

胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织中磷酸化p38与JNK通路及痹肿消汤的影响***★

肖玉美, 熊新贵, 陈 疆, 梁清华, 郭亚静, 徐则林, 吴 丹, 范 荣

Effects of *Bizhongxiao* decoction on activation of phosphorylated p38 and JNK proteins in synovium of rats with collagen-induced arthritis

Xiao Yu-mei, Xiong Xin-gui, Chen Jiang, Liang Qing-hua, Guo Ya-jing, Xu Ze-lin, Wu Dan, Fan Rong

Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Xiao Yu-mei, ★ Studying for master's degree, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China 179423557@qq.com

Correspondence to: Liang Qing-hua, Professor, Doctoral supervisor, Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China Lqhxy@126.com

Supported by: Ph.D. Program Foundation of Ministry of Education of China, No.200805330011*; Science and Technology Planning Program of Hunan Province, No.2009SK3163*; Traditional Chinese Medicine Foundation of Hunan Province, No. 2010038*

Received: 2011-03-05
Accepted: 2011-06-11

Abstract

BACKGROUND: Reports have shown that abnormal synovial cell signaling is one of important mechanisms of rheumatoid arthritis.

OBJECTIVE: To investigate the effects of *Bizhongxiao* decoction on activation of phosphorylated p38 and JNK proteins in mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in synovium of rats with collagen-induced arthritis.

METHODS: A total of 72 Sprague-Dawley rats were randomly and evenly divided into three groups: normal, model, and *Bizhongxiao* decoction. In the model and *Bizhongxiao* decoction groups, rat models of collagen-induced arthritis were created by injection of type II collagen and complete Freud's adjuvant into rat toes. After 10 days, rats were immunized again. From day 14 after primary immunization, the *Bixiao* decoction group rats were intragastrically administered *Bizhongxiao* decoction every day, the model group rats were identically given distilled water, and the normal group rats were allowed to drink water freely.

RESULTS AND CONCLUSION: Western blot analysis results showed that phosphorylated p38 and JNK expressions were significantly greater in the collagen-induced arthritis rats than in the normal controls ($P < 0.05$). Compared with the model group, phosphorylated p38 and JNK expressions were significantly downregulated in the *Bizhongxiao* decoction group ($P < 0.05$). These findings suggest that *Bizhongxiao* decoction can inhibit phosphorylated p38 and JNK expressions in rheumatoid arthritis.

Xiao YM, Xiong XG, Chen J, Liang QH, Guo YJ, Xu ZL, Wu D, Fan R. Effects of *Bizhongxiao* decoction on activation of phosphorylated p38 and JNK proteins in synovium of rats with collagen-induced arthritis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2011;15(33): 6216-6219. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 有研究报道滑膜细胞信号传导异常是类风湿关节炎发病的重要机制之一。

目的: 观察胶原诱导性关节炎大鼠中丝裂原活化蛋白激酶通路中磷酸化 p38 和磷酸化 JNK 的活化及痹肿消汤的影响。

方法: 将 72 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、痹肿消汤组。模型组及痹肿消汤组大鼠足趾注射胶原蛋白乳剂制备胶原诱导性关节炎模型大鼠, 10 d 后加强免疫, 初次免疫后第 14 天开始给痹肿消汤组大鼠每天痹肿消汤灌胃, 模型组蒸馏水灌胃, 正常组自由饮水。

结果与结论: Western blot 检测结果显示, 胶原诱导性关节炎大鼠中磷酸化 p38 及 JNK 的表达较正常组显著增高($P < 0.05$)。与模型组相比, 痹肿消汤组能下调磷酸化 p38 及 JNK 蛋白的表达($P < 0.05$)。说明痹肿消汤可抑制类风湿关节炎中磷酸化 p38 及 JNK 的高表达。

关键词: 痹肿消汤; 胶原诱导性关节炎; 滑膜; 丝裂原活化蛋白激酶; p38; JNK; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.33.033

