



小檗碱对肥胖小鼠炎症因子分泌和炎症信号通路的作用

尚文斌^{1*}, 刘佳¹, 于希忠², 赵娟¹

(1. 南京中医药大学第一临床医学院 临床医学实验中心, 江苏 南京 210046;

2. 南京师范大学 生命科学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 观察小檗碱对高脂饮食诱导的肥胖小鼠血清炎症因子分泌的影响及其作用的分子机制。方法: 6 周龄雄性昆明小鼠 40 只, 随机分为正常组(NC)和高脂组(HF)。高脂组小鼠高脂饲料喂养 13 周后, 随机分为 3 组, 模型组(BM)、小檗碱低剂量组(BL)和小檗碱高剂量组(BH)并继续给予高脂饲料喂养, 其中 BL 组和 BH 组分别按 50, 150 mg · kg⁻¹ 体重每天灌服小檗碱 1 次, NC 组和 BM 组灌胃等量的生理盐水。治疗 2 周后进行口服葡萄糖耐量实验(OGTT), OGTT 结束后 3 d, 取血清, 检测肿瘤坏死因子(TNF- α)、白介素 6(IL-6)、脂联素的含量, 并称取肝脏、附睾脂肪质量, 检测肝脏、附睾脂肪中 IKK β 表达以及 IKK- β (ser¹⁸¹)的磷酸化水平。结果: BM 组小鼠血清 TNF- α , IL-6 含量高于 NC 组, 经小檗碱治疗后, 无论是 BL 组还是 BH 组 TNF- α , IL-6 含量均下降, 与 BM 组比较有显著性差异, 而各组之间脂联素未见明显差异; BH 组小鼠肝脏和附睾脂肪组织中 IKK- β 的表达水平与 NC 组和 BM 组未见明显改变, 但 IKK- β (ser¹⁸¹)的磷酸化水平则明显下降; 此外, 小檗碱能够明显改善肥胖小鼠的糖耐量, 降低体重和附睾脂肪含量。结论: 小檗碱能够通过减少肥胖小鼠炎症因子的分泌和抑制炎症信号通路, 这可能是其改善机体胰岛素抵抗和糖代谢异常的作用机制之一。

[关键词] 小檗碱; 炎症因子; IKK; 胰岛素抵抗

肥胖诱发的慢性炎症是胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发生发展的重要机制之一。肥胖以及 2 型糖尿病患者血清炎症因子的分泌和表达增加^[1]。体内升高的炎症因子可以通过激活炎症信号通路干扰胰岛素信号转导途径, 导致胰岛素抵抗和糖代谢的异常^[1-3]。中药黄连属苦寒之品, 具有清热解毒的功效, 研究表明其有抗炎、抗病毒的作用^[4-5]。近年来的研究发现黄连的主要有效成分小檗碱能够降低血糖、调节异常的脂质代谢, 改善胰岛素抵抗^[6-8], 但其作用机制有待进一步深入研究。本研究观察小檗碱对高脂喂养的肥胖小鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 6(interleukin 6, IL-6)等主要炎症因子和炎症信号通路关键激酶 IKK- β 的影响, 其结果有助于阐明其改善胰岛素抵抗和防治糖尿病及其慢性并发症的分子机制。

1 材料

1.1 动物及试剂 40 只 6 周龄健康雄性昆明小鼠, 体重 20 g 左右, 购自上海斯莱克实验动物责任公司, 许可证号 SCXK(沪)2007-0005。普通饲料: 碳水化合物 60%、蛋白质 22%、脂肪 10%、纤维素和其他成分 8%; 高脂饲料: 猪油 20%、白糖 4%、奶粉 2%、胆固醇 1%、普通饲料 73%, 2 种饲料均购自南京江宁青龙山动物繁殖场。盐酸小檗碱购自中国药品生物制品检定所。小鼠血清 TNF- α , IL-6 和脂联素 ELISA 检测试剂盒购自上海西塘生物科技有限公司。抗 β -actin 抗体、抗 IKK- β 抗体、抗 IKK- α (ser¹⁸⁰)/IKK- β (ser¹⁸¹) 抗体和羊抗兔第二抗体均购自美国 Cell signaling technology。ECL 化学发光检测试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 仪器 血糖仪(One Touch[®] Ultra Easy[™])购自强生(中国)医疗器械有限公司; 酶标仪购自 BioTek 公司; 电泳仪、半干转膜系统均购自 Amersham 公司。

