

小檗碱的神经保护作用及其相关机制的研究进展

万瑾舒 张孟仁

摘要 小檗碱,又称黄连素,是中药黄连的主要成分。现代药理研究表明,小檗碱具有抗菌、抗炎、降血糖、治疗心血管系统疾病,抗肿瘤等多种作用。近年来,关于小檗碱的神经保护作用的研究越来越多,作为一种多靶点治疗的药物,小檗碱对脑缺血、阿尔茨海默病、多发性硬化、帕金森病等多种神经损伤动物/细胞损伤模型均有保护作用,涉及抗神经炎症、抗氧化应激、抗凋亡、调节神经递质的多种机制。本文综述近年来小檗碱神经保护作用的相关研究及其分子机制,提出小檗碱作为神经保护药物的可能,希望对临床有一定的指导作用。

关键词 小檗碱 神经保护 抗神经炎症 抗氧化应激 抗凋亡

中图分类号 R711 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.06.047

随着人口老龄化的日益加重,神经退行性疾病及脑血管疾病发生率日益增高。由于神经元细胞的不可再生性,大部分脑血管病及神经退行性疾病的核心问题是神经元损害引起的神经功能障碍。因此,找寻有效的神经保护作用的药物对改善神经元损伤、恢复神经功能意义重大。

小檗碱,又名黄连素,是一种异喹啉生物碱,存在于小檗科、毛茛科等许多植物中,是中药黄连的主要成分。现代药理研究表明,小檗碱具有抗菌、抗炎、降血糖、治疗心血管系统疾病,抗肿瘤等多种作用。药代动力学提示小檗碱能够通过血-脑脊液屏障直接作用于大脑神经细胞并且在海马区浓度较高^[1],并且有研究表明小檗碱和维拉帕米合用可以有效改善侧脑室注射 STZ 导致的大鼠认知功能下降^[2]。目前,针对小檗碱的神经保护作用方面的研究大部分为基础实验研究,包括缺血、缺氧导致的神经元损伤模型、各种类型的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型、实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)——多发性硬化(multiple sclerosis, MS)模型等,具体机制涉及抗神经炎症、抗氧化应激、抗凋亡、调节神经递质等。本文通过总结近年来小檗碱神经保护作用的相关基础实验研究成果,系统阐述小檗碱的神经作用及涉及的可能机制,为进一步深入研究提供思路。

一、小檗碱对不同神经损伤模型的神经保护作用

1. 缺血、缺氧诱导的神经元损伤:缺血性脑血管病最初几天的继发性脑损伤常导致病情加重,损伤机制主要包括细胞炎症反应、线粒体功能异常、细胞毒性作用、氧化应激、细胞凋亡、Ca²⁺稳态失调等,其中以过度的炎症反应和细胞凋亡为主要原因。有研究发现脑梗塞后早期给予黄连素干预,脑含水量明显降低,梗死体积减少,神经功能行为缺损评分改善;同时腹腔注射黄连素溶液(10mg/kg 或 40mg/kg)能上调磷酸化蛋白激酶 B(phosphorylation protein kinase B, p-Akt)、磷酸化糖原合成激酶-3(phosphorylation glycogen kinase-3, p-GSK3)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, p-CREB)等的表达水平,并降低核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)的表达,从而对脑缺血后脑组织起到保护作用^[3]。Chai 等^[4]研究发现,小檗碱通过与视神经母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)环磷腺苷效应元件结合蛋白的 poly(A)加尾信号特异性结合,进而抑制 Rb mRNA 的降解,促进 Rb 蛋白表达。而细胞周期调节蛋白 Rb 的表达增高使得细胞周期阻滞,从而减少体外氧糖缺乏(oxygen glucose deprivation, OGD)神经元损伤后进入细胞周期发生的凋亡,发挥神经保护作用。小檗碱亦可以通过作用于鞘氨醇磷酸酯(sphingosine-1-phosphate, S1P)/低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)通路改善缺血缺氧造成的神经元细胞损伤^[5]。

2. AD 模型:AD 是一类以学习、记忆和认知功能障碍为主要表现的中枢神经系统退行性疾病,主要病

作者单位:100730 中国医学科学院/北京协和医学院北京协和医院

通讯作者:张孟仁,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:xbzh-mr425@sina.com

