

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.002

小檗碱对脂代谢及血管粥样硬化的影响及机制探讨

邱红梅, 杨发建, 张 琴, 何 琦, 金 磊, 杨俊霞

(重庆医科大学药学院药理学教研室, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究小檗碱(Berberine, Ber)对高脂兔模型脂代谢和血管硬化的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:采用高脂饲料喂养 2 月建立高脂兔动物模型。40 只新西兰大耳白兔随机分成普通饲料组(普食组)、高脂模型组、高脂+Ber 组[28、112 mg/(kg·d)]、高脂+非诺贝特组[30 mg/(kg·d)]。2 月后测定各组血清总胆固醇(Total cholesterol, TC)、三酰甘油(Triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)水平;HE 染色观察主动脉组织形态学变化;实时荧光定量 PCR 检测主动脉诱导型一氧化氮合酶(Inductible nitric oxide synthase, iNOS)和 B 类 1 型清道夫受体(Scavenger receptor class-B type 1, SR-B1)基因表达的变化。结果:与普食组相比,高脂模型组 TC、TG 和 LDL-C 水平显著升高($P<0.05$),主动脉内膜出现明显的脂质沉积和泡沫细胞形成,iNOS 和 SR-B1 mRNA 表达显著升高($P<0.05$);与高脂模型组相比,高脂+Ber 处理组血清 TC、TG 和 LDL-C 的水平显著降低($P<0.05$),而 HDL 水平显著升高($P<0.05$),主动脉粥样硬化减轻,泡沫细胞明显减少,iNOS 和 SR-B1 mRNA 表达显著降低($P<0.05$)。结论:Ber 具有明显的调血脂和抗血管硬化作用,其作用机制与抑制 iNOS 和 SR-B1 基因表达相关。

【关键词】小檗碱;动脉粥样硬化;调血脂;诱导型一氧化氮合酶;B 类 1 型清道夫受体

【中国图书分类法分类号】R285.5;R972.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-15

Effects of Berberine on lipid metabolism and atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits and its mechanism

QIU Hongmei, YANG Fajian, ZHANG Qin, HE Qi, JIN Lei, YANG Junxia

(Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of Berberine(Ber) on lipids metabolism and atherosclerosis in hyperlipidemic rabbits and to study the possible mechanism. Methods: The hyperlipidemic rabbit model was established by feeding high fat diet for 2 months. 40 New-Zealand rabbits were randomly divided into control group, high fat diet model group, high fat diet and Ber treated group [28, 112 mg/(kg·d)], high fat diet and Fenofibrate treated group [30 mg/(kg·d)]. The levels of serum total cholesterol(TC), triglycerides(TG), low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) and high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C) were determined after 2 months, pathomorphological changes of aortic arteries was observed and inducible nitric oxide synthase(iNOS) and scavenger receptor class-B type 1(SR-B1) mRNA expression in aortic tissue were quantified by quantitative real time PCR. Results: The levels of serum TC, TG and LDL-C were obviously elevated($P<0.05$), apparent atherosclerotic plaque was observed in aortic arteries and iNOS and SR-B1 mRNA expressions were obviously increased($P<0.05$) in high fat diet group compared with those in control group. Serum TC, TG and LDL-C levels were decreased($P<0.05$), HDL-C level was increased($P<0.05$), degree of aortic atherosclerosis was mitigated, foam cells were reduced and iNOS activity and SR-B1 mRNA expressions were reduced($P<0.05$) in high fat diet and Ber treated group than in high fat diet model group. Conclusions: Ber can obviously reduce the blood lipid levels and aortic atherosclerosis in the hyperlipidemic rabbits. The mechanisms may be related with the down-regulation of the iNOS and SR-B1 mRNA expressions.

【Key words】Berberine; atherosclerosis; lipid regulation; inducible nitric oxide synthase(iNOS); scavenger receptor class-B type 1(SR-B1)

小檗碱(Berberine, Ber)属异喹啉类生物碱,是中药黄连的主要有效成分,又名黄连素。国内外研

究均发现 Ber 具有多种药理作用,如调脂、抗炎、降糖、抗肿瘤等^[1-4],但其作用机制尚未完全阐明。心脑血管疾病是威胁中老年人健康的常见病和多发病,动脉粥样硬化是其常见的病因之一。大量研究证实,脂质代谢异常,尤其是低密度脂蛋白(Low density lipoprotein, LDL)异常升高会导致血管内膜下脂质

作者介绍:邱红梅(1978-),女,讲师,硕士,

研究方向:中药药理学、神经药理学。

通信作者:杨俊霞,女,副教授,Email: yangjunxia1234@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30600812)。