肖玉美, 熊新贵, 陈疆, 梁清华, 郭亚静, 徐则林, 吴丹, 范荣. 胶原诱导性关节炎大鼠滑膜组织中磷酸化 p38 与 JNK 通路及痹肿消汤的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(33):6216-6219.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

近年来, 很多研究资料表明, 滑膜细胞信号传导异常是类风湿关节炎的重要发病机制之一^[1-2], 而丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)在该细胞信号传导通路中可能起到了十分重要的作用。

复方中药痹肿消汤是在大量临床实践中, 在中医辨证论治原则指导下, 结合现代药理研究成果, 筛选到的治疗类风湿关节炎的有效中药方剂。实验观察了类风湿关节炎中丝裂原活

化蛋白激酶的表达情况及痹肿消汤对类风湿关节炎的治疗机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010-04/08在中南大学中西医结合实验室完成。

材料:

实验动物: 健康40~50 d Sprague-Dawley (SD)大鼠72只, 雌雄各半, 体质量(150±30) g, 购自中南大学湘雅医学院动物实验中心。实验

对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[3]。

痹肿消汤: 痹肿消汤由白花蛇舌草、白芍、肿节风、丹参、络石藤、骨碎补、苡米等中药组成。方中药材从湘雅医院中药房一次性选购, 入砂锅中加4倍体积的超轻水浸泡30 min, 煎2次, 30 min/次, 去渣, 两煎混合, G4滤器过滤, 于60 °C水浴中浓缩成每毫升药液含生药6.21 g, 密封隔水煮沸消毒, 4 °C冰箱保存。

主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|-----------------------|------------------------|
| 牛 II 型胶原蛋白 | Sigma 公司 |
| 兔抗 p-p38, p-JNK 多克隆抗体 | ABCAM 公司 |
| Elx800 自动酶标仪 | Bio-Tek Instruments 公司 |

实验方法:

分组及建模: 72只大鼠适应性饲养7 d后随机分为正常组、模型组、痹肿消汤组, 每组24只, 每组分为建模后14, 21, 28 d组, 每时间点每组8只。初次免疫后第14天开始痹肿消汤组每天灌服中药3 mL, 相当于生药62.1 g/(kg·d), 按人-动物体表面积换算后为70 kg成人临床用药3倍, 模型组灌服蒸馏水3 mL, 正常组自由饮水。

胶原诱导性关节炎大鼠模型的制备: 牛 II 型胶原蛋白20 mg与0.05 mol/L冰醋酸溶液10 mL混匀, 质量浓度为2 g/L, 置于4 °C冰箱中过夜。冰浴下将含有牛 II 型胶原蛋白的冰醋酸与完全弗氏佐剂等体积混合, 研磨、乳化, 质量浓度为1 g/L, 将混悬乳剂于模型组及痹肿消汤组大鼠左后足底、尾根部、背部皮内注射乳化液共0.2 mL, 第10天用同样方法在右后足底、尾根部、背部加强注射1次^[4]。若建模成功大鼠趾端至踝关节段可出现发红肿胀。

各组每个时间点大鼠各8只, 于免疫前、初次免疫后14, 21, 28 d分别测量体质量, 从足爪出现红肿起每隔4 d按关节炎指数积分法记录关节红肿情况和范围以及关节肿大和变形情况, 按5级评分法评价。0分: 无红肿; 1分: 趾关节红肿; 2分: 趾关节和足趾肿胀; 3分: 踝关节以下的足爪肿胀; 4分: 踝关节在内的全部足爪肿胀。四肢关节累积积分为最后总得分, 关节炎指数积分越高, 关节症状越严重。大鼠致炎前测定大鼠右后足爪容积, 从足爪出现红

