DOI:10.16016/j.1000-5404.202003316

NDP-MSH 激活黑皮质素 3 受体通过 PKC/ERK 信号通路减轻小鼠脑出血后氧化应激和神经元凋亡

傅思铭[1],吴 旋[2],谢宗义[1] 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科[1];400016 重庆,重庆医科大学基础医学院人体解剖学教研室[2]

[摘要] **目的** 探讨 Nle4-D-Phe7-α-MSH(NDP-MSH)激活黑皮质素受体-3(Mc3r)在小鼠脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)后氧化应激和神经元凋亡中的作用。**方法** 170 只小鼠按随机数字表法分为 3 组:Sham 组($n=22$)、ICH 组($n=46$)、ICH+NDP-MSH 组($n=102$),建立小鼠 ICH 模型。ICH 后 24 h 进行改良 Garcia 评分、Beam balance 评分和脑含水量测定,双标免疫荧光检测小鼠脑血肿周围组织中 Mc3r 和 Neun 共定位,ELISA 检测 ICH 小鼠血肿周围组织的 MDA、SOD、CAT 含量,Western blot 检测脑组织中 Mc3r、PKC、ERK1/2、Bcl-2、caspase-3 的表达。**结果** Mc3r 在术后 24 h 达到表达高峰,在神经元中广泛分布。NDP-MSH 治疗后,改良的 Garicia 评分和 Beam balance 评分显著提高($P<0.05$),同侧基底神经节和皮层中的水肿显著降低($P<0.05$),ROS 活性明显降低($P<0.05$)。下调脑组织中 Mc3r 和 PKC 的表达后 p-PKC,p-ERK1/2,Bcl-2 的表达明显降低,c-caspase-3 升高($P<0.05$)。**结论** NDP-MSH 激活黑皮质素-3 受体通过 PKC/ERK 信号通路改善小鼠脑出血后的氧化应激和神经元凋亡。

[关键词] 脑出血;氧化应激;神经元凋亡;NDP-MSH;黑皮质素受体-3

[中图法分类号] R743.34; R965; R977.6 [文献标志码] A

NDP-MSH activates melanocortin-3 receptor to attenuate oxidative stress and neuronal apoptosis in mice with intracerebral hemorrhage *via* PKC/ERK signaling pathway

FU Siming[1], WU Xuan[2], XIE Zongyi[1] [1]Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Human Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of Nle4-D-Phe7-α-MSH (NDP-MSH) that binds to melanocortin-3 receptor (Mc3r) on oxidative stress and neuronal apoptosis in mice with intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** A total of 170 male mice were randomly assigned into sham-operated group ($n=22$), ICH model group ($n=46$), and ICH+NDP-MSH group ($n=102$). The modified Garcia score, Beam balance score, and brain water content of the mice were measured 24 h after ICH. Dual-label immunofluorescence assay was used to detect the colocalization of Mc3r and the neuronal marker NeuN, and ELISA was used to detect the contents of MDA, SOD and CAT contents in the surrounding tissues of cerebral hematoma of the mice. Western blotting was performed to detect the expression of Mc3r, PKC, ERK1/2, Bcl-2, and caspase-3 in the brain tissue of the mice. **Results** The peak level of Mc3r expression in the brain tissue of the mice occurred 24 h after ICH with a diffuse distribution in the neurons. Treatment with NDP-MSH

[基金项目] 重庆市留学人员回国创业创新支持计划项目(CX2019156);重庆医科大学附属第二医院宽仁英才项目(201959)

[通信作者] 谢宗义,E-mail:zyxieneuro2013@yahoo.com

significantly increased the modified Garcia score and Beam balance score ($P<0.05$), decreased water content in the ipsilateral basal ganglia and the cortex ($P<0.05$), and lowered ROS activity in the brain tissue of the mice with ICH ($P<0.05$). Down-regulation of the expressions of Mc3r and PKC using a Mc3r siRNA and staurosporinein (a PKC inhibitor), respectively, significantly decreased the expressions of p-PKC, p-ERK1/2, and Bcl-2 and enhanced the expression of c-caspase-3 in the brain tissue of the mice ($P<0.05$). **Conclusion** NDP-MSH, by binding with Mc3r, ameliorates oxidative stress and neuronal apoptosis in mice with ICH *via* the PKC/ERK signaling pathway.

[**Key words**] intracerebral hemorrhage; oxidative stress; neuronal apoptosis; Nle4-MSH; melanocortin-3 receptor

Supported by the Project of Supporting Startups for Talents Returning from Overseas of Chognqing (CX2019156) and the Kuan Ren Talent Program of the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University (201959). Corresponding author: XIE Zongyi, E-mail: zyxieneuro2013@yahoo.com

脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)是指脑组织的自发性出血,占所有脑血管意外的15%~20%,具有较高的发病率和死亡率[1]。越来越多的证据表明,氧化应激和神经元凋亡在ICH后继发性脑损伤(secondary brain injury,SBI)的病理生理过程中起着关键作用,尽管促成SBI的确切机制仍然不明[2]。因此,抑制氧化应激和细胞凋亡可能是减轻SBI的有效方法。

