

## 二甲双胍对小鼠脑缺血后血管再生的影响

沈晓娟 杜芳 李伟旺 安升

710016 西安大兴医院神经内科(沈晓娟、杜芳、李伟旺); 710032 西安, 空军军医大学西京医院神经内科(杜芳); 710016 西安, 长安医院神经内科(安升)

通信作者: 沈晓娟, Email: dxxiaojuan\_1976@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.08.007

**【摘要】目的** 探究二甲双胍处理对小鼠脑缺血的保护作用及其发生机制。**方法** 将30只C57/BL6小鼠分为对照组和二甲双胍组, 通过MCAO手术对小鼠进行脑缺血造模, 在术后1~7 d, 二甲双胍组小鼠腹腔给予50 mg/kg二甲双胍处理, 对照组给予等量生理盐水。术后的第1、3、5、7天, 采用神经系统严重程度评分(NSS)量表进行神经功能评估, 通过Rotarod检测脑缺血后小鼠在转棒上的停留时间; 在术后第7天, 通过Western blot检测脑组织pAMPK/AMPK、ALK1、HIF-1 $\alpha$ 和BCL-2蛋白的表达水平, 免疫组织化学染色检测小鼠半暗带区域血管再生情况。**结果** 脑缺血后给予50 mg/kg二甲双胍处理, 引起的梗死体积相比对照组显著降低[(14.20 $\pm$ 2.23)%比(37.80 $\pm$ 1.77)%], 在给予二甲双胍后, 血管的数量相比对照组显著增加[(103.60 $\pm$ 1.66)条比(57.70 $\pm$ 1.01)条]。给药第7天时, 二甲双胍组小鼠的NSS评分显著低于对照组[(5.85 $\pm$ 1.23)分比(3.33 $\pm$ 0.57分)], 其余时间点对比差异无统计学意义。二甲双胍组的pAMPK/AMPK比值为(1.79 $\pm$ 0.24), 明显高于对照组(1.00 $\pm$ 0.33); 对照组ALK1的表达水平为(2.01 $\pm$ 0.52), 明显低于二甲双胍组的(3.09 $\pm$ 0.64), 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。二甲双胍可以显著增加BCL-2的表达[(1.06 $\pm$ 0.25)比(0.53 $\pm$ 0.07)], 降低HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平[(0.71 $\pm$ 0.12)比(2.24 $\pm$ 0.69)]。给药第7天结束后, 二甲双胍组小鼠在转棒上的停留时间相比对照组显著增加(均 $P < 0.05$ )。**结论** 二甲双胍可以降低脑梗死体积, 改善神经功能症状和运动功能, 促进血管再生, 其机制可能与增加AMPK磷酸化水平和ALK1表达有关。

**【关键词】** 二甲双胍; 脑缺血; AMPK; ALK1

**Effects of metformin on vascular regeneration after cerebral ischemia in mice** Shen Xiaojuan, Du Fang, Li Weiwang, An Sheng

Department of Neurology, Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710016, China (Shen XJ, Du F, Li WW); Department of Neurology, Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China (Du F); Department of Neurology, Chang'an Hospital, Xi'an 710016, China (An S)

