

艾灸调控铁死亡-脂质代谢通路改善类风湿性关节炎大鼠滑膜炎性损伤的机制研究

彭传玉¹, 王天城², 蔡荣林³, 郝峰⁴, 何璐¹, 刘磊³, 王洁³, 钟毓秀¹

(¹安徽中医药大学针灸推拿学院, 合肥 230038; ²安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230038;

³安徽省中医药科学院针灸经络研究所, 合肥 230038; ⁴南京中医药大学针灸推拿学院, 南京 210023)

【摘要】目的:基于铁死亡-脂质代谢通路探讨艾灸改善类风湿性关节炎(RA)模型大鼠滑膜炎性损伤的作用机制。**方法:**SD大鼠随机分为正常组、模型组、艾灸组、艾灸+长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)抑制剂组,每组12只。采用风、寒、湿环境结合弗氏完全佐剂注射复制RA模型。艾灸组予以艾灸“肾俞”“足三里”,每次每穴20 min,每日1穴(双侧),两穴交替选取,1次/d,连续15 d;艾灸+ACSL4抑制剂组在施灸后给予腹腔注射ACSL4抑制剂罗格列酮(0.4 mg/kg),1次/d,连续15 d。HE染色法观察各组大鼠滑膜组织病理形态学变化;生化法检测各组大鼠血清谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量;流式细胞术检测各组大鼠滑膜组织活性氧(ROS)水平;Western blot法检测各组大鼠滑膜组织谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、ACSL4、溶血卵磷脂酰基转移酶3(LPCAT3)蛋白表达;ELISA法检测各组大鼠血清白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠滑膜增生明显、大量炎性细胞浸润;血清中GSH含量显著降低($P<0.01$),MDA、IL-6、TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);滑膜组织ROS水平、ACSL4和LPCAT3蛋白表达显著升高($P<0.01$),GPX4蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织中的炎性细胞浸润和增生有不同程度的缓解;血清中GSH含量显著升高($P<0.01$),MDA、IL-6、TNF- α 含量显著降低($P<0.01$);滑膜组织ROS水平、ACSL4和LPCAT3蛋白表达显著降低($P<0.01$),GPX4蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织炎性细胞浸润和滑膜细胞增生改善较为明显、滑膜层数减少;血清中GSH含量显著升高($P<0.01$),MDA、IL-6、TNF- α 含量显著降低($P<0.01$);滑膜组织ROS水平、ACSL4和LPCAT3蛋白表达显著降低($P<0.01$, $P<0.05$),GPX4蛋白表达显著升高($P<0.05$)。**结论:**艾灸“肾俞”“足三里”能够减轻RA大鼠滑膜炎性损伤,其作用机制可能与降低脂质过氧化及ROS水平,抑制铁死亡的发生有关。

【关键词】 艾灸;类风湿性关节炎;长链脂酰辅酶A合成酶4;铁死亡;脂质代谢

Study on the mechanism of moxibustion regulating ferroptosis-lipid metabolism pathway to improve synovitis inflammatory injury in rheumatoid arthritis rats

PENG Chuan-yu¹, WANG Tian-cheng², CAI Rong-lin³, HAO Feng⁴, HE Lu¹, LIU Lei³, WANG Jie³, ZHONG Yu-xiu¹

(¹School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; ²School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038; ³Institute of Acupuncture and Meridian, Anhui Academy of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038; ⁴School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023)

【ABSTRACT】 Objective To explore the mechanism of moxibustion in improving synovitis inflammatory injury in rheumatoid arthritis (RA) model rats based on the ferroptosis-lipid metabolism pathway. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into normal, model, moxibustion and moxibustion + long-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4)

[DOI] 10.13702/j.1000-0607.20240075

引用格式:彭传玉,王天城,蔡荣林,等.艾灸调控铁死亡-脂质代谢通路改善类风湿性关节炎大鼠滑膜炎性损伤的机制研究[J].针刺研究,2024,49(12):1296-1302,1309.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82205289、82274645);安徽省自然科学基金青年项目(No.2208085QH265、2108085QH363);安徽高校自然科学研究重点项目(No.KJ2021A0571);国家级大学生创新创业训练计划项目(No.202310369007、202310369008)

