文章编号:1000-5404(2014)08-0793-04

论著

侧脑室注射CART促进2型糖尿病大鼠胰岛素分泌

李聃丹,侯 君,应 懿,樊 莉,谯 巍,周世文 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院临床药理基地)

[摘要] **目的** 测定并比较侧脑室注射可卡因-苯丙胺转录调节肽(cocaine and amphetamine regulated transcript, CART)24 h后2型糖尿病大鼠与正常组大鼠空腹血糖(FBG)、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDLC)、低密度脂蛋白(LDLC)、糖化血红蛋白(HbA_1C)、血清和组织胰岛素含量以及胰腺组织胰岛素(insulin, INS) mRNA相对表达量,明确在2型糖尿病大鼠侧脑室注射CART后胰腺中胰岛素含量变化。**方法** 采用高糖高脂饮食/大剂量链脲佐菌素(STZ)制备2型糖尿病大鼠模型,侧脑室注射人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)/CART 24 h后,测定血液中FBG、TC、TG、HDLC、LDLC、HbA_1C,血清和胰腺组织中胰岛素含量;采用免疫荧光法对大鼠胰腺CART、INS进行定位分析;采用荧光定量PCR测定胰腺组织中INS mRNA相对表达量。**结果** 对2型糖尿病大鼠模型进行侧脑室注射CART后,FBG明显下降($P<0.05$),但未达到正常水平,胰腺中INS mRNA相对表达量上调,与糖尿病大鼠侧脑室注射ACSF相比较具有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 糖尿病大鼠侧脑室注射CART后能增加胰腺中CART的表达量及胰岛素含量,表明CART有促进胰岛β细胞分泌胰岛素的作用。

[关键词] 2型糖尿病;侧脑室;CART;胰腺
[中图法分类号] R322.57;R587.1;R977.6 [文献标志码] A

Injection of CART *via* lateral ventricle enhances insulin secretion in rats with type 2 diabetes

Li Dandan, Hou Jun, Ying Yi, Fan Li, Qiao Wei, Zhou Shiwen (Base for Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the biochemical parameters, insulin content in serum and tissue and mRNA level of insulin upon injection of cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) *via* lateral ventricle for 24 h in normal rats and type 2 diabetes rats, and to explicit the role of CART on insulin secretion in pancreas. **Methods** Type 2 diabetes model was established by food with high fat and sugar/STZ. After injection of artificial cerebrospinal fluid (ACSF) or CART *via* lateral ventricle for 24 h, biochemical parameters and insulin content of both tissue and serum were detected. CART and insulin positioning analysis was accomplished by double immunofluorescent labeling. Insulin mRNA level in pancreas was measured by quantitative RT-PCR. **Results** Compared with ACSF injection, fasting blood glucose (FBG) decreased in type 2 diabetes rats after CART injection ($P<0.05$), although it did not return to the normal level. Furthermore, the mRNA level of insulin in pancreas increased significantly after injection of CART in type 2 diabetes rats ($P<0.05$). **Conclusion** Both CART and insulin contents increase obviously in pancreas after CART injection in lateral ventricle of type 2 diabetes rats. CART may play important roles in enhancing insulin secretion in pancreas.

[**Key words**] type 2 diabetes; lateral ventricle; cocaine and amphetamine regulated transcript; pancreas

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5012). Corresponding author: Zhou Shiwen, E-mail: swzhou56@163.com

2型糖尿病主要发病机制是胰岛β细胞功能减退和/或胰岛素抵抗。但是目前临床上常用的药物治疗多具有耐受性差、易导致低血糖、胰岛细胞毒性以及易发生治疗抵抗等不足。目前,内分泌调节肽作为一种新的药物,已经在多个领域应用,尤其是胰高血糖素样肽的类似物及其受体激动剂艾塞那肽和利拉鲁肽目前已经在临床上广泛应用,并且具有不导致低血糖、耐受性好以及心血管保护等优点,使得内分泌调节肽在内

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5012)
[通信作者] 周世文,E-mail:swzhou56@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140314.1521.008.html(2014-03-14)

