

艾灸对类风湿性关节炎大鼠PINK1/Parkin通路及线粒体自噬的影响

王洁^{1,2}, 胡文萱¹, 王天城³, 刘倩楠¹, 刘磊², 吴子建^{1,2}, 蔡荣林¹, 彭传玉^{1,2}
(¹安徽中医药大学针灸推拿学院, 合肥 230038; ²安徽省中医药科学院针灸经络研究所, 合肥 230038; ³安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230038)

【摘要】 目的:观察艾灸“肾俞”“足三里”对类风湿性关节炎(RA)模型大鼠PTEN诱导激酶1(PINK1)/E3泛素连接酶(Parkin)通路及线粒体自噬的影响,探讨艾灸改善RA的可能机制。方法:将24只SD大鼠随机分为正常组、模型组、艾灸组和西药组,每组6只。除正常组外其余3组采用风寒湿环境+注射弗氏完全佐剂法复制RA模型。艾灸组悬灸“肾俞”“足三里”(两穴交替),每次20 min,连续15 d。西药组给予甲氨蝶呤(0.35 mg/kg)灌胃,每周2次,连续15 d。采用透射电子显微镜观察大鼠右膝关节滑膜组织线粒体形态变化;JC-1荧光探针检测大鼠滑膜组织线粒体膜电位水平;荧光探针法检测大鼠血清活性氧(ROS)水平;荧光素酶法检测大鼠滑膜组织ATP含量;免疫荧光法观察大鼠滑膜组织线粒体外膜易位酶20(TOMM20)与微管相关蛋白轻链3(LC3)B共定位的情况;Western blot法检测大鼠滑膜组织Beclin1、选择性自噬接头蛋白(p62)、PINK1、Parkin蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I比值。结果:与正常组相比,模型组大鼠滑膜组织线粒体肿胀、结构紊乱,内嵴缺损,自噬小体增多;线粒体膜电位水平和ATP含量降低($P<0.01$);血清ROS水平,滑膜组织TOMM20和LC3B共定位表达,Beclin-1、PINK1、Parkin蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I比值升高($P<0.01$),p62蛋白表达水平下降($P<0.01$)。与模型组相比,艾灸组与西药组线粒体结构损伤减轻,嵴较模糊,自噬小体减少;线粒体膜电位水平和ATP含量升高($P<0.05$, $P<0.01$);血清ROS水平,滑膜组织TOMM20和LC3B共定位表达,Beclin1、PINK1、Parkin蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I比值下降($P<0.01$, $P<0.05$),p62表达水平升高($P<0.01$)。与艾灸组相比,西药组线粒体膜电位水平升高($P<0.05$)。结论:艾灸“肾俞”“足三里”可改善RA模型大鼠线粒体结构损伤,降低线粒体自噬水平,其机制可能与抑制PINK1/Parkin通路异常活化相关。

【关键词】 艾灸;类风湿性关节炎;PINK1/Parkin信号通路;线粒体;自噬

Effect of moxibustion on the PINK1/Parkin pathway and mitophagy in rats with rheumatoid arthritis

WANG Jie^{1,2}, HU Wen-xuan¹, WANG Tian-cheng³, LIU Qian-nan¹, LIU Lei², WU Zi-jian^{1,2}, CAI Rong-lin¹, PENG Chuan-yu^{1,2} (¹College of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; ²Institute of Acupuncture and Meridian, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230038; ³College of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effect of moxibustion at “Shenshu” (BL23) and “Zusanli” (ST36) on the PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/E3 ubiquitin ligase (Parkin) pathway and mitophagy in rats with rheumatoid arthritis (RA), so as to explore its possible mechanism in improving RA. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into normal, model, moxibustion, and medication groups, with 6 rats in each group. The RA model was established by Freund’s complete adjuvant solution injection combined with freezing and wind-cold dampness method. Suspended moxibustion was applied to BL23 and ST36 for 20 min, once daily for 15 consecutive

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250632

引用格式:王洁,胡文萱,王天城,等.艾灸对类风湿性关节炎大鼠PINK1/Parkin通路及线粒体自噬的影响[J].针刺研究,2026,51(4):447-454.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82205289,82274645);安徽省自然科学基金青年项目(No.2208085QH265)

通信作者:彭传玉,E-mail:274113031@qq.com

days. Methotrexate (0.35 mg/kg) was administered via oral gavage twice a week for 15 consecutive days. The morphological changes of mitochondria in synovial tissue were observed by transmission electron microscopy. JC-1 staining was used to detect the level of mitochondrial membrane potential in synovial tissue. The ROS level in serum of rats was detected by fluorescence probe method. The content of ATP in synovial tissue was detected by luciferase assay. The co-localization of mitochondrial outer membrane translocation enzyme 20 (TOMM20) and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) B in synovial tissue was observed by immunofluorescence. The expression levels of Beclin1, selective autophagy adaptor protein (p62), PINK1 and Parkin and the ratio of LC3 II/LC3 I in synovial tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, the model group showed swollen mitochondria, disordered structure, disrupted cristae, and increased autophagosomes in synovial tissue; the mitochondrial membrane potential level and ATP content, and the protein expression level of p62 were decreased ($P < 0.01$), while the serum ROS level, the co-localization expression of TOMM20 and LC3B in synovial tissue, and the protein expression levels of Beclin1, PINK1, and Parkin and the ratio of LC3 II/LC3 I were increased ($P < 0.01$). In contrast to the model group, the increased and decreased indexes mentioned above were reversed ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in both moxibustion and medication groups; and the mitochondrial membrane potential was obviously higher ($P < 0.05$) in the medication group than that in the moxibustion group. **Conclusion** Moxibustion at BL23 and ST36 can ameliorate mitochondrial structural damage and reduce the level of mitochondrial autophagy in RA model rats, which may be related to its function in inhibiting the abnormal activation of PINK1/Parkin pathway.

