

小檗碱对动脉粥样硬化性损伤的保护作用*

丁辉¹ 陈鑫[△] 曹长春 范丽 张日东

(南京医科大学附属南京第一医院 江苏 南京 210006)

摘要 目的:探讨小檗碱对动脉粥样硬化损伤的保护作用。方法:将 56 只大鼠,随机分为对照组(C),高脂饮食假手术组(HD),肾动脉狭窄组(RAS),肾动脉狭窄高脂饮食组(HD+RAS)。C及RAS组给予正常饮食,HD及HD+RAS组给予高脂饮食,RAS及HD+RAS组采用固定内径银夹夹左肾动脉。饲养 12 周,每组处死 6 只进行检测,剩余除 C 外每日灌胃小檗碱(150mg/kg),C 予以等量生理盐水灌服,持续 4 周,四周后处死进行相同检测,用药前后结果进行对比评价小檗碱功能。结果:与 C 相比,HD,RAS,HD+RAS 组肌酐显著升高($P<0.05$),HD 及 HD+RAS 组胆固醇明显升高($P<0.05$),超氧化物歧化酶(SOD)在 HD,RAS 及 HD+RAS 组显著降低($P<0.05$),丙二醛(MDA)在 HD,RAS 及 HD+RAS 组显著增高($P<0.05$),血管内皮生长因子 VEGF 在 HD,RAS 及 HD+RAS 组表达量升高。给予小檗碱灌胃处理后,检测指标各组间无统计学差异($P>0.05$)。结论:小檗碱对动脉粥样硬化性损伤具有良好的保护作用。

关键词:小檗碱;动脉粥样硬化性损伤;SOD;MDA;VEGF

中图分类号:R285.6 R543.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-223-04

Protective Effect of Berberine on Atherosclerotic Injury*

DING Hui, CHEN Xin[△], CAO Chang-chun, FAN Li, ZHANG Ri-dong

(Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University Nanjing 210006 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protect effect of Berberine on atherosclerotic injury. **Methods:** Fifty-six rats were randomly divided into control group (C),high-fat diet group (HD),renal artery stenosis group (RAS), high-fat diet with renal artery stenosis group (HD+RAS), fourteen in each group.C and RAS were given proper diet, HD and HD+RAS were given high fat diet. RAS and HD+RAS were clamped by sliver clip with a fixed diameter on left renal artery. 12 weeks later, executed six of every group for testing, the left were given Berberine (150mg/kg) every day except C,C were given saline .4 weeks later, the left rats were executed for the same testing. **Results:** Compared with C, Creatinine was significantly higher in other three groups($p<0.05$). Cholesterol was significantly higher in HD and HD+RAS groups ($p<0.05$).SOD was Significantly higher while MDA was Significantly lower in HD, RAS and HD+RAS group. The ex- pression of VEGF was significantly higher in HD,RAS and HD+RAS group. After given berberine, the testing results had no significant difference in different groups. **Conclusions:** Berberine has good protection effect on atherosclerotic injury.

Key words: Berberine; Atherosclerotic injury; SOD; MDA;VEGF

Chinese Library Classification(CLC): R285.6 R543.5 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)02-223-04

动脉粥样硬化是引起动脉狭窄的最主要的原因,约占 90%,由此造成的终末期血管病变的发病率也不断上升。同时,心血管疾病又是各器官慢性疾病常见的并发症,在这类病人中,因心血管事件死亡的占死亡总数的 40%-50%,是普通人群的 20 倍,其中动脉粥样硬化是最主要的原因。小檗碱(Berberine, BBR),也称黄连素,现代药理研究发现它还有扩张冠状血管、调血脂、抗肿瘤等作用,被广泛地应用于心力衰竭、糖尿病、高脂血症等疾病的治疗中^[1,2]。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠,56 只,体重 250 克,雄性(南京医科大学附属

南京第一医院实验动物中心)。实验动物统一饲养一周后开始实验,控制室温 25℃,湿度 60%。

1.2 药品,试剂及仪器

小檗碱(美国,SIGMA 公司),高脂饲料(南京医科大学附属南京第一医院动物实验中心,15%猪油,2%胆固醇),VEGF 抗体(SANTACRUZ),BETA-ACTIN 抗体(凯基生物),全蛋白提取试剂盒(凯基生物),蛋白浓度测定试剂盒(凯基生物),超敏发光试剂盒(凯基生物),超氧化物歧化酶试剂盒(凯基生物),丙二醛浓度测定试剂盒(凯基生物),银夹(上海奥尔科特生物公司),全自动生化分析仪,eppendorf 分光光度计,leica 切片机,稳压器(南大普阳科技),电泳转膜设备(BIO-RAD)。

