

二甲双胍在对缺血性脑卒中的脑保护作用及机制的研究进展

吕程美 王晴晴 孙永鑫 张 兵

【中图分类号】 R743 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2015)05-0317-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2015.05.019

缺血性脑卒中是全世界范围内导致死亡的第二大疾病^[1],由于它致死率较高,给社会造成了极大负担。目前唯一被 FDA 批准用于缺血性脑卒中治疗的药物是 rt-PA,在脑卒中发生 4.5 h 内应用 rt-PA 对提高神经功能起到一定促进作用,但由于其治疗窗窄,不到 5% 的患者从中受益^[2]。二甲双胍是目前治疗 2 型糖尿病的一线用药,通过激活 AMPK,二甲双胍抑制肝糖原异生,促进外周糖利用,从而发挥有效的降糖作用^[3]。近期的流行病学研究显示,长期接受二甲双胍治疗的糖尿患者脑卒中发生风险及严重程度都显著下降,且与二甲双胍的降糖作用无关^[4]。这一结果使得二甲双胍的应用有可能成为改善脑卒中患者预后的重要治疗手段。本研究主要针对二甲双胍对缺血性脑卒中的脑保护作用及作用机制进行综述。

1 二甲双胍在缺血性脑卒中后的神经保护作用

1.1 缺血性脑卒中发生前二甲双胍单次剂量预处理减少脑梗死面积、细胞凋亡、神经功能缺损

Jiang 等用大鼠建立局脑缺血(MCAO)模型,在实施 MCAO 24 h 前腹腔单次注射二甲双胍(10 mg/kg)进行预处理,MCAO 后 24 h TTC 染色结果显示二甲双胍预处理组脑梗死面积显著减少,Benderson 法神经功能评分得到显著改善,TUNEL 凋亡细胞数明显减少^[5]。二甲双胍组血糖水平与对照组无统计学差异。认为二甲双胍预处理能减少缺血性脑卒中后的梗死面积、细胞凋亡及神经功能损伤。

1.2 缺血性脑卒中后应用二甲双胍减少血脑屏障破坏、减少梗死面积、促进神经功能恢复与组织修复

Takata 等利用体外培养的大鼠脑毛细血管内皮细胞构建体外血脑屏障模型,证实二甲双胍能提高血管内皮细胞的跨细胞电阻值,降低内皮细胞对荧光素钠和伊文思蓝的通透性,改善缺血缺氧后的血脑屏障功能^[6]。Liu 等使用 CD-1 大鼠构建 MCAO 模型,再灌注时开始腹腔注射二甲双胍(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),在 MCAO 后的 1、3、14 d 对大鼠进行

神经功能、梗死面积和血脑屏障的测定,结果显示二甲双胍并不影响血糖水平,但是能显著减少梗死面积,促进 MCAO 后神经功能的恢复,显著减少大鼠脑伊文思蓝渗出,紧密连接相关蛋白(occludin, ZO-1 和 claudin-5)表达与对照组比较显著增加,从而减少 MCAO 后的血脑屏障损害^[7]。Jin 等^[8]应用小鼠 MCAO 模型在 MCAO 后 24h 开始腹腔注射二甲双胍(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连续使用 30 d。结果显示二甲双胍组在滚筒实验及神经缺损功能评分中显著优于对照组,MCAO 后 30 d 的“皮质宽度指数(cortical width index)”二甲双胍组显著大于对照组,即皮质形成空洞的程度显著小于对照组。此外,研究者还证实二甲双胍促进了缺血区域新生血管的生成,促进室管膜下区与侧脑室壁神经元的生成,从而进一步促进了组织修复。

2 二甲双胍对缺血性脑卒中的神经保护作用机制

2.1 通过激活 AMPK 促进小胶质细胞/巨噬细胞由 M1 极化状态向 M2 态转换而发挥神经保护作用

二甲双胍是磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)激动剂^[9],当 ATP 与 AMP 比例失衡即 AMP 比例增加时,二甲双胍通过促进 AMPK 上苏氨酸残基(Thr-172)的磷酸化而激活 AMPK^[10]。生理情况下小胶质细胞处于静止监视状态,随内环境的不同表现为不同表型即 M1、M2 型^[11-12],当病原体入侵机体后小胶质细胞被迅速激活、反应。M1 型小胶质细胞/巨噬细胞加剧神经元死亡,而 M2 型则提高损伤后组织修复^[12-13]。研究证实二甲双胍能促进小胶质细胞/巨噬细胞由 M1 型向 M2 型转变^[14]。Jin 等证明在 MCAO 后二甲双胍可通过激活 AMPK 促进小胶质细胞/巨噬细胞由 M1 向 M2 极化状态转变,从而促进组织修复,发挥神经保护作用^[8]。

