

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.008

刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠皮肤纤维化相关指标的影响*

康小龙¹,何承辉^{2△},卢军¹,刘晶¹

(1.新疆医科大学附属中医医院药研室,乌鲁木齐 830000;2.新疆维吾尔自治区药物研究所药剂室,乌鲁木齐 830004)

[摘要] **目的** 研究刺山柑总生物碱对系统性硬皮病(SSc)小鼠 I 型胶原 $\alpha 1$ 链(COL1A1)、纤维连接蛋白(Fn)、血管紧张素 II (Ang II)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)等皮肤纤维化相关指标的影响。**方法** 90 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、青霉胺组及刺山柑总生物碱低、中、高剂量组,每组 15 只。除对照组外,其余各组小鼠背部注射盐酸博莱霉素建立 SSc 模型,成模后刺山柑总生物碱组小鼠背部外敷刺山柑总生物碱乳膏,青霉胺组给予青霉胺灌胃,对照组、模型组背部外敷不含药基质。末次给药后,Western blot 检测皮肤 COL1A1 表达,ELISA 法测定小鼠皮肤 Fn 和血清 Ang II、IL-1 β 水平。**结果** 刺山柑总生物碱中、高剂量可明显降低小鼠皮肤 COL1A1 表达,刺山柑总生物碱高剂量可降低 SSc 小鼠皮肤 Fn 和血清 Ang II 水平($P < 0.05$),对 IL-1 β 没有明显影响($P > 0.05$)。**结论** 刺山柑总生物碱可抑制 SSc 皮肤组织 COL1A1 和 Fn 表达,调节 Ang II 的异常升高,改善 SSc 皮肤纤维化。

[关键词] 刺山柑总生物碱;硬皮病,系统性;I 型胶原 $\alpha 1$ 链;纤维连接蛋白;血管紧张素 II;白细胞介素-1 β **[中图法分类号]** R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3032-03

Effect of capparispinosa total alkaloid on skin fibrosis related indexes in mice with systemic sclerosis*

KANG Xiaolong¹, HE Chenghui^{2△}, LU Jun¹, LIU Jing¹

(1. Department of Medicine Research, Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830000, China; 2. Department of Pharmaceutics, Xinjiang Medicine Research Institute, Urumqi, Xinjiang 830004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of capparispinosa total alkaloid on skin fibrosis related indexes of collagen $\alpha 1$ type I (COL1A1), fibronectin (Fn), angiotensin II (Ang II) and interleukin-1 β (IL-1 β) in mice models with systemic sclerosis (SSc). **Methods** A total of 90 BALB/c mice were divided into the control group, the model group, the penicillamine group and the capparispinosa total alkaloid low-, medium- and high-dose group with 15 cases in each group. Mice models with SSc were established by injections of bleomycin in the back except the control group. After modeling, the capparispinosa total alkaloid groups received external application with capparispinosa total alkaloid cream, the penicillamine group was given penicillamine for gavage; the control and model group received cream without capparispinosa total alkaloid. The expression of COL1A1 was detected by Western blot, and the levels of Fn, Ang II and IL-1 β were measured by ELISA after the last medication. **Results** The expression of COL1A1 significantly decreased in the capparispinosa total alkaloid middle- and high-dose groups, the levels of Fn and Ang II markedly decreased in the capparispinosa total alkaloid high-dose group ($P < 0.05$), but there was no influence on IL-1 β ($P > 0.05$). **Conclusion** Capparispinosa total alkaloid can inhibit the expression of COL1A1 and Fn, regulate the abnormal increase of Ang II, and improve the skin fibrosis of SSc.

