

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.15.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240511.1138.012\(2024-05-13\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240511.1138.012(2024-05-13))

小檗碱对缺血再灌注小鼠骨骼肌、肾脏中 UCP2 及线粒体动力学相关蛋白的调节作用*

张永春¹, 孙林^{2△}, 徐凯², 陈绪龙³, 李昊², 张永创², 杨清滔³

(1. 武警贵州省总队医院外二科, 贵阳 550005; 2. 武警贵州省总队医院卫勤处, 贵阳 550005;

3. 贵州医科大学附属医院泌尿外科, 贵阳 550004)

[摘要] **目的** 研究小鼠下肢缺血再灌注损伤(IRI)时小檗碱对骨骼肌及肾脏中 UCP2 表达及线粒体动力学的影响。**方法** 将 30 只雄性昆明小鼠随机分为阴性对照组、阳性对照组及低、中、高剂量小檗碱干预组($n=6$)。各实验组小鼠使用止血带构建双下肢缺血再灌注损伤模型,并腹腔注射不同剂量的小檗碱溶液,阳性对照组使用生理盐水替代。使用苏木素-伊红(HE)染色检测骨骼肌、肾脏病理情况,PCR 及 Western blot 检测线粒体解偶联蛋白 2(UCP2)、线粒体分裂蛋白 1(FIS1)、线粒体动力蛋白相关蛋白 1(DRP1)、线粒体融合蛋白 1(Mfn1)、线粒体融合蛋白 2(Mfn2)的基因和蛋白表达水平,并检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)的变化。**结果** 当小鼠下肢缺血再灌注损伤后,骨骼肌、肾脏均出现炎性细胞浸润,骨骼肌的细胞结构出现损伤性变化;同时,骨骼肌中 UCP2、FIS1、DRP1 的基因和蛋白表达水平及 GSH、SOD 水平明显升高($P<0.05$),Mfn1、Mfn2 的基因和蛋白表达水平及 MDA 水平明显降低($P<0.05$),肾脏中 UCP2、DRP1 的基因与蛋白表达上升存在差异性($P<0.05$)。小檗碱可上调 UCP2 在骨骼肌的基因表达,以及在肾脏中的蛋白表达($P<0.05$),同时,DRP1 的基因和蛋白水平在肾组织中受到明显抑制($P<0.05$),而在骨骼肌中无明显变化。**结论** 小鼠下肢缺血再灌注损伤导致受损部位出现剧烈的氧化应激损伤,线粒体动力学失衡,并引起肾脏的炎性损害。小檗碱对骨骼肌、肾脏 IRI 的治疗作用可能是通过抑制氧化应激损伤,其中对肾脏的保护作用还可能与上调 UCP2 后抑制 DRP1 表达从而限制线粒体分裂、减缓损伤发展有关。

[关键词] 小檗碱;缺血再灌注;骨骼肌;肾脏;UCP2;线粒体动力

[中图法分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)15-2254-07

Study on berberine regulating relationship between UCP2 and mitochondrial dynamics in skeletal muscle and kidney of mice with ischemia-reperfusion*

ZHANG Yongchun¹, SUN Lin^{2△}, XU Kai², CHEN Xulong³, LI Hao²,

ZHANG Yongchuang², YANG Qingtao³

(1. Second Department of Surgery, Hospital of Armed Police Guizhou Corps, Guiyang, Guizhou 550005, China; 2. Department of Administration, Hospital of Armed Police Guizhou Corps, Guiyang, Guizhou 550005, China; 3. Department of Urological Surgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of berberine on UCP2 expression and the mitochondrial dynamics in skeletal muscle and kidney in mice with ischemia reperfusion injury (IRI) of lower limb. **Methods** Thirty male Kunming mice were randomly divided into the negative control group, the positive control group, and low, medium and high doses berberine intervention groups. The mice in all experimental groups constructed the ischemia reperfusion injury model of lower limbs by tourniquet, different doses of berberine solution were injected intraperitoneally for intervention, while the ischemia repeating supply group used normal saline for replacement. The HE staining was used to detect the pathological conditions of skeletal muscle and kidney, PCR and Western blot were used to detect the gene and protein expression levels of UCP2, FIS1, DRP1, Mfn1 and Mfn2, and the changes of SOD, MDA and GSH were detected by kit. **Results** After IRI intervention in the both lower extremities, the inflammatory cell infiltration occurred in both skeletal muscle and kidney, and the

