

文章编号: 1005-0957 (2025) 04-0482-08

• 动物实验 •

雀啄灸对湿热痹阻型类风湿关节炎大鼠滑膜抗瓜氨酸化蛋白抗体免疫复合物表达的影响

邓慧榕¹, 岳婷¹, 杨东宇¹, 刘煜¹, 王煜¹, 杨吉勃², 赵中亭¹, 严兴科¹, 朱田田¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730000)

【摘要】 目的 观察雀啄灸对湿热痹阻型类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)大鼠滑膜抗瓜氨酸化蛋白抗体免疫复合物(anti-citrullinated protein antibodies-immune complex, ACPA-IC)表达的影响, 探究灸法干预早期 RA 的免疫机制及灸治热证的现代生物学机制。**方法** 从 72 只雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠中随机抽取 18 只作为空白组, 其余 54 只采用胶原诱导性关节炎结合风、湿、热环境刺激复合造模法进行湿热痹阻型 RA 大鼠病证结合的模型制备, 并采用关节炎指数(arthritis index, AI)结合热和痛的证候特征指标对模型进行评价。将造模成功的大鼠随机分为模型组、药物组和雀啄灸组, 每组 18 只。药物组大鼠采用甲氨蝶呤混悬液进行灌胃治疗, 雀啄灸组大鼠进行雀啄灸干预。干预结束后采集 4 组大鼠 AI 评分、关节表面温度和足底热痛阈值; 采用透射电镜技术观察 4 组大鼠滑膜细胞超微结构; 采用酶联免疫吸附测定法检测大鼠双侧膝关节滑膜白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平; 采用蛋白印迹法检测大鼠滑膜 ACPA-IC 的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠病变关节足底热痛阈值降低($P < 0.05$); 滑膜细胞出现水肿, 细胞核和线粒体出现炎性改变; AI 评分、关节表面温度以及滑膜 IL-1、TNF- α 和 ACPA-IC 水平均升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 药物组和雀啄灸组大鼠足底热痛阈值升高($P < 0.05$); 滑膜细胞水肿减轻, 细胞核和线粒体炎性病变改善; AI 评分、关节表面温度以及滑膜 IL-1、TNF- α 和 ACPA-IC 水平均降低($P < 0.05$)。与药物组比较, 雀啄灸组大鼠足底热痛阈值升高($P < 0.05$), 滑膜 IL-1、TNF- α 和 ACPA-IC 水平降低($P < 0.05$)。**结论** 雀啄灸可改善湿热痹阻型 RA 大鼠滑膜细胞炎性损伤, 减轻热和痛的关节外部表现, 调节滑膜 ACPA-IC 水平, 降低滑膜 IL-1 和 TNF- α 水平。

【关键词】 灸法; 艾条灸; 雀啄灸; 关节炎, 类风湿; 湿热痹阻; 特异性免疫复合物; 大鼠

【中图分类号】 R2-03 **【文献标志码】** A

DOI: 10.13460/j.issn.1005-0957.2025.04.0482

Effect of sparrow-pecking moxibustion on the expression of anti-citrullinated protein antibodies-immune complex in the synovium of rats with rheumatoid arthritis of damp heat stasis pattern DENG Huirong¹, YUE Ting¹, YANG Dongyu¹, LIU Yu¹, WANG Yu¹, YANG Jibo², ZHAO Zhongting¹, YAN Xingke¹, ZHU Tiantian¹. 1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730000, China

[Abstract] Objective To observe the effect of sparrow-pecking moxibustion on the expression of anti-citrullinated protein antibodies-immune complex (ACPA-IC) in the synovium of rats with rheumatoid arthritis (RA) of damp heat stasis pattern and to discover the immune mechanism of moxibustion intervening in early-stage RA and the modern biological mechanism of moxibustion treating heat patterns. **Method** Eighteen rats were randomly selected from 72

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(82060892, 81560791); 甘肃省科技厅省自然基金项目(20JR10RA313); 甘肃省重点人才项目(2024 年)

