

本文引用: 李挺, 王德奖, 徐颖怡, 等. 二甲双胍通过激活 AMPK/STAT3 通路调控巨噬细胞分化抑制小鼠动脉粥样硬化形成[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(4): 287-294.

[文章编号] 1007-3949(2022)30-04-0287-08

· 动脉粥样硬化与免疫炎症专栏 ·

## 二甲双胍通过激活 AMPK/STAT3 通路调控巨噬细胞分化抑制小鼠动脉粥样硬化形成

李挺<sup>1</sup>, 王德奖<sup>1</sup>, 徐颖怡<sup>1</sup>, 杨雪雯<sup>1</sup>, 李忠豪<sup>2</sup>, 吴炜<sup>2</sup>, 燕翼<sup>1</sup>

(1. 广州医科大学附属第三医院心血管内科, 广东省广州市 510150; 2. 南方医科大学病理生理学教研室  
广东省医学休克微循环重点实验室, 广东省广州市 510515)

[关键词] 二甲双胍; 腺苷酸活化蛋白激酶; 信号转导及转录激活因子 3; 巨噬细胞分化; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探究二甲双胍(Met)通过腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/信号转导及转录激活因子 3(STAT3)信号通路调控巨噬细胞表型对小鼠动脉粥样硬化(As)形成的影响。方法 体外培养 RAW264.7 巨噬细胞,使用脂多糖促进巨噬细胞分化,同时使用 Met 刺激细胞。流式细胞术检测不同表型(CD86、CD206)巨噬细胞比例。Western blot 检测相关信号通路蛋白诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、精氨酸酶 1(Arg-1)、AMPK、磷酸化 AMPK(pAMPK)、STAT3、磷酸化 STAT3(pSTAT3)蛋白表达水平。高脂饲料喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠构建 As 模型。实验组(Met 组)小鼠予 Met 灌胃干预,对照组(CTL 组)小鼠给予同体积生理盐水灌胃干预。3 个月后,提取小鼠大动脉全长(头臂干至双侧髂动脉)及主动脉根部,分别行油红 O 染色和免疫荧光染色,评价主动脉脂质沉积情况和脂质斑块内巨噬细胞不同表型比例。提取大动脉蛋白,Western blot 验证相关信号通路的 AMPK、pAMPK、STAT3、pSTAT3 蛋白表达水平。结果 细胞实验表明, Met 刺激后 M1 巨噬细胞比例明显减少, M2 巨噬细胞比例明显增加( $P < 0.05$ ), AMPK 活性明显增加, 而 STAT3 活性明显下降。动物实验表明, 在造模 3 个月后, 油红 O 染色示 Met 组小鼠大动脉全长和主动脉瓣膜处脂质沉积均较 CTL 组明显减少( $P < 0.05$ ); 免疫荧光染色示 Met 组脂质斑块内 M1 巨噬细胞比例较 CTL 组明显减少, 而 M2 巨噬细胞比例较 CTL 组明显增多( $P < 0.05$ )。Western blot 实验显示, 与 CTL 组相比, Met 组 AMPK 活性明显增加, 而 STAT3 活性明显降低( $P < 0.05$ )。结论 Met 通过激活 AMPK 抑制 STAT3 活性, 调控斑块内巨噬细胞表型分化, 抑制小鼠 As 形成。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### Metformin regulates macrophage differentiation and inhibits formation of atherosclerosis by activating AMPK/STAT3 pathway in mice

LI Ting<sup>1</sup>, WANG Dejiang<sup>1</sup>, XU Yingyi<sup>1</sup>, YANG Xuewen<sup>1</sup>, LI Zhonghao<sup>2</sup>, WU Wei<sup>2</sup>, YAN Yi<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510150, China; 2. Department of Pathophysiology, Southern Medical University & Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Shock and Microcirculation, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

[KEY WORDS] metformin; adenosine monophosphate-activated protein kinase; signal transducer and activator of transcription 3; macrophage differentiation; atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of metformin (Met) regulating macrophage phenotype through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signal pathway on the formation of atherosclerosis (As) in mice. **Methods** RAW264.7 macrophages were cultured *in vitro*, lipopolysaccharide was used to promote macrophage differentiation, and Met was used to stimulate cells. The proportion of macrophages with different phenotypes (CD86, CD206) was detected by flow cytometry. The protein expression levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase-1 (Arg-1), AMPK, phosphorylated AMPK (pAMPK), STAT3 and

[收稿日期] 2021-07-11

[修回日期] 2021-09-11

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81870320);广州市卫健委特色技术项目(TS20190337)

[作者简介] 李挺, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 lt2812@foxmail.com. 通信作者燕翼, 博士, 副教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病发病机制、心脏电生理、心血管再生医学等, E-mail 为 yy8308@hotmail.com.

