

益气补肾活血方对佐剂关节炎大鼠滑膜 ERK1/2 的影响

刘家昌 刘淑清 陈湘君 秦熠 汪蔚清

【摘要】 目的 以益气补肾活血方治疗佐剂关节炎(adjuvant arthritis, AA)大鼠,通过观测该中药复方对 AA 大鼠滑膜(extracellular signal-regulated kinase 1/2,ERK1/2)表达水平的影响,探讨该中药复方对类风湿关节炎的治疗机制。方法 以雷公藤多苷作为对照,采用 AA 大鼠模型,用益气补肾活血方对 AA 大鼠进行灌胃治疗。通过动态观测 SD 大鼠关节肿胀度及滑膜 ERK1/2 的磷酸化表达结果,并以灰度扫描软件分析结果,以观测该中药复方对 AA 大鼠滑膜 ERK1/2 表达的影响。结果 益气补肾活血方既能明显降低 AA 大鼠的关节肿胀度,又能明显降低 AA 大鼠滑膜 ERK1/2 的磷酸化表达水平。结论 滑膜 ERK1/2 的磷酸化表达水平在类风湿关节炎发病机制中具有重要作用,而益气补肾活血方能显著降低滑膜 ERK1/2 的磷酸化表达水平,可能是该方治疗类风湿关节炎的作用机制之一。

【关键词】 类风湿关节； 细胞外信号调节激酶 1/2； 佐剂关节炎大鼠； 益气补肾活血方； 雷公藤多苷

【中图分类号】 R282.5 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.10.011

Effects of Yiqi Bushen Huoxue (YQBSHX) decoction on extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 expression in the synovial tissue in adjuvant arthritis (AA) rats *LIU Jia-chang, LIU Shu-qing, CHEN Xiang-jun, et al. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China*

基金项目: 上海中医药大学附属普陀医院院级重点课题(2013ZD192)
作者单位: 200062 上海中医药大学附属普陀区中心医院中医内科[刘家昌(硕士研究生)、刘淑清],急诊内科(秦熠),心内科(汪蔚清);上海中医药大学附属龙华医院风湿科(陈湘君)
作者简介: 刘家昌(1988-),2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药治疗风湿病的临床和实验研究。
E-mail: liujiachang198820@163.com
通讯作者: 刘淑清(1973-),博士,副主任医师,硕士生导师。研究方向: 中医药治疗风湿病的临床和实验研究。E-mail: baobeiqi2002@126.com

Corresponding author: LIU Shu-qing, E-mail: baobeiqi2002@126.com

[Abstract] Objective To explore the effects of *Yiqi Bushen Huoxue* (YQBSHX) decoction on extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) expression in the synovial tissue in adjuvant arthritis (AA) rats, and further to investigate the mechanism of *Yiqi Bushen Huoxue* decoction in the treatment of rheumatoid arthritis. **Methods** With the tripterygium glycosides as the control drug, the joint swelling degree of SD rats was observed dynamically, the level of phosphorylated expression of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 in the synovial tissue was detected by using the gray scale scanning software to analyze the effects of *Yiqi Bushen Huoxue* decoction. **Results** *Yiqi Bushen Huoxue* decoction can significantly reduce the joint swelling degree of arthritis rats, and the level of phosphorylated expression of ERK 1/2 in the synovial tissue. **Conclusion** The level of phosphorylated expression of ERK 1/2 in the synovial tissue played an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and *Yiqi Bushen Huoxue* decoction can significantly reduce this level, which could be one of the mechanism of *Yiqi Bushen Huoxue* decoction in the treatment of rheumatoid arthritis.

