



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการให้สารต้านตัวรับเอสโตรเจน (ICI 182 780) โดยตรงที่สมอง
ส่วนท้ายของหนูเพศเมียต่อพฤติกรรมการกินอาหาร

น.สพ.ดร. สัมพันธ์ ธรรมเจริญ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตุลาคม 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของการให้สารต้านตัวรับเอสโตรเจน (ICI 182 780) โดยตรงที่สมอง
ส่วนท้ายของหนูเพศเมียต่อพฤติกรรมการกินอาหาร

น.สพ.ดร. สัมพันธ์ ธรรมเจริญ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นความเห็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “ผลของการให้สารต้านตัวรับเอสโตรเจน (ICI 182 780) โดยตรงที่สมองส่วนท้ายของหนูเพศเมียต่อพฤติกรรมการกินอาหาร” ได้รับทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ภายใต้การสนับสนุนจาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2554 (MRG5480142)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480142

ชื่อโครงการ: ผลของการให้สารต้านตัวรับเอสโตรเจน (ICI 182 780) โดยตรงที่สมองส่วนท้ายของหนูเพศเมียต่อพฤติกรรมกรรมการกินอาหาร

ชื่อนักวิจัย: นายสัตวแพทย์ สัมพันธ์ ธรรมเจริญ

ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail address: sprueksagorn@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 15 มิถุนายน 2554 ถึง 14 มิถุนายน 2556 (ขยายเวลา 31 ตุลาคม 2556)

เอสโตรเจน (E_2)ลดการกินอาหารโดยกลไกการกระตุ้นตัวรับเอสโตรเจน (ER) ที่อยู่ในสมอง กลุ่มวิจัยของเราได้เสนอผลงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้น $ER\alpha$ ที่สมองส่วนท้ายโดยการฝัง E_2 ขนาดน้อยสามารถทำให้การกินอาหารลดลงได้ในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ได้ เพื่อที่จะทดสอบสมมติฐานว่า “สมองส่วนท้ายมีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมีย” ผู้วิจัยวางแผนการทดลองโดยจะทำการฉีดสารเข้าสู่สมองส่วนท้ายโดยตรงด้วยวิธีการสอดท่อผ่านช่องของสมองลำดับที่ 4 (4th icv)

ในลำดับแรกผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมีย ดังนั้น หนูเพศเมียพันธุ์วิสตาที่มีรังไข่สมบูรณ์มีรูปแบบการกินอาหารที่ลดลงจำเพาะกับระยะวงจรการพัฒนารังไข่ สำหรับในหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) พบว่าการเสริมเอสตราไดออล เบนโซเอต (EB) แบบเป็นวงจรทำให้การกินอาหารลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองในขั้นแรกนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ E_2 ในหนู OVX ภายใต้สภาวะการจัดการของเราสามารถเลียนแบบรูปแบบการกินอาหารที่พบในหนูเพศเมียที่มีรังไข่สมบูรณ์ได้ดังเช่นที่เคยพบมา กลุ่มวิจัยของเราทำการศึกษาในลำดับต่อมาพบว่าการให้สารต้าน ER (ICI) ในขนาด 4 และ 8 นาโนโมลาร์ (nM) สามารถลดฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารได้ โดยพบว่าการให้ EB ทำให้การกินอาหารลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูกลุ่มที่ได้รับสารควบคุมผ่าน 4th icv (1%DMSO) แต่สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับสาร ICI ขนาด 4 และ 8 nM ผ่าน 4th icv ฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารลดลงจะน้อยลง ผลการทดลองที่ได้สนับสนุนผลการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่าการให้ ICI เข้าสู่ช่องของสมองทำให้ฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารลดลง และที่สำคัญกลุ่มวิจัยได้รายงานผลการทดลองว่าการให้สาร ICI ด้วยวิธีดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อพฤติกรรมการกินอาหารตลอดระยะเวลา 12 วันของการให้สาร รวมถึงไม่มีผลต่อจำนวน $ER\alpha$ ที่นับได้จากนิวเคลียสของสมองส่วนไฮโปทาลามัส จากผลการทดลองทั้งหมด กลุ่มผู้วิจัยสรุปว่า ในหนูเพศเมียการให้สาร ICI ผ่าน 4th icv สามารถลดฤทธิ์ของเอสโตรเจนที่เกิดจากการฉีดต่อการกินอาหารได้และนำไปสู่การสรุปว่าสมองส่วนท้ายเป็นบริเวณที่มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมีย

คำหลัก: ไอซีไอ อีบี หนูเพศเมีย การกินอาหาร

ABSTACT

Project code: MRG5480142

Project title: The effect of central administration of the estrogen receptor antagonist (ICI 182 780) to hindbrain of female rats on eating behavior

Investigator: Dr. Sumpun Thammacharoen

Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

E-mail address: sprueksagorn@hotmail.com

Project period: 14 June 2011 to 14 June 2013 (extension period to 31 Oct 2013)

Estrogen (E_2) inhibits food intake by activating estrogen receptor (ER) within the brain. We showed previously that activated hindbrain $ER\alpha$, by E_2 implantation, is sufficient to inhibit eating in ovariectomized (OVX) rats. To investigate that hindbrain $ER\alpha$ is required for estrogenic control of eating, hindbrain infusion of ICI directly to the 4th intracerebroventricular (4th icv) was performed in the current experiment.

We first demonstrated the effect of E_2 on food intake in our condition. Female intact Wistar rat showed clear typical decreased pattern of eating across the ovarian cycle. Cyclic estradiol benzoate (EB) treatment in OVX rats decreased food intake significantly. The results revealed that in our condition exogenous E_2 mimic eating pattern in female intact rat as reported previously. We demonstrated next that the 4th icv infusion of ER antagonist, ICI, at 4nM and 8nM could attenuate the effect of EB on food intake. There was significant lower daily food intake from EB than from oil treatment in 1% DMSO 4th icv group. However, the effect of EB on food intake was compromised from both 4nM and 8nM ICI 4th icv groups. These results support previous report that central infusion of ICI could attenuate estradiol's anorexigenic effect. Importantly, we demonstrated that across 12 days of ICI 4th icv ICI hindbrain infusion had no effect on FI. Further, there was no difference in the number of $ER\alpha$ immunopositive neurons from the selected hypothalamic nuclei. Taken together, we conclude that the 4th icv with ICI attenuated the exogenous estrogenic effect on food intake in female rat and that hindbrain appear to be the site required for estrogenic effect of food intake.

Key words: ICI, EB, female rat, food intake

EXECUTIVE SUMMARY

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

พฤติกรรมการกินอาหาร (eating or feeding behavior) ถือเป็นพฤติกรรมพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด พฤติกรรมนี้มีบทบาทในการรักษาสมดุลของพลังงานและการได้รับสารอาหารที่จำเป็นสำหรับขบวนการทางชีววิถีต่าง ๆ ความสำคัญของการศึกษาพฤติกรรมดังกล่าวได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากในปัจจุบันพบว่า อุบัติการณ์ของภาวะอ้วน (obesity) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (BRFSS., 2010) ภาวะอ้วนถือเป็นภาวะสมดุลของพลังงานเกินที่มีสาเหตุส่วนหนึ่งเกิดขึ้นจากพฤติกรรมการกินอาหารที่ตอบสนองต่อรูปแบบของสังคมในปัจจุบันที่ต่างจากในอดีตอย่างมาก และภาวะอ้วนนี้ส่งผลถึงโรคต่างๆ ที่จะเกิดตามมามากมาย เช่น โรคทางเมแทบอลิซึม โรคของหลอดเลือดและหัวใจ และโรคเบาหวาน ฯลฯ (Després et al., 2008; Flegal et al., 2005; Moller and Kaufman., 2005) พฤติกรรมการกินอาหารที่เบี่ยงเบนยังส่งผลต่อภาวะสมดุลของพลังงานขาด และเกี่ยวข้องกับโรคทางจิต (psychological diseases) ด้านพฤติกรรมการกิน เช่น anorexia nervosa bulimia nervosa และ binge eating disorder (Geary., 2001; Klein and Walsh., 2004) ข้อเท็จจริงประการหนึ่งสำหรับปัญหาที่เกิดจากพฤติกรรมการกินที่กล่าวมาข้างต้น คือ เพศหญิงพบอุบัติการณ์ของโรคทางจิตที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหารมากกว่าเพศชาย และเพศหญิงเป็นเพศที่พบภาวะอ้วนแบบรุนแรง (morbid type obesity) มากกว่าเพศชาย ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นชี้ให้เห็นถึงความต่างของเพศ (gender differences) ที่มีผลต่อพฤติกรรมการกิน และโดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการกินที่เกิดมากในเพศหญิง (Geary., 2001; Woods et al., 2003) การศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมการกินในเพศหญิงหรือในสัตว์เพศเมียจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ความเข้าใจในขบวนการการแสดงพฤติกรรมนี้ในแง่มุมต่างๆ จะทำให้เราเข้าใจถึงความเป็นไปของการเกิดความผิดปกติต่างๆ ได้

พฤติกรรมการกินในสัตว์เพศเมียนั้นมีลักษณะจำเพาะที่แตกต่างไปจากในสัตว์เพศผู้ คือ ปริมาณการกินอาหารต่อวันจะมีความสัมพันธ์กับวงจรการเป็นสัด โดยการกินอาหารต่อวันจะลดลงในช่วงระหว่างการตกไข่ (periovulatory phase) พฤติกรรมที่แสดงออกนี้เป็นผลจากระดับของ E_2 ที่มีอยู่สูงในช่วงเวลาดังกล่าว (Asarian and Geary, 2006; Butera, 2010) ปรากฏการณ์นี้ได้ถูกศึกษาอย่างมากในหนูเพศเมียซึ่งมีวงจรการเป็นสัด 4 ถึง 5 วัน ในหนูนี้นั้นจะพบการกินอาหารลดลงในวันที่หนูเป็นสัด (estrus day) ซึ่งเป็นวันถัดจากที่มีระดับ E_2 สูงในกระแสเลือด คือ วันก่อนการเป็นสัด (proestrus day) การกินอาหารที่ลดลงนี้เป็นผลเนื่องจากการลดลงของขนาดมื้ออาหาร (meal size) โดยพบว่าการชะลอความถี่ของมื้ออาหาร (meal frequency) อยู่ระดับหนึ่ง การกินอาหารต่อวันจะกลับคืนสู่ระดับปกติเมื่อหนูเข้าสู่ระยะ ไดเอสตรัส (diestrus) สอดคล้องกับการลดลงของระดับ E_2 ในกระแสเลือด (Asarian and Geary, 2002) ผลของ E_2 ต่อการลดระดับการกินอาหารในหนูเพศเมียนี้นี้ยังได้รับการยืนยันจากการศึกษาในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทิ้ง (ovariectomized rat)

ซึ่งจะมีระดับ E_2 อยู่ต่ำมาก ทำให้หนูดังกล่าวเพิ่มระดับการกินอาหารต่อวันสูงขึ้นจนทำให้มีน้ำหนักที่มากกว่าหนูปกติ และการให้ฮอร์โมน E_2 ทดแทนสามารถที่จะลดระดับการกินอาหารและลงน้ำหนักไว้ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทิ้งได้ (Asarian and Geary, 2002) การศึกษาหลายชิ้นยังบ่งชี้ว่า E_2 นั้นมีผลต่อพฤติกรรมการกินโดยการออกฤทธิ์ที่สมอง (Asarian and Geary, 2006; Rivera and Eckel, 2010) งานวิจัยในอดีตที่ใช้วิธีการให้ E_2 ในระดับต่ำไปที่สมองส่วนต่างโดยตรง พบว่า สมองส่วนไฮโปทาลามัสหลายจุดน่าจะเป็นตำแหน่งที่ E_2 ออกฤทธิ์ (Palmer and Gray, 1986; Butera and Beikirch, 1989; Dagnault and Richard, 1997) อย่างไรก็ตามการศึกษาหลายชิ้นก็ให้ผลการวิจัยที่แย้งกันกับงานวิจัยในกลุ่มที่กล่าวว่าสมองส่วนไฮโปทาลามัสเป็นจุดออกฤทธิ์ของ E_2 (Hrupka et al., 2002; Gao et al., 2007; Musatov et al., 2006) และในอีกด้านหนึ่งยังพบว่าฤทธิ์ของ E_2 ต่อพฤติกรรมการกินอาหารเป็นฤทธิ์ที่เกิดขึ้นจากการที่ E_2 ให้ผลควบคุมฮอร์โมน ซีซีเค (CCK) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากทางเดินอาหาร โดยปกติแล้ว CCK จะให้ผลลดการกินอาหารและ E_2 จะมีผลทำให้ฤทธิ์ของ CCK เพิ่มสูงขึ้น การควบคุมพฤติกรรมการกินอาหารของ E_2 ผ่าน CCK นี้เป็นการควบคุมที่เกิดขึ้นที่สมองเป็นหลัก (Eckel and Geary, 2001; Eckel et al., 2002; Asarian and Geary, 2007) โดยที่ฮอร์โมน CCK ออกฤทธิ์ต่อพฤติกรรมการกินที่สมองส่วนเมดัลลา (medulla) เป็นหลัก ทำให้มีการตั้งสมมุติฐานว่า สมองบริเวณเมดัลลานี้จะเป็นสมองอีกส่วนหนึ่งที่เป็นจุดออกฤทธิ์ของ E_2 งานวิจัยของกระผมได้ชี้ให้เห็นว่า สมองส่วน นิวเคลียส แทรกทัส โซลิทารียัส (nucleus tractus solitarius, NTS) ซึ่งตั้งอยู่ที่สมองส่วนเมดัลลาเป็นจุดสำคัญที่เซลล์สมองมีตัวรับของเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER) และมีความสามารถเพียงพอในการทำให้ E_2 ออกฤทธิ์ต่อพฤติกรรมการกินอาหารที่สัมพันธ์กับฮอร์โมน CCK (Thammacharoen et al., 2008)

จากผลการทดลองของกระผมที่แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารนั้นส่วนหนึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ปรากฏอยู่ที่สมองส่วนท้าย ทำให้มีความเข้าใจเดิมที่เชื่อว่า E_2 จะออกฤทธิ์ต่อพฤติกรรมการกินโดยผ่านบริเวณสมองส่วน ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) เป็นสำคัญ จำเป็นต้องได้รับการทบทวน โดยกระผมเชื่อว่าการออกฤทธิ์ของ E_2 นั้นเกิดขึ้นจากทั้งสองบริเวณโดยที่การเชื่อมโยงระหว่างสมองทั้งสองบริเวณยังคงต้องมีการศึกษาอีกระดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังต้องมีสมมุติฐานสำคัญอีกหลายข้อที่จำเป็นต่อการอธิบายองค์ความรู้หลักที่เกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของ E_2 และสมองส่วน NTS ต่อพฤติกรรมการกินในหนูเพศเมีย องค์ความรู้เสริมที่กระผมสนใจเป็นเบื้องต้น คือ การแสดงให้เห็นว่าสมองส่วน NTS นี้มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของ E_2 และการแสดงออกของพฤติกรรมการกิน และกลไกการออกฤทธิ์ของ E_2 ที่สมองส่วน NTS ในระดับเซลล์ประสาทและระดับโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับพฤติกรรมการกิน ผลกระทบ (impact) ของการค้นพบดังสมมุติฐานที่ตั้งไว้นอกจากจะสามารถใช้อธิบายองค์ความรู้หลัก (Thammacharoen et al., 2008) ยังใช้เชื่อมโยงให้เห็นถึงความสำคัญของสมองส่วนท้ายในการที่จะสามารถทำหน้าที่เป็นส่วนบูรณาการ (integration unit) สำหรับข้อมูลต่างๆ และส่งผลต่อการแสดง

พฤติกรรม ซึ่งข้อบ่งชี้เป็นส่วนหนึ่งของความเข้าใจในสรีรวิทยาของระบบประสาทที่สำคัญชิ้นหนึ่ง

