

恩格列净通过抑制小胶质细胞激活改善小鼠缺血性脑损伤

曹明, 周心雨, 刘苏亚, 刘芸, 郑婉晴, 张翔南^{*}(浙江大学药学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 明确恩格列净对缺血性脑损伤及神经功能损伤的保护作用, 并探究潜在的作用机制。方法 利用 C57BL/6J 小鼠永久性大脑中动脉栓塞建立急性脑缺血模型, 术后 1 h 灌胃给予小鼠不同剂量 (10, 30 mg·kg⁻¹) 恩格列净, 术后 24 h 进行小鼠神经症状评分并检测脑梗死体积。利用小鼠光化学栓塞法 (photo-thrombosis, PT) 建立局灶性急性脑缺血模型, 术后连续 7 d 或 14 d 灌胃给予小鼠不同剂量 (3, 10, 30 mg·kg⁻¹) 恩格列净, 术后每天采用圆筒和网格实验评价小鼠运动感觉功能。在 PT 造模后连续 7 d 给予小鼠 10 mg·kg⁻¹ 恩格列净, 同时腹腔给予 10% 葡萄糖溶液, 并评价小鼠运动感觉功能, 于术后 7 d 采用免疫荧光检测梗死灶周围小胶质细胞数量及其激活情况。**结果** 永久性大脑中动脉栓塞术后 1 h 给予恩格列净显著增加脑梗死体积并加剧神经损伤。在 PT 造模后连续 7 d 或连续 14 d 灌胃给予 10 mg·kg⁻¹ 恩格列净, 可显著降低小鼠错步率和跛行不对称率, 并且给予葡萄糖不能取消其改善作用。然而, 在 30 mg·kg⁻¹ 剂量下, 恩格列净加重了 PT 诱导的小鼠神经功能障碍, 给予 3 mg·kg⁻¹ 恩格列净对 PT 造模小鼠的神经功能没有影响。此外, 10 mg·kg⁻¹ 恩格列净可抑制 PT 造模小鼠缺血区小胶质细胞激活。**结论** 恩格列净对永久性大脑中动脉栓塞所致小鼠缺血性脑损伤无保护作用; 恩格列净以剂量依赖性的方式改善局灶性缺血引起的小鼠神经功能损伤, 其神经功能改善作用可能与其降糖效应无关, 而与抑制小胶质细胞激活有关。

关键词: 脑卒中; 高血糖; 恩格列净; 运动功能损伤

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)02-0146-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20233120

引用本文: 曹明, 周心雨, 刘苏亚, 等. 恩格列净通过抑制小胶质细胞激活改善小鼠缺血性脑损伤[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(2): 146-155.

Empagliflozin Protects Against Ischemic Brain Injury in Mice by Inhibiting Activation of Microglia

CAO Ming, ZHOU Xinyu, LIU Suyu, LIU Yun, ZHENG Wanqing, ZHANG Xiangnan^{*}(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identify the protective effect of empagliflozin on ischemic brain injury and neurological dysfunction in mice, and further explore its potential mechanism. **METHODS** Acute cerebral ischemia model was induced by the permanent middle cerebral artery occlusion surgery in C57BL/6J mice. Empagliflozin (10 and 30 mg·kg⁻¹) was administered to mice one hour after the onset of occlusion. Brain infarct volume and neurological defect score were assayed 24 h after surgery. Mice were subjected to photo-thrombosis and further administered with empagliflozin 3, 10, 30 mg·kg⁻¹ intragastrically for either 7 or 14 consecutive days. The grid-walking task and the cylinder task were performed daily to determine the sensory-motor function of the mice. Alternatively, the mice were treated with 10 mg·kg⁻¹ empagliflozin simultaneously with 10% glucose (i.p.) for 7 consecutive days after the photo-thrombosis model to evaluate their motor sensory function. Immunofluorescence staining was used to detect the activation of microglia within the infarct area 7 d after the photo-thrombosis. **RESULTS** One hour after permanent middle cerebral artery occlusion surgery, gavage of empagliflozin significantly increased the brain infarct volume and neurological dysfunction. While in photo-thrombosis surgery, treatment of empagliflozin (10 mg·kg⁻¹) for consecutive 7 or 14 days significantly decreased the rate of false foot in grid-walking task and the asymmetric index in cylinder task. At the dose of 30 mg·kg⁻¹, however, empagliflozin even aggravated photo-thrombosis-induced neurological dysfunction, while the dose of 3 mg·kg⁻¹ showed no effect. Unexpectedly, the protective effect of empagliflozin (10 mg·kg⁻¹) could not be reversed by glucose treatment. The results of immunofluorescence showed that empagliflozin (10 mg·kg⁻¹) significantly alleviated the microglia activation in the ischemic area after the photo-thrombosis operation. **CONCLUSION** Empagliflozin cannot protect against acute ischemia-induced brain injury in mice. Empagliflozin alleviated ischemia-induced neurological dysfunction with consecutive administration in a dose-related manner. Empagliflozin-conferred neuroprotection may not be attributable to its effects on lowering blood glucose. Alternatively, empagliflozin may play a neuroprotective effect by inhibiting the excessive activation of microglia in ischemic brains.

KEYWORDS: stroke; empagliflozin; neurological; dysfunction

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LZ21H310001)

作者简介: 曹明, 男, 硕士 E-mail: 21819018@zju.edu.cn *通信作者: 张翔南, 男, 博士, 教授 E-mail: xiangnan_zhang@zju.edu.cn

缺血性脑卒中具有高致死率、致残率、复发率的特点^[1-2]。并且,缺血性脑卒中发生后常出现较多并发症,通常有脑水肿、颅内高压、感染、高糖血症等,其中高糖血症(通常定义为空腹血糖浓度 $>6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)是最常见的并发症之一^[3]。缺血性脑卒中患者约有三分之二在入院时即观察到高糖血症^[4-5],且与是否患有糖尿病无关^[5]。虽然脑卒中后血糖升高的原因尚不完全清楚,但多项研究表明,高糖血症与缺血性脑卒中的不良预后密切相关^[6]。研究表明,高血糖通过增加凝血酶-抗凝血酶复合物^[7]的刺激凝血从而加重脑卒中损伤^[8-9];高糖血症引起的胰岛素水平升高还会降低纤溶活性从而加重血管阻塞^[10];高血糖降低血管舒张功能^[11],并通过增加活性氧加重再灌注损伤^[12]。有研究表明,控制卒中后的血糖水平有利于改善患者的预后,恢复其神经功能。目前临床主要使用胰岛素治疗脑卒中后的高血糖^[13],然而胰岛素的用量不易把握,且需持续的血糖监测,一旦不慎引起急性低血糖,反而会加重患者的脑损伤等不良反应^[13]。因此,亟需寻找合适的降糖药物来达到脑卒中后快速降糖的目的。

钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(sodium-dependent glucose transports 2, SGLT-2)是位于肾小管上皮细胞中的葡萄糖转运体^[14],该蛋白是参与肾脏葡萄糖重吸收的主要蛋白^[15]。SGLT-2 抑制剂是一类新型抗糖尿病药物,其降糖机制是通过抑制肾脏对葡萄糖的重吸收,促进葡萄糖从尿液中排除,从而快速降低血糖^[16]。恩格列净^[17]是 2014 年在美国首先上市的一类新型口服降糖药,属于 SGLT-2 抑制剂^[18]。恩格列净通过选择性抑制肾脏中 SGLT-2 的活性,减少肾脏对葡萄糖的重吸收,增加尿糖排泄,快速降低血糖水平^[19]。已有研究发现,恩格列净除了降低血糖之外,还可以通过降低动脉硬化程度实现降压效果^[20],改变能量供应改善心脏和肾脏功能^[21-22];不仅如此,EMPA-REG 研究结果还表明恩格列净可降低人群全因死亡率^[23]。此外,动物研究显示恩格列净可减少心脏、肾脏的缺血性损伤^[24-25]。上述研究提示恩格列净可能是一种潜在的抗脑缺血损伤药物^[26-28]。然而恩格列净对缺血性脑卒中是否存在保护作用尚不清楚,其主要针对的脑卒中病理环节及作用机制也未见研究报道。因此本研究利用小鼠大脑永久性中动脉栓塞(permanent middle cerebral artery

occlusion, pMCAO)模型和光化学栓塞法(photothrombosis, PT)诱导运动皮层局部血栓模型,分别模拟脑缺血后的急性期损伤及后期神经功能障碍,考察不同类型缺血性脑卒中病理情况下恩格列净的作用,旨在明确恩格列净的抗缺血性脑损伤药理作用,并在此基础上探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

冷冻切片机、激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);冷冻离心机(德国 Heraeus 公司,离心半径 15 cm);VS120 荧光显微镜(日本 Olympus 公司);组织匀浆仪(法国 Bertin Technologies 公司);SDS-PAGE 胶电泳及转膜装置(美国 BIO-RAD 公司);ELX800 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司);小动物立体定位仪(美国 Stoelting 公司);小动物步态分析仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司)。

1.2 药物及试剂

恩格列净(德国 Ingelheim Boehringer Pharma GmbH & Co.KG,产品编号:S14202853284;批准文号:国药准字 J20171073;批号:190603-12;规格:10 mg \times 10 片);BCA 蛋白检测试剂(Pierce,批号:WK336478);GAPDH 鼠抗抗体(上海康成,批号:3522122856);Iba-1 兔抗抗体(批号:GR3455264-1)、NeuN 兔抗抗体(批号:3698178-1)均购自 Abcam;Rose Bengal 玫瑰红(批号:198250-5G)、2%三苯基四唑氯化物(TTC,批号:G3005)均购自 Sigma;甲苯胺蓝(Solarbio,批号:20220308)。

1.3 动物

C57BL/6J 小鼠 60 只,♂,购于浙江省医学科学院实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。小鼠为 10 周龄,体质量 23~25 g,饲养于(23 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$ 的清洁级环境中。饲养环境控制适宜温湿度,光照时间为 8:00—20:00,所有动物均可自由进食进水。依据浙江大学动物实验中心制定的动物伦理学条例以及美国国立卫生研究院(National Institute of Health,NIH)中有关动物实验相关的伦理学规定执行,最大程度地减少动物痛苦和使用数量。

2 方法

2.1 小鼠脑缺血模型制备

2.1.1 pMCAO 小鼠模型的制备和给药 pMCAO 模型制作方法参考文献[29]。C57BL/6J 小鼠麻醉

后剪开头皮，露出前囟，把多普勒血流仪前端固定在小鼠的颅骨上，固定位置在小鼠的前囟 2 mm，中线右侧 6~8 mm 处，用多普勒血流仪检测小鼠大脑中动脉的血流量，以找到最佳血流量位置为准。

pMCAO 手术具体流程如下：先把小鼠以仰卧方式固定好四肢，暴露并且分离出小鼠的右侧颈总动脉，结扎小鼠的远心端，止血钳夹闭小鼠的近心端。随后用显微外科剪在颈总动脉上剪一小口，把一端钝化的 6-0 号尼龙线插入小鼠颈内动脉约 8~10 mm 处。观察多普勒血流仪的血流数据，血流值下降量>80% 作为造模成功的标准。从手术开始至小鼠苏醒，将小鼠体温保持在 37 ℃。

于缺血 24 h 后开始评测神经症状评分：0(无缺陷)，1(把小鼠尾巴悬起，小鼠向缺血的侧进行旋转)，2(小鼠绕着缺血损伤对侧旋转)，3(小鼠单侧偏瘫)，4(小鼠已经丧失自主行动的能力)，5(死亡)。

在造模成功的 24 h 后，给予小鼠安乐死，将小鼠断头后取脑，并以 1 mm 为间隔将小鼠脑组织冠状切片，随后在 37 ℃ 下用 TTC 染色 15 min。脑片经过 37% 甲醛溶液固定后使用扫描仪进行扫描，并使用 Image J 程序测量梗死面积。梗死体积的计算公式为(左侧小鼠脑未梗死面积-右侧小鼠脑未梗死面积)/左侧小鼠脑未梗死面积×100%。

2.1.2 PT 脑缺血模型 小鼠经戊巴比妥麻醉以后放置于立体定位仪上，剪开头部皮肤，将冷光源放置于前囟右偏移 1.5 mm 处。腹腔内注射玫瑰红 (100 mg·kg⁻¹)，5 min 后，用冷光源 (Cobolt, 50 mW, 561 nm) 照射 15 min。光照结束后，将头皮缝合，放在保温装置中维持温度 37 ℃，等待小鼠苏醒。不同组别之间的动物体质量、体温或手术时间差异无统计学意义。

2.2 网格试验

本实验依据已发表的试验方法进行^[30]。将待测试小鼠放置于钢制网格 (长度和宽度分别为 32.5 cm 和 20.5 cm，网格边长为 1.3 cm × 1.3 cm) 上，钢制网格下方用摄像头记录拍摄整个行走过程，让小鼠在网格上行走 3 min，并记录小鼠左前肢每 100 步里的错步次数。具体计算公式为错步百分比=错步次数/100 × 100%。小鼠左前肢未支撑住而穿过网格或仅靠腕部在网格边缘支撑均计为错步。

2.3 圆筒试验

圆筒试验利用了小鼠有沿壁向上进行探索的特性，通过对小鼠前肢贴壁的对称性来判断其感觉运动功能。试验过程如下，首先准备一个透明圆柱体，大小为 12 cm(直径)×15 cm(高度)，在圆筒上方悬挂摄像头来记录小鼠前肢贴壁情况，视频记录时间为 5 min。分别统计小鼠左肢、右肢以及左右肢同时置于圆筒上的次数，小鼠的不对称率计算公式为左肢和右肢贴壁次数之差/(左肢+右肢+小鼠双肢贴壁次数)×100%^[30]。

