

急性心肌缺血模型大鼠内关、心俞穴穴区肥大细胞的分布及特征*

邓雅方¹, 胡颖¹, 许金森², 万隆², 罗来², 董亚琴^{2△}

(1. 福建中医药大学针灸学院, 福建 福州 350108; 2. 福建省中医药科学院, 福建 福州 350003)

摘要: 目的 观察急性心肌缺血模型大鼠不同穴区肥大细胞(MC)活化情况。方法 健康SD雄性大鼠12只, 随机分为对照组、模型组各6只。皮下多点注射盐酸异丙肾上腺素(ISO)制备大鼠急性心肌缺血模型, 氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定心肌缺血面积验证造模成功与否, 甲苯胺蓝染色法检测左侧心俞穴、左侧内关穴穴区MC分布及活化情况。结果 ①模型组心肌缺血面积明显大于对照组($P<0.05$); ②与对照组相比, 模型组左侧心俞穴MC数目和MC脱颗粒率显著增大($P<0.05$); 左侧内关穴MC脱颗粒率升高显著($P<0.05$), MC数目没有显著差异; ③对照组左侧内关穴MC数目大于左侧心俞穴MC数目($P<0.05$), 模型组左侧内关穴与心俞穴MC数目没有明显差异。结论 急性心肌缺血可引起心俞穴和内关穴穴位敏化, 穴区呈现MC募集和脱颗粒活化表达; 正常状态下不同部位穴区MC含量不同, 推测四肢部位穴区MC含量高于背部穴区。

关键词: 肥大细胞; 穴位敏化; 心肌缺血; 内关; 心俞

中图分类号: R245

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)04-0022-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.04.004

Characteristics and Distribution of Mast Cells at Neiguan and Xinshu Acupoints of Acute Myocardial Ischemia Rats

DENG Yafang¹, HU Ying¹, XU Jinsen², WAN Long², LUO Lai², DONG Yaqin²

(1. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;

2. Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou 350003, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the activation of mast cells in the different acupoints area of acute myocardial ischemia rats. **Methods** Twelve healthy male SD rats were stochastically assigned to control group and model group, with 6 rats per group. Acute myocardial ischemia was produced in rats by injecting 60 mg/kg of isoproterenol subcutaneously at multiple points. Myocardial ischemia proportion was measured by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining to verify the success of the model. Distribution and activation of mast cells in the left Neiguan (PC6) and in the left Xinshu (BL15) of rats was detected by toluidine blue staining. **Results** 1. The myocardial ischemia area of model group was significantly higher than it of control group ($P<0.05$); 2. Compared with the control group, the number and degranulation rate of MCs in the left Xinshu of model group were significantly increased ($P<0.05$); the degranulation rate of MCs in the left Neiguan of model group was significantly increased ($P<0.05$), there was no significant difference in the number of MCs in the left Neiguan between 2 groups; 3. The number of MC in the left Neiguan was higher than that in the left Xinshu among control group ($P<0.05$), no significant difference in the number of MCs between that 2 acupoints among model group. **Conclusion** Xinshu (BL15) and Neiguan (PC6) in the acute myocardial ischemia model rats were sensitized, which displayed visible recruitment and degranulation of MCs; The number of MCs was different in acupoints of different body parts, that in limbs acupoints probably higher than that in back acupoints.

KEY WORDS: mast cell; acupoint sensitization; myocardial ischemia; Neiguan (PC6); Xinshu (BL15)

收稿日期: 2021-06-23

* 基金项目: 国家自然科学基金(81403490); 福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(2017-ZQN-70); 福建省自然科学基金项目(2018J01857); 福建省经络感传重点实验室资助

第一作者简介: 邓雅方(1996-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 经络感传与针灸的作用机制。

