

·针灸推拿·

本文引用: 祁芳, 艾坤, 丁强盛, 赵君, 潘家慧, 吴庆泽, 瞿启睿, 张亮, 刘梨. 电针调节 G6PD/NADPH/FAS/TKS5 对佐剂性关节炎模型大鼠膝关节滑膜 Th1、Th17 相关促炎因子表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(8): 1629–1636.

电针调节 G6PD/NADPH/FAS/TKS5 对佐剂性关节炎模型大鼠 膝关节滑膜 Th1、Th17 相关促炎因子表达的影响

祁芳¹, 艾坤¹, 丁强盛¹, 赵君¹, 潘家慧¹, 吴庆泽¹, 瞿启睿¹, 张亮¹, 刘梨^{2*}

1. 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 目的 以葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)/脂肪酸合成酶(FAS)代谢轴及其下游足体支架蛋白酪氨酸激酶底物(TKS5)为切入点, 观察电针干预对佐剂性关节炎(AIA)大鼠关节滑膜内辅助性 T(Th)1 细胞、Th17 细胞相关促炎因子表达的调控作用, 初步阐释电针缓解类风湿关节炎(RA)滑膜炎的分子作用机制。方法 将 36 只 SPF 级 SD 大鼠按照体重分层后, 随机抽取 9 只设为空白组, 余下 27 只先构建 AIA 模型, 再随机分为模型组、药物组、电针组, 每组 9 只。造模次日起, 电针组每日行穴位电针干预, 连续干预 21 d; 药物组予以甲氨蝶呤灌胃, 每周 2 次, 共干预 6 次。干预全程监测大鼠体重与足跖容积; 干预结束后, HE 染色观察滑膜组织病理形态变化, 免疫荧光染色检测滑膜组织中干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-17A(IL-17A)阳性表达以分别评估 Th1、Th17 浸润程度, qRT-PCR 检测滑膜组织中 TKS5 mRNA 相对表达量, Western blot 检测滑膜组织中 G6PD、NADPH 氧化酶 4(NOX4)、FAS 蛋白相对表达量。结果 干预结束后, 与空白组相比, 模型组大鼠足跖肿胀显著升高($P < 0.01$), 滑膜组织增生伴大量炎症细胞浸润, IFN- γ 、IL-17A 阳性表达率均显著上调($P < 0.01$), TKS5 mRNA 相对表达量及 G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量均显著升高($P < 0.01$); 与模型组相比, 电针组与药物组足跖肿胀程度均显著降低($P < 0.01$), 滑膜炎浸润显著改善, IFN- γ 、IL-17A 阳性表达率均显著下调($P < 0.01$), TKS5 mRNA 相对表达量均显著降低($P < 0.01$), G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量均不同程度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 电针可有效改善 AIA 大鼠关节滑膜炎, 该效应可能通过调控 G6PD/NADPH/FAS 代谢轴及下游 TKS5、减少促炎效应 T 细胞的滑膜浸润来实现。

〔关键词〕 佐剂性关节炎; 电针; 免疫; 辅助性 T 细胞 1; 辅助性 T 细胞 17; 足体支架蛋白酪氨酸激酶底物; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶

〔中图分类号〕R245

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.08.013

Effects of electroacupuncture on expression of pro-inflammatory factors related to Th1 and Th17 in the kneesynovium of rats with adjuvant-induced arthritis by regulating the G6PD/NADPH/FAS/TKS5 axis

QI Fang¹, AI Kun¹, DING Qiangsheng¹, ZHAO Jun¹, PAN Jiahui¹, WU Qingze¹, QU Qirui¹,
ZHANG Liang¹, LIU Li^{2*}

1. School of Acupuncture-moxibustion, Tuina and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the regulatory effects of electroacupuncture (EA) on the expression of pro-inflammatory factors related to T helper (Th) 1 cells and Th17 cells, in the joint synovium of adjuvant-induced arthritis (AIA) rats, with the glucose-

〔收稿日期〕2026-05-21

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(82274627, 82609199); 湖南省自然科学基金项目(2026JJ81029); 湖南中医药大学本科科研创新基金项目(2025BKS218)。

〔通信作者〕* 刘梨, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: 26134591@qq.com。