分泌疾病的临床治疗方面成为一个新的焦点。

可卡因-苯丙胺转录调节肽(cocaine and amphetamine regulated transcript,CART)是近年来发现的一种内源性神经肽[1],广泛分布在与进食行为相关的大脑和胃肠系统中,并和某些与进食行为相关的神经肽或神经递质共同在神经元中参与进食行为调节[2]。最近有研究表明CART在调节胰岛功能的副交感神经和胰腺内分泌细胞中也有表达[3]。目前对CART的研究主要是对大脑直接注射重组CART活性片段研究其对摄食行为的调节,大多数研究是在弓状核、室旁核和边缘下丘脑中进行,还没有探究过CART在在体情况下对于胰岛素或血糖的调控作用[2,4]。同时,侧脑室与中枢的多个核团都有着直接联系,在动物实验以及人体颅内感染的治疗中经常作为给药途径。本研究采用侧脑室给药的方法,验证给糖尿病大鼠侧脑室注射CART后能否增加胰腺组织中胰岛素含量,进而对于血糖的控制起到一定的改善作用,从而进一步明确CART与胰岛素分泌的关系,给治疗2型糖尿病提供一种新策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

1.1.1 动物分组及模型建立分组 将36只体质量为240~260 g SD健康雄性大鼠(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),禁食12 h后空腹血糖(FBG)小于10 mmol/L,按照随机数字法分为6组:①正常组;②正常/侧脑室注射人工脑脊液(ACSF)组;③正常/侧脑室注射CART组;④糖尿病组;⑤糖尿病/侧脑室注射人工脑脊液(ACSF)组;⑥糖尿病/侧脑室注射CART组。

2型糖尿病模型建立:给予4~6组大鼠高糖高脂饲料饮食4周,禁食12 h后以30 mg/kg STZ腹腔注射,72 h后测定其空腹血糖均高于16.7 mmol/L,即为2型糖尿病模型建立。其中STZ用0.1 mol/L(pH=4.5)柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制[5]。

ACSF配制:按Uchida等[6]的方法配置:Na^+ 145.5 mol/L,K^+ 2.8 mol/L,Ca^{2+} 2.3 mol/L,Mg^{2+} 2.2 mol/L,Cl^- 128.5 mol/L,HCO_3^- 23.1 mol/L,$H_2PO_4^-$ 1.1 mol/L,葡萄糖0.61 g/L,渗透压289.0 mosm/L,pH值7.3。

侧脑室注射ACSF或CART:在确定造模成功后第2天,将空腹的2、3、5组和6组大鼠分别以2%戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)麻醉后[7],参照Paxinos-Watson鼠脑立体定位图谱进行侧脑室(AP:-0.8 mm;ML:1.5 mm;DV:-3.5 mm)定位[9]分别注射ACSF和CART。将大鼠头部固定在立体定位仪上,头皮正中切口,暴露前囟,于前囟后0.8 mm,中线右侧旁开1.5 mm,用牙科钻钻开颅骨,微量注射器自颅骨下进针3.5 mm,2组和5组缓慢注射0.2 nmol ACSF,3组和6组缓慢注射0.2 nmol CART溶液[9],用502胶和牙托粉封闭。

1.1.2 试剂及仪器试剂 链脲佐菌素(STZ,Sigma公司);胰岛素ELISA试剂盒(慧嘉生物);血糖试剂(韩国i-SENS公司);CART(Sigma公司);胰岛素抗体(AB7842,Abcam);CART抗体(sc-18068,Santa公司);CY5标记山羊抗豚鼠IgG(AB102372,Abcam公司);CY3标记驴抗山羊IgG(A0502,碧云天公司);dNTP Mixture(4030,TaKaRa公司);TRIzon Reagent TRIzon(CW0580,康为世纪公司);DEPC水(R0021,碧云天公司);Oligo d(T)15 Primer(3805,TaKaRa公司);M-MLV逆转录酶(C28025-011,Invitrogen公司);引物(Invitrogen公司);SYBR Premix Ex *Taq*® Ⅱ(TliRNaseH Plus)(RR820A,TaKaRa公司);RNase Inhibitor(R0102,碧云天公司);正常山羊血清工作液(中杉金桥公司);免疫染色一抗稀释液(P0103,碧云天公司);DAPI(C1002,碧云天公司);抗荧光淬灭封片液(P0128,碧云天公司);人工脑脊液(自制)。

