

刺山柑乙醇提取物乳膏对系统性硬皮病小鼠 Notch1、DLL1和ADAM17表达的影响

迪力努尔·艾尼¹, 阿依提拉·麦麦提¹, 康小龙^{2,3*} (1. 新疆医科大学第四临床医学院, 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆中药炮制研究重点实验室, 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的: 在系统性硬皮病(SSc)模型小鼠上研究刺山柑乙醇提取物乳膏对Notch通路中重要蛋白Notch1、DLL1和ADAM17的调控作用。方法: 给予刺山柑乙醇提取物乳膏治疗SSc模型小鼠(模型应用BALB/c小鼠皮下注射博来霉素4 w建立)8 w。小鼠皮肤组织中Notch1 mRNA和蛋白的表达分别采用实时荧光逆转录PCR(qPCR)和免疫组化法测定, DLL1和ADAM17含量采用ELISA法测定。结果: 过表达的Notch1 mRNA和蛋白可被450、900 mg·kg⁻¹刺山柑乙醇提取物乳膏抑制, DLL1和ADAM17可被900 mg·kg⁻¹刺山柑乙醇提取物乳膏抑制。结论: SSc小鼠受损皮肤Notch通路中过表达的Notch1、DLL1和ADAM17可被刺山柑乙醇提取物乳膏抑制, 提示其对SSc Notch通路的过度激活有一定抑制作用。

关键词: 刺山柑乙醇提取物乳膏; 系统性硬皮病; Notch1; DLL1; ADAM17

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)04-0420-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.04.008

Effects of Capparis Spinosa Ethanolic Extract Cream on Expressions of Notch1, DLL1 and ADAM17 in Systemic Sclerosis Mice

Dilinuer·Aini¹, Ayitila·Maimaiti¹, Kang Xiaolong^{2,3*} (1. The Fourth College of Clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 3. Xinjiang Key Laboratory of Processing and Research of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000, China)

Abstract Objective: To explore the regulation effects of capparispinosa ethanolic extract cream on expressions of Notch1, DLL1 and ADAM17 in Notch pathway in Systemic Sclerosis (SSc) mice. **Methods:** SSc model mice were treated with capparispinosa ethanolic extract cream (the model was established by subcutaneous injection of bleomycin for 4 w in BALB/c mice) for 8 w. The mRNA expression of Notch1 and protein in mouse skin were detected by real-time reverse transcriptase PCR (qPCR) and immunohistochemical method, respectively. The contents of DLL1 and ADAM17 were measured by ELISA in skin tissue. **Results:** The mRNA and protein expression of Notch1 were inhibited by 450 and 900 mg·kg⁻¹ capparispinosa ethanolic extract cream and DLL1 and ADAM17 were inhibited by 900 mg·kg⁻¹ capparispinosa ethanolic extract cream. **Conclusion:** Capparis

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(编号 2022D01C557)

作者简介: 迪力努尔·艾尼 Tel: (0991) 5853365; E-mail: 408705201@qq.com

通信作者: 康小龙 Tel: (0991) 5853365; E-mail: kangxiaolong_163@163.com

spinosa ethanolic extract cream could inhibit the Notch pathway in damaged skin of SSc mice by down-regulating the expressions of Notch1, DLL1 and ADAM17, suggesting that the SSc Notch pathway overactivation could be inhibited to some extent.

Keywords: capparispinosa ethanolic extract cream; systemic sclerosis; Notch1; DLL1; ADAM17

硬皮病或系统性硬皮病 (Systemic Sclerosis, SSc) 的主要特征是纤维化, 是一种复杂的、动态的病理生理过程, 可导致组织损伤^[1]。其临床症状首先出现雷诺现象, 然后是手指和手背肿胀, 皮肤变厚, 急性肾危象, 肺纤维化和肺动脉高压等^[2]。研究表明, SSc患者受损皮肤和从皮肤样本中分离培养的成纤维细胞中都检测到Notch信号的激活^[3], 提示Notch信号通路与SSc有着密切的相关性。本实验室从新疆传统维吾尔药刺山柑 (*Capparis spinosa* L.) 果实中提取了乙醇提取物, 前期研究表明: 刺山柑乙醇提取物乳膏可使SSc模型小鼠真皮鳞状上皮变薄, 皮脂腺增多, 炎性细胞浸润减轻, 有效抑制皮肤胶原沉积, 可能对SSc皮肤纤维化有一定改善作用^[4-5]。本试验在SSc模型小鼠上观察刺山柑乙醇提取物乳膏对Notch通路中重要蛋白Notch1、DLL1和ADAM17的影响, 探索其治疗SSc组织纤维化的药理作用。

