刺络泻血疗法对高脂血症大鼠模型 ApoCⅢ及 LPL 的影响

张 博 赵慧玲 魏丹蕾 曾 蕊 张书鹏 崔艳芝 曹范锡
（北京中医药大学针灸推拿学院，北京，100029）

摘要 目的：观察刺络泻血疗法对高脂血症模型大鼠载脂蛋白 CⅢ（ApoCⅢ）及脂蛋白酯酶（LPL）活性的影响，并探讨其作用机制。方法：将 34 只清洁级雄性 SD 大鼠分为空白组、模型对照组、立普妥组及刺络泻血组，每组 8 只，以高脂饲料喂养造模，造模持续 28 d。第 4 周造模成功后，各造模组仍给予高脂饲料喂养，空白组不进行任何干预；模型组仅抓取按压处理，2 次/周；立普妥组按照 1.8 mg/（kg·d）的剂量给大鼠灌胃阿托伐他汀钙，2 次/周；刺络泻血组选取大鼠委中穴及足三里穴穴位附近的血络，出血量为 0.3～0.5 mL，至第 8 周。第 9 周腹主动脉取血，采用酶联免疫吸附法测定 ApoCⅢ，采用光谱检测法测定 LPL、TC、TG、HDL-C、LDL-C 的含量。结果：实验结束后，与正常组比较，模型组 ApoCⅢ、TC、LDL-C 含量均显著增高，差异有统计学意义（$P<0.05$），LPL 含量无明显变化（$P>0.05$）；与模型组比较，刺络泻血组与立普妥组 ApoCⅢ、TC、LDL-C 含量显著降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$），LPL 含量无明显变化（$P>0.05$）。结论：刺络泻血疗法可以有效抑制 ApoCⅢ活性，降低高脂血症大鼠 TC、LDL-C 水平，还不能认为对 LPL 有干预作用。

关键词 高脂血症；刺络泻血；载脂蛋白；脂蛋白脂肪酶

Effects of Pricking Blood Therapy on ApoCⅢ and LPL in Hyperlipidemia Rats

Zhang Bo, Zhao Huiling, Wei Danlei, Zeng Rui, Zhang Shupeng, Cui Yanzhi, Cao Fanxi
(*School of Acupuncture-moxibustion and Tuina*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*)

Abstract **Objective**: To observe the effects of pricking blood therapy on ApoCⅢ and LPL in hyperlipidemia rats and explore its mechanism. **Methods**: A total of 34 male SD rats were randomly divided into 4 groups: normal group, model group, lipitor group and blood pricking therapy group, with 8 in each group. Hyperlipidemia model was induced by high fat diet for 28 days. After successful modeling of 4 weeks, each group was still given high fat diet except control group. Rats in normal group didn't accept any interventions, while the model group was treated with grabbing and pressing, twice per week. The lipitor group was given atorvastatin calciumby intragastric administration with 1.8 mg/(kg·d) each time, twice per week. In the blood pricking therapy group, the superficial vein of Weizhong and Zusanli were selected for 0.3 to 0.5 mL bleeding until the eighth week. Blood was collected from the abdominal aorta on the 9th week, and ApoCⅢ was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of LPL, TC, TG, HDL-C and LDL-C were measured by spectrophotometry. **Results**: Comparing with the control group, the level of TC, LDL-C and ApoCⅢ of the model group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). No significant changes were seen in LPL ($P>0.05$). Compared with the model group, the level of TC, LDL-C and ApoC3 of the blood pricking therapy group and lipitor group decreased significantly, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). No significant changes were seen in LPL ($P>0.05$). **Conclusion**: Blood-letting therapy can effectively inhibit the activity of ApoC III and reduce the levels of TC and LDL-C in hyperlipidemia rats, but it cannot be considered as an intervention to LPL.