作者简介: 邓慧榕(1997—), 女, 2022 级硕士生, Email: 2318214192@qq.com

通信作者: 朱田田(1988—), 女, 副教授, 博士, Email: zhutiantian2012ji@163.com

female Sprague-Dawley (SD) rats as a blank control group, and the other 54 rats were prepared to be disease-pattern-combined RA models of damp heat stasis pattern using a combo modeling method (collagen-induced arthritis plus environmental stimuli, including wind, damp, and heat). The model was assessed using the arthritis index (AI) and indicators of heat and pain patterns. The successful rat models were randomized into a model group, a medication group, and a sparrow-pecking moxibustion group, with 18 rats in each group. Rats in the medication group received methotrexate suspension via gavage, and rats in the sparrow-pecking moxibustion group received sparrow-pecking moxibustion. When the intervention finished, the AI score, joint surface temperature, and plantar thermal pain threshold value were collected from each group. The ultrastructure of synovial cells of the four groups of rats was observed using transmission electron microscopy; the levels of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the synovium of bilateral knee joints were detected using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the expression of synovial ACPA-IC was determined using Western blotting. **Result** Compared to the blank control group, the plantar thermal pain threshold of the diseased joint side declined in the model group rats ($P < 0.05$); the model group also presented synovial cell swelling, inflammatory changes in the nucleus and mitochondria, and increased AI scores, joint surface temperatures, and synovial IL-1, TNF- α , and ACPA-IC levels ($P < 0.05$). Compared to the model group, rats in the medication and sparrow-pecking moxibustion groups showed increased plantar thermal pain thresholds ($P < 0.05$), reduced synovial cell swelling, improved inflammatory changes in the nucleus and mitochondria, and decreased AI scores, joint surface temperatures, and synovial IL-1, TNF- α , and ACPA-IC levels ($P < 0.05$). Compared to the medication group, the plantar thermal pain threshold was higher ($P < 0.05$), and the levels of synovial IL-1, TNF- α , and ACPA-IC were lower in the sparrow-pecking moxibustion group rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Sparrow-pecking moxibustion can improve inflammatory injuries in the synovial cells, reduce joint surface manifestations of heat and pain, regulate synovial ACPA-IC levels, and down-regulate synovial IL-1 and TNF- α levels in rats with RA of damp heat stasis pattern.

[Key words] Moxibustion; Moxa stick moxibustion; Sparrow-pecking moxibustion; Arthritis, Rheumatoid; Damp heat stasis; Specific immune complex; Rats

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以全身小关节对称性、多发性、侵袭性慢性滑膜炎为主要临床表现的自身免疫性疾病,其病理表现为炎性细胞浸润、滑膜组织增生、血管翳形成以及关节软骨和骨质破坏^[1-2]。据流行病学调查显示,RA 全球患病率为 0.5%~1.0%^[3],是人类最具有破坏性的疾病之一。RA 发病机制复杂,有研究表明 RA 患者体内有大量瓜氨酸化抗原的蓄积以及瓜氨酸化蛋白自身抗体的广泛存在,提示瓜氨酸化失调是引起 RA 发病的重要病理环节^[4]。二者结合形成的抗瓜氨酸化蛋白抗体免疫复合物(anti-citrullinated protein antibodies-immune complex, ACPA-IC)之间相互作用、沉淀,可诱导多种炎性因子的释放,从而引起滑膜慢性、持续性炎症^[5]。因此,ACPA-IC 被认为是刺激 RA 滑膜炎持续存在的关键因素。目前西医治疗早期 RA 主要以糖皮质激素、非甾体类抗炎药、传统抗风湿药物、靶向小分子药物

等药物治疗为主,但长期使用易产生不良反应^[6]。灸法作为中医学重要外治法之一,可温经散寒,扶正祛邪,调理阴阳^[7]。前期研究^[8]表明,灸法能够有效改善 RA 大鼠关节局部红肿,具有调整免疫紊乱的功能,且灸法相较于药物治疗还具有安全、经济、不良反应少等优势,在临床中得到了广泛的应用^[9]。早期 RA 病变关节表现为红、肿、热、痛,属中医学痹证中的热痹,治疗应以泻为主,故本研究采用以泻为主的雀啄灸进行治疗,对湿热痹阻型 RA 大鼠进行干预,观察其对大鼠双侧膝关节滑膜 ACPA-IC、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平的影响,探究灸法干预早期 RA 的免疫机制及灸治热证的现代生物学机制,为灸法干预早期 RA 的机制研究和“热证可灸”理论的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

共 72 只 SPF 级雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 质量为 (200 ± 20) g, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供[合格证编号 110324220103133465, 许可证号 SCXK(京)2019-0010]。本研究所有操作均通过甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准(实验伦理批号为 SY2021-817)。适应性饲养 1 周后, 从中随机抽取 18 只作为空白组, 常规饲养; 剩余 54 只大鼠进行模型制备, 造模成功后再随机分为模型组、药物组和雀啄灸组, 每组 18 只。

