

• 综述 •

亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的研究进展

张孟钦¹ 卢剑飞² 陈春花^{1*}

(1. 北京大学医学部基础医学院人体解剖学与组织学胚胎学系 北京 100083;

2. 上海交通大学基础医学院解剖学与生理学系 上海 200025)

[摘要] 脑卒中作为全球高致死、高致残的疾病,一直被广泛研究。亚甲蓝作为一种被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗高铁血红蛋白血症和氰化物中毒的药物已有一百二十余年,而在近期研究中发现其具有神经保护作用,并在缺血性脑卒中的动物模型中展现出良好的保护作用。我们就近年来亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的研究进行简要综述。

[关键词] 亚甲蓝;缺血性脑卒中;神经保护

[中图分类号] R322 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2019.05.023

Progress in the therapeutic use of methylene blue in ischemic stroke

ZHANG Meng-qin¹, LU Jian-fei², CHEN Chun-hua^{1*}

(1. Department of Human Anatomy and Histo-Embryology, School of Basic Medical Sciences, Peking University

Health Science Center Beijing 100083, China; 2. Department of Anatomy and Physiology, Shanghai Jiao

Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China)

[Abstract] Stroke has been widely studied as a highly lethal and highly disabling disease worldwide. Methylene blue approved by the Food and Drug Administration (FDA) of the United States has been used in the treatment of methemoglobinemia and cyanide poisoning for more than one hundred and twenty years. In recent studies, it has been found to have neuroprotective effects and is effective in a few of animal models of ischemic stroke. This article briefly reviews the recent research on the therapeutic use of methylene blue in ischemic stroke.

[Key words] Methylene blue; Ischemic stroke; Neuroprotection

脑卒中(cerebral stroke)是一组以血管堵塞或破裂所导致的脑组织供血障碍并引起组织损伤的疾病统称。前者称为缺血性脑卒中(ischemic stroke),占总发病率的60%~70%;后者称为出血性脑卒中。脑卒中目前已经成为全球第2大致死与第1大致残疾病。在我国,脑卒中每年造成约188万患者死亡,给我国带来的直接和间接经济损失高达700亿人民币^[1]。鉴于脑卒中高发病率、高致死率、高致残率、高复发率的特点,全球的医疗科研人员在脑卒中领域投入大量的精力、物力。目前在缺血性脑卒中领域,世界公认的也是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)唯一批准的治疗方案是重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue

plasminogen activator, rt-PA)静脉溶栓。但该治疗方案治疗时间窗短,仅4.5h^[2],且在治疗窗外有出血转化(hemorrhagic transformation)的风险^[3]。此外,缺血后重建血流所致的缺血/再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury)^[4]也是加重神经组织损伤,影响患者预后的重要因素。延长治疗窗以及保护神经组织免受进一步损害是目前脑卒中实验研究的重点。

亚甲蓝(methylene blue)是美国FDA最早批准的药物之一,被广泛用于高铁血红蛋白血症、氰化物中毒、疟疾、异环磷酰胺引发的脑病等^[5]。亚甲蓝也可作为一种神经组织染料^[5]。最近几年的研究表明,低剂量亚甲蓝具有改善线粒体功能障碍等神经保护作用,在阿尔茨海默症^[6]、帕金森病^[6]、视神经病^[7]以及缺血性脑卒中等神经疾病的动物模型中有积极作用。此外,多年研究表明,低剂量亚甲蓝的副作用、药物动力学等性质清楚,对人体危害小^[8,9]。

我们拟从缺血性脑卒中损伤机制、亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的药理作用、亚甲蓝治疗缺血性脑卒

[收稿日期] 2018-10-23 **[修回日期]** 2018-11-22

[基金项目] 国家自然科学基金(81873769)

[作者简介] 张孟钦(1997—),男(汉族),湖北省黄冈市人,本科生在读。

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: cch@bjmu.edu.cn Tel: (010) 82801427

