

高血圧自然発症ラットの内臓脂肪および腎臓とマウス 3T3-L1 細胞に
対するベルベリンの影響に関する基礎研究

Effects of Berberine on Adipose Tissues and Kidney Function in
Spontaneously Hypertensive Rats and 3T3-L1 Cells

2016 年

岸本 亜野

目次

緒言	-1-
第1章 高血圧自然発症ラットを用いたベルベリンの影響	
1. 序言	-3-
第1節 SHRにおけるベルベリン投与による影響	
2. 実験方法	-4-
3. 実験結果	-6-
4. 考察	-10-
第2節 SHRにおけるベルベリン投与による腎機能改善効果	
2. 実験方法	-11-
3. 実験結果	-12-
4. 考察	-14-
第1章 総合的考察	-15-
第2章 3T3-L1細胞の脂肪細胞分化過程におけるベルベリンの影響	
1. 序言	-16-
2. 実験方法	-18-
3. 実験結果	-22-
4. 考察	-29-
総括	-30-
謝辞	-31-
引用文献	-32-
論文目録	-38-

緒言

ベルベリンは、ベンジルイソキノリンアルカロイドの1種であり(Fig. 1)、キハダやオウレンなどの植物に含まれている成分である¹⁾。抗菌、抗炎症、止瀉作用があり、主に止瀉薬として用いられている。また、血糖、血圧および血中脂質低下作用が報告されており、生活習慣病予防に有用であることが示唆されている^{2,3)}。

近年、食生活の欧米化や運動不足など、人々のライフスタイルの変化に伴い、高血圧症、脂質異常症、糖尿病、動脈硬化症、メタボリック症候群などの罹患者数が増加し、問題となっている。これらの生活習慣病は、互いに合併しやすく、肥満、特に内臓に脂肪（内臓脂肪）が蓄積した肥満が関わっている。生活習慣病が進行すると血管障害である動脈硬化などを引き起こすことが知られている。また、腎臓の動脈にも動脈硬化が起こるなど、腎障害の発症リスクが高くなる。Cicero らの報告⁴⁾によれば、ベルベリンを含む植物由来成分が生活習慣病の各種指標の改善に役立つ可能性を示唆している。

本研究では、高血圧を加齢とともに発症し、腎障害を発症する高血圧自然発症ラット(Spontaneously Hypertensive Rat : SHR)^{5,6)}を用いて、ベルベリンによる血圧および腎障害への影響を検討した。その結果、ベルベリン投与により、血圧低下を伴わず、腎障害を軽減させる可能性を見出した⁷⁾。また、体重増加の抑制や脂肪組織の減少が認められたことから、詳細なメカニズムを検討するため、*in vitro* で解析を行った。*in vitro* の解析では、脂肪細胞の培養モデルであり、脂肪細胞分化やエネルギー代謝の研究に広く用いられているマウス前駆脂肪細胞の培養株である 3T3-L1 細胞を用いてベルベリンの影響を検討した。その結果、ベルベリンは前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化抑制に関与することが示唆された。また、脂肪細胞と酸化ストレスの関係が深いことが知られており^{8,9)}、本研究では、ベルベリンが 3T3-L1 脂肪細胞の酸化ストレスを抑制している可能性を見出した¹⁰⁾。

本論文の第1章では、高血圧自然発症ラット(SHR)の脂肪組織および腎臓に対するベルベリンの影響を検討した結果を述べ、第2章では、培養細胞株である 3T3-L1 細胞に対するベルベリンの影響を検討した結果を述べる。

本研究において、ベルベリンは血圧には影響せずに腎障害を軽減する作用があること、および肥満を基盤とした生活習慣病を予防し改善する可能性が示唆された。

ベルベリンについて

ベルベリンは、キンポウゲ科オウレン(*Coptis japonica*)やミカン科キハダ(*Phellodendron amurense*)の他、メギ科、ツツラフジ科など広く分布するベンジルイソキノリンアルカロイドの一種である。漢方薬では、オウレンやキハダが利用され、強い苦味を有する。オウレンは、ひげ根を取った地下茎が用いられ、生薬名は"黄連"であり、キハダは、樹皮が用いられ、生薬名は"黄柏"である。黄連や黄柏に含まれるベルベリンは、黄色ブドウ球菌や赤痢菌、コレラ菌などに対して抗菌作用があり^{11, 12)}、腸内腐敗、醗酵抑制作用や蠕動運動抑制作用を有しているため、止瀉薬として用いられている。日本薬局方には、塩化ベルベリンとして収載されており、換算した生薬の乾燥物に対して定量値は、オウレンは4.2%以上、オウバク末は1.2%以上となっている。一般用医薬品では、タンニン酸ベルベリンやベルベリン塩化物として様々な止瀉薬に用いられている。

ベルベリンには、止瀉作用だけでなく、血糖や血圧、脂質低下作用が報告されており、様々な研究がされている。

本研究で用いたベルベリンは、Sigma社のものを使用した。

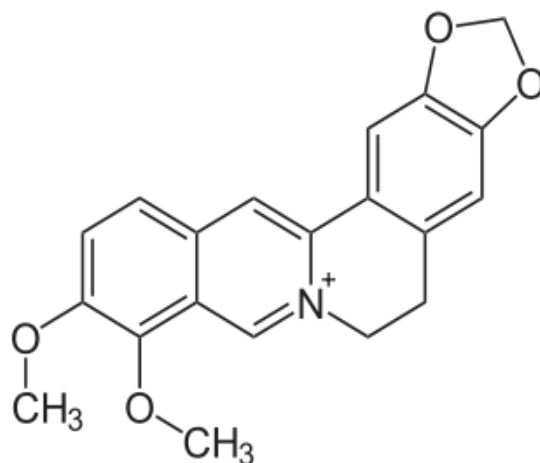


Figure1. Structure of Berberine

第 1 章

高血圧自然発症ラット(SHR)を用いたベルベリンの影響

【序言】

高血圧自然発症ラット(Spontaneously Hypertensive Rat: SHR)は、1963 年に岡本らによって Wistar Kyoto(WKY)ラットより系統分離され、数代の選択交配で SHR が作成された。SHR は特別な処置なしに加齢とともに血圧が高くなり、ヒトの高血圧モデルとして汎用されている。また、加齢とともに血圧が上昇し、その血圧の上昇とともに心臓肥大、腎臓障害の発症が認められる(Fig. 2)。



Figure 2. SHR (left), kidney injury (middle), development of hypertension in SHR (right)

肥満は、生活習慣病の最大の危険因子である。動脈硬化性疾患だけでなく、腎障害の発症リスクも高いことが報告されている。SHR は血管周囲脂肪が血管障害に関与することが知られており、また腎障害を発症するが、この腎障害の発症に活性酸素種が関与しているという報告¹³⁾がある。SHR では対照系統である WKY と比較して活性酸素種が亢進していることが報告されている¹⁴⁾。今回の SHR を用いた実験でもベルベリン投与により活性酸素種の低下が認められるかを血中指標で検討した。また、活性酸素種と密接に関連する組織である脂肪組織および活性酸素種と脂肪組織の両方より影響を受けると考えられる腎臓に着目し、ベルベリンが SHR の脂肪組織と腎障害に与える影響について検討した。

第1節 ベルベリン投与における SHR への影響

【実験方法】

(1) 試料の作成

ベルベリンは Sigma 社のものを用いた。ベルベリン粉末を生理食塩水に混ぜ、150 mg/kg のベルベリン含有生理食塩水を作成した。この投与量の設定は、先行文献の Wan ら¹⁵⁾ および Chen ら¹⁶⁾ の文献より 150 mg/kg と設定した。

(2) 実験動物

5 週齢雄性 SHR10 匹を SHR 等疾患モデル共同研究会（京都）より分与を受け、1 週間の予備飼育期間を設けた後、実験を開始した。実験開始の当日より、体重および血圧を測定し、生理食塩水を投与する群(Control 群, n=5)とベルベリンを投与する群(BBR 群, n=5)の 2 群に分けた。ラットへの投与方法は、ゾンデにて経口投与を行い、一日一回、8 週間実施した。飼育環境はコンベンショナルで、温度 23±3℃、湿度 50-60% の条件下で飼養した。また、飼料は普通食と水道水を自由摂取させた。本実験による動物実験は、動物愛護法を遵守し、実施した。

(3) 体重と血圧測定

体重と血圧の測定は、実験開始前の 6 週齢から 14 週齢まで 2 週間に 1 回実施した。血圧は tail-cuff 法により自動血圧測定装置を用いて測定した。

(4) 採尿・採血および臓器摘出

実験開始日から 8 週目の時点において 24 時間の尿をメタボリックケージ(ナルゲン)により採取した。1 日の自由行動後、16 時間絶食させ、イソフルランによる麻酔下で腹大動脈より採血し、遠心分離を行い、得られた血清、血漿試料は測定まで-80℃で冷凍保存した。

