

• 针灸经络 •

艾灸肺俞和心俞对慢性心力衰竭大鼠心室质量指数及心肌组织 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平的影响

王 荃¹,曾永蕾²,武凤琴³,孙瑞瑞³,陈 静³

(1. 安徽中医药大学中医临床学院,安徽 合肥 230038;2. 安徽中医药大学第二附属医院,安徽 合肥 230061;3. 安徽中医药大学研究生部,安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 探究艾灸肺俞、心俞治疗慢性心力衰竭(chronic heart failure,CHF)的机制。方法 将35只雄性SD大鼠分为正常组、模型组、西药组(卡托普利25 mg/kg,每日1次)、艾灸组(艾灸肺俞和心俞,温和灸,每日1次)、艾灸加西药组,每组7只。采用阿霉素隔日腹腔注射的方法复制CHF模型。3周后,测定各组大鼠左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)和右心室质量指数(right ventricular mass index, RVMI),应用RT-PCR测定心肌组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)mRNA的表达水平。结果 西药组、艾灸组、艾灸加西药组LVMI、RVMI及心肌TNF- α 、IL-6 mRNA表达水平较模型组显著降低($P<0.05$,或 $P<0.01$);3组间上述指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 艾灸改善心室重塑的作用与其降低心肌TNF- α 和IL-6 mRNA的表达水平有关。

[关键词]艾灸;慢性心力衰竭;心室质量指数;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-6

[中图分类号]R541.6;R224 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.04.018

慢性心力衰竭(chronic heart failure,CHF)病变机制较为复杂。近年来研究表明,心室重塑是其发生发展的关键^[1],而免疫和炎性递质在心力衰竭的发生及进展过程中起着重要的作用^[2]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)作为炎性细胞因子,可长期影响心肌组织的重塑,参与CHF的病理生理过程^[3]。艾灸对免疫系统^[4]和心血管系统^[5]具有良好的调整作用,且艾灸具有容易操作、不良反应少、作用显著等优势。本实验以心室质量指数及TNF- α 、IL-6 mRNA表达水平作为观测指标,拟从免疫炎症角度,初步探讨艾灸肺俞、心俞对CHF心室重塑的影响机制。

1 材料

1.1 动物 健康SD大鼠35只,雄性,SPF级,体质量180~220 g,由安徽中医药大学实验动物中心提供。

1.2 主要仪器 ABI-2720型PCR仪:美国应用生物系统公司;Tanon 3500型电子凝胶成像系统:上海天能公司。

1.3 试剂和药物 RNA抽提试剂盒、逆转录试剂盒及TNF- α 、IL-6、 β -actin特异性引物均为江苏省南京诺维赞公司产品,其序列及扩增长度见表1。阿霉素(adriamycin, ADR):浙江海正药业股份有限公司生产,批号H33021980,每支10 mg。卡托普利:上海旭东海普药业有限公司,生产批号

H31020564,每片25 mg。

表1 TNF- α 、IL-6、 β -actin 扩增引物序列及产物长度		
基因名	引物序列	产物长度/bp
TNF- α	上游:CTCAAAGACAACCAACTAGTG	654
	下游:GGCAACCTGACACTCTCCC	
IL-6	上游:CTGCTCACTTGCCGGTTTTCC	480
	下游:GGTTGAAGATATGAATTAGA	
β -actin	上游:CGACAACGGCTCCGGCATGTG	360
	下游:GGGTGTTGAAGGTCTCAAACA	

2 方法

2.1 模型复制 采用ADR隔日腹腔注射的方法^[6]复制CHF模型,ADR长期小剂量累积给药,可诱导严重的CHF模型,且可靠简便^[7]。SD大鼠适应性喂养1周后进行模型复制,剂量依次为1、2、3、4 mg/kg,每个剂量给药2次,依次递增,隔日1次,共8次,累积量20 mg/kg,持续15 d。正常喂养3周,每日密切观察大鼠精神状态、活动、进食饮水量、体质量及呼吸频率变化。以左心室湿质量/体质量比值和右心室湿质量/体质量比值分别代表左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)和右心室质量指数(right ventricular mass index, RVMI),以反映心室重构情况^[8],结合大鼠一般情况及心率,作为模型复制成功的标准^[9]。

