

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.005

黄连素通过 SOCS1 减轻 A β 淀粉样蛋白诱导的小胶质细胞激活 *

鲍和¹ 王晨^{2Δ} 杭建峰³ 王志刚⁴ 李楠¹ 郭琪⁵

(1 西安交通大学第二附属医院药学部 陕西 西安 710004; 2 空军军医大学第二附属医院药剂科 陕西 西安 710003;

3 中国人民解放军广州总医院检验科 广东 广州 510010; 4 西安交通大学第一附属医院肾内科 陕西 西安 710061;

5 西安交通大学附属广仁医院药剂科 陕西 西安 710003)

摘要 目的:观察黄连素(Berberine, BBR)对暴露于 A β 淀粉样蛋白(β Amyloid, A β)中的小胶质细胞激活的影响,并明确细胞因子沉默蛋白 1(Silencing of Cytokine Signaling Factor 1, SOCS1)是否参与了 BBR 对小胶质细胞激活的影响。**方法:**将 N9 小胶质细胞暴露于含 5 μ M A β 的培养基中模拟阿尔兹海默症(Alzheimer's, AD)中的小胶质细胞激活。随后,将细胞分为 5 组,分别为 Control 组、5 μ M 的 A β 损伤组 (A β)、BBR+A β 组、SOCS1-siRNA 干扰组 (SOCS1-siRNA+ BBR+A β) 和乱序 siRNA 处理组(SC-siRNA+ BBR+A β),细胞处理 24 h 后,采用 Western blot 检测细胞诱导型一氧化氮合酶(Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)、SOCS1 蛋白的表达,酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测细胞培养基内炎症因子的水平。**结果:**与正常培养的 Control 组相比,5 μ M 的 A β 暴露 24 h 可显著增加细胞 iNOS 蛋白表达水平和肿瘤坏死因子 α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (Interleukin 1 β , IL-1 β)和 IL-6 的释放($P < 0.05$),但并未对 SOCS1 蛋白表达产生显著影响($P > 0.05$),5 μ M 的 BBR 可显著降低 iNOS 表达和上述 3 种促炎症因子的释放($P < 0.05$),并上调 SOCS1 蛋白表达,而 SOCS1-siRNA 可显著逆转 BBR 对 iNOS 和 SOCS1 蛋白表达及 3 种炎症因子释放的影响($P < 0.05$)。**结论:**BBR 可能通过 SOCS1 减轻 A β 淀粉样蛋白对小胶质细胞的激活。

关键词:小胶质细胞;炎症;阿尔兹海默症;黄连素;细胞因子沉默蛋白 1

中图分类号:R-33;R741.02;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1222-05

Berberine Attenuate β Amyloid-Induced Microglial Activation via SOCS1*

BAO He¹, WANG Chen^{2Δ}, HANG Jian-feng³, WANG Zhi-gang⁴, LI Nan¹, GUO Qi⁵

(1 Department of Pharmacology, the Second Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

3 Department of Laboratory, Guangzhou General Hospital of the PLA, Guangzhou, Guangdong, 510010, China; 4 Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China; 5 Department of Pharmacology, the Affiliated Guangren Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate berberine (BBR)-induced effects on microglial activation induced by β amyloid (A β), and explore the role of Silencing of Cytokine Signaling Factor 1 (SOCS1) in BBR-induced effects on microglial activation. **Methods:** N9 microglial cells were exposed to 5 μ M A β to mimic microglial activation in Alzheimer's disease (AD). The microglial cells were divided into five groups, including normal cultured Control, A β : cells were exposed to 5 μ M A β , BBR+A β : cells were exposed to 5 μ M BBR plus 5 μ M A β , SOCS1-siRNA+BBR+A β : cells were treated with SOCS1-siRNA and then exposed to BBR plus A β ; SC-siRNA+BBR+A β : cells were treated with scrambled (SC)-siRNA and then exposed to BBR plus A β ; after 24-h treatment, western blot and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits were taken to assess inducible nitric oxide synthase (iNOS) and SOCS1 protein expressions and pro-inflammatory cytokines in the medium. **Results:** Compared with the Control, 5 μ M A β exposure increased the iNOS expression and the inflammatory cytokine secretions, including tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and IL-6 ($P < 0.05$), but showed no significant effect on the SOCS1 expression ($P > 0.05$), and 5 μ M BBR reduced the A β -induced iNOS expression and the cytokine releases, and increased the SOCS1 expression ($P < 0.05$), however, SOCS1-siRNA treatment, but not the scrambled(SC)-siRNA ($P > 0.05$), reversed the BBR-induced effects above ($P < 0.05$). **Conclusion:** Our findings indicated that BBR decreased A β -induced microglial activation via SOCS1 protein.