6-phosphate dehydrogenase (G6PD)/reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)/fatty acid synthase (FAS) metabolic axis and its downstream podosome scaffold protein tyrosine kinase substrate 5 (TKS5) as the focus, and to preliminarily elucidate the molecular mechanism of EA in alleviating synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Totally 36 SPF-grade SD rats were stratified by body weight and were randomly divided into a blank group ($n=9$) and the AIA model group ($n=27$). After successful establishment of the AIA models, the 27 rats were randomly divided into model, drug, and EA groups, with nine rats in each group. Beginning on the day after model establishment, the EA group received daily EA intervention at selected acupoints for 21 consecutive days, while the drug group was given methotrexate by gavage twice a week for a total of 6 interventions. Body weight and paw volume of rats were monitored throughout the intervention. After the intervention, HE staining was used to observe the pathomorphological changes in synovial tissue. Immunofluorescence staining was performed to determine the positive expression of interferon- γ (IFN- γ) and interleukin-17A (IL-17) A in synovial tissue to evaluate the infiltration of Th1 and Th17 cells, respectively. The relative mRNA expression levels of TKS5 and the relative protein expression levels of G6PD, NADPH oxidase 4 (NOX4), and FAS in synovial tissue were determined by qRT-PCR and Western blot, respectively. **Results** After the intervention, compared with the blank group, paw swelling in rats of the model group increased significantly ($P<0.01$), with synovial hyperplasia accompanied by massive inflammatory cell infiltration, and significantly increased positive expression rates of IFN- γ and IL-17A ($P<0.01$), as well as significantly increased relative mRNA expression levels of TKS5 and the relative protein expression levels of G6PD, NOX4, and FAS ($P<0.01$). Compared with the model group, both the EA and drug groups showed a significantly reduced degree of paw swelling ($P<0.01$), alleviated synovial inflammatory infiltration, and significantly decreased positive expression rates of IFN- γ and IL-17A ($P<0.01$). The relative mRNA expression level of TKS5 decreased significantly in both groups ($P<0.01$), while the relative protein expression levels of G6PD, NOX4, and FAS declined to varying degrees ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** EA can effectively ameliorate joint synovial inflammation in AIA rats, which may be associated with the regulation of the G6PD/NADPH/FAS metabolic axis and its downstream TKS5, thereby reducing the synovial infiltration of pro-inflammatory effector T cells.

[**Keywords**] adjuvant-induced arthritis; electroacupuncture; immunity; T helper 1 cells; T helper 17 cells; podosome scaffold protein tyrosine kinase substrate; glucose-6-phosphate dehydrogenase

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床常见的慢性自身免疫性疾病,以侵蚀性关节病变为核心特征,目前临床尚缺乏疗效显著且安全经济的治疗手段^[1-2]。适应性免疫紊乱是RA病理进程的核心驱动因素,其中CD4⁺T细胞的异常活化、分化及关节滑膜浸润是介导疾病发生发展的关键环节^[3]。代谢免疫学研究证实,免疫细胞的功能表型与其代谢模式高度耦联,CD4⁺T细胞的代谢重编程已成为调控其免疫效应的核心枢纽^[4-5]。代谢重编程产生的中间产物与相关酶可直接参与信号通路调控,决定CD4⁺T细胞向辅助性T(T helper, Th)1细胞、Th17细胞等促炎亚型或调节性T细胞等抑炎亚型的分化方向^[6-7]。

在RA病理微环境中,CD4⁺T细胞代谢重编程呈现显著失衡状态^[4]。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)是磷酸戊糖途径的核心速率调控酶,当其功能异常激活时,会引起还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)生成量显著上升并在胞内富集,上调脂肪酸合成酶

(fatty acid synthase, FAS)表达以促进脂滴生成,提高胞内足体支架蛋白酪氨酸激酶底物(podosome scaffold protein tyrosine kinase substrate, TKS5)含量,进而促进Th1、Th17细胞在关节滑膜的选择性聚集,形成促炎微环境^[8]。因此,CD4⁺T细胞中G6PD/NADPH/FAS通路的调控与RA的发病密切相关^[9]。临床研究表明,G6PD缺陷人群的RA发病风险显著升高,进一步证实G6PD介导的代谢紊乱与RA发病密切相关^[10]。

针灸作为中医药外治法的重要组成部分,在RA治疗中展现出明确的抗炎镇痛与免疫调节作用,且安全性高、不良反应少^[11-12]。本课题组前期研究已证实,电针治疗佐剂性关节炎(adjuvant-induced arthritis, AIA)模型大鼠可有效改善关节滑膜炎,其效应机制与抑制TKS5蛋白表达,减少F-actin和Cortactin的聚集,从而抑制Th1、Th17在关节病灶聚集相关^[13]。但此种效应是否与CD4⁺T细胞中的G6PD/NADPH/FAS途径相关,目前尚未明确。

基于上述研究背景,本研究以AIA大鼠为模型,

探讨电针对膝关节滑膜组织中 Th1、Th17 含量的影响,并深入分析其与 G6PD/NADPH/FAS/TKS5 信号通路的内在关联,明确电针干预 RA 的作用靶点与分子调控机制,为针灸疗法在 RA 的临床应用提供部分参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

本研究选用的 36 只 SPF 级雄性 SD 大鼠均采购自北京维通利华实验动物技术有限公司,初始体质量区间为 90~110 g。所有大鼠均放置于湖南中医药大学实验动物中心屏障环境内分笼饲养[许可证号:SYXK(湘)2023-0008],饲养环境遵照大鼠统一饲养条件:温度(26.0±1.0)℃,湿度 50%±10%。经 7 d 适应性饲养后正式启动实验。所有大鼠经体质量分层后,随机抽取 9 只设为空白组,余下 27 只纳入造模,用于关节炎模型构建,造模成功后再随机分为模型组、电针组与药物组,每组 9 只。本实验方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(伦理审批编号:LL2021032406),实验操作全过程严格依照《关于善待实验动物的指导性意见》中的相关要求执行。