cell structure of skeletal muscle showed the damage changes. Meanwhile, the gene and protein expressions levels of UCP2, FIS1 and DRP1 and the levels of GSH and SOD in skeletal muscle were significantly increased ($P < 0.05$), while the gene and protein expression levels of Mfn1 and Mfn2 and the levels of MDA were significantly decreased ($P < 0.05$). The increase of UCP2 and DRP1 gene and protein expression levels in kidney was different ($P < 0.05$). Berberine could up-regulate the UCP2 gene expression in skeletal muscle and the protein expression in skeletal muscle ($P < 0.05$). At the same time, DRP1 gene and protein were significantly inhibited in the kidney tissue ($P < 0.05$), but which in skeletal muscle had no significant change. **Conclusion** IRI of skeletal muscle of lower extremity in mice leads to severe oxidative stress injury, mitochondrial dynamic imbalance and inflammatory damage of kidney in the injured parts. The therapeutic effect of berberine on skeletal muscle and kidney IRI may be achieved by inhibiting oxidative stress injury, in which its protective effect on kidney may also be related to inhibit the expression of DRP1 after UCP2 up-regulation, thus limit the mitochondrial fission and slow down the development of injury.

[Key words] berberine; ischemia-reperfusion; skeletal muscle; kidney; UCP2; mitochondrial dynamics

下肢肌群缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)可诱发代谢紊乱,导致肾脏的形态和功能受损^[1],是下肢肌群 IRI 损害中最敏感的器官^[2]。既往研究认为,下肢肌群 IRI 造成的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是由横纹肌溶解后释放的肌红蛋白和炎症细胞因子对肾小管细胞造成直接或间接的细胞毒性作用所致^[3]。随着研究深入,发现线粒体功能紊乱在其中起到关键的作用^[4]。

线粒体解偶联蛋白 2(mitochondrial uncoupling protein 2, UCP2)在骨骼肌、肾脏富集,UCP2 的高表达可调控线粒体动力学相关蛋白来限制 IRI 诱导的线粒体碎片化。此外,在机体应激环境下,UCP2 还诱导线粒体融合蛋白的上调,介导细胞器内外膜的融合而使线粒体内稳态平衡向融合倾斜^[5]。作为黄连主要成分的小檗碱,不仅可明显提高 UCP2 的基因、蛋白表达水平^[6],而且具有低毒、价廉、易获取的优点,高产重庆、四川等地^[7],另外,小檗碱可明显抑制因肾脏 IRI 直接造成炎症和氧化应激而导致的 AKI^[8]。但是,下肢肌群 IRI 间接造成的 AKI 与肾脏直接发生的 IRI 存在明显差异^[9],本研究旨在探讨小檗碱是否对远端脏器 IRI 间接造成的 AKI 同样具有抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

1 月龄雄性昆明小鼠 30 只,体重 15~22 g,均购自贵州医科大学实验动物中心[实验动物许可证号:SYXK(黔)2018-0001]。本研究动物实验方案已通过贵州医科大学实验动物中心、贵州省人民医院中心实验室、武警贵州省总队医院伦理委员会审查批准。

1.1.2 实验试剂

小檗碱(安诺伦生物公司),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒

(南京建成生物工程研究所),RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、超敏 ECL、快速转膜液(苏州新赛美生物科技有限公司),5×蛋白上样缓冲液(含 DTT)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒配 BSA、5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液、Tris 三(羟甲基)氨基甲烷、吐温 20(北京索莱宝科技有限公司), $10 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$ 蛋白 marker(北京聚合美生物科技有限公司),UCP2 多克隆抗体、线粒体分裂蛋白 1(FIS1)多克隆抗体、线粒体动力蛋白相关蛋白 1(DRP1)多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),线粒体融合蛋白 1 兔源 mAb、线粒体融合蛋白 2 兔源 pAb、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(成都正能生物技术有限责任公司), β -actin 内参抗体(郑州普美生物技术有限公司),一抗稀释液、二抗稀释液、快速制胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型构建

将小鼠适应性喂养 7 d 后随机分为 5 个小组,每组 6 只,按空白对照(阴性对照)、阳性对照、低(25 mg/kg)、中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)药物干预进行划分。小鼠下肢 IRI 模型按 CREAGER 等^[10]描述的方法进行,并将缺血范围扩散为双侧下肢,即应用止血带从根部阻断小鼠双下肢血供,阻断后立即将不同剂量小檗碱溶液给予小鼠腹腔注射,缺血 2 h 后解除止血带,建立双侧下肢 IRI 模型。阳性对照组建模后用生理盐水干预,阴性对照组不做任何处理。于拆除止血带恢复血运 4 h 后收集下肢肌群和肾脏组织,一侧以 4%多聚甲醛固定行病理检查,另一侧干冰转运后存储于液氮罐备用。