肿起, 每隔7 d测1次, 某一时间免疫后与免疫前足容积的差值即为该时大鼠的足爪肿胀度。

Western blot检测大鼠磷酸化p38及JNK蛋白的表达: 取各组大鼠关节滑膜组织, 加组织裂解液, 提取总蛋白, BCA法测定各样品蛋白浓度; 进行SDS-PAGE胶电泳, 转印于硝酸纤维素膜上, 封闭, 一抗孵育, 同时选用 β -actin抗体进行内参检测, 二抗孵育, 选用ECL荧光检测试剂, 压片, 洗片, 检测磷酸化p38及JNK蛋白的表达。结果用是目的蛋白和内参的灰度值比值表示。

主要观察指标: 体质量变化情况, 关节红肿情况, 足爪肿胀度, p38及JNK有表达情况。

统计学分析: 计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 10.0统计学软件进行统计学分析。各组间数据比较采用单因素方差分析, 和SNK-*q*法, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入72只大鼠均进入结果分析, 无脱落。

2.2 大鼠一般情况观察 模型组注射部位出现溃疡结痂。关节炎体征在初次免疫8~10 d开始出现, 普遍发现动物的后肢先发病, 最早表现趾端发红, 然后从趾端向踝关节发展, 形成肿胀, 随之其余肢体也相继受累。发病过程中, 大鼠表现为精神萎靡, 少动, 饮食减少, 体质量减轻。痹肿消汤组治疗1周, 关节炎体征较模型组有减轻, 饮食增强, 较模型组好动。

2.3 大鼠体质量变化 见表1。

| Group | Primary immunization time (d) | |
|--------|-------------------------------|-------------------------|
| | 0 | 14 |
| Normal | 10.67±0.02 | 10.45±0.30 |
| Model | 10.62±0.21 | 10.55±0.26 |
| BZXD | 10.61±0.20 | 10.46±0.25 |
| Group | Primary immunization time (d) | |
| | 21 | 28 |
| Normal | 10.31±0.19 | 10.10±0.24 |
| Model | 7.51±0.20 ^a | 7.29±0.16 ^a |
| BZXD | 8.50±0.22 ^{ab} | 8.24±0.18 ^{ab} |

^a $P < 0.05$, vs. normal group at the same time; ^b $P < 0.05$, vs. model group at the same time; BZXD: *Bizhongxiao* decoction

中南大学湘雅医院中西医结合科, 湖南省长沙市 410008

肖玉美★, 女, 1983年生, 湖南省邵阳市人, 汉族, 中南大学在读硕士, 主要从事中西医结合脑血管及风湿免疫临床与实验研究。179423557@qq.com

通讯作者: 梁清华, 教授, 博士生导师, 中南大学湘雅医院中西医结合科, 湖南省长沙市 410008 Lqhxy@126.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)33-06216-04

收稿日期: 2011-03-05
修回日期: 2011-06-11
(0101116004/WJ·S)

大鼠免疫前(0 d)及初次免疫后2周(14 d), 模型组及痹肿消汤组大鼠较正常组体质量增长相对缓慢 ($P > 0.05$)。初次免疫后3, 4周(即治疗后1, 2周, 21, 28 d), 痹肿消汤组体质量增加明显快于模型组 ($P < 0.05$), 以上结果提示痹肿消汤可改善胶原诱导性关节炎大鼠的生活质量。

2.4 大鼠关节炎指数积分 见表2。

表2 关节炎指数积分变化
Table 2 The change of Arthritis index points in three groups ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{score}$)

| Group | Primary immunization time (d) | | | | | |
|--------|-------------------------------|---------|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 |
| Normal | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Model | 1.5±0.1 | 1.6±0.1 | 2.0±0.2 | 7.2±0.2 | 8.5±0.2 | 8.2±0.1 |
| BZXD | 1.6±0.1 | 1.7±0.2 | 2.0±0.1 | 6.3±0.2 ^a | 6.6±0.2 ^a | 6.5±0.2 ^a |