phosphorylated STAT3 (pSTAT3) were detected by Western blot. ApoE<sup>-/-</sup> mice were fed with high-fat diet to construct As model. Mice in the experimental group (Met group) were given Met intragastric intervention, and mice in the control group (CTL group) were given the same volume of normal saline intragastric intervention. After 3 months, the whole length of the mouse aorta (from the brachiocephalic trunk to the bilateral iliac arteries) and the aortic root were extracted and stained with oil red O and immunofluorescence respectively to evaluate the lipid deposition of the aorta and the different phenotypic proportion of macrophages in the lipid plaque. The large artery proteins were extracted, and the expression levels of AMPK, pAMPK, STAT3 and pSTAT3 in related signal pathways were verified by Western blot. **Results** Cell experiments showed that after Met stimulation, the proportion of M1 macrophages decreased significantly, the proportion of M2 macrophages increased significantly ( $P < 0.05$ ), AMPK activity increased significantly, and STAT3 activity decreased significantly. Animal experiments showed that three months after modeling, oil red O staining showed that the lipid depositions in the whole length of large artery and aortic valve in Met group were significantly lower than those in CTL group ( $P < 0.05$ ); immunofluorescence staining showed that the proportion of M1 macrophages in lipid plaque in Met group was significantly lower than that in CTL group, while the proportion of M2 macrophages was significantly higher than that in CTL group ( $P < 0.05$ ). Western blot experiment showed that AMPK activity increased significantly and STAT3 activity decreased significantly in Met group compared with the CTL group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Met inhibits the activity of STAT3 by activating AMPK, regulates the phenotypic differentiation of macrophages in plaque and inhibits the formation of As in mice.

二甲双胍(metformin, Met)是一种双胍类药物,属于草药类药物,研究者发现从山茱萸中提取的胍和相关化合物可以降低动物血糖<sup>[1]</sup>。自1950年代以来, Met 已经广泛用于治疗糖尿病。1998年,英国前瞻性糖尿病研究(United Kingdom Prospective Diabetes Study, UKPDS)的长期回顾性研究表明,长期使用 Met 除了可以控制血糖,还可以降低心血管事件并提高生存率。2008年 UKPDS 的10年随访再次显示,早期使用该药物具有持续的心血管益处<sup>[2]</sup>。Met 如何发挥降血糖作用已有大量研究,但是其如何降低心血管风险尚缺乏权威的研究。此前有研究表明, Met 的多效性部分由腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)活化介导<sup>[3]</sup>。AMPK 作为机体能量感受器,可以感测机体的能量状态,对调节全身能量平衡具有至关重要的作用<sup>[4]</sup>。当细胞内 AMP/ATP 比例增加时 AMPK 变构激活<sup>[5]</sup>。在日常口服剂量下, Met 可使 AMPK 活性增强<sup>[3]</sup>。在一些疾病状态下(如心肌缺血缺氧、心力衰竭等) AMPK 活性较一般生理状态下明显增强,其结果是加速生物体内的分解代谢和抑制合成代谢,以维持生物体所需的能量平衡<sup>[6]</sup>。AMPK 活性的增加不仅可调控血管内皮细胞膜的通透性以及影响细胞因子的释放<sup>[7]</sup>,还能作用于平滑肌细胞,调控细胞的迁移、增殖,进而影响脂质斑块的形成<sup>[8]</sup>,同时对单核细胞的分化<sup>[9]</sup>以及巨噬细胞的表型分化均可能有潜在的调控作用。而在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成过程中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、游离脂

肪酸、高脂饮食等脂质大量输注会造成脂质的代谢紊乱进而刺激上述各种细胞产生病理变化<sup>[10]</sup>,脂质的代谢紊乱本身也会下调 AMPK 的活性<sup>[11]</sup>, AMPK 活性的下降减弱了其对各种细胞的调控作用,造成恶性循环,加剧 As 形成。

巨噬细胞是目前公认的先天性免疫和适应性免疫的重要成员,其在全身性代谢、造血、血管生成、细胞凋亡、恶性肿瘤形成中有重要调节作用<sup>[12]</sup>。巨噬细胞会根据不同的环境分化成不同表型,其分化是各种代谢和炎症信号网络共同作用的结果<sup>[13]</sup>。巨噬细胞分化后有两种表型,分别是 M1 和 M2 表型。M1 巨噬细胞(通常激活的巨噬细胞)是宿主防御系统的免疫细胞之一,它能产生炎症反应,抑制细菌和病毒引起的感染<sup>[14]</sup>;而 M2 巨噬细胞(选择活化的巨噬细胞)具有抗炎活性,其在促进伤口愈合中有重要作用<sup>[15]</sup>。AMPK 的激活抑制巨噬细胞向 M1 表型分化,减弱了炎症反应,同时可诱导巨噬细胞向 M2 表型分化,加速伤口愈合<sup>[16]</sup>。研究表明,在易损斑块的纤维帽上有更多的 M1 巨噬细胞聚集<sup>[17]</sup>。

研究发现, Met 激活 AMPK 后介导信号转导及转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)活性下降,抑制巨噬细胞向 M1 表型分化,促进向 M2 表型分化;通过对血管斑块的免疫调节作用, Met 抑制小鼠 As 的形成,发挥在 As 性疾病中的潜在保护作用。本研究组推测 Met 可能通过激活 AMPK 来调控巨噬细胞的分化,进而调控 As 的形成。本研究观察了 Met 对 RAW264.7

