

二甲双胍通过 AMPK/STAT3 信号通路抑制 星形胶质细胞的反应性*

林海旭 管徒晨 巫荣华

(南通大学, 江苏 南通 226000)

【摘要】 目的 探讨二甲双胍对体外培养的大鼠脊髓星形胶质细胞反应性的作用及机制。**方法** 使用三因子(TNF- α , IL-1 α , C1q)诱导产生反应性星形胶质细胞, RT-qPCR 及 Western blot 检测补体 3(C3)的表达;使用 5、10、20 mM 浓度的二甲双胍处理, Western blot 检测星形胶质细胞中腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)与信号转导和转录激活因子 3(STAT3)磷酸化水平;采用 AMPK 抑制剂 Compound C 处理, 检测 AMPK 和 STAT3 磷酸化水平。**结果** 形态学及 RT-qPCR 结果显示:与对照组相比,三因子处理改变了星形胶质细胞形态并显著提高了 C3 的表达($P < 0.05$),表明成功建立反应性星形胶质细胞模型。RT-qPCR 结果及 Western blot 结果显示:与对照组相比,二甲双胍对 C3 表达有明显的抑制作用,呈现浓度依赖性($P < 0.05$)。在诱导星形胶质细胞反应性过程中,与对照组相比,AMPK 的磷酸化水平显著降低($P < 0.05$),使用不同浓度二甲双胍处理后,AMPK 的磷酸化水平显著增加且呈浓度依赖性($P < 0.05$),同时信号传导及 STAT3 的磷酸化水平显著降低且呈浓度依赖性($P < 0.05$)。AMPK 抑制剂 Compound C 处理后显著抑制了二甲双胍导致的 AMPK 活性升高及 STAT3 活性降低,同时抑制了 C3 表达下调($P < 0.05$)。**结论** 二甲双胍通过 AMPK/STAT3 信号通路抑制星形胶质细胞的反应性。

【关键词】 二甲双胍;星形胶质细胞反应性;腺苷酸激活蛋白激酶;信号转导和转录激活因子 3;补体 3

【中图分类号】 R977.1⁺5 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 06. 005

Metformin inhibits the reactivity of astrocytes through AMPK/STAT3 signaling pathway

LIN Haixu, GUAN Tuchen, WU Ronghua

(Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate the effect and mechanism of metformin on the reactivity of rat spinal cord astrocytes in vitro. **Methods** The reactive astrocytes were induced by three factors (TNF- α , IL-1 α , C1q), and the expression of complement component 3 (C3) was detected by RT-qPCR and Western blot. The phosphorylation levels of AMPK and STAT3 (signal transduction and transcription activator 3) in astrocytes were detected by Western blot after treatment with different concentrations (5mM, 10 mM and 20 mM) of metformin. The Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and signal transduction and transcription activator 3 (STAT3) phosphorylation (p-AMPK and p-STAT3) levels were detected by an AMPK inhibitor Compound C. **Results** Morphology and RT-qPCR results showed that compared with the control group, the triple-factor treatment altered the morphology of astrocytes and significantly increased the expression of C3 ($P < 0.05$), indicating the successful establishment of a reactive astrocyte model. RT-qPCR and Western blot results showed that compared with the control group, metformin had a significant inhibitory effect on C3 expression, showing concentration dependence ($P < 0.05$). During the induction of reactive astrocytes, compared with the control group, the phosphorylation level of AMPK was significantly decreased ($P < 0.05$). After treatment with different concentrations of metformin, the phosphorylation level of AMPK was signifi-

基金项目:国家自然科学基金项目(82001295)

通讯作者:巫荣华, E-mail: wuronghua5@ntu.edu.cn

引用本文:林海旭,管徒晨,巫荣华.二甲双胍通过 AMPK/STAT3 信号通路抑制星形胶质细胞的反应性[J].西部医学,2023,35(6):805-811.

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 06. 005

cantly increased and showed concentration dependence ($P < 0.05$), while the phosphorylation level of STAT3 was significantly decreased and showed concentration dependence ($P < 0.05$). Treatment with the AMPK inhibitor Compound C significantly suppressed the metformin-induced increase in AMPK activity and decrease in STAT3 activity, and also suppressed the downregulation of C3 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** This study revealed metformin could inhibit three factors (TNF- α , IL-1 α , C1q) induced astrocytes activation through AMPK/STAT3 signaling pathway.

