

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.21.001

文章编号: 1005-8982(2020)21-0001-05

基础研究·论著

刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠 Wnt3a/ β -catenin 表达的影响*

卢军¹, 何承辉², 阿依提拉·麦麦提江¹, 康小龙¹

(1. 新疆医科大学附属中医医院 药物研究室, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆维吾尔自治区药物研究所 药剂室, 新疆 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小鼠 Wnt 通路相关蛋白 Wnt3a、Wnt1 诱导的信号通路蛋白 1 (WISP1) 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 的调控作用。**方法** 采用盐酸博莱霉素皮下注射法复制系统性硬皮病小鼠模型后, 给予受试药乳膏治疗 8 周。酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测小鼠皮肤组织 Wnt3a 和 WISP1 的浓度, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测小鼠皮肤组织 β -catenin mRNA 的表达, 免疫组织化学法检测小鼠皮肤组织 β -catenin 蛋白表达。**结果** 刺山柑总生物碱 450 mg/kg 可降低 Wnt3a 的浓度; 450 mg/kg 和 900 mg/kg 可降低 β -catenin mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$), 对 WISP1 浓度无影响 ($P > 0.05$)。**结论** 刺山柑总生物碱可抑制系统性硬皮病小鼠皮肤组织 Wnt3a 和 β -catenin 的异常表达, 对系统性硬皮病 Wnt/ β -catenin 通路的过度激活有一定抑制作用。

关键词: 硬皮病, 系统性; 刺山柑总生物碱; Wnt3a; β -连环蛋白; Wnt1 诱导的信号通路蛋白 1

中图分类号: R593.2; R285.5

文献标识码: A

Effects of capparispinosa total alkaloid on Wnt3a/ β -catenin expressions in mice with systemic sclerosis*

Jun Lu¹, Cheng-hui He², Ayitila·Maimaitijiang¹, Xiao-long Kang¹

(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 explore the effects of capparispinosa total alkaloid on Wnt pathways related protein Wnt3a, β -catenin and Wnt1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP1) expressions in mice with systemic sclerosis (SSc). **Methods** Subcutaneous injection of bleomycin was injected in BALB/c mice to replicate the SSc model. Capparispinosa total alkaloid cream (225, 450 and 900 mg/kg) was topically applied to the mice daily for 8 weeks. The levels of Wnt3a and WISP1 were measured by ELISA, the mRNA expression of β -catenin was detected by real-time reverse transcriptase PCR (qRT-PCR), and the β -catenin protein expression was detected by immunohistochemical in skin tissue. **Results** The level Wnt3a was markedly decreased after administration of 450 mg/kg capparispinosa total alkaloid, and the mRNA and protein expressions of β -catenin were markedly decreased after administration of 450 and 900 mg/kg capparispinosa total alkaloid than those in model group mice (all $P < 0.05$). But the level of WISP1 was not influenced ($P > 0.05$). **Conclusion** Capparispinosa total alkaloid can inhibit the Wnt/ β -catenin pathway of SSc mice by down-regulating the expressions of Wnt3a and β -catenin.

收稿日期: 2020-05-04

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81760560)

[通信作者] 康小龙, E-mail: kangxiaolong_163@163.com; Tel: 0991-5853365

Keywords: scleroderma, systemic; capparidaceae total alkaloid; Wnt3a; β -catenin; Wnt1-inducible signaling pathway protein 1

系统性硬皮病的病理表现为多组织、多器官纤维化,免疫系统失衡及血管异常^[1]。刺山柑为白花菜科山柑属植物,系新疆道地药材。刺山柑果实乙醇提取物对成纤维细胞增殖和 I 型胶原的合成有一定抑制作用^[2]。硬皮病模型小鼠的胶原沉积、真皮增厚等病理改变可被刺山柑流浸膏抑制^[3]。给硬皮病小鼠外用刺山柑乙酸乙酯和乙醇提取物后,小鼠真皮增厚, I 型胶原、转化生长因子- β , 过表达被抑制^[4]。刺山柑总生物碱系本课题组从刺山柑中提取的有效成分,前期研究表明,将刺山柑总生物碱制成乳膏给系统性硬皮病小鼠外用后,小鼠皮肤增厚、纤维化等情况有所改善^[5],同时羟脯氨酸及 I、III 型胶原过表达被逆转^[6-7],提示刺山柑总生物碱可抑制系统性硬皮病胶原合成,改善组织纤维化。本实验观察刺山柑总生物碱对 Wnt 通路相关蛋白 Wnt3a、Wnt1 诱导的信号通路蛋白 1 (WISP1) 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 的影响,研究其对系统性硬皮病 Wnt/ β -catenin 通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 BALB/c 小鼠 90 只,体重 18 ~ 22 g,购自北京维通利华实验动物公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。