^a $P < 0.05$, vs. model group at the same time; BZXD: *Bizhongxiao* decoctio

关节炎指数是反映关节炎发生与发展的一个重要客观指标。

初次免疫1周后, 模型组及痹肿消汤组大鼠出现关节发红肿胀等关节炎体征, 痹肿消汤组治疗1周后关节炎指数积分开始下降, 模型组则不断上升。

于出现关节炎症状后即初次免疫后第8天及此后每隔4 d记录下关节炎指数积分情况, 痹肿消汤组在20, 24, 28 d关节炎指数明显低于模型组 ($P < 0.05$)。

2.5 足爪肿胀度测量 见表3。

表3 足爪肿胀度测量结果
Table 3 Measurement of paw swelling in three groups ($\bar{x} \pm s, n=8, \text{mm}$)

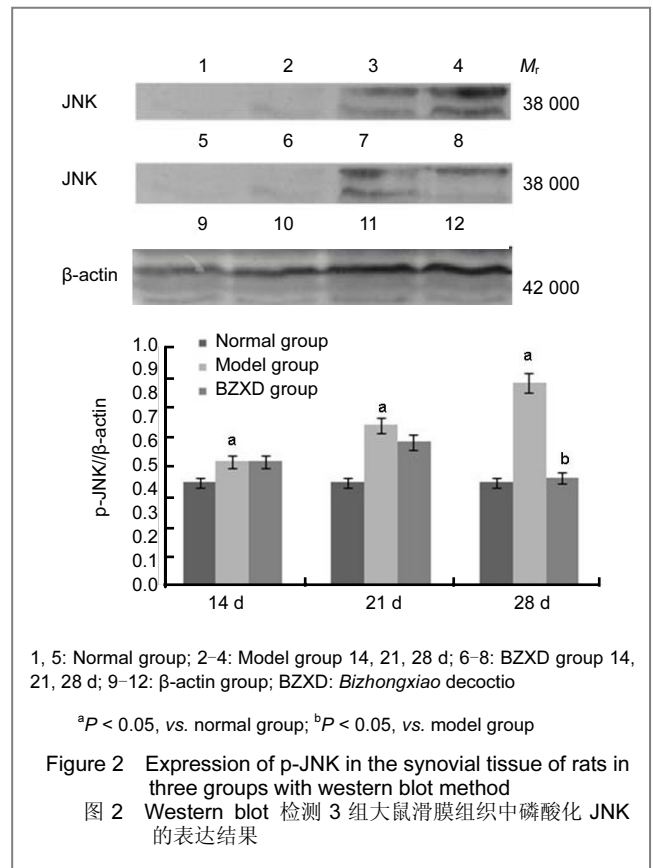
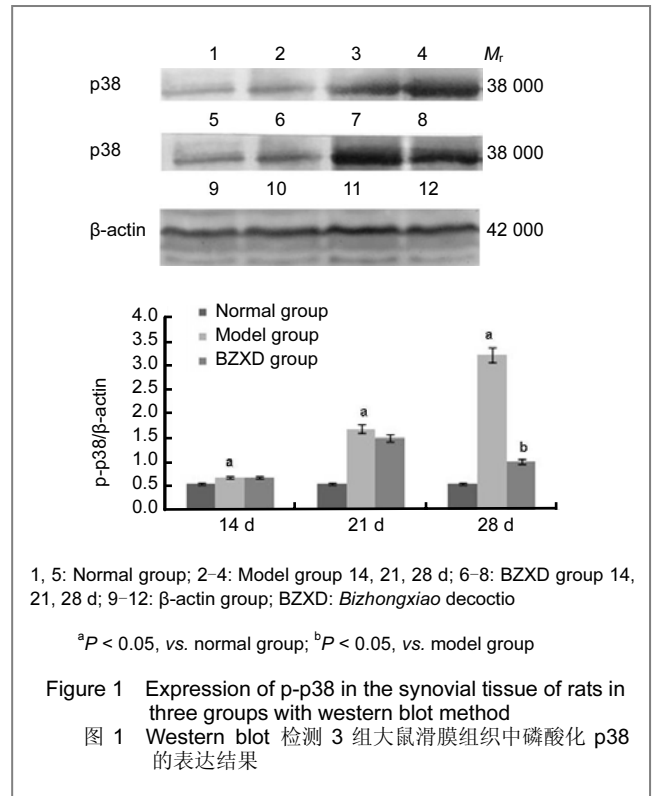
| Group | Primary immunization time (d) | | | | |
|--------|-------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Normal | 4.1±0.1 | 4.7±0.2 | 4.8±0.1 | 5.3±0.4 | 5.5±0.2 |
| Model | 4.1±0.1 | 6.6±0.2 ^a | 7.9±0.1 ^a | 10.2±0.2 ^a | 10.0±0.2 ^a |
| BZXD | 4.1±0.1 | 6.6±0.1 ^a | 7.7±0.2 ^a | 9.5±0.2 ^{ab} | 9.4±0.2 ^{ab} |