【Key words】 Metformin; Astrocyte reactivity; AMPK; STAT3; C3

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)是一种临床上常见的神经系统损伤疾病,具有较高的致死率和致残率,其导致的运动及感觉功能障碍给患者及社会带来了沉重的经济和精神负担^[1-3]。脊髓损伤后神经再生困难的主要原因有中枢系统神经元轴突再生能力有限,轴突生长的微环境中存在抑制因素,以及胶质瘢痕的形成阻碍了轴突再生^[4]。脊髓损伤后星形胶质细胞活化增生,形成反应性星形胶质细胞(Reactive astrocytes, RAs)。研究^[5]发现,按照反应性星形胶质细胞对神经元轴突生长的影响,可以分别分为:抑制轴突生长作用的反应性星形胶质细胞(A1 型星胶)和促进轴突生长或神经保护作用的反应性星形胶质细胞(A2 型星胶)。另有研究^[6]指出,创伤后微环境中的肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 1 α (IL-1 α)、补体 1q(C1q)三种因子(简称三因子)的含量上升,将其加入正常状态星形胶质细胞中可以诱导其成为 A1 型星胶,而补体成分 3(Complement component 3, C3)被认为是 A1 型星胶的标记物^[7]。2019 年, Vismara 等^[8]发现在小鼠脊髓损伤后选择性抑制 A1 型星胶进程可以促进功能恢复,提示调节 A1 型星胶可以作为治疗脊髓损伤修复的方向之一。

二甲双胍是 II 型糖尿病的经典用药,被广泛报道^[9-11]在多种领域中具有潜在功效,比如可以作用于肺部、肠道等。近年有研究^[12-13]报道二甲双胍具有抗炎、抗氧化、抗凋亡和神经保护的作用,其主要机制包括激活 AMPK 通路增加细胞代谢、线粒体呼吸和葡萄糖摄取^[14]、抑制 mTOR 通路抑制细胞凋亡促进自噬等。二甲双胍可以促进大鼠脊髓损伤后后肢运动功能恢复,其机制可能与抗炎和神经保护作用有关、与抑制内质网应激相关、通过对自噬通量的调节、与稳定微管和抑制氧化应激及线粒体功能障碍有关^[13, 15-17]。另有研究^[18-19]表明,二甲双胍可以通过调节小胶质细胞促进髓鞘碎片清除,加速脊髓损伤后的神经修复。并显著促进轴突生长。本研探讨二甲双胍对体外培养的大鼠脊髓星形胶质细胞反应性的作用及可能机制,为二甲双胍治疗脊髓损伤提供实验研究数据。

1 资料与方法

1.1 TNF- α 、IL-1 α 、C1q 及二甲双胍溶液配制 实验中所用的细胞因子 TNF- α (货号: abs04232-10 μ g)购自上海爱必信生物科技公司; IL-1 α (货号: 400-01A)购自 Peprotech 公司; C1q(货号: NBP2-62410)购自 Novus 公司; 盐酸二甲双胍(货号: M107827)购自上海阿拉丁生化科技公司。药物在超净工作台中分别使用相应的溶剂溶解至储存浓度,使用一次性注射器及无菌滤器过滤并分装,置于-80℃长期保存,见表 1。

表 1 细胞因子及二甲双胍的使用浓度
Table 1 Concentrations of cytokines and metformin

药物名称	储存浓度	终浓度	溶剂
TNF- α	400 μ g/mL	400 ng/mL	H ₂ O
IL-1 α	3 μ g/mL	3 ng/mL	PBS
C1q	30 μ g/mL	30 ng/mL	H ₂ O
Metformin	200 mmol/L	—	H ₂ O

1.2 原代脊髓星形胶质细胞的培养 实验所用 SPF 级 SD 大鼠乳鼠由南通大学实验动物中心提供,并在南通大学动物护理和使用委员会的指导方针下进行动物实验(伦理号为 S20200330-003)。对出生 1 d 的 SD 乳鼠进行取材,具体过程如下:将乳鼠使 75%酒精擦拭消毒后,用眼科剪断头处理,随后沿脊柱将皮肤剪开,暴露乳鼠脊椎椎骨。使用显微剪插入锥孔沿脊柱将脊椎剖开,暴露脊髓。使用显微弯镊沿脊髓两侧对神经束进行离断,将脊髓完整取出,浸泡于含 2%青链霉素(碧云天,货号: C0222)的 Hanks 液(美仑生物,货号: MA0015)中。体式显微镜下,使用显微直镊与显微弯镊将脊髓表面脊膜剥离,剥离后的脊髓浸泡于含 2%青链霉素的 Hanks 液中。使用 1000 μ L 移液器将组织吹散,然后收集至 15 mL 离心管中,1200 rpm 室温离心 3 min。去上清,加入 2 mL 0.25%胰酶(Gibco,货号: 25200072)消化,置于 37℃细胞培养箱中消化 15 min,每 5 min 振荡 1 次,每次 15 s。加入 2 倍体积含有 10%胎牛血清(LONSERA,货号: S711-001S)的 DMEM/F12(Corning,货号: 10092022)完全培养基终止消化,过 40 μ m 筛网后收集细胞悬液至 15 mL 离心管中,1000 rpm 离心 5 min 后弃上清。加入适量的完全培养基重悬细胞,按 5×10^6 的细胞量接种

至 T75 细胞培养瓶中,随后使用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素、1% L-谷氨酰胺(碧云天,货号:C0212)及 0.1% 两性霉素 B(美仑生物,货号:MB1014)的 DMEM/F12 完全培养基培养于 5% CO₂ 的 37℃ 细胞培养箱内,2~3 d 换液,至其长满后备用。

