

REFERENCES

- [1] OHGAKI H, KLEIHUES P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(5): 1445-1453.
- [2] OHGAKI H, DESSEN P, JOURDE B, et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 892-899.
- [3] FUKAI J, KOIZUMI F, NAKAO N. Enhanced anti-tumor effect of zoledronic acid combined with temozolomide against human malignant glioma cell expressing O6-methylguanine DNA methyltransferase [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): 1038-1045.
- [4] FU D, CALVO J A, SAMSON L D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(2): 104-120.
- [5] CASTRO G N, CAYADO-GUTIERREZ N, ZOPPINO F C, et al. Effects of temozolomide (TMZ) on the expression and interaction of heat shock proteins (HSPs) and DNA repair proteins in human malignant glioma cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2015, 20(2): 253-265.
- [6] JIAO Y, LI H, LIU Y, et al. Resveratrol Inhibits the Invasion of glioblastoma-initiating cells via down-regulation of the PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 4383-4402.
- [7] SUPPASANSATORN P, WANG G, CONWAY B R, et al. Skin delivery potency and antitumor activities of temozolomide ester prodrugs [J]. *Cancer Lett*, 2006, 244(1): 42-50.
- [8] FARES M, ABEDI-VALUGERDI M, HASSAN M, et al. DNA damage, lysosomal degradation and Bcl-xL deamidation in doxycycline- and minocycline-induced cell death in the K562 leukemic cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 103(12): 1781-1792.
- [9] DARZYNKIEWICZ Z, ZHAO H, HALICKA H D, et al. DNA damage signaling assessed in individual cells in relation to the cell cycle phase and induction of apoptosis [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2012, 49(5): 199-217.
- [10] WIEWRODT D, NAGEL G, DREIMULLER N, et al. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(6): 1391-1403.
- [11] YOUSUF A, BHAT M Y, PANDITH A, et al. MGMT gene silencing by promoter hypermethylation in gastric cancer in a high incidence area [J]. *Cell Oncol(Dordr)*, 2014, 37(4): 245-252.
- [12] FRIEDMAN H S, KOKKINAKIS D M, PLUDA J, et al. Phase I trial of O6-benzylguanine for patients undergoing surgery for malignant glioma [J]. *J Clin Oncol*, 1998, 16(11): 357-364.
- [13] SMALLEY S, CHALMERS A J, MORLEY S J. mTOR inhibition and levels of the DNA repair protein MGMT in T98G glioblastoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(4): 144-154.
- [14] HUANG H, LIN H, ZHANG X, et al. Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-kappaB-dependent pathway [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(6): 2050-2060.
- [15] KELLY P N, STRASSER A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(9): 1414-1424.
- [16] ROOS W P, KAINA B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2013, 332(2): 237-244.
- [17] EVERETT H, MCFADDEN G. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria [J]. *Virology*, 2001, 288(1): 102-115.

收稿日期: 2015-06-06

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

康小龙¹, 何承辉^{2*}, 田红林¹, 何强¹ (1.新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

摘要: 目的 研究刺山柑总生物碱乳膏外用对系统性硬皮病(systemic sclerosis, SSc)小鼠组织纤维化的改善作用。方法 BALB/c 小鼠背部注射盐酸博莱霉素建立 SSc 模型, 外用刺山柑总生物碱乳膏进行干预后, 比较给药前后小鼠真皮厚度的变化, ELISA 法检测小鼠皮肤及肺组织羟脯氨酸(Hyp)和 I 型胶原(Col-I)表达水平。结果 刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量可明显降低 SSc 小鼠真皮厚度, 同时可降低小鼠皮肤及肺组织 Hyp 含量($P < 0.05$ 或 0.01), 高剂量还可降低肺组织 Col-I 含量($P < 0.01$)。结论 刺山柑总生物碱乳膏对 SSc 组织纤维化有一定改善作用。

关键词: 刺山柑总生物碱乳膏; 系统性硬皮病; 组织纤维化; I 型胶原

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)01-0032-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.008

Effect of Capparis Spinosa Total Alkaloid Cream on the Tissue Fibrosis in Systemic Sclerosis Mice

KANG Xiaolong¹, HE Chenghui^{2*}, TIAN Honglin¹, HE Qiang¹ (1.Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Xinjiang

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260235)

