

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.04.007

黄连素对小鼠心肌梗死后心室重构的作用研究*

田孝祥 刘 丹 刘美丽 刘艳霞 齐艳萍 吴 鹏

(沈阳军区总医院心血管病研究所心内科 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的:探讨黄连素(Berberine, BBR)在小鼠心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心室重构中的作用,并比较 BBR 预处理(BBR pre-treatment, preBBR)和 BBR 后处理(BBR post-treatment, postBBR)给药的效果。**方法:**将 60 只 C57 BL/6 小鼠随机分为 4 组,分别为假手术组、单纯 MI 对照组、MI+preBBR 组及 MI+postBBR 组,每组 15 只。MI 模型采用前降支结扎法制备。MI+preBBR 组在 MI 模型制备前 2 周开始用 BBR(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)每天灌胃,持续至 MI 后 28 d;MI+postBBR 组在 MI 模型制备后 4 h 开始用 BBR(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)每天灌胃,持续至 MI 后 28 d。记录实验期间小鼠生存情况。MI 后 28 天采用小动物超声测定左心室收缩功能;取心脏组织,测定心脏大小和重量;ELISA 方法测定血浆 BNP 水平;Masson 染色评价心肌纤维化程度。**结果:**与单纯 MI 对照组相比,MI+preBBR 组及 MI+postBBR 组小鼠生存率提高、心脏收缩功能增强、心脏变小、心脏重量减轻、血浆 BNP 水平降低、心肌纤维化明显改善。其中,MI+preBBR 组上述指标的改善程度优于 MI+postBBR 组。**结论:**BBR 可抑制 MI 后心室重构,且 BBR 预处理效果优于后处理。

关键词:黄连素;心肌梗死;心室重构

中图分类号:R-33; R542.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)04-628-05

A Study on the Role of Berberine in the Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction in Mice*

TIAN Xiao-xiang, LIU Dan, LIU Mei-li, LIU Yan-xia, QI Yan-ping, WU Peng

(Cardiovascular Research Institute and Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Region,

Shenyang, Liaoning, 110016, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of berberine (BBR) in the ventricular remodeling after myocardial infarction (MI) in mice, and compare the effect of BBR pre-treatment (preBBR) and BBR post-treatment (post-BBR). **Methods:** A total of 60 C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups, which were Sham group, MI control group, MI+preBBR group and MI+postBBR group (n=15 in each group). MI model was established by ligation of left anterior descending coronary artery. In MI+preBBR group, BBR (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) was given by gavage once a day from 2 weeks prior-MI until 28 days post-MI; while in MI+postBBR group, BBR (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹) was given once a day from 4 hours post-MI to 28 days post-MI. Murine survival were recorded daily. Twenty-eight days after MI, left ventricular systolic function was assessed by small animal echocardiography. Size and weight of collected hearts were measured. Plasma BNP level was quantified by ELISA. Cardiac fibrosis was determined by Masson's staining. **Results:** Compared to MI control group, both pre-BBR and post-BBR showed increased survival rate, improved systolic function, reduced heart size and weight, alleviated serum BNP level and cardiac fibrosis. Between MI+preBBR group and MI+postBBR group, the former had better results than the latter. **Conclusion:** BBR inhibited post-MI ventricular remodeling in mice, and therapeutic effect of BBR pretreatment was better than that of post-treatment.

Key words: Berberine; Myocardial infarction; Ventricular remodeling

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)04-628-05

前言

心肌梗死(Myocardial infarction, MI)及梗死后心室重构导致的心力衰竭已经成为致死致残率最高的疾病之一,严重威胁人类健康^[1],但是目前仍缺乏经济、有效的药物对 MI 进行预防和治疗。黄连素(Berberine, BBR)是从小檗科植物中(如黄连、黄柏等)提取的一种异喹啉生物碱,主要用于治疗细菌性痢疾和

胃肠炎^[2]。近年来的基础和临床研究显示 BBR 对冠心病三大危险因素糖尿病^[3]、高血压^[4]及高脂血症^[5]均有治疗作用。此外, BBR 是非处方药,价格低廉、毒性低、副作用少^[2]。因此, BBR 有望成为一种经济有效的预防或治疗心血管疾病的药物,但目前对于 BBR 在 MI 及梗死后心室重构中的作用报道较少,仅有个别研究发现 BBR 可减轻心肌缺血再灌注损伤^[6-8]。因此,本研究拟采用小鼠 MI 模型探讨 BBR 在 MI 及梗死后心室重构中的

