

☆ XXXX ☆

基于TLR4/MyD88/MAPK信号通路介导的滑膜细胞自噬探究热补针法治疗类风湿关节炎的抗炎机制

苏成红¹, 杜小正², 刘 强², 刘莉梅³, 刘 翠², 梁 芳¹, 任志雄¹

(¹航空总医院, 北京 100012; ²甘肃中医药大学针灸推拿学院, 兰州 730000; ³甘肃中医药大学附属医院郑氏针灸科, 兰州 730000)

【摘要】 目的:观察热补针法对类风湿关节炎(RA)寒证模型家兔膝关节滑膜组织自噬活性及Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响,探究热补针法治疗RA抗炎机制。**方法:**40只新西兰家兔随机分为正常组、模型组、瑞沙托维(TAK-242)(简称“TAK-242组”)、热补针法组(简称“热补组”)及脂多糖(LPS)+热补针法组(简称“LPS+热补组”),每组8只。采用弗氏完全佐剂及卵蛋白混合溶液注射联合低温冷冻法建立RA寒证模型。热补组取“足三里”施热补针法操作,留针30 min,1次/d,干预14次;TAK-242组耳缘静脉注射TAK-242(0.75 mg/kg),隔日1次,共7次;LPS+热补组先耳缘静脉注射LPS(0.25 mg/kg),注射30 min后施热补针法干预,隔日1次,共7次。干预结束后,测量家兔膝关节周径和痛阈;HE染色检测家兔膝关节滑膜组织病理形态;透射电镜观察滑膜细胞自噬小体;Western blot法检测滑膜组织自噬相关蛋白5(Atg5)、Unc-51样自噬激活激酶1(ULK1)、微管相关蛋白轻链3(LC3)、自噬相关蛋白Beclin-1、TLR4、MyD88、细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)及p38MAPK蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组家兔膝关节周径增加($P<0.05$)、痛阈降低($P<0.05$),滑膜组织ULK1、LC3 II/I、Atg5、Beclin-1蛋白表达降低($P<0.05$),TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,TAK-242组、热补组膝关节周径缩小($P<0.05$),痛阈增高($P<0.05$),滑膜组织Atg5、ULK1、LC3 II/I、Beclin-1蛋白表达升高($P<0.05$),TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK蛋白表达降低($P<0.05$)。与LPS+热补组比较,热补组膝关节周径缩小($P<0.05$),痛阈升高($P<0.05$),滑膜组织Atg5、ULK1、LC3 II/I、Beclin-1蛋白表达升高($P<0.05$),TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK蛋白表达降低($P<0.05$)。**结论:**热补针法可减轻RA关节滑膜炎性反应,其机制与抑制滑膜组织TLR4/MyD88/MAPK通路从而增强滑膜细胞自噬活性有关。

【关键词】 热补针法;类风湿关节炎;滑膜炎性反应;Toll样受体4/髓样分化因子88/丝裂原活化蛋白激酶信号通路;细胞自噬

Exploration on the anti-inflammatory mechanism of heat-reinforcing acupuncture in the treatment of rheumatoid arthritis from the perspective of synoviocyte autophagy mediated by TLR4/MyD88/MAPK signaling pathway

Su Chenghong¹, Du Xiaozheng², Liu Qiang², Liu Limei³, Liu Cui², Liang Fang¹, Ren Zhixiong¹ (¹Aviation General Hospital, Beijing 100012, China; ²College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; ³Department of Zheng's Acupuncture and Moxibustion, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effects of heat-reinforcing acupuncture on autophagic activity and the

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20260030

引用格式:苏成红,杜小正,刘强,等.基于TLR4/MyD88/MAPK信号通路介导的滑膜细胞自噬探究热补针法治疗类风湿关节炎的抗炎机制[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-9.

项目来源:国家中医药管理局甘肃郑氏针法学术流派传承工作室项目(No.2305135901);首都卫生发展科研专项(No.2022-3-6102)

通信作者:任志雄,E-mail:13661339405@126.com

Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in knee synovial tissue of cold-syndrome rabbit models with rheumatoid arthritis (RA), so as to explore the anti-inflammatory mechanism of heat-reinforcing acupuncture against RA. **Methods** Forty New Zealand rabbits were randomly divided into a normal group, a model group, a resatorvid (TAK-242) group (abbreviated as TAK-242 group), a heat-reinforcing acupuncture group (abbreviated as heat-reinforcing group), and a lipopolysaccharide (LPS) + heat-reinforcing acupuncture group (abbreviated as LPS + heat-reinforcing group), with 8 rabbits in each group. The cold-syndrome RA model was established by combined injection of complete Freund's adjuvant and ovalbumin mixed solution plus low-temperature freezing treatment. For the heat-reinforcing group, heat-reinforcing acupuncture manipulation was performed at "Zusanli" (ST36) with needle retention for 30 min once a day for 14 consecutive interventions. The TAK-242 group received auricular vein injection of TAK-242 (0.75 mg/kg) once every other day for a total of 7 injections. For the LPS + heat-reinforcing group, LPS (0.25 mg/kg) was injected via the auricular vein, and heat-reinforcing acupuncture intervention was conducted 30 min after LPS injection once every other day for 7 times in total. After all interventions, HE staining was adopted to detect the pathological morphology of rabbit knee synovial tissue; transmission electron microscopy was used to observe autophagosomes in synoviocytes; Western blot was applied to detect the protein expression levels of autophagy-related 5 (Atg5), unc-51-like autophagy activating kinase 1 (ULK1), microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), autophagy-related protein Beclin-1, TLR4, MyD88, extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and p38MAPK in synovial tissue. **Results** Compared with the normal group, the model group exhibited increased knee joint circumference ($P<0.05$), decreased pain threshold ($P<0.05$), down-regulated protein expression of ULK1, LC3 II/I, Atg5 and Beclin-1 in synovial tissue ($P<0.05$), as well as up-regulated protein expression of TLR4, MyD88, ERK1/2, JNK and p38MAPK ($P<0.05$). Compared with the model group, the TAK-242 group and heat-reinforcing group showed reduced knee joint circumference ($P<0.05$), elevated pain threshold ($P<0.05$), up-regulated protein expression of Atg5, ULK1, LC3 II/I and Beclin-1 in synovial tissue ($P<0.05$), and down-regulated protein expression of TLR4, MyD88, ERK1/2, JNK and p38MAPK ($P<0.05$). Compared with the LPS + heat-reinforcing group, the heat-reinforcing group presented smaller knee joint circumference ($P<0.05$), higher pain threshold ($P<0.05$), higher protein expression of Atg5, ULK1, LC3 II/I and Beclin-1 in synovial tissue ($P<0.05$), and lower protein expression of TLR4, MyD88, ERK1/2, JNK and p38MAPK ($P<0.05$). **Conclusion** Heat-reinforcing acupuncture can alleviate synovial inflammatory response in RA joints, and its mechanism is associated with inhibiting the TLR4/MyD88/MAPK pathway in synovial tissue and thereby enhancing autophagic activity of synoviocytes.

