

二甲双胍减轻氧糖剥夺/复糖复氧所诱导的小胶质细胞炎性反应

董银凤, 张 华*

(南京中医药大学护理学院内科学教研室, 江苏 南京 210023)

[摘要] **目的:**研究二甲双胍在氧糖剥夺/复糖复氧所致小胶质细胞炎性反应中的作用。**方法:**建立氧糖剥夺/复糖复氧模型诱导小胶质细胞(BV-2 细胞株)的活化,给予不同浓度(0.02、0.20、2.00 mmol/L)的二甲双胍预处理 BV-2 细胞,通过 MTT 活性和乳酸脱氢酶活性检测确定二甲双胍的有效浓度;通过酶联免疫吸附试验测定细胞上清炎性因子白介素(IL)-1 β 的含量,免疫荧光检测细胞表面分子 CD11b 的表达及蛋白免疫印迹法分析胞核蛋白 κ B 的表达。**结果:**二甲双胍(2.00 mmol/L)能够减少氧糖剥夺/复糖复氧模型诱导的 BV-2 细胞乳酸脱氢酶的释放并增加 MTT 的活性,降低细胞表面分子 CD11b 的表达,抑制胞核蛋白 κ B 的核转位,减少 IL-1 β 的生成与释放。**结论:**二甲双胍能够减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致小胶质细胞的炎性反应。

[关键词] 二甲双胍;氧糖剥夺;小胶质细胞;炎性反应

[中图分类号] R742

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)10-1349-06

doi:10.7655/NYDXBNS20151003

Metformin reduces the oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced microglial inflammation

Dong Yinfeng, Zhang Hua*

(Department of Internal Medicine, Nursing School of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:**To study the effects of metformin on oxygen glucose deprivation and reoxygenation (OGD/R)-induced microglial inflammatory reaction. **Methods:** To establish the OGD/R model of microglia(BV-2 cells), BV-2 cells were pretreated with different concentrations(0.02, 0.20 and 2.00 mmol/L) of metformin, the effective concentration of metformin was determined by MTT and lactate dehydrogenase (LDH) assays. The supernatant of IL-1 β was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, expressions of nuclear factor kappaB and CD11b were analyzed by Western blot and immunofluorescence, respectively. **Results:** Metformin (2.00 mmol/L) decreased the release of OGD/R-induced LDH from BV-2 cells and increased MTT activity, reduced the expression of cell surface molecule CD11b, inhibited nuclear translocation of NF-kappaB, and decreased production and release of IL-1 β . **Conclusion:** Pretreatment with metformin could reduce OGD/R-induced microglia inflammatory response.

[Key words] metformin; oxygen-glucose deprivation; microglia; inflammation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(10): 1349-1354]

二甲双胍为双胍类口服降糖药,临床主要用于对饮食和锻炼治疗无效的 2 型糖尿病患者的治疗。近年研究发现二甲双胍除了降糖、降脂、减轻体重及增加胰岛素的敏感性等作用之外,还具有抑炎和抗氧化的作用^[1-3]。实验研究证实二甲双胍对老年痴呆症及亨廷顿病等神经退行性疾病有较

好的疗效,主要与其抑炎作用有关^[4-5]。越来越多的研究认为脑内胶质细胞介导的神经炎症在神经系统疾病中具有举足轻重的地位^[6-7]。脑卒中后数小时即可激活脑内的小胶质细胞,产生大量的致炎因子白介素-1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α),并维持数天,持续存在的致炎因子是促进脑缺血后神经细胞凋亡的重要因素^[8]。寻找靶向调节小胶质细胞炎性反应的药物,对脑卒中的治疗有重要意义。

[基金项目] 江苏省高校自然面上项目(14KJB310010);南京中医药大学青年基金项目资助(13XZR30)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:zhnhjx@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

BV-2 细胞株是小鼠源性永生化的小胶质细胞^[9]。细胞培养于正常含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 DMEM 完全培养基中。