また、内臓脂肪組織及び循環器疾患関連臓器を摘出し秤量した。採取した脂肪組織の一部はホルマリンで固定し HE(Hematoxylin-Eosin)染色を行った。

(5) 摂餌量・摂水量および糞量の測定

実験開始後 8 週目の時点において、メタボリックケージでラットを 24 時間飼育し摂餌量、飲水量および糞量を測定した。

(6) 統計解析

本実験のデータは、平均値±標準誤差で算出した。群間の比較は student's t-test により、有意差検定を行った。危険率 5%未満の場合を有意であると判定した。

【実験結果】

(1) ベルベリン投与による SHR の体重、血圧の変化

8週目における摂餌量は、ベルベリン(BBR) 12.12 ± 0.68 g, Control 群 12.11 ± 2.53 g と有意な差は認められなかった。また、肝機能指標である Aspartate amino transferase (AST)および Alanine amino transaminase (ALT)はそれぞれ BBR 群 89.2 ± 8.1 IU/L、 45.8 ± 2.2 IU/L であり Control 群では 94.0 ± 10.1 IU/L、 42.8 ± 1.9 IU/L で有意な差は認められなかった。

体重は Fig. 3 で示すように、ベルベリン投与 4 週目より Control 群に比べ、体重増加が緩やかとなり、8 週目には有意に近い値($p=0.058$)を示した。8 週間投与実験終了時の体重増加量において BBR 群(164.72 ± 8.46 g)では、Control 群 (179.94 ± 7.47 g)と比較して有意に減少していた($p<0.05$)。また Table 1 に示すように血圧では、有意な差は見られなかった。

ベルベリン(150mg/kg)投与 4 週目より体重の低下傾向が観察され、8 週目における体重増加量について有意差が認められたため、さらに各臓器の重量変化の観察が必要とされた。

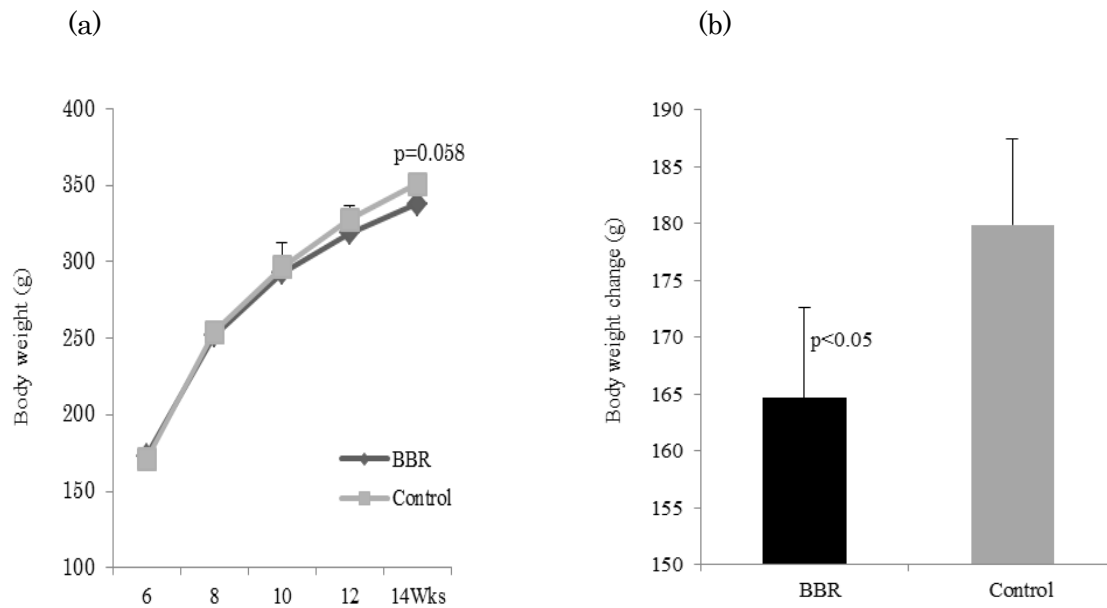


Figure 3. The body weight in BBR (a), and the body weight gain during the experiment (b). BBR: Berberine-treated SHR. Each bar and dot represents the mean \pm SD, $n = 5$.

Table 1. The development of blood pressure (mmHg) in berberine treated SHR

Age (weeks)	6	8	10	12	14
BBR (n=5)	178 \pm 11	199 \pm 16	209 \pm 12	206 \pm 9	216 \pm 12
Control (n=5)	179 \pm 10	194 \pm 12	210 \pm 13	209 \pm 5	219 \pm 8

BBR: Berberine treated SHR. Each value represents the mean \pm SD

(2) ベルベリンによる SHR の内臓脂肪組織への影響

採取した内臓脂肪組織は、副睪丸周囲脂肪(Epi)、後腹膜脂肪(Ret)、腸間膜脂肪(Mes)である。

内臓脂肪組織重量において Ret は、Control 群(4.46 ± 0.54 g)に対して BBR 群(3.57 ± 0.59 g)が有意に減少しており、Mes も同様に Control 群(2.19 ± 0.22 g)に対して BBR 群(1.80 ± 0.28 g)が有意に減少していた($p < 0.05$)。また Epi においても同じく減少傾向にあった(Fig. 4a)。

それぞれの脂肪組織を HE 染色で観察した結果、Epi、Mes において BBR 群の脂肪組織は、Control 群と比較すると脂肪組織径が小さくなっていた。Ret でも同様な傾向にあった(Fig. 4b)。

また SHR において臓器障害の発症しやすい脳、心臓、腎臓重量を測定した。脳、心臓では差が認められなかったが、腎臓は、ベルベリン投与により重量が減少していた(Table 2)。

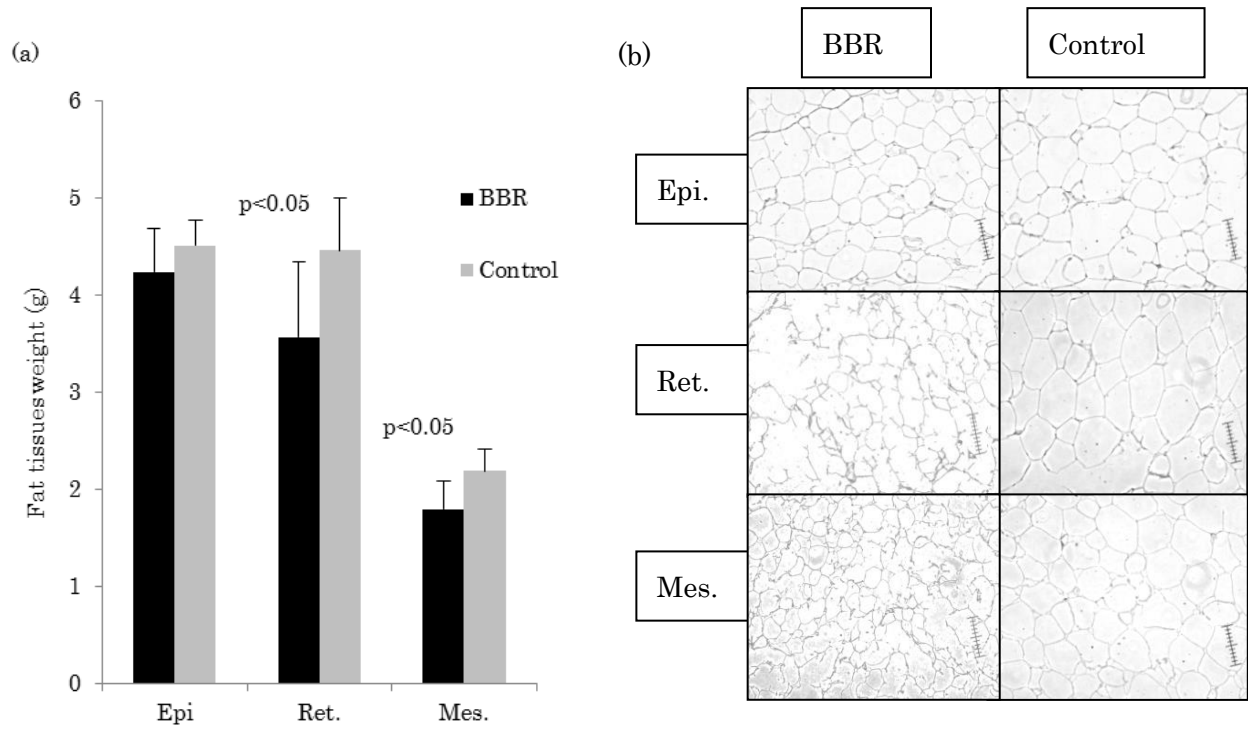


Figure 4. Effect of berberine on epididymal, retroperitoneal and mesenteric adipose tissues in berberine treated SHR. BBR: Berberine-treated SHR (a). Representative hematoxylin and eosin staining of epididymal, retroperitoneal and mesenteric adipose tissue histology after 8 weeks of BBR administration. Original magnification, x40. (b) Significant values were calculated between BBR and control. Epi.: Epididymal adipose tissue, Ret.:Retroperitoneal adipose tissue, Mes.: mesenteric adipose tissue.