1.3 A1 型反应性星形胶质细胞模型的建立 P2 代星形胶质细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后计数后按 5×10^4 个/孔接种到 6 孔板中。待细胞贴壁 2 h 后,按照表 1 加入三因子(TNF- α 、IL-1 α 、C1q)继续培养 3 d。使用徕卡 DMi8 显微镜拍摄细胞形态,并使用实时荧光定量 PCR 检测基因的 mRNA 表达水平。

1.4 二甲双胍和 Compound C 处理 A1 型星胶二甲双胍处理 A1 型星胶实验中将 P2 代星形胶质细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后计数后按 5×10^4 个/孔接种到 6 孔板中。待细胞贴壁 1 h 后按照表 1 加入三因子(TNF- α 、IL-1 α 、C1q)和不同浓度的二甲双胍,继续培养 3 d 后进行后续实验;将细胞分为对照组、A1 型星胶组、二甲双胍处理组(5、10、20 mM)。使用 Compound C 处理星胶实验中待细胞贴壁后使用不同浓度(5 μ M、15 μ M)Compound C(简称 CC, MCE 公司,货号:1219168-18-9)处理细胞 1 d 后进行后续实验;细胞分组为对照组、CC 处理组(5 μ M、15 μ M)。二甲双胍和 Compound C 处理星胶细胞实验中待细胞贴壁 1 h 后使用 20 mM 二甲双胍预处理细胞 1 h,后加入三因子继续培养 2 d,然后加入 15 μ M Compound C 处理细胞 1 d 后进行后续实验;细胞分组为对照组、A1 型星胶组、20 mM 二甲双胍处理组、20 mM 二甲双胍 + 15 μ M CC 处理组。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测不同处理组的星胶细胞使用 1×PBS 洗涤 3 次后使用微量 RNA 提取试剂盒(Magen,货号:R4012-02)提取总 RNA,使用逆转录试剂盒(诺唯赞,货号:R312-01/02)将 RNA 逆转录为 cDNA,使用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(takara,货号:RR820)进行实时荧光定量 PCR 检测,反应体系总体积为 10 μ L: TB Green® Premix Ex Taq™ II 5 μ L, cDNA 1 μ L, Sense Primer(10 μ M)0.5 μ L, Antisense Primer(10 μ M)0.5 μ L, RNase-Free H₂O 3 μ L。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析相对基因表达, GAPDH 作为内参基因。引物序列,见表 2。

表 2 实时荧光定量 PCR 引物信息

Table 2 The sequences of the primers for RT-qPCR

目的基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
GAPDH	TGCCACTCAGAAGACT GTGG	CAACGGATACATTGGG GGTA
C3	GAAGCCCTAGTGCGGA AGTC	AACACCATGAGGTCGA AAGG

1.6 Westernblot 实验 不同处理组的星胶细胞使用 1×PBS 洗涤 3 次后加入适量含有 1% PMSF(碧云天,货号:ST506)、2% 磷酸酶抑制剂(碧云天,货号:P1045)的细胞裂解液(碧云天,货号:P0013B)冰上裂解 30 min。然后收集至 1.5 mL EP 管中,4℃,12,000 rpm 离心 15 min。收集上清,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天,货号:P0012)测定浓度,将蛋白样品的终浓度定为 2 mg/mL,按比例加入 6×SDS loading buffer,置于 100℃ 水浴锅煮沸 5 min。使用 Express cast Page 彩色凝胶快速试剂盒(新赛美,货号:P2011)配置凝胶,进行 SDS 蛋白电泳,随后将蛋白转移至 PVDF 膜(默克,货号:ISEQ00010)。将膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h 后,4℃ 使用一抗(C3(Abcam, ab200999, 1:1000)、p-AMPK(Cellsignalingtechnology, # 2535, 1:1000)、AMPK(Cellsignalingtechnology, # 5832, 1:1000)、STAT3(Cellsignalingtechnology, # 9139, 1:1000)、p-STAT3(Cellsignalingtechnology, # 9145, 1:1000)和 α/β -Tubulin(Cellsignalingtechnology, # 2148, 1:2500))孵育过夜,1×TBST 摇床洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min,然后室温孵育相应二抗(1:2500)2 h,使用 1×TBST 洗涤 3 次,每次 20 min。采用 High-sig ECL 发光试剂(Tanon,货号:180-501)曝光条带,使用 Tanon 仪器进行拍照。

1.7 统计学分析 Westernblot 结果使用 image J 进行灰度值统计分析。所有数据均以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,每个实验重复三到四次。实时荧光定量 PCR 结果使用相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)进行分析。使用 Graphpad Prism 软件绘制统计图,采用双尾非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三因子诱导 A1 型反应性星形胶质细胞模型的建立 为了验证原代培养的脊髓星形胶质细胞是否可以诱导为 A1 型星胶,使用三因子(TNF- α 、IL-1 α 、C1q)进行诱导,在第 1~3 d 收集细胞并提取 RNA,逆转录后进行 RT-qPCR 检测。结果显示加入细胞因子后,星形胶质细胞形态由星形转变到狭长的梭形(见图 1A);同时 A1 型星胶标记物 C3 基因在 mRNA 水平上的表达量显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$, 见图 1B)。上述结果表明,在原代培养的脊髓星形胶质细胞中加入三因子后,可以成功诱导成 A1 型反应性星形胶质细胞。