Key words: Microglia; Inflammation; Alzheimer's disease; Berberine; SOCS1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R741.02; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1222-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81700644)

作者简介:鲍和(1985-),男,硕士,主管药师,主要研究方向:神经保护药物,E-mail: baohexjtu@163.com

Δ 通讯作者:王晨,女,主管药师,主要研究方向:神经损伤机制,E-mail: fofox911@163.com,电话:13991291955

(收稿日期:2018-08-18 接受日期:2018-09-12)

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的老年神经退行性疾病,以进行性学习、认知和记忆障碍为主要临床表现^[1-3],严重者需专人照顾,给家庭和社会带来了极大负担。AD的详细发病机制尚未完全阐明,目前较为公认的发病机制是脑内 β 淀粉样蛋白(β Amyloid, A β)的过度沉积可引起神经元毒性,继而进行性损伤患者记忆功能^[4,5]。此外,流行病学研究显示 AD 患者脑内 A β 蛋白含量显著增高。因此,抑制 A β 对神经细胞的毒性被认为是防治 AD 的有效手段^[6,7]。

有研究显示脑内 A β 的大量沉积可通过激活小胶质细胞促进其分泌神经炎症因子,继而引起小胶质细胞周围的神经元细胞损伤甚至凋亡^[8,9]。黄连素(Berberine, BBR)是中药黄连中提取的一种生物活性物质,现代医学研究显示 BBR 具有抗炎、抗肿瘤和抗氧化应激损伤等功效^[10-12],而其对 AD 的作用尚未见报道。在本研究中,我们采用 A β 激活小胶质细胞,探讨 BBR 对小胶质细胞活化的影响,并进一步分析了细胞因子沉默蛋白 1(Silencing of Cytokine Signaling Factor 1, SOCS1)是否参与了 BBR 对小胶质细胞活化的调控作用。

1 材料与方 法

1.1 材料

本研究所使用的小鼠 N9 小胶质细胞系获赠于空军军医大学(原第四军医大学)基础医学院, A β 1-42 淀粉样蛋白、IMDM 培养基、BBR、iNOS、SOCS1 一抗和 DAPI 细胞核染液购自美国 Sigma-Aldrich 公司,胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 检测试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所。GAPDH 和 β -actin 一抗购自北京世纪康为公司。抗 iNOS 和抗 SIRT1 一抗购自英国 Abcam 公司。胰蛋白酶购自中国北京索莱宝公司。

1.2 细胞培养

将小胶质细胞在含 5%胎牛血清和 1%青链霉素混合溶液的 IMDM 培养基中培养,培养箱温度为 37 $^{\circ}$ C,湿度 100%,每隔 2-3 d 更换细胞培养基一次,当细胞贴壁达到培养瓶底面积的 90%时,进行传代。

1.3 Western blot 检测

将 N9 小胶质细胞接种于 6 孔细胞培养板,密度为 2×10^6 个/孔。孵育 24 h 后,加入不同处理药物,处理 24 h 后,弃去上层细胞培养基,随后,每孔加入 500 μ L 细胞裂解液,裂解 5 min 后,用细胞刮将细胞收集,放至离心管 4 $^{\circ}$ C 离心,收集离心后上清蛋白溶液,根据 Bradford 法进行蛋白定量,随后用于检测。蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至聚偏氟乙烯膜上。5%脱脂奶粉封闭,4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后。加入兔抗小鼠一抗(1:500 稀释,抗 iNOS 和抗 SOCS1),37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,再加入山羊抗兔二抗(辣根过氧化物酶标记的 IgG, 1:1000 稀释,北京世纪康)4 $^{\circ}$ C 孵育 12 h 后。化学发光法显色,采用凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)进行图像量化分析。应用 GAPDH 和 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参。

