

单文婷,王潇,杨晓龙,等. 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路探讨铁筷子对 CIA 大鼠骨破坏的防护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(10): 1250-1260.

Shan WT, Wang X, Yang XL, et al. Exploring the protective effect of *helleborus thibetanus* franch alcohol extract on bone destruction in CIA rats based on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(10): 1250-1260.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.10.002

基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路 探讨铁筷子对 CIA 大鼠骨破坏 的防护作用

单文婷,王潇,杨晓龙,艾飞,刘杨,魏鑫,刘霞*

(贵州中医药大学,贵阳 550025)

【摘要】 目的 探讨铁筷子对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)模型大鼠的抗炎作用及对 OPG/RANK/RANKL 信号通路的影响。**方法** 雌性 Wistar 大鼠 60 只分为:正常组、模型组、阳性药物组(甲氨蝶呤,MTX)、低剂量组、中剂量组和高剂量组。采用胶原抗体诱导法于大鼠尾根部注射牛Ⅱ型胶原蛋白建立 CIA 大鼠模型,模型建立成功后进行灌胃给药,正常组:给予 10 mL/(kg·d)生理盐水;模型组:给予 10 mL/(kg·d)生理盐水;阳性药物组每次给予 2.0 mL/(kg·d) MTX,每周 3 次;铁筷子低、中、高剂量组每次分别给予 0.25 g/(kg·d)、0.5 g/(kg·d)、1.0 g/(kg·d);连续灌胃治疗 25 d。通过记录大鼠体重;观察大鼠足肿胀程度;大鼠踝关节炎指数评分;micro-CT 观察踝关节骨组织病理改变;苏木素-伊红(HE)染色对大鼠踝关节骨组织和滑膜病理变化;抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色法检测观察破骨细胞数量的改变;PCR 检测骨保护素(OPG)、核因子- κ B 受体激活剂(RANK)、RANK 配体(RANKL)、肿瘤坏死因子(TNF- α)和骨形成蛋白 2(BMP-2)的 mRNA 水平,OPG、RANK、RANKL、TNF- α 和 BMP-2 蛋白相对表达量检测用蛋白免疫印迹法(Western Blot),以确定铁筷子对类风湿关节炎大鼠的治疗作用及其对骨关节保护的潜在药理机制。**结果** 数据统计结果表明,与正常组相比,CIA 大鼠体重增长减慢($P < 0.05$),足底厚度增加($P < 0.05$),踝关节出现关节腔变窄,骨组织啃噬样骨质破坏、滑膜的病理性变化,如炎性细胞增生和滑膜异常增生浸润;Micro-CT 结果显示:与正常组相比,模型组、低剂量组、中剂量组,踝关节表面凹凸不平、外形不完整,踝关节表面出现啃噬样骨质破坏,高剂量组与正常组相比,各项指标变化都不明显;HE 染色发现模型组大鼠踝关节出现关节腔变窄,骨组织啃噬样骨质破坏,滑膜组织增生和炎性细胞浸润等病理改变;与模型组相比,低、中、高剂量组大鼠踝关节骨组织增生和炎性浸润显著改善;TRAP 染色观察与正常组比,模型组破骨细胞数量最多,低、中、高剂量组干预下 TRAP 染色阳性破骨细胞数量逐渐减少;qRT-PCR 的结果,与模型组相比,低、中、高剂量组 OPG、BMP-2 mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$),RANK、RANKL、TNF- α mRNA 相对表达量降低($P < 0.05$);Western Blot 结果,与模型组比,低、中、高剂量组 OPG、BMP-2 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$),RANK、RANKL、TNF- α 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。**结论** 铁筷子可能通过调节 OPG/RANK/RANKL 信号通路缓解 RA 大鼠体内炎症反应,发挥其抗类风湿关节炎机制的作用。

【关键词】 类风湿关节炎;铁筷子;骨破坏;OPG/RANK/RANKL 信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 10-1250-11

【基金项目】 国家自然科学基金(81760738),贵州中医药大学 2021 年国家自然科学基金后补助资金科研创新探索专项基金(2018YFC170810524)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81760738), Guizhou University of Traditional Chinese Medicine 2021 National Natural Science Foundation Subvention Fund for Research Innovation and Exploration Special Fund (2018YFC170810524).

【作者简介】 单文婷(1994—),在读硕士研究生,研究方向:中医药治疗炎性疾病的物质基础及分子机制。

Email:shantingtingmile@163.com

【通信作者】 刘霞(1980—),教授,硕士导师,博士,研究方向:中药药效物质基础。Email:liuxia0851@126.com

Exploring the protective effect of *helleborus thibetanus* franch alcohol extract on bone destruction in CIA rats based on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway

SHAN Wenting, WANG Xiao, YANG Xiaolong, AI Fei, LIU Yang, WEI Xin, LIU Xia *

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guizhou 550025, China)

Corresponding author: LIU Xia. E-mail: liuxia0851@126.com

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-inflammatory effect of *helleborus thibetanus* franch on collagen-induced arthritis (CIA) model rats and its effect on the OPG/RANK/RANKL signaling pathway. **Methods** Sixty female Wistar rats were divided into normal group, model group, positive drug methotrexate (MTX) group, low dose group, medium dose group, and high dose group. The CIA model was established by injecting bovine type II collagen into the tail root of rats using the collagen antibody induction method, and drugs were administered by gavage after the model was successfully established. In the normal group, 10 mL/(kg·d) saline was administered. In the model group, 10 mL/(kg·d) saline was administered. In the positive drug group, 2 mg/(kg·d) MTX was administered three times a week. In low, medium, and high dose group, 0.25, 0.5, and 1.0 g/(kg·d) were administered, respectively. Continuous gavage treatment was applied for 25 days. Body mass of rats was recorded to observe the degree of foot swelling. The ankle arthritis index score was calculated. Micro-CT was used to observe histopathological changes in the ankle joint bone. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe pathological changes in ankle joint bone tissue and synovial membrane. Changes in the number of osteoclasts were determined by tartaric acid phosphatase (TRAP) staining. PCR was used to measure mRNA levels of osteoprotegerin (OPG), nuclear factor- κ B receptor activator (RANK), RANK ligand (RANKL), tumor necrosis factor (TNF)- α , and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2). Relative protein expression of OPG, RANK, RANKL, TNF- α , and BMP-2 was measured by Western Blot. *helleborus thibetanus* franch on rats with rheumatoid arthritis and its potential pharmacological mechanism for osteoarthritic protection. **Results** Compared with the normal group, CIA rats had a lower body mass ($P < 0.05$), increased thickness of the plantar foot ($P < 0.05$), narrowing of the joint cavity in the ankle joint, gnawing-like bone destruction, and pathological changes in the synovium, such as inflammatory cell proliferation and abnormal synovial hyperplasia infiltration. Micro-CT showed that, compared with the normal group, model, low and medium-dose groups showed an uneven ankle joint surface with an incomplete shape and gnawing-like bone destruction, and the high-dose group showed no significant changes in all indexes. HE staining revealed that the ankle joint of the model group showed joint cavity narrowing, gnawing-like bone destruction, synovial tissue proliferation, and inflammatory cell infiltration. Pathological changes, such as destruction of bone tissue, synovial tissue hyperplasia, and inflammatory cell infiltration, were found in the ankle joint of rats in the model group. Compared with the model group, bone tissue hyperplasia and inflammatory cell infiltration in the ankle joint of rats in low, medium, and high dose groups were significantly improved. TRAP staining showed that the model group had the largest number of osteoclasts, and the number of TRAP-positive osteoclasts was reduced in low, medium, and high dose groups compared with the normal group. qRT-PCR showed that, compared with the model group, relative mRNA expression of OPG and BMP-2 was increased in low, medium, and high dose groups ($P < 0.05$), and relative mRNA expression of RANK, RANKL, and TNF- α was decreased in low, medium, and high dose groups ($P < 0.05$). Western Blot showed that, compared with the model group, relative protein expression of OPG and BMP-2 was increased in low, medium, and high dose groups ($P < 0.05$), and relative protein expression of RANK, RANKL, and TNF- α was decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** *Helleborus thibetanus* franch may alleviate the inflammatory response in RA rats through an anti-rheumatoid arthritis mechanism involving the OPG/RANK/RANKL signaling pathway.

