

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.06.017

针刺“人迎”穴对自发性高血压大鼠下丘脑基因表达的影响

安娜¹, 郭妍², 芦娟¹, 赵瑞利¹, 马田¹, 石学敏², 郭长青^{*}

(1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 天津中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 探讨针刺人迎穴治疗高血压病的可能作用机制。方法 将 20 只自发性高血压大鼠 (SHR) 随机分为人迎组和模型组, 每组 10 只。10 只 WKY 大鼠作为空白组。人迎组每天针刺大鼠“人迎”穴 20 min, 每 6 天休息 1 天, 共 28 天; 模型组和空白组不做任何干预。于针刺干预第 1、5、9、13、17、21、25 和 28 天测量血压, 实验结束后取材下丘脑进行基因芯片分析, 并采用 PCR 技术检测关键基因 5-羟色胺 1A 受体 (5-HT_{1A}) 与胱硫醚 β 合成酶 (CBS) mRNA 表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠收缩压在第 1、5、9、13、17、21、25、28 天升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 人迎组在第 5、9、13、21、25、28 天收缩压降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组前一观察点比较, 模型组第 21、25、28 天血压均升高, 人迎组仅第 21 天血压升高 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组 129 个基因上调, 243 个基因下调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 人迎组 167 个基因上调, 188 个基因下调 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组 5-HT_{1A} mRNA、CBS mRNA 表达下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 人迎组 5-HT_{1A} mRNA、CBS mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。结论 针刺“人迎”穴对于降低 SHR 血压有效, 影响下丘脑的基因表达如促进神经递质和交感神经的兴奋性等可能是其作用机制。

关键词 自发性高血压; 针刺; 人迎穴; 下丘脑; 基因芯片

随着生活水平的快速提升及人口老龄化现象, 高血压病已成为一个重要的公共卫生问题。全球因高血压并发症发生危险的人数每年超过 10 亿, 占高血压事件的 90% ~ 95%^[1]。针灸是治疗原发性高血压的有效方法之一, 已广泛用于治疗与高血压相关的心血管病治疗中^[2]。基于中医学“气海”理论, 以人迎穴为主针刺降压疗效肯定^[3-4]。基因芯片技术具有高灵敏度、高通量等特征, 是一种分析基因表达的新方法^[5-6]。本课题组以自发性高血压 (SHR) 大鼠作为研究对象, 针刺人迎穴为主要干预手段, 运用基因芯片技术, 探究针刺人迎穴治疗高血压病的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 WKY 大鼠 10 只, SHR 20 只, 均为雄性, 9 ~ 10 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 由北京维通利

华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号均为: BUCM-4-2015091002-3004。实验动物饲养于北京中医药大学中药学院 SPF 级动物室, 温度 (20 ± 1) °C, 湿度 50%, 12 h 明暗循环, 自由进食和饮水, 垫料和饲料均购自北京维通利华有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

液氮 (批号: YDS-3), 北京氧立来生物科技有限公司; 无水乙醇 (批号: 20160101), 北京博朗生科技有限公司; 10% 水合氯醛 (批号: 20150921), 国药集团化学试剂有限公司; DNA 提取试剂盒 (批号: 4367659), 转录因子 cDNA 合成试剂盒 (批号: WK049), 均为北京博朗生科技有限公司产品; SYBR Green PCR 混合试剂盒 (批号: S9430), 美国 Sigma-Aldrich 公司。毫针: 中研太和牌一次性毫针 (0.16 mm × 7.00 mm, 北京中研太和医疗器械有限公司; BP-6 型动物无创血压仪, 成都泰盟软件有限公司; ER-482A 型电子天平, 日本 A&D 公司; E5E2-R3T 型温控器, 日本欧姆龙公

基金项目: 2015 年国家中医药管理局行业专项 (201507001-08)

* 通讯作者: guochangqing66@163.com, 18600083671

司; MAE-U50A 型冰箱, 日本 SANYO 公司; ABI 9700 型 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 动物分组及干预

20 只 SHR (收缩压 ≥ 140 mmHg) 用红色油性笔在尾部标记序号, 按照 Excel 2010 工作表自动生成的随机数字分为模型组、人迎组, 每组 10 只。10 只 WKY 大鼠作为空白组。