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81570767)

作者简介:田孝祥(1979-),博士研究生,主治医师,主要研究方向:心血管病学, E-mail: tian_xx@163.com

(收稿日期:2016-11-21 接受日期:2016-12-15)

作用;此外,本研究拟设定 2 种给药策略,即 BBR 预处理组及 BBR 后处理组,比较预防性应用与治疗性应用 BBR 的治疗效果,以期拓展 BBR 在心血管疾病中的适应证及用法奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

8 周龄雄性 C57 BL/6 小鼠,体重(20 ± 2) g,由北京维通利华公司提供。普通小鼠饲料由沈阳军区总医院实验动物科提供。异氟烷由山东科源制药公司提供。BBR、小鼠脑钠肽(Brain Natriuretic Peptide, BNP)ELISA 检测试剂盒及 Masson 染色试剂盒由美国 Sigma Aldrich 公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及给药策略 将 60 只小鼠随机分为 4 组,(1)假手术(Sham)组:按照 MI 模型制备步骤进行手术,但不结扎前降支,不灌胃;(2)单纯 MI 对照组:结扎前降支制备 MI 模型,在 MI 制备前 2 周开始用蒸馏水每天灌胃 ($0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$),持续至 MI 术后 28 d;(3)MI+BBR 预处理 (BBR pre-treatment, preBBR)组:结扎前降支制备 MI 模型,在 MI 制备前 2 周开始用 BBR 每天灌胃 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),持续至 MI 术后 28 d;(4)MI+BBR 后处理(BBR post-treatment, postBBR)组:在 MI 制备前 2 周开始用无菌水每天灌胃($0.1 \text{ mL}/10 \text{ g}$),持续至结扎前降支制备 MI 模型,MI 术后 4 h 改用 BBR($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,每天 1 次,持续至 MI 术后 28 d。实验动物饲养于清洁级动物房,采用 12 h 光照,自由摄取食水。动物实验严格遵守实验动物使用原则。

1.2.2 MI 模型制备 MI 模型制备参照 Gao 等^[9]建立的方法。简言之,小鼠用 2.5 %异氟烷吸入麻醉后,将其四肢固定于手术板上,以 2.0 %维持麻醉。小鼠四肢接小动物心电图机电极,校正基线后用于记录心电图变化。剪开小鼠胸前区皮肤,用止血钳钝性分离胸大肌、胸小肌,并分开 3-4 肋间。用左手配合将心脏“挤”出胸腔。用 6-0 手术线从左心耳下缘以下 2 mm 处穿过并结扎,进针深度不超过 1 mm。观察左心室颜色及心电图变化,确认结扎成功后将心脏送回胸腔。尽量挤出胸腔内气体,用 4-0 手术线缝合皮肤。撤掉麻醉,观察至小鼠苏醒。假手术组不结扎冠状动脉,其余步骤与 MI 组相同。

1.2.3 小鼠存活情况 每天在给药时记录各组小鼠存活情况。对于死亡小鼠进行尸检,明确死亡原因。

1.2.4 超声心动图检测 在 MI 术后 28 d,采用 VisioSonic 公司 Vevo2100 型高分辨率小动物超声检测各组小鼠心功能。首先用 2 %异氟烷麻醉小鼠,然后将小鼠固定于操作台。将探头置于小鼠胸骨旁与胸骨平行,在 B 型模式下清晰显示心脏长轴切面。将探头旋转 90 度,得到短轴切面图像。转换至 M 型模式,记录图像。所有图像采集完毕后,进行离线分析。主要测量指标包括左心室射血分数 (Left ventricular ejection fraction, LVEF)、左心室短轴缩短率 (Left ventricular fractional shortening, LVFS)、左心室舒张末期内径(Left ventricular internal diameter in diastole, LVIDd)及左心室收缩末期内径(Left ventricular internal diameter in systole, LVIDs)。