沉积、泡沫细胞形成,诱导血管内壁慢性炎症的发生,损伤内皮细胞,最终导致动脉粥样硬化斑块的形成。诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)在炎症刺激下活性增强,促进大量病理 NO 自由基产生,引起组织损伤,促进动脉粥样硬化的产生和发展^[5]。B 类 1 型清道夫受体(Scavenger receptor class-B type 1, SR-B1)是近年发现的一类高密度脂蛋白受体,可介导巨噬细胞吞噬氧化 LDL 形成泡沫细胞,促进动脉粥样硬化的发生^[6]。本实验采用高脂饲料喂养建立高脂兔模型,观察 Ber 的调脂作用和抗动脉粥样硬化的防治作用,并通过检测 iNOS 和 SR-B1 mRNA 的表达探讨其可能的作用机制,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只清洁级新西兰大耳白兔,雄性,体重 2.0~2.2 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK 渝 20070003)。

1.2 药品与试剂

Ber(四川鸿鸣植物制品有限公司,纯度 $\geq 97\%$,批号 080626);非诺贝特(河南开封制药有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号 080527);iNOS 合酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);RNA 提取试剂 RNAiso Plus、实时荧光定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);PCR 引物(上海生工设计并合成)。

1.3 实验方法

1.3.1 分组及模型制作^[7] 40 只新西兰雄性大耳白兔,单笼饲养,自由饮水及摄食,普通饲料适应性喂养 1 周。1 周后随机分为 5 组,即普通饲料组(普食组)、高脂模型组、高脂饲料+Ber 组[28、112 mg/(kg·d)]、高脂饲料+非诺贝特组[30 mg/(kg·d)]。高脂饲料成分为:每 10 kg 基础饲料加 150 g 胆固醇、500 g 猪油、1 kg 鸡蛋。高脂饲料+Ber 组、高脂饲料+非诺贝特组在高脂饲料喂养的基础上分别灌胃给予 Ber 28、112 mg/(kg·d)和非诺贝特 30 mg/(kg·d),连续 2 月并每周称重。

1.3.2 血脂测定 于实验末禁食 12 h 后兔耳缘静脉采血,离心后取血清,采用全自动生化分析仪测定血清中总胆固醇(Total cholesterol, TC)、三酰基甘油(Triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)水平。

1.3.3 主动脉病理形态学检查 采血后处死兔,剥离主动脉,以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色后于光镜下观察主动脉组织形态学的改变。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 法检测主动脉组织 iNOS 和 SR-B1 基因表达 采血后处死兔,取兔主动脉,在液氮下研磨,按 RNAiso Plus 试剂说明书提取总 RNA,紫外分光光度计定量并计算 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值,琼脂糖凝胶电泳检测确保 RNA 的完整性。反转录体系:2×RT Buffer 10 μl , RT Enzyme Mix 1 μl , 随机引物 1 μl , RNA 5 μl , DEPC 水 3 μl , 混匀。反转录条

件:25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 60 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。iNOS 基因上游引物:5'-AATACGAGTGGTTTCGG GAGC-3', 下游引物:5'-GGAGCACGGCGATGTTGA-3'; SR-B1 基因上游引物:5'-GAGAT CCTGAAGGCGAGAA-3', 下游引物:5'-GATGTT-GGGAATGACGAT GTAG-3'; 内参 β -actin 基因上游引物:5'-AGTGGACGTGGACATCCG-3', 下游引物:5'-TGGCTCT-AACAGTCCGCCTAG-3'。实时荧光定量 PCR 反应体系(50 μl): 2×PCR Buffer 25 μl , 上下游引物(浓度 25 $\mu\text{mol/L}$)各 0.6 μl , Sybr green I 0.3 μl , cDNA 1 μl , DEPC 水 22.5 μl , 混匀。反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 循环 35 次。反应结束后自动生成溶解曲线,结果以 Ct 值表示。以公式 $F=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 来计算各处理组和正常组之间目的基因的相对表达量。

1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理,用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ber 对脂质代谢的影响