1.2 主要药品与试剂

甲氨蝶呤(100 mg,货号:M2228,美国 AbMole Bioscience 公司);灭活结核分枝杆菌(货号:231141,美国 Becton Dickinson 公司);G6PD 抗体、NADPH 氧化酶 4(NADPH oxidase 4, NOX4)抗体、F-actin 一抗、Cortactin 一抗、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)一抗、白细胞介素-17A(interleukin-17A, IL-17A)一抗(货号:bs-0966R、bs-1092R、bs-1571R、AF300644、af02446、DF6127,北京艾方博奥生物科技有限公司);SYBR Green qPCR Mix(货号:4472920,美国 ABI Invitrogen 公司)。

1.3 主要仪器

轮转式切片机(型号:RM2016,上海徕卡仪器有限公司);华佗牌 SDZ-II 型电针治疗仪(型号:SDZ-II,苏州医疗用品厂有限公司);足跖容积测量仪(型号:YLS-7C,济南益廷科技发展有限公司);酶标仪(型号:RT-6100,深圳雷杜生命科学股份有限公司);

荧光定量 PCR 仪(型号:Q2000B,杭州朗基科学仪器有限公司);台式高速冷冻离心机(型号:CF1524R,北京兰杰柯科技有限公司)。

1.4 模型制备

在本实验中,课题组采用完全弗氏佐剂构建 AIA 大鼠模型^[14],该模型成模稳定且复制较为容易,在预实验以及课题组前期大量研究^[15]中,模型成功复制率接近 100%。准确提取灭活结核分枝杆菌,并将其放入高温灭菌后的研磨钵,使用移液枪精确移取矿物油置于研磨钵,以研磨杵采用顺时针-逆时针交替的方式充分研磨处理,直至体系溶液呈均匀乳浊状态、无明显悬浮颗粒物残留。配制灭活结核分枝杆菌浓度为 3 mg/mL 的完全弗氏佐剂,将经异氟烷吸入麻醉后的大鼠放入特制的盒中固定,75%乙醇擦拭消毒注射部位,采用微量注射器在大鼠尾根部下约 2 cm 处进针,并以 0.1 mL/只缓慢注射完全弗氏佐剂。空白组大鼠以相同操作、等量矿物油进行注射。大鼠于造模后第 3 天即可观察到注射部位出现局部炎症表现,第 9~12 天关节肿胀达到峰值;当大鼠出现体质量下降、注射部位皮温升高、足跖容积进行性增大、继发关节肿胀等表现时,判定 AIA 大鼠模型制备成功^[16]。本研究中 27 只大鼠均造模成功。

1.5 干预方法

本研究以造模当日记为第 0 天,次日起电针组正式施行电针干预。将大鼠固定于实验鼠板后,取双侧足三里、关元及局部阿是穴(足爪肿胀最显著处),以 1 寸毫针直刺 0.2~0.3 寸;左侧下肢足三里与同侧阿是穴组成一组电极回路,右侧下肢足三里与关元组成一组电极回路,足三里接电针正极,阿是穴、关元接负极,电针仪选用 10/50 Hz 的疏密波,刺激强度以针体微颤为度。每天治疗 1 次,每次 20 min,连续干预 21 d。

药物组自造模后第 1 天起予以甲氨蝶呤按 0.35 mg/kg 灌胃干预,每周一、周四干预,连续干预 3 周,共干预 6 次^[13]。

空白组、模型组每日接受与电针组同等时长的捆绑固定干预,不实施针刺、电刺激及药物干预,正常饲养,干预周期同为 21 d。

1.6 取材方法

干预 21 d 结束后,大鼠经麻醉后予以安乐死。

分离获取大鼠左膝关节,置于 4%多聚甲醛中固定,再行脱钙处理,用于后续 HE 染色和免疫荧光检测;随后取大鼠右侧膝关节滑膜组织,经液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于后续的 Western blot和qRT-PCR 检测。

1.7 观察指标及检测方法

1.7.1 测量大鼠足跖容积 采用足跖容积测量仪,于造模后第 0、6、9、12、15、18、21 天同一时间点对 36 只大鼠双侧后足跖容积进行测定并记录。使用标记笔在大鼠足踝外侧做标记,将大鼠后足置于仪器配套测量杯内,使标记点与水面保持同一水平面后读取数据。双侧后足足跖容积均进行检测,每侧重复测量 3 次,取平均值;3 次测量数据差值控制在 0.05 mL 以内。

1.7.2 HE 染色观察大鼠膝关节滑膜组织 取经多聚甲醛固定、脱钙后的大鼠左侧完整膝关节标本行石蜡包埋,制备切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇由高至低水化;苏木素染色后自来水冲洗,盐酸乙醇短暂分化,流水充分返蓝,再行伊红染色;随后经由低至高梯度乙醇脱水、二甲苯透明,滴加中性树胶,加盖盖玻片封固。光学显微镜下观察膝关节滑膜增生、炎症细胞浸润等病理形态改变。