1.2 主要仪器、试剂和药物

快速混匀器(金坛市白塔新宝仪器厂, 型号 SK-1), 智能人工气候培养箱(宁波江南仪器厂, 型号 RXZ-380A-LED), 智能热板仪(成都泰盟科技有限公司, 型号 RB-200), 红外热成像仪(FLIR 公司, 型号 FLIR QuickPlot version 1.2.10173.1002), 超低温冰箱(海尔集团, 型号 DW-86L419), 超薄切片机(Leica 公司, 型号 Leica UC7), 钻石切片刀(Daitome 公司, 型号 Ultra45), 透射电子显微镜(Hitachi 公司, 型号 HT7800/HT7700), 全波长酶标仪(BioTek 公司, 型号 Epoc), 垂直电泳仪/转膜仪(北京君意东方电泳设备有限公司, 型号 JY-ZY5), 全自动化学发光成像系统(北京六一生物科技有限公司, 型号 WD-9423C), 低温超速离心机(四川蜀科仪器有限公司, 型号 TGL-1850), 电热恒温水浴锅(江苏荣华公司, 型号 SHA-C), 电热恒温培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司, 型号 DH-420)。

牛 II 型胶原蛋白(bovintype II collagen, CII)(Chondrex 公司, 批号 210624), 不完全弗氏佐剂(SIGMA 公司, 批号 SLCM1118), 完全弗氏佐剂(SIGMA 公司, 批号 SLCF1289), 戊巴比妥钠(天津市大茂化学试剂厂, 批号 05116), 甲氨蝶呤片(methotrexate, MTX)(通化茂祥制药有限公司, 批号 220303), 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)(Cytiva 公司, 批号 AH29787894), 电镜固定液(Servicebio 公司, 批号 G1102), 钨酸(Ted Pella 公司, 批号 ZKP-E150020-1), 丙酮(Servicebio 公司, 批号 G4212), 包埋剂(SPI 公司, 批号 90529-77-4), 放射免疫沉淀法缓冲液裂解液(radioimmunoprecipitation assay buffer, RIPA)(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20220927), 二喹啉甲酸蛋白检测试剂盒

(bicinchoninic acid, BCA)(北京索莱宝科技有限公司, 批号 20220910), 二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜(Millipore 公司, 批号 IRVH00010), 化学发光底物(上海翊圣生物科技有限公司, 批号 36208-A/B), 蛋白电泳 Marker(上海翊圣生物科技有限公司, 批号 26616), 大鼠 TNF- α 酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司, 批号 2212R17), 大鼠 IL-1 ELISA 试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司, 批号 2212R23), 兔蛋白酶 3 抗体(爱博泰克生物科技有限公司, 批号 0131080201), 山羊抗兔 IgG 抗体(ImmunoWay 公司, 批号 TDY04345254), 上官氏天然艾条(规格 4 mm $\times$ 100 mm)。

1.3 模型制备方法

采用胶原诱导性关节炎^[10](collagen induced arthritis, CIA)联合风、湿、热环境刺激的复合造模法进行湿热痹阻型 RA 大鼠病证结合的模型制备^[11]。造模第 1 天在大鼠麻醉的状态下, 于脊柱两侧及尾根部注射 CII 与完全弗氏佐剂混合乳剂, 每个部位各 0.1 mL, 完成初次免疫。造模第 7 天在大鼠右侧足垫部注射 CII 与不完全弗氏佐剂混合乳剂 0.3 mL, 完成加强免疫。另外, 从造模第 1 天开始, 每天将大鼠置于智能人工气候培养箱内予风、湿、热环境刺激(风速 5 m/s, 温度 35~40 °C, 相对湿度为 80%~90%), 每次 40 min, 共刺激 10 d。造模第 10 天, 采用关节炎指数(arthritis index, AI)结合热、痛的证候特征指标对模型大鼠进行评价, 以 AI $\geq$ 4 分作为模型复制成功的标准^[12]。

1.4 干预方法

1.4.1 药物组

于干预第 1、第 7 和第 14 天, 取 MTX 混悬液进行灌胃治疗, 以每 100 g 体质量灌胃 0.1 mg 为剂量标准, 每周 1 次, 共灌胃 3 次。

1.4.2 雀啄灸组

选取大椎、曲池及阿是穴。腧穴定位参照《实验针灸学》^[13]及《大鼠断层解剖彩色图谱》^[14]中标准, 曲池位于桡骨近端的关节外侧前方的凹陷中, 大椎位于第 7 颈椎与第 1 胸椎间的背部正中, 阿是穴取双后肢踝关节局部压痛处。将腧穴部位毛发剃除, 用固定衣进行固定, 暴露施灸部位, 用上官氏微烟艾条(规格 4 mm $\times$ 100 mm)进行施灸, 使艾条燃烧端距皮肤表面 0.5~2 cm, 做上下移动, 频率 120 次/min, 左右两侧

