

小檗碱及其体内代谢产物对高糖诱导大鼠 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用

张晨阳^{1, 2}, 张琳¹, 杨卫利^{1, 2*}

1. 首都医科大学附属北京同仁医院 内分泌科, 北京 100730

2. 北京市糖尿病研究所, 北京 100730

摘要: 目的 探究小檗碱及其体内代谢产物对高糖诱导大鼠 H9c2 心肌细胞损伤的保护作用。方法 将 H9c2 心肌细胞分成对照组、模型组、正常给药组、模型给药组, 对照组用无血清 DMEM 培养, 正常给药组于无血清 DMEM 中加药, 模型组用含 50 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的无血清 DMEM 培养(造模剂量筛选实验设置 25、50、100、200 mmol·L⁻¹), 模型给药组于高糖无血清 DMEM 中加药, 加药浓度分别为小檗碱 1.25、2.50、5.00、10.00 μmol·L⁻¹, 二氢小檗碱(DHB) 0.5、1.0、2.0、4.0 μmol·L⁻¹, 小檗红碱 1.25、2.50、5.00、10.00 μmol·L⁻¹, 非洲防己碱(COL) 1.25、2.50、5.00、10.00 μmol·L⁻¹, 巴马汀 3.125、6.250、12.500、25.000 μmol·L⁻¹, 药根碱 6.25、12.50、25.00、50.00 μmol·L⁻¹, 去亚甲基小檗碱(DEM) 6.25、12.50、25.00、50.00 μmol·L⁻¹, 处理 48 h 后, 通过细胞增殖计数(CCK-8)法检测细胞存活率; 通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测经典代谢调控通路沉默调节蛋白 1(*Sirt1*)、过氧化物酶体增殖物激活受体-γ 共激活因子 1α(*PGC1α*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 α(*PPARα*) 基因水平, 葡萄糖代谢相关基因丙酮酸脱氢酶激酶 4(*PDK4*)、葡萄糖激酶(*GCK*)、己糖激酶(*HK2*)、葡萄糖转运蛋白 4(*Glut4*) 表达水平, 线粒体动力学相关基因线粒体融合蛋白 2(*Mfn2*)、视神经萎缩蛋白 1(*OPA1*)、动力学相关蛋白 1(*Drp1*) 水平及细胞凋亡相关基因天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(*Caspase-3*)、*Caspase-9*、*Bcl-2* 相关 X 蛋白(*Bax*)、B 淋巴细胞瘤-2(*Bcl-2*) 水平; 通过 Western blotting 实验检测 *PGC1α*、*Glut4*、线粒体氧化磷酸化系统(OXPHOS)蛋白表达。结果 与高糖模型组相比, 小檗碱 2.5、5.0、10.0 μmol·L⁻¹, DHB 1、2 μmol·L⁻¹, COL 5、10 μmol·L⁻¹, 巴马汀 12.5 μmol·L⁻¹, 药根碱 25、50 μmol·L⁻¹, DEM 12.5、25.0 μmol·L⁻¹ 处理 48 h 的细胞存活率均显著上升($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 小檗碱、DHB、药根碱、DEM 处理的心肌细胞中 *PDK4* 水平显著增加($P < 0.05$ 、0.001), 小檗碱、DHB、DEM 处理的心肌细胞中 *GCK* 水平显著增加($P < 0.01$ 、0.001), 小檗碱、DHB、COL、巴马汀、DEM 处理的心肌细胞中 *HK2* 水平显著增加($P < 0.05$ 、0.01), DEM 处理的心肌细胞中 *Glut4* 水平显著增加($P < 0.001$); 药根碱、DEM 处理的心肌细胞中 *OPA1* 水平显著增加($P < 0.05$ 、0.001), 小檗碱、DHB、COL、巴马汀、药根碱、DEM 处理的心肌细胞中 *Drp1* 水平显著降低($P < 0.01$ 、0.001), 小檗碱、DHB、药根碱、DEM 处理的心肌细胞中 *Mfn2* 水平显著增加($P < 0.05$ 、0.001); 小檗碱、DHB、COL 处理的心肌细胞中 *Caspase-3* 水平显著降低($P < 0.01$ 、0.001), 小檗碱、小檗红碱、COL、巴马汀处理的心肌细胞中 *Caspase-9* 水平显著降低($P < 0.01$ 、0.001), 小檗碱、DHB、小檗红碱、COL、巴马汀、药根碱、DEM 处理的心肌细胞中 *Bax* 水平显著降低($P < 0.05$ 、0.001), 小檗碱、DHB、巴马汀处理的心肌细胞中 *Bcl-2* 水平显著增加($P < 0.01$ 、0.001); 小檗碱及其代谢产物处理的心肌细胞中 *PGC1α*、*Glut4*、OXPHOS 表达均明显增加。结论 小檗碱体内代谢产物可以缓解高糖造成的 H9c2 心肌细胞损伤, 其作用机制与调控 *Sirt1*/*PGC1α*/*PPARα* 信号通路, 促进 H9c2 心肌细胞葡萄糖代谢、改善线粒体功能、抑制细胞凋亡有关。

关键词: 小檗碱; 体内代谢产物; 高糖; H9c2 细胞; 心肌细胞损伤; 糖代谢; 线粒体; 凋亡; 二氢小檗碱; 小檗红碱; 非洲防己碱; 巴马汀; 药根碱; 去亚甲基小檗碱

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)01-0068-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.008

Protective effects of berberine and its metabolites on high glucose-induced H9c2 cardiomyocytes injury

ZHANG Chenyang^{1, 2}, ZHANG Lin¹, YANG Weili^{1, 2}

1. Department of Endocrinology, Beijing Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100730, China.

2. Beijing Diabetes Institute, Beijing 100730, China

收稿日期: 2023-08-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82000825); 北京市中医药科技发展资金项目资助(JJ-2020-25)