Nle4-D-Phe7-α-MSH(NDP-MSH)作为与天然α-MSH分子发挥相似作用的非特异性黑皮质素受体激动剂,对局部和全身宿主反应发挥调节作用,包括抗凋亡和保护神经功能[3-4]。NDP-MSH通过结合不同的黑皮质素受体(Mc1r~Mc5r)在中枢神经系统中发挥抗炎、抗凋亡等神经保护作用[5]。黑色素3受体(Mc3r)是一种G蛋白偶联受体,研究表明NDP-MSH对Mc3r具有高特异性亲和力[6]。蛛网膜下腔出血后,NDP-MSH治疗可以起到抗凋亡和抗氧化应激的作用。此外,在成人多发性硬化症中,NDP-MSH被证实能通过激活Mc3r和Mc4r保护星形胶质细胞并减少细胞凋亡[7]。迄今为止,已经确定NDP-MSH可以减轻小鼠ICH后的神经炎症和血脑屏障(blood brain barrier, BBB)破坏并改善神经功能[8]。但是,关于NDP-MSH和Mc3r对ICH后氧化应激反应和神经元凋亡的影响知之甚少。先前的研究表明,Mc3r与HEK293细胞中的PKC途径相互作用[8]。在大鼠局灶性脑出血中,证据表明PKC途径通过激活ERK 1/2信号通路参与了对神经元的神经保护作用[9-11]。此外,越来越多的证据表明,PKC可以调节ERK 1/2的转录活性从而减少细胞凋亡[12-13]。

本研究假设NDP-MSH激活Mc3r可以减少小鼠脑出血后的氧化应激反应和神经元细胞凋亡,通过自体血注射法建立小鼠ICH模型,探讨NDP-MSH的神经保护作用及其可能的机制,旨在为脑出血临床研究寻找新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

从重庆医科大学动物中心购买170只C57BL/6小鼠(雄性,25~30 g)。本研究中实验方案均得到重庆医科大学动物伦理委员会的批准,操作过程和处死方案均基于国际通用实验动物使用指南。Mc3r抗体、Neun抗体购自英国Abcam公司,PKC抗体、p-PKC抗体、ERK抗体、p-ERK1/2抗体、Bcl-2抗体、caspase-3抗体c-caspase-3抗体购自美国Cell signaling公司,PKC抑制剂Staurosporine购自美国Selleck公司,总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脑出血模型建立和分组 小鼠经戊巴比妥(40 mg/kg,腹膜内注射)深度麻醉后,取中央尾动脉中提取30 μL未抗凝的自体动脉血备用,俯卧位固定小鼠于脑立体定位仪,前卤右侧2 mm处钻1个直径约1 mm的孔。然后将自体血注入基底神经节(立体位置坐标:前部0.2 mm,前部右侧2.3 mm,深度3.5 mm)。首先,在2.8 mm的深度注入5 μL血液。5 min后,剩余的25 μL血液以3.5 mm的深度输送。注射后将针头再固定10 min,然后缓慢拔出,缝合头皮。170只小鼠按随机数字表法分为3组:Sham组、ICH组、ICH+NDP-MSH组。其中Sham组28只,在出血模型的相同部位注射等量无菌盐水;ICH组52只,按上述方法建立小鼠脑出血模型;ICH+NDP-MSH组90只,于ICH建模后1 h腹腔给予NDP-MSH治疗。Sham组和ICH组,每组4只小鼠后用于免疫染色,每张切片取同侧血肿周围脑组织显微镜观察(×400倍)。另外,每组6只小鼠用于神经功能评分和脑水肿检测,

6 只用于 Western blot 检测,其余每组 6 只用于酶联免疫吸附测定试剂盒检测。

1.2.2 侧脑室注射 用戊巴比妥(40 mg/kg,腹膜内注射)深度麻醉小鼠,将其置于俯卧位的立体定向头架中。沿中心线作纵向切口并在前囟右侧 1 mm 处钻孔。根据制造商的说明,将 Mc3r siRNA 或 Staurosporine 溶解在无菌无核糖核酸的水中。将 Mc3r siRNA 或 Staurosporine 混合物(100 pmol/2 μL)以 2.5 mm 的深度送入同侧脑室。注射后将针头再留 5 min 后缓慢拔出。用骨蜡密封毛刺孔,用缝合线缝合切口。

1.2.3 神经学评分 改良的 Garcia 评分和 Beam balance 评分用于评估 ICH 后 24 h 的神经行为功能。改良的 Garcia 评分包括 6 个子项:自发运动(0~3 分),肢体对称(0~3 分)、向前伸展(0~3 分)、攀爬(1~3 分)、身体本体感受(1~3 分)和对触须的响应(1~3 分),评分越低损伤越重。在 Beam balance 评分中,将小鼠放在木板上,测量小鼠在上面行走的时间(0~4 分),评分越低损伤越重。

1.2.4 脑水含量的测定 在深度麻醉下处死小鼠。立即将大脑切除,并迅速分为 5 个部分:同侧和对侧基底神经节,同侧和对侧皮质以及小脑。保留小脑作为内部对照。立即在电子分析天平上称量样品的质量以确定湿质量(wet weight,WW),然后在 105 ℃下干燥 72 h 以确定干质量(dry weight,DW)。脑含水量 = [(WW-DW)/WW]×100%。

1.2.5 组织学分析 ICH 后 24 h,对小鼠进行深度麻醉并向体内灌注 20 mL 冷磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH=7.4),然后注射 20 mL 4%多聚甲醛。快速收集整个大脑,然后在 4%多聚甲醛中于 4 ℃固定 24 h。分别在 10%、20%、30%的蔗糖溶液中固定 24 h 至大脑完全沉底。OCT 化合物包埋并使用低温恒温器在-25 ℃切成 10 μm 厚的冠状切片,以进行双重免疫荧光分析。

