

分类号:

密级:



甘肃中医药大学
GANSU UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

硕 士 研 究 生 学 位 论 文
(专 业 学 位)

论文题目 (中文) 基于 IL-23/IL-17 信号通路探讨黄连提取物小檗碱
对强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的影响

论文题目 (外文) **Effect of berberine extracted from Coptis chinensis**
on fibroblast like synovial cells in ankylosing
spondylitis based on the IL-23/IL-17 signaling
pathway

研 究 生 姓 名 刘跃振

学 科、专 业 中医骨伤科学

研 究 方 向 中医药防治骨伤科疾病的研究

导师姓名、职称 李红专主任医师

论 文 工 作

起 止 年 月 2022 年 01 月 至 2024 年 03 月

论文提交日期 2024 年 03 月

论文答辩日期 2024 年 05 月

学位授予日期 2024 年 06 月

目 录

英文缩略词表.....	9
前言.....	11
第一部分 文献综述	14
综述一:中医药干预强直性脊柱炎相关信号通路研究进展	14
综述二: 西医对强直性脊柱炎研究概况	31
第二部分 实验研究黄连提取物小檗碱对 AS 成纤维样滑膜细胞的影 响	36
1 技术路线图.....	36
2 材料.....	37
3 实验方法.....	40
4 实验结果.....	51
5 讨论.....	66
6 小结.....	75
第三部分 结语.....	76
1 结论.....	76
2 创新之处.....	76
3 不足之处.....	76
4 展望.....	76
参考文献.....	78
附录.....	91

摘要

目的：基于 IL-23/IL-17 信号通路探讨黄连提取物小檗碱（Berberine, BBR）对脂多糖诱导的强直性脊柱炎（Ankylosing spondylitis, AS）成纤维样滑膜细胞（Fibroblast-like synoviocyte, FLS）增殖、凋亡、侵袭、迁移以及成骨分化影响及分子机制，为临床上使用黄连提取物小檗碱治疗强直性脊柱炎提供理论依据，也为其他治疗强直性脊柱炎药物开发提供新的治疗靶点。

方法：本研究以人源性 AS FLS 细胞作为研究对象，以 BBR 作为研究药物。

1. 原代细胞的提取及鉴定：从 AS 患者滑膜组织活检中分离出 FLS 细胞进行培养。待 AS FLS 细胞传至第三代后，通过免疫荧光对 AS FLS 细胞进行鉴定。

2. 生物学功能的研究：用脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）提前预处理细胞 24h 以建立 AS FLS 模型，再用含有不同浓度 BBR 的培养基干预细胞 24 h。随后，采用倒置显微镜（Inverted microscope, IM）观察 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的形态学变化，CCK-8 和平板克隆实验检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞增殖能力的影响，Calcein/PI 染色实验检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞活力的影响，Hoechst33342 染色实验和 Annexin-V/PI 检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞凋亡的影响，流式细胞术检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞生长周期的影响，Transwell 小室实验检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞侵袭能力的影响，划痕实验检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞迁移能力的影响，茜红素染色检测 BBR 对 AS FLS 细胞成骨分化程度的影响，酶联免疫吸附测定法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞上清液中 IL-6、TNF- α 、IL-17、IL-23 等炎性细胞因子表达水平的影响。

3. 机制研究：采用蛋白质印迹（Western blot, WB）技术检测 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞中 Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3、N-cadherin、E-cadherin、IL-17、IL-23、p-JNK、p-ERK1/2 蛋白表达水平的影响。

4. 分子对接：应用 Autodock 和 Chimera 软件检测 BBR 与 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 、p-JNK、p-ERK1/2、K-ras、c-Raf 的结合能力及相互作用位点。

结果：

1. 待原代细胞培养至第 5 天时，采用 IM 可观察到组织的周围逐渐有细胞爬

出，且培养至第 7 天时，能观察到大量细胞贴壁于培养瓶底部。同时，借助 IM 可观察到细胞呈现梭形，体积相对较大，且第 3 代 FLS 细胞形态一致、生长良好、胞核清晰可见。经过 Vimentin 蛋白免疫荧光染色后呈阳性，即经 DAPI 染色后细胞核为蓝色荧光，而细胞质为绿色荧光，同时结合倒置荧光显微镜下观察到的细胞形态，表明分离出的细胞正是 FLS 细胞。

2. 采用 LPS 体外诱导 FLS 细胞，从而在体外成功构建出 AS 模型。不同浓度组 LPS 对 AS FLS 细胞分别诱导 12、24、48h 后，发现 $1\mu\text{g/mL}$ LPS 处理组干预 24h 时，细胞上清液中的 IL-6、TNF- α 含量水平最高，表明 AS FLS 细胞的炎症反应最强，因此将其作为诱导炎症反应模型的最佳干预浓度及时间。

3. 用不同浓度的 BBR ($0\text{--}300\mu\text{mol/L}$) 分别作用于 LPS 刺激下 AS FLS 细胞 24、48、72h 后，BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的生长具有抑制作用，且趋势具有时间和剂量依赖性 ($P<0.05$)。此外，根据 CCK-8 的结果，发现 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的最佳干预时间和浓度分别为 24h 和 $120\mu\text{mol/L}$ ，并以此来确定 BBR 处理剂量的分组，从而为后续实验奠定基础。

4. 用不同浓度 BBR 处理 LPS 刺激下 AS FLS 细胞 24h 后，与空白组相比，BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的增殖、侵袭、迁移能力具有一定的抑制作用，且趋势呈剂量依赖性。此外，与空白组相比，BBR 对 IL17/IL23 刺激下 AS FLS 细胞的成骨分化程度同样具有一定的抑制作用。

5. 用不同浓度 BBR 处理 LPS 刺激下 AS FLS 细胞 24h 后，与空白组相比，BBR 处理组可诱导 LPS 刺激下 AS FLS 细胞凋亡 ($P<0.05$)，总凋亡率分别为 16.4 ± 0.95 、 21.2 ± 1.77 、 29.6 ± 0.95 。随后，通过流式细胞术来检测细胞的生长周期，发现 BBR 可以使 LPS 刺激下 AS FLS 细胞中 G1 和 G2 期的细胞比例以剂量依赖性的方式降低，与此同时 S 期的细胞比例呈剂量依赖性地升高，且组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。这说明 BBR 处理可阻滞 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的生长周期于 S 期，不再分裂。

6. 用不同浓度 BBR 处理 LPS 刺激下 AS FLS 细胞 24h 后，与空白组相比，BBR 处理可呈剂量依赖性地抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞中 IL-17、IL-23、TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的表达，且组间差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。这说明 BBR 处理可有效地降低 AS FLS 细胞在 LPS 诱导下的炎症反应。

7. 用不同浓度 BBR 处理 LPS 刺激下 AS FLS 细胞 24h 后, 与空白组相比, BBR 处理组可以上调 Bax、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白的相对表达, 且组间差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。同时, BBR 处理组可以下调 Bcl-2、N-cadherin、IL-17、IL-23、p-JNK 和 p-ERK1/2 蛋白的相对表达, 且组间差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。

8. 为了让结果更有说服力, 应用 Autodock 和 Chimera 软件观察 BBR 与 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 、p-JNK、p-ERK1/2、K-ras、c-Raf 的结合能力及相互作用位点, 发现 BBR 对这些分子靶点均具有良好好的结合能力, 从而为后期得到更多有关 BBR 治疗 AS 作用的实验依据。

结论:

1. BBR 可抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的生长, 其机制可能与 BBR 可有效阻滞 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的有丝分裂有关, BBR 可阻滞 AS FLS 细胞的生长周期于 S 期。

2. BBR 可抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的增殖、侵袭、迁移能力, 其机制可能与抑制 N-cadherin 蛋白的表达, 并促进 E-cadherin 蛋白的表达相关。

3. BBR 可诱导 LPS 刺激下 AS FLS 细胞发生凋亡, 其机制可能与促进 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达, 并抑制 Bcl-2 蛋白的表达有关。

4. BBR 可抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的炎症反应, 并且抑制 IL-17/IL-23 刺激下 AS FLS 细胞的成骨分化程度。

5. BBR 可抑制 IL-17/IL-23 信号通路的激活来调控 AS FLS 细胞的生物学功能。

总之, BBR, 作为一种从黄连中提取的活性化合物, 不仅可以抑制 AS FLS 细胞的活力、增殖、侵袭、迁移、成骨分化及炎症反应, 还可以诱导其发生凋亡, 该机制可能与抑制 IL-23/IL-17 信号通路的活性有关。

关键词: 黄连提取物小檗碱; 强直性脊柱炎; 成纤维样滑膜细胞; IL-23/IL-17 信号通路; 成骨分化

ABSTRACT

Objective : To investigate the effects and molecular mechanisms of berberine (BBR) extracted from *Coptis chinensis* on the proliferation, apoptosis, invasion, migration, and osteogenic differentiation of fibroblasts like synovial (FLS) cells in lipopolysaccharide (LPS) induced ankylosing spondylitis (AS) based on the IL-23/IL-17 signaling pathway, so as to provide a theoretical basis for the clinical use of BBR extracted from *Coptis chinensis* in the treatment of AS, and to provide new therapeutic targets for the development of other drugs for treating AS.

Methods : This study focused on human AS FLS cells and used BBR as the research drug.

1. Extraction and identification of primary cells: FLS cells were isolated from synovial tissue biopsy of AS patients and cultured. After the AS FLS cells were transferred to the third generation, they would be identified by immunofluorescence.

2. Research on biological functions: Cells were pretreated with LPS for 24 hours to establish an AS FLS model, and were treated with culture media containing different concentrations of BBR for 24 hours. Subsequently, the morphological changes of AS FLS cells under LPS stimulation were observed using an inverted microscope (IM). The effects of BBR on the proliferation ability of AS FLS cells under LPS stimulation were detected using CCK-8 and plate cloning experiments. The effects of BBR on the viability of AS FLS cells under LPS stimulation were detected using a Calcein/PI staining. The Hoechst33342 staining and Annexin V/PI staining were used to investigate the effects of BBR on apoptosis of AS FLS cells under LPS stimulation, Flow cytometry was used to detect the effect of BBR on the growth cycle of AS FLS cells under LPS stimulation. Transwell chamber experiment was used to detect the effect of BBR on the invasive ability of AS FLS cells under LPS stimulation. Scratch experiment was used to detect the effect of BBR on the migration ability of AS FLS cells under LPS stimulation. The effect of BBR on the degree of osteogenic differentiation of AS FLS cells was detected by Alizarin staining. Enzyme linked

immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the effect of BBR on the expression levels of inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α , IL-17 and IL-23.

3. Research on mechanism: Western blot (WB) technology was used to detect the effect of BBR on the expression levels of Bax, Bcl-2, Cleaved-caspase-3, N-cadherin, E-cadherin, IL-17, IL-23, p-JNK, p-ERK1/2 proteins in AS FLS cells under LPS stimulation.

4. Molecular docking: The Autodock and Chimera softwares were used to detect the binding ability and interaction sites of BBR and IL-23, IL-17, IL-6, TNF- α , p-JNK, p-ERK1/2, K-ras, and c-Raf.

Results:

1. When the primary cells were cultured until the 5th day, the IM was used to observe that cells gradually climb out around the tissue, and until the 7th day, a large number of cells could be observed adhering to the bottom of culture bottle. Meanwhile, with the help of IM, it can be observed that the cells were spindle shaped, relatively large in volume, and the morphology of the third generation FLS cells was consistent, growing well, and the nuclei were clearly visible. After Vimentin protein immunofluorescence staining, the result was positive, that is, after DAPI staining, the nucleus showed blue fluorescence and the cytoplasm showed green fluorescence. Combined with the cell morphology observed under an inverted fluorescence microscope, it indicated that the isolated cells were FLS cells.

2. The LPS was used to induce FLS cells in vitro and the AS model was successfully constructed in vitro. After inducing AS FLS cells with different concentrations of LPS for 12, 24, and 48hours, it was found that 1 μ g/mL LPS treatment group had the highest levels of IL-6 and TNF- α in the cell supernatant after 24 hours of intervention, indicating that AS FLS cells had the strongest inflammatory response. Therefore, it was selected as the optimal intervention concentration and time for inducing inflammatory response models.

3. Different concentrations of BBR (0-300 μ mol/L) were applied to AS FLS cells stimulated by LPS for 24, 48, and 72hours, respectively. BBR had an inhibitory effect

on the growth of AS FLS cells under LPS stimulation, and the trend was time- and dose-dependent ($P<0.05$). In addition, according to the results of CCK-8, it was found that the optimal intervention time and concentration of BBR on AS FLS cells under LPS stimulation were 24hours and 120 μ mol/L, respectively, and the grouping of BBR treatment doses was determined based on this result, so as to lay a foundation for subsequent experiments.

4. After treating AS FLS cells stimulated by LPS with different concentrations of BBR for 24hours, compared with the blank group, BBR has a certain inhibitory effect on the proliferation, invasion, and migration ability of AS FLS cells under LPS stimulation, and the trend is dose-dependent. Moreover, compared with the blank group, BBR also has a certain inhibitory effect on the osteogenic differentiation of AS FLS cells under IL17/IL23 stimulation.

5. After treating AS FLS cells stimulated by LPS with different concentrations of BBR for 24hours, compared with the blank group, the BBR treatment group could induce apoptosis of AS FLS cells under LPS stimulation ($P<0.05$), with total apoptosis rates of 16.4 ± 0.95 , 21.2 ± 1.77 , 29.6 ± 0.95 , respectively. Subsequently, flow cytometry was used to detect the cell growth cycle and it was found that BBR could reduce the proportion of G1 and G2 phase cells in AS FLS cells under LPS stimulation in a dose-dependent manner, while the proportion of S phase cells increases in a dose-dependent manner, and the differences between groups were statistically significant ($P<0.05$), indicating that BBR treatment could block the growth cycle of AS FLS cells under LPS stimulation in the S phase and no longer divide.

6. After treating AS FLS cells stimulated by LPS with different concentrations of BBR for 24hours, compared with the blank group, BBR treatment could dose-dependently inhibit the expression of inflammatory cytokines (such as IL-17, IL-23, TNF- α , IL-6) in AS FLS cells stimulated by LPS, and the differences between groups were statistically significant ($P<0.05$), indicating that BBR treatment could effectively reduce the inflammatory response of AS FLS cells induced by LPS.

7. After treating AS FLS cells stimulated by LPS with different concentrations of

BBR for 24hours, compared with the blank group, the BBR treatment group could up-regulate the relative expression of Bax, Cleaved-caspase-3, and E-cadherin proteins, and the differences between groups were statistically significant ($P<0.01$). Meanwhile, the BBR treatment group could down-regulate the relative expression of Bcl-2, N-cadherin, IL-17, IL-23, p-JNK, and p-ERK1/2 proteins, and the differences between groups were statistically significant ($P<0.01$).

8.To make the results more convincing, Autodock and Chimera softwares were used to observe the binding ability and interaction sites of BBR and IL-23, IL-17, IL-6, TNF- α , p-JNK, p-ERK1/2, K-ras, and c-Raf, and it was found that BBR has good binding ability to these molecular targets, so as to provide more experimental evidence for the therapeutic effect of BBR on AS in the later stage.

Conclusion:

1. BBR could inhibit the growth of AS FLS cells under LPS stimulation, and its mechanism might be related to its ability to effectively block the mitosis of AS FLS cells under LPS stimulation. BBR could block the growth cycle of AS FLS cells in the S phase.

2. BBR could inhibit the proliferation, invasion, and migration ability of AS FLS cells under LPS stimulation, and its mechanism might be related to inhibiting the expression of N-cadherin protein and promoting the expression of E-cadherin protein.

3. BBR could induce apoptosis in AS FLS cells under LPS stimulation, and its mechanism might be related to promoting the expression of Bax and Cleaved-caspase-3 proteins and inhibiting the expression of Bcl-2 protein.

4. BBR could inhibit the inflammatory response of AS FLS cells under LPS stimulation and inhibit the degree of osteogenic differentiation of AS FLS cells under IL-17/IL-23 stimulation.

5. BBR could inhibit the activation of IL-17/IL-23 signaling pathway to regulate the biological function of AS FLS cells.

In summary, BBR, as an active compound extracted from *Coptis chinensis*, could not only inhibit the activity, proliferation, invasion, migration, osteogenic

differentiation, and inflammatory response of AS FLS cells, but also induce apoptosis. This mechanism might be related to the inhibition of the activity of IL-23/IL-17 signaling pathway.

Key words: Berberine extract from *Coptis chinensis*; Ankylosing spondylitis; Fibroblastic synovial cells; IL-23/IL-17 signaling pathway; Osteogenic

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AS	Ankylosing spondylitis	强直性脊柱炎
Annexin-V/PI	Annexin-V/PI	膜联蛋白-V/PI
BBR	Berberine	小檗碱
Bax	Bax	促凋亡蛋白
Bcl-2	Bcl-2	抗凋亡蛋白
Calcein/PI	Calcein/PI	钙蛋白/PI
CCK-8	Cell counting kit 8	细胞计数试剂盒 8
Cleaved-casepase-3	Cleaved-casepase-3	半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3
E-cad	E-cadherin	上皮钙黏蛋白
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
ERK	extracellular-signalregulated protein kinase	细胞外信号调节蛋白激酶
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
IL-6	Interleukin-6	白介素-6
IL-17	Interleukin-17	白介素-17
IL-23	Interleukin-23	白介素-23
IF	Immunofluorescence	免疫荧光染色
IM	Inverted microscope	倒置显微镜
LPS	Lipopolysaccharides	脂多糖
JNK	c-Jun kinase	c-Jun 氨基末端激酶
K-ras	Kirsten rats arcomaviral oncogene homlog	Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物
N-cad	N-cadherin	神经钙黏蛋白
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲液

Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
TNF- α	Tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子- α
Vimentin	Vimentin	波形蛋白
WB	Western blot	蛋白印迹法

前言

强直性脊柱炎（Ankylosing spondylitis, AS）是一种病变以骶髂关节和脊柱为主要的慢性炎症疾病，炎症、骨破坏和新骨形成是 AS 的典型病理变化^[1]。近年来的研究发现，在 AS 早期，脊柱关节滑膜增生的一个重要原因是 AS 成纤维样滑膜细胞（Fibroblast-like synoviocyte, FLS）的过度增殖及炎性反应^[2]。在晚期，AS 主要表现在成骨和破骨细胞之间的不平衡，造成 AS 残疾率较高，严重影响患者的生活质量，其致残率较高与滑膜细胞增生、侵袭迁移密切相关^[3]。因此，抑制 FLS 细胞的增生、迁移侵袭，促进细胞凋亡，对控制 AS 的发病与缓解 AS 疾病进展具有重要意义。

西医对 AS 的治疗，多以抗炎镇痛为主，因此临床应用应用较多的药物有非甾体类抗炎药、抗风湿药、糖皮质激素等抗炎镇痛药，但是存在很多的副作用，如胃肠道不良反应，肝肾损伤等，而且需长期依赖。虽然新型生物制剂药物治疗效果较好，显著作用较快，但存在一定的免疫反应以及价格高昂等问题。除此之外，AS 的治疗还包括手术治疗，但可能存在手术风险系数较高，费用较高，以及使用寿命有限、功能恢复不满意等缺陷。

强直性脊柱炎，根据其临床症状表现如脊柱僵直、骶髂关节疼痛及周围关节功能活动受限，将其归属于中医“大偻”、“痹证”、“骨痹”等范畴。它是因肾虚督空、加上外感风寒湿，气血凝滞导致经络痹阻、气血运行不畅的脊柱关节病变，关节红肿疼痛和疼痛剧烈是急性活动期的重要表现，治疗上当以清热祛湿止痛、补肝肾强筋骨为治疗原则。中医药对治疗 AS 具有疗效可靠、治法多样、绿色安全等特点，随着生物分子学的细胞学的发展，研究发现，中药单体有效成分治疗 AS 具有多靶点，多通路的优势，因此研究中药单体治疗 AS 具有重大研究意义。

中药黄连为毛茛科植物黄连（*Coptis chinensis Franch.*）、云连（*Coptisteeta Wall.*）、三角叶黄连（*Coptis deltoidea C.Y.Cheng et Hsial*）的干燥根茎，在我国西南地区分布广泛。它的主要有效成分是原小檗碱型化合物，包括小檗碱、巴马汀、黄连碱、药根碱等。中药黄连四气五味中，味苦性寒，具有清热、泻火、燥湿、解毒的功效，可以治疗湿热导致的痞满、呕吐以及心火上炎导致的口舌生疮等症状。作为清热燥湿解毒的中药，在临床上得到广泛应用，黄连提取物中有效成分

小檗碱具有抗炎、抗腹泻、降血压、降血糖降血脂以及抗心律失常等作用^[4]。近年来,国内外研究发现,黄连主要成分小檗碱在体外有抑制人体肿瘤细胞生长的作用^[5]。小檗碱是中药黄连中的主要生物碱,已有报道证明了小檗碱具有抗炎和胃溃疡的作用^[6]。目前研究表明,黄连中抗炎作用的主要活性成分为小檗碱,此外,也有相关数据显示,小檗碱有很好的抗炎作用^[7]。除此之外,中药黄柏提取的有效成分小檗碱,也具有抗炎镇痛的疗效。黄柏为芸香科植物黄皮树 (*Phellodendron chinense* Schneid) 的干燥树皮,性偏寒,味偏苦,归膀胱和肾,具有清热、泻火、燥湿、解毒以及除蒸的功效。其中,黄柏的化学成分主要包括生物碱类、柠檬苦素类、酚酸类、苯丙素类、挥发油等,现代学者对黄柏有效成分的研究多集中于生物碱类,并已证明其具有广泛的药理作用^[8]。近年来研究黄柏有效成分药理作用的文献,具有抗炎、抑菌、抗氧化、抗肿瘤、降糖、保护神经、止泻等多方面的药理作用^[9]。黄柏由多种化学成分组成,其中生物碱中有效药物成分为小檗碱^[10]。小檗碱是一种喹啉生物碱的盐酸盐。有研究发现,小檗碱能改变细胞内的氧浓度以及清除氧化还原反应产生的自由基,具有抗炎解热、抗肿瘤、抗菌、抗血小板、舒张血管等药理作用^[11-13]。

黄连提取物小檗碱 (Berberine, BBR) 是中草药黄连、黄柏的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗感染、抗肿瘤、提高免疫力及改善心血管功能等多种生物学作用,对肠道内环境、多种炎症性皮肤病和自身免疫性疾病等具有良好的治疗效果^[14-15]。已有研究表明,BBR 不仅可以抑制白细胞介素-1 (Interleukin-1, IL-1) 和肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 激活的内皮细胞与多形核白细胞之间的粘附,也抑制 TNF- α 激活的多形核白细胞和血管内皮细胞的粘附,从而减少炎症细胞的浸润和结肠粘膜的病变^[16]。白细胞介素-23 (Interleukin-23, IL-23) /白细胞介素-17 (Interleukin-17, IL-17) 轴是参与调控炎症反应的重要信号转导通路,IL-23 具有多种生物学效应,其最主要的功能是通过诱导 T 辅助细胞 17 (T helper cell 17, Th17) Th17 细胞产生 IL-17, IL-23 主要由巨噬细胞和树突状细胞响应外源性或内源性信号产生,研究发现,在强直性脊柱炎活动期中,IL-23 与 IL-23 受体结合后,能够促进 Th17 细胞的活化,Th17 细胞产生 IL-17,可以促进炎症反应,也可通过调控细胞的过度增殖和凋亡异常,也可通过病毒、肿瘤坏死因子和 T 细胞活化因子等刺激因子的活化以诱导滑膜细胞促进炎

症因子表达参与炎症反应效应,均参与 AS 的发病和发生发展^[17]。AS 病理因素主要脊柱关节滑膜增生增厚,并且伴有大量炎性细胞的浸润,在此过程中滑膜组织产生大量的炎性细胞因子,如 TNF- α 、IL-6、IL-1、IL-17、IL-23 等^[18]。实验证明,BBR 可以通过抑制 TNF- α 、IL-1 等炎性因子,进而抑制 FLS 的增殖,促进风湿性关节炎、强直性脊柱炎等自身免疫性疾病的治疗^[19-20],但其作用机制仍不清楚。为探讨黄连提取物小檗碱的作用及其机制,本次研究的研究对象是人类强直性脊柱炎患者的成纤维样滑膜 AS FLS 细胞,通过观察 BBR 对脂多糖刺激下 AS FLS 细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移以及成骨分化影响及分子机制,并进一步探讨其调控 AS 发生发展的生物学分子机制,以期为黄连提取物小檗碱抗 AS 的临床应用提供实验依据。

第一部分 文献综述

综述一：中医药干预强直性脊柱炎相关信号通路研究进展

强直性脊柱炎（Ankylosing spondylitis, AS）是一种病因不明的慢性炎症疾病，病理因素表现为脊柱关节滑膜增生增厚，主要特征是慢性炎症和异位骨化^[21]。现代研究发现，当 AS 产生炎症反应的过程中，成纤维样滑膜细胞（Fibroblast-like synoviocyte, FLS）释放大量细胞促炎性因子，导致滑膜细胞增生异常及炎性细胞因子浸润，进而侵蚀关节软骨及脊柱骨骼等，最终导致脊柱关节侵蚀破坏、硬化和畸形^[22]，其致残率较高与滑膜细胞增生、侵袭迁移密切相关^[3]。因此，抑制 AS FLS 的过度增殖和炎症反应，诱导 AS FLS 发生凋亡，可能会控制滑膜炎症的进展，进而有效地缓解 AS 病情。

近年来国内外大量研究证实，中药具有“简、便、廉、优”的特点，其富含的中药单体及活性成分可以通过调控相关信号通路。既往研究表明^[23-28]，中医药通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B, PI3K/Akt）信号通路、Wnt/ β -连环蛋白（Wnt/ β -catenin）、络氨酸激酶/转录因子 3（Leucosine kinase/transcription factor 3, JAK/STAT3）、核转录因子- κ B（nuclear factor- κ B, NF- κ B）、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinases, MAPK）、白介素-17/23（Interleukin-17/23, IL-17/IL-23）等信号通路的传导，抑制炎症因子的释放和活性、调节异常能量代谢、减轻氧化应激反应、加速强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞自噬性凋亡、抑制成纤维样滑膜细胞的增殖、分化、迁移以及促进细胞凋亡，最终对强直性脊柱炎的发生发展起到阻碍的效果。

1 中医对 AS 的认识

在祖国医学历代医书古籍文献中，并无“强直性脊柱炎”的病名记载，现代医家根据其病变部位脊柱僵直、骶髂关节疼痛及周围关节功能活动受限，严重时甚至骨骼畸形等临床表现及特点，将其归属于中医“大偻”、“痹证”、“竹节风”、“骨痹”、“脊痹”等范畴^[29]。正如《黄帝内经》中《素问·生气通天论》曰：“阳

气者，精则养神，柔则养筋，开阖不得，寒气从之，乃生大痠。”《素问·长刺节论》曰：“病在骨，骨重不可举，骨髓酸痛，寒气至，名曰骨痹。”古代医者认为强直性脊柱炎的发病与脊柱、督脉、肾主骨等关系密切，正如《素问·骨空论》曰：“督脉者……贯脊属肾……夹脊抵腰中”，“督脉为病，脊强反折。”现代国家名中医焦树德、阎小平等将 AS 归为中医“尪痹”、“大痠”、“脊痹”等范畴，并将 AS 纳入国家中医药管理局“十一五”重点专科风湿病临床验证方案中，因此，AS 以中医病名“大痠”的正式在全国风湿病专科推广使用。

2 AS 的中医病因病机

强直性脊柱炎的病因可划分为内因、外因和不内外因。内因即来自身体内部的因素，包括个人体质、精神状态、七情、年龄、遗传及免疫力失调等因素，如《济生方·痹》曰：“皆因体虚，腠理空疏，受风寒湿气而成痹也。”《诸病源候论·风湿痹候》曰：“由血气虚，则受风湿，而成此病。”外因则为机体感受外邪的侵袭，外邪又称“六淫”或“戾气”，包括“风、寒、暑、湿、燥、火”6种邪气，是机体外感疾病的主要致病因素，与强直性脊柱炎的发生密切相关，如《素问·痹论》曰：“痹者，风寒湿三气杂至，合而为痹”^[30]。当今社会，所谓的外因还应该包括超出人体健康承受范围之外的环境污染、生物病毒、化学污染及各种物理辐射等对机体有损害的不利因素。除此之外，不内外因也是强直性脊柱炎发病的重要原因之一，比如个人饮食偏嗜、喜食肥甘厚味，或因暴力及金石外伤等因素损伤机体骨骼，又复感外邪侵袭等内外作用，致使人体脏腑功能失调，经络不通，郁结壅塞，气血凝滞，导致强直性脊柱炎的发病，如《中藏经·论肉痹》曰：“肉痹者，饮食不节，膏粱肥美之为所也。”从传统中医的整体观念出发，认为强直性脊柱炎的主要病机是以肾气亏虚为本，加以内伤七情或外感六淫，导致气滞、血瘀、痰湿内生，留于骨骼则成骨痹。正如在《素问·痹论》中记载：“骨痹不已，复感于邪，内舍于肾”^[31]。

3 AS 的中医辨证分型

传统中医根据痹证的辨证分型，将其分为风寒湿痹、风湿热痹、痰瘀痹阻和肝肾两虚4个证型，而目前大多数中医学者，通过中西医相结合的方法即“中医辨证”和“西医辨病”的思维模式，以虚实、寒热、脏腑等进行辨证论治。如名

中医焦树德教授将强直性脊柱炎主要病机归为肾督两虚，外感寒邪，根据病机病因将其划分为肾虚督寒证、邪及肝肺证、痹阻肢节证和邪郁痹阻证 4 个证型^[32]。国医大师朱良春根据强直性脊柱炎早期辨证，认为其发病病机为肾亏邪阻，故将其分为肾督亏损和湿热痹阻 2 个证型，后期日久发病为肾督两虚的骨痹型^[33]。全国名中医胡荫奇教授根据多年对强直性脊柱炎的治疗经验，认为其发病的病机是肝肾不足为本，外感邪气为表，因此他将强直性脊柱炎分为早、中、晚三期，早期以湿热痹阻证为主，中期以肝肾不足、寒湿痹阻证为主，晚期以痰瘀阻络证为主^[34]。根据临床研究和大量的文献查阅，翁於欢等^[35]通过检索中国知网、维普和万方数据库中有关 AS 中医证候文献 4014 篇，统计得到 AS 中医证型 29 种，其中肝肾不足证(46.64%)、湿热痹阻证(22.96%)、瘀血痹阻证(21.74%)及寒湿痹阻证(6.37%)为 4 个主要证型。不仅如此，全国很多名中医对强直性脊柱炎的辨证分型大同小异，如王为兰、周乃玉、娄多峰、冯兴华、陈纪藩等认为强直性脊柱炎主要病机是肾虚督空，邪气留恋，证型基本分为肾虚督寒证、寒湿痹阻证、湿热伤肾证、瘀血阻滞证 4 个证型^[36]。

4 AS 相关信号通路

4.1 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路

PI3K/Akt 是一个高度保守的信号通路，主要参与细胞的生长、增殖、凋亡、代谢等过程^[33]。PI3K 是一种细胞内磷脂酰肌醇激酶，PI3Ks 构成了一个脂质激酶家族，可将其分为 3 类，其中 I 型 PI3K 和肿瘤的关系较为密切^[37]。现在研究发现，PI3K/Akt 也是协调先天免疫系统防御机制的重要参与者^[38]。当 PI3K 信号通路被激活时，可与下游成员 Akt 发生结合，并使 Akt 处于活跃状态，而磷酸化后的 Akt 是启动 PI3K/Akt 信号通路的关键环节^[39]。实验发现，Liu 等^[40]通过肿瘤因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 诱导下强直性脊柱炎患者的间充质干细胞，发现 PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 表达明显升高，PI3K 磷酸化抑制后，患者的 Akt/mTOR 的表达和正常人间充质干细胞的蛋白表达水平一样，抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可以减弱强直性脊柱炎患者间充质干细胞的细胞自噬能力。