通信作者:蔡荣林, E-mail: ronglincai@ahtcm.edu.cn

inhibitor groups, with 12 rats in each group. The RA model was replicated using environmental factors of wind, cold, and dampness combined with Freund's complete adjuvant injection. The moxibustion group received moxibustion at "Shenshu" (BL23) and "Zusanli" (ST36) for 20 minutes per acupoint each time, once daily at a single acupoint (both sides) with alternating acupoints over 15 consecutive days. The moxibustion + ACSL4 inhibitor group received intraperitoneal injection of the ACSL4 inhibitor rosiglitazone (0.4 mg/kg) after moxibustion, once daily for 15 consecutive days. Histopathological changes in synovial tissue were observed using HE staining; serum contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) were detected using biochemical methods; reactive oxygen species (ROS) levels in synovial tissues were detected using flow cytometry; the expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4), ACSL4, and lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 (LPCAT3) proteins in synovial tissues were detected using Western blot; and serum contents of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected using ELISA. **Results** Compared with the normal group, the serum contents of GSH decreased ($P<0.01$) while MDA, IL-6, and TNF- α contents increased ($P<0.01$); the ROS levels, ACSL4 and LPCAT3 protein expressions increased ($P<0.01$) while GPX4 protein expression decreased ($P<0.01$) in synovial tissue in the model group. Compared with the model group, the serum contents of GSH increased ($P<0.01$) while MDA, IL-6, and TNF- α contents decreased ($P<0.01$); the ROS levels, ACSL4 and LPCAT3 protein expressions decreased ($P<0.01$) while GPX4 protein expression increased ($P<0.01$) in synovial tissue in the moxibustion group and moxibustion + ACSL4 inhibitor group. Compared with the moxibustion group, the serum contents of GSH increased ($P<0.01$) while MDA, IL-6, and TNF- α contents decreased ($P<0.01$); the ROS levels, ACSL4 and LPCAT3 protein expressions decreased ($P<0.01$, $P<0.05$) while GPX4 protein expression increased ($P<0.05$) in synovial tissue in the moxibustion + ACSL4 inhibitor group. HE staining showed that the model group had significantly increased synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration; the moxibustion group and moxibustion + ACSL4 inhibitor group showed varying degrees of alleviation in inflammatory cell infiltration and hyperplasia in synovial tissue; compared with the moxibustion group, the moxibustion + ACSL4 inhibitor group showed more significant improvements in inflammatory infiltration and hyperplasia of synovial cells, reduced layers of synovium. **Conclusion** Moxibustion at BL23 and ST36 can alleviate synovial inflammatory injury, and its mechanism may be related to reducing lipid peroxidation and ROS levels, and inhibiting the occurrence of ferroptosis.

【KEYWORDS】 Moxibustion; Rheumatoid arthritis; ACSL4; Ferroptosis; Lipid metabolism

类风湿性关节炎(RA)是以关节受累、增生性滑膜炎、骨与软骨破坏、关节功能丧失为病理特征的慢性、全身性自身免疫性疾病^[1]。临床治疗多以抗风湿药、非甾体类抗炎药和糖皮质激素为主,但不良反应较大,故其治疗是医学界一致关注的重点^[2-4]。研究表明^[5],艾灸能够减轻关节肿胀,下调血清和滑膜中的促炎因子、上调抗炎因子,调节免疫细胞平衡,进而抑制关节及滑膜炎性反应。

研究显示^[6],在弗氏完全佐剂诱导的大鼠关节炎模型中,关节组织长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)大量表达,其在炎症疾病中发挥重要作用。ACSL4是长链脂酰辅酶A(CoA)合成酶家族的一员,将花生四烯酸和肾上腺酸分别合成为花生四烯酰CoA和肾上腺酰CoA,形成花生四烯酸磷脂酰乙醇胺(AA-PE)和肾上腺酸磷脂酰乙醇胺(AdA-PE),经脂肪氧合酶氧化为脂质过氧化物,引发铁死亡,是铁死亡脂质代谢过程中的关键调控因子^[7-9]。同时有研究^[10]表明,ACSL4敲除可以减少脂质过氧化物生成,过表达则会增加脂质过氧化物生

成。因此,本研究拟以ACSL4为切入点,从铁死亡-脂质代谢通路的角度探讨艾灸对RA模型大鼠滑膜炎性损伤的影响,为艾灸治疗RA提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性清洁级SD大鼠48只,体质量(200 ± 20)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。饲养于安徽中医药大学动物实验室,在恒温、光暗12 h/12 h交替、相对湿度为(65 ± 5)%的环境下,自由饮水和进食(标准饮食)。适应性饲养1周后,随机分为正常组、模型组、艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组,每组12只。实验过程中对动物的处置严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》的相关规定。本研究已通过安徽中医药大学动物伦理委员会审核(批准号:AHUCM-rats-2023040)。

