

基于 Tim-3/Gal-9 信号通路探讨艾灸调控巨噬细胞极化抑制类风湿关节炎滑膜炎性反应的作用机制

钟玉梅^{1,2}, 郭彦玓^{1,2}, 罗 堃², 杨 馨³, 马文彬², 周海燕²

(¹成都市中西医结合医院疼痛科, 成都 610041; ²成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075;

³成都中医药大学养生康复学院, 成都 610075)

【摘要】目的:观察艾灸“肾俞”“足三里”对类风湿关节炎(RA)大鼠T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3/半乳糖凝集素-9(Tim-3/Gal-9)信号通路及巨噬细胞极化的影响,分析艾灸改善RA滑膜炎性反应的机制。**方法:**雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、艾灸组、干扰组,每组8只。采用足跖皮下注射弗氏完全佐剂制备RA模型。干扰组一次性足跖皮下多点注射Tim-3慢病毒,艾灸组、干扰组予“肾俞”“足三里”麦粒灸,每穴5壮,1次/d,6次为1个疗程,每疗程结束后休息1d,共治疗3个疗程。分别于实验第1、7、14、21、28、35天测量双侧足跖厚度,HE染色观察关节病理改变并进行评分,ELISA法检测血清白细胞介素(IL)-4、血管内皮生长因子(VEGF)含量,免疫荧光染色法检测滑膜组织Tim-3、Gal-9及巨噬细胞极化相关分子CD86、CD206的表达。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠双侧足跖厚度增加($P<0.01$),关节间隙变窄,滑膜组织、纤维组织增生,滑膜组织增生、纤维组织增生、炎细胞浸润评分升高($P<0.01$),大鼠血清IL-4含量降低($P<0.05$),血清VEGF含量升高($P<0.01$),大鼠滑膜组织Tim-3、Gal-9、CD86表达升高($P<0.01$, $P<0.05$),CD206表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,艾灸组大鼠第35天双侧足跖厚度减少($P<0.01$),关节间隙变窄程度减轻,滑膜组织、纤维组织增生减轻,滑膜组织增生、纤维组织增生、炎细胞浸润评分降低($P<0.01$),血清IL-4含量升高($P<0.05$),血清VEGF含量降低($P<0.01$),滑膜组织Tim-3、Gal-9、CD206表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),CD86表达降低($P<0.05$)。与艾灸组比较,干扰组大鼠关节间隙变窄,滑膜组织增生、炎性细胞浸润评分升高($P<0.05$),血清IL-4含量、关节滑膜组织Tim-3、Gal-9、CD206表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),CD86表达升高($P<0.05$)。**结论:**艾灸可以改善RA大鼠滑膜炎性反应,其作用机制可能与调节Tim-3/Gal-9信号通路的表达,抑制巨噬细胞M1型极化,促进巨噬细胞M2型极化有关。

【关键词】 类风湿关节炎;艾灸;T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3/半乳糖凝集素-9信号通路;巨噬细胞极化;滑膜;炎性反应

Mechanism of moxibustion in inhibiting synovial inflammation of rheumatoid arthritis by regulating macrophage polarization based on the Tim-3/Gal-9 signaling pathway

ZHONG Yu-mei^{1,2}, GUO Yan-ding^{1,2}, LUO Kun², YANG Xin³, MA Wen-bin², ZHOU Hai-yan² (¹Department of Painology, Chengdu Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Chengdu 610041, China; ²School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075; ³School of Health Preservation and Rehabilitation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effects of moxibustion at “Shenshu” (BL23) and “Zusanli” (ST36) on the T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3/galectin-9 (Tim-3/Gal-9) signaling pathway and macrophage polarization in rats with rheumatoid arthritis (RA), so as to explore the mechanism by which moxibustion ameliorates synovial inflammation in RA. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into the blank control, model, moxibustion, and Tim-3 knockdown (Tim-3 KD) group, with 8 rats in each group. The RA model

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250351

引用格式:钟玉梅,郭彦玓,罗堃,等.基于Tim-3/Gal-9信号通路探讨艾灸调控巨噬细胞极化抑制类风湿关节炎滑膜炎性反应的作用机制[J].针刺研究,2026,51(5):593-601.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82405558,81973959);四川省自然科学基金项目(No.2023NSFSC1823)

通信作者:周海燕, E-mail:zhouhaiyan@cdutcm.edu.cn

was established by subcutaneous injection of Freund's complete adjuvant (FCA) into the plantar region. The Tim-3 KD group received a single multi-point subcutaneous injection of Tim-3 lentivirus into the plantar region. Both the moxibustion group and Tim-3 KD group were treated with grain-sized moxibustion at BL23 and ST36, 5 cones per acupoint, once daily, with 6 treatments as one course and 1 day of rest after each course, totaling 3 courses. The thickness of bilateral plantar regions was measured on days 1, 7, 14, 21, 28, and 35 of the experiment. HE staining was used to observe joint pathological changes and pathological scores were evaluated. ELISA was employed to detect the serum contents of interleukin (IL)-4 and vascular endothelial growth factor (VEGF). Immunofluorescence staining was used to determine the expression of Tim-3, Gal-9, and macrophage polarization-related molecules (CD86, CD206) in synovial tissue. **Results** Compared with the blank control group, the model group showed increased thickness of bilateral plantar regions ($P<0.01$), narrowed joint space, proliferation of synovial and fibrous tissues, elevated scores of synovial hyperplasia, fibrous tissue proliferation, and inflammatory cell infiltration ($P<0.01$), decreased serum IL-4 content ($P<0.05$), increased serum VEGF content ($P<0.01$), up-regulated expression of Tim-3, Gal-9, and CD86 ($P<0.01$, $P<0.05$) and down-regulated expression of CD206 ($P<0.01$) in synovial tissue. Compared with the model group, the moxibustion group exhibited reduced thickness of bilateral plantar regions ($P<0.01$), alleviated joint space narrowing, decreased proliferation of synovial and fibrous tissues, lowered scores of synovial hyperplasia, fibrous tissue proliferation, and inflammatory cell infiltration ($P<0.01$), increased serum IL-4 content ($P<0.05$), decreased serum VEGF content ($P<0.01$), up-regulated expression of Tim-3, Gal-9, and CD206 ($P<0.05$, $P<0.01$) and down-regulated expression of CD86 ($P<0.05$) in synovial tissue. Compared with the moxibustion group, the Tim-3 KD group showed narrowed joint space, increased score of synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration ($P<0.05$), decreased serum IL-4 content, and down-regulated expression of Tim-3, Gal-9, and CD206 ($P<0.05$, $P<0.01$), along with up-regulated CD86 expression ($P<0.05$) in synovial tissue. **Conclusion** Moxibustion can ameliorate synovial inflammation in RA rats, and its mechanism may be related to regulating the expression of the Tim-3/Gal-9 signaling pathway, inhibiting M1 macrophage polarization, and promoting M2 macrophage polarization.

