

## 二甲双胍对糖尿病肾病保护作用的机制

林杨 叶山东

**【摘要】** 二甲双胍是治疗糖尿病的一线药物,很多研究已经证实,二甲双胍具有降糖之外的肾脏保护作用,相关机制包括抗炎、抗氧化、缓解肾脏的缺氧和能量消耗,抑制肾脏肥大和减轻肾脏脂质沉积等,从而预防和延缓糖尿病肾病(DN)的发生和发展,为 DN 的防治提供新的治疗方法,其确切机制仍需进一步探讨。

**【关键词】** 二甲双胍;糖尿病肾病;炎症;氧化应激

**Protective effects of metformin on diabetic nephropathy and its mechanism** Lin Yang\*, Ye Shandong.

\* Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China

Corresponding author: Ye Shandong, Email: ysd196406@163.com

**【Abstract】** Metformin is a first-line drug for the treatment of diabetes, many studies have confirmed that metformin has a protective effect on kidney through anti-inflammatory, anti-oxidative stress, alleviation of the renal hypoxia and energy consumption, inhibition of renal hypertrophy and lightening renal lipid deposition, which is independent of its hypoglycemic effect. So metformin can prevent and delay the occurrence and development of diabetic nephropathy. The mechanism remains to be explored.

**【Key words】** Metformin; Diabetic nephropathy; Inflammation; Oxidative stress

在糖尿病人群中,糖尿病肾病(DN)的发病率为 20%~40%,已成为终末期肾功能衰竭和糖尿病患者死亡的重要原因之一。二甲双胍是治疗糖尿病的一线药物。近年来研究发现其对 DN 具有保护作用,且独立于降血糖作用,其机制可能是多途径的<sup>[1]</sup>。

### 1 抗炎作用

炎症反应在 DN 的发生和发展中扮演着重要的角色,其可在分子水平激活细胞内信号通路和转录因子<sup>[2]</sup>。炎症因子如白细胞介素(IL)-1、IL-6 和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  等刺激细胞黏附分子和生长因子表达,增加内皮细胞渗透性,促进肾小球系膜增生、肾小球肥大和活性氧簇的生成。趋化因子如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)可增强白细胞对肾血管内皮细胞的黏附及浸润<sup>[3]</sup>。

高血糖、晚期糖基化终末产物(AGEs)、血管紧张素 II(Ang II)等都可激活肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞的核因子- $\kappa$ B 通路,参与多种炎症因子、趋化因子的产生,成纤维细胞的增殖、分化,基底膜

外基质交联及细胞凋亡等过程<sup>[4-6]</sup>。在 DN 时,多种炎症细胞和肾脏的肾小管细胞、肾小球系膜细胞、肾小球内皮细胞、足细胞都会产生 TNF- $\alpha$ 、MCP-1<sup>[7]</sup>。二甲双胍通过激活 AMP 活化蛋白激酶(AMPK),阻止核因子- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  亚基的磷酸化和降解,降低高糖诱导的肾小球系膜细胞核因子- $\kappa$ B 和核因子- $\kappa$ B 依赖的多种炎症因子和黏附分子如 MCP-1、ICAM-1、转化生长因子(TGF)- $\beta$ 1 mRNA 的表达<sup>[8]</sup>。TGF- $\beta$  可促进肾脏细胞胶原基因的表达和肾小球细胞外基质的合成,降低细胞外基质的降解,从而导致肾小管间质纤维化,肾小球基底膜增厚和肾小球硬化<sup>[9]</sup>。研究表明,二甲双胍可降低肾组织 TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  水平<sup>[2]</sup>。激活转录因子-3(ATF-3)是 cAMP 反应原件结合蛋白家族成员,二甲双胍可通过上调 ATF-3 的表达抑制脂多糖刺激的雄性小鼠巨噬细胞产生炎症因子,二甲双胍还可诱导 ATF-3 占据 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的启动子,竞争性抑制核因子- $\kappa$ B 与 TNF- $\alpha$ 、IL-6 启动子的结合而抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达<sup>[10]</sup>。

### 2 减轻氧化应激

高糖可通过多种机制如 AGEs 的产生增多、刺激线粒体释放过氧化物,激活多元醇通路和 NADPH 氧化酶等诱导体内产生过多的活性氧簇,超过了机体对其的清除能力,导致糖尿病患者氧化应激增强,进而致细胞凋亡和器官功能下降,特别是肾小球足

