

黄芩苷对大鼠类风湿性关节炎软骨损伤的影响

孙标¹, 邓翠翠¹, 王加¹, 刘超¹, 王利华²

(1. 宜昌市中医医院骨科, 湖北宜昌 443003; 2. 武汉科技大学附属医院骨科, 湖北武汉 430000)

摘要:【目的】探讨黄芩苷对完全弗氏佐剂(CFA)诱导的大鼠类风湿性关节炎(RA)的治疗作用及机制。【方法】将40只SD大鼠随机分为5组,即假手术组,模型组,黄芩苷低、中、高剂量组,每组8只。除假手术组注射0.1 mL生理盐水外,其余各组大鼠均于右后足垫皮内一次性注射0.1 mL CFA诱导类风湿关节炎大鼠模型。成功造模后,黄芩苷低、中、高剂量组每天在同一时间分别给予对应剂量为25、50、100 mg/kg的黄芩苷(溶于生理盐水配制)灌胃,假手术组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,连续给药14 d。采用苏木素-伊红(HE)染色法观察膝关节病理变化,CT扫描测量骨小梁间距,进行碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素含量的检测,番红O染色法观察软骨损伤情况,蛋白免疫印迹法检测股骨组织Osx、Col1a1、Dlx-2、白细胞介素(IL)-6、IL-10、Janus激酶1(JAK1)、磷酸化JAK1(p-JAK1)、信号转导转录激活因子3(STAT3)、磷酸化STAT3(p-STAT3)表达水平,酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测血清IL-17、IL-23、IL-10的水平。【结果】与假手术组比较,模型组大鼠关节组织出现明显的病理损伤,软骨损伤严重,骨小梁间距显著增宽($P < 0.05$),ALP、骨钙素含量显著降低($P < 0.05$),Osx、Col1a1和Dlx-2表达水平显著下调($P < 0.05$),IL-6、IL-10、IL-17、IL-23细胞因子水平及p-JAK1/JAK1和p-STAT3/STAT3的相对表达量均显著上调($P < 0.05$);与模型组比较,黄芩苷处理组尤其是高剂量组(100 mg/kg)可显著改善类风湿关节炎大鼠对软骨破坏的炎症反应及滑膜增生,改善软骨损伤,减小骨小梁间距($P < 0.05$),升高ALP和骨钙素的含量($P < 0.05$),且明显上调Osx、Col1a1、Dlx-2、IL-10表达水平($P < 0.05$),下调细胞因子IL-6、IL-17、IL-23的水平及p-JAK1/JAK1和p-STAT3/STAT3的相对表达量($P < 0.05$)。【结论】黄芩苷可修复CFA诱导的类风湿性关节炎大鼠炎症损伤和骨组织病变,其可能是通过抑制JAK1/STAT3通路激活发挥作用。

关键词: 黄芩苷; 类风湿性关节炎; 成骨分化; 炎症反应; JAK1/STAT3通路; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)07-1440-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.07.025

Effects of Baicalin on Cartilage Injury in Rheumatoid Arthritis Rats

SUN Biao¹, DENG Cui-Cui¹, WANG Jia¹, LIU Chao¹, WANG Li-Hua²

(1. Dept. of Orthopaedics, Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443003 Hubei, China; 2. Dept. of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430000 Hubei, China)

Abstract: Objective To explore the treatment effects of baicalin for rheumatoid arthritis injury induced by complete Freund's adjuvant (CFA) in rats and its mechanism. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into 5 groups, namely sham-operation group, model group, and low-, middle-, and high-dose groups, 8 rats in each group. Apart from the sham-operation group given injection of 0.1 mL of normal saline, the rats of other groups were given one-off intradermal injection of 0.1 mL of CFA into the right hind foot pad to induce into rheumatoid arthritis model. After modeling, the low-, middle-, and high-dose baicalin groups were given intragastric administration of baicalin (dissolved in normal saline) at the dosage of 25, 50, 100 mg/kg at the same time every day, respectively, and the sham-operation group and model group were given intragastric administration of the same volume of normal saline, the treatment lasting 14 days. The pathological changes in knee joint were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining method, trabecular bone spacing was measured by CT scan, contents of alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin in serum were detected, cartilage injury was observed by safranin O staining method, expression levels of Osx, Col1a1, Dlx-2, interleukin (IL)-6, IL-10, Janus

