

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2018)26-02-0144-08

小檗碱抑制氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞增殖及其分子机制

马春艳, 徐瑞霞, 姚雨宏, 李小林, 郭远林, 张彦, 李莎, 李建军

(中国医学科学院北京协和医学院国家心血管病中心阜外医院心血管疾病国家重点实验室
血脂异常与心血管病诊治中心, 北京市 100037)

[关键词] 小檗碱; 氧化型低密度脂蛋白; 人脐静脉内皮细胞; 细胞增殖; 信号通路

[摘要] 目的 探讨小檗碱对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增殖的抑制作用及其相关信号通路改变。方法 体外培养 HUVEC, 以 ox-LDL 刺激增殖并以不同浓度小檗碱干预, 采用细胞计数试剂盒 8 与 EdU 掺入实验检测小檗碱对 HUVEC 增殖的抑制作用, 通过实时荧光定量 PCR 及 Western blot 分析相关基因和蛋白表达及信号通路变化。结果 小檗碱(1~50 mg/L)呈浓度依赖性显著抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖, 并降低增殖细胞核抗原(PCNA)、核因子 κ B(NF- κ B)、凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)的表达; 该作用与 PI3K/Akt、ERK1/2 及 p38MAPK 信号通路蛋白的磷酸化水平降低相关。结论 小檗碱通过下调 PCNA、NF- κ B 与 LOX-1 表达从而抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖, PI3K/Akt、ERK1/2 及 p38MAPK 信号通路参与其中。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Inhibitory effect of berberine on proliferation of human umbilical vein endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein and its molecular mechanism

MA Chun-Yan, XU Rui-Xia, YAO Yu-Hong, LI Xiao-Lin, GUO Yuan-Lin, ZHANG Yan, LI Sha, LI Jian-Jun

(Diagnosis and Treatment Center for Dyslipidemia and Cardiovascular Diseases, State Key Laboratory of Cardiovascular Diseases, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

[KEY WORDS] Berberine; Oxidized low density lipoprotein; Human umbilical vein endothelial cell; Cell proliferation; Signaling pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the inhibitory effect of berberine on the proliferation of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and the changes of related signaling pathways. **Methods** HUVEC was cultured in vitro, and the proliferation of HUVEC was stimulated by ox-LDL and intervened with berberine at different concentrations. The inhibitory effect of berberine on proliferation of HUVEC was detected by cell counting kit 8 and EdU incorporation experiment. The expressions of related genes and proteins and the changes of signaling pathway were analyzed by real-time quantitative PCR and Western blot. **Results** In a concentration dependent manner, berberine (1~50 mg/L) significantly inhibited the HUVEC proliferation induced by ox-LDL, and reduced the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), nuclear factor κ B (NF- κ B) and lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). These effects were associated with decreased phosphorylation levels of PI3K/Akt, ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways. **Conclusion** Berberine inhibits the proliferation of HUVEC induced by ox-LDL through the down-regulation of PCNA, NF- κ B and LOX-1 expressions. PI3K/Akt, ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways are involved in this process.

[收稿日期] 2017-06-30

[修回日期] 2017-08-20

[基金项目] 北京协和医学院协和青年基金项目(3332016018);阜外医院科研人才支持计划项目(2012-FWXX02);首都卫生发展科研专项项目(2016-1-4035)

[作者简介] 马春艳, 硕士研究生, 研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化, E-mail 为 imachunyan@163.com。通讯作者徐瑞霞, 博士, 副研究员, 研究方向为血脂异常与动脉粥样硬化, E-mail 为 ruixiaxu@sina.com。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是一种特殊的以动脉管壁慢性炎症为特征的病理状态。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 可诱导巨噬细胞形成泡沫细胞, 触发炎症反应, 在 As 形成过程中起关键作用。新近研究表明, 炎症与血管内皮细胞过度增殖及血管功能障碍密切相关; 同时, 血管内皮过度增殖可能是 As 性心血管疾病的重要原因^[1]。既往研究发现, ox-LDL 可通过 RhoA 激活还原型 NADPH 氧化酶, 从而诱导内皮细胞生成活性氧, 并活化丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路促进内皮细胞增殖^[2-3], 提示抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖可作为抗 As 治疗的潜在作用靶点。

小檗碱是一种从黄连等小檗科植物中提取出来的天然异喹啉类生物碱^[4], 在抗炎、抑菌治疗方面应用广泛^[5-6]。此外, 小檗碱还具有抗肿瘤、抗氧化、抗高血糖和降低低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 等治疗作用^[7-9]。然而, 小檗碱对炎症相关血管内皮细胞增殖的影响及分子机制尚不完全清楚。本研究旨在探讨小檗碱对 ox-LDL 诱导的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 增殖的影响及其相关信号通路, 以期小檗碱对 As 性心血管疾病等的临床治疗提供实验依据和理论基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

M199 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 公司 (Grand Island, 美国)。血管内皮细胞生长因子 (endothelial cell growth factor, ECGF) 购自 Sciencell 公司 (北京, 中国)。LY294002、U0126、SB202190、兔多克隆抗体、抗磷酸化 p44/42 (Thr202/Tyr204)、抗 p44/42、抗磷酸化 Akt (ser-473)、抗 Akt、抗 Caspase-3、抗磷酸化 p38MAPK (Thr180/Tyr182)、抗 p38MAPK、抗增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和抗核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抗体、小鼠单克隆抗体、抗 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗鼠二抗均购自 Cell Signal Technology 公司 (Beverly, 美国)。兔多克隆抗体、抗凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 抗体购自 Abcam 公司 (Cambridge, 英国)。

