

内分泌腺疾病及代谢病基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001949

利拉鲁肽通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体改善合并糖尿病的局灶性脑缺血损伤

何 婧, 韩江全, 施宁华, 刘 婷, 郭琪琪

(遵义医学院第五附属(珠海)医院神经内科, 珠海 519100)

【摘要】目的:通过观察利拉鲁肽对糖尿病大鼠脑缺血损伤后脑组织中过氧化物酶体增殖物激活受体表达的影响,进一步探讨利拉鲁肽如何影响合并糖尿病的脑缺血损伤及可能机制。**方法:**48 只成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、糖尿病脑缺血组(DCI 组)、利拉鲁肽组(Lir 组)、胰岛素组(Ins 组),每组 12 只。应用链脲佐菌素腹腔注射诱发糖尿病,继而制作永久性大脑中动脉闭塞模型。Lir 组、Ins 组于缺血前 7 d 分别腹腔注射利拉鲁肽(100 $\mu\text{g/kg}$, q12h)、胰岛素(2 U/kg, q12h),其他各组于同一时间段腹腔注射等量生理盐水。脑缺血 24 h 后作神经功能评分,断头取脑行 2,3,5-氯化三苯四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色测脑梗死面积,蛋白印迹法检测缺血区 PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α)、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κB 、p65、TNF- α 的表达情况。**结果:**各组药物干预前后血糖同组比较:Lir 组、Ins 组注射利拉鲁肽、胰岛素后血糖水平明显下降,注射前后均有统计学差异($P=0.000$; $P=0.008$)。神经功能缺损评分:Sham 组无神经功能缺损,与 DCI 相比,Ins 组神经功能评分无明显改变;而 Lir 组明显降低($P=0.000$)。TTC 染色:Sham 组未见梗死灶,与 DCI 组相比,Ins 组梗死灶无明显变化,而 Lir 组梗死体积明显缩小($P=0.033$)。蛋白质印迹显示:PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κB p65、TNF- α 表达水平在 Sham 组、DCI 组、Ins 组和 Lir 组各组间存在统计学差异($F=15.826$, $P=0.000$; $F=21.988$, $P=0.000$; $F=21.132$, $P=0.000$; $F=21.023$, $P=0.000$; $F=63.607$, $P=0.000$)。与 DCI 组相比,Ins 组各组蛋白表达无统计学差异。而 Lir 组 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 表达明显增高($P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$),NF- κB p65、TNF- α 表达明显降低($P=0.000$; $P=0.000$)。**结论:**利拉鲁肽对糖尿病大鼠局灶性脑缺血损伤具有一定的保护作用,其可能机制与上调 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 表达,下调 NF- κB p65、TNF- α 表达有关。

【关键词】利拉鲁肽;糖尿病;脑缺血;胰岛素;过氧化物酶体增殖物激活受体;炎症反应**【中图分类号】**R743.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-05-23

Liraglutide protects against focal cerebral ischemic injury with diabetes mellitus by activating peroxisome proliferator-activated receptors

He Jing, Han Jiangquan, Shi Ninghua, Liu Ting, Guo Qiqi

(Department of Neurology, The Fifth Affiliated Hospital of Zunyi Medical College)

【Abstract】Objective: To observe the effect of liraglutide on the expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the brain tissue of diabetic rats after cerebral ischemic injury, and to further investigate the effect of liraglutide on cerebral ischemic injury with diabetes mellitus and the possible mechanism. **Methods:** Forty-eight adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups: sham-operated group (Sham group), diabetes cerebral ischemia group (DCI group), liraglutide-pretreatment DCI group (Lir group), and insulin-pretreatment DCI group (Ins group), with 12 rats in each group. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin, and a model of permanent middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established in the diabetic rats. The rats in the Lir group and Ins group were intraperitoneally injected with liraglutide (100 $\mu\text{g/kg}$, q12h) and insulin (2 U/kg, q12h), respectively, 7 days before MCAO, while the other two groups were injected with an equal volume of normal saline during the same period of time. Neurological deficit scores were determined at 24 hours after MCAO. Then the rats were decapitated, and their

brain tissues were taken out to measure the infarct area by TTC staining. Western blotting was used to measure the expression of PPAR α , PPAR β , PPAR γ , nuclear factor- κB p65 (NF- κB p65), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the ischemic area. **Results:** The Lir group and Ins group showed significant reductions in blood glucose after injection of liraglutide or insulin ($P=0.000$, $P=0.000$). The Sham group showed no neuro-