[Key words] Rheumatoid arthritis; Extracellular signal-regulated kinase 1/2; Adjuvant arthritis rats; *Yiqi bushen huoxue* decoction (YQBSHX); Tripterygium Glycosides

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是由于自身免疫系统病变引起的多系统炎症性疾病, 本病多累及周围关节。其主要的病理变化在关节滑膜, 而关节滑膜的病理变化是在滑膜细胞信号的调控下进行的, 因此滑膜细胞信号的转导异常是本病的重要发病机制之一^[1]。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径是生物体内广泛介导细胞内及细胞间的多种生理反应过程的重要信号系统^[2], 细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK 1/2) 途径是 MAPK 途径的重要组成部分。ERK 1/2 可特异性地激活该途径, 其广泛地存在于关节滑膜组织中, 参与滑膜组织的信号转导过程。近年来的研究表明, ERK1/2 途径的激活, 是类风湿关节炎发病的重要机制之一。本实验通过观测益气补肾活血方对佐剂关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠 ERK1/2 表达水平的影响, 探讨该复方对类风湿关节炎的治疗机制和作用靶点。

1 材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠 60 只, 雌性, 5 周龄, 体质量为 (160±20)g, SPF 级, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 使用许可证: SCXK (沪) 2013-0006。实验动物由上海中医药大学附属普陀区中心医院实验动物中心负责饲养。

1.2 药物

雷公藤多苷片: 购自黄石飞云制药有限公司,

生产批号: 20070601。益气补肾活血方: 由生黄芪 30 g、白芍 30 g、生白术 10 g、巴戟天 20 g、土鳖虫 12 g、骨碎补 15 g 组成, 大鼠中药用量按体表面积 (200 g 大鼠=70 kg 人类) 折算, 中药灌胃制剂由上海中医药大学附属普陀区中心医院中药制剂室按既定工艺制作并提供。

1.3 试剂和仪器

RIPA 组织裂解液 (含有 PMSF, leupeptin, aprotinin 等蛋白酶抑制剂)、BCA 蛋白定量试剂盒、兔抗大鼠 ERK1/2 抗体等均购自美国 Abcam 公司, 弗氏完全佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA), 购自美国 Sigma 公司, 酶标仪, 电泳仪, Image Scanner 扫描仪, 低温高速离心机 (HERAEUS D-37520 德国)。

2 方法

2.1 动物分组

SD 大鼠按随机数字表法分为 6 组: 空白对照组、模型对照组、雷公藤多苷组、低剂量中药组、中剂量中药组、高剂量中药组, 每组 10 只。

2.2 造模方法

常规 AA 大鼠造模方法: 采用在造模 SD 大鼠左后足跖皮内注射弗氏完全佐剂 (0.1 mL) 的方法诱导 AA 大鼠模型, 于空白对照组大鼠左后足跖皮内注射生理盐水 (0.1 mL)。

2.3 给药方法

从造模的第 14 天开始灌胃给药。空白对照组和模型对照组: 将生理盐水按 10 mL/kg 予以灌胃给药, 1 次/天; 益气补肾活血方治疗组: 将益气补

肾活血方按常规方法煎煮,并将药物浓度浓缩为 240 mg/mL、480 mg/mL、960 mg/mL 3 种浓度,将低、中、高剂量中药组大鼠分别按照 240 mg/mL、480 mg/mL、960 mg/mL 3 种浓度进行灌胃给药,1 次/天。雷公藤治疗组:将雷公藤多苷片用灭菌蒸馏水配制成混悬液(1 mL 内含雷公藤多苷 0.36 mg),按 3.6 mg/kg 灌胃给药,1 次/天;各组均给药 40 天。

2.4 检测指标

关节肿胀度。分别在造模后的第 1、7、14、21、30、40、50 天,以排水法测量大鼠左(右)后足体积。大鼠足体积:各组所有大鼠左(右)后足体积之和/大鼠数量。大鼠滑膜 ERK 1/2 磷酸化表达。检测方法:采用免疫印迹法(Western blot, WB)检测大鼠滑膜 ERK 1/2 磷酸化表达水平。

2.4.1 滑膜组织蛋白的提取 于造模后的第 50 天处死大鼠,剥取大鼠关节滑膜组织,于液氮中冻存。将滑膜组织与组织裂解液(RIPA)按 1:8 的比例加入离心管并混匀,高速匀浆,每次 10 秒,停止 20 秒,重复三次,使组织充分破裂。将裂解液移至离心管中冰上裂解,然后在 4℃ 下离心,取上清液,分装、保存。

