DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20240830.002
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240830.1116.004

针刺“足三里”对弗氏完全佐剂诱导关节炎小鼠足爪部位巨噬细胞募集及趋化因子表达的影响

殷建朝[1,2],王 悦[1,2],公一囡[1,2],郭永明[1,2],苑功名[1,2],苏枫雅[1,2],谢 飞[1,2],徐 媛[1,2]✉
(1. 天津中医药大学实验针灸学研究中心,天津 301617;2. 国家中医针灸临床医学研究中心,天津 301617)

[**摘要**] **目的**:观察针刺“足三里”对弗氏完全佐剂(Complete Freund′s Adjuvant,CFA)诱导关节炎小鼠足爪部位巨噬细胞募集及趋化因子表达的影响,探讨针刺改善CFA小鼠病变部位炎症反应的可能机制。**方法**:30只雄性BALB/c小鼠随机分为盐水组、模型组、针刺组,每组10只。采用右足跖皮下注射CFA建立关节炎模型。其中针刺组给予双侧“足三里”针刺30 min,第1~7天,每天1次,第8~15天,隔天1次。期间观察各组小鼠热辐射痛阈值、足趾容积及关节炎症评分。采用流式细胞术检测足爪部位巨噬细胞数量、M1型和M2型巨噬细胞的数量;采用RT-qPCR检测足爪部位促炎因子IL-1β、TNF-α,抗炎因子IL-10、IL-4在基因水平的表达;采用液相芯片技术检测足爪部位抗炎因子IL-10、IL-4及趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1在蛋白水平的表达。**结果**:与盐水组相比,造模后模型组热辐射痛阈阈值显著降低($P<0.01$),足趾容积、关节炎症评分均显著升高($P<0.01$);模型组足爪部位巨噬细胞数量及M1、M2型巨噬细胞均显著升高($P<0.01$);模型组足爪部位TNF-α、IL-1β在基因水平的表达升高($P<0.01$),IL-10、IL-4在基因水平的表达无明显变化($P>0.05$);模型组足爪部位IL-10、IL-4在蛋白水平的表达显著升高($P<0.01$),趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1均显著升高($P<0.01$)。与模型组相比,针刺组热辐射痛阈值显著升高($P<0.01$),足趾容积、关节炎症评分均降低($P<0.05$);针刺组足爪部位巨噬细胞数量及M1、M2型巨噬细胞均显著降低($P<0.01$);针刺组足爪部位TNF-α、IL-1β在基因水平的表达降低($P<0.01$,$P<0.05$),IL-10、IL-4在基因水平的表达无明显变化($P>0.05$);针刺组小鼠足爪部位IL-10在蛋白水平的表达升高($P<0.05$),IL-4表达在蛋白水平无明显变化($P>0.05$),趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1表达均降低($P<0.05$)。**结论**:针刺“足三里”能有效减轻CFA小鼠关节炎症反应,可能是通过减少病变局部趋化因子从而减轻巨噬细胞募集来实现的。

[**关键词**] 针刺;巨噬细胞;趋化因子;抗炎
[**中图分类号**] R245 [**文献标志码**] A [**文章编号**] 2097-5953(2025)09-0683-08

Effect of acupuncture at “Zusanli” (ST 36) on macrophage recruitment and chemokine expression in mice with arthritis in paws induced by Complete Freund´s Adjuvant

YIN Jianchao[1,2], WANG Yue[1,2], GONG Yinan[1,2], GUO Yongming[1,2], YUAN Gongming[1,2], SU Fengya[1,2], XIE Fei[1,2], XU Yuan[1,2]✉
(1. *Experimental Acupuncture Research Center of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin* 301617, *China*; 2. *National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine Acupuncture, Tianjin* 301617, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82004473)

[*Author*]: *YIN Jianchao, E-mail*: 1310620540@qq.com.
[*Correspondence to*]: *XU Yuan, E-mail*: 183412710@qq.com.

Received: 2024-05-16 *Revised*: 2024-08-22 *JHMU*, 2025;31(9):683-690

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82004473)
[作者简介] 殷建朝,E-mail:1310620540@qq.com。
[通讯作者] 徐媛, E-mail:183412710@qq.com。
[收稿日期] 2024-05-16 [修回日期] 2024-08-22 网络出版时间:2024-08-31 16:35:32