1.2.6 免疫荧光染色 将样本用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,每次 10 min。然后在室温下免疫荧光封闭液孵育 1 h 后将样本以用抗 NeuN 和抗 Mc3r 共标,在 4 ℃孵育过夜。第 2 天将样本用 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,与荧光二抗在 37 ℃温育 1 h,DAPI 染色 5 min 后封片。

1.2.7 氧化应激检测 根据 ELISA 测试试剂盒的说明,将 ICH 后 24 h 小鼠脑血肿(基底神经节)周围的组织匀浆。检测丙二醛(MDA),过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的表达。

1.2.8 Western blot 分析 断头取脑,收集血肿周围组织,提取总蛋白进行 Western blot 分析。将等量蛋白上样于 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶行,通过 80 V 恒压电泳分离蛋白质。250 mA 恒定电流转膜至 PVDF 膜上,将膜在 WB 封闭液中于 37 ℃封闭 2 h,然后在 4 ℃条件下一抗稀释液孵育过夜。一抗是抗 Mc3r,抗 PKC,抗磷酸化 PKC,抗 ERK1/2,抗磷酸化 ERK1/2,抗 Bcl-2,抗 caspase-3,抗 c-caspase-3,抗 β-Tubulin。第 2 天在室温下用 PBST 洗涤 PVDF 膜,二抗 37 ℃孵育 1 h。ECL 显影液曝光,用凝胶成像仪曝光分析条带。

1.3 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并使用 SigmaPlot 11.0 和 GraphPad Prism 6 进行统计分析。多组均数比较采取单因素方差分析(one-way ANOVA),两组均数比较采取 t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 ICH 后 Mc3r 表达增加

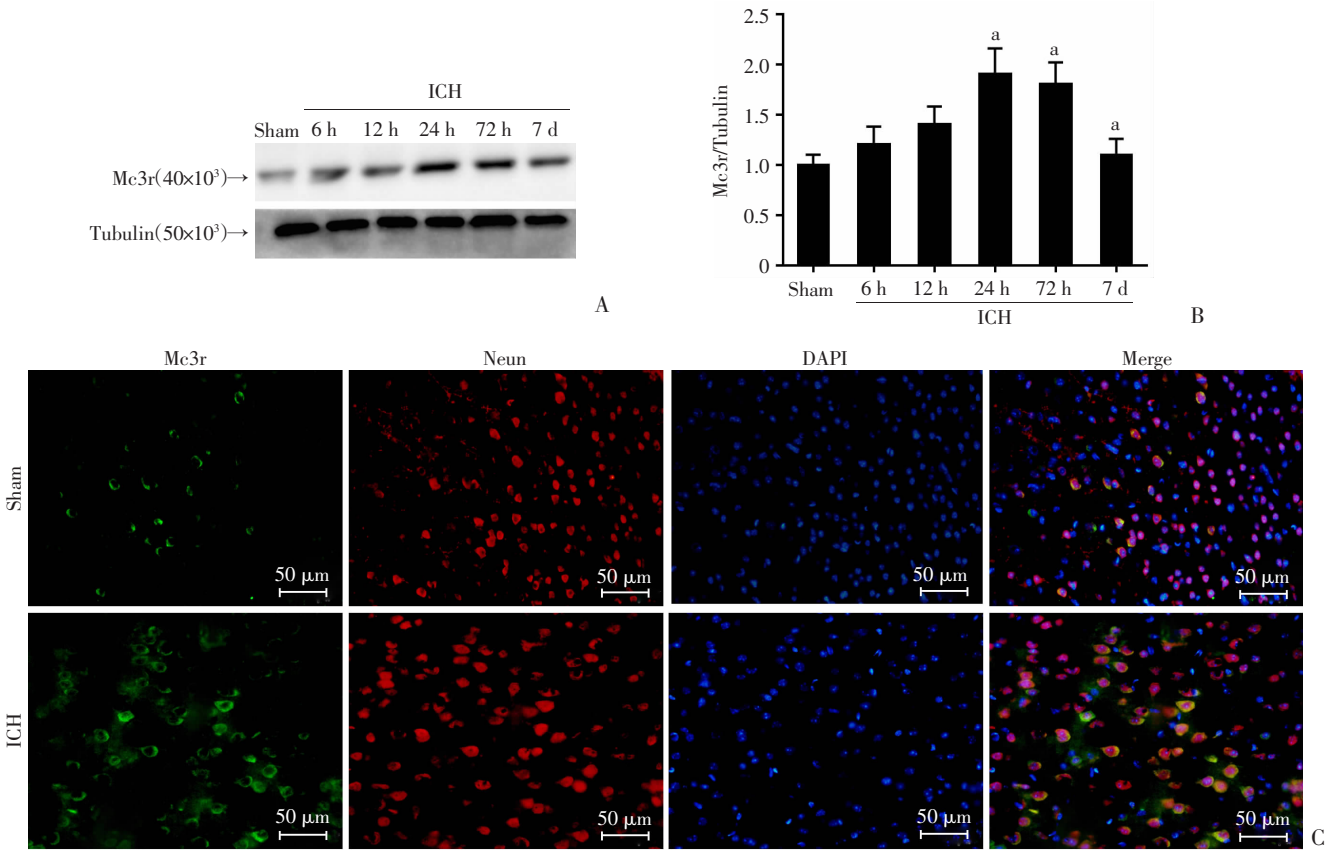
与假手术组相比,Mc3r 的表达增加,并在术后 24 h 达到高峰($P<0.05$,图 1A、B)。与假手术组相比,ICH 组的 Mc3r(绿色)表达显著增加;同时,在假手术组和 ICH 组中,Mc3r 在神经元中表达(图 1C)。

