基于钟基因 Clock 和 Bmal1 调控探究辰时针刺 自发性高血压大鼠的降压机制

王艳君^{1,2}, 李宏坤¹, 孙明新¹, 李艳红^{1,2}, 薛维华^{1,2}

(1. 河北中医学院附属医院, 河北 石家庄 050011; 2. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011)

[摘要]目的 以自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)为观察对象,探究针刺降压的钟基因调控作用。**方法** 将24只SHR随机分为针刺组和模型组,12只Wistar-Kyoto(WKY)大鼠作为正常组。针刺组选择辰时针刺SHR双侧曲池、足三里穴,模型组和正常组仅接受与针刺组同等强度的捆绑操作。4周后,各组分别在辰、酉时随机抽取6只大鼠,测量鼠尾收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),然后检测血清5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、褪黑素(melatonin, MT)的含量以及心脏生物钟基因 Clock 和 Bmal1 的表达水平。**结果** 分组因素对SBP、DBP、血清MT含量、Clock表达结果的RQ值、Bmal1表达结果的RQ值的主效应均有统计学意义($P < 0.05$),时辰因素对各指标的主效应和两者的交互作用均无统计学意义($P > 0.05$)。模型组辰、酉两个时辰的SBP和DBP均高于正常组($P < 0.05$),针刺组辰时的SBP和DBP及酉时的SBP均低于模型组($P < 0.05$)。模型组辰时MT含量较正常组降低,5-HT含量较正常组升高($P < 0.05$),针刺组辰时MT含量较模型组升高,5-HT含量较模型组降低($P < 0.05$);针刺组酉时的MT含量较模型组升高($P < 0.05$)。针刺组辰时心脏Clock基因表达水平和酉时心脏Bmal1基因表达水平较模型组升高($P < 0.05$)。**结论** 辰时针刺可以降低SHR的“双峰”血压,其作用机制可能与提高血清MT含量,减少5-HT含量以及提高心脏Clock和Bmal1基因的表达水平有关。

[关键词] 针刺; 降压; 生物钟基因; 褪黑素; 5-羟色胺

[中图分类号] R544.1⁺1 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2020.05.018

原发性高血压是以血压升高为主要临床表现的综合征,是心脑血管疾病的重要病因和危险因素^[1],中国的原发性高血压患病率高达18.8%^[2]。原发性高血压作为世界上流行最广、危害最重且隐蔽最深的一种心血管疾病,一直倍受关注^[3]。目前原发性高血压的诊断不仅仅局限于血压水平,血压昼夜节律模式已列为原发性高血压诊断和评估心血管事件发生率的参考标准之一^[4]。针刺治疗原发性高血压的研究越来越受到重视,一般认为其治疗机制与肾素-血管紧张素-醛固酮系统,抑制炎症因子和调节免疫系统、神经系统、血管内皮功能等有关^[5]。近年来采用基因组学和蛋白质组学的方法研究疾病机制已成为研究的新方向。血压的昼夜节律主要受控于生物钟^[6],其中钟基因 Clock、Bmal1 是关键的信号分子,人体多数外周组织如心脏、肾脏都存在生物钟系统。笔者的前期研究^[7]提示,针刺可以降低自发性高血压大鼠(spontaneous hypertensive rat, SHR)“双峰”血压,其降压效应可能与调节血清5-

羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、褪黑素(melatonin, MT)水平有关。故本次研究主要从钟基因 Clock、Bmal1 调控出发,进一步探讨针刺调节血压的内在机制。

1 材料

1.1 实验动物 11周龄SPF级健康雄性SHR大鼠24只,体质量为(260.00±9.04)g,同周龄健康雄性Wistar-Kyoto(WKY)大鼠12只,体质量为(255.30±5.66)g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。在普通动物房饲养,温度为(21±2)℃,湿度为45%~55%,自由摄食和饮水。

