

针刺内关穴对心肌缺血/再灌注损伤大鼠脊髓背角和背根神经节内 5-羟色胺表达的影响

易受乡, 周国祥, 林亚平, 王晓顺

(湖南中医药大学针灸推拿学院, 经穴与脏腑相关重点实验室,
国家中医药管理局三级实验室, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的 探讨针刺内关穴对缺血/再灌注(I/R)损伤大鼠心肌的保护作用及其与脊髓背角和背根神经节(DRG)内 5-羟色胺(5-HT)的关系。方法 将 40 只大鼠随机分为正常对照组、假手术组、模型组、针刺组 4 组, 每组 10 只。结扎大鼠左冠状动脉前降支造成心肌 I/R 损伤模型, 假手术组只穿线不结扎; 针刺组在针刺大鼠内关穴 5 d 后再行 I/R。采用分光光度计测定血清缺血修饰白蛋白(IMA)含量, 用免疫组化法测定脊髓背角和 DRG 内 5-HT 阳性表达量。结果 模型组大鼠心肌 I/R 损伤后心电图 ST Ⅰ 电位值、血清 IMA 含量、脊髓背角和 DRG 内 5-HT 阳性表达量均显著高于正常对照组和假手术组, 而针刺组上述指标则较模型组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 针刺内关穴能减少血清 IMA 含量, 降低心电图 ST Ⅰ 电位值, 对缺血心肌具有保护作用, 其机制可能与针刺通过干预脊髓背角和 DRG 内 5-HT 的表达, 抑制缺血伤害性刺激的传导, 减轻心肌应激性损伤有关。

【关键词】 针刺; 内关穴; 缺血/再灌注损伤; 心肌; 缺血修饰白蛋白; 5-羟色胺

中图分类号: R245.9; R256.2 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.001

The effect of acupuncture at Neiguan point (内关穴) on expression of 5-hydroxytryptamine in the dorsal spinal cord and dorsal root ganglion in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats YI Shou-xiang, ZHOU Guo-xiang, LIN Ya-ping, WANG Xiao-shun. Major Laboratory of Meridians and Viscera, Tertiary Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Institute of Acupuncture, Moxibustion and Massage, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

【Abstract】 **Objective** To observe the protective effect of acupuncture at Neiguan point (内关穴) on myocardia in rats with myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury and explore the relationship between the effect and the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the dorsal spinal cord and dorsal root ganglion (DRG). **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: normal control, sham operated, model and acupuncture groups (each $n=10$). The rat models of I/R were established by ligating the left anterior descending coronary artery. The artery was not ligated, but a thread was passed around it in the sham operated group. The rats took acupuncture at Neiguan point everyday for 5 days, and then I/R was performed on them in the acupuncture group. Spectrophotometry was used to detect the content of ischemia modified albumin (IMA) in serum, while immunohistochemical method was applied to detect the expression of 5-HT in the dorsal spinal cord and the DRG. **Results** The value of ST Ⅰ in electrocardiogram (ECG), the content of IMA in serum and expression of 5-HT in dorsal spinal cord and DRG in model group were all significantly higher than those in the control and sham operated groups. But the indexes mentioned above of acupuncture group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Acupuncture at Neiguan point can decrease the content of IMA and degrade the value of ST Ⅰ in ECG, so it may protect myocardia in rats with I/R. The mechanism is probably related to the regulation of the expression of 5-HT in dorsal spinal cord and DRG, and inhibition of transduction of ischemia noxious stimulation, thus the myocardial irritability injury is reduced.

【Key words】 acupuncture; Neiguan point; myocardial ischemia/reperfusion injury; ischemia modified albumin; 5-hydroxytryptamine

基金项目: 国家“973”计划资助项目(2005CB523306); 湖南省自然科学基金资助项目(06JJ50049)

作者简介: 易受乡(1946-), 女(汉族), 湖南省人, 教授, 主要研究方向为针灸治病机制的研究, 曾获国家教育部自然科学二等奖, 发表相关领域学术论文 40 余篇, Email: yishouxian@yahoo.com.cn.

