

艾灸对实验性RA家兔滑膜NLRP3炎性小体、Caspase-12表达的影响^{*}

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

(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(Rheumatoid arthritis, RA)家兔滑膜组织中NLRP3炎性小体、Caspase-12表达的影响,探索艾灸对RA家兔抗炎作用的机制。方法 将24只日本大耳白兔根据体质量和性别随机分为3组:对照组、模型组、艾灸组。将弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)按照同等剂量(0.5 mL·kg⁻¹)注射到各组(模型组、艾灸组)实验动物双侧后膝关节腔内,对照组各动物于该位置处注入同等体积的生理盐水用作对照。对艾灸组家兔双侧“肾俞”、“足三里”穴进行无瘢痕艾灸,每天每穴5壮,连续治疗6天,休息1天,为1个疗程,共治疗3个疗程。光镜下观察家兔膝关节滑膜样本的组织形态学改变,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)法检测家兔膝关节滑膜组织中NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)、Caspase-12的mRNA表达,酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)检测实验动物滑膜液中IL-1 β (白细胞介素1 β)的含量变化。结果 相较于对照组,模型组滑膜的炎性细胞浸润程度、滑膜组织增生程度、纤维组织增生程度、巨噬细胞增生程度等病理改变及病理评分增加($P<0.05$),NLRP3、Caspase-1 mRNA的表达升高($P<0.05$),Caspase-12 mRNA的表达显著下降($P<0.01$),IL-1 β 的表达显著升高($P<0.01$);与模型组相比,艾灸组滑膜病变程度以及病理评分均有所减少($P<0.05$),NLRP3、Caspase-1 mRNA的表达下降($P<0.05$),Caspase-12 mRNA的表达显著上升($P<0.01$),IL-1 β 的表达降低($P<0.05$)。结论 艾灸对RA家兔膝关节滑膜炎病理过程具有明显的抑制作用;艾灸“肾俞”、“足三里”穴可上调Caspase-12表达进而抑制NLRP3炎性小体,可能是艾灸减轻RA炎症反应的机制之一。

关键词: 类风湿性关节炎 艾灸 NLRP3 Caspase-12

doi: 10.11842/wst.20220625006 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种与Caspase-12等表达异常有关的自身免疫性疾病,以免疫失调和滑膜炎性细胞浸润为主要病理表现^[1]。RA在我国发病率为0.42%,男女发病率约为1:3^[2-3],近年来发病率呈上升趋势,已经严重威胁人类的健康,

对患者身心健康和经济状况产生严重的影响。现已证实,艾灸“肾俞”、“足三里”可显著降低炎性细胞因子的表达,改善RA炎症反应,对RA产生良好的治疗作用^[4-5]。在RA演变过程中,成纤维滑膜细胞(Fibroblast-like synoviocytes, FLS)的异常表达在RA

收稿日期:2022-06-25

修回日期:2023-04-04

* 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面上项目(81674068):基于“DVL2交叉调控Wnt与NF- κ B信号通路”的艾灸治疗RA骨保护机制研究,负责人:刘旭光;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:杨馨,副教授,硕士研究生导师,博士,主要研究方向:针灸治疗神经免疫性疾病的基础研究。

滑膜炎症和关节损伤的中起关键作用,大量增殖的FLS将导致炎性细胞因子分泌增多,加重RA炎症反应,因此与RA炎症关系紧密^[6]。NLRP3炎性小体是机体免疫调节的重要组成部分,可通过调控FLS的异常增生进而影响RA滑膜炎症^[2]。Caspase-12属于Caspase第一家族,是一种炎性Caspase,与RA炎性细胞因子的产生有关^[7-9]。前期研究表明,Caspase-12对NLRP3炎性小体复合物中Caspase-1的激活有抑制作用,可进一步介导RA等自身免疫性疾病的病程^[7,10-12]。故本实验进一步探讨艾灸能否通过影响Caspase-12对NLRP3炎性小体产生作用,从而为RA的治疗提供新思路。