[Key words] capparispinosa total alkaloid; scleroderma, systemic; collagen $\alpha 1$ type I; fibronectin; angiotensin II; interleukin-1 β

系统性硬皮病(systemic sclerosis, SSc)是一种结缔组织疾病,表现为过量胶原在皮肤、肺、消化道等内

脏器官沉积,以皮肤和内脏器官纤维化为特征^[1-2]。刺山柑总生物碱系本课题组从新疆地产药材刺山柑

中提取的有效部位,拟用于 SSc 的治疗。本实验观察了刺山柑总生物碱对 SSc 纤维化相关指标 I 型胶原 $\alpha 1$ 链(COL1A1)、纤维连接蛋白(Fn)、血管紧张素 II(Ang II)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 体质量(22.1 \pm 1.9)g 清洁级雌性 BALB/c 小鼠 90 只,购自新疆实验动物研究中心,合格证号:SCXK(新)2015-0027。

1.1.2 药材与试剂 刺山柑药材(新疆麦迪森维药有限公司饮片厂);盐酸博莱霉素粉针剂(日本化药株式会社,批号:430312);青霉胺片(上海信谊药厂,批号:052130503);小鼠 Fn ELISA 试剂盒(上海润裕生物科技有限公司,批号:201601);小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司,批号:201603);小鼠 Ang II ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号:201602);二辛可宁酸蛋白定量试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所,批号:20160320);COL1A1 抗体, β -actin 抗体,HRP 标记兔抗山羊 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自美国 Cell Signaling 公司。

1.1.3 主要仪器 酶标仪、低温离心机(美国 Thermo Fisher 公司);Western blot 设备(美国 Biorad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 SSc 模型的建立及给药方法 BALB/c 小鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、刺山柑总生物碱低(225 mg/kg)、中(450 mg/kg)、高(900 mg/kg)剂量组及阳性药青霉胺(125 mg/kg)组,每组 15 只,博莱霉素皮下注射法建立 SSc 模型^[3-4]:将小鼠背部中央区被毛剃除,盐酸博莱霉素粉针剂用生理盐水配成浓度为 300 μ g/mL 的药液,除对照组背部皮下注射生理盐水外,其余各组注射博莱霉素,30 μ g/d,注射 4 周后,刺山柑总生物碱各剂量组小鼠注射部位外敷刺山柑总生物碱乳膏,青霉胺组给予青霉胺灌胃,对照组、模型组背部外敷不含药乳膏基质,每天 1 次,给药 8 周。

1.2.2 小鼠皮肤 COL1A1 表达检测 给药 8 周后,取小鼠背部皮肤,加入预冷的 RIPA 裂解液,组织匀浆机研磨成组织匀浆,浓度为 10%,冰浴裂解 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,二辛可宁酸试剂盒定量上清液中蛋白水平,调整每孔上样量,使每个加样孔中总蛋白量相同,样品与上样缓冲液混合,95 $^{\circ}$ C 水浴中 10 min 变性蛋白,上样后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至 PVDF 膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h,Tris-HCl-Tween 洗膜后,加入 COL1A1

一抗(按 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,ECL 发光剂显影,以 β -actin 做为内参,Image J 软件扫描条带灰度,比较蛋白相对表达量。

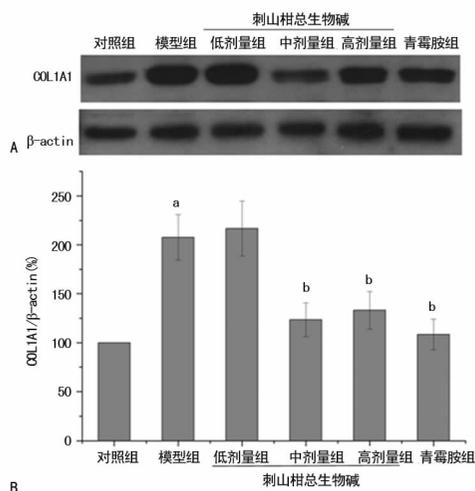
1.2.3 小鼠皮肤 Fn 表达检测 给药 8 周后,取小鼠背部皮肤,加入生理盐水,组织匀浆机研磨成组织匀浆,浓度为 10%,4 000 r/min 离心 10 min 后提取上清液。上清液中 Fn 水平采用 ELISA 试剂盒测定,按试剂盒说明书进行操作,同时用二辛可宁酸蛋白定量试剂盒检测上清液中总蛋白浓度,以每毫升上清液中总蛋白水平校正 ELISA 结果(pg/mg)。

