

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.24.013

隔药饼灸对动脉粥样硬化易损斑块模型兔腹主动脉 RhoA/Rock 信号通路的影响

宋家薇, 马逸杰, 饶泽华, 廖意娟, 吴雪芬, 易丽贞, 刘欣, 岳增辉✉

湖南中医药大学针灸推拿学院, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 410208



[摘要] **目的** 探讨隔药饼灸稳定动脉粥样硬化(AS)易损斑块的可能作用机制。**方法** 将50只新西兰兔随机分为空白组8只,模型组9只,直接灸组9只,隔药饼灸组7只,阿托伐他汀钙组9只,抑制剂组8只。除空白组外,其余各组通过“高脂饲养喂养+腹主动脉球囊损伤术+基因转染+触发斑块破裂”制作AS易损斑块兔模型。空白组、模型组不予操作;阿托伐他汀钙组给予阿托伐他汀钙片1.96 mg/(kg·d)喂养;抑制剂组予盐酸法舒地尔10 mg/(kg·d)沿耳缘静脉缓慢注射;直接灸组及隔药饼灸组分别直接灸及隔药饼灸,穴选Ⅰ组(“巨阙”及双侧“天枢”“丰隆”)或Ⅱ组(双侧“心俞”“肝俞”“脾俞”),每日一组交替使用,每穴连续灸3壮。各组干预时间均为8周。13周实验结束后采用ELISA法测定血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL),并计算HDL/LDL;HE染色观察腹主动脉斑块组织结构,测量血管内膜厚度、内膜-中膜厚度(IMT);免疫组化法观察腹主动脉Ras同源物基因组成员A(RhoA)、Ras同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rock)、Toll样受体4(TLR4)、核因子κB(NF-κB)的抗原活性。**结果** 与空白组比较,模型组实验兔血清TC、TG、LDL含量显著升高,HDL含量及HDL/LDL值显著降低,腹主动脉血管内膜厚度及IMT显著增加,腹主动脉中RhoA、Rock、TLR4、NF-κB灰度值显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,直接灸组、隔药饼灸组、阿托伐他汀钙组TC、TG、LDL明显降低,HDL含量及HDL/LDL值明显升高,内膜厚度、IMT、RhoA、Rock、TLR4、NF-κB灰度值明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与直接灸组比较,隔药饼灸组与阿托伐他汀钙组NF-κB灰度值降低($P<0.05$)。**结论** 隔药饼灸可能通过抑制RhoA/Rock信号通路下调TLR4、NF-κB表达,从而保护血管内皮功能、稳定AS易损斑块。

[关键词] 动脉粥样硬化;隔药饼灸;易损斑块;血管内皮功能;Ras同源物基因组成员A;Ras同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶;Toll样受体4;核因子κB

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心肌梗死、缺血性中风等多种急性心血管事件的基础病变,以血管内皮炎性反应、脂质浸润累积、斑块破裂为特点,常发生于大中动脉附近,是由多项因素共同参与的、机制复杂的慢性病理过程^[1]。易损斑块断裂和伴随的血栓形成是AS的首要病理基础。血管内皮功能障碍被认为是AS进程的关键性环节^[2],AS普遍存在的大量炎性细胞浸润以及脂质聚集是导致或加重易损斑块易损性的重要因素^[3]。

由于内皮细胞多种黏附分子表达增加,导致血管壁内膜单核细胞聚集,而斑块的稳定性又是决定疾病发病的关键^[4]。因此,保护血管内皮功能成为治疗AS的新靶点。研究显示,真核组织中广泛存在的蛋白家族Ras同源物基因组成员A(RhoA)及其下游的重要调节分子Ras同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rock)参与了AS细胞功能的信号转导通路,在血管内皮细胞的增生、凋亡等诸多方面发挥着重要作用^[5-6]。

隔药饼灸是在选定的穴位上贴敷药饼,再将艾炷置于药物之上,借以艾灸的热量将药物的有效成分透过皮肤渗入腧穴,集艾叶温热刺激、中药、经

基金项目:国家自然科学基金(81874430);湖南省研究生科研创新项目(CX20200753, CX20200778, CX20200779)

✉ 通讯作者:624755064@qq.com

络穴位三者共同作用的中医传统治疗方法。课题组前期研究^[7-9]结果显示,隔药饼灸可改善脂质代谢、保护血管内皮细胞功能,并抑制主动脉Toll样受体4(TLR4)、核因子 κ B(NF- κ B)的免疫表达,稳定AS斑块,延缓其发展。本研究观察隔药饼灸对AS易损斑块模型兔腹主动脉中RhoA/RocK信号通路表达的影响,探讨隔药饼灸抗AS的可能机制通路。本研究通过湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(批号LL2019081905)。

1 材料与方法

1.1 动物

普通级雄性新西兰大耳白兔70只,体质量(2000±200)g,由湖南太平生物科技有限公司提供,实验动物合格证号:SCXK(湘)2020-0005。饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,每笼1只,温度25℃,湿度50%~70%,12h/12h明暗周期。

