

小檗碱对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的影响及机制研究

左璇[#], 罗金雀[#], 姜新海, 韩小婉, 王潇, 刘鹏, 李依宁,
王瑞海, 许艳妮*, 司书毅*

(中国医学科学院、北京协和医学院, 医药生物技术研究所, 卫健委抗生素生物工程重点实验室,
国家新药(微生物)筛选实验室, 北京 100050)

摘要: 本文旨在高脂喂养的 $ApoE^{-/-}$ 小鼠模型中研究小檗碱 (berberine, BBR) 抗动脉粥样硬化的作用及可能的作用机制, 为 BBR 的临床研究打下基础。将 7 周龄的雄性 $ApoE^{-/-}$ 小鼠, 随机分为对照组 (普通饲料)、模型组、BBR 组 (BBR-L: $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、BBR-H: $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、阿托伐他汀组 ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。高脂饲料喂养 $ApoE^{-/-}$ 小鼠 12 周建立实验性高脂血症动物模型, 同时给予不同剂量的 BBR。12 周后, 分离主动脉进行油红染色, 统计各组 $ApoE^{-/-}$ 小鼠主动脉斑块情况; 采用悬液芯片试剂盒检测血清中炎症因子水平; 应用试剂盒测定肝脏总胆固醇、甘油三酯和游离脂肪酸的含量, Western blot 方法检测肝脏中炎症信号通路相关蛋白以及胆固醇转运相关基因的表达情况。所有动物实验均按照医药生物技术研究所实验室动物管理条例进行。结果表明, 与模型组相比, BBR 可以显著降低主动脉全长中的斑块面积, 抑制血清中促炎因子 IL-1 β 等的表达, 减少肝脏中总胆固醇等的聚积; 机制研究结果显示, BBR 能显著抑制 MAPKs 和 NF- κ B 信号通路的活化, 显著上调胆固醇代谢调节蛋白 LDLR、ABCA1 等的表达。总之, BBR 能显著抑制高脂饮食喂养的 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化斑块的形成, 其作用机制与抑制炎症和降低胆固醇的聚积有关。

关键词: 小檗碱; 动脉粥样硬化; $ApoE^{-/-}$; 炎症; 胆固醇

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0104-07

The anti-atherosclerotic effect and mechanism study of berberine in hyperlipidemic $ApoE^{-/-}$ mice

ZUO Xuan[#], LUO Jin-que[#], JIANG Xin-hai, HAN Xiao-wan, WANG Xiao, LIU Peng,
LI Yi-ning, WANG Rui-hai, XU Yan-ni*, SI Shu-yi*

(NHC Key Laboratory of Biotechnology of Antibiotics, National Center for New Microbial Drug Screening, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The purpose of this research is to study the anti-atherosclerotic effects and mechanisms of berberine (BBR) in high fat diet (HFD) fed $ApoE^{-/-}$ mice, and then to lay a solid foundation of the clinical studies of BBR treatment. The hyperlipidemic $ApoE^{-/-}$ mice model was established by feeding HFD for 12 weeks. Mice were randomly divided into control group (chow diet), model group, BBR group (BBR-L: $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, BBR-H: $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and atorvastatin ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group. Mice were intragastric administration with BBR in 0.5% sodium salt of carboxy methyl cellulose. After 12 weeks, enface aortas were stained with oil red O, and the lesions area were

收稿日期: 2018-08-09; 修回日期: 2018-09-10.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程专项经费 (2016-I2M-1-011); 国家自然科学基金面上项目 (81573482); 国家重大新药创制专项 (2018ZX09711001-003-006).

[#]共同第一作者。

*通讯作者 Tel: 86-10-63180623, E-mail: xuyanniwendeng@hotmail.com;

Tel / Fax: 86-10-63180604, E-mail: sisymb@hotmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0724

analyzed by Image J software. The inflammatory factor levels were detected by suspension microarray kits. Liver total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and free fatty acids (FFA) were determined by commercial kits. Western blot was performed to examine the inflammatory pathway related and cholesterol and lipid transport related proteins' expression. All animal experiments were performed in accordance with the Regulation on the Administration of Laboratory Animals of Institute of Medicinal Biotechnology. After 12 weeks treatment, compared with model group, BBR treatment significantly reduced the lesions area of en face aortas and obviously inhibited serum proinflammatory factors such as IL-1 β and IL-6 compared with model group. In addition, BBR treatment obviously reduced liver TC, TG and FFA levels compared with model group. Furthermore, mechanic study showed that BBR significantly inhibited MAPKs and NF- κ B pathways, and increased cholesterol and lipid regulated proteins expression such as p-AMPK, LDLR, ABCA1 and SR-BI. In conclusion, BBR can obviously reduce enface aortas lesions in *ApoE*^{-/-} mice, which is related to inhibit inflammation and liver cholesterol and lipid accumulation.

