

- [22] Shackebaei D, Yari K, Rahimi N, *et al.* Targeting the NLRp3 by natural compounds; therapeutic strategies to mitigate doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2025, 83(3): 2779-2791.
- [23] Xu H, Pang M, Hu C, *et al.* *Panax ginseng* exerts cardioprotective effect post myocardial infarction by attenuating myocardial fibrosis and inflammation through SIRT1 signaling pathways[J]. *J Ginseng Res*, 2025, 49(2): 197-207.
- [24] Yu P, Li Y, Fu W, *et al.* *Panax quinquefolius* L. Saponins protect myocardial ischemia reperfusion no-reflow through inhibiting the activation of NLRP3 inflammasome via TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 607813.
- [25] Qin Q, Lin N, Huang H, *et al.* Ginsenoside Rg1 ameliorates cardiac oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1091-1103.
- [26] Ren B, Feng J, Yang N, *et al.* Ginsenoside Rg3 attenuates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy through repressing NLRP3 inflammasome and oxidative stress via modulating SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107841.

基于 IL-17A/Wnt/ β -catenin 信号通路探讨五劳七损方对强直性脊柱炎小鼠病理性新骨形成的影响

杨娟娟¹, 陈平¹, 王海东^{1*}, 张智敏², 李浩林², 苏瑾², 金芳梅¹, 阙丽丽¹, 年芳红¹

(1. 甘肃省中医院, 甘肃兰州 730050; 2. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃兰州 730000)

摘要: **目的** 探讨五劳七损方对强直性脊柱炎(AS)小鼠病理性新骨形成的作用机制。**方法** 采用蛋白聚糖(PG)诱导建立AS小鼠模型,将造模成功的AS小鼠随机分为模型组、塞来昔布组[塞来昔布胶囊 26 mg/(kg·d)]、抑制剂组[抗小鼠IL-17A抗体, 10 mg/(kg·周)]和中药低、中、高剂量组[五劳七损方 11.38、22.75、45.5 g/(kg·d)],另设空白组,每组8只。给药4周后,观察并采用关节炎评分评估小鼠四肢、足趾肿胀情况;ELISA法检测血清炎症因子(IL-17A、IL-23、IL-6、IL-1 β 和TNF- α)水平;流式细胞术检测脾脏中Th17细胞和Treg细胞比例;Micro-CT、HE和番红O-固绿染色观察脊柱椎间盘间隙及病理形态学变化;RT-qPCR和Western blot法检测脊柱韧带组织IL-17A、Wnt3a、Dkk-1、GSK-3 β 、 β -catenin、Runx2、Osx、OCN mRNA和蛋白表达。**结果** 与模型组比较,塞来昔布组和中药中、高剂量组小鼠四肢关节发红、肿胀均减轻;关节炎指数降低($P < 0.01$);血清IL-17A、IL-23、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 水平降低($P < 0.01$);脾脏中Th17细胞比例及Th17/Treg比值降低($P < 0.01$),Treg细胞比例升高($P < 0.01$);脊柱椎体关节结构融合程度减轻,椎间盘结构变窄及破坏缓解,骨基质形成减少。与模型组比较,抑制剂组和中药中、高剂量组脊柱韧带组织IL-17A、Wnt3a、 β -catenin、Runx2、Osx、OCN mRNA和蛋白表达均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),Dkk-1、GSK-3 β mRNA和蛋白表达均升高($P < 0.01$)。**结论** 五劳七损方可有效延缓AS病理性新骨形成,其作用机制与抑制IL-17A/Wnt/ β -catenin信号通路活性,下调成骨分化相关因子水平有关。

关键词: 五劳七损方;强直性脊柱炎;IL-17A/Wnt/ β -catenin信号通路;病理性新骨形成

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0806-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.013

收稿日期: 2025-07-16

基金项目: 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(国中医药人教函[2022]226号);甘肃省科技计划资助(23JRRA1535)

作者简介: 杨娟娟(1993—),女,博士,主治医师,从事中医药防治风湿病的研究。E-mail: 1711638266@qq.com

*通信作者: 王海东(1964—),男,教授,主任医师,从事中医药防治风湿病的研究。E-mail: whaidong5895@163.com

Effects of Wulao Qishan Formula on pathological new bone formation in mice with ankylosing spondylitis based on IL-17A/Wnt/ β -catenin signaling pathway

YANG Juan-juan¹, CHEN Ping¹, WANG Hai-dong^{1*}, ZHANG Zhi-min², LI Hao-lin², SU Jin², JIN Fang-mei¹, KAN Li-li¹, NIAN Fang-hong¹

(1. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China; 2. School of Clinical Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the mechanism of Wulao Qishan Formula on pathological new bone formation in mice with ankylosing spondylitis (AS). **METHODS** The AS mouse model was established by the proteoglycan (PG) induction, and AS mice with successful modeling were randomly divided into model group, celecoxib group [celecoxib capsule 26 mg/(kg·d)], inhibitor group [anti-mouse IL-17A antibody 10 mg/(kg·week)] and low, medium and high dose groups of traditional Chinese medicine (TCM) [Wulao Qishan Formula 11.38、22.75、45.5 g/(kg·d)], and the blank group was set up, with 8 mice in each group. After 4 weeks of administration, the swelling of limbs and toes in mice was observed and evaluated by arthritis score. Serum inflammatory factors (IL-17A, IL-23, IL-6, IL-1 β and TNF- α) were detected by ELISA. The proportions of Th17 and Treg cells in the spleen were detected by flow cytometry. Micro-CT, HE and safranin O-fast green staining were used to observe the intervertebral disc space and pathological morphology in the spine. RT-qPCR and Western blot were used to detect the mRNA and protein expressions of IL-17A, Wnt3a, Dkk-1, GSK-3 β , β -catenin, Runx2, Osx, OCN in spinal ligament tissues. **RESULTS** Compared with the model group, the redness and swelling of limbs in celecoxib group and middle and high dose groups of TCM were reduced; arthritis index decreased ($P < 0.01$); serum levels of IL-17A, IL-23, IL-6, IL-1 β and TNF- α decreased ($P < 0.01$); the Th17 cells proportion and Th17/Treg ratio in spleen decreased ($P < 0.01$), while the Treg cells proportion increased ($P < 0.01$); the fusion degree of joint structure of spine and vertebral body is reduced, the narrowing and destruction of intervertebral disc structure are alleviated, and the formation of bone matrix is reduced. Compared with the model group, the mRNA and protein expressions of IL-17A, Wnt3a, β -catenin, Runx2, Osx, OCN in the inhibitor group and the middle and high dose groups of TCM decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the mRNA and protein expressions of Dkk-1 and GSK-3 β increased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Wulao Qisun Formula can effectively delay the pathological new bone formation of AS, and its mechanism is related to inhibiting the activity of IL-17A/Wnt/ β -catenin signaling pathway and down-regulating the level of osteogenic differentiation-related factors.