Key Words Hyperlipidemia; Blood pricking therapy; ApoCⅢ; LPL
中图分类号：R245.31+2 **文献标识码**：A **doi**：10.3969/j.issn.1673-7202.2018.04.036

近年来，随着人们生活习惯特别是饮食习惯的改变等多种因素的影响，高脂血症的发病率有明显增高的趋势，对我国健康人群血脂水平的调查发现，男女、城乡人群的 TG 和 T-CHO 水平都较以往升高[1]。高脂血症是 AS 和冠心病（Coronary Heart Disease，CHD）的独立危险因素，其中，LDL-C 是导致 AS 的基本因素[2-3]。高脂血症是危及人类生命和健康的主要疾病之一，是人类健康的隐形杀手，其严重性不容忽视。加强对血脂的控制可以降低 CHD 及其他心血管疾病发生的概率，JAMA 杂志曾经发表

基金项目：教育部人文社科研究项目（15YJAZH117）
作者简介：张博（1989.09—），男，2015 级针灸推拿学专业硕士研究生，研究方向：刺络泻血疗法作用机理的实验研究，E-mail：zhangbo@bucm.edu.cn
通信作者：赵慧玲（1957.07—），女，硕士，教授，研究方向：刺络泻血疗法作用机理的实验与临床研究，E-mail：zyydxzhao@163.com

述评,认为高质量的脂质处理和血运重建同样重要,降低血脂可以延缓 AS 的进展[4]。有效数据证明,有效控制血脂异常,能够降低患者的住院率化及病死率、提高存活率。高脂血症患者主要推荐药物治疗,虽然西药的调脂作用疗效较好,但一旦停药则疗效减低甚至消失,而长期应用伴有多种不良反应。因此寻找安全、有效、作用持久的方法治疗高脂血症,尤其探索科学合理的治疗高脂血症的临床治疗方案就显得非常重要。本研究基于刺络泻血疗法"祛瘀生新"理论[5],在高脂血症模型大鼠造模成功后,刺血足三里穴和丰隆穴对模型大鼠进行干预。通过观察实验中高脂血症模型大鼠的载脂蛋白 CⅢ(Apo CⅢ)及脂蛋白脂肪酶(LPL)的变化,分析刺络泻血疗法对高脂血症模型大鼠 Apo CⅢ以及脂蛋白脂肪酶(LPL)的影响,研究刺络泻血疗法治疗高脂血症的具体机制,为防治由血脂水平异常引起的心脑血管疾病提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　清洁级健康雄性 SD 大鼠 34 只,体重(200 ± 10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2016-0011。在 2 级动物室(北京中医药大学实验针灸动物室:室温 22 ℃,相对湿度 45%)清洁条件下喂养。

1.1.2　药物　高脂饲料(82.8%基础饲料、1%胆固醇、10%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶,5%蛋黄粉和 1%胆酸钠,由北京科澳协力饲料有限公司提供);立普妥(阿托伐他汀钙,10 mg/片,辉瑞制药有限公司(国产),国药准字 H20051407),使用前使用去离子水超声乳化,配制成 1.8 mg/mL 的溶液备用。

1.1.3　试剂与仪器　戊巴比妥钠(Sigma 试剂公司,059H0612),碘酒(上海利康消毒高科技有限公司,20140718);大鼠载脂蛋白 C-Ⅲ(ApoCⅢ)酶联免疫试剂盒(武汉华美提供),大鼠脂蛋白脂酶(LPL)试剂盒,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒,总胆固醇(T-CHO)试剂盒,三酰甘油(TG)试剂盒(南京建成提供),小号三棱针,分光光度计(UV-2100 尤尼柯)恒温水浴锅(HW·SY11-K 北京市长风仪器仪表公司)离心机(3K18 Sigma)标准规格酶标仪(Multiskan MK3 Thermo Scientific),自动洗板机(DEM-3 北京拓普分析仪器有限公司),电热恒温培养箱(SKP-02.600 黄石市恒丰医疗器械有限公司)电子秤(HOCKY AD05)。

