

·针灸推拿·

本文引用:王璐璐,吴子建,蔡荣林,胡玲,刘磊,余情,何璐.电针“神门”与“太渊”对急性心肌缺血模型大鼠心肌组织 HCN4 表达的研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(5):623-626.

电针“神门”与“太渊”对急性心肌缺血模型大鼠心肌组织 HCN4 表达的研究

王璐璐¹,吴子建²,蔡荣林²,胡玲²,刘磊¹,余情²,何璐²

(1.安徽中医药大学研究生院,安徽 合肥 230012;2.安徽中医药大学针灸经络研究所,安徽 合肥 230038)

〔摘要〕目的 探究电针经穴效应、后效应,比较电针心经原穴“神门”与肺经原穴“太渊”后在急性心肌缺血(AMI)模型大鼠心肌组织内超极化激活的环核苷酸门控通道 4(HCN 4)mRNA 与蛋白表达的影响。**方法** 大鼠随机分为正常组、模型组、电针“神 1”组、电针“神 2”组、电针“太 1”组、电针“太 2”组,每组 10 只。模型组、电针组复制 AMI 模型,电针组在模型复制后 1 d 予以 7 d 的治疗,电针最后一次即刻和次日同等时间分别取材,每组 6 只。以 RT-qPCR、western-blot 法分析心肌组织 HCN4 mRNA 相对表达量及蛋白平均相对表达量。**结果** HCN4 mRNA 和蛋白表达量:与正常组比较,模型组表达量二者显著减少($P<0.01$);与模型组比较,“神 1”“神 2”和“太 1”组二者表达量显著增多($P<0.01$);与“神 1”组比较,“神 2”“太 1”和“太 2”组二者表达量显著减少($P<0.01$);与“神 2”组比较,HCN4 mRNA 相对表达量“太 2”组显著减少($P<0.01$),HCN4 蛋白表达量“太 2”组显著减少($P<0.01$);与“太 1”组比较,“太 2”组二者表达量显著减少($P<0.01$)。**结论** 电针“神 1”“神 2”“太 1”组在治疗 AMI 大鼠模型中,能显著增加 HCN4 mRNA 和蛋白表达量,电针“神 1”组效果最为显著,电针“神门”和“太渊”均具有后效应,二者具有相对特异性差异且在一定程度上有持续的后效应的表达。

〔关键词〕 急性心肌缺血;神门穴;太渊穴;相对特异性;超极化激活;环核苷酸门控通道

〔中图分类号〕 R245

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.05.014

Study on the Expression of HCN4 in Myocardial Tissue of Rats with Acute Myocardial Ischemia by Electroacupuncture Shenmen (HT7) and Taiyuan (LU9)

WANG Lulu¹, WU Zijian², CAI Ronglin², HU Ling², LIU Lei¹, YU Qing², HE Lu²

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230012, China; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the acupoint effects and the post-effect of electroacupuncture, and to compare the effects of expression on cyclic nucleotide gated channel 4 (HCN 4) mRNA and protein activated by hyperpolarization in myocardial tissue in rats with acute myocardial ischemia (AMI) after electroacupuncture at the heart channel original point Shenmen (HT7) and the lung channel original point Taiyuan (LU9). **Methods** The rats were randomly divided into a normal group, a model group, an electroacupuncture "Shen1" group, an electroacupuncture "Shen2" group, an electroacupuncture "Tai1" group, and an electroacupuncture "Tai2" group, with 10 rats in each group. AMI models were replicated in the model group and the electroacupuncture group. The electroacupuncture group was treated 7 days after the model was replicated 1 day, and 6 AMI models were taken from each group immediately at the last time and at the same time the next day. The relative expression of HCN4 mRNA and the relative expression of protein in myocardial tissue were analyzed by RT-Qpcr and western-blot. **Results** HCN4 mRNA and protein expression levels: compared with the normal group, the expression levels in the model group were significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression levels of "Shen1", "Shen2" and "Tai1" groups were significantly increased ($P<0.01$). Compared with "Shen1" group, the expression levels of "Shen2", "Tai1" and "Tai2" groups were significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the "Shen 2" group, the relative HCN4 mRNA expression in the "Tai2" group were significantly decreased ($P<0.01$), and the HCN4 protein expression in the "Tai2" group was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the "Tai1" group, the relative expression in the "Tai2" group was significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion** The electroacupuncture "Shen1", "Shen2" and "Tai1" groups can significantly increase the expression level of HCN4 mRNA and

〔收稿日期〕 2019-01-07

〔基金项目〕 国家自然科学基金面上项目(81574083,21571180);国家重点基础研究发展计划(2015CB554504);安徽高校科研创新平台建设基金项目(2015TD033)。

〔作者简介〕 王璐璐,女,在读硕士研究生,研究方向:腧穴效应特异性及针灸临床应用研究。

〔通讯作者〕 * 吴子建,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:vagabondowl@163.com。

protein in the AMI rat model. The electroacupuncture "Shen1" group has the most significant effects. The electroacupuncture at both Shenmen (HT7) and Taiyuan (LU9) have post-effect, and the two have relatively specificity and have a sustained expression of persistence to some extent.