1.2.4 小鼠血清 Ang II 和 IL-1 β 水平检测 给药 8 周后,取血分离血清,Ang II 和 IL-1 β 水平按 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组间均数比较采用方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠皮肤组织 COL1A1 表达水平 与对照组比较,模型组皮肤组织 COL1A1 表达增高($P<0.01$);与模型组比较,刺山柑总生物碱中、高剂量及阳性药青霉胺可降低 COL1A1 表达($P<0.01$),见图 1。



A: Western blot 检测小鼠皮肤 COL1A1 蛋白水平;B: COL1A1 灰度分析;^a: $P<0.01$,与对照组比较;^b: $P<0.01$,与模型组比较

图 1 各组小鼠皮肤 I 型胶原 $\alpha 1$ 链(COL1A1)蛋白水平比较

2.2 各组小鼠皮肤 Fn 表达水平 模型组小鼠皮肤组织 Fn 表达明显高于对照组($P<0.01$);刺山柑总生物碱高剂量组和青霉胺组小鼠 Fn 水平显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);刺山柑总生物碱高剂量组与青霉胺组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.3 各组小鼠血清 Ang II 水平 模型组小鼠血清 Ang II 水平明显高于对照组($P<0.01$);刺山柑总生

物碱高剂量组小鼠血清 Ang II 水平较模型组明显降低($P<0.05$),见表 2。

表 1 各组小鼠皮肤 Fn 水平比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量(mg/kg)	Fn(pg/mg)
对照组		117.55±24.66
模型组		155.82±26.76 ^a
青霉胺组	125	126.72±27.83 ^b
刺山柑总生物碱	225	158.76±30.56
	450	142.59±24.97
	900	132.96±23.48 ^c

^a: $P<0.01$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与模型组比较

表 2 各组小鼠血清 Ang II 水平比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量(mg/kg)	Ang II (pg/mL)
对照组		108.00±19.80
模型组		154.97±22.08 ^a
青霉胺组	125	144.10±22.26
刺山柑总生物碱	225	146.04±20.26
	450	161.78±25.73
	900	134.87±24.86 ^b

^a: $P<0.01$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较

2.4 各组小鼠血清 IL-1 β 水平 模型组小鼠血清 IL-1 β 水平明显高于对照组($P<0.01$);各给药组与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 各组小鼠血清 IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量(mg/kg)	IL-1 β (pg/mL)
对照组		123.33±20.68
模型组		145.81±21.44 ^a
青霉胺组	125	138.97±19.45
刺山柑总生物碱	225	132.75±18.81
	450	135.08±17.65
	900	133.37±23.64

^a: $P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

SSc 是一种表现为多组织炎症和纤维化的慢性自身免疫性疾病,目前认为 SSc 病因是由于过度活化的成纤维细胞(Fb)合成胶原、Fn 和糖胺聚糖等增多,细胞外基质(ECM)沉积,引发组织纤维化^[5-6]。I、III 型前胶原主要由 Fb 合成,SSc I 型前胶原合成较正常 Fb 升高,提示 SSc 以 I 型前胶原增多为主^[7-8]。将硬皮病 Fb 培养至第 15 代,其胶原合成量仍高于正常 Fb,活化的 Fb 过量表达 I 型前胶原,后者客观反映了硬皮病的纤维化程度^[9]。本实验中,SSc 模型组小鼠皮肤组织 COL1A1 和 Fn 表达显著增高,刺山柑总生物碱中、高剂量可明显降低 COL1A1 和 Fn 表达;本

课题组已经证实:刺山柑总生物碱可使 SSc 小鼠真皮厚度变薄^[10],病理结果亦表明 SSc 小鼠皮肤和肺部炎症和纤维化得到明显改善^[11],提示刺山柑总生物碱可能通过抑制 SSc 纤维化形成过程中胶原合成及 Fn 表达,减少 ECM 沉积,改善 SSc 组织纤维化。