对血脂代谢的影响见表 1。与普食组相比,高脂模型组、高脂+低剂量 Ber 组、高脂+高剂量 Ber 组、高脂+非诺贝特组血清 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高(F 值分别为 103.031、58.53、124.028, P 值均为 0.000)。高脂+低剂量 Ber 组和高脂+非诺贝特组还可显著升高血清 HDL-C 水平(F 值为 12.283, P 值分别为 0.000、0.004)。与高脂模型组相比,高脂+低剂量 Ber 组血清 TC、TG 及 LDL-C 水平均显著降低(F 值分别为 103.031、58.53、124.028, P 值均为 0.000), HDL-C 水平显著升高(F 值为 12.283, P 值为 0.022);高脂+高剂量 Ber 组血清 TC、TG 及 LDL-C 水平显著降低(F 值分别为 103.031、58.53、124.028, P 值均为 0.001、0.000、0.000);高脂+非诺贝特组血清 TG 水平显著降低(F 值为 58.53, P 值为 0.000), HDL-C 水平显著升高(F 值为 12.283, P 值为 0.000)。提示低、高剂量 Ber 及非诺贝特均可显著抑制高脂饮食诱导的血清 TC、TG、LDL-C 水平升高,其中以低剂量 Ber 作用更突出。

2.2 Ber 对主动脉组织形态学的影响

主动脉 HE 染色结果见图 1。普食组血管结构正常,无脂质沉积;高脂模型组血管内膜明显增厚,可见显著脂质沉积和大量泡沫细胞。与高脂模型组相比,高脂+非诺贝特组、高脂+低剂量 Ber 组及高脂+高剂量 Ber 组血管内膜轻度增厚、脂质沉积减少,少量泡沫细胞形成。提示 Ber 对改善血管内膜脂质沉积,减少泡沫细胞形成,防止动脉粥样硬化有明显疗效,其中低剂量 Ber 效果更明显。

2.3 Ber 对主动脉 iNOS 和 SR-B1 基因表达的影响

主动脉 iNOS、SR-B1 mRNA 表达变化见表 2。与普食组相比,高脂模型组 iNOS、SR-B1 mRNA 表达显著升高。与模型组相比,高脂+非诺贝特组、高脂+低剂量 Ber 组及高脂+高剂量 Ber 组均可显著抑制高脂饮食诱导的 iNOS、SR-B1 mRNA 表达增高(F 值分别为 11.040、13.253, P 值分别为 0.002、0.001、0.001、0.000、0.001、0.003),其中高脂+低剂量 Ber 组作

用更为明显。提示 Ber 可抑制高脂饮食诱导的主动脉 iNOS、SR-B1 mRNA 表达增高。

3 讨论

Ber 的降脂作用最初是在实验性治疗 2 型糖尿病模型中偶然发现的,并在随后的动物实验及临床试验中得到进一步确认,其机制不同于经典的他汀类和贝特类降脂药物,可通过促进 LDL 受体表达,激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)等途径发挥功效^[8,9]。此外,研究表明,Ber 可通过抑制核转录因子活化蛋白-1(Activated protein-1,AP-1)减少环氧化酶 2(Cyclooxygenase-2,COX-2)的表达,通过核转录因子 NF-κB 信号通路抑制 IL-1β、TNF-α 产生等多个环节发挥一定的抗炎作用^[10,11]。因此,Ber 作为中药黄连的主要成分,源于天然,资源丰富,无明显毒副作用,有望通过其降脂和抗炎作用成为安全有效的调脂和抗动脉粥样硬化药物,其作用机制值得深入全面的研究。

通过高脂饲料持续喂养家兔 2 月产生高脂血症,并诱导动脉血管内壁脂质沉积泡沫细胞形成,最终导致动脉粥样硬化斑块形成,同时灌胃给予

Ber,观察 Ber 的降脂和抗动脉粥样硬化作用。结果显示,Ber 对高脂饮食诱导的血清TG、TC 以及 LDL-C 的浓度升高和血管内膜脂质沉积,动脉粥样硬化斑块形成有显著抑制作用,证明 Ber 对高脂饮食导致的血脂升高和动脉粥样硬化的产生有良好的防治作用。其中,高脂+低剂量 Ber 组防治效果更为显著,这可能与机体存在反馈调节机制有关。前期实验研究也发现低剂量 Ber 可通过促进 Insig-2 基因表达而抑制胆固醇合成,而高剂量 Ber 却无此作用^[7]。

一氧化氮(Nitric oxide,NO)在动脉粥样硬化过程中发挥了非常重要的作用。一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase,NOS)是体内合成 NO 的关键酶,分为神经型 NOS(Neuronal nitric oxide synthase,nNOS)、内皮型 NOS(Endothelial nitric oxide synthase,eNOS)和 iNOS。在对食饵性动脉粥样硬化的研究中发现,血管内皮细胞损伤导致 eNOS 表达下降、活性降低,生理性 NO 合成显著减少;同时炎症刺激导致血管内皮细胞、平滑肌细胞及巨噬细胞内 iNOS 活性增强,病理性 NO 合成显著增加,并与过氧阴离子反应生成 NO 自由基,促进细胞凋亡、胶原组织降解、引起组织损伤,加速动脉粥样硬化的形成^[12]。活化的核转录因子 NF-κB 可诱导 iNOS 基因表达、活性增