近年来已有不少关于从临床和分子生物学方面使用针灸调整心肌缺血机制研究的报道^[1-3]。而针灸是否通过对神经传导通路上相关物质的影响,抑制心肌缺血伤害性神经信号传递过程,从而实现对心肌保护的机制鲜有报道。本研究中通过观察针刺内关穴对心肌缺血/再灌注(I/R)损伤大鼠心电图 ST 段电位值、血清缺血修饰白蛋白(IMA)含量及大鼠颈 5~胸 1(C5~T1)节段脊髓背角和背根神经节(DRG)内 5-羟色胺(5-HT)表达的影响,以探讨针灸对 I/R 损伤心肌的保护作用;揭示针灸对缺血伤害性刺激信号传入的干预作用及其与 5-HT 的关系,进一步阐明针刺内关穴对心肌保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及心肌 I/R 损伤模型制备方法:健康清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180~220 g,月龄 3~4 个月,购自上海西普-比凯尔实验动物有限公司。将 40 只动物按随机数字表法分为 4 组,每组 10 只。正常对照组:麻醉捆绑后静置 60 min;假手术组:开胸后于左冠状动脉(冠脉)前降支(LAD)下穿线静置 60 min;模型组:开胸后结扎 LAD 20 min、再灌注 40 min;针刺组:针刺内关穴 5 d 后,麻醉、开胸结扎 LAD 20 min、再灌注 40 min。各组大鼠均麻醉后捆绑,全程记录心电图(标 I 导联)。

模型制备方法:腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠,常规记录心电图、行气管插管、接动物人工呼吸机。开胸暴露心脏,结扎 LAD,以左室前壁向外膨胀、发绀及心电图 ST 段抬高>0.5 mm 为心肌缺血的标准;结扎 20 min 后放松闭环恢复 LAD 灌流 40 min,制模过程完成。剔除结扎前心电图不正常,或未观察到终点而死亡以及制模不成功的动物。

1.2 取穴及针刺方法:根据《实验针灸学》中大鼠针灸穴位定位方法及拟人比照法取内关穴(位于大鼠前臂下 1/6 折点处,桡、尺骨缝中),以医用 15 mm、30 号毫针直刺双侧内关穴 1~2 mm。针刺组针刺内关穴平补平泻 1 min 后留针,共 30 min,每日 1 次,

连续 5 d。

1.3 观察指标与检测方法

1.3.1 心电记录及分析:用生理记录仪持续监测心电图,以 ST 段抬高程度作为衡量心肌缺血程度。分别于冠脉结扎前及缺血 20 min 末、再灌注 40 min 末取 5 个心动周期的 ST 段电位值(定标 1 mV/cm),以其均值作为衡量心肌缺血程度和恢复的指标。

1.3.2 血清 IMA 含量测定:取颈动脉血 3 ml,离心取血清,用分光光度计测定其在 470 nm 处的吸光度(A)值,IMA 结果以吸光度单位(ABSU)表示。

1.3.3 大鼠脊髓背角和 DRG 内 5-HT 阳性表达的测定:每组随机挑选 5 只大鼠,颈动脉取血后,经左心室插入升主动脉导管行心脏灌流固定,然后迅速取出 C5~T1 节段的脊髓 DRG 和相应节段脊髓,用多聚甲醛水溶液固定,石蜡包埋,连续冠状切片,行非生物素酶法(PV 二步法)免疫组化,显微镜摄片,图像分析系统分析。5-HT 阳性表达判定标准为细胞核中出现棕色或棕黄色颗粒,每张切片随机分析 3 个高倍视野(40×10),计阳性细胞数密度(阳性细胞数/统计场面积),取平均值。

