

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0889-04

• 实验研究 •

小檗碱对家兔颈动脉粥样硬化组织核因子·B、血管细胞粘附分子 1 及单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响

何国厚¹, 王建², 刘勇¹

(1 湖北省郢阳医学院附属太和医院神经内科, 湖北省十堰市 442000; 2 浙江省富阳市人民医院内科)

[关键词] 病理学与病理生理学; 颈动脉粥样硬化; 小檗碱; 核因子·B; 血管细胞粘附分子 1; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] **目的** 探讨小檗碱预防家兔颈动脉粥样硬化形成的作用机制。**方法** 将 24 只大白兔随机分为正常对照组、模型组和小檗碱组。正常对照组给予普通饮食, 模型组和小檗碱组给予高脂饲料喂养 1 周后行右侧颈动脉内膜空气干燥术, 术后继续高脂饲料喂养 4 周以制成颈动脉粥样硬化模型, 小檗碱组在给予高脂饲料喂养的同时每日灌服小檗碱。第 5 周麻醉处死, 取右侧颈动脉组织行 HE 染色观察颈动脉病理改变, 行免疫组织化学染色检测核因子·B 的活性, 逆转录聚合酶链反应检测核因子·Bp65、血管细胞粘附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达水平。**结果** 模型组颈动脉血管内膜明显增生, 内膜下和中膜可见大量泡沫细胞堆积, 有明显的动脉粥样硬化斑块形成; 而小檗碱组的内膜轻度增厚, 内膜下有少量泡沫细胞形成。小檗碱组核因子·Bp65 阳性细胞数高于正常对照组 (19.58 ± 2.60 比 2.00 ± 0.93 , $P < 0.01$), 但明显低于模型组 (37.50 ± 2.45 , $P < 0.01$)。小檗碱组核因子·Bp65 mRNA (0.42 ± 0.05)、血管细胞粘附分子 1 mRNA (0.61 ± 0.11) 和单核细胞趋化蛋白 1 mRNA (0.57 ± 0.18) 的表达高于正常对照组 (分别为 0.18 ± 0.04 , 0.20 ± 0.04 和 0.33 ± 0.05 , $P < 0.01$), 但明显低于模型组 (分别为 0.66 ± 0.16 , 0.81 ± 0.11 和 0.76 ± 0.03 , $P < 0.01$)。核因子·B 的活性与血管细胞粘附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 表达量明显相关 ($r = 0.926$, $P < 0.01$; $r = 0.958$, $P < 0.01$)。**结论** 小檗碱可能通过抑制核因子·B 活性以及降低血管细胞粘附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的表达而预防家兔颈动脉粥样硬化。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Berberine on the Expression of Nuclear Factor Kappa B, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Carotid Artery Atherosclerosis of Rabbits

HE Guo-Hou, WANG Jian, and LIU Yong

(Taihe Hospital of Yunyang University, Shiyan 442000, China)

[KEY WORDS] Carotid Artery Atherosclerosis; Berberine; Nuclear Factor Kappa B; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Monocyte Chemoattractant Protein-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of berberine on preventing atherosclerosis (As) in rabbits

Methods New Zealand white rabbits ($n = 24$) were randomly divided into three groups including the normal group, the carotid artery atherosclerosis group and berberine group ($n = 8$). The rabbits of the normal group were fed with normal diet. Carotid atherosclerosis was established by an air-drying operation which was performed on the right common carotids and in conjunction with a high cholesterol diet in the second week for 4 weeks. Berberine was administered intragastrically daily for 5 weeks. The right carotid arteries were assayed by HE staining to investigate the effect of berberine on carotid atherosclerotic lesion and by immunohistochemistry staining to assay the effects of berberine on the activity of nuclear factor kappa B (NF- κ B), and by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to assay the effects of berberine on the expression of NF- κ Bp65, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). **Results** The air-operation in conjunction with a high cholesterol diet increased numerous foam cells compared with the normal group, which were decreased in the berberine group. The density of the positive cells increased from 2.00 ± 0.93 (the normal group) to 37.50 ± 2.45 (the carotid artery atherosclerosis group), and decreased to 19.58 ± 2.60 (berberine group) ($P < 0.01$). The relative copies of NF- κ Bp65 mRNA on β -actin increased from 0.18 ± 0.04 (the normal group) to 0.66 ± 0.16 (the carotid artery atherosclerosis group), and decreased to 0.42 ± 0.05 (berberine group). The relative copies of VCAM-1 mRNA on β -actin increased from 0.20 ± 0.04 (the normal group) to 0.81 ± 0.11 (the carotid artery atherosclerosis group), and decreased to 0.61 ± 0.11 (berberine group) ($P < 0.01$). The relative