Key words: berberine; atherosclerosis; *ApoE*^{-/-}; inflammation; cholesterol

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 是全世界范围内引起死亡的主要原因。动脉粥样硬化是引起 CVD 的主要原因^[1], 其症状通常在心肌梗塞、脑卒中和外周动脉疾病等并发症发生后才发现。动脉粥样硬化是脂质代谢失衡和持续炎症反应的结果^[2], 积极研究和发现动脉粥样硬化的发病机制和抗动脉粥样硬化药物的药理作用及其机制, 对于防治动脉粥样硬化以及心血管疾病具有重要的意义。

小檗碱 (berberine, BBR) 是中药黄连的主要有效成分, 属于异喹啉类生物碱, 又名黄连素。国内外研究发现 BBR 具有多种药理作用, 如胃肠炎、细菌性痢疾、调血脂、抗内皮损伤、抗炎、抗血栓等作用^[3]。高脂饲养的 *ApoE*^{-/-} 小鼠是国际公认的动脉粥样硬化的动物模型^[4]。本研究将通过高脂饲养 *ApoE*^{-/-} 小鼠构建动脉粥样硬化模型, 从调节炎症和影响脂质代谢方面对 BBR 抗动脉粥样硬化作用以及机制进行较为全面的探讨。

材料与方 法

动物 7 周龄的 *ApoE*^{-/-} 雄性小鼠购买于北京维通立华实验动物技术有限公司 (合格证号: 11400700248689)。实验动物饲养于中国医学科学院医药生物技术研究所 SPF 级动物房, 每日光照 12 h, 并于实验开始前 1 周适应饲养。所有动物实验饲养及操作严格遵守中国医学科学院医药生物技术研究所以及国家和北京市动物福利伦理与保护相关规定。

高脂饲料 高脂饲料由南通特洛菲饲料有限公司提供 (TP-26300), 普通饲料由中国医学科学院医药生物技术研究所动物房提供。饲料都经过高温灭菌处理。

主要试剂 BBR (纯度 98% 以上) 购自南京泽朗生物科技有限公司; 组织总胆固醇 (total cholesterol, TC) 来源于北京普利莱基因技术有限公司; 组织甘油

三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒购自 Biovision 公司; 小鼠游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 酶联免疫分析试剂盒来源于森贝伽 (南京) 生物科技有限公司; ATP 结合盒转运体 A1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)、低密度脂蛋白受体 (LDL receptor, LDLR) 和清道夫受体 B 族 I 型 (scavenger receptor class B type I, SR-BI) 抗体购自 Novus 公司; 腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)、p-AMPK、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、p-ACC、p-NF- κ B-p65、p-ERK 和 ERK 抗体购自 Cell Signalling Technology 公司; p-JNK、JNK、p-p38、p38 和 NF- κ B-p65 抗体购自 Bioworld 公司; GAPDH 抗体和 β -actin 抗体购自 Santa Cruz 公司; RIPA 裂解液、山羊抗兔、山羊抗鼠等二抗购自中杉金桥; 炎症因子试剂盒来源于 Bio-Rad 公司 (M60009RDPD); BCA 法蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo Fisher 公司; ECL 化学发光液购自 Millipore 公司; 谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 以及尿素 (Urea) 测定试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司。

Western blot RIPA 裂解液提取细胞中总蛋白。称取一定量的组织, 加入适量的 RIPA 裂解液, 用匀浆机破碎组织。将样品置于冰上裂解 30 min, 13 000 r \cdot min⁻¹、4 $^{\circ}$ C 下离心 20 min。BCA 法测蛋白浓度。通过 10% SDS-PAGE 分离蛋白质 (每孔 30 μ g), 然后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上。5% 脱脂乳封闭膜 1 h, 然后孵育相应的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗 3 次, 每次 10 min。然后孵育相应的二抗, 室温条件下孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 使用蛋白发光液在 Tanon 5200 全自动化学发光图像分析系统成像。

***ApoE*^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型构建及处理** 将 7 周龄的 *ApoE*^{-/-} 小鼠随机分为对照组 (5 只)、模型组 (10 只)、BBR 组 [BBR-L: 50 mg \cdot kg⁻¹、BBR-H: 150 g \cdot kg⁻¹,

