

桂枝附子汤对 CIA 大鼠滑膜组织中 MAPK 信号通路的影响

张晨晨, 金镭, 陈慧慧, 朱捷*
(解放军第105医院, 合肥 230031)

[摘要] **目的:**探讨桂枝附子汤对胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠滑膜组织中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响。**方法:**将SD大鼠60只随机分为正常组,模型组,桂枝附子汤组(1.5,4.5,13.5 g·kg⁻¹),甲氨蝶呤组,共6组;大鼠尾部皮下注射鸡Ⅱ型胶原(chicken typeⅡ collagen, CCⅡ)乳剂制备CIA模型;自造模后第14天开始,每周观察各给药组的关节炎指数;采用蛋白质免疫印迹(Western blot)检测滑膜组织MAPK信号转导通路中JNK, ERK, p38蛋白及相应磷酸化蛋白p-JNK, p-ERK, p-p38的表达水平。**结果:**CIA大鼠的足爪肿胀度和关节炎指数第7,14,21,28,35,42天各个时间点均高于正常组,在给予桂枝附子汤治疗后在第14天后CIA大鼠的足爪肿胀度和关节炎指数均明显降低。桂枝附子汤能明显改善CIA大鼠滑膜增生和炎性细胞浸润,使得炎性细胞减少。与正常组p-JNK, p-ERK, p-p38比较, CIA组中的p-JNK, p-ERK, p-p38的表达水平显著增强,两组治疗间有显著性变化($P < 0.01$);用甲氨蝶呤治疗CIA大鼠,与模型组比较其p-JNK, p-ERK和p-p38表达水平显著降低,两组治疗间有显著性变化($P < 0.01$);用桂枝附子汤治疗CIA大鼠,与模型组相比较其p-JNK, p-ERK, p-p38明显降低,并且呈现剂量依赖性关系。**结论:**桂枝附子汤可抑制CIA大鼠MAPK信号转导通路的活化,从而缓解炎症症状。

[关键词] 桂枝附子汤; 胶原诱导性关节炎; 丝裂原活化蛋白激酶; 信号转导

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0130-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050130

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1414.050.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 14:14

Effect of Guizhi Fuzitang on MAPK Signaling Pathway in Synovial Tissue of Rats with Collagen-Induced Arthritis

ZHANG Chen-chen, JIN Lei, CHEN Hui-hui, ZHU Jie*
(The 105th Hospital of PLA, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Guizhi Fuzitang on mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in the synovial tissue of rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Method:** The 60 SD rats were randomly divided into normal group, model group, Guizhi Fuzitang group (1.5, 4.5, 13.5 g·kg⁻¹) and methotrexate group. The rats were injected subcutaneously with chicken typeⅡ collagen (CCⅡ) through tail root to establish CIA model. Since the 14th day after modeling, the arthritic index of all groups at different time points were observed and measured. The expressions of JNK, ERK and p38 proteins in MAPK signal transduction pathway as well as the expression of corresponding phosphorylated proteins p-JNK, p-ERK and p-p38 were detected by western blot. **Result:** The swelling degree and arthritis index of the CIA rats were higher than the normal group at 7 th, 14 th, 21 th, 28 th, 35 th, 42 th time, and were significantly reduced at d14 after being given Guizhi Fuzitang. Guizhi Fuzitang can obviously alleviate the synovial hyperplasia and the infiltration of inflammatory cell, and reduce the inflammatory cells. Compared with the normal group (p-JNK, p-ERK, p-p38), the protein

[收稿日期] 20160615(011)

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(1408085QH163)

[第一作者] 张晨晨, 硕士, 主管药师, 从事药理学研究, Tel:0551-65967572, E-mail: chenchen105yiyuan@126.com

[通讯作者] *朱捷, 硕士, 副主任药师, 从事临床药理学研究, Tel:0551-65966231, E-mail: zzyy105@sina.com

expression level (p-JNK, p-ERK, p-p38) of the CIA group significantly increased, with significant differences between the two groups ($P < 0.01$). Compared with the model group, the protein expression level (p-JNK, p-ERK, p-p38) of the methotrexate group significantly decreased, with significant differences between the two groups ($P < 0.01$). Compared with the model group, CIA rats showed significantly lower protein expression levels of p-JNK, p-ERK, p-p38 in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Guizhi Fuzitang could inhibit the activation of MAPK signal transduction pathway to alleviate the symptoms of inflammation in CIA rats.

