

“温阳通脉”灸法通过PI3K/Akt/mTOR信号通路对ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠内皮功能的影响

朱 洲¹, 潘 莉¹, 闫朝勃², 张 宁¹, 杨志虹¹, 熊娇娇¹, 杨孝芳¹

(¹贵州中医药大学针灸推拿学院, 贵阳 550025; ²长沙市中医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的:研究“温阳通脉”灸法对动脉粥样硬化(AS)小鼠磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路及内皮功能相关因子的影响,探讨“温阳通脉”灸法通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路防治AS的可能机制。方法:将30只雄性ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、灸法组和灸法+激动剂组,每组10只,高脂饲料喂养12周复制AS模型。10只C57BL/6J雄性小鼠作为对照组,普通饲料喂养12周。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;灸法组在“膻中”“神阙”及双侧“内关”“血海”行灸法干预,每次30 min;灸法+激动剂组在灸前30 min给予腹腔注射740Y-P(5 μmol·kg⁻¹·d⁻¹)。以上各组均每周干预5 d,连续干预12周。观察小鼠一般情况及体质量;生化分析测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量;HE染色法观察小鼠胸主动脉病理形态;ELISA法检测小鼠血清中一氧化氮(NO)及内皮素-1(ET-1)含量;流式细胞术检测主动脉活性氧(ROS)含量;qPCR及Western blot法检测小鼠主动脉组织中PI3K、Akt、mTOR、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA及蛋白表达。结果:与对照组比较,模型组小鼠第8、12周体质量,血清TC、TG、LDL-C含量均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$),血清HDL-C、NO含量显著降低($P<0.01$);主动脉弓内壁不平整,内膜增厚,有“斑块”增生;血清ET-1含量,主动脉中ROS含量、mTOR mRNA表达,p-PI3K/PI3K、p-mTOR/mTOR蛋白表达比值显著升高($P<0.01$),主动脉中eNOS mRNA表达,eNOS蛋白表达量和p-Akt/Akt比值显著降低($P<0.01$, $P<0.05$)。与模型组比较,灸法组小鼠主动脉弓偶见少量内膜细胞脱落,未见明显病理变化,其余指标除HDL-C外均逆转($P<0.01$, $P<0.05$)。与灸法组相比,灸法+激动剂组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量显著增加($P<0.01$, $P<0.05$);主动脉弓见少量或极少量“斑块”增生,内膜偶见较少内皮细胞脱落;血清NO含量降低($P<0.05$),血清ET-1含量,主动脉中ROS含量,主动脉p-PI3K/PI3K、p-mTOR/mTOR蛋白表达比值显著增高($P<0.01$, $P<0.05$),主动脉eNOS mRNA表达,eNOS蛋白表达量及p-Akt/Akt比值显著降低($P<0.01$, $P<0.05$)。结论:“温阳通脉”灸法可降低ApoE^{-/-}AS小鼠体质量,改善血脂异常,修复内皮损伤,减轻AS症状,其机制可能与通过调节PI3K/Akt/mTOR信号通路进而影响氧化应激反应保护内皮功能有关。

【关键词】 “温阳通脉”灸法;动脉粥样硬化;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路;活性氧;内皮功能,氧化应激

Effect of “Wenyang Tongmai” moxibustion on endothelial function in ApoE^{-/-} atherosclerotic mice via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

ZHU Zhou¹, PAN Li¹, YAN Zhao-bo², ZHANG Ning¹, YANG Zhi-hong¹, XIONG Jiao-jiao¹, YANG Xiao-fang¹ (¹School of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; ²Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007)

【ABSTRACT】 **Objective** To observe the impact of “Wenyang Tongmai” (warming yang and unblocking vessels) moxibustion on Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20250195

引用格式:朱洲,潘莉,闫朝勃,等.“温阳通脉”灸法通过PI3K/Akt/mTOR信号通路对ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠内皮功能的影响[J].针刺研究,2026,51(5):583-592.

项目来源:国家自然科学基金项目(No.82160937,82360978);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础-ZK[2022]一般499)

通信作者:杨孝芳,E-mail:363110152@qq.com

mTOR) signaling pathway and endothelial function-related factors in ApoE^{-/-} mice with atherosclerosis (AS), so as to explore its potential mechanism underlying prevention and treatment of AS. **Methods** Thirty male ApoE^{-/-} mice were randomly assigned to three groups: model, moxibustion, and moxibustion plus PI3K agonist (moxibustion + agonist) groups, with 10 mice in each group. The AS model was established by feeding the mice with high-fat diet for 12 weeks. An additional 10 male C57BL/6J mice were used as the control group, and fed with a standard diet for 12 weeks. The interventions began on the first day of modeling. Rats of the control and model groups were only restrained for fixation. Moxibustion was applied to “Danzhong”(CV17), “Shenque”(CV8), bilateral “Neiguan”(PC6) and “Xuehai”(SP10) acupoints for 30 min per session. Mice of the moxibustion + agonist group received intraperitoneal injection of PI3K agonist 740Y-P (5 μmol·kg⁻¹·d⁻¹) 30 min before each moxibustion. The intervention was conducted 5 days per week for 12 consecutive weeks. General conditions and body weight of the mice were recorded. Biochemical analysis was performed to measure serum triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) contents. Histopathological changes in the thoracic aorta were observed via H. E. staining. The contents of serum nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) were detected using ELISA. The reactive oxygen species (ROS) content in the aorta was detected by flow cytometry. The Western blot and qPCR were employed to analyze the expression of PI3K, Akt, mTOR, and eNOS proteins and mRNA in the aortic tissue, respectively. **Results** Compared to the control group, the model group showed a significant increase in the body weight at week 8 and 12 after modeling ($P<0.05$), serum TC, TG, and LDL-C and ET-1 contents, and aorta ROS content, expression levels of mTOR mRNA, and, p-PI3K/PI3K and p-mTOR/mTOR ratios in the aorta tissue ($P<0.01$), and a significant decrease in the serum HDL-C and NO contents, and expression levels of eNOS mRNA and protein and p-Akt/Akt ratio in the aorta ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with the model group, the moxibustion intervention obviously lowered the body weight at week 8 and 12, contents of serum TC, TG, LDL-C, ET-1 and aorta ROS, and expression levels of mTOR mRNA and protein and p-PI3K/PI3K ratio ($P<0.01$, $P<0.05$), and evidently elevated serum NO content, expression of eNOS mRNA and protein and p-Akt/Akt ratio ($P<0.01$). Compared to the moxibustion group, the moxibustion+agonist group exhibited an evident elevation in the serum TC, TG, and LDL-C contents ($P<0.01$, $P<0.05$), ET-1, ROS contents and the ratio of p-PI3K/PI3K and p-mTOR/mTOR proteins ($P<0.01$, $P<0.05$), and a striking down-regulation in the content of NO, expression of eNOS mRNAs and proteins, and p-Akt/Akt ratio ($P<0.05$, $P<0.01$). Histopathological examination revealed uneven aortic inner walls, intimal thickening, and plaque proliferation in the model group, while minor intimal cell detachment in the aortic arch and no obvious lesions in the moxibustion group, and a small amount of “plaque” and hyperplasia in the aortic arch, and an occasional endothelial cell sloughing of the intima in the moxibustion+agonist group. **Conclusion** “Wenyang Tongmai” moxibustion can reduce body weight, alleviate dyslipidemia and mitigate AS symptoms in ApoE^{-/-} mice, which may be associated with its functions in inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, reducing oxidative stress and protecting the endothelial function.

