

· 针灸推拿 ·

本文引用:宋 瑾,王 超,阳仁达,冯 果,谭成富,刘薇薇,严 洁.电针内关穴预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠线粒体膜电位、腺苷 A1 受体的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(4):402-405.

电针内关穴预处理对心肌缺血再灌注损伤大鼠 线粒体膜电位、腺苷 A1 受体的影响

宋 瑾,王 超*, 阳仁达,冯 果,谭成富,刘薇薇,严 洁
(湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 观察电针内关穴预处理对心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)大鼠心肌线粒体膜电位、腺苷 A1 受体的影响,探讨电针预处理防治 MIRI 的可能作用机制。**方法** 40 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术、缺血再灌注组(模型组)、电针内关穴组、电针环跳穴组,每组 10 只。采用冠脉结扎法造模,电针内关穴组和电针环跳穴组在造模前,给予电针刺刺激 20 min/d,共 7 d。采用荧光技术测定心肌细胞线粒体膜电位变化,免疫组化法测腺苷 A1 受体的表达。**结果** 模型组线粒体膜电位及腺苷 A1 受体较假手术组明显下降($P<0.01$);电针内关穴组线粒体膜电位较模型组、电针环跳穴组及假手术组明显升高($P<0.05$);电针内关穴组腺苷 A1 受体较模型组、电针环跳穴组和假手术组明显升高($P<0.01$);模型组与电针环跳穴组间无明显差异($P>0.05$)。**结论** 电针内关穴预处理可以诱导腺苷 A1 受体的表达,升高线粒体膜电位,对心肌细胞产生保护作用。

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤;电针;内关穴;线粒体膜电位;腺苷 A1 受体

[中图分类号] R245.9

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.04.016

Effects of Electroacupuncture at Neiguan Point on Mitochondrion Membrane Potential and Adenosine A1 Receptor in Rats with Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury

SONG Jin, WANG Chao*, YANG Renda, FENG Guo, TAN Chengfu, LIU Weiwei, YAN Jie

(College of Acupuncture and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To explore the cardioprotective mechanisms of electroacupuncture (EA) at Neiguan point and observe the effect of mitochondrial membrane potential and adenosine A1 receptors in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury. **Methods** The 40 SD male rats were randomly divided into the sham-operation group, ischemia reperfusion (model group), EA Neiguan group and EA Huantiao group, 10 rats in each group. The models were established by ligating the coronary artery. The EA Neiguan group and EA Huantiao group were given electroacupuncture stimulation pretreatment 20 min every day lasting for 7 days before establishing MIRI model respectively. The mitochondrial membrane potential was tested by fluorescent technique. The expression of adenosine A1 receptor was determined by Immunohistochemical method. **Results** The mitochondrial membrane potential and adenosine A1 receptor contents of model group decreased significantly than those of control sham-operation group with obviously statistical difference ($P<0.01$). The mitochondrial membrane potential of EA Neiguan group increased than those of model group, control sham-operation group and EA Huantiao group ($P<0.05$). The adenosine A1 receptor increased significantly than model group, EA Huantiao group and control sham-operation group ($P<0.01$). But there was no significant difference between model group and EA Huantiao group ($P>0.05$). **Conclusion** The EA at Neiguan point preconditioning could induce the expression of adenosine A1 receptor, increase mitochondrial membrane potential, and have a protection on myocardial cells.

[Keywords] MIRI; electroacupuncture; Neiguan point; mitochondrial membrane potential; adenosine A1 receptor

[收稿日期] 2016-09-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81574080);湖南省中医药管理局课题(2015211);湖南省高校创新平台开放基金项目(15k093);2015年针灸推拿学湖南省“十二五”重点学科开放基金资助项目(06)。

[作者简介] 宋 瑾,女,在读硕士研究生,研究方向:经脉-脏腑相关规律与机制研究。

[通讯作者] *王 超,女,医学硕士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:592436380@qq.com。