1.4 细胞因子检测

采用 ELISA 法检测细胞培养基内炎症因子,将细胞接种

于 24 孔细胞培养板,细胞处理完毕后,吸取细胞培养板内每孔上清液 100 μ L,在 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后,使用相应细胞因子检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国),并按照试剂盒说明书进行检测。

1.5 siRNA 干扰

将 N9 小胶质细胞接种于 6 孔细胞培养板, 5×10^6 个/孔,铺板后 24 h,给予 SOCS1-siRNA 孵育 6 h, SC-siRNA 同时孵育 6 h,孵育结束后,采用 Western blot 检测 SOCS1 蛋白表达水平,评价干扰效果。

1.6 免疫细胞化学染色

将细胞接种于共聚焦显微镜专用培养皿,密度 1×10^5 个/孔,待细胞接种 24 h 后,处理细胞,细胞处理完毕后,吸取上层培养基,使用磷酸盐缓冲液(PBS),清洗细胞 3 次,5min/次,随后使用 4%的多聚甲醛固定细胞 30 min,随后,使用 PBS 清洗细胞 3 次,将体积为 200 μ L, 1:50 稀释的 iNOS 兔抗小鼠一抗加入培养皿内,在 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,随后使用 PBS 清洗,在每孔内加入 200 μ L 的 Cy3 标记的山羊抗兔二抗(红色),常温避光孵育 30 min 后,每孔加入 DAPI 染液 100 μ L 用于标记细胞核(蓝色),常温避光孵育 5 min 后,再使用 PBS 清洗 3 次,使用共聚焦显微镜观察(Olympus, 日本)。

1.7 统计学分析

本研究结果采用 SPSS20.0(SPSS, 美国)进行数据分析,所有数据采用均数标准差(MeanSD)表示,组间差异性比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及 Tukey 检验,以 $P < 0.05$ 表示组间具有统计学差异。

2 结果

2.1 黄连素(BBR)可抑制 A β 诱导的小胶质细胞 iNOS 的表达,减少 TNF- α 释放并上调 SOCS1 表达

为寻找适宜 BBR 浓度,我们将小胶质细胞分为 5 组,分别为正常培养的对照组(Control)、5 μ M 的 A β 损伤组(A β)和含有浓度分别为 0.1 μ M、1 μ M 和 5 μ M BBR 和 5 μ M 的 A β 的 3 个 BBR 干预组。孵育 24 h 后,western blot 结果显示:与 Control 组相比, A β 组小胶质细胞激活标记物 iNOS 表达水平显著上升($P < 0.05$)、SOCS1 表达无显著变化($P > 0.05$),而 1 μ M 和 5 μ M 的 BBR 可显著降低 iNOS 表达,并上调 SOCS1 蛋白表达($P < 0.05$);ELISA 结果显示:A β 组细胞培养基内 TNF- α 水平与 Control 组相比显著上升,而 1 μ M 和 5 μ M 的 BBR 可显著降低培养基内 TNF- α 水平 ($P < 0.05$),其中 5 μ M 的 BBR 效果更为明显。因此,我们选择 5 μ M 的 BBR 进行后续实验,见图 1。

2.2 BBR 可减少 A β 诱导的小胶质细胞促炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的释放

为进一步探讨 BBR 对 A β 诱导的小胶质细胞促炎症因子释放水平的影响,我们将细胞分为 4 组,分别为 Control 组、5 μ M 的 A β 损伤组(A β)、5 μ M 的 BBR 与 5 μ M 的 BBR 共同处理组(BBR+A β)和 5 μ M 的 BBR 单独处理组(BBR),细胞处理 24 h 后, A β 组培养基中 IL-1 β 和 IL-6 水平较 Control 组显著升高($P < 0.05$),而 BBR 可显著降低培养基内 IL-1 β 和 IL-6 水平,而与 Control 组相比, BBR 单独处理未对细胞培养基内上述两种促炎症因子水平产生明显影响($P > 0.05$)。见图 2。

