DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.020

温阳通脉灸法通过线粒体途径对 ApoE$^{-/-}$ 动脉粥样硬化小鼠内皮相关凋亡因子的影响

吴冰心[1],杨孝芳[1],闫朝勃[2],伍先明[3,4],熊娇娇[1],朱洲[1],张宁[1],杨志虹[1]
[1.贵州中医药大学针灸推拿学院,贵州 贵阳 550025;2.长沙市中医院(长沙市第八医院),湖南 长沙 410007;
3.贵州中医药大学第二临床医学院,贵州 贵阳 550025;4.贵州中医药大学第二附属学院,贵州 贵阳 550002]

摘要:目的 研究"温阳通脉"灸法对 ApoE$^{-/-}$ 动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)小鼠线粒体形态、功能及细胞凋亡水平的影响,探讨其防治 AS 的作用机制。方法 8 周龄 SPF 级雄性 ApoE$^{-/-}$ 小鼠 22 只,随机分为模型组和艾灸组,每组 11 只,高脂饲料饲养复制 AS 模型。11 只 C57BL/6J 小鼠作为对照组,普通饲料饲养。各组小鼠均在造模第 1 天开始干预,对照组、模型组仅抓取固定,艾灸组小鼠于"膻中""神阙""内关"(双侧)及"血海"(双侧)穴处行艾灸治疗,每日 1 次,每次 30 min,每周连续 5 次,共干预 12 周后取材。用酶法测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)含量,比色法测定血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量;苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠胸主动脉病理形态结构;透射电镜观察小鼠胸主动脉线粒体形态;流式细胞术(JC-1)检测胸主动脉线粒体膜电位(MMP)变化;免疫荧光染色法检测胸主动脉 Cytochrome C(Cyt C)蛋白表达;免疫组化和 Western blot 法检测胸主动脉 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达。结果 与对照组比较,模型组小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 含量显著升高($P<0.01$),HDL-C 含量降低($P<0.01$);小鼠的胸主动脉结构呈血管内膜增厚,内皮细胞变性、肿胀和脱落,可见泡沫细胞;线粒体大量肿胀,嵴数量大大减少;线粒体膜电位水平明显下降($P<0.01$);胸主动脉组织 Cyt C 蛋白含量明显升高($P<0.01$);Bax、Caspase-3 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,艾灸组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 含量显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);小鼠胸主动脉管腔较为规则,内膜可见少量的内皮细胞变性和肿胀;线粒体轻度肿胀,嵴结构排列较整齐;线粒体膜电位水平明显上升($P<0.01$);胸主动脉组织 Cyt C 蛋白表达含量明显降低($P<0.01$),Bax、Caspase-3 蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),Bcl-2 蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。结论 "温阳通脉"灸法通过改善线粒体形态及功能,降低细胞凋亡水平,从而防治 AS。

关键词:温阳通脉;灸法;动脉粥样硬化;线粒体;凋亡因子
中图分类号:R246.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)03-0105-09

Effects of Warming Yang and Dredging Vessels Moxibustion on Endothelium-Associated Apoptotic Factors in ApoE$^{-/-}$ Atherosclerotic Mice via Mitochondrial Pathway

WU Bingxin[1],YANG Xiaofang[1],YAN Chaobo[2],WU Xianming[3,4],XIONG Jiaojiao[1],ZHU Zhou[1],ZHANG Ning[1],YANG Zhihong[1]
[1. School of Acupuncture and Tuina,Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550025,Guizhou,China;
2. Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine(Changsha Eighth Hospital),Changsha 410007,Hunan,China;
3. Second Clinical School of Medicine,Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550025,Guizhou,China;
4. The Second Affiliated College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine,Guiyang 550002,Guizhou,China]

Abstract:*Objective* To study the effects of moxibustion method of "warming Yang and dredging vessels" on the morphology and function of mitochondria and the level of apoptosis in ApoE$^{-/-}$ atherosclerosis(AS) mice,and to explore the mechanism of prevention and treatment of AS. *Methods* Twenty-two 8-week-old SPF-grade male ApoE$^{-/-}$ mice were randomly allocated into the model group and the moxibustion group,each comprising 11 mice,and the mice were placed on a high-fat diet to establish the atherosclerosis model. Eleven C57BL/6J mice formed the control group and were administered the standard chow. The intervention commenced on the initial day of the modeling for each group,with only the control and model groups being restricted,while the mice in the moxibustion group were positioned at "Danzhong(RN17)","Shenque(RN8)" and "Neiguan(PC6)"(bilaterally). The mice in the moxibustion group received moxibustion at "Danzhong(RN17)","Shenque(RN8)","Neiguan(PC6)"(bilaterally) and "Xuehai(SP10)"(bilaterally),administered daily for 30 minutes,five times per week. The samples

基金项目:国家自然科学基金项目(82360978,82160937);贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般499)
作者简介:吴冰心(1998-),女(仡佬族),贵州务川人,硕士在读,研究方向:针灸治疗心脑血管系统疾病临床及机制。
通讯作者:杨志虹(1988-),女,贵州贵阳人,高级实验师,博士,研究方向:针灸治疗心脑血管及盆底疾病的临床与基础。E-mail:yangmiss1115@163.com。

were collected 12 weeks after intervention. The levels of serum triglyceride(TG) and total cholesterol(TC) were quantified by using an enzymatic assay, while the levels of serum low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C) were assessed by a colorimetric test. The utilization of hematoxylin-eosin(HE) staining facilitated the examination of the pathological morphology and the structure of the thoracic aorta in mice. The transmission electron microscopy was utilized to analyze the morphology of mitochondria in the thoracic aorta, and the whilst flow cytometry(JC-1) was used to evaluate the mitochondrial membrane potential in the thoracic aorta. The changes in mitochondrial membrane potential(MMP) were assessed by using JC-1. The cytochrome C(Cyt C) protein expression in the thoracic aorta was examined through immunofluorescence staining and the protein expression levels of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in the thoracic aorta were measured by using immunohistochemistry and Western blot analysis. *Results* Compared with those of the control group, the levels of serum TC, TG and LDL-C of mice in the model group were significantly higher($P<0.01$) and HDL-C levels were significantly lower($P<0.01$). The thoracic aortic structures in mice showed intimal thickening, endothelial cell degeneration, swelling and detachment, and the foam cells were seen. The mitochondria were massively swollen and the number of cristae was greatly reduced. Mitochondrial membrane potential levels were significantly reduced($P<0.01$). The Cyt C protein levels were significantly higher in thoracic aortic tissue($P<0.01$). The protein expression levels of Bax and Caspase-3 were significantly higher ($P<0.01$), and the protein expression level of Bcl-2 was significantly lower($P<0.01$). *Conclusion* "Warming Yang and dredging vessels" moxibustion prevents and treats AS by improving the morphology and function of mitochondria and reducing the level of apoptosis.

