

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.19.005

小檗碱对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌梗死的保护作用*

朱舜明¹ 张荣怀¹ 张学军¹ 祝 领¹ 安慧仙² 王 瑞² 曾广伟^{3Δ}

(1 陕西省人民医院心内一科 陕西 西安 710068; 2 空军军医大学第二附属医院心内科 陕西 西安 710038;

3 西安国际医学中心心内科 陕西 西安 710100)

摘要 目的:揭示小檗碱(BER)对异丙肾上腺素(ISO)诱导大鼠心肌梗死的保护作用及机制。**方法:**将 100 只 SD 大鼠随机分为 5 组(n=20): 对照组、ISO 组、ISO+10BER (BER 10 mg/kg/d)、ISO+20BER (BER 20 mg/kg/d)和 ISO+50BER (BER 50 mg/kg/d)。给药组大鼠按照指定的剂量灌胃 BER, 对照组和 ISO 组灌胃等体积无菌水, 共灌胃 2 周。然后, 除对照组之外, 其他组大鼠皮下注射 ISO (5 mg/kg/d), 对照组皮下注射等体积的 0.9% 无菌盐水, 连续 3 d。通过超声心动图检查大鼠的 EF、FS、LVEDD 和 LVESD; 苏木精和伊红(HE)染色评价心肌组织形态学; Masson 三色染色用于评估心脏的间质纤维化; 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑(TTC)法检测心肌梗死体积。Western blot 检测心肌组织中 collagen I、collagen III、TGF- β 1、TNF- α 、Smad3、p-Smad3、NF- κ B、 α -SMA、Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的表达。免疫组化评估间隙连接蛋白 43(Cx43)的表达。使用试剂盒检测血清 SOD、CAT 和 MDA 表达水平。**结果:**与 ISO 组相比, BER 预处理组大鼠的心肌梗死体积和 LVEDD 和 LVESD 显著降低, 而 EF 和 FS 显著升高($P<0.05$)。BER 预处理组大鼠的纤维化标志物 (collagen I、collagen III 和 α -SMA) 表达水平与 ISO 组相比显著下调($P<0.05$)。与 ISO 组相比, BER 预处理组大鼠的 TGF- β 1/Smad3 信号通路和炎症因子 (TNF- α 和 NF- κ B) 被抑制。BER 预处理组大鼠的 Cx43 阳性染色评分显著高于 ISO 组($P<0.05$)。与 ISO 组相比, BER 预处理组大鼠的促凋亡蛋白 (Bax 和 caspase-3) 被下调, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 被上调($P<0.05$)。与 ISO 组相比, BER 预处理组大鼠的 MDA 水平显著降低, 而 SOD 和 CAT 显著升高($P<0.05$)。BER 预处理组大鼠的 Nrf2 和 HO-1 水平显著高于 ISO 组($P<0.05$)。**结论:**在异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠模型中, 小檗碱预处理可通过抑制心脏纤维化、炎症反应、心肌细胞凋亡和氧化应激损伤来减少心肌梗死体积并改善心脏功能。

关键词: 小檗碱; 心肌梗死; 异丙肾上腺素; 心脏纤维化; 炎症; 细胞凋亡; 氧化应激

中图分类号: R-33; R542.22 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2020)19-3627-07

Protective Effect of Berberine on Isoprenaline-induced Myocardial Infarction in Rats*

ZHU Shun-ming¹, ZHANG Rong-huai¹, ZHANG Xue-jun¹, ZHU Ling¹, AN Hui-xian², WANG Ru², ZENG Guang-wei^{3Δ}

(1 1st Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

3 Department of Cardiology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710100, China)

ABSTRACT Objective: To reveal the protective effect and mechanism of berberine (BER) on isoprenaline (ISO) -induced myocardial infarction in rats. **Methods:** 100 SD rats were randomly divided into 5 groups (n=20): control group, ISO group, ISO+10BER (BER 10 mg/kg/d), ISO+20BER (BER 20 mg/kg/d) and ISO+50BER (BER 50 mg/kg/d). The rats in the administration group were orally administered BER at the prescribed dose, and the control group and the ISO group were orally administered with an equal volume of sterile water for 2 weeks. Then, except for the control group, rats in the other groups were subcutaneously injected with ISO (5 mg/kg/d), and the control group was subcutaneously injected with an equal volume of 0.9% sterile saline for 3 consecutive days. The EF, FS, LVEDD and LVESD of the rats were examined by echocardiography. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to evaluate myocardial histomorphology. Masson trichrome staining was used to assess cardiac interstitial fibrosis. The volume of myocardial infarction was measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) method. Western blot was used to detect the protein expression of collagen I, collagen III, TGF- β 1, TNF- α , Smad3, p-Smad3, NF- κ B, α -SMA, Nrf2, HO-1, Bcl-2, Bax and caspase-3. Immunohistochemistry was used to assess gap junction protein 43 (Cx43) expression. Serum SOD, CAT and MDA levels were measured using a commercial kit. **Results:** Compared with the ISO group, the myocardial infarction volume and LVEDD and LVESD of the BER pretreatment group rats were sig-

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81700401); 陕西省重点研发计划项目(2018SF-085)

作者简介: 朱舜明(1981-), 男, 博士研究生, 副主任医师, 主要研究方向: 冠心病基础和临床研究,

E-mail: shen_jie_8008@163.com, 电话: 18829001234

Δ 通讯作者: 曾广伟(1981-), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 主要研究方向: 冠心病和结构性心脏病基础和临床研究,