细胞凋亡,足突消失,蛋白尿增加,还可引起肾小球系膜细胞、血管内皮细胞氧化损伤,导致肾小球纤维化。二甲双胍是 AMPK 激活剂,可通过增加 AMPK 磷酸化,降低 AGEs 的产生和活性氧簇水平,是其保持氧化还原平衡的重要机制<sup>[11]</sup>。

氧化应激可致 DNA 损伤,鸟嘌呤氧化成 8-羟基脱氧鸟苷(8-OhdG)是 DNA 氧化损伤的标志,8-OhdG 增多致 DNA 突变,DNA 损伤后的 DNA 修复致细胞周期推迟,诱导细胞凋亡,包括足细胞。Kim 等<sup>[11]</sup>发现,糖尿病大鼠肾脏 AMPK 活性明显下降,尿和肾组织的 8-OhdG 水平明显升高,大鼠表现为肾小球基质膨胀,肾小管间质性损害,蛋白尿增多,二甲双胍治疗通过增加 AMPK 活性,缓解该表现,降低尿和肾组织 8-OhdG 水平。Piwkowska 等<sup>[12]</sup>也报道二甲双胍通过激活 AMPK,降低 NADPH 氧化酶活性和体外培养的足细胞活性氧簇水平,缓解氧化应激所致足细胞损伤。

Maheshwari 等<sup>[2]</sup>报道,二甲双胍治疗可使糖尿病大鼠肾脏亚硝酸盐含量降至正常水平,同时降低肾组织的丙二醛含量,增加抗氧化剂超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活性,降低白蛋白尿和血肌酐水平。Buldak 等<sup>[13]</sup>也发现,二甲双胍可降低体外培养的单核巨噬细胞 NADPH 的水平,增加抗氧化酶超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化酶的表达。二甲双胍还可抑制呼吸链复合物-1,缓解肾小管的氧化应激损伤<sup>[14]</sup>。

### 3 缓解肾脏缺氧和能量消耗

二甲双胍的多种作用与 AMPK 的激活有关,AMPK 是保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可在能量受限的情况下保护细胞功能,激活的 AMPK 使细胞从合成代谢转化为分解代谢,减少 ATP 的消耗,保存能量<sup>[15]</sup>。慢性缺氧和肾小管间质纤维化是 DN 的主要病变,低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )在这一病理过程中起重要作用。目前认为,慢性缺氧介导的 HIF-1 $\alpha$  的表达增加是 DN 发病和进展的重要因素,慢性缺氧使肾小管细胞 HIF-1 $\alpha$  表达增加,促进结缔组织生长因子生成、上皮间充质转化、肾小球上皮细胞凋亡、基质产生增多,导致肾脏纤维化<sup>[16]</sup>。Takiyama 等<sup>[16]</sup>报道,缺氧使人肾小管上皮细胞 HIF-1 $\alpha$  表达增多,二甲双胍可抑制线粒体呼吸链,减少耗氧量,降低细胞内 ATP 水平,增加 AMPK- $\alpha$  磷酸化而激活 AMPK,促进 HIF-1 $\alpha$  蛋白酶体的降解,抑制 HIF-1 $\alpha$  表达及其诱导的纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)、血管内皮生长因子和葡萄糖转运蛋白-1 mRNA 等的表达。

肾脏葡萄糖和电解质的重吸收以及滤过都需要耗氧,肾脏通过氧化磷酸化和糖酵解产生 ATP,在缺氧情况下,肾脏通过巴斯德效应厌氧发酵产生 ATP 来维持功能<sup>[17]</sup>。高糖即使在缺氧情况下也增加氧

耗,可见高糖可抑制巴斯德效应,二甲双胍通过抑制线粒体呼吸链复合物-1,减少氧耗和氧化应激,缓解能量缺失,恢复被高糖损害的巴斯德效应<sup>[16]</sup>。

### 4 抑制肾脏肥大

DN 最初的结构改变包括肾脏体积增大,细胞肥大,细胞内 RNA 含量和蛋白质增加,而不是细胞的增殖,肾脏细胞肥大与 TGF- $\beta$ 1 和 Ang II 等的生成增多、基质的堆积有关,是 DN 的发生机制之一。细胞肥大增加蛋白质合成率,蛋白质合成消耗细胞内能量,而高糖可诱导蛋白质的合成,抑制 AMPK 的磷酸化和活性,二甲双胍可促进 AMPK 磷酸化,从而抑制能量消耗,抑制肾脏肥大。