理表现为 A β 为主的老年斑和 Tau 蛋白过度磷酸化导致的神经纤维缠结。据报道,小檗碱可以改善不同 AD 动物模型的认知功能,减少 A β 产生、抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化、抗炎、抗氧化、调节中枢神经递质代谢等,从而发挥其神经保护功能^[6]。另外,对 A β 25 ~ 35 (25 μ mol/L) μ mol/L 诱导原代海马神经元复制的 AD 细胞模型加入小檗碱 (1、2、4 μ mol/L) 进行干预后,AD 模型细胞存活率有所提高,凋亡相关蛋白活化的半胱氨酸蛋白酶 -3 (cysteine aspartic acid specific protease - 3, caspase - 3) 表达显著下降 (4 μ mol/L),提示小檗碱可能通过抑制凋亡对 AD 细胞模型起神经保护作用^[7]。观察口服小檗碱 [25mg/(kg · d) 和 100mg/(kg · d)] 对 APP/PS - 1/tau 三转基因阿尔茨海默病 (3 \times Tg - AD) 模型小鼠的神经保护作用亦得出类似结论:小檗碱可以改善空间认知功能,抑制 β 分泌酶 (beta - site amyloid precursor protein cleaving enzyme1, BACE1) 的表达,减少 A β 的生成。进一步的体外细胞学试验表明小檗碱 (1 μ mol/L) 可能是通过自噬依赖的方式辅助清除 A β 从而减少其生成^[8]。

3. EAE——MS 模型:MS 是一种主要以免疫失衡、中枢神经系统炎症反应、髓鞘破坏为主要病理特征的自身免疫性疾病,EAE 是其公认的动物模型。朱振国等^[9, 10] 给免疫后的 EAE 大鼠小檗碱灌胃 [50mg/(kg · d)],造模结束后立即给药,连续给予 14 天后,与 EAE 组相比,大鼠临床症状减轻,发病潜伏期延长,中枢神经系统内炎症细胞浸润减少和髓鞘脱失减轻,进一步研究表明黄连素对 EAE 的神经保护作用可能与下调基质金属蛋白酶 9 (matrix metallo protein - 9, MMP - 9)、细胞间黏附分子 - 1 (intercellular cell adhesion molecule - 1, ICAM - 1) 蛋白及基因水平的表达有关。Luo 等用 C57BL/6 小鼠造模 EAE 动物模型,于造模结束后第 10 天予小檗碱灌胃 [50mg/(kg · d), 100mg/(kg · d), 300mg/(kg · d)],连续给药 15 天后发现小檗碱 [100mg/(kg · d), 300mg/(kg · d)] 显著改善 EAE 小鼠脱髓鞘和神经功能丧失。分离 C57BL/6 小鼠星形胶质细胞,予脂多糖 LPS (100ng/ml) 和小檗碱 (1、3、10 μ mol/L) 处理 24h 后进行体外培养后提示小檗碱对 EAE 小鼠的神经保护作用与其部分阻断鞘氨醇基酶 1 (sphingosine kinases 1, SPHK1)/S1P 信号通路激活相关。

4. 其他:另外,小檗碱对其他因素导致的神经损伤也有保护作用。给单侧纹状体注射 6 - 羟基多巴

诱导的 PD 模型腹腔注射小檗碱 [25mg/(kg · d), 50mg/(kg · d)] 后发现,腹腔注射 50mg/kg 小檗碱可以显著改善 PD 大鼠偏侧旋转行为;与模型组相比,小檗碱用药组酪氨酸羟化酶 (tyrosine - hydroxylase, TH) 阳性神经元数目明显增多^[11]。小檗碱亦能改善糖尿病大鼠的记忆和认知功能,并且可能通过 MAPK 通路调控海马神经突蛋白的表达,对海马起保护作用^[12, 13]。对于汞诱导的神经毒性和氧化应激损伤,小檗碱 [100mg/(kg · d)] 能够减少活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的产生,降低肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF - α),显著增加谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平,降低脑组织凋亡相关蛋白 Bax 与 Bcl - 2 的比值,具有抗炎、抗氧化应激、抗凋亡等多靶点作用特点^[14]。

