

雷公藤红素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞中 RANKL、OPG 及炎性因子表达的影响

冯小可¹, 谈文峰², 王芳³, 甘可⁴, 张缪佳², 张前德^{1*}

(¹南京医科大学中西医结合研究所, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第一附属医院风湿科, ³心脏科, 江苏 南京 210029; ⁴南京中医药大学中医内科学系, 江苏 南京 210023)

[摘要] 目的: 观察雷公藤红素(Celastrol, Cel)对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 细胞中核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)、骨保护素(OPG)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白细胞介素-8(IL-8)表达的影响。方法: 以白细胞介素-1 β (IL-1 β)刺激 MH7A, 不同浓度的 Cel(0.1、0.5、1.0、2.0 μ mol/L)干预细胞 24 h 后, 采用 real-time PCR 和免疫荧光的方法检测 RANKL、OPG、IL-6、TNF- α 及 IL-8 的表达。结果: IL-1 β 刺激 MH7A 细胞系 24 h 后, RANKL、OPG、IL-6、TNF- α 及 IL-8 mRNA 及 RANKL 免疫荧光明显增强, Cel 呈剂量依赖性抑制 MH7A 中 IL-1 β 诱导的 RANKL、OPG、IL-6、TNF- α 及 IL-8 mRNA 水平($P < 0.05$)和 MH7A 中 RANKL 免疫荧光表达, 显著上调 OPG/RANKL 轴比值。结论: Cel 能调节滑膜成纤维细胞中 OPG/RANKL 轴和抑制促炎因子、趋化因子的表达, 可能在阻止类风湿关节炎“炎症”和“骨侵蚀”中发挥重要作用。

[关键词] 雷公藤红素; 类风湿关节炎; 滑膜成纤维细胞; 核因子 κ B 受体活化因子配体

[中图分类号] R593.22

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-759-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20130609

The effect of Celastrol on the expressions of RANKL, OPG, IL-6, TNF- α and IL-8 in human rheumatoid synoviocyte MH7A

Feng Xiaoke¹, Tan Wengfeng², Wang Fang³, Gan Ke⁴, Zhang Miaojia², Zhang Qiande^{1*}

(¹Integrated Traditional and Western Medicine Institution of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Rheumatology, ³Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ⁴Traditional Chinese Internal Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Celastrol on the expressions of RANKL, OPG, IL-6, TNF- α and IL-8 in human rheumatoid synoviocyte MH7A. **Methods:** MH7A was stimulated with IL-1 β and added in different concentration of Celastrol (0.1, 0.5, 1, 2 μ mol/L). The expressions of RANKL, OPG, IL-6, TNF- α and IL-8 in MH7A were assayed by real-time PCR and immunofluorescence. **Results:** The expressions of RANKL, OPG, IL-6, TNF- α and IL-8 in MH7A were significantly increased in MH7A upon stimulation with IL-1 β ($P < 0.05$). Celastrol could inhibit the expressions of RANKL, OPG, IL-6, TNF- α and IL-8 in a dose-dependent manner and notably elevated the ratio of OPG/RANK axis. **Conclusion:** Celastrol could regulate the ratio of OPG/RANKL axis and suppress the inflammatory cytokines and chemokine expression in rheumatoid arthritis synovioblast, suggesting a potent role in preventing the inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis.

[Key words] Celastrol; rheumatoid arthritis; synovioblast; RANKL

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 759-765]

[基金项目] 国家自然科学基金(30701129, 30901332, 81172845, 81273294); 国家中医药局青年科学基金(06-07JQ06); 江苏省自然科学基金(BK2011851, BK2012875); 教育部博士点基金(20093237110005); 亚太风湿病联盟青年基金; 国际风湿病联盟基金

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangqiande@njmu.edu.cn

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是最常见的自身免疫病之一,以滑膜慢性炎症和骨侵蚀为基本病理特征。大量研究表明滑膜成纤维细胞(fibroblast like synovial cells, FLS)在RA病理过程中起重要作用。在异常免疫信号的刺激下,FLS激活后能分泌大量炎症因子和金属蛋白酶。活化的FLS还是核因子 κ 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)的主要来源之一^[1]。RANKL是近20年来发现的最重要的调节破骨细胞分化激活的因子^[2],而骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是RANKL的诱骗受体,能阻止RANKL与其受体的结合,从而抑制破骨细胞(osteoclast, OC)分化的激活。因此,如何通过调控OPG/RANKL轴阻止RA骨侵蚀成为目前研究的热点之一^[3]。雷公藤生药或化合物已在临床广泛用于RA的治疗,但确切的作用机制尚不明确。雷公藤红素(Celastrol, Cel)来源于雷公藤的根皮,是雷公藤中最主要的活性成分之一。既往研究表明,Cel能明显抑制模型大鼠关节炎的关节症状和关节外表现^[4],体外实验表明Cel具有抗肿瘤、抑制血管生成、诱导细胞凋亡、抑制免疫及抗炎等多种生物活性^[5-6]。本研究着重探讨Cel对FLS中OPG/RANKL以及促炎因子IL-6、TNF- α 和IL-8表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

