

基于慢病毒介导的NLRP3过表达对艾灸调控实验性RA家兔关节滑膜液anti-CCP、RF水平的影响*

杨馨¹, 王焱², 杨慎峭¹, 马文彬², 吴菲³, 席东来², 路晓清¹,
陈俊¹, 周海燕^{2**}

(1. 成都中医药大学养生康复学院 成都 610075; 2. 成都中医药大学针灸推拿学院 成都 610075;
3. 成都中医药大学外语学院 成都 610075)

摘要:目的 观察艾灸对实验性类风湿性关节炎(RA)家兔的抗炎消肿作用,通过在RA家兔实验模型过表达由慢病毒载体介导的NOD样受体相关蛋白3(NLRP3),研究艾灸对其膝关节滑膜液中抗环瓜氨酸多肽抗体(anti-CCP)、类风湿因子(RF)、白细胞介素-18(IL-18)含量的影响及其NLRP3调控机制。方法 日本大耳白兔30只,随机分为空白组、模型组、艾灸组、NLRP3过表达组、NLRP3阴性对照组,每组各6只动物。福氏完全佐剂(FCA)平均注入家兔双膝关节腔(0.5 mL·kg⁻¹)。RA模型塑造后第3天及治疗后第10天,将NLRP3过表达慢病毒载体(Lv-NLRP3-GFP)10 μL注入NLRP3过表达组兔双后膝关节腔,NLRP3阴性对照组家兔同法注入等量携带GFP的慢病毒载体(LvGFP)作对照。艾柱灸艾灸各组家兔双侧“肾俞”、“足三里”穴(5壮/穴/天,6天1疗程,疗程间间隔1天,3个疗程)。治疗后观测各家兔左、右后膝关节周长,ELISA法检测关节滑膜液中anti-CCP、RF、IL-18的含量。结果 与空白组比较,模型组左、右膝关节周长增大,膝关节滑膜液anti-CCP、RF、IL-18含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,艾灸组左、右膝关节周长缩小,膝关节滑膜液anti-CCP、RF、IL-18含量显著降低($P<0.01$);与艾灸组相比,NLRP3过表达组左、右膝关节周长增大($P<0.05$),膝关节滑膜液anti-CCP、RF、IL-18含量升高($P<0.05$)。结论 艾灸对实验性RA家兔具有抗炎效应,艾灸“肾俞”、“足三里”穴可显著降低RA家兔膝关节滑膜液中免疫效应因子anti-CCP、RF以及炎性细胞因子IL-18的含量,在NLRP3过表达的情况下其作用显著降低,提示艾灸抑制实验性RA家兔异常免疫功能,从而实现其抗炎调节作用可能与NLRP3的表达情况有密切关联。

关键词: 艾灸 类风湿性关节炎 NLRP3 anti-CCP RF

doi: 10.11842/wst.20220727003 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是有关节滑膜持续慢性炎症、进行性软骨和骨破坏、自身抗体产生为特征的自身免疫性疾病^[1],炎症就是剧烈免疫反应的结果。现代研究证实,机体的固有免疫和

适应性免疫均在RA发病中起着重要作用^[2]。RA是一种严重的慢性疾病,发病率在0.4%~1.3%之间^[3]。在RA中,持续性滑膜炎症的存在最终导致肌腱、关节囊、软骨和骨出现进行性和不可逆性破坏以及功能障

收稿日期:2022-07-27

修回日期:2023-02-13

* 国家自然科学基金委员会面上项目(81774435):艾灸治疗RA的NLRP3炎症小体“免疫-炎症”分子信号调控机制研究,负责人:杨馨;国家自然科学基金委员会青年项目(81001555):艾灸调控RA家兔滑膜细胞功能的JAK-STAT信号通路负反馈机制研究,负责人:杨馨;国家自然科学基金委员会面上项目(81973959):艾灸“扶正祛邪”治疗类风湿关节炎“正邪相争”的巨噬细胞M1/M2极化免疫机制研究,负责人:周海燕。

** 通讯作者:周海燕,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向:针灸治疗神经免疫性疾病的基础研究。

碍^[4]。艾灸作为一种无明显毒副作用的中医外治法,被广泛用于RA的治疗并取得较好的临床效果^[5-8]。NOD样受体相关蛋白3(NOD-like receptor associated protein 3, NLRP3)炎症小体是先天性免疫的主要组成,而抗环瓜氨酸多肽抗体(anti-cyclic citrulline peptide, anti-CCP)和类风湿因子(Rheumatoid factor, RF)的产生是RA自身免疫失常的特征之一^[9];NLRP3作为炎性细胞因子的触发器,与其下游的白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)的活化与释放相关,而IL-18对RA的发生发展具有全局性的影响。我们的前期研究已经证实艾灸能够抑制NLRP3 mRNA的表达和炎性细胞因子的释放,从而减轻滑膜的炎症。因此,鉴于NLRP3炎症小体在“炎症-免疫”反应中的纽带作用,在人体先天性免疫中的关键调节作用,本实验通过慢病毒载体来介导NLRP3在实验性RA家兔体内的过表达,居于艾灸的抗炎效应,观察其对膝关节滑膜免疫效应因子anti-CCP、RF,炎性细胞因子IL-18含量的影响,讨论NLRP3在艾灸调整RA免疫,实现其抗炎效应中的作用,探索艾灸对实验性RA异常免疫功能的影响,进一步探讨其NLRP3调控机制。

