

多巴胺调控 CART 对缺血性脑卒中的保护作用

俞茹云¹, 林莉莉^{2*}, 林 彬¹

(¹ 无锡卫生高等职业技术学校护理系, ² 药理学系, 江苏 无锡 214028)

[摘要] 目的: 探索多巴胺(dopamine, DA)和可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptides, CART)对缺血性脑卒中的作用及调控机制。方法: 利用大鼠急性缺血性脑损伤模型, 通过外源性给药, 测定神经功能缺损评分、脑梗死体积和炎症小体活化, 阐明 DA 和 CART 在急性缺血性脑损伤中的表达和作用。结果: DA 和 CART 均能降低急性缺血性脑损伤大鼠的神经功能缺损评分和脑梗死体积, 抑制炎症小体的活化, 并且 CART 的表达受到 DA 的调控。结论: DA 通过 CART 减少炎症小体活化, 对缺血性脑卒中产生保护作用。

[关键词] 多巴胺; 可卡因-苯丙胺调节转录肽; 急性缺血性脑损伤; 炎症小体

[中图分类号] R743.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)09-1221-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150907

The protective effects of dopamine on ischemic stroke by regulation of CART

Yu Ruyun¹, Lin Lili^{2*}, Lin Bin¹

(¹Department of Nursing, ²Department of Pharmacology, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China)

[Abstract] Objective: To explore the function and regulation mechanism of dopamine(DA)and cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptides(CART)in ischemic stroke. **Methods:** The acute ischemic stroke model in rat was established, accompanied with administration of DA and CART. The neurological deficit scores, infarct volume, and inflammasome activity were detected to clarify the role of DA and CART in acute ischemic. **Results:** DA and CART reduced neurological deficit scores and infarct volumin in rats with acute ischemic stroke, and inhibited the activation of the inflammasome by reducing Caspase-1 and IL-1 β secretion. Moreover, the expression of CART is regulated by DA. **Conclusion:** Dopamine can reducing inflammasome activity to protect ischemic stroke by regulation of CART.

[Key words] dopamine; cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptides; acute ischemic stroke; inflammasome.

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(09): 1221-1224]

脑卒中是一种高发病率、高致残率及高复发率的神经系统疾病, 缺血性卒中是其最主要的形式。脑缺血时脑内多种神经递质的释放紊乱, 其中包括重要的神经递质多巴胺(dopamine, DA)^[1]。已知 DA 参与调节情绪反应和运动等多种生理功能, 但 DA 在缺血性脑损伤中的作用仍有争议。一种观点认为, 过度聚积的 DA 能产生神经毒性, 另一观点认为 DA 通过 DA 受体参与缺血后的神经保护作用^[2-3]。

可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptides, CART) 是近

年来确认的一种多功能分泌型神经肽, 参与神经内分泌调节、神经营养和应激反应等多种生理功能^[4]。部分研究证实 CART 在脑卒中中具有积极的神经保护作用^[5], 但具体的调控机制仍未阐明。本研究通过构建大鼠的大脑中动脉栓塞(middle cerebral arterial occlusion, MCAO)模型, 对 DA 和 CART 在缺血性脑卒中的作用和机制进行探索。

1 材料和方法

1.1 材料

戊巴比妥钠、左旋多巴和四氮唑红(TTC)等试剂(Sigma 公司, 美国), CART(Phoenix pharmaceuti-

[基金项目] 无锡市卫生局科技支撑项目(ML201315)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lyly567@sina.com

cals 公司, 美国), Caspase-1 和 IL-1 β ELISA 试剂盒 (上海麦约尔生物公司), DA 检测试剂盒 (IBL 公司, 德国), 其他常用试剂购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物和实验分组

健康雄性清洁级 SD 大鼠 (体重 200~300 g, 上海斯莱克动物实验中心), 维持室温 (25 \pm 5) $^{\circ}$ C 和湿度 (40 \pm 60)%, 昼夜交替 12 h, 自由进水进食。50 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组、急性脑缺血损伤模型组、DA 干预组和 CART 干预组。

