

盐酸小檗碱对大鼠肾缺血再灌注的保护作用及机制研究

邬凌峰 陈斌 汪雪萍 何屹

[摘要] 目的 研究盐酸小檗碱(BBR)预处理对肾脏缺血再灌注的保护作用,并探讨其可能的机制。方法 建立大鼠肾脏缺血再灌注(RIRI)损伤模型,随机分为Sham组、RIRI组、RIRI+BBR-1组和RIRI+BBR-2组。72 h后检测大鼠血浆中尿素氮(BUN)和血清肌酐(Scr)的含量和肾组织中丙二醛(MDA)、白介素-6(IL-6)和白介素-1 β (IL-1 β)的含量;使用NRK-52E细胞建立缺氧复氧(H/R)模型,MTT法检测细胞损伤情况,测定BBR对NRK-52E细胞中活性氧(ROS)的影响;使用Western Blot方法相关蛋白表达水平变化。结果 RIRI组中BUN、Scr、MDA、IL-6和IL-1 β 的含量均较Sham组明显上升(q 分别=8.06、9.16、7.89、6.48、5.68, P 均 <0.05)。相比于RIRI组,RIRI+BBR-2组的BUN、Scr、MDA、IL-6和IL-1 β 的含量都明显降低(q 分别=5.68、5.88、6.46、5.45、5.19, P 均 <0.05),同时RIRI+BBR-1组的MDA的含量也降低($q=4.54$, P 均 <0.05)。H/R明显降低NRK-52E细胞的细胞活力,明显增加细胞中ROS水平(q 分别=9.65、18.09, P 均 <0.05),BBR可逆转H/R导致的细胞活力的降低及ROS水平的升高(q 分别=2.95、11.66, P 均 <0.05)。NAC作为抗氧化剂和BBR发挥相同的作用(q 分别=4.26、15.67, P 均 <0.05)。Baf与BBR同时处理H/R细胞时,结果显示细胞活力比H/R组更低($q=3.87$, $P<0.05$)。H/R明显增加细胞中p-AMPK和LC3 II的表达,抑制p-mTOR的水平。结论 BBR可降低大鼠肾脏缺血再灌注损伤,其机制与ROS/AMPK/mTOR/LC3通路有关。

[关键词] 盐酸小檗碱; 肾缺血再灌注; 缺氧再复氧; 活性氧; 自噬

Research about therapeutic effects of hydrochloric berberine on renal ischemic/reperfusion in rats and its potential mechanism WU Lingfeng, CHEN Bin, WANG Xueping, et al. Department of Urology, First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effects of hydrochloric berberine on renal ischemic/reperfusion in rats and its potential mechanism. **Methods** The rat renal ischemia reperfusion injury model was established and randomly divided into Sham group, RIRI group, RIRI+BBR-1 group and RIRI+BBR-2 group. After 72 hours, automatic biochemical analyzer was used to measure the level of BUN and Scr in plasma, and MDA, IL-6, IL-1 β in renal tissue. NRK-52E cells were used to mimic RIRI condition by hypoxia/reperfusion (H/R). MTT assay was used to detect cell viability to further confirm the therapeutic effects of berberine on ROS in NRK-52E cells. Western blot was used to measure the protein level. **Results** The results showed that the levels of BUN, Scr, MDA were significantly increased in RIRI group compared with Sham group, and these parameters were significantly decreased after dealing with BBR ($q=8.06, 9.16, 7.89, 6.48, 5.68, 5.68, 5.88, 6.46, P<0.05$). Meanwhile, BBR reduced the level of IL-6 and IL-1 β induced by RIRI as well as the MDA ($q=5.45, 5.19, 4.54, P<0.05$). H/R significantly decreased the cell viability of NRK-52E cells and significantly increased ROS level ($q=9.65, 18.09, P<0.05$), while BBR reversed the decreasing of cell viability and the increasing of ROS level induced by H/R ($q=2.95, 11.66, P<0.05$). NAC played the same role with the BBR ($q=4.26, 15.67, P<0.05$). When Baf and BBR treated H/R cells simultaneously, the results showed that the cell viability was

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2019.05.008
作者单位: 314000 浙江嘉兴, 嘉兴市第一医院泌尿外科

通讯作者: 何屹, Email: 84748480@qq.com

lower than that of H/R group ($q=3.87, P<0.05$). H/R significantly increased the expression of p-AMPK and LC3 II, and inhibited the level of p-mTOR. **Conclusion** BBR can effectively improve renal function in

rats with RIRI, which possibly through ROS/AMPK/mTOR/ LC3 II pathway.