巨噬细胞分化的影响,以及 Met 抑制小鼠 As 形成的潜在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及细胞

C57BL/6J 遗传背景的载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knocked-out, ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠 (B6.129P2-ApoEtm1/Nju) 购自广州中医药大学实验动物中心,雄性,清洁级,8 周龄,体质量(22±2)g,合格证号[SCXK(粤)2018-0034];所有小鼠饲养于广州医科大学实验动物中心(SPF 级)。RAW264.7 巨噬细胞购自美国 ATCC 公司。本实验通过广州医科大学附属第三医院伦理委员会批准。

### 1.2 材料和试剂

盐酸二甲双胍、LPS、油红 O 粉末 (Sigma-Aldrich 公司);AMPK 抗体、磷酸化 AMPK (phosphorylated AMPK, pAMPK) 抗体 (苏氨酸 172 位)、STAT3 抗体、磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, pSTAT3) 抗体、羊抗兔/羊抗鼠二抗 (Cell Signaling Technology 公司);诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 抗体、精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1) 抗体、CD206 抗体、CD86 抗体、CD68 抗体、GAPDH 抗体 (Abcam 公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、羊抗兔荧光二抗 594、羊抗鼠荧光二抗 488 (Bioss 公司);Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚) (Solarbio 公司);高脂高胆固醇饲料(蔗糖 20%,猪油 15%,胆固醇 1.2%,胆酸钠 0.2%,酪蛋白 10%,磷酸氢钙 0.6%,石粉 0.4%,预混料 0.4%,基础饲料 52.2%) (广东省动物中心)。

### 1.3 细胞培养及 Western blot 实验

使用含 10% 血清、1% 非必需氨基酸、1% 青链霉素双抗混合液的 DMEM 培养 RAW264.7 巨噬细胞,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度为 90% 的培养箱中,培养条件为每隔 1 天进行 1 次换液,待细胞生长到 80% ~ 90% 汇合度时按照 1:4 进行传代。将 RAW264.7 巨噬细胞按照 2×10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种于 3.5 cm 培养皿中,培养过夜,更换含 100 μg/L LPS 的培养基,同时分成两组,实验组 (Met 组) 加入 2 mmol/L Met,对照组 (control 组,CTL 组) 加入同体积磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS),刺激 24 h 后弃去上清,用预冷 PBS 清洗细胞,RIPA 裂解液裂解 30 min,细胞刮刀刮取细胞,12 000 r/min 离心 15 min,取上清,二喹啉甲酸 (bicinchoninic

acid,BCA) 法测定蛋白浓度,100 °C 使蛋白变性。小鼠动脉组织使用 RIPA 裂解液裂解,研磨成匀浆,12 000 r/min 离心 15 min 后取上清,BCA 法测定蛋白浓度,100 °C 使蛋白变性。经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白电转至二氟化树脂膜上,5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 封闭 1 h,切取相应蛋白条带,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗常温孵育 1 h,蛋白条带浸于增强化学发光试剂中,曝光,使用 Image J 软件进行统计与分析。

### 1.4 流式细胞学实验

将 RAW264.7 巨噬细胞接种于 3.5 cm 培养皿中,培养过夜,更换含 100 μg/L LPS 的培养基,同时分成两组,Met 组加入 2 mmol/L Met,CTL 组加入同体积 PBS,刺激 24 h 后弃去上清,使用 PBS 重悬细胞,1 200 r/min 离心 2 min 去除上清,重复上述步骤两次,留取细胞备用。M1 巨噬细胞的检测:将离心后的细胞重悬于 0.5 mL PBS 中,按 1:1 000 比例稀释 CD86 抗体,加入抗体工作液 0.5 mL 染色 30 min,1 200 r/min 离心 2 min 后去除上清液,PBS 清洗后离心弃去上清液,将细胞溶解于 0.5 mL PBS 中,使用 Accuri C6 流式细胞仪 (BD Biosciences 公司) 分析。M2 巨噬细胞的检测:离心后的细胞使用 4% 多聚甲醛固定 1 h,1 200 r/min 离心弃去上清,PBS 清洗后离心弃去上清,使用 5% Triton X-100 破膜 3 ~ 5 min,1 200 r/min 离心弃去上清,PBS 清洗后再次离心弃去上清,0.5 mL PBS 重悬细胞,按 1:1 000 比例稀释 CD206 抗体,加入抗体工作液 0.5 mL 染色 30 min,使用 Accuri C6 流式细胞仪分析细胞。之后用 BD Accuri C6 Plus 软件分析结果。

### 1.5 As 小鼠模型制备及取材

25 只 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分成两组,CTL 组共 12 只,Met 组共 13 只,全部使用高脂饲料喂养,Met 组予 Met[0.1 g/(kg·d),溶解于生理盐水中]灌胃干预,CTL 组给予同体积生理盐水灌胃。喂养 3 个月取材,使用过量麻醉法处死小鼠,快速分离心脏及整条大动脉:(1) 在小鼠心脏平行主动脉瓣切取主动脉根部,使用聚乙二醇和聚乙烯醇水溶性混合物 (opti-mum cutting temperature compound, OCT) 包埋,冰冻切片机快速切取 4 μm 左右的含主动脉瓣膜的切片,保存于 -20 °C 环境下,用于主动脉瓣膜的油红 O 染色及免疫荧光染色;(2) 大动脉全长浸泡于 10% 多聚甲醛中,24 h 后行油红 O 染色。