【KEYWORDS】 Heat-reinforcing acupuncture; Rheumatoid arthritis; Synovial inflammatory response; TLR4/MyD88/MAPK signaling pathway; Cellular autophagy

类风湿关节炎(RA)是以关节滑膜炎性反应、血管翳形成及软骨与骨破坏为主要表现的自身免疫性疾病,早期的病理改变以关节滑膜的炎性反应为主^[1]。四肢多关节持续性的炎性肿痛不仅给患者带来了不良的情绪体验,而且还限制关节活动,甚至导致残疾,严重影响患者的生活质量^[2]。RA早期治疗以非甾体抗炎药、糖皮质激素及抗风湿药来减轻炎性肿痛,延缓病情进展,但长期使用存在胃肠道反应、糖脂代谢紊乱、骨质疏松等不良反应^[3]。

Toll样受体4(TLR4)/髓样分化因子88(MyD88)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路在细胞的增殖分化、氧化应激与炎性反应等生理病理过程中发挥重要作用,广泛参与RA炎性进程^[4]。自噬是真核细胞通过降解错误折叠蛋白、功能异常

细胞器及病原微生物为细胞提供能量的方式^[5]。TLR4/MyD88/MAPK信号通路是调控细胞自噬的重要通路,使用该通路抑制剂瑞沙托维(TAK-242)能够增强结肠上皮细胞的自噬活性^[6]。前期研究表明热补针法既可抑制TLR4/MyD88/MAPK信号通路,改善RA关节滑膜炎性反应,又可上调自噬关键蛋白自噬相关蛋白5(Atg5)、Unc-51样自噬激活酶1(ULK1)、微管相关蛋白轻链3(LC3)、自噬相关蛋白Beclin-1表达,增强关节局部能量代谢,抑制肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6的合成与分泌^[7-8]。因此,本课题通过进一步研究热补针法通过增强滑膜自噬改善RA关节滑膜炎性反应是否与抑制TLR4/MyD88/MAPK通路有关,为热补针法的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康2~3月龄清洁级新西兰家兔40只(雌雄各半),体质量为 (2.0 ± 0.5) kg,购买于陕西省君行生物科技有限公司[生产许可证号:SCXK(陕)2022-001]。于第九四〇医院动物饲养科单笼喂养,温度20~25℃、湿度30%~60%、自由摄食、饮水,每日光照时间12 h。实验方案获得甘肃中医药大学动物实验伦理委员会审批,审批号为:2020-009,家兔干预及尸体处置严格遵照科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》执行。

1.2 主要仪器和试剂

压力测痛仪(上海邦典),无弹性软皮尺(德国SINCE),一次性无菌针灸针(0.16 mm $\times$ 7 mm,苏州医疗用品厂),高速冷冻离心机(长沙恒宇),电镜切片机(德国LEICA),切片机(德国KA),IX51型光学显微镜(苏州奥林巴斯),石蜡包埋机、JEM 1400型透射电镜、JEM 1400型数码相机(日本日立),恒温箱、Western blot转膜仪、电泳仪、凝胶成像仪(北京君意),化学发光成像系统(上海勤翔),Image J软件(美国NIH)。

卵蛋白干粉、弗氏完全佐剂(美国Sigma), TAK-242(美国MCE),脂多糖(LPS,大连美仑),4%多聚甲醛(武汉赛维尔),ULK1、LC3B、Beclin-1、Atg5、TLR4、MyD88、C-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38MAPK及GAPDH一抗(英国Abcam),细胞外信号调节激酶(ERK)1/2一抗(英国CST),HRP标记山羊抗兔IgG二抗(美国Immunoway),SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(上海碧云天),BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液(北京索莱宝),苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(美国Sigma)。

1.3 分组与造模

40只实验家兔,以体质量为依据,按随机数抽取8只作为正常组,其余32只作为造模组。造模组采用弗氏完全佐剂及卵蛋白混合溶液注射联合低温冷冻法建立RA寒证模型。卵蛋白溶液(4 mg/mL)加入等量弗氏完全佐剂摇匀,选定6个注射部位(脊椎正中线与两肩胛骨下角连线所形成的“十”字交点,以“十”字交点为定位点1,“十”字交点上下1 cm为定位点2、3,3个定位点各左右旁开0.5 cm共6个注射部位),1 mL注射器每部位皮下注射0.2 mL,14 d后等量重复注射1次,6 d后向家兔双后腿膝关节腔内注入0.4 mL卵蛋白氯化钠溶液(20 mg/mL)。关节腔注射后第2天,兔台法固定家