[KEYWORDS] Rheumatoid arthritis; Moxibustion; Tim-3/Gal-9 signaling pathway; Macrophage polarization; Synovium; Inflammatory reaction

类风湿关节炎(RA)是以慢性滑膜炎性反应为特征的自身免疫性疾病。滑膜炎性反应的持续存在是RA病情反复发作、进一步恶化的直接因素,延缓甚至阻断滑膜炎性反应成为本病治疗的重要靶标。巨噬细胞是滑膜的常驻细胞,在RA滑膜炎性反应过程中具有重要的作用。正常情况下,体内巨噬细胞极化保持动态平衡,而在RA局部炎性反应微环境的刺激下,巨噬细胞极化的动态平衡被打破,出现M1型极化增强,产生大量细胞因子如血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素 1β (IL- 1β)等,促进炎性反应的发展^[1-2];同时,巨噬细胞M2型极化减弱,使得白细胞介素4(IL-4)、精氨酸酶1(Arg-1)等分泌减少,不足以对抗RA的炎性反应,从而加重局部组织的损伤。T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(Tim-3)作为巨噬细胞极化信号的诱导器,通过与其配体半乳糖凝集素-9(Gal-9)结合发挥相应的生物学功能,调节巨噬细胞极化^[3]。研究^[4]结果显示,Tim-3的基因多态性与RA易感性相关,其通过促进细胞内信号的转导、调节巨噬细胞极化和T细胞的分化,在自身免疫性疾病和抗炎中具有关键的

作用^[5-6]。

艾灸具有益气扶正、温经通脉的功效,可改善RA关节疼痛、肿胀的症状,也能降低类风湿因子水平,调节炎性信号通路的异常激活等,抑制炎症反应和保护关节滑膜,在RA的治疗中发挥着重要的作用^[7-8]。但艾灸改善RA滑膜炎性反应是否通过Tim-3/Gal-9信号通路调节巨噬细胞极化尚待研究。故本研究以Tim-3/Gal-9信号通路为切入点,观察艾灸对RA大鼠滑膜组织巨噬细胞极化及相关炎性因子表达的影响,以深化艾灸治疗RA的科学内涵。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康成年雄性SD大鼠32只,体质量(200 ± 20)g,由成都达硕动物科技有限公司提供,清洁级,生产许可证号:SCXK(川)2020-030。开展正式实验之前,大鼠适应性饲养1周。饲养环境:室温(23 ± 1)℃,相对湿度50%~60%,定时通风换气,自然光暗周期,动物自由摄食饮水。采用随机数字表法将大鼠分为空白组、模型组、艾灸组、干扰组,每组8只。

实验过程中对动物的操作和处置均符合科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。本实验通过成都中医药大学动物实验伦理审批,伦理审批编号:2022-11。

1.2 主要试剂与仪器

弗氏完全佐剂(FCA,美国 Sigma),大鼠 IL-4 ELISA 试剂盒、大鼠 VEGF ELISA 试剂盒(杭州 MultiSciences),慢病毒载体 Lv-Tim-3-RNAi(上海吉凯基因),Tim-3 抗体、Gal-9 抗体、CD86 抗体(英国 Abcam),CD206 抗体(武汉三鹰),艾绒(南阳市医乐嘉),DAPI(武汉谷歌),二抗(杭州联科),HE 试剂盒(北京索莱宝)。

离心机(上海安亭),Epoch 型酶标仪(美国 BioTek),BMJ-Ⅲ型包埋机(常州中威),RA2135 型自动切片机(德国 Leica),KD-P 型组织摊片机(金华科迪),Eclipse C1 型荧光显微镜、DS-U3 型成像系统(日本尼康),ChemiScope analysis 图像分析系统(上海勤翔),卡尺(日本三丰)。

1.3 模型制备

本研究采用足跖注射 FCA 法制备 RA 模型,参照文献[9],于实验第 1 天,分别对模型组、干扰组、艾灸组大鼠足跖消毒,将 FCA 按 0.5 mL/kg 于大鼠双侧足跖皮下单点注射,同法将等量无菌 0.9% 氯化钠溶液注入空白组大鼠双侧足跖内。以造模后 24 h 足踝部出现红、肿等急性炎性反应表现,48 h 后出现继发性全身多关节炎为造模成功标准^[10]。

1.4 干预方法

Tim-3 干扰慢病毒载体在体操作^[11]:实验第 7 天,将 100 μ L Tim-3 干扰慢病毒载体(滴度 2.0×10^8 TU/mL)用 0.9% 氯化钠溶液配置成 0.2 mL 溶液,使用微量注射器分别对干扰组大鼠双侧足跖皮下多点注射,并轻微按揉 3 min 以加速足跖内慢病毒的扩散,空白组、模型组、艾灸组按同法注入等量 0.9% 氯化钠溶液。

实验第 14 天开始麦粒灸治疗,参照《实验针灸学》^[12]定位大鼠“肾俞”“足三里”。艾灸组、干扰组大鼠以穴位为中心,周围剃毛 1 cm $\times$ 1 cm,将大鼠固定于手套中(余组同法固定,但不予以艾灸治疗),暴露背部及后肢,施灸穴位涂以凡士林,将搓捻好的艾炷(5 mg/壮)置于“肾俞”“足三里”,每穴灸 5 壮,1 次/d,每次治疗一侧,左右两侧穴位交替治疗,6 次为 1 个疗程,每个疗程结束后休息 1 d,共治疗 3 个疗程。