Keywords: warming Yang and dredging vessels; moxibustion; atherosclerosis; mitochondria; apoptotic factor

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是多种缺血性心脑血管疾病(ischemic cardio/cerebrovascular disease, ICVD)的发病基础[1]。其发病机制主要涉及脂质代谢异常、炎性反应、氧化应激、线粒体功能障碍和细胞凋亡等[2-3]。细胞凋亡是机体维持体内平衡的重要机制,内皮细胞过度凋亡可引起斑块不稳定和破裂,加速AS疾病的进展[4]。研究发现当线粒体功能障碍,线粒体膜电位下降,线粒体内部Cyt C转移至细胞质,激活凋亡小体生成,即启动线粒体介导的细胞凋亡[5],从而影响AS的发生发展。课题组前期研究发现艾灸可上调血管内皮细胞沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)的表达,调节凋亡因子P53、Caspase3的含量,进而影响AS进展[6-7]。但艾灸是否可通过线粒体途径调节细胞凋亡因子,减少细胞凋亡,从而延缓AS疾病进展?基于此假说,本实验将在前期研究基础上以ApoE$^{-/-}$小鼠为研究对象,探究艾灸抑制线粒体途径细胞凋亡防治AS的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SPF级C57BL/6J雄性小鼠11只,ApoE$^{-/-}$雄性小鼠33只,均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,体质量(20±2)g,8周龄,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,饲养于贵州中医药大学SPF级实验动物中心,昼夜节律为12 h光照/12 h黑暗,自由饮食,室温(25±2)℃,湿度(50±5)%,适应性喂养1周。将11只C57BL/6J小鼠设为对照组,饲喂基础饲料;22只ApoE$^{-/-}$小鼠随机将其分为模型组、艾灸组,每组11只,给予高脂饲料喂养(78.85%基础饲料+21%猪油+0.15%胆固醇),持续喂养12周以建立AS模型。实验过程中对动物的处置符合《关于善待实验动物的指导性意见》中相关规定,本研究方案已经贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准(批号:20210147)。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:动物实验用细艾条(0.5 mm×15 cm)(湖香艾生物科技有限公司);组织包埋盒(广州维格斯生物科技有限公司);高效切片石蜡(上海华灵康复器械厂);无水乙醇(成都海兴化工试剂厂);二甲苯、多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司);PBS缓冲液(北京中杉金桥生物技术有限公司);苏木素染液(武汉塞维尔生物科技有限公司);伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司);812环氧树脂包埋套装、醋酸双氧铀(SPI);柠檬酸铅(EMS);一抗Cystatin C、VDAC1(三鹰);二抗HRP标记山羊抗兔IgG、FITC-Tyramide和CY3标记山羊抗兔(Servicebio);一抗Bax、Bcl-2(博奥森);一抗Caspase-3、二抗HRP标记山羊抗兔、DAPI染色试剂(赛维尔);DAB试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司)。

主要仪器:转轮式切片机(德国徕卡);超薄切片机(LEICA);干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司);漩涡混匀仪(江苏新康医疗器械有限公司);脱色摇床(上海程捷仪器设备有限公司);移液枪(大龙兴创实验仪器北京有限公司);组织包埋机(常州郊区中威电子仪器厂);数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);台式高速微量离心机(大龙兴创实验仪器北京股份);透射电子显微镜(日本电子JEOL);数字切片扫描仪(OLYMPUS JAPAN)。

1.3 模型制备 适应性喂养7 d后,ApoE$^{-/-}$小鼠给予高脂饲料喂养(78.85%基础饲料+21%猪油+0.15%胆固醇),持续喂养12周建立AS模型,造模后HE染色观察到小鼠主动脉处见典型粥样斑块,即表明造模成功[8]。

1.4 干预方法 对照组给予普通饲料常规饲养,模型和艾灸组给予高脂饲料饲养,并从第1天给予相应的干预。对照组、模型组常规饲养,予等时长和方式的抓取、固定。艾灸组:依照《实验针灸学》[9]"常用动物穴位及图谱"取小鼠"膻中""神阙""内关"(双侧)及"血海"(双侧)穴进行艾灸治疗,将小鼠固定于束缚板,艾灸固定在自制艾灸架上,艾条点燃后固定于小鼠穴位正上方,施灸过程中及时调整艾条与小鼠皮肤的距离,穴位皮温保持在(40±2)℃,每次30 min,每日1次,每周连续5次,共干预12周。

1.5 取材及指标检测 (1)小鼠血清血脂四项测定:末次干预后小鼠禁食12 h,取材前以20%乌拉坦(0.01 mL/g)腹腔注射麻醉,摘除眼球,采集眼眶静脉丛处约1 mL血液至EP管,静置1 h后放入4 ℃离心机中,以3000 r/min的转速离心10

min 得到血清，分离血清到新的 EP 管置于 -20 ℃冰箱冻存。严格按照试剂盒要求，检测小鼠血清总胆固醇（total cholesterol，TC）、甘油三酯（triglycerides，TG）、低密度脂蛋白（low density lipoprotein cholesterol，LDL-C）、高密度脂蛋白（high density lipoprotein cholesterol，HDL-C）水平变化。

（2）HE 染色法观察小鼠胸主动脉病理形态：取部分胸主动脉组织于 10% 多聚甲醛溶液中清洗、固定，再进行脱水、石蜡包埋及切片（厚度约为 0.4 μm）处理。按照常规流程对石蜡切片进行脱蜡复水、苏木精染色、伊红复染色、二甲苯透明、中性树胶封固等操作，最后放置于显微摄像下观察小鼠胸主动脉的病理结构情况，采集图像观察分析。

（3）透射电镜观察小鼠胸主动脉线粒体超微结构：取部分胸主动脉组织剪成 1 mm 小块，放入 3% 戊二醛中固定、1% 四氧化锇再固定；丙酮逐级脱水，脱水浓度逐级上升，每梯度 5 min；再分别在丙酮和环氧树脂混合液中浸润 3 h 后 Ep812 包埋；采用超薄切片机切片后晾干，分别用醋酸铀、柠檬酸铅染色，最后采用透射电镜进行图像采集分析。

（4）流式细胞术检测线粒体膜电位改变：取部分胸主动脉组织，迅速剪碎、研磨、吹打、过滤后，离心制备细胞悬液，各组取 0.5 mL 细胞悬液加入 0.5 mL JC-1 工作液，混匀，37 ℃孵育 20 min，配置 JC-1 染色缓冲液，孵育结束后，4 ℃ 600 r/min（离心半径为 10 cm）离心 3 min，弃上清，使用 JC-1 染色缓冲液重悬细胞，于流式细胞仪下观察红光/绿光比值，代表 MMP 水平。

