

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.22.013

推拿手法对颈动脉粥样硬化斑块模型兔 CD68、MMP-2 表达的影响

袁钰¹, 蒋涛²✉, 陈飞², 陈辉¹

1. 安徽中医药大学第二临床医学院, 安徽省合肥市蜀山区梅山路 103 号, 230038; 2. 安徽中医药大学第二附属医院

[摘要] **目的** 探讨不同颈椎旋转角度的推拿手法对颈动脉粥样硬化的影响。**方法** 25 只新西兰兔随机抽取 5 只作为对照组, 其余 20 只兔作为造模组。造模组兔采用动脉内膜球囊损伤联合高脂饲料喂养的方式建立颈动脉粥样硬化模型, 造模后随机分为模型组及颈椎旋转 90°、105°、120°组, 每组 5 只。颈椎旋转 90°、105°、120°组采用一指禅推法、揉法、拨法放松兔颈部肌肉后, 分别进行颈椎旋转 90°、105°、120°, 左右各旋转 1 次。上述全部手法每天 1 次, 共干预 2 周, 其余两组不做干预。取兔左侧颈总动脉, 用 HE 染色观察颈动脉组织病理形态, 免疫组化染色观察颈动脉组织内巨噬细胞通用标志物 CD68 及基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 表达情况并进行半定量分析。**结果** HE 染色显示, 对照组颈动脉未见明显病变; 模型组可见内膜下泡沫细胞聚集, 中膜血管平滑肌细胞增多、排列紊乱, 部分血管平滑肌细胞由中膜进入内膜下, 形成纤维帽; 颈椎旋转 90°、105°、120°组内膜下泡沫细胞大量聚集, 管腔狭窄症状较模型组改善; 与颈椎旋转 90°组比较, 颈椎旋转 105°、120°组颈动脉内皮稍有脱落倾向。与对照组比较, 模型组及颈椎旋转 90°、105°、120°组颈动脉组织 CD68、MMP-2 表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 颈椎旋转 90°、105°、120°组颈动脉组织 CD68、MMP-2 表达降低 ($P<0.05$); 颈椎旋转 90°、105°、120°组三组间两两比较, CD68 阳性表达差异无统计学意义 ($P>0.05$); 颈椎旋转 105°、120°组颈动脉组织 MMP-2 阳性表达较颈椎旋转 90°组升高 ($P<0.05$)。**结论** 推拿手法可通过降低斑块内巨噬细胞 CD68 含量和 MMP-2 水平, 促进斑块稳定; 但随着颈椎旋转角度的增加, 可能会导致 MMP-2 表达升高, 从而一定程度上降低斑块稳定性。

[关键词] 颈动脉粥样硬化; 推拿手法; 巨噬细胞; 基质金属蛋白酶

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种血管系统的慢性炎症性疾病^[1]。颈动脉处发生的动脉硬化被称为颈动脉粥样硬化 (carotid atherosclerosis, CAS), 常作为全身动脉粥样硬化形成和演变的观察“窗口”^[2]。全球心血管疾病的主要死亡原因是缺血性心脏病和缺血性卒中, 主要的可改变危险因素之一是低密度脂蛋白 (LDL) 升高, 而 CAS 是缺血性脑卒中和心肌梗死的重要诱因, 其发病机制也与 LDL 密切相关^[3]。颈动脉斑块是 CAS 的主要表现, 斑块的脱落或破裂也是诱发心血管意外的重要

原因之一, 2020 年全球 30~79 岁人群颈动脉斑块患病率估计为 21.1%^[4]。该年龄段群体亦是颈椎病的高发人群, 在中国颈椎病患病率为 13.76%^[5]。

推拿手法具有理筋整复、纠正小关节紊乱、松懈粘连、缓解颈椎肌群肌肉疲劳等作用, 临床常作为颈椎病的首选治疗方式^[6]。有研究^[7-8]发现, 颈椎失稳、退行性病变等刺激颈椎后纵韧带交感神经兴奋, 可引起颈内动脉、椎动脉等血管收缩痉挛, 继而导致血流动力学改变, 诱发 CAS 斑块形成。临床上许多因颈椎病接受推拿手法治疗的患者, 合并有颈动脉斑块。前期 Meta 分析结果^[9]显示, 推拿手法对 CAS 动物模型的血流动力学因素无影响。但推拿手法是否影响斑块内纤维帽厚度、炎细胞浸润等, 以及不同的颈椎旋转角度对斑块稳定性的影

基金项目: 安徽中医药大学科研基金 (2021efylc05); 安徽省名中医及基层名中医工作室建设项目 (中发展 [2020]10 号); “十四五”省级中医优势特色专科项目 (皖中医药服务秘 [2021]71 号); 2019 年省级中医发展专项资金项目 (皖卫中医药发 [2019]8 号)

