

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.07.013

复方雷公藤外敷对Ⅱ型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织细胞因子及 ERK 通路的影响

赵越¹, 唐晓颖^{*}, 姜泉¹, 王洁晶², 吴振宇¹, 吴广均¹, 杨卉¹, 巩勋¹, 王建¹, 李波¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区北线阁 5 号, 100053; 2. 包头医学院中医系)

摘要 目的 探讨复方雷公藤外敷治疗类风湿关节炎的可能作用机制。方法 30 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和雷公藤外敷组, 每组 10 只。除正常组外其余两组采用Ⅱ型胶原诱导型关节炎大鼠模型, 雷公藤外敷组于首次免疫后第 14 天起, 大鼠双后肢给予复方雷公藤外敷剂 0.50 g/(kg·d) 外敷, 每天 1 次, 连续 28 天, 模型组、正常组不给予处理。每周测量各组大鼠后足体积, 实验结束时检测血清及滑膜组织白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和血管生成素 1 (Ang-1) 含量以及滑膜组织细胞外信号调节激酶 (ERK) 通路蛋白表达, 并进行关节病理检测。结果 模型组大鼠后足体积、血清 (除 VEGF 外) 及滑膜组织各细胞因子水平较正常组明显升高, 滑膜组织 p-ERK1/2 表达亦升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 关节病理切片显示可见大量炎症细胞浸润, 关节软骨及关节面严重破坏, 骨实质侵蚀, 结构紊乱。而复方雷公藤外敷组大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 和 Ang-1 水平降低, 滑膜组织中各细胞因子水平及 mRNA 表达下降, p-ERK1/2 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 病理显示复方雷公藤外敷有良好的抑制滑膜组织增殖、减少炎症细胞浸润、延缓骨与软骨破坏的效果。结论 复方雷公藤外敷剂可能通过降低关节炎滑膜组织炎症细胞因子水平、减弱 ERK 通路活化, 从而抑制滑膜组织增殖、减少滑膜中血管新生和血管翳形成。

关键词 类风湿关节炎; 复方雷公藤; 外敷剂; 滑膜组织; 细胞因子; 细胞外信号调节激酶通路

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以四肢对称性多关节炎为主要表现的自身免疫性疾病, 以关节滑膜慢性炎症、滑膜血管翳形成、关节的进行性破坏为特征。其病因尚不明确, 主要表现为滑膜增生和多种炎症细胞的浸润, 导致骨与软骨的破坏^[1]。目前临床治疗以尽可能控制炎症、减轻骨侵蚀为目标, 这需通过抑制滑膜细胞增殖、血管翳形成而实现。在 RA 发病中细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 可由细胞因子激活^[2], ERK 通路活化与白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和血管生成素 1 (Ang-1) 等共同参与 RA 滑膜增殖、血管生成, 最终导致骨侵蚀^[3-5]。复方雷公藤外敷剂由中国中医科学院广安门医院风湿科研制, 具有抗炎、镇痛、消肿的作

用, 可有效缓解关节炎症, 临床疗效肯定^[6]。本实验拟从细胞因子及 ERK 通路活化的角度, 初步探讨复方雷公藤外敷剂治疗 RA 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

雌性 SD 大鼠 30 只, 7 周龄, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物合格证号 SCXK (京) 2012-0001。

1.2 药物

复方雷公藤外敷剂, 中国中医科学院广安门医院院内制剂, 由雷公藤、芒硝、炙乳香、炙没药、薄荷等组成, 每克含生药 0.48 g, 批号: 15011303。

1.3 主要试剂及仪器

免疫源性牛Ⅱ型胶原 (Chondrex 公司, 批号 130167); 完全弗氏佐剂 (Chondrex 公司, 批号

基金项目: 国家自然科学基金 (81373595)