中的基础研究成果 3 个方面对近几年亚甲蓝在缺血性脑卒中的研究进展进行总结,并对其未来发展方向提出自己的看法。

1. 缺血性脑卒中的损伤机制

缺血性脑卒中的损伤机制十分复杂,涉及到多步骤、多因素。到目前为止,缺血性脑卒中的损伤机制尚待进一步研究。我们所述为目前已经公认的部分机制。

首先,当血流中断时,梗死部位细胞的 O_2 与葡萄糖供应中断,直接导致线粒体内细胞呼吸受阻,ATP 生成障碍,导致细胞能量供给不足。此后 ATP 依赖的 Na^+-K^+ 泵受影响,导致细胞内外的 Na^+ 、 K^+ 离子失衡,细胞外的 K^+ 浓度上升导致细胞膜持续去极化,影响神经功能。在渗透压的作用下,大量水分进入细胞,造成细胞水肿。循环障碍导致 O_2 与营养物质运输不足,无氧呼吸加剧,同时 CO_2 堆积,两者共同导致梗死组织局部产生酸中毒。酸中毒以及 ATP 缺乏共同促进细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,产生钙超载,造成包括兴奋性氨基酸大量释放^[10]、大量分解细胞结构的酶被激活^[11]、线粒体膜电位紊乱^[12]、细胞渗透压改变等多种严重后果,使细胞的进一步损伤,最终导致细胞坏死或者凋亡。

其次,由于氧化磷酸化过程中断,复合体 I、III 产生过多的体内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)^[13], 从而对细胞内的大分子物质进行攻击,导致细胞内多种酶活性降低,细胞结构功能损伤,最终导致细胞死亡。组织内自由基过多也可激活细胞凋亡的瞬时受体电位通道 7 (transient receptor potential melastain 7, TRPM7) 通路^[14], 引起细胞凋亡。细胞内大量的 Ca^{2+} 也可以激活线粒体上的钙离子依赖蛋白酶、磷脂酶等破坏细胞结构的酶,从而对细胞产生损伤。并且线粒体的细胞色素 C (cytochrome C, CytC) 被释放之后,可激活线粒体凋亡途径^[15], 导致损伤部位大量细胞凋亡,加重损伤。

除此之外,体内大量 ROS 的生成^[16], 大量兴奋性氨基酸的生成与释放^[17], 梗死部位引发的炎症反应等也参与了脑卒中的病理损伤。在受影响的组织中,神经元功能严重受损或者坏死的部位是梗死的核心区。而梗死核心区周围功能受损但仍然存活的神经组织,被称为缺血半影区 (ischemic penumbra)。然而随着时间的推移,在炎症反应、氧化应激等作用下,半影区的神经组织最终也会死亡,加大最终梗死体积。

缺血-再灌注损伤也是脑卒中损伤的重要因素。在发生上述病理改变的同时,血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 也受到不同程度的损伤,从而加重了再灌注的损伤。虽然血流的重建能够拯救部分受损

较轻的组织,但是伴随着血液中大量的 O_2 、炎性分子、 Ca^{2+} 、炎细胞等进入受损组织,受损组织中的氧化应激、细胞凋亡、炎症反应等进一步加剧,造成受损组织的二次损伤,甚至扩大损伤范围。

由此可见,线粒体功能异常以及由此引发的离子失衡、氧化应激等在缺血性脑卒中的损伤中起到了重要的作用。针对线粒体功能障碍和氧化应激的药物研发已经成为目前脑卒中治疗的重要方向。而亚甲蓝作为一种能提高梗死组织代谢能力和线粒体功能的药物而备受关注。

2. 亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的药理作用

亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的药理作用目前仍然在不断的深入研究。目前主要集中于以下 5 个方面: 高脂溶性,保护线粒体和加强代谢,促进自噬和抑制凋亡和坏死,增加血流量、氧耗和糖摄取量,减轻炎症反应和促进神经再生。

2.1 高脂溶性: 亚甲蓝具有较高的脂溶性。早期药物动力学实验证明了亚甲蓝可以通过 BBB 并且在包括神经组织在内的多种组织中富集,其中静脉注射 1 h 后,其在神经组织中的浓度可达到血液中的 10 倍以上^[9]。高脂溶性保证了亚甲蓝可以高效进入神经组织细胞的细胞质与线粒体中,发挥神经保护作用。

2.2 保护线粒体与加强代谢: 在线粒体内部,亚甲蓝能够接收来自复合体 I 的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 转移的电子,结合 H^+ 形成还原性亚甲蓝,而还原性亚甲蓝可以直接将电子转移给 CytC 而重新被氧化为亚甲蓝。亚甲蓝的这种“自动氧化”的特性使其可以作为电子转运载体,能够跳过复合体 I 至 III,在线粒体中不断促进细胞呼吸过程^[18]。并且在这个过程中,亚甲蓝并不会影响复合体 I / III 作为质子泵的功能,反而能够增加细胞 ATP 的生成。此外,复合体 I / III 被认为是在损伤过程中发生电子漏 (electron leak) 而产生 ROS 的主要部位^[13]。亚甲蓝通过改变电子转移途径,可以减少复合体 I / III 产生 ROS^[18]。可见,亚甲蓝可以降低缺血性损伤后产生的 ROS 水平。但是有实验证明,亚甲蓝对已经产生的 ROS 造成的损伤无明显效果,即无直接清除自由基功能^[18]。此外,长期低剂量的亚甲基蓝能上调复合体 IV 的活性以及表达,从而加强细胞的代谢水平^[19,20]。亚甲蓝还可以在线粒体内直接将 O_2 还原成水,从而在低氧或常氧条件下增加大脑的氧耗和能量供给^[21]。