1 实验材料与实验方法

1.1 实验动物

1.1.1 动物

日本大耳白兔30只,2.0 kg≤体质量≤3 kg,雌雄各半,成都中医药大学实验动物研究中心(许可证编号:SYXK(川)2019-049)提供。动物于实验前进行适应性驯养,时长为1周。普通动物饲养条件。

1.1.2 分组

原则:按体质量、性别分层,30只家兔随机分为空白对照组(简称空白组)、RA模型组(简称模型组)、艾灸治疗组(简称艾灸组)、艾灸+NLRP3过表达组(简称NLRP3过表达组)、艾灸+NLRP3阴性对照组(简称NLRP3阴性对照组),6只/组。

1.1.3 动物处置

遵循《关于善待实验动物的指导性意见》(国科发财字[2006]398号);成都中医药大学实验动物研究中心批准,伦理审核申请备案编号为2018-22。

1.2 主要试剂药品及仪器

1.2.1 试剂

①福氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant,

FCA),美国Sigma公司,批号:F5881;②NLRP3过表达慢病毒载体LV-NLRP3(22143-1):2E+8TU·mL⁻¹,上海吉凯基因公司,批号:GCD0220715;③Rabbit CCP-Ab ELISA KIT/Rabbit RF ELISA KIT/Rabbit IL-18 ELISA KIT,上海茁彩生物科技有限公司,批号:ZC-54615/ZC-54611/ZC-52384。

1.2.2 药品

小艾柱(4×10 mm),济南欧脉医疗器械有限公司,批号:09000314471。

1.2.3 仪器

①SpectraMAX Plus384酶标仪,美谷分子仪器有限公司;②UPH-II-10T优普超纯水制造系统,成都超纯科技有限公司;③移液枪,大龙兴创实验仪器(北京)有限公司;④枪头,美国Axygen公司;⑤EP管,美国Axygen公司;⑥软皮尺,精度:1MM。

1.3 造模方法

1.3.1 RA模型塑造

模型组、艾灸组、NLRP3过表达组、NLRP3阴性对照组各家兔双后腿膝关节剃毛、消毒后,将FCA平均注入兔双膝关节腔内(0.5 mL·kg⁻¹,穿刺点:髌骨下缘、腓韧带外侧凹陷),空白组同法注入等量无菌生理盐水作对照。该模型为实验性RA的经典模型^[10],课题组在既往研究中反复多次塑造获得成功,并观察到实验性RA动物模型在造模后滑膜组织发生明显的炎性反应。

1.3.2 慢病毒介导NLRP3炎症小体过表达模型塑造

在体操作之前,先进行感染效率验证(体外分离、培养兔滑膜细胞并转导NLRP3过表达慢病毒载体Lv-NLRP3-GFP,Western blot和RT-PCR检测NLRP3蛋白及mRNA表达情况-由上海吉凯基因化学技术有限公司完成)。根据文献^[11],造模后第3天和开始治疗后第10天共进行两次NLRP3过表达慢病毒载体在体操作,应用微量注射器将NLRP3过表达慢病毒载体溶液0.34 mL(Lv-NLRP3-GFP(滴度5.0×10¹¹TU·mL⁻¹)10 μL+生理盐水)平均注入NLRP3过表达组兔双后膝关节腔内,在关节处用手轻揉5 min,帮助注入慢病毒的扩散。LvGFP同法等量注入NLRP3阴性对照组作对照,无菌生理盐水同法等量注入空白组、模型组、艾灸组作对照。

1.4 治疗方法

造模后第7天,用兔架固定艾灸组、NLRP3过表达组、NLRP3阴性对照组家兔,小艾柱灸双侧“肾俞”、“足三里”(定位:《实验针灸学》^[12])穴各五壮/1次/日

表1 各组家兔左后膝关节周长比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	造模前(cm)	治疗后第6天(cm)	治疗后第12天(cm)	治疗后第18天(cm)	治疗后第21天(cm)
空白对照组	9.870±0.216	9.960±0.232	10.010±0.166	10.020±0.199	9.990±0.145
RA模型组	9.830±0.206	10.960±0.288 [*]	10.970±0.258 [*]	11.100±0.249 [*]	10.910±0.160 [*]
艾灸治疗组	9.913±0.146	10.300±0.107 [♦]	10.263±0.200 [♦]	10.100±0.131 [♦]	10.025±0.175 [♦]
NLRP3过表达组	10.000±0.245	10.811±0.136 [▼]	10.767±0.16 [▼]	10.544±0.230 [▼]	10.333±0.166 [▼]
NLRP3过表达阴性组	9.900±0.200	10.330±0.164	10.050±0.127	10.060±0.212	10.040±0.217