1.2 主要仪器和试剂

JW3021HR型离心机(安徽嘉文),EPS300型电泳仪、电泳槽、转膜仪(上海天能),RT-6100型酶

标仪(深圳雷杜),UV-1800型紫外可见分光光度计(上海菁华),CytoFLEX型流式细胞仪(美国BECKMAN),CKX31倒置显微镜(日本Olympus),GL-88B型漩涡混合器(海门其林贝尔),香烟型艾条(河南南阳汉医)。弗氏完全佐剂(美国Sigma),罗格列酮(上海源叶),ECL超敏发光试剂盒(美国Thermo),RIPA细胞裂解液、活性氧(ROS)检测试剂盒(上海碧云天),PAGE胶促凝剂(美国Solarbio),谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)抗体、ACSL4抗体、鼠抗溶血卵磷脂酰基转移酶3(LPCAT3)抗体(英国Abcam),GAPDH一抗、HRP标记的二抗(北京中杉金桥),谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成),白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA检测试剂盒(武汉基因美)。

1.3 造模方法

采用“风寒湿”环境加弗氏完全佐剂注射法^[11]复制RA大鼠模型:除正常组外,其余各组大鼠放入“风寒湿”环境的自制造模箱中,保持湿度80%~90%,加入适量冰块保持温度(6 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,箱内风扇吹风,时间持续20 d(12 h/d,每日20:00至次日8:00)。第21天用75%乙醇消毒右后足趾,注射弗氏完全佐剂0.15 mL致炎。观察3 d,以24 h后足踝部出现急性肿胀和颜色改变,48 h后伴随对侧肢体、耳、尾部出现红肿或炎性结节等,为造模成功标准^[12]。

1.4 干预方法

正常组和模型组不予干预,其余两组第24天开始干预。艾灸组参考《实验针灸学》^[13]选取双侧“肾俞”“足三里”,大鼠剪去被毛,采用香烟型艾条,于距离穴位2 cm处悬灸。每日艾灸1穴(双侧),两穴交替选取,每穴每次施灸20 min,1次/d,连续15 d。艾灸+ACSL4抑制剂组在艾灸干预后,予以ACSL4抑制剂罗格列酮(0.4 mg/kg)腹腔注射^[14],1次/d,连续15 d。

1.5 观察指标及检测方法

取材方法:干预结束后,腹腔注射麻醉,腹主动脉取血5 mL,静置2 h后离心20 min,提取上清液,并保存于 -80°C 冰箱。将大鼠处死,从大鼠膝关节正中上方切开,剥离膝关节附近的肌肉韧带组织,露出髌骨后继续分离,取出滑膜组织。

HE染色观察滑膜组织形态学变化:取各组大鼠滑膜组织放入4%多聚甲醛液中固定,蒸馏水冲洗,乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片(厚度4 μm)、恒温箱烤片,脱蜡,苏木精染色,1%盐酸乙

醇溶液分化,返蓝,伊红染液染色,脱水封片。在光学显微镜下观察大鼠滑膜组织病理形态学变化。

生化法检测各组大鼠血清GSH、MDA的含量:取每组6只大鼠血清样本,采用微板法检测各组大鼠血清GSH的含量,根据试剂盒说明书操作,在酶标仪波长为405 nm处测定各孔吸光度值;TBA法检测各组大鼠血清MDA含量,按照试剂盒说明操作,于波长532 nm处测定各管吸光度值。绘制标准曲线,计算血清GSH、MDA含量。

流式细胞术检测各组大鼠滑膜组织ROS水平:取每组4只大鼠的滑膜组织,用手术剪剪碎,PBS洗涤2次,离心6 min,弃上清,消化,重复洗涤离心1次,沉淀经PBS重悬,制成单细胞悬液。收集上述各组细胞并调整细胞浓度至 $(1\sim 10)\times 10^6$ 个/mL,加入浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,每隔3~5 min混匀1次,使探针和细胞充分作用,并设置不染色的细胞作为阴性细胞对照。PBS洗涤,去除未进入细胞内的DCFH-DA,流式细胞仪检测ROS平均荧光强度。