△通信作者: 董亚琴, E-mail: 16171236@qq.com

穴位不仅仅是神经血管等结构的复合体,在这个角度并未找到确切的穴位特性依据。从功能性、动态性的穴位敏化角度探讨穴位实质,是近年研究者们寻求的新出路,也带来了新的进展和认识。其中要注意的是肥大细胞(mast cell, MC)活化的动态表现与穴位敏化密切相关,MC 是穴位敏化的重要物质基础,进一步研究疾病状态下病理靶器官相关穴区 MC 的改变,对腧穴本质研究仍有重要意义。临床上治疗冠心病选穴重用心俞穴和内关穴^[1-2],本实验通过观察急性心肌缺血模型大鼠心俞穴和内关穴穴区 MC 的改变,为进一步证实 MC 分布及结构改变是腧穴敏化重要物质基础和客观指标提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 12 只,体质量(220 ± 20)g,生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。实验前 7 d 适应性喂养委托福建省中医药科学院动物实验中心完成,环境自然光照、温度 26℃、湿度 50%~60%,饮食自由。12 只 SD 大鼠按随机数字表法分成对照组和模型组,每组 6 只。

1.2 主要仪器与试剂 ISO(Sigma-Aldrich, USA, 批号:WXBC9656V);HE 染液套装(索莱宝科技有限公司,北京, G1003);TTC (Sigma-Aldrich, USA, 批号:BCBX0337);JB-P5 型石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司);LEICA RM2016 切片机;Powerlab 多通道生理记录仪(澳大利亚 AD Instruments 公司);小动物麻醉呼吸系统(深圳瑞沃德生命科技有限公司)。

1.3 模型制备 模型组于大鼠四肢内侧根部及背部皮下多点注射 ISO 60 mg/kg,注射 2 次,中间间隔 24 h。大鼠吸入异氟烷进入稳定麻醉状态后,连接 Powerlab 多通道数据采集分析系统,将心电图(ECG)3 个针状电极插入大鼠右上肢、左右下肢皮下,记录肢体 II 导联 ECG,稳定 3~5 min 后根据 ECG 评判是否造模成功。造模成功的评判标准:T 波倒置或双向,并伴有 ST 段抬高^[3]。对照组皮下多点注射生理盐水 60 mg/kg。

1.4 TTC 染色测定心肌缺血面积 造模完成后,每组随机抽取 3 只大鼠,经麻醉后立即开胸取出心脏,置于-20℃冰箱冷冻 3 h,从心尖向心底的方向将心脏横向切成 6 片(每片约厚 1.5~2 mm)。放入 2%TTC

溶液中,37℃恒温箱避光水浴 30 min,每隔 5 min 进行一次翻面。用 4%多聚甲醛冲洗掉多余 TTC 染液后固定。成功染色正常心肌组织呈红色,缺血组织呈苍白色。图像扫描后通过 Image-Pro Plus 5.1 图像分析软件计算心肌缺血面积。心肌缺血面积比=缺血面积/总面积 $\times 100\%$ 。

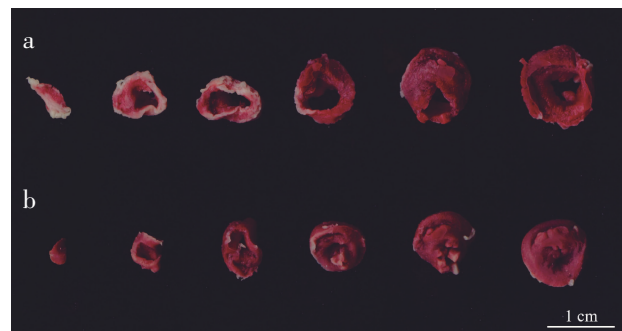
1.5 甲苯胺蓝染色法检测 MC 所有大鼠麻醉状态下处死,剪取左侧心俞穴和内关穴 5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 5 mm 组织(皮肤及皮下肌肉),甲醛固定组织后包埋切片处理,切片脱蜡水化后浸入 0.5%甲苯胺蓝进行染色,冲洗、透明后组织封固。

1.6 MC 图像采集和数据分析 利用正置光学显微镜拍摄甲苯胺蓝染色切片图像(拍摄倍数为 10 $\times$)。于 CaseViewer 软件中放大 40 倍后通过五点取样法,每个样本切片随机选取 10 个等大不重叠视野,单个视野大小为 469 $\mu\text{m} \times 893 \mu\text{m}$ 。统计平均单视野 MC 和脱颗粒 MC 的数目,计算样本 MC 脱颗粒率,MC 脱颗粒率=脱颗粒 MC 数目/MC 总数目 $\times 100\%$ 。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行两独立样本 *t* 检验和配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