表 1 不同处理组兔血清 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 水平 (mmol/L, $\bar{x} \pm s,n=8$)
Tab.1 Levels of rabbit serum TC, TG, LDL-C and HDL-C in various groups (mmol/L, $\bar{x} \pm s,n=8$)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
普食组	1.34 ± 0.09	0.53 ± 0.05	1.20 ± 0.56	0.27 ± 0.04
高脂模型组	32.73 ± 2.93*	4.26 ± 0.36*	33.61 ± 2.68*	0.34 ± 0.05
高脂 + 非诺贝特组	31.12 ± 1.77*	2.32 ± 0.21*#	30.01 ± 1.56*	0.61 ± 0.12*#
高脂 + 低剂量 Ber 组	21.28 ± 1.80*#	2.11 ± 0.44*#	20.30 ± 1.27*#	0.47 ± 0.03*#
高脂 + 高剂量 Ber 组	25.52 ± 2.59*#	2.49 ± 0.36*#	24.95 ± 2.55*#	0.40 ± 0.07

注:*,与普食组相比,P<0.05;#,与高脂模型组相比,P<0.05

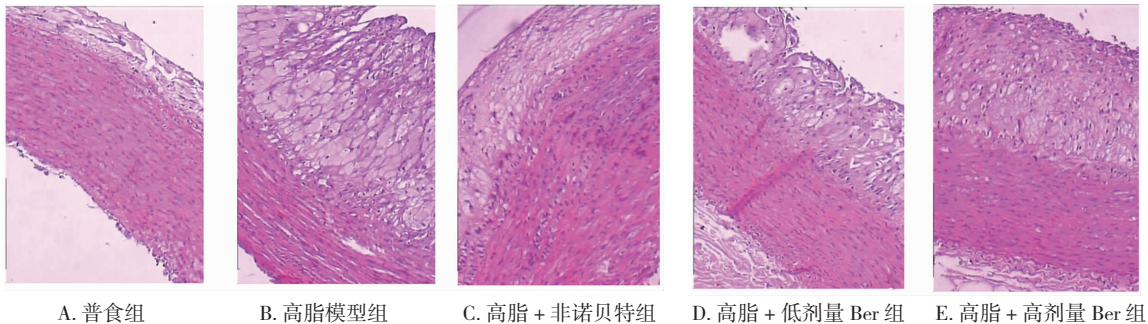


图 1 Ber 对主动脉病理形态学的影响 (HE,100×)

Fig.1 Effects of Ber on aorta pathomorphology of atherosclerotic rabbits (HE,100×)

表 2 Ber 对兔主动脉 iNOS、SR-B1 基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s,n=8$)
Tab.2 Effects of Ber on iNOS and SR-B1 mRNA expression in rabbit ($\bar{x} \pm s,n=8$)

mRNA 表达	普食组	高脂模型组	高脂 + 非诺贝特组	高脂 + 低剂量 Ber 组	高脂 + 高剂量 Ber 组
iNOS	1	1.688 ± 0.531	0.727 ± 0.058#	0.533 ± 0.166#	0.683 ± 0.112#
SR-B1	1	1.304 ± 0.372	0.372 ± 0.140#	0.482 ± 0.072#	0.697 ± 0.058#

注:#,与高脂模型组相比,P<0.05

强^[13],AMPK 则发挥抑制作用^[14]。研究发现 Ber 可通过抑制 NF- κ B 活性、激活 AMPK 发挥抗动脉粥样硬化作用^[9]。因此,通过实时荧光定量 PCR 检测了高脂兔主动脉内 iNOS mRNA 的表达,结果显示高脂模型组 iNOS mRNA 的表达明显升高,而 Ber 可显著抑制高脂饮食诱导的 iNOS mRNA 的表达,由此可见 Ber 有可能通过抑制 NF- κ B 活化、激活 AMPK 而降低主动脉中 iNOS mRNA 的表达,减少 NO 的合成,延缓动脉粥样硬化的发展。