作者介绍:何 婧, Email: 460438922@qq.com,

研究方向:脑血管疾病。

通信作者:韩江全, Email: gdshanj@163.com。

基金项目:珠海市重点学科资助项目(编号:珠卫 20088013);遵义市科技计划资助项目(编号:遵市科合社字[2018]20 号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181228.1002.002.html>
(2018-12-29)

logical deficit; compared with the DCI group, the Ins group had no significant change in neurological deficit score, but the Lir group showed a significant reduction in neurological deficit score ($P=0.008$). TTC staining showed that no infarct was observed in the Sham group; compared with the DCI group, the Ins group had no significant change in infarct volume, but the Lir group showed a significant reduction in infarct volume ($P=0.033$). Western blot showed significant differences in the expression levels of PPAR α , PPAR β , PPAR γ , NF- κ Bp65, and TNF- α between the Sham group, the DCI group, the Ins group, and the Lir group ($F=15.826, P=0.000; F=21.988, P=0.000; F=21.132, P=0.000; F=21.023, P=0.000; F=63.607, P=0.000$); compared with the DCI group, the Ins group had no significant changes in the expression of the above proteins, but the Lir group showed significant increases in the expression of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ ($P=0.000, P=0.000, P=0.000$) and significant reductions in the expression of NF- κ Bp65 and TNF- α ($P=0.000, P=0.000$). **Conclusion:** Liraglutide has a certain protective effect against focal cerebral ischemic injury in diabetic rats, possibly by up-regulating the expression of PPAR α , PPAR β , and PPAR γ and down-regulating the expression of NF- κ B p65 and TNF- α .

[Key words] liraglutide; diabetes mellitus; cerebral ischemia; insulin; peroxisome proliferator-activated receptor; inflammation

脑梗死是严重危害人类健康的疾病,具有高发病率、高致残率的临床特点。糖尿病被公认为是脑梗死的独立危险因素。糖尿病常与脑梗死相伴发生。研究报道,超过 1/3 的急性脑梗死患者入院时合并有糖尿病^[1]。合并糖尿病的脑梗死病情更为严重,其致残率、病死率及再梗死率明显增加。目前临床上对合并糖尿病的脑梗死缺乏有效的治疗手段。重组组织型纤溶酶原激活物(recombination tissue-type plasminogen activator, rtPA)溶栓治疗是目前唯一被 FDA 批准的、被认为是脑梗死急性期内最有效的治疗手段。但糖尿病可降低脑梗死后溶栓治疗血管再通率,使梗死面积缩小不明显、神经功能恢复困难,且溶栓后出现症状性颅内出血的风险明显增加^[2]。可见,合并糖尿病的脑梗死不大可能从溶栓治疗中获益。因此,寻找对糖尿病合并脑梗死具有保护作用的新的干预措施十分关键。

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs)属于核受体超家族成员,为配体激活的转录因子,包括 3 种亚型,即 PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 。激活 PPARs 可在调节脂质代谢、维持体内葡萄糖稳态、参与细胞增殖与分化、调控炎症和氧化应激等过程中发挥重要作用^[3]。近年来研究表明,PPARs 的激活有利于调节缺血性脑损伤中的神经元死亡^[4]。PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 各亚型激动剂在动物脑缺血模型中已显示可明显减少脑梗死体积并改善实验性卒中的神经功能损伤^[5-7]。此外,同时激活 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 对脑缺血损伤后炎症及氧化应激的抑制效应具有协同及叠加作用^[8]。新近研究发现,糖尿病显著下调大鼠脑内 PPAR γ 的表达,并加重脑功能损