2.2 二甲双胍对 A1 型星形胶质细胞反应性的影响 在 A1 型星胶中加入了不同浓度的二甲双胍,3 d 后提取 RNA,逆转录为 cDNA 进行 RT-qPCR 检测。A1

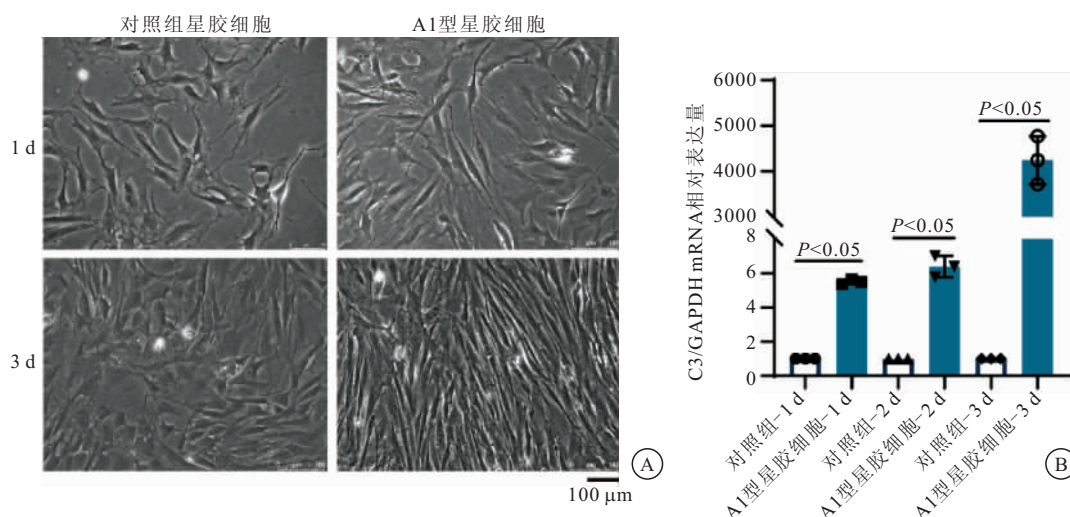


图 1 三因子诱导星形胶质细胞为 A1 型反应性星形胶质细胞

Figure 1 Astrocytes induced by three factors are A1 type reactive astrocytes

注: A. 星形胶质细胞中加入三因子 1 d 和 3 d 的形态变化; B. 加入三因子 1~3 d 后星形胶质细胞中 C3 的 mRNA 表达情况。

型星形胶质细胞 C3 的表达在 mRNA 和蛋白水平都随着二甲双胍浓度的增加而逐渐降低并呈剂量依赖性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 特别是二甲双胍浓

度为 20 mM 时, C3 的蛋白表达水平恢复到与对照组一致。上述结果表明二甲双胍可以抑制 A1 型星胶的产生。见图 2。

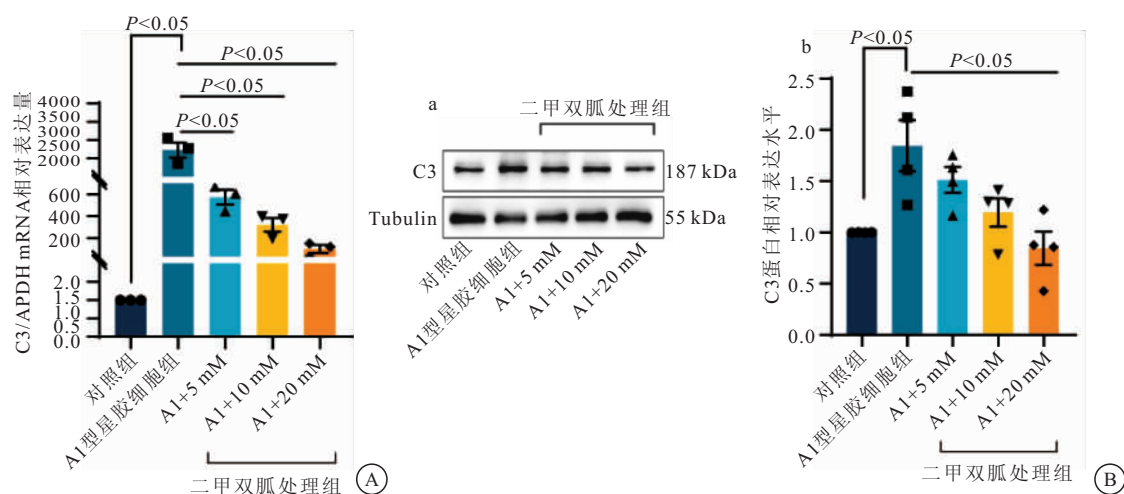


图 2 二甲双胍抑制 A1 型星胶细胞标志物 C3 的表达

Figure 2 Metformin inhibits the expression of type A1 astrocyte marker C3

注: A. 不同浓度二甲双胍处理后星形胶质细胞中 C3 的 mRNA 表达水平; B. 不同浓度二甲双胍处理后星形胶质细胞中 C3 的蛋白表达水平。a. 代表性的 Western blot 图; b. C3 蛋白水平统计图。