1.2　实验方法

1.2.1　分组与模型制备　采用随机数字表法将 34 只大鼠随机分为 2 组,空白组 8 只,模型组 26 只。参考 Qi Zhang 在 Application of GC/MS-based metabonomic profiling in studying the lipid-regulating effects of Ginkgo biloba extract on diet-induced hyperlipidemia in rats 中使用的造模方法对 26 只大鼠造模。4 周后随机选取 2 只造模组大鼠腹主动脉取血,检查血浆中总胆固醇的含量≧ 5.2 mmol/L[6],提示造模成功。然后将模型组大鼠随机分为模型对照组,刺络泻血组及立普妥组,每组 8 只。

1.2.2　干预方法　全部大鼠适应性喂养 1 周后,空白组:常规饲养 8 周,不做任何处理;模型对照组:高脂饲料喂养 8 周,从第 4 周后开始,去离子水灌胃,2 次/周,不做其他处理;刺络泻血组:高脂饲料喂养 8 周,从第 4 周开始,去离子水灌胃,丰隆,足三里刺血,出血量为 0.3 ~0.5 mL(换算公式为出血量 = 体重 ×7.4% ×2%),2 次/周;立普妥组:高脂饲料喂养 8 周,从第 4 周后开始,按照 1.8 mg/(kg·d)立普妥灌胃,2 次/周。

1.2.3　检测指标与方法　实验进行至第 8 周末,各组大鼠禁食 24 h,使用 6% 戊巴比妥钠(0.1 mL/100 g)进行腹腔注射麻醉后,腹主动脉部位取血,低温离心进行血清分离,置 -20 ℃ 的冰箱保存,待用于 ApoCⅢ、LPL、TC、TG、HDL、LDL 的检测。

1.3　统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理。各组数据以均数 ± 标准差表示,各组方差齐且数据符合正态分布时用单因素 ANOVA 检验,组间比较用 LSD 法,方差不齐或非正态时用 Welch 检验或 Nemenyi 非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　各组大鼠血脂 4 项的比较　实验 8 周后,各组大鼠血脂四项进行比较,与空白组比较,模型对照组的总胆固醇及低密度脂蛋白显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),刺络泻血组和立普妥组稍有升高,差异无统计学意义($P > 0.05$),与立普妥组比较,刺络泻血组总胆固醇及低密度脂蛋白差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2　各组大鼠 ApoCⅢ及 LPL 的比较　实验 8 周后,各组大鼠进行比较,与空白组比较,模型对照组的 ApoCⅢ含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),刺络泻血组和立普妥稍有升高,差异无统计学意义($P > 0.05$),与立普妥组比较,刺络泻血组

ApoCⅢ差异无统计学意义($P>0.05$),各组 LPL 含量无明显差异,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 各组大鼠血脂四项的比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	总胆固醇(mmol/L)	甘油三脂(mmol/L)	高密度脂蛋白(mmol/L)	低密度脂蛋白(mmol/L)
空白组	1.57 ± 0.50	0.32 ± 0.10	0.58 ± 0.12	0.58 ± 0.21
模型对照组	6.40 ± 1.89 *	0.51 ± 0.21	0.61 ± 0.12	2.80 ± 0.86 *
刺络泻血组	1.79 ± 0.24 △	0.47 ± 0.23	0.76 ± 0.19	0.63 ± 0.11 △
立普妥组	2.14 ± 0.82 △	0.57 ± 0.12	0.81 ± 0.35	0.85 ± 0.38 △

注:各组大鼠血脂 4 项与空白组比较,* $P<0.05$;各组大鼠与空白组比较,△ $P<0.05$

表 2 各组大鼠 ApoCⅢ及 LPL 的比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	ApoCⅢ(mg/mL)	LPL(U/mL)
空白组	51.92 ± 12.32	0.140 ± 0.003
模型对照组	144.29 ± 40.98 *	0.141 ± 0.002 △
刺络泻血组	67.19 ± 19.21 △	0.143 ± 0.002 △
立普妥组	52.53 ± 9.90 △	0.141 ± 0.005 △