1.2 LDL 的分离与氧化

依照文献^[10]所述方法, 制备人的 LDL 和 ox-

LDL。从人新鲜血浆中提取 LDL, 并用 0.22 μ m 滤器除菌。LDL 用含 5 μ mol/L CuSO₄ 的乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA) 等渗盐水于 37°C 下渗析 8 h 进行氧化。加入 EDTA 使终浓度达到 100 μ mol/L 终止氧化, 用含 0.1 μ mol/L EDTA 的等渗盐水于 4°C 大范围渗析以除去铜离子。ox-LDL 于 pH 7.4 的 10 mmol/L Tris-HCl、0.14 mol/L NaCl 和 0.5 mmol/L EDTA 中 4°C 下避光保存, 可用 2 周。

1.3 HUVEC 的培养

HUVEC 购自 Sciencell 公司, 培养于含 10% FBS、10 μ g/L ECGF 和 100 kU/L 青霉素-链霉素的 M199 培养基中, 37°C、5% CO₂ 和 95% 空气条件下培养。ox-LDL 刺激实验: HUVEC 生长至 80% 融合后, 换成不含 ECGF 的 2% FBS 培养基静息 6 h, 然后用不同浓度的 ox-LDL (10、25、50、75、100 mg/L) 孵育不同时间 (3、6、12、24、48 h)。抑制实验: HUVEC 用小檗碱 (1、5、10、25、50 mg/L) 预处理 1 h, 用不含 ECGF 的 2% FBS 培养基静息 6 h 后继续培养 24 h。抑制剂实验: 细胞用磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidyl inositol-3-kinase, PI3K/Akt) 抑制剂 LY294002 (25 μ mol/L) 或 MEK1/2 抑制剂 PD98059 (10 μ mol/L) 或 p38 抑制剂 SB202190 (10 μ mol/L) 预处理, 再加入小檗碱 (25 mg/L)。正常组: 细胞于含 10% FBS、10 μ g/L ECGF 和 100 kU/L 青霉素-链霉素的 M199 培养基中培养。对照组: 细胞于不含 ECGF 的 2% FBS 培养基中培养。不同浓度 ox-LDL 组: 细胞在不含 ECGF 的 2% FBS 培养基中培养, 并加入不同浓度 ox-LDL 处理细胞。

1.4 CCK8 法检测细胞增殖

细胞增殖用细胞计数试剂盒 8 (CCK8; Dojindo 公司, 中国) 测定。将细胞以每 100 μ L 体积含 5000 个细胞的密度接种于 96 孔板上, 用 ox-LDL 和/或小檗碱处理 24 h, 向每孔中加入 10 μ L CCK8 溶液, 在培养箱中孵育 1~4 h。用酶标仪 (瑞士、奥地利) 测定 450 nm 处的光密度 (optical density, OD)。

1.5 EdU 增殖实验

HUVEC 增殖用 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU) 标记检测试剂盒 (Ribobio 公司, 中国) 进行测定。胸苷是一种核苷类似物, 在 DNA 的合成过程中仅通过细胞增殖而被并入 DNA, EdU 荧光分子的加入, 使增殖的细胞荧光可视化。细胞用 50 μ mol/L EdU 于 37°C、5% CO₂ 条件下孵育 12 h, 然后进行固定、透化和 EdU 染色, 细胞核用 Hoechst 33342 (5 mg/L) 染色 30 min。最

后,在激光共聚焦显微镜(Leica Microsystems 公司,德国)下观察细胞。

1.6 实时荧光定量 PCR

用 Trizol 试剂(Life Technologies 公司,美国)提取细胞总 RNA。用 Access RT-PCR 试剂盒(Promega 公司,美国)进行实时荧光定量 PCR。定量 PCR 引物序列:GAPDH 上游 5'-CTCCTCCACCTTTGACGCTG-3',下游 5'-TCCTCTTGTGCTCTTGCTGG-3'; PCNA 上游 5'-CACCAAACCAGGAGAAAG-3',下游 5'-TCCAATATGCTGAGATC-3'; LOX-1 上游 5'-TGATAGAAACCCTTGCTCG-3',下游 5'-TTGCTTGCTGGATGAAGTC-3'; NF- κ B 上游 5'-TGGACTACCTGGTGCCTCT-3',下游 5'-GTGTTTCCCACCAGGCTG-3'; PI3K 上游 5'-CCAGGCTTCATATTCCTA-3',下游 5'-ATGCCACTGGTTTCCTTC-3'。所有产物用 Melt 曲线分析,定量检测采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法,以 GAPDH 的表达作为内参。

1.7 蛋白质提取与 Western blot 分析

依照文献^[11]所述方法,提取细胞蛋白,进行 Western blot。收集细胞,500 g 离心力 4℃ 离心 10 min。弃上清,将沉淀重悬于含有蛋白酶抑制剂的裂解液中,冰浴上放置 10 min,并每隔 5 min 在涡旋混合仪上震荡 30 s。12000 g 离心力 4℃ 离心 10 min,将上清转移到新的离心管中,即为细胞总蛋白产物。用 Bradford 法进行蛋白定量。取 30 μ g 蛋白,加入 5 \times SDS 凝胶上样缓冲液,煮沸 5 min 后,进行 8%~15% SDS-PAGE 电泳。电泳后,将蛋白转移到尼龙膜上。

用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,尼龙膜与一抗 4℃ 共同孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,尼龙膜与二抗室温共同孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。利用 ChemiDoc XRS 系统(Bio-Rad 公司,美国)进行曝光。

1.8 统计分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验,由 SPSS 12.0 统计软件完成, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ox-LDL 诱导 HUVEC 增殖

