

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

康小龙¹, 何承辉², 刘晶¹, 卢军¹, 杨俊玲¹

(1. 新疆医科大学附属中医医院药物研究室, 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 观察刺山柑总生物碱对系统性硬皮病(SSc)小鼠病理及Ⅲ型胶原(COL-Ⅲ)表达的影响。**方法** BALB/c小鼠背部注射盐酸博莱霉素建立SSc模型,给予刺山柑总生物碱进行干预,HE染色观察小鼠皮肤及肺组织病理变化,ELISA法检测小鼠皮肤及肺组织COL-Ⅲ表达水平。**结果** 高剂量刺山柑总生物碱可明显改善SSc小鼠皮肤和肺部炎症及纤维化,降低COL-Ⅲ表达水平($P < 0.05$)。**结论** 刺山柑总生物碱对SSc组织纤维化有一定改善作用。

关键词 刺山柑总生物碱; 系统性硬皮病; 病理; Ⅲ型胶原; 纤维化**中图分类号** R965.1 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646(2016)08-0688-04**网络出版地址****DOI:** 10.12007/j.issn.0258-4646.2016.08.004

Effects of Capparis Spinosa Total Alkaloid on Type III Collagen Expression in Systemic Sclerosis Mice

KANG Xiaolong¹, HE Chenghui², LIU Jing¹, LU Jung¹, YANG Junling¹

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

Abstract Objective To investigate the effects of cappariss spinosa total alkaloid on the pathological changes and the type III collagen (COL-III) expression in systemic sclerosis (SSc) mice. **Methods** Mice models with SSc were established by repeated local injection of bleomycin in BALB/c mice back. After administration of cappariss spinosa total alkaloid, the pathological changes of skin and lung tissue were observed, and the COL-III expression was detected by ELISA. **Results** Compared with the model group, the inflammation and fibrosis of skin and lung tissue were improved, and the level of COL-III was markedly reduced by treatment of high dose cappariss spinosa total alkaloid ($P < 0.05$). **Conclusion** Capparis spinosa total alkaloid is effective in treating fibrosis of SSc.

Keywords Capparis spinosa total alkaloid; systemic sclerosis; pathological change; type III collagen; fibrosis

系统性硬皮病(systemic sclerosis, SSc)是一种病因不明的结缔组织病,表现为不同程度的皮肤硬化和内脏器官纤维化^[1]。在我国,SSc的发病率高,病因及发病机制复杂,治疗手段有限。刺山柑(Capparis spinosa L.)又名槌果藤、野西瓜、老鼠瓜,为白花菜科(Capparaceae)山柑属(Capparis L.)植物,系维吾尔医传统药材。本研究组从刺山柑中提取了有效成分刺山柑总生物碱,拟用于治疗SSc。本研究通过观察刺山柑总生物碱对SSc小鼠病理及Ⅲ型胶原(type III collagen, COL-Ⅲ)表达的影响,探讨其抗SSc组织纤维化的疗效。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:清洁级BALB/c小鼠,体质量18~24 g,由新疆实验动物研究中心提供,合格证号:SCXK(新)2003-0002。

1.1.2 主要试剂: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COL-Ⅲ ELISA试剂盒(上海江莱生物科技公司,批号:201502);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:20150223)。

刺山柑总生物碱乳膏:将刺山柑总生物碱与基质混匀,基质为硬脂酸、白凡士林、单硬脂酸甘油酯、月桂氮卓酮,于水浴加热至90℃使熔融,做为油相;甘油与浓缩液混合于水浴,加热至90℃,做为水相;十二烷基硫酸钠、对羟基苯甲酸乙酯溶于适量

基金项目:国家自然科学基金(81260235)**作者简介:**康小龙(1975-),男,副主任药师,博士。**通信作者:**何承辉, E-mail: 408705201@qq.com**收稿日期:**2015-05-11**网络出版时间:**

水中,于水浴加热,使溶解为乳化剂,当油相、水相温度降至 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。