1.2 药品、试剂及仪器

以等比例丹参、郁金、山楂、泽泻、大黄药粉(湖南中医药大学第一附属医院中药房)制成中药粉,取3~5g中药粉,用3~5ml陈醋调成糊状成厚2~3mm、直径0.8~1.2cm的药饼;阿托伐他汀钙片(辉瑞公司,批号:H20051408,每片20mg)。

高脂饲料组成:1%胆固醇、10%蛋黄粉、5%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、83.8%基础饲料,由湖南嘉泰实验动物有限公司订制;艾炷(南阳昊翔药业有限公司,货号:hx-0258);Ad5-p53重组载体(深圳赛百诺基因技术有限公司,批号:20130602);斑点蝥蛇毒(广西医科大学蛇毒研究所);组胺(上海三杰生物技术有限公司,批号:20110901);乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司,批号:20190419);肝素钠(常州千红生化制药股份有限公司,批号:H32022088);青霉素(成都倍特药业股份有限公司,批号:H13021731);盐酸法舒地尔(上海源叶生物技术有限公司,货号:S32087);总胆固醇(TC,货号:ZF014)、甘油三酯(TG,货号:ZF013)、低密度脂蛋白(LDL,货号:QT089)及高密度脂蛋白(HDL,货号:QT093)试剂盒,江苏艾迪生生物科技有限公司;RhoA抗体(湖南艾方生物科技有限公司,货号:AF03289);HE染色液(货号:G1005)、DAB显色剂(货号:G1211)、RocK抗体(货号:GB11265)、TLR4抗体(货号:GB11186)、NF- κ B抗体(货

号:GB11142),Servicebio公司。

台式高速冷冻微量离心机(DragonLab公司,型号:D3024R);掌上离心机(Servicebio公司,型号:D1008E);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);显微镜(日本Nikon公司,型号:E100);(3.0~3.5)mm×15mm球囊导管与附件、0.14mm×195cm导引导丝、0.84mm×145cm导引导管、30atm-20ml手推式球囊扩张压力泵(美国Cordis公司)。

1.3 分组及造模方法

适应性喂养1周后,将实验兔按随机数字表法分为空白组10只和手术组60只。空白组给予普通饲料喂养,手术组参照文献[10]采用“高脂饲料喂养+腹主动脉球囊损伤术+基因转染+触发斑块破裂”方法制作兔腹主动脉粥样硬化易损斑块模型。腹主动脉球囊损伤术造模过程中共5只兔死亡,剩余55只兔,将腹主动脉球囊损伤术成功的实验兔采用随机数字表法分为模型组、直接灸组、隔药饼灸组、阿托伐他汀钙组、抑制剂组,每组11只。

造模方法:高脂饲料喂养第3周末行腹主动脉球囊损伤术。第12周末第1天为增加斑块的易损性进行基因转染操作,第13周末为诱发斑块破裂实行药物触发。模型制作周期为13周,以腹主动脉出现AS易损斑块为造模成功的标准。1)腹主动脉球囊损伤术:将兔沿耳缘静脉推注乌拉坦5ml/kg麻醉后,继续沿耳缘静脉注射肝素钠200U/kg抗凝血,固定于兔台上,对实验兔右大腿内侧备皮。切开右大腿内侧皮肤,游离股动脉约2~3cm,结扎股动脉远心端后剪一小口,沿导丝缓慢导入球囊导管,深度约20cm。将肝素钠注入球囊内,转动压力泵使大气压保持607.98~810.64kPa,往回牵拉球囊至髂动脉,抽空球囊。每45s重复1次,共3次,使血管内皮受损,退出球囊及导丝,结扎股动脉近心端,逐层清理缝合伤口,严格消毒。术后连续3d肌肉注射青霉素(40万U/d)预防感染。2)基因转染:操作同球囊损伤术,送入导管后,向球囊内注入20μl滴度为 1.0×10^{12} VP/ml的Ad5-p53重组载体进行基因转染。3)药物触发:动物于处死前48h、24h腹膜下注射0.15mg/kg斑点蝥蛇毒,均30min后经耳缘静脉注射0.02mg/kg组胺。

各干预组兔术后继续高脂饲养并进行相应干预。

1.4 干预方法

实验第4周起各组进行相应干预,空白组、模型组将实验兔捆绑于兔台,不予操作,每天

30 min。直接灸组将实验兔穴位剃毛后捆绑于兔台,将艾炷(下有纸质垫盘)直接粘于Ⅰ组(“巨阙”及双侧“天枢”“丰隆”)或Ⅱ组(双侧“心俞”“肝俞”“脾俞”)穴位^[11]上,每天一组交替施灸,每穴连续灸3壮(约30 min),每天1次。隔药饼灸组将艾柱粘于药饼上放于穴位上施灸,选穴及其余操作同直接灸组。阿托伐他汀钙组给予阿托伐他汀钙片1.96 mg/(kg·d)拌入高脂饲料喂养。抑制剂组将RhoA/Rock信号通路抑制剂盐酸法舒地尔^[12]按10 mg/(kg·d)分两次沿耳缘静脉缓慢注射,对兔进行捆绑,不予操作,每天30 min。各组均连续8周。第11周末干预结束后,停止高脂饲养,所有动物改为普通饲料喂养。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 血脂检测 实验兔于第13周末药物触发后取材,取材前12 h禁食不禁水,采取耳缘静脉推注乌拉坦5 ml/kg将其麻醉,仰卧固定于兔台。取腹主动脉血2~3 ml于抗凝管中,常温、3000 r/min离心15 min,离心半径8.67 cm,用移液枪抽取血清约1 ml。采用ELISA法检测血清TC、TG、LDL、HDL含量,并计算HDL/LDL。