Table 2. Organ weight in berberine treated SHR

	Brain(g)	Heart(g)	Kidneys(g)
BBR (n=5)	1.90±0.05	1.31±0.09	2.43±0.13*
Control (n=5)	1.93±0.03	1.39±0.02	2.57±0.13

BBR: Berberine treated SHR, *p<0.05 from Control. Each value represents the mean ± SD

【考察】

ベルベリン投与により体重増加が抑制され、内臓脂肪である後腹膜脂肪や腸間膜脂肪の減少が認められた。本研究における体重の減少は、摂餌量が対照群と比較して変わらなかったことや、肝機能指標においても差がなかったことから、摂食の低下や肝機能低下によるベルベリンの副作用によるものではないことが示唆された。また、ベルベリンには、止瀉作用があることから、腸の蠕動運動が抑制されることにより、糖、脂質、タンパク質などの栄養分の吸収の低下が懸念されたが、糞便の形や色において対照群と比較して変わらなかったことや、糞量においても差がなかったことから、ベルベリン投与による体重増加抑制は、栄養の吸収低下によるものではないと推察される。

本実験においては、ベルベリン投与により SHR の体重の減少が認められたが、ラットにおけるベルベリン投与による体重減少の報告は各種あり一貫していない。高脂肪食投与ラットでは体重減少が認められているが^{17, 18)}、ストレスプトゾトシン処置糖尿病ラットでは体重減少が認められていない¹⁹⁾。また、SHR に関していえばベルベリンによる高血圧、内皮由来弛緩反応については報告があるが^{13, 20)}、体重への関与や脂肪細胞に関しての報告はない。

本研究において SHR を用いてベルベリン(150mg/kg)の 8 週間経口投与により体重増加が抑制された。内臓脂肪である副睾丸周囲脂肪、後腹膜脂肪、腸間膜脂肪の中で後腹膜脂肪、腸間膜脂肪がより大きい減少を示し、これが体重増加抑制作用の原因の一つであると考えられる。ただ、体重抑制作用は今回測定していないが皮下脂肪への影響も推察される。

第2節 SHRにおけるベルベリン投与による腎機能改善効果

【実験方法】

(1) 試料および実験動物

試料の作成や実験動物は、第1章、第1節と同じものを用いた。

実験開始日から8週目の時点において24時間の尿をメタボリックケージ(ナルゲン)により採取し、尿中アルブミンおよび総タンパク量を測定した。1日の自由行動後、16時間絶食させ、イソフルランによる麻酔下で腹大動脈より採血し、遠心分離を行い、血清を得た。

(2) 酸化ストレスの評価

① 血中 d-ROM(The Diacron reactive oxygen metabolite test)の測定

測定には、フリーラジカル解析装置(Diacron SPF, Grosseto, Italy)を用いた。

② 尿中 8-OHdG(8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)の測定

測定には、New 8-OHdG Check(日研ザイル)を用いた。

【実験結果】

(1) ベルベリン投与 SHR の腎機能改善効果

ベルベリン投与後 8 週間目に 24 時間の尿をメタボリックケージにて採取した。尿量は両群とも有意差は認められなかった。正常血圧である WKY ラットでは 24 時間尿中アルブミンの排泄量は $227.7 \pm 14.6 \mu\text{g/day}$ であるが、ベルベリン投与 SHR の BBR 群($437.4 \pm 87.6 \mu\text{g/day}$)は、Control 群($713.5 \pm 136.3 \mu\text{g/day}$)と比較して減少しており、尿中アルブミン排泄が有意に抑制され($p < 0.01$)、尿中タンパク量も低下傾向にあった(Fig. 5)。

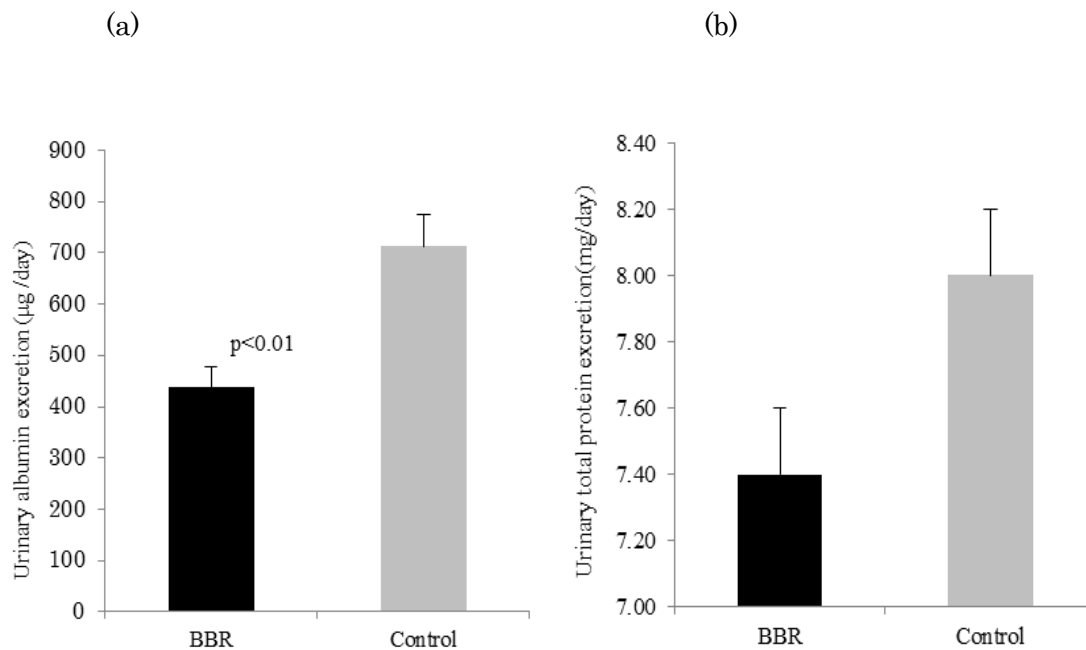


Figure 5. Twenty-four hour urinary albumin (a) and protein (b) excretion in BBR. BBR: Berberine-treated SHR. * $p < 0.01$ from Control. Each bar represents the mean \pm SD, with $n = 5$.

(2) ベルベリンによる SHR の酸化ストレスへの影響

酸化ストレスの評価には、d-ROM を用いた。d-ROM は生体内の活性酸素やフリーラジカルより生じた血中の酸化ストレスのマーカーであるヒドロペルオキシド濃度を呈色反応で計測し、生体内の酸化ストレス度の状態を総合的に評価するものである。単位は Carratelli units (U.CARR)として表される。結果を Fig. 6a に示すが、ベルベリン投与にて活性酸素種の減少傾向はあるが有意な減少は認められなかった。

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)は DNA を構成する塩基の一つデオキシグアノシンの 8 位がヒドロキシル化された構造を持つ DNA 酸化損傷マーカーである²¹⁾。デオキシグアノシンは活性酸素による酸化を受けやすいため、現在最も広く用いられている酸化ストレスマーカーの一つであり、動物種を問わず尿を使って生体内酸化ストレスを評価できる。また、SHR の垂系である SHRSP の尿中 8-OHdG が高く酸化ストレスの亢進が報告されているため²²⁾ 本実験でも 24 時間尿を用いて 8-OHdG 量を測定した。結果は、ベルベリン投与により減少傾向であったが、有意な減少が認められなかった(Fig. 6b)。

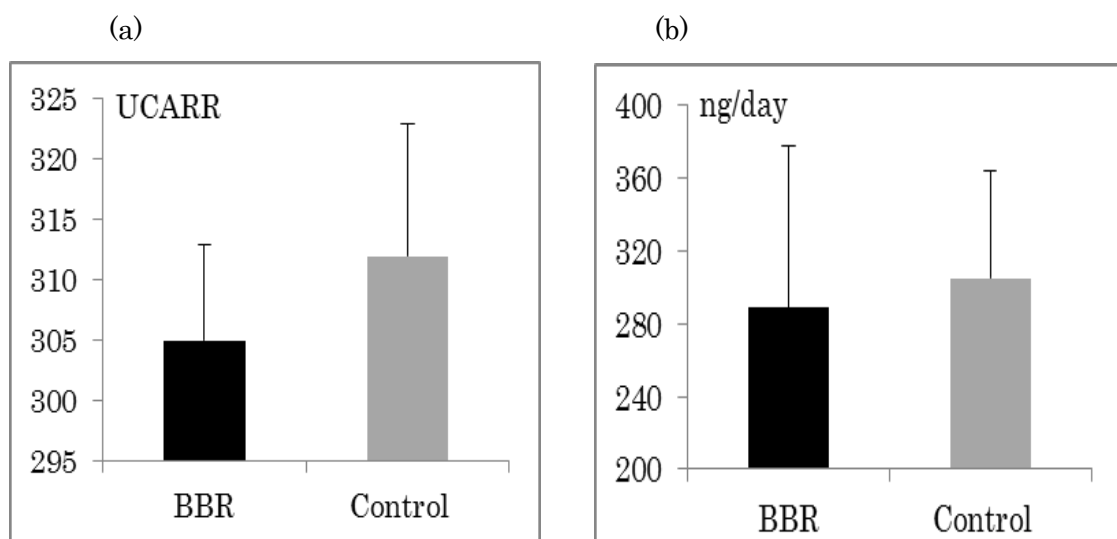


Figure 6. Effect of reactive oxygen species production in blood(a) and urine(b). BBR:berberine treated SHR. Each bar represents the mean \pm SD, with $n = 5$.