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อแสดงให้เห็นว่าสมองส่วน NTS นี้มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของ E_2 และการแสดงออกของพฤติกรรมการกินในหนูเพศเมีย

2.2 เพื่อค้นหากลไกการออกฤทธิ์ของ E_2 ที่บริเวณสมองส่วน NTS ต่อพฤติกรรมการกินในหนูเพศเมียในระดับเซลล์ประสาทและระดับโมเลกุล ทั้งในด้านการออกฤทธิ์ที่ผ่านตัวรับเอสโตรเจน และผลการกระตุ้นตัวรับเอสโตรเจนที่มีต่อการสื่อสารประสาทบริเวณ NTS

3. ระเบียบวิธีวิจัย

แผนการวิจัยเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ทั้งสองข้อ มีลำดับดังนี้

3.1 เพื่อแสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมียในสภาวะการเลี้ยงที่จะใช้สำหรับโครงการ ผู้วิจัยได้วางแผนศึกษาในหนูเพศเมียทั้งที่ไม่ได้ตัดรังไข่ (ซึ่งมีวงจรเปลี่ยนแปลงรังไข่สมบูรณ์) และในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่และได้รับการเสริม E_2 จากการฉีดเอสตราไดออล เบนโซเอต (estradiol benzoate, EB)

3.2 เพื่อแสดงให้เห็นว่าสมองส่วน NTS มีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน E_2 ผู้วิจัยวางแผนที่จะให้สารต้านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptor, ER, antagonist) คือ ICI 182 780 (ICI) หรือสารควบคุม (1%DMSO) เข้าสู่ช่องของสมองลำดับที่ 4 (4^{th} intracerebroventricular, 4^{th} icv) โดยตรงสู่สมองส่วนท้ายผ่านอุปกรณ์ส่งสารด้วยแรงออสโมติก (osmotic pump, 1002OP) การทดลองนี้ทำในหนูเพศเมียที่ทำการตัดรังไข่ทิ้งแล้ว หลังจากผ่าตัดฝังท่อเพื่อให้สาร ICI ที่สมองส่วนท้ายเป็นผลสำเร็จ หนูชุดดังกล่าวจะถูกทดสอบฤทธิ์ของ E_2 หรือสารควบคุม (น้ำมันงา) และบันทึกข้อมูลการกินอาหารและน้ำหนัก

3.3 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน E_2 ในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล เนื่องจากกลไกการต้านตัวรับของสาร ICI ที่สำคัญกลไกหนึ่งคือ การสนับสนุนการขบวนการทำลาย ER ผู้วิจัยวางแผนที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวน ER ภายในสมองส่วนหน้าและส่วนท้ายหลังการได้รับสาร ICI เข้าสู่สมองส่วนท้ายโดยตรง การศึกษาในหัวข้อนี้จะทำการเตรียมตัวสัตว์เหมือนกับในการทดลอง 3.2 เพียงแต่ไม่ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของ E_2 แต่จะทำการวัดการกินอาหารและน้ำหนัก พร้อมทั้งทำการฉีดยาและนำชิ้นส่วนสมองมาทำการตรวจนับจำนวน ER ภายในสมองบริเวณต่างๆ

การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดผู้วิจัยจะทำในลักษณะเช่นเดียวกับที่เคยใช้ (Thammacharoen et al., 2008; Thammacharoen et al., 2009) โดยหลักการทั่วไป คือ ข้อมูลของการวิจัยต่างๆ ทั้งหมดจะรายงานโดยใช้สถิติเชิงพรรณนาเป็น ค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการทดลอง ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) การทดสอบสมมุติฐานใดๆ ของการทดลองจะทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน

(analysis of variance, ANOVA) ตามด้วยการทดสอบความแตกต่างของผลการทดลองเมื่อข้อมูลผ่านการวิเคราะห์ความแปรปรวนแล้ว

4. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการทดลองในเบื้องต้น ผู้วิจัยสามารถแสดงให้เห็นฤทธิ์ของฮอร์โมน E_2 ทั้งที่มีอยู่ในหนูเพศเมียที่มีรังไข่สมบูรณ์และในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่และเสริม EB หนูเพศเมียที่มีรังไข่สมบูรณ์จะกินอาหารลดลงในช่วงวันที่เป็นสัด และหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่จะกินอาหารลดลงหลังการได้รับ EB แล้ว 2 คืน (รูปที่ 3) ผลการทดลองในเบื้องต้นนี้มีความสำคัญมากในอันที่จะเป็นเครื่องยืนยันถึงวิธีการทดลองในสภาวะการเลี้ยงที่ใช้สำหรับโครงการในอนาคตว่าไม่แตกต่างจากที่พบโดยทั่วไป สำหรับการทดลองลำดับที่ 2 นั้นพบว่าการให้สาร ICI โดยตรงเข้าสู่สมองส่วนท้ายผ่าน 4th icv และ 1002OP สามารถต้านทานฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารได้ โดยพบว่าในกลุ่มที่ให้ 1%DMSO เข้าสู่สมองส่วนท้ายโดยตรงนั้นการให้ EB ทำให้การกินอาหารลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 8) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ ICI ทั้งในระดับ 4 และ 8 nM นั้นพบว่าการกินอาหารในหนูกลุ่มที่ได้รับ EB ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันงา (รูปที่ 8) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการให้ ICI ผ่านเข้าสู่สมองส่วนท้ายโดยตรงสามารถต้านฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารได้ และหมายความว่าสมองส่วนท้ายมีความจำเป็นต่อการออกฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหาร การทดลองในลำดับต่อมาคือการศึกษาเกี่ยวกับผลการให้สาร ICI ด้วยวิธีดังกล่าวต่อการกินอาหารโดยตรงและผลที่เกิดขึ้นกับจำนวน ER ที่จะตรวจสอบที่สมองบริเวณต่างๆ ทั้งจากสมองส่วนท้ายโดยเฉพาะที่บริเวณ นิวเคลียส แทรกทรัส โซลิทาลีส (nucleus tractus solitarius, NTS) และที่ไฮโปทาลามัสของสมองส่วนหน้า คือที่บริเวณ มีเดียล พร็อพติก นิวเคลียส (medial preoptic nucleus, MPO) บริเวณ อาร์คูเอต นิวเคลียส (arcuate nucleus, Arc) และบริเวณ เวนโทรมีเดียล นิวเคลียส ของไฮโปทาลามัส (ventronucleus of hypothalamus, VMH) ผลการทดลองพบว่าการให้สาร ICI เข้าสู่สมองส่วนท้ายโดยตรงนั้นไม่มีผลต่อการกินอาหารตลอด 12 วันของการทดลอง และที่สำคัญพบว่าไม่มีผลต่อจำนวน ER ที่พบภายในเซลล์ประสาทที่นับได้จากสมองส่วนหน้าทั้ง 3 บริเวณ (รูปที่ 10) ผลการทดลองชี้ให้เห็นการให้ ICI ซึ่งสามารถต้านฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารได้นั้นมิได้เกิดขึ้นจากผลของตัวเองแต่อย่างใด ที่สำคัญเป็นที่ทราบกันอยู่ว่า กลไกการออกฤทธิ์ของ ICI ที่สำคัญกลไกหนึ่งในการต้านฤทธิ์ของ EB คือ การส่งเสริมให้มีการสลาย ER ภายในเซลล์ ดังนั้นผลการทดลองที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวน ER จากสมองส่วนหน้าอาจเป็นข้อบ่งชี้ว่า การให้ ICI ด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้ ICI ออกฤทธิ์ต้าน ER จำกัดที่บริเวณสมองส่วนท้าย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นข้อตอกย้ำถึงบทบาทของสมองส่วนท้ายต่อกลไกการออกฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหาร อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าการย้อมสี ER ที่บริเวณสมองส่วนท้ายนั้นติดสีน้อยมากทำให้ไม่สามารถนับจำนวนได้ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณ ER ที่แตกต่างกันของสมองบริเวณต่างๆ

5. บทสรุปและทัศนคติ

การวิจัยภายใต้โครงการเรื่อง “ผลของการให้สารต้านตัวรับเอสโตรเจน (ICI 182 780) โดยตรงที่สมองส่วนท้ายของหนูเพศเมียต่อพฤติกรรมการกินอาหาร” กลุ่มผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลอง 3 การทดลองหลักดังได้กล่าวไว้ข้างต้น ผลการทดลองสามารถพิสูจน์ได้ว่าสมองส่วนท้ายมีความจำเป็นต่อกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมีย ซึ่งข้อสรุปดังกล่าวนี้ขยายความเข้าใจเดิมซึ่งกลุ่มผู้วิจัยได้เคยพิสูจน์แล้วว่า สมองส่วนท้ายโดยเฉพาะบริเวณ NTS ซึ่งมีเซลล์ประสาทที่มี ER อยู่เป็นบริเวณที่ E_2 สามารถออกฤทธิ์ต่อการกินอาหารได้ อย่างไรก็ตามกลุ่มผู้วิจัยคิดว่าในด้านกลไกการออกฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมียในแง่ของตำแหน่งที่ฮอร์โมนออกฤทธิ์นั้นสมองทั้งส่วนหน้าและส่วนท้ายน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกันทั้งนี้จากเหตุผลสองประการ คือ ในประการแรกการให้สาร ICI เข้าสู่สมองส่วนหน้าผ่านทางช่องสมองด้านข้างก็ให้ผลด้านฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารได้เช่นกัน และการให้สาร ICI เข้าสู่สมองโดยตรงทั้งที่สมองส่วนหน้าและส่วนท้ายไม่สามารถด้านฤทธิ์ได้สมบูรณ์ เหตุผลประการที่สองคือที่บริเวณสมองส่วนหน้าและที่ส่วนท้ายสามารถตรวจพบ ER ได้ กลุ่มผู้วิจัยได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ที่สมองส่วนท้ายเป็นหลักและได้มีการตั้งสมมุติฐานเบื้องต้นไว้ว่าน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระบบสารสื่อประสาทกลูตาเมต (glutamatergic system) และการสื่อสารประสาทผ่านเซลล์ประสาทในกลุ่ม โปรโอปิโอเมลานโนคอร์ติน (pro-opiomelanocortin neurons) และกลุ่มเซลล์ประสาทที่มีตัวรับสารสื่อประสาทนี้ ในการนี้กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการทดลองเพื่อพยายามหาระดับของสาร แอลฟา เมเอชเอส (α -MSH) ที่บริเวณสมองส่วนท้ายเพื่อหาความสัมพันธ์ของสารดังกล่าวต่อกรณีที่สาร ICI สามารถด้านฤทธิ์ของ EB ต่อการกินอาหารได้ อย่างไรก็ตามการทดลองนำร่องในเบื้องต้นพบว่าสาร α -MSH ที่หาได้จากสมองส่วนท้ายที่สัมพันธ์กับมื้ออาหารน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถดำเนินการทดลองต่อด้วยวิธีการที่เลือกใช้ (ผลการทดลองมิได้นำเสนอ) ดังนั้นในการศึกษากลไกโดยละเอียดของการออกฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารที่สมองส่วนท้ายในแง่ที่สัมพันธ์กับสารสื่อประสาทข้างต้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการที่ละเอียดเพิ่มมากขึ้น

กลุ่มผู้วิจัยมีความเห็นว่า องค์ความรู้ตามข้อสรุปจากผลการทดลองข้างต้นนอกจากทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมียแล้ว ยังเป็นตัวอย่างของกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน E_2 ต่อพฤติกรรมที่สมองซึ่งจะไม่ขึ้นกับนิวเคลียสจุดใดจุดหนึ่งเป็นสำคัญ กรณีของการกินอาหารนี้จะมีกลไกต่างอย่างสิ้นเชิงกับผลของฮอร์โมน E_2 ต่อพฤติกรรมการโก่งตัว (lordosis) ที่พบในหนูเพศเมียและเป็นส่วนหนึ่งของพฤติกรรมการสืบพันธุ์ (Pfaff, 2005) ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงเห็นว่า การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ E_2 ต่อการกินอาหารในหนูเพศเมียจะมีประโยชน์ในหลายด้านและทำให้เป็นแรงจูงใจสำคัญให้การดำเนินงานวิจัยภายใต้โครงการเกิดขึ้นต่อไปในอนาคต

เนื้อหางานวิจัย

INTRODUCTION

Estrogens (Blaustein, 2008) are one major group of female sex steroid hormones. The natural forms of estrogens are 17 β -estradiol (E₂), estrone (E₁) and estriol (E₃). E₂ is considered to be the major estrogen form because of its high level in the circulation and its potency to activate estrogen receptor (ER) mediated transcription activity. E₂ is involved in many physiological functions including, e.g. development, growth and homeostasis. Besides the main function of E₂ in reproductive physiology, a further important action of E₂ and the major focus of this work is its role in the control of FI (FI) and body weight (BW) in female animals. These effects are clinically important because it is well accepted that women are more prone to developing severe obesity and eating disorders than are men (Geary, 2001; Klein and Walsh., 2004).

Eating is a complex behavior that is controlled by multiple brain centers. This behavior in female is in part controlled by E₂. Unlike the effect of E₂ on reproductive behavior, Iodosis (Pfaff, 2005), the effect of E₂ on FI has not been work out thoroughly. The effect of E₂ on FI apparently mediated via ER α in the brain. However, the mechanisms and the specific site(s) of E₂ action on eating are still unclear. Therefore, my current experiments focused on the specific site and the mechanisms of E₂ action in the control of eating in female rats. The current report contains, in the first part, basic information on the mechanisms of how E₂ to modulate cellular activities, the mechanisms of peripheral and central controls of eating behavior and the general knowledge regarding estrogenic control of eating. The second part contains the current experiments including the detail material & methods, results and discussion.

Mechanisms of estrogens action

All physiological effects of E_2 are mediated by ligand-inducible nuclear transcription factor, ERs. Two ER subtypes, $ER\alpha$ and $ER\beta$ have been identified and cloned (Green et al., 1986; Greene et al., 1986; Kuiper et al., 1996). ERs belong to the steroid/thyroid hormone superfamily of nuclear receptors. These receptors are composed of three domains including: the NH₂-terminal A/B domain; the C domain; and the carboxyl terminal D/E/F domain (Nilsson et al., 2001). The NH₂-terminal A/B domain encodes a ligand-independent activation function (AF1), a region involved in transcriptional activation and in protein-protein interactions. The highly homologous C domain contains the DNA binding domain (DBD) with two zinc finger structures. This domain has a role in receptor dimerization and target DNA binding. The carboxyl terminal D/E/F domain contains the E/F ligand-binding domain (LBD), which harbors the ligand-dependent activation function (AF2). The overall structure of ER-LBD is composed of 12 helices (H1-H12) and two stranded β -sheets (S1 and S2). After ligand binding, the position of H12 is the key event that permits discrimination between estrogen receptor agonist and antagonist (Brzozowski et al., 1997). The LBD plays an important role in ligand binding, receptor dimerization, nuclear translocation and target gene transcription activation.

It is well accepted to date that the two basic mechanisms of ER-mediated E_2 actions involve genomic and non-genomic effects. Both mechanisms depend on the binding structure of E_2 to ER. For the ER dependent gene transcription, the receptor is localized predominantly in the nucleus, the nuclear ER (nER) (King and Greene., 1984; Welshons, 1984; Kawata et al., 2001). In addition, the plasma membrane associated ER (mER) has been shown to mediate the rapid non-genomic actions of estrogen (Mendelsohn, 2000b; Milner et al., 2005; Pedram et al., 2006; Pietras and

Marquez-Garban, 2007; Ronnekleiv et al., 2007; Song, 2007; Toran-Allerand, 2004; Vasudevan et al., 2005).