人迎组: 将大鼠束缚于自制鼠套中, 露出颈部, 以右手为刺手, 取双侧“人迎”穴 (颈前两侧下颌骨隅突连线下 8 mm, 前正中线旁开 3.5 mm^[7]), 直刺 4~5 mm。刺入后以针体微微颤动为准, 行捻转平补平泻法 1 min, 留针 20 min。每天 12:00 针刺 1 次, 针刺 6 天休息 1 天, 共针刺 4 周。模型组和空白组大鼠束缚于自制鼠套 20 min, 不做任何干预。

1.4 测量收缩压

在室温 (22 ± 2) °C 条件下, 将清醒状态下的大鼠于 36°C 下预热, 用 E5E2-R3T 温控器调节温度恒定约 15 min, 用无创血压仪测量大鼠安静清醒状态尾压, 连续测量 3 次, 取其均值。于针刺干预第 1、5、9、13、17、21、25、28 天测量血压。

1.5 基因芯片检测及 KEGG 信号通路分析

将各组大鼠用 10% 水合氯醛 (0.5 ml/100 g) 麻醉后立即处死并取材下丘脑, 放入液氮中于 -80°C 冰箱保存。每组样本用 Affymetrix Gene Chip (2.0, Affymetrix 芯片) 进行基因表达频谱分析, 按照 Affymetrix Gene Chip 说明书, 在北京博朗生科技有限公司进行基因芯片的制备, RNA 标记, 芯片杂交和芯片扫描。将扫描后的 CEL 格式图像输入到 Affymetrix Expression console software 1.4, 对基因芯片图像进行数据分析。观察 3 组间基因表达差异, 其中 fold-change 值 ≥ 1.5 为差异基因。然后进行差异表达基因的 KEGG 信号通路分析。本实验所采用通路信息为 KEGG (<http://www.genome.jp/>

kegg/) 通路数据库提供。

1.6 RT-PCR 检测 5-羟色胺受体 (5-HT1A) 与胱硫醚 β 合成酶 (CBS) mRNA 表达

为了验证基因芯片的结果, 从下丘脑组织挑选 5-HT1A 和 CBS 两个基因进行 PCR 验证。提取总 RNA, 进行反转录和逆转录, 用转录因子 cDNA 合成试剂盒, 反应条件: 25°C 10 min, 55°C 30 min, 85°C 5 min。用实时 PCR 仪与 SYBR Green PCR 混合试剂盒运用定量 RT-PCR 法检测基因表达。由博朗生科技有限公司采用 Primer 3.0 软件进行引物设计。引物: GADPH, 正链, 5'-CAGGGCTGCCT-TCTCTTGTG-3', 反链, 5'-ACCAGCATCAC-CCCATTGTA-3', 长度 217bp; 5-HT1A, 正链, 5'-TGATCTCGCTCACTTGGCTC-3', 反链, 5'-CGG-GATATAGAAAGCGCCGA-3', 长度 152bp; CBS, 正链, 5'-AAGCTGAAGGAGAAGTGCCC-3', 反链, 5'-CGGTGGGGATGAAGTCGTAG-3', 长度 136bp。在 PCR 管中配制逆转录反应体系。用 PCR 仪完成逆转录反应, 设定好 PCR 反应体系和 RT-PCR 反应。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。计量资料服从正态分布者以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时间收缩压比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠收缩压在 第 1、5、9、13、17、21、25、28 天升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 人迎组在第 5、9、13、21、25、28 天收缩压降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明针刺人迎穴对于降低 SHR 的血压有短期效应。与本组前一观察点比较, 模型组第 21、25、28 天血压均升高, 人迎组仅第 21 天血压升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间收缩压比较 (mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
空白组	10	117.9 $\pm$ 3.1	118.6 $\pm$ 3.8	119.2 $\pm$ 3.2	119.7 $\pm$ 3.7
模型组	10	168.8 $\pm$ 2.9*	170.4 $\pm$ 2.9*	172.7 $\pm$ 2.8*	174.1 $\pm$ 2.6*
人迎组	10	168.0 $\pm$ 3.2*	167.2 $\pm$ 3.9* $\Delta\Delta$	167.8 $\pm$ 4.4* $\Delta\Delta$	169.2 $\pm$ 3.6* Δ
组别	鼠数	第 17 天	第 21 天	第 25 天	第 28 天
空白组	10	120.9 $\pm$ 3.4	121.8 $\pm$ 3.3	123.4 $\pm$ 2.5	124.9 $\pm$ 2.1
模型组	10	175.4 $\pm$ 2.7*	178.6 $\pm$ 2.8* Δ	182.8 $\pm$ 3.0* Δ	186.6 $\pm$ 3.3* Δ
人迎组	10	170.4 $\pm$ 3.6* Δ	173.9 $\pm$ 2.8* $\Delta\Delta$	176.9 $\pm$ 2.7* Δ	179.8 $\pm$ 2.4* Δ

