

二甲双胍对正常组织的保护性作用及机制研究进展

冯婷婷 凌孙彬 朱利明 辛文秀

摘 要 二甲双胍不仅是 2 型糖尿病一线和基础治疗用药,也是近年来抗肿瘤研究的热点药物。研究发现其在高糖、炎症、氧化应激及放化疗损伤等病理过程中,显示出对正常人体组织显著的保护作用。本文将综述二甲双胍对正常组织的保护效应及机制,以为二甲双胍作为放化疗辅助用药提供新的研究思路。

关键词 二甲双胍 氧化应激 保护作用

中图分类号 R730.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.05.044

近年来,二甲双胍的抗肿瘤作用、放化疗及靶向增敏作用的研究证据日益增多。笔者所在研究团队已证实二甲双胍可抑制胆管癌、食管癌细胞的增殖^[1,2]。虽然回顾性研究报道,二甲双胍治疗可能并不延长合并糖尿病的肿瘤患者的总生存率^[3]。这可能与该研究临床样本量较小有关。而笔者的研究团队发现二甲双胍不仅对胆管癌的治疗药物吉西他滨、5-氟尿嘧啶(5-FU)、三氧化二砷及索拉菲尼具有药物增敏作用,还可增强食管癌细胞放疗敏感度,并可逆转肝癌细胞 BEL7402/FU 对 5-FU 的耐药性^[1,2,4]。与此同时,已有临床研究表明正常处方剂量的二甲双胍作为放化疗增敏剂已为肿瘤患者带来生存获益并显示良好的耐受性^[5]。此外,近期二甲双胍减轻放化疗组织损伤的研究引起了笔者的注意。笔者认为二甲双胍联合常规放化疗可能是一种减毒增效的治疗策略。探索对正常组织及肿瘤的差异性影响将为二甲双胍作为放化疗辅助用药提供新的研究思路。

一、二甲双胍对正常组织的保护效应

1. 二甲双胍对糖尿病患者组织保护的临床研究证据:多项临床研究证实二甲双胍可降低心血管事件的发生率和病死率^[6];英国糖尿病前瞻性系列研究(U. K. prospective diabetes study)显示,二甲双胍可使心肌梗死的风险降低 16%。台湾基于 645 710 名 2 型糖尿病患者 13 年的随访发现,二甲双胍组可显著降低心房颤动发生风险。而糖尿病肾病是糖尿病重

要的微血管病变,最新循证医学证据提示对于肾小球率过率仅 30~60 ml/min 的肾功能不全的患者,二甲双胍降糖治疗不仅是安全的,亦可降低糖尿病肾病患者的尿白蛋白的排泄^[7]。另有研究提示长期服用二甲双胍可使糖尿病合并肝纤维化患者的肝性脑病的发生风险显著下降,并改善其肝功能及预后^[8]。目前二甲双胍以罕见的不良反应及出色的心血管保护作用,成为了 2 型糖尿病降糖的一线用药和基础用药。二甲双胍因其抗炎、抗氧化应激作用,将不限于糖尿病患者正常组织的保护作用,在非糖尿病患者抗衰老、慢性病的防治研究中也获得越来越多的关注。

2. 二甲双胍可缓解正常组织的放化疗损伤:多柔比星作为蒽环类化疗药的代表药物,其心脏毒性不容忽视。有研究者发现低剂量的二甲双胍可减少多柔比星引起心肌细胞的乳酸脱氢酶漏出,活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成和钙离子水平的提高,并通过激活核转录因子 kappa B(NF- κ B)促进细胞铁重链蛋白表达改善多柔比星所致的线粒体功能障碍和细胞凋亡^[9]。二甲双胍同样可通过抑制细胞内钙离子水平、细胞凋亡和限制 ROS 生成改善顺铂对耳蜗细胞株 HEI-OC1 所致的神经毒性^[10]。在体内水平,二甲双胍可以显著改善化疗药物引起丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平增加和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等抗氧化物水平降低,减少表皮神经缺失以减轻链脲霉素、顺铂和紫杉醇所引起的痛觉过敏^[11]。此外,有研究发现二甲双胍可以抑制电离辐射所引起的 ROS 水平增加,减轻对造血干细胞的损伤^[12]。目前研究多提示二甲双胍主要通过抗氧化应激作用改善放化疗损伤,但有研究提示二甲双胍虽可改善顺铂诱发大鼠体内 MDA 水平

