

川芎嗪对胶原诱导型关节炎大鼠细胞外调节蛋白激酶通路的影响

梁锦峰¹, 刘文华¹, 鄢宏², 邓少杰¹

(1. 深圳市宝安区人民医院骨科中心, 深圳 518100;

2. 深圳市第二人民医院骨关节外科, 深圳 518000)

[摘要] 目的 探讨川芎嗪对胶原诱导型关节炎大鼠细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)通路的影响。方法 30只SPF级雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组和川芎嗪组, 每组10只。对模型组和川芎嗪组大鼠进行胶原诱导型关节炎造模, 造模成功后川芎嗪组每日给予川芎嗪(0.1 g/kg), 连续灌胃给药28 d; 模型组、正常组给予相同体积生理盐水。每周测量3组大鼠后足体积变化情况, 采用HE染色法观察各组大鼠炎性细胞浸润情况, 并采用实时荧光定量PCR和ELISA法检测大鼠滑膜组织及血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、血管生成素1(angiotensin 1, Ang-1)、白细胞介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)水平, 以及采用蛋白质印迹法检测大鼠滑膜组织中ERK通路相关蛋白的表达水平。结果 造模后第二周开始, 模型组大鼠后足体积显著大于对照组($P < 0.05$), 川芎嗪组大鼠后足体积与模型组同时间点比较显著降低($P < 0.05$); 同时模型组和川芎嗪组大鼠血清和滑膜组织中炎性因子TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 及其mRNA表达水平相比对照组大鼠均上升($P < 0.05$); 川芎嗪组大鼠滑膜组织中VEGF水平相比模型组下降($P < 0.05$); 模型组和川芎嗪组大鼠磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)蛋白表达水平均上升($P < 0.05$), 但川芎嗪组大鼠p-ERK1/2蛋白表达水平明显低于模型组($P < 0.05$)。结论 川芎嗪可能通过有效抑制ERK通路, 调节胶原诱导型关节炎大鼠血清和滑膜组织中TNF- α 、IL-1 β 水平, 缓解关节肿胀症状。

[关键词] 川芎嗪; 胶原诱导型关节炎; 细胞外信号调节激酶通路; 炎性因子

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)04-0000

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种自身免疫性骨关节炎, 主要病理改变为关节滑膜炎症性浸润以及患者运动功能受损, 临床症状表现为关节肿痛、关节畸形和行动不便。目前, 临床上治疗RA的主要方向是减轻患者关节炎症、改善患者骨侵蚀程度, 这需通过抑制滑膜细胞增殖、血管翳形成而实现^[1]。RA发病机制尚未完全明确, 但已有研究^[2]证实一些炎性因子

如白细胞介素1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等在RA发病过程中发挥重要作用。细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinase, ERK)作为参与细胞信号转导的重要通路之一, 其具有促进细胞增殖分化以及参与机体炎性反应功能。研究^[3]证实, ERK通路也参与了RA的发生和发展过程, RA的关节炎性浸润病理改变与ERK通路存在紧密联系, 因此ERK通路在RA中的作用逐渐引起高度重视。川芎嗪(tetramethylpyrazine)是目前临床中医治疗RA的一种常用药物, 临床试验证实其具有抗炎、消肿和镇痛之功效, 可以有效缓解RA患者关节炎临

[收稿日期] 2020-01-02

[作者简介] 梁锦峰(1972—), 男, 副主任医师, 骨科关节脊柱方向。E-mail: uzhuang26264@sina.com

床症状。同时川芎嗪还具有抑制血管内皮细胞增殖和新生血管生成的作用,但川芎嗪治疗 RA 是否通过干预 ERK 通路起效仍需要进一步研究证实^[4]。本研究通过建立胶原诱导型关节炎大鼠模型,观察川芎嗪对关节炎模型大鼠病理学变化和体内炎性因子水平的影响,探讨和分析川芎嗪治疗 RA 的起效机制以及对 ERK 通路的影响。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, (10.23 ± 2.15) 周龄, 体质量 300~350 g, 购自深圳康泰生物制品股份有限公司[SCXK (粤) 2018-0193]。动物饲养于康美华大基因技术有限公司[SYXK (粤) 2019-0205], 动物实验伦理审批文号: 医科伦审 - 2018017。TNF- α 、血管生成素 1 (Ang-1)、IL-1 β 和血管内皮生长因子 (VEGF) 抗体试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; 磷酸川芎嗪片购自广州康和药业有限公司 (规格 50 mg, 国药准字 H44024272); 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自美国赛默飞公司。