1.1.3 主要仪器:酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 SSc 模型的复制及给药方法:将 90 只清洁级雌性 BALB/c 小鼠随机分为空白对照组、模型组、青霉素组(125 mg·kg⁻¹)、刺山柑总生物碱低、中、高剂量(225、450、900 mg·kg⁻¹)组,每组 15 只。实验前用剃毛刀将小鼠背部毛剃除。除空白对照组外,其余各组用生理盐水将盐酸博莱霉素粉针剂稀释至 300 μg·mL⁻¹,注射入小鼠背部皮下,空白对照组小鼠背部皮下注射生理盐水,1次/d,0.1 mL/次,共 4 周。观察小鼠背部注射部位皮肤是否出现皮肤增厚、弹性变差等变化。注射 4 周后,刺山柑总生物碱低、中、高剂量组小鼠背部外敷刺山柑总生物碱乳膏,青霉素组给予青霉素灌胃,空白对照组、模型组背部外敷不含药基质,1次/d,连续 8 周。

1.2.2 病理组织切片制作:末次给药后 4 h,取小鼠背部注射区皮肤及肺组织,置于组织固定液中固定,HE 染色,观察病理组织形态学改变。

1.2.3 小鼠皮肤及肺组织 COL-Ⅲ 含量测定:末次给药后 4 h,取小鼠背部注射区皮肤及肺组织制成 10% 组织匀浆,制备好的匀浆以 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,提取上清液分装。首先用二辛可宁酸蛋白定

量试剂盒测定皮肤及肺组织匀浆中蛋白浓度,ELISA 试剂盒检测匀浆液中 COL-Ⅲ 含量,操作按试剂盒说明书进行,测定结果以每毫升匀浆液中蛋白含量(pg/mg prot)进行校正。

1.3 统计学分析

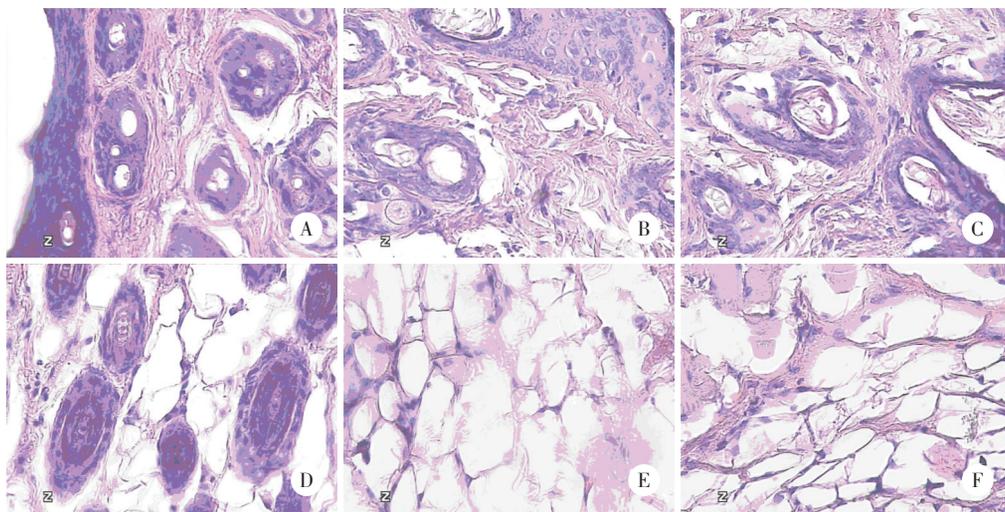
采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 刺山柑总生物碱对 SSc 小鼠皮肤和肺组织病理形态学的影响

小鼠皮肤组织病理切片 HE 染色(图 1)显示:空白对照组胶原纤维分布正常,真皮层、真皮下层血管壁结构正常,毛囊、皮脂腺分布均匀,脂肪层结构正常;模型组皮肤厚度明显增厚,胶原纤维增生,真皮下层血管增粗,血管壁明显变薄,血管闭塞,毛囊、皮脂腺明显减少,脂肪层变薄、消失,并伴有炎性细胞浸润。刺山柑总生物碱低、中剂量组可见胶原纤维增生,排列紧密,真皮鳞状上皮稍增生,真皮下毛细血管壁增厚,毛囊、皮脂腺减少,伴有少量炎性细胞浸润;刺山柑总生物碱高剂量组和青霉素组可见真皮鳞状上皮变薄,胶原纤维明显减少、排列疏松、均质化,皮脂腺增多,炎性细胞浸润明显减少。

小鼠肺组织病理切片 HE 染色(图 2)显示:空白



A, control group; B, model group; C, low dose group; D, moderate dose group; E, high dose group; F, Penicillamine group.

