

小檗碱在预防家兔颈动脉粥样硬化中对血管紧张素 ① 型受体的影响

何国厚, 周 岚, 王云甫, 艾志兵

(郧阳医学院附属太和医院神经内科, 湖北省十堰市 442000)

[关键词] 病理学与病理生理学; 小檗碱; 颈动脉粥样硬化; 血管紧张素 ① 型受体; 阳性细胞数

[摘要] 目的 探讨小檗碱在预防家兔颈动脉粥样硬化中对血管紧张素 ① 型受体的影响。方法 32 只雄性新西兰大白兔随机分成正常组、颈动脉粥样硬化组(模型组)、生理盐水组(对照组)、小檗碱预防组(小檗碱组)。除正常组外, 其余各组建立颈动脉粥样硬化模型, 术前 1 周分别给予对照组和小檗碱组肌注生理盐水和小檗碱, 术后 4 周内继续进行上述干预。第 5 周麻醉处死后取右侧颈动脉, 行 HE 染色和血管紧张素 ① 型受体免疫组织化学染色。结果 HE 染色发现模型组颈动脉血管病变以泡沫细胞为主, 形成动脉粥样斑块; 对照组病理改变与模型组类似; 小檗碱组血管内膜轻度增厚。颈动脉血管紧张素 ① 型受体免疫组织化学染色发现, 模型组和对对照组颈动脉粥样硬化组织中平滑肌细胞和泡沫细胞胞膜血管紧张素 ① 型受体表达丰富, 阳性细胞数密度较正常组明显增高; 小檗碱组血管中膜平滑肌细胞仅有少量血管紧张素 ① 型受体表达, 血管紧张素 ① 型受体阳性细胞数密度明显低于对照组($P < 0.05$)。结论 小檗碱预防颈动脉粥样硬化的形成可能与其对颈动脉组织中血管紧张素 ① 型受体表达的调节有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Berberine on the Angiotensin ① Receptor Type 1 in the Prevention of Carotid Artery Atherosclerosis in Rabbits

HE Guo-Hou, ZHOU Lan, WANG Yun-Fu, and AI Zhi-Bing

(Neurology Department, Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China)

[KEY WORDS] Berberine; Carotid Artery Atherosclerosis; Angiotensin ① Receptor Type 1; Positive Cells Number

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of berberine on the angiotensin ① (Ang ①) receptor type 1 (AT1R) in the prevention of carotid artery atherosclerosis in rabbits. **Methods** Thirty-two New Zealand white rabbits were divided into four groups: normal group, carotid artery atherosclerosis (model group) group, normal saline group (control group) and berberine prevention group (berberine group). Except normal group with normal diet, other groups were fed with high cholesterol diet and air-dried on the common carotid, on the basis of that, physiological saline group and berberine group were treated with intramuscular physiological saline injection and berberine respectively. After air-dry for four weeks, all rabbits were sacrificed with anaesthesia. The right carotid arteries were also harvested for HE staining and immunohistochemistry of AT1R after the sacrifice. **Results** The vasculature structure of the carotid arteries was characterized by foam cells which formed atheromatous plaque in model group, and thickening in intima with few foam cells underneath in berberine group. There were few positive cells in media of the common carotid in normal group and the expression of AT1R was found both in model group and control group, and the former was much lower. The number density of the positive cells in berberine group were decreased compared with that in control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The mechanism of preventing development of carotid artery atherosclerosis for berberine may be through inhibiting expression of AT1R.

