opioid receptor antagonists (naloxone, CTOP, naltridole, nor-binaltorphimine) on sweet food intake in chronic restraint stress rats.....52	52
Figure 4-11	Effect of opioid receptor antagonists (naloxone, CTOP, naltridole, nor-binaltorphimine) on locomotor activity in the open field.....53	53
Figure 4-12	Histograms illustrate effect of naloxone, naltridole and nor- binaltorphimine on DA and its metabolite in amygdala.....56	56
Figure 4-13	Histograms illustrate effect of naloxone (NX), naltridole (NT) and nor- binaltorphimine (nor-BNI) on DOPAC/DA and HVA/DA ratios in amygdala.....57	57
Figure 4-14	Histograms illustrate effect of naloxone, naltridole and nor- binaltorphimine on DA and its metabolite in frontal cortex.....58	58
Figure 4-15	Histograms illustrate effect of naloxone (NX), naltridole (NT) and nor- binaltorphimine (nor-BNI) on DOPAC/DA and HVA/DA ratios in frontal cortex.....59	59
Figure 4-16	Histograms illustrate effect of naloxone (NX), naltridole (NT) and nor- binaltorphimine (nor-BNI) on DA and its metabolites in hippocampus.....60	60
Figure 4-17	Histograms illustrate effect of naloxone (NX), naltridole (NT) and nor- binaltorphimine (nor-BNI) on DOPAC/DA and HVA/DA ratios in hippocampus.....61	61

PAGE

Figure 4-18	Histograms illustrate effect of naloxone (NX), naltridole (NT) and nor-binaltorphinmine (nor-BNI) on DA and its metabolites in nucleus accumbens.....	62
Figure 4-19	Histograms illustrate effect of naloxone (NX), naltridole (NT) and nor-binaltorphinmine (nor-BNI) on DOPAC/DA and HVA/DA ratios in nucleus accumbens.....	63

LIST OF ABBREVIATIONS

AMY	amygdala
AADC	aromatic L-amino acid decarboxylase
AGW	adrenal gland weight
BW	body weight
CON	control
CON+FL	control+FL
DA	dopamine
DHBA	3,4-dihydroxy-benzyl-amine hydrobromide
DOPAC	3-4-dihydroxyphenylaceticacid
DWG	daily weight gain
DFI	daily feed intake
FC	frontal cortex
FL	Froot loops®
HIP	hippocampus
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal axis
HPLC	high-performance liquid chromatography
HVA	homovanillic acid
min	minute
NAc	nucleus accumbens
NE	norepinephrine
PAG	periaqueductal gray matter
s	second
S	septum
St	stress
St+FL	stress+FL
Veh	vehicle
VTA	ventral tegmental area