为确定 ox-LDL 对 HUVEC 的影响,在基础条件(不含 ECGF 的 2% FBS 培养基)下,我们用不同浓度 ox-LDL(10、25、50、75、100 mg/L)处理 HUVEC 不同时间(3、6、12、24、48 h)。用 CCK8 试剂盒测定细胞增殖,ox-LDL 以时间依赖性和剂量依赖性的方式诱导 HUVEC 增殖(图 1)。用 ox-LDL 处理 24、48 h 后,HUVEC 增殖率显著增加。与正常组相比,处理 48 h 的对照组 HUVEC 增殖率显著下降,表明长期低营养状态导致细胞活性较低。与正常组和对照组相比,用 50 mg/L ox-LDL 处理 24 h 可显著增加细胞增殖。因此,我们选用基础条件下 50 mg/L ox-LDL 处理细胞 24 h 进行后续实验。

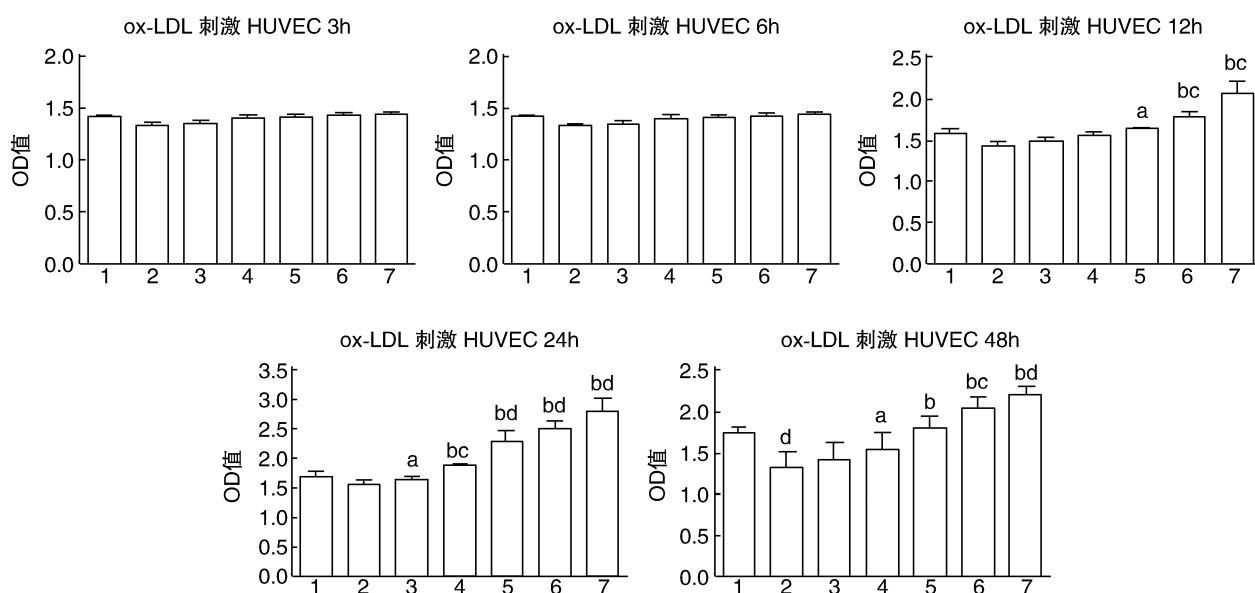


图 1. CCK8 法测定 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖 1 为正常组,2 为对照组,3 为 10 mg/L ox-LDL 组,4 为 25 mg/L ox-LDL 组,5 为 50 mg/L ox-LDL 组,6 为 75 mg/L ox-LDL 组,7 为 100 mg/L ox-LDL 组。a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与对照组比较;c 为 $P<0.05$,d 为 $P<0.01$,与正常组比较。

Figure 1. Proliferation of HUVEC induced by ox-LDL is determined by CCK8 assay

同时,本研究用 LDL 作为阴性对照,比较未氧化 LDL 和 ox-LDL 对 HUVEC 的影响。HUVEC 分别用不同浓度 LDL 和 ox-LDL (10、25、50、75、100 mg/L) 处理,结果只有 100 mg/L 的天然 LDL 对 HUVEC 增殖有明显作用,其他浓度天然 LDL 对 HUVEC 增殖无影响。而 ox-LDL 随浓度升高显著增强 HUVEC 的增殖,明显增加细胞数量并改善细胞形态(图 2)。

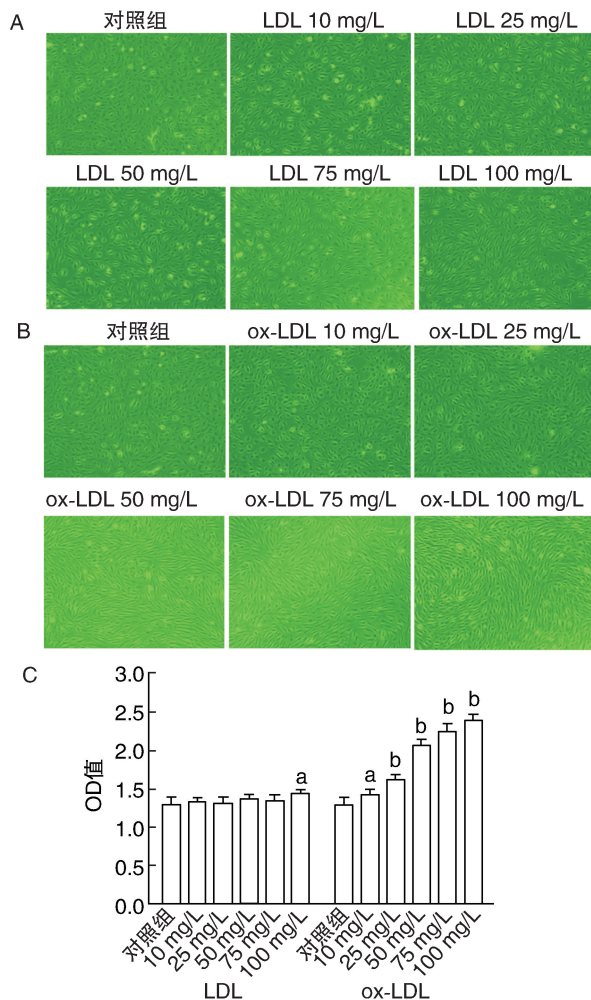


图 2. 天然 LDL 和 ox-LDL 对 HUVEC 增殖的影响 显微镜图放大倍数为 100。A 为不同浓度 LDL 处理 HUVEC 24 h; B 为不同浓度 ox-LDL 处理 HUVEC 24 h; C 为 CCK8 法测定不同浓度 LDL 和 ox-LDL 处理 HUVEC 24 h 对细胞增殖的影响。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Effects of natural LDL and ox-LDL on proliferation of HUVEC