（5）免疫荧光检测小鼠胸主动脉组织 Cyt C 含量：取部分胸主动脉组织石蜡切片放入二甲苯、无水乙醇脱蜡至水，将切片浸入柠檬酸盐缓冲液修复 20 min，冷却后用 PBS 洗 3 次，再放置在脱色摇床上洗涤 3 次，以血清封闭；滴加按比例配好的一抗，PBS 清洗 3 次后滴加二抗；抗原修复后再次一抗、二抗，滴加 DAPI、清洗后抗荧光封片剂封片。

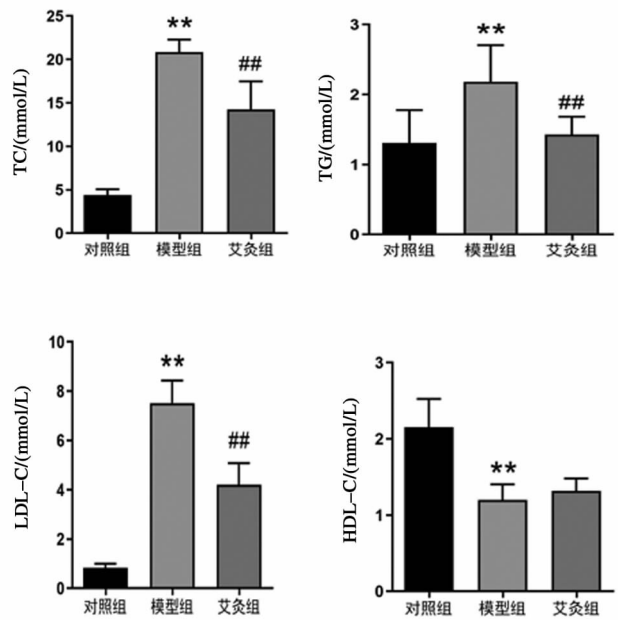
（6）免疫组化染色法检测小鼠胸主动脉组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达水平：取部分胸主动脉组织石蜡切片脱蜡，置于乙醇中复水，冲洗后置于柠檬酸盐缓冲液内高压高热修复抗原，PBS 洗涤后，采用 3% 过氧化氢孵育 10 min 去除内源性过氧化氢酶，PBS 洗涤后滴加牛血清蛋白溶液内封闭，PBS 洗涤后滴加配好的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 一抗工作液内反应过夜，再经 PBS 洗涤后置于二抗工作液内反应 1 h，最后经 DAB 显色、苏木素复染后中性树胶封片。数码摄像显微镜下观察并拍照，计算 Bax、Bcl-2、Caspase-3 阳性表达率。

（7）蛋白质印迹法（WB）测定大鼠胸主动脉 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平：取部分胸主动脉组织，研磨后加入 RIPA 裂解液后反复研磨，充分裂解，随后离心提取含蛋白样品的上清液。经 BCA 法测定蛋白浓度后，行沸水浴 15 min 使蛋白变性。蛋白冷却后按常规顺序进行电泳、转膜、封闭过程。抗体孵育阶段，先加入稀释好的一抗 Bax、Bcl-2、Caspase-3（1∶1000）及内参 β-actin（1∶2000），4 ℃下孵育过夜，再加入二抗（稀释浓度 1∶5000），室温下孵育 2～3 h 后，在 PVDF 膜上滴加 ECL 发光液，待反应 1 min 后，将 PVDF 膜置于成像仪中曝光，调整曝光时间保存条带图片。采用天能 GIS 系统分析条带灰度值，最后计算 Bax、Bcl-2、Caspase-3 条带密度值与 β-actin 密度值的比值。

1.6 统计学处理 SPSS 26.0 软件进行数据分析。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）方式描述，经正态检验、方差齐性检验后，组间比较选用单因素方差分析，事后检验采用 LSD 检验或 Tamhane's T^2 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血脂水平变化 与对照组比较，模型组小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 含量显著升高（$P<0.01$），而 HDL-C 含量降低（$P<0.01$）；与模型组比较，艾灸组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 含量显著下降（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），血清 HDL-C 水平无变化；以上结果表明，高脂饲料喂养导致 ApoE$^{-/-}$ 小鼠脂质代谢水平异常，艾灸治疗可以改善 AS 小鼠的血脂水平。见图 1。



注：**与对照组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图 1 各组动脉粥样硬化小鼠血脂水平变化

2.2 各组小鼠胸主动脉弓病理形态比较 对照组小鼠主动脉弓结构完整，血管内膜、中膜、外膜结构较为清晰，管腔较为规则。血管内皮为衬贴于血管腔的单层扁平上皮，内皮细胞核所在部位略隆起，中膜各层弹性膜由弹力纤维相连，可见环形平滑肌、少量胶原纤维和弹性纤维，外膜逐渐移行为疏松结缔组织。模型组小鼠主动脉弓可见内膜增厚，有斑块形成（红色箭头），斑块内为泡沫细胞（绿色箭头），血管内皮增生，少量新生纤维组织（粉色箭头），中膜层坏死，基质溶解（黄色箭头），染色较浅。艾灸组小鼠主动脉弓亦见内皮增厚，斑块形成（红色箭头），斑块内有泡沫细胞堆积（绿色箭头），斑块病变程度较模型组减轻，部分内皮细胞肿胀变性并脱落（黑色箭头）。见插页XXX图 2。

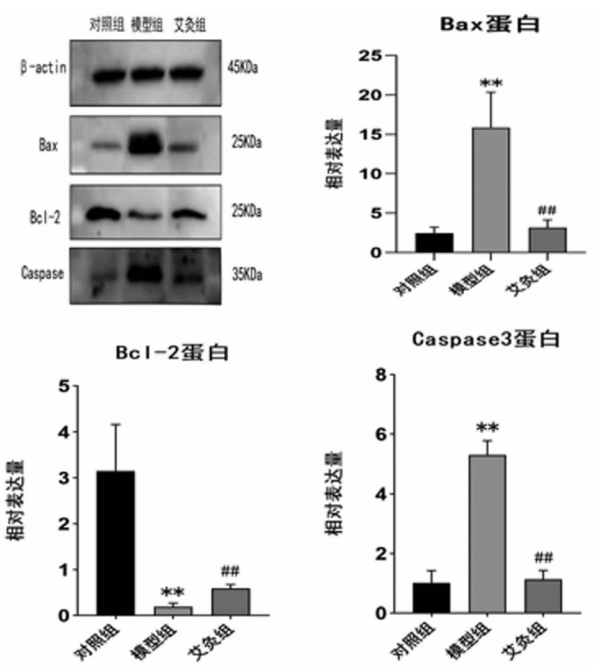
2.3 各组小鼠主动脉线粒体形态比较 对照组主动脉中内皮细胞形态结构正常，呈扁平状，附着在内弹性膜腔面。细胞核呈不规则形，染色质分布较均匀，以常染色质为主，异染色质附着在核膜周边，核膜连续完整，线粒体呈杆状或圆形，嵴排列紧密，基质均匀，呈均一灰色（红色箭头）。模型组小鼠主动脉内皮细胞形态结构异常，呈扁平状，附着在内弹性膜腔面，细胞核呈不规则形，染色质凝集，异染色质轻微增多，核膜连续完整，