表2 各组家兔右后膝关节周长比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	造模前(cm)	治疗后第6天(cm)	治疗后第12天(cm)	治疗后第18天(cm)	治疗后第21天(cm)
空白对照组	9.990±0.173	9.920±0.193	9.990±0.223	10.030±0.164	10.070±0.125
RA模型组	9.930±0.183	11.050±0.259 [*]	11.070±0.245 [*]	11.370±0.221 [*]	11.210±0.179 [*]
艾灸治疗组	9.925±0.191	10.263±0.160 [♦]	10.250±0.160 [♦]	10.163±0.119 [♦]	10.013±0.113 [♦]
NLRP3过表达组	9.989±0.242	10.800±0.166 [▼]	10.767±0.1942 [▼]	10.511±0.169 [▼]	10.311±0.190 [▼]
NLRP3过表达阴性组	9.860±0.178	10.320±0.175	10.050±0.143	10.100±0.194	10.010±0.202

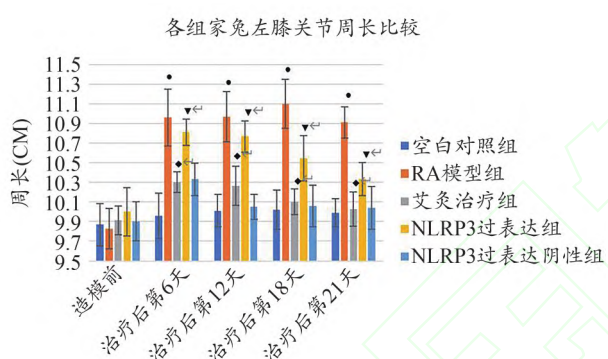


图1 各组家兔在造模前及治疗后各个时间段左膝关节周长变化图

注:与空白组相比, $P<0.01$;与模型组相比, $♦P<0.01$;与艾灸组相比, $▼P<0.01$ 。

(治疗穴位部位剃毛 $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$), 6天为1个疗程, 总共3疗程, 每疗程之间停1天。空白组和模型组动物同法固定作参照。

1.5 指标及检测方法

1.5.1 膝关节周长测定

测定各组家兔后腿左、右膝关节周长(时间节点:造模前, 治疗后第6、12、18、21天)。

1.5.2 滑膜液抽取

实验结束后, 耳缘静脉空气注射处死实验动物, 同法取双侧滑膜液: 膝关节腔注入 1 mL 生理盐水(轻微活动膝关节混匀滑膜液)并回抽 0.4 mL 注入 Eppendorf管, -80°C 保存备用。

1.5.3 anti-CCP、RF、IL-18 检测操作

将 CCP-Ab、RF、IL-18 抗体包被于微孔板中, 制成固相载体后, 进行加样、配液、洗涤、显色、终止, 最

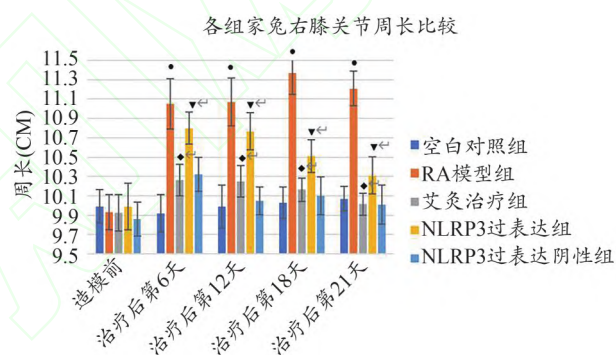


图2 各组家兔在造模前及治疗后各个时间段右膝关节周长变化图

注:与空白组相比, $P<0.01$;与模型组相比, $♦P<0.01$;与艾灸组相比, $▼P<0.01$ 。

表3 基于NLRP3过表达的艾灸对实验性RA家兔滑膜液 anti-CCP 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	anti-CCP($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白对照组	8.898±3.000
RA模型组	14.370±2.837 [*]
艾灸治疗组	9.897±2.223 [♦]
NLRP3过表达组	13.793±3.170 [▼]
NLRP3阴性对照组	9.395±1.786

后用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD值), 计算样品浓度。

1.6 统计学处理

统计分析采用 SPSS 19.0 软件。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间采用单因素方差分析, 方差齐, 选用 LSD 检验; 方差不齐, 选用 Tamhane's T2 检验。统计学意义标准: $P<0.05$ 为有差异。