[Abstract] Objective: To observe the effect of acupuncture at "Zusanli" (ST36) on macrophage recruitment and chemokine expression in the paw of arthritis mice induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA), and to explore the possible mechanism of acupuncture improving the inflammatory response in the lesion site of CFA mice. Methods: A total of 30 male BALB/c mice were randomly divided into the saline group, model group, and acupuncture group, with 10 mice in each group. The arthritis model was established by subcutaneous injection of CFA into the right foot. The acupuncture group was given bilateral "Zusanli" acupuncture for 30 min, once a day from day 1 to day 7, and once every other day from day 8 to day 15. The thermal radiation pain threshold, toe volume and joint inflammation score of mice in each group were observed during the period. Flow cytometry was used to detect the number of macrophages, M1 and M2 macrophages in the paw. RT-qPCR was used to detect the expression of pro-inflammatory factors IL-1β and TNF-α, anti-inflammatory factors IL-10 and IL-4 at the gene level. The expression of anti-inflammatory factors IL-10, IL-4 and chemokines CCL2, CCL7, CCL12, and CX3CL1 at the protein level was detected by liquid chip technology. Results: Compared to the saline group, the thermal radiation pain threshold of the model group was significantly decreased ($P<0.01$), and the toe volume and joint inflammation score were significantly increased ($P<0.01$). The number of macrophages and M1 and M2 macrophages in the paw of the model group were significantly increased ($P<0.01$). The expression of TNF-α and IL-1β in the paw of the model group increased at the gene level ($P<0.01$), and the expression of IL-10 and IL-4 at the gene level did not change significantly ($P>0.05$). The expression of IL-10 and IL-4 in the paw of the model group was significantly increased at the protein level ($P<0.01$), and the chemokines CCL2, CCL7, CCL12, and CX3CL1 were significantly increased ($P<0.01$). Compared to the model group, the thermal radiation pain threshold of the acupuncture group was significantly increased ($P<0.01$), and the toe volume and joint inflammation score were decreased ($P<0.05$). The number of macrophages and M1 and M2 macrophages in the foot claws of the acupuncture group were significantly decreased ($P<0.01$). The expression of TNF-α and IL-1β in the foot claws of the acupuncture group decreased at the gene level ($P<0.01$, $P<0.05$), and the expression of IL-10 and IL-4 at the gene level did not change significantly ($P>0.05$). The expression of IL-10 in the foot paw of the acupuncture group was increased at the protein level ($P<0.05$), and the expression of chemokines CCL2, CCL7, CCL12, and CX3CL1 was decreased ($P<0.05$). Conclusion: Acupuncture at "Zusanli"can effectively reduce the joint inflammatory response in CFA mice, which may be achieved by reducing the recruitment of macrophages by reducing the chemokines in the lesion.

[Key words] Acupuncture; Macrophages; Chemokines; Anti-inflammatory

趋化因子是一类分子量为8～15 kDa的细胞因子或信号蛋白，因其具有诱导反应细胞定向趋化的能力而被命名为"趋化因子"[1]，目前已在哺乳动物中鉴定出近50种[2]。趋化因子通常由四个保守的半胱氨酸残基构成，根据半胱氨酸残基位置可分为CC、CXC、XC、CX3C四种亚型[3]。在炎症反应中，免疫细胞从骨髓或胸腺到血液或淋巴结，再到组织中的募集都离不开迁移，而趋化因子是推动免疫细胞定向迁移的重要驱动力[4]。当类风湿关节炎(rheumatoid arthritis，RA)发生时，趋化因子可促使免疫细胞迁移到炎症关节局部，其中诱导外周血单核细胞进入关节变为巨噬细胞是RA进展的重要步骤[5]，且巨噬细胞可进一步分化为促炎型的M1型巨噬细胞和抗炎型的M2型巨噬细胞。在RA的急性炎症期主要由外周血和滑膜组织中的M1巨噬细胞介导和维持，并释放促炎细胞因子肿瘤坏死因子α(TNF-α)、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6和导致骨破坏[6]。而M2型巨噬细胞主要出现在RA的缓解期，并释放抗炎细胞因子IL-10和转化生长因子β(TGF-β)，促进伤口愈合和血管生成，并减轻炎症过程[7]。

有研究表明，负责单核细胞迁移的趋化因子有CCL2、CCL7、CCL8、CCL12、CXCL1、CX3CL1等[8]，本研究以弗氏完全佐剂(Complete Freund's Adjuvant，CFA)诱导小鼠关节炎，模拟类风湿关节炎，针刺双侧"足三里"穴，观察对热辐射痛阈值、足趾容积及关节炎症评分及足爪部位巨噬细胞、炎症因子、趋化因子的变化情况，探讨针刺是否通过调节趋化因子减少巨噬细胞募集以抗炎镇痛，为针刺改善RA提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 实验材料

健康SPF级BALB/c雄性小鼠30只，7～8周龄，体重(20～22)g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号：SCXK-(京)2021-0006]。饲养期间保证室温为(22±3)℃，相对湿度为(55±5)%，可自由饮水和进食，保持12 h光照周期，注意通风和环境清洁。实验取得天津中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号：TCM-LAEC2021288)，并遵循《实验动物护理和使用指

南》,所有操作均符合天津中医药大学实验伦理学要求。采用随机数表法将30只小鼠分为盐水组、模型组、针刺组,每组10只。

1.2 实验方法

1.2.1 主要仪器 足底热痛测量仪(意大利Ugo Basile公司)、足肿胀测量仪(意大利Ugo Basile公司),Attune Nxt流式细胞仪(美国Thermo Fisher公司),高速低温离心机(美国Thermo Fisher公司),液相芯片分析系统Luminex X-200(美国Texas公司),基因PCR扩增仪(杭州博日科技股份有限公司),荧光定量PCR仪(美国Life technologies公司),实时荧光定量PCR系统(美国Thermo Fisher公司)。