线粒体主要呈圆形,嵴数量大大减少,基质溶解,严重者呈空泡化(红色箭头)。艾灸组小鼠主动脉中内皮细胞形态结构轻微受损,染色质分布较均匀,以常染色质为主,异染色质附着在核膜周边,线粒体轻度肿胀,嵴结构排列较整齐,基质部分溶解,电子密度降低(红色箭头)。见插页XXX图3。

2.4 各组小鼠主动脉线粒体膜电位水平比较 采用JC-1探针二聚体与单体的比例评价小鼠主动脉线粒体膜电位水平。与对照组比较,模型组小鼠JC-1二聚体/单体比例显著降低($P<0.01$),线粒体膜电位水平下降;与模型组比较,艾灸组JC-1二聚体/单体比例显著增加($P<0.01$),线粒体膜电位水平上升。见插页XXXⅢ图4。

2.5 各组小鼠Cyt C蛋白含量比较 与对照组相比,模型组主动脉Cyt C蛋白含量明显升高,VDAC1蛋白含量明显降低,Cyt C红+VDAC1绿(合)蛋白含量降低($P<0.01$)。与模型组相比,艾灸组小鼠主动脉组织Cystatin C蛋白含量均明显降低,VDAC1蛋白含量明显升高,Cystatin C红+VDAC1绿(合)蛋白含量明显升高($P<0.01$)。见插页XXXⅠ图5。

2.6 各组小鼠细胞凋亡水平比较 与对照组比较,模型组小鼠胸主动脉内皮细胞凋亡蛋白Bax、Caspase-3蛋白含量明显升高($P<0.01$),Bcl-2蛋白含量明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,艾灸组小鼠Bax、Caspase-3蛋白含量明显降低($P<0.01$);Bcl-2蛋白含量明显升高($P<0.01$)。见插页XXXⅠ图6、图7。



注:**与对照组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$。

图7 各组动脉粥样硬化小鼠细胞凋亡水平对比(Western blot)

3 讨论

AS归属中医"脉痹""胸痹"范畴,病位在心脉,阳气虚为本,痰瘀阻塞心脉为标。《灵枢·百病始生》中记载:"凝血蕴里而不散,津液涩渗,着而不去,而积皆成矣",机体阳气虚,无力推动精血津液运行或嗜食肥甘厚腻致痰浊血瘀积于血脉,使血管狭窄、内皮受损,加重心脑血管疾病。《景岳全书》曰:"凡大结大滞者最不易散,必欲散之,非藉火力不能速也,所以极宜用灸",课题组前期研究也证实艾灸能有效防AS。选用心包经络穴内关调心神、通血脉,现代研究也发现内关穴可改善线粒体呼吸功能[10];膻中穴畅达气机,助全身气血运行;神阙穴补中益气,促进气血化生;血海穴益气养血、行血祛瘀,针刺血海能抑制凋亡因子Bax和Caspase-3蛋白的表达[11];具有温热活血之性的艾灸作用于以上穴位,可温阳化痰、行气祛瘀,防止脉道瘀堵,从而防治AS。ApoE基因敲除小鼠结合高脂饲料喂养12周形成的AS模型,是病理形态与人类最相似的模型之一[12]。模型组小鼠有精神不佳、毛色暗淡伴有脱落、食欲下降等表现;且胸主动脉AS病变明显,血管内壁增厚,内皮细胞变性、肿胀和脱落,可见大量泡沫细胞,提示造模成功。艾灸组小鼠精神尚可,毛色及食欲无明显变化;胸主动脉结构相对改善,变性或肿胀内皮细胞减少,无明显的泡沫细胞和脂质斑块形成,说明艾灸干预可以改善$ApoE^{-/-}$小鼠的一般状况,还可减轻血脂异常对血管壁的损伤,延缓AS的疾病进展,这一现象与既往研究结果报道一致[13]。

内皮细胞(VEC)具有减少血管通透性、抑制细胞的迁移与趋化、抑制血小板聚集等多种生理功能[14]。VEC病理性凋亡是形成动脉粥样硬化斑块和血栓的关键,发生于AS病变早期[15-16]。越来越多的证据表明,调节细胞凋亡因子及凋亡相关信号通路在治疗AS中发挥重要作用[17]。B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)家族蛋白是细胞凋亡过程的主要调控者,促凋亡蛋白(以Bax为主)和抗凋亡蛋白(以Bcl-2为主)两类蛋白以线粒体为靶器官发挥促进和抑制细胞凋亡两种相反的功能,细胞凋亡受这两类蛋白含量和功能状态平衡的调控[18-19]。Bcl-2家族蛋白控制着线粒体外膜通透性(MOMP),MOMP被认为是细胞凋亡诱导中的"不可逆点",达到这个阈值就会发生细胞凋亡[20]。Bax是一种胞浆蛋白,在健康细胞中位于细胞浆且处于休眠状态,应对促凋亡刺激时,Bax被BH3-only蛋白诱导发生相关构象变化增加MOMP、启动孔隙形成,从而移位到线粒体外膜参与膜损伤[21]。在这个过程中,Bax与线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道2(VDAC2)相互作用,这些作用可能会影响Bax从细胞浆运输到细胞质途中在线粒体外膜的"滞留时间",这决定了细胞凋亡的有效性[22]。因此,调控Bax的促凋亡可有效改善AS的病理改变。而抗凋亡Bcl-2蛋白可以直接或与激活剂BH3-only蛋白相互作用,改变Bax相关构象,将Bax从线粒体外膜(MOM)逆向转运从而抑制细胞凋亡[23]。既往研究显示,动脉粥样硬化斑块中Bax蛋白表达增加,而Bcl-2蛋白表达降低[24]。本实验研究表明模型组胸主动脉Bax蛋白含量升高,而Bcl-2蛋白含量降低;经艾灸干预后显著提高Bcl-2的蛋白含量,同时降低Bax的蛋白含量,提示艾灸可能通过调节Bax、Bcl-2含量以及Bax/Bcl-2比值,减少AS斑块的形成,从而延缓AS进展。

血管内皮细胞的线粒体功能障碍与AS的发生发展密切相关。研究发现,通过线粒体生物合成、线粒体动力学(不断分裂与融合)和线粒体自噬可纠正线粒体形态和结构、修复清除受损线粒体、产生细胞能量ATP等维持细胞稳态及调控细胞存活与凋亡[25]。因此,线粒体形态异常,膜电位下降,ROS产生增加等一系列线粒体功能障碍可能诱导细胞凋亡,进而造成如动脉粥样硬化、神经系统疾病发生[26]。线粒体损伤引起的内源性(线粒体途径)细胞凋亡,从激活细胞凋亡信号(如