膻穴交替施灸。每日 1 次, 6 d 为 1 个疗程, 疗程间间隔 1 d, 共 3 个疗程。

1.4.3 空白组和模型组

于雀啄灸治疗的同一时间进行抓取固定, 但不进行干预。

1.5 取材方法

干预结束后, 对 4 组大鼠的滑膜组织进行取材。采用 2%戊巴比妥钠溶液对大鼠进行腹腔注射麻醉 (2 mL/kg), 麻醉成功后固定于操作台上, 使其后肢呈屈膝外展外旋状态; 将其膝关节周围皮毛剪开, 暴露膝关节, 剥离皮下筋膜后可见髌韧带; 沿髌韧带下方横向切开, 提起关节腔, 可见一层平滑光亮的淡黄色组织, 即为滑膜; 把滑膜层和纤维层分离并将滑膜组织剪下。整个过程均按照实验动物伦理学要求进行^[15]。

1.6 指标检测

1.6.1 关节炎指数评分

采用 AI 评分对大鼠病变关节肿胀程度进行评价。0 分为正常无红肿, 1 分为趾关节轻微肿胀不超过 1 个, 2 分为足爪轻度红肿, 3 分为踝关节以下的足趾关节肿胀, 4 分包括踝关节在内的全足爪重度红肿。

1.6.2 关节表面温度

采用红外热成像仪和处理软件检测和分析大鼠病变关节局部红外热像图谱及其温度值。将待测大鼠四肢朝上固定, 在离大鼠 50 cm 垂直位置调整焦距, 采集双侧踝及趾关节局部红外热像图谱, 并采用红外热像图处理软件测量大鼠双侧踝关节及足趾局部皮肤表面的平均温度。每只大鼠采集 3 次, 取平均值。

1.6.3 足底热痛阈值

采用智能热板仪观察大鼠对热刺激的反应时间, 评估大鼠足底热痛阈值。将大鼠置于恒温 (55±1) °C 智能热板仪并立即计时, 当大鼠第一次出现舔足、跺足或跳起动作时结束计时, 此时间即为大鼠对热刺激的反应时间, 即为热痛阈值。反复测量 3 次, 取平均值并记录热痛阈值。

1.6.4 大鼠滑膜细胞超微结构观察

采用透射电镜技术观察大鼠滑膜细胞超微结构。用 PBS 溶液将滑膜组织冲洗干净后用电镜固定液避光固定 2 h; 用 PBS 溶液冲洗 3 次后再用 1%锇酸固定, 继续用 PBS 溶液漂洗 3 次, 使用乙醇按梯度脱水; 丙酮和包埋剂混合渗透后用包埋剂过夜渗透; 于 37 °C、45 °C、60 °C 分别作用 24 h 制作包埋块; 切超薄切片,

150 目方华膜铜网捞片; 用醋酸双氧铀对切片染色, 蒸馏水漂洗再用柠檬酸铅进行染色, 干燥; 用电镜观察后拍照记录。

1.6.5 大鼠滑膜 IL-1 和 TNF- α 水平

严格按照 ELISA 试剂盒说明书配液, 加样, 孵育, 加入终止液, 反应终止后于 450 nm 波长下检测吸光度 (optical density, OD) 值, 绘制标准曲线, 计算大鼠滑膜 IL-1 和 TNF- α 水平。

1.6.6 大鼠滑膜 ACPA-IC 表达

采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测各组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白相对表达量。先提取免疫复合物 (immune complex, IC), 用聚乙二醇 6000 (macrogol 6000, PEG6000) 沉淀法提取 IC, 将滑膜组织与 PEG6000 混合静置, 离心后弃上清, 用 PBS 溶解即可得 IC, -20 °C 下保存。然后测定蛋白含量, 按照 BCA 试剂盒说明配置工作液, 稀释后加入 96 孔板内, 用 PBS 溶液补足后, 各孔再加入 BCA 工作液, 37 °C 水浴, 绘制曲线, 计算样品蛋白浓度。再进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 电泳, 将玻璃板移入电泳槽加入电泳液, 用移液枪把碎胶分离, 再加入蛋白质分子和 IC 样品, 接通 8 V 电压, 待蛋白通过上层浓缩胶时, 将电压调为 120 V 持续 60 min; 观察溴酚蓝, 适时结束; 结束后取出凝胶切块。再进行转膜, 用甲醇将 PVDF 膜活化, 按一定的顺序放在夹板面上, 进行转膜。转膜后取出 PVDF 膜用洗涤缓冲液漂洗; 加 5% 脱脂奶粉, 摇床室温封闭; 封闭结束, 弃去脱脂奶粉, 再次于洗涤缓冲液中漂洗。孵育, 加入一抗兔蛋白酶 3 抗体 (1:2 000), 4 °C 下摇床孵育过夜; 用洗涤缓冲液洗膜 3 次, 再加入二抗山羊抗兔 IgG 抗体 (1:6 000), 室温摇床孵育; 再将 PVDF 膜洗膜 3 次。用化学发光底物浸泡 PVDF 膜, 取出沥干后置于凝胶成像系统显影。数据结果以 β -actin 为内参蛋白进行校准, 运用 Image J 软件计算条带的灰度值, 以各组蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为该蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

