

丹皮酚对强直性脊柱炎模型小鼠 Wnt 和 BMP/Smad 信号转导通路的影响^Δ

吴 琪^{1*}, 吴 倩², 周晓红³, 吴玲慧⁴ (1. 湖北中医药大学临床技能实训中心, 武汉 430061; 2. 上海市东方医院南院血液透析室, 上海 200123; 3. 湖北中医药大学针灸骨伤学院, 武汉 430061; 4. 咸宁市妇幼保健院儿童保健中心计划免疫科, 湖北 咸宁 437000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)11-1500-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.11.15

摘 要 目的: 研究丹皮酚对强直性脊柱炎(AS)模型小鼠分泌型糖蛋白(Wnt)和骨形态发生蛋白(BMP)/细胞信号转导分子(Smad)通路的影响, 探讨丹皮酚防治 AS 的机制。方法: 将 40 只小鼠随机分为正常组、模型组、柳氮磺吡啶组(阳性对照, 9 mg/kg)和丹皮酚组(3 mg/kg), 每组 10 只。除正常组外的其余各组小鼠均采用完全弗氏佐剂+蛋白聚糖腹腔注射法复制 AS 模型。各给药组小鼠在成模后灌胃相应药物, 正常组和模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水, 每天给药 1 次, 连续 20 d。末次给药后处死小鼠, 透射电镜下观察各组小鼠骶髂关节滑膜细胞超微病理结构变化, 采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、Wnt 信号通路病理性骨化相关因子(DKK-1)含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应法检测小鼠滑膜组织中骨形态发生蛋白 2(BMP-2)、细胞内核心结合因子 α 1(Cbfa1)、Smad1 mRNA 表达。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 TNF- α 含量明显增加、DKK-1 含量明显减少, 滑膜组织中 BMP-2、Cbfa1 和 Smad1 mRNA 表达水平明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 电镜下可见模型组小鼠滑膜细胞增生, 排列紊乱, 分泌活性细胞器分泌亢进, 细胞间隙增宽。与模型组比较, 柳氮磺吡啶组和丹皮酚组小鼠血清中 TNF- α 含量均明显减少, 丹皮酚组小鼠血清中 DKK-1 含量明显增加, 滑膜组织中 BMP-2、Cbfa1 和 Smad1 mRNA 表达水平明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 电镜下可见丹皮酚组小鼠滑膜细胞线粒体、溶酶体、粗面内质网的形态明显改善。结论: 丹皮酚防治 AS 的机制可能与降低血清中 TNF- α 含量、升高血清中 DKK-1 含量, 下调滑膜细胞中 BMP-2、Cbfa1 和 Smad1 mRNA 表达, 抑制 Wnt 和 BMP/Smad 骨化相关信号转导通路逆转滑膜细胞成骨分化有关。

关键词 丹皮酚; 强直性脊柱炎; 分泌型糖蛋白; 骨形态发生蛋白; 细胞信号转导分子; 小鼠

环中的滞留时间, 有效提高其生物利用度。

染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束增加了药物在血浆中的蓄积量而降低了在肝中的蓄积量, 其原因可能在于 MePEG-PLGA 共聚物胶束的亲水外壳可以使胶束体系在一定程度上避免某些器官网状内皮系统的识别和摄取。本研究有望为染料木素的临床应用提供一种疗效更佳、更安全的新制剂。

参考文献

[1] LAI WX, YANG YJ, CUI L. Research progress of anti-osteoporotic effects of genistein[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2016, 32(10):1345-1348.
[2] ZHENG X, LEE S, CHUN OK. Soy isoflavones and osteoporotic bone loss: a review with an emphasis on modulation of bone remodeling[J]. *J Med Food*, 2016, 19(1):1-6.
[3] 苏文, 刘艳平, 李忠魁, 等. 染料木素诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其分子机制的研究[J]. *中草药*, 2007, 38(6): 874-878.
[4] 郑秋玲, 聂少平, 李文娟, 等. 染料木素对人宫颈癌细胞株 HeLa 增殖的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(11):