1.2.2 大鼠 MCAO 模型建立和药物干预

异氟烷气体麻醉大鼠, 皮肤消毒, 暴露颈总动脉以及颈内、外动脉, 从颈外动脉插入特制栓线, 经颈内动脉进入颅内, 插入深度从分叉处算起。此时, 轻微的阻力表明栓线的顶端已位于大脑前动脉的近端, 阻塞了同侧大脑中动脉的起源, 激光多普勒血流仪监测局部脑血流, 确定梗死后立即注射生理盐水、DA 和 CART。DA 组腹腔注射 20 mg/kg DA, CART 组尾静脉注射 1 μ g/kg CART 进行干预, 2 h 后将栓线轻轻拔出。

1.2.3 神经功能缺损评分

本研究中的大鼠神经功能缺损在 MCAO 后 24 h 测定, 采用 Longa 法评分, 判断标准为 0 分: 神经功能正常; 1 分: 左前肢无法伸直; 2 分: 出现自发性左转; 3 分: 无法正常行走, 出现左倾; 4 分: 丧失正常意识状态。MCAO 法建模后神经功能缺损评分 > 2 分视为建模成功。

1.2.4 脑梗死体积测定

行神经功能缺损评分后, 麻醉处死大鼠, 分离大脑, TTC 染色固定, 相同距离下使用数码相机拍照, 梗死体积使用分析软件 Image Pro Plus 6.0 完成, 计算公式为脑梗死体积 (%) = [LT - (RT - RI)] / LT \times 100% (LT: 左侧大脑半球面积; RT: 右侧大脑半球面积; RI: 梗死部分面积)。

1.2.5 ELISA 法测定 DA、caspase-1 和 IL-1 β 含量

动物颈椎脱臼处死, 冰上迅速分离脑组织, 取半暗带检测区域, 按 100 mg 组织加入 100 μ L 匀浆液匀浆后, 离心后取上清液进行检测。根据 ELISA 试剂盒的说明书进行操作, 分别检测 DA、caspase-1 和 IL-1 β 含量。

1.2.6 蛋白印迹分析检测 CART 表达

蛋白提取物经定量后, 各组取等量蛋白加入上样缓冲液并变性, 行 SDS-PAGE 垂直电泳, 转膜, 牛奶封闭, 分别加 CART 抗体 (内参为 GAPDH 抗体),

4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗孵育, 奥德赛红外扫描仪扫描。

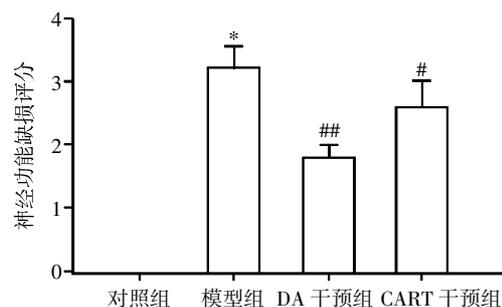
1.3 统计学方法

数据分析使用 Graphpad Prism 5.0 统计软件, 数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采取 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DA 和 CART 降低 MCAO 大鼠的神经功能缺损

通过大脑中动脉栓塞法建立急性缺血性脑损伤模型, 在给予 DA 和 CART 干预后, 神经功能缺损评分结果显示 (图 1), 与正常对照组相比较, 模型组的缺损评分为 3.12 ± 0.21 ($P < 0.01$); DA 和 CART 干预均能显著改善神经功能缺损, 其中 DA 干预组下降到 1.86 ± 0.19 (与模型组比较, $P < 0.01$), CART 干预组下降到 2.48 ± 0.25 (与模型组比较, $P < 0.05$)。