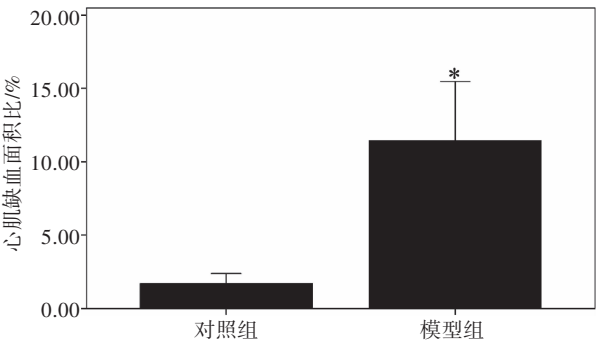
2.1 TTC 染色结果 TTC 染色后正常心肌组织呈现红色,缺血组织被染为苍白色。染色结果显示与对照组相比,模型组白色区域面积增大,主要集中在心尖部,提示模型组大鼠心肌组织出现损伤。见图 1。



注:a.模型组,b.对照组;标尺为 1 cm。

图1 大鼠心肌组织 TTC 染色

2.2 两组大鼠心肌缺血面积比较 与对照组相比,模型组心肌缺血百分比显著上升,提示 60 mg/kg ISO 可造成心肌组织一定程度损伤。见图 2。

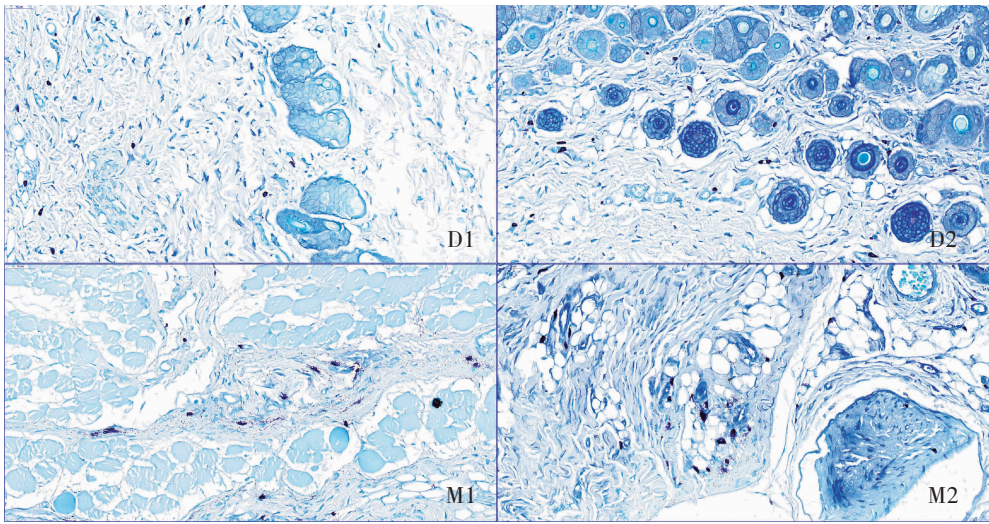


注:与对照组相比,* $P<0.01$ 。

图 2 心肌缺血面积比统计图

2.3 甲苯胺蓝染色结果 染色结果显示,对照组大鼠心俞穴、内关穴穴区 MC 多呈椭圆形,边界完整清晰,周边无颗粒样物质。急性心肌缺血模型大鼠穴区 MC 数目明显增多,MC 呈现破裂、多角、星云等形状,周围散落分布大量颗粒样物质。见图 3。

2.4 急性心肌缺血各穴区 MC 活化情况比较 急性心肌缺血造模完成后,与对照组相比,左侧心俞穴 MC 数目和脱颗粒率显著上升,左侧内关穴 MC 脱颗粒率显著提高,提示脏腑有疾时,疾病相关穴位 MC 活化表达显著。对照组内比较,左侧内关穴 MC 数目



注:D1.对照组左侧心俞穴,D2.对照组左侧内关穴,M1.模型组左侧心俞穴,M2.模型组左侧内关穴;标尺为 50 μm 。

图 3 MC 甲苯胺蓝染色($\times 400$)