二甲双胍 (EJ110551, 天津太平洋有限公司)。胎牛血清和 DMEM (Gibco 公司, 美国), 细胞培养板 (Corning 公司, 德国), Hoechst 33342 荧光染料与 MTT (Sigma 公司, 美国), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (南京建成生物有限公司), 二甲基亚砷 (上海凌峰化学试剂有限公司), ELISA 试剂盒 (上海康成生物有限公司), 蛋白提取试剂盒 (南京凯基生物有限公司), 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物研究所), 大鼠抗 CD11b (Abcam 公司, 美国), 兔抗 NF- κ B p65 稀释比为 1:800 (SAB 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与给药

培养 BV-2 细胞并接种于细胞培养板中, 随机分为正常对照组、正常对照+二甲双胍组、氧糖剥夺/复糖复氧组、氧糖剥夺/复糖复氧+二甲双胍预处理组。给药方法如下: 氧糖剥夺前给予不同浓度二甲双胍预处理 1 h, 氧糖剥夺完成后换正常培养基时继续给予二甲双胍在正常 CO₂ 培养箱中孵育 24 h。

1.2.2 氧糖剥夺/复糖复氧模型

BV-2 细胞培养并接种于细胞培养板中, 进行体外氧糖剥夺/复糖复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 模型的制备, 首先将完全培养基换成无糖的 DMEM 培养基。置入参数预先设置好的三气培养箱 (气体参数设置为: 1% O₂, 94% N₂, 5% CO₂), O₂ 浓度降至 1.2% 时开始计时, 稳定 1 h 后, 将无糖 DMEM 培养基换成含 10% FBS DMEM 的完全培养基, 并置于正常 (气体参数设置为: 21% O₂, 74% N₂, 5% CO₂) 的细胞培养箱中继续培养。

1.2.3 细胞免疫荧光化学染色

将细胞培养基弃除, 用预冷的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 缓冲液洗涤细胞 3 次。将细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, 再用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤。分别加入一抗: 大鼠抗 CD11b (1:200), 4℃ 过夜。0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤细胞, 加入二抗并在室温孵育 1 h。0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤细胞。加入终浓度为 1 μ g/mL 的 Hoechst 33342 荧光染料室温孵育 5 min。0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次。

随机选取 6 个视野, 在荧光显微镜下观察, 通过酶标仪分析荧光强度。

1.2.4 细胞上清 LDH 的测定

BV-2 细胞经 OGD 1 h 和 R 24 h 后, 吸出上清, 应用 LDH 试剂盒 (南京建成生物有限公司), 测定细胞上清中 LDH 的含量。所有操作步骤均按试剂盒说明书进行。于自动酶标仪上 (波长 450 nm) 测定吸光值的大小, 根据计算公式换算出 LDH 的含量。

1.2.5 MTT 活性的测定

将正常培养基弃除, 每孔加入 180 μ L 无血清的 DMEM 培养基和 20 μ L MTT (50 mg/mL, Sigma 公司, 美国), 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 200 μ L 二甲基亚砷, 振荡 5 min, 于自动酶标仪上 (波长 490 nm) 测定吸光值的大小。

1.2.6 酶联免疫法测定细胞上清 IL-1 β 的含量

BV-2 细胞经 OGD 1 h 和 R 24 h 后, 收集细胞上清液用于测定 IL-1 β 的含量, 所有步骤均按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.2.7 蛋白质免疫印迹法

BV-2 细胞经 OGD 1 h 和 R 24 h 后, 弃除上清, 用预冷的 D-Hank's (pH 7.4) 缓冲液洗涤, 加入裂解液并将细胞刮下。BCA 法测定细胞总蛋白的含量。沸水煮 5 min 使蛋白预变性。取 30 μ g 蛋白样品, 用 12% SDS-PAGE 胶进行电泳分离, 利用电转系统 C (miniprotein-III wet transfer unit, Bio-Rad 公司, 美国) 转至 PVDF 膜 (Millipore 公司, 美国)。10% 脱脂奶粉-TBST (pH 7.5, 10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 室温封闭 1 h, 加入一抗, 4℃ 过夜。TBST 漂洗 3 次后, 加入二抗并在室温孵育 1 h。ECL (Pierce, Thermo Scientific 公司, 美国) 发光底物染 1 min。Omega 161C 全自动化学发光凝胶成像系统显影分析。