兔,将冰袋(3份冰+1份结晶氯化钙)置于膝关节冷冻1.5 h,45℃温水中复温5 min,共冷冻1次。造模结束后第2天开始评价模型,以家兔痛阈降低、膝关节周径增加(周径大于正常组家兔1.5 cm以上)提示模型制备成功^[9-10]。模型制备成功后,将造模组家兔随机分为模型组、TAK-242组、热补组及LPS+热补组,每组8只。

1.4 干预方法

模型制备成功后,从第2天开始给予干预。实验家兔均以双侧前腿及后腿捆绑方式固定于兔台上,操作全程对家兔适当安抚。

正常组、模型组:耳缘静脉注射0.9%氯化钠溶液,隔日1次,共计7次;TAK-242组:1 mL的无菌注射器耳缘静脉注射TAK-242(0.75 mg/kg),给药体积为0.3 mL/kg,隔日1次,共7次^[11];热补组:选取“足三里”,定位参照文献^[12]及《实验针灸学》^[13]常用实验动物针灸穴位附图中的取穴方法,操作参照《郑氏针灸全集》^[14],即左手揣按“足三里”,右手将针迅速刺入穴内10~12 mm,左手紧按穴位,加重指压,右手拇指向前连续捻按5次,针尖顶着针感部位连续重插轻提5次,拇指再向前连续捻按5次,反复操作1 min,留针30 min,每日1次,共计14次;LPS+热补组:1 mL的无菌注射器耳缘静脉注射LPS(0.25 mg/kg),给药体积为0.3 mL/kg,30 min后施加热补针法干预,选穴及操作同热补组,隔日1次,共7次^[15-16]。

1.5 观察指标及检测方法

家兔膝关节周径、痛阈检测:以无弹性软皮尺沿股骨内外侧髁旋转1周测量膝关节周径,用型压力测痛仪按压家兔内膝眼位置,取家兔出现挣扎弹腿时所测的压力值,重复测量3次,计算其平均值为该兔的痛阈值。

取材:家兔经心脏空气栓塞法处死后,仰卧位固定双后腿膝关节,沿髌韧带中点与股骨内外髁连线切开周围肌肉组织,沿髌骨上缘2~3 cm切割并掀开髌骨,纵行分离胫骨和腓骨,眼科剪分离周围的关节囊结构,眼科钝性分离器剥离滑膜组织。

家兔膝关节滑膜组织病理形态检测:将滑膜组织切割为0.3 cm $\times$ 0.3 cm $\times$ 0.3 cm的小块结构,石蜡包埋机包埋,切片机将其切成厚度为4 μ m左右的薄片,苏木精染色液5~10 min,蒸馏水漂洗后浸入0.5%伊红染色液5 min,水洗,低浓度到高浓度乙醇梯度脱水各1 min,中性树脂封片,IX51型光学显微镜观察滑膜固有层厚度及其被覆细胞增生、炎性细

胞浸润等情况。

透射电镜观察家兔膝关节滑膜细胞超微结构及自噬体:将1 mm×1 mm×1 mm膝关节滑膜组织块固定于2.5%戊二醛6 h,PBS缓冲液漂洗,1%锇酸固定4 h,50%乙醇梯度脱水20 min,包埋液+纯丙酮室温过夜,40℃烤箱10 h、60℃烤箱48 h固化,切成70 nm厚片,3%醋酸铀-柠檬酸双染色,JEM 1400型透射电镜观察,高清数码相机记录图像。

Western blot法检测滑膜组织ULK1、LC3 II/I、Atg5、Beclin-1、TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK蛋白表达:100 mg滑膜组织用RIPA组织液裂解,BCA法检测蛋白浓度,加入5×上样缓冲液,根据每组蛋白浓度计算上样量;凝胶电泳,80 V恒压浓缩,120 V恒压分离;300 mA转膜90 min后,PVDF膜置于5%脱脂奶粉中孵育1 h后,加入ULK1、LC3 II/I、Atg5、Beclin-1、TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK(1:1 000)抗体,4℃孵育过夜后,继续37℃孵育30 min;TBST洗膜,山羊抗兔二抗(1:4 000)孵育;洗涤后,化学发光成像系统曝光,获取蛋白条带,ImageJ分析灰度值,以目标蛋白与内参蛋白条带灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理

采用SPSS21.0软件进行所有实验数据的统计分析,ImagePro Plus对实验图片进行分析,Origin Pro 9.1软件整理生成统计图;计量资料均符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐者多组间比较采用单因素ANOVA方差分析,两组间比较采用LSD法,方差不齐者用Tamhane's T_2 法。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

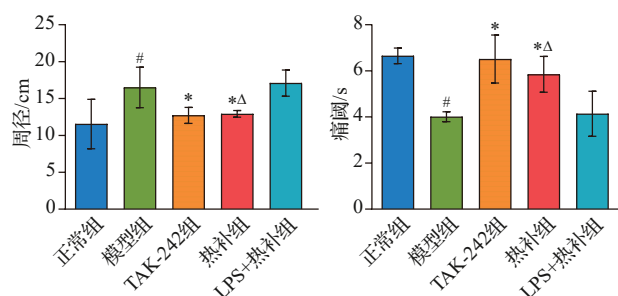
2 结果

2.1 各组家兔膝关节周径、痛阈比较

与正常组比较,模型组家兔膝关节周径显著增加,痛阈降低($P < 0.05$);与模型组比较,TAK-242组、热补组膝关节周径缩小,痛阈升高($P < 0.05$);与LPS+热补组比较,热补组膝关节周径缩小,痛阈升高($P < 0.05$)。见图1。