[Keywords] rheumatoid arthritis; *helleborus thibetanus* franch; bone destruction; OPG/RANK/RANKL signaling pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 属于一种慢性进行自身免疫性疾病^[1], 其病理特点包括慢性炎症浸润、血管翳形成、进行性骨侵蚀、骨丢失和关节破坏, 在疾病晚期可导致多脏器的并发症^[2], 且 RA 女性的发病率高于男性, 致残率约占全球人口的 1% ~ 2%^[3]。目前临床上用于治疗 RA 主要以抗风湿病药物、糖皮质激素及生物制剂为主, 如甲氨蝶呤、肿瘤坏死因子 (TNF) α 抑制剂、白细胞介素 (IL-6) 抑制剂、羟氯喹、甲泼尼龙^[4], 这些药物对于 RA 的关节改善有限, 而脏器的不良反应较多且价格昂贵, 因此需要找到在治疗 RA 方面更具有临床意义和研究价值的药物。

中医认为 RA 引起骨破坏的发生与发展属于气滞血瘀证范畴, 而活血化瘀、理气止痛类药物在该类疾病的临床应用中可取得较好疗效^[5]。苗药铁筷子 (*helleborus thibetanus franch*) 又名黑毛七、小桃儿七、九龙丹、见春花、九朵云、九莲灯, 为腊梅科腊梅 (*Chimonanthus*) 属植物腊梅 (*chimonanthus praecox* L. Link) 及山腊梅 (*chimonanthusitens* Oliv) 的干燥根^[6]。药用部位为植物干燥的根部, 性温味辛, 具有理气止痛、活血化瘀的功效^[7], 是苗族人民常用于治疗 RA、跌打损伤、疮疡肿毒的传统用药。目前临床研究和实验研究均已证明铁筷子醇提物能够显著改善血管翳异常增生以及骨关节的生理特性和功能异常^[8], 但目前对其作用机制的认识还不够深入。

骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 是肿瘤坏死因子受体 (tumor necrotic factor receptor, TNFR) 之一, 通过与核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 竞争性结合 RANK (NF- κ B 受体激活子), 阻断 RANK 与其配体结合, 抑制破骨细胞的活化和成熟, 诱导破骨细胞凋亡^[9]。由此, OPG/RANKL/RANK 信号通路构成新的调控网络, 不仅调控破骨细胞的激活和骨重建, 还在骨破坏相关疾病中起至关重要的作用。研究表明, 类风湿关节炎组织中破骨细胞数量与活性明显增加, 提示活化的破骨细胞参与 RA 的骨破坏。可见抑制破骨细胞的活化可能是治疗该疾病的关键。基于此, 本研究采用胶原和不完全弗氏佐剂复制 CIA 大鼠模型^[10], 通过观察铁筷子对 CIA 大鼠的治疗效果及 OPG/RANK/RANKL 信号通路关键因子的检测, 以探讨铁筷子对模型大鼠骨组织的防护机制, 为铁筷子治疗 RA 奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60 只 5 周龄 SPF 级 Wistar 雌性健康大鼠, 体重 110 ~ 150 g, 由斯贝福 (北京) 生物技术有限公司提供【SCXK (京) 2019-0010】。本研究于室内温度 21 ~ 25℃, 相对湿度 40% ~ 50%, 每日光照时间 5 h 环境进行, 饲养于贵州中医药大学动物实验中心【SYXK (黔) 2021-0005】。通过贵州中医药大学实验动物伦理委员会的批准 (20220108)。

1.1.2 药物

铁筷子购于贵阳市乌当区三江镇农场, 经贵州中医药大学药学院生药教研室进行初步鉴定, 铁筷子为山腊梅科腊梅属植物腊梅的根茎。购来的铁筷子用水清洗弃其杂质后, 进行晒干, 将其打成粗粉。称取粉碎后铁筷子 1000 g, 7 倍量甲醇回流提取 2 次, 每次 3 h, 甲醇热回流提取蒸干, 将混合的滤液过滤以获得总提取物, 减压浓缩后在水浴锅将提取物平铺于托盘蒸干浓缩得浸膏, 将其放入 4℃ 冰箱保存, 动物给药时用 25% 乙醇溶解以达到所需生药浓度, 以 0.25、0.50、1.00 g/kg 作为后续实验的药物浓度, 记为低剂量组、中剂量组、高剂量组。

1.1.3 主要试剂与仪器

甲氨蝶呤 (上海上药信谊药厂有限公司, 197220704); 牛 II 型骨胶原蛋白 (美国 chondrex 公司, 20022)、不完全弗氏佐剂 (美国 chondrex 公司, 7002); Molpure[®] Cell/Tissue Total RNA Kit (YEASEN 公司, 19221ES50); PrimeScript^{RT} reagent Kit (宝日医生物技术有限公司, RR047A)、TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) (宝日医生物技术有限公司, RR820A); 苏木素染液 (武汉塞维尔生物科技有限公司, G1004); 伊红染液 (合肥博美生物科技有限责任公司, YE2080); TRAP 染色试剂盒 (德国 Sigma-Aldrich, 387A-1KT); 预染蛋白 Marker (abclonalRM, 19001)、RANKL (abclonal, A2550)、 β -actin (abclonal, AC033)、OPG (abclonal, A12997)、RANK (abclonal, A2100)、HRP Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (abclonal, AS003); TNF- α (booster, BA0131); BMP-2 (proteintech, 66383-1-Ig); Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) HRP (Affinity, S0001)。实时荧光定量 (qRT-PCR) 仪 (四川西陇科学有限公司); 转轮式切片机 (2016 德国徕卡); 组织包埋机

