



论文

利用新型碳纳米管丝电极探讨穴区外周神经电刺激对大鼠心肌缺血的改善作用

于傲天¹, 李鹏伟¹, 原郡鸽², 傅琦轩¹, 宁斯敏¹, 徐文静^{1*}

1. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 102401

2. 郑州大学物理学院, 郑州 450001

* 联系人, E-mail: jingwenxu2013@pku.edu.cn

收稿日期: 2024-12-13; 接受日期: 2025-05-14; 网络版发表日期: 2025-09-05

北京中医药大学高层次人才项目(批准号: 2022-XJ-KYQD-004)、北京中医药大学“揭榜挂帅”项目(批准号: 2024-JYB-JBZD-066)、国家中医药管理局针灸高水平重点学科项目(批准号: zyyzdxk-2023254)和企业横向项目(批准号: BUCM-2024-JS-FW-030)资助

摘要 心肌缺血是心血管不良事件中最常见且风险系数较高的疾病, 寻找安全、有效的治疗方法具有重要的临床意义. 近年来, 外周神经刺激疗法作为一种非药物治疗方式, 逐渐被广泛应用于心血管疾病的治疗中, 疗效显著, 但其安全性和靶向性有待进一步提高. 因此, 本研究以传统中医经络穴位理论为依托, 利用具有微米直径、高柔软、高强度、高导电性和良好生物性的碳纳米管丝电极, 研究内关穴区正中神经电刺激对心肌缺血大鼠模型的改善作用. 通过对大鼠心电图、心肌组织形态学、血清心肌肌钙蛋白-T水平等指标的检测, 结果表明, 内关穴区正中神经电刺激能够显著改善心肌缺血所引发的心电图S-T段异常、心率异常、心肌组织损伤和心脏功能等, 且植入式碳纳米管丝电极未引发明显的组织损伤或神经功能丧失. 本研究将为建立基于传统中医经络穴位理论的外周神经刺激疗法提供新的思路, 有望成为一种靶向性强、安全性高、疗效显著的外周神经刺激方法, 为未来心肌缺血等心血管疾病的有效治疗提供新途径, 但其长期安全性和微创植入仍值得进一步探索.

关键词 碳纳米管丝, 外周神经电极, 外周神经电刺激, 电针, 心肌缺血

心肌缺血(myocardial ischemia, MI)是心血管疾病中最常见的病理生理表现, 严重时可引发心源性猝死^[1], 因此不断探索安全、有效的治疗方法具有重要意义. 近年来, 随着生物电子医药(bioelectronic medicine), 尤其美国SPARC计划(Stimulating Peripheral Activity to Relieve Conditions)的提出, 外周神经刺激疗法(peripheral nerve stimulation, PNS)作为一种新型非药物疗法, 已经得到越来越广泛的研究([http://common-](http://common-fund.nih.gov/sparc)

[fund.nih.gov/sparc](http://common-fund.nih.gov/sparc)). 该疗法结合多学科技术成果, 利用新型工具和技术开发出一系列外周神经刺激电极, 研究外周神经电刺激对内在器官或系统功能的改善^[2,3]. 该疗法不仅在神经系统疾病(如慢性疼痛、运动障碍等)治疗中取得了积极成果, 还在心血管疾病、代谢性疾病等领域展现了潜在应用价值, 逐渐成为现代医学中重要的治疗手段之一^[4~7]. 目前, 关于PNS的研究, 主要集中在迷走神经电刺激, 因为迷走神经系统对内

引用格式: 于傲天, 李鹏伟, 原郡鸽, 等. 利用新型碳纳米管丝电极探讨穴区外周神经电刺激对大鼠心肌缺血的改善作用. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1902–1913

Yu A T, Li P W, Yuan J G, et al. Investigating the effect of peripheral nerve electrical stimulation at acupoint area on myocardial ischemia in rats based on novel carbon nanotube fiber electrodes (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1902–1913, doi: [10.1360/SSV-2024-0349](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0349)

脏器官和系统具有广泛的调节作用. 研究表明, 迷走神经刺激通过调节自主神经功能, 能够有效改善心肌缺血或心肌缺血/再灌注损伤^[8-10]. 然而, 迷走神经的对内脏系统和器官的广泛调节作用将带来无法避免的脱靶现象(如声音嘶哑、呼吸困难、吞咽障碍)、胸腔术后感染等风险^[11]. 因此, 探索更加安全、有效的外周神经刺激界面至关重要.

针对这一需求, 中国传统医学中的经络腧穴理论或将提供更多启发. 研究表明, 针刺心包经(以内关穴为代表)能够有效改善心肌缺血^[12,13], 且这一改善作用与激活伴行心包经的正中神经密切相关. 正中神经作为针刺刺激的主要传入神经, 在激活神经-内分泌-免疫调节网络过程中扮演了重要角色^[7,14]. 因此, 我们合理推测: 电刺激穴位正中神经有望成为改善心肌缺血的新的外周神经刺激方法.

