

针刺“内关”、“心俞”穴对冠状动脉粥样硬化性心脏病模型大鼠 MMP-9 基因表达的影响*

孙旭¹, 李梦^{2△}, 沈德凯¹, 胡玲¹, 蔡荣林¹, 吴子建¹, 韦志强², 彭传玉²

(1. 安徽中医学院针灸经络研究所, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医学院, 安徽合肥 230038)

摘要:目的 探讨针刺“内关”、“心俞”穴对冠心病的治疗作用及其机制,为临床防治冠心病和腧穴配伍作用提供实验依据。方法 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 75 只,按照随机抽样的方法选择 15 只作为正常对照组,其余大鼠饲喂高脂饲料复制冠心病模型,随机选择 15 只大鼠作为针刺预处理组,在模型复制的同时予针刺“内关”、“心俞”干预治疗。其余模型复制成功的大鼠随机分为模型对照组、针刺治疗组、阳性药物对照组,每组 15 只。针刺治疗组选取“内关”和“心俞”进行针刺治疗,药物对照组予以阿托伐他汀混悬液灌胃,治疗两周。实验结束后,HE 染色观察大鼠冠状动脉脂质沉积情况;采用荧光定量 PCR 法检测冠状动脉组织 MMP-9 mRNA 表达情况。结果 模型复制成功后,模型组大鼠冠状动脉组织脂质沉积及 MMP-9 mRNA 表达量明显高于正常对照组($P<0.01$)。而与模型组相比较,针刺预处理组、针刺治疗组和阳性药物对照组大鼠冠状动脉组织脂质沉积及 MMP-9 mRNA 表达显著减少($P<0.01$);且针刺治疗组与阳性药物对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 电针“内关、心俞”组穴可以有效地降低 CHD 模型大鼠冠状动脉内壁脂质沉积量,同时能够减少 MMP-9 mRNA 表达水平,金属基质蛋白酶-9 可能是针刺防治冠状动脉粥样硬化性心脏病的重要目标物质之一。

关键词: 内关; 心俞; 冠状动脉粥样硬化; 金属基质蛋白酶-9

中图分类号: R245.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)02-0005-05

冠状动脉性心脏病 (coronary heart disease, CHD), 简称冠心病, 是最常见的心血管疾病之一。针灸治疗冠心病, 临床应用广泛, 疗效确切^[1-2]。有研究发现, 针灸能够使颈动脉粥样硬化斑块消退, 可以明显改善冠心病心肌缺血动物模型的心功能、心率变异性、心肌酶、血浆乙酰胆碱与去甲肾上腺素等水平, 可改善颈动脉和脑动脉血流状况, 有助于减轻和防止颈动脉粥样硬化的发生和发展^[3-8]。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发病机制众说纷纭, 目前普遍认为 AS 是一种炎症性疾病, 同时与自身免疫应答关系密切。近年来的研究表明, 基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinases-9, MMP-9) 与 AS 病变和斑块结构具有密不可分的关系^[9-10]。但目前对针刺防治 CHD 的基础研究不够深入,

MMP-9 可能作为致病因素的研究也缺乏系统和完整的报道。针刺对动脉粥样硬化斑块的改善作用是否与 MMP-9 有关还有待于进一步深入研究。

我们的前期研究发现, 针刺“心俞”和“内关”组穴在心电图、心率变异性和血流变^[4-6, 11]等方面的改善作用优于“心俞”、“内关”穴的单独应用。为了系统的阐述“内关”、“心俞”穴对心脏的保护作用, 进一步明确针刺治疗 CHD 的作用机制, 本文从影响斑块形成的角度, 观察针刺“内关”、“心俞”预处理和治疗对 CHD 模型大鼠病理形态学变化的影响, 并采用荧光定量 PCR 法检测针刺前后冠状动脉组织 MMP-9 mRNA 表达的变化, 以期探明 MMP-9 在针刺防治 CHD 过程中的作用, 为临床治疗冠心病和腧穴协同作用研究提供实验依据。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (NO: 81102659); 安徽省高等学校自然科学研究项目 (NO: KJ2011A188); 针灸基础与技术安徽省重点实验室开放基金资助项目 (NO: 2009zjkf001A)