1.3 统计学方法

数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 One-way ANOVA 分析组间差异, 多组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。P \leq 0.05 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 OGD 不同时间点 BV-2 细胞形态变化

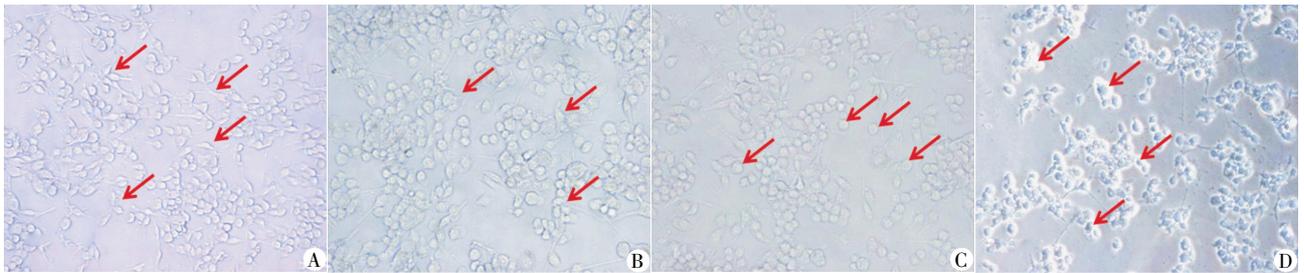
正常状态下 BV-2 细胞呈梭形, 突起细长, 细胞胞体透亮 (图 1A)。OGD 0.5 h 和 R 24 h 后 (图 1B), 部分细胞出现胞体增大, 突起缩短, 呈椭圆或圆形。OGD 1 h 和 R 24 h 后 (图 1C), 细胞胞体增大, 变圆, 突起缩短并增多。OGD 2 h 和 R 24 h 后 (图 1D),

细胞胞体缩小,呈不规则状,透光性差,且数量明显减少,细胞出现凋亡的现象。

2.2 MTT 与 LDH 测定的结果

MTT 和 LDH 是反映细胞存活与代谢状态的重要指标。BV-2 细胞 OGD 1 h 和 R 24 h 后,细胞 MTT 活性并没有显著改变(图 2A),而细胞释放

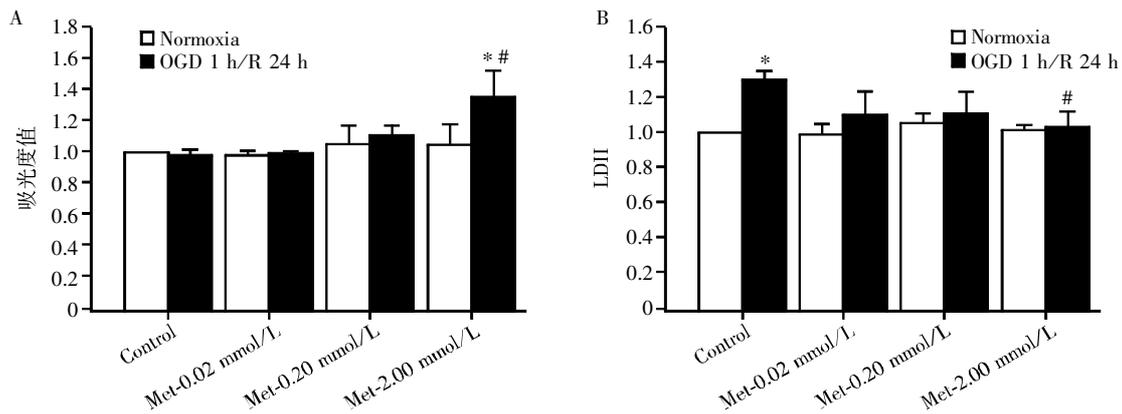
LDH 较正常对照组显著增多(图 2B);给予不同浓度(0.02、0.20 和 2.00 mmol/L)的二甲双胍不影响正常状态下细胞的 MTT 活性(图 2A)及 LDH 的释放(图 2B),但二甲双胍(2.00 mmol/L)预处理能显著减少 OGD/R 诱导的 LDH 释放的增多(图 2B)并增加细胞 MTT 的活性(图 2A)。