1.5 观察指标及检测方法

大鼠足跖厚度测量:实验第 1、7、14、21、28、35 天对大鼠双足跖厚度进行测量。测量方法:固定大鼠后,拉伸后肢,足跖测量部位用记号笔标记,将游标卡尺置于大鼠后足掌关节掌骨正中冠状面处测量,每次测量 3 次取平均值。为减少视觉读数的误差,每次测量由同一人完成。

HE 染色观察大鼠关节病理改变并进行评分:实验第 36 天,大鼠称重后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(1 mL/100 g)麻醉。打开左踝关节皮肤后,剥离周围软组织,剪去多余的骨组织,将关节放入 4% 多聚甲醛溶液浸泡固定 72 h,然后进行脱钙。按照病理检验标准操作程序进行脱水、修剪、石蜡包埋,制成 5 μ m 厚切片,HE 染色、树胶封片处理。光镜下观察大鼠踝关节病理改变,拍照保存图片,并对各组大鼠关节滑膜在光镜下的组织形态按病理评分标准进行分级评分。具体评分标准见表 1。

表 1 关节病理评分标准						分
Table 1 Criteria of joint pathological						scores
滑膜组织增生		纤维组织增生		炎性细胞浸润		
病变	评分	病变	评分	病变	评分	
正常滑膜	0	无增生	0	偶见炎性细胞	0	
早期病变	1~2	轻度增生	1~2	轻度浸润	1~2	
慢性期病变	3	中度增生	3	中重度浸润	3~4	
晚期病变	4	重度增生	4	-	-	

注:“-”表示无此项评分。

ELISA 法检测大鼠血清 IL-4、VEGF 含量:大鼠麻醉后,打开腹腔暴露腹主动脉,取腹主动脉血置于采血管中,室温静置 2~4 h,离心 20 min,吸取上清,-80 $^{\circ}$ C 保存。操作前,从冰箱取出试剂盒和血清,平衡至室温。根据 ELISA 试剂盒说明书,按照标准品稀释、加样、洗涤、显色、终止反应的步骤操作,以空白孔调零,450 nm 波长下依次测量各孔的吸光度值,通过绘制标准曲线分别计算样本中 IL-4、VEGF 的含量。

免疫荧光染色法检测大鼠滑膜组织 Tim-3、Gal-9、CD86、CD206 的表达:大鼠麻醉后,剥离右踝关节周围软组织,打开关节,取下淡黄色的滑膜组织放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h,浸洗、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋待测。将固定的组织蜡块取出,切片(厚度 4 μ m),常规脱蜡、脱水后进行抗原修复。切片于 PBS 溶液中洗涤 3 次,每次 5 min。

随后用山羊血清室温封闭1 h。封闭结束后甩干,滴加一抗(Tim-3 1:200, Gal-9 1:500, CD86 1:500, CD206 1:500),4℃孵育过夜。PBS洗涤3次后,滴加荧光二抗(1:500或1:1 000),避光室温孵育50 min,DAPI复染细胞核,最后封片。于荧光显微镜下观察并采集图像,Image-Pro Plus 6.0软件分析荧光强度。测算积分吸光度(IOD)值及检测区域面积(Area),以IOD值与Area的比值计算得出平均荧光强度。

1.6 统计学处理

运用SPSS25.0对数据资料进行分析。所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较用单因素方差分析,足跖厚度采用重复测量方差分析。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠足跖厚度比较

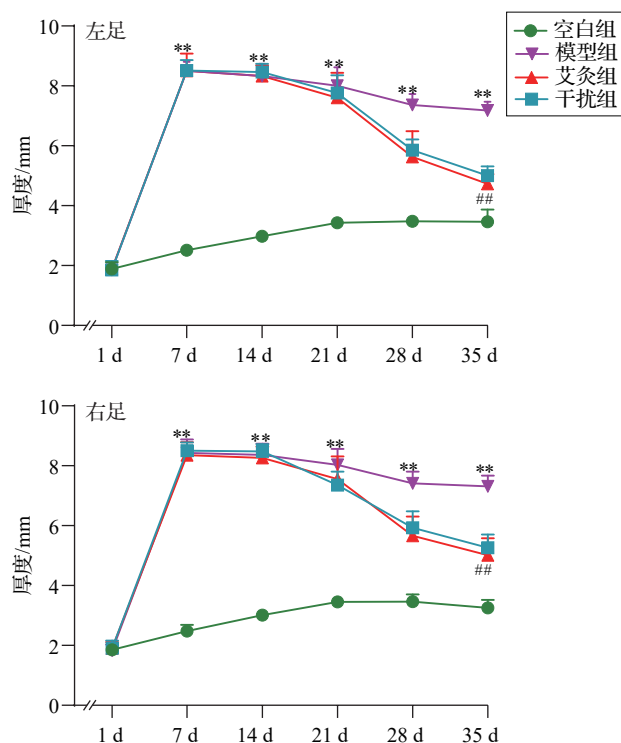
实验第1天,各组大鼠足跖厚度比较,差异无统计学意义。实验第7、14、21、28、35天,与空白组比较,模型组大鼠双足跖厚度增加($P < 0.01$)。实验第35天,与模型组比较,艾灸组双足跖厚度减少($P < 0.01$);与艾灸组比较,干扰组足跖厚度呈增加趋势,但差异无统计学意义。见图1。

2.2 各组大鼠关节病理表现及评分比较

空白组大鼠关节间隙正常,滑膜组织光滑、排列规则整齐,无炎性细胞浸润、血管增生;模型组大鼠关节间隙变窄,滑膜组织明显充血、水肿,可见大量炎性浸润;艾灸组、干扰组大鼠关节间隙变窄及滑膜组织充血、水肿程度均减轻,关节内少量炎性细胞浸润。与空白组比较,模型组大鼠关节滑膜组织增生、纤维组织增生、炎性细胞浸润评分均升高($P < 0.01$)。与模型组比较,艾灸组大鼠滑膜组织增生、纤维组织增生、炎性细胞浸润评分降低($P < 0.01$)。与艾灸组比较,干扰组大鼠滑膜组织增生、炎性细胞浸润评分升高($P < 0.05$),纤维组织增生评分差异无统计学意义。见图2。