2.2 各组家兔膝关节滑膜组织病理形态比较

正常组家兔膝关节囊内侧滑膜规整,滑膜细胞层排列整齐,滑膜细胞层下间质内无纤维结缔组织增生、微血管形成及炎性细胞浸润;模型组家兔膝关节囊内侧滑膜表面粗糙,滑膜细胞层显著增生、增厚,细胞层下间质内大量纤维结缔组织增生、



注:LPS为脂多糖,TAK-242为瑞沙托维。与正常组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与LPS+热补组比较,^Δ $P < 0.05$ 。

图1 各组家兔膝关节周径、痛阈比较($\bar{x} \pm s$,6只兔/组)
Fig. 1 Comparison of knee joint circumference and pain threshold of the knee joint of rabbits in the 5 groups ($\bar{x} \pm s$,6 rabbits/group)

微血管形成,大量炎性细胞浸润聚集;TAK-242组及热补组家兔膝关节囊内侧滑膜基本平整,滑膜细胞层轻度增生、增厚,细胞层下轻度间质内纤维结缔组织增生,少量炎性细胞浸润;LPS+热补组家兔膝关节囊内侧滑膜粗糙,滑膜细胞层增生、增厚,滑膜细胞层下间质内纤维结缔组织增生、微血管形成及炎性细胞浸润聚集明显。见图2。

2.3 各组家兔膝关节滑膜组织自噬活性比较

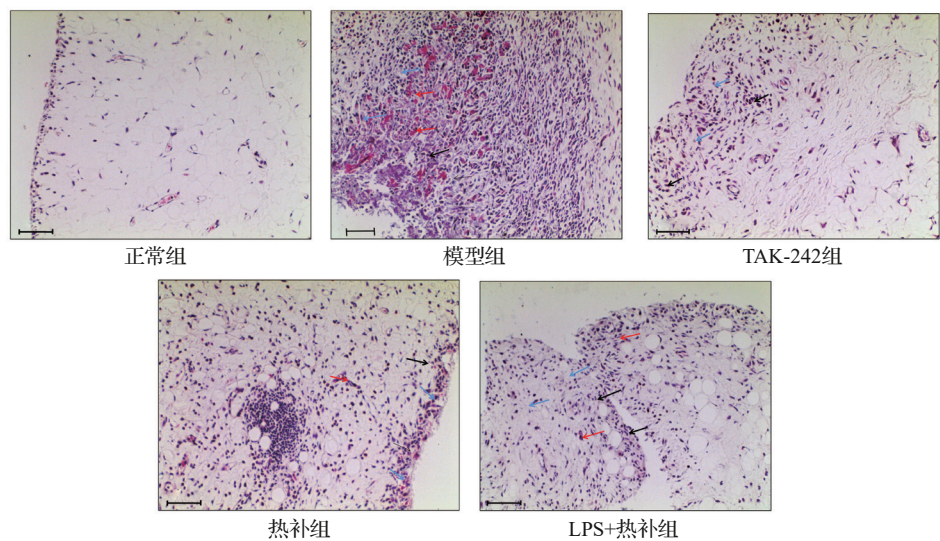
正常组家兔膝关节滑膜线粒体、核糖体、内质网等细胞器形态规整,散在分布着双层膜封闭的圆球状自噬小体、溶酶体及其降解的胞质成分。模型组膝关节滑膜细胞线粒体、核糖体肿胀,胞内少见自噬小体分布。TAK-242组及热补组家兔滑膜细胞内可见吞噬泡及双膜结构的自噬小体,吞噬泡延伸将细胞器揽入双膜闭合结构,自噬小体包裹内质网及延长的线粒体,溶酶体数量增加;LPS+热补组滑膜染色质固缩,散在分布吞噬泡、自噬小体、溶酶体等结构。见图3。

2.4 各组家兔膝关节滑膜组织Atg5、ULK1、LC3 II/I、Beclin-1蛋白相对表达量比较

与正常组比较,模型组家兔膝关节滑膜组织Atg5、ULK1、LC3 II/I、Beclin-1蛋白表达降低($P < 0.05$);与模型组比较,TAK-242组、热补组Atg5、ULK1、LC3 II/I、Beclin-1蛋白表达升高($P < 0.05$);与LPS+热补组比较,热补组Atg5、ULK1、LC3 II/I、Beclin-1蛋白表达升高($P < 0.05$)。见图4。