RA滑膜细胞系MH7A由美国加州大学洛杉矶分校David Yu教授惠赠,此细胞系是由RA患者的FLS经SV40T抗原基因转染转化而成的永生化细胞系。

Cel(Sigma公司,美国);重组人细胞因子IL-1 β (Peprotech公司,美国);CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所);免疫组化抗人RANKL抗体(武汉博士德生物工程有限公司);免疫组化罗丹明荧光二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);免疫组化抗体稀释液(碧云天生物技术研究);TRIzol及逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)SYBR Green Mixture及384孔反应板(ABI公司,美国);PCR引物由上海英骏生物技术有限公司合成;PCR反应仪器为ABI Prism 7900HT型PCR仪;免疫荧光成像显微镜型号为OLMPUS BX51。

1.2 方法

1.2.1 MH7A细胞培养

RAFLS系MH7A接种于含10%胎牛血清、100

U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的DMEM高糖液体培养基中。每2 d换液,待2~3 d细胞80%融合后,用含0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA的消化液消化,按1:2~1:4传代。

1.2.2 Cel对细胞增殖的影响

为检测不同浓度的Cel对MH7A增殖的影响,将处于指数增长状态良好的MH7A细胞按 1×10^3 个/孔接种于96孔板,24 h后加浓度分别为0.0、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 μ mol/L的Cel,每组5个复孔。加药24、48及72 h后分别于空白组和加药组加入每孔10 μ l CCK-8试剂,孵育1.5 h后,以荧光分光光度计检测每孔吸光值。

1.2.3 不同浓度IL-1 β 在不同时间点对RANKL mRNA表达的影响

为确定不同浓度的IL-1 β 在哪个时间点对MH7A表达RANKL的作用最强,将处于指数增长的状态良好的MH7A细胞按 3×10^4 个/孔接种于12孔板,贴壁生长24 h左右换液,以0、1、10、20 ng/ml的IL-1 β 分别作用24、48及72 h,采用TRIzol法提取各组总RNA, TaKaRa逆转录试剂盒反转成cDNA,并以实时荧光定量PCR检测RANKL mRNA的表达。每次实验每组3个复孔。

1.2.4 Cel对MH7A中OPG/RANKL及IL-6、TNF- α 和IL-8 mRNA表达的影响

1.2.4.1 刺激细胞

MH7A细胞分为空白对照组、IL-1 β 刺激组(20 ng/ml)、IL-1 β 加不同浓度Cel组(Cel终浓度分别为0.1、0.5、1.0、2.0 μ mol/L剂量组),各组细胞以 5×10^3 个/孔加入24孔板,置于37 $^{\circ}$ C含5% CO₂培养箱中。24 h后,除空白对照组外,其余各组均加入或不加入20 ng/ml的IL-1 β 及Cel刺激细胞24 h。

1.2.4.2 实时荧光定量PCR检测

上述各组细胞干预24 h后采用TRIzol法提取总RNA, TaKaRa逆转录试剂盒反转成cDNA。以荧光定量PCR检测各组细胞RANKL、OPG以及促炎因子IL-6、TNF- α 和IL-8表达。PCR反应体系如下:2.5 μ l Power SYBR Green PCR Master Mix吸光值为1的上下游引物各0.125 μ l, 1 μ l cDNA, 1.25 μ l双蒸水。序列见附1。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 共40个循环。每份标本均作复孔,复孔间的Ct值差异控制在0.2以内。所有扩增均在ABI 7900实时PCR仪上进行。反应结束后作熔解曲线。以目的基因的Ct值减去内参的Ct值为 Δ Ct, $2^{-\Delta$ Ct值来表示目的基因mRNA表达水平的高低。