2.4 免疫组织荧光

小鼠经过量戊巴比妥麻醉行安乐死，随后分别用 0.9% 生理盐水和 4% 多聚甲醛进行灌流。取出脑组织放置于多聚甲醛中，在 4 ℃ 环境下过夜，用 30% 蔗糖脱水处理至脑组织下沉至试管底部，冷冻切片将小鼠脑组织切片，切片厚度为 25 μm。随后用 1×PBS 将冷冻切片清洗 3 次，每次 5 min，在 0.1% Triton 进行破膜 20 min 处理后，用 5% 驴血清封闭 2 h。之后分别加上对应的一抗：兔抗 Iba-1(1:200)、兔抗 NeuN(1:400)。置于 4 ℃ 环境下过夜。第 2 天将切片于室温下复温 30 min 后，用 1×PBS 清洗 3 次，每次 5 min。再加上 1 μg·mL⁻¹ 的二抗 Alexafluor488 或者 Alexafluor594，避光 2 h 后，用 1×PBS 清洗 3 次，每次 5 min，最后用含 DAPI 的封片液封片。用激光共聚焦显微镜对缺血脑组织切片缺血周边区域进行观察，用 Image J 进行荧光强度分析，结果取平均值，同时把视野下阳性染色细胞核的数量作为整个视野区域的细胞数。

2.5 甲苯胺蓝染色

把小鼠的缺血脑组织用冷冻切片在脑组织冠状面连续切片，切片厚度为 25 μm。待冷冻切片于室温环境下复温后，用 1×PBS 清洗 3 次，每次 5 min。随后用 1% 甲苯胺蓝浸染 20 min，随后用清水漂洗脑片 3 次，用 75% 乙醇、85% 乙醇、95% 乙醇以及无水乙醇漂洗后晾干，在二甲苯中透明化 5 min，最后用封片液 (树胶：二甲苯=1:1) 封片。用 VS120 荧光显微镜于明场条件下观察和采集图像，用 Image J 计算梗死体积。

2.6 数据统计方法

所有的数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 GraphPad-Prism8.0 进行数据统计，用 *t*-test 检验 2 组数据间差异是否具有统计学意义，用 One-way ANOVA

(Tukey's post-hoc test) 或 Two-way ANOVA (Bonferroni's post-hoc test) 来分析多组数据间的差异。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 恩格列净加重小鼠大脑 pMCAO 所致缺血性脑损伤

因部分脑卒中患者无法在规定时间内得到有效的复灌治疗, 因此本实验探究恩格列净是否能减少永久缺血性脑卒中损伤。实验流程见图 1A, 受试动物随机分组, 进行 pMCAO 手术, 用药组小鼠于栓塞缺血 1 h 后灌胃给予 10, 30 mg·kg⁻¹ 恩格列净, 模型组小鼠给予同等体积生理盐水灌胃。于术前 30 min 至术后 120 min 内每 30 min 检测血糖情况, 在术后 24 h 检测小鼠的脑梗死体积以及神经症状评分。TTC 染色正常脑组织显现红色, 梗死区域则显现为白色。由结果可见, 小鼠血糖于术后 1 h 内逐渐升高。相对于模型组, 给予 10, 30 mg·kg⁻¹ 恩格列净均可显著降低小鼠血糖, 见图 1B, 提示恩格列净可降低脑卒中所致血糖升高。然而和模型组相比, 10, 30 mg·kg⁻¹

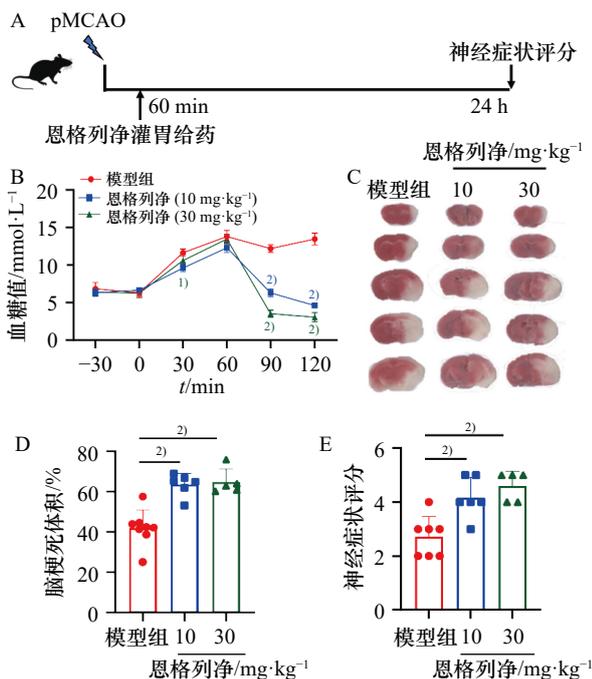


图 1 恩格列净加重小鼠 pMCAO 所致缺血性脑损伤 ($\bar{x} \pm s$, $n=5\sim 8$)

A-实验流程; B-血糖值; C-脑梗死图; D-脑梗死体积; E-神经症状评分; 与模型组相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.001。

Fig. 1 Empagliflozin aggravated ischemic brain injury induced by pMCAO ($\bar{x} \pm s$, $n=5\sim 8$)

A-experimental procedure; B-blood glucose level; C-cerebral infarction; D-cerebral infarction volume; E-neurological symptom score; compared with model group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.001.

恩格列净反而显著增加脑梗死体积 [模型组 vs 10 mg·kg⁻¹ vs 30 mg·kg⁻¹: (41.9±3.1)% vs (63.5±2.2)% vs (64.7±5.1)%], 并且显著上调神经症状评分 (模型组 vs 10 mg·kg⁻¹ vs 30 mg·kg⁻¹: 2.7±0.48 vs 4.1±0.39 vs 4.6±0.41, 见图 1E)。表明恩格列净对永久急性缺血性脑损伤无保护作用, 反而加重缺血损伤。

3.2 恩格列净对 PT 所致脑缺血小鼠神经功能的影响

进一步利用 PT 模型考察恩格列净是否可改善缺血后的神经功能损伤。实验流程见图 2A, 受试动物于 PT 手术后的 1~14 d 内每天灌胃给予 3, 10, 30 mg·kg⁻¹ 恩格列净, 并每天检测其网格错步率及趴壁不对称率反映其神经功能。结果表明, 相对于模型组, 10 mg·kg⁻¹ 恩格列净可显著改善