### 1.6 免疫荧光染色实验

小鼠主动脉瓣膜切片行免疫荧光染色,用防水

笔标记出需染色组织,滴入4%多聚甲醛固定液固定组织,30 min后吸净,滴入0.01% Triton X-100处理组织20 min,吸净后加入5% BSA封闭组织30 min,一抗(CD68/iNOS/Arg-1)按说明书比例稀释后滴入组织中,4℃孵育过夜,切片洗净后加入荧光二抗,常温孵育1 h,最后使用DAPI染色细胞核。对每个组织切片进行数字扫描(Nanozoomer扫描仪,Hamamatsu公司)。CD68是巨噬细胞的标志物,iNOS是M1巨噬细胞的标志物,Arg-1是M2巨噬细胞的标志物。

### 1.7 油红O染色实验

首先配制油红O染液,按1 g油红O粉末:100 mL 60%异丙醇的比例将油红O粉末溶于60%异丙醇中,震荡溶解30 min,过滤后备用。将取材好的主动脉瓣膜/大动脉全长置入包埋盒中,流水冲洗30 min,取出沥净,将组织浸泡于60%异丙醇中,使组织更容易被染色,将组织浸泡于配制好的油红O染液中,浸染15 min,取出组织置入60%异丙醇中浸泡分化,直至脂质斑块呈红色而周围组织呈白色,取出沥干,置于白色底板上,使用数码相机进行拍摄。

### 1.8 统计学分析

使用专业软件Graph Pad Prism 6.0、Image Pro Plus 7.0、BD Accuri C6 Plus及Adobe Illustrator CC

2019进行数据处理与分析。使用SPSS软件进行统计学分析,所有图形数据结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 $t$ 检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Met抑制巨噬细胞向M1表型分化及促进向M2表型分化

巨噬细胞的分化受多种因素影响,根据不同的刺激因素巨噬细胞会分化成不同表型,LPS能促进巨噬细胞向M1表型分化。培养RAW264.7巨噬细胞,并使用LPS刺激细胞促进细胞分化,分成两组,分别使用Met(Met组)和PBS(CTL组)处理24 h。结果显示,CTL组M1巨噬细胞标志物iNOS表达水平增加,Met组表达iNOS较CTL组下降;CTL组M2巨噬细胞标志物Arg-1表达水平下降,Met组表达Arg-1较CTL组明显增加(图1A)。

为确定两组中M1巨噬细胞和M2巨噬细胞的比例,使用CD86抗体标记M1巨噬细胞,CD206抗体标记M2巨噬细胞,再使用流式细胞术分选两组细胞。结果显示,Met组M1巨噬细胞比例小于CTL组,M2巨噬细胞比例大于CTL组(图1B),提示Met刺激后,M2巨噬细胞的比例增加,M1巨噬细胞的比例减少。

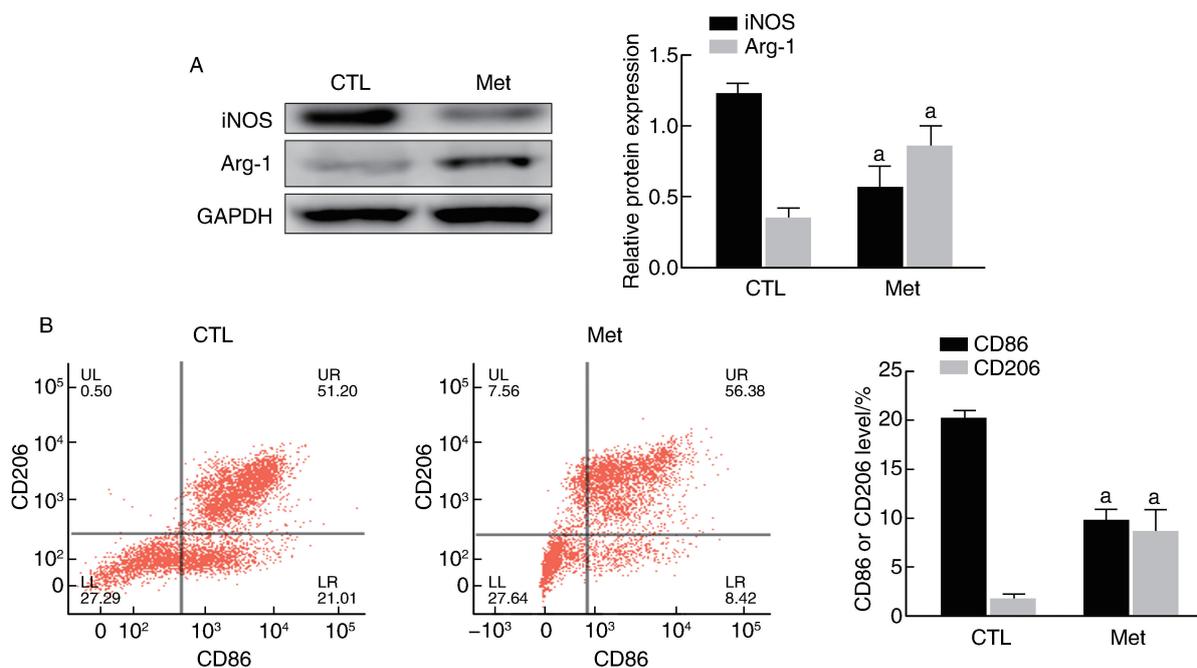


图1. Met对巨噬细胞分化的影响( $n=3$ )