^a $P < 0.05$, vs. normal group at the same time; ^b $P < 0.05$, vs. model group; BZXD: *Bizhongxiao* decoctio

模型组及痹肿消汤组于初次免疫1周后关节足爪肿胀度高于正常组 ($P < 0.05$)。

痹肿消汤组治疗1周后足爪肿胀度较模型组有所下降 ($P < 0.05$)。

2.6 磷酸化p38和JNK的表达 Western blot 检测结果显示, 与正常组比较, 模型组滑膜组织p-p38及p-JNK表达在14, 21, 28 d水平递增 ($P < 0.05$)。痹肿消汤组p-p38及p-JNK表达于建模后28 d低于模型组 ($P < 0.05$), 3组大鼠磷酸化p38和JNK的表达见图1, 2。



3 讨论

类风湿关节炎是一种以慢性滑膜炎和关节结构破

坏为主要症状的全身免疫性疾病。其特征为对称性、进行性及侵蚀性的多关节慢性炎症病变。据统计, 中国类风湿关节炎患病率为0.32%~0.36%^[5], 全世界此病患病率为0.5%~1.0%^[6]。若未进行及时有效的治疗, 2年致残率为50%, 3年致残率达70%^[7], 严重影响患者的生活质量, 也是造成中国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一。MAPK信号通路参与了类风湿关节炎中关节滑膜的炎症反应, 目前对MAPK信号通路的抑制剂的研究越来越受到关注, 已成为了类风湿关节炎的潜在治疗途径^[8]。以往的研究发现p38和JNK途径在类风湿关节炎滑膜中的活化明显增强^[9], 与关节局部炎症及骨质破坏有关, 具有重要的致病意义。

中药治疗类风湿关节炎具有多靶点, 多环节或整体调节或双向调节的作用, 且毒副作用少。痹肿消汤是在大量临床实践中, 在中医辨证论治原则指导下, 结合现代药理研究成果, 筛选到的治疗类风湿关节炎的有效中药复方, 具有清热解毒、祛风除湿、活血化瘀、补益肝肾等功效。方中选用白花蛇舌草、肿节风等清热解毒, 薏苡仁、络石藤等利湿祛风通络, 丹参、肿节风等活血化瘀通络, 骨碎补等补益肝肾, 诸药协同, 湿热之邪得清, 经络瘀阻得通, 红、肿、热、痛自止, 损伤之骨自复。

目前研究显示, 大部分大鼠于初次免疫2周后造模成功, 例如出现关节红肿, 炎性细胞浸润, 血管生成, 滑膜炎, 软骨或骨侵蚀, 关节变形等^[10]。实验发现, 与模型组相比, 痹肿消汤组大鼠于初次免疫两三周后出现体重增长明显, 关节症状的缓解, 关节积分的下降, 表明痹肿消汤具有抑制炎症反应的作用。同样与模型组对比, 初次免疫3周后痹肿消汤组中p-p38和p-JNK的表达开始下降。而模型组大鼠的关节炎症状越来越严重, 出现了软骨破坏和骨侵蚀, 最终导致关节僵硬和畸形。