基金项目:浙江省医药卫生科技项目(2015KYB06);浙江省医药卫生科技项目(平台计划骨干人才项目)(2015RCB006)

作者单位:310022 杭州,浙江省肿瘤医院(冯婷婷、朱利明、辛文秀);310003 杭州,浙江大学附属第一医院(凌孙彬)

通讯作者:冯婷婷,电子信箱:ftt0319@126.com

增加和抗氧化物的水平降低,却并没有改善 72h 内肌酐和尿素氮及 caspase-3 的水平,提示有必要对二甲双胍化疗保护的其他作用机制进一步探究^[13]。

二、二甲双胍对正常组织发挥保护效应机制研究

1. 二甲双胍可改善高血糖所致的氧化应激:目前认为氧化应激是由于 ROS 和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的产生与机体抗氧化防御系统之间的失衡造成的。线粒体电子传递链(electron transport chain, ETC)是产生 ROS 的主要途径。目前已知有氧真核生物细胞吸收的氧分子,绝大部分均在 ETC 末端的细胞色素氧化酶的作用下还原生成水,但约 1%~2% 的氧可在 ETC 中途接受电子,在多种病理生理过程中起着关键作用。虽尚存争议,目前主流观点认为线粒体酶复合物 I 和 III 中会持续产生少量的 ROS。SOD、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶作为抗氧化防御系统将超氧产物催化转化成氧气和水。当 ROS 增加的水平超过防御系统的清除能力,ROS 将造成 DNA、巯基氧化和脂质过氧化,进而导致细胞色素酶 C 从线粒体释放,线粒体通透性转换孔开放,引发线粒体相关的细胞损伤。此外,除线粒体产生途径,药物的生物转化、炎症反应、紫外线和离子辐射等过程中均可产生 ROS。

高血糖可通过 ETC(主要途径)、葡萄糖自氧化和多元醇通路等途径增加机体内的 ROS 与 RNS 含量,促使氧化应激损伤的发生。此外,氧化应激可通过干扰胰岛素受体和胰岛素受体底物的磷酸化,影响磷脂酰肌醇 3-激酶的活化,抑制葡萄糖转运子 4(glucose transporter 4, GLUT4)的转位以及损伤细胞骨架等诱导胰岛素抵抗的发生,进一步导致糖尿病的发展恶化,形成促氧化应激的恶性循环^[14]。二甲双胍可通过减少肝糖的产生,降低肠道对糖元的吸收,并且可通过增加外周葡萄糖的摄取和利用以提高胰岛素的敏感度等方式调节血糖和改善胰岛素抵抗进而改善高血糖所致的氧化应激损伤。此外,研究发现二甲双胍可通过抑制 ETC 中的复合物 I、抑制蛋白激酶 C-NAD(P)H 氧化酶途径改善高血糖导致 ROS 的产生^[15]。同时,二甲双胍通过代谢调节减少过量的糖和蛋白质在体内合成的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs),进而减少 AGEs 和人体的各种组织细胞结合所致的组织细胞损伤。研究证明,AGEs 能够加速人体的衰老,能够引起各种慢性退化性疾病,比如糖尿病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化等疾病。所以降低 AGEs 可以起到

抗衰老和预防各种慢性退化性疾病。

2. 二甲双胍的线粒体低毒兴奋效应(mitohormesis):研究发现,热量限制或血糖下降可通过影响线粒体代谢延长酵母菌、果蝇、线虫及小鼠等寿命。与 Harman 的自由基理论不同的是,ROS 作为一种生理调控因子在延长寿命过程中发挥重要作用。研究发现由于线粒体产生 ROS,引起机体的自适应,进而诱发抗氧化防御系统的激活,提高细胞的抗氧化能力,即线粒体低毒兴奋效应^[16]。

腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)作为机体能量代谢平衡的总开关,其活性主要受 AMP/ATP 比例的调控。AMPK 在葡萄糖丢失、缺血、缺氧、氧化应激等应激状态下被激活。二甲双胍是著名的 AMPK 激活剂,可直接或通过部分抑制 ETC 上的复合物 I 间接激活 AMPK,致使线粒体电子传递无法进行,氧化磷酸化受阻,ATP 合成减少,引发 AMP/ATP 升高,致使 AMPK 正反馈激活,促使线粒体产生 ROS,继而诱导抗氧化酶大量表达,以清除活性氧,避免细胞的氧化损伤。研究发现,二甲双胍可通过线粒体低毒兴奋效应促进线虫延寿,其中关键环节是对细胞抗氧化成分 PRDX2 的诱导^[16]。另有研究发现,多西他赛致使心肌细胞线粒体功能受抑,导致心肌细胞能量饥饿,线粒体低毒兴奋效应降低,二甲双胍可以逆转这一现象,促使抗氧化系统相关基因及蛋白的表达上调,改善多西他赛对大鼠心肌结构损伤。值得注意的是,本研究中二甲双胍对多西他赛对心肌的 ATP 改善呈现剂量依赖性,提示二甲双胍通过线粒体低毒兴奋效应并非单纯依赖于对 AMP/ATP 的调控,其机制有待深入探索^[17]。

3. 二甲双胍的促线粒体生物合成效应(mitochondrial biogenesis):现已发现在多种生物中,能量限制可使机体的活性自由基水平下降,并伴随线粒体活性增强,呼吸作用加强,引起营养供应减少导致物质代谢增加这一矛盾现象。曾庆平教授团队等通过分析酵母菌的全转录组发现能量限制可导致的线粒体发生双期响应(dual-phase response)似乎可使此现象得到一个合理的解释:热量限制在早期可使线粒体增殖,线粒体氧化损伤的危险信号得到放大,致使大量活性氧释放进而诱导更多抗氧化酶合成,发挥抗氧化作用^[18]。但在后期线粒体不再增殖而以功能维持为主,糖、脂、蛋白质、核酸等主要物质分解代谢增强、合成代谢减弱以维持机体正常的能量供应。

过氧化物酶体增植物激活受体 γ 辅激活因子 - 1α (peroxisome proliferator - activated receptor - γ co-activator - 1α , PGC - 1α) 是转录辅助激活因子,在线粒体合成中起关键作用,主要存在于能量要求高、线粒体丰富的组织。研究发现,二甲双胍可通过激活 AMPK/PGC - 1α 促进线粒体生物合成在神经、血管内皮细胞及肌肉细胞等保护中发挥重要作用。二甲双胍和能量限制可通过激活 AMPK/PGC - 1α 促进纤维肌痛综合征 (fibromyalgia, FM) 患者 (AMPK 普遍功能缺陷) 促进线粒体生物合成进而提高 NADPH 及 SOD 等抗氧化酶的表达,进而改善 FM 的氧化应激损伤^[19]。另有研究显示二甲双胍可以通过 AMPK 影响线粒体 PGC - 1α 的表达,改善 AGEs 所致的神经干细胞线粒体功能损伤及下调凋亡相关基因的表达,促进全脑缺血型大鼠模型中神经细胞的线粒体增殖并改善细胞凋亡^[20,21]。在肌肉细胞和脂肪细胞中,二甲双胍可上调 GLUT4 的表达促进糖摄取和氧化利用改善胰岛素抵抗,同时可激活 AMPK/PGC - 1α 促进线粒体增殖发挥抗氧化应激作用。富含线粒体的组织如肝、肾、心脏、神经和肌肉等往往是能量要求较高也是放化疗损伤的常见靶器官。某些化疗药物,如阿霉素所致的心脏毒性及奥沙利铂所致的神经毒性对于部分患者甚至是永久性的,极度缺乏特效治疗药物,不仅影响临床治疗决策更极大影响了患者的生存质量。二甲双胍是否可同对线粒体机能的调控对上述靶器官发挥作用,以改善化疗药物相关损伤值得深入探究。

4. 二甲双胍与 Sirtuin 家族:自从发现酵母染色质沉默因子 Sir2 (silent information regulator 2) 可以延长酵母寿命,真核生物中同源酶即 Sir2 相关酶类 (Sir2 - related enzymes, sirtuin) 家族在代谢方面被予以广泛关注。Sirtuin 家族是一类依赖于 NAD⁺、核心区域高度保守的蛋白去乙酰化酶和 ADP 核糖基转移酶,参与调控细胞应激反应、代谢、衰老和凋亡等过程。Sirt1 是在哺乳动物中最早发现的 Sir2 的同源蛋白,与 Sir2 同源性最高。NAD⁺ 作为 sirtuin 家族的底物,可连接尼克酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyl transferase, Nampt) 和 Sirt1。二甲双胍通过激活 AMPK 促进 NAD⁺ 生成,促进 Nampt 的表达,进而激活下游 Sirt1,直接或间接 (通过调控 p300 和一氧化氮合酶) 致使 p53 中 382 位 Lys 残基去乙酰化或下调 p53 发挥抗氧化应激的作用^[22]。PGC - 1α 作为辅助共转录因子,可与 p53 结合,研究发现二甲