1.7.3 免疫荧光检测大鼠膝关节滑膜组织中 IFN- γ 、IL-17A 阳性表达 每组随机选取 6 只大鼠,检测膝关节滑膜组织中 Th1 相关促炎因子 IFN- γ 、Th17 相关促炎因子 IL-17A 的表达。取经固定、脱钙处理的大鼠左侧膝关节滑膜组织标本,石蜡包埋后制备连续切片,依次脱蜡至水并进行抗原修复。血清封闭 1 h 后,分别滴加稀释比 1:2 000 的 IFN- γ 一抗、1:1 000 的 IL-17A 一抗,置于湿盒内 4℃孵育过夜;室温复温 30 min, TBST 充分漂洗,加入 Cy3 标记山羊抗兔二抗,置于湿盒内 37℃孵育 1 h。TBST 漂洗,DAPI 避光复染细胞核,再次 TBST 漂洗;采用自发荧光淬灭剂处理 5 min,短暂水洗,滴加抗荧光淬灭封片剂封片。于 400 倍荧光显微镜下采集图像,采集过程固定显微镜曝光参数,每张切片随机选取 5 个无重叠高倍视野,采用 ImageJ 软件分析 IFN- γ 、IL-17A 的平均阳性表达率。

1.7.4 qRT-PCR 检测大鼠膝关节滑膜组织中 TKS5 mRNA 相对表达量 每组随机选取 6 只大鼠,称取

20 mg 经-80℃冻存的右侧膝关节滑膜组织,以 β -actin 作为内参基因。按照试剂盒说明书提取总 RNA,检测 RNA 纯度与完整性,经 DNase 处理去除基因组 DNA 后逆转录合成 cDNA;配制 qRT-PCR 反应体系,置于实时荧光定量 PCR 仪进行扩增检测。采用三步法扩增程序:预变性 95℃,5 min;共 40 个扩增循环,95℃变性 10 s、58℃退火 20 s、72℃延伸 20 s;扩增结束后行熔解曲线分析。每个样本设置 3 个技术复孔,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 TKS5 mRNA 相对表达量,引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名	引物序列	长度/bp
TKS5	正向:5'-ACATTATCCCTCTCCCAGC-3'	173
	反向:5'-CCACCACCCACTTCTACC-3'	
β -actin	正向:5'-CTGATACGTGATAATTGTCCGAGA-3'	145
	反向:5'-TTGCCATATGGTGATGACCTG-3'	

1.7.5 Western blot 检测大鼠膝关节滑膜组织中 G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量 每组随机选取 6 只大鼠,取-80℃冻存的右侧膝关节滑膜组织,用于 G6PD、NOX4、FAS 蛋白定量检测。首先提取滑膜组织,加入预冷 RIPA 裂解液及 PMSF 蛋白酶抑制剂,EP 管内放置研磨钢珠,置于组织破碎仪进行组织破碎,冰上充分裂解,离心后取上清液。配制 BCA 工作液并加入 96 孔板,酶标仪测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,沸水浴蛋白变性。蛋白样本经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转印至经甲醇活化的 PVDF 膜,转膜完成后进行封闭处理,TBST 洗膜,分别加入 G6PD、NOX4、FAS 一抗,4℃孵育过夜;TBST 充分洗膜后加入对应二抗,室温孵育;再次 TBST 洗膜后行 ECL 化学发光显影,以软件分析内参与各目标蛋白的灰度值。NADPH 属于小分子代谢物,本研究未直接定量检测 NADPH;G6PD 负责调节 NADPH 生成速率,NOX4 介导胞内 NADPH 氧化消耗,FAS 催化脂肪酸合成全过程依赖 NADPH 提供还原氢^[17-18]。因此,本研究通过检测上述 3 种蛋白表达水平,可间接反映膝关节滑膜组织内 NADPH 的生成与代谢利用状态。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 28.0 统计软件进行数据分析。连续型计量资料采用 Shapiro-Wilk 法检验正态性, Levene 法检验方差齐性。符合正态分布且方差齐的资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间差异有统计学意义时采用 LSD 法进行两两比较; 非正态分布或方差不齐的资料以“ $M(P25, P75)$ ”描述, 采用 Kruskal-Wallis H 检验进行组间比较, 两两比较采用经 Bonferroni 校正的 Dunn 检验。所有假设检验均为双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

空白组大鼠一般情况正常; 模型组大鼠于造模后第 3 天炎症局部出现皮温升高, 第 9 天开始出现体质量减少、足跖肿胀、耳部小结节、尾根部溃烂等继发性全身症状, 第 12~15 天达到症状高峰; 电针组和药物组大鼠上述症状均较模型组明显减轻。