Western blot法检测各组大鼠滑膜组织GPX4、ACSL4、LPCAT3蛋白表达:取每组4只大鼠滑膜组织各100 g,加入RIPA裂解液裂解,离心15 min,收集上清液,BCA法测定蛋白浓度,加入5 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,沸水浴加热15 min,待样品冷却至室温后上样,每孔加5~10 μL 。SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、封闭后,加入GPX4(1:2 000)、ACSL4(1:5 000)、LPCAT3(1:2 000)、GAPDH(1:2 000)一抗孵育过夜,洗涤后加入二抗孵育,使用ECL发光试剂盒显影。采用Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白条带与内参(GAPDH)蛋白条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

ELISA法检测各组大鼠血清IL-6和TNF- α 的含量:取每组6只大鼠血清,梯度复温,根据ELISA试剂盒说明书的方法进行标准品的稀释与加样、加酶、温育、配液、洗涤、显色等操作,加入终止液50 μL ,以空白孔调零,在15 min内使用酶标仪于450 nm波长处依序测量各孔的吸光度值,通过标准品的浓度和吸光度值绘制标准曲线,计算血清IL-6和TNF- α 的含量。

1.6 统计学处理

采用GraphPad Prism 9.0和SPSS25.0软件进行统计分析、制作统计图。所有数据符合正态分布,用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,组间比较采用单因

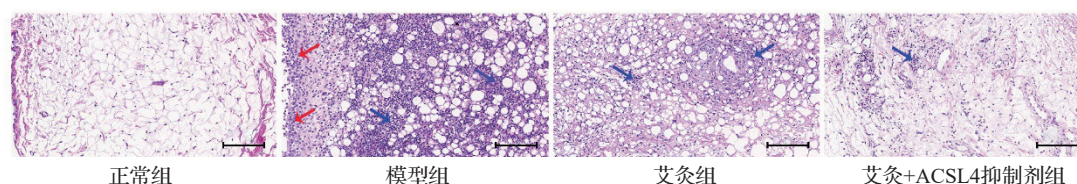
素方差分析,方差齐时两两比较用LSD检验,方差不齐时用Tamhane's t_2 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠膝关节滑膜组织病理形态比较

正常组大鼠膝关节滑膜组织表面平滑整齐,滑

膜细胞排列较为规则,未见炎性细胞浸润;模型组滑膜组织中有大量炎性细胞浸润,滑膜增生增厚,细胞排列不整齐。与模型组比较,艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组滑膜组织中的炎性细胞浸润和滑膜增生有不同程度缓解;与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组滑膜组织炎性细胞浸润和滑膜细胞增生明显改善,滑膜层数减少。见图1。



注:标尺=50 μm ,红色箭头示滑膜增生,蓝色箭头示炎性细胞。

图1 各组大鼠膝关节滑膜组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 1 Comparison of pathological morphology of knee joint synovial tissue of rats in the 4 groups (HE staining)

2.2 各组大鼠血清MDA、GSH含量比较

与正常组比较,模型组大鼠血清MDA含量显著升高($P < 0.01$),GSH含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠血清MDA含量显著降低($P < 0.01$),GSH含量显著升高($P < 0.01$)。与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠血清MDA含量显著降低($P < 0.01$),GSH含量显著升高($P < 0.01$)。见图2。

2.3 各组大鼠滑膜组织ROS水平比较

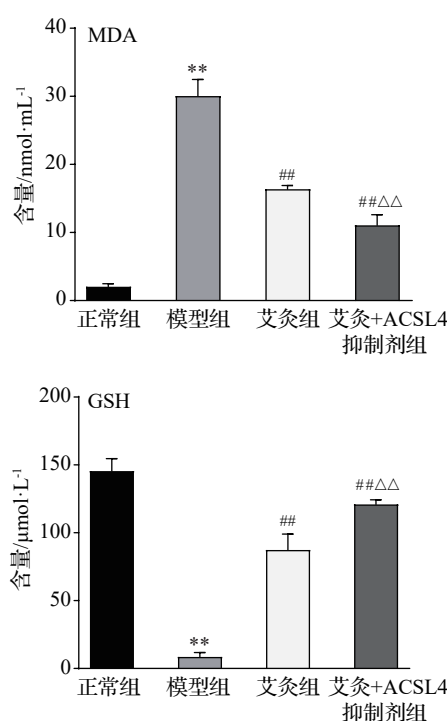
与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织ROS水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织ROS水平显著降低($P < 0.01$);与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织ROS水平显著降低($P < 0.01$)。见图3。