【考察】

SHR は加齢とともに腎障害を発症することが報告されている。本実験では、ベルベリン投与により腎障害の指標である尿中アルブミン排泄量が減少していた。この結果より、ベルベリンには、腎障害の軽減作用があると示唆された。

また、SHR の腎障害に酸化ストレスが関与している報告があり、本実験では、ベルベリン投与により血中の酸化ストレス指標は低下傾向にあるものの、尿中酸化ストレス指標には有意な差が見られず、個体差によるものと考えられる。

【第1章 総合的考察】

SHR は加齢とともに腎障害を発症し、2015 年に Guo ら²³⁾ は、ベルベリン投与によりアンギオテンシン II が低下することによる降圧作用とともに腎障害の軽減作用を報告しており、その腎障害の軽減作用を降圧作用が一つの原因としている。我々の結果では、血圧の低下なしに腎障害の軽減作用が認められた。血圧低下作用が認められないことを補強する結果として、ベルベリン投与で血圧上昇に伴う心重量の増加が認められなかったことから確認できる⁷⁾。この結果は、血圧以外の因子が関与している可能性を示している。

SHR の腎障害に酸化ストレスが関与している報告^{24, 25)} があり、本実験でも酸化ストレスについて検討した。ベルベリン投与では血中、尿中酸化ストレス指標の低下傾向はあるものの、有意差は認められなかった。しかし、糖尿病性腎障害においてもベルベリン投与により、酸化ストレスが低下し、腎機能の改善効果が示されている²⁶⁻²⁸⁾。本実験では、ベルベリン投与によって酸化ストレスの軽減はみられなかったが、高血圧および糖尿病による腎障害は、ベルベリン投与により酸化ストレスを低下させ、腎機能改善効果があると示唆された。

近年、高脂肪食投与の SHR において、内臓脂肪増加に伴い、活性酸素種の増加、アディポネクチンの低下、さらに腎障害が亢進するとの報告がある²⁹⁾。そこで、本研究において、腎障害軽減が明らかとなったベルベリン投与による内臓脂肪組織への影響を検討した。本実験の結果では、ベルベリン投与により体重上昇が抑制され、内臓脂肪である後腹膜脂肪や腸間膜脂肪の減少が認められた。本研究における体重減少は、摂食の低下や肝機能低下によるベルベリンの副作用によるものではないことを示している。

第 2 章

マウス 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程におけるベルベリンの影響

【序言】

第 1 章においてベルベリンは、脂肪組織を減少させる作用があることが示唆された。この結果を受けて、脂肪細胞の培養モデルであるマウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて³⁰⁾ ベルベリンによる脂肪細胞への影響を検討した。

3T3-L1 細胞は、IBMX、DEX ならびにインスリンを混合した分化誘導剤を作用させることで、効率よく前駆脂肪細胞から脂肪細胞に分化することが知られている^{31, 32)}。

3T3-L1 細胞の分化は前駆脂肪細胞の増殖過程、前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化する過程、脂肪細胞に脂肪が蓄積して成熟する過程からなる。分化を制御する重要な転写因子は、CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP)ファミリーと peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)ファミリーであることが明らかとなっている^{33, 34)}。分化初期の一過性細胞増殖期に発現する C/EBP β 、C/EBP δ は、互いに協調して活性化し、分化中期に発現する PPAR γ や C/EBP α の発現を誘導する^{35, 36)}。このうち、PPAR γ は、脂肪細胞の分化に必須の転写因子であり、同じく C/EBP α は、脂肪細胞がインスリン感受性の獲得に必須の転写因子である^{37, 38)}。これら二つの転写因子は、脂肪細胞の分化におけるマスター・レギュレーターと位置付けられており、脂肪蓄積に関わる脂肪酸合成酵素 fatty acid synthase (FAS)や脂肪細胞特異的に発現する fatty acid binding protein (aP2)などの発現を促し、脂肪細胞の肥大化をもたらすことが知られている(Fig. 7)^{39, 40)}。これらの転写因子についてベルベリンによる変化を検討した。

また、ベルベリンの脂肪分化抑制作用を補完する目的でアディポカインと呼ばれるレジスチンおよびレプチンの mRNA 発現量に与える影響について検討した。さらに、肥満では酸化ストレスが亢進し^{9, 41)}、脂肪細胞からも活性酸素種が産生されることから、ベルベリン添加による活性酸素種への影響についても検討した。

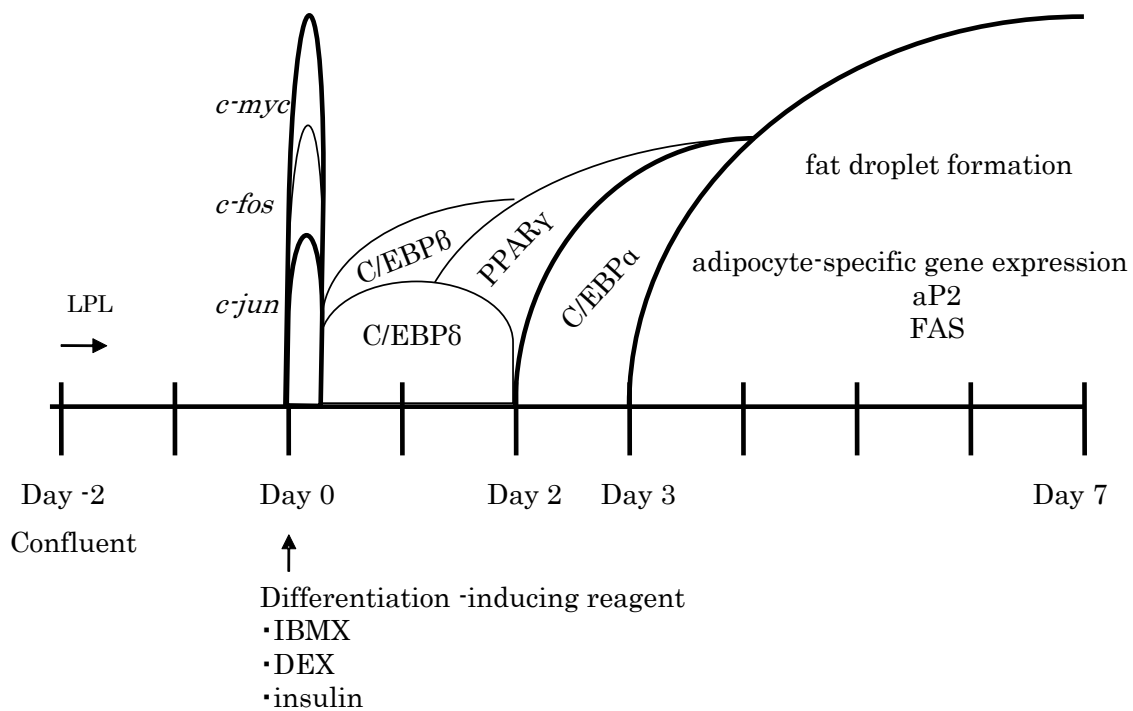


Figure 7. Progression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation. The major identified events of preadipocyte differentiation are presented chronologically. Areas labeled by gene names represent periods of gene expression during the differentiation program. The distinct stages of differentiation (very early, early, intermediate and late) are also provided. LPL, lipoprotein lipase; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein, PPAR, peroxisome proliferatoractivated receptor; MIX, methylisobutylxanthine; DEX, dexamethasone.

【実験材料】

＜使用細胞＞

マウス由来脂肪前駆細胞 3T3-L1

＜ベルベリンの調製＞

ベルベリン(Berberine chloride form, SIGMA-ALDRICH, Japan,)は、DMSO(和光純薬)に 37℃の水浴中で 40 分溶解した。無菌状態でフィルトレーションを行い、-20℃で保存した。Kumar らの報告²⁷⁾により細胞毒性の認められない濃度である 5、10 及び 20 μ M で使用した。

＜培養用試薬＞

- ・ FBS(Fetal Bovine Serum): FBS (Hyclone)は 56℃で 30 分の非動化处理を行った。
- ・ 抗生物質 : Penisillin-Streptomysin Mided Solution, Stabilized(ナカライテスク)を使用した。
- ・ PBS(Phosphate-Buffered Saline): NaCl 8.0g、Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g、KCl 0.2g、KH₂PO₄ 0.2g/L で作成し、加熱滅菌後に使用した。
- ・ Trypsin : 0.25% Trypsin/1mM-EDTA Solution (ナカライテスク)を使用した。
- ・ 細胞増殖培地 : Dulbecco's Modifed Eagle's Medium (DMEM) Low-Glucose(ナカライテスク) を使用した。
- ・ 分化誘導培地 : Dulbecco's Modifed Eagle's Medium (DMEM) 4.5g/L High-Glucose(ナカライテスク)、に 10%FBS および 100 U/mL Penisillin、100 μ g/mL Streptomysin を加えた培養液に 1mM Dexamethasone:DEX (和光純薬)、100mM Isobutylmethylxanthine:IBMX (和光純薬)、10 μ g/ μ L insulin (和光純薬)を添加した。
- ・ RIPA Buffer : ナカライテスク社のものを使用した。