[Key words] hydrochloric berberine; RIRI; H/R; ROS; autophagy

缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)主要是由于器官组织缺血之后血液再灌注引起的^[1]。有研究表明,在经过肾移植和肾脏手术的患者较容易受到缺血再灌注损伤^[2]。尽管医学工作者在肾脏缺血再灌注治疗中付出了很大的努力,但是治疗效果不是特别的令人满意,而且发病率和死亡率仍然很高^[3]。

小檗碱是一种常见的季铵生物碱。有研究表明小檗碱具有良好的抗菌作用,在治疗消化系统疾病和腹泻方面有可观的治疗效果,同时在心血管方向,小檗碱可通过阻断 α 受体,发挥抗心律失常作用^[4,5]。在最近的研究表明,小檗碱还有抗炎症和抗氧化应激的作用,在抑制人体内免疫和抗凋亡过程中具有调节作用^[6,7]。

在本研究中,首先构建大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型,研究盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, BBR)在治疗肾脏缺血再灌注(renal ischemia reperfusion injury, RIRI)方面的作用,同时在NRK-52E细胞中进一步验证BBR的保护作用及机制,为临床中RIRI的治疗提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 实验动物 取200~250 g的雄性SD大鼠〔动物许可证号:SCXK(浙)2014-0001〕32只,在黑暗、温度为25℃左右,湿度大于40%的SPF级动物饲养室中正常饲养3 d,给予充足的粮食和饮水,每日定时更换一次垫料。待实验动物情绪稳定,且活动进食正常后准备实验。实验时间为2018年8月至10月。

1.2 试剂 BBR(由美国Sigma Aldrich公司生产); Baflomycin A1(Baf)(由美国Sigma Aldrich公司生产);N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)(由大连美仑生物公司生产);丙二醛(MDA)检测试剂盒(由北京索莱宝科技有限公司生产);IL-6和IL-1 β Elisa检测试剂盒(由武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司生产);p-AMPK(Thr172)、AMPK、p-mTOR、mTOR抗体(由美国cell signal technology公司生产);Actin和GAPDH抗体(由美国Abclonal公司生产);DCFH-DA试剂盒(由上海碧云天生物技术有限公司生产);其他试剂均为市售分析纯。

1.3 方法

1.3.1 肾缺血再灌注模型的建立及药物处理 将SD大鼠随机分为Sham组、RIRI组、RIRI+BBR-1组和RIRI+BBR-2组,各8只。RIRI+BBR-1组和RIRI+BBR-2组在RIRI手术前5 d分别灌胃给药BBR 50 mg/kg和200 mg/kg,每天一次;Sham组和RIRI组前5 d灌胃给药相同体积的0.9%氯化钠注射液。手术时,使用1.25%阿弗汀灌胃给药麻醉大鼠,之后大鼠背部去毛,消毒备皮,俯卧位固定于手术板上,在背部脊柱旁,肋骨下缘3 cm处切开皮肤和肌肉,可见肾脏,小心分离肾脏两边的肾动脉,迅速用无损伤微动脉夹夹闭两侧动脉。缺血30 min后,松开动脉夹,观察肾脏血流情况。将两侧肾脏归位,缝合伤口,放回鼠笼继续饲养72 h,且每天继续灌胃给药相应剂量的BBR,72 h后取材。

1.3.2 细胞缺氧复氧模型的建立 将细胞培养基使用D-Hanks缓冲液代替,在含有1% O₂,5% CO₂和94% N₂的缺氧箱中放置24 h,然后在正常培养基中继续培养12 h,气体条件为21% O₂^[8]。同时设置在正常培养箱中使用正常培养基培养的细胞为对照。

1.4 检测指标 动物取材时提取血浆,使用AU800全自动生化分析仪检测每只大鼠血浆中血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, Scr)的含量。使用MDA检测试剂盒、ELISA检测试剂盒检测肾脏组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)和白介素-1 β (IL-1 β)的含量。使用Western Blot法检测肾脏组织中蛋白表达。使用DCFH-DA染料检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平。使用MTT法检测细胞活力的变化。

1.5 统计学方法 采用Graph Pad软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间采用one-way ANOVA(方差分析),两两比较采用 q 检验。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR预处理对大鼠BUN、Scr和MDA的影响见表1