1.5.2 腹主动脉斑块病理检测 采用HE染色法观察,由于抑制剂组的设立是为了证实TLR4、NF- κ B等指标是否与RhoA/RocK信号的抑制作用相关,因此未进行形态学指标的检测。空气栓塞法处死兔,将主动脉弓到髂总动脉分叉处的主动脉全长分为4段,取一段采用4%多聚甲醛浸泡固定,蒸馏水冲洗,选取斑块形成处进行脱水、浸蜡、包埋,镜检。石蜡切片经苏木素染色、盐酸酒精分化、酸化伊红染色、梯度酒精脱水、透明、树胶封固后在显微镜下观察。取5处测量病变部位观察斑块的组织结构,采用Image-Pro Plus 6.0软件分析,测量斑块的血管内膜厚度、内膜-中膜厚度(IMT),并计算平均值。

1.5.3 腹主动脉RhoA、Rock、TLR4、NF- κ B抗原活性 采用免疫组化法检测。将腹主动脉分段常规脱水、包埋、切片、脱蜡、抗原修复、过氧化氢灭活、血清封闭。滴加一抗兔RhoA(1:100)、Rock(1:100)、TLR4(1:500)、NF- κ B(1:100)单克隆抗体、二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔(1:200)后加入DAB显色,苏木素衬染,冲洗、封片,显微镜观察。每个切片计数1个视野,重复测量3次,在AIPATHWELL医学图像分析系统分析,取平均光密度值作为该切片指标

表达的灰度值。

1.6 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,组间比较方差齐采用LSD检验,方差不齐时选择Tamhane T^2 或Games-Howell检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

腹主动脉球囊损伤术造模分组后,在实验过程中共有15只兔死亡,其中空白组因腹泻死亡2只,模型组因腹泻死亡1只、基因转染手术死亡1只,直接灸组因不慎跌落死亡1只、肠梗阻死亡1只,隔药饼灸组因不慎跌落死亡2只、基因转染手术死亡2只,阿托伐他汀钙组因腹泻死亡1只、基因转染手术死亡1只,抑制剂组因腹泻死亡1只、不明原因死亡2只。最终纳入结果分析的为空白组8只、模型组9只、直接灸组9只、隔药饼灸组7只、阿托伐他汀钙组9只、抑制剂组8只。

2.1 各组实验兔血脂水平比较

表1示,与空白组比较,模型组血清TC、TG、LDL含量显著升高,HDL含量及HDL/LDL值显著降低($P<0.01$);与模型组比较,直接灸组、隔药饼灸组、阿托伐他汀钙组及抑制剂组TC、TG、LDL明显降低,直接灸组、隔药饼灸组及阿托伐他汀钙组HDL含量及HDL/LDL值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),抑制剂组HDL/LDL值明显升高($P<0.01$);与阿托伐他汀钙组比较,抑制剂组TC明显降低($P<0.05$),其余各干预组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组实验兔腹主动脉斑块组织形态比较

图1示(扫描本文二维码获取彩图),空白组血管内皮细胞完整,紧贴内弹力板,中层平滑肌细胞排列有序,内皮下未见泡沫细胞、脂质沉积。模型组血管内膜增厚凸起,膜内结构破坏,弹力纤维不连续,有大量脂质沉积,动脉粥样斑块形成,可见多处斑块破裂出血迹象。直接灸组内皮下可见泡沫细胞形成,内膜增生,中膜稍变窄。隔药饼灸组与阿托伐他汀钙组可见少量泡沫细胞,斑块形成,未见出血,内膜增生较模型组、直接灸组明显降低,中膜纤维结构不清,无明显变窄。