✉ 通讯作者: 729552674@qq.com, (0551)62668506

响是否具有差异,尚缺乏足够的证据。研究显示,CD68 作为巨噬细胞通用标志物,在不稳定斑块中表达升高,而在稳定斑块中表达下调,因此可作为不稳定斑块的有效诊断标志物^[10]。在人类颈动脉脆弱斑块中,基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 的蛋白及 mRNA 水平均升高,有助于不稳定斑块的诊断^[11]。故本研究旨在通过对 CAS 兔进行不同颈椎旋转角度的推拿干预,观察其对颈动脉组织内巨噬细胞 CD68 以 MMP-2 表达的影响,探讨不同颈椎旋转角度对 CAS 兔斑块稳定性的影响,以期为临床推拿手法的安全运用提供科学依据。本研究通过江西中洪博元实验动物伦理委员会认证(伦理编号:202212010002)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级成年雄性新西兰兔 25 只,体质量 2.0~2.5 kg,3 月龄,购买于湖南太平生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2020-0005。动物饲养于室温 20~22℃、湿度 40%~60% 环境下,12 h 昼夜循环,动物可自由饮水和摄食。

1.2 主要试剂与仪器

二甲苯(批号:33535)、无水乙醇(批号:32061)、95% 乙醇(批号:32061),西陇科学股份有限公司;苏木素染液(批号:ZLI-9610)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)(批号:ZB-2301),北京中杉金桥生物技术有限公司;Scott 蓝化液(批号:G1865)、伊红染色液(批号:G1100),美国 Solarbio 公司;DAB 显色试剂盒(批号:CW0125M),北京 CWBIO 公司;CD68 抗体(批号:DF7518)、MMP-2 抗体(批号:AF5330),美国 Affinity 公司;二水柠檬酸钠(批号:S116311),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;柠檬酸(批号:77-92-9),天津市大茂化学试剂厂;牛血清白蛋白(BSA,批号:S12012),上海源叶生物科技有限公司,30% 过氧化氢(批号:51001),天津玉福泰化学试剂有限公司;戊巴比妥钠(批号:201201),北京化学试剂公司;注射用青霉素钠(批号:030202659),华北制药股份有限公司;高脂饲料(2% 胆固醇+5% 猪油+1% 蛋黄粉+92% 普通饲料,批号:20230721),江苏省协同医药生物工程有限责任公司。

1.5 mm×15 mm PTCA 球囊扩张导管(上海康德莱医疗器械股份有限公司);KD-TS3S1 型组织脱水机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);

HistoCore Arcadia H 型石蜡包埋机、HistoCore BIOCUT 型切片机、Leica HI1210 型摊片机(德国 Leica 公司);CX43 型显微镜(日本 OLYMPUS 公司);HGZF-101-1 型电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司);DHP-9054 型热恒温培养箱(山东博科生物有限公司)。

1.3 动物分组与造模

将 25 只雄性新西兰兔普通饲料适应性喂养 1 周,按体质量大小排序,用随机数字表法抽取 5 只作为对照组。对照组继续普通饲料喂养 11 周,其余新西兰兔作为造模组采用动脉内膜球囊损伤联合高脂饲料喂养^[12]的方法建立颈动脉粥样硬化模型:高脂饲料 120 g/d 喂养 1 周后,进行动脉内膜球囊损伤术。新西兰兔仰卧固定于手术台上,用 3% 戊巴比妥钠 1 ml/kg 耳缘静脉注射进行麻醉,备皮、消毒、切开颈部皮肤,分离左侧颈总动脉,夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉,结扎颈外动脉远心端,于颈内外动脉分叉处前方 0.5 cm 剪“V”形切口,插入球囊导管,注入空气,使球囊扩张,回拉 3 次后撤出,结扎颈外动脉,缝合皮肤。术后连续 3 天肌肉注射 40 万 U 青霉素预防感染。术后继续高脂饲料(120 g/d)喂养 8 周。造模组采用随机数字表法随机抽取 2 只新西兰兔验证造模情况,空气栓塞法处死后,取颈总动脉全长,肉眼观察可见颈动脉斑块,HE 染色显示内-中膜增厚,内膜下泡沫细胞大量聚集,中膜血管平滑肌细胞增多、排列紊乱,提示造模成功^[12]。将剩余 18 只造模成功的新西兰兔,再次按体质量大小排序,用随机数字表法分为模型组 3 只,颈椎旋转 90°、105°、120° 组各 5 只,并将此前随机抽取的 2 只验证模型的新西兰兔归为模型组,故最终模型组兔为 5 只。

