

小檗碱对高脂血症鼠脂联素的调控作用及其对血脂指标和斑块形成的影响

曹辉, 裴蓓, 徐文, 曹飞, 吴松

湖北省荆州市中心医院, 湖北 荆州 434401

摘要: **目的** 研究小檗碱对高脂血症鼠脂联素的调控作用及其对血脂指标和斑块形成的影响。 **方法** 在 40 只 Wistar 雄性鼠随机选取 30 只并喂养高脂饲料饮食进行高血脂(HLP)造模, 对照组($n=10$)则喂养正常食物并自由摄取水。10 周后, 将 HLP 模型随机分为 3 组: HLP 组($n=10$)、HLP+LBB 组($n=10$)和 HLP+HBB 组($n=10$)。对 HLP+LBB 组鼠进行低剂量小檗碱(berberine, BB)灌胃($150 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$), HLP+HBB 组高剂量小檗碱灌胃($300 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$), 对照组和 HLP 组则以生理盐水代替。连续喂养 10 周后测定并比较 4 组鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)、血清总脂联素和高分子量脂联素含量, 以及心肌梗死斑块面积。 **结果** 造模后, 与对照组相比, HLP 组大鼠 TG、TC 和 LDL-C 显著升高, HDL-C 水平显著下降($P<0.05$)。提示 HLP 大鼠造模成功。与 HLP 组相比, HLP+LBB 组、HLP+HBB 组 TG、TC 和 LDL-C 显著降低($P<0.001$), HLP+LBB 组 HDL-C 水平显著升高($P<0.05$)。四组大鼠血清总脂联素含量差异无统计学意义($P>0.05$), 但 HLP 组中高分子量脂联素与总脂联素的比值显著低于对照组, 而 HLP+HBB 组显著高于 HLP 组($P<0.05$)。与对照组比较, AdipoR1 在 HLP 组中表达下调($P<0.05$), 而 HLP+HBB 组显著高于 HLP 组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。AdipoR2 在 HLP 组中的表达无明显变化, 但 HLP+HBB 组显著高于对照组($P<0.05$)。HLP+HBB 组梗塞面积[(11.4 ± 1.0)%]显著低于 HLP 组[(52.2 ± 0.9)%]和 HLP+LBB 组[(33.1 ± 1.1)%](均 $P<0.05$)。 **结论** 小檗碱可对抗高脂血症鼠血中脂联素的下调, 这一干预可能在血脂指标和斑块形成方面起到改善作用。

关键词: 高脂血症; 脂联素; 脂联素受体; 小檗碱

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)05-0561-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.05.013

Role of berberine in regulating adiponectin and its impact on blood lipid indexes and atheromatous plaque formation in hyperlipidemia rats

CAO Hui, PEI Bei, XU Wen, CAO Fei, WU Song

Jingzhou Central Hospital, Jingzhou, Hubei 434401, China

Abstract: **Objective** To explore the role of berberine in regulating adiponectin and its influence on blood lipid indexes and atheromatous plaque formation in rats with hyperlipidemia (HLP). **Methods** Hyperlipidemia rat models were induced by feeding male Wistar rats with high-cholesterol diet for 30 days, and another 10 rats treated with regular food and water were selected as the control group. After 10 weeks, the 30 hyperlipidemia rats were randomly assigned into 3 groups, HLP group ($n=10$), HLP+LBB group ($n=10$) and HLP+HBB group ($n=10$). The latter two groups were respectively given low-dosage ($150 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) and high-dosage ($300 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$) berberine for 10 weeks, while the control group and the HLP group