[**Keywords**] acute myocardial ischemia; Shenmen (HT7); Taiyuan (LU 9); relatively specificity; hyperpolarization activation; cyclic nucleotide gated channel

急性心肌缺血(acute myocardial ischemic, AMI)及梗死(infarction)后引起恶性心律失常导致心源性猝死(sudden cardiac death, SCD)发生率越来越高,其防治目前始终是心血管疾病研究范畴的重难点。电针对保护心脏有积极治疗作用,于心律失常、冠心病心绞痛和 AMI 均有良好效应,故电针已在医学临床上得到了普及应用^[1-3],但我们应深入探究其作用机制。

超极化激活的电流^[1](hyperpolarization-activated current, I_h)因受自主神经系统的调控可广泛参与对心脏的生理活动,同时其受超极化激活的环核苷酸门控(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide gated, HCN)通道的介导。 I_h 异常可以产生心脏方面的疾病,因其可调节神经内分泌系统的同时亦影响着某些病理状态的变化^[4-6]。我们前期实验^[7-10]已证实电针拥有相对特异性且与多种神经递质有相互联系,电针心经保护心脏即是通过自主神经调控的。本研究在前期基础上,比较电针心经的原穴神门和肺经的原穴“太渊”后,在不同时间点 AMI 模型大鼠心肌组织 HCN4 mRNA 和蛋白表达情况,从改善心脏自主神经活动,电针心经与肺经效应的相对特异性,以及电针后效应的相对特异性等方面研究,为深入探讨电针经穴效应相对特异性提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

同条件普食喂养 60 只普通健康雄性 SD 大鼠,购自安徽省实验动物中心,许可证号:scxk(皖)2011-002,体质量为(250±20)g。实验过程严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》^[11]。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:华佗牌 SDZ-V 型电子针疗仪(苏州医疗用品厂有限公司);荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);Powerlab 8 生理记录仪(澳大利亚 AD Instruments 公司);PIKO Plate Illuminator(美国 Thermo 公司);全自动凝胶成像系统(北京科创锐新生物科技有限公司)。

主要试剂:三氯甲烷(上海苏懿化学试剂有限公司,20151020);快速 PCR 反应试剂盒(Qiagen(凯杰)公司,151034942);引物合成(美国英杰生命技术有限公司);DEPC(美国 Sigma 公司,20150802554);

Trizol(美国英杰生命技术有限公司,批号:101002);逆转录试剂盒(第一链 cDNA 合成试剂盒,Thermo 公司,00287813);ECL 超敏发光试剂盒(美国 Thermo 公司,QE218149);beta-Actin(北京中杉);兔抗 HCN4(Bioss,bs-1691R,129kDa)。

1.3 模型复制及评价

将大鼠随机分为正常组、模型组、电针“神门”组(此组分为 2 组,电针“神门 8”组简称为“神 1”组,电针“神门 9”组简称为“神 2”组)、电针太渊组(此组分为两组,电针“太渊 8”组简称为“太 1”组,电针“太渊 9”组简称为“太 2”组),共 6 组,每组 10 只。

据前期工作并参考文献[12]采用左冠状动脉前降支结扎法复制大鼠急性心肌缺血模型。具体方法:室温条件下,将大鼠用乙醚麻醉后固定于鼠台上,剃除胸骨左缘鼠毛后用剪刀剪开此处皮肤,用止血钳顿性分离大鼠左侧的胸大肌,暴露左侧第 2、3、4 肋骨,可清晰地暴露出心脏暗影,用弯头止血钳迅速沿胸骨左缘 3、4 肋间分开肋骨,挤出心脏以充分暴露心脏及其表面的血管,用 6/0 医用缝合线在冠状动脉前降支挂线结扎,然后快速将心脏送回胸腔,用长嘴止血钳把胸部皮肤和肌肉夹紧,以防气胸,快速缝合肌肉皮肤。手术过程中,采用标准 II 导联心电图监控模型大鼠,满足以下一项即可认为急性心肌缺血模型复制成功:(1)T 波高耸并伴有 ST 段移位;(2)ST 段水平偏移,向上或向下偏移 ≥ 0.1 mV;(3)T 波高耸,超过同导联 R 波 1/2。