1 实验材料

1.1 实验动物与分组

1.1.1 实验动物

日本大耳白兔24只,清洁级动物(clean animal, CL),雌雄各12只,体质量 (2.00 ± 0.25) kg,购于成都达硕动物有限责任公司。饲养于成都中医药大学实验动物研究中心SYXK(川)2019-049。正式实验前的1周,为确保实验的正常进行,对家兔进行适应性饲养。饲养室内温度 $18-21^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度55%-70%,依据家兔习性,每天固定内时间进行通风换气,自然明暗周期。动物可以自由饮食、饮水及活动。动物实验根据替代、减少、优化-(Replacement, Reduction and Refinement, 3Rs)原则以及国立卫生研究院(National Institutes of Health Guide, NIH)动物护理和指南进行,整个实验步骤和对家兔的处理均符合国家实验动物管理规定《关于善待实验动物的指导性意见》^[13]。本研究伦理备案编号:2018-22。

1.1.2 动物分组

实验开始前,根据体质量、性别采用完全随机分组方法分为3组:空白对照组(以下指对照组,8只兔子)、RA模型组(以下指模型组,8只兔子)、艾灸治疗组(以下指艾灸组,8只兔子),共24只兔子。

1.2 实验试剂与器材

弗氏完全佐剂,美国Sigma公司生产,批号:F5881;RNA提取试剂盒:FOREGENE公司生产,批号:RE-03014;反转录试剂盒:宝日医生物技术有限公司生产,批号:RR047A;RT-PCR反应试剂盒:宝日医生物技术有限公司生产,批号:RR820A;ELISA试剂盒,上海茁彩生物科技有限公司生产,批号:ZC-52385;酶

标仪,美谷分子仪器有限公司生产,批号:SpectraMAX Plus384;Eppendorf管,美国Axygen公司生产;RT-PCR仪,美国伯腾仪器有限公司生产;小艾炷,苏州东方艾绒厂生产,规格:直径0.8 cm×高1.0 cm。

2 实验方法

2.1 造模方法

根据文献^[14],在正式实验开始的第1天,先进行关节炎模型制备。将模型组、艾灸组家兔以膝关节为中心剃出范围约 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 的区域,后对该区域使用无水乙醇消毒。一只手固定膝关节并轻轻弯曲,另一只手将FCA按 $0.5\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重剂量平均注入各组家兔固定位置处(位置:膝关节髌骨下缘、髌韧带外侧凹陷)。对照组各动物于该位置处注入同等体积的生理盐水用作对照。本课题组前期研究发现RA动物造模后膝关节部位出现明显的肿胀和结节,说明已成功塑造RA模型。

2.2 艾灸操作

在实验造模1周后,操作者将接受艾灸操作的艾灸组动物固定在定制的实验兔架上,根据家兔的解剖结构准确定位背部治疗穴位(穴位部位剃毛区域约 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$),采用无瘢痕灸,分别用小艾炷灸双侧“肾俞”、“足三里”穴,以皮肤潮红不起脓疱为度,当艾炷燃剩1/3时,换炷再灸,每穴各5壮,每日1次。治疗周期为3周,其中1周内包括6天治疗和1天休息,对照组和模型组动物也被固定在兔架上,但与艾灸组不同的是不进行艾灸治疗操作。

2.3 取材方法及指标检测

2.3.1 取材方法

①滑膜液抽取:治疗后第21天(3个治疗周期后),空气栓塞法(耳缘静脉处)处死各组动物,剪去双侧膝关节前面部位毛发,操作者一只手在膝关节两侧及下面固定膝关节,另一手持1 mL注射器于动物膝关节腔部位进针,注射0.3 mL生理盐水于该处,为了使生理盐水与关节腔内滑膜液均匀混合,操作者慢慢上下推动膝关节,后用注射器抽取注射处滑膜液0.3 mL,立即放到EP管内,然后存放于 -20°C 低温冰箱,便于后续指标检测。家兔另一侧关节部位滑膜液也用上述方法收集。②滑膜组织取材:治疗后第21天,使用特定方法处死动物后,操作者用手术刀沿双侧后膝关节中心纵向切开表面皮肤(范围约 $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$),用齿镊仔

细分离髌骨和胫骨,可见骨头表面的一层淡黄色滑膜组织。完整剥离该层滑膜组织,刀片切下后放于锡箔纸上,包裹后标记编号,存放于低温液氮冷冻罐待测。同法采集另一侧膝关节滑膜组织。