第一作者: 张晨阳, 博士, 研究实习员, 从事中药治疗糖尿病及其并发症研究。E-mail: zhangchenyang0120@126.com

*通信作者: 杨卫利, 博士, 助理研究员, 从事糖尿病发病机制及治疗药物研究。E-mail: weiliyang0321@163.com

Abstract: Objective To investigate the protective effect of berberine metabolites on H9c2 cardiomyocytes injury induced by high glucose. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were divided into control group, model group, berberine metabolites-treated group and high glucose together with berberine metabolites-treated group. The control group was cultured in serum-free DMEM, the normal treatment group was treated with medication in serum-free DMEM, and the model group was cultured in serum-free DMEM containing 50 mmol·L⁻¹ glucose (modeling dose screening experiments were set at 25, 50, 100, and 200 mmol·L⁻¹). The model treatment group was treated in high glucose serum-free DMEM with concentrations of berberine (BBR) 1.25, 2.50, 5.00, and 10.00 μmol·L⁻¹, dihydroberberine (DHB) 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 μmol·L⁻¹, berberine (BRB) 1.25, 2.50, 5.00, and 10.00 μmol·L⁻¹, columbamine (COL) 1.25, 2.50, 5.00, and 10.00 μmol·L⁻¹, palmatine (PAL) 3.125, 6.250, 12.500, and 25.000 μmol·L⁻¹, jatrorrhizine (JAT) 6.25, 12.50, 25.00, and 50.00 μmol·L⁻¹, demethyleneberberine (DEM) 6.25, 12.50, 25.00, and 50.00 μmol·L⁻¹. After 48 hours of treatment, the cell survival rate was measured by cell proliferation count (CCK-8) method. Detection of classical metabolic regulatory pathway silencing regulatory protein 1 (*Sirt1*) and peroxisome proliferator activated receptors-γ Co-activation factor 1 α (*PGC1α*), peroxisome proliferator activated receptor α (*PPARα*) Gene level, expression levels of glucose metabolism related genes pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*PDK4*), glucokinase (*GCK*), hexokinase (*HK2*), glucose transporter 4 (*Glut4*), and mitochondrial dynamics related genes mitochondrial fusion protein 2 (*Mfn2*), optic atrophy protein 1 (*OPA1*), dynamics related protein 1 (*Drp1*) and apoptosis related genes *Caspase-3*, *Caspase-9*, Bcl-2 related X protein (*Bax*), and B lymphomatoma-2 (*Bcl-2*) by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Detection of *PGC1α*, *Glut4*, mitochondrial oxidative phosphorylation system (OXPHOS) protein expression through Western blotting experiment. **Results** Compared with the high glucose model group, the cell survival rate significantly increased in BBR 2.5, 5.0, 10.0 μmol·L⁻¹, DHB 1, 2 μmol·L⁻¹, COL 5, 10 μmol·L⁻¹, PAL 12.5 μmol·L⁻¹, JAT 25, 50 μmol·L⁻¹, and DEM 12.5, 25.0 μmol·L⁻¹ group after 48 hours of treatment ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). The levels of *PDK4* were significantly increased in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, JAT, and DEM ($P < 0.05$, 0.001), *GCK* levels were significantly increased in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, and DEM ($P < 0.01$, 0.001), *HK2* levels were significantly increased in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, COL, PAL, and DEM ($P < 0.05$, 0.01), and *Glut4* levels were significantly increased in cardiomyocytes treated with DEM ($P < 0.001$). The levels of *OPA1* were significantly increased in cardiomyocytes treated with JAT and DEM ($P < 0.05$, 0.001), while the levels of *Drp1* were significantly reduced in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, COL, PAL, JAT, and DEM ($P < 0.01$, 0.001). The levels of *Mfn2* were significantly increased in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, JAT, and DEM ($P < 0.05$, 0.001). The levels of *Caspase-3* in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, and COL were significantly reduced ($P < 0.01$, 0.001), while the levels of *Caspase-9* in cardiomyocytes treated with BBR, BRB, COL, and PAL were significantly reduced ($P < 0.01$, 0.001). The levels of *Bax* in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, BRB, COL, PAL, JAT, and DEM were significantly reduced ($P < 0.05$, 0.001), while the levels of *Bcl-2* in cardiomyocytes treated with BBR, DHB, and PAL were significantly increased ($P < 0.01$, 0.001). The expression of *PGC1α*, *Glut4* and OXPHOS in cardiomyocytes treated with BBR and its metabolites was significantly increased. **Conclusion** BBR metabolites can ameliorate high glucose induced H9c2 cardiomyocyte injury, and its mechanism may be through regulating *Sirt1/PGC1 α/PPAR α* signaling pathway, promoting glucose metabolism of H9c2 cardiomyocytes, improving mitochondrial function, and inhibiting apoptosis.

Key words: berberine; metabolites; high glucose; H9c2 cardiomyocytes; myocardial cell injury; glucose metabolism; mitochondria; apoptosis; dihydroberberine; berberrubine; columbamine; palmatine; jatrorrhizine; demethyleneberberine

目前世界范围内的糖尿病患病率仍在逐年上升,尽管多种有效的降糖策略已经取得显著的疗效,但糖尿病并发症带来的危害仍然是世界医学关注的热点^[1-2]。糖尿病患者伴有葡萄糖利用下降,脂肪酸利用增加,导致毒性脂肪酸中间产物积聚,进一步抑制心肌利用葡萄糖,造成线粒体功能障碍,细胞凋亡,进而诱发心脏结构和功能异常,最终导致心力衰竭^[3-4]。这种独立于冠心病、高血压或心脏瓣膜病,由糖尿病引起的心脏疾病称为糖尿病心肌病^[5](DCM),DCM是糖尿病致死的重要原因。目前临床使用的血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂、β

受体阻滞剂和二肽基肽酶4(DPP-4)抑制剂,以及SGLT2抑制剂和GLP1激动剂等降低患者血糖的药物均具有一定治疗作用^[6-7]。然而,单纯的降糖治疗并未完全逆转DCM的病死率^[8],因此,探索 and 开发治疗DCM的创新药物,具有十分重要的临床意义。

小檗碱是中药黄连的主要活性成分,具有良好的抗糖尿病作用和心血管保护作用^[9-10]。但由于小檗碱生物利用度极低,其发挥体内药效的具体机制仍不明确,限制了其进一步用于临床^[11]。大鼠ig 200 mg·kg⁻¹小檗碱后,约有2.71 ng小檗红碱、4.72 ng非洲防己碱(COL)、6.75 ng巴马汀、7.13 ng

药根碱、0.28 ng 去亚甲基小檗碱(DEM)在胆汁中被检测到,二氢小檗碱(DHB)则在粪便中被检测到^[12]。小檗碱及其体内代谢产物化学结构见图1,巴马汀是小檗碱I相代谢甲基化产物,具有抗炎、抗氧化等功效,可被用于高血压、心脏肥大、糖尿病及其并发症等疾病治疗^[13]。小檗红碱是小檗碱I相代谢去甲基产物,其对糖尿病、非酒精性脂肪肝、高血脂等均具有一定治疗作用^[14]。药根碱是小檗碱I相代谢还原产物,对糖尿病、肥胖、高血脂等具有良好治疗作用^[15]。DHB、COL 是小檗碱的I相代谢还原产物,DEM 是小檗碱I相代谢去亚甲基产物,均具有一定调节糖脂代谢、抗菌、抗氧化功效^[16]。小檗碱的体内代谢产物生物利用度显著增加^[17-18],但其是否能发挥抗 DCM 作用及作用机制尚不明确。本研究以 H9c2 心肌细胞为实验对象,探讨小檗碱及其体内代谢产物对高糖诱导 H9c2 心肌细胞糖代谢、线粒体功能和细胞凋亡的影响。

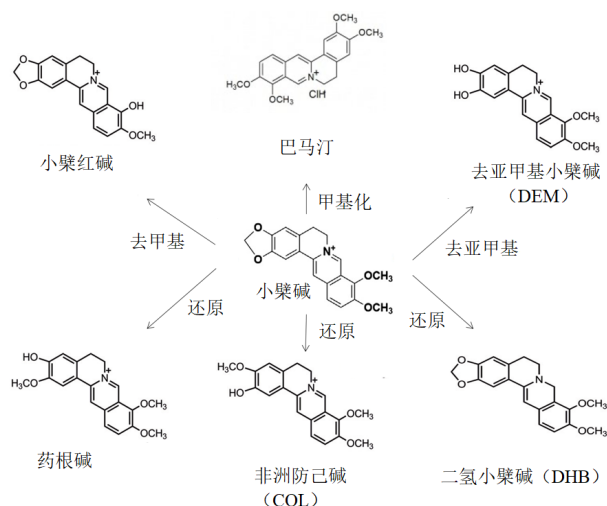


图1 小檗碱及其体内代谢产物化学结构

Fig. 1 Chemical structure of berberine and its metabolites

1 材料

1.1 细胞

H9c2 心肌细胞,购自中国科学院细胞库(上海)。

1.2 药品

小檗碱,质量分>98%,批号 MUST-22010607,购自成都曼斯特生物科技有限公司。COL,质量分数>98%,批号 220609;DHB,质量分数>98%,批号 220602,均由上海融禾科技发展有限公司生产。药根碱,质量分数≥98%,批号 MUST-21121107;DEM,质量分数≥98%,批号:MUST-22080511;巴马汀,质量分数≥98%,批号:MUST-22021604;小檗

红碱,质量分数≥98%,批号:MUST-21120701,均由成都曼斯特生物科技有限公司生产。

1.3 主要试剂

细胞计数(CCK-8)试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒,均购自北京 TransGen 公司;胎牛血清、细胞培养基(DMEM)、胰蛋白酶、Trizol 均购自美国 ThermoFisher 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自武汉 Servicebio 公司;蛋白一抗均购自英国 Abcam 公司,二抗购自碧云天生物技术有限公司。

1.4 主要仪器

Infinite M Plex 多功能酶标仪,购自德国 TECAN 公司;NanoDrop 2000 微量分光光度计,购自美国 Thermo Fisher 公司;LightCycler® 96 实时荧光定量 PCR 体系,购自瑞士 Roche 公司;Mini-Protein Tetra System 蛋白质电泳仪,购自美国 BIO-RAD 公司;Image Quant 500 凝胶成像系统,购自美国 Cytiva 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

