

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.004

刺山柑总生物碱对系统性硬皮病 HGF/C-Met 通路的调控作用*

康小龙¹,何承辉^{2△},卢军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)肝细胞生长因子(HGF)/C-Met 通路的调控作用。**方法** 90 只雌性 BALB/c 小鼠分为对照组,SSc 模型组,低(225 mg/kg)、中(450 mg/kg)、高(900 mg/kg)剂量刺山柑总生物碱组及青霉胺组。小鼠皮下注射博来霉素 4 周建立 SSc 模型后,刺山柑总生物碱组背部外敷刺山柑总生物碱乳膏,青霉胺组给予青霉胺灌胃,正常组、SSc 模型组背部外敷不含药乳膏基质,每天 1 次,连续 8 周。Western blot 检测皮肤组织 HGF 表达,ELISA 实验检测小鼠皮肤组织 HGF 和 C-Met 水平。**结果** 中、高剂量刺山柑总生物碱组小鼠 HGF 和 C-Met 表达较 SSc 模型组明显降低($P<0.05$)。**结论** 刺山柑总生物碱可能通过上调 HGF/C-Met 通路改善 SSc 组织纤维化。

[关键词] 刺山柑总生物碱;硬皮病,系统性;纤维化;肝细胞生长因子;C-Met**[中图分类号]** R965.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)14-2353-03

Effects of capparispinosa total alkaloid on hepatocyte growth factor/C-Met signalling pathways in systemic sclerosis*

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

(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 830000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of capparispinosa total alkaloid on hepatocyte growth factor (HGF)/C-Met signalling pathways in systemic sclerosis (SSc). **Methods** A total of 90 female BALB/c mice were divided into the control group, the SSc model group, the low- (225 mg/kg), medium- (450 mg/kg) and high-dose (900 mg/kg) capparispinosa total alkaloid groups and the penicillamine group. Subcutaneous injection of bleomycin was injected in mice for 4 weeks to establish SSc model. The capparispinosa total alkaloid groups received external application with capparispinosa total alkaloid cream, the penicillamine group were given penicillamine for gavage, the control group and the model group received external application without substance with once a day for 8 weeks. The expression of HGF in skin tissue was detected by Western blot and the levels of HGF and C-Met in skin tissue were measured by ELISA. **Results** Compared with the SSc model group, the expressions of HGF and C-Met significantly decreased more in the medium- and high-dose capparispinosa total alkaloid groups ($P<0.05$). **Conclusion** Capparispinosa total alkaloid is effective in treating fibrosis of SSc by up-regulating HGF/C-Met signalling pathways.

[Key words] capparispinosa total alkaloid; scleroderma, systemic; fibrosis; hepatocyte growth factor; C-Met

系统性硬皮病(systemic sclerosis, SSc)是一种结缔组织疾病,临床表现为皮肤和内脏器官纤维化、免疫异常及血管病变^[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成分,拟用于 SSc 的治疗。本实验观察了刺山柑总生物碱对 SSc 组织纤维化密切相关的肝细胞生长因子(hepatocyte

growth factor, HGF)/C-Met 通路的调控作用,以探讨刺山柑总生物碱改善 SSc 组织纤维化的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选取清洁级雌性 BALB/c 小鼠 90

只,平均体质量(22.1 ± 1.9)g,购自新疆实验动物研究中心,合格证号:SCXK(新)2015-0027。

1.1.2 药物 刺山柑药材:新疆麦迪森维药有限公司饮片厂,由新疆药物研究所何江研究员鉴别为正品;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。

1.1.3 试剂 小鼠 HGF ELISA 试剂盒(批号 201503),购自美国 R&D 公司;小鼠 C-Met ELISA 试剂盒(批号 J27030166),购自武汉华美生物科技有限公司;二辛可宁酸蛋白定量试剂盒(批号 20150223),购自江苏碧云天生物技术有限公司。HGF 抗体、 α -tubulin 抗体,购自美国 Santa Cruz 公司;山羊抗兔 IgG-HRP,购自美国 Cell Signaling 公司。

1.1.4 仪器 酶标仪(型号 Multiskan Spectrum)、低温离心机(型号 Multifuge X1R),美国 Thermo Fisher 公司;Western blot 设备(型号 Mini-protean Tetra System),美国 Biorad 公司。

1.2 方法

1.2.1 刺山柑总生物碱的提取 将晒干粉碎的刺山柑果实,加 10 倍体积量 95%乙醇 80℃水浴回流提取 30 min,提取 2 次,过滤,滤液备用,两次的滤液减压浓缩至药材:药液(g/g)质量比为 2:1。提取物浓缩干燥后经紫外分光光度法(UV)测得刺山柑总生物碱水平为 32.0%(w/w),高效液相色谱法(HPLC)测得盐酸水苏碱水平为 2.2%(w/w)。