* 通讯作者: tangxiaopo@163.com

130044); Ang-1 ELISA 试剂盒 (Cusabio 公司, 批号 G19030372); TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 228462546)、VEGF ELISA 试剂盒 (批号 224145514)、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 228241221) 均为 MultiSciences 公司产品; 超纯 RNA 提取试剂盒 (Cwbio 公司, 批号 CW0581)。手提式均质仪 (德国 IKA 公司, 型号 T10 Basic Ultra-turrax); 荧光定量 PCR 仪 (杭州博日科技有限公司, 型号 FQD-33A); 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司, 型号 Mikro220R); 电泳仪 (北京六一仪器厂, 型号 DYCZ-40G); 电泳槽 (北京六一仪器厂, 型号 DYCP-31A); 凝胶成像仪 (天能公司, 型号 Tanon-6600); 分光光度计 (上海尤尼柯公司, 型号 UV-2000)。

1.4 动物分组及造模

采用完全随机分组法将大鼠分为正常组、模型组和雷公藤外敷组, 每组 10 只。在超净台无菌环境中, 将牛Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂按 1:1 比例在冰浴下, 采用均质仪充分乳化至油包水状, 滴入水中不分散。乳剂中牛Ⅱ型胶原的终浓度为 1 mg/ml。除正常组外, 其余大鼠在适应环境 1 周后进行第 1 次免疫, 于每只大鼠尾根部皮下注射 0.15 ml 胶原乳剂。首次免疫后第 7 天加强免疫 1 次, 方法同首次免疫^[8]。

1.5 给药方法

雷公藤外敷组于大鼠双后肢膝关节以下部位去毛, 每次给予复方雷公藤外敷剂 0.50 g 生药/(kg·d), 相当于 12.5 倍成人临床用量, 涂于膝关节上下 0.5 cm 范围及自踝关节上 0.5 cm 处以下 (包括全部足趾), 每天上午 9:00-10:00 给药, 自首次免疫后第 14 天起, 每天 1 次, 连续给药 28 天。模型组、正常组不给予特殊药物处理。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 关节肿胀度测定 首次免疫第 1 天起, 在大鼠足部踝骨关节突出部位划线作为标记, 采用排水法^[9]测大鼠后足体积, 分别于免疫后每周记录 1 次, 直至实验结束。

1.6.2 病理切片 给药 28 天后处死大鼠, 将大鼠双后肢自膝关节以下部分浸泡在 10% 多聚甲醛溶

液中 24 h 后, 自来水冲洗 24 h, 5% 硝酸浸泡脱钙 2 周, 每周换液 2 次, 至刀片能轻松切断骨质后, 重新浸泡至 10% 多聚甲醛溶液、石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.6.3 血清及滑膜组织细胞因子含量测定 给药 28 天后, 用 10% 的水合氯醛麻醉各组大鼠, 腹主动脉取血, 采集血清; 分离膝关节滑膜组织。血清及滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 、VEGF 和 Ang-1 含量检测采用 ELISA 法, 操作步骤严格按照试剂盒中对应说明书进行。

1.6.4 滑膜组织细胞因子 mRNA 表达测定 取滑膜组织, 按说明书操作, 提取总 RNA, 逆转录, 然后进行 PCR 扩增。反应条件为: 变性 95℃ 30s, 退火 60℃ 1 min, 延伸 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 7 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 采用 LEICAQ-500IW 图像分析处理系统进行分析, 通过测定目的基因与内参照的积分光密度比值计算 mRNA 相对表达量。

1.6.5 滑膜组织 ERK 通路蛋白表达 采用 Western Blot 法检测, 取滑膜组织, 预冷 PBS 洗涤 2 遍, 加入 1 ml 细胞裂解液冰上裂解 30 min, 4℃、12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清获得细胞总蛋白。用 BCA 法测定 ERK1/2 及其磷酸化状态 (p-ERK1/2) 蛋白浓度。将定量好的细胞总蛋白与蛋白电泳上样缓冲液混合, 沸水煮 5 min 备用。配好分离胶及浓缩胶后 SDS-PAGE 电泳, 200 mA 转膜后用 3% BSA 封闭 2 h 以上, 依次加一抗, 4℃ 孵育过夜、洗涤、加二抗 (兔抗羊 IgG), 室温孵育 1 h、洗涤, 扫描图像并分析。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 10.0 统计软件, 计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$), 多组间均数比较采用方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间后足体积比较