注:各组大鼠血脂四项与空白组比较,* $P<0.05$;各组大鼠与空白组比较,△ $P<0.05$

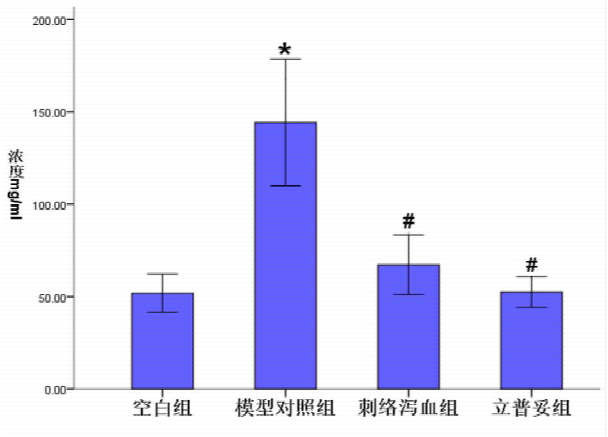

图 1 各组大鼠血清 ApoCⅢ的含量比较($\bar{x}\pm s$, mg/mL)

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

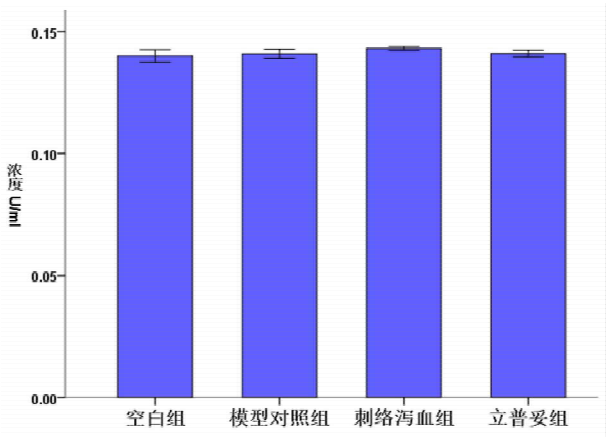

图 2 各组大鼠血清 LPL 的含量比较($\bar{x}\pm s$, U/mL)

3 讨论

国家卫生与计划生育委员会 2015 年初发布的《中国居民营养与慢性病调查报告》[7] 显示,2012 年中国成人血脂异常患病率 40.40%,比较 2002 年的患病率水平出现大幅度增加,其中高胆固醇血症患病率 4.9%,高脂血症的患病率 13.1%,低高密度脂蛋白胆固醇血症的患病率 33.9%,呈现为国民血脂异常的普遍暴露状态。

临床上血脂检测的基本项目为 TC、TG、LDL、HDL。国内外血脂异常防治指南均强调,LDL 在 AS 的发病中起着核心作用,因此推荐 LDL 为首要干预靶点[3,8-9],胆固醇占 LDL 比重的 50% 左右,故 LDL-C 浓度基本能反映血液 LDL 总量,那么以 LDL-C 作为评估一种治疗方法对于高脂血症的干预效果指标,无疑是合适的。在本次实验中,我们发现刺络泻血疗法的确对高脂血症有明确的治疗效果,而战慧敏[10] 等在刺络泻血对高脂血症模型大鼠血脂、NO 及 ET-1 影响的研究中也明确了,刺络泻血疗法对于高脂血症模型大鼠的血脂有明确的干预作用。为探究该疗法如何调控大鼠体内的 LDL,本实验选取了 ApoC3 及 LPL 作为研究目标。通过本次实验,发现刺络泻血疗法能明显降低 ApoC3 的含量,但是对于 LPL 无明显调节作用。

