

董爱爱,武荣林,郭继龙,等. 针刺对 SHR 颈内动脉顺应性及 JNK/MCP1 通路的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(2): 1-8.

Dong AA, Wu RL, Guo JL, et al. Effects of acupuncture on internal carotid artery compliance and c-Jun N-terminal kinase/monocyte chemoattractant protein-1 pathway in spontaneous hypertension rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(2): 1-8.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.02.001

针刺对 SHR 颈内动脉顺应性及 JNK/MCP1 通路的影响

董爱爱¹, 武荣林¹, 郭继龙¹, 金晓飞¹, 来晓云¹, 崔依依¹, 王维峰²,
王盛隆³, 冀来喜^{1*}

(1.山西中医药大学,太原 030619;2.山西省针灸研究所,太原 030006;3.山西省中西医结合医院,太原 030001)

【摘要】 目的 研究针刺“降压方”对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertension rats,SHR)颈内动脉顺应性的影响及血管保护机制。方法 选用11周龄雄性SHR大鼠30只,随机分为模型组、针刺组,另取Wistar Kyoto Rats(WKR)大鼠15只为正常对照组。模型组、对照组采用与针刺组相同的抓取固定,针刺组另予膻穴“降压方”针刺,每日1次。干预4周后,离体组织恒温灌流及生物机能实验系统检测各组大鼠颈内动脉收缩和舒张反应性,电镜观察颈内动脉内膜及中膜超微结构,ELISA检测血清c-Jun N-末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP1)水平,免疫荧光双染观测颈内动脉p-JNK/MCP1表达,Western blot检测颈内动脉转录因子AP1(activator protein-1,AP1)、细胞表面趋化因子受体-2(CC chemokine receptor 2,CCR2)蛋白表达。结果 针刺能降低SHR颈内动脉对去甲肾上腺素的缩血管敏感性,增强其对硝普钠的舒张血管反应。针刺能减轻SHR颈内动脉内膜及中膜损伤,降低血清JNK、MCP1水平($P < 0.05$),减少颈内动脉p-JNK/MCP1荧光强度及AP1、CCR2蛋白表达($P < 0.05$)。结论 针刺能抑制颈内动脉JNK/MCP1通路,发挥良性调节SHR颈内动脉舒缩反应性及减轻颈内动脉损伤的作用。

【关键词】 自发性高血压;颈内动脉;针刺;JNK/MCP1通路;血管反应性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2023)02-0001-08

Effects of acupuncture on internal carotid artery compliance and c-Jun N-terminal kinase/monocyte chemoattractant protein-1 pathway in spontaneous hypertension rats

DONG Aiai¹, WU Ronglin¹, GUO Jilong¹, JIN Xiaofei¹, LAI Xiaoyun¹, CUI Yiyi¹, WANG Weifeng²,
WANG Shenglong³, JI Laixi^{1*}

(1. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China. 2. Shanxi Institute of Acupuncture and Moxibustion, Taiyuan 030006. 3. Shanxi Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Taiyuan 030001)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of “Jiangya Fang” acupuncture on internal carotid artery compliance and the mechanism of vascular protection in spontaneous hypertension rats (SHR). **Methods** Thirty 11-week-old male SHR rats were divided randomly into a model group (SHR) and an acupuncture group (SHR+Acu), with Wistar Kyoto Rats (WKR) as a control group ($n = 15$ rats per group). The model group and control group underwent the same handling procedures as the acupuncture group, while the acupuncture group also received “Jiangya Fang” acupuncture once

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81673887);山西省教育厅高校科技创新项目(2020L0410);山西省自然科学基金青年项目(20210302124006)。

【作者简介】董爱爱(1986—),女,博士,研究方向:脑病的针灸治疗。E-mail:xiaoyixipangliang@126.com

【通信作者】冀来喜(1964—),男,教授,研究方向:膻穴处方规范化的基础研究。E-mail:tjylaixi@126.com

a day for 4 weeks. The contractile and diastolic reactivities of the carotid artery in each group were then detected by *in vitro* thermostatic perfusion and biological function experiments, and the ultrastructure of the intima and middle membrane of the internal carotid artery were observed by electron microscopy. Serum levels of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and the expression of phospho-JNK/MCP1 in the internal carotid artery was observed by co-immunofluorescence staining. Protein expression of transcription activator protein 1 (AP1) and CC chemokine receptor 2 (CCR2) in the internal carotid artery were detected by Western blot. **Results** Acupuncture reduced the vasoconstriction sensitivity of the internal carotid artery to norepinephrine and enhanced its vasodilation response to sodium nitroprusside in SHR. Acupuncture also alleviated injury of the intima and middle membrane of the internal carotid artery in SHR, reduced serum levels of JNK and MCP1 ($P < 0.05$), and decreased p-JNK/MCP1 fluorescence intensity and AP1 and CCR2 protein expression in the internal carotid artery ($P < 0.05$). **Conclusions** Acupuncture can inhibit the JNK/MCP1 pathway in the internal carotid artery and may play a benign role in regulating vasomotor reactivity of the carotid artery and alleviating injury of the internal carotid artery in SHR.