A:正常状态;B:OGD 0.5 h/R 24 h;C:OGD 1 h/R 24 h;D:OGD 2 h/R 24 h。

图 1 光学显微镜下观察静息状态及氧糖剥夺不同时间点诱导活化的小胶质细胞的形态(x200)

Figure 1 Morphology of resting and activated microglia after different time-points of OGD and reoxygenation 24 h(x200)



A:MTT 活性测定;B:LDH 测定。与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与 OGD/R 组比较,* $P < 0.05$ 。

图 2 二甲双胍逆转 OGD/R 诱导的小胶质细胞活力的降低

Figure 2 Metformin reversed OGD/R-induced the decreases of the BV-2 cell viability

2.3 免疫荧光化学法标记 CD11b 表达的结果

生理状态下,CD11b 表达在小胶质细胞/巨噬细胞的表面,作为小胶质细胞/巨噬细胞的重要标记分子,应激或损伤时能诱导 CD11b 的表达增多。如图 3 所示,正常状态下,CD11b 表达在 BV-2 细胞胞膜与胞浆中,给予二甲双胍(2 mmol/L)处理不影响正常状态下小胶质细胞中 CD11b 的表达;当 BV-2 细胞 OGD 1 h 和 R 24 h 后,BV-2 细胞中 CD11b 的表达较正常对照组明显增多,而给予二甲双胍(2 mmol/L)处理能显著抑制 OGD/R 诱导的 BV-2 细胞中 CD11b 的表达增高。

2.4 Western blot 半定量分析 NF- κ B 表达的结果

细胞在正常无刺激的生理状态下,核因子- κ B(NF- κ B)主要以无活性的形式存在于胞浆中,在细胞受刺激后,NF- κ B 被激活并进入细胞核中,作为重要的转录分子,诱导靶基因的表达。本实验结果显示,BV-2

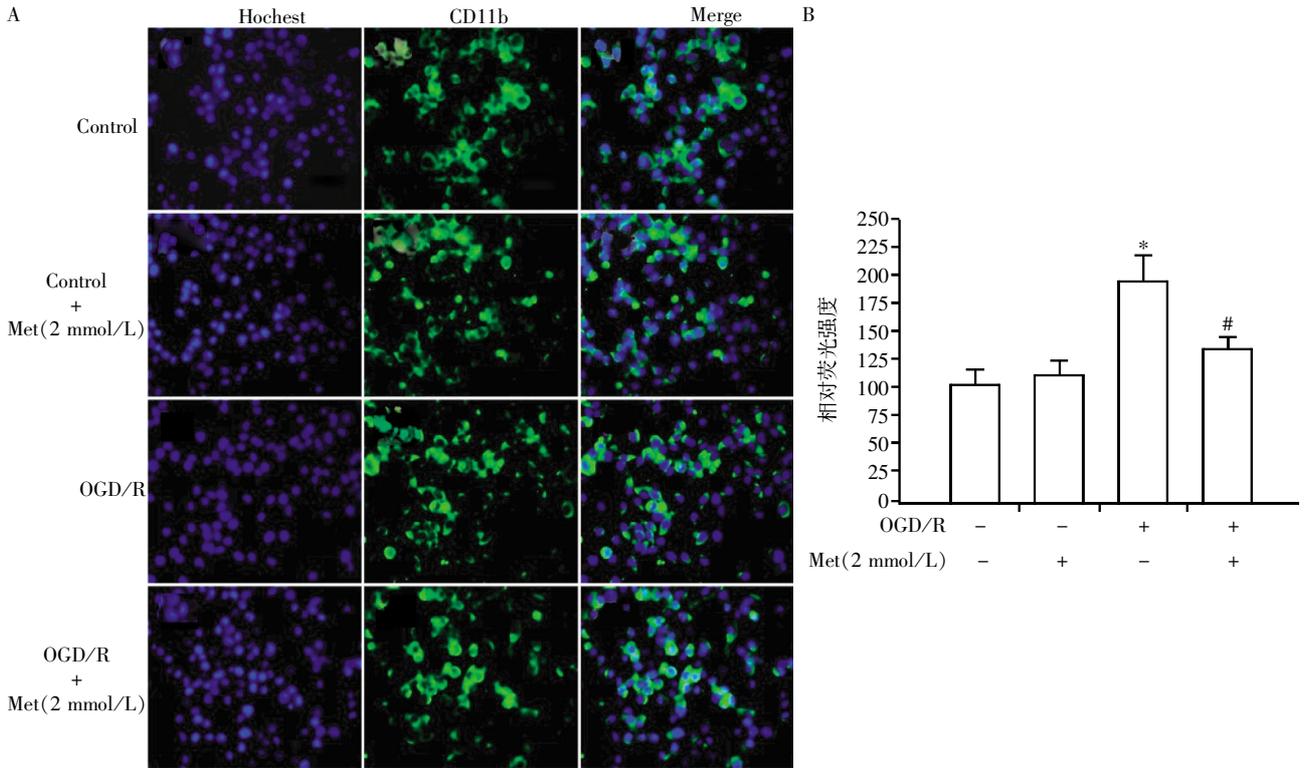
细胞 OGD 1 h 和 R 24 h 后,胞核内 NF- κ B 的表达显著增高;而给予二甲双胍(2 mmol/L)预处理能显著降低 OGD/R 诱导胞核内 NF- κ B 表达的增高(图 4)。