A为iNOS和Arg-1的表达情况;B为流式细胞术测定M1巨噬细胞( $CD86^+CD206^-$ )和M2巨噬细胞( $CD86^-CD206^+$ )的比例。

a为 $P < 0.05$ ,与CTL组相比。

Figure 1. Effect of Met on macrophage differentiation ( $n=3$ )

## 2.2 Met 通过激活 AMPK 介导 STAT3 失活以调控巨噬细胞分化

STAT3 的活性影响巨噬细胞的表型分化, AMPK 是 STAT3 的上游信号蛋白, Met 又是 AMPK 的激活剂, 为此本研究探究了 Met 调控巨噬细胞分

化的潜在机制。通过检测相关蛋白表达水平发现, 与 CTL 组相比, Met 组 pAMPK 表达水平增加, 而 pSTAT3 表达水平明显下降(图 2), 提示 Met 刺激后 AMPK 的活性增加, 介导 STAT3 的活性下降, 同时巨噬细胞的分化表型比例发生变化。

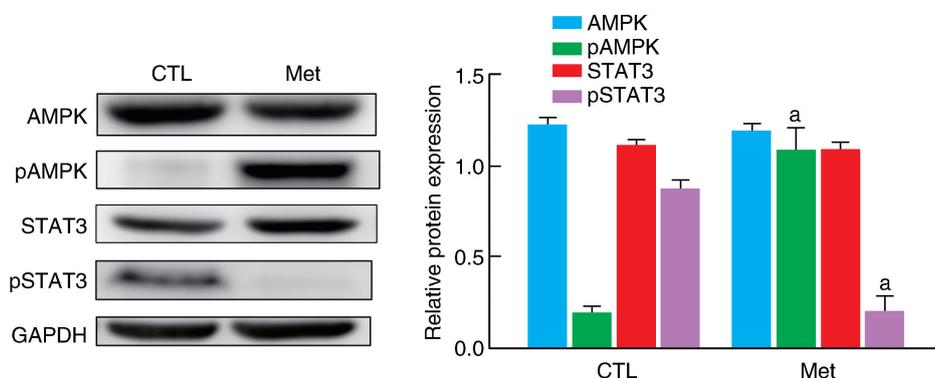


图 2. Met 对巨噬细胞 AMPK 信号通路蛋白表达水平的影响( $n=3$ )

a 为  $P<0.05$ , 与 CTL 组相比。

Figure 2. Effect of Met on the expression of AMPK signaling pathway protein in macrophage ( $n=3$ )

## 2.3 Met 通过调控 AMPK/STAT3 信号通路抑制小鼠 As 形成

构建小鼠 As 模型, 分成两组, 分别使用 Met (Met 组) 和生理盐水 (CTL 组) 治疗。脂质斑块形成中存在巨噬细胞的迁移、分化, 脂质斑块纤维帽大部分由 M1 巨噬细胞形成。结果显示, 与 CTL 组相比, Met 组小鼠主动脉瓣膜及大动脉全长脂质形成明显减少(红色区域为脂质形成区域)。同时检测了两组小鼠动脉相关蛋白表达水平, 结果和上述细胞实验一致, 与 CTL 组相比, Met 组 pAMPK 表达水平增加, 而 pSTAT3 表达水平明显下降。使用免疫荧光技术检测两组主动脉瓣膜斑块处不同巨噬细胞的比例, 其中 iNOS 为 M1 巨噬细胞的标记蛋白, Arg-1 为 M2 巨噬细胞的标记蛋白, 使用羊抗兔荧光二抗 594 分别标记上述抗体, CD68 为总巨噬细胞标记蛋白, 使用羊抗鼠荧光二抗 488 标记。结果显示, CTL 组主动脉瓣膜脂质斑块较多, 巨噬细胞浸润明显增多, iNOS 荧光信号明显增强; 而 Met 组主动脉瓣膜脂质斑块较少, 巨噬细胞浸润少, iNOS 荧光信号较 CTL 组明显降低, 而 Arg-1 荧光信号较 CTL 明显增强(图 3)。

