

本文引用:阳晶晶,赵钊,石佳,葛君芸,欧阳里知,常小荣,刘迈兰,黄洁.隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔血清 TNF- α 、INF- γ 含量的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(11):1258-1261.

隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔血清 TNF- α 、INF- γ 含量的影响

阳晶晶¹,赵钊²,石佳¹,葛君芸¹,欧阳里知¹,常小荣¹,刘迈兰^{1*},黄洁^{2*}

(1.湖南中医药大学,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** 观察隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (INF- γ)含量的影响,探讨其抗动脉粥样硬化作用的机制。**方法** 40只新西兰大耳白兔随机分为5组,每组8只,即正常组、模型组、隔药饼灸组、直接灸组、辛伐他汀组。通过高脂饲料喂养建立高脂血症合并动脉粥样硬化兔模型,待造模成功后,除正常组外,其余四组均予以相应干预,每天1次,连续干预4周后,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定兔血清中 TNF- α 、INF- γ 。**结果** 与正常组比较,模型组、直接灸组、辛伐他汀组血清 TNF- α 、INF- γ 的含量升高,且差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组相比,直接灸组、辛伐他汀组、隔药饼灸组中血清 TNF- α 、INF- γ 的含量均明显下降,差异具有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);隔药饼灸组与正常组相比较,隔药饼灸组的血清 INF- γ 含量有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$),TNF- α 与正常组相比含量增多,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔血清相关性炎症因子 TNF- α 、INF- γ 的影响是隔药饼灸抗动脉粥样硬化作用机制之一。

[关键词] 隔药饼灸;高脂血症;动脉粥样硬化;肿瘤坏死因子 α ;干扰素 γ

[中图分类号] R245;R541.4

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.11.008

Effect of Herbal Cake-Separated Moxibustion on the Expression of Serum TNF- α and INF- γ in Rabbits with Hyperlipidemia and Atherosclerosis

YANG Jingjing¹, ZHAO Zhao², SHI Jia¹, GE Junyun¹, OUYANG Lizhi¹, CHANG Xiaorong¹, LIU Mailan^{1*}, HUANG Jie^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of herbal cake-separated moxibustion on the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (INF- γ) in the serum of rabbits with hyperlipidemia and atherosclerosis, and to investigate the mechanism of its anti-atherosclerotic effect. **Methods** A total of 40 New Zealand white rabbits were randomly divided into five groups, namely blank control group (normal group), model group, herbal cake-separated moxibustion group, direct moxibustion group, and simvastatin group, with eight rabbits in each group. A hyperlipidemia and atherosclerosis rabbit model was established by feeding high-fat diet to the animals. After successful modeling, all the five groups, except the blank control group, received corresponding treatment once a day for four successive weeks; then enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the levels of TNF- α and INF- γ in the serum of the rabbits. **Results** The

[收稿日期] 2018-08-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273828;81273830;81704182),湖南省自然科学基金项目(2018JJ3397)。

[作者简介] 阳晶晶,女,硕士,讲师,研究方向:针灸治病机制的研究。

[通讯作者] *刘迈兰,女,副教授,E-mail:mailan_an_l@163.com; *黄洁,女,副主任医师,E-mail:1420186988@qq.com。

expression levels of TNF- α and INF- γ in the serum increased significantly in the model group, the direct moxibustion group, and the simvastatin group compared with those in the normal group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); the serum levels of TNF- α and INF- γ decreased significantly in the direct moxibustion group, the simvastatin group, and the herbal cake-separated moxibustion group compared with that in the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); compared with the normal group, the herbal cake-separated moxibustion group had a significantly increased expression level of serum TNF- α ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the two groups in the serum level of INF- γ despite an increasing trend in the herbal cake-separated moxibustion group ($P > 0.05$). **Conclusion** The effect on relevant inflammatory factors (TNF- α and INF- γ) in the serum of atherosclerotic rabbits is one of the anti-atherosclerotic mechanisms of herbal cake-separated moxibustion.