[Keywords] spontaneous hypertension; internal carotid artery; acupuncture; JNK/MCP1 signaling pathway; vascular reactivity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

自发性高血压大鼠 (spontaneous hypertension rats, SHR) 为研究高血压性心脑血管疾病较理想的模型,在中风前期的研究中可使用该模型。SHR 具有脑血管缺血性损伤的易感性,12 周龄时核磁即能检出自发性脑损伤,显示出人类神经血管单元缺血性病理损伤的诸多特征^[1]。综合控制高血压血管损伤及相关危险因素,符合高危非致残性缺血性脑血管病 (high-risk non-disabling ischemic cerebrovascular event, HR-NICE) 患者管理的国家宗旨。研究表明颈动脉形态学改变多与高血压、老龄化等因素相关^[2]。颈内动脉是颅内一条重要的供血动脉,供应大脑半球的前 2/3 和部分的间脑。颈内动脉血流动力学改变,常影响脑血流灌注,引起脑缺血的发生^[3]。颈内动脉功能正常对于脑穿支动脉等“应变血管”的血液供应及脑血管自动调节功能至关重要。现代医学在减轻高血压相关脑血管损伤方面并未取得突破性进展,并且承受着不良反应和依从性问题的困扰;而针灸治疗高血压有颅脑供应血管及神经保护的优势^[4]。

慢性高血压与血管平滑肌、内皮和神经血管偶联功能障碍密切相关,这些功能障碍会导致平滑肌反应减弱和大脑自动调节,进而降低高血压对脑小动脉及微循环的保护作用。颈内动脉接收的舒缩刺激信号强度和性质发生改变,以及血流动力学不稳和舒缩张力失衡,均可导致血管弹性及顺应性下降。而脑血管顺应性下降及功能失调会引起血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 破坏,激活神经胶质炎性改变,甚至发生突触功能障碍和神经元死亡。

因此,增强颈内动脉的顺应性对慢性高血压脑血流供应至关重要。

课题组前期进行了腧穴“降压方”组穴的筛选^[5],并通过临床观察发现针刺“降压方”对原发性高血压证属“肝阳上亢”者疗效较好。“降压方”腧穴处方中,“人迎”穴周围特殊的解剖结构为治疗高血压的理论基础,针刺“人迎”穴能刺激舌咽神经颈动脉窦支神经末梢,舌咽神经将刺激冲动传于延髓腹外侧,从而反馈性引起迷走神经兴奋性增加,拮抗高血压之交感兴奋性增强及血压增高。“足三里”“曲池”为手、足同名经-阳明经之合穴,阳明经“多气多血”“合主逆气而泄”,两穴起到清泄降气、和调气血之功。“太冲”“内关”为手、足同名经-厥阴经之穴,具有调节脏腑气血、通达三焦气机之功。此五穴共用,共奏疏肝理气,宽胸降逆,平和阴阳气血之效。

在自发性高血压大鼠中,“肝阳上亢”易激惹的行为学表征尤为突出,如捉持颈部时惊跳或欲咬人,与同笼大鼠频繁打斗、啃咬铁笼等^[6]。既往课题组系列研究结果显示^[7-8],采用腧穴“降压方”针刺 SHR 大鼠,可以发挥降压、改善激惹症状、上调脑区神经递质 γ -氨基丁酸水平的作用,同时可部分逆转主动脉及心脏等靶器官损伤。由此可见,针刺“降压方”对高血压心脑血管靶器官的保护是多途径、多靶点的,值得进一步研究其作用机制。本研究从针刺调节 SHR 大鼠颈内动脉顺应性、超微结构改变及 JNK/MCP1 通路角度,阐释腧穴“降压方”对 SHR 颈内动脉的保护机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用 11 周龄 SPF 级雄性 SHR 大鼠 30 只, 体重 265~290 g, 选取 SPF 级同周龄、同性别、相似体重的 Wistar Kyoto Rats 大鼠 (WKR) 15 只。大鼠均购于北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2021-0006], 所有大鼠均饲养于山西中医药大学实验动物中心实验室 [SYXK (晋) 2020-0006], 自由食水, 适应性喂养 1 周后开始实验。本实验经过山西中医药大学动物管理伦理委员会的审批 (2020DW059), 并遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

JNK (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 66210-1-Ig); AP1 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 24909-1-AP); MCP1 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-1101R); CCR2 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-10963R); β -tubulin (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-4511R); α -tubulin (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-0159R); EDTA (pH=8.0) 抗原修复液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号: G1203)。