Cyt C、ROS、Ca^{2+}等)开始触发细胞凋亡程序,促凋亡蛋白 Bax 是线粒体应激引起细胞凋亡的关键,接收凋亡信号后,Bax 形成寡聚体并转位至线粒体膜,降低线粒体膜电位(MMP),增加膜的通透性,受损线粒体的脂质和蛋白导致可溶性线粒体膜间蛋白 Cyt C 释放到细胞质中[27]。Cyt C 是线粒体凋亡通路激活的标志[28],正常情况下 Cyt C 主要存在于线粒体内外膜之间的腔隙内,当由脂质代谢异常引发动脉粥样硬化组织细胞的线粒体过度分裂时,细胞产生凋亡信号,细胞质中 Cyt C 的增加与凋亡蛋白酶激活因子 1(apoptotic protease activating factor - 1,Apaf - 1)结合形成寡聚体复合物,进一步募集结合 Caspase - 9 酶原形成凋亡体,Caspase - 9 活化后激活下游 Caspase - 3,从而发生细胞凋亡[29]。Caspase - 3 处于核心位置,是细胞凋亡的标志[30]。本研究结果显示模型组小鼠胸主动脉细胞质中 Cyt C 蛋白含量升高,MMP 水平下降、线粒体形态改变,下游 Caspase - 3 含量增加,这些结果说明动脉粥样硬化导致内皮细胞线粒体功能受损,Cyt C 释放并激活 Caspase 级联引起线粒体途径的细胞凋亡,提示线粒体参与了细胞凋亡的调控。艾灸组小鼠胸主动脉细胞质中 Cyt C 蛋白含量降低,MMP 水平上升,线粒体形态基本正常,Caspase - 3 含量减少,说明艾灸可有效保护线粒体形态及功能,并且可能通过线粒体途径抑制细胞凋亡,从而防治 AS。

综上所述,艾灸可以改善 $ApoE^{-/-}$动脉粥样硬化小鼠胸主动脉内皮细胞损伤,延缓 AS,可能是通过抑制线粒体途径细胞凋亡发挥作用,这也为后续研究艾灸通过抑制线粒体途径的细胞凋亡从而改善心脑血管疾病提供思路。

参考文献

[1] 赵若楠,荣卓,邵静. 消溶稳斑方治疗气虚痰瘀阻滞型颈动脉粥样硬化不稳定斑块的临床疗效研究[J]. 时珍国医国药,2023,34(11):2701 - 2706.

[2] LI Z, LI Q, WANG L, et al. Targeting mitochondria - inflammation circle by renal denervation reduces atheroprone endothelial phenotypes and atherosclerosis[J]. Redox Biology, 2021, 47(11): 102156.

[3] 李何玉,王越,汪颖,等. 细胞凋亡在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 大连医科大学学报,2023,45(6):527 - 531,537.

[4] LIU Y, CUI X, WANG C, et al. LncRNA HCG11 regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell through targeting miR - 144 - 3p/FOXF1 axis in atherosclerosis[J]. Biol Res, 2020, 53(1): 44.

[5] 张勤. 基于线粒体自噬探讨右美托咪定对大鼠肠缺血再灌注损伤的作用及机制[D]. 南昌:南昌大学,2022.

[6] 杨志虹,杨孝芳,陈盼碧,等. 体外适宜温热刺激对络脉相关血管内皮细胞延缓衰老物质 P53 SIRT1 含量影响的机制研究[J]. 时珍国医国药,2019,30(1):230 - 232.

[7] 杨孝芳,张宁,杨志虹,等. 灸法热刺激对脐静脉血管内皮细胞 Caspase - 3 表达影响的研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(6):1505 - 1507.

[8] LI L, ZHUANG S, JIANG S. Muscone inhibits the progression of atherosclerotic plaques in mice aorta by inhibiting the NF - kappaB/p65 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 702: 149628.

[9] 余曙光,徐斌. 实验针灸学[M]. 北京:人民卫生出版社,2021:287 - 295.

[10] 姜越,赵霞,严花. 固本防哮饮对哮喘缓解期小鼠肺组织线粒体凋亡相关因子 CytC Bcl - 2 及 Caspase - 3 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2023,30(8):81 - 86.

[11] 钟俊青,王连成. 针刺治疗缺血性脑卒中机制的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2020,35(2):823 - 826.

[12] ZHANG Y, FATIMA M, HOU S, et al. Research methods for animal models of atherosclerosis(Review)[J]. Molecular medicine reports, 2021, 24(6): 12511.

[13] 张瑞. 艾灸及艾烟调节 Rho/ROCK 信号通路干预 $ApoE^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化的机制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2020.

[14] 高爽,王臻楠,顾耘. 血管内皮细胞功能障碍与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(20):2966 - 2970.

[15] 曾安宁,王国秋,葛立永,等. 非瓣膜性心房颤动患者血清 S100 钙结合蛋白 A4 和正五聚素蛋白 3 水平与左心耳血栓的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2024,26(3):276 - 279.

[16] 田硕,张宁,林桦,等. 乙酰半胱氨酸对高脂血症患者性激素水平的影响[J]. 河北医药,2023,45(12):1812 - 1815.

[17] 任正肖,朱庆均,王彦芳,等. 中药调控细胞凋亡抗动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(22):214 - 223.

[18] NORDESTGAARD L T, CHRISTOFFERSEN M, AFZAL S, et al. Triglycerides as a shared risk factor between dementia and atherosclerotic cardiovascular disease: a study of 125 727 individuals[J]. Clinical chemistry, 2021, 67(1): 245 - 255.

[19] SANDESARA P B, VIRANI S S, FAZIO S, et al. The forgotten lipids: triglycerides, remnant cholesterol, and atherosclerotic cardiovascular disease risk [J]. Endocrine reviews, 2019, 40 (2): 537 - 557.

[20] 祁宏,李智超,史志强. 线粒体膜完整性对细胞命运的调控[J]. 生物化学与生物物理进展,2022,49(9):1638 - 1647.

[21] BALLING M, AFZAL S, DAVEY SMITH G, et al. Elevated LDL triglycerides and atherosclerotic risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2023, 81(2): 136 - 152.

[22] LIANG X, WANG L, WANG M, et al. MicroRNA - 124inhibits macrophage cell apoptosis via targeting p38/MAPK signaling pathway in atherosclerosis development [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(13): 13005 - 13022.

[23] LI MX, DEWSON G. Mitochondria and apoptosis: emerging concepts [J]. F1000Prime Rep, 2015, 7: 42.

[24] 闻双全. 葛根素缓解镉致大鼠大脑皮质神经元线粒体损伤介导的神经毒性[D]. 扬州:扬州大学,2023.

[25] 张斌森,张笑佳,秦晓宇,等. 电针对布比卡因中毒大鼠心肌损伤及线粒体功能的影响[J]. 西部中医药,2024,37(1):20 - 23.