Corresponding author: Shen Xiaojuan, Email: dxxiaojuan\_1976@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effect of metformin treatment on cerebral ischemia in mice and its mechanism. **Methods** Thirty C57/BL6 mice were divided into control group and metformin group. Cerebral ischemia was modeled by MCAO surgery. 1–7 days after the surgery, mice in the metformin group were given metformin treatment at 50mg/kg intraperitoneally, while those in the control group were given the same amount of normal saline. On the 1st, 3rd, 5th and 7th day after surgery, the neurological function was assessed by Neurological severity scores (NSS) scale, and the residence time of mice on the rotating rod after cerebral ischemia was measured by Rotarod. On the 7th day after surgery, the expression levels of AMPK, pAMPK, HIF-1 $\alpha$ , BCL-2 and ALK1 in the penumbra region of the two groups were detected by Western blot. On the 7th day after the operation, hemidark zone angiogenesis in the two groups of mice was detected by immunohistochemical staining. **Results** After treatment with metformin (50 mg/kg) after cerebral ischemia, the volume of infarction caused by metformin was significantly lower than that of the control group [(14.2 $\pm$ 2.23)% vs (37.8 $\pm$ 1.77)%]. After administration of metformin, the number of blood vessels increased significantly compared with the control group [(103.6 $\pm$ 1.66) vs (57.7 $\pm$ 1.01)]. On the 7th day, the NSS of mice in metformin group was significantly lower than that of control group [(5.85 $\pm$ 1.23) vs (3.33 $\pm$ 0.57)]. There was no significant difference at other time points. The pAMPK/AMPK ratio in the metformin group was (1.79 $\pm$ 0.24), and the

control group was normalized to  $(1.00 \pm 0.33)$ . The expression level of ALK1 was  $(2.01 \pm 0.52)$  in the control group, and  $(3.09 \pm 0.64)$  in the metformin group. Metformin could significantly increase the expression of BCL-2 [ $(1.06 \pm 0.25)$  vs  $(0.53 \pm 0.07)$ ] and decrease the expression of HIF-1  $\alpha$  [ $(0.71 \pm 0.12)$  vs  $(2.24 \pm 0.69)$ ]. After the end of the 7th day of administration, the stay time of mice in the metformin group on the rod was significantly increased compared with that in the control group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Metformin can reduce the volume of cerebral infarction, improve neurological symptoms and motor function, and promote vascular regeneration, which may relate to the increase of AMPK phosphorylation and ALK1 expression.

**【Key words】** Metformin; Cerebral ischemia; AMPK; ALK1

脑缺血因其复杂的病理过程和发病机制,目前临床主要通过溶栓对其进行治疗,但是由于溶栓的治疗时间窗较窄,脑缺血的治疗仍是临床一大难题。有研究发现促进血管再生、增加微血管形成可以促进脑缺血后的恢复过程<sup>[1]</sup>。二甲双胍是临床上治疗2型糖尿病的一线口服药物<sup>[2]</sup>,有研究发现给予二甲双胍还可以起到抗癌<sup>[3]</sup>、治疗神经疾病<sup>[4-5]</sup>和心脑血管疾病等作用<sup>[6]</sup>。流行病学数据显示,二甲双胍可以降低脑缺血的发生率及减缓脑缺血的严重程度<sup>[7]</sup>。单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)位于二甲双胍的作用下游,它能调节细胞代谢、增殖和迁移等过程<sup>[8]</sup>,有研究发现AMPK也参与调节血管再生和内皮细胞的相关功能<sup>[9]</sup>,活化素样受体激酶1(ALK1)是转化生长因子(TGF)- $\beta$ 的一类受体,TGF- $\beta$ -ALK1信号通路可以调节多种细胞功能,在肿瘤组织的血管中发现ALK1的表达增加,与肿瘤的增殖密切相关<sup>[10]</sup>。本研究通过在脑缺血小鼠模型上,检测二甲双胍对ALK1与AMPK的表达影响,检测半暗带区域血管再生情况和小鼠在脑缺血后的运动功能,发现二甲双胍促进脑缺血恢复,与其通过AMPK-ALK1信号通路促进血管再生过程有关,为临床上二甲双胍治疗脑缺血提供新的研究基础与治疗依据。

### 一、材料与方法

1. 实验动物分组:所有实验均通过动物研究伦理委员会和《中国实验动物管理条例》。从南京模式生物有限公司购买30只10周大的C57/BL6雄鼠,体重20~25 g。将小鼠随机分为对照组、二甲双胍组,每组各15只。

