

# 艾灸及艾烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠血清 MDA、SOD 水平的影响

黄畅<sup>1</sup> 崔莹雪<sup>2</sup> 刘钧天<sup>1</sup> 刘耀萌<sup>1</sup> 韩丽<sup>1</sup> 于梦芸<sup>1</sup> 赵百孝<sup>1</sup>

(1 北京中医药大学,北京,100029; 2 北京中医医院,北京,100010)

**摘要** 目的:观察艾灸及艾烟对载脂蛋白 E 基因敲除(Apolipoprotein E-deficient, ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠氧化应激相关指标的影响。方法:38 只 8 周龄 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为 5 组:模型组( $n=6$ )、假艾灸组( $n=6$ )、香烟组( $n=8$ )、艾烟组( $n=9$ )、艾灸组( $n=9$ ),13 只同龄 C57BL/6 小鼠作为正常对照,正常组与模型组小鼠暴露于玻璃缸中,艾灸与假艾灸组均对小鼠关元穴进行艾灸,假艾灸组艾条不点燃,艾烟组小鼠暴露于 10~15 mg/m<sup>3</sup> 的艾烟环境,香烟组小鼠暴露于 10~15 mg/m<sup>3</sup> 的香烟环境,各组小鼠每天干预 20 min,连续干预 12 周,每周干预 6 d,于 12 周末检测小鼠血清氧化应激指标丙二醛(Malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)的表达水平。结果:艾灸组及艾烟组血清 MDA 含量较模型组显著降低( $P<0.05$ ),且艾灸组显著低于假艾灸组( $P<0.05$ ),艾烟组显著低于香烟组( $P<0.05$ )。艾灸组及艾烟组血清 SOD 含量较模型组显著升高( $P<0.05$ ),艾灸组显著高于假艾灸组( $P<0.05$ ),艾烟组显著高于香烟组( $P<0.05$ )。结论:艾灸和艾烟是通过调节机体 MDA、SOD 水平,发挥抗氧化作用,保护血管内皮改善 AS。

**关键词** 艾灸;艾烟;动脉粥样硬化;氧化应激

## Effects of Moxibustion and Moxa Smoke on Serum MDA and SOD Levels in Apolipoprotein E-deficient Mice

Huang Chang<sup>1</sup>, Cui Yingxue<sup>2</sup>, Liu Juntian<sup>1</sup>, Liu Yaomeng<sup>1</sup>, Han Li<sup>1</sup>, Yu Mengyun<sup>1</sup>, Zhao Baixiao<sup>1</sup>

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Beijing Traditional Chinese Medical Hospital, Beijing 100010, China)

**Abstract Objective:** To observe the intervention effects of moxibustion and moxa smoke on oxidative stress indexes in ApoE<sup>-/-</sup> mice. **Methods:** Thirty-eight ApoE<sup>-/-</sup> mice (8 weeks old) were randomly divided into model group ( $n=6$ ), sham-moxibustion group ( $n=8$ ), cigarette smoke group ( $n=8$ ), moxa smoke group ( $n=9$ ), and moxibustion group ( $n=9$ ). Thirteen same age C57BL/6 mice were used as blank controls. Mice in the blank control and model control groups were put into a glass box without any treatment. Mice of the sham and real moxibustion groups received moxibustion on Guanyuan (RN4) while the two smoke groups were exposed to smoke, whose concentration is 10 mg/m<sup>3</sup>. All the manipulations were performed 20 min/day, 6 days each week, 12 weeks totally. Levels of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) were determined by colorimetric method. **Results:** Comparing with the model group, mice in the moxibustion group and moxa smoke group had significant lower level of MDA ( $P<0.05$ ), and significant higher level of SOD ( $P<0.05$ ). There was a remarkable decrease of MDA level ( $P<0.05$ ) and an increase of SOD activity ( $P<0.05$ ) in the moxibustion group compared to the sham-moxibustion group. MDA level was decreased ( $P<0.05$ ) and SOD level was significantly increased ( $P<0.05$ ) in moxa smoke group compared to those of the cigarette smoke group. **Conclusions:** Both moxibustion and moxa smoke can regulate the levels of serum MDA and SOD, which might be one of the mechanisms of their anti-oxidation effects for relieving the damage of vascular intima and atherosclerosis.