4.2 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路

Wnt/ β -catenin 信号通路是一种进化上保守的通路,不仅可以控制干细胞的增殖、存活、分化,同时还可以调节钙稳态、细胞极性以及成人组织稳态,尤其是在骨骼系统疾病中^[41]。Wnt 信号通路有两大主要途径,即经典 β -连环蛋白依赖 (canonical pathway) 和非经典 β -连环蛋白独立 (non-canonical pathway) 途径。参与调控凋亡、增殖的主要分子有 Wnt3a、Wnt5a、Wnt7b、Wnt9a、糖原合成激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)。其中, Wnt5a 与强直性脊柱炎关系最为密切^[42]。研究发现^[43], Pinto Tasende JA 等人通过抽取强直性脊柱炎患者外周血清发现, Wnt5、Wnt1b 和白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 在血清浓度中较高。另外根据 Liu R 等人研究发现,中国人群 Wnt/ β -catenin 信号通路基因的多态性与强直性脊柱炎基因的易感性成显著性关联^[44]。

4.3 络氨酸激酶/转录因子 3 (JAK/STAT3) 信号通路

JAK/STAT3 是一条由细胞因子刺激的信号转导通路,主要参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等多种重要的生物学过程^[45]。JAKs 蛋白有四种,可分为 JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2,而 STATs 蛋白有七种,可分为 STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5A、STAT5B 和 STAT6。当细胞受到外源性刺激时, JAKs 蛋白会与细胞因子受体以非共价的形式进行结合,介导受体酪氨酸磷酸化,磷酸化后的酪氨酸接着与生长因子 STAT 相结合形成复合物,并被转运到细胞核中作为转录因子而发挥生物学作用^[46]。研究表明, JAK2/STAT3 信号通路与强直性脊柱炎的关系最为密切, JAK2/STAT3 信号通路的激活可以抑制成纤维样滑膜细胞增殖^[47]。实验表明, JAK 抑制剂治疗强直性脊柱炎的临床试验取得很好成果^[48]。

4.4 核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路

NF- κ B 是一类具有多种生理功能的调节因子,主要参与调节细胞的代谢、免疫和炎症^[49]。当大多数静息细胞未受到刺激时,处于二聚体形态的 NF- κ B 会与 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 在细胞质中结合形成具有稳定性的三聚体,且保持非活性状态,然而,当细胞接受各种外界刺激信号时,细胞膜上的受体会转移至细胞质内, I κ B 通过与 I κ B 激酶复合物结合而被磷酸化,进而激活 NF- κ B 信号通路,此时的 NF- κ B 会移向细胞核内,并且诱导相关基因发生转录^[50]。此外,激活后的 NF- κ B 信号通路还可以诱导相关因子发生生物学反应,如 IL-6、TNF- α 、趋化因子、

炎症介质（一氧化氮（NO）、前列腺素 E2（Prostaglandine2, PGE2））、诱导性环氧化酶-2（Inducible cyclooxygenase-2, COX-2）、粘附因子、炎症酶、免疫受体、凋亡基因、增殖调节基因、信号转导基因、抗氧化应激相关基因等^[51]，并进一步地放大炎症反应^[52]。研究发现，通过药物、抑制剂来抑制 NF- κ B 信号通路进而减轻强直性脊柱炎炎症，延缓强直性脊柱炎发病。

4.5 丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 信号通路

MAPK 通路是多种信号通路的重要中心环节，主要参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、周期阻滞、免疫、炎症等^[53]。目前，在哺乳动物中，根据其特有的结构和功能，可将 MAPK 的亚型划分为细胞外信号调节蛋白激酶（extracellular-signal-regulated protein kinase, ERK）、c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun kinase, JNK）和 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK）三种^[54]。其中，ERK 主要与肿瘤的分化、生长最为密切^[55]，而 JNKs 和 p38MAPK 信号通路则在炎症、细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用。在正常生理状态下，MAPK 处于静默状态，当细胞受到生长因子、炎症、氧化应激等因素的刺激之后，MAPK 信号通路可被激活，此时的 MAPK 蛋白处于磷酸化状态，从而介导转化生长因子- β -活化蛋白激酶 1（Transforming growth factor- β -Activated protein kinase 1, TAK1）/结合蛋白 1（Transforming growth factor-Activated protein binding, 1TAB1）与 p38 相互作用，进而导致 p38-MAPK 信号通路被激活，下调嘌呤能配体门控离子通道 7 受体、TNF- α 、白介素-1 β （Interleukin-1 β , IL-1 β ）因子的表达，抑制周围炎症反应^[56]。研究发现^[57]，Wang 等人通过鉴定与幼年强直性脊柱炎发病机制相关的基因和信号通路中发现，强直性脊柱炎与炎症相关的通路和丝裂原活化蛋白激酶 5 信号通路是富集最多的。

4.6 白细胞介素 17/23（IL-17/IL-23）信号通路

IL-23 是 Robert Kastelein^[58]发现由 IL-23p19 亚基和 IL-12p40 亚基构成的一种异二聚体，主要由巨噬细胞和树突状细胞响应外源性或内源性信号产生，在自身性免疫疾病中发挥重要的作用^[59]，可以驱动辅助性 T 细胞 17（Th17）细胞的分化和活化，随后产生 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 和肿瘤坏死因子 α ^[60]。另外发现 IL-23 具有多种生物学效应，其最主要的功能是通过诱导 Th17 细胞产生 IL-17。IL-23 主要由巨噬细胞和树突状细胞响应外源性或内源性信号产生，研究发现，

在强直性脊柱炎活动期中, IL-23 与 IL-23 受体 (IL-23R) 结合后, 能够促进 Th17 细胞的活化, Th17 细胞产生 IL-17, 而后 IL-17 和 IL-17 受体 (IL-17R) 结合后通过不同通路发挥其生物学作用^[61]。IL-17 是由 Th17 细胞分泌的细胞因子, 它的家族有 6 个成员 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F, 其中 IL-17A、IL-17E、IL-17F 是重要的促炎症因子。IL-17 受体家族由五个成员组成, 它们在许多细胞类型上表达, 如上皮细胞、成纤维样滑膜细胞、B 细胞和 T 细胞、单核细胞等, IL-17 信号转导激活 NF- κ B 信号通路、激活接头蛋白-1 (Activate adapter protein-1, ACT1) 信号通路、p38MAK 信号通路、JNK 信号通路、ERK 信号通路、JAK 信号通路、STAT 信号通路、PI3K 信号通路等以及诱导多种促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)、抗菌肽 (β -防御素)、和基质金属蛋白酶^[62]。研究发现, Jethwa 等^[63]发现 IL-17/IL-23 可以介导强直性脊柱炎的免疫炎症反应。

5 中药干预相关信号级联反应靶向治疗 AS

5.1 中药单体干预相关信号通路治疗 AS

近几年, 很多研究者研究中药单体用来治疗 AS 取得很好的疗效, 如雷公藤甲素、柚皮苷、木香内酯、安石榴苷、黄芪总黄酮、丹皮酚、丹参酮IIA。雷公藤甲素, 又称雷公藤内脂, 具有调控免疫和抑制炎症的功效^[64]。研究发现, Ji 等人^[65]通过实验发现雷公藤内脂通过激活 NF- κ B 和 MAPK 通路, 降低 circ-0110634 外泌体的分泌, 以促进破骨细胞生成。同时, Liu 等^[66]实验发现雷公藤甲素通过抑制 NF- κ B 的信号通路, 进而抑制 NF- κ B 的磷酸化, 降低了 TNF- α 表达水平, 成功逆转了成骨细胞分化的抑制。此外, Ji、Lin 等^[67-68]通过临床疗效观察也证实雷公藤甲素可以抑制炎症反应、调控成骨细胞和破骨细胞平衡以抗 AS 的疾病的发展。柚皮苷是一种具有广泛生物活性的膳食类黄酮苷, 具有抑制炎症反应、抗肿瘤和调控氧化应激的特性^[69]。研究发现, Liu 等^[70]实验发现柚皮苷通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路, AS 小鼠的骨钙素 (Bone glaprotein, BGP)、碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP) 和甘油三酯 (Triglyceride, TG) 活性值显著下降, 抑制了炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NF- κ Bp65 表达水平和氧化应激, 改善了 AS 小鼠的症状, 进而抑制了强直性脊柱炎的发展。木香内酯源自小山菊内酯, 更稳定易溶于血浆, 具有抗氧化和抗炎特性。研究发现, Tian 等^[71]实验发现木香内酯

通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活来调控 NF- κ B 的信号通路,抑制炎症因子的表达,缓解强直性脊柱炎的发病。安石榴苷是石榴中广泛存在的主要生物活性多酚,具有抗炎和抗氧化的特性。Feng 等^[72]实验发现通过调节 NF- κ B-TH17 信号传导和氧化应激对强直性脊柱炎发挥保护作用。研究发现,黄芪总黄酮是中草药中黄芪的有效成分,具有很好的调控炎症、调节免疫以及抗癌等多种药理特性。焦士军等^[73]通过实验发现,与空白组相比,黄芪总黄酮通过 Notch-Wnt 信号通路可以降低 AS 大鼠 IL-6、IL-1 β 和 IL-8 炎症因子,抑制碱性磷酸酶活性、骨钙素分泌、I 型前胶原氨基端前肽 (Procollagen amino terminal peptide, PINP) 含量明显降低,改善成纤维样滑膜细胞成骨细胞转化,改善了 AS 大鼠的症状。丹皮酚是来自中草药牡丹的一种酚类化合物,具有很好的镇痛、镇静、解热、抗炎、抗氧化和抗癌的药理作用。研究发现,丹皮酚也可以用来改善 AS 的症状,如郑家春等^[74]通过丹皮酚抑制 p38MAPK 通路,AS 小鼠模型的血清中 TNF- α 表达明显下降,抑制了跟腱炎症反应和成骨分化,从而改善了 AS 的症状。除此之外,邢伟等^[75]通过实验发现丹皮酚通过调控 Wnt 信号通路,显著抑制 AS 小鼠中核因子 κ B 受体活化因子配体 (ReceptorActivator of Nuclear Factor- κ B Ligand, RANKL) 表达水平,有效改善 AS 小鼠模型的炎症反应,发挥抗 AS 的疗效。丹参酮IIA 是中草药中丹参中主要的活性成分,它在抑制骨病、抗纤维化、抗炎等方面效果显著。现代研究发现,丹参酮IIA 对 AS 的治疗效果明显,如付姣等^[76]实验发现丹参酮IIA 通过抑制骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMP) /Smad 信号通路,抑制 AS 成纤维样滑膜细胞的增殖和成骨细胞的分化,发挥了抗 AS 的治疗作用。

研究发现,很多研究者基于网络药理学 (Network pharmacology, NP) 研究中药单体用来治疗 AS 的作用机制,如淫羊藿、独活、青风藤、雷公藤、丹参素、杜仲等中药单体。石金杰等^[77]通过 NP 的方法研究淫羊藿治疗 AS 的作用机制,通过筛选获得淫羊藿有效成分 23 个,与 AS 交集的靶点 68 个,其核心靶点有 7 个如槲皮素、木犀草素、山奈酚等;通过基因本体 (Gene Ontology, GO) 功能分析发现,淫羊藿治疗 AS 的靶蛋白在细胞内的存在位点、潜在分子及生物学过程如分子功能主要涉及细胞因子受体结合、受体配体活性细胞因子活性等;基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析得出,共同靶点与辅助性 T 淋巴细胞 17(Th17)、晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产

物受体 (Advanced glycation end products-receptors for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路、及肿瘤坏死因子信号通路、IL-17 信号通路、核转录因子- κ B 信号通路等有关。王琳玲等^[78]采用 NP 的方法研究独活对 AS 的作用机制, 检索获得独活有效成分 9 个, 可能参与治疗 AS 的靶基因 67 个; 通过 GO 功能、KEGG 通路和分子对接分析发现, 独活活性成分治疗 AS 的靶点主要涉及四类信号通路, 1.炎症相关通路有络氨酸激酶/转录因子 3 (JAK/STAT3) 信号通路、脂肪因子通路等; 2.延缓纤维化相关通路包括:缺氧诱导分子-1 α (Hypoxia inducible molecule-1 α , HIF-1 α) 信号通路、缺氧诱导分子-2 α (Hypoxia inducible molecule-1 α , HIF-2 α) 信号通路; 3.骨代谢相关通路有 Wnt/ β -catenin) 信号通路、TNF 的通路、类固醇激素的合成及破骨细胞分化等; 4.免疫相关通路:NF- κ B、T 细胞受体信号通路、Toll 样受体信号通路、核苷酸寡聚化结构域 (Nucleotide Oligomerization Domain, NOD) 样受体、肠道免疫等。姜平等^[79]利用 NP 的方法研究青风藤干预 AS 的分子机制, 通过检索数据库分析获得有效成分 6 个, 与 AS 相关的疾病靶点有 37 个; 通过 GO 功能分析, 发现有 98 个参与生物过程, 通过 KEGG 富集通路分析, 共 13 条相关信号通路, 主要靶点与环磷酸腺苷 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、环磷酸鸟苷-依赖性蛋白激酶 (Cyclic guanosine phosphate dependent protein kinase, cGMP-PKG) 信号通路、神经活性配体-受体相互作用、血清素激活突触通路、钙信号通路等有关, 分子对接结果显示青风藤中有效成分治疗 AS 的靶点有着良好亲和力。Zhang 等^[80]采用 NP 的方法研究雷公藤有效成分治疗 AS 的作用机制, 检索获得雷公藤活性成分 62 个, 11 个治疗 AS 的相关靶基因; 通过 GO 功能和 KEGG 通路分析发现, 筛选出 10 条生物过程和 18 条信号通路, 主要是催乳素信号通路、NF- κ B 信号通路、TNF 信号通路、人类嗜 T 淋巴细胞病毒-1 (Human T-lymphotropic virus-1, HTLV-1) 信号通路、癌症通路等, 分子对接方法提示雷公藤的生物活性分子与络氨酸酶-3(L-arginase-3, TYR-3)和葡萄糖转运蛋白-3 (Glucose transporter-3, GLU-3) 之间氢键结合具有良好亲和力。Li 等^[81]通过 NP 的方法研究丹参素对 AS 抗成骨作用, 筛选出丹参素活性成分 359 个, AS 相关疾病靶点 2897 个, 丹参素与 AS 的共同靶基因 47 个; 通过 GO 功能和 KEGG 通路分析发现, 筛选出 40 条生物过程和 13 条信号通路, 主要包括细胞外信号调节蛋白激酶和 c-JunNH2 末端激酶信号通路。

在中药单体有效成分治疗 AS 相关生物过程中, 调节炎症反应、骨代谢、免疫调节等的信号通路出现的次数较多, 有 JAK/STAT3、HIF-1 α 、TNF、NF- κ B、IL-17、ERK、JNK 等。尽管中药单体活性成分治疗 AS 的疗效单一, 但副作用少。

5.2 中药药对干预相关信号通路治疗 AS

中药药对是一种疗效较高、固定搭配和相对稳定的最小组方单位, 其组成为两味中药配对应用, 在临床治疗上常以相须使用, 如杜仲-牛膝、白芍-甘草、青风藤-穿山龙、鸡血藤-络石藤、黄柏-苍术等。

李舒等^[82]利用 NP 方法研究杜仲-牛膝药对治疗 AS 的作用机制, 检索数据库获得杜仲-牛膝活性成分 35 个, AS 相关疾病靶点 1914 个, 药物与疾病的交集靶点 67 个; 通过 GO 功能分析发现, 主要靶点富集在转录调节复合物、细胞因子活性、细胞因子受体结合和受体-配体活性、RNA 聚合酶 II 转录调节复合物和膜筏等, 通过 KEGG 富集分析发现, 主要靶点与免疫系统中的细胞因子信号传导通路、白介素相关信号通路、肿瘤坏死因子相关信号通路有关。胡倩等^[83]通过 NP 方法探讨白芍-甘草药对治疗 AS 的作用机制, 检索获得白芍-甘草药对的有效成分 87 个, 治疗 AS 的相关靶基因 80 个; 通过 GO 功能和 KEGG 富集分析, 发现主要靶点集中在 NF- κ B 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等。赖楚儿等^[84]基于 NP 的方法研究青风藤-穿山龙药对治疗 AS 的作用机制, 通过筛选得出青风藤-穿山龙药对的活性成分 16 个, AS 疾病靶点 816 个, 药对治疗 AS 的靶基因 56 个; 通过 GO 功能和 KEGG 富集分析发现, 主要靶点与丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 信号通路、类固醇激素生物合成、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路、补体和凝血级联、叉头框转录蛋白 (Fork Head Box Transcription Protein, FOXO) 信号通路及 T 细胞受体信号通路有关。许鑫杰等^[85]利用 NP 方法鸡血藤-络石藤药对治疗 AS 的作用机制, 通过筛选获得鸡血藤-穿山龙药对有效成分 31 个, 治疗 AS 疾病靶基因的 50 个; 通过 GO 功能分析获得 378 条参与生物过程, 其主要靶点与炎症反应、NF- κ B 信号通路正调控、细胞外区域、质膜以及细胞因子、酶结合、5-羟色胺结合等有关, KEGG 富集分析发现, 涉及到 116 条信号通路, 主要靶点与松弛素信号通路、AGE-RAGE、TNF 信号通路及 IL-17 信号通路有关, 分子对接结果提示鸡血藤-络石藤药对有效成分与催化酶、基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinases-9, MMP-9)、TNF、IL-6 等核心靶点有较好的结合亲和力。王芳

等^[86]通过 NP 方法探讨黄柏-苍术药对治疗 AS 的作用机制,筛选出黄柏-苍术药对活性成分 16 个,治疗 AS 相关靶基因 90 个;通过 GO 功能发现 244 条生物过程条目,KEGG 通路富集分析出 67 条相关信号通路,主要靶点与 HIF-1 信号通路趋化因子、PI3K-Akt 信号通路等有关。中药药对治疗 AS 的机制是多靶点、多通路的,其相关生物过程中调节骨细胞代谢、炎症反应、酶激活反应、免疫反应等出现次数较多,与 MAPK、IL-17、TNF- α 、NF- κ B、PI3K-AKT、AGE-RAGE 信号通路关系最为密切。中药固定配伍药对于 AS 的治疗,效果显著,可以减少毒性和提高疗效,组方相对固定和简单,但是相比中药复方,缺少疗效的整体性、系统性和综合性。

5.3 中药复方干预相关信号通路治疗 AS

中药复方在临床上治疗 AS 方面具有很好的效果,且应用广泛,如补肾舒脊颗粒、壮督驱寒合剂、加味愈痛丸、健脾清热通络丸、黄芩清热除痹胶囊、新风胶囊等复方的研究取得了显著效果。补肾舒脊颗粒具有补肝肾、养筋脉、舒筋活络等功效,它是由名中医阎小萍经过多年临床经验创立,治疗 AS 具有很好的疗效,但作用机制尚不明确,因此,现代很多研究者投入研究,如杨文雪等^[87]实验发现补肾舒脊颗粒可以通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 β -catenin 的磷酸化,与空白组相比,人的骨髓间充质干细胞(Human bone marrow mesenchymal stem cells, hBMSC)软骨分化 Wnt5a、 β -catenin mRNA 表达明显下降,抑制了软骨细胞分化,发挥抗 AS 的疗效。另外研究发现,吴伊莹等^[88]壮督驱寒合剂也可以通过抑制 Wnt3a、 β -catenin 信号通路抑制 AS 小鼠炎症因子的表达和成骨细胞的分化,改善了 AS 小鼠病理性成骨及炎症反应。加味愈痛丸具有补肾壮腰、祛寒化湿的功效,临床常用于外感寒湿,肝肾亏虚的患者,尚娟^[89]通过加味愈痛丸治疗强直性脊柱炎,并探讨加味愈痛丸的作用机制,通过抑制 JAK/STAT 信号通路,不仅抑制 p-JAK、p-STAT3 的磷酸化水平,IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等炎症因子表达显著下降,相反,免疫蛋白抗体 IgG1、IgG2、IgA、IgM 表达显著升高,加味愈痛丸可以通过抑制 JAK/STAT 发挥治疗 AS 的作用。除此之外,丁香^[90]通过实验发现健脾清热通络方调控 JAK2/STAT3 信号通路,抑制炎症反应,改善 AS 的疼痛症状,缓解了 AS 的发病。研究发现,黄旦等^[91]实验发现黄芩清热除痹胶囊激活过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (Peroxisome proliferator activated receptor- γ ,

PPAR γ) 介导 AMPK/FOXO3a 信号通路, 不仅抑制血清超氧化物歧化酶 (SOD)、总抗氧化能力 (Total antioxidant capacity, TAOC)、过氧化脂质 (Lipid peroxide, LPO)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 等氧化应激因子表达水平, 还抑制了 IL-1 β 、IL-10、IL-4、TNF- α 炎症因子的表达, 改善强直性脊柱炎症状, 发挥了抗 AS 的疗效。方利等^[92]通过新风胶囊抑制 miR-155/NF- κ B 信号通路改善强直性脊柱炎活动期患者高凝状态。陈鹏^[93]通过实验发现清热活血法抑制 IL-23/Th17 信号通路抗强直性脊柱炎炎症。

研究发现, 很多研究者基于 NP 研究中药复方用来治疗 AS 的作用机制。中药复方相比中药药对在治疗 AS 方面具有很好的效果, 目前在临床上应用广泛, 如右归丸、蠲痹汤、四妙丸、羌活胜湿汤、黄芪桂枝五物汤、甘草附子汤、补阳还五汤、补肾强脊颗粒、独活寄生汤、解痉舒督汤、寒湿痹颗粒、补肾强督治痿方等, 这些复方在临床上的研究取得了显著效果。杨涛等^[94]利用 NP 的方法研究右归丸对 AS 的作用机制, 通过检索得出右归丸的活性成分 79 个, AS 疾病的靶基因 767, 右归丸有效成分治疗 AS 的相关靶基因 98 个; 通过 GO 功能发现 535 条生物过程条目和 KEGG 通路富集分析出 121 条相关信号通路, 主要靶点与主要信号通路为 TNF 信号通路、IL-17 信号通路及 HIF-1 信号通路。刘宁等^[95]基于 NP 的方法探讨蠲痹汤对 AS 治疗的作用机制, 通过筛选得出蠲痹汤的活性成分 153 个, 作用靶点 137 个, 与 AS 疾病相关的靶点 188 个, 交集靶点 23 个; 通过 GO 功能分析得出, 主要靶点与细胞因子活性、细胞对脂多糖的反应、一氧化氮生物合成过程的正调控及降钙素 1-单加氧酶活性的正调控等多个生物过程有关, KEGG 通路富集分析, 发现主要靶点与非特异性通路外 TNF 信号通路、NOD 样受体 (NOD-like receptor, NOD) 通路、HIF-1 信号通路及 Toll 样受体通路等多条通路有关。陈聪聪等^[96]通过 NP 与分子对接的方法研究四妙丸治疗 AS 的作用机制, 通过检索得出四妙丸的活性成分 50 个, 作用靶点 215 个, AS 相关靶基因 2291 个, 四妙丸活性成分治疗 AS 的靶基因 82 个; 通过 GO 功能发现 137 条生物过程条目和 KEGG 通路富集分析得出 100 条相关信号通路, 主要靶点与主要涉及炎症反应、氧化反应、免疫代谢调节等有关, 分子对接实验提示四妙丸活性成分与核心靶点 IL-6、TNF、IL-1 β 结合具有良好亲和力。许晓娜等^[97]基于 NP 的方法探讨羌活胜湿汤对 AS 治疗的作用机制, 通过筛选得出羌活胜湿汤活性成分 61 个, 作

用靶点 265 个, AS 疾病相关靶基因 1672 个, 羌活胜湿汤有效成分治疗 AS 的相关靶基因 26 个; 通过 GO 功能分析得出, 有 475 条相关信号通路参与生物过程, 主要靶点与有脂质生物合成过程、对有毒物质调节激素水平的反应、辅助因子代谢过程等有关, KEGG 富集分析发现, 涉及 28 条信号通路, 主要靶点与 NOD 样受体信号通路、类固醇激素生物合成通路、Toll 样受体 (Toll-like receptor 4, TLR4) 信号通路等有关。李明波等^[98]利用网络药理学与分子对接技术的方法研究黄芪桂枝五物汤对 AS 治疗的作用机制, 通过检索发现黄芪桂枝五物汤有效成分有 74 个, 作用靶点 997 个, AS 疾病相关靶基因 2234 个, 黄芪桂枝五物汤活性成分治疗 AS 的交集靶点 78 个; 通过 GO 功能分析得出, 有 1190 条生物过程条目, 主要靶点与 DNA-结合转录因子结合、细胞因子活性、细胞因子受体结合等有关, KEGG 通路富集分析出 135 条相关信号通路, 主要靶点与 AGE-RAGE 信号通路、脂质与动脉粥样硬化、流体剪应力与动脉粥样硬化等信号通路有关, 分子对接分析提示黄芪桂枝五物汤活性成分与 PTGS2 结合具有良好的亲和力。侯卫等^[99]基于 NP 的方法研究甘草附子汤治疗 AS 的作用机制, 筛选得出甘草附子汤的活性成分 127 个, 作用靶点 213 个, AS 疾病相关的靶基因 2124 个, 甘草附子汤有效成分治疗 AS 疾病的交集靶基因 71 个; 通过 GO 功能分析参与生物过程的有 1387 条, 主要靶点与脂多糖应答、炎症反应的调节及对细菌来源的分子反应等有关, KEGG 富集分析得出与 AS 有关的信号通路 144 条, 主要靶点与 IL-17 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等有关。李伟等^[100-101]通过 NP 的方法研究补阳还五汤、独活寄生汤治疗 AS 的作用机制, 检索获得补阳还五汤有效成分 106 个, 独活寄生汤活性成分 264 个, 补阳还五汤治疗 AS 的相关靶基因 82 个, 独活寄生汤治疗 AS 的靶点 129 个; 通过 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 补阳还五汤和独活寄生汤有效成分与 AS 主要靶点与炎症反应、RNA 聚合酶 I 启动子转录的正调控、DNA 模板化、脂多糖的反应、转录的正调控及 HIF-1 信号通路、NF- κ B、NOD 样受体通路等有关。石金杰等^[102]利用 NP 的方法研究补肾强脊颗粒治疗 AS 的作用机制, 筛选出补肾强脊颗粒活性成分 58 个, AS 疾病的相关靶基因 1817 个, 通过靶点交集得出补肾强脊颗粒有效成分治疗 AS 的共同靶点 54 个; 通过 GO 功能分析得出, 共同靶点与对脂多糖的应答、细胞因子介导的信号通路、对细菌来源分子的应答等生物过程; 细胞因子受体结合、受体配体活

性、细胞因子活性等分子功能；突触前膜固有成分、突触前膜的整体成分及突触后膜的组成成分等有关，KEGG 通路富集分析发现，主要靶点与 IL-17 信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化等通路、AGE-RAGE 信号通路有关。张婷等^[103]通过 NP 的技术研究解痉舒督汤治疗 AS 的作用机制，检索出解痉舒督汤的活性成分 130 个，AS 疾病治疗相关靶基因 72 个；通过 GO 功能分析得出，共同靶点与免疫应答方面、炎症反应及调控脂多糖介导的信号通路有关，KEGG 通路富集分析发现，主要靶点与 TNF、T 细胞受体、Toll 样受体信号通路有关。王卓等^[104]基于 NP 的方法探讨寒湿痹颗粒治疗 AS 作用机制，经检索和筛选获得寒湿痹颗粒活性成分 69 个，作用靶点 142 个，AS 相关疾病靶点 595 个，寒湿痹颗粒有效成分治疗 AS 的靶基因 39 个；通过 GO 功能分析，共同靶点与急性炎症反应、活性氧代谢调节、花生四烯酸的代谢、脂肪酸代谢、神经递质的生物过程等生物功能有关，KEGG 富集分析发现，主要靶点与 AGE-RAGE 信号通路、IL-17、NF- κ B、TNF、Toll 样受体信号通路等有关。邱冬妮等^[105]利用 NP 的方法研究补肾强督治痿方治疗 AS 的作用机制，经检索得出补肾强督治痿方潜在基因 1846 个，AS 疾病相关的靶点 4158 个，补肾强督治痿方有效成分治疗 AS 疾病相关靶基因 705 个，通过 GO 功能分析得出，共同靶点与线粒体、细胞溶质、细胞外间隙、细胞质等有关。共同靶点基因与蛋白质同源二聚体活性、酶结合、受体结合等有关，KEGG 富集分析，T 细胞受体、雌激素信号通路、TNF 等有关。中药复方治疗的机制是多靶点多通路的，在参与相关生物过程中炎性细胞因子、活性氧代谢调节、脂肪酸代谢的调控及脂多糖应答等出现次数较多，共同的信号通路有 TNF、IL-17、AGE-RAGE、NF- κ B、Toll 样受体、T 细胞受体及 NOD 样受体等出现次数较多。中药复方对 AS 的治疗效果更为显著，但相对于中药配伍药对，其具有多样性、复杂性和综合性。

中药单体有效成分对 AS 相关信号通路的调控作用

中药名称	筛选	主要活性成分	交集	作用通路	参考
------	----	--------	----	------	----

	活性成分		靶点	文献
淫羊藿	23	槲皮素、木犀草素、山奈酚、淫羊藿苷等	68 IL-17、AGE-RAGE、TNF、NF- κ B、Th17 等	[77]
独活	9	欧前胡素、异欧前胡素、当归醇 D、当归酸等	67 Toll 样受体、NOD 样受体、T 细胞受体、TNF、NF- κ B、JAK/STAT3、Wnt/ β -catenin 等	[78]
青风藤	6	千金藤啶碱、 β -谷甾醇、青藤碱、大花内酯等	37 神经活性配体-受体相互作用、钙信号通路、血清素激活突触通路、环磷酸腺苷(cAMP)信号通路、血管平滑肌收缩、环磷酸鸟苷-依赖性蛋白激酶(cGMP-PKG)信号通路等	[79]
雷公藤	62	雷公藤内酯、山奈酚、川陈皮素等	11 TNF、NF- κ B、HTLV-1、催乳素信号通路等	[80]
丹参素	359	丹参素	47 ERK、JNK 等	[81]
杜仲-牛膝	35	β 谷甾醇、山奈酚、槲皮素等	67 免疫系统中的细胞因子信号传导通路、白介素相关信号通路、TNF 相关信号通路等	[82]
白芍-甘草	87	槲皮素、柚皮素、山奈酚、钩藤酮 a 等	80 IL-17、TNF、NF- κ B 等	[83]
青风藤-穿山龙	16	薯蓣皂苷元、纤细薯蓣皂苷等	56 类固醇激素生物合成、补体和凝血级联、foxo 信号通路、MAPK、PI3K/Akt、T 细胞受体等	[84]
鸡血藤-络石藤	31	木犀草素、 β 谷甾醇、豆甾醇等	50 IL-17、AGE-RAGE、TNF、松弛素等	[85]
黄柏-苍	16	槲皮素、汉黄芩素、小	90 PI3K-Akt、趋化因子、HIF-1 等	[86]