以上数据采用 SPSS26.0 统计软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用均数±标准差表示, 若数据方差齐, 采用单因素方差分析进行组间比较, 组间进一步比较采用最小显著性差异法检验。若数据不符合正态分布及方差不齐, 则采用秩和检验进行比较。

检验结果以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 4组大鼠一般情况比较

空白组大鼠状态良好,无明显异常;模型组大鼠关节红肿,大鼠活动度降低,行动不灵活;药物组大鼠经灌胃治疗后,足爪肿胀程度减轻,但出现躁动及互相啃咬的情况;雀啄灸组大鼠经治疗后,足趾肿胀程度减轻,活动性和灵敏性有所提高。实验过程中,雀啄灸组及空白组大鼠未出现死亡情况,模型组和药物组分别死亡1只和2只。

2.2 4组大鼠AI评分比较

干预前,与空白组比较,模型组、药物组和雀啄灸组大鼠AI评分均升高($P<0.05$)。干预后,与模型组比较,药物组和雀啄灸组大鼠AI评分均降低($P<0.05$);药物组和雀啄灸组大鼠AI评分比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表1。

表1 4组大鼠AI评分比较($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	<i>n</i>	干预前	干预后
空白组	18	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	17	6.95±1.21 ¹⁾	12.11±3.26 ¹⁾
药物组	16	7.61±2.04 ¹⁾	8.06±1.95 ¹⁾²⁾
雀啄灸组	18	7.00±1.72 ¹⁾	7.20±2.34 ¹⁾²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ 。

2.3 4组大鼠关节表面温度比较

干预前,与空白组比较,模型组、药物组和雀啄灸组大鼠踝关节及足趾部位平均温度均升高($P<0.05$)。干预后,药物组和雀啄灸组大鼠踝关节及足趾部位平均温度较干预前降低($P<0.05$);与模型组比较,药物组和雀啄灸组大鼠踝关节及足趾部位平均温度均降低($P<0.05$);药物组和雀啄灸组大鼠踝关节及足趾部位平均温度比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表2。

2.4 4组大鼠足底热痛阈值比较

干预前,与空白组比较,模型组、药物组和雀啄灸组大鼠足底热痛阈值降低($P<0.05$)。干预后,药物组和雀啄灸组大鼠足底热痛阈值均较干预前升高($P<0.05$);与模型组比较,药物组和雀啄灸组大鼠足底热痛阈值均升高($P<0.05$);与药物组比较,雀啄灸组大鼠足底热痛阈值升高($P<0.05$)。详见表3。

表2 4组大鼠踝关节及足趾部位平均温度比较($\bar{x} \pm s$)

单位:℃			
组别	<i>n</i>	干预前	干预后
空白组	18	27.72±2.45	27.75±2.34
模型组	17	34.95±1.74 ¹⁾	34.71±2.01 ¹⁾
药物组	16	34.94±1.89 ¹⁾	31.08±1.39 ¹⁾²⁾³⁾
雀啄灸组	18	35.01±1.48 ¹⁾	30.72±1.98 ¹⁾²⁾³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与同组干预前比较²⁾ $P<0.05$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$ 。

表3 4组大鼠踝关节及足趾部位平均温度比较($\bar{x} \pm s$)

单位:s			
组别	<i>n</i>	干预前	干预后
空白组	18	7.20±0.69	6.88±1.52
模型组	17	3.52±0.82 ¹⁾	3.60±0.57 ¹⁾
药物组	16	3.65±0.80 ¹⁾	4.80±1.66 ¹⁾²⁾³⁾
雀啄灸组	18	3.38±0.78 ¹⁾	5.80±1.05 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与同组干预前比较²⁾ $P<0.05$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$;与药物组比较⁴⁾ $P<0.05$ 。

2.5 4组大鼠滑膜细胞超微结构比较

空白组大鼠滑膜细胞未见肿胀,胞内结构完整,细胞器发育良好,无明显病变。模型组大鼠滑膜细胞水肿,细胞核和线粒体出现病变,凋亡小体形成。药物组大鼠滑膜细胞轻微水肿,细胞核形态基本正常,线粒体大多轻微肿胀。雀啄灸组滑膜细胞轻微水肿,细胞核形态基本正常,线粒体结构完整,内质网无明显病理损伤。详见图1和图2。