溶于0.5%羧甲基纤维素钠(sodium salt of carboxy methyl cellulose, CMC-Na), 每组10只, 普通饲料喂养1周。从8周龄开始, 模型组和BBR给药组喂养高脂饲料, 对照组继续喂养普通饲料; BBR组同时灌胃给予一定剂量的BBR, 模型组和对照组灌胃给予0.5% CMC-Na。10周后, 动物禁食过夜。眼底静脉丛取血, 静置2 h, 室温离心15 min, 吸取血清储存于 -80°C 冰箱。脱颈椎处死小鼠后固定小鼠, 先取新鲜新鲜的肝脏组织, 立即冻于液氮中, 然后转移到 -80°C 冰箱储存。取好肝脏后, 剪开胸腔, 剪去胸骨, 暴露心脏, 立即进行心脏灌流, 先用生理盐水灌入大约10 mL, 然后换成4%多聚甲醛灌入大约3~5 mL。分离自主动脉至髂骨总分支的动脉全长, 置于4%多聚甲醛中固定过夜, 然后置于20%蔗糖中。

主动脉油红染色 将主动脉用PBS漂洗, 在解剖显微镜(Leica公司, DM2500)下小心去除主动脉周围的脂肪组织及其他组织, 并将其纵向剪开。用蒸馏水漂洗血管3次, 60%异丙醇浸泡10 min进行同步化。将同步化的血管放入现配的油红工作液中, 缓慢摇晃浸泡15 min。然后在60%异丙醇中分色1 min, 双蒸水漂洗3次, 在解剖镜下用相机立即拍照保存。

炎症因子的测定 使用Bio-Rad悬液芯片试剂盒(M60009RDPD), 按照试剂盒方法测定小鼠巨噬细胞上清以及小鼠血清中的TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和IL-10的水平。

TC、TG测定 按照试剂盒说明书进行测定肝脏TC等含量。将肝脏组织称重后加入裂解液($10\ \mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$), 用匀浆机破碎组织。静置10 min。取适量上清转移到1.5 mL离心管, 70°C 加热10 min, 室温 $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min, 取上清按照说明书酶标仪550 nm条件下分别测定TC和TG的含量。BCA法蛋白定量试剂盒做蛋白含量测定, 并以每mg蛋白浓度校正含量。

FFA酶联免疫分析 按照试剂盒说明书进行测定。称取一定量小鼠肝脏组织标本, 加入一定量PBS,

将标本匀浆充分, $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min, 收集上清。设置空白孔、待测样品孔和标准样品孔。按照说明书在450 nm测各孔吸光度来计算FFA的含量。利用BCA法测定样品的蛋白浓度, 以每毫克蛋白浓度校正含量。

ALT、AST及Urea水平测定 按照试剂盒的说明进行测定。吸取 $20\ \mu\text{L}$ *ApoE*^{-/-}小鼠血清, 加入 $80\ \mu\text{L}$ 生理盐水稀释5倍, 在7100型全自动生化分析仪测定小鼠血清的3个指标, 最后根据标准品计算样品的浓度。

统计学分析 所有数据均以mean \pm SEM表示, 组间统计学差异采用one-way ANOVA和Dunnett's test进行比较。*P*值小于0.05被认为有显著性差异。

结果

1 BBR对高脂饮食的*ApoE*^{-/-}小鼠主动脉斑块的作用

ApoE^{-/-}小鼠在喂养高脂饲料后会产生明显的主动脉粥样硬化病变症状。油性红O能特异性地使组织和细胞内脂质以及脂蛋白等染色, 主动脉油红染色呈红色部位说明存在动脉粥样硬化斑块。如图1A、B所示, 与对照组相比, 模型组小鼠主动脉中斑块的面积显著增加, 这说明动脉粥样硬化造模成功; 与模型组相比, 给予BBR可以显著减少主动脉斑块的面积。

2 BBR对高脂饮食的*ApoE*^{-/-}小鼠血清中炎症因子的影响

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, 因此, 本研究检测了BBR处理后对血清中炎症因子的影响。小鼠血清炎症因子测定实验结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平显著升高($P < 0.05$) (图2), 这也说明在动脉粥样硬化发生过程中确实伴随着炎症的增加。与模型组相比, BBR高、低剂量组均可以显著降低血清中促炎因子IL-1 β (图2A)、IL-6 (图2B)、TNF- α (图2C)的水平, 并升高抑炎因子IL-10的水平 (图2D), 这说明BBR在高脂饮食的*ApoE*^{-/-}小鼠中具有很好的抗炎作用。