荧光定量 PCR 仪 (型号 ABI 7500, 美国赛默飞公司); 高速冷冻离心机型号 Mikro220R, 德国 Hettich 公司; 电泳仪和电泳槽 (型号分别为 DYCZ、DYCP, 中国北京六一仪器厂); 分光光度计 (型号 UV-2000, 美国安捷伦科技公司); 酶标仪 (型号 EL30, 美国 Bio-Tek 公司); ELISA 分析软件 (ReaderFit, 中国杭州艾米绿公司); 96 孔酶标板 (美国 Costar 公司)。

1.2 方法

将 30 只大鼠随机分为对照组、模型组和川芎嗪组, 每组各 10 只, 采用文献报道的胶原诱导型关节炎造模方法^[5-6]: 将 20 mg 鸡 II 型胶原充分溶解于 10 mL 浓度为 0.1 mol/L 的乙酸中, 得到质量浓度为 2 g/L 的鸡 II 型胶原, 然后将等体积弗氏完全佐剂与该溶液混合并乳化完全得到乳化剂。造模成功后, 川芎嗪组每日给予川芎嗪 (0.1 g/kg) (其中磷酸川芎嗪片使用适量生理

盐水溶解, 配制成灌胃混悬液), 连续灌胃给药 28 d; 模型组、正常组给予相同体积生理盐水。每周测量 3 组大鼠后足体积变化情况, 采取苏木精-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠炎性细胞浸润情况, 采用 ELISA 法测定各组大鼠滑膜组织及血清中 TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 、VEGF 水平, 另外采用蛋白质印迹法检测各组大鼠 ERK1/2 蛋白及磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 蛋白的表达水平。

1.3 观察指标及评价标准

1.3.1 各组大鼠关节肿胀度测定及比较 造模成功后, 使用记号笔在大鼠足部踝骨关节突出位置作标记, 每周使用排水法^[7]测量并记录各组大鼠后足的体积大小, 每只大鼠每次测定 3 次, 取平均值。

1.3.2 各组大鼠组织病理学变化比较 于实验 28 d 脊椎脱臼法处死大鼠后, 使用体积分数 10% 的多聚甲醛溶液浸泡大鼠双后肢膝关节 1 d, 然后使用体积分数 5% 的硝酸溶液浸泡膝关节组织 2 周, 浸泡至组织脱钙完全且能够顺畅切断骨质后, 重新使用体积分数 10% 的多聚甲醛溶液浸泡, 然后进行石蜡包埋、切片以及 HE 染色。

1.3.3 各组大鼠滑膜组织及血清中炎性因子水平测定 于实验 28 d 脊椎脱臼法处死大鼠前采集大鼠动脉血 4 mL, 离心后分离得到上层血清, 另外手术切取大鼠膝关节滑膜组织, 采用 ELISA 试剂盒检测所有样本中 TNF- α 、IL-1 β 、Ang-1 以及 VEGF 水平。严格按试剂盒操作说明检测, 使用酶标仪进行样品检测。

1.3.4 滑膜组织各炎性因子 mRNA 表达测定 分别取各组大鼠关节滑膜组织, 然后采用总 RNA 提取试剂盒提取组织中总 RNA, 使用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 样品吸光度 (A) 比值 $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ 视为合格。然后采用反转录试剂盒将总 RNA 进行反转录, 分别得到模板单链 cDNA, 然后使用 PCR 试剂盒对 cDNA 进行 PCR。PCR 反应条件为 95 °C 30 s 退火 60 °C 40 s, 延伸 72 °C 30 s; 连续循环 30 次。然后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分别计算血清 mRNA 相对表达量^[8]。

1.3.5 蛋白质印迹法测定 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平 剪取各组小鼠滑膜组织并加入裂解缓冲液, 当组织进行充分匀浆后将其静置一段时

间, 并放入离心机以 12 000 r/min 离心 20 min, 取出上清液后采用 BCA 法对 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白进行定量测定。使用 10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白样品进行分离后, 将蛋白转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 使用封闭液将样品于室温下封闭 2 h, 将膜转入封闭液稀释的一抗。4 ℃ 过夜后使用 PBST 冲洗液进行洗涤, 加二抗后继续于室温下孵育 1 h, 洗涤后采用电化学发光法检测并进行印迹成像。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件分析不同组别各项指标间差异, 多组间采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠关节肿胀度