1.4 统计学处理:数据用 SPSS 16.0 软件处理。结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行 *t* 检验、方差分析、LSD 法(组间方差齐)、Tamhane's T2 法(总体方差不齐),*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 针刺内关穴对 I/R 损伤大鼠心电图的影响(表 1):结扎前各组动物间 ST I 电位值比较差异无统计学意义(*P*均>0.05)。正常对照组和假手术组 ST I 电位值在 60 min 的观察过程中无显著变化(*P*均>0.05)。结扎后模型组和针刺组 ST I 电位值较结扎前均有显著提高(*P*均<0.01),其中模型组差值明显高于针刺组(*P*<0.01)。再灌注后模型组和针刺组 ST I 电位值都有降低(*P*均<0.01),而针刺组 ST I 电位值差值显著低于模型组(*P*<0.01),但仍高于正常对照组和假手术组(*P*均<0.01)。

表 1 各组大鼠不同时间点心电图 ST I 电位值的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	ST I 电位值(mV)			ST I 电位值差值(mV)	
		结扎前(1)	缺血 20 min(2)	再灌注 40 min(3)	(2)-(1)	(3)-(1)
正常对照组	10	0.021±0.005	0.023±0.006	0.024±0.005	0.002 0±0.000 5	0.002 0±0.000 4
假手术组	10	0.022±0.004	0.024±0.005	0.028±0.006	0.003 0±0.000 4	0.005 0±0.000 5
模型组	10	0.020±0.005	0.323±0.084 ^a	0.216±0.054 ^{ab}	0.303 0±0.074 0 ^{df}	0.196 0±0.053 0 ^{df}
针刺组	10	0.023±0.004	0.195±0.039 ^a	0.121±0.027 ^{ab}	0.172 0±0.049 0 ^{df}	0.118 0±0.021 0 ^{df}

注:与本组结扎前比较,^a*P*<0.01;与本组缺血 20 min 比较,^b*P*<0.01;与正常对照组比较,^d*P*<0.01;与假手术组比较,^f*P*<0.01;与模型组比较,^h*P*<0.01

2.2 针刺内关穴对心肌 I/R 损伤大鼠血清 IMA 含量的影响(表 2):I/R 损伤后模型组大鼠血清 IMA 含量明显高于正常对照组和假手术组(P 均 <0.01);而针刺组血清 IMA 含量则较模型组显著降低,但仍高于正常对照组和假手术组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组大鼠血清 IMA 含量和脊髓背角、DRG 内 5-HT 阳性表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	IMA(ABSU)	5-HT($\times 10^{-3}/\mu\text{m}^2$)	
		脊髓背角	DRG
正常对照组	12.9 $\pm$ 3.6(10)	47.2 $\pm$ 12.9(5)	18.6 $\pm$ 5.2(5)
假手术组	17.5 $\pm$ 5.4(10) ^c	67.3 $\pm$ 13.8(5) ^c	35.9 $\pm$ 6.7(5) ^c
模型组	65.7 $\pm$ 12.4(10) ^{df}	210.2 $\pm$ 45.6(5) ^{df}	116.3 $\pm$ 20.7(5) ^{df}
针刺组	38.3 $\pm$ 5.6(10) ^{deq}	54.6 $\pm$ 22.3(5) ^{deq}	85.3 $\pm$ 16.4(5) ^{deq}

注:与正常对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与假手术组比较,

^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;与模型组比较,^g $P<0.05$;括号内为动物数

2.3 针刺内关穴对心肌 I/R 损伤大鼠脊髓背角和 DRG 内 5-HT 阳性表达的影响(彩色插图 1~2;表 3):切片背底清晰,细胞核经苏木素复染为浅蓝色,5-HT 阳性染色为棕色。模型组大鼠脊髓背角和 DRG 内 5-HT 阳性表达显著高于正常对照组和假手术组(P 均 <0.01);针刺组大鼠脊髓背角和 DRG 内 5-HT 阳性表达亦显著高于正常对照组和假手术组(P 均 <0.01),但低于模型组(P 均 <0.05)。