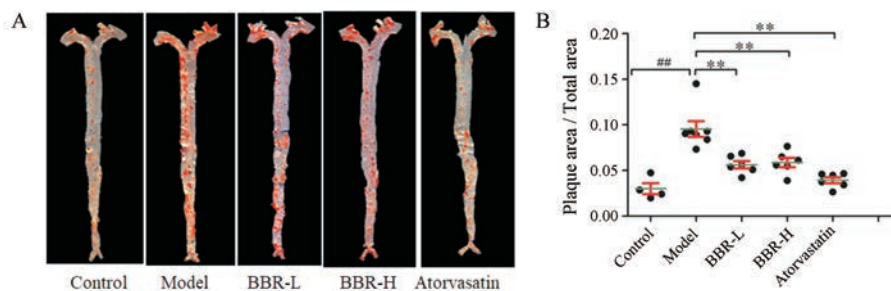


Figure 1 Berberine (BBR) treatment reduced atherosclerotic lesions in *ApoE*^{-/-} mice. A: Representative images of enface staining for the lesions of each group of mice were shown; B: Quantitative analysis of enface staining lesions was shown. $n = 4$ for control group, $n = 7$ for model group, $n = 6$ for each other group, mean \pm SEM. ## $P < 0.01$; ** $P < 0.01$

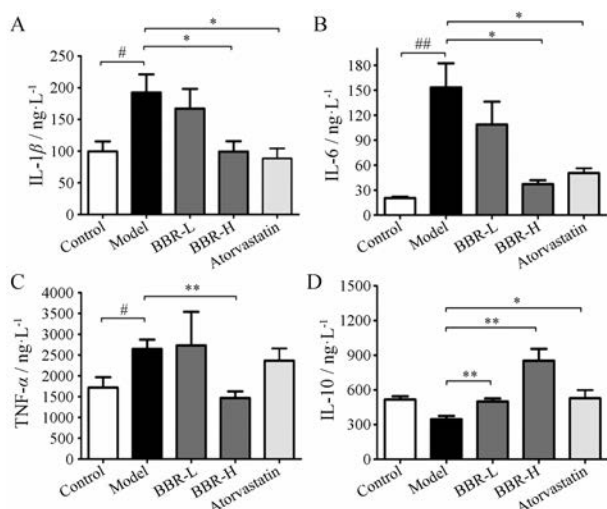


Figure 2 Effect of BBR on serum inflammatory factors in *ApoE*^{-/-} mice. Inflammatory factors were measured by suspension microarray kit. A: IL-1 β ; B: IL-6; C: TNF- α ; D: IL-10. $n = 4-5$ for control group, $n = 7-10$ for each other group, mean \pm SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 BBR对高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠肝脏中脂质的作用

小鼠肝脏总胆固醇TC、TG、FFA测定结果表明,与对照组相比,模型组小鼠肝脏中TC、TG、FFA水平显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,BBR高、低剂量组均可以显著降低TC、TG、FFA的水平(图3),这些结果表明BBR能显著减少高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠中肝脏中胆固醇和脂质聚积。

4 BBR在高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠体内抗炎作用的机制探讨

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)和核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)是主要的两条调节炎症反应的信号通路。MAPKs通路主要由p38分裂原激活蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、c-Jun氨基末端激酶(c-jun-N-terminal kinase, JNK)和细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)组

成。因此,本文考察了BBR对炎症的抑制作用是否与这两条通路相关。肝脏Western blot结果(图4)表明,与模型组相比,BBR治疗组能显著减少p38 MAPK、ERK和JNK的磷酸化,说明BBR能通过MAPK通路调节炎症反应。此外,与模型组相比,BBR治疗组能显著减少p65的磷酸化。这些结果提示,BBR可能是通过调节MAPKs和NF- κ B信号通路的活化而发挥抗炎作用。

5 BBR在高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠中减少肝脏脂质聚积的机制

巨噬细胞泡沫化及脂质聚积在动脉粥样硬化的发生发展过程中起到很重要的作用,并且有研究表明BBR可以调节AMPK及LDLR等来减少脂质的聚积^[5-9]。AMPK是生物能量代谢调节的关键分子。ACC是脂肪酸合成的关键酶,在脂类代谢调节方面具有重要作用。AMPK激活后通过磷酸化作用抑制ACC活性,增强脂肪酸氧化作用,进而抑制脂肪合成。LDLR介导的富含胆固醇的LDL内吞,是体内清除血浆中胆固醇的重要途径之一。ABCA1和SR-BI等是胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)过程中的关键受体。