2.3.2 指标检测

(1)动物整体状况观察

每日于固定时间 15:00–16:00 观察并记录各组实验家兔精神状态、皮毛色泽、进食饮水、日常活动等整体状况以及双膝关节局部病变情况。

(2)病理形态检测

取材结束后,立即将滑膜组织置于甲醛液中,标本固定保存。经苏木精-伊红染色法(Hematoxylin-eosin staining, HE)染色后,行镜下滑膜病理检测。采用数字切片扫描仪对切片进行图像采集(400倍),观察采集区域的滑膜炎性细胞浸润程度,组织增生情况(滑膜组织、纤维组织和巨噬细胞)及血管翳形成情况(分级标准见表1)。

(3)mRNA 表达检测

采用 RT-PCR 法检测各组家兔膝关节滑膜组织中

NLRP3、Caspase-1、Caspase-12 mRNA 的表达。实验步骤如下:①样本总 RNA 提取:取标本家兔滑膜组织进行研磨、离心等收集 RNA 溶液待测。②基因组 DNA 的除去反应,见表2。③逆转录反应,见表3。④引物设计:从美国国家生物技术信息中心(US National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库中搜索相应基因全序列,通过 Primer Premier 引物设计软件,设计筛选各基因特异性引物。引物交由上海生工生物工程技术服务有限公司设计合成,并以 ULTRAPAGE 纯化,本次实验所用碱基序列见表4。⑤ RT-PCR 反应,见表5和表6。⑥使用 Thermo Scientific PikoReal 软件(Thermo 公司)分析 RT-PCR 反应过程各检测样本的循环阈值(Threshold cycle, CT)值。本实验通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 X 相对 mRNA 表达水平。

(4)IL-1β 表达水平检测

按照 ELISA 试剂盒的说明进行操作,将试剂盒放至室温,将 50μL 标准品和 50μL 样品加入到反应板中,每孔各加入检测抗体 100μL,混合 30s 后封孔,温育条件为 37℃, 60min;将反应板内液体抽干后洗涤,静置 1min 后弃去,并除去水滴,重复洗 5 次;将显色液

表1 滑膜组织病变程度分级标准

滑膜病变	0分	1分	2分	3分
炎性细胞浸润	无	稀疏、散在	较密集	大量
滑膜组织增生	无	单层	2层	3层
纤维组织增生	无	少量增生	中量	大量
巨噬细胞增生	无	稀疏	较密集	大量

表2 基因组 DNA 去除反应体系

试剂	体积(μL)
5×g DNA Eraser Buffer	2
gDNA Eraser	1
Total RNA	2
RNase Free dH ₂ O	5
Total	10

注:依次加入各试剂后,42℃,2 min。

表3 逆转录反应体系

试剂	体积(μL)
5×PrimeScript Buffer 2	4
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1
RT Primer Mix	1
RNA	10
RNase Free dH ₂ O	4
Total	20

注:依次加入各试剂,置 RT-PCR 仪上进行反应,结束后离心低温保存。

表4 NLRP3、Caspase-1、Caspase-12的碱基序列

引物名称	上游(5'→3')	下游(5'→3')
NLRP3	accaccacetcacagaccaccacag	gccatcagcagccaaggagcagaga
Caspase-1	cgcacccgtcttgcctcattatc	gccttcagctctgtagccatgtccaa
Caspase-12	gctctggcaccacctgaggactgtta	ggcactaactgggtccaggcaatca

表5 PCR 反应体系

试剂	体积(μL)
2×Real PCR Easy™ Mix-SYBR	10.0
Forward Primer(10μM)	0.8
Reverse Primer(10μM)	0.8
Template(DNA)	2.0
ddH ₂ O	6.4
Total	20.0

表6 PCR 反应体系

反应温度	时间	备注
95℃	30s	预变性
95℃	5s	变性
55℃	30s	退火
72℃	30s	充分延伸,采集荧光

注:45 次循环。

加入到每孔(体积:100 μ L),混合后室温避光放置15min;最后各孔加入终止液(体积:50 μ L),再次混合30s。在固定时间内(时间范围:15min)内用酶标仪读出450nm处的吸光度(OD值),计算IL-1 β 的浓度。