2.4 各组大鼠滑膜组织ACSL4、LPCAT3、GPX4蛋白表达

与正常组比较,模型组大鼠滑膜组织ACSL4、LPCAT3蛋白表达显著升高($P < 0.01$),GPX4蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织ACSL4、LPCAT3蛋白表达显著降低($P < 0.01$),GPX4蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织ACSL4、LPCAT3蛋白表达显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),GPX4蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。见图4。

2.5 各组大鼠血清IL-6、TNF- α 含量比较

与正常组比较,模型组大鼠血清IL-6、TNF- α

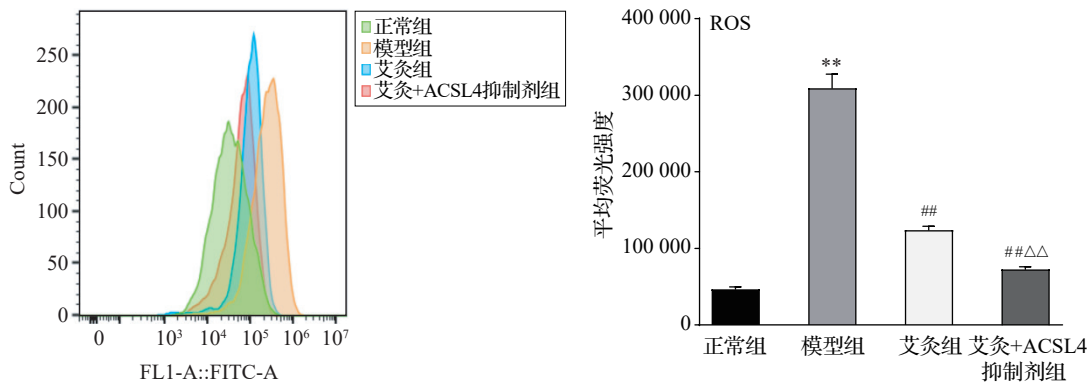


注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与艾灸组比较,△△ $P < 0.01$ 。

图2 各组大鼠血清MDA、GSH的含量比较($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of serum MDA and GSH contents of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 rats/group)

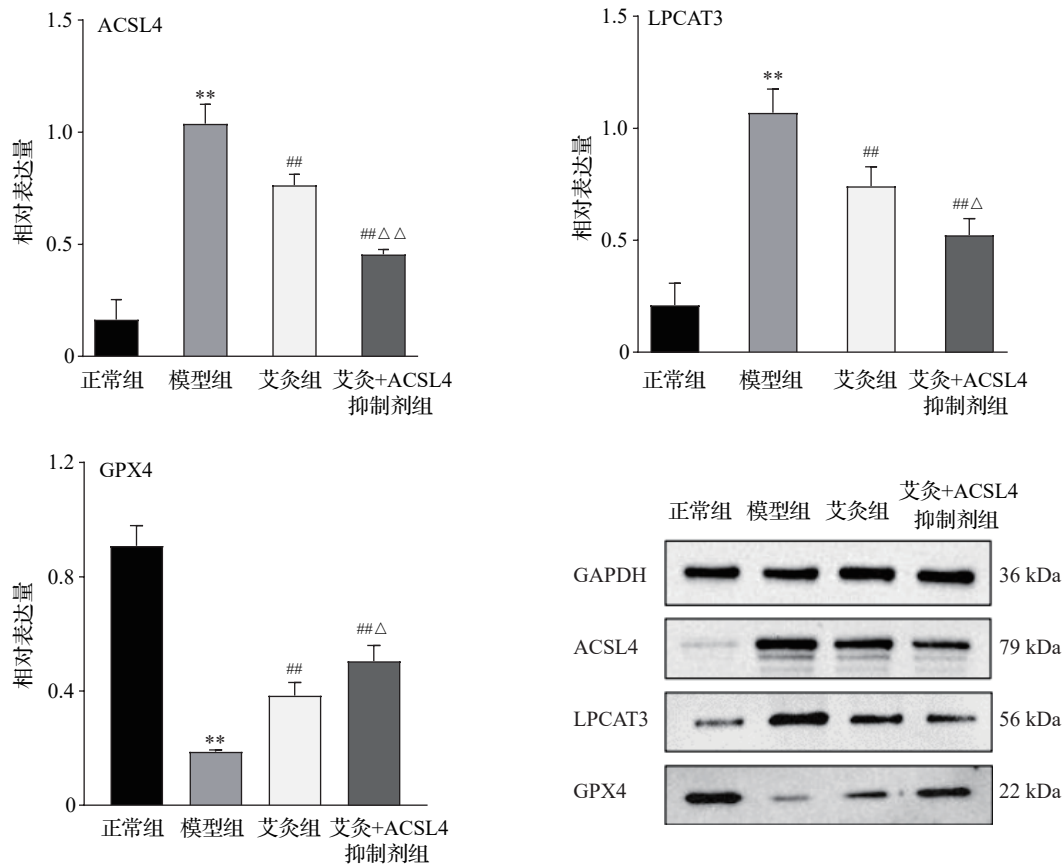
含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,艾灸组、艾灸+ACSL4抑制剂组血清IL-6、TNF- α 含量显著降低($P < 0.01$)。与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组血清IL-6、TNF- α 含量显著降低($P < 0.01$)。见图5。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与艾灸组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图3 各组大鼠滑膜组织ROS水平比较($\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of ROS levels in synovial tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与艾灸组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠滑膜组织ACSL4、LPCAT3、GPX4蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$,4只鼠/组)