与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n=10$ 。

图 1 各组急性脑缺血损伤大鼠的神经功能缺损评分

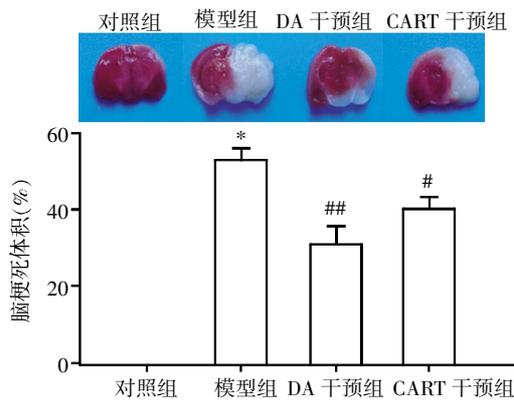
Figure 1 The neurologic impairment score in acute cerebral ischemia injury rats

2.2 DA 和 CART 降低 MCAO 的脑梗死体积

大鼠 MCAO 24 h 后, 分离各组大鼠的脑组织, 检测脑梗死体积, 与正常对照组相比较, 模型组脑梗死体积为 (48.60 \pm 3.10)% ($P < 0.01$); DA 和 CART 的干预均能显著降低脑梗死体积, 其中 DA 干预组下降到 (29.10 \pm 6.55)% ($P < 0.01$), CART 干预组下降到 (36.2 \pm 4.03)% ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 DA 和 CART 抑制急性脑缺血损伤大鼠脑内炎症小体活化

炎症小体是指感受经由 NOD 样受体 (NLR) 传导细胞内信号的一类多蛋白复合物, 会被多种病理因素包括组织损伤激活, 其主要组成包括 Caspase-1 和炎性细胞因子如 IL-1 β ^[6]。本研究检测了 DA 和 CART 对急性脑缺血损伤大鼠脑内的炎症小体 Caspase-1 和 IL-1 β 的影响, 结果显示: 模型组脑内的 Caspase-1 和 IL-1 β 浓度显著上调, 而 DA 和 CART 能



与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n=10$ 。

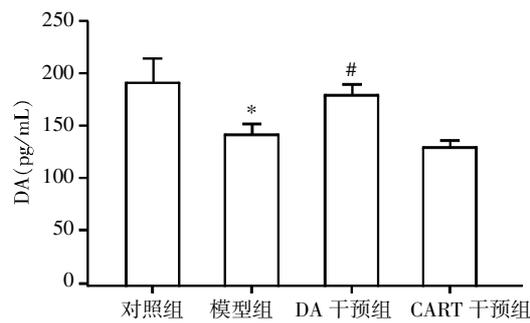
图 2 MCAO 大鼠的脑梗死体积比较

Figure 2 The cerebral infraction volum in MCAO rats

抑制了脑内的 Caspase-1 和 IL-1 β 分泌 (图 3A、B)。因此我们认为 DA 和 CART 能够显著抑制急性脑缺血损伤大鼠脑内的炎症小体活化。

2.4 CART 对 MCAO 大鼠脑内 DA 的影响

为探索 DA 和 CART 的上下游调控关系, 本研究检测了各组大鼠脑内的 DA 含量, 结果显示 (图 4), 与正常对照组比较, 模型组 DA 明显减少, 为 $(146.9 \pm 10.5) \text{pg/mL}$ ($P < 0.01$); DA 干预组的 DA 含量上升为 $(189.6 \pm 8.1) \text{pg/mL}$ ($P < 0.01$)。而 CART 干预组的 DA 含量为 $(131.2 \pm 7.9) \text{pg/mL}$, 与模型组无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 CART 不影响 MCAO 大鼠脑内 DA 浓度。