2.4 统计学分析

用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,excel软件制作实验图形。各组数据先进行正态性分析,满足正态性后,再进行方差齐性检验。组间比较采用单因素方差分析,方差分析结果提示方差齐,数据分析选用最小显著差异法(*Least Significant Difference, LSD*),方差分析结果提示方差不齐,数据分析选用塔姆黑尼T2(*Tamhane's T2*)检验。本次研究所有的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 艾灸对动物整体状况的影响

对照组:家兔精神佳,活泼好动,被毛紧密、色泽光亮,饮食无明显异常,大便正常,双侧后膝关节无发红肿胀,皮温正常,活动自如,动作灵活。模型组:家兔精神萎靡,不喜活动,被毛暗淡、无光泽,进食饮水较少,大便稀溏,双侧后膝关节出现明显发红肿胀,皮温升高,活动受限,出现跛行,部分家兔膝关节出现化脓,甚则破溃。艾灸组:家兔精神一般,活动量减少,被毛有光泽,进食无明显异常,个别大便偏稀,双侧后膝关节轻度肿胀,皮肤未见发红,皮温正常,活动轻度受限。

3.2 光镜下观察艾灸对各组家兔膝关节滑膜病理学形态的影响

对照组:滑膜整体情况完整,衬里层表现为单层或双层半透明状的滑膜细胞,细胞间间隔大且部分细胞不连续,衬里下层细胞间排列疏松,主要的细胞有大量的脂肪细胞、部分成纤维细胞、巨噬细胞和结缔

组织,其他未见明显病理改变。模型组:滑膜充血水肿,可见局部细胞增生,衬里层见多层滑膜细胞增生,衬里下层有大范围的炎性细胞浸润,包括淋巴细胞和少量中性粒细胞;纤维组织发生少量至大量增生;部分衬里下层见少量至中量巨噬细胞增生;滑膜下方见小血管扩张。艾灸组:滑膜增生、炎性浸润等情况较模型组有所减轻。见图1。

3.3 光镜下观察艾灸对家兔膝关节滑膜组织病变程度的影响

本次实验结果表现为,造模后,与对照组相比,模型组的炎性细胞浸润程度及组织增生程度(滑膜组织、纤维组织和巨噬细胞)及病理评分增加($P<0.05$);与模型组相比,艾灸组滑膜病变程度及病理评分均有所减少($P<0.05$)。提示艾灸对家兔RA膝关节滑膜炎病理过程演变具有明显的抑制作用。见图2。

3.4 艾灸对各组RA家兔膝关节滑膜组织中NLRP3 mRNA的表达影响

实验结果显示,模型组相比于对照组,NLRP3 mRNA的表达显著升高($P<0.01$);艾灸组相比于模型组,NLRP3 mRNA的表达下降($P<0.05$)。提示艾灸相应穴位对RA家兔滑膜细胞的NLRP3mRNA表达有下调作用。见图3。

3.5 艾灸对各组RA家兔膝关节滑膜组织中Caspase-1 mRNA的表达影响

实验结果显示,与对照组相比,模型组的Caspase-1 mRNA的表达升高($P<0.05$);艾灸组较模型组,Caspase-1 mRNA的表达下降($P<0.05$)。提示艾灸相应穴位对RA家兔滑膜细胞的Caspase-1 mRNA表达有下调作用。见图4。