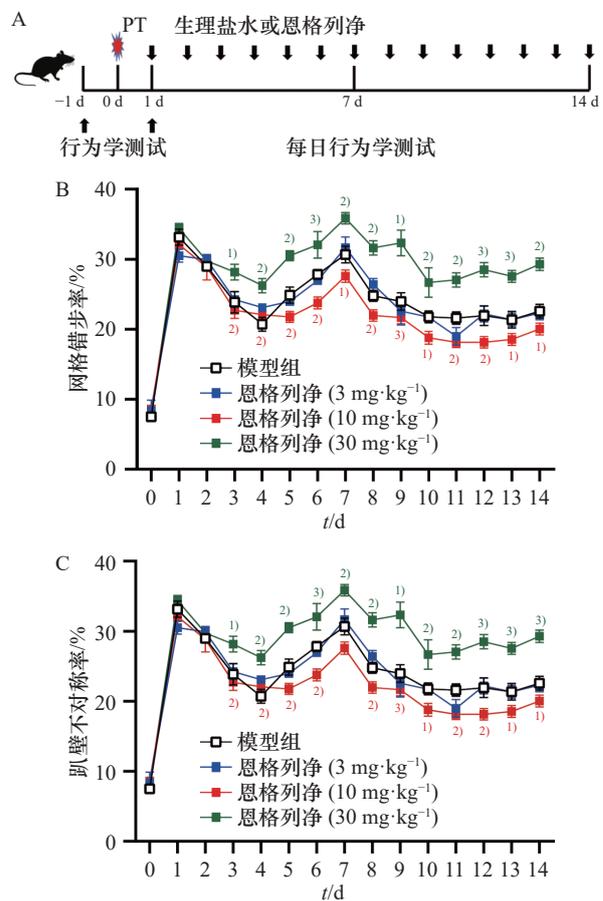


图 2 恩格列净对 PT 所致脑缺血后小鼠神经功能损伤的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=3\sim 12$)

A-实验流程; B-网格错步率; C-趴壁不对称率; 与模型组相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001。

Fig. 2 Effect of empagliflozin on neurological function in mice after PT induced cerebral ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n=3\sim 12$)

A-experimental procedure; B-foot faults in grid-walking task; C-assymmetric index in cylinder task; compared with model group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01, ³⁾P<0.001.

PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍；3 mg·kg⁻¹ 恩格列净未能显著改善 PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍；30 mg·kg⁻¹ 恩格列净反而显著加重 PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍。以上结果表明，恩格列净能够以剂量依赖性的方式影响 PT 术后动物运动功能损伤。

3.3 恩格列净于小鼠 PT 造模后 7 d 内给药对其神经功能的作用

PT 所致神经功能障碍在造模 7 d 内呈现继发性加重，随后部分自发恢复，与文献报道相符^[31]，其机制可能与神经炎症激活有关。前期研究提示 7 d 内可能是重要的病理过程发生阶段，进一步检测了恩格列净在造模后的 7 d 内给药是否足以逆转神经功能损伤。实验流程见图 3A，受试动物于 PT 手术后的 1~7 d 内每天灌胃给予 3, 10,

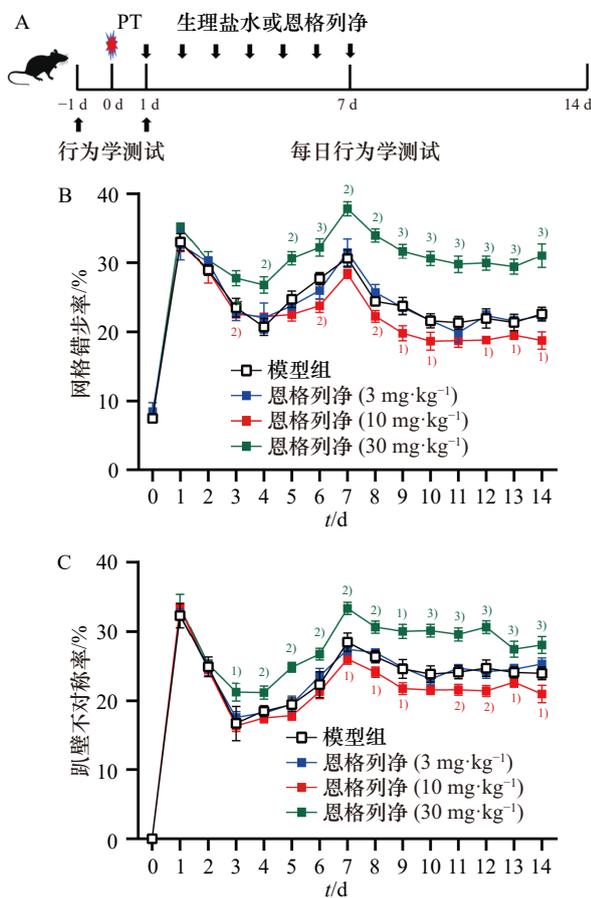


图 3 恩格列净于小鼠 PT 造模后 7 d 内给药对其神经功能的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=8-10$)
A-实验流程；B-网格错步率；C-趴壁不对称率；与模型组相比，¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Neurological effect of empagliflozin administration for 7 consecutive days in PT induced ischemia ($\bar{x} \pm s$, $n=8-10$)
A-experimental procedure; B-foot faults in grid-walking task; C-assymmetric index in cylinder task; compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

30 mg·kg⁻¹ 恩格列净，并每天检测其网格错步率及趴壁不对称率反映其神经功能。结果表明，相对于模型组，10 mg·kg⁻¹ 恩格列净可显著改善 PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍；3 mg·kg⁻¹ 恩格列净未能显著改善 PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍；30 mg·kg⁻¹ 恩格列净可显著加重 PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍。以上结果表明，缩短恩格列净的给药时间，药物仍能够以剂量依赖性的方式影响 PT 术后动物运动功能损伤。

3.4 葡萄糖不能取消恩格列净对 PT 所致小鼠的运动功能损伤的保护作用

上述结果提示了恩格列净在 10 mg·kg⁻¹ 剂量下发挥缺血后的神经功能保护作用。如前所述，卒中后高糖血症加重了神经损伤，因此，进一步探索恩格列净的神经保护作用是否与其降糖作用有关。为此，设计了如下实验，流程见图 4，受试动物于 PT 手术后的 1~7 d 内每天灌胃给予 10 mg·kg⁻¹ 的恩格列净并同时腹腔注射 10% 葡萄糖溶液，于术后 180~360 min 内每 30 min 检测血糖情况。通过每天检测小鼠的网格错步率以及圆筒趴壁不对称率反映其神经功能。由结果可见，相对于模型组，恩格列净可下降血糖至 3.8 mmol·L⁻¹ 左右，并至少维持至给药后 360 min。给予了 10% 的葡萄糖之后，小鼠血糖在 60 min 后上升至 14 mmol·L⁻¹ 左右，并在其后的 30 min 内恢复。进一步检测了同时给予恩格列净和葡萄糖后的血糖水平。结果发现，10% 葡萄糖腹腔注射可一过性升高血糖并显著逆转恩格列净的降血糖作用，其效应维持约 90 min，见图 4B。研究进一步检测了葡萄糖是否逆转恩格列净对 PT 小鼠神经功能障碍的影响。如前所述，10 mg·kg⁻¹ 恩格列净可显著改善 PT 后 14 d 内小鼠的神经功能障碍。然而意外地发现，相比于恩格列净给药组，恩格列净和葡萄糖共给药组小鼠的网格错步率以及小鼠趴壁的不对称率未发生逆转，表明同时给予葡萄糖未能显著取消恩格列净的保护作用，见图 4C、D。以上结果提示，恩格列净对 PT 所致运动功能损伤的保护作用可能与恩格列净的降糖作用无关。