术		槲碱等			
右归丸	79	β -谷甾醇、三萜酚、颠茄碱等	98	IL-17、HIF-1、TNF 等	[94]
蠲痹汤	153	槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素等	23	TNF、NOD 样受体、Toll 样受体、HIF-1 等	[95]
四妙丸	50	槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、 β -谷甾醇、芸香碱、黄芩素等	82	炎症反应、氧化反应、免疫代谢调节等	[96]
羌活胜湿汤	61	麻素苷、阿魏酸、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、甘草酸、羌活醇、藁本内酯、蛇床子素等	26	类固醇激素生物合成、NOD 样受体信号、Toll 样受体等	[97]
黄芪桂枝五物汤	74	槲皮素、芍药苷、山柰酚等	78	脂质与动脉粥样硬化、AGE-RAGE、流体剪应力与动脉粥样硬化等	[98]
甘草附子汤	127	槲皮素、山柰酚、柚皮素、甘草查尔酮 A 等	71	IL-17、AGE-RAGE、TNF 等	[99]
补阳还五汤	106	槲皮素、山柰酚、木樨草素、黄芩素、芒柄花黄素等	82	NF- κ B、NOD 样受体、HIF-1 等	[100]
独活寄生汤	264	槲皮素、山柰酚、柚皮素、汉黄芩素、黄芩素等	129	NF- κ B、NOD 样受体、HIF-1 等	[101]
补肾强脊颗粒	58	槲皮素、山柰酚、豆甾醇等	54	IL-17、AGE-RAGE、流体剪应力和动脉粥样硬化等	[102]
解痉舒督汤	130	槲皮素、柚皮素、山柰酚等	72	TNF、T 细胞受体、Toll 样受体等	[103]

寒湿痹颗粒	69	槲皮素、异鼠李素、 β -谷甾醇等	39	AGE-RAGE、流体剪切应力和动脉粥样硬化、IL-17、NF- κ B、TNF、Toll 样受体等	[104]
补肾强督治痿方	1846	槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇等	4158	TNF、T 细胞受体、破骨细胞分化及雌激素等	[105]

6 小结

综上所述,中草药通过调控 Wnt/ β -catenin、MAPK、PI3K/Akt、JAK/STAT3、NF- κ B 和 IL-17/IL-23 等信号通路的传导,抑制炎症因子的释放和活性、调节异常能量代谢、减轻氧化应激反应、加速强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞自噬性凋亡、抑制成纤维样滑膜细胞的增殖、分化、迁移以及促进细胞凋亡,最终对强直性脊柱炎的发生发展起到阻碍的效果。中草药是大自然所馈赠的财富,在人类健康发展史上发挥了不可或缺的作用,它具有多活性、多成分、多靶点、多通路等特点,同时具备疗效显著和副作用小等治疗优势。大量的研究表明,中草药所富含的有效成分能够有效地抑制强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞的繁殖和分化,促进强直性脊柱炎细胞凋亡,甚至有些化合物可以逆转强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞成骨和破骨分化平衡。

通过网络药理学筛选出中药有效成分治疗 AS 出现频次较高的有槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、黄芩素、汉黄芩素、柚皮素、谷甾醇及小檗碱等。目前利用网络药理学在探索中药单体、药对和复方的有效成分对 AS 的治疗作用机制中应用较多,通过网络药理学将疾病与药物分子构建“药物-靶点-疾病”网络体系等进行综合性和系统性分析,可以初步筛选出中药有效成分治疗疾病的作用分子机制。因此,通过网络药理学技术发现中药治疗 AS 的作用机制是多靶点、多通路的,其相关生物过程中骨代谢、免疫反应、炎症反应等出现次数是最多的,富集到的共同信号通路有 TNF、IL-17、NF- κ B、HIF-1、MAPK、T 细胞受体、Toll 样受体、JAK/STAT3、AGE-RAGE、PI3K-AKT、NOD 受体等出现次数也是最多的。

但目前研究依旧存在诸多问题及亟待攻克的难点,当前中药中有效成分和强直性脊柱炎的作用机制尚未彻底研究明确,且中草药在临床上治疗 AS 的过程中发挥着辅助性作用,未能成为当前临床上的主要治疗手段。更重要的是,临床实

践与基础研究之间缺乏有效衔接，强直性脊柱炎的主要研究集中于中药复方，很少涉及中药单体有效成分。当然，由于多靶点、多途径必然会导致其复杂的作用机制，这也大大地增加了科研工作的难度，而中药所具备的多靶点、多途径特点又与中医的整体观念有着异曲同工之意。因此，针对中药单体的研究还是非常有必要涉及。

综述二:西医对强直性脊柱炎研究概况

强直性脊柱炎 (Ankylosing spondylitis, AS) 是临床常见的一种自身免疫系统性疾病, 主要侵犯中轴骨骼及周围关节, 其主要特征是全身炎症、异位骨化和骨结构损伤, 具有较高致残率^[106]。研究发现, AS 的发病机制可能与基因遗传、自身免疫、周围环境以及感染等因素有关^[107], 其临床症状主要表现为脊柱僵硬、腰背部疼痛、活动障碍、肌腱端炎以及周围关节炎等, 休息时可加重, 活动时可减轻^[108]。近几年来, 研究表明^[109], 对于 AS 的治疗, 临床应用较多的为非甾体类抗炎药、抗风湿药以及糖皮质激素等药物, 虽然可缓解患者疼痛症状, 但长期服用往往伴有胃肠反应, 肝肾损害等不良反应, 且具有依赖性。随着现代医疗技术的发展, 生物制剂在临床上取得了显著的疗效, 包括肿瘤因子抑制剂 (如依那西普、阿达木单抗)、白介素-17 (interleukin-17, IL-17) 抑制剂 (如司库奇优单抗)、Janus 激酶抑制剂 (如托法替布) 等, 可以快速改善炎症反应, 提高患者的生活质量^[110]。除此之外, AS 的治疗还包括手术治疗、功能锻炼等, 当 AS 患者晚期丧失工作和生活自理能力时, 需行手术治疗, 包括脊柱矫形或固定、髋关节置换术等, 提高患者的生活质量^[111]。

1 西医对 AS 的认识

强直性脊柱炎是一种强直性脊柱炎慢性炎症疾病^[112]。AS 发病病因不明, 但与遗传和环境因素关系密切, 研究表明, 人类白细胞抗原 B27 (human leucocyte antigen-B27, HLA-B27) 关系最为密切^[113]。AS 全球发病率约 0.1%-0.5%^[114], 具有较高的致残率。据相关文献报道^[115], AS 在不同国家、不同种族、不同地理区域之间存在差异, 如不同种族之间, 白人为发病率 4.85%; 黑人发病率为 2.92%。研究发现^[116], AS 发病在青少年时好发, 男女性别比 3:1, 男性发病率比女性高, 且女性患者发病缓慢。AS 早期临床症状主要表现在腰骶部疼痛、脊柱僵硬、功能活动障碍等, 少数患者还会出现低热、疲劳感、消瘦等全身症状^[117]。随着病程进展, 患者脊柱就会逐渐畸形、僵硬强直, 甚至导致患者残疾, 严重影响了患者的健康和生活质量, 同时, 在影像学上脊柱出现“竹节样改变”的典型特征。目前 AS 发病机制包括基因遗传、自身免疫、异位骨化等因素, 各分子机制间相

互影响,共同导致 AS 发病进程^[118]。另外,近几年研究发现,IL-23/Th17 轴是 AS 发病机制的关注的热点,IL-23/Th17 轴在 AS 的免疫炎症中的发病机制中处于关键的作用^[119]。

2 西医对 AS 的发病机制

强直性脊柱炎是一种慢性炎症疾病,目前对 AS 的发病机制尚未明确,但是,AS 发病主要与基因遗传、免疫调节、炎症反应等有关,除此之外,还与异位成骨、感染因素、内分泌失调、环境等密切相关。

2.1 基因遗传与 AS

研究发现,强直性脊柱炎与人类白细胞抗原 HLA-B27 发病密切相关,且具有明显家族遗传倾向,在我国,患有强直性脊柱炎的患者中 HLA-B27 阳性率达到 90%以上^[120],其中在直系亲属中患病率可达 11%-25%,因此 HLA-B27 基因高表达与 AS 发病具有较强关联性^[121]。其发病机制是 HLA-B27 当外界炎症刺激后,炎症多肽链激活 HLA-B27 向 CD8⁺T 淋巴细胞传递,刺激 CD8⁺T 淋巴细胞激活,HLA-B27 在内质网氨基肽酶 1/2 异常剪切多肽,导致 HLA-B27 轻链缺失,重链发生折叠异常和降解并形成同源二聚体,这些异常折叠的肽链或同源二聚体无法运输到细胞膜上,在内质网上堆积导致内质网应激反应和炎症效应,最终导致 AS 的发病^[122]。随着现代医学的不断发展,除了 HLA-B27 与 AS 的有有关联外,还有其他的基因与 AS 的发病具有较强的紧密联系。研究发现,穆杰等^[123]通过提取 AS 患者与健康人的 DNA 做基因分型,并通过 KEGG 富集和免疫分析法,发现 AS 的易感性与基因 AF4/FMR2、IL-10 多态性关系最为密切,并且发现基因 AF4/FMR2、IL-10 可以与环境相影响交互导致 AS 发病。AF4/FMR2 基因是一类转录因子,通过刺激淋巴细胞表达,它可以参与细胞炎症反应、自身免疫反应等过程,导致 AS 的发病。

2.2 免疫因素与 AS

免疫反应是指自身机体对于自身机体变异的异己成分或自体成分做出的防御反应,免疫调节的细胞主要有 T 细胞和 B 细胞介导的免疫应答反应。而免疫反应与 AS 的发病有密切的关系,免疫功能失调是导致 AS 致病的发病因素^[124]。实验发现,张冬青等^[125]通过抽取 73 例 AS 患者和 73 例健康人的外周血,检测免疫免

疫球蛋白 IgA、IgE、IgM、IgG 等含量水平,发现 AS 患者的外周血中免疫球蛋白 IgA、IgE、IgM、IgG 含量水平较高,不仅如此,同时,也发现 HLA-B27 及炎症指标较高,因此,免疫指标高表达与 AS 发病具有较强关联性。 $CD4^+$ 细胞是人体免疫系统中一种重要免疫细胞,主要表达辅助或者诱导 T 细胞调节免疫反应。研究发现,陈溶微等^[126]通过抽取 80 例 AS 患者和 50 例健康人的外周血,检测 $CD4^+CD25^+Foxp3^+Treg$ 、 $CD8^+CD28^+Tc$ 、 $CD8^+CD28^-Treg$ 等蛋白表达水平,发现外周血中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 调节性 T 细胞表达异常,在 AS 发病过程中作用显著。不仅如此,朱康祥等^[127]通过抽取 22 例 AS 患者和 22 例健康人的外周血发现 $CD19^+CD24^{high}CD27^+$ 调节性 B 细胞显著上升,且上升频率与疾病活动度显著相关。张宇等^[128]通过实验发现,与健康人相比,活动期与非活动期的 $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ 、 $CD8^+CD28^-Treg$ 细胞比例下降。并且发现免疫炎症因子较高。另外研究发现,辅助性 T 细胞 17 (Th17) /调节性 T 细胞 (Treg) 比例失衡是导致 AS 发病的关键,因此,调整 Th17/Treg 免疫失衡可以治疗 AS^[129]。因此,AS 发病机制与自身免疫有着密切的联系。

2.3 炎症反应与 AS

AS 被认为是一种慢性免疫性炎性疾病^[130]。研究表明,AS 患者关节囊、肌腱、韧带的骨附着点以及周围的滑膜组织容易发生慢性炎症反应,它是发生 AS 的主要病理特征^[131]。在炎症细胞因子刺激作用下,脊柱及关节周围的滑膜组织细胞的增殖、合成、胶原基质分泌等活动十分活跃,致使滑膜组织增生并发生炎症反应^[132],因此,炎症反应是在 AS 发病中起着不可替代的角色。炎症反应其发病机制是当细胞受到刺激外,巨噬细胞、单核细胞、T 细胞或 B 细胞等炎症细胞激活并分泌大量的炎症因子,如 IL-6、IL-17、IL-22、IL-23、IL-1 β 、肿瘤因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等,进而促进 AS 的发病^[133]。炎症反应包括肠道微生物失调、IL-23/Th17 轴等,不仅如此,有些因素可以诱发并加重 AS 炎症反应,包括脊柱的长期受压,工作压力过大以及气候的忽冷忽热等都可以导致炎症反应的加重,也是 AS 发病发生的诱因条件^[134]。既往研究表明^[23-18],通过调节丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK)、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B, PI3K/Akt) 信号通路、Wnt/ β -连环蛋白 (Wnt/ β -catenin)、

络氨酸激酶/转录因子 3 (Leucosine kinase/transcription factor 3, JAK/STAT3)、IL-17/IL-23 等信号通路的传导,抑制炎症因子的释放和活性,抑制细胞的增殖和活性,调节异常能量代谢,减轻氧化应激反应,加速强直性脊柱炎成纤维样滑膜细胞自噬性凋亡、抑制成纤维样滑膜细胞的侵袭、迁移以及促进细胞凋亡,最终对强直性脊柱炎的发生发展起到阻碍的效果。除此之外,IL-23/Th17 轴是近年来全球研究 AS 发病机制的焦点,可见 IL-23/Th17 细胞轴在 AS 的发病机制中扮演着重要的角色。

2.4 异位成骨与 AS

AS 是一种临床上常见的强直性脊柱炎疾病,有研究发现,慢性滑膜炎是 AS 的主要病理特点。AS 发病机制是炎症细胞因子介质刺激作用下,滑膜组织成纤维样滑膜细胞 (Fibroblast-like synoviocytes, FLS) 的增殖、合成、胶原基质分泌等活动十分活跃,致使结缔组织增生并进一步发生纤维化和骨化^[135],因此,异位骨化与 AS 发病密切相关^[136]。在 AS 发病机制中,异位成骨涉及的成骨信号通路主要包括 Wnt/ β -catenin 信号通路^[137]、骨形态发生蛋白 (Bone morphogenetic protein, BMPs) 即 BMP/Smads 信号通路^[138]以及 Hedgehog 信号通路^[139]等。研究发现^[140], Wnt/ β -catenin 蛋白参与调控维持骨稳态以及新骨形成,当 Wnt/ β -catenin 激活后,阻止蛋白质及糖原合成激酶等其他蛋白对 β -catenin 蛋白降解,以促进新骨形成和成骨细胞分化,因此,可以抑制 AS 成骨分化,改善 AS 的症状。研究发现^[141], BMP/Smads 信号通路可以通过诱导滑膜细胞异位骨化和软骨形成,进而促进脊柱关节融合。Hedgehog 信号通路可以参与多种疾病的产生与发展,可以调控成骨分化重要因子,尤其是对骨髓充干细胞的调控^[142]。

3 西医对 AS 治疗现状

目前治疗强直性脊柱炎主要控制炎症反应引起的疼痛以及身体僵硬、活动障碍等,近几年来,研究表明^[143],对于 AS 的治疗,临床应用较多的为非甾体类抗炎药、抗风湿药、糖皮质激素等药物,如 Deshpande 等^[144]通过研究发现柳氮磺吡啶具有短期疗效、良好的耐药性等,适用于 AS 患者。Liver^[145]研究发现抗风湿药治疗自身免疫性疾病的炎症反应。Bratzkus 等^[146]发现蔡普生治疗急性痛风、类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、骨关节炎、滑囊炎以及肌腱炎等。虽然可缓解患者

症状,但往往伴有胃肠反应,肝肾损害等副作用,且具有长期依赖性,如 Kim 等^[147]通过队列研究发现长期使用非甾体抗炎药治疗强直性脊柱炎相关的心血管疾病风险会增加。Khalil 等^[148]通过研究发现美洛昔康的与非甾体抗炎药的副作用相似,都可以导致水肿、贫血、腹痛,严重时还会引起胃肠道的出血等症状。随着现代医疗技术的发展,生物制剂在临床上取得了显著的疗效,包括肿瘤因子抑制剂(依那西普、阿达木单抗)、白介素-17 抑制剂(司库奇尤单抗)、Janus 激酶抑制剂(托法替布)等,可以快速改善炎症反应,提高患者的生活质量。Yoo 等^[149]通过实验发现依那西普一种肿瘤因子抑制剂改善 AS 治疼痛症状,且安全性和有效性高,Sakaguchi 等^[150]通过使用 TNF- α 抑制剂改善了患有 AS 小女孩的疼痛症状。Dubinina 等^[151]通过研究发现所有 IL-17 抑制剂在治疗 AS 方面都具有很好的临床疗效。Tian 等^[152]通过比较 JAK 抑制剂、TNF- α 抑制剂和白 IL-17 抑制剂在 AS 患者中的治疗疗效发现, TNF- α 抑制剂治疗 AS 疗效高。但使用生物制剂价格昂贵,对于不富裕的家庭是一笔不小的负担。当 AS 发展到晚期时,保守治疗效果差,全髋关节置换术被认为是现有的主要治疗方法。然而关节置换可能存在手术风险系数较高、功能恢复不满意命有限、费用较高等缺陷。总体来说 AS 的治疗目标主要在于改善炎症反应,延缓疾病进展,维持正常的活动范围及活动强度,缓解关节僵硬,提高生活质量。

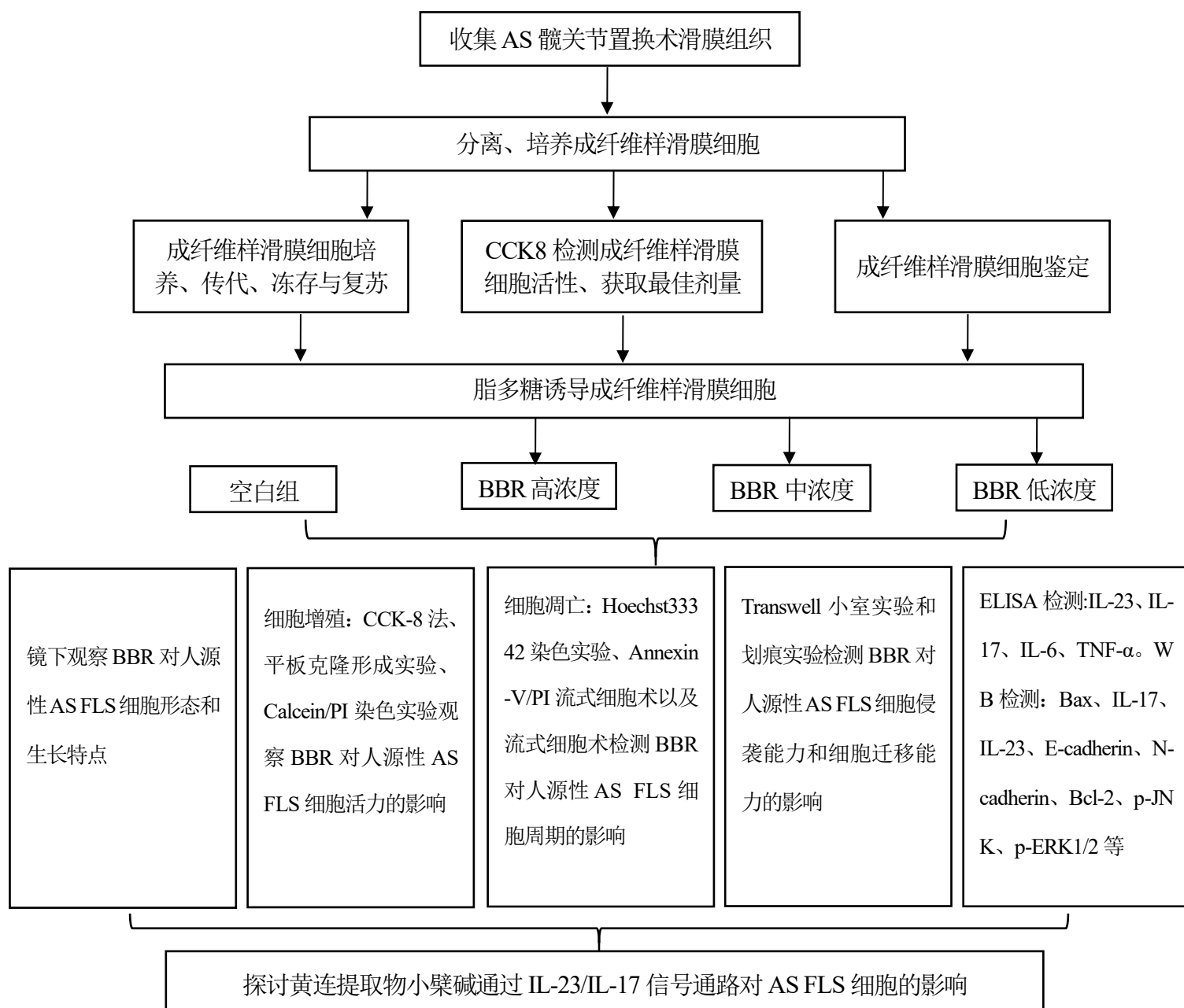
4 小结

强直性脊柱炎是一种病因不明的慢性炎症疾病,虽然发病机制尚不明确,但它具有发病机制复杂、影响因素较多的特点,其发病机制可能与基因遗传、自身免疫、周围环境以及感染等因素有关,除此之外,还与异位成骨、感染因素、内分泌失调、环境等密切相关,因此,控制炎症和免疫反应可以改善 AS 的临床症状。临床应用较多的为非甾体类抗炎药、抗风湿药以及糖皮质激素等药物,但是存在副作用大如胃肠道不良反应,且需长期依赖。虽然生物制剂新型药物治疗效果较好,显著作用较快,但存在免疫反应以及价格高昂等问题。除此之外,AS 的治疗还包括手术治疗、功能锻炼等,当 AS 患者晚期丧失工作和生活自理能力时,需行手术治疗,包括脊柱矫形或固定、髋关节置换术等,提高患者的生活质量,然而关节置换可能存在手术风险系数较高、费用较高等缺陷。

第二部分 实验研究

黄连提取物小檗碱对 AS 成纤维样滑膜细胞的影响

1 技术路线图



2 材料

2.1 细胞来源及特性

滑膜组织标本取自甘肃省中医院行髋关节置换术的 3 例 AS 患者。这些 AS 患者均符合改良的纽约 AS 标准^[153], 且无感染性疾病、炎症性疾病或风湿性疾病等病史。这项研究通过甘肃省中医院医学伦理委员会的支持和批准, 并遵循了《赫尔辛基宣言》的原则。所有参与者均签署书面知情同意书。

2.2 仪器与设备

名称	产地/制作商	型号
单人单面净化工作台	苏州净化设备有限公司	SW-CJ-1FD
CO ₂ 培养箱	上海力申科学仪器有限公司	HF90
倒置光学显微镜	日本 Olympus 公司	6B40330
倒置荧光显微镜	日本 Olympus 公司	IX70
酶标仪	美国伯腾仪器有限公司	XmarkTM
流式细胞仪	美国 BD 公司	FACSCalibu
凝胶成像仪器	美国 Bio-Rad 公司	CHEMIDOC™-XRS+
电热恒温培养箱	上海皓庄仪器有限公司	HZP-9162
水平恒温摇床	上海皓庄仪器有限公司	ST20H
低速离心机	长沙湘智离心机仪器有限公司	TDZ5WS
电子天平	美国奥豪斯仪器有限公司	AR224CN
细胞自动计数器	美国 Bio-Rad 公司	TC20
紫外线消毒车	山东迈福科学仪器股份有限公司	MF-II-ZW30S19W
医用冷藏冰箱	青岛海尔生物医疗股份有限公司	HYCD-282C (21 款)
1-10μL 排枪 (8 连)	德国 Eppendorf 公司	Reference2
100-1,000μL 移液枪	德国 Eppendorf 公司	Reference2
10-100μL 移液枪	德国 Eppendorf 公司	Reference2
0-2.5μL 移液枪	德国 Eppendorf 公司	Reference2

2.3 试剂及耗材

名称	生产厂家	货号/批号
黄连提取物小檗碱	上海源叶生物科技有限公司	25316-40-9
DMEM 培养基	上海源培生物科技有限公司	L110KJ
磷酸盐缓冲盐水 (PBS)	上海源培生物科技有限公司	B320KJ
胎牛血清 (FBS)	上海诺娃医药科技有限公司	AB-FBS-1050S
0.25%EDTA 的胰蛋白酶	北京索莱宝科技有限公司	G4001
青-链霉素混合液	北京索莱宝科技有限公司	P1400
胶原酶 I	北京索莱宝科技有限公司	T2195
细胞活力测定试剂盒	上海翊圣生物技术有限公司	40203ES60
4%组织细胞固定液	北京索莱宝科技有限公司	P1110
TritonX-100	北京索莱宝科技有限公司	T820
N-cadherin	武汉三鹰生物技术有限公司	10026796
E-cadherin	武汉三鹰生物技术有限公司	10004426
Transwell 小室	广州洁特生物过滤有限公司	210708-325
彩色预染标准分子量蛋白 Marker	北京博奥龙免疫技术有限公司	KEB3022593
增强型 ECL 化学发光试剂盒	北京博奥龙免疫技术有限公司	NMB3015103
蛋白酶磷酸抑制剂混合物	北京索莱宝科技有限公司	20230222
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	北京索莱宝科技有限公司	20220909
高效 RIPA 组织/细胞快速裂解液	北京索莱宝科技有限公司	20220808
PVDF 膜	德国 MerckGmbH 公司	0000194582
PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%)	上海雅酶生物医药科技有限公司	03745300
兔冰快速转膜缓冲液 (10×)	上海雅酶生物医药科技有限公司	03681200
脂多糖 (LPS)	北京索莱宝科技有限公司	3230809001

续表：试剂及耗材

名称	生产厂家	货号/批号
p-JNK	美国 Immunoway 公司	Y185
p-ERK1/2	美国 Immunoway 公司	B2501
Bax	武汉三鹰生物技术有限公司	00107829
Bcl-2	武汉三鹰生物技术有限公司	00085540
Cleaved-caspase-3	武汉三鹰生物技术有限公司	B0601
Annexin-V/PI 流式细胞术试剂盒	杭州联科生物科技股份有限公司	A30335
Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司	121522230328
人 IL-6ELISA 试剂盒	江苏晶美生物科技有限公司	MM-0049H1
人 IL-17ELISA 试剂盒	江苏晶美生物科技有限公司	MM-2217H1
人 IL-23ELISA 试剂盒	江苏晶美生物科技有限公司	MM-0196H1
人 TNF- α ELISA 试剂盒	江苏晶美生物科技有限公司	MM-0122H1
人 RANKLELISA 试剂盒	江苏晶美生物科技有限公司	JM-01495R2
人 DDK-1ELISA 试剂盒	江苏晶美生物科技有限公司	JM-01587R2
抗坏血酸	北京索莱宝科技有限公司	A8100
糖磷酸盐	北京索莱宝科技有限公司	G8100
地塞米松	北京索莱宝科技有限公司	D8040
茜红素染色试剂盒	安徽雷根生物技术有限公司	DS0052
细胞周期试剂盒	杭州联科生物科技股份有限公司	A30214
Vimentinantibody	北京索莱宝科技有限公司	GTX100G19-S
5xTris-甘氨酸电泳缓冲液	北京索莱宝科技有限公司	T1070
20xTBST 缓冲液	北京索莱宝科技有限公司	T1082
羊抗兔二抗	武汉三鹰生物技术有限公司	SA00001-2
白介素 17	美国 Immunoway 公司	YT5976

续表：试剂及耗材

名称	生产厂家	货号/批号
白介素-23	美国 Immunoway 公司	YN2207
山羊抗鼠 IgG 二抗	武汉三鹰生物技术有限公司	SA00001-1-A

2.4 主要实验试剂的配制

2.4.1 成纤维细胞样滑膜细胞完全培养基（含 10%FBS 的培养基）

取 50mL 离心管，用移液器向其中加入 0.5mL 青-链霉素溶液（双抗），再向其中加入解冻完成的 FBS5mL，最后加入 DMEM 培养基 45mL，混合均匀后，保存在 4℃冰箱中备用。

2.4.2 黄连提取物小檗碱配制

第一步，将固态黄连提取物小檗碱溶解于 DMSO，得出黄连提取物小檗碱的浓度和体积。第二步，根据 $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ 公式得出所需的黄连提取物小檗碱的终浓度和体积。

2.4.3 I型胶原酶溶液的配制

取 100mL 的 DMEM 培养基，加入再取 100mgI型胶原酶，配置成 1mg/mL，震荡混合均匀后，放入-20℃冰箱中保存备用。

2.4.4 LPS 的制备

取 1mLDMEM 细胞培养基，再称取 1mg 放入 10mL 离心管中，并混匀震荡至 LPS 冻干粉完全溶解，配置成终浓度为 1mg/mL 的 LPS 原液，分装后保存在-20℃冰箱中保存备用。实验时，根据所需浓度用 DMEM 细胞培养基进行稀释。

3 实验方法

3.1 人源性 AS FLS 细胞的提取及原代培养

（1）从手术室将 AS 患者废弃的新鲜滑膜组织置入无菌标本盒后并迅速拿出，转移至细胞实验室中单人单面净化工作台，使用无菌的组织镊将滑膜组织移至无菌培养皿中，用含有青-链霉素双抗溶液的 PBS 缓冲液进行冲洗干净。

（2）使用经紫外线消毒且无菌的组织剪，剔除滑膜组织周围多于的脂肪组织、杂质等，剔除干净后，将其置于 50mL 无菌的离心管中，然后用无菌组织剪将滑

膜组织充分剪碎，并研磨成乳糜状，大小为 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 体积，然后移至无菌 50mL 离心管中，再次使用含有双抗溶液的 PBS 冲洗，冲洗结束后，用离心机离心，时间设置 5min，转速 1,200r/min，结束后弃去上清液。

(3) 将上述得到的滑膜组织内加入 5mL 完全培养基，加入 50 μL 双抗溶液，最后再加入 5 μL I 型胶原酶溶液，摇匀，轻微震荡，最后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床，转速为 120r/min，时间 3h。

(4) 等上述时间结束后，使用细胞过滤网过滤上述滑膜组织悬液细胞（过滤网孔径为 20 μm ），等过滤结束后，将滤出液置于无菌的 50ml 的离心管中，加入适量的完全培养基，进行离心机离心，时间设置 5min，转速 1,200r/min，结束后弃去上清液，再用 5mL 无菌含青-链霉素溶液的 PBS 缓冲液重悬细胞后，进行离心，1,200r/min，时间 5min，离心结束后弃去上清液。

(5) 将上述步骤得到的细胞置于 50mL 离心管中，并加入 4mL 完全培养基，轻轻摇匀后接种于 25 cm^2 细胞培养瓶，每瓶加 2-3mL 完全培养基，置入 CO_2 浓度为 5%，温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱。

(6) 12h 后在倒置显微镜下观察细胞贴壁情况，隔 3 天进行细胞换液；及时观察细胞形态及生长情况，根据细胞生长速度和密度及时进行细胞换液及传代。

3.2 人源性 AS FLS 细胞的传代、冻存与复苏

准备工作：提前对单人单面净化工作台和细胞间消毒，时间约 30min，准备含 10%FBS 完全培养基、0.25%EDTA 的胰蛋白酶、25 cm^2 细胞培养瓶、一次性手套、1,000 μL 移液器及枪头、PBS、酒精灯等。

3.2.1 细胞传代

(1) 从培养箱中取出培养瓶，倒掉细胞培养瓶中的原液（完全培养基），加入 1mL PBS，轻轻摇晃，时间约 20sec，重复 2-3 次，弃掉 PBS 冲洗液，然后每瓶中加入 1mL 含 0.25%EDTA 的胰蛋白酶进行消化，用 1,000 μL 规格的移液枪的枪头反复吹打，吹打 2min 后，置于在倒置显微镜下进行观察，当有大量的贴壁细胞变成有走的圆形的细胞后，立即向其中加入 3mL 完全培养基终止消化，并用移液器轻轻反复吹打均匀。