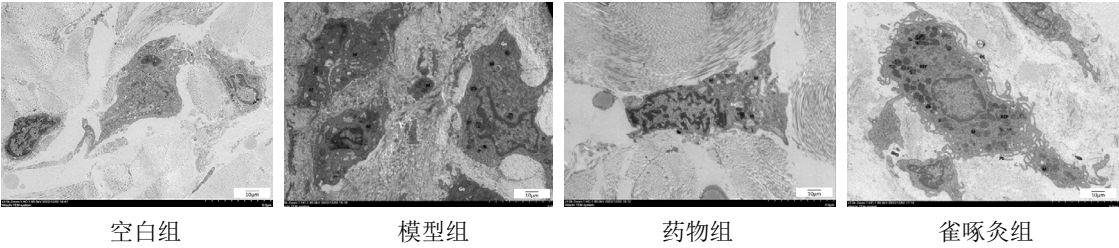


图1 电镜下4组大鼠滑膜细胞超微结构图(×3.0 k)

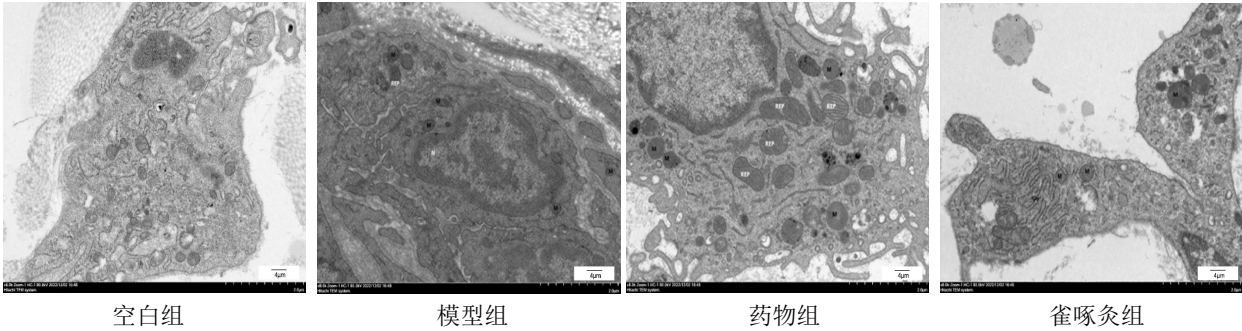


图 2 电镜下 4 组大鼠滑膜细胞超微结构图(×8.0 k)

2.6 4 组大鼠滑膜 TNF-α和 IL-1 水平比较

与空白组比较,模型组大鼠滑膜 TNF-α和 IL-1 水平升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,药物组和雀啄灸组大鼠 TNF-α和 IL-1 水平降低 ($P<0.05$);与药物组比较,雀啄灸组大鼠滑膜 TNF-α和 IL-1 水平降低 ($P<0.05$)。详见表 4。

表 4 4 组大鼠滑膜 TNF-α和 IL-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

单位:ng · L ⁻¹			
组别	<i>n</i>	TNF-α	IL-1
空白组	18	455.35±48.79	131.39±5.74
模型组	17	819.32±60.83 ¹⁾	187.45±4.81 ¹⁾
药物组	16	623.90±55.29 ¹⁾²⁾	168.59±5.74 ¹⁾²⁾
雀啄灸组	18	530.47±36.57 ¹⁾²⁾³⁾	151.79±7.54 ¹⁾²⁾³⁾

注:与空白组比较 ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$;与药物组比较 ³⁾ $P<0.05$ 。

2.7 4 组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白相对表达量比较

与空白组比较,模型组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白相对表达量升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,药物组和雀啄灸组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。与药物组比较,雀啄灸组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白相对表达量降低 ($P<0.05$)。详见表 5 和图 3。

表 5 4 组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	相对表达量
空白组	18	0.51±0.02
模型组	17	1.46±0.01 ¹⁾
药物组	16	1.09±0.01 ¹⁾²⁾
雀啄灸组	18	0.77±0.02 ¹⁾²⁾³⁾

注:与空白组比较 ¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较 ²⁾ $P<0.05$;与药物组比较 ³⁾ $P<0.05$ 。