1.2.5 心脏大小及重量测量 心功能测定结束后将所有小鼠颈动脉取血处死。打开胸腔,取下心脏,在生理盐水中冲洗后,

用电子天平称心脏重量(Heart weight, HW),用游标卡尺测量最大心脏长度(Heart length, HL),用游标卡尺测量胫骨长度(Tibial length, TL)。计算 HW/TL 及 HL/TL。

1.2.6 血浆 BNP 水平测定 颈动脉取血,3000 rpm 离心 15 min 分离血浆,冻存于 -80°C 冰箱。按照小鼠 BNP ELISA 检测试剂盒说明书操作。显色后用分光光度计在 450 nm 处测定吸光度值。绘制标准曲线,并计算 BNP 浓度。

1.2.7 Masson 染色 将新鲜取出的心脏固定在 4 %多聚甲醛溶液中 48 h。沿左右心耳连线将心脏在长轴切片切掉 1/3,剩余 3/2 心脏进行常规的石蜡包埋并切片。切片脱蜡后,采用 Masson 染色试剂盒,按照说明书进行 Masson 染色。用正置显微镜观察并拍照。每组选取五个样本,每个样本选取梗死边缘区 5 个高倍视野,用 IPP 软件进行 Masson 染色阳性区域的定量分析,每个视野重复测量 3 次取平均值。

1.3 统计学分析

用 SPSS20.0 软件对实验数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$)表示,计数资料以百分率表示。多组间均数比较采用 one way ANOVA,两组间均数比较采用 t 检验,两组间百分率的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组小鼠的生存分析

我们首先制备了小鼠 MI 模型。术中心电图监测证实结扎前降支后 ST 段明显上移(图 1),表明模型制备成功。进一步根据 MI 术后每天记录的小鼠生存情况绘制生存曲线,结果显示各组小鼠的死亡集中在 MI 术后前 2 周,各组生存率分别为 Sham 组 100 %,MI 组 67 %,MI+preBBR 组 87 %,MI+postBBR 组 80 %(图 2)。无论 BBR 预处理还是后处理,小鼠生存率均较对照组高。其中,预处理组生存率又高于后处理组。经尸检证实小鼠死亡原因主要包括心脏破裂、充血性心力衰竭和疑似心脏骤停。



图 1 心电图证实成功建立小鼠心肌梗死模型

Fig. 1 Myocardial infarction (MI) model in mice was confirmed by electrocardiography

2.2 各组小鼠心功能比较

小动物超声测定结果显示:与 Sham 组相比,MI 对照组反映左心室收缩功能的指标 LVEF、LVFS 显著降低,而 LVIDd 及 LVIDs 均显著升高。与 MI 对照组相比,BBR 预处理及 BBR 后处理均可使 LVEF、LVFS 升高,使 LVIDs 及 LVIDs 降低。此外,上述指标在 MI+preBBR 的改善情况更加明显(见图 3)。

2.3 各组小鼠心脏大小及重量比较

在处死小鼠时取心脏组织,测量并计算各组小鼠心重/胫骨长度(HW/TL)及心脏长度/胫骨长度(HL/TL)。结果显示:与 Sham 组相比,MI 对照组 HW/TL 及 HL/TL 均显著增加,表明