E-mail: zengguangwei1026@163.com, 电话: 13629266606

(收稿日期: 2020-02-23 接受日期: 2020-03-18)

nificantly reduced, while EF and FS were significantly increased ($P<0.05$). Fibrosis markers (collagen I, collagen III, and α -SMA) in the BER pretreatment group rats were significantly down-regulated compared to the ISO group ($P<0.05$). Compared with the ISO group, the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway and inflammatory factors (TNF- α and NF- κ B) in the BER pretreatment group rats were inhibited ($P<0.05$). The Cx43 positive staining score of the BER pretreatment group rats was significantly higher than that of the ISO group ($P<0.05$). Compared with the ISO group, the pro-apoptotic proteins (Bax and caspase-3) in the BER pretreatment group rats were down-regulated, and the anti-apoptotic protein Bcl-2 was up-regulated ($P<0.05$). Compared with the ISO group, the MDA level in the BER pretreatment group rats was significantly reduced, while SOD and CAT were significantly increased ($P<0.05$). The Nrf2 and HO-1 levels in the BER pretreatment group rats were significantly higher than those in the ISO group ($P<0.05$). **Conclusion:** In isoprenaline-induced myocardial infarction in rat models, berberine pretreatment can reduce myocardial infarction volume and improve cardiac function by inhibiting cardiac fibrosis, inflammatory response, myocardial cell apoptosis, and oxidative stress injury.

Key words: Berberine; Myocardial infarction; Isoprenaline; Cardiac fibrosis; Inflammation; Apoptosis; Oxidative stress

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

Article ID: 1673-6273(2020)19-3627-07

前言

心血管疾病也是世界上死亡率最高的疾病,目前,我国心血管疾病的发病率逐年升高,已经是老年人口中最常见的死亡原因。心肌梗死作为一种常见的心血管疾病,其发生和进展与多种病理因素有关,心肌梗死后发生的一系列功能改变被称为心脏重塑,心脏纤维化是心脏重塑的必要部分,心脏成纤维细胞转分化的激活和随后的细胞外基质沉积是驱动心脏纤维化的关键细胞事件^[1]。此外,炎症反应和氧化应激也参与心肌梗死的发生发展,并且在诱导心肌细胞凋亡和心肌纤维化方面扮演重要角色^[2]。使用非选择性 β -肾上腺素受体激动剂异丙肾上腺素(Isoprenaline, ISO)进行的慢性 β -肾上腺素刺激可以诱发心肌的炎症反应和心肌纤维化,ISO也通常作为一种诱导心肌梗死的常用动物建模方法^[3]。小檗碱(Berberine, BER)是一种从几种中草药中分离出来的生物活性生物碱,具有多种药理作用,包括抗病毒、抗炎、抗癌、抗氧化和心脏保护作用^[4,5]。研究显示,小檗碱通过抑制巨噬细胞的 IL-6 分泌来抑制心肌梗死后的心脏重塑^[6]。另外,小檗碱能够通过调节核因子 κ B(Nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 信号通路来减轻脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症和细胞外基质沉积^[7]。本研究旨在评估小檗碱对治疗 ISO 诱导的大鼠心肌梗死和心脏纤维化的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

100 只 SD 大鼠(雄性,180~230 g)由陕西省人民医院[SYXK(陕)2016-006]提供,在无特定病原体的条件下于 25℃、55%相对湿度、12 h 的明暗周期内饲养,饲养期间不限制饮食。

BER(纯度 $\geq 98\%$)和 ISO(纯度 $\geq 98\%$)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。苏木精和伊红(HE)染色试剂盒、Masson 三色染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)试剂购自上海如吉生物科技发展有限公司。RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量分析试剂盒、E-CL-Plus 化学发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。collagen I、collagen III、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、核因子- κ B(NF- κ B)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、核因子 E2 相关因

子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)和甘油醛糖磷酸脱氢酶(GAPDH)—抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。抗肿瘤生长因子- β 1(TGF- β 1)、Smad3、磷酸化(p)-Smad3、Bcl-2、Bax、间隙连接蛋白 43(Cx43)和 caspase-3 购自英国 Abcam 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自北京百奥莱博科技有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)检测试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和处理 将 100 只 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 20 只:对照组、ISO 组、ISO+10BER(BER 10 mg/kg/d,灌胃)、ISO+20BER(BER 20 mg/kg/d,灌胃)和 ISO+50BER(BER 50 mg/kg/d,灌胃)。将 BER 溶于无菌水中,给药组大鼠按照指定的剂量灌胃 BER,对照组和 ISO 组灌胃等体积无菌水,共灌胃 2 周。然后,将 ISO 溶解于 0.9%无菌盐水中,除对照组之外,其他组大鼠皮下注射 ISO(5 mg/kg/d),对照组皮下注射等体积的 0.9%无菌盐水,连续 3 d,通过心电图段抬高值作为心肌梗死指标,当两个以上导联呈 ST 段抬高持续 0.2 mV 以上时表示建模成功^[8]。

1.2.2 超声心动图检查 通过配备 10MHz 线性阵列超声换能器的 Visual Sonics Vevo 2100 超高分辨率小动物超声成像系统对各组大鼠进行超声心动图检查。超声心动图参数包括:左室射血分数(EF)、左室缩短分数(FS)、左室舒张末期直径(LVEDD)、左室收缩末期直径(LVESD)。

1.2.3 苏木精和伊红(HE)染色 将石蜡包埋的大鼠心脏组织 5 μ m 切片脱蜡再水合,用苏木精和伊红(H&E)染色试剂盒进行染色,染色步骤严格按照说明书进行。最后在 Olympus 光学显微镜下观察心肌组织的病理改变。

1.2.4 Masson 三色染色 Masson 三色染色用于评估心脏的间质纤维化。用 4%多聚甲醛固定心脏,将其包埋在石蜡中,并以 5 μ m 的厚度切片。按照制造商说明书通过 Masson 三色染色试剂盒评估各组大鼠的纤维化程度。

1.2.5 心肌梗死体积测定 大鼠采血后从动脉注入 10 mL 1% TTC 磷酸盐缓冲液(pH7.4),孵育 15 min 后取下心脏,剪去心耳并称重。将心脏横切成 5 份并用 1% TTC 磷酸盐缓冲液(pH7.4)孵育 15 min,切取梗死心肌并称重。心肌梗死体积=(梗死心肌/心脏重量) $\times 100\%$ 。