2.4.2 BCA 法测定蛋白浓度 BCA 工作液, A 液:B 液=50:1,标准品为 BSA 牛血清白蛋白,样品用 PBS 进行稀释。将样品与工作液按 1:8 的比例混匀,孵育后,测取 OD 值。

2.4.3 蛋白浓度调整 以 RIPA 调整样品的蛋白浓度为 10 mg/mL,煮沸变性。

2.4.4 目的蛋白电泳与 WB 检测

将蛋白在 120 V 分离胶(10%)恒压,90V 浓缩胶(5%)恒压条件下电泳 2 小时,在 300 mA 恒流的 NC 膜转膜 1 小时,转膜后,丽春红染色,观察转膜效果。洗去丽春红,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 小时,将膜取出,置于一杂交袋中,加入抗 ERK1/2 抗体,室温孵育 10 分钟,4℃ 过夜。第二天在室温孵育 30 分钟,TBS T 洗膜 5 分钟×5 次。将膜取出,置于另一杂交袋中,加入酶标二抗,室温轻摇 60 分钟。TBST 洗膜 5 分钟×6 次。ECL 显色,曝光显像,扫描,保存结果。

2.5 统计方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,各项数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料首先进

行正态性、方差齐性检验。数据方差齐时,用单样本方差分析(One-way ANOVA)进行组间方差分析;数据方差不齐时用 Tamabane's T2 法分析;同一组间的重复测量资料比较采用配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。本文中表 1、表 2 数据符合方差齐性检验,组间数据进行单样本方差分析。

3 结果

3.1 大鼠左后足体积变化

造模第 1 天,各组大鼠左后足体积间无明显差异;造模后第 7 至 50 天,空白组大鼠左后足体积均小于其它各组,空白组与其它各组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);造模第 40 天,各治疗组大鼠左后足体积明显低于模型组,各治疗组大鼠左后足体积和模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);中剂量中药治疗组与雷公藤多苷组间无显著差异($P > 0.05$);中剂量中药治疗组大鼠左后足体积明显小于低剂量中药治疗组和高剂量中药治疗组,组间比较,有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 大鼠右后足体积变化

造模后的第 1 天与第 7 天,空白对照组大鼠右后足与其它各组比较,均无统计学差异,从造模第 14 天开始,在不同时间段,空白组大鼠右后足体积均低于其它各组,有统计意义($P < 0.05$);其它各组大鼠右后足在造模第 14 天后,均出现不同程度肿胀,造模后第 30 天,模型组大鼠右后足体积明显大于其它组,有统计学差异($P < 0.05$);各组治疗后前后自身对照,右后足体积均有增加,有统计学意义($P < 0.05$),中剂量中药组和雷公藤多苷治疗组组间比较,右后足体积差别无统计意义($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 大鼠滑膜组织 ERK1/2 的表达

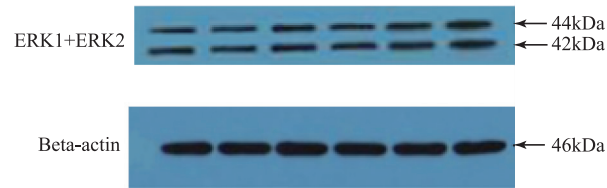
实验结果显示:治疗后,组间分析比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),益气补肾活血方组大鼠滑膜组织 ERK1/2 的表达水平明显低于模型组,提示益气补肾活血方能抑制大鼠滑膜 ERK1/2 的表达;其中中剂量治疗组的大鼠滑膜 ERK1/2 的表达水平明显低于低剂量组和高剂量组,提示中剂量的益气补肾活血方是抑制大鼠滑膜 ERK1/2 的表达最适剂量。益气补肾活血方能抑制 AA 大鼠滑膜组织 ERK1/2 的激活,从而影响 ERK1/2 转到通路的活化。见图 1、表 3。