2.3 各组实验兔腹主动脉血管内膜厚度、IMT比较

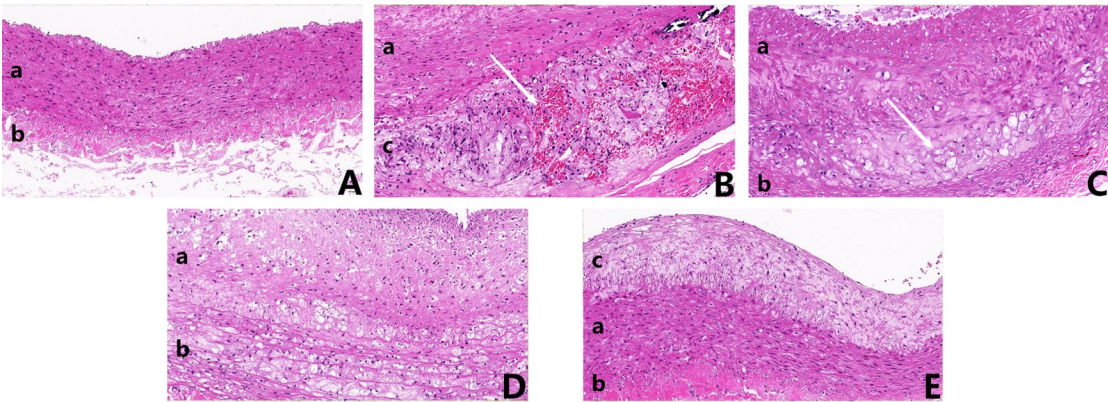
表2示,与空白组比较,模型组内膜及IMT显

表 1 各组实验兔血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	兔数	TC	TG	LDL	HDL	HDL/LDL
空白组	8	5.313±0.914	0.375±0.124	2.791±0.872	0.853±0.304	0.316±0.091
模型组	9	10.211±2.116 ^{a)}	1.590±0.457 ^{a)}	6.856±1.619 ^{a)}	0.380±0.123 ^{a)}	0.057±0.018 ^{a)}
直接灸组	9	5.993±1.099 ^{b)}	1.036±0.345 ^{b)}	3.219±0.975 ^{b)}	0.619±0.227 ^{c)}	0.197±0.099 ^{b)}
隔药饼灸组	7	6.541±1.893 ^{b)}	1.024±0.511 ^{b)}	3.953±1.495 ^{b)}	0.609±0.216 ^{c)}	0.176±0.103 ^{b)}
阿托伐他汀钙组	9	7.519±0.845 ^{b)}	0.899±0.482 ^{b)}	3.446±1.016 ^{b)}	0.694±0.213 ^{b)}	0.215±0.063 ^{b)}
抑制剂组	8	5.287±2.216 ^{b) d)}	0.761±0.244 ^{b)}	3.249±1.687 ^{b)}	0.560±0.218	0.202±0.092 ^{b)}

注：TC，总胆固醇；TG，甘油三酯；LDL，低密度脂蛋白；HDL，高密度脂蛋白。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与阿托伐他汀钙组比较， $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，直接灸组；D，隔药饼灸组；E，阿托伐他汀钙组。a，内膜层；b，中膜层；c，斑块层。模型组箭头所指为易损斑块破裂处，直接灸组箭头所指为脂质堆积、泡沫细胞浸润处。

图 1 各组实验兔腹主动脉斑块组织形态 (HE 染色, $\times 200$)

著增厚 ($P<0.01$)；与模型组比较，直接灸组、隔药饼灸组、阿托伐他汀钙组内膜厚度及 IMT 明显减小 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，各干预组间差异无

表 2 各组实验兔腹主动脉血管内膜厚度、IMT 比较 (μm , $\bar{x}\pm s$)

组别	兔数	内膜厚度	IMT
空白组	8	4.367±1.208	200.665±26.060
模型组	9	447.229±149.561 ^{a)}	605.400±150.359 ^{a)}
直接灸组	9	136.263±123.593 ^{b)}	337.000±154.197 ^{c)}
隔药饼灸组	7	158.840±138.706 ^{c)}	325.503±119.864 ^{c)}
阿托伐他汀钙组	9	148.349±126.205 ^{c)}	310.645±120.511 ^{b)}

注：IMT，内膜-中膜厚度。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

表 3 各组实验兔腹主动脉 RhoA、Rock、TLR4、NF- κ B 抗原活性比较 (光密度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	兔数	RhoA	Rock	TLR4	NF- κ B
空白组	8	0.076±0.011	0.080±0.011	0.074±0.011	0.088±0.018
模型组	9	0.180±0.037 ^{a)}	0.157±0.016 ^{a)}	0.180±0.046 ^{a)}	0.147±0.021 ^{a)}
直接灸组	9	0.120±0.038 ^{b)}	0.120±0.034 ^{b)}	0.113±0.032 ^{b)}	0.128±0.022 ^{c)}
隔药饼灸组	7	0.114±0.030 ^{b)}	0.110±0.031 ^{b)}	0.103±0.028 ^{b)}	0.106±0.018 ^{b) d)}
阿托伐他汀钙组	9	0.110±0.039 ^{b)}	0.101±0.038 ^{b)}	0.093±0.019 ^{b)}	0.107±0.012 ^{b) d)}
抑制剂组	8	0.089±0.014 ^{b)}	0.088±0.021 ^{b)}	0.090±0.024 ^{b)}	0.095±0.024 ^{b)}