二、小檗碱发挥神经保护作用的可能机制

1. 抗神经炎症:研究证实,小檗碱可以抑制 A β 25 - 35 介导的小胶质细胞炎症反应^[14]。在小鼠原代胶质细胞和 BV2 细胞中,小檗碱均可显著抑制 A β 刺激引起的白介素 6 (interleukin, IL - 6) 和单核细胞趋化蛋白 - 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP - 1) 表达上调,同时抑制环氧化酶 2 (cyclooxygenase 2, COX - 2) 及诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达,进一步的机制研究发现小檗碱能够显著抑制 NF - κ B 的激活以及 Akt, p38 和细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 的磷酸化,提示小檗碱对小胶质细胞炎症反应的抑制作用可能是通过抑制 PI₃K/Akt 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinase, MAPK) 途径实现的。Chen 等^[15] 通过控制性脑皮质撞击 (CCI) 方法建立颅脑创伤模型 (TBI) 后发现在脑外伤早期 (3h) 使用小檗碱 (10mg/kg) 即可改善脑挫伤体积,改善神经元损伤和凋亡,起到神经保护作用。在体和体外实验最终证实小檗碱可能是通过抑制炎症反应,减少炎症介质因子的产生从而减轻神经细胞损伤,而不是直接对神经元细胞发挥神经保护作用。值得一提的是,脑外伤小鼠在体实验表明,小檗碱 (10mg/kg) 对 Akt 及 ERK 信号通路并没有影响,与上述小鼠原代胶质细胞和 BV2 细胞体外实验结果不一致,推测与小檗碱的使用浓度、神经损伤模型不同有关。另外,在体实验小檗碱可能通过代谢使得其起作用的有效成分与体外应用时不同而导致结果不相一致。

2. 抗氧化应激:氧化应激是指体内氧化与抗氧化

作用失衡,产生大量的氧化中间产物,其中 ROS 和活性氮(reactive nitrogen species,RNS)是引起蛋白质和脂质氧化损伤的重要因素。段文彪等^[16]以冈田酸(OA)损伤的 HT22 海马细胞系作为氧化应激损伤的体外模型,发现小檗碱(2.5~20.0 $\mu\text{mol/L}$)能减少脂质氧化终产物丙二醛(malondialdehyde,MDA)的产生,抑制了细胞内 ROS 的积聚,提高了抗氧化酶(SOD-1 和 GSH-Px)的活性。Zhang 等^[17]和 Hsu 等^[18]通过对小檗碱抗氧化应激相关机制进行深入研究发现核因子 E2 相关因子 2[nuclear factor(erythroid-derived 2)-related factor-2,Nrf2]/血红素氧合酶-1(heme oxygenase,HO-1)相关通路在其中发挥重要作用,小檗碱还能通过激活 Nrf2 核转录促进轴突生长发挥神经保护作用^[19]。

3. 抗凋亡:大量的实验数据表明^[17,20-24],小檗碱通过抑制起细胞凋亡执行者作用的 caspase-3 蛋白,增加抑制凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 bax 的表达比例发挥抗神经细胞凋亡作用。Liang 等^[21]通过分离新生的 C57BL/6 小鼠海马神经元进行原代培养,用 A β 25-35 干预诱导 AD 细胞模型研究小檗碱的神经保护发现,小檗碱(0.01、0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)能抑制 A β 25-35 对神经元细胞的细胞毒性,降低多种 caspase 蛋白活性,增加 Bcl-2/bax。在谷氨酸诱导的大鼠 PC12 细胞系和小鼠(神经瘤母细胞)N2a 细胞系氧化应激细胞损伤中,小檗碱(50~1000 $\mu\text{mol/L}$)除对氧化应激相关指标 SOD、GSH、ROS 有所改变之外,亦表现为降低 caspase-3 蛋白活性,增加 Bcl-2/bax 比值^[20]。关于小檗碱抗神经细胞凋亡的具体机制,大多数研究^[17,22-24]都认为小檗碱减少神经细胞凋亡的作用是由 PI₃K/Akt 相关通路所介导,Simoes 等^[23]则认为 Akt/GSK3 β 通路,ERK 1/2 通路和 JNK(c-Jun 氨基末端激酶,c-Jun N-terminal kinase)通路均参与了小檗碱抗凋亡的神经保护作用。小檗碱还可通过促进细胞周期相关蛋白 Rb 的表达,阻滞脑缺血 OGD 细胞模型进入细胞周期而减少神经细胞凋亡^[4]。

4. 调节中枢神经递质:乙酰胆碱是中枢神经系统中重要的神经递质之一,与认知和记忆密切相关。乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase,AChE)催化乙酰胆碱的水解反应,其活性增高会导致乙酰胆碱丢失,认知功能障碍程度与 ACh 降低水平呈正相关。研究表明,小檗碱能抑制 AChE 的活性(IC₅₀ = 0.44~1.07 $\mu\text{mol/l}$)从而发挥其抗痴呆作用^[25]。另外,腹腔