3 讨论

心电图 ST Ⅰ 电位值抬高被视为大鼠心肌缺血损伤的判断标准^[4]。本实验中模型组和针刺组制模后 ST Ⅰ 电位值均明显高于制模前,表明大鼠心肌缺血模型成功。再灌注后针刺组和模型组 ST Ⅰ 电位值均下降,但仍明显高于制模前,表明再灌注恢复供血后心肌损害的程度均有所缓解,但未能恢复到制模前水平。再灌注后针刺组 ST Ⅰ 电位值明显低于模型组,说明针刺内关穴能减轻心肌 I/R 损伤程度,促进心肌缺血的恢复。

Bar-Or 等^[5]发现心肌缺血患者血清白蛋白在体外结合外源性钴的能力降低,推测在心肌缺血期间或缺血事件后,白蛋白 N-末端部分分子显著改变或丧失,与金属离子的结合力降低,这种 N-末端发生改变的白蛋白叫做 IMA,而 IMA 在心肌缺血发生后 5~10 min 迅速升高。现有的生化标志物如肌钙蛋白、肌酸激酶同工酶、肌红蛋白仅在心肌细胞损伤的基础上释放。作为一项新的早期诊断心肌缺血的生化标志物,IMA 同其他检测指标相比,具有敏

感性高、阴性预测值高、出现时间早等优点^[6]。因而本研究中采用 ST 段电位值和血清 IMA 含量的变化作为制模成功与否和针刺疗效的判断依据,表明制模刺激使心肌受到损伤,而针刺内关穴能降低血清 IMA 的含量,具有保护心肌的作用。

5-HT 是体内活跃的自体活性物质,它不仅与炎症、免疫有关,而且还广泛参与体内的多种病理生理过程。当机体受到损伤、体内发生体液免疫或细胞免疫时,可引起 5-HT 释放,并作用于效应细胞受体,产生炎症反应;当机体的生理状态发生某种改变时,亦可引起 5-HT 的释放,通过直接或间接作用途径,使组织器官的生理活动或组织结构发生改变^[7]。有研究认为,脊髓去甲肾上腺素(NE)系统的完整性是腺苷和 5-HT 在脊髓水平对伤害性刺激信号发挥调制作用的重要前提^[8]。NE 和 5-HT 等单胺类神经递质参与脊髓水平下行伤害性刺激的调控,NE 通过 α -肾上腺素能受体,5-HT 通过 5-HT 受体的作用共同阻抗伤害性冲动的传导,降低疼痛的敏感性^[9]。在心肌缺血性疼痛的产生、传导和调制过程中,伴随着大量神经递质及其受体的活动^[10]。心肌缺血、缺氧时,心脏交感神经将伤害性刺激信号经 DRG 细胞的中枢突和脊髓背角上行投射性神经元上传至上位高级中枢而感受疼痛^[11]。疼痛引起机体应激反应而释放儿茶酚胺等物质,反过来使病变血管收缩和增加心脏做功,从而使已经缺氧的心肌更加缺氧,加重心肌的缺血性伤害^[12]。伤害性感受的通路是靠阿片肽和 5-HT 调节,或靠激活阿片受体和 5-HT 受体调节的^[13]。心肌缺血可明显诱发大鼠丘脑束旁核部位 5-HT 受体 mRNA 的表达,5-HT 受体参与了急性心肌缺血性疼痛/伤害刺激在大鼠脑束旁核的调制^[14]。中枢 5-HT 受体激动后,通过抑制 5-HT 的释放来调节交感和迷走神经的活动,使交感神经活性降低,心肌缺血伤害性刺激传入冲动减少^[15],从而起到心肌保护作用。