KEY WORDS: Wulao Qisun Formula; ankylosing spondylitis; IL-17A/Wnt/ β -catenin signaling pathway; pathological new bone formation

强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS) 是一种以慢性炎症和病理性新骨形成为病理特征的自身免疫性疾病, 与免疫失衡、炎性因子释放、成骨与破骨平衡紊乱等密切相关^[1-2]。AS 致残的核心在于炎症驱动下的病理性新骨形成, 最终导致脊柱强直和关节功能丧失。Wnt/ β -catenin 通路作为 AS 病理性新骨形成的关键通路, 其异常激活加速了 AS 病程发展^[3]。研究表明, 促炎因子 IL-17A 不仅加剧炎症反应, 还可通过调控 Wnt/ β -catenin 通路促进成骨分化, 加剧 AS 病理性新骨形成, 二者构成的“炎症-骨形成”轴是推动 AS 发生发展的关键

环节^[4]。故抑制炎症反应是延缓 AS 病理性新骨形成的核心。

五劳七损方是课题组在《武威汉代医简》所载“治东海白水侯所奏方”基础上, 结合临证经验化裁而来, 用于治疗 AS 的临床验方, 全方共奏强督祛寒、补益肝肾之效。前期研究证实, 五劳七损方在改善 AS 患者临床症状、抑制炎症反应及改善异位骨化方面效果显著; 另外, 五劳七损方能够抑制 AS 成纤维细胞增殖及成骨分化, 进而延缓 AS 病理性新骨形成^[5-9]。为阐明具体作用机制, 本研究通过建立蛋白聚糖 (proteoglycan, PG) 诱导的

AS小鼠模型,运用影像学、组织病理学及分子生物学方法,系统评价五劳七损方的干预效果,并探讨其对IL-17A/Wnt/ β -catenin信号通路的调控作用,旨在从“炎症-骨形成”角度揭示该方延缓病理性新骨形成的分子机制,为临床推广提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 56只SPF级雌性BALB/c小鼠,6月龄,体质量(22 ± 2)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[实验动物生产许可证号SCXK(京)2019-0008],饲养于甘肃中医药大学动物实验中心SPF级动物房[实验动物使用许可证号SYXK(甘)2021-0004],饲养温度(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度(50 ± 10)%,明暗交替各12h,自由饮食、饮水。本实验已通过甘肃中医药大学动物伦理审查委员会审查(伦理审查批准编号SY2023-963)。

1.2 药物 五劳七损方由熟地黄(批号20231201)、肉苁蓉(批号240304)、牛膝(批号240605),续断(批号240320)、山茱萸(批号240321)、黄柏(批号240301A)、防风(批号240813)、桔梗(批号240702)、桂枝(批号20240123)、桑寄生(批号20240317)、补骨脂(批号20231201)、蜜远志(批号230903)、山药(批号20231001)、杜仲(批号240616)、淡附片(批号2404086)组成,以上药材均购于甘肃省中医院中药房,且经甘肃省中医院药学部鉴定符合2020年版《中国药典》要求。取各药材,加10倍量水浸泡30min,将淡附片先煎30min,而后加入剩余药材煮沸30min,用纱布过滤,药渣再加6倍量水煮沸20min,合并滤液,浓缩,得到生药量5.0g/mL的药液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。塞来昔布胶囊(规格0.2g/粒,国药准字J20140072)购自晖致制药(大连)有限公司,胶囊去壳后用蒸馏水充分溶解,并配制成混悬液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。抗小鼠IL-17A单克隆抗体(克隆号17F3)购自美国Bio X Cell公司。

1.3 试剂 双十八烷基二甲基溴化铵(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDA)、PG(美国Sigma公司,货号D2779、P5864);IL-6、IL-17A、IL-23、IL-1 β 及TNF- α ELISA检测试剂盒(江苏酶免实业有限公司,货号MM-0163M2、MM-0759M2、MM-0018M2、MM-0040M2、MM-0132M2);无菌PBS(大连美仑生物技术有限公司,货号MA0015);anti-mouse CD4-FITC、anti-mouse/rat

IL-17A-PE、anti-mouse CD25-APC(杭州联科生物技术有限公司,货号F21004016、70-F211L1702、F2102503);anti-mouse/rat/human FOXP3-PE(美国Biolegend公司,货号320008);伊红染色液、苏木素染色液、固绿染色液、番红O染色液、BCA蛋白定量试剂盒、RIPA蛋白裂解液(北京索莱宝生物科技有限公司,货号G1100、G1140、G1661、S8020、PC0020、R0010);反转录试剂盒、荧光定量试剂盒、ECL发光液(上海翊圣生物科技有限公司,货号11141ES60、11202ES08、36222-A/B);IL-17A抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号26163-1-AP);Dkk-1抗体(美国Affinity公司,货号BF8416);Wnt3a、GSK-3 β 、 β -catenin抗体(美国GeneTex公司,货号GTX128101、GTX111192、GTX101435);Runx2、Osx、OCN、GAPDH抗体、山羊抗鼠及山羊抗兔(美国ImmunoWay公司,货号YT5356、YN0332、YN2865、YM3218、RS0002、RS0001)。