实验结果说明痹肿消汤在控制类风湿关节炎的关节炎症状, 缓解关节肿胀方面具有明显疗效, 痹肿消汤可能通过抑制p38和JNK信号传导通路, 从而减少炎症因子的释放, 抑制滑膜异常增殖, 达到阻抑类风湿关节炎关节骨质侵蚀的目的, 从而为今后的临床工作提供了更多的依据。但由于痹肿消汤为中药复方, 实验很难去评价其中的哪些有效成分具有抗关节炎的功效。这种现象在中医药中很见, 就像蜈蚣经常与僵蚕一起使用, 地黄经常与芍药一起使用, 这些药物配伍后所产生的抗炎作用肯定大于单个药所产生的功效^[10]。

4 参考文献

- [1] Sun TY, Yang L, Wang YN. Huabei Meitang Yixueyuan Xuebao. 2006;8(3):315-318.
孙天英, 杨林, 王娅南. p38丝裂原活化蛋白激酶在类风湿性关节炎中的研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2006, 8(3):315-318.
- [2] Chen Q, Wei W. Effects and mechanisms of chaenomeles speciosa on collagen-induced arthritis in rats. Int Immunopharmacol. 2003;3(4):593-608.
- [3] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [4] Zhang P, Han D, Tang T, et al. The destruction evaluation in diver-en foot joints: new ideas in collagen-induced arthritis rat model. J Rheumatol. 2009;29(6):607-613.
- [5] Ye RG, Lu ZY. Beijing: Renmin Weisheng Chubanshe. 2004.
叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [6] Zhonghua Yixuehui Fengshixue Fenhui. Zhonghua Fengshixue Zazhi. 2003;7(4):145.
中华医学会风湿病学分会. 类风湿性关节炎诊治指南(草案)[J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(4):145.
- [7] Xun XQ, Xiong XG, Chen J. Zhongguo Zuzhi Gongcheng yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41):7696-7699.
寻晓庆, 熊新贵, 陈疆. 痹肿消汤对活动期类风湿关节炎骨侵蚀的作用: 与甲氨蝶呤联合柳氮磺胺吡啶效果比较[J]. 中国组织工程与临床康复, 2010, 14(41):7696-7699.
- [8] Ralph JA, Morand EF. MAPK phosphatases as novel targets for rheumatoid arthritis. Expert Opin Ther Targets. 2008;12(7):795-808.
- [9] Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, et al. Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000;43(11):250-2512.
- [10] Yang M, Xiao C, Wu Q, et al. Anti-inflammatory effect of Sanshuibaihu decoction may be associated with nuclear factor- κ B and p38 MAPK α in collagen-induced arthritis in rat. J Ethnopharmacol. 2010;127(2):264-273.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 课题受国家教育部高校博士点基金(200805330011), 湖南省科技计划项目(2009SK3163)和湖南中医药基金(2010038)资助。

作者贡献: 熊新贵进行实验设计, 实验实施为肖玉美, 徐则林, 郭亚静, 实验评估为肖玉美, 徐则林, 郭亚静, 资料收集为熊新贵, 陈疆, 肖玉美成文, 梁清华审校, 肖玉美对文章负责。

致谢: 感谢中南大学湘雅医院梁清华老师的帮助和支持。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其它经济或利益赞助。

伦理批准: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

本文创新性: 以往的研究大部分是从炎性细胞(如白细胞介素核肿瘤坏死因子等)方面进行研究类风关的形成机制, 本次实验则从蛋白质网络, 从信号传导通路方面更深入的探讨类风关的发病机制, 为今后的新药开发及临床治疗提供科学依据。