1.4 穴位定位及经脉段选择干预

穴位定位参考《实验针灸学》^[13]中实验动物的穴位及人体腧穴进行定位,选取心经原穴双侧的“神门”穴和肺经原穴双侧“太渊”穴并在各自穴位前方 1 mm 处刺入 1~2 mm 深度的针灸针并接电针仪,选择 1 mA 的疏密波,10 Hz 的频率,时间为 15 min,1 次/d。在模型复制后第 2 天开始电针治疗,持续 7 d,在电针最后一刻和次日的同等时间分别取材,称“神 1”组、“神 2”组、“太 1”组和“太 2”组,每组取 6 只,正常组和模型组未进行任何干预治疗。

1.5 检测指标

1.5.1 心电图检测及分析 采用 Powerlab 8 生理记录仪连接大鼠肢体端,测出并记录标准 II 导联心电图信号,处理心电信号,采用 Chart 5 软件进行分析。

1.5.2 RT-qPCR 法测定心肌组织 HCN4 mRNA

表达 实验结束即刻随机选取 6 只大鼠开胸取心,准确称取心肌左心室游离壁组织组织 200 mg 于冰冷生理盐水中漂洗数次后用滤纸吸干,迅速冷冻,以便测试。以实时荧光定量 PCR 法(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)检测 HCN4 mRNA 表达,其中 Rat β -actin 荧光定量引物序列为:Forward primer 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',Reverse primer 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3',产物长度为 150 bp;Rat HCN4 荧光定量引物序列为:Forward primer 5'-GTGCTGGAGGAGTATCCCA-3',Reverse primer 5'-GTTGAAGACGCCTGAGTTGA-3',产物长度为 132 bp。采用 relative quantification study 对 RT-qPCR 数据进行半定量分析,计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.5.3 Western-blot 分析心肌组织 HCN4 蛋白表达 随机选取的 6 只大鼠,准确称取其 100 mg 左心室游离壁组织后加入内含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 细胞裂解液 1 mL 进行裂解离心 10 min,12 000 转/min。收集含有组织总蛋白的上清液待测。使用 DS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天生物技术公司)配制凝胶后以 1:200 的比例用一抗稀释液稀释后 4℃缓慢摇动,过夜孵育后分别加入洗涤液洗 3 次,每次 10 min;用二抗稀释液稀释(比例为 1:10 000)辣根过氧化物酶来标记二抗,室温孵育 2 h 后分别加洗涤液洗涤 3 次,每次 10 min。以 ECL 发光试剂盒检测心肌组织 HCN 4 蛋白表达后以凝胶成像分析系统做分析检测。

1.6 统计学处理

数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”来表示,采用 Graphpad Prism 6 软件进行统计分析并绘制统计图表。计量资料用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较选择 Tukey's multiple comparisons test 检验有无统计学意义的 P 值,其中 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义, $P<0.01$ 表示差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 模型大鼠心电图改变

以 Powerlab 8 导生理记录仪来观测 AMI 模型复制前后心电图的变化状况来判断心肌缺血模型复制是否成功。图 1 为模型复制前后大鼠心电图,模型复制前为窦性心律,复制后 ST 段抬高即模型复制成功。

2.2 各组 HCN4 mRNA 相对表达量与蛋白平均相对表达量的结果

HCN4 mRNA 相对表达量结果:与正常组比较,模型组的表达量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,“神 1”“神 2”和“太 1”组相对表达量显著增多($P<0.01$);与“神 1”组比较,“神 2”“太 1”和“太 2”组的