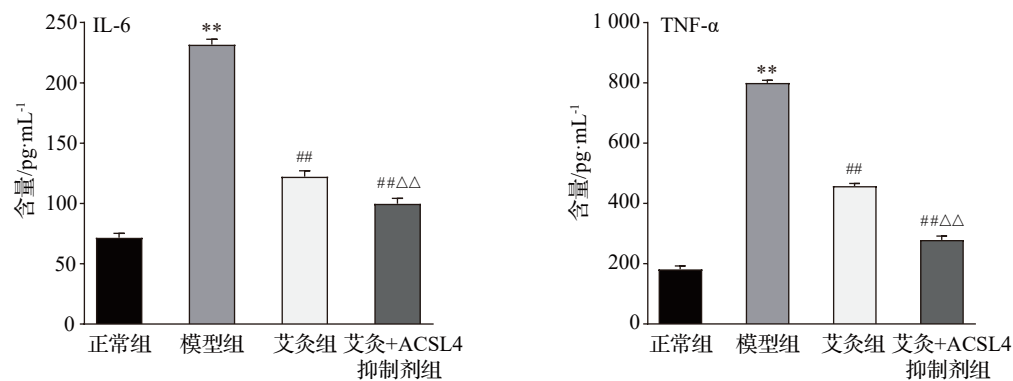
Fig. 4 Comparison of the expression of ACSL4, LPCAT3 and GPX4 proteins in synovial tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 4 rats/group)

3 讨论

RA属于中医学“痹症”范畴,《黄帝内经》曰:“风寒湿三气杂至,合而为痹……其风气胜者为行痹,寒气胜者为痛痹,湿气胜者为着痹……”提出风寒湿邪侵犯机体是引起痹证的重要因素。艾灸疗法作为中国传统医学的特色疗法,借助火的温和热

力及艾草的药效,起到激发机体正气、温经散寒、抗炎消肿、通络止痛的作用。

铁死亡是一种程序性细胞死亡,有独特的形态学与生化改变,与炎症反应密切相关^[15-16]。铁死亡过程中多伴有炎症反应,研究者在草酸诱导的急性肾损伤小鼠模型的肾脏中观察到了与铁死亡相关



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与艾灸组比较,△△ $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠血清IL-6、TNF-α含量比较($\bar{x}\pm s$,6只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of serum IL-6 and TNF-α contents of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

的炎症反应,表明铁死亡与炎症反应密切相关^[17]。研究结果显示^[18-19],RA患者的多形核白细胞中的GPX活性降低,铁死亡激活剂RSL3可诱导滑膜细胞发生铁死亡并加重滑膜炎,促使转铁蛋白受体1和核受体共激活因子4上调。此外,铁死亡可导致RA关节软骨破坏,可能作为研究RA的新靶点。前期研究显示^[20],RA模型大鼠滑膜组织中的铁死亡相关因子表达明显增加,滑膜异常增生,大量炎症细胞浸润,滑膜炎性损伤加重,提示RA的发病机制可能与铁死亡密切相关。

