

· 针灸推拿 ·

本文引用:廖宗力,孙璐,朱重政,黄文韬,谭静,阳仁达.不同促透剂运用于隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔主动脉形态及血清 IL-6、IL-10 的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(11):1368-1372.

不同促透剂运用于隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔主动脉形态及血清 IL-6、IL-10 的影响

廖宗力¹,孙璐¹,朱重政²,黄文韬³,谭静¹,阳仁达^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.惠州市中医院,广东惠州 516000;

3.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

〔摘要〕目的 探讨氮酮和冰片作为促透剂运用于隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔主动脉病理形态及血清炎症因子的影响。**方法** 选取 40 只新西兰纯种兔随机分成 5 组,每组 8 只,即正常组、模型组、无促透剂组、氮酮组和冰片组。高脂血症合并动脉粥样硬化兔模型造模成功后除正常组和模型组外,其余各组采用隔药饼灸干预,每日 1 次,连续 4 周。采用 ELISA 检测血清白细胞介素 6(Interleukin 6,IL-6)、白细胞介素 10(Interleukin 10,IL-10)含量;采用 HE 染色,光学显微镜下观察主动脉组织形态。**结果** 与正常组比,模型组 IL-6 水平显著升高、IL-10 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比,无促透剂组、氮酮组及冰片组 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)、IL-10 水平升高($P<0.05$);与无促透剂比,氮酮组和冰片组 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)、IL-10 差异无统计学意义($P>0.05$);与氮酮组比,冰片组 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)、IL-10 差异无统计学意义($P>0.05$)。主动脉组织镜检结果显示:正常组无异常;模型组可见组织整体凌乱,管腔壁可见明显增厚,内皮坏死,有明显的脂质斑块及泡沫细胞;无促透剂组有内膜增厚,可见少量泡沫细胞,细胞排列较模型组稍好,脂质沉积明显较模型组减少,斑块不明显;氮酮组和冰片组无显著异常。**结论** 隔药饼灸对高脂血症合并动脉粥样硬化兔具有抑制炎症反应和抗动脉粥样硬化作用,在药饼中加入促透剂后施灸疗效更优,可能与药饼中药物透皮吸收增强有关,值得进一步临床应用和研究。

〔关键词〕 隔药饼灸;促透剂;高脂血症;动脉粥样硬化;白细胞介素 6;白细胞介素 10

〔中图分类号〕R245.8

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.11.017

Effects of Different Transdermal Enhancers for Herbal Cake-separated Moxibustion on the Aortic Morphology and Serum IL-6 and IL-10 Levels in Rabbits with Hyperlipidemia Concomitant with Atherosclerosis

LIAO Zongli¹, SUN Lu¹, ZHU Zhongzheng², HUANG Wentao³, TAN Jing¹, YANG Rendai^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Huizhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huizhou, Guangdong 516000, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the effects of using laurocapram and borneol as transdermal enhancers for herbal cake-separated moxibustion on the arterial pathological morphology and serum inflammatory factors in rabbits with hyperlipidemia concomitant with atherosclerosis. **Methods** A total of 40 New Zealand purebred rabbits were randomized into 5 groups including a normal group, a model group, a transdermal enhancer-free group, a laurocapram group and a borneol group, with 8 cases in each group. Rabbit models with hyperlipidemia concomitant with atherosclerosis were established, after which except the normal group and the model group, the other groups were given herbal cake-separated moxibustion intervention 1 time each day for consecutive 4 weeks. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum Interleukin 6 (IL-6) and Interleukin 10 (IL-10)

〔收稿日期〕2019-07-05

〔基金项目〕湖南省高校创新平台开放基金项目(16K068);2017年湖南省大学生创新实验研究项目(CX2017B431);湖南省大学生创新实验项目(017-132)。