For the genomic action, the receptor is dissociated from the chaperone protein, phosphorylated and dimerized after the binding of the ligand. The ligand-ER complex stimulates the target gene by either direct or indirect initiation of transcription. The direct binding of the complex to the estrogen response element (ERE) activates specific gene transcription. In the indirect activation of transcription, the ligand-ER complex does not bind directly to DNA, but tethers with another transcriptional activator to promote gene expression. Many transcriptional factors have been shown to interact with ER via the indirect mechanism i.e. NF κ B (Kalaitzidis et al., 2005), Sp1 (Safe, 2001) and AP-1 (Kushner et al., 2000). Moreover, the ER itself can be activated by mechanisms independent of ligand binding. Many signaling pathways can modulate ER through phosphorylation via regulators of the phosphorylation state (PKA or PKC) i.e. extracellular signals (peptides growth factors, cytokines or neurotransmitters) and cell cycle regulators (Nilson et al., 2001). The DBD, AF1 and AF2 domains of ERs are all responsible for the activation of transcription via the genomic action of ER. While DBD specifically binds with ERE (Klinge, 2001), AF1 and AF2 synergistically activate transcription by recruiting the basic transcriptional machinery and several coregulatory proteins. The coregulator proteins recruited by AF1 and AF2 can be subdivided into coactivators and corepressors (Hall and McDonnell, 2005; Perissi and Rosenfeld, 2005). The detailed mechanisms by which AF1 and AF2 recruit the coregulator proteins and initiate the transcription are different (Lavery and McEwan, 2005; Pike, 2006; Warnmark et al., 2003). The role of AF1 and AF2 on ER activated transcription has been revealed by many estrogen agonists/antagonists and by different cells and promoter contexts. First, different cells

that were transfected with the same promoter appeared to have different degrees of transcription after estradiol treatment. Second, different promoters that were transfected to the same cell also showed differences in transcription activity. Tamoxifen, acting as an AF2 domain blocker, has an estrogen antagonistic effect on the gene that requires only the AF2 domain for ER-mediated transcription. In contrast, tamoxifen has a partial agonist effect on genes where AF2 is not required. In addition, the AF1 of ER α appears to have stronger activity than ER β (Delaunay et al., 2000; Tzukerman et al., 1994). Collectively, this information suggest that the genomic effects of E₂ and estrogen agonists/antagonists depend partly on the interaction among AF domains of ER, cell types and promoter contexts of estrogen responsive genes (Delaunay et al., 2000; McDonnell et al., 1995; Tzukerman et al., 1994).

Another pathway of E₂ dependent ER actions involves rapid effects that cannot be attributed to genomic actions. This is the so-called non-genomic pathway. E₂ is able to evoke fast responses in many tissues, within seconds to minutes after ligand binding. Many intracellular signaling cascades have been shown to be responsible for these rapid effects. These include e.g. the activation of ion channels, the MAPK pathway; the CREB pathway, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathways; the G-protein coupled receptor (cAMP and intracellular calcium); and the nitric oxide pathway (Collins and Webb, 1999; Mendelsohn, 2000b; Pietras and Marquez-Garban, 2007; Ronnekleiv et al., 2007; Vasudevan et al., 2005). The mERs appear to mediate these rapid effects. These mERs probably share a common origin with nuclear ERs (Pietras and Marquez-Garban, 2007). Both ER α and ER β and a novel ER (ERX) have been identified at the membrane (Chambliss et al., 2002; Kelly and Ronnekleiv, 2008; Milner et al., 2005; Pedram et al., 2006; Pietras and Marquez-Garban, 2007; Song, 2007; Toran-Alland et al., 2002). It should be

noted here that E₂ can activate intracellular signaling independent of mER. The G protein coupled receptor 30 (GPR30) was reported to bind E₂ but the biological function which is mediated by GPR30 has yet to be investigated (Filardo and Thomas, 2005; Funakoshi et al., 2006; Pedram et al., 2006; Prossnitz et al., 2008; Revankar et al., 2005). Evidence for an important functional role of the non-genomic ER pathway has been provided for many different tissues including the reproductive system (Luconi et al., 2004), cardiovascular system (Fu and Simoncini, 2007; Leung et al., 2007; Mendelsohn, 2000a; Fu and Simoncini, 2007) and central nervous system (Behl, 2002; Kelly and Ronnekleiv, 2008; McEwen et al., 2001; Ronnekleiv et al., 2007). In the brain, the rapid non-genomic ER pathway appears to involve mechanisms of neuroprotection and aging (Behl, 2002; Garcia-Sugura et al., 2007; Mendez et al., 2005), reproduction (Vasudevan et al., 2005; Kow and Pfaff, 2004) and eating behavior (Asarian, 2006; Arbogast, 2007; Dagnault and Richard, 1997; Liang et al., 2002; Gao et al., 2007). Despite these reports, it is still difficult to dissociate the role of genomic and non-genomic pathways of E₂ for a specific behavior or brain function. The lordosis behavior in female rats is one example of influence by both pathways (Kow and Pfaff, 2004). It was first suggested that lordosis is a behavior which requires the genomic action of E₂ (Parsons et al., 1982). Later, using the BSA conjugated E₂ (E₂-BSA) which acts only on the membrane and the couple treatments paradigm; Kow and Pfaff (2004) demonstrated that the first treatment with E₂-BSA potentiates the second treatment with E₂ on lordosis score. The result suggested that rapid non-genomic ER action potentiates the genomic ER action of lordosis.

Estrogens and ER ligands have diverse effects in many organs. Besides their physiological functions, estrogens are also involved in many pathophysiological

processes, e.g. cancer, osteopenia, menopause syndromes, and brain and psychological disorders. Based on the variety of ERs dependent mechanisms reviewed above, it is not surprising that one steroid can influence many different biological functions and diseases. The simple model that determines the outcome of action of E₂ and ERs dependent mechanisms involves three fundamental factors: the spatio-temporal expression of both ER subtypes (Laflamme et al., 1998; Milner et al., 2001; Milner et al., 2005; Mitra et al., 2003; Schlenker and Hansen, 2006; Shughrue et al., 1997; Toran-Alland et al., 2002); the nature of the cell types (the coregulator molecules and promoter context; Lavery and McEwan, 2005; Pike 2006; Warnmark et al, 2003); and the type of ligands (E₂ or SERMs; Osborne et al., 2000). It is therefore crucial to identify all these factors in order to understand E₂ effect on behavior, e.g. FI.

Food intake control mechanisms

The biological goals of eating behavior are to provide energy and necessary nutrients to the body. The pattern of eating is generally characterized by distinct meals or eating bouts that are distributed over the course of a day. Meal pattern varies between species and also between individuals. Daily FI depends on meal frequency and meal size. Eating behavior is controlled by two fundamental factors: internal controls and external stimuli (i.e. pleasure of food, social system, predation, reproduction etc). The internal control mechanisms of meals can be considered into four categories. These are signals for the initiation of eating; signals for maintaining eating during a meal; signals that terminate eating; and signals that maintain the intermeal interval. Animal starts to eat (meal initiation) when they are hungry. In this state, animals are more sensitive to a variety of food stimuli including the signals from the olfactory, visual and gustatory systems. However, the mechanisms of meal initiation themselves are still not clear. Eating also occurs even in a state of ample energy balance and without external cues. Meal initiation has been demonstrated to correlate with the concentration of metabolites (glucose and fatty acids), metabolic rate and body temperature (Even and Nicolaidis, 1985; De Vries et al., 1993). At least in a series of experiments, a premeal reduction of glucose was demonstrated a few minutes prior to a spontaneous meal (Campfield and Smith, 2003). During a meal (meal maintenance), the presence of food in the GI tract produces a set of mechanical and chemical signals. The balance of positive feedback (pleasure) and negative feedback (satiation) signals determines the size of a meal and the rate of eating. While pleasure from food facilitates eating, satiation promotes meal termination, thereby limits meal size. The postprandial feeling and behavior that affects the interval to the next meal is referred to as satiety.

One characteristic of eating behavior is that animals, and obviously humans as well, select foods preferentially when food choices are ample, instead of having the same menu every day. This suggests that the internal control systems contain not only homeostatic but also hedonic components (Saper et al., 2002; Berthoud, 2004). Both mechanisms participate in the decision about what kind and how much food an animal eats. While homeostatic controls maintain normal energy and nutrient supplies to the body, hedonic controls of eating have specific characteristics that can overpower the homeostatic controls and result in eating behavior at any times and even at excessively high levels. These internal controls of eating behavior include the interplay between peripheral sensing and signaling systems (sensory organs, gastrointestinal tract and adipose tissue), and central integration (the brain). The hedonic components receive signals mainly via sensory organs, as well as from previous experiences with food that have been memorized and learned. This component plays a role in food rewarding aspect (Berridge and Robinson, 2003). In the homeostatic control of eating, peripheral signals could be classified into **“short and long term control mechanisms”**. In the short term control of eating, GI tract translates the signals (both volume and nutrient) from ingested food into hormonal (Chaudhri et al., 2006; Cummings and Overduin, 2007) or neuronal signals (Marty et al., 2007; Thaler and Cumming, 2008). In addition, some nutrients can work directly as signals to control eating behavior (Levin et al., 2004; Marty et al., 2007). The long-term control involves somewhat different properties. Adipose tissue and pancreas (adiposity signals) provide tonic signals for maintaining homeostasis to match the energy input and expenditure (Woods et al., 2000). Another peripheral signal that control eating depends on the cyclic pattern reproductive cycle especially in female. It is well known that female animal eat less during the estrous phase of ovarian cycle

and this behavior is mediated mainly by E_2 . The estrogenic effect on FI in female rat is the main interest of the current work and will be introduced in detail in “**Estrogenic control of food intake**”.

Estrogenic control of food intake

Eating behavior shows specific gender-related differences between males and females. A clear phenotypic difference between intact males and females is that females show a cyclic pattern of eating while males do not (Asarian and Geary, 2006). During the peri-ovulatory phase of the estrous cycle, female dog, pig, rat, monkey and woman decrease their daily intake (Czaja and Goy, 1975; Eckel et al., 2000; Friend, 1971; Gong et al., 1989; Houpt et al., 1979; Lyons et al., 1989). This phenomenon has been studied most extensively in rats which typically have a four or five day cycle (Fig1). The reduction of FI usually occurs during the night of the estrus. This is preceded by an increased plasma E_2 concentration during proestrus (Fig1). The reduction of FI is due to a decrease in meal size with a partially compensatory increase in meal frequency (Asarian and Geary, 2002). FI then returns to baseline in the subsequent diestrus. An ovariectomy removes the major source of E_2 in females. Ovariectomized (OVX) rats have dramatically decreased levels of plasma E_2 and gradually increase daily FI and BW. The increase in daily intake in OVX rats is due to an increase in meal size while meal frequency decreases (Asarian and Geary, 2002). Daily FI in OVX rats is generally higher than in intact rats at all stages of the estrus cycle. This suggests two functional components of E_2 's effect on eating. The first is a tonic inhibition by E_2 , which is revealed by an increase in the basal level of eating after OVX. The second is a phasic inhibition by E_2 , which is the absence of the cyclic decrease in eating after OVX. Replacement with a physiological dose of estradiol

benzoate (EB) but not progesterone reverses the effect of OVX on FI and BW in rats. Administration of EB in the middle of the light phase increased plasma E_2 in the first night after injection, which corresponds to the increase of plasma E_2 during proestrus in intact rats. Rats eat less in the second night after EB injection, which corresponds to the decrease in FI during the night of estrus in intact rats (Figure 1, Asarian and Geary, 2002). The effect of exogenous E_2 on FI again occurs mainly via a change on meal size. Meal size is decreased after replacement, while meal frequency usually partially compensates by increasing (Asarian and Geary, 2002).

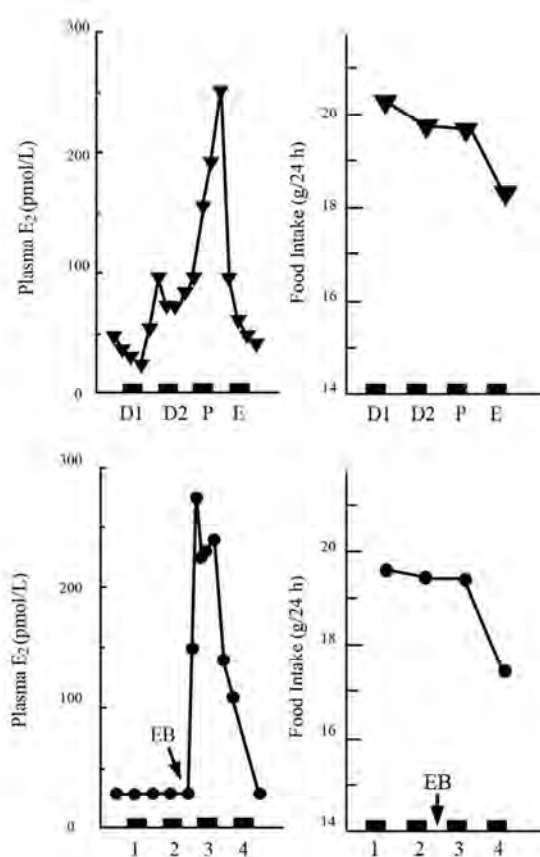


Fig 1 Top: Plasma concentration of E_2 (Left) and daily food intake (right) in female intact rats during estrus cycle (D1, diestrus1; D2, diestrus2; P, proestrus; E, estrus). Bottom: Plasma E_2 concentration is low in OVX rats without EB replacement. Two microgram per rat of EB treatment at mid-light phase of Day 2 increases plasma E_2 levels in the first 3 h and a peak during 6-15 h (Left). With EB treatment as described, daily food intake is decreased on day 4 (Data are adapted from Asarian and Geary, 2002; used with permission).

E₂ appears to affect FI and BW through the stimulation of ER α rather than ER β . Firstly, ER α receptor knockout (α ERKO) mice were higher BW than wild type whereas BW of ER β receptor knockout (β ERKO) mice did not differ from wild type (Couse and Korach, 1999). Secondly, E₂ produced its effects on BW and FI in wild types and β ERKO mice, but had no effects in α ERKO mice (Geary et al., 2001; Geary, 2004). Finally, OVX rats treated with specific ER α but not ER β agonists decreased FI (Roesch, 2006; Santollo et al., 2007; Thammacharoen et al., 2007) and the same ER α agonist produced no effect on FI in α ERKO mice (Thammacharoen et al., 2009).

While it has been established that the estrogenic inhibition of FI appears to be an activation of ER α , it remains unclear which downstream genomic or non-genomic pathways are responsible for eating inhibitory effect. The coupling of plasma E₂ and behavior outcome that can be observed in intact rats and in the OVX rats after cyclic EB replacement suggested that the physiologic effect of E₂ on eating needs time to develop. In addition, direct administration of a protein synthesis inhibitor (e.g. anisomycin) blocked E₂'s effect on eating (Butera et al., 1993). This suggested that the effect is mediated partly via the genomic effect of ER action. Some evidences however support the role of non-genomic ER action on FI. First, E₂ administration to the brain at pharmacological doses decreased FI shortly after treatment (Dagnault and Richard, 1997; Gao et al., 2007). However, Liang et al. (2002) demonstrated no acute effect of central administration of E₂ into brain on eating. Second, the ER α agonist PPT, injected subcutaneously, produced an inhibitory effect on FI within 4 hours (Santollo et al., 2007; Thammacharoen et al., 2007). The onset of PPT to decrease FI was faster than what can be observed after peripheral E₂ replacement. An example that has been shown previously about a participation of both genomic and non-

genomic E₂ actions is the lordosis behavior in female rats. Lordosis is one of the sexual behaviors that require genomic action of ER. It has been shown later that a non-genomic E₂ action enhances the genomic action of ER on lordosis behavior (Kow and Pfaff, 2004). Based on the above information, it seems plausible that both genomic and non-genomic E₂ actions may contribute to the estrogenic inhibition of FI. However, further experiments need to be conducted to test directly whether and how the genomic and non-genomic actions of ER could participate on the estrogenic inhibition of FI.