2.2 NDP-MSH 可改善 ICH 后神经功能并减轻脑水肿和氧化应激反应

与 Sham 组相比,ICH 组和 ICH+1.5 μgNDP-MSH 组在 ICH 后 24 h 的神经功能缺损和脑水肿明显恶化。然而,ICH+5 μgNDP-MSH 和 ICH +15 μgNDP-MSH 的给药显著改善了神经功能障碍($P<0.05$,图 2A、B),减少了同侧基底神经节的脑水肿($P<0.05$,图 2C)。根据以上实验结果,NDP-MSH 的最佳剂量为 5 μg,用于后续的实验。ICH 后 24 h,与 Sham 组相比,ICH 组 MDA 水平显著升高,CAT 和 SOD 水平下降($P<0.05$,图 3A~C)。然而,与 ICH 组相比,使用 NDP-MSH 治疗显著降低了 MDA 水平,提高了 CAT 和 SOD 水平。

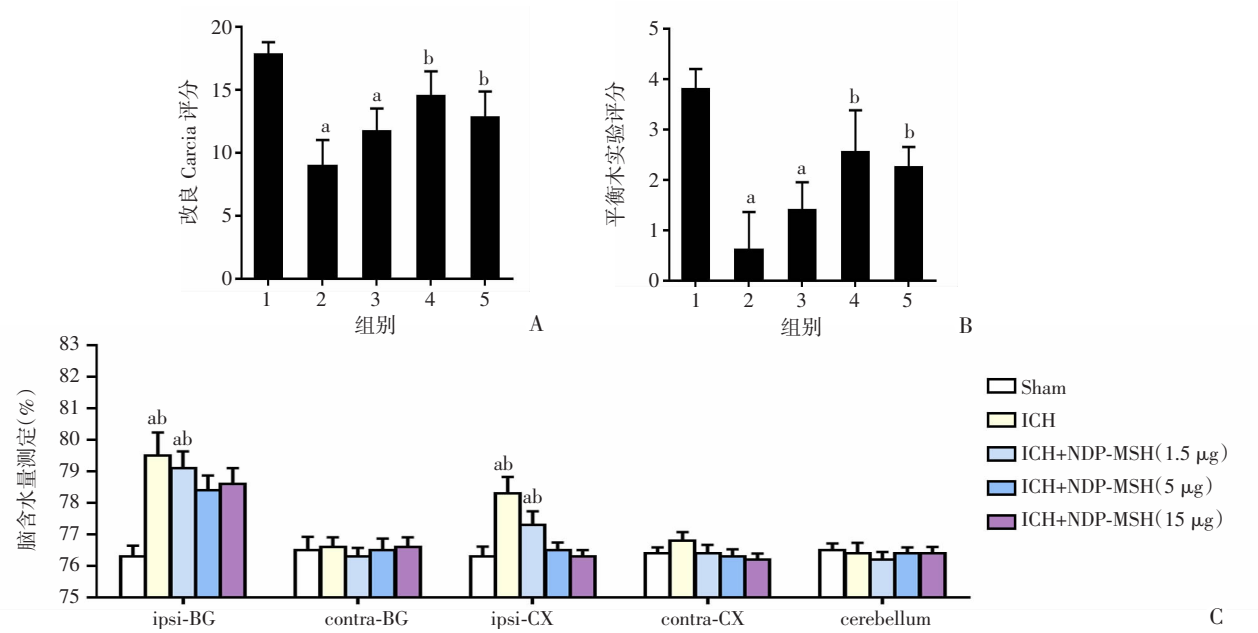
2.3 Mc3r 敲低对 ICH 后氧化应激反应和下游分子表达的影响

为了进一步研究 NDP-MSH 的保护作用,经侧脑室注射了 Mc3r siRNA 以抑制内源性 Mc3r 的表达。敲除 Mc3r 消除了 NDP-MSH 对 ICH 后氧化应激反应的保护作用($P<0.05$,表 1)。NDP-MSH 治疗组与 ICH 组相比,p-PKC、p-ERK1/2、Bcl-2 表达降低,c-caspase-3 表达增加($P<0.05$)。相反,与 ICH+NDP-MSH 组相比,使用特异性 siRNA 敲除 Mc3r 后,下游信号分子 PKC、ERK1/2、Bcl-2、caspase-3 表达发生了相反的变化($P<0.05$,图 4)。



A:Western blot 检测 ICH 后不通时间点血肿组织中 Mc3r 表达;B:定量分析($\bar{x}\pm s$, $n=6$) a: $P<0.05$,与 Sham 组比较;C:双重免疫荧光染色观察 ICH 后 24 h Mc3r 与神经元(Neun)在小鼠脑血肿周围组织中共定位