从第 2 周开始, 模型组大鼠后足开始发生明显肿胀, 后足体积显著大于川芎嗪组和对照组 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 大鼠关节组织病理学观察

对照组大鼠关节结构完整且关节面光滑, 关节间隙大小正常, 未显示存在炎性浸润和滑膜组

织增生, 关节两端未发生骨侵蚀 (图 1A); 模型组大鼠关节腔间隙相比对照组显著变大, 且间隙中填充有滑膜增生组织, 存在炎性浸润和骨侵蚀现象, 关节面和关节结构被破坏 (图 1B)。川芎嗪组大鼠关节病理切片情况相比模型组有明显好转, 关节面较清晰, 关节间隙轻微增大, 存在轻微炎性浸润情况, 但未发生明显骨侵蚀, 骨关节结构相对较完整 (图 1C)。

2.3 大鼠血清和滑膜组织中炎性因子水平

模型组和川芎嗪组大鼠血清和滑膜组织中炎性因子 TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 表达水平相比对照组大鼠均显著上升 ($P < 0.05$), 同时川芎嗪组大鼠血清和滑膜组织中各炎性因子水平相比模型组均下降 ($P < 0.05$)。各组大鼠血清中均未检测到 VEGF, 但模型组和川芎嗪组大鼠滑膜组织中 VEGF 水平均上升 ($P < 0.05$), 且川芎嗪组明显低于模型组 ($P < 0.05$) (表 2)。

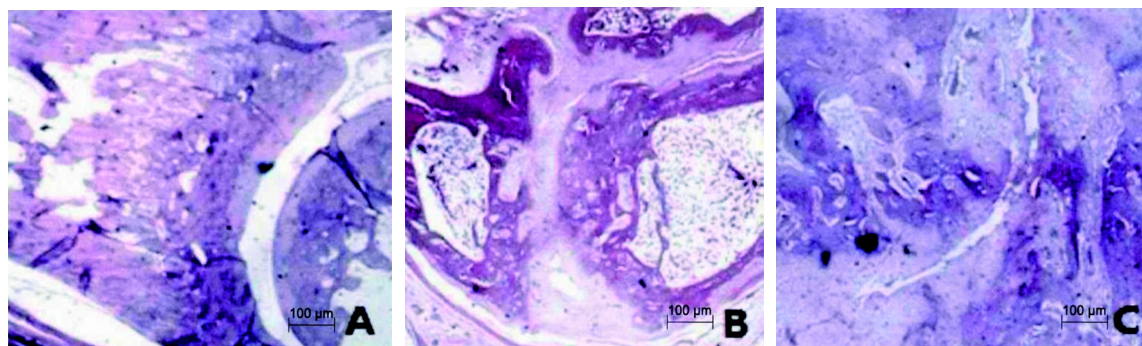
2.4 大鼠滑膜组织各炎性因子 mRNA 表达

与对照组相比, 模型组和川芎嗪组大鼠滑膜组织中各炎性因子 mRNA 表达水平均显著上升 ($P < 0.05$); 川芎嗪组大鼠各炎性因子 mRNA 水平与模型组相比均显著下降 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 1 各组大鼠关节肿胀度测定
Table 1 Results of joints welling test in rats

组别	<i>n</i>	用药后时间			
		1 周	2 周	3 周	4 周
对照组	10	1.08 ± 0.24	1.06 ± 0.24	1.09 ± 0.31	1.11 ± 0.28
模型组	10	1.05 ± 0.19	1.62 ± 0.30*	1.97 ± 0.42*	2.05 ± 0.43*
川芎嗪组	10	1.10 ± 0.23	1.31 ± 0.27*#	1.59 ± 0.38*#	1.55 ± 0.46*#

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。



A 为对照组, B 为模型组, C 为川芎嗪组。

图 1 大鼠关节组织病理学观察 (HE 染色)

Figure 1 Pathological observation on joint tissues in rats (HE staining)

2.5 大鼠滑膜组织 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达

与对照组比较, 模型组和川芎嗪组大鼠滑膜组织 p-ERK1/2 蛋白表达水平均上升 ($P<0.05$),

但川芎嗪组表达水平低于模型组 ($P<0.05$); 模型组和川芎嗪组大鼠 ERK1/2 蛋白表达水平与对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 4)。