铁死亡的基本特征为细胞内铁代谢异常、活性氧和脂质过氧化物水平升高。铁死亡的发生涉及多个代谢途径,如铁代谢、氨基酸代谢和脂质代谢等,其中,铁代谢和氨基酸代谢最终将会引发脂质代谢的变化,说明脂质代谢失调是导致铁死亡发生的主要原因^[21]。脂质合成代谢失调会导致多不饱和脂肪酸积累,并消耗细胞内大量GSH,产生更多的过氧化脂质,提高细胞对铁死亡的敏感性。在正常生理状态下,脂质氧化和脂质还原处于平衡状态,如果细胞稳态被打破,脂质氧化相关基因表达水平上调,氧化脂质在细胞内大量积累,则可诱导细胞铁死亡^[22]。MDA是由多不饱和脂肪酸通过酶催化的化学反应产生,是脂质过氧化中最常检测的生物标志物^[23]。本研究结果显示,RA模型大鼠滑膜组织ROS水平及ACSL4、LPCAT3蛋白表达显著升高,GPX4蛋白表达显著降低,血清GSH含量显著降低、MDA含量显著升高,提示RA模型大鼠中存在脂质过氧化并进一步诱导铁死亡的发生。经过艾灸“肾俞”“足三里”干预后,大鼠滑膜组织ROS水平、ACSL4、LPCAT3蛋白表达显著降低,GPX4蛋白表达显著升高,血清GSH含量显著升高、MDA含

量显著降低,说明艾灸能够降低脂质过氧化物的合成,进而抑制铁死亡的发生。

ACSL4作为长链脂酰辅酶A合成酶的家族成员,参与多不饱和脂肪酸的合成与重塑,是脂质代谢过程中的重要调节因子,也是LPCAT3的上游限速酶^[24-25]。在脂质合成的过程中,ACSL4可以把多不饱和脂肪酸(PUFA)中的花生四烯酸催化成为花生四烯酰CoA,并在LPCAT3的酯化作用下,生成AA-PE,随后进入脂质氧化环节,形成磷脂过氧化物,引起铁死亡^[26]。徐硕等^[10]研究显示,ACSL4敲除可以减少细胞脂质氧化物生成,过表达则会增加脂质氧化物生成。研究^[27-28]表明,敲除ACSL4和LPCAT3基因可以明显降低细胞对铁死亡诱导剂的敏感性,抑制铁死亡的发生。噻唑烷二酮类药物是ACSL4的特异性抑制剂,在噻唑烷二酮类药物中,罗格列酮是ACSL4的最强抑制剂^[29]。本研究在艾灸干预的基础上,对RA模型大鼠加用铁死亡抑制剂罗格列酮。结果显示,相较模型组和艾灸组,艾灸+ACSL4抑制剂组大鼠滑膜组织ROS水平、ACSL4、LPCAT3蛋白表达显著降低,GPX4蛋白表达明显升高,血清GSH含量显著升高,MDA含量显著降低,表明艾灸与ACSL4抑制剂取得了协同作用,即通过降低脂质代谢物的产生,进而抑制铁死亡的发生,这一结果与相关报道较为一致^[10,27-28]。

本实验结果显示艾灸组大鼠滑膜组织炎症细胞浸润和增生明显缓解,促炎因子IL-6、TNF-α含量显著降低,说明艾灸能够改善滑膜炎性损伤,与既往研究结果一致。与艾灸组比较,艾灸+ACSL4抑制剂组炎症浸润和滑膜细胞的增生明显改善,促炎因子IL-6、TNF-α含量显著降低,进一步表明艾灸和ACSL4抑制剂通过调控铁死亡-脂质代谢通路

改善RA模型大鼠滑膜炎性损伤的协同作用。

目前关于艾灸治疗RA的基础研究多聚焦于抑制滑膜成纤维细胞的异常增殖和影响细胞自噬凋亡等死亡形式,改善肠道菌群稳态和恢复代谢紊乱,调控多条信号通路的传导及炎性介质的表达来改善免疫功能等。但关于艾灸调控铁死亡改善RA的研究极少,本研究以ACSL4为切入点,从铁死亡-脂质代谢通路的角度探讨艾灸对RA模型大鼠滑膜炎性损伤的影响,为艾灸治疗RA提供新视角下的实验依据。由于铁死亡机制复杂,在脂质代谢过程中存在多种相关基因和代谢通路参与其中,呈网络化相互影响的关系,艾灸调控RA炎性损伤铁死亡的具体机制仍有待进一步探索。