载脂蛋白 CⅢ(Apolipoprotein CⅢ, Apo CⅢ)是脂蛋白代谢的重要调节蛋白之一,其主要作用是抑制具有水解血浆三酰甘油(Triglyceride, TG)功能的脂蛋白酯酶活性,并可干扰受体依赖或者非依赖途径的肝脏对富含 TG 脂蛋白的摄取,并可促进极低密度脂蛋白(Very Low Density Lipoprotein, VLDL)在肝脏的组装和分泌。Apo CⅢ抑制富含 TG 的脂蛋白(TRLs)的分解和清除。无论是在体内还是在体外 CM 和 VLDL 中 Apo CⅢ可以抑制肝细胞对 CM 和 VLDL 的摄取。Apo CⅢ抑制脂蛋白 ApoB 和肝细胞上的 ApoB 或 ApoE 受体的结合。Apo CⅢ的这种抑制作用是由于 Apo CⅢ对 ApoB 或者 ApoE 的受体区域的掩盖。Apo CⅢ也可以抑制脂蛋白酶(LPL)的活性,并且在高 TG 血症的患者中,Apo CⅢ也是 LPL 的一个明确的抑制剂。缺乏 Apo CⅢ的受试对象 TRL 水平较低,来自这些受试对象的血清可以激活人奶中的 LPL,但是正常的血清可以有效地抑制 LPL 的活性。这些发现表明 Apo CⅢ是通过抑制 LPL 介导的 TRLs 的脂解作用导致高 TG 血症的发展。

ApoC3 能促进 VLDL 的组装与分泌,而 LDL 正

是从 VLDL 转化而来，并且 ApoC3 能抑制 LDL 被干细胞膜上 LDL 受体的摄取，从而导致血液中 LDL 的升高，这正与本次实验的数据相符合。说明刺络泻血疗法可能是通过抑制血浆中 ApoC3 的含量，间接的调控血浆中 LDL 的含量，并且可能对 LDL 的含量有直接的调控作用。本次实验中，并未体现 LPL 的含量有明显的变化，在与空白组比较，模型组、刺络泻血组、立普妥组中，LPL 的含量变化基本一致，差异无统计学意义。

LPL 全称为三脂酰甘油蛋白脂酰基水解酶（Triacylglyc-roprotein Acylhydrolase），是由 LPL 基因编码的糖蛋白。1966 年由 Scanu 在高密度脂蛋白研究中命名。成熟 LPL 是由 448 个氨基酸组成的糖蛋白，相对分子质量为 55 000。LPL 蛋白以单体和二聚体 2 种形式存在，活性形式为通过非共价键结合形成的同二聚体，其催化中心由 Ser132、Asp156、His241 组成，LPL 的酶活性必须由辅因子载脂蛋白 CⅡ（apoCⅡ）激活，载脂蛋白 CⅢ（ApoCⅢ）则抑制 LPL 酶活性。健康人血浆中 LPL 活性低，静脉注射肝素后血浆中 LPL 活性明显增加。LPL 主要由脂肪细胞、心肌、骨骼肌等肝外实质细胞合成分泌，释放入血后，借助硫酸肝素等葡糖胺聚糖结合在毛细血管内皮上。LPL 的生物作用复杂，血浆中 LPL 是 TG 代谢的限速酶，LPL 的二聚体水解血液中富含 TG 的乳糜微粒和极低密度脂蛋白，生成的甘油、脂肪酸可供组织氧化分解并提供能量；LPL 将脂蛋白结合到血管壁上，促进 TG 的水解及脂蛋白颗粒的摄取；LPL 还可作为 LDL 受体的配体；LPL 参与磷脂和载脂蛋白向高密度脂蛋白的转移。LPL 含量或者活性的改变可通过影响 TG 代谢进而影响到高脂血症的发病。