Estrogenic inhibition of eating is partly due to a modulation of the peripheral feedback controls of eating. E₂ increases the potency of gastrointestinal satiation hormones like CCK (Geary, 2001) and glucagon (Asarian and Geary, 1999), and decreases the potency of ghrelin which is a gastric orexigenic hormone (Clegg et al., 2007). The most extensive studies on the estrogenic modulation of peripheral signals came from the studies of an E₂'s effect to increase CCK satiation (Geary, 2001 and Asarian and Geary, 2006). Exogenous E₂ enhanced exogenous CCK's satiation effect (Butera et al., 1993; Geary et al., 1994; Linden et al., 1990). Later, it has been shown that the CCK-1 antagonist (devazepide) increased FI only during the day of estrus in female rats. This suggests that endogenous CCK action also changes across the estrus cycle (Eckel and Geary, 1999). In OVX rats, endogenous CCK satiation is also enhanced by exogenous E₂ (Asarian and Geary, 1999; Asarian and Geary, 2007). It is clear from the above information that endogenous and exogenous E₂ seem to modulate the satiation effect of both exogenous and endogenous CCK. The estrogenic inhibition of eating may also be mediated by the interaction with other peripheral feedback controls of eating, especially adiposity signals. It has been shown that female rats were more sensitive to leptin than male rats (Clegg et al., 2003). Later, the

same group demonstrated that E₂ increased leptin effect in female rat (Clegg et al., 2006). However, some evidences reported the contrary results. First, importantly, it was also demonstrated contrary that leptin sensitivity does not change in both intact and OVX rats (Pellemounter et al., 1999; Chen and Heiman, 2001). Second, plasma leptin was not changed before the onset of obesity after OVX, and leptin levels did not change when corrected by fat mass either in OVX or E₂ replacement (Pellemounter et al., 1999). Third, female OVX ob/ob and db/db mice still respond to E₂ replacement as in sham control (Gao et al., 2007; Shimomura et al., 2002). Based on above information, it seems that an interaction of E₂ and leptin to control FI and BW needs further investigations with an appropriate experimental design.

E₂ is generally thought to act in the brain to inhibit feeding (Butera et al., 1993; Geary et al., 1996; Rivera and Eckel., 2010). Various experiments have shown that microinjection of E₂ into various sites of the brain, especially into various hypothalamic nuclei, decreased FI in rats. E₂ implantation into the VMH (Wade and Zucker, 1970; Nunes et al., 1980), the medial preoptica area (MPA) (Dagnault and Richard, 1997) or the PVN (Palmer and Gray, 1986; Butera and Beikirch, 1989) reduced FI in rats. However, the exact site(s) where E₂ mediates its action on FI is still not clear for because of inconsistent results from above studies. Palmer and Gray (1986) failed to reproduce the effect on FI of E₂ implantation into the VMH as originally reported by Wade and Zucker (1970). Furthermore, Butera and Beikirch (1989) found that only PVN implantation (not VMH and MPA) of E₂ reduced 3-d FI in OVX rats. Further, peripheral E₂ treatment has been shown to decrease FI and BW in mice with a specific ER- α knockdown in the VMH, strongly suggesting that the VMH may not be required for the control of feeding and BW by E₂ (Musatov et al., 2006). The role of the PVN has been questioned as well because bilateral PVN

lesions did not abolish the effect of E₂ on FI in OVX rats (Dagnault and Richard, 1994). This was corroborated by a study published by Hrupka et al. (2002) suggesting that the action of E₂ in the PVN is not sufficient to account for the estrogenic control of FI. However, information from some of c-Fos studies appears to support that the PVN region may be one of the potential sites for the estrogenic inhibition of eating. E₂ increased c-Fos in different paradigms related to CCK satiation at several brain regions (Eckel and Geary, 2001; Eckel et al., 2002; Asarian and Geary, 2007). Eating induced c-Fos was first demonstrated to be enhanced by E₂ in the NTS, PVN and the central amygdala (CeA) (Eckel and Geary, 2001). The same c-Fos pattern and sites could also be observed when rats were treated with exogenous CCK and E₂ (Eckel et al., 2002). It was demonstrated later that E₂ treatment in rats with intraduodenal lipid infusion (a secretagogue of intestinal CCK) had significant higher c-Fos in caudal NTS than in control rats; this result could not be observed in PVN (Asarian and Geary, 2007). The results on c-Fos studies suggest that at the hindbrain NTS may all involve in E₂ enhanced CCK's satiation either from eating and exogenous CCK models, however only the caudal NTS is the area where E₂ enhances intraduodenum lipid induced-cFos. We showed the results suggesting the possibility that NTS is sufficient for mediating the estrogenic effect on FI (Thammacharoen et al., 2008). We demonstrated first, that the spreading of E₂ was very limited and affected only the dorsal but not to the ventral part of the NTS. Importantly, E₂ spreading was not observed in the forebrain either. Second, FI in OVX rats with EB applied to NTS was lower than in control OVX rats. Third, with the same paradigm we demonstrated that CCK activated c-Fos only at the NTS but not at any forebrain nuclei and the CCK induced c-Fos at cNTS was colocalized with ER α -expressing neurons. These results suggested that E₂ acts on ER α -expressing neurons at the NTS, especially at its caudal

part. In light of our previous finding we investigated the mechanism of E₂ regarding to the brain site where E₂ influences eating behavior. Our hypothesis is that the hindbrain is required for E₂ effect on FI in female rat.

MATERIALS & METHODS

Animals and housing condition

Female Wistar rats (National laboratory animal care, Mahidol University) weighing around 250-300 g were housed individually in hanging cages with stainless steel wire-mesh floors (33X18X20 cm) in a room maintained at 22±2 °C with 12:12 light: dark cycle (light on 00h). All rats had ad libitum to pelleted standard chow (#082, Perfect Companion Group Ltd., Samutprakarn, Thailand) and tap water. Rats were adapted to the housing condition for at least 1 week before starting experiment. Daily FI (± 0.1 g corrected for spillage) and BW (± 1 g) were measured throughout the experimental period. All procedures were performed according to the ethical principles and guidelines for the use of animals for scientific purposes from the National research council of Thailand and and were approved by the animal used committee, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University.

Ovariectomy

In the current project, intact female rats were ovariectomized at different time point depending on the experiment. Rats were anesthetized with isoflurane (2.5-3%, Minrad, Inc, USA) and bilaterally ovariectomized using an intraabdominal approach (Thammacharoen et al., 2008). Immediately after surgery, rat was subcutaneously injected with enrofloxacin (2.5-5.0 mg/kg iv; Bayer Korea Ltd., Korea) for antibiotic prophylaxis. Ibuprofen (Reckitt Benckiser, Inc., UK) was given once orally (15 mg/kg po) and via drinking water at the concentration of 12 mg/100ml for 4 days to minimize post-surgical pain.

The fourth ventricle cannulation, infusion and verification

The fourth ventricle intracerebroventricular cannulation (the 4th icv) was operated to study the hindbrain infusion of ICI on FI effect of exogenous estradiol (experiment 2 & 3). Seven days after OVX, rats were anesthetized with intraperitoneally pentobarbital sodium (50 mg/kg ip, Nembutal[®], Ceva Santa Animal, France). A guide cannula (22 G, PlasticsOne, Roanoke, VA, USA) was stereotaxically positioned into the fourth ventricle. The cannula tip was placed 3.5 mm posterior to the interaural line, 1.4 mm lateral to midline and 6.2 mm ventral to the skull surface (Blevins et al., 2004). The cannula was fixed to the skull with stainless steel mounting screw and dental cement. The guided cannula was attached to the osmotic pump (Alzet Model 1002, reservoir volume 100 μ l). After surgery, rat was received antibiotic and analgesic as described previous. FI ($\pm$ 0.1 g, corrected for spillage) and BW ($\pm$ 1 g) were measured daily throughout the experimental period.

At the end of experiment, all rats were killed by intravenously injection with the high dose of pentobarbital sodium (65 mg/kg ip, Nembutal[®], Ceva Santa Animal, France). To verify the cannula placement in the second experiment, 5 μ l of Evans blue was slowly injected through the ICV cannula. After the cannula was carefully removed, the brain was isolated and frozen. The frozen brain was sectioned to confirm cannula tip and dye diffusion.

Perfusion & IHC

In the third experiment, the expression of ER α was investigated after hindbrain infusion of ICI and control. At a day before the end of OP infusion period (day 13), rat was deeply anesthetized with sodium pentobarbital intraperitoneally and transcardially perfused with ice-cold phosphate buffer [PB, 0.1 M (pH 7.4)] followed

by 4% paraformaldehyde in 0.1 m PB. The brains were removed, postfixed at 4 °C in the paraformaldehyde perfusion solution for 2 h and in 20% sucrose in 0.1 M PB for 2 d. Brain were cut into 40 µm sections on a cryostat (Leica CM1800,). Sets of each fifth hindbrain [~17 to 11 mm posterior to bregma (Paxions and Watson., 1998)] and forebrain [~ 0.9 to 3.6 mm posterior to bregma (Paxions and Watson., 1998)] sections were stored in cryoprotectant solution (a 4:3:3 mixture of 0.1 m PB, ethylene glycol, and glycerol; Sigma) at -20 °C.

Immunohistochemistry staining of ERα from the brain section was performed using our previous protocol with minor modification (Thammacharoen et al., 2008). Briefly, brain sections were immersed in glass jar filled with 10 mM citric acid buffer and heated at high power of microwave oven (Sharp R209) with an operating frequency of 2450 MHz and 800 W power output. The antigen retrieving process was repeated 3 times for 5 minutes each. Following the heating session, the sections were kept cool down and processes for ERα IHC as described. Brain sections were washed 3 times with 0.1 M PB and incubated for 10 min each in 0.5% H₂O₂ solutions. After 3 times washed with 0.1 M PB, the blocking and detecting process were done with 1 h incubation in 1% normal goat serum in 0.1 m PB 0.3% Triton X-100, and then 48 hr with rabbit polyclonal ERα antibody (c1355, 1:10,000; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Sections were then washed and incubated with biotinylated antirabbit goat antibody (1:200; BA1000, Vector laboratory, CA) and avidin-biotin complex (1:400; PK-6100, Vector laboratory, CA), for 1 h each. ABC-ERα complex was visualized with DAB peroxidase complex reaction (SK-4105, Vector laboratory, CA). Finally, sections were mounted on gelatinized microscope slides, coverslipped, dried, and digitally imaged. The numbers of ERα positive neurons were counted within the following areas of interest using templates based on the atlas of Paxinos and Watson

(1998): NTS (NTS subregion nomenclature is our own (Thammacharoen et al., 2008); locations are millimeters caudal to bregma), caudal NTS (cNTS: about 14.1–14.4 mm); subpostremal NTS (spNTS; about 13.7–14.0 mm); POA (0.4 mm posterior to bregma), Arc (2.3 mm posterior to bregma) and VMH (2.3 mm posterior to bregma). Cells were considered ER α positive if their nuclei contained punctate brown-black immunolabeling and were counted using constant minimum and maximum OD and object size criteria, which were validated with visual counts.

Experiment 1: The cyclic pattern and the effect of EB on food intake and body weight in female rat

The first experiment was performed to show the cyclic pattern of FI and BW in intact female rat and the effect of exogenous EB (Sigma-Aldrich, Co. USA) in OVX rat. After 1 week of adaptation to the housing condition and management, the ovarian cycle was monitored as well as FI and BW measurement. Days of the ovarian cycle were identified using vaginal cytology (VC) with the standard identification criteria as previous described (Asarian & Geary., 2002). Daily vaginal mucosal samples were obtained about 1 h prior the onset of dark phase. A cotton swab moistened with warm saline was inserted gently to the vaginal cavity. The sample was transferred to the slide and examined under the light microscope (Olympus). Cycle day labels (D1, diestrus 1; D2, diestrus 2; P, proestrus; and E, estrus) were assigned to the 24-h period ending at the time of VC evaluation. Either 4-day or 5-days cycles were detected from all rats used in the current experiment, however, only 4-day cycle data was used to demonstrate the FI pattern from intact female rats.

After 2-3 ovarian cycles were recorded, all rats were ovariectomized as described previous. The effect of exogenous estradiol on FI and BW was investigated

1 week after OVX. According to the 4-day of ovarian cycle, the day of EB injection (2 μ g/ rat subcutaneously every fourth day at midlight phase) was marked as day 2 of treatment cycle and corresponded to D2 in intact rat. Plasma E₂ was rapid increased within 3 hr (peak at 6 hr), maintain until 15 hr and gradually decreased during the next day (the first dark and light day; day 3 of treatment cycle). This pattern of plasma E₂ was comparable with the pattern from P in intact female rat. FI, however, was not changed during this period. From the second dark and light day (day 4 of treatment cycle), FI was decreased similar to the pattern observed from E in intact female rat. All rats were observed for FI and BW for 4 cycles of EB treatment.

Experiment 2: The fourth ventricle continuous infusion of ICI attenuated estrogenic control of food intake

The second experiment was performed to investigate the effect of hindbrain ER α blockage on the E₂ effect of FI via the 4th icv ICI infusion over a period of 14 days as depicted in Fig 2. OVX rat (n = 10 per group) was cannulated directly to the 4th ventricle and connected with the OP contained either ICI, at the concentration 4 and 8 nM, or vehicle (1% DMSO in normal saline). This yielded 3 treatment groups; control, 4 nM ICI and 8 nM ICI. Rats were allowed 4 days to recover from surgery. At the mid light phase of day 6 postsurgery, half the rats from each group was injected subcutaneously with 2 μ g EB, another half was injected with sesame oil as vehicle control. Injections were reversed on day 12 postsurgery. With this within-subject design, each group received single injection of EB. FI & BW were monitored throughout the experimental period.

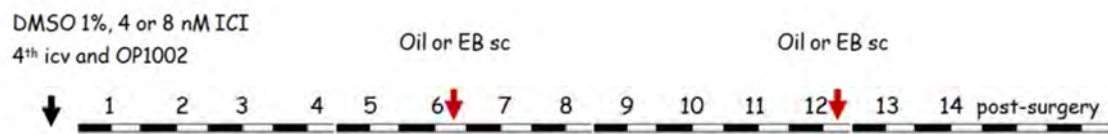


Fig 2 Experimental days (dark/light phase=black/white bars) after 4th icv and osmotic pump infusion (black arrow). Rats in each group received oil or EB injection on day 6 and 12 (red arrows). FI and BW were monitored throughout the experimental period. With this method, the expected days of estrus were day 8 and 14.

Experiment 3: The fourth ventricle continuous infusion of ICI and brain ER α expression

If hindbrain ICI infusion could block or attenuate E₂ effect of FI, the third experiment was designed to study the potential mechanism by which ICI attenuated E₂ effect of FI. In this experiment, OVX rats (n=10 per group) were divided into 8 nM ICI or 1%DMSO 4th icv infusion as described in experiment 2. FI and BW were measured until a day before the end of experiment (14 days). As described previous, all rats were deeply anesthetized and perfused at day 13 post-surgery. Brain was collected and processed for ER α immunohistochemistry.

Statistical analysis

Data from the experiment that contain either multiple time points or 2 factors were analyzed using one way or two way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni posttest. Data of two experimental groups were compared with student t test. Significant main effects were followed up with pair wise comparisons using Bonferroni posttest. All data were presented as mean $\pm$ SEM.

RESULTS

Experiment 1: The cyclic pattern and the effect of estradiol benzoate on food intake and body weight in female rat

Daily FI from both intact female and EB treated OVX Wistar rats revealed the estrogenic effect of eating behavior (Fig 3a). During estrous cycle, intact female Wistar rats showed significant decreased pattern of daily FI ($F_{3,63}= 6.72$, $P<0.05$). In OVX rats, estradiol treatment also decreased FI significantly ($F_{3,57}= 9.67$, $P<0.05$). The difference of FI between diestrus day 1 (D1) and estrous day (E) in the intact rat and between day 1 and day 4 of EB treatment days was apparently no significant ($t_{40} = 0.65$, $P>0.05$, Fig 3b). In addition, BW from both intact and OVX rat were increased significantly during the observation period (Fig4, $F_{3,63}= 33.26$ and $F_{3,57}= 14.52$, $P<0.05$, respectively).