亚甲蓝不仅能促进代谢,还能通过保持线粒体膜电位 (mitochondria membrane potential, MMP) 来稳定线粒体的结构。相对较高的线粒体膜电位也可

以促进线粒体自噬(mitophagy) 的进行,帮助细胞清除功能异常的线粒体,从而减少功能异常的线粒体导致的细胞损伤^[22]。

2.3 促进自噬和抑制凋亡及坏死: 亚甲蓝除了稳定线粒体外,还通过调节细胞的凋亡、自噬以及坏死而起到保护神经元的作用。Di 等^[22]在研究亚甲蓝对急性脑缺血损伤的影响时发现,亚甲蓝可以抑制神经元在缺血后受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein-1 ,RIP1) 和 RIP3 的升高,而这两者被认为是细胞程序性坏死的关键信号分子。这项研究提示,亚甲蓝可能有减轻梗死部位细胞坏死的能力,对梗死组织的细胞起到一定的保护作用。

Jiang 等^[23]则发现,亚甲蓝在灌注成像-扩散成像不匹配区(perfusion-diffusion mismatch ,PDM) 组织中,可以通过下调 p53 的表达,从而上调自噬信号的腺苷单磷酸活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase ,AMPK) -结节性硬化症 2(tuberous sclerosis complex 2 ,TSC2) -哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin ,mTOR) 通路和下调凋亡信号通路 Bcl-2 相关的 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein ,Bax) -B 淋巴细胞瘤基因(B-cell lymphoma ,Bcl) -Caspase-3。两种机制共同保护 PDM 区域中的神经细胞。这表现了亚甲蓝在针对自噬与凋亡方面的神经保护作用。

2.4 增加血流量、氧耗和糖摄取量: 亚甲蓝除了在细胞和亚细胞水平上对神经细胞有保护作用以外,也可改善神经组织微环境。大量的实验均发现,亚甲蓝可以显著提高全脑组织的氧耗速率,增加糖摄取量以及血流^[23-26]。现在认为,亚甲蓝通过加强细胞的代谢,造成细胞的高氧耗,在组织局部造成短暂低氧的状态,诱导细胞色素氧化酶形成一氧化氮^[27],从而产生血管扩张作用,进而增强大脑血流和大脑摄取葡萄糖^[25]。此外, Lin 等^[25]的实验也证明,在缺氧条件下,亚甲蓝可以通过提高氧摄取分数,维持脑组织的能量代谢。

2.5 减轻炎症反应和促进神经再生: 神经炎症与神经再生是关系到缺血性脑卒中预后的重要因素之一。Ahmed 等^[20]通过构建光化学栓塞法(photo thrombosis ,PT) 大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion ,MCAO) 模型发现,亚甲蓝可以明显降低梗死部位的反应性胶质增生,并且使梗死部位肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α ,TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β) 和 IL-6 等促炎因子的含量明显下降。这一点证明亚甲蓝具有明显抗炎作用。此外,在蛛网膜下腔出血脑卒中模型中,亚甲蓝可以通过磷酸化蛋白激酶 B(protein kinase B ,

PKB 也称为 Akt) 以及糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β ,GSK-3 β) ,增强肌细胞增强因子 2D(myocyte enhancer factor 2D ,MEF2D) 的核定位,从而促进抗炎因子 IL-10 以及抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子的表达,达到减轻炎症的作用^[28]。

Ahmed 等^[20]同时也发现,在 PT 模型中,亚甲蓝可以促进半影区中的神经再生。相比对照组,亚甲蓝组的半影区中神经元再生更多,表达更高的新生神经标记,如神经核抗原(neuronuclear antigen ,NeuN)、双皮层蛋白(doublecortin ,DCX)、Ki67。但是两组的神经元分布均比较随机。这可能与亚甲蓝能改善神经元生存的微环境有关: 亚甲蓝能增强新生神经元的线粒体功能,提高新生神经元存活、生长和迁移能力; 亚甲蓝还可以降低半影区内促炎因子的浓度,从而减轻对新生神经元增殖、生存与分化的抑制作用。