收稿日期: 2020-07-01

作者简介: 孙标(1977-),男,主治医师; E-mail: sunbiao102030@163.com

基金项目: 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目(编号: WJ2015MB120)

kinase 1(JAK1), phosphorylated JAK1(p-JAK1), signal transducers and activators of transcription 3(STAT3), phosphorylated STAT3(p-STAT3) in femur tissue were determined by Western blotting assay, levels of serum IL-17, IL-23, IL-10 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with the sham-operation group, the obvious pathological changes in knee joint were seen in the model group, and the trabecular spacing was significantly widened($P < 0.05$), serum contents of ALP and osteocalcin were significantly reduced ($P < 0.05$), cartilage damage was found, expression levels of Osx, Col1a1 and Dlx-2 were significantly down-regulated ($P < 0.05$), and levels of cytokine IL-6, IL-10, IL-17 and IL-23 and relative expression contents of p-JAK1/JAK1 and p-STAT3/STAT3 were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with the model group, the obvious pathological changes in knee joint were improved in the baicalin group, especially in the high-dose baicalin group (100 mg/kg), and the trabecular spacing was significantly reduced ($P < 0.05$), serum contents of ALP and osteocalcin were significantly enhanced ($P < 0.05$), cartilage damage was relieved, expression levels of Osx, Col1a1, Dlx-2 and IL-10 were significantly up-regulated ($P < 0.05$), and levels of cytokine IL-6, IL-17 and IL-23 and relative expression contents of p-JAK1/JAK1 and p-STAT3/STAT3 were significantly down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalin is effective for protecting rats from CFA-induced rheumatoid arthritis injury and bone tissue lesions, and it plays a role of inhibiting activation of JAK1/STAT3 pathway.

Keywords: baicalin; rheumatoid arthritis; osteogenic differentiation; inflammatory response; JAK1/STAT3 pathway; rats

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis)是一种慢性、对称和全身性的自身免疫性关节疾病,其主要特征为滑膜增生、关节和周围组织炎症以及骨骼和软骨组织破坏^[1-2]。其病因不明,发病机理复杂,可导致关节破坏和畸形,使人们丧失工作能力甚至死亡。目前,类风湿关节炎的治疗策略已从使用传统的非甾体类抗炎药、糖皮质激素和疾病改良型抗风湿药变为靶向细胞因子包括肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、环氧合酶(COX)和白细胞介素(IL)等的生物靶向剂^[3-4],但这些药物成本高昂且伴有严重副作用,包括免疫缺陷、肠胃不适和体液疾病等。中草药被认为是现代西药的补充疗法,其副作用低,便于抗风湿性关节炎的长期康复治疗,恰好弥补了非甾体抗炎药治疗的不足^[5]。黄芩,是唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi的根,味苦,性寒,无毒,有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效,用于湿温、暑温胸闷呕恶、湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽、高热烦渴、血热吐衄、痈肿疮毒、胎动不安等病证的治疗。黄芩苷(baicalin)是从黄芩的根部分离出来的一种黄酮类化合物,可抑制炎症、调控免疫功能^[6],改善类风湿关节炎大鼠症状、减轻关节炎炎

症反应,疗效较好,不良反应小^[7-9]。有研究表明,Janus激酶(JAK)/信号转导转录激活因子3(STAT3)信号通路可调控炎症反应,激活该信号,可促进类风湿关节炎疾病的进展^[10]。为进一步探讨黄芩苷治疗类风湿关节炎的作用机制,本研究拟观察黄芩苷对类风湿关节炎大鼠骨组织JAK/STAT3途径的调控作用,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康SPF级雌性SD大鼠40只,体质量(180 \pm 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物质量合格证号:SCXK(京)2016-0011。饲养环境保持温度在25 $^{\circ}$ C左右,湿度50%~70%,12h光照,动物自由饮水,3d换1次垫料,保持鼠笼清洁干燥。所有动物实验均根据相关的国际实验动物规则和道德准则进行。