BBR能显著减少高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠中肝脏中脂质聚积(图5),因此,本研究检测BBR抑制脂质聚积的机制是否与AMPK、LDLR、ABCA1以及SR-BI这些受体等有关。结果表明,BBR给药组能显著增加LDLR蛋白水平,增加RCT关键蛋白ABCA1和SR-BI的表达,且能上调p-AMPK并抑制其下游蛋白ACC的磷酸化,而上调p-AMPK、LDLR、ABCA1及SR-BI这些蛋白都对BBR减少肝脏脂质聚积有益。

6 BBR对高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠的肝肾毒性作用

本文测定了 *ApoE*^{-/-} 小鼠血清中的ALT、AST及Urea的水平,以评估在所用剂量下BBR的毒性。结果显示,BBR在两个剂量下均没有升高 *ApoE*^{-/-} 小鼠血清中的ALT(图6A)、AST(图6B)及Urea(图6C)的水平,

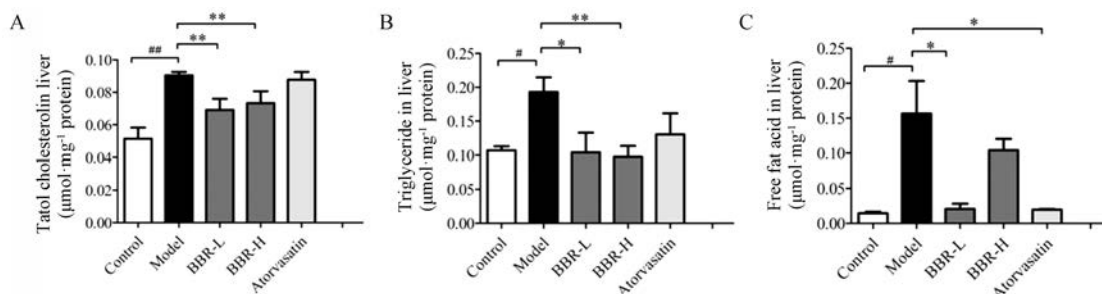


Figure 3 Effect of BBR on cholesterol distribution in liver of *ApoE*^{-/-} mice. BBR treatment lowers liver TC (A), TG (B) and FFA (C) in *ApoE*^{-/-} mice on HFD. $n = 4-5$ for control group, $n = 7-10$ for each other group, mean \pm SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

提示在所用剂量下, BBR 无明显肝肾毒性。

讨论

当前的研究表明, 动脉粥样硬化是一种慢性炎症

性疾病^[10], 其特征是包括胆固醇在内的脂质聚积在血管壁, 并且伴随血管炎症的增加。因此, 调节炎症、减少胆固醇在内的脂质聚积对动脉粥样硬化的预防和治疗有益, 是临床防治动脉粥样硬化的基本方案之一^[3]。