1.2.2 主要试剂 完全弗氏佐剂(美国Sigma公司),异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司),F4/80抗体(美国Thermo Fisher公司),CD86抗体(美国Thermo Fisher公司),CD206抗体(美国Thermo Fisher公司),小鼠液相芯片试剂盒(美国BIO-RAD公司),RNA反转录试剂(宝生物Takara公司),RT-qPCR扩增试剂(上海翌圣生物科技股份有限公司)。

1.2.3 模型制备 对照文献[9,10]进行RA小鼠造模。造模时使用自制小鼠固定器束缚小鼠[11],碘伏常规消毒后,左手拇指和食指夹持小鼠右足,中指和无名指抵住固定器以防挣扎,右手持1 mL无菌注射器缓慢进针注射药物,注意避开足底血管。注射结束后缓慢出针,按压片刻以防药物渗出。注射完成后小鼠右后足出现肿胀、皮肤泛红并伴有焦躁不安、来回跳跃、舔爪、跛行等行为即可视为模型制备成功。模型组、针刺组均在右后足跖皮下注射50 μL CFA,盐水组则注射同等剂量生理盐水作为对照。

1.2.4 干预措施 根据中国针灸学会制定的《实验动物常用穴位名称与定位》,选取小鼠双侧“足三里”穴位针刺,该穴位位于小鼠膝关节后外侧,腓骨小头下方约2 mm处[12]。小鼠束缚并常规消毒后,使用0.16 mm×7 mm规格一次性无菌针灸针直刺双侧“足三里”,进针时避开血管和神经,进针深度为3 mm。针刺得气后行平补平泻捻转手法,频率180次/min,时长2 min,每间隔5 min针刺1次,共4次,总留针时长为30 min。第1~7天,每天进行1次干预,第8~15天,隔天干预1次。盐水组和模型组小鼠采取同样的束缚方法,但不进行针刺。所有动物在第15天干预结束后用异氟烷麻醉处死进行取材。

1.2.5 足底热痛测量仪测量小鼠热痛阈值 测量期间保持室温(22±3)℃,相对湿度(55±5)%。正式测量前,将小鼠放入检测隔板内适应30 min,待其安静后,将光源对准小鼠右侧足底后开启计时,当小鼠出现明显的缩足反射时,仪器终止计时,该时间即为热痛阈值(s)。每只小鼠进行3次测量,每次间隔5 min,最后取3次结果的平均值,数值越大表示痛阈越高。每间隔5 d进行1次测量。

1.2.6 足趾容积测量仪检测小鼠右后足足趾容积 在小鼠外踝尖上3 mm处画1条与外踝平行的线,然后将右足放入测量杯内,待水面和标记线相平时,仪器显示毫升数即为足趾容积,数值越大表示足趾容积越大。每隔1 d进行1次测量。

1.2.7 目测法对关节炎症进行评分 每日针刺后进行关节炎症评分。0分表示正常,1分表示至少一个脚趾关节肿胀,2分表示全部足爪肿胀,3分表示全部足爪肿胀但不涉及到踝关节,4分表示所有足爪并且踝关节肿胀。分值越大表示炎症程度越重,每隔1 d进行1次测量。

1.2.8 流式细胞术检测足爪巨噬细胞数量及M1型和M2型巨噬细胞数量变化情况 首先将足爪组织置于铁网细胞筛上,并放入含有2 mL无色1640培养液的培养皿中剪碎。剪碎后将液体移至15 mL离心管中,置于冰上保存。其次将液体通过70 μm橙色细胞滤网过滤,放入4 ℃离心机中1 500 r/min离心5 min,离心完毕后弃上清液。随后加入5 mL Buffer并再次离心,离心完毕后弃上清液。然后将离心管内细胞抽取到1.5 mL EP管中,加入100 μL Buffer重悬细胞。使用F4/80标记巨噬细胞数量,CD86标记M1型巨噬细胞,CD206标记M2型巨噬细胞。加入F4/80、CD86、CD206三种抗体后室温孵育20 min上机检测。

1.2.9 RT-qPCR技术检测足爪部位炎症因子在基因水平的表达 将足爪部位用超声打碎后提取RNA,将RNA反转录成cDNA,进行RT-qPCR扩增反应后,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法进行相对定量分析,计算目的基因mRNA的表达量。

1.2.10 液相芯片技术检测足爪中炎症因子、趋化因子的变化情况 小鼠异氟烷麻醉处死后剪下足爪部位,参照液相芯片操作说明书制备检测样品,完成样品制备后置于Luminex仪器上检测。