1577-1581.
[5] SIMONS AL, RENOUF M, MURPHY PA, et al. Greater apparent absorption of flavonoids is associated with lesser human fecal flavonoid disappearance rates[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(1):141-144.
[6] 赖文秀, 杨亚军, 崔燎. 染料木素抗骨质疏松研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(10):1345-1348.
[7] 孟庆杰, 包琳琳, 潘五九, 等. 染料木素固体分散体的制备及其性质研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(10):1406-1408.
[8] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化染料木素胶束的制备处方[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(22):12-16.
[9] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 染料木素胶束的体外释药研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(17):223-225.
[10] 何礼, 韩瑞伟, 唐晓飞, 等. 染料木素 MePEG-PLGA 共聚物胶束的制备及其药动学研究[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2012, 29(6):477-482.
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:556-557.
[12] 白永涛, 文红梅, 彭彬, 等. UPLC 法测定大鼠血浆中染料木素浓度及其药代动力学参数[J]. *中药新药与临床药理*, 2010, 21(5):512-514.

^Δ 基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划资助项目(No. Q20162011)

* 高级实验师, 博士。研究方向: 骨关节病的中医药防治。电话: 027-68889070。E-mail: wuqi111@163.com

(收稿日期: 2017-11-22 修回日期: 2018-04-08)
(编辑: 邹丽娟)

Effects of Paeonol on Wnt and BMP/Smad Signal Transduction Pathway in the Ankylosing Spondylitis Model Mice

WU Qi¹, WU Qian², ZHOU Xiaohong³, WU Linghui⁴ (1.Teaching and Demonstration Center of Clinical Skill, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China; 2.Hemodialysis Room, South Branch of Shanghai East Hospital, Shanghai 200123, China; 3.College of Acupuncture and Orthopaedics-Traumatology, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China; 4.Dept. of Immunology, Child Health Center, Xianning Center for Maternal and Child Health Care, Hubei Xianning 437000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of paeonol on Wnt and BMP/Smad pathway in ankylosing spondylitis (AS) model mice, and to investigate prevention and treatment mechanism of paeonol for AS. **METHODS:** 40 mice were randomly divided into normal group, model group, sulfasalazine group (positive control, 9 mg/kg) and paeonol group (3 mg/kg), with 10 mice in each group. In addition to the normal group, Freund's adjuvant and proteoglycan were used to establish AS model in each group. After modeling, mice in each administration group were given relevant medicine intragastrically; normal group and model group were given constant volume of distilled water intragastrically, once a day, for consecutive 20 d. After last administration, the mice were killed, TEM was used to observe the ultrastructural pathologic change of synovial cells in articulationes sacroiliaca. The serum contents of TNF- α and DKK-1 were determined by ELISA, and the mRNA expressions of BMP-2, Cbfa1 and Smad1 in synovial tissue were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **RESULTS:** Compared with normal group, serum content of TNF- α in model group was increased significantly, while serum content of DKK-1 was decreased significantly; mRNA expressions of BMP-2, Cbfa1 and Smad1 in synovial tissue were increased significantly, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Under the electron microscope, the synoviocytes of mice in model group were proliferated and arranged in disorder, and the secretory activity of active organelles were hyperactivity and the gap among cells became widened. Compared with model group, serum content of TNF- α in sulfasalazine group and paeonol group were decreased significantly; serum content of DKK-1 was increased significantly and mRNA expressions of BMP-2, Cbfa1 and Smad1 in synovial tissue were decreased significantly in paeonol group, with statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Electron microscopy showed that mitochondria, lysosome and rough endoplasmic reticulum structure of synovial cell were improved significantly in paeonol group. **CONCLUSIONS:** The mechanism prevention and treatment of paeonol on AS may be associated with reducing serum content of TNF- α , increasing serum content of DKK-1, down-regulating mRNA expressions of BMP-2, Cbfa1 and Smad1 in synovial cells, inhibiting Wnt and BMP/Smad ossification related signal transduction pathway and reversing osteogenic differentiation of synovial cells.

KEYWORDS Paeonol; Ankylosing spondylitis; Wnt; BMP/Smad; Mice

强直性脊柱炎(Ankylosing spondylitis, AS)是以骶髂关节和脊柱慢性炎症为主的全身性疾病^[1],最终病变发展为中枢关节的纤维化和骨性强直^[2],并由此引起腰背僵硬或疼痛、脊柱强直、畸形愈合等临床症状^[3]。据统计,我国AS患病率为0.3%,且好发于青、中年男性^[4],具有较高的致残率和至畸率,目前已成为国内外人口与健康研究领域的研究重点^[5]。病理形成骨是AS患者致残的主要原因,AS治疗最终必须解决正常韧带及滑膜骨化强直问题^[6]。成骨过程受多种因素、多个信号路径的调节,经典的分泌型糖蛋白(Wnt)和骨形态发生蛋白(BMP)信号通路在调节成骨细胞功能及骨形成中发挥重要的协同作用^[7-8]。研究表明,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)是触发AS“炎症因子风暴”级联瀑布效应的关键因子之一,其与AS韧带骨化具有密切的联系^[9]。