2.3 各组大鼠血清IL-4、VEGF含量比较

与空白组比较,模型组大鼠血清IL-4含量降低($P < 0.05$),VEGF含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组IL-4含量升高($P < 0.05$),VEGF含量降低($P < 0.01$);与艾灸组比较,干扰组IL-4含量降低($P < 0.05$),VEGF含量差异无统计学意义。见图3。



注:与同时点空白组比较,** $P < 0.01$;与同时点模型组比较,## $P < 0.01$ 。

图1 各组大鼠左、右足跖厚度变化比较($\bar{x} \pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of the thickness of the left and right plantar of rats in the 4 groups($\bar{x} \pm s$, 8 rats/group)

2.4 各组大鼠滑膜组织Tim-3、Gal-9、CD86、CD206表达比较

与空白组比较,模型组大鼠滑膜组织Tim-3、Gal-9、CD86表达升高($P < 0.01$, $P < 0.05$),CD206表达降低($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组Tim-3、Gal-9、CD206表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),CD86表达降低($P < 0.05$);与艾灸组比较,干扰组Tim-3、Gal-9、CD206表达降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),CD86表达升高($P < 0.05$)。见图4~图7。

3 讨论

中医学根据RA的病因病机和临床症状特点,将其归于“痹症”范畴。《济生方》曰:“皆因体虚,腠理空疏,受风湿气而成痹也”,认为痹症发生的主要原因是正气不足,易感受风寒湿气侵袭而成。《素问·痹论》云:“淫气肌绝,痹聚在脾”,同时王肯堂言“痹病有风、有湿、有寒、有热……皆标也;肾虚其本也”,可见RA的发生与脾肾关系密切。足三里为胃经五输穴之合穴、胃之下合穴,该穴具有益气健脾的作用。研究表明,针灸“足三里”参与中枢神经递质的调控,可恢复T细胞的动态平衡从而调节机体免疫功能^[13-14]。肾俞乃肾气输注于背腰部的穴位,

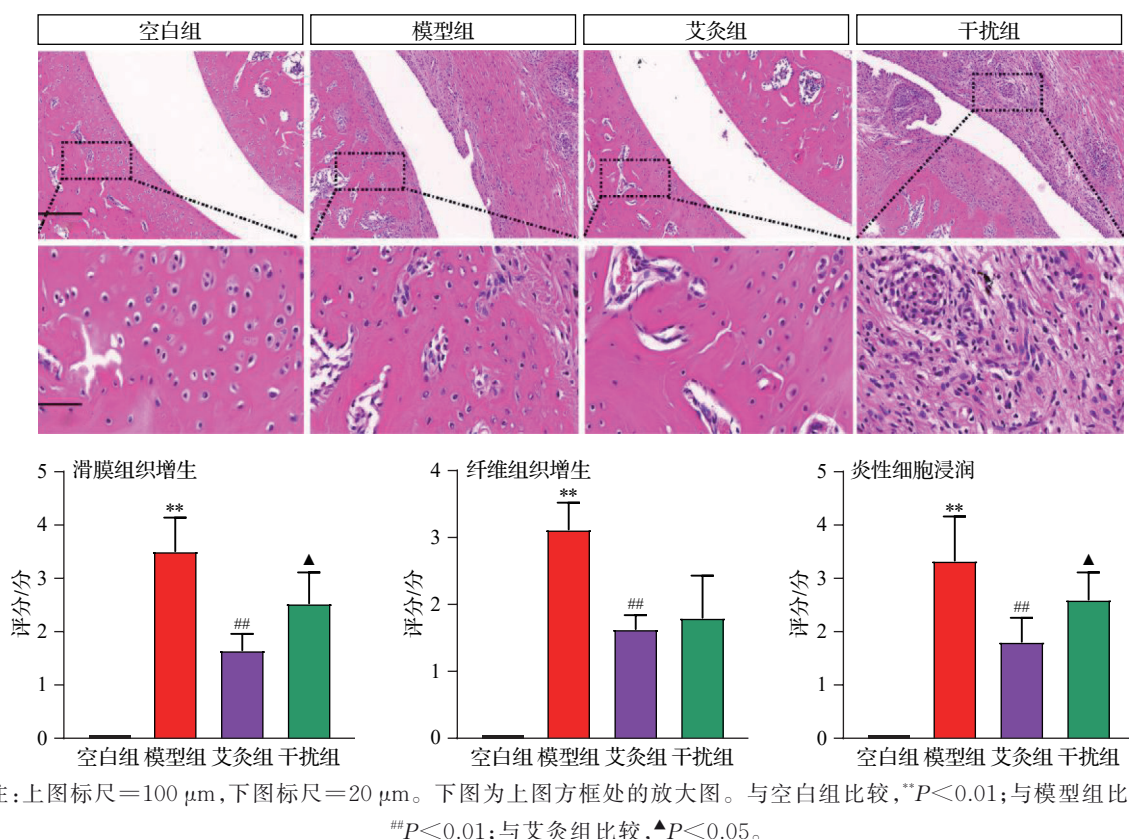


图2 各组大鼠关节病理形态及评分比较(HE染色, $\bar{x}\pm s$, 8只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of pathological morphology and pathological scores of joints of rats in the 4 groups (HE staining, $\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

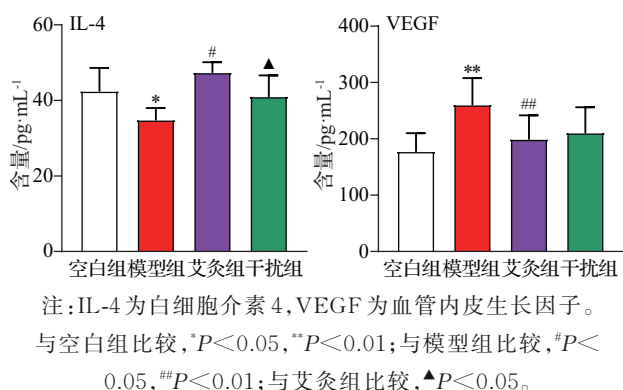


图3 各组大鼠血清IL-4、VEGF含量比较($\bar{x}\pm s$, 8只鼠/组)