表 2 大鼠滑膜组织和血清中炎症因子水平

Table 2 The levels of inflammatory factors levels in synovial tissue and serum of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清			滑膜组织			
		TNF- α	Ang-1	IL-1 β	TNF- α	Ang-1	IL-1 β	VEGF
		$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	$\rho/(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
对照组	10	8.85 $\pm$ 0.10	8.05 $\pm$ 1.15	45.71 $\pm$ 8.20	54.47 $\pm$ 5.69	8.68 $\pm$ 1.52	38.25 $\pm$ 7.41	75.62 $\pm$ 8.45
模型组	10	656.35 $\pm$ 12.74*	23.20 $\pm$ 2.01*	756.35 $\pm$ 20.41*	263.65 $\pm$ 15.25*	58.25 $\pm$ 6.87*	123.24 $\pm$ 12.36*	146.57 $\pm$ 10.14*
川芎嗪组	10	235.41 $\pm$ 10.32**	15.74 $\pm$ 2.06**	352.28 $\pm$ 15.26**	68.34 $\pm$ 6.85**	23.54 $\pm$ 5.14**	42.36 $\pm$ 8.55**	104.46 $\pm$ 8.56**

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, ** $P<0.05$ 。

表 3 大鼠滑膜组织各炎症因子 mRNA 表达

Table 3 The mRNA expressions of inflammatory factors in synovial tissues of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α	Ang-1	IL-1 β	VEGF
对照组	10	0.89 $\pm$ 0.11	0.88 $\pm$ 0.17	0.78 $\pm$ 0.12	1.20 $\pm$ 0.12
模型组	10	3.98 $\pm$ 0.69*	3.98 $\pm$ 0.41*	4.89 $\pm$ 0.54*	7.65 $\pm$ 0.46
川芎嗪组	10	2.12 $\pm$ 0.54**	1.56 $\pm$ 0.25**	1.56 $\pm$ 0.23**	2.31 $\pm$ 0.32**

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, 与模型组比较, ** $P<0.05$ 。

表 4 大鼠滑膜组织 ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达水平

Table 4 The expressions of ERK1/2 and p-ERK1/2 proteins in synovial tissues of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK1/2	p-ERK1/2
对照组	10	1 080.41 $\pm$ 100.25	720.84 $\pm$ 85.42
模型组	10	1 102.62 $\pm$ 125.69	1 052.98 $\pm$ 100.56*
川芎嗪组	10	1 185.17 $\pm$ 130.41	896.23 $\pm$ 60.82**

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, 与模型组比较, ** $P<0.05$ 。

3 讨论

胶原诱导型关节炎大鼠模型是一种慢性免疫炎症性动物模型, 已被学术界认可作为研究 RA 发病机制的理想动物模型^[9]。ERK 作为与细胞信号转导和炎症反应密切相关的信号通路, 与 RA 的新生血管生成、细胞增殖分化、炎症浸润以及蛋白酶表达等过程密切相关, 在 RA 整个发生和发展过程中活跃度很高^[10]。TNF- α 、IL-1 β 是促炎性 Th1 细胞分泌的一些重要炎症因子, 其中 IL-1 β 属于炎症始动因子, 高 IL-1 β 水平会刺激软骨细胞过度合成胶原酶以及致炎致痛物质前列腺素 E2, 同时促进嗜中性粒细胞、巨噬细胞聚集于关节滑膜, 从而产生关节滑膜炎性反应, 导致软骨基质

发生降解^[11]。TNF- α 不仅可以诱导炎症反应, 还能促进成纤维细胞增生, 以及导致软骨受损^[12]。在 RA 患者体内 Th1 和 Th2 细胞处于失衡状态, 其中 Th1 细胞及其分泌的促炎细胞因子占据绝对优势。本研究发现 RA 模型大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 等 Th1 促炎因子相比正常组大鼠明显升高 ($P<0.05$)。有研究表明, VEGF、基质金属蛋白酶等一些与血管新生相关的细胞因子在 RA 患者血清和关节滑膜组织中也呈现明显高表达, 且与患者 RA 疾病严重程度存在显著正相关性^[13]。以上研究结果说明上述细胞因子共同参与了 RA 疾病的进展, 促进新生血管生成、炎症浸润以及骨侵蚀过程。

川芎嗪是从中药材川芎中提取出来的一种活性成分, 其药理作用如抗新生血管生成、抑制细胞分化增殖和抑制炎症反应等均已得到充分证实, 且大量临床研究和基础研究证实川芎嗪可以缓解 RA 患者临床症状^[14]。本研究结果显示, 造模后第 2 周开始, 模型组大鼠后足体积以及炎症因子 TNF- α 、Ang-1、IL-1 β 水平显著大于或者高于对照组和川芎嗪组 ($P<0.05$); 且病理观察显示, 模型组大鼠关节腔间隙存在炎症浸润、滑膜