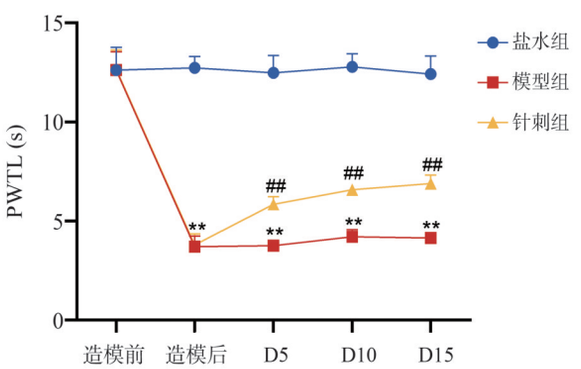
1.3　统计学处理

采用SPSS25.0软件对实验数据进行统计学分析，GraphPad Prism 8.0软件制作统计图。所有数据用均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。热辐射痛阈值、足趾容积及关节炎症评分采用重复测量的方差分析，组间比较采取多元方差分析；其他数据，同一时间点不同组间比较采取单因素方差分析，如果满足方差齐性检验，采取LSD检验；如果不满足，采取Dunnett's T3检验。所有数据不满足正态分布用秩和检验，以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组小鼠热辐射痛阈值比较

与盐水组比较，造模后模型组小鼠热辐射痛显著降低（$P<0.01$），经针刺治疗后，与模型组比较，针刺组热辐射痛阈值显著升高（$P<0.01$），见图1。



与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

图1　各组小鼠热辐射痛阈值比较

Fig 1　Comparison of paw withdrawal thermal latency in mice of each group

2.2　各组小鼠足趾容积比较

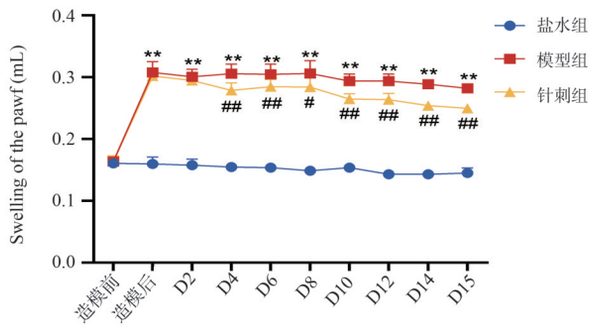
与盐水组比较，造模后模型组小鼠足趾容积显著升高（$P<0.01$），经针刺治疗后，与模型组比较，针刺组小鼠足趾容积在针刺第4天之后降低（$P<0.05$），见图2。

2.3　各组小鼠关节炎症评分比较

与盐水组比较，造模后模型组小鼠关节炎症评分显著升高（$P<0.01$），经针刺治疗后，与模型组比较，针刺组小鼠关节炎症评分在针刺第10天之后降低（$P<0.01$），见图3。

2.4　各组小鼠足爪巨噬细胞数量及M1型和M2型巨噬数量变化情况比较

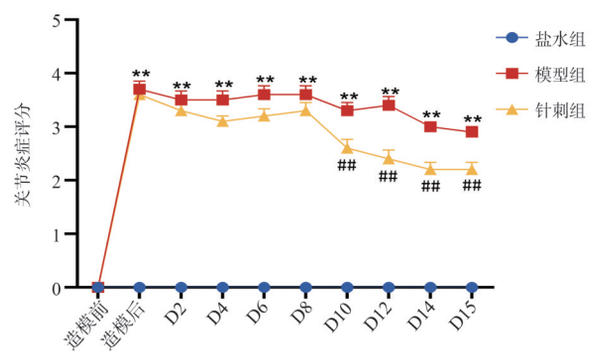
与盐水组比较，模型组足爪部位巨噬细胞数量及M1、M2型巨噬细胞的表达水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，针刺组足爪部位巨噬细胞数量及M1、M2型巨噬细胞的表达水平显著降低（$P<0.01$），见图4。