双胍会导致细胞 p53 依赖性细胞周期阻滞及 ROS 清除,当阻断 PGC - 1α 后导致细胞的大量凋亡,提示 PGC - 1α 在 AMPK/Sirt1/P53 所致的细胞保护发挥重要作用^[23]。此外,二甲双胍可通过激活 AMPK/Sirt1 通路抑制外周血单核细胞、血管内皮细胞中 NF - κ B、FoxO - 1 等炎性通路改善高血糖对血管所致损伤^[24]。值得一提的是,研究发现二甲双胍可抑制 microRNA - 34a 的表达,进而激活下游的 Sirt1 及一氧化氮合酶翻译后修饰改善高血糖促发的氧化应激所致的血管内皮损伤^[25]。而在 p53 野生型的肿瘤细胞中二甲双胍可激活 microRNA - 34a 进而下调 Sirt1/PGC - 1α /Nrf2 导致肿瘤细胞对氧化应激的易感性^[26]。二甲双胍对于正常组织及肿瘤组织的分子调控差异值得深入研究,以为肿瘤的综合治疗提供依据。

Sirt3 是第 1 个被定位于哺乳动物细胞线粒体的 Sirtuin 家族蛋白。研究提示,二甲双胍可通过 Sirt3/AMPK 改善高血糖及舒张性心力衰竭合并肺动脉高压综合征^[27]。Sirt3 在富含线粒体的组织如肝、肾、心脏等高表达。线粒体是二甲双胍的主要效应部位,其与 Sirt3 的相关性将逐渐得到更多的关注,而代谢密切相关的 Sirtuin 家族蛋白与二甲双胍之间的关系也将得到更加深入的探究。

5. 二甲双胍的抗炎作用:研究发现,AMPK 可通过 Sirt1/PGC - 1α /p53/FoxO3a 等下游蛋白调节 NF - κ B 的活性剂炎性因子的表达。在体外研究中,二甲双胍可抑制血管平滑肌细胞、血管内皮细胞及巨噬细胞诱导的前炎性因子,主要与二甲双胍可抑制炎症信号转导通路中 IKK/NF - κ B 有关,进而减少促炎细胞因子如 IL - 6、TNF - α 等所诱导 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 合成大量病理性一氧化氮所致的细胞损伤、衰老与癌变。此过程可能受 AMPK - PTEN 调控。

三、二甲双胍在肿瘤患者中的运用前景

综上所述,二甲双胍作为近期抗肿瘤药物的研究热点,有着毒性不良反应小、价格便宜、服药方便等优点。二甲双胍放化疗增敏效应已在诸多研究中得以证实。线粒体是细胞重要的功能结构,也是二甲双胍最主要的作用部位,富含线粒体的组织往往是能量要求较高亦是放化疗损伤的常见靶器官。目前认为二甲双胍主要通过抗氧化应激作用发挥改善放化疗损伤效应,但其机制尚待深入探索。进一步研究二甲双胍对正常组织及肿瘤能量、物质代谢等方