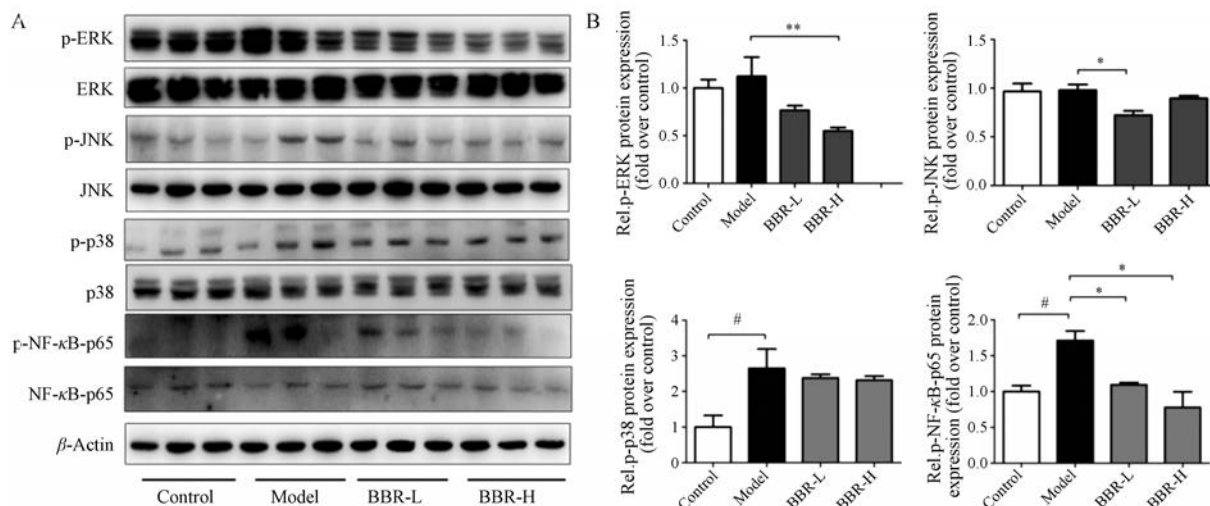


Figure 4 Effect of BBR on MAPKs and NF- κ B pathways in liver of *ApoE*^{-/-} mice. The protein expression related to inflammatory pathway were measured. Representative bands of Western blot results are shown (A), and the abundances were normalized to that of β -actin (B). $n = 5$ for control group, $n = 6$ for each other group, mean \pm SEM. # $P < 0.05$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

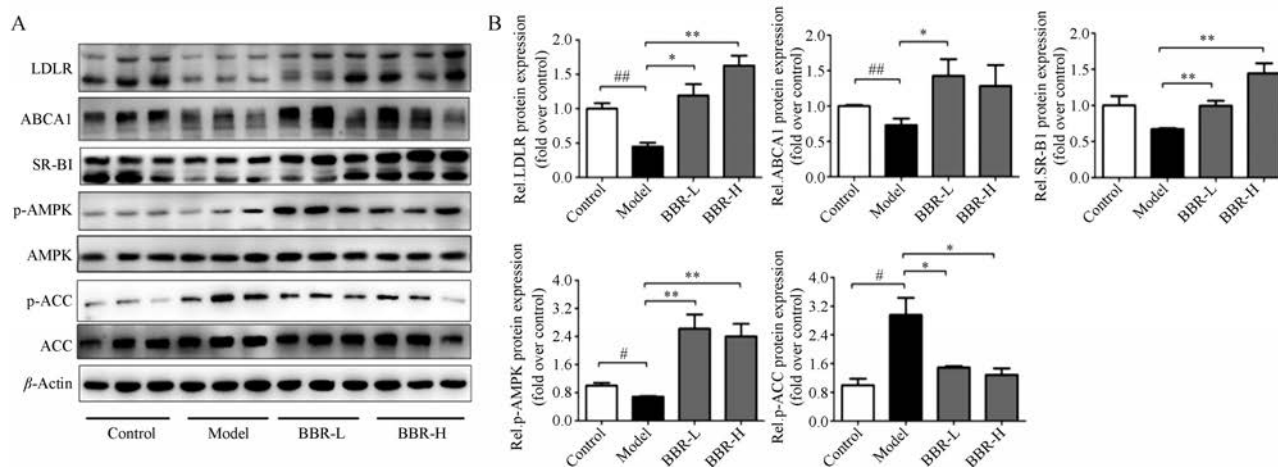


Figure 5 Effects of BBR on cholesterol metabolism related gene expression in liver of *ApoE*^{-/-} mice. Gene expressions were measured by Western blot analysis. Representative bands of Western blot results are shown (A), and the abundances were normalized to that of β -actin (B). $n = 5$ for control group, $n = 6$ for each other group, mean \pm SEM. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

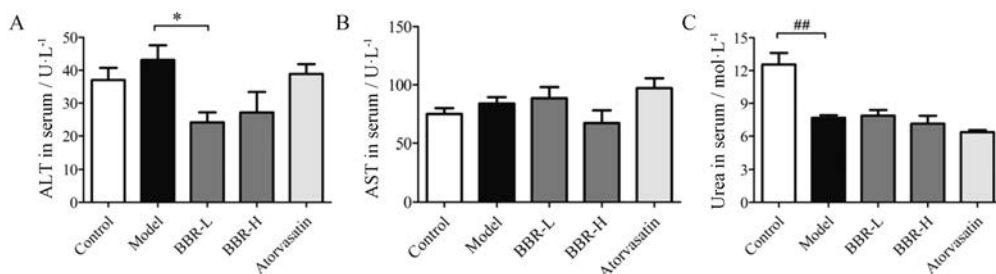


Figure 6 Evaluation of hepatotoxicity and nephrotoxicity of BBR in *ApoE*^{-/-} mice. (A) ALT, (B) AST and (C) urea levels in the serum were measured by the tissue ALT, AST and urea kits, respectively. $n = 4-5$ for control group, $n = 7-10$ for each other group, mean \pm SEM. ## $P < 0.01$; * $P < 0.05$