作者简介: 康小龙, 男, 博士, 副主任药师 Tel: (0991)5853365 E-mail: kangxiaolong_163@163.com *通信作者: 何承辉, 女, 硕士, 副研究员 Tel: (0991)2318172 E-mail: 408705201@qq.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of Capparis Spinosa Total Alkaloid cream on the tissue fibrosis in systemic sclerosis(SSc) mice. **METHODS** SSc mice model was established by repeated local injections of bleomycin in BALB/c mice back. After therapy by Capparis Spinosa Total Alkaloid cream, the dermis thickness was examined, and the hydroxyproli(Hyp) and collagen- I (Col- I) content in the skin and lung tissue were detected by ELISA. **RESULTS** Compared with the model group, the dermis thickness and the levels of Hyp in the skin tissues were markedly decreased by moderate and high dose of Capparis Spinosa Total Alkaloid cream($P<0.05$ or 0.01). The level of Col- I in the lung tissue was markedly decreased by high dose Capparis Spinosa Total Alkaloid cream($P<0.01$). **CONCLUSION** Capparis Spinosa Total Alkaloid cream is effective in treating fibrosis of SSc.

KEY WORDS: Capparis Spinosa Total Alkaloid cream; systemic sclerosis; fibrosis; collagen- I

系统性硬皮病(systemic sclerosis, SSc)是一种累及皮肤和多系统多器官的结缔组织疾病,临床上以皮肤增厚和内脏组织进行性纤维化为特征^[1]。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。本课题组从刺山柑中提取了有效部位刺山柑总生物碱,拟用于治疗SSc。本研究研究了刺山柑总生物碱乳膏对SSc小鼠组织纤维化的疗效,为临床推广使用提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 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)2014-0035。

1.2 药材与试剂

刺山柑药材购自新疆麦迪森维药有限公司饮片厂,经新疆药物研究所何江研究员鉴定为正品,拉丁名:*Capparis spinosa* L.;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I型胶原(collagen- I, Col- I)ELISA试剂盒(北京绿源大德生物科技公司,批号:201504);小鼠羟脯氨酸(hydroxyproli, Hyp)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,批号:20150223)。

1.3 仪器

Multiskan Spectrum 型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);DM3000B 医学病理图像分析系统(德国 Leica)。

2 方法

2.1 刺山柑总生物碱制备方法

刺山柑药材于80℃水浴中,加10倍量95%

乙醇提取2次,每次0.5 h,浓缩干燥,得刺山柑总生物碱,经UV测定,总生物碱含量>32%。

2.2 刺山柑总生物碱乳膏制备方法

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。刺山柑总生物碱乳膏高、中、低剂量:每1 g乳膏中分别含0.6, 0.3, 0.15 g总生物碱。

2.3 SSc模型的制备及给药方法

90只清洁级BALB/c小鼠,♀,体质量为(21.9±1.8)g,随机分为空白对照组、模型组、青霉胺组(125 mg·kg⁻¹)、刺山柑总生物碱乳膏低、中、高剂量(225, 450, 900 mg·kg⁻¹)组,每组各15只,实验前用剃毛刀将背部毛剃除。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成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,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。注射4周后,受试药组小鼠背部涂抹刺山柑总生物碱乳膏,每次1.5 g·kg⁻¹,面积为2 cm×3 cm,以无菌凡士林纱布覆盖,胶布固定,保留6 h后用棉签蘸取灭菌蒸馏水擦去残留药物,吹干,随动物体质量增加相应增加药物用量。青霉胺组灌胃给予青霉胺,空白对照组、模型组背部外敷不含药基质,每日1次,连续8周。

2.4 小鼠真皮厚度测量

末次给药后4 h,取小鼠背部注射区皮肤组织

切片行 HE 染色,应用医学彩色病理图像分析软件 Leica Application Suite 4.4.0 测量真皮厚度。

2.5 小鼠皮肤及肺组织 Hyp、Col- I 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, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 提取上清液, 二辛可宁酸蛋白定量试剂盒测定匀浆中蛋白浓度, ELISA 试剂盒检测 Hyp、Col- I 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(pg·mgprot⁻¹)进行校正。

2.6 统计方法

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

3 结果

3.1 刺山柑总生物碱乳膏对SSc小鼠真皮厚度的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠真皮厚度明显增厚(P<0.01); 与模型组比较, 刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量及青霉胺可明显降低小鼠真皮厚度(P<0.05或0.01)。刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量组与青霉胺组比较差异没有显著性意义。结果见表1。