[收稿日期] 2008-09-01 [修回日期] 2008-10-15

[作者简介] 何国厚, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管疾病, E-mail为 taheguo07@sina.com。刘勇, 硕士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为脑血管疾病和疼痛的治疗。王建, 硕士, 医师, 研究方向为脑血管疾病。

copies of MCP-1 mRNA expression on β -actin increased from 0.33 ± 0.05 (the normal group) to 0.76 ± 0.03 (the carotid artery atherosclerosis group) ($P < 0.01$), and decreased to 0.57 ± 0.18 (berberine group). The activity of NF- κ B was positively associated with the expression of VCAM-1 mRNA and MCP-1 mRNA ($r = 0.926$, $P < 0.01$; $r = 0.958$, $P < 0.01$). **Conclusions** Berberine could prevent carotid artery atherosclerosis by inhibiting the activity of NF- κ B and inhibiting the expression of VCAM-1 and MCP-1.

脑血管病是危害人类健康的主要疾病之一,具有发病率高、致残率高和致死率高的特点。缺血性脑血管病占脑血管病的80%左右,其中30%左右的缺血性脑血管病与颈动脉粥样硬化有关。我们前期的研究发现,小檗碱对兔颈动脉粥样硬化形成有抑制作用,其效果与舒降之作用相近^[1]。炎症因子在动脉粥样硬化的发生和发展过程中起主要作用,其中血管细胞粘附分子1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)与单核细胞趋化蛋白1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)可以促进炎症反应,其表达主要依赖核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)的调控。本研究拟通过观察小檗碱对颈动脉粥样硬化家兔NF- κ B活性、VCAM-1与MCP-1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 材料和方法

1.1 主要试剂

盐酸小檗碱片(每片100 mg)由东北制药总厂制造(批号200611025);纯化胆固醇颗粒购自北京海淀区微生物培养基制品厂;高脂饲料由96%普通饲料、2%胆固醇和2%食用猪油配制而成;NF- κ Bp65一抗、二抗和SABC复合物购自武汉博士德生物技术有限公司;DAB购自北京中杉金桥生物技术有限公司,RT-PCR试剂盒(F-580S)购自深圳晶美生物技术有限公司,由Finnzymes公司生产;RNA酶抑制蛋白(RNasin)和100 bp DNA Ladder购自深圳晶美生物技术有限公司,由Fementas Life Sciences生产;VCAM-1、MCP-1、NF- κ B及 β -actin引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2 动物实验

雄性新西兰大白兔24只,体重3~4 kg,清洁级,购自邵阳医学院实验动物中心,在自然风、白昼交替的室温下适应性喂养1周。将24只大白兔随机分成3组:正常对照组、颈动脉粥样硬化组(模型组)和小檗碱预防组(小檗碱组),每组8只。正常对照组予普通饲料喂养5周,自由饮水,每天进食150 g左右;模型组先给予高脂饲料喂养1周,然后行颈动脉内膜空气干燥术,术后继续高脂饲料喂养4周以建立家兔右侧颈动脉粥样硬化模型^[2];小檗碱组

同模型组一样建立右侧颈动脉粥样硬化模型,在予高脂饲料喂养同时每日灌服小檗碱100 mg/kg直至术后4周^[1]。利用高脂饲料喂养加颈动脉内膜空气干燥法^[3]复制新西兰大白兔右侧颈动脉粥样硬化模型。术后4周,麻醉处死,自颈内外动脉分叉起截取2 cm颈动脉组织。

1.3 HE染色观察颈动脉病理改变

每组每只大白兔所取的右侧颈动脉截取远端1 cm,4%多聚甲醛4℃过夜固定,石蜡包埋固定,5 μ m厚切片。每组每个标本随机选取1张切片,行HE染色观察其病理改变。