研究发现, BBR 作为中药黄连的主要有效成分, 具有多种药理作用, 如抗炎、调血脂、抗内皮损伤等作用。尽管已经有一些 BBR 在 *ApoE*^{-/-} 小鼠中调血脂、抗动脉粥样硬化方面的作用和机制报道^[11-15], 但是这些研究相对比较分散, 通常只设置一个给药剂量, 对 BBR 的机制考察又都集中在一个方面, 这对于 BBR 作为一个调血脂药的临床前研究远远不够。因此, 在本论文中, 课题组设置两个相对合理的剂量组 (BBR-L: 50 mg·kg⁻¹ 和 BBR-H: 150 mg·kg⁻¹), 除了考察并比较了不同剂量的 BBR 在抗炎和降脂方面的作用和机制外, 还考察了 BBR 的肝肾毒性, 为 BBR 的临床前以及临床研究提供科学支持。

本研究在肝脏中考察了 BBR 抗炎和降脂方面的机制。主动脉斑块是一个非常重要的抗动脉粥样硬化的评价指标, 所以, 本研究将所有的血管进行油红染色来考察 BBR 对主动脉斑块的影响。而考虑到肝脏在动脉粥样硬化的发生与发展中起着十分重要的作用^[16], 并且已有文献选用肝脏组织来做机制研究^[6,17,18], 所以, 本研究也选择了小鼠肝脏来考察 BBR 抗炎和降脂的作用机制。

BBR 具有很好的抗炎作用^[19], MAPKs 和 NF- κ B 是主要的两条调节炎症反应的信号通路。NF- κ B 被激活, 致炎细胞因子及细胞趋化因子分泌增多, 促发炎症发生^[3]。MAPKs 通路主要由 p38、JNK 和 ERK 组成。MAPKs 和 NF- κ B 信号转导途径参与炎症反应, 在抗炎抗动脉硬化中有重要的调节作用。研究表明, BBR 可以抑制 NF- κ B 活化, 下调 p38、ERK、JNK 及 MAPK 信号通路的活性表达, 从而抑制巨噬细胞、中性粒细胞在损伤血管局部聚集及表面黏附分子表达, 减少降低血管损伤后炎症因子 IL-6、TNF- α 的合成, 发挥抗炎功效^[20,21]。本研究结果表明, 在高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠中, 给予 BBR 确实能显著降低血清中促炎性因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等的表达, 并且 BBR 高剂量 (BBR-H) 组抗炎效果较低剂量 (BBR-L) 组好。机制研究表明, BBR 能显著下调包含 p38、ERK 和 JNK 的 MAPKs 信号通路, 抑制 NF- κ B 的活化, 这说明 BBR 在高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠体内抗炎作用与抑制 MAPKs 和 NF- κ B 通路相关。相比 BBR-L 组, BBR-H 组下调 JNK、ERK 和 p65 的磷酸化程度更高, 说明 BBR 不同剂量的抗炎作用与其对 MAPK 和 NF- κ B 通路的调节能力相关。

多项基础实验及临床研究结果均证实 BBR 及其衍生物具有调脂功效。在新西兰兔给予高脂饮食构建的动脉粥样硬化模型中, 与模型组相比, BBR 干预组显著降低血清中的 TC 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 水平, 减少粥样硬化斑块面积和脂质沉积扩大动脉管

腔径^[22,23]。宋丹青教授课题组^[24]等发现 BBR 的衍生物在体外可以拮抗清道夫受体 CD36 从而抗动脉粥样硬化。蒋建东教授课题组^[6]发现 BBR 能通过增强 LDLR 蛋白表达发挥调血脂作用。Li 等^[25]研究发现 BBR 给药 4 周能够有效调节高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠的血清脂质水平, 减少炎症介质对血管内皮的损伤并抑制血管钙化, 从而改善动脉粥样硬化发挥心血管保护作用。AMPK 信号通路是脂质代谢过程中重要的信号通路。本研究结果显示, BBR 高、低两个剂量组均能显著减少主动脉中的斑块面积, 没有显著性差别。BBR 给药显著减少肝脏中 TC、TG 及 FFA 的含量, 并且这种对脂质的调节作用可能与上调 LDLR、ABCA1、SR-BI 等的表达, 增加 AMPK 的磷酸化有关。相比 BBR-L 组, BBR-H 组对 LDLR、SR-BI、p-AMPK 的作用更强。此外, 本研究发现 BBR 在两个剂量下均无肝肾毒性, 在此剂量下安全性较好。