害^[9]。使用 PPAR γ 激动剂(15-脱氧前列腺素 J2)可上调 PPAR γ 的表达,显著改善糖尿病大鼠脑缺血后神经细胞的凋亡^[10]。这些数据表明,激活 PPARs 可能是保护糖尿病合并脑梗死的潜在治疗策略。

利拉鲁肽(liraglutide)是通过基因重组技术利用酵母生产的长效胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide-1, GLP-1)类似物。GLP-1 是一种由哺乳动物体内肠 L 细胞分泌的肽类激素,也是由神经元细胞合成的神经肽。它可通过激活 GLP-1 受体(GLP-1R)而发挥生物学效应^[11]。GLP-1 受体在整个脑内高度表达,激活 GLP-1 受体可发挥对神经炎症、氧化应激、神经毒性和记忆障碍的保护作用^[12]。近年来国内外学者包括本研究课题组的前期研究证实,利拉鲁肽可通过抑制炎症反应及氧化应激、抗凋亡等发挥对糖尿病大鼠脑缺血损伤的保护作用^[13-14]。此外,新近研究发现,利拉鲁肽可通过激活 PPAR α 显著降低糖尿病大鼠合并心肌缺血后的梗死面积^[15]。然而,利拉鲁肽的神经保护作用是否与激活 PPARs 有关尚未见文献报道。

本研究通过观察利拉鲁肽对糖尿病大鼠脑缺血损伤后脑组织中 PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ 表达的影响,进一步探讨利拉鲁肽对合并糖尿病的脑缺血损伤保护作用的可能机制,以期为临床治疗合并糖尿病的脑梗死提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及方法

选用 48 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8~10 周龄,体质量 250~280 g,购于广东省医学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)

2008-0002。实验前将大鼠置于实验室分笼饲养,适应环境 1 周,自由饮水,进食。将所有大鼠按随机数字表法随机分为假手术组(Sham 组)、糖尿病脑缺血组(DCI 组)、胰岛素干预组(Ins 组)、利拉鲁肽干预组(Lir 组),每组 12 只。Lir 组、Ins 组在脑缺血造模术前,分别于大鼠腹腔注射利拉鲁肽 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, q12h,胰岛素 2 U/kg, q12h, Sham 组、DCI 组于同一时间腹腔注射等量生理盐水。

1.2 模型制备

1.2.1 糖尿病模型制备 制备方法参照周迎生等^[16]的研究,各组大鼠在禁食 8 h 后于左下腹腔内注射链脲佐菌素(美国 Sigma 公司)2 mg/100 g, 24 h 后再次腹腔注射链脲佐菌素 3.5 mg/100 g, 48 h 后用血糖仪测定尾尖血糖变化。当空腹血糖 $>16.7\text{ mmol/L}$ 且出现多尿、体质量下降等表现即判定为糖尿病大鼠,剔除未达标准或未到时间点死亡者,随机补充。

1.2.2 MCAO 模型制备 采用线栓法建立永久性大脑中动脉阻塞脑缺血模型^[17];模型制作时假手术组插线深度 10~12 mm,栓线仅进入颈内动脉而未达大脑中动脉,其余各组将尼龙栓线自颈总动脉插入向颈内动脉方向入颅,直至送入大脑中动脉与大脑前动脉分叉处(线头距颈动脉分叉处约 18 mm)阻断血流。

1.2.3 神经功能评分 根据 Hunter 等^[18]的评分标准进行神经功能评价。0 分:无神经功能缺损症状;1 分:不能完全伸展对侧前爪;2 分:向对侧转圈;3 分:向对侧倾倒;4 分:不能自发行走,意识丧失;5 分:死亡。在模型制作后 24 h 进行神经功能缺损评分。1~4 分视为模型制作成功,0 分者剔除,5 分者行脑组织大体观察后剔除,随机补充。