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)是指较长时间心肌缺血的基础上,恢复血流灌注,即复灌后缺血和组织损伤并不减轻,反而加重甚至发生不可逆性损伤的现象。中医针灸作为一种传统的治疗方法,也是治疗冠心病的手段之一。本课题组大量的实验及临床研究证明电针内关穴对心肌缺血有明显的改善作用^[1-5]。腺苷是一种重要的神经调质主要分布于神经系统中,主要有四种亚型(A1,A2,A3,A4),对保护组织发挥重要的作用,腺苷的神经调节作用主要是通过腺苷 A1 受体实现的^[6]。线粒体是真核生物细胞中非常重要的细胞器,线粒体介导的凋亡过程是重要的细胞凋亡途径之一。本试验以心肌缺血再灌注大鼠为模型,分析电针内关穴预处理对大鼠 MIRI 后腺苷 A1 受体和线粒体膜电位的作用,为经脉脏腑相关理论及针刺“治未病”,“胸肋内关谋”理论在临床的应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

选取 SPF 级雄性 SD 大鼠,250~300 g,共 40 只,由湖南中医药大学动物实验中心提供(SYXK 湘 2013-0005,SCXK 湘 2013-0004)。随机分为 4 组,假手术组、缺血再灌注组、针刺内关穴组、针刺环跳穴组,每组 10 只。

1.2 主要试剂与设备

细胞凋亡线粒体膜电位检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);免疫组化检测腺苷 A1 受体试剂盒:腺苷 A1 受体抗体规格 1mL(美国 Santacruz 公司),图像分析软件为 IPP(Image-Pro-Plus),显微镜(MOTIC BA210T);华佗牌 SDZ-V 型电子针疗仪(苏州医疗用品有限公司);汉医牌一次性使用无菌针灸针(0.25 mm×13 mm,100 支/盒)(长春爱泉医疗器械有限公司);H1850 医用离心机台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);ECG-1106G 数字式心电图机(深圳市凯沃尔电子有限公司);ALC-V108 动物呼吸肌(上海奥尔科特生物科技有限公司);BDLSR II 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 造模方法

造模参照汪谦^[7]的方法。大鼠以 10%水合氯醛麻醉 0.3 mL/100 g 腹腔注射。行气管插管后,接动物人工呼吸机,(频率 70~80 次/min,潮气量 5~6 mL/100 g),然后沿左侧第四、五肋骨间开胸,轻轻剪破心包膜,提起左心耳,在冠状动脉左前降支 1/3 处穿 4“0”号线,置一硅胶管结扎,以心电图 T 波高尖及冠脉左前降支结扎下段血管膨出或供血心肌发绀

为造模成功标志,结扎 40 min 后,剪开/取下硅胶管恢复左前降支灌流 60 min,腹主动脉取血 3~5 mL,摘取心脏。

1.4 穴位定位及处理方法

1.4.1 穴位定位 “内关”“环跳”、穴定位参照林文注、王佩主编《实验针灸学》并结合解剖学定位。内关:前肢内侧、离腕关节约 3 mm 左右的尺桡骨缝间。环跳穴位于股骨大转子后上缘凹陷处。

1.4.2 处理方法 参照汪谦^[7],假手术组和缺血再灌注组饲养至第 7 天,其中假手术组开胸,左冠状动脉前降支上、中 1/3 交界处穿线不结扎,40 min 后,再灌注 60 min,记录心电图,缺血再灌注组左冠状动脉前降支上、中 1/3 交界处穿线结扎,结扎 40 min 后,再灌注 60 min,记录心电图。电针内关穴组和电针环跳穴组在进行 MIRI 造模之前 7 d,每天给予电针刺刺激,分别针刺双侧“内关”和“环跳”连接 SDZ-V 型电子针疗仪(10 Hz,疏密波),时间 20 min,1 次/d,共针刺 7 次后再行造模。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 JC-1 染色法测线粒体膜电位 取 500 μ L JC-1 工作液将细胞均匀悬浮,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中孵育 15~20 min;室温离心(200 rpm/min,5 min)收集心肌细胞,用 500 μ L JC-1×染色结合液洗 2 次;吸取 500 μ L JC-1×染色结合液重新悬浮细胞,用流式细胞仪进行流式检测。

