

基于调节性 T 细胞/辅助性 T 细胞 17 平衡探讨 低强度脉冲聚焦超声治疗小鼠类风湿关节炎的作用机制

何镜¹, 王艳杰², 陈卓玥¹, 崔博², 蓝泉博³, 周文智⁴

(1. 成都体育学院, 四川 成都 641418; 2. 四川省骨科医院, 四川 成都 610041;

3. 纽约大学, 纽约 10012; 4. 成都市妇女儿童中心医院, 四川 成都 610091)

摘要 目的:观察低强度脉冲聚焦超声治疗小鼠类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的效果,并基于调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)/辅助性 T 细胞 17(helper T cell 17, Th17)平衡探讨其作用机制。**方法:**将 36 只雄性 DBA/1J 小鼠随机分为正常组、模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组和聚焦超声组,每组 6 只。除正常组外的各组小鼠均采用Ⅱ型胶原诱导法建立胶原诱导性关节炎模型。在造模结束时,采用关节炎指数评分评价小鼠双侧踝关节关节炎情况,判断造模是否成功。在造模成功后,模型组小鼠直接处死取材,聚焦超声组在小鼠肾俞、足三里穴位采用低强度脉冲聚焦超声治疗,瘢痕灸组在相同穴位采用艾柱直接灸,安慰剂组在相同部位采用棉花直接灸,正常组、不治疗组不采取任何治疗措施。聚焦超声组、瘢痕灸组、安慰剂组每天治疗 1 次,治疗 6 d 为 1 个疗程,共治疗 2 个疗程。在治疗 1 个疗程时、治疗结束时,记录小鼠双侧踝关节关节炎指数评分。治疗结束后,采用 HE 染色观察各组小鼠踝关节软骨和滑膜组织病变情况,采用流式细胞术检测各组小鼠脾脏组织中 Th17、Treg 的百分比,分别采用实时定量 PCR 和 Western Blot 法检测各组小鼠脾脏组织中叉头框蛋白 3(forkhead box protein 3, FOXP3)、维甲酸受体相关孤儿受体(retinoid acid receptor-related orphan receptor, ROR γ t)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平。**结果:**①小鼠踝关节关节炎指数评分结果。不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节关节炎指数评分随时间变化均呈上升趋势($F=4.903, P=0.019; F=4.189, P=0.031$),瘢痕灸组小鼠踝关节关节炎指数评分随时间变化基本保持不变($F=1.683, P=0.212$),聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分随时间变化呈下降趋势($F=11.354, P=0.000$)。治疗结束时,瘢痕灸组和聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分均低于不治疗组和安慰剂组(不治疗组: $P=0.000, P=0.000$;安慰剂组: $P=0.000, P=0.000$),不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节关节炎指数评分的差异无统计学意义($P=1.000$),聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分低于瘢痕灸组($P=0.000$)。②小鼠踝关节组织病理学观察结果。模型组小鼠软骨层变薄、软骨面粗糙不平、软骨细胞分布不均匀,滑膜组织细胞排列紊乱,有增生及炎症细胞浸润;与模型组相比,不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节组织病变略有加重,瘢痕灸组小鼠踝关节组织病变略有减轻,聚焦超声组小鼠踝关节组织病变明显减轻。③脾脏组织中 Th17、Treg 的百分比检测结果。不治疗组和安慰剂组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均高于模型组($P=0.000, P=0.000$),Treg 的百分比均低于模型组($P=0.000, P=0.000$);瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均低于模型组($P=0.002, P=0.000$),瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 Treg 的百分比低于模型组($P=0.000$),聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Treg 的百分比高于模型组($P=0.000$)。聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比低于瘢痕灸组($P=0.000$),Treg 的百分比高于瘢痕灸组($P=0.000$)。④小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 表达水平检测结果。不治疗组、安慰剂组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均低于模型组($P=0.001, P=0.001$),ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均高于模型组(ROR γ t: $P=0.001, P=0.019$;NF- κ B: $P=0.000, P=0.000$);瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量与模型组的组间差异均无统计学意义($P=0.999, P=0.052, P=0.995$);聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均高于模型组($P=0.000$),ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均低于模型组($P=0.000, P=0.000$);聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均高于瘢痕灸组($P=0.000$),ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均低于瘢痕灸组($P=0.000, P=0.000$)。⑤小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的蛋白表达水平检测结果。不治疗组、安慰剂组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量均低于模型组($P=0.001, P=0.000$),ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均高于模型组(ROR γ t: $P=0.010, P=0.013$;NF- κ B: $P=0.014, P=0.001$);瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量与模型组的差异均无统计学意义($P=0.573, P=0.304$);瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量与模型组的组间差异均无统计学意义($P=0.999, P=0.999$),聚焦超声组小鼠脾脏组织中 ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均低于模型组($P=0.017, P=0.010$);聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量高

基金项目:四川省中医药管理局科学技术研究专项课题(2023MS611)

通讯作者:王艳杰 E-mail:13236437@qq.com

于瘢痕灸组($P=0.021$), ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均低于瘢痕灸组($P=0.016, P=0.010$)。结论: RA 在不治疗的情况下病情会不断加重, 瘢痕灸和低强度脉冲聚焦超声均能够遏制 RA 病情进展, 且低强度脉冲聚焦超声的效果优于瘢痕灸; 其作用机制可能与调节 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的表达从而影响 Treg/Th17 平衡有关。

关键词 关节炎, 类风湿; 胶原诱导性关节炎; 瘢痕灸疗法; 超声疗法; T-淋巴细胞, 调控; Th17 细胞; 小鼠

Exploring the mechanism of focused low-intensity pulsed ultrasound in treating rheumatoid arthritis in mice based on the balance between regulatory T cell and T helper cell 17

HE Jing¹, WANG Yanjie², CHEN Zhuoyue¹, CUI Bo², LAN Quanbo³, ZHOU Wenzhi⁴

1. Chengdu Sport University, Chengdu 641418, Sichuan, China

2. Sichuan Province Orthopedic Hospital, Chengdu 610041, Sichuan, China

3. New York University, New York 10012, USA

4. Chengdu Women's and Children's Central Hospital, Chengdu 610091, Sichuan, China

ABSTRACT Objective: To observe the therapeutic effects of focused low-intensity pulsed ultrasound (FLIPUS) on rheumatoid arthritis (RA) in mice, and to explore its underlying mechanism based on the balance between regulatory T cell (Treg) and helper T cell 17 (Th17).