3.6 艾灸对各组RA家兔膝关节滑膜组织中Caspase-12 mRNA的表达影响

实验结果显示,与对照组相比,模型组的Caspase-12 mRNA的表达显著下降($P<0.01$);与模型组相比,艾

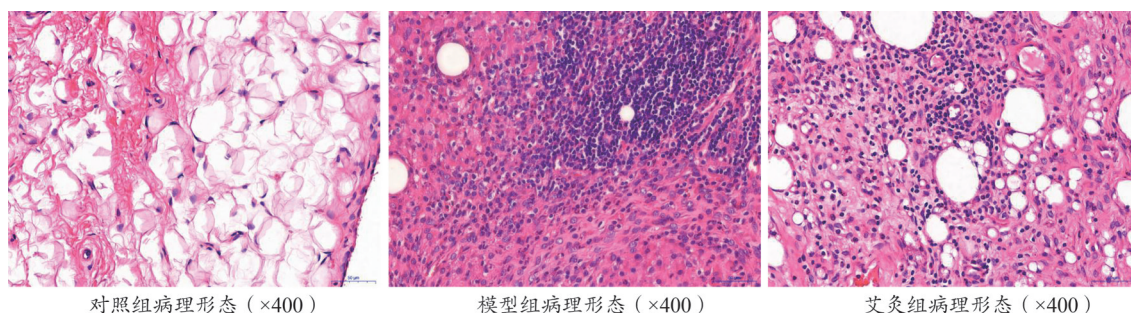


图1 各组家兔滑膜组织病理形态

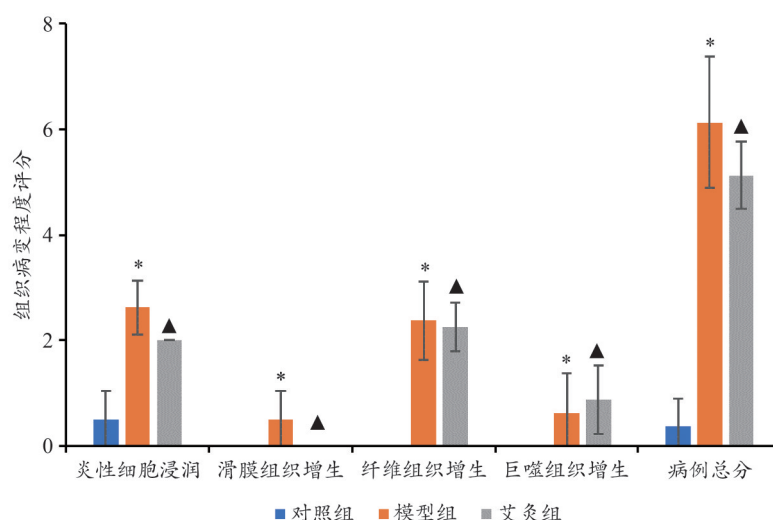


图2 各组家兔滑膜组织病变程度评分比较($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,▲ $P<0.05$ 。

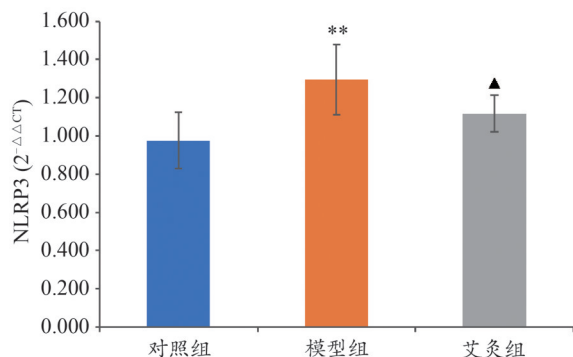


图3 艾灸对各组RA家兔膝关节滑膜细胞中NLRP3 mRNA的表达影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,▲ $P<0.05$ 。

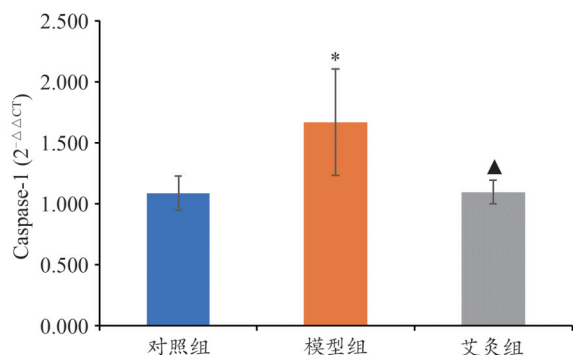


图4 艾灸对各组RA家兔膝关节滑膜细胞中Caspase-1 mRNA的表达影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,▲ $P<0.05$ 。

灸组的Caspase-12 mRNA的表达明显升高($P<0.01$)。提示艾灸相应穴位对RA家兔滑膜细胞的Caspase-12 mRNA表达有下调作用。见图5。

3.7 艾灸对各组RA家兔膝关节滑膜液中IL-1 β 的表达影响

本次实验结果表现为,造模后,与对照组相比,模型组滑膜液中IL-1 β 的含量明显呈增高状态($P<0.01$);经艾灸后,与模型组相比,艾灸组滑膜液中IL-1 β 的含量明显呈降低状态($P<0.05$)。表示艾灸相应穴位可下调实验性RA家兔滑膜细胞中IL-1 β 的表达。实验结果见图6。