表 1 示, 模型组大鼠从免疫后 2 周开始后足开始肿胀, 后足体积均高于同时间的正常组 (P<0.01); 雷公藤外敷组大鼠从免疫后 2 周起后足体

表 1 各组大鼠不同时间后足体积比较 (ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周
正常组	10	1.10 $\pm$ 0.82	1.05 $\pm$ 0.10	1.10 $\pm$ 0.82	1.12 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.10	1.20 $\pm$ 0.08
模型组	10	1.10 $\pm$ 0.00	1.63 $\pm$ 0.15*	1.98 $\pm$ 0.05*	1.93 $\pm$ 0.05*	1.88 $\pm$ 0.05*	1.75 $\pm$ 0.06*
雷公藤外敷组	10	1.08 $\pm$ 0.05	1.33 $\pm$ 0.17 Δ	1.73 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta$	1.65 $\pm$ 0.58 $\Delta\Delta$	1.43 $\pm$ 0.15 $\Delta\Delta$	1.36 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$

注: 与正常组同时时间比较, * P<0.01; 与模型组同时时间比较, Δ P<0.05, $\Delta\Delta$ P<0.01

积均较模型组同时降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠关节病理切片

正常组大鼠关节面光滑, 关节间隙大小正常, 关节囊结构完整, 关节腔两面滑膜软骨结构光滑完整, 层次分明, 关节腔无炎症细胞浸润, 无滑膜组织增生, 关节两端骨组织致密。模型组关节间隙明显增宽, 被增生的滑膜组织等完全填充, 可见大量炎症细胞浸润, 关节软骨及关节面严重破坏, 骨实质侵蚀, 结构紊乱。雷公藤外敷组关节病理较模型组明显改善, 可见相对清晰的关节面、关节间隙, 关节腔有少量滑膜组织和炎症细胞浸润, 关节两端骨组织结构尚完整, 骨实质疏松, 存在少量炎症细胞浸润。各组大鼠关节病理图片见图 1。

2.3 各组大鼠血清细胞因子表达水平比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清中

IL-1 β 、TNF- α 、Ang-1 含量明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 雷公藤外敷组大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、Ang-1 含量均降低 ($P < 0.01$)。而各组大鼠血清中 VEGF 含量均未测到。

2.4 各组大鼠滑膜组织细胞因子水平比较

表 3 示, 模型组滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 、VEGF 和 Ang-1 含量较正常组明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 雷公藤外敷组各细胞因子水平均显著降低 ($P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠滑膜组织细胞因子 mRNA 表达比较

表 4 示, 模型组大鼠滑膜组织 IL-1 β 、TNF- α 、VEGF、Ang-1 的 mRNA 表达均较正常组显著升高 ($P < 0.01$)。雷公藤外敷组各细胞因子 mRNA 水平均不同程度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.6 各组大鼠滑膜组织 ERK 通路蛋白表达比较

表 5 示, 模型组 p-ERK1/2 表达较正常组明显



注: A, 正常组; B, 模型组; C, 雷公藤外敷组
图 1 各组大鼠关节病理图片 (HE 染色, $\times 20$)

表 2 各组大鼠血清细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	Ang-1 (ng/ml)
正常组	10	47.66 $\pm$ 8.47	0.99 $\pm$ 0.17	9.02 $\pm$ 5.54
模型组	10	743.52 $\pm$ 103.08*	681.27 $\pm$ 102.30*	23.45 $\pm$ 1.56*
雷公藤外敷组	10	340.00 $\pm$ 91.84 Δ	211.59 $\pm$ 49.44 Δ	18.17 $\pm$ 2.00 Δ