〔作者简介〕廖宗力,男,在读博士研究生,主治医师,研究方向:针灸治病机制的研究。

〔通讯作者〕* 阳仁达,男,教授,博士研究生导师,E-mail:yangrd11@163.com。

levels. HE staining was performed to observe the aortic tissue morphology under optical microscope. **Results** Compared with normal group, model group had significantly increased IL-6 level and significantly decreased IL-10 level ($P<0.01$). Compared with model group, transdermal enhancer-free group, laurocapram group and borneol group had a markedly decreased IL-6 level ($P<0.01$) and increased IL-10 level ($P<0.05$). Compared with transdermal enhancer-free group, laurocapram group and borneol group had significantly decreased IL-6 level ($P<0.01$), while the differences of IL-10 level were not statistically significant ($P>0.05$). Compared with laurocapram group, borneol group had significantly decreased IL-6 level ($P<0.01$), while the differences of IL-10 level were not statistically significant ($P>0.05$). The aortic tissue microscopy results showed that in the normal group, no abnormality was noted; in the model group, the tissues were in disorder in the whole, the luminal wall was obviously thickened, the endothelium was necrotic, and notable lipid plaques and foam cells were noted; in transdermal enhancer-free group, the endarterium was thickened, a small amount of foam cells were noted, the cells were arranged slightly better than those in model group, the lipodosis decreased notably than that in model group, and the plaques were not obvious; no obvious abnormality was noted in neither Laurocapram group nor borneol group. **Conclusion** Herbal cake-separated moxibustion can inhibit the inflammatory reactions and promote the anti-atherosclerotic effect in rabbits with hyperlipidemia concomitant with atherosclerosis, whose efficacy is more superior when transdermal enhancers are added in the herbal cake, which may be resulted by the enhancement of the transdermal absorbability of the drugs in the herbal cake. It is worth to be further clinically applied and studied.

[**Keywords**] herbal cake-separated moxibustion; transdermal enhancer; hyperlipidemia; atherosclerosis; interleukin-6; interleukin-10

高脂血症 (hyperlipidemia, HLP) 是由于体内脂质转运和(或)代谢异常,导致机体血液脂质水平异常的病症。长期 HLP 导致脂质及泡沫细胞沉积在动脉内膜中,是诱发和促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的重要危险因素^[1]。有研究^[2]表明,炎症反应贯穿 AS 病理变化全程,单纯降低低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)对 AS 疗效较差,同时进行炎症控制才能取得良好疗效。目前,HLP 及 AS 病越来越高发,严重影响人们的健康与生活工作。临床对 HLP 及 AS 治疗方法较多且疗效确切,但药物内服所致毒副作用一直困扰 HLP 患者和医务工作者,因此,积极探索安全有效、便捷价廉、依从性高的降脂外治方案对促进患者健康、延长患者寿命、提高其生活质量有着重要的意义。李娟等^[3]研究表明,传统中医药疗法在降脂中疗效确切。隔药饼灸是一种特色中医外治疗法,课题组前期大量研究^[4-6]表明隔药饼灸降脂及治疗 AS 疗效肯定。因此,本研究探讨了在药饼中加入不同促透剂后施灸对 HLP 合并 AS 兔主动脉形态结构及血清炎症因子 IL-6、IL-10 的影响是否优于单纯隔药饼灸,以进一步探索增强隔药饼灸疗效的方案。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

选用 40 只 6~8 月龄新西兰纯种兔(体质量

2.0~2.5 kg),由湖南中医药大学动物实验中心提供(清洁级,动物合格证号:SYXK<湘>2013-0005)。分笼饲养于动物实验室。温度保持 20~25 ℃,湿度保持 50%~70%。兔笼、笼架、食槽、水杯在使用前严格消毒处理并定时冲洗。按时按量喂养饲料,正式实验前适应性普通饲料喂养 7 d。按随机数字表法分成正常组、模型组、无促透剂组(高脂模型+使用水作溶剂做的药饼施灸)、氮酮组(高脂模型+使用氮酮溶液做的药饼施灸)、冰片组(高脂模型组+使用冰片溶液做的药饼施灸),每组 8 只。

1.2 主要试剂及仪器

氮酮(新乡高金药业有限公司,59227-89-3),精密量取脂溶性氮酮溶液 5 mL 溶于 100 mL 无水乙醇溶液中,混匀备用;冰片(山东百味堂饮片有限公司,207-352-6),精密称取冰片 2 g 溶于 50 mL 无水乙醇溶液中,再加入蒸馏水 35 mL 稀释备用;10% 乌拉坦(山东省齐鲁兴华制药有限公司,51-79-6)无水乙醇(SIGMA 公司,E7023);4%多聚甲醛(Solarbio);神灸 300 灸艾炷(苏州东方艾绒厂,东方一型);丙硫氧嘧啶(国药集团药业股份有限公司,XW00515251);胆固醇(国药集团药业股份有限公司,69008214);蛋黄粉(亳州海川蛋制品有限公司,57583-35-8);猪油(市售)。药饼中药物组成:丹参、大黄、山楂、郁金、泽泻(购于湖南中医药大学第一附属医院中药房),将所有饮片打粉过 200 目筛等比例

混合。药饼制作:将药粉按分组不同分别加入蒸馏水、氮酮溶液、冰片溶液调成糊状,比例为每 100 g 药粉加入 80 mL 溶液,用统一规格模具制作直径为 1 cm,高 3 mm 的药饼。