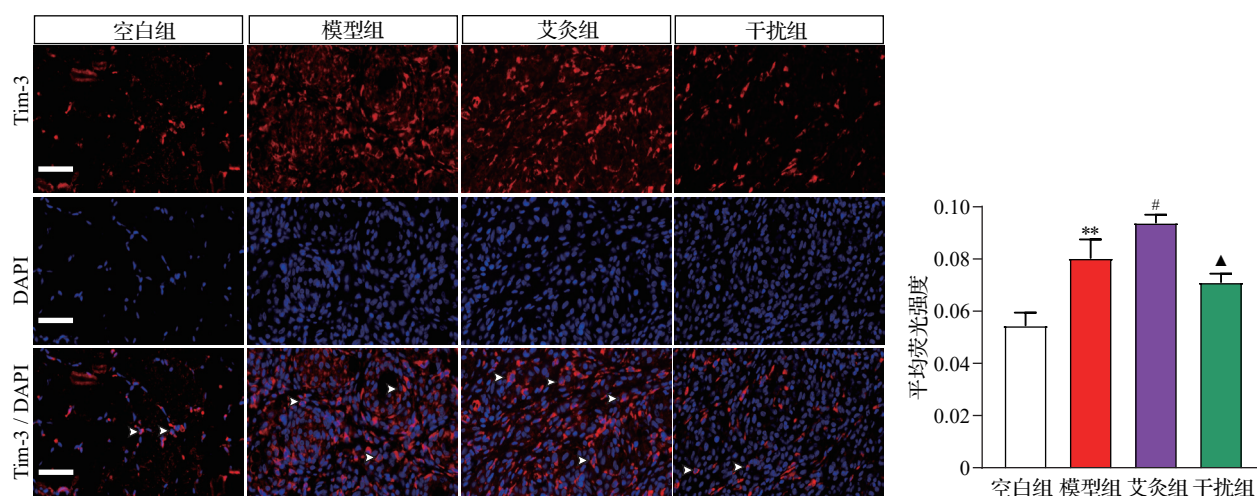
Fig. 3 Comparison of the contents of IL-4 and VEGF in serum of rats in the 4 groups($\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

具有补益脾肾、调节脏腑功能的作用。现代研究也证明艾灸“肾俞”可调节大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴功能,促进IL-4、IL-10等抗炎因子分泌,显著抑制滑膜炎性反应^[15-16]。故本研究选取“肾俞”“足三里”为治疗穴位。

滑膜炎性反应是RA病理过程的始动环节,持续并贯穿于疾病过程的始终。早期表现以巨噬细胞为主的炎性细胞增殖与浸润,继而形成血管翳。

一旦骨质遭到破坏,其病理改变持续发展,最终导致RA患者残疾。研究^[17]结果显示,滑膜炎性活动程度与炎性血管翳导致的软骨侵蚀严重程度密切相关,血管翳附着并侵入关节软骨,诱导破骨细胞激活导致骨破坏发生。滑膜炎性反应是RA的基本病理变化,是出现疾病相关关节破坏的主要原因。为了抑制关节破坏的进展,应在治疗窗内尽早缓解滑膜炎性反应^[18]。艾灸治疗RA疗效确切,其机制可能与调节关节局部炎性因子水平,减轻滑膜炎性反应有关^[19-20],但具体作用机制尚待进一步研究。本研究结果表明RA大鼠关节足跖厚度增加,滑膜组织和纤维组织增生,出现大量炎性细胞浸润,经艾灸干预后足跖厚度减少,滑膜组织和纤维组织增生减轻,炎性细胞浸润减少,进一步证实艾灸治疗能减轻RA大鼠滑膜炎性反应。

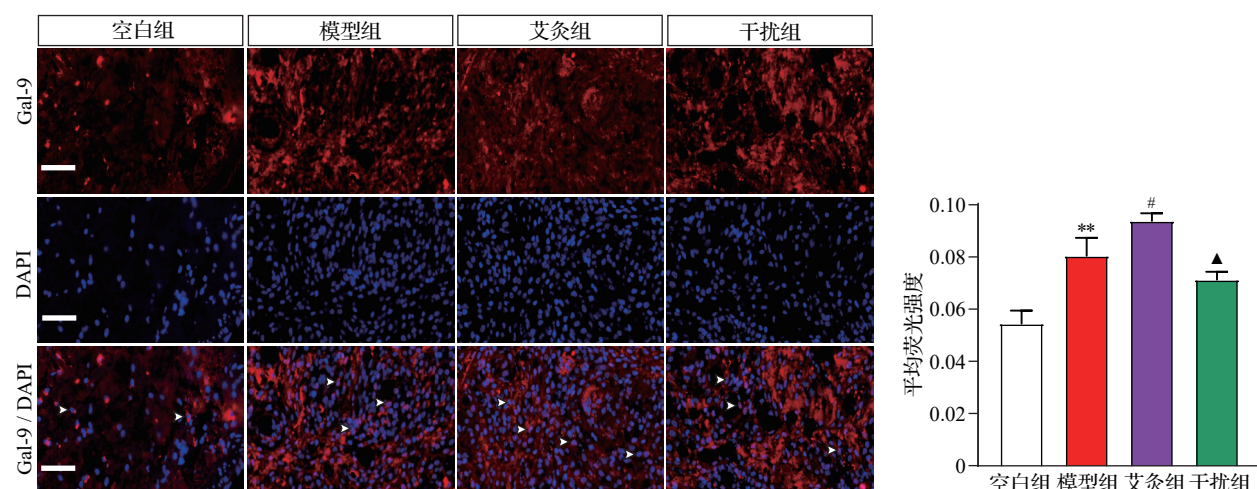
巨噬细胞浸润是RA病理过程的特征性表现,在驱动慢性炎性反应和组织损伤的恶性循环中占据了中心地位。在炎性条件下,巨噬细胞被激活并分化为两种亚型,即经典活化巨噬细胞(M1型)和替代活化巨噬细胞(M2型)^[21]。M1型巨噬细胞表达CD86等表面标志物,分泌如诱导型一氧化氮合



注:标尺=20 μm 。Tim-3为T细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3。箭头所示红色荧光为Tim-3的阳性表达。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与艾灸组比较,▲ $P<0.05$ 。