2.2 小檗碱抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖

为了探讨小檗碱对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖是否具有抑制作用,我们用小檗碱 (1、5、10、25、50 mg/L) 处理 ox-LDL 诱导下的细胞,即 HUVEC 用浓度梯度的小檗碱预处理 1 h,再与 ox-LDL 共同孵育 24 h。CCK8 实验结果显示,小檗碱可呈浓度依赖性抑

制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖(图 3A)。为进一步探讨小檗碱对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖的抑制作用,我们还进行了 EdU 增殖实验,结果显示,与对照组相比,ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 EdU 阳性细胞显著增加,小檗碱可有效抑制细胞增殖(图 3B 和 3C)。

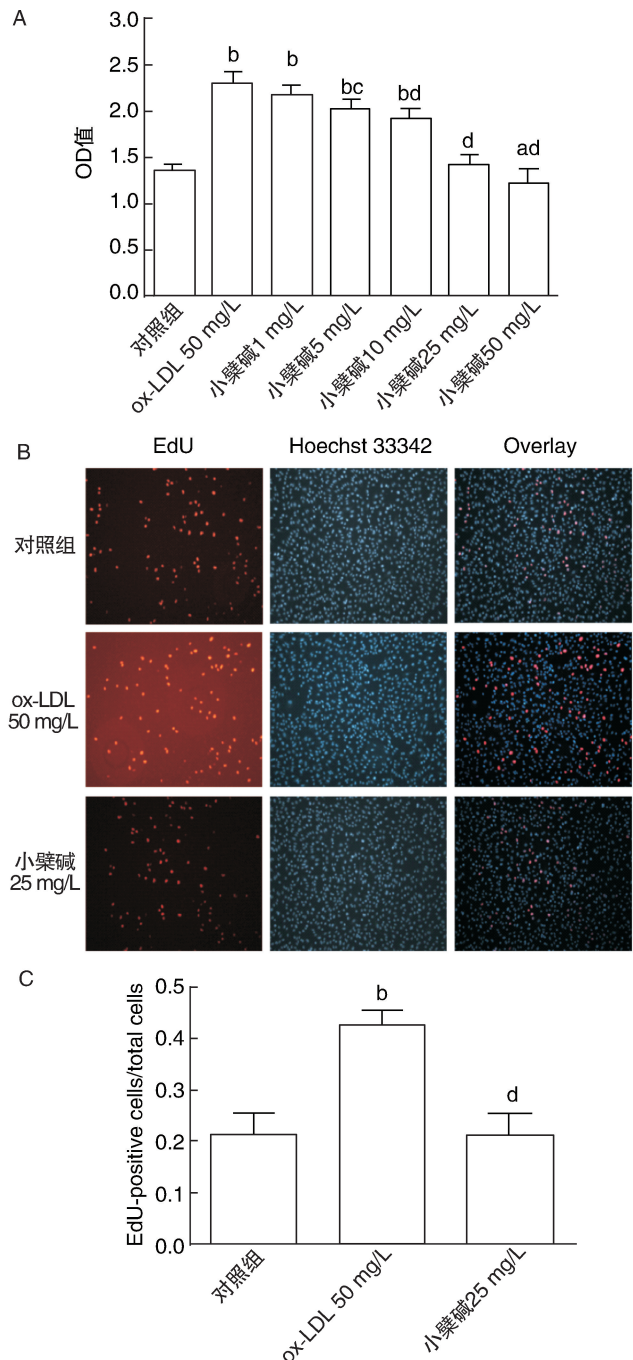


图 3. 小檗碱抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖 显微镜图放大倍数为 100。A 为 CCK8 法检测不同浓度小檗碱对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖的影响; B、C 为 EdU 法检测 25 mg/L 小檗碱对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖的影响。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 ox-LDL 50 mg/L 组比较。

Figure 3. Berberine inhibits the proliferation of HUVEC induced by ox-LDL

2.3 小檗碱对 HUVEC 增殖相关基因表达的影响

前期研究通过基因芯片技术检测发现, ox-LDL 诱导的 HUVEC 中某些与增殖相关的基因, 包括 PCNA、NF- κ B、LOX-1 和 PI3K 在 mRNA 水平上的表达增加(数据未显示)。为进一步明确小檗碱抑制 ox-LDL 诱导 HUVEC 增殖的分子机制, 我们检测了小檗

碱对 PCNA、NF- κ B、LOX-1 和 PI3K 在 mRNA 水平上表达的影响。HUVEC 用浓度梯度的小檗碱预处理 1 h, 再与 ox-LDL 共同孵育 24 h。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与对照组相比, ox-LDL 显著增加 HUVEC 中 PCNA、NF- κ B、LOX-1 和 PI3K mRNA 水平 ($P < 0.01$), 而小檗碱呈浓度依赖性地抑制该变化(图 4)。