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与本组前一时点比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 模型组与空白组大鼠差异基因的 KEGG 功能注释

KEGG 信号通路	基因
rno00590: 花生四烯酸代谢	CBR1, CYP4F4, PLA2G2A, EPHX2, ALOX5
rno04612: 抗原处理与提呈	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5, CD4, WDR46
rno04514: 细胞黏附因子	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5, CD274, CD4, CLDN10
rno00260: 甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢	PSAT1, GLDC, CBS
rno05332: 移植物抗宿主病	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5
rno05330: 移植排斥反应	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5
rno00830: 视黄醇代谢	ALDH1A1, RETSAT, UGT2B
rno04940: I 型糖尿病	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5
rno05320: 自身免疫性甲状腺疾病	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5
rno05416: 病毒性心肌炎	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5
rno00650: 丁酸代谢	ACSM3, HMGCS2
rno00564: 甘油磷脂代谢	GPD1, PLA2G2A
rno04144: 内吞作用	RT1-CE1, RT1-CE4, RT1-CE5
rno04620: Toll 样受体信号通路	TLR7, TLR8
rno04670: 白细胞跨内皮迁移	CYBB, CLDN10
rno04740: 嗅觉传到	OLR513, OLR1673, OLR1467, OLR1686, OLR1378, OLR1733
rno04080: 神经活性配体受体相互作用	HTR1A, PRSS1

表 3 模型组与人迎组大鼠差异基因的 KEGG 功能注释

KEGG 信号通路	基因
rno04612: 抗原处理与提呈	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, CD4, WDR46, RT1-N2
rno05332: 移植物抗宿主病	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, RT1-N2
rno05330: 移植排斥反应	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, RT1-N2
rno04940: I 型糖尿病	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, RT1-N2
rno05320: 自身免疫性甲状腺疾病	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, RT1-N2
rno04514: 细胞黏附因子	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, CD4, RT1-N2
rno05416: 病毒性心肌炎	RT1-CE16, RT1-CE4, RT1-CE5, RT1-N2
rno04144: 内吞作用	RT1-CE16, LOC684122, RT1-CE4, RT1-CE5, RT1-N2
rno00260: 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	PSAT1, CBS
rno00830: 视黄醇代谢	ALDH1A1, RETSAT
rno04920: 脂肪细胞因子信号通路	CD36, POMC
rno00590: 花生四烯酸代谢	CBR1, EPHX2
rno04640: 造血细胞谱系	CD36, CD4
rno04660: T 细胞受体信号通路	RHOC, CD4
rno04080: 神经活性配体受体相互作用	HTR1A, PTGDL, NMUR2
rno00230: 嘌呤代谢	POLR3K, ATIC
rno04810: 肌动蛋白细胞骨架的调节	RHOC, FGF1
rno04740: 嗅觉传到	OLR329, OLR1704, OLR470, OLR4, OLR1611, OLR951
rno04010: MAPK 信号通路	PRKCA, FGF7, FGF16, MKNK2, FGF12, MAX, BDNF, MAP3K5, ATF4, PLA2G12A, RASGRP2, PLA2G2A, GADD45B

2.2 各组大鼠基因表达比较

与空白组比较,模型组有 372 个基因表达发生了变化,其中 129 个基因表达升高,243 个基因表达降低 (fold-change 值 ≥ 1.5 , $P < 0.05$)。与模型组比较,人迎组 355 个基因表达发生了变化,其中 167 个基因表达升高,188 个基因表达降低 (fold-change 值 ≥ 1.5 , $P < 0.05$)。模型组表达上调的基因中有 75 个基因在人迎组下调,模型组表达下调的基因中有 67 个基因在人迎组表达上调。

2.3 KEGG 信号通路分析结果

表 2 示,空白组与模型组差异表达的基因与 17 条信号通路有关;表 3 示,人迎组与模型组差异表达的基因与 19 条信号通路有关。

2.4 各组大鼠 CBS、5-HT1A mRNA 表达比较

表 4 示,与空白组比较,模型组 5-HT1A、CBS mRNA 表达下降 ($P < 0.01$);与模型组比较,人迎组 5-HT1A mRNA、CBS mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。