【実験方法】

(1) 3T3-L1 細胞の通常培養の方法

Fig. 8a に示すように前駆脂肪細胞 3T3-L1 は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Low-Glucose の培養液中に 10%FBS、100 U/mL Penicillin と 100 μ g/mL Streptomycin を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

(2) 脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化誘導

前駆脂肪細胞 3T3-L1 を 6 well plate に播種した。脂肪細胞への分化誘導は、細胞が confluent になった 2 日後に 10%FBS/DMEM(High-Glucose)に 500 μ M IBMX、1 μ M DEX、5 μ g/mL インスリンを加えた分化誘導培地に交換を行い、培養した(Day 0)。その 3 日後、5 μ g/mL インスリンを加えた 10%FBS/DMEM(High-Glucose) に 5、10、20 μ M のベルベリンをそれぞれ添加した(Day 3)。さらにその 2 日後、10%FBS/DMEM (High-Glucose)に上記に記載した濃度のベルベリンを添加し、2 日間培養を行った(Day5)。その後 Day5 と同様の成分の培養液に交換して 3 日間培養を行った(Day 8)。

(3) Oil Red-O 染色法による細胞内脂肪滴の染色

150mg Oil Red(SIGMA)を 60%イソプロパノールに溶解した。60%になるように精製水で希釈し、ろ過した。Day8 の分化した脂肪細胞を PBS(-)で DMEM の色が無くなるまで洗浄した後、10%ホルマリンで 10 分固定した。PBS で 2 回洗浄後、60%イソプロパノールに 1 分置換し、イソプロパノールを捨てる。その後 Oil Red-O 染色液を加えて脂肪滴の染色を 10-30 分行い、60%イソプロパノールで 1 回洗浄、PBS で 2 回洗浄後、画像にて各群の比較を行った。

(4) 細胞内の TG(トリグリセリド)量の測定

Day8 の分化した脂肪細胞を 37°Cで温めておいた PBS で 2 回洗浄後、500 μ l の RIPA Buffer で回収した。回収した細胞は超音波にて破碎し、遠心分離を行い、上清を回収した。各上清を用いて細胞内の TG をトリグリセライド E-テストワコー(和光純薬)を用いて測定した。各同じ上清より総タンパク量を Bio-rad Protein assay Kit (Bio-rad Laboratories)を用いて測定し、補正を行った。

(5) 脂肪細胞の分化に関与する遺伝子発現量の解析

分化誘導後 Day8 の 3T3-L1 細胞から QIAGEN RNeasy Mini Kit を使用して total RNA を抽出した。2 μg の total RNA を用いて High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit にて cDNA を合成し試料とした。試料を Polymerase chain reaction (PCR) にて増幅を行った。遺伝子特異的プライマーは、C/EBP β 、C/EBP α 、PPAR γ 、aP2、FAS を用いた。PCR 産物は、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイドを加えた 1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、UV にて検出した。それぞれの遺伝子発現量は、Sion-image にて数値化し、得た結果は GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) で補正した。

(6) RT-PCR によるアディポカインの遺伝子発現量の解析

上記(4)の方法と同様に、分化誘導後 Day8 の 3T3-L1 細胞から QIAGEN RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出し、2 μg の total RNA を用いて High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit にて cDNA を作成した。アディポカインであるレジスチンおよびレプチンのプライマーを用いて、PCR にて増幅を行った。PCR 産物は、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エチジウムブロマイドを加えた 1.5%アガロースゲルにて電気泳動し、UV にて検出した。それぞれの遺伝子発現量は、Sion-image にて数値化し、得た結果は GAPDH で補正した。

レプチンは、Forward primer: AGAAGATCCCAGGGAGGAAA、Reverse primer: TCATTGGCTATCTGCAGCAC、レジスチンは、TCATTTCCTCC TTTTCCT、GGCTGCTGTCCAGTCTATCC であり、GAPDH は Table 3 に示す。

(7) 酸化ストレスの評価

① NBT 法を用いた活性酸素種の評価

活性酸素種の評価には Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 法を用いた SOD assay Kit-WST(Dojindo, Tokyo, Japan)にて SOD の活性値を測定した。NBT は、活性酸素種によって還元されることで青色を呈するため、Day8 の分化した脂肪細胞に NBT を加えて反応後、回収した細胞を超音波にて破碎し、50%酢酸溶液に懸濁させ、その吸光度を測定することで酸化ストレスの評価を行った。

② 酸化ストレスマーカーによる酸化ストレスの評価

上記(4)の方法と同様に、分化した Day8 の脂肪細胞から total RNA を抽出し、cDNA を作成した。得られた cDNA より、酸化ストレスマーカーである GPx (Glutathione peroxidase) のプライマーを用いて PCR にて増幅した。PCR 産物は、0.5 µg/ml エチジウムブロマイドを加えた 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し、UV にて検出した。GPx の発現量においても、Sion-image にて数値化し、得た結果は GAPDH で補正した。また、GPx の活性の測定には、分化誘導後 Day8 の細胞を回収し、超音波にて破碎し、遠心分離を行い、上清を回収し、得た上清を用いて GPx assay kit (Northwest Life Science Specialties) にて測定した。補正は総タンパク量で行った。

GPx は、Forward primer: GGGCAAGGTGCTGCTCAT TG、Reverse Primer: AGAGCGGGTGAGCCTTCTCA であり、GAPDH は Table 3 に示す。

【実験結果】

(1) ベルベリンによる脂肪細胞分化への影響

前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導過程においてベルベリンを添加した脂肪細胞は、ベルベリンの濃度依存的に脂肪滴が抑制された(Fig. 8a)。ベルベリン添加により濃度依存的に染色された脂肪滴は少なくなり、細胞内の TG においてもベルベリンの濃度に従って含量は低下していた(Fig. 8b)。

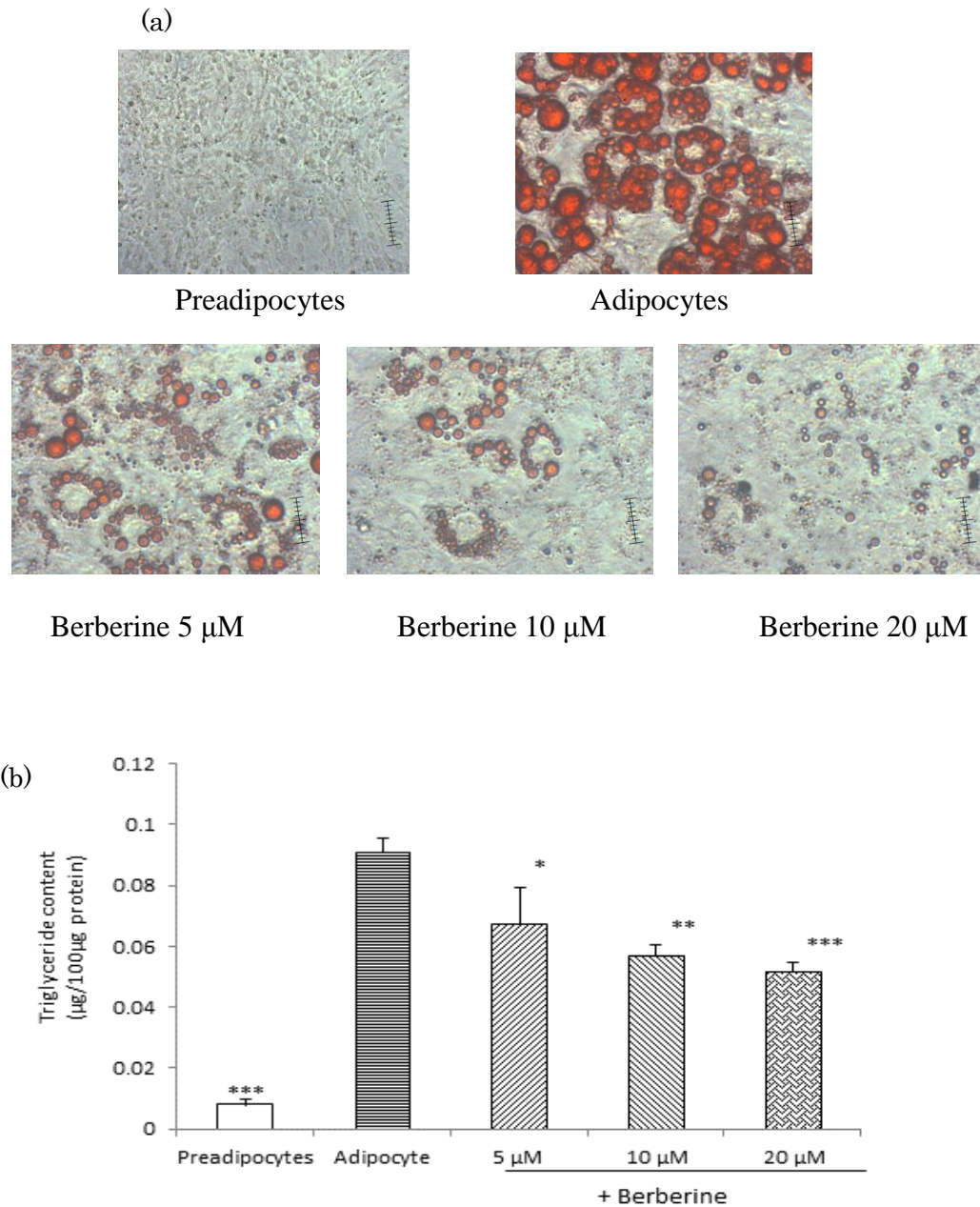


Figure 8. Berberine inhibited 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes and suppressed intercellular triglyceride accumulation. Berberine treatment inhibited adipocyte differentiation markedly. When compared with mature adipocytes, droplets observed in the cells were markedly fewer and smaller after berberine treatment (a). Triglyceride content was measured by an ultraviolet spectrophotometric method (b). Each bar represents the mean \pm SD, with $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. adipocyte group, using one-way ANOVA, followed by the post-hoc test.