1.3 大鼠动脉粥样硬化性模型的制备及分组

* 基金项目:中华医学会临床医学科研专项资金项目(09010290184)

作者简介:丁辉(1985-),男,硕士,主要研究方向:冠状动脉粥样硬化性心脏病 电话 15951855183,

E-mail:doctordinghui@163.com

△ 通讯作者:陈鑫

(收稿日期:2010-10-06 接受日期:2010-10-30)

Wistar 大鼠 56 只,随机分为 4 组,每组 14 只。第一组为正常饮食对照组,第二组为高脂饮食假手术组,第三组为正常饮食左肾动脉狭窄组,第四组为高脂饮食左肾动脉狭窄组。肾动脉狭窄模型制备^[3]:0.5%戊巴比妥钠,40mg/kg,腹腔注射麻醉,常规背部皮肤消毒,备皮,依次剪开皮肤肌肉,找到肾动脉,用内径 0.3mm 银夹套夹肾动脉^[4],观察肾脏颜色变化数分钟,若颜色逐渐变暗红,继续观察无坏死发黑则表示肾动脉狭窄模型建造成功,逐层缝合,青霉素抗感染。假手术组处理除不上银夹,其余同肾动脉狭窄模型制备。四组大鼠按不同分组饲养 12 周,12 周后每组处死 6 只用于模型鉴定,剩下大鼠继续饲养,高脂饮食,肾动脉狭窄及高脂饮食肾动脉狭窄组大鼠予以小檗碱 150mg/kg 灌胃处理^[5]。每日一次,给药 4 周后处死进行检测。

1.4 检测指标

生化检测,超氧化物歧化酶 SOD,丙二醛 MDA,VEGF 蛋白检测。

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件处理数据。所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组资料的比较采用成组资料的 t 检验, P<0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1.1 用药前不同组生化指标检测结果 相对于正常对照组 C, HD 组,RAS 组及 HD+RAS 组的肌酐水平均出现有统计学意义的升高(P<0.05),其中肌酐水平尤以 HD+RAS 组升高最明显,尿素氮及甘油三酯各组间无统计学意义上的差异(P>0.05)。

表 1 四组大鼠用药前生化指标检测结果的比较

Tab1 Comparison of biochemical test results between four groups before treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Groups)	尿素氮 (Urea nitrogen) (mmol/l)	肌酐 (Creatinine) (umol/l)	总胆固醇 (Total cholesterol) (mmol/l)	甘油三酯 (Triglyceride) (mmol/l)
正常对照组 (Group C)	7.67± 0.40	35.77± 1.53	1.45± 0.12	1.08± 0.25
高脂饮食假手术组 (Group HD)	7.36± 0.24 [#]	41.12± 0.99 [*]	2.13± 0.52 [*]	1.02± 0.19 [#]
肾动脉狭窄组 (Group RAS)	7.70± 0.48 [#]	40.33± 1.69 [*]	1.49± 0.34 [#]	0.90± 0.12 [#]
高脂饮食肾动脉狭窄组 (Group HD+RAS)	7.14± 0.88 [#]	47.13± 2.74 [*]	2.02± 0.33 [*]	1.10± 0.14 [#]

注:与对照组相比 *P<0.05 #P>0.05, Note:Compared with control group *P<0.05 #P>0.05

2.1.2 用药后不同组生化指标检测结果 相对于正常对照组 C, HD 组,RAS 组,HD+RAS 组的尿素氮,肌酐,胆固醇及甘油三

表 2 四组大鼠用药后生化指标检测结果的比较

Tab2 Comparison of biochemical test results between four groups after treatment ($\bar{x} \pm s$)

组别 (Groups)	尿素氮 (Urea nitrogen) (mmol/l)	肌酐 (Creatinine) (umol/l)	总胆固醇 (Total cholesterol) (mmol/l)	甘油三酯 (Triglyceride) (mmol/l)
正常对照组 (Group C)	5.94± 0.37	32.72± 3.80	1.50± 0.13	1.06± 0.20
高脂饮食假手术组 (Group HD)	6.28± 0.66 [#]	32.42± 3.29 [#]	1.66± 0.16 [#]	1.03± 0.13 [#]
肾动脉狭窄组 (Group RAS)	6.43± 0.46 [#]	34.75± 4.82 [#]	1.40± 0.35 [#]	0.85± 0.13 [#]
高脂饮食肾动脉狭窄组 (Group HD+RAS)	6.14± 1.04 [#]	31.37± 2.97 [#]	1.70± 0.26 [#]	0.94± 0.27 [#]