3.5 恩格列净抑制 PT 术后小鼠脑内小胶质细胞的激活

脑缺血通常会导导致小胶质细胞的激活并伴有小胶质细胞形态和数量的变化^[32-33]，因此本实验探索恩格列净的神经保护作用是否和小胶质细胞的

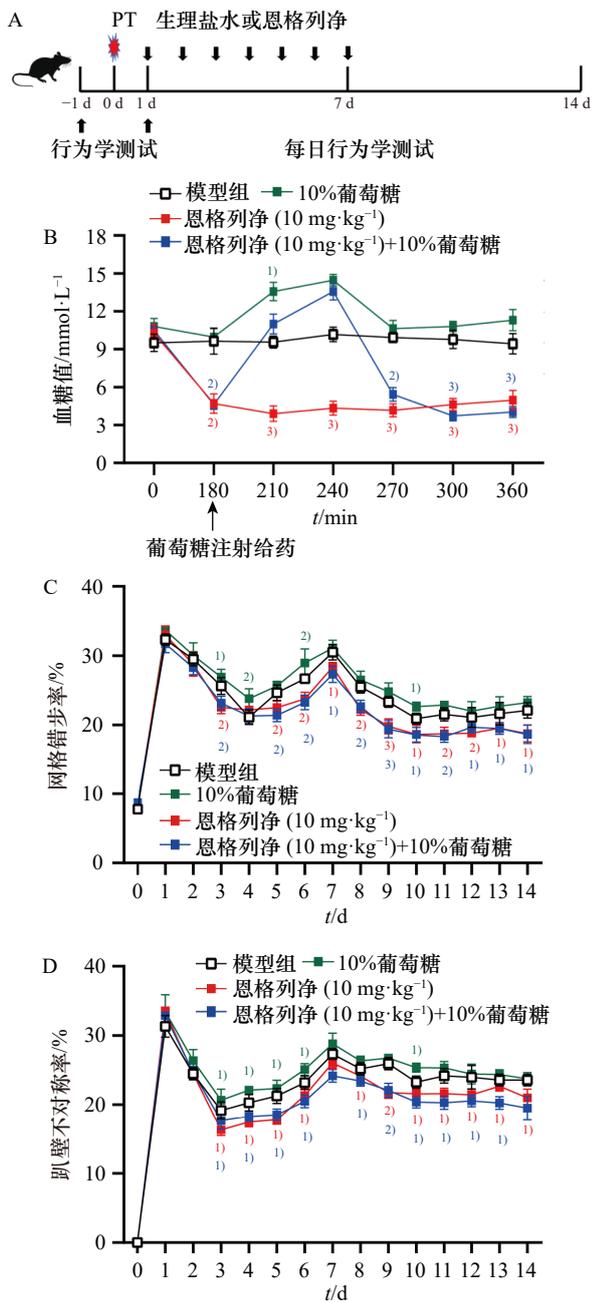


图 4 葡萄糖不能取消恩格列净对 PT 所致小鼠运动功能损伤的保护作用 ($n=3$)
A-实验流程; B-小鼠血糖值; C-网格错步率; D-趴壁不对称率; 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Glucose cannot abolish the neurological protection of empagliflozin in photoembolization induced ischemia($n=3$)
A-experimental procedure; B-blood glucose level; C-foot faults in grid-walking task; D-assymeric index in cylinder task; compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

激活程度有关。实验利用 VS120 和激光共聚焦显微镜来检测小鼠在 PT 术后第 7 天小胶质细胞的激活情况。结果表明, 在假手术组小鼠的脑片中小胶质细胞胞体较小, 凸起较长, 而在缺血区域的小胶质细胞呈现明显的阿米巴样激活状态, 具体

表现为胞体增大, 凸起变短, 见图 5A。对激活的小胶质细胞进行定量分析, 结果发现, 与模型组相比, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的给药组小胶质细胞激活数量减少, 其凸起数量增加, 见图 5B、C, 而在 3, $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的给药组中, 2 组指标均无显著性差异。以上结果表明在慢性脑缺血过程中, $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的恩格列净能够显著减少小胶质细胞的激活从而发挥神经保护作用。

4 讨论

缺血性脑卒中机制复杂, 缺乏公认的药物治靶点^[34]。目前唯一被美国 FDA 批准用于缺血性脑卒中治疗的药物是溶栓剂 r-tPA, 但是溶栓时间窗很窄, 导致患者受治率低, 疗效有限^[35-36]。临床研究显示应激性高血糖是脑卒中的常见并发症^[37-38], 控制卒中后的血糖水平有利于改善患者预后, 恢复其神经功能, 但究竟应采用何种降糖措施及目标血糖值业内尚无定论^[39-40]。目前, 胰岛素仍然是治疗脑卒中后高血糖的首选药物, 然而胰岛素的用量不易把握, 且需持续的血糖监测, 一旦不慎引起急性低血糖, 反而会加重患者的脑损伤^[41]。因此, 亟需寻找合适的降糖药物来达到脑卒中后快速降糖的目的。

恩格列净是 2014 年刚上市的新型口服降糖药, 能够选择性抑制肾脏的 SGLT-2 活性, 阻止肾脏对葡萄糖的重吸收, 从而增加尿糖排泄, 快速降低血糖水平^[42]。恩格列净的降糖机制为促进尿糖排泄, 不影响胰岛素分泌, 也不改善胰岛素敏感性, 因此低血糖不良反应较少, 用于卒中后降糖的安全性更高。研究报道, 恩格列净可减少心脏、肾脏的缺血性损伤^[43-44], 但其对缺血性脑卒中是否存在保护作用尚不清楚。以往的研究表明在急性脑缺血小鼠模型上, 二甲双胍能通过减少梗死体积发挥抗脑缺血作用^[45], 而对于缺血后的长期损伤并没有改善作用^[46-47]。与之不同的是, 用 pMCAO 和 PT 2 种急性脑缺血模型发现, 在 pMCAO 模型中恩格列净反而加重了脑缺血损伤。其原因可能与恩格列净使得血细胞比容升高, 引起血液黏稠度增加, 从而增加了动脉血栓的风险有关^[48]。目前, 恩格列净在治疗中风方面的作用存在争议。一项基于大数据的 meta 分析结果显示, 卡格列净和恩格列净可能增加非致命性中风的发生率 (HR 1.3; 95%CI 1~1.68; $P=0.049$)^[49-50]。另一方面, 在 CANVAS 试验中使用卡格列净则会