2.5 ELISA 检测细胞上清 IL-1 β 含量的结果

IL-1 β 属于 ILs 家族的重要成员,是重要的致炎分子,在损伤刺激及炎症反应下,能被诱导大量表达并释放至胞外。本研究通过 ELISA 测定细胞上清液中 IL-1 β 的含量,结果显示,BV-2 细胞在 OGD 1 h 和 R 24 h 后,细胞上清液中 IL-1 β 含量较正常对照组显著升高,而给予二甲双胍(2 mmol/L)预处理的 BV-2 细胞,细胞上清液中 IL-1 β 的含量较 OGD/R 显著降低(图 5)。

3 讨论

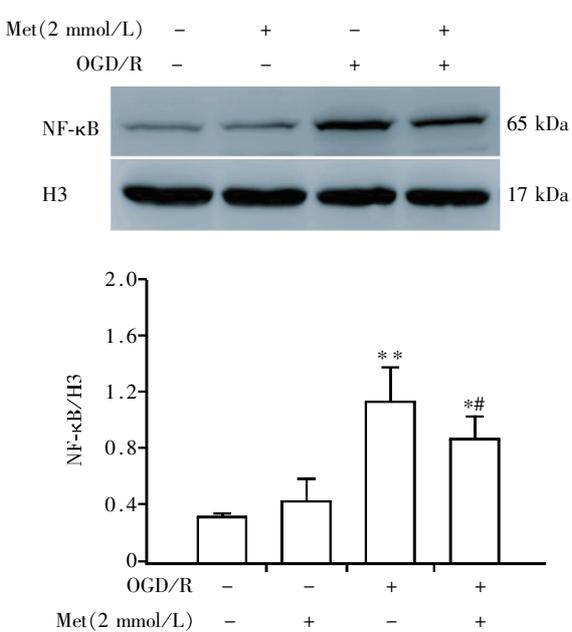
小胶质细胞作为脑内固有的免疫吞噬细胞,对中枢神经系统的免疫监视起重要作用。生理情况



A:代表性的免疫荧光化学图片($\times 400$),绿色荧光:CD11b,蓝色荧光:Hoechst 33342 标记细胞核;B:荧光强度分析图,与正常对照组比较, $*P < 0.05$;与 OGD/R 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 3 二甲双胍抑制 OGD/R 诱导的小胶质细胞表面分子 CD11b 的表达增高

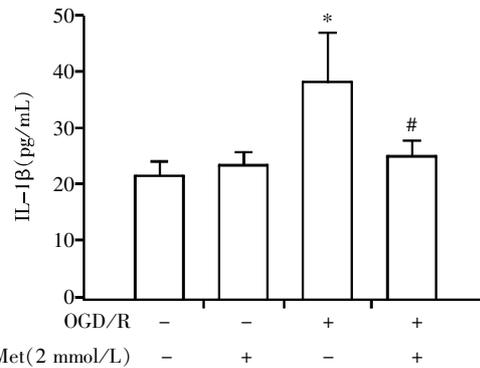
Figure 3 Metformin inhibited OGD/R-induced up-regulation of CD11b in BV-2 cell lines