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; Ang-1, 血管生成素 1; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表 3 各组大鼠滑膜组织细胞因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	Ang-1 (ng/ml)
正常组	10	40.73 $\pm$ 19.68	52.28 $\pm$ 14.82	79.21 $\pm$ 6.70	8.60 $\pm$ 2.16
模型组	10	115.07 $\pm$ 11.09*	271.52 $\pm$ 59.16*	129.24 $\pm$ 5.80*	64.00 $\pm$ 8.01*
雷公藤外敷组	10	43.39 $\pm$ 14.03 Δ	73.35 $\pm$ 11.63 Δ	91.73 $\pm$ 12.09 Δ	21.77 $\pm$ 3.71 Δ

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; VEGF, 血管内皮生长因子; Ang-1, 血管生成素 1; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表 4 各组大鼠滑膜组织细胞因子 mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-1 β	TNF- α	VEGF	Ang-1
正常组	10	0.86 $\pm$ 0.61	0.91 $\pm$ 0.10	1.25 $\pm$ 0.31	0.87 $\pm$ 0.17
模型组	10	4.65 $\pm$ 1.13*	3.87 $\pm$ 0.82*	7.34 $\pm$ 0.98*	3.72 $\pm$ 0.21*
雷公藤外敷组	10	1.42 $\pm$ 0.68 Δ	1.38 $\pm$ 0.28 $\Delta\Delta$	2.48 $\pm$ 0.23 $\Delta\Delta$	1.21 $\pm$ 0.39 $\Delta\Delta$

注: IL-1 β , 白细胞介素 1 β ; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; VEGF, 血管内皮生长因子; Ang-1, 血管生成素 1; 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

升高 ($P < 0.05$); 雷公藤外敷组 p-ERK1/2 表达较模型组明显降低 ($P < 0.01$)。各组 ERK1/2 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)

表 5 各组大鼠滑膜组织 ERK 通路蛋白表达灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p-ERK1/2	ERK1/2
正常组	10	714.39 ± 200.99	1092.35 ± 376.68
模型组	10	1033.34 ± 236.08*	1119.55 ± 277.57
雷公藤外敷组	10	838.23 ± 57.42 [△]	1288.47 ± 60.26

注: ERK, 细胞外信号调节激酶; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

RA 属中医学“痹证”“历节”“尪痹”等范畴, 其中医药治疗包括复方汤剂、中成药、单味药、中药外治等。中药外敷疗法应用已有数千年历史, 以吴师机的外治基本理论“外治之理, 即内治之理; 外治之药, 亦即内治之药; 所异者, 法耳”为宗。中医外治法以中医的整体观念和辨证论治思想为指导, 运用各种不同的方法将药物施于皮肤、孔窍、腧穴等部位, 以发挥其疏通经络、畅通气机、镇痛消肿的作用, 并且药物可以经穴位经络、皮肤黏膜的吸收, 通过体表、腠理到达脏腑, 起到调整机体内脏功能、抗病祛邪的治疗作用。复方雷公藤外敷剂以雷公藤为君, 芒硝、炙乳香、炙没药为臣, 薄荷为使。《本草纲目》载雷公藤, “破癥积, 除脚膝痹痛, 四肢拘挛”, 并“可通行十二经”。芒硝, 《本草衍义》载其“扫一切风热毒气攻注目险外, 及发于头面、四肢肿痛, 应手神验”; 《医学衷中参西录》载“乳香……善透窍以理气, 没药……善化瘀理气。其性皆微温, 二药并用为宣通脏腑流通经络之要药, 故凡心胃胁腹肢体关节诸疼痛皆能治之, 外用能解毒、消肿、生肌、止痛”。三药用于本方, 可减少雷公藤用量, 从而减少雷公藤的毒性。薄荷外用具有清凉止痛的作用, 对多种药物有促渗作用。诸药并用共奏清热除湿、化瘀止痛之功。