1.2 主要试剂与仪器 大鼠MT试剂盒(批号E02M0005)、5-HT试剂盒(批号E02H0106):上海蓝基生物科技有限公司;DEPC(批号20160802554):Sigma公司;RNAiso Plus(批号9108)、RT试剂(批号RR047Q):TaKaRa公司;SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒(批号FP209):Tiangen公司;一次性使用针灸针(0.25 mm×25 mm):长春爱康医疗器械有限公司;全自动大小鼠无创血压测量系统(BP-100A):成都泰盟软件有限公司;电针仪(BT701-1B型):上海华谊医用器械有限公司;实时荧光定量PCR仪(规格7500fast):ABI

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项计划(2018YFC1707803);河北省中医药管理局项目(2017054);河北省财政厅项目(361025)

作者简介: 王艳君(1962-),女,主任医师,博士研究生导师

公司。

2 方法

2.1 分组 将24只SHR大鼠适应性喂养1周后,随机分为针刺组和模型组,每组12只,12只WKY大鼠为正常组。

2.2 干预方法 针刺组于辰时针刺SHR双侧曲池、足三里,取穴参照《实验针灸学》^[8],将大鼠装入自制固定器内,常规无菌操作后毫针直刺穴位,接通电针仪,干预4周。模型组和正常组在正常条件下饲养4周,每日仅接受与针刺组同等强度捆绑操作。

2.3 观察指标及检验方法

2.3.1 各组大鼠SBP和DBP比较 采用尾套法测量血压。采用全自动无创血压测量仪,按照操作规程进行测量,血压测定均由同一人操作。各组大鼠分别于治疗前和治疗结束后次日,在辰、酉两个时辰随机抽取6只测量尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),每只大鼠连续测量5次,取平均血压值。

2.3.2 各组血清MT、5-HT水平比较 治疗结束后,将各组大鼠随机分为辰时和酉时2个组,每组6

只,在相应时辰进行心脏采血与样本采集。动物麻醉灌流后,快速断头处死大鼠,开胸暴露心脏采血,3 500 r/min离心15 min,取血清样品,-80℃保存。采用ELISA法测定血清MT、5-HT水平。取出心脏置于冰盒上,剪取左心室肌,生理盐水冲洗后置于无RNA酶的EP管中经液氮固定,-80℃冰箱保存备用。

2.3.3 各组大鼠心脏基因Clock和Bmal1相对表达水平比较 采用RT-PCR检测心脏Clock、Bmal1基因的表达。取组织约100 mg,应用RNAiso Plus试剂提取组织中RNA,反转录为单链cDNA,应用实时定量PCR试剂盒检测钟基因Clock、Bmal1 mRNA的表达。得到各样本各目的基因及内参基因GAPDH的 C_T 值, $\Delta C_T = \text{目的基因 } C_T \text{ 值} - \text{内参基因 GAPDH 的 } C_T \text{ 值}$,按照公式 $Q = 2^{-\Delta C_T}$,得到每个目的基因的Q值及Q均值,再以每个目的基因的Q值/Q均值,即各目的基因表达的相对定量值(RQ值)。操作步骤均参照试剂盒说明书。大鼠内参基因GAPDH及目的基因的引物序列见表1。

表1 引物序列

基因名称	扩增片段长度/bp	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
GAPDH	235	CCTCCTGAACTTGAGGCAGTTT	TGTATTGTAACCAGTCATCAGCA
Bmal1	104	TGCCACTGACTACCAAGAAAGT	GGGCCTCCCTTGCATTTTTG
Clock	156	TGTATCTGAGACGGTAACTTCGT	AAGTCCTCGGGGGTTAAGGA

2.4 统计学方法 采用SPSS 21.0软件进行统计学处理,所有指标均为连续型变量。若满足正态分布,用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”进行统计学描述;若不满足正态分布,用中位数(四分位数间距)表示。组间比较采用两因素方差分析,考虑时辰因素和分组因素各自的主效应及二者的交互效应。若分组因素的主效应有统计学意义,进一步进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 干预前各组大鼠SBP和DBP比较 干预前针刺组和模型组SBP和DBP均高于正常组($P < 0.05$);针刺组和模型组SBP和DBP比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表2。

表2 干预前各组大鼠SBP和DBP比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SBP/mmHg	DBP/mmHg
正常	12	122.67±6.03	91.32±4.29
模型	12	180.09±10.61*	142.43±13.34*
针刺	12	182.67±9.05*	137.48±9.07*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$