2.2 各组大鼠足跖容积比较

基线阶段(实验第 0 天), 4 组大鼠的基础足跖容积相近, 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。自造模后第 15 天起, 相较于空白组, 模型组大鼠足跖肿胀明显加剧, 足跖容积显著升高($P<0.01$)。干预 21 d 后, 与同期模型组对比, 电针组与药物组足跖容积均显著降低($P<0.01$)。详见图 1。

2.3 各组大鼠膝关节滑膜组织形态学比较

空白组大鼠膝关节滑膜组织结构规则且形态完整, 无炎症细胞浸润; 与空白组相比, 模型组滑膜组织增生明显, 可见大量炎症细胞浸润; 与模型组相比, 电针组和药物组滑膜组织增生减轻, 炎症细胞浸

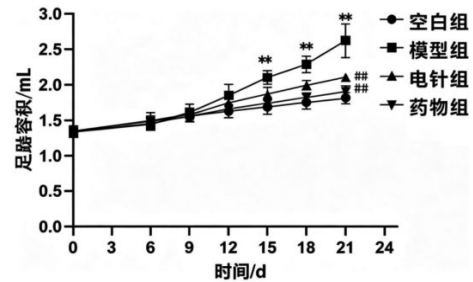


图 1 各组大鼠不同时间点足跖容积比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Fig.1 Comparison of paw volume among groups at different time points ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

注: 与空白组比较, $**P<0.01$; 与模型组比较, $\#P<0.01$ 。

润显著减少。详见图 2。

2.4 各组大鼠膝关节滑膜组织中 IFN- γ 、IL-17A 阳性表达率比较

免疫荧光染色结果显示, IFN- γ 与 IL-17A 的阳性表达在各组样本中均有分布。与空白组相比, 模型组大鼠膝关节滑膜组织 IFN- γ 、IL-17A 阳性表达率显著上调($P<0.01$); 与模型组相比, 电针组、药物组 IFN- γ 、IL-17A 阳性表达率均显著下调($P<0.01$)。详见图 3。

2.5 各组大鼠膝关节滑膜组织中 TKS5 mRNA 相对表达量比较

与空白组相比, 模型组大鼠膝关节滑膜组织中 TKS5 mRNA 相对表达量显著升高($P<0.01$); 与模型组相比, 电针组、药物组 TKS5 mRNA 相对表达量均显著降低($P<0.01$)。详见图 4。

2.6 各组大鼠膝关节滑膜组织中 G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量比较

与空白组相比, 模型组大鼠膝关节滑膜组织 G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量均显著升高($P<0.01$); 与模型组相比, 电针组、药物组 G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量均不同程度降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图 5。

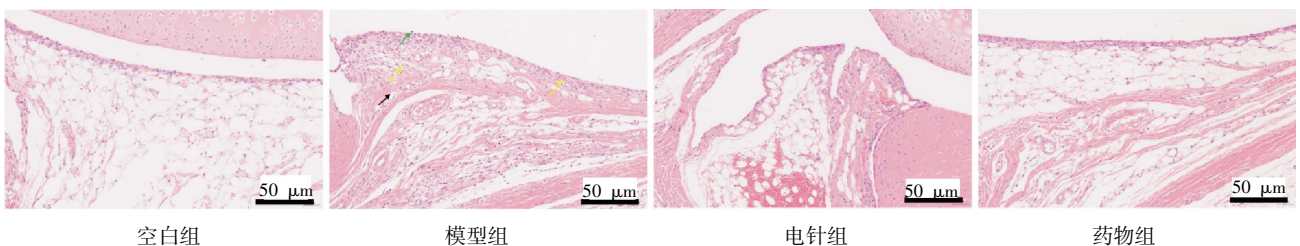


图 2 各组大鼠膝关节滑膜组织病理形态学结果(HE, $\times 400$)

Fig.2 Pathomorphological results of knee synovium among groups (HE, $\times 400$)