2 方法

2.1 造模及给药 将 40 只小鼠分为 2 组, 分别为正常组(NC, $n = 10$)和高脂组(HF, $n = 30$)。HF 组高脂饲料喂养 13 周后随机分为 3 组, 分别为模型组

[稿件编号] 20091102010

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(08KJB360012); 南京中医药大学中医内科学重点学科开放课题(ZN091002)

[通信作者] * 尚文斌, 副教授, 研究方向为内分泌代谢疾病, Tel: (025)85811146, E-mail: wbshang@njutcm.edu.cn



(BM)、小檗碱低剂量组 (BL) 和小檗碱高剂量组 (BH), 每组 10 只, 继续给予高脂饲料喂养。并分别按 50, 150 mg · kg⁻¹ 体重给予 BL 组和 BH 组小鼠每天灌服小檗碱 1 次, NC 组和 BM 组以等量的生理盐水灌胃。治疗 2 周后进行口服葡萄糖耐量试验 (OGTT), OGTT 结束后 3 d, 断头处死小鼠, 取血, 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 留取血清, -70 °C 保存, 并称取肝脏、附睾脂肪质量, 迅速置于液氮中保存。小鼠自由摄食饮水, 每周称重 2 次。

2.2 葡萄糖耐量试验 小鼠禁食 12 h 后, 次日清晨 50% 葡萄糖按 3 g · kg⁻¹ 体重剂量灌胃, 分别在 0, 30, 60, 120 min 取血针尾静脉采血, 血糖仪测血糖值。

2.3 血清 TNF-α, IL-6, 脂联素含量检测 按照 ELISA 法试剂盒说明书操作。

2.4 肝脏、附睾脂肪中 IKKβ 表达以及 IKK-β (ser¹⁸¹) 的磷酸化水平检测 将待测组织放入预冷的玻璃匀浆器中, 加入组织裂解液和蛋白酶抑制剂的混合物充分研磨, 研磨过程在冰上操作。4 °C, 13 000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 吸取上清, 用 BCA 法检测蛋白样品浓度。加入上样缓冲液, 95 °C 变性 5 min, 用 10% SDS-PAGE 分离蛋白, 转膜后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温杂交 2 h, 洗膜后, 压片显影检测蛋白。

2.5 统计学分析 所有数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 软件进行统计分析, 组间差异比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 小檗碱降低小鼠血清 TNF-α 和 IL-6 水平 肥胖小鼠体内 TNF-α 和 IL-6 水平显著升高, BM 组比 NC 组分别升高 100% 和 55% (*P* < 0.05)。小檗碱治疗 2 周后, BL 组和 BH 组与 BM 组比较, TNF-α 和 IL-6 含量均明显下降 (*P* < 0.05)。见表 1。此外, NC, BM, BL, BH 组小鼠血清脂联素分别为 (11.01 ± 7.32), (11.02 ± 4.08), (10.33 ± 10.35), (13.43 ± 7.06) mg · L⁻¹, 各组之间未见统计学差异。

3.2 小檗碱抑制 IKK-β 的磷酸化激活 运用蛋白免疫印迹方法检测小鼠肝脏、脂肪组织中 IKK-β 表达和 IKK-β (ser¹⁸¹) 磷酸化水平, 结果显示小檗碱干预治疗后, BH 组小鼠肝脏和脂肪组织中 IKK-β 的表达水平与 BM 组比较没有明显改变, 但是 IKK-β (ser¹⁸¹) 的磷酸化水平与 BM 组比较明显下降。见图 1, 2。