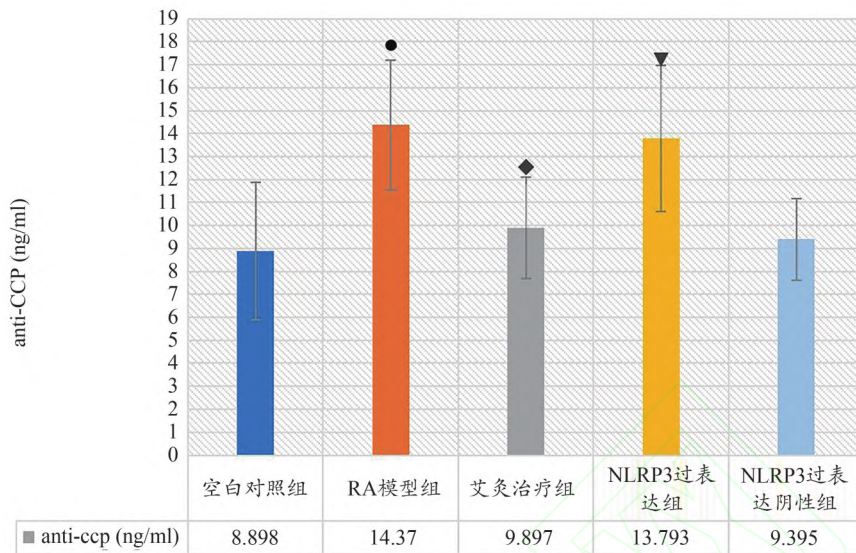


图3 基于NLRP3过表达的艾灸对实验性RA家兔滑膜液anti-CCP水平的影响

注:与空白组相比, $P < 0.01$;与模型组相比, $\blacklozenge P < 0.01$;与艾灸组相比, $\blacktriangledown P < 0.01$ 。

表4 基于NLRP3过表达的艾灸对实验性RA家兔滑膜液RF含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	RF (ng·mL ⁻¹)
空白对照组	0.322±0.122
RA模型组	0.587±0.108
艾灸治疗组	0.320±0.115 \blacklozenge
NLRP3过表达组	0.662±0.152 \blacktriangledown
NLRP3过表达阴性组	0.495±0.091

2 结果

2.1 艾灸对实验性RA家兔膝关节周长的影响

结果参照表1、表2及图1、图2。根据结果可以看出,各组家兔左、右后膝关节周长在造模前无明显差异 ($P > 0.05$),提示各组实验动物可以进行比较;模型组较空白组家兔左、右后膝关节周长在治疗后第6、12、18、21天均显著增长 ($P < 0.01$),炎症反应持续存在,提示实验性RA模型塑造成功;艾灸组较模型组在治疗后第6、12、18、21天测得左、右后膝关节周长明显下降 ($P < 0.01$);NLRP3过表达组较艾灸组在治疗后第6、12、18、21天测得左、右后膝关节周长明显增长 ($P < 0.05$),NLRP3过表达阴性组较艾灸组在治疗后各个时间点左、右膝关节周长无明显差异 ($P > 0.05$),提示仅有空病毒注射不会对实验动物产生影响,慢病毒介导的NLRP3在体过表达塑造成功,在NLRP3炎症小体过表达的情况下,艾灸治疗RA的抗炎消肿作用有明显抑制。

2.2 艾灸对实验性RA家兔滑膜液anti-CCP含量的影响

结果见表3及图3。根据结果可以看出,模型组较空白组 anti-CCP 含量明显升高 ($P < 0.01$);艾灸组较模型组 anti-CCP 含量明显降低 ($P < 0.01$),NLRP3 过表达组较艾灸组 anti-CCP 明显升高 ($P < 0.05$);提示通过艾灸治疗可降低RA家兔双侧膝关节滑膜液中 anti-CCP 的含量,但在NLRP3过表达的情况下其作用明显降低;与艾灸组比较,NLRP3过表达阴性组 anti-CCP 含量无明显差异 ($P > 0.05$),提示仅有空病毒注射不会对实验动物产生影响,慢病毒介导的NLRP3在体过表达塑造成功。

2.3 艾灸对实验性RA家兔滑膜液RF含量的影响

结果见表4及图4。根据结果可以看出,模型组较空白组 RF 含量明显升高 ($P < 0.01$);艾灸组较模型组 RF 含量明显降低 ($P < 0.01$),NLRP3过表达组较艾灸组 RF 含量明显升高 ($P < 0.01$),提示通过艾灸治疗可降低RA家兔双侧膝关节滑膜液中RF的含量,但在NLRP3过表达的情况下其作用明显降低;与艾灸组比较,NLRP3过表达阴性组 RF 含量无明显差异 ($P > 0.05$),提示仅有空病毒注射不会对实验动物产生影响,慢病毒介导的NLRP3在体过表达塑造成功。

2.4 艾灸对实验性RA家兔IL-18含量的影响

结果见表5及图5。根据结果可以看出,模型组较空白组 IL-18 含量明显升高 ($P < 0.01$);艾灸组较模型组 IL-18 含量明显降低 ($P < 0.01$),NLRP3 过表达组较