2.2 通过减轻炎症反应发挥神经保护作用

MCAO 之后过度的炎症反应具有神经毒性作用,影响神经功能的恢复。近期研究证实二甲双胍能通过激活 AMPK 从而降低血管内皮细胞 TNF- α 诱导的炎症反应^[15]。此外,AMPK 的激活能促进免疫反应由促炎向抗炎转变^[11]。生理情况下细胞粘附因子-1(ICAM-1)在血管内皮细胞、淋巴细胞等细胞中持续低水平表达,在缺氧情况下 ICAM-1 表达显著增加,从而增加中性粒细胞粘附与组织浸润,在缺血

基金项目:国家自然科学基金项目(编号为 81372026);国家自然科学基金项目(编号为 81000822)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第二医院,黑龙江省麻醉与危重病重点实验室,黑龙江省普通高等学校麻醉基础理论与应用研究重点实验室[吕程美 王晴晴 孙永鑫 张 兵(通信作者)]

性脑卒中转归过程中发挥重要作用^[16-17]。研究表明二甲双胍能降低血浆中 ICAM-1 的水平^[18]。Liu 等进一步揭示二甲双胍通过 AMPK-NF- κ B 通路减少 ICAM-1 的表达,减轻中性粒细胞的浸润和炎症因子对血脑屏障的破坏,促进神经功能恢复^[7]。

2.3 通过改变脑组织中磷酸化蛋白组学而发挥神经保护作用

磷酸化蛋白组学分析特别适用于分析药物对信号通路的影响^[19]。Khang 等使用二甲双胍($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)处理小鼠,取脑组织作为样品 1DE/2DE 凝胶电泳、液相色谱-质谱分析及免疫印迹测定脑组织内各种磷酸化蛋白质的表达情况,结果显示磷酸化 AMPK、磷酸化的能量代谢酶原(HADH、LVD、MDH1 等)表达有所下降,而线粒体代谢蛋白(ADP/ATP 转移酶 1、ATP 合酶等)、神经结构蛋白(髓鞘蛋白脂蛋白 PLP1、神经细胞粘附因子 NCAM1)表达增加^[20]。ATP 合酶发生磷酸化后活性降低,减少了细胞氧化磷酸化水平,导致神经元向无氧酵解转变以产生 ATP,这种代谢的转变被认为能通过 ROS 预处理将神经元坏死程度降至最小^[21],而神经结构蛋白对细胞的结构和完整性都有重要意义。同时,研究者也观察到应用二甲双胍后磷酸化 α -突触核蛋白表达显著下降,而磷酸化 α -突触核蛋白的过度表达具有神经毒性^[22]。因此,二甲双胍发挥脑保护的一个机制可能与磷酸化蛋白组学的改变有关。

2.4 通过促进血管生成与神经元生成而发挥神经保护作用

缺血性脑卒中后脑组织中的血管生成是决定神经功能恢复的主要机制之一。Jin 等发现,小鼠 MCAO 模型后应用二甲双胍促进缺血区域的血管生成,这种促进血管生成的作用与小胶质细胞极化状态的改变有关^[8]。此外,还证实二甲双胍组室管膜下区与侧脑室壁有神经元再生现象,对远期神经功能恢复起到了积极的促进作用。Venna 等用小鼠建立 MCAO 模型后给予二甲双胍($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续应用 3 周,脑组织免疫荧光结果显示缺血区域新生血管的密度明显大于对照组,且缺血同侧血管内皮生长因子(VEGF)表达显著增加,并证明二甲双胍的促血管生成作用是由 AMPK 介导^[23]。

2.5 通过改善氧化应激水平而发挥神经保护作用

脑组织对氧化应激引起的损伤特别敏感,活性氧的过度生成产生氧化性损伤,包括脂质过氧化、蛋白氧化、DNA 损伤,从而导致神经细胞的凋亡和坏死^[24]。Abd-Elsameea 等^[25]用大鼠建立全脑缺血模型,在模型建立前 1 周通过灌胃法给予二甲双胍($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),之后测定脑组织中反映氧化应激的指标,结果显示二甲双胍明显抑制缺血脑组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSHPx),SOD 及过氧化氢酶的生成,从而抑制氧化应激反应,从而发挥神经保护作用。

2.6 二甲双胍通过减轻脑缺血后糖耐受不良而发挥神经保护作用

Harada 等认为脑缺血后会出现胰岛素抵抗,从而引起高糖血症,这种现象被称之为脑缺血后糖耐受不良,能加重神经功能损害^[26]。抑制缺血引起的高糖血症则能减轻神经功能损害,因此认为在脑缺血后应用二甲双胍能减轻脑缺血后糖耐受不良,从而发挥神经保护作用。

3 存在问题与应用前景

目前二甲双胍在缺血性脑卒中的神经保护作用尚存在一定争议。Li 等发现长期使用二甲双胍(MCAO 前 3 周或后 3 周)能显著降低脑梗死面积,但提前 3 d 使用却加重缺血性脑卒中的损伤^[27]。Li 则观察到糖尿病大鼠脑卒中急性期应用二甲双胍会加重神经功能损伤^[28]。造成这种不同实验结果的可能原因是不同的动物模型,给药的时间点与方式不同,长期应用二甲双胍的动物模型趋向于具有神经保护作用。因此,二甲双胍在缺血性脑卒中的神经保护作用有待进一步的临床研究证实。二甲双胍治疗的过程中非糖尿病大鼠血糖并不受影响,且是广泛使用的降糖药,副作用小,因此有广泛的研究与应用前景。