SR-B1 是一类高密度脂蛋白受体,可介导胆固醇和脂质在高密度脂蛋白与细胞间的双向流动。SR-B1 主要广泛分布于肝脏组织中,但在单核细胞分化而来的巨噬细胞侵入血管内皮的过程中也见大量该受体^[16,15]。近年来研究发现 LDL 可在血管内皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞氧化作用下生成氧化 LDL。氧化 LDL 可在 SR-B1 介导被巨噬细胞摄取,形成泡沫细胞,促进粥样斑块形成,同时可吸引大量单核细胞粘附于血管壁,对内皮细胞产生毒性作用^[16]。大鼠、兔的高脂膳食模型制作过程中均发现,高脂饮食开始的前几天可见 LDL 样粒子附着于血管壁,其后有单核细胞附着于血管内膜、巨噬细胞导致脂质条纹形成并出现成百上千巨噬细胞簇,此时发现有大量的清道夫受体,随着病灶逐步进入平滑肌细胞层,其深部巨噬细胞仅有少量残存受体。目前认为,氧化 LDL 显著增加,SR-B1 介导的巨噬细胞摄取显著增多是脂质沉积的重要原因,也是动脉粥样硬化发病的重要机制^[15,16]。通过实时荧光定量 PCR 检测发现高脂兔主动脉内 SR-B1 mRNA 表达显著增加,而 Ber 可显著抑制高脂饮食诱导的 SR-B1 mRNA 的表达升高,提示 Ber 可以通过抑制 SR-B1 合成,减少巨噬细胞对氧化 LDL 的吞噬作用,从而减少泡沫细胞形成,延缓动脉粥样硬化的进程。

综上所述,Ber 有显著的降脂和抗动脉粥样硬化的作用,其机制可能与抑制主动脉 iNOS 和 SR-B1 基因表达有关。

参 考 文 献

- [1] Zhang Q, Xiao X, Feng K, et al. Berberine moderates glucose and lipid metabolism through multipathway mechanism[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2010, [Epub ahead of print]doi:10.1155/2011/924851.
- [2] Lou T, Zhang Z, Xi Z, et al. Berberine inhibits inflammatory response and ameliorates insulin resistance in hepatocytes[J]. *Inflammation*, 2011, 34(6): 659–667.
- [3] Chen Y, Wang Y, Zhang J, et al. Berberine improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rats in association with multiple factors of insulin resistance[J]. *ISRN Endocrinol*, 2011, [Epub ahead of print]doi:10.5402/2011/519371.
- [4] Tan W, Li Y, Chen M, et al. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 1773–1777.
- [5] Perrotta I, Brunelli E, Sciangula A, et al. Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression in human atherogenesis: an immunohistochemical and ultrastructural study[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2009, 18(6): 361–368.
- [6] Hoekstra M, Van Eck M, Korpelaar S J. Genetic studies in mice and humans reveal new physiological roles for the high-density lipoprotein receptor scavenger receptor class B type I[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(2): 127–132.
- [7] 常伟, 王红, 尹华峰, 等. 小檗碱对胆固醇代谢及肝脏 Insig-2 基因表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(1): 85–88.
- [8] Chang W, Wang H, Yin H F, et al. Effects of berberine on cholesterol metabolism and Insig-2 gene expression of hyperlipidemic rats[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2009, 25(1): 85–88.
- [9] Wang Q, Zhang M, Liang B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase is required for berberine-induced reduction of atherosclerosis in mice: the role of uncoupling protein 2[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25436.
- [10] Brusq J M, Amcellin N, Grondin P, et al. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP-kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine[J]. *J Lipid Res*, 2006, 47(6): 1281–1288.
- [11] Domitrović R, Jakovac H, Blagojević G. Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2, and iNOS expression in CCl₄-intoxicated mice[J]. *Toxicology*, 2011, 280(1–2): 33–43.
- [12] Goto H, Kariya R, Shimamoto M, et al. Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- κ B pathway[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4): 775–781.
- [13] 刘同涛, 于清霞, 田庆印, 等. NOS/NO 和 HO/CO 系统及药物干预在实验性兔动脉粥样硬化进程中的作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2008, 46(6): 566–570.
- [14] Liu T T, Yu Q X, Tian Q Y, et al. Medication intervention on heme oxygenase/carbon monoxide and nitric oxide synthase/nitric oxide systems in the atherosclerosis model of rabbits[J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2008, 46(6): 566–570.
- [15] Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation[J]. *Life Sci*, 2004, 75(6): 639–653.
- [16] Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 20767–20774.
- [17] Valacchi G, Sticozzi C, Lim Y, et al. Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1229: E1–7.
- [18] Ketelhuth D F, Hansson G K. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5): 779–786.

(责任编辑:冉明会)