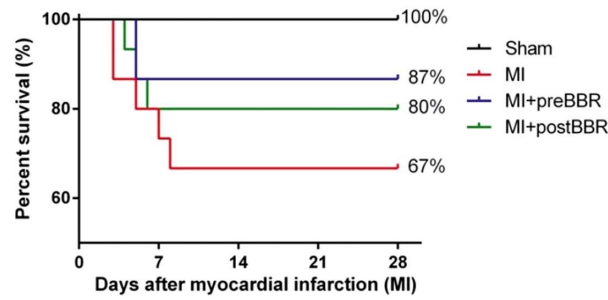


图 2 各组小鼠生存曲线

Fig. 2 Survival curve of different groups

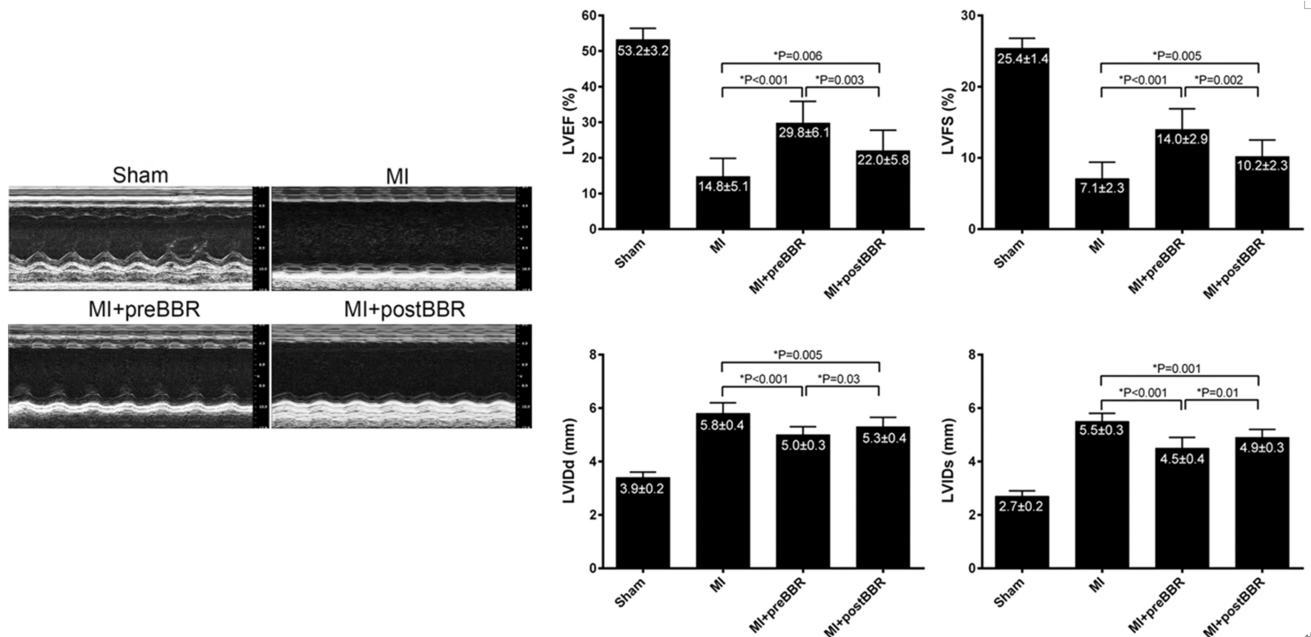


图 3 各组小鼠心脏超声测定

Fig. 3 Echocardiography measurement of different groups

Note: LVEF, left ventricular ejection fraction; LVFS, left ventricular fractional shortening; LVIdD, left ventricular internal diameter in diastole; LVIdS, Left ventricular internal diameter in systole.

心脏体积增大、重量增加,提示心脏发生明显重构。经 BBR 处理后,HW/TL 及 HL/TL 均显著降低。其中,MI+preBBR 组较 MI+postBBR 组上述指标进一步降低(图 4)。

2.4 各组小鼠血浆 BNP 水平比较

测定 MI 术后 28 d 各组小鼠血浆中 BNP 水平。结果显示:与 Sham 组相比,MI 对照组血浆水平明显升高,提示发生心力衰竭。经 BBR 处理后,BNP 水平显著降低。其中,MI+preBBR 组较 MI+postBBR 组 BNP 水平进一步降低(图 5)。