1.2.2 刺山柑总生物碱乳膏制备方法 在水浴中将白凡士林、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸、月桂氮卓酮加热至 90℃使其熔融,作为油相;水浴加热刺山柑总生物碱提取物浓缩液与甘油混合物,温度达到 90℃时作为水相;乳化剂为在适量水中加入羟基苯甲酸乙酯、十二烷基硫酸钠,水浴加热使其溶解;当水相、油相温度降至 85℃时,依次将水相和乳化剂加入油相中,边加边搅拌至乳化完全。

1.2.3 小鼠 SSc 模型的建立及给药方法 90 只 BALB/c 小鼠,分为对照组、SSc 模型组、低(225 mg/kg)、中(450 mg/kg)、高(900 mg/kg)剂量刺山柑总生物碱组及青霉胺(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,刺山柑总生物碱乳膏外敷低、中、高刺山柑总生物碱组小鼠背部,青霉胺组还给予青霉胺灌胃,对照组和 SSc 模型组外敷不含药基质乳膏,每天 1 次,连续给药 8 周。

1.2.4 Western blot 检测小鼠皮肤组织 HGF 表达 给药 8 周后,取小鼠背部皮肤,加入预冷的 RIPA

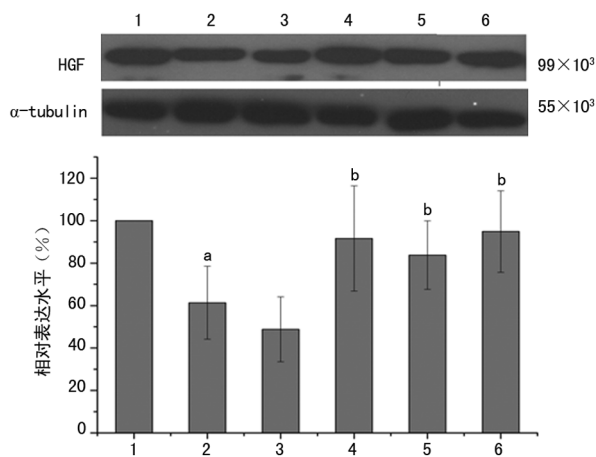
裂解液,组织匀浆机研磨成组织匀浆,冰浴裂解 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,二辛可宁酸试剂盒定量上清液中蛋白水平,调整每孔上样量,使每个加样孔中总蛋白量相同,样品与上样缓冲液混合,95℃水浴中 10 min 变性蛋白,上样后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后电转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h,Tris-HCl-Tween 洗膜后,加入 HGF 一抗(按 1:1 000 稀释),4℃孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,ECL 发光剂显影,以 α -tubulin 作为内参,Image J 软件扫描条带,比较蛋白相对表达水平。

1.2.5 ELISA 实验检测小鼠皮肤组织 HGF 和 C-Met 水平 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,4 000 r/min 离心 10 min 后提取上清液。上清液中 HGF 和 C-Met 水平采用 ELISA 试剂盒测定,以每毫升上清液中总蛋白水平(二辛可宁酸蛋白定量试剂盒测定)浓度校正 ELISA 结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 SNK-*q* 法,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 HGF 表达比较 Western blot 结果显示,与对照组比较,SSc 模型组小鼠皮肤组织 HGF 表达减弱($P < 0.01$);与 SSc 模型组比较,中、高剂量刺山柑总生物碱组及青霉胺组小鼠皮肤组织 HGF 表达增强($P < 0.05$),见图 1。ELISA 结果显示,与对照组比较,SSc 模型组小鼠皮肤组织 HGF 水平明显降低($P < 0.01$);与 SSc 模型组比较,中、高剂量刺山柑总生物碱组及青霉胺组 HGF 水平明显升高($P < 0.05$);中、高剂量刺山柑总生物碱组及青霉胺组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。



1:对照组;2:SSc 模型组;3:低剂量刺山柑总生物碱组;4:中剂量刺山柑总生物碱组;5:高剂量刺山柑总生物碱组;6:青霉胺组;a: $P < 0.01$,与对照组比较;b: $P < 0.05$,与 SSc 模型组比较