作者简介: 曹辉 (1986-), 男, 湖北荆州人, 本科学历, 主要从事药剂科工作。

参考文献

- [1] Diggle L. Rotavirus diarrhoea and future prospects for prevention[J]. Br J Nurs, 2007, 16(16): 970-974.
- [2] WHO. Rotavirus vaccines. WHO position paper - January 2013[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2013, 88(5): 49-64.
- [3] Kawai K, O'Brien MA, Goveia MG, et al. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: a systematic review[J]. Vaccine, 2012, 30(7): 1244-1254.
- [4] 刘晓玲, 陈青山, 吴泰顺. 2010-2014 年深圳市宝安区其他感染性腹泻流行病学特征[J]. 实用预防医学, 2017, 24(1): 120-123.
- [5] 刘晓玲, 王卫云, 陈青山, 等. 深圳市宝安区 5 岁以下儿童轮状病毒腹泻发病危险因素分析[J]. 华南预防医学, 2016, 57(2): 147-150.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构消毒技术规范[Z]. 2012.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 疫源地消毒总则[Z]. 2004.
- [8] 杨绍基, 任红. 传染病学[M]. 第 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 52-57.
- [9] 詹志强, 叶发忠, 彭敬, 等. 深圳市宝安区计划免疫工作人员现状分析[J]. 华南预防医学, 2015, 56(3): 297-298.
- [10] 鲍建敏, 任建华, 胡红艳. 广州市部分流动儿童家长对第 2 类疫苗的的认知程度、儿童疫苗接种情况及其影响因素[J]. 职业与健康, 2013, 29(2): 223-225.
- [11] 方琼, 王永刚, 蔡琳, 等. 2013 年深圳市福田区本地和流动儿童一类与二类疫苗接种现况调查分析[J]. 实用预防医学, 2015, 22(3): 322-323.
- [12] Agocs MM, Serhan F, Yen C, et al. WHO global rotavirus surveillance network: a strategic review of the first 5 years, 2008-2012[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2014, 63(29): 634-637.

收稿日期: 2017-04-11

were given normal saline. After 10 weeks, the serum levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), serum total adiponectin and high molecular weight (HMW) adiponectin were tested and compared between the four groups; meanwhile, the infarction areas of the rat hearts were evaluated and compared. **Results** Compared with the control group, the serum levels of TG, TC and LDL-C in the HLP group were significantly increased, but the serum level of HDL-C was significantly decreased, suggesting that the HLP rat models were successfully established. Compared with the HLP group, the serum levels of TG, TC and LDL-C in the HLP+LBB group and the HLP+HBB group were significantly decreased ($P<0.001$), but the serum level of HDL-C in the HLP+LBB group was significantly increased ($P<0.05$). No statistically significant difference was found in the serum total adiponectin level among the 4 groups ($P>0.05$). The ratio of HMW adiponectin to total adiponectin was significantly lower in the HLP group than in the control group, but it was significantly higher in the HLP+HBB group than in the HLP group ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression of AdipoR1 protein in the HLP group was down-regulated, but it was significantly higher in the HLP+HBB group than in the HLP group, with a statistically significant difference ($P<0.05$). The expression of AdipoR2 protein in the HLP group showed no apparent variation, but it was significantly higher in the HLP+HBB group than in the control group ($P<0.05$). The infarction area in the HLP+HBB group was significantly less than those in the HLP group and the HLP+LBB group ($(11.4\pm1.0)\%$ vs. $(52.2\pm0.9)\%$, $(11.4\pm1.0)\%$ vs. $(33.1\pm1.1)\%$, both $P<0.05$). **Conclusions** Berberine can confront the deregulation of adiponectin expression in hyperlipidemia rats, and it may be a potential therapeutic strategy for blood lipid and atheromatous plaque formation.