显著高于左侧心俞穴,提示正常状态不同部位穴位 MC 数目存在差异表达,见表 1。

表 1 各穴区 MC 活化比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	(左)心俞穴		(左)内关穴	
	MC 数目 (个/视野)	MC 脱颗 粒率/%	MC 数目 (个/视野)	MC 脱颗 粒率/%
对照组	12.00±2.19	31.59±4.67	21.00±6.53a	30.43±4.69
模型组	18.95±5.00b	42.84±4.35b	22.75±5.19	44.79±8.36b

注:与(左)心俞穴相比,* $P<0.05$;与对照组相比,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

穴位是体现脏腑阴阳气血失衡和调节失衡的部位,脏腑阴阳失衡经络腧穴可能出现疼痛、皮肤样改变等反应^[4]。1977 年首次以大数据的方式观察到经络敏感者循经线上出现出血点、皮疹带、白线等^[5],同时

内脏(包括皮肤等器官组织)病变引起相应神经节段腧穴体表牵涉痛也是“有诸内者,必形诸外”的体现,可称之为“穴位敏化”^[6-7]。如研究者发现肺脏、肠道、生殖有疾时,相应神经节段体表出现压痛,区域与论治腧穴有关^[8-10],穴位不是固定不变的结构,脏腑生理病理状态的改变,穴位敏化呈现“敏化与失敏”的状态切换。

伊文思蓝(EB)渗出点是出现在体表内脏损伤导致的神经源性炎性反应敏化部位,内脏病理变化通过中枢、周围等机制,引起病理损伤器官相应神经节段体表出现神经源性炎性反应,局部炎性因子释放、血管扩张。课题组前期研究发现^[11],大鼠肾上腺素急性心肌缺血模型造模后 4 h,生理盐水对照组心俞穴几乎未见 EB 渗出,而模型组心俞穴 EB 渗出率高达 60.46%。其他研究者发现大鼠冠脉结扎造成心肌缺

血模型后6 h,EB 渗出点多分布在左侧胸、背、肩、上肢部位,渗出点区域呈现痛觉敏化,并且与心绞痛患者牵涉痛分布部位出现相似情况^[12]。

穴位敏化是出现在内脏损伤相应神经节段体表的神经源性炎性反应,是内脏损伤引起的相应体表区域特殊的感受阈值变化,使得穴位对压痛、温度、光、电、声、化学等刺激的激活阈值下调^[7],表现形式多样^[13],引起穴区炎性介质的释放有所不同,但MC 活化是穴位敏化的共同环节,MC 分布及结构的活化表达是穴位敏化的重要物质基础。内脏损害可导致脊髓及脊髓上中枢躯体内脏会聚神经元敏感性增强,从而增强体表刺激信号传入,外周机制通过背根反射、轴突反射传递至外周,引起MC 释放相关炎症因子,进而产生穴位敏化^[14-15]。

研究者们发现不同病理情况,可引起相关穴区MC 改变。膝关节关节炎模型兔犊鼻穴穴区MC 数目显著增多^[16-17],MC 脱颗粒率释放致痛物质^[17];胃溃疡模型大鼠足三里穴、中脘穴、胃俞穴穴区MC 活化显著,呈现MC 募集和脱颗粒现象^[18];李志刚课题组发现^[19-21],膝关节关节炎大鼠阳陵泉、鹤顶穴穴区MC 数目及脱颗粒率均明显高于正常组大鼠,且活化程度与病程相关。笔者课题组前期研究也证实^[22],哮喘大鼠肺俞穴、华盖穴、定喘穴穴区MC 数目及脱颗粒率显著上升。本实验结果显示大鼠急性心肌缺血损伤,可致左侧心俞穴、左侧内关穴穴区MC 数目增加和促MC 脱颗粒,与前述研究结果一致,进一步证实MC 分布和结构的改变是发生穴位敏化物质基础。

MC 广泛存在于人体各部位,分布于皮肤、结缔组织、以及呼吸道、肠道等器官黏膜中,常见于血管、神经末梢附近^[23]。穴位解剖层次包括表皮、真皮、皮下、筋膜,主要为结缔组织,是血管、淋巴管、神经丛的复合体^[24],穴位结缔组织多存在MC,并沿血管神经分布。这为证明MC 是穴位敏化重要结构物质提供解剖基础。同时李永明教授量化不同部位皮肤肥大细胞后发现皮肤肥大细胞分布规律和经典穴位以及微针刺系统呈现高度一致^[25]。MC 有经穴分布倾向,但生理状态下不同部位腧穴MC 含量不同,本实验发现正常大鼠位于四肢部的内关穴MC 数目高于背部心俞穴MC 数目,提示生理情况下四肢腧穴较背部腧穴MC 含量更高。研究中也发现足三里、三阴交、内关、曲池