丹皮酚(Paeonol)为芍药科植物徐长卿的主要药理成分,具有与非甾体类抗炎药相似的药理作用,包括解热镇痛、抗炎、抗氧化、调节细胞免疫、诱导肿瘤细胞凋

亡以及抗辐射等,且不良反应少,具有治疗慢性炎症风湿性疾病的潜力^[10-12]。目前,关于丹皮酚抑制多种肿瘤作用的研究报道较多,而关于其对AS病理性骨化相关信号转导通路的影响尚未见报道。故本研究以蛋白聚糖(PG)诱导的AS小鼠为模型,通过观察骶髂关节滑膜细胞超微病理结构变化,检测血清中炎症相关细胞因子TNF- α 和Wnt信号通路病理性骨化相关因子(DKK-1)的含量,研究丹皮酚对滑膜细胞BMP-2、Smad1及Cbfa1 mRNA表达的影响,探讨其对Wnt和BMP/Smad病理性骨化相关信号转导通路的调控作用,为丹皮酚临床治疗AS以及阐明其作用机制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

HT-770型透射电镜(日本日立高新技术公司); C2500-R-230V微型高速离心机(美国Labnet公司); ICV-450型电热恒温培养箱(日本Asone科学仪器公司); Multiskan MK3型全自动酶标仪(美国Thermo公

司);DHG 9203A 型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Iiumina 生物科技公司);Nano-100 型微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

丹皮酚片(广西亿康药业股份有限公司,批号:H45021119,规格:40 mg/片);柳氮磺吡啶肠溶片(上海信谊天平药业有限公司,批号:H31020557,规格:0.25 g/片);PG(美国 Sigma 公司,批号:D-8428,纯度:>99%);完全弗氏佐剂(美国 MP Bio 公司,批号:642857,纯度:>99%);小鼠 TNF- α 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号:E-EL-M0049c)、小鼠 DKK-1 ELISA 试剂盒(批号:E-EL-M0024c)均购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;总 RNA 提取试剂盒(Trizol,北京艾德莱生物科技有限公司,批号:252250AX);Hiscript 逆转录酶(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:R101-01/02);Taq Plus DNA Polymerase 聚合酶、DL2000 DNA Marker(北京天根生化科技有限公司,批号:ET105-01、D114-02);PCR 引物由北京擎科生物技术公司合成;其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 BALB/c 小鼠 40 只,♂,鼠龄(16 $\pm$ 4)周,体重(20 $\pm$ 3) g,由武汉大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0004。实验过程中对动物的处置符合科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。

2 方法

2.1 分组与造模

将小鼠适应性饲养 1 周后随机分为正常组、模型组、柳氮磺吡啶组和丹皮酚组,每组 10 只。除正常组外,其余 3 组小鼠均复制 AS 模型,具体操作如下:将完全弗氏佐剂 100 μ L、PG 100 μ L 混合,分别在第 0、3、6 周注入小鼠腹腔^[13]。

2.2 给药与取材

参照临床用药剂量,丹皮酚的小鼠给药剂量为 3 mg/kg(临用前用蒸馏水溶解后配成 0.3 mg/mL 的溶液),柳氮磺吡啶的小鼠给药剂量为 9 mg/kg(临用前用蒸馏水溶解后配成 0.9 mg/mL 的溶液),正常组和模型组小鼠灌胃等体积蒸馏水。从造模成功后的第 1 天开始,各组小鼠分别灌胃相应药物,每日 1 次,连续用药 20 d。末次给药后,摘除小鼠眼球,通过眼底静脉丛采血 800~1 000 μ L,以离心半径为 6 cm、3 000 r/min 离心 10 min,留取血清,−20 $^{\circ}$ C 冰箱保存;并于小鼠骶髂关节切取滑膜组织置于冻存管中,−80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.3 血清中 TNF- α 、DKK-1 含量测定