Key words: hyperlipidemia; adiponectin; adiponectin receptor; berberine

高血脂(hyperlipidemia, HLP)是一种渐进性损伤全身的系统性疾病,其临床特征是血流中脂类含量过高,如甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高,而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平下降,导致全身动脉硬化加速,是脑中风、心肌梗塞、心源性猝死和冠状动脉疾病的重要风险因子^[1-2]。目前已经证实的是,由脂肪组织分泌形成的一类脂肪因子脂联素(adiponectin),对高血脂症发挥拮抗作用^[3]。近年来有研究表明,小檗碱能够调节异常脂质代谢^[4],但其具体机制仍不明确。本实验通过研究脂联素在高血脂症中的作用,并进一步探讨小檗碱对高血脂症鼠脂联素的调控作用及其对血脂指标和斑块形成的影响,初步明确小檗碱在此过程中的作用机制,以期为高血脂药理性治疗对策的替代指标提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 冷冻高速离心机(Thermo Scientific Centrifuge CL2, Thermo Fisher Scientific), -80℃冰箱(海尔,上海), -20℃冰箱(海尔,上海),日立全自动生化分析仪 7600(日立,日本),酶标仪, anti-AdipoR1、anti-AdipoR2 和 β -actin 抗体(上海银海圣生物科技有限公司, TTC 染液(南京建成生物工程研究所), PVDF 膜(杭州兴源离型膜有限公司)。

1.2 高血脂鼠模型的构建 40 只 8 周龄 Wistar 雄性鼠(体重: 300 ± 20 g)由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2014-0021 号。将所有鼠饲养在 SPF 级动物房,实验动物使用许可证号为 SYXK(鄂)2015-0052 号。饲养条件:温度(21 ± 2)℃,相对湿度 30%~70%,光照周期 12/12 h。在 40 只 Wistar 雄性鼠随机选取 30 只并喂

养高脂饲料饮食进行高血脂(HLP)造模,并对该组鼠分别编号,对照组($n=10$)则喂养正常食物并自由摄取水。高脂饲料配方组成为:基础饲料 81%,胆固醇 2%,猪油 7%,蛋黄粉 10%。连续喂养 10 周后,尾静脉采血测定血脂水平, TG、TC 和 LDL-C 显著升高, HDL-C 水平显著下降,说明高脂血症模型造模成功^[5]。将 HLP 模型鼠随机分为 3 组: HLP($n=10$), HLP+LBB($n=10$), HLP+HBB($n=10$)。对 HLP+LBB 鼠进行低剂量小檗碱(berberine, BB)灌胃 [$150\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$], HLP+HBB 进行高小檗碱灌胃 [$300\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$], 对照组和 HLP 组则以生理盐水代替。继续喂养 10 周后采集鼠血清和分离心脏组织进行检测。所有动物实验遵循动物研究伦理委员会的批准及伦理指导。

1.3 血脂检测 对鼠进行禁食 6 h 后,用 2%戊巴比妥钠麻醉心脏后取血 3 ml, 1 000 g 4℃离心 20 min 获得血清,用自动生化分析仪测定 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 含量。

1.4 总脂联素和高分子量脂联素的测定 分别采用美国脂联素 ELISA 试剂盒和高分子量脂联素 ELISA 试剂盒进行测定。将-80℃保存的样品和试剂盒置于室温下平衡后,将抗总脂联素和抗高分子量脂联素抗体分别包被于微板上,然后分别加入标样、待检样品和空白对照(PBS),依次加入辣根过氧化物酶孵育和酶底物显色测 450 nmOD 值。做标准曲线并计算总脂联素和高分子量脂联素的含量及其比值。

1.5 Western blot 检测脂联素受体 取分离的心脏组织 100 mg 在 PBS 溶液中进行匀浆,加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液并进行 2 000 g 4℃离心 10 min,保留上清液并取少量进行 Bio-Rad 蛋白定量分析。根

据测定的蛋白浓度均衡样品开始浓度进行 SDS-PAGE 电泳,参数设置:上层胶低压(80 V);溴酚蓝下层胶高压(120 V);90 min。电泳完成后进行 PVDF 转膜(300~400 mA,60 min),然后加入封闭液室温孵育 1 h,加入一抗(anti-AdipoR1、anti-AdipoR2 和 β -actin 抗体)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,用 BeyoECL Plus 检测蛋白(暗盒压片,洗片,显影)。