3.2 不同时辰针刺对各组大鼠SBP和DBP的影

响 模型组辰、酉两个时辰的SBP和DBP均高于正常组($P < 0.05$),针刺组辰时SBP和DBP以及酉时SBP均低于模型组($P < 0.05$)。两因素方差分析结果显示,分组因素对SBP、DBP的主效应均有统计学意义($P < 0.05$),时辰因素对SBP、DBP的主效应及两者的交互作用均无统计学意义($P > 0.05$)。见表3、表4。

表3 不同时辰针刺对各组大鼠SBP和DBP的影响($\bar{x} \pm s$)

时辰	组别	n	SBP/mmHg	DBP/mmHg
辰时	正常	6	128.15±10.96	92.58±11.29
	模型	6	184.88±8.52*	143.43±6.44*
	针刺	6	141.29±4.74#	105.28±4.07#
酉时	正常	6	128.93±7.44	91.51±7.08
	模型	6	177.82±16.59*	135.58±24.62*
	针刺	6	155.04±11.12#	131.90±14.16

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

3.3 不同时辰针刺对各组大鼠血清MT和5-HT含量的影响 模型组辰时MT含量低于正常组,5-HT含量高于正常组($P < 0.05$),针刺组辰、酉两个时辰的MT含量均高于模型组,辰时5-HT含量

低于模型组($P < 0.05$)。两因素方差分析结果显示,分组因素对 MT 的主效应有统计学意义($P < 0.05$),分组因素对 5-HT 含量的主效应、时辰因素

对 MT 和 5-HT 含量的主效应及两者的交互作用均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5、表 6。

表 4 时辰因素和分组因素对大鼠血压影响的两因素方差分析结果

指标	差异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
SBP	时辰	5.768	1	5.768	0.060	0.809
	分组	16 081.656	2	8 040.828	83.147	0.000
	时辰×分组	503.636	2	251.818	2.604	0.091
	误差	2 901.197	30	96.707		
DBP	时辰	763.325	1	763.325	5.515	0.260
	分组	4 537.579	2	2 268.789	16.392	0.000
	时辰×分组	1 820.834	2	910.417	6.578	0.400
	误差	4 152.301	30	138.410		

3.4 不同时辰针刺对各组大鼠心脏基因 Clock 和 Bmal1 相对表达水平的影响 针刺组辰时心脏 Clock 基因、酉时心脏 Bmal1 基因的相对表达水平均高于模型组($P < 0.05$)。两因素方差分析结果显示,分组因素对 Clock 和 Bmal1 相对表达水平的主效应有统计学意义($P < 0.05$),时辰因素对 Clock 和 Bmal1 相对表达水平的主效应及两者的交互作用均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 7、表 8。

表 5 不同时辰针刺对各组大鼠 MT 和 5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

时辰	组别	n	MT/(ng/mL)	5-HT/(ng/mL)
辰时	正常	6	183.30±23.10	20.47±4.96
	模型	6	152.34±53.60*	27.51±1.48*
	针刺	6	217.90±5.97 [#]	25.91±1.06 [#]
酉时	正常	6	161.33±27.22	30.59±3.36
	模型	6	168.82±21.08	27.72±4.13
	针刺	6	205.31±31.66 [#]	31.45±7.40

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

表 6 时辰因素和分组因素对大鼠 MT 和 5-HT 含量影响的两因素方差分析结果

指标	差异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
血清 MT 含量	时辰	2 302.560	1	2 302.560	2.965	0.095
	分组	12 348.589	2	6 174.295	7.951	0.002
	时辰×分组	4 118.236	2	2 059.118	2.652	0.087
	误差	23 295.625	30	776.521		
血清 5-HT 含量	时辰	30.895	1	30.895	1.720	0.200
	分组	11.548	2	5.774	0.322	0.728
	时辰×分组	156.546	2	78.273	4.359	0.220
	误差	538.731	30	17.958		

表 7 不同时辰针刺对各组大鼠 Clock 和 Bmal1 相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