注射小檗碱(50、200mg/kg)能显著减少 4-氨基吡啶(4-aminopyridine,4-AP)诱发的海马细胞外兴奋性氨基酸的过度释放,降低细胞外谷氨酸和天冬氨酸的水平,延迟 4-AP 诱发的晕厥发作^[26]。

三、展望

综上所述,小檗碱在缺血、阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化、糖尿病认知功能障碍等多种中枢神经损伤性疾病中均能起到一定的神经保护作用,涉及包括抗神经炎症、抗氧化应激、抗凋亡、调节神经递质等多种机制。近年来,关于小檗碱降血糖、降血脂、抗肿瘤等药理作用的报道亦越来越多,提示小檗碱具有广大的临床应用前景。尽管如此,鉴于小檗碱的口服利用率极低,大多数神经保护作用的研究都集中在体外实验,因此,在体情况下,尤其是对人体,小檗碱能否发挥良好的神经保护作用尤待质疑。有相关的药理学研究指出虽然小檗碱口服后肠道吸收利用率低,但口服的小檗碱在到达胃肠道后会在肝、脑、肾、胰腺等脏器重新分布并且发生相应的代谢作用,许多小檗碱的代谢中间产物都被证实具有抗炎、抗氧化应激等小檗碱类似作用^[27]。希望能有更多对小檗碱的代谢过程的全面的研究,作用机制及其结合位点的深入挖掘,为小檗碱作为神经保护用药提供理论依据和指导。

参考文献

- 1 Wang X, Wang R, Xing D, et al. Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of coptidis rhizoma extract[J]. Life Sci, 2005,77(24):3058-3067
- 2 Kumar A, Ekavali, Mishra J, et al. Possible role of P-glycoprotein in the neuroprotective mechanism of berberine in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive dysfunction[J]. Psychopharmacology:Berl, 2016,233(1):137-152
- 3 张晓林. 脑梗死早期应用黄连素对缺血性脑组织的保护作用及对 pAkt,pGSK,pCREB 和 NF- κ B 调节作用的实验研究[D]. 河北医科大学, 2012
- 4 Chai Y S, Yuan Z Y, Lei F, et al. Inhibition of retinoblastoma mRNA degradation through Poly(A) involved in the neuroprotective effect of berberine against cerebral ischemia[J]. PLoS One, 2014,9(6):e90850
- 5 Zhang Q, Bian H, Guo L, et al. Berberine preconditioning protects neurons against ischemia via sphingosine-1-phosphate and hypoxia-inducible factor-1[J]. Am J Chin Med, 2016,44(5):927-941
- 6 张海静,赵春晖,张文生. 小檗碱治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 环球中医药, 2017,10(6):663-667
- 7 杨吉平,费琳,张军峰,等. 小檗碱对 A β (25~35)诱导的阿尔茨海默病细胞模型的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2014,34