表 4 各组大鼠下丘脑 CBS mRNA、5-HT1A mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Cbs	5-HT1A
空白组	10	7.23 ± 1.26	1.54 ± 0.27
模型组	10	1.08 ± 0.45*	1.00 ± 0.27*
人迎组	10	3.40 ± 1.19 [△]	1.36 ± 0.31 [△]

注: Cbs, 胱硫醚 β 合成酶; 5-HT1A, 5-羟色胺 1A 受体; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

3 讨论

原发性高血压的基本发病机是气血运行失调, 脏腑阴阳失衡, 导致风、火、痰、瘀、虚等病理变化。针刺可调整机体阴阳, 使气血调和。人迎穴作为足阳明胃经和足少阳胆经的交会穴, 既可调节多气多血之胃经, 又可调节少血多气之胆经, 起到疏通气血之效。本研究结果显示, 与模型组比较, 人迎组在除第 1 天外的其他时间收缩压有所降低, 说明针刺人迎穴对于降低 SHR 的血压有效。基因筛选结果显示, 有 355 个基因在针刺治疗后表达有变化, 这表明针刺 SHR “人迎” 穴可以改变下丘脑的部分基因转录。KEGG 通路分析显示, 针刺治疗后的差异基因与 19 条信号通路有关, 其中一条通路是丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号传导通路, 它可能与针刺 “人迎” 穴对 SHR 的降压作用相关。MAPK 通路参与心肌细胞和血管平滑肌细胞的增殖、肥大、变异的活动, 在部分心血管疾病的病理过程中起关键作用, 如高血压病、充血性心力衰竭、左心室肥大和动脉粥样硬化等^[8]。

细胞黏附因子是另一条与针刺治疗后差异基因相关的信号通路, 它表明针刺过程可激活细胞间信号传导。许多细胞黏附分子存在于神经元轴突和树突的突触部位, 这些分子连接了突触前膜和突触后膜, 在细胞之间以连接桥的作用存在^[9]。研究表明, 特定的细胞黏附分子之间的相互作用可以直接影响突触的形成, 调节树突的形态, 改善突触受体功能, 调节突触的可塑性^[10]。本研究结果显示, 针刺人迎穴可通过激活细胞黏附因子信号通路而介导神经元间的信号传递。

基于基因芯片分析的结果, 我们选择两个候选基因 5-HT1A 和 CBS 进行 PCR 验证, 这两个基因是与神经传导物联系紧密的主要基因^[11]。两个基因比值 fold-change ≥ 1.5 为表达上调, 因此 5-HT1A 和 CBS 均为表达上调基因。下丘脑是心血管核心的重要组成部分, 它通过不同的神经递质调控交感-迷走神经的平衡来调节心血管系统^[12]。5-HT1A

是一种调节心血管反应受体, 作为神经递质受体发挥着重要作用^[13], 能激活脑干和脊髓, 通过下行通路抑制交感神经活性, 降低血压, 减缓心率^[14]。结果显示, 与空白组相比, 模型组大鼠体内的 5-HT1A 和 CBS mRNA 表达降低, 人迎组 5-HT1A 和 CBS mRNA 表达升高。我们推测, 针刺人迎穴可以影响 5-HT1A 和 CBS 等兴奋性和抑制性神经递质在中枢神经系统中释, 从而改变感觉信息传递的过程, 最终降低血压。