仪器:激光共聚焦(Leica SP5);荧光定量PCR仪(Step One Plus);酶标仪(Thermo);冷冻离心机(Thermo);脑立体定位仪(ZH-蓝星B)。

1.2 方法

1.2.1 模型取材 将2组和5组大鼠侧脑室注射ACSF,3组和6组大鼠侧脑室注射CART,1组和4组大鼠不经过处理,24 h后测定其空腹血糖。用2%戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)麻醉后开腹腔进行腹主动脉取血,分别测定其FBG、血清胰岛素、血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDLC)、低密度脂蛋白(LDLC)和糖化血红蛋白(HbA_1C)含量。其中TC、TG、HDLC、LDLC和HbA_1C含量委托新桥医院检验科进行检测。迅速摘取各组胰腺组织,摘取部分存放于10%甲醛溶液中,其余部分存放于液氮中备用。

1.2.2 血清胰岛素及组织胰岛素含量 采用ELISA方法测定。称量液氮中胰腺组织并匀浆,将同组胰腺混匀后离心取上清备用。动物取血后红头管促凝后离心取上清备用。取待测样本10 μL,样本稀释液40 μL加入孔板中封膜温育37 ℃,30 min后,弃去液体甩干,每孔加满洗涤液静置30 s弃去,重复5次拍干。加入酶标试剂50 μL,封膜37 ℃,30 min后弃去液体甩干,每孔加满洗涤液静置30 s弃去,重复5次拍干。加入显色剂A 50 μL,显色剂B 50 μL混匀后37 ℃避光显色15 min。加入终止液50 μL,测定光密度值。

1.2.3 RNA提取及逆转录RNA提取 液氮中标本选取血管丰富部位,液氮碾磨后加1 mL Trizon室温放置5 min→200 μL氯仿→混匀后室温放置15 min→4 ℃,12 000 r/min,离心15 min→吸取上层至RNase free管中→500 μL异丙醇混匀→室温放置10 min→4 ℃,12 000 r/min,离心10 min弃上清→加75%乙醇1 mL→4 ℃,12 000 r/min,离心3 min,弃上清→室温晾干2~3 min→20 μL DEPC水溶解。测定其$D(260)/D(280)$比值均在1.8~2.0之间,显示其纯度较高,并进行RNA含量测定。

逆转录:RNA 2 μg,Oligodt 1 μL,DNTP 1 μL,DEPC水共12 μL进行65 ℃,5 min;冷却后加入5×buffer 4 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,RNase Inhibitor 1 μL,M-MLV 1 μL,37 ℃,50 min→70 ℃,15 min。

1.2.4 荧光实时定量PCR测mRNA水平仪器 Applied Biosytems StepOne Plus;上游序列:5′-CCAAGTCCCGTCGTGAAG-3′,下游序列:5′-CCACAATGCCACGCTTCT-3′(上海英骏生物技术有限公司)。

表 1　各组大鼠生化指标比较（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	血糖(mmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDLC(mmol/L)	LDLC(mmol/L)	HbA_1C(mmol/L)
正常组	6.7±0.80[a]	1.18±0.21[a]	0.75±0.15[a]	0.68±0.11	0.20±0.05[a]	0.90±0.08[a]
正常/侧脑室注射 ACSF 组	7.4±0.51[a]	1.24±0.17[a]	0.77±0.10[a]	0.76±0.10	0.26±0.07[a]	0.88±0.08[a]
正常/侧脑室注射 CART 组	8.2±0.40[a]	1.21±0.10[a]	0.81±0.06[a]	0.66±0.07	0.25±0.04[a]	1.00±0.09[a]
糖尿病组	29.6±2.22[b]	3.52±0.92[b]	3.84±1.16[b]	0.61±0.16	0.73±0.11[b]	4.13±0.69[b]
糖尿病/侧脑室注射 ACSF 组	30.9±1.28[b]	3.87±0.97[b]	4.48±1.40[b]	0.65±0.15	0.75±0.10[b]	3.73±0.69[b]
糖尿病/侧脑室注射 CART 组	22.0±1.98[ab]	1.62±0.13[a]	2.98±0.43[b]	0.67±0.06	0.46±0.08[b]	3.13±0.21[b]

a:$P<0.05$,与糖尿病组比较;b:$P<0.05$,与正常组比较

反应体系:SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ 25.0 μL,上游引物 2.0 μL,下游引物 2.0 μL,ROX Refernce Dye 1.0 μL,cDNA 4.0 μL,DEPC 水 16.0 μL,反应总体积 50 μL,以 β-actin 作为内参照。反应条件:阶段 1:预变性,95 ℃,30s;阶段 2:PCR 反应,95 ℃,5 s,56 ℃,30 s。