1 材料

1.1 实验动物

实验用BALB/c小鼠由北京维通利华实验动物公司提供, SPF级, 雌性。许可证号为SCXK(京)2016-0006。

1.2 试验药物

试验用刺山柑 (*Capparis spinosa* L.) 果实由新疆麦迪森饮片厂提供; 注射用盐酸博莱霉素 (海正辉瑞制药有限公司, 生产批号为17001711); 青霉胺片 (上海上药信谊药厂, 生产批号为052160901)。

1.3 试剂

兔抗小鼠Notch1抗体 (货号: 3608S), 山羊抗兔IgG-HRP (货号: 7074S), 购自Cell Signaling公司; SABC免疫组化试剂盒 (批号: 20200929, 北京索莱宝科技有限公司); SYBR实时荧光逆转录PCR (qPCR) 试剂盒 (批号: P190601, FOREGENE公司); 小鼠Delta样配体1 (DLL1) ELISA试剂盒 (批号: V23010365)、解聚素金

属蛋白酶17 (ADAM17) ELISA试剂盒 (批号: V11010367), 购自武汉华美生物科技公司; BCA蛋白测定试剂盒 (批号: 20200425), 购自江苏碧云天生物公司。

1.4 仪器

C1000 Thermal Cycler实时定量PCR仪, (BIO-RAD公司); Multifuge X1R低温离心机、Multiskan Spectrum酶标仪, (Thermo Fisher公司); RM2245切片机、DFC360 FX显微镜, (LEICA公司)。

2 方法

2.1 刺山柑乙醇提取物的制备

刺山柑干果打粉过筛, 95%乙醇 (10倍量) 水浴 (80 °C) 回流提取2次, 每次0.5 h, 合并过滤, 减压浓缩至药材为药液质量的2倍。紫外分光光度法 (Ultraviolet Spectrophotometry, UV) 定量总生物碱占提取物的32% (w/w), 高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 测得盐酸水苏碱在提取物中含量为2.2% (w/w)。

2.2 刺山柑乙醇提取物乳膏制备方法

油相为单硬脂酸甘油酯、白凡士林、月桂氮卓酮、硬脂酸, 水浴加热至90 °C使熔融; 水相为刺山柑乙醇提取物乳膏提取物浓缩液与甘油混合物, 水浴加热至90 °C; 乳化剂为在适量水中加入羟苯甲酸乙酯、十二烷基硫酸钠, 水浴加热使其溶解; 把油相、水相自水浴中取出, 温度降至85 °C时, 在油相中一边加入水相和乳化剂一边搅拌, 直至乳化完全。

2.3 小鼠SSc模型的建立及给药方法

随机数字表法将90只BALB/c小鼠均分为6组, 即空白对照组, SSc模型组, 低、中、高 (225、450、900 mg · kg⁻¹) 剂量受试药及阳性对照青霉胺 (125 mg · kg⁻¹) 组。生理盐水注射空白对照组小鼠背部皮下, 其余各组用博莱霉素皮下注射造模 (30 μg · d⁻¹ × 30 d)^[6-7], 注射前将小鼠背部被毛剃去。然后, 治疗组注射部位外用受试药乳膏, 阳性对照组灌胃青霉胺, 1次 · d⁻¹ × 60 d。

2.4 实时荧光逆转录PCR (qPCR) 检测小鼠皮肤组织Notch1 mRNA表达

从给药结束后处死的小鼠背部皮肤提取总RNA, 逆转录成互补DNA (cDNA), Notch1上游引物5'-GCC TTC GTG CTC CTG TTC TTT GT-3', 下游引物5'-GGC TCT CTC CGC TTC TTC TTG CT-3', 内参照Rn18s上游引物5'-CTA TTT TGG TTT TCG GAA CTG AG-3', 下游引物5'-TTG GCA AAT GCT TTC GCT CTG-3', 采用SYBR实时定量PCR试剂盒进行qPCR分析, 实时定量PCR仪检测系统扩增产物, 结果以GAPDH水平做相对表达量分析, 采用比较荧光强度达阈值时的循环数 (Ct) 值法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法) 计算, 相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。