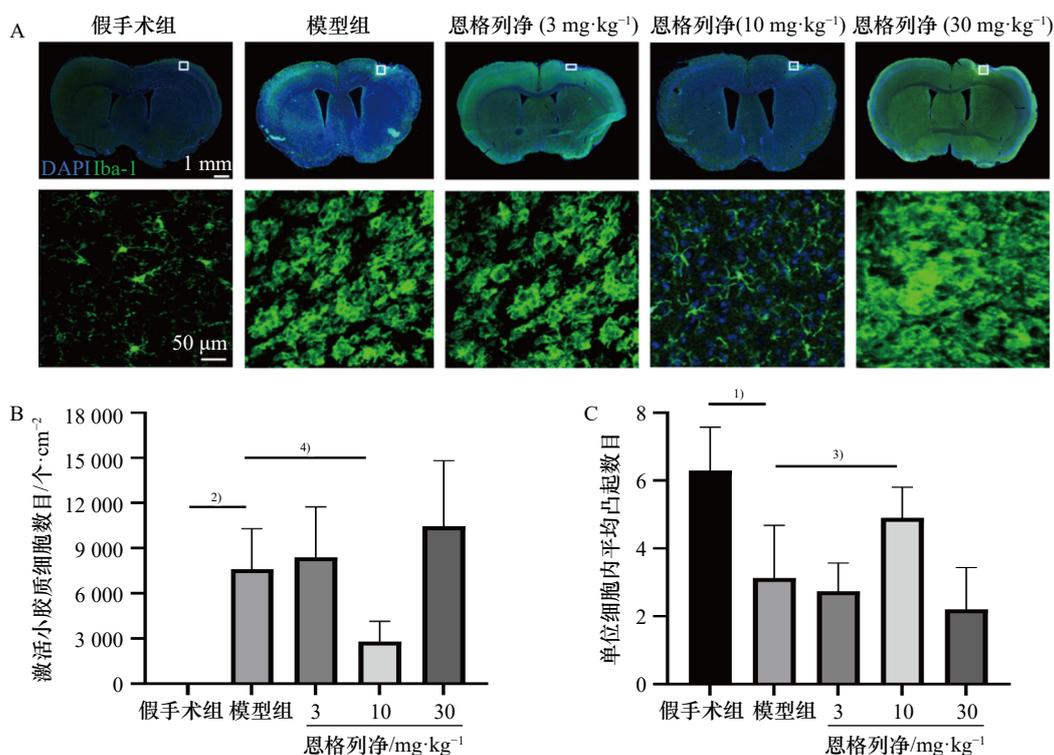


图5 恩格列净抑制PT术后小鼠脑内小胶质细胞的激活($\bar{x} \pm s$, $n=3\sim5$)

A-小胶质细胞的免疫荧光图像; B-缺血灶对应区域的小胶质细胞数量; C-缺血灶对应区域激活小胶质细胞的凸起数目; 与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 5 Empagliflozin inhibited the activation of microglia in PT induced ischemia($\bar{x} \pm s$, $n=3\sim5$)

A-immunofluorescence images of microglia; B-number of microglia surrounding the ischemic area; C-number of bulges of activated microglia surrounding the ischemic area; compared with sham group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.001$.

使中风的风险有降低的趋势。2016年, Zou等^[51]分析了来自3种SGLT2抑制剂(卡格列净、达格列净和恩格列净)的26项临床试验的数据之后,发现SGLT-2抑制剂并未降低缺血性卒中的风险。此外,最近的一项分析发现, SGLT-2抑制剂对中风风险没有影响^[52]。因此,该结果提示恩格列净对不同病理情况的脑缺血的作用及其机制需要进一步研究,且恩格列净的使用需格外注重其适应证。

而在小鼠PT模型中,发现脑缺血1~14d连续给予恩格列净以剂量依赖性的方式影响术后小鼠的神经运动功能(图2),其中 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 恩格列净可显著改善PT后14d内小鼠的神经功能障碍。可见,与二甲双胍的急性期保护作用不同,恩格列净可能具有改善脑缺血后长期神经功能损伤的作用。然而,给予 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 高剂量的恩格列净反而显著加重术后14d内小鼠的神经功能损伤,考虑可能与高剂量恩格列净引起缺血后脑内血糖过低有关。

PT造模后,所有组别动物的行为学总体趋势

一致:网格错步率和趴壁不对称率均在缺血后3~7d持续恶化,至第7天达顶峰,随后则逐步下降并趋于稳定,提示缺血后1~7d可能是疾病发生发展的关键病理期(图2)。故在此基础上,尝试缩短恩格列净的给药时间为缺血后1~7d,以进一步优化给药方案。结果发现,缩短给药时间并未影响恩格列净的抗脑缺血作用, $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 依然是最佳的给药剂量,高剂量仍会加重神经损伤,但损伤程度略轻于连续给药14d(图3),提示脑缺血后早期给予恩格列净的保护作用更优。不仅如此,本研究结果还提示,恩格列净如作为卒中后患者的治疗药物使用,必须严格控制其剂量,高剂量使用可能会增加卒中患者的神经功能障碍。

研究表明,高血糖会对大脑微血管有毒性作用,包括髓磷脂的损失和神经元轴突的塌陷,星形胶质细胞的分离,周细胞丧失,基底膜增厚等^[53],进而造成神经血管单元重塑,最终导致大脑认知功能下降^[54-55]。为进一步明确恩格列净的抗脑缺血作用是否与降糖有关,在PT造模后,每日同时给予恩格列净和葡萄糖,结果发现血糖升高

并未影响恩格列净促神经功能恢复的作用。近期有研究认为, SGLT-2 抑制剂的心血管保护和肾脏保护作用可能不依赖于其降糖特性^[56-57], 而恩格列净也可通过激活自噬, 降低内质网应激和抑制肝细胞凋亡来缓解非酒精性脂肪肝病的进展^[58]。因此, 结合本研究结果, 推测恩格列净促缺血后神经功能恢复的作用也可能不通过降糖机制实现。需要指出的是, 本研究利用了腹腔注射葡萄糖的方法逆转恩格列净的降血糖作用, 结果显示, 本方法只能一过性增加小鼠血糖, 而维持高血糖水平是否能逆转恩格列净的作用尚不清楚。因受技术条件所限, 本研究未对此展开研究。

有研究表明, 神经系统紊乱常伴发炎症和小胶质细胞的激活, 表现为小胶质细胞增生, 表型改变, 这种现象被称为反应性胶质增生^[59]。目前认为, 小胶质细胞对脑卒中的作用存在两面性, 这与其激活后成为不同极化表型有关^[60-61]: 在炎症早期, 小胶质细胞通常极化为 M1 表型(促炎型), 负责分泌多种炎症因子, 并促进炎症反应强化, 是缺血性脑损伤的危险因素之一; 而在急性炎症的晚期阶段, M1 表型的小胶质细胞会逐步转变为 M2 表型(抗炎型), 通过分泌抗炎细胞因子发挥神经保护作用, 并促进受损脑组织的修复^[62-63]。PT 后 7 d, 小鼠缺血半暗带脑区出现明显的小胶质细胞激活, 表现为小胶质细胞数量增多, 胞体凸起减少, 而恩格列净能剂量依赖性地抑制小胶质细胞的激活(图 5)。本研究中恩格列净的给药时间点为 PT 后 1~7 d, 属于缺血早期阶段, 故此时激活的小胶质细胞应以促炎的 M1 表型为主, 表明恩格列净的抗脑缺血作用主要是通过抑制小胶质细胞的炎性激活, 减轻缺血后的急性炎症损伤实现。