2.5 各组家兔膝关节滑膜组织TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK蛋白相对表达量比较

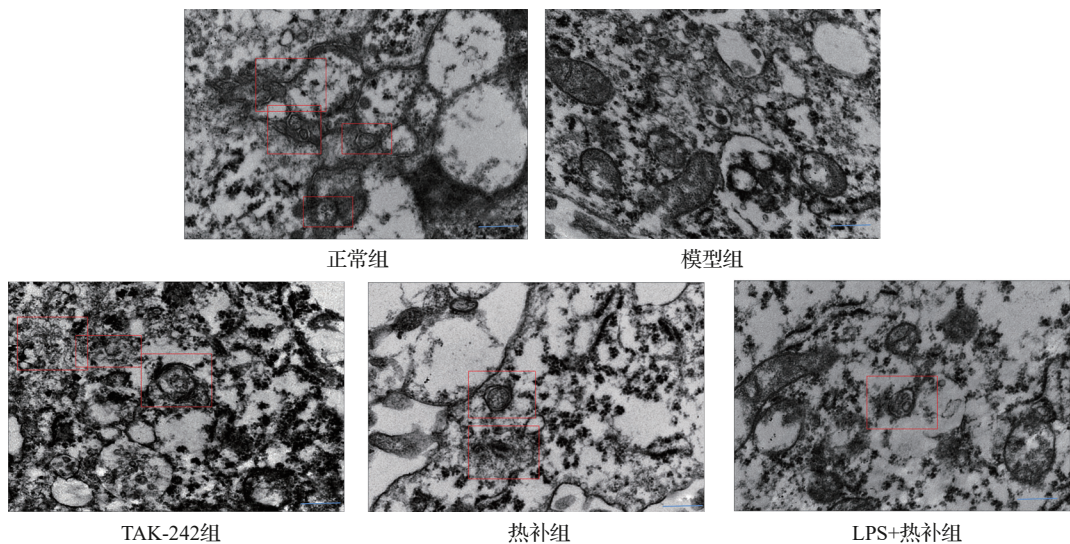
与正常组比较,模型组滑膜组织TLR4、



注:LPS为脂多糖,TAK-242为瑞沙托维。标尺=100 μ m。黑色箭头示炎性细胞浸润,蓝色箭头示滑膜细胞结缔组织,红色箭头示血管。

图2 各组家兔膝关节滑膜组织病理形态学比较(HE染色)

Fig. 2 Comparison of morphology of synovial tissues of the knee joints of rabbits in the 5 groups (HE staining)



注:LPS为脂多糖,TAK-242为瑞沙托维。标尺=500 nm。红色框表示自噬小体和溶酶体结构。

图3 各组家兔膝关节滑膜组织自噬小体及超微形态比较(透射电子显微镜)

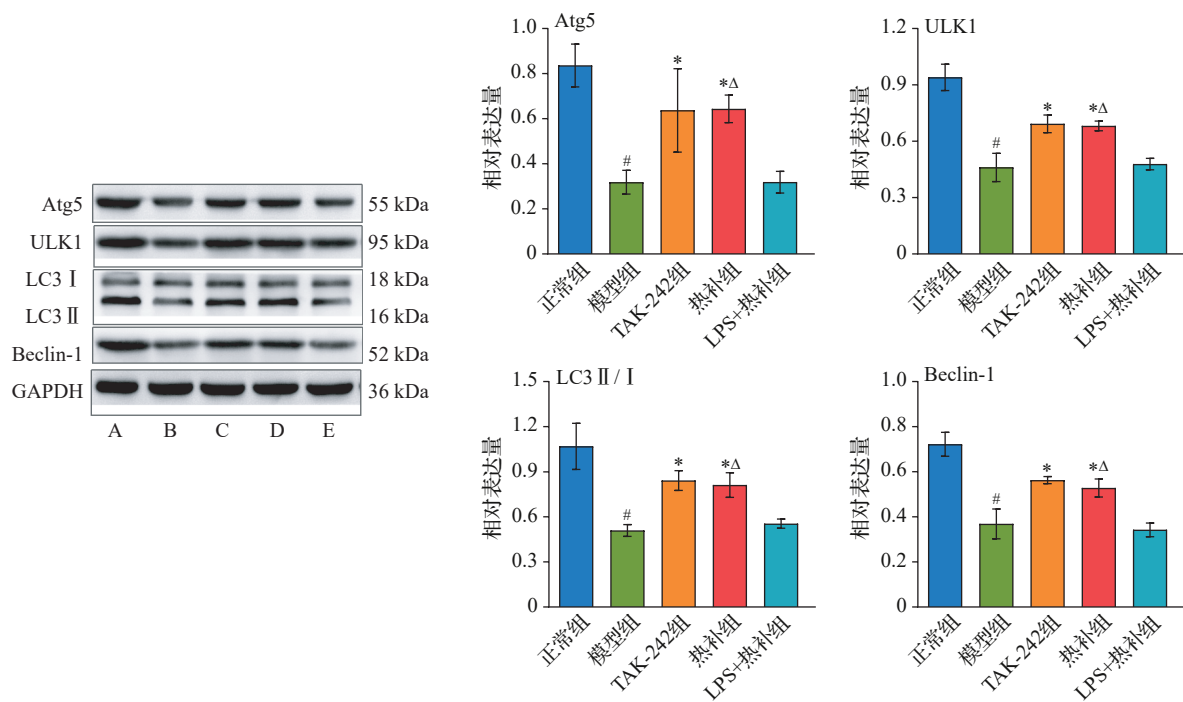
Fig. 3 Comparison of autophagosomes and ultrastructure in synovial tissue of the knee joints of rabbits in the 5 groups (transmission electron microscope)

MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组比较,TAK-242组、热补组TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与LPS+热补组比较,热补组TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK 蛋白表达降低 ($P<0.05$)。见图5。

3 讨论

《素问·阴阳应象大论篇》载“味归形,形归气;