1.6 TTC 染色 每组动物在灌注结束后,将前室间支原位重新结扎、经舌静脉静脉推注 0.05%伊文氏兰 1.5 ml,缺血区清晰显示后,快速去除心脏并用冷却生理盐水冲洗后剪去心房及右心室。 -20°C 冷冻 10 min,将左心室横切成 6 片,相等厚度,然后在硫酸纸上绘出整片面积及缺血区面积后,用 IBAS 图像分析仪求出梗塞区,用 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)对高脂血症鼠心脏组织染色。先将分离的心脏组织进行 -20°C 处理,再切成 2 mm 薄片,将薄片放入 0.05%TTC 溶液中(TTC 和磷酸盐缓冲液)进行染色。光敏感脂溶性复合物 TTC 可以被活组织内的脱氢酶还原为 1,3,5-三苯甲臍(TPF)显红色,死组织或受损斑块则不与之发生反应而显苍白。37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 30 min 后进行观察和拍照。通过 IBAS 图像分析仪测定切片积分吸光度,每张切片测定 5 个视野。

1.7 统计分析 采用 SPSS 21.0 统计软件包进行数据分析。制图分析软件为 GraphPad Prism 6。计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 ANOVA 方差分析,发现差异采用 SNK 检验进行两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组大鼠的血脂含量比较 见表 1。造模后,与对照组相比,HLP 组大鼠 TG、TC 和 LDL-C 显著升高,HDL-C 水平显著下降($P<0.05$),提示 HLP 大鼠造模成功。与 HLP 组相比,HLP+LBB 组、HLP+HBB 组 TG、TC 和 LDL-C 显著降低($P<0.001$),HLP+LBB 组 HDL-C 水平显著升高($P<0.05$),差异均有统计学意义。

表 1 四组大鼠的血脂指标水平比较(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TG	TC	LDL-C	HDL-C
对照组	10	0.89 \pm 0.12	1.11 \pm 0.15	0.12 \pm 0.05	0.85 \pm 0.11
HLP 组	10	4.65 \pm 0.14 ^①	5.11 \pm 1.37 ^①	3.99 \pm 1.01 ^①	0.71 \pm 0.08 ^①
HLP+LBB 组	10	2.52 \pm 0.15 ^{①③}	3.20 \pm 1.15 ^{①③}	1.21 \pm 0.31 ^{①③}	0.81 \pm 0.06 ^②
HLP+HBB 组	10	0.92 \pm 0.16 ^③	1.47 \pm 1.41 ^③	0.19 \pm 0.08 ^③	0.78 \pm 0.09

注:①与对照组相比, $P<0.001$;②与 HLP 组相比, $P<0.05$;③与 HLP 组相比, $P<0.001$ 。

2.2 脂联素血清含量水平 总脂联素的血清含量在四组鼠中无明显变化,见图 1。但高分子量脂联素的浓度不同,HLP 组中高分子量脂联素与总脂联素的比值显著低于对照组($P<0.05$);而 HLP+HBB 组的比值显著高于 HLP 组($P<0.05$),见图 2。

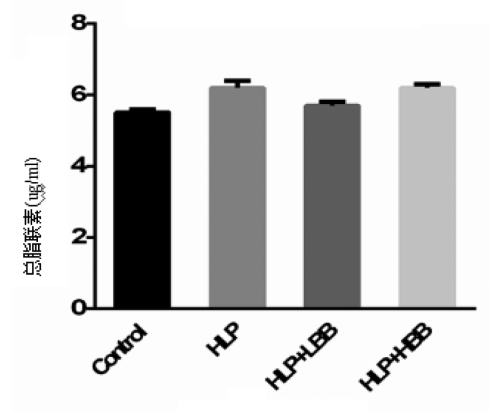
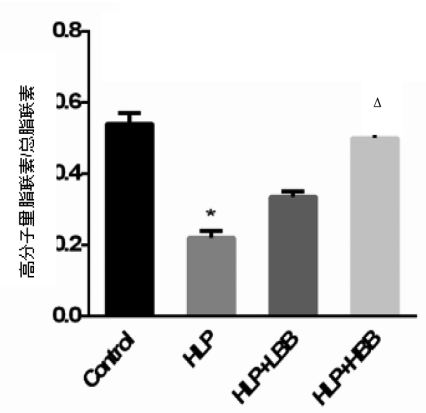