1.4 干预措施

对照组和模型组不做任何干预措施。颈椎旋转 90° 组、颈椎旋转 105° 组和颈椎旋转 120° 组在造模成功后,实施推拿手法治疗,为期 2 周。所有操作手法均由同一有经验的推拿医师进行,操作的同时观察动物的表现。具体操作如下:新西兰兔取蹲坐位,操作者安抚其 3~5 min,待兔安静后,分别于一指禅推法、滚法、拨法作用于兔颈项部,操作时间约 15~20 min;待兔颈部肌肉放松后,使其颈部前屈 10~15°,操作者一手掌心托住兔下颌部,另一手以张开的虎口扶持兔后枕部,两手向上用力拔伸颈椎,停留 3~5 s;其后双手协同用力,颈椎旋转 90°、105°、120° 组分别反向旋转兔头颈部

90°、105°、120°，左右各 1 次。上述全部手法每天 1 次，7 次为 1 个疗程，共 2 个疗程。

1.5 观察指标及方法

实验最后一天，禁食，不禁水。次日称重，3% 戊巴比妥钠 1 ml/kg 耳缘静脉注射麻醉。沿颈部正中切开皮肤，分离皮下组织及肌肉，暴露并游离左侧颈总动脉，取其全长，用缓冲液冲洗后，剥离周围脂肪和结缔组织，用 4% 多聚甲醛溶液 4℃ 固定。

1.5.1 HE 染色观察颈动脉病理形态 用 4% 多聚甲醛溶液 4℃ 固定颈总动脉，72 h 后取出，用磷酸盐缓冲溶液清洗后，梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋，切片连续切片 7 张，切片厚度 5 μm。将切片放入二甲苯、乙醇脱蜡；苏木素染液染 3~5 min，自来水洗，1% 盐酸酒精分化，自来水洗，返蓝液返蓝，流水冲洗；伊红染液染 3~5 min，流水冲洗。梯度乙醇脱水，二甲苯透明，超净高级封片胶封片。显微镜下观察颈动脉病理形态。

1.5.2 免疫组化染色观察颈动脉组织内 CD68、MMP-2 表达 将颈动脉组织石蜡切片用梯度乙醇、二甲苯脱蜡；加入柠檬酸盐缓冲液进行高温高压抗原修复，自然冷却后，使用 PBS 淋洗；滴加 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶活性，PBS 充分淋洗；0.5% TritonX-100 室温通透 20 min；PBS 浸洗玻片 3 次，封闭液 37℃ 封闭 30 min；加稀释后一抗 CD68 (1:100)、MMP-2 (1:100)，4℃ 过夜；PBS 漂洗 3 次，加入辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)，37℃ 孵育 30 min，PBS 充分淋洗；DAB 显色 3~5 min，PBS 冲洗 1 min，苏木素染液复染 3 min，盐酸酒精分化，返蓝，自来水冲洗；脱水、透明、

中性树胶封片。显微镜下观察颈动脉组织内 CD68、MMP-2 显色程度，并半定量分析计算其累积光密度 (IOD)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行分析。本研究计量资料均满足正态分布用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，方差齐时多组间比较用单因素方差分析，组间两两比较用 LSD 检验；方差不齐时多组间比较用 Welch 检验，组间两两比较用 Dunnett-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

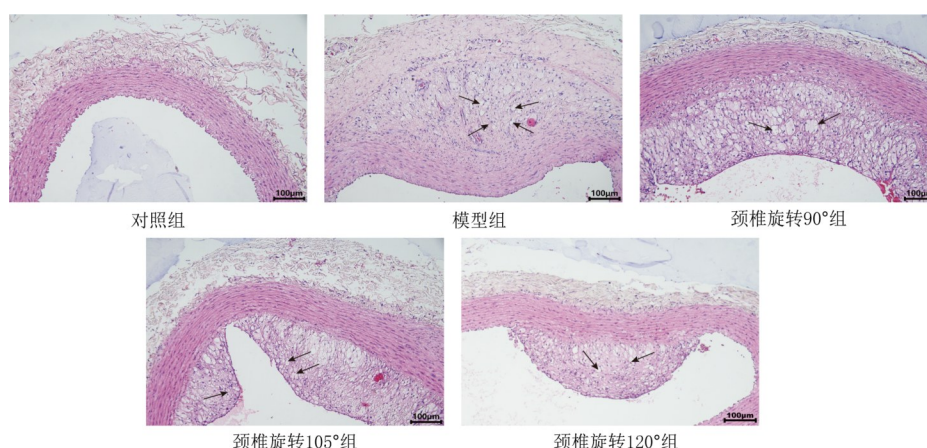
2 结果

2.1 各组兔颈动脉组织病理形态比较

对照组颈动脉结构正常，未见明显病变；模型组颈动脉内-中膜增厚，内膜下可见泡沫细胞聚集，中膜血管平滑肌细胞增多、排列紊乱，部分血管平滑肌细胞由中膜进入内膜下，形成纤维帽，管腔狭窄。颈椎旋转各组内膜下泡沫细胞大量聚集，管腔狭窄症状较模型组改善。与颈椎旋转 90° 组比较，颈椎旋转 105°、120° 组颈动脉内皮稍有脱落倾向。见图 1。