Methods: Thirty-six male DBA/1J mice were randomized into normal group, model group, untreated group, placebo group, scar moxibustion group, and FLIPUS group, with 6 cases in each group. All mice but the ones in normal group were modeled by type II collagen for inducing collagen-induced arthritis (CIA). At the end of the modeling, the arthritis of bilateral ankles were assessed using the arthritis index (AI) score to evaluate whether the modeling was successful. After successful modeling, the mice in model group were sacrificed for collecting their spleens and bilateral ankle joints. The ones in FLIPUS group were treated with FLIPUS at Shenshu (BL23) and Zusanli (ST36), the ones in scar moxibustion group with moxa cone moxibustion at the same acupoints as FLIPUS group, the ones in placebo group with cotton moxibustion at the same sites, and the ones in normal group and untreated group were not given any treatment. The mice in FLIPUS group, scar moxibustion group, and placebo group were treated once a day for consecutive 2 courses of treatment, 6 days for each course. The AI scores of bilateral ankle joints were recorded after 6-day treatment and at the end of treatment, respectively. After the end of treatment, all mice but the ones in model group were sacrificed for harvesting their spleens and bilateral ankle joints, then the collected ankle cartilages and synovial tissues were stained with HE for observing the histopathological changes, and the percentages of Th17 and Treg in spleen tissues were detected by flow cytometry. Moreover, the mRNA and protein expression levels of forkhead box protein 3 (FOXP3), retinoid acid receptor-related orphan receptor (ROR) γ t, and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the spleen tissues of mice in each group were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western Blot, respectively. **Results:** ①The ankle AI score. The ankle AI score presented an upward trend over time in untreated group and placebo group ($F=4.903, P=0.019; F=4.189, P=0.031$), remained essentially unchanged over time in scar moxibustion group ($F=1.683, P=0.212$), and presented a downward trend over time in FLIPUS group ($F=11.354, P=0.000$). At the end of treatment, the ankle AI score was lower in scar moxibustion group and FLIPUS group compared to untreated group and placebo group (untreated group: $P=0.000, P=0.000$; placebo group: $P=0.000, P=0.000$), with no significant difference between untreated group and placebo group ($P=1.000$), and a much lower score in FLIPUS group compared to scar moxibustion group ($P=0.000$). ②The pathological changes in ankle tissues. The changes, manifesting as thinned cartilage layer, roughened and uneven cartilage surface, and irregular distribution of chondrocyte, accompanied by disorderedly arranged synovial tissue architecture with hyperplasia and inflammatory cell infiltration, were observed in the ankle joint tissues of mice in model group; while, compared with that of model group, the ankle joint pathology slightly progressed in mice of untreated group and placebo group, whereas, which was moderately attenuated in scar moxibustion group, and marked attenuated in FLIPUS group. ③The percentages of Th17 and Treg in spleen tissues. The percentage of Th17 in the spleen tissue was higher, while that of Treg was lower in untreated group and placebo group compared to model group ($P=0.000, P=0.000; P=0.000, P=0.000$). The percentage of Th17 in spleen tissue was lower in scar moxibustion group and FLIPUS group compared to model group ($P=0.002, P=0.000$), while that of Treg was lower in scar moxibustion group compared to model group, but was higher in FLIPUS group compared to model group ($P=0.000, P=0.000$). Furthermore, the percentage of Th17 in the spleen tissue was lower, while that of Treg was higher in FLIPUS group compared to scar moxibustion group ($P=0.000, P=0.000$). ④The mRNA expression levels of FOXP3, ROR γ t, and NF- κ B in the spleen tissues. The relative mRNA expression level of FOXP3 in the spleen tissues was lower, while that of

ROR γ t and NF- κ B were higher in untreated group and placebo group compared to model group (FOXP3: $P=0.001$, $P=0.001$; ROR γ t: $P=0.001$, $P=0.019$; NF- κ B: $P=0.000$, $P=0.000$). The relative mRNA expression levels of FOXP3, ROR γ t, and NF- κ B in the spleen tissues were not significantly different from each other between scar moxibustion group and model group ($P=0.999$, $P=0.052$, $P=0.995$). The relative mRNA expression level of FOXP3 in the spleen tissues was higher, while that of ROR γ t and NF- κ B were lower in FLIPUS group compared to model group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). Furthermore, the relative mRNA expression level of FOXP3 in the spleen tissues was higher, while that of ROR γ t and NF- κ B were lower in FLIPUS group compared to scar moxibustion group ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$). ⑤The protein expression levels of FOXP3, ROR γ t, and NF- κ B in the spleen tissues. The relative protein expression level of FOXP3 in the spleen tissues was lower, while that of ROR γ t and NF- κ B were higher in untreated group and placebo group compared to model group (FOXP3: $P=0.001$, $P=0.000$; ROR γ t: $P=0.010$, $P=0.013$; NF- κ B: $P=0.014$, $P=0.001$). The relative protein expression level of FOXP3 in the spleen tissues was not significantly different from each other between scar moxibustion group and model group, and between FLIPUS group and model group ($P=0.573$, $P=0.304$). The relative protein expression levels of ROR γ t and NF- κ B in the spleen tissues were not significantly different from each other between scar moxibustion group and model group ($P=0.999$, $P=0.999$), while, were lower in FLIPUS group compared to model group ($P=0.017$, $P=0.010$). Furthermore, the relative protein expression level of FOXP3 in the spleen tissues was higher, while that of ROR γ t and NF- κ B were lower in FLIPUS group compared to scar moxibustion group ($P=0.021$, $P=0.016$, $P=0.010$). **Conclusion:** The RA will continuously worsen without treatment. Both scar moxibustion and FLIPUS can slow the progression of RA, with FLIPUS demonstrating superior efficacy to scar moxibustion. It may work by influencing the balance of Treg/Th17 via modulating the expression of FOXP3, ROR γ t, and NF- κ B.

Keywords arthritis, rheumatoid; collagen-induced arthritis; scarring moxibustion therapy; ultrasonic therapy; T-lymphocytes, regulatory; Th17 cells; mice

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的慢性全身性自身免疫疾病,以手、腕、膝、踝等多关节的持续性滑膜炎和滑膜血管翳形成成为主要病理特征,后期可能导致关节畸形、关节功能丧失等严重后果^[1]。RA 的发病率随着年龄增长而增加,并在 60~70 岁达到顶峰,且女性的发病率高于男性^[2]。RA 治疗的主要目标是控制炎症、减轻疼痛,遏制疾病进展,并尽可能提高患者的生活质量^[3]。目前,临床上治疗 RA 的方法较多,其中艾灸作为中医特色疗法表现出良好的治疗效果^[4]。瘢痕灸是艾灸的一种,其具有渗透力强、见效快等特点,能够有效缓解 RA 患者的关节疼痛^[5]。然而,由于该方法治疗时疼痛感强烈、损伤皮肤、影响美观,患者接受度较低,临床上应用日趋减少。超声波疗法利用超声波在机体组织中产生的机械效应,能够发挥加速局部血液循环、缓解疼痛的作用^[6]。近年来,低强度脉冲聚焦超声在临床上应用逐渐增多,在缓解关节疼痛、改善关节功能方面取得了良好疗效,且具有无创、安全、舒适等特点^[7-8]。应用低强度脉冲聚焦超声刺激穴位或可成为瘢痕灸的替代疗法。为了探讨低强度脉冲聚焦超声治疗 RA 的疗效及其作用机制,我们建立了小鼠胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 模型,并开展了相关动物实验,现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

8~10 周龄雄性 SPF 级 DBA/1J 小鼠 36 只,购自北京华阜康生物科技有限公司[动物生产许可证号: SCKK(京)2019-0008]。小鼠饲养于成都体育学院动物实验室[动物使用许可证号: SYXK(川)2023-0211],饲养温度 (27.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 (55 ± 5)%,12 h 明暗交替,自由进食饮水。动物实验方案经成都体育学院动物伦理委员会审查通过,伦理批件号:成体伦理[2023]113 号。