1.4 仪器 酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司);流式细胞仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);Micro-CT系统(德国Bruker公司);病理切片机、组织摊片机、生物组织冷冻包埋机(金华市益迪医疗设备有限公司);显微拍照系统(山东志盈医学科技有限公司);微量核酸测定仪(北京凯奥科技发展有限公司);PCR扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);荧光定量PCR仪[鲲鹏基因(北京)科技有限责任公司];全自动化学发光成像系统(北京六一生物科技有限公司);基础电泳仪电源、小型垂直电泳及转印槽(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 造模剂制备 将100 μg PG用1 \times PBS(pH 7.4)充分溶解至终质量浓度为1mg/mL,全程置于冰上溶解,保持低温稳定。佐剂选择DDA,称取2.0mg DDA,用1 \times PBS(pH 7.4)混匀,混匀后将DDA溶液放置在60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中充分溶解为均匀混悬液,溶解完全后,置于冰上冷却,制得质量浓度为20mg/mL的DDA溶液

2.2 AS小鼠模型建立 依据文献[10]报道,分别在第0、21、42天,按等体积比例用涡旋振荡器充分混合PG溶液和DDA溶液,每只小鼠每次腹腔注射200 μL 混合液(含100 μg PG和2.0mg DDA)进行免疫。

2.3 分组及给药 第3次免疫后,除空白组外,将48只造模成功的小鼠随机分为模型组、塞来昔布组、抑制剂组和中药低、中、高剂量组,每组8只。按照人与小鼠体表面积换算法计算给药剂量^[11],中药低、中、高剂量组分别灌胃给予11.38、22.75、45.5 g/kg五劳七伤方药液,每天1次;塞来昔布组灌胃给予26 mg/kg塞来昔布胶囊混悬液,每天1次;抑制剂组腹腔注射10 mg/kg抗小鼠IL-17A单克隆抗体,每周1次^[12];空白组和模型组灌胃给予等体积生理盐水,每天1次。小鼠在PG诱导后第10周开始灌胃给药,持续4周(28 d),实验周期共14周。

2.4 标本采集 灌胃给药28 d后,小鼠禁食不禁水12 h,次日心脏采血,全血室温静置2 h,4 ℃、3 000 r/min离心20 min,分离得到血清,置于-80 ℃冰箱保存备用。取小鼠脊柱,生理盐水清洗后于4%多聚甲醛中固定;脊柱韧带组织用液氮速冻后,置于-80 ℃冰箱保存备用;取脾脏组织,置于1×PBS中备用。

2.5 检测指标

2.5.1 关节炎评分 采用国际动物关节炎评分标准(arthritis index, AI),在第3次免疫后,每天对AS小鼠四肢进行关节炎评分,每只小鼠总评分范围为0~16分^[13]。评分标准如下:足部完全正常,无发红和/或肿胀,计0分;1~2个足趾发红和/或肿胀,计1分;3个及以上足趾发红和/或肿胀,计2分;足趾发红和/或肿胀,僵直伴活动受限,计3分;踝关节肿胀伴畸形,活动严重受限,计4分。

2.5.2 血清炎症因子水平 根据ELISA试剂盒说明书检测小鼠血清IL-17A、IL-23、IL-6、IL-1β和TNF-α水平。

2.5.3 流式细胞术检测脾脏Th17和Treg细胞比例 制备小鼠脾脏单细胞悬液后,分别进行Th17与Treg细胞染色。Th17细胞检测:使用PMA/离子霉素及蛋白转运抑制剂刺激细胞4~6 h后,依次进行CD4表面染色与IL-17A胞内染色。Treg细胞检测:直接对细胞进行CD4/CD25表面染色,经固定破膜后实施Foxp3胞内染色。所有操作均在避光条件下完成,步骤间进行常规洗涤。最后通过流式细胞术分析细胞比例。

2.5.4 Micro-CT扫描观察脊柱椎体关节间隙变化 取出小鼠脊柱后固定48 h,固定好的组织采用75%乙醇清洗,将清洗后的组织置于Micro-CT仪器中进行扫描。扫描条件:电压70 kV;电流

200 μA;Al过滤器;曝光时间700 ms;扫描分辨率8 μm,高分辨率。扫描结束后应用三维重建处理软件NRecon及DataViewer对获得的扫描原始数据进行三维图像重建,生成样本的3D模型。观察小鼠脊柱椎体关节间隙,进行定性分析。

2.5.5 脊柱椎间盘病理形态观察 取小鼠脊柱组织,经4%多聚甲醛固定24 h后,采用脱钙液脱钙4周,依次进行脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋及切片,分别进行苏木素-伊红(HE)染色和番红O-固绿染色。HE染色主要用于观察椎间盘及周围软组织炎症细胞浸润、组织结构破坏等一般病理变化;番红O-固绿染色则用于评估软骨基质降解及软骨-骨交界区形态结构。

2.5.6 RT-qPCR法检测脊柱韧带组织IL-17A/Wnt/β-catenin信号通路及成骨分化相关基因的表达 取出于-80 ℃冰箱保存的小鼠脊柱韧带组织,称取约0.1 g,使用Trizol试剂提取总RNA,按照逆转录试剂盒说明书将总RNA逆转录为cDNA,进行扩增(反应体系为20 μL)。反应条件为95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,65 ℃ 30 s,循环40次。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCT}法计算目的基因相对表达量。引物由博迈德生物科技(固安)有限公司合成,序列见表1。

表1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
IL-17A	正向 TACCTCAACCGTTCACGTC	119
	反向 TTCCCTCCGATTGACACA	
Runx2	正向 CAGTCCCAACTTCTCTGTGCT	103
	反向 CCCATCTGGTACCTCTCCGA	
Osx	正向 GGAAAGGAGGCACAAAGAA	175
	反向 CCAGAAATGACTGAGGGA	
OCN	正向 CATCTTCTGCTCACTCTG	243
	反向 TTCAAGCCATACTGGTCTG	
Dkk-1	正向 TCTCTATGAGGGCGGAACA	156
	反向 TTTCCGCAAGCCAGACAGAT	
Wnt3a	正向 TACTACGAGCCCTCACCCAA	103
	反向 ACCCATCTATGCCATCCGAG	
GSK-3β	正向 GCTGTGTGTGGCTGAATTGT	195
	反向 CTGCTCCTGGTGAATCTTT	
β-catenin	正向 CAGCAGCAGTCTTACTTGGGA	287
	反向 TTAGTGGGATGAGCAGCGTC	
GAPDH	正向 CTTAAGAGGGATGCTGCC	261
	反向 ACTGTGCCCTTGAATTTGCC	