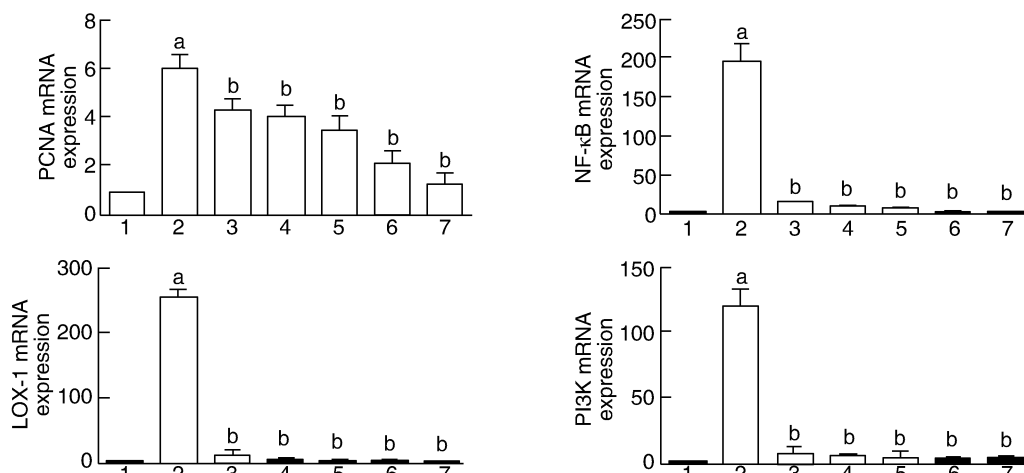


图 4. 小檗碱抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 中 PCNA、NF- κ B、LOX-1 和 PI3K mRNA 表达 1 为对照组, 2 为 50 mg/L ox-LDL 组, 3 为 1 mg/L 小檗碱组, 4 为 5 mg/L 小檗碱组, 5 为 10 mg/L 小檗碱组, 6 为 25 mg/L 小檗碱组, 7 为 50 mg/L 小檗碱组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 50 mg/L ox-LDL 组比较。

Figure 4. Berberine inhibits the mRNA expressions of PCNA, NF- κ B, LOX-1 and PI3K induced by ox-LDL in HUVEC

2.4 小檗碱对 ox-LDL 诱导 HUVEC 增殖相关信号通路的影响

我们探讨了 ox-LDL 对 PCNA、NF- κ B、LOX-1、PI3K/Akt、ERK 和 p38MAPK 信号通路的影响, 及小檗碱对上述通路是否有抑制作用。与对照组相比, ox-LDL 呈剂量依赖性地显著增加 PCNA、NF- κ B 和 LOX-1 表达, 且显著增加 Akt、ERK 和 p38MAPK 的磷酸化(图 5)。小檗碱呈浓度依赖性地抑制 ox-LDL 诱导的 PCNA、NF- κ B 和 LOX-1 表达, 并明显降低 Akt、ERK 和 p38MAPK 的磷酸化(图 6)。小檗碱达 25 mg/L 时对上述靶基因表现出显著影响 ($P < 0.01$), 因此选用 25 mg/L 小檗碱进行后续实验。

为了进一步研究 PI3K/Akt、ERK 和 p38MAPK 信号通路在小檗碱抗 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖中的作用, 我们用 LY294002 (PI3K 抑制剂)、PD98059 (ERK1/2 抑制剂) 和 SB202190 (p38MAPK 抑制剂) 进行后续实验。HUVEC 用 LY294002 (25 μ mol/L)、PD98059 (10 μ mol/L) 和 SB202190 (10 μ mol/L) 预处理 1 h, 再加入小檗碱 (25 mg/L), 然后加入 ox-LDL (50 mg/L) 孵育 24 h; Western blot 或 CCK8 实验结果显示, LY294002、PD98059 和 SB202190 可分别逆转小檗碱对 ox-LDL 诱导的 Akt、

ERK 和 p38MAPK 磷酸化的抑制作用, 且可部分逆转小檗碱对 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖的抑制作用(图 7)。

3 讨论

细胞过度增殖是 As 以及癌症等多种疾病的关键步骤之一, 有效抑制细胞增殖是防治此类疾病的根本措施。本研究发现, 小檗碱呈剂量依赖性抑制 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖, 且小檗碱可通过抑制 PCNA、NF- κ B、LOX-1 的表达及降低 PI3K/Akt、ERK1/2 和 p38MAPK 信号通路活性来调控 ox-LDL 诱导的 HUVEC 增殖。该研究结果在小檗碱抑制细胞增殖作用及其潜在机制方面对既往研究进行了一定的补充。

既往研究表明, ox-LDL 通过刺激 NADPH 氧化酶产生活性氧^[10]并激活小 GTPase RhoA^[2]从而诱导 HUVEC 增殖。此外, 新近研究发现 ox-LDL 和 LOX-1 可诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖和内皮细胞损伤, 在 As 病理生理进程中起重要作用^[12-13]。本研究结果显示, ox-LDL 能显著增加 HUVEC 中 PCNA、NF- κ B 和 LOX-1 在 mRNA 和蛋白水平上的表达, 且