综上所述, 本研究发现脑缺血后早期连续给予恩格列净有助于促进受损的神经功能的恢复, 该作用呈剂量依赖性, 其机制可能与抑制小胶质细胞的炎性激活有关, 而可能与其降血糖作用无关。本研究提示恩格列净可能作为一种潜在的抗缺血性脑卒中药物用于卒中后神经功能恢复。

REFERENCES

[1] OVBIAGELE B, NGUYEN-HUYNH M N. Stroke epidemiology: Advancing our understanding of disease mechanism and therapy[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(3): 319-

329.
 [2] DONKOR E S. Stroke in the 21st century: A snapshot of the burden, epidemiology, and quality of life[J]. *Stroke Res Treat*, 2018, 2018: 3238165.
 [3] CHEN R, OVBIAGELE B, FENG W W. Diabetes and stroke: Epidemiology, pathophysiology, pharmaceuticals and outcomes[J]. *Am J Med Sci*, 2016, 351(4): 380-386.
 [4] LINDSBERG P J, ROINE R O. Hyperglycemia in acute stroke[J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 363-364.
 [5] MIEDEMA I, LUIJCKX G J, BROUNS R, et al. Admission hyperglycemia and outcome after intravenous thrombolysis: Is there a difference among the stroke-subtypes?[J]. *BMC Neurol*, 2016, 16: 104.
 [6] ZHAO L, WANG L, LU M H, et al. Hyperglycemia is associated with poor in-hospital outcome in elderly patients with acute ischemic stroke[J]. *Medicine*, 2019, 98(31): e16723.
 [7] UNDAS A, WIEK I, STÉPIEN E, et al. Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome[J]. *Diabetes Care*, 2008, 31(8): 1590-1595.
 [8] SHUKLA V, SHAKYA A K, PEREZ-PINZON M A, et al. Cerebral ischemic damage in diabetes: An inflammatory perspective[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 21.
 [9] VENKAT P, CHOPP M, CHEN J L. Blood-brain barrier disruption, vascular impairment, and ischemia/reperfusion damage in diabetic stroke[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(6): e005819.
 [10] PANDOLFI A, GIACCARI A, CILLI C, et al. Acute hyperglycemia and acute hyperinsulinemia decrease plasma fibrinolytic activity and increase plasminogen activator inhibitor type 1 in the rat[J]. *Acta Diabetol*, 2001, 38(2): 71-76.
 [11] WILLIAMS S B, GOLDFINE A B, TIMIMI F K, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans *in vivo*[J]. *Circulation*, 1998, 97(17): 1695-1701.
 [12] BEHREND S, MARTINEZ-PALLI G, NIEMANN C U, et al. Acute hyperglycemia worsens hepatic ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14(3): 528-535.
 [13] KAGANSKY N, LEVY S, KNOBLER H. The role of hyperglycemia in acute stroke[J]. *Arch Neurol*, 2001, 58(8): 1209-1212.
 [14] POULSEN S B, FENTON R A, RIEG T. Sodium-glucose cotransport[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(5): 463-469.
 [15] DAVIDSON J A, KURITZKY L. Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors and their mechanism for improving glycemia in patients with type 2 diabetes[J]. *Postgrad Med*, 2014, 126(6): 33-48.
 [16] PEREIRA M J, ERIKSSON J W. Emerging role of SGLT-2 inhibitors for the treatment of obesity[J]. *Drugs*, 2019, 79(3): 219-230.
 [17] CHAO E C. SGLT-2 inhibitors: A new mechanism for glycemic control[J]. *Clin Diabetes*, 2014, 32(1): 4-11.
 [18] NEUMILLER J J. Empagliflozin: A new sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes[J]. *Drugs Context*, 2014, 3: 212262.