2.2 各组兔颈动脉组织巨噬细胞 CD68、MMP-2 表达比较

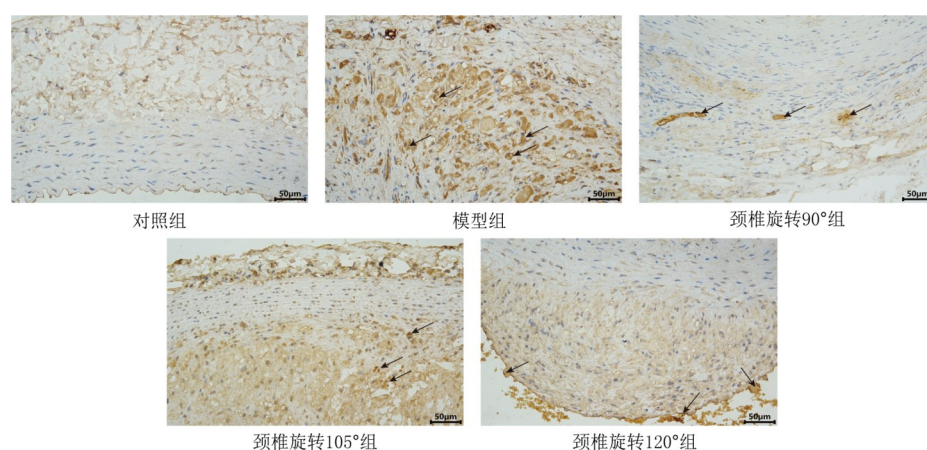
免疫组化染色可见 CD68 阳性表达的巨噬细胞呈棕色。图 2 示，对照组几乎不表达棕色；模型组棕色表达明显增多；颈椎旋转各组棕色表达较模型组明显减少，与颈椎旋转 90° 组比较，颈椎旋转 105°、120° 组棕色表达稍增多。免疫组化染色可见 MMP-2 棕染呈阳性。图 3 示，对照组几乎不表达棕色；模型组棕色表达明显增多；颈椎旋转各组棕色



注：黑色箭头为颈动脉粥样硬化病变处。

图 1 各组兔颈动脉组织病理学形态 (HE 染色，×200)

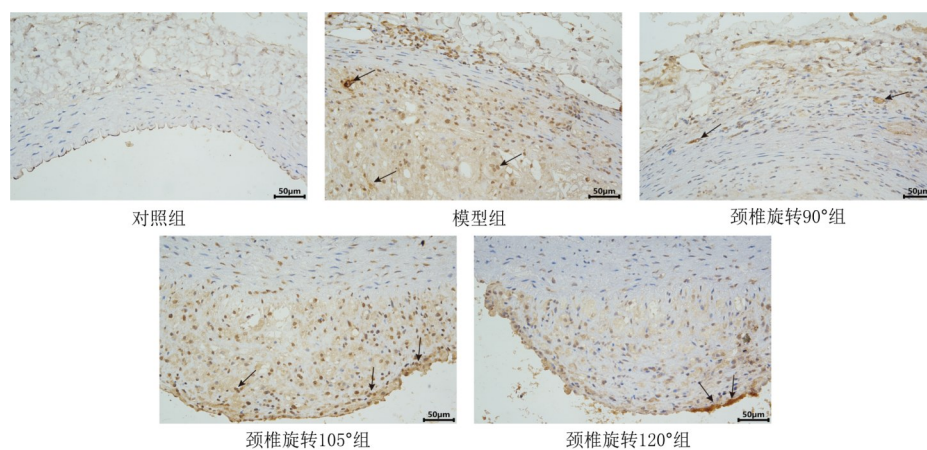
Figure 1 Histopathologic morphology of carotid artery of rabbits in each group (HE staining, ×200)



注：黑色箭头代表巨噬细胞 CD68 表达定位。

图2 各组兔颈动脉 CD68 表达情况 (免疫组化染色, ×400)

Figure 2 CD68 expression in the carotid artery of rabbits in each group (immunohistochemical staining, ×400)