1.2 实验药物

刺山柑原药材(新疆麦迪森维药饮片厂),刺山柑乳膏(新疆医科大学附属中医医院药物研究室自制)盐酸博莱霉素注射剂(批号:17001711,上海瀚晖制药有限公司),青霉胺片(批号:052160901,上海上药信谊药厂)。

1.3 试剂

β -catenin 抗体、goat anti-rabbit IgG-HRP 购自美国 Cell Signaling 公司, SABC 免疫组织化学染色试剂盒、小鼠 WISP1 ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,高纯总 RNA 快速提取试剂盒、SYBR real-time PCR 试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,小鼠 Wnt3a ELISA 试剂盒购自武汉华美生物公司,蛋白测定试剂盒(BCA 法)购自江苏碧云天生物公司。

1.4 仪器

酶标仪(型号:Multiskan Spectrum)、低温离心机(型号:Multifuge X1R)购自美国 Thermo Fisher 公司,显微镜(型号:LEICA DFC360 FX)、切片机(型号:LEICA RM2245)购自德国 Leica 公司,实时定量 PCR 仪(型号:C1000 Thermal Cycler)购自美国 Bio-Rad 公司。

1.5 方法

1.5.1 小鼠系统性硬皮病模型的复制及给药方法

BALB/c 小鼠 90 只随机分为 6 组:空白对照组、系统性硬皮病模型组(SSc 模型组)、刺山柑总生物碱低剂量组(225 mg/kg)、刺山柑总生物碱中剂量组(450 mg/kg)、刺山柑总生物碱高剂量组(900 mg/kg)及青霉胺组(125 mg/kg),每组 15 只。剃除小鼠背部中央区被毛,除空白对照组背部皮下注射生理盐水外,其余各组皮下注射盐酸博莱霉素复制系统性硬皮病模型^[8-9]:30 μ g/d \times 30 d,然后各给药组小鼠背部外敷刺山柑乳膏,青霉胺组小鼠给予青霉胺灌胃,1 次/d \times 60 d。

1.5.2 小鼠皮肤组织 Wnt3a 和 WISP1 浓度的检测

未次给药 4 h 后处死小鼠,取小鼠背部皮肤用组织匀浆机研磨成 10% 组织匀浆,离心(4 000 r/min, 10 min),ELISA 试剂盒测定上清液中 Wnt3a 和 WISP1 的浓度,ELISA 结果用上清液中总蛋白浓度(BCA 蛋白定量试剂盒检测)进行校正。

1.5.3 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测小鼠皮肤组织 β -catenin mRNA 表达

未次给药 4 h 后处死小鼠,取小鼠背部皮肤,液氮迅速冷冻 10 min,置入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。采用高纯总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)提取组织总 RNA,操作按试剂盒说明书进行,逆转录获到 cDNA,设计特异性 β -catenin 引物, β -catenin 正向引物为 5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3',反向引物为 5'-GACTCATCGTACTCCTCGCTTGC-3';内参照 Rn18s 正向引物为 5'-CTATTTTGGTTTTTCGGAAGTGAAG-3',反向引物为 5'-TTGGCAAATGCTTTTCGCTCTG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 相对表达,即相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。