颈动脉粥样硬化性狭窄是缺血性脑卒中的主要病因, 而动脉粥样硬化的发生和发展与肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)密切相关^[1]。我们研究发现小檗碱有预防兔颈动脉粥样硬化形成的作用^[2], 本研究通过观察小檗碱在预防家兔颈动脉粥样硬化中对血管紧张素 ① 型受体(an-

giotensin ① receptor type 1, AT1R) 表达的影响, 初步探讨小檗碱预防颈动脉粥样硬化形成的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

高脂饲料由 96% 普通饲料、2% 纯化胆固醇颗粒和 2% 食用猪油配制而成; 小檗碱溶液(安徽涂山制药厂制造, 批号 0003121); AT1R 免疫组织化学试剂: 一抗为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品, 二抗和

[收稿日期] 2006-07-09

[修回日期] 2006-12-01

[作者简介] 何国厚, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病。周岚, 硕士, 医师, 研究方向为脑血管病。王云甫, 博士, 副教授, 研究方向为神经肌肉疾病。

辣根酶标记工作液为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.2 实验动物及分组

雄性新西兰大白兔 32 只, 体重 3~4 kg, 清洁级, 购自武汉大学动物实验中心, 常温、干燥、通风及自然光下饲养 1 周后, 随机分成四组: 正常组、颈动脉粥样硬化组(模型组)、生理盐水对照组(对照组)和小檗碱预防组(小檗碱组), 每组 8 只。正常组普通饲料喂养 5 周, 自由饮水, 每天进食 150 g; 模型组采用高脂饲料喂养加颈动脉内膜空气干燥法^[3]建立家兔右侧颈动脉粥样硬化模型, 高脂饲料喂养 1 周后, 进行颈动脉内膜空气干燥术, 术后继续高脂喂养 4 周; 对照组高脂饲料喂养并每日肌肉注射生理盐水 2 mL, 1 周后行颈动脉内膜空气干燥术, 术后继续高脂喂养 4 周, 并每日肌肉注射生理盐水 2 mL; 小檗碱组高脂饲料喂养并每日肌注小檗碱 5 mg/kg, 1 周后加颈动脉内膜空气干燥术, 术后继续高脂喂养 4 周, 同时每日肌注小檗碱 5 mg/kg。

1.3 组织病理学观察

实验第 5 周处死动物, 取颈动脉空气干燥段约 2 cm, 将其均分成四块, 随机取出其中一块, 用 4% 甲醛固定过夜后, 石蜡包埋, 常规行 HE 染色。

1.4 免疫组织化学染色

HE 染色证实模型成功后, 再将包埋的颈动脉组织行 AT1R 免疫组织化学染色。石蜡切片 60℃烤 30 min 后, 脱蜡至水; 10% H₂O₂ 浸入, 阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 3 次, 微波抗原修复 15 min, 自然凉至室温; 加入一抗(山羊来源的多克隆抗体, 1:100), 4℃过夜, 加入二抗生物素化兔抗羊抗体, 再滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液, 然后 DAB 显色, 最后苏木素衬染后脱水透明, 中性树脂封片; 光镜下观察 AT1R 阳性细胞数, 取平均值。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较先用方差分析, 为减少多重比较产生的 IV 类错误的机会, 故进行 LSD 检验多重均数两两比较。

2 结果

2.1 颈动脉形态学改变

正常组血管内皮细胞连接紧密、完整, 内膜无增厚, 中膜平滑肌细胞排列规则, 分布均匀, 未见泡沫细胞和坏死物堆积; 模型组血管内膜明显增厚, 中膜变薄, 并形成以泡沫细胞为主的动脉粥样斑块, 内有大量泡沫细胞堆积, 间有坏死物沉积; 对照组血管病

变以泡沫细胞为主的动脉粥样硬化灶, 内膜增厚, 中膜稍变薄, 平滑肌细胞排列紊乱, 内有大量泡沫细胞和坏死物质; 小檗碱组血管内膜明显增厚, 中膜未见明显变薄, 平滑肌细胞排列紊乱, 无明显泡沫细胞形成及粥样斑块(图 1)。