1.2 实验主要试剂

牛 II 型胶原 (货号:20021,美国 Chondrex 公司),福氏完全佐剂 (货号:F5881)、福氏不完全佐剂 (货号:F5506)均购自美国 Sigma 公司,醋酸-醋酸钠缓冲液 (货号:R27203,上海源叶生物科技有限公司),艾绒 (货号:6973676241586,南阳市东易宛艾生物科技有限公司),HE 染液 (货号:BL735A,北京白鲨易科技有限公司),台盼蓝 (货号:C3601-2,碧云天生物科技有限公司),佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯 (货号:CS1001)、布雷菲德菌素 A (货号:CS1002)均购自杭州联科生物技术有限公司,小鼠辅助性 T 细胞 17 (helper T cell 17, Th17)染色试剂盒 (货号:KTH217)、小鼠调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg)染色试剂

盒(货号:KTR201)均购自杭州联科生物技术有限公司,总 RNA 提取试剂盒(货号:DP419,北京天根生化科技有限公司),All-In-One 5 × RT Mastermix(货号:G592)、Blastaq™ 2 × qPCR Mastermix(货号:G891)均购自爱必梦生物科技有限公司,叉头框蛋白 3(fork-head box protein 3, FOXP3)抗体(货号:22228-1-AP)、维甲酸受体相关孤儿受体(retinoid acid receptor-related orphan receptor, ROR)γt 抗体(货号:29910-1-AP)、核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)抗体(货号:10745-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(货号:GB11002,武汉赛维尔生物科技有限公司),辣根过氧化物酶-羊抗鼠免疫球蛋白 G(货号:A0216,碧云天生物技术有限公司)。

1.3 实验主要仪器

CD-2 型低强度脉冲聚焦超声治疗仪(成都海之元生物科技有限公司),RM2016 型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司),Eclipse E100 型正置光学显微镜、DS-U3 型成像系统(日本尼康公司),MICRO-17R 型低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Cytotflex 流式细胞仪(美国 Beckman 公司),MCO-15AC 型二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司),MA-6000 型实时荧光定量 PCR 仪(苏州雅睿生物技术有限公司),XRS + 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司)。

2 方 法

2.1 分组方法

将 36 只小鼠按体质量排序编号,从随机数字表中连续抄录 36 个随机数字记录在小鼠编号下方,再将 36 个随机数字从小到大排序,将随机数字排序 1 ~ 6 对应的小鼠纳入正常组、7 ~ 12 对应的小鼠纳入模型组、13 ~ 18 对应的小鼠纳入不治疗组、19 ~ 24 对应的小鼠纳入安慰剂组、25 ~ 30 对应的小鼠纳入瘢痕灸组、31 ~ 36 对应的小鼠纳入聚焦超声组。

2.2 造模方法

模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠参考文献[9]采用Ⅱ型胶原诱导法建立 CIA 模型:将牛Ⅱ型胶原溶解于 0.05 mol · L⁻¹ 的醋酸中,配制成浓度为 2 mg · mL⁻¹ 的胶原溶液,4 ℃ 过夜。在冰浴条件下,采用样本均质仪低速混合,将等体积的完全弗氏佐剂滴入胶原溶液,配制成Ⅱ型胶原乳剂。于小鼠尾根部皮下注射 200 μL Ⅱ型胶原乳剂。注射

Ⅱ型胶原乳剂 21 d 后,采用上述方法将胶原溶液与等体积的不完全弗氏佐剂混合,于小鼠尾根部皮下注射 100 μL Ⅱ型胶原乳剂。再次注射Ⅱ型胶原乳剂 7 d 后(造模结束时),采用关节炎指数评分^[10]评价小鼠双侧踝关节关节炎情况,双侧踝关节关节炎指数评分 > 4 分或者单侧踝关节关节炎指数评分 > 2 分,则造模成功^[11]。

2.3 治疗方法

在造模成功后,参考《实验针灸学》^[12]中的动物穴位图谱,确定小鼠肾俞、足三里。将小鼠放入小鼠艾灸固定装置^[13],去除肾俞、足三里处毛发,常规消毒。聚焦超声组采用低强度脉冲聚焦超声治疗:在穴位上涂抹适量耦合剂,将低强度脉冲聚焦超声仪器的操作头放置在穴位处,设置频率 0.8 MHz、强度 50 mW · cm⁻²、操作头与能量聚集焦点距离 28 mm、占空比 20%,每次每个穴位治疗 10 min。瘢痕灸组采用瘢痕灸治疗:按照每壮 1 mg 将艾绒捏成圆柱体,每次每个穴位灸 6 壮。安慰剂组将艾绒换成棉花,采用与瘢痕灸组相同的方法进行治疗。正常组、不治疗组不采取任何治疗措施。聚焦超声组、瘢痕灸组、安慰剂组每天治疗 1 次,治疗 6 d 为 1 个疗程,共治疗 2 个疗程,2 个疗程间休息 2 d。

2.4 踝关节关节炎指数评分测定方法

在治疗 1 个疗程、治疗结束时,采用关节炎指数评分评价小鼠双侧踝关节关节炎情况。

2.5 组织标本获取与保存方法

造模成功后,采用颈椎脱臼法处死模型组小鼠,取小鼠踝关节,浸泡于 4% 多聚甲醛中备用;取小鼠脾脏,分装于无菌冻存管中,液氮速冻 5 min 后转移至 -80 ℃ 超低温冰箱保存。在治疗结束后,采用上述方法处死其余 5 组小鼠,取小鼠脾脏和双侧踝关节,分别采用上述方法处理保存。

2.6 踝关节组织病理学观察方法

取踝关节组织,梯度酒精脱水,石蜡包埋,制成厚度 4 μm 的切片。采用 HE 染色试剂盒进行染色,于显微镜下观察小鼠踝关节软骨和滑膜组织病变情况。

2.7 脾脏组织中 Th17、Treg 的百分比检测方法

取脾脏组织,加入含 2% 胎牛血清的 PBS,研磨后经 200 目的滤网过滤,离心,沉淀用含 2% 胎牛血清的 PBS 重悬,加入淋巴细胞分离液,离心,吸取乳白色单核细胞层,加入含 2% 胎牛血清的 PBS,充分混匀后离

心,重复洗涤 2 次,收集细胞沉淀。将细胞沉淀用 1640 培养基重悬,取 90 μL 细胞悬液,加入 10 μL 台盼蓝溶液,计数活细胞,调整细胞密度约 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。取细胞悬液,加入细胞刺激剂(佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯和布雷菲德菌素 A 混合液),以细胞悬液样本为对照,采用流式细胞仪分别测定 Th17 和 Treg 的百分比。

2.8 脾脏组织中 FOXP3、ROR γt 、NF- κB 的 mRNA 表达水平检测方法

取脾脏组织,提取总 RNA,反转录获得 cDNA 产物,采用实时定量 PCR 检测 FOXP3、ROR γt 、NF- κB 的 mRNA 表达水平。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因的 mRNA 相对表达量。实时定量 PCR 引物信息见表 1。

2.9 脾脏组织中 FOXP3、ROR γt 、NF- κB 的蛋白表达水平检测方法

取脾脏组织,提取总蛋白,采用 Western Blot 法检测 FOXP3、ROR γt 、NF- κB 的蛋白表达水平(FOXP3 和 ROR γt 抗体稀释比例 1:500, GAPDH 和 NF- κB p65 抗体稀释比例为 1:1000)。采用 ImageJ 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算各基因的蛋白相对表达量。