酶标板(40孔或96孔);台式冷冻离心机(北京时代北利离心机有限公司,GTR16-2);全自动酶标洗板机(济南来宝医疗器械有限公司,ST-36W);酶标仪(南京德铁实验设备有限公司,HBS-1096A);恒温振荡器(天津欧诺仪器股份有限公司,HNY-200B);奥林巴斯显微镜(南京伊若达仪器设备有限公司,BX43)。兔 IL-6 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,E-EL-RB0014c);兔 IL-10 ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,E-EL-RB0487c)。

1.3 模型制备

正常组采用普通饲料喂养,其余动物参考[7]方法改良造模:每天于上午 8:00 喂养高脂饲料,每只兔约吃高脂饲料 100 g,其中蛋黄粉为 15 g、胆固醇为 0.5 g、猪油为 5 g、丙硫氧嘧啶为 10 mg/kg,其余为基础饲料。将以上成分按照比例混合(猪油加热溶解)拌匀,然后加工成颗粒状高脂饲料。喂养时,先喂完高脂饲料后再添加普通饲料,每只兔每天进食总量约为 100~130 g。饮水不限制,连续喂养 12 周后,随机抽样解剖见兔主动脉内壁有脂质斑块出现,参考戴氏标准^①检测动物血清 TC、TG 升高,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.05$),表明造模成功。

1.4 分组干预

正常组普通饲料常规喂养,模型组不予施灸,无促透剂组采用蒸馏水药饼、氮酮组采用氮酮溶液药饼、冰片组采用冰片溶液药饼行隔药饼灸,每日 1 次,连续 4 周。

1.5 穴位选择

参照李忠仁主编《实验针灸学》及拟人比照法制定取穴方法,采用如下两组穴位,每天施灸一组穴位,两组穴位交替施灸。A 组取穴:双天枢、巨阙、双丰隆;B 组取穴:双心俞、双脾俞、双肝俞。

1.6 隔药饼灸方法

将兔固定在兔台上,定位取穴后将穴位周围 2 cm 兔毛剪除。用 8% 硫化钠溶液脱毛至兔皮裸露,用生理盐水冲洗干净,确保皮肤无破损。将艾炷放在药

饼上,一起放于穴位上方皮肤处,点燃艾炷施灸。每组穴位隔天灸 1 次,两组穴位交替施灸,每穴 4 炷(约 30 min),连续 4 周。

1.7 检测指标及方法

1.7.1 血清指标检测 将兔固定、麻醉,剪去左侧胸部皮毛,络合碘消毒。从左前腋水平向上 2~2.5 cm (3~4 肋间),可以触摸到心脏的跳动,此处为进针点。快速进针后针头向内胸骨方向与水平面呈 45°角刺入,当针头深约 3.5 cm(9 号针头)时抽血。抽取血液 3 mL 注入到 10% EDTA-Na 230 μ L 及 4×10^5 U/mL 抑肽酶 40 μ L 试管中,手动摇匀,放入 3 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 恒温离心机离心 10 min。分离血清,ELISA 检测 IL-6、IL-10 水平。

1.7.2 组织标本检测 将兔麻醉、固定,心脏采血后,空气栓塞处死。剖开胸腔,剪取从心脏发出段的主动脉弓 3 cm 置于 4% 多聚甲醛固定液固定,以各级乙醇将标本脱水后用二甲苯透明处理,经石蜡包埋、切片后进行苏木精-伊红染色,光镜下($\times 200$ 倍)观察主动脉病理形态变化。

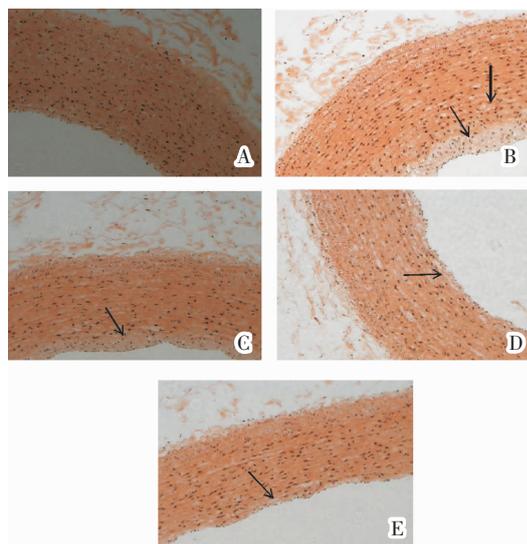
1.8 统计学处理

将实验结果所得所有数据进行统计,用 SPSS 18.0 windows 软件操作处理。各检测指标都用“ $\bar{x}\pm s$ ”来表示,各组之间进行两两对比,如果方差齐时用 LSD 法,方差不齐时则用 Dunnet's T3 法分析。不满足正态分布时则用秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔主动脉形态学比较