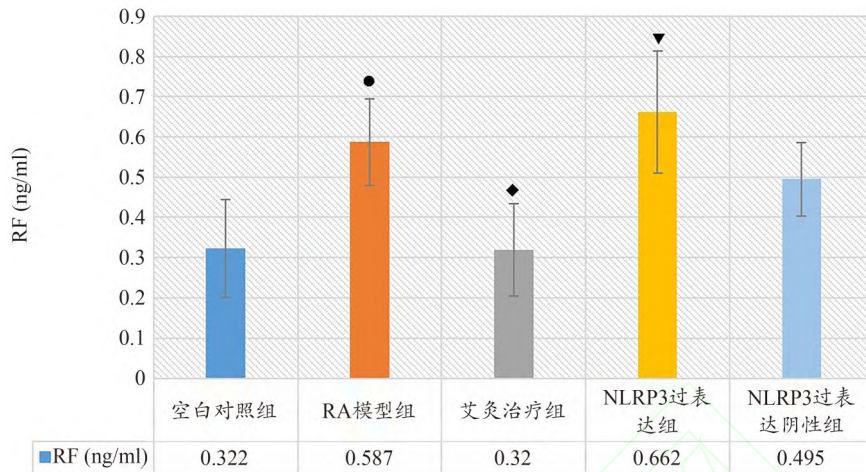


图4 基于NLRP3过表达的艾灸对实验性RA家兔滑膜液RF水平的影响

注:与空白组相比, $P<0.01$;与模型组相比, $\blacklozenge P<0.01$;与艾灸组相比, $\blacktriangledown P<0.01$ 。

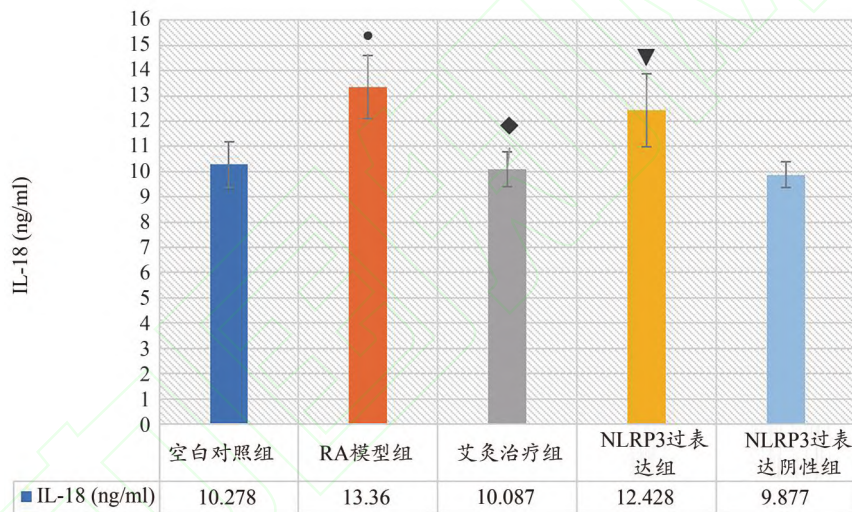


图5 基于NLRP3过表达的艾灸治疗对实验性RA家兔滑膜液IL-18含量的影响

注:与空白组相比, $P<0.01$;与模型组相比, $\blacklozenge P<0.01$;与艾灸组相比, $\blacktriangledown P<0.01$ 。

表5 基于NLRP3过表达的艾灸治疗对实验性RA家兔滑膜液IL-18含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	IL-18($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白对照组	10.278 \pm 0.899
RA模型组	13.360 \pm 1.246
艾灸治疗组	10.087 \pm 0.683 \blacklozenge
NLRP3过表达组	12.428 \pm 1.440 \blacktriangledown
NLRP3过表达阴性组	9.877 \pm 0.502

艾灸组IL-18含量明显升高($P<0.01$),提示通过艾灸治疗可降低RA家兔双侧膝关节滑膜液中IL-18的含量,但在NLRP3过表达的情况下其作用明显降低;与艾灸组比较,NLRP3过表达阴性组IL-18含量无显著差异($P>0.05$),与艾灸组比较,NLRP3过表达阴性组

IL-18含量无明显差异($P>0.05$),提示仅有空病毒注射不会对实验动物产生影响,慢病毒介导的NLRP3在体过表达塑造成功。

3 讨论

免疫反应与炎症在组织、细胞、分子信号水平关系密切,适度的免疫反应对机体有利,但过度的免疫反应却会对机体产生伤害,导致机体内环境的稳态被破坏而致病^[13],免疫功能失调就是RA发病的主要原因。NLRP3炎症小体是机体先天性免疫系统的关键调节者,是调控炎症细胞因子产生的最主要途径^[14-15],近来研究发现,先天性免疫失调会促使大量炎症细胞