与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图2　各组小鼠足趾容积比较

Fig 2　Comparison of toe volume in each group of mice



与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

图3　各组小鼠关节炎症评分比较

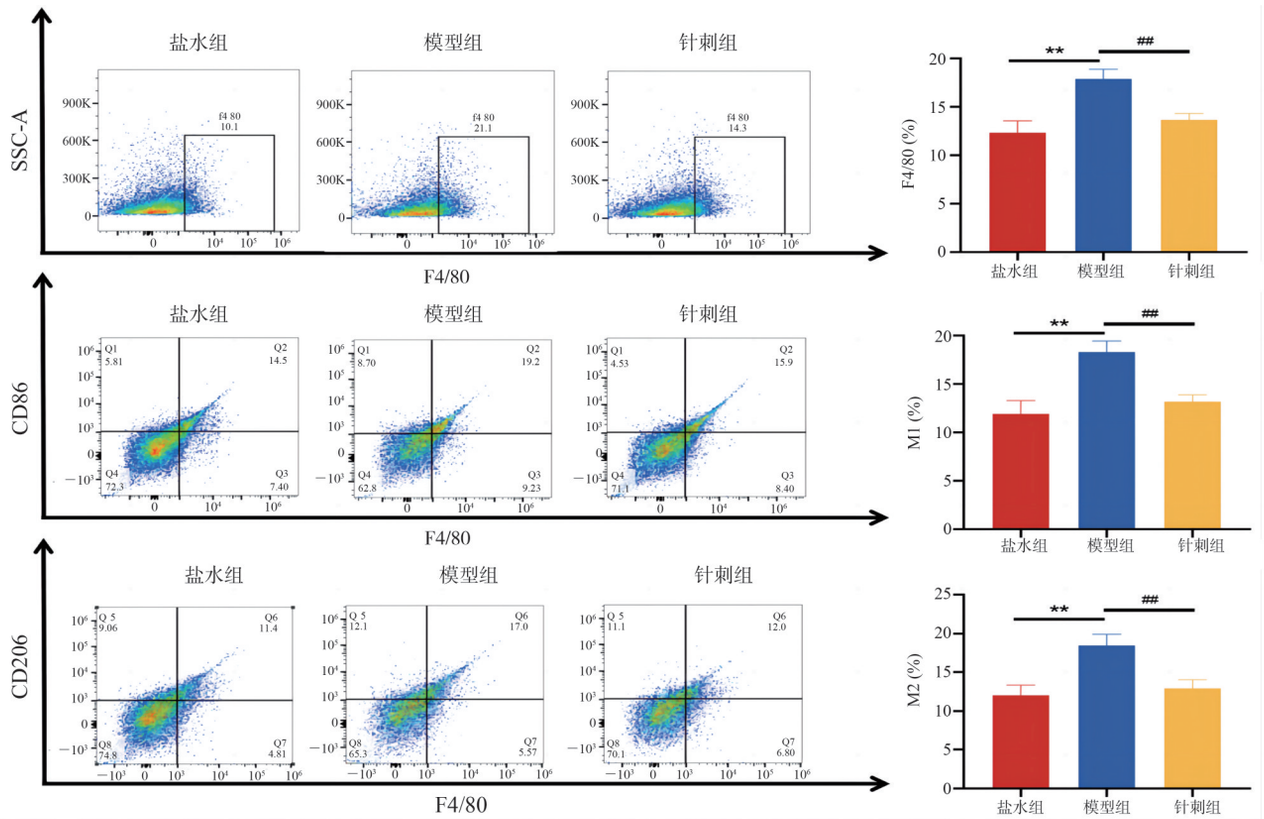
Fig 3　Comparison of joint inflammation scores in each group of mice

2.5　各组小鼠足爪炎症因子在基因水平变化情况比较

与盐水组比较，模型组足爪部位TNF-α、IL-1β的表达水平显著升高（$P<0.01$，$P<0.01$），IL-4、IL-10的有升高趋势，但无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组比较，针刺组足爪部位TNF-α、IL-1β的表达水平降低（$P<0.01$，$P<0.05$），IL-4、IL-10的有降低趋势，但无统计学意义（$P>0.05$），见图5。

2.6　各组小鼠足爪炎症因子蛋白水平变化情况比较

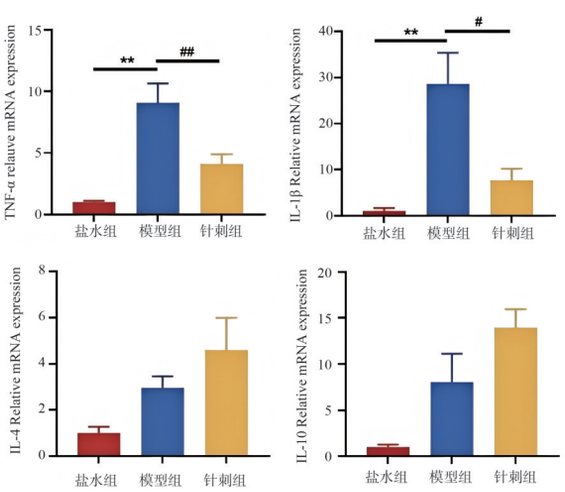
前期对IL-4跟IL-10做了基因水平的检测，发现有升高趋势，但无统计学差异，考虑到它是一种分泌蛋白，本研究用液相芯片技术在在蛋白水平做进一步检测，与盐水组比较，模型组足爪部位IL-10、IL-4的表达水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组



与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#\#}P<0.01$

图4　各组小鼠足爪部位巨噬细胞数量及M1型、M2型巨噬细胞数量比较

Fig 4　Comparison of the number of macrophagesand the number of M1 and M2 macrophages in the paws of mice in each group

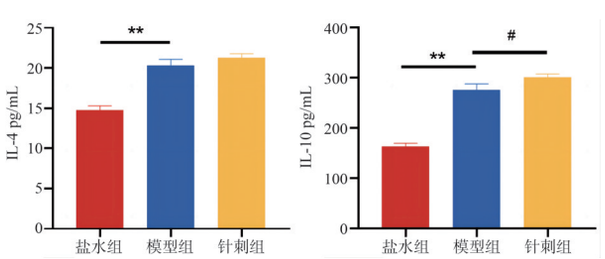


与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.05$

图5　各组小鼠足爪部位*TNF-α*、*IL-1β*、*IL-4*、*IL-10*基因水平表达量比较

Fig 5　Comparison of *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-4*, and *IL-10* gene level expression in paws of mice in each group