图 1 各组小鼠皮肤组织 HGF 表达比较

2.2 各组小鼠皮肤组织 C-Met 水平比较 与对照组比较,SSc 模型组小鼠皮肤组织 C-Met 水平明显降低 ($P < 0.01$);与 SSc 模型组比较,中、高剂量刺山柑总生物碱组及青霉素组小鼠皮肤组织 C-Met 水平升高 ($P < 0.05$),中、高剂量刺山柑总生物碱组及青霉素组之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠皮肤组织 HGF 及 C-Met 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	HGF(pg/mgprot)	C-Met(ng/mgprot)
对照组	873.33 ± 71.13	313.76 ± 41.79
SSc 模型组	710.25 ± 67.65 ^a	255.62 ± 30.53 ^a
低剂量刺山柑总生物碱组	737.36 ± 68.15	266.96 ± 31.06
中剂量刺山柑总生物碱组	768.39 ± 51.74 ^b	292.09 ± 32.79 ^b
高剂量刺山柑总生物碱组	808.44 ± 60.84 ^b	284.90 ± 34.95 ^b
青霉素组	790.16 ± 68.75 ^b	300.70 ± 26.93 ^b

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

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 是由于过度活化的成纤维细胞合成胶原、纤维连接蛋白和糖胺聚糖等增多,细胞外基质沉积,引发组织纤维化^[5-6]。

HGF 主要由内皮细胞、间质成纤维细胞、肾小球系膜细胞等间质来源的细胞生成。HGF 通过与细胞膜上特异性受体 C-Met 结合,激活下游信号通路后发挥其生物学作用,HGF 是一种抗纤维化细胞因子,它通过抑制纤维化和促进血管生成,在修复受损的组织中起一定作用^[7]。HGF 通过抑制胶原生成,诱导成纤维细胞凋亡,降解细胞外基质等作用而发挥抗纤维化作用^[8-9]。

在 SSc 的研究中表明 HGF/C-Met 通路具有明显的抗纤维化作用。IWASAKI 等^[10]证实转染 HGF 基因后紧皮型(TSK/+)小鼠的皮肤硬化得到明显改善;WU 等^[11]研究发现用人类 HGF 基因转染至经博来霉素处理过的小鼠,不仅可以阻止皮肤硬化和肺纤维化进程,而且能有效改善皮肤硬化症状;KAWAGUCHI 等^[12]证实 HGF 能抑制 SSc 成纤维细胞胶原产生;SHERRIFF 等^[13]也发现 SSc 成纤维细胞 I 型胶原及结缔组织生长因子的合成可被 HGF 抑制;BOGATKEVICH 等^[14]研究发现美国非洲裔 SSc 患者支气管肺泡灌洗液、血清及体外肺成纤维细胞培养基中 HGF 浓度较白种人显著降低,且 HGF 诱导的成纤维细胞 C-Met 受体磷酸化水平在非洲裔 SSc 患者也明显低于白种人,推测这可能是美国的非洲裔 SSc 患者病情较重及预后差的原因,同时也表明 HGF/C-Met 与 SSc 病程密切相关。本研究也发现 SSc 模型组小

鼠皮肤组织 HGF 和 C-Met 表达较对照组明显减少,中、高剂量刺山柑总生物碱组 HGF 和 C-Met 表达较对照组明显增多,而与青霉素组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),提示刺山柑总生物碱对 SSc HGF 与 C-Met 水平的异常降低有一定升高作用,其作用与青霉素相当。

综上所述,本实验发现刺山柑总生物碱可增加 SSc 小鼠皮肤组织 HGF 和 C-Met 表达,本课题组已经证实:给 SSc 小鼠外用刺山柑总生物碱乳膏后,小鼠皮肤、肺组织炎症和纤维化等病理改变得到改善^[15],增厚的真皮鳞状上皮变薄,并可下调皮肤组织羟脯氨酸及 I、III 型胶原表达^[15-16],提示刺山柑总生物碱可能通过上调 HGF/C-Met 通路,抑制胶原生成,降解细胞外基质,改善 SSc 皮肤纤维化。

参考文献

- [1] 雷玲,钟小宁,赵斌,等. Th17 细胞及相关细胞因子在系统性硬化病小鼠模型中的表达及意义[J]. 北京大学学报(医学版),2012,44(2):259-264.
- [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 Y, TU W Z, et al. Dissection of the mechanism of traditional Chinese medical prescription-Yiqihuoxue formula as an effective anti-fibrotic treatment for systemic sclerosis[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1):224-231.
- [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 W. Morphogen pathways in systemic sclerosis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2012, 15(1):299-306.
- [6] FANG F, OOKA K, SUN X Y, et al. A synthetic TLR3 ligand mitigates profibrotic fibroblast responses by inducing autocrine IFN signaling[J]. J Immunol, 2013, 191(6):2956-2966.
- [7] UEKI T, KANEDA Y, TSUTSUI H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats[J]. Nat Med, 1999, 5(2):226-230.
- [8] KAWAGUCHI Y, HARIGAI M, HARA M, et al. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor (C-Met) in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis[J]. J Rheumatol, 2002, 29(9):1877-1883.
- [9] MIZUNO S, MATSUMOTO K, LI M Y, et al. HGF reduces advancing lung fibrosis in mice; a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis[J]. FASEB J, 2005, 19(6):580-582.