[26] 马立威,陈哲,王文豹,等. 从表型差异探讨大戟大枣汤含药血清抗乳腺癌的作用[J]. 中成药,2023,45(7):2373 - 2378.

[27] 李梦琦,石玉,杨诗宇,等. 夏枯草抗肿瘤活性成分及其作用机制研究进展[J]. 中国现代应用药学,2024,41(5):716 - 726.

[28] 沈建,张昕,焦阳,等. 沙库巴曲缬沙坦对缺氧心肌细胞线粒体动力系统和细胞凋亡的影响[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2024,23(3):217 - 222.

[29] DADSENA S, KING L E, GARCÍA - SÁEZ A J. Apoptosis regulation at the mitochondria membrane level[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2021, 1863(12): 183716.

[30] 王记委,李雁冰,李娜,等. 针刺治疗通过抑制细胞凋亡改善缺血性脑卒中疗效及其机制[J]. 中国老年学杂志,2024,44(7):1773 - 1777.

温阳通脉灸法通过线粒体途径对 ApoE$^{-/-}$动脉粥样硬化小鼠内皮相关凋亡因子的影响

（正文见 105－109 页）

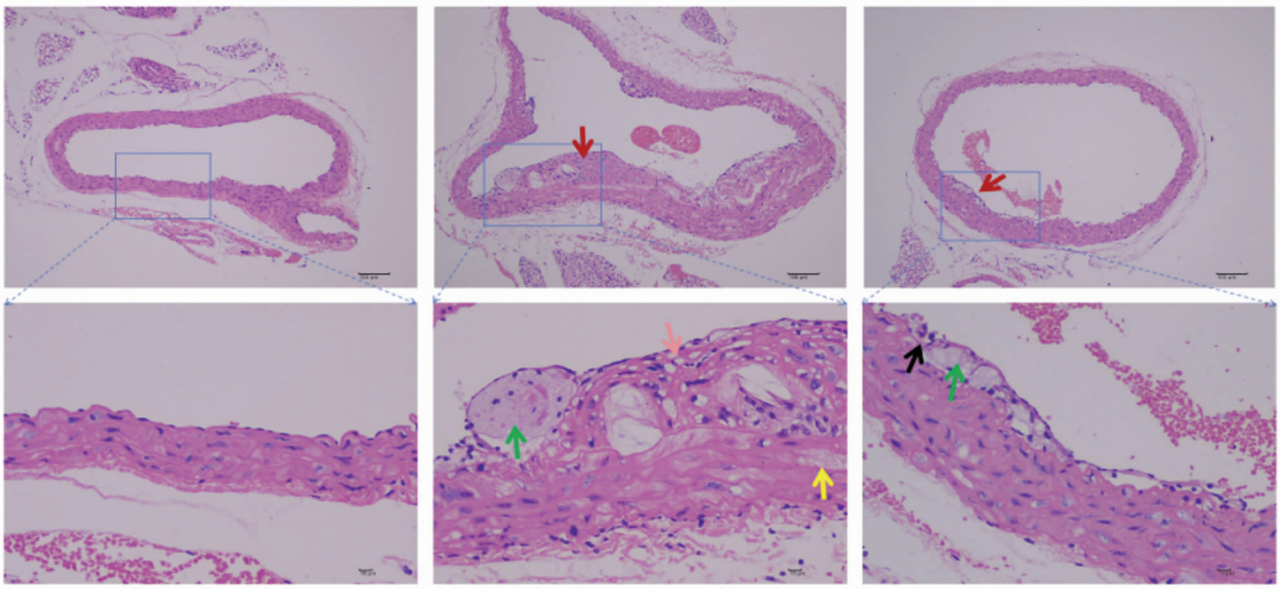


图 2　各组动脉粥样硬化小鼠主动脉弓病理形态图（HE 染色，×400）

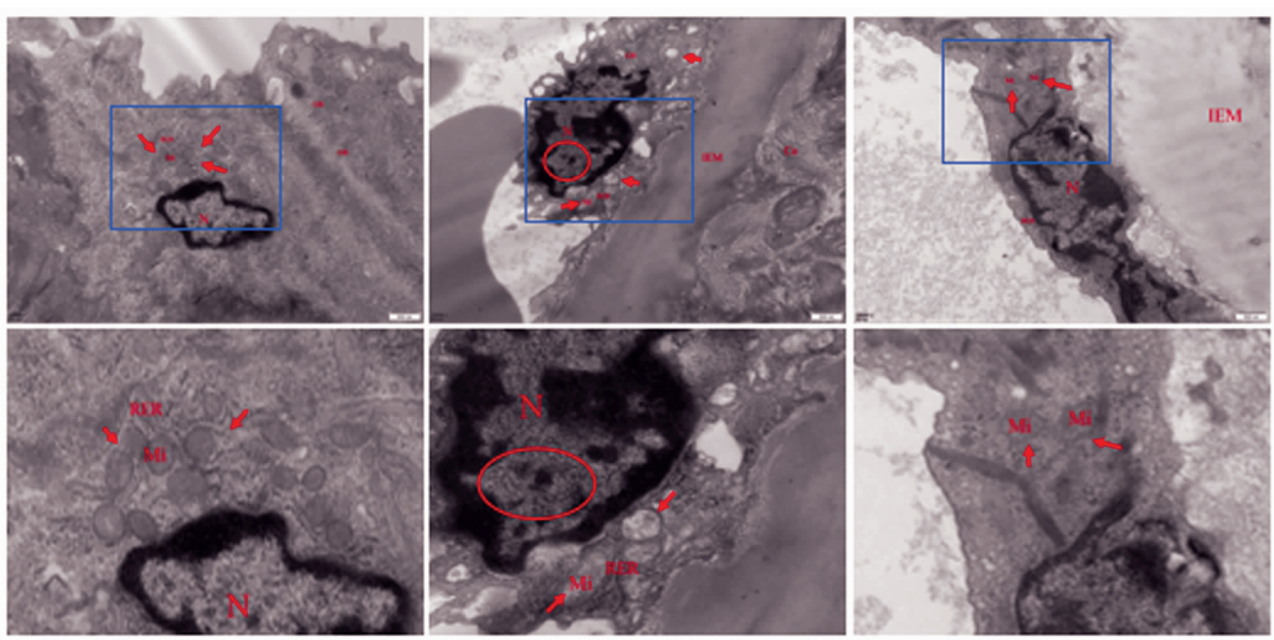
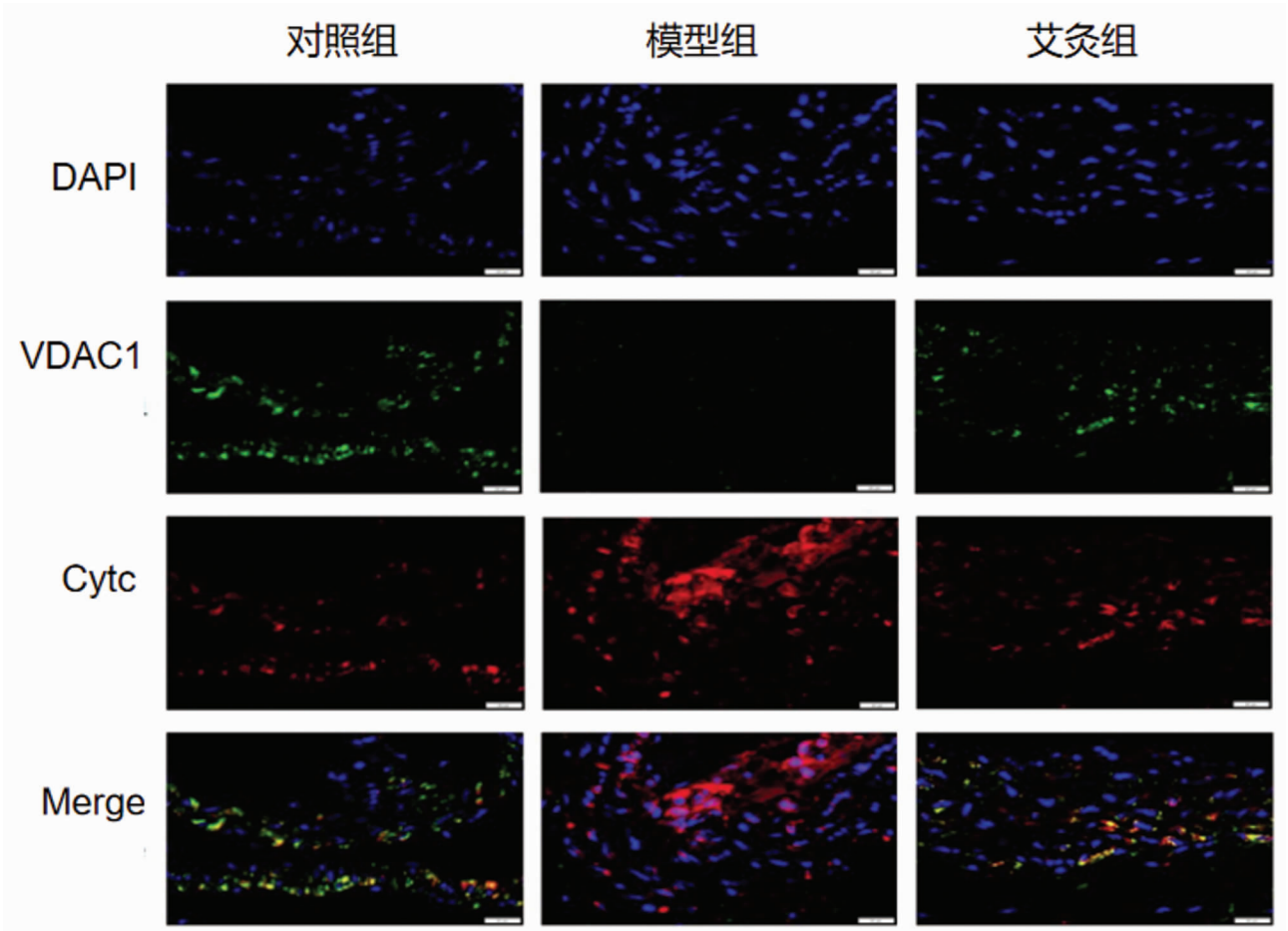
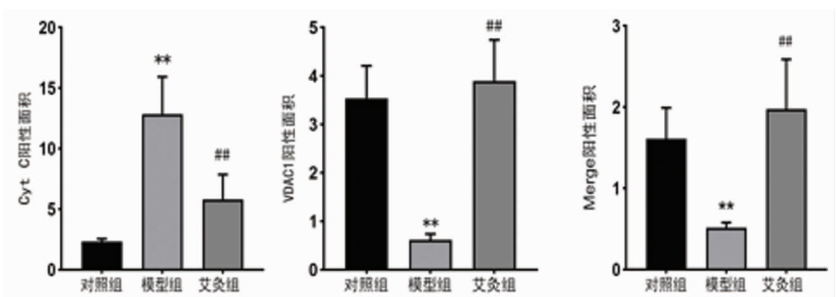