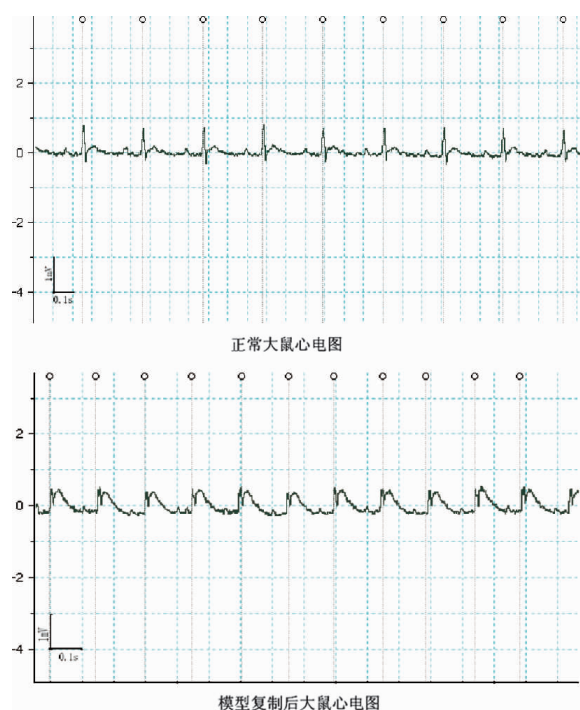


图 1 急性心肌缺血模型复制前后大鼠心电图对比

HCN4 mRNA 相对表达量减少($P<0.01$);与“神 2”组比较“太 2”组 HCN4 mRNA 相对表达量显著减少($P<0.01$);与“太 1”组比较,“太 2”组相对表达量显著减少($P<0.01$)。

HCN4 蛋白平均相对表达结果:与正常组比较,模型组的相对表达显著减少($P<0.01$);与模型组比较,“神 1”“神 2”和“太 1”组相对表达显著增多($P<0.01$);与“神 1”组比较,“神 2”“太 1”和“太 2”组相对表达显著减少($P<0.01$);与“神 2”组比较,“太 2”组相对表达显著减少($P<0.01$);与“太 1”组比较,“太 2”组相对表达显著减少($P<0.01$)。详见图 2,表 1。



图 2 各组心肌组织 HCN4 蛋白表达电泳图

表 1 各组 HCN4 mRNA 相对表达量与蛋白平均相对表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	mRNA 相对表达量	蛋白平均相对表达量
正常组	6	1.00±0.06	2.31±0.16
模型组	6	0.12±0.03**	0.64±0.14**
神 1 组	6	0.95±0.07 $\Delta\Delta$	1.89±0.08 $\Delta\Delta$
神 2 组	6	0.51±0.05 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.47±0.26 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
太 1 组	6	0.62±0.05 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.33±0.22 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
太 2 组	6	0.20±0.03 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.91±0.13 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$;与“神 1”组比较, $\Delta\Delta\Delta$ $P<0.01$;与“神 2”组比较, $\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P<0.01$;与“太 1”组比较, $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P<0.01$;与“太 2”组比较, $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

3 讨论

在本研究中,急性心肌缺血模型是由冠状动脉左前降支结扎法来复制的,并通过心电图证实模型复制成功后采集缺血局部心肌组织并进行组织匀浆,HCN4 mRNA 和蛋白在 RT-qPCR 法与 estern blot 法检测中的情况:比较正常组和模型组大鼠后表明电针心经原穴“神门”及肺经原穴“太渊”均可以促进急性心肌缺血模型大鼠心肌组织二者的表达,两者之间存在显著性差异。通过电针此两穴干预结束后 1 d 的相同时间段,相同的方法对相同部位的心肌组织取材并进行 HCN4 mRNA 和蛋白表达影响的比较后发现电针后 1 d 的 HCN4 表达较之电针干预结束后仍然有明显的促进作用,虽然两穴后效应作用在 HCN4 mRNA 和蛋白量上较电针本穴最后一次的即刻取材组表达量均显著减少,但电针原穴具有一定的后效应;而电针心经与肺经在调整心肌组织 HCN4 表达中具有相对特异性的影响则体现在电针“神门”穴和“太渊”穴的效应和后效应相对特异性差异中。本实验验证在 HCN4 mRNA 和蛋白表达量上,电针心经原穴“神门”穴及其后效应表达上效果均显著好于电针肺经原穴“太渊”穴。

经脉(穴)脏腑二者的联系有相对特异性^[14-15],前期的工作表明电针手少阴心经原穴“神门”可以在中枢神经系统的调控下,通过神经-体液途径有效地改善因急性心肌缺血导致的心肌组织缺血缺氧状态和认知功能障碍,并对急性心肌缺血模型动物的心率变异性有明显的调整干预意义^[16-19]。电针“神门”亦可以上调心肌缺血大鼠海马 BDNF、TrkB 的表达,促进心肌组织 HCN 2mRNA 和蛋白的表达,且与电针手太阴肺经原穴“太渊穴”比较二者拥有相对特异性差异,但是对于电针的后效应及电针对心肌组织细胞离子通道变化的研究相对较少。

HCN 通道具有的作用包括钠钾离子通透、超极化激活、胞内 cAMP 调节及微弱的单通道电导等,于中枢神经系统、心脏等处均有表达,同时可以维持心脏自主起搏性节律活动,亦可参与神经信号的传导。HCN 通道可以被超极化激活,是阳离子通道,这是与其他离子通道不同之处,神经系统就是通过其被激活的阳离子通道来调节递质和神经网络的发展。HCN 基因主要是分部于心脏传导系统,且在窦房结转录翻译产物中 HCN4 是占据着绝对优势。HCN 通道故被认为是起搏点去极化的重要离子机制和起搏活动所必须的独特的特征^[20-21],本实验通过电针实现对离子通道 HCN4 的刺激,初步认为信号是由各受体与各配体介导的离子通道转变为生物信号后传输的,HCN4 是心脏自主性