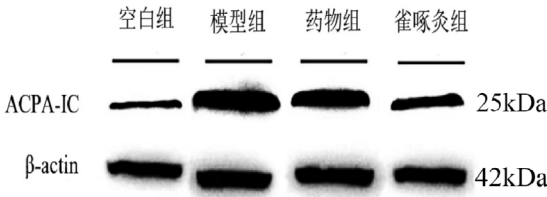


图 3 4 组大鼠滑膜 ACPA-IC 蛋白表达的条带图

3 讨论

类风湿关节炎(RA)是一种慢性自身免疫性疾病,其病理特征为持续性滑膜炎和自身抗体的产生。目前认为蛋白质的瓜氨酸化是维持 RA 炎症和持续免疫反应的重要因素,当环境、遗传、细菌等外界因素导致机体 Ca²⁺ 浓度异常升高时,肽酰精氨酸脱亚胺酶被激活,在其催化下精氨酸翻译后修饰为带有瓜氨酸残基的瓜氨酸蛋白,这一过程称为瓜氨酸化^[16-17]。瓜氨酸是人体内一种非标准氨基酸,能够使相应蛋白质的理化性质发生改变,这种理化性质的改变使瓜氨酸化蛋白更易被抗原呈递细胞呈递给 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞而诱发免疫豁免的丧失^[18],从而产生一种针对自身抗原的抗体 ACPA,ACPA 特异性和瓜氨酸化蛋白结合后形成 ACPA-IC,激活巨噬细胞促进炎症因子的产生^[19]。有研究^[20]发现 RA 滑膜液中 ACPA-IC 能诱导正常人外周单个核细胞释放 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等多种炎症因子。LAURENT L 等^[21]也发现 ACPA-IC 能刺激单核巨噬细胞产生 TNF-α,并且能降低软骨细胞活性和增殖能力,使其凋亡率增加。此外,高德玉等^[22]研究发现,ACPA-IC 刺激可明显促进成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocyte, FLS)增殖,并可刺激 FLS 分泌更多的 IL-8 和 IL-6 等炎症因子。由此可见,ACPA-IC 在 RA 早期滑膜组织炎症反应的发生和发展中起着重要的作用。

RA 早期以急性炎症反应为主,表现为关节焮热红肿、疼痛剧烈、活动不利等症状,这与中医学“痹证”中的热痹极为相似^[23],其病机总属本虚标实,以机体正气虚弱为内因,外邪侵袭为外因,正虚邪实,经脉不通,不通则痛,最终导致痹证的发生^[24]。《素问·痹论》提及久处湿热之地,饮食不当,易生挛痹。后世医家在其基础之上不断探究致痹证因,发现六淫之中的热邪亦可导致痹证的发生。张子和在《儒门事亲》中所述“痹痛以湿热为源,风寒为兼,三气合而为痹”,强调了正虚和湿热之邪致痹的重要性。因此治疗上应当遵循清泻通络,扶正祛邪的原则^[25]。中医学认为灸法具有温经散寒、通痹止痛、温阳补虚、拔毒泻热等功效^[26]。不仅可用于寒性病症的治疗,也可用于热性病症的干预,即“热证可灸”。“热证可灸”可追溯到《黄帝内经》时期,随后历代医家又有自己对“热证可灸”理论独特的发挥。随着灸法现代研究的逐渐深入,灸法治疗热证也得到了广泛的认可。因此,本研究在“热证可灸”理论指导下,选取以泻为主的雀啄灸为干预手段,以湿热痹阻型 RA 大鼠为干预对象开展研究。

本研究发现,雀啄灸能够显著降低 RA 早期大鼠病变关节局部温度,提高热痛阈值,改善滑膜细胞结构病理损伤,还能降低滑膜炎性因子 IL-1 和 TNF- α 表达含量,提示雀啄灸可通过降低致炎因子 IL-1 和 TNF- α 的表达水平而发挥其抗炎作用,减轻关节发热、肿胀、疼痛等症状,这正体现了灸法的“祛邪”作用。本研究还发现雀啄灸可显著降低 RA 大鼠关节滑膜 ACPA-IC 表达含量,表明雀啄灸还能通过调节自身免疫反应,减少蛋白质瓜氨酸化的发生,降低 RA 大鼠滑膜 ACPA-IC 表达,进而达到缓解炎症反应、治疗 RA 的目的,这体现灸法的“扶正”作用。因此本研究认为,雀啄灸可能是通过调节免疫而达到抗炎的效果,即“扶正”以“祛邪”作用的体现。本项目组前期通过实验研究发现,灸法可通过调节 TNF- α 和 IL-10 表达水平发挥抗炎效应^[27]。此外,雀啄灸还可以显著调节 RA 大鼠血清特异自身抗体类风湿因子、抗角蛋白抗体、抗环瓜氨酸肽抗体和抗核周因子抗体的异常表达,修复滑膜炎性损伤,具有显著的抗炎和免疫调节作用,这与本次研究所得结论基本一致。

综上所述,由蛋白质的瓜氨酸化导致的一系列病理反应包括 ACPA-IC 的形成贯穿着 RA 发病的始终,本研究发现雀啄灸能调节蛋白质的瓜氨酸化,通过调控

RA 滑膜 ACPA-IC 表达水平,降低滑膜炎性因子 IL-1 和 TNF- α 的表达含量,改善滑膜细胞炎性损伤,进而改善大鼠病变关节热、痛等证候特征改变,这可能是雀啄灸干预早期 RA 的重要免疫机制,也可能是灸治热证的现代生物学机制。但本研究仅选取 ACPA-IC 作为研究对象,对于其他特异性 IC 未做深入研究。今后将进一步对 RA 发生发展中的其他特异性 IC 进行系统的筛选鉴定。