大量临床报道,针灸对缺血性心绞痛的临床疗效肯定,可降低心肌耗氧量,增加冠脉血流量,缓解心绞痛症状,减少硝酸甘油含服量,改善心电图缺血 ST 段等^[1]。实验研究表明,针刺对冠心病的调整作用与改善冠脉血液循环,降低血液黏稠度,减轻血管内皮细胞损伤,提高抗氧化酶活性,改善心肌细胞的缺血、缺氧状态有关^[2]。近年来研究发现,针刺手厥阴经穴不仅可降低心肌肌钙蛋白 T(cTnT),还能抑制心肌细胞的凋亡,从而减轻心肌 I/R 损伤程度^[3]。内关穴是治疗心血管疾病的重要穴位之一。本课题

组以往研究表明,针刺内关穴有显著的抗心肌 I/R 损伤的作用^[16-18]。本研究中再次观察到针刺内关穴可促进心肌 I/R 损伤大鼠心电图 ST 段的恢复、降低血清 IMA 含量,减轻心肌 I/R 损伤程度,加速缺血心肌的修复,对缺血心肌具有良性保护作用。针刺内关穴保护心肌的机制可能为:急性心肌缺血时,大鼠相应节段脊髓背角和 DRG 内 5-HT 表达显著增高,多为疼痛引起机体应激反应,致儿茶酚胺类递质释放增加,从而增加心脏做功及心肌需氧量,进一步加重了心肌缺氧。而针刺干预可显著降低冠脉结扎后大鼠脊髓背角和 DRG 内 5-HT 表达,提示针刺可通过降低交感神经的兴奋性,调制急性心肌 I/R 损伤大鼠伤害性刺激的传导,减轻机体的应激反应,从而起到保护心肌的作用。

参考文献

- [1] 刁利红,严洁. 针灸治疗冠心病心肌缺血临床研究概况[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(4): 59-61.
- [2] 田岳凤,吴富东,乔海法,等. 针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血/再灌注损伤肌钙蛋白 T 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(1): 3-5.
- [3] 张艳玲,周苏宁. 细胞凋亡与心肌缺血/再灌注损伤及中医药研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(3): 187-189.
- [4] 严洁,杨孝芳,易受乡,等. 电针“内关”对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞膜钠泵活性及其基因表达的影响[J]. 针刺研究, 2007, 32(5): 296-300.
- [5] Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia—a preliminary report[J]. J Emerg Med, 2000, 19(4): 311-315.
- [6] 龙国文,胡佳林. 缺血修饰白蛋白——新的心肌缺血生化标志物[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 77-80.
- [7] 陈宝生,刘声远. 5-羟色胺对平滑肌的作用[J]. 河南科技大学报, 2004, 22(4): 312-314.
- [8] Li X, Conklin D, Ma W, et al. Spinal noradrenergic activation mediates allodynia reduction from an allosteric adenosine modulator in a rat model of neuropathic pain[J]. Pain, 2002, 97(1-2): 117-125.
- [9] Markenson JA. Mechanisms of chronic pain[J]. Am J Med, 1996, 101(1A): S6-18.
- [10] 牛燕兰,郭政. 结扎大鼠冠状动脉对心肌和背根神经节内肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(11): 657-661.
- [11] Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(1): 31-47.
- [12] 安建雄, 袁克非, 刘进. 胸部硬膜外阻滞治疗顽固性心绞痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2000, 6(2): 109-115.
- [13] Dafny N, Reyes-Vazquez C, Qiao JT. Modification of nociceptively identified neurons in thalamic parafascicularis by chemical stimulation of dorsal raphe with glutamate, morphine, serotonin and focal dorsal raphe electrical stimulation[J]. Brain Res Bull, 1990, 24(6): 717-723.
- [14] 温建忠, 郭政. 急性心肌缺血期大鼠丘脑束旁核神经元 5-HT_{1A} 受体 mRNA 表达变化的研究[J]. 中国急救医学, 2007, 27(6): 539-542.
- [15] 刘保坚, 邱学才. 中枢 5-羟色胺受体与心血管活动的调节[J]. 北京医科大学学报, 1992, 24(5): 421-423.
- [16] 田岳凤, 易受乡, 严洁, 等. 电针内关穴对心肌缺血/再灌注损伤预防保护作用的实验研究(I)——对超微结构及细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 15-18.
- [17] 杨昱, 易受乡, 林亚平, 等. 电针内关穴对家兔心肌缺血的延迟保护作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(4): 442-443.
- [18] 杨孝芳, 王超, 易受乡, 等. 电针内关穴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.