1.2.6 Western blot 在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中裂解心肌组织并匀浆,4℃下 5000 r/min 离心 15 min,收集上清液,使用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定蛋白质浓度。将 30 μ g 蛋白质样品进行 10% SDS-PAGE 并转移至 PVDF 膜。然后分别与 collagen I (1:500)、collagen III (1:500)、TGF- β 1 (1:1000)、TNF- α (1:1000)、Smad3 (1:2000)、p-Smad3 (1:2000)、NF- κ B (1:1000)、 α -SMA (1:500)、Nrf2 (1:500)、HO-1 (1:2000)、Bcl-2 (1:3000)、Bax (1:3000)、caspase-3 (1:1000) 和 GAPDH (1:1000) 一抗 4℃过夜孵育。然后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:2000) 在室温下孵育 2 h。然后使用 ECL-Plus 化学发光试剂盒进行显影。使用 Image J 软件进行光密度分析。

1.2.7 免疫组化 将心肌组织切片脱蜡再水合,然后与 0.6% 过氧化氢甲醇孵育 30 min 阻断内源性过氧化物酶活性。将切片与 Cx43 (1:2000) 一抗过夜孵育。然后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:1000) 在 37℃ 下孵育 30 min。使用 DAB 显色试剂盒进行显色。随机选择 5 个视野进行阳性染色评分。阳性细胞计数评分规则如下:0:<5%;1:5~25%;2:

26~50%;3:51~75%;4:>75%。染色强度评分如下:0:未染色;1:浅黄色;2:棕黄色;3:深棕色。Cx43 阳性染色评分 = 阳性细胞计数评分 $\times$ 染色强度评分。

1.2.8 血清抗氧化能力分析 按照试剂盒说明,使用 SOD、CAT 和 MDA 测定试剂盒检测大鼠血清的抗氧化能力。

1.3 统计分析

符合正态分布的数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。数据通过单因素方差分析后进行 Tukey 事后检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小檗碱对心肌梗死大鼠心脏功能的影响

与对照组相比,ISO 组大鼠的 EF 和 FS 水平显著降低,而 LVEDD 和 LVESD 水平显著增加 ($P < 0.05$)。ISO+10BER 组、ISO+20BER 组和 ISO+50BER 组大鼠的 EF 和 FS 水平显著高于 ISO 组,而 LVEDD 和 LVESD 显著低于 ISO 组,并且表现出 BER 浓度依赖性 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠的 EF、FS、LVESD 和 LVEDD

Table 1 EF, FS, LVESD and LVEDD of each group of rats

	EF (%)	FS (%)	LVESD (mm)	LVEDD (mm)
Control	61.34 $\pm$ 5.58 ^a	34.65 $\pm$ 2.89 ^a	8.11 $\pm$ 0.70 ^c	5.27 $\pm$ 0.41 ^d
ISO	22.45 $\pm$ 2.04 ^d	12.56 $\pm$ 1.05 ^e	12.67 $\pm$ 1.10 ^a	9.54 $\pm$ 0.73 ^a
ISO+10BER	41.65 $\pm$ 3.79 ^c	18.65 $\pm$ 1.55 ^d	10.13 $\pm$ 0.88 ^b	7.12 $\pm$ 0.55 ^c
ISO+20BER	44.56 $\pm$ 4.05 ^c	23.57 $\pm$ 1.96 ^c	10.71 $\pm$ 0.93 ^b	7.88 $\pm$ 0.61 ^b
ISO+50BER	48.34 $\pm$ 4.39 ^b	25.43 $\pm$ 2.12 ^b	10.76 $\pm$ 0.93 ^b	7.95 $\pm$ 0.61 ^b

Note: Different letters "a-e" indicate that there was a significant difference between groups in the same column of data ($P < 0.05$), and the same letter indicates that the differences between groups were not significant ($P > 0.05$). Same below.

2.2 小檗碱对心肌梗死大鼠心脏病变的影响

HE 染色结果显示,对照组大鼠的心肌组织紧密,未见细胞形态改变。ISO 组大鼠出现心肌组织肿胀、心肌纤维断裂、细胞间隙扩大、细胞坏死。BER 处理组的组织肿胀、心肌纤维断裂、细胞坏死等情况显著减轻。心肌梗死结果显示,对照组大鼠中未发现心肌梗死,ISO 组大鼠的心肌梗死体积为 (19.43 $\pm$ 2.04)%。与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+20BER 组和 ISO+50BER 组大鼠的心肌梗死体积显著降低,分别为 (15.11 $\pm$

1.42)%(12.28 $\pm$ 1.26)%和 (9.73 $\pm$ 0.94)%,并且表现出 BER 浓度依赖性降低 ($P < 0.05$)。见图 1 和图 2。

与对照组相比,ISO 组大鼠的细胞凋亡调控因子 Bcl-2 的蛋白表达水平显著降低,而 Bax 和 caspase-3 显著升高 ($P < 0.05$)。与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+20BER 组和 ISO+50BER 组大鼠的 Bcl-2 的蛋白表达水平显著升高,而 Bax 和 caspase-3 显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

