

刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠 基质金属蛋白酶及其抑制剂的影响

康小龙¹, 刘晶¹, 何承辉², 卢军¹, 杨俊玲¹

1.新疆医科大学附属中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所, 新疆 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IV型胶原(Col-IV)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)和纤溶酶原激活物抑制因子-1(PAI-1)水平的影响,探讨其抗SSc组织纤维化的作用机制。**方法** BALB/c小鼠90只随机分为空白对照组、模型组、青霉胺组及刺山柑总生物碱低、中、高剂量组。除空白对照组外,其余各组小鼠背部注射盐酸博来霉素建立SSc模型。成模后刺山柑总生物碱组小鼠背部外敷不同剂量刺山柑总生物碱乳膏,青霉胺组予青霉胺灌胃,空白对照组、模型组背部外敷不含药基质,每日1次,连续60d。末次给药后,ELISA检测小鼠皮肤Col-IV和血清MMP-9、TIMP-1、PAI-1含量。**结果** 与模型组比较,刺山柑总生物碱中、高剂量组小鼠血清MMP-9含量及MMP-9/TIMP-1比值升高,血清TIMP-1及皮肤Col-IV含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),但对PAI-1水平无明显影响($P>0.05$)。**结论** 刺山柑总生物碱可通过调节MMP-9/TIMP-1失衡,减少Col-IV合成,改善SSc组织纤维化。

关键词: 刺山柑总生物碱; 系统性硬皮病; IV型胶原; 基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶抑制剂-1; 纤溶酶原激活物抑制因子-1; 小鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2016.03.014

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-5304(2016)03-0051-03

Effects of Capparis Spinosa Total Alkaloid on MMP-9 and TIMP-1 Levels in Systemic Sclerosis Mice KANG Xiao-long¹, LIU Jing¹, HE Cheng-hui², LU Jun¹, YANG Jun-ling¹ (1. Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Xinjiang Medicine Research Institute, Urumqi 830004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of capparispinosa total alkaloid on type IV collagen (Col-IV), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in bleomycin-induced systemic sclerosis (SSc) mice; To explore the effective mechanism of capparispinosa total alkaloid on fibrosis of SSc. **Methods** Totally 90 BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, penicillamine group and capparispinosa total alkaloid low-, medium- and high-dose group. Mice models with SSc were established by repeated local injections of bleomycin in mice back, except for the control group. Mice in medication groups received external application with capparispinosa total alkaloid cream; mice in penicillamine group were given penicillamine for gavage; mice in the control and model group received external application without substance, one time a day, for 60 days. The contents of MMP-9, TIMP-1 and PAI-1 in serum and Col-IV in skin tissue were detected respectively by ELISA after the last medication. **Results** Compared with the model group, the levels of MMP-9 and ratio of MMP-9/TIMP-1 markedly increased and the levels of Col-IV and TIMP-1 markedly decreased in medium and high-dose of capparispinosa total alkaloid group ($P<0.05$, $P<0.01$). But the level of PAI-1 was not influenced ($P>0.05$). **Conclusion** Capparispinosa total alkaloid is effective in treating fibrosis of SSc by adjusting imbalance of MMP-9/TIMP-1 and decreasing expression of Col-IV.

Key words: capparispinosa total alkaloid; systemic sclerosis; type IV collagen; MMP-9; TIMP-1; PAI-1; mice

基金项目: 国家自然科学基金(81260235)

通讯作者: 何承辉, E-mail: 408705201@qq.com

系统性硬皮病(systemic sclerosis, SSc)是一种病因不明的慢性多系统疾病,以皮肤组织器官纤维化为特征。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及其抑制剂-1

(TIMP-1) 和纤溶酶原激活物抑制因子-1 (PAI-1) 可能在 SSc 细胞外基质 (ECM) 的合成中起了重要作用。刺山柑 *Capparis spinosa* L. 为白花菜科 Capparaceae 山柑属 *Capparis* L. 植物, 系维吾尔医习用药材之一。前期研究表明, 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^[1]; 刺山柑鲜果 75% 乙醇调制的糊膏及刺山柑流浸膏均能显著抑制硬皮病模型小鼠的真皮增厚、胶原沉积^[2]。本课题组从刺山柑中提取有效部位刺山柑总生物碱, 观察其对 SSc 小鼠 IV 型胶原 (Col-IV)、MMP-9、TIMP-1 和 PAI-1 水平的影响, 探讨其抗 SSc 组织纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及制备

刺山柑药材购自新疆麦迪森维药有限公司饮片厂, 经新疆维吾尔自治区药物研究所何江研究员鉴定为正品; 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。刺山柑总生物碱乳膏制备方法: 将刺山柑总生物碱与基质 (硬脂酸、白凡士林、单硬脂酸甘油酯、月桂氮卓酮) 混匀, 于水浴加热至 90 °C 使熔融, 做为油相; 甘油与浓缩液混合, 于水浴加热至 90 °C 做为水相; 十二烷基硫酸钠、对羟基苯甲酸乙酯溶于适量水中, 于水浴加热使溶解为乳化剂, 当油相、水相温度降至 85 °C 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 动物