**Key Words** Moxibustion; Moxa smoke; Atherosclerosis; Oxidative stress

中图分类号:R245.81 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.08.004

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的常见疾病,百余年来其危险因素和发病机制一直是医学领域的重要研究课题。其中氧化应激被认为是 AS 发病的核心机制,直接参与 AS 发生、发展及恶化的全过程<sup>[1]</sup>。

艾灸作为中医学最古老的疗法之一,其治疗 AS 和保护动脉血管的作用已被大量的实验研究和临床观察所证实。然而,现阶段对于艾灸抗 AS 的作用机制研究多集中于其调脂和抗炎的效应,少有从“氧化应激”学说出发。因此,我们拟用 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠 AS

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81373730);国家自然科学基金项目(编号:81574068);国家青年自然科学基金项目(编号:81403449);国家国际科技合作专项项目(编号:2011DFA31370)

作者简介:黄畅,博士研究生,研究方向:艾灸的作用机理研究,电话:(010)64286737, E-mail:214330358@qq.com

通信作者:赵百孝(1963.03—),博士,教授,博士研究生导师,北京中医药大学针灸推拿学院院长,研究方向:艾灸作用与原理, Tel: (010) 64286737, E-mail:baixiao100@vip.sina.com

模型,以 SOD 和 MDA 作为客观指标,从抗氧化的角度探讨艾灸及艾烟保护血管内皮的作用机制,进一步明确艾灸抗 AS 效应中的关键因素,为临床推广艾灸疗法治疗 AS 提供理论基础和科学依据。现报道如下。

## 1 材料与仪器

1.1 实验动物 清洁级 8 周龄雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 38 只, C57BL/6 小鼠 13 只,体重(22.46 ± 1.12)g,购自北京大学动物医学中心[许可证: SCXK(京)2011-0012]。

1.2 药品 SOD 试剂盒、MDA 试剂盒均由中国科学院心理研究所提供。

1.3 仪器 小鼠固定器(规格:长 130 cm × 宽 60 cm × 高 50 cm);自制带孔玻璃缸(1 m × 1 m × 1 m, 顶层玻璃正中设一直径 5 mm 圆孔);光散射式数字粉尘测试仪(购自北京宾达绿创科技有限公司);低温离心机(德国 ZK380 型);超低温冰箱(日本三洋公司生产)。

1.4 其他材料 自制细艾条(直径 0.5 cm × 长 20 cm,河南南阳汉医艾绒有限公司提供);香烟(中南海牌,焦油含量 10 mg/支)。

## 2 实验方法

2.1 分组及模型制备 小鼠购进后,适应性饲养 1 周,干预 12 周,每周干预 6 d。按随机数字表法将 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为模型组、假艾灸组、香烟组、艾烟组、艾灸组,并将 13 只 C57BL/6 小鼠作为正常组进行对照。ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠采用高脂饲料(购自北京维通利华实验动物有限公司,含 15% 猪油、2% 胆固醇、0.05% 胆酸)喂养, C57BL/6 小鼠采用标准饲料喂养,自由进水;饲养环境温度 22 °C ± 2 °C,相对湿度 50% ~ 60%,保持 12 h 光照(8:00—20:00)和黑暗(20:00—次日 8:00)交替循环。

2.2 干预方法 1)空白干预:将正常组与模型组小鼠分别暴露于玻璃缸中 20 min,期间不施加其他干预。

2)艾灸干预:将艾灸组小鼠分别装进小鼠固定器中,腹部向下,小鼠关元穴置于艾条上方,点燃自制细艾条,艾灸干预 20 min。

3)假艾灸干预:将假艾灸组小鼠分别装进小鼠固定器中,腹部向下,小鼠关元穴正对艾条上方,不点燃艾条,干预 20 min。

4)艾烟干预:将调试好的粉尘测试仪置于自制玻璃缸中间,让艾烟组小鼠自由暴露在玻璃缸中,点燃艾条,将点燃的一端从玻璃缸上方的圆孔插入,令

艾烟充满玻璃缸。用粉尘测试仪检测缸中艾烟浓度,达到预定浓度范围后(此过程艾条燃烧约 15 s),取出艾条,迅速封闭圆孔。此后每隔 3 min 记录一次浓度数值,使艾烟浓度保持在 10 mg/m<sup>3</sup> 左右。若数值高于 15 mg/m<sup>3</sup>,即将上方玻璃盖稍微移动,令艾烟散去部分后迅速将盖子移回;若数值低于 15 mg/m<sup>3</sup>,可再将点燃的艾条由圆孔插入,继续补充艾烟。艾烟组小鼠干预 20 min 后,取出小鼠。在对艾烟组小鼠进行干预时,要严格隔离其他组别小鼠,避免其他干预组小鼠嗅到艾烟。