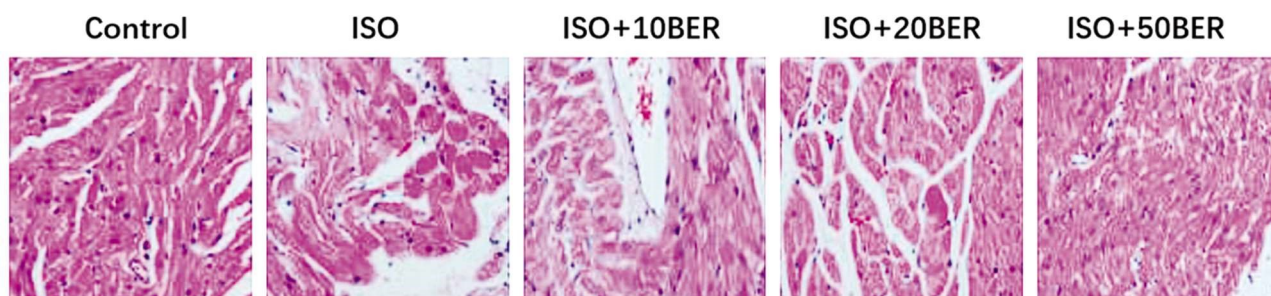


图 1 大鼠心肌组织的苏木精和伊红 (HE) 染色 (200 $\times$)

Fig.1 Hematoxylin and eosin (H & E) staining of rat myocardial tissue (200 $\times$)

2.3 小檗碱对心肌梗死大鼠心肌纤维化和 TGF- β 1/Smad2/3 信号通路的影响

Masson 三色结果显示,对照组大鼠未发生心肌纤维化,ISO 组大鼠显示严重纤维化、肌原纤维被破坏、心肌细胞肥大,

各浓度 BER 处理组大鼠的纤维化程度显著减轻。与对照组相比,ISO 组大鼠的心肌纤维化标志物 collagen I、collagen III 和 α -SMA 的蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+10BER 组和 ISO+10BER 组大鼠的 collagen I、collagen III 和 α -SMA 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。见图 4 和图 5。

与对照组相比,ISO 组大鼠的 TGF- β 1 蛋白表达和 Smad3 的磷酸化水平均显著升高 ($P<0.05$)。而与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+10BER 组和 ISO+10BER 组大鼠的 TGF- β 1 蛋白表达和 Smad3 的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$)。见图 6。

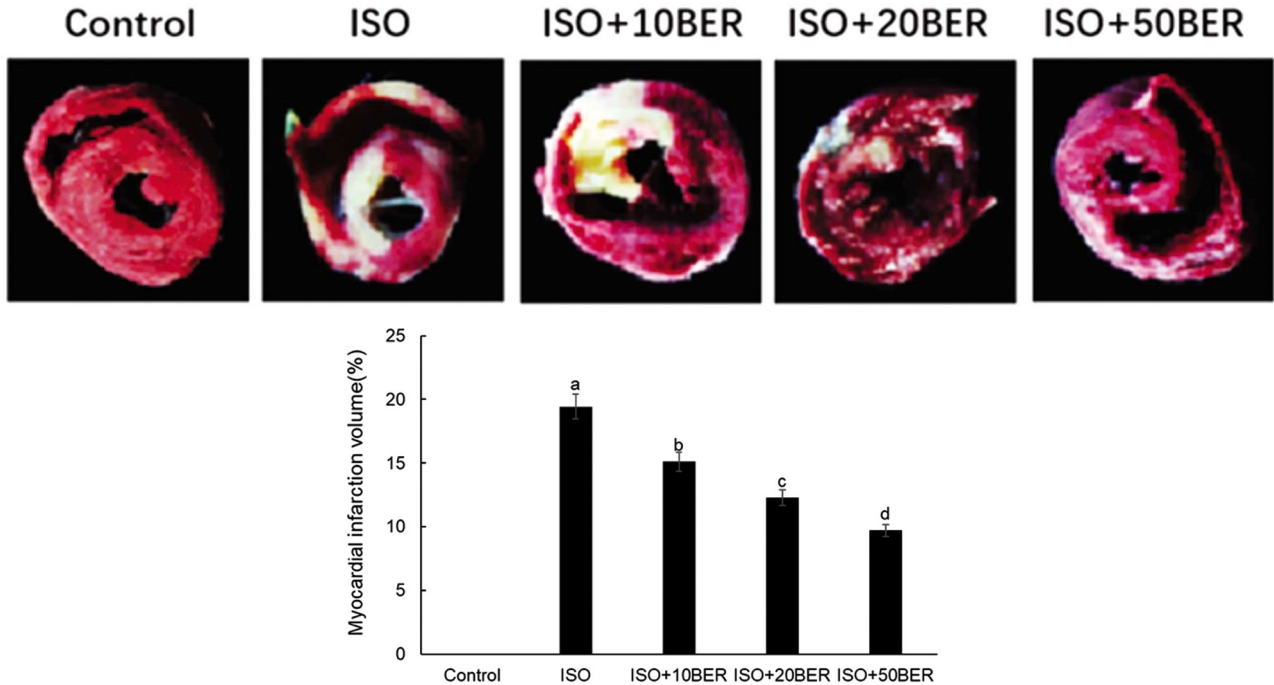


图 2 各组大鼠心肌梗死体积

Fig.2 Myocardial infarction volume of each group of rats

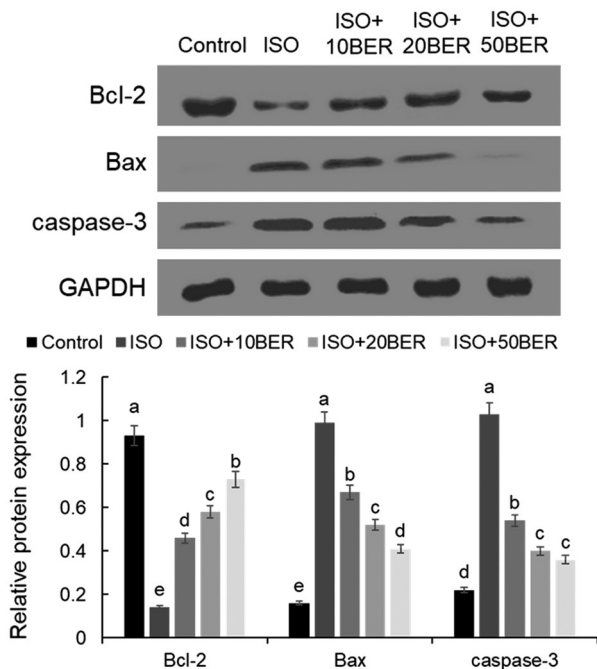


图 3 各组大鼠心肌组织中 Bcl-2、Bax 和 caspase-3 的蛋白表达

Fig.3 Bcl-2, Bax and caspase-3 protein expression in myocardial tissue of each group of rats