1.2.2 苏木素-伊红(HE)染色及病理学分析

肌肉、肾脏组织甲醛固定 24 h 后流水冲洗过夜,使用梯度浓度酒精脱水。二甲苯透明处理后 60 °C 烤箱软蜡,硬蜡包埋。切片机行 3 μ m 连续切片,贴附于

载玻片于 37 °C 温箱干燥。使用二甲苯及酒精脱蜡,行 HE 染色,使用酒精及二甲苯脱水,中性塑胶封片。待完全晾干后置于光镜下观察并拍照,进行病理学损伤分析。

1.2.3 UCP2、线粒体动力学相关蛋白基因水平检测

肌肉组织选取止血带远端部分股四头肌及腓肠肌,肾脏标本统一选取左肾。充分研磨后置入 EP 管,加入 1 mL Trizol;12 000 r/min,4 °C 环境下离心 15 min 后转上清,氯仿混匀后离心转移上清,异丙醇混匀后离心取沉淀;加入 75% 乙醇(DEPC 配置),洗涤离心 2 次,晾干沉淀后加入 DEPC 溶解;测定样品总 RNA 浓度及吸光度行反转录,以反转录所得的 cDNA 为模板扩增;PCR 扩增反应条件为:预变性 94 °C 30 s,单次循环;PCR 反应:95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 次循环。使用罗氏 LightCycler 480 高通量实时荧光定量 PCR 仪自动分析 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 及内参的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值。

1.2.4 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 的蛋白水平检测

同上取组织标本,液氮中研磨后置入 EP 管称重,按 1:10 加入蛋白裂解液,冰上匀浆破碎。12 000 r/min,4 °C 环境下离心 15 min,并提取上清液,重复 2 次;BCA 法浓度测定后煮样;制胶并蛋白热变性后小

心上样,80 V、120 V 两步电泳;PVDF 转膜、TBST 洗膜 3 次后置于孵育盒中,分别加入 2 mL TBST 稀释的各目的蛋白、内参一抗,4 °C 孵育过夜;复温并 TBST 洗膜 5 min,3 次后加入二抗摇床孵育 2 h,再次 TBST 洗膜 5 min,3 次后行 ECL 发光检测。

1.2.5 肌肉及肾脏组织 SOD、MDA、GSH 的检测

取材步骤和要求同上,生理盐水清洗后尽量剪碎,再用 Tris-HCl 缓冲液对取材组织研磨匀浆化,4 °C 环境下 15 000 r/min 离心,连续进行 3 次,每次 15 s。取上清液按试剂盒使用说明进行测定。

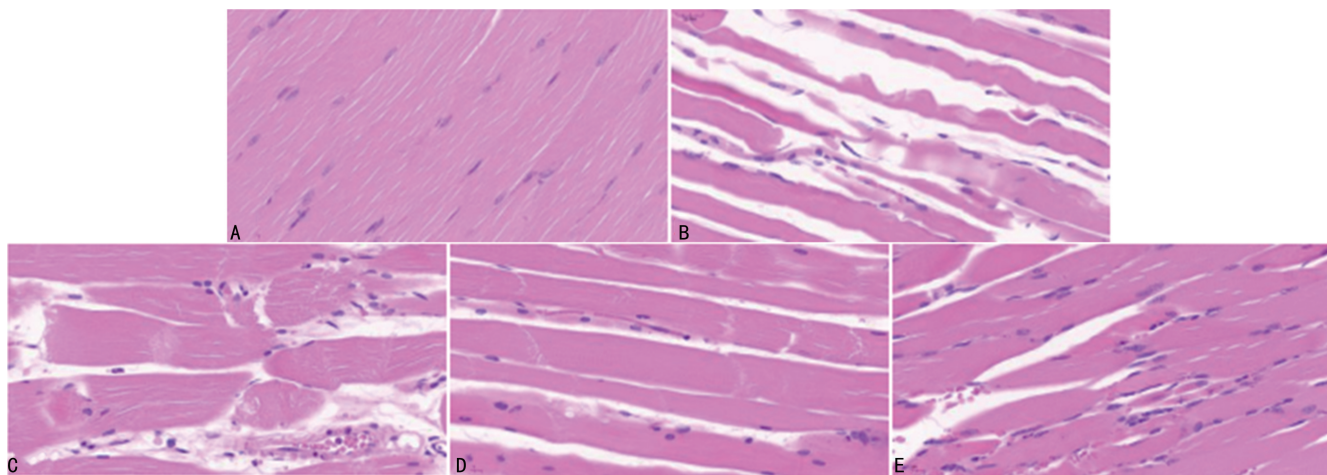
1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 *t* 检验或单因素方差分析(ANOVA)进行差异显著性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理学表现

IRI 建模后,小鼠骨骼肌均出现了不同程度的细胞肿胀、破裂,胞核萎缩和炎性细胞浸润。当给予小檗碱干预后,在高剂量组可见细胞损伤程度明显减轻;肾脏出现肾小管的肿胀和炎性细胞浸润和组织淤血,给予小檗碱干预,肿胀情况似有减轻,见图 1、2。