2.10 数据统计方法

采用 SPSS23.0 软件进行数据统计分析。4 组小鼠踝关节关节炎指数评分的比较采用重复测量资料的方差分析;6 组小鼠脾脏组织中 Th17、Treg 的百分比及 FOXP3、ROR γt 、NF- κB 的蛋白相对表达量的组间总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 Tukey's 法;6 组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γt 、NF- κB 的 mRNA 相对表达量的组间总体比较均采用 Welch 检验,组间两两比较均采用 Dunnett's T3 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 小鼠踝关节关节炎指数评分结果

时间因素和分组因素存在交互效应;4 组小鼠的踝关节关节炎指数评分总体比较的组间差异有统计学意义,即存在分组效应;治疗前后不同时间点踝关节关节炎指数评分的差异无统计学意义,即不存在时间效应。不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节关节炎指数评分随时间变化均呈上升趋势,瘢痕灸组小鼠踝关节关节炎指数评分随时间变化基本保持不变,聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分随时间变化呈下降趋势。造模结束时,4 组小鼠踝关节关节炎指数评分的组间差异无统计学意义;治疗 1 个疗程时,瘢痕灸组和聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分均低于不治疗组和安慰剂组(不治疗组: $P = 0.460$, $P = 0.005$;安慰剂组: $P = 0.460$, $P = 0.005$),不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节关节炎指数评分的差异无统计学意义($P = 1.000$),聚焦超声组和瘢痕灸组小鼠踝关节关节炎指数评分的差异无统计学意义($P = 0.227$);治疗结束时,瘢痕灸组和聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分均低于不治疗组和安慰剂组(不治疗组: $P = 0.000$, $P = 0.000$;安慰剂组: $P = 0.000$, $P = 0.000$),不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节关节炎指数评分的差异无统计学意义($P = 1.000$),聚焦超声组小鼠踝关节关节炎指数评分低于瘢痕灸组($P = 0.000$)。见表 2。造模结束时模型组小鼠踝关节及治疗结束时正常组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠踝关节图片见图 1。

3.2 小鼠踝关节组织病理学观察结果

小鼠踝关节组织 HE 染色图片显示,正常组小鼠踝关节软骨层清晰、软骨面光滑、软骨细胞分布均匀,滑膜组织细胞规则排列,无增生及炎症细胞浸润;模型组小鼠软骨层变薄、软骨面粗糙不平、软骨细胞分

表 1 实时定量 PCR 引物信息

基因名称	引物序列(5'—3')	扩增片段长度/bp
叉头框蛋白 3	上游引物 GGTTTACTCGCATGTTCCGC	162
	下游引物 GTTGGCTCCTCTTCTTGCGA	
核因子- κB	上游引物 ACTGTGTTGCCCACTTCAGG	142
	下游引物 GTGGAAGCCCTGTCCTAGTT	
维甲酸受体相关孤儿受体 γt	上游引物 GCTGCAAAGAAGACCCACAC	141
	下游引物 CACATTACACTGCTGGCTGC	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	上游引物 TGGAAAGCTGTGGCGTGAT	146
	下游引物 ACACATTGGGGGTAGGAACAC	

布不均匀,滑膜组织细胞排列紊乱,有增生及炎症细胞浸润;与模型组相比,不治疗组和安慰剂组小鼠踝关节组织病变略有加重,瘢痕灸组小鼠踝关节组织病变略有减轻,聚焦超声组小鼠踝关节组织病变明显减轻(图 2)。

表 2 各组小鼠踝关节炎症指数评分

组别	样本量/例	关节炎指数评分/ ($\bar{x} \pm s$, 分)				F 值	P 值
		造模结束时	治疗 1 个疗程时	治疗结束时	合计		
不治疗组	6	5.667 ± 1.366	7.667 ± 1.366	8.333 ± 1.211	7.222 ± 1.700	4.903	0.019
安慰剂组	6	6.000 ± 1.789	7.667 ± 1.633	8.500 ± 1.049	7.389 ± 1.789	4.189	0.031
瘢痕灸组	6	5.667 ± 1.633	6.333 ± 1.211	5.000 ± 1.414	5.667 ± 1.455	1.683	0.212
聚焦超声组	6	5.500 ± 1.049	4.667 ± 1.033	1.833 ± 0.753	4.000 ± 1.847	11.354	0.000
合计	24	5.708 ± 1.398	6.583 ± 1.767	5.917 ± 2.992	6.069 ± 2.052	2.670 ¹⁾	0.082 ¹⁾
F 值		0.119	6.887	46.797	30.003 ¹⁾	$F = 7.295^{2)}$, $P = 0.000^{2)}$	
P 值		0.948	0.002	0.000	0.000 ¹⁾		