2.4 小檗碱对心肌梗死大鼠心肌组织中间隙连接蛋白 43 (Cx43)表达的影响

免疫组化结果显示,与对照组相比,ISO 组大鼠的 Cx43 阳性染色评分显著降低;与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+10BER 组和 ISO+10BER 组大鼠的 Cx43 阳性染色评分均显著升高($P<0.05$)。见图 7。

2.5 小檗碱对心肌梗死大鼠心肌组织炎症的影响

结果显示,与对照组相比,ISO 组大鼠的炎症因子 TNF- α 和 NF- κ B 的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+10BER 组和 ISO+10BER 组大鼠的 TNF- α 和 NF- κ B 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。见图 8。

2.6 小檗碱对心肌梗死大鼠血清抗氧化能力和抗氧化相关基因表达的影响

结果显示,与对照组相比,ISO 组大鼠的血清 SOD 和 CAT 水平显著降低,而 MDA 显著升高($P<0.05$)。与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+10BER 组和 ISO+10BER 组大鼠的血清 SOD 和 CAT 水平显著升高,而 MDA 显著降低($P<0.05$)。与对照组相比,ISO 组大鼠的抗氧化调控因子 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与 ISO 组相比,ISO+10BER 组、ISO+10BER 组和 ISO+10BER 组大鼠的 Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。见表 2 和图 9。

3 讨论

目前已有的研究主要集中于小檗碱(BER)在各种心脏损伤模型中的作用,包括高脂饮食和链佐霉素诱导的 2 型糖尿病

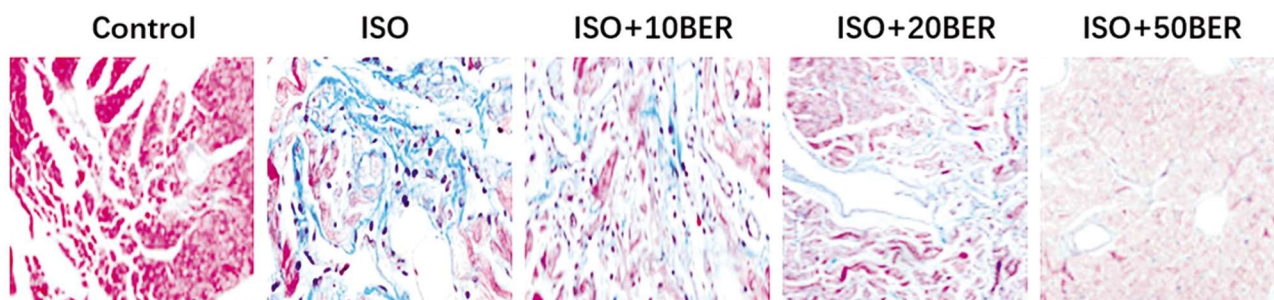


图4 各组大鼠心肌组织 Masson 三色染色(200×)

Fig.4 Masson trichrome staining of myocardial tissue in each group of rats (200×)

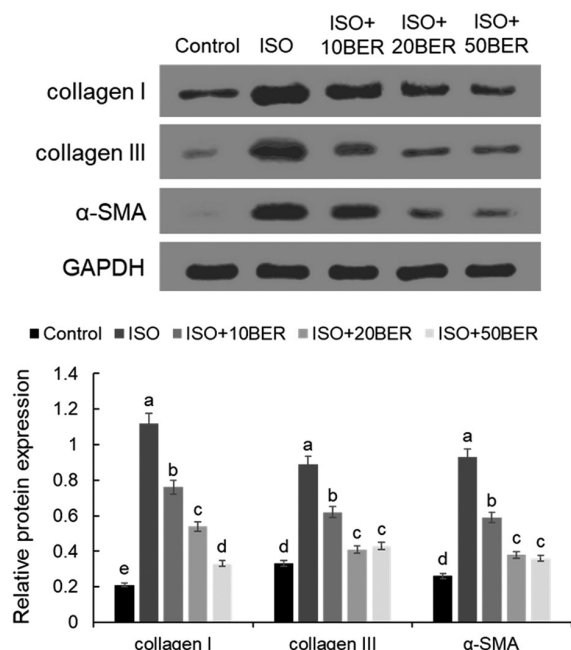


图5 各组大鼠心肌组织中 collagen I、collagen III 和 α-SMA 的蛋白表达

Fig.5 Protein expression of collagen I, collagen III, and α-SMA in myocardial tissue of each group of rats

模型、压力超负荷引起的心脏肥大模型、左前降冠状动脉结扎模型、猪心肌素诱导的实验性自身免疫性心肌炎模型以及大剂量 ISO (85 mg/kg) 注射引起的心脏损伤模型^[9-13]。在这些模型中, BER 已显示出重要的心脏保护作用。但是, BER 在心肌梗死中的作用机制尚不清楚。