【KEYWORDS】 Moxibustion; Rheumatoid arthritis; PINK1/Parkin signaling pathway; Mitochondria; Autophagy

类风湿性关节炎(RA)是一种慢性、全身性自身免疫性疾病,关节滑膜细胞过度增生和炎症反应是主要的病理特征,最终导致关节畸形和功能丧失^[1]。近年研究显示,线粒体自噬在RA发病中发挥关键作用^[2]。RA患者滑膜细胞及软骨细胞内普遍存在线粒体功能障碍,其代谢产物,如线粒体DNA(mtDNA)、活性氧(ROS)积累并驱动炎症反应,形成恶性循环^[3]。研究显示,RA模型大鼠中存在线粒体损伤,且线粒体自噬水平的增强会进一步加剧炎症小体的活化^[4]。PTEN诱导激酶1(PINK1)/E3泛素连接酶(Parkin)信号通路参与调控线粒体自噬,PINK1或Parkin过度表达会伴随ROS释放的增多,从而加剧氧化应激和炎症反应^[5-6]。

目前西医治疗RA主要以药物为主,对病程控制有限,也易导致肝肾功能损害、胃肠道反应、过敏反应等不良反应^[7]。研究显示,艾灸可有效改善RA患者各项临床指标,尤其在改善关节疼痛、肿胀和晨僵等方面效果显著^[8]。同时,前期研究显示,艾灸“肾俞”“足三里”可抑制RA模型大鼠血清中促炎因子的表达,减轻滑膜炎性级联反应^[9]。而PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬在艾灸治疗RA中的作用机制研究尚未见报道,本研究拟通过观察艾灸“肾俞”“足三里”对RA模型大鼠PINK1/Parkin通路及线粒体自噬的影响,探究其作用机制,以期 为艾灸治疗RA提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

24只SPF级雄性健康SD大鼠,体质量(200±20)g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号为SCXK(辽)2020-0001。大鼠饲养于恒温(21~25)℃、恒湿50%~60%、12h/12h明暗交替的环境中,予以自由饮水摄食。将大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、艾灸组和西药组,每组6只。本动物实验通过了安徽中医药大学伦理委员会审批(批准号:AHUCM-rats-2024013),实验过程符合《关于善待实验动物的指导性意见》等相关规定。

1.2 主要试剂与仪器

甲氨蝶呤(上海信宜),PINK1抗体(北京Bioss),RIPA细胞裂解液(上海Beyotime),ECL试剂盒(合肥Biosharp),PVDF膜(美国Millipore),ROS检测试剂盒(南京建成),山羊抗小鼠IgG、山羊抗兔IgG(北京Zsbio),Parkin抗体(美国Santa Cruz Biotechnology),微管相关蛋白轻链3(LC3)B抗体(美国CST,北京Bioss),易位酶20(TOMM20)、Beclin1抗体(英国Abcam),选择性自噬接头蛋白(p62)抗体(美国Proteintech),弗氏完全佐剂(美国Sigma),Western blot快速转膜液、JC-1检测试剂盒(上海碧云天),ATP检测试剂盒(武汉基因美)。

酶标仪(深圳雷杜),离心机(安徽嘉文),漩涡混合器(江苏其林贝尔),电泳仪、电泳槽、转膜仪(上海天能),自动曝光仪(上海培清),超薄切片机

(上海徕卡),透射电子显微镜(日本电子),流式细胞仪(美国贝克曼库尔特),显微镜(日本 Olympus)。

1.3 造模方法

除正常组外,其余各组均按照课题组前期研究方法制备RA模型^[10]:将大鼠放置于模拟“风寒湿”环境的人工造模箱中,风扇以高档位持续吹风,箱内加入冰块使温度保持在4~8℃,湿度维持在80%~90%,每天12h,连续20d。造模第21天,在大鼠右后足趾消毒并注射0.15mL弗氏完全佐剂以诱导RA模型。3d后,以大鼠右侧足踝部出现关节红肿、僵硬,对侧肢体、耳、尾部出现结节或红肿为造模成功的标准^[11]。

1.4 干预方法

正常组与模型组仅给予同样的抓取和固定,不予干预。从第24天开始,艾灸组于大鼠“肾俞”“足三里”给予悬灸。治疗前,穴区剃毛,将大鼠放置于自制艾灸架上,于距穴位皮肤2cm处用香烟型艾条悬灸,每日1次,每次1穴(双侧同取),两穴交替选取,每次灸20min,连续15d。穴位选取依据《实验动物常用穴位名称与定位第2部分:大鼠》^[12]。西药组予以甲氨蝶呤灌胃(0.35mg/kg)^[13],每周2次,连续干预15d。

1.5 观察指标及检测方法

取材:干预结束后次日,腹腔注射2%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉大鼠,经腹主动脉取血后处死,取右膝关节滑膜组织,其中一部分放置于2.5%戊二醛固定液中,其余部分于液氮中冷冻后,转移至-80℃保存。