2.2 动物分组 将35只大鼠随机抽取28只用于模型复制,另7只作正常组。正常喂养3周,将28只模型大鼠分为4组,即模型组、西药组、艾灸组、艾灸加西药组。

2.3 治疗方案 模型复制3周后开始进行。

2.3.1 西药组:给予卡托普利混悬液(25 mg/kg)

灌服,每日 1 次,连续 3 周。

2.3.2 艾灸组:取双侧肺俞、心俞,定位参照《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱^[10],行艾条温和灸,用特制小艾条在距离穴位 1~2 cm 处施灸,每次每穴各灸 15 min,每日 1 次,共 3 周。

2.3.3 艾灸加西药组:先给予卡托普利(25 mg/kg)混悬液灌服,再用艾条温和灸肺俞、心俞,每日 1 次,连续 3 周。

2.3.4 模型组和正常组:正常喂养,不进行任何治疗。期间注意观察各组大鼠行为特征。

2.4 指标观察

2.4.1 心肌组织取材与保存:将大鼠称质量,用 4%戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将其仰卧固定于鼠台,腹主动脉放血处死,开胸暴露心脏,结扎出入心脏大血管,于右心室剪一小口,用 4℃预冷的生理盐水逆行灌注,冲洗心室腔至冲洗液无血性液体。取出心脏,用清洁滤纸吸干水分后,分别称取左、右心室(包括室间隔)湿质量,全过程于冰浴中进行。计算左、右心室湿质量/体质量比值,为心室质量指数。处理后心肌冻存于液氮中,液氮冷冻后转存于-70℃超低温冰箱,用于 RT-PCR 检测。

2.4.2 RT-PCR 法检测心肌组织 TNF-α、IL-6 mRNA 水平:①总 RNA 提取:按所购总 RNA 抽提试剂盒说明进行。②逆转录:取 2 μl RNA 溶液做模板,总反应体积为 55 μl,具体步骤按逆转录试剂盒说明书进行。③PCR 扩增 TNF-α 及 IL-6:PCR 反应总体积 50 μl,预变性 95℃,3 min,变性 98℃,10 s,退火 58℃15 s;延伸 72℃,30 s;30 个循环,末次循环后再 72℃延伸 1 min。β-actin 反应条件,同目的扩增产物的反应条件。1%琼脂糖凝胶电泳,在电子凝胶成像仪上检测 PCR 产物。结果以 TNF-α 及 IL-6 与同组 β-actin 电泳带光密度的比值,作为该组标本的基因表达的相对值。

2.5 统计学方法 运用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。分析前对数据进行正态性检验,连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。多组均数比较采用单因素方差分析,两组之间均数比较采用 LSD 分析(方差齐时)或 Tamhane's T_2 分析(方差不齐时)。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况 从第 8 天开始,与正常组比较,模型组大鼠陆续出现精神萎靡、活动减少、倦卧、反应迟钝、呼吸困难,体质量下降等现象。从治疗第 2 周开始,治疗组大鼠气喘、食欲下降、萎靡倦怠等有所不同程度改善,大鼠反应性提高;模型组上述症状依然存在,总体上有加重趋势;正常组大鼠活动、反

应灵敏性如常,体质量上升。

3.2 各组大鼠心室肌质量指数比较 与正常组比较,模型组大鼠 LVMI 和 RVMI 显著增高(P<0.01);与模型组比较,西药组、艾灸组、艾灸+西药组 LVMI 和 RVMI 显著降低(P<0.05,或 P<0.01)。结果表明艾灸能显著降低心室肌质量指数。见表 2。