(2) 脂肪細胞分化に関する遺伝子発現への影響

Day8 で回収した 3T3-L1 脂肪細胞を同様に脂肪細胞の分化マーカーや脂肪細胞に発現する C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、aP2、FAS に対して 5-20 μ M ベルベリンの影響を検討した。ベルベリンを添加した脂肪細胞では、C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ 、aP2、FAS のそれぞれの遺伝子発現量がベルベリン濃度依存的に減少していた(Fig. 9)。

Table 3. The primers for PCR

Primers	Forward primer	Reverse primer
C/EBP α	ATCCCAGAGGGACTGGAGTT	AAGTCTTAGCCGGAGGAAGC
C/EBP β	GTTTCGGGACTTGATGCAAT	ATGCTCGAAACGGAAAAGG
PPAR γ	TTCAGAAGTGCCTGGCTGTG	TCTTTCCTGTCAAGATCGCC
aP2	AAATCACCGCAGACGACAG	AAATTTCCATCCAGGCCTCT
FAS	CAGTATAAGCCCAAGGCC	TAGCCCTCCCGTACACTCAC
GAPDH	GAGGACCAGGTTGTCTCCTG	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG

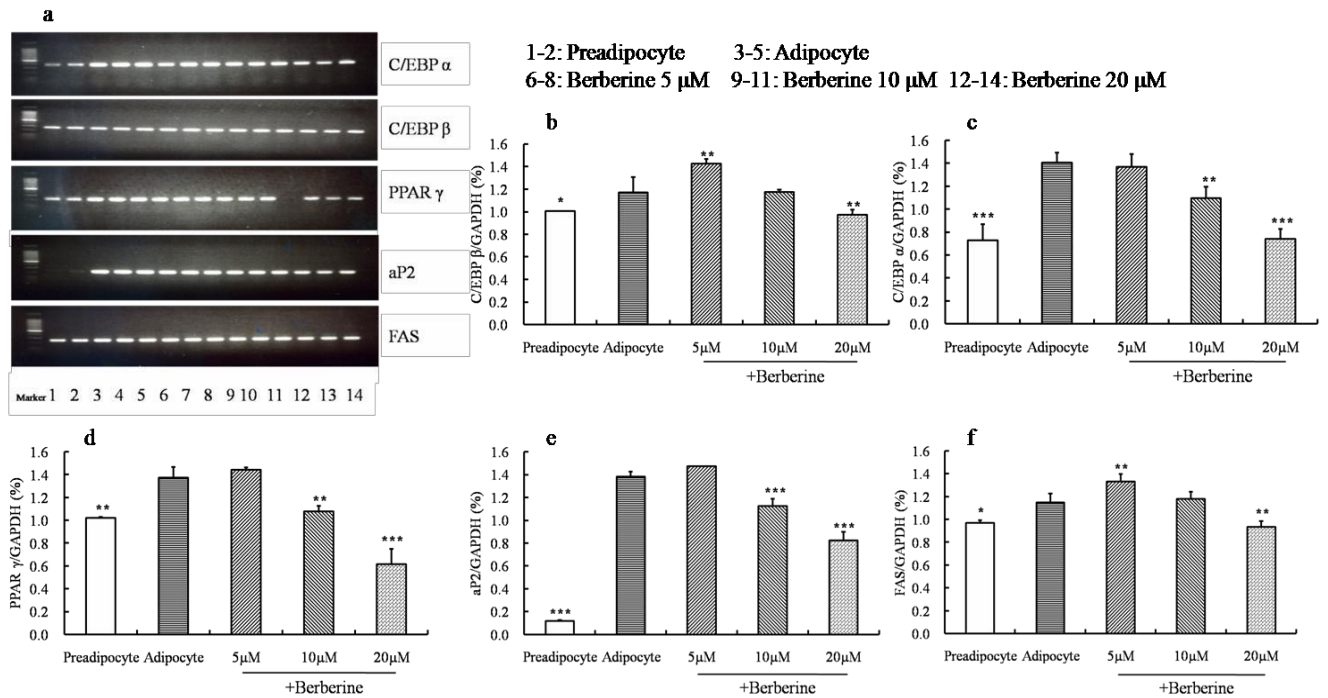


Figure 9. The effect of berberine on gene expression of transcription factors and PPAR target genes during 3T3-L1 cell differentiation. Transcription factors including C/EBP β (b), C/EBP α (c), and PPAR γ (d), and PPAR target genes, such as adipocyte-specific aP2(e) and FAS(f) mRNA gene expression, were tested by the RT-PCR method using GAPDH as an internal control. Each bar represents the mean \pm SEM, with $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. adipocyte group.

(2) アディポカインの発現における分化解析

3T3-L1 脂肪細胞においてアディポカインであるレジスチンおよびレプチンの発現は、ともにベルベリン濃度依存的に低下した(Fig. 10)。

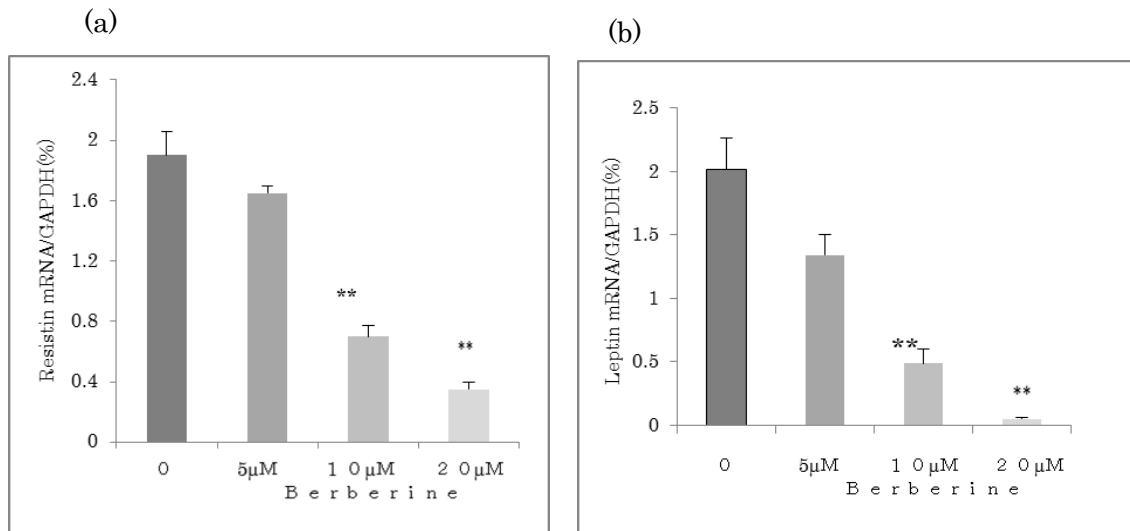


Figure 10. Effect of Berberine on the expressions of resistin(a) and leptin(b) in 3T3-L1 adipocytes. Each bar represents the mean \pm SD, with $n = 3$. ** $P < 0.01$ vs. adipocyte group, using one-way ANOVA, followed by the post-hoc test.