时辰	组别	n	Clock	Bmal1
辰时	正常	6	0.93±0.11	0.80±0.08
	模型	6	0.70±0.01	0.72±0.67
	针刺	6	1.37±0.10 [#]	1.14±0.02
酉时	正常	6	0.96±0.25	0.78±0.08
	模型	6	1.08±0.56	0.87±0.80
	针刺	6	1.06±0.19	1.17±0.06 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

4 讨论

原发性高血压是一种常见的慢性病,据调查,2010 年因高血压死亡的人数占中国心血管病死亡总人数的 24.60%,且呈逐年增长的态势^[9]。正常情况下,人夜间血压均值应略低于白天,24 h 血压呈现“双峰一谷”的“长柄杓”曲线,有益于适应机体活动、保护靶器官结构和功能。随着现代生活节奏

的加快和社会压力的增大,血压昼夜节律紊乱的人数在全世界范围内正日益增长。尽管高血压和血压昼夜节律紊乱可以通过不同的药物治疗,但是药物的不良反应仍然是一个不容忽视的问题。而且某些药物,如血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂、 β 受体阻滞剂在降压的同时又增大了血压变异性^[10]。针灸作为一种安全有效的治疗方法,对治疗原发性高血压有一定的应用价值,同时能有效调整紊乱的高血压昼夜节律。雷云等^[11]发现针刺疗法配合常规西药治疗能够有效改善原发性高血压患者血压昼夜节律及相关动态血压参数。李洪波等^[12]通过时辰取穴针刺,证明针刺对“非杓型”高血压病患者有明显的调节作用。

生物节律是生物固有的内源性特征,人体许多生理功能如血压、睡眠均呈现节律变化,这些节律受体内生物钟系统的调控。生物钟是一种自持振荡

表 8 时辰因素和分组因素对大鼠心脏基因 Clock 和 Bmal1 相对表达水平影响的两因素方差分析结果

指 标	差异来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Clock 基因表达水平	时辰	77.8	1	77.8	0.941	0.340
	分组	154 264.9	2	77 132.4	933.4	0.000
	时辰×分组	161.8	2	80.9	0.979	0.387
	误差	2 479.0	30	82.6		
Bmal1 基因表达水平	时辰	71.9	1	71.9	0.868	0.359
	分组	154 631.3	2	77 315.6	934.118	0.001
	时辰×分组	167.4	2	83.7	1.011	0.376
	误差	2 483.0	30	82.8		

机制,由输入部分、时钟系统、输出部分三部分组成^[13]。输入部分由授时因子构成,主要分为光性授时因子和非光性授时因子^[14]。时钟系统包括中枢生物钟与外周生物钟系统,哺乳动物的中枢生物钟位于下丘脑视交叉上核,而外周生物钟存在于心、肺、肾等外周器官组织中。输出部分包括神经内分泌系统和自主神经系统两大途径^[15]。传入通路将感受到的外界变化信息传递给中央振荡器,在后者整合以后,经传出通路输送给靶器官,使之表现出昼夜节律性^[16]。昼夜节律发生的物质基础是分子计时器,即昼夜节律生物钟。它是由一组特异的核心元件(包括 Clock、Bmal1、Per、Cry 4 个生物钟基因)组成的正负调节回路。其中 Clock 基因和 Bmal1 基因构成自主调节的转录和翻译反馈环路,对于维持昼夜节律振荡环有重要意义^[17]。近年来大量的实验研究表明,MT 具有调节生物钟,稳定并且重建体内生物节律的作用^[18],作为一种非光性授时因子,以第一信使的形式对许多生理功能的昼夜节律起调节作用^[19]。MT 的减少或昼夜节律紊乱,可能是导致高血压发生的原因之一^[20]。通过升高内源性 MT 或给予外源性 MT,能在降压的基础上恢复血压昼夜节律,对稳定血压节律具有重要意义^[21]。5-HT 是一种组蛋白修饰剂,可能影响基因表达^[22]。同时,5-HT 能促进血管平滑肌细胞的收缩、增生,参与血压的调节^[23]。血压是评估心血管功能最直接、有效的生理参数^[24]。在大多数心血管疾病的病理过程中,存在有生物节律基因和相应的时钟基因的异常表达^[25]。心脏是心血管系统中最为关键的器官,其生物钟系统受中枢生物钟系统通过体液因子、激素和神经信号的调控,产生与中枢生物钟系统相同步的昼夜节律^[26]。