与正常对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$;与 OGD/R 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 4 二甲双胍抑制 OGD/R 诱导的小胶质细胞 NF-κB 的核转位

Figure 4 Metformin inhibited OGD/R-induced the nuclear translocation of NF-κB in BV-2 cell lines



与正常对照组比较, $*P < 0.05$;与 OGD/R 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 5 二甲双胍降低 OGD/R 诱导的小胶质细胞 IL-1β 的释放
Figure 5 Metformin reduced OGD/R-induced IL-1β release from BV-2 cell lines

下,小胶质细胞呈静息状态,呈梭形、突起较少且细长。当在损伤相关分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMP) 和病原相关分子模式 (pathogen associated molecular patterns, PAMP) 作用下能被激活,胞体增大,突起缩短并增多,释放大量的炎性介质;活化的小胶质细胞主要分为两种类型,其中, M1 型活化的小胶质细胞主要释放大量的致炎因子 IL-1β;而 M2 型主要释放抑炎因子 IL-4 和

IL-10^[10]。脑缺血再灌注损伤后,小胶质细胞被激活成 M1 型并产生大量的促炎介质,促进神经元的凋亡,从而加重脑缺血损伤^[11]。IL-1 β 是参与机体固有免疫反应的重要促炎因子,在脑缺血再灌注损伤的早期,IL-1 β 主要来源于脑内的小胶质细胞^[12-13]。OGD/R 作为脑缺血再灌注的离体细胞损伤模型,能够激活小胶质细胞(图 1)。CD11b 作为小胶质细胞的标记物,其表达与小胶质细胞的状态密切相关。当小胶质细胞活化时,能够诱导 CD11b 的表达增高;而细胞过度激活出现凋亡时 CD11b 的表达降低^[14]。本研究中,OGD 1 h 和 R 24 h 能促进细胞表面分子 CD11b 的表达(图 3)并释放大量的致炎因子 IL-1 β (图 5),提示 OGD/R 能够诱导小胶质细胞活化呈 M1 型致炎状态。

细胞的代谢与炎症反应密切相关。OGD/R 导致细胞能量代谢障碍,能够产生大量的 ROS 及 LDH 等酸性物质释放至胞外,从而激活小胶质细胞。本研究结果显示,OGD/R 引起小胶质细胞 LDH 的释放增加,二甲双胍降低 OGD/R 诱导的 LDH 的释放增多,而促进细胞活力的恢复(图 2)。NF- κ B 作为介导细胞代谢与炎症的重要信号分子,是属于 NF- κ B/Rel 家族高度保守的核转录因子。静息状态下,NF- κ B 处于失活状态,与抑制蛋白 I κ B 结合并存在于胞浆中。当细胞受到某些刺激时,I κ B 被磷酸化或泛素化而发生水解,使得 NF- κ B 转位到核内与靶基因的 DNA 序列结合,从而诱导炎性分子靶基因的转录^[15]。OGD/R 诱导小胶质细胞 NF- κ B 的核转位(图 4),从而促进炎性介质 IL-1 β 的生成(图 5);二甲双胍抑制 OGD/R 诱导小胶质细胞的炎性反应,与抑制 NF- κ B 的核转位(图 4),减少 IL-1 β 的生成有关(图 5)。此外,目前的研究发现,激活的小胶质细胞释放 IL-1 β 还与细胞外的 ATP 浓度、ROS 水平、LDH 的量及 PH 值等因素有关^[16-18]。

二甲双胍通过作为临床一线降糖药,其机制主要通过减少肝糖原形成,抑制糖异生并增加胰岛素受体的敏感性。基础实验研究及临床研究均发现,二甲双胍具有降糖效应以外的抗炎及抗氧化的作用,且作用机制与降低血糖水平无关。动物研究证明二甲双胍能顺利跨过血脑屏障进入中枢发挥作用,其血药浓度的分布具有脑区差异性^[19]。Łabuzek 等^[20]的研究发现,二甲双胍(4 mmol/L)预处理能显著改善 LPS 诱导的小胶质细胞的损伤并增加其吞噬功能。本研究将非胰岛素分泌细胞-BV2 细胞置于非高糖代谢状态的 OGD/R 模型中,并参考 Łabuzek