现代研究表明, RA 的整个病理过程都有细胞因子的参与, 其中 IL-1 β 、TNF- α 为最重要的致病因子, 关节滑膜中 IL-1 β 、TNF- α 与其受体结合后, 通过作用于滑膜细胞信号传导, 引起 RA 滑膜细胞的无限制增生^[1]。滑膜组织中的成纤维细胞及中性粒细胞等炎症细胞能分泌大量的 VEGF, 其作为滑膜血管翳形成并维持其生物状态的关键因子, 能诱导血管增生, 促进炎症滑膜组织形成新生血管及

血管内物质外渗, 加重滑膜组织炎症及血管翳形成^[1]。RA 滑膜血管翳形成过程中伴有新血管生成, 而 Ang-1 与 RA 的血管新生密切相关^[2], 在稳定血管和促进血管成熟中起到重要作用^[3]。VEGF 和 Ang-1 通过协同作用可以刺激血管新生^[4]。同时, ERK 通路参与 RA 受累滑膜组织病理信号的转导, 促进 T 细胞的增殖及多种细胞因子的分泌, 引起单核细胞和巨噬细胞的聚集和活化, 进一步分泌 TNF- α 和 IL-1 β 等多种炎症细胞因子^[5]。VEGF 和血管生成素 (Ang) 对于 RA 滑膜新血管生成和血管翳形成的作用机制与提高 ERK 活性或者活化 ERK 相关^[5,13]。

本实验结果显示, 复方雷公藤外敷剂可以明显减轻 II 型胶原诱导型关节炎大鼠关节肿胀程度, 病理切片显示有良好的抑制滑膜组织增殖、减少炎症细胞的浸润、延缓骨与软骨破坏的效果。在细胞因子的检测中, 复方雷公藤外敷剂可显著降低关节炎大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 、Ang-1 水平, 减少滑膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 、VEGF、Ang-1 的含量及 mRNA 表达, 同时雷公藤外敷组滑膜组织 p-ERK1/2 表达水平较模型组明显降低, 证实复方雷公藤外敷剂能降低关节炎大鼠血清及滑膜组织中炎症因子, 抑制滑膜组织 ERK 通路的活化, 从而抑制滑膜组织增殖、减少滑膜中血管新生和血管翳形成。

参考文献

- [1] 姜泉, 曹炜, 唐晓颖, 等. 清热活血方药治疗活动期类风湿性关节炎的临床疗效观察 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(7): 588-592.
- [2] 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 [J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(11): 2501-2512.
- [3] GOODRIDGE HS, HARNETT W, LIEW FY, et al. Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and-independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses [J]. Immunology, 2003, 109(3): 415-425.
- [4] KIM WU, KANG SS, YOO SA, et al. Interaction of vascular endothelial growth factor 165 with neuropilin-1 protects rheumatoid synoviocytes from apoptotic death by regulating Bcl-2 expression and Bax translocation [J]. J Immunol, 2006, 177(8): 5727-5735.
- [5] MACKENZIE NM. New therapeutics that treat rheumatoid