4 讨论

RA以肢体疼痛、肿胀和关节活动不利为主要临床表现^[15],与中医“痹证”的临床表现相似,故将其归属为“痹证”范畴。中医认为RA的基本病机以本虚标实、虚实夹杂为要点。本虚涉及肝、脾、胃、肾正气不足,标实涉及风寒湿热痰浊血瘀等外内邪气,使得气血郁滞而不通,不通则痛^[16-17]。中医治疗多以祛风除湿、活血止痛为治则^[18]。明代的《医学入门·针灸》中写到:“药之不及,……,必须灸之”^[19]。艾灸是一种传统的中医疗法,主要原材料为艾绒,经加工后制成艾炷和艾条,点燃后放于体表腧穴处而起到治疗作用,功效主要为温通经络、消散寒气、运行气血等,为目前多种灸法奠定基础^[20-21]。临床研究发现艾灸可抑制RA患者的滑膜炎,且疗效明确^[22-23]。基础研究发现艾灸能够通过抑制炎症细胞因子的分泌等减轻RA炎症反应,进而对RA家兔和大鼠产生良好的治疗作用^[24]。本研究所选穴位为“肾俞”和“足三里”。“肾俞”为足太阳膀胱经之

穴,肾之背俞穴。前期研究发现,艾灸“肾俞”对RA患者关节炎症、滑膜病理改变具有良性调节作用^[25]。“足三里”为足阳明胃经穴之一,为胃之下合穴,临床研究发现艾灸“足三里”穴可提高机体免疫力,降低RA中炎性细胞因子的表达,改善患者病情^[26-27]。Meta分析和系统评价表明,艾灸“肾俞”、“足三里”穴对模型动物的关节滑膜病理结构产生明显改善^[28-29],减轻相应滑膜组织的充血水肿以及增厚,调节相关炎性细胞和滑膜细胞浸润、增生和渗出,降低炎性细胞因子的表达,常用于治疗RA^[23,30]。结合本次研究,模型组与艾灸组比较,滑膜病变的程度和病理评分明显下降,炎性细胞因子IL-1 β 的表达降低,提示艾灸可减轻RA炎症反应,改善滑膜病变情况。

NLRP3炎性小体是目前科研实验中研究最多的炎性小体之一,由NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1前体(Pro-caspase-1)和凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-associated specklike protein containing a CARD, ASC)组成,在RA等自身免疫性疾病中发挥关

键作用^[31-32]。经研究,NLRP3通常处于自我抑制状态,只有在细胞内外信号刺激条件下,NLRP3、ASC和Pro-caspase-1三者结合,生成大量的Caspase-1,进而介导下游炎性细胞因子的表达,导致RA炎症反应的发生^[33-34]。Caspase家族是一类参与机体炎症反应和细胞凋亡的蛋白酶,包括Caspase-1到Caspase-12,共12种蛋白酶。Caspase-12在该家族中主要通过抑制NLRP3炎性小体复合物中Caspase-1的激活,调节炎性细胞因子IL-1 β 和IL-18的分泌,而参与RA炎症反应的调控^[35-37]。

本研究发现,艾灸组较模型组滑膜病变的程度和病理评分明显下降,Caspase-12 mRNA的表达明显升高,NLRP3 mRNA、Caspase-1 mRNA的表达明显下降,提示艾灸可通过促进Caspase-12的表达,进一步抑制的Caspase-1的分泌,进而抑制NLRP3炎性小体的激活,减轻RA的炎症反应,改善滑膜病变情况。本实验为进一步丰富艾灸治疗RA的疗效机制提供新的研究思路 and 方向。