【KEYWORDS】 “Wenyang Tongmai” moxibustion; Atherosclerosis; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; Reactive oxygen species; Endothelial function; Oxidative stress

动脉粥样硬化(AS)是心血管疾病(CVD)的主要病理基础,被称为损害人类健康的“头号杀手”,主要与慢性炎性反应及脂质沉积密切相关,具有高发病率和高死亡率的特点^[1-3]。目前研究^[4]表明,AS发病机制尚未明确,但多与炎性反应、脂质代谢、血管内皮功能障碍(ECD)、细胞自噬等密切相关,其中ECD是AS发病的始动因素。ECD作为AS早期即可出现的病理变化,不仅可增加脂质沉积和血管壁炎性反应风险,还会诱导平滑肌细胞迁移、血小板聚集和不稳定斑块形成等事件发生,而血管氧化应激是导致ECD的重要病理因素^[5-6]。因而,调控血管氧化应激修复血管内皮功能可作为防治AS的重

要方向。既往研究^[7]表明,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路与AS疾病密切相关,可通过影响氧化应激、炎性反应及凋亡等多种生物过程,从而干预AS的发生发展。选择性抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路可减轻氧化应激诱导的人冠状动脉ECD,发挥心血管保护作用。

艾灸作为中医学的重要外治法之一,具有“温通”“温补”之效,可有效改善AS病理变化,防治AS的发生^[8]。课题组前期研究证实“温阳通脉”灸法可有效改善ApoE^{-/-} AS小鼠血脂水平,调节血管氧化应激反应,从而逆转AS的发生发展^[8-9]。此外,

PI3K/Akt/mTOR信号通路也可通过影响氧化应激从而干预AS的发生发展。然而,“温阳通脉”灸法是否可通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路,改善氧化应激反应,从而减少ECD达到防治AS的目的尚未明确。因此,本实验将基于PI3K/Akt/mTOR信号通路观察“温阳通脉”灸法对ApoE^{-/-} AS小鼠ECD和氧化应激的影响,为“温阳通脉”灸法防治AS提供更多的实验基础与科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

10只C57BL/6J雄性小鼠,30只雄性ApoE^{-/-}小鼠,体质量(20±2)g,均购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,自由摄食和饮水,环境温度(22±1)℃,湿度(55±5)%,每日光照/黑暗各12h。适应性喂养1周后,将C57BL/6J小鼠作为对照组,30只ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、“温阳通脉”灸法组(以下简称灸法组)、灸法+PI3K激动剂组(以下简称灸法+激动剂组),每组10只。动物处理均依照科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》执行并通过贵州中医药大学动物伦理审查委员会批准(批号:20210147)。

1.2 主要试剂与仪器

总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(深圳迈瑞),苏木精染液(武汉赛维尔),伊红染液(合肥博美),一氧化氮(NO)测定试剂盒(南京建成),内皮素-1(ET-1)ELISA试剂盒(上海茁彩),活性氧(ROS)探针、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天),740Y-P(合肥Biosharp),内皮型一氧化氮合酶(eNOS)抗体(美国Abcam),磷酸化(p)-Akt、mTOR、PI3K抗体(美国Proteintech), α -actin、Akt抗体(武汉Abclonal),p-mTOR抗体(成都正能),p-PI3K抗体(美国genetex),二抗(武汉Servicebio),清艾条(0.4 cm×12 cm,临湘湖香艾)。

电子天平(美国康州HZ),徠卡-2016转轮式切片机(德国徠卡),自动脱水机(武汉俊杰),RS36型全自动染色机(常州派斯杰),Pannoramic250数字切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH),C2500低温离心机(湖南湘仪),SpectraMAX Plus384酶标仪(上海美谷),KZ-III-F高速低温组织研磨仪(武汉赛维尔),QuantStudio TM3实时荧光定量PCR仪(美国ThermoFisher),JY200C电泳仪(北京君意东方),

TY-80A水平脱色摇床(江苏科析),5200化学发光凝胶成像仪(上海天能),Image J软件(美国NIH),兽用生化分析仪(深圳迈瑞),PVDF膜(美国Millipore),显微镜(厦门麦克奥迪),转膜仪(上海翌圣),流式细胞仪(美国Beckman)。

1.3 模型制备

参照团队既往研究^[10]方法造模:30只ApoE^{-/-}小鼠用高脂饲料(含基础饲料78.85%,猪油21%,胆固醇0.15%)持续喂养12周以复制AS模型。造模后HE染色观察到小鼠主动脉处呈现血管内膜粗糙、血管壁增厚、管腔狭窄、斑块形成等病理改变,证明造模成功^[11]。