[**Key words**] Guizhi Fuzitang; collagen-induced arthritis; mitogen-activated protein kinase; signal transduction

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以对称性多关节炎为主要表现的慢性、进行性、侵蚀性的系统性自身免疫疾病^[1]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是信号转导系统网状结构中最重要酶类之一,该信号通路的异常活化与RA的发生和发展密切相关^[2]。桂枝附子汤出自《伤寒论》,常用于痹证的治疗,药方中桂枝温通经脉;附子散寒止痛,温经通络;生姜、大枣、炙甘草益气健脾,和卫固表。综观全方,诸药配伍,共达温阳散寒、祛风除湿之功效。研究发现,桂枝挥发油可能通过影响炎症介质生成、抑制花生四烯酸代谢及抗氧化等作用,从而对急性、慢性和免疫损伤性炎症起显著的抑制作用^[3]。另有研究表明,附子酸性多糖能增强免疫功能低下小鼠的脾脏和胸腺指数,并刺激抗体生成,促进淋巴细胞转化,而起到免疫调节作用^[4]。然而在RA疾病进程中桂枝附子汤对MAPK信号通路的作用机制国内尚无报道,本实验通过建立胶原诱导性关节炎(CIA)大鼠模型,研究桂枝附子汤对CIA模型大鼠滑膜组织中磷酸化的JNK, ERK, p38蛋白水平变化的影响,进一步明确药物的作用机制是否与调控MAPK信号通路相关,为其临床使用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠,SPF级,体重(220±10)g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号SCXK(军)2012-0004。在恒温(22±2)℃,光照周期12h:12h环境中饲养1周后进行实验。所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 桂枝附子汤组成附子15g,桂枝12g,大枣25g,生姜9g,甘草6g,药材均购于亳州药材市场;甲氨喋呤片(上海信谊药厂有限公司,批号036130413);鸡Ⅱ型胶原及不完全弗氏佐剂(美国Sigma公司,批号分别为062M4075V,051M8728);兔抗ERK1/2,兔抗p-ERK1/2,兔抗

JNK,兔抗p-JNK抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为BS1112,BS4621,BS1544,BS4763);兔抗p38,兔抗p-p38抗体(美国BD公司,批号分别为BS4766,BS4635);兔抗β-肌动蛋白(β-actin)抗体(美国Santa Cruz公司,批号E021020)。

1.3 仪器 DYY-6C型双稳定时电泳仪,DYY-Ⅲ40B型转移电泳槽及WD-9405B型水平脱色摇床(北京六一仪器厂);CCD型凝胶成像系统(美国UVP公司),TB-718型生物组织自动包埋机(泰雄电子设备有限公司),ASP200型组织脱水机(德国Leica公司),RM-2126RT型切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 供试药物制备 取附子加适量水煎煮60min后,将桂枝、大枣、生姜、甘草加入到药液中,加约10倍药材的水,用大火煮沸后,用文火煎煮30min,冷却后倒出药液,再将药渣按照上述方法煎煮倒出滤液,合并2次药液,将其浓缩至每毫升汤药中含有1g的生药^[5]。

2.2 CIA模型的建立^[6] 将CCⅡ溶于0.05 mol·L⁻¹冰乙酸中,在4℃下搅拌充分溶解,置4℃冰箱过夜;取不完全弗氏佐剂等体积混合,于冰上充分乳化,制得抗原乳剂,并置4℃冰箱保存备用。首次免疫于大鼠尾部皮下注射Ⅱ型胶原乳剂0.2mL,1周后取该乳剂0.1mL加强免疫1次;正常组同法注射等体积生理盐水。