收稿日期: 2013-02-28 修回日期: 2013-04-03

作者简介: 孙旭 (1986~), 男, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要从事针灸防治心脑血管疾病作用及其机制的研究。

△通信作者: 李梦, E-mail: limeng2004@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

220~260 克清洁级健康雄性 Wistar 9 周龄大鼠 75 只, (南京安立默实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (苏) 2011-0005)。同等条件下饲养于室温 (24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 (55 ± 5)%, 12h 明暗交替环境中, 适应性喂养 1 周。

1.2 仪器与试剂

DYY-6B 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂), TGL-18R 冷冻离心机 (黑马仪器公司), 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司 ABI7500), 低速离心机 (上海飞鸽离心机 TDL-40B), 可调式移液器 (Eppendorf 可调式移液器), Trizol Reagent (Invitrogen 公司, 货号: 15596-026), 逆转录试剂盒 (RevertAidTM first Strand cDNA Synthesis Kit) (Fermentas 公司, 货号: 00064525), 氯仿 (上海建信化工有限公司试剂厂), 无水乙醇 (上海苏燃化学试剂有限公司), 异丙醇 (南京化学试剂厂), 焦碳酸二乙酯 (Ruibio 公司), 引物及探针合成 (Invitrogen 公司), 荧光定量试剂及实验耗材 (TaKaRa 公司)

1.3 模型复制与分组

按照随机分组方法, 将大鼠按照体重从小到大排序并标号, 抽取随机数字对应各大鼠, 每个数字分别除以 5 取余数, 根据余数分组, 选择 15 只大鼠作为正常对照组, 其余大鼠分别为模型对照组、针刺预处理组、针刺治疗组和阳性药物对照组, 各组大鼠进行模型复制。根据参考文献[12-13]的模型复制方法采用高脂饲料及 VD3 诱发大鼠 AS: 饲喂高脂饲料 (4%胆固醇、10%猪油、5%白糖、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、80.3%基础饲料), 并在饲养开始时, 腹腔注射 VD3 2mL/kg (60 万 IU/kg), 分 3 次, 连续 3 天完成。共喂养 12 周, 每周一记录体重。正常对照组大鼠仅饲喂基础饲料, 并在饲养开始时, 腹腔注射生理盐水 2mL/kg, 分 3 次, 连续 3 天完成。高脂喂养 12 周后, 造模大鼠每组随机抽取 2 只, 观察动脉脂质沉积, 确认模型复制成功。造模过程中模型对照组与针刺治疗组大鼠各死亡 1 只; 治疗过程中阳性药物对照组与针刺预处理组大鼠各死亡 1 只。将死亡大鼠剔除, 其余模型复制成功的大鼠每组 12 只。

1.4 实验方法

正常对照组及模型对照组: 给予蒸馏水灌胃

2mL $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹, 共 2 周。

针刺预处理组: 在模型复制开始时即进行针刺干预, 将大鼠置于自制高台上, 用华佗牌 1.5 寸针灸针针刺“内关”穴和“心俞”穴, 行提插捻转手法治疗, 每次 30min, 每 10min 行针 1 次, 隔日 1 次, 共 12 周。

针刺治疗组: 模型复制成功后, 予普通饲料喂养大鼠, 并开始针刺治疗, 治疗方法同针刺预处理组, 每天 1 次, 共 2 周。(说明: 关于对于大鼠治疗的 2 周设置, 是我们根据文献发现其他研究者对大鼠使用阿托伐他汀治疗 1 周效果明显的基础上设置的。)

阳性药物对照组: 以阿托伐他汀混悬液 0.25mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 灌胃给药, 每天 1 次, 共 2 周。