华佗牌一次性针灸针 (苏州医疗用品有限公司, 型号: 32 号 \times 25 mm); 酶标仪 (美国伯乐, 型号: Bio-Rad 680); 离体组织恒温灌流及生物机能实验系统 (成都泰盟, 型号: HV1403); 电镜 (日本电子 JEOL, 型号: 1200EX); 超薄切片机 (奥地利, 型号: Leica UC7); 双垂直电泳仪 (北京六一, 型号: DYCZ-24F); 转印电泳仪 (北京六一, 型号: DYCZ-TRANS 2); 凝胶成像系统 (上海天能, 型号: 5200Multi); 正置荧光显微镜 (日本, 型号: ECLIPSE CI)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组、干预及取材

所有大鼠适应性饲养 1 周后, 将 30 只 SHR 大鼠随机分为模型组、针刺组, 每组 15 只; 将 15 只 WKR 大鼠作为对照组。每日自由食水, 取材前 1 d 禁食水。于 12 周龄时开始针刺干预。针刺组于每日 14:00~16:00, 由同一操作者针刺双侧“人迎”“曲池”“足三里”“太冲”“内关”, 每日 1 次, 留针 30 min, 每 10 min 行针 1 次, 每周治疗 6 d 间歇 1 d; 疗程 4 周, 共治疗 24 次。对照组、模型组采用与针刺组相同的固定方式, 但不针刺。取穴参考中国针灸学会实验针灸分会制定的“动物针灸穴位图谱”及

模拟人体经穴定位法相结合进行^[9]。取材: 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 下腔静脉采血 5 mL, 3500 r/min 离心 10 min, 留取血清, 分装保存备 ELISA 检测。颈内动脉取材: 颈正中纵行切开, 分离颈部肌肉、神经, 分出颈总动脉, 过分叉后, 截取颈内动脉颈段 0.5 cm。

1.3.2 测定血管环张力的变化

游离出颈内动脉, 修剪除去周围组织, 剪成 4 mm 左右的血管环。将血管环固定于张力测定仪, 恒温浴槽 (调至 37 $^{\circ}$ C) 加 10 mL 的 Krebs's 液, 并持续混合通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 气体。检测颈内动脉血管收缩活性, 设定预张力值为 15 mN, 然后用 60 mmol/L 的 KCl 引起血管收缩, 待血管收缩稳定后用 Krebs's 液洗脱, 静置 30 min, 重复上述步骤, 前后两次平均收缩张力值相差 10% 为可接受的误差, 两次均值记录为 E_{max}。按累积浓度法 (以累加给药法给予去甲肾上腺素 (10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L)) 向浴槽 K-H 液中依次加入 NE, 记录不同浓度下 NE 对血管环产生的收缩力。以最大收缩效应 (E_{max}) 作为 100%, 计算 NE 介导的血管张力变化值占最大收缩张力值的百分比。检测颈内动脉血管收缩活性, 血管平衡后用 5 \times 10⁻⁵ mol/L NE 预收缩血管环, 达到最大收缩幅度, 按累积浓度法 (同 NE) 向 K-H 液浴槽液中依次加入硝普钠 (SNP), 记录不同浓度下 SNP 对血管环产生的舒张力。将预收缩血管环张力记为 100%, 计算 SNP 介导的血管张力变化值占最大收缩张力值的百分比。

1.3.3 透射电镜检测颈内动脉内皮、内膜下层及中膜结构

将组织修整后置入 2.5% 戊二醇中固定, 后放入 1% 四氧化锇固定液中, 固定好的组织在梯度乙醇-丙醇溶液中脱水, 包埋, 将组织切成 70 nm 厚度的切片, 采用铀铅双染色, 于透射电镜下观察。

1.3.4 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测血清 JNK、MCP1 水平

采用制备好的血清按照 ELISA 试剂盒所述步骤进行检测, 用酶标仪读取吸光度值, 画出标准曲线后计算各组血清 JNK 和 MCP1 的含量。

1.3.5 免疫荧光双染检测颈内动脉 p-JNK/MCP1 表达

石蜡切片脱蜡至水后进行抗原修复, 使用自发荧光淬灭剂淬灭自发荧光后, 滴加 BSA 进行封闭 30 min, 随后一抗孵育 p-JNK (1:100)、MCP1 (1:

100), 于湿盒中 4℃ 过夜; PBS 洗涤 3×5 min, 荧光二抗室温下避光孵育 50 min, 最后在荧光显微镜下观察并采集图像。用 IPP 5.1 软件分析分别对红色、绿色荧光单染图片读取荧光强度, 橙黄色为荧光双染共标位置。

1.3.6 Western blot 检测颈内动脉 AP1、CCR2 蛋白表达

将颈内动脉组织加入裂解液和酶抑制剂, 冰上匀浆成糊状, 放入 4℃ 冰箱, 静置 1.5 h, 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 蛋白浓度试剂盒测定蛋白浓度后, 加入 5×Loading Buffer 混匀, 在 100℃ 下加热 10 min, 取 10 μL 样品液加入样品孔中, 进行电泳, 80 V/120 V 电泳约 80 min, 切胶, 200 mA 电流条件下进行湿转, TBST 洗膜 10 min, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 10 min×3 次, 一抗孵育 AP1(1:200)、CCR2(1:100), 室温下孵育 30 min, 后放入 4℃ 冰箱过夜, TBST 洗膜 10 min×3 次, 二抗孵育(1:1000) 2 h, TBST 洗膜 10 min×3 次。滴加 ECL 发光显影液于 PVDF 膜上, 在仪器上进行显影, 用 Image 分析软件进行条带灰度分析。以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 软件进行处理, 正态分布的计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较时, 方差齐采用 SNK 法; 方差不齐采用 Dunnett's T3 法。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 针刺对 SHR 颈内动脉反应性的影响