图4 各组大鼠滑膜组织Tim-3的表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,8只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of expression of Tim-3 in synovium of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)



注:标尺=20 μm 。Gal-9为半乳糖凝集素-9。箭头所示红色荧光为Gal-9的阳性表达。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$;与艾灸组比较,▲ $P<0.05$ 。

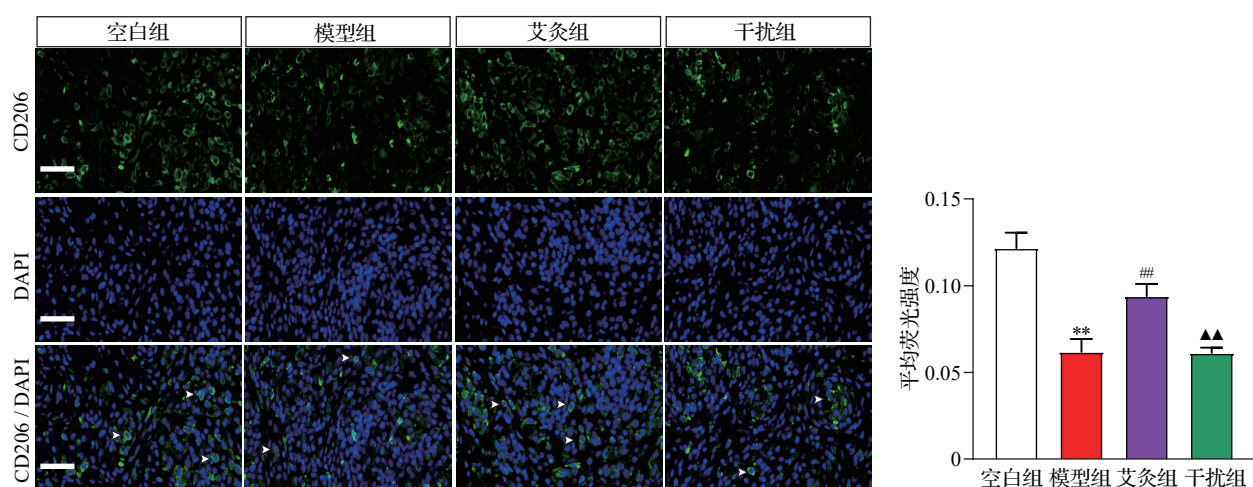
图5 各组大鼠滑膜组织Gal-9的表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,8只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of expression of Gal-9 in synovium of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

酶、VEGF、白细胞介素(IL)-23等促炎细胞因子,促进炎症反应^[2,22];而M2型巨噬细胞则与免疫调节和耐受性相关,表达CD206等表面标志物,分泌如Arg-1、IL-4等抗炎细胞因子,限制过度炎症反应并促进组织修复^[23-24]。研究显示,RA巨噬细胞在受到炎症微环境的刺激后,出现M1型极化增强,M2型极化减弱,巨噬细胞的动态平衡被打破^[23]。调节巨噬细胞极化表型是防治RA的关键靶点之一。本研究结果显示,模型组滑膜组织M1型巨噬细胞标志物CD86及VEGF表达上调,而M2型巨噬细胞标

志物CD206和IL-4表达下降,巨噬细胞极化出现失衡;艾灸干预后,滑膜组织CD86及VEGF表达水平较模型组下降,同时M2型巨噬细胞标志物CD206、IL-4表达显著上调,表明艾灸干预可使滑膜组织巨噬细胞由促炎M1型向抗炎M2型极化,从而发挥对RA滑膜炎性反应的调节作用。

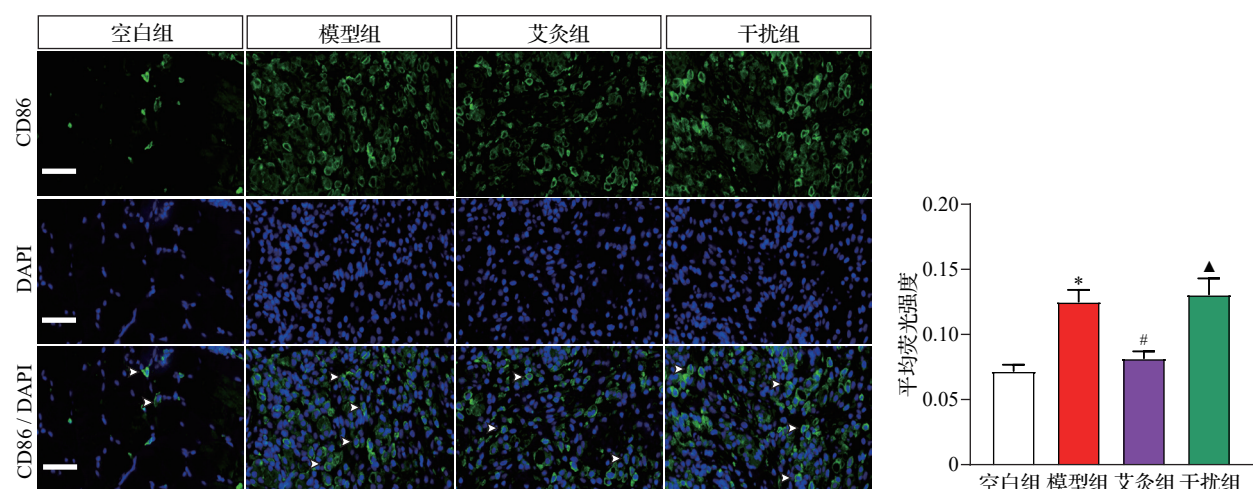
Tim-3/Gal-9信号通路是调控巨噬细胞极化的诱导器。Tim-3作为免疫系统的关键调节分子,通过调节巨噬细胞极化、促进细胞内信号的转导和T细胞的分化,在自身免疫性疾病和抗炎中具有关键



注:标尺=20 μm 。箭头所示绿色荧光为CD206的阳性表达。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,### $P<0.01$;与艾灸组比较,▲▲ $P<0.01$ 。

图6 各组大鼠滑膜组织CD206的表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,8只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of expression of CD206 in synovium of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)