1.2.5　荧光双标法定位 INS 和 CART 一抗混合液制备　在 100 μL 一抗稀释液中加入 1 μL 胰岛素抗体原液和 1 μL CART 抗体原液,4 ℃备用,即配成胰岛素抗体和 CART 抗体浓度均为 1∶100。

二抗混合液制备:在 300 μL PBS 中加入 CY5 标记二抗原液 1 μL 和 CY3 标记二抗原液 1 μL,-20 ℃备用,即配成 CY5 二抗和 CY3 二抗浓度均为 1∶300。

10% 甲醛溶液中标本固定 3 d 后放入自动脱水机脱水,石蜡包埋成块后切成 4 μm 厚的石蜡切片。石蜡切片常规脱蜡至水,3% 过氧化氢 10 min,PBS 洗 5 min×3 次,抗原修复 25 min,自然冷却至室温 30 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加 5% 正常山羊血清 30 min;滴加一抗混合液,4 ℃过夜后,37 ℃复温 30 min,PBS 洗 5 min×3 次,滴加二抗混合液,37 ℃ 1 h,PBS 洗 5 min×3 次,滴加适量 DAPI,抗荧光淬灭封片剂封片,激光共聚焦拍照。

1.2.6　统计学分析　采用 SPSS 16.0 软件进行处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　各组大鼠 FBG、血清和 HbA_1C 含量比较

糖尿病大鼠侧脑室注射 CART 24 h 后其 FBG、TC 明显下降($P<0.05$),但未达到正常水平;TG、LDLC 和 HbA_1C 远高于正常组($P<0.05$),但与糖尿病组相比有一定改善;各组 HDLC 含量没有显著性变化(表 1)。

2.2　各组大鼠血清胰岛素及胰腺组织胰岛素含量比较

糖尿病大鼠侧脑室注射 CART 后血清胰岛素和组织胰岛素有明显提高($P<0.05$),但不能达到正常水平(表 2)。

表 2　各组大鼠血清胰岛素和组织胰岛素含量比较（$n=6$, $\bar{x}\pm s$）

组别	血清胰岛素 (mU/L)	组织胰岛素 [mU/(L·g)]
正常组	14.72±1.40[a]	17.38±1.67[a]
正常/侧脑室注射 ACSF 组	13.63±1.36[a]	17.66±1.09[a]
正常/侧脑室注射 CART 组	17.67±1.05[ab]	20.37±0.92[ab]
糖尿病组	4.30±0.73[b]	10.78±0.52[b]
糖尿病/侧脑室注射 ACSF 组	3.98±1.85[b]	9.47±1.47[b]
糖尿病/侧脑室注射 CART 组	7.88±0.85[ab]	15.20±1.16[a]

a:$P<0.05$,与糖尿病组比较;b:$P<0.05$,与正常组比较

2.3　RT-PCR 检测各组大鼠胰腺组织 INS mRNA 表达水平

糖尿病大鼠 INS mRNA 表达量(0.34±0.04),糖尿病大鼠侧脑室注射 CART 后 INS mRNA 表达量(0.61±0.04)明显上调($P<0.05$),但不能达到正常水平(1.01±0.15);正常大鼠用 CART 处理后 INS mRNA 表达量(3.10±0.12)与其他各组[正常大鼠侧脑室注射 ACSF 组(0.98±0.04)、糖尿病大鼠侧脑室注射 ACSF 组(0.20±0.01)]相比明显上调($P<0.05$)(图 1)。