(常州郊区中威电子仪器);JY-SCZ4 + 型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

随机将大鼠分为正常组(Control)、模型组(Model)、阳性药物组(MTX)、低剂量组、中剂量组和高剂量组,共6组,每组10只。用戊巴比妥钠(50 mg/kg)对正常组以外的剩余大鼠进行腹腔注射麻醉后,进行第1次免疫(Day 0):在每只大鼠的尾根部3 cm的位置进行皮下注射0.2 mL的牛Ⅱ型胶原蛋白乳剂;在1次免疫后7 d进行2次免疫:在大鼠的尾根部3 cm的位置用0.4 mL牛Ⅱ型胶原蛋白乳剂以加强免疫刺激。胶原蛋白乳剂的配制:将等体积的2 mg/mL牛Ⅱ型胶原溶液与1 mg/mL不完全弗氏佐剂混合在冰浴状态下用匀浆器搅拌均匀,使其充分混合乳化,待牛Ⅱ型胶原蛋白乳液完全乳化后(乳化条件为:乳液滴水面成球状,不分散),置于冰上待用,以避免胶原蛋白的变性和失活。CIA模型构建成功后(模型成功标准:用游标卡尺法测定造模大鼠踝关节肿胀 ≥ 6 mm),于一次免疫第14天,正常组与模型组分别灌胃10 mL/(kg·d)浓度0.9%生理盐水;阳性药物组给予MTX,每周3次,均按照实时体重计算给药量;低剂量组、中剂量组和高剂量组大鼠,0.25、0.50、1.00 g/kg浓度铁筷子每天1次,连续灌胃给药25 d。

1.2.2 形态指标检测及取材

末次给药后,禁食禁饮1 d,用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射全麻基础上断颈处死大鼠,于冰上取左踝关节骨组织,做好标记,放入-80℃冰箱中保存。取右踝关节骨组织,多聚甲醛固定一部分骨组织,做石蜡切片。将包埋好的石蜡切成6 μ m厚的石蜡切片备用。于冰上取骨组织并置入配制好10% EDTA脱钙溶液中1个月。PBS缓冲液冲洗3次,将1 mL蛋白提取液添加到试管中,骨组织蛋白液超声匀浆化,离心,取上清,以备测定。

1.2.3 一般情况的观察

大鼠体重、进食量、行为状态、毛发等一般状况。用游标卡尺分别在7、14、20、26、32、38 d测量大鼠双侧后肢肿胀程度。

1.2.4 Micro-CT检测

造模成功后RA大鼠取材,对各组大鼠关节损伤进行Micro-CT检测,扫描胫骨和踝关节骨组织获

取骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨密度(bone mineral density, BMD)及骨表面面积比(bone surface area/bone volume, BS/BV)。

1.2.5 踝关节组织病理学观察(HE染色)

4%多聚甲醛将大鼠踝关节骨组织固定48 h后,将组织取出放入配制好的10% EDTA脱钙溶液中1个月。脱钙组织置于75%乙醇脱水30 h、85%乙醇脱水4 h、95%乙醇脱水8 h、100%乙醇脱水2 h、100%乙醇脱水1 h,二甲苯Ⅰ、二甲苯Ⅱ各45 min进行透明处理后进行石蜡包埋,石蜡切片(厚为4 μ m),用常规脱蜡至水,将各标本的蜡块各取5张切片,再于苏木精-伊红(HE)染色下用光学显微镜观察,收集图像并进行分析。

1.2.6 踝关节组织病理学观察(TRAP染色)

石蜡切片常规脱蜡至水,切片于纯水洗5 min后,吸水纸吸干。置于盛有纯水的湿盒中,用纯水37℃孵育2 h。倒去组织上纯水后,切片重新放入湿盒,加现配好的trap工作液完全覆盖于切片组织上,放于37℃烤箱避光染色20~30 min。倾去染液,水洗玻片,用抗酒石酸酸性磷酸酶浸染1~2 min(破骨细胞呈酒红色,细胞核呈蓝色)水洗;切片经3次无水乙醇,每次5 min,放入二甲苯2次,每次5 min。待染色切片透明后,滴加中性树胶封片剂密封切片,切片干燥后在显微镜下对其进行观察,并进行图像采集和分析。

1.2.7 qRT-PCR技术测定踝关节组织中OPG、RANK、RANKL、TNF- α 、BMP-2基因表达

从-80℃超低温冰箱取出冻存的踝关节骨组织,液氮下研磨成粉,按TRIzol试剂盒说明提取总RNA,根据逆转录试剂盒说明书进行操作获取cDNA,以 β -actin作为内参。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司设计并合成,序列如表1所示。RT-qPCR扩增体系为20 μ L; Template(DNA)2 μ L,上下游引物各0.8 μ L,加无菌蒸馏水6.4 μ L。反应条件:42℃预变性2 min;扩增反应:95℃反应35 s,55℃反应30 s,72℃反应30 s,收集荧光信号,共45个循环;熔点曲线55~95℃,扩增反应在QuantStudio多重实时荧光定量PCR仪上进行。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法,比较各组OPG、RANKL、RANK、BMP-2、TNF- α mRNA相对表达水平。

1.2.8 Western Blot技术检测踝关节组织中OPG、RANK、RANKL、TNF- α 、BMP-2蛋白表达

在-80℃下,将保存的骨组织放入含有2%SDS

表 1 实时定量荧光 PCR 引物

Table 1 Real-time quantitative fluorescent PCR primers

引物名称 Primer name	上游 Upstream	下游 Downstream
<i>β-actin</i>	5'-GGGAAATCGTGCGTGACATT-3'	5'-GCGGCACTGGCCATCTC-3'
<i>BMP-2</i>	5'-AAGCGTCAAGCCAAACACAAACAG-3'	5'-CCCCACATCACTGAAGTCCACATAG-3'
<i>OPG</i>	5'-TGTGTCCCTTGCCCTGACTACTC-3'	5'-CTCGGTTGTGGGTGCGGTTG-3'
<i>RANK</i>	5'-CAAGGGACGACGGAATCAGATGTG-3'	5'-TGAAGAGGAGCAGGACGATGAGAC-3'
<i>RANKL</i>	5'-GAGCGAAGACACAGAAGCACTACC-3'	5'-GAGCCACGAACCTTCCATCATAGC-3'
<i>TNF-α</i>	5'-CACCACGCTCTTCTGTCTACTGAAC-3'	5'-TGGGCTACGGGCTTGTCCTACTC-3'