注:1)主效应的 F 值和 P 值;2)交互效应的 F 值和 P 值。

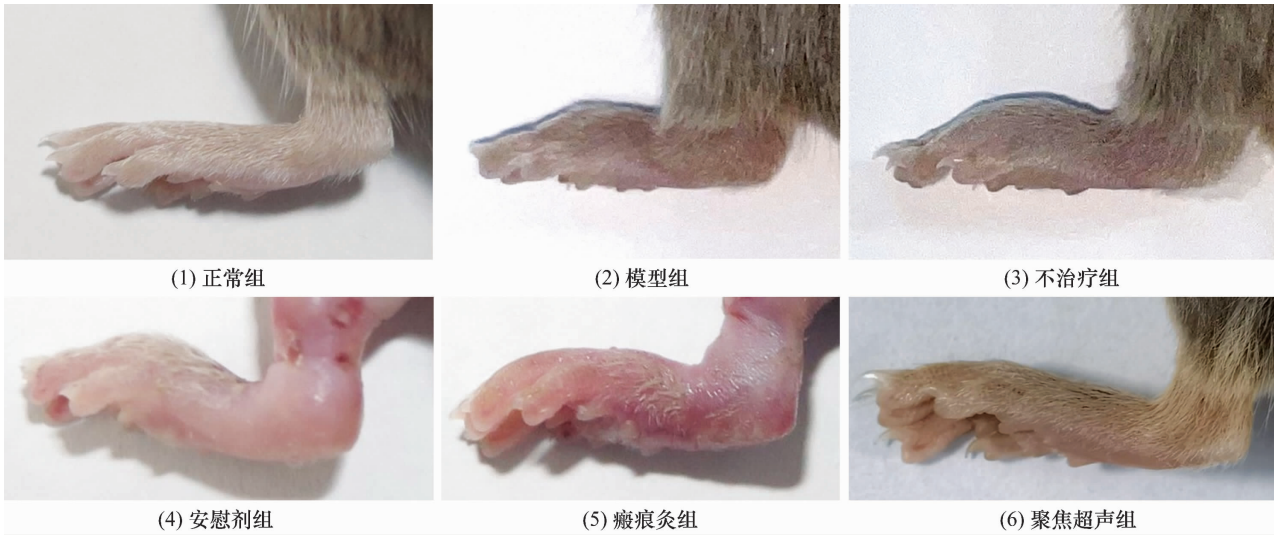


图 1 各组小鼠踝关节肿胀程度比较

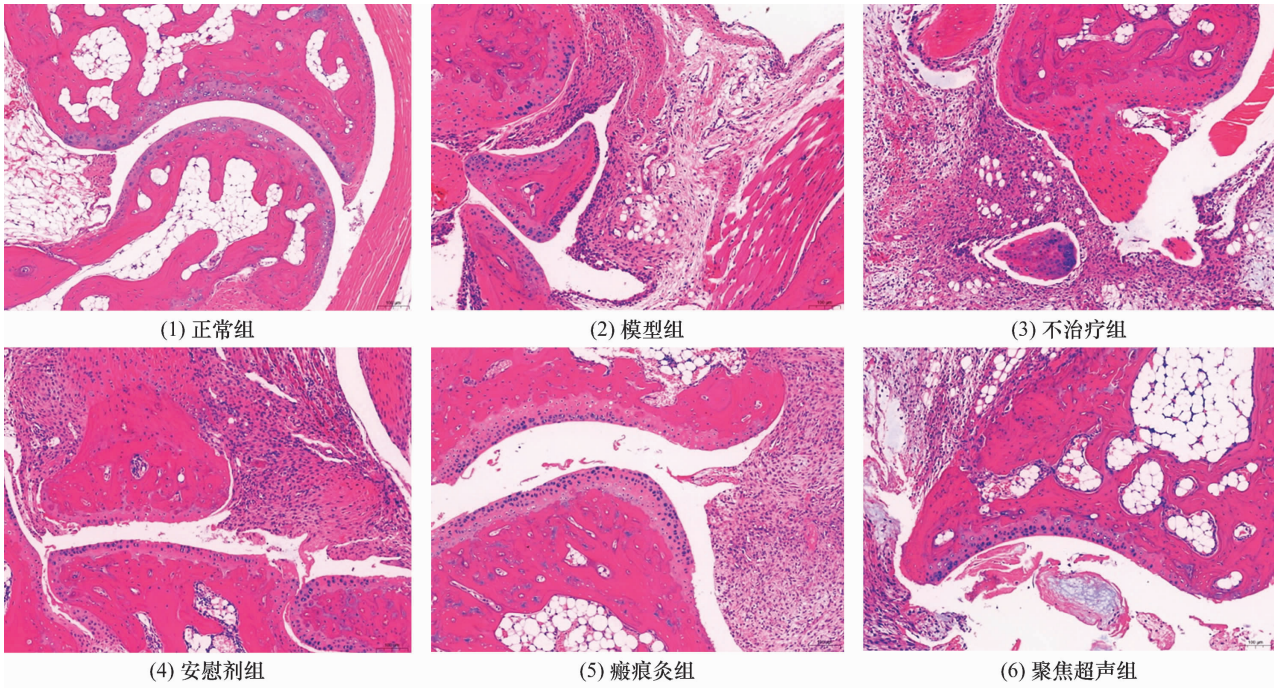


图 2 各组小鼠踝关节组织 HE 染色图片(×100)

3.3 脾脏组织中 Th17、Treg 的百分比检测结果

6 组小鼠脾脏组织中 Th17、Treg 的百分比的组间差异均有统计学意义。模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均高于正常组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$), 聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比与正常组的差异无统计学意义 ($P=0.966$); 模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Treg 的百分比均低于正常组 ($P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。不治疗组和安慰剂组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均高于模型组 ($P=0.000, P=0.000$), Treg 的百分比均低于模型组 ($P=0.000, P=0.000$); 瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均低于模型组 ($P=0.002, P=0.000$), 瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 Treg 的百分比低于模型组 ($P=0.000$), 聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Treg 的百分比高于模型组 ($P=0.000$)。安慰剂组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比与不治疗组的差异无统计学意义 ($P=0.734$), Treg 的百分比低于不治疗组 ($P=0.005$); 瘢痕灸组和聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均低于不治疗组 ($P=0.000, P=0.000$), Treg 的百分比均高于不治疗组 ($P=0.000, P=0.000$)。瘢痕灸组和聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比均低于安慰剂组 ($P=0.000, P=0.000$), Treg 的百分比均高于安慰剂组 ($P=0.000, P=0.000$)。聚焦超声组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比低于瘢痕灸组 ($P=0.000$), Treg 的百分比高于瘢痕灸组 ($P=0.000$)。见表 3、图 3、图 4。

3.4 小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平检测结果

模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均低于正常组

($P=0.039, P=0.003, P=0.004, P=0.050$), ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均高于正常组 (ROR γ t: $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$; NF- κ B: $P=0.000, P=0.000, P=0.000, P=0.000$); 聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量与正常组的组间差异均无统计学意义 ($P=0.707, P=0.777, P=0.285$)。不治疗组、安慰剂组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均低于模型组 ($P=0.001, P=0.001$), ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均高于模型组 (ROR γ t: $P=0.001, P=0.019$; NF- κ B: $P=0.000, P=0.000$); 瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量与模型组的组间差异均无统计学意义 ($P=0.999, P=0.052, P=0.995$); 聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均高于模型组 ($P=0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均低于模型组 ($P=0.000, P=0.000$)。安慰剂组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量与不治疗组的组间差异均无统计学意义 ($P=0.610, P=0.999, P=0.999$); 瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均高于不治疗组 ($P=0.000, P=0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均低于不治疗组 (ROR γ t: $P=0.002, P=0.000$; NF- κ B: $P=0.000, P=0.000$)。瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均高于安慰剂组 ($P=0.000, P=0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均低于安慰剂组 (ROR γ t: $P=0.007, P=0.000$; NF- κ B: $P=0.000, P=0.000$)。聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的 mRNA 相对表达量均高于瘢痕灸组 ($P=0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 相对表达量均低于瘢痕灸组 ($P=0.000, P=0.000$)。见表 4。

表 3 各组小鼠脾脏组织中辅助性 T 细胞 17 和调节性 T 细胞的百分比

组别	样本量/只	辅助性 T 细胞 17/ $(\bar{x} \pm s, \%)$	调节性 T 细胞/ $(\bar{x} \pm s, \%)$
正常组	6	1.222 \pm 0.111	13.390 \pm 0.178
模型组	6	6.602 \pm 0.226	9.497 \pm 0.178
不治疗组	6	8.683 \pm 0.198	6.250 \pm 0.096
安慰剂组	6	8.550 \pm 0.203	5.893 \pm 0.203
瘢痕灸组	6	6.175 \pm 0.105	8.407 \pm 0.119
聚焦超声组	6	1.145 \pm 0.108	11.340 \pm 0.119
F 值		2 523.000	2 148.000
P 值		0.000	0.000