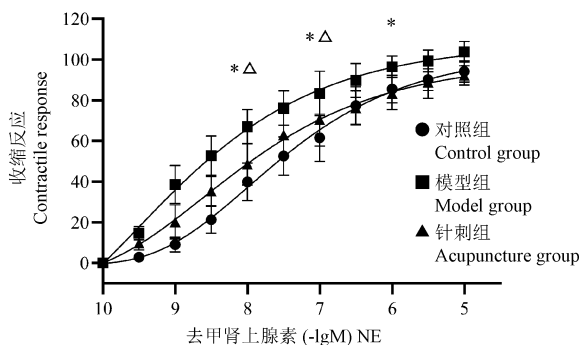
各组大鼠颈内动脉的收缩反应性(如图 1)随着去甲肾上腺素浓度的增大而增强, 当浓度达到 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 时, 模型组的收缩反应较对照组显著增强($P < 0.05$), 提示模型组颈内动脉对 NE 缩血管敏感性明显增强; 当浓度达到 10^{-6} ~ 10^{-5} mol/L 时, 针刺组颈内动脉收缩反应性较模型组显著降低($P < 0.05$)。由此得出, 去甲肾上腺素介导的模型组颈内动脉收缩反应明显受损, 针刺“降压方”能减弱模型组颈内动脉的收缩反应。

各组大鼠颈内动脉的舒张反应性(如图 2)随着 SNP 浓度的增大而增强, 当浓度达到 10^{-7} 、 10^{-6} mol/L 时, 模型组的舒张反应性较对照组显著减弱($P < 0.05$), 而针刺组舒张反应性较模型组显著增加($P < 0.05$)。提示模型组颈内动脉对 SNP 舒张血管的

敏感性减低, 而针刺“降压方”可增强模型组颈内动脉的舒张反应。

2.2 针刺对颈内动脉内膜及中膜超微结构影响

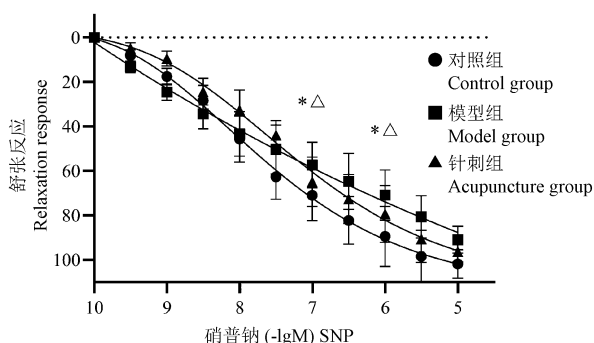
透射电镜结果显示, 对照组颈内动脉内皮完整, 内膜厚薄均匀, 无异常增厚或断裂(如图 3A); 平滑肌间弹力纤维和胶原纤维平行(如图 3D)。模型组血管内皮细胞和平滑肌细胞(VSMC)均出现不同程度的损伤, 表现为内皮细胞肿胀、细胞坏死、胞核脱失, 内膜弹力纤维厚薄不均、弹力纤维老化、断裂, 线粒体空泡明显(如图 3B); 中膜平滑肌内线粒体膨胀、胞质液化, 平滑肌以合成型为主, 弹力板断裂, 胶原纤维成分增多, 增生明显伴钙化(如图 3E)。针刺组, 血管内皮细胞完整性较好, 坏死及核缺失较少, 内膜损伤较模型组减轻(如图 3C); 中膜



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 1 去甲肾上腺素介导的各组大鼠颈内动脉收缩反应
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 1 Internal carotid artery systolic response mediated by norepinephrine in rats of each group



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 2 硝普钠介导的各组大鼠颈内动脉舒张反应
Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 2 Internal carotid artery relaxation response mediated by sodium nitroprusside in rats of each group

平滑肌内线粒体肿胀较少,平滑肌分泌型及收缩型分布均匀,胶原纤维比例适中,弹力纤维及胶原纤维交织排布(如图 3F)。由此得出针刺“降压方”可改善模型组颈内动脉内膜及中膜损伤。

2.3 针刺对 SHR 血清学 JNK、MCP1 水平的调节

结果显示,与对照组相比,模型组血清中 JNK 与 MCP1 含量明显升高($P < 0.05$);而针刺组血清中 JNK 与 MCP1 含量均显著下降($P < 0.05$)。可知,针刺“降压方”可降低模型组血清 JNK、MCP1 水平,如图 4。