5)香烟干预:除将艾烟换成香烟,其他干预方式及注意事项与艾烟组相同。

2.3 取材 末次干预后,禁食不禁水 12 h。小鼠麻醉后,采用眼球摘除法,从眼眶静脉丛采集血液标本约 1.5 ~ 2 mL,置于离心管中,静置 1 h 后,离心 15 min(4 °C, 1 500 r/min)。离心后将血清保存于 -80 °C 冰箱中。

2.4 指标检测 采用黄嘌呤氧化酶法测定血清 SOD 活性,采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。测定时严格按照试剂盒的说明进行操作。

2.5 统计学方法 所有数据应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

表 1 各组小鼠血清 MDA 和 SOD 活性比较

组别	样本量	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mg)
正常组	13	6.54 ± 1.49 <sup>△</sup>	82.63 ± 10.78 <sup>△</sup>
模型组	6	10.73 ± 1.84	49.21 ± 8.19
假艾灸组	6	10.21 ± 1.75	63.80 ± 7.76
香烟组	8	10.05 ± 1.59	70.29 ± 5.43
艾烟组	9	7.02 ± 0.77 <sup>#△</sup>	81.46 ± 9.38 <sup>#△</sup>
艾灸组	9	6.94 ± 1.05 <sup>*△</sup>	87.04 ± 10.91 <sup>*△</sup>

注:△P < 0.05,与模型组比较; \*P < 0.05,与假艾灸组比较; #P < 0.05,与香烟组比较。

## 3 结果

各组小鼠血清 MDA 和 SOD 活性比较。见表 1。表 1 中数据表明:各组小鼠血清 MDA 含量以模型组最高,正常组最低。模型组较正常组显著增加(P < 0.05),艾灸组及艾烟组较模型组显著降低(P < 0.05),且艾灸组显著低于假艾灸组(P < 0.05),艾烟组显著低于香烟组(P < 0.05)。各组小鼠血清 SOD 含量以模型组最低,艾灸组最高。模型组较正常组显著降低(P < 0.05),艾灸组及艾烟组较模型组显著升高(P < 0.05),艾灸组显著高于假艾灸组(P < 0.05),艾烟组显著高于香烟组(P < 0.05)。从

图2中可以比较直观地看出各组大鼠血清中MDA及SOD水平的变化。

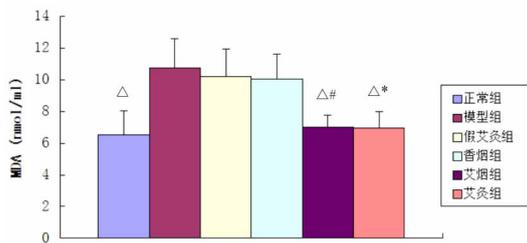


图1 各组小鼠血清MDA水平比较

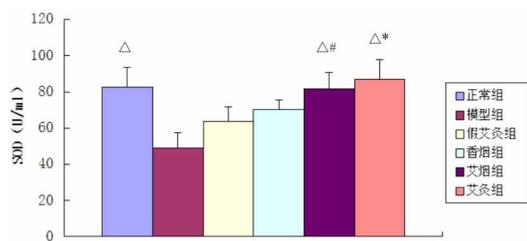


图2 各组小鼠血清SOD水平比较

#### 4 讨论

ApoE (Apolipoprotein E, ApoE) 是血浆脂蛋白的重要组成部分,主要参与脂质的转运、利用和排泄,缺乏 ApoE 将导致血液循环中胆固醇清除障碍进而形成 AS。研究表明, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠自发形成的 AS 病变无论是在病理学还是组织学形态上都与人类极为相似<sup>[2]</sup>。因此, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠已成为近年 AS 发病机制研究中最重要动物模型之一。

氧化应激是心血管疾病发生发展的重要环节,与 AS 的发病关系极为密切,其不仅能氧化修饰低密度脂蛋白,形成大量泡沫细胞,还可促进炎症反应和细胞增殖,介导内皮功能损伤,从而多方面参与 AS 的形成和发展<sup>[3]</sup>。由于活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 在细胞内蓄积所产生的细胞毒性是氧化应激引起血管内皮功能障碍的主要原因。且大量实验证明抗氧化剂可延缓 AS 的疾病过程<sup>[4]</sup>。故本研究选取了活性氧清除系统研究中使用较普遍的抗氧化酶 SOD 和氧化代谢产物 MDA 为观测指标,以阐明艾灸及艾烟抗动脉粥样硬化的氧化应激机制。