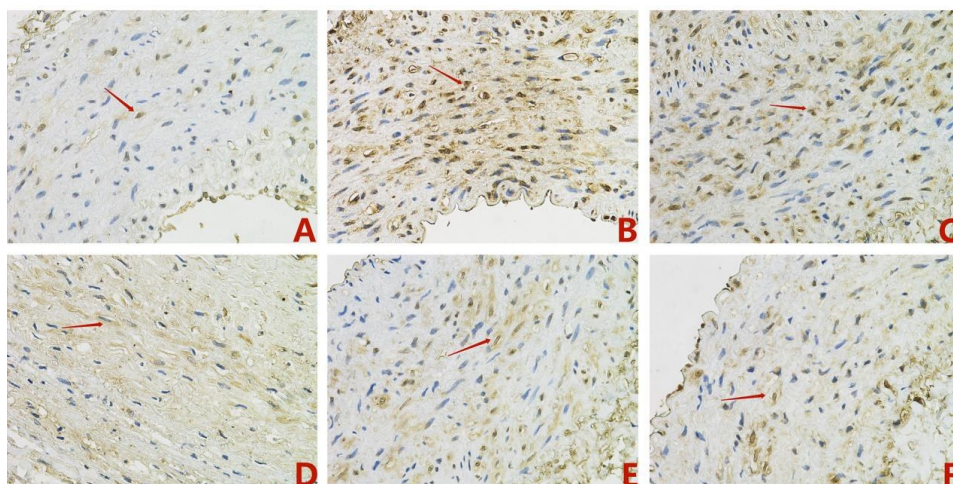
注：RhoA，Ras 同源物基因组成员 A；RocK，Ras 同源物相关卷曲螺旋蛋白激酶；TLR4，Toll 样受体 4；NF- κ B，核因子 κ B。

a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与直接灸组比较， $P<0.05$ 。

统计学意义 ($P>0.05$)。

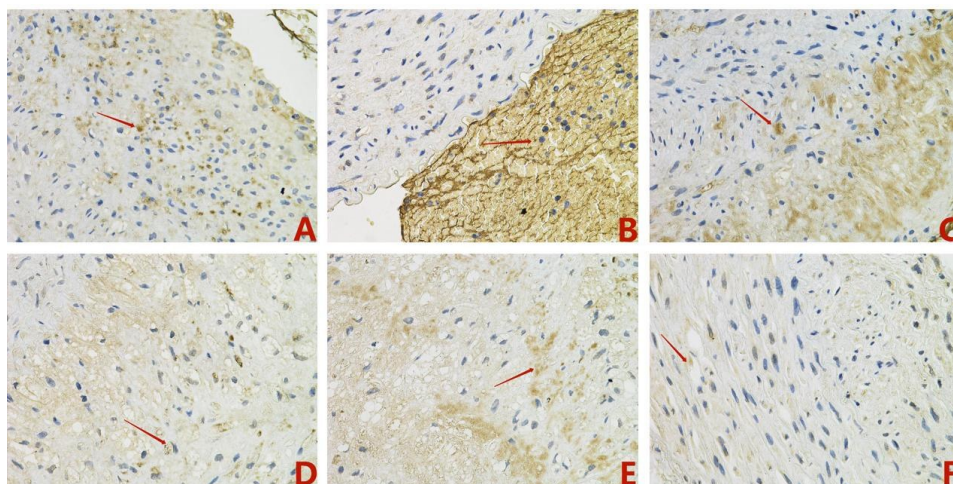
2.4 各组实验兔腹主动脉 RhoA、Rock、TLR4、NF- κ B 抗原活性比较

表 3 示，与空白组比较，模型组 RhoA、RocK、TLR4、NF- κ B 光密度值显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，直接灸组、隔药饼灸组、阿托伐他汀钙组、抑制剂组 RhoA、RocK、TLR4、NF- κ B 光密度值明显下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与直接灸组比较，隔药饼灸组与阿托伐他汀钙组 NF- κ B 光密度值降低 ($P<0.05$)。各组实验兔腹主动脉 RhoA、Rock、TLR4、NF- κ B 免疫组化阳性表达见图 2~图 5 (扫描本文二维码获取彩图)。