表 1 PCR 引物碱基序列

Table 1 Nucleobase sequences of PCR primers

名称	上游	下游
β-Actin	CCACACTGTGCCCATCTACG	AGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTCAG
RANKL	ACCAGCATCAAAATCCCAAG	CCCCAAAGTATGTTGCATCC
OPG	AGCTGCAGTACGTCAAGCAGGA	TTTGCAAAGTATTTTCGCTCTGG
IL-6	AACCTGAACCTTCCAAAGATGG	TCTGGCTTGTTCCTCACTACT
TNF-α	CCCTCTGGCCCAGGCAGTCA	ATGGGTGGAGGGCAGCCCTT
IL-8	CATACTGCCAAACCTTTCACCCC	TCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTCCA

1.2.5 免疫荧光检测 Cel 对 MH7A 中 RANKL 表达的影响

将上述不同刺激组 MH7A 以 2×10^5 个/皿加入直径 3.5 cm 培养皿(培养皿中已预先放置高压灭菌的玻片),置于 37℃含 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,以 PBS 振荡洗涤后,4%多聚甲醛覆盖细胞,室温静置 15 min,PBS 洗涤后,将兔抗人 RANKL 一抗以抗体稀释液按 1:100 稀释后,滴加覆盖标本表面,4℃孵育 16 h 左右(过夜),室温复温后,将罗丹明标记二抗以免疫荧光二抗稀释液按 1:200 稀释,覆盖标本表面,室温避光孵育 60 min,PBS 洗涤 3 次,DAPI 染料覆盖细胞表面,室温避光静置 2 min,PBS 洗涤 3 次,将爬片的细胞面扣在干净的载玻片上,封片,镜检。实验重复操作 2 次以上。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 分析数据并作图,实验数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间的统计学差异检验用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cel 对 MH7A 增殖的影响

以不同浓度的 Cel 分别处理 MH7A 细胞系 24、48 及 72 h,0.1、0.5、1.0、2.5 μmol/L 4 个浓度的 Cel 在各个时间点对 MH7A 增殖无明显抑制作用。但 Cel 10 μmol/L 在 24 h,5 μmol/L 在 48 h 能明显抑制 MH7A 增殖,表明大剂量 Cel 对 MH7A 有一定毒性作用。因此本实验选用 2.5 μmol/L 浓度范围内的 0.1、0.5、1.0 和 2.0 μmol/L 4 个浓度在本研究中选择进一步研究用剂量,以保证雷公藤对细胞增殖的影响最小(图 1)。

2.2 不同剂量 IL-1β 在不同时间点对 RANKL 表达的作用

以 0、1、10、20 ng/ml 的 IL-1β 分别刺激 MH7A 24、48、72 h 后,以 PCR 检测 RANKL mRNA 表达水

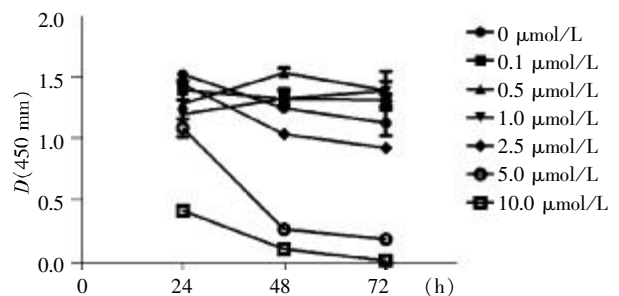


图 1 不同浓度 Cel 对 MH7A 细胞系增殖的影响

Figure 1 The contribution of different concentration of Celastrol effecting on the growth of MH7A

平(图 2)。结果显示,3 个时间点的 RANKL mRNA 的表达均随着 IL-1β 剂量的增大而升高(图 2A~C)。且 20 ng/ml 剂量组与空白组相比,作用 24 h RANKL mRNA 增高的倍数最大(图 2D)。

2.3 Cel 对 MH7A 中 OPG/RANKL 表达的影响

IL-1β 刺激 MH7A 24 h 后,细胞中 RANKL mRNA 表达明显增加 ($P < 0.001$),Cel 呈剂量依赖性抑制促炎因子 IL-1β 诱导的 RANKL mRNA 表达 ($P < 0.05$),其中以 Cel 2 μmol/L 剂量组作用最强 ($P < 0.01$,图 3A)。采用免疫荧光方法进一步分析了 MH7A 中 RANKL 蛋白表达情况。与 mRNA 表达相似,IL-1β 刺激 48 h 后,MH7A 中 RANKL 免疫荧光明显强于空白对照组(图 4B),而 Cel 呈剂量依赖性抑制 MH7A 中 RANKL 免疫荧光强度(图 4C~F)。