(2) 将上述步骤得到的细胞悬液抽取 2mL 加入新的细胞培养瓶培养瓶中, 再往新培养瓶中加入 3mL 含有 10%FBS 完全培养基, 置入 CO₂ 浓度为 5%, 温度为 37°C 的细胞培养箱继续培养。

(3) 每隔 2 日观察细胞形态及生长情况, 根据细胞生长的情况和生长的密度及时细胞换液, 待培养瓶的细胞长满至 90% 以上时, 重复上述步骤进行细胞传代。

3.2.2 细胞冻存

目的: 待细胞传代至第 3 代时, 当使用显微镜观察细胞时, 铺满培养瓶底部达 90% 以上时, 进行细胞冻存, 以备后续实验的需要, 细胞冻存时要缓慢, 与细胞复苏操作过程相反, 细胞冻存缓慢可避免水分快速结冰造成细胞死亡。

实验步骤: 从培养箱中取出培养瓶, 弃掉细胞培养瓶中的完全培养基, 加入 PBS 缓冲液 1mL 进行冲洗, 轻轻摇晃, 时间约 20sec, 冲洗结束后弃掉 PBS 冲洗液, 重复 2 次, 然后每瓶中加入 1mL 含 0.25%EDTA 的胰蛋白酶进行消化, 再用移液器轻轻反复吹打, 吹打 2min 后, 在倒置显微镜下进行观察当有大量贴壁的细胞变成游离的圆形细胞后, 立即向其中加入适量完全培养基以终止消化, 进行离心, 1,200r/min, 时间 5min, 离心结束后弃掉上清液, 然后置于冻存管中, 每只冻存管内加入 1mL 细胞冻存液, 封口膜封闭冻存管, 先置于温度为 -4°C 冰箱中, 时间设置 30min, 再转移至 -20°C 冰箱中, 时间设置 1h, 然后置于温度为 -80°C 冰箱中, 时间为 12h, 最后放于液氮中。

3.2.3 细胞复苏

(1) 将使用的试剂和器材提前做好准备后, 从液氮中取出冻存管迅速置入温度为 37°C 的水浴箱中, 为加快融化速度不间断摇晃。与细胞冻存操作过程相反, 细胞复苏需要快速将冻存细胞融化, 因为水分进入细胞内容容易造成细胞损害。

(2) 待冻存管内融化后, 快速置于工作台中, 迅速用 1,000μL 的移液器吸出冻存管中细胞悬液置于无菌的 50ml 离心管内, 再加入适量含 10%FBS 的完全培养基, 轻轻用 1,000μL 的移液器轻轻反复吹打均匀, 离心机进行离心, 时间设置 5 min, 转速 1,200r/min, 离心结束后弃去上清液。

(3) 将上述步骤所得细胞加入 1mL 完全培养基, 用 1,000μL 规格的移液器轻轻反复吹打均匀, 然后移入新的细胞培养瓶内, 再往新培养瓶中加入 4mL 含有完

全培养基，最后置入恒温为 5%CO₂、37℃细胞培养箱，24h 后进行细胞观察，3 天后进行细胞换液。

3.3 人源性 AS FLS 细胞的鉴定

成纤维样滑膜细胞根据形态学和免疫荧光法进行鉴定，形态学通过倒置光学显微镜下观察成纤维样滑膜细胞的形态、生长情况。

免疫荧光法的具体步骤如下：

(1) 种板和细胞爬片：将培养瓶中消化后得到细胞以 1×10^5 个/mL 接种于预先放有无菌盖玻片的 6 孔板中，轻轻摇晃 6 孔板以使细胞单层排列、均匀分布，最后置于恒温为 5%CO₂、37℃细胞培养箱中培养 24h。

(2) 细胞固定：向 6 孔板中各加 1mLPBS，用 1,000μL 规格的移液器轻轻冲洗，时间 5min，重复 3 次，弃掉 PBS 冲洗液，然后向每孔中加入 4% 固定液 1mL，室温，时间 0.5hmin。

(3) 细胞通透：固定结束后，向 6 孔板中各加 PBS 缓冲液 1mL，轻轻用手摇晃或者用 1,000μL 规格的移液器轻轻冲洗，冲洗 5min，结束后弃掉 PBS 冲洗液，总共重复 3 次，然后每孔加入 500μL 含有 0.5%TritonX-100 溶液，室温，时间 0.5h。

(4) 细胞封闭：上述细胞通透后，向 6 孔板中各加 PBS 缓冲液 1mL，轻轻用手摇晃或者用 1,000μL 规格的移液器轻轻冲洗，冲洗 5min，结束后弃掉 PBS 冲洗液，总共重复 3 次，将牛血清白蛋白（BSA）用 PBS 稀释成 5%，每孔加入 500μL 5%BSA 溶液，室温，时间 1h。

(5) 一抗孵育：细胞封闭结束后，向 6 孔板中各加 PBS 缓冲液 1mL，轻轻用手摇晃或者用 1,000μL 规格的移液器轻轻冲洗，冲洗 5min，结束后弃掉 PBS 冲洗液，总共重复 3 次，将一抗（Vimentin 蛋白）按说明书用 PBS 稀释成 1:200，每孔加 300μL 一抗，放入 4℃冰箱中过夜。

(6) 二抗孵育：24h 一抗孵育后，向 6 孔板中各加 PBS 缓冲液 1mL，轻轻用手摇晃或者用 1,000μL 规格的移液器轻轻冲洗，冲洗 5min，结束后弃掉 PBS 冲洗液，总共重复 3 次，按说明书将二抗稀释为 1:400，每孔加 300μL，室温暗光放置 1h。

(7) 观察并拍照：向 6 孔板中各加 1mLPBS，用 1,000μL 规格的移液器轻轻冲

洗, 时间 5min, 重复 3 次, 弃掉 PBS 冲洗液, 在暗光下向每孔加 200 μ L DAPI, 避光孵育 20min, 然后向 6 孔板中各加 1mL PBS, 用 1,000 μ L 规格的移液器轻轻冲洗, 暗光加入适量抗荧光衰减剂, 加入后即可在置于倒置荧光显微镜下进行观察并拍照记录和分析。

3.4 LPS 诱导人源性 AS FLS 细胞炎症反应构建体外 AS 模型浓度和时间的筛选

根据文献报道^[154-157]构建体外 AS 模型。本研究采用 LPS 诱导人源性 AS FLS 细胞以构建体外 AS 模型。实验步骤如下:

(1) 种板: 从 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中取出培养瓶置于无菌的超净工作台, 点好酒精后, 弃掉培养瓶中的细胞完全培养基, 然后向培养瓶中加入 1mL 的 PBS 缓冲液, 用 1,000 μ L 规格的移液器轻轻冲洗, 重复 3 次, 弃掉 PBS 冲洗液, 含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶消化细胞, 再用移液器轻轻反复吹打, 吹打 2min 后, 在倒置显微镜下进行观察当有大量贴壁的细胞变成游离的圆形细胞后, 立即向其中加入 3mL 完全培养基以终止消化, 用移液器轻轻反复吹打均匀, 再用细胞计数板将细胞悬液的密度控制为 1×10^5 个/mL, 并且以 100 μ L/孔的体积接种于无菌的 96 孔板, 并置于恒温为 5%CO₂、37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中孵育过夜。

(2) 分组: 分别设置 0.1 μ g/mL、1 μ g/mL、10 μ g/mL LPS 浓度组和空白组。每孔设置 3 个复孔。

(3) 干预: 次日弃掉每孔细胞原液, 并观察细胞贴壁后, 每孔加入不同浓度 LPS 溶液 100 μ L, 然后置入恒温为 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 细胞培养箱过夜, 孵育时间分别设置为 12、24、48h。

(4) 检测: 干预结束后, 收集每孔中上清液用来测得各组 IL-6、TNF- α 的含量水平, 选择含量最高的一组作为下一步研究 LPS 诱导人源性 AS FLS 细胞炎症反应的干预浓度和时间。

3.5 CCK-8 法检测黄连提取物 BBR 对体外 AS FLS 活性的影响

(1) 标记: 取 3 个无菌的 96 孔板, 用标记笔分别标记为 24h、48h、72h。

(2) 分组: 3 个无菌的 96 孔板分别设对照组与不同浓度的 BBR 干预组, 设置为对照组 (只含有完全培养基, 不含细胞)、0 μ mol/L、40 μ mol/L、80 μ mol/L、120 μ mol/L、160 μ mol/L、200 μ mol/L、240 μ mol/L、300 μ mol/L 浓度组, 每组设置 5 个平行孔。

(3) 种板: 在 BBR 处理组每孔中接种第 3 代人源性 ASFLS 细胞悬液 $100\mu\text{L}$ 于 96 孔板中, 每孔细胞的密度设置为 1×10^5 个/mL, 将接种有细胞的孔板置入恒温为 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 细胞培养箱中孵育过夜。

(4) 造膜: 24h 后用显微镜观察细胞完全贴壁后, 除对照组外每组每孔加入浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 储存液, 再干预 24h。

(5) 干预: 造膜结束后弃细胞原液, 对照组仍是完全培养基, 其他组相应加入等体积浓度为 $0\mu\text{mol/L}$ 、 $40\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ 、 $120\mu\text{mol/L}$ 、 $160\mu\text{mol/L}$ 、 $200\mu\text{mol/L}$ 、 $240\mu\text{mol/L}$ 、 $300\mu\text{mol/L}$ BBR, 细胞培养箱中孵育 24、48、72h。

(6) 检测: 干预结束后, 每个孔中加入 $10\mu\text{L}$ 的 CCK-8 试剂, 将 96 孔板放置于 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 细胞培养箱中避光孵育 2h, 为防治影响吸光度的读数, 在操作过程中避免生成气泡, 轻轻操作, 使用酶标仪在 450nm 处测定每孔的吸光度值并计算分析。

3.6 人源性 AS FLS 细胞的分组及干预

将分离得到的人源性 AS FLS 细胞转移至完全培养基(包括 DMEM, $10\%\text{FBS}$, 1% 青-链霉素)中进行培养, 并放置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下的培养箱中进行孵育。细胞分组待细胞传至第 3 代后, 为了持续炎症, 提前用 LPS (终浓度为 $1\mu\text{g/mL}$) 刺激的人源性 AS FLS 细胞进行造膜处理, 再用 BBR 干预该细胞。

组别设计如下:

空白组: AS FLS+完全培养基+LPS 干预。

黄连提取物 BBR 高剂量组: $200\mu\text{mol/L}$ BBR+AS FLS+培养基+LPS 干预。

黄连提取物 BBR 中剂量组: $120\mu\text{mol/L}$ BBR+AS FLS+完全培养基+LPS 干预。

黄连提取物 BBR 低剂量组: $80\mu\text{mol/L}$ BBR+AS FLS+完全培养基+LPS 干预。

3.7 CCK-8 法检测黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞活力的影响

实验步骤: 在无菌的 96 孔板中接种以密度为 1×10^5 个/mL 的细胞, 并将 96 孔板放置于培养箱内培养 24h。根据“3.6”项下分组给予药物干预 24、48 和 72h。每个处理组设置 5 个平行孔。干预结束后, 每个孔中加入 $10\mu\text{L}$ 的 CCK-8 试剂, 并将 96 孔板放置于 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C 培养箱中避光孵育 2h, 使用酶标仪在 450nm 处测定每孔的吸光度值并分析计算。

3.8 倒置光学显微镜观察黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞形态的影响

实验步骤：取第 3 代细胞，当人源性 ASFLS 细胞的生长密度达到 95%以上时，在无菌的 6 孔板中接种以密度为 1×10^5 个/mL 的细胞，并将 6 孔板置于在 5% CO_2 、37℃培养箱中培养 24h。根据“3.6”项下分组给予药物干预，干预结束后，通过倒置光学显微镜观察和拍照各组中 AS FLS 细胞的形态变化。

3.9 平板克隆形成实验观察黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞增殖能力的影响

(1) 种板：取第 3 代细胞，当人源性 AS FLS 细胞的生长密度达到 95%以上时，在无菌的 6 孔板中接种以密度为 1×10^3 个/mL 的细胞，并将 6 孔板置于在 5% CO_2 、37℃培养箱中培养 24h。

(2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(3) 冲洗：干预结束后，弃细胞培养液，同时，用 PBS 轻轻冲洗。冲洗 2 次后，加入新鲜的完全培养基。待细胞培养至 2 周后，弃除原培养基，再用 PBS 轻轻冲洗细胞 2 次。

(4) 固定：冲洗结束后，加入预冷的 4%固定液进行固定，固定时间约 15min。

(5) 染色：固定结束后再用 PBS 清洗细胞 2 次，每孔加入 0.1%结晶紫染液进行染色，染色时间为 30min，用流水冲洗染色的细胞，并将孔板倒置晒干。

(6) 观察：通过倒置光学显微镜进行观察和统计每组的细胞簇团。

3.10 Calcein/PI 染色实验观察黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞活力的影响

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(3) 冲洗：待 AS FLS 细胞干预结束后，弃细胞培养液，同时，用 PBS 轻轻冲洗细胞 2 次。

(4) 染色：每孔加入 200 μL Calcein/PI 染色工作液，并将孔板放置于 37℃、5% CO_2 培养箱中避光孵育 15min。

(5) 观察：通过倒置荧光显微镜观察和拍照各组中 AS FLS 细胞的情况。

3.11 Hoechst33342 染色实验观察黄连提取物 BBR 对 AS FLS 细胞凋亡的影响

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(3) 冲洗：实验步骤同“3.10”。

(4) 固定：冲洗结束后，加入 4% 固定液固定细胞，固定时间为 20min。

(5) 染色：用 PBS 清洗细胞 2 次，在暗光下加入 500 μ L Hoechst33342 工作液进行染色，染色时间约为 30min，染色结束后用 PBS 轻轻冲洗细胞，总共冲洗 3 次，每次时间为 5min，最后每孔加入适量 PBS 溶液。

(6) 观察：在倒置荧光显微镜下观察和拍照各组染色细胞的变化。

3.12 Annexin-V/PI 流式细胞术检测黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞凋亡的影响

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(3) 冲洗：实验步骤同“3.10”。

(4) 离心：冲洗结束后，加入适量不含 EDTA 的胰蛋白酶进行消化，将其收集到 50mL 离心管中，加入适量 PBS 进行 1,200r/min 离心、离心时长 5min，弃去 PBS 液体。

(5) 冲洗：再用 1 $\times$ Loadingbuffer 试剂冲洗细胞，冲洗 2 次，每次 3min。

(6) 染色：冲洗结束后，在暗光下加入 5 μ L AV 染液进行染色，染色时长为 30min。

(7) 冲洗：待染色结束后，用 PBS 轻轻冲洗细胞 2 次。

(8) 染色：同时在暗光下再加入 5 μ L 的 PI 染液再次染色，使用尼龙目筛网过滤 ASFLS 细胞悬液。

(9) 记录分析：待过滤结束后，使用流式细胞术仪分析结果并记录。

3.13 流式细胞术检测黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞周期的影响

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(3) 冲洗：实验步骤同“3.10”。

(4) 固定：冲洗结束后，加入 4% 固定液固定细胞，固定时间为 20min。

(5) 冲洗：实验步骤同“3.10”。

(6) 染色：冲洗结束后，加入 100 μ L RnaseA 染液进行染色，室温避光孵育时

间为 30min。

(7) 冲洗：实验步骤同“3.10”。

(8) 染色：冲洗结束后，加入 400 μ LPI 染液进行染色，并在温度为 4℃冰箱中避光孵育 10min，染色结束后，通过尼龙目筛过滤细胞悬液。

(9) 观察分析：通过流式细胞仪分析结果和记录。

3.14 Transwell 小室实验检测黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞侵袭能力的影响

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(3) 冲洗：实验步骤同“3.10”。将细胞浓度调整为 1×10^5 个/mL 备用。

(4) 孵育：在制备好 Transwell 小室中，分为上室和下室，上室滴加不含 FBS 的细胞悬液 200 μ L，下室加入 800 μ L 含有 20%FBS 的完全培养基，置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 72h。

(5) 固定：待孵育结束后，先用 4%固定液固定细胞 30min。

(6) 冲洗：固定结束后用 PBS 轻轻冲洗 3 次，每次 3min。

(7) 染色：然后每孔加入 0.1%结晶紫染液进行染色，染色时间 30min，用流水冲洗染色的细胞，并将孔板倒置晒干。

(8) 观察：通过倒置光学显微镜进行观察和拍照。

3.15 划痕实验检测黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞迁移能力的影响

(1) 划线：在 6 孔板底面，用标记笔顺直尺画三条线作为标记线。

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(3) 划痕：当人源性 AS FLS 细胞的生长密度达到 95%以上时，用 200 μ L 规格的枪头垂直于孔板由上而下地划线，使划痕与标记线呈直角相交。

(4) 冲洗：实验步骤同“3.10”，轻轻冲洗。

(5) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。

(6) 观察：通过倒置光学显微镜观察划痕位置的变化并拍照记录。

3.16 ELISA 法检测黄连提取物 BBR 对人源性 AS FLS 细胞上清液中 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 含量水平的影响

ELISA 法检测遵循试剂盒的说明书进行操作。

具体操作步骤如下：

- (1) 种板：实验步骤同“3.9”。
- (2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。
- (3) 冲洗：实验步骤同“3.10”。
- (4) 收集上清液：收集 6 孔板中的培养上清液，离心机 1,000r/min 离心 5min，轻轻吸取细胞上清液。
- (5) 在包被 96 孔板中用标记笔标记出 1 至 5 号标准孔，每个标准孔设 3 个复孔，遵循说明书进行标准品的浓度稀释，将已稀释好的标准品按照标记的 1 至 5 号标准孔精确加样 50 μ L。
- (6) 在包被 96 孔板中标记出各组样品孔，同样，每组样品孔也设 3 个复孔，在各组样品孔中先加样品稀释液 40 μ L，再加入 10 μ L 待测上清液样品（样品最终稀释度为 5 倍），将样品尽量加在酶标板底部。
- (7) 温育：包被 96 孔板用封板膜封好，然后放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中暗光温育 0.5h。
- (8) 洗涤：待温育结束后，轻轻揭掉包被 96 孔板上的封板膜，将每孔的液体丢到烧瓶中，并充分甩干包被 96 孔板，然后用按照比例配制好的洗涤液清洗各孔，静置 0.5min 后弃去，拍干，重复 5 次，洗涤结束。
- (9) 除空白孔外，在上述每孔中加入酶标试剂 50 μ L 后再次温育操作同（7），洗涤操作同（8）。
- (10) 显色：每孔中先加入 50 μ L 的显色剂 A 50 μ L，然再加 50 μ L 显色试剂 B，置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中暗光显色 10min。
- (11) 终止：每个孔中包括空白孔各加 50 μ L 的终止液终止反应。
- (12) 分析：待终止反应时间 15min 后，打开酶标仪，并在 450nm 波长下测量各孔吸光度值。

3.17 Western Blotting 检测 Bax、Bcl-2、Cleaved-caspase-3、N-cadherin、E-cadherin、IL-17、IL-23、p-JNK、p-ERK1/2 蛋白表达

- (1) 种板：实验步骤同“3.9”。
- (2) 根据“3.6”项下分组给予药物干预。
- (3) 冲洗：实验步骤同“3.10”。

(4) 提取蛋白: 用 1.5mL 规格的 EP 管收集培育好的细胞, 并且在其中加入 500 μ L 高效 RIPA 细胞快速裂解液, 将 EP 管置于冰上进行裂解。细胞被裂解 20min 之后, 采用 4 $^{\circ}$ C 离心机进行离心, 5,000r/min, 15min。用新的 1.5mL 规格的 EP 管收集各组的上清液。

(5) 蛋白浓度测定: 将蛋白样品搜集起来, 同时借助 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对各组的蛋白浓度进行测量, 并根据公式添加适量的 PBS 和蛋白上样缓冲液, 将蛋白样品放置于 99 $^{\circ}$ C 水浴锅中加热 10min, 待蛋白样品在室温中冷却后放置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

(6) 制备 SDS-PAGE 凝胶: 参照目标蛋白分子量的多少来制作出与之相符合的 SDS-PAGE 凝胶。

(7) 上样电泳: 将各组蛋白样品垂直加入 SDS-PAGE 凝胶中的泳道内, 同时在泳道的两旁添加 3 μ L Marker, 在电泳槽中灌入预冷的电泳液, 在操作的时候其需要的电压是 100 V, 持续时间是 2h。

(8) 转膜: 当蛋白样品跑至 SDS-PAGE 凝胶的底部时就将电泳停止, 并将 SDS-PAGE 凝胶和 PVDF 膜放置于转膜槽中开始转膜操作, 采用 300mA 恒流进行电转, 持续时间为 90min。

(9) 封闭: 将附着有蛋白印迹的 PVDF 膜用含有 5% 脱脂奶粉的 1 $\times$ TBST 溶液浸泡, 并且在摇床上慢慢地摇晃, 保持时间为 2h。

(10) 一抗孵育: 用 1 $\times$ TBST 清洗 PVDF 膜 2 次, 15min/次。采用抗体稀释液对一抗进行稀释 (1:1,000, 该稀释比例是根据一抗说明书进行), 将 PVDF 膜浸泡于相应的一抗溶液中, 并在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜孵育。

(11) 二抗孵育: 按照二抗说明书中提供的稀释比例进行操作 (1:5,000), 采用抗体稀释液对二抗进行稀释。当一抗孵育结束以后, 将一抗回收至 10mL 规格的离心管中, 1 $\times$ TBST 清洗 PVDF 膜 2 次, 15min/次。然后将 PVDF 膜浸泡于稀释完成的二抗溶液中, 采用摇床在室温条件下孵育 2h。

(12) 洗涤: 当二抗孵育结束以后, 将二抗回收至 50mL 规格的离心管中, 用 1 $\times$ TBST 清洗 PVDF 膜 2 次, 15min/次。

(13) 显影曝光: 将 ECL 化学发光特超敏试剂盒中的 A 液与 B 液以 1:1 的比例配制显影液, 用移液枪吸取适量的显影液, 并将其均匀地滴加至 PVDF 膜上,

采用凝胶成像系统进行曝光操作。

(14) 观察：观察各组蛋白的变化并保存记录。

3.18 茜红素染色实验观察人源性 AS FLS 细胞成骨分化程度的影响

(1) 种板：实验步骤同“3.9”。

(2) 成骨诱导：根据文献记载，待细胞的生长密度达到 80-90%时，将原培养液更换成 Xvivo Stempro 培养基，并且与 50 μ M 抗坏血酸、10mM 糖磷酸盐和 100nM 地塞米松一起培养^[158]。

(3) 药物干预：在 BBR (0、80、120、200 μ M) 和 IL-17/IL-23 (10 ng/mL) 信号轴的存在下，人源性 AS FLS 细胞被持续分化 21 日。

(4) 换液：分化期间，6 孔板中的液体每周更新两次。

(5) 染色：待人源性 AS FLS 细胞的培养时间达到后，将 6 孔板中的液体吸除，用 PBS 清洗细胞 2 次，用 4%固定液固定细胞 15min，并用 2%茜红素染液对细胞进行染色。

(6) 观察：通过倒置光学显微镜观察各组染色细胞的变化并拍照记录。

3.19 分子对接实验

应用 Autodock 和 Chimera 软件预测 BBR 的直接靶分子，分子结构及相互作用位点，观察 BBR 与 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 、p-JNK、p-ERK1/2、K-ras, c-Raf, P-p38 结合能力，以证实 BBR 的直接靶分子。

3.20 统计学分析

应用 SPSS25.0 软件对结果进行统计学分析，检测数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。组间均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较均采用 *LSD-t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义， $P<0.01$ 表示组间差异具有显著性。

4 实验结果

4.1 人源性 AS FLS 细胞的观察

细胞提取后，隔 3 天观察一下并更换培养基，当原代细胞培养 4 天后，采用显微镜进行观察到少量细胞贴壁，如图 4-1A、B。当原代细胞培养 8 天后，能观察到培养瓶底部有大量细胞，如图 4-1C；在光学显微镜下观察时，AS FLS 细胞

体积相对较大，呈梭形。第 3 代 AS FLS 细胞生长良好、胞核清晰、形态一致可见，如图 4-1D、E、F。

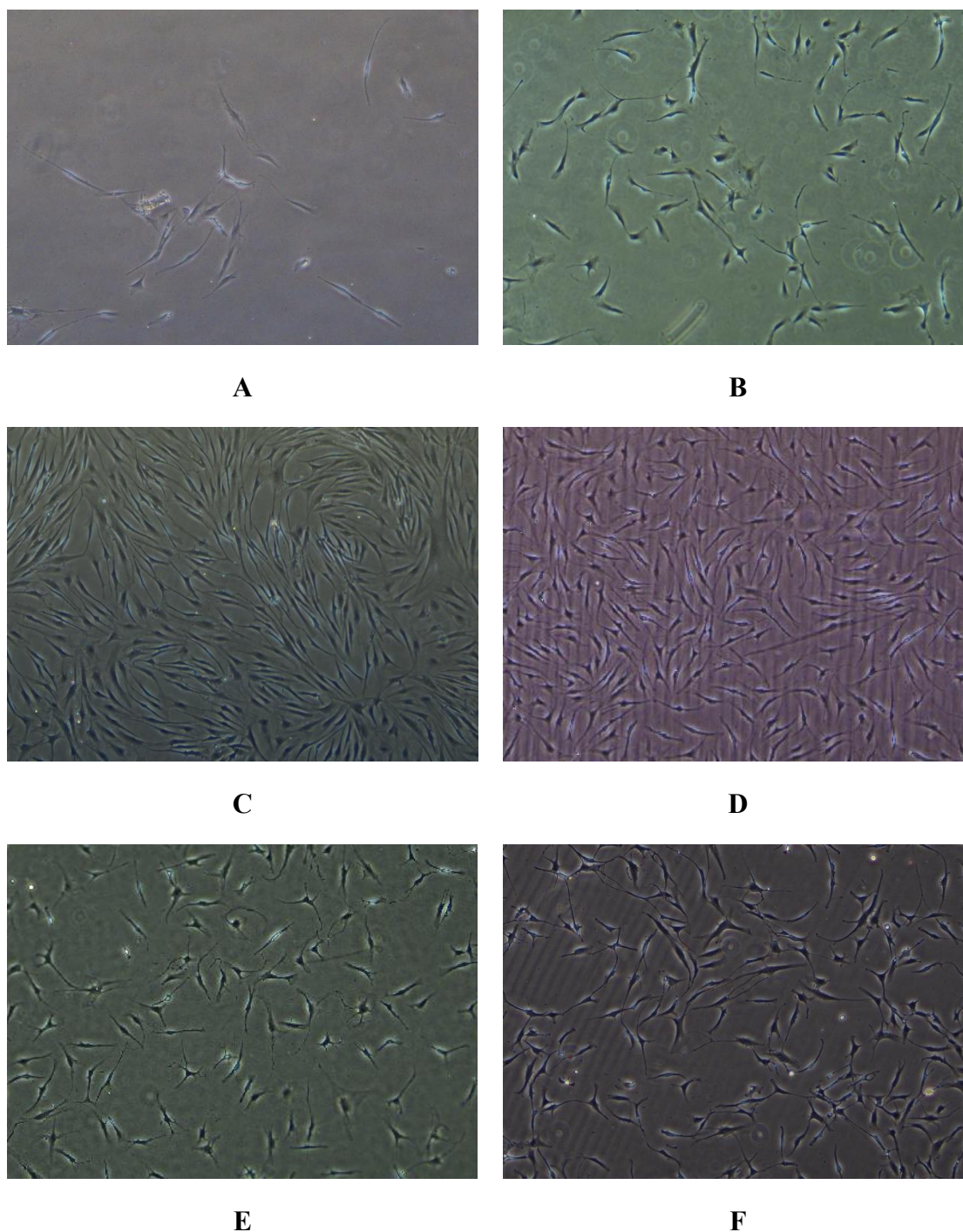


图 4-1 源性 AS FLS 细胞，倒置显微镜下观察（图 A、B、C、D 放大倍镜为 $\times 40$ ；E、F 放大倍镜为 $\times 100$ ）。

4.2 人源性 AS FLS 细胞的鉴定

本实验对通过形态学和免疫荧光法对 AS 患者的滑膜组织中获得 FLS 细胞

进行鉴定。在光学显微镜下，细胞体积相对较大，以梭形的形式呈现，第3代 AS FLS 细胞生长良好、胞核清晰、形态一致可见，如图 4-2A 所示。经 Vimentin 蛋白免疫荧光染色后呈阳性，即经 DAPI 染色后细胞质为绿色荧光、细胞核为蓝色荧光，（见 4-2B、C 所示），待图片重合后蓝色荧光位于绿色荧光内（见 4-2D 所示）。经上述鉴定，证明提取的滑膜细胞是人源性 AS FLS 细胞。

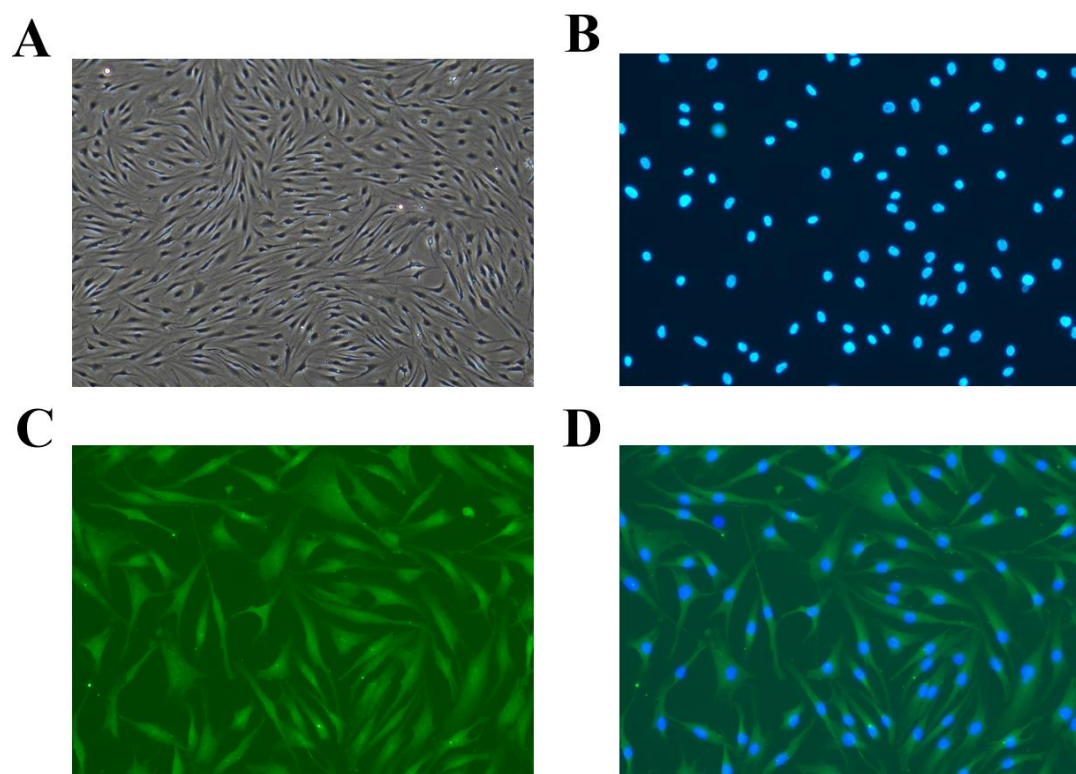


图 4-2 通过波形蛋白免疫荧光鉴定人源性 AS FLS 细胞（放大倍镜， $\times 200$ ）

A: 倒置显微镜观察人源性 AS FLS 细胞的形态；B: DAPI 染色观察人源性 AS FLS 细胞的细胞核；C: 用 Vimentin 蛋白免疫荧光法观察人源性 AS FLS 细胞的细胞质；D: 经重合后可见蓝色荧光位于绿色荧光内。