表 1 刺山柑总生物碱乳膏对 SSc 小鼠真皮厚度的影响 (n=15, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of Capparis Spinosa Total Alkaloid cream on the dermis thickness in SSc mice(n=15, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	真皮厚度/μm
空白对照组	—	111.33±18.54
模型组	—	142.50±13.84 ¹⁾
刺山柑总生物碱组	225	135.44±14.03
	450	130.45±12.54 ²⁾
	900	120.21±12.28 ³⁾
青霉胺组	125	128.77±15.77 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与模型组比较, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01。
Note: Compared with blank control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

3.2 刺山柑总生物碱乳膏对SSc小鼠皮肤及肺组织Hyp含量的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠皮肤及肺组织Hyp含量明显升高(P<0.01); 与模型组比较, 刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量及青霉胺可降低小鼠皮肤及肺组织Hyp含量(P<0.05或0.01); 刺山柑总生物碱乳膏高剂量组与青霉胺组比较差异无统计学意义。结果见表2。

表 2 刺山柑总生物碱乳膏对SSc小鼠皮肤及肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量的影响(n=15, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of Capparis Spinosa Total Alkaloid cream on the hydroxyprolin(Hyp) content in skin and lung tissue of SSc mice(n=15, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	皮肤 Hyp/ pg·mgprot ⁻¹	肺 Hyp/ pg·mgprot ⁻¹
空白对照组	—	9.51±2.89	3.25±0.59
模型组	—	27.03±4.72 ¹⁾	11.17±1.05 ¹⁾
刺山柑总生物碱组	225	25.07±4.19	11.47±1.13
	450	22.95±4.86 ²⁾	7.91±0.91 ³⁾
	900	17.41±4.94 ³⁾	8.21±0.87 ³⁾
青霉胺组	125	15.83±3.79 ³⁾	8.65±0.98 ³⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与模型组比较, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01。
Note: compared with blank control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

2.3 刺山柑总生物碱乳膏对SSc小鼠皮肤及肺组织Col- I 含量的影响

与空白对照组比较, 模型组小鼠皮肤及肺组织Col- I 含量明显升高(P<0.01); 与模型组比较, 刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量及青霉胺可降低小鼠皮肤Col- I 含量(P<0.01), 刺山柑总生物碱乳膏高剂量及青霉胺可降低小鼠肺组织Col- I 含量(P<0.01)。结果见表3。

表 3 刺山柑总生物碱乳膏对SSc小鼠皮肤及肺组织 Col- I 含量的影响(n=15, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of Capparis Spinosa Total Alkaloid cream on the type I collagen (Col- I) content in skin and lung tissue of SSc mice(n=15, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	皮肤 Col- I / pg·mgprot ⁻¹	肺 Col- I / pg·mgprot ⁻¹
空白对照组	—	9.04±1.72	5.32±0.73
模型组	—	19.83±2.74 ¹⁾	13.26±0.78 ¹⁾
刺山柑总生物碱组	225	18.51±2.95	13.19±0.80
	450	15.90±3.23 ²⁾	12.78±0.83
	900	15.74±2.85 ²⁾	11.45±1.16 ²⁾
青霉胺组	125	16.45±2.46 ²⁾	8.48±0.94 ²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与模型组比较, ²⁾P<0.01。
Note: compared with blank control group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.01.

4 讨论

SSc的主要特点是成纤维细胞合成以胶原为主的主要细胞外基质异常增多, 导致组织器官纤维化和硬化, 并出现功能障碍^[2]。其病理特点以皮肤增厚和纤维化为特征, 并可导致微血管损伤以及肺、心、肾、胃肠道病变的自身免疫性疾病^[3]。本研究发现, 刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量可明显降低小鼠真皮厚度; 本课题组前期对小鼠病理形态

学研究亦表明,刺山柑总生物碱乳膏可使SSc小鼠真皮鳞状上皮变薄,胶原纤维明显减少,皮脂腺增多,炎性细胞浸润明显减少^[4],提示刺山柑总生物碱乳膏对SSc组织纤维化有一定改善作用。