A: 阴性对照组;B: 阳性对照组;C: 低剂量干预组;D: 中剂量干预组;E: 高剂量干预组。

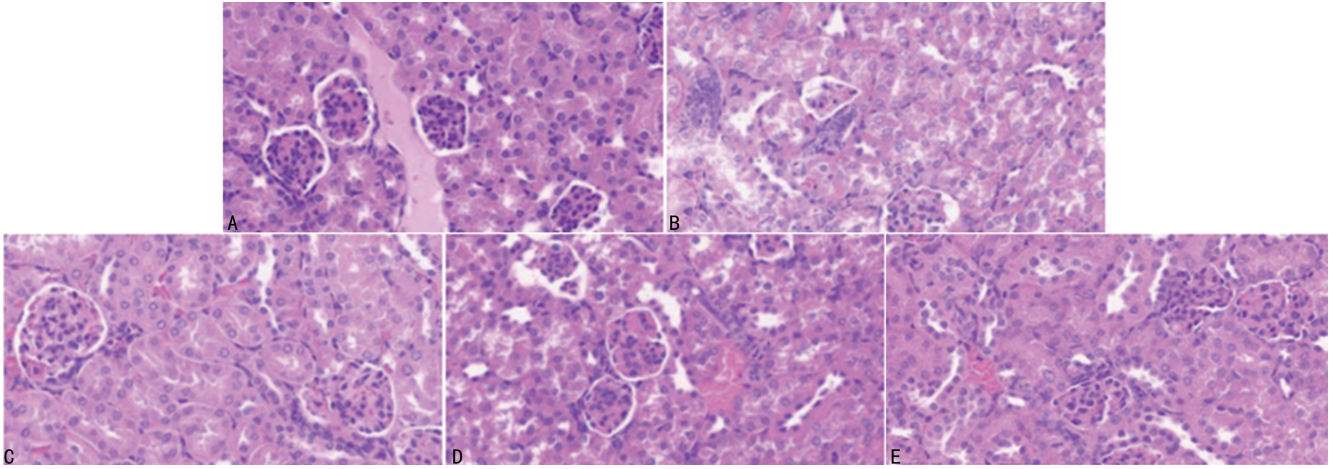
图 1 各组小鼠骨骼肌组织形态(HE,100×)

2.2 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 的基因变化情况

骨骼肌中,IRI 建模后 UCP2 的表达明显升高($P < 0.05$),小檗碱促进 UCP2 的基因表达,在高剂量组出现明显升高($P < 0.05$)。FIS1、DRP1 在 IRI 干预后明显升高($P < 0.05$),Mfn1、Mfn2 出现明显下降($P < 0.05$);小檗碱干预后,DRP1 未出现明显变化,仅体现下降趋势($P > 0.05$),FIS1 无明显变化,Mfn1、Mfn2 表现出升高趋势但差异无统计学意义

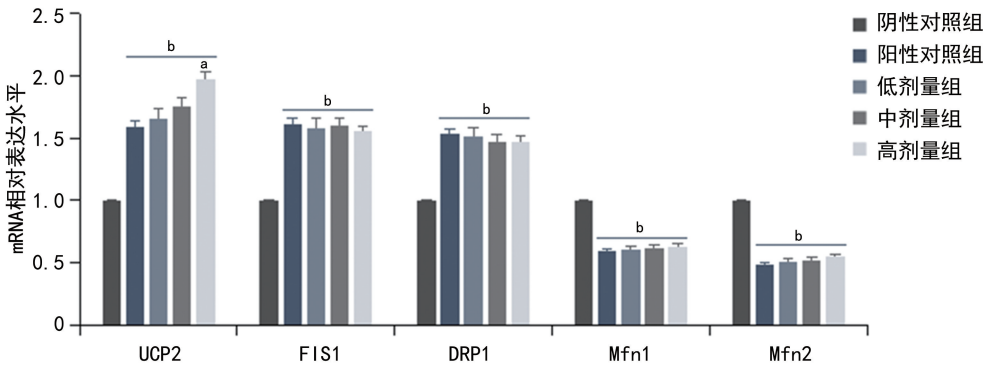
($P > 0.05$),见图 3。

肾脏中,IRI 建模后 UCP2 的表达明显升高($P < 0.05$),小檗碱可促进 UCP2 的基因表达,但仅出现升高趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$)。DRP1 在 IRI 干预后明显升高($P < 0.05$),FIS1 有升高趋势但差异无统计学意义($P > 0.05$),Mfn1、Mfn2 无变化趋势;小檗碱干预后,DRP1 在高剂量组出现明显下降($P < 0.05$),FIS1、Mfn1、Mfn2 无明显变化趋势($P > 0.05$),见图 4。