穴区皮肤MC 含量显著高于肝俞、胃俞穴区MC^[11],这与本实验结果一致。

参考文献:

- [1] 梁睿智,刘运珠.近10年针灸治疗冠心病选穴规律探讨[J].中国针灸,2016,36(4):443-447.
- [2] 陈昕怡,高旭,张前福,等.基于数据挖掘技术的穴位贴敷治疗心绞痛的用药与选穴规律分析[J].世界中西医结合杂志,2020,15(11):2007-2012.
- [3] 卞楠,田辉,隋月皎,等.电针“内关”对缺血性心肌损伤大鼠钠离子通道相关蛋白的影响[J].中国针灸,2016,36(1):64-68.
- [4] 朱兵.论穴位与穴位特异性[J].中国针灸,2021,41(9):943-950.
- [5] 李永明.纪念宋继美教授及“宋氏理论”[J].辽宁中医杂志,2017,44(12):2633-2635.
- [6] 朱兵.经脉循行与身体分节的对应[J].针刺研究,2021,46(10):815-820.
- [7] 朱兵.穴位敏化现象及其生物学意义[J].中国针灸,2019,39(2):115-121.
- [8] 王健,付勇,王渊,等.肺系疾病和穴位敏化的关系[J].中华中医药杂志,2020,35(12):6029-6032.
- [9] 崔翔,章薇,孙建华,等.肠道疾病相关的牵涉痛规律与穴位敏化的关系[J].中国针灸,2019,39(11):1193-1198.
- [10] 吴强,章薇,施静,等.妇科相关疾病牵涉痛与穴位敏化的关系[J].中医杂志,2019,60(23):2001-2007.
- [11] 董亚琴,黄倩茹,万隆,等.与急性心肌缺血损伤相关体表敏化穴位的初步分布观察[J].中华中医药杂志,2018,33(2):672-674.
- [12] 施静,王健,王渊,等.心绞痛牵涉痛与穴位敏化的关系[J].针刺研究,2018,43(5):277-284.
- [13] 万敏,周玉梅,周洁,等.穴位敏化现象和规律探究的分析[J].针灸临床杂志,2017,33(3):74-77.
- [14] LUZ L L,FERNANDES E C,SIVADO M,et al. Monosynaptic convergence of somatic and visceral C-fiber afferents on projection and local circuit neurons in lamina I: a substrate for referred pain[J]. Pain,2015,156(10):2042-2051.
- [15] 朱兵.穴位可塑性:穴位本态的重要特征[J].中国针灸,2015,35(11):1203-1208.
- [16] 李琳慧.基于TRPV1热敏灸KOA兔的穴位外周敏化机制及镇痛效应机制研究[D].南昌:江西中医药大学,2021.

(下转第31页)

亟待解决的问题。

本研究选择 IL-1 β 、IL-2、IL-8、IL-10、FIB、D-二聚体与中医证候进行相关性分析,发现 IL-1 β 可能是湿热蕴结证和痰瘀痹阻证相关影响因素 ($P<0.05$), FIB 与上述讨论证候都存在相关性,D-二聚体可能是寒湿痹阻证的影响因素。有研究表明,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 与痛风中医证型存在相关性^[10]。另外 IL-6 与 TNF- α 联合血尿酸、CRP 诊断急性痛风具有一定的准确性^[11]。研究发现 FIB 和 D-二聚体可以用来评价痛风疾病活动度,其中 FIB 可作为独立相关因子评价痛风活动度^[12]。