参考文献

- 任庆杰,王辉,曹津,等.嘉兴地区类风湿关节炎患病现状及其危险因素分析.实用预防医学,2021,28(1):88-90.
- 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.
- Deane K D, Demoruelle M K, Kelmenson L B, et al. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2017, 31(1):3-18.
- 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.针刺研究,2022,47(3):250-255.
- 李佳,李柏村,蔡国伟,等.针灸足三里对佐剂性关节炎模型大鼠胃肠动力的调节作用.中国组织工程研究,2022,26(26):4141-4146.
- 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.
- Liu L, Chen M L, Lin K, et al. Inhibiting caspase-12 mediated inflammasome activation protects against oxygen-glucose deprivation injury in primary astrocytes. *Int J Med Sci*, 2020, 17(13):1936-1945.
- Chow S E, Chien H T, Chu W K, et al. Human caspase 12 enhances NF- κ B activity through activation of IKK in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9):4610.
- Salvamoser R, Brinkmann K, O'Reilly L A, et al. Characterisation of mice lacking the inflammatory caspases-1/11/12 reveals no contribution of caspase-12 to cell death and sepsis. *Cell Death Differ*, 2019, 26(6):1124-1137.
- Fernández D J, Lamkanfi M. Inflammatory caspases: Key regulators of inflammation and cell death. *Biol Chem*, 2015, 396(3):193-203.
- Liu D L, Zeng X, Li X, et al. Advances in the molecular mechanisms of NLRP3 inflammasome activators and inactivators. *Biochem Pharmacol*, 2020, 175:113863.
- García de la Cadena S, Massieu L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. *Focus on caspase-12. Apoptosis*, 2016, 21(7):763-777.
- 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见.2008.
- 陈奇.中药药理实验方法.北京:人民卫生出版社,1994.
- 郭苏健,姚博,赵延龙,等.类风湿关节炎的中医药治疗优势.中华中医药学刊,2017,35(7):1769-1771.
- Wang W J, Wang X C, Tang X P, et al. Classifying rheumatoid arthritis by Traditional Chinese Medicine Zheng: A multi-center cross-sectional study. *J Tradit Chin Med*, 2019, 39(3):425-432.
- 王顺吉,治尔西,张瑜,等.回灸烙灸结合西药治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎临床疗效观察.中国针灸,2017,37(10):1047-1051.
- 蔡强,金书欣,陈广洁,等.青藤碱联合甲氨蝶呤治疗早期类风湿关节炎的疗效及对患者MMP-3、RANKL/OPG表达的影响.上海中医药大学学报,2019,33(1):36-41.
- 葛云鹏,嵇波,苏杭,等.艾灸足三里穴的现代研究进展.中医药导报,2019,25(22):95-99.

- 20 董怡辛, 杨巧菊, 孙小倩, 等. 灸法治疗类风湿关节炎的研究进展. 风湿病与关节炎, 2019, 8(9):66-69.
- 21 Shen B Y, Sun Q, Chen H Y, *et al.* Effects of moxibustion on pain behaviors in patients with rheumatoid arthritis. *Medicine*, 2019, 98(30): e16413.
- 22 朱艳, 俞红五, 潘喻珍, 等. 艾灸“足三里”“肾俞”抑制 miR-155 介导的 TLR4/NF- κ B 信号通路改善大鼠佐剂性关节炎的研究. 针刺研究, 2021, 46(3):194-200.
- 23 钟玉梅, 吴菲, 罗小超, 等. 基于 PD-1/PD-L1 信号通路艾灸治疗类风湿性关节炎的机制研究. 中国针灸, 2020, 40(9):976-982.
- 24 谢清, 成学飞, 王爱华, 等. 灸法治疗类风湿关节炎临床应用. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(11):131-134.
- 25 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. *Am J Transl Res*, 2019, 11(7):4029-4045.
- 26 王姣姣, 陈育松. 隔物温和灸治疗寒湿痹阻型类风湿性关节炎的临床观察. 中国中医药科技, 2021, 28(2):266-268.
- 27 郝锋, 吴立斌, 胡骏, 等. 艾灸对类风湿性关节炎模型大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响. 中国针灸, 2020, 40(11): 1211-1216.
- 28 Zhong Y M, Cheng bo-, Zhang L L, *et al.* Effect of moxibustion on inflammatory cytokines in animals with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:1-12.
- 29 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.
- 30 郝锋, 吴立斌, 胡骏, 等. 艾灸对类风湿性关节炎模型大鼠足跖滑膜组织 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响. 中国针灸, 2020, 40(11): 1211-1216.
- 31 Liu Y X, Wei W, Wang Y, *et al.* TNF- α /calreticulin dual signaling induced NLRP3 inflammasome activation associated with HuR nucleocytoplasmic shuttling in rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, 2019, 68(7):597-611.
- 32 Liu P W, Wang J, Wen W, *et al.* Cinnamaldehyde suppresses NLRP3 derived IL-1 β via activating succinate/HIF-1 in rheumatoid arthritis rats. *Int Immunopharmacol*, 2020, 84:106570.
- 33 Li Z, Guo J L, Bi L Q. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130:110542.
- 34 Addobbati C, da Cruz H L A, Adelino J E, *et al.* Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. *Inflamm Res*, 2018, 67(3):255-264.
- 35 顾鑫亮. Caspase-12 基因多态性对脓毒症易感性及外周血中炎症因子表达的影响. 呼和浩特: 内蒙古医科大学硕士学位论文, 2017.
- 36 Nakajima T, Wang B, Ono T, *et al.* Differences in sustained alterations in protein expression between livers of mice exposed to high-dose-rate and low-dose-rate radiation. *J Radiat Res*, 2017, 58(4):421-429.
- 37 Bolívar B E, Vogel T P, Bouchier-Hayes L. Inflammatory caspase regulation: Maintaining balance between inflammation and cell death in health and disease. *FEBS J*, 2019, 286(14):2628-2644.