1.2 药物与试剂 黄芩苷(分子量:446.4 g/mol;分子式: C₂₁H₁₈O₁₁;批号: B20570;含量 \geq 98%)购自上海源叶生物科技有限公司。完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)(美国Sigma公司);白细胞介素(IL)-17、IL-23、IL-10酶联免疫吸附分析(ELISA)试剂盒(美国R&D公司);抗

Osx、I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(Col1a1)、Dlx-2、IL-6、IL-10、 β -actin等抗体(北京博奥森生物技术有限公司);抗JAK1、磷酸化JAK1(p-JAK1)、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)等抗体(上海赛信通公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、番红O染色液、碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司);骨钙素(osteocalcin)检测试剂盒(德国罗氏诊断有限公司)。

1.3 仪器 CX23光学显微镜(日本Olympus公司);UV-1200紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);XELx800型酶标仪(美国Perkin Elmer公司);1659001型蛋白电泳仪、小型Trans-Blot转膜仪(美国Bio-Rad公司);GIS-500型凝胶成像仪(杭州米欧仪器有限公司)。

1.4 动物模型的构建与给药 适应性喂养7 d后,将40只SD大鼠随机分为5组,即假手术组,模型组,黄芩苷低、中、高剂量组,每组各8只。除假手术组大鼠右后足垫皮内一次性注射0.1 mL生理盐水之外,其余各组大鼠均于右后足垫皮内一次性注射0.1 mL完全弗氏佐剂诱导类风湿关节炎模型(为第1天)^[11]。按照以下关节炎症状评分法,每天进行评估:正常爪,计0分;脚趾红斑,计1分;脚掌红斑和肿胀,计2分;脚踝肿胀,计3分;整个腿完全肿胀,计4分;无法弯曲,计6分。每只大鼠的关节炎指数是将4个单独爪的分数相加得出的^[12]。第1~13天观察关节炎症状,当至少1只未注射的爪发炎时,则判断类风湿关节炎模型建立成功,当第10~13天,大鼠关节炎症状已达高峰。成功造模后,第14~28天,黄芩苷低、中、高剂量组每天在同一时间分别给予对应剂量为25、50、100 mg/kg的黄芩苷(溶于生理盐水配制)灌胃,假手术组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 骨小梁间距测量 给药结束后,以戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠后,显微CT扫描股骨测量骨小梁间距(Tb.Sp)。

1.5.2 HE染色法观察关节组织病理变化 取大鼠踝关节组织,以10%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,包埋在石蜡中,石蜡切片后用HE染色,然后在光学显微镜下观察关节组织病理变化。

1.5.3 番红O染色法观察软骨损伤情况 取膝关节,脱钙、包埋、石蜡切片后番红O染色液内浸

染,分化液洗涤切片,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封固后,在光学显微镜下观察软骨病理改变。

1.5.4 血清ALP、骨钙素的检测 按ALP检测试剂盒和骨钙素检测试剂盒说明书操作。使用紫外分光光度计检测510 nm波长处吸光度值,计算大鼠血清ALP含量;使用酶标仪检测450 nm波长处吸光度值,计算大鼠血清骨钙素含量。

1.5.5 蛋白免疫印迹法检测股骨组织Osx、Col1a1、Dlx-2、IL-6、IL-10、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3表达 取股骨组织,提取总蛋白,用Nanodrop 2000测量蛋白质浓度并调平后,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,再将其转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。接下来,用含有50 g/L脱脂牛奶的Tris-HCl缓冲盐吐温溶液(TBST)将膜封闭2 h。然后,将膜与抗Osx抗体4℃孵育过夜。TBST洗涤3次,与辣根过氧化物酶(HRP)偶联的抗体37℃孵育1 h。TBST洗涤3次,加入增强的化学发光液,应用凝胶成像仪曝光,对电泳条带灰度值进行分析。Col1a1、Dlx-2、IL-6、IL-10、JAK1、p-JAK1、STAT3、p-STAT3、 β -actin等指标的检测方法同上。