表 2 各组大鼠心室肌质量指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LVMI/(mg/g)	RVMI/(mg/g)
正常	7	2.136±0.252	0.534±0.063
模型	7	2.823±0.314**	0.724±0.080**
西药	7	2.450±0.291△	0.615±0.073△
艾灸	7	2.490±0.355△	0.627±0.090△
艾灸+西药	7	2.194±0.280△△	0.550±0.070△△

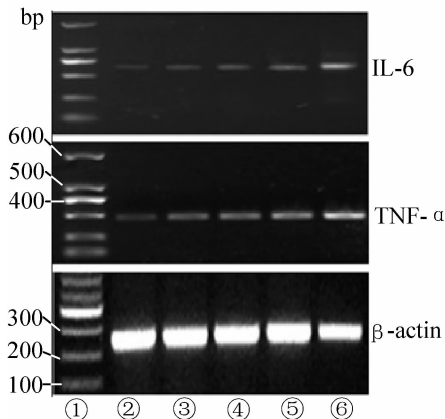
注:与正常组比较,**P<0.01;
与模型组比较,△P<0.05,△△P<0.01。

3.3 各组大鼠心肌组织 TNF-α、IL-6 mRNA 相对表达水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 TNF-α、IL-6 mRNA 相对表达水平显著升高(P<0.01);与模型组比较,3 个治疗组 TNF-α、IL-6 mRNA 相对表达水平显著降低,(P<0.01)。见表 3、图 1。

表 3 各组大鼠心肌组织 TNF-α、IL-6 mRNA 相对表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA
正常	7	1.005±0.128	1.018±0.376
模型	7	5.024±0.640**	5.189±0.749**
西药	7	2.439±0.346△△	2.546±0.344△△
艾灸	7	2.520±0.471△△	2.988±0.471△△
艾灸+西药	7	2.334±0.327△△	2.414±0.460△△

注:与正常组比较,**P<0.01;
与模型组比较,△△P<0.01。



注:①DNA marker;②正常组;③艾灸加西药组;④西药组;⑤艾灸组;⑥模型组。

图 1 RT-PCR 检测各组大鼠心肌组织 TNF-α、IL-6 mRNA 相对表达水平

4 讨论

关于 CHF 发病和心室重塑形成机制的研究,正不断深入。近年研究发现,CHF 不仅存在血流动

力学紊乱,更重要的是激活了包括交感神经系统和肾素-血管紧张素-醛固酮系统在内的一系列神经内分泌反应^[11-12]。炎症细胞因子在 CHF 心室重塑的演变过程中,扮演着非常重要的角色。高水平表达的炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6,作用于细胞膜上的特殊受体,导致细胞凋亡,引起心脏间质纤维化、心肌收缩力下降和心室重构等。血浆中 TNF- α 、IL-6 水平增高的患者,存在病死率增高的趋势。TNF- α 、IL-6 可长期影响心肌重塑,参与 CHF 的病理生理过程。它们通过促使左心室扩大、降低左心室收缩能力和诱导凋亡使心脏功能减退^[3]。

本实验采用 ADR 隔日腹腔注射的模型复制方法。有研究^[7]证实,ADR 作为一种高效蒽醌类广谱抗肿瘤药物,其心脏毒性作用机制表现为抑制谷胱甘肽过氧化物酶活性,破坏细胞膜的结构和功能,影响线粒体的能量代谢,随其剂量在动物体内积累增加而导致心肌细胞变性坏死,从而引起严重的心力衰竭,多用于复制慢性心力衰竭模型。而腹主动脉半缩窄术构建的是舒张性心力衰竭模型^[6],手术操作难度大,缩窄程度与结扎很难一致,病死率较高。预实验表明,ADR 隔日腹腔注射的方法复制模型的效果较好,病死率低。