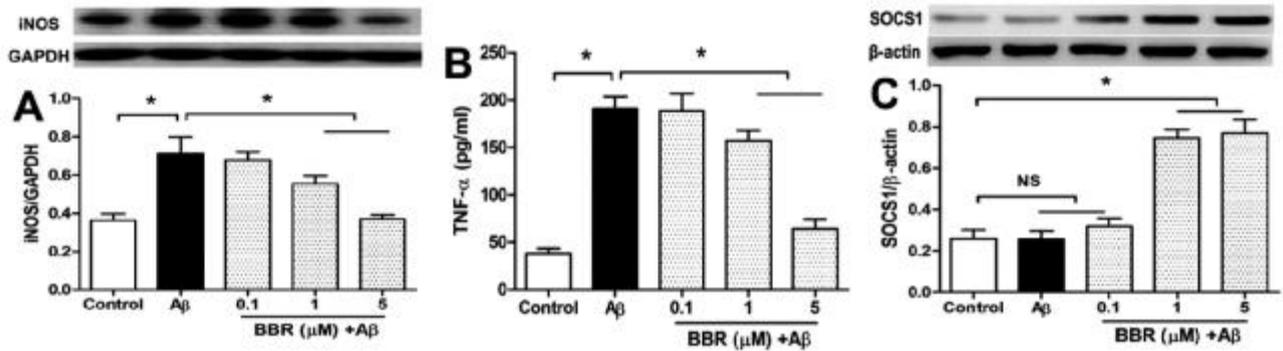


图1 不同浓度 BBR 对小胶质细胞 iNOS 和 SOCS1 表达及 TNF- α 释放的影响

Fig.1 Effects of different doses of BBR on the microglial iNOS and SOCS1 expressions and release of TNF- α

Note: A: Effects of BBR on microglial iNOS expression, n=4; B: Effects of BBR on microglial TNF- α release, n=8; C: Effects of BBR on microglial SOCS1 expression, n=4; Data are expressed as means \pm SD. *P<0.05; NS no significance.

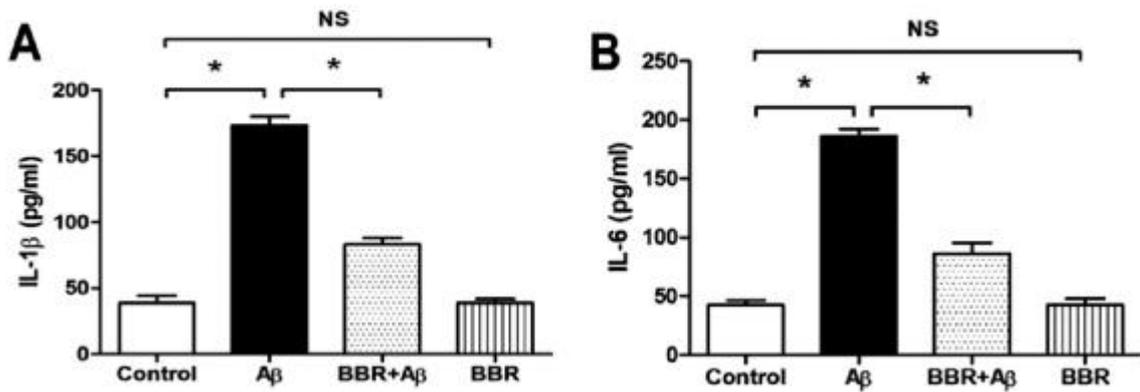


图2 BBR 对 A β 诱导的小胶质细胞 IL-1 β 和 IL-6 释放的影响

Fig.2 Effects of BBR on A β -induced release of microglial IL-1 β and IL-6

Note: A: Effect of BBR on microglial IL-1 β release; B: Effect of BBR on microglial IL-6 release; Data are expressed as means \pm SD, n=8. *P<0.05; NS no significance.