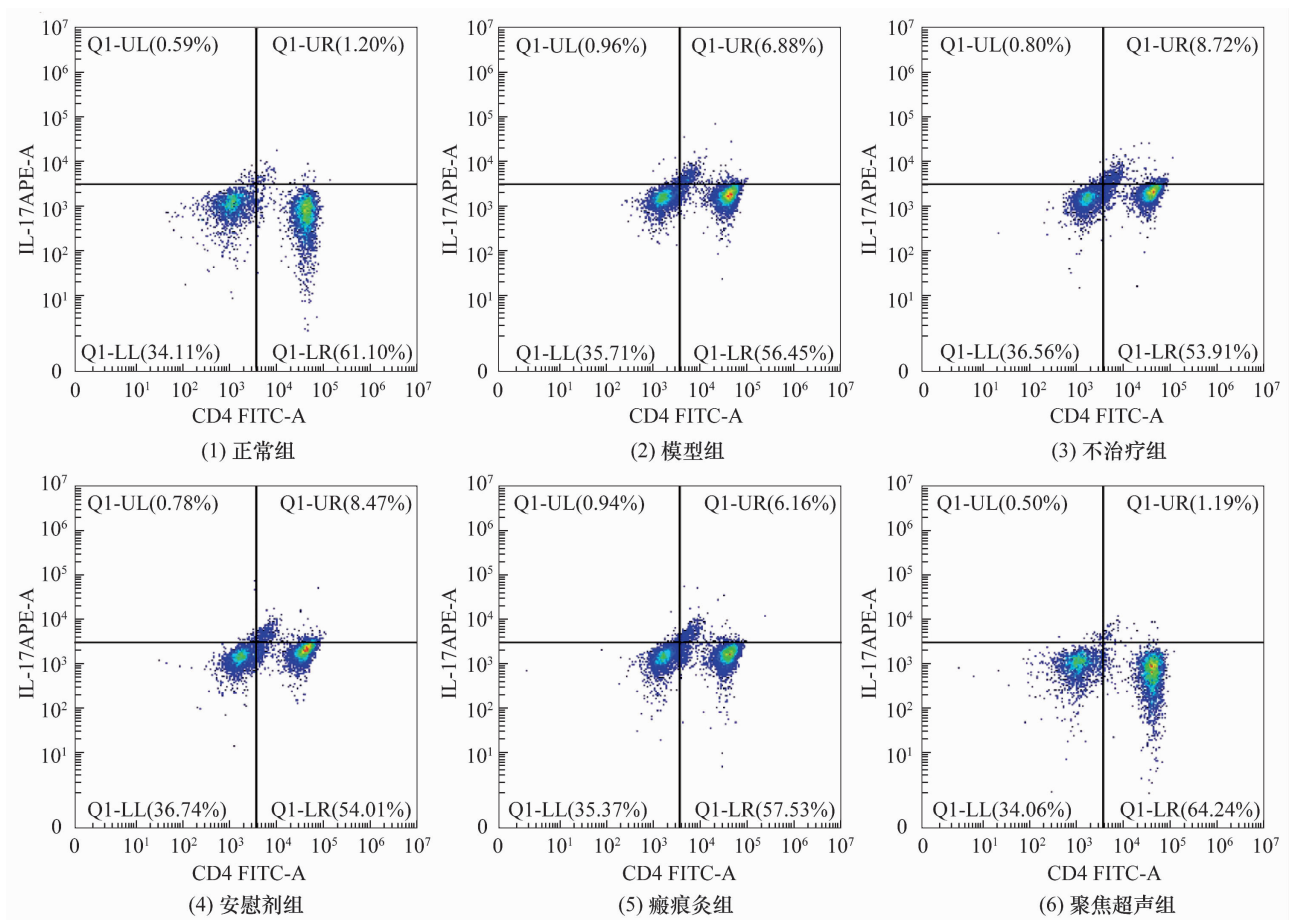


图 3 各组小鼠脾脏组织中辅助性 T 细胞 17 流式细胞仪检测散点图

模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量均低于正常组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.010$), NF- κ B 的蛋白相对表达量均高于正常组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.008$); 模型组、不治疗组、安慰剂组、瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 ROR γ t 的蛋白相对表达量均高于正常组 ($P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000, P = 0.000$), 聚焦超声组小鼠脾脏组织中 ROR γ t 的蛋白相对表达量与正常组的差异无统计学意义 ($P = 0.270$)。不治疗组、安慰剂组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量均低于模型组 ($P = 0.001, P = 0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均高于模型组 (ROR γ t: $P = 0.010, P = 0.013$; NF- κ B: $P = 0.014, P = 0.001$); 瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量与模型组的差异均无统计学意义 ($P = 0.573, P = 0.304$), 瘢痕灸组小鼠脾脏组织中 ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量与模型组的组间差异均无

统计学意义 ($P = 0.999, P = 0.999$), 聚焦超声组小鼠脾脏组织中 ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均低于模型组 ($P = 0.017, P = 0.010$)。安慰剂组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量与不治疗组的组间差异均无统计学意义 ($P = 0.913, P = 0.999, P = 0.454$); 瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量均高于不治疗组 ($P = 0.019, P = 0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均低于不治疗组 (ROR γ t: $P = 0.010, P = 0.000$; NF- κ B: $P = 0.014, P = 0.000$)。瘢痕灸组、聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量均高于安慰剂组 ($P = 0.004, P = 0.000$), ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均低于安慰剂组 (ROR γ t: $P = 0.014, P = 0.000$; NF- κ B: $P = 0.001, P = 0.000$)。聚焦超声组小鼠脾脏组织中 FOXP3 的蛋白相对表达量均高于瘢痕灸组 ($P = 0.021$), ROR γ t、NF- κ B 的蛋白相对表达量均低于瘢痕灸组 ($P = 0.016, P = 0.010$)。见表 4、图 5。