1.4 核因子 κ Bp65免疫组织化学染色

每组每个标本随机取5张石蜡切片,采用SABC法,其中一抗(兔来源的多克隆抗体,1:300 武汉博士德生物公司)4℃过夜,二抗生物素化鼠抗兔抗体(1:400),SABC复合物工作液孵育,DAB显色。光镜下观察NF- κ Bp65阳性细胞数目,随机选择不同的视野,每个标本观察4个不同区域计数阳性细胞数,每个标本的结果取平均值作为该标本的阳性细胞数。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测核因子 κ Bp65、血管细胞粘附分子1和单核细胞趋化蛋白1的mRNA表达

将每组每只大白兔所取右侧颈动脉近端1 cm组织迅速放入碾钵中,倒入少许液氮充分碾磨后,加入TRIzol试剂1 mL碾磨均匀,采取苯酚-氯仿法提取总RNA,调节总RNA浓度为0.1 g/L。总RNA采用AMV逆转录酶逆转录为cDNA。每只取2 μ L逆转录样本加入25 μ L扩增体系(包括10 mmol/L dNTP 1 μ L, 50 mmol/L Mg²⁺ 1 μ L, Pfu酶0.5 μ L, 10 μ mol/L上游引物1 μ L, 10 μ mol/L下游引物1 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 0.1% DEPC水16 μ L)。引物序列为NF- κ Bp65上游为5'-CGC ATC CAG ACC AAC AAC A-3',下游为5'-TGC CCA GAA GGA AAC ACC A-3',产物长度为819 bp;VCAM-1上游为5'-CCC AAA CAA AGG CAG AGT A-3',下游为5'-CTG AAA GAG GCT GTA GGT C-3',产物长度为197 bp;MCP-1上游为5'-ATC TCA GTG AAG AGG CTA ATG-3',下游为5'-GTG TTC TTG GGT TGT GGA-3';产物长度为201 bp。内参 β -actin上游为5'-TGC TGT

CCT TCT GGC TGA ACA TT -3,下游为 5-GAA TCA GAC AGC TTT CGG AAG TTG G-3,产物长度为 287 bp 反应条件为 94℃预变性 2 min 按 94℃变性 1 min → 59℃退火 1 min → 72℃延伸 1 min 的顺序进行 32个循环,最后 72℃再延伸 15 min。分别取 PCR 产物和 β-actin 扩增产物各 10 μL 混匀后行 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭 (EB) 做荧光指示剂,然后应用自动凝胶成像分析系统进行吸光度扫描,分别计算出每组每个标本的 NF-κBp65、VCAM-1 和 MCP-1 与 β-actin 的吸光度比值。

1.6 统计学分析

所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间先用方差分析,再行多重均数间两两比较。NF-κB 活性与 VCAM-1 mRNA 和 MCP-1 mRNA 关系行单因素相关分析。

2 结果

2.1 颈动脉 HE 染色结果

正常对照组颈动脉血管内膜完整,中膜为梭形平滑肌细胞;模型组有粥样斑块形成,内膜明显增厚,内膜下有大量泡沫细胞堆积;小檗碱组内膜也有轻度的增生,内膜下仅有少量的泡沫细胞形成,程度轻于模型组(图 1)。表明颈动脉粥样硬化模型制作是成功的,小檗碱具有干预颈动脉粥样硬化的作用。

2.2 颈动脉核因子 κB 免疫组织化学染色结果

正常对照组血管壁有少量 NF-κBp65 阳性表达细胞;模型组血管壁泡沫细胞、平滑肌细胞和内皮细胞的胞核中有 NF-κBp65 强阳性表达;小檗碱组在内膜、中膜的细胞核内可见 NF-κBp65 阳性表达。小檗碱组 NF-κBp65 阳性细胞密度明显高于正常对照组,但低于模型组(表 1 和图 1, $P < 0.01$)。

2.3 核因子 κBp65、血管细胞粘附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 表达水平

小檗碱组扩增带 NF-κBp65、VCAM-1 和 MCP-1 与 β-actin 吸光度比值均高于正常对照组 ($P < 0.01$),但明显低于模型组(表 1 及图 2, $P < 0.01$)。