2.5 免疫组化检测小鼠皮肤组织Notch1表达

小鼠皮肤分别进行石蜡包埋和皮肤切片免疫组化染色, 兔抗小鼠Notch1一抗在4℃孵育过夜, 山羊抗兔IgG-HRP二抗室温孵育1 h, DAB染色, 水洗后苏木精复染。显微镜摄片, 运用Image-Pro Plus 6.0分析软件对图片进行Notch1的相对表达量分析, 即平均光密度 (Mean Optical Density, MOD) =

积分光密度 (Integral Optical Density, IOD) / 组织面积 (Area), Notch1的相对表达量 (Relative Expression) = 各组MOD/空白对照组MOD。

2.6 ELISA法检测小鼠皮肤组织DLL1和ADAM17含量

根据试剂盒提供的方案, ELISA法测定小鼠皮肤组织10%组织匀浆上清液中DLL1和ADAM17含量, 同时用BCA蛋白定量试剂盒测定的上清液中总蛋白浓度校正ELISA结果。

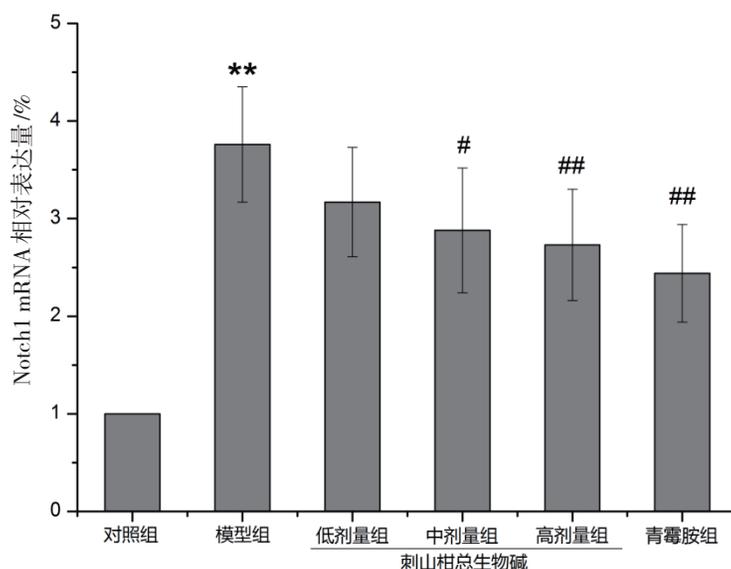
2.7 统计学方法

采用方差分析检验各组间均数差异的统计学意义, SNK-q法检验组间差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结果

3.1 Notch1 mRNA相对表达量比较

小鼠皮肤组织Notch1 mRNA相对表达量各组比较: 模型组较空白对照组明显升高 ($P < 0.01$), 450、900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 刺山柑乙醇提取物乳膏组及青霉胺组较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 450、900 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 刺山柑乙醇提取物乳膏组与青霉胺组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图1。



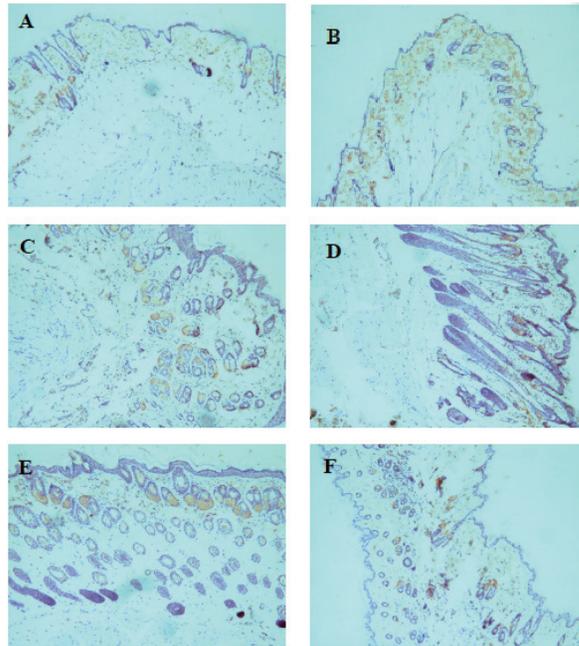
与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图1 小鼠皮肤组织 Notch1 mRNA 相对表达量比较 ($n=5$)