2.3 动物分组及给药 采用随机数字表法将大鼠随机分为6组,分别为正常组,模型组,甲氨喋呤组(1.5 mg·kg⁻¹),桂枝附子汤低、中、高剂量组(1.5, 4.5, 13.5 g·kg⁻¹),每组10只。于致炎后,各给药组连续ig给药规定剂量的桂枝附子汤,正常组和模型组以等量的生理盐水灌胃(ig),各组连续给药21d。

2.4 大鼠CIA模型的评价 致炎前及炎症出现后

每隔 1 周测定大鼠足爪容积(非致炎侧),求继发侧足爪肿胀度($\Delta =$ 致炎后足容积 - 致炎前足容积);炎症出现后,每隔 1 周对 CIA 大鼠进行一次关节炎指数评分。依据关节红肿的程度和范围,每只足爪的关节炎指数评分标准为:0 为正常;1 为踝关节轻微肿胀;2 为踝关节到趾关节轻微肿胀;3 为踝关节到趾关节中度肿胀;4 为踝关节到趾关节重度肿胀。每只大鼠最多评 12 分。

2.5 样本采集 给药结束后,腹主动脉放血处死动物。取部分大鼠膝关节滑膜组织置于 4% 多聚甲醛中固定,不同浓度梯度乙醇逐级脱水、浸蜡、石蜡包埋,切片、苏木素-伊红(HE)染色。其余新鲜组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于蛋白质免疫印迹(Western blot)检测。

2.6 指标测定

2.6.1 大鼠滑膜组织 HE 染色 光学显微镜(400 倍)观察滑膜组织病理组织形态学的变化。

2.6.2 Western blot 检测 MAPK 信号通路中 JNK, ERK, p38 蛋白及相应磷酸化蛋白 p-JNK, p-ERK, p-p38 表达水平 称取一定量的滑膜组织用干净剪刀将组织剪碎后,置于干净的玻璃匀浆器中,加入一定量的 RIPA 蛋白裂解液,冰上匀浆, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min),收集上清,加一定量 $5\times$

电泳加样缓冲液,置沸水中煮沸 10 min 后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将样品 $8\ \mu\text{L}$ 加入预制的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电泳结束后将凝胶中的蛋白电转移至硝酸纤维素滤膜(NC 膜)上。将膜用 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭过夜,加入一抗,室温轻摇孵育 4 h,洗膜,加入二抗,室温振荡 2 h,洗膜。加入显色剂显色,凝胶成像系统扫描,以特异性条带浓度与面积的乘积为有效值,表示蛋白表达水平。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,多样本均数间两两比较采用 LSD 和 S-N-K 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CIA 大鼠关节肿胀度和关节炎指数的影响 正常大鼠足爪无肿胀,活动正常。CIA 大鼠约从免疫后第 14 天起开始出现前、后肢踝关节红肿,免疫后第 21 天至第 35 天炎症反应进入急性期,踝关节累及趾关节甚至整个脚掌红肿明显,关节炎指数明显升高。之后炎症进入慢性期,红肿略消退。桂枝附子汤各剂量组和甲氨喋呤组可显著抑制 CIA 大鼠的足爪肿胀度和关节炎指数($P < 0.01$)。见表 1, 2。

表 1 桂枝附子汤对 CIA 大鼠关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Guizhi Fuzitang on paw swelling of CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 10$) mL

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
正常	-	0.062 \pm 0.045	0.064 \pm 0.043	0.074 \pm 0.048	0.078 \pm 0.051	0.075 \pm 0.038	0.068 \pm 0.021
CIA	-	0.075 \pm 0.053	0.341 \pm 0.045 ¹⁾	0.773 \pm 0.036 ¹⁾	0.887 \pm 0.034 ¹⁾	0.881 \pm 0.025 ¹⁾	0.693 \pm 0.044 ¹⁾
桂枝附子汤	1.5	0.081 \pm 0.067	0.352 \pm 0.068 ²⁾	0.754 \pm 0.052 ²⁾	0.715 \pm 0.058 ²⁾	0.626 \pm 0.044 ²⁾	0.467 \pm 0.062 ²⁾
	4.5	0.079 \pm 0.069	0.345 \pm 0.053 ²⁾	0.768 \pm 0.051 ²⁾	0.641 \pm 0.059 ²⁾	0.423 \pm 0.046 ²⁾	0.303 \pm 0.055 ²⁾
	13.5	0.079 \pm 0.061	0.353 \pm 0.045 ²⁾	0.776 \pm 0.063 ²⁾	0.521 \pm 0.055 ²⁾	0.344 \pm 0.057 ²⁾	0.169 \pm 0.043 ²⁾
甲氨喋呤	1.5×10^{-3}	0.078 \pm 0.054	0.355 \pm 0.042 ²⁾	0.789 \pm 0.047 ²⁾	0.609 \pm 0.035 ²⁾	0.455 \pm 0.064 ²⁾	0.247 \pm 0.033 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