8 周龄清洁级 BALB/c 小鼠 90 只, 体质量 18~24 g, 新疆实验动物研究中心, 合格证号 SCXK (新) 2003-0002, 置于清洁级环境, 普通饲料和水饲养。

1.3 主要试剂与仪器

小鼠 MMP-9 ELISA 试剂盒 (批号 201502)、小鼠 TIMP-1 ELISA 试剂盒 (批号 201502), 上海泛科生物科技公司; 小鼠 PAI-1 ELISA 试剂盒 (批号 E11030163), 武汉华美生物科技公司; 小鼠 Col-IV ELISA 试剂盒 (批号 201502), 上海江莱生物科技公司; 二辛可宁酸蛋白定量试剂盒 (批号 20150223), 江苏碧云天生物技术研究所。酶标仪, 美国赛默飞世尔科技公司。

1.4 分组、造模与给药

实验小鼠随机分为空白对照组、模型组、青霉胺组 (125 mg/kg) 和刺山柑总生物碱低 (225 mg/kg)、中 (450 mg/kg)、高 (900 mg/kg) 剂量组, 每组 15 只, 实验前用剃毛刀将背部毛剃除。采用博莱霉素皮

下注射制备 SSc 动物模型^[3], 造模组小鼠背部皮下注射 300 μg/mL, 每日 1 次, 每次 0.1 mL, 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。4 周后, 刺山柑总生物碱组小鼠背部外敷不同剂量的刺山柑总生物碱乳膏, 青霉胺组给予青霉胺灌胃, 空白对照组和模型组背部外敷不含药基质, 1 次/d, 连续 60 d。

1.5 小鼠皮肤 IV 型胶原含量测定

末次给药后 4 h, 取小鼠背部注射区皮肤制成 10% 组织匀浆, 4000 r/min 离心 10 min, 提取上清液分装, 二辛可宁酸蛋白定量试剂盒测定皮肤匀浆液中蛋白浓度, ELISA 试剂盒检测匀浆液中 Col-IV 含量, 操作按试剂盒说明书进行, 测定结果以每 1 mL 匀浆液中蛋白含量进行校正。

1.6 小鼠血清基质金属蛋白酶-9、基质金属蛋白酶抑制剂-1 和纤溶酶原激活物抑制因子-1 含量测定

末次给药后 4 h, 摘除眼球采血, 4000 r/min 离心 10 min, 分离血清, ELISA 试剂盒检测血清中 MMP-9、TIMP-1 和 PAI-1 含量, 按试剂盒说明书进行操作。

1.7 统计学方法

采用 SPSS11.0 统计软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对模型小鼠皮肤 IV 型胶原含量的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠皮肤 Col-IV 含量明显升高 (P<0.01); 与模型组比较, 刺山柑总生物碱各剂量组和青霉胺组皮肤 Col-IV 含量明显降低 (P<0.01)。结果见表 1。

表 1 各组小鼠皮肤 Col-IV 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量/(mg/kg)	Col-IV/(pg/mg)
空白对照组	15		5.03±0.80
模型组	15		10.01±1.02 ^{##}
刺山柑总生物碱低剂量组	15	225	8.62±1.32 ^{**}
刺山柑总生物碱中剂量组	15	450	7.98±0.68 ^{**}
刺山柑总生物碱高剂量组	15	900	7.38±1.09 ^{**}
青霉胺组	15	125	8.14±0.93 ^{**}

注: 与空白对照组比较, ^{##}P<0.01; 与模型组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01 (下同)

2.2 对模型小鼠血清基质金属蛋白酶-9、基质金属蛋白酶抑制剂-1 和纤溶酶原激活物抑制因子-1 含量的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠血清 MMP-9 含量明显降低、TIMP-1 含量明显升高 (P<0.01), PAI-1 含量无明显差异 (P>0.05); 与模型组比较, 刺山柑

总生物碱中、高剂量组和青霉胺组 MMP-9 含量及 MMP-9/TIMP-1 比值升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 刺山柑总生物碱高剂量组和青霉胺组 TIMP-1 含量降低 ($P<0.01$), 刺山柑总生物碱各剂量组和青霉胺组