当细胞生长融合至 80%~90%,弃去培养液,用 PBS 洗 3 次,除去血清的影响,加入胰酶消化。待细胞变圆开始脱落时,加入含血清的 DMEM 培养液终止消化,吹打成单个细胞悬液,转移至离心管中,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。弃上清,加入完全培养基将细胞重悬,按 1:2 分配,移入到新的细胞培养瓶中,置于 37 °C 细胞培养箱中培养。

2.2 CCK-8 法检测细胞存活率

将 H9c2 心肌细胞接种于 96 孔板(1×10⁴·mL⁻¹,每孔 100 μL),细胞生长状况良好且融合程度达 80% 左右即可实验。对照组用无血清 DMEM 培养;正常给药组于无血清 DMEM 中加入小檗碱 1.25、2.50、5.00、10.00 μmol·L⁻¹,DHB 0.5、1.0、2.0、4.0 μmol·L⁻¹,小檗红碱 1.25、2.50、5.00、10.00 μmol·L⁻¹,COL 1.25、2.50、5.00、10.00 μmol·L⁻¹,巴马汀 3.125、6.250、12.500、25.000 μmol·L⁻¹,药根碱 6.25、12.50、25.00、50.00 μmol·L⁻¹,DEM 6.25、12.50、25.00、50.00 μmol·L⁻¹;模型组用含 50 mmol·L⁻¹ 葡萄糖的无血清 DMEM 培养(造模剂量筛选实验设置 25、50、100、200 mmol·L⁻¹);模型给药组于高糖模型中加入小檗碱 2.5、5.0、10.0 μmol·L⁻¹,DHB 0.5、1.0、2.0 μmol·L⁻¹,小檗红碱 1.25、2.50、5.00 μmol·L⁻¹,COL 2.5、5.0、10.0 μmol·L⁻¹,巴马汀 3.125、6.250、12.500 μmol·L⁻¹,药根碱 12.5、25.0、50.0 μmol·L⁻¹,DEM 12.5、25.0、50.0 μmol·L⁻¹。

各组同时设置6个复孔,药物作用48 h后,每孔中加入CCK-8溶液10 μL ,在培养箱中培养1 h,等待至明显显色,用多功能酶标仪在450 nm波长处测定各组吸光度(A)值。以对照组细胞的活力为100%,计算其余各组与其比值,求得细胞存活率。

2.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验

将心肌细胞接种于6孔板中,细胞生长状况良好且融合程度达80%左右即可实验。对照组用无血清DMEM培养;正常给药组于无血清DMEM中加入小檗碱10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、小檗红碱10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DHB

2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、COL 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、巴马汀12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、药根碱50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、DEM 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,模型组用含50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖的无血清DMEM培养;模型给药组于高糖模型中加入上述药物。药物作用48 h后,采取Trizol裂解法提取总RNA,最终根据白色沉淀多少加入Rnase-free water溶解RNA沉淀,Nanodrop 2000c测定浓度后进行反转录,选择TransStart Tip Green qPCR SuperMix进行实时荧光定量PCR反应。以18S为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因相对表达量。引物序列见表1。

表1 qRT-PCR所用引物序列
Table 1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
18S	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
葡萄糖激酶(<i>GCK</i>)	TGAGCCGATGCAGAAGGA	GCAACATCTTTACTGTCCT
天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(<i>Caspase-3</i>)	TGGTGATGAAGGGGTCATTTATG	TTCGGCTTTCCAGTCAGACTC
<i>Caspase-9</i>	GACGCTCTGCTGAGTCGAG	GGTCTAGGGGTTTAACAGCCTC
Bcl-2相关X蛋白(<i>Bax</i>)	TGAAGACAGGGGCCTTTTGT	AATTCGCCGAGACACTCG
B淋巴细胞瘤-2(<i>Bcl-2</i>)	GTCGCTACCGTCGTGACTTC	CAGACATGCACCTACCCAGC
视神经萎缩蛋白1(<i>OPA1</i>)	CGACTTTGCCGAGGATAGCTT	CGTTGTGAACACACTGCTCTTG
动力学相关蛋白1(<i>Drp1</i>)	CAGGAATTGTTACGGTTCCTAA	CCTGAATTAACCTGTCCCGTGA
沉默调节蛋白1(<i>Sirt1</i>)	GCTGACGACTTCGACGACG	TCGGTCAACAGGAGGTTGTCT
线粒体融合蛋白2(<i>Mfn2</i>)	ACCCCGTTACCACAGAAGAAC	AAAGCCACTTTCATGTGCCTC
过氧化物酶体增殖物激活受体 α (<i>PPARα</i>)	AGAGCCCCATCTGTCTCTC	ACTGGTAGTCTGCAAAACCAA
过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α (<i>PGC1α</i>)	AAGTGGTGTAGCGACCAATCG	AATGAGGGCAATCCGTCTCA
丙酮酸脱氢酶激酶4(<i>PKD4</i>)	AGGGAGGTCGAGCTGTTCTC	GGAGTGTTCACTAAGCGGTCA
葡萄糖转运蛋白4(<i>Glut4</i>)	CTCATGGGCCTAGCCAATGC	CCCTGATGTTAGCCCTGAGTA
己糖激酶(<i>HK2</i>)	CTAAGGGGTTCAAGTCCAGTGG	AGACCAATCTCGCAGTTCTGA

2.4 Western blotting 实验

细胞接种、造模、加药操作同“2.3”项,处理48 h后,每孔加入100 μL 裂解液,超声裂解后离心,取上清加入25 μL Loading Buffer混匀并煮沸使蛋白变性,凉至室温后进行SDS-PAGE电泳,样品根据相对分子质量大小分离后恒流400 mA转膜40 min,取出PVDF膜,按所需目的蛋白分子量裁剪后室温封闭2~4 h。根据Marker指示裁剪出目标蛋白,做好标记,放入一抗工作液中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第2天使用TBST洗3次,每次10 min,放入一抗对应种属的二抗工作液中室温摇床孵育1~2 h。二抗孵育完成后,使用TBST洗3次,每次10 min。将1:1配制的化学发光检测底物工作液滴加在膜上,用凝胶成像系统扫描、拍片。

2.5 统计学处理

使用软件GraphPad Prism 9.4进行统计分析,实验数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),用Tukey进行多组间比较,采用 t 检验进行两组间比较。

3 结果

3.1 小檗碱及其体内代谢产物对细胞存活率的影响

与对照组相比,DHB 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$)、小檗红碱10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.001$)、巴马汀25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$)、DEM 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.05$)孵育48 h后细胞存活率显著降低,表明高于该浓度后小檗碱体内代谢产物孵育48 h具有细胞毒性,见图2。小檗碱($\leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、COL($\leq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和药根碱($\leq 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)孵育48 h后细胞存活率