面的影响及作用机制差异,将为肿瘤的增效减毒的综合治疗提供新的靶点与策略,具有重大的科研及临床应用价值。

参考文献

- Ling S, Feng T, Ke Q, *et al.* Metformin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(6): 2611 – 2618
- Feng T, Li L, Ling S, *et al.* Metformin enhances radiation response of ECa109 cells through activation of ATM and AMPK [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 69: 260 – 266
- Yang Z, Zhang X, Roberts R O, *et al.* Metformin does not improve survival of cholangiocarcinoma patients with diabetes [J]. *Hepatology*, 2016, 63(2): 667 – 668
- Ling S, Tian Y, Zhang H, *et al.* Metformin reverses multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma Bel7402/5fluorouracil cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(6): 2891 – 2897
- Chen H, Yao W, Chu Q, *et al.* Synergistic effects of metformin in combination with EGFR – TKI in the treatment of patients with advanced non – small cell lung cancer and type 2 diabetes [J]. *Cancer Lett*, 2015, 369(1): 97 – 102
- Lamanna C, Monami M, Marchionni N, *et al.* Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta – analysis of randomized clinical trials [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13(3): 221 – 228
- Castelino RL, Peterson G. Prescribing of metformin based on estimated GFR rather than serum creatinine expands the eligible population and is likely safe [J]. *Evid Based Med*, 2016, 21(2): 68
- Zhang X, Harmsen WS, Mettler TA, *et al.* Continuation of metformin use after a diagnosis of cirrhosis significantly improves survival of patients with diabetes [J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2008 – 2016
- Asensio – Lopez MC, Sanchez – Mas J, Pascual – Figal DA, *et al.* Ferritin heavy chain as main mediator of preventive effect of metformin against mitochondrial damage induced by doxorubicin in cardiomyocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 67: 19 – 29
- Chang J, Jung HH, Yang JY, *et al.* Protective effect of metformin against cisplatin – induced ototoxicity in an auditory cell line [J]. *J Assoc Res Otolaryngol*, 2014, 15(2): 149 – 158
- Mao – Ying QL, Kavelaars A, Krukowski K, *et al.* The anti – diabetic drug metformin protects against chemotherapy – induced peripheral neuropathy in a mouse model [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100701
- Xu G, Wu H, Zhang J, *et al.* Metformin ameliorates ionizing irradiation – induced long – term hematopoietic stem cell injury in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87: 15 – 25
- Sahu BD, Kuncha M, Putcha UK, *et al.* Effect of metformin against cisplatin induced acute renal injury in rats: a biochemical and histoarchitectural evaluation [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2013, 65(6): 933 – 940
- Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, *et al.* Molecular events linking oxidative stress and inflammation to insulin resistance and beta – cell dysfunction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 181643
- Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, *et al.* Metformin and liraglutide ameliorate high glucose – induced oxidative stress via inhibition of PKC – NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 232(1): 156 – 164
- De Haes W, Frooninckx L, Van Assche R, *et al.* Metformin promotes lifespan through mitohormesis via the peroxiredoxin PRDX – 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(24): E2501 – 2509
- Ashour AE, Sayed – Ahmed MM, Abd – Allah AR, *et al.* Metformin rescues the myocardium from doxorubicin – induced energy starvation and mitochondrial damage in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 434195
- Wang D, Wu M, Li S, *et al.* Artemisinin mimics calorie restriction to extend yeast lifespan via a dual – phase mode: a conclusion drawn from global transcriptome profiling [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(5): 451 – 465
- Alcocer – Gomez E, Garrido – Maraver J, Bullon P, *et al.* Metformin and caloric restriction induce an AMPK – dependent restoration of mitochondrial dysfunction in fibroblasts from Fibromyalgia patients [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(7): 1257 – 1267
- Chung MM, Chen YL, Pei D, *et al.* The neuroprotective role of metformin in advanced glycation end product treated human neural stem cells is AMPK – dependent [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(5): 720 – 731
- Ashabi G, Khodagholi F, Khalaj L, *et al.* Activation of AMP – activated protein kinase by metformin protects against global cerebral ischemia in male rats: interference of AMPK/PGC – 1alpha pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2014, 29(1): 47 – 58
- Zhang E, Guo Q, Gao H, *et al.* Metformin and resveratrol inhibited high glucose – Induced metabolic memory of endothelial senescence through SIRT1/p300/p53/p21 pathway [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0143814
- Sen N, Satija YK, Das S. PGC – 1alpha, a key modulator of p53, promotes cell survival upon metabolic stress [J]. *Mol Cell*, 2011, 44(4): 621 – 634
- Arunachalam G, Samuel SM, Marei I, *et al.* Metformin modulates hyperglycaemia – induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(2): 523 – 535
- Arunachalam G, Lakshmanan AP, Samuel SM, *et al.* Molecular interplay between microRNA – 34a and Sirtuin1 in hyperglycemia – mediated impaired angiogenesis in endothelial cells: effects of metformin [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 356(2): 314 – 323
- Do MT, Kim HG, Choi JH, *et al.* Metformin induces microRNA – 34a to downregulate the Sirt1/Pgc – 1alpha/Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild – type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 74: 21 – 34
- Lai YC, Tabima DM, Dube JJ, *et al.* SIRT3 – AMP – activated protein kinase activation by nitrite and metformin improves hyperglycemia and normalizes pulmonary hypertension associated with heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Circulation*, 2016, 133(8): 717 – 731

(收稿日期:2016 – 09 – 25)

(修回日期:2016 – 10 – 07)