表 2 桂枝附子汤对 CIA 大鼠关节炎指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Guizhi Fuzitang on arthritis index of CIA rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天
正常	-	0	0	0	0	0	0
CIA	-	0.50 \pm 0	4.52 \pm 0.01 ¹⁾	8.55 \pm 0.51 ¹⁾	10.73 \pm 0.65 ¹⁾	11.58 \pm 0.56 ¹⁾	9.44 \pm 0.35 ¹⁾
桂枝附子汤	1.5	0.60 \pm 0	4.37 \pm 0.01 ²⁾	8.65 \pm 0.56 ²⁾	8.96 \pm 0.45 ²⁾	8.61 \pm 0.55 ²⁾	7.31 \pm 0.52 ²⁾
	4.5	0.50 \pm 0	4.40 \pm 0.02 ²⁾	8.48 \pm 0.57 ²⁾	7.61 \pm 0.53 ²⁾	6.83 \pm 0.41 ²⁾	5.16 \pm 0.37 ²⁾
	13.5	0.55 \pm 0	4.69 \pm 0.02 ²⁾	8.88 \pm 0.54 ²⁾	6.03 \pm 0.47 ²⁾	4.78 \pm 0.53 ²⁾	3.14 \pm 0.43 ²⁾
甲氨喋呤	1.5×10^{-3}	0.50 \pm 0	4.64 \pm 0.02 ²⁾	8.73 \pm 0.49 ²⁾	6.91 \pm 0.67 ²⁾	5.85 \pm 0.61 ²⁾	5.03 \pm 0.44 ²⁾

3.2 对 CIA 大鼠关节滑膜病理形态学的影响 正常大鼠滑膜层由 1 ~ 2 层滑膜细胞组成,滑膜下层细胞分布散、数量少,未见炎性细胞浸润。CIA 大鼠滑膜细胞增生明显,分布紊乱,有大量炎性细胞浸润。

桂枝附子汤各剂量组和甲氨喋呤组对 CIA 大鼠滑膜增生和炎性细胞浸润有不同程度地改善,滑膜增生程度减轻,炎性细胞数目变少。见图 1。

3.3 对 CIA 大鼠滑膜组织中 MAPK 信号通路的蛋

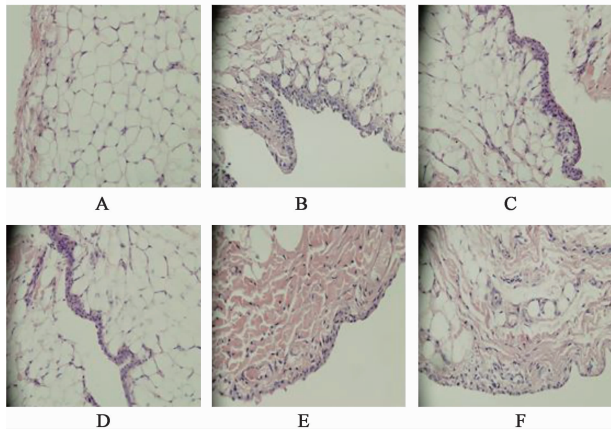


图 1 桂枝附子汤对 CIA 大鼠关节滑膜病理形态学的影响 (HE, $\times 400$)
A. 正常组; B. CIA 组; C. 桂枝附子汤 $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 桂枝附子汤 $4.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 桂枝附子汤 $13.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; F. 甲氨喋呤组 (图 2~4 同)