注：黑色箭头代表 MMP-2 表达定位。

图3 各组兔颈动脉基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 表达情况 (免疫组化染色, ×400)

Figure 3 Carotid artery matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression in rabbits in each group (immunohistochemical staining, ×400)

表达较模型组明显减少, 与颈椎旋转 90°组比较, 颈椎旋转 105°组和颈椎旋转 120°组棕色表达增多。

表 1 示, 与对照组比较, 模型组及颈椎旋转 90°、105°、120°组的巨噬细胞 CD68、MMP-2 表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 颈椎旋转 90°、105°、120°组巨噬细胞 CD68、MMP-2 表达降低 ($P < 0.05$); 颈椎旋转 90°、105°、120°组三组之间 CD68 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与颈椎旋转 90°组比较, 颈椎旋转 105°、120°组 MMP-2 表达升高 ($P < 0.05$); 颈椎旋转 105°、120°组间 MMP-2 表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

根据 CAS 的临床症状, 可将其归为中医学“眩晕”“头痛”“中风”等范畴^[13]; 根据 CAS 的病位, 又与“脉痹”“脉浊”相对应。CAS 病因复杂,

表 1 各组兔颈动脉组织内巨噬细胞 CD68、MMP-2 表达比较
Table 1 Comparison of macrophage CD68 and MMP-2 expression in carotid artery tissues of rabbits in each group (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	CD68	MMP-2
对照组	5	25511.81±8269.81	35455.40±10987.86
模型组	5	385100.90±147015.50 ^{a)}	169279.92±19440.82 ^{a)}
颈椎旋转 90°组	5	157195.98±50673.09 ^{a) b)}	67396.86±5956.19 ^{a) b)}
颈椎旋转 105°组	5	203059.08±15498.26 ^{a) b)}	114008.94±13728.88 ^{a) b) c)}
颈椎旋转 120°组	5	262261.92±97329.20 ^{a) b)}	92987.49±32300.17 ^{a) b) c)}
F 值		12.92	36.05
P 值		<0.05	<0.05

注：IOD, 累积光密度; MMP-2, 基质金属蛋白酶 2。

a) 与对照组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与颈椎旋转 90°组比较, $P < 0.05$ 。

主要与外感六淫、先天不足、饮食不节、情志失调、年老体衰等相关。CAS 病机总属本虚标实，高社光教授强调本病病机主要责之于痰瘀互结^[14]；国医大师朱良春认为脾肾不足，痰瘀互结是导致 CAS 斑块不稳定的核心病机^[15]；而顾锡镇教授则认为其本在于肝肾阴虚，其标在于痰瘀阻络^[16]。由此可见，虽然各位医家对于本虚的意见不一，但其标在于痰瘀互结这一观点，已经在一定程度上取得了学界的共识。从中医学角度来讲，过食膏粱厚腻，易致脾胃亏虚，脾虚无以运化津液，停滞中焦，生痰成瘀，痰瘀互结阻滞脉内，日久形成斑块^[17]。但由于单纯高脂饲料喂养更易造成腹主动脉粥样硬化，而联合动脉内膜球囊损伤有助于指定病变位置，缩短斑块形成时间^[18]。因此，本研究采用高脂饲料喂养联合动脉内膜球囊损伤进行造模。

孙子雯等^[8]研究发现，颈椎失稳、退行性病变等会诱发 CAS 斑块形成。推拿中一指禅推法、滚法、拨法等作用于颈部，具有缓解局部肌肉紧张，松解肌肉粘连，促进物质代谢，加快椎-基底动脉血流速度，改善内皮功能，减轻炎症反应等作用^[19-20]；颈椎拔伸法和颈椎旋转扳法等关节整复类手法，具有减轻神经卡压，纠正小关节错缝、紊乱，提升椎间盘应力，恢复颈椎内外源稳定的作用^[21]。因此，推拿常作为临床治疗颈椎病的首选方法。而对于合并有 CAS 的颈椎病患者，能否运用推拿手法，学术界观点不一。《素问·举痛论篇》曰：“按之则热气至……按之则血气散”，指出推拿具有行气活血化瘀的功能。《黄帝内经》中将“痰”称为“积饮”“汁沫”等，有学者指出中医所说的“痰”“沫”等物质可能与现代医学中的炎症因子相似^[22]。