图 1 总脂联素在鼠血清中的浓度

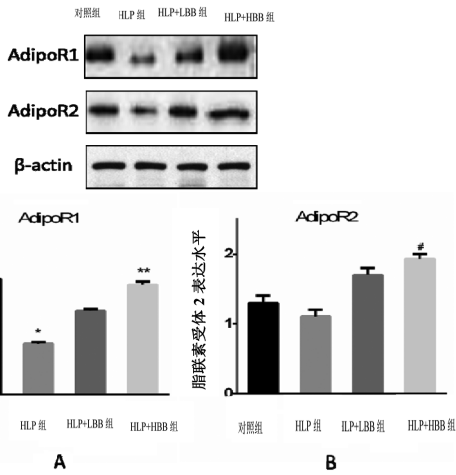


注: * 与对照组比较, $P<0.05$; Δ 与 HLP 组比较, $P<0.05$ 。

图 2 鼠血清中高分子量脂联素与总脂联素比值

2.3 心脏组织中脂联素受体 1(AdipoR1)和脂联素受体 2(AdipoR2)的蛋白水平表达 用 Western blot 分别检测到心脏组织中 AdipoR1 和 AdipoR2 蛋白表达,与对照组比较,AdipoR1 在 HLP 组中表达下调($P<0.05$),而 HLP+HBB 组显著高于 HLP 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。AdipoR2 蛋白表达结果显示,其在 HLP 组中的表达无明显变化,但 HLP+HBB 组显著高于对照组($P<0.05$)。见图 3。

2.4 高脂血症鼠心脏梗塞区面积 对照组鼠无梗塞区(无苍白区域),而在 HLP、HLP+LBB 和 HLP+HBB 组均检测到苍白梗塞区,且发生梗塞的面积有差异。HLP+LBB 和 HLP+HBB 组梗塞斑块面积显著低于 HLP 组($P<0.001$);HLP+HBB 组显著低于 HLP+LBB ($P<0.001$)。见表 2。



注:A AdipoR1 蛋白表达,*与对照组比较, $P<0.05$; **与 HLP 组比较, $P<0.05$;B AdipoR2 蛋白表达。#与对照组比较, $P<0.05$ 。

图 3 Western blot 检测鼠心脏组织中脂联素受体 1 和 2 的蛋白表达水平

表 2 TTC 染色测定高血脂鼠心脏组织梗塞面积($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	梗塞面积(%)
HLP 组	10	52.2±0.9
HLP+LBB 组	10	33.1±1.1 ^①
HLP+HBB 组	10	11.4±1.0 ^{①②}

注:①与 HLP 组相比, $P<0.001$;②与 HLP+LBB 组相比, $P<0.001$ 。

3 讨论

脂肪组织是生命体中重要的动态内分泌器官,分泌多种脂肪因子,如脂联素,其进入代谢循环并通过影响胰岛素敏感性、葡萄糖和脂代谢参与多种慢性疾病的发生^[6]。研究发现,在冠状动脉疾病研究对象中,脂联素的表达水平显著下降且易引发血管并发症^[7]。本实验研究结果表明,在成功造模的高血脂大鼠血清中,甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量显著升高,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平显著下降,符合高血脂鼠的血脂水平特征。HLP 能对抗上述作用,且高剂量小檗碱作用更强。同时,在各组大鼠血清高分子量脂联素水平与总脂联素比值方面进行比较发现,该比值在高脂血症大鼠中较正常鼠下降而总脂联素无明显变化,一定程度上提示高分子量脂联素主导调控脂联素在高脂血症中的作用。这可能是因为,脂联素的受体 AdipoR1 和 AdipoR2 分别于 AMP 激酶和过氧化物酶体增殖物激活受体-α(PPAR-α)通路的激活相关^[8]。激活的 AdipoR1 和 AdipoR2 可以促进线粒体生物合成,提高脂肪酸氧化,上调葡萄糖摄取并抑制心血管疾病代谢危险因素,比如炎症和氧化应激^[9]。同样的,受损的 AdipoR1 和 AdipoR2 导致胰岛素耐受性和葡萄糖不良反