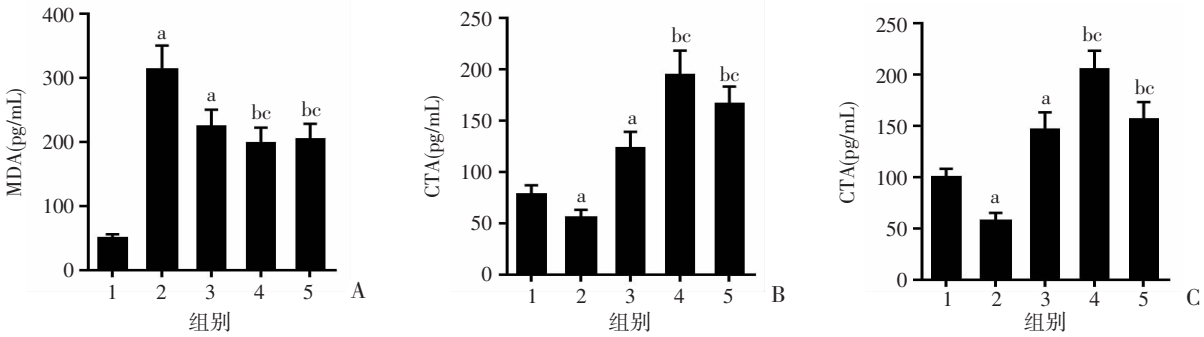
图 1 小鼠脑出血后血肿周围组织中的 Mc1r 的表达



1: Sham; 2: ICH; 3: ICH+NDP-MSH(1.5 μg); 4: ICH+NDP-MSH(5 μg); 5: ICH+NDP-MSH(15 μg)

A:小鼠 ICH 后 24 h 各组改良 Garcia 评分;B:ICH 后 24 h 各组 Beam balance 评分;C: ICH 后 24 h 各组脑水含量 a: $P<0.05$, 与 Sham 组比较; b: $P<0.05$,与 ICH+NDP-MSH (5 μg)组比较

图 2 NDP-MSH 治疗后各组小鼠神经功能评分和脑含水量 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



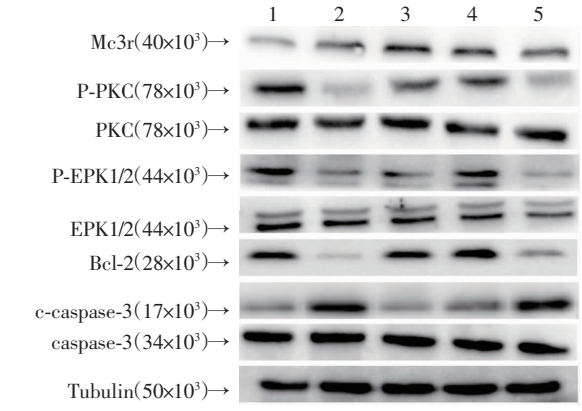
1: Sham; 2: ICH; 3: ICH+NDP-MSH(1.5 μg); 4: ICH+NDP-MSH(5 μg); 5: ICH+NDP-MSH(15 μg)
A:小鼠 ICH 后 24 h 各组 MDA 含量;B:小鼠 ICH 后 24 h 各组 CAT 含量;C: 小鼠 ICH 后 24 h 各组 SOD 含量 a: $P<0.05$,与 sham 组比较; b: $P<0.05$ 与 ICH 组比较; C: $P<0.05$,与 ICH+NDP-MSH(1.5 μg)组比较

图 3 小鼠脑出血后 24 h 各组血肿周围脑组织中氧化应激相关因子水平 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

表 1 Mc3r 抑制后小鼠 ICH 后脑组织 CAT、MDA、SOD、Mc3r、PKC、ERK、Bcl-2、caspase-3 表达 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

指标	Sham	ICH	ICH+NDP-MSH	ICH+NDP-MSH+Scr siRNA	ICH+NDP-MSH+Mc3r siRNA
MDA	75.5±6.1	53.2±8.3^{a}	212.3±22.7^{bc}	185.2±18.5^{bc}	110.1±12.5
CAT	73.3±8.4	294.1±30.5^{a}	135.4±22.2^{bc}	143.8±19.1^{bc}	286.3±27.3
SOD	101.7±9.1	52.3±7.5^{a}	248.0±23.5^{bc}	187.4±20.6^{bc}	110.5±16.3
Mc3r	1.03±0.12	1.87±0.36^{a}	2.56±0.58^{bc}	2.48±0.54^{bc}	2.43±0.46
p-PKC	1.08±0.21	0.53±0.13^{a}	1.21±0.27^{bc}	1.17±0.23^{bc}	0.49±0.18
p-ERK1/2	0.97±0.18	0.43±0.17^{a}	1.13±0.32^{bc}	1.22±0.27^{bc}	0.47±0.18
Bcl-2	1.14±0.24	0.37±0.16^{a}	1.04±0.31^{bc}	0.97±0.28^{bc}	0.41±0.13
c-caspase-3	0.98±0.13	2.01±0.32^{a}	1.14±0.20^{bc}	1.08±0.24^{bc}	1.83±0.47

a: $P<0.05$ 与 Sham 组比较; b: $P<0.05$,与 ICH 组比较; c: $P<0.05$,与 ICH+NDP-MSH+Mc3r siRNA 组比较