因子的释放^[16],而炎性细胞因子的分泌在NLRP3相关通路传导受抑制的情况下可有效减少,RA的发展进程得到控制^[17-18]。NLRP3作为炎症小体的主要组成部分,能识别体内多种危险信号,通过结合ASC,形成具有促炎活性的Caspase-1,进而诱导IL-18的生成引起炎症反应,在机体免疫炎症中发挥关键作用^[19]。IL-18是NLRP3炎症小体的下游效应分子,在RA的发病过程中十分关键,对RA的发生具有全局性影响,能诱导其它炎症因子、黏附分子及炎症介质的分泌与合成^[20-21]。

研究表明NLRP3与RF等自身抗体具有显著相关性^[22]。anti-CCP、RF等免疫分子的异常增多与RA的发生发展密切相关^[23]。基于anti-CCP在RA中的高度特异性^[24-25],RF在RA中的高度敏感性,2010年ACR和欧洲抗风湿联盟(European League Against Rheumatism, EULAR)制定的新RA分类标准增加了anti-CCP指标^[26]。以往anti-CCP、RF等联测模式多用于提高诊断^[27-30]的准确性,实际上,anti-CCP、RF的量化能够敏感地反映RA免疫反应的程度:RF含量与自身免疫反应剧烈程度呈现正相关,随病情发展增加^[31],与病情处于活动期、病程长有关,剧烈的免疫反应会加快炎症的进程。当病情得到控制后,RF滴度降低,其含量变化对判断RA预后具有重要意义。另外,滑膜液中的RF还会与变性IgG结合,形成中等大小的免疫复合物后沉积于关节滑膜,从而导致慢性、免疫炎症性损伤;anti-CCP是RA的临床监测指标,与RA的活动性、病情严重程度及病情发展有关,用于判断RA疾病活动程度及骨侵蚀严重程度^[32-34]。

RA发病之根本所在,是标实的同时寓有本虚,先

天禀赋不足,肾精亏虚。因此,温肾固本,通经活络,扶正以祛邪是类风湿性关节炎的治疗之根^[35-36]。艾灸之法,温经散寒、扶正祛邪、调理阴阳,因此常用于各种经脉痹阻、阳气不足所致之症。本实验选穴足三里、肾俞,分别为胃经下合穴与肾之背俞穴,具有调理脾胃、调理先天之本、振奋正气之效。二者配伍,后天补先天,先天生后天,使阳气内生,匡扶正气。临床研究、系统性评价业已证实艾灸具有较好的临床治疗效果^[5-8]及循证医学证据^[37]支持。我们的前期研究表明艾灸对实验性RA具有明确的抗炎效应和免疫调整作用,且能够良性调整引发持续性滑膜炎的炎性细胞因子的分泌及其信号传导通路^[38-45]。结合本次实验结果,提示艾灸可降低家兔双侧膝关节肿胀程度及滑膜液中免疫效应因子anti-CCP、RF,促炎性细胞因子IL-18的含量,在NLRP3过表达的情况下其作用显著降低,说明艾灸可能通过有效调控实验性RA家兔关节滑膜液中anti-CCP、RF、IL-18的含量来实现抑制实验性RA家兔异常免疫反应,从而实现其抗炎调节作用,而这一作用的实现可能与NLRP3表达情况有密切关联。本实验结果也印证了“炎症就是剧烈免疫反应的结果”。近年来,随着医学的发展和进步,已基本明确了NLRP3的结构,但是NLRP3是如何启动、激活、调控的,尤其在RA中,尚处于探索研究阶段。RA是一个以自身免疫抗体产生为特征的自身免疫性疾病,作为免疫与炎症的纽带,以NLRP3为切入点,艾灸-NLRP3-anti-CCP/RF-IL-18为研究主线,有望在艾灸治疗RA的研究领域取得新进展,可以为临床探索RA的治疗提供新思路,为艾灸治疗RA提供实验依据。

参考文献

- Guo C, Fu R, Wang S, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, 2018, 194(2):231-243.
- Firestein G S, Budd R C, Gabriel S E, et al. *kelly and Firestein's text book of Rheumatology*. 10/E, Singapore, Elsevier Inc, 2017:1115-1166.
- Littlejohn E A, Monrad S U. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. *Prim Care*, 2018, 45(2):237-255.
- Mor A, Abramson S B, Pillinger M H. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: A key player in inflammation and joint destruction. *Clin Immunol*, 2005, 115(2):118-128.
- 朱艳,俞红五,潘喻珍,等. 艾灸强壮穴治疗类风湿关节炎. 长春中医药大学学报, 2020, 36(1):99-102.
- 邓凯峰,宁恒,李雪,等. 艾灸与西药治疗类风湿性关节炎临床疗效及炎症标志物水平比较的Meta分析. 针灸临床杂志, 2020, 36(12):48-53.
- Lin B B. Clinical observation of warm needling moxibustion for rheumatoid arthritis. *J Acupunct Tuina Sci*, 2015, 13(2):121-124.
- 王嘉琳. 通脉温阳灸治疗类风湿性关节炎的临床研究. 合肥:安徽中医药大学硕士学位论文, 2019.
- Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2010, 376(9746):1094-1108.
- 陈奇. 中药药理实验方法. 北京:人民卫生, 1994:68.