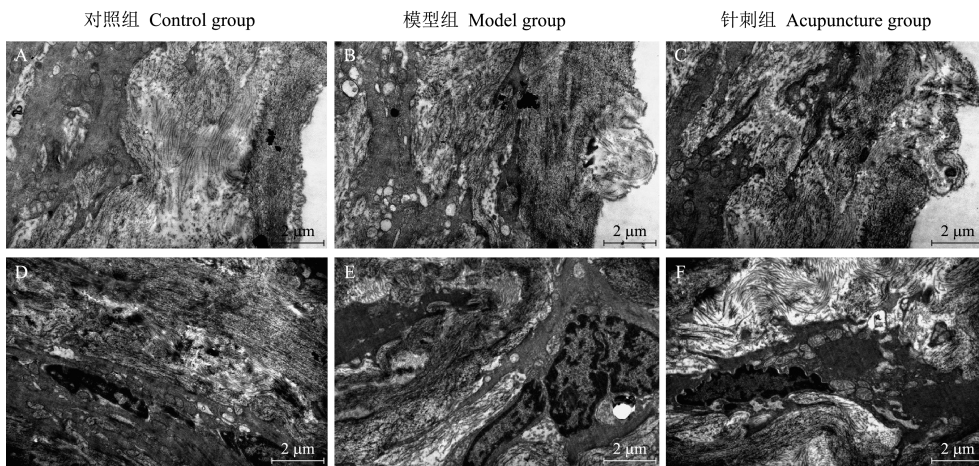
2.4 针刺对 SHR 颈内动脉 p-JNK/MCP1 表达的调节

结果显示,与对照组相比,模型组颈内动脉 p-JNK 红色荧光强度、MCP1 绿色荧光强度均显著增

高($P < 0.05$),p-JNK/MCP1 荧光共标记增强。与模型组相比,针刺组颈内动脉 p-JNK、MCP1 荧光强度显著减弱($P < 0.05$),p-JNK/MCP1 荧光共标记减少。Merge 图可知,在各组大鼠内膜及中膜,p-JNK 与 MCP1 荧光共标记呈橙黄色,两者在细胞核和细胞质均存在共表达;针刺对模型组 p-JNK、MCP1 荧光强度及共表达具有一致性下调作用,如图 5。

2.5 针刺对 SHR 颈内动脉 AP1、CCR2 蛋白表达的调节

与对照组相比,模型组 AP1、CCR2 蛋白表达均显著升高($P < 0.05$),而针刺组 AP1、CCR2 蛋白表达均显著下调($P < 0.05$)。可知,针刺“降压方”可降低模型组颈内动脉 AP1、CCR2 蛋白表达,如图 6。

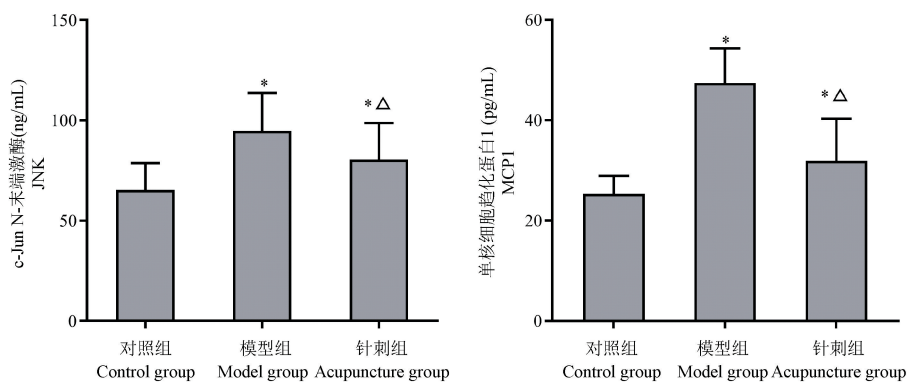


注:A、B、C:血管内膜层及内膜下层;D、E、F:血管中膜层纤维及平滑肌。

图 3 各组大鼠颈内动脉内膜及中膜超微结构

Note. A/B/C, Vascular intima and subintima. D/E/F, Fibers and smooth muscle of vascular medium membrane.

Figure 3 Ultrastructure of intima and media of internal carotid artery in rats of each group