其他研究中已经报道低剂量的 ISO (0.3~6 mg/kg) 可用于建立心肌梗死动物模型和诱发心脏肥大和心脏纤维化。由于肾上腺素系统的激活, ISO 给药会给心肌造成严重的压力, 并与转导机制的激活和纤维化因子表达的增加有关, 从而导致心脏重塑和功能障碍^[14]。本研究应用 10、20 和 50 mg/kg/d 的剂量对大鼠进行预处理 2 周, 然后通过皮下注射 ISO (5 mg/kg) 在大鼠模型中诱发了心肌梗死大鼠模型。研究发现, 小檗碱预处理可以剂量依赖性方式升高 EF 和 FS 并降低 LVEDD 和 LVESD, 说明小檗碱可抑制心肌梗死大鼠心脏功能的恶化 (EF 和 FS) 和心脏扩大 (LVESD 和 LVEDD)。此外, HE 染色结果证实, 小檗碱可显著减轻 ISO 诱导的心肌损伤。TTC 测定显示, 小檗碱预处理减少了 ISO 引起的心肌梗死体积。Western blot 结果发现, 小檗碱预处理上调了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达并下调了促凋亡蛋白 Bax 和 caspase-3 的表达, 从而抑制了心肌细胞凋亡。

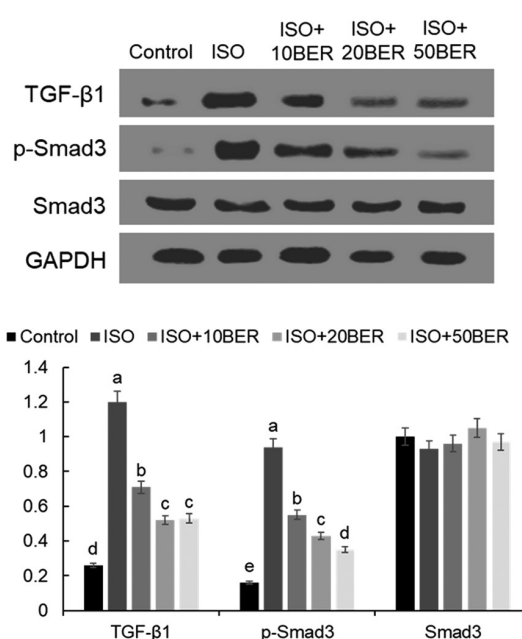


图6 各组大鼠心肌组织中 TGF-β1、Smad3 和 p-Smad3 的蛋白表达

Fig.6 Protein expression of TGF-β1, Smad3 and p-Smad3 in myocardial tissue of each group of rats

上述结果说明小檗碱在治疗心肌梗死中具有较高应用价值。

心脏纤维化是心脏重塑的主要表现, 其特征是心肌间质胶原蛋白沉积、纤维蛋白增生和各种胶原的失衡。严重的心脏纤维化可导致心脏舒张和收缩功能障碍、心脏硬度增加, 并最终导致心力衰竭。心肌胶原主要由 collagen I 和 collagen III 组成, collagen I 和 collagen III 的比例改变说明胶原合成与降解之间的平衡被打破, 从而引起胶原重塑。另外, α-SMA 是成纤维细胞的标志物, α-SMA 的高表达反映了成纤维细胞的过度增殖。本研究 Masson 三色染色发现, 小檗碱预处理显著减轻了心肌纤维化程度, 并且显著抑制了 ISO 诱导的心肌纤维化标志物 collagen I、collagen III 和 α-SMA 的蛋白表达。上述结果说明小檗碱预处理通过抑制心脏纤维化来发挥心脏保护作用。

细胞外基质 (ECM) 中的胶原蛋白沉积主要通过 TGF-β1 来介导, TGF-β1 通过控制 Smads 介导的胶原蛋白基因转录来促进心房间质纤维化^[15]。TGF-β1 通过调节 Smad 3 的磷酸化并使后者易位进入细胞核, 从而促纤维化细胞因子的转录^[16]。TGF-β1 还可以诱导成纤维细胞分化为成肌纤维细胞从而导致 ECM 沉积^[15]。本研究发现, 小檗碱预处理抑制了 TGF-β1 的蛋白表达和 Smad3 的磷酸化, 提示小檗碱可通过抑制 TGF-β1/