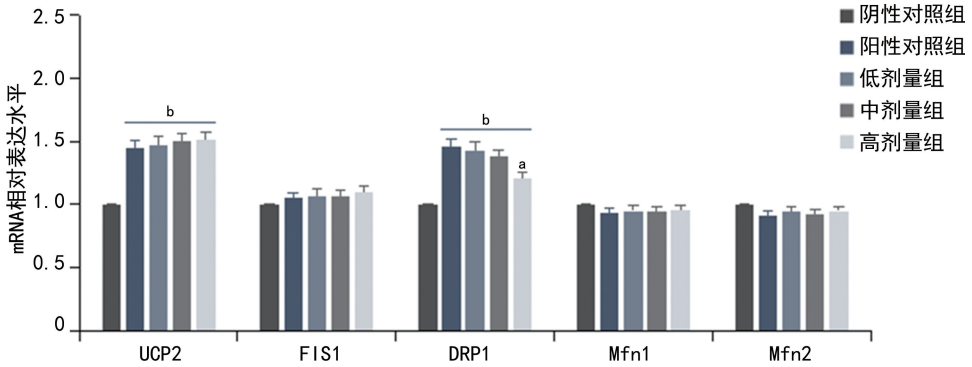
A: 阴性对照组; B: 阳性对照组; C: 低剂量干预组; D: 中剂量干预组; E: 高剂量干预组。

图 2 各组小鼠肾脏组织形态(HE, 100×)



^a: $P < 0.05$, 与阳性对照组相比; ^b: $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

图 3 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 在骨骼肌中的基因表达水平



^a: $P < 0.05$, 与阳性对照组相比; ^b: $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

图 4 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 在肾脏中的基因表达水平

2.3 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 的蛋白变化情况

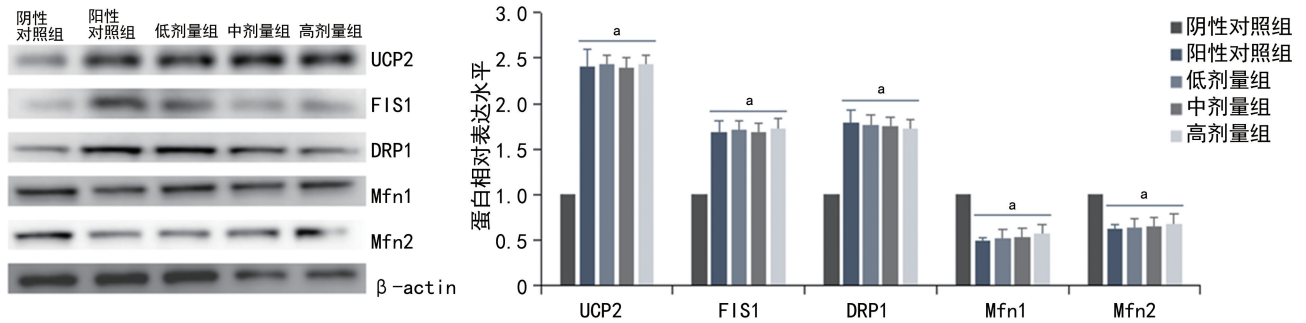
骨骼肌中, 阴性对照组 UCP2 的蛋白表达量少, 当 IRI 干预后, UCP2 的表达明显升高 ($P < 0.05$), 各剂量小檗碱的干预下 UCP 2 蛋白表达未出现明显变化。FIS1、DRP1 在 IRI 干预后明显升高 ($P < 0.05$), Mfn1、Mfn2 在 IRI 干预后出现明显下降 ($P < 0.05$); 小檗碱干预后, DRP1 及 FIS1 仅出现不明显的下降趋势 ($P > 0.05$), Mfn1、Mfn2 蛋白表达仅出现升高趋势但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

肾脏中, 同样在阴性对照组 UCP2 的表达较低, 当 IRI 干预后, UCP2 的蛋白表达量出现明显升高, 小檗碱可促进肾脏中 UCP2 的蛋白表达, 在中、高剂量组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。DRP1 在 IRI 干预后明显升高 ($P < 0.05$), FIS1 有升高趋势但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), Mfn1、Mfn2 仅出现不明显下降趋势 ($P > 0.05$); 小檗碱干预后, DRP1 在高剂量组出现明显下降 ($P < 0.05$), FIS1 无明显变化趋势 ($P > 0.05$), Mfn1、Mfn2 出现不明显升高趋势 ($P > 0.05$), 见图 6。