- [19] CHILTON R, TIKKANEN I, CANNON C P, et al. Effects of empagliflozin on blood pressure and markers of arterial stiffness and vascular resistance in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2015, 17(12): 1180-1193.
- [20] VERMA S, RAWAT S, HO K L, et al. Empagliflozin increases cardiac Energy Production in diabetes: Novel translational insights into the heart failure Benefits of SGLT2 inhibitors[J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3(5): 575-587.
- [21] NESPOUX J, VALLON V. SGLT2 inhibition and kidney protection[J]. *Clin Sci*, 2018, 132(12): 1329-1339.
- [22] NEELAND I J, MCGUIRE D K, CHILTON R, et al. Empagliflozin reduces body weight and indices of adipose distribution in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2016, 13(2): 119-126.
- [23] VERMA S, SHARMA A, ZINMAN B, et al. Empagliflozin reduces the risk of mortality and hospitalization for heart failure across Thrombolysis in Myocardial Infarction Risk Score for Heart Failure in Diabetes categories: Post hoc analysis of the EMPA-REG OUTCOME trial[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22(7): 1141-1150.
- [24] PHAM D, ALBUQUERQUE ROCHA N, MCGUIRE D K, et al. Impact of empagliflozin in patients with diabetes and heart failure[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2017, 27(2): 144-151.
- [25] MENNE J, DUMANN E, HALLER H, et al. Acute kidney injury and adverse renal events in patients receiving SGLT2-inhibitors: A systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS Med*, 2019, 16(12): e1002983.
- [26] ZUREK A M, YENDAPALLY R, URTEAGA E M. A review of the efficacy and safety of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: A focus on diabetic ketoacidosis[J]. *Diabetes Spectr*, 2017, 30(2): 137-142.
- [27] SCHEEN A J, PAQUOT N. Metabolic effects of SGLT-2 inhibitors beyond increased glucosuria: A review of the clinical evidence[J]. *Diabetes Metab*, 2014, 40(6 Suppl 1): S4-S11.
- [28] CEFALO C M A, CINTI F, MOFFA S, et al. Sotagliflozin, the first dual SGLT inhibitor: Current outlook and perspectives[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2019, 18(1): 20.
- [29] CHIANG T, MESSING R O, CHOU W H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion[J]. *J Vis Exp*, 2011(48): 2761.
- [30] SCHAAR K L, BRENNEMAN M M, SAVITZ S I. Functional assessments in the rodent stroke model[J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2010, 2(1): 13.
- [31] LIN Y H, DONG J, TANG Y, et al. Opening a new time window for treatment of stroke by targeting HDAC2[J]. *J Neurosci*, 2017, 37(28): 6712-6728.
- [32] PATEL A R, RITZEL R, MCCULLOUGH L D, et al. Microglia and ischemic stroke: A double-edged sword[J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2013, 5(2): 73-90.
- [33] ZHANG S X. Microglial activation after ischaemic stroke[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2019, 4(2): 71-74.
- [34] CATANESE L, TARSIA J, FISHER M. Acute ischemic stroke therapy overview[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 541-558.
- [35] BERSANO A, GATTI L. Pathophysiology and treatment of stroke: Present status and future perspectives[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14848.
- [36] PEÑA I D, BORLONGAN C, SHEN G F, et al. Strategies to extend thrombolytic time window for ischemic stroke treatment: An unmet clinical need[J]. *J Stroke*, 2017, 19(1): 50-60.
- [37] ZHU B H, PAN Y S, JING J, et al. Stress hyperglycemia and outcome of non-diabetic patients after acute ischemic stroke[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 1003.
- [38] DI LUZIO R, DUSI R, MAZZOTTI A, et al. Stress hyperglycemia and complications following traumatic injuries in individuals with/without diabetes: The case of orthopedic surgery[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 9-17.
- [39] AGRAWAL N, JAMSHED N, AGGARWAL P, et al. Severe hypoglycemia masquerading as cerebellar stroke[J]. *J Family Med Prim Care*, 2014, 3(4): 440-442.
- [40] WAN SULAIMAN W A, HASHIM H Z, CHE ABDULLAH S T, et al. Managing post stroke hyperglycaemia: Moderate glycaemic control is better? An update[J]. *EXCLI J*, 2014, 13: 825-833.
- [41] SMITH L, CHAKRABORTY D, BHATTACHARYA P, et al. Exposure to hypoglycemia and risk of stroke[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2018, 1431(1): 25-34.
- [42] PRATTE K A, JOHNSON A, BEALS J, et al. Regression to normal glucose regulation in American Indians and Alaska natives of a diabetes prevention program[J]. *Diabetes Care*, 2019(42): 1209-1216.
- [43] CHU C, LU Y P, YIN L H, et al. The SGLT2 inhibitor empagliflozin might be a new approach for the prevention of acute kidney injury[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2019, 44(2): 149-157.
- [44] FITCHETT D, INZUCCHI S E, CANNON C P, et al. Empagliflozin reduced mortality and hospitalization for heart failure across the spectrum of cardiovascular risk in the EMPA-REG OUTCOME trial[J]. *Circulation*, 2019, 139(11): 1384-1395.
- [45] ARBELÁEZ-QUINTERO I, PALACIOS M. To use or not to use metformin in cerebral ischemia: A review of the application of metformin in stroke rodents[J]. *Stroke Res Treat*, 2017, 2017: 9756429.
- [46] LIVINGSTON J M, SYEDA T, CHRISTIE T, et al. Subacute metformin treatment reduces inflammation and improves functional outcome following neonatal hypoxia ischemia[J]. *Brain Behav Immun Health*, 2020, 7: 100119.
- [47] JIA J, CHENG J, NI J S, et al. Neuropharmacological actions of metformin in stroke[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2015, 13(3): 389-394.
- [48] UEDA P, SVANSTRÖM H, MELBYE M, et al. Sodium glucose cotransporter 2 inhibitors and risk of serious adverse events: Nationwide register based cohort study[J]. *BMJ*, 2018, 363: k4365.
- [49] ZINMAN B, INZUCCHI S E, LACHIN J M, et al. Empagliflozin and cerebrovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus at high cardiovascular risk[J]. *Stroke*, 2017, 48(5): 1218-1225.
- [50] SKELLEY J W, CARTER B S, ROBERTS M Z. Clinical potential of canagliflozin in cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2018, 14: 419-428.

- [51] ZOU C Y, LIU X K, SANG Y Q, et al. Effects of SGLT2 inhibitors on cardiovascular outcomes and mortality in type 2 diabetes: A meta-analysis[J]. *Medicine*, 2019, 98(49): e18245.
- [52] GUO M, DING J Y, LI J S, et al. SGLT2 inhibitors and risk of stroke in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2018, 20(8): 1977-1982.
- [53] HAYDEN M R, GRANT D G, AROOR A R, et al. Empagliflozin ameliorates type 2 diabetes-induced ultrastructural remodeling of the neurovascular unit and neuroglia in the female *db/db* mouse[J]. *Brain Sci*, 2019, 9(3): 57.
- [54] SALAMEH T S, SHAH G N, PRICE T O, et al. Blood-brain barrier disruption and neurovascular unit dysfunction in diabetic mice: Protection with the mitochondrial carbonic anhydrase inhibitor topiramate[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 359(3): 452-459.
- [55] IADECOLA C, GOTTESMAN R F. Neurovascular and cognitive dysfunction in hypertension[J]. *Circ Res*, 2019, 124(7): 1025-1044.
- [56] FLORES E, SANTOS-GALLEGO C G, DIAZ-MEJÍA N, et al. Do the SGLT-2 inhibitors offer more than hypoglycemic activity?[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018, 32(2): 213-222.
- [57] GEORGIANOS P I, DIVANI M, ELEFThERIADIS T, et al. SGLT-2 inhibitors in diabetic kidney disease: What lies behind their renoprotective properties?[J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(29): 5564-5578.
- [58] NASIRI-ANSARI N, NIKOLOPOULOU C, PAPOUTSI K, et al. Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in high fat diet fed ApoE^{-/-} mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 818.
- [59] BURDA J E, SOFRONIEW M V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease[J]. *Neuron*, 2014, 81(2): 229-248.
- [60] HU X M, LEAK R K, SHI Y J, et al. Microglial and macrophage polarization—New prospects for brain repair[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(1): 56-64.
- [61] ZHAO S C, MA L S, CHU Z H, et al. Regulation of microglial activation in stroke[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(4): 445-458.
- [62] ZHANG W, TIAN T, GONG S X, et al. Microglia-associated neuroinflammation is a potential therapeutic target for ischemic stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(1): 6-11.
- [63] WANG W Y, TAN M S, YU J T, et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease[J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(10): 136.

收稿日期: 2023-10-25

(本文责编: 沈倩)



青年编委会主任委员: 张翔南

张翔南, 教授, 博士生导师, 浙江大学药学院副院长、药学系主任, 国家优秀青年基金获得者, 作为负责人获多项国家自然科学基金以及浙江省杰出青年基金等科研项目。主要从事线粒体自噬在缺血性脑损伤中的作用机制及相关药物靶点发现研究。证实线粒体自噬在脑缺血的复灌过程中发挥神经保护作用, 提出通过干预线粒体自噬治疗缺血性脑损伤的新策略, 并发现 Nix 及其磷酸化是调控缺血过程中线粒体自噬的分子靶点, 为寻找通过精准干预线粒体自噬抗脑缺血的药物新靶点提供依据。近年来发表 SCI 论文 30 余篇, 包括以第一或通讯作者在 *J Cell Biol*、*Autophagy*、*Redox Biology*、*Nat Commun* 等刊物上发表论文, 并获得浙江省自然科学一等奖及教育部自然科学一等奖。