- 11 Tang Q, Hao L, Peng Y X, *et al.* RNAi silencing of IL-1 β and TNF- α in the treatment of post-traumatic arthritis in rabbits. *Chem Biol Drug Des*, 2015, 86(6):1466-1470.
- 12 李忠仁. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2003:314-316.
- 13 Barabas A Z, Cole C D, Graeff R M, *et al.* The role of autoimmunologists in investigating and treating autoimmune disorders. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(3):166-170.
- 14 Shin J I, Lee K H, Joo Y H, *et al.* Inflammasomes and autoimmune and rheumatic diseases: A comprehensive review. *J Autoimmun*, 2019, 103: 102299.
- 15 Jo E K, Kim J K, Shin D M, *et al.* Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(2): 148-159.
- 16 Yin H, Liu N, Sigdel K R, *et al.* Role of NLRP3 inflammasome in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*, 2022, 13:931690.
- 17 Liu PW, Wang J, Wen W, *et al.* Cinnamaldehyde suppresses NLRP3 derived IL-1 β via activating succinate/HIF-1 in rheumatoid arthritis rats. *Inter Immunopharmacol*, 2020, 84:106570.
- 18 Wang M L, Li H Y, Wang Y F, *et al.* Anti-rheumatic properties of gentiopicroside are associated with suppression of ROS-NF- κ B-NLRP3 axis in fibroblast-like synoviocytes and NF- κ B pathway in adjuvant-induced arthritis. *Front Pharmacol*, 2020, 11:515.
- 19 Li Z, Guo J L, Bi L Q. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130:110542.
- 20 Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20):10922.
- 21 谢廷良, 王向真, 任梓润, 等. IL-18在类风湿性关节炎疾病中的研究进展. *海峡药学*, 2021, 33(9):1-3.
- 22 赵紫琴, 徐瑾, 王瑞琳, 等. 类风湿性关节炎滑膜组织中NLRP3炎性小体及下游因子IL-1 β /IL-18的表达及意义. *临床与实验病理学杂志*, 2019, 35(5):534-538.
- 23 Humphreys J H, van Nies J A B, Chipping J, *et al.* Rheumatoid factor and anti-citrullinated protein antibody positivity, but not level, are associated with increased mortality in patients with rheumatoid arthritis: Results from two large independent cohorts. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(6):483.
- 24 郑智琴, 施加才. 抗环瓜氨酸多肽抗体及血清类风湿因子联合检测应用于类风湿关节炎的价值. *中国临床医生杂志*, 2022, 50(8): 923-925.
- 25 Ramos K C, Pilar M D, Macías C. Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection. *Talanta*, 2021, 224:121801.
- 26 罗采南, 李正芳, 武丽君, 等. 类风湿关节炎不同分类标准的多中心临床比较. *北京大学学报(医学版)*, 2020, 52(5):897-901.
- 27 张岳汉, 黄林燕, 钟志辉, 等. 超敏C反应蛋白、类风湿因子、抗环瓜氨酸肽抗体联合血清淀粉样蛋白A检测在类风湿性关节炎诊断中的应用价值. *中国医学工程*, 2020, 28(5):9-11.
- 28 曲丹丹, 吴佳南. 抗环瓜氨酸肽抗体、类风湿因子和免疫球蛋白联合诊断在早期类风湿性关节炎诊断中的应用价值. *中国民康医学*, 2020, 32(7):8-10.
- 29 徐士荣, 徐骏, 徐红珍, 等. RF、抗CCP抗体、抗AKA及CRP联合检测在类风湿关节炎诊断中的应用价值. *检验医学与临床*, 2020, 17(2):199-201.
- 30 Bugatti S, Bogliolo L, Vitolo B, *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies and high levels of rheumatoid factor are associated with systemic bone loss in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1):226.
- 31 Reyes-Pérez I V, Sánchez-Hernández P E, Muñoz-Valle J F, *et al.* Cytokines (IL-15, IL-21, and IFN- γ) in rheumatoid arthritis: Association with positivity to autoantibodies (RF, anti-CCP, anti-MCV, and anti-PADI4) and clinical activity. *Clin Rheumatol*, 2019, 38(11):3061-3071.
- 32 武幸福, 张云燕, 安园. 风湿病的现代检验诊断与临床. 合肥: 安徽大学出版社, 2018:102.
- 33 陈顺乐, 邹和建. 风湿内科学. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 32-33.
- 34 兰培敏. 现代风湿病的诊断治疗进展. 长春: 吉林科学技术出版社, 2019:54.
- 35 周学平. 中医药治疗类风湿关节炎的思路与方法. *新中医*, 2001, 33(1):526.
- 36 刘健, 郑志坚. 类风湿性关节炎中西医结合治疗. 北京: 人民卫生出版社, 2005:78.
- 37 Sun Z L, Xu X, Du S Z, *et al.* Moxibustion for treating rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Integr Med*, 2014, 6(6):621-630.
- 38 杨馨, 刘旭光, 杨慎峭, 等. 艾灸调控实验性RA基因干扰家兔滑膜细胞分泌功能的研究. *时珍国医国药*, 2015, 26(4):1005-1007.
- 39 杨馨, 刘旭光, 杨涵棋, 等. 基于慢病毒介导的SOCS1、PIAS1、PTPN22干扰对艾灸调控实验性RA家兔关节滑膜液EGF、FGF水平的影响. *中华中医药学刊*, 2015, 33(4):816-819.
- 40 王焱, 杨馨, 刘华辉, 等. 基于NLRP3炎症小体的艾灸对实验性RA家兔血清MMPs影响的研究. *时珍国医国药*, 2020, 31(10):2553-2556.
- 41 杨馨, 刘旭光, 王月, 等. 艾灸对类风湿性关节炎家兔滑膜细胞JAK-STAT通路负反馈调节家族细胞因子信号抑制因子的影响. *针刺研究*, 2013, 38(2):129-133.
- 42 杨馨. 艾灸调控RA滑膜细胞功能的JAK-STAT信号通路负反馈机制研究. 成都: 成都中医药大学博士学位论文, 2014.
- 43 席东来, 杨慎峭, 周海燕, 等. 基于慢病毒介导的NLRP3过表达对艾灸调控实验性RA家兔关节滑膜组织ASC、Caspase-1水平的影响. *时珍国医国药*, 2022, 33(4):992-996.
- 44 陈俊, 刘华辉, 路晓清, 等. 艾灸对实验性类风湿性关节炎家兔滑膜组织NLRP3炎性小体激活因素Cathepsin-B、ROS水平的影响. *中华中医药学刊*, 2022, 40(9):152-157.
- 45 王焱. 基于NLRP3炎症小体的艾灸治疗RA调整“免疫-炎症”状态的研究. 成都: 成都中医药大学硕士学位论文, 2021.