以上研究表明, BBR 给药 12 周能够有效抑制高脂饮食的 *ApoE*^{-/-} 小鼠主动脉中斑块的发生发展, 其机制可能与抑制炎症和调节包含胆固醇在内的脂质聚积有关。随着 BBR 抗动脉粥样硬化的研究的逐步深入, BBR 将来很可能成为一种重要的治疗动脉粥样硬化乃至心血管疾病的药物。

References

- [1] Frostegard J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease [J]. BMC Med, 2013, 11: 117.
- [2] Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options [J]. Nat Med, 2011, 17: 1410-1422.
- [3] Jia YJ, Li JJ. Anti-atherosclerosis effect of berberine and its mechanism [J]. Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志), 2013, 21: 364-368.
- [4] Jawien J. The role of an experimental model of atherosclerosis: *ApoE*-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2012, 13: 2435-2439.
- [5] Chang XX, Yan HM, Xu Q, et al. The effects of berberine on hyperhomocysteinemia and hyperlipidemia in rats fed with a long-term high-fat diet [J]. Lipids Health Dis, 2012, 11: 86.
- [6] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. Nat Med, 2004, 10: 1344-1351.
- [7] Lee YS, Kim WS, Kim KH, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states [J]. Diabetes, 2006, 55: 2256-2264.
- [8] Zhang M, Lv X, Li J, et al. Sodium caprate augments the hypoglycemic effect of berberine via AMPK in inhibiting hepatic gluconeogenesis [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 363:

- 122-130.
- [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: e25436.
- [10] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis — a matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27: 184-193.
- [11] Chen J, Cao J, Fang L, et al. Berberine derivatives reduce atherosclerotic plaque size and vulnerability in *ApoE*^{-/-} mice [J]. J Transl Med, 2014, 12: 326.
- [12] Feng M, Zou Z, Zhou X, et al. Comparative effect of berberine and its derivative 8-cetylberberine on attenuating atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 43: 195-202.
- [13] Zhu L, Zhang D, Zhu H, et al. Berberine treatment increases Akkermansia in the gut and improves high-fat diet-induced atherosclerosis in *ApoE*^{-/-} mice [J]. Atherosclerosis, 2018, 268: 117-126.
- [14] Li H, He C, Wang J, et al. Berberine activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma to increase atherosclerotic plaque stability in *ApoE*^{-/-} mice with hyperhomocysteinemia [J]. J Diabetes Investig, 2016, 7: 824-832.
- [15] Feng M, Kong SZ, Wang ZX, et al. The protective effect of coptisine on experimental atherosclerosis *ApoE*^{-/-} mice is mediated by MAPK/NF- κ B-dependent pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 93: 721-729.
- [16] Ponziani FR, Pecere S, Gasbarrini A, et al. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 9: 1055-1067.
- [17] Song D, Fang G, Mao SZ, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis by NF- κ B-dependent mechanisms [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822: 1650-1659.
- [18] Liu Y, Major AS, Zienkiewicz J, et al. Nuclear transport modulation reduces hypercholesterolemia, atherosclerosis, and fatty liver [J]. J Am Heart Assoc, 2013, 2: e000093.
- [19] Lee S, Lim HJ, Park HY, et al. Berberine inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation and migration *in vitro* and improves neointima formation after balloon injury *in vivo*. Berberine improves neointima formation in a rat model [J]. Atherosclerosis, 2006, 186: 29-37.
- [20] Hu Y, Chen X, Duan H, et al. Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB2 in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009, 31: 550-555.
- [21] Wang QZ, Guo Y, Han LM, et al. The inhibitory effect of berberine on COX-2 by ERK and JNK signal transduction pathway [J]. J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报), 2009, 30: 2935-2939.
- [22] Xu WT, Huang JJ, Zhu LB, et al. Effect of berberine on vulnerable plaque and blood lipid in rabbit atherosclerosis [J]. Suzhou Univ J Med Sci (苏州大学学报(医学版)), 2010, 2: 280-283.
- [23] Qiu HM, Yang FJ, Zhang Q, et al. Effect of berberine on lipid metabolism and atherosclerosis and its mechanism [J]. J Chongqing Med Univ (重庆医科大学学报), 2012, 37: 661-664.
- [24] Li YH, Wang L, Hong B, et al. Synthesis of 13-hexyl berberine analogues and structure-activity relationship of CD36 antagonistic activity [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 1128-1133.
- [25] Li XM, Wang QZ, Shi J, et al. Berberine improves vascular inflammatory response and calcification in atherosclerotic mice [J]. Basic Clin Med (基础医学与临床), 2018, 38: 163-168.