注:标尺=20 μm 。箭头所示绿色荧光为CD86的阳性表达。与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$;与艾灸组比较,▲ $P<0.05$ 。

图7 各组大鼠滑膜组织CD86的表达比较(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$,8只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of expression of CD86 in synovium of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 8 rats/group)

的作用,已成为治疗RA的一个关键靶点^[6,25]。Gal-9作为Tim-3的配体,可以磷酸化Tim-3尾部的酪氨酸残基,当其与Tim-3特异性结合时,向T细胞提供负性共刺激信号,导致辅助性T细胞1程序性死亡,最终诱导外周免疫耐受,参与多种自身免疫性疾病过程^[26]。研究显示,骨髓来源巨噬细胞分化为M1和M2巨噬细胞表型后,Tim-3/Gal-9的表达分别出现了显著变化^[6]。当M2型巨噬细胞增加时,其表达上调;而当M2表型巨噬细胞减少且M1表型巨噬细胞增加时,其表达则下调。研究还证实, α -乳糖

(Gal-9抑制剂)和Tim-3单抗(Tim-3阻滞剂)在脂多糖刺激下降低了M2表型的比例,同时增加了M1表型的比例^[6]。Gal-9的过表达和分泌与巨噬细胞M2极化密切相关,而其下调则促进巨噬细胞M1极化^[27]。可见,Tim-3/Gal-9信号通路在调控巨噬细胞极化中具有重要的作用。

Tim-3在RA患者的各类型免疫细胞上的表达上调,且Tim-3的表达与疾病活动评分28和血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平呈负相关关系^[28-29]。本研究结果显示,RA大鼠滑膜组织存在Tim-3、Gal-9

表达的升高,与既往研究结果具有一致性^[28,30]。相关研究表明 Tim-3 高表达于 RA 大鼠滑膜组织,艾灸治疗后 Tim-3 表达进一步上调,且 M1 巨噬细胞相关炎症因子 IL-12、TNF- α 表达降低,当 Tim-3 表达被敲低时,炎症因子 IL-12、TNF- α 的表达水平即使在艾灸治疗后也未被抑制^[31]。RA 病理过程中,持续的抗原刺激使机体反应性抑制不断增殖的 T 细胞,体内的负性信号 Tim-3 等也相应增强,但其增强不足以抑制持续的抗原刺激,不能为细胞免疫应答提供足够的负性调控,打破了体内的免疫自稳态导致免疫损伤。本研究结果显示,艾灸治疗后, Tim-3 的表达上调,使其配体 Gal-9 的表达也随之升高,高表达的 Tim-3 与 Gal-9 结合后,有利于恢复巨噬细胞极化的平衡状态,故 M1 型标记物 CD86 和效应分子 VEGF 表达下调,同时 M2 型标记物 CD206 和效应分子 IL-4 表达上调。这与 Zhang 等、Luo 等^[6,31]的研究结果一致,即 Tim-3 高表达于 RA 患者滑膜组织, Gal-9 高表达于 RA 患者的外周血单个核细胞,同时对 Tim-3、Gal-9 的抑制降低了 M2 表型的百分比,但增加了 M1 表型的百分比。为了进一步明确 Tim-3 在 RA 巨噬细胞极化中的作用,采用慢病毒载体介导抑制 Tim-3 的表达,结果显示艾灸调节巨噬细胞表型极化即抑制 M1 型极化,促进 M2 型极化的作用被显著抑制。可见, Tim-3 作为巨噬细胞极化的关键调控分子,通过与其配体 Gal-9 结合,在调节巨噬细胞极化的动态平衡中具有重要的作用。但 Tim-3/Gal-9 在多种细胞上均有表达,本研究未对 Tim-3/Gal-9 与巨噬细胞进行多重荧光共定位等手段进行检测,还有待于下一步的研究中完善。

综上所述,艾灸能有效减轻 RA 滑膜炎性反应,其作用机制可是通过调节 Tim-3/Gal-9 信号通路的表达,抑制巨噬细胞 M1 型极化,促进巨噬细胞 M2 型极化,恢复巨噬细胞极化的动态平衡,这可能是艾灸治疗 RA 的作用机制之一。本研究未进行关节局部炎症因子及 Tim-3/Gal-9 与巨噬细胞共定位相关检测,还有待进一步的研究以明确 Tim-3/Gal-9 信号通路对巨噬细胞的具体调控机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] FENG Z, MENG F Y, HUO F, et al. Inhibition of ferroptosis rescues M2 macrophages and alleviates arthritis by suppressing the HMGB1/TLR4/STAT3 axis in M1 macrophages[J]. Redox Biol, 2024, 75: 103255.
- [2] ZHANG S J, HOU B, XU A J, et al. Ganlu formula ethyl acetate extract (GLEE) blocked the development of experimental arthritis by inhibiting NLRP3 activation and reducing M1 type macrophage polarization [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 332: 118377.
- [3] ZHAO L Z, CHENG S Y, FAN L, et al. TIM-3: an update on immunotherapy [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99: 107933.
- [4] RAZI B, REYKANDEH S E, ALIZADEH S, et al. TIM family gene polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2019, 14(2): e0211146.
- [5] NOZAKI Y, AKIBA H, AKAZAWA H, et al. Inhibition of the TIM-1 and -3 signaling pathway ameliorates disease in a murine model of rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2024, 218(1): 55-64.
- [6] ZHANG W, ZHANG Y T, HE Y X, et al. Lipopolysaccharide mediates time-dependent macrophage M1/M2 polarization through the Tim-3/Galectin-9 signalling pathway[J]. Exp Cell Res, 2019, 376(2): 124-132.
- [7] 张敏, 赵晨, 蒋玲, 等. 艾灸联合西药治疗肝肾亏虚型风湿关节炎临床疗效及机制探讨[J]. 中国针灸, 2021, 41(5): 489-492, 524.
- [8] ZHANG M, ZHAO C, JIANG L, et al. Clinical effect and mechanism of moxibustion combined with western medication for rheumatoid arthritis of liver-kidney deficiency (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2021, 41(5): 489-492, 524.
- [9] WANG Y N, TAO S Y, YU Z Y, et al. Effect of moxibustion on β -EP and dyn levels of pain-related indicators in patients with rheumatoid arthritis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6637554.
- [10] VANTI G, MICHELI L, BERRINO E, et al. Escinosome thermosensitive gel optimizes efficacy of CAI-CORM in a rat model of rheumatoid arthritis[J]. J Control Release, 2023, 358: 171-189.
- [11] 贺君宇, 覃诗颖, 郑婧琪, 等. 木瓜总三萜和吡咯美辛联用对弗氏完全佐剂诱导大鼠类风湿性关节炎的治疗作用研究[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(8): 42-50.
- [12] HE J Y, QIN S Y, ZHENG J Q, et al. Therapeutic effect of total triterpenoids of chaenomeles speciosa combined with indomethacin on rheumatoid arthritis induced by Freund's complete adjuvant in rats (in Chinese)[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2024, 40(8): 42-50.
- [13] SHI Q Z, LI G, DOU S J, et al. Negative regulation of RIG-I by Tim-3 promotes H1N1 infection [J]. Immunol Invest, 2023, 52(1): 1-19.
- [14] 余曙光, 郭义. 实验针灸学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 146-147.
- [15] YU S G, GUO Y. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 2nd edition. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2014: 146-147.
- [16] ZHAO C, LI X Y, YANG Y, et al. An analysis of Treg/