与空白组比较,IL-1β 刺激 MH7A 24 h 后,OPG mRNA 表达增加 ($P = 0.016$)。Cel 0.1、0.5 和 1.0 μmol/L 干预组与单纯 IL-1β 刺激组相比,OPG mRNA 表达无明显差异。但 Cel 2 μmol/L 组能显著提高 IL-1β 刺激的 MH7A 中 OPG mRNA 表达 ($P = 0.027$,图 3B)。进一步分析 Cel 对 OPG/RANKL 比值的影响,结果显示 Cel 呈剂量依赖性提高 OPG/RANKL 轴比值(图 3C)。

2.4 Cel 对 MH7A 中 IL-6、TNF-α 和 IL-8 mRNA 表达的影响

IL-1β 刺激 MH7A 24 h 后,细胞中促炎因子

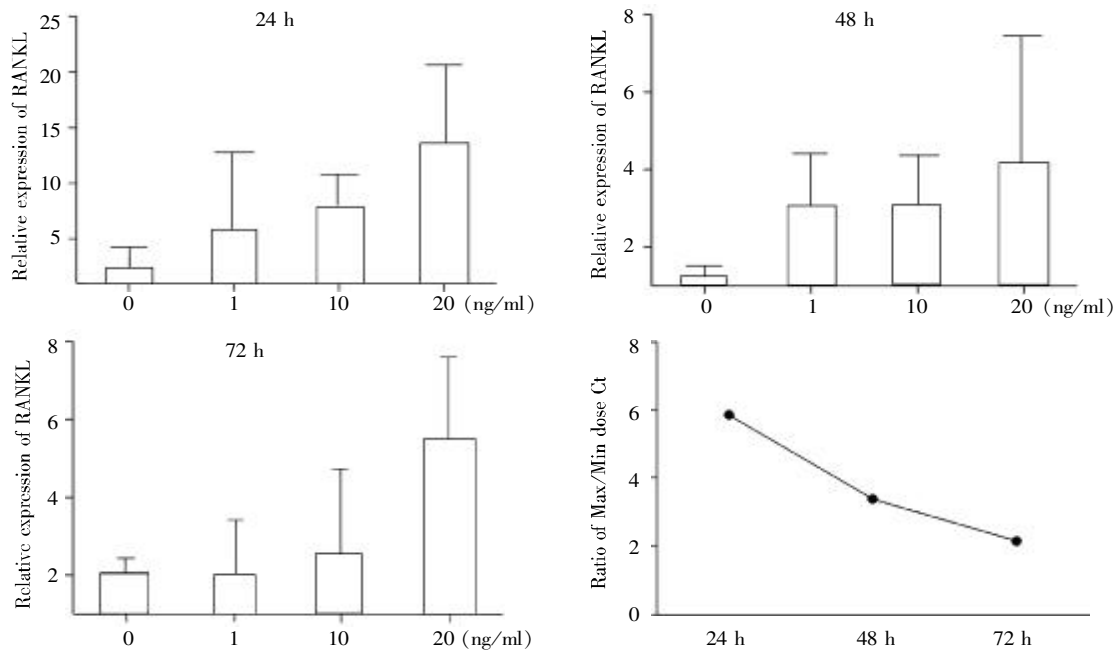
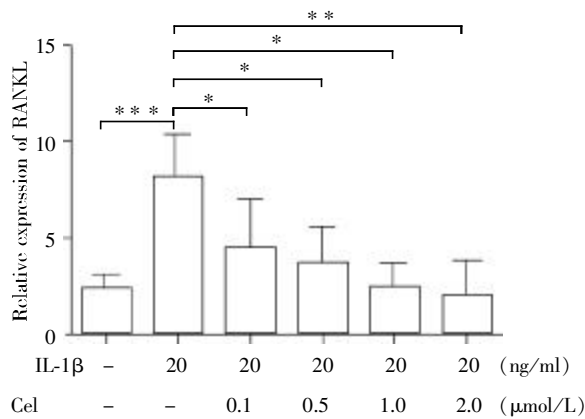


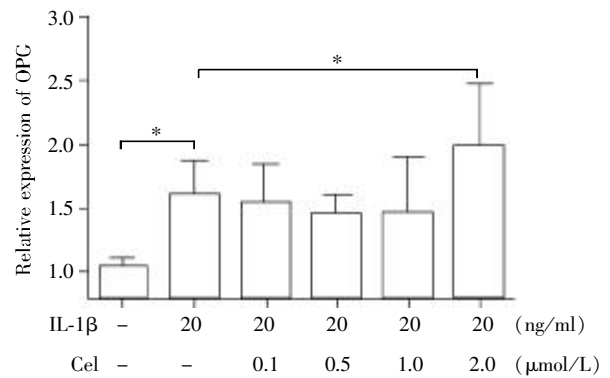
图2 不同浓度 IL-1β 在不同时间点对 RANKL mRNA 表达的影响

Figure 2 The effect on the expression of RANKL mRNA by different concentration of IL-1β