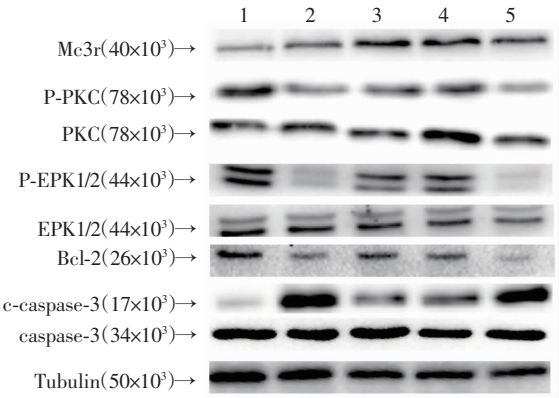


1: Sham; 2: ICH; 3: ICH+NDP-MSH; 4: ICH+NDP-MSH+Scr siRNA; 5: ICH+NDP-MSH+Mc3r siRNA

图 4 Mc3r 敲低后 Weston blot 检测 Mc3r、PKC、ERK、Bcl-2、caspase-3 在小鼠脑组织中的表达

2.4 PKC 特异性抑制剂 Staurosporine 减轻 ICH 后 NDP-MSH 的保护作用

为了进一步确定 NDP-MSH 的神经保护作用是否通过 PKC 信号通路调节,在 ICH 诱导前 48 h 通过侧脑室注射施用 PKC 特异性抑制剂 Staurosporine,并在 ICH 后 24 h 用 NDP-MSH 治疗。在 ICH 后 24 h,抑制 PKC 会加剧氧化应激反应($P<0.05$,表 2)。此外,PKC 的抑制增加了血肿周围组织中 c-caspase-3 的表达,并且降低了 p-PKC,p-ERK1/2 和 Bcl-2 的表达($P<0.05$,图 5)。



1: Sham; 2: ICH; 3: ICH+NDP-MSH; 4: ICH+NDP-MSH+Vihecle; 5: ICH+NDP-MSH+Staurosporin

图 5 PKC 抑制后 Weston blot 检测 Mc3r、PKC、ERK、Bcl-2、caspase-3 在小鼠脑组织中的表达

表 2 PKC 抑制后小鼠 ICH 后脑组织 CAT、MDA、SOD、Mc3r、PKC、ERK、Bcl-2、caspase-3 表达（$n=6,\bar{x}\pm s$）

指标	Sham	ICH	ICH+NDP-MSH	ICH+NDP-MSH+Vihecle	ICH+NDP-MSH+Staurosporin
MDA	99.8±8.2	50.4±6.3[a]	210.6±26.7[bc]	195.2±22.3[bc]	118.1±13.6
CAT	60.4±6.2	330.7±35.1[a]	175.1±20.4[bc]	185.9±20.1[bc]	286.2±29.8
SOD	101.2±8.1	49.3±6.5[a]	250.7±30.3[bc]	226.2±28.6[bc]	125.4±16.9
Mc3r	1.00±0.15	1.80±0.24[a]	2.73±0.52[bc]	2.63±0.45[bc]	1.90±0.32
p-PKC	0.98±0.13	0.52±0.16[a]	0.95±0.47[bc]	1.13±0.44[bc]	0.54±0.28
p-ERK1/2	1.25±0.26	0.53±0.11[a]	1.10±0.36[bc]	1.12±0.41[bc]	0.48±0.16
Bcl-2	1.14±0.31	0.48±0.14[a]	1.32±0.41[bc]	1.19±0.39[bc]	0.44±0.14
c-caspase-3	1.05±0.23	1.86±0.48[a]	0.97±0.32[bc]	1.12±0.27[bc]	1.92±0.38

a：$P<0.05$，与 Sham 组比较；b：$P<0.05$，与 ICH 组比较；c：$P<0.05$，与 ICH+NDP-MSH+Staurosporin 组比较

3 讨论

氧化应激反应和神经元凋亡是由 ICH 后 SBI 引起的重要的病理事件，其形成的机制非常复杂。研究表明，ICH 后由氧化剂（ROS / RNS）和抗氧化剂之间的不平衡引起的氧化应激和多种因素诱导的神经元细胞凋亡起着重要的作用[14-15]。ICH 后，大量自由基被释放，ROS 导致膜脂质过氧化、蛋白质和 DNA 的氧化损伤[16]。此外，自由基级联，炎症，细胞因子刺激，凝血酶，血液成分和许多调节神经元凋亡的基因，例如促进凋亡的 Bcl-x 和 caspase-3，是 ICH 诱导神经元凋亡的主要因素。本研究首先确定了 NDP-MSH 对 ICH 后氧化应激和神经元凋亡的神经保护作用，同时观察到以下结果：①小鼠 ICH 早期，血肿周围的 Mc3r 表达水平升高，广泛表达于神经元中；②腹腔给予 NDP-MSH 可以在 ICH 后 24 h 显著降低氧化应激和脑水肿，并伴有神经功能障碍的改善；③NDP-MSH 治疗与 p-PKC，p-ERK1/2 和 Bcl-2 的上调以及 c-caspase-3 的下调有关；④通过特异性 siRNA 抑制 Mc3r 或通过 Staurosporine 抑制 PKC 途径抵消了 NDP-MSH 对氧化应激和神经元凋亡的作用。