2.3 二甲双胍对星形胶质细胞 AMPK 和 STAT3 表达的影响 检测 AMPK 和 STAT 信号通路, 结果显示, 在星形胶质细胞中加入不同浓度的二甲双胍后 p-AMPK 表达升高, 同时抑制 p-STAT3 的表达, 且呈浓度依赖性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 二甲双胍通过 AMPK/STAT3 信号途径抑制 A1 型反应性星形胶质细胞 为了进一步确认二甲双胍是否通过 AMPK/STAT3 信号轴来发挥作用, 在培养的星形胶质细胞中加入 5 μM 和 15 μM 的 AMPK

信号通路抑制剂 (Compound C, 简称 CC) 来抑制 AMPK 的活性, 发现加入 15 μM CC 后具有较好的抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 4A)。然后在三因子诱导的 A1 星胶和二甲双胍处理 A1 型星胶中, 加入 15 μM CC 处理 (见图 4B), 结果提示, 抑制 AMPK 活性后, STAT3 的活性升高, 同时 C3 表达也升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 4C)。上述结果表明, 二甲双胍通过 AMPK 信号通路抑制 A1 型星形胶质细胞的反应性。

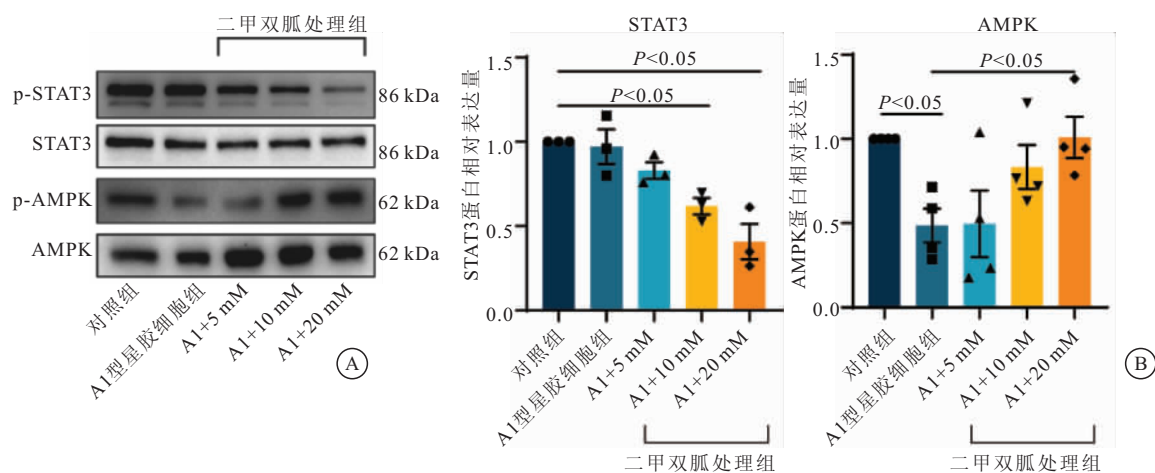


图3 二甲双胍对星形胶质细胞中 AMPK 和 STAT3 表达的影响

Figure 3 Effect of metformin on AMPK and STAT3 expression in astrocytes

注:A. 不同浓度二甲双胍处理后星形胶质细胞中 AMPK 和 STAT3 的蛋白表达水平;B. AMPK 和 STAT3 蛋白表达的统计图。

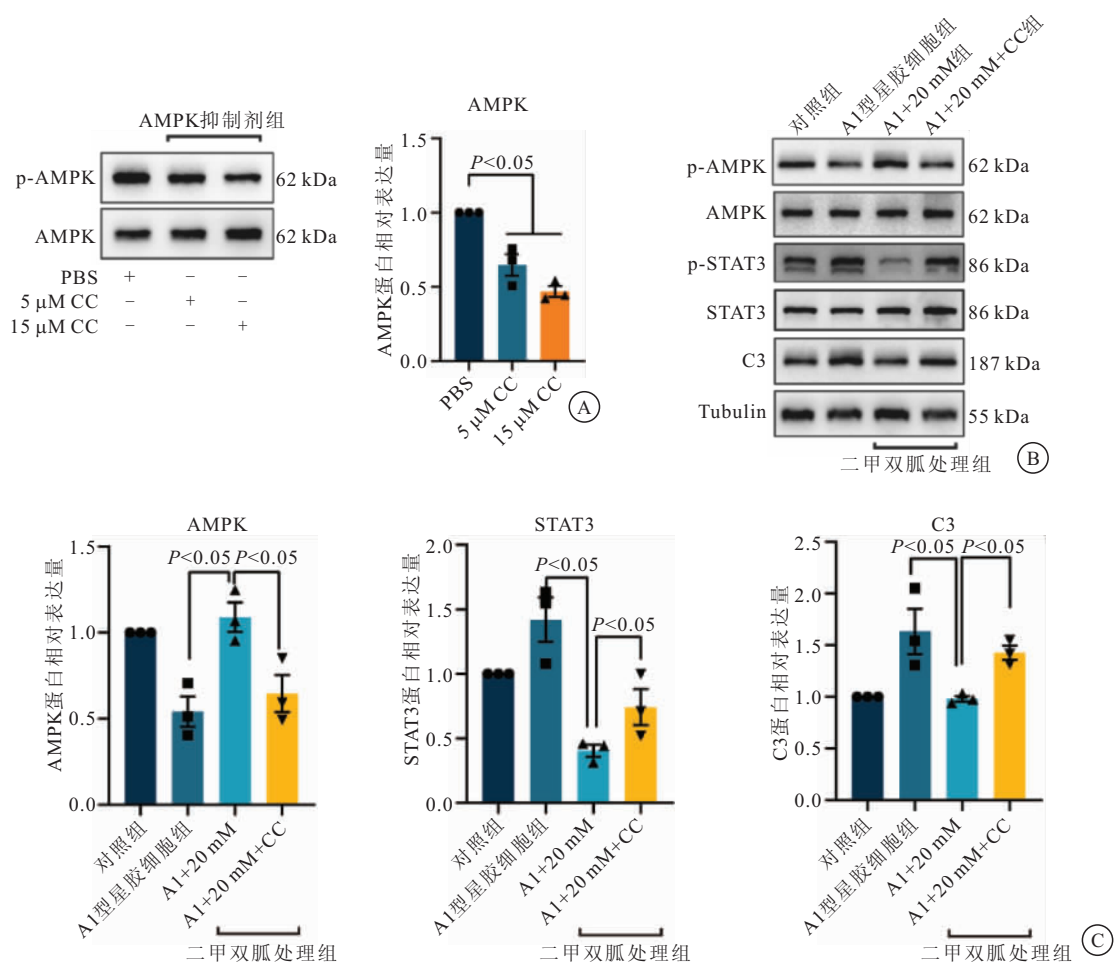


图4 二甲双胍通过 AMPK/STAT3 信号途径抑制 A1 型反应性星形胶质细胞

Figure 4 Metformin inhibits type A1 reactive astrocytes through AMPK/STAT3 signaling pathway

注:A. 不同浓度 Compound C 对 AMPK 的抑制作用;B. 二甲双胍和 Compound C 处理星形胶质细胞后 AMPK、STAT3 和 C3 的蛋白表达;C. 二甲双胍和 Compound C 处理星形胶质细胞后蛋白表达的统计图。