(3) 酸化ストレスの評価

ベルベリン添加により活性酸素種が濃度依存的に低下していた(Fig. 11)。また、抗酸化酵素である glutathione peroxidase (GPx) の mRNA 発現および活性は有意に上昇した(Fig. 12)。

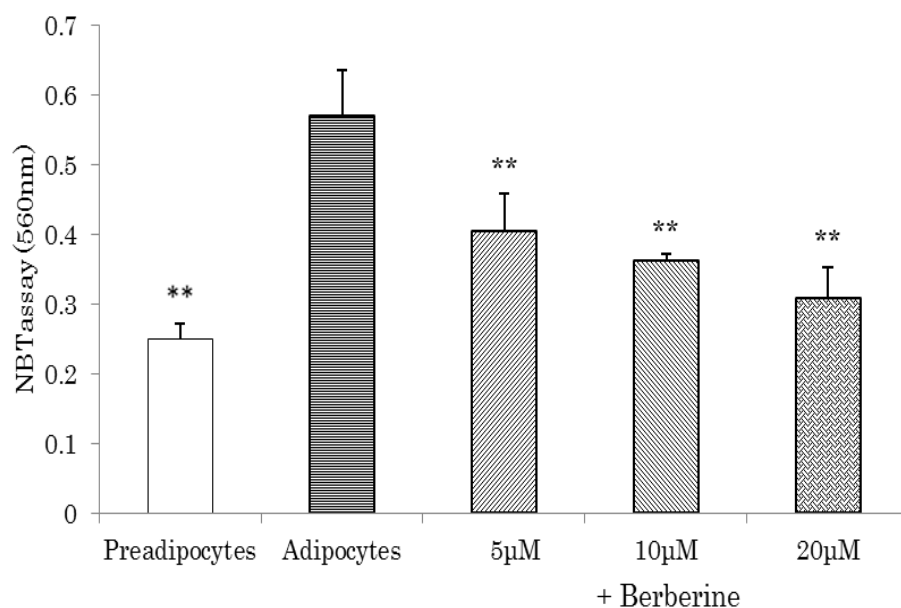


Figure 11. Reactive oxygen species production was detected by NBT assay. Each bar represents the mean \pm SD, with $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. adipocyte group, using one-way ANOVA, followed by the post-hoc test.

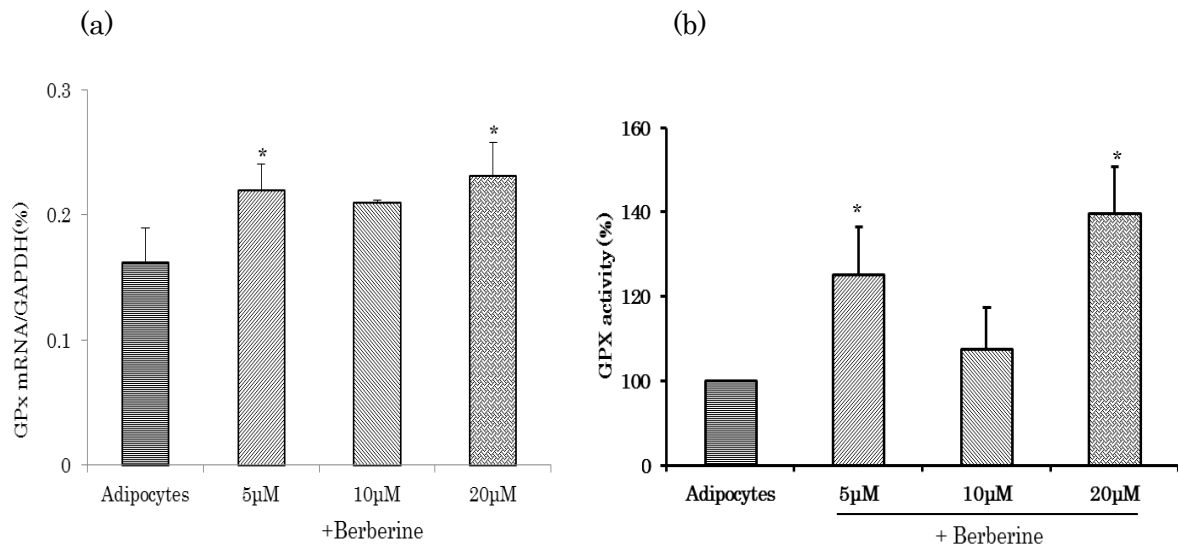


Figure 12. Effect of berberine on GPx in 3T3-L1 adipocytes. (a) GPx gene expressions were measured by RT-PCR using GAPDH as an internal control. Each bar represents the mean \pm SEM, $n = 3$. (b) GPx activity. Each bar represents the mean \pm SD, $n = 4-5$. * $P < 0.05$ vs. adipocyte group, using one-way ANOVA followed by the post-hoc test.

【考察】

ベルベリン濃度 5 μ M より脂肪滴の減少、TG の低下が認められた。また、ベルベリンは脂肪滴の蓄積および PPAR γ の発現を減少させ、脂肪細胞への分化を抑制したという報告もある⁴²⁾。本研究では、ベルベリンは脂肪細胞の分化マーカーである

C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ および脂肪細胞特異的に発現する遺伝子である aP2、FAS の発現を抑制することにより、脂肪細胞への分化を抑制することが示唆された。

ベルベリンによる活性酸素種の抑制作用が認められ、機序として抗酸化酵素である GPx の増加によることが示唆された。また、アディポカインであるレジスチンおよびレプチンの mRNA 発現量も低下しており、ベルベリンの濃度依存的な脂肪細胞分化抑制作用が確認された。レジスチンは、3T3-L1 細胞では C/EBPs と PPAR γ を介して産生され⁴³⁻⁴⁵⁾、また、D'Aplito⁴⁶⁾らは 3T3-L1 細胞において活性酸素種の増加とともにレジスチンの発現増加を報告しており、本実験の結果でもベルベリンにより分化抑制および活性酸素種の低下にともないレジスチンの発現が低下していることが考察された。また、レプチンは脂肪細胞から発現することから、ベルベリン添加による脂肪細胞の減少により、レプチン産生が低下したものと考察される⁴⁷⁾。

総括

SHR においてベルベリンの 8 週間経口投与により血圧の低下の影響なしに腎障害の軽減作用が認められたことを新規に示し、血圧低下以外の因子がベルベリンによる腎障害軽減に関与している可能性を示した。

また、ベルベリンを投与した SHR では体重増加が抑制され、後腹膜脂肪、腸間膜脂肪のより大きい減少が関与していることが新たに示唆された。ベルベリンの添加により 3T3-L1 細胞の脂肪滴、TG が濃度依存的に減少することが確認され、脂肪細胞特異的に発現する遺伝子の発現抑制の関与が示唆された。また、ベルベリンの添加により 3T3-L1 脂肪細胞における活性酸素種の濃度依存的減少が新規に認められ、酸化ストレス改善作用は抗酸化酵素である GPx の上昇が原因であることが推察された。

近年 Zhang ら⁴⁸⁾は肥満マウスを用いて、ベルベリンにエネルギー消費増加や褐色脂肪の活性化による体重増加制限を報告しており、また Pérez-Rubio ら⁴⁹⁾は、ヒトの臨床研究においてインスリン受容体の感受性増大、腹囲周囲脂肪の減少および収縮期血圧、TG を顕著に減少したと報告している。さらに、Knight ら⁵⁰⁾は、SHR において高脂肪食によって腎障害の亢進が認められたが、抗酸化酵素誘導剤による酸化ストレスの軽減および腎障害の軽減を報告している。今後、酸化ストレス改善作用を有するベルベリンを用いた脂肪組織の減少と腎臓障害の関与について、さらに詳細に検討するため肥満モデル動物を用いて調べる必要がある。

以上の結果から、ベルベリンには腎障害の軽減作用および肥満を基盤とした生活習慣病に有用である可能性が示唆された。

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御教示賜りました武庫川女子大学薬学部 健康機能解析学研究室 池田克巳教授に深く感謝し、心より御礼申し上げます。

本論文を作成にあたり、御懇切なる御指導、御助言を賜りました武庫川女子大学薬学部 衛生化学研究室 西川淳一教授、循環機能制御学研究室 篠塚和正教授、東洋医薬学研究室 高明教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、有益な御助言、御支援を賜りました武庫川女子大学薬学部 健康機能解析学研究室 根岸裕子助教に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導と御鞭撻を賜りました武庫川女子大学薬学部 薬学教育推進センター 安井菜穂美講師に心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、多大なる御指導と御鞭撻を賜りました北京中医薬科大学 Jian-ning Sun 教授、及び Shi-fen Dong 先生に心より感謝申し上げます。

最後に、研究を遂行するにあたり、実験に御協力を頂いた武庫川女子大学薬学部 健康機能解析研究室内の皆様に感謝致します。

引用文献

- (1) Ikram M. Berberis. A review on the chemical and pharmacological aspects of genus Berberis. *Planta Medica*, **28**, 353-358. (1975)
- (2) Zhou J, Zhou S, Tang J, Zhang K, Guang L, Huang Y, Xu Y, Ying Y, Zhang L, Li D. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*, **606**, 262-268. (2009)
- (3) Dong SF, Hong Y, Liu M, Hao YZ, Yu HS, Liu Y, Sun JN. Berberine attenuates cardiac dysfunction in hyperglycemic and hypercholesterolemic rats. *Eur J Pharmacol*, **660**, 368-374. (2011)
- (4) Cicero AF, Tartagni E, Ertek S. Nutraceuticals for metabolic syndrome management: from laboratory to benchside. *Curr Vasc Pharmacol*, **12**, 565-571. (2014)
- (5) Hultström M. Development of structural kidney damage in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, **30**, 1087-1091. (2012)
- (6) Lazaro A, Gallego-Delgado J, Justo P, Esteban V, Osende J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J. Long-term blood pressure control prevents oxidative renal injury. *Antioxidance and Redox Signaling*, **7**, 1285-1293. (2005)
- (7) Kshimoto A, Dong S, Negishi H, Yasui N, Sun JN, Ikeda K. Effects of Berberine on Adipose Tissues and Kidney Function in 3T3-L1 Cells and Spontaneously Hypertensive Rats. *Natural Product Communications*, **10**(9) 1543-1546. (2015)
- (8) Ookawara T, Kizaki T, Takayama E, Imazeki N, Matsubara O, Ikeda Y, Suzuki K, Li Ji L, Tadakuma T, Taniguchi N, Ohno H. Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **296**, 54-61. (2002)
- (9) Kobayashi H, Matsuda M, Fukuhara A, Komuro R, Shimomura I. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, **296**, 1326-1334. (2009)