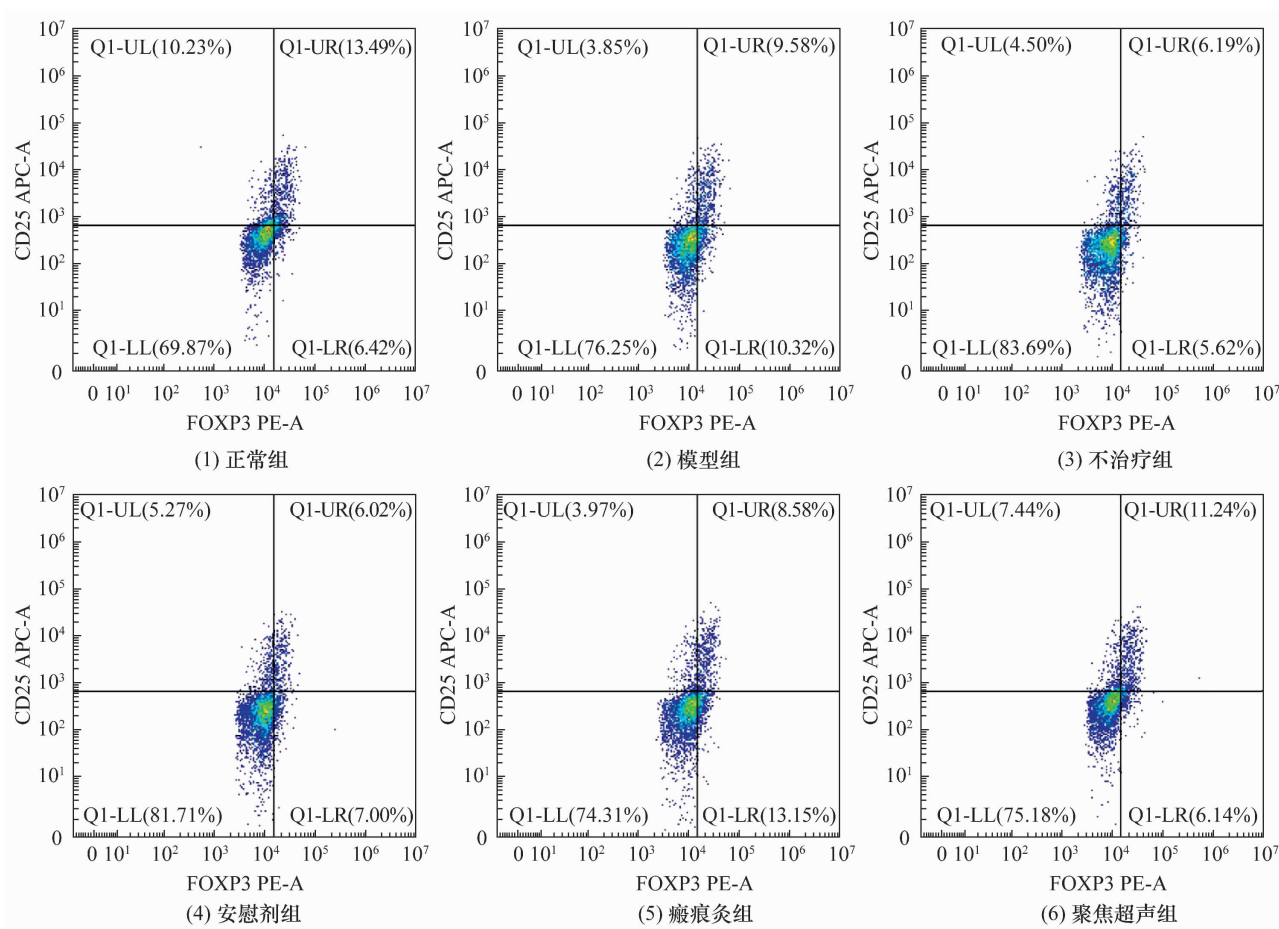


图 4 各组小鼠脾脏组织中调节性 T 细胞流式细胞仪检测散点图

表 4 各组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的 mRNA 和蛋白相对表达量

组别	样本量/ 只	FOXP3 ¹⁾ ($\bar{x} \pm s$)		ROR γ t ²⁾ ($\bar{x} \pm s$)		NF- κ B ³⁾ ($\bar{x} \pm s$)	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常组	6	1.040 \pm 0.491	1.010 \pm 0.031	1.193 \pm 0.593	0.267 \pm 0.135	1.410 \pm 0.841	0.333 \pm 0.101
模型组	6	0.374 \pm 0.026	0.720 \pm 0.053	6.978 \pm 1.032	0.780 \pm 0.115	37.190 \pm 10.840	0.767 \pm 0.049
不治疗组	6	0.039 \pm 0.018	0.473 \pm 0.040	13.110 \pm 3.447	1.133 \pm 0.117	81.080 \pm 15.390	0.970 \pm 0.060
安慰剂组	6	0.051 \pm 0.008	0.430 \pm 0.061	13.640 \pm 4.368	1.120 \pm 0.044	83.310 \pm 14.390	1.063 \pm 0.035
瘢痕灸组	6	0.398 \pm 0.061	0.647 \pm 0.055	5.640 \pm 0.380	0.783 \pm 0.068	41.720 \pm 9.601	0.767 \pm 0.051
聚焦超声组	6	0.743 \pm 0.140	0.817 \pm 0.072	1.878 \pm 1.090	0.453 \pm 0.091	3.489 \pm 2.147	0.553 \pm 0.045
F 值		107.000	48.450	93.670	36.480	136.200	58.580
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

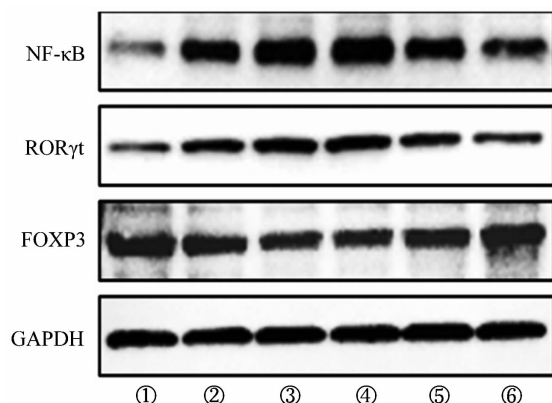
注:1) 叉头框蛋白 3;2) 维甲酸受体相关孤儿受体 γ t;3) 核因子- κ B。

4 讨论

RA 属中医学“历节风”“顽痹”“尪痹”等范畴,病机为本虚标实,风寒湿邪侵袭。瘢痕灸是传统灸法之一,以温补为主、补泻兼施,能够补充元气、驱邪外出。瘢痕灸历史悠久,被古人用于多种疑难杂症的治疗,疗效显著^[14]。《小品方》曰:“灸得脓坏,风寒乃出,不坏,则病不除也。”《甲乙经》曰:“灸疮不发者,用故履底灸令热熨之,三日即发,脓出自然愈疾。”《针灸资生经》曰:“凡着艾得疮发,所患即捷,若不发,其病不

愈。”古人采用瘢痕灸治疗过程中,重视灸疮的发生,并将灸疮作为治愈疾病的关键^[15]。然而,由于瘢痕灸治疗过程中强烈的灼痛感及治疗后残留瘢痕,患者对于瘢痕灸的接受度较低,瘢痕灸在临床上的应用也日趋减少。近年来,低强度脉冲聚焦超声作为一种物理疗法,具有无创、安全、舒适等特点,逐渐在临床上广泛应用^[16]。王枰稀等^[17]的研究结果表明,低强度脉冲聚焦超声治疗膝骨关节炎,能够缓解膝关节疼痛、改善膝关节活动度,提高患者生活质量。因此,结

合中医穴位应用低强度脉冲聚焦超声或可成为癍痕灸的替代疗法。



NF- κ B 为核因子- κ B, ROR γ t 为维甲酸受体相关孤儿受体 γ t, FOXP3 为叉头框蛋白 3, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶;①为正常组,②为模型组,③为不治疗组,④为安慰剂组,⑤为癍痕灸组,⑥为聚焦超声组。

图5 各组小鼠脾脏组织中 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的蛋白表达 Western Blot 法检测结果

小鼠 CIA 模型具有与人 RA 相似的临床特征,能够模拟 RA 的发病过程。在本研究中,我们建立了小鼠 CIA 模型, CIA 模型小鼠表现出踝关节、跖趾关节红肿等症状,则提示造模成功。我们选取肾俞和足三里作为治疗穴位,肾俞是足太阳膀胱经上的穴位,灸之可补肾纳气、健骨强筋;足三里是足阳明胃经的穴位,灸之可燥化脾湿、生发胃气;二穴合灸,共奏温阳散寒、扶阳除痹之效^[18]。路晓清等^[19]研究发现,艾灸肾俞、足三里可减轻 RA 炎症反应,其作用机制与促进半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 12 表达,进而抑制 NOD 样受体蛋白 3 的激活有关。唐洁等^[20]的研究结果表明,艾灸肾俞、足三里能够显著缓解 RA 患者的关节疼痛、改善关节活动度。

免疫稳态是维持健康状态的关键, Treg/Th17 平衡在维持免疫稳态中发挥重要作用^[21]。 Th17 和 Treg 是 CD4⁺ T 细胞分化而成的不同亚群。 Th17 细胞主要通过分泌白细胞介素 (interleukin, IL)-17 促进炎症反应,引起自身免疫性疾病的发生; Treg 主要通过分泌 IL-10 和转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 参与抗炎反应,维持自身免疫耐受状态^[22]。相关研究表明, Treg/Th17 平衡失调与 RA 的发生密切相关^[23]。 Treg 减少、 Th17 增加会导致免疫系统失控,引起免疫细胞和炎症因子大量生成,加剧 RA 症