正常组显示无显著异常;模型组中整体模糊凌乱,各层分布不均,管腔壁内膜可见明显增厚,内膜不光滑不完整,内皮坏死,有明显的泡沫细胞浸润及脂质斑块沉积,表明造模成功;无促透剂组示内膜仍有增厚,平滑肌细胞排列无序但较模型组稍好,可见少量泡沫细胞,脂质沉积较模型组明显减少,斑块不明显;氮酮组中整体结构较整齐,内膜无明显增厚,平滑肌细胞排列较无促透剂组整齐,可见极少量的泡沫细胞;冰片组整体较无促透剂组、氮酮组更加清晰整齐,无显著异常。见图 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.无促透剂组;D.氮酮组;E.冰片组

图 1 各组兔主动脉形态学光镜图($\times 200$)

2.2 各组兔血清 IL-6、IL-10 含量比较

与正常组比,模型组 IL-6 水平显著升高($P<0.01$)、IL-10 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比,无促透剂组、氮酮组及冰片组 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)、IL-10 水平升高($P<0.05$);与无促透剂组比,氮酮组和冰片组 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)、IL-10 差异无统计学意义($P>0.05$);与氮酮组比,冰片组 IL-6 水平显著降低($P<0.01$)、IL-10 差异无统计学意义($P>0.05$),如表 1 所示。

表 1 各组兔血清中 IL-6、IL-10 的含量比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	IL-6	IL-10
正常组	8	34.24 \pm 6.56	58.32 \pm 18.31
模型组	8	171.59 \pm 36.30 $\Delta\Delta$	35.67 \pm 9.95 $\Delta\Delta$
无促透剂组	8	88.88 \pm 12.12 $\Delta\Delta$	46.72 \pm 8.99 Δ
氮酮组	8	65.69 \pm 9.84 $\Delta\Delta$ **	48.12 \pm 8.59 Δ
冰片组	8	42.33 \pm 15.65 $\Delta\Delta$ **★	48.40 \pm 7.77 Δ

注:与正常组比较, Δ 、 $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与模型组比较, Δ 、 $\Delta\Delta$ $P<0.05$, $\Delta\Delta\Delta$ $P<0.01$;与无促透剂组比较,** $P<0.01$;与氮酮组比较,★ $P<0.01$

3 讨论

HLP 是西医学病名,传统中医无对应病名,但中医学中有“膏”“脂”的论述。《灵枢》曰:“五谷之津液合而为膏者……”。张景岳《类经》有云:“膏,脂膏也。”西医认为,血脂升高,会导致血液粘稠度升高、血流流速减慢,长期高血脂可引起血管内皮损伤,从而导致脂质、血小板等沉积在血管损伤局部,发生慢性炎症改变,形成粥样硬化斑块。早期症状与中医

痰浊极为相似,后期血管损伤、粥样斑块形成与中医的“瘀血”相近,因此,中医认为本病病机主要为痰浊瘀血阻滞。有研究指出:灸法“以温促通”,能疏通经络,促进气血运行,治疗 HLP 疗效较佳^[9]。

隔药饼灸是一种特色灸法,结合艾燃烧的温热刺激、药饼中药物的作用及经络穴位三位一体共同发挥效用,是针灸疗法的重要组成部分^[10-11]。有研究^[12]指出,隔药饼灸具有明确抗炎作用。IL-6 由多种细胞(如单核/巨噬细胞等)分泌,研究表明^[13-14]IL-6 是促进 AS 形成的一种多功能细胞因子,且它在 AS 病理演变过程中大量存在,其导致 AS 炎症机制可能与激活巨噬细胞,加强巨噬细胞对低密度脂蛋白的摄入,刺激基质降解酶的合成,上调黏附分子的表达有关。本研究结果表明,HLP 合并 AS 模型兔血清 IL-6 显著高于正常组,采用隔药饼灸治疗后各组血清 IL-6 水平均显著低于模型组,提示隔药饼灸可抑制 IL-6 表达,这可能是隔药饼灸抗炎抗 AS 的机制之一。且氮酮组和冰片组 IL-6 水平下降幅度最大,说明采用两种促透剂分别运用于药饼后施灸对抑制 IL-6 表达具有增效作用。IL-10 主要由 CD4⁺淋巴细胞和巨细胞产生,具有强大抗炎作用。Potteaux 等^[15]研究表明,AS 小鼠 IL-10 升高能显著减少 AS 损伤区域面积。Galigiuri 等^[16]发现敲除大鼠 apoE 基因,IL-10 减少,AS 斑块面积显著增加,表明升高 IL-10 具有抗 AS 作用。本研究结果显示,无促透剂组、氮酮组、冰片组 IL-10 水平明显高于模型组,这说明隔药饼灸通过升高 IL-10 水平抗炎的作用极其优越。但本次实验发现,与无促透剂相比,氮酮组和冰片组 IL-10 水平虽然有升高趋势,但是差异无统计学意义($P>0.05$),表明本次实验中,在药饼中加入促透剂氮酮或冰片后施灸,对 HLP 合并 AS 兔血清 IL-10 的上调表达无显著增效作用,也可能存在影响 IL-10 表达的其他因素,有待进一步研究探索。