2.3 SOCS1-siRNA 逆转 BBR 对小胶质细胞 iNOS 表达和炎症因子释放的影响

为探讨 SOCS1 在 BBR 抑制 A β 诱导的小胶质细胞炎症因子表达和释放中的作用, 我们采用 SOCS1-siRNA 抑制小胶质细胞 SOCS1 蛋白表达, 将细胞分为 5 组, 分别为 Control 组、5 μ M 的 A β 损伤组 (A β), BBR+A β 、SOCS1-siRNA 干扰组 (SOCS1-siRNA+BBR+A β) 和乱序 siRNA 处理组 (SC-siRNA+BBR+A β)。细胞处理 24 h 后, western blot 结果显示: 与 A β 组相比, BBR 显著降低了小胶质细胞 iNOS 蛋白表达水平 (P<0.

05), 而 SOCS1-siRNA 可显著逆转 BBR 对 iNOS 蛋白表达的影响 (P<0.05), SC-siRNA 未对 BBR 抑制 iNOS 表达的作用产生明显影响 (P>0.05)。此外, BBR 显著抑制了暴露于 A β 中的小胶质细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 (P<0.05), SOCS1-siRNA 逆转了 BBR 对上述 3 种促炎症因子释放的影响 (P<0.05), 而 SC-siRNA 则未对 BBR 的抑制炎症因子分泌作用产生显著影响 (P>0.05)。以上结果提示 BBR 可显著降低 A β 对小胶质细胞的激活, SOCS1 分子可能介导了 BBR 的上述作用, 见图 3。

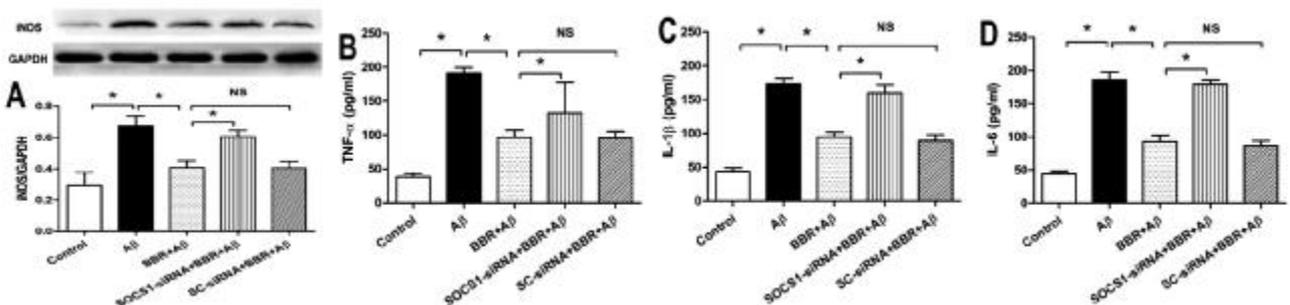


图3 SOCS1-siRNA 逆转 BBR 对小胶质细胞 iNOS 表达和促炎症因子释放的影响

Fig.3 SOCS1-siRNA reversed BBR-induced effects on microglial iNOS expression and cytokine releases

Note: A: SOCS1-siRNA reversed BBR-induced effects on microglial iNOS expression, n=4; B-D: SOCS1-siRNA reversed BBR-induced effects on microglial TNF- α , IL-1 β and IL-6 releases, n=8; Data are expressed as means \pm SD. *P<0.05; NS no significance.

2.4 SOCS1-siRNA 逆转了 BBR 对小胶质细胞形态和 iNOS 及 SOCS1 表达的影响

为进一步观察 BBR 对暴露于 A β 中的小胶质细胞激活的影响及 SOCS1 在其中的作用,我们将小胶质细胞分为 5 组,分组和处理同前,即 Control、A β 、BBR+A β 、SOCS1-siRNA+BBR+A β 和 SC-siRNA+BBR+A β 组,处理 24 h 后,免疫细胞化学结果显示:5 μ M 的 A β 可显著上调细胞 iNOS 表达(红色),并使细胞形态变大,提示细胞处于激活状态,而 BBR 可显