1.5.4 免疫组织化学法检测小鼠皮肤组织 β -catenin 蛋白表达

未次给药 4 h 后处死小鼠,取小鼠背部

注射区皮肤, 4% 多聚甲醛中固定、脱水、包埋、切片。脱蜡, 放入柠檬酸钠液中, 微波修复 5 min, 用 3% H_2O_2 封闭 20 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗, β -catenin 一抗 4℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, DAB 染色后用苏木精复染。显微镜摄片后输入计算机, Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件对图片进行分析, 求得积分光密度与组织面积的比值即平均光密度, 各组平均光密度与空白对照组平均光密度的比值作为 β -catenin 的相对表达量。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wnt3a 和 WISP1 浓度的比较

各组小鼠皮肤组织 Wnt3a 和 WISP1 浓度比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SSc 模型组 Wnt3a 和 WISP1 较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 刺山柑总生物碱中剂量组 Wnt3a 较 SSc 模型组降低 ($P < 0.05$); 刺山柑总生物碱各剂量组、青霉素组 WISP1 与 SSc 模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 β -catenin mRNA 相对表达量比较

各组小鼠皮肤组织 β -catenin mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SSc 模型组较空

表 1 各组小鼠皮肤组织 Wnt3a 和 WISP1 浓度比较
($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	Wnt3a/ (pg/mg)	WISP1/ (ng/mg)
空白对照组	182.79 \pm 47.05	1.32 \pm 0.36
SSc 模型组	293.17 \pm 59.66 ^①	2.02 \pm 0.40 ^①
刺山柑总生物碱低剂量组	300.73 \pm 46.77	1.93 \pm 0.32
刺山柑总生物碱中剂量组	245.77 \pm 56.09 ^②	1.89 \pm 0.35
刺山柑总生物碱高剂量组	269.84 \pm 44.64	2.11 \pm 0.44
青霉素组	274.84 \pm 39.48	2.00 \pm 0.50
F 值	11.336	7.499
P 值	0.000	0.000

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与 SSc 模型组比较, $P < 0.05$ 。

白对照组升高 ($P < 0.05$), 刺山柑总生物碱中剂量组、高剂量组及青霉素组较 SSc 模型组降低 ($P < 0.05$); 刺山柑总生物碱中剂量组、高剂量组与青霉素组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 1。

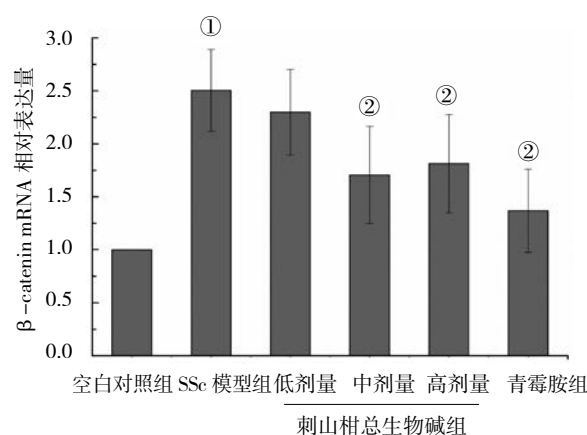
2.3 β -catenin 蛋白相对表达量比较

免疫组织化学实验结果显示, 各组小鼠皮肤组织 β -catenin 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); SSc 模型组较空白对照组升高 ($P < 0.05$); 刺山柑总生物碱各剂量组及青霉素组较 SSc 模型组降低 ($P < 0.05$); 刺山柑总生物碱各剂量组与青霉素组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3 和图 2、3。

表 2 各组小鼠皮肤组织 β -catenin mRNA 相对表达量比较
($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	β -catenin mRNA 相对表达量
空白对照组	1.00 \pm 0.00
SSc 模型组	2.50 \pm 0.39 ^①
刺山柑总生物碱低剂量组	2.30 \pm 0.40
刺山柑总生物碱中剂量组	1.71 \pm 0.46 ^②
刺山柑总生物碱高剂量组	1.81 \pm 0.46 ^②
青霉素组	1.37 \pm 0.39 ^②
F 值	10.620
P 值	0.000

注: ①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与 SSc 模型组比较, $P < 0.05$ 。