注: 绿色箭头示滑膜细胞排列紊乱, 黑色箭头示滑膜血管扩张, 黄色箭头示炎症细胞浸润明显。

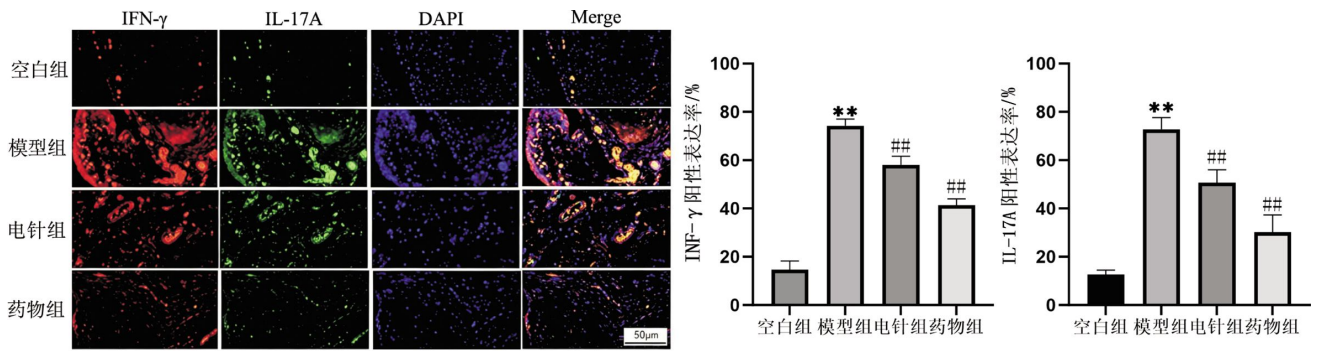


图3 各组大鼠膝关节滑膜组织中 IFN- γ 、IL-17A 阳性表达率比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.3 Comparison of positive expression rates of IFN- γ and IL-17A in the knee synovial tissue among groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注: IFN- γ 阳性表达细胞显示红色荧光信号, IL-17A 阳性表达细胞显示绿色荧光信号, DAPI 特异性染核后细胞核呈蓝色; 叠加图像(Merge)显示两种阳性细胞在滑膜组织中的分布情况。与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

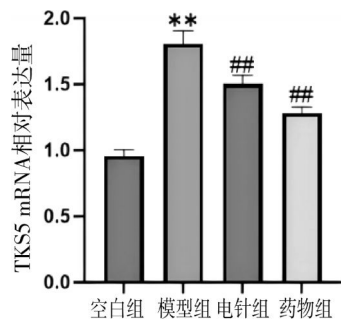


图4 各组大鼠膝关节滑膜组织中 TKS5 mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.4 Comparison of relative mRNA expression level of TKS5 among groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$ 。

3 讨论

RA 的核心病理特征是持续性滑膜炎症与关节结构破坏, 而 CD4⁺T 细胞亚群失衡及异常活化是这一进程的始动与关键驱动力量。正常生理状态下, CD4⁺T 细胞亚群(Th1、Th17、Treg)处于动态平衡, 维持机体免疫系统稳态; 但在 RA 病理微环境中, 这一平衡被打破, 呈现显著的促炎偏向性^[9]。本研究 HE 染色结果显示, 与空白组相比, 模型组膝关节滑膜组织可见大量炎症细胞浸润; 免疫荧光结果表明, 模型组大鼠膝关节滑膜组织中 Th1 相关促炎因子 IFN- γ 、Th17 相关促炎因子 IL-17A 阳性表达率显著升高,

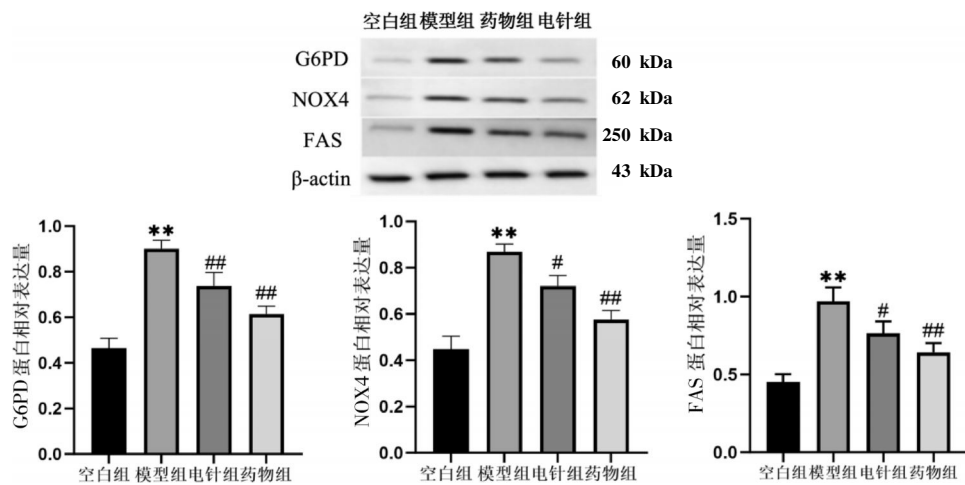


图5 各组大鼠膝关节滑膜组织中 G6PD、NOX4、FAS 蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.5 Comparison of relative protein expression levels of G6PD, NOX4 and FAS in synovial tissue among groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

间接提示滑膜组织 Th1、Th17 细胞浸润增加;同时伴随滑膜组织增生、炎症细胞大量浸润、足跖容积明显增加,这与临床 RA 患者的病理特征一致。已有研究证实,Th1 细胞分泌的 IFN- γ 可激活巨噬细胞释放促炎因子,加剧滑膜炎症;Th17 细胞产生的 IL-17A 则直接作用于滑膜成纤维细胞,介导靶细胞异常增殖活化,并上调基质金属蛋白酶的表达水平与分泌量,加速关节软骨与骨质破坏^[9]。此外,Th1、Th17 细胞的异常聚集还会抑制 Treg 细胞的抑炎功能,形成“促炎增强-抑炎减弱”的恶性循环,推动 RA 从早期滑膜炎症向中晚期关节畸形进展^[3]。本研究中,甲氨蝶呤与电针均可显著降低滑膜组织中 Th1、Th17 相关促炎因子 IFN- γ 、IL-17A 表达,间接抑制 Th1、Th17 细胞介导的滑膜炎症,二者均能通过纠正 CD4⁺T 细胞亚群失衡发挥抗炎效应,进一步印证了 T 细胞异常在 RA 病理进程中的核心作用。