1.3 TTC 染色检测脑梗死面积

各组大鼠随机各取 6 只,在脑缺血后 24 h 后采用 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)(美国 Sigma 公司)染色并检测脑梗死面积。新鲜脑组织置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中速冻 20 min,沿冠状位将鼠脑切成 5 片,厚度 2 mm/片,置于 20 g/L 的 TTC 磷酸盐缓冲液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,4%多聚甲醛固定 24 h,拍照并用 Image J 测定每张脑片的梗死面积,计算梗死面积百分比。

1.4 脑组织中的 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κB p65、TNF- α 表达测定

采用 Western blot 测定脑组织中的 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κB p65、TNF- α 表达水平。取各组大鼠缺血侧标本,以 100 mg 组织样本加入 100 μL RIPA 裂解液将组织样本迅速研磨后冰上裂解 10 min,玻璃匀浆器匀浆,离心后收集上清液,提取总蛋白,应用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。将总蛋白加入等体积 2 $\times$ 电泳样品缓冲液后 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中水浴 5 min 使其变性,经 SDS-PAGE 电泳后用半干转印仪转膜至硝酸纤维素膜;5%脱脂奶粉封闭后,室温孵育 1 h,加入相应一抗[兔抗大鼠 PPAR α (1:500),小鼠抗兔 PPAR β (1:500),羊抗大鼠 PPAR γ (1:500)、小鼠抗兔 NF- κB p65(1:500)、小鼠抗兔

TNF- α (1:500)](美国 Santa Cruz 公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇振孵育过夜;应用 TBS-T 洗膜 3~4 次,每次 10 min;加入辣根过氧化物酶标记二抗[山羊抗兔(1:5 000),兔抗小鼠(1:5 000),兔抗山羊(1:5 000),兔抗小鼠(1:5 000),兔抗小鼠(1:5 000)](博士德公司),室温避光孵育 60 min;TBS-T 洗膜 4 次,每次 10 min;于暗室中滴入 ECL 显色剂显色后放于暗盒中曝光,并通过 Image J 对显示的蛋白电泳条带进行分析,获取各组蛋白质印迹条带平均灰度值(目的蛋白与内参灰度值的比值即为目的蛋白表达的相对值)。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 21.0 软件进行统计学处理。定量资料进行正态性和方差齐性检验,符合正态分布者以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多个均数间比较采用单因素方差分析,如方差齐两两比较采用 LSD- t 检验;如方差不齐,两两比较采用 Tamhane's T2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠模型的建立

2.1.1 各组大鼠糖尿病模型制作前血糖值 各组比较无统计学差异。参照糖尿病大鼠模型血糖 16.7 mmol/L 的标准,糖尿病大鼠模型制成后,均出现精神萎靡、毛发蓬乱、多饮、多食、多尿、体质量减轻(三多一少)等典型糖尿病症状。

2.1.2 模型建立后血糖值 各组血糖值注射前后,药物干预前各组血糖水平均明显升高,各组间无统计学差异($F=0.162$, $P=0.921$),药物干预后各组血糖水平存在统计学差异($F=23.435$, $P=0.000$),且 Ins 组、Lir 组在注射胰岛素、利拉鲁肽后血糖明显降低,差异均具有统计学意义($P=0.000$)。Sham 组、DCI 组注射生理盐水后血糖水平无明显改变,见表 1。

表 1 各组大鼠药物干预前后血糖值比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	药物干预前血糖值	药物干预后血糖值
Sham组	23.470 $\pm$ 2.405	24.277 $\pm$ 2.550
DCI组	23.250 $\pm$ 2.507	25.123 $\pm$ 2.790
Lir组	23.808 $\pm$ 2.008	18.406 $\pm$ 2.210 ^a
Ins组	23.223 $\pm$ 2.344	18.863 $\pm$ 2.503 ^a
F 值	0.162	23.435
P 值	0.921	0.000