PAI-1 含量无明显差异 ($P>0.05$); 与青霉胺组比较, 刺山柑总生物碱高剂量组血清 MMP-9、TIMP-1 含量及 MMP-9/TIMP-1 比值无明显差异 ($P>0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组小鼠血清 MMP-9、TIMP-1、PAI-1 含量及 MMP-9/TIMP-1 比值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	剂量/(mg/kg)	MMP-9/(pg/mL)	TIMP-1/(pg/mL)	MMP-9/TIMP-1	PAI-1/(ng/mL)
空白对照组	15		14.44±1.91	7.68±1.62	1.94±0.40	17.84±2.13
模型组	15		8.73±1.97 ^{##}	11.65±1.72 ^{##}	0.77±0.24 ^{##}	19.36±3.60
刺山柑总生物碱低剂量组	15	225	9.60±2.18	12.01±2.30	0.83±0.23	18.33±3.12
刺山柑总生物碱中剂量组	15	450	10.73±2.22 [*]	10.83±2.53	1.04±0.33 [*]	19.16±2.97
刺山柑总生物碱高剂量组	15	900	11.52±2.43 ^{**}	8.38±1.82 ^{**}	1.42±0.40 ^{**}	18.04±2.79
青霉胺组	15	125	12.32±1.84 ^{**}	8.86±1.86 ^{**}	1.45±0.37 ^{**}	16.66±3.79

3 讨论

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是一组锌离子依赖的内肽酶, 是 ECM 降解过程中必不可少的酶类, 几乎能降解 ECM 的所有成分, 其活性可被 TIMPs 抑制, 其中 MMP-9 是 MMPs 家族中的主要成分, 是降解 Col-IV 最主要的酶, MMP-9 受 MMP 相应的负性调节剂 TIMP-1 的抑制, 抑制其对 ECM 的降解, MMP-9 与 TIMP-1 的活性平衡对于维持 ECM 的稳定至关重要。Kikuchi 等^[4]研究显示, SSc 患者血清 MMP-9 活性水平明显降低, 且 MMP-9 含量与调整的 Rodnan 皮肤厚度指数呈负相关, 提示血清 MMP-9 水平可作为 SSc 疾病活动性尤其是皮肤病变严重程度的一个指标。Giannelli 等^[5]检测了 SSc 肺动脉高压患者血清中 MMP-9 含量, 结果肺动脉高压患者的血清 MMP-9 含量显著降低, 经波生坦治疗症状改善后, 再次进行同样检测, 患者血清 MMP-9 含量显著升高, 从而认为升高 MMP-9 活性可能对 SSc 有一定的治疗作用, 这项研究表明 MMP-9 水平可能可用于判断某些药物治疗 SSc 的疗效。Kuroda 等^[6]检测了 SSc 患者和正常人皮肤成纤维细胞 TIMP-1 mRNA 的表达, 结果 SSc 患者 TIMP-1 mRNA 表达明显高于对照组。Bou-Gharios 等^[7]用流式细胞技术检测 SSc 患者成纤维细胞合成的 TIMP-1 较正常对照高 50%, TIMP-1 是评估 SSc 严重程度的指标。本研究发现, 刺山柑总生物碱中、高剂量可降低 SSc 小鼠皮肤 Col-IV 及血清 TIMP-1 水平, 升高血清 MMP-9 水平及 MMP-9/TIMP-1 比值, 本课题组前期研究亦表明, 刺山柑总生物碱可使 SSc 小鼠真皮鳞状上皮变薄, 胶原纤维明显减少, 减少 I、III 型胶原的合成, 提示刺山柑总生物碱可能通过增加 MMP-9 表达, 抑制 TIMP-1 表达, 使 SSc ECM 降解增加, 减少胶原合成, 改善 SSc 组织纤维化。

尿激酶/组织型纤溶酶原激活物 (uPA/tPA) 和纤溶酶对维持体内 ECM 合成和分解平衡有重要调节作

用, 且其活性受 uPA/tPA 的抑制剂 PAI-1 的调节。PAI-1 对机体有保护性调节作用, 若生成过多可因过度抑制 uPA/tPA 和纤溶酶而导致胶原和其他 ECM 生成过多, 引起多器官和组织纤维化。本研究结果显示, 各组小鼠血清 PAI-1 水平未见明显差异, 提示刺山柑总生物碱可能对 SSc PAI-1 水平无影响。

综上, 刺山柑总生物碱可通过调节 MMP-9/TIMP-1 失衡, 减少 Col-IV 合成, 改善 SSc 组织纤维化。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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): 560-562.
- [3] 沈佚藏, 王京, 周平. 阿维 A 对硬皮病小鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中国医药导报, 2013, 10(25): 20-22.
- [4] KIKUCHI K, KUBO M, HOASHI T, et al. Decreased MMP-9 activity in the serum of patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis[J]. Clin Exp Dermatol, 2002, 27(4): 301-305.
- [5] GIANNELLI G, IANNONE F, MARINOSCI F, et al. The effect of bosentan on matrix metalloproteinase-9 levels in patients with systemic sclerosis-induced pulmonary hypertension[J]. Curr Med Res Opin, 2005, 21(3): 327-332.
- [6] KURODA K, SHINKAI H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis[J]. Arch Dermatol Res, 1997, 289(10): 567-572.
- [7] BOU-GHARIOS G, OSMAN J, BLACK C, et al. Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis[J]. Clin Chim Acta, 1994, 231(1): 69-78.

(收稿日期: 2015-05-29)

(修回日期: 2015-06-21; 编辑: 华强)