注：A，空白组；B，模型组；C，直接灸组；D，隔药饼灸组；E，阿托伐他汀钙组；F，抑制剂组。箭头所指为免疫蛋白反应较为明显处。

图2 各组实验兔腹主动脉 RhoA 表达（免疫组化，×400）



注：A，空白组；B，模型组；C，直接灸组；D，隔药饼灸组；E，阿托伐他汀钙组；F，抑制剂组。箭头所指为免疫蛋白反应较为明显处。

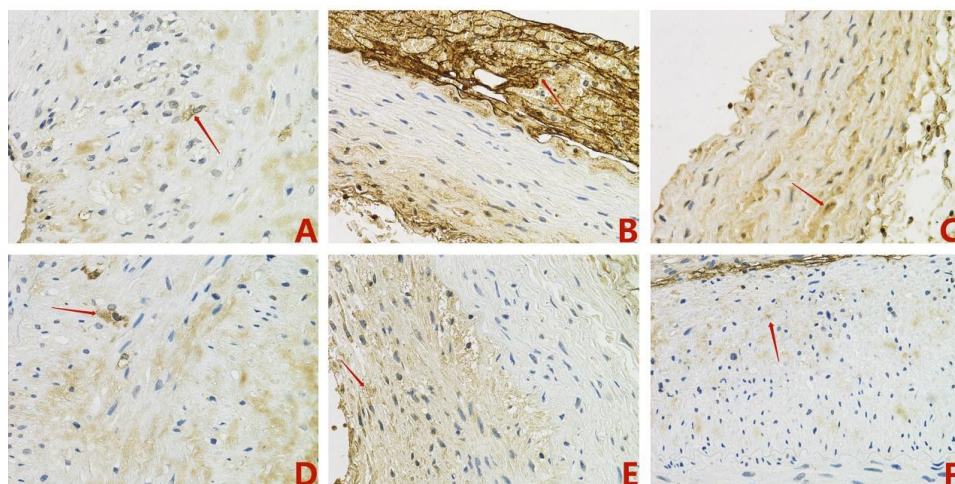
图3 各组实验兔腹主动脉 RocK 表达（免疫组化，×400）

3 讨论

根据临床表现与发病特点，AS 可归属于中医学“胸痹”“中风”“眩晕”等范畴，因血管内皮损伤的病位为血管内膜，故而又可归为“脉痹”范畴。中医学认为，此类病症或因外感寒邪，痰浊、瘀血内侵至血脉凝滞，又或饮食不节，劳倦内伤，脾失健运，累及心肾^[13]。因此，我们选取活血祛瘀、化浊消积、行气降脂的丹参、郁金、山楂、泽泻、大黄作为药饼的主要成分。郁金能行能散，山楂入肝经血分，配以丹参止痛，既能活血，又能行气，专治心血瘀阻之胸痹心痛；大黄配以泽泻活血逐瘀、利水通经。巨阙、天枢为心与大肠的募穴，丰隆为治痰主穴，心俞、肝俞、脾俞各为其脏之背俞穴。采取俞募配穴法，选取心之俞募二穴，意在

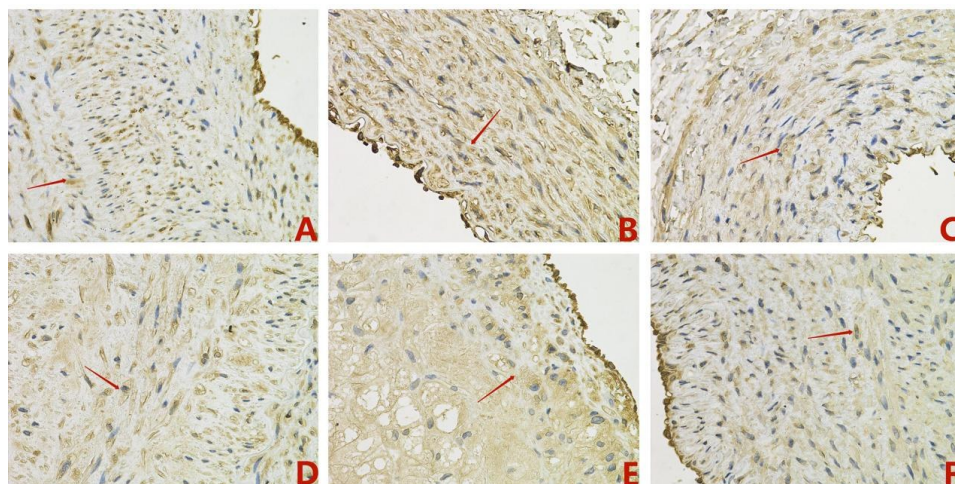
使心气充沛、血液充盈、脉道通利；配以天枢、丰隆、肝俞、脾俞，有疏肝健脾、调节肠胃以化浊调脂之功。隔药饼灸能增强中药成分的作用，又能够中和苦寒药性；而中药敷于特定穴位能发挥艾灸与穴位贴敷的补充协同作用。

脂质代谢紊乱是诱使 AS 发生与进展的重要危险因素^[14]，血清 TC、TG、LDL、HDL 的含量是反映机体脂肪代谢、检验血脂水平的重要指标。本研究表明，造模后兔血清 TC、TG、LDL 升高，HDL、HDL/LDL 值降低，均为 AS 的危险因素；而隔药饼灸、直接灸及阿托伐他汀钙均能有效下调 TC、TG、LDL 含量，上调 HDL 含量及 HDL/LDL 值，且隔药饼灸与阿托伐他汀钙疗效相当。抑制剂组 TC、TG、LDL 含量下调提示各干预组 TC、TG、



注：A，空白组；B，模型组；C，直接灸组；D，隔药饼灸组；E，阿托伐他汀钙组；F，抑制剂组。箭头所指为免疫蛋白反应较为明显处。

图4 各组实验兔腹主动脉TLR4表达（免疫组化，×400）



注：A，空白组；B，模型组；C，直接灸组；D，隔药饼灸组；E，阿托伐他汀钙组；F，抑制剂组。箭头所指为免疫蛋白反应较为明显处。

图5 各组实验兔腹主动脉NF-κB表达（免疫组化，×400）

LDL调节的变化可能与RhoA/RocK信号通路的抑制相关，而在下调TC含量方面，阿托伐他汀钙组相对于抑制剂组作用较弱。同时，隔药饼灸组实验兔斑块组织形态学表现及血管内膜、IMT厚度均较模型组明显减小，说明隔药饼灸可抑制血管细胞增生，降低血管内膜厚度，保护血管内皮，起到稳定易损斑块、延缓AS的进一步发展的作用。