著降低 iNOS 蛋白表达和细胞体积,SOCS1-siRNA 可显著逆转 BBR 对 iNOS 和细胞体积的上述作用,SC-siRNA 未对 BBR 产生的上述作用产生明显影响。Western blot 结果显示:A β 暴露未对小胶质细胞 SOCS1 表达产生影响($P>0.05$),而 BBR 可显著增加 SOCS1 蛋白表达($P<0.05$),SOCS1-siRNA 降低了 SOCS1 蛋白表达($P<0.05$),而 SC-siRNA 未对 SOCS1 水平产生显著影响($P>0.05$),见图 4。

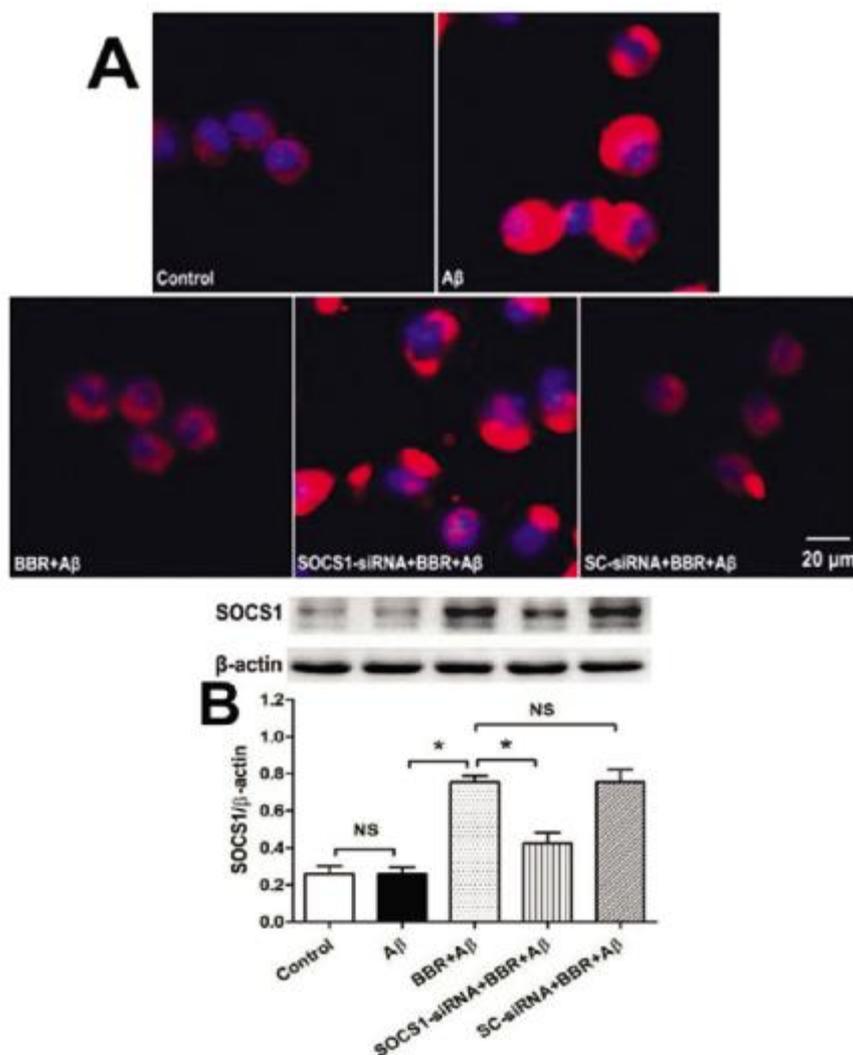


图 4 免疫细胞化学染色显示 SOCS1-siRNA 可逆转 BBR 对小胶质细胞 iNOS 和 SOCS1 表达的影响

Fig.4 Immunocytochemistry showed SOCS1-siRNA reversed BBR-induced effects on microglial iNOS and SOCS1 expression

Note: A: SOCS1-siRNA reversed BBR-induced effects on microglial iNOS staining; B: SOCS1-siRNA reversed BBR-induced effect on microglial SOCS1 expression, n=4; Data are expressed as means \pm SD. * $P<0.05$; NS no significance; Bar=20 μ m.