1.5 标本采集

实验结束时, 用 25%乌拉坦以 2mL/kg 体重腹腔注射麻醉, 大鼠仰卧于手术台上, 固定头部及四肢, 剪开腹部正中皮肤及肌肉, 分离腹主动脉, 负压管采集动脉血。开胸暴露心脏, 取主动脉弓, 纵行剪开, 置于 10%多聚甲醛溶液固定待测, 并立即取靠近主动脉弓的同一部位冠状动脉组织 1cm³ 大小数块立即置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存待测。

1.6 观察指标

(1) 10%多聚甲醛固定主动脉弓组织, 常规石蜡包埋, 5 μm 厚连续切片, HE 染色作病理组织学检查。

(2) 荧光定量 PCR 法检测冠状动脉 MMP-9 mRNA 表达: 称取冠状动脉及其周边组织 50-100mg 剪碎, 加入 1mL TRIzol, 使用组织匀浆器在冰上进行匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000g 离心 10min, 以去除未完全裂解的组织以及脂肪等。加入 0.2mL 氯仿, 剧烈振荡 15s, 室温放置 3min。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000g 离心 15min, 取上清 (约 500 μL) 加入到另一 EP 管中。加入 0.5mL 异丙醇, 温和混匀, 室温放置 10min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000g 离心 10min, 弃去上清。加入 1mL 75%乙醇 (焦碳酸二乙酯水配制)。4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500g 离心 5min, 弃上清。室温放置 30min 干燥 RNA 沉淀。加入 20 μL 焦碳酸二乙酯水, 55 $^{\circ}\text{C}$ 促溶 10min, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。经 RT 反应取出反应液, 即为 cDNA, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。取出上述反应液 2 μL 作为荧光定量的模板, 反应体系如下: 2 $\times$ 荧光混合物 10 μL , 正向引物, 10 μM 0.4 μL , 反向引物, 10 μM 0.4 μL , 探针, 10 μM 0.4 μL , 模板 DNA 2 μL , 核糖核酸酶游离水 6.8 μL , 反应总体积为

20 μ L。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 10min,95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,40 cycles。大鼠 MMP-9 引物及探针序列 Forward primer 5'-TCGAAGGCGACCTCAAGTG-3', Reverse primer 5'-TTCGGTGTAGCTTTGGATC-CA-3', Probe 5'-CACCATCATAACATCACC-3'。

1.7 统计学处理

统计结果均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。各组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间均数的两两比较采用最小显著法(LSD)法。其中, $P<0.05$ 为组间有显著性差异, $P<0.01$ 为组间有非常显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠体重比较

由表1可见,第1周大鼠平均体重为(0.22 $\pm$ 0.02)kg之间,组间没有明显差异。在喂养12周加

表1 各组大鼠第1周与第14周体重比较($\bar{x}\pm s$) kg

组别	鼠只数	第1周	第14周
正常对照组	12	0.21 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.02
模型对照组	12	0.22 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.01 $^{\Delta}$
针刺治疗组	12	0.23 $\pm$ 0.05	0.45 $\pm$ 0.02 $^{\Delta\circ}$
针刺预处理组	12	0.21 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.05 $^{\Delta\Delta}$
阳性药物对照组	12	0.20 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.03 $^{\Delta*\circ}$

注: $^{\Delta}P<0.01$ 与正常组比较; $^{\Delta}P<0.05$ 与模型组比较; $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 与模型组比较; $^{*}P>0.05$ 与针刺治疗组; $^{\circ}P<0.05$ 与针刺预处理组比较

治疗2周后,各组大鼠体重均有所增长,其中模型对照组大鼠体重增长明显高于正常对照组($P<0.01$),而针刺治疗组、阳性药物对照组、针刺预处理组与模型组比较,体重均明显低于模型组($P<0.05$ 、 $P<0.01$),阳性药物对照组大鼠体重与针刺治疗组没有明显差异($P>0.05$),针刺预处理组与阳性药物对照组、针刺治疗组比较差异明显($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠主动脉病理 HE 染色