采用 ELISA 法测定小鼠血清中 TNF- α 、DKK-1 含

量,具体操作按照相应试剂盒说明进行,通过酶标仪读取吸光度(A)值,并计算其含量。

2.4 骶髂关节滑膜细胞超微结构观察

取小鼠双侧骶髂关节面约 2 mm 厚的滑膜组织标本,4% 戊二醛 0.1 mol/L 酸缓冲液前固定,1% 锇酸后固定,梯度酒精逐级脱水,环氧树脂包埋剂 EPON812 逐级浸泡、包埋,定位后行超薄切片,透射电镜观察滑膜细胞内细胞器形态变化。

2.5 滑膜组织中 BMP-2、Smad1 和 Cbfa1 mRNA 表达测定

采用实时荧光定量 PCR 法测定小鼠滑膜组织中 BMP-2、Smad1 和 Cbfa1 mRNA 表达。取 100 mg 滑膜组织,匀浆后,按照 Trizol 法提取总 RNA。取溶解后的总 RNA 2 μ L,用微量分光光度计测定样本的浓度和纯度。取总 RNA 按照逆转录反应体系逆转录成 cDNA,反应条件为 25 $^{\circ}$ C、5 min;50 $^{\circ}$ C、15 min,85 $^{\circ}$ C、5 min,4 $^{\circ}$ C、10 min。将 cDNA 作 10 倍稀释后进行 PCR 扩增,引物序列: β -肌动蛋白(β -actin)上游序列为 5'-CACGATGGAGG-GGCCGGACTCATC-3',下游序列为 5'-TAAAGACCT-CTATGCCAACACAGT-3',扩增产物长度为 240 bp;BMP-2 上游序列为 5'-TGTGAGGATTAGCAGGTCTT-TG-3',下游序列为 5'-TCTCGTTTGTGGAGCGGATG-3',扩增产物长度为 111 bp;Smad1 上游序列为 5'-GGCGACATATTGGGAAAGGA-3',下游序列为 5'-TGAAAGCCGTGGTGGTAGTT-3',扩增产物长度为 121 bp;Cbfa1 上游序列为 5'-GGACGAGGCAAGAGTT-TCA-3',下游序列为 5'-TGGTGCAGAGTTCAGG-GAG-3',扩增产物长度为 249 bp。扩增条件:95 $^{\circ}$ C、10 min;95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,72 $^{\circ}$ C、40 s,共循环 40 次。反应体系:cDNA(10 倍稀释)4 μ L,上、下游引物(100 μ mol/L)各 0.4 μ L,SYBR Green Master Mix 预混液 10 μ L,50 $\times$ ROX Reference Dye 预混液 0.2 μ L,水 5 μ L。保存荧光定量 PCR 扩增 BMP-2、Cbfa1、Smad1、 β -actin 基因的扩增曲线及解链曲线。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清中 TNF- α 、DKK-1 含量测定结果

与正常组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α 含量明显增加($P < 0.01$),DKK-1 含量明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较,柳氮磺吡啶组和丹皮酚组小鼠血清中 TNF- α

含量均明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),丹皮酚组小鼠血清中DKK-1含量明显增加($P<0.05$),结果见表1。

表1 各组小鼠血清中TNF- α 、DKK-1含量测定结果($\bar{x}\pm s,n=10,\text{ng/mL}$)

Tab 1 Serum contents of TNF- α and DKK-1 of mice in each group($\bar{x}\pm s,n=10,\text{ng/mL}$)

组别	剂量,mg/kg	TNF- α	DKK-1
正常组		92.463 $\pm$ 2.146	2 650.744 $\pm$ 53.761
模型组		251.142 $\pm$ 6.213**	1 487.615 $\pm$ 64.902**
柳氮磺吡啶组	9	192.286 $\pm$ 4.694 [#]	1 862.794 $\pm$ 25.958
丹皮酚组	3	137.352 $\pm$ 6.541 ^{##}	2 174.349 $\pm$ 20.327 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$
Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

3.2 髌膝关节滑膜细胞超微病理结构观察结果

正常组:滑膜细胞疏松平行排列,滑膜层由细胞层和内膜下层构成,可见绒毛,内含胶原性纤维;滑膜细胞有A、B两型,均无异常;巨噬细胞样A型细胞的细胞质内含丰富的线粒体、囊泡和溶酶体;成纤维细胞样B型细胞含有高浓度的内质网,少量线粒体和空泡。模型组:滑膜细胞排列紊乱,细胞内膜明显增厚,细胞质内细胞器变形,胞核内染色质分布不均。柳氮磺吡啶组:滑膜层细胞性内膜增生,B型细胞的细胞质内线粒体肿胀,粗面内质网扩张,有大量空泡形成,胞核凹陷。丹皮酚组:滑膜细胞层轻度增厚,排列均匀,A型细胞的细胞质内线粒体轻度肿胀,初级溶酶体多见;B型细胞的细胞质内粗面内质网丰富,胞核内染色质分布均匀。各组小鼠髌膝关节滑膜细胞超微结构观察结果见图1。