透射电子显微镜观察各组大鼠滑膜组织线粒体形态学变化:取1mm×1mm×1mm的滑膜组织,于2.5%戊二醛中固定后倒入PBS缓冲液漂洗,置于1%锇酸中二次固定后梯度乙醇脱水,染色、浸透,纯环氧树脂包埋后放入45℃烤箱12h、72℃烤箱24h,用超薄切片机制成超薄切片(片厚70nm),并以3%醋酸铀-枸橼酸铅进行染色。通过透射电镜观察线粒体超微结构变化并采集图像。

JC-1荧光探针检测各组大鼠滑膜组织线粒体膜电位水平:取各组大鼠滑膜组织100mg,PBS缓冲液漂洗后置于无菌培养皿中,加入适量胶原酶IV(2mg/mL)于37℃消化30min,研磨组织至匀浆状,加入适量PBS缓冲液,收集细胞悬液。用2mL的1640培养基润洗70μm细胞滤网,过滤单细胞悬液,离心10min,弃上清后用PBS缓冲液洗涤,取(1~6)×10⁵个细胞,重悬、孵育、收集细胞、洗涤后,用适

量JC-1染色缓冲液重悬细胞。采用流式细胞仪检测分析细胞红绿荧光强度,计算红绿荧光比值。

荧光探针法检测各组大鼠血清ROS的水平:在96孔板中加入100μL血清样本、10μL 012探针,用移液器吹打,混匀,置于37℃环境下避光孵育15~30min,采用荧光酶标仪检测各孔荧光强度(设定激发波长为488nm,发射波长为530nm),以此代表血清中ROS的水平。

免疫荧光法检测各组大鼠滑膜组织TOMM20与LC3B共表达:将滑膜组织切片放入60℃干燥箱中干燥1h,二甲苯脱蜡,pH6.0柠檬酸修复液中修复抗原,阻断内源性过氧化物酶,滴加山羊血清封闭30min,滴加一抗(TOMM20稀释比例为1:100、LC3B为1:300),4℃孵育过夜,PBS洗3次,每次5min。加适量二抗,室温避光孵育30min,PBS洗3次,每次5min。TSA荧光染料反应液反应,抗体洗脱后滴加DAPI复染细胞核,室温孵育后使用PBS冲洗,封片。在荧光显微镜下观察拍照,细胞核呈蓝色,TOMM20阳性表达为绿色,LC3B阳性表达为红色,统计TOMM20和LC3B共定位情况。

荧光素酶法检测各组大鼠滑膜组织ATP的含量:取大鼠滑膜组织100mg,加入PBS缓冲液后匀浆,离心20min,收取上清液,用裂解液稀释上清液样本,加样、加酶、温育、配液、洗涤后,每孔加入显色剂50μL,避光显色后加入50μL终止液,以空白孔调零,用酶标仪在450nm波长下依序测量各孔的吸光度值,根据标准曲线计算样品中ATP的含量。

Western blot法检测各组大鼠滑膜组织Beclin1、p62、PINK1、Parkin蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I比值:取0.1g大鼠滑膜组织,加入RIPA细胞裂解液。离心,取上清液,配置SDS-PAGE凝胶,加入蛋白上样缓冲液。上样后恒压80V电泳1h转膜、封闭。加入一抗稀释液(LC3 II、LC3 I、p62、PINK1、Parkin稀释比例1:1000;Beclin1稀释比例1:2000),4℃孵育过夜,次日用PBST洗涤,加入二抗(1:20000),室温孵育1.2h,PBST洗涤3次。使用ECL发光试剂盒曝光显影,通过Image J软件进行灰度分析,以目标蛋白与内参蛋白GAPDH的灰度值比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理

采用SPSS26.0软件对实验数据进行统计分析,通过GraphPad Prism 9.0软件作图。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐用

LSD 法检验, 方差不齐则用 Dunnett's *t*3 法检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠滑膜组织线粒体形态比较

透射电子显微镜结果显示, 正常组大鼠滑膜组织线粒体结构较为完整, 呈椭圆形, 边界清楚, 内嵴清晰, 未见分裂小体; 与正常组相比, 模型组大鼠滑膜组织线粒体肿胀、结构紊乱, 内嵴缺损, 可见较多的自噬小体; 与模型组相比, 艾灸组与西药组滑膜组织线粒体肿胀程度减轻, 结构紊乱改善, 虽线粒体嵴较模糊, 但自噬小体数量减少。见图 1。

2.2 各组大鼠滑膜组织线粒体膜电位水平比较

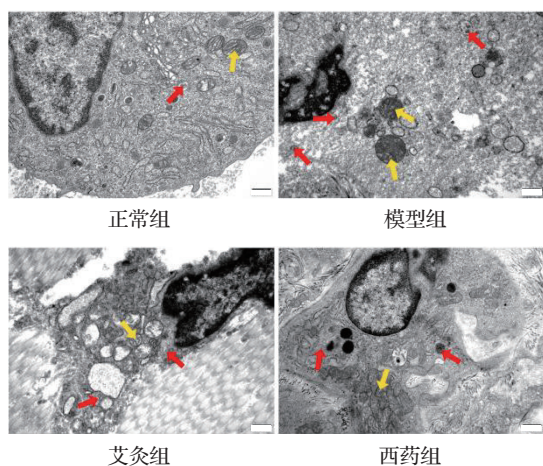
JC-1 荧光探针检测结果显示, 与正常组相比, 模型组滑膜组织线粒体膜电位水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 艾灸组和西药组线粒体膜电位水平升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与艾灸组相比, 西药组线粒体膜电位水平升高 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组大鼠血清 ROS 水平比较