3.2 Notch1蛋白表达水平比较

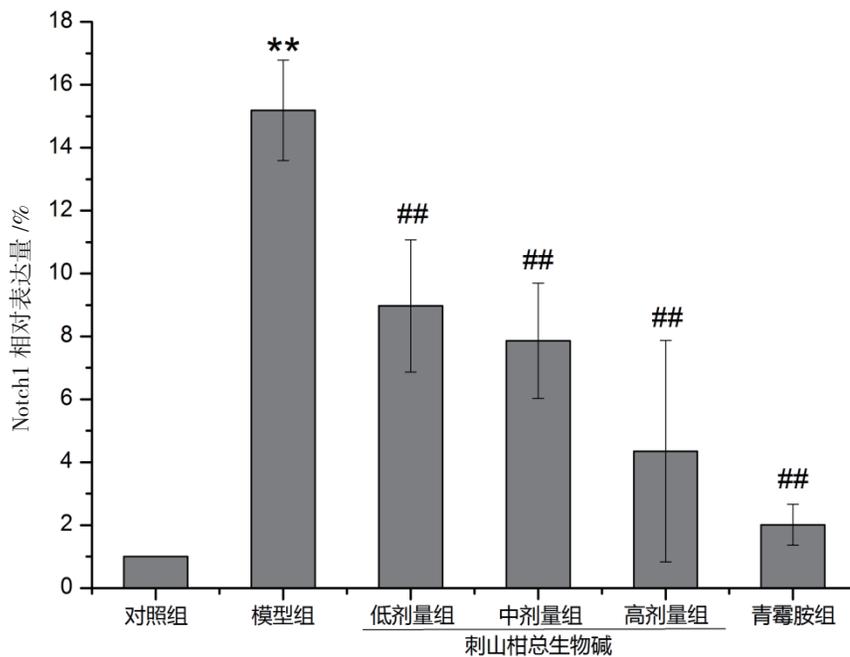
免疫组化检测小鼠皮肤Notch1蛋白表达，阳性表达呈棕黄色颗粒，各组小鼠比较：模型组较空白对照组明显增高 ($P < 0.01$)，刺山柑乙醇提取物

乳膏及青霉素组较模型组明显降低 ($P < 0.01$)， $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 刺山柑乙醇提取物乳膏组与青霉素组相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图2、图3。



A. 空白对照组；B. 模型组；C. 低剂量组；D. 中剂量组；E. 高剂量组；F. 青霉素组。

图2 免疫组化检测小鼠皮肤组织 Notch1 表达情况 (SABC 法, HE × 40)



与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图3 小鼠皮肤组织 Notch1 相对表达比较 ($n=5$)

3.3 DLL1和ADAM17含量比较

各组小鼠皮肤组织DLL1和ADAM17含量比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.01$); DLL1和ADAM17含量在SSc模型组较空白对照组升高 ($P < 0.01$),

经900 mg · kg⁻¹受试药及青霉胺治疗后, 其含量降低 ($P < 0.05$), 且900 mg · kg⁻¹受试药组与青霉胺组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表1。

表1 小鼠皮肤组织 DLL1 和 ADAM17 含量比较 (±s, n=15)

组别	剂量 / (mg · kg ⁻¹)	DLL1 / (ng · mg ⁻¹ prot)	ADAM17 / (pg · mg ⁻¹ prot)
空白对照组	—	17.22 ± 2.69	75.79 ± 9.12
SSc 模型组	—	25.24 ± 3.93**	88.80 ± 10.15**
刺山柑乙醇提取物乳膏	225	26.22 ± 3.48	87.07 ± 9.09
	450	24.09 ± 4.50	83.79 ± 9.60
	900	20.03 ± 3.11 ^{##}	80.10 ± 11.38 [#]
青霉胺组	125	16.55 ± 3.90 ^{##}	79.19 ± 12.15 [#]

注: — 表示给予不含药乳膏基质; 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

3 讨论

SSc被认为是一种典型的纤维性疾病, 影响皮肤和许多内部器官系统, 包括肺、心脏和肠粘膜。有5种不同的Notch配体[Jagged1、Jagged2和Delta-like 1,3,4 (DLL1,3,4)]和4种不同的Notch受体(Notch1-4), Notch与其配体之一结合, 在ADAM17金属蛋白酶作用下引发Notch在细胞外分裂, 释放出Notch的胞内段(Notch Intracellular Domain, NICD), NICD转位到细胞核, 诱导目的基因的转录, 这些基因主要属于Hes和Hey家族^[8-9]。