3.3 滑膜组织中BMP-2、Smad1和Cbfa1 mRNA表达测定结果

与正常组比较,模型组小鼠滑膜组织中BMP-2、Cbfa1、Smad1 mRNA表达水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,丹皮酚组小鼠滑膜组织中BMP-2、Cbfa1和Smad1 mRNA表达水平均不同程度降低($P<0.05$),而柳氮磺吡啶组小鼠滑膜组织中BMP-2、Cbfa1、Smad1 mRNA表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表2。

4 讨论

滑膜组织内A、B型滑膜细胞是AS骨破坏和病理性骨化的效应细胞。本研究结果显示,模型组小鼠滑膜细胞增生,排列紊乱,细胞间隙增宽;丹皮酚组小鼠滑膜细胞细胞质中线粒体、溶酶体、粗面内质网的形态明显改善,表明丹皮酚可减轻滑膜细胞变性和损伤。

AS炎症反应与新骨形成都是由众多细胞因子和信号通路组成的错综复杂的调控机制网络。在骨形成的早期阶段主要由BMP信号转导通路调控,在成骨晚期

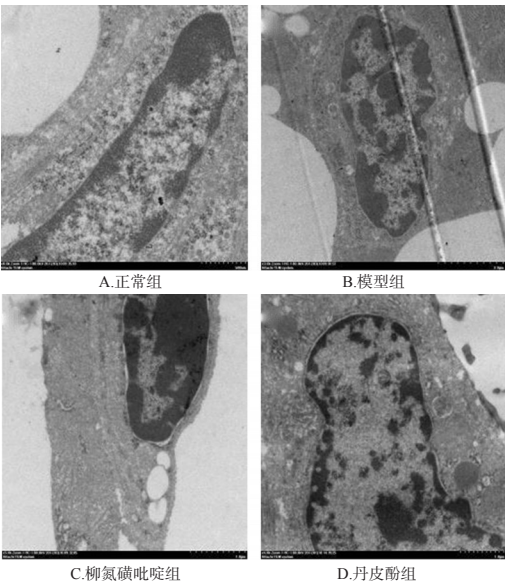


图1 各组小鼠髌膝关节滑膜细胞超微结构观察的透射电镜图($\times 5\ 000$)

Fig 1 Transmission electron microscopy of ultra-microstructure of synovial cells of mice in each group($\times 5\ 000$)

表2 各组小鼠滑膜细胞中BMP-2、Cbfa1和Smad1 mRNA表达测定结果($\bar{x}\pm s,n=10$)

Tab 2 Determination of BMP-2, Cbfa1 and Smad1 mRNA in synovial cells of mice in each group($\bar{x}\pm s,n=10$)

组别	2 ^{-$\Delta\Delta C_t$} 值		
	BMP-2 mRNA	Cbfa1 mRNA	Smad1 mRNA
正常组	1	1	1
模型组	3.141 $\pm$ 0.295**	2.342 $\pm$ 0.283**	1.762 $\pm$ 0.163**
柳氮磺吡啶组	2.596 $\pm$ 0.331	1.961 $\pm$ 0.305	1.597 $\pm$ 0.214
丹皮酚组	1.628 $\pm$ 0.207 [#]	1.428 $\pm$ 0.146 [#]	1.224 $\pm$ 0.115 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$
Note: vs. normal group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

阶段主要由Wnt信号转导通路为成骨细胞的发生和新骨形成传递信号,是骨重塑的重要调控者^[14]。其中DKK-1是Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路最主要的抑制因子。研究证实,在AS患者中DKK-1出现功能失调而出现Wnt信号通路活化,导致新骨形成^[15]。炎症与新骨形成之间有一定关联,而TNF- α 是炎症细胞因子网络的关键因子^[15]。BMP是多功能生长因子,除BMP-1外均属于转化生长因子 β (TGF- β)超家族,BMP能通过Smad途径上调成骨转录因子Osx的表达而介导成骨基因转录发挥作用^[16]。因此,TNF- α 、Wnt信号通路以及BMP信号通路之间平衡的变化决定着新骨的形成。传统的一线抗风湿药物(如柳氮磺吡啶)在延缓AS进行性结构破坏的疗效上并不确切。本研究通过ELISA检测发现,与模型组比较,丹皮酚在降低血清中TNF- α 含量