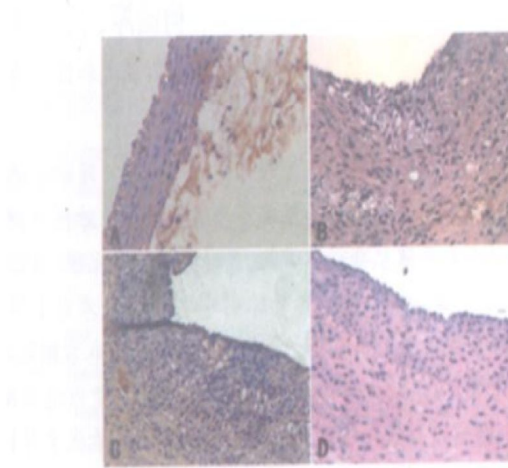


图 1. 颈动脉 HE 染色 ($\times 100$) A 为正常组, B 为模型组, C 为对照组, D 为小檗碱组。

2.2 颈动脉血管紧张素 AT_1 型受体免疫组织化学染色情况

正常组血管结构正常, 内膜未见明显 AT1R 阳性表达, 中膜有少量阳性表达的平滑肌细胞; 模型组内膜未见明显阳性细胞, 而粥样斑块中泡沫细胞胞膜 AT1R 表达丰富, 胞质中也有少量表达; 对照组颈动脉内膜未见明显的阳性细胞, 粥样斑块中有大量阳性表达的泡沫细胞, 胞质中有少量表达; 小檗碱组内膜轻度增厚, 但内膜未见阳性细胞表达, 只有中膜平滑肌细胞膜有少量 AT1R 表达(图 2)。模型组和对照组阳性细胞数密度明显高于正常组 ($P < 0.05$), 模型组与对照组间比较差异无显著性; 小檗碱组阳性细胞数密度明显低于模型组和对照组, 而小檗碱组与正常组比较差异无显著性(表 1)。

表 1. 血管紧张素 AT_1 型受体阳性细胞数密度 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	阳性细胞数密度 (个/高倍视野)
正常组	8	0.21 \pm 0.03 ^{bc}
模型组	8	37.12 \pm 3.28 ^a
对照组	8	35.20 \pm 3.45 ^a
小檗碱组	8	0.32 \pm 0.02 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

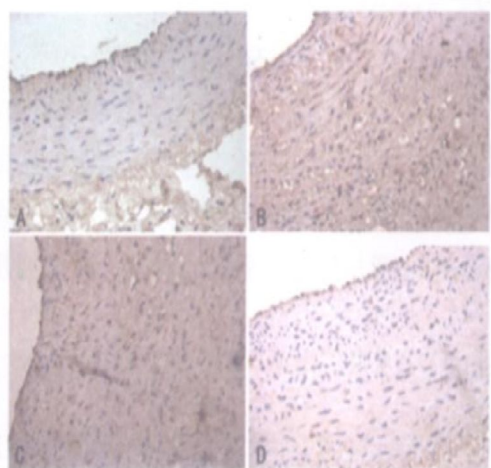


图 2. 颈动脉血管紧张素 AT1R 型受体免疫组织化学染色 ($\times 100$) A 为正常组, B 为模型组, C 为对照组, D 为小檗碱组。

3 讨论

小檗碱是从传统中药黄连素中提取的一种生物碱。大量研究报道它有促进血管内皮舒张因子(如一氧化氮)释放及抗血管平滑肌细胞增殖、保护血管内皮细胞和抗炎的作用^[4,6]。我们前期研究发现小檗碱能够预防兔颈动脉粥样硬化形成^[2]。动脉粥样硬化被认为是一种慢性炎症性疾病,而且 RAS 具有启动和促进其炎症过程进展的作用^[1,7]。RAS 主要成分包括血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)、血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、血管紧张素 iv(Ang iv)和血管紧张素 I (Ang I) 及其代谢产物等。免疫组织化学和分子生物学方法证实,家兔及大鼠动脉粥样硬化组织中 AT1R 呈高表达状态,且伴随单核细胞趋化蛋白 1 和氧自由基增多。动脉粥样硬化的发生和发展可通过 Ang I 过度激活 AT1R 等实现的,AT1R 可促进血管细胞因子和炎症因子的释放,引起单核细胞向血管壁迁移、转化及泡沫细胞的形成,同时诱发血管平滑肌细胞增殖和迁移,再加上间质病变,共同构成了动脉粥样硬化的发生和发展^[8]。我们在建立兔颈动脉粥样硬化模型上,观察 AT1R 表达情况,探讨小檗碱是否能通过影响 RAS 中 AT1R 表达,从而对预防兔颈动脉粥样硬化形成起作用。