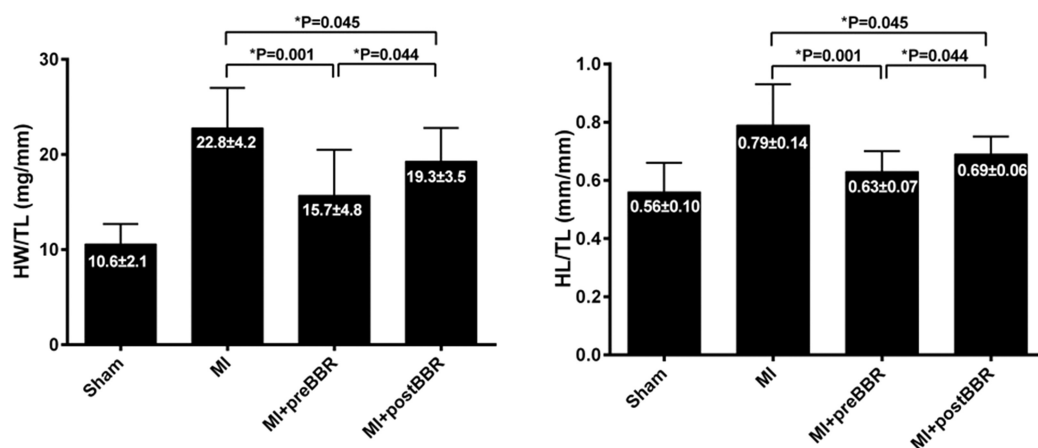


图 4 各组小鼠心脏重量 / 胫骨长度和心脏长度 / 胫骨长度

Fig. 4 Heart weight (HW)/tibial length (TL) and heart length (HL)/tibial length (TL) in different groups

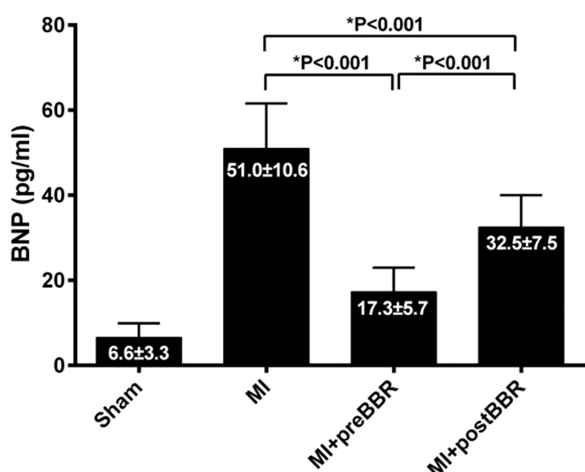


图5 各组小鼠血浆脑钠肽水平测定

Fig. 5 Plasma brain natriuretic peptide (BNP) level in different groups

2.5 各组小鼠梗死边缘区纤维化程度比较

对各组小鼠心脏进行 Masson 染色, 观察梗死边缘区纤维化程度, 并对纤维化进行定量。结果显示: Sham 组心肌基本看不到纤维化, MI 对照组纤维化显著增加。与 MI 对照组相比, MI+postBBR 组纤维化明显减轻, MI+preBBR 组纤维化程度最轻(图 6)。