表 1 各组小鼠血清 TNF-α, IL-6 含量比较
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TNF-α	IL-6
NC	12.73 ± 5.31	33.21 ± 15.23
BM	25.98 ± 8.27 ¹⁾	51.59 ± 11.37 ¹⁾
BL	9.18 ± 6.61 ²⁾	30.90 ± 10.35 ²⁾
BH	17.85 ± 5.96 ²⁾	31.09 ± 11.05 ²⁾

注: 与 NC 组相比¹⁾ *P* < 0.05; 与 BM 组相比²⁾ *P* < 0.05 (表 2 同)。

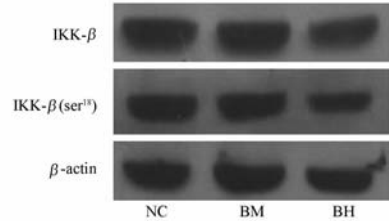


图 1 小鼠肝脏蛋白免疫印迹图

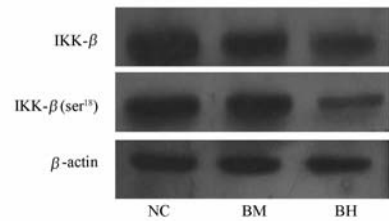


图 2 小鼠脂肪蛋白免疫印迹图

3.3 小檗碱降低肥胖小鼠的体重和附睾脂肪含量 高脂饲料喂养 15 周后, BM 组小鼠体重明显高于 NC 组 (*P* < 0.05), 小檗碱治疗 2 周后体重下降, BL 组和 BH 组与 BM 组比较体重均显著减轻 (*P* < 0.05), 附睾脂肪含量也显著减少 (*P* < 0.05), 但各组之间肝脏重量无明显差异。见表 2。

表 2 治疗后小鼠体重、肝脏及附睾脂肪重量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	体重 /g	肝脏/体重 (×100)	附睾脂肪/体重 (×100)
NC	44.47 ± 4.07	4.21 ± 0.38	1.03 ± 0.18
BM	50.55 ± 3.00 ¹⁾	4.29 ± 0.21	1.55 ± 0.27 ¹⁾
BL	47.36 ± 1.67 ²⁾	4.42 ± 0.37	1.02 ± 0.14 ²⁾
BH	44.82 ± 3.14 ²⁾	4.52 ± 0.69	1.29 ± 0.39 ²⁾

3.4 小檗碱改善肥胖小鼠的糖耐量 高脂喂养后, OGTT 中 BM 组小鼠各时间点的血糖值均高于 NC 组 (除 0 min 外, 其余时间点 *P* < 0.05), 出现糖耐量异常; 小檗碱高剂量治疗后的小鼠各时间点的