表 1. 各组核因子 κBp65 活性及核因子 κBp65、血管细胞粘附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	NF-κB 阳性细胞数	NF-κBp65 mRNA	VCAM-1 mRNA	MCP-1mRNA
正常对照组	2.00 ± 0.92	0.18 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.33 ± 0.49
模型组	37.50 ± 2.44 ^a	0.66 ± 0.10 ^a	0.81 ± 0.11	0.76 ± 0.03 ^a
小檗碱组	19.58 ± 2.60 ^{ab}	0.42 ± 0.05 ^{ab}	0.61 ± 0.11 ^{ab}	0.57 ± 0.18 ^{ab}

a为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

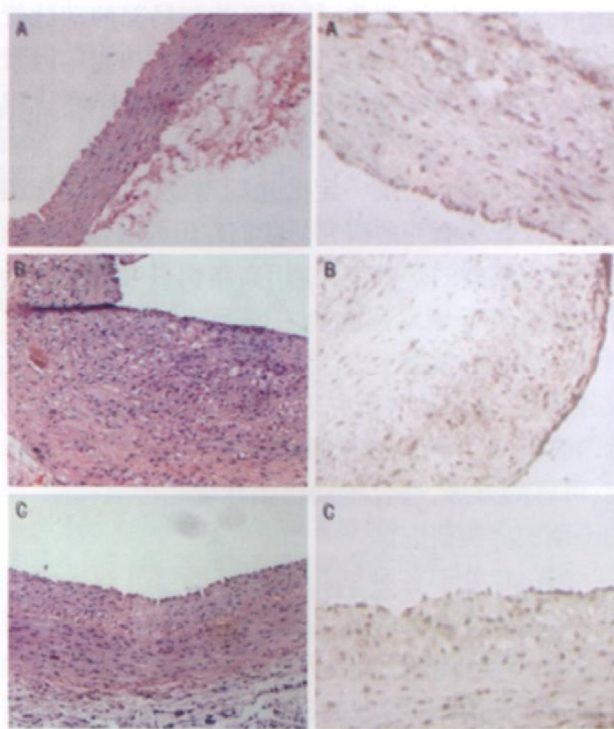


图 1. 颈动脉 HE 染色结果(左, x200) 及核因子 κB 免疫组织化学染色结果(右, x200) A 为正常对照组, B 为模型组, C 为小檗碱组。

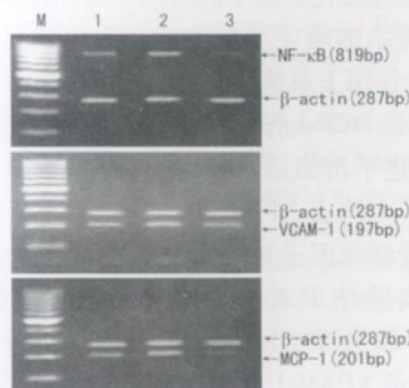


图 2. 核因子 κBp65、血管细胞粘附分子 1 和单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 表达 M 为相对分子质量 Marker, 1 为小檗碱组, 2 为模型组, 3 为正常对照组。

2.4 核因子 κB 活性与血管细胞粘附分子 1、单核细胞趋化蛋白 1 和核因子 κBp65 mRNA 相关分析

直线相关分析结果表明, NF-κB 活性与 VCAM-1、MCP-1 和 NF-κBp65 的 mRNA 水平呈显著正相关 ($r = 0.926$, $P < 0.01$; $r = 0.958$, $P < 0.01$; $r = 0.95$, $P < 0.01$)。

3 讨论

动物实验证明, 高脂饲料喂养在 3~5 个月内不

能形成颈动脉粥样硬化,原因可能与局部的动脉管腔结构、血流动力学特点以及内皮细胞功能等因素有关。球囊导管扩张法可以建立动脉粥样硬化模型,由于内膜剥脱不完整、中膜扩展性损伤的存在和损伤程度的不同以及一定的血栓形成等,不适于颈动脉粥样硬化病变的研究。我们在国内制作颈动脉粥样硬化模型的基础上,应用高脂饲料喂养加颈动脉内膜空气干燥术建立兔右侧颈动脉粥样硬化模型^[2]。此种方法操作简单,制作周期短,可重复性强,前期实验和本次研究表明高脂饲料喂养加颈动脉内膜空气干燥术制作颈动脉粥样硬化模型是稳定、可靠的方法,适合颈动脉粥样硬化形成机制、药物干预的实验研究。