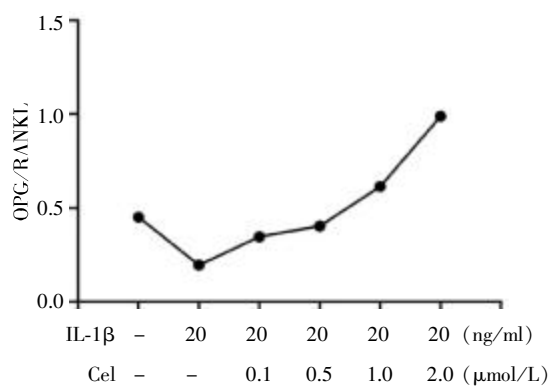
A



B



C



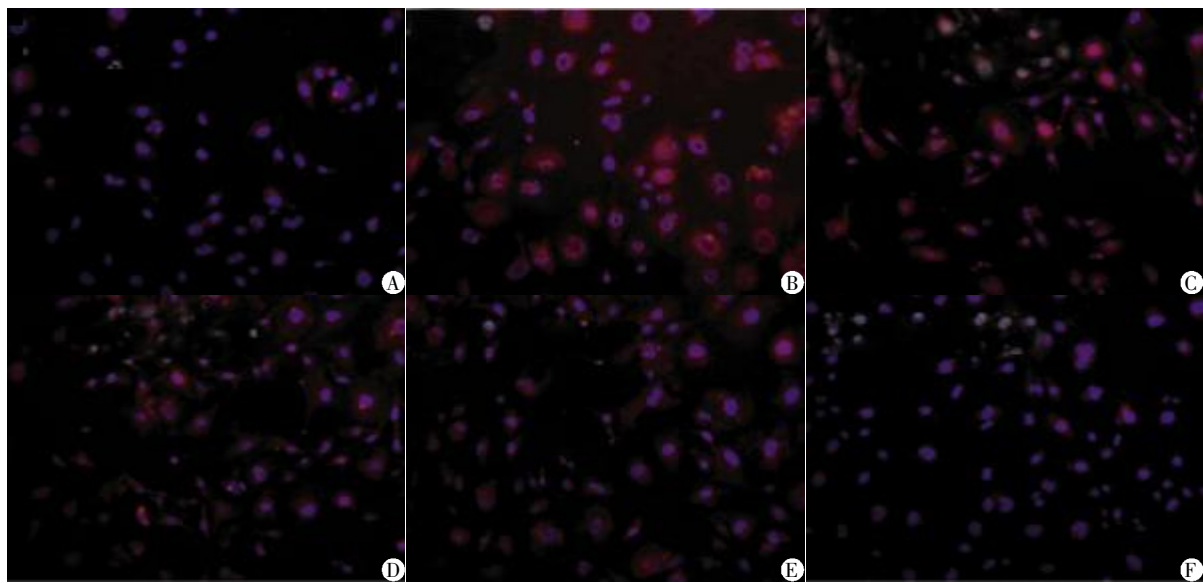
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

图3 不同浓度 Cel 对 MH7A 表达 RANKL、OPG 基因的影响

Figure 3 IL-1β combines with Cel contribute the expression of RANKL and OPG

IL-6、TNF-α 和趋化因子 IL-8 mRNA 表达水平分别增加约 20、2 和 100 倍,Cel 呈剂量依赖性抑制 IL-6

(图 5A)、TNF-α (图 5B)和 IL-8 (图 5C)mRNA 的表达(P < 0.05)。



A:空白组;B:IL-1 β 刺激组;C:IL-1 β +Cel(0.1 μ mol/L);D:IL-1 β +Cel(0.5 μ mol/L);E:IL-1 β +Cel(1.0 μ mol/L);F:IL-1 β +Cel(2.0 μ mol/L)。

图 4 不同浓度 Cel 抑制 MH7A 表达 RANKL 蛋白

Figure 4 The contribution of different concentration of Celastrol effecting on protein expression of RANKL in MH7A