2.5.7 Western blot法检测脊柱韧带组织IL-17A/Wnt/β-catenin信号通路及成骨分化相关蛋白的表达 取出于-80 ℃冰箱保存的小鼠脊柱韧带组织适量,剪碎,加入RIPA组织裂解液提取总蛋白200 μL,并利用BCA法测定蛋白浓度。经SDS-PAGE

凝胶电泳后转至 PVDF 膜，置于 5% 脱脂奶粉封闭液中孵育 2 h 进行封闭处理，分别加一抗 IL-17A、Wnt3a、Dkk-1、GSK-3 β 、 β -catenin、Runx2、Ox、OCN 和 GAPDH (1 : 2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，洗膜后加入山羊二抗 (1 : 5 000) 孵育 1 h，洗膜 3 次并滴加发光液反应 5 min，曝光、显影、观察，采用 Image J 软件分析条带灰度值，以 GAPDH 为内参，计算各目的蛋白相对表达量。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，方差齐时多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验；方差不齐采用 Dunnett

T3 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

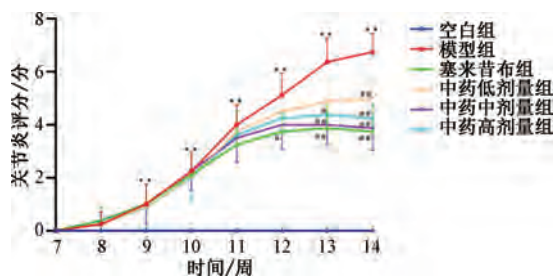
3 结果

3.1 五劳七伤方对 AS 小鼠外周关节及关节炎评分的影响 空白组小鼠关节无发红、肿胀等症状；造模组小鼠从第 3 次注射 PG 溶液后的第 2 周开始，小鼠出现足趾及四肢关节发红、肿胀等症状，关节炎指数开始升高；第 10 周开始，模型组小鼠四肢关节发红、肿胀症状逐渐加重，关节炎指数持续升高；与模型组比较，各给药组小鼠四肢关节发红、肿胀症状减轻，关节炎指数降低且趋于平稳 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 1~2。



图 1 第 14 周各组小鼠外周关节表现

Fig. 1 Appearance of peripheral joints of mice in each group in the 14th week



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 2 各组小鼠关节炎评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Fig. 2 Comparison of arthritis scores of mice in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

表 2 各组小鼠血清 IL-17A、IL-23、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab. 2 Comparison of serum IL-17A, IL-23, IL-6, IL-1 β and TNF- α levels of mice in each group (pg/mL, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	IL-17A	IL-23	IL-6	IL-1 β	TNF- α
空白组	4.23 \pm 1.48	17.67 \pm 1.70	29.44 \pm 3.01	18.63 \pm 2.00	227.55 \pm 19.29
模型组	23.79 \pm 2.08**	36.04 \pm 2.06**	52.40 \pm 1.89**	35.95 \pm 1.26**	375.85 \pm 21.75**
塞来昔布组	8.87 \pm 1.68###	23.50 \pm 1.65###	35.40 \pm 1.60###	23.30 \pm 1.08###	275.85 \pm 20.04###
中药低剂量组	17.51 \pm 1.14###	29.74 \pm 1.81###	45.14 \pm 1.89###	34.10 \pm 2.57#	363.61 \pm 32.81
中药中剂量组	11.70 \pm 1.33###	23.93 \pm 1.71###	38.29 \pm 1.72###	28.84 \pm 1.33###	312.24 \pm 26.78###
中药高剂量组	12.61 \pm 1.41###	24.94 \pm 0.93###	38.18 \pm 2.35###	28.74 \pm 1.19###	313.27 \pm 22.67###

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.2 五劳七伤方对 AS 小鼠血清炎症因子水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠血清 IL-17A、IL-23、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组小鼠血清 IL-17A、IL-23、IL-6 和 IL-1 β 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，塞来昔布组和中药中、高剂量组小鼠血清 TNF- α 水平降低 ($P<0.01$)，见表 2。

3.3 五劳七伤方对 AS 小鼠脾脏中 Th17/Treg 细胞比例的影响 与空白组比较，模型组小鼠脾脏中 Th17 细胞比例及 Th17/Treg 比值升高 ($P<0.01$)，

Treg 细胞比例降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组小鼠脾脏中 Th17 细胞比例及 Th17/Treg 比值均降低 ($P<0.01$)，塞来昔布组及中药中、高剂

量组小鼠脾脏中 Treg 细胞比例升高 ($P<0.01$)，见表 3、图 3~4。

表 3 各组小鼠脾脏中 Th17/Treg 细胞比例比较 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Tab. 3 Comparison of Th17/Treg cell ratio in spleen of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Th17/%	Treg/%	Th17/Treg
空白组	3.92±0.14	9.69±0.88	0.41±0.03
模型组	13.83±0.40**	2.97±0.40**	4.72±0.75**
塞来昔布组	4.42±0.41##	6.84±1.08##	0.67±0.18##
中药低剂量组	8.11±0.40##	3.49±0.10	2.33±0.18##
中药中剂量组	5.80±1.05##	5.31±1.08##	1.15±0.45##
中药高剂量组	6.67±1.34##	5.27±0.62##	1.30±0.41##