综上,患者年龄、发病年龄、临床分期与中医证候存在相关性,D-二聚体可能是寒湿痹阻证发生的危险因素,D-二聚体越高,寒湿痹阻证发生的风险也就越高。FIB 可能是痛风发生的危险因素,IL-1 β 可能是湿热蕴结证和痰瘀痹阻证发生的相关性因素。痛风患者病程较长,且迁延反复,加强患者教育、规范治疗是预防病情进展的有效措施。本研究为更好的判别痛风患者的中医证候,探索客观性诊断指标,为痛风的证候分析提供参考,进一步为痛风的诊疗提供思路。

参考文献:

- [1] FAUCI A S. 哈里森风湿病学[M]. 3 版. 田新平,曾小峰,主译. 北京:科学出版社,2018:225-231.
- [2] 中华中医药学会风湿病分会. 痛风和高尿酸血症病证结合诊疗指南[J]. 中医杂志,2021,62(14):1276-1288.
- [3] 中华医学会风湿病学分会. 2016 中国痛风诊疗指南[J]. 中华内科杂志,2016,55(11):892-899.
- [4] 曾学军. 《2015 年美国风湿病学会/欧洲抗风湿联盟痛风分类标准》解读[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2015,9(4):235-238.
- [5] 范永升. 中西医结合临床风湿病学[M]. 北京:中国中医药出版社,2021:458-459.
- [6] RICHETTE P,DOHERTY M,PASCUAL E,et al. 2018 updated European League Against Rheumatism evidence-based recommendations for the diagnosis of gout [J]. Ann Rheum Dis,2020,79(1):31-38.
- [7] 邱晓莲,陈春晖,李鑫,等. 基于文献研究痛风性关节炎中医证候分布及遣方用药规律[J]. 云南中医学院学报,2019,42(5):81-85.
- [8] 陈炜. 女性原发性痛风性关节炎患者三磷酸腺苷结合盒蛋白 G2 基因表达的意义[J]. 华北理工大学学报(医学版),2018,20(2):85-88.
- [9] 李军,李振华. 绝经期妇女高尿酸血症临床分析[J]. 实用妇科内分泌杂志(电子版),2018,5(5):7.
- [10] 杨烨晗,肖碧跃,谢梦洲,等. 痛风性关节炎中医证型与 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 相关性研究[J]. 中国中医急症,2018,27(4):625-627.
- [11] 朱超超,张格艳. 血清尿酸、CRP、IL-6、TNF- α 联合检测诊断急性痛风的价值[J]. 临床医学研究与实践,2021,6(14):92-94.
- [12] 陈抒扬. 探讨血浆纤维蛋白原与 D-二聚体对痛风疾病活动度评估的意义[D]. 广州:南方医科大学,2021.
- [17] BAI F H,MA Y Y,GUO H Y,et al. Spinal cord glycine transporter 2 mediates bilateral ST35 acupoints sensitization in rats with knee osteoarthritis[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2019,2019:7493286.
- [18] 蒋海琳. 胃溃疡模型大鼠“同功穴”与肥大细胞相关性电针干预后对胃组织蛋白翻译后修饰的研究[D]. 长春:长春中医药大学,2019.
- [19] DING N,JIANG J,QIN P P,et al. Mast cells are important regulator of acupoint sensitization via the secretion of tryptase,5-hydroxytryptamine,and histamine[J]. PLoS One,2018,13(3):e0194022.
- [20] 王巧侠,丁宁,姜婧,等. 膝骨关节炎模型大鼠相关穴位敏化的肥大细胞机制研究[J]. 针灸临床杂志,2018,34(10):51-55.
- [21] 王巧侠,王鑫,丁宁,等. 膝骨关节炎模型大鼠在穴位敏化不同时间节点相关穴区的肥大细胞研究[J]. 环球中医药,2018,11(9):1352-1357.
- [22] 张锐红,许金森,陈铭,等. 基于肥大细胞和 P 物质探讨哮喘大鼠背部腧穴敏化机制[J]. 中华中医药杂志,2020,35(11):5759-5763.
- [23] GURISH M F,AUSTEN K F. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets[J]. Immunity,2012,37(1):25-33.
- [24] 牟秋杰,嵇波,李昱颀,等. 穴位敏化与肥大细胞的相关性研究[J]. 针灸临床杂志,2020,36(2):1-4.
- [25] LI Y M. The neuroimmune basis of acupuncture:correlation of cutaneous mast cell distribution with acupuncture systems in human[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(8):1781-1793.

(上接第 25 页)