如图1所示,模型对照组大鼠的主动脉明显比正常组织粗糙,可见较多的脂质沉积和内膜出现剥脱,且有散在泡沫细胞,可见不规则粉红染。在针灸治疗组与针刺预处理组与阳性药物对照组中,大鼠动脉内膜的脂质沉积明显低于模型对照组,阳性药物对照组可见少量泡沫细胞,针刺治疗组和针刺预处理组无泡沫细胞。与模型对照组相比,药物和针灸均能有效抑制溃疡形成。同时,在针刺预处理组大鼠动脉内膜比针刺治疗组更平滑。

2.3 各组大鼠冠状动脉组织 MMP-9 mRNA 表达比较

荧光定量 PCR 法检测显示,模型对照组大鼠 MMP-9 mRNA 表达与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$),针刺预处理组及针刺治疗组均能明显降低 LOX-1 mRNA 蛋白表达,与模型组比较有显著差异($P<0.01$),与针刺预处理组相比,药物治疗组 LOX-1 mRNA 表达无明显差异($P>0.05$)。详见表2。

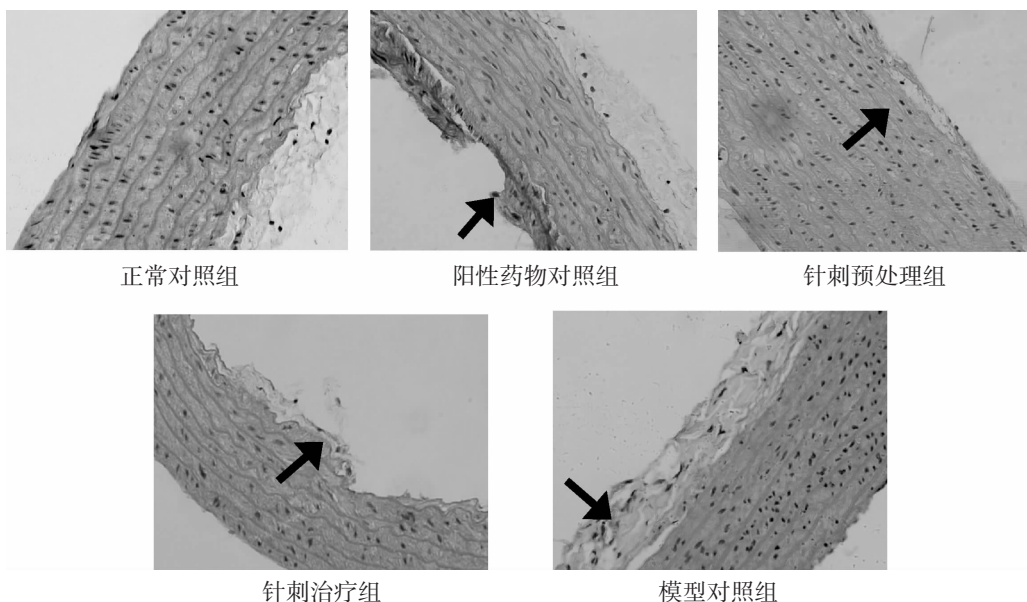


图1 各组大鼠主动脉弓 HE 染色比较(HE *400)

表 2 各组大鼠 MMP-9 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠只数	MMP-9 表达量
正常对照组	12	1.12±0.04
模型对照组	12	2.37±0.08 [△]
针刺治疗组	12	1.28±0.04 [▲]
针刺预处理组	12	1.20±0.07 [▲]
阳性药物对照组	12	1.10±0.07 ^{▲*}