与正常组相比, 模型组大鼠血清 ROS 水平上升 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 艾灸组与西药组大鼠血清 ROS 表达水平下降 ($P < 0.01$); 艾灸组与西药组比较差异无统计学意义。见图 3。

2.4 各组大鼠膝关节滑膜组织线粒体膜标记物 TOMM20 与自噬标志物 LC3B 表达比较

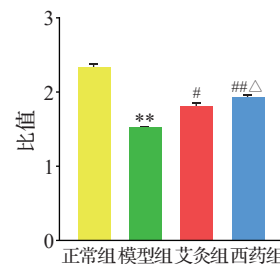
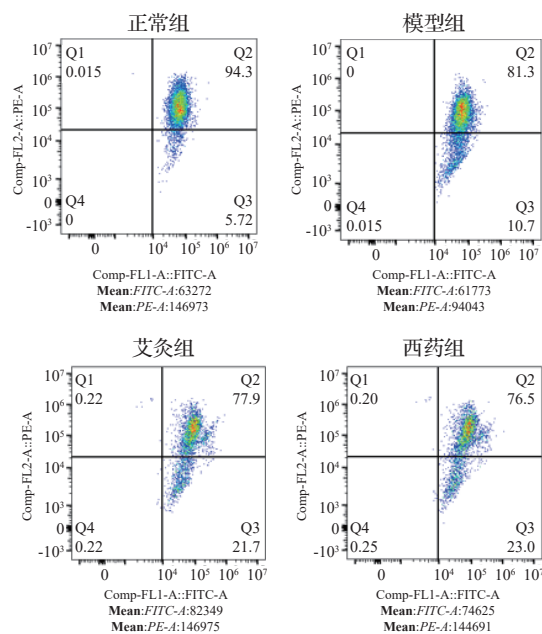
与正常组相比, 模型组大鼠滑膜组织 TOMM20 和 LC3B 共定位表达增加 ($P < 0.01$); 与



注: 标尺=500 nm。黄色箭头示线粒体, 红色箭头示自噬小体。

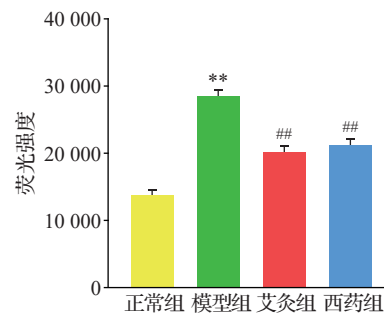
图 1 各组大鼠滑膜组织线粒体超微结构比较 (透射电子显微镜)

Fig. 1 Comparison of mitochondrial ultrastructure in the synovial tissue of rats in the 4 groups (transmission electron microscopy)



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与艾灸组比较, Δ $P < 0.05$ 。

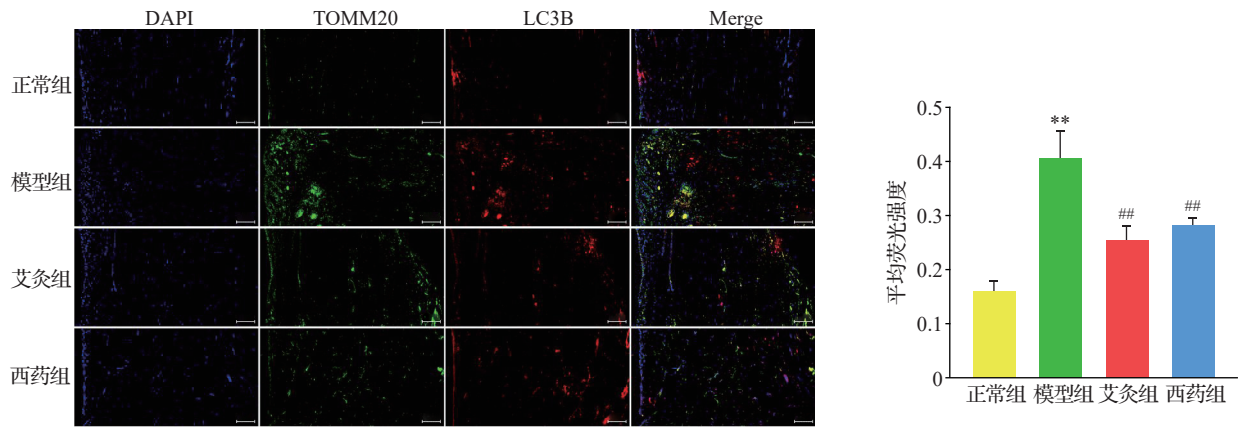
图 2 各组大鼠滑膜组织线粒体膜电位比较 ($\bar{x} \pm s, 6$ 只鼠/组)
Fig. 2 Comparison of mitochondrial membrane potential in the synovial tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s, 6$ rats/group)



注: ROS 为活性氧。与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠血清 ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s, 6$ 只鼠/组)
Fig. 3 Comparison of ROS levels in the serum of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s, 6$ rats/group)