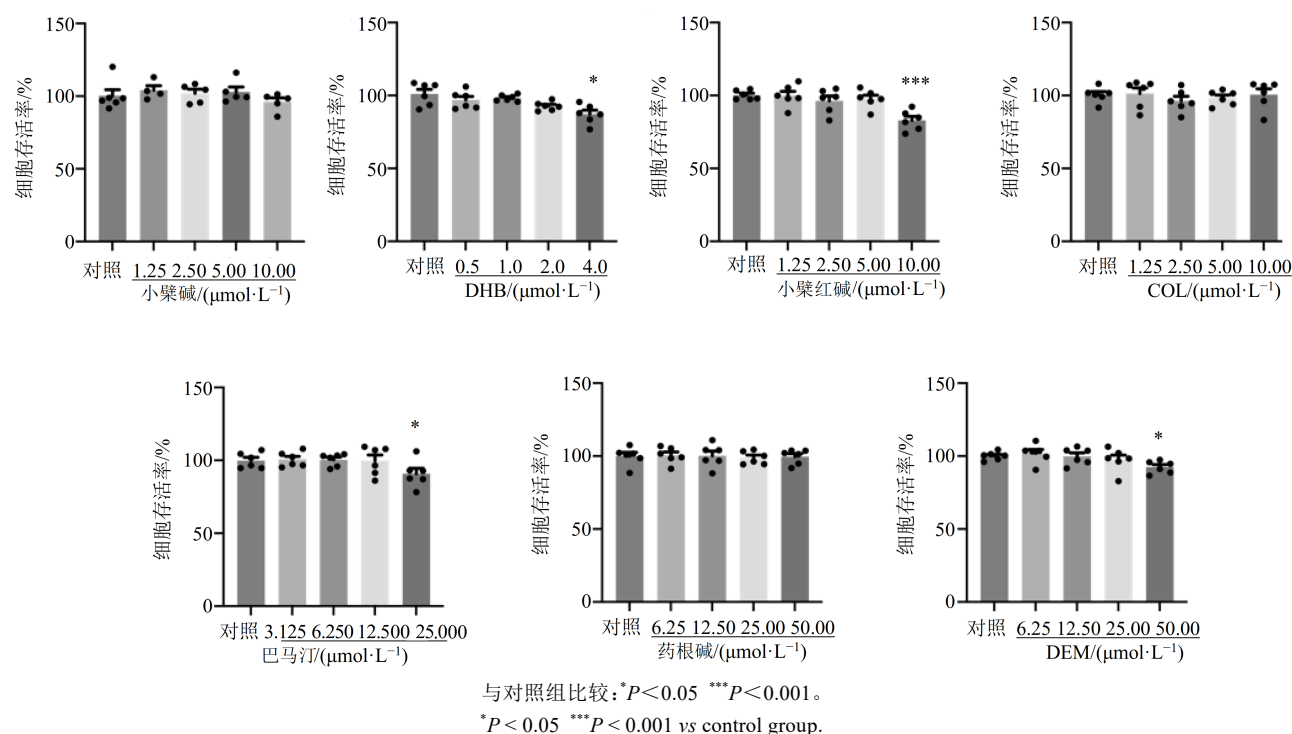


图2 小檗碱及其体内代谢产物处理48 h细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 2 BBR and its metabolites-treated 48 h cell survival ($\bar{x} \pm s, n=6$)

与对照组无差异。

3.2 小檗碱及其体内代谢产物对高糖诱导细胞损伤的影响

与对照组相比,50 mmol·L⁻¹葡萄糖处理48 h细胞存活率降低至80%左右,差异有统计学意义($P < 0.001$),因此以该浓度作为高糖造模条件;与高糖模型组相比,小檗碱2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),DHB 1、2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.001$),COL 5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$),巴马汀12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$),药根碱25、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05, 0.001$),DEM 12.5、25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05, 0.01$)处理48 h的细胞存活率均显著上升,说明小檗碱及其体内代谢产物对高糖引起的H9c2心肌细胞损伤有一定的保护作用。见图3。

3.3 小檗碱体内代谢产物对葡萄糖代谢的影响

正常条件孵育48 h后,与对照组比较,COL、巴马汀、药根碱能显著增加心肌细胞中PDK4水平($P < 0.05, 0.001, 0.001$),药根碱能显著增加心肌细胞中GCK水平($P < 0.001$),DHB、小檗红碱、DEM显著降低心肌细胞中HK2水平($P < 0.05$),小檗碱、巴马汀、药根碱显著增加心肌细胞中Glut4水平($P < 0.05, 0.01$)。

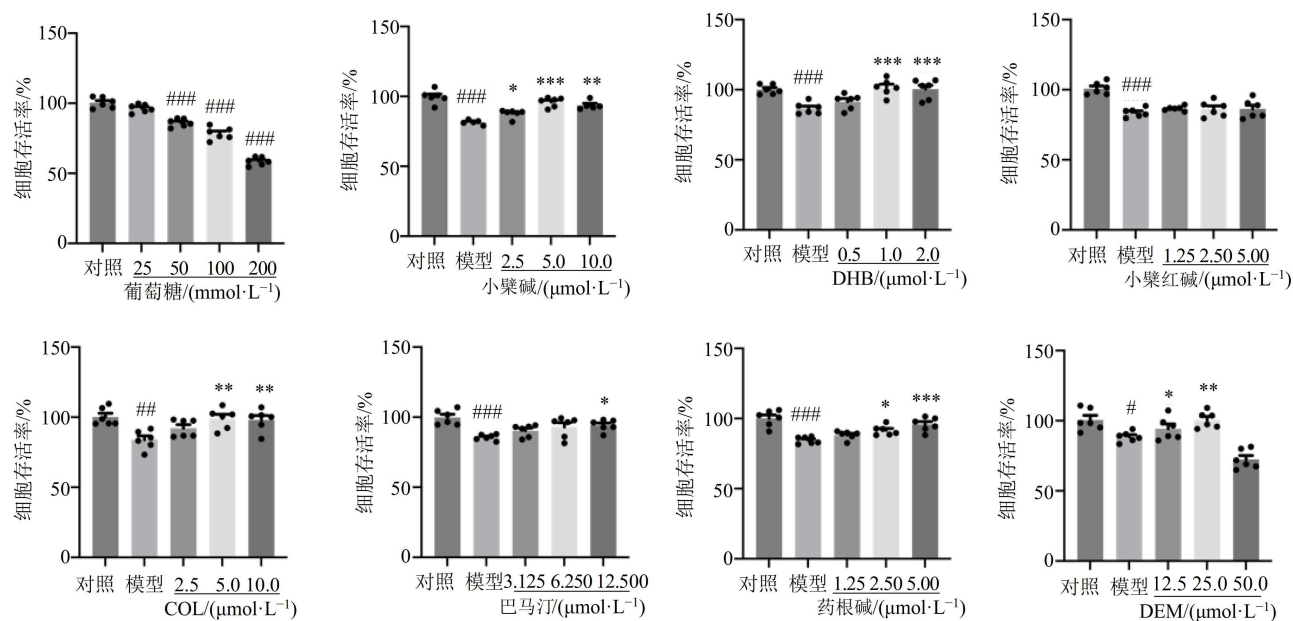
高糖模型组中PDK4、GCK、HK2、Glut4水平均较对照组明显降低($P < 0.001$),说明高糖条件会损伤心肌细胞的葡萄糖代谢功能;与高糖模型组相

比,小檗碱、DHB、药根碱、DEM处理的心肌细胞中PDK4水平显著增加($P < 0.05, 0.001$),小檗碱、DHB、DEM处理的心肌细胞中GCK水平显著增加($P < 0.01, 0.001$),小檗碱、DHB、COL、巴马汀、DEM处理的心肌细胞中HK2水平显著增加($P < 0.05, 0.01$),DEM处理的心肌细胞中Glut4水平显著增加($P < 0.001$)。结果表明小檗碱及其体内代谢产物可以改善高糖导致的心肌细胞糖代谢功能障碍。见图4。

3.4 小檗碱体内代谢产物对线粒体动力学的影响

正常条件孵育48 h后,与对照组比较,药根碱、DEM能显著增加心肌细胞中OPA1水平($P < 0.001$),DEM能显著降低心肌细胞中Drp1水平($P < 0.05$),DHB、小檗红碱、药根碱能显著增加心肌细胞中Mfn2水平($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

高糖模型组中Mfn2、OPA1水平均较对照组明显降低($P < 0.001$),Drp1水平显著增加($P < 0.05$),说明高糖条件会损伤心肌细胞的线粒体动力学,影响线粒体功能。与高糖模型组相比,药根碱、DEM处理的心肌细胞中OPA1水平显著增加($P < 0.05, 0.001$),小檗碱、DHB、COL、巴马汀、药根碱、DEM处理的心肌细胞中Drp1水平显著降低($P < 0.01, 0.001$),小檗碱、DHB、药根碱、DEM处理的心肌细胞中Mfn2水平显著增加($P < 0.05, 0.001$)。结