血管炎症反应贯穿AS疾病始终，RhoA/RocK信号通路通过多种途径参与AS的发生发展，主要以血管壁慢性炎症反应、内皮损伤、脂质沉积和纤维化为病理基础^[15]。RhoA参与调控细胞的增殖、凋亡，其下游重要调节分子Rock广泛参与调控细胞的生物学效应以及多种心血管疾病的的发生发展。Rock可增加血管内皮通透性，亦可上调Toll样受体

(TLRs)、NF-κB等炎症因子的表达^[16]，增加易损斑块的不稳定性，诱导AS加剧。有研究^[17]证实，激活RhoA/RocK信号通路会增加内皮细胞的通透性、影响血管内皮功能，引起过度的炎症反应；而抑制该信号通路的激活可以减少脂质堆积，保护血管内皮，稳定易损斑块，减轻AS。本研究结果显示，各干预组斑块局部RhoA/RocK的免疫表达均较模型组显著降低，说明在AS进程中RhoA/RocK信号通路被激活，而直接灸、隔药饼灸及阿托伐他汀钙均能够通过减少炎性细胞聚集抑制斑块局部炎症反应以抑制RhoA/RocK的免疫表达，增强斑块的稳定性。直接灸、隔药饼灸与阿托伐他汀钙组间RhoA/RocK的免疫表达无显著差异，说明三种干预方式抑制RhoA/RocK免疫表达的效果相当。

TLRs 是一组跨膜受体蛋白质, 在 AS 中发挥调控炎症应答的作用, TLR4 可通过脂多糖诱导细胞内信号通路的激活, 进而调节释放和合成炎症细胞因子, 加剧 AS 形成^[18]。但 TLR4 仅间接发挥作用, 直接影响因子则为 NF- κ B 因子。NF- κ B 是 AS 多条炎症信号通路的关键转录因子, 会上调内皮细胞上黏附分子的表达, 从而介导单核细胞黏附内皮细胞并迁移向内皮下, 是血管内皮细胞损伤的机制之一^[19]。研究^[20]证实, TLR4/NF- κ B 信号途径可上调凋亡因子表达, 通过诱导血管内皮细胞凋亡, 导致斑块不稳定甚至破裂。本研究结果显示, 模型组实验兔腹主动脉 TLR4、NF- κ B 的免疫表达显著升高, 而在干预后各干预组 TLR4、NF- κ B 的免疫表达较模型组均显著降低, 说明直接灸、隔药饼灸及阿托伐他汀钙均可抑制 TLR4、NF- κ B 的免疫表达, 减少血管内皮炎症反应及其凋亡, 预防 AS 斑块的破裂。隔药饼灸和阿托伐他汀钙抑制 NF- κ B 免疫表达的作用优于直接灸, 说明隔药饼灸与阿托伐他汀钙在预防内皮细胞炎症表达、增强斑块的稳定性方面更为优越, 这可能与隔药饼灸的干预中增加了中药成分有关。隔药饼灸与阿托伐他汀钙对 TLR4、NF- κ B 的免疫表达影响无显著差异, 说明两者效应相当。抑制剂组的设立提示 TLR4、NF- κ B 免疫表达的降低与 RhoA/RocK 信号通路的抑制相关, 提示 TLR4/NF- κ B 可能是 RhoA/RocK 下游信号通路。

综上, 隔药饼灸可能是通过抑制 RhoA/RocK 信号通路使 TLR4、NF- κ B 表达下降, 从而减少因血管内皮细胞增殖、分化、凋亡而产生的一系列炎症反应, 保护血管内皮功能, 起到稳定 AS 斑块的作用。