(20):5794-5796

- 8 Huang M, Jiang X, Liang Y, *et al.* Berberine improves cognitive impairment by promoting autophagic clearance and inhibiting production of beta-amyloid in APP/tau/PS1 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Exp Gerontol*, 2017,91:25-33
- 9 朱振国, 黄艳君, 张元涛, 等. 黄连素对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠神经保护作用的实验研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015,31(1):59-62
- 10 朱振国, 黄艳君, 李剑敏. 黄连素对实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠影响的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2013,31(7):1680-1682
- 11 Negahdar F, Mehdizadeh M, Joghataei MT, *et al.* Berberine chloride pretreatment exhibits neuroprotective effect against 6-hydroxydopamine-induced neuronal insult in rat[J]. *Iran J Pharm Res*, 2015,14(4):1145-1152
- 12 Zhou J, Du X, Long M, *et al.* Neuroprotective effect of berberine is mediated by MAPK signaling pathway in experimental diabetic neuropathy in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016,774:87-94
- 13 Abdel MA. The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats[J]. *Metab Brain Dis*, 2015,30(4):935-942
- 14 贾立云. 天然药物人参皂苷和小檗碱的神经保护作用及机制研究[D]. 济南:山东大学, 2012
- 15 Chen C C, Hung T H, Lee C Y, *et al.* Berberine protects against neuronal damage via suppression of glia-mediated inflammation in traumatic brain injury[J]. *PLoS One*, 2014,9(12):e115694
- 16 段文彪, 肖春苟, 叶茂盛, 等. 小檗碱对冈田酸诱导 HT22 细胞损伤的保护作用[J]. *解剖学研究*, 2016,38(04):261-268
- 17 Zhang C, Li C, Chen S, *et al.* Berberine protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells and zebrafish through hormetic mechanisms involving PI₃K/AKT/Bcl-2 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Redox Biol*, 2017,11:1-11
- 18 Hsu YY, Chen CS, Wu SN, *et al.* Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and protects against oxidative damage via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism in NSC34 motor neuron-like cells[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012,46(5):415-425
- 19 Hsu YY, Tseng YT, Lo YC. Berberine, a natural antidiabetic drug, attenuates glucose neurotoxicity and promotes Nrf2-related neurite outgrowth[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013,272(3):787-796
- 20 Sadeghnia HR, Kolangikhah M, Asadpour E, *et al.* Berberine protects against glutamate-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 and N2a cells[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017,20(5):594-603
- 21 Liang Y, Huang M, Jiang X, *et al.* The neuroprotective effects of Berberine against amyloid beta-protein-induced apoptosis in primary cultured hippocampal neurons via mitochondria-related caspase pathway[J]. *Neurosci Lett*, 2017,655:46-53
- 22 Kim M, Shin MS, Lee JM, *et al.* Inhibitory effects of isoquinoline alkaloid berberine on ischemia-induced apoptosis via activation of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway[J]. *Int Neurourol J*, 2014,18(3):115-125
- 23 Simoes PE, Frozza RL, Hoppe JB, *et al.* Berberine was neuroprotective against an in vitro model of brain ischemia: survival and apoptosis pathways involved[J]. *Brain Res*, 2014,1557:26-33
- 24 Hu J, Chai Y, Wang Y, *et al.* PI₃K p55gamma promoter activity enhancement is involved in the anti-apoptotic effect of berberine against cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012,674(2-3):132-142
- 25 Jung HA, Min BS, Yokozawa T, *et al.* Anti-Alzheimer and antioxidant activities of coptidis rhizoma alkaloids[J]. *Biol Pharm Bull*, 2009,32(8):1433-1438
- 26 Sadeghnia HR, Taji AR, Forouzanfar F, *et al.* Berberine attenuates convulsing behavior and extracellular glutamate and aspartate changes in 4-aminopyridine treated rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017,20(5):588-593
- 27 Wang K, Feng X, Chai L, *et al.* The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects[J]. *Drug Metab Rev*, 2017,49(2):139-157

(收稿日期:2017-08-22)

(修回日期:2017-09-07)

(上接第 196 页)

- 18 Sohn IW, Joo YB, Won S, *et al.* Late-onset systemic lupus erythematosus: is it "mild lupus"? [J]. *Lupus*, 2017,10:1-8
- 19 李晓岚, 郝丽霞, 钟华, 等. ETS1 基因多态性与系统性红斑狼疮临床表型的相关性分析[J]. *临床皮肤科杂志*, 2016,45(3):19-22
- 20 Yarwood A, Huizinga TW, Worthington J. The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA [J]. *Rheumatology: Oxford*, 2016,55(2):199-209
- 21 Okada Y, Wu D, Trynka G, *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery [J]. *Nature*, 2014,506(7488):376-381
- 22 Heo SH, Cho JY. ELK3 suppresses angiogenesis by inhibiting the transcriptional activity of ETS-1 on MT1-MMP[J]. *Int J Biol Sci*, 2014,10(4):438-447
- 23 Kothari P, Pestana R, Mesraoua R, *et al.* IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages [J]. *J Immunol*, 2014,192(1):349-357
- 24 Shan S, Dang J, Li J, *et al.* ETS1 variants confer susceptibility to ankylosing spondylitis in Han Chinese [J]. *Arthritis Res Ther*, 2014,16(2):R87
- 25 Lill CM, Luessi F, Alcina A, *et al.* Genome-wide significant association with seven novel multiple sclerosis risk loci [J]. *J Med Genet*, 2015,52(12):848-855
- 26 孙菲, 李萍, 徐涓涓, 等. ETS1 基因多态性与原发性干燥综合征的相关性[J]. *中华临床免疫与变态反应杂志*, 2013,7(2):103-108

(收稿日期:2017-07-07)

(修回日期:2017-10-06)