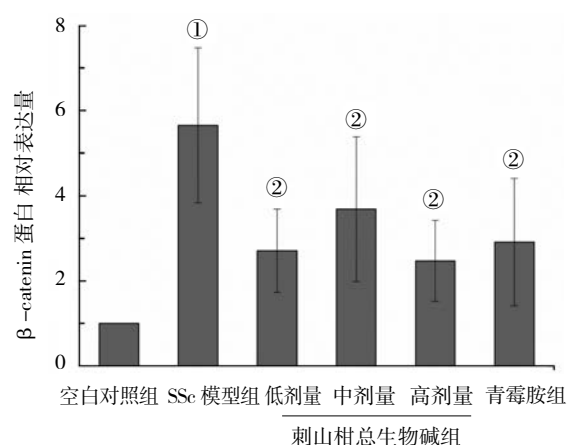
①与空白对照组比较, $P < 0.05$; ②与 SSc 模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 小鼠皮肤组织 β -catenin mRNA 相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

表 3 各组小鼠皮肤组织 β -catenin 蛋白相对表达量比较
($n=15, \bar{x} \pm s$)

组别	β -catenin 蛋白相对表达量
空白对照组	1.00 ± 0.00
SSc 模型组	5.66 ± 1.82 ^①
刺山柑总生物碱低剂量组	2.71 ± 0.98 ^②
刺山柑总生物碱中剂量组	3.69 ± 1.70 ^②
刺山柑总生物碱高剂量组	2.47 ± 0.95 ^②
青霉胺组	2.91 ± 1.50 ^②
<i>F</i> 值	5.524
<i>P</i> 值	0.003

注：①与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；②与 SSc 模型组比较， $P < 0.05$ 。



①与空白对照组比较， $P < 0.05$ ；②与 SSc 模型组比较， $P < 0.05$ 。

图 2 小鼠皮肤组织 β -catenin 蛋白相对表达量比较
($\bar{x} \pm s$)

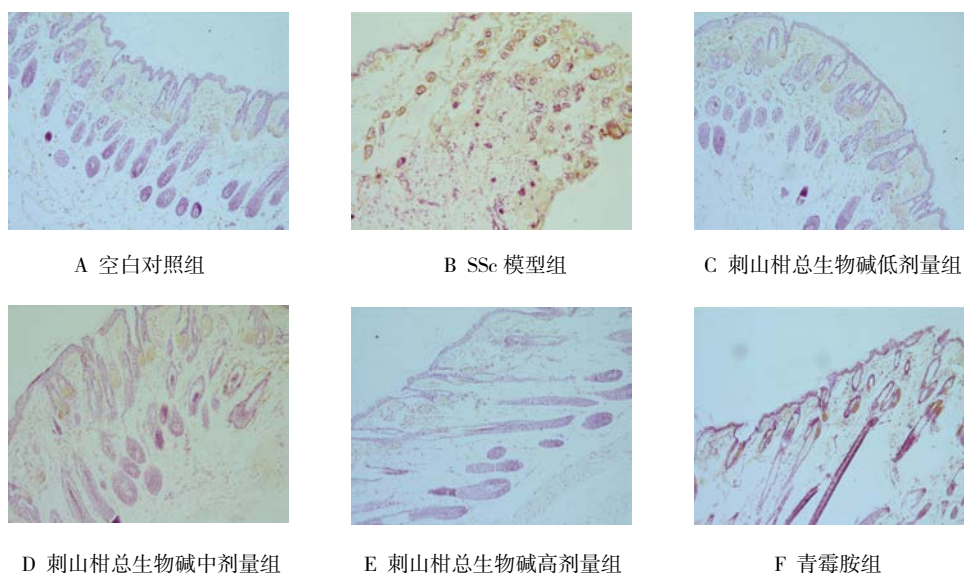


图 3 小鼠皮肤组织 β -catenin 蛋白表达情况 (免疫组织化学 × 100)