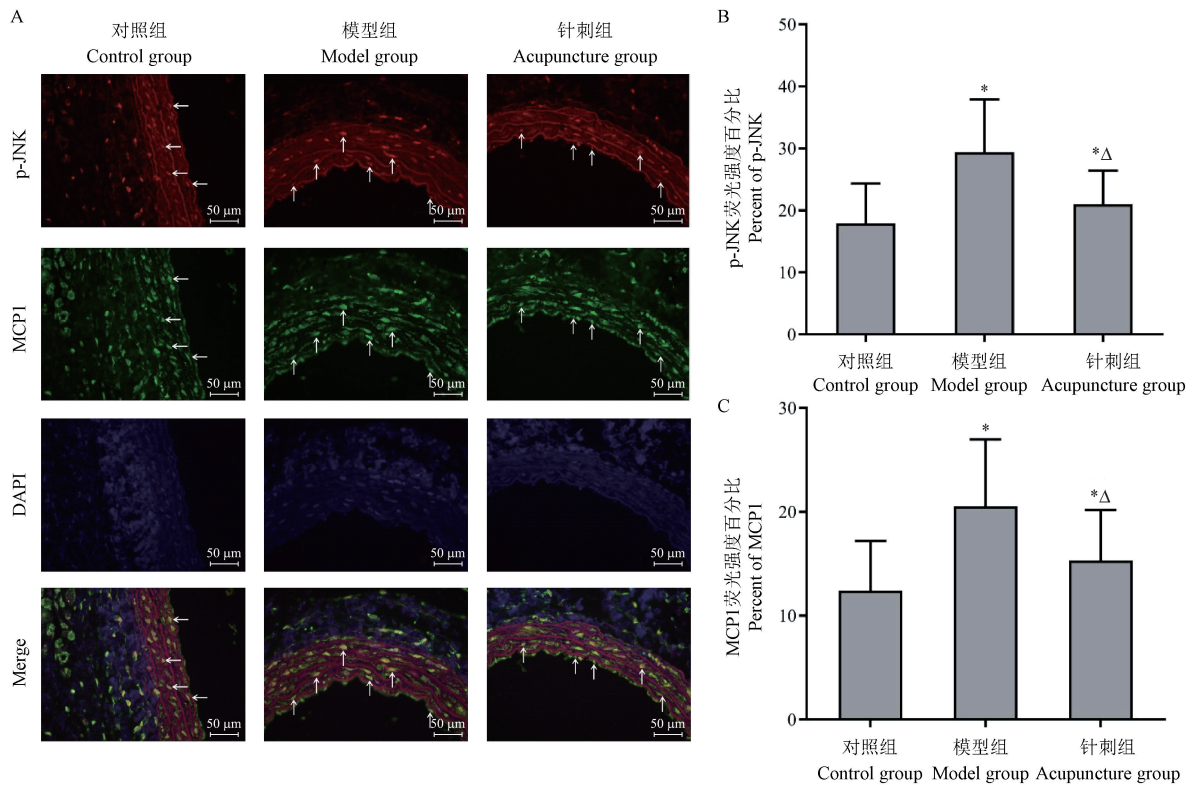


注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, Δ $P < 0.05$ 。

图 4 各组大鼠血清学 JNK 和 MCP1 水平的变化

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, Δ $P < 0.05$.

Figure 4 Serological changes of JNK and MCP1 in rats of each group

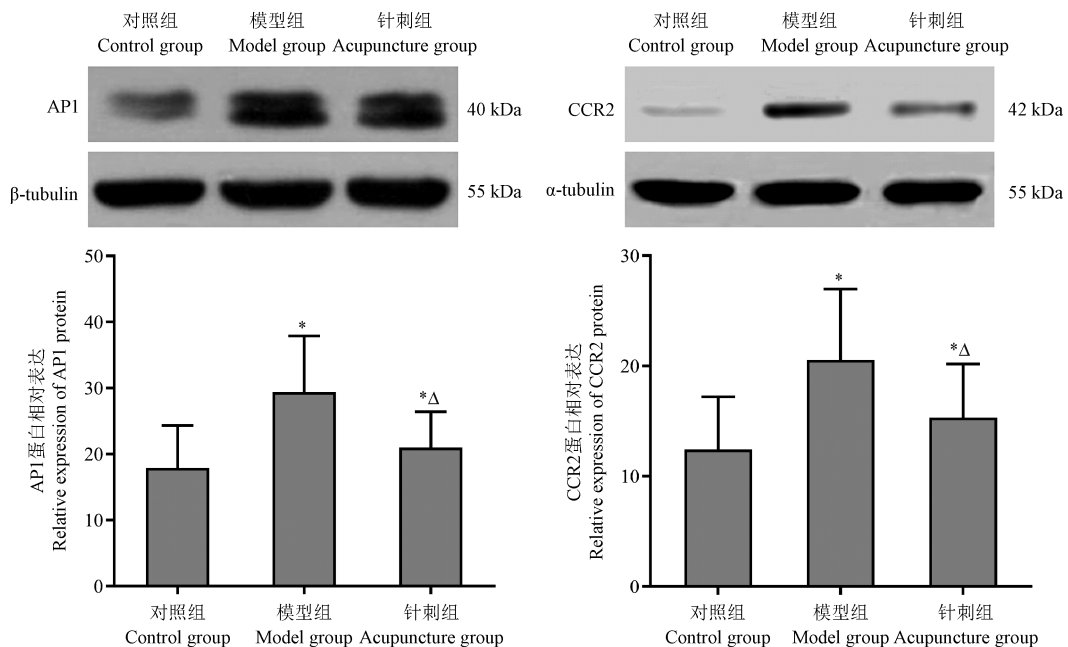


注:A:免疫荧光图;B、C:p-JNK、MCP1 荧光强度统计。与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠颈内动脉 p-JNK/MCP1 免疫荧光双染及统计结果

Note. A, Immunofluorescence staining. B/C, Fluorescence intensity statistics of p-JNK and MCP1. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 5 Co-immunofluorescence stain and quantifications of p-JNK/MCP1 in internal carotid artery of rats in each group



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

图 6 各组大鼠颈内动脉 AP1 和 CCR2 蛋白表达变化

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, $\Delta P < 0.05$.