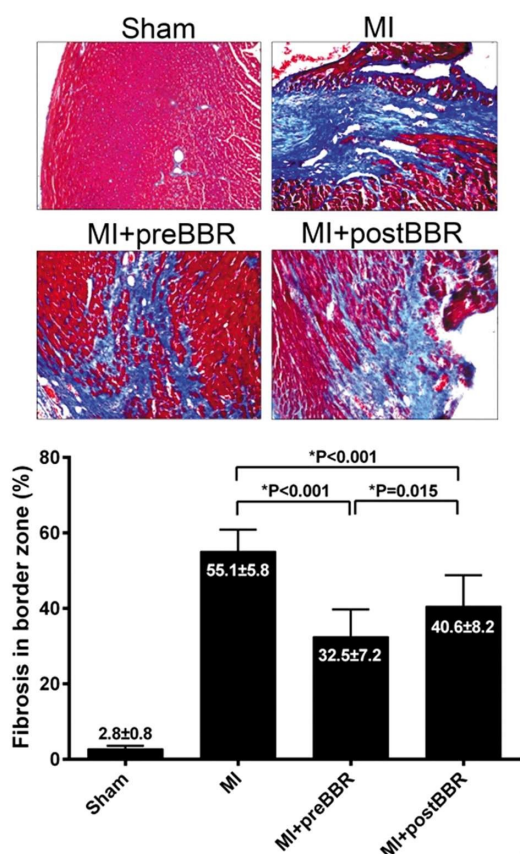


图6 各组小鼠梗死边缘区纤维化情况

Fig. 6 Fibrosis of border zone in different groups

3 讨论

目前"老药"新用是研究的热点之一。与"新药"相比,大

部分"老药"价格低廉,且都经过了数十年的临床检验,其安全性非常可靠。因此,如果能拓展"老药"的适应症,将节省大量的资金,并取得巨大的社会效益。以阿司匹林为例,最开始发现它是一种解热镇痛药。随着研究的深入,阿司匹林逐渐被确立为心血管病的一级预防用药。最近,美国预防服务工作组发布指南,正式将阿司匹林作为结直肠癌的一线预防药物^[10]。类似的"老药"还有二甲双胍^[11]等。BBR 是我国应用很久的传统中药之一,以 BBR 为主要成分的盐酸小檗碱片是目前较常用的治疗急性胃肠炎的非处方药。近年来,大量的研究表明 BBR 对胃肠炎以外的多种类型疾病均有治疗作用,包括癌症^[12]、肥胖症、肝硬化^[13]、骨质疏松、阿尔茨海默病、帕金森氏病^[14]、抑郁症、药物成瘾、类风湿性关节炎^[15]、真菌感染、尿路结石等^[2]。尤其值得关注的是,BBR 具有降低血压、调节血脂和降低血糖的作用,提示其对与高血压、高血脂、糖尿病密切相关的心血管疾病可能具有很好的治疗作用^[2]。作为一个"老药",BBR 有许多优点。首先,BBR 虽然血浆浓度很低,但是它经肠道吸收后迅速分布到心脏、肝脏、脑、肺脏、脂肪等重要脏器并在局部富集较高浓度^[16]。第二,BBR 的毒性和副作用非常低。动物实验表明,口服 BBR 不存在致死剂量^[17]。临床研究显示 BBR 的主要不良反应为轻度的胃肠道反应^[2]。第三,BBR 价格低廉,容易获取。因此,本研究拟探讨 BBR 在 MI 及梗死后心肌重构中是否发挥作用。此外,本研究通过设置预处理及后处理两种给药策略,模拟临床上对心血管的一级预防及二级预防,探讨 BBR 是否可用于 MI 及梗死后心肌重构的一级预防。

在成功建立 MI 模型的基础上,我们发现 BBR 预处理和后处理均能提高 MI 小鼠的存活率。有报道 BBR 可对抗糖尿病大鼠心律失常^[18],同时具有降低血压的作用^[9],这两种作用有可能减少因恶性心律失常及充血性心力衰竭所导致的小鼠死亡。此外,BBR 还被报道具有对抗炎症、调节免疫^[19]、抑制细胞凋亡的作用^[20],这些作用可能参与了 BBR 后续的保护作用。与 BBR 后处理组相比,BBR 预处理组小鼠存活率更高,其他与心室重构及心功能相关的指标也均有明显改善,这可能是由于 BBR 预处理提前调整了机体各个脏器的功能及免疫系统的状态。另外,预处理组在受到 MI 损伤时心脏组织中已经具有高浓度的药物,而后处理组为模拟临床情况,在 MI 后 4 h 才给药,药物无法马上起效。此外,与 MI 对照组相比,BBR 治疗组的心功能更好、心脏更小、重量更轻、纤维化程度更轻。并且,BBR 预处理组较后处理组上述指标改善更加明显。这些结果表明 BBR 能很好的抑制 MI 后心室重构、改善心脏收缩功能,提示其对心肌梗死后心力衰竭可能具有治疗作用。已有研究显示 BBR 具有正性肌力作用^[21],这可能部分解释 BBR 为什么具有对抗心力衰竭的作用。临床上,BNP 被认为是评价心脏功能及判断有无心力衰竭的强有力指标^[22]。我们在实验中还检测了各组小鼠血浆中的 BNP 水平。虽然在小鼠中没有与临床上类似的诊断阈值,但是我们仍发现 BBR 可显著降低 MI 引起的 BNP 升高,且预处理组降低的幅度最大,提示预处理组心脏功能障碍最轻。这一结果与 Li 等^[23]报道的结果类似,他们发现在大鼠的慢性心力衰竭模型中,BBR 可降低 BNP 的水平。