## 3 讨论

动脉粥样硬化形成是一种慢性免疫介导的动

脉血管壁炎性疾病, 其特征是内膜增厚, 主要是由于单核细胞募集进入内皮下, 以及分化成不同巨噬细胞, 介导炎症的发生<sup>[18]</sup>。而 Met 作为糖尿病一线用药和一种 AMPK 激活剂<sup>[19]</sup>, 近年来有大量研究发现其在心血管疾病中具有保护作用<sup>[20]</sup>, 潜在机制尚不完全明确。Vasamsetti 等<sup>[9]</sup>研究表明 Met 激活 AMPK 后抑制 STAT3 活性, 并抑制单核细胞向巨噬细胞分化, 从而有效抑制 As 形成, 但巨噬细胞的表型变化此研究尚未阐述。在本研究中, 首先证明 Met 在体外可有效抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞向 M1 表型分化, 促进向 M2 表型分化。对相关细胞蛋白进行 Western blot 实验发现, Met 有效激活 AMPK, STAT3 活性明显下降, 因而证实了 Met 调节巨噬细胞分化和 AMPK/STAT3 信号通路之间存在联系。在体实验中也观察到 Met 组 pAMPK 活性增加, pSTAT3 活性下降。通过油红 O 染色实验及免疫荧光实验发现, 与 CTL 组相比, Met 组 As 斑块减少, 且 Met 组 M1 巨噬细胞数量下降, M2 巨噬细胞数量增多。证明 Met 通过 AMPK/STAT3 信号通路抑制巨噬细胞向 M1 表型分化, 促进向 M2 表型分化, 从而抑制 As 形成。

Met 抑制 As 形成的机制已有很多研究者进行了探讨。本研究组先前的研究发现, Met 通过激活 AMPK/Pdlim 5 信号通路改变平滑肌肌动蛋白骨架系统抑制小鼠 As 形成<sup>[8]</sup>, 这可从平滑肌细胞骨架

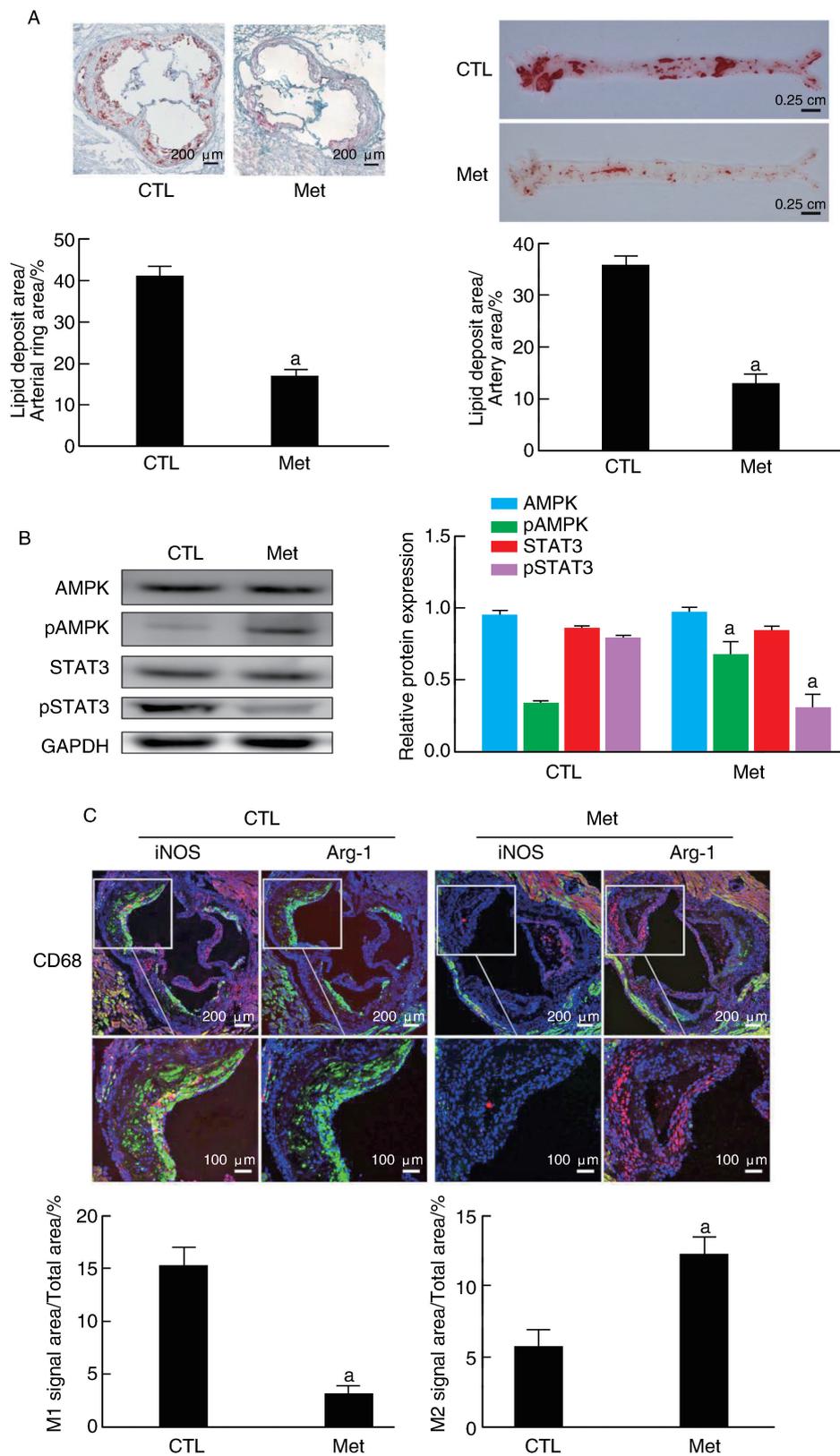


图 3. Met 对小鼠动脉斑块形成及巨噬细胞分化的影响 (n=10)