与对照组相比 *P<0.05 #P>0.05 Compared with control group *P<0.05 #P>0.05

2.2.1 用药前超氧化物歧化酶 SOD 及丙二醛 MDA 含量 相对于正常对照组 C,HD 组,RAS 组及 HD+RAS 组血清超氧化物歧化酶(SOD)的含量出现有统计学意义的降低(P<0.05),尤以高脂饮食肾动脉狭窄组降低最明显。而与机体超氧化物歧化酶(SOD)紧密联系的丙二醛(MDA)在这三组则呈现具有统计学意义的升高(P<0.05),尤以 HA+RAS 组为甚。

2.2.2 用药后超氧化物歧化酶 SOD 及丙二醛 MDA 含量 相对于正常对照组 C,HD+RAS 组,RAS 组及 HD 组血清超氧化物歧化酶(SOD)的含量仍偏低,但不具有统计学意义(P>0.05)。丙二醛(MDA)在这三组的表达量略高于对照组但亦不具有统计学意义(P>0.05)。

2.5 Western-blot 检测肾组织血管内皮生长因子(VEGF)用药

前后表达量

表 3 四组大鼠用药前 SOD 及 MDA 检测结果的比较

Tab3 Comparison of SOD and MDA results between four groups before treatment ($\bar{x} \pm s$)

检测指标 (Indexs)	正常对照组 (Group C) (mmol/l)	高脂饮食假手术组 (Group HD) ($\mu\text{mol/l}$)	肾动脉狭窄组 (Group RAS) (mmol/l)	高脂饮食肾动脉狭窄组 (Group HD+RAS) (mmol/l)
SOD U/ml	304.10 \pm 21.70	253.55 \pm 19.86*	248.95 \pm 24.98*	226.34 \pm 18.49*
MDA nmol/ml	6.47 \pm 1.04	10.54 \pm 1.75*	10.21 \pm 1.62*	12.58 \pm 2.15*

注:与对照组相比, *P<0.05, Note: Compared with control group *P<0.05

表 4 四组大鼠用药后 SOD 及 MDA 检测结果的比较

Tab4 Comparison of SOD and MDA results between four groups after treatment ($\bar{x} \pm s$)

检测指标 (Indexs)	正常对照组 (Group C) (mmol/l)	高脂饮食假手术组 (Group HD) ($\mu\text{mol/l}$)	肾动脉狭窄组 (Group RAS) (mmol/l)	高脂饮食肾动脉狭窄组 (Group HD+RAS) (mmol/l)
SOD U/ml	302.53 \pm 18.29	289.88 \pm 16.66*	294.96 \pm 17.4*	287.95 \pm 18.21*
MDA nmol/ml	6.25 \pm 0.64	6.71 \pm 0.97*	6.60 \pm 0.61*	7.00 \pm 0.92*

注:与对照组相比, *P>0.05, Note:Compared with control group *P>0.05

表 5 四组大鼠用药前后 VEGF/ β -actin 比值

Tab5 Comparison of VEGF/ β -actin ratio between four groups before/after treatment ($\bar{x} \pm s$)

处理 (Treatment)	正常对照组 (Group C) (mmol/l)	高脂饮食假手术组 (Group HD) ($\mu\text{mol/l}$)	肾动脉狭窄组 (Group RAS) (mmol/l)	高脂饮食肾动脉狭窄组 (Group HD+RAS) (mmol/l)
用药前 (Before ig)	0.27 \pm 0.02	0.76 \pm 0.01*	0.46 \pm 0.01*	0.78 \pm 0.02*
用药后 (After ig)	0.28 \pm 0.01	0.30 \pm 0.03#	0.25 \pm 0.02#	0.31 \pm 0.01#