比较，针刺组足爪部位IL-10的表达水平显著升高（$P<0.01$），IL-4的表达水平无统计学意义（$P>0.05$），见图6。



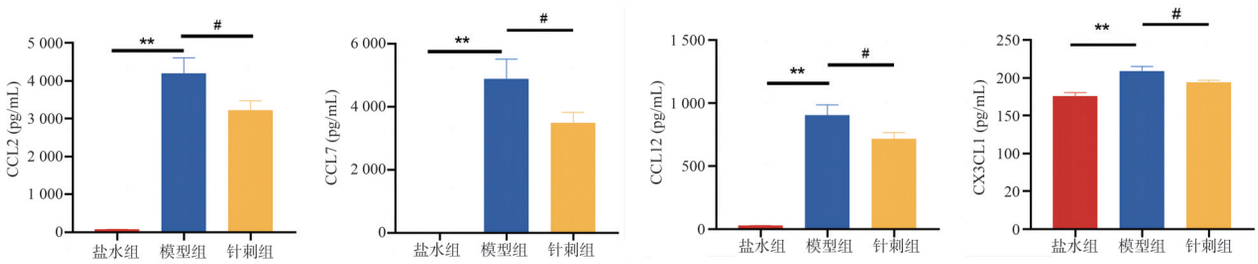
与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$

图6　各组小鼠足爪部位IL-10、IL-4蛋白水平表达量比较

Fig 6　Comparison of IL-10 and IL-4 protein level expression in paws of mice in each group

2.7　各组小鼠足爪巨噬细胞趋化因子变化情况比较

与盐水组比较，模型组足爪部位巨噬细胞趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，针刺组足爪部位趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1均降低（$P<0.05$），见图7。



与盐水组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$

图7　各组小鼠足爪部位趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1表达量的比较

Fig 7　Comparison of chemokine CCL2, CCL7, CCL12, and CX3CL1 expression in the paw of mice in each group

3　讨论

RA是一种病因复杂的多因素自身免疫性疾病，以病变部位持续炎症和全身炎症为特征[13,14]，以疼痛和关节肿胀为主要临床表现。本研究采用CFA诱导小鼠关节炎模拟类风湿关节炎，监测热辐射痛阈值、足爪肿胀度、关节炎症评分来评价RA病变情况以及针刺干预效果。结果表明，模型组小鼠热辐射痛痛阈降低、足肿胀度及关节评分升高，而针刺干预后热辐射痛痛阈升高、足肿胀度及关节评分降低，说明针刺“足三里”能有效缓解类风湿关节炎小鼠关节的炎症症状。

巨噬细胞在免疫系统中发挥重要作用，能够调节炎性反应和维持体内平衡[15]，有研究发现巨噬细胞浸润与关节侵蚀程度呈正相关，浸润的巨噬细胞进一步介导各种炎症细胞状态，通过协调细胞因子网络显著促进RA的发生和持续[16,17]。其中外周血单核细胞进入关节变成巨噬细胞是RA进展的重要步骤。有研究表明将RA患者单核细胞提取后用锝^{99m}标记，再将其输回体内，用单光子发射计算机断层扫描发现，标记过的单核细胞在关节炎症部位募集不断增多，而耗竭外周血单核细胞，关节部位病理评分减轻，炎症反应降低[18]。巨噬细胞可进一步分化为具有促炎作用的M1型巨噬细胞和具有抗炎作用的M2型巨噬细胞[19,20]。其中干扰素-γ、TNF-α和细菌脂多糖以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子可诱导产生经典活化的M1型巨噬细胞，并释放促炎因子，如IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-12、IL-23和其他炎症应答分子（如活性氧、一氧化氮），造成关节的损伤；IL-4、IL-13、IL-10和TGF-β等可诱导产生替代活化的M2型巨噬细胞，并释放抑炎因子（IL-10和TGF-β等），有助于血管生成、组织重塑和修复[21,22]。本研究结果显示，针刺小鼠双侧“足三里”后，巨噬细胞数量、M1型巨噬细胞、M2型巨噬细胞均有降低，提示针刺可能通过减少促炎型M1型巨噬细胞发挥抗炎作用，而抗炎型M2型巨噬细胞也下降，可能是取材的时间点尚未出现M2型巨噬细胞数量的变化，虽然针刺促进IL-10含量的增高，有助于诱导产生M2型巨噬细胞，但在此时间点尚未观察到数量的改变。本研究并未发现针刺对IL-4的改变，可能针刺并不能影响IL-4的改变。