2. 脑缺血小鼠造模<sup>[11]</sup>:采用右侧颈总动脉结扎(middle cerebral artery occlusion, MCAO)进行造模。将小鼠用10%戊巴比妥钠麻醉后绑缚于解剖台上,颈部备皮。剪开颈部正中皮肤,钝性分离气管前肌,分离出颈总动脉并穿线以活结阻断血流;沿颈总动脉向上分离颈外动脉,在颈外动脉的近心端另备一活结,用眼科剪剪一小口,将线栓插入,将颈外动脉

近心端活结系紧固定线栓,揭开阻断颈总动脉的活结,缝合并消毒,将小鼠置于恒温箱,至小鼠完全苏醒后,放回原鼠笼。

3. 动物给药处理:购买二甲双胍(Sigma, 美国),用生理盐水作为溶剂溶解,二甲双胍组小鼠在MCAO后第1天至第7天连续每天给予腹腔注射50 mg/kg二甲双胍<sup>[11]</sup>;对照组小鼠在相同时间点给予等量生理盐水腹腔注射。

4. 神经功能评估<sup>[12]</sup>:在MCAO手术后的第1、3、5、7天,对对照组和二甲双胍组小鼠的神经功能进行评估。采用神经系统严重程度评分(NSS)量表,其中包含了一套涉及运动、感觉、反射和平衡相关的测试。在测试中,神经功能评分范围为0~18分,0分代表功能正常,18分代表最大神经功能缺损得分。

5. TTC染色分析脑梗死体积<sup>[13]</sup>:随机选取对照组和二甲双胍组小鼠各5只,在第7天转棒实验结束后,将小鼠用10%戊巴比妥钠麻醉,断头,在冰上剥离脑组织并切片为2 mm后的冠状面切片,浸没在2% TTC(Sigma, 美国)溶液中,浸泡20 min。在扫描仪上进行扫描,用Image J(NIH, 美国)对梗死区域进行体积统计分析。

6. Rotarod检测脑缺血后小鼠在转棒上的停留时间<sup>[14]</sup>:在进行MCAO手术前5 d,连续每天对所有小鼠进行Rotarod检测,所有小鼠均可在转棒上停留5 min。在MCAO手术后的第1、3、5、7天,对照组和二甲双胍组小鼠分别进行Rotarod检测。Rotarod检测参数如下:每次连续5轮,每轮5 min,两轮之间休息15 min,转棒速度为4 r/min逐渐增加为40 r/min。记录每只小鼠在每轮训练中从转棒上掉落的时间。

7. Western blot检测脑组织pAMPK/AMPK、ALK1、HIF-1 $\alpha$ 和BCL-2蛋白的表达水平<sup>[15]</sup>:随机选取对照组和二甲双胍组小鼠各5只,在第7天转棒实验结束后,将小鼠用10%戊巴比妥钠麻醉,断头,在冰上剥离脑组织并分离半暗带区域脑组织、裂解,12 000  $\times$  g离心10 min,用蛋白定量检测试剂盒(Pierce, 美国)对总蛋白浓度进行定量分析。提

取 20  $\mu$ g 蛋白样本用 SDS-PAGE 凝胶分离, 转膜至 PVDF 膜(Bio-Rad, 美国)上; 将条带用 4% BSA 进行封闭, 一抗在 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 二抗室温 1 h, 采用化学发光仪(Tanon, 中国)进行条带拍摄。AMPK(1 : 1 000, Cell Signaling Technology); pAMPK(1 : 2 000, Cell Signaling Technology); ALK1(1 : 2 000, Abcam); GAPDH(1 : 1 000, Cell Signaling Technology); BCL-2 和 HIF-1  $\alpha$  单克隆抗体(1 : 500, Chemicon 公司),  $\beta$ -actin 单克隆抗体(1 : 500, Sigma) 为内参; 荧光标记的二抗 IgG-BCL-2 和 IgG-HIF-1  $\alpha$  (1 : 200 000, Takara)。检测 pAMPK/AMPK、ALK1、HIF-1  $\alpha$  和 BCL-2 蛋白的表达水平。