裂解液的 Ep 管中,试管内加入钢珠,用匀浆装置研磨,室温放置 20 min,在室温下以 10 000 r/min 离心 30 min。取上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量,并对其总浓度进行测定,各实验组取 50 μL,在 95℃ 条件下变性 15 min,取 30 μg 蛋白样品,用 10% SDS-PAGE 电泳分离 1 h,之后将样品转移到 PVDF 膜上,在室温下,用 5%脱脂奶粉将 PVDF 膜封闭 1 ~ 2 h,TBST 洗膜 3 次,并在 4℃ 时加入针对靶蛋白 OPG(1:2000)、RANK(1:2000)、RANKL(1:2000)、TNF-α(1:2000)、BMP-2(1:2000)、β-actin(1:50000)的一抗孵育过夜,将膜用 TBST 洗涤 3 次后,与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗体 IgG 稀释缓冲剂(1:5000)在室温孵育 2 ~ 3 h,采用 ECL 荧光显像技术,以 β-actin 的表达量作为内参,应用 Image J 软件进行条带灰度值分析,并以正常组结果为 1,对各组蛋白表达结果进行归一化处理。

1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据均使用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 6 统计软件展

开数据分析。两组样本间的比较采用 *t* 检验;以单因子方差分析/重复计量方差分析(ANOVA)进行多组之间的比较,以 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况及足肿胀度的影响

药物铁筷子有毒性,将总提取物以 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00 g/kg 的浓度梯度进行动物急性毒性检测,发现 1.00 g/kg 以上浓度可致大鼠死亡,在急性毒性浓度梯度进行动物检测时发现 1.00 g/kg 以上大鼠出现毒性反应,将 1.00 g/kg 记为安全范围。故选择低剂量组(0.25 g/kg)、中剂量组(0.50 g/kg)、高剂量组(1.00 g/kg)。

一次免疫的第 7 天记录测量足肿胀度、关节炎指数、体重(表 2),各组大鼠体重增长率变化情况(图 1A)、足底厚度改变情况(见图 1B,1C)。正常组大鼠发育良好、被毛致密光亮,日常活动及食、水摄入量均正常;与正常组相比,模型组大鼠在二次免疫后,被毛变黄无光泽,精神躁动不安,食、水摄入量减少,后肢沉重呈拖行状态、四肢明显肿胀,体

表 2 给药结束时各组小鼠的体重、足趾肿胀度测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Results of body mass and toe swelling of mice in each group at the end of drug administration were measured($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	左足趾肿胀度(mm) Swelling of left toe(mm)	右足趾肿胀度(mm) Swelling of right toe(mm)	关节炎评分(分) Arthritis score(score)	体重(g) Wight(g)
正常组 Normal group	2.24 ± 0.21	2.23 ± 0.19	0	233.37 ± 3.75
模型组 Model group	5.33 ± 0.83 ^a	5.32 ± 0.87 ^a	7.30 ± 1.57 ^a	194.08 ± 1.52 ^a
阳性药物组 Positive drug group	4.21 ± 0.54 ^b	4.87 ± 0.86	5.00 ± 2.08 ^b	192.94 ± 4.20
低剂量组 Low dose group	4.83 ± 1.03	4.78 ± 0.91	5.67 ± 1.91 ^b	203.49 ± 5.06
中剂量组 Medium dose group	4.41 ± 1.02	4.67 ± 1.15	5.33 ± 2.07 ^b	200.96 ± 3.72
高剂量组 High dose group	3.75 ± 0.76 ^b	3.80 ± 0.73 ^b	5.03 ± 2.26 ^b	208.46 ± 3.07 ^b

注:与正常组相比,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05。(下图/表同)
Note. Compared with normal group, ^a*P* < 0.05. Compared with model group, ^b*P* < 0.05. (The same in the following figures and tables)