1.5.6 ELISA法检测血清炎症因子IL-10、IL-17、IL-23含量 麻醉大鼠后,摘取眼球取血,静止30 min,以3 000 r/min(离心半径8.5 cm)4℃离心10 min,分离出上层血清,按照ELISA试剂盒说明书操作,应用酶标仪于波长450 nm处测定吸光度值,计算血清IL-10、IL-17、IL-23的含量。

1.6 统计方法 采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行正态分布检验和方差齐性检验。所有数值均符合正态分布和方差齐性,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠关节组织病理变化比较 图1结果显示:假手术组大鼠滑膜和软骨组织结构正常,滑膜细胞排列整齐,软骨表面光滑,关节腔内未见渗出液,无炎性细胞浸润;模型组大鼠关节表面不平整,周围大量中性粒细胞浸润,滑膜增生肥厚,纤维组织增生,软骨及骨骼损伤;与模型

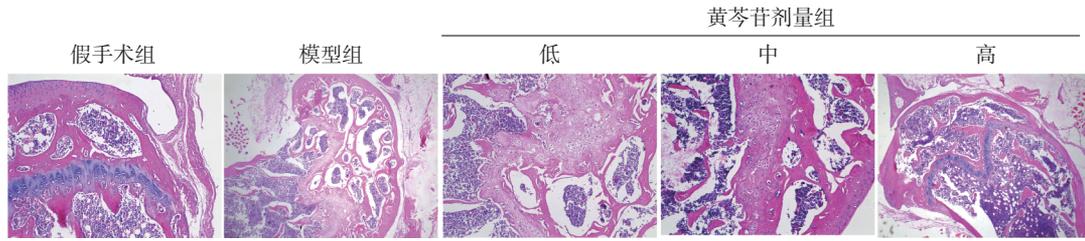


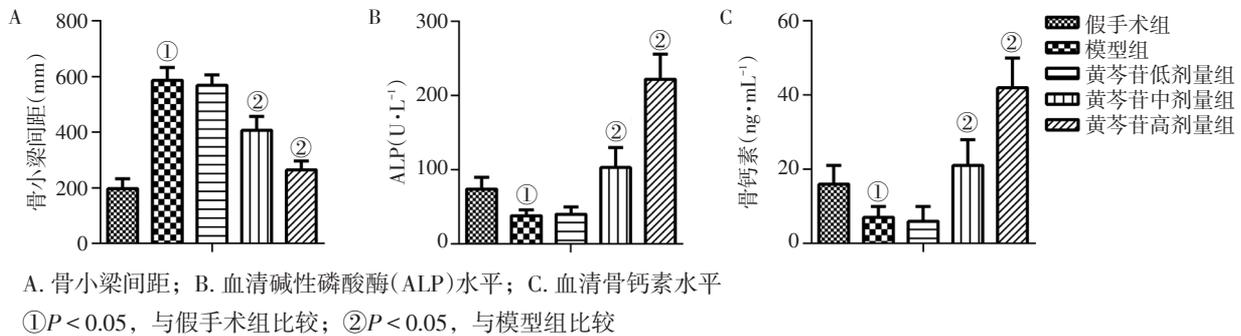
图1 各组大鼠关节组织病理变化比较(HE染色, ×200)

Figure 1 Comparison of the pathological changes in rat knee joint tissue of various groups (by HE staining, ×200)

组比较, 黄芩苷中、高剂量组大鼠滑膜增生、炎性细胞浸润、软骨表面侵蚀和关节变性显著减轻。表明黄芩苷可显著改善类风湿性关节炎大鼠软骨损伤。

2.2 各组大鼠骨小梁间距, 血清ALP、骨钙素

含量的比较 图2结果显示: 与假手术组比较, 模型组骨小梁间距增宽, 血清ALP和骨钙素含量降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷中、高剂量组骨小梁间距显著减小, 血清ALP和骨钙素含量显著升高($P < 0.05$)。



A. 骨小梁间距; B. 血清碱性磷酸酶(ALP)水平; C. 血清骨钙素水平

① $P < 0.05$, 与假手术组比较; ② $P < 0.05$, 与模型组比较

图2 各组大鼠骨小梁间距, 血清碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素含量的比较

Figure 2 Comparison of the trabecular bone spacing and serum contents of ALP and osteocalcin in various groups