4.3 黄连提取物 BBR 抑制 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞的增殖

首先，采用 ELISA 法评估了在 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中炎症因子的影响。结果如图 4-3A 和图 4-3B 所示，LPS 刺激促进人源性 AS FLS 细胞中炎症因子的表达，有统计学意义（ $P < 0.05$ ），且在时间为 24h，浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 时炎症因子表达水平最高。为了保障细胞中炎症状态的持续，后续实验所用到的细胞均用终浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 进行提前干预。

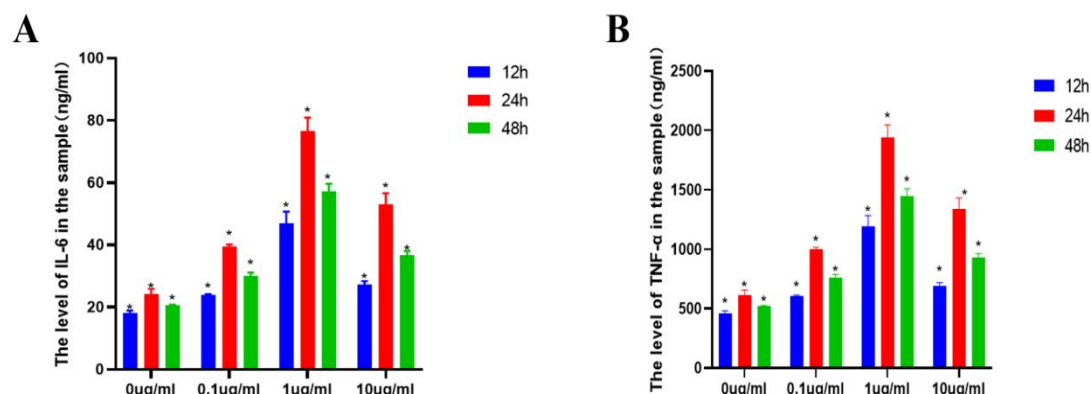
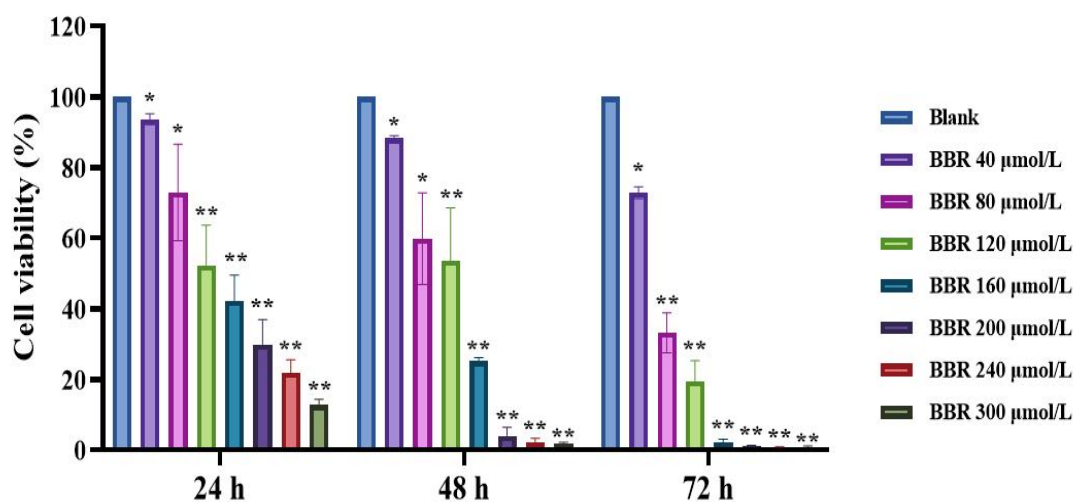


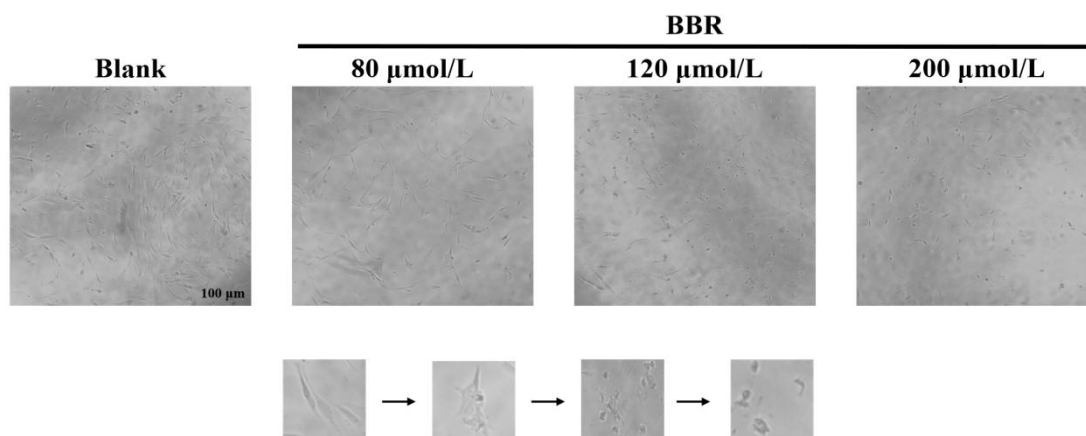
图 4-3 通过 ELISA 检测 LPS 对人源性 AS FLS 细胞中炎症因子的影响。

A: ELISA 法测定 LPS 对 AS FLS 细胞中 IL-6 含量水平的影响, *与空白组比较 $P < 0.05$; B: ELISA 法测定 LPS 对 AS FLS 细胞 TNF- α 含量水平的影响, *与空白组比较 $P < 0.05$ 。

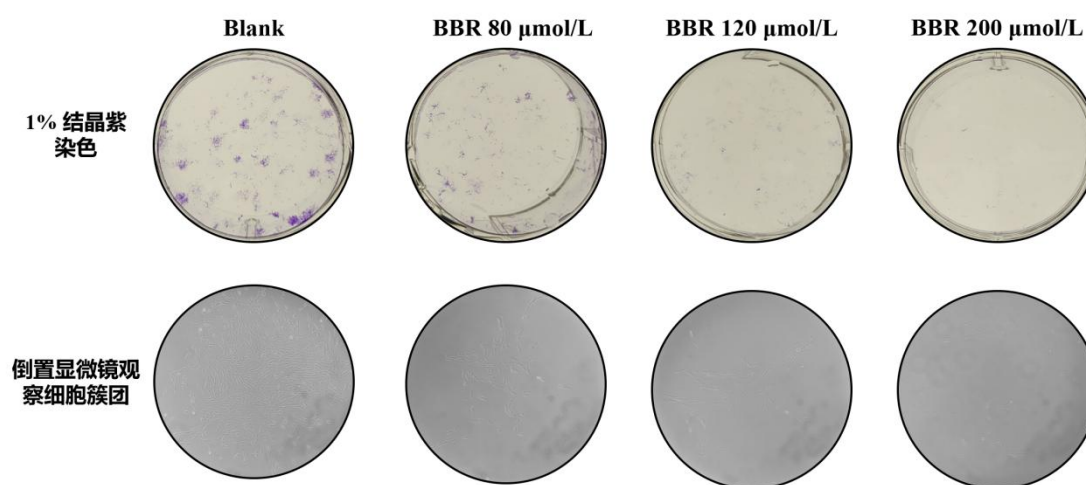
随后, 将 LPS 刺激下的细胞接种在无菌的 96 孔板上, 并用不同浓度的 BBR (0-300 μ mol/L) 分别处理 24、48、72h, 并采用 CCK-8 法评估了不同浓度 BBR 对脂多糖刺激下人源性 AS FLS 细胞增殖能力的影响。结果如图 4-3C 所示, 与空白组相比, BBR 处理组中细胞的存活率随着药物浓度的增加而降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。根据药物的有效性以及 IC_{50} 值, 我们将 BBR 的终浓度确定为 80、120、200 μ mol/L, 并将处理时间选为 24h。为了让结果更有说服力, 我们采用倒置显微镜观察不同浓度 BBR (80、120、200 μ mol/L) 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞生长的影响。结果如 4-3D 所示, 与空白组相比, 经 BBR 处理细胞 24h 后呈剂量依赖性地增加了细胞之间的间隙以及圆形凋亡细胞的数量。同时, 平板克隆形成实验的结果如 4-3E 所示, 与空白组相比, 80、120、200 μ mol/L BBR 处理组的细胞簇团呈剂量依赖性地缩小。总之, 这些结果均表明, BBR 可有效地抑制 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞的增殖能力。



C



D



E

图 4-3 通过 CCK-8 法、倒置显微镜观察和平板克隆形成试验检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性

AS FLS 细胞增殖的影响。C: 用 CCK-8 法检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞增殖的影响, *与空白组相比, $P<0.05$, ** $P<0.01$; D: 用倒置显微镜 (放大倍镜, $\times 100$) 观察 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞增殖的影响; E: 用平板克隆法检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞增殖的影响。

4.4 黄连提取物 BBR 诱导 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞的凋亡

如图 4-4A 所示, 根据细胞 Calcein/PI 染色实验的结果显示, 空白组中, LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞的形态呈现长梭状。然而, 经过 80、120、200 $\mu\text{mol/L}$ BBR 处理细胞 24h 后, 视野中的 AS FLS 细胞开始呈现多边形, 逐渐变成圆形, 圆形为凋亡细胞, 且凋亡细胞的数量呈剂量依赖性地增加。

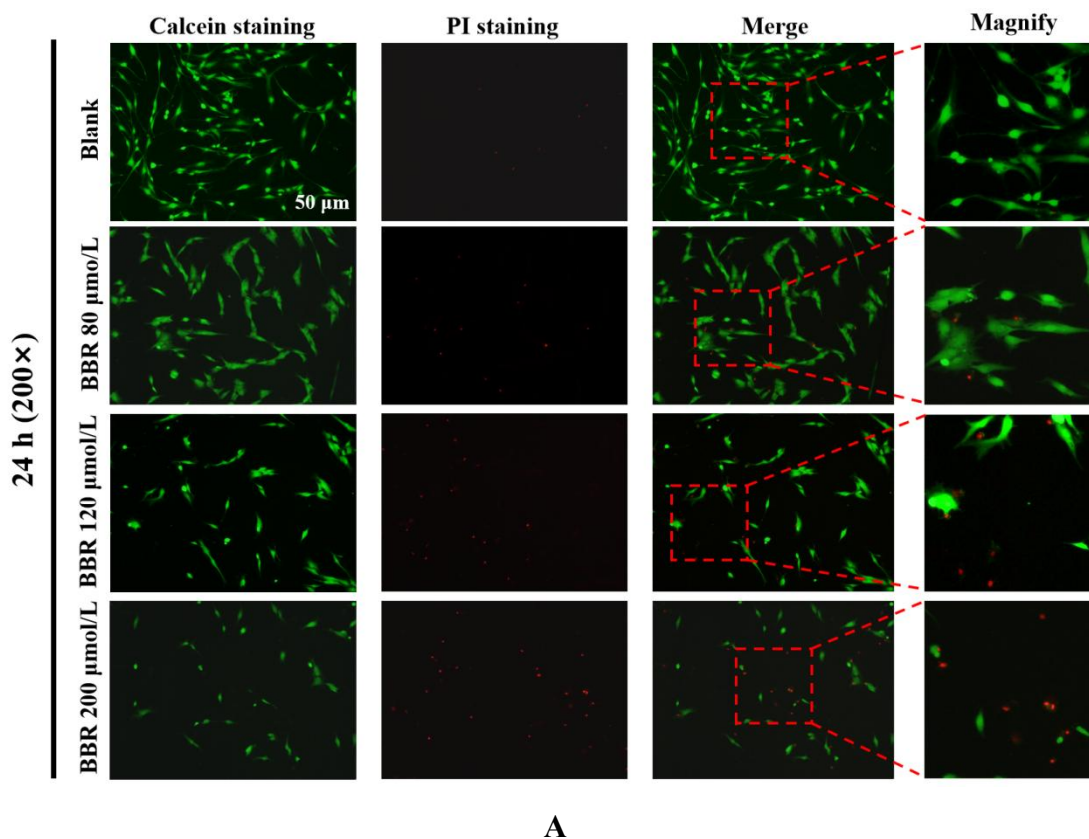


图 4-4A Calcein/PI 染色用于检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞活力的影响 (放大倍镜, $\times 200$)。

核染色凝聚现象是凋亡的经典形态特征之一。通过 Hoechst33342 染色实验观察不同浓度的 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中核染色质状况的影响, 结果如 4-4B 所示, 与空白组比较, 黄连提取物 BBR 处理的 AS FLS 细胞中核染

色质凝聚现象呈浓度依赖性地增多。

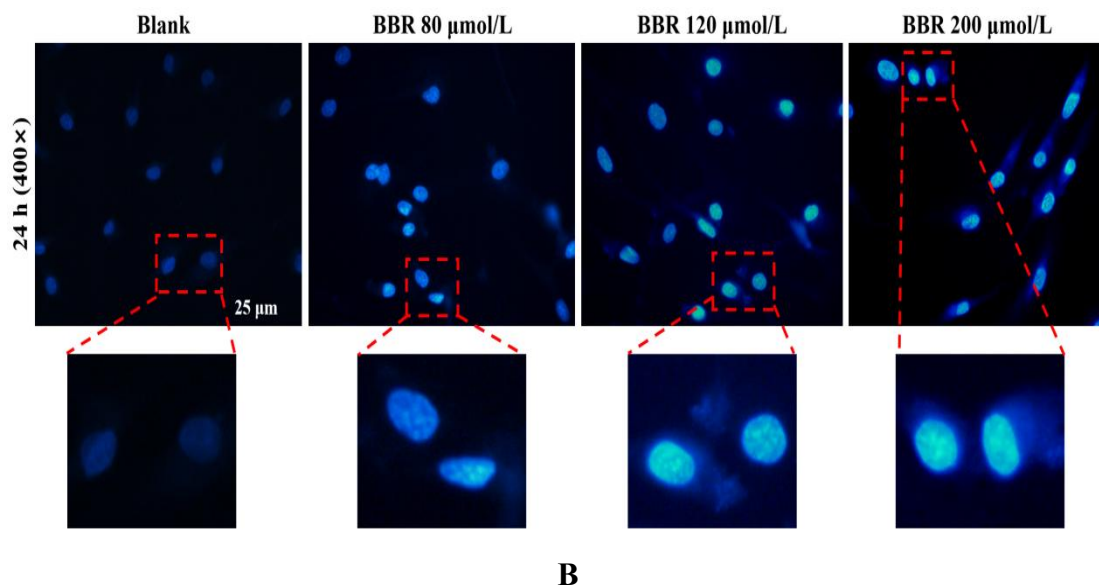


图 4-4B Hoechst33342 染色用于研究 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞核染色质的影响
(放大倍镜, $\times 400$)。

通过流式细胞术的结果如 4-4C 所示, 与空白组相比, LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞经 BBR 处理后, 总凋亡率以浓度依赖性的方式明显增多, 有统计学意义 ($P < 0.05$), 且 80、120、200 $\mu\text{mol/L}$ BBR 处理组中的总凋亡率分别为 16.4 ± 0.95 、 21.2 ± 1.77 、 29.6 ± 0.95 。为了进一步观察 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞周期的影响, 继续采用流式细胞术进行分析。结果如图 4-4D 所示, 与空白组比较, LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞经过不同浓度 BBR 处理 24h 后, S 期的细胞比例呈浓度依赖性地升高, 与此同时, G1 和 G2 期的细胞比例以浓度依赖性的方式降低, 这说明黄连提取物 BBR 处理下 AS FLS 的细胞周期被阻滞在 S 期, 不再分裂, 有统计学意义 ($P < 0.05$)。

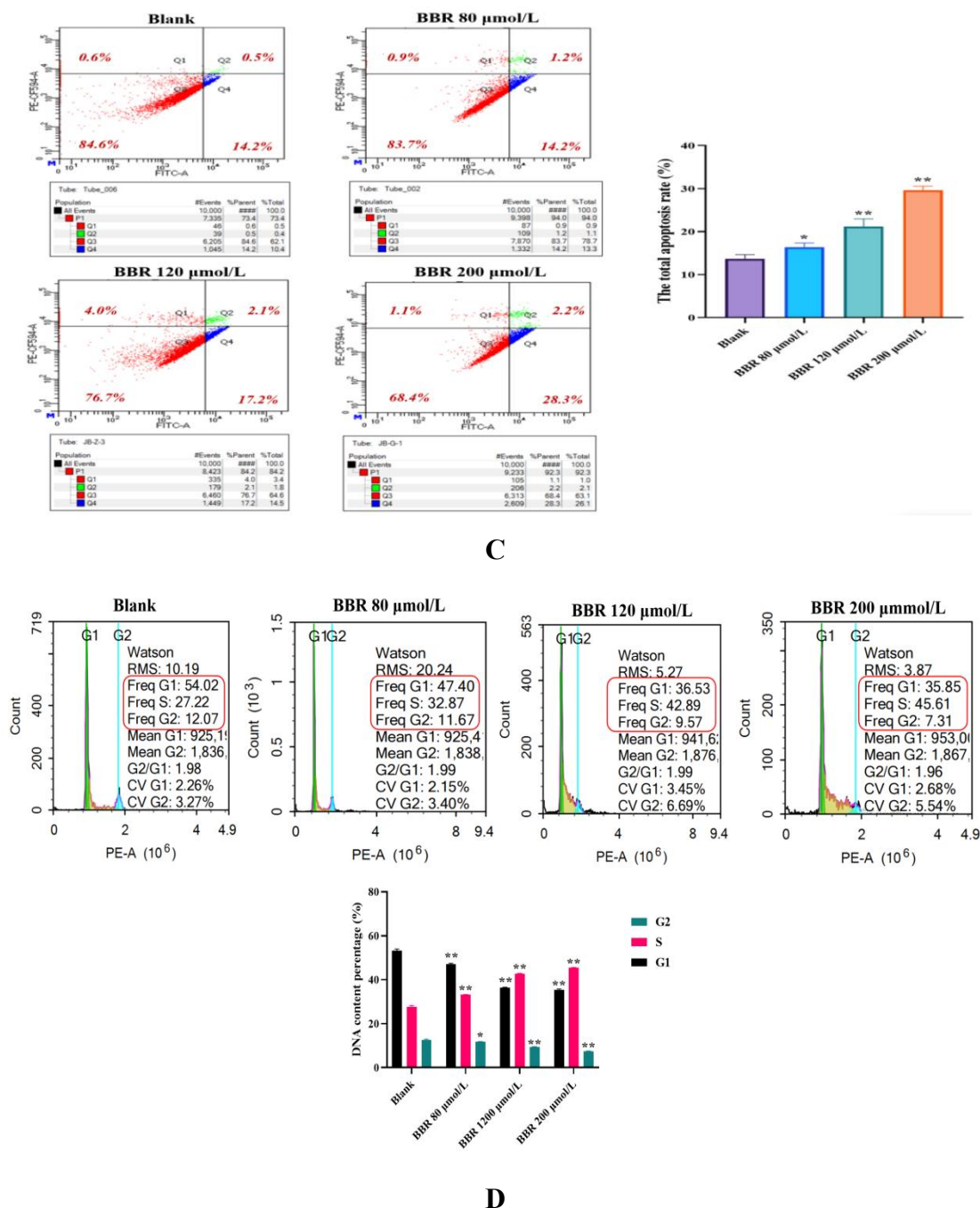


图 4-4C、D 流式细胞仪检测 BBR 对脂多糖刺激的 AS FLS 细胞凋亡及周期的影响, *与空白组相比, $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

4.5 Transwell 小室实验检测黄连提取物 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS-FLS 细胞侵袭能力的影响

与空白组比较, BBR 组 (80、120、200 μmol/L) 中能够穿过 Transwell 小室中 Matrigel 基质胶的 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞数量逐渐减少, 且趋势呈现浓度依赖性。见图 4-5 所示。

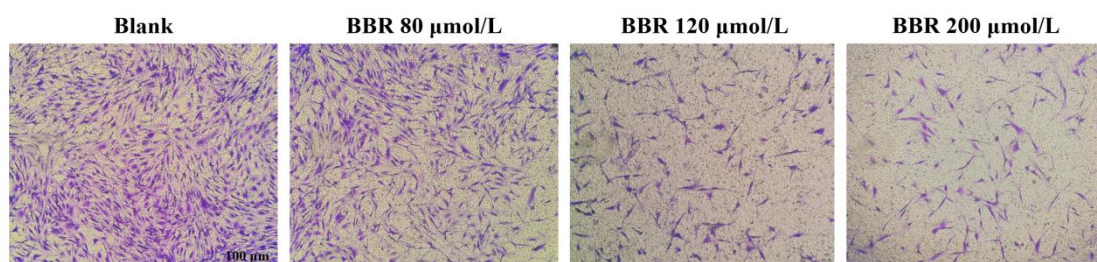


图 4-5 Transwell 小室实验检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS-FLS 细胞侵袭能力的影响（放大倍镜， $\times 100$ ）。

4.6 划痕实验检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞迁移能力的影响

BBR 对 AS FLS 细胞迁移能力的影响与空白组比较，BBR 处理组（80、120、200 $\mu\text{mol/L}$ ）愈合面积均明显增加，且趋势呈现时间和浓度依赖性。见图 4-6 所示。

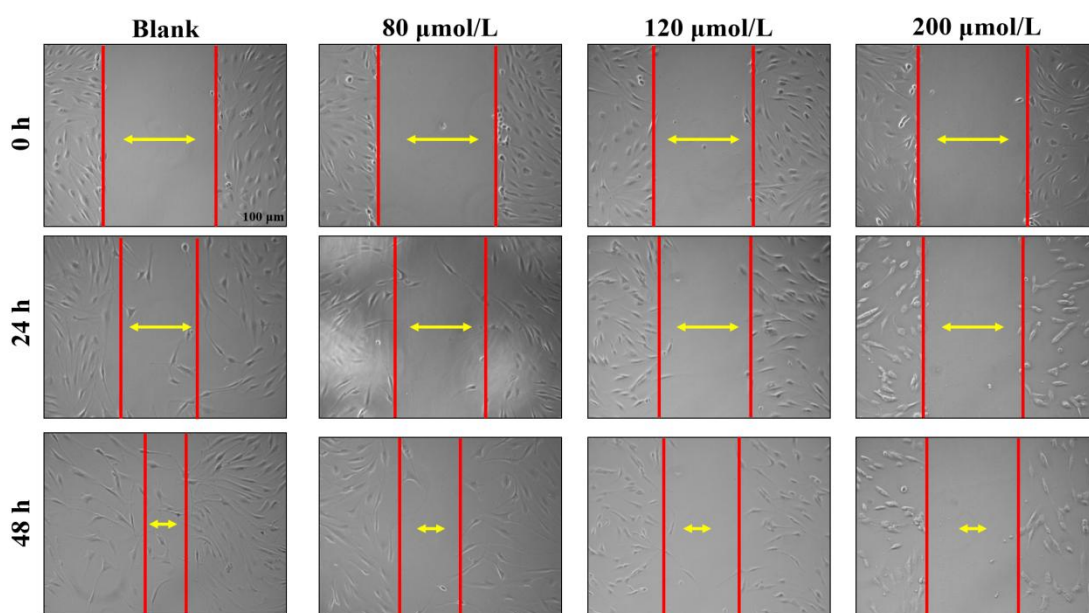


图 4-6 检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞迁移能力影响的划痕实验（放大倍镜， $\times 100$ ）。

4.7 黄连提取物 BBR 抑制 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞的炎症反应

当 AS FLS 受到 LPS 刺激后，空白组中的促炎因子（包括 IL17、IL-23、IL-6 和 TNF- α ）的含量均呈现高水平。当用不同浓度的 BBR 干预处理后，与空白组相比，药物处理组中 IL-17、IL-23、IL-6 和 TNF- α 的含量呈剂量依赖性地降低，有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。见图 4-7 所示。

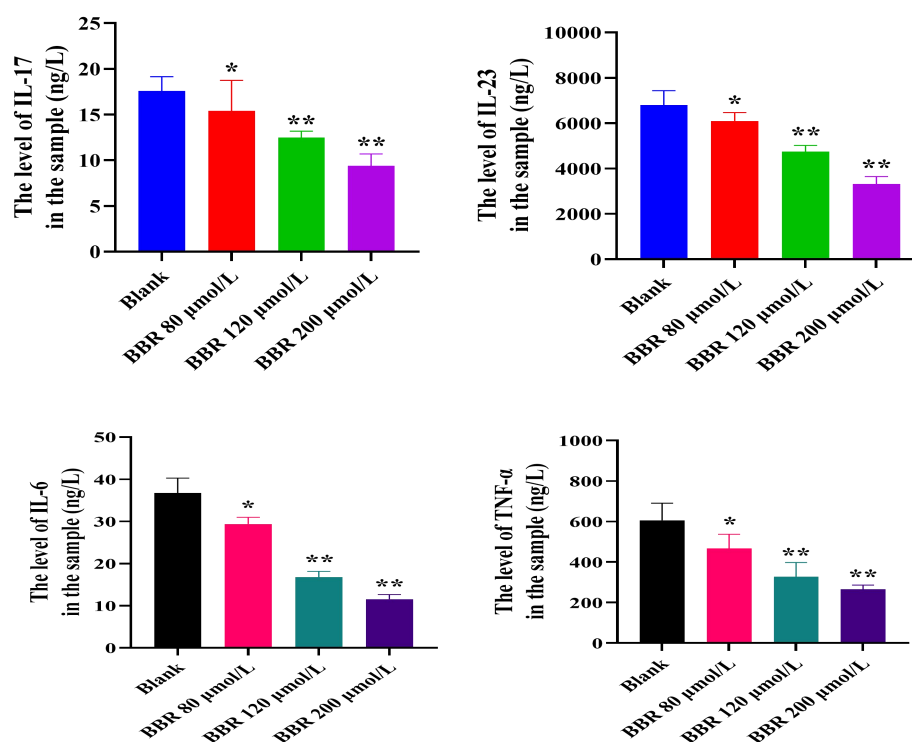


图 4-7 通过 ELISA 法检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中炎症细胞因子的影响，

*与空白组相比， $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

4.8 黄连提取物 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中凋亡相关蛋白表达水平的影响

Western blot 的结果显示，与空白组相比，80、120、200 $\mu\text{mol/L}$ BBR 干预后，细胞中 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白的相对表达量均呈剂量依赖性地升高，有统计学意义 ($P<0.01$)，而 Bcl-2 蛋白的相对表达量呈剂量依赖性地降低，有统计学意义 ($P<0.01$)，见图 4-8 所示。这些蛋白表达的变化说明 BBR 可通过线粒体途径来诱导 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞凋亡，抑制 AS FLS 细胞在脊柱关节部位异常增生，促进细胞凋亡，进而有效地控制 AS 的病变进程。

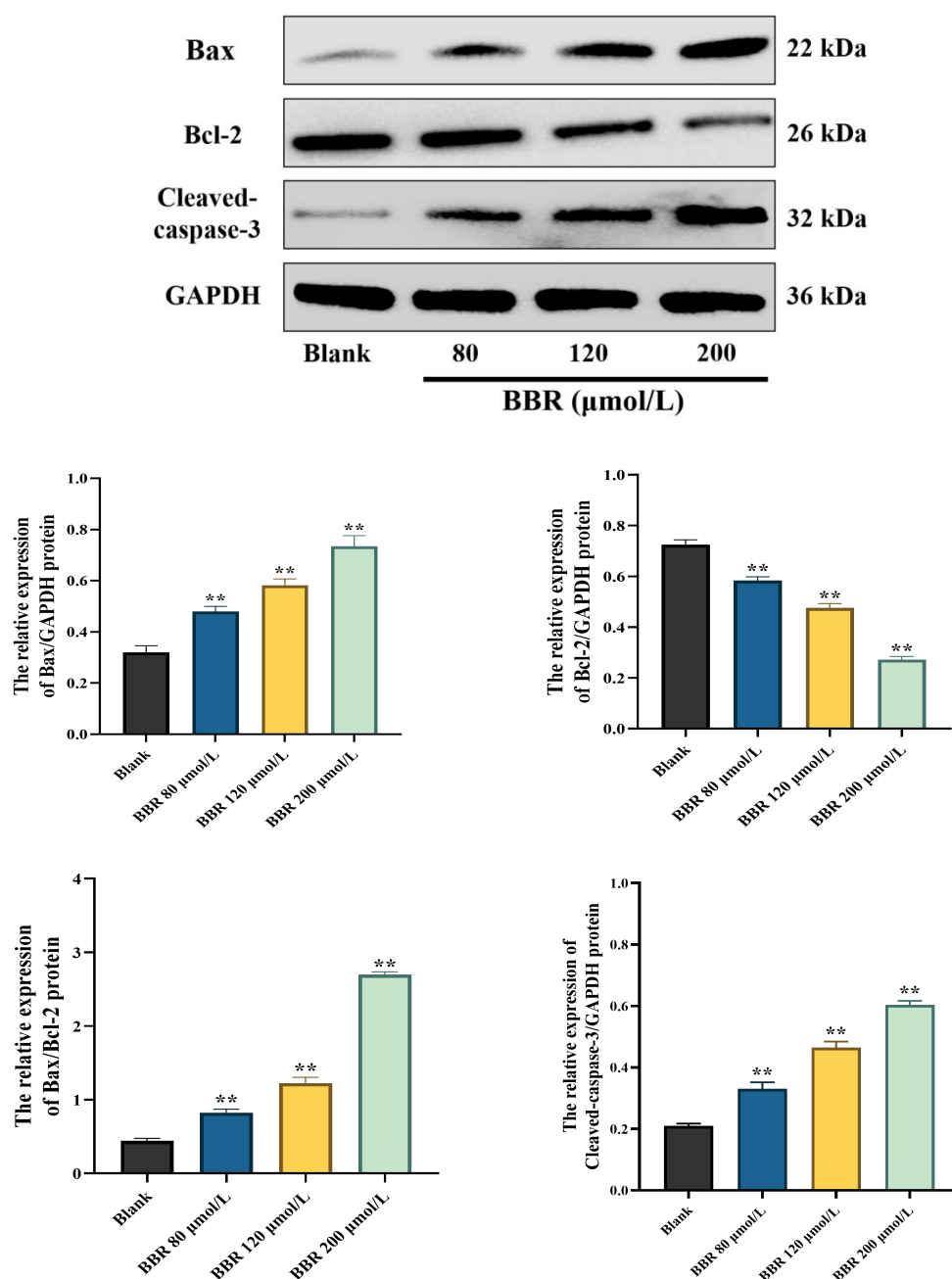


图 4-8 采用 Western blot 法检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中凋亡相关蛋白(包括 Bax、Bcl-2 和 Cleaved-caspase-3) 表达水平的影响, **与空白组相比 $P < 0.01$ 。

4.9 黄连提取物 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中侵袭迁移相关蛋白表达水平的影响

Western blot 的结果显示, 与空白组比较, BBR 组 (80、120、200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中 E-cadherin 蛋白的相对表达量呈剂量依赖性地升高, 有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 N-cadherin 蛋白的相对表达量呈剂量依赖性