T 细胞异常活化、分化与组织浸润并非孤立发生,而是受特定分子的精准调控,其中,TKS5 是连接 T 细胞功能异常与 RA 滑膜炎症的核心分子节点^[9]。TKS5 富含 SH3 结构域,作为细胞骨架重塑与信号转导的关键衔接分子,其核心功能在于调控免疫细胞迁移、侵袭能力及效应功能发挥^[9]。本研究结果显示,模型组大鼠膝关节滑膜组织 TKS5 mRNA 相对表达量显著升高,且与 Th1、Th17 相关促炎因子高表达所反映的 Th1、Th17 细胞高浸润状态呈正相关;经电针干预后,TKS5 mRNA 表达被显著抑制,同时 Th1、Th17 细胞在滑膜组织的聚集明显减少,滑膜炎症得以改善。这一结果与 Shen 等^[9]的研究结论高度契合;TKS5 可通过促进细胞膜突起形成与侵袭伪足稳定,增强 Th1、Th17 细胞的组织浸润能力,使其在关节滑膜组织选择性聚集并持续释放促炎因子,放大局部炎症反应。课题组前期研究表明,电针可通过下调 TKS5 表达,抑制 T 细胞异常聚集与功能过度活化,明确了 TKS5 是电针干预 T 细胞异常、改善 RA 炎症的关键靶点^[13]。

TKS5 的表达与功能深度依赖细胞代谢状态的改变,CD4⁺T 细胞代谢重编程失衡可通过 G6PD/NADPH/FAS 信号通路直接调控 TKS5 表达,形成“代谢紊乱→TKS5 异常→T 细胞失衡→RA 炎症”的病理链条^[9]。本研究结果显示,G6PD、NOX4、FAS 蛋白在模

型组大鼠滑膜组织中均呈显著高表达状态,且与 TKS5 mRNA 的高表达呈正相关;经电针干预后,G6PD、NOX4、FAS 蛋白表达被有效抑制,同时 TKS5 mRNA 及 Th1、Th17 细胞聚集均显著减少。从分子调控机制分析,G6PD 作为磷酸戊糖途径限速酶,其异常激活会导致 NADPH 大量积累;一方面为 FAS 催化的脂肪酸合成提供还原力,促进滑膜组织脂滴沉积与脂质代谢异常;另一方面通过改变细胞内氧化还原电位,调控 TKS5 的转录与翻译^[7,9]。已有研究证实,TKS5 的表达依赖脂质代谢产物(如磷脂酰肌醇)的修饰,而 FAS 介导的脂肪酸合成增加可直接促进 TKS5 的稳定性与功能活化^[9]。此外,过量 NADPH 还会通过抑制 ATM 激酶活性,绕过细胞周期检查点,推动 CD4⁺T 细胞异常增殖并向 Th1、Th17 亚型分化,同时上调 TKS5 表达,进一步增强 T 细胞的滑膜组织浸润能力^[3,20]。本研究证实,电针可通过靶向抑制 G6PD/NADPH/FAS 代谢通路,从上游阻断 TKS5 的异常表达,进而纠正 T 细胞失衡,甲氨蝶呤对该代谢轴的抑制效应更为显著,提示该代谢轴是 RA 抗炎治疗的共同作用靶点,也为电针作为 RA 辅助治疗手段提供了实验依据。

本研究结果显示,甲氨蝶呤对 G6PD/NADPH/FAS 通路蛋白以及 TKS5 的抑制效应均优于电针。甲氨蝶呤作为临床一线改善病情抗风湿药,可通过阻断叶酸代谢通路直接抑制淋巴细胞增殖,因此,对本研究检测的相关促炎分子呈现更强的下调效应,但该药物长期使用存在肝肾损伤等明确毒副作用^[21]。相较之下,电针虽对上述分子的抑制强度弱于甲氨蝶呤,但同样可显著下调 G6PD/NADPH/FAS 代谢轴及其下游 TKS5 表达,减少滑膜组织 Th1、Th17 浸润,减轻关节局部炎症;作为非药物干预手段,电针无化学药物带来的脏器毒性,临床可作为 RA 的辅助治疗手段,与抗风湿药物联合使用,有助于减少西药使用剂量,降低长期用药带来的毒副作用风险。

中医学将 RA 归属于“痹病”“尪痹”范畴。该病核心病机为虚实夹杂;先天肝肾亏虚、后天脾胃气虚是发病的内在基础,外感寒湿之邪久滞经脉、痰浊瘀血互结壅塞关节为局部病变的外在诱因,施治需兼顾扶正与通痹两大思路。