NF- κ B处于各种细胞因子网络调节的中心环节。NF- κ B最多见的活化形式是P50-P65异源二聚体,NF- κ B的DNA结合活性由一组I κ B抑制蛋白(inhibitory I κ B)家族的抑制蛋白控制。通常情况下,以二聚体形式和I κ B结合在一起,存在于胞浆中。NF- κ B活化可以促进粘附分子、致炎症反应因子、趋化因子、生长因子、活性氧、巨噬细胞集落刺激因子和基质金属蛋白酶9等因子转录^[4]。NF- κ B可在动脉粥样硬化形成中的炎症反应、泡沫细胞形成、血管平滑肌的增生和细胞凋亡等环节起作用。在VCAM-1作用下单核细胞与内皮细胞粘附并向内皮下迁移,在MCP-1作用下单核细胞向活化内皮细胞募集,促进平滑肌细胞增殖。VCAM-1和MCP-1基因启动子中均有NF- κ B位点,VCAM-1和MCP-1基因转录受转录因子NF- κ B调控^[5]。

本实验结果表明在颈动脉粥样硬化模型组VCAM-1和MCP-1的mRNA表达明显高于正常对照组,提示VCAM-1和MCP-1可能参与了动脉粥样硬化的启动,相关性分析发现VCAM-1和MCP-1的mRNA表达与NF- κ B的活性呈正相关,提示可通过影响细胞核中NF- κ B的活性,而影响VCAM-1mRNA和MCP-1mRNA的表达。

小檗碱是从传统中药黄连中提取的一种异喹啉类生物碱,基础研究表明小檗碱可抑制血清中血管紧张素转化酶活性和促进血管内皮舒张因子的释放^[6],对抗H₂O₂引起的血管内皮细胞凋亡和坏死,

从而保护内皮细胞,抑制血管平滑肌细胞的增殖^[2]。我们的前期研究发现小檗碱具有预防兔颈动脉粥样硬化形成的作用,它能减轻巨噬细胞在动脉粥样硬化血管内的堆积^[7]。本实验中小檗碱组NF- κ B阳性细胞数高于正常对照组($P < 0.01$),但明显低于模型组($P < 0.01$);小檗碱组NF- κ Bp65、VCAM-1和MCP-1的mRNA表达高于正常对照组($P < 0.01$),而明显低于模型组($P < 0.01$)。Hsiang等^[8]发现在HePG2细胞小檗碱可能通过核转录因子NF- κ B信号通路抑制乙醛诱导的白细胞介素 β 和肿瘤坏死因子 α 产生。故推测小檗碱可能通过影响NF- κ B活性,降低VCAM-1和MCP-1的表达,减轻动脉粥样硬化的形成。

综上所述,NF- κ B、VCAM-1和MCP-1参与动脉粥样硬化形成和发展,小檗碱可能通过抑制动脉粥样硬化血管壁NF- κ B活性、下调VCAM-1和MCP-1的表达而发挥抗动脉粥样硬化作用,这可为临床上小檗碱防治动脉粥样硬化的产生提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] 艾志兵,何国厚,刘勇,等. 小檗碱对家兔颈动脉粥样硬化干预的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2005, 22(2): 138-140
- [2] 艾志兵,何国厚,李承晏,等. 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
- [3] KO WH, Sohn EJ, Kwon EK, et al. Vasorelaxant and antiproliferative effect of berberine [J]. Eur J Pharm, 2003, 39: 187-191.
- [4] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor kappa B is present in the atherosclerosis lesion [J]. J Clin Invest 1996, 97(7): 1715-722
- [5] Ruizo M, Bustos M, Miguel AH, et al. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor NF- κ B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis [J]. J Immunol 1998, 161(1): 430-439
- [6] Kang DG, Sohn EJ, Kwon EK, et al. Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGmp system in vessels [J]. Vascular Pharmacol 2002, 39: 281
- [7] 何国厚,艾志兵,刘勇,等. 小檗碱对兔颈动脉粥样硬化中内膜增生和巨噬细胞趋化作用的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23(1): 94-96
- [8] Hsiang CY, Wu SL, Cheng SE, et al. Acetaldehyde-induced interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production is inhibited by berberine through nuclear factor-kappaB signaling pathway in HePG2 cells [J]. J Biomol Sci 2005, 12(5): 791-801

(此文编辑 许雪梅)