- arthritis by blocking T-cell activation [J]. Drug Discov Today, 2006, 11(19/20): 952-956.
- [6] SCOTT BB, ZARATIN PF, GILMARTIN AG, et al. TNF- α modulates angiopoietin-1 expression in rheumatoid synovial fibroblasts via the NF- κ B signalling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(2): 409-414.
- [7] 曹炜, 焦娟, 姜泉. 复方雷公藤外敷治疗活动期类风湿关节炎的临床疗效观察 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(7): 433-435.
- [8] TRENTAM DE, TOWNES AS, KANG AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis [J]. J Exp Med, 1977, 146(3): 857-868.
- [9] 姜泉, 李德平, 曹炜, 等. 风湿清方对 CIA 大鼠骨保护作用机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1648-1652.
- [10] 燕太强, 吕厚山, 药立波. 类风湿关节炎滑膜细胞酪氨酸激酶信号传导系统 [J]. 中华风湿病学杂志, 1999, 3(2): 56-58.
- [1] 陈勇, 黄娟倩, 陈立斌, 等. 类风湿关节炎患者超声评估滑膜病变与血清血管内皮生长因子检测的相关性研究 [J]. 现代实用医学, 2011, 23(9): 973-976.
- [2] HASHIRAMOTO A, SAKAI C, YOSHIDA K, et al. Angiopoietin 1 directly induces destruction of the rheumatoid joint by cooperative, but independent, signaling via ERK/MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(7): 2170-2179.
- [3] KITADAI Y. Angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer [J]. J Oncol, 2010; 468725. doi: 10.1155/2010/468725.
- [4] SZEKANECZ Z, BESENYEI T, SZENTPETERY A, et al. Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2010, 22(3): 299-306.
- [5] 李芳, 姚建华, 张凤肖, 等. 类风湿关节炎患者血清血管内皮生长因子、肿瘤坏死因子 α 的检测及其临床意义 [J]. 临床荟萃, 2007, 22(18): 1332-1333.

Effect of Compound *Tripterygium Wilfordii* External Application on Cytokines and ERK Pathway in Synovial Tissues of Rats with Type II Collagen-induced Arthritis

ZHAO Yue¹, TANG Xiaopo¹, JIANG Quan¹, WANG Jiejing², WU Zhenyu¹, WU Guangjun¹, YANG Hui¹, GONG Xun¹, WANG Jian¹, LI Bo¹

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053; 2. Department of Chinese Medicine, Baotou Medical College)

ABSTRACT Objective To explore possible mechanism of external application of compound *Tripterygium Wilfordii* in treating rheumatoid arthritis. **Methods** Randomly divided 30 SD rats into normal group, model group and compound *Tripterygium Wilfordii* external application group, with 10 rats in each group. Except for the normal group, the other two groups adopted type II collagen-induced rat model with arthritis. Rats in the compound *Tripterygium Wilfordii* external application group were given compound *Tripterygium Wilfordii* topical agent 50 g/(kg · d) for external application on bilateral legs from the 14th day after primary immune, once per day, for 28 days. The model and normal groups were not treated. Measured the volume of rats' metapodium in each group every week. At the end of the experiment, examined the levels of interleukins1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor α (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenin 1 (Ang-1) in serum and synovial tissues. Examined the expression of proteins of extracellular signal regulated protein kinase (ERK) pathway in synovial tissues and conducted pathological examination on articular tissues. **Results** Volume of metapodium, level of each cytokine (except for VEGF) in serum and synovial tissue of rats in the model group remarkably increased compared with the normal group and the expression of p-ERK1/2 in synovial tissue also increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Large amount of inflammatory cell infiltration, severe injury of articular cartilage and surface, bone substance erosion and structure disorder could be seen in pathological articular section. However, levels of IL-1 β , TNF- α and Ang-1 of rats in the compound *Tripterygium Wilfordii* external application group decreased and each cytokine level and mRNA expression in synovial tissue decreased. P-ERK1/2 expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Pathological results showed compound *Tripterygium Wilfordii* external application had good effect in inhibiting synovial proliferation, decreasing inflammatory cell infiltration, and postponing bone and cartilage injury. **Conclusion** Compound *Tripterygium Wilfordii* external application could inhibit synovial proliferation, decrease angiogenesis and pannus formation in synovial tissues by decreasing inflammatory cytokines levels in synovial tissue and activation of ERK pathway in arthritis.

Keywords rheumatoid arthritis; compound *tripterygium wilfordii*; topical agent; synovial tissues; cytokines; extracellular signal regulated protein kinase pathway

(收稿日期: 2016-08-27; 修回日期: 2016-12-10)

编辑: 邓 媛