表 1 各组大鼠左后足体积变化情况 (mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 (mg/kg)	足体积变化						
			1 天	7 天	14 天	21 天	30 天	40 天	50 天
空白对照组	10	--	0.85±0.08	1.11±0.11	1.33±0.10	1.49±0.08	1.64±0.09	1.74±0.09	1.77±0.08
模型对照组	10	--	0.83±0.28	1.90±0.14	2.05±0.10	2.28±0.13	2.56±0.05	2.66±0.08	2.85±0.10
雷公藤多苷组	10	3.6	0.83±0.30	1.88±0.11	2.05±0.11	2.27±0.10	2.52±0.08	2.51±0.07	2.61±0.07
低剂量中药组	10	2400	0.84±0.10	1.90±0.09	2.06±0.12	2.26±0.15	2.53±0.07	2.56±0.10	2.68±0.11
中剂量中药组	10	4800	0.83±0.02	1.89±0.18	2.06±0.18	2.25±0.09	2.52±0.05	2.50±0.07	2.60±0.05
高剂量中药组	10	9600	0.84±0.15	1.89±0.22	2.05±0.11	2.27±0.11	2.54±0.04	2.58±0.09	2.70±0.13

表 2 各组大鼠右后足体积变化情况 (mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 (mg/kg)	足体积变化						
			1 天	7 天	14 天	21 天	30 天	40 天	50 天
空白对照组	10	--	0.84±0.06	0.99±0.05	1.34±0.09	1.43±0.07	1.49±0.06	1.52±0.04	1.58±0.08
模型对照组	10	--	0.84±0.03	1.10±0.11	1.52±0.15	1.59±0.15	1.69±0.09	1.78±0.10	1.93±0.08
雷公藤多苷组	10	3.6	0.83±0.03	1.09±0.12	1.47±0.12	1.61±0.09	1.63±0.07	1.67±0.07	1.81±0.07
低剂量中药组	10	2400	0.84±0.05	1.10±0.09	1.49±0.12	1.58±0.15	1.64±0.07	1.71±0.10	1.83±0.10
中剂量中药组	10	4800	0.83±0.02	1.09±0.11	1.50±0.11	1.58±0.08	1.59±0.06	1.66±0.07	1.79±0.09
高剂量中药组	10	9600	0.82±0.05	1.09±0.12	1.51±0.11	1.59±0.11	1.65±0.04	1.72±0.09	1.84±0.13



注:图 1 中蛋白印迹的表达,从左到右的顺序依次为:雷公藤组、空白组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组、模型组。

图 1 各组大鼠滑膜组织 ERK1/2 的表达

表 3 各组大鼠滑膜组织 ERK1/2 的表达水平比较

组别	n	ERK1/2
雷公藤组	10	0.133
空白组	10	0.108
中药低剂量组	10	0.142
中药中剂量组	10	0.131
中药高剂量组	10	0.158
模型组	10	0.195

分析图 1 和表 3,各组大鼠滑膜组织中 ERK1/2 表达程度由低到高的排列顺序为:空白组、中药中剂量组、雷公藤组、中药低剂量组、中药高剂量组、模型组。

4 讨论

类风湿关节炎是以慢性滑膜炎和关节结构破坏为主要症状的自身免疫系统病,其主要的病理变化发生在关节滑膜。关节滑膜的一个重要组成部分——成纤维样滑膜细胞,可以分泌基质金属蛋白酶、化学趋化因子、促炎性细胞因子等,这些物质均可作用于滑膜细胞的信号转导途径,引起滑膜细胞的信号转导异常,最终导致关节滑膜的病理变化^[3]。因此滑膜细胞信号的转导异常是本病的重要发病机制之一。

MAPK 途径是生物体内广泛介导细胞内及细胞间的多种生理反应过程的重要信号系统。目前在哺乳动物体内已经证实的 MAPK 信号转导通路有 4 条,分别是 C-Jun 氨基末端激酶 (c-jun n-terminal kinase,JNK) 通路、P38 丝裂原活化蛋白激酶通路、ERK1/2 通路、ERK5 通路^[4]。ERK1/2 途径是 MAPK 途径的重要组成部分。ERK1/2 可特异性地激活该途径,其广泛地存在于关节滑膜组织中,参与滑膜组织的信号转导过程。近年来的研究表明,ERK1/2 途径的激活,是类风湿关节炎发病的重要机制之一。