增生组织和骨侵蚀现象, 关节面和关节结构被破坏, 而川芎嗪组大鼠关节间隙炎性损伤程度明显低于模型组大鼠, 未发生明显骨侵蚀, 骨关节结构相对较完整, 表明川芎嗪可降低炎性反应, 减轻后足炎性损伤。谢平金等^[15]研究发现, 使用川芎嗪对模型大鼠进行干预后, 大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 表达水平相对于模型组显著降低 ($P < 0.05$), 证实川芎嗪在治疗 RA 中发挥显著抗炎作用。另外, 本研究结果表明, 模型组和川芎嗪组大鼠 p-ERK1/2 蛋白表达水平相比对照组均显著上升 ($P < 0.05$), 但川芎嗪组相比模型组显著下降 ($P < 0.05$), 说明模型大鼠中 p-ERK1/2 蛋白存在过度表达, 而川芎嗪可以通过抑制 ERK 信号通路促进 ERK1/2 磷酸化即增加 p-ERK1/2 蛋白表达水平。李巍等^[16]研究表明, 川芎嗪可以通过抑制滑膜组织 ERK 通路活化, 从而有效降低胶原诱导型关节炎模型动物血清和滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-12 炎性因子表达水平 ($P < 0.05$), 与本研究结果一致。王春亮等^[17]研究发现, IL-1 和 TNF- α 可以快速激活成纤维样滑膜细胞中 ERK、c-JUN 氨基末端蛋白激酶和 P38 激酶活性, 激活后的 ERK 和 P38 又会进一步诱导 IL-1 和 TNF- α 等细胞因子表达, 进而导致 RA 的发生发展。白菁安等^[18]报道, 川芎嗪治疗 RA 的起效机制可能与抑制 ERK 通路活化过程存在密切联系。结合本次研究结果, 笔者认为川芎嗪治疗 RA 的起效机制可能是由于川芎嗪显著减少炎性因子分泌, 抑制机体淋巴细胞增殖, 从而抑制 ERK 通路, 降低 ERK 相关蛋白表达水平, 最终有效改善大鼠关节肿胀症状, 缓解关节组织的病理情况。

本研究采用的是经典 RA 大鼠造模方法, 已有大量文献报道验证, 故研究中仅对造模组血清和滑膜组织炎性反应进行评估, 就可以判断造模成功。同时考虑到本研究主要目的是观察川芎嗪对炎性因子和 ERK 通路相关蛋白表达的影响, 因此着重关注川芎嗪组与模型组和空白对照组的比较, 未设置阳性药对照组, 后续可进一步完善。

综上所述, 川芎嗪可能是通过有效抑制 ERK 通路, 调节胶原诱导型关节炎大鼠血清和滑膜组织中 TNF- α 、IL-1 β 等炎性因子水平, 缓解关节肿胀症状。

参考文献:

- [1] Strangfeld A, Richter A, Siegmund B, et al. Risk for lower intestinal perforations in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in comparison to treatment with other biologic or conventional synthetic DMARDs [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(3):504-510.
- [2] Javadi F, Ahmadzadeh A, Eghtesadi S, et al. The effect of Quercetin on inflammatory factors and clinical symptoms in women with rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized controlled trial[J]. *J Am Coll Nutr*, 2017, 36(1):9-15.
- [3] Borges G, Miguelez C, Neto F, et al. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) in the locus coeruleus contributes to pain-related anxiety in arthritic male rats[J]. *Int J Neuropsychoph*, 2017, 20(6):463.
- [4] Usoltsev AN, Adonin SA, Abramov PA, et al. Tetra- and pentanuclear iodobismuthates with the cation based on 2, 3,5,6-tetramethylpyrazine: syntheses and crystal structures[J]. *Russ J Coord Chem*, 2018, 44(12):772-778.
- [5] 梁洁, 赵向聪, 牛红青, 等. ATP 结合盒转运蛋白在胶原诱导性关节炎模型鼠的差异表达及其与血清炎性细胞因子的相关性研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2019, 23(3): 153-159.
- [6] 周强, 吕厚山, 栗占国. 胶原诱导的关节炎动物模型研究现状及进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2003, 7(4):227-231.
- [7] 蔡国伟, 李柏村, 李佳, 等. 温针灸对骨关节炎大鼠软组织 Clock、Bmal1 蛋白的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(10):1225-1229.
- [8] Liu N, Feng X, Wang W, et al. Paeonol protects against TNF- α -induced proliferation and cytokine release of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by upregulating FOXO3 through inhibition of miR-155 expression [J]. *Inflammation Res*, 2017, 66(7):1-8.
- [9] Serchov T, Heumann R, Van Calker D, et al. Signaling pathways regulating Homer1a expression[J]. *Biol Chem*, 2017, 397(3):207-214.
- [10] Yeh CC, Mann MJ, Fan Y, et al. Atrial ERK1/2 activation in the embryo leads to incomplete Septal closure: a novel mouse model of atrial Septal defect[J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1):89-94.
- [11] 樊莎莎, 宗明, 陆英, 等. 体外实验经典活化型巨噬细胞抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞增殖[J]. *中华风湿病学杂志*, 2015, 19(8):540-544.
- [12] Thanapati S, Ganu M, Giri P, et al. Impaired NK cell functionality and increased TNF- α production as biomarkers of chronic chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis [J]. *Hum Immuno*, 2017, 78(4):370-374.