心俞是心的背俞穴,具有调理气血、养心安神、宁心定志之功,为历代医家治疗心胸病症之要穴。现代研究^[13]表明,针刺不仅能有效地缓解患者的症状,而且能影响血流动力学参数。肺俞是肺的背俞穴,具宣肺通气、疏调上焦之功。现代研究^[14]证明,针刺肺俞穴能明显改善肺功能,增大肺通气量,主要治疗呼吸系统疾病。肺与心表现为气血关系,故肺俞可用于治疗与气血关系最为相关的心血管疾病。

艾灸肺俞、心俞能显著改善心功能和降低血浆内皮素水平^[15],说明艾灸对神经内分泌系统和心血管系统有良性调整作用。本课题在此基础上,进一步观察心室质量指数,并检测心室肌 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平,探讨艾灸对慢性心力衰竭心室重塑的影响。实验结果显示,3 个治疗组心室质量指数及 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平显著降低。有研究^[16]表明,艾灸刺激穴位后,可引起机体神经-内分泌系统功能的变化,释放某些生物活性物质,激活靶细胞信号转导。本研究提示,艾灸肺俞、心俞穴对缓解 CHF 心室重塑、改善心肌肥厚有着积极意义,为临床治疗 CHF 拓宽了思路。有关艾灸对 CHF

心室重塑的影响及其相关的神经-内分泌-免疫机制,还有待进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] 王爱民,王立君. 心室重塑的研究进展[J]. 疑难病杂志, 2008,7(2):123-125.
- [2] Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, et al. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure; alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy[J]. Eur Heart J, 2003, 24(10):883-896.
- [3] Parish RC, Evans JD. Inflammation in chronic heart failure[J]. Ann Pharmacother, 2008, 42(7):1002-1016.
- [4] 张传英. 艾灸调节机体免疫功能研究概况[J]. 安徽中医学院学报, 2009, 28(2):60-61.
- [5] 李莎莎,肖雪,王跃生,等. 血瘀证与活血化瘀研究进展[J]. 河南中医学院学报, 2009, 24(1):102-104.
- [6] 王玉敏,马琰岩,高俊虹,等. 黄芪总提取物及其有效成分改善阿霉素致心衰的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7):208-212.
- [7] 邓青秀,彭成. 中医药心力衰竭动物模型的研究现状[J]. 四川动物, 2011, 30(2):296-300.
- [8] 杨冬花,付蓉,卞震炯. 益气温阳活血方对慢性心衰大鼠心室重构 NF- κ B 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(1):77-80.
- [9] 李梅秀,田国忠,欧叶涛,等. 大鼠阿霉素慢性心衰模型的制备与心衰指标的判定[J]. 解剖学研究, 2005, 3(27):176-178.
- [10] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:327-329.
- [11] 中华医学会心血管病学分会,中华心血管病杂志编辑委员会. 慢性心力衰竭诊断治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(12):1076-1095.
- [12] 戴闰柱. 心力衰竭治疗的新问题:神经内分泌不协调[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(1):1-2.
- [13] 郭俐宏,陈德森,方伟,等. 电针内关、心俞对大鼠急性心肌缺血的保护作用[J]. 针灸临床杂志, 2009, 25(11):46-48.
- [14] 吴兆利. 肺俞穴古今研究[J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(4):504-505.
- [15] 王荃,曾永蕾,江莉,等. 艾灸对慢性心衰模型大鼠心功能及 ET 的影响[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(4):421-423.
- [16] 王少锦. 针灸效应与细胞信息传导关系的初步探讨[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(11):31-33.