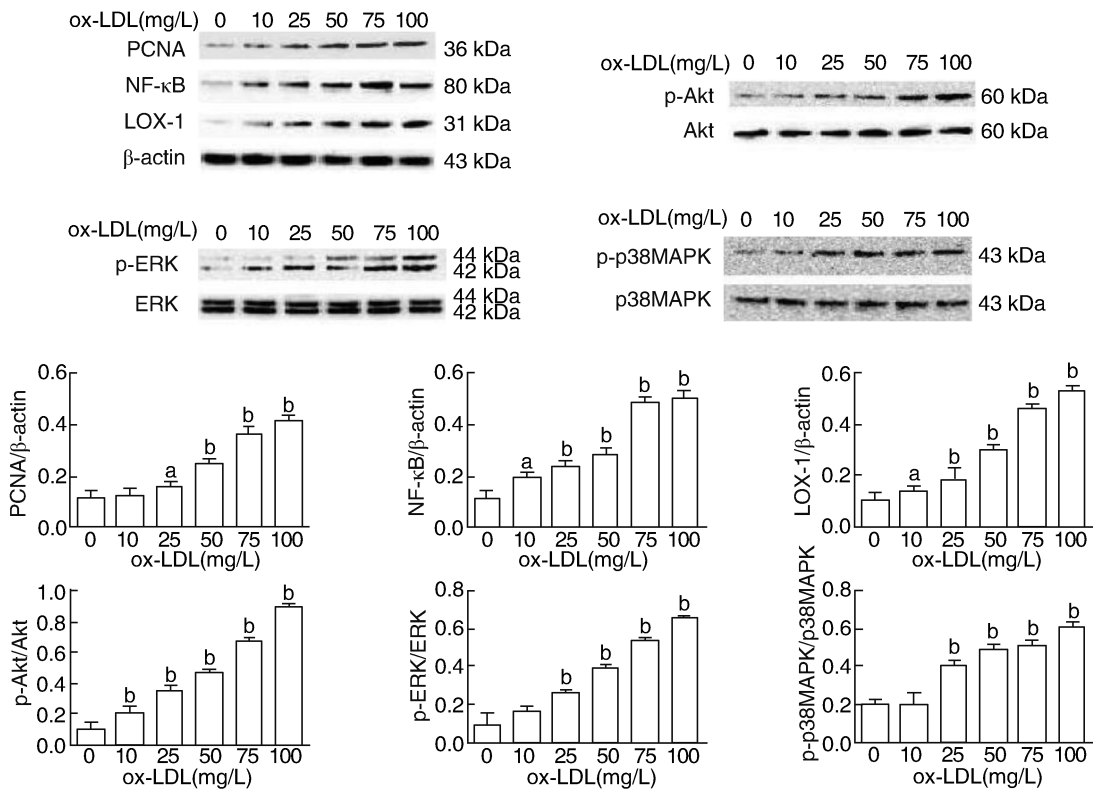


图 5. ox-LDL 增加 PCNA、NF-κB、LOX-1 表达和 Akt、ERK、p38MAPK 磷酸化 a 为 P<0.05, b 为 P<0.01, 与对照组(0 mg/L ox-LDL 组)比较。
Figure 5. Ox-LDL increases the expressions of PCNA, NF-κB, LOX-1 and the phosphorylations of Akt, ERK and p38MAPK

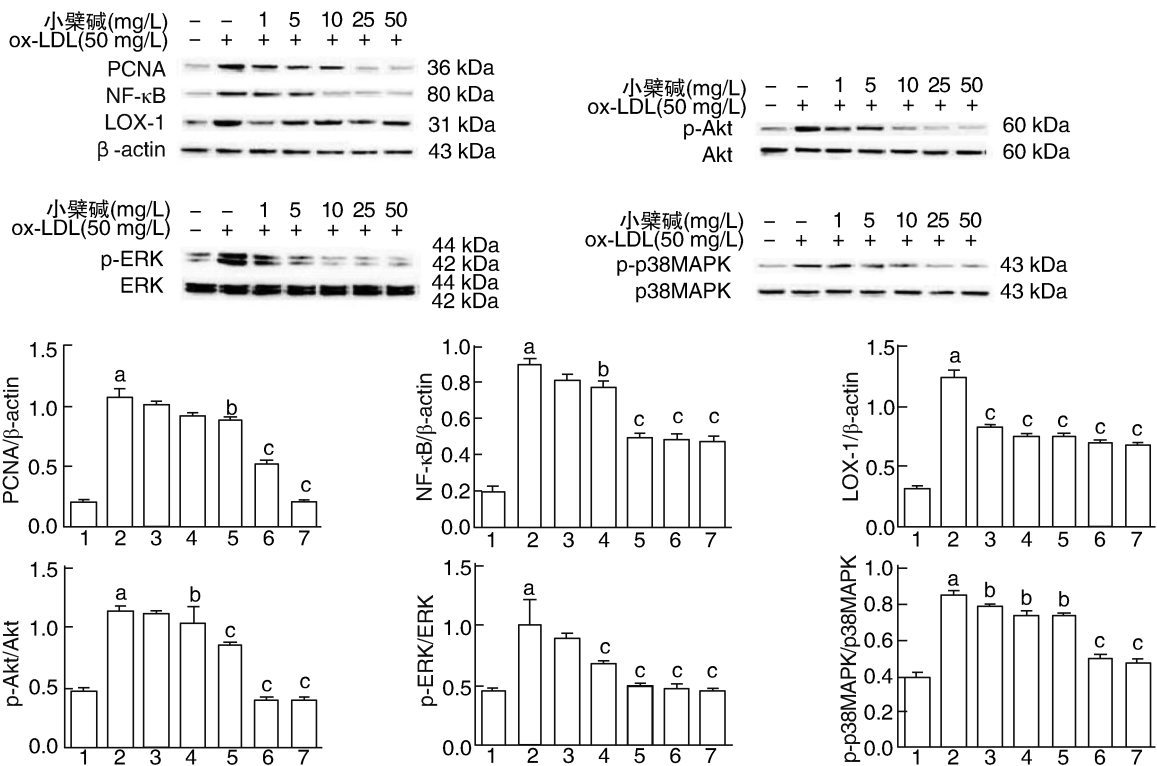


图 6. 小檗碱抑制 ox-LDL 诱导的 PCNA、NF-κB、LOX-1 表达和 Akt、ERK、p38MAPK 磷酸化 1 为对照组, 2 为 50 mg/L ox-LDL 组, 3 为 50 mg/L ox-LDL 加 1 mg/L 小檗碱组, 4 为 50 mg/L ox-LDL 加 5 mg/L 小檗碱组, 5 为 50 mg/L ox-LDL 加 10 mg/L 小檗碱组, 6 为 50 mg/L ox-LDL 加 25 mg/L 小檗碱组, 7 为 50 mg/L ox-LDL 加 50 mg/L 小檗碱组。a 为 P<0.01, 与对照组比较; b 为 P<0.05, c 为 P<0.01, 与 50 mg/L ox-LDL 组比较。
Figure 6. Berberine inhibits the expressions of PCNA, NF-κB, LOX-1 and the phosphorylations of Akt, ERK and p38MAPK induced by ox-LDL