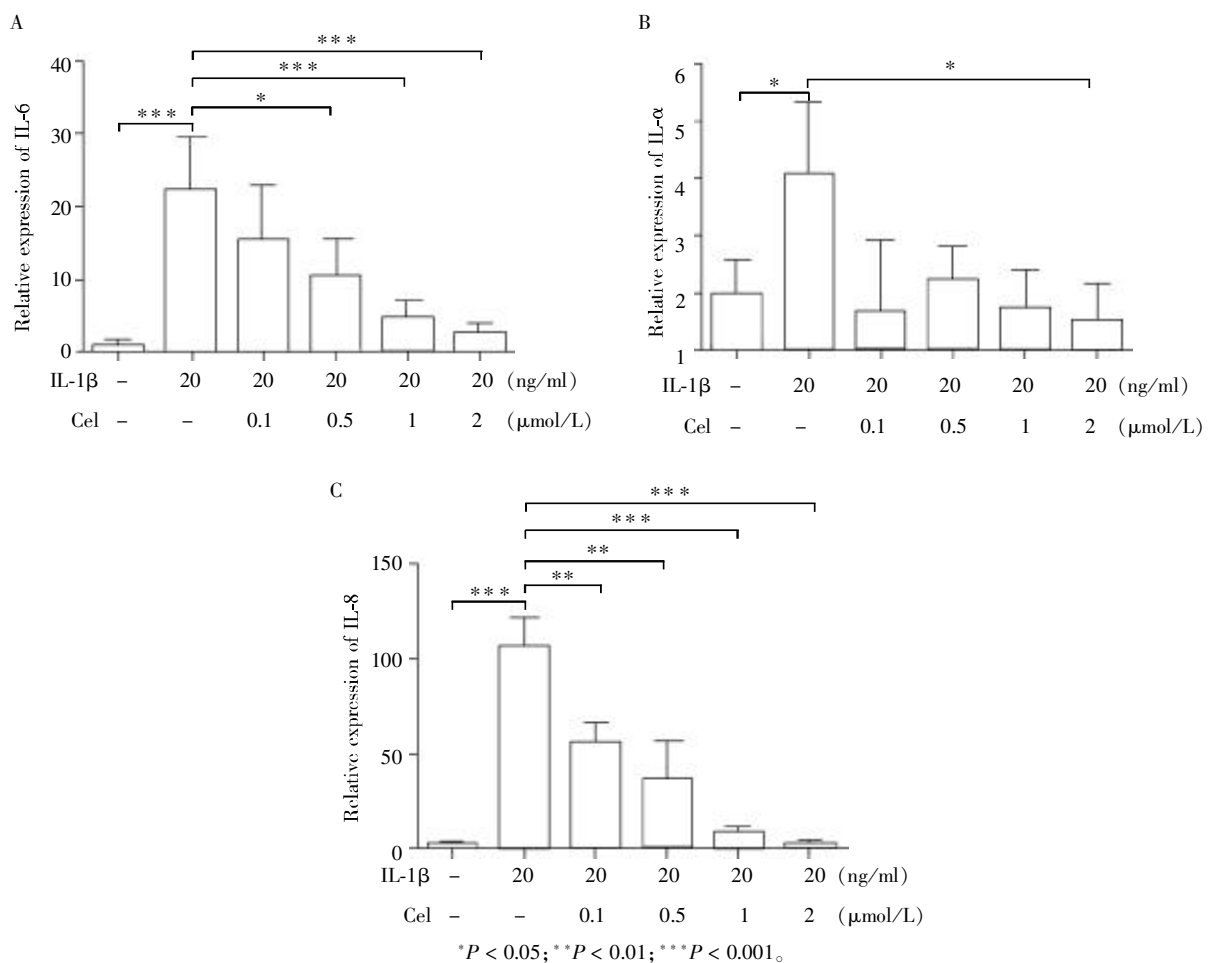


图 5 不同浓度 Cel 对 MH7A 分泌的炎性因子及趋化因子的抑制作用

Figure 5 The contribution different concentration of Celastrol effecting on the expression of inflammatory factor and chemotatic factor in MH7A

3 讨论

RA 病理过程中涉及两个基本环节,滑膜慢性炎症和骨侵蚀,FLS 在这两个环节中均起到重要作用。各种抗原通过识别 FLS 表面的 Toll 样受体,刺激下游信号通路的激活,早期即参与并触发免疫应答,随后活化的 FLS 能产生大量炎症因子、趋化因子、金属蛋白酶以及 RANKL,导致持续性关节炎和破骨细胞激活,促进细胞外基质的变性降解,最终导致骨侵蚀发生和关节破坏^[7]。同时这些因子又反过来作用于 FLS,使 FLS 恶性过度增殖,凋亡减少,形成恶性循环。因此,如何抑制 FLS 的过度活化,减少其表达炎症因子、趋化因子和 RANKL 等,从而抑制破骨细胞的活化,阻滞骨侵蚀的发生,成为治疗 RA 的主要目标之一。本研究选择了来源于 RA 患者 FLS 细胞系 MH7A 作为干预细胞。