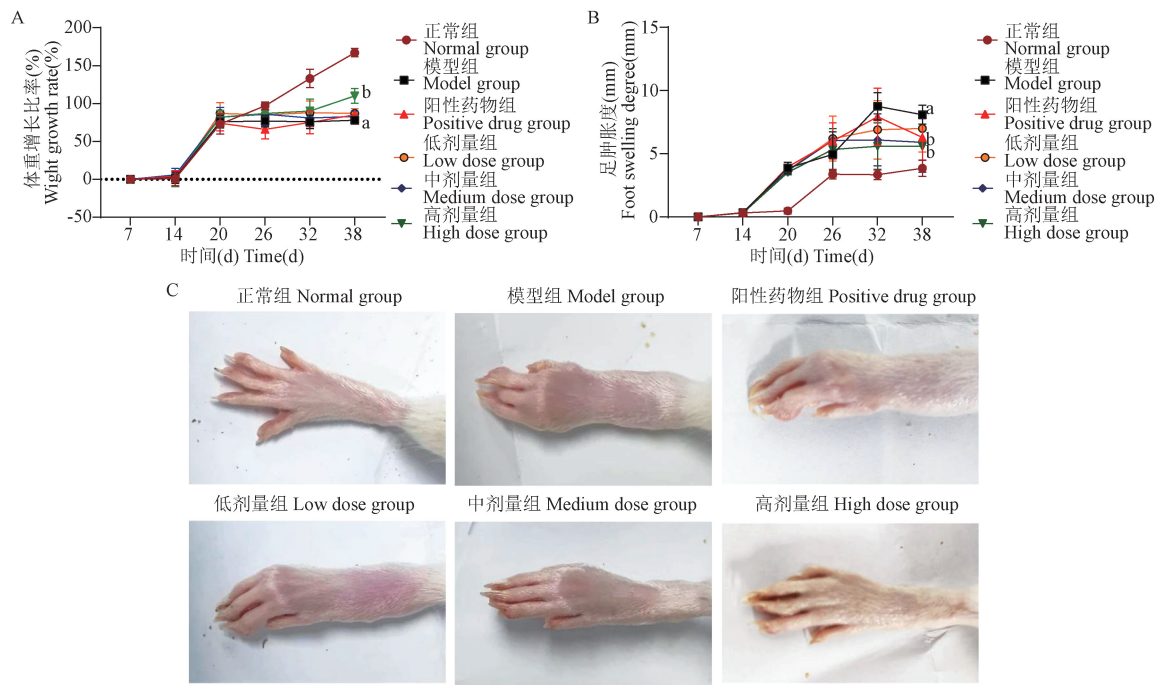


图 1 铁筷子对 RA 大鼠体重和足肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

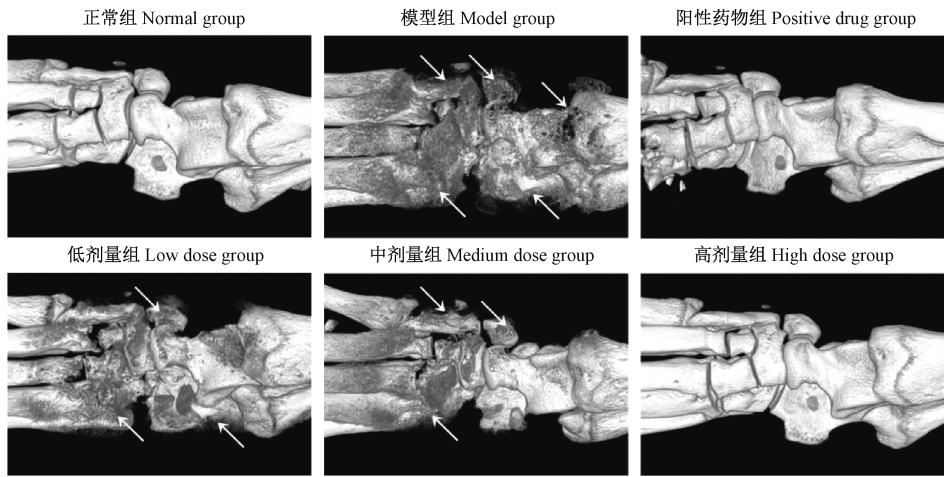
Figure 1 Effect of *helleborus thibetanus* franch on body mass, foot and plantar swelling in rats with RA ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

重下降 ($P < 0.05$);与模型组相比,阳性药物组与高剂量组大鼠一般状况、体重 ($P < 0.05$)、足肿胀度 ($P < 0.05$)均显著改善。

2.2 踝关节 microCT 的影响

正常组踝关节表面光滑、外形完整(图 2)。与正常组比,模型组踝关节表面凹凸不平、外形不完整,骨组织表面出现啃噬样骨质破坏。骨密度(BMD)和骨体积分数(BV/TV)均显著下降 ($P <$

0.05),骨表面积体积比(BS/BV)则明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比,阳性药物组踝关节表面光滑,外形完整。相比 BS/BV 均降低 ($P < 0.05$);BMD、BV/TV 升高 ($P < 0.05$)。与阳性药物组相比,低、中剂量组踝关节表面较凹凸不平,外形不完整,骨组织表面出现啃噬样骨质破坏;BS/BV 降低 ($P < 0.05$);BMD、BV/TV 升高较明显 ($P < 0.05$)。高剂量组踝关节表面光滑,外形完整。BS/BV 明显降低



注:白色箭头:骨组织破坏。

图 2 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织 Micro-CT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. White arrow. Bone tissue destruction.

Figure 2 Effect of *helleborus thibetanus* franch on Micro-CT of bone tissue in rheumatoid arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.05$),BMD、BV/TV 明显升高($P < 0.05$),高剂量组效果与阳性药物组接近(表 3)。可见随着铁筷子剂量加大,BS/BV 降低更加明显,BMD、BV/TV 升高明显,说明铁筷子药物作用呈量效关系。

表 3 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织 Micro-CT 的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of <i>helleborus thibetanus</i> franch on Micro-CT of bone tissue in rheumatoid arthritis rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)			
组别 Groups	骨量百分比(%) Bone mass percentage(%)	骨表面体积(%) Bone surface volume(%)	骨密度(%) Bone density(%)
正常组 Normal group	84.07 ± 4.81	6.87 ± 0.28	0.76 ± 0.01
模型组 Model group	59.66 ± 7.21 ^a	12.41 ± 1.90 ^a	0.59 ± 0.09 ^a
阳性药物组 Positive drug group	69.71 ± 2.85 ^b	10.77 ± 0.76 ^b	0.68 ± 0.15 ^b
低剂量组 Low dose group	83.87 ± 7.04 ^b	8.25 ± 1.97 ^b	0.76 ± 0.07 ^b
中剂量组 Medium dose group	81.21 ± 9.38 ^b	7.80 ± 2.05 ^b	0.76 ± 0.10 ^b
高剂量组 High dose group	83.18 ± 3.55 ^b	7.10 ± 0.52 ^b	0.78 ± 0.02 ^b

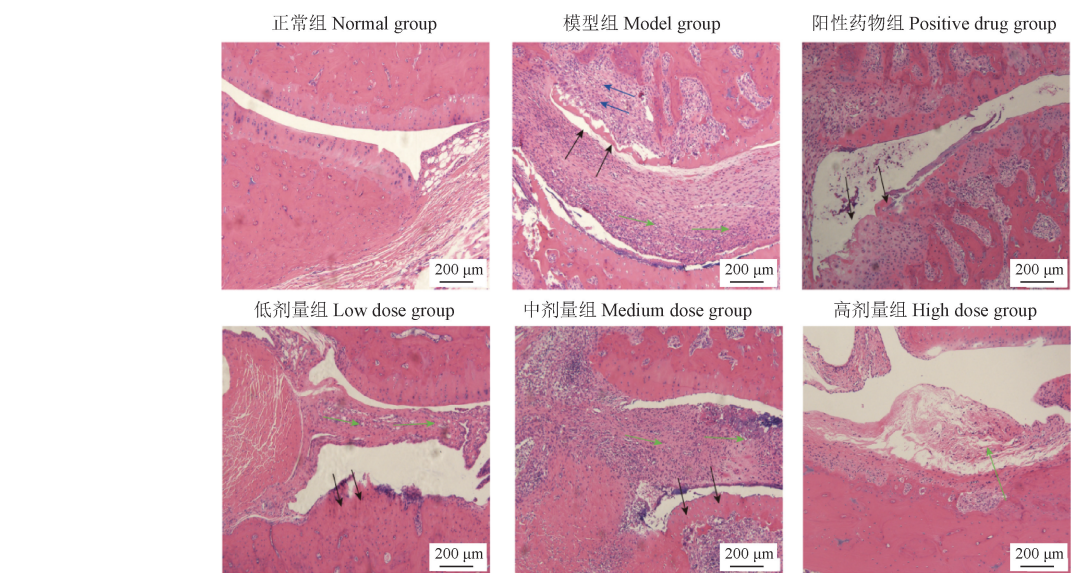
2.3 踝关节组织病理学的影响(HE 染色)

正常组大鼠踝关节骨组织中的成骨细胞和骨细胞均有规整排列,且结构完整,滑膜表面光滑,没有明显增生,亦无炎性浸润(见图 3);模型组骨关节腔内有大量的成纤维细胞和大量的炎症细胞浸润,滑膜表面可见“啃噬”样病理改变,滑膜上的细胞排列不规则,关节腔增生、肿胀明显。低、中、高剂量组较模型组明显减轻了滑膜的炎性细胞浸润和增生;其中,铁筷子高剂量组对踝关节滑膜组织和骨

组织有显著的保护作用。

2.4 踝关节组织(TRAP 染色)