除了上述机制以外,亚甲蓝还被发现可以保护 BBB 的完整性^[28],能够降低诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase ,iNOS) 的合成而减少 ROS 的生成^[29],能够保护原始星形胶质细胞^[30],能够促进和稳定低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factors-1 ,HIF-1 α) 从而保护细胞^[31]。

值得一提的是,亚甲蓝具有明显的兴奋效应(hormesis),即低剂量有保护效应,高剂量有损害效应^[32]。目前认为,低剂量(0.5~4.0 mg/kg) 亚甲蓝在体内有神经保护作用,并且在人体和动物实验中证实是安全的^[6]。

通过上述机制,亚甲蓝可以减少梗死面积,改善神经元功能,增强后续功能恢复。由此可见,亚甲蓝是一种功能全面,在神经保护方面可能具有广阔前景的药物。

3. 亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的基础研究成果

自从 1891 年开始被作为药物研究以来,亚甲蓝在近一百二十年用药史中屡次有新突破,并且在多种疾病的治疗过程中发挥着重要的作用^[33]。近二十年以来,随着对神经疾病研究的深入,科研人员发现,线粒体功能障碍及氧化应激在阿尔茨海默症、帕金森病、视神经病、缺血性脑卒中等疾病的发展过程中起重要作用^[34]。而 Kupfer 等^[35]在 1994 年首先报道的亚甲蓝成功预防化疗药物异环磷酰胺造成的代谢性脑病的两个案例,拉开了亚甲蓝在神经保护领域的帷幕。下面简单介绍近年来亚甲蓝治疗缺血性脑卒中的基础研究(表 1)。

Rojas 等^[36]在 2009 年间接研究亚甲蓝在卒中方面的作用。他们在纹状体内单次注射鱼藤酮(rotenone) 和亚甲蓝。鱼藤酮可以降低复合物 I 的活性,从而导致线粒体功能障碍,导致类似中风的组

织表现。而亚甲蓝则降低鱼藤酮造成的代谢损伤,但不提高复合体 I 的活性。这提示,亚甲蓝能直接增强大脑代谢,改善大脑功能。但是脑内注射不是常规给药方式,并且该实验模型也不是常规的脑卒中模型。Wen 等^[18]则在 2011 年报道,在短暂性大脑中动脉栓塞(transient MCAO, tMCAO)模型中单次注射亚甲蓝能减小梗死面积。该文献进一步阐述在体外氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型中,亚甲蓝在线粒体中作为电子转运体,越过复合体 I ~ III 直接将电子传递给 CytC 从而加强细胞代谢,同时减少由复合体 I 和 III 产生的 ROS,从而在体外起到神经保护作用。亚甲蓝在体外 OGD 模型中保护线粒体功能、提高细胞代谢、减少 ROS 生成的作用也被其他研究人员报道^[37]。

有报道称,亚甲蓝能够在体内和体外增强细胞和大脑摄取氧气和葡萄糖的能力,减轻卒中后的血流动力学损伤。Lin 等^[25]观察到,亚甲蓝在体外可以增加 HT-22 细胞在 OGD 模型中 O₂ 消耗以及葡萄糖摄取。此外,他们首次观察到,在低氧以及常氧环境下亚甲蓝可以提高全脑的 O₂ 摄取,葡萄糖摄取以及 O₂ 消耗。他们利用 MRI 观察到,在尾静脉单次注射 0.5 mg/kg 亚甲蓝之后,无论是常氧组还是低氧组, Sprague-Dawley (SD) 大鼠全脑的代谢和血流动力学参数明显改善。但这些早期的实验均为单次注射,并没有研究亚甲蓝的长期作用。

随着多模式 MRI 的发展以及 PDM 定义的提出与推广,研究人员可以通过 MRI 更加直观判断卒中损伤的部位,划分半影区和核心区。这也更方便直观评价亚甲蓝在脑卒中的作用以及长期应用所产生的影响。Shen 等^[24]利用 MRI 的表观扩散系数(apparent diffusion coefficient, ADC)、大脑血流(cerebral blood flow, CBF)以及 T2 等参数来划分脑卒中的半影区以及核心区,并利用逐像素记录法,由此发现,在 tMCAO 模型中,亚甲蓝可以挽救更多的核心区以及半影区的组织,并且能够减少在再灌注中出现的有害的超灌注(hyperperfusion)现象,最终在两天后能够减少约 30% 梗死体积并改善生物学行为。此后, MRI 成为研究亚甲蓝在脑卒中领域的重要手段。