注:a,与同组比较, $P=0.000$

2.2 神经功能缺损评分

Sham 组未检测到神经功能缺损,其余各组大鼠在麻醉清醒后即出现不同程度神经功能缺损(表 2)。Sham 组、DCI 组、Ins 组、Lir 组神经功能缺损评分分别为 0 分、(3.080 $\pm$ 0.793)分、(2.830 $\pm$ 0.718)分和(1.750 $\pm$ 0.965)分,各组间存在统计学差异($F=45.499$, $P=0.000$)。其中,DCI 组神经功能评分与 Sham 组相比明显增加($P=0.000$),Lir 组较 DCI 组明显减少($P=0.008$),Ins 组较 DCI 组无明显改善($P=0.965$)。

表 2 各组大鼠神经功能评分比较 (分, $\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	神经功能评分
Sham组	0.000 ± 0.000
DCI组	3.080 ± 0.793 ^a
Lir组	1.750 ± 0.965 ^b
Ins组	2.830 ± 0.718 ^c
<i>F</i> 值	45.499
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与 Sham 组比较, $P=0.000$;b:与 DCI 组比较, $P=0.008$;c:与 DCI 组比较, $P=0.965$

2.3 梗死面积

Sham 组经 TTC 染色后未见白色梗死区域,其余各组大鼠大脑染色均有不同范围的白色梗死区,主要位于大脑中动脉供血的额顶叶皮质区和基底节区(图 1)。各组间梗死面积存在统计学差异($F=69.279, P=0.000$),其中 Ins 组梗死面积较 DCI 组无明显缩小($P=0.973$),而 Lir 组梗死面积较 DCI 组明显缩小($P=0.033$),见表 3。

表 3 各组大鼠脑梗死面积比较 (% , $\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	梗死面积
Sham组	0.000 ± 0.000
DCI组	41.457 ± 5.999 ^a
Lir组	29.197 ± 6.096 ^b
Ins组	38.477 ± 7.134 ^c
<i>F</i> 值	69.279
<i>P</i> 值	0.000

注:a,与 Sham 组比较, $P=0.000$;b:与 DCI 组比较, $P=0.033$;c:与 DCI 组比较, $P=0.973$

2.4 Western blot 测定脑组织中 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κ Bp65、TNF- α 表达水平

局灶性脑缺血 24 h 后各组大鼠脑组织采取 Western blot 测定 PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 表达水平,可见各组均存在统计学差异(表 4,图 2)。与 Sham 组相比,DCI 组 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和 NF- κ Bp65、TNF- α 表达水平均增高($P=$

0.026; $P=0.007$; $P=0.019$; $P=0.000$; $P=0.000$);与 DCI 相比,Lir 组 PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 表达水平均明显增高($P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$),NF- κ Bp65、TNF- α 表达水平明显降低($P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$);而 Ins 组 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 和 NF- κ Bp65、TNF- α 表达无统计学差异($P=0.794$; $P=0.605$; $P=0.555$; $P=0.115$; $P=0.298$)。

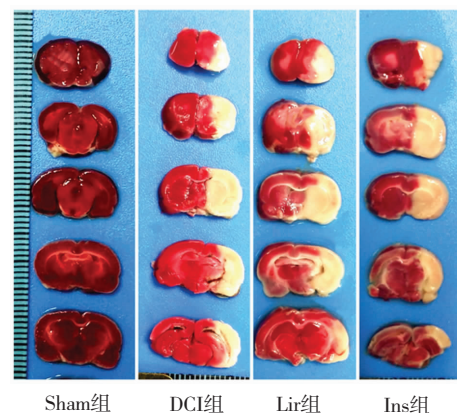
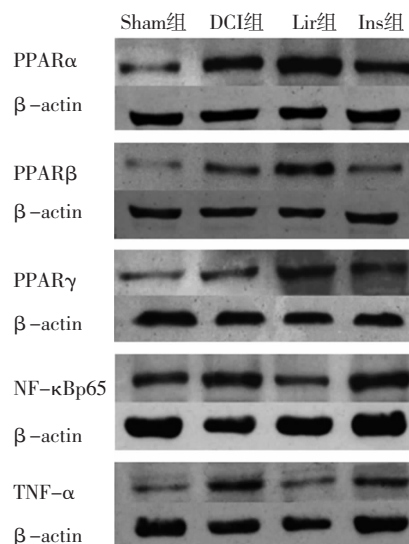