本实验选取足三里、关元配合关节局部阿是穴

开展电针干预。足三里为足阳明经合穴,功在健运中州、燥湿行痹,可扶助脾胃以充盈周身气血;关元隶属任脉,连通肝、脾、肾三经,可温固真元、滋养筋骨,填补先天精气之耗损;阿是穴直抵病变关节,专以疏通局部瘀滞气血、消肿止痛。三穴配伍,体现了先后天精气调养与病灶局部气血疏通相结合的标本共治的取穴思路,能够从传统中医理论层面阐释电针减轻关节滑膜炎症损伤、调控局部免疫状态的内在机制。

综上所述,本研究证实电针能够调控 G6PD/NADPH/FAS 代谢轴及其下游 TKS5 表达,通过“代谢-免疫”机制减轻 RA 滑膜组织损伤,为针灸临床施治该病提供部分实验依据。但本研究尚存在一定局限性,实验仅检测 G6PD、NOX4、FAS 蛋白表达以间接反映 NADPH 的代谢状态,未对 NADPH 进行直接定量测定,下一步研究需补充 NADPH 的直接检测,并进一步探究 G6PD 上游调控靶点,以此更全面地解析电针治疗 RA 的内在作用机制。

参考文献

- [1] Brown P, Pratt A G, Hyrich K L. Therapeutic advances in rheumatoid arthritis[J]. *BMJ*, 2024, 384: e070856.
- [2] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Pathogenetic insights and therapeutic targets in rheumatoid arthritis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2023, 389(2): 120-133.
- [3] Weyand C M, Goronzy J J. The immunology of rheumatoid arthritis[J]. *Nature Immunology*, 2021, 22(1): 10-18.
- [4] Weyand C M, Goronzy J J. Immunometabolism in the development of rheumatoid arthritis[J]. *Immunological Reviews*, 2020, 294(1): 177-187.
- [5] Liu Y B, Zhou Y W, Zhang J, et al. Regulation of CD4⁺T cell differentiation and function by glucose metabolism[J]. *Genes & Immunity*, 2025, 26(4): 287-296.
- [6] Shipman L. Metabolic interventions repair CD4⁺T cells in RA[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2016, 12(5): 254.
- [7] Yang Z, Shen Y, Oishi H, et al. Restoring oxidant signaling suppresses proarthritogenic T cell effector functions in rheumatoid arthritis[J]. *Science Translational Medicine*, 2016, 8(331): 331ra38.
- [8] Mustonen A M, Tollis S, Käkälä R, et al. Increased n-6 polyunsaturated fatty acids indicate pro- and anti-inflammatory lipid modifications in synovial membranes with rheumatoid arthritis[J]. *Inflammation*, 2023, 46(4): 1396-1413.
- [9] Shen Y, Wen Z K, Li Y Y, et al. Metabolic control of the scaffold protein TKS5 in tissue-invasive, proinflammatory T cells[J]. *Nature Immunology*, 2017, 18(9): 1025-1034.
- [10] Israel A, Schäffer A A, Berkovitch M, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and long-term risk of immune-related disorders[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1232560.
- [11] Li F Y, Liu Z, Xu Y, et al. Potential mechanisms of acupuncture treatment for rheumatoid arthritis: A study based on network topology and machine learning[J]. *Chinese Medicine*, 2025, 20(1): 164.
- [12] 龙轶映, 张亮, 祁芳, 等. 电针与艾灸对佐剂性关节炎大鼠脾脏 CD4⁺T 细胞影响的对比研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(4): 700-704.
- [13] 丁强盛, 吴庆泽, 瞿启睿, 等. 电针对佐剂性关节炎大鼠 TKS5 蛋白表达及 Th1、Th17 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(2): 267-273.
- [14] Pearson C M. Development of arthritis, peri-arthritis and periorbitis in rats given adjuvants[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*, 1956, 91(1): 95-101.
- [15] 祁芳, 李艳玲, 艾坤, 等. SD 大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评估[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(1): 23-26.
- [16] 张亮, 赵凌云, 龙轶映, 等. 艾灸调控 G6PD 介导的磷酸戊糖途径对佐剂性关节炎大鼠 CD4⁺T 细胞增殖的影响[J]. *针灸推拿医学(英文版)*, 2024, 22(4): 273-279.
- [17] Tarafdar A, Pula G. The role of NADPH oxidases and oxidative stress in neurodegenerative disorders[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3824.
- [18] Liu H L, Liu J Y, Wu X, et al. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker[J]. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 1(1): 69-89.
- [19] Miossec P, Kolls J K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, 11(10): 763-776.
- [20] Yang Z, Fujii H, Mohan S V, et al. Phosphofructokinase deficiency impairs ATP generation, autophagy, and redox balance in rheumatoid arthritis T cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2013, 210(10): 2119-2134.
- [21] Sherbini A A, Sharma S D, Gwinnutt J M, et al. Prevalence and predictors of adverse events with methotrexate mono- and combination-therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review[J]. *Rheumatology*, 2021, 60(9): 4001-4017.