析其原因可能与益生菌下调血清 DAO、D-LA 水平及 NF- κ B、TNF- α 表达有关。益生菌通过调整肠道内菌群,改变肠道微生态环境,减轻了炎性反应,促进了肠道黏膜屏障功能修复,进而有利于胆汁淤积症状缓解及肝功能恢复。

综上所述,益生菌可通过下调血清 DAO、D-LA 水平及 NF- κ B、TNF- α 表达,减轻炎性反应,修复肠黏膜屏障功能,达到治疗肝内胆汁淤积的目的。

参考文献

- [1] FISCHLER B, LAMIREAU T. Cholestasis in the newborn and infant [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38(3): 263-267.
- [2] 荀蕾, 卢秉久. 痘清颗粒对急性肝内胆汁淤积模型大鼠肝功能的保护作用及其机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(13): 1794-1796.
- [3] 江玲, 单庆文, 王琳琳, 等. 益生菌治疗对婴儿胆汁淤积性肝病肠道菌群及相关细胞因子的影响[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(12): 945-948.
- [4] CUNNINGHAM R S, AHRNÉ S, JOHANN L R, et al. Effect of probiotic bacteria on microbial host defense, growth, and immune function in human immunodeficiency virus type-1 infection[J]. *Nutrients*, 2011, 3(12): 1042-1070.
- [5] 梁惠, 吕锐, 傅泳, 等. 益生菌对大鼠酒精性肝损伤的保护作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(7): 991-997.
- [6] 刘圣烜, 黄志华, 林莉. 益生菌对胆汁淤积性黄疸大鼠小肠上皮细胞紧密连接蛋白的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(5): 434-438.
- [7] 熊小丽, 鄢素琪, 秦欢, 等. 大黄素预处理对幼龄大鼠肝内胆汁淤积的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18(2): 165-171.
- [8] 席明名, 王俐, 汤倩, 等. 茵黄合剂提取物对肝内胆汁淤积模型大鼠胆汁分泌和肝脏功能的改善作用[J]. *中国药房*, 2016, 27(28): 3936-3938.
- [9] KOMATSUZAKI N, SHI M J. Effects of live lactobacillus paracasei on plasma lipid concentration in rats fed an ethanol-containing diet [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(2): 232-237.
- [10] 武岩峰, 张晓磊, 张予心, 等. 益生菌通过调整正常菌群缓解酒精性肝损伤的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(10): 1988-1993.
- [11] 谢基明, 王玉珍, 张威, 等. 益生菌 L. Casei hang 对大鼠急性肝损伤的保护作用及其对 TLR4-ERK-PPAR- γ 通路的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(9): 910-913.
- [12] 顾维, 张启春, 王俐, 等. 茵黄合剂对肝内胆汁淤积大鼠肝脏 GABA 通路及胆汁转运体的影响[J]. *药学与临床研究*, 2017, 25(1): 42-45.
- [13] NEISH A S, GEWIRTZ A T, ZENG H, et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination [J]. *Science*, 2000, 289(5484): 1560-1563.
- [14] MANKERTZ J, TAVALALI S, SCHMITZ H, et al. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(11): 2085-2090.
- [15] DING L L, ZHANG B F, ZHAN C S, et al. Danning tablets attenuates α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis by modulating the expression of transporters and metabolic enzymes [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14(1): 249.

(收稿日期: 2019-01-10 修回日期: 2019-04-02)

(上接第 2355 页)

- [10] IWASAKI T, IMADO T, KITANO S, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates dermal sclerosis in the tight-skin mouse model of scleroderma [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): R161-167.
- [11] WU M H, YOKOZEKI H, TAKAGAWA S, et al. Hepatocyte growth factor both prevents and ameliorates the symptoms of dermal sclerosis in a mouse model of scleroderma [J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(2): 170-180.
- [12] KAWAGUCHI Y, HARIGAI M, HARA M, et al. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor (C-Met) in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29(9): 1877-1883.
- [13] SHERRIFF T R, OHTA A, MORITO F, et al. Antifibrotic effects of hepatocyte growth factor on scleroderma fibroblasts and analysis of its mechanism [J]. *Mod Rheumatol*, 2006, 16(6): 364-371
- [14] BOGATKEVICH G S, LUDWICKA-BRADLEY A, HIGHLAND K B, et al. Impairment of the antifibrotic effect of hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from African Americans: possible role in systemic sclerosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(7): 2432-2442.
- [15] 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.
- [16] 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.

(收稿日期: 2019-01-12 修回日期: 2019-04-04)