中医时间医学以整体观为理论基础,根据人体生命活动周期及变化规律指导养生和疾病的防治^[27]。子午流注学说属于中医时间医学的一部分,是指十二经脉随着十二时辰的更替,其气血流注也发生相应的节律性变化。孟建晓等^[28]总结发现,根

据子午流注时辰规律治疗高血压患者,可有效调节患者气血阴阳,改善紊乱的血压昼夜节律,保护靶器官。本次实验选择辰时针刺,辰时属足阳明胃经,是阳明经气血最盛之时,同时也是高血压患者气血紊乱之时。取手足阳明经的合穴曲池、足三里,两阳相配,两合相会,共调全身气血阴阳。沈攀攀等^[29]通过研究也证实,同名经配穴效应存在,降压效果明显。故本次实验选择辰时针刺足三里、曲池,以内敛阳气,纳阴蓄血。同时根据血压的两个峰值,选择辰时和酉时观察各项指标变化,探究针刺治疗原发性高血压的时效规律以及降压的作用机制。

两因素方差分析结果显示,分组因素对 SBP、DBP、血清 MT 含量、Clock 表达结果的 RQ 值、Bmal1 表达结果的 RQ 值的主效应均有统计学意义($P < 0.05$),时辰因素对各指标的主效应和两者的交互作用均无统计学意义($P > 0.05$),说明本实验中分组是影响结果的主要因素。本研究发现,SHR 的血压和血清 MT、5-HT 及心脏 Clock 和 Bmal1 的表达变化具有一定的规律性,辰时针刺组的 SBP 和 DBP 均低于模型组,说明此时针刺具有降压效应;针刺组 MT 含量较模型组升高($P < 0.05$),5-HT 含量较模型组降低($P < 0.05$),心脏基因 Clock 表达结果较模型组显著升高($P < 0.05$)。此结果提示,针刺可能是通过提高 SHR 心脏 Clock 基因的表达,提升血清 MT 含量,降低 5-HT 含量,从而实现降压效果。酉时针刺组 SBP 均低于模型组($P < 0.05$),说明此时针刺具有降低收缩压的作用;针刺组 MT 含量较模型组升高($P < 0.05$),心脏 Bmal1 基因表达水平较正常组和模型组显著升高($P < 0.05$)。此结果提示,针刺可能是通过提高 SHR 心脏 Bmal1 基因的表达水平,提升血清 MT 含量,从而实现降低收缩压的效果,推测提高 MT 含量和心脏 Bmal1 基因的表达水平只是针刺多靶点降压机制的一部分。研究^[30]发现,电针作为一种外源性授时因子,可以促进节律紊乱的恢复。针刺可能是在辰时和酉时通过提升血清 MT 含量、减少 5-HT 含量,以及提