(收稿日期:2013-12-19)

基于经络平衡的电导法经络测量分析方法 对慢性肾病的诊断价值研究

黄 鹍¹,戴 洪²,李盼盼³,林铭铭⁴,罗翠文⁴,原嘉民¹,杨志敏¹

(1. 广东省中医院治未病中心,广东 广州 510120;2. 中国人民解放军总参谋部警卫局卫生保健处,北京 100017;3. 广州中医药大学 2010 级非医攻读博士班,广东 广州 510405;
4. 广州中医药大学 2008 级七年制本硕连读班,广东 广州 510405)

[摘要]目的 基于经络平衡理论,探究电导法经络测量值的分析方法,考察其对慢性肾病的诊断价值。方法 纳入健康人群 82 例和慢性肾病人群 222 例,采用电导法测量手足井穴和原穴的电阻值,分别计算原穴阴阳比值、井穴阴阳比值、原穴手足比值、井穴手足比值、原穴左右比值、井穴左右比值,采用接收者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线考察两组差异具有统计学意义的比值对慢性肾病的诊断价值。结果 两组人群在井穴阴阳比值、原穴手足比值方面比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。ROC 曲线显示井穴阴阳比值的曲线下面积(area under curve, AUC)为 0.618,95% CI 为[0.537,0.699]($P<0.05$),原穴手足比值的 AUC 为 0.727,95% CI 为[0.655,0.800]($P<0.01$)。井穴阴阳比值的最优切点是 1.16,灵敏度为 0.64,特异度为 0.52,原穴手足比值最优切点是 1.04,灵敏度为 0.68,特异度为 0.72。结论 慢性肾病患者的经络平衡处于阴盛阳衰、上盛下衰状态,基于经络平衡的电导法经络测量分析方法具有较好的临床诊断效能。

[关键词] 经络平衡;电导法经络测量;慢性肾病;健康状态;诊断性试验

[中图分类号] R224 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2014.04.019

电导法经络测量是以穴位体表电阻呈低电阻状

态^[1]为基本理论的经络穴位诊断方法。它以恒定直流电压为电源,测量时需要操作者用手握住电源一极,另一极置于被检测者皮肤的穴位上。该方法始于 1953 年德国 Reinhard voll,他发现穴位电阻变化可以反映很多器官的生理和病理情况^[2],此后国内外学者运用该测量方法,对健康人群和疾病状

基金项目:国家 973 计划项目(2011CB505404);广东省直单位卫生专项(粤中医财[2011]6 号);广东省级财政产业技术研究与开发专项(粤财工[2010]207 号)

作者简介:黄鹍(1981-),女,硕士,主治医师

通信作者:杨志敏, yangyo@vip. tom. com

Effects of Moxibustion at Feishu and Xinshu on Ventricular Mass Index and Myocardial mRNA Expression of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6 in Rats with Chronic Heart Failure

WANG Jing¹, ZENG Yong-lei², WU Feng-qin³, SUN Rui-rui³, CHEN Jing³

(1. Academy of Clinical Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230061, China; 3. Graduate Division, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract]**Objective** To investigate the mechanism of moxibustion at Feishu and Xinshu in the treatment of chronic heart failure (CHF). **Methods** Thirty-five male Sprague-Dawley rats were equally divided into normal group, model group, Western medicine (WM) group, moxibustion group, and moxibustion+WM group. All rats except those in normal group were intraperitoneally injected with adriamycin once every other day to induce a CHF model. The WM group received captopril (25 mg/kg) once daily; the moxibustion group received mild-warm moxibustion at Feishu and Xinshu once daily; the moxibustion+WM group received both mild-warm moxibustion and captopril. Three weeks later, left ventricular mass index (LVMI) and right ventricular mass index (RVMI) were determined, and the myocardial mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) was determined by RT-PCR. **Results** The WM group, moxibustion group, and moxibustion+WM group had significantly reduced LVMI, RVMI, and mRNA expression of TNF- α and IL-6 compared with the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). There were no significant differences in the above indices between the three treatment groups ($P>0.05$). **Conclusion** Moxibustion can reduce ventricular remodeling, which may be related to downregulation of myocardial mRNA expression of TNF- α and IL-6.

[Key words] moxibustion; chronic heart failure; ventricular mass index; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6