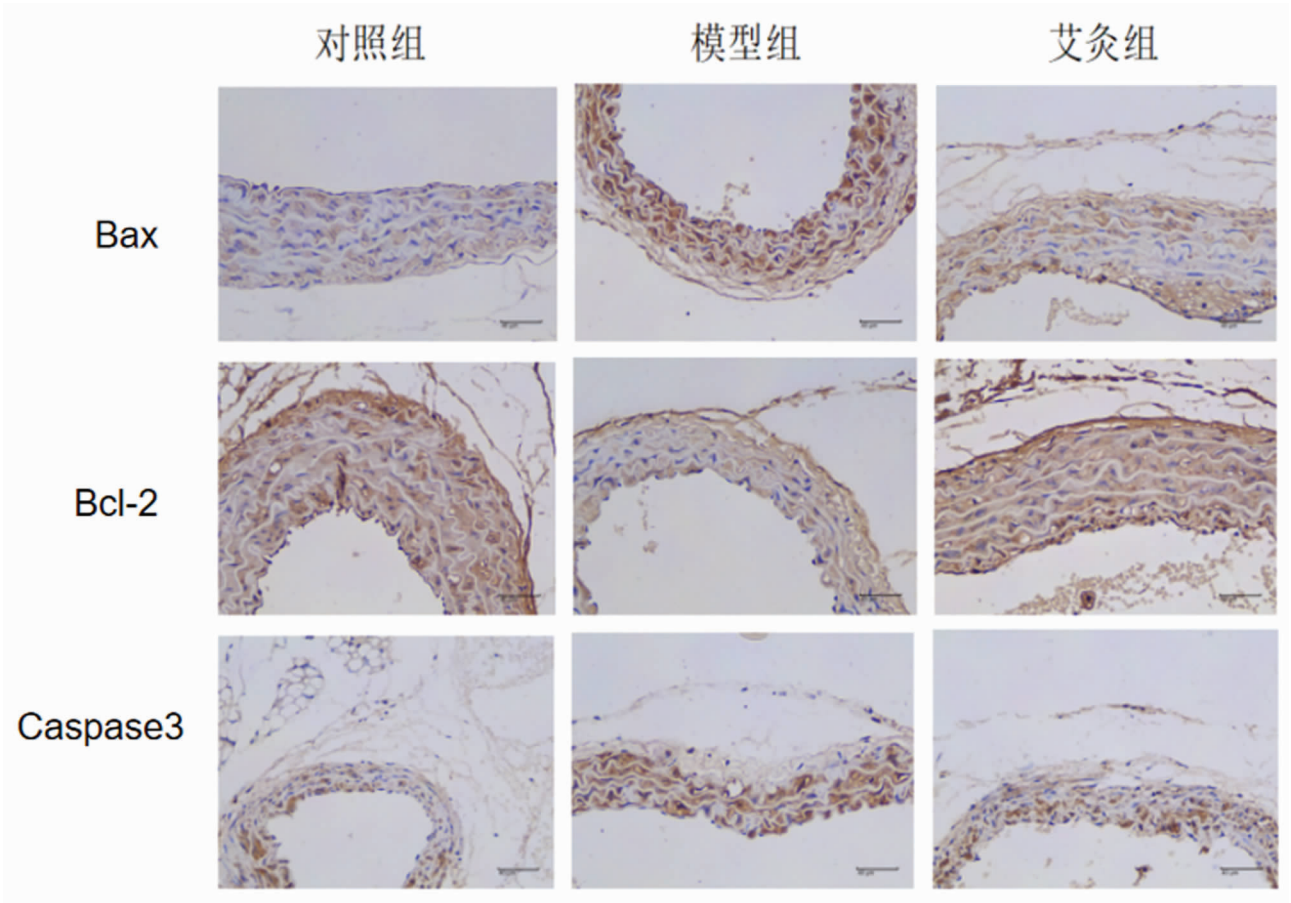
图 3　各组动脉粥样硬化小鼠胸主动脉线粒体形态图（透射电镜，×40 000）

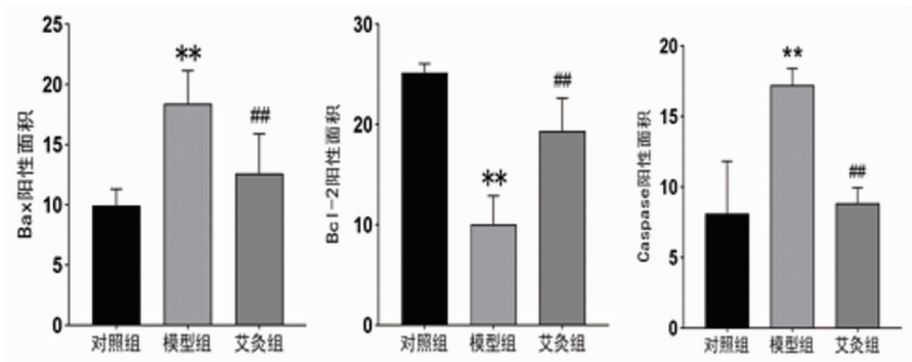




注:DAPI染细胞核为蓝色,VDAC1显出的阳性表达为绿色,Cystatin C显出的阳性表达为红色(×400)。**与对照组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$。

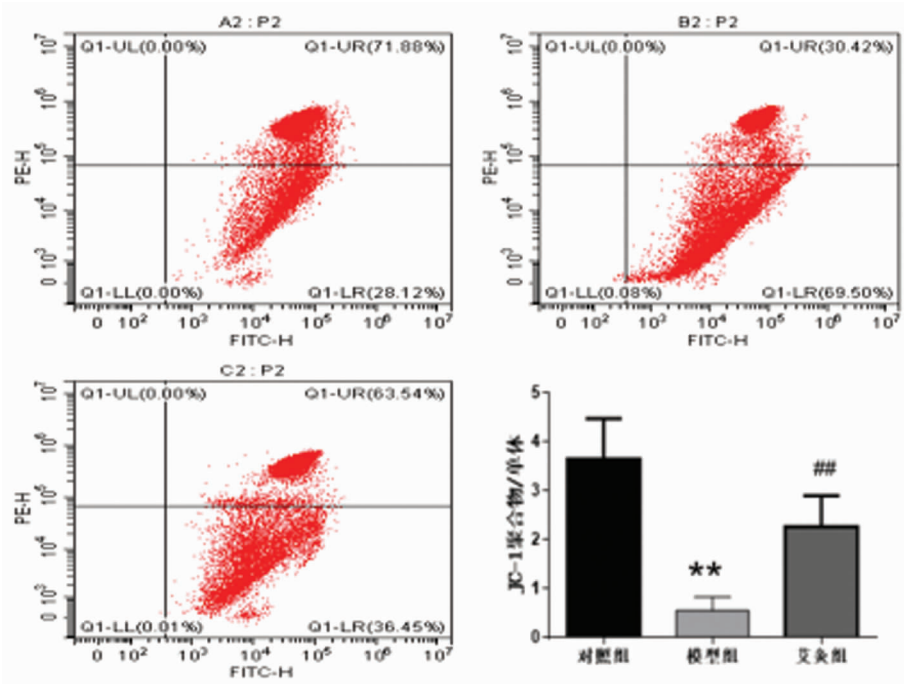
图5 各组动脉粥样硬化小鼠Cyt C蛋白含量比较





注：＊＊与对照组比较，$P<0.01$；##与模型组比较，$P<0.01$。

图6 各组动脉粥样硬化小鼠细胞凋亡水平对比（免疫组化）



注：**与对照组比较，$P < 0.01$；##与模型组比较，$P < 0.01$。

图 4　各组动脉粥样硬化小鼠胸主动脉线粒体膜电位水平比较

益气活血调脉汤联合胺碘酮对心房颤动患者伴快速心室率控制及心功能的影响

（正文见 70－74 页）

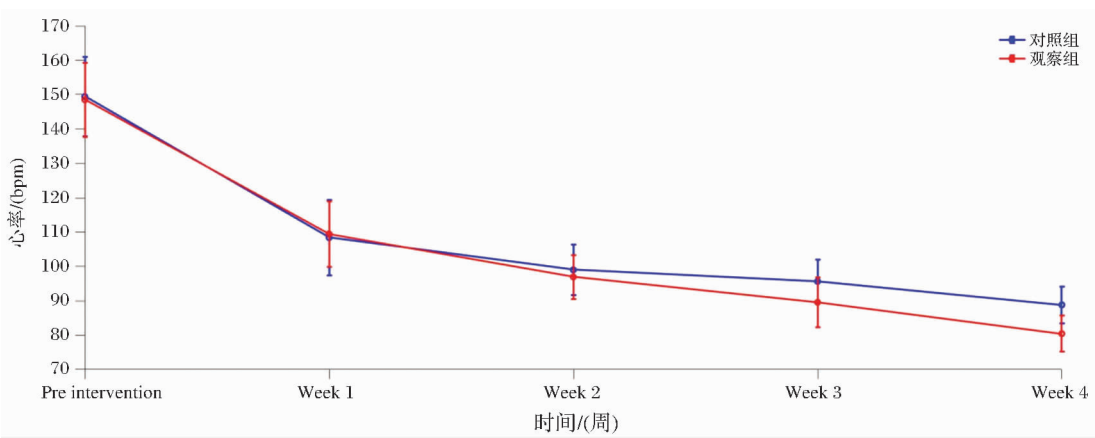


图 1　两组患者干预前后心率变化