图 1 桂枝附子汤对 CIA 大鼠关节滑膜病理形态学的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Guizhi Fuzitang on histopathologic examination of synovium in CIA rats (HE, $\times 400$)

白表达的影响 MAPK 信号通路中 JNK, ERK 和 p38 在各组中的总蛋白表达量无统计学差异,但其蛋白磷酸化水平均发生明显变化,与正常组比较, CIA 组中的 p-JNK, p-ERK 和 p-p38 的表达水平显著增强 ($P < 0.01$); 表明模型组大鼠体内 MAPK 信号通路被激活; 桂枝附子汤各剂量组和甲氨喋呤组可显著下调 p-JNK, p-ERK 和 p-p38 的蛋白水平 ($P < 0.01$), 抑制该通路的活化。各给药组之间 p-JNK, p-ERK 和 p-p38 的变化无统计学差异。见图 2~4 及表 3。

表 3 桂枝附子汤对 CIA 大鼠滑膜组织 JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, p38, p-p38 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Guizhi Fuzitang on expression of JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, p38 and p-p38 in synovial tissue of CIA rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	JNK/ β -actin	p-JNK/ β -actin	ERK/ β -actin	p-ERK/ β -actin	p38/ β -actin	p-p38/ β -actin
正常	-	1.63 ± 0.15	0.44 ± 0.07	1.31 ± 0.21	0.49 ± 0.05	1.17 ± 0.16	0.52 ± 0.05
CIA	-	1.61 ± 0.19	$1.39 \pm 0.10^{1)}$	1.48 ± 0.19	$1.48 \pm 0.04^{1)}$	1.19 ± 0.11	$1.20 \pm 0.08^{1)}$
桂枝附子汤	1.5	1.59 ± 0.15	$0.94 \pm 0.22^{2)}$	1.37 ± 0.13	$0.75 \pm 0.10^{2)}$	1.14 ± 0.15	$0.74 \pm 0.03^{2)}$
	4.5	1.57 ± 0.18	$0.89 \pm 0.22^{2)}$	1.42 ± 0.19	$0.68 \pm 0.04^{2)}$	1.08 ± 0.19	$0.66 \pm 0.04^{2)}$
	13.5	1.58 ± 0.13	$0.85 \pm 0.15^{2)}$	1.38 ± 0.18	$0.56 \pm 0.02^{2)}$	1.13 ± 0.17	$0.53 \pm 0.09^{2)}$
甲氨喋呤	1.5×10^{-3}	1.54 ± 0.15	$0.82 \pm 0.21^{2)}$	1.39 ± 0.12	$0.71 \pm 0.05^{2)}$	1.07 ± 0.18	$0.71 \pm 0.10^{2)}$

4 讨论

RA 是一种以滑膜异常增生, 骨和软骨进行性破坏为特征的慢性、进行性系统免疫性疾病^[7]。MAPK 是真核生物细胞内广泛存在的一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 可以被一系列的细胞外刺激信号 (如炎症因子、丝裂原、生长因子等) 激活, 激活后对细胞的生长、增殖、分化、存活等发挥重要作用。MAPK 家族的信号途径主要包括 JNK, ERK 和 p38 条途径, 其异常活化与 RA 关节肿胀、滑膜细胞的活

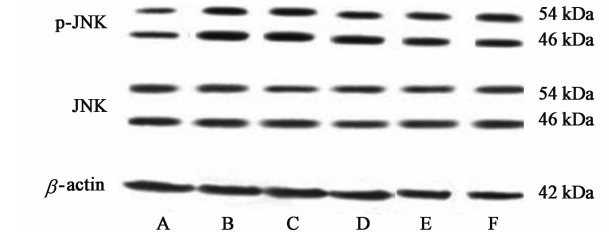


图 2 桂枝附子汤对 CIA 大鼠滑膜组织 JNK, p-JNK 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Guizhi Fuzitang on expression of JNK and p-JNK in synovial tissue of CIA rats