研究表明:SSc 患者血清及皮损中 Ang II 水平升高,体外培养的 SSc 患者真皮 Fb 中 Ang II 表达上调,血管紧张素原的合成增加,皮肤及肺 Fb 血管紧张素受体 1(AT1)和 AT2 受体表达上调。Ang II 与 AT1 结合后可诱导 Fb 合成转化生长因子- β ,刺激 α -平滑肌肌动蛋白在 Fb 中表达增高,胶原及 Fn 等 ECM 成分过度合成,促使胶原基质收缩及组织纤维化形成,因此认为 Ang II 异常表达可促进 SSc 组织纤维化的形成^[12]。本研究中,模型组小鼠血清 Ang II 水平升高,刺山柑总生物碱高剂量可降低 SSc 小鼠 Ang II 水平,提示刺山柑总生物碱可能通过降低 Ang II 水平,抑制 SSc 纤维化形成。

自身免疫功能紊乱和炎症反应是 SSc 的病程初期的表现,导致细胞因子网络调节失衡,许多促炎因子如 IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等分泌增加,一方面,Fb 被这些促炎因子激活后合成 ECM 增加;另一方面血管内皮细胞受损后释放促炎因子,后者激活 Fb,最终造成小血管纤维化和组织炎症反应^[13]。因此,抑制 IL-1 β 、TNF- α 等炎症相关因子的合成、分泌,阻断炎症信号转导通路可能在 SSc 早期阶段具有重要的治疗前景。本研究在对各组小鼠血清 IL-1 β 水平检测后表明模型组 IL-1 β 水平明显增高,提示 IL-1 β 可能参与了 SSc 的形成,各受试药组与模型组比较 IL-1 β 水平差异没有显著性意义,提示刺山柑总生物碱可能不能降低升高的 SSc IL-1 β 水平。

本研究表明刺山柑总生物碱可能通过降低 Ang II 水平,抑制 SSc 纤维化形成过程中胶原合成及 Fn 表达,减少 ECM 沉积,改善 SSc 组织纤维化,但刺山柑总生物碱如何降低 Ang II 水平及 Ang II 水平降低后如何调控下游信号通路的传导,从而抑制胶原合成及 Fn 表达等问题目前还不清楚,将成为本课题组今后研究的方向。

参考文献

- [1] 李晶冰,张彩萍,季江,等.阿维 A 对系统性硬皮病成纤维细胞胶原合成及 I 型前胶原 mRNA 表达的影响[J].中国麻风皮肤病杂志,2014,30(7):397-399.
- [2] 闫小宁,张建荣,李文彬,等.温阳除痹汤对硬皮病模型小鼠 CTGF 的影响[J].中国中西医结合皮肤性病杂志,2013,12(1):13-16.
- [3] WU T, CHU H, TU W, et al. Dissection of the mechanism of traditional Chinese medical pre-(下转第 3038 页)