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

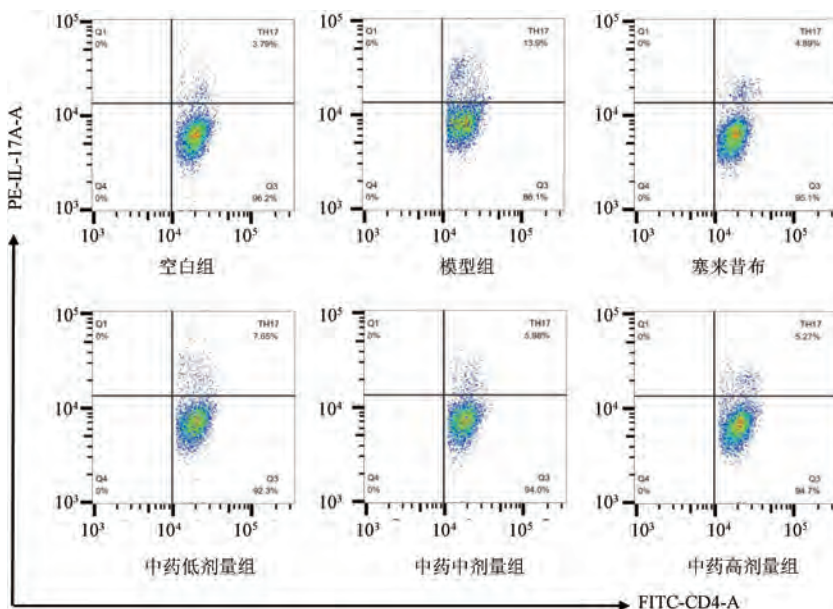


图 3 各组小鼠脾脏中 Th17 细胞比例流式图

Fig. 3 Proportional flow chart of Th17 cells in spleen of mice in each group

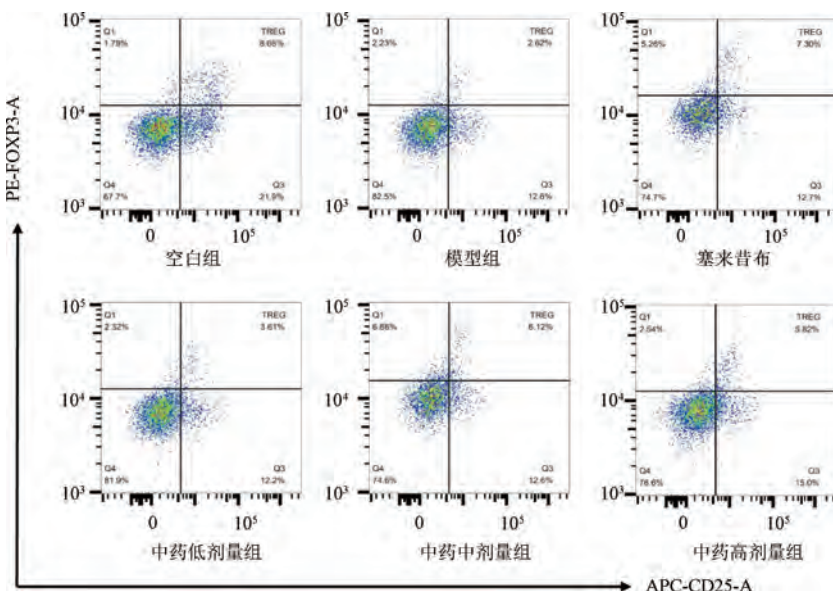


图 4 各组小鼠脾脏中 Treg 细胞比例流式图

Fig. 4 Proportional flow chart of Treg cells in spleen of mice in each group

3.4 五劳七伤方对 AS 小鼠脊柱椎体关节间隙的影响 空白组小鼠脊柱关节结构完整,椎体关节间隙未见明显变化;模型组小鼠椎体空间变窄,脊柱

椎体关节出现融合;各药物组小鼠脊柱椎体出现轻度的空间变窄,脊柱椎体关节结构融合程度减轻,见图 5。

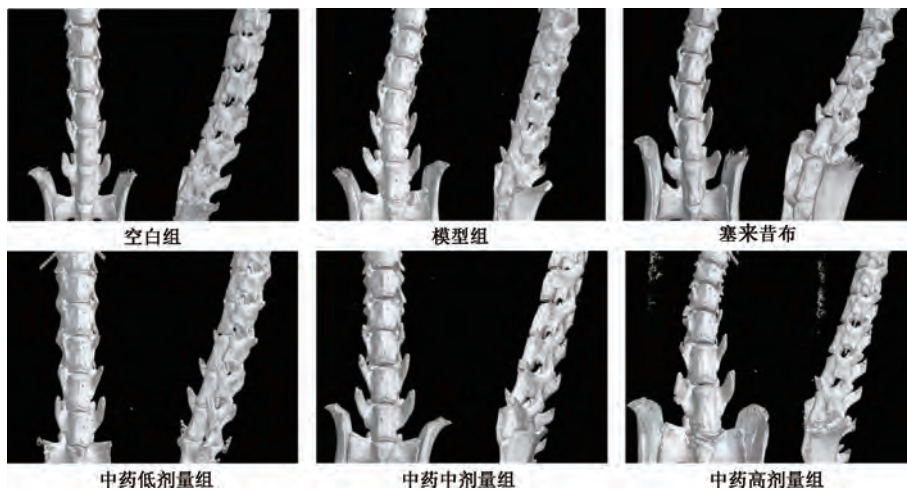


图 5 各组小鼠脊柱 Micro-CT 代表扫描图

Fig. 5 Micro-CT representative scan of spinal column of mice in each group

3.5 五劳七伤方对 AS 小鼠脊柱椎间盘病理形态的影响 空白组小鼠脊柱关节正常,椎间盘结构未见改变,纤维环和髓核完整;模型组小鼠脊柱关节正常形状基本消失,椎间盘结构、纤维环和髓核破