- [13] Äyräväinen L, Heikkinen A M, Kuuliala A, et al. Inflammatory biomarkers in saliva and serum of patients with rheumatoid arthritis with respect to periodontal status [J]. *Ann Med*, 2018, 50(4):1-38.
- [14] 朱海泉, 刘子敏, 孟祥圣, 等. 川芎嗪抑制 NF- κ B P65 磷酸化对 LPS 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(2):59-63.
- [15] 谢平金, 余翔, 柴生颢, 等. 川芎嗪干预早期膝骨关节炎大鼠软骨 II 型胶原纤维 α 1 基因与血管内皮生长因子 mRNA 及 miR20b 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(12):1846-1851.
- [16] 李巍, 冼呈, 赵劲民, 等. 骨髓间充质干细胞移植联合川芎嗪膝关节腔注射治疗兔膝关节骨关节炎[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(5):18-22.
- [17] 王春亮, 王林, 潘继红. TNF- α 对类风湿性关节炎患者滑膜成纤维细胞 RUNX3 表达的影响及意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(20):21-24.
- [18] 白菁安, 边艳琴, 牛旭艳, 等. 川芎嗪联合来氟米特对胶原诱导关节炎大鼠血小板活化和炎症反应的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017(7):953-956.

Effect of Tetramethylpyrazine on Extracellular Regulated Protein Kinase Pathway in Collagen-induced Arthritis Rats

LIANG Jinfeng¹, LIU Wenhua¹, YAN Hong², DENG Shaojie¹

(1. Department of Orthopedic, Shenzhen Baoan District People's Hospital, Shenzhen 518100, China)

2. Department of Bone and Joint Surgery, Shenzhen 518000, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on the extracellular regulated protein kinase (ERK) pathway in collagen-induced arthritis rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into control group, model group and TMP group, with 10 rats in each group. The rats in the model group and the TMP group were modeled with collagen-induced arthritis. After the successful modeling, the TMP group was treated daily with TMP (0.1 g/kg) by intragastric administration, for continuous 28 d. The model group and the normal group were given the same volume of physiological saline. The volume changes of the hind paws in the three groups were measured weekly, and the inflammatory cell infiltration of each group was observed by HE staining. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), angiotensin 1 (Ang-1), interleukin 1 β (IL-1 β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in synovial tissue and serum of rats were detected by real-time PCR and ELISA, respectively. The expressions of ERK pathway-related proteins in synovial tissues were detected by Western blotting. **Results** From the second week after modeling, the hind paw volume of the model group was higher than that of the control group ($P < 0.05$), and the TMP group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). The expression levels of inflammatory factors TNF- α , Ang-1 and IL-1 β in the model group and the TMP group were higher than those in the control group ($P < 0.05$), but the TMP group were lower than the model group ($P < 0.05$). The level of VEGF in the synovial tissue of rats in the TMP group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). The expression of p-ERK1/2 protein in the model group and the TMP group was increased ($P < 0.05$), and the expression level of p-ERK1/2 protein in the TMP group was lower than that of the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** TMP can effectively inhibit the levels of TNF- α and IL-1 β in serum and synovial tissue of rats with collagen-induced arthritis and alleviate the symptoms of joint swelling by inhibiting the ERK pathway.

[Key words] Tetramethylpyrazine; Collagen-induced arthritis; Extracellular regulated protein kinase pathway; Inflammatory factor