跳动的主要环节,参与冲动的形成亦影响其传播,在稳定心脏节律性上具有至关重要的作用^[22]。电针治疗急性心肌缺血脑损伤是否与电针调控其他离子通道有关,及电针介入治疗的时机与机制,尚亟待进一步研究。

参考文献

- [1] 老锦雄,潘清洁.背俞穴温针灸对冠心病无症状性心肌缺血患者心电图及血液动力学的影响[J].针灸临床杂志,2012,28(7):37-39.
- [2] 李林,方家,刘中勇,等.热敏灸治疗冠心病心绞痛 50 例临床观察[J].新中医,2011,43(12):82-84.
- [3] 吴长岩,贾乐红,吕志军.温针灸对冠心病心绞痛发作频率及静息心电图的影响[J].针灸临床杂志,2009,25(6):32-34.
- [4] 成秋平.HCN 通道特性研究[D].湖北:华中科技大学,2013.
- [5] 胡涛.利多卡因抑制大鼠脊髓背角胶质神经元超极化激活电流的作用研究[D].江西:南昌大学,2016.
- [6] 刘金凤,彭杰,汪艳丽,等.窦房结细胞起搏与超极化激活的环核苷酸门控通道关系的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2015,13(14):1622-1625.
- [7] 吴子建,蔡荣林,何璐,等.针刺“内关”“神门”穴对高脂血症大鼠心肌梗死后室旁核区和血清 5-羟色胺含量的影响[J].针刺研究,2013,38(6):482-487.
- [8] 李梦,胡玲,蔡荣林,等.电针内关、心俞穴对急性心肌缺血大鼠脊髓背根神经电活动及下丘脑室旁核去甲肾上腺素、多巴胺浓度的影响[J].中西医结合学报,2012,10(8):874-879.
- [9] 汪克明,刘婧,吴子建,等.针刺不同经穴干预心肌缺血模型大鼠下丘脑内单胺类递质的相对特异性[J].针刺研究,2011,36(3):205-208,235.
- [10] 吴子建,蔡荣林,徐春生,等.心经与肺经在大脑相对特异性的 fMRI 研究[J].中国针灸,2011,31(6):529-534.
- [11] 科学技术部.关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知[S].2006.
- [12] 纪影实,邵江波,关凤英,等.大鼠缺血性心律失常模型制备方法的改进[J].山西医科大学学报,2012,43(2):148-149.
- [13] 余曙光,郭义.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,2014:147-148.
- [14] 曾希玲,周美启,吴生兵.经脉脏腑相关理论在针灸临床中的应用研究概况[J].湖南中医杂志,2014,30(9):159-160.
- [15] 郭义,李桂华,李桂兰,等.脏腑-经穴相关机制的生化研究进展[J].天津中医药,2009,26(2):169-171.
- [16] 郝锋,刘磊,吴子建,等.电针不同经穴对心肌缺血模型大鼠大脑皮质区神经生长因子、酪氨酸激酶 A 表达的影响[J].针刺研究,2018,43(7):400-405.
- [17] 蔡荣林,崔帅,吴子建,等.电针心经经穴对心肌缺血大鼠下丘脑室旁核神经元电活动的影响[J].针刺研究,2018,43(7):406-413.
- [18] 吴子建,王洁,段文秀,等.电针心经与肺经对急性心肌缺血模型大鼠心肌组织超极化激活的环核苷酸门控通道 2 表达的影响[J].针刺研究,2018,43(3):175-179.
- [19] 吴子建,汪克明,王月兰,等.电针对心肌缺血细胞 G 蛋白信号通路的影响[J].针刺研究,2006,31(5):264-267,321.
- [20] FENSKE S, KRAUSE S, BIEL M, et al. The Role of Hcn Channels in Ventricular Repolarization[J]. Trends in Cardiovascular Medicine, 2011,21(8):5.
- [21] 钟妮尔,郑小璞,马爱群,等.链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠窦房结 HCN 通道表达的变化[J].山西医科大学学报,2016,47(5):406-410.
- [22] 周立,王庆志,王志勇,等.HCN4 基因在大鼠心脏不同发育时期的表达[J].实用儿科临床杂志,2009,24(19):1514-1516.