铁筷子低、中、高剂量组作用于 RA 大鼠,破骨细胞的 TRAP 染色结果,正常组破骨细胞数目明显较少;模型组破骨细胞数目显著增加(图 4),有明显的骨破坏形成;与模型组相比,铁筷子中剂量组和铁筷子高剂量组干预下破骨细胞数量减少,大鼠骨损伤程度减轻,证明了铁筷子可以抑制 RANK 诱导的破骨细胞的生成。

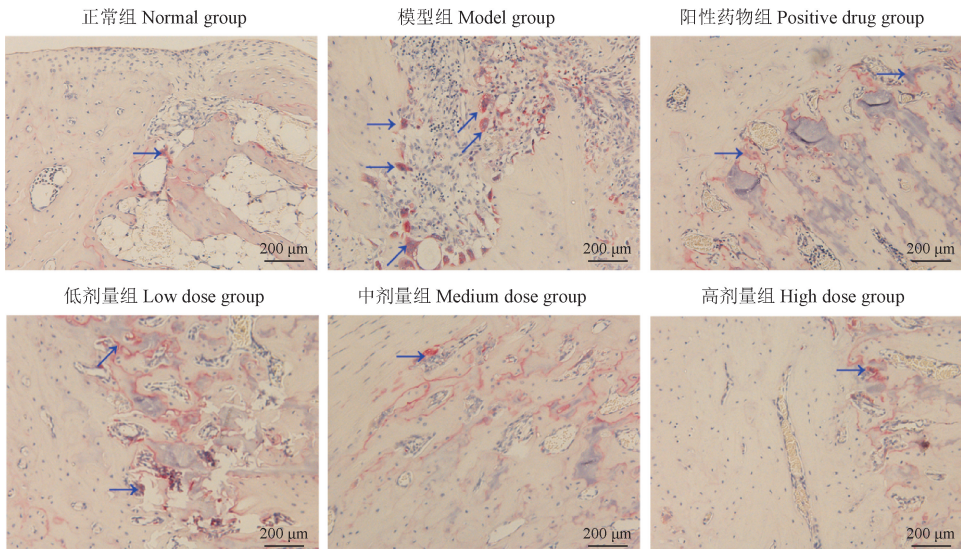


注:黑色箭头:啃噬样骨破坏;蓝色箭头:炎症细胞浸润;绿色箭头:骨关节腔滑膜组织。

图 3 各组大鼠踝关节不同组织病理形态学观察(HE 染色)($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Black arrow. Gnawing bone destruction. Blue arrow. Inflammatory cell infiltration. Green arrow. Synovial tissue.

Figure 3 Observations on different histopathologic morphology of ankle joints of rats in various groups(HE staining)($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注：蓝色箭头：破骨细胞。
图 4 各组大鼠踝关节破骨细胞活化情况观察 (TRAP 染色) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Blue arrow. Osteoclasts.

Figure 4 Observation of osteoclast activation in the ankle joint of rats in each group (TRAP staining) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5 踝关节骨组织 OPG、RANK、RANKL、TNF-α、BMP-2 基因表达的影响

采用 qRT-PCR 对类风湿关节炎大鼠踝关节骨组织中 *TNF-α*、*RANKL*、*RANK*、*OPG*、*BMP-2* mRNA 水平进行检测 (图 5)。结果显示,与正常组相比 (表 4),模型组大鼠踝关节骨组织 *OPG* mRNA 表达水平显著下降 ($P < 0.05$),*TNF-α*、*RANKL*、*RANK*、*BMP-2* mRNA 表达显著升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,铁筷子高剂量组大鼠踝关节骨组织 *OPG*、*BMP-2* mRNA 表达升高,*TNF-α*、*RANKL*、*RANK* 表达降低,改善效果最为明显 ($P < 0.05$)。与阳性药物组相比,铁筷子中

剂量组 *OPG*、*BMP-2* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$),*TNF-α*、*RANK* 表达降低 ($P < 0.05$);铁筷子低剂量组大鼠踝关节骨组织 *OPG*、*BMP-2* mRNA 表达升高,*TNF-α* 表达降低,具有一定的改善作用 ($P < 0.05$)。

2.6 踝关节骨组织 OPG、RANK、RANKL、TNF-α、BMP-2 蛋白表达的影响

与正常组相比 (表 5),模型组大鼠踝关节骨组织中 *TNF-α*、*RANKL*、*RANK* 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$),*OPG*、*BMP-2* 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,阳性药物组、铁筷子中、高剂量组大鼠踝关节滑膜组织中 *TNF-α*、*RANKL*、*RANK* 蛋白表

表 4 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织中 OPG/RANK/RANKL 通路 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

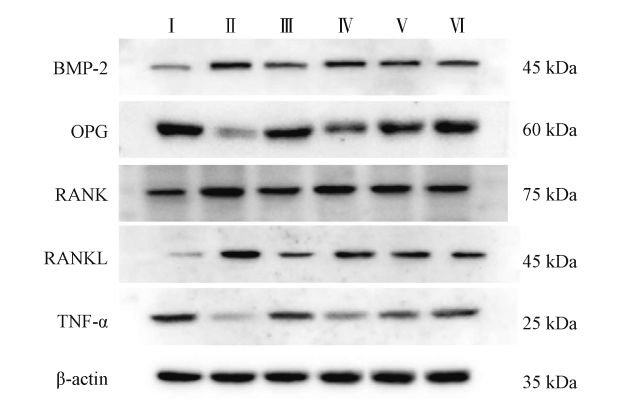
Table 4 Effects of *helleborus thibetanus* franch on mRNA expression levels of OPG/RANK/RANKL pathway in bone tissue of rheumatoid arthritis rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	OPG	RANK	RANKL	BMP-2	TNF-α
正常组 Normal group	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组 Model group	0.27 ± 0.05 ^a	1.63 ± 0.02 ^a	2.59 ± 0.28 ^a	0.46 ± 0.07 ^a	4.46 ± 0.04 ^a
阳性药物组 Positive drug group	0.76 ± 0.09 ^b	1.04 ± 0.12 ^b	1.05 ± 0.13 ^b	0.34 ± 0.01 ^b	1.02 ± 0.13 ^b
低剂量组 Low dose group	0.28 ± 0.01	1.94 ± 0.03 ^b	2.76 ± 0.05	0.23 ± 0.01 ^b	3.44 ± 0.06 ^b
中剂量组 Medium dose group	0.31 ± 0.04	1.60 ± 0.06	1.41 ± 0.05 ^b	0.29 ± 0.02 ^b	2.27 ± 0.08 ^b
高剂量组 High dose group	0.60 ± 0.02 ^b	0.88 ± 0.14 ^b	1.00 ± 0.04 ^b	0.31 ± 0.02 ^b	1.42 ± 0.05 ^b