综上所述, 针刺 “人迎” 穴可以明显降低 SHR 血压, 影响下丘脑的基因表达, 其机制可能与神经递质和交感神经兴奋性相关的关键基因及信号转导通路有关。

参考文献

- [1] LLOYD-JONES D, ADAMS R, CARNETHON M, et al. Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. Circulation, 2009, 119(3): e181.
- [2] YIN C, SEO B, PARK HJ, et al. Acupuncture, a promising adjunctive therapy for essential hypertension: a double-blind, randomized, controlled trial [J]. Neurol Res, 2007, 29 Suppl 1: S98-S103.
- [3] 殷春, 杜宇征. 针刺人迎穴为主对原发性高血压降压效应观察 [J]. 中国针灸, 2012, 32(9): 776-778.
- [4] 刘楠, 樊小农, 孟智宏. 针刺人迎穴为主治疗原发性高血压疗效的 Meta 分析 [J]. 河南中医, 2017, 37(7): 1282-1287.
- [5] KOROSTYNSKI M, PIECHOTA M, GOLDA S, et al. High-throughput gene expression profiling of opioid-induced alterations in discrete brain areas [M]. Opioid Receptors: Methods and Protocols, 2015, 1230: 65-76. doi: 10.1007/978-1-4939-1708-2_5.
- [6] LEIN ES, HAWRYLYCZ MJ, AO N, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain [J]. Nature, 2007, 445(7124): 168-176.
- [7] PARK JM, SHIN AS, PARK SU, et al. The acute effect of acupuncture on endothelial dysfunction in patients with hypertension: a pilot, randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial [J]. J Altern Complement Med, 2010, 16(8): 883-888.
- [8] DALVA MB, MCCLELLAND AC, KAYSER MS. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8(3): 206-220.
- [9] CHEN H, DAI J, ZHANG X, et al. Hypothalamus-related resting brain network underlying short-term acupuncture

- treatment in primary hypertension [1]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 808971. doi: 10. 1155/2013/808971.
- [10] BARNES NM, SHARP T. A review of central 5-HT receptors and their function [J]. Neuropharmacology, 1999, 38(8): 1083-1152.
- [11] DUAN XC, LIU SY, GUO R. Cystathionine-β-Synthase gene transfer into rostral ventrolateral medulla exacerbates hypertension via nitric oxide in spontaneously hypertensive rats [J]. Am J Hypertens, 2015, 28(9): 1106-1113.
- [12] RAMAGE AG, VILLALON CM. 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation [J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(9): 472-481.
- [13] SAHLY I, FABRE V, VYAS S, et al. 5-HT1A-iCre, a new transgenic mouse line for genetic analyses of the serotonergic pathway [J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36(1): 27-35.
- [14] PERNA AF, LANZA D, SEPE I, et al. Hydrogen sulfide, a toxic gas with cardiovascular properties in uremia: how harmful is it? [J]. Blood Purification, 2011, 31(1-3): 102-106.

Impact of Needling Point “Renying (ST9) ” on Hypothalamic Gene Expression of Spontaneous Hypertension Rats

AN Na¹, GUO Yan², LU Juan¹, ZHAO Ruili¹, MA Tian¹, SHI Xuemin², GUO Changqing¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of needling Point Renying (ST9) in treating hypertension. **Methods** Twenty spontaneous hypertension rats (SHR) were randomized into a Renying group and a model group (n = 10 in each group). Another ten Wistar-Kyoto (WKY) rats were set as a blank group. The rats in Renying group were needled at Point “Renying (ST9) ” for 20 min each day, taking one day off every 6 days, totally for 28 days. The model group and the blank group were given no intervention. Rats' blood pressure was measured on the 1st, 5th, 9th, 13th, 17th, 21st, 25th and 28th day of needling. At the end of the experiment, hypothalamus was collected to make gene chip analysis. The expressions of key gene 5-hydroxytryptamine 1A receptor (5-HT1A) and Cystathionine β synthetase (CBS) mRNA were detected with polymerase chain reaction (PCR) technology. **Results** Compared with that in the blank group, systolic pressure of rats in the model group increased on the 1st, 5th, 9th, 13th, 17th, 21st, 25th and 28th day ($P < 0.01$). Compared with that in the model group, systolic pressure of rats in the Renying group decreased on the 5th, 9th, 13th, 21st, 25th and 28th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with that at the previous time point in the same group, blood pressure in the model group increased on the 21st, 25th and 28th day, while blood pressure in the Renying group increased only on the 21st day ($P < 0.05$). Compared with those in the blank group, 129 genes were up-regulated, and 243 genes were down-regulated in the model group ($P < 0.05$). Compared with those in the model group, 167 genes were up-regulated, and 188 genes were down-regulated in the Renying group ($P < 0.05$). Compared with those in the blank group, the expressions of 5-HT1A mRNA and CBS mRNA in the model group decreased ($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the expressions of 5-HT1A mRNA and CBS mRNA in the Renying group increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Needling Point “Renying (ST9) ” seems to be effective in decreasing blood pressure of SHR. Influencing hypothalamus gene expression, such as promoting excitability of neurotransmitters and sympathetic nerves, might be the potential mechanism.

Keywords spontaneous hypertension; needling; Renying ST9; hypothalamus; gene chip

(收稿日期: 2017-07-24; 修回日期: 2017-12-28)

编辑: 王利菊