(收稿日期: 2009-03-30 修回日期: 2009-04-20)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

第四次全国中毒与危重症救治学术会议征文通知

为了提高我国中毒与急危重症的救治水平,认真总结交流近年来在临床经验和学术研究成果,经中国毒理学会批准,中国毒理学会中毒与救治专业委员会第四次全国中毒与危重症救治学术会议定于 2010 年 3 月在广东省深圳市召开,届时将有我国中毒与危重症救治方面的专家作专题报告介绍中毒与危重症救治方面的最新进展。现将征文内容通知如下。

征文内容:①各种农药、药物、重金属、有害气体等中毒救治的基础和临床研究;②心、肝、肾、呼吸等多器官功能衰竭的救治;③人工气道管理与呼吸机的应用;④危重病各种监测技术和经验交流;⑤急危重病救治的新技术、新药物及新方法;⑥中毒与危重症救治中的组织管理及体会;⑦中毒与危重症的院前急救、现场救治及转运;⑧中毒性疾病的检测与监控;⑨中毒、急危重病救治护理经验介绍;⑩血液净化在中毒及危重症中的应用;⑪中毒及危重症患者的早期营养支持。

征文要求:文章请用稿纸书写或打印,加盖公章或介绍信,来稿一律不退,请自留底稿;全文字数 3 000 字以内,并附 300~500 字摘要,同时附电子版。

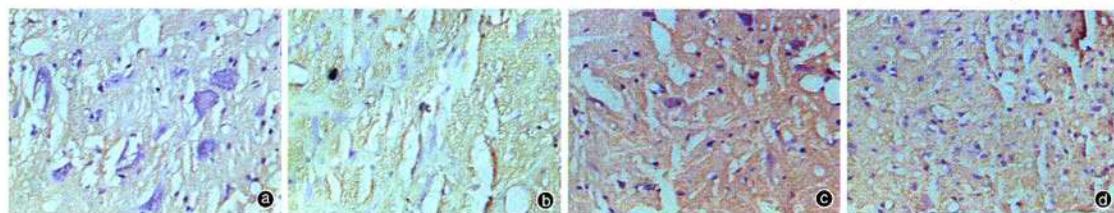
稿件截止日期:2010 年 1 月 28 日,以邮戳为准,同时将论文电子版发至 Email: zww-5@163.com。

稿件邮寄地址:广东省深圳市宝安区宝城 4 区龙井二路 118 号 深圳市宝安区人民医院急诊科 张文武收,邮编:518101;电话:0755-27880712;手机:13923453969。

(中国毒理学会中毒与救治专业委员会)

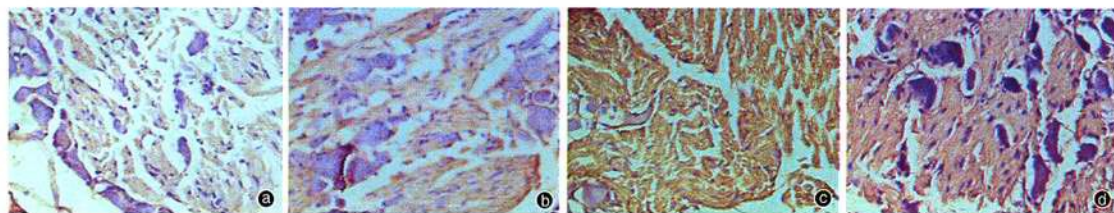
针刺内关穴对心肌缺血/再灌注损伤大鼠脊髓背角和背根神经节内5-羟色胺表达的影响

(正文见195页)