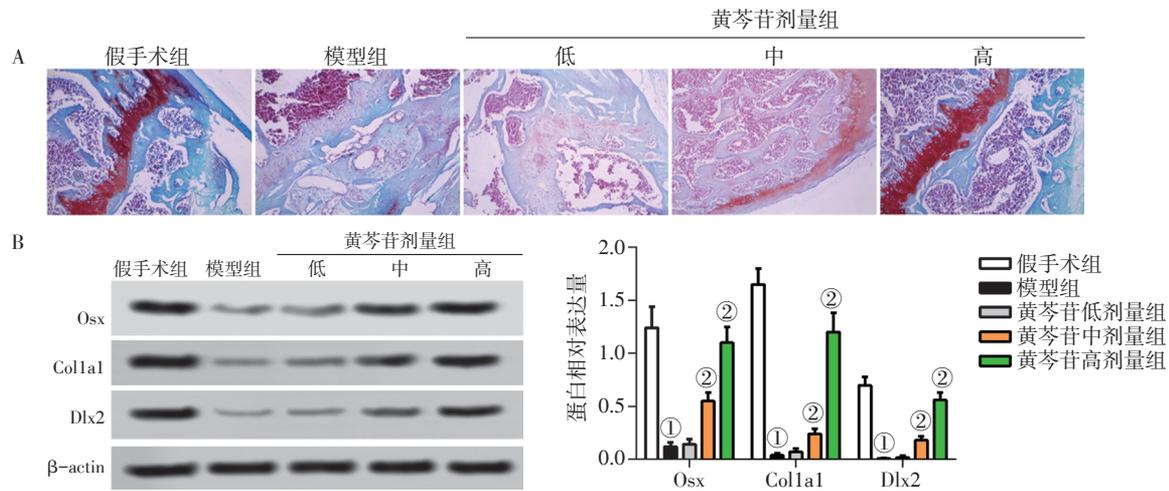
2.3 各组大鼠软骨损伤情况及成骨标记蛋白O_{sx}、Col1a1、Dlx2表达的比较 图3结果显示: 假手术组软骨基质呈红色, 结构规则, 基质较丰厚; 模型组软骨基质蛋白多糖流失几乎不着色, 缺损部位深及软骨层钙化, 软骨下骨小梁结构疏松紊乱, 且股骨组织中O_{sx}、Col1a1、Dlx2表达水平均显著下调($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷处理组尤其是高剂量组显著改善软骨损伤, 软骨基质恢复充盈, 结构恢复规则致密, 且黄芩苷中、高剂量组股骨组织中O_{sx}、Col1a1、Dlx2表达水平显著上调($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠炎症因子IL-17、IL-23、IL-6、IL-10水平的比较 图4结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠血清IL-17、IL-23、IL-10含量均显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷中、高剂量组呈剂量依赖性显著降低血清IL-17、IL-23含量, 升高血清IL-10含量($P < 0.05$)。IL-6和IL-10蛋白表达的趋势与上述结果一致。

2.5 各组大鼠股骨组织JAK1、STAT3磷酸化水平比较 图5结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨组织p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3的蛋白相对表达量显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄芩苷中、高剂量组p-JAK1/JAK1、p-STAT3/STAT3的蛋白相对表达量显著下降($P < 0.05$), 黄芩苷低剂量组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