模型组相比, 艾灸组与西药组大鼠滑膜组织 TOMM20 和 LC3B 共定位表达减少 ($P < 0.01$); 艾灸组与西药组比较差异无统计学意义。见图 4。



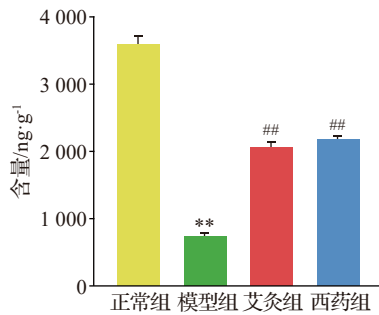
注:细胞核呈蓝色;TOMM20为线粒体外膜易位酶20,阳性表达为绿色;LC3B为微管相关蛋白轻链3B,阳性表达为红色。标尺=50 μm。与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠膝关节滑膜组织 TOMM20 和 LC3B 共定位(免疫荧光染色, $\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 4 Colocalization of TOMM20 and LC3B in synovial tissue mitochondria of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

2.5 各组大鼠滑膜组织 ATP 含量比较

与正常组相比,模型组大鼠滑膜组织 ATP 含量下降($P<0.01$);与模型组相比,艾灸组与西药组大鼠滑膜组织 ATP 含量均升高($P<0.01$);艾灸组与西药组比较差异无统计学意义。见图5。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠滑膜组织 ATP 含量的比较($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of ATP content in the synovial tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

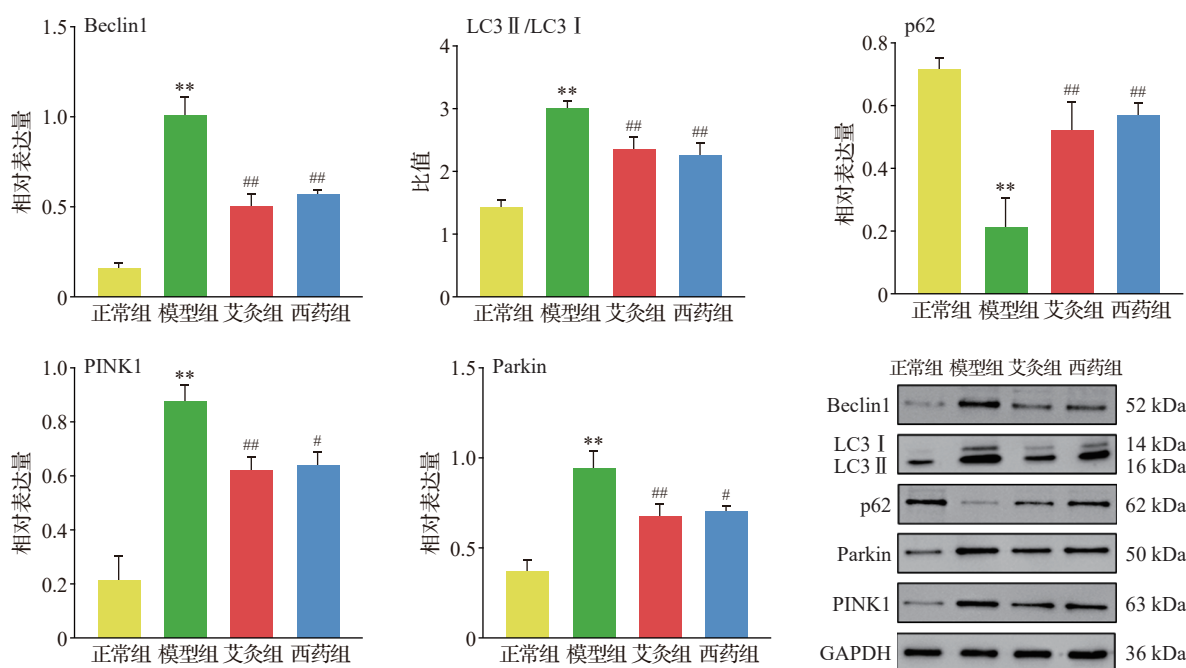
2.6 各组大鼠滑膜组织 Beclin1、p62、PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II /LC3 I 比值比较

与正常组相比,模型组大鼠滑膜组织 Beclin1、PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II /LC3 I 比值升高($P<0.01$),p62 蛋白表达水平下降($P<0.01$);与模型组相比,艾灸组与西药组大鼠滑膜组织 Beclin1、PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II /LC3 I 比值下降($P<0.01, P<0.05$),p62 表达升高($P<0.01$);艾灸组与西药组比较差异无统计学意义。见图6。

3 讨论

临床治疗 RA 多使用非甾体抗炎药、糖皮质激素和生物制剂等,虽具有一定的镇痛和抗炎作用,但存在较多不良反应及严重的经济负担等问题^[14]。因此,寻找安全有效、不良反应小且价格低廉的补充替代医学方案十分迫切。RA 属中医学“痹证”范畴,又称“历节”“鹤膝风”等。中医理论认为此病乃风寒湿邪侵袭人体,致经脉痹阻,气血瘀滞,从而不通则痛。艾灸作为中医传统疗法,可通过温热刺激局部穴位来温通经络、行气活血,促进关节部位的代谢废物和病理产物排出,缓解疼痛和肿胀^[15],且艾叶本身具有散寒祛湿的特性。中医认为“肾主骨生髓”“肾充则髓实,髓实则骨坚”,肾俞为肾之背俞穴,具有温补肾阳、强筋健骨的作用;足三里属足阳明胃经,具有健脾和胃、扶正培元的功效。临床研究表明,艾灸肾俞、足三里可改善 RA 患者的免疫功能及关节僵硬疼痛等症状^[16]。因此,本研究以艾灸为干预手段,选取大鼠“肾俞”“足三里”进行治疗,探讨其治疗 RA 的作用机制,并选取临床治疗 RA 的一线药物甲氨蝶呤作为西药组进行对照^[17]。