Figure 6 Expression of AP1 and CCR2 protein in internal carotid artery of rats in each group

3 讨论

高血压患者血管顺应性下降,表现为血管舒缩反应减退^[10]。动脉顺应性即动脉弹性,可反映血管对管内压力变化的适应能力。动脉顺应性下降表明血管功能受损,而这种功能受损多提示血管结构的变化。本研究表明,SHR 大鼠颈内动脉顺应性下降,表现为对 NE 介导的收缩反应增强,对 SNP 介导的舒张反应减弱。膻穴“降压方”针刺后 SHR 大鼠动脉顺应性改善。

SHR 大鼠血管损伤涉及血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的增殖与肥大、炎症、纤维化以及细胞外基质沉积等过程^[11]。高血压血流动力学改变相关的血管损伤主要表现为内膜的损伤^[12],中膜和外膜上的胶原纤维的增加、中膜上 VSMC 的增加^[13]。内膜表面的内皮细胞可分泌多种血管活性物质调节血管壁的舒缩和中膜 VSMC 的增殖;血管中膜在维持血管壁张力和调节血流动力学方面起主要作用,VSMC 是中膜的主要组成细胞,正常的 VSMC 呈收缩型,含有较丰富的肌纤维。在体内外刺激因素的影响下,VSMC 可由高分化状态转变为去分化状态,即由收缩型 VSMC 向合成型 VSMC 转变^[14]。合成型的 VSMC 缺乏肌纤维,富含粗面内质网、高尔基体、核糖体,细胞外基质合成活跃,致使血管刚性增加,弹性减弱。研究表明,减少合成型血管平滑肌细胞比例可以改善动脉重塑^[15]。本研究通过透射电镜观察,发现“降压方”针刺干预 4 周可减少 SHR 大鼠内皮细胞肿胀、坏死、胞核脱失,减轻中膜平滑肌内线粒体肿胀,同时调节平滑肌细胞、弹力纤维及胶原纤维分布。且本研究中针刺减轻内皮、中膜损伤与改善动脉内皮顺应性具有一致性。

JNK 属于丝裂源活化蛋白激酶家族,与高血压关系密切,在血管平滑肌细胞增殖、迁移和凋亡过程中起到重要作用^[16]。JNK 通路还参与了血管紧张素 II 诱导小鼠腹主动脉瘤模型的动脉损伤病理过程^[17]。MCP1 是一种趋化因子,可以趋化单核细胞、树突状细胞到达炎症部位^[18]。内皮细胞和平滑肌细胞均可分泌 MCP1,临床研究表明高血压患者血清中 MCP1 水平比健康受试者高^[19]。Santisteban 等^[20]研究发现 SHR 大鼠脑脊液中 MCP1 水平高于 WKR 大鼠。MCP1 表达增加会损伤内皮细胞,导致内皮细胞通透性增加^[21]。另有体外研究表明

MCP1 可促进炎症因子诱导的 VSMC 增殖^[22]。本研究显示,SHR 大鼠颈内动脉 p-JNK/MCP1 免疫荧光表达较 WKR 大鼠增加,血清学 JNK 和 MCP1 水平变化亦如此;提示 JNK/MCP1 参与了 SHR 血管顺应性下降的病理过程。经“降压方”针刺干预的 SHR,其 p-JNK 和 MCP1 血清学、血管组织免疫荧光表达同向性减低,说明针刺“降压方”可经由 JNK/MCP1 通路调节 SHR 大鼠颈内动脉的顺应性。

JNK 被刺激因素激活后,部分会进入细胞核,进而激活转录因子 AP1 蛋白^[23]。AP1 启动可调控许多炎症因子和前炎症因子如 IL-1 β 、MCP-1 等并激活下游级联反应^[24]。CCR2 为 MCP1 的细胞表面特异性受体,单核细胞、内皮细胞、平滑肌细胞表面均有表达,两者结合之后可募集单核细胞至炎症部位,引起炎症反应,并导致 VSMC 的迁移,引起血管损伤^[25]。有研究发现,SHR 大鼠中 MCP1 与 CCR2 参与了血管纤维化和血管重构的过程^[26]。本研究得出 SHR 组中 JNK 下游 AP1 蛋白、MCP1 受体蛋白 CCR2 的表达较 WKR 组明显增加,而针刺组则比 SHR 组明显下降,这也进一步佐证了针刺可抑制 JNK/MCP1 通路发挥血管保护的作用。