Rodriguez 等^[26]于 2014 年在前人的基础上阐述了亚甲蓝在永久性大脑中动脉堵塞(permanent MCAO, pMCAO)模型中的作用。他们发现,亚甲蓝在 pMCAO 中能够显著延长 PDM 的时间,并且轻微提高低灌区的脑血流量(cerebral blood flow, CBF)。这在临床上能够为后续的静脉溶栓以及机械取栓争取宝贵的时间。但亚甲蓝并没有改变 pMCAO 模型中的最终梗死体积。这可能暗示亚甲蓝不能直接改

变缺血组织的命运,然而这有待进一步的研究。

2015 年与 2016 年是亚甲蓝在缺血性脑卒中神经保护作用机制研究的井喷之年。

与其他人注重神经元的不同, Roy Choudhury 等^[30]着手于亚甲蓝对星形胶质细胞的作用。星形胶质细胞对神经元的存活和能量代谢起到十分重要的作用。他们发现,在 OGD 模型中,再灌注之后加入的亚甲蓝可以增加星形胶质细胞的 O₂ 消耗、糖摄取和己糖激酶活性,从而促进合成 ATP 和胶原。脑组织中细胞组成的稳定有助于长期神经功能的恢复。

Di 等^[22]则发现,亚甲蓝可以保护梗死核心区细胞线粒体结构,并通过维持 MMP 的较高水平而增强急性脑损伤中的线粒体自噬现象,从而减轻受损线粒体产生的 ROS 以及其释放所诱导细胞程序性坏死的蛋白的影响。而 Jiang 等^[23]则通过多模型 MRI 以及 Western blotting 探究了亚甲蓝在缺血性脑卒中的不同位置的作用以及分子机制。他们发现,除减少梗死面积,增强 PDM 区域的 CBF,在 24 h 最大程度减少超灌注外,亚甲蓝还可以通过下调 PDM 组织细胞的 p53 从而下调凋亡信号通路和上调自噬信号通路,起到神经保护作用。HIF-1 α 被认为是缺血/低氧条件下维持细胞稳态的重要转录因子,而 Ryou 等^[31]报道,在 OGD 模型中亚甲蓝能够通过增强糖代谢从而增加丙酮酸的含量、启动促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)和 mTOR 信号通路以及增强核定位,从而稳定 HIF-1 α ,发挥其在细胞低氧条件下的维持稳态的作用。

神经再生作为减轻脑损伤的另一热门话题,亚甲蓝也参与其中。Ahmed 等^[20]构建了大鼠的 PT 模型。在此模型中,亚甲蓝能够减轻梗死部位的反应性胶质化、减少促炎因子的释放,并且提高半影区的复合体 IV 的活性以及 ATP 的生成,从而促进新生神经元在缺血部位的存活,达到促进神经再生的作用。

除神经元损伤外,缺血后脑水肿也是缺血性脑卒中病情与预后的重要影响因素。Fang 等^[38]通过 MRI 和透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)研究了亚甲蓝在缺血后水肿中的作用。在 tMCAO 模型中,亚甲蓝通过增强细胞呼吸,改善细胞离子泵的状态从而改善星形胶质细胞和毛细血管内皮细胞的水肿以及神经元的皱缩,降低神经血管单位成分的水肿。除细胞性脑水肿得到改善外,星形胶质细胞和毛细血管内皮细胞的完整性也保证了 BBB 的完整性,减轻血管性脑水肿。两者共同降低缺血性脑卒中引发的缺血后脑水肿。

鉴于亚甲蓝优良的神经保护作用,联合其他治疗方法已成为新的研究方向。Rodriguez 等^[39]联合

常压低温疗法和亚甲蓝治疗进行了探索。他们发现,虽然联合处理组梗死面积与亚甲蓝组相接近,但神经功能显著改善,并持续至实验末(28 d)。这可能是因为两者联合作用可以有效地帮助细胞产生