Heller[11] 等报道阿托伐他汀未改变高脂血症个体 LPL 活性，表明此药物降低 TG 不是由此酶加强对 TG 饱和脂蛋白的分解作用。Kobayashi[12] 等的研究结果表明，21 名高脂血症患者服用阿托伐他汀 6 周后，血浆 LPL 未见明显改变。

通过本次实验，还不能说明刺络泻血疗法对 LPL 有调控作用。通过实验比较研究发现，与目前临床使用他汀类降脂药物比较，所有强化他汀治疗的临床研究结果均表明，数倍增量他汀确实可使 AS 时间发生危险有所降低，但获益的绝对值小，且全因死亡并未下降[13]，在临床上，根据导师的临床经验发现，长期服用他汀类药物的患者，虽然可以有效控制血脂中 LDL 的含量，但是却有明显的食欲减退，乏力，反酸等不良反应，而本疗法在有效降低 LDL 的含量的同时，不仅治疗的次数少，而且并未出现其他的不良反应，明显优于他汀类药物，缺点在于本疗法在治疗过程中，不如他汀类药物降低血脂迅速，如血脂过高，需要快速降低血脂指数，建议优先选择他汀类药物治疗，并联合本疗法，在后期治疗中可以替代他汀药物，以减轻他汀类药物的不良反应及停药后的血脂升高。

参考文献

[1] 廖晓阳，许国藩，伍佳，等. 城乡社区高脂血症伴也血管危险因素的流行病学现状研究[J]. 华西医学，2013，28(1)：14-17.

[2] Jacobson TA，Ito MK，Maki KC，et al. National Lipid Association recommendations for patient-centered management of dyslipidemia：part 1-executive summary[J]. Journal of Clinical Lipidology，2015，9(6)：473.

[3] Stone NJ，Robinson JG，Lichtenstein AH，et al. 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. Future Cardiology，2014，10(2)：149-152.

[4] 陈竞巧，郁晓，钱培刚，等. 清热化痰祛瘀方对高脂血症模型大鼠血脂和肝功能影响的研究[J]. 江苏中医药，2013，45(8)：70-72.

[5] 马庆宇. 刺络放血治疗痰瘀互结型高脂血症的临床研究[D]. 北京：北京中医药大学，2010.

[6] 中国成人血脂异常防治指南修订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南(2016 年修订版)[J]. 中国循环杂志，2016，31(10)：7-28.

[7] 林晓斐.《中国居民营养与慢性病状况报告(2015 年)》发布[J]. 中医药管理杂志，2015(13)：89-89.

[8] RabarS，Harker M，O'Flynn N，et al. Lipid modification and cardiovascular risk assessment for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease：summary of updated NICE guidance[J]. Bmj，2014，349(349)：1-6.

[9] 胡大一. 降低密度脂蛋白胆固醇是硬道理[J]. 中华心血管病杂志，2015，43(1)：3-4.

[10] 战慧敏，赵慧玲，谭丽，等. 刺络泻血对高脂血症模型大鼠血脂、NO 及 ET-1 影响的研究[J]. 世界中医药，2017，12(5)：1101-1104.

[11] Heller F R，Descamps O S，Hondekijn J C，et al. Atorvastatin and the plasma activities of lipoprotein lipase，hepatic lipase and lecithin：cholesterol acyltransferase in patients with mixed hyperlipidemia[J]. European Journal of Internal Medicine，2000，11(1)：33-38.

[12] Kobayashi J，Maruyama T，Masuda M，et al. Effect of atorvastatin treatment on lipoprotein lipase mass in the pre-heparin plasma in Japanese hyperlipidemic subjects[J]. Clinica Chimica Acta，2001，314(1)：261-264.

[13] 孙艺红，胡大一. 如何理解强化剂量他汀的证据和获益[J]. 中华心血管病杂志，2014，42(11)：899-901.

(2017－08－15 收稿　责任编辑：王明)