

· 实验研究 ·

# 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔主动脉内皮细胞 过氧化酶体增殖物激活型受体 $\gamma$ 的影响

常小荣<sup>1</sup> 张 亮<sup>2</sup> 郁保生<sup>1</sup> 符 凌<sup>2</sup> 岳增辉<sup>1</sup> 何新群<sup>2</sup>

(1. 湖南中医药大学针灸推拿学院、基础医学院, 湖南省长沙市含浦科教园区  
象嘴路, 410208; 2. 湖南中医药大学 2007 级硕士研究生)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973802; 30873308); 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)  
资助项目(2009CB522904); 长沙市科技计划产学研合作资金专项重点项目(k1005020-31)

\* 通讯作者: xrchang1956@163.com, (0731) 88458187

**[摘要]** **目的** 观察隔药饼灸对动脉粥样硬化(AS)兔主动脉内皮细胞过氧化酶体增殖物激活型受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )的影响,探讨隔药饼灸延迟AS形成的作用机理。**方法** 通过高脂饲料喂养及免疫损伤法建立兔AS模型。将75只新西兰大耳白兔随机分为5组,每组15只,即空白组(空白对照组)、模型组(AS模型组)、直接灸组(AS模型+艾炷直接灸)、隔药饼灸组(AS模型+隔药饼灸)、西药组(AS模型+阿托伐他汀)。治疗16周后检测兔主动脉内皮细胞PPAR $\gamma$ 表达。**结果** 模型组主动脉内皮细胞PPAR $\gamma$ 的蛋白表达明显低于空白组、西药组和隔药饼灸组,且有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );与直接灸组比较,西药组和隔药饼灸组PPAR $\gamma$ 平均灰度值降低( $P < 0.05$ );西药组与隔药饼灸组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 隔药饼灸能通过激活AS兔主动脉内皮细胞PPAR $\gamma$ 的蛋白表达,起到延迟AS斑块形成的作用。

**[关键词]** 隔药饼灸; 动脉粥样硬化; 过氧化酶体增殖物激活型受体  $\gamma$

Effect of Herbal-cake-isolated Moxibustion on the Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  in Aortic Endothelial Cells of Atherosclerotic Rabbits

CHANG Xiaorong<sup>1</sup>, ZHANG Liang<sup>2</sup>, YU Baosheng<sup>1</sup>, FU Ling<sup>2</sup>, YUE Zenghui<sup>1</sup>, HE Xinqun<sup>2</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 2. Postgraduate Students of Hunan University of Chinese Medicine)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of herbal-cake-isolated moxibustion on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) in aortic endothelial cells of atherosclerosis (AS) rabbits and explore its functional mechanism in delaying the AS formation. **Methods** The AS models were established through high-fat diet and immunologic injury. Seventy-five New Zealand white rabbits were randomized into 5 groups, i.e. blank control group, model group, direct moxibustion group, herbal-cake-isolated moxibustion group, and atorvastatin group, with 15 rabbits in each. The expression of PPAR $\gamma$  in aortic endothelial cells was measured after treatment of 16 weeks. **Results** The PPAR $\gamma$  expression of the model group was lower than the blank control group, atorvastatin group, and herbal-cake moxibustion group with a significant difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with the direct moxibustion group, the average grey degree of PPAR $\gamma$  of the atorvastatin group and herbal-cake-isolated moxibustion group was decreased ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the atorvastatin group and herbal-cake-isolated moxibustion group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The herbal-cake-isolated moxibustion is able to activate the PPAR $\gamma$  expression in aortic endothelial cells of AS rabbits to delay the formation of atherosclerotic plaque.

**Key Words** herbal-cake-isolated moxibustion; atherosclerosis; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成与脂质代谢异常所致的慢性炎症性过程密切相关,动脉血管受损后的炎症反应是AS发生发展的核心,近年来研究表明,过氧化酶体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是干预此过程的关键靶点<sup>[1]</sup>。PPAR在细胞

核内识别内、外源性配体后,调控靶基因转录,引起具有逆向转运胆固醇功能的基因表达增加,抑制巨噬泡沫细胞在血管壁的聚集及抑制炎症反应来发挥抗AS的作用<sup>[2-3]</sup>。所以目前研究认为,PPAR是抗AS的潜在治疗靶点。我们前期研究证实,隔药饼灸具有明显降脂作用、调节血管黏附分子的表达及

抗动脉血管内皮损伤等作用<sup>[5-6]</sup>。本研究以新西兰大耳白兔为受试对象,在使其形成 AS 的过程中施以隔药饼灸进行干预治疗,观察隔药饼灸是否可以通过激活 PPAR 的表达,从而达到延缓 AS 形成的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康新西兰大耳白兔 75 只,雌雄各半,体重 1.8~2.2 kg,3 月龄,由湖南东创实验动物中心提供(动物合格证号:医动检证字 2006-0001),普通饲料由湖南东创实验动物中心提供。每只分笼饲养于湖南中医药大学实验动物中心,饲养温度 20~25℃,相对湿度 50%~70%。