正常情况下，人的颈椎左右旋转范围为 60°~80°，在进行颈椎旋转扳法时，一般操作为达到其病理位或功能位后之“扳机点”，再扩大 10°~15°到达其生理位。既往研究显示^[23]，CAS 兔的颈椎从 0°~90°的旋转过程中，不同的颈椎旋转角度不会改变颈动脉血流速度。但在实验过程中发现，兔的颈椎旋转角度远超于此（最大可旋转至 180°），因此在考虑兔安全的前提下，本研究将颈椎旋转角度设为 90°、105°、120°。研究结果显示，与对照组相比，模型组颈动脉管腔变窄，泡沫细胞聚集，提示 CAS 造模成功；与模型组相比，颈椎旋转各组管腔狭窄症状改善，提示推拿手法可有效改善 CAS 管腔狭窄症状；与颈椎旋转 90°组比较，颈椎旋转 105°、120°组颈动脉内皮稍有脱落倾向，提示颈椎

旋转角度增加可能会降低斑块稳定性。

巨噬细胞是 CAS 中最主要的免疫细胞之一，贯穿 CAS 病变的全程^[24]。研究发现，CD68 在单核/巨噬细胞谱系中高表达，且在炎症的刺激作用下，巨噬细胞 CD68 的表达显著上调^[25]，因此常常作为巨噬细胞的通用标志物来反映巨噬细胞的激活、聚集。在正常情况下，动脉血中的巨噬细胞相对较少；当 CAS 发生时，为了清除侵入动脉内膜的脂质，单核细胞在趋化因子的作用下，通过内皮细胞间隙进入内膜，转化为巨噬细胞^[26-27]。本研究结果发现，模型组与颈椎旋转 90°、105°、120°组的 CD68 阳性表达较对照组显著增多，反映了 CAS 造模成功后，斑块内巨噬细胞增多。Wang 等^[10]通过测序研究发现，CD68 在不稳定斑块中表达升高，在稳定斑块中表达降低，可作为诊断标志物有效预测斑块稳定性。本研究结果显示，与模型组相比，颈椎旋转 90°、105°、120°组的 CD68 阳性表达均降低，提示推拿手法使 CAS 斑块内巨噬细胞减少，有利于改善 CAS 内炎性环境，促进斑块稳定。将颈椎旋转 90°、105°、120°组三组之间的 CD68 阳性表达进行比较，结果显示差异无统计学意义，提示颈椎旋转角度不会通过影响巨噬细胞含量而影响斑块稳定性。

基质金属蛋白酶（Matrix metalloproteinases, MMPs）由成纤维细胞、巨噬细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞等多种细胞分泌，具有分解细胞外基质、调节血管生成等功能，亦与 CAS 发生发展密切相关^[28-30]。MMP-2 为 MMPs 家族成员之一，在动脉粥样硬化中的表达具有高度可变性，参与 CAS 晚期新生血管生成与血管重构^[31]。在 CAS 早期，MMP-2 可导致内皮细胞基底膜降解，降低内皮细胞的防御能力，进而导致 LDL 向内膜迁移；随着 CAS 进一步发展，MMP-2 可以促进细胞外基质的降解，促进斑块形成后血管平滑肌细胞的增殖和迁移，导致斑块不稳定^[32]。本研究结果显示，与对照组比较，模型组与颈椎旋转 90°、105°、120°组的 MMP-2 阳性表达均增加，反映了 MMP-2 参与 CAS 的形成，是该过程中主要的蛋白酶之一。Guo 等^[11]研究证实，在人的颈动脉易损斑块中，MMP-2 mRNA 水平和蛋白水平表达明显升高，提示 MMP-2 可能与斑块不稳定性相关。本研究结果显示，与模型组比较，颈椎旋转 90°、105°、120°组 MMP-2 表达降低，反映推拿手法不同旋转度数均使斑块内 MMP-2 阳性表达降低，抑制了细胞外基质的降解

和血管平滑肌细胞的增殖和迁移,促进斑块稳定。与颈椎旋转 90°组相比,颈椎旋转 105°组和颈椎旋转 120°组 MMP-2 表达升高,而颈椎旋转 105°、120°组两组之间比较差异无统计学意义,提示颈椎旋转角度增加可能会降低斑块稳定性。

综上所述,推拿手法可通过降低斑块内巨噬细胞含量和 MMP-2 水平,改善颈动脉粥样硬化的发展,促进稳定斑块;但随着颈椎旋转角度的增加,可能会一定程度上降低推拿手法的治疗效果。因此,临床上对于合并有 CAS 的颈椎病患者,运用颈椎旋转手法恢复关节错位时,不可强求“弹响”声,特别是对于重度 CAS 斑块的患者,应谨慎使用复位手法,适当地运用软组织放松类手法(如一指禅推法、揉法、拨法等)有利于疾病的改善。本研究存在一定的局限性:由于新西兰兔和人体的差异,作用于兔的推拿手法与作用于人体的推拿手法不完全相同,特别是实施颈椎旋转手法的差异方面,故本实验研究结果对于人体的借鉴作用还有待进一步证实;本研究仅对颈椎旋转角度进行了研究,而对手法的类型、力度、频率等因素未进行量化比较,可能在力度和频率等因素达到极限的情况下,本实验结果存在一定的偏差,故有待进一步实验结果证实,这也是未来深入研究的方向。