综上所述,针刺可经由 JNK/MCP1 通路改善血管内膜及中膜损伤,起到保护颅脑重要供应血管-颈内动脉顺应性的作用。

参考文献:

- [1] Ménard B, Chazalviel L, Roussel S, et al. Two-kidney one-clip is a pertinent approach to integrate arterial hypertension in animal models of stroke: serial magnetic resonance imaging studies of brain lesions before and during cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(10): 1769-1780.
- [2] 张海峰, 梁国标, 于春泳, 等. 复合手术治疗慢性颈内动脉闭塞的临床疗效 [J]. *中华神经外科杂志*, 2021, 37(4): 381-385.
- [3] Pfeiffer J, Becker C, Ridder GJ. Aberrant extracranial internal carotid arteries: new insights, implications, and demand for a clinical grading system [J]. *Head Neck*, 2016, 38(1): E687-E693.
- [4] Sun J, Ashley J, Kellawan JM. Can acupuncture treatment of hypertension improve brain health? A mini review [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 240.
- [5] 崔依依, 郭继龙, 董爱爱, 等. 针刺不同膻穴组方对 SHR 大鼠血压及血清 CGRP、ET-1 和 Ang II 水平的影响 [J]. *上海针灸杂志*, 2020, 39(1): 84-89.
- [6] 杨佩, 李君玲, 李玉波, 等. 角音干预对肝火亢盛型自发性高血压大鼠宏观表征及易激惹程度的影响 [J]. *世界中医药*, 2018, 13(9): 2102-2106.

- [7] 董爱爱, 郭继龙, 崔依依, 等. 针刺对自发性高血压大鼠血管紧张素 II 及其受体 1 以及 γ -氨基丁酸的影响 [J]. 中国中医急症, 2018, 27(11): 1891-1894.
- [8] 王海军, 刘高峰, 郭继龙, 等. 针刺膻穴“降压方”对自发性高血压大鼠心肌肥厚的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(21): 1915-1920.
- [9] 郭义, 赵雪. 实验针灸学实验指导 [M]. 新世纪第五版. 北京: 中国中医药出版社; 2021.
- [10] Safar ME. Arterial stiffness as a risk factor for clinical hypertension [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(2): 97-105.
- [11] Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, et al. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR [J]. Am J Hypertens, 1994, 7(2): 193-200.
- [12] Mordi I, Mordi N, Delles C, et al. Endothelial dysfunction in human essential hypertension [J]. J Hypertens, 2016, 34(8): 1464-1472.
- [13] Sehgel NL, Sun Z, Hong Z, et al. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging [J]. Hypertension, 2015, 65(2): 370-377.
- [14] Frisantiene A, Philippova M, Erne P, et al. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity [J]. Cell Signal, 2018, 52: 48-64.
- [15] Zhou N, Lee JJ, Stoll S, et al. Inhibition of SRF/myocardin reduces aortic stiffness by targeting vascular smooth muscle cell stiffening in hypertension [J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(2): 171-182.
- [16] Hu C, Zuo K, Li K, et al. p38/JNK is required for the proliferation and phenotype changes of vascular smooth muscle cells induced by *L3MBTL4* in essential hypertension [J]. Int J Hypertens, 2020, 2020: 3123968.
- [17] 李会朋, 肖影, 王国华, 等. c-Jun 氨基末端激酶信号通路在血管紧张素 II 诱导腹主动脉瘤小鼠模型中的作用机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(7): 96-103.
- [18] 姜懿纳, 陈乃宏. CCL2/MCP-1 在其相关疾病的机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(12): 1634-1638.
- [19] Tucci M, Quatraro C, Frassanito MA, et al. Deregulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in arterial hypertension: role in endothelial inflammation and atheromasia [J]. J Hypertens, 2006, 24(7): 1307-1318.
- [20] Santisteban MM, Ahmari N, Carvajal JM, et al. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension [J]. Circ Res, 2015, 117(2): 178-191.
- [21] Gong P, Angelini DJ, Yang S, et al. TLR4 signaling is coupled to SRC family kinase activation, tyrosine phosphorylation of zonula adherens proteins, and opening of the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia [J]. J Biol Chem, 2008, 283(19): 13437-13449.
- [22] 龚姗, 李弘, 刘叶倩, 等. 复方七芎降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 733-741.
- [23] Dunn C, Wiltshire C, MacLaren A, et al. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor [J]. Cell Signal, 2002, 14(7): 585-593.
- [24] Shaulian E. AP-1--the Jun proteins: oncogenes or tumor suppressors in disguise? [J]. Cell Signal, 2010, 22(6): 894-899.
- [25] Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling [J]. Circ Res, 2004, 94(9): 1203-1210.
- [26] Hamakawa Y, Omori N, Ouchida M, et al. Severity dependent up-regulations of LOX-1 and MCP-1 in early sclerotic changes of common carotid arteries in spontaneously hypertensive rats [J]. Neurol Res, 2004, 26(7): 767-773.

[收稿日期] 2022-06-07