肾脏肥大包括肾小球和肾小管细胞肥大,细胞生长的调控最终发生在细胞周期水平上,在这一过程中细胞周期调控蛋白起着关键作用。p21 作为一种具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期负调控蛋白,与早期 DN 肾脏肥大密切相关。p21 存在于细胞核中,可结合并抑制特定细胞周期蛋白-细胞周期蛋白依赖性激酶复合物的活性,引起细胞周期停滞,使视网膜瘤蛋白不能磷酸化,从而不能释放转录因子 E2F,使 G1 期过度延长,细胞增殖受抑制,导致细胞肥大。Kuan 等<sup>[18]</sup>研究发现,在体外,高糖诱导的大鼠系膜细胞肥大与 p21 蛋白表达水平升高有关。Molnar 等<sup>[19]</sup>报道,二甲双胍通过激活 AMPK 抑制高糖诱导的 p21 表达。

多项研究表明,高血糖通过诱导磷脂酰肌醇 3 激酶、蛋白激酶 B 的活化,激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路<sup>[20]</sup>。mTOR 作为细胞内重要的信号通路,能够调节蛋白质合成起始和延长阶段中一些关键分子,控制蛋白质的合成,其活性改变对糖尿病肾脏结构改变,包括肾小球肥大、基底膜增厚及细胞外基质沉积也起着重要的作用<sup>[21]</sup>。DN 大鼠肾组织中 AMPK 活性被抑制,致其下游 mTOR 信号通路分子(包括磷酸化的真核延伸因子 2 激酶、磷酸化的起始因子 4E 结合蛋白 1 等)活化,促使细胞外基质蛋白合成增加<sup>[21]</sup>。Langer 等<sup>[22]</sup>报道,高糖可诱导人足细胞 mTOR 磷酸化,二甲双胍通过足细胞表面的有机阳离子转运子 1 进入足细胞后,可逆转高糖导致的足细胞 AMPK 磷酸化降低、mTOR 的激活,抑制细胞凋亡蛋白酶-3 的活性,从而抑制足细胞凋亡。

### 5 抑制肾脏的脂毒性

肾脏的脂毒性也是 DN 发生、发展的重要因素。脂毒性可促进活性氧簇产生,促炎因子和促纤维化因子的释放,进而致肾脏细胞凋亡和慢性肾小管损伤<sup>[23]</sup>。游离脂肪酸和白蛋白结合可促进炎性因子释放,促进肾小管间质病变的发生<sup>[24]</sup>。Zhang 等<sup>[24]</sup>研究发现,大鼠注射游离脂肪酸后,肾组织 ICAM-1、

TNF- $\alpha$  和 PAI-1 表达均明显升高,PAI-1 还通过刺激白细胞和胶原生成细胞迁移到损伤组织,促进胶原沉积,导致纤维化。王小英等<sup>[25]</sup>发现,高脂喂养联合低剂量链脲佐菌素诱导的早期 DN 大鼠模型总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇、甘油三酯、游离脂肪酸水平升高,高密度脂蛋白-胆固醇水平降低,二甲双胍可降低总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇,甘油三酯、游离脂肪酸水平,提高高密度脂蛋白-胆固醇水平,防止早期 DN。

综上所述,二甲双胍可通过抗炎、抗氧化、抑制肾脏的脂毒性等多种途径发挥对 DN 的保护作用,为临床 DN 的防治提供了新的治疗方法,但尚需更多的临床试验进一步证实,并探讨其确切的机制。