参考文献

- [1]程翔, 廖玉华. 炎症与动脉粥样硬化[J]. 中华心血管病杂志, 2004, 32(5):94-96.
- [2]MUJAJ B, BOS D, KAVOUSI M, et al. Serum insulin levels are associated with vulnerable plaque components in the carotid artery: the rotterdam study [J]. Eur J Endocrinol, 2020, 182(3):343-350.
- [3]KRAMER CM, TREIMAN GS. Vulnerable plaque in carotid arteries without "significant" stenosis: unmasking the hidden links to stroke [J]. J Am Coll Cardiol, 2020, 76(19):2223-2225.
- [4]LIBBY P, AIKAWA M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets [J]. Nat Med, 2002, 8(11):1257-1262.
- [5]GIL-PULIDO J, ZERNECKE A. Antigen-presenting dendritic cells in atherosclerosis [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 816:25-31. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.016.
- [6]陈亚丽, 苏瑞瑛. Rho 激酶在动脉粥样硬化和血管疾病中的重要作用[J]. 河北医药, 2012, 34(2):256-258.
- [7]岳增辉, 严洁, 常小荣, 等. 隔药饼灸对高脂血症兔主动脉内皮细胞超微结构的影响[J]. 中国针灸, 2005, 25(1):64-67.
- [8]岳增辉, 何新群, 常小荣, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔血清载脂蛋白 A 及载脂蛋白 B 水平的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(9):33-34.
- [9]易丽贞, 杨俊, 谢涛, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化易损斑块兔腹主动脉 TLR2、TLR4、NF- κ B 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(3):364-369.
- [10]PHINIKARIDOU A, HALLOCK KJ, QIAO Y, et al. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis [J]. J Lipid Res, 2009, 50(5):787-797.
- [11]李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003.
- [12]SATO S, UTSUNOMIYA T, TSURUI K, et al. Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage [J]. Life Sci, 2001, 69(12):1441-1453.
- [13]康骏, 叶良策, 胡慙, 等. 动脉粥样硬化中医研究进展 [J]. 实用中西医结合临床, 2020, 20(6):181-183.
- [14]安冬青, 吴宗贵. 动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识 [J]. 中国全科医学, 2017, 20(5):507-511.
- [15]SCHILLER NK, BOISVERT WA, CURTISS LK. Inflammation in atherosclerosis [J]. Archivos De Cardiologia De Mexico, 2016, 109(12):708-715.
- [16]HATTORI T, SHIMOKAWA H, HIGASHI M, et al. Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice [J]. Circ Res, 2004, 94(1):46-52.
- [17]胡洪贞, 李伟, 姜月华, 等. 大黄素对脂多糖诱导的内皮细胞损伤 Rho/RocK 信号通路的影响 [J]. 山东中医杂志, 2016, 35(2):146-149.
- [18]BJÖRKBACKA H. Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2006, 17(5):527-533.
- [19]欧思琳, 李茹冰. NF- κ B 在动脉粥样硬化疾病中的研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(7):1095-1101.
- [20]韩代书, 王海坤. Toll 样受体 (TLRs) 的信号转导与免疫调节 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(9):820-827.

Effect of Herbal Cake-Separated Moxibustion on RhoA/Rock Signaling Pathway in the Abdominal Aorta of Rabbits Model with Atherosclerotic Vulnerable Plaques

SONG Jiawei, MA Yijie, RAO Zehua, LIAO Yijuan, WU Xuefen, YI Lizhen, LIU Xin, YUE Zenghui

School of Acupuncture, Moxibustion & Tuina, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of herbal cake-separated moxibustion in stabilizing the vulnerable plaque of atherosclerosis (AS). **Methods** Fifty New Zealand rabbits were randomly divided into blank group (n=8), model group (n=9), direct moxibustion group (n=9), herbal cake-separated moxibustion group (n=7), atorvastatin group (n=9) and inhibitor group (n=8). The AS vulnerable plaque model was established in all groups except for the blank group by high-fat feeding, balloon injury of abdominal aorta, gene transfection, and trigger plaque rupture. The blank group and model group were not operated. The atorvastatin group was fed with atorvastatin calcium tablets 1.96 mg/(kg·d), and the inhibitor group was injected with fasudil hydrochloride 10 mg/(kg·d) along the ear edge veins. Direct moxibustion group and herbal cake-separated moxibustion group used moxibustion either directly on the acupoints or with a herbal cake; the two acupoints groups, Juque (CV14), bilateral Tianshu (ST25) and Fenglong (ST40) as group 1, or bilateral Xinshu (BL15), Ganshu (BL18) and Pishu (BL20) as group 2, should be used alternatively once daily, three moxa cones for each acupoint; the treatment course of all the groups lasted for 8 weeks. After 13 weeks, the serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) were detected by the ELISA method, and the HDL/LDL was calculated; The pathological changes of vulnerable plaque and the aortic intima thickness, intima-media thickness (IMT) were observed through HE staining; immunohistochemical method was used to observe the antigen activity of Ras homolog gene family, member A (RhoA), Rho-associated coiled-coil kinase (Rock), Toll-like receptor 4 (TLR4), and nuclear factor kappa B (NF-κB) in abdominal aorta. **Results** Compared to the blank group, the model group had significantly increased serum content of TC, TG and LDL, decreased HDL and HDL/LDL, increased intima thickness and IMT, as well as the increased grayscale value of RhoA, RocK, TLR4 and NF-κB ($P<0.01$). Compared to the model group, the direct moxibustion group, the herbal cake-separated moxibustion group, and the atorvastatin group had significantly lower level of TC, TG, and LDL, higher HDL and HDL/LDL, and lower aortic intima thickness, IMT, and the grayscale value of RhoA, RocK, TLR4 and NF-κB ($P<0.05$, or $P<0.01$). The grayscale value of NF-κB in the herbal cake-separated moxibustion group and the atorvastatin group were significantly reduced as compared to that in direct moxibustion group ($P<0.05$). **Conclusion** Herbal cake-separated moxibustion may downregulate the expression of TLR4 and NF-κB by inhibiting the RhoA/RocK signaling pathway, so as to protect the function of vascular endothelial, and to stabilize AS vulnerable to plaque.

Keywords atherosclerosis; herbal cake-separated moxibustion; vulnerable plaque; vascular endothelial function; Ras homolog gene family, member A; Rho-associated coiled-coil kinase; Toll-like receptor 4; nuclear factor kappa B

(收稿日期: 2021-06-27; 修回日期: 2021-09-01)

[编辑: 王利芬]