线粒体功能在 RA 的发生发展中扮演重要角色^[18]。在 RA 病理状态下,由于炎症反应、氧化应激等因素,线粒体功能可能受损,导致 ROS 的蓄积增多,ATP 合成受阻及能量代谢异常,这种能量代谢异常可能影响滑膜细胞和免疫细胞的正常功能,加剧关节破坏和炎症反应^[19]。有研究显示,由于 RA 受累关节存在缺氧微环境,导致 ROS 表达增加,ATP 合成减少,线粒体膜电位降低,线粒体功能损



注:LC3为微管相关蛋白轻链3,p62为选择性自噬接头蛋白,PINK1为PTEN诱导激酶1,Parkin为E3泛素连接酶。与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图6 各组大鼠滑膜组织 Beclin1、p62、PINK1、Parkin 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值比较($\bar{x} \pm s$, 6 只鼠/组)
 Fig. 6 Comparison of Beclin1、p62、PINK1 and Parkin protein expression levels and the ratio of LC3 II/LC3 I in the synovial tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

伤严重^[20]。本研究结果显示,模型组大鼠膝关节滑膜组织线粒体结构严重破坏、自噬小体增加,同时伴随线粒体膜电位水平及ATP含量降低,ROS水平升高,与既往相关研究一致^[21];经艾灸干预后,大鼠膝关节滑膜组织线粒体结构完整性改善,自噬小体数量明显减少,且线粒体膜电位水平及ATP含量升高,ROS水平降低,与西药组结果类似,提示艾灸干预后能够缓解RA模型大鼠滑膜组织的线粒体损伤,改善功能障碍。

线粒体自噬在维持细胞稳态、调控炎症反应及代谢平衡中发挥核心作用^[22-23]。线粒体自噬过程中,LC3 I向LC3 II转变,并聚集在自噬体膜上,p62介导的可降解物质被自噬体吞噬,随后自噬溶酶体中的蛋白酶将p62和吞噬的物质降解^[24-25]。p62作为自噬底物,其含量降低是自噬活跃的标志,Beclin1调控自噬体膜的形成,是自噬启动的关键蛋白^[26-27]。线粒体膜标记物TOMM20与自噬标志物LC3B免疫荧光共定位通常用来观察自噬的发生^[28]。研究显示,艾灸可以通过影响滑膜细胞自噬水平,抑制滑膜细胞的增殖,进而缓解RA炎症反应损伤^[29]。本研究结果表明,模型组滑膜组织TOMM20和LC3B共定位表达减少,Beclin1、PINK1、Parkin蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I升

高,p62蛋白表达水平下降;而经艾灸和甲氨蝶呤干预后,Beclin1蛋白表达水平及LC3 II/LC3 I降低,p62蛋白表达水平升高,TOMM20与LC3B共定位表达增加,提示艾灸可发挥与甲氨蝶呤类似的作用,能够减弱过度激活的线粒体自噬,缓解RA引发的线粒体自噬水平失衡。

PINK1/Parkin信号通路是细胞清理受损线粒体的“质检系统”,是线粒体自噬的经典途径,可调控线粒体质量控制、氧化应激及炎症反应。PINK1和Parkin是调控线粒体自噬的关键蛋白,在健康线粒体中,PINK1在线粒体内膜上降解,Parkin无活性;当线粒体受损时,膜电位下降,导致PINK1无法被正常切割,在线粒体外膜积累,并通过磷酸化作用招募Parkin至受损线粒体,Parkin在PINK1的激活下,对线粒体外膜蛋白进行泛素化修饰,形成特定的泛素链标记^[29-31]。这些泛素链标记被自噬受体(如p62、NDP52)识别,进而结合LC3蛋白,形成自噬体包裹受损线粒体,最终被溶酶体内水解酶降解,导致线粒体自噬障碍^[27]。研究显示,骨痹方可以通过抑制PINK1和LC3过度表达,降低线粒体自噬水平,从而改善膝骨关节炎模型小鼠软骨退变^[32]。本研究中,RA模型大鼠线粒体自噬增强,PINK1、Parkin的表达水平升高,线粒体自噬水平处于失衡

状态,可能提示在RA发展过程中,PINK1/Parkin信号通路与线粒体自噬相关;而经艾灸干预后,PINK1和Parkin的表达水平降低,线粒体自噬减弱,同时线粒体功能得到恢复,与甲氨蝶呤的治疗效果类似。