既往对雷公藤红素与 RA 的研究基本集中于抗炎作用,大量实验表明其能明显抑制 FLS 中 IL-1 β 、COX-2 的表达^[8-9],并降低 NF- κ B 活性,减少 PGE₂ 和细胞黏附分子的分泌和表达,从而缓解局部炎症,减轻患者的临床症状。本研究中,以 IL-1 β 刺激类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 后,发现 MH7A 中与 RA 病理过程密切相关的促炎因子 IL-6、TNF- α 和趋化因子 IL-8 分别上调了约 20、2 和 100 倍,而雷公藤红素能呈剂量依赖性抑制这些促炎因子和趋化因子表达,进一步证实了雷公藤红素强大的抗炎作用。

OPG/RANKL 的比例决定了骨形成和骨降解的平衡,RANKL 属于肿瘤坏死因子超家族成员,被认为是近十年来发现的最重要的调节破骨细胞分化发生的因子^[1],也是近年来发现的关键的联系免疫系统与骨骼系统的信号通路^[10]。因此 OPG/RANKL 轴在由于破骨细胞活化而导致的 RA 骨侵蚀中也至关重要。近年研究表明,TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等多个促炎因子参与 RA 破骨细胞激活和骨侵蚀过程主要通过一个共同通路——RANKL^[11-18]。在 RA 中,炎症信号刺激滑膜成纤维细胞或 T 细胞表达 RANKL,活化的 RANKL 通过诱导破骨细胞前体向成熟破骨细胞分化^[19],激活成熟的破骨细胞释放出 H⁺、多种蛋白酶降解骨基质,最终导致骨侵蚀的发生^[20]。多个临床研究发现 RA 关节液、滑膜组织或外周血单核细胞中 RANKL mRNA 或蛋白水平明显升高,增高的 RANKL 水平与 RA 关节毁损程度和进程呈正比^[21-22]。OPG 是 RANKL 的诱骗受体,能阻止 RANKL 与其受体

的结合,从而抑制破骨细胞分化激活^[23]。因此,OPG/RANKL 轴是导致 RA 骨侵蚀的关键通路之一^[24]。RANKL 的单克隆抗体 Denosumab 已试用于 RA 患者治疗,发现能显著阻止 RA 患者关节破坏的发生^[25]。雷公藤红素除了抗炎之外,能否抑制 FLS 表达 RANKL、能否影响 OPG/RANKL 平衡从而起到保护 RA 患者骨破坏的作用是本实验的核心问题。

多项影像学研究显示,RA 关节局部骨侵蚀和持续的滑膜炎密切相关,并很有可能骨侵蚀完全继发于滑膜炎^[26],这进一步证明了关节滑膜的慢性炎症在 RA 骨侵蚀中起到的主导地位。本研究中,以 IL-1 β 刺激 MH7A 后,细胞中 RANKL 表达明显增加,而 Cel 能呈剂量依赖性抑制 RANKL 表达。更为重要的是,本文发现 Cel 2 μ mol/L 能显著提高 IL-1 β 刺激的 MH7A 中 OPG mRNA 表达,改变 OPG/RANKL 比值。本研究初步表明,除抗炎作用外,Cel 可影响 RA 关节 FLS 的 OPG 和 RANKL 平衡,抑制 RANKL 表达的同时升高 OPG 表达,从而可能抑制下游破骨细胞的分化激活。而 Cel 对炎症因子和趋化因子的抑制作用也将进一步抑制 FLS 自身的过度增殖和 RANKL 的释放,截断 RA 中 FLS 的恶性循环,在阻止 RA 骨侵蚀中发挥重要作用。

雷公藤的不良反应在一定程度上限制了其在临床上的运用,目前研究表明其毒性主要来源于根部,而雷公藤红素是纯化的雷公藤单体成分,是雷公藤中含量最多的活性成分。本研究发现一定工作浓度的雷公藤红素不影响细胞增殖,纯化的雷公藤单体成分是否有更好的安全性值得进一步观察。