8. 免疫组织化学染色<sup>[16]</sup>: 随机选取对照组和二甲双胍组小鼠各 5 只, 在第 7 天转棒实验结束后, 用生理盐水进行心脏灌流, 用 4% 多聚甲醛在 4  $^{\circ}$ C 固定过夜, 30% 蔗糖溶液脱水沉底。用冰冻切片机(Leica, 德国)将小鼠脑切为 30  $\mu$ m 厚度切片, 保存于 -80  $^{\circ}$ C。采用共聚焦(Olympus FV1000, 日本)进行拍摄成像, 每张脑片上随机拍摄 3 个半暗带区域, 统计不同组中血管的数量。所用一抗为 Lectin (1 : 400, Vector Laboratory, 美国)。

9. 统计学方法: 所有数据均用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行单因素方差分析(ANOVA)和重复测量的双向方差分析(two-way ANOVA), 确定结果测量的差异。采用 Tukey 单因素方差分析检验和重复测量方差分析检验进行多重比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 二、结果

1. 二甲双胍对脑缺血损伤、促进半暗带区域血管再生的影响: 见表 1。脑缺血后给予二甲双胍处理, 引起的梗死体积和 HIF-1  $\alpha$  蛋白表达水平相比对照组显著降低, 而血管的数量和 BCL-2 蛋白表达水平相比对照组显著增加。

2. 二甲双胍对脑缺血后神经功能症状的影响: 见表 2。在给药第 7 天时, 二甲双胍组小鼠的 NSS 显著低于对照组, 其余时间点对比差异无统计学意义。

3. 二甲双胍对 AMPK 蛋白磷酸化、ALK1 蛋白表

表 1 两组小鼠的脑梗死体积、BCL-2 及 HIF-1  $\alpha$  和血管再生数量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	脑梗死体积(%)	BCL-2	HIF-1 $\alpha$	血管再生数量(条)
对照组	5	37.80 $\pm$ 1.77	0.53 $\pm$ 0.07	2.24 $\pm$ 0.69	57.70 $\pm$ 1.01
二甲双胍组	5	14.20 $\pm$ 2.23	1.06 $\pm$ 0.25	0.71 $\pm$ 0.12	103.60 $\pm$ 1.66
<i>t</i> 值		18.535	-4.565	4.885	-52.820
<i>P</i> 值		<0.001	0.007	0.007	<0.001

达水平的影响: 见表 3。二甲双胍处理能显著增加 AMPK 的磷酸化水平。同时, 对照组 ALK1 的表达水平明显低于二甲双胍组, 二甲双胍可以显著增加半暗带区域 ALK1 的表达。

4. 二甲双胍对小鼠在转棒上的停留时间的影响: 见表 4。在给药第 7 天时, 二甲双胍组小鼠在转棒上的停留时间明显高于对照组, 其余时间点对比差异无统计学意义。

讨论 脑缺血是全球第三大成年人致死致残的疾病, 尽管最近几十年医疗技术已经有了显著提高, 但是对于脑缺血来说, 只是降低了其死亡率, 而存活下来的患者并不能被完全治愈<sup>[14]</sup>。脑缺血会造成沉重的社会经济负担, 但是临床上目前仅有 t-PA 溶栓治疗获得 FDA 批准, 由于其较短的时间窗, 限制了其应用。因此, 亟需对脑缺血的发病机制进行深入研究, 寻找新的有效治疗方式。本研究通过对 MCAO 小鼠给予二甲双胍处理, 检测 AMPK 和其磷酸化的表达水平及血管再生的数量、运动功能恢复情况等指标, 探讨其可能的作用机制。

二甲双胍在临床上的应用已有五十余年, 是 2 型糖尿病的一线治疗药物<sup>[17]</sup>。由于二甲双胍被发现对神经病理疾病、心血管疾病等均具有治疗效果<sup>[4-6]</sup>, 尽管糖尿病和高血糖也是诱发脑缺血的重要因素, 但是二甲双胍对脑缺血的保护作用并不依赖于其降糖作用<sup>[6]</sup>。这些研究结果提示二甲双胍也可能成为治疗脑缺血的有效药物。本研究结果显示, 在给药第 7 天时, 二甲双胍组小鼠的 NSS 显著低于对照组, 二甲双胍组在转棒上的停留时间明显高于对照组,