①:正常对照组; ②:假手术组; ③:模型组; ④:针刺组

图1 各组大鼠脊髓背角内5-HT阳性表达(免疫组化, ×400)

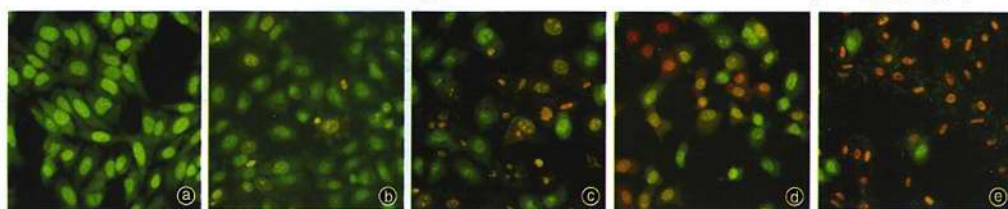


①:正常对照组; ②:假手术组; ③:模型组; ④:针刺组

图2 各组大鼠DRG内5-HT阳性表达(免疫组化, ×400)

归肝经中药对肝癌HepG2细胞增殖抑制及凋亡诱导作用的研究

(正文见199页)



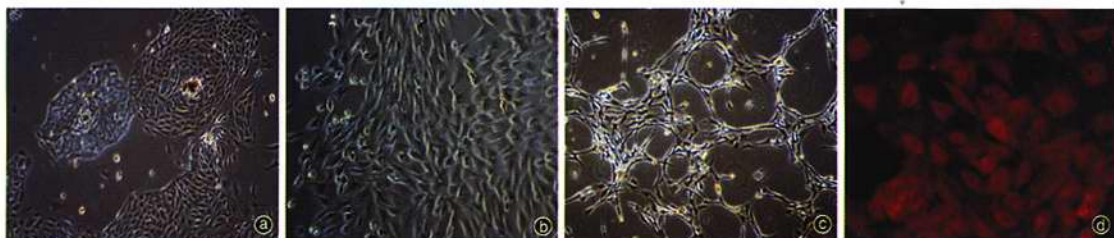
①:对照; ②:白花蛇舌草; ③:丹参; ④:水蛭; ⑤:莪术

图1 不同归肝经中药IC50药物浓度处理48 h后HepG2细胞凋亡情况(AO/EB双染, ×400)

血必净注射液对脂多糖诱导大鼠肾脏微血管内皮细胞

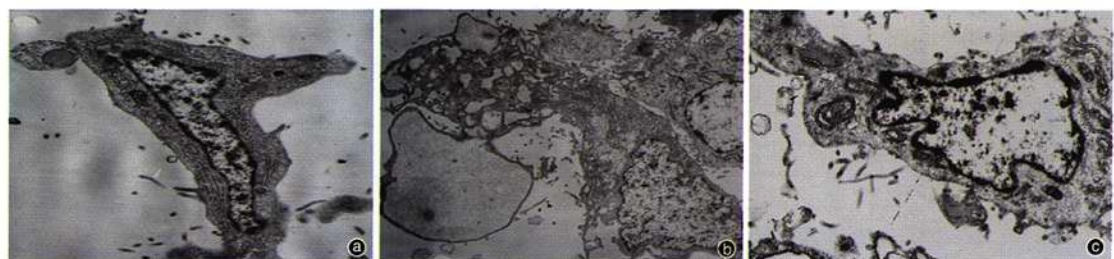
组织因子表达的影响及机制探讨

(正文见218页)



①:培养3~4 d; ②:培养6 d; ③:传代后; ④:分离培养后(间接免疫荧光)

图1 倒置显微镜下观察原代分离培养大鼠RMECs不同阶段的变化(×400)



①:对照组(×3000); ②:10 mg/L LPS作用24 h组(×5000); ③:血必净25.0 g/L治疗组(×7000)

图2 透射电镜下观察各组大鼠RMECs形态学变化(铀-铅双染)