隔药饼灸作用的发挥离不开药饼中的中药作用。本次实验药饼中大黄、山楂、泽泻、郁金、丹参五味中药在实验及临床研究中多次证实其有效成分具有明确的降脂作用^[17-18]。有研究表明^[19-20]氮酮和冰片对多种亲水或亲脂性药物成分具有促进其透皮吸收的效果。本研究结果显示,在药饼中加入促透剂氮酮或冰片对血清 IL-6 水平及主动脉组织病理形态的

调节作用更显著,表明隔药饼灸作用的发挥可能与药饼中有效成分的透皮吸收相关,且冰片组 IL-6 水平显著低于氮酮组,说明冰片略优于氮酮。

综上,隔药饼灸可抑制 HLP 合并 AS 兔炎症反应,这可能是隔药饼灸抗 AS 的作用机制之一。同时,隔药饼灸能促进 AS 兔主动脉组织损伤修复,在药饼中加入促透剂后施灸疗效更佳,可能与药饼中药透皮吸收增强有关,值得进一步临床应用和研究。

参考文献

- [1] 翁春艳,唐晓鸿,袁洪,等.高血压合并高脂血症对血管早期病变的影响[J].中国动脉硬化杂志,2012,20(1):52-56.
- [2] 陈立伟,蔺洁.高胆固醇血症和炎症共同作用导致动脉粥样硬化形成[J].中国动脉硬化杂志,2004,12(3):253-275.
- [3] 李娟,杨晓龙,卢军,等.中药复方降脂颗粒对高脂血症大鼠 NO、VEGF 的干预作用[J].新疆中医药,2017,35(4):7-8.
- [4] 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.
- [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,2013,31(9):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] 戴晓洁,梁子钧,潘家祜.炎症诱发高脂血症家兔产生抗动脉粥样硬化形成的预适应效应[J].复旦大学学报(医学版),2012,39(1):42-47.
- [9] 张会芳.不同灸温调脂通脉效应及 TRV1 介导灸法“以温促通”效应机制研究[D].南京:南京中医药大学,2013.
- [10] 单增天,田岳凤,李雷男,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.
- [11] 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.
- [12] 阳晶晶,赵钊,常小荣,等.隔药饼灸对高脂血症兔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.
- [13] 杨永宗.动脉粥样硬化型心血管病基础与临床[M].2版.北京:科学出版社,2009.
- [14] 刘公理,吴赛珠,阮云军,等.多种生化标志物与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系[J].山东医药,2012,52(5):7-9.
- [15] POTTEAUX S, ESPOSITO B, MALLAT Z, et al. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2004, 24(8): 1474-1478.
- [16] CALIGIURI Q, RUDLING M, OLLIVIER V, et al. Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice[J]. Molecular Medicine, 2003, 9(1-2):10-7.
- [17] 李甜,廖茂梁,郑雅楠,等.泽泻汤对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪堆积的抑制作用[J].现代药物与临床,2017,32(5):772-775.
- [18] 方鉴.决明子、丹参、苦丁茶、绞股蓝不同组分配伍的降血脂的价值分析[J].海峡药学,2017,29(1):105-106.
- [19] 盛平,林辉国.氮酮对茶碱在气虚家兔皮肤上透过行为的影响[J].中华全科医学,2015,13(11):1748-1750.
- [20] 李学敏,吴清,范峥,等.骨伤凝胶膏剂中促渗剂的优选研究[J].北京中医药大学学报,2011,34(1):64-67.

(本文编辑 匡静之)