表 2 两组小鼠 MCAO 术后 NSS 评分情况(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	15	11.01 $\pm$ 2.03	9.96 $\pm$ 2.07	8.25 $\pm$ 1.95	5.85 $\pm$ 1.23	22.200	<0.001
二甲双胍组	15	10.20 $\pm$ 2.05	9.65 $\pm$ 2.01	7.01 $\pm$ 1.88	3.33 $\pm$ 0.57	78.806	<0.001
<i>t</i> 值		1.087	0.416	1.773	7.199		
<i>P</i> 值		0.286	0.680	0.087	<0.001		

**表3** 两组小鼠的AMPK磷酸化和ALK1蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	pAMPK/AMPK	ALK1
对照组	15	1.00 ± 0.33	2.01 ± 0.52
二甲双胍组	15	1.79 ± 0.24	3.09 ± 0.64
<i>t</i> 值		-4.329	-2.929
<i>P</i> 值		0.002	0.017

其余时间点对比差异无统计学意义。说明二甲双胍能够显著改善MCAO小鼠的神经功能症状以及运动功能。

HIF-1 $\alpha$ 和BCL-2与缺血性脑卒中可导致神经元和星形胶质细胞缺血、缺氧有关, HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平增加, BCL-2蛋白表达水平下降时, 神经元和星形胶质细胞最终表现为坏死或凋亡, 而这一系列病理生理变化过程同样也是脑卒中后神经功能难以恢复的最主要的原因。本研究结果显示, 脑缺血后给予二甲双胍处理, 引起的梗死体积和HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平相比对照组显著降低, 而血管的数量和BCL-2蛋白表达水平相比对照组显著增加, 提示二甲双胍能够显著降低MCAO小鼠的梗死体积, 可能与增加BCL-2蛋白表达, 下调HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平有关。

二甲双胍的起效主要依赖于它可以激活AMPK信号通路<sup>[18]</sup>。AMPK是Ser/Thr激酶家族中的一员, 在脑缺血中, 可以通过增加分解代谢过程, 对脑缺血损伤起到保护作用<sup>[19]</sup>。ALK1是TGF- $\beta$ 家族中的一员, 磷酸化的ALK1可以促进下游的Smad1/5/8磷酸化并活化, 活化后的Smad1/5/8可与Smad4结合形成复合物, 此复合物可以进入细胞核, 启动促血管形成相关基因的表达<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, 二甲双胍组的AMPK磷酸化水平、半暗带区域ALK1蛋白水平增加, 说明二甲双胍MCAO小鼠的神经功能症状以及运动功能均得到了改善, 其机制可能与增加AMPK磷酸化水平和ALK1表达有关, 同时ALK1表达与血管的发生及形成密切相关, 血管再生是指在原有毛细血管和(或)微静脉基础上通过血管内皮细胞的迁移和增殖等过程, 从现有血管处形成新的

以毛细血管为主的血管系统。研究发现, 不论是在脑缺血动物模型还是病患脑内, 均发现在脑梗死的半暗带区域有血管再生现象出现<sup>[20]</sup>。对脑缺血患者进行深入研究发现, 患者的存活率与血管形成的数量之间呈正相关<sup>[21]</sup>。这些研究结果均表明, 血管再生是脑缺血的一项重要恢复手段, 是提高患者预后和生存质量的一个研究方向。在本研究中, 通过对半暗带区域的血管数量进行统计, 发现二甲双胍处理能显著增加半暗带区域的血管数量, 提示二甲双胍可以促进血管再生。本研究发现二甲双胍可以通过上调ALK1在缺血半暗带区域的表达, 而ALK1可以启动促血管形成相关基因的表达, 在MCAO术后可以显著促进半暗带区域的血管再生, 这也提示二甲双胍在调节血管形成方面具有双重作用, 为临床使用二甲双胍提供了研究基础。