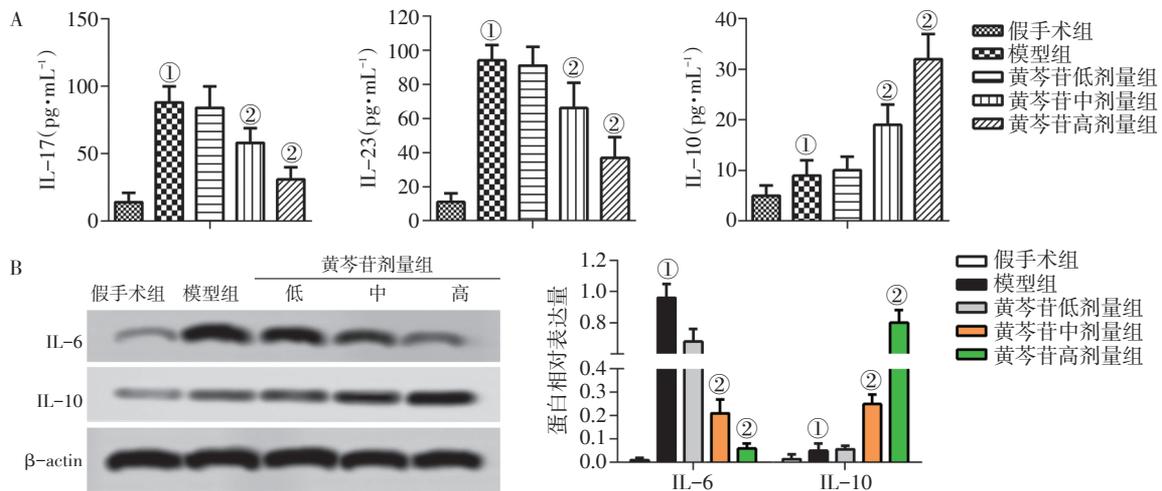
越来越多的研究^[7-9,13]表明, 黄芩苷可有效治疗类风湿性关节炎, 但其机制尚不完全明确。完全弗氏佐剂诱发的关节炎是临床前研究中常用的动物模型, 其病理特征如血管生成、炎性细胞浸润、软骨细胞降解和骨侵蚀与人类类风湿性关节炎非常相似。因此, 该模型被广泛用于类风湿性关节炎的基础研究和抗类风湿性关节炎药物的开发^[14]。本研究通过在大鼠右后足垫皮内注射完全弗氏佐剂构建了类风湿性关节炎模型, 病理组织切片结果可见类



A. 软骨组织病理表现(番红O染色, ×200); B. 股骨组织中Osx、Col1a1、Dlx2的电泳条带及相对表达量
①P < 0.05, 与假手术组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较

图3 各组大鼠软骨损伤情况及成骨标记蛋白Osx、Col1a1、Dlx2表达的比较

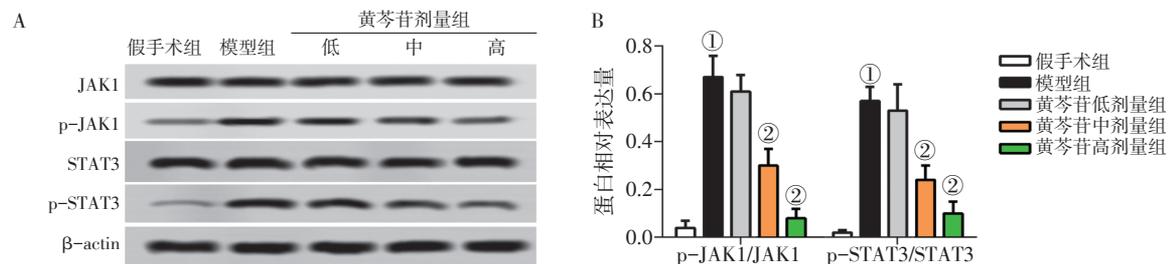
Figure 3 Comparison of the cartilage damage status and expression levels of marker Osx, Col1a1 and Dlx2 of osteogenic differentiation in various groups



A. 血清IL-17、IL-23和IL-10水平; B. IL-6、IL-10蛋白的电泳条带及相对表达量
①P < 0.05, 与假手术组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较。

图4 各组大鼠炎症因子IL-17、IL-23、IL-6、IL-10水平的比较

Figure 4 Comparison of the levels of inflammatory factor IL-17, IL-23, IL-6, IL-10 in various groups



A. JAK1、STAT3、p-JAK1、p-STAT3电泳条带; B. JAK1、STAT3磷酸化水平
①P < 0.05, 与假手术组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较

图5 各组大鼠股骨组织JAK1、STAT3磷酸化水平比较

Figure 5 Comparison of JAK1 and STAT3 phosphorylation levels in femur tissue in various groups