参考文献

- [1] 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[J]. 针刺研究, 2021, 46(3): 194-200.
ZHU Y, YU H W, PAN Y Z, et al. Effect of moxibustion at “Zusanli” (ST36) and “Shenshu” (BL23) on miR-155-mediated TLR4/NF- κ B signaling involving amelioration of synovitis in rheumatoid arthritis rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(3): 194-200.
- [2] 王森,朱艳. 艾灸治疗类风湿关节炎相关机制的研究进展[J]. 风湿病与关节炎, 2023, 12(10): 56-60.
WANG M, ZHU Y. Research progress on the mechanism of moxibustion therapy for rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. Rheumatism and Arthritis, 2023, 12(10): 56-60.
- [3] 贾文瑞,赵永星. 类风湿关节炎的中医药研究进展[J]. 中医药信息, 2019, 36(1): 117-120.
JIA W R, ZHAO Y X. Research progress of TCM treating RA (in Chinese) [J]. Information on Traditional Chinese Medicine, 2019, 36(1): 117-120.
- [4] HARDY R, COOPER M S. Unravelling how glucocorticoids work in rheumatoid arthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2018, 14(10): 566-567.
- [5] 苏虹,栗胜勇,羊璞,等. 针灸治疗类风湿关节炎作用机制研究进展[J]. 针刺研究, 2023, 48(5): 500-507.
SU H, SU S Y, YANG P, et al. Progress of research on mechanisms of acupuncture and moxibustion in the treatment of rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2023, 48(5): 500-507.
- [6] 周茂杰,谭为,哈木拉提·哈斯木,等. 基于Nrf2/HO-1/GPX4通路探讨大戟脂总三萜抗类风湿性关节炎的作用[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(18): 4834-4842.
ZHOU M J, TAN W, HASIMU H, et al. Total triterpenes of euphorbium alleviates rheumatoid arthritis via Nrf2/HO-1/GPX4 pathway (in Chinese) [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(18): 4834-4842.
- [7] YUAN H, LI X M, ZHANG X Y, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 478(3): 1338-1343.
- [8] 刘燕. ACSL4介导铁死亡与心血管疾病的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(4): 666-670.
LIU Y. Research progress of ACSL4-mediated iron death and cardiovascular diseases (in Chinese) [J]. Journal of Youjiang Medical University for Nationalities, 2023, 45(4): 666-670.
- [9] 王磊,吴生兵,左海燕,等. 电针对急性心肌梗死大鼠铁死亡-脂质代谢通路调控机制研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(8): 76-80.
WANG L, WU S B, ZUO H Y, et al. Study on the regulatory mechanism of electroacupuncture on ferroptosis-lipid metabolism pathway in rats with myocardial ischemia (in Chinese) [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2022, 24(8): 76-80.
- [10] 徐硕,李华. 酰基辅酶A合成酶长链家族成员4介导的脂质过氧化导致乳腺癌细胞发生铁死亡[J]. 成都医学院学报, 2020, 15(5): 545-551, 566.
XU S, LI H. ACSL4-mediated lipid peroxidation leads to ferroptosis in breast cancer cells (in Chinese) [J]. Journal of Chengdu Medical College, 2020, 15(5): 545-551, 566.
- [11] 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[J]. 针刺研究, 2022, 47(3): 250-255.
PENG C Y, HU L, WU Z J, et al. Effect of moxibustion on inflammatory pain and N-methyl-D aspartic acid receptor-nitric oxide-cyclic GMP pathway in spinal cord of adjuvant arthritis rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2022, 47(3): 250-255.
- [12] 叶冠成,陈光耀,江雯欣,等. 类风湿关节炎动物模型研究进展[J]. 安徽中医药大学学报, 2019, 38(5): 88-92.
YE G C, CHEN G Y, JIANG W X, et al. Research progress of animal models of rheumatoid arthritis (in Chinese) [J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2019, 38(5): 88-92.
- [13] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-329.
LI Z R. Experimental acupuncture (in Chinese) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003: 327-329.
- [14] LIU S Y, TANG Y P, LIU L, et al. Proteomic analysis reveals that ACSL4 activation during reflux esophagitis contributes to ferroptosis-mediated esophageal mucosal damage [J]. Eur J Pharmacol, 2022, 931: 175175.
- [15] 马臣杰,张雯,曾瑾,等. 铁死亡调控机制的研究进展[J]. 生物学杂志, 2021, 38(4): 109-113.
MA C J, ZHANG W, ZENG J, et al. The molecular mechanisms of ferroptosis (in Chinese) [J]. Journal of Biology, 2021, 38(4): 109-113.
- [16] 李贝,田首元,郭志佳,等. 铁死亡与炎症性疾病的研究现状[J]. 医学综述, 2021, 27(7): 1302-1306.
LI B, TIAN S Y, GUO Z J, et al. Research status of ferroptosis and inflammatory diseases (in Chinese) [J]. Medical Recapitulate, 2021, 27(7): 1302-1306.

(下转第1309页)