研究表明，NDP-MSH 可以通过刺激迷走神经背侧或软骨下的 Mc3/Mc4 受体来激活迷走神经介导的胆碱能抗炎途径并参与神经保护作用[17]。蛛网膜下腔出血后，通过减少细胞外信号调节激酶（ERK1/2）的磷酸化，NDP-MSH 阻断了 SAH 诱导的基底动脉基因表达谱的变化，抑制了涉及炎症，氧化应激反应，细胞凋亡和血管重塑[18]。此外，在神经元中，NDP-MSH 通过与 Mc3r 结合来激活 ERK1/2 信号传导途径，从而诱导细胞增殖[19]。它也可以增加细胞内 Ca^{2+} 水平，并与 PKC 途径相互作用以改善神经功能[20]。与以前的发现一致，本研究结果表明 NDP-MSH 的治疗可促进 p-PKC、p-ERK1/2、Bcl-2 的上调和 caspase-3 的下调，从而减少氧化应激和神经元凋亡。

目前，已证明 NDP-MSH 通过结合不同的黑皮质素受体（Mc1r 至 Mc5r）在中枢神经系统中发挥有效的抗炎和神经保护作用[21-22]。然而，Mc3r 是中枢神经系统中黑色素皮质受体最丰富的亚型，在下丘脑和边缘系统中含量丰富，并且与能量稳态的中枢调节密切相关[7]。本研究观察到 Mc3r 在小鼠的大脑神经元细胞中表达。此外，用 Mc3r siRNA 敲低 Mc3r 可以通过增加凋亡相关分子 caspase-3 的表达和降低 Bcl-2 的表达从而显著消除 NDP-MSH 的神经保护作用。ELISA 结果显示，敲除 Mc3r 后氧化应激反应升高。因此，有理由推测，Mc3r 的激活介导了 ICH 后 NDP-MSH 诱导的神经保护作用。尽管发现与以前的观察结果不同，这表明用 NDP-MSH 或 RO27-3225 激活 Mc4r 可以改善 ICH 动物模型的神经功能。我们建议这种差异可能是由于动物模型和组织类型的差异。

PKC 已显示出通过调节 ERK1/2 的转录活性来减轻氧化应激和细胞凋亡的作用。越来越多的证据表明，ERK1/2 或 PKC 活性的增强导致多种信号传导机制的激活，例如活性氧（ROS）/NO，Bcl 家族，从而在中风后介导氧化应激和神经元凋亡的调节[23-24]。在当前的研究中，PKC 活性的敲低降低了 p-ERK1/2，Bcl-2 的表达，升高了 caspase-3 的表达，并导致氧化应激反应加重和神经元凋亡。因此，敲低 PKC 逆转了 NDP-α-MSH 的神经保护作用。

据报道 NDP-α-MSH 在中枢神经系统疾病中通过多种途径（CREB，MAPK 等）发挥其神经保护作

用[25-26]。但本研究仅研究了 Mc3r 通过 PKC/ERK1/2 途径的作用,而未进一步研究其他途径;其次,仅研究了 NDP-α-MSH 对 ICH 后氧化应激和神经元凋亡的神经保护作用,而未进一步研究其在抗自噬等方面的作用;第三,尽管本研究结果验证了 NDP-α-MSH 的新机制,通过上调 Mc3r,激活 ERK1/2 信号通路介导的神经保护作用,但是 NDP-α-MSH 同时对 Mc1r、Mc4r 也有一定的作用,是否在这一过程中发挥作用仍需进一步探讨。此外,进一步的研究还应集中在探索 Mc3r 的更详细作用以及 Mc3r 如何增加 ERK1/2 水平的潜在机制上。

参考文献:

[1] HEMPHILL J C 3rd, ADEOYE O M, ALEXANDER D N, *et al*. Clinical performance measures for adults hospitalized with intracerebral hemorrhage: performance measures for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association[J]. Stroke, 2018, 49(7): e243-e261. DOI: 10.1161/STR.0000000000000171.

[2] DELCOURT C, SATO S, ZHANG S H, *et al*. Intracerebral hemorrhage location and outcome among INTERACT2 participants[J]. Neurology, 2017, 88(15): 1408-1414. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003771.

[3] SABA J, CARNIGLIA L, RAMÍREZD, *et al*. Melanocortin 4 receptor activation protects striatal neurons and glial cells from 3-nitropropionic acid toxicity[J]. Mol Cell Neurosci, 2019, 94: 41-51. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.12.002.

[4] PATEL C A, ACHARYA S R. Energy homeostasis and obesity: the therapeutic role ofanorexigenic and orexigenic peptide[J]. Int J Pept Res Ther, 2019, 25(3): 919-932. DOI: 10.1007/s10989-018-9740-7.

[5] CATANIA A. Neuroprotective actions ofmelanocortins: a therapeutic opportunity[J]. Trends Neurosci, 2008, 31(7): 353-360. DOI: 10.1016/j.tins.2008.04.002.

[6] YAMADA-GOTO N, OCHI Y, KATSUURA G, *et al*. Neuronal cells derived from human induced pluripotent stem cells as a functional tool ofmelanocortin system[J]. Neuropeptides, 2017, 65: 10-20. DOI: 10.1016/j.npep.2017.04.004.

[7] BENJAMINS J A, NEDELKOSKA L, LISAK R P. Melanocortin receptor subtypes are expressed on cells in the oligodendroglial lineage and signal ACTH protection[J]. J Neurosci Res, 2018, 96(3): 427-435. DOI: 10.1002/jnr.24141.