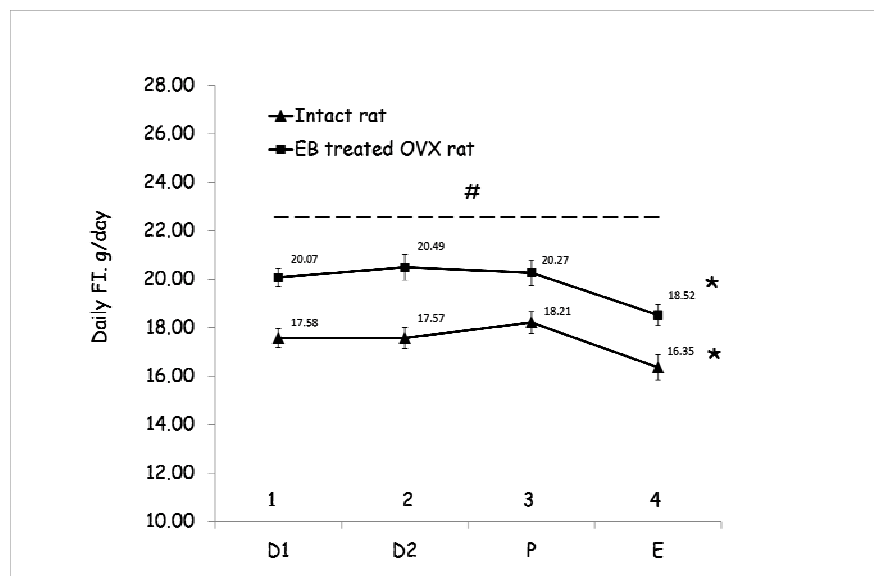


Fig 3a Daily FI from cyclic intact rat (triangle) and EB treated OVX rat (square). * Significant lower FI at E or day 4 than at day 1/2 or D1/D2, # Significant lower FI from cyclic intact rat than from EB treated OVX rat, $P<0.05$.

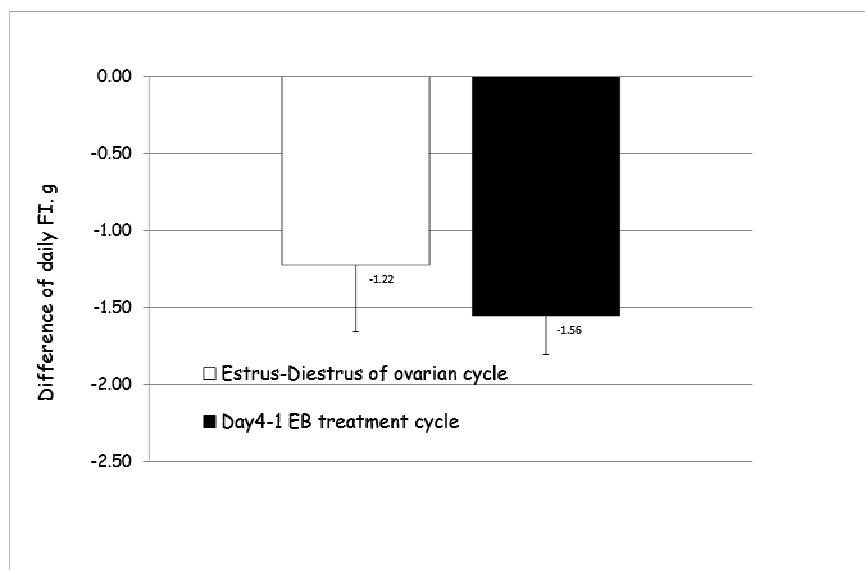


Fig 3b The comparable effects of endogenous E_2 in intact rat (white bar) and exogenous E_2 in OVX rat (black bar) on FI.

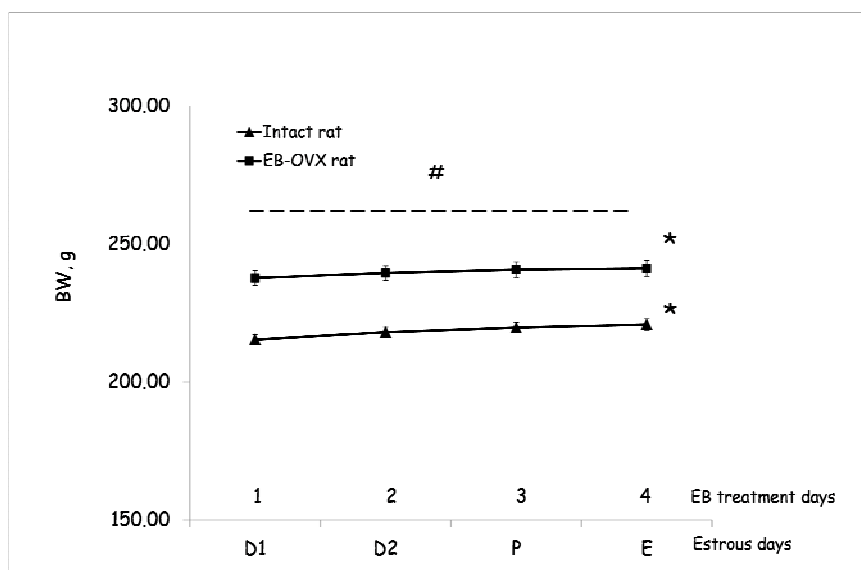


Fig 4 Body weight from cyclic intact rat (triangle) and EB treated OVX rat (square). * Significant lower FI at E or day 4 than at day 1/2 or D1/D2, # Significant lower FI from cyclic intact rat than from EB treated OVX rat, $P < 0.05$.

Experiment 2: The fourth ventricle continuous infusion of ICI attenuated estrogenic control of food intake

Continuous administration of ER α antagonist (ICI) into hindbrain via the 4th ventricle cannulation revealed that both 4 and 8 nM ICI could attenuate the exogenous estradiol effect of FI. In 1%DMSO hindbrain infusion groups, there was clear effect of estradiol on daily FI pattern (Fig 5a, $F_{3,48} = 3.54$, $P < 0.05$). However, daily FI patterns from 4 nM ICI hindbrain infusion were not different comparing between oil and EB treatment throughout the observation periods (Fig 6a, $F_{3,54} = 0.37$, $P > 0.05$). The similar patterns of FI was seen when both oil and EB treated rats were infused with 8 nM ICI (Fig 7a, $F_{3,54} = 1.17$, $P > 0.05$). On day 4 of the EB treatment regimen (Fig8), there was significant effect of EB on FI from DMSO hindbrain infusion groups ($t_{17} = 3.34$, $P < 0.05$). However there were no effect of EB on daily FI from both 4 and 8 nM ICI hindbrain infusion doses ($t_{19} = 2.04$ and 1.49 , $P > 0.05$).

BW (Fig 5b, 6b and 7b) from all 3 groups of hindbrain infusion increased significantly through the experimental period (DMSO/ $F_{3,48} = 2.97$, 4nM/ $F_{3,54} = 4.60$, 8nM/ $F_{3,54} = 8.54$; $P > 0.05$). However, increased BW in the current experiment mainly came from oil treatment groups. This is because, BW from all 3 hindbrain infusion group increased significantly in oil treatment groups (DMSO/ $F_{3,24} = 13.34$, 4nM/ $F_{3,27} = 3.51$, 8nM/ $F_{3,27} = 5.41$; $P < 0.05$). Further, EB treatment could restore BW in DMSO and 4 nM hindbrain infusion ($F_{3,24} = 0.73$, $F_{3,27} = 1.68$; $P > 0.05$, respectively), but not in 8 nM hindbrain infusion ($F_{3,27} = 3.54$; $P < 0.05$).

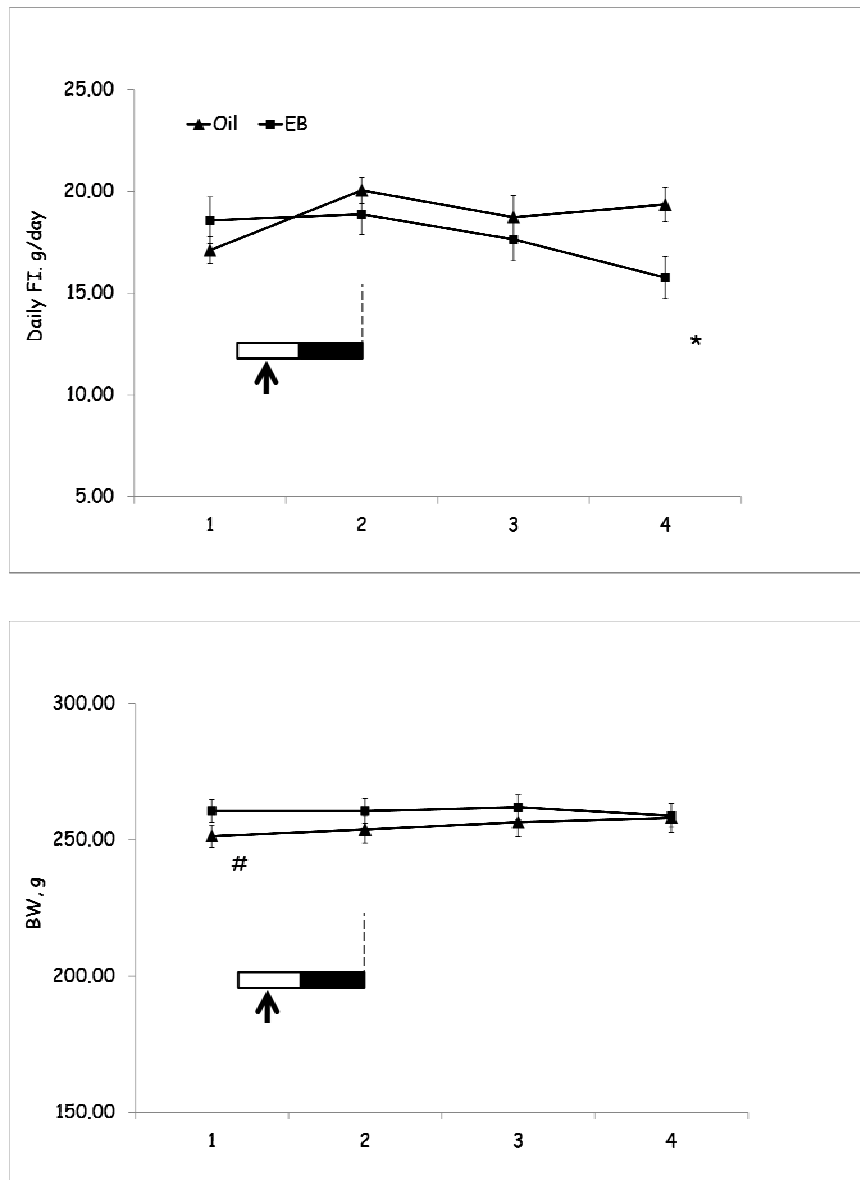


Fig 5 In 1% DMSO hindbrain infusion group, (a, upper) daily FI from oil treatment group (triangle) was comparable during 4 days experiment. However, FI from EB treatment group (square) decreased gradually during 4 days experiment. At day 4, FI from EB group was lower than form control group. (b, lower) BW from both oil and EB treatment group increased significantly during 4 days experiment. Daily FI from each experimental day is the cumulative amount of FI from dark and light period (dark and white bars). The injection of oil or EB was done at mid-light phase of day 2 (arrow). * Significant different FI , $P<0.05$. # BW was increased significantly in oil treatment group across the experiment period, $P<0.05$.

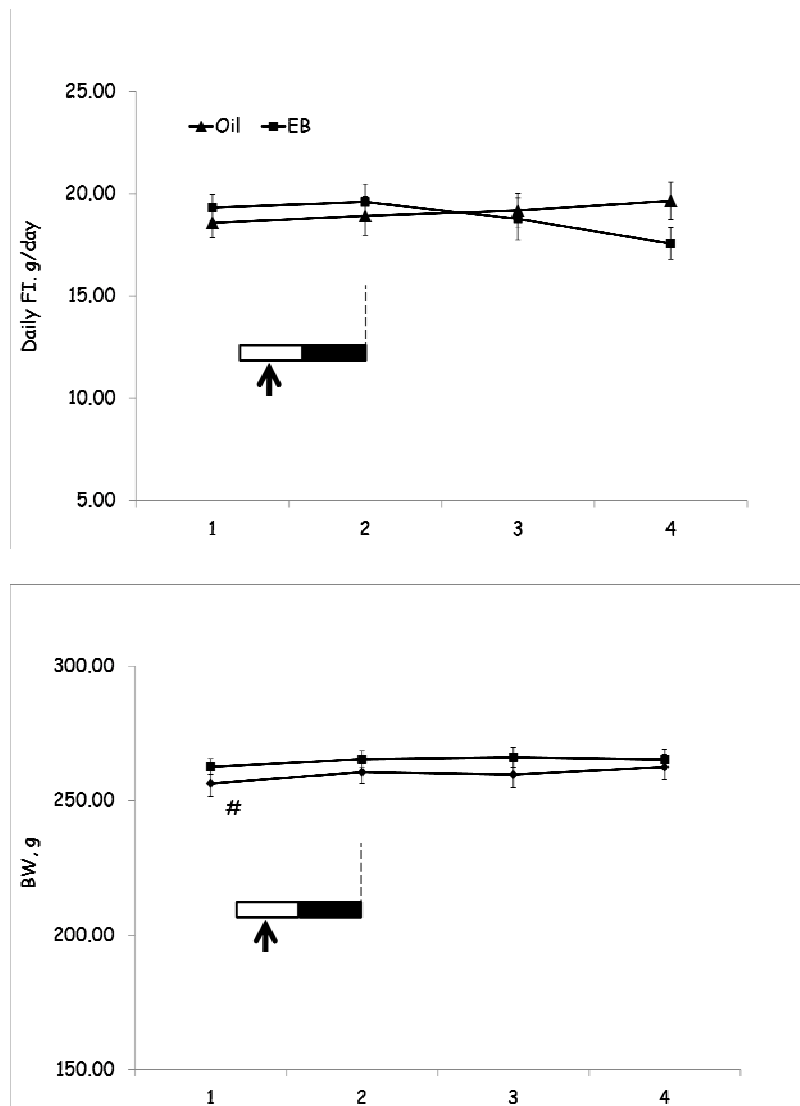


Fig 6 In 4 nM ICI hindbrain infusion group, (a, upper) daily FI from both oil (triangle) and EB (square) treatment groups was comparable. In addition, FI from EB treatment group slightly decreased across 4 days experiment; however, this was not significant. At day 4, FI from EB group was not significant different from control group. (b, lower) BW from both oil and EB treatment group increased significantly during 4 days experiment. Daily FI from each experimental day is the cumulative amount of FI from dark and light period (dark and white bars). The injection of oil or EB was done at mid-light phase of day 2 (arrow). # BW was increased significantly in oil treatment group across the experiment period, $P < 0.05$.