3 讨论

AD 是最为常见的 CNS 退行性疾病之一,以进行性降低的学习和记忆功能为主要临床表现,然而,由于 AD 发生发展的机制还不十分清楚,因此治疗手段有限。新近研究表明在 AD 患者脑内有 A β 和 tau 蛋白的大量沉积,而上述蛋白的大量沉积可对神经细胞产生毒性作用,继而激活脑内小胶质细胞,并进行性损伤神经元,最终导致神经功能受损^[89]。而 A β 引起的小胶质细胞的激活,可通过释放促炎症因子,继而引起神经元

细胞的炎性损伤,甚至凋亡,最终可引起 CNS 功能受损^[13]。因此,抑制 A β 引起的小胶质细胞激活被认为是防治 AD 的重要手段。

我们发现小胶质细胞暴露于 5 μ M A β 24 h 可显著上调细胞 iNOS 蛋白表达,并促进促炎症因子释放,表明本研究所使用的 A β 剂量和暴露时间可明显激活小胶质细胞。BBR 是一种临床常用的药物,可从中药黄连、黄柏和三颗针中提取分离,具有显著的抗菌和抗炎作用^[14],其常见的盐酸盐为盐酸小檗碱,主要用于治疗各类细菌性胃肠道感染,由于黄连素口服后,通

过胃肠道代谢但不被其吸收,因此不良反应相对较小^[5]。目前,除治疗胃肠道细菌性炎症外,BBR 还被发现具有抗氧化应激、抗肿瘤和器官保护等功效^[16,17]。研究表明 BBR 可通过腺苷酸依赖的蛋白激酶(AMPK)降低 ATP 消耗,对缺血心肌产生保护作用^[18]。还有研究表明 BBR 可通过促进鼠脑内新生细胞存活,产生神经再生作用^[19]。过度的氧自由基(Reactive Oxygen Species, ROS)是产生氧化应激损伤的重要机制,而 BBR 可通过促进细胞超氧化物歧化酶(SOD)表达,继而清除体内过多的 ROS,产生抗氧化应激损伤作用。此外,还有研究显示 BBR 可通过促进肝癌细胞发生自噬和凋亡,产生抗肿瘤作用。

细胞因子抑制信号蛋白 (Suppressor of Cytokine Signaling, SOCS)是表达于细胞表面的一种特异性受体,该受体的激活或者高表达可显著抑制细胞分泌炎症因子。现有证据表明^[20]至少存在 8 种蛋白分子构成了 SOCS 家族,分别为 SOCS1-7 蛋白分子以及细胞因子诱导 SH-2 蛋白 (亦称之为 CIS),SOCS2 和 CIS 结构较为相似,SOCS1 和 SOCS3 相似,SOCS4 和 SOCS5 相似,SOCS6 和 SOCS7 相似。在小胶质细胞和巨噬细胞中,SOCS1 高表达可抑制小胶质细胞过度激活。因此,本研究选择了 SOCS1 分子进行观察,我们发现 BBR 可显著降低 A β 对小胶质细胞的激活,而使用能够干扰 SOCS1 表达的 siRNA 后,发现可显著逆转 BBR 产生的下调 iNOS 表达和促炎症因子释放等作用,以上结果表明 SOCS1 分子可能介导了 BBR 对 A β 引起的小胶质细胞激活。BBR 可能作为一种小胶质细胞激活抑制剂,可通过 SOCS1 分子减轻 AD 患者脑内 A β 对 CNS 的炎性损伤,为防治 AD 提供了一种潜在的干预靶点。然而,本研究也有一些不足。首先,我们使用的是小胶质细胞系,并非原代培养细胞或在体动物,因此,我们的结论还需要进一步通过在体实验验证;其次,SOCS 家族的其他分子是否参与了 BBR 的抗炎作用,也需要通过进一步实验以明确。

综上所述,本研究表明 BBR 可减轻 A β 对小胶质细胞的激活,其作用可能通过 SOCS1 分子介导。

参考文献(References)