MDA 是活性氧或自由基攻击生物膜所形成的脂质过氧化代谢终产物<sup>[5]</sup>,其含量可反映机体脂质过氧化程度,间接地反应出细胞的损伤情况。研究表明,冠心病患者机体脂质过氧化程度升高与 MDA 大量形成密切相关<sup>[6]</sup>。MDA 含量增多时,还可进一步损伤冠状血管内皮细胞,加重冠状动脉硬化的程度。机体为抵抗这一过程,消除脂质过氧化物,保护内皮细胞,形成了一系列抗氧化防御系统。

SOD 就是该系统中非常重要的金属酶,它能清除生物体内超氧阴离子自由基,维持细胞内环境的稳态,保护血管内皮免受过氧化损伤。大量基础研究已证实 SOD 的活性增加可抑制细胞介导的低密度脂蛋白过氧化,减少 Ox-LDL 的形成,从而阻止巨噬细胞对脂类的过度摄取和泡沫细胞在内皮下的积累<sup>[7~8]</sup>。Masuo Ohashi 等还发现 SOD 可抑制 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠体内过氧化物的生成,防止内皮功能紊乱<sup>[9]</sup>。

中医学认为 AS 主要由于痰浊瘀血导致脉络痹阻不通所引起,而艾灸具有温通血脉,调和气血的作用。近年研究也已表明艾灸可通过调脂、抗炎、抗血栓形成等功效降低血脂,改善动脉粥样硬化。本实验研究发现, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠经高脂饲料喂养后会出现明显的氧化应激状态,血清 MDA 含量升高, SOD 含量降低,进而导致血管内皮功能障碍,脂质浸润,形成 AS 斑块。然而,经艾灸干预后,小鼠 MDA 含量明显降低, SOD 活性增强,说明艾灸可通过增强机体抗氧化的能力,抑制脂质过氧化效应,从而防止 AS 的发生和发展。

吸烟是公认的 AS 的危险因素之一,其可导致机体氧化应激水平升高,从而破坏血管内皮的功能<sup>[10]</sup>。艾烟虽与香烟烟雾以相同的途径进入机体,且具有相似的物理性状,但两者本质上是截然不同的物质,对机体产生的效应也完全不同。香烟烟雾中含有大量自由基,可导致机体氧化应激水平升高,血脂紊乱,血管内皮功能障碍,引发多种心血管疾病<sup>[11]</sup>。本实验中艾烟组与香烟组小鼠暴露于浓度相同的烟雾环境中,艾烟组小鼠 MDA 含量明显低于香烟组和模型组, SOD 含量明显高于香烟组和模型组。可见与香烟烟雾的效应相比,艾烟可增强机体抗氧化、清除氧自由基的能力,从而保护细胞生物膜,有效地缓解 AS。本课题组前期在对艾灸干预 AS 的实验研究中还发现艾灸及艾烟对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、hs-CRP、vWF 含量也有影响,说明改善动脉粥样硬化过程中,艾灸及艾烟发挥作用的途径除了本实验所证实的降低氧化应激反应外,减少炎症反应也是其途径之一<sup>[12]</sup>。可见,艾灸及艾烟可能是通过多途径、多靶点来产生抗 AS 的效应。

综上所述,除了艾灸的热以外,艾烟也是艾灸发挥治疗作用的关键因素。艾灸与艾烟可能是通过降低机体氧化应激水平,减少脂质过氧化物生成,保护血管内皮的途径,发挥抗 AS 作用的机制之一。

(下接第 1413 页)

素之一可有效提高脑内神经递质 5-HT 和 GABA 含量,起到延缓脑组织衰老的作用。本课题组之前的试验已证明艾烟可减少 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的脑内 A $\beta$  蛋白沉淀<sup>[5]</sup>,降低 GFAP 蛋白在海马的表达水平<sup>[15]</sup>,改善学习记忆功能,其作用途径可能是艾烟中有效挥发油成分,被呼吸系统和皮肤的黏膜吸收,调节神经递质和脂质代谢,增强神经系统兴奋性,改善脑内氧化应激损伤和炎症反应,从而起到预防和改善阿尔兹海默病症状的作用。