地降低, 有统计学意义 ($P<0.01$)。如图 4-9 所示。

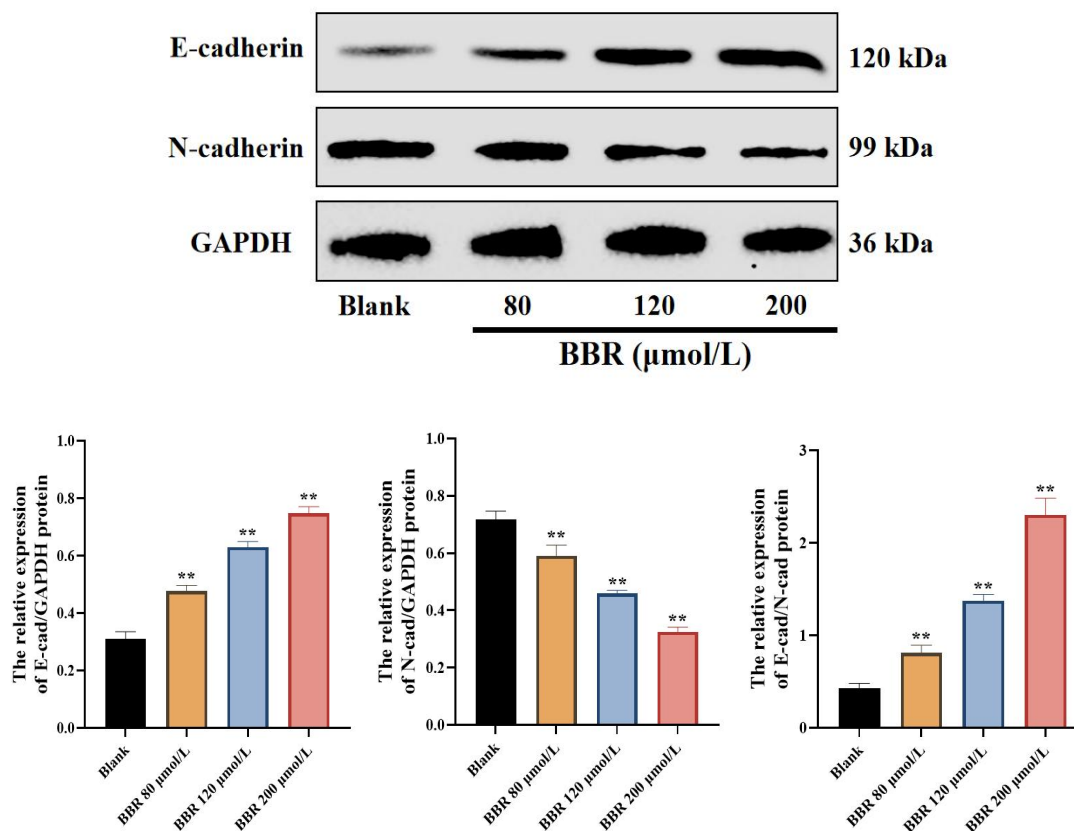
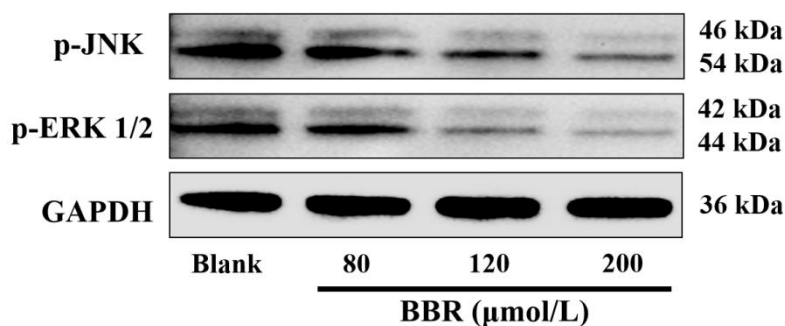


图 4-9 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中侵袭迁移相关蛋白（包括 E-cadherin 和 N-cadherin）表达水平的影响表达的影响, **与空白组相比 $P<0.01$ 。

4.10 黄连提取物 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中炎症蛋白 p-JNK、p-ERK1/2 表达的影响

Western blot 的结果显示, 与空白组相比, 经 80、120、200μmol/LBBR 分别干预处理 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞后, 细胞中 p-JNK、p-ERK1/2 蛋白的表达水平随着 BBR 浓度的增加而降低, 有统计学意义 ($P<0.01$)。见图 4-10 所示。



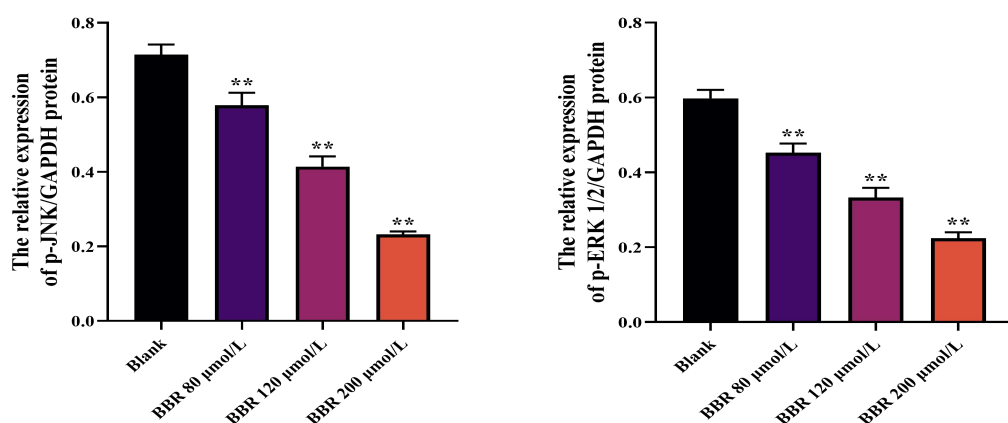


图 4-10 采用 Westernblot 法检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中信号通路相关蛋白（包括 p-JNK 和 p-ERK1/2）表达水平的影响，**与空白组相比 $P<0.01$ 。

4.11 黄连提取物 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中 IL-17、IL-23 通路蛋白表达水平的影响

Western blot 分析显示，与空白组相比，BBR 处理的 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中 IL-17、IL-23 蛋白的相对表达水平均以剂量依赖性的方式降低，有统计学意义 ($P<0.01$)，见图 4-11 所示。

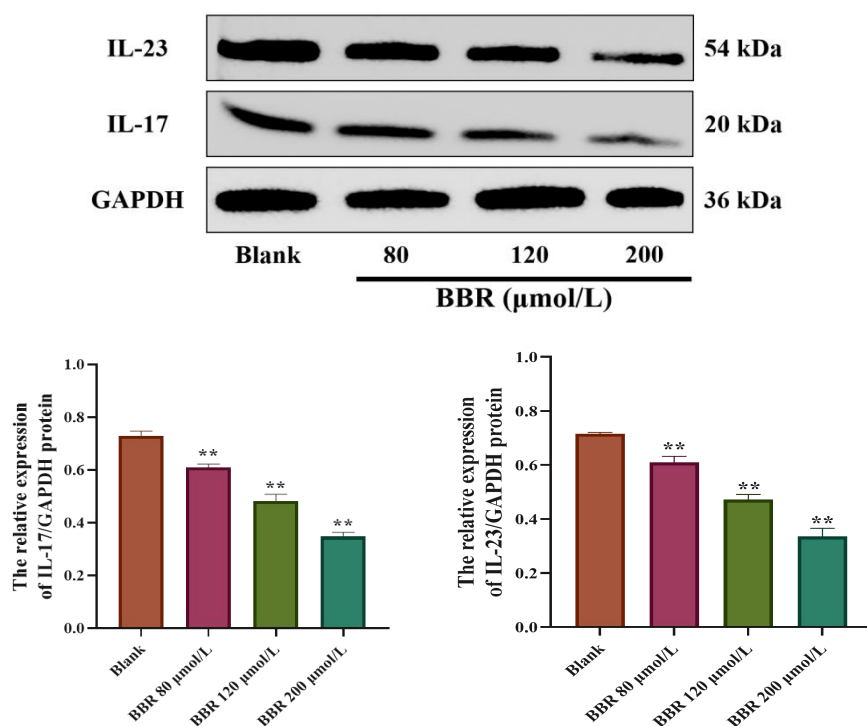


图 4-11 使用 Western blot 法检测 BBR 对 LPS 刺激下人源性 AS FLS 细胞中炎症细胞因子相关蛋白（包括 IL-17 和 IL-23）表达水平的影响，**与空白组相比 $P<0.01$ 。

4.12 黄连提取物 BBR 抑制 IL-17/IL-23 刺激下源性 AS FLS 细胞的成骨分化

鉴于 FLS 细胞可以作为骨前体细胞，并在体外可分化为成骨样细胞^[159]。因此，我们验证了 BBR 是否对源性 AS FLS 细胞成骨分化存在着潜在的影响。基于文献记载^[158]，我们在 Xvivo Stempro 培养基（包括 IL-17/IL-23）中培养源性 AS FLS 细胞，并在 BBR 的干预下分化 21 天。由于矿化是成熟成骨样细胞的一个典型特征，所以我们采用茜素红染色液对细胞进行矿化染色。根据茜素红染色的结果如图 4-12 所示，与空白组相比，BBR 处理组可显著降低茜素红染色的百分比，并以剂量依赖性的方式降低了第 21 天的茜素红染色程度。这些数据暗示了 BBR 可在一定程度上抑制源性 AS FLS 细胞的成骨分化。

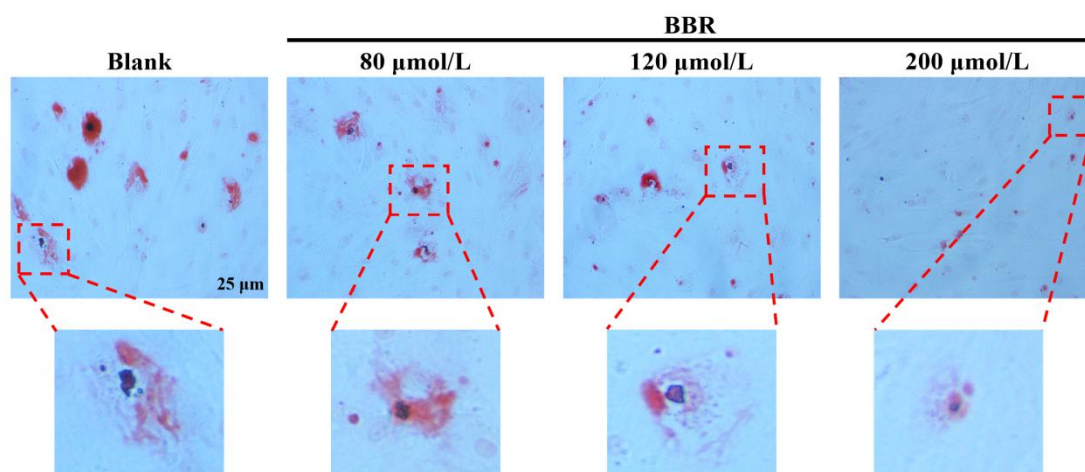


图 4-12 BBR 对 IL-17/IL-23 诱导的源性 AS FLS 细胞成骨分化程度的影响（放大倍镜， $\times 400$ ）。

4.13 分子对接实验

应用 Autodock 和 Chimera 软件预测 BBR 的直接靶分子，分子结构及相互作用位点，观察 BBR 与 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 、p-JNK、p-ERK1/2、K-ras、c-Raf、P-p38 的结合能力，以证实 BBR 的直接靶分子。一般认为，配体与分子结合所需的能量越低，则表示对接就越容易成功。如果结合能值小于 0 千卡/摩尔，则考虑到这些分子可以通过自身结合。结果如图 4-13A、B 所示，BBR 对 IL-23、IL-17、IL-6、TNF- α 、JNK、ERK1/2、MAPK、K-ras、c-Raf 均具有最好的结合能力，为后期得到更多有关小檗碱治疗强直性脊柱炎作用的实验依据。

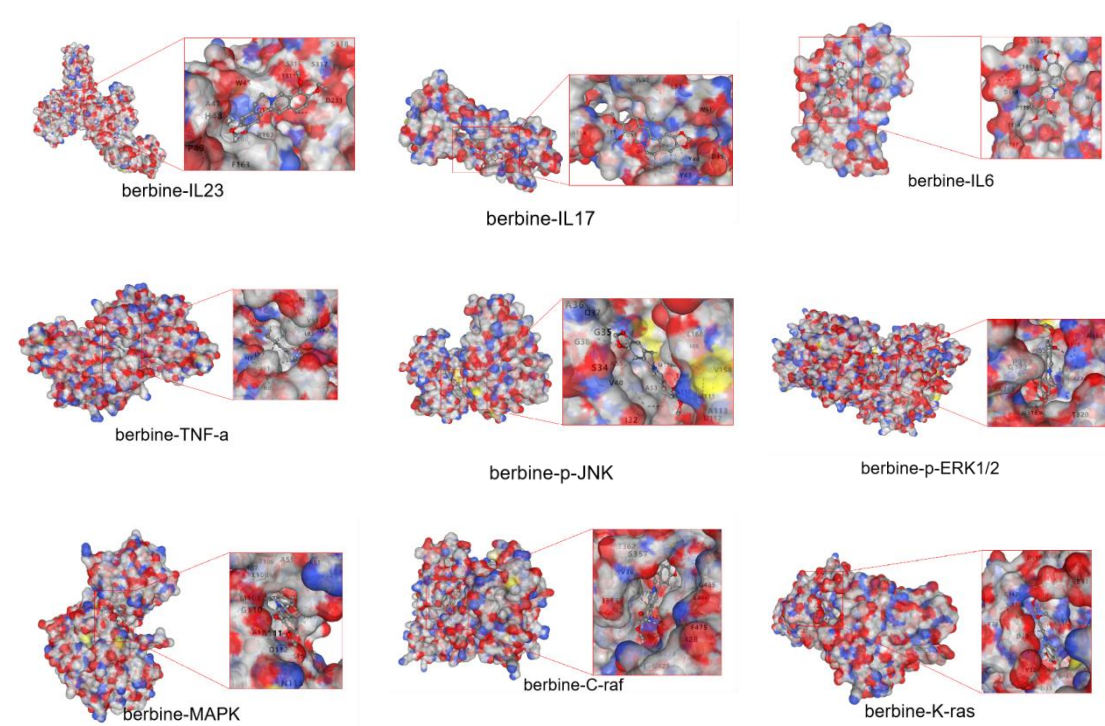


图 4-13A

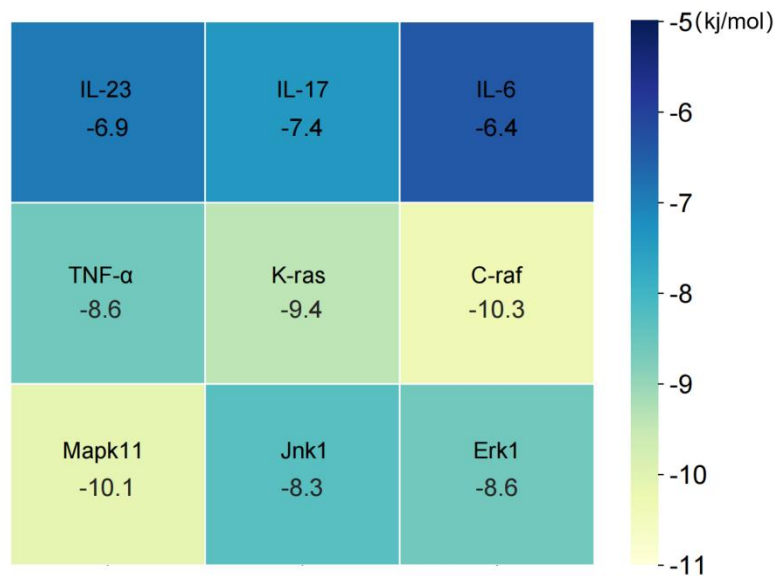


图 4-13B

图 4-13 通过分子对接技术观察 BBR 与 IL-23、IL-17、IL-6、TNF-α、p-JNK、p-ERK1/2、K-ras, c-Raf, P-p38 的结合能力。A: 分子结合可视化图; B: 结合能热图。

5 讨论

5.1 炎症与 AS 关系

炎症反应的发病机制是当细胞受到刺激时,巨噬细胞、单核细胞、T 细胞、B 细胞等炎症细胞被激活并分泌大量的炎症因子(包括肿瘤因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白介素-17 (Interleukin-17, IL-17)、白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β 等),提高滑膜细胞组织的增殖能力,直接或间接地促进 AS 的发病^[133]。炎症反应可包括肠道微生物失调、IL-23/T 辅助细胞 17 (T helper cells 17, Th17) 信号轴等,不仅如此,有些因素可以诱发并加重强直性脊柱炎 (Ankylosing spondylitis, AS) 的炎症反应,包括脊柱的长期受压、工作压力过大及气候的忽冷忽热等都可以加重炎症反应的程度,这也是 AS 发病发展的诱因条件^[134]。AS 被认为是一种慢性免疫性炎性疾病^[130]。AS 关节囊、肌腱、韧带的骨附着点以及周围的滑膜组织容易发生慢性炎症反应,它是发生 AS 的主要病理特征^[131]。研究发现,在炎症细胞因子刺激作用下,脊柱及关节周围的滑膜组织细胞的增殖、合成、胶原基质分泌等活动十分活跃,致使滑膜组织增生并发生炎症反应^[132]。因此,炎症反应在 AS 发病过程中起着不可替代的角色。

临床上,AS 具有炎症、骨质破坏和成骨分化三个典型特征,而炎症反应的加剧是脊椎关节炎骨形成的重要影响因素^[160]。研究表明,促炎细胞因子 (TNF- α 和 IL-17) 可以影响疾病中的炎症表型并加速 FLS 细胞在脊椎关节炎中的成骨分化^[161-162]。尽管成纤维样滑膜细胞 (Fibroblast-like synoviocyte, FLS) 细胞在免疫反应中不是被动的参与者,但它们在炎性细胞因子的产生中发挥着关键性作用,从而使炎症反应在体内持续存在^[163]。然而,慢性的炎症可引发正常基因发生突变,从而使机体增加癌变的风险^[164]。因此,炎症的调控对于疾病的预后是非常有必要的。此外,FLS 细胞产生的 IL-6 可能通过影响白细胞募集、激活和凋亡来调节先天免疫向后天免疫的转换^[165]。既往的体外研究结果表明,BBR 对于类风湿性关节炎患者中的 FLS 细胞具有多种作用,譬如抑制有助于类风湿性关节炎发生和发展的炎性增殖,诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞,抑制白介素-21 (Interleukin-21, IL-21) IL-21/IL-21R 依赖的自噬等,从而缓解类风湿性关节炎动物模型中的疾病进展和严重程度^[42]。值得注意的是,BBR 在某些关节炎的实验模型中显示出良好

的抗炎效果，譬如抑制炎症细胞的滑膜浸润，降低胶原诱导的关节炎和佐剂诱导的关节炎中血液和滑膜中的促炎介质水平^[166]。正如 Dinesh 等人^[167]的研究发现，BBR 可通过浓度依赖性的方式显著减少佐剂诱导的关节炎 FLS 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-23 等炎性细胞因子的释放。除此之外，IL-23/Th17 信号轴还是近年来全球研究 AS 发病机制的焦点。由此可见，IL-23/Th17 信号轴在 AS 的发病机制中扮演着重要的角色。

5.2 FLS 细胞与 AS 关系

AS 是一种病因不明的慢性炎症疾病，病理因素表现为脊柱关节滑膜增生增厚，主要特征是慢性炎症和异位骨化^[1]。现代研究发现，FLS 细胞在 AS 发病及病程进展中起着关键性作用，其主要表现是 FLS 细胞的过度增殖和凋亡异常^[2]。此外，在 AS 产生炎症反应的过程中，FLS 细胞可释放出大量的细胞促炎因子，从而导致滑膜细胞的增生异常以及炎性细胞因子的浸润，进而侵蚀关节软骨及脊柱骨骼等，最终导致脊柱关节侵蚀破坏、硬化和畸形^[3]。因此，抑制 AS FLS 的过度增殖和炎症反应，并诱导 AS FLS 发生凋亡，可能会控制滑膜炎的进展，进而有效地缓解 AS 的病情。

FLS 细胞，作为滑膜的主要细胞群，可提供结构完整性并保持关节表面健康^[68-169]。FLS 细胞在包括类风湿关节炎在内的几种关节炎中的作用已被广泛研究，它们的生长有助于疾病的发生和发展^[170-171]。然而，人们对于 FLS 细胞在 AS 中的作用知之甚少。最近，新出现的证据表明，从 AS 患者的滑膜组织中所分离出的 FLS 细胞可以在体外分化为成骨细胞样细胞，并参与典型的 AS 谱系异常骨重塑。同时，FLS 细胞还可以作为成骨细胞样细胞的前体，促进骨、内皮细胞和肌腱的异位骨形成^[172]。由此可见，FLS 细胞固有的成骨倾向是 AS 骨形成的主要决定因素。因此，以 FLS 细胞作为研究对象可能被认为是治疗 AS 的新方向。

各种细胞产生的细胞因子在推动 AS 的免疫反应中扮演着重要的角色^[173]。已有证据表明，TNF- α 在 AS 的发病机制中起着关键作用，且特异性地阻断 TNF- α 的活性对于 AS 患者的炎症反应有着显著性的影响^[174]，但其潜在的机制尚不清楚。越来越多的证据表明，IL-23/IL-17 信号轴在 AS 中起着至关重要的作用。IL-23 和 IL-17 的异常激活可引发慢性炎症性疾病（包括 AS）^[19]。此外，IL-17 还可以直接影响破骨细胞并激活破骨细胞的生成^[175]。因此，IL-23/IL-17 信号轴在 AS 的发

生发展过程中发挥着关键性作用。研究发现,在炎症介质趋化作用下,FLS 细胞的增殖和胶原基质分泌等活动非常活跃,致使结缔组织增生增厚,并进一步发生 FLS 纤维化和骨化。此外,FLS 还可以分泌一系列细胞因子(白细胞介素(interleukin,IL)、生长相关致癌基因 α (Growth related oncogenes α , GRO- α)、单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、巨噬细胞炎症蛋白(Macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 等,并对单核巨噬细胞、淋巴细胞和骨细胞发挥多效性作用^[172]。

5.3 中医与 AS 关系

在祖国医学历代医书古籍文献中,并无“强直性脊柱炎”的病名记载,现代医家根据其病变部位脊柱僵直、骶髂关节疼痛及周围关节功能活动受限,严重时甚至骨骼畸形等临床表现及特点,将其归属于中医“大偻”、“痹证”、“竹节风”、“骨痹”、“脊痹”等范畴^[29]。正如《黄帝内经》中《素问·生气通天论》曰:“阳气者,精则养神,柔则养筋,开阖不得,寒气从之,乃生大偻。”《素问·长刺节论》曰:“病在骨,骨重不可举,骨髓酸痛,寒气至,名曰骨痹。”古代医者认为强直性脊柱炎的发病与脊柱、督脉、肾主骨等关系密切,正如《素问·骨空论》曰:“督脉者……贯脊属肾……夹脊抵腰中”,“督脉为病,脊强反折。”现代国家名中医焦树德、阎小平等将 AS 归为中医“尪痹”、“大偻”、“脊痹”等范畴,并将 AS 纳入国家中医药管理局“十一五”重点专科风湿病临床验证方案中,因此,AS 以中医病名“大偻”的正式在全国风湿病专科推广使用。AS 的病因可划分为内因、外因和不内外因。内因即来自身体内部的因素,包括个人体质、精神状态、七情、年龄、遗传及免疫力失调等因素,如《济生方·痹》曰:“皆因体虚,腠理空疏,受风寒湿气而成痹也。”《诸病源候论·风湿痹候》曰:“由血气虚,则受风湿,而成此病。”外因则为机体感受外邪的侵袭,外邪又称“六淫”或“戾气”,包括“风、寒、暑、湿、燥、火”6种邪气,是机体外感疾病的主要致病因素,与强直性脊柱炎的发生密切相关,如《素问·痹论》曰:“痹者,风寒湿三气杂至,合而为痹”^[30]。当今社会,所谓的外因还应该包括超出人体健康承受范围之外的环境污染、生物病毒、化学污染及各种物理辐射等对机体有损害的不利因素。除此之外,不内外因也是强直性脊柱炎发病的重要原因之一,比如个人饮食偏嗜、喜食肥甘厚味,或因暴力及金石外伤等因素损伤机体骨骼,又复感外邪侵袭等内外作用,致

使人体脏腑功能失调，经络不通，郁结壅塞，气血凝滞，导致强直性脊柱炎的发病，如《中藏经·论肉痹》曰：“肉痹者，饮食不节，膏粱肥美之为所也。”从传统中医的整体观念出发，认为强直性脊柱炎的主要病机是以肾气亏虚为本，加以内伤七情或外感六淫，导致气滞、血瘀、痰湿内生，留于骨骼则成骨痹。正如在《素问·痹论》中记载：“骨痹不已，复感于邪，内舍于肾”^[31]。

目前，中药复方在治疗 AS 方面具有很好的效果，且在临床上应用广泛，如补肾舒脊颗粒、壮督驱寒合剂、加味愈痛丸、健脾清热通络丸、黄芩清热除痹胶囊、新风胶囊等复方的研究取得了显著效果。随着医疗科技的不断发展，很多研究者基于网络药理学或数据挖掘等手段，研究中草药及其所富含的活性化合物对 AS 的影响及作用机制，如淫羊藿、独活、青风藤、雷公藤、丹参素、杜仲以及杜仲-牛膝、白芍-甘草、青风藤-穿山龙、鸡血藤-络石藤、黄柏-苍术等。其中，中草药中所含的有效成分出现频率较多的有槲皮素、山柰酚、 β -谷甾醇、黄芩素、汉黄芩素、柚皮素、谷甾醇及小檗碱等，且这些成分与 AS 疾病靶点结合较多。目前，利用网络药理学在探索中药单体、药物配对和复方的有效成分在 AS 的治疗作用机制中应用较多，将药物分子与疾病相关的“药物-靶点-疾病”网络体系进行综合和系统性分析，可以初步筛选出中药活性成分治疗复杂疾病的分子机制。通过网络药理学技术发现中药治疗 AS 的作用机制是多成分、多靶点、多通路，其相关生物过程中骨代谢、炎症反应、免疫反应、脂多糖反应、细胞因子及调控凋亡信号通路等出现次数是最多的，富集到的共同信号通路有 TNF- α 、IL-17、核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、缺氧诱导因子-1 (Hypoxia inducible molecule-1, HIF-1)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK)、T 细胞受体、Toll 样受体 (Toll-like receptor 4, TLR4)、络氨酸激酶/转录因子 3 (Leucosine kinase/transcription factor 3, JAK/STAT3)、晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体 (Advanced glycation end products-receptors for advanced glycation end products, AGE-RAGE)、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (Phosphatidylinositol 3-kinase/Protein kinase B, PI3K/Akt)、核苷酸寡聚化结构域 (Nucleotide Oligomerization Domain, NOD) 样受体等出现次数也是最多的。

近年来，国内外大量研究证实，中药具有“简、便、廉、优”的特点，其富含的中药单体及活性成分可以通过调控相关信号通路影响疾病的发生发展。既往

研究表明^[23-28], 中医药通过调节 PI3K/Akt、Wnt/ β -catenin、JAK/STAT3、NF- κ B、MAPK、IL-17/IL-23 等信号通路的传导, 抑制炎症因子的释放和活性、调节异常能量代谢、减轻氧化应激反应、加速 AS FLS 细胞自噬性凋亡、抑制 FLS 细胞的增殖、成骨分化、侵袭迁移以及促进细胞凋亡, 最终对 AS 的发生发展起到阻碍的效果。

5.4 黄连提取物 BBR 与 AS

中药黄连为毛茛科植物黄连 (*Coptis chinensis Franch.*)、云连 (*Coptisteeta Wall.*)、三角叶黄连 (*Coptis deltoidea C.Y.Cheng et Hsial*) 的干燥根茎, 在我国西南地区分布广泛^[176]。黄连, 性寒、味苦, 归属脾、胃、肝、胆及大肠经, 具有清热燥湿、泻火解毒的功效。在临床应用中, 可以治疗湿热引起的腹部痞满、呕吐、湿疹湿疮, 高热引起的神昏谵语, 血热引起的衄血, 胃热引起的牙痛、消渴, 心火上炎引起的口舌生疮、目赤肿痛等病症^[177]。在用法用量中, 黄连生用可以清热、泻火、燥湿、解毒, 酒炮制的黄连可以清上焦的火热如心火上炎导致的口舌生疮, 姜炮制的黄连可以清泻胃热、止呕止泻, 萸黄连善于疏肝止呕。由于本品具有大寒大苦药性, 因而脾胃虚寒者应当慎用。现代药理学证据表明, 可从黄连中提取到小檗碱、黄连碱、药根碱等多种活性化合物, 其中主要有效成分便是小檗碱^[178]。

黄连素 (Berberine, BBR), 亦称小檗碱, 是传统中草药黄连和黄柏中提取的天然异喹啉生物碱。近年来, BBR 已被证实具有广泛的药理学作用, 包括抗菌^[179]、抗肿瘤^[180]、降血脂^[181]、降血糖^[182]、抗心律失常^[183]、降血压^[184]以及免疫调节^[185]等作用。已有报道证明显示, 黄连提取物 BBR 具有抗炎和抗胃溃疡的作用^[186]。目前研究表明, 黄连中抗炎作用的主要活性成分为 BBR。此外, 也有相关数据显示, BBR 有着很好的抗炎作用^[187]。实验发现, BBR 不仅可以抑制 IL-1 和 TNF- α 激活的内皮细胞与多形核白细胞之间的粘附, 也抑制 TNF- α 激活的多形核白细胞和血管内皮细胞的粘附, 从而减少炎症细胞的浸润和结肠粘膜的病变, 这提示了 BBR 具有很好的抗炎功效^[188]。近几年来, 特别是, BBR 在几种关节炎的动物模型和一些细胞系中同样显示出显著的抗关节炎作用^[189-190]。因此, BBR 的这些有益作用及其对健康细胞的低毒作用获得了广大研究者的青睐^[191]。

AS 的病理因素主要体现在脊柱关节滑膜增生增厚, 并且伴有大量炎性细胞

的浸润,在此过程中滑膜组织可产生大量的炎性细胞因子,如 TNF- α 、IL-6、IL-1、IL-17 等^[18]。实验证明,BBR 可以通过抑制 TNF- α 、IL-1 等炎性细胞因子的活性,进而抑制 FLS 细胞的增殖,提高风湿性关节炎、脊柱炎关节炎等自身免疫性疾病的治疗效果^[19-20],但其作用机制仍不清楚。目前,有关治疗 AS 作用的具体机制和作用靶点尚未明确。因此,本研究选用黄连提取物 BBR 作用于一种常见 AS 的细胞株,以期得到更多有关 BBR 治疗 AS 作用的实验依据。

5.4.1 黄连提取物 BBR 抑制 AS FLS 细胞的增殖能力

在 AS 发病期间,其病变主要是脊柱关节部位滑膜增生增厚,并有大量炎性细胞浸润导致功能受限和疼痛。T 细胞是滑膜组织中最主要的炎性细胞^[192],并在 AS 发病过程中可产生大量的炎性细胞因子,如 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-23 等^[193],进而加快了滑膜组织的炎症反应,促进 AS 的发病及进程。实验发现,AS 患者的滑膜组织及血液细胞中存在着大量炎性因子(包括 TNF- α 、IL-6),且与 AS 患者的病情息息相关^[194]。正如李家江等人以健康人为对照组,采用 ELISA 法检测 IL-1、IL-6、IL-17、IL-23 的含量水平,与正常空白组比较,AS 患者血清中 IL-1、IL-6、IL-17、IL-23 的含量水平明显升高^[195]。Van 等人通过使用 IL-17 抑制剂可有效地治疗以及减轻关节炎^[196]。Liao 等人通过调节细胞因子的正反馈来诱导更多 T-reg 产生和抗炎细胞因子分泌,从而抑制这种炎症状态,并且可以通过抗 TNF- α 治疗逆转,炎症反应也得到改善^[194]。与他们的结果相似,本研究通过 ELISA 实验发现,黄连提取物 BBR 治疗在体外降低了 LPS 刺激下 AS FLS 细胞中促炎因子 IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 的含量水平。同时,本研究通过 CCK-8 法和平板克隆形成实验发现 BBR 能够有效地抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的增殖能力。此外,本研究应用流式细胞术发现 BBR 可阻滞 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的生长周期于 S 期,不再分裂,这也为 BBR 对 LPS 刺激下 AS FLS 细胞中炎性增殖的抑制作用提供了一定的理论支持。