为验证上述假设, 本研究选取碳纳米管丝(carbon nanotube fiber, CNTF)作为刺激电极, 因为我们的前期研究工作已经可控制备出直径在微米至几十微米的碳纳米管丝, 且证明了其具有高度柔软性、高机械强度、优良的导电性、良好的生物相容性等优异性能, 为其长期、在体应用奠定了基础^[15]. 在上述研究的基础上, 本研究利用碳纳米管丝电极探讨内关穴区正中神经电刺激对心肌缺血大鼠的改善作用. 该研究一方面依托传统中医经络穴位理论, 在保证有效性的同时, 能够让外周神经刺激更安全、更具有靶向性, 另一方面发挥植入式神经刺激的优势, 有利于实现精准、持续刺激作用.

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级健康成年雄性SD大鼠65只, 质量为(250 $\pm$ 20) g. 购自于北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号: SYXK(京)2022-0052. 饲养于北京中医药大学实验动物中心. 饲养条件: 正常饲养, 温度为20~25°C, 12 h/12 h光照周期, 相对湿度40%~60%. 实验过程中对动物的使用与处理均遵照北京中医药大学有关动物的使用及伦理学规定, 伦理审批号: BUCM-2023032301-1117.

适应性饲养一周后, 使用随机数字表法, 将50只大鼠平均分为5组: 空白对照组(Control)、模型组(Mod-

el)、正中神经电刺激组(median nerve stimulation, MNS)、假正中神经电刺激组(仅植入不进行电刺激, Sham)、电针组(electroacupuncture, EA). 剔除造模前心电图异常或中途死亡及造模不成功的大鼠, 最终每组取6只($n=6$). 其余15只正常大鼠用于电极安全性评价实验, 只植入CNTF, 不进行造模、干预等处理, 检测Control组和CNTF在体第1, 3, 5, 15天时, 大鼠血清中的促炎因子水平.

1.2 主要仪器和试剂

本研究所采用的仪器设备如下: 扫描电子显微镜(S-4800, 日本Hitachi), 高精度千分(MNTQFC02, 美耐特上海电动工具制造有限公司), 5843单柱测试仪(Instron, 美国), 万用表(TOP01-890C/D, 德力西, 安徽), 电化学工作站(CHI604E, 上海辰华), PowerLab3508细胞外电生理记录系统(AD Instruments, 澳大利亚), 生化培养箱(THA-200, 广州瑞丰实验设备有限公司), 酶标仪(SpectraMax M2, 美国), 冰冻切片机(Leica, 德国), 正置荧光显微镜(BX43, 日本OLYMPUS), 0.30 mm $\times$ 13 mm一次性无菌针灸针(北京中研太和医疗器械有限公司), 华佗电针仪, BL-420N⁺生物机能实验系统(成都泰盟)等.

本研究所采用的试剂: Parylene-C颗粒(派珂纳米科技苏州有限公司), 异氟烷(深圳市瑞沃德生命科技有限公司), 4%多聚甲醛溶液(北京艾比凡生物科技有限公司), 大鼠心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTn-T)ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司), 大鼠IL-6 ELISA 试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司), 大鼠TNF- α 试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司), PBS溶液(北京索莱宝科技有限公司), 20%蔗糖溶液, 30%蔗糖溶液, NIMP-R14抗体(美国Abcam), HRP标记的山羊抗鼠Ig G(Alexa Fluor® 488, Abcam), 抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)(北京百瑞极生物科技有限公司), 曲拉通X-100(北京百瑞极生物科技有限公司), 山羊血清(北京索莱宝科技有限公司)等.

1.3 碳纳米管丝神经电极的植入

对MNS组和Sham组大鼠分别进行碳纳米管丝神经电极植入手术. 术前12 h动物禁食禁水, 对所有手术器械和植入物组进行消毒处理. 然后, 利用2%戊巴比妥钠(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉后(表现为对镊子夹