抗瓜氨酸化蛋白抗体和类风湿因子与瓜氨酸蛋白形成免疫复合物并激活巨噬细胞，触发炎症细胞因子的释放，如IL-1β和TNF-α[23]。IL-1β在RA中主要由单核细胞和巨噬细胞产生。IL-1β激活单核细胞/巨噬细胞，从而导致炎症增加。它还诱导成纤维细胞的增殖，从而诱导滑膜的增殖。此外，IL-1β激活软骨细胞，导致软骨损伤，并激活破骨细胞，导致骨破坏[24]。TNF-α在RA中主要由单核细胞来源的巨噬细胞产生，是RA发病机制的关键调节因子之一，其在RA患者中的表达增加，TNF-α的过表达在转基因动物中引起自身免疫性关节炎，它激活内皮细胞并募集促炎细胞，如滑膜成纤维细胞和巨噬细胞，从而释放促炎细胞因子，如IL-6和IL-1β[25,26]。因此IL-1β和TNF-a往往成为评价关节炎造模成功与减轻与否的金指标。IL-10在类风湿关节炎中主要是由调节性B细胞分泌，发挥免疫抑制作用，能够抑制自身免疫应答，因此对炎症和自身免疫的调控发挥重要作用[27,28]。IL-10通过减少类风湿关节炎患者的骨关节滑膜周围淋巴细胞和炎症介质的大量浸润，并且阻止破骨细胞激活而降低关节肿胀发炎程度，抑制关节炎疾病的发展，发挥免疫调节功能[29]。IL-10还通过调控Jak1/STAT3通路减少促炎症介质的释放，启动抗感染性级联反应来抑制免疫应答[30]。IL-4主要由Th2细胞分泌，可抑制炎症因子分泌[31]。IL-4可以激活JAK3/STAT6通路，从而促进巨噬细胞极化为M2型巨噬

细胞发挥抗炎作用[32]。本研究结果表明,针刺组足爪部位TNF-α、IL-1β含量降低,IL-10含量升高,并且其热辐射痛阈升高,足趾容积及关节炎症评分均降低,表明针刺可抑制炎症,IL-4未见明显升高,说明针刺对其影响较小。

单核细胞募集到足爪局部变为巨噬细胞是RA发展的重要环节,趋化因子在当中起了重要作用。引起单核细胞迁移的趋化因子有CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1等。CCL2在许多炎症性疾病(如关节炎、动脉粥样硬化和癌症)中引起单核细胞募集到炎症部位[33,34],主要由单核细胞和巨噬细胞产生,在RA中,血清和滑膜组织中CCL2表达水平均升高[35]。有研究表明,CCL7、CCL12主要由单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞产生,CCL7、CCL12在RA中的过表达会加剧RA的发展[36,37]。CX3CL1由滑膜组织中的成纤维细胞样滑膜细胞和内皮细胞上表达。肿瘤坏死因子-α和干扰素-γ会增强CX3CL1的表达,并诱导单核细胞、T细胞和破骨细胞向RA滑膜组织迁移。CX3CL1还诱导巨噬细胞、T细胞和成纤维细胞样滑膜细胞产生炎症介质。此外,CX3CL1促进血管生成和破骨细胞生成。在RA的动物模型中,通过消除CX3CL1可以改善关节炎症[38]。模型组小鼠CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1升高,说明趋化因子募集单核细胞及炎症因子到病变局部,而针灸干预后其表达量降低说明针刺可以降低趋化因子的表达,减少巨噬细胞的募集。

综上所述,针刺可以降低热痛、足趾容积及关节炎评分,降低足爪部位巨噬细胞及M1型巨噬细胞数量,降低趋化因子CCL2、CCL7、CCL12、CX3CL1表达量,表明针刺可通过降低病变部位趋化因子含量,进一步减少巨噬细胞的募集,从而减轻类风湿关节炎小鼠炎性反应,改善疼痛和关节肿胀,发挥治疗作用。

作者贡献度说明:

殷建朝:完成实验,进行指标检测,分析、整理数据,撰写论文;王悦:前期用PCR检测炎症因子在基因水平的表达;公一囡、苑功名、苏枫雅、谢飞:协助完成实验,在指标检测、数据分析方面给予相应的指导;徐媛:通讯作者,实验设计、指导及文章修改;郭永明:对实验的顺利完成给予支持和帮助。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Hughes CE, Nibbs RJ. A guide to chemokines and their receptors[J]. FEBS J, 2018, 285(16): 2944-2971.

2 Murayama MA, Shimizu J, Miyabe C, et al. Chemokines and chemokine receptors as promising targets in rheumatoid arthritis [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1100869.

3 Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity[J]. Einstein (Sao Paulo), 2015, 13(3): 469-473.

4 Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, et al. Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics[J]. Annu Rev Immunol, 2016, 34: 203-242.

5 Thurlings RM, Wijbrandts CA, Bennink RJ, et al. Monocyte scintigraphy in rheumatoid arthritis: The dynamics of monocyte migration in immune-mediated inflammatory disease [J]. PLoS One, 2009, 4 (11): e7865.

6 Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: The good, the bad, and the gluttony [J]. Front Immunol, 2021, 12: 708186.

7 Abdelaziz MH, Abdelwahab SF, Wan J, et al. Alternatively activated macrophages; A double-edged sword in allergic asthma[J]. J Transl Med, 2020, 18: 58.

8 Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: Positioning cells for host defense and immunity [J]. Annu Rev Immunol, 2014, 32: 659-702.

9 Qin F, Zhang H, Liu A, et al. Analgesic effect of *Zanthoxylum nitidum* extract in inflammatory pain models through targeting of ERK and NF-κB signaling[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 359.