2.4 氧化应激指标的变化

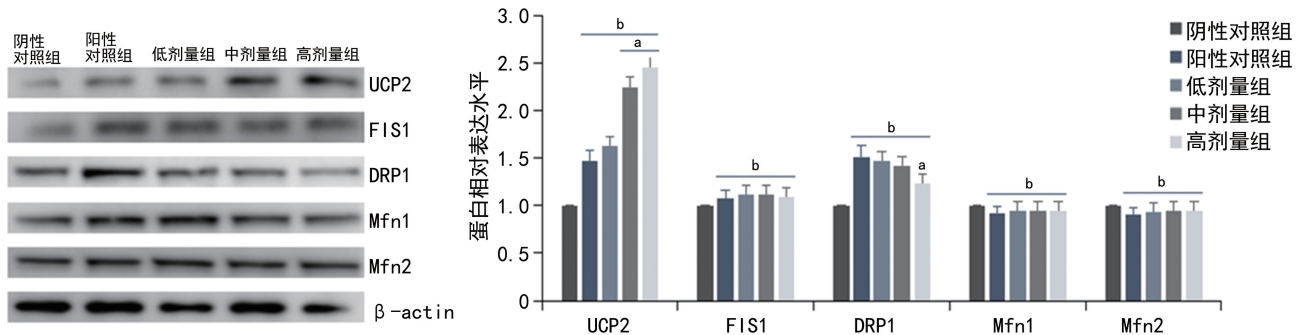
骨骼肌中, IRI 干预后, 与阴性对照组相比, GSH、SOD 明显降低, 而 MDA 明显上升 ($P < 0.05$); 在不同剂量小檗碱干预后, 与阳性对照组相比, GSH、SOD 逐渐上升, 并在高剂量组出现明显变化 ($P < 0.05$), MDA 在小檗碱干预后仅出现下降趋势 ($P > 0.05$)。

肾脏中, IRI 干预后, 与阴性对照组相比, GSH、SOD 明显降低, 而 MDA 明显上升 ($P > 0.05$); 在不同剂量小檗碱干预后, 与阳性对照组相比, GSH、SOD 逐渐上升, 但无明显变化 ($P > 0.05$), MDA 在高剂量组明显下降 ($P < 0.05$), 见表 1。



^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

图 5 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 在骨骼肌中的蛋白表达水平



^a: $P < 0.05$, 与阳性对照组相比; ^b: $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

图 6 UCP2、FIS1、DRP1、Mfn1、Mfn2 在肾脏中的蛋白表达水平

表 1 小鼠骨骼肌氧化应激指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSH ($\mu\text{mol/g}$)		SOD (U/mg)		MDA (nmol/mg)	
		骨骼肌	肾脏	骨骼肌	肾脏	骨骼肌	肾脏
阴性对照组	6	1.89 ± 0.16	1.59 ± 0.17	28.26 ± 1.31	26.43 ± 1.05	0.66 ± 0.16	0.51 ± 0.11
阳性对照组	6	0.85 ± 0.21 ^a	0.73 ± 0.21 ^a	18.40 ± 2.28 ^a	20.62 ± 2.37 ^a	1.22 ± 0.21 ^a	1.17 ± 0.52 ^a
低剂量干预组	6	0.87 ± 0.20 ^a	0.73 ± 0.43 ^a	18.29 ± 1.05 ^a	19.97 ± 1.31 ^a	1.21 ± 0.12 ^a	1.13 ± 0.30 ^a
中剂量干预组	6	1.09 ± 0.33 ^a	0.78 ± 0.17 ^a	19.67 ± 1.79 ^a	20.44 ± 1.54 ^a	1.17 ± 0.09 ^a	1.08 ± 0.22 ^a
高剂量干预组	6	1.39 ± 0.26 ^{ab}	1.08 ± 0.25 ^a	23.52 ± 2.10 ^{ab}	22.78 ± 1.16 ^a	1.13 ± 0.05 ^a	0.89 ± 0.15 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与阴性对照组相比; ^b: $P < 0.05$, 与阳性对照组相比。

3 讨论

UCP2 是线粒体内膜蛋白的一员, 在大多数组织中都有表达, 但在各脏器组织的表达差异较大。UCP2 易受细胞代谢状态影响^[11], 并且越来越多的证据表明, 因疾病、代谢改变或直接免疫刺激引起的 UCP2 转录变化通常发生在数天以后^[12], 而 UCP2 的转录后调控似乎很快就能响应, 即以蛋白变化为主^[13]。UCP2 在基因和蛋白表达上不同步可能是因为氧化磷酸化解偶联使机体耗能与产能出现矛盾, 故出现了 UCP2 的转录后调控, 溶酶体对蛋白质的降解

等, 均为维持耗能与产能达到机体所需平衡时将 UCP2 的表达维持在特定数值^[14]。本研究发现, IRI 干预小鼠后, 骨骼肌、肾脏中 UCP2 的基因、蛋白表达未发生明显的一致变化, 印证了既有研究的观点。在基因层面, 当给予高剂量小檗碱干预后, 骨骼肌中 UCP2 的基因表达水平可出现明显上升, 推测除了代谢因素外, 还与骨骼肌直接受到机械损伤产生明显的破坏性变化, 使机体短时间内急剧发生 UCP2 的扩增, 同时也可能与小檗碱的药理作用有关, 但在肾脏中却未观察到小檗碱对 UCP2 基因的明显促表达作