- [1] Maccioni RB, Gonzalez A, Andrade V, et al. Alzheimer's Disease in the Perspective of Neuroimmunology [J]. *Open Neurol J*, 2018, 12: 50-56
- [2] Rose KM, Lach J, Perkhounkova Y, et al. Use of Body Sensors to Examine Nocturnal Agitation, Sleep, and Urinary Incontinence in Individuals With Alzheimer's Disease [J]. *J Gerontol Nurs*, 2018, 44(8): 19-26
- [3] Montgomery W, Goren A, Kahle-Wroblewski K, et al. Detection, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease dementia stratified by severity as reported by caregivers in Japan [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, 14: 1843-1854
- [4] Son HJ, Jeong YJ, Yoon HJ, et al. Assessment of brain beta-amyloid deposition in transgenic mouse models of Alzheimer's disease with PET imaging agents (18)F-flutemetamol and (18)F-florbetaben[J]. *BMC Neurosci*, 2018, 19(1): 45
- [5] Abner EL, Neltner JH, Jicha GA, et al. Diffuse Amyloid- β Plaques, Neurofibrillary Tangles, and the Impact of APOE in Elderly Persons' Brains Lacking Neuritic Amyloid Plaques[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 64(4): 1307-1324
- [6] Lv C, Ma Q, Han B, et al. Long-Term DL-3-n-Butylphthalide Treatment Alleviates Cognitive Impairment Correlate With Improving Synaptic Plasticity in SAMP8 Mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 200
- [7] Syad AN, Devi KP. Gelidiella acerosa Exhibits Neuroprotective Effect Against Amyloid Beta 25-35 Peptide-Induced Toxicity in PC12 Cells [J]. *J Diet Suppl*, 2018, 29: 1-15
- [8] Gomi F, Uchida Y, Endo S. Up-regulation of NSP3 by Oligomeric A β Accelerates Neuronal Death Through Cas-independent Rap1A Activation[J]. *Neuroscience*, 2018, 386: 182-193
- [9] Berry BJ, Smith AST, Long CJ, et al. Physiological A β Concentrations Produce a More Biomimetic Representation of the Alzheimer's Disease Phenotype in iPSC Derived Human Neurons [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9(7): 1693-1701
- [10] Palmieri A, Iapichino A, Cura F, et al. Pre-treatment with berberine enhances effect of 5-fluorouracil and cisplatin in HEP2 laryngeal cancer cell line[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(2 Suppl. 1): 167-177
- [11] Tian P, Ge H, Liu H, et al. Leukocytes from diabetic patients kill retinal endothelial cells: effects of berberine [J]. *Mol Vis*, 2013, 19: 2092-2105
- [12] Wang B, Xu X, He X, et al. Berberine Improved AldoInduced Podocyte Injury via Inhibiting Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress Pathways both In Vivo and In Vitro[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(1): 217-228
- [13] Shmuel-Galia L, Klug Y, Porat Z, et al. Intramembrane attenuation of the TLR4-TLR6 dimer impairs receptor assembly and reduces microglia-mediated neurodegeneration [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(32): 13415-13427
- [14] Zhao Y, Jing Z, Lv J, et al. Berberine activates caspase-9/cytochrome c-mediated apoptosis to suppress triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 95: 18-24
- [15] Kumar A, Ekavali, Chopra K, et al. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 761: 288-297
- [16] Wang Y, Zhang S. Berberine suppresses growth and metastasis of endometrial cancer cells via miR-101/COX-2[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1287-1293
- [17] Zhang YJ, Yang SH, Li MH, et al. Berberine attenuates adverse left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after acute myocardial infarction in rats: role of autophagy [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(12): 995-1002
- [18] Chang W, Li K, Guan F, et al. Berberine Pretreatment Confers Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury in a Rat Model of Type 2 Diabetes [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2016, 21 (5): 486-494
- [19] Liu R, Zhang X, Zhang L, et al. Bitterness intensity prediction of berberine hydrochloride using an electronic tongue and a GA-BP neural network[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(6): 1696-1702
- [20] Masuhara M, Sakamoto H, Matsumoto A, et al. Cloning and characterization of novel CIS family genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239(2): 439-446