注: [△] $P < 0.01$ 与正常组比较; [▲] $P < 0.01$ 与模型组比较; ^{*} $P > 0.05$ 与针刺治疗组、针刺预处理组比较

3 讨论

CHD 是动脉粥样硬化导致器官病变的最常见类型,而不稳定的粥样斑块破裂可以导致急性冠脉综合症的发生^[4]。因其死亡率高,发生迅速等特征,一直为临床医生和学者所关注。近年来对于不稳定斑块的形成机制研究增多,有学者指出^[5],与动脉粥样硬化有关的炎性标记物有近 10 种,其中 MMPs 在动脉粥样硬化的过程中扮演的重要的角色,目前部分学者^[16-17]提出了, MMP-9 与 AS 的形成关系更为密切, MMP-9 不但参与 CHD 的形成和发生发展,而且 MMP-9 还与斑块的不稳定性有关。临床上可以将 MMP-9 的检测水平作为斑块不稳定性的预测指标。

从中医学角度来看, CHD 属于“厥心痛”、“真心痛”、胸痹的范畴。《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证并治》“夫脉当取太过不及,阳微阴弦,即胸痹而痛,所以然者,责其极虚也。……以其阴弦故也。”《素问》有“心痹者,脉不通”和“脉涩曰痹”的论述。治疗当取心经和心包经为宜。内关穴是手厥阴心包经的络穴,又是八脉交会穴之一,《灵枢·邪客第七十一》曰:“心者,五脏六腑之大主……邪弗能容也,容之则伤心,心伤则神去,神去则死矣。故诸邪之在于心者,皆在于心之包络。”《灵枢·经脉第十》则说“手心主之别,名曰内关……心系实则心痛,虚则为烦心,取之两筋间也。”均有相关论点证明心脏疾病可以内关穴治疗;心俞穴则是心脏之气输注于背部的穴位,反应了心的功能状态,《难经·六十七难》说“阴病行阳……故令俞在阳”,《素问·阴阳应象大论篇第五》说“阴病治阳”,等观点证明心脏的疾病可以选择心俞穴进行治疗。

本实验的结果表明,针刺“内关、心俞”穴的干预和治疗,均可以有效地减少 CHD 模型大鼠主动脉内膜脂质的沉积,减少泡沫细胞的形成,在早期

减少大鼠脂肪堆积,控制大鼠体重的增加,同时降低冠状动脉组织 MMP-9 mRNA 的表达。由此,我们认为针刺对冠状动脉粥样硬化性心脏病的防治效应与 MMP-9 有着密切的关系,针刺可能通过抑制 MMP-9 的表达,调节多种炎症反应,从而达到阻止不稳定斑块形成的效应。MMP-9 可能是针刺防治冠状动脉粥样硬化斑块的重要效应途径之一。该研究在开展“内关”、“心俞”协同作用的机理研究方面,为今后的研究提供了新的思路,同时也印证了前人的工作,对临床检测和预防冠心病有积极意义。

参考文献

- [1] 庄国立,罗陆一. 针灸治疗冠心病临床研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(3): 225-227.
- [2] 刘建荣,谭英,潘文举. 针灸治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 新中医, 2010, 42(5): 68-70.
- [3] 王占奎,王伟志,傅立新,等. 针灸对颈动脉粥样硬化患者颈动脉形态学和动力学的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2005, 24(6): 8-11.
- [4] 胡玲,何璐,蔡荣林,等. 电针不同单穴与原络配穴对急性心肌缺血家兔心功能及心肌酶的影响 [J]. 针刺研究, 2010, 35(5): 363-367.
- [5] 蔡荣林,胡玲,汪克明,等. 电针“内关”“太冲”穴对急性心肌缺血家兔心功能的影响 [J]. 针刺研究, 2010, 35(2): 104-107.
- [6] 李梦,胡玲,蔡荣林,等. 电针“内关”“心俞”改善急性心肌缺血大鼠心率变异性的协同作用 [J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(8): 1760-1762.
- [7] 何璐,龙迪和,胡玲,等. 电针不同经穴对急性心肌缺血家兔血浆乙酰胆碱与去甲肾上腺素的影响[J]. 中国医药导报, 2008, 5(23): 23-25.
- [8] 张莉,刘雨英,张镨. 针刺治疗下肢闭塞性动脉硬化症 29 例疗效观察[J]. 黑龙江中医药, 2008, 37(2): 41.
- [9] 王永维,孟晓萍,韩敏. 基质金属蛋白酶 MMP9 与各类型冠心病的相关性[J]. 吉林医学, 2007, 28(11): 1269-1271.
- [10] 冯胜红,鲁力,任静. 脑心通胶囊对冠心病病人非急性期 hs-CRP、MMP-2 及 MMP-9 的影响 [J]. 中西医结合心血管病杂志, 2008, 6(7): 760-762.
- [11] 李梦,胡玲,高忻洙,等. 电针内关和心俞对家兔急性心肌缺血的协同保护作用[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(6): 30-32.
- [12] 姜岩, 刘丹. 原花青素预防大鼠冠状动脉粥样硬化研究 [J]. 中国医学工程, 2011, 19(4): 104-105.
- [13] 方厚华. 医学实验模型动物[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2002: 23-26.