1.4 干预方法

灸法组:造模第1天开始,取小鼠“膻中”“神阙”及双侧“内关”“血海”进行艾灸治疗,腧穴定位依据《实验动物常用穴位名称与定位 第3部分:小鼠》^[12]。将小鼠固定于束缚板,采用自制艾灸架将充分燃烧的艾条固定于小鼠穴位正上方,施灸距离为3~4 cm,在施灸过程中应及时调整艾条与小鼠皮肤的距离,每次每穴艾灸30 min,每日1次,每周连续干预5 d,休息2次,共治疗12周。

灸法+激动剂组:在灸前30 min,行腹腔注射PI3K激动剂740Y-P(5 μ mol·kg⁻¹·d⁻¹)^[13],艾灸治疗同灸法组,共干预12周。

对照组与模型组给予灸法组和灸法+激动剂组相同固定方法和固定时间,但不干预。

1.5 观察指标及检测方法

小鼠一般情况及体质量检测:每日观察小鼠存活率、皮毛光泽度,精神状态,活动度及其他症状,同时记录小鼠体质量。

取材:干预结束后,小鼠禁食不禁水24 h后开始取材,予小鼠1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,摘除小鼠眼球,取血0.5~1 mL,室温静置1 h后4℃离心10 min,收集血清于-20℃冻存待测。取血后快速打开小鼠胸腹腔,分离主动脉,一部分主动脉弓于10%多聚甲醛溶液中固定,剩余一部分放入液氮中速冻,然后放入-80℃冻存,用于后续实验。

小鼠血清血脂含量检测:采用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清TG、TC、LDL-C和HDL-C含量,其中TC、TG含量采用甘油磷酸氧化酶-过氧化物酶法测定,HDL-C含量采用磷酸钨沉淀法测定,LDL-C含量则采用聚乙烯硫酸沉淀法测定。

HE染色法观察小鼠胸主动脉弓病理形态:将固定组织修剪后进行脱水、石蜡包埋及切片处理

(厚 5 μm)。按照 HE 染色法流程对切片进行脱蜡复水,苏木精染色,伊红复染,二甲苯透明,中性树脂封片等操作。于光镜下观察小鼠主动脉弓组织病理形态。

ELISA 法检测小鼠血清中 NO、ET-1 含量:取冻存血清,复温后,按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。在酶标仪 450 nm 处测得各孔吸光度值,根据标准品吸光度值绘制标准曲线,计算样本中 ET-1、NO 含量。

流式细胞术法检测小鼠主动脉活性氧(ROS)含量:取每组 6 只小鼠主动脉组织于直径 60 mm 装有 2 mL 预冷 PBS 的玻璃平皿中漂洗干净后,用眼科剪剪成小块后将组织研磨,收集细胞悬液用 200 目细胞筛过滤,300×g 离心 5 min,弃上清,经 PBS 洗涤后,加入 3 倍体积的红细胞裂解液室温裂解 5 min,离心收集细胞沉淀。按照 1:1 000 的比例用无血清培养液稀释 DCFH-DA 探针(浓度 10 μmol/L),在每管样品中加入 1 mL 的 DCFH-DA 稀释液,37℃ 细胞培养箱内温育 20 min,每隔 3~5 min 颠倒混匀,使探针和细胞充分接触后,350×g 离心 5 min,弃上清,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。最后使用流式细胞仪检测 ROS 含量,使用 CytExpert 软件分析流式数据。

qPCR 法检测小鼠主动脉 PI3K、Akt、mTOR 及 eNOS mRNA 表达:取每组 6 只小鼠 10~20 mg 冻存的主动脉组织加入 350 μL 裂解液研磨捣碎后,将研磨匀浆液移至装有 DNA 清除/RNA 吸附通用柱上(柱子放在 2 mL 收集管内),离心 1 min,收集含 RNA 的滤液,将 DNA 清除/RNA 吸附通用柱放入 1.5 mL 离心管中,在膜中央加入 30~50 μL RNase-free H₂O,室温放置 1 min 后,离心 1 min,得到 RNA 滤液。进行基因组 DNA 去除反应、反转录反应并通过 PCR 反应体系进行扩增。PCR 反应体系:Tli RNaseH Plus 10 μL,对应基因上下游引物(引物序列见表 1)各 0.8 μL,Template(DNA) 2 μL,ddH₂O 6.4 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 30 s;95℃ 变性 5 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 充分延伸 30 s,共 45 个循环。最终得到检测样本相应 Ct 值,以 2^{-ΔΔCt} 法计算样本中目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

Western blot 法检测小鼠主动脉组织 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 比值及 eNOS 蛋白表达:取每组 6 只小鼠冻存主动脉组织 10~20 mg,经 RIPA 裂解液进行匀浆裂解,4℃ 离心 10 min 后取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度,其后进行蛋白变

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
Akt	上游 TGCACAAACGAGGGGAATATAT	88
	下游 CGTTCCTTGTAGCCAATAAAGG	
eNOS	上游 CTGAGAGCCTGCAATTACTACC	81
	下游 TTTCCACAGAGAGGATTGTAGC	
mTOR	上游 CTGATCCTCAACGAGCTAGTTC	112
	下游 GGTCTTTGCAGTACTTGTTCATG	
PI3K	上游 AAACAAAGCGGAGAACCCTATTG	125
	下游 TAATGACGCAATGCTTGACTTC	
β-actin	上游 CTACCTCATGAAGATCCTGACC	90
	下游 CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC	

注:Akt 为蛋白激酶 B,eNOS 为内皮型一氧化氮合酶,mTOR 为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,PI3K 为磷脂酰肌醇 3-激酶。

性、电泳、转膜、封闭、一抗孵育(p-Akt 1:1 000,Akt 1:2 000,mTOR 1:5 000,PI3K 1:1 000,p-mTOR 1:1 000,p-PI3K 1:1 000,e-NOS 1:1 000,α-actin 1:2 000)、二抗孵育(1:5 000 稀释)。ECL 发光液滴加到 PVDF 膜上,反应 1 min 后,放入化学发光凝胶成像仪暗室中,使用 GIS 机箱控制软件 V2.0 进行曝光扫描,Image J 软件读取条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量,并以对照组为对照进行归一化处理。