3 讨论

系统性硬皮病呈现多组织、多器官进行性纤维化，其病因与成纤维细胞异常增殖，胶原、纤维连接蛋白等细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度合成并沉积有关^[10-11]。Wnt/ β -catenin 信号通路是成纤维细胞持续活化的关键途径之一，在肺、皮肤等器官纤维化进程中起重要作用^[12]。研究表明，在系统性硬皮病皮肤和肺组织成纤维细胞中 Wnt/ β -catenin 通路被激活， β -catenin 水平升高，导致系统性硬皮病成纤维细胞中 β -catenin 蓄积，细胞核内 β -catenin 水平升高使目标基因转录增加，引起系统性硬皮病组织纤维化^[13-15]。Wnt3a 是 Wnt 通路中的重要配体，WEI 等^[16]

和 BAYLE 等^[17]研究表明，Wnt3a/ β -catenin 通路过度激活，可引起系统性硬皮病患者皮肤成纤维细胞增殖，ECM 合成增加，异常增多的 Wnt3a 与受体结合激活 β -catenin 可引发系统性硬皮病组织纤维化，是因为后者可活化成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化，使 ECM 合成增多。本研究发现，SSc 模型组小鼠皮肤 Wnt3a 和 β -catenin 表达升高，与上述研究结果一致；刺山柑总生物碱 450 mg/kg 可降低系统性硬皮病小鼠皮肤 Wnt3a 的浓度；450 mg/kg 和 900 mg/kg 可降低 β -catenin mRNA 和蛋白表达，提示刺山柑总生物碱对系统性硬皮病 Wnt/ β -catenin 信号通路的过度激活有一定抑制作用。

WISP1, 又名 CCN4, 是 Wnt/ β -catenin 下游靶蛋白, 有研究表明, 多组织器官的纤维化过程都与 WISP1 水平的异常升高有关^[18]。本实验发现, WISP1 在 SSc 模型组小鼠皮肤组织表达升高, 提示 WISP1 可能参与系统性硬皮病皮肤纤维化的形成; 刺山柑总生物碱组 WISP1 表达与 SSc 模型组差异无统计学意义, 提示刺山柑总生物碱可能不会改变系统性硬皮病小鼠 WISP1 的异常升高。

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学杂志, 2013, 12(1): 13-16.
- [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] 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.
- [4] 李凡, 赵娜, 华伟, 等. 槲果藤乙醇提取物对体外培养的人皮肤成纤维细胞生长的影响 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2009, 23(8): 475-477.
- [5] 阿依提拉·麦麦提江, 卢军, 姜林, 等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠 WNT 通路相关蛋白表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(4): 53-56.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] BEYER C, DISTLER J W. Morphogen pathways in systemic sclerosis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2012, 15(1): 299-306.
- [11] 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.
- [12] AKHMETSHINA A, PALUMBO K, DEES C, et al. Activation of canonical Wnt signaling is required for TGF-beta-mediated fibrosis[J]. Nat Commun, 2012, 3: 735.
- [13] BEYER C, SCHRAMM A, AKHMETSHINA A, et al. beta-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis[J]. Ann Rheum Dis, 2012, 71(5): 761-767.
- [14] LAM A P, FLOZAK A S, RUSSELL S, et al. Nuclear beta-catenin is increased in systemic sclerosis pulmonary fibrosis and promotes lung fibroblast migration and proliferation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(5): 915-922.
- [15] WEI J, MELICHIAN D, KOMURA K, et al. Canonical Wnt signaling induces skin fibrosis and subcutaneous lipodystrophy: a novel mouse model for scleroderma[J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(6): 1707-1717.
- [16] WEI J, FANG F, LAM A P, et al. Wnt/beta-catenin signaling is hyperactivated in systemic sclerosis and induces Smad-dependent fibrotic responses in mesenchymal cells[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(8): 2734-2745.
- [17] BAYLE J, FITCH J, JACOBSEN K, et al. Increased expression of Wnt2 and SFRP4 in Tsk mouse skin: role of Wnt signaling in altered dermal fibrillin deposition and systemic sclerosis[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(4): 871-881.
- [18] 简易成, 熊伍军. Wnt 诱导分泌蛋白 -1 与器官纤维化 [J]. 国际消化杂志, 2010, 30(5): 297-299.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 卢军, 何承辉, 阿依提拉·麦麦提江, 等. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠 Wnt3a/ β -catenin 表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(21): 1-5.