注:与对照组相比, *P<0.05 #P>0.05, Note:Compared with control group *P<0.05 #P>0.05

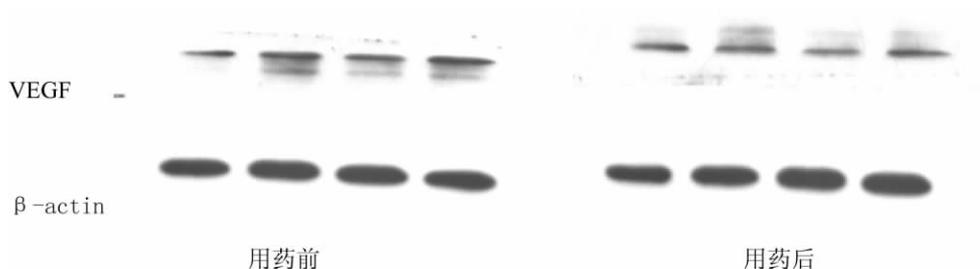


图 1 四组大鼠用药前后 VEGF 表达

Fig1 The expression of VEGF between treatment and non-treatment in four groups

3 讨论

动脉粥样硬化性损伤是主要是由于动脉粥样硬化造成动脉狭窄引起的以缺血缺氧为主的病理变化,有研究发现,小檗碱能有效降低高血脂患者血脂水平,其效果等同或优于他汀类降脂药,无肝肾毒副作用,其降血脂作用的一个重要机制是通过激活细胞外信号调节激酶(ERK)通路,作用于 LDLR 基因的 3'非翻译区,稳定 LDLR 的 mRNA,从而增加 LDLR 的表达,

使肝细胞清除胆固醇的功能增加^[6]。小檗碱具有扩张冠状血管、调血脂、抗肿瘤等作用,被广泛地应用于心力衰竭、糖尿病、高脂血症等疾病的治疗中。本实验的目的就是探讨小檗碱对动脉粥样硬化性损伤的保护作用以及具体的机制。

动脉粥样硬化是以血管内皮细胞完整性破坏,平滑肌细胞和成纤维细胞增生为主的疾病。其主要特点是在大中动脉内膜下脂质粥样斑块形成,具体机制目前不清楚。近年研究表明,高脂血症,高血压,吸烟和糖尿病等高危因素均可增加机体细

胞的脂质过氧化损伤,促进动脉粥样硬化形成和发展[7-9]。目前已知的低密度脂蛋白 LDL 是动脉粥样硬化形成的关键因素,然而有研究表明,高浓度的天然低密度脂蛋白(LDL)与巨噬细胞共同孵育并不能使细胞内大量脂质堆积并诱发泡细胞的形成。这是因为 LDL 通过 LDL 受体(LDL-R)进入细胞后水解产生的游离胆固醇可介导负反馈机制,下调细胞内胆固醇。因此,高血脂与动脉粥样硬化形成之间必定存在中间环节,即 LDL 在形成动脉粥样硬化时,一定经过化学修饰过程,LDL 水平升高为其化学修饰提供了丰富的修饰底物。

目前已有研究显示,细胞内氧化应激信号选择性诱导炎症相关基因表达是它们引发动脉粥样硬化共同的分子机制之一^[10]。在病理状态下,体内产生大量的 ROS,ROS 使 LDL 表面的多不饱和脂肪酸双链氧化并发生断裂,载脂蛋白 B(apoB)与其交联形成共轭双烯,从而使 LDL 表面结构发生改变。氧化修饰后的 LDL 不再被 LDL-R 识别,而被巨噬细胞表面的清道夫受体(scavengerreceptor,SR)-A 识别。与天然 LDL 相比,ox-LDL 与 SR-A 受体结合更快,且不受游离胆固醇的负反馈调节,更容易被巨噬细胞识别并吞噬形成泡沫细胞。因此可以说,LDL 氧化产生的氧化低密度脂蛋白是发生动脉粥样硬化的中心环节。氧化应激主要通过氧化作用,诱导血管基因表达,促进局部炎症反应和细胞增殖,多方面参与动脉粥样硬化的发生与发展^[11,12]。ox-LDL 的理化特性与天然 LDL 炯然不同,它能通过多种途径直接和间接促成动脉粥样硬化。

血管内皮生长因子(VEGF)又称血管通透因子或促血管因子,它是一种糖蛋白。它能特异性的作用于血管内皮细胞,具有维持血管正常状态和完整性,提高血管通透性,促进血管生成的作用。血管内皮生长因子作为一种局部内源性调节剂,起着维护血管正常状态和完整性的作用^[13]。有研究表明,在缺血缺氧等损伤条件下,VEGF 的表达量会明显升高,而在过氧的条件下 VEGF 的表达量则会下降。