#### 参考文献

- [1] 许焕芳,崔莹雪,黄茶熙,等. 艾燃烧生成物对 SAMP8 小鼠血清 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(5):1387-1390.
- [2] 刘美凤,周惠. 艾叶挥发油与燃烧烟雾的化学成分比较[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2012,40(1):30-34.
- [3] 靳然,赵百孝,于密密,等. 艾燃烧生成物组分固相萃取气相色谱质谱法定性分析[J]. 北京中医药大学学报,2011,34(9):632-636.
- [4] 杨佳,赵百孝,韩丽,等. 不同浓度艾烟长期干预对大鼠血清 vWF 及 ox-LDL 表达的影响[J]. 世界中医药,2013,8(8):859-861.
- [5] 刘钧天,崔莹雪,黄玉海,等. 艾烟与香烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠学习记忆功能与海马  $\beta$  淀粉样蛋白沉淀的影响[J]. 环球中医药,2015,8(5):527-531.
- [6] Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. Journal of Physiology and Pharmacology, 2004, 55(3):503-517.

- [7] Horsburgh K, Kelly S, McCulloch J, et al. Increased neuronal damage in apolipoprotein E-deficient mice following global ischaemia[J]. NeuroReport, 1999, 10:837-841.
- [8] Horsburgh K, McCulloch J, Makoto K. Intraventricular infusion of apolipoprotein E ameliorates acute neuronal damage after global cerebral ischemia in mice[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2000, 20:458-462.
- [9] Mashah E, Mallory M, Ge N, et al. Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice[J]. Experimental Neurology, 1995, 136:107-122.
- [10] P. Krzykowski O, Ghribi J, Gagnu P > C. Chabot S. Kar J. Rochford G. Massicotte and J. Poirier. Cholinergic systems and long-term potentiation in memory-impaired apolipoprotein E-deficient mice[J]. Neuroscience, 1999, 92:1273-1286.
- [11] Chapman S, Michaelson DM. Specific neurochemical derangements of brain projecting neurons in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Journal of Neurochemistry, 1998, 70(2):708-714.
- [12] 杨秀丽. 脂欣康益智作用临床观察及干预 ApoE 基因敲除小鼠认知功能障碍的研究[D]. 济南:山东中医药大学,2007.
- [13] 于平,尹文娟,于萍. 5-羟色胺受体对记忆的调节作用[J]. 首都师范大学学报:社会科学版,2009, S4:141-145.
- [14] 袁水霞,李霞,于萍. 脑内 GABA 受体在学习记忆中的作用[J]. 首都师范大学学报:社会科学版,2009, S4:156-160.
- [15] 刘钧天,崔莹雪,黄玉海,等. 艾烟与香烟对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠自主行为与海马 GFAP 表达的影响[J]. 上海针灸杂志, 2015, 34(10):1009-1012.

(2016-06-28 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 1409 页)

#### 参考文献

- [1] Shishebor M H, Hazen S L. Inflammatory and oxidative markers in atherosclerosis: relationship to outcome[J]. Current atherosclerosis reports, 2004, 6(3):243-250.
- [2] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. Physiological reviews, 2006, 86(2):515-581.
- [3] Cathcart M K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages contributions to atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2004, 24(1):23-28.
- [4] Plotnikov M B, Plotnikov D M, Aliev O I, et al. Hemorheological and antioxidant effects of Ascovertin in patients with sclerosis of cerebral arteries[J]. Clinical hemorheology and microcirculation, 2003, 30(3-4):449-452.
- [5] Gałecki P, Szemraj J, Bieńkiewicz M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment[J]. Pharmacological reports, 2009, 61(3):436-447.
- [6] 苏显明,马丙寅,王东琦,等. 冠心病患者血中 SOD 及 MDA 测定分析[J]. 陕西医学杂志,2003,23(12):1070-1072.

- [7] Heinecke J W, Baker L, Rosen H, et al. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells[J]. Journal of Clinical Investigation, 1986, 77(3):757.
- [8] Steinbrecher U P. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 1988, 959(1):20-30.
- [9] Ohashi M, Runge M S, Faraci F M, et al. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice[J]. Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology, 2006, 26(10):2331-2336.
- [10] Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, et al. Cigarette smoking induced oxidative stress may impair endothelial function and coronary blood flow in angiographically normal coronary arteries[J]. Circulation Journal, 2006, 70(5):593-599.
- [11] Pittilo M. Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease[J]. International journal of experimental pathology, 2000, 81(4):219-230.
- [12] 刘耀萌,崔莹雪,哈略,等. 艾灸及艾烟对动脉粥样硬化模型小鼠血清 TNF- $\alpha$ 、hs-CRP 及 vWF 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4):1377-1379.

(2016-06-28 收稿 责任编辑:洪志强)