参考文献

- [1] LIBBY P, BURING JE, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.
- [2] 伍满燕, 梁文卿, 陈江天, 等. 颈动脉粥样硬化性疾病的诊治进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(11): 1223-1226.
- [3] VADUGANATHAN M, MENSAH GA, TURCO JV, et al. The global burden of cardiovascular diseases and risk: a compass for future health[J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 80(25): 2361-2371.
- [4] SONG P, FANG Z, WANG H, et al. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study[J]. Lancet Glob Health, 2020, 8(5): e721-e729.
- [5] LV Y, TIAN W, CHEN D, et al. The prevalence and associated factors of symptomatic cervical Spondylosis in Chinese adults: a community-based cross-sectional study[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2018, 19(1): 325.
- [6] 张帅攀, 朱清广, 孔令军, 等. 基于“筋骨平衡”理论探讨推拿治疗颈椎病的生物力学内涵[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 160-162.
- [7] 尹鹏晔. 颈椎失稳与颈部动脉粥样硬化斑块的相关性研究[D]. 百色: 右江民族医学院, 2022.
- [8] 孙子雯, 张耘硕, 曹盛楠, 等. 颈椎病脑-交感神经症状产生机制[J]. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)学报, 2022, 43(11): 876-880.
- [9] 袁钰, 蒋涛, 陈辉. 推拿干预颈动脉粥样硬化动物模型安全性的系统评价和 Meta 分析[J]. 安徽中医药大学学报, 2023, 42(4): 49-55.
- [10] WANG J, KANG Z, LIU Y, et al. Identification of immune cell infiltration and diagnostic biomarkers in unstable atherosclerotic plaques by integrated bioinformatics analysis and machine learning[J]. Front Immunol, 2022, 13: 956078. doi: 10.3389/fimmu.2022.956078.
- [11] GUO ZY, ZHANG B, YAN YH, et al. Specific matrix metalloproteinases and calcification factors are associated with the vulnerability of human carotid plaque[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(3): 2071-2079.
- [12] 许振坤, 任丽玮, 原涛. 高脂饲养结合颈总动脉球囊损伤制作胰岛素抵抗兔动脉粥样硬化模型[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(1): 28-32.
- [13] 李贺, 杜雅薇, 吴圣贤. 中药治疗颈动脉粥样硬化临床随机对照试验设计与评价技术规范(2021 版)[J]. 中医杂志, 2021, 62(24): 2204-2208.
- [14] 李海英, 杨杨, 胡翠平. 高社光教授防治颈动脉粥样硬化斑块的临床经验[J]. 河北中医, 2017, 39(1): 12-15.
- [15] 李英, 龚宝莹, 朱建华, 等. 国医大师朱良春从痰瘀论治颈动脉不稳定斑块的学术经验[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23): 195-200.
- [16] 陈果然, 顾锡镇. 顾锡镇教授治疗颈动脉粥样硬化经验[J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(3): 260-262.
- [17] 陈宁, 宋囡, 贾连群, 等. 基于“脾-线粒体”相关理论谈痰瘀互结所致动脉粥样硬化的微观变化[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(4): 849-851.
- [18] 叶鹏飞, 郭应坤, 张怡, 等. 构建兔颈总动脉粥样硬化斑块模型的新方法及评价[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 301-306.
- [19] 陈迪光, 方磊, 房敏, 等. 一指禅推法舒筋生物学效应的手法参数研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2423-2425.
- [20] 冯亮, 秦美影, 龙翔宇. 理筋推拿联合益气活血汤对气虚血瘀型椎动脉型颈椎病患者的临床疗效[J]. 中成药, 2022, 44(10): 3397-3400.
- [21] 张怡瑾, 李辉, 陈子颖, 等. 基于“筋出槽, 骨错缝”病机探析推拿治疗颈椎病的调衡作用[J]. 中医杂志, 2023, 64(14): 1436-1439.
- [22] 曹奔, 张帅攀, 周鑫, 等. 基于炎性微环境探析推拿干预腰椎间盘突出症的镇痛机理[J]. 中医杂志, 2022, 63(24): 2321-2325.
- [23] ZHANG S, QI J, ZHANG L, et al. Effects of Cervical Rotation Angle on Atherosclerotic Internal Carotid Artery