Study on the Effect of lentivirus-Mediated NLRP3 Overexpression on Levels of Anti-CCP and RF in Synovial Fluid of Experimental RA Rabbits Regulated by Moxibustion

Yang Xin¹, Wang Yi², Yang Shenqiao¹, Ma Wenbin², Wu Fei³, Xi Donglai², Lu Xiaoqing¹,
Chen Jun¹, Zhou Haiyan²

(1. College of Health Preservation and Rehabilitation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 2. College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 3. College of Foreign Languages, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

Abstract: Objective Observation of the anti-inflammatory and detumescence effects on experimental rheumatoid arthritis (RA) rabbits by moxibustion, With lentiviral vector mediated NLRP3 overexpression in RA animal models, to investigate the effect of moxibustion on anti-CCP/RF levels in synovial fluid of RA rabbit joints and its regulation mechanism of NLRP3. Methods Randomly divided thirty Japanese big-ear white rabbits into 5 groups: group of blank, group of model, group of moxibustion, NLRP3 overexpression group and NLRP3 overexpression negative group, with 6 rabbits in each group. Both joint of the model group, and the groups with moxibustion was injected into FCA ($0.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), the blank group used the same method to inject sterile saline. On the 3rd day and the 10th day after treatment, $10 \mu\text{L}$ of NLRP3 overexpression lentiviral vector was injected into the joint cavity of the NLRP3 overexpression group of rabbits. The rabbits in the NLRP3 overexpression negative group were injected with the same amount of LvGFP as Contrast. moxibustion bilateral "BL23", "ST 36" of the groups with moxibustion (5 cones with one point in a day. 6 days for 1 course, 1 day for rest, 3 courses of treatment in total.) After treatment, observe the circumference of each rabbit's left and right knee joints, the content of RF, anti-CCP, IL-18 in synovial fluid was detected by ELISA. Results Compared with the blank group, the left and right knee joint circumferences in the model group increased, and the anti-CCP, RF, and IL-18 contents in the synovial fluid of the knee joint increased significantly ($P < 0.01$); compared with the model group, The circumference of the knee joint decreased, and the content of anti-CCP, RF and IL-18 decreased significantly ($P < 0.01$); compared with the moxibustion group, the circumference of the left and right knee joints in the NLRP3 overexpression group increased ($P < 0.05$), the content of anti-CCP, RF and IL-18 increased ($P < 0.05$). Conclusions Moxibustion has anti-inflammatory effects on experimental RA rabbits. Moxibustion at Shenshu (BL23) and Zusanli (ST36) can significantly reduce the level of anti-CCP, RF the immune effector, also IL-18, the in synovial fluid of RA rabbits knee joint, yet this effect can be declined significantly under NLRP3 overexpression, suggesting that moxibustion performed its anti-inflammatory regulation by suppressing abnormal immune function in experimental RA rabbits, which may be closely related to the NLRP3 expression.

Keywords: Moxibustion, Rheumatoid arthritis, NLRP3, Anti-CCP, RF

(责任编辑: 刘玥辰)