3 讨论

星形胶质细胞是中枢神经系统中最多的神经胶质细胞,随着研究进展,星形胶质细胞越来越被认为

在大脑和脊髓中都具有关键功能。在生理条件下,星形胶质细胞主要参与维持中枢神经系统稳态相关的多种功能,包括血脑屏障(bLOOD BRAIN BARRI-

ER, BBB) 和血脊髓屏障 (Blood spinal cord barrier, BSCB) 的形成和维持、跨突触的信号传递、维持神经元功能和代谢调节^[20]。然而,在病理背景下,星形胶质细胞会被激活,这些细胞的终生适应性、可塑性和疾病背景下的复杂性决定了损伤后星形胶质细胞亚群的多样性^[21]。2017 年, Liddelw 等^[5]发现了他们命名为 A1 型星形胶质细胞具有神经毒性,其神经毒性作用已在多种中枢神经系统疾病中得到证实^[22, 23-24]。研究^[25-27]表明,脊髓损伤后, A1 型反应性星形胶质细胞增多,抑制 A1 型反应性胶质细胞的活化可以促进脊髓损伤后的功能恢复。因此,通过药物、基因调控等手段抑制 A1 型反应性星形胶质细胞的活化可能是治疗脊髓损伤一个有效的方向。

二甲双胍是用于治疗 II 型糖尿病的降糖药,且已用于各个方面的实验性研究,如生殖医学、肿瘤化疗、代谢性疾病^[28]并且对多种不同病因的神经系统疾病动物模型具有保护作用^[29]。最近, Song 等^[13]发现二甲双胍可以促进小鼠脊髓损伤后肢运动功能恢复,目前,其对神经系统的研究主要在神经元和小胶质细胞中探讨其可能的作用^[16, 18],在脊髓损伤后对星形胶质细胞反应性方面还未曾见报道。AMPK 作为调控能量稳态的重要激酶,是真核生物细胞和有机体代谢的中心调节剂之一,负责监管细胞的能力输入和输出,维持细胞生理活动的平稳运转。Zhang 等^[30]发现, miR-299a-5p 通过激活 AMPK 通路对脊髓损伤有保护作用。Hu 等^[31]表明锌通过激活 AMPK 途径来调节脊髓和神经元的葡萄糖代谢,进而促进脊髓损伤后的功能恢复。本研究结果发现,在星形胶质细胞中加入不同浓度二甲双胍后 P-AMPK 表达升高,同时抑制 P-STAT3 的表达,且呈浓度依赖性。已有文献^[14]表明,二甲双胍的主要作用靶点是 AMPK,而活化的 AMPK 可以起到神经保护作用。STAT3 是反应性星形胶质细胞中一个重要的转录因子,研究^[32]表明 AMPK 可以负性调节 STAT3 的磷酸化。