- Blood Flow: A Safety Study Using an Animal Model of Internal Carotid Atherosclerosis[J]. Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics, 2020, 43(5): 521-530.
- [24] MOORE KJ, TABAS I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3): 341-355.
- [25] CHISTIakov DA, KILLINGSWORTH MC, MYASOE-DOVA VA, et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker[J]. Lab Invest, 2017, 97(1): 4-13.
- [26] MUNJAL A, KHANDIA R. Atherosclerosis: orchestrating cells and biomolecules involved in its activation and inhibition[J]. Adv Protein Chem Struct Biol, 2020, 120: 85-122. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.11.002.
- [27] WYNN TA, VANNELLA KM. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis[J]. Immunity, 2016, 44(3): 450-462.
- [28] DE ALMEIDA L, THODE H, ESLAMBOLCHI Y, et al. Matrix metalloproteinases: from molecular mechanisms to physiology, pathophysiology, and pharmacology[J]. Pharmacol Rev, 2022, 74(3): 712-768.
- [29] FIC P, ZAKROCKA I, KURZEPA J, et al. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2011, 65: 16-27. doi: 10.5604/17322693.931536.
- [30] BRÄUNINGER H, KRÜGER S, BACMEISTER L, et al. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease and myocardial infarction[J]. Basic Res Cardiol, 2023, 118(1): 18.
- [31] MITTAL B, MISHRA A, SRIVASTAVA A, et al. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease[J]. Adv Clin Chem, 2014, 64: 1-72. doi: 10.1016/b978-0-12-800263-6.00001-x.
- [32] ZHU Y, XIAN X, WANG Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. Biomolecules, 2018, 8(3): 80.

Effect of Tuina Manipulation on the Expression of CD68 and MMP-2 in Rabbits with Carotid Atherosclerotic Plaque YUAN Yu¹, JIANG Tao², CHEN Fei², CHEN Hui¹

1. The Second Clinical Medical College of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230038; 2. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effect of *tuina* manipulation with different cervical rotation angle on carotid atherosclerosis. **Methods** Twenty-five New Zealand rabbits were randomly selected, 5 of which as the control group, and the other 20 rabbits as the modeling group. The modeling group were made by arterial intimal balloon injury combined with high-fat diet, and were randomly divided into model group, cervical rotation angle of 90° group, cervical rotation angle of 105° group and cervical rotation angle of 120° group (5 rabbits in each group) after successful modeling. After relaxing the neck muscles of rabbits with manipulation of one-finger meditation, rolling and dialing, the cervical vertebrae of each group was rotated by 90°, 105° and 120° respectively for 2 weeks, while the other two groups were not intervened. Then took the entire length of the left common carotid artery from the rabbit, observed the pathological morphology of the carotid artery tissue using HE staining, and observed the expression of CD68 and MMP-2 in the carotid artery tissue using immunohistochemistry staining, and conducted semi quantitative analysis. **Results** HE staining showed that there was no obvious pathological change in the carotid artery in the control group; the model group showed subintimal foam cells gathered, vascular smooth muscle cells increased and arranged disorderly, and some vascular smooth muscle cells entered the intima from the media to form a fibrous cap. Compared with the model group, the number of foam cells increased and the symptoms of lumen stenosis were improved in all groups of cervical rotation; compared with the group with 90° rotation, the endothelium tended to fall off slightly in the group with 105° rotation and 120° rotation. Compared with the control group, the model group and the cervical rotation angle of 90° group, cervical rotation angle of 105° group and cervical rotation angle of 120° group showed an increase in positive expression of CD68 and MMP-2 ($P < 0.05$); compared with the model group, the positive expression of CD68 and MMP-2 in the cervical rotation angle of 90° group, cervical rotation angle of 105° group and cervical rotation angle of 120° group decreased ($P < 0.05$); there was no statistically significant difference in CD68 positive expression among cervical rotation angle of 90° group, cervical rotation angle of 105° group and cervical rotation angle of 120° group compared in pairs ($P > 0.05$); the positive expression of MMP-2 in the group of cervical rotation angle of 105° group and cervical rotation angle of 120° group was higher than that in cervical rotation angle of 90° group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Tuina* manipulation can promote the stability of plaque by reducing the CD68 content of macrophages and the level of MMP-2 in plaque; but as the rotation angle of the cervical spine increased, the expression of MMP-2 may increase, which may reduce the plaque stability to a certain extent and affect the therapeutic effect of *tuina*.

Keywords carotid atherosclerosis; *tuina*; macrophages; matrix metalloproteinase

(收稿日期: 2023-06-25; 修回日期: 2023-09-02)

[编辑: 王利芬]