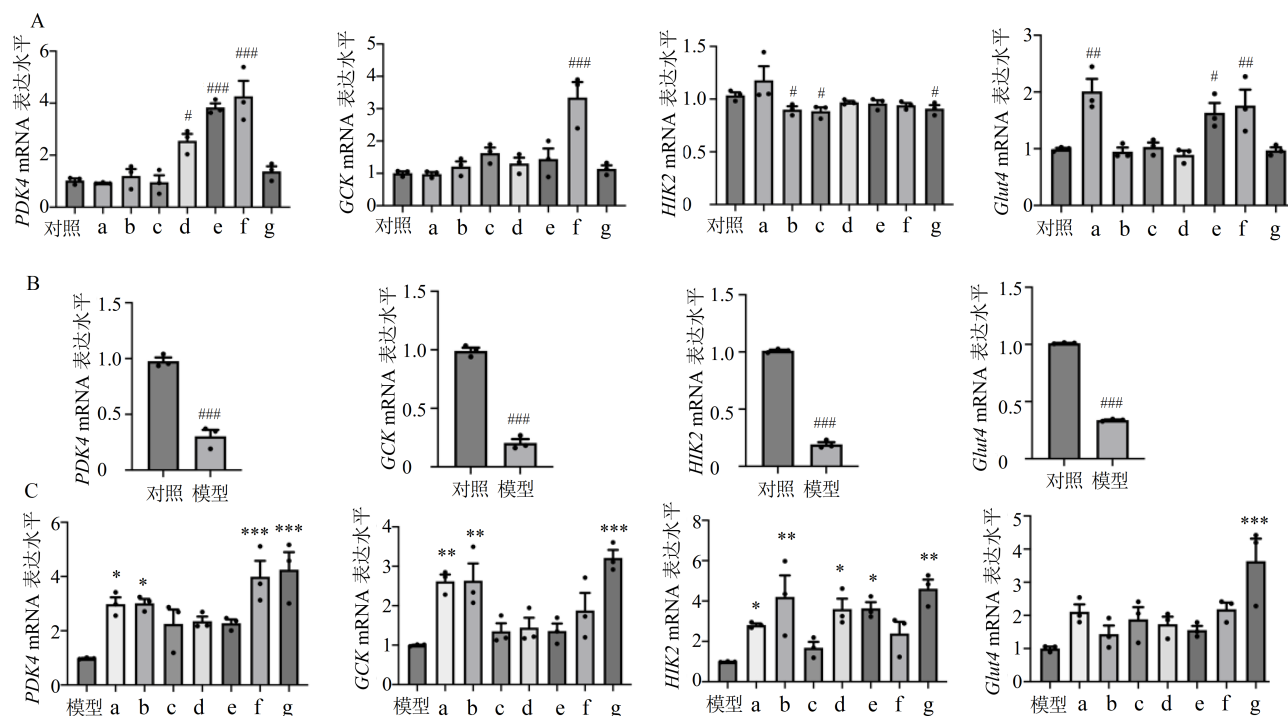


与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

图3 小檗碱及其体内代谢产物处理48 h细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 BBR and its metabolites-treated 48 h cell survival ($\bar{x} \pm s, n=6$)



a-小檗碱; b-DHB; c-小檗红碱; d-COL; e-巴马汀; f-药根碱; g-DEM; 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

a-BBR; b-DHB; c-BRB; d-COL; e-PAL; f-JAT; g-DEM; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图4 正常条件下小檗碱及其体内代谢产物培养48 h(A)、正常和高糖条件处理48 h(B)、高糖条件下小檗碱及其体内代谢产物处理48 h(C)对PDK4、GSK、HK2、Glut4 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 PDK4, GSK, HK2, and Glut4 mRNA expression after cells cultured with berberine and its metabolites for 48 h under normal conditions (A), after cells treated with normal or high-glucose conditions for 48 h (B), and after cells treated with high glucose and berberine metabolites for 48 h (C) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

果表明小檗碱及其体内代谢产物可以改善高糖导致的心肌细胞线粒体动力学异常。结果见图5。

3.5 小檗碱体内代谢产物对细胞凋亡相关基因的影响

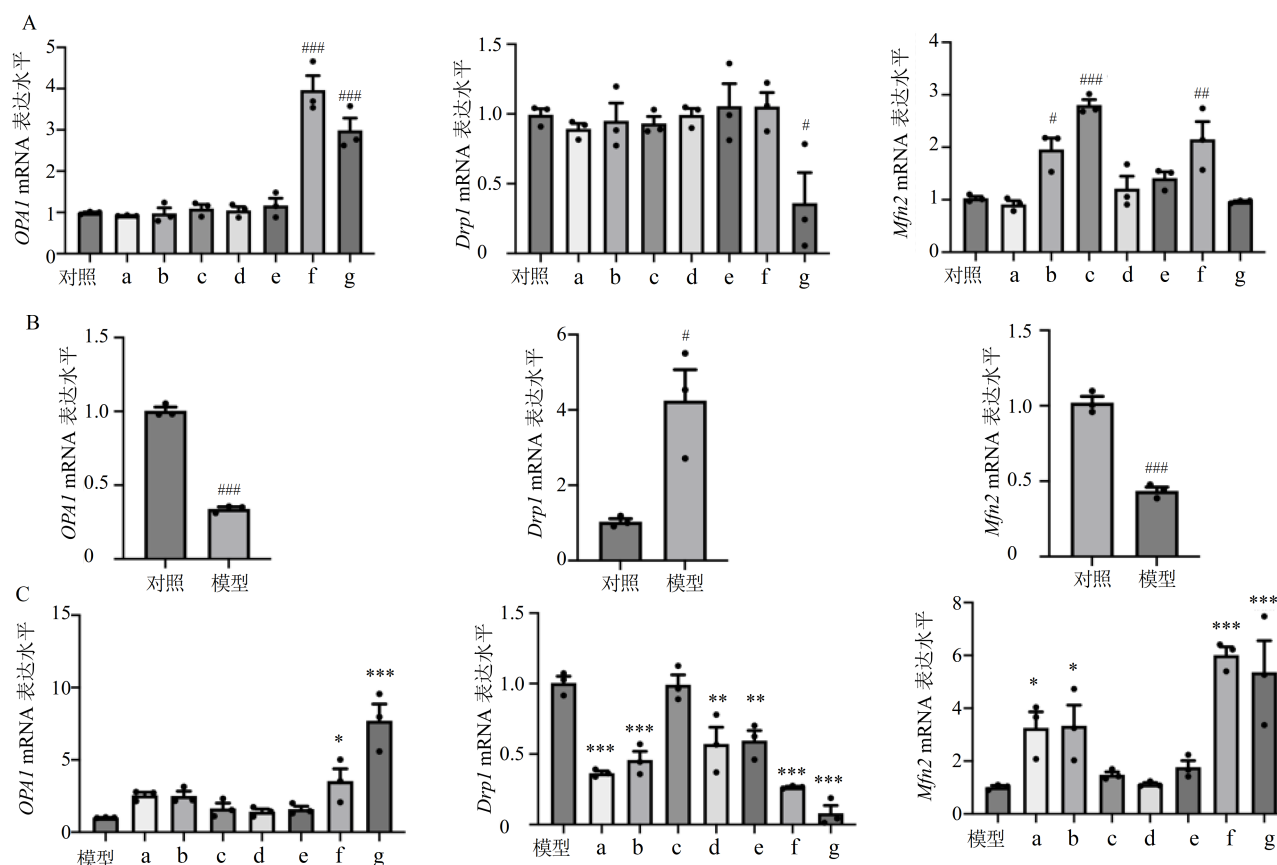
正常条件孵育48 h后,与对照组比较,小檗碱和DHB能显著降低心肌细胞中 *Caspase-3* 水平($P < 0.01$),小檗碱、DHB、小檗红碱、COL、巴马汀、DEM能显著降低心肌细胞中 *Caspase-9* 水平($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),小檗碱、DHB、小檗红碱、COL、巴马汀、DEM能显著降低心肌细胞中 *Bax* 水平($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),药根碱显著增加心肌细胞中 *Bcl-2* 水平($P < 0.01$)。