有研究报^[5, 27]道通过三因子 (TNF- α 、IL-1 α 、C1q) 可以诱导星形胶质细胞反应性,然而对于体外培养的大鼠脊髓星形胶质细胞往 A1 型反应性星胶诱导的模式尚未有明确文献。本研究通过三因子处理原代培养的脊髓星形胶质细胞,发现 A1 星形胶质细胞的标志分子 C3 的转录水平在 24 h 已有明显升高,而在 72 h 增加了数千倍,蛋白水平有显著升高,表明成功建立了体外 A1 星形胶质细胞反应性模型。进而在此模型中,研究了二甲双胍对星形胶质细胞活化的影响,发现不同浓度的二甲双胍可以明显减少 A1 型标记物 C3 的表达且呈现浓度依赖性。脊髓损伤后,小胶质细

胞激活产生三因子等细胞因子进而活化星形胶质细胞^[25],由于二甲双胍具有抗炎作用,我们首先检测了 NF- κ B 信号通路,结果显示二甲双胍处理 A1 型星胶后,其 NF- κ B 的磷酸化水平未发生明显改变(数据未显示)。本研究检测了 AMPK/STAT3 通路,结果显示二甲双胍可以升高 AMPK 的磷酸化,降低 STAT3 的磷酸化水平;进一步地通过 AMPK 的特异性抑制剂,发现二甲双胍激活 AMPK 是其作用于星形胶质细胞反应性的信号通路。

4 结论

本研究结果表明,二甲双胍可以通过 AMPK/STAT3 信号途径抑制星形胶质细胞 A1 型反应性,为二甲双胍治疗脊髓损伤提供参考。

【参考文献】

- [1] WANG W, LI J, ZHANG Z, *et al.* Genome-wide analysis of acute traumatic spinal cord injury-related RNA expression profiles and uncovering of a regulatory axis in spinal fibrotic scars[J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(1): e12951.
- [2] REINHARDT D R, STEHLIK K E, SATKUNENDRARA-JAH K, *et al.* Bilateral cervical contusion spinal cord injury: A mouse model to evaluate sensorimotor function[J]. *Exp Neurol*, 2020, 331:113381.
- [3] 胡坤,冉斌,赵桥,等. JAK-STAT 信号通路抑制剂在脊髓损伤后的作用机制[J]. *西部医学*, 2021, 33(8): 1106-1110.
- [4] ANDERSON M A, O'SHEA T M, BURDA J E, *et al.* Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury[J]. *Nature*, 2018, 561(7723): 396-400.
- [5] LIDDELOW S A, GUTTENPLAN K A, CLARKE L E, *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia[J]. *Nature*, 2017, 541(7638): 481-487.
- [6] LI T, LIU T, CHEN X, *et al.* Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 211.
- [7] UGALDE C L, LEWIS V, STEHMANN C, *et al.* Markers of A1 astrocytes stratify to molecular sub-types in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease brain[J]. *Brain Commun*, 2020, 2(2): fcaa029.
- [8] VISMARA I, PAPA S, VENERUSO V, *et al.* Selective Modulation of A1 Astrocytes by Drug-Loaded Nano-Structured Gel in Spinal Cord Injury[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(1): 360-371.
- [9] LIANG H, SONG H, ZHANG X, *et al.* Metformin attenuated sepsis-related liver injury by modulating gut microbiota[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 815-828.
- [10] POLVERINO F, WU T D, ROJAS-QUINTERO J, *et al.* Metformin: Experimental and Clinical Evidence for a Potential Role in Emphysema Treatment[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 204(6): 651-666.
- [11] INDURI S N R, KANSARA P, THOMAS S C, *et al.* The Gut Microbiome, Metformin, and Aging[J]. *Annu Rev Pharmacol*