趾间无反应), 对大鼠进行仰卧位固定并放至恒温鼠台, 使其体温保持在 $(37\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ 。接着, 对大鼠左上肢内侧进行脱毛、消毒处理, 在腕关节上3 mm尺、桡骨缝间做纵向切口, 钝性分离出正中神经(大约2~3 mm的部分与所有结缔组织完全分离), 并利用棉线提供少量张力将神经悬吊在空气中。随后将碳纳米管丝未绝缘部分缠绕至已分离出来的正中神经上, 并使用具有生物相容特性的可溶性纱布覆盖电极植入处并固定电极丝, 促进神经周围组织修复。最后, 使用4-0缝线封闭皮肤切口。在大鼠意识恢复前为大鼠佩戴颈套, 包扎伤口, 防止其舔舐、撕咬自由端电极, 并一次性给予青霉素肌肉注射80 U。结束植入手术后, 对手术台进行消毒处理, 将大鼠进行单独饲养, 注意保暖。实验人员密切关注其生命体征, 在碳纳米管丝神经刺激电极植入约1周后, 待大鼠表现出正常的饮食和活动, 再次对植入组进行心电图检查。若大鼠未出现其他显著损伤症状, 再进行心肌缺血建模。其他组大鼠均佩戴与MNS和Sham组相同的脖套, 保持相同的饲养条件。

1.4 大鼠心肌缺血的造模

对Model组、MNS组、Sham组、EA组大鼠进行心肌缺血造模。本研究采用连续3天腹腔注射40 mg/kg异丙肾上腺素(ISO)的方式构建大鼠心肌缺血模型。第3天注射完成后, 立即在2%异氟烷下以1 L/min的进氧速度麻醉大鼠, 行肢体Ⅱ导联心电图检查, 记录大鼠心电图。本研究造模成功的标志为大鼠心电图S-T段或J点抬高 $\geq 0.1\text{ mV}$ ^[16]。对照组大鼠采取相同方式捉抓, 固定, 腹腔注射0.9%氯化钠(40 mg/kg), 同时记录其肢体Ⅱ导联心电图。

1.5 穴位定位与干预方法

依据大鼠针灸穴位定位标准, 测量后折算确定大鼠“内关穴”位于: 前肢内侧, 离腕关节约3 mm的尺桡骨缝间^[17]。造模成功后, 在2%异氟烷下以1 L/min进氧速度麻醉大鼠, 选择各项生理指标平稳的时间点作为第0 min开始标记。

不同组采用不同的干预方式^[14]: Control组、Model组及Sham组不进行干预, 但仍采取同样的抓取、固定及麻醉方式。EA组: 采用0.13 mm $\times$ 13 mm毫针垂直刺入双侧“内关穴”约2 mm, 并接穴位电针仪(华佗SDZ-II)进行电针刺激, 电针参数设定为: 疏密波, 频率

2~50 Hz, 强度1~2 mA, 强度以大鼠肢体微微颤动为宜, 每次留针20 min。MNS组: 采用BL-420N⁺生物机能实验系统刺激器, 刺激导线正极金属夹连接已植入动物体内且自由端留置在穴区体表的碳纳米管丝电极, 负极金属夹连接内关穴旁开5 mm的皮下针灸针, 形成导电回路并同步Ⅱ导联ECG记录。设定为高级程控方波刺激模式, 50 Hz, 1.5 mA, 定量刺激, 每次治疗时间为20 min。两组治疗周期均为1周, 连续治疗7天。

1.6 指标检测及方法

电化学: 利用CHI604E电化学工作站对碳纳米管丝的电荷储存量进行检测。检测方法为传统的三电极方法: CNTF电极、Pt电极和SCE(饱和甘汞电极)分别作为工作电极、对电极和参比电极, 在室温($\sim 20^{\circ}\text{C}$)、磷酸盐缓冲盐水(pH值7.2~7.4)中进行循环伏安测试, 测试参数设定为扫描电势 $-1.2\sim 0.6\text{ V}$, 扫描速率100 mV/s。电荷储存量(charge storage capacity, CSC)的计算公式如下^[18]:

$$\text{CSC} = \frac{1}{vA} \int_{E_c}^{E_a} |i| dE,$$

其中 v 为扫描速率(mV/s), A 为电极表面积(cm^2), E_a 和 E_c 为扫描电势极限, i 为测量电流密度(mA/cm^2)。

形貌及力学表征: 采用扫描电镜(S-4800, Hitachi)对CNTF绝缘前后的形貌结构、横截面结构进行表征。采用高精度测微仪(MNTQFC02, 美耐特上海电动工具制造有限公司)和5843单柱测试仪(Instron), 分别在“力控制”和“位移控制”模式下测量CNTF的循环拉伸性能和“应力-应变”曲线。

心电测量和分析: 使用BL-420N⁺生物机能实验系统软件采集并分析大鼠肢体Ⅱ导联心电图S-T段值及HRV中LF/HF值。负极平行插入右上肢皮下, 接地平行插入右下肢皮下, 正极平行插入左下肢皮下。记录并分析每次干预前、干预中、干预20 min后的心电情况。

颈迷走神经(LCVN)放电活动的检测与分析: 大鼠呈仰卧位置于鼠板, 在颈椎水平进行脱毛、消毒处理后, 并在颈前部做一个纵向的内侧切口, 钝性分离局部肌肉、筋膜组织后, 暴露大鼠左侧颈动脉, 可见外侧伴行的白色纤维样迷走神经, 使用玻璃分针小心地将迷走神经周围结缔组织中分离, 确保暴露长度约0.5~1 cm。然后, 使用双极钩状金属电极将该段LCVN钩起至半空中, 避免周围组织与钩状电极接触。连接

PowerLab3508细胞外电生理记录系统(AD Instruments), 低通设置为2 kHz, 高通设置为100 Hz排除工频干扰, 观察神经放电变化. 使用LabChart 8.0数字信号分析软件, 对神经放电活动进行分析处理, 并采集稳定状态下30 s时间尺度下的放电信号用于神经放电面积积分的计算.