[**Keywords**] herbal cake-separated moxibustion; hyperlipidemia; atherosclerosis; tumor necrosis factor alpha; interferon gamma

高脂血症(hyperlipidemia, HLP)是一种常见的发病率较高的代谢性疾病,由于机体的脂代谢异常或运转异常,从而导致血浆或血清中脂质水平过度升高的一种病症。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)因动脉内膜积聚的脂质外观呈黄色粥样,而命名为动脉粥样硬化。HLP 是诱发并促进 AS 的形成的一大重要致病因素,也是引发急性冠脉综合征、心肌缺血、心肌梗死、脑梗死等危害性严重的心脑血管疾病的重要原因。课题组前期研究已经证实了隔药饼灸对 HLP 合并 AS 有肯定疗效^[1-6]。

AS 的发病机制是较为复杂的,但是炎症反应参与其发病的环节已得到确切的证实,AS 斑块的稳定性和进展,炎症反应是起着至关重要的作用。近年来,随着大量临床和基础研究的深入开展,探知到越来越多的炎症因子参与了 AS 的发生与发展中。本文主要观察隔药饼灸对 HLP 合并 AS 兔的炎症反应中的相关炎症因子 TNF- α 、INF- γ 的影响,旨在临床更有效地运用隔药饼灸法来防治 HLP 合并 AS 病症,以便更发挥隔药饼灸这一价廉、绿色、安全无毒的作用和优势。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

实验动物选用 40 只体质量为 1.5~2.5 kg 的健康纯种雄性新西兰大耳白兔,湖南中医药大学动物实验中心提供[清洁级,动物许可证号:SCXK<湘>2015-0004]。饲养于动物实验中心动物房(清洁级),均分笼饲养于兔笼,适应性喂养 1 周,将 40 只兔随机分配为 5 组:正常组、模型组、隔药饼灸组、直接灸组、辛伐他汀组,每组 8 只。对实验动物的处置均符合科技部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要仪器与试剂

THZ-C 恒温振荡器(太仓强乐实验仪器有限公司);PW-812 全自动酶标洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司);TGL-16 台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);MB-530 酶标仪(深圳市汇松科技发展有限公司);兔 INF- γ ELISA 试剂盒(CSB-E06925Rb);兔 TNF- α ELISA 试剂盒(CSB-E06998Rb),均由武汉华美生物工程有限公司提供。辛伐他汀 10 mg/片,广东彼迪药业有限公司,国药准字:H20066221;胆固醇(河南利伟生物药业股份有限公司);丙硫氧嘧啶(50 mg/片,上海朝晖药业有限公司,国药准字 H31021082);20%乌拉坦(上海化学试剂公司,生产批号:20150123)。蛋黄粉(郑州中成化工有限公司);猪油(市售);艾炷:“神灸 300 灸”艾炷(型号:东方一型);隔药饼灸组药饼的药物组成:丹参、郁金、山楂、泽泻、大黄(湖南中医药大学第一附属医院药房购),将所有药物按等份比例打粉备用,药饼制作方法:将中药粉和醋调成糊状,制做成圆形药饼,药饼厚 3 mm,直径为 1 cm。

1.3 造模方法

HLP 合并 AS 模型是采用高胆固醇饲料喂养的方法来造模,具体方法如下:正常组仍食用普通饲料,其余 4 组兔均在每天上午 9:00 喂食时,先给予高胆固醇饲料约 100 g/只。每 100 g 高胆固醇饲料的配方:胆固醇 1%,猪油 5%,蛋黄粉 10%,普通饲料 84%,另含 20 mg 丙基硫氧嘧啶(约按[10 mg/(kg·d⁻¹)]计算^[7]。

连续喂养 12 周,经随机抽样检测,解剖见兔主动脉壁内有脂质粥样斑块形成,兔血清血脂指标升高,提示模型制备成功。

1.4 分组干预

适应性喂养 1 周,随机分为 5 组,正常组遵循普通喂养模式喂养,另 4 组按照“1.3”方法造模。造

模成功后,模型组不予处理,其余3组按照被试因素施加方法,连续4周分别予以隔药饼灸、直接灸和喂食辛伐他汀(辛伐他汀粉[1.96 mg/(kg·d⁻¹)]拌入第一口饲料,食完再继续补充普通饲料),干预4周后,动物禁食不禁水12 h,将20%乌拉坦经兔耳缘静脉注射麻醉,麻醉成功后,再经腹主动脉取血。

1.5 腧穴选择

本次实验选取两组穴位交替施灸,第1组穴位:巨阙、天枢(双)、丰隆(双),第2组穴位:心俞(双)、肝俞(双)、脾俞(双)。取穴方法参照李忠仁主编的《实验针灸学》常用动物穴位定位及拟人比照法制定。

1.6 施灸方法

隔药饼灸法:将动物置于兔台上固定,腧穴局部除毛,放置药饼,去掉神灸300灸底盘,把艾炷直接放置于药饼上施灸。待艾炷燃尽,继续放置艾炷施灸,每穴连续灸4壮(约30 min),每天1次,两组穴位隔日交替施灸,连续灸4周。