表 5 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织中 OPG/RANK/RANKL 通路关键蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Expression levels of key proteins of OPG/RANK/RANKL pathway in the bone group of rheumatoid arthritis rats by <i>helleborus thibetanus franch</i> ($\bar{x} \pm s, n = 3$)					
组别 Groups	OPG	RANK	RANKL	BMP-2	TNF- α
正常组 Normal group	1.25 $\pm$ 0.13	0.24 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.01
模型组 Model group	0.44 $\pm$ 0.05 ^a	0.56 $\pm$ 0.05 ^a	0.78 $\pm$ 0.07 ^a	0.19 $\pm$ 0.02 ^a	0.59 $\pm$ 0.04 ^a
阳性药物组 Positive drug group	1.06 $\pm$ 0.11 ^b	0.40 $\pm$ 0.03 ^b	0.64 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.03 ^b	0.28 $\pm$ 0.01 ^b
低剂量组 Low dose group	0.69 $\pm$ 0.05	0.51 $\pm$ 0.03	0.73 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.03 ^b	0.47 $\pm$ 0.03 ^b
中剂量组 Medium dose group	0.91 $\pm$ 0.08 ^b	0.43 $\pm$ 0.03 ^b	0.64 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.03 ^b	0.41 $\pm$ 0.02 ^b
高剂量组 High dose group	1.03 $\pm$ 0.08 ^b	0.41 $\pm$ 0.04 ^b	0.61 $\pm$ 0.07 ^b	0.52 $\pm$ 0.04 ^b	0.34 $\pm$ 0.02 ^b

达水平降低($P < 0.05$),OPG、BMP-2 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),而铁筷子低剂量组与阳性药物组比较差异无显著性($P > 0.05$)。



注: I: 正常组; II: 模型组; III: 阳性药物组; IV: 低剂量组; V: 中剂量组; VI: 高剂量组。

图 5 铁筷子对类风湿关节炎大鼠骨组织中 OPG/RANK/RANKL 通路关键蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. I. Normal group. II. Model group. III. Positive drug group. IV. Low dose group. V. Medium dose group. VI. High-dose group.

Figure 5 *helleborus thibetanus franch* on the Western Blot expression level of OPG/RANK/RANKL pathway in bone tissue of rheumatoid arthritis rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

RA 是一种以关节腔内滑膜异常增生、血管翳组织增多,骨破坏为病理特征的对称性慢性自身免疫疾病^[11]。其基本病理机制是滑膜组织炎症过程中滑膜细胞增生,伴有血管翳形成,软骨和骨受损,最后导致关节畸形和功能丧失^[12]。病理变化可能

是由滑膜细胞损伤、滑膜组织浸润过程中炎症细胞释放的促炎细胞因子、趋化因子等因素共同作用引起的^[13]。有研究报道,炎症因子在 RA 的发展中起着重要作用^[14]。RA 发病初期患者会感到关节肿胀、屈伸不利、晨僵产生疼痛、关节变形、严重会导致残疾并伴随全身性并发症、脏腑功能的紊乱^[15]。尽管 RA 在临床治疗中取得一定的进展,如利用生物制剂、激酶抑制剂、MTX 等进行治疗,但上述药物均存在因众多不良反应,总体疗效仍不理想,因此寻找副作用小且疗效确切的抗 RA 药物十分重要。

在 RA 的模型中,CIA 模型被研究得最为广泛,与人类 RA 在形态学上有许多相似之处,包括血管翳的形成、滑膜炎和软骨的模式以及骨侵蚀^[16]。因此,本研究采用抗体牛 II 型胶原和不完全弗氏佐剂配成胶原蛋白乳剂诱导 RA 大鼠模型,模型组大鼠出现食欲不振、体重减轻、足爪肿胀度升高等典型症状,提示 RA 大鼠模型的成功建立。

苗药铁筷子是一种具有理气止痛、祛风解毒作用的药物,主治风湿痹痛、胃痛、腹痛等常见的疼痛病症,是苗族常用于治疗风湿痹痛、跌打损伤的药物之一,对于消除关节肿胀,改善关节功能具有较好的疗效^[17]。在此疗效上,贵州许多医药企业还在此基础上以铁筷子为主开发了“筋骨伤喷雾”“通络骨宁”等药物,具有祛风除湿、通经活血、败毒止痛的功效,此外,铁筷子还是苗药透骨香方中的主要方药^[18]。

研究证实,铁筷子具有抗菌、抗炎症、抗肿瘤和止痛等多方面的功能,其提取物对 RA 有着较好的治疗作用,能减轻关节肿胀程度、抑制血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、PAF,还能明显下调关节组织中

HIF-1α 及 VEGF、MMP-3 的表达^[19-20]。

RA 局灶骨破坏主要发生在关节表面骨血管翳附着处和软骨及骨小梁处,且破坏处组织中破骨细胞数量与活性明显增加^[21],研究显示破骨细胞的活化是 RA 的骨质破坏的关键环节。RANKL/RANK/OPG 信号通路是破骨细胞分泌的一种跨膜信号分子,在 RA 发病的骨破坏过程中发挥着重要作用。RANKL、RANK 及 OPG 均属于糖蛋白,RANKL、OPG 在成骨细胞中发挥重要作用,抑制破骨细胞的分化和活性。而 RANK 蛋白在破骨细胞前体细胞有高表达。RANKL 可以通过诱导破骨细胞参与促进骨质破坏,而 OPG 则可以通过抑制 RANKL 与其受体 RANK 的结合来阻止骨质破坏,RA 病理过程中产生的多种促炎细胞因子上调该信号通路,刺激破骨细胞的活性,从而导致骨破坏。因此防治 RA 骨破坏的调节 RANKL 和 OPG 表达之间的相对平衡有助于预防和治疗骨破坏。本实验通过 Micro-CT 检测:在铁筷子各治疗组中,相对于低剂量组,高剂量组铁筷子的大鼠骨量和骨密度明显增高,骨表面体积指数显著降低;高剂量组对 RA 大鼠的关节骨质破坏起到了保护作用^[22]。TRAP 染色结果提示:与低剂量组相比,中剂量组和高剂量组干预下 TRAP 染色阳性破骨细胞数量减少,铁筷子有效抑制了 RA 大鼠关节破骨细胞的生成和活化。进一步检测结果显示:在 qRT-PCR 结果中,铁筷子不同剂量 3 组对比,只有铁筷子高剂量组 OPG mRNA 相对表达明显上调($P < 0.05$),证明铁筷子可以有效抑制 RANK 的转录和表达,同时促进 OPG、BMP-2 的转录和表达,其中以铁筷子高剂量组改善效果最为明显。上述结果提示,铁筷子可能通过调节 OPG/RANKL/RANK 信号通路,抑制破骨细胞的生成与活化,从而对 RA 大鼠的骨关节起到保护作用。