本实验表明,雷公藤红素能抑制促炎因子、趋化因子表达,调节滑膜成纤维细胞中 OPG/RANKL 轴,不仅能减轻 RA 关节炎,并且更重要的是在疾病远期阻止骨侵蚀中发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Nanki T. Molecular mechanisms of bone destruction in rheumatoid arthritis [J]. J Clin Calcium, 2007, 17 (4): 510-516
- [2] Sims NA, Walsh NC. Intercellular cross-talk among bone cells: new factors and pathways [J]. J Curr Osteoporos Rep, 2012, 10(2): 109-117
- [3] Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis [J]. J Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012, 4(4): 225-233
- [4] 赵太平,徐玉东,朱勇杰. 雷公藤对类风湿性关节炎大鼠治疗作用的研究 [J]. 中国医药指南, 2012, 4(10): 477

- [5] 卞晓霞. 雷公藤红素药理作用研究进展 [J]. 中国当代医药, 2009, 7(13): 18
- [6] 张小蒙. 雷公藤的药理作用和临床应用研究进展 [J]. 临床合理用药, 2012, 7(78): 180
- [7] 贺琤雯, 沈 茜. 滑膜成纤维细胞在类风湿性关节炎发病中的作用 [J]. 国际免疫学杂志, 2010, 33 (2): 117-119
- [8] 涂胜豪, 冬 云, 红 波等. 雷公藤甲素抑制外周血单个核细胞分泌 IL-1 β 及其基因多态性的关系 [J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9: 520
- [9] Venkatesha SH, Astry B, Nanjundaiah SM, et al. Suppression of autoimmune arthritis by Celastrus-derived Celastrol through modulation of pro-inflammatory chemokines [J]. J Bioorg Med Chem. 2012, 20(17): 5229-5234
- [10] Takayanagi H. New immune connections in osteoclast formation [J]. Ann NY Acad Sci, 2010, 1192: 117-123
- [11] Rifas L, Weitzmann MN. A novel T cell cytokine, secreted osteoclastogenic factor of activated T cells, induces osteoclast formation in a RANKL-independent manner [J]. J Arthritis Rheum, 2009, 60(11): 3324-3335
- [12] Huang H, Kim HJ, Chang EJ, et al. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells; implications for bone remodeling [J]. J Cell Death Differ, 2009, 16(10): 1332-1343
- [13] Maruotti N, d'Onofrio F, Corrado A, et al. Why TNF-alpha inhibition is not sufficient to avoid juxta-articular erosions in chronic arthritis [J]. J Intern Emerg Med, 2012, 7(1): 15-20
- [14] Kim YG, Lee CK, Oh JS, et al. Effect of interleukin-32gamma on differentiation of osteoclasts from CD14⁺ monocytes [J]. J Arthritis Rheum, 2010, 62(2): 515-523
- [15] Adamopoulos IE, Sabokbar A, Wordsworth BP, et al. Synovial fluid macrophages are capable of osteoclast formation and resorption [J]. J Pathol, 2006, 208(1): 35-43
- [16] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. J Nature, 2003, 423 (6937): 337-342
- [17] Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis [J]. J Nat Rev Rheumatol, 2009, 5(10): 543-548
- [18] Ellabban AS, Kamel SR, Ahmed SS, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand serum and synovial fluid level. A comparative study between rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. J Rheumatol Int, 2012, 32(6): 1589-1596
- [19] Cohen SB, Dore RK, Lane NE, et al. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial [J]. J Arthritis Rheum, 2008, 58(5): 1299-1309
- [20] 张前德, 时彦标, 谈文峰, 等. 雷公藤甲素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞系 MH7A 中 VEGF、MMP-9 水平变化的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2008, 28(7): 904-907
- [21] Geusens P. The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis [J]. J Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012, 4(4): 225-233
- [22] Silva I, Branco JC. Rank/OPG/RANKL: literature review [J]. J Acta Reumatol Port, 2011, 36(3): 209-218
- [23] Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M. Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review [J]. J Oral Sci, 2008, 50(4): 367-376
- [24] Lee YM, Fujikado N, Manaka H, et al. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions [J]. J Int Immunol, 2010, 22(10): 805-816
- [25] Lee YA, Choi HM, Lee SH, et al. Hypoxia differentially affects IL-1 β -stimulated MMP-1 and MMP-13 expression of fibroblast-like synoviocytes in an HIF-1 α -dependent manner [J]. J Rheumatology (Oxford), 2012, 51 (3): 443-450
- [26] McGonagle D, Tan AL. What magnetic resonance imaging has told us about the pathogenesis of rheumatoid arthritis—the first 50 years [J]. J Arthritis Res Ther, 2008, 10(5): 222