ATP,维持细胞生存。

Huang 等^[40]进行长期口服亚甲蓝治疗,则填补了亚甲蓝在缺血性脑卒中慢性期作用的空白。在长达60 d的实验过程中,大鼠于前21每日口服

表1 近几年有关亚甲蓝在缺血性脑卒中的进展

Table 1 The recent progress of methylene blue in ischemic stroke

年份 year	实验对象 subject	亚甲蓝剂量 dose	主要发现 main findings
2009	SD 大鼠 SD rats	8.8 μg 脑内注射(8.8 μg intracerebral injection)	在体内对抗鱼藤酮带来的纹状体结构破坏和氧化应激 ^[36] Resists structure destruction of striatum and oxidative stress caused by rotenone <i>in vivo</i>
2011	SD 大鼠 SD rats HT-22 细胞 HT-22 cells	500 μg/kg 100 mg/L	作为电子转运体绕过 ETC,减少 ROS 的生成,降低缺血再灌注损伤 ^[18] Works as electron carrier to bypass ETC, in order to reduce ROS production and then ischemia/reperfusion injury
2012	HT-22 细胞 HT-22 cells	10 nmol/L, 100 nmol/L, 1 μmol/L, 10 μmol/L	减低超氧化物生成并且有抗氧化性 ^[37] Reduces superoxide formation and works as antioxidant
2012	SD 大鼠 SD rats HT-22 细胞 HT-22 cells	0.5 mg/kg 10 μmol/L	在常氧和低氧条件下增强大脑的代谢和血流动力学特性 ^[25] Enhances brain metabolism and hemodynamics under normoxia and hypoxia condition
2013	SD 大鼠 SD rats	0.5 mg/kg, 1 mg/kg	在 tMCAO 模型用 MRI 观察中显著减少梗死体积并改善功能学评分 ^[24] Significantly reduces the infarction volume by MRI and improves function scores in tMCAO model
2014	SD 大鼠 SD rats	1 mg/kg, 3 mg/kg	能够在 pMCAO 模型中延缓 PDM 区演变为梗死 ^[26] Delays the development of PDM into infarction in pMCAO models
2015	SD 大鼠 SD rats PC12 细胞 PC12 cells	1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg 0.5 μmol/L	恢复梗死后的 MMP,从而稳定线粒体结构,促进线粒体自噬的启动,减少细胞的程序性坏死,提高神经学功能,从而对抗急性脑缺血性损伤 ^[22] Restores MMP after infarction to stabilize mitochondrial structure, promotes mitochondrial autophagy initiation, reduces programmed necrosis and improves neurological function against acute cerebral ischemic injury
2015	HT-22 细胞 HT-22 cells	1 μmol/L, 10 μmol/L	提高细胞的能量代谢和通过 EPO 信号通路增强 HIF-1α 的含量,保护细胞对抗 OGD-再供氧损伤 ^[31] Improves cell energy metabolism and enhances HIF-1α content through EPO signaling pathway to protect cells against OGD-reoxygenation damage
2015	SD 大鼠 SD rats	1 mg/kg	下调 p53 从而上调自噬通路和下调凋亡通路,保护 PDM 区的组织 ^[23] Down-regulates p53 to up-regulate the autophagy pathway and down-regulates the apoptotic pathway, protecting the tissues of the PDM region
2015	原始星形胶质细胞 (C57bL6 小鼠) primary astrocyte (C57bL6 mice)	0.01 μmol/L, 0.1 μmol/L 1 μmol/L, 10 μmol/L	再供氧后,保护星形胶质细胞免于 OGD-再供氧造成的死亡,并且能够促进星形胶质细胞的糖代谢和氧化磷酸化 ^[30] After re-oxygenation, protects astrocytes from OGD-re-oxygenation and promotes glucose metabolism and oxidative phosphorylation of astrocytes
2016	SD 大鼠 SD rats	1 mg/kg	联合常压低温治疗较单一治疗改善功能恢复 ^[39] Improve the functional recovery compared with single treatment when combined with normobaric hypothermia
2016	SD 大鼠 SD rats	0.5 mg/kg	减少半影区的神经炎症和增强线粒体活性和 ATP 生成从而减少 PT 模型中的梗死体积和感觉运动障碍 ^[20] Reduces neuroinflammation in the penumbra and enhances mitochondrial activity and ATP production to reduce infarct volume and sensorimotor dysfunction in the PT model
2016	SD 大鼠 SD rats	3 mg/kg	保护神经血管单位成分,减少 tMCAO 模型中的缺血后脑水肿 ^[38] Protects neurovascular unit components to prevent post-ischemic brain edema in the tMCAO model
2018	SD 大鼠 SD rats	4 mg/kg(口服 p.o)	长期口服,在 tMCAO 模型中能够减少脑卒中慢性期的脑损伤体积和白质损伤并且调高局部脑血流和行为学功能 ^[40] When long-term oral administration, reduces brain damage volume and white matter damage in the chronic phase of stroke and increases regional cerebral blood flow and behavioral function in the tMCAO model