坏,间隙变窄,骨基质形成明显增多;各给药组小鼠脊柱椎间盘结构变窄及破坏均明显缓解,骨基质形成显著减少,见图 6~7。

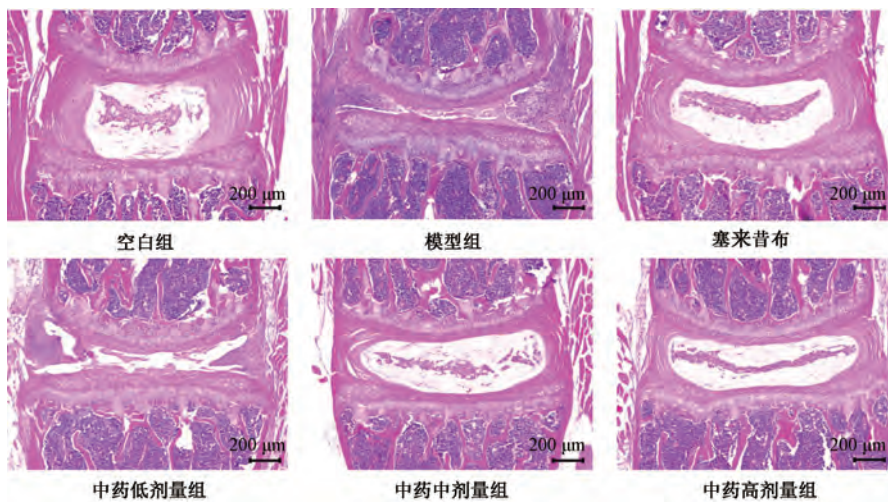


图 6 各组小鼠脊柱关节 HE 染色典型图

Fig. 6 Typical HE staining of spinal joints of mice in each group

3.6 五劳七伤方对 AS 小鼠脊柱韧带组织 IL-17A-Wnt/ β -catenin 信号通路的影响 与空白组比较,模型组小鼠脊柱韧带组织 IL-17A、Wnt3a、 β -catenin mRNA 和蛋白表达均升高 ($P < 0.01$), Dkk-1、GSK-3 β mRNA 和蛋白表达均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,中药中、高剂量组和抑制剂组小鼠脊柱韧带组织 IL-17A、Wnt3a 和 β -catenin mRNA

和蛋白表达均降低 ($P < 0.01$), Dkk-1、GSK-3 β mRNA 和蛋白表达均升高 ($P < 0.01$), 中药低剂量组小鼠脊柱韧带组织 IL-17A、Wnt3a、 β -catenin mRNA 和 IL-17A、 β -catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Dkk-1、GSK-3 β mRNA 和 GSK-3 β 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 4、图 8。

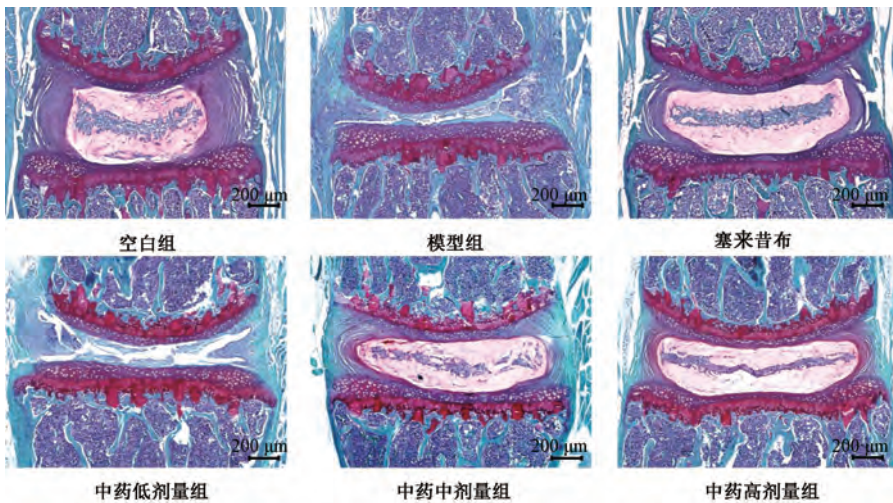


图7 各组小鼠脊柱关节番红O-固绿染色典型图

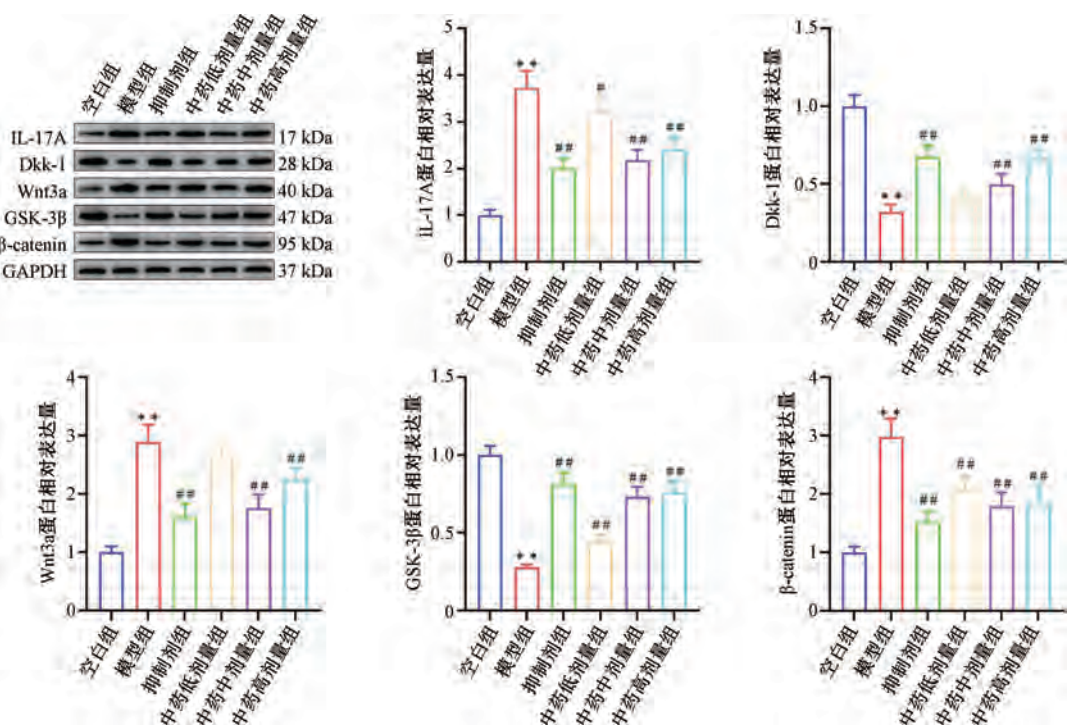
Fig. 7 Typical images of saffron O-fast green staining of spinal joints of mice in each group