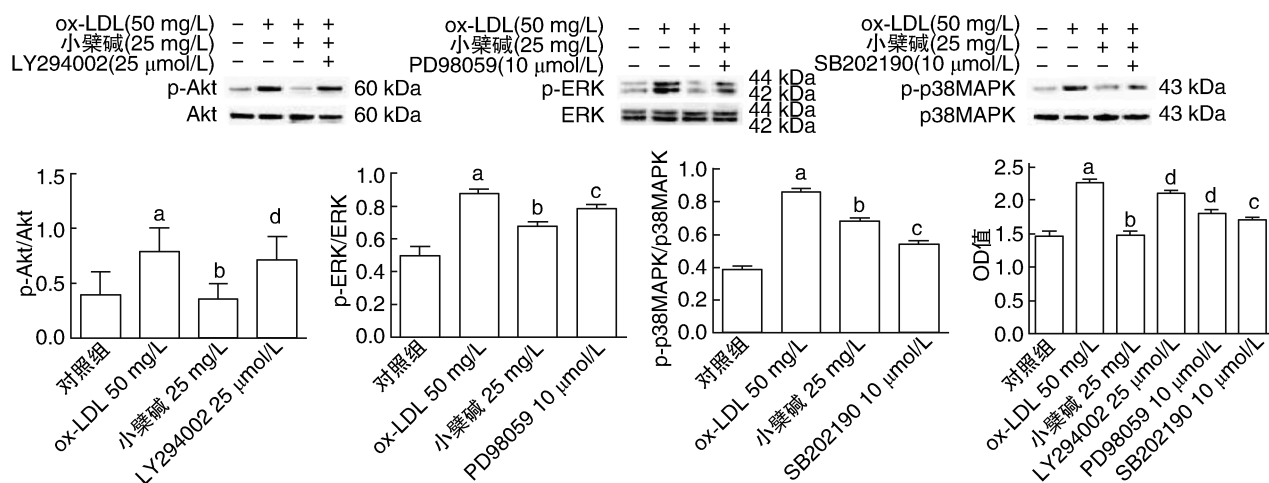


图7. 小檗碱通过PI3k/Akt、ERK和p38MAPK信号通路抑制ox-LDL诱导的HUVEC增殖 a为 $P<0.01$,与对照组比较;b为 $P<0.01$,与ox-LDL 50 mg/L组比较;c为 $P<0.05$,d为 $P<0.01$,与小檗碱25 mg/L组比较。

Figure 7. Berberine inhibits the proliferation of HUVEC induced by ox-LDL through PI3k/Akt, ERK and p38MAPK signaling pathways

显著增加PI3K/Akt、ERK1/2和p38MAPK的磷酸化水平。此外,先前研究报道,NF- κ B和LOX-1能够参与冠状动脉内皮细胞或HUVEC的增殖^[3,14];本研究结果与此相一致。

小檗碱是一种从小檗科植物中提取出来的天然中草药,可用于治疗腹泻和胃肠道疾病^[4,15],且具有抗菌、抗炎症和调节胰岛素分泌等多种药理作用^[16]。最近研究发现,小檗碱还有抗肿瘤作用,即小檗碱对体外培养的几种不同类型的肿瘤细胞增殖具有显著抑制作用。小檗碱可抑制上皮性卵巢癌细胞株、甲状腺癌细胞株和肝癌HepG2细胞株等多种细胞的增殖^[17-19]。小檗碱能抑制人皮肤鳞状细胞癌A431细胞的增殖,诱导其凋亡并抑制A431的侵袭^[20]。此外,小檗碱联合高良姜素可诱导食管癌细胞凋亡并抑制其增殖,两者具有协同抗癌作用。而小檗碱的抗癌作用可能是通过抑制DNA拓扑异构酶II α 和拓扑异构酶II介导的DNA裂解来实现的^[21]。新近研究表明,小檗碱能够抑制天然LDL的氧化,并逆转ox-LDL诱导的细胞功能失调^[22],在抗As方面发挥着重要作用。Huang等^[23]研究表明,小檗碱通过抑制佛波酯诱导的巨噬细胞中p38MAPK的激活来降低其基质金属蛋白酶,提示小檗碱在稳定As斑块方面具有潜在作用。Bae等^[24]研究发现,小檗碱能增加脂多糖诱导的内毒素血症小鼠脾和肺中转录因子3的表达和腺苷酸活化蛋白激酶磷酸化,同时减少血浆和组织中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素6和白细胞介素1 β 等炎症因子,提示小檗碱在巨噬细胞中具有抗炎作用。上述

研究表明,小檗碱可作为抗As的潜在候选药物。小檗碱还可经由ERK/Egr-1信号通路抑制体外机械损伤诱导的血管平滑肌细胞增殖^[25]。然而,小檗碱对内皮细胞增殖的影响尚不明确。本研究首次证明,小檗碱能呈剂量依赖性下调PCNA、NF- κ B和LOX-1来抑制ox-LDL诱导的HUVEC增殖,且主要通过NF- κ B和LOX-1通路进行调控。此外,本研究发现,小檗碱抑制Akt、ERK1/2和p38MAPK的磷酸化,表明PI3K/Akt、ERK1/2和p38MAPK信号通路可能参与了小檗碱抑制ox-LDL诱导HUVEC增殖的过程。