综上所述,艾灸“肾俞”“足三里”可有效地改善RA模型大鼠膝关节滑膜组织的线粒体损伤,降低线粒体自噬水平,其作用机制可能与抑制PINK1/Parkin信号通路的异常激活有关,提示调控线粒体自噬通路可能是艾灸改善RA炎症反应损伤的作用途径之一。但是RA与线粒体自噬之间的机制复杂,本研究仅对PINK1/Parkin通路进行了初步探索,仍存在一定的局限性,如缺乏体外实验进一步验证,其作用机制仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] 刘梨,张亮,艾坤,等. 艾灸对佐剂性关节炎大鼠足趾滑膜组织自噬和凋亡的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(3): 253-258.
LIU L, ZHANG L, AI K, et al. Effect of moxibustion on the indicators of autophagy and apoptosis in synovium of rats with adjuvant arthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(3): 253-258.
- [2] 李加根,陈跃平,黄柯琪,等. 线粒体自噬视域下的类风湿关节炎: 基于多机器学习算法的互作分析[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(26): 5595-5607.
LI J G, CHEN Y P, HUANG K Q, et al. Rheumatoid arthritis from the perspective of mitophagy: interaction analysis based on multiple machine learning algorithms (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2025, 29(26): 5595-5607.
- [3] 路宜贤,郭锦晨,卢佳,等. 线粒体功能障碍在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2024, 40(10): 789-795.
LU Y X, GUO J C, LU J, et al. Advances in the study of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Immunological Journal*, 2024, 40(10): 789-795.
- [4] 康艳慧,穆萍萍,张海雷. 雷公藤甲素对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞线粒体自噬、NLRP3炎症小体活化和细胞焦亡的影响[J]. 现代药物与临床, 2024, 39(2): 290-295.
KANG Y H, MU P P, ZHANG H L. Effect of triptolide on mitochondrial autophagy, activation of NLRP3 inflammatome and pyroptosis of fibroblast synoviocytes in rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Drugs & Clinic*, 2024, 39(2): 290-295.
- [5] 叶子丰,邝高艳,阮一蔚,等. 线粒体自噬对骨性关节炎的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2024, 53(6): 858-864.
YE Z F, KUANG G Y, YUAN Y W. Summary of the effects of mitophagy in OA (in Chinese) [J]. *Acta Med Uni Sci Technol Huazhong*, 2024, 53(6): 858-864.
- [6] 马莉,赵俊杰,王鹏,等. 黄芪甲苷通过PINK1/parkin通路介导的线粒体自噬途径减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2025, 41(3): 501-508.
MA L, ZHAO J J, WANG P, et al. Astragaloside IV protects against rat cerebral ischemia-reperfusion injury via PINK1/parkin mitophagy-associated pathway (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2025, 41(3): 501-508.
- [7] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗类风湿关节炎临床应用指南(2022年)[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(3): 261-273.
Standardization Project Team of “Clinical Application Guidelines for Advantageous Diseases Treated with Chinese Patent Medicines”. Guidelines for clinical application of Chinese patent medicine in the treatment of rheumatoid arthritis(2022) (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2023, 43(3): 261-273.
- [8] 魏洪悦,谷晓玲,冯颖,等. 艾灸干预在类风湿关节炎病人中应用的范围综述[J]. 循证护理, 2024, 10(23): 4252-4257.
WEI H Y, GU X L, FENG Y, et al. Research on moxibustion intervention in patients with rheumatoid arthritis: a scoping review (in Chinese) [J]. *Chinese Evidence-based Nursing*, 2024, 10(23): 4252-4257.
- [9] 彭传玉,王天城,蔡荣林,等. 艾灸调控铁死亡-脂质代谢通路改善类风湿性关节炎大鼠滑膜炎性损伤的机制研究[J]. 针刺研究, 2024, 49(12): 1296-1302, 1309.
PENG C Y, WANG T C, CAI R L, et al. Study on the mechanism of moxibustion regulating ferroptosis-lipid metabolism pathway to improve synovitis inflammatory injury in rheumatoid arthritis rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(12): 1296-1302, 1309.
- [10] 彭传玉,胡玲,吴子建,等. 艾灸对佐剂性关节炎大鼠脊髓中N-甲基-D天冬氨酸受体-一氧化氮-环鸟苷酸通路的影响[J]. 针刺研究, 2022, 47(3): 250-255.
PENG C Y, HU L, WU Z J, et al. Effect of moxibustion on inflammatory pain and N-methyl-D aspartic acid receptor-nitric oxide-cyclic GMP pathway in spinal cord of adjuvant arthritis rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2022, 47(3): 250-255.
- [11] 夏晴,纪羽婷,刘海亮,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(11): 107-113.
XIA Q, JI Y T, LIU H L, et al. Research progress on animal models of rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2020, 30(11): 107-113.
- [12] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第2部分: 大鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 351-352.
China Association of Acupuncture-Moxibustion. Nomenclature and location of acupoints commonly used in laboratory animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(4): 351-352.
- [13] 张慧,吴显,吴生兵,等. 艾灸对佐剂性关节炎大鼠踝关节滑膜组织低氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子表达的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(4): 347-352.
ZHANG H, WU X, WU S B, et al. Effect of moxibustion on the expressions of hypoxia inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor in ankle synovial tissue of rats with adjuvant arthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(4): 347-352.
- [14] DI MATTEO A, BATHON J M, EMERY P. Rheumatoid