1.5.2 免疫组化法检测心肌组织腺苷 A1 受体含量 将取材的心肌组织切成 2~3 mm 厚的小块后用 0.9%氯化钠溶液洗净,滤纸吸净后迅速浸入 4%多聚甲醛中固定,温度 4 $^{\circ}$ C。60 $^{\circ}$ C 烤片 30~60 min,先将切片置于二甲苯中 10 min,2 次。然后依次在 100%,95%,85%和 75%乙醇,每级放置 5 min。再用蒸馏水浸洗 5 min,将切片浸入 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),电炉或微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 min 后,反复 1~2 次。冷却后 0.01 M PBS(pH 7.2~7.6)洗涤 3 min×3 次;PBS 冲洗 3 min×3 次;滴加适当稀释的一抗(腺苷 A1 受体),4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 冲洗 5 min×3 次;滴加 50~100 μ L 抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,PBS 冲洗 5 min×3 次;滴加预制好的显色剂 DAB 工作液 50~100 μ L,室温孵育 1~5 min,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤;苏木素复染 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 返蓝;各级酒精(60%~100%)脱水,每级 5 min。取出后置于二甲苯 10 min,2 次,中性树胶封片、显微镜观察。

1.6 数据统计方法

应用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”

表示。所有数据进行正态性检验,满足正态性时,采用单因素方差分析。组间比较若方差齐时采用LSD法检验,方差不齐时用Tamhane's T2法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 电针内关穴对大鼠心电图T波的影响

各组大鼠术前T波比较,差异无统计学意义($P>0.05$),说明各组大鼠术前齐同可比。造模后各时段其余三组与假手术组比较差异非常显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$),表明造模成功。结扎后40 min与再灌注后60 min:与缺血再灌注组比较,电针内关穴组T波均明显下降($P<0.01$),而电针环跳穴组与缺血再灌注组之间无明显差异($P>0.05$),与电针内关穴组比较,电针环跳穴组T波均明显升高($P<0.01$)。以上结果提示:电针内关穴预处理能改善心肌缺血再灌注损伤大鼠心电图T波。见表1。

表1 各组大鼠结扎后T波电压的比较 (mv, n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	结扎前	结扎后1 min	结扎后40 min	再灌后60 min
假手术组	0.203±0.021	0.284±0.033	0.282±0.023	0.277±0.023
缺血再灌注组	0.208±0.024	0.419±0.044 [◆]	0.638±0.040 [◆]	0.416±0.042 [◆]
电针内关穴组	0.207±0.022	0.388±0.043 [◆]	0.494±0.039 ^{◆△}	0.362±0.049 ^{◆◆△}
电针环跳穴组	0.209±0.017	0.418±0.041 [◆]	0.608±0.066 ^{◆*}	0.411±0.046 ^{◆*}

注:与假手术组比较[◆] $P<0.01$,^{◆◆} $P<0.05$;与缺血再灌注组比较[△] $P<0.01$;与电针内关穴组比较^{*} $P<0.01$ 。

2.2 电针内关穴对MIRI大鼠腺苷A1受体的影响

腺苷A1受体阳性染色信号为黄色或棕黄色(深的可至褐色)染色,定位于细胞浆内。计算平均IOD值,即视野下的阳性表达部位的累积光密度和视野下样品面积的比值,得出阳性染色强度。实验主要采用平均IOD值作为腺苷A1受体组织化学染色阳性的参数。发现缺血再灌注组平均IOD较假手术组明显下降($P<0.01$),电针内关穴组平均IOD较缺血再灌注组明显升高($P<0.01$),与电针环跳穴组相比电针内关穴组平均IOD明显升高($P<0.01$),而电针环跳穴组与缺血再灌注组间无明显差异($P>0.05$),环跳穴组与假手术组间无明显差异($P>0.05$)。见表2。

2.3 电针内关对MIRI大鼠线粒体膜电位的影响比较

当线粒体膜电位较高时JC-1聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1不能聚集在线粒体的基质中,形成单体,产生绿色荧光,用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况,绿色荧光通过FITC通道通常为FL1来检测,红色荧光通过PI通道通常为FL2来检测。正

表2 各组大鼠腺苷A1受体的平均IOD比较结果 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	平均IOD
假手术组	0.044±0.007
缺血再灌注组	0.029±0.010 [◆]
电针环跳穴组	0.037±0.015
电针内关穴组	0.051±0.010 ^{△◆}