图 1 糖尿病脑缺血后脑片 2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色图片

图 2 各组大鼠缺血脑组织 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κ Bp65、TNF- α 表达 (Western blot)表 4 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、NF- κ Bp65、TNF- α 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PPAR α	PPAR β	PPAR γ	NF- κ Bp65	TNF- α
Sham组	0.331 ± 0.136	0.298 ± 0.125	0.336 ± 0.130	0.460 ± 0.136	0.265 ± 0.535
DCI组	0.582 ± 0.206 ^a	0.544 ± 0.132 ^d	0.542 ± 0.136 ^e	1.045 ± 0.187 ^j	0.731 ± 0.835 ^m
Lir组	1.039 ± 0.185 ^b	0.956 ± 0.177 ^c	0.968 ± 0.160 ^b	0.500 ± 0.112 ^k	0.305 ± 0.758 ⁿ
Ins组	0.610 ± 0.189 ^c	0.587 ± 0.127 ^f	0.591 ± 0.134 ⁱ	0.897 ± 0.174 ^l	0.684 ± 0.843 ^o
<i>F</i> 值	15.826	21.988	21.132	21.023	63.607
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与 Sham 组比较, $P=0.026$;b:与 DCI 组比较, $P=0.000$;c:与 DCI 组比较, $P=0.794$;d:与 Sham 组比较, $P=0.007$;e:与 DCI 组比较, $P=0.000$;f:与 DCI 组比较, $P=0.605$;g:与 Sham 组比较, $P=0.019$;h:与 DCI 组比较, $P=0.000$;i:与 DCI 组比较, $P=0.555$;j:与 Sham 组比较, $P=0.000$;k:与 DCI 组比较, $P=0.000$;l:与 DCI 组比较, $P=0.115$;m:与 Sham 组比较, $P=0.000$;n:与 DCI 组比较, $P=0.000$;o:与 DCI 组比较, $P=0.298$

3 讨论

本研究结果显示,给予利拉鲁肽治疗可显著改善糖尿病大鼠的神经功能缺损并减轻脑梗死体积,且该效应的取得与其减弱 NF- κ B 活化、下调 TNF- α 表达有关。此外,本研究首次发现 PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ 参与了利拉鲁肽的神经保护作用。

利拉鲁肽具有明确的降血糖和保护胰腺作用,已被美国 FDA 批准上市,目前临床上较为广泛地用于 2 型糖尿病的治疗。由于利拉鲁肽克服了天然 GLP-1 易被降解的缺点,又保留了 GLP-1 确切的神经保护作用,并可无损伤地通过血脑屏障,利拉鲁肽对脑缺血损伤的作用越发受到关注。2013 年, Sato 等^[19]首次发现利拉鲁肽可减轻大脑中动脉阻塞所致的脑缺血再灌注损伤。近年研究证实,利拉鲁肽对糖尿病大鼠的脑缺血损伤有明确的保护作用。然而,利拉鲁肽目前在临床上仍主要用于治疗 2 型糖尿病,其对合并糖尿病的脑缺血损伤保护作用的效应还有待进一步试验证实,且作用机制的探讨也比较有限。本研究发现,利拉鲁肽及胰岛素预处理后均可明显降低并发脑缺血损伤的糖尿病大鼠的血糖水平,但只有利拉鲁肽对减少梗死体积及改善神经功能缺损具有积极作用,这一发现与之前的一些实验研究一致^[20]。此外有临床研究证实,使用胰岛素可将血糖降至正常水平,却不能改善伴有高血糖的急性缺血性卒中的短期预后^[21]。上述研究提示糖尿病加重脑缺血损伤是多因素相互作用的结果,仅仅降低高血糖不是神经保护的主要机制。本研究进一步证实了利拉鲁肽是一种神经保护剂,对合并糖尿病的脑梗死具有重要的保护作用。