- arthritis[J]. *Lancet*, 2023, 402(10416): 2019-2033.
- [15] 袁娟, 王婷. 艾灸治疗类风湿性关节炎临床疗效的Meta分析[J]. *长治医学院学报*, 2021, 35(3): 211-214.
YUAN J, WANG T. Clinical efficacy of moxibustion in treatment of rheumatoid arthritis: a Meta-analysis (in Chinese) [J]. *Journal of Changzhi Medical College*, 2021, 35(3): 211-214.
- [16] 唐洁, 武平, 余泽芸, 等. 艾灸对类风湿关节炎患者血清中白三烯B4、基质金属蛋白酶-9的影响[J]. *针刺研究*, 2023, 48(5): 488-493.
TANG J, WU P, YU Z Y, et al. Regulatory effect of moxibustion on LTB4/MMP-9 in serum of patients with rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(5): 488-493.
- [17] 卢俊光, 郭奇虹, 冯锦帛, 等. 耳穴疗法联合甲氨蝶呤治疗活动性类风湿关节炎临床观察[J]. *天津药学*, 2021, 33(4): 46-48.
LU J G, GUO Q H, FENG J F, et al. Clinical observation on auricular point therapy combined with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Tianjin Pharmacy*, 2021, 33(4): 46-48.
- [18] 贾东晔, 潘志. 线粒体稳态在类风湿关节炎致病中的作用[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2025, 30(4): 541-547.
JIA D Y, PAN Z. Role of mitochondrial homeostasis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2025, 30(4): 541-547.
- [19] FEARON U, CANAVAN M, BINIECKA M, et al. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(7): 385-397.
- [20] 展俊平, 黄硕, 孟庆良, 等. 缺氧微环境下补阳还五汤通过抑制BNIP3-PI3K/Akt通路抑制类风湿关节炎滑膜成纤维细胞的线粒体自噬[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(1): 35-42.
ZHAN J P, HUANG S, MENG Q L, et al. Buyang Huanwu Decoction reduces mitochondrial autophagy in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts in hypoxic culture by inhibiting the BNIP3-PI3K/Akt pathway (in Chinese) [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2025, 45(1): 35-42.
- [21] 井维尧, 许从荟, 刘翠, 等. 热补针法对寒湿证类风湿关节炎家兔Drp1/Mff通路活性及线粒体质量的影响[J]. *针刺研究*, 2025, 50(10): 1124-1132.
JING W Y, XU C H, LIU C, et al. Effects of heat-reinforcing acupuncture on Drp1/Mff pathway activity and mitochondrial quality in rabbits with cold-dampness rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(10): 1124-1132.
- [22] WANG S T, ZHANG K L, YAO Y C, et al. Autophagy and mitochondrial homeostasis during infection: a double-edged sword[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 738932.
- [23] KRISHNAN S, SHRESTHA Y, JAYATUNGA D P W, et al. Activate or inhibit? Implications of autophagy modulation as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6739.
- [24] 杨苗, 于文静, 贺春香, 等. 基于PINK1-Parkin介导的线粒体自噬研究当归芍药散对AD大鼠的影响[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(2): 534-541.
YANG M, YU W J, HE C X, et al. Effect on Danggui Shaoyao Powder on mitophagy in rat model of Alzheimer's disease based on PINK1-Parkin pathway (in Chinese) [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(2): 534-541.
- [25] 肖华业, 汪磊, 王佳慧, 等. 基于PINK1/Parkin信号通路探讨莪术醇对肝星状细胞线粒体自噬的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(5): 919-928.
XIAO H Y, WANG L, WANG J H, et al. Exploring the role of curcumol on mitochondrial autophagy in hepatic stellate cells based on the PINK1/Parkin signalling pathway (in Chinese) [J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2025, 60(5): 919-928.
- [26] LIU W J, YE L, HUANG W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin - proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2016, 21(1): 29.
- [27] VEGA-RUBÍN-DE-CELIS S, KINCH L, PEÑA-LLOPIS S. Regulation of Beclin 1-mediated autophagy by oncogenic tyrosine kinases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9210.
- [28] 余泽宇, 夏帅, 卢曼, 等. 针刀对膝关节骨关节炎软骨PINK1/Parkin通路介导的线粒体自噬的影响[J]. *针刺研究*, 2023, 48(9): 898-905.
SHE Z Y, XIA S, LU M, et al. Effect of acupotomy on mitophagy mediated by PINK1/Parkin pathway in cartilage of rabbits with knee osteoarthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(9): 898-905.
- [29] HAO F, WANG Q, LIU L, et al. Effect of moxibustion on autophagy and the inflammatory response of synovial cells in rheumatoid arthritis model rat [J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 42(1): 73-82.
- [30] 何雨函, 宋雨晖, 邱懿, 等. 电针介导PINK1/Parkin信号通路治疗功能性消化不良模型大鼠的机制研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2025, 48(6): 869-876.
HE Y H, SONG Y H, QIU Y, et al. Mechanism of electroacupuncture-mediated PINK1/Parkin signal pathway in the treatment of functional dyspepsia in rats (in Chinese) [J]. *Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine*, 2025, 48(6): 869-876.
- [31] 党赢, 焦雨琦, 海日, 等. 基于PINK1/parkin通路介导线粒体自噬探讨冲和膏促进糖尿病溃疡创面愈合的机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2025, 41(2): 338-347.
DANG Y, JIAO Y Q, HAI R, et al. Mechanism of Chonghe Paste promoting wound healing of diabetic ulcer through PINK1/parkin pathway-mediated mitophagy (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2025, 41(2): 338-347.
- [32] 肖思奇, 程森, 王磊, 等. 基于PINK1/Parkin线粒体自噬通路探讨骨痹方抗膝骨关节炎的机制研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2024, 26(4): 13-18.
XIAO S Q, CHENG M, WANG L, et al. Investigating the mechanism of Gubi Prescription against knee osteoarthritis based on PINK1/Parkin mitophagy pathway (in Chinese) [J]. *Journal of Hubei University of Chinese Medicine*, 2024, 26(4): 13-18.