1.6 统计学处理

用 SPSS26.0 统计软件进行统计分析。数据符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 One-Way ANOVA 检验,进一步两两比较方差齐采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况及体质量比较

实验开始前,各组小鼠皮毛光亮润泽、反应灵活、活泼好动、进食正常。12 周干预结束后,对照组小鼠未见明显异常;模型组小鼠毛色黯淡,反应灵活度欠佳,精神状态较差,活动量减少,进食尚可;灸法组、灸法+激动剂组小鼠毛色稍暗,精神状态尚可,反应灵敏度及活动量一般,食欲未见明显异常。

各时间点组间比较,第0周和第4周,各组小鼠体质量比较差异无统计学意义;第8周及第12周,与对照组相比,模型组小鼠体质量显著增加($P < 0.05$),与模型组比较,灸法组、灸法+激动剂组小鼠体质量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$)。见图1。

2.2 各组小鼠血清TC、TG、LDL-C、HDL-C含量比较

与对照组比较,模型组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量均显著升高($P < 0.01$),HDL-C含量显

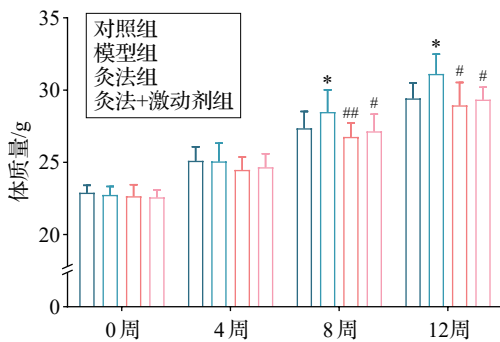
著降低($P < 0.01$);与模型组比较,灸法组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);与灸法组比较,灸法+激动剂组小鼠血清TC、TG、LDL-C含量显著升高($P < 0.01, P < 0.05$)。见图2。

2.3 各组小鼠主动脉弓病理形态比较

对照组小鼠主动脉弓结构完整,内膜、中膜和外膜结构完整清晰,血管内皮细胞较为完整,内皮细胞呈扁平状,紧贴内弹性膜,胞核呈长梭形,未见明显AS病变特征。模型组小鼠主动脉弓内壁不平整,内膜增厚,中膜结构紊乱,可见“斑块”增生,少量内膜细胞脱落。干预后,灸法组小鼠主动脉弓偶见少量内膜细胞脱落;中膜层含丰富的弹性纤维和平滑肌细胞,未见明显病理改变。灸法+激动剂组小鼠主动脉弓可见少量或极少量“斑块”增生,内膜偶见较少内皮细胞脱落。见图3。

2.4 各组小鼠血清中NO、ET-1含量比较

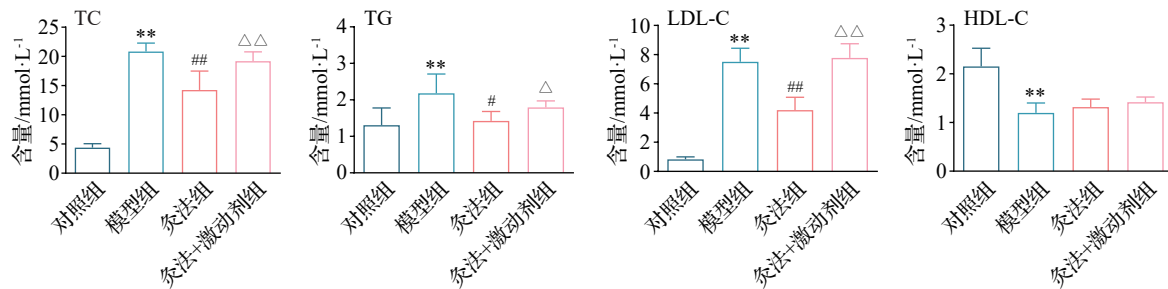
与对照组比较,模型组小鼠的血清NO含量显著降低($P < 0.01$),ET-1含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,灸法组小鼠的血清NO含量显著升高($P < 0.01$),而血清ET-1含量显著降低($P < 0.01$);与灸法组比较,灸法+激动剂组小鼠血清NO含量下降($P < 0.05$),ET-1含量显著增加($P < 0.01$)。见图4。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠体质量比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)

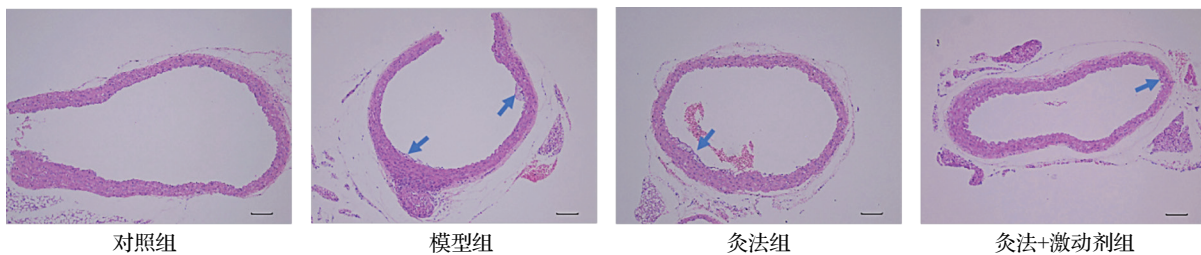
Fig. 1 Comparison of body weight of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 10 mice/group)



注:TC为总胆固醇,TG为甘油三酯,LDL-C为低密度脂蛋白胆固醇,HDL-C为高密度脂蛋白胆固醇。与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与灸法组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$ 。

图2 各组小鼠血清TC、TG、LDL-C、HDL-C含量的比较($\bar{x} \pm s$, 10只鼠/组)