总之,As是一个复杂的病理生理过程,它与炎症、氧化应激和细胞增殖密切相关^[26-28],ox-LDL在As斑块的形成中扮演着重要的角色。本研究表明,小檗碱能够抑制ox-LDL引起的内皮细胞增殖,该作用与PCNA、NF- κ B和LOX-1表达下调相关,同时PI3K/Akt、ERK1/2和p38MAPK信号通路也参与其中。本文研究结果为小檗碱在As性心血管疾病的临床治疗提供了实验基础和理论依据。

[参考文献]

- [1] Zhang T, Zhang X, Yu W, et al. Effects of chemokine-like factor 1 on vascular smooth muscle cell migration and proliferation in vascular inflammation[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 226(1): 49-57.
- [2] Seibold S, Schurle D, Heinloth A, et al. Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(12): 3 026-034.
- [3] Kuhlmann CR, Schafer M, Li F, et al. Modulation of endothelial

- Ca²⁺ activated K⁺ channels by oxidized LDL and its contribution to endothelial proliferation [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 60(3): 626-634.
- [4] Kuo HP, Chuang TC, Yeh MH, et al. Growth suppression of HER2-overexpressing breast cancer cells by berberine via modulation of the HER2/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(15): 8 216-224.
- [5] Cecil CE, Davis JM, Cech NB, et al. Inhibition of H1N1 influenza A virus growth and induction of inflammatory mediators by the isoquinoline alkaloid berberine and extracts of goldenseal (*Hydrastis canadensis*) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(11): 1 706-714.
- [6] Meng S, Wang LS, Huang ZQ, et al. Berberine ameliorates inflammation in patients with acute coronary syndrome following percutaneous coronary intervention[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(5): 406-411.
- [7] Sefidabi R, Mortazavi P, Hosseini S. Antiproliferative effect of berberine on canine mammary gland cancer cell culture[J]. *Biomed Rep*, 2017, 6(1): 95-98.
- [8] Li W, Liu Y, Wang B, et al. Protective effect of berberine against oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 4 041-048.
- [9] Deng YX, Zhang XJ, Shi QZ, et al. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of traditional Chinese medicine Huanglian Wan in streptozocin-induced diabetic rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 425-432.
- [10] Heinloth A, Heermeier K, Raff U, et al. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(10): 1 819-825.
- [11] 王 银, 徐瑞霞, 马春艳. TNNI3K 基因过表达诱导小鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(4): 325-333.
- [12] Zhang Z, Zhang M, Li Y, et al. Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and ox-LDL through LOX-1 pathway[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 332-340.
- [13] Zhang L, Jia YH, Zhao XS, et al. Trichosanatine alleviates oxidized low-density lipoprotein induced endothelial cells injury via inhibiting the LOX-1/p38MAPK pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(12): 5 455-464.
- [14] Dandapat A, Hu C, Sun L, et al. Small concentrations of ox-LDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11): 2 435-442.
- [15] Chen C, Yu Z, Li Y, et al. Effects of berberine in the gastrointestinal tract--a review of actions and therapeutic implications[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42(5): 1 053-070.
- [16] Huang LH, Pan XP, Gong KR, et al. Anti-inflammatory effects of three kinds of traditional Mongolian medicine monomer and its combination on LPS-stimulated RAW264.7 macrophages[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(5): 950-958.
- [17] Park KS, Kim JB, Lee SJ, et al. Berberine-induced growth inhibition of epithelial ovarian carcinoma cell lines [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2012, 38(3): 535-540.
- [18] Park KS, Kim JB, Bae J, et al. Berberine inhibited the growth of thyroid cancer cell lines 8505C and TPC1 [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(2): 346-351.
- [19] Chen J, Wu FX, Luo HL, et al. Berberine upregulates miR-22-3p to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Sp1 [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 4 932-941.
- [20] Li DX, Zhang J, Zhang Y, et al. Inhibitory effect of berberine on human skin squamous cell carcinoma A431 cells [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 10 553-568.
- [21] Kang MR, Chung IK. Down-regulation of DNA topoisomerase II alpha in human colorectal carcinoma cells resistant to a protoberberine alkaloid, berberrubine [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 61(4): 879-884.
- [22] Hsieh YS, Kuo WH, Lin TW, et al. Protective effects of berberine against low-density lipoprotein (LDL) oxidation and oxidized LDL-induced cytotoxicity on endothelial cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(25): 10 437-445.
- [23] Huang Z, Wang L, Meng S, et al. Berberine reduces both MMP-9 and EMMPRIN expression through prevention of p38 pathway activation in PMA-induced macrophages [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 146(2): 153-158.
- [24] Bae YA, Cheon HG. Activating transcription factor-3 induction is involved in the anti-inflammatory action of berberine in RAW264.7 murine macrophages [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20(4): 415-424.
- [25] Liang KW, Ting CT, Yin SC, et al. Berberine suppresses MEK/ERK-dependent Egr-1 signaling pathway and inhibits vascular smooth muscle cell regrowth after in vitro mechanical injury [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(6): 806-817.
- [26] Li JJ. Inflammation in coronary artery diseases [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(21): 3 568-575.
- [27] Gu L, Bai W, Li S, et al. Celastrol prevents atherosclerosis via inhibiting LOX-1 and oxidative stress [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65 477.
- [28] Liu J, Jia YJ, Li XL, et al. RANTES gene G-403A polymorphism and coronary artery disease: a Meta analysis of observational studies [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47 211.

(此文编辑 曾学清)