等的研究结果,给予二甲双胍进行干预,结果显示二甲双胍(2 mmol/L)能够减轻此模型诱导的小胶质细胞的炎症反应,结果表明二甲双胍的抗炎效应并不依赖于降血糖作用。目前研究揭示二甲双胍的抗炎作用主要体现在减轻脂多糖诱导的炎症以及糖尿病高糖代谢状态引起的脂肪细胞及外周炎性细胞介导的慢性炎症^[21-22]。而本研究新发现二甲双胍对 OGD/R 模型诱导的小胶质细胞炎性反应也具有调节作用,深化了当前关于二甲双胍抗炎作用的认识,而详细作用机制仍有待进一步研究阐明。

总之,本研究发现二甲双胍抗 OGD/R 诱导的小胶质细胞炎症,不仅拓展了二甲双胍的抗炎效应范围,而且为二甲双胍与其他神经保护剂联合应用于脑卒中的治疗学研究有重要提示意义。二甲双胍长期作为临床一线抗糖尿病药物的历史,有望得到新的突破。

[参考文献]

- [1] Scheen AJ, Esser N, Paquot N. Antidiabetic agents: Potential anti-inflammatory activity beyond glucose control [J]. *Diabetes Metab*, 2015, [Epub ahead of print]
- [2] Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats [J]. *Nat Med*, 2015, [Epub ahead of print]
- [3] Mousavi SM, Niazmand S, Hosseini M, et al. Beneficial effects of teucricum polium and metformin on diabetes-induced memory impairments and brain tissue oxidative damage in rats [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2015, 2015:493729
- [4] DiTacchio KA, Heinemann SF, Dziewczapolski G. Metformin treatment alters memory function in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 44 (1):43-48
- [5] Ma TC, Buescher JL, Oatis B, et al. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 411(2):98-103
- [6] Skaper SD, Facci L, Giusti P. Neuroinflammation, microglia and mast cells in the pathophysiology of neurocognitive disorders: a review [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014, 13(10):1654-1666
- [7] Thundyil JI, Lim KL. DAMPs and neurodegeneration [J]. *Ageing Res Rev*, 2014, [Epub ahead of print]
- [8] Shichita T, Ago T, Kamouchi M, et al. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke [J]. *J Neurochem*, 2012, 123(Suppl 2):29-38
- [9] Zhao AP, Dong YF, Liu W, et al. Nicorandil inactivates

NLRP3 inflammasome to protect against oxygen-glucose deprivation(OGD) induced inflammatory responses in BV-2 cells[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(2):147-153

[10] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, [Epub ahead of print]

[11] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation[J]. *Nat Med*, 2011, 17 (7): 796-808

[12] Rothwell N, Allan S, Toulmond S. The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(11):2648-2652

[13] Schilling M, Besselmann M, Muller M, et al. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice[J]. *Exp Neurol*, 2005, 196(2):290-297

[14] Kong H, Omran A, Ashhab MU, et al. Changes in microglial inflammation-related and brain-enriched MicroRNAs expressions in response to in vitro oxygen-glucose deprivation[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(2):233-243

[15] Chen FE, Huang DB, Chen YQ, et al. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA[J]. *Nature*, 1998, 391(6665):410-413

[16] Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP [J]. *Nature*, 2006, 440(7081):228-232

[17] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2):136-140

[18] Rajamaki K, Nordstrom T, Nurmi K, et al. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(19):13410-13419

[19] Łabuzek K, Suchy D, Gabryel B, et al. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide[J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(5):956-965

[20] Łabuzek K, Liber S, Gabryel B, et al. Metformin has adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)-independent effects on LPS stimulated rat primary microglial cultures [J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(5):827-848

[21] Aljada A. Lipopolysaccharides-Induced inflammatory Response in white blood cells Is associated with alterations in senescence mediators: Modulation by metformin [J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2015, 13(6):278-285

[22] Agrawal NK, Kant S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options[J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(5):697-710

[收稿日期] 2015-04-17