本项目以 RANKL/RANK/OPG 系统为切入点,从防治骨质破坏的角度,综合运用植物化学、药理学以及分子生物学等研究手段,观察铁筷子对 RA 的治疗作用,探索其治疗机制,为充实铁筷子治疗 RA 的科学内涵提供新的思路。

参 考 文 献(References)

[1] Weyand CM, Yang Z, Goronzy JJ. T-cell aging in rheumatoid arthritis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2014, 26(1): 93-100.
[2] McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2017, 389(10086): 2328-2337.
[3] Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of

rheumatoid arthritis: A Synopsis [J]. Am J Manag Care, 2014, 20(7): S128-S135.
[4] Lin YJ, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. Cells, 2020, 9(4): 880.
[5] 朱成香,周欣,陈华国. 苗药治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2669-2677.
Zhu CX, Zhou X, Chen HG. Advances on treatment of rheumatoid arthritis with Miao medicine [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(21): 2669-2677.
[6] 李姝臻,李媛,刘晓龙,等. 贵州蜡梅属药用植物化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(6): 59-65.
Li SZ, Li Y, Liu XL, et al. Phytochemical and pharmacological progress on genus *Chimonanthus* in Guizhou [J]. Chin J Ethnomedicine Ethnopharmacy, 2021, 30(6): 59-65.
[7] 邓颖,金璨,段志豪,等. 资本瓜总苷对 RA 模型小鼠的骨保护作用及机制 [J]. 中国药房, 2023, 34(9): 1042-1047.
Deng Y, Jin C, Duan ZH, et al. The osteoprotective effects and mechanisms of RA model mice by total saponins of *Chaenomeles speciosa* [J]. Chin Pharm, 2023, 34(9): 1042-1047.
[8] 罗进芳,吴秋妹,黄聪,等. 苗药铁筷子的研究进展 [J]. 贵州中医药大学学报, 2023, 45(2): 75-80.
Luo JF, Wu QM, Huang C, et al. Research progress of Miao medicine *Radix chimonanthi praecox* [J]. J Guizhou Univ Tradit Chin Med, 2023, 45(2): 75-80.
[9] 刘晓婷,刘建军,安文博,等. 基于 OPG/RANK/RANKL 信号通路防治股骨头坏死的中医药研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(16): 274-282.
Liu XT, Liu JJ, An WB, et al. Traditional Chinese medicine in prevention and treatment of osteonecrosis of femoral head based on OPG/RANK/RANKL signaling pathway: a review [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2023, 29(16): 274-282.
[10] 谭日钊,牛国栋,赵振达,等. 关节软骨与软骨下骨改变在不同骨关节炎动物模型中的特点 [J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(4): 450-455.
Tan QZ, Niu GD, Zhao ZD, et al. Alterations of articular cartilage and subchondral bone in different rat models of osteoarthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4): 450-455.
[11] 姜刚刚,漆文霞,李志婷,等. 基于“肾主骨”理论探讨中药干预类风湿关节炎骨破坏与 OPG/RANK/RANKL 的相关性进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(12): 58-62.
Jiang GG, Qi WX, Li ZT, et al. Based on the theory of “kidney governs bone”, this paper discusses the progress of correlation between Chinese medicine intervention on bone destruction of rheumatoid arthritis and OPG/RANK/RANKL [J]. Rheum Arthritis, 2022, 11(12): 58-62.
[12] Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. Nature, 2003, 423(6937): 356-361.
[13] 施佳君,陈方明,马全鑫,等. 胶原诱导 Wistar 和 Lewis 大鼠类风湿关节炎模型病理特点的比较 [J]. 中国比较医学杂

- 志, 2018, 28(4): 19–26, 37.
- Shi JJ, Chen FM, Ma QX, et al. Comparison of pathological characteristics of Wistar and Lewis rat models of collagen-induced rheumatoid arthritis [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(4): 19–26, 37.
- [14] Xu R, Liu Z, Hou J, et al. Osthole improves collagen-induced arthritis in a rat model through inhibiting inflammation and cellular stress [J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23: 19.
- [15] 褚乙晓, 李秀文, 杜进璇. 自拟散寒化瘀通络方对湿寒痹阻型 RA 效果观察 [J/OL]. 辽宁中医杂志: 1–10 [2023–06–12].
Chu YX, Li XW, Du JX. Effect of self-developed formula for dispersing cold, resolving stasis, and clearing ligaments on damp-cold paralysis and blockage type RA [J/OL]. Liaoning J Traditi Chin Med: 1–10 [2023–06–12].
- [16] 王珊珊, 袁嘉丽, 牛海涛. 基于中西医理论指导的类风湿关节炎动物模型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(8): 1114–1120.
Wang SS, Yuan JL, Niu HT. Analysis of animal models of rheumatoid arthritis based on theories of traditional Chinese and Western medicine [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(8): 1114–1120.
- [17] Ho TY, Santora K, Chen JC, et al. Effects of relaxin and estrogens on bone remodeling markers, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), in rat adjuvant-induced arthritis [J]. Bone, 2011, 48(6): 1346–1353.
- [18] 郭川英. 苗药透骨香方治疗类风湿性关节炎实验研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院; 2015.
Guo CY. Experimental study on Miao medicine Touguxiang recipe in treating rheumatoid arthritis [D]. Guiyang: Guiyang College of Traditional Chinese Medicine; 2015.
- [19] 李梦, 李亚烽, 钱海兵. 铁筷子醇提取物对大鼠佐剂性关节炎作用及机制研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(3): 19–21.
Li M, Li YF, Qian HB. Effects of alcohol extract from *Chimonanthus praecox* on adjuvant arthritis rats and their mechanisms [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2017, 19(3): 19–21.
- [20] 李梦, 钱海兵. 铁筷子醇提取物对佐剂性关节炎大鼠 HIF-1 α 、VEGF 和 MMP-3 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9): 1326–1327.
Li M, Qian HB. Effect of alcohol extract of *Dictyophora ferruginea* on the expression of HIF-1 α , VEGF and MMP-3 in adjuvant arthritis rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(9): 1326–1327.
- [21] 张引红, 李美宁, 王春芳, 等. 补骨脂素对类风湿性关节炎小鼠模型的免疫调节作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(2): 207–210.
Zhang YH, Li MN, Wang CF, et al. Immunoregulatory effect of Psoralen on collagen-induced arthritis in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(2): 207–210.
- [22] 赵海玥, 王雅哲, 施依璐, 等. 多模态超声在类风湿性关节炎动物模型中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 861–866.
Zhao HY, Wang YX, Shi YL, et al. Advances in the application of multimodal ultrasound in animal models of rheumatoid arthritis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(6): 861–866.

[收稿日期] 2023–07–13