5.4.2 黄连提取物 BBR 抑制 AS FLS 细胞的侵袭、迁移能力

细胞侵袭是细胞通过一个区域穿过基底膜基质层到另一个新的区域,与炎症反应、伤口修复、癌细胞转移、细胞迁移等密不可分^[197]。Sun 等人通过实验证明,BBR 可以通过抑制转化因子 β 1 (Transforming growth factor beta, TGF- β 1) 信号通路的活性,抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭^[198]。同时,实验表明,通过 BBR 干

预处理 AGS 和 SGC7901 胃癌细胞, 不仅抑制胃癌细胞的增殖, 还有效地减缓胃癌细胞的迁移侵袭, 其作用机制与 AMPK-HNF4 α -WNT5 信号通路有关^[199]。本研究通过侵袭和划痕实验结果表明, 黄连提取物 BBR 可以抑制 AS FLS 细胞的侵袭和迁移能力, 进一步通过蛋白印迹法表明黄连提取物 BBR 可以促进上皮钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达, 抑制神经钙黏蛋白 (N-cadherin), 进而抑制 AS FLS 细胞的侵袭和迁移。

5.4.3 黄连提取物 BBR 促进 AS FLS 细胞凋亡

研究发现, Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白, Bax 是一种促凋亡蛋白, 当 Bcl-2 和 Bax 活化后, 通过异二聚体的形式相结合, 影响线粒体膜通透性变化, 使线粒体外膜渗透性达到最大, 从而促进细胞色素 C 产生并大量释放, 并与凋亡肽酶激活因子-1 (Apoptosis peptidase activating factor-1, Apaf-1) 相结合形成凋亡小体。然后, 凋亡小体与下游靶点 Caspase-9 相结合, 开始一系列的 Caspase 级联激活效应, 而 Caspase-3 作为 Caspase-9 的下游靶点, Caspase-9 可激活效应子 Caspase-3, 从而导致脱氧核糖核酸酶抑制剂水解, 进而释放脱氧核糖核酸酶, 然后通过某种方式进入细胞核内, 导致核内的细胞蛋白骨架分离、DNA 降解和核碎裂等现象, 最后引起细胞凋亡的发生^[18]。本研究首先通过 IM 观察、Calcein/PI 染色、Hoechst33342 染色以及流式细胞术发现, 黄连提取物 BBR 确实能够诱导 AS FLS 细胞凋亡, 并且进一步通过蛋白免疫印迹技术发现, 黄连提取物 BBR 可以升高 Bax 和 Cleaved-caspase-3 蛋白的表达水平, 同时降低 Bcl-2 蛋白的表达水平, 表明黄连提取物 BBR 可通过线粒体途径来诱导 AS FLS 凋亡, 抑制 AS FLS 在关节部位异常增生, 进而有效地缓解 AS 病变。

5.4.4 黄连提取物 BBR 抑制 AS FLS 细胞的炎症反应

实验研究显示, TNF- α 可以诱导炎症基因, 激活基因调控元件的持续染色质, 促进 FLS 细胞的生长, 进而使滑膜炎反应进一步扩大^[200]。同时, TNF- α 可诱导 FLS 细胞中 p38 和 ERK 的磷酸化和活化, 进而激活 MAPK 信号途径^[201]。MAPK 通路是多种信号通路的重要中心环节, 主要参与调控细胞的增殖、凋亡、炎症等^[202]。目前, 在哺乳动物中, 根据其特有的结构和功能, 可将 MAPK 的亚型划分为细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular-signalregulated protein kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun kinase, JNK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitoge

n-activated protein kinases, p38MAPK)^[203]。其中, ERK 主要与癌症细胞的增殖、生长最为密切^[204], ERK 激活也参与促进 AS 中成骨细胞和成纤维细胞的骨化^[205]。通过多重蛋白定量法和 ELISA 法进一步定量候选差异表达的细胞因子, 随后用来刺激脂肪来源的干细胞中的 GRB2/ERK/runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor2, RUNX2) 通路, 通过 GRB2 刺激 ERK 磷酸化并增强 RUNX2 的表达, 激活 MAPK 促进脂肪来源的干细胞的成骨细胞生成, 并增强成骨细胞的细胞外基质, 这可能有助于 AS 的病理性骨形成^[206]。然而, ERK 激活也可以促进 ERK 磷酸化, 进而促进 FLS 细胞中炎性细胞因子的分泌, 例如 IL-6、IL1 β 和 TNF- α 。反之, ERK 抑制剂可抑制 ERK 的磷酸化, 降低炎性因子的分泌^[207]。而 JNKs 和 p38MAPK 信号通路则在细胞增殖、分化、凋亡、迁移以及炎症等应激反应中发挥重要作用。在正常生理状态下, MAPK 处于静默状态, 当细胞受到炎症细胞因子和氧化应激等因素的刺激之后, MAPK 信号通路可被激活, 此时的 MAPK 蛋白处于磷酸化状态, 从而介导转化生长因子- β -活化蛋白激酶 1/结合蛋白 1 与 p38 相互作用, 进而导致 p38-MAPK 信号通路被激活, 下调嘌呤能配体门控离子通道 7 受体 (Purinergic ligand gated ion channel 7 receptor, P2X7R)、TNF- α 、IL-1 β 因子的表达, 抑制炎症反应^[208]。近年的研究表明, ERK 和 p38MAPK 可以活化不同信号转导路径, 在滑膜组织导致的炎性反应和氧化应激中, 可参与各种因素导致的刺激细胞的信号转导^[209]。因此, p38MAPK 和 ERK 介导并调控 AS 滑膜炎的核心机制, 能被炎症细胞因子如 TNF- α 、IL-6、IL-17、IL-23 等细胞因子刺激并激活, 且活化后的 p38MAPK 和 ERK 又可能产生炎性细胞因子如 TNF- α 、IL-6 等, 进一步促进炎性反应发展, 从而使 AS 迁延难愈。如果能够抑制 TNF- α 激活的 IL-17、IL-23、p38MAPK、ERK1/2 信号通路, 就能抑制 FLS 细胞的活性和增殖, 从而抑制 AS 滑膜组织增生, 进而控制炎症反应, 最后有效控制并缓解 AS 的发生发展。因此, 本研究采用蛋白免疫印迹技术发现, 黄连提取物 BBR 能够抑制 p-JNK、p-ERK1/2 以及 IL-17、IL-23 蛋白的表达水平。同时, 应用分子对接技术观察了 BBR 与这些分子靶点的结合能力与相互作用点, 发现 BBR 与 p-JNK、p-ERK1/2、IL-17、IL-23 均具有良好的结合能力, 从而为 BBR 抗 AS 的作用机制提供了一定的理论依据。

5.4.5 黄连提取物 BBR 抑制 AS FLS 细胞的成骨分化程度

AS 是一种病变以骶髂关节和脊柱为主要的慢性炎症疾病,炎症、骨质破坏和新骨形成是 AS 的典型病理变化。在 AS 中,骨重塑的不平衡已被证实是该病的主要诱发因素,包括脊柱中新骨的形成,以及主要在外周关节的骨破坏和骨吸收^[210-211]。骨重塑是由骨稳态因子调节的,而破骨细胞的发育是通过 RANKL 信号因子的激活来介导,并且发现其下游成员(包括 TNF- α 、IL-17 和 TGF- β)在关节炎的 FLS 细胞中呈现过表达的状态^[212]。另有研究报道显示,成骨细胞的活性可被 DDK-1 阻断^[213],而 DDK-1 又在 AS 患者的血清中增加^[214],提示了 DDK-1 可作为脊柱疾病的新型检测指标或治疗靶点。因此,在本研究中,我们检测了 BBR 对 AS FLS 细胞中骨稳态调节因子分泌量的影响。有趣的是,我们的结果发现 IL-17/IL-23 可诱导 AS FLS 细胞加剧成骨分化程度,而 BBR 的干预处理可以逆转这一效应。因此,BBR 可能是一种新型的强直性脊柱炎新骨形成的抑制剂。

5.5 黄连提取物 BBR 抑制 IL-17/IL-23 信号轴治疗 AS

IL-23 是 Robert Kastelein^[58]发现由 IL-23p19 亚基和 IL-12p40 亚基构成的一种异二聚体,主要由巨噬细胞和树突状细胞响应外源性或内源性信号产生,在自身性免疫疾病中发挥重要的作用^[59],如可以并驱动辅助性 T 细胞 17 (Th17) 细胞的分化和活化,随后产生 IL-17A、IL-17F、IL-6、IL-22 和 TNF- α ^[60]。另外发现 IL-23 具有多种生物学效应,其最主要的功能是通过诱导 Th17 细胞产生 IL-17。IL-23 主要由巨噬细胞和树突状细胞响应外源性或内源性信号产生,研究发现,在强直性脊柱炎活动期中,IL-23 与 IL-23 受体 (IL-23R) 结合后,能够促进 Th17 细胞的活化,Th17 细胞产生 IL-17,而后 IL-17 和 IL-17 受体 (IL-17R) 结合后通过不同通路发挥其生物学作用^[61]。IL-17 是由 Th17 细胞分泌的细胞因子,它的家族有 6 个成员 IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E、IL-17F,其中 IL-17A、IL-17E、IL-17F 是重要的促炎因子。IL-17 受体家族由五个成员组成,它们在许多细胞类型上表达,如上皮细胞、成纤维样滑膜细胞、B 细胞和 T 细胞、单核细胞等,IL-17 信号转导激活 NF- κ B 信号通路、激活接头蛋白 1 (Activate adapter protein, ACT1) 信号通路、p38MAK 信号通路、JNK 信号通路、ERK 信号通路、JAK 信号通路、STAT 信号通路、PI3K 信号通路等并诱导多种促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)、抗菌肽 (β -防御素)、和基质金属蛋白酶^[62]。值得注意的是,

Jethwa H 等人^[63]的研究发现 IL-17/IL-23 信号轴可以介导 AS 的免疫炎症反应。

本研究通过 ELISA 实验发现, 黄连提取物 BBR 治疗在体外降低了 LPS 刺激下 AS FLS 细胞中促炎因子 IL-6、IL-17、IL-23、TNF- α 的含量水平。同时, 本研究通过 CCK-8 法和平板克隆形成实验发现黄连提取物 BBR 能够有效地抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的增殖能力。同时, 本研究应用分子对接技术发现, 黄连提取物能够与 IL-17、IL-23 均存在着良好的结合能力。随后, 采用蛋白免疫印迹技术发现, 黄连提取物 BBR 能够抑制 IL-17、IL-23 蛋白的表达水平, 以期得到更多有关 BBR 治疗 AS 作用的相关研究提供实验依据。

6 小结

综上所述, 首先, 经 Vimentin 蛋白免疫荧光染色后呈阳性, 即经 DAPI 染色后细胞质为绿色荧光, 而细胞核为蓝色荧光, 且通过 IM 镜下观察细胞形态, 表明分离出的细胞正是 AS FLS 细胞。其次, 用 LPS 诱导体外培养的 FLS 细胞后, 可构建体外 AS 模型。通过 CCK-8 法、Calcein/PI 染色、平板克隆形成实验和 ELISA 实验发现, 与空白组相比, 黄连提取物 BBR 抑制 LPS 刺激下 IL-17、IL-23、TNF- α 、IL-6 等炎性细胞因子的表达, 并抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的增殖。通过流式细胞术检测细胞的生长周期后发现, BBR 处理可阻滞 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的生长周期于 S 期, 不再分裂。同时, 通过 Calcein/PI 染色、Hoechst33342 染色、流式细胞术发现, BBR 处理还可以诱导 LPS 刺激下 AS FLS 细胞发生凋亡。此外, 通过 Transwell 小室实验、划痕实验、茜红素染色后发现, BBR 处理可以有效地抑制 AS FLS 细胞的侵袭、迁移及成骨分化。进一步的机制探索中, 我们发现 BBR 可以上调 Bax、Cleaved-caspase-3、E-cadherin 蛋白的相对表达, 且下调 Bcl-2、N-cadherin、IL-17、IL-23、p-JNK 和 p-ERK1/2 蛋白的表达水平。总之, 黄连提取物 BBR 不仅可以抑制 AS FLS 细胞的增殖、侵袭、迁移及成骨分化, 同时还能诱导其凋亡, 从而在一定程度上抑制 AS 的进展, 该机制可能与 IL-23/IL-17 信号通路的活性被抑制有关。然而, 黄连提取物 BBR 抑制 AS FLS 细胞的生物学功能的相关作用机制较为复杂, 且具体通过 IL-23/IL-17 通路下游的哪些蛋白发挥作用有待进一步探索研究。

第三部分 结 语

1 结论

黄连提取物 BBR 可抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的生长,其机制可能与 BBR 可有效阻滞 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的有丝分裂有关, BBR 可阻滞 AS FLS 细胞的生长周期于 S 期。BBR 可抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的增殖、侵袭、迁移能力,其机制可能与抑制 N-cadherin 蛋白的表达,并促进 E-cadherin 蛋白的表达相关。BBR 可诱导 LPS 刺激下 AS FLS 细胞发生凋亡,其机制可能与促进 Bax、Cleaved-caspase-3 蛋白的表达,并抑制 Bcl-2 蛋白的表达有关。BBR 可抑制 LPS 刺激下 AS FLS 细胞的炎症反应,并且抑制 IL-17/IL-23 刺激下 AS FLS 细胞的成骨分化程度。BBR 可抑制 IL-17/IL-23 信号通路的激活来调控 AS FLS 细胞的生物学功能。

总之, BBR, 作为一种从黄连中提取的活性化合物, 不仅可以抑制 AS FLS 细胞的活力、增殖、侵袭、迁移、成骨分化及炎症反应, 还可以诱导其发生凋亡, 该机制可能与抑制 IL-23/IL-17 信号通路的活性有关。

2 创新之处

2.1 首次从细胞水平和分子水平, 观察黄连提取物小檗碱对强直性脊柱炎的 FLS 细胞增殖、凋亡、迁移以及侵袭的作用影响。

2.2 以 IL-23/IL-17 信号通路作为治疗靶点, 评估黄连提取物小檗碱对强直性脊柱炎的可能治疗作用, 为其他治疗强直性脊柱炎药物开发提供新的治疗靶点, 为黄连提取物小檗碱用于强直性脊柱炎临床治疗奠定理论基础。

3 不足之处

3.1 本实验从甘肃省中医院转化医学实验室完成细胞提取、培养、传代以及实验部分等, 因疫情影响, 实验时间紧张, 细胞实验 PCR 检测指标未完成。

3.2 本实验未设阳性对照组, 在后续研究中将进一步改善实验方案。

4 展望

4.1 近几年, 很多研究者研究中药单体用来治疗 AS 取得很好的疗效, 中药单

体具有疗效单一，但副作用少特点，本研究从 IL-23/IL-17 信号通路角度探讨黄连提取物小檗碱治疗 AS 的分子机制，但还不能完全阐述该黄连提取物小檗碱治疗 AS 的机理，因此仍需要深入研究探索黄连提取物小檗碱防治 AS 的作用机制。

4.2 强直性脊柱炎（Ankylosing spondylitis, AS）是一种病变以骶髂关节和脊柱为主要的慢性炎症疾病，炎症、骨破坏和新骨形成是 AS 的典型病理变化。不幸的是，目前还没有高效且安全的治疗策略来解决这一疾病。因此，暂无临床对强直性脊柱炎应用有效的报道作为支撑。不过，这也从侧面体现了本研究的创新性，通过 AS 的发病机理这个角度出发，探究黄连提取物小檗碱对脂多糖诱导的 AS 成纤维样滑膜细胞活力、增殖、侵袭、迁移、炎症反应的影响及分子机制，从而有望让黄连提取物 BBR 成为治疗该类疾病的临床药物。

参考文献

- [1]Kim S H, Lee S H. Updates on ankylosing spondylitis: Pathogenesis and therapeutic agents [J]. *Rheum Dis*, 2023, 30 (4): 220–233.
- [2]叶倩义, 牟兴, 吴歆, 等. 成纤维细胞在自身免疫性疾病中作用的研究进展 [J]. *现代免疫*, 2022, 42 (5): 421-426.
- [3]邹佳, 尧章洪, 郑其祥, 等. 盐酸小檗碱对芍药苷的经皮促透规律及促透机制研究[J]. *中草药*, 2023, 54 (22): 7412-7420.
- [4]Wang J, Wang L, Lou GH, et.al. Coptidis Rhizoma: a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. *Pharm Biol*,2019,57 (1):193-225.
- [5]Samadi P, Sarvarian P, Gholipour E, et al. Berberine: A novel therapeutic strategy for cancer[J]. *IUBMB Life* ,2020, 72: 2065–79.
- [6]Tong Y, Liu L, Wang R, et.al. Berberine Attenuates Chronic Atrophic Gastritis Induced by MNNG and Its Potential Mechanism[J]. *Front Pharmacol.*,2021,25;12:644638.
- [7]Shakeri F, Kiani S, Rahimi G, et.al. Anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of Berberis vulgaris and its constituent berberine, experimental and clinical, a review[J]. *Phytother Res.*,2024,15:13-225.
- [8]Sun Y, Lenon GB, Yang AWH. Phellodendri Cortex: A Phytochemical, Pharmacological, and Pharmacokinetic Review[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*,2019,2019:7621929.
- [9]Xu H, Wu C, Wang D, et.al. Alleviating effect of Nexrutine on mucosal inflammation in mice with ulcerative colitis: Involvement of the RELA suppression[J]. *Immun Inflamm Dis*,2024,12(1):e1147.
- [10]王锦,程昆木.不同地区黄柏小檗碱的含量研究[J].*山西化工*,2023,43(10):40-42.
- [11]Jin BR, An HJ. Oral administration of berberine represses macrophage activation-associated benign prostatic hyperplasia: a pivotal involvement of the NF-κB[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(16):20016-20028.
- [12]Kim HJ, Kim YJ, Park W. Berberine modulates hyper-inflammation in mouse macrophages stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid via calcium-CHOP/STAT pathway[J]. *Sci Rep*,2021,11(1):11298.
- [13]Yu H, Zhang S, Li R, et.al. Berberine alleviates inflammation and suppresses PLA2-CO X-2-PGE2-EP2 pathway through targeting gut microbiota in DSS-induced ulcerative colitis[J]. *Biochem Biophys Res Commun.*,2024 ,695:149411.
- [14]胡威, 方满新, 刘犇, 等. 小檗碱的生物学功能及其在动物生产中的应用 [J]. *动物营养学报*, 2023, 10 (30): 1-13.
- [15]Li S, Liu X, Chen X, et al. Research progress on anti-inflammatory effects and mechanisms of alkaloids from Chinese medical herbs [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 18: 1303524.
- [16]Ding M, Guan T J, Wei C Y, et al. Identification of pathways significantly associated with spondyloarthritis/ankylosing spondylitis using the sub-pathway method [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (4): 3825–3833.

- [17]XFu L, Li M, Wang P, et.al. Tanshinone IIA, a component of the self-made Xiao-Yin decoction, ameliorates psoriasis by inhibiting IL-17/IL-23 and PTGS2/NF- κ B/AP-1 pathways[J]. *Skin Res Technol*, 2024,30(2):e13577.
- [18]Zong S, Zhou J, Cai W, et al. Berberine inhibits autophagy and promotes apoptosis of fibroblast-like synovial cells from rheumatoid arthritis patients through the ROS/mTOR signaling pathway[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2023, 43 (4): 552–559.
- [19]Yang F J, Gao R M, Luo X X, et al. Berberine influences multiple diseases by modifying gut microbiota [J]. *Front Nutr*, 2023, 10: 1187718.
- [20]Van der Linden S, Valkenburg H A, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. *Arthritis Rheum*, 1984, 27 (4): 361–368.
- [21]Ramiro S, Nikiphorou E, Sepriano A, et al. ASAS-EULAR recommendations for the management of axial spondyloarthritis: 2022 update [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82 (1): 19–34.
- [22]Chen S, Paveley R, Kraal L, et al. Selective targeting of PI3K δ suppresses human IL-17-producing T cells and innate-like lymphocytes and may be therapeutic for IL-17-mediated diseases [J]. *Autoimmun*, 2020, 111: 102435.
- [23]Fang Y, Liu J, Long Y, et.al. Knockdown of circular RNA hsa_circ_0003307 inhibits synovial inflammation in ankylosing spondylitis by regulating the PI3K/AKT pathway[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2022,31(7):781-788.
- [24]Xie Y, Li X, Zhang Q,et.al. Stretching Training Rehabilitation Has Potential to Alleviate Ankylosing Spondylitis in Mice by Inactivating the Wnt/ β -Catenin Pathway[J].*Comput Math Methods Med*,2022,2022:3932504.
- [25]Deng Y, Xu W, Gao X, et.al. JAK-STAT signaling pathway-related gene single nucleotide polymorphisms and susceptibility to ankylosing spondylitis in eastern Chinese Han population[J]. *Clin Rheumatol*, 2023,42(2):549-562.
- [26]Feng X, Zhu S, Qiao J, et.al. CX3CL1 promotes M1 macrophage polarization and osteoclast differentiation through NF- κ B signaling pathway in ankylosing spondylitis in vitro[J]. *JTransl Med*,2023,21(1):573.
- [27]Fu R, Guo X, Pan Z, et.al. Molecular mechanisms of AMPK/YAP/NLRP3 signaling pathway affecting the occurrence and development of ankylosing spondylitis[J]. *Orthop Surg Res*, 2023,18(1):831.
- [28]Zhang H, Wei Y, Jia H, et.al. Immune activation of characteristic gut mycobiota *Kazachstania pintolopesii* on IL-23/IL-17R signaling in ankylosing spondylitis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2022,12:1035366.
- [29]石金杰,刘宏潇.强直性脊柱炎中医辨证论治概述[J].*辽宁中医杂志*,2023,50(12):249-252.
- [30]杨孝余,罗丰,熊鸿,等.运用《伤寒论》六经辨证理论探究痹症的中医治疗[J].*贵州中医药大学学报*,2023,45(06):10-14.
- [31]马玲萍,陈博,王钢,等.王钢主任医师治疗强直性脊柱炎的临床经验[J].*临床医学研究与实践*,2024,9(01):18-21.
- [32]焦树德 ,阎小萍. 大(九+萎)(强直性脊柱炎)病因病机及辨证论治探讨(下)[J]. *江苏中医药*, 2003, (02): 1-3.
- [33]邱志济,朱建平,马璇卿.朱良春治疗强直性脊柱炎用药特色选析——著名老中医学家朱良

- 春教授临床经验系列之二十三[J].辽宁中医杂志,2001(11):656-657.
- [34] 刘 燊 亿,胡 悦.胡 荫 奇 教 授 治 疗 强 直 性 脊 柱 炎 学 术 思 想 探 析[J].中 华 中 医 药 杂 志,2014,29(03):765-767.
- [35] 张新路,刘宏潇,徐晓涵等.强直性脊柱炎中医证候研究进展[J].中医学报,2023,38(09):1872-1878.
- [36] 石金杰,刘宏潇.强直性脊柱炎中医辨证论治概述[J].辽宁中医杂志,2023,50(12):249-252.
- [37] 赵福来,常君丽,支文兰,等.中药有效成分防治骨肉瘤转移作用与机制研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2022,24(02):482-489.
- [38] Yu HC, Huang KY, Lu MC, et.al. HLA-B*27 Heavy Chain Homo-Oligomers Promote the Cytotoxicity of NK Cells via Activation of PI3K/AKT Signaling[J]. Medicina (Kaunas), 2022,58(10):1411.
- [39] Fang Y, Liu J, Long Y, et.al. Knockdown of circular RNA hsa_circ_0003307 inhibits synovial inflammation in ankylosing spondylitis by regulating the PI3K/AKT pathway[J]. Adv Clin Exp Med,2022,31(7):781-788.
- [40] Liu Z, Min S, Lu X, et.al. [Hyperactivation of PI3K/AKT/mTOR signal pathway impairs TNF- α -induced autophagy in mesenchymal stem cells from patients with ankylosing spondylitis][J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2022,42(2):272-277.
- [41] Liu C, Liang T, Zhang Z, et.al. Transfer of microRNA-22-3p by M2 macrophage-derived extracellular vesicles facilitates the development of ankylosing spondylitis through the PER2-mediated Wnt/ β -catenin axis. Cell Death Discov. 2022 May 23;8(1):269.
- [42] Tönük ŞB, Yorgancıoğlu ZR. Biomechanical Factors in Psoriatic Disease: Defective Repair Exertion as a Potential Cause. Hypothesis Presentation and Literature Review[J]. ACR Open Rheumatol,2019,1(7):452-461.
- [43] Pinto Tasende JA, Fernandez-Moreno M, Vazquez-Mosquera ME, et.al. Increased synovial immunohistochemistry reactivity of TGF- β 1 in erosive peripheral psoriatic arthritis[J]. BMC Musculoskelet Disord,2023,24(1):246.
- [44] Liu R, Zhang X, Jiang G, et.al. Gene-gene interaction and association of Wnt/B-catenin signalling pathway gene polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility in the Chinese Han population[J]. Autoimmunity, 2019,52(7-8):281-288.
- [45] Li X, Chen S, Hu Z, et.al. Aberrant upregulation of CaSR promotes pathological new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. EMBO Mol Med,2020,12(12):e12109.
- [46] Raychaudhuri S, Cheema KS, Raychaudhuri SK, et.al. Janus kinase-signal transducers and activators of transcription cell signaling in Spondyloarthritis: rationale and evidence for JAK inhibition[J]. Curr Opin Rheumatol,2021,33(4):348-355.
- [47] Zou YC, Yan LM, Gao YP, et.al. miR-21 may Act as a Potential Mediator Between Inflammation and Abnormal Bone Formation in Ankylosing Spondylitis Based on TNF- α Concentration-Dependent Manner Through the JAK2/STAT3 Pathway[J]. Dose Response, 2020,18(1):1559325819901239.
- [48] White JPE, Coates LC. JAK1 selective inhibitors for the treatment of spondyloarthropathies[J]. Rheumatology (Oxford), 2021,60:39-44.
- [49] Feng X, Zhu S, Qiao J, et.al. CX3CL1 promotes M1 macrophage polarization and osteoclast differentiation through NF- κ B signaling pathway in ankylosing spondylitis in vitro[J]. J Transl

- Med,2023,21(1):573.
- [50] Qin H, Wu T, Liu J, et.al. MALT-1 inhibition attenuates the inflammatory response of ankylosing spondylitis by targeting NF- κ B activation[J]. Injury,2021,52(6):1287-1293.
 - [51] Li HM, Kouye O, Yang DS,et al. Polyphenols from the Peels of Punica granatum L. and Their Bioactivity of Suppressing Lipopolysaccharide-Stimulated Inflammatory Cytokines and Mediators in RAW 264.7 Cells via Activating p38 MAPK and NF- κ B Signaling Pathways[J]. Molecules,2022,27(14):4622.
 - [52] Li R, Sano T, Mizokami A,et al. miR-582-5p targets Skp1 and regulates NF- κ B signaling-mediated inflammation[J]. Arch Biochem Biophys,2023,734:109501.
 - [53] Malona J, Chuaqui C, Seletsky BM,et.al. Discovery of CC-99677, a selective targeted covalent MAPKAPK2 (MK2) inhibitor for autoimmune disorders[J]. Transl Res,2022,249:49-73.
 - [54] Ijomone OM, Iroegbu JD, Aschner M,et al. Impact of environmental toxicants on p38- and ERK-MAPK signaling pathways in the central nervous system[J]. Neurotoxicology, 2021,86:166-171.
 - [55] Rovida E, Tusa I. Targeting MAPK in Cancer 2.0[J]. Int J Mol Sci,2022,23(10):5702.
 - [56] Gaur R, Mensah KA, Stricker J, et.al. CC-99677, a novel, oral, selective covalent MK2 inhibitor, sustainably reduces pro-inflammatory cytokine production[J]. Arthritis Res Ther, 2022,24(1):199.
 - [57] Wang Z, Han Y, Zhang Z, et.al. Identification of genes and signaling pathways associated with the pathogenesis of juvenile spondyloarthritis[J]. Mol Med Rep,2018 ,18(2):1263-1270.
 - [58] 余锋.补肾强督治痿汤对强直性脊柱炎患者骨质变化机理的研究[D].广州中医药大学,2007
 - [59] Mease P, van den Bosch F. IL-23 and axial disease: do they come together[J].Rheumatology (Oxford),2021,60:28-33.
 - [60] Schinocca C, Rizzo C, Fasano S,et.al. Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview[J]. Front Immunol,2021,12:637829.
 - [61] Zhang H, Wei Y, Jia H, et.al. Immune activation of characteristic gut mycobiota Kazachstania pintolopesii on IL-23/IL-17R signaling in ankylosing spondylitis[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:1035366.
 - [62] Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, et.al. Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview[J]. Front Immunol,2021,12:637829.
 - [63] Jethwa H, Bowness P. The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment[J]. Clin Exp Immunol,2016,183(1):30-6.
 - [64] Fang WY, Tseng YT, Lee TY,et.al. Triptolide prevents LPS-induced skeletal muscle atrophy via inhibiting NF- κ B/TNF- α and regulating protein synthesis/degradation pathway[J]. Br J Pharmacol,2021,178(15):2998-3016.
 - [65] Ji W, Lu Y, Ma Z, et.al. Triptolide attenuates inhibition of ankylosing spondylitis-derived mesenchymal stem cells on the osteoclastogenesis through modulating exosomal transfer of circ-0110634[J]. J Orthop Translat, 2022,36:132-144.
 - [66] Liu SP, Wang GD, Du XJ, et.al. Triptolide inhibits the function of TNF- α in osteoblast differentiation by inhibiting the NF- κ B signaling pathway[J]. Exp Ther Med,2017 ,14(3):2235-2240.