用。在蛋白层面,小檗碱对 UCP2 蛋白的促表达作用体现在了肾组织中,而在骨骼肌中却效果甚微。推测可能因肾脏遭受损伤为间接方式,UCP2 的蛋白表达水平更多的是适应产能与耗能的平衡,出现了相应的明显变化。另一方面,也可能由于 UCP2 在骨骼肌中的分布较肾脏更为丰富^[15],当肾脏遭受损伤时,主要是通过增加蛋白量来增加其调节能量代谢的功能。

线粒体是哺乳动物细胞中主要的能量产生细胞器,在细胞损伤和死亡信号传导中起着核心作用。线粒体的功能障碍导致细胞内稳态的丧失,引起亚致死性损伤,进一步导致细胞死亡^[16]。在细胞损伤过程中,线粒体发生了明显的碎片化趋势。在实验性 AKI 中,裂变优势导致线粒体碎片化^[17]。重要的是,线粒体碎裂不仅是一种形态学变化,也是导致线粒体膜渗漏和随后肾小管上皮细胞死亡的早期和关键过程。本研究给予小鼠下肢骨骼肌 IRI 干预后,骨骼肌中 FIS1、DRP1 的基因和蛋白表达均明显升高,Mfn1、Mfn2 的基因和蛋白表达均明显下降,说明骨骼肌受到直接的创伤及之后的再灌注损伤后,其线粒体动力学向着线粒体碎裂的方向进展,且线粒体融合趋势急剧下降。给予小檗碱干预后,骨骼肌中 4 种线粒体动力学相关蛋白均未发生明显变化,但肾脏中 DRP1 在基因和蛋白的表达上都出现了明显下降,推测小檗碱干预远端组织 IRI 所致肾损伤主要是通过直接或间接的作用抑制 DRP1 来抵抗线粒体的分裂。因骨骼肌受到的创伤直接且剧烈,线粒体发生了较重的破坏性改变,抵消了基因和蛋白的表达上体现出小檗碱的药理学作用。围绕上述结果,引入组织病理学检查进行印证。小鼠下肢 IRI 干预后发现,骨骼肌细胞明显水肿,部分细胞发生破裂、胞核萎缩,在肌细胞周围出现炎性细胞浸润。当给予不同剂量小檗碱干预后,在高剂量组可见细胞损伤程度明显减轻,炎性细胞浸润情况似有缓解。而 IRI 干预后的肾脏标本中仅发现肾小管细胞发生肿胀和炎性细胞浸润,未见明显的核固缩或细胞坏死。给予小檗碱干预,肿胀情况似有减轻,病理损伤程度小于骨骼肌细胞,推测可能与骨骼肌遭到直接的损伤,其破坏性变化较肾脏更为剧烈,相应的组织病理学变化更为明显,或因阻断血供和再灌注时间较短,肾脏的继发性反应尚未体现有关。

有研究发现,小鼠肾脏 UCP2 表达增加可减少肾小管细胞凋亡,改善 IRI 诱导的 AKI^[18],继续通过给予基因或药物干预上调肾脏中 UCP2 的表达后,可下调 DRP1 依赖的裂变,从而使线粒体分裂趋势得到限制,肾功能明显改善,UCP2 在保持线粒体完整性方面发挥了重要作用^[19]。小檗碱是一种异喹诺酮类生物碱。关于小檗碱在肾脏疾病方向与线粒体动力学关

系的研究很少,仅提及小檗碱可抑制 DRP1 保护肾脏足细胞^[20],没有具体研究其可能的机制。本研究提出了小檗碱对肾损伤的抑制作用是通过上调 UCP2 来抑制 DRP1 形成的假设,实验结果印证了小檗碱可上调 IRI 肾损伤模型中 UCP2 的蛋白表达,同时,DRP1 的基因及蛋白表达均明显下降。

在小鼠模型中,小檗碱除了可明显提高 UCP2 的基因和蛋白水平^[21]外,还能抑制组织的氧化应激损伤^[22]。活性氧簇是造成 IRI 中主要的伤害因素之一。过量的活性氧簇会形成 MDA 等有害过氧化产物,同时,机体为了抵御过氧化产物的伤害,反应性生成产生 SOD、GSH 等产物进行防御^[23]。本研究发现,IRI 干预小鼠后,骨骼肌、肾脏中 GSH、SOD 明显降低,而 MDA 明显上升,说明发生了明显的氧化应激反应。给予小檗碱干预后,GSH、SOD 降低和 MDA 上升的趋势得到有效缓解,但各指标在骨骼肌及肾脏中的变化程度存在差异,推测与骨骼肌、肾脏受到的损伤程度及反应时间有关。