10 Gao F, Xiang HC, Li HP, et al. Electroacupuncture inhibits NLRP3 inflammasome activation through CB2 receptors in inflammatory pain [J]. Brain Behav Immun, 2018, 67: 91-100.

11 苑功名, 刘兴星, 公一囡, 等. 一种小鼠后肢针灸固定装置的制作与使用[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 14-19.
Yuan G, Liu X, Gong Y, et al. A device for securing mouse hind limbs for acupuncture and moxibustion experimental manipulation [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 14-19.

12 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位第3部分:小鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(5): 445-446.
China Association of Acupuncutre-Moxibustion. Name and location of commonly used acupoints in experimental animals part 3 : Mice[J]. Acupunct Res, 2021, 46(5): 445-446.

13 Radu AF, Bungau SG. Management of rheumatoid ar-

thritis: An overview[J]. Cells, 2021, 10(11): 2857.

14 Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis [J]. Lancet, 2010, 376(9746): 1094-1108.

15 赵磊，万磊，刘健，等. 佐剂性关节炎大鼠炎症极化、Notch通路变化及其相关性分析[J].海南医学院学报，2021, 27(22): 1681-1686.
Zhao L, Wan L, Liu J, et al. Changes and correlation of inflammatory polarization and Notch pathway in rats with adjuvant arthritis [J]. J Hainan Med Univ, 2021, 27(22): 1681-1686.

16 Yoon BR, Yoo SJ, Choi YH, et al. Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA) [J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109775.

17 Boutet MA, Courties G, Nerviani A, et al. Novel insights into macrophage diversity in rheumatoid arthritis synovium[J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(3): 102758.

18 Brühl H, Cihak J, Plachý J, et al. Targeting of Gr-1+, CCR2+ monocytes in ollagen-induced arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(9): 2975-2985.

19 Funes SC, Rios M, Escobar-Vera J, et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity[J]. Immunology, 2018, 154(2): 186-195.

20 王成，袁君，郭彦玎，等. 艾灸“足三里”对膝关节骨关节炎与类风湿性关节炎大鼠膝关节滑膜巨噬细胞极化的影响的比较研究[J]. 针刺研究，2023, 48(10): 993-1000.
Wang C, Yuan J, Guo Y, et al. Comparison of the effect of moxibustion at “Zusanli” (ST36) on the polarization of synovial macrophages of knee joints in rats with knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. Acupunct Res, 2023, 48(10): 993-1000.

21 Yang G, Kang HC, Cho YY, et al. Inflammasomes and their roles in arthritic disease pathogenesis[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1027917.

22 England BR, Thiele GM, Mikuls TR. Anticitrullinated protein antibodies: Origin and role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2017, 29(1): 57-64.

23 Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine networks in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10922.

24 Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1β secretion [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(4): 189-195.

25 McInnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. Lancet, 2017, 389(10086): 2328-2337.

26 Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(1): 49-62.

27 Keystone E, Wherry J, Grint P. IL-10 as a therapeutic strategy in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 1998, 24(3): 629-639.

28 Volchenkov R, Karlsen M, Jonsson R, et al. Type 1 regulatory T cells and regulatory B cells induced by tolerogenic dendritic cells[J]. Scand J Immunol, 2013, 77(4): 246-254.

29 Koh B, Hufford MM, Sun X, et al. Etv5 regulates IL-10 production in Th cells[J]. Immunol, 2017, 198(5): 2165-2171.

30 Johnson JL, Jones MB, Cobb BA. Polysaccharide-experienced effector T cells induce IL-10 in FoxP3+ regulatory T cells to prevent pulmonary inflammation[J]. Glycobiology, 2018, 28(1): 50-58.

31 Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis [J]. Cells, 2021, 10(11): 3000.

32 Zhong Y, Zhang L, Lu W, et al. Moxibustion regulates the polarization of macrophages through the IL-4/STAT6 pathway in rheumatoid arthritis[J]. Cytokine, 2022, 152: 155835.

33 Dhaiban S, Al-Ani M, Elemam NM, et al. Targeting chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Inflamm Res, 2020, 13: 619-633.

34 Fei L, Ren X, Yu H, et al. Targeting the CCL2/CCR2 axis in cancer immunotherapy: One stone, three birds [J]. Front Immunol, 2021, 12: 771210.

35 Zhang L, Yu M, Deng J, et al. Chemokine signaling pathway involved in CCL2 expression in patients with-rheumatoid arthritis[J]. Yonsei Med J, 2015, 56(4): 1134-1142.

36 Mao D, Jiang H, Zhang F, et al. HDAC2 exacerbates rheumatoid arthritis progression *via* the IL-17-CCL7 signaling pathway [J]. Environ Toxicol, 2023, 38(7): 1743-1755.

37 Rossato C, Albuquerque LL, Katz IS, et al. Early peritoneal CC chemokine production correlates with divergent inflammatory phenotypes and susceptibility to experimental arthritis in mice[J]. Immunol Res, 2019, 2019: 2641098.

38 Nanki T, Imai T, Kawai S. Fractalkine/CX3CL1 in rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2017, 27(3): 392-397.

[本文编辑] 雷 燕 宋睿璞 陈思润