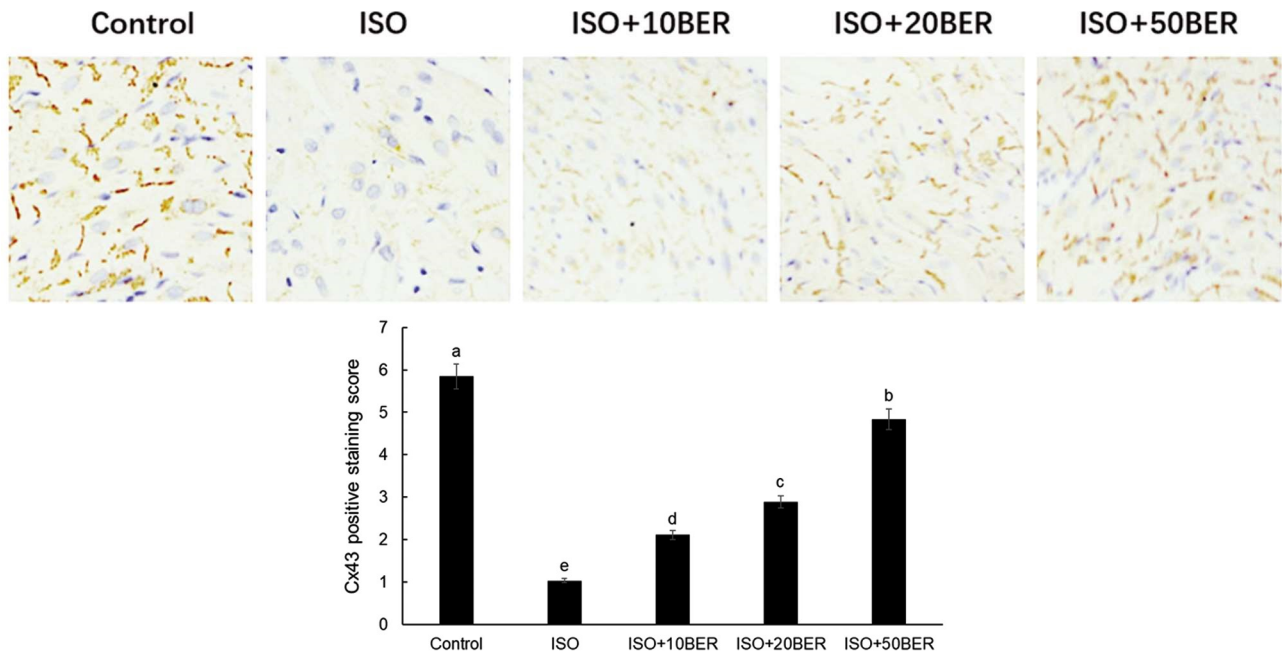


图 7 免疫组织检测各组大鼠心肌组织中 Cx43 的阳性表达

Fig.7 Immune tissue detection of Cx43 positive expression in myocardial tissue of each group of rats

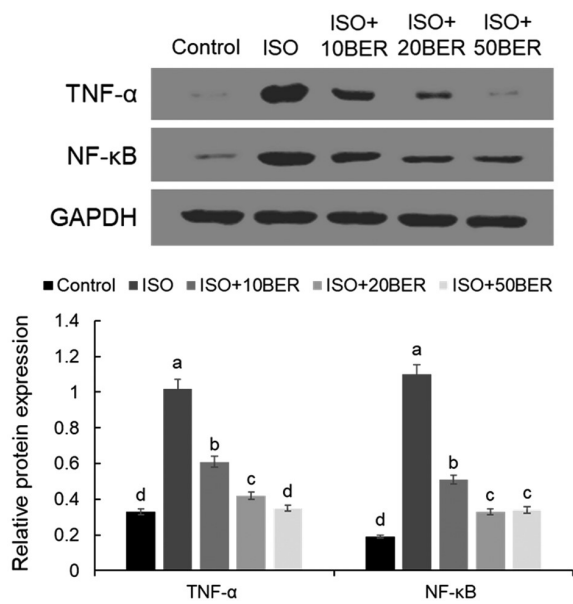


图 8 各组大鼠心肌组织中 TNF-α 和 NF-κB 的蛋白表达

Fig.8 Protein expression of TNF-α and NF-κB in myocardial tissue of each group of rats

Smad 3 信号通路来抑制胶原沉积,从而发挥抗纤维化作用。

心肌细胞间的主要连接方式是缝隙连接通道,Cx43 是缝

隙连接通道的主要组成蛋白。Cx43 的分布受纤维化影响,纤维化会破坏与正常 Cx43 组织相关的细胞骨架网络和粘附蛋白^[17]。因此,抑制间质纤维化有益于纠正 Cx43 的表达。本研究发现,小檗碱预处理上调了 Cx43 的阳性表达,说明小檗碱也可以通过维持缝隙连接通道的稳定来发挥心脏保护作用。

炎症反应和氧化应激是心肌梗死过程中的重要特征,炎症反应参与心电和结构重塑、心肌细胞凋亡、心肌重塑、氧化应激等多种生理病理过程。活性氧(ROS)的过量累积可促进促炎性介质的合成和分泌(包括 TGF-β1、TNF-α 和 NF-κB),从而促进胶原沉积^[18-20]。NF-κB 可调节炎症反应有关基因表达,促进 TNF-α 等多种促炎细胞因子的转录,并最终诱导纤维化^[21-23]。本研究发现,小檗碱预处理显著抑制了 TNF-α 和 NF-κB 的蛋白表达,并上调了血清中抗氧化酶 SOD 和 CAT 的水平,而降低了膜脂质过氧化终产物 MDA 的水平。此外,Nrf2 可以启动多种抗 ROS 的抗氧化反应元件(ARE)基因及其下游基因的表达,其中包括血红素氧合酶 1(HO-1)。抑制 Nrf2 可加重氧化应激损伤并促进心肌细胞肥大和纤维化^[24]。相反,激活 Nrf2/HO-1 信号通路则可有效抑制心房结构重塑^[25]。本研究发现小檗碱预处理激活了 Nrf2/HO-1 信号通路。上述结果说明小檗碱预处理通过抑制炎症和氧化应激来发挥心脏保护作用。

表 2 各组大鼠血清 SOD、CAT 和 MDA 水平

Table 2 Serum SOD, CAT and MDA levels of each group of rats

	SOD (U/mL)	CAT (U/mL)	MDA (nmol/mL)
Control	63.32± 5.29 ^a	2.54± 0.23 ^a	3.18± 0.40 ^d
ISO	36.76± 3.07 ^d	1.17± 0.11 ^c	5.29± 0.66 ^a
ISO+10BER	44.69± 3.73 ^c	1.84± 0.17 ^b	4.44± 0.51 ^b
ISO+20BER	51.17± 4.27 ^b	2.04± 0.19 ^b	3.84± 0.43 ^c
ISO+50BER	53.63± 4.48 ^b	2.01± 0.18 ^b	3.71± 0.45 ^c

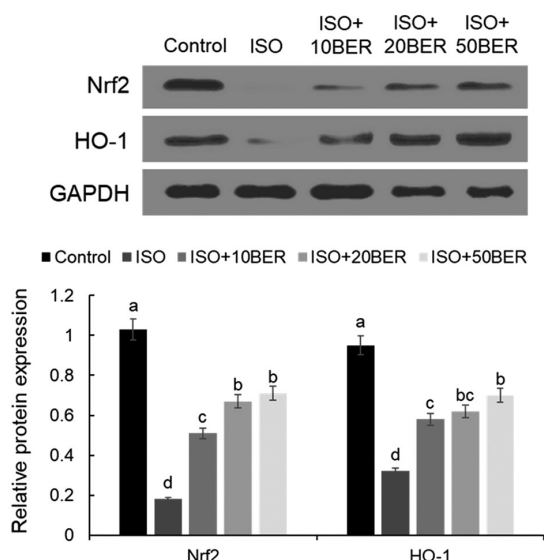


图9 各组大鼠心肌组织中Nrf2和HO-1的蛋白表达

Fig.9 Nrf2 and HO-1 protein expression in myocardial tissue of each group of rats