和增加血清中 DKK-1 含量方面优于柳氮磺吡啶。这说明丹皮酚可以通过降低血清中 TNF- α 含量,增加血清中 DKK-1 含量,从而抑制 Wnt 信号通路传导和延缓病理性骨形成。通过实时荧光定量 PCR 结果显示,丹皮酚可明显下调模型小鼠滑膜组织中 BMP-2、Cbf α 1 和 Smad1 mRNA 表达,从而阻断成骨细胞通路靶基因表达,这与电镜显示丹皮酚干预后滑膜细胞超微结构形态改善相符。

综上所述,丹皮酚可通过协同抑制 Wnt 和 BMP/Smad 骨化相关信号转导通路逆转滑膜细胞成骨分化,从而发挥其对 AS 的防治作用。下一步笔者将深入探讨丹皮酚不同浓度和不同给药时间对早期 AS 模型病理性骨化的影响。

参考文献

[1] NEERINCKX B, LORIES R. Mechanisms impact and prevention of pathological bone regeneration in spondyloarthritis[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2017, 29(4): 287-292.

[2] MOLTO A, GRANGER B, WENDLING D, et al. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in early axial spondyloarthritis in daily practice: data from the DESIR cohort [J]. *Joint Bone Spine*, 2017, 84(1): 79-82.

[3] LORIES RJ, HAROON N. Bone formation in axial spondyloarthritis[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014, 28(5): 765-777.

[4] YANG Y, DAI M. Expression of PADI4 in patients with ankylosing spondylitis and its role in mediating the effects of TNF- α on the proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(2): 565-570.

[5] BLEIL J, SIEPER J, MAIER R, et al. Cartilage in facet joints of patients with ankylosing spondylitis (AS) shows signs of cartilage degeneration rather than chondrocyte hypertrophy: implications for joint remodeling in AS[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015. DOI: 10.1186/s13075-015-0675-5.

[6] RANGANATHAN V, GRACEY E, BROWN MA, et al. Pathogenesis of ankylosing spondylitis-recent advances

and future directions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(6): 359-367.

[7] BROWN MA, KENNA T, WORDSWORTH BP. Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(2): 81-91.

[8] ASHE HL. Modulation of BMP signalling by integrins[J]. *Biochem Soc T*, 2016, 44(5): 1465-1473.

[9] ALTONEN K, HEINONEN A, JOENSUU J, et al. Effectiveness and drug survival of TNF-inhibitors in the treatment of psoriatic arthritis: a prospective cohort study[J]. *Semin Arthritis Rheu*, 2017, 46(6): 732-739.

[10] 耿帅, 赵育林, 曾凯, 等. 丹皮酚的研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2016, 38(5): 310-313.

[11] TSAI CY, KAPOOR M, HUANG YP, et al. Synthesis and evaluation of aminothiazole-paeonol derivatives as potential anticancer agents[J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 145-154.

[12] 吴琪, 周晓红, 杨德才, 等. 徐长卿-二妙散-三藤方对蛋白聚糖诱导关节炎模型小鼠血清中 TNF- α 和 DKK-1 含量的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(31): 4369-4372.

[13] 童文文, 李甲, 徐卫东. 蛋白聚糖诱导小鼠关节炎模型的研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(5): 530-535.

[14] HE GX, Shi Y, LIM J, et al. Differential involvement of Wnt signaling in Bmp regulation of cancellous versus periosteal bone growth[J]. *Bone Res*, 2017. DOI: 10.1038/boneres.

[15] DEES C, SCHLOTTMANN I, FUNKE R, et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 1232-1239.

[16] DONG M, YU DS, DURAI PANDIYAN V, et al. The protective effect of chrysanthemum indicum extract against ankylosing spondylitis in mouse models[J]. *Biomed Res Int*, 2007. DOI: 10.1155/2017/8206281.

(收稿日期: 2017-12-13 修回日期: 2018-03-20)

(编辑: 林 静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊, 欢迎投稿、订阅