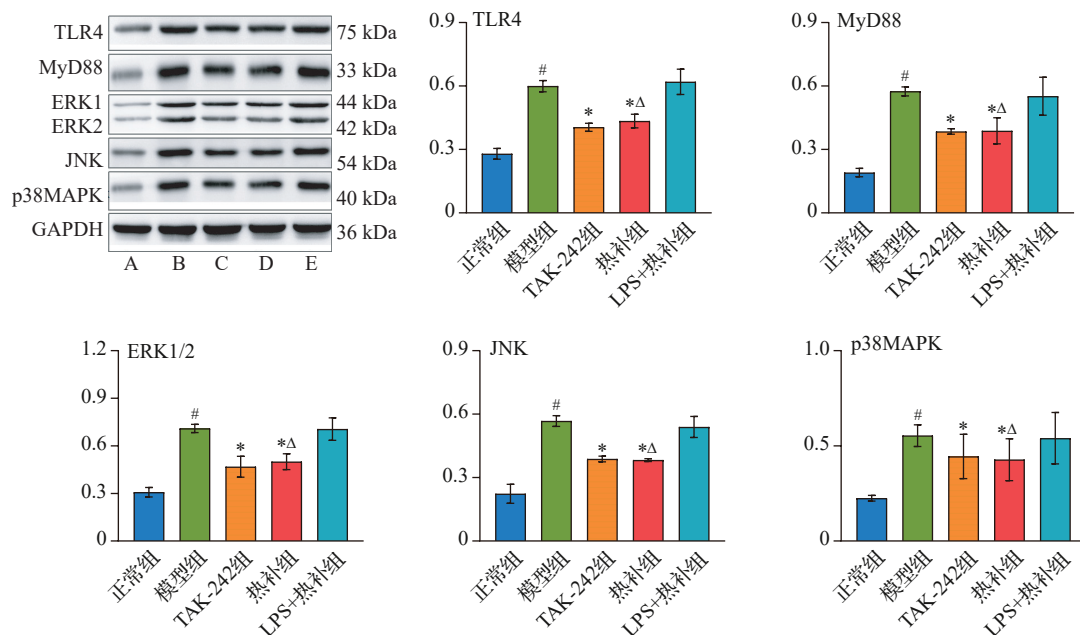
气归精,精归化……化生精,气生形”。中医“精化气”理论与细胞通过自噬途径降解受损细胞器及错误折叠蛋白为细胞提供能量的“自我保护”方式类似。自噬过度时其非选择性降解细胞结构或能量代谢酶,导致机体的“正气”过度消耗,正如《黄帝内经》中所言“精气夺则虚”。风寒湿环境下受损的线粒体、脂质、蛋白质及过氧化损伤物等“寒凝”物质被双层膜结构的自噬小体包裹,类似于中医学“蠲寒”的作用。热补针法是“西北针王”郑魁山教授的



注:LPS为脂多糖,TAK-242为瑞沙托维,Atg5为自噬相关蛋白5,ULK1为Unc-51样自噬激活激酶1,LC3为微管相关蛋白轻链3。A为正常组,B为模型组,C为TAK-242组,D为热补组,E为LPS+热补组。与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与LPS+热补组比较,^Δ $P<0.05$ 。

图4 各组家兔膝关节滑膜组织Atg5、ULK1、LC3II/I、Beclin-1蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$,3只兔/组)

Fig. 4 Comparison of the relative expression levels of Atg5, ULK1, LC3II/I, and Beclin-1 proteins in synovial tissues of the knee joints of rabbits in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rabbits/group)



注:LPS为脂多糖,TAK-242为瑞沙托维,TLR4为Toll样受体4,MyD88为髓样分化因子88,MAPK为丝裂原活化蛋白激酶,ERK1/2为细胞外信号调节激酶1/2,JNK为c-Jun氨基末端激酶。A为正常组,B为模型组,C为TAK-242组,D为热补组,E为LPS+热补组。与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与LPS+热补组比较,^Δ $P<0.05$ 。

图5 各组家兔膝关节滑膜组织TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$,3只兔/组)

Fig. 5 Comparison of the relative expression levels of TLR4, MyD88, ERK1/2, JNK, and p38MAPK proteins in synovial tissues of the knee joints of rabbits in the 5 groups ($\bar{x}\pm s$,3 rabbits/group)

特色针刺手法,既能温补阳气之不足,又能驱散痹阻之风寒、温通凝聚之血脉,对阳虚风寒湿阻型RA临床疗效确切^[17],其内在机制是基于自噬途径的“温阳”与“蠲寒”。足三里为足阳明经合穴、胃之下合穴及四总穴,位于肌肉丰厚的胫骨前缘,适合针刺手法的操作,可增强热补针法的补益效应,研究表明插补法能使足三里穴区局部的微循环血流灌注量明显升高^[18]。

MAPK 信号通路包括 ERK1/2、JNK、p38 MAPK 3个亚型通路,在细胞的增殖分化、氧化应激及炎症反应等多种生理病理过程中发挥重要作用^[19]。活化的 MAPK 信号通路激活抑制性核因子 κ B 蛋白,使其磷酸化并发生核转位,进而促使下游 ERK1/2、JNK、p38MAPK 通路活化,加重 RA 滑膜炎性反应与关节损害^[20]。多酚化合物的抗炎特性与抑制 TLR4/MyD88/MAPK 信号通路,限制 NF- κ B Rel 同源结构域与 JNK 的结合,减少炎症因子分泌相关^[21]。雷公藤抗炎和免疫抑制作用与拮抗 TLR4/MAPK/NF- κ B 通路活性密切相关^[22]。课题组以高通量测序技术检测家兔滑膜组织中差异长链非编码 RNA(lncRNA),结果显示热补针法逆向回调的 lncRNA 表现为细胞周期、MAPK 信号通路和细胞衰老的核心功能聚类^[23]。TAK-242 是小分子量、脂溶性、易穿透细胞膜的乙烯羧酸酯衍生物,一线用药甲氨蝶呤的有效成分,可泛素化结合 TLR4 蛋白的 TIR 结构域^[24]。LPS 是刺激 TLR4 释放关键致炎因子的多糖结构,LPS 诱导 TLR4 C 端白细胞介素 1 受体结构域发生同源二聚化,引发炎症信号胞内转导级联^[25]。因此本课题分别使用 TAK-242 及 LPS 为 TLR4 通路抑制剂及激动剂。结果表明热补针法及 TAK-242 干预后,RA 模型家兔膝关节周径显著缩小,痛阈增高,滑膜细胞层显著增厚,炎性细胞浸润明显,TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK 蛋白表达水平显著降低,提示热补针法具有类似 TLR4 通路抑制剂的作用。而经 LPS+热补针法组干预后,TLR4、MyD88、ERK1/2、JNK、p38MAPK 蛋白表达水平及膝关节周径、痛阈、滑膜病理变化均较单纯热补组回调,说明 LPS 削弱了热补针法对 TLR4 通路的抑制作用。