高心脏 Clock 和 Bmal1 基因的表达水平,从而实现
对辰、酉时“双峰”血压的调节。但本次实验仅进行
了外周心脏钟基因表达水平的检测,未进行中枢组
织基因的观察分析。今后应增加对下丘脑视交叉上
核内生物钟基因表达的检测,探索中枢-外周生物钟
协同作用机制,同时增加不同时间节点监测指标,对
针刺降压的机制进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] 刘海华,刘朝,王莹莹,等. 刮痧对原发性高血压降压作
用的时效规律研究[J]. 中国针灸,2015,35(7):711-
714.
- [2] 何科杰,李景,王玉妹,等. 针刺太溪穴对自发性高血压
大鼠血压和脑区糖代谢的影响[J]. 中国中医基础医学
杂志,2019,25(4):522-525.
- [3] ARREDONDO A, CUADRA S M, DUARTE M B. Challen-
ges of the epidemiological and economic burdens associ-
ated with hypertension in middle income countries: evi-
dence from Mexico[J]. BMC Public Health,2015,15:
1106.
- [4] HERMIDA R C, SMOLENSKY M H, AYALA D E, et
al. Ambulatory Blood Pressure Monitoring (ABPM) as
the reference standard for diagnosis of hypertension and
assessment of vascular risk in adults[J]. Chronobiol Int,
2015,32(10):1329-1342.
- [5] 崔依依,冀雨芳,郭继龙,等. 针刺降压机制实验研究进
展[J]. 辽宁中医药大学学报,2019,21(4):156-159.
- [6] YANG G, CHEN L, ZHANG J, et al. Bmal1 deletion in
mice facilitates adaptation to disrupted light/dark condi-
tions[J]. JCI Insight,2019,5(10):125-133.
- [7] 王艳君,刘威萍,李红奇,等. 电针曲池、足三里对 SHR
“两峰”血压、血清褪黑素及 5-羟色胺的影响[J]. 中华中
医药学刊,2018,36(1):197-200.
- [8] 余曙光,徐斌. 实验针灸学[M]. 北京:人民卫生出版社,
2012:269-272.
- [9] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2015》
概要[J]. 中国循环杂志,2016,31(6):521-528.
- [10] ALASTAIR J, FISCHER U, MEHTA Z, ROTHWELL P
M. Effects of antihypertensive-drug class on interindi-
vidual variation in blood pressure and risk of stroke: a
systematic review and meta-analysis[J]. Lancet,2010,
375(9718):906-915.
- [11] 雷云,金玖,班海鹏,等. 针刺调节原发性高血压患者血
压昼夜节律疗效观察[J]. 中国针灸,2017,37(11):
1157-1161.
- [12] 李洪波,罗莎,陈春华,等. 时辰取穴针刺对高血压病血
压昼夜节律变异的干预作用[J]. 广西中医药,2011,34
(4):28-29.
- [13] ZUBER A M, CENTENO G, PRADERVAND S, et al.
Molecular clock is involved in predictive circadian ad-
justment of renal function[J]. Proc Natl Acad Sci U S
A,2009,106(38):16523-16528.
- [14] VAN KE, LEHMAN M N, BOER G J. The suprach-
iasmatic nucleus and the circadian time-keeping system
revisited[J]. Brain Res Brain Res Rev,2000,33(1):
34-77.
- [15] DUN LAP J C, LOROS J J, MERROW M. The genetic
and molecular dissection of a prototypic circadian sys-
tem[J]. Prog Brain Res,1996,111:11-27.
- [16] JOHNSON M S. Activity and distribution of certain
wild mice in relation to biotic communities [J]. J Mam-
mal,1926,7(4):245-277.
- [17] 丁莉,游秋云,王平. 生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆
小鼠自主活动昼夜节律的影响及对下丘脑生物钟基因
的调节[J]. 时珍国医国药,2017,28(2):301-304.
- [18] 张如意,王平,张舜波,等. 褪黑素治疗睡眠障碍的作用
机制探讨[J]. 中华中医药学刊,2018,36(2):308-310.
- [19] 刘臻,赵娜,谢晨,等. 电针对失眠大鼠睡眠-觉醒昼夜
节律及褪黑素节律的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,
31(9):3695-3699.
- [20] FORMAN J P, CURHAN G C, SCHERNHAMMER
E S. Urinary melatonin and risk of incident hyperten-
sion among young women[J]. J Hypertens,2010,28
(3):446-451.
- [21] TRANQUILLI A L, TURI A, GIANNUBILO S R.
Circadian melatonin concentration rhythm is lost in
pregnant women with altered blood pressure rhythm
[J]. Gynecol Endocrinol,2004,18(3):124-129.
- [22] MARLENE, CERVANTES, PAOLO, et al. Modifica-
tion of histone proteins by serotonin in the nucleus[J].
Nature,2019,567(7749):464-465.
- [23] FROHLICH E D. The first Irvine H. Page lecture.
The mosaic of hypertension: past, present and future.
[J]. J Hypertens Suppl,1988,6(4):S2-S11.
- [24] 李沛璐,张启明. 血压调节能力对中医“心主血脉”功能
的客观测评[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19
(78):213,218.
- [25] MOHRI T, EMOTO N, NONAKA H, et al. Altera-
tions of circadian expressions of clock genes in Dahl
salt-sensitive rats fed a high-salt diet [J]. Hyperten-
sion,2003,42(2):189-194.
- [26] SINGH D, TRIVEDI A K, RANI S, et al. Circadian
timing in central and peripheral tissues in a migratory
songbird: dependence on annual life-history states[J].
FASEB J,2015,29(10):4248-4255.
- [27] 温利丹,支艳. 中医时间医学在月经病中的应用[J]. 中
医学报,2017,32(5):780-783.
- [28] 孟建晓,毛静远,侯雅竹,等. 血压昼夜节律与子午流注
时辰规律的相关性[J]. 中医杂志,2015,56(16):1378-