参考文献

- [1] DEANE K D, HOLERS V M. Rheumatoid arthritis pathogenesis, prediction, and prevention: an emerging paradigm shift[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2021(2):181-193.
- [2] KARMAKAR U, VERMEREN S. Crosstalk between B cells and neutrophils in rheumatoid arthritis[J]. *Immunology*, 2021(4):689-700.
- [3] WU C Y, YANG H Y, LAI J H. Anti-citrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis: biological effects and mechanisms of immunopathogenesis[J]. *Internat J Molecul Sci*, 2020(11):4015.
- [4] FERT-BOBER J, DARRAH E, ANDRADE F. Insights into the study and origin of the citrullinome in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol Rev*, 2020(1):133-147.
- [5] SOHRABIAN A, MATHSSON-ALM L, HANSSON M, et al. Number of individual ACPA reactivities in synovial fluid immune complexes, but not serum anti-CCP2 levels, associate with inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheumat Dis*, 2018(9):1345-1353.
- [6] BURMESTER G R, POPE J E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis[J]. *Lancet*, 2017(10086):2338-2348.
- [7] 罗业浩, 方刚, 许栋涵, 等. 灸法治疗类风湿关节炎的临床研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022(16):4113-4119.
- [8] 马重兵, 朱田田, 刘安国, 等. 悬灸对湿热痹阻型 RA 大鼠类风湿因子表达影响的研究[J]. 时珍国医国药, 2018(3):2789-2891.
- [9] 赵怡坤, 朱田田, 赵中亭, 等. 艾灸对类风湿关节炎免疫功能调节的机制研究进展[J]. 中国中医药信息杂

- 志, 2017 (6) : 131-133.
- [10] HE X, HU R, LUO P, *et al.* BTN2A2 protein negatively regulates T cells to ameliorate collagen-induced arthritis in mice[J]. *Scientif Rep*, 2021 (1) : 19375.
- [11] 蔡义思, 李佳钰, 陆麒瑾, 等. 基于定量蛋白质组学研究当归拈痛汤对风湿热痹佐剂性关节炎大鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022 (13) : 62-70.
- [12] 谭连红, 史亦南, 孙诗月, 等. 电针对大鼠胶原诱导型关节炎的缓解效应及作用机制[J]. 针刺研究, 2021 (8) : 649-655.
- [13] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 132-133.
- [14] 李云庆. 大鼠断层解剖彩色图谱[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2010: 136-147.
- [15] 科学技术部. 关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知[J]. 畜牧兽医科技信息, 2007 (4) : 35-36.
- [16] DARRAH E, ANDRADE F. Rheumatoid arthritis and citrullination[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2018 (1) : 72-78.
- [17] ZHU D, SONG W, JIANG Z, *et al.* Citrullination: a modification important in the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. *Clin Immunol*, 2022 (245) : 109134.
- [18] NGUYEN H, JAMES E A. Immune recognition of citrullinated epitopes[J]. *Immunology*, 2016 (2) : 131-138.
- [19] LAURENT L, ANQUETIL F, CLAVEL C, *et al.* IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies[J]. *Ann Rheumat Dis*, 2015 (7) : 1425-1431.
- [20] SOKOLOVE J, ZHAO X, CHANDRA P E, *et al.* Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor[J]. *Arthrit Rheumat*, 2011 (1) : 53-62.
- [21] LAURENT L, CLAVEL C, LEMAIRE O, *et al.* Fcγ receptor profile of monocytes and macrophages from rheumatoid arthritis patients and their response to immune complexes formed with autoantibodies to citrullinated proteins[J]. *Ann Rheumat Dis*, 2011 (6) : 1052-1059.
- [22] 高德玉, 陈芳芳, 刘阳, 等. 抗瓜氨酸化肽特异性免疫复合物对类风湿关节滑膜细胞功能影响的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2013 (2) : 115-120.
- [23] 富丽萍, 李佳钰, 陆麒瑾, 等. 从炎症、凋亡与自噬评价 Mtb 诱导类风湿关节炎风湿热痹动物模型[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022 (23) : 44-52.
- [24] 张灵星, 吴华堂, 王行宽. 浅析王行宽治疗类风湿关节炎经验[J]. 中华中医药杂志, 2020 (9) : 4461-4463.
- [25] 徐丹, 董巡. 温针灸治疗类风湿关节炎的疗效观察及对炎症因子的影响[J]. 上海针灸杂志, 2021 (10) : 1228-1233.
- [26] 杨九思, 张琦, 胡俊霞, 等. 火针与灸法临床应用之异同[J]. 中华中医药杂志, 2022 (4) : 2034-2038.
- [27] 赵中亭, 郑倩华, 严兴科, 等. 不同刺灸法调节 RA 细胞因子的实验研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015 (4) : 487-490.

收稿日期 2024-07-26