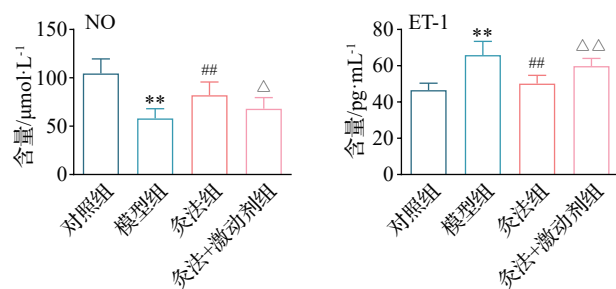
Fig. 2 Comparison of serum TC, TG, LDL-C, and HDL-C contents of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 10 mice/group)



注:标尺=100 μm。蓝色箭头示变性的主动脉病理结构。

图3 各组小鼠胸主动脉病理形态比较(HE染色)

Fig. 3 Comparison of pathological morphology of thoracic aorta of mice in the 4 groups (HE staining)



注:NO为一氧化氮,ET-1为内皮素-1。与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与灸法组比较, $\Delta P < 0.05$,
 $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图4 各组小鼠血清中NO、ET-1含量的比较($\bar{x} \pm s$,10只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of serum NO and ET-1 contents of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$,10 mice/group)

2.5 各组小鼠主动脉组织ROS含量比较

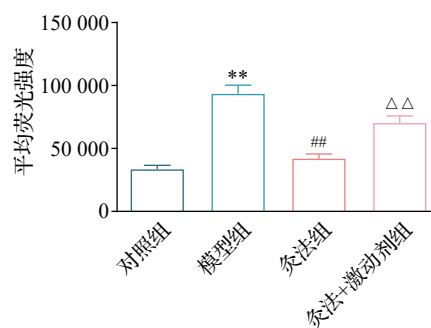
与对照组比较,模型组小鼠主动脉中ROS含量显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,灸法组小鼠主动脉中ROS含量显著减少($P < 0.01$);与灸法组比较,灸法+激动剂组小鼠主动脉中ROS含量显著增加($P < 0.01$)。见图5。

2.6 各组小鼠主动脉组织PI3K、Akt、mTOR及eNOS mRNA表达比较

与对照组比较,模型组小鼠主动脉中mTOR mRNA表达显著增加($P < 0.01$),eNOS mRNA表达显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,灸法组mTOR mRNA表达显著减少($P < 0.05$),eNOS mRNA表达显著增加($P < 0.01$);与灸法组比较,灸法+激动剂组小鼠mTOR mRNA表达差异无统计学意义,eNOS mRNA表达显著减少($P < 0.01$)。各组PI3K、Akt mRNA表达差异无统计学意义。见图6。

2.7 各组小鼠主动脉组织p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR比值及eNOS蛋白表达比较

与对照组相比,模型组小鼠p-PI3K/PI3K、



注:ROS为活性氧。与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与灸法组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

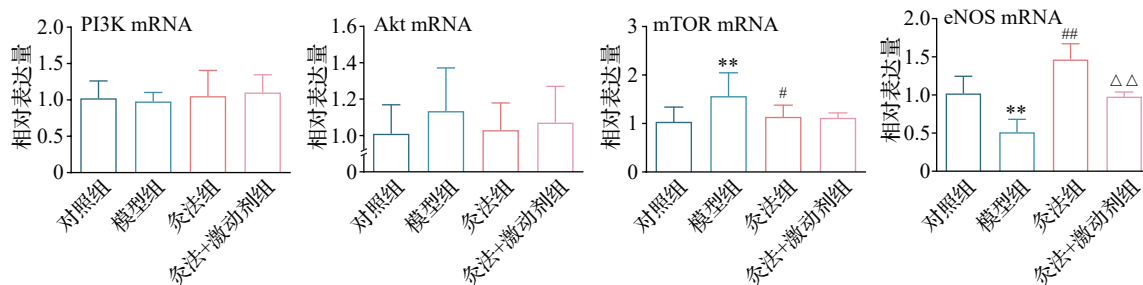
图5 各组小鼠主动脉组织中ROS含量的比较($\bar{x} \pm s$,6只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of ROS contents in thoracic aorta of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$,6 mice/group)

p-mTOR/mTOR蛋白表达比值显著增加($P < 0.01$),p-Akt/Akt蛋白比值、eNOS蛋白表达水平显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$);与模型组相比,灸法组小鼠p-PI3K/PI3K、p-mTOR/mTOR蛋白表达比值显著减少($P < 0.01$),p-Akt/Akt蛋白比值、eNOS蛋白表达水平显著增加($P < 0.01$);与灸法组相比,灸法+激动剂组小鼠p-PI3K/PI3K、p-mTOR/mTOR蛋白表达比值显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),主动脉中p-Akt/Akt蛋白比值、eNOS蛋白表达水平显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图7。