1381.

[29] 沈攀攀,陈月婷,肖双凯,等.“太冲”配“内关”针刺对自发性高血压大鼠血压及延髓头端腹外侧区天冬氨酸及谷氨酸水平的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(2): 102-106.

[30] 陈莎莎,王颖,魏大能,等. 电针重置超前性光暗周期转移小鼠的节律特征及其对 SCN 内相关钟基因表达的影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2017, 56(2): 13-21.

(收稿日期:2020-05-24;编辑:曹健)

Antihypertensive Mechanism of Acupuncture During the Period of the Day from 7 a. m. to 9 a. m. in Spontaneously Hypertensive Rats Based on the Regulation of Circadian Clock Genes Clock and Bmal1

WANG Yan-jun^{1,2}, LI Hong-kun¹, SUN Ming-xin¹, LI Yan-hong^{1,2}, XUE Wei-hua^{1,2}

(1. The Affiliated Hospital of Hebei University of Traditional Chinese Medicine, Hebei Shijiazhuang 050011, China; 2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hebei Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] Objective To investigate the regulatory effect of circadian clock genes in reducing blood pressure by acupuncture in spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Methods** A total of 24 SHRs were randomly divided into acupuncture group and model group, and 12 Wistar Kyoto (WKY) rats were selected as normal group. The rats in the acupuncture group were given acupuncture at bilateral Quchi and Zusanli acupoints during the period of the day from 7 a. m. to 9 a. m. , and those in the model group and the normal group were tied up with the same intensity as the acupuncture group. Four weeks later, six rats were randomly selected from each group during the periods of the day from 7 a. m. to 9 a. m. and from 5 p. m. to 7 p. m. to measure rat tail systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), as well as the serum levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and melatonin (MT) and the mRNA expression of the circadian clock genes Clock and Bmal1. **Results** The main effects of grouping factors on SBP, DBP, serum MT, and RQ values of the expression of Clock and Bmal1 were statistically significant ($P < 0.05$), while the main effect of time factor on each index and the interaction between them was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the normal group, the model group had significantly higher SBP and DBP during the periods of the day from 7 a. m. to 9 a. m. and from 5 p. m. to 7 p. m. ($P < 0.05$), and compared with the model group, the acupuncture group had significantly lower SBP and DBP during the period of the day from 7 a. m. to 9 a. m. and a significantly lower SBP during the period of the day from 5 p. m. to 7 p. m. ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the model group had a significant reduction in MT and a significant increase in 5-HT during the period of the day from 7 a. m. to 9 a. m. ($P < 0.05$); compared with the model group, the acupuncture group had a significant increase in MT and a significant reduction in 5-HT during the period of the day from 7 a. m. to 9 a. m. ($P < 0.05$), as well as a significant increase in MT during the period of the day from 5 p. m. to 7 p. m. ($P < 0.05$). Compared with the model group, the acupuncture group had a significant increase in the mRNA expression of Clock during the period of the day from 7 a. m. to 9 a. m. and a significant increase in the mRNA expression of Bmal1 during the period of the day from 5 p. m. to 7 p. m. ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture during the period of the day from 7 a. m. to 9 a. m. can reduce "bimodal" blood pressure of SHR, possibly by increasing serum MT, reducing 5-HT, and increasing the mRNA expression of the Clock and Bmal1 genes in the heart.

[Key words] Acupuncture; Antihypertensive effect; Circadian clock gene; Melatonin; 5-Hydroxytryptamine