表1 BBR预处理对大鼠BUN、Scr和MDA的影响

组别	<i>n</i>	BUN/mmol/L	Scr/ μ mol/L	MDA/ μ mol/L
Sham组	8	5.23 \pm 0.38	53.07 \pm 3.77	5.71 \pm 0.71
RIRI组	8	17.98 \pm 2.19*	159.02 \pm 15.54*	13.58 \pm 1.49*
RIRI+BBR-1组	8	14.03 \pm 1.52	126.75 \pm 12.52	9.05 \pm 0.73 [#]
RIRI+BBR-2组	8	8.99 \pm 1.24 [#]	91.06 \pm 11.05 [#]	7.14 \pm 0.87 [#]

注: *:与Sham组比较, $P < 0.05$; #:与RIRI组比较, $P < 0.05$ 。

由表1可见, RIRI组中BUN和Scr及肾组织中MDA的含量均较Sham组明显上升(q 分别=8.06、9.16、7.89, P 均 <0.05)。相比于RIRI组, RIRI+BBR-2组的BUN、Scr和MDA的含量都明显降低(q 分别=5.68、5.88、6.46, P 均 <0.05), 同时RIRI+BBR-1组的MDA的含量也降低($q=4.54, P < 0.05$)。

2.2 BBR对大鼠肾组织苏木素-伊红染色的影响见图1

由封二图1可见, 相比于Sham组, RIRI组中可见近曲小管上皮细胞水肿明显, 胞浆内含空泡的细胞增多, 蛋白管型很多, 细胞凋亡明显, RIRI+BBR-1组中细胞水肿和凋亡明显, 但相比于RIRI组中细胞状态好转, RIRI+BBR-2组中上皮细胞状态良好, 水肿和凋亡明显降低。

2.3 BBR预处理对大鼠IL-6和IL-1 β 的影响见表2

表2 BBR预处理对大鼠IL-6和IL-1 β 的影响/ n mol/L/kg protein

组别	<i>n</i>	IL-6	IL-1 β
Sham组	8	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.14
RIRI组	8	4.05 \pm 0.67*	2.98 \pm 0.48*
RIRI+BBR-1组	8	2.86 \pm 0.56	1.72 \pm 0.43
RIRI+BBR-2组	8	1.49 \pm 0.28 [#]	1.17 \pm 0.21 [#]

注: *:与Sham组比较, $P < 0.05$; #:与RIRI组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见, 以Sham组标准化均数为1, RIRI组与Sham组相比, 肾脏组织有明显的炎症反应, IL-6和IL-1 β 含量明显增加(q 分别=6.48、5.68, P 均 <0.05), 而RIRI+BBR-2组可明显降低RIRI引起的免疫反应(q 分别=5.45、5.19, P 均 <0.05)。

2.4 BBR对肾脏组织中自噬相关信号的影响见图2

由图2可见, RIRI后引起了肾脏组织中LC3 II蛋白的上升, 同时伴随着自噬相关蛋白AMPK激活的增加和mTOR信号的抑制, 说明肾缺血再灌注是通过AMPK/mTOR/LC3信号通路显著增加了自噬的

发生。然而给予BBR-2(200 mg/kg)处理后, 发现p-AMPK和LC3 II蛋白表达明显降低, p-mTOR蛋白明显升高, 说明BBR改变了由肾缺血再灌注引起的自噬反应。