表4 各组小鼠脊柱韧带组织 IL-17A、Wnt3a、Dkk-1、GSK-3β、β-catenin mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 4 Comparison of the mRNA expressions of IL-17A, Wnt3a, Dkk-1, GSK-3β and β-catenin in spinal ligaments of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	IL-17A	Wnt3a	Dkk-1	GSK-3β	β-catenin
空白组	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.07	1.00±0.06	1.00±0.02
模型组	2.99±0.19**	1.94±0.23**	0.45±0.05**	0.27±0.05**	2.08±0.30**
抑制剂组	1.53±0.14###	1.45±0.27###	0.87±0.06##	0.88±0.06###	1.57±0.23###
中药低剂量组	2.20±0.23###	1.78±0.30###	0.59±0.07#	0.42±0.08#	1.81±0.25###
中药中剂量组	1.54±0.10###	1.52±0.13###	0.69±0.05##	0.72±0.14###	1.66±0.19###
中药高剂量组	1.99±0.29###	1.67±0.20###	0.76±0.05##	0.75±0.07###	1.79±0.18###

注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，### $P<0.01$ 。



注：与空白组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，### $P<0.01$ 。

图8 各组小鼠脊柱韧带组织 IL-17A、Wnt3a、Dkk-1、GSK-3β、β-catenin 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Comparison of the protein expressions of IL-17A, Wnt3a, Dkk-1, GSK-3β and β-catenin in spinal ligaments of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.7 五劳七损方对AS小鼠脊柱韧带组织成骨分化相关基因和蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠脊柱韧带组织 *Runx2*、*Osx*、*OCN* mRNA和蛋白表达均升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,中药中、高剂量组和抑制剂组小鼠脊柱韧带组织 *Osx*、*OCN* mRNA和蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),中药低剂量组小鼠脊柱韧带组织 *OCN* mRNA和 *Runx2*、*Osx*、*OCN* 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表5、图9。

4 结论

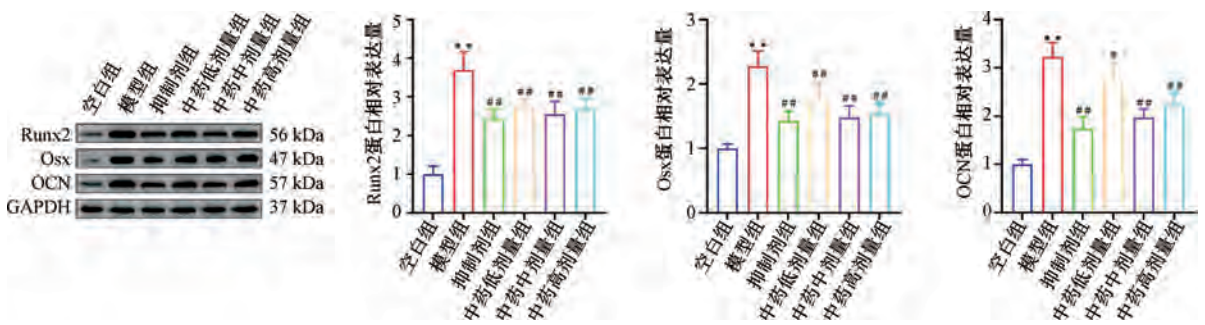
炎症反应作为AS早期病理特征,其诱发的多种细胞因子是引起并加速AS病情发生发展的关键

表5 各组小鼠脊柱韧带组织 *Runx2*、*Osx*、*OCN* mRNA表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Tab. 5 Comparison of the mRNA expressions of *Runx2*, *Osx* and *OCN* in spinal ligament tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	<i>Runx2</i>	<i>Osx</i>	<i>OCN</i>
空白组	1.00±0.10	1.00±0.05	1.00±0.05
模型组	1.99±0.19**	1.77±0.28**	1.81±0.14**
抑制剂组	1.54±0.19##	1.21±0.16##	1.29±0.17##
中药低剂量组	1.71±0.18	1.42±0.30	1.54±0.17##
中药中剂量组	1.65±0.20#	1.33±0.15##	1.48±0.18##
中药高剂量组	1.66±0.17#	1.36±0.16##	1.48±0.10##

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。



注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图9 各组小鼠脊柱韧带组织 *Runx2*、*Osx*、*OCN* 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Comparison of the protein expressions of *Runx2*, *Osx* and *OCN* in spinal ligament tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

因素。研究表明,AS患者中IL-23、TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A、IL-6等炎症因子高表达,其中IL-23/IL-17轴在疾病进程中发挥关键作用^[14]。IL-23作为Th17细胞分化因子,与IL-1 β 共同促进Th17细胞分化,进而分泌IL-17A、IL-17F、IL-22等因子^[15]。IL-17A作为IL-23/IL-17轴中最重要的效应因子,直接参与AS的炎症进程。研究表明,阻断IL-23/IL-17轴可显著缓解AS临床症状,进一步说明其在AS中的重要作用^[16]。另外,炎症反应不仅是早期病理表现,更是介导晚期病理性新骨形成,最终导致患者残疾的核心环节。因此,有效抑制炎症反应成为控制AS病情发展与结构损害的关键策略。病理性新骨形成是AS致残的主要因素,其分子机制与Wnt/ β -catenin信号通路的异常活化密切相关^[17-19]。该通路过度激活导致 β -catenin在胞质内积累并核转位,与TCF/LEF转录因子结合后上调*Runx2*、*OCN*等成骨相关基因表达。研究显示,AS患者中Wnt通路抑制剂Dkk-1的表达下调是促进病理性新骨形成的重要因素^[20-24]。另外,在动物模型中,抑制Dkk-1会激活Wnt/ β -catenin信号,