- [67] Ji W, Chen Y, Zhao X, et.al. Beneficial effects of tripterygium glycosides tablet on biomarkers in patients with ankylosing spondylitis[J]. Mol Med Rep,2015,12(1):684-90.
- [68] Lin Z, Chen M, Chen X, et.al. Protective Effect and Possible Mechanisms of Tripterygium Glycosides in Patients with Ankylosing Spondylitis: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Oxid Med Cell Longev,2022,2022:9374895.
- [69] Aihaiti Y, Song Cai Y, Tuerhong X, et.al. Therapeutic Effects of Naringin in Rheumatoid Arthritis: Network Pharmacology and Experimental Validation[J]. Front Pharmacol,2021,12:672054.
- [70] Liu K, Wu L, Shi X, et.al. Protective effect of naringin against ankylosing spondylitis via ossification, inflammation and oxidative stress in mice[J]. Exp Ther Med,2016,12(2):1153-1158.
- [71] Tian ZG, Yao M, Chen J. Micheliolide alleviates ankylosing spondylitis (AS) by suppressing the activation of the NLRP3 inflammasome and maintaining the balance of Th1/Th2 via regulating the NF- κ B signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2020 ,8(16):991.
- [72] Feng X, Yang Q, Wang C, et.al. Punicalagin Exerts Protective Effects against Ankylosing Spondylitis by Regulating NF- κ B-TH17/JAK2/STAT3 Signaling and Oxidative Stress[J]. Biomed Res Int,2020,2020:4918239.
- [73] 焦士军,李岩,韦中阳,等.黄芪总黄酮通过调节 Notch-Wnt 信号通路对强直性脊柱炎模型大鼠炎症反应和成纤维细胞成骨转化的影响[J].广东药科大学学报,2022,38(03):43-48.
- [74] 郑家春,熊正罡,赵洋洋,等.丹皮酚对强直性脊柱炎小鼠跟腱滑膜的影响[J].中国矫形外科杂志,2021,29(11):1019-1023.
- [75] 邢伟,李鹏飞,付海平,等.丹皮酚通过调节 Wnt 途径对强直性脊柱炎小鼠疗效及滑膜组织中 RANKL 和 Smad1 水平的影响[J].临床和实验医学杂志,2020,19(02):118-121.
- [76] 付姣,赵哲,刘宏潇,等.丹参酮IIA 通过影响 BMP/Smad 信号对强直性脊柱炎异位成骨的干预作用[J].辽宁中医杂志,2021,48(05):141-144.
- [77] 石金杰,刘宏潇.基于网络药理学探讨淫羊藿治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].河北中医,2022,44(01):139-143+156.
- [78] 王琳玲,孙晓静,孙治中,等.基于网络药理学探析独活治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].中医学报,2021,36(04):845-852.
- [79] 姜平,魏凯,金晔华,等.基于网络药理学及分子对接技术探析青风藤干预强直性脊柱炎的分子作用机制[J].中国药师,2022,25(03):426-432.
- [80] Zhang J, Zhou Y, Ma Z. Multi-target mechanism of Tripterygium wilfordii Hook for treatment of ankylosing spondylitis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Ann Med, 2021,53(1):1090-1098.
- [81] Li J, Chen Z, Liao H, et.al. Anti-Osteogenic Effect of Danshensu in Ankylosing Spondylitis: An in Vitro Study Based on Integrated Network Pharmacology[J]. Front Pharmacol,2021 ,12:772190.
- [82] 李舒,万磊,刘健,等.基于网络药理学和分子对接探讨杜仲-牛膝药对治疗强直性脊柱炎机制[J].云南中医中药杂志,2023,44(04):60-67.
- [83] 胡倩,李丽梅,王兴强,等.基于网络药理学探析白芍-甘草治疗强直性脊柱炎作用机制[J].现代中医药,2022,42(04):32-38.
- [84] 赖楚儿,王义军.基于网络药理学探讨青风藤穿山龙药对治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].

- 特产研究,2022,44(03):43-50.
- [85] 许鑫杰,李志岭,张曼怡,等.基于 GEO 数据库和网络药理学探讨鸡血藤-络石藤治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].颈腰痛杂志,2023,44(06):899-903.
- [86] 王芳,李峰,徐丽婷等.基于网络药理学分析黄柏-苍术药对治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].中国药物与临床,2023,23(04):214-219+273-275.
- [87] 杨文雪,金玥,周童亮,等.补肾舒脊颗粒对 hBMSC 软骨内成骨过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J].中华中医药杂志,2018,33(02):512-516.
- [88] 吴伊莹,柳玉佳,王焱,等.壮督驱寒合剂对强直性脊柱炎小鼠 Wnt3a、 β -catenin 表达及炎症因子的影响[J].世界中西医结合杂志,2020,15(12):2236-2240.
- [89] 尚娟.加味愈痛丸治疗强直性脊柱炎疗效观察及对血清 JAK/STAT 信号通路的影响[J].新中医,2023,55(21):77-82.
- [90] 丁香. 健脾清热通络方调控 NONHSAT227927.1/JAK2/STAT3 组合改善强直性脊柱炎湿热痹阻证患者感受的机制研究[D].安徽中医药大学,2024.
- [91] 黄旦,刘健,纵瑞凯,等.黄芩清热除痹胶囊激活 PPAR γ 介导 AMPK/FOXO3a 信号通路改善强直性脊柱炎患者氧化应激[J].中国中药杂志,2020,45(02):451-456.
- [92] 方利,刘健,万磊,等.新风胶囊通过抑制 miR-155/NF- κ B 信号通路改善强直性脊柱炎活动期患者高凝状态[J].细胞与分子免疫学杂志,2016,32(08):1094-1098+1104.
- [93] 陈鹏. 从 IL-23/Th17 炎症轴探讨清热活血法抗强直性脊柱炎炎症的分子机制[D].北京中医药大学,2014.
- [94] 杨涛,赵鹏,张光宇,等.基于网络药理学探讨右归丸干预强直性脊柱炎作用机制[J/OL].辽宁中医药大学学报:1-17[2024-01-22].
- [95] 刘宁,徐展望,王明喜等.蠲痹汤“异病同治”法治疗类风湿关节炎和强直性脊柱炎的网络药理学作用机制研究[J].西部中医药,2023,36(10):20-27.
- [96] 陈聪聪,周全.基于网络药理学与分子对接探讨四妙丸“异病同治”强直性脊柱炎和高尿酸血症的作用机制[J].河南中医,2023,43(10):1534-1542.
- [97] 许晓娜,许二平,王晓鸽.羌活胜湿汤治疗强直性脊柱炎的网络药理学分析[J].中医学报,2022,37(07):1503-1509.
- [98] 李明波,黄燕波,刘俊城,等.黄芪桂枝五物汤治疗强直性脊柱炎的网络药理学探讨[J].山东大学学报(医学版),2022,60(03):29-38.
- [99] 侯卫,汪宗清,陈晨等.基于网络药理学探讨甘草附子汤治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].云南中医中药杂志,2021,42(11):49-55.
- [100] 李伟,李春根,穆晓红,等.基于网络药理学探讨补阳还五汤治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].中医学报,2021,36(10):2213-2220.
- [101] 李伟,李春根,穆晓红等.基于网络药理学预测独活寄生汤治疗强直性脊柱炎作用机制[J].辽宁中医药大学学报,2021,23(09):108-114.
- [102] 石金杰,张华东,赵亚男,等.基于网络药理学探讨补肾强脊颗粒治疗强直性脊柱炎的机制[J].北京中医药,2021,40(04):431-435.
- [103] 张婷,薛笑笑,张昆,等.基于网络药理学分析解痉舒督汤治疗强直性脊柱炎的作用机制[J].临床医学研究与实践,2021,6(01):5-7+14.
- [104] 王卓,石忠峰,王风云,等.基于网络药理学研究寒湿痹颗粒治疗强直性脊柱炎的机制[J].中国组织工程研究,2020,24(11):1738-1744.
- [105] 邱冬妮,潘峰,谭希,等.基于网络药理学探讨补肾强督治痿方治疗强直性脊柱炎的作用机

- 理[J].中医杂志,2018,59(02):1
- [106] Zhang S, Fan Z, Ouyang Z, et.al. Purine metabolites promote ectopic new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. Int Immunopharmacol, 2023,116:109810.
- [107] Fang Y, Liu J. Novel regulatory role of non-coding RNAs in ankylosing spondylitis[J]. Front Immunol,2023,14:1131355.
- [108] Park YG, Goh TS, Kim DS, et.al. Relationships between Clinical Status and Gait Parameters in Ankylosing Spondylitis[J]. Clin Orthop Surg,2023 ,15(2):249-256.
- [109] Walsh JA, Saffore CD, Collins EB, et.al. Clinical and Economic Benefit of Advanced Therapies for the Treatment of Active Ankylosing Spondylitis[J]. Rheumatol Ther,2023 ,0(5):1385-1398.
- [110] Kim SH, Lee SH. Updates on ankylosing spondylitis: pathogenesis and therapeutic agents[J]. Rheum Dis, 2023,30(4):220-233.
- [111] Zhang H, Hu J, Zhang C, et.al. Treating thoracic-lumbar Andersson lesion in patients with ankylosing spondylitis: case series[J]. Ann Med Surg (Lond), 2023,85(5):1420-1424.
- [112] Li X, Yu W, Jia Z, et.al. Frontiers of ankylosing spondylitis research: an analysis from the top 100 most influential articles in the field[J]. Clin Exp Med, 2023,23(7):3019-3040.
- [113] Khan MA. HLA-B*27 and Ankylosing Spondylitis: 50 Years of Insights and Discoveries[J]. Curr Rheumatol Rep, 2023,25(12):327-340.
- [114] Tian D, Zhou Y, Chen Y,et.al. Genetically predicted ankylosing spondylitis is causally associated with psoriasis[J]. Front Immunol,2023,14:1149206.
- [115] Resende GG, Saad CGS, de Oliveira DCM,et.al.HLA-B27 positivity in a large miscegenated population of 5,389,143 healthy blood marrow donors in Brazil[J]. Adv Rheumatol, 2023,63(1):16.
- [116] 徐德君. 基于 IL-23/Th17 轴探讨长蛇灸对 BALB/c 小鼠诱导的强直性脊柱炎的机制研究[D].云南中医药大学,2023.
- [117] Taitt HA, Balakrishnan R. Spondyloarthritides[J]. Immunol Allergy Clin North Am, 2023 ,43(3):593-612.
- [118] 张曙琼,邵粉丽,孙洋.强直性脊柱炎发病机制及药物调控研究进展[J].中国药理学通报,2022,38(12):1761-1766.
- [119] Wendling D. An overview of investigational new drugs for treating ankylosing spondylitis[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2016,25(1):95-104.
- [120] 姜佳彤,刘天月,武风云,等.强直性脊柱炎易感基因的研究进展[J].吉林医药学院学报,2024,1-4.
- [121] 谭希,徐永跃,邱冬妮,等.强直性脊柱炎动物模型归类及其机制研究与进展[J].中国组织工程研究,2017,21(11):1783-1789.
- [122] Hanson A, Brown MA. Genetics and the Causes of Ankylosing Spondylitis[J]. Rheum Dis Clin North Am,2017,43(3):401-414.
- [123] 穆杰,徐永申,朱辉.AF4/FMR2、IL-10 基因多态性与强直性脊柱炎的遗传易感性和免疫浸润相关[J].南方医科大学学报,2023,43(05):741-748.
- [124] 任燕,张俊莉,杨姝怡.痹祺胶囊联合雷公藤多甙治疗强直性脊柱炎的效果及对患者血液高凝状态和 B、T 淋巴细胞衰减因子的影响[J].临床医学研究与实践,2022,7(13):87-89.
- [125] 张冬青,赵娇,龙丽娟.强直性脊柱炎患者 HLA-B27 核酸、炎症指标、免疫指标的临床意

- 义分析[J].检验医学与临床,2023,20(13):1846-1849.
- [126] 陈溶微,谢文静,江裕,等.强直性脊柱炎患者外周血 CD4+CD25+Foxp3+调节性 T 细胞的变化及临床意义[J].右江医学,2022,50(04):280-285.
- [127] 朱康祥,金盛,祝军峰,等.CD19+CD24^{high}CD27+调节性 B 细胞在强直性脊柱炎检测中的临床意义[J].中国卫生检验杂志,2021,31(08):989-991.
- [128] 张宇,马莉,吴青青,等.强直性脊柱炎患者外周血 CD4+CD25^{high}CD127^{low}、CD8+CD28-调节性 T 细胞水平变化及临床意义[J].中国免疫学杂志,2020,36(13):1625-1630.
- [129] 吴琪,秦桂福,郑毅等.十全育真汤对早期活动性强直性脊柱炎患者外周血 Th17/Treg 细胞平衡的影响[J].风湿病与关节炎,2023,12(07):15-19+31.
- [130] Luan Z, Wang Y. Association between ankylosing spondylitis and m6A methylation[J]. JOrthop Surg Res,2023,18(1):757.
- [131] McGonagle D, David P, Macleod T, et.al. Predominant ligament-centric soft-tissue involvement differentiates axial psoriatic arthritis from ankylosing spondylitis[J]. Nat Rev Rheumatol,19(12):818-827.
- [132] Kocyigit BF, Sagtaganov Z, Yessirkepov M, et.al. Assessment of complementary and alternative medicine methods in the management of ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, and fibromyalgia syndrome[J]. Rheumatol Int,2023,43(4):617-625.
- [133] Won EJ, Kim HJ, Lee YJ, et.al. CCL20 inhibition for treating inflammation in ankylosing spondylitis[J]. Rheumatology (Oxford),2023,62(12):4000-4005.
- [134] Paul L, McDonald MT, McConnachie A, et.al. Online physiotherapy for people with axial spondyloarthritis: quantitative and qualitative data from a cohort study[J]. Rheumatol Int,2024,44(1):145-156.
- [135] Chen S, Li Z, Chen D, et.al. Piezo1-mediated mechanotransduction promotes enthesal pathological new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis,2023 , 82(4):533-545.
- [136] Liu S, Niu T, Wang Y. Beaklike ossification in ankylosing spondylitis[J]. QJM,2023,16(11):949.
- [137] Jaśkiewicz Ł, Chmielewski G, Kuna J, et.al. The Role of Sclerostin in Rheumatic Diseases: A Review[J]. J Clin Med,2023,12(19):6248.
- [138] Jiang N, Liu HX, Liang HY,et.al. Osteogenic differentiation characteristics of hip joint capsule fibroblasts obtained from patients with ankylosing spondylitis[J]. Ann Transl Med,2021,9(4):331.
- [139] Kusuda M, Haroon N, Nakamura A. Complexity of enthesitis and new bone formation in ankylosing spondylitis: current understanding of the immunopathology and therapeutic approaches[J]. Mod Rheumatol, 2022 ,32(3):484-492.
- [140] Liu C, Liang T, Zhang Z,et.al. Transfer of microRNA-22-3p by M2 macrophage-derived extracellular vesicles facilitates the development of ankylosing spondylitis through the PER2-mediated Wnt/ β -catenin axis[J]. Cell Death Discov, 2022 ,8(1):269.
- [141] Fu L, Wang G, Deng W, et.al. MicroRNAs in the Pathogenesis of Ankylosing Spondylitis and their Clinical Implication[J]. Curr Mol Med, 2023,23(10):1058-1065.
- [142] Su Y, Xing H, Kang J,et.al. Role of the hedgehog signaling pathway in rheumatic diseases: An overview[J]. Front Immunol. 2022,13:940455.

- [143] Baraliakos X, Kiltz U, Kononenko I, et al. Treatment overview of axial spondyloarthritis in 2023[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2023, 37(3): 101858.
- [144] Deshpande G, Sonawale A, Mulkalwar A, et al. Short-Term Efficacy and Adverse Effects of Sulfasalazine in the Management of Axial Spondyloarthropathy[J]. Cureus, 2023, 15(12): e49978.
- [145] LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases[J]. Antirheumatic Agents. 2021, 56: 316-529.
- [146] Brutzkus JC, Shahrokhi M, Varacallo M[J]. Naproxen, 2023, 4: 556-845.
- [147] Kim JW, Yoon JS, Park S, et al. Risk of cardiovascular disease associated with long-term use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in ankylosing spondylitis[J]. Rheumatology (Oxford), 2024, 12: 684.
- [148] Khalil NY, Aldosari KF. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol[J]. Meloxicam, 2020, 45: 159-197.
- [149] Yoo WH, Kang YM, Kim DW, et al. Safety and Effectiveness of Etanercept Biosimilar SB4 for Rheumatic Diseases in South Korea: Real-World Post-marketing Surveillance Data[J]. Rheumatol Ther, 2023, 10(2): 329-341.
- [150] Sakaguchi A, Kondo N, Kakutani R, et al. A case of juvenile-onset ankylosing spondylitis effectively treated with tumour necrosis factor-alpha inhibitor agents[J]. Mod Rheumatol Case Rep, 2024, 7: 006.
- [151] Dubinina TV, Gaidukova IZ, Sableva NA, et al. Comparative Pharmacoeconomic Effectiveness of Interleukin-17 Inhibitors for the Treatment of Ankylosing Spondylitis[J]. Dokl Biochem Biophys, 2023, 511(1): 173-179.
- [152] Tian C, Shu J, Shao W, et al. Efficacy and safety of IL inhibitors, TNF- α inhibitors, and JAK inhibitors in patients with ankylosing spondylitis: a systematic review and Bayesian network meta-analysis[J]. Ann Transl Med, 2023, 11(4): 178.
- [153] 施桂英. 强直性脊柱炎诊治指南 (草案) [J]. 中华风湿病学杂志, 2003, 7(10): 599.
- [154] 易浩, 李可, 谭希, 等. 补肾强督治痿方对强直性脊柱炎炎症及 IL-23/IL-17 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(02): 1081-1087.
- [155] 丁香. 健脾清热通络方调控 NONHSAT227927.1/JAK2/STAT3 组合改善强直性脊柱炎湿热痹阻证患者感受的机制研究[D]. 安徽中医药大学, 2024.
- [156] 谭希. 补肾强督治痿方有效成分分析以及对 IL-23/Th17 炎症轴的影响[D]. 广州中医药大学, 2019.
- [157] Wei L, Zhang X, Yao Y, et al. LncRNA HOTTIP impacts the proliferation and differentiation of fibroblast-like synoviocytes in ankylosing spondylitis through the microRNA-30b-3p/PGK1 axis[J]. Orthop Surg Res, 2023, 18(1): 237.
- [158] Ding M, Cheng Y, Xu Z, et al. Hypoxia Inhibits Osteogenesis and Promotes Adipogenesis of Fibroblast-like Synoviocytes via Upregulation of Leptin in Patients with Rheumatoid Arthritis[J]. Immunol Res, 2022, 2022: 1431399.
- [159] Shakeri F, Kiani S, Rahimi G, et al. Anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of Berberis vulgaris and its constituent berberine, experimental and clinical, a review[J]. Phytother Res, 2024, 15: 665-677.

- [160]Klavdianou K, Tsiami S, Baraliakos X. New developments in ankylosing spondylitis-status in 2021[J]. Rheumatology (Oxford), 2021, 60:29–37.
- [161]Mo Q, Zhang W, Zhu A,et al. Regulation of osteogenic differentiation by the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α : current conclusions and controversies[J]. Hum Cell, 2022, 35: 957–71.
- [162]Fischer V, Haffner-Luntzer M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis[J]. Semin Cell Dev Biol ,2022, 123: 14–21.
- [163]Falconer J, Murphy AN, Young SP, et al. Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2018, 70: 984–99.
- [164]Afify SM, Hassan G, Seno A,et al. Cancer-inducing niche: the force of chronic inflammation[J]. Br J Cancer, 2022, 127: 193–201.
- [165]Liu R, Zhao P, Zhang Q, et al. Adiponectin promotes fibroblast-like synoviocytes producing IL-6 to enhance T follicular helper cells response in rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2020, 38: 11–8.
- [166]Dinesh P, Rasool M. Berberine mitigates IL-21/IL-21R mediated autophagic influx in fibroblast-like synoviocytes and regulates Th17/Treg imbalance in rheumatoid arthritis[J]. Apoptosis, 2019, 24: 644–61.
- [167]Zhou J, Yu Y, Yang X, et al. Berberine attenuates arthritis in adjuvant-induced arthritic rats associated with regulating polarization of macrophages through AMPK/NF- κ B pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 852: 179–88.
- [168]Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. Immunol Rev, 2010, 233: 233–55.
- [169]Nygaard G, Firestein GS. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes[J]. Nat Rev Rheumatol, 2020,16: 316–33.
- [170]Mahmoud DE, Kaabachi W, Sassi N, et al. The synovial fluid fibroblast-like synoviocyte: A long-neglected piece in the puzzle of rheumatoid arthritis pathogenesis[J]. Front Immunol ,2022,13: 942417.
- [171]Tsaltzkan V, Firestein GS. Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Pharmacol, 2022, 67: 102304.
- [172]Mousavi MJ, Karami J, Aslani S, et al. Transformation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis; from a friend to foe[J]. Auto Immun Highlights, 2021,12: 3.
- [173]Furst DE, Louie JS. Targeting inflammatory pathways in axial spondyloarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21: 135.
- [174]Fiehn C. Treatment of rheumatoid arthritis and spondylarthritis with biologics[J]. Internist (Berl), 2022, 63: 135–42.
- [175]Tan J, Dai A, Pan L, et al. Inflamm-Aging-Related Cytokines of IL-17 and IFN- γ Accelerate Osteoclastogenesis and Periodontal Destruction[J]. Immunol Res, 2021, 2021: 9919024.
- [176]Li M, Tian F, Guo J,et.al. Therapeutic potential of Coptis chinensis for arthritis with underlying mechanisms[J]. Front Pharmacol, 2023,14:1243820.
- [177]Yang F, Gao R, Luo X, et.al. Berberine influences multiple diseases by modifying gut microbiota[J]. Front Nutr, 2023,10:1187718.
- [178]Tian E, Sharma G, Dai C. Neuroprotective Properties of Berberine: Molecular Mechanisms

- and Clinical Implications[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023,12(10):1883.
- [179]Peng L, Kang S, Yin Z, et al. Antibacterial activity and mechanism of berberine against *Streptococcus agalactiae*[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 5217–23.
- [180]Samadi P, Sarvarian P, Gholipour E, et al. Berberine: A novel therapeutic strategy for cancer[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72: 2065–79.
- [181]Dong H, Zhao Y, Zhao L, Lu F. The effects of berberine on blood lipids: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Planta Med*, 2013, 79: 437–46.
- [182]Liang Y, Xu X, Yin M, et al. Effects of berberine on blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic literature review and a meta-analysis[J]. *Endocr J*, 2019, 66: 51–63.
- [183]Wang L, Yu C, Fu Y, et al. Berberine elicits anti-arrhythmic effects via IK1/Kir2.1 in the rat type 2 diabetic myocardial infarction model[J]. *Phytother Res*, 2011, 25: 33–7.
- [184]Suadoni MT, Atherton I. Berberine for the treatment of hypertension: A systematic review[J]. *Complement Ther Clin Pract*, 2021, 42: 101287.
- [185]Ma W, Zhang Y, Yu M, et al. In-vitro and in-vivo anti-breast cancer activity of synergistic effect of berberine and exercise through promoting the apoptosis and immunomodulatory effects[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 87: 106787.
- [186]Guo Q, Lu T, Zhang M, et al. Protective Effect of Berberine on Acute Gastric Ulcer by Promotion of Tricarboxylic Acid Cycle-Mediated Arachidonic Acid Metabolism[J]. *Inflamm Res*, 2024, 17:15-28.
- [187]Wang X, Liang F, Dai Z, et al. Combination of *Coptis chinensis* polysaccharides and berberine ameliorates ulcerative colitis by regulating gut microbiota and activating AhR/IL-22 pathway[J]. *Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt B):117050.
- [188]Shen P, Jiao Y, Miao L, et al. Immunomodulatory effects of berberine on the inflamed joint reveal new therapeutic targets for rheumatoid arthritis management[J]. *Cell Mol Med*, 2020,24: 12234–45.
- [189]Ehteshamfar S-M, Akhbari M, Afshari JT, et al. Anti-inflammatory and immune-modulatory impacts of berberine on activation of autoreactive T cells in autoimmune inflammation[J]. *JCell Mol Med*, 2020,24: 13573–88.
- [190]Singh S, Pathak N, Fatima E, et al. Plant isoquinoline alkaloids: Advances in the chemistry and biology of berberine[J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 226: 113839.
- [191]Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological Activity of Berberine-A Summary Update[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12: 713.
- [192]Zhu W, He X, Cheng K, et al. Ankylosing spondylitis: Etiology, pathogenesis, and treatments [J]. *Bone Res*, 2019, 7: 22.
- [193]Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, et al. Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 637829.
- [194]Liao H T, Tsai C Y. Cytokines and regulatory T cells in ankylosing spondylitis [J]. *Bone Joint Res*, 2023, 12: 133–137.
- [195]李家江, 王守鹏, 张兆川, 等. 微小 RNA-146a 靶向调控 Krüppel 样转录因子 7 对强直性脊柱炎 T 细胞炎症反应及自噬的影响 [J]. *安徽医药*, 2022, 26 (8): 1611-1614.
- [196]Van der Heijde D, Deodhar A, Baraliakos X, et al. Efficacy and safety of bimekizumab in

- axial spondyloarthritis: Results of two parallel phase 3 randomised controlled trials [J]. *Ann Rheum Dis*, 2023, 82 (4): 515–526.
- [197]Cai L, Zhou MY, Hu S, et al. Umbelliferone Inhibits Migration, Invasion and Inflammation of Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synoviocytes and Relieves Adjuvant-Induced Arthritis in Rats by Blockade of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway[J]. *Am J Chin Med*, 2022,50(7):1945-1962.
- [198]Sun Y, Huang H, Zhan Z, et al. Berberine inhibits glioma cell migration and invasion by suppressing TGF- β 1/COL11A1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022 , 625:38-45.
- [199]Hu Q, Li L, Zou X, et al. Berberine Attenuated Proliferation, Invasion and Migration by Targeting the AMPK/HNF4 α /WNT5A Pathway in Gastric Carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2018,9:1150.
- [200]Svensson M N D, Zoccheddu M, Yang S, et al. Synoviocyte-targeted therapy synergizes with TNF inhibition in arthritis reversal [J]. *Sci Adv*, 2020, 6 (26): eaba4353.
- [201]Hui W, Zhao C, Bourgoin S G. Differential effects of inhibitor combinations on lysophosphatidic acid-mediated chemokine secretion in unprimed and tumor necrosis factor- α -primed synovial fibroblasts [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 848.
- [202]Farkhondeh T, Mehrpour O, Buhrmann C, et al. Organophosphorus compounds and MAPK signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4258.
- [203]Ijomone O M, Iroegbu J D, Aschner M, et al. Impact of environmental toxicants on p38- and ERK-MAPK signaling pathways in the central nervous system [J]. *Neurotoxicology*, 2021, 86: 166–171.
- [204]Rovida E, Tusa I. Targeting MAPK in Cancer 2.0 [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (10): 5702.
- [205]Li J, Z. Chen Z, H. Liao H, et al. Anti-osteogenic effect of Danshensu in ankylosing spondylitis: An in vitro study based on integrated network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 772190.
- [206]Tang Y, Yang K, Liu Q, et al. Preosteoclast plays a pathogenic role in syndesmophyte formation of ankylosing spondylitis through the secreted PDGFB - GRB2/ERK/RUNX2 pathway [J]. *Arthritis Res Ther*, 2023, 25 (1): 194.
- [207]Sharma A R, Jagga S, Chakraborty C, et al. Fibroblast-like-synoviocytes mediate secretion of pro-inflammatory cytokines via ERK and JNK MAPKs in ti-particle-induced osteolysis [J]. *Materials (Basel)*, 2020, 13 (16): 3628.
- [208]Czarnecka A M, Synoradzki K, Firlej W, et al. Molecular biology of osteosarcoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (8): 2130.
- [209]Leone G M, Mangano K, Petralia M C, et al. Past, present and (foreseeable) future of biological anti-TNF alpha therapy [J]. *J Clin Med*, 2023, 12 (4): 1630.
- [210]Bautista-Molano W, Romero-Sánchez C, De Ávila J, et al. Bone remodeling in spondyloarthritis[J]. *Rev Med Chil*, 2013, 141: 1182–9.
- [211]González-Chávez SA, Quiñonez-Flores CM, Pacheco-Tena C. Molecular mechanisms of bone formation in spondyloarthritis[J]. *Joint Bone Spine*, 2016, 83: 394–400.
- [212]Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17[J].

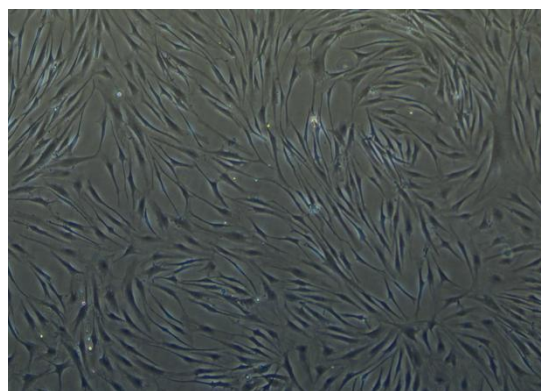
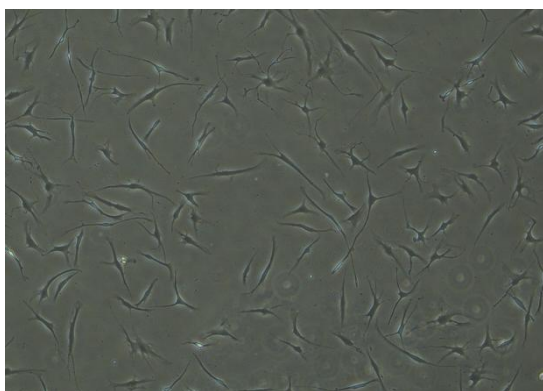
Rheumatology (Oxford), 2008, 47: 1635–40.

[213]Tanida A, Kishimoto Y, Okano T,et al. Etanercept Promotes Bone Formation via Suppression of Dickkopf-1 Expression in Rats with Collagen-Induced Arthritis[J]. Yonago Acta Med, 2013,56: 13–9.

[214]Henderson J, Pryzborski S, Stratton R,et al. Wnt antagonist DKK-1 levels in systemic sclerosis are lower in skin but not in blood and are regulated by microRNA33a-3p[J]. Exp Dermatol,2021, 30: 162–8.

附 录

1 实验过程及学术会议



2 伦理审查表

附件 4 伦理审查意见 (FJ/04-IRB/C/018-V4.1)

伦理审查意见

意见号	2021-115-01		
项目名称	盐酸小檗碱对成纤维样滑膜细胞 IL-23/IL-17 信号通路的影响及作用机制研究		
项目来源	重点研究计划-社发领域		
研究单位	甘肃省中医院		
主要研究者	张邦能		
审查类别	初始审查	审查方式	会议审查
审查日期	2021.11.10	审查地点	甘肃省中医院东院区 8 号楼 8 楼会议室
审查委员	王海东、徐柏林、罗向霞、杨维建、田旭东、石宗珂、吴心音、韩 羽。		
审查文件	科研项目伦理审查申请表；主要研究者简历；研究经济利益声明；毕业证；执业证；研究方案（版本号：1.0 版，版本日期：2021 年 10 月 11 日）；知情同意书（版本号：1.0 版，版本日期：2021 年 10 月 11 日）；任务书；研究者手册。		
审查意见	根据《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》（2016 年）、《药物临床试验伦理审查工作指导原则》（2010 年）、《药物临床试验质量管理规范》（2020 年）、《医疗器械临床试验质量管理规范》（2016 年）、WMA《赫尔辛基宣言》和 CIOMS《人体生物医学研究国际道德指南》的伦理原则，经本伦理委员会审查，同意按所审查的临床研究方案、知情同意书等材料开展本项试验/研究。 请遵循 GCP 原则、遵循伦理委员会同意的方案开展临床研究，保护受试者的健康与权利。 研究过程中若变更主要研究者，或对研究方案、知情同意书、招募材料、以及提供给受试者的其他书面资料的修改，申请人均需提交“修正案审查申请”，伦理委员会审查同意后方可实施。 本院发生的所有严重不良事件，请申请人及时提交严重不良事件报告。 研究者应当按照伦理审查意见所要求的年度/定期审查频率，在截止日期前一个月提交研究进展报告。如果伦理审查同意研究的有效期到期，通过研究进展报告申请延长有效期，请申请人及时向伦理委员会提交研究进展报告。 研究纳入了不符合纳入标准或符合排除标准的受试者，符合终止试验规定而未让受试者退出研究，给予错误的治疗或剂量，给予方案禁止的合并用药等情况；或者可能对受试者的权益和安全、以及研究的科学性造成显著影响的情况，请申请人提交违背方案报告。 研究者/申办者提前终止或者暂停临床试验，申请人应当及时向伦理委员会提交终止/暂停研究报告。 研究完成后，请申请人向伦理委员会提交研究完成报告和分中心小结表，以证明研究的完成。		
年度跟踪审查频率	12 个月		
有效期	2021.11.13-2022.11.12		
联系人与联系电话	李玉梅，		
伦理委员会主任委员/副主任委员签字			
伦理委员会	甘肃省中医院伦理委员会 (盖章)		
日期	2021.11.12		