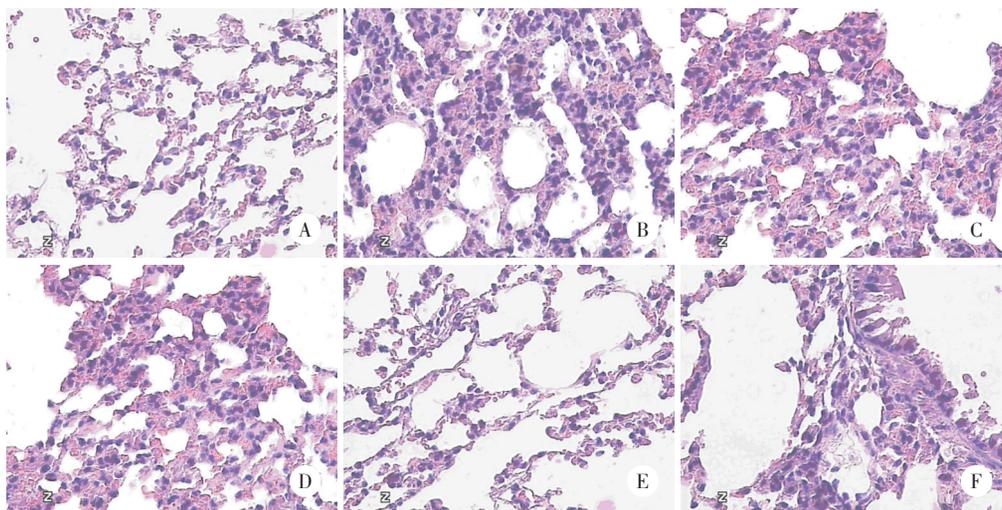
图 1 刺山柑总生物碱对 SSc 小鼠皮肤组织病理形态学的影响 HE ×40

Fig.1 Effects of Capparis spinosa total alkaloid on the pathological change of skin tissue in systemic sclerosis mice HE ×40

对照组肺结构完整,小血管壁结构未见异常,无明显炎性细胞浸润;模型组肺泡及细支气管内炎性渗出,肺泡间隔增厚,肺泡腔狭窄,大量单核细胞、淋巴细胞浸润,小血管壁增厚,肺泡内出血,炎性细胞浸润;刺山柑总生物碱低剂量组肺泡间隔增厚,可见大量单核细胞浸润,小血管壁增厚,肺泡内出血,

炎性细胞浸润;刺山柑总生物碱中、高剂量组及青霉胺组肺泡间隔增厚明显改善,可见少量单核细胞浸润,小血管壁增厚,炎性细胞浸润明显减少。提示高剂量刺山柑总生物碱能明显改善SSc小鼠皮肤和肺部的炎症和纤维化。

2.2 刺山柑总生物碱对SSc小鼠皮肤及肺组织COL-



A, control group; B, model group; C, low dose group; D, moderate dose group; E, high dose group; F, Penicillamine group.

图2 刺山柑总生物碱对SSc小鼠肺组织病理形态学的影响 HE×40

Fig.2 Effects of Capparis spinosa total alkaloid on the pathological change of lung tissue in systemic sclerosis mice HE×40

III表达的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠皮肤及肺组织中COL-III表达明显增高($P < 0.01$);与模型组小鼠比较,高剂量刺山柑总生物碱组和青霉胺组小鼠皮

肤组织COL-III表达水平降低($P < 0.05$),且后两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。中、高剂量刺山柑总生物碱和青霉胺可降低小鼠肺组织中COL-III表达水平($P < 0.01$)。见表1。

表1 刺山柑总生物碱对SSc小鼠皮肤及肺组织COL-III表达的影响

Tab.1 Effects of Capparis spinosa total alkaloid on type III collagen expression in systemic sclerosis mice

Group	n	Skin COL-III (pg/mg prot)	Lung COL-III (pg/mg prot)
Control	15	6.05±1.17	3.23±0.49
Model	15	9.27±2.42 ¹⁾	4.12±0.88 ¹⁾
Penicillamine	15	7.17±1.10 ³⁾	3.16±0.24 ³⁾
Capparis spinosa total alkaloid			
Low dose	15	8.18±1.58	4.23±0.80
Moderate dose	15	7.69±1.91	3.28±0.27 ³⁾
High dose	15	7.24±1.68 ²⁾	3.43±0.14 ³⁾

1) $P < 0.01$ vs control group; 2) $P < 0.05$, 3) $P < 0.01$ vs model group.