导致关节融合和骨赘形成^[25-26]。因此,抑制Wnt/ β -catenin通路已成为延缓AS病理性新骨形成的关键。

目前AS治疗的目标在于控制症状和体征,防止进展性结构性破坏,临床以口服药物为主,但西药在缓解症状的同时存在一定的局限性^[27-28]。中医药具有多环节、多途径、多靶点、多层次的药理学作用,在调节免疫系统、镇痛、抗炎、骨保护作用方面有独特作用^[29]。AS属于中医学“大偻”范畴,认为阳虚为此病发病本质,“补肾强督”为治疗大法,佐以活血脉、祛风湿。五劳七损方由熟地黄、续断、桑寄生等15味药物组成,方中以熟地、淡附片为君药,共补肾中水火,使坎离交济,阴阳自和;续断、杜仲、牛膝、桑寄生、补骨脂、山茱萸、肉苁蓉、山药共为臣药,以补肝肾、强筋骨;佐以黄柏、远志、桂枝、防风,调和寒湿、通络安神;桔梗引药上行,宣肺达下为使药,全方共奏强督祛寒,补益肝肾之效。本研究结果显示,五劳七损方能够改善AS小鼠四肢关节发红、肿胀,降低AI评分,延缓脊柱关节椎体间隙变窄,改善椎间

盘破坏, 骨基质形成的减少亦能够降低小鼠脾脏中 Th17 细胞比例, 升高 Treg 细胞比例, 降低 Th17/Treg 比值, 降低 IL-23、IL-17A、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平; 降低 IL-17A、Wnt3a、 β -catenin 表达, 上调 Dkk-1、GSK-3 β 表达, 并抑制 Runx2、OCN 和 Osx 成骨因子的表达。

综上所述, 五劳七损方可能通过调控 IL-17A/Wnt/ β -catenin 信号通路, 在抑制炎症反应和延缓病理性新骨形成方面发挥双重调控作用, 从而发挥防治 AS 的作用。这些发现为阐释中医药多靶点治疗 AS 的机制提供了实验依据, 也为 AS 的临床治疗提供了新思路。

参考文献:

[1] Sieper J, Poddubnyy D. Axial spondyloarthritis[J]. *Lancet*, 2017, 390(10089): 73-84.

[2] Xiong Y, Cai M, Xu Y, et al. Joint together: the etiology and pathogenesis of ankylosing spondylitis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 996103.

[3] Xie W, Zhou L, Li S, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays a key role in the development of spondyloarthritis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1364(1): 25-31.

[4] Huangfu L, Li R, Huang Y, et al. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 402.

[5] 苏小军, 王海东. 中医辨证治疗强直性脊柱炎的临床研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(8): 3580-3584.

[6] 苏小军, 王海东, 田雪梅. 五劳七损方对强直性脊柱炎患者 Dickkopf-1 蛋白水平的影响[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2016, 24(3): 26-28.

[7] 杨娟娟, 陈平, 王海东, 等. 五劳七损方调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对 AS 成纤维细胞增殖及成骨分化的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(2): 67-73.

[8] 苏小军, 朱文菊, 田雪梅, 等. 王海东主任医师治疗强直性脊柱炎临床经验思辨[J]. *西部中医药*, 2024, 37(10): 19-22.

[9] 苏小军, 王海东, 田雪梅, 等. 五劳七损方治疗强直性脊柱炎 50 例临床研究[J]. *新中医*, 2013, 45(11): 52-54.

[10] Yang L, Liu B, Zheng J, et al. Rifaximin alters intestinal microbiota and prevents progression of ankylosing spondylitis in mice[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 44.

[11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.

[12] Goulet D R, Atkins W M. Considerations for the design of antibody-based therapeutics[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(1): 74-103.

[13] Moore A R. Collagen-induced arthritis[J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 225: 175-179.

[14] Fang P, Liu X, Qiu Y, et al. Exploring causal correlations between inflammatory cytokines and ankylosing spondylitis: a bidirectional mendelian-randomization study[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1285106.

[15] 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.

[16] Zhu W, He X, Cheng K, et al. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments[J]. *Bone Res*, 2019, 7: 22.

[17] Mauro D, Thomas R, Guggino G, et al. Ankylosing spondylitis: an autoimmune or autoinflammatory disease? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(7): 387-404.

[18] Li X, Wang J, Zhan Z, et al. Inflammation intensity-dependent expression of osteoinductive wnt proteins is critical for ectopic new bone formation in ankylosing spondylitis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(7): 1056-1070.

[19] Kwon S R. The long, dynamic journey to the elucidation of the links between inflammation, ectopic bone formation, and Wnt signaling in ankylosing spondylitis[J]. *J Rheum Dis*, 2022, 29(1): 1-3.

[21] Duan P, Bonewald L F. The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 77(Pt A): 23-29.

[21] Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.

[22] Doumpas N, Lampart F, Robinson M D, et al. TCF/LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes[J]. *EMBO J*, 2019, 38(2): e98873.

[23] Zhao L, Jiao J, Yan G, et al. Circ_0018168 inhibits the proliferation and osteogenic differentiation of fibroblasts in ankylosing spondylitis via regulating miR-330-3p/DKK1 axis[J]. *Regen Ther*, 2022, 21: 175-184.

[24] Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-7481.

[25] Xie W, Zhou L, Li S, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays a key role in the development of spondyloarthritis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1364(1): 25-31.

[26] Wu M, Chen M, Ma Y, et al. Dickkopf-1 in ankylosing spondylitis: review and meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 481: 177-183.

[27] Benavent D, Navarro-Compán V. Exploring the latest advances in axial spondyloarthritis management[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2024, 20(2): 79-80.

[28] Kim J, Yoon J S, Park S, et al. Risk of cardiovascular disease with high-dose versus low-dose use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in ankylosing spondylitis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2024, 83(8): 1028-1033.

[29] 杨娟娟, 李浩林, 王振东, 等. 强直性脊柱炎的骨免疫机制及中医药治疗的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(8): 1264-1271.