但是本研究也存在一些不足之处, 首先, 在目前的研究中, 并没有对二甲双胍如何作用于AMPK进行深入研究, 接下来的实验中, 将会从这方面把二甲双胍调节AMPK-ALK1信号通路的作用机制阐述更为清晰; 其次, 在本实验中对于二甲双胍的给药方式是缺血后连续给予二甲双胍处理7d, 在第7天开始对小鼠的运动功能有显著保护作用, 因此, 是否预给二甲双胍处理, 以及何种剂量给药, 能否对脑缺血进行更早的干预和产生保护作用, 也是下一步的研究内容。

综上所述, 二甲双胍可以降低脑梗死体积, 改善神经功能症状和运动功能, 促进血管再生, 其机制可能与增加AMPK磷酸化水平和ALK1表达水平有关。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 试验设计为沈晓娟、杜芳, 研究实施为沈晓娟、李伟旺, 论文撰写为沈晓娟、安升, 数据分析为安升、李伟旺, 论文修订和审校为杜芳

**参 考 文 献**

[1] Ruan L, Wang B, Zhu GQ, et al. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke[J]. Brain Res, 2015, 1623: 166-173. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.02.042.

**表4** 两组小鼠MCAO训练后在转棒上的停留时间(s,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	术后1d	术后3d	术后5d	术后7d	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	15	67.70 ± 7.98	109.30 ± 10.98	123.70 ± 20.41	157.20 ± 25.87	64.961	< 0.001
二甲双胍组	15	68.10 ± 7.85	110.30 ± 10.54	126.80 ± 21.54	250.00 ± 28.11	256.791	< 0.001
<i>t</i> 值		-0.138	-0.254	-0.352	-9.408		
<i>P</i> 值		0.891	0.801	0.727	< 0.001		