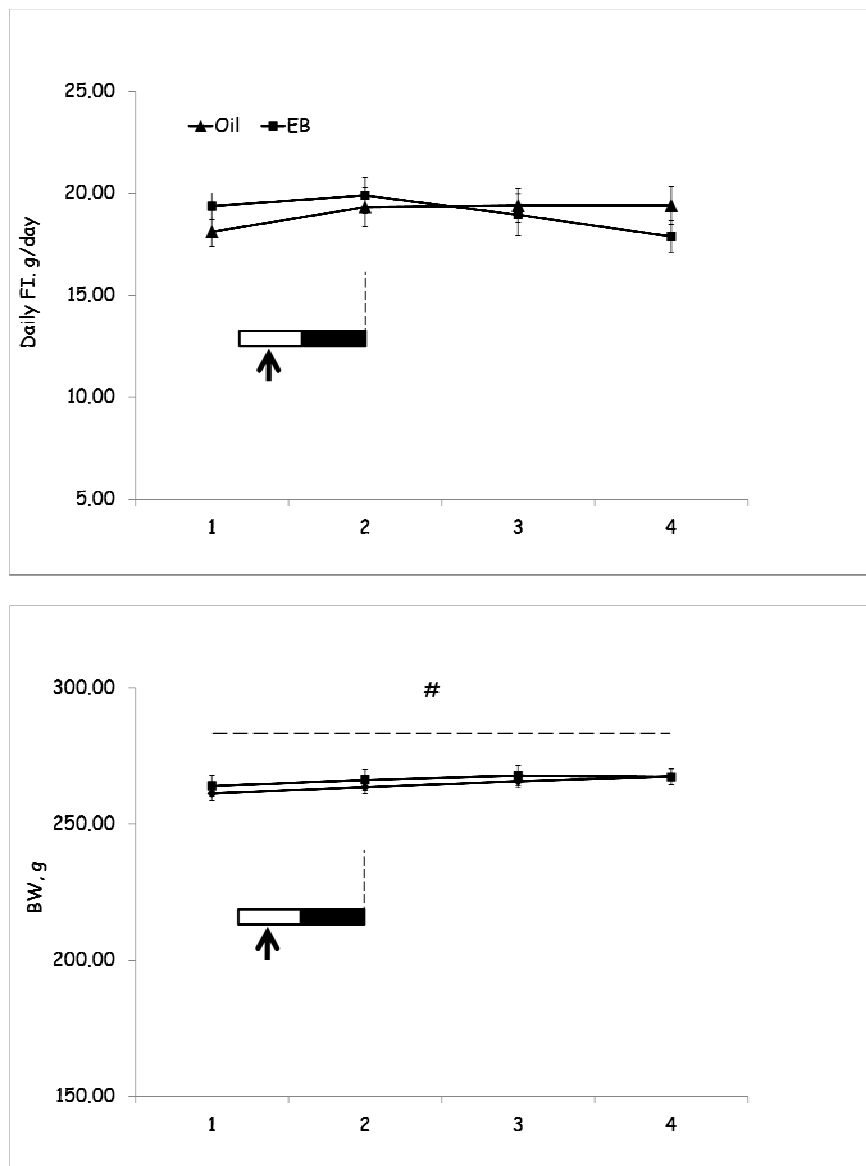


Fig 7 In 8 nM ICI hindbrain infusion group, (a, upper) daily FI from both oil (triangle) and EB (square) treatment groups was comparable. In addition, FI from EB treatment group slightly decreased across 4 days experiment; however, this was not significant. At day 4, FI from EB group was not significant different from control group. (b, lower) BW from both oil and EB treatment group increased significantly during 4 days experiment. Daily FI from each experimental day is the cumulative amount of FI from dark and light period (dark and white bars). The injection of oil or EB was done at mid-light phase of day 2 (arrow). # BW was increased significantly across the experiment period in both oil and EB treatment groups, $P < 0.05$.

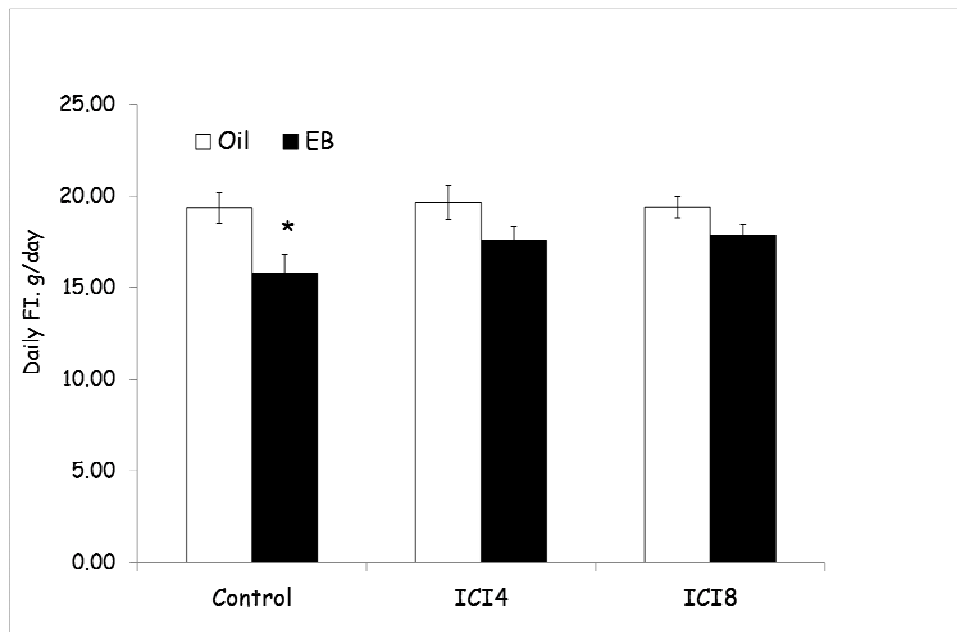


Fig 8 Daily FI at day 4 of experimental period from 1%DMSO, 4 nM and 8 nM hindbrain infusion groups treated with either oil or EB. There was significantly lower of FI in EB than in oil group in 1% DMSO hindbrain infusion. * Significant different FI , $P < 0.05$.

Experiment 3 The fourth ventricle continuous infusion of ICI and brain ER α expression

This experiment revealed a potential mechanism by which ICI attenuated E_2 effect of FI. First, hindbrain infusion of ICI alone had no effect of both FI (Fig 9a) and BW (Fig 9b). Daily FI was decreased significantly on the day after surgery ($F_{12,216} = 23.36$; $P < 0.05$). Importantly, FI from both groups were similar to the level before surgery by day 3 after surgery ($t_9 = 0.15$ and 0.86 ; $P < 0.05$). Moreover, daily FI from both 1%DMSO and 8 nM ICI hindbrain infusion groups were not significantly different throughout the experiment period ($F_{1,216} = 0.95$; $P > 0.05$). BW from both 1%DMSO and 8 nM ICI hindbrain infusion groups were not significantly different from each group ($F_{1,198} = 0.93$; $P > 0.05$) but increased throughout the experimental period ($F_{11,198} = 47.23$; $P < 0.05$).

Second, results from ER α IHC revealed that 8 nM ICI hindbrain infusion had no effect on the number of ER α positive neurons from forebrain sites (Fig 10) including PAO (Fig 10a, $t_9 = 0.92$; $P>0.05$), VMH (Fig 10b, $t_8 = 0.09$; $P>0.05$) and Arc (Fig 10c, $t_8 = 1.10$; $P>0.05$). Unfortunately, the same ER α IHC could not detect ER α positive neurons from hindbrain.

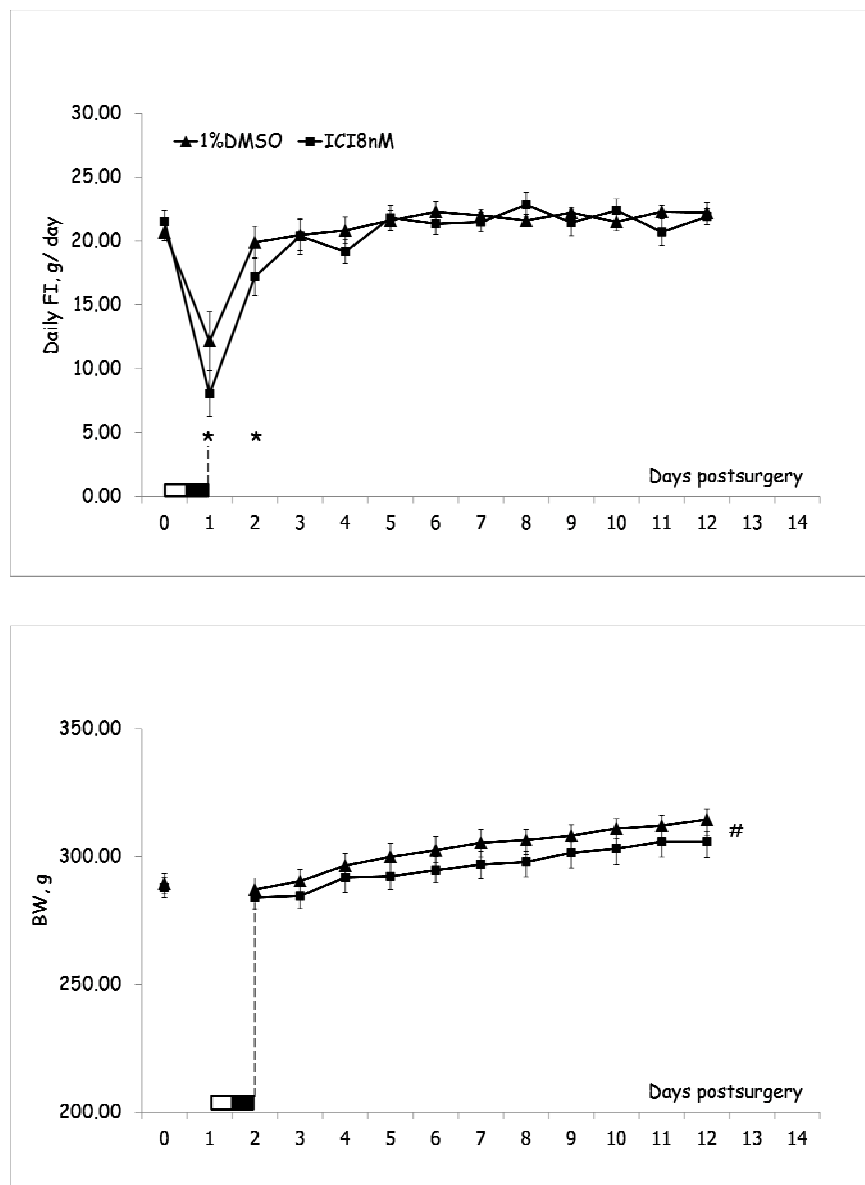


Fig 9 ICI hindbrain infusion didn't affect FI and BW in OVX rat. (a, upper) Daily FI throughout 12 days of 4th icv period. The effect of surgery was mark during 2 days after 4th icv. However, there was no different of FI between groups. (b, lower) BW recorded in the same day as FI. There was significant increase in BW over time but not between groups. * Significant different FI from presurgical day , $P<0.05$. # Significant increase in BW , $P<0.05$.

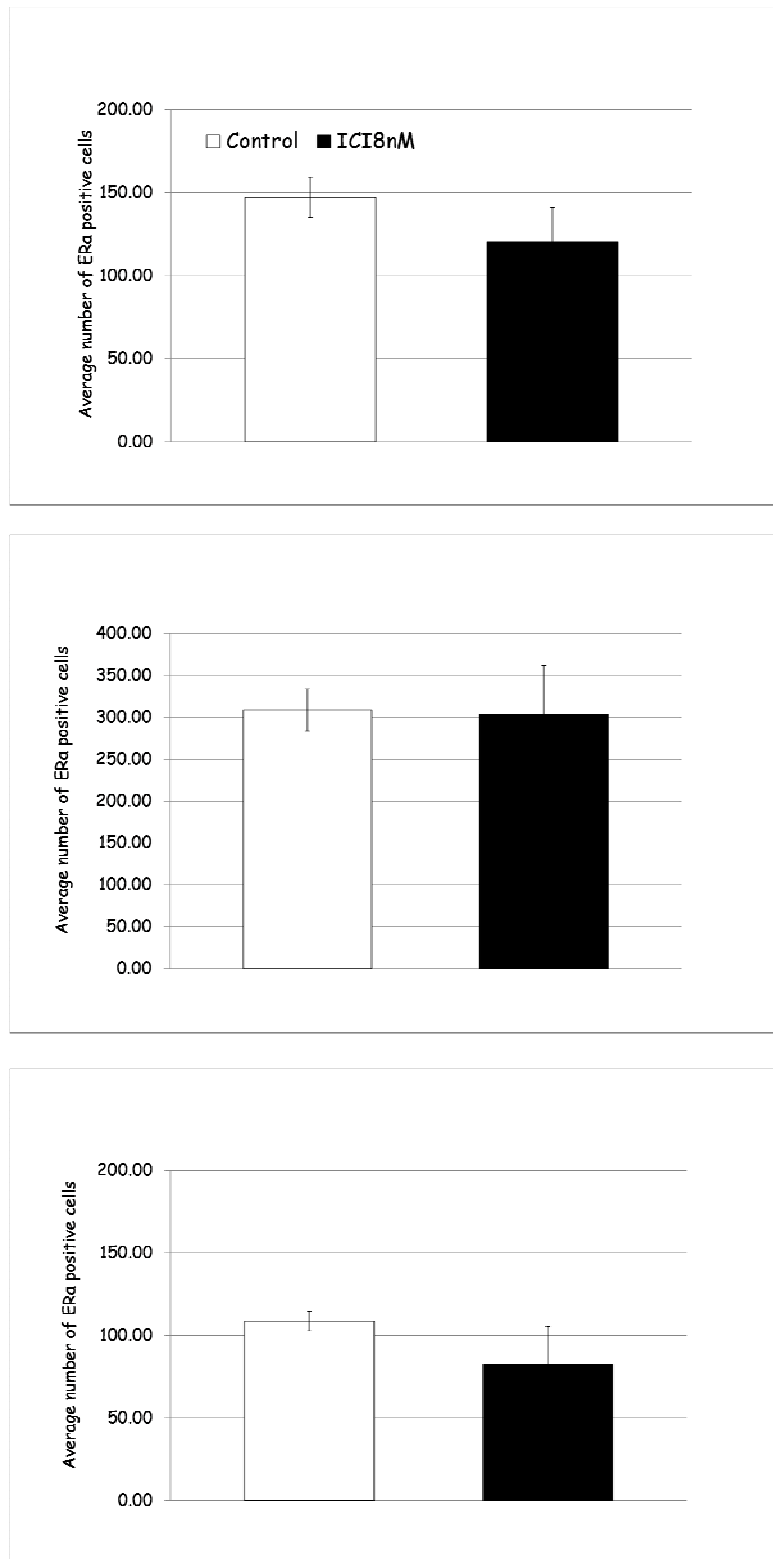


Fig 10 ICI hindbrain infusion didn't affect the number of ERα immunopositive cells at the selected hypothalamic forebrain: (a, upper) Medial preoptic nucleus (PAO), (b, center) Ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and (c, lower) Arcuate nucleus of hypothalamus (Arc).

DISCUSSION

Estrogens inhibit eating in female animals by activating ER in the brain. Both hypothalamic forebrain and the nucleus tractus solitarius of hindbrain appear to be the sites mediated this phenomena. The current experiment revealed that hindbrain infusion of the pure estrogen receptor antagonist, ICI, could attenuate E₂ effect on FI. Further, ICI hindbrain infusion didn't affect the number of ER α positive neuron form forebrain nuclei. The results suggested that ICI apparently attenuated E₂ effect on FI in hindbrain and that hindbrain nucleus is in part required for this action.

In the current experiment, we first showed the pattern of FI in ovarian intact female and exogenous E₂ supplemented OVX Wistar rats. In intact rat, we demonstrated that across the ovarian cycle there was a decrease in pattern of FI that has been reported previously (Asarian and Geary., 2002; Blaustein and Wade., 1976). We showed further that in OVX rat the cyclic injection of E₂ mimic eating pattern of intact female rat. Importantly, the effect from both endogenous E₂ fluctuation and exogenous E₂ supplementation was comparable. The results emphasized that with our condition we could replicate the physiological model of cyclic supplementation of E₂ on FI in OVX rat (Asarian and Geary., 2002). We then used this method as standard model to investigate the site and mechanism of E₂ effect on FI in the current experiment.