- [14] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社,2004:272.
- [15] 范剑锋,汤圣兴. 与动脉粥样硬化有关的炎症标记物[J]. 中华高血压杂志,2009,17(4):300-302.
- [16] 梁晓萍,戴勇,石丹,等. 血清基质金属蛋白酶-9与冠心病相关性的临床研究[J]. 中国心血管杂志. 2002,7(2):94-95.
- [17] 刘晓红,来春林,胡长青,等. 冠心病患者血清 MMP-9 与 Hcy 的临床意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志. 2009,7(3):263-265.
- (编辑:迟越)

Effects of Acupuncture Neiguan(PC 6)and Xinshu(BL 15)on the Expression of MMP-9 with Coronary Heart Disease Rats

SUN Xu¹, LI Meng², SHEN De-kai¹, HU Ling¹, CAI Rong-lin¹, WU Zi-jian¹,
WEI Zhi-qiang², PENG Chuan-yu²

(1. Institute of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038;

2. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei Anhui 230038)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effects and mechanism of acupuncture “Neiguan”, “Xinshu” acupoints for treating coronary atherosclerotic heart disease, and provide experimental support for the clinical treatment and the combination effect of acupoints theory. **Methods** 75 clean healthy male Wistar rats, 15 of them were randomly selected as the normal control group, and the remaining rats were fed with a high fat diet to duplicate the atherosclerotic coronary heart disease model, at the beginning of this, chose 15 of them as the acupuncture preconditioning group randomly, after the model successfully duplicated, the rats were randomly divided into model group, acupuncture group, and the positive control group, in each group, 15 rats were counted to make an analysis. In the 2 acupuncture group, “Neiguan” and “Xinshu” were selected to acupuncture, and in the drug control group, rats were received atorvastatin suspension orally 2 weeks. At the end of the experiment, To take the aortic arch organization, fixed at 10% of formaldehyde solution, and embedded in paraffin, cut into slices in the same section, and hematoxylin-eosin (HE) staining such slices, then to observed the pathological morphological change and to detect the expression of MMP-9 in the sample of coronary arterial tissue by PCR. **Results** After model duplicated successfully, there were changes in vascular inner membrane of intima rough, fiber cap formation, and foam cell deposit in the aortic tissue of rats in model control group. Compared with in model control group, such items in acupuncture predicting group, acupuncture treating group and drugs control group were all decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with in acupuncture treating group, the atorvastatin could decrease expression of MMP-9 significantly ($P < 0.05$). Compared with in acupuncture predicting group, the atorvastatin could decrease expression of MMP-9 not significantly ($P > 0.05$). **Conclusion** Acupuncture at “Neiguan” and “Xinshu” acupoints can effectively prevent and treat CHD through reduce the expression of MMP-9 in coronary arterial tissue, but the effect of acupuncture does not superior to the drugs of torvastatin.

KEY WORDS: Neiguan(PC 6); Xinshu(BL 15); Coronary atherosclerotic heart disease; MMP-9