高糖模型组中 *Caspase-3*、*Caspase-9*、*Bax* 水平均较对照组显著升高($P < 0.01$ 、 0.001),*Bcl-2* 水平显

著降低($P < 0.001$),说明高糖条件会诱导心肌细胞凋亡。与高糖模型组相比,小檗碱、DHB、COL处理的心肌细胞中 *Caspase-3* 水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.001),小檗碱、小檗红碱、COL、巴马汀处理的心肌细胞中 *Caspase-9* 水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.001),小檗碱、DHB、小檗红碱、COL、巴马汀、药根碱、DEM处理的心肌细胞中 *Bax* 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.001),小檗碱、DHB、巴马汀处理的心肌细胞中 *Bcl-2* 水平显著增加($P < 0.01$ 、 0.001)。结果表明小檗碱及其体内代谢产物可以缓解高糖导致的心肌细胞凋亡。结果见图6。

3.6 小檗碱体内代谢产物对 *Sirt1*、*PGC1 α* 、*PPAR α* 的影响

正常条件孵育48 h后,与对照组比较,药根碱显著增加心肌细胞中 *Sirt1* 和 *PPAR α* 水平($P < 0.01$ 、



a-小檗碱;b-DHB;c-小檗红碱;d-COL;e-巴马汀;f-药根碱;g-DEM;与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

a-BBR;b-DHB;c-BRB;d-COL;e-PAL;f-JAT;g-DEM; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图5 正常条件下小檗碱及其体内代谢产物培养48 h(A)、正常和高糖条件处理48 h(B)、高糖条件下小檗碱及其体内代谢产物处理48 h(C)对 *OPA1*、*Drp1*、*Mfn2* 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 *OPA1*, *Drp1*, and *Mfn2* expression after cells cultured with berberine and its metabolites for 48 h under normal conditions (A), after cells treated with normal or high-glucose conditions for 48 h (B), and after cells treated with high glucose and berberine metabolites for 48 h (C) ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

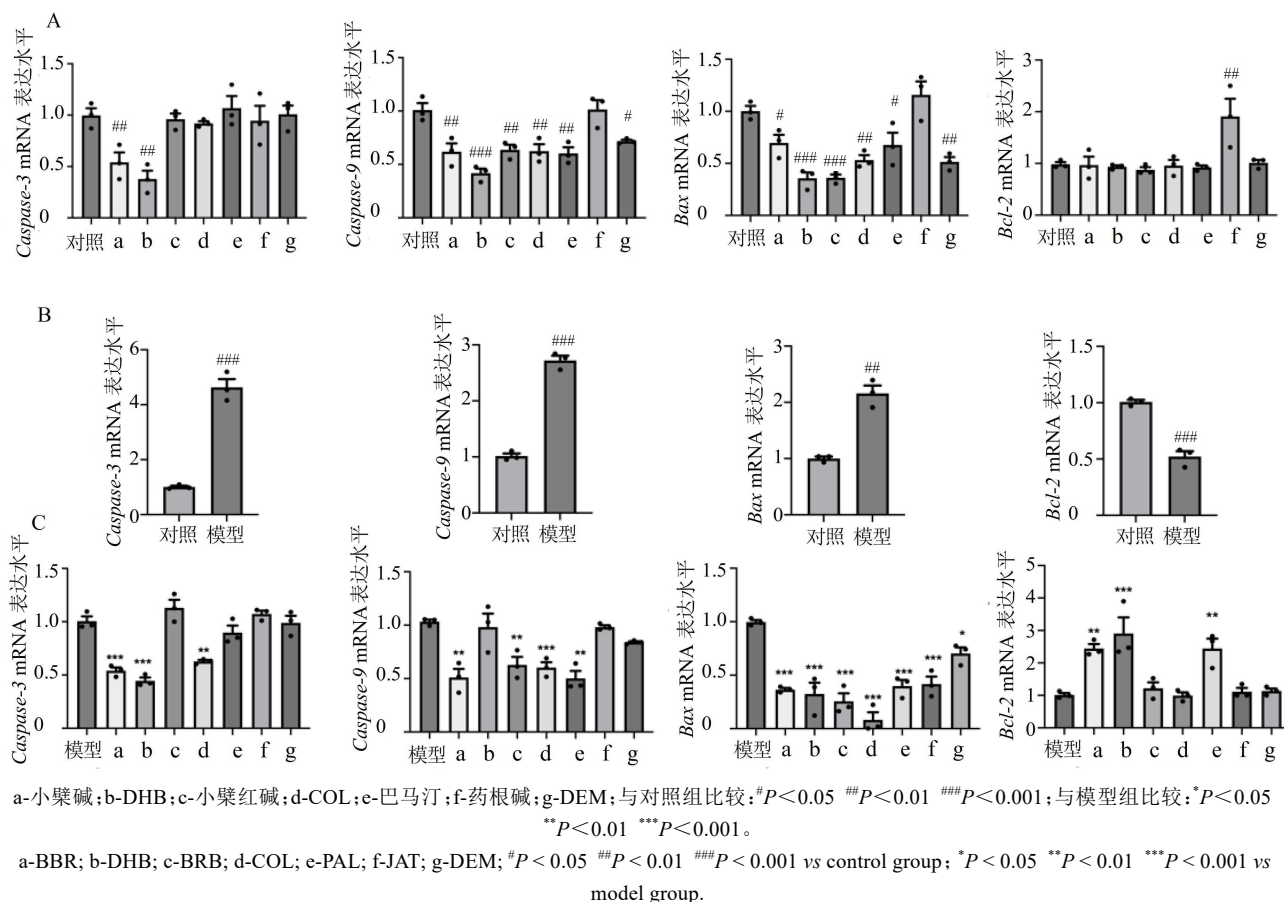


图6 正常条件下小檗碱及其体内代谢产物培养48 h(A)、正常和高糖条件处理48 h(B)、高糖条件下小檗碱及其体内代谢产物处理48 h(C) caspase-3、caspase-9、Bax、Bcl-2表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 caspase-3, caspase-9, Bax, Bcl-2 expression after cells cultured with berberine and its metabolites for 48 h under normal conditions (A), after cells treated with normal or high-glucose conditions for 48 h (B), and after cells treated with high glucose and berberine metabolites for 48 h (C) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

0.001), COL、巴马汀显著增加 $PGC1\alpha$ 水平 ($P < 0.05, 0.01$)。高糖模型组中 $Sirt1$ 、 $PGC1\alpha$ 、 $PPAR\alpha$ 水平均较对照组明显降低 ($P < 0.05, 0.001$)。与高糖模型组相比,药根碱、DEM处理的心肌细胞中 $Sirt1$ 水平显著增加 ($P < 0.001$),小檗碱、DHB、COL处理的心肌细胞中 $PGC1\alpha$ 水平显著增加 ($P < 0.01$),小檗碱、DHB处理的心肌细胞中 $PPAR\alpha$ 水平显著增加 ($P < 0.05, 0.001$)。结果表明小檗碱体内代谢产物可能通过调节 $Sirt1$ 、 $PGC1\alpha$ 、 $PPAR\alpha$ 缓解高糖导致的心肌细胞损伤。结果见图7。