Several previous reports indicated that in female rat E₂ acts centrally in the brain to decrease FI. Administration of small E₂ to many hypothalamic nuclei of forebrain revealed the potential site(s) of E₂ on FI effect (Wade and Zucker, 1970; Nunes et al., 1980; Dagnault and Richard, 1997; Palmar and Gray, 1986; Butera and Beikirch, 1989; Hrupka et al., 2002; Santollo et al., 2011). However, it is unlikely that only hypothalamic nuclei are involved for estrogenic effect of FI. This is because

several investigations studied the effect of E₂ on CCK and feeding induced c-Fos suggested the participation of hindbrain on this action (Eckel and Geary, 2001; Eckel et al., 2002; Asarian and Geary, 2007). In addition, we showed directly that the activation of ER α at caudal NTS decreased FI (Thammacharoen et al., 2008). Therefore we think that the hindbrain NTS appeared to participate for this phenomenon as well. In the current experiment, we showed that ICI infusion to hindbrain could attenuate, but not complete block, the effect of E₂ on FI. This was consistent with the previous experiment that revealed the necessary of brain ER for FI effect of E₂. On those experiment the infusion of ICI directly to the lateral ventricle have been demonstrate to attenuate E₂ effect on FI as well (Rivera and Eckel., 2010). Further, we showed in the same experimental paradigm that hindbrain ICI infusion itself had no effect on FI across 12 days of infusion duration. Taken together we conclude that both lateral and 4th ventricle infusion of 4 nM ICI could attenuate E₂ effect on FI in OVX female rat. At this point, the current experiment does not disclose whether hindbrain ER require for E₂ effect on FI.

A long hydrophobic side chain of pure ER antagonist, ICI, has been shown to play the major role on the ER antagonist mechanisms (Osborne et al., 2000). The antiestrogenic action of ICI was different from other groups of the selective estrogen receptor modulator (SERM). Besides AF1 and AF2 ER transactivation blocking and dimerization impairment, ICI inhibit estrogenic action most importantly by promote ER degradation (Dauvois et al., 1992; Htun et al., 1999; Long and Nephew, 2006). Because most of the studies that investigate the mechanisms of ICI antagonist came from the experiment performed in cell culture condition, it is still difficult to conclude the detail mechanisms that ICI could block or attenuate any E₂ effect in vivo. One of the in vivo antagonist mechanism came from the measurement of [³H] labeled E₂ in

brain and uterus after ICI injection in Syrian hamster and rat. The results clearly demonstrated that ICI could decrease cell nuclear binding of [^3H] labeled E_2 up to 90% in rat and 50% in Syrian hamster (Wade et al., 1993a; Wade et al., 1993b). In the brain, the fluctuation of ER immunopositive neurons has been demonstrated across ovarian cycle in female rats (Shughrue et al., 1998; Child et al., 2001; Helena et al., 2006; MendozaGarces et al., 2011;). If ER degradation is one important mechanism of antiestrogenic effect of ICI, we would like to investigate the effect of ICI hindbrain infusion on the number of ER immunopositive neurons *in vivo* in our experimental condition. As expected we demonstrated that ER α immunopositive neurons from the forebrain hypothalamic nuclei (POA, VMH and Arc) were comparable between control and ICI hindbrain infusion at day 13 of ICI hindbrain infusion. Unfortunately, we could not see any ER immunopositive neurons with the same IHC technique from hindbrain NTS. The result suggested that infusion of ICI directly to hindbrain did not affect the number of ER from selected hypothalamic nuclei of forebrain. Whether hindbrain infusion of hindbrain could modify ER positive neurons from hindbrain NTS remain to be investigated.

Our current results are relevant to the identification of brain site(s) where E_2 decreases FI in female rat. We showed previously that the hindbrain NTS is sufficient for estrogenic control of FI in female rat (Thammacharoen et al., 2008). The attenuation effect of hindbrain ICI infusion on estrogenic effect of FI suggested that an anorexigenic effect of E_2 depends in part on the activation of ER α in the hindbrain.

REFERENCES:

- Arbogast LA. 2008. Estrogen genomic and membrane actions at an intersection. Trends Endocrinol Metab. 19(1). 1-2.
- Asarian L. 2006. Membrane estrogen receptors and energy homeostasis. The Journal of Neuroscience. 26(44). 11255-11256.
- Asarian L and Geary N. 1999. Cyclic estradiol treatment phasically potentiates endogenous cholecystokinin's satiating action in ovariectomized rats. Peptides. 20. 445-450.
- Asarian L and Geary N. 2002. Cyclic estradiol treatment normalized body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity. Horm Behav. 42. 461-471.
- Asarian L and Geary N. 2006. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. Phil. Trans. R. Soc. B. 361. 1251-1263.
- Asarian L and Geary N. 2007. Estradiol Enhances Cholecystokinin-Dependent Lipid-Induced Satiation and Activates Estrogen Receptor- α -Expressing Cells in the Nucleus Tractus Solitarius of Ovariectomized Rats. Endocrinology. 148(12). 5656-5666.
- BRFSS (Behavior risk factors surveillance system). 2010. US Obesity trends: trends by states 1985-2009.
- Behl C. 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. Nat Rev Neurosci. 3(6). 433-442.
- Berridge KC and Robinson TE. 2003. Parsing reward. Trends Neurosci. 26(9). 507-513.

- Berthoud HR. 2004. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiology & Behavior*. 81. 781-793.
- Blaustein JD. 2008. An estrogen by any other name. *Endocrinology*. 149(6). 2697-2698.
- Blaustein JD and Wade G. 1976. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiology & Behavior*. 17. 201-208.
- Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. 2004. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287(1). R87-96.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA and Carlquist M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 389(6652). 753-758.
- Butera PC. 2010. Estradiol and control of food intake. *Physiol and Behavior*. 99(2). 175-180.
- Butera PC and Beikirch RJ. 1989. Central implants of dilute estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats. *Brain Res*. 491. 266-273.
- Butera PC, Campbell RB and Bradway DM. 1993. Antagonism of estrogenic effects on feeding behavior by central implants of anisomycin. *Brain research*. 624. 354-356.
- Campfield LA and Smith FJ. 2003. Blood glucose dynamics and control of meal initiation: A pattern detection and recognition theory. *Physiol rev*. 83. 25-58.

- Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelsohn ME and Shaul PW. 2002. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Mol Endocrinol.* 16(5). 938-946.
- Chaudri O, Small C and Bloom S. 2006. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Phil Trans of The Royal Soc B.* 361(1471). 1187-1209.
- Chen Y and Heiman ML. 2001. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280(2). E315- E322.
- Childs GV, Unabia G, Komak S. 2001. Differential expression of estradiol receptors alpha and beta by gonadotropes during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem.* 49(5). 665-666.
- Clegg DJ, Riedy CA, Blake Smith KA, Benoit SC and Woods SC. 2003. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes.* 52. 682-687.
- Clegg DJ, Brown LM, Woods SC and Benoit SC. 2006. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes.* 55. 978-987.
- Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M and Geary N. 2007. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes.* 56(4). 1051-1058.
- Collins P and Webb C. 1999. Estrogen hits the surface. *Nat Med.* 5(10). 1130-1131.
- Couse JF and Korach K. 1999. Estrogen receptors null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocrine rev.* 20(3). 358-417.
- Cummings DE and Overduin J. 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest.* 117(1). 13-23.
- Czaja JA and Goy RW. 1975. Ovarian hormones and food intake in female guinea pigs and rhesus monkeys. *Horm Behav.* 6(4). 329-349.

- Dagnault A and Richard D. 1994. Lesion of hypothalamic paraventricular nuclei do not prevent the effect of estrogen on energy and fat balance. *Am J Physiol.* 267. E32-E38.
- Dagnault A and Richard D. 1997. Involvement of the medial preoptic area in the anorectic action of estrogen. *Am J Physiol.* 272. R311-317.
- Dauvois S, Danielian PS, White R, Parker MG. 1992. Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(9). 4037-4041.
- De Vries J, Strubbe JH, Wildering WC, Gorter JA and Prins AJ. 1993. Patterns of body temperature during feeding in rats under varying ambient temperatures. *Physiology & Behavior.* 53(2). 229-235.
- Delaunay F, Pettersson K, Tujague M and Gustafsson JA. 2000. Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Pharmacol.* 58(3). 584-590.
- Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. 2008. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(6). 1039-1049.
- Eckel LA and Geary N. 1999. Endogenous cholecystokinin's satiating action increase during estrus in female rats. *Peptides.* 20. 451-456.
- Eckel LA and Geary N. 2001. Estrogen treatment increase feeding-induced c-Fos expression in the brain of ovariectomized rats. *Am J Physiol.* 281. R738-R746.
- Eckel LA, Houpt TA and Geary N. 2000. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiology & Behavior.* 70. 397-405.

- Eckel LA, Houpt TA, and Geary N. 2002. Estradiol replacement increases CCK-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. *Am J Physiol.* 283. R1378-R1385.
- Even P and Nicolaidis S. 1985. Spontaneous and 2DG induced metabolic changes and feeding: the ischymetric hypothesis. *Brain Res Bull.* 15(4). 429-35.
- Filardo EJ and Thomas P. 2005. GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab.* 16(8). 362-367.
- Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. 2005. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA.* 293(15). 1861-1867.
- Friend DW. 1971. Self-selection of feeds and water by swine during pregnancy and lactation. *J Anim Sci.* 32(4). 658-666.
- Fu XD and Simoncini T. 2007. Non-genomic sex steroid actions in the vascular system. *Semin Reprod Med.* 25(3).178-186.
- Funakoshi T, Yanai A, Shinoda K, Kawano MM and Mizukami Y. 2006. G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun.* 346(3). 904-910.
- Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao X-B, Mobbs C, Shulman GI, Diano S and Horvath TL. 2007. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nature Medicine.* 13. (1). 89-94.
- Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y, Perez-Martin M and Darnaudéry M. 2007. Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology.* Suppl 1.S57-61.
- Geary N. 2001. Estrogen, CCK, and satiation. *Peptides.* 22. 1251-1263.

- Geary N. 2004. The estrogenic inhibition of eating, In: Handbook of behavioural neurobiology, 2nd edit volume 14, Stricker EM and Woods SC, editors. NY: Kluwer academic. 307-345.
- Geary N, Trace D, McEwen B and Smith GP. 1994. Cyclic estradiol replacement increases the satiety effect of CCK-8 in ovariectomized rats. *Physiology & Behavior*. 56(2). 281-289.
- Geary N, Smith GP and Corp ES. 1996. The increased satiating potency of CCK-8 by estradiol is not mediated by upregulation of NTS CCK receptors. *Brain Research*. 179. 179-186.
- Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW and Ogawa S. 2001. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER-alpha null mice. *Endocrinology*. 142(11). 4751-4757.
- Gong EJ, Garrel D and Calloway DH. 1989. Menstrual cycle and voluntary food intake. *Am J Clin Nutr*. 49(2). 252-258.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P and Chambon P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 320(6058). 134-139.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y and Shine J. 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*. 231(4742). 1150-1154.
- Hall JM and McDonnell DP. 2005. Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*. 5(6). 343-357.
- Helena CV, de Oliveira Poletini M, Sanvitto GL, Hayashi S, Franci CR, Anselmo-Franci JA. 2000. Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor

- expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *J Endocrinol.* 188(2). 155-165.
- Haupt KA, Coren B, Hintz HF and Hilderbrandt JE. 1979. Effect of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 174(10). 1083-1085.
- Hrupka BJ, Smith GP and Geary N. 2002. Hypothalamic implants of dilute estrogen fail to reduce feeding in ovariectomized rats. *Physiology & Behavior.* 77. 233-241.
- Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL. 1999. Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell.* 10(2). 471-486.
- Kalaitzidis D and Gilmore TD. 2005. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol. Metab.* 16(2). 46-52.
- Kawata M, Matsuda K, Nishi M, Ogawa H and Ochiai I. 2001. Intracellular dynamics of steroid hormone receptor. *Neurosci Res.* 40(3). 197-203.
- Kelly MJ and Rønnekleiv OK. 2008. Membrane-initiated estrogen signaling in hypothalamic neurons. *Mol Cell Endocrinol.* 290(1-2). 14-23.
- King WJ and Greene GL. 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature.* 307(5953). 745-747.
- Klein DA and Walsh BT. 2004. Eating disorders: clinical features and pathophysiology. *Physiol & Behavior.* 81(2). 359-374.
- Klinge CM. 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic acids Research.* 29(14). 2905-2919.

- Kow LM and Pfaff DW. 2004. The membrane actions of estrogens can potentiate their lordosis behavior-facilitating genomic actions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(33). 12354-12357.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(12). 5925-5930.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiao AK, Uht RM and Webb P. 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74(5). 311-317.
- Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C and Rivest S. 1998. Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol.* 36(3). 357-378.
- Lavery DN and McEwan IJ. 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem. J.* 391(Pt 3). 449-464.
- Leung SW, Teoh H, Keung W and Man RY. 2007. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(8). 822-826.
- Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM and Dunn-Meynell AA. 2004. Neuronal glucosensing: what do we know after 50 years? *Diabetes.* 53(10). 2521-2528.
- Liang Y-Q, Akishita M, Kim S, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Yoshizumi M and Ouchi Y. 2002. Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J of Obesity.* 26. 1103-1109.

- Linden A, Uvnas-Moberg K, Forsberg G, Bednar I and Sodersten P. 1990. Involvement of cholecystokinin in food intake: III. Oestradiol potentiates the inhibitory effect of cholecystokinin octapeptide on food intake in ovariectomized rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 2. 797-801.
- Long X, Nephew KP. 2006. Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor- α . *J Biol Chem*. 281(14). 9607-9615.
- Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G and Baldi E. 2004. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids*. 69(8-9). 553-559.
- Lyons PM, Truswell AS, Mira M, Vizzard J and Abraham SF. 1989. Reduction of food intake in the ovulatory phase of the menstrual cycle. *Am J Clin Nutr*. 49(6). 1164-1168.
- Marty N, Dallaporta M and Thorens B. 2007. Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda)*. 22. 241-251.
- McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME and Pike JW. 1995. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 9(6). 659-669.
- McEwan BS, Akama K, Alves S, Brake WG, Bulloch K, Lee S, Li C, Yuen G and Milner TA. 2001. Tracking the estrogen receptor in neurons: implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(13). 7093-7100.
- Mendelsohn ME. 2000a. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 74(5). 337-343.

- Mendelsohn ME. 2000b. Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean? *Circ Res.* 87(11). 956-960.
- Mendez P, Azcoitia I and Garcia-Segura LM. 2005. Interdependence of oestrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. *J Endocrinol.* 185(1). 11-17.
- Mendoza-Garcés L, Mendoza-Rodríguez CA, Jiménez-Trejo F, Picazo O, Rodríguez MC, Cerbón M. 2011. Differential expression of estrogen receptors in two hippocampal regions during the estrous cycle of the rat. *Anat Rec (Hoboken).* 294(11). 1913-1919.
- Milner TA, McEwen BS, Hayashi S, Li CJ, Reagan LP and Alves SE. 2001. Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol.* 429(3). 355-371.
- Milner TA, Ayoola K, Drake CT, Herrick SP, Tabori NE, McEwen BS, Warriar S and Alves SE. 2005. Ultrastructural localization of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat hippocampal formation. *J Comp Neurol.* 491(2). 81-95.
- Mitra SW, Hoskin E, Yudlovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS and Alves SE. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor α . *Endocrinology.* 144(5). 2055-2067.
- Moller DE and Kaufman KD. 2005. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med.* 56. 45-62.
- Musatov S, Chen W, Pfaff DW, Kaplitt MG and Ogawa S. 2006. RNAi-mediated silencing of estrogen receptor α in the ventromedial nucleus of hypothalamus

- abolishes female sexual behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(27). 10456-10460.
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M and Gustafsson JA. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 81(4). 1535-1565.
- Nunez AA, Gray JM and Wade GN. 1980. Food intake and adipose tissue lipoprotein lipase activity after hypothalamic estradiol benzoate implants in rats. *Physiology & Behavior*. 25. 595-598.
- Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. 2000. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol*. 18(17). 3172-3186.
- Palmaer K and Gray JM. 1986. Central vs. peripheral effects of estradiol on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiology & Behavior*. 37. 187-189.
- Parsons B, Rainbow TC, Pfaff DW and McEwen BS. 1982. Hypothalamic protein synthesis essential for the activation of the lordosis reflex in the female rat. *Endocrinology*. 110(2). 620-624.
- Paxinos and Watson. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordination*, 4th edition. Academic Press Inc, USA. 474PP.
- Pedram A, Razandi M and Levin ER. 2006. Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol*. 20(9). 1996-2009.
- Pelleymounter MA, Beker MB and McCaleb M. 1999. Does estradiol mediate leptin's effect on adiposity and body weight? *Am. J. Physiol*. 276. E955-E963.
- Perissi V and Rosenfeld MG. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(7). 542-554.