直接灸法:固定动物,取穴,选用“神灸300灸”直接放置于穴位上,点燃艾炷施灸,每穴灸4壮(约30 min),每日1次,两组穴位隔日交替施灸,连续灸4周。

1.7 观察指标及检测方法

选取20%乌拉坦作为麻醉用药,参照4 mL/kg注射剂量标准,经耳缘静脉注射,麻醉成功,固定于兔台上,经腹主动脉取血2 mL,抽取血样注入到含10%EDTA-Na230 μL和4×10⁵ U/mL抑肽酶40 μL的特制试管中,手动摇匀后,再放入恒温于离心机中选用3 000 r/min转速,4℃恒温离心10 min,提取上层血清,迅速存放于-20℃低温冰箱,采用ELISA法测定兔血清中TNF-α、IFN-γ的含量。

1.8 统计学处理

所有数据均输入计算机,采用SPSS 20.0 windows统计软件处理,各检测指标统计数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间两两比较若方差齐时选择LSD法,方差不齐时选择Tamhane法进行方差分析。不满足正态性时选择秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

从表1可以看出,和正常组比较,模型组、直接灸组、辛伐他汀组这3组血清中TNF-α、IFN-γ的含量均明显升高,具有显著统计学差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);隔药饼灸组与正常组相比较:兔血清TNF-α含量升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),血清中IFN-γ含量有升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);

与模型组相比,隔药饼灸组、直接灸组、辛伐他汀组血清TNF-α、IFN-γ的含量均明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表1 各组兔血清TNF-α、IFN-γ含量比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF-α	IFN-γ
正常组	8	42.43±7.48	44.67±15.34
模型组	8	177.47±32.9 ^{▲▲}	183.41±36.23 ^{▲▲}
隔药饼灸组	8	61.67±19.24 ^{▲▲▲}	64.31±27.37 ^{▲▲}
直接灸组	8	89.51±20.76 ^{▲▲▲}	106.13±31.37 ^{▲▲}
辛伐他汀组	8	116.25±22.58 ^{▲▲▲}	169.01±68.31 ^{▲▲}

注:与正常组相比,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与模型组相比,★ $P < 0.05$,★★ $P < 0.01$ 。

3 讨论

隔药饼灸属于灸法中的一种,它是将艾灸、中药、经络、腧穴相结合的一种综合疗法,利用艾炷燃烧的温热刺激,加速血液循环,再集合药物的透皮吸收,集温热刺激、中药、经络穴位三者于一体,以达到疏通经络、调和阴阳、扶正驱邪的目的,是传统医学针灸疗法的重要组成部分^[8-9]。本课题组从二十世纪九十年代开始,就开展了大量的隔药饼灸治疗HLP的临床研究和实验研究,证实了隔药饼灸具有调节血脂的临床疗效。

本次实验选取了两组穴位隔日交替施灸,巨阙、天枢、丰隆和脾俞、心俞、肝俞,巨阙乃心之募穴,其临床具有很好的宽胸理气止痛的功效;天枢乃大肠的募穴,也属于足阳明胃经的腧穴,刺激该穴可消积导滞、升清降浊、调理胃肠;丰隆穴归属于足阳明胃经,是本经络穴,沟通胃、脾二经,具有祛痰化湿、健脾和胃之效,善于治疗各种痰证^[10]。心俞、脾俞、肝俞均为足太阳膀胱经的背俞穴,善于调治其所属脏腑的慢性病症。巨阙配心俞乃俞募配穴法,两穴相配,可提振心气,通利脉道,促进血液运行。脾俞、肝俞,可共奏健脾疏肝的功效,达到促进血脂在肝内的转化的作用。根据AS的病理变化基础及腧穴的特性,将以上两组穴位共用,在一定程度上起到抑制和延缓AS发生、发展的作用。

实验研究表明,HLP合并AS兔血清中TNF-α含量高于正常兔血清中的含量,AS的形成主要是免疫驱动导致氧化脂质积累的过程。TNF-α是AS的炎性标记物之一,具有很强的生物学活性,它主要由活化的巨噬细胞分泌的,参与AS发病机制的炎症反应环节,在AS斑块中能够检测到它的存在^[11]。炎

症反应贯穿着 AS 整个病理过程,而 TNF- α 作主要参与炎症反应的炎症因子,在 AS 的形成和进展中发挥着重要作用^[12]。在 AS 早期,TNF- α 的表达能够促进黏附分子的表达、增强血小板的黏附,并介导血管平滑肌细胞增殖和迁移,从而激发 AS 早期的炎症反应。TNF- α 会加快内皮细胞的损伤,促进 AS 病变进展和斑块形成,维持炎症的持续发展,加快 AS 发生和发展过程^[13-14]。