注:与假手术组相比,[◆] $P<0.01$;与缺血再灌注组相比,[△] $P<0.01$;与电针环跳穴组相比,[▼] $P<0.01$ 。

常细胞{FL-1亮,FL-2亮;R1},凋亡细胞{FL-1亮,FL-2暗;R2},流失检验结果如图1,R1(右上限)代表正常细胞,R2(右下限)代表凋亡细胞。流式细胞仪检测到的显绿色荧光的细胞数(凋亡细胞)可间接反映细胞线粒体膜电位的大小,凋亡细胞值越大,线粒体膜电位就越低。如表3所示缺血再灌注组凋亡细胞较假手术组有所升高($P<0.01$),则线粒体膜电位就越低;电针内关穴组凋亡细胞较缺血再灌注组和电针环跳穴组明显下降($P<0.05$),则线粒体膜电位越高;而电针环跳穴组与缺血再灌注组间无明显差异($P>0.05$)。以上结果提示电针内关穴预处理可以使MIRI大鼠线粒体膜电位升高。

表3 各组大鼠心肌凋亡细胞(线粒体膜电位)的比较 (n=10, $\bar{x}\pm s$)

组别	R1(红色荧光) 正常细胞(%)	R2(绿色荧光) 凋亡细胞(%)
假手术组	30.255±5.094	69.673±5.030
缺血再灌注组	10.232±1.752 ^{◆◆}	89.953±1.560 ^{◆◆}
电针环跳穴组	12.154±3.155	87.790±3.173
电针内关穴组	30.592±16.536 ^{△▼}	69.09±16.553 ^{△▼}

注:与假手术组相比,[◆] $P<0.05$,^{◆◆} $P<0.01$;与缺血再灌注组相比,[△] $P<0.05$;与电针环跳穴组相比,[▼] $P<0.05$ 。

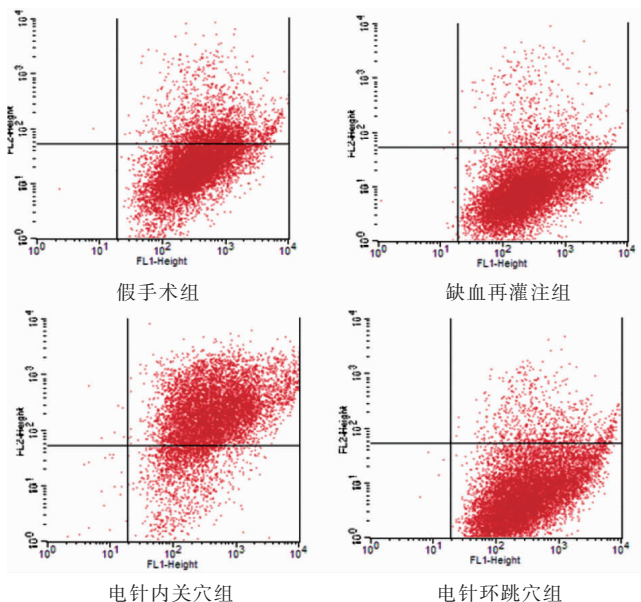


图1 各组流式检验凋亡细胞结果

3 讨论

冠状动脉左前降支是左心供血最主要的血管,通过结扎大鼠冠状动脉左前降支造心肌缺血再灌注模型是观察心肌保护最常用的模型。心肌缺血再灌注损伤是指在心肌血供中断一定时间后恢复血供,原缺血心肌发生较血供恢复前更为严重的损伤,表现为闭塞的冠状动脉再通、梗死区血液灌流重建后一段时间内,出现血压骤降、心功能不全、心律失常甚至猝死等现象^[8]。针灸预处理,是指预先采用针灸的方法对机体的某些腧穴进行刺激,增强机体的抗病与应变能力,并产生阻抑或减轻随后疾病损伤的方法,研究表明针灸预处理能启动机体的内源性保护机制,调动各种自我反馈和调节机制以维持内环境稳定,进而产生防病减病的保护作用。

腺苷是人体组织内产生的一种内源性核苷,是一种抗炎物质,对心脏功能有多方面的作用。腺苷 A1 受体与腺苷的亲合力最高,主要分布于心肌细胞内,通过调节增加细胞内 K^+ 和降低慢通道 Ca^{2+} 内流量而抑制窦房结自律性和降低房室结传导性^[9]。有研究表明,腺苷 A1 受体激动剂(CCPA)通过与细胞膜上的 A1 受体结合,激活 PKC,导致 KATP 通道开放,稳定线粒体膜电位和减少 ROS 生成,从而抑制 mPTP 开放,保护心肌细胞^[10]。本实验中缺血再灌注组平均 IOD 较假手术组明显下降($P<0.01$),说明缺血再灌注损伤会抑制腺苷 A1 受体的表达;电针内关组平均 IOD 较缺血再灌注组明显升高($P<0.01$),与电针环跳组相比电针内关组平均 IOD 明显升高($P<0.01$),电针内关组腺苷 A1 受体阳性率表达明显高于模型组和电针环跳穴组。以上结果说明电针内关穴预处理可以激活心肌细胞腺苷 A1 受体的表达,与环跳穴相比,内关穴对保护心肌细胞具有特异性作用。