与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, # $P < 0.01$; $n=10$ 。

图 4 各组 MCAO 大鼠脑内的 DA 含量比较

Figure 4 Content of dopamine in brain in MCAO rats

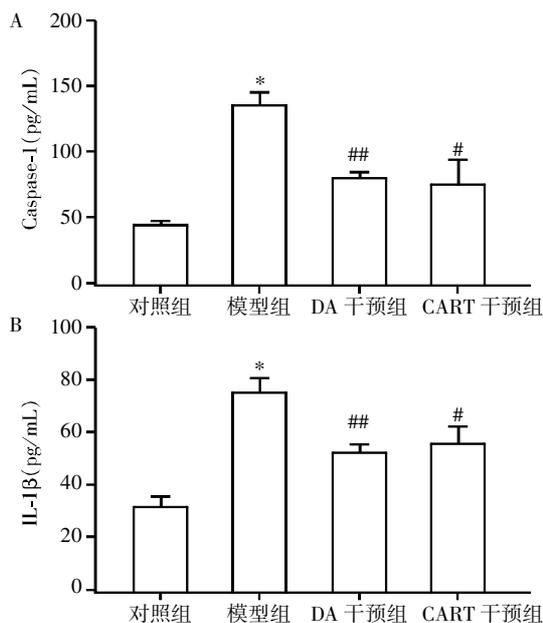
2.5 DA 增强急性脑缺血损伤大鼠脑内 CART 表达

随后我们检测了各组大鼠脑内的 CART 表达, 结果显示 (图 5), 与正常对照组相比较, 模型组大鼠脑组织 CART 表达明显降低; CART 干预组脑组织 CART 表达明显增强, 而 DA 干预组的大鼠脑组织 CART 表达也呈上升趋势。结果证明 DA 增强急性脑缺血损伤大鼠脑内 CART 表达。



图 5 各组急性脑缺血损伤大鼠脑内的 CART 表达

Figure 5 The expression of CART in acute cerebral ischemia injury rat



与对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n=10$ 。

图 3 各组急性脑缺血损伤大鼠脑内的 Caspase-1 和 IL-1 β 浓度

Figure 3 Content of Caspase-1 and IL-1 β in acute cerebral ischemia injury rat

3 讨论

脑卒中是一种高发病、高损伤的脑血液循环障碍性疾病, 阐明其发病的关键分子对其预防和治疗具有重要意义。近年来针对脑卒中的急性缺血性脑损伤的研究已经成为国内外的热点问题^[7]。

目前研究表明, 在病理条件下, 患者脑内的 DA 异常聚集于纹状体和海马等部位, 证实 DA 在脑损伤中发挥重要作用^[8]。但对于 DA 在急性缺血性脑损伤中的作用仍存在争议。早在 1987 年 Globus 等^[9]的研究表明使用高浓度的 6-OHDA 损伤 DA 通路能够显著减轻纹状体缺血症状, 而使用抑制剂拮抗 D1 样 DA 受体后能够保护缺血性脑损伤^[10]; 但也有研究指出, 敲除小鼠大脑黑质中 DA 能神经元能显著控制缺血性脑损伤的症状^[11]。因此, 本研究首先对 DA 在缺血性脑损伤中的作用进行检测, 结果证实外源性 DA 能够显著减轻 MCAO 大鼠的急性缺血性脑损伤, 减少神经损伤评分和脑梗死体积, 具有积极的保护作用。

CART 是一种分泌型神经肽,目前已经发现多种器官的神经元能够分泌 CART,尤其以下丘脑、大脑和垂体等器官为主^[12]。与 CART 在体内的广泛表达一致,研究发现其具有多种重要的生理功能,包括能量代谢和神经营养等。使用慢病毒转染 CART 的 siRNA 干扰动物模型神经元表达 CART 后,大鼠的急性缺血性脑梗死体积及缺氧缺糖后神经元的死亡数量均出现显著上升^[13]。此外,雌激素能增加长度为 55~102 个氨基酸的 CART 浓度,从而抑制缺血神经元损伤^[14],这些研究证实 CART 对缺血损伤导致的神经元凋亡具有保护作用。本研究发现外源性 CART 显著减轻 MCAO 大鼠的脑损伤,减少神经损伤评分和脑梗死体积,具有积极的保护作用,与其他研究结果一致。而本研究也显示外源性 DA 能够增加脑内 CART 浓度,表明 CART 的表达可能是受到 DA 调节。但目前对于 CART 调控下游神经保护机制仍不明确。但有研究指出,外源性 CART 抑制 caspase-3 的活性和炎症因子的分泌,从而抑制神经元的凋亡^[15-17],与此类似的是,本研究发现,CART 抑制以 Caspase-1 和 IL-1 β 为主的炎症小体激活,从而对缺血性脑损伤中的神经元凋亡和炎症发生产生保护性的抑制作用。