- Toxicol, 2022, 62:85-108.
- [12] CHEN Q, XIE D, YAO Q, *et al.* Effect of Metformin on Locomotor Function Recovery in Rat Spinal Cord Injury Model: A Meta-analysis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:1948003.
- [13] SONG W Y, DING H, DUNN T, *et al.* Low-dose metformin treatment in the subacute phase improves the locomotor function of a mouse model of spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(11): 2234-2242.
- [14] VOSS C M, ANDERSEN J V, JAKOBSEN E, *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) regulates astrocyte oxidative metabolism by balancing TCA cycle dynamics[J]. *Glia*, 2020, 68(9): 1824-1839.
- [15] ZHANG D, XUAN J, ZHENG B B, *et al.* Metformin Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury via Autophagy Flux Stimulation[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3327-341.
- [16] WANG H, ZHENG Z, HAN W, *et al.* Metformin Promotes Axon Regeneration after Spinal Cord Injury through Inhibiting Oxidative Stress and Stabilizing Microtubule[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:9741369.
- [17] 郭卫东, 李刚, 范仲凯. 二甲双胍对大鼠脊髓损伤后内质网应激和细胞凋亡的影响[J]. *解剖学杂志*, 2019, 42(2): 161-166.
- [18] WU Y Q, XIONG J, HE Z L, *et al.* Metformin promotes microglial cells to facilitate myelin debris clearance and accelerate nerve repairment after spinal cord injury[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(6): 1360-1371.
- [19] 管徒晨, 滕龙, 郭贝贝, 等. 二甲双胍促进大鼠皮层神经元轴突生长的体外效应研究[J]. *南通大学学报(医学版)*, 2021, 41(3): 199-202.
- [20] MOLOFSKY A V, DENEEN B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed[J]. *Glia*, 2015, 63(8): 1320-1329.
- [21] VERKHRATSKY A, NEDERGAARD M. Physiology of Astroglia[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 239-389.
- [22] YU G, ZHANG Y, NING B. Reactive Astrocytes in Central Nervous System Injury: Subgroup and Potential Therapy[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15:792764.
- [23] GUO Q, LI S, LIANG Y, *et al.* Effects of C3 deficiency on inflammation and regeneration following spinal cord injury in mice[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 485(1): 32-36.
- [24] YADAV S K, ITO N, SOIN D, *et al.* Dimethyl Fumarate Suppresses Demyelination and Axonal Loss through Reduction in Pro-Inflammatory Macrophage-Induced Reactive Astrocytes and Complement C3 Deposition[J]. *J Clin Med*, 2021, 10(4):857.
- [25] QIAN D, LI L, RONG Y, *et al.* Blocking Notch signal pathway suppresses the activation of neurotoxic A1 astrocytes after spinal cord injury[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(21): 3010-3029.
- [26] LIU W, WANG Y, GONG F, *et al.* Exosomes Derived from Bone Mesenchymal Stem Cells Repair Traumatic Spinal Cord Injury by Suppressing the Activation of A1 Neurotoxic Reactive Astrocytes[J]. *J Neurotrauma*, 2019, 36(3): 469-484.
- [27] ZOU H J, GUO S W, ZHU L, *et al.* Methylprednisolone Induces Neuro-Protective Effects via the Inhibition of A1 Astrocyte Activation in Traumatic Spinal Cord Injury Mouse Models[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15:628917.
- [28] 王文婷, 胡杨志, 张炎, 等. 二甲双胍与胃癌细胞的增殖、迁移及上皮-间充质转化之间的关系[J]. *西部医学*, 2022, 34(4): 516-519, 524.
- [29] SANZ P, SERRATOSA J M, SANCHEZ M P. Beneficial Effects of Metformin on the Central Nervous System, with a Focus on Epilepsy and Lafora Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10):5351.
- [30] ZHANG Z Z, XIAN S Y, BAO C, *et al.* MicroRNA-299a-5p Protects against Spinal Cord Injury through Activating AMPK Pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:8659587.
- [31] HU H, XIA N, LIN J, *et al.* Zinc Regulates Glucose Metabolism of the Spinal Cord and Neurons and Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury through the AMPK Signaling Pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021:4331625.
- [32] VASAMSETTI S B, KARNEWAR S, KANUGULA A K, *et al.* Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis[J]. *Diabetes*, 2015, 64(6): 2028-2041.

(收稿日期:2022-08-13;修回日期:2023-04-10;编辑:王小菊)

(上接第 804 页)

- [18] SHARMA C, KIM Y, AHN D, *et al.* Protein tyrosine phosphatases (PTPs) in diabetes: causes and therapeutic opportunities[J]. *Arch Pharm Res*, 2021, 44(3):310-321.
- [19] KEENE K L, MYCHALECKY J C, SMITH S G, *et al.* Comprehensive evaluation of the estrogen receptor alpha gene reveals further evidence for association with type 2 diabetes enriched for nephropathy in an African American population[J]. *Hum Genet*, 2008, 123(4):333-41.
- [20] DEVIS-JAUREGUI L, ERITJA N, DAVIS M L, *et al.* Autophagy in the physiological endometrium and cancer[J]. *Autophagy*, 2021, 17(5):1077-1095.
- [21] LIU Y, FENG Q, MIAO J, *et al.* C-X-C motif chemokine receptor 4 aggravates renal fibrosis through activating JAK/STAT/GSK3 β / β -catenin pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(7):3837-3855.
- [22] CAO L, LIU Y, ZHANG L, *et al.* Role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 and cytokines in acute renal injury in elderly Chinese patients with diabetes mellitus[J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 12:2039-2045.
- [23] GODEL M, HARTLEBEN B, HERBACH N, *et al.* Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6):2197-209.
- [24] CAMAYA I, DONNELLY S, O'BRIEN B. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic beta-cells to enhance their survival and function: An emerging therapeutic strategy for type 1 diabetes[J]. *J Diabetes*, 2022, 14(4):247-260.

(收稿日期:2022-09-09;修回日期:2023-02-26;编辑:王小菊)