应^[10]。小檗碱是一种植物提取物,研究发现其可用于治疗糖尿病、脂代谢异常和一些心脑血管疾病并上调脂联素的表达^[11]。但由于具体机制尚不明确,因此缺少足够的证据能证实其可作为高血脂药理性治疗对策的替代指标。本实验中采用小檗碱处理高血脂鼠来调节脂联素的含量水平。结果发现,高血脂鼠表现出低脂联素,小檗碱上调高脂血症鼠高分子量脂联素血清含量、AdipoR1 和 AdipoR2 的蛋白表达,并抑制高血脂鼠的高甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白,下调高血脂指标。这与以往相关研究结果一致^[12]。此外,有研究表明,在高血脂兔模型中通过小檗碱处理可以降低发生动脉粥样斑块的可能^[13]。本实验中采用小檗碱处理高血脂鼠,结果表明其梗塞斑块面积显著降低,且降低程度与小檗碱剂量相关。表明小檗碱对高血脂大鼠的心脏起到一定保护作用,有助于缓解心肌梗死的可能。

综上所述,小檗碱可上调高脂血症鼠血中脂联素的表达,且对其的干预表达调控可以在血脂指标和斑块形成方面起到改善作用。

参考文献

[1] Nelson RH. Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. [J]. Prim Care, 2013, 40(40):195-211.

[2] Navaraboggan AM, Peterson ED, D'Agostino RB, et al. Hyperlipidemia in early adulthood increases long-term risk of coronary heart disease [J]. Circulation, 2015, 131(1):451-458.

[3] Fülöp P, Seres I, Lőrincz H, et al. Association of chemerin with oxidative stress, inflammation and classical adipokines in non-diabetic obese patients [J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(7):1313-1320.

[4] Zhou JY, Zhou SW, Zhang KB, 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.

[5] 孙赫,李文雄. 高血脂症大鼠模型几种造模方法的比较 [J]. 动物医学进展, 2014, 35(3):78-82.

[6] Correnti JM, Juskeviciute E, Swarup A, et al. Pharmacological ceramide reduction alleviates alcohol-induced steatosis and hepatomegaly in adiponectin knockout mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 306(11):959-973.

[7] Mostowik M, Gajos G, Zalewski J, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids increase plasma adiponectin to leptin ratio in stable coronary artery disease [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2013, 27(4):289-295.

[8] Combs TP, Marliss EB. Adiponectin signaling in the liver [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2014, 15(2):137-147.

[9] Martinez Cantarin MP, Keith SW, Waldman SA, et al. Adiponectin receptor and adiponectin signaling in human tissue among patients with end-stage renal disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(12):2268-2277.

[10] Parker-Duffen JL, Nakamura K, Silver M, et al. Divergent roles for adiponectin receptor 1 (AdipoR1) and AdipoR2 in mediating revascularization and metabolic dysfunction *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2014, 289(23):16200-16213.

[11] Wu U, Cha Y, Huang X, et al. Protective effects of berberine on high fat-induced kidney damage by increasing serum adiponectin and promoting insulin sensitivity [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11):14486-14492.

[12] Yoshida S, Fuster JJ, Walsh K. Adiponectin attenuates abdominal aortic aneurysm formation in hyperlipidemic mice [J]. Atherosclerosis, 2014, 235(2):339-346.

[13] 贾燕璐,李建军. 小檗碱的抗动脉粥样硬化作用及其机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(4):364-368.