3 讨论

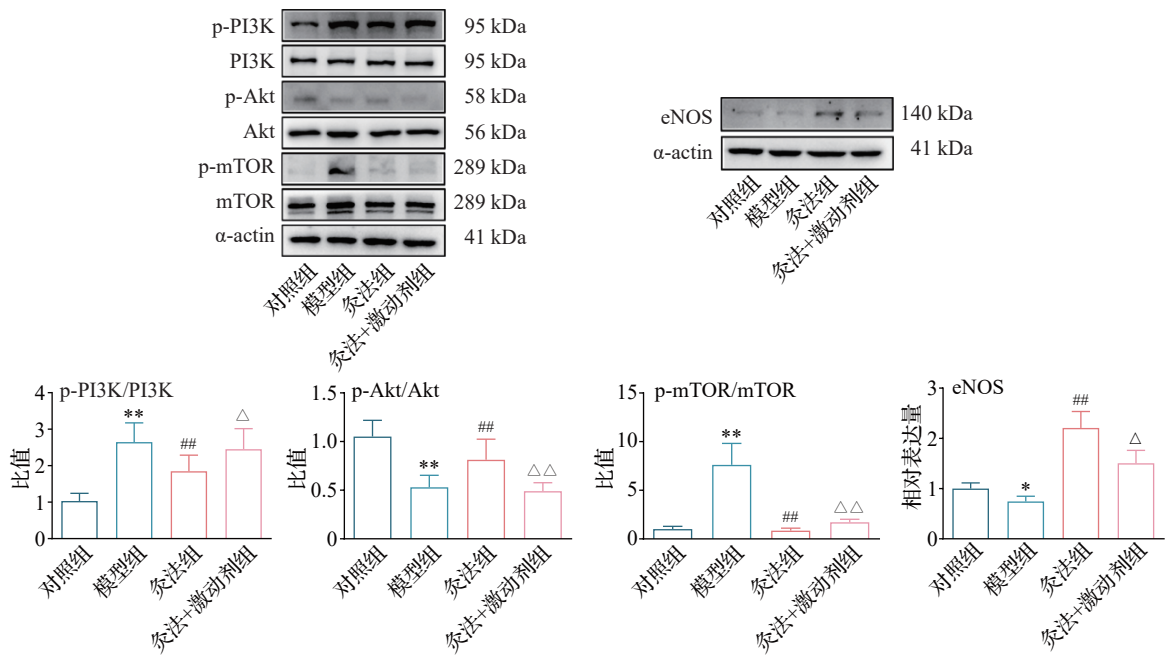
AS属中医学“真心痛”“胸痹”“脉阻”等范畴。中医学认为AS是虚实错杂类疾病,其病因涉及“寒”“痰”“瘀”“虚”。血得温则行,得寒则凝,寒邪是AS发病过程的重要病理因素,艾灸具有“温补”及“温通”双重效应,可延缓机体衰老^[14]、温经散寒、活血通脉,有效针对阳虚和痰浊血瘀之证。本研究



注:PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,Akt为蛋白激酶B,mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,eNOS为内皮型一氧化氮合酶。与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与灸法组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图6 各组小鼠主动脉组织中PI3K、Akt、mTOR及eNOS mRNA表达的比较($\bar{x} \pm s$,6只鼠/组)

Fig. 6 Comparison of mRNA expression levels of PI3K, Akt, mTOR, and eNOS in thoracic aorta of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$,6 mice/group)



注:PI3K为磷脂酰肌醇3-激酶,Akt为蛋白激酶B,mTOR为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白,eNOS为内皮型一氧化氮合酶。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与灸法组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$ 。

图7 各组小鼠主动脉组织中PI3K、Akt、mTOR及eNOS蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$,6只鼠/组)

Fig. 7 Comparison of protein expression levels of PI3K, Akt, mTOR, and eNOS in thoracic aorta of mice in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 6 mice/group)

“温阳通脉”灸法选穴为膻中、神阙、内关(双侧)、血海(双侧)。内关为心包经络穴,可通调三焦气机,行郁滞之气;膻中为八会穴之气会,具有宽胸理气、行气疏肝、活血化瘀之效;“血海者,是心生血、肝藏血、肾助血,三阴并行,通血之要路”,故艾灸血海可达滋养肝血,促进肝气疏泄的功效;神阙为任脉要穴,可增强周身气机,促进痰瘀消散。四穴合用,可共奏行气、益气、温气的治疗效果,进而达到调气行血,温阳健脾、化瘀通脉之效。本研究结果显示,艾灸上述诸穴能够显著改善ApoE^{-/-} AS小鼠一般情况、体质量,调节血脂水平及主动脉组织病理变化,与课题组前期研究^[8]结果一致。

ECD是AS发病的始动因素。自“内皮损伤反应”学说提出以来,ECD与AS的相关性逐步得到广泛证实^[15]。ECD是指血管内皮细胞不能维持血管内稳态的病理过程,包括形态及结构两方面的改变,其中血管舒张因子及收缩因子表达失衡是ECD的重要病理特征。血管舒张因子NO可在内皮细胞损伤时,发挥保护作用^[16]。ECD会导致内皮收缩因子ET-1水平升高,发生严重的血管收缩,最终导致AS发生^[17]。研究显示,ET-1与NO表达呈负相关,两者失衡会导致全身微循环障碍、血小板异常黏附、炎性因子释放、内皮细胞渗透性增加,进而导致

AS发生^[16,18-19]。eNOS是NO合成的关键酶,可有效调节NO的生成,从而维持血管功能^[20]。研究^[21-22]表明,ROS作为重要的氧化应激标志物,当机体处于氧化应激状态时,会生成大量ROS以抑制eNOS的表达,从而导致NO水平的降低,引起NO与ET-1失衡,导致AS的发生发展。本研究结果表明,与对照组相比,模型组AS小鼠主动脉ROS含量显著升高,主动脉eNOS mRNA及蛋白表达显著降低,血清NO含量显著降低,血清ET-1含量显著升高。干预后,与模型组相比,灸法组ROS含量显著降低,eNOS mRNA及蛋白表达显著升高,NO含量显著升高,ET-1含量显著降低,AS程度得到缓解,提示“温阳通脉”灸法可有效调节AS小鼠主动脉氧化损伤,促进内皮功能损伤的修复,延缓AS疾病进展。

近年来,大量研究^[23-24]显示,PI3K/Akt/mTOR信号通路在AS疾病进展中发挥关键作用,其激活可在内皮氧化应激反应的调控中发挥关键作用。PI3K被激活后会导导致3,4-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP₂)转变为3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP₃),而PIP₃作为第二信使与3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1结合后,再与细胞内含有PH结构的Akt信号蛋白相互结合,导致Akt在苏氨酸308处和丝氨酸473处发生磷酸化,进而导致Akt被激活。活化的Akt再继续