- Th17 cells imbalance associated microRNA networks regulated by moxibustion therapy on Zusanli (ST36) and Shenshu (BL23) in mice with collagen induced arthritis[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7): 4029-4045.
- [14] 徐小珊,熊罗节,马伟,等.隔药饼灸对慢性疲劳综合征大鼠免疫蛋白及T细胞调节因子Tim-3、LAG-3的影响[J].*中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(10): 1666-1671.
- XU X S, XIONG L J, MA W, et al. Effect of medicinal cake moxibustion on immune proteins and T cell regulatory factors Tim-3 and LAG-3 in rats with chronic fatigue syndrome (in Chinese) [J]. *Journal of Basic Chinese Medicine*, 2023, 29(10): 1666-1671.
- [15] 郝锋,吴立斌,刘磊,等.艾灸对类风湿关节炎大鼠IL-23/IL-17炎症轴及相关血清炎性因子的影响[J].*上海针灸杂志*, 2020, 39(12): 1491-1498.
- HAO F, WU L B, LIU L, et al. Effects of moxibustion on the IL-23/IL-17 inflammatory axis and the associated serum inflammatory factors in rheumatoid arthritis rats (in Chinese) [J]. *Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion*, 2020, 39(12): 1491-1498.
- [16] WU X, LIU X G, JING Z K, et al. Moxibustion benignantly regulates circadian rhythm of REV-ERB α in RA rats[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1459-1468.
- [17] SCHERER H U, HÄUPL T, BURMESTER G R. The etiology of rheumatoid arthritis[J]. *J Autoimmun*, 2020, 110: 102400.
- [18] VAN STEENBERGEN H W, DA SILVA J A P, HUIZINGA T W J, et al. Preventing progression from arthralgia to arthritis: targeting the right patients[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(1): 32-41.
- [19] 彭传玉,蔡荣林,郝锋,等.艾灸对类风湿关节炎模型大鼠滑膜组织cGAS/STING信号通路的影响[J].*针刺研究*, 2025, 50(9): 1029-1036.
- PENG C Y, CAI R L, HAO F, et al. Effect of moxibustion on the cGAS/STING signaling pathway in synovial tissue of rats with rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(9): 1029-1036.
- [20] WANG M, ZHAO H F, ZHAO H, et al. Moxibustion-mediated alleviation of synovitis in rats with rheumatoid arthritis through the regulation of NLRP3 inflammasome by modulating neutrophil extracellular traps[J]. *Heliyon*, 2023, 10(1): e23633.
- [21] CHEN Y N, HU M R, WANG L, et al. Macrophage M1/M2 polarization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 877: 173090.
- [22] ALANAZI F J, ALRUWAILI A N, ALDHAFEERI N A, et al. Pathological interplay of NF- κ B and M1 macrophages in chronic inflammatory lung diseases [J]. *Pathol Res Pract*, 2025, 269: 155903.
- [23] CUTOLO M, CAMPITIELLO R, GOTELLI E, et al. The role of M1/M2 macrophage polarization in rheumatoid arthritis synovitis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 867260.
- [24] KUNG C C, DAI S P, HAO C A, et al. Temporal expression patterns of distinct cytokines and M1/M2 macrophage polarization regulate rheumatoid arthritis progression[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(5): 3423-3437.
- [25] ZHONG Y M, LUO K, GUO Y D, et al. Moxibustion regulates the expression of T cells in rheumatoid arthritis through Tim-3/Gal-9 signaling pathway [J]. *Rejuvenation Res*, 2025, 28(1): 17-24.
- [26] SABATOS C A, CHAKRAVARTI S, CHA E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(11): 1102-1110.
- [27] LV R, BAO Q, LI Y. Regulation of M1-type and M2-type macrophage polarization in RAW_{264.7} cells by Galectin-9 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9111-9119.
- [28] KOOHINI Z, HOSSEIN-NATAJ H, MOBINI M, et al. Analysis of PD-1 and Tim-3 expression on CD4⁺ T cells of patients with rheumatoid arthritis; negative association with DAS28[J]. *Clin Rheumatol*, 2018, 37(8): 2063-2071.
- [29] LIU Y, SHU Q, GAO L F, et al. Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity [J]. *Clin Immunol*, 2010, 137(2): 288-295.
- [30] JIANG X W, ZHOU T T, XIAO Y, et al. Tim-3 promotes tumor-promoting M2 macrophage polarization by binding to STAT1 and suppressing the STAT1-miR-155 signaling axis [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(9): e1211219.
- [31] LUO K, ZHONG Y M, GUO Y D, et al. Moxibustion inhibits the macrophage M1 polarization toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor 88/nuclear factor kappa B signaling pathway by regulating T-cell immunoglobulin and mucin-containing protein-3 in rheumatoid arthritis[J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 44(6): 1227-1235.

收稿日期:2025-04-06 修回日期:2025-05-05
网络首发:2025-12-16 编辑:秦田雨