### 1.2 施灸材料及药饼制作

艾炷:选用苏州东方艾绒厂生产的“神灸 300 灸”艾炷(型号:东方 1 型,艾炷下有 3mm 厚的纸制底盘,可直接粘于穴位上)。隔药饼灸的药物组成及药饼制作:将丹参、山楂、郁金、大黄、泽泻(购自湖南中医药大学第一附属医院药房)各等份碾成粉末,陈醋调匀成糊状,制成厚约 3mm,直径为 1cm 的药饼。

### 1.3 实验药物及主要试剂

阿托伐他汀钙片(北京嘉林药业股份有限公司产品,国药准字:H19990258,批号:090203440)。牛血清白蛋白、胆固醇(Sigma 公司);卵清白蛋白、血脂试剂(罗氏公司);胆酸钠(上海蓝季科技发展有限公司);PPAR  $\gamma$  放免试剂盒,SABC 免疫组化染色试剂盒,DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

### 1.4 造模方法

采用高脂饲养加免疫反应损伤法<sup>[7-8]</sup>。每天喂高脂饲料(15%蛋黄粉、5%猪油、2%胆固醇、0.5%胆酸钠、77.5%普通饲料,由湖南中医药大学实验动物中心加工成颗粒饲料),并于第 1、3、5d 各从耳缘静脉注射牛血清白蛋白 125mg/kg 体重,共 3 次;同时用卵清白蛋白进行皮下注射(每次 2.5mg/kg,两天 1 次,共 5 次)。每只兔进食量按 30g/(kg·d)给予,并根据体重增减不断调整进食量。各兔均自由饮水。共饲养 16 周,每周称体重 1 次并记录。

### 1.5 动物分组及处理方法

将 75 只兔按随机数字表法分为 5 组,空白组、模型组、直接灸组、隔药饼灸组、西药组各 15 只。

空白组和模型组每天喂饲基础饲料,不进行任何干预。直接灸组每天喂饲高脂饲料,并进行艾炷直

接灸。选穴:Ⅰ组:巨阙、天枢(双)、丰隆(双);Ⅱ组:心俞(双)、肝俞(双)、脾俞(双)。取穴定位参照《实验针灸学》<sup>[9]</sup>及拟人比照法制订。直接灸法:于造模的第 1d 同时施加灸法治疗,取穴定位后剪毛,将直径 0.5cm 的艾炷直接粘于穴位上,点燃施灸,待艾炷燃完余热散尽后再换另一壮。每穴连续灸 3 壮(约 15~20min),每日 1 次,Ⅰ组、Ⅱ组穴位隔日交替施灸,连续治疗 16 周。隔药饼灸组每天喂饲高脂饲料,并进行隔药饼灸。隔药饼灸法:取穴定位后剪毛,穴位敷上药饼后,将艾炷的垫盘除去,再将艾炷放在药饼上施灸,其余操作同直接灸组。西药组每天喂饲高脂饲料,并在高脂饲料中每日加入阿托伐他汀 1mg/kg。

### 1.6 指标检测方法

兔处死后,快速将主动脉从根部分离至腹主动脉分叉处断离。取主动脉弓下 1.5~3.5cm、长约 2cm 的一段组织,纵向剪开摊平,放入 4% 多聚甲醛液内固定,4℃ 保存。将固定后的组织材料进行洗涤与脱水;进行适当的透明处理;然后浸蜡与包埋;包埋好的蜡块用刀片修成规整的方形或长方形,进行贴片与烤片后待检。

用免疫组化法检测兔主动脉内皮细胞 PPAR  $\gamma$  表达(检测单位:湖南中医药大学基础医学院实验中心)。所有标本均在 MIAS 医学图像分析系统内放大相同倍数,每个标本计数 1 张切片,每个切片计数 1 个视野,以阳性细胞染色的灰度值来表示抗原的表达量。灰度值越大则蛋白表达越弱,反之则蛋白表达越强。每个切片重复测量 3 遍并取其平均值,记录并进行结果统计。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据都进行正态性和方差齐性检验。满足正态性时,采用单因素方差分析,组间比较若方差齐时采用方差分析-LSD 检验,方差不齐时用方差分析-Tamhane's  $T^2$  检验。

## 2 结果

表 1 示,与空白组比较,模型组 PPAR  $\gamma$  平均灰度值明显升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,西药组和隔药饼灸组 PPAR  $\gamma$  平均灰度值降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );直接灸组较模型组低,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与直接灸组比较,西药组和隔药饼灸组 PPAR  $\gamma$  平均灰度值降低( $P < 0.05$ );西药组与隔药饼灸组比较差异无统计学意义

( $P>0.05$ )。表明西药、隔药饼灸可以使PPAR $\gamma$ 平均灰度值降低,两种方法均能明显提高PPAR $\gamma$ 在主动脉内皮细胞上的蛋白表达,且作用相近。