为了评价兔颈动脉粥样硬化模型病理改变情况及小檗碱、生理盐水对兔颈动脉粥样硬化的干预情况,正常组及各干预组颈动脉行 HE 染色。病理结果发现模型组具有典型的动脉粥样硬化斑块,对照组也有动脉粥样硬化灶形成,而小檗碱组内膜明显

增厚,但未见动脉粥样硬化病灶,说明高脂喂养加颈动脉内膜空气干燥术建立的颈动脉粥样硬化模型较典型、可靠,而小檗碱组家兔颈动脉未见明显颈动脉粥样硬化形成。

动物实验证实 AT1R 阻滞剂(angiotensin receptor blocker, ARB)可抑制心血管增生、肥大,从而减轻兔、鼠和灵长类动物动脉粥样硬化病变^[9]。临床认为氯沙坦可与 AT1R 高度结合,起到降低血压的作用,并可减轻 AT1R 介导的 Ang I 激活效应,减少大量氧自由基生成及细胞因子和炎症因子的产生,从而抑制了动脉粥样硬化中血管的炎症反应和血管平滑肌细胞增殖、凋亡。AT1R 作为 RAS 的终末作用环节,在动脉粥样硬化的发生、发展中起到了非常重要的作用,阻断 AT1R,就可能抑制动脉粥样硬化的进展。本实验中通过检测各组颈动脉组织中 AT1R 表达发现,AT1R 主要在对照组和模型组颈动脉组织内皮下,特别是在中膜细胞膜中表达丰富,这与 Baichun 等^[10]研究的结果一致。而小檗碱组与对照组和模型组比较,AT1R 表达水平明显减低。说明小檗碱对 AT1R 有调节作用,从而可能起到预防兔颈动脉粥样硬化形成的作用。小檗碱是一种良好的 AT1R 抑制剂。

小檗碱可能通过抑制颈动脉组织中 AT1R 表达,从而预防动脉粥样硬化的形成。

[参考文献]

- [1] Allan RB, Adrian R, Mohsen SE. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1 257-266
- [2] 艾志兵, 何国厚, 刘勇. 小檗碱对家兔颈动脉粥样硬化干预的实验研究[J]. *中风与神经疾病*, 2005, **22** (2): 138-140
- [3] 艾志兵, 何国厚, 李承晏. 家兔颈动脉粥样硬化模型的建立[J]. *卒中与神经疾病*, 2005, **12** (2): 96-99
- [4] Kang DG, Sohn EJ, Kwon EK. Effects of berberine on angiotensin converting enzyme and NO/cGmp system in vessels [J]. *Vascular Pharmac*, 2002, **39**: 281-283
- [5] KO DG, Sohn EJ, Kwon EK. Vasorelaxant and antiproliferative effect of berberine [J]. *Eur J Pharmac*, 2003, **39**: 187-196
- [6] Kim TS, Kang BY, Cho D. Induction of interleukin 12 production in mouse macrophage by berberine, a benzodioxquinolizidine alkaloid, deviates CD4⁺ T cells from a Th2 to a Th1 responses [J]. *Immunol*, 2003, **109**: 407-414
- [7] Karsten G, Helmut D, Bernhard S. Renin-angiotensin system and atherosclerosis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, **19**: 770-773
- [8] Georg N, David GH. The AT1-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis, Part ② AT1 receptor regulation [J]. *Circulation*, 2002, **105**: 530-536
- [9] Werner N, Nickenning G. AT1 receptor in atherosclerosis: biological effects including growth, angiogenesis, and apoptosis [J]. *Eur Heart J Suppl*, 2003, **5** (Suppl A): 9-13
- [10] Baichun CY, Milan Phillip, Dagmara M. Increased angiotensin AT1 type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1433-439

(此文编辑 文玉珊)