综上,BBR 对 MI 及梗死后心室重构具有治疗作用,且预防性应用 BBR 的保护作用更强,提示 BBR 有作为 MI 及梗死

后心力衰竭一级预防用药的可能。本研究虽然为拓展 BBR 心血管病适应证及用法提供了实验基础,但很多问题仍未解决,如 BBR 的作用机制,BBR 不同的用量、不同给药途径及更细化的给药时间是否有差别,这些问题均有待在后续研究中深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Reddy K, AKhaliq, R J Henning. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction [J]. World J Cardiol, 2015, 7 (5): 243-276
- [2] Imenshahidi M, H Hosseinzadeh. Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review[J]. Phytother Res, 2016, [Epub ahead of print]
- [3] Caliceti C, P Franco, S Spinozzi, et al. Berberine: New Insights from Pharmacological Aspects to Clinical Evidences in the Management of Metabolic Disorders[J]. Curr Med Chem, 2016, 23(14): 1460-1476
- [4] Guo Z, Sun H, Zhang H, et al. Anti-hypertensive and renoprotective effects of berberine in spontaneously hypertensive rats [J]. Clin Exp Hypertens, 2015, 37(4): 332-339
- [5] Chang X, Wang Z, Zhang J, et al. Lipid profiling of the therapeutic effects of berberine in patients with nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Transl Med, 2016, 14: 266
- [6] Yu L, Li Q, Yu B, et al. Berberine Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Oxidative Stress and Inflammation Response: Role of Silent Information Regulator 1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 1689602
- [7] Wang Y, Liu J, Ma A, et al. Cardioprotective effect of berberine against myocardial ischemia/reperfusion injury via attenuating mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 14513-14519
- [8] Guo J, Wang SB, Yuan TY, et al. Coptisine protects rat heart against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing myocardial apoptosis and inflammation [J]. Atherosclerosis, 2013, 231 (2): 384-391
- [9] Gao E and Koch WJ. A novel and efficient model of coronary artery ligation in the mouse[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1037: 299-311
- [10] Patrignani P and Patrono C. Aspirin and Cancer [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(9): 967-976
- [11] Chae YK, Arya A, Malecek MK, et al. Repurposing metformin for cancer treatment: current clinical studies[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 40767-40780
- [12] Liu H, Huang C, Wu L, et al. Effect of evodiamine and berberine on miR-429 as an oncogene in human colorectal cancer[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 4121-4127
- [13] He Q, Mei D, Sha S, et al. ERK-dependent mTOR pathway is involved in berberine-induced autophagy in hepatic steatosis[J]. J Mol Endocrinol, 2016, 57(4): 251-260
- [14] Ahmed T, Gilani AU, Abdollahi M, et al. Berberine and neurodegeneration: A review of literature [J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(5): 970-979
- [15] Hu Z, Jiao Q, Ding J, et al. Berberine induces dendritic cell apoptosis and has therapeutic potential for rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(4): 949-959
- [16] Tan XS, Ma JY, Feng R, et al. Tissue distribution of berberine and its metabolites after oral administration in rats [J]. PLoS One, 2013, 8 (10): e77969
- [17] Kheir MM, Wang Y, Hua L, et al. Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(4): 1105-1110
- [18] Wang LH, Li XL, Li Q, et al. Berberine alleviates ischemic arrhythmias via recovering depressed I (to) and I (Ca) currents in diabetic rats[J]. Phytomedicine, 2012, 19(3-4): 206-210
- [19] Li C, Xi Y, S Li, et al. Berberine ameliorates TNBS induced colitis by inhibiting inflammatory responses and Th1/Th17 differentiation [J]. Mol Immunol, 2015, 67(2): 444-454
- [20] Zhuo Y, Chen Q, Chen B, et al. Berberine promotes antiproliferative effects of epirubicin in T24 bladder cancer cells by enhancing apoptosis and cell cycle arrest [J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2016: [Epub ahead of print]
- [21] Shaffer JE. Inotropic and chronotropic activity of berberine on isolated guinea pig atria [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1985, 7 (2): 307-315
- [22] Calzetta L, Orlandi A, Page C, et al. Brain natriuretic peptide: Much more than a biomarker[J]. Int J Cardiol, 2016, 221: 1031-1038
- [23] 李永民, 陈晓春, 刘华, 等. 人参总皂苷合黄连小檗碱对慢性心衰大鼠血浆 BNP、心肌细胞内钙离子浓度的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 324-327
- Li Yong-min, Chen Xiao-chun, Liu Hua, et al. Effects of ginseng total saponins with berberine on plasma brain natriuretic peptide and Ca²⁺ concentration in experimental rats with chronic congestive heart failure [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 34(3): 324-327