血糖值均低于 BM 组(其中 120 min 时 $P < 0.05$), 而与 NC 组相比未见显著差异。肥胖小鼠的糖耐量异常得到明显改善。见图 3。

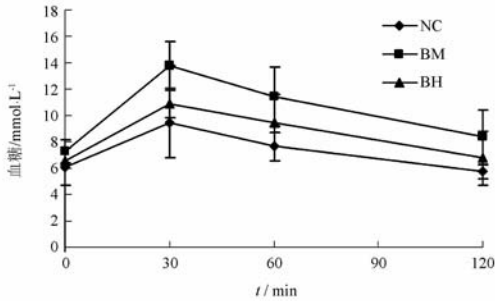


图3 口服葡萄糖耐量试验血糖水平的比较

4 讨论

在肥胖和 2 型糖尿病动物和患者中,炎症因子的分泌增加和炎症信号通路的激活所致的慢性炎症状态,参与了胰岛素抵抗和糖尿病及其慢性并发症的发生和发展^[2,9]。脂肪组织,作为重要的内分泌器官,可以分泌多种炎症因子和炎症标志物,如 TNF- α , IL-6, 单核细胞趋化因子-1 (MCP-1), 瘦素 (leptin), 脂联素 (adiponectin) 等^[10]。在多种肥胖动物模型中,脂肪组织中 TNF- α 的表达增加^[11]。TNF- α 可以引起胰岛素受体底物-1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1) 丝氨酸残基的磷酸化,使得胰岛素信号转导减弱,用可溶性的 TNF- α 抗体中和 TNF- α 可以改善肥胖大鼠的胰岛素抵抗^[12]。另有研究表明, TNF- α 或者 TNF- α 受体-1 基因缺陷的小鼠不会因为高脂饮食或者肥胖发展为胰岛素抵抗^[13]。IL-6 是另一个表达增加的重要的炎症因子,参与了胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的形成^[2]。IL-6 可以抑制过氧化物酶体增殖物活化受体- γ 的表达,降低外周组织对胰岛素的敏感性^[14]。可见,抑制炎症因子的表达和分泌,可以减轻机体的炎症状态,从而改善胰岛素抵抗和糖代谢异常。本研究中,高脂喂养的小鼠,体重及内脏脂肪明显增加,出现糖耐量的异常,并且血清 TNF- α , IL-6 水平升高。一些研究表明高脂喂养的肥胖大小鼠存在胰岛素抵抗和糖耐量异常^[8,15], 而小檗碱可以明显改善肥胖大鼠和 db/db 肥胖小鼠的胰岛素抵抗和糖代谢异常^[8]。本研究中,虽然未能直接检测小鼠的胰岛素敏感性,但是小檗碱治疗后肥胖小鼠的糖耐量异常改善、内脏脂肪含量减少,表明胰岛素敏感性得到了一定的改善,同

时血清主要炎症因子 TNF- α , IL-6 的水平降低,这表明抑制炎症因子的分泌可能是小檗碱增加胰岛素敏感性和改善糖代谢异常的作用机制之一。

脂联素是脂肪细胞特异性分泌的细胞因子,是重要的抗炎细胞因子之一。在肥胖和 2 型糖尿病中,脂联素的分泌减少^[16]。本研究没有发现小檗碱具有增加肥胖小鼠血清脂联素分泌的作用,但有研究表明小檗碱在体外具有增加 3T3-L1 脂肪细胞脂联素 mRNA 表达的作用^[17], 这种体内和体外的差异及其机制有待进一步研究。

核因子 κ B 抑制物激酶 (IKK)/核因子 κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路是体内主要的炎症信号转导通路。在肥胖和糖尿病状态下,体内升高的炎症因子,如 TNF- α , IL-6 等,可以激活 IKK- β , IKK- β 通过磷酸化降解使得 NF- κ B 与其抑制物 I κ B 在细胞浆中分离,进而转位至细胞核内,转位的 NF- κ B 一方面进一步促进炎症因子的分泌和表达,另一方面可以干扰胰岛素信号转导途径,引起胰岛素抵抗^[9]。肝脏和脂肪组织是胰岛素的主要的靶组织,两者的 NF- κ B 通路被激活,均引起机体的胰岛素抵抗^[18]。所以,通过抑制 IKK- β 的激活,从而阻断 NF- κ B 的转位,能够减少炎症因子分泌和表达, IKK/ NF- κ B 通路有可能成为胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的治疗靶点^[18]。本研究发现小檗碱在不影响 IKK- β 表达水平的情况下,抑制了 IKK- β 的激活。这表明小檗碱可以抑制 NF- κ B 炎症信号通路,减轻了机体的炎症状态。

总之,小檗碱能够减少肥胖小鼠血清炎症因子的分泌,并且能够抑制主要的炎症信号蛋白 IKK- β 磷酸化激活,表明小檗碱可以减轻肥胖小鼠的炎症状态,这可能是小檗碱改善胰岛素抵抗和糖代谢异常的重要作用机制之一。

[参考文献]

- [1] Shoelson S E, Lee J, Goldfine A B. Inflammation and insulin resistance[J]. J Clin Invest, 2006,116(7):1793.
- [2] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes[J]. Trends Immunol, 2004, 25(1):4.
- [3] Wellen K E, Hotamisligil G S. Inflammation, stress, and diabetes[J]. J Clin Invest, 2005, 115(5):1111.
- [4] Kim K S, Rhee H I, Park E K, et al. Anti-inflammatory effects of Radix Gentianae Macrophyllae (Qinjiao), Rhizoma Coptidis (Huanglian) and Citri Unshui Pericarpium (Wenzhou migan) in animal models[J]. Chin Med, 2008, 3:10.