- Pfaff D. 2005. Hormone-driven mechanisms in the central nervous system facilitate the analysis of mammalian behaviours. *J Endocrinol.* 184(3). 447-453.
- Pietras RJ and Márquez-Garbán DC. 2007. Membrane-associated estrogen receptor signaling pathways in human cancers. *Clin Cancer Res.* 13(16). 4672-6.
- Pike AC. 2006. Lessons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20(1).1-14.
- Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA and Hathaway HJ. 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol.* 70. 165-90.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB and Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307(5715). 1625-1630.
- Rivera HM and Eckel LA. 2010. Activation of central, but not peripheral, estrogen receptor is necessary for estradiol's anorexigenic effect in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 151 (12). 5680-5688.
- Roesch DM. 2006. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiology & Behavior.* 87. 39-44.
- Ronnekleiv OK, Malyala A and Kelly MJ. 2007. Membrane-initiated signaling of estrogen in the brain. *Semin Reprod Med.* 25(3). 165-177.
- Safe S. 2001. Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm.* 62. 231-52.
- Santollo J, Wiley MD and Eckel LA. 2007. Acute activation of ER{alpha} decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293(6). R2194- R2201.

- Santollo J, Torregrossa AM, Eckel LA. 2011. Estradiol acts in the medial preoptic area, arcuate nucleus, and dorsal raphe nucleus to reduce food intake in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 60(1). 86-93.
- Saper CB, Chou TC and Elmquist JK. 2002. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron.* 36(2). 199-211.
- Schlenker EH and Hansen SN. 2006. Sex-specific densities of estrogen receptors alpha and beta in the subnuclei of the nucleus tractus solitarius, hypoglossal nucleus and dorsal vagal motor nucleus weanling rats. *Brain Res.* 1123(1).89-100.
- Shimomura K, Shimizu H, Tsuchiya T, Abe Y, Uehara Y and Mori M. 2002. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endocr J.* 49(4). 417-423.
- Shughrue PJ, Lane MV and Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and $-\beta$ mRNA in the rat central nervous system. *The J. of Comp Neuro.* 388. 507-525.
- Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I. 1998. Evidence for the colocalization of estrogen receptor-beta mRNA and estrogen receptor-alpha immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinology.* 139(12). 5267-5270.
- Song RX. 2007. Membrane-initiated steroid signaling action of estrogen and breast cancer. *Semin Reprod Med.* 25(3). 187-197.
- Thaler JP and Cummings DE. 2008. Metabolism: food alert. *Nature.* 452(7190). 941-942.
- Thammacharoen S, T A Lutz, N Geary and L Asarian. 2007. Anomalously rapid effect of the estrogen receptor- α agonist PPT on food intake in ovariectomized rats. *Appetite.* 49 (1). 334.

- Thammacharoen S, T A Lutz, N Geary and L Asarian. 2008. Hindbrain administration of estradiol inhibit feeding and activate ER α -expressing cells in the NTS of ovariectomized rats. *Endocrinology*. 149(4). 1609-1617.
- Thammacharoen S, T A Lutz, N Geary and L Asarian. 2009. Divergent effects of estradiol and the estrogen receptor- α agonist PPT on eating and activation of PVN CRH neurons in ovariectomized rats and mice. *Brain research*. 1268. 88-96.
- Toran-Allerand CD. 2004. A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? *Endocrinology*. 145(3). 1069-1074.
- Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES Jr, Nethrapalli IS and Tinnikov AA. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci*. 22(19). 8391-8401.
- Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW and McDonnell DP. 1994. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol*. 8(1). 21-30.
- Vasudevan N, Kow LM and Pfaff D. 2005. Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in the brain. *Steroids*. 70(5-7). 388-396.
- Wade GN and Zucker I. 1970. Modulation of food intake and locomotor activity in female rats by diencephalic hormone implants. *J Comp Physiol Psychol*. 72(2). 328-336.
- Wade GN, Blaustein JD, Gray JM, Meredith JM. 1993a. ICI 182,780: a pure antiestrogen that affects behaviors and energy balance in rats without acting in

- the brain. *Am J Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 265. R1392-R1398.
- Wade GN, Powers JB, Blaustein JD, Green DE. 1993b. ICI 182,780 antagonizes the effects of estradiol on estrous behavior and energy balance in Syrian hamsters. *Am J Physiol.* 265(6 Pt 2). R1399-R1403.
- Warnmark A, Treuter E, Wright AP and Gustafsson JA. 2003. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 17(10).1901-1909.
- Welshons WV, Lieberman ME and Gorski J. 1984. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature.* 307(5953). 747-749.
- Woods SC, Schwartz MW, Baskin DG and Seeley RJ. 2000. Food intake and the regulation of body weight. *Annu Rev Psychol.* 51. 255-277.
- Woods SC, Gotoh K and Clegg DJ. 2003. Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med.* 228. 1175-1180.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลการทดลองที่เสนอในรายงานฉบับสมบูรณ์นี้ส่วนหนึ่งได้ถูกนำเสนอแล้วในการประชุม “นักวิจัยใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 13 ประจำปี 2556 ในรูปแบบโปสเตอร์ (P-BIO-I25) ดังรายละเอียดบทคัดย่อและโปสเตอร์ที่นำเสนอในภาคผนวก และผู้วิจัยอยู่ระหว่างการดำเนินการจัดทำต้นฉบับสำหรับการส่งให้แก่วารสารเพื่อการพิจารณาตีพิมพ์

ภาคผนวก

Hindbrain infusion of estrogen receptor antagonist attenuated estradiol effect on food intake in ovariectomized (OVX) rat

Thammacharoen S^{1*}, Suwanapaporn P¹, Kitchanukitwattana P¹ and Chaiyabutr N^{1,2}

¹ Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

² Queen Saovabha Memorial Institute, The Thai Red Cross Society, Bangkok 10330, Thailand.

Abstract

Estrogen (E₂) inhibits food intake by activating estrogen receptor within the brain. We showed that activated hindbrain ER α , by E₂ implantation, is sufficient to inhibit eating in OVX rats. To investigate that hindbrain ER α is required for estrogenic control of eating, ICI infusion to the 4th intracerebroventricular (4th icv) was performed to test the inhibition effect of estrogen on food intake.

We first demonstrated the effect of E₂ on food intake in our condition. Female intact Wistar rat showed clear typical pattern of eating across the ovarian cycle. Estradiol benzoate (EB) treatment in OVX rats decreased food intake significantly. The results revealed that exogenous E₂ mimic eating pattern as in female intact rat. We demonstrated next that the 4th icv infusion of 4nM and 8nM ICI could attenuate the effect of EB on food intake. On day 4 of the EB treatment regimen, there was significant lower daily food intake from EB than from oil treatment in DMSO 4th ICV group. However, the effect of EB on food intake was compromised from both 4nM and 8nM ICI groups. These results support previous report that central infusion of ICI could attenuate estradiol's anorexigenic effect. Importantly, the current results also suggested that hindbrain appear to be the site required for estrogenic effect of food intake. In conclusion, the hindbrain infusion of ICI attenuated the exogenous estrogenic effect on food intake in female rat.

Keywords: ICI, female rat, food intake

*Corresponding author

Tel.: 02-2189740; Fax: 02-2251209

E-mail: sprueksagorn@hotmail.com



Hindbrain infusion of Estrogen receptor antagonist attenuated estrogenic effect on food intake in ovariectomized rats.

S Thammacharoen*, P Suwanapaporn, P Kitchanukitwattana and N Chaiyabutr

Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University



INTRODUCTION

Estradiol (E_2) inhibits food intake by activating estrogen receptor within the brain. In female rat and other species, daily food intake (FI) decreases during the peri-ovulatory phase of the ovarian cycle. Disruption of the ovarian cycle by ovariectomy increases FI and body weight (BW). Exogenous E_2 is sufficient to restore normal eating behavior and BW after ovariectomy.

We showed that caudal nucleus of tractus solitarius (cNTS) is one of the important brain site for the estrogenic effect on eating behavior (1). In addition, infusion of estrogen receptor antagonist (ICI 182780, ICI) into the lateral ventricle has been shown to inhibit the effect of E_2 on FI (2). In light of our results, ICI infusion directly to hindbrain via the 4th intracerebroventricular (4th icv) was performed to test the inhibition effect of E_2 on FI and its potential mechanism.

AIM OF THE PRESENT STUDY

To investigate whether the ER α of hindbrain required for the estrogenic effect of FI.

MATERIALS AND METHODS

The first experiment aimed to replicate the effect of E_2 on FI in our condition. Intact female wistar rats were observed for the pattern of FI during ovarian cycle. Normal 4 days cycle (diestrus 1&2 = D1&D2, proestrus = P and estrus = E) was selected for this experiment. After the success of 2-3 cycle records, the effect of exogenous E_2 on FI and BW (estradiol benzoate, EB 2 μ g/rat x.r. at the mid light phase) was investigated in ovariectomized (OVX) rat. According to the 4-day of ovarian cycle, the day of EB injection corresponded to D2 and defined as day 2 of treatment. FI effect was demonstrated in the second night after treatment and defined as day 4 of treatment or estrus day in intact rat (3).

The second experiment was performed to test that hindbrain infusion of ICI could block E_2 effect on FI. OVX rat (n=10 per groups) was infused with ICI (4 or 8 nM) or vehicle (1% DMSO) directly via 4th icv connected with osmotic pump (Alzet[®], OPI002). The pump was designed to deliver the solution across 14 days with the flow rate of 0.25 μ l/hr. At the midnight phase of day 6 post-surgery, each of infusion groups was injected with either E_2 or vehicle. Injections were reversed at day 12 post-surgery (Fig1). FI and BW were monitored throughout the experimental period.

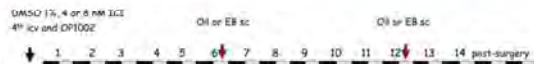


Fig 1 Experimental days (dark/light phase/black/white bars) after 4th icv and osmotic pump infusion (black arrow). Rats in each group received oil or EB injection on day 6 and 12 (red arrows). FI and BW were monitored throughout the experimental period. With this method, the expected days of estrus were day 8 and 14.

Because hindbrain ICI infusion could attenuate E_2 effect on FI in the second experiment and because one of the major mechanisms that ICI could block estradiol effect is to promote ER degradation, we then studied the potential mechanisms of hindbrain ICI infusion to antagonist E_2 effect. This experiment was performed using 2 groups of OVX rat (8 nM and vehicle 4th icv) as described previous. FI and BW were monitored 13 days post-surgery. At day 13 post-surgery, all rats were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. After perfusion, brain was collected and processed for hind and fore brain ER α immunohistochemistry (IHC) evaluation.

RESULTS

The first experiment revealed the effect of endogenous and exogenous E_2 on FI in female rat. During ovarian cycle, intact female rats showed significant decreased pattern of FI (Fig2a). In OVX rat, EB treatment also decreased FI significantly (Fig2a). The difference of FI between D1 and E in the intact rat and between day 1 and day 4 of EB treatment days was not significantly different (Fig2b). The results suggested that in our condition the treatment regimen of exogenous E_2 could mimic the pattern of FI during ovarian cycle of intact rat.

In the second experiment, continuous administration of ER antagonist directly into hindbrain via the 4th icv revealed that both 4 and 8 nM ICI could attenuate E_2 effect of FI. In 1%DMSO hindbrain infusion group, FI from EB treated group was significant lower than from oil treated group (Fig3). However, FI from both 4 and 8 nM ICI hindbrain infusion groups were not significantly different between oil and EB treatment (Fig3).

The last experiment revealed potential mechanism that ICI hindbrain infusion could attenuate E_2 effect on FI. First, thirteen days infusion of 8 nM ICI to hindbrain had no effect of daily FI (Fig 4). Second, there were no significant different in the number of ER α positive cells at different area in the forebrain (Fig 5). However, the same IHC technique could not identify ER α positive cell from hindbrain.

RESULTS

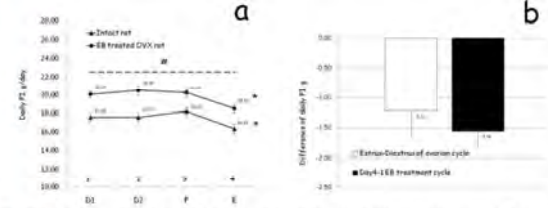


Fig 2 (a) Daily FI from cyclic intact rat and EB treated OVX rat (b) The effect of endogenous and exogenous E_2 on FI. * Significant lower FI at E or day 4 than at day 1/2 or D1/D2, P<0.05

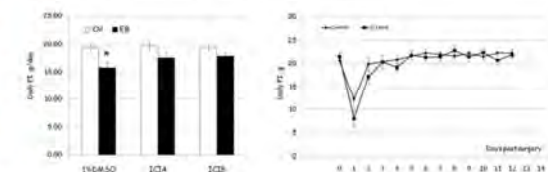


Fig 3 Daily FI from day 4 of EB treatment days between oil (white bar) and EB (black bar) treated groups. Three groups of hindbrain infusion were control (1% DMSO) and 4 nM (ICI4) and 8 nM (ICI8) treatment groups. Fig 4 Daily FI during 13 days of 1%DMSO and 8nM ICI hindbrain infusion. Rat from both group had comparable of daily FI before surgical implantation of cannula (day 0). The surgical effect on FI was marked at day 1. However, FI from both group were recovered and had comparable level at day 3 and 4.

* Significant lower FI than oil treated group; P<0.05



Fig 5 Average number of ER α positive cells at different area in the forebrain. Medial preoptic nucleus (MPO), Arcuate nucleus of hypothalamus (Arc) and Ventromedial nucleus of hypothalamus (VMH).

DISCUSSION

We have showed previously that hindbrain is a sufficient site for the estrogenic control of FI in female rat (1). In this experiment, we showed the potential effect of hindbrain infusion of estrogens antagonist to block estrogenic effect on FI. Continuous ICI hindbrain infusion (both 4 and 8 nM) appeared to attenuate estrogenic effect on FI. Importantly, infusion of 8nM ICI alone had no effect of FI across the experimental period. The results extend the previous finding that ICI infusion to the lateral ventricle could attenuate estradiol's anorexic effect (2). Further, the effect of ICI hindbrain infusion apparently limited to its effect on hindbrain ER α . If forebrain ER α is the main target neurons that mediate estradiol's anorexic effect, we should see the significant effect of EB treatment on FI in both vehicle and ICI hindbrain infusion. This is because there were no different of ER α positive cell from forebrain nuclei from both vehicle and ICI hindbrain infusion. Unfortunately, we couldn't demonstrated ER α positive cell from hindbrain with the same IHC technique. Whether ICI attenuated E_2 by increased degradation of hindbrain ER α remains to be investigated.

In conclusion, we demonstrated previously that hindbrain is sufficient for estrogenic control of FI. The current results suggested that hindbrain is in part required for estrogenic control of eating in female rat.



This work was supported by Grant from the Thailand Research Fund, The Higher Education Commission and Chulalongkorn University (6605480242 N.S.).
References (1) Thammacharoen, S. et al. Endocrinology 149(4): 1609-1617. (2) Rivera, H.M. and Eckel, L.A. 2010. Endocrinology 151(12): 5680-5688. (3) Asanori, L. and Geary, N. 2002. Horm Behav 42: 461-471.