靶向调控下游 mTOR、AMPK 等信号分子,从而参与细胞增殖、血管生成、侵袭、氧化应激和迁移等生物过程^[25]。研究证实,PI3K/Akt/mTOR 信号通路被激活后可调节机体还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶活性^[26],从而影响 ROS 生成,使 eNOS 表达降低,导致 NO 水平降低,氧化应激反应加剧导致 AS 内皮功能损伤。既往研究^[27]也证实,青蒿素可通过 PI3K/Akt 途径抑制 ROS 的聚集及丙二醛的活性,同时增加 eNOS 及 NO 的生成,进而改善氧化应激诱导的内皮依赖性血管舒张损伤,改善血管内皮功能。本研究结果显示,模型组小鼠主动脉中 PI3K 磷酸化水平增加的同时,Akt 磷酸化受到抑制,mTOR 磷酸化水平升高,主动脉中 ROS 含量增加,并且主动脉中 eNOS 表达及血清中 NO 含量减少,血清中 ET-1 含量增加,说明 AS 时 PI3K、Akt、mTOR 表达的变化可能会影响氧化应激反应,从而造成血管内皮功能损伤。模型组 Akt 磷酸化程度反而下降,可能与 mTOR 激活后导致 Akt 被抑制的负反馈环路相关^[28-29]。干预后,灸法组小鼠主动脉中 PI3K、mTOR 磷酸化水平较模型组降低,主动脉中 ROS 含量降低,并且主动脉中 eNOS 表达及血清中 NO 含量增加,血清中 ET-1 含量降低,提示“温阳通脉”灸法可通过调控 PI3K、Akt、mTOR 的表达,抑制 ROS 的生成,修复机体氧化损伤,保护血管功能,从而延缓 AS 的进展。

740Y-P 作为 PI3K 激动剂,可特异性促进 PI3K 磷酸化为 p-PI3K,从而激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,以发挥调控细胞代谢、血管生成、氧化应激等作用^[13,30-32]。本研究通过使用 740Y-P 旨在验证灸法通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路从而改善 AS 的潜在机制。本研究结果显示,腹腔注射 740Y-P 后行艾灸干预,与灸法组比较,灸法+激动剂组小鼠 PI3K 和 mTOR 磷酸化水平升高,Akt 磷酸化水平降低,主动脉中 ROS 含量增加,eNOS 表达及血清中 NO 含量减少,ET-1 含量增加,同时血清 TC、TG 及 LDL-C 含量进一步增加,主动脉弓内皮细胞肿胀加重。在注射 740Y-P 后,灸法+激动剂组主动脉弓仍有少量斑块增生且血脂水平等较模型组无统计学意义,说明灸法对于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的抑制作用在注射 740Y-P 后减弱。提示腹腔注射 740Y-P 后,“温阳通脉”灸法未能有效发挥调节血脂水平、调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路、改善机体氧化应激、修复内皮功能的功效。进一步证实了“温阳通脉”灸法可能通过调节 PI3K/Akt/

mTOR 信号通路影响氧化应激及内皮细胞因子表达以干预 AS 的进展。下一步我们将进一步研究“温阳通脉”灸法调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的具体作用机制及其影响 AS 进展的相关因素,更进一步证实灸法通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对 AS 的影响。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] ZHU Y H, XIAN X M, WANG Z Z, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): 80.
- [2] DING Y Y, SUN Y, WANG H Y, et al. Atherosclerosis-associated lnc_000048 activates PKR to enhance STAT1-mediated polarization of THP-1 macrophages to M1 phenotype [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(11): 2488-2498.
- [3] YANG M Q, JIAO H C, LI Y, et al. Guanmaitong granule attenuates atherosclerosis by inhibiting inflammatory immune response in ApoE^{-/-} mice fed high-fat diet [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 3145-3168.
- [4] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments[J]. *Cell*, 2022, 185(10): 1630-1645.
- [5] HOUGLUGT A, KLATT O, HUVENEERS S. Vascular stiffening and endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2022, 33(6): 353-363.
- [6] BATTY M, BENNETT M R, YU E. The role of oxidative stress in atherosclerosis [J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3843.
- [7] 杜天依, 鞠建庆, 曲华, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在动脉粥样硬化中作用及中药干预研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(11): 1401-1405.
DU T Y, JU J Q, QU H, et al. Research progress of PI3K/Akt/mTOR signal pathway in atherosclerosis and intervention of traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2022, 42(11): 1401-1405.
- [8] 熊娇娇, 伍先明, 闫朝勃, 等. 基于 SIRT1/FOXO3a 信号通路探讨“温阳通脉”灸法对 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠炎症反应的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2024, 41(9): 2410-2417.
XIONG J J, WU X M, YAN C B, et al. Effect of “Wenyang Tongmai” moxibustion on the inflammatory response of ApoE^{-/-} atherosclerotic mice based on the SIRT1/FOXO3a signaling pathway (in Chinese) [J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 41(9): 2410-2417.
- [9] 闫朝勃, 伍先明, 张宁, 等. 艾灸对 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠 SIRT1/FOXO3a 信号通路的影响 [J]. *针刺研究*, 2024,