炎症反应是造成糖尿病加重缺血脑组织再灌注损伤的重要因素,而炎性细胞因子是缺血性损伤向炎症性损伤转变的基础^[22]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种由激活的单核/巨噬细胞分泌的、具有广泛生物学功能的多效促炎性细胞因子,也是引发炎症放大效应的一种重要细胞因子。而核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是普遍存在于真核细胞中的一种重要核转录因子。研究表明, TNF- α 是核因子信号转导的靶点之一^[23]。NF- κ B 在脑缺血再灌注后表达上调,通过调节促炎性细胞因子 TNF- α 、白细胞介素-1 β 等

表达,放大炎症效应,最终导致脑损伤加重,而抑制 NF- κ B 表达可明显减轻脑缺血损伤^[24]。本研究团队在糖尿病大鼠脑缺血损伤的前期研究中发现, NF- κ B 和 TNF- α 表达上调,可使脑缺血损伤进行性加重;而抑制 NF- κ B 和 TNF- α 表达,可显著改善大鼠神经功能缺损及梗死体积^[25]。这表明 NF- κ B 和 TNF- α 表达上调可能是糖尿病加重脑缺血再灌注损伤的机制之一。本实验发现,给予利拉鲁肽治疗可明显下调 NF- κ Bp65 和 TNF- α 的表达水平,进一步证实抗炎作用是利拉鲁肽改善糖尿病合并脑缺血损伤的潜在保护机制。

本研究首次证实 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 的上调参与了利拉鲁肽改善合并糖尿病的脑缺血损伤的机制。越来越多的证据表明,PPARs 的激活在中枢神经系统疾病包括缺血性脑损伤、阿尔茨海默病和帕金森病中起着重要的保护作用^[26-27]。因此,PPARs 已被认为是内源性神经保护因子。在各种病理(包括缺血)条件下,PPARs 可与 NF- κ Bp65 亚基相互作用,抑制 NF- κ B 通路的激活,继而减弱炎症反应^[28-29]。本研究结果显示,给予利拉鲁肽后,PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 在脑组织中明显上调,由此推测利拉鲁肽对合并糖尿病的脑缺血性损伤的保护作用与 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 的上调有关。

综上所述,本研究进一步证实利拉鲁肽对合并糖尿病的急性缺血性卒中具有确切的保护作用。其保护机制可能与其上调 PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ 的表达,并抑制 NF- κ B 的活化,从而减轻炎症反应有关。这些结果表明,利拉鲁肽可能是治疗缺血性卒中潜在的全 PPARs 激动剂,但尚需要选择性 PPARs 拮抗剂或 PPAR 敲除动物进一步阐明其确切的分子机制。

参 考 文 献

- [1] Akpalu J, Yawson AE, Osei-Poku F, et al. Stroke outcome and determinants among patients with and without diabetes in a tertiary hospital in Ghana[J]. Stroke Res Treat, 2018, 2018: 7521351.
- [2] Arnold M, Mattle S, Galimanis A, et al. Impact of admission glucose and diabetes on recanalization and outcome after intra-arterial thrombolysis for ischaemic stroke[J]. Int J Stroke, 2014, 9(8): 985-991.
- [3] Bordet R, Ouk T, Petraut O, et al. PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt 6): 1341-1346.