[8] RODRIGUES A R, ALMEIDA H, GOUVEIA A M. Intracellular signaling mechanisms of themelanocortin receptors: current state of the art[J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72(7): 1331-1345. DOI: 10.1007/s00018-014-1800-3.

[9] MA K, YANG Z H, YANG L M, *et al*. Activation of M1mAChRs by lesatropane rescues glutamate neurotoxicity in PC12 cells via PKC-mediated phosphorylation of ERK1/2[J]. Bosn J Basic Med Sci, 2013 13(3): 146-152. DOI: 10.17305/bjbms.2013.2346.

[10] ZHAO G C, YANG L J, WANG S Q, *et al*. TREK-2 mediates the neuroprotective effect of isoflurane preconditioning against acute cerebral ischemia in the rat[J]. Rejuvenation Res, 2019, 22(4): 325-334. DOI: 10.1089/rej.2017.2039.

[11] LIU C, DU Q M, ZHANG X, *et al*. Clematichinenoside serves as a neuroprotective agent against ischemic stroke: the synergistic action of ERK1/2 and cPKC pathways[J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9: 517. DOI: 10.3389/fncel.2015.00517.

[12] KIM J E, KANG T C. PKC, AKT and ERK1/2-mediated modulations of PARP1, NF-κB and PEA15 activities distinctly regulate regional specific astroglial responses following status epilepticus[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 180. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00180.

[13] JIANG S F, LI X Z, JIN W, *et al*. Ketamine-induced neurotoxicity blocked by N-Methyl-d-aspartate is mediated through activation of PKC/ERK pathway in developing hippocampal neurons[J]. Neurosci Lett, 2018, 673: 122-131. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.02.051.

[14] HU X, TAO C Y, GAN Q, *et al*. Oxidative stress in intracerebral hemorrhage: sources, mechanisms, and therapeutic targets[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 3215391. DOI: 10.1155/2016/3215391.

[15] XIE R X, LI D W, LIU X C, *et al*. Carnosine attenuates brain oxidative stress and apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats[J]. Neurochem Res, 2017, 42(2): 541-551. DOI: 10.1007/s11064-016-2104-9.

[16] WANG Z, ZHOU F, DOU Y, *et al*. Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via suppressing apoptosis, inflammation, oxidative stress, DNA damage, and mitochondria injury[J]. Transl Stroke Res, 2018, 9(1): 74-91. DOI: 10.1007/s12975-017-0559-x.

[17] GIULIANI D, OTTANI A, NERI L, *et al*. Multiple beneficial effects ofmelanocortin MC4 receptor agonists in experimental neurodegenerative disorders: Therapeutic perspectives[J]. Prog Neurobiol, 2017, 148: 40-56. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.11.004.

[18] HOLLOWAY P M, SMITH H K, RENSHAW D, *et al*.

Targeting themelanocortin receptor system for anti-stroke therapy[J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(2): 90-98. DOI: 10.1016/j.tips.2010.11.010. [PubMed]

[19] KONDA Y, GANTZ I, DELVALLE J, *et al*. Interaction of dual intracellular signaling pathways activated by the melanocortin-3 receptor [J]. J Biol Chem, 1994, 269(18): 13162-13166.

[20] WACHIRA S J, HUGHES-DARDEN C A, TAYLOR C V, *et al*. Evidence for the interaction of protein kinase C andmelanocortin 3-receptor signaling pathways[J]. Neuropeptides, 2003, 37(4): 201-210. DOI: 10.1016/s0143-4179(03)00026-x.

[21] SABA J, CARNIGLIA L, RAMÍREZ D, *et al*. Melanocortin 4 receptor activation protects striatal neurons and glial cells from 3-nitropropionic acid toxicity[J]. Mol Cell Neurosci, 2019, 94: 41-51. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.12.002.

[22] CATANIA A, LONATI C, SORDI A, *et al*. The peptide NDP-MSH induces phenotype changes in the heart that resemble ischemic preconditioning[J]. Peptides, 2010, 31(1): 116-122. DOI: 10.1016/j.peptides.2009.09.030.

[23] SHU Q, ZHANG J H, MA W, *et al*. Orexin-A promotesGlu uptake by OX1R/PKCα/ERK1/2/GLT-1 pathway in astrocytes and protects co-cultured astrocytes and neurons against apoptosis in Anoxia/hypoglycemic injury in vitro[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 425(1/2): 103-112. DOI: 10.1007/s11010-016-2866-z.

[24] LEE B K, JUNG Y S. Alliumcepa extract and quercetin protect neuronal cells from oxidative stress via PKC-ε inactivation/ERK1/2 activation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 2495624. DOI: 10.1155/2016/2495624.

[25] RAMÍREZ D, SABA J, CARNIGLIA L, *et al*. Melanocortin 4 receptor activates ERK-cFos pathway to increase brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes and hypothalamus[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 411: 28-37. DOI: 10.1016/j.mce.2015.04.008.

[26] MYKICKI N, HERRMANN A M, SCHWAB N, *et al*. Melanocortin-1 receptor activation is neuroprotective in mouse models ofneuroinflammatory disease[J]. Sci Transl Med, 2016, 8(362): 362ra146. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf8732.

(**收稿**:2020-03-25;**修回**:2020-04-26)

(编辑 吴培红)