3 讨论

SSc是一种以多组织器官广泛纤维化为特征的

炎性自身免疫性结缔组织疾病。最早出现的病理改变是外周微血管损伤,继而活化成纤维细胞合成过多的胶原蛋白和细胞外基质(extracellular matrix,

ECM),导致组织的广泛纤维化。肺脏是最常发生纤维化的器官之一,其病因和发病机制尚不清楚,血管破坏、胶原聚集、免疫活化是3个主要因素^[2]。

维吾尔族传统药物刺山柑具有祛风、散寒、除湿、消肿、止痛的作用^[3],研究表明,刺山柑对SSc、银屑病等有明显治疗效果^[4]。刺山柑乙醇提取物可抑制SSc患者成纤维细胞增殖及I型胶原的合成^[5];刺山柑鲜果75%乙醇调制的糊膏以及刺山柑流浸膏均能显著抑制SSc模型小鼠的真皮增厚、胶原沉积^[6]。李凡等^[7]用刺山柑治疗6例SSc患者,获得了较满意的疗效。刺山柑总生物碱系本研究组从刺山柑中提取的有效成分,本实验观察了它对SSc小鼠皮肤和肺组织病理形态学的影响,结果表明,高剂量(900 mg·kg⁻¹)刺山柑总生物碱可明显改善SSc小鼠皮肤和肺部炎症及纤维化,可能对治疗SSc具有一定效果。

SSc的发病机制复杂,主要组织病理特点是皮肤真皮层增厚,ECM合成增多。胶原合成过多,降解减少,大量胶原纤维在皮肤、肺、消化道等组织器官的沉积是SSc的主要病理过程之一。成纤维细胞是合成胶原蛋白等ECM的主要细胞^[8],其胶原合成异常增多是SSc的重要环节^[9]。COL-Ⅲ是ECM的主要成分,是反映胶原代谢的主要参数^[10]。体外培养显示,SSc患者皮损组织成纤维细胞COL-Ⅲ mRNA表达明显多于正常皮肤,说明SSc患者成纤维细胞的胶原合成量增加,结缔组织的异常代谢是SSc发病机制的重要环节^[11]。本研究结果表明,高剂量刺山柑总生物碱能明显降低SSc小鼠皮肤及肺组织中COL-Ⅲ的表达,提示刺山柑总生物碱可能通过抑制胶原表达,减少ECM合成,改善SSc组织纤维化。动物实验的结果为刺山柑总生物碱的新药开发奠定

了基础。

参考文献:

- [1] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0709.2013.01.004.
- [2] 徐清,罗龙飞,雷铁池. 系统性硬皮病伴纤维化改变机制研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2013, 42(6): 383-385. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4963.2013.06.030.
- [3] 李凡,陶娟,涂亚庭. 刺山柑乳膏治疗银屑病的临床观察[J]. 中国医药, 2013, 8(10): 1453-1454.
- [4] 李凡,陶娟,涂亚庭. 刺山柑软膏抗炎止痒作用评价[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2014, 30(3): 166-168.
- [5] 曹越兰,李欣,郑敏. 槲果藤对进行性系统性硬化症患者成纤维细胞增殖和I型胶原产生的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(5): 560-563. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5302.2008.05.019.
- [6] 曹越兰,李欣,王群. 槲果藤对硬皮病小鼠模型皮肤硬化抑制作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 215-217. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5302.2008.02.033.
- [7] 李凡,阿曼古力,阿不里克木江,等. 维吾尔药槲果藤治疗硬皮病6例[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(1): 53-54.
- [8] 吕芹,卞华,陈志国,等. 温阳化浊通络方含药血清对硬皮病成纤维细胞胶原分泌和TGF-β1表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 184-187.
- [9] 高地,朱鹭冰,李明. 细胞因子TGFβ1, CTGF和IFN-γ对系统性硬皮病克隆成纤维细胞胶原代谢的影响[J]. 中国皮肤性病杂志, 2012, 26(1): 9-11, 35.
- [10] 闫小宁,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杂志, 2011, 10(6): 353-355.
- [11] 谢志军,曹灵勇,温成平,等. 温阳通络方对硬皮病成纤维细胞I、Ⅲ型胶原及MMP-1 mRNA的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2011, 21(5): 295-297, 299. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4561.2011.05.002.

(编辑 王又冬)