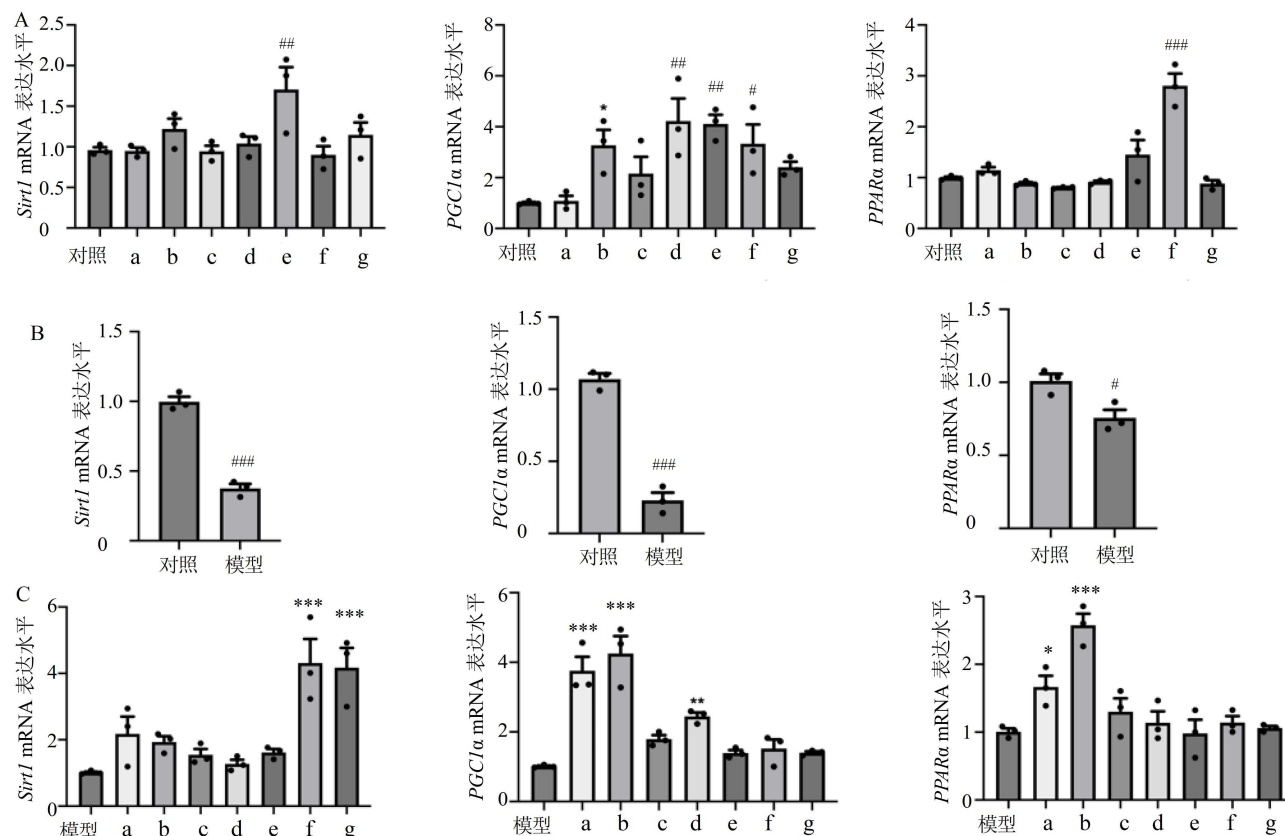
3.7 小檗碱体内代谢产物对 $PGC1\alpha$ 、Glut4、线粒体氧化磷酸化系统(OXPHOS)蛋白表达的影响

小檗碱及其体内代谢产物正常条件孵育48 h后不影响 $PGC1\alpha$ 和 Glut4 水平。线粒体氧化磷酸化为细胞代谢的中心,电子传递链中的5种酶复合物(包括 CI-NDUFB8、CII-SDHB、CIII-UQCRC2、CIV-MTCO1、CV-ATP5A,简称 OXPHOS)在其中具有关键作用,正常条件下小檗碱及其体内代谢产物

不影响 OXPHOS 表达。高糖模型组中 $PGC1\alpha$ 、Glut4、OXPHOS 水平均较对照组明显降低。与高糖模型组相比,小檗碱及其代谢产物处理的心肌细胞中 $PGC1\alpha$ 、Glut4、OXPHOS 表达均明显增加。结果见图8。

4 讨论

T2DM 伴随着长期高血糖,引起心肌细胞对葡萄糖的利用减少,心肌细胞代谢底物改变,使得大量脂毒性中间产物蓄积,从而诱发线粒体功能障碍,最终导致心肌细胞凋亡和心脏收缩功能下降^[19-20]。小檗碱能通过促进糖脂代谢、改善线粒体功能、减少心肌细胞凋亡显著缓解 DCM,但由于其生物利用度极低,在体内发挥作用的药效物质基础不明确而被限制了进一步应用于临床^[21-23]。小檗碱体内代谢产物如巴马汀能减轻心肌损伤^[24],药根碱能减轻缺血造成的心肌细胞凋亡和纤维化^[25],但其对于 DCM 是否有作用及作用机制尚不明确。本研究结果表明,小檗碱体内代谢产物能调控 $Sirt1$ /



a-小檗碱;b-DHB;c-小檗红碱;d-COL;e-巴马汀;f-药根碱;g-DEM;与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$;与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
a-BBR; b-DHB; c-BRB; d-COL; e-PAL; f-JAT; g-DEM; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图7 正常条件下小檗碱及其体内代谢产物培养 48 h(A)、正常和高糖条件处理 48 h(B)、高糖条件下小檗碱及其体内代谢产物处理 48 h(C)对 Sirt1、PGC-1 α 、PPAR α 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Sirt1, PGC-1 α , PAR α expression after cells cultured with berberine and its metabolites for 48 h under normal conditions (A), after cells treated with normal or high-glucose conditions for 48 h (B), and after cells treated with high glucose and berberine metabolites for 48 h (C) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

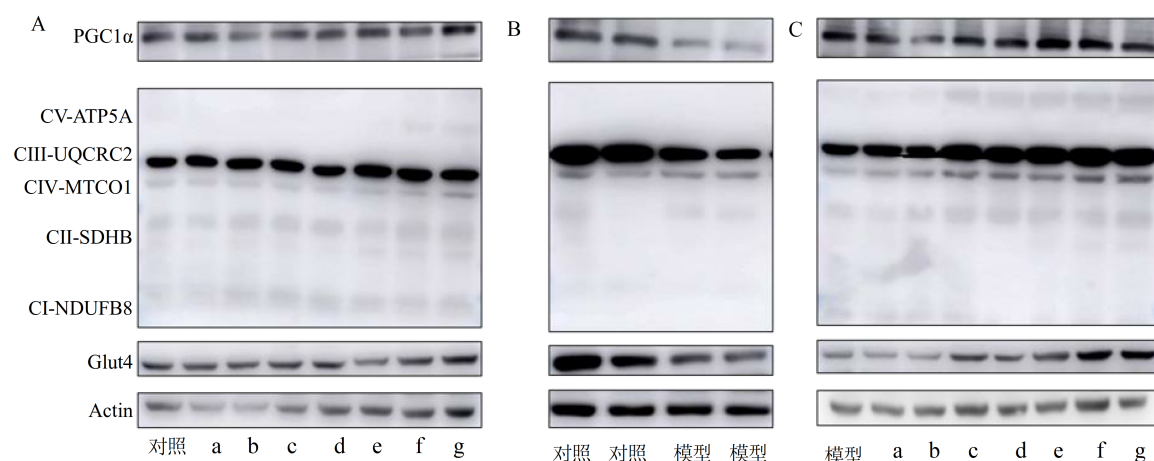


图8 正常条件下小檗碱及其体内代谢产物培养 48 h(A)、正常和高糖条件处理 48 h(B)、高糖条件下小檗碱及其体内代谢产物处理 48 h(C)后 PGC-1 α 、Glut4、OXPHOS 蛋白表达水平

Fig. 8 PGC-1 α 、Glut4、OXPHOS expression after cells cultured with berberine and its metabolites for 48 h under normal conditions (A), after cells treated with normal or high-glucose conditions for 48 h (B), and after cells treated with high glucose and berberine metabolites for 48 h (C)

PGC1 α /PPAR α 、促进葡萄糖代谢、改善线粒体动力学、减少高糖引起的细胞凋亡、减轻心肌细胞损伤、发挥对糖尿病心脏的保护作用。

长期高糖环境导致心肌细胞 Glut4 表达降低,对葡萄糖的利用减少,细胞内葡萄糖代谢相关酶如 PDK4、GCK、HK2 的表达水平也显著降低,使得细胞的代谢底物由葡萄糖转变为脂肪酸,造成代谢异常^[26-27]。但小檗碱体内代谢产物处理显著增加了高糖状态下心肌细胞对葡萄糖的利用,促进糖代谢,纠正了代谢紊乱。高糖状态下线粒体动力学相关蛋白如 Mfn2、OPA1 水平显著降低,Drp1 水平显著增加导致线粒体分裂增加,融合减少,产生大量功能不完整的线粒体,进一步影响心肌细胞的代谢功能^[28-30]。小檗碱体内代谢产物处理显著增加了促进线粒体融合基因的表达,减少线粒体分裂,改善了高糖导致的线粒体动力学异常,保证心肌细胞的能量供应,进而改善细胞功能。长期高糖状态也使得心肌细胞中促凋亡基因 *Caspase-3*、*Caspase-9*、*Bax* 水平显著增加,抗凋亡基因 *Bcl-2* 水平显著降低,进而促进心肌细胞凋亡^[31-32]。小檗碱体内代谢产物能促进抗凋亡基因的表达,抑制促凋亡基因表达,减少心肌细胞凋亡,增加高糖状态下心肌细胞的存活率,保证心脏功能。Sirt1/PGC1 α /PPAR α 在维持线粒体稳态和能量代谢中有重要作用^[33-34],高糖条件抑制 Sirt1/PGC1 α /PPAR α 的表达,导致线粒体动力学和功能异常,造成细胞糖脂紊乱,影响细胞正常功能;小檗碱体内代谢产物能促进 Sirt1/PGC1 α /PPAR α 的表达,恢复线粒体功能和能量代谢,改善细胞状态。