自噬是真核细胞通过降解错误折叠蛋白、功能异常细胞器为细胞提供能量的方式。滑膜细胞自噬受到多条信号通路的影响,其中 MAPK 信号通路可诱导 mTOR 活化,通过 mTOR-p70S6K 信号轴作用于 p70S6K,作为自噬的负调节因子抑制自噬^[26]。

研究显示活动性溃疡性结肠炎的小鼠模型中,TLR4/MyD88/MAPK 信号通路异常激活,mTOR 磷酸化表达增强,自噬通量降低,TNF- α 、IL- β 、IL-6 表达增加^[6]。TRAF6 作为 mTOR 泛素连接酶,其泛素化调节 TLR4/MyD88/MAPK 是持续激活自噬活性关键一环,前期研究提示热补针法可通过抑制 TRAF6 泛素化水平而起到抑制关节滑膜炎性反应的作用^[27]。动力蛋白相关蛋白 1(Drp1)/线粒体分裂因子(Mff)通路是介导线粒体自噬的关键通路,热补针法可抑制 Drp1/Mff 通路而提高滑膜细胞线粒体质量,而 MAPK 磷酸化酶是介导 Drp1 s616 磷酸化的关键位点^[28]。因此课题组上述研究均指向于热补针法抗炎机制与 MAPK 信号通路调节自噬活性有关。自噬发生发展中,Atg5、ULK1 参与自噬启动过程,Becn-1 参与自噬泡的成熟,LC3 含量与自噬泡数量成正比^[29-30]。因此本课题以 Atg5、ULK1、Becn-1 及 LC3 蛋白表达量反映自噬活性的强弱。结果表明,与模型组比较,TAK-242 组、热补组自噬小体数目增加,Atg5、ULK1、LC3 II / I 及 Becn-1 蛋白表达升高,说明 TAK-242 通过抑制 TLR4/MyD88/MAPK 信号通路而提高滑膜细胞自噬活性,而热补针法与 TAK-242 作用类似。同样地,热补针法增强自噬的作用在应用 LPS 后被回调,证实热补针法通过抑制 TLR4/MyD88/MAPK 信号通路而增强滑膜细胞自噬活性,从而抑制 RA 滑膜炎性反应。另外,坏死性凋亡与自噬吞噬功能密切相关,前期研究显示热补针法可抑制坏死性凋亡蛋白表达^[31],但是否通过 TLR4/MyD88/MAPK 信号通路介导自噬实现,需要进一步的研究证实。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Finckh A, Gilbert B, Hodkinson B, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2022, 18(10): 591-602.
- [2] 曾小峰,朱松林,谭爱春,等.我国类风湿关节炎疾病负担和生存质量研究的系统评价[J].中国循证医学杂志,2013,13(3): 300-307.
Zeng X F, Zhu S L, Tan A C, et al. Disease burden and quality of life of rheumatoid arthritis in China: a systematic review (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2013, 13(3): 300-307.
- [3] 国家皮肤与免疫疾病临床医学研究中心(北京协和医院),中国医师协会风湿免疫专科医师分会,中国康复医学会风湿免疫病康复专业委员会,等.2024 中国类风湿关节炎诊疗指南[J].中华内科杂志,2024,63(11): 1059-1077.
National Clinical Research Center for Dermatologic and