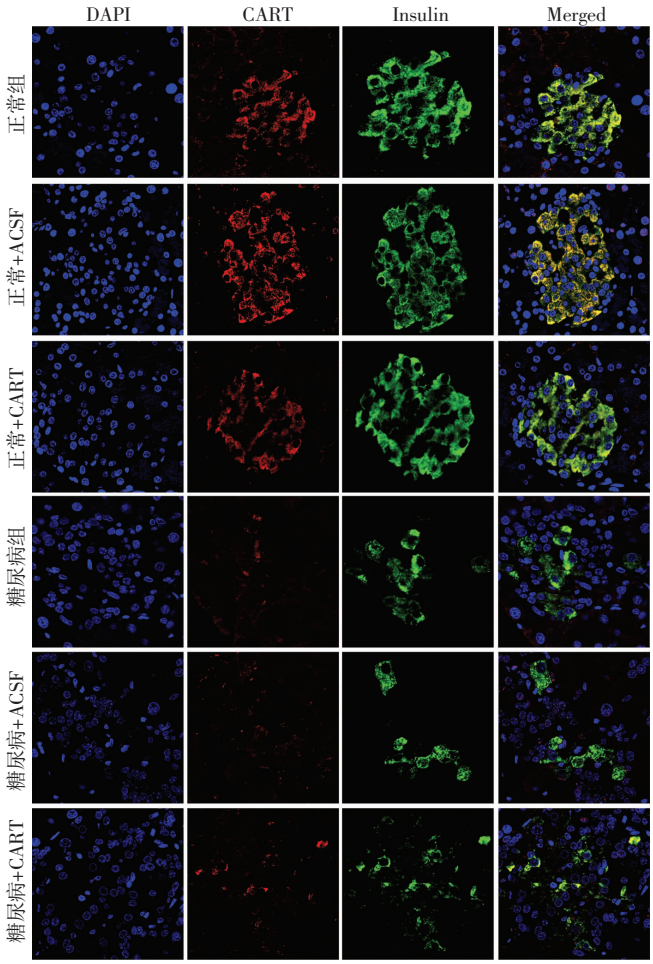


图 1　各组大鼠胰腺组织免疫荧光观察（×800）

2.4　免疫荧光分析 CART 和 INS 的定位及表达

各组大鼠胰腺组织切片进行 INS 和 CART 双重染色可知:INS(绿色表示 cy5)和 CART(红色表示 cy3)在 β 细胞中均有表达。在正常大鼠模型中,胰岛成团状,排列规则、紧密、整齐,

INS表达强烈,CART表达较强,正常大鼠侧脑室注射CART后INS表达更强烈。糖尿病大鼠胰腺组织中胰岛排列不规则,分散,INS在β细胞表达较弱,同时CART在β细胞表达更弱。糖尿病大鼠侧脑室注射CART后INS,CART表达均有所增强。见图1。

3 讨论

通过刺激胰岛β细胞增加胰岛素分泌是治疗2型糖尿病的重要策略。本实验结果表明,糖尿病大鼠侧脑室注射CART 24 h后TC和FBG均有明显下降,TG、LDLC和HbA_1C有一定改善,胰腺组织中CART含量有所增加,且胰岛素含量明显升高,尤其是在正常大鼠胰岛β细胞未遭受损害的情况下,CART刺激胰岛β细胞分泌胰岛素效果更加显著,提示侧脑室给予外源性CART可以发挥对胰岛素的刺激作用。

CART是一种新型的肽类神经递质或共存递质,除了在中枢和外周神经系统中有分布外,在外周组织如交感节前神经纤维、胃窦G细胞中也有表达,并参与相关的重要生理活动[4]。近年来有研究表明CART在调节胰岛功能的副交感神经和胰腺内分泌细胞中也有表达,并证实CART敲除小鼠会出现胰岛功能障碍,表明CART能通过调节胰岛素分泌维持正常的胰岛功能[10-11],但是具体的机制仍不清楚。Wierup等[12]发现CART在胰岛β细胞中有表达,并证实CART在离体的β细胞中增强腺苷酸环化酶活性或加入磷酸二酯酶抑制剂均能增加胰岛素含量,但当阻断PKA通路再给予CART处理时并不能达到增加胰岛素的效果。由于在细胞中腺苷酸环化酶和磷酸二酯酶分别调控cAMP合成和降解,因此CART在cAMP含量增加时激活cAMP/PKA信号通路能促进胰岛β细胞分泌胰岛素。Sathanoori等[13]最近证实了CART能够保护β细胞对抗葡萄糖毒性并促进细胞增殖。因此在正常大鼠β细胞未受损情况下,受CART刺激后胰岛素分泌更加显著,与本实验结果一致。