风湿关节炎模型大鼠关节表面不平整, 周围大量中性粒细胞浸润, 滑膜增生肥厚, 软骨及骨骼损伤, 表明类风湿关节炎模型构建成功。给予黄芩苷干预后, 类风湿关节炎大鼠软骨的破坏及炎症反应明显改善, 滑膜增生、炎性细胞浸润和软骨破损显著减轻, 表明黄芩苷对类风湿关节炎具有潜在的保护作用。

ALP和骨钙素均由成骨细胞合成分泌。ALP的活性是反映成骨细胞分化程度和功能状态的良好指标^[15]。骨钙素是骨组织的特异性蛋白, 目前认为血清骨钙素是反映成骨细胞功能的标志物^[16]。骨小梁间距, 可反映骨小梁结构形态的变化。本研究结果显示: 类风湿关节炎大鼠骨小梁间距显著变宽, ALP和骨钙素含量显著降低, 黄芩苷能够逆转骨小梁间距, 恢复骨小梁正常结构, 且能显著增加ALP和骨钙素含量。表明黄芩苷能够促进类风湿关节炎大鼠的骨分化, 改善骨小梁结构。

类风湿关节炎的关节滑膜炎和增生导致血管翳形成, 进而侵犯关节软骨, 最终导致骨关节畸形和功能丧失^[11]。当软骨受到损伤时, 软骨中的糖蛋白会释放出来, 使基质成分分布不均匀, 导致番红O淡染或不着色^[17]。本研究番红O染色结果显示, 假手术组大鼠软骨基质呈红色, 结构规则, 基质较丰厚, 模型组大鼠软骨基质几乎不着色, 表明模型组大鼠软骨基质蛋白多糖流失严重。且模型组大鼠股骨匀浆中成骨细胞分化和骨形成过程中的关键调控因子Osx、Col1a1和Dlx2表达水平显著下调。但经黄芩苷干预后, 软骨病理损伤得到显著改善, Osx、Col1a1和Dlx2表达水平显著上调, 故表明黄芩苷可显著逆转类风湿关节炎大鼠软骨损伤。

有研究证实, 患者血清或关节炎中促炎性细胞因子IL-6、IL-17和IL-23, 抗炎性细胞因子IL-10的水平, 与关节的损坏和破坏密切相关^[18-19]。抑制这些促炎性细胞因子、促进抗炎性细胞因子水平对类风湿关节炎有积极的治疗作用。本研究结果显示, 类风湿关节炎大鼠血清IL-17、IL-23和IL-10表达水平均显著上调, 给予黄芩苷尤其是100 mg/kg剂量处理后, IL-17和IL-23表达水平显著下调, 抗炎因子IL-10表达水平显著上调, 表明黄芩苷通过其抗炎作用可减轻类风湿关节炎炎症反应。

JAK1/STAT3作为介导类风湿关节炎的发生及

疾病进展的信号通路, 可广泛参与促炎因子TNF- α 和IL-6等的合成转化, 在免疫炎症过程中具有重要的调节作用, 抑制该信号的活化可减轻类风湿关节炎的临床症状, 延缓疾病的进展^[20-21], 且JAK/STAT途径的选择性抑制剂CP-690550已开发用于类风湿关节炎的治疗^[22]。本研究结果显示, 黄芩苷能够显著降低类风湿关节炎大鼠骨组织中JAK1和STAT3的磷酸化水平, 表明黄芩苷可通过抑制JAK1/STAT3通路的活性减轻类风湿关节炎。

综上所述, 黄芩苷可有效改善类风湿关节炎大鼠的软骨损伤, 其机制可能与其抑制JAK1/STAT3途径的活化进而抑制炎症反应, 从而阻止关节炎病变进程有关。故预测黄芩苷可能成为治疗类风湿关节炎的新型药物。

参考文献:

- [1] GOU K J, ZENG R, REN X D, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects in adjuvant-induced arthritis in rats and molecular docking studies of *Polygonum orientale* L. extracts [J]. Immunol Lett, 2018, 201: 59-69.
- [2] BAI L, BAI Y, YANG Y, et al. Baicalin alleviates collagen-induced arthritis and suppresses TLR2/MYD88/NF- κ B p65 signaling in rats and HFLS-Ras [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(4): 2833-2841.
- [3] PISETSKY D S. Advances in the treatment of rheumatoid arthritis: costs and challenges [J]. N C Med J, 2017, 78(5): 337-340.
- [4] HYNDMAN I J. Rheumatoid arthritis: past, present and future approaches to treating the disease [J]. Int J Rheum Dis, 2017, 20(4): 417-419.
- [5] LI Y, LI R, OUYANG Z, et al. Herb network analysis for a famous TCM doctor's prescriptions on treatment of rheumatoid arthritis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 451319.
- [6] DINDA B, DINDA S, DASSHARMA S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. Eur J Med Chem, 2017, 131: 68-80.
- [7] HANG Y, QIN X, REN T, et al. Baicalin reduces blood lipids and inflammation in patients with coronary artery disease and rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lipids Health Dis, 2018, 17(1): 146-152.
- [8] 王宏志, 葛存兴, 王广志, 等. 黄芩苷对人成纤维细胞样滑膜细胞(类风湿关节炎)的影响研究 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(2): 129-131.
- [9] WANG H Z, WANG H H, HUANG S S, et al. Inhibitory effect of baicalin on collagen-induced arthritis in rats through the nuclear factor- κ B pathway [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 350(2): 435-443.

- [10] 吴峰森, 叶凯丽, 刘曦. 黄芩苷对大鼠胶原诱导性关节炎 JAK/STAT3 信号通路及 Th17/Treg 免疫平衡的影响[J]. 中国药师, 2020, 23(2): 246-251.
- [11] PAN T, CHENG T F, JIA Y R, et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of traditional Chinese herb couple in adjuvant-induced arthritis in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 205: 1-7.
- [12] PAL R, CHAUDHARY M J, TIWARI P C, et al. Protective role of theophylline and their interaction with nitric oxide (NO) in adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 29(2): 854-862.
- [13] YANG X, YANG J, AND ZOU H. Baicalin inhibits IL-17-mediated joint inflammation in murine adjuvant-induced arthritis [J]. Clin Dev Immunol, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/268065>.
- [14] JIA P, CHEN G, QIN W Y, et al. *Xitong Wan* attenuates inflammation development through inhibiting the activation of nuclear factor- κ B in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 193: 266-271.
- [15] ZHANG J, ZHANG W, DAI J, et al. Overexpression of *Dlx2* enhances osteogenic differentiation of BMSCs and MC3T3-E1 cells via direct upregulation of *Osteocalcin* and *Alp* [J]. Int J Oral Sci, 2019, 11(2): 119-130.
- [16] DOU X, WEI X, LIU G, et al. Effect of porous tantalum on promoting the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro through the MAPK/ERK signal pathway [J]. J Orthop Translat, 2019, 19: 81-93.
- [17] BERGMANN B, MÖLNE J, GJERTSSON I. The bone-inflammation-cartilage (BIC) stain: a novel staining method combining Safranin O and Van Gieson's stains [J]. J Histochem Cytochem, 2015, 63(9): 737-740.
- [18] ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, et al. Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease [J]. Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(6): 325-331.
- [19] SIEBERT S, TSOUKAS A, ROBERTSON J, et al. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases [J]. Pharmacol Rev, 2015, 67(2): 280-309.
- [20] NI S, LI C, XU N, et al. Follistatin-like protein 1 induction of matrix metalloproteinase 1, 3 and 13 gene expression in rheumatoid arthritis synoviocytes requires MAPK, JAK/STAT3 and NF- κ B pathways [J]. J Cell Physiol, 2018, 234(1): 454-463.
- [21] WANG C, SONG Y, WANG X, et al. Baicalin ameliorates collagen-induced arthritis through the suppression of janus kinase 1 (JAK1)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling in mice [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 9213-9222.
- [22] TANAKA Y, SUZUKI M, NAKAMURA H, et al. Phase II study of tofacitinib (CP-690, 550) combined with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate [J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2011, 63(8): 1150-1158.

【责任编辑：侯丽颖】