- Immunologic Diseases (Peking Union Medical College Hospital), Rheumatology and Immunology Physicians Branch of Chinese Medical Doctor Association, Rheumatology and Immunology Rehabilitation Professional Committee of Chinese Association of Rehabilitation Medicine, et al. 2024 Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2024, 63(11): 1059-1077.
- [4] Bai X, Fu R Z, Duan Z G, et al. Ginsenoside Rh4 alleviates antibiotic-induced intestinal inflammation by regulating the TLR4-MyD88-MAPK pathway and gut microbiota composition[J]. Food Funct, 2021, 12(7): 2874-2885.
- [5] Lee J P, Foote A, Fan H P, et al. Loss of autophagy enhances MIF/macrophage migration inhibitory factor release by macrophages[J]. Autophagy, 2016, 12(6): 907-916.
- [6] Zhou M X, Xu W M, Wang J Z, et al. Boosting mTOR-dependent autophagy *via* upstream TLR4-MyD88-MAPK signalling and downstream NF- κ B pathway quenches intestinal inflammation and oxidative stress injury [J]. EBioMedicine, 2018, 35: 345-360.
- [7] 苏成红, 杜小正, 方晓丽, 等. 热补针法对类风湿关节炎寒证家兔模型膝关节滑膜组织 TLR4-MyD88-ERK1/2 信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(7): 745-754.
- Su C H, Du X Z, Fang X L, et al. Effect of heat-reinforcing needling on the TLR4-MyD88-ERK1/2 signaling pathway in the synovial tissue of the knee joint of rabbits with rheumatoid arthritis with cold syndrome (in Chinese) [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 45(7): 745-754.
- [8] 苏成红, 杜小正, 方晓丽, 等. 热补针法对类风湿关节炎寒证模型家兔血清炎症因子及膝关节滑膜组织自噬的影响[J]. 针刺研究, 2022, 47(9): 769-777.
- Su C H, D X Z, Fang X L. Effect of heat-reinforcing needling on expression of serum inflammatory factors and autophagy of knee joint synovial tissue in rheumatoid arthritis rabbits with cold syndrome (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2022, 47(9): 769-777.
- [9] Tominaga K, Alstergren P, Kurita H, et al. Clinical course of an antigen induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint [J]. J Oral Pathology Medicine, 1999, 28(6): 268-273.
- [10] 袁博, 王金海, 方晓丽, 等. 家兔类风湿关节炎寒证模型的建立与病理学研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 3117-3120.
- Yuan B, Wang J H, Fang X L, et al. Establishment and pathological study of cold syndrome animal model of rheumatoid arthritis in rabbits (in Chinese)[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2017, 32(7): 3117-3120.
- [11] Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, et al. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules[J]. Mol Pharmacol, 2011, 79(1): 34-41.
- [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 and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(4): 351-352.
- [13] 郭义. 实验针灸学[M]. 4版. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 255-257.
- Guo Y. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. 4th edition. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2016: 255-257.
- [14] 郑魁山. 郑氏针灸全集[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 289-290.
- Zheng K S. Complete works of Zheng's acupuncture (in Chinese) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 289-290.
- [15] Ono Y, Maejima Y, Saito M, et al. TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice[J]. Sci Rep, 2020, 10: 694.
- [16] Tang X M, Liao Z K, Huang Y W, et al. Atractylenolide I protects against lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation by anti-inflammatory and anticoagulation effect[J]. Asian Pac J Trop Med, 2017, 10(6): 582-587.
- [17] 张枫帆, 袁博, 田亮, 等. 热补针法治疗类风湿关节炎临床疗效及对机体氧化应激的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(2): 26-30.
- Zhang F F, Yuan B, Tian L, et al. Clinical efficacy of hot needling acupuncture for rheumatoid arthritis and its effects on oxidative stress (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2019, 26(2): 26-30.
- [18] 李晓梅, 李岩琪, 周丹, 等. 提插补泻对健康人足三里穴皮肤微循环血流灌注量的影响[J]. 针刺研究, 2013, 38(4): 297-300.
- Li X M, Li Y Q, Zhou D, et al. Influence of different acupuncture manipulations at Zusanli (ST 36) on skin microcirculation blood perfusion in healthy subjects (in Chinese)[J]. Acupuncture Research, 2013, 38(4): 297-300.
- [19] Hepworth E M W, Hinton S D. Pseudophosphatases as regulators of MAPK signaling[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12595.
- [20] Li J Y, Sun Q, Zheng C Y, et al. Lipoxin A4-mediated p38 MAPK signaling pathway protects mice against collagen-induced arthritis[J]. Biochem Genet, 2021, 59(1): 346-365.
- [21] Behl T, Upadhyay T, Singh S, et al. Polyphenols targeting MAPK mediated oxidative stress and inflammation in rheumatoid arthritis[J]. Molecules, 2021, 26(21): 6570.
- [22] Xie C M, Jiang J, Liu J P, et al. Triptolide suppresses human synovial cell MH7A cells mobility and maintains redox balance by inhibiting autophagy [J]. Biomed Pharmacother, 2019,

- 115: 108911.
- [23] 杜小正, 刘莉梅, 刘翠, 等. 热补针法对类风湿性关节炎寒证家兔滑膜组织中长链非编码RNA表达谱的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(1): 65-75.
- Du X Z, Liu L M, Liu C, et al. Effect of heat-reinforcing needling on expression profile of LncRNAs in synovial tissues of rabbits with cold-syndrome type rheumatoid arthritis (in Chinese)[J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 65-75.
- [24] 郝喆, 倪娟, 王欢, 等. IL-38抑制LPS/TLR4诱导炎症减轻类风湿性关节炎的机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(11): 1647-1651.
- Hao Z, Ni J, Wang H, et al. Mechanism of IL-38 inhibits LPS/TLR4 induced inflammation in patients with rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2017, 33(11): 1647-1651.
- [25] 张娟, 尚德静. Toll样受体4(TLR4)信号通路及其靶向药物的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(7): 657-662.
- Zhang J, Shang D J. Research progress of TLR4 signaling pathway and its targeted drugs (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2021, 37(7): 657-662.
- [26] Saber T, Veale D J, Balogh E, et al. Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23540.
- [27] 张枫帆, 张小娜, 张星华, 等. 热补针法对类风湿性关节炎寒证家兔膝关节滑膜组织中TRAF6-K63泛素化水平及NF- κ B通路的影响[J]. 针刺研究, 2025, 50(6): 641-648.
- Zhang F F, Zhang X N, Zhang X H, et al. The effect of heat-reinforcing needling on the level of TRAF6-K63 ubiquitination and NF- κ B pathway in the synovial tissue of knee joint in rabbits with rheumatoid arthritis of cold syndrome (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(6): 641-648.
- [28] 井维尧, 许从荟, 刘翠, 等. 热补针法对寒湿证类风湿性关节炎家兔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.
- [29] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al. Tor-mediated induction of autophagy *via* an Apg1 protein kinase complex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(6): 1507-1513.
- [30] Slessareva J E, Routt S M, Temple B, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome[J]. *Cell*, 2006, 126(1): 191-203.
- [31] 刘莉梅, 杜小正, 刘强, 等. 热补针法对类风湿性关节炎寒证家兔膝关节滑膜组织炎症反应及滑膜细胞坏死性凋亡的影响[J]. 针刺研究, 2023, 48(5): 438-445.
- Liu L M, Du X Z, Liu Q, et al. Effect of heat-reinforcing needling on the inflammation and necrotizing apoptosis of synovial cells in synovial tissues of knee joint in rabbits with cold syndrome rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(5): 438-445.

收稿日期:2026-01-11 修回日期:2026-03-08