线粒体是介导细胞凋亡的重要细胞器,线粒体膜电位是维持线粒体功能和结构的根本,它的改变将会造成线粒体膜发生一系列的功能和状态的变化。线粒体膜电位的丧失是心肌细胞凋亡早期的一个显著的特征。针灸可以调节线粒体能量代谢,介导线粒体的功能而抑制细胞凋亡,维持细胞内 Ca^{2+} 稳态,以及发挥对线粒体 DNA 的影响等方面的作用^[11]。本研究结果显示,与假手术组比,缺血再灌注组出现大量凋亡细胞,且差异具有统计学意义,说明缺血再灌注损伤会导致线粒体膜电位下降,破坏线粒体膜的完整性;同时与缺血再灌注组比,电针内关组凋亡细胞数明显减少,差异具有统计学意义。结果说明

电针内关穴预处理可以提高心肌细胞线粒体膜电位,减少心肌细胞凋亡,从而保护心肌;与电针环跳组相比,电针内关穴组心肌细胞凋亡数明显减少,差异具有统计意义,说明内关穴作为手厥阴心包经之络穴,对保护心肌具有特异性作用。

以上结果说明电针内关穴预处理可以诱导 MIRI 大鼠腺苷 A1 受体的表达,减少心肌细胞线粒体膜电位下降,其可能作用机制是针灸内关预处理通过诱导腺苷 A1 受体的表达,从而稳定线粒体膜电位,保护心肌细胞线粒体膜的完整,抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌细胞损伤程度,从而对心肌缺血再灌注起到保护作用,同时也进一步说明了内关治疗胸部疾病的特异性,内关穴为手厥阴心包经之络穴,又为八脉交会穴之一,通于阴维脉,手厥阴心包经起于胸中,出属心包络,向下通过横膈,从胸至腹依次联络上、中、下三焦,为经脉脏腑相关理论及针灸“治未病”,“胸肋内关谋”理论在临床的应用提供依据,从而更好的指导我们临床上应用电针内关治疗心血管疾病。

参考文献:

- [1] 阳晶晶,严洁,王超,等.针灸内关预处理对心肌缺血再灌注损伤血清 NO、NOS 及腺苷含量的影响[J].中国中医急症,2014,23(7):1209-1211,1227.
- [2] 严洁,田岳凤,刘健华,等.电针内关对心肌缺血再灌注损伤中心肌组织一氧化氮及一氧化氮合酶的影响(英文)[J].中国临床康复,2004,8(36):8400-8401.
- [3] 杨孝芳,王超,易受乡,等.电针内关对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌钙泵活性及其基因表达的影响[J].世界中西医结合杂志,2007,2(3):137-140.
- [4] 杨孝芳,王超,易受乡,等.电针内关对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞内钙离子浓度的调节[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(34):6759-6761.
- [5] 沈菁,王超,张佳丽,等.电针内关对心肌缺血再灌注损伤家兔 SOD 与线粒体膜电位的影响[J].湖南中医药大学学报,2015,35(7):47-49,53.
- [6] 夏洪莲,陈猛,芦相玉,等.腺苷 A1 受体拮抗剂对异丙酚诱导脑缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(7):727-731.
- [7] 汪谦.现代医学实验方法[M].北京:人民卫生出版社,1997:106.
- [8] 周建美.腺苷 A₁ 受体激动剂预处理延迟心肌保护作用的蛋白质组学研究[D].长沙:中南大学,2007.
- [9] 王韵,曹旭,高山红,等.腺苷对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国医科大学学报,2006,35(6):568-570.
- [10] 向飞.腺苷 A1 受体对缺氧心肌细胞线粒体通透性转换孔开放的影响及调控机制[D].重庆:第三军医大学,2007.
- [11] 熊萍.针灸治疗线粒体功能异常引起阿尔茨海默病的实验研究进展[J].湖北中医药大学学报,2014,16(1):106-109.