A 为小鼠主动脉瓣膜、大动脉全长油红 O 染色和定量分析, 左边显微镜图及直方图为主动脉瓣膜, 右边照片图及直方图为大动脉全长;

B 为小鼠动脉相关蛋白表达情况; C 为小鼠主动脉瓣膜中 Arg-1 和 iNOS 的荧光信号, 显微镜图下排图为上排图方框局部的放大图。

a 为  $P < 0.05$ , 与 CTL 组相比。

Figure 3. Effects of Met on arterial plaque formation and macrophage differentiation in mice (n=10)

系统的改变解释 Met 对 As 获益的部分原因。但 As 的形成是一个复杂的过程,其形成除了存在平滑肌细胞的异位迁移和增殖,还涉及脂质浸润、炎症损伤、受体功能异常等众多因素<sup>[21]</sup>。同时,As 形成过程中涉及巨噬细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等多种细胞参与<sup>[22]</sup>。特别是巨噬细胞的前身单核细胞,主要存在于循环系统中,当内皮细胞受损伤而脂质浸润时,单核细胞定向迁移至内皮下,分化为巨噬细胞吞噬脂质。事实上,单核细胞驻留在内皮细胞损伤处可以大致分为两种巨噬细胞,一种是促进炎症反应的 M1 表型,一种是抑制炎症的 M2 表型。已经证实,M1 巨噬细胞主要促进炎症的发生,M2 巨噬细胞具有促进组织修复、抑制异常炎症反应的作用,M2 巨噬细胞在 As 中具有保护作用<sup>[23]</sup>。相关研究表明,使用 100  $\mu\text{g/L}$  LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞 24 h, M1 巨噬细胞数量大大增加<sup>[24]</sup>,而使用 2 mmol/L Met 可以有效抑制 M1 巨噬细胞分化,促进 M2 巨噬细胞分化<sup>[25]</sup>。在肿瘤领域, Met 激活 AMPK 可抑制核因子  $\kappa\text{B}$  (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ ) 活性, NF- $\kappa\text{B}$  具有调节炎性细胞因子表达的功能, NF- $\kappa\text{B}$  活性下降抑制了白细胞介素 4 (interleukin-4, IL-4)、IL-10 和 IL-13 的表达,这些细胞因子在诱导巨噬细胞向 M2 表型分化中有重要作用,它们的合成受到抑制直接导致 M2 表型肿瘤相关巨噬细胞的分化减少,从而抑制肿瘤细胞形成<sup>[26]</sup>。As 越来越被认为是一种代谢性疾病,本研究证实 Met 通过 AMPK/STAT3 信号通路促进 RAW264.7 巨噬细胞向 M2 表型分化,这种抗炎细胞分化抑制了 As 形成。与肿瘤领域涉及的坏死相关信号不同, STAT3 是转录相关的合成因子,参与代谢、免疫、炎症等病理生理过程。AMPK 对 STAT3 的调控,更多是从代谢角度发挥作用的。

有趣的是,研究发现 M1 巨噬细胞主要定位于动脉斑块的易损区域,而 M2 巨噬细胞主要定位于斑块的较稳定区域, M2 巨噬细胞的活化能抑制动物模型斑块破裂<sup>[27]</sup>。说明 M2 巨噬细胞可能不仅通过抗炎抑制 As 形成,而且在吞噬脂质形成泡沫细胞后,也对形成的脂质斑块具有维持稳定的作用。STAT3 是参与调节巨噬细胞 M1 和 M2 表型转换的重要因子<sup>[27]</sup>,但这种调控巨噬细胞表型转换的功能并不是 STAT3 独有的。报道显示控制 miR-320a 表达能下调 STAT4 抑制 M2 表型分化<sup>[28]</sup>, STAT6 过表达激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导以促进巨噬细胞向 M2 表型分化<sup>[29]</sup>。STAT 家族由 STAT1、2、3、4、5A、5B、6 共 7 个成员组成,它们在细胞分化、免疫反应

和炎症方面均发挥着或多或少的作用<sup>[30]</sup>。本研究发现 STAT3 活性下降介导巨噬细胞 M2 表型分化增加以抑制 As 形成;本研究仅观察到部分 RAW264.7 巨噬细胞分化为 M2 表型,这也提示调节细胞分化的过程是由 STAT 家族多个成员调控的。