ERK1/2 信号通路是细胞内重要的促增殖和抗凋亡通路,可影响下游细胞的周期调节蛋白、凋亡

蛋白等分子的活性,在细胞的生长、发育、凋亡过程中起重要作用。ERK1/2 信号通路的主要激活途径有 2 条:G 蛋白偶联受体途径和受体酪氨酸激酶 Ras 途径。ERK 途径的经典通路为 RPTK-Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2。ERK1/2 信号通路激活后,可磷酸化膜蛋白、胞质蛋白、转录因子等多种靶蛋白^[5]。滑膜组织细胞内的白细胞介素(interleukin,IL)1、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子受体,可与配体特异性结合,活化 Ras 蛋白,激活 ERK1/2 信号通路^[6-7]。高水平的细胞因子的产生,可能是滑膜细胞增生的重要原因。实验结果显示,治疗后,各治疗组大鼠滑膜 ERK1/2 的表达水平均明显低于模型组,提示 AA 大鼠关节炎症状的严重程度与 ERK1/2 的表达水平密切相关,ERK1/2 信号通路在 RA 的发病过程中发挥重要作用。

前期研究表明益气补肾活血方对 RA 的治疗具有良好的疗效。益气补肾活血方能显著降低关节炎大鼠血清肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 的水平^[8]。益气补肾活血方通过抑制 RANKL(与骨破坏密切相关的细胞因子)的水平,提高骨保护素 OPG 的水平,达到了明显的骨保护作用^[9]。益气补肾活血方促进大鼠 T 细胞的活化、增殖,并能上调 IL-10,下调 IL-17,从而增强了细胞因子的抗炎效应,抑制了细胞因子的促炎效应,具有双向免疫调节作用^[10]。实验结果显示,治疗后,益气补肾活血方组大鼠滑膜 ERK1/2 的表达水平明显低于模型组,提示益气补肾活血方能下调关节炎大鼠滑膜 ERK1/2 的表达水平,抑制关节炎大鼠滑膜组织 ERK1/2 的激活,从而抑制 ERK1/2 转导通路的活化,起到抑制滑膜异常增殖和关节骨质侵蚀的作用。这可能是该方治疗类风湿关节炎的作用机制之一。通过对本研究中益气补肾活血方治疗类风湿关节炎疗效的观察,中医药对类风湿关节炎滑膜细胞转导通路的影响会是未来中医药治疗类风湿关节炎研究的一大热点。

本研究的不足之处:如果在实验的不同时间

(造模后的 14 天、21 天、30 天、40 天),各处死大鼠 2 只,测量各组大鼠滑膜组织 ERK1/2 的表达,进行各组大鼠前后不同时间 ERK1/2 表达水平的比较,更能体现药物对大鼠体内 ERK1/2 表达的影响。

参 考 文 献

- [1] Xue-Ying Huang, Xiao-Ming Zhang, Fei-Hu Chen, et al. Anti-proliferative effect of recombinant human endostatin on synovial broblasts in rats with adjuvant arthritis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, (723): 7-14.
- [2] 冯作化. 医学分子生物学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004, 114.
- [3] Erlman H, Pagliari LJ, Liu H, et al. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(1): 21-30.
- [4] Nishimoto S, Nishida E. MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2[J]. *EMBO Rep.* 2006, (8): 782-786.
- [5] Kato H, Nishida K, Yoshida A, et al. Effect of NOS2 gene deficiency on the development of autoantibody mediated arthritis and subsequent articular cartilage degeneration[J]. *J Rheumatol.* 2003, 30(2): 247-255.
- [6] Cichowski K, Santiago S, Jardim M, et al. Dynamic regulation of the Ras pathway via proteolysis of the NF1 tumor suppressor[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(4): 449-454.
- [7] Yosuke Hattori, Toshihisa Kojima, Daizo Kato, et al. A selective estrogen receptor modulator inhibits tumor necrosis factor- α -induced apoptosis through the ERK1/2 signaling pathway in human chondrocytes[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, (421): 418-424.
- [8] 刘淑清, 陈湘君. 益气补肾活血方对佐剂关节炎大鼠白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(5): 67-69.
- [9] 刘淑清, 陈湘君. 益气补肾活血方对佐剂关节炎大鼠 OPG 和 RANKL 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 9(30): 2091-2093.
- [10] 刘淑清, 陈湘君. 益气补肾活血方对佐剂关节炎大鼠 IL-10 和 IL-17 的影响[J]. *风湿病与关节炎*, 2013, 2(12): 26-29.

(收稿日期: 2014-12-17)

(本文编辑: 禹佳)