参考文献

- [1] 姜春霞. 宣痹汤对类风湿性关节炎模型小鼠的抗炎、镇痛机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2016.
- [2] 成满福, 刘晓艳. 类风湿性关节炎动物模型及中医病因病机研究概述[J]. 吉林中医药, 2015, 35(11): 1182-1184.
- [3] 高璠, 琚坚, 王伟, 等. 威灵仙总皂苷对实验性非酒精性脂肪性肝炎大鼠氧化应激的干预作用[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(7): 1070-1075.
- [4] 潘建科, 罗斌, 郭达, 等. 龙螫胶囊对膝骨关节炎大鼠 IL-1 β 、IL-6、IL-10 水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1675-1679.
- [5] 赵海梅, 左志琴, 程绍民, 等. 全蝎、蜈蚣对胶原诱导型关节炎大鼠小肠黏膜 IL-2、IL-4、IL-10 表达及关节损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 80-83.
- [6] 缪成贵, 刘健, 张永和, 等. 滁菊总黄酮调控类风湿性关节炎模型大鼠滑膜组织 Wnt 通路 SFRP4 表达[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(7): 715-721.
- [7] 黄莉, 黄纯兰. 威灵仙总皂苷对 HL60 细胞株体外作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 311-315.
- [8] 郭锦锦, 孙万邦. IL-10 受体及其信号转导研究进展[J]. 临床医学工程, 2012, 19(1): 135-137.
- [9] 齐剑英, 郭荣, 叶贤龙, 等. scBsAb1/17 双特异性抗体对小鼠类风湿性关节炎模型的治疗效果[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(3): 366-371.
- [10] 曲道炜. 桂枝芍药知母汤对 AA 大鼠 COX 信号通路介导的免疫调控研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [11] 沈文文. miR-20a 对 AA 大鼠模型滑膜细胞中 NLRP3 炎症小体的调控作用及其机制的研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2015.
- [12] 汪永忠, 邓龙飞, 韩燕全, 等. 威灵仙总皂苷对佐剂性关节炎(AA)大鼠 IL-6、IL-10 及滑膜中 p-JAK2、p-STAT3 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 86-90.
- [13] 万强, 周凤华, 崔小冰, 等. 小檗碱通过 JNK 通路降低内脏脂肪素诱导人脐静脉内皮细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 的研究[J]. 中草药, 2015, 46(7): 1012-1017.
- [14] 刘铁钢, 于河, 张望, 等. 银菜汤对食积复合流感病毒感染小鼠肠黏膜 sIgA、TNF- α 、IL-10 的作用[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(2): 86-89.
- [15] 苗平, 陆梅生, 张冬青. IL-6/IL-6 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 355-360.
- [16] 郭江燕, 高梓珊, 姜妹妹, 等. IL-17 和 NF- κ B 通路与类风湿性关节炎的相关性研究[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(1): 192-194.
- [17] 郭明, 安高, 封桂英, 等. CD4⁺T 细胞亚群在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(9): 1004-1007.
- [18] 王艳霞. 类风湿性关节炎滑膜淋巴细胞 CD3、CD4、CD8 的表达及意义[D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- (收稿日期: 2018-02-12 修回日期: 2018-05-26)
- (上接第 3034 页)
- scription-Yiqihuoxue formula as an effective anti-fibrotic treatment for systemic sclerosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 224-234.
- [4] HAO Z F, SU Y M, LIU J Y, et al. Astragalus polysaccharide suppresses excessive collagen accumulation in a murine model of bleomycin-induced scleroderma [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(3): 3848-3854.
- [5] BEYER C, DISTLER J H. Morphogen pathways in systemic sclerosis [J]. Curr Rheumatol Rep, 2013, 15(1): 299-306.
- [6] FANG F, OOKA K, SUN X, et al. A synthetic TLR3 ligand mitigates profibrotic fibroblast responses by inducing autocrine IFN signaling [J]. J Immunol, 2013, 191(6): 2956-2966.
- [7] 李晶冰, 张彩萍, 季江, 等. 阿维 A 对系统性硬皮病成纤维细胞胶原合成及 I 型前胶原 mRNA 表达的影响[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2014, 30(7): 397-399.
- [8] 周茂松, 严煜林, 罗虹. 硬皮病皮损 CTGF、COL- I III 的检测及意义[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2008, 22(8): 456-469.
- [9] 闰小宁, 韩世荣, 李文彬, 等. “热敷药”对硬皮病小鼠模型 COL- I、COL- III 蛋白含量的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志, 2011, 10(6): 353-355.
- [10] 康小龙, 何承辉, 田红林, 等. 刺山柑总生物碱乳膏外用对系统性硬皮病小鼠组织纤维化的改善作用[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(1): 32-35.
- [11] 康小龙, 何承辉, 刘晶, 等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠 III 型胶原表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(8): 688-691.
- [12] 宋克敏, 杨蓉娅. 转化生长因子- β 、内皮素-1 及血管紧张素 II 与硬皮病纤维化关系研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2011, 40(3): 184-186.
- [13] BECVAR R, HULEJOVA H, BRAUN M, et al. Collagen degradation products and proinflammatory cytokines in systemic and localized scleroderma [J]. Folia Biol(Praha), 2007, 53(2): 66-68.
- (收稿日期: 2018-02-09 修回日期: 2018-03-26)