参与 STAT3 的调控也不乏细胞因子的参与。在使用 LPS 诱导巨噬细胞分化中, IL-6/STAT3 信号通路在 M1 巨噬细胞中受到抑制,但在 M2 巨噬细胞中被激活<sup>[31]</sup>。IL-4 通过刺激巨噬细胞上 IL-4 受体促进 STAT3 磷酸化,在巨噬细胞选择性激活中提供重要的启动作用<sup>[32]</sup>。本研究主要观察 Met 对巨噬细胞分化的调控作用,但在 As 形成过程中细胞因子的参与也是必不可少的,在调控 STAT3 过程中 Met 和各种细胞因子之间也必然存在着某种联系,值得以后继续探讨。另外,在解析 AMPK 与 STAT3 关系时,缺少对上游信号敲低的干预;未来本研究组将进一步使用 AMPK<sup>-/-</sup> 细胞验证其与 STAT3 之间的关系。

总之,本研究表明, Met 激活 AMPK 后抑制 STAT3 活性,介导巨噬细胞 M1 表型分化减少,促进 M2 表型分化增加,从而抑制小鼠 As 形成。

#### [参考文献]

- [1] BAILEY C J. Metformin: historical overview[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(9): 1566-1576.
- [2] HOLMAN R R, PAUL S K, BETHEL M A, et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(15): 1577-1589.
- [3] RENA G, HARDIE D G, PEARSON E R. The mechanisms of action of metformin [J]. *Diabetologia*, 2017, 60(9): 1577-1585.
- [4] LIN S C, HARDIE D G. AMPK: sensing glucose as well as cellular energy status [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 299-313.
- [5] KE R, XU Q, LI C, et al. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(4): 384-392.
- [6] QI D, YOUNG L H. AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(8): 422-429.
- [7] SABBATINELLI J, PRATTICCHIZZO F, OLIVIERI F, et al. Where metabolism meets senescence: focus on endothelial cells [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1523.
- [8] LI T, HE M, LI Z, et al. Metformin inhibits aortic atherosclerosis in mice by regulating actin skeleton in vascular smooth muscle cells [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2019, 39(11): 1357-1363.

- [9] 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.
- [10] POZNYAK A, GRECHKO A V, POGGIO P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection; the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1835.
- [11] YANG Z, KAHN B B, SHI H, et al. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1 AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19051-19059.
- [12] CHEN S, YANG J, WEI Y, et al. Epigenetic regulation of macrophages; from homeostasis maintenance to host defense[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(1): 36-49.
- [13] YANG S, YUAN H Q, HAO Y M, et al. Macrophage polarization in atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 501: 142-146.
- [14] YUNNA C, MENGRU H, LEI W, et al. Macrophage M1/M2 polarization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [15] WANG L X, ZHANG S X, WU H J, et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases[J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 106(2): 345-358.
- [16] QING L, FU J, WU P, et al. Metformin induces the M2 macrophage polarization to accelerate the wound healing via regulating AMPK/mTOR/NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(2): 655-668.
- [17] STÖGER J L, GIJBELS M J, VAN DER VELDEN S, et al. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 225(2): 461-468.
- [18] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 56.
- [19] ADAK T, SAMADI A, ÜNAL A Z, et al. A reappraisal on metformin[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2018, 92: 324-332.
- [20] CROWLEY M J, DIAMANTIDIS C J, MCDUFFIE J R, et al. Clinical outcomes of metformin use in populations with chronic kidney disease, congestive heart failure, or chronic liver disease; a systematic review[J]. *Ann Intern Med*, 2017, 166(3): 191-200.
- [21] MARCHIO P, GUERRA-OJEDA S, VILA J M, et al. Targeting early atherosclerosis; a focus on oxidative stress and inflammation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8563845.
- [22] MACHADO-OLIVEIRA G, RAMOS C, MARQUES A R A, et al. Cell senescence, multiple organelle dysfunction and atherosclerosis[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2146.
- [23] ZHAO X N, LI Y N, WANG Y T. Interleukin-4 regulates macrophage polarization via the MAPK signaling pathway to protect against atherosclerosis[J]. *Genet Mol Res*, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15017348.
- [24] ZHANG W, ZHANG Y, HE Y, et al. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signalling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 376(2): 124-132.
- [25] JING Y, WU F, LI D, et al. Metformin improves obesity-associated inflammation by altering macrophages polarization[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 461: 256-264.
- [26] CHIANG C F, CHAO T T, SU Y F, et al. Metformin-treated cancer cells modulate macrophage polarization through AMPK-NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20706-20718.
- [27] DE GAETANO M, CREAN D, BARRY M, et al. M1- and M2-type macrophage responses are predictive of adverse outcomes in human atherosclerosis[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 275.
- [28] FORTUNATO O, BORZI C, MILIONE M, et al. Circulating miR-320a promotes immunosuppressive macrophages M2 phenotype associated with lung cancer risk[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(11): 2746-2761.
- [29] GONG M, ZHUO X, MA A. STAT6 upregulation promotes M2 macrophage polarization to suppress atherosclerosis[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017, 23: 240-249.
- [30] SZELAG M, PIASZYK-BORYCHOWSKA A, PLENS-GALASKA M, et al. Targeted inhibition of STATs and IRFs as a potential treatment strategy in cardiovascular disease[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 48788-48812.
- [31] YIN Z, MA T, LIN Y, et al. IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(11): 9419-9432.
- [32] ODEGAARD J I, CHAWLA A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance[J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(11): 619-626.

(此文编辑 曾学清)