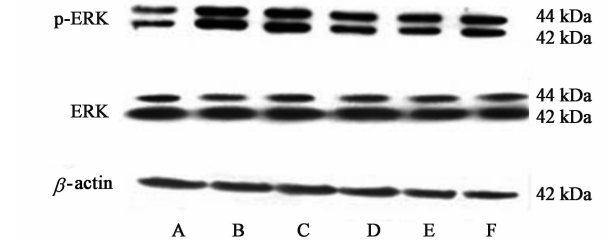


图 3 桂枝附子汤对 CIA 大鼠滑膜组织 ERK, p-ERK 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Guizhi Fuzitang on expression of ERK and p-ERK in synovial tissue of CIA rats

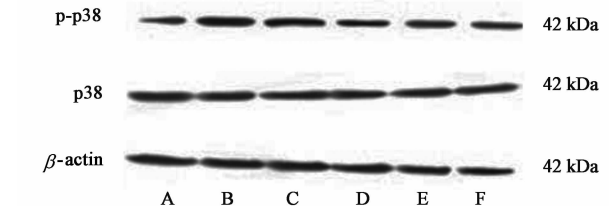


图 4 桂枝附子汤对 CIA 大鼠滑膜组织 p38, p-p38 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Guizhi Fuzitang on expression of p38 and p-p38 in synovial tissue of CIA rats

化增生以及关节软骨的降解破坏等病理过程密切相关^[8-9]。例如, 使用 JNK 抑制剂能够降低胶原诱导的关节炎 CIA 大鼠成纤维样滑膜细胞中基质金属蛋白酶 (MMP)-1 和 MMP-3 的产生, 从而减轻关节及软骨的破坏^[10]。另有研究发现 ERK 抑制剂 (FR180204), 可以显著抑制 CIA 小鼠 T 淋巴细胞的活化, 有效缓解炎症症状^[11]。此外, 有实验表明, p38 蛋白激酶抑制剂 FR167653 可降低 CIA 大鼠血清和关节组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞

介素-1(IL-1)的水平,缓解 CIA 大鼠全身炎症症状,抑制关节破坏^[12]。

桂枝所含的主要活性物质为挥发油类,已有研究证实桂枝中的挥发油可下调 LPS 诱导的大鼠肺损伤组织中异常增高的 PTK,磷酸化的 I κ B- α 和 IL-1 β ,而起抗炎作用^[13]。附子主要活性物质为生物碱类,附子所含的双酯型乌头碱类成分均可显著抑制二甲苯致小鼠耳肿的毛细血管通透性,减少白细胞在炎症中的渗出发挥抗炎作用^[14]。有实验报道,桂枝附子汤对大鼠佐剂性关节炎及大鼠棉球肉芽肿形成有明显抑制作用,可减轻病变部位疼痛,抑制局部组织炎性介质生成,解除炎性浸润,吸收渗出水肿,并通过免疫调节作用改善疼痛和肿胀^[15]。本实验也证实了桂枝附子汤可以不同程度地抑制 CIA 大鼠滑膜增生和炎性细胞浸润,使滑膜增生程度减轻,炎性细胞数目变少。

由于 CIA 主要发病机制和病理表现与人类 RA 非常相似,被认为是目前最适合用于研究人类 RA 的动物模型。且前述资料已表明 MAPK 信号转导通路于 RA 的发生发展密切关系,为进一步研究桂枝附子汤抗炎作用机制,本实验通过建立胶原诱导性关节炎大鼠模型,研究桂枝附子汤对 CIA 模型大鼠滑膜组织中磷酸化的 JNK,ERK,p38 蛋白水平变化的影响,探讨药物的作用机制是否与调控 MAPK 信号通路相关。实验结果表明,CIA 大鼠的足爪肿胀度和关节炎指数第 7,14,21,28,35,42 天个时间点均高于正常组,在给予桂枝附子汤治疗后在第 14 天后 CIA 大鼠的足爪肿胀度和关节炎指数均明显降低。桂枝附子汤能明显改善 CIA 大鼠滑膜增生和炎性细胞浸润,使得炎性细胞减少。在 MAPK 信号通路中 JNK,ERK 和 p38 在各组中的总蛋白表达水平没有发生明显变化,但其蛋白磷酸化水平均发生明显变化,与正常组比较,CIA 组中的 p-JNK,p-ERK 和 p-p38 的表达水平显著增强,两组治疗间有显著性变化,表明模型组大鼠体内 MAPK 信号通路被激活;用甲氨蝶呤治疗 CIA 大鼠,与模型组比较其 p-JNK,p-ERK 和 p-p38 表达水平显著降低,两组治疗间有显著性变化,表明该通路的活化受到了抑制,用桂枝附子汤治疗 CIA 大鼠,与模型组相比较其 p-JNK,p-ERK,p-p38 明显降低,并且呈现剂量依赖性关系,表明该通路的活化受到了抑制,从而对 CIA 产生一定的治疗作用。