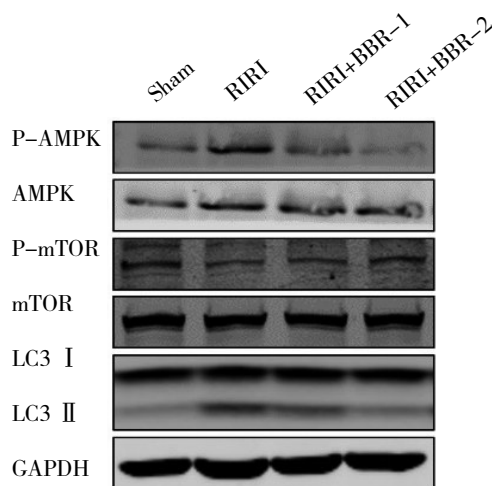


图2 肾组织中AMPK、mTOR和LC3蛋白表达水平变化

2.5 BBR对NRK-52E细胞缺氧复氧模型的保护作用 为了方便地研究肾缺血再灌注机制, 本次研究使用了NRK-52E细胞株, 并运用H/R模拟肾缺血再灌注模型。BBR对NRK-52E细胞缺氧复氧模型的保护作用见图3。

由图3A可见, H/R明显降低NRK-52E细胞的细胞活力($q=9.65, P < 0.05$), BBR可逆转H/R导致的细胞活力的降低($q=2.95, P < 0.05$)。图3B可见, H/R明显增加细胞中ROS水平($q=18.09, P < 0.05$), BBR加入后明显降低ROS水平($q=11.66, P < 0.05$), NAC作为抗氧化剂和BBR发挥相同的作用(q 分别=4.26、15.67, P 均 <0.05)。Baf与BBR同时处理H/R细胞时, 结果显示细胞活力比H/R组更低($q=3.87, P < 0.05$)。由图3C可见, H/R明显增加细胞中p-AMPK和LC3 II的表达, 抑制p-mTOR的水平, 说明H/R引起显著的自噬反应, BBR处理后自噬水平降低, 而抗氧化剂NAC也具有同样的作用。

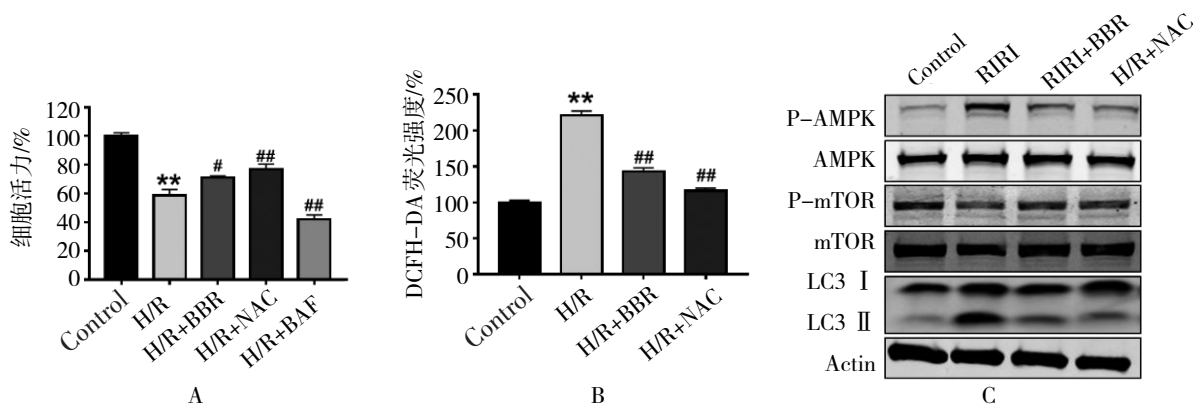


图3 BBR对NRK-52E细胞缺氧复氧模型的保护作用

注:A:NRK-52E细胞活力的变化;B:细胞中ROS的变化;C:细胞中AMPK、mTOR和LC3蛋白表达水平变化。

3 讨论

肾脏是一个高灌注的器官,并且对缺血缺氧和再灌注极其敏感。缺血再灌注损伤是由长期的缺血缺氧之后血液的再灌注引起的,这种损伤会延缓组织器官修复的时间,并对组织器官带来一定的损伤。目前,IRI病理机制还不确定,主要的理论是钙超载,中性粒细胞作用和ATP缺乏^[9]。

小檗碱,又名黄连素,为黄连的主要成分,首先运用于肠道感染^[10]。之后越来越多的报道发现,小檗碱对免疫调节^[11]、治疗糖尿病^[12]、抗高血脂^[13]、心血管疾病^[14]、癌症^[15]等疾病方面都有影响和作用,而对用于RIRI的治疗鲜有报道。

本次研究探索了BBR对肾缺血再灌注的保护作用,结果发现提前5 d腹腔给予BBR预处理,可以降低RIRI手术导致的肾脏损伤。RIRI引起了肾脏组织中显著的自噬水平的增加,给予BBR后自噬水平显著降低,但该自噬是保护性的还是损伤的无法确定,所以本次研究使用了肾小管上皮细胞继续进行了验证,发现当H/R处理的基础上继续抑制自噬,损伤增加,说明该自噬可能是RIRI导致的自身调节反馈。NAC作为抗氧化剂可以显著降低H/R引起的细胞死亡,且可显著逆转AMPK/mTOR/LC3信号,BBR可发挥相同的作用和功能,说明BBR保护肾缺血再灌注的机制可能是降低缺血再灌注后ROS的增多,ROS的增多会诱导自噬的增加,当BBR参与保护作用时,ROS水平降低,自噬水平也随之降低。同时肾缺血再灌注会引起组织严重的免疫应激反应^[16],BBR也降低了缺血再灌注引起的炎症反应。