参 考 文 献

- Mathers CD, Boerma T, Ma Fat D. Global and regional causes of death. *Br Med Bull*, 2009, 92: 7-32.
- Kleindorfer D, Lindsell CJ, Brass L, et al. National US estimates of recombinant tissue plasminogen activator use: ICD-9 codes substantially underestimate. *Stroke*, 2008, 39(3): 924-928.
- Calvert JW, Gundewar S, Jha S, et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*, 2008, 57(3): 696-705.
- Selvin E, Hirsch AT. Contemporary risk factor control and walking dysfunction in individuals with peripheral arterial disease: NHANES 1999 2004. *Atherosclerosis*, 2008, 201(2): 425-433.
- Jiang T, Yu JT, Zhu XC, et al. Acute metformin preconditioning confers neuroprotection against focal cerebral ischaemia by pre-activation of AMPK-dependent autophagy. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13): 3146-3157.
- Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, et al. Metformin induces up-regulation of blood brain barrier functions by activating AMP-activated protein kinase in rat brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013, 433(4): 586-590.
- Liu Y, Tang G, Li Y, et al. Metformin attenuates blood-brain barrier disruption in mice following middle cerebral artery occlusion. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 177.
- Jin Q, Cheng J, Liu Y, et al. Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associated with enhanced alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke. *Brain Behav Immun*, 2014, 40: 131-142.
- Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Clin Invest*, 2001, 108(8): 1167-1174.
- Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, et al. Met-

- formin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun*, 2013, 4: 2192.
- 11 O'Neill LA, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*, 2013, 493(7432): 346-355.
- 12 Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *Pathol*, 2013, 229(2): 176-185.
- 13 Hu X, Li P, Guo Y, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, 43(11): 3063-3070.
- 14 Kato Y, Koide N, Komatsu T, et al. Metformin attenuates production of nitric oxide in response to lipopolysaccharide by inhibiting MyD88-independent pathway. *Horm Metab Res*, 2010, 42(9): 632-636.
- 15 Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, et al. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension*, 2006, 47(6): 1183-1188.
- 16 Greenwood J, Mason JC. Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends Immunol*, 2007, 28(2): 88-98.
- 17 Strecker JK, Sevimli S, Schilling M, et al. Effects of G-CSF treatment on neutrophil mobilization and neurological outcome after transient focal ischemia. *Exp Neurol*, 2010, 222(1): 108-113.
- 18 Diamanti-Kandarakis E, Paterakis T, Alexandraki K, et al. Indices of low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome and the beneficial effect of metformin. *Hum Reprod*, 2006, 21(6): 1426-1431.
- 19 Lemeer S, Heck AJ. The phosphoproteomics data explosion. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, 13(4): 414-420.
- 20 Khang R, Park C, Shin JH. The biguanide metformin alters phosphoproteomic profiling in mouse brain. *Neuroscience Letters*, 2014, 579: 145-150.
- 21 Formentini L, Pereira MP, Sanchez-enizol L, et al. In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO*, 2014, 33(7): 762-778.
- 22 Dulovic M, Jovanovic M, Xilouri M, et al. The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro. *Neurobiol Dis*, 2014, 63: 1-11.
- 23 Venna VR, Li J, Hammond MD, et al. Chronic metformin treatment improves post-stroke angiogenesis and recovery after experimental stroke. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(12): 2129-2138.
- 24 Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 222(3): 236-245.
- 25 Abd-Elsameea AA, Moustaf AA, Mohamed AM. Modulation of the oxidative stress by metformin in the cerebrum of rats exposed to global cerebral ischemia and ischemia/reperfusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(16): 2387-2392.
- 26 Harada S, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. The importance of regulation of blood glucose levels through activation of peripheral 5'-AMP-activated protein kinase on ischemic neuronal damage. *Brain Res*, 2010, 1351: 254-263.
- 27 Li J, Benashski SE, Venna VR, et al. Effects of metformin in experimental stroke. *Stroke*, 2010, 41(2): 2645-2652.
- 28 Li W, Qu Z, Prakash R, et al. Comparative analysis of the neurovascular injury and functional outcomes in experimental stroke models in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Brain Res*, 2013, 1541: 106-114.

(2015-03-19 收稿)

• 消 息 •

《卒中与神经疾病》网上平台正式开通

尊敬的新老用户：

《卒中与神经疾病》网上投稿平台已正式开通，网址为 <http://wdstroke.paperopen.com>。欢迎踊跃投稿。《作者在线投稿说明》在网站首页的“作者园地”栏目下。本刊联系电话：027-88328261，邮箱地址：czhyshjjb@163.com。

《卒中与神经疾病》杂志编辑部