表1 各组兔主动脉内皮细胞PPAR $\gamma$ 平均灰度值比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别    | 兔数 | 平均灰度值                   |
|-------|----|-------------------------|
| 空白组   | 10 | 108.180 $\pm$ 30.748    |
| 模型组   | 10 | 191.520 $\pm$ 46.933▲▲  |
| 直接灸组  | 10 | 173.380 $\pm$ 58.591▲▲  |
| 隔药饼灸组 | 10 | 150.200 $\pm$ 43.473▲▲* |
| 西药组   | 10 | 140.020 $\pm$ 45.355△△* |

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$ ,△△ $P<0.01$ ;与直接灸组比较,\* $P<0.05$

3 讨论

PPAR 是近年来在 AS 基础研究中颇受瞩目的一类核转录因子,AS 是包含炎症、脂质和内分泌代谢紊乱等的复杂过程,最新的研究进展越来越显示出 PPAR 位于这些作用的交叉点。PPAR 是调节脂质代谢、脂肪生成、胰岛素敏感、炎症反应、细胞生长和分化的重要因子。PPAR 有  $\alpha$   $\beta$   $\delta$  和  $\gamma$  3 个亚型,在人体的各个组织中,PPAR 的 3 种亚型均有所表达,包括组成血管壁的细胞,如血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和单核/巨噬细胞等。此外,在 AS 的损伤处,也检测到了 PPAR  $\alpha$  和 PPAR  $\gamma$ <sup>[10]</sup>。

AS 过程是一个血管受损伤后的炎症反应过程,炎症反应贯穿了 AS 发生、发展的整个过程。PPAR 信号通路在 AS 发生发展过程中,起到了非常重要的作用。PPAR 通过影响基因转录、翻译及信号转导途径在调节炎症反应过程中主要起抗炎效应,通过配体依赖方式及非配体依赖方式,精确地调控靶基因 ATP 结合转运子-1(ABCA-1)、基质金属蛋白酶(MMPs)、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的表达,最终达到干预 AS 形成、稳定斑块、重塑血管内皮的作用。

本研究主要观察隔药饼灸是否可以通过激活 AS 兔主动脉内皮细胞 PPAR  $\gamma$  的蛋白表达,起到延迟 AS 斑块形成的作用机制。实验结果表明,隔药饼灸可以通过激活 PPAR  $\gamma$  的蛋白表达,之后 PPAR  $\gamma$  再通过抑制炎症因子,调节全身脂质代谢,增加胆固醇的逆转运,以及抑制巨噬泡沫细胞在血管壁的聚集,从而可以抗炎、抑制血管平滑肌增殖迁移,最终保护血管内皮细胞,起到延迟 AS 斑块的作用。提示隔药饼灸对 AS 有预防和治疗作用。

隔药饼灸属于灸法中的间接灸,即在选定的穴

位上贴敷药饼,再将艾炷置于药物之上,通过艾灸的热力作用,将药物的有效成分透过皮肤渗入腧穴,由艾灸燃烧时的物理因子和药饼的药化因子,与腧穴的特殊作用、经络的特殊途径相结合,而产生的一种综合效应,即达到疏通经络、调和气血、调理脏腑的功能。经络腧穴对机体的调节是灸法作用的内因,艾灸时艾的燃烧和所隔药物是灸法作用的外因,两者缺一不可。本研究结果可为临床合理应用隔药饼灸治疗 AS 提供一定的实验依据,也将提高艾灸治疗 AS 的临床疗效,充分发挥艾灸的临床作用和优势。

参考文献

[1]易光辉,唐朝克,莫中成,等. PPAR 在动脉粥样硬化发生与发展中的作用[J]. 生命的化学, 2004, 24( 3 ): 141 - 143.

[2]Vosper H, Patel L, Graham TL, et al. The peroxisome proliferators-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages [J]. J Biol Chem, 2001, 276( 47 ): 44258 - 44265.

[3]Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferators-activated receptor gamma gene in mice results in low expression of ABCA1, ABCG1, and ApoE in macrophages and reduced cholesterol efflux [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22( 8 ): 2607 - 2619.

[4]Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets [J]. Circulation, 2007, 115( 4 ): 518 - 533.

[5]常小荣,严洁,岳增辉,等. 隔药饼灸对高脂血症兔高低密度脂蛋白含量及比值的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 12( 11 ): 1054 - 1055.

[6]常小荣,严洁,岳增辉,等. 隔药饼灸对高脂血症兔血浆前列环素和血栓素含量影响[J]. 中国临床康复杂志, 2004, 33( 8 ): 7446 - 7447.

[7]魏国华,刘兰,蔡晓波,等. 高脂饮食所致动脉粥样硬化家兔肝组织学损伤评估[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16( 5 ): 373 - 375.

[8]王园园,龙民慧,周磊磊,等. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 实验动物学, 2008, 25( 3 ): 18 - 21.

[9]李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 314 - 319.

[10]金楠,王宪. 过氧化物酶体增殖物激活受体与动脉粥样硬化[J]. 生理科学进展, 2004, 35( 1 ): 13 - 18.