综上所述,小鼠下肢受到 IRI 损伤后,受损部位骨骼肌及远端器官肾脏均出现剧烈的氧化应激损伤,线粒体动力学失衡,但受损部位骨骼肌的损伤程度高于肾脏。给予小檗碱干预后可从病理学、氧化应激反应上观察到骨骼肌、肾脏的损伤明显减轻,其可能的机制是小檗碱抑制氧化还原损伤,减缓损伤发展。其中,对肾损伤的抑制还可能与上调 UCP2 后抑制 DRP1 的表达从而限制线粒体分裂有关。然而,本研究未验证小檗碱对 IRI 损伤的线粒体动力学调节是否与 UCP2 存在密切相关性,是否存在小檗碱可直接调节线粒体动力学相关蛋白的作用,未来尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] KASEPALU T, KUUSIK K, LEPNER U, et al. Remote ischaemic preconditioning reduces kidney injury biomarkers in patients undergoing open surgical lower limb revascularisation: a randomised trial[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7098505.
- [2] YASSIN M M, HARKIN D W, BARROS D'SA A A, et al. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction[J]. *World J Surg*, 2002, 26(1): 115-121.
- [3] SIMON F, OBERHUBER A, FLOROS N, et al. Acute limb ischemia-much more than just a

- lack of oxygen[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 374.
- [4] NATH M, AGARWAL A. New insights into the role of heme oxygenase-1 in acute kidney injury[J]. *Kidney Res Clin Pract*, 2020, 39(4): 387-401.
- [5] FRIEDMAN J R, NUNNARI J. Mitochondrial form and function[J]. *Nature*, 2014, 505(7483): 335-343.
- [6] STANZIONE R, FORTE M, COTUGNO M, et al. Uncoupling protein 2 as a pathogenic determinant and therapeutic target in cardiovascular and metabolic diseases [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(4): 662-674.
- [7] 李建民, 李华擎. 黄连商品种类现状考察[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(10): 1476-1479.
- [8] KUMAŞ M, EŞREFOĞLU M, KARATAŞ E, et al. Investigation of dose-dependent effects of berberine against renal ischemia/reperfusion injury in experimental diabetic rats[J]. *Nefrologia (Engl Ed)*, 2019, 39(4): 411-423.
- [9] PACKIALAKSHMI B, STEWART I J, BURMEISTER D M, et al. Tourniquet-induced lower limb ischemia/reperfusion reduces mitochondrial function by decreasing mitochondrial biogenesis in acute kidney injury in mice[J]. *Physiol Rep*, 2022, 10(3): e15181.
- [10] CREAGER M A, KAUFMAN J A, CONTE M S. Clinical practice. Acute limb ischemia[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2198-2206.
- [11] RUPPRECHT A, MOLDZIO R, MÖDL B, et al. Glutamine regulates mitochondrial uncoupling protein 2 to promote glutaminolysis in neuroblastoma cells [J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2019, 1860(5): 391-401.
- [12] HASS D T, BARNSTABLE C J. Uncoupling proteins in the mitochondrial defense against oxidative stress[J]. *Prog Retin Eye Res*, 2021, 83: 100941.
- [13] BARNSTABLE C J, ZHANG M, TOMBRANTINK J. Uncoupling proteins as therapeutic targets for neurodegenerative diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5672.
- [14] DONADELLI M, DANDO I, FIORINI C, et al. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(7): 1171-1190.
- [15] FLEURY C, NEVEROVA M, COLLINS S, et al. Uncoupling protein-2; a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia [J]. *Nat Genet*, 1997, 15(3): 269-272.
- [16] ZHAN M, BROOKS C, LIU F, et al. Mitochondrial dynamics: regulatory mechanisms and emerging role in renal pathophysiology[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(4): 568-581.
- [17] BROOKS C, WEI Q, CHO S G, et al. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(5): 1275-1285.
- [18] ZHOU Y, CAI T, XU J, et al. UCP2 attenuates apoptosis of tubular epithelial cells in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(4): F926-937.
- [19] QIN N, CAI T, KE Q, et al. UCP2-dependent improvement of mitochondrial dynamics protects against acute kidney injury[J]. *J Pathol*, 2019, 247(3): 392-405.
- [20] QIN X, ZHAO Y, GONG J, et al. Berberine protects glomerular podocytes via inhibiting drp1-mediated mitochondrial fission and dysfunction [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1698-1713.
- [21] WANG Q, ZHANG M, LIANG B, et al. Activation of AMP-activated protein kinase is required for berberine-induced reduction of atherosclerosis in mice; the role of uncoupling protein 2[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25436.
- [22] LIU L, LIU J, GAO Y, et al. Uncoupling protein-2 mediates the protective action of berberine against oxidative stress in rat insulinoma INS-1E cells and in diabetic mouse islets[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13): 3246-3254.
- [23] ISMAIL T, KIM Y, LEE H, et al. Interplay between mitochondrial peroxiredoxins and ros in cancer development and progression[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4407.