- [5] Hayashi K, Minoda K, Nagaoka Y, et al. Antiviral activity of berberine and related compounds against human cytomegalovirus [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007,17(6):1562.
- [6] Zhou J Y, Zhou S W, Zhang K B, et al. Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008,31(6):1169.
- [7] Yin J, Gao Z, Liu D, et al. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008,294(1):E148.
- [8] 周丽斌, 杨颖, 尚文斌, 等. 小檗碱改善高脂饮食大鼠的胰岛素抵抗[J]. *放射免疫学杂志*, 2005,18(3):198.
- [9] Shoelson S E, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003,27(3):S49.
- [10] Calabro P, Yeh E T. Obesity, inflammation, and vascular disease: The role of the adipose tissue as an endocrine organ[J]. *Subcell Biochem*, 2007,42:63.
- [11] de Luca C, Olefsky J M. Inflammation and insulin resistance [J]. *FEBS Lett*, 2008,582(1):97.
- [12] Hotamisligil G S, Arner P, Caro J F, et al. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 1995,95(5):2409.
- [13] Spiegelman B M, Hotamisligil G S. Through thick and thin: Wasting, obesity, and TNF alpha[J]. *Cell*, 1993,73(4):625.
- [14] Krag M B, Rasmussen L M, Hansen T K, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR) agonism reduces the insulin-stimulated increase in circulating interleukin-6 in GH replaced GH-deficient adults[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2009,71(3):363.
- [15] Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta[J]. *Science*, 2001,293(5535):1673.
- [16] Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005,115(5):911.
- [17] 谷卫, 曾文衡, 胡海英, 等. 小檗碱对 3T3-L1 脂肪细胞脂联素表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2005,30(4):286.
- [18] Ruan H, Pownall H J. The adipocyte IKK/NFkappaB pathway: A therapeutic target for insulin resistance[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009,10(4):346.

Effects of berberine on serum levels of inflammatory factors and inflammatory signaling pathway in obese mice induced by high fat diet

SHANG Wenbin^{1*}, LIU Jia¹, YU Xizhong², ZHAO Juan¹

(1. *Clinical Medical Research Center, First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China*; 2. *College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of berberine on serum levels of TNF- α , IL-6 and adiponectin in obese mice induced by high fat diet and its potential molecular mechanisms. **Method:** Normal male Kunming mice were randomly divided into two groups taking normal chow (NC, $n = 10$) and high fat diet (HF, $n = 30$), respectively. After 13 weeks, HF mice were continuously given high fat diet and divided into three groups, model group (BM), low-dosage of berberine group (BL) and high-dosage of berberine group (BH). Mice in BL and BH were administered berberine by gavage at the dosage of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. Two weeks later, oral glucose tolerance test was performed. At the end of the experiment, the mice were killed and blood samples were collected. The epididymal fat tissue and liver were removed promptly and weighed. The serum cytokine was measured by ELISA. The levels of I κ B kinase β (IKK- β) and IKK- β (ser¹⁸¹) were detected by Western blotting. **Result:** Serum levels of TNF- α , IL-6 in mice of BM were significantly higher than those in NC ($P < 0.05$). After two-week treatment of berberine, serum levels of TNF- α , IL-6 in BL and BH were lower than those in BM ($P < 0.05$, respectively). However, there were no significant difference of adiponectin among four groups. The degrees of phosphorylation of IKK- β (ser¹⁸¹) were decreased in liver and adipose tissue in BH in comparison to that in BM, although the expression of total IKK- β did not change. Furthermore, the glucose tolerance was improved, while the body weight and epididymal fat were reduced in mice treated with berberine. **Conclusion:** Berberine is able to reduce inflammatory cytokines expression and inhibit activation of IKK- β (ser¹⁸¹) in obese mice, which may partly explain the therapeutic effect of berberine on insulin resistance and abnormal glucose metabolism.

[Key words] berberine; inflammatory cytokine; IKK; insulin resistance

doi: 10.4268/cjcmm20101125

[责任编辑 张宁宁]

• 1477 •