- 49(4): 376-383.
- YAN Z B, WU X M, ZHANG N, et al. Effect of moxibustion on the SIRT1/FOXO3a signaling pathway in ApoE^{-/-} mice with atherosclerosis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(4): 376-383.
- [10] 伍先明. 基于P2Y2受体调控SIRT1/FOXO3a信号通路探讨艾灸对ApoE^{-/-}小鼠血管内皮功能的影响及机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2023.
- WU X M. Exploration of the effect and mechanism of moxibustion on vascular endothelial function in ApoE^{-/-} mice based on P2Y2 receptor regulating the SIRT1/FOXO3a signaling pathway (in Chinese) [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2023.
- [11] CUI Y X, LIU J T, HUANG C, et al. Moxibustion at CV4 alleviates atherosclerotic lesions through activation of the LXR α /ABCA1 pathway in apolipoprotein-E-deficient mice [J]. *Acupunct Med*, 2019, 37(4): 237-243.
- [12] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第3部分: 小鼠[J]. 针刺研究, 2021, 46(5): 445-446.
- China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 3: mice (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2021, 46(5): 445-446.
- [13] 周朝霞, 张骥, 赵媛, 等. 芍药苷通过调控PI3K/AKT/mTOR信号通路对盐敏感性高血压大鼠血压和血管内皮功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(8): 1403-1408, 1432.
- ZHOU Z X, ZHANG J, ZHAO Y, et al. Effects of paeoniflora on blood pressure and vascular endothelial function in salt-sensitive hypertensive rats by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease*, 2024, 22(8): 1403-1408, 1432.
- [14] 李怡, 李学智, 廖冬梅, 等. 基于MCP-1/MMP-2/TGF- β 1局部促炎信号环探讨温和灸对老年大鼠血管衰老的干预作用[J]. 针刺研究, 2022, 47(4): 290-297.
- LI Y, LI X Z, LIAO D M, et al. Effect of mild moxibustion on vascular aging in senescence rats based on local MCP-1/MMP-2/TGF- β 1 pro-inflammatory signal loop (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2022, 47(4): 290-297.
- [15] GIMBRONE M A Jr, GARCÍA-CARDEÑA G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-636.
- [16] 王磊, 方叶青, 艾文, 等. 干细胞生长因子对动脉粥样硬化大鼠NO、ET-1、MMP-9的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(19): 4823-4826.
- WANG L, FANG Y Q, AI W, et al. Effects of stem cell growth factor on NO, ET-1 and MMP-9 in atherosclerotic rats (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2022, 42(19): 4823-4826.
- [17] 於永婷, 李玉堂, 张志超, 等. 谷红注射液联合前列地尔治疗急性大面积脑梗死并发脑心综合征疗效及对血浆ET-1、NO及8-iso-PGF2 α 的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(22): 2440-2443.
- YU Y T, LI Y T, ZHANG Z C, et al. Therapeutic effect of Guhong injection combined with alprostadil on acute massive cerebral infarction complicated with brain-heart syndrome and its influence on plasma ET-1, NO and 8-iso-PGF2 α (in Chinese) [J]. *Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2017, 26(22): 2440-2443.
- [18] ARIFA R D N, MADEIRA M F M, DE PAULA T P, et al. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(7): 2023-2034.
- [19] WU X M, ZHANG N, LI J S, et al. Purinergic receptors mediate endothelial dysfunction and participate in atherosclerosis [J]. *Purinergic Signal*, 2023, 19(1): 265-272.
- [20] 王家兴, 史奇, 武权生. 加味少腹逐瘀汤介导VEGF/PI3K/Akt/eNOS信号通路抑制子宫内膜异位症血管生成的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(7): 81-90.
- WANG J X, SHI Q, WU Q S. Modified Shaofu Zhuyutang mediates VEGF/PI3K/Akt/eNOS signaling pathway to inhibit angiogenesis in endometriosis (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2025, 31(7): 81-90.
- [21] 程陈, 张静, 黄萃园, 等. 组蛋白修饰与血管内皮功能失调关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(13): 3318-3323.
- CHENG C, ZHANG J, HUANG C Y, et al. Research progress on the relationship between histone modification and vascular endothelial dysfunction (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2024, 44(13): 3318-3323.
- [22] 丘雨旻, 陈曦, 张建宁, 等. NAD⁺激活SIRT3/IDH2信号通路改善高血压血管内皮功能障碍[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2025, 46(1): 70-80.
- QIU Y M, CHEN X, ZHANG J N, et al. NAD⁺ ameliorates endothelial dysfunction in hypertension via activation of SIRT3/IDH2 signal pathway (in Chinese)[J]. *Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences)*, 2025, 46(1): 70-80.
- [23] 王和峰, 翟纯刚, 庞文会, 等. PI3K/Akt/mTOR信号通路在巨噬细胞自噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 390-397.
- WANG H F, ZHAI C G, PANG W H, et al. Roles of PI3K/

- Akt/mTOR signaling pathway in macrophage autophagy and atherosclerotic plaque instability (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2013, 29(3): 390-397.
- [24] 彭涵, 易洪芬, 陈昕羽, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔 PI3K/AKT/mTOR 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2024, 41(7): 1839-1844.
- PENG H, YI H F, CHEN X Y, et al. Effect of herbal cake-separated moxibustion on the expression of PI3K/AKT/mTOR in atherosclerotic rabbits (in Chinese) [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2024, 41(7): 1839-1844.
- [25] CHEN H X, ZHOU L, WU X R, et al. The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2016, 21(5): 1084-1091.
- [26] 赵雪颖, 张立媛, 王育文. 血小板与中性粒细胞的配-受体结合及信号传导[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(22): 2730-2733.
- ZHAO X Y, ZHANG L Y, WANG Y W. Binding of platelets to neutrophils involve in ligand-receptor and signal transduction (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Immunology, 2021, 37(22): 2730-2733.
- [27] WANG P, TIAN X Y, TANG J X, et al. Artemisinin protects endothelial function and vasodilation from oxidative damage via activation of PI3K/Akt/ENOS pathway [J]. Exp Gerontol, 2021, 147: 111270.
- [28] LU Q, YAN S, SUN H, et al. Akt inhibition attenuates rasfonin-induced autophagy and apoptosis through the glycolytic pathway in renal cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2015, 6(12): e2005.
- [29] 张梁. 针刺对胰岛素抵抗模型大鼠干预的信号转导机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- ZHANG L. Study on the signal transduction mechanism of acupuncture intervention in rats with insulin resistance model (in Chinese) [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2010.
- [30] 丁英鹏. PI3K/Akt 信号介导 N ϵ -羧甲基赖氨酸参与动脉粥样硬化的机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.
- DING Y P. Study on the mechanism of PI3K/Akt signaling-mediated N ϵ -carboxymethyllysine involved in atherosclerosis (in Chinese) [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016.
- [31] 周泓屹. 丙泊酚通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控内皮细胞自噬对动脉粥样硬化的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2023.
- ZHOU H Y. Effect of propofol on atherosclerosis by regulating endothelial cell autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway (in Chinese) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2023.
- [32] 林泉. 西洋参丹参配伍调控 PI3K/Akt/NF- κ B 通路稳定动脉粥样硬化易损斑块的作用机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2021.
- LIN Q. Study on the mechanism of regulating PI3K/Akt/NF- κ B pathway by compatibility of Radix Panacis Quinquefolii and Radix Salviae Miltiorrhizae in stabilizing vulnerable atherosclerotic plaques (in Chinese) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2021.

收稿日期: 2025-02-26 修回日期: 2025-03-13