作为一种新近被鉴定的脑肠肽,Kasacka等[14]证实了CART也存在于胰腺的神经纤维和神经节胞体,由于胰腺是由复杂的神经环路进行调控的,胰腺中大部分的神经纤维都在副交感神经节中换元,因此CART可能参与了由副交感控制的胰腺功能调节。在本研究中,我们创新性地发现在2型糖尿病大鼠侧脑室注射CART后,胰岛素的分泌增加,并且观察到胰腺组织中CART表达增加,我们推测是通过中枢-迷走神经-胰岛轴来发挥调节作用。可能的机制为通过侧脑室注射CART刺激了侧脑室附近的迷走神经背核,进而通过迷走神经传出神经冲动,到达副交感中枢神经节换元,节后纤维终止于胰腺腺泡、胰岛细胞,从而刺激位于胰腺副交感神经元上的CART,进而对胰岛细胞的分泌起直接调节作用。同时,胰腺组织中CART与β细胞膜上的受体结合,进而激活G蛋白偶联的腺苷酸环化酶,促进cAMP释放,激活了cAMP/PKA信号通路,在cAMP增加的情况进一步刺激胰岛素分泌,起到血糖调控的作用,但是本假说需要进一步的实验验证。因此本研究通过侧脑室注射CART揭示了侧脑室中CART对胰腺CART有刺激作用,并进一步刺激胰岛素分泌,明确了在体水平脑肠肽CART对于胰岛素分泌的调控作用,从而可能为治疗2型糖尿病提供一种新靶点。

参考文献:

[1] Kuhar M J, Adams L D, Hunter R G, *et al*. CART peptides[J]. Regul Pept, 2000, 89(1/3): 1-6.

[2] Rogge G, Jones D, Hubert G W, *et al*. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions[J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(10): 747-758.

[3] Wierup N, Sundler F. CART is a novel islet regulatory peptide[J]. Peptides, 2006, 27(8): 2031-2036.

[4] Dylag T, Kotlinska J, Rafalski P, *et al*. The activity of CART peptide fragments[J]. Peptides, 2006, 27(8): 1926-1933.

[5] 洪丽莉, 许冠荪, 申国明, 等. SD大鼠2型糖尿病模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(6): 379-381.

[6] Uchida K, Yamada M, Hayashi T, *et al*. Possible harmful effects on central nervous system cells in the use of physiological saline as an irrigant during neurosurgical procedures[J]. Surg Neurol, 2004, 62(2): 96-105.

[7] 胡军, 邓宏勇, 梁艳, 等. 改良大鼠颈静脉长期置管术[J]. 上海实验动物科学, 2002, 22(1): 42-43.

[8] 杨文青, 马晶, 刘争, 等. 侧脑室注射链脲佐菌素致大鼠脑内胰岛素通路障碍和认知水平降低[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 462-468.

[9] Hou J, Zheng D Z, Zhou J Y, *et al*. Orexigenic effect of cocaine- and ampheta mine-regulated transcript (CART) after injection into hypothalamic nuclei in streptozotocin-diabetic rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(10): 989-995.

[10] Wierup N, Richards W G, Bannon A W, *et al*. CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight[J]. Regul Pept, 2005, 129(1/3): 203-211.

[11] Ekblad E. CART in the enteric nervous system[J]. Peptides, 2006, 27(8): 2024-2030.

[12] Wierup N, Bjorkqvist M, Kuhar M J, *et al*. CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the beta-cells of type 2 diabetic rats[J]. Diabetes, 2006, 55(2): 305-311.

[13] Sathanoori R, Olde B, Erlinge D, *et al*. Cocaine- and ampheta mine-regulated transcript (CART) protects beta cells against glucotoxicity and increases cell proliferation [J]. J Biol Chem, 2013, 288(5): 3208-3218.

[14] Kasacka I, Janiuk I, Lewandowska A, *et al*. Distribution pattern of CART-containing neurons and cells in the human pancreas[J]. Acta Histochem, 2012, 114(7): 695-699.

(**收稿**:2014-01-09;**修回**:2014-01-26)

(编辑 张 维)