Effects of Moxibustion on NLRP3 Inflammasome and Caspase-12 in Synovium of Experimental RA Rabbits

Lu Xiaoqing¹, Liu Huahui², Chen Jun¹, Xi Donglai², Wang Yi², Yang Shenqiao¹,
Zhou Haiyan², Ma Wenbin², Wu Fei³, Yang Xin¹

(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 To observe the effects of moxibustion on the expression of Nucleotide binding oligomeric domain like receptor thermoprotein domain associated protein 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) inflammasome and Cysteine aspartate protease 12 (Caspase-12) in synovial tissue of experimental Rheumatoid Arthritis (RA) rabbits, and explore the anti-inflammatory mechanism of moxibustion on RA rabbits. Methods Twenty-four Japanese big-eared white rabbits were randomly divided into 3 groups according to body weight and sex: the control group, the model group and the moxibustion group. The Freund's Complete Adjuvant (FCA) was injected into the joint cavities of two knee joints of rabbits at the dose of 0.5 mL·kg⁻¹ in the model group and the moxibustion group, and the control group was injected

with the same amount of normal saline as control. For the moxibustion group, scar free moxibustion was operated at bilateral "BL 23" and "ST 36" acupoints, moxibustion for 3 times per acupoint per day, continuous treatment for 6 days, rest for 1 day, as a course of treatment, a total of 3 courses of treatment. The histological changes of synovium samples of rabbit knee joints were observed under light microscope, real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of NLRP3, Cysteine aspartate protease 1 (Caspase-1), Caspase-12 in synovial tissues and Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) was used to measure the change of Interleukin-1 β (IL-1 β) content in the synovial fluid of experimental animals. Results Compared with the control group, the degree of synovial lesions (inflammatory cell infiltration, synovial tissue hyperplasia, fibrous tissue hyperplasia, macrophage hyperplasia, etc.) and pathological score were increased ($P<0.05$), the expression of NLRP3, Caspase-1 mRNA were increased ($P<0.05$), the expression of Caspase-12 mRNA was significantly downregulated ($P<0.01$) and the expression content of IL-1 β was significantly up-regulated ($P<0.01$) in the model group; Compared with the model group, the synovial lesion degree and pathological score were decreased ($P<0.05$), the expression of NLRP3, Caspase-1 mRNA were decreased ($P<0.05$), the expression of Caspase-12 mRNA was significantly increased ($P<0.01$) and the expression of IL-1 β was decreased ($P<0.05$) in the moxibustion group. Conclusion Moxibustion can significantly inhibit the pathological process of knee synovitis in RA rabbits; Moxibustion at "Shenshu (BL 23)" and "Zusanli (ST 36)" acupoints can significantly up-regulate the expression of Caspase-12 and then inhibit the NLRP3 inflammasome, which may be one of mechanisms of moxibustion to reduce RA inflammatory response.

Keywords: Rheumatoid Arthritis, Moxibustion, NLRP3, Caspase-12

(责任编辑: 李青)