- [ 2 ] Maruthur NM, Tseng E, Hutfless S, et al. Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis[ J ]. *Ann Intern Med*, 2016, 164(11): 740-751. DOI: 10.7326/M15-2650.
- [ 3 ] Bowker SL, Yasui Y, Veugelers P, et al. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure[ J ]. *Diabetologia*, 2010, 53(8): 1631-1637. DOI: 10.1007/s00125-010-1750-8.
- [ 4 ] Patrone C, Eriksson O, Lindholm D. Diabetes drugs and neurological disorders: new views and therapeutic possibilities[ J ]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2(3): 256-262. DOI: 10.1016/S2213-8587(13)70125-6.
- [ 5 ] Howland RH. A "glucose eater" drug as a therapeutic agent in psychiatry[ J ]. *J Psychosoc Nurs Ment Health Serv*, 2013, 51(9): 13-16. DOI: 10.3928/02793695-20130805-01.
- [ 6 ] Roussel R, Travert F, Pasquet B, et al. Metformin use and mortality among patients with diabetes and atherothrombosis[ J ]. *Arch Intern Med*, 2010, 170(21): 1892-1899. DOI: 10.1001/archinternmed.2010.409.
- [ 7 ] Cheng YY, Leu HB, Chen TJ, et al. Metformin-inclusive therapy reduces the risk of stroke in patients with diabetes: a 4-year follow-up study[ J ]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014, 23(2): e99-e105. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.09.001.
- [ 8 ] Morizane Y, Thanos A, Takeuchi K, et al. AMP-activated protein kinase suppresses matrix metalloproteinase-9 expression in mouse embryonic fibroblasts[ J ]. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 16030-16038. DOI: 10.1074/jbc.M110.199398.
- [ 9 ] Takeuchi K, Morizane Y, Kamami-Levy C, et al. AMP-dependent kinase inhibits oxidative stress-induced caveolin-1 phosphorylation and endocytosis by suppressing the dissociation between c-Abl and Prdx1 proteins in endothelial cells[ J ]. *J Biol Chem*, 2013, 288(28): 20581-20591. DOI: 10.1074/jbc.M113.460832.
- [ 10 ] Cunha SI, Bocci M, Lövrot J, et al. Endothelial ALK1 Is a Therapeutic Target to Block Metastatic Dissemination of Breast Cancer[ J ]. *Cancer Res*, 2015, 75(12): 2445-2456. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3706.
- [ 11 ] 王凯. 长时程二甲双胍预处理通过诱导自噬发挥脑保护作用的机制研究[ D ]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [ 12 ] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[ J ]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011. DOI: 10.1161/01.STR.32.4.1005.
- [ 13 ] 孙亚蒙, 张燕, 莫云, 等. 缺血后处理抑制神经元凋亡减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[ J ]. *中国临床神经科学*, 2018, 26(3): 8-16. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0678.2018.03.001.
- Sun YM, Zhang Y, Mo Y, et al. Ischemic Postconditioning Ameliorates Cerebral Ischemia-reperfusion Injury through Inhibiting Apoptosis during Early Reperfusion in the Rat[ J ]. *Chinese Journal of Clinical Neurosciences*, 2018, 26(3): 8-16.
- [ 14 ] 陈艳华, 舒彬, 杨忠, 等. 耐力运动对青年与老年小鼠股骨组织微结构变化的影响[ J ]. *中国临床解剖学杂志*, 2018, 36(6): 652-656. DOI: 10.13418/j.issn.1001-165x.2018.06.011.
- Chen YH, Shu B, Yang Z, et al. Effect of endurance exercise on microstructure changes of femoral tissue in young and old mice[ J ]. *Chinese Journal of Clinical Anatomy*, 2018, 36(6): 652-656.
- [ 15 ] 吴明娟, 孙晓伟, 卢金荣, 等. 头穴透刺对MCAO/R大鼠缺血脑组织NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 蛋白表达的影响[ J ]. *针灸临床杂志*, 2017, 33(10): 64-67. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0779.2017.10.018.
- Wu MJ, Sun XW, Lu JR, et al. Effect of GV20-GB7 Scalp-acupuncture on the Protein Expressions of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  in MCAO/R Rats[ J ]. *Journal of Clinical Acupuncture and Moxibustion*, 2017, 33(10): 64-67.
- [ 16 ] 张智申, 董贝贝, 谢克亮, 等. 血管内皮祖细胞-血管再生在缺血再灌注损伤中的作用探讨[ J ]. *天津医药*, 2016, 44(6): 694-699, 650. DOI: 10.11958/20160042.
- Zhang ZS, Dong BB, Xie KL, et al. The potential effects of EPCs-angiogenesis on ischemia-reperfusion injury[ J ]. *Tianjin Medical Journal*, 2016, 44(6): 694-699, 650.
- [ 17 ] 曾晓会, 卓俊城, 谢凯枫, 等. 二甲双胍治疗II型糖尿病大鼠的代谢组学研究[ J ]. *中国药理学通报*, 2019, 35(9): 1212-1220. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2019.09.007.
- Zeng XH, Zhuo JC, Xie KF, et al. Metabonomic study of metformin in type II diabetic rats[ J ]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2019, 35(9): 1212-1220.
- [ 18 ] Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin[ J ]. *Diabetologia*, 2017, 60(9): 1577-1585. DOI: 10.1007/s00125-017-4342-z.
- [ 19 ] 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[ J ]. *Brain Behav Immun*, 2014, 40(3): 131-142. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.03.003.
- [ 20 ] Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin[ J ]. *Science*, 2005, 310(5754): 1642-1646. DOI: 10.1126/science.1120781.
- [ 21 ] Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, et al. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia[ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(2): 166-180. DOI: 10.1097/01.WCB.0000041283.53351.CB.

(收稿日期: 2019-06-19)

(本文编辑: 戚红丹)