状^[24]。此外, Th17 的分化依赖 TGF- β 和 ROR γ t, 而 Treg 的分化则依赖 TGF- β 和 FOXP3^[25]。因此, ROR γ t 和 FOXP3 分别是 Th17 和 Treg 的特征蛋白。本研究结果显示,模型组、不治疗组、安慰剂组小鼠脾脏组织中 Th17 的百分比正常组升高, Treg 的百分比正常组降低;而癍痕灸组和聚焦超声组 Th17 的百分比正常组降低, Treg 的百分比正常组升高;同时, FOXP3 的 mRNA 和蛋白表达水平表现出和 Treg 的百分比相似的变化趋势, ROR γ t 的 mRNA 和蛋白表达水平表现出和 Th17 的百分比相似的变化趋势。

NF- κ B 是免疫反应的关键调节因子,在 RA、系统性红斑狼疮、 I 型糖尿病、炎症性肠病等多种自身免疫性疾病的发生发展中起重要作用^[26]。在 RA 进程中, NF- κ B 主要通过调控促炎性细胞因子、基质金属蛋白酶、血管生成因子及诱导酶的表达参与炎症反应、软骨损伤等病理过程^[27]。相关研究表明, IL-6 和肿瘤坏死因子- α 能够促进 FOXP3 拮抗剂 miR-34a 的转录,进而抑制 FOXP3 表达,导致 Treg/Th17 的失衡^[28]。本研究结果显示,模型组、不治疗组、安慰剂组小鼠脾脏组织中 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平较正常组显著升高,而癍痕灸组和聚焦超声组 NF- κ B 的 mRNA 和蛋白表达水平均较不治疗组降低。我们认为, NF- κ B 也是癍痕灸和低强度脉冲聚焦超声调控 Treg/Th17 平衡的关键分子。

此外,在本研究中,我们在造模成功后将模型组小鼠处死取材,并设置了不治疗组和安慰剂组。不治疗组和安慰剂组与模型组的比较结果表明,在不治疗的情况下, RA 的各种症状会不断加重,并不会随时间延长而自行缓解。安慰剂组的设置在排除非特异实验因素干扰的同时,也说明单纯灼烧并不能起到治疗效果。

本研究结果表明, RA 在不治疗的情况下病情会不断加重,癍痕灸和低强度脉冲聚焦超声均能够遏制 RA 病情进展,且低强度脉冲聚焦超声的效果优于癍痕灸;低强度脉冲聚焦超声治疗小鼠 RA 的作用机制可能与调节 FOXP3、ROR γ t、NF- κ B 的表达从而影响 Treg/Th17 平衡有关。

参考文献

- [1] 卢增鹏,于海洋,张晓刚,等. 中药干预类风湿关节炎相关信号通路研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024,

- 30(12):289-298.
- [2] BROWN P, PRATT A G, HYRICH K L. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis[J]. BMJ, 2024, 384:e70856.
- [3] ALETAAHA D, SMOLEN J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review[J]. JAMA, 2018, 320(13):1360-1372.
- [4] 罗业浩, 方刚, 许栋涵, 等. 灸法治疗类风湿关节炎的临床研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(16):4113-4119.
- [5] 李雪梅, 任奎羽, 沈琦佳, 等. 麦粒灸治疗类风湿关节炎的临床进展及展望[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(4):929-931.
- [6] 殷娜, 汤锋武, 符锋, 等. 低强度脉冲聚焦超声联合等速肌力训练对膝关节关节炎患者膝关节本体感觉、生活质量和炎性因子水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(22):4275-4278.
- [7] 贾朗, 谭波涛, 陈锦云. 低强度脉冲聚焦超声治疗膝关节关节炎的安全性和有效性[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(5):633-638.
- [8] JIA L, CHEN J, WANG Y, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound affects extracellular matrix degradation via decreasing chondrocyte apoptosis and inflammatory mediators in a surgically induced osteoarthritic rabbit model[J]. Ultrasound Med Biol, 2016, 42(1):208-219.
- [9] BRAND D D, LATHAM K A, ROSLOENIEC E F. Collagen-induced arthritis[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5):1269-1275.
- [10] 郑权发, 张宇, 陈芳, 等. 乌头汤、四妙散对胶原诱导性关节炎 DBA/1 小鼠的作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(4):564-570.
- [11] 徐慧雯, 郝文婷, 陈德生, 等. DBA/1J 小鼠胶原诱导关节炎模型的建立与鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9):7-10.
- [12] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.
- [13] 刘志丹, 李晓燕, 赵创, 等. 艾灸对类风湿关节炎小鼠 Treg/Th17 细胞及其信号通路的影响[J]. 中国针灸, 2017, 37(10):1083-1092.
- [14] 曹树琦, 沈宇平, 蔡卫根. 化脓灸述要及灸后治疗[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(6):2641-2643.
- [15] 单凯, 王美娟, 邢皓博, 等. 中医临床疗法“出泡”现象的研究现状与探讨[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9):5388-5392.
- [16] 牛雪飞, 闫俊杰, 王彤彤, 等. 聚焦超声波结合体外冲击治疗特异性膝关节滑膜炎的临床疗效观察[J]. 临床研究, 2023, 31(10):47-50.
- [17] 王梓稀, 曾凡伟, 张东, 等. 低强度脉冲聚焦超声对早中期膝关节骨关节炎患者关节功能影响的研究[J]. 川北医学院学报, 2021, 36(4):433-436.
- [18] 梁慧, 朱艳, 张敏, 等. 艾灸对佐剂性关节炎大鼠膝关节滑膜细胞超微结构及血清细胞因子的影响[J]. 中国针灸, 2023, 43(3):317-321.
- [19] 路晓清, 刘华辉, 陈俊, 等. 艾灸对实验性 RA 家兔滑膜 NLRP3 炎性小体、Caspase-12 表达的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(9):2975-2982.
- [20] 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.
- [21] ASTIER A L, KOFLER D M. Editorial: dysregulation of Th17 and Treg cells in autoimmune diseases[J]. Front Immunol, 2023, 14:1151836.
- [22] JIN S, CHEN H, LI Y, et al. Maresin 1 improves the Treg/Th17 imbalance in rheumatoid arthritis through miR-21[J]. Ann Rheum Dis, 2018, 77(11):1644-1652.
- [23] DU Y Y, CHEN Z X, LIU M Y, et al. Leonurine regulates Treg/Th17 balance to attenuate rheumatoid arthritis through inhibition of TAZ expression[J]. Front Immunol, 2020, 11:556526.
- [24] PARADOWSKA-GORYCKA A, WAJDA A, ROMANOWSKA-PROCHNICKA K, et al. Th17/Treg-related transcriptional factor expression and cytokine profile in patients with rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol, 2020, 11:572858.
- [25] NOACK M, MIOSSEC P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases[J]. Autoimmun Rev, 2014, 13(6):668-677.
- [26] SUN S C, CHANG J H, JIN J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity[J]. Trends Immunol, 2013, 34(6):282-289.
- [27] 王晨, 程艳杰. NF- κ B 在类风湿性关节炎中的作用及调控机制[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(18):2600-2603.
- [28] XIE M, WANG J, GONG W, et al. NF-kappaB-driven miR-34a impairs Treg/Th17 balance via targeting FOXP3[J]. J Autoimmun, 2019, 102:96-113.

(收稿日期:2024-10-22 本文编辑:吕宁)