综上所述,本研究表明,在异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠模型中,小檗碱预处理可通过抑制心脏纤维化、炎症反应、心肌细胞凋亡和氧化应激损伤来减少心肌梗死体积并改善心脏功能。小檗碱在治疗心肌梗死方面可能具有较高的应用价值。

参考文献(References)

- [1] Xiao H, Li H, Wang J J, et al. IL-18 cleavage triggers cardiac inflammation and fibrosis upon β -adrenergic insult [J]. *European heart journal*, 2018, 39(1): 60-69
- [2] Cai J, Chen X, Chen X, et al. Anti-Fibrosis Effect of Relaxin and Spironolactone Combined on Isoprenaline-Induced Myocardial Fibrosis in Rats via Inhibition of Endothelial-Mesenchymal Transition [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 41(3): 1167-1178
- [3] Zhao L, Wu D, Sang M, et al. Stachydrine ameliorates isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by suppressing inflammation and oxidative stress through inhibiting NF- κ B and JAK/STAT signaling pathways in rats [J]. *International immunopharmacology*, 2017, 48: 102-109
- [4] Wang K, Feng X, Chai L, et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects [J]. *Drug metabolism reviews*, 2017, 49(2): 139-157
- [5] Kou JY, Li Y, Zhong ZY, et al. Berberine-sonodynamic therapy induces autophagy and lipid unloading in macrophage [J]. *Cell death & disease*, 2018, 8(1): e2558-e2558
- [6] Allijn I E, Czarny B M S, Wang X, et al. Liposome encapsulated berberine treatment attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction [J]. *Journal of controlled release*, 2017, 247: 127-133
- [7] Jiang Q, Liu P, Wu X, et al. Berberine attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells: involvement of NF- κ B signaling pathway [J]. *Molecular and cellular endocrinology*, 2011, 331(1): 34-40
- [8] Panda VS, Naik SR. Cardioprotective activity of Ginkgo biloba phyto-somes in isoproterenol-induced myocardial necrosis in rats: a biochemical and histoarchitectural evaluation [J]. *Experimental and toxicologic pathology*, 2008, 60(4-5): 397-404
- [9] Zhang T, Yang S, Du J. Protective effects of berberine on isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats through regulating HMGB1-TLR4 axis [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 2014: 849783
- [10] Chang W, Zhang M, Meng Z, et al. Berberine treatment prevents cardiac dysfunction and remodeling through activation of 5' -adenosine monophosphate-activated protein kinase in type 2 diabetic rats and in palmitate-induced hypertrophic H9c2 cells [J]. *European journal of pharmacology*, 2015, 769: 55-63
- [11] Li MH, Zhang YJ, Yu YH, et al. Berberine improves pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction through enhanced autophagy [J]. *European journal of pharmacology*, 2014, 728: 67-76
- [12] Liu X, Zhang X, Ye L, et al. Protective mechanisms of berberine against experimental autoimmune myocarditis in a rat model [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 79: 222-230
- [13] Zhang YJ, Yang SH, Li MH, et al. Berberine attenuates adverse left ventricular remodeling and cardiac dysfunction after acute myocardial infarction in rats: role of autophagy [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2014, 41(12): 995-1002
- [14] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(2): 141-151
- [15] Rahmutula D, Marcus GM, Wilson EE, et al. Molecular basis of selective atrial fibrosis due to overexpression of transforming growth factor-1 [J]. *Cardiovascular Research*, 2013, 99(4): 769-779
- [16] Hu YF, Chen YJ, Lin YJ, et al. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2015, 12(4): 230-243
- [17] Ruckermartin C, Milliez P, Tan S, et al. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts [J]. *Cardiovascular Research*, 2006, 72(1): 69-79
- [18] Jalife J. Novel upstream approaches to prevent atrial fibrillation perpetuation [J]. *Heart Fail Clin*, 2016, 12(2): 309-322
- [19] Zhu X, Huang S, Zeng L, et al. HMOX-1 inhibits TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in the MCF-7 breast cancer cell line [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(2): 411-417
- [20] Singhirunnusorn P, Moolmuang B, Lirdprapamongkol K, et al. Arsenite exposure potentiates apoptosis-inducing effects of tumor necrosis factor- α through reactive oxygen species [J]. *Journal of Toxicological Sciences*, 2018, 43(2): 159-169
- [21] Aschar-Sobbi R, Izaddoustdar F, Korogyi AS, et al. Increased atrial arrhythmia susceptibility induced by intense endurance exercise in mice requires TNF α [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 6018
- [22] Wang R, Wang J, Song F, et al. Tanshinol ameliorates CCl4-induced liver fibrosis in rats through the regulation of Nrf2/HO-1 and NF- κ B/I κ B α signaling pathway [J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2018, 12: 1281-1292
- [23] Fu S, Li YL, Wu YT, et al. Icariside II attenuates myocardial fibrosis by inhibiting nuclear factor- κ B and the TGF- β 1/Smad2 signalling pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 100: 64-71
- [24] Kumar RR, Narasimhan M, Shanmugam G, et al. Abrogation of Nrf2 impairs antioxidant signaling and promotes atrial hypertrophy in response to high-intensity exercise stress [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 86
- [25] Yeh YH, Kuo CT, Chang GJ, et al. Rosuvastatin suppresses atrial tachycardia-induced cellular remodeling via Akt/Nrf2/heme oxygenase-1 pathway [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2015, 82: 84-92