硬皮病的发病机制复杂,主要病理过程之一是成纤维细胞合成胶原增多、分解减少,大量胶原纤维在皮肤、肺、消化道等组织器官沉积,组织器官硬化,出现功能障碍^[5]。SSc胶原纤维主要合成I、III型前胶原,且I型前胶原比例较正常胶原纤维增高,表明本病以I型前胶原增多为主^[6]。Col-I、Col-III过量表达与胶原纤维的持续活化,分泌过量的胶原蛋白相关,将硬皮病胶原纤维培养至第15代,其胶原合成量仍高于正常人,并显示出高胶原合成的特性,因此Col-I客观反映了硬皮病的病理状态^[7]。Hyp是胶原蛋白中一种重要且含量稳定的氨基酸,在其他组织中含量甚微,因此,测定Hyp的含量是检测胶原含量的可靠方法^[6]。本研究发现,刺山柑总生物碱乳膏中、高剂量可降低小鼠皮肤及肺组织Hyp、Col-I含量,提示刺山柑总生物碱乳膏可减少Col-I在组织器官的过度沉积,减轻纤维化程度。

REFERENCES

- [1] LI Y, DENG D Q. Recent advances in the treatment on systemic sclerosis [J]. Chin J Derm Venereol(中国皮肤性病学杂志), 2011, 25(5): 393-396.
- [2] LU X Y, LI M, WENG M W. The expression of type I collagen mRNA and transforming growth factor β 1 in dermal fibroblasts from patients with systemic sclerosis [J]. Chin J Dermatol(中华皮肤科杂志), 2003, 36(9): 490-492.
- [3] LV Q, BIAN H, CHEN Z G, et al. Effects of Wenyang Huazhuo Tongluo recipe contained serum on collagen protein and TGF- β 1 of systemic sclerosis skin fibroblasts [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(16): 184-187.
- [4] KANG X L, HE C H, LIU J, et al. Effect of capparid spinosa total alkaloid on the III type collagen expression in systemic sclerosis mice [J]. J China Med Univ(中国医科大学学报), inpress.
- [5] HE N, LIN Y K, LIU J P. Systemic scleroderma and tissue fibrosis [J]. J Clin Dermatol(临床皮肤科杂志), 2009, 38(8): 546-548.
- [6] LI J B, ZHANG C P, JI J, et al. Effect of acitretin on collagen synthesis and mRNA expression in cultured systemic sclerosis fibroblasts [J]. Chin J Lepr Skin Dis(中国麻风皮肤病杂志), 2014, 30(7): 397-399.
- [7] YAN X N, HAN S R, LI W B, et al. Effects of Refu Yao on mice models with scleroderma of COL-I and COL-III [J]. Chin J Dermatovenereol Integr Tradit West Med(中国中西医结合皮肤性病学杂志), 2011, 10(6): 353-355.

收稿日期: 2015-07-27

藏药刺柏提取物对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的保护作用

武燕¹, 何华¹, 刘健²(1.甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2.兰州大学第一附属医院, 兰州 730000)

摘要: 目的 研究藏药刺柏提取物(Juniperus extract, JE)对大鼠肝纤维化的保护作用和相关机制。方法 利用 CCl₄ 建立大鼠肝纤维化模型, JE(25, 50 mg·kg⁻¹)连续灌胃给药 6 周。给药结束后检测血清谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)以及肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量; HE 染色观察肝组织的变化; 应用免疫组化法检测 MMP-2 的表达。结果 与模型组比较, JE 组大鼠血清中 ALT、AST 水平降低($P<0.05$), 同时肝组织中 SOD 含量增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 50 mg·kg⁻¹ JE 组 MDA 含量降低($P<0.05$); 病理学研究表明, JE 组大鼠肝纤维化程度明显改善, 50 mg·kg⁻¹ JE 组能明显抑制肝组织中 MMP-2 的表达($P<0.05$)。结论 JE 可能通过降低 MMP-2 的表达减少氧化应激, 从而改善 CCl₄ 引起的肝纤维化损伤。

关键词: 刺柏提取物; 肝纤维化; 氧化应激; MMP-2

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)01-0035-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.01.009

Protective Effect of Juniperus Extract on CCl₄-induced Liver Fibrosis of Rats

WU Yan¹, HE Hua¹, LIU Jian²(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

基金项目: 甘肃省科技计划项目(1506RJYA039); 甘肃中医学院中青年科研基金项目(ZQ2014-6)

作者简介: 武燕, 女, 讲师 Tel: (0931)8641182 E-mail: wuyan8188@163.com