有研究表明,肾缺血再灌注后2 h后自噬水平开始增加,48 h后达到最大值,72 h后开始下降。在

缺血再灌注时给予自噬抑制剂3-MA处理会增加肾小管细胞的凋亡^[17],因此本课题所涉及的BBR保护肾缺血再灌注并不是通过降低自噬,而可能是抑制了自噬的上游信号。文献表明ROS的增加可诱导自噬水平的升高^[18],BBR可显著降低H/R导致的ROS水平的提高,因此BBR保护肾脏缺血再灌注的机制为抑制了缺血再灌注所引起的ROS的增高,从而伴随着自噬水平的降低。

本次研究对于RIRI的机制研究并没有在动物水平做进一步探究,但本次研究较清楚地解释了BBR抗氧化抗炎症保护RIRI的机制,可能为临床上RIRI的治疗和预防提供新的思路。

参考文献

- 1 Dorweiler B, Pruefer D, Andradi TB, et al. Ischemia-reperfusion injury: pathophysiology and clinical implications [J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2007, 33(6): 600-612.
- 2 Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 2847-2859.
- 3 Nezu M, Souma T, Yu L, et al. Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression [J]. *Kidney Int*, 2017, 91(2): 387-401.
- 4 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]. *Phytotherapy Res*, 2012, 19(3-4): 206-210.
- 5 Wang LH, Yu CH, Fu Y, et al. Berberine elicits anti-arrhythmic effects via IK1/Kir2.1 in the rat type 2 diabetic myocardial infarction model [J]. *Phytother Res*, 2011, 25(1): 33-37.

- 6 Zhao GL, Yu LM, Gao WL, et al. Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(3): 354-367.
- 7 de Oliveira JS, Abdalla FH, Dornelles GL, et al. Neuroprotective effects of berberine on recognition memory impairment, oxidative stress, and damage to the purinergic system in rats submitted to intracerebroventricular injection of streptozotocin[J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2018.
- 8 Shen Y, Zhao Y, Wang L, et al. MicroRNA-194 overexpression protects against hypoxia/reperfusion-induced HK-2 cell injury through direct targeting Rheb[J]. *J Cell Biochem*, 2018.
- 9 Nogueira MA, Coelho AM, Sampietre SN, et al. Beneficial effects of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel opener on liver ischemia/reperfusion injury[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(41): 15319-15326.
- 10 Yu HH, Kim KJ, Cha JD, et al. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *J Med Food*, 2005, 8(4): 454-461.
- 11 Choi BH, Ahn IS, Kim YH, et al. Berberine reduces the expression of adipogenic enzymes and inflammatory molecules of 3T3-L1 adipocyte[J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(6): 599-605.
- 12 Zhou L, Yang Y, Wang X, et al. Berberine stimulates glucose transport through a mechanism distinct from insulin[J]. *Metabolism*, 2007, 56(3): 405-412.
- 13 Cicero AF, Rovati LC, Setnikar I. Eulipidemic effects of berberine administered alone or in combination with other natural cholesterol-lowering agents. A single-blind clinical investigation[J]. *Arzneimittelforschung*, 2007, 57(1): 26-30.
- 14 Zeng XH, Zeng XJ, Li YY. Efficacy and safety of berberine for congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy[J]. *Am J Cardiol*, 2003, 92(2): 173-176.
- 15 Inoue K, Kulsum U, Chowdhury SA, et al. Tumor-specific cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of berberines[J]. *Anticancer Res*, 2005, 25(6B): 4053-4059.
- 16 Ling H, Chen H, Wei M, et al. The Effect of autophagy on inflammation cytokines in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 347-356.
- 17 Guan X, Qian Y, Shen Y, et al. Autophagy protects renal tubular cells against ischemia / reperfusion injury in a time-dependent manner[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(1): 285-298.
- 18 Zhang X, Cheng X, Yu L, et al. MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12109.

(收稿日期:2019-01-31)

(本文编辑 蔡华波)

欢迎投稿

欢迎征订