最近, 一些文献表明Notch信号的过度表达可能在多种疾病中产生纤维化效应, 包括硬皮病、特发性肺纤维化、肾纤维化和心脏纤维化^[10-11]。Notch1在SSc患者受损皮肤和成纤维细胞中被激活^[12-13]; 用博莱霉素诱导的SSc和Tsk1小鼠皮肤和肺部NICD水平也显示升高, NICD的积累与ADAM17的过度活化有关; 此外, 用DAPT(一种阻止NICD释放的分泌酶抑制剂)治疗小鼠, 可以减少皮肤和肺部的胶原含量和自身抗体的产生, 从而阻止不同小鼠模型中SSc的发展^[12-14]; 类似地, 用Notch siRNA治疗SSc小鼠可以防止皮肤增厚和纤维化^[14]。

与上述研究相同, 本试验也证实Notch1 mRNA和蛋白表达水平在SSc模型组小鼠皮肤组织升高,

DLL1和ADAM17表达也升高, 刺山柑乙醇提取物乳膏450、900 mg · kg⁻¹可部分逆转Notch1 mRNA和蛋白过表达, 900 mg · kg⁻¹可降低DLL1和ADAM17水平, 提示刺山柑乙醇提取物乳膏可部分抑制Notch受体与配体的结合激活及ADAM17的过度活化, 对SSc损伤性皮肤Notch信号的过度表达有一定抑制作用。

综上所述, 本试验发现刺山柑乙醇提取物乳膏可抑制SSc小鼠损伤皮肤Notch1、DLL1和ADAM17的过表达, 本课题组前期研究表明: 刺山柑乙醇提取物乳膏给药8 w后, 可使SSc小鼠鳞状真皮上皮变薄, 胶原沉积减少, 皮脂腺受损及炎性细胞浸润减轻^[4], 皮肤组织羟脯氨酸及I、III型胶原的过表达被部分逆转^[15-16], 提示刺山柑乙醇提取物乳膏可能通过抑制SSc损伤皮肤Notch信号的过度表达, 抑制胶原合成, 改善SSc皮肤纤维化。

参考文献:

- [1] Bhattacharyya S, Varga J. Endogenous Ligands of TLR4 Promote Unresolving Tissue Fibrosis: Implications for Systemic Sclerosis and Its Targeted Therapy[J]. Immunol Lett, 2018, 195: 9-17.
- [2] Andreasson K, Lillpers K, Wollheim F, et al. Systemic Sclerosis—a Rare but Important Diagnosis in Primary

- Health Care[J]. *Lakartidningen*, 2019, 116: FPL6.
- [3] Ledein L, Leger B, Dees C, et al. Translational Engagement of Lysophosphatidic Acid Receptor 1 in Skin Fibrosis: from Dermal Fibroblasts of Patients with Scleroderma to Tight Skin 1 Mouse[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177 (18) : 4296–4309.
- [4] 阿依提拉·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.
- [5] 赵宇涵, 何承辉, 卢军. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠皮肤组织Notch1、Hes1及HeyL表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (6) : 3603–3606.
- [6] Wu T, Chu H, Tu W, 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.
- [7] Hao ZF, Su YM, Liu JY, 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.
- [8] Beyer C, Distler JW. Morphogen Pathways in Systemic Sclerosis[J]. *Curr Rheumatol Rep*, 2012, 15 (1) : 299–306.
- [9] Fang F, Ooka K, Sun X, et al. A Synthetic TLR3 Ligand Mitigates Profibrotic Fibroblast Responses by Inducing Autocrine IFN Signaling[J]. *J Immunol*, 2013, 191 (6) : 2956–2966.
- [10] Plantier L, Crestani B, Wert SE, et al. Ectopic Respiratory Epithelial Cell Differentiation in Bronchiolised Distal Airspaces in Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. *Thorax*, 2011, 66 (8) : 651–657.
- [11] Bielez B, Sirin Y, Si H, et al. Epithelial Notch Signaling Regulates Interstitial Fibrosis Development in the Kidneys of Mice and Humans[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (11) : 4040–4054.
- [12] Kavian N, Servettaz A, Mongaret C, et al. Targeting ADAM–17/Notch Signaling Abrogates the Development of Systemic Sclerosis in a Murine Model[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62 (11) : 3477–3487.
- [13] Dees C, Tomcik M, Zerr P, et al. Notch Signalling Regulates Fibroblast Activation and Collagen Release in Systemic Sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70 (7) : 1304–1310.
- [14] Dees C, Zerr P, Tomcik M, et al. Inhibition of Notch Signaling Prevents Experimental Fibrosis and Induces Regression of Established Fibrosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63: 1396–404.
- [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 2022年8月9日 编辑 邹宇玲)