IFN- γ 被称之为“巨噬细胞活化因子”,它主要由平滑肌细胞、巨噬细胞和 Th1 细胞分泌,这种活化因子的存在能够增强 NK 细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞的活性^[15-16],产生炎症细胞因子、氧自由基和金属蛋白酶,进而激发炎症反应。IFN- γ 通过减少平滑肌细胞的浸入和再生、大量的减少胶原合成、从而增加细胞外基质降解蛋白的过度表达,进而导致动脉粥样硬化斑块纤维帽变薄并且抑制纤维帽的形成,从而增快了易损性斑块的形成进程^[17]。大量的实验数据也已证实,IFN- γ 在 AS 中表达水平明显增高^[18]。有研究者发现,被试小鼠施行基因敲除术造模成缺乏内源性 IFN- γ 的小鼠,其动脉粥样硬化病症的进展速度和普通小鼠相比要缓慢,而且其病变程度也会有所减轻,主要表现在缺乏内源性 IFN- γ 的小鼠病变的斑块中巨噬细胞含量减少,斑块纤维化程度增高,胶原含量也增加^[19-20]。

本实验表明,隔药饼灸能够对 HLP 合并 AS 兔病变炎症反应进行有效抑制,减缓 AS 斑块的形成和进展,可能与隔药饼灸能够有效抑制促炎症因子 TNF- α 、INF- γ 的释放,并且能够调节 AS 病变中促炎因子间的相互作用有关。

参考文献:

[1] 常小荣,周国平,严洁,等.隔药饼灸对高脂血症患者血清 HDL-C、LDL-C 及其它脂质含量的影响[J].针刺研究,1998,23(4):272-273.
 [2] 常小荣,严洁,林亚平,等.隔药饼灸对高脂血症患者血脂及载脂蛋白的影响[J].中国中医药信息杂志,2000,7(10):72-73.
 [3] 常小荣,严洁,易受乡,等.隔药饼灸治疗血脂异常的临床研究[J].中华中医药学刊,2010,28(1):8-10.
 [4] 岳增辉,严洁,常小荣,等.隔药饼灸对高脂血症兔血管内皮细胞超微结构的影响[J].中国针灸,2005,25(1):64-67.

[5] 岳增辉,常小荣,严洁,等.隔药饼灸对兔高脂血症合并动脉粥样硬化主动脉血管细胞粘附分子-1 mRNA 表达的影响[J].针刺研究,2006,31(3):145-148.
 [6] 艾坤,艾潇,刘密.隔药饼灸对动脉粥样硬化兔总胆固醇和甘油三酯含量的影响[J].中华中医药学刊,2013,9(31):1857-1859.
 [7] 黎鹏程,谭达全,尹抗抗,等.舒心稳斑颗粒对 AS 兔血脂及 ICAM-1 的影响[J].湖南中医杂志,2014,30(4):151-154.
 [8] 阳仁达,郑秋菊,谭静,等.隔药饼灸对慢性支气管炎模型大鼠血清 IgG、IgA 水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2013,33(5):37-40.
 [9] 单增天,田岳凤,李雷勇,等.不同灸法对免疫抑制兔脾脏指数及细胞因子的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(11):83-86.
 [10] 赵吉平,王燕平.针灸特定穴—理论与临床[M].第 2 版.北京:科学技术文献出版社,2005.
 [11] 张安邦,高杰,李令根.相关炎症因子与动脉粥样硬化的关系[J].中国中西医结合外科杂志,2014,20(5):563-566.
 [12] NAPOLIP D, TACCARDI A A, OLIVER M, et al. Statins and stroke: Evidence for Cholesterol-Independent Effects[J]. Eur Heart J, 2002, 23(24):1908-1921.
 [13] 黄修猷,李利华,吴新华.血管内皮细胞与动脉粥样硬化[J].医学综述,2010,16(18):2724-2726.
 [14] POPA C, NETEA M G, VAN RIEL P L, et al. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk[J]. J Lipid Res. 2007,48(4):751-762.
 [15] PFEILSCHIFER M H. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma[J]. Int Immunopharmacol, 2003,3(9):1247-1255.
 [16] SCHOENBOM J R, WILSON C B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses[J]. Adv Immunol, 2007,96:41-101.
 [17] 朱哲蓓,姜红菊,李润智,等.冠心病患者动脉粥样硬化斑块特征与 Th 细胞漂移的关系[J].中国动脉硬化杂志,2012,20(7):643-645.
 [18] MCLAREN J E, RAMJI D P. Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(2):125-135.
 [19] KLEEMANN R, ZADELAAR S, KOOISTRA T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(3): 360-376.
 [20] WHITMAN S C, RAVISANKAR P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice[J]. J Interferon Cytokine Res, 2002, 22(6):661-670.

(本文编辑 杨 瑛)