综上所述,桂枝附子汤可抑制 CIA 大鼠 MAPK 信号转导通路的活化,这可能是其发挥抗炎作用的

机制之一,但细胞内信号转导通路是相当复杂的,涉及上下游多种激酶及底物。该药是如何影响 p-JNK,p-ERK 和 p-p38 的表达,具体的作用机制需待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 李瑞昌,李娟. 正清风痛宁联合甲氨蝶呤治疗类风湿性关节炎的系统评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(11):1-4.
- [2] Melissa J T,Caralee J S,Mark E L,et al. Central role of the MEK/ERK MAP kinase pathway in a mouse model of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum,2007,56(10):3347-3357.
- [3] 沈映君,徐世军,解宇环,等. 桂枝、荆芥挥发油对大鼠急性肺损伤模型核因子 κ B 信号通路影响的比较[J]. 华西药理学杂志,2008,23(2):132-134.
- [4] 苗智慧,刘京生,王燕凌,等. 附子酸性多糖提高免疫低下小鼠免疫功能的实验研究[J]. 河北中医,2007,29(12):1130-1132.
- [5] 张啸环. 桂枝附子汤的抗炎镇痛作用试验研究[J]. 长春中医药大学学报,2007,23(5):17-18.
- [6] 邹晓慧,董秋梅,陈琨,等. 蒙古族药忠伦阿汤对 CIA 大鼠 MMP-3,MMP-9 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):106-111.
- [7] Michaud K, Wolfe F. Comorbidities in rheumatoid arthritis [J]. Best Pract Res Clin Rh,2007,21(5):885-906.
- [8] Volin M V, Huynh N, Klosowska K, et al. Fractalkine-induced endothelial cell migration requires MAP kinase signaling[J]. Pathobiology,2010,77(1):7-16.
- [9] Yamana J, Santos L, Morand E. Enhanced induction of LPS-induced fibroblast MCP-1 by interferon-gamma: Involvement of JNK and MAPK phosphatase [J]. Cell Immunol,2009,255(1/2):26-32.
- [10] Kanbe K, Chiba J, Nakamura A. Inhibition of JNK in synovium by treatment with golimumab in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatol Int,2014,34(1):125-130.
- [11] Hubert M, Salahuddin A, Jeffrey H R, et al. Blocking ERK-1/2 reduces tumor necrosis factor-induced interleukin-18 bioactivity in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by induction of interleukin-18 binding proteina [J]. Arthritis Rheum,2010,62(3):722-731.
- [12] 唐敏,何成松. 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路与类风湿关节炎关系的研究[J]. 现代医药卫生,2014,30(8):1203-1206.
- [13] 徐世军,沈映君,金沈锐,等. 桂枝挥发油对 LPS 致急性肺损伤大鼠模型蛋白酪氨酸激酶活性的影响[J]. 成都中医药大学学报,2007,30(4):28-30.
- [14] 吴克红,唐力英,王祝举,等. 附子的化学和生物活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(2):212-220.
- [15] 张啸环. 桂枝附子汤的抗炎镇痛作用试验研究[J]. 长春中医药大学学报,2007,23(5):17-18.

[责任编辑 周冰冰]