本实验模型相比于对照组 C, HD 组, RAS 组及 HD+RAS 组肌酐水平明显升高,有统计学意义($P<0.05$),肾功能损伤明显,HD 组及 HD+RAS 组胆固醇水平明显升高,有统计学意义($P<0.05$),提示高胆固醇血症。给予小檗碱以后以上三组肌酐水平明显下降,与对照组 C 相比无统计学意义($P>0.05$),提示肾功能恢复良好,HD 组及 HD+RAS 组胆固醇水平下降至正常水平,提示高胆固醇血症消失。用药前 HD 组, RAS 组, HD+RAS 组相对于对照组 C 超氧化物歧化酶 SOD 均表现出具有统计学意义的降低($P<0.05$),提示机体抗氧化能力减低,而同时氧化应激产物丙二醛 MDA 均有统计学意义的升高($P<0.05$),表示氧化应激反应明显,机体损伤严重。给予小檗碱后,以上三个干预组超氧化物歧化酶 SOD,丙二醛 MDA 均恢复正常。血管内皮生长因子 VEGF 在血管缺血缺氧等损伤状态下表达量会增高,在本实验中 Western blot 提示血管内皮生长因子 VEGF 在 HD 组, RAS 组, HD+RAS 组表达量增高,给予小檗碱后表达量降低至正常水平。

本研究结果显示相对于对照组 C, HD 组, RAS 组及 HD+RAS 组均表现为不同程度的动脉粥样硬化性损伤,尤其以 HD+RAS 组最明显。小檗碱对动脉粥样硬化性损伤具有良好的保护作用,它对各组肾损伤均有不同程度的保护作用,由此我们可以大胆推断,小檗碱对动脉粥样硬化造成的其他器官损伤亦具有保护作用,这种保护作用一方面通过调节血脂胆固醇来

完成,另外也可以通过保护机体的氧化应激系统来阻止低密度脂蛋白大量的被细胞摄取而引起泡沫细胞的形成,切断动脉粥样硬化的源头进而阻止动脉粥样硬化性损伤的进展。另外,三个干预组的 VEGF 表达量明显升高,表明在损伤因素的刺激下,自体可以产生 VEGF 保护血管的完整性并完善组织修复,而在应用小檗碱处理后,三个干预组 VEGF 的表达量均明显下降,针对用药前后 VEGF 表达量的差别,我们认为有两种可能,一方面小檗碱可以抑制损伤因素的表达从而减少对机体的刺激使 VEGF 表达量下降,另一方面小檗碱也可能直接作用于某条信号通路组织 VEGF 的升高,但是具体机制仍不清楚,有待进一步研究。总之,小檗碱对动脉粥样硬化性损伤的保护作用是明确的,有待深入研究进一步阐明它的保护机制。

参考文献(References)

- [1] Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system[J]. *Circulation*, 2007,116(1):85-97
- [2] Amann K, Tyralla K, Gross ML, et al. Special characteristics of atherosclerosis in chronic renal failure[J]. *Clin Nephrol*, 2003,60 Suppl 1:S13-21
- [3] Chade AR, Rodriguez-Portel M, Grande JP, et al. Distinct renal injury in early atherosclerosis and renovascular disease[J]. *Circulation*, 2002,106(9):1165-1171
- [4] Xu-Ping Qin, Feng Ye, et al. Involvement of calcitonin gene-related peptide in the depressor effects of losartan and perindopril in rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2003,464:63-67
- [5] Ji Yin Zhou, Shi Wen Zhou, et al. Chronic Effects of Berberine on Blood, Liver Glucolipid Metabolism and Liver PPARs Expression in Diabetic Hyperlipidemic Rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008,31(6):1169-1176
- [6] Kong W, Wei J (魏敬, 共同第一作者), Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. *Nature Medicine*, 2004,10(12):1344-1351
- [7] 林燕, 黄惟义. 氧化应激致动脉粥样硬化作用的研究进展[J]. *黑龙江医学*, 2004,28(7):517-519
Lin Yan, Huang Wei-yi. The research progress of Oxidative stress on Atherosclerosis[J]. *HeiLongJiang Medicine*, 2004,10(12):1344-1351
- [8] Heutzer T, Schlinzig T, Krohn K, et al. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2004,104:2673-2678
- [9] Molavi B, Mehta JL. Oxidative stress in cardiovascular disease: Molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2004,19(5):488-493
- [10] Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective[J]. *Hypertension*, 1995,25:155-161
- [11] Liao F, Andalibi A, Qiao J H, et al. Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice [J]. *J Clin Invest*, 1994,94(2):877-884
- [12] Cathcart M K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidases in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004,24(1):23-28
- [13] Couffignal T, Kearney M, Witzensichler B, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries[J]. *Am J Pathol*, 1997,150(5):1673