### 参 考 文 献

- [1] Louro TM, Matafome PN, Nunes EC, et al. Insulin and metformin may prevent renal injury in young type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 653 (1-3): 89-94. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.11.029.
- [2] Maheshwari RA, Balaraman R, Sen AK, et al. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats [J]. Indian J Pharmacol, 2014, 46 (6): 627-632. DOI: 10.4103/0253-7613.144924.
- [3] Agrawal NK, Kant S. Targeting inflammation in diabetes: newer therapeutic options [J]. World J Diabetes, 2014, 5 (5): 697-710. DOI: 10.4239/wjd.v5.i5.697.
- [4] Yi B, Hu X, Zhang H, et al. Nuclear NF- $\kappa$ B p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP-1, RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy [J]. PLoS One, 2014, 9 (6): e99633. DOI: 10.1371/journal.pone.0099633.
- [5] 陈频, 陈晶波, 陈文钰, 等. 槲皮素对糖尿病大鼠肾脏泛素蛋白酶系统介导核因子- $\kappa$ B p65 表达的影响 [J]. 中华内科杂志, 2012, 51 (6): 460-465. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2012.06.015
- [6] Gu J, Ye S, Wang S, et al. Metformin inhibits nuclear factor- $\kappa$ B activation and inflammatory cytokines expression induced by high glucose via adenosine monophosphate-activated protein kinase activation in rat glomerular mesangial cells *in vitro* [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127 (9): 1755-1760.
- [7] Chung CH, Fan J, Lee EY, et al. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on podocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 and in diabetic nephropathy [J]. Nephron Extra, 2015, 5 (1): 1-18. DOI: 10.1159/000369576.
- [8] Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, et al. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells [J]. Hypertension, 2006, 47 (6): 1183-1188. DOI: 10.1161/01.HYP.0000221429.94591.72.
- [9] Xie S, Lu K, Zhang Y, et al. Effects of Jiangya Xiaoke prescription on TGF- $\beta$ 1 in diabetic nephropathy rats with hypertension and its mechanisms [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (4): 5129-5136.
- [10] Kim J, Kwak HJ, Cha JY, et al. Metformin suppresses lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory response in murine macrophages via activating transcription factor-3 (ATF-3) induction [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (33): 23246-23255. DOI: 10.1074/jbc.M114.577908.
- [11] Kim J, Shon E, Kim CS, et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 210821. DOI: 10.1155/2012/210821.
- [12] Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, et al. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393 (2): 268-273. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.119.
- [13] Bułdak Ł, Łabuzek K, Bułdak RJ, et al. Metformin reduces the expression of NADPH oxidase and increases the expression of antioxidative enzymes in human monocytes/macrophages cultured *in vitro* [J]. Exp Ther Med, 2016, 11 (3): 1095-1103. DOI: 10.3892/etm.2016.2977.
- [14] Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, et al. Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH:ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages [J]. J Biol Chem, 2015, 290 (33): 20348-20359. DOI: 10.1074/jbc.M115.662114.
- [15] Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview [J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122 (6): 253-270. DOI: 10.1042/CS20110386.
- [16] Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, et al. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin: a possible role of HIF-1 $\alpha$  expression and oxygen metabolism [J]. Diabetes, 2011, 60 (3): 981-992. DOI: 10.2337/db10-0655.
- [17] Takiyama Y, Haneda M. Hypoxia in diabetic kidneys [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 837421. DOI: 10.1155/2014/837421.
- [18] Kuan CJ, al-Douhji M, Shankland SJ. The cyclin kinase inhibitor p21WAF1, CIP1 is increased in experimental diabetic nephropathy: potential role in glomerular hypertrophy [J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9 (6): 986-993.
- [19] Molnar Z, Millward AB, Tse W, et al. p21 (WAF1/CIP1) expression is differentially regulated by metformin and rapamycin [J]. Int J Chronic Dis, 2014, 2014: 327640. DOI: 10.1155/2014/327640.
- [20] 赵鸿, 冀倩倩, 李永霞, 等. mTOR 复合物在糖尿病肾病小鼠肾组织中的不同分布和表达 [J]. 解剖学报, 2014, 45 (4): 555-560. DOI: 10.3969/j.issn.0529-1356.2014.04.021.
- [21] 罗霞, 邓玲艳, 许文娟, 等. 腺苷酸活化蛋白激酶通过抑制 mTOR 信号通路缓解糖尿病大鼠肾脏细胞外基质沉积 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2015, 44 (1): 10-15. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2015.01.002.
- [22] Langer S, Kreutz R, Eisenreich A. Metformin modulates apoptosis and cell signaling of human podocytes under high glucose conditions [J]. J Nephrol, 2016, 29 (6): 765-773. DOI: 10.1007/s40620-015-0258-1.
- [23] Wang XX, Jiang T, Shen Y, et al. The farnesoid X receptor modulates renal lipid metabolism and diet-induced renal inflammation, fibrosis, and proteinuria [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297 (6): F1587-F1596. DOI: 10.1152/ajprenal.00404.2009.
- [24] Zhang C, Shao M, Yang H, et al. Attenuation of hyperlipidemia- and diabetes-induced early-stage apoptosis and late-stage renal dysfunction via administration of fibroblast growth factor-21 is associated with suppression of renal inflammation [J]. PLoS One, 2013, 8 (12): e82275. DOI: 10.1371/journal.pone.0082275.
- [25] 王小英, 冯积容, 周艳, 等. 2 型糖尿病早期肾病大鼠模型制备及二甲双胍干预作用 [J]. 临床医学工程, 2013, 20 (2): 152-155. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4659.2013.02.0152.

(收稿日期: 2017-03-30)