综上,本研究结果证实了 DA 通过 CART 减少炎症小体活化,对急性缺血性脑损伤产生保护作用,但其具体的作用机制尚有待进一步的深入探索。

[参考文献]

- [1] Korten A, Lodder J, Vreeling F, et al. Stroke and idiopathic Parkinson's disease: does a shortage of dopamine offer protection against stroke? [J]. *Mov Disord*, 2001, 16(1): 119-123
- [2] McDowell S, Whyte J, D'Esposito M. Differential effect of a dopaminergic agonist on prefrontal function in traumatic brain injury patients [J]. *Brain*, 1998, 121(6): 1155-1164
- [3] McAllister TW, Flashman LA, McDonald BC, et al. Dopaminergic challenge with bromocriptine one month after mild traumatic brain injury; altered working memory and BOLD response [J]. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2011, 23(3): 277-286
- [4] Jaworski JN, Kozel MA, Philpot KB, et al. Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(3): 1038-1044
- [5] Chang L, Chen Y, Li J, et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript modulates peripheral immunity and protects against brain injury in experimental stroke [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(2): 260-269
- [6] Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome [J]. *Nature*, 2006, 440(7081): 237-241
- [7] Jang SH, Kim SH, Lim HW, et al. Injury of the lower ascending reticular activating system in patients with hypoxic-ischemic brain injury: diffusion tensor imaging study [J]. *Neuroradiology*, 2014, 56(11): 965-970
- [8] Fan LW, Tien LT, Zheng B, et al. Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(2): 286-297
- [9] Globus MY, Ginsberg MD, Dietrich WD, et al. Substantia nigra lesion protects against ischemic damage in the striatum [J]. *Neurosci Lett*, 1987, 80(3): 251-256
- [10] O'Dell SJ, Weihmuller FB, Marshall JF. Methamphetamine-induced dopamine overflow and injury to striatal dopamine terminals: Attenuation by dopamine D1 or D2 antagonists [J]. *J Neurochem*, 1993, 60(5): 1792-1799
- [11] Hagg T, Varon S. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(13): 6315-6319
- [12] True C, Verma S, Grove KL, et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript is a potent stimulator of GnRH and kisspeptin cells and may contribute to negative energy balance-induced reproductive inhibition in females [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(8): 2821-2832
- [13] De Lartigue G, Dimaline R, Varro A, et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript mediates the actions of cholecystokinin on rat vagal afferent neurons [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(4): 1479-1490
- [14] Xu Y, Zhang W, Klaus J, et al. Role of cocaine-and amphetamine-regulated transcript in estradiol-mediated neuroprotection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(39): 14489-14494
- [15] 王爱红, 朱洁, 刘翠梅, 等. 肌肽对局灶性脑缺血大鼠外周血 IFN- γ 、IL-4 的影响 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2014, 34(9): 1179-1183
- [16] Dominguez G, Lakatos A, Kuhar MJ. Characterization of the cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells [J]. *J Neurochem*, 2002, 80(5): 885-893
- [17] Heldsinger A, Lu Y, Zhou SY, et al. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript is the neurotransmitter regulating the action of cholecystokinin and leptin on short-term satiety in rats [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303(9): 1042-1051

[收稿日期] 2015-01-19