- (10) Dong S, Yasui N, Negishi H, Kishimoto A, Sun JN, Ikeda K. Increased Oxidative Stress in Cultured 3T3-L1 Cells was Attenuated by Berberine Treatment. *Natural Product Communications*, **10**, 895-897. (2015)
- (11) Amin AH, Subbaiah TV, Abbasi KM. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. *Can J Microbiol*, **9**, 1067-76. (1969)
- (12) UKITA T, MIZUNO D, TAMURA T. Studies on the antibacterial properties of berberinium chloride. *Jpn J Exp Med*, **2**, 103-8. (1949)
- (13) Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, **44**(3), 248-252. (2004)
- (14) Clayton L, Hiley C, Davies S, D'Souza R, Jones P, Strange R, Aber G. Glomerular injury induced by hydrogen peroxide: modifying influence of ACE inhibitors. *Free Radic Res Commun*, **17**(4), 271-278. (1992)
- (15) Wan X, Chen X, Liu L, Zhao Y, Hung WJ, Zhang Q, Miao GG, Chen W, Xie HG, Cao CC. Berberine ameliorates chronic kidney injury caused by atherosclerotic renovascular disease through the suppression of NFκB signaling pathway in rats. *PLoS One*, **8**, e59794. (2013)
- (16) Chen Y, Wang Y, Zhang J, Sun C, Lopez A. Berberine improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rats in association with multiple factors of insulin resistance. *ISRN Endocrinology*, 519371. (2011)
- (17) Zhang X, Zhao Y, Zhang M, Pang X, Xu J, Kang C, Li M, Zhang C, Zhang Z, Zhang Y, Li X, Ning G, Zhao L. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats. *PLoS One*, **7**, e42529. (2012)
- (18) Teodoro JS, Duarte FV, Gomes AP, Varela AT, Peixoto FM, Rolo AP, Palmeira CM. Berberine reverts hepatic mitochondrial dysfunction in high-fat fed rats: a possible role for SirT3 activation. *Mitochondrion*, **13**, 637-646. (2013)
- (19) Xie X, Chang X, Chen L, Huang K, Huang J, Wang S, Shen X, Liu P, Huang H. Berberine ameliorates experimental diabetes-induced renal inflammation and fibronectin by inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling.

- Molecular and Cellular Endocrinology*, **381**, 56-65. (2013)
- (20) Liu L, Liu J, Huang Z, Yu X, Zhang X, Dou D, Huang Y. Berberine improves endothelial function by inhibiting endoplasmic reticulum stress in the carotid arteries of spontaneously hypertensive rats. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **458**, 796-801. (2015)
- (21) Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H, Nishimura S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res*, **12**(4), 2127-2136. (1984)
- (22) Negishi H, Njelekela M, Ikeda K, Sagara M, Noguchi T, Kuga S, Kanda T, Liu L, Nara Y, Tagami M, Yamori Y. Assessment of in vivo oxidative stress in hypertensive rats and hypertensive subjects in Tanzania, Africa. *Hypertens Res*, **23**(3), 285-289. (2000)
- (23) Guo Z, Sun H, Zhang H, Zhang Y. Anti-hypertensive and renoprotective effects of berberine in spontaneously hypertensive rats. *Clinical Experimental Hypertension*, **13**, 1-8. (2015)
- (24) de Champlain J, Wu R, Girouard H, Karas M, EL Midaoui A, Laplante MA, Wu L. Oxidative stress in hypertension. *Clinical Experimental Hypertension*, **26**, 593-601. (2004)
- (25) Liu Y, Yasui N, Kishimoto A, Sun JN, Ikeda K. Antioxidant action of solid preparation of Xingnaojing in SHRSP. *Natural Product Communications*, **8**, 627-628. (2013)
- (26) Liu W, Liu P, Tao S, Deng Y, Li X, Lan T, Zhang X, Guo F, Huang W, Chen F, Huang H, Zhou SF. Berberine inhibits aldose reductase and oxidative stress in rat mesangial cells cultured under high glucose. *Arch Biochem Biophys*, **475**(2), 128-34. (2008)
- (27) Liu WH, Hei ZQ, Nie H, Tang FT, Huang HQ, Li XJ, Deng YH, Chen SR, Guo FF, Huang WG, Chen FY, Liu PQ. Berberine ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats by suppression of both oxidative stress and aldose reductase. *Chin Med J (Engl)*, **121**(8), 706-12. (2008)
- (28) Domitrović R, Cvijanović O, Pernjak-Pugel E, Skoda M, Mikelić L,

- Crnčević-Orlić Z. Berberine exerts nephroprotective effect against cisplatin-induced kidney damage through inhibition of oxidative/nitrosative stress, inflammation, autophagy and apoptosis. *Food Chem Toxicol*, **62**, 397-406. (2013)
- (29) Cao J, Inoue K, Sodhi K, Puri N, Peterson SJ, Rezzani R, Abraham NG. High-fat diet exacerbated renal dysfunction in SHR: reversal by induction of HO-1-adiponectin axis. *Obesity (Silver Spring)*, **20**(5):945-53. (2012)
- (30) Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, **130**(12):3122S-3126S. (2000)
- (31) Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr*, **130**(12):3116S-3121S. (2000)
- (32) Green H, Kehinde O. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, **1**, 113-116 (1974)
- (33) Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes*, **9**, 168-181. (1995)
- (34) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, **79**, 1147-1156. (1994)
- (35) Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*, **276**:18464-18471. (2001)
- (36) Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 850-855. (2003)
- (37) Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**:4333-4337. (1998)
- (38) Huang C, Zhang Y, Gong Z, Sheng X, Li Z, Zhang W, Qin Y. Berberine

- inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPAR gamma pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **348**, 571-578. (2006)
- (39) Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, **11**:779-791. (1997)
- (40) Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med*, **226**, 997-1002. (2001)
- (41) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, **114**, 1752-1761. (2004)
- (42) Zhou LB, Chen MD, Wang X, Song HD, Yang Y, Tang JF, Li FY, Xu MY, Chen JL. Effect of berberine on the differentiation of adipocyte. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **83**, 338-340. (2003)
- (43) Liu F, Guo XR, Gong HX, Ni YH, Fei L, Pan XQ, Guo M, Chen RH. A resistin binding peptide selected by phage display inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Chinese Medical Journal (English)*, **119**, 496-503. (2006)
- (44) Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, **409**, 307-312. (2001)
- (45) Haugen F, Jorgensen A, Dreven A, Trayhurn P. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Letters*, **507**, 105-108. (2001)
- (46) D'Apolito M, Du X, Zong H, Catucci A, Maiuri L, Trivisano T, Pettoello-Mantovani M, Campanozzi A, Raia V, Pessin JE, Brownlee M, Giardino I. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest*, **120**, 203-13. (2010)
- (47) Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in

- mammals. *Nature*, **395**, 763-770. (1998)
- (48) Zhang Z, Zhang H, Li B, Meng X, Wang J, Zhang Y, Yao S, Ma Q, Jin L, Yang J, Wang W, Ning G. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue. *Nat Commun*, Nov 25; 5:5493. (2014)
- (49) Pérez-Rubio KG, González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Robles-Cervantes JA, Espinel-Bermúdez MC. Effect of berberine administration on metabolic syndrome, insulin sensitivity, and insulin secretion. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, **11**, 366-369. (2013)
- (50) Knight SF, Yuan J, Roy S, Imig JD. Simvastatin and tempol protect against endothelial dysfunction and renal injury in a model of obesity and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, **298**, F86-F94. (2010)

論文目録

本学位論文は下記の論文により一部構成される。

1) Aya Kishimoto, Shi-fen Dong, Hiroko Negishi, Naomi Yasui, Jian-ning Sun and Katsumi Ikeda. Effects of Berberine on Adipose Tissues and Kidney Function in 3T3-L1 Cells and Spontaneously Hypertensive Rats., *Natural Product Communications* ; 10(9):1543-1546 (2015)

2) Shi-fen Dong, Naomi Yasui, Hiroko Negishi, Aya Kishimoto, Jian-ning Sun and Katsumi Ikeda. Increased Oxidative Stress in Cultured 3T3-L1 Cells was Attenuated by Berberine Treatment., *Natural Product Communications* ; 10(6):895-897 (2015)