表格中未标识的亚甲蓝剂量均为静脉注射(动物模型)或培养液浓度(细胞)

Unmarked doses of methylene blue in the table are intravenous administration (for animal model) or cultivate concentration (for cell)

4 mg/kg 亚甲蓝。最终实验结果也表明,亚甲蓝能够提高大鼠的行为学结果直至实验终止(60 d),并且可以减少部分核心区以及半影区的损伤体积,大脑内的白质损伤也被减轻。这进一步证明亚甲蓝在缺血性脑卒中治疗的长期作用以及安全性。

4. 总结与展望

我们回顾了缺血性脑卒中的损伤机制,亚甲蓝对应的药理作用以及亚甲蓝在目前缺血性脑卒中的研究进展。这些实验提示,亚甲蓝这种历史悠久、疗效明确的药物,在缺血性脑卒中有优异的应用前景。独特的药物动力学特性、组织亲和性、全面的作用机制、明确的安全性以及较低的毒性都让低剂量亚甲蓝在缺血性脑卒中药物研发中一枝独秀。慢性期的治疗分子机制的研究、与其他治疗手段(尤其与机械取栓)联合治疗的研究、药物最佳剂量的研究、全面深入的临床试验等是以后亚甲蓝在缺血性脑卒中研究方面突破的重点。如果这些方面能够得到解决,笔者相信亚甲蓝一定能够造福广大的脑卒中患者。

参 考 文 献

- [1] Wang LD, Wang JH, Peng B, et al. Summary of "China Stroke Prevention Report 2016" [J]. Chinese Journal of Cerebrovascular Diseases, 2017, 14(4): 217-224. (in Chinese)
王龙德,王金环,彭斌,等.《中国脑卒中防治报告2016》概要[J]. 中国脑血管病杂志, 2017, 14(4): 217-224.
- [2] Ma Y, Li L, Kong L, et al. Pinocembrin protects blood-brain barrier function and expands the therapeutic time window for tissue-type plasminogen activator treatment in a rat thromboembolic stroke model [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8943210.
- [3] Sussman ES, Connolly ES Jr. Hemorrhagic transformation: a review of the rate of hemorrhage in the major clinical trials of acute ischemic stroke [J]. Front Neurol, 2013, 4: 69.
- [4] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion --from mechanism to translation [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [5] Ginimuge PR, Jyothi SD. Methylene blue: revisited [J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol, 2010, 26(4): 517-520.
- [6] Rojas JC, Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue [J]. Prog Neurobiol, 2012, 96(1): 32-45.
- [7] Zhang X, Rojas JC, Gonzalez-Lima F. Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina [J]. Neurotox Res, 2006, 9(1): 47-57.
- [8] Walter-Sack I, Rengelshausen J, Oberwittler H, et al. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2009, 65(2): 179-189.
- [9] Peter C, Hongwan D, Kupfer A, et al. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2000, 56(3): 247-250.
- [10] Xu J, Liu ZA, Pei DS, et al. Calcium/calmodulin-dependent kinase II facilitated GluR6 subunit serine phosphorylation through GluR6-PSD95-CaMKII signaling module assembly in cerebral ischemia injury [J]. Brain Res, 2010, 1366: 197-203.
- [11] Richard MJ, Connell BJ, Khan BV, et al. Cellular mechanisms by which lipoic acid confers protection during the early stages of cerebral ischemia: a possible role for calcium [J]. Neurosci Res, 2011, 69(4): 299-307.
- [12] Gouriou Y, Demareux N, Bijlenga P, et al. Mitochondrial calcium handling during ischemia-induced cell death in neurons [J]. Biochimie, 2011, 93(12): 2060-2067.
- [13] Nohl H, Gille L, Staniek K. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria [J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(5): 719-723.
- [14] Nicotera P, Bano D. The enemy at the gates: Ca^{2+} entry through TRPM7 channels and anoxic neuronal death [J]. Cell, 2003, 115(7): 768-770.
- [15] Martinez-Fabregas J, Diaz-Moreno I, Gonzalez-Arzo K, et al. Structural and functional analysis of novel human cytochrome C targets in apoptosis [J]. Mol Cell Proteomics, 2014, 13(6): 1439-1456.
- [16] Tajas M, Ill-Raga G, Palomer E, et al. Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 826143.
- [17] Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, et al. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport [J]. Neurobiol Dis, 2005, 18(2): 336-345.
- [18] Wen Y, Li W, Poteet EC, et al. Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection [J]. J Biol Chem, 2011, 286(18): 16504-16515.
- [19] Atamna H, Nguyen A, Schultz C, et al. Methylene blue delays cellular senescence and enhances key mitochondrial biochemical pathways [J]. FASEB J, 2008, 22(3): 703-712.
- [20] Ahmed ME, Tucker D, Dong Y, et al. Methylene Blue promotes cortical neurogenesis and ameliorates behavioral deficit after photothrombotic stroke in rats [J]. Neuroscience, 2016, 336: 39-48.
- [21] Huang S, Du F, Shih YY, et al. Methylene blue potentiates stimulus-evoked fMRI responses and cerebral oxygen consumption during normoxia and hypoxia [J]. Neuroimage, 2013, 72: 237-242.
- [22] Di Y, He YL, Zhao T, et al. Methylene blue reduces acute cerebral ischemic injury via the induction of mitophagy [J]. Mol Med, 2015, 21: 420-429.
- [23] Jiang Z, Watts LT, Huang S, et al. The effects of methylene blue on autophagy and apoptosis in MRI-defined normal tissue, ischemic penumbra and ischemic core [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0131929.
- [24] Shen Q, Du F, Huang S, et al. Neuroprotective efficacy of methylene blue in ischemic stroke: an MRI study [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79833.
- [25] Lin AL, Poteet E, Du F, et al. Methylene blue as a cerebral metabolic and hemodynamic enhancer [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46585.
- [26] Rodriguez P, Jiang Z, Huang S, et al. Methylene blue treatment delays progression of perfusion-diffusion mismatch to infarct in permanent ischemic stroke [J]. Brain Res, 2014, 1588: 144-149.
- [27] Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide

- and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase [J]. *Discov Med*, 2011, 11(57): 154-159.
- [28] Xu H, Li J, Wang Z, et al. Methylene blue attenuates neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage in rats through the Akt/GSK-3 β /MEF2D signaling pathway [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 65: 125-139.
- [29] Huang C, Tong L, Lu X, et al. Methylene Blue Attenuates iNOS Induction Through Suppression of Transcriptional Factor Binding Amid iNOS mRNA Transcription [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(8): 1730-1740.
- [30] Roy Choudhury G, Winters A, Rich RM, et al. Methylene blue protects astrocytes against glucose oxygen deprivation by improving cellular respiration [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123096.
- [31] Ryou MG, Choudhury GR, Li W, et al. Methylene blue-induced neuronal protective mechanism against hypoxia-reoxygenation stress [J]. *Neuroscience*, 2015, 301: 193-203.
- [32] Bruchey AK, Gonzalez-Lima F. Behavioral, physiological and biochemical hormetic responses to the autoxidizable dye methylene Blue [J]. *Am J Pharmacol Toxicol*, 2008, 3(1): 72-79.
- [33] Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M, et al. "Lest we forget you - methylene blue..." [J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(12): 2325.
- [34] Akbar M, Essa MM, Daradkeh G, et al. Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress [J]. *Brain Res*, 2016, 1637: 34-55.
- [35] Kupfer A, Aeschlimann C, Cerny T. Methylene blue and the neurotoxic mechanisms of ifosfamide encephalopathy [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, 50(4): 249-252.
- [36] Rojas JC, Simola N, Kernath BA, et al. Striatal neuroprotection with methylene blue [J]. *Neuroscience*, 2009, 163(3): 877-889.
- [37] Poteet E, Winters A, Yan LJ, et al. Neuroprotective actions of methylene blue and its derivatives [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e48279.
- [38] Fang Q, Yan X, Li S, et al. Methylene blue ameliorates ischemia/reperfusion-induced cerebral edema: an MRI and transmission electron microscope study [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2016, 121: 227-236.
- [39] Rodriguez P, Zhao J, Milman B, et al. Methylene blue and normobaric hyperoxia combination therapy in experimental ischemic stroke [J]. *Brain Behav*, 2016, 6(7): e00478.
- [40] Huang L, Lu J, Cerqueira B, et al. Chronic oral methylene blue treatment in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Brain Res*, 2018, 1678: 322-329.

(编辑 张立克)

更 正

《解剖学报》2019 年第 50 卷第 4 期第 465 页张微等作者的文章“5-氮杂-2'-脱氧胞苷通过反转原钙黏蛋白 10 表达抑制人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的侵袭和迁移”中,基金项目应为[黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017166)] 1 项 特此更正。

《解剖学报》编辑部

2019 年 10 月