因此,虽然小檗碱生物利用度极低,但其进入体内后可能通过各种代谢酶转化为 DHB、小檗红碱、COL、巴马汀、药根碱、DEM 等各种代谢产物发挥作用。小檗碱体内代谢产物能显著改善高糖造成的心肌细胞损伤,促进葡萄糖代谢,改善线粒体动力学,减少细胞凋亡,但其在体内的药效作用有待进一步实验验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Demir S, Nawroth P P, Herzig S, et al. Emerging targets in type 2 diabetes and diabetic complications [J]. Adv Sci, 2021, 8(18): e2100275.
- [2] Zheng Y, Ley S H, Hu F B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 88-98.
- [3] Jia G H, Whaley-Connell A, Sowers J R. Diabetic cardiomyopathy: A hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease [J]. Diabetologia, 2018, 61(1): 21-28.
- [4] Bugger H, Abel E D. Molecular mechanisms of diabetic cardiomyopathy [J]. Diabetologia, 2014, 57(4): 660-671.
- [5] Murtaza G, Virk H U H, Khalid M, et al. Diabetic cardiomyopathy - A comprehensive updated review [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2019, 62(4): 315-326.
- [6] Arow M, Waldman M, Yadin D, et al. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor dapagliflozin attenuates diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Diabetol, 2020, 19(1): 7.
- [7] Tan Y, Zhang Z G, Zheng C, et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: Preclinical and clinical evidence [J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(9): 585-607.
- [8] Nakamura K, Miyoshi T, Yoshida M, et al. Pathophysiology and treatment of diabetic cardiomyopathy and heart failure in patients with diabetes mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3587.
- [9] Habtemariam S. Berberine pharmacology and the gut microbiota: A hidden therapeutic link [J]. Pharmacol Res, 2020, 155: 104722.
- [10] Feng X J, Sureda A, Jafari S, et al. Berberine in cardiovascular and metabolic diseases: From mechanisms to therapeutics [J]. Theranostics, 2019, 9(7): 1923-1951.
- [11] Song D Y, Hao J Y, Fan D M. Biological properties and clinical applications of berberine [J]. Front Med, 2020, 14(5): 564-582.
- [12] Ma J Y, Feng R, Tan X S, et al. Excretion of berberine and its metabolites in oral administration in rats [J]. J Pharm Sci, 2013, 102(11): 4181-4192.
- [13] Long J Y, Song J W, Zhong L, et al. Palmatine: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics [J]. Biochimie, 2019, 162: 176-184.
- [14] Yang S, Cao S J, Li C Y, et al. Berberrubine, a main metabolite of berberine, alleviates non-alcoholic fatty liver disease via modulating glucose and lipid metabolism and restoring gut microbiota [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 913378.
- [15] Zhong F R, Chen Y, Chen J, et al. Jatrorrhizine: A review of sources, pharmacology, pharmacokinetics and toxicity [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 783127.
- [16] Wang K, Feng X C, Chai L W, et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects [J]. Drug Metab Rev, 2017, 49(2): 139-157.
- [17] Feng X C, Wang K, Cao S J, et al. Pharmacokinetics and excretion of berberine and its nine metabolites in rats [J].

- Front Pharmacol, 2021, 11: 594852.
- [18] Xu L Q, Lin G S, Yu Q X, et al. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of dihydroberberine in potassium oxonate- and hypoxanthine-induced hyperuricemic mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 645879.
- [19] Dillmann W H. Diabetic cardiomyopathy [J]. Circ Res, 2019, 124(8): 1160-1162.
- [20] Jia G H, DeMarco V G, Sowers J R. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy [J]. Nat Rev Endocrinol, 2016, 12(3): 144-153.
- [21] Dong S F, Zhang S F, Chen Z R, et al. Berberine could ameliorate cardiac dysfunction via interfering myocardial lipidomic profiles in the rat model of diabetic cardiomyopathy [J]. Front Physiol, 2018, 9: 1042.
- [22] 王瑞瑶, 霍梦露, 李超, 等. 小檗碱对高糖诱导心肌细胞 AMPK-AS160-GLUT4 通路的调节及保护作用 [J]. 中国临床保健杂志, 2020, 23(2): 241-246.
- Wang R Y, Huo M L, Li C, et al. Regulation and protective effect of berberine on hyperglycemic-induced AMPK-AS160-GLUT4 pathway in cardiomyocytes [J]. Chin J Clin Healthc, 2020, 23(2): 241-246.
- [23] 董世芬, 洪纓, 汪瑞祺, 等. 小檗碱对实验性2型糖尿病心脏病大鼠模型心脏保护作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(9): 1216-1221.
- Dong S F, Hong Y, Wang R Q, et al. Berberine attenuates cardiac dysfunction in experimental type 2 diabetic cardiomyopathy rat model [J]. Chin Pharmacol Bull, 2013, 29(9): 1216-1221.
- [24] Cheng D L, Liu P, Wang Z W. Palmatine attenuates the doxorubicin-induced inflammatory response, oxidative damage and cardiomyocyte apoptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 106: 108583.
- [25] Hao M X, Jiao K L. Jatrorrhizine reduces myocardial infarction-induced apoptosis and fibrosis through inhibiting p53 and TGF- β 1/Smad2/3 pathways in mice [J]. Acta Cir Bras, 2022, 37(7): e370705.
- [26] Chen M Y, Meng X F, Han Y P, et al. Profile of crosstalk between glucose and lipid metabolic disturbance and diabetic cardiomyopathy: Inflammation and oxidative stress [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 983713.
- [27] El Hayek M S, Ernande L, Benitah J P, et al. The role of hyperglycaemia in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. Arch Cardiovasc Dis, 2021, 114(11): 748-760.
- [28] Wu Q R, Zheng D L, Liu P M, et al. High glucose induces Drp1-mediated mitochondrial fission via the Orail calcium channel to participate in diabetic cardiomyocyte hypertrophy [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(2): 216.
- [29] Yuan M, Gong M Q, Zhang Z W, et al. Hyperglycemia induces endoplasmic reticulum stress in atrial cardiomyocytes, and mitofusin-2 downregulation prevents mitochondrial dysfunction and subsequent cell death [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 6569728.
- [30] Hu L, Ding M G, Tang D S, et al. Targeting mitochondrial dynamics by regulating Mfn2 for therapeutic intervention in diabetic cardiomyopathy [J]. Theranostics, 2019, 9(13): 3687-3706.
- [31] Chen Y, Hua Y Y, Li X S, et al. Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 42.
- [32] Wei J J, Zhao Y T, Liang H H, et al. Preliminary evidence for the presence of multiple forms of cell death in diabetes cardiomyopathy [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(1): 1-17.
- [33] Khan S A, Sathyanarayan A, Mashek M T, et al. ATGL-catalyzed lipolysis regulates SIRT1 to control PGC-1 α /PPAR- α signaling [J]. Diabetes, 2015, 64(2): 418-426.
- [34] Hu L, Guo Y J, Song L Q, et al. Nicotinamide riboside promotes Mfn2-mediated mitochondrial fusion in diabetic hearts through the SIRT1-PGC1 α -PPAR α pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 183: 75-88.

[责任编辑 兰新新]