- [4] Ouk T, Potey C, Gautier S, et al. PPARs: a potential target for a disease-modifying strategy in stroke[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(7): 752–767.
- [5] Xuan AG, Chen Y, Long DH, et al. PPAR α agonist fenofibrate ameliorates learning and memory deficits in rats following global cerebral ischemia[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(1): 601–609.
- [6] Chehaibi K, le Maire L, Bradoni S, et al. Effect of PPAR- β/δ agonist GW0742 treatment in the acute phase response and blood-brain barrier permeability following brain injury[J]. *Transl Res*, 2017, 182: 27–48.
- [7] Xia P, Pan Y, Zhang F, et al. Pioglitazone confers neuroprotection against ischemia-induced pyroptosis due to its inhibitory effects on HMGB-1/RAGE and Rac1/ROS pathway by activating PPAR- γ [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(6): 2351–2368.
- [8] Luo Y, He Q, Kuang G, et al. PPAR- α and PPAR- β expression changes in the hippocampus of rats undergoing global cerebral ischemia/reperfusion due to PPAR- γ status[J]. *Behav Brain Funct*, 2014, 10(1): 21.
- [9] 蔡雯雯, 张京慧, 江宏, 等. 吡格列酮对糖尿病大鼠中枢神经系统 PPAR- γ 表达的影响[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2017, 17(1): 34–36.
- [10] Huang L, Li G, Feng X, et al. 15d-PGJ2 reduced microglia activation and alleviated neurological deficit of ischemic reperfusion in diabetic rat model[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 864509.
- [11] Hölscher C. Central effects of GLP-1: new opportunities for treatments of neurodegenerative diseases[J]. *J Endocrinol*, 2014, 221(1): T31–41.
- [12] Darsalia V, Nathanson D, Nyström T, et al. GLP-1R activation for the treatment of stroke: updating and future perspectives[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2014, 15(3): 233–242.
- [13] Parthasarathy V, Hölscher C. The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 700(1–3): 42–50.
- [14] Deng C, Cao J, Han J, et al. Liraglutide activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and protects brain nerve cells against cerebral ischemia in diabetic rats[J]. *Comput Intell Neurosci*, 2018: 3094504.
- [15] Zhang Q, Xiao X, Zheng J, et al. Liraglutide protects cardiac function in diabetic rats through the PPAR α pathway[J]. *Biosci Rep*, 2018, pii: BSR20180059.
- [16] 周迎生, 高妍, 李斌, 等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(3): 154–158.
- [17] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84–91.
- [18] Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke[J]. *Neuropharmacology*, 2000, 39(5): 806–816.
- [19] Sato K, Kameda M, Yasuhara T, et al. Neuroprotective effects of liraglutide for stroke model of rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 21513–21524.
- [20] Briyal S, Shah S, Gulati A. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide in the rat brain following focal cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2014, 281: 269–281.
- [21] Bellolio MF, Gilmore RM, Ganti L. Insulin for glycaemic control in acute ischaemic stroke[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014(1): CD005346.
- [22] Shukla V, Shukla AK, Perez-Pinzon MA, et al. Cerebral ischemic damage in diabetes: an inflammatory perspective[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 21.
- [23] Yan M, Leng T, Tang L, et al. Neuroprotectant androst-3 β , 5 α , 6 β -triol suppresses TNF- α -induced endothelial adhesion molecules expression and neutrophil adhesion to endothelial cells by attenuation of CYLD-NF- κ B pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(2): 892–896.
- [24] Prabhakar O. Cerebroprotective effect of resveratrol through antioxidant and anti-inflammatory effects in diabetic rats[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2013, 386(8): 705–710.
- [25] Han JQ, Liu CL, Wang ZY, et al. Anti-inflammatory properties of lipoxin A4 protect against diabetes mellitus complicated by focal cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(4): 636–640.
- [26] Zolezzi JM, Santos MJ, Bastías-Candia S, et al. PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation[J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2017, 92(4): 2046–2069.
- [27] Cai W, Yang T, Liu H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): a master gatekeeper in CNS injury and repair[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163–164: 27–58.
- [28] Deng Y, Xiong D, Yin C, et al. Icariside II protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats via nuclear factor- κ B inhibition and peroxisome proliferator-activated receptor up-regulation[J]. *Neurochem Int*, 2016, 96: 56–61.
- [29] Chang X, Zhang K, Zhou R. Cardioprotective effects of salidroside on myocardial ischemia-reperfusion injury in coronary artery occlusion-induced rats and Langendorff-perfused rat hearts[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 215: 532–544.

(责任编辑: 唐秋姗)