苏木精-伊红染色(HE): 在2%异氟烷下以1 L/min进氧速度麻醉大鼠, 打开大鼠胸腔剪去多余气管、血管等组织, 迅速摘取心脏, 用0.9%氯化钠溶液冲洗后, 立刻放入4%多聚甲醛溶液中并在4°C下固定24 h. 取各组大鼠固定后的心脏样品, 置于自动脱水机经脱水、透明、浸蜡后, 进行包埋处理以制备4 μm 厚的心尖(横断位)石蜡切片, 并对组织进行染色. 使用正置荧光显微镜(BX43, OLYMPUS)观察心肌纤维大小、排列情况及炎性细胞的浸润程度.

酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清cTn-T、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量. 首先, 在2%异氟烷下以1 L/min进氧速度麻醉大鼠, 将大鼠仰卧位固定在手术台上, 充分暴露腹主动脉, 一次性采血管采集腹主动脉血5 mL, 静置2 h后, 3000 r/min离心20 min, 微量移液器提取上清3~5 mL, 放至-80°C冰箱冻存. 使用时, 将血清从-80°C冰箱中取出并置于冰上融化. 室温平衡后, 酶标板标准品孔中按浓度顺序依次加入标准品各50 μL . 在待测样品孔中加入40 μL 样品稀释液, 然后再加待测样品10 μL (样品最终稀释5倍). 按照试剂盒说明书步骤, 依次经过样品孵育、辣根过氧化物酶标记抗体、洗涤等步骤后, 加入显色TMB 37°C避光孵育后, 最后加入终止液, 终止反应并在 A_{450} 波长处测定各孔吸光度(A 值).

免疫荧光染色(IF): 取血后, 将大鼠左上肢置于冰上, 取内关穴下正中神经(植入组电极缠绕处)取约2~3 mm, 置于4%多聚甲醛溶液中并进行4°C固定24 h. 然后评价新型CNTF电极对组织的安全性: 正中神经经过固定、脱水后, 进行OTC包埋以制备7 μm 厚的冰冻切片. 经过洗胶、5%山羊血清常温封闭1 h后, 滴加一抗(NIMP-R14, 1:500) 4°C过夜约12 h, 滴加二抗(Alexa Fluor® 488, 1:1000)选择常温避光结合. 使用DAPI封片后, 立刻通过正置荧光显微镜(BX43, OLYMPUS)观察正中神经(横断位)中性粒细胞的表达, 以评价CNTF电极带来的神经组织损伤或炎性反应并使用ImageJ软件分析相对荧光强度.

1.7 统计学方法

实验所有数据均SPSS 26.0统计软件进行分析, 组内对照符合正态分布使用配对 t 检验, 若实验数据符合正态分布且方差齐性检验, 使用单因素ANOVA以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 继以least-significant difference (LSD)检验组间差异, 非正态分布或方差不齐采用非参数检验, $P < 0.05$ 为具有统计学差异.

2 结果

2.1 碳纳米管丝的结构与性能表征

图1A展示了碳纳米管丝在扫描电子显微镜下的照片. 结果显示, 本研究所采用的碳纳米管丝呈均匀的圆柱状结构, 直径约为40 μm . 通过化学气相沉积(chemical vapor deposition, CVD)法在对其中间段进行绝缘处理后, 横向剪切该碳纳米管丝, 发现碳纳米管丝因剪切力的作用变得扁曲, 但绝缘层与碳纳米管丝之间的界限清晰、接触紧密, 其厚度大约为4 μm , 既满足实验绝缘要求, 也不会影响CNTF的机械性能, 如图1B所示.

接着, 本研究测试了上述碳纳米管丝的电导率, 发现其电导率达 2×10^6 S/m, 导电性能良好. 为了进一步验证其是否达到作为刺激电极的标准, 本研究利用循环伏安方法对其电化学性能进行了表征, 并获得了近似矩形的循环伏安曲线, 进一步计算得到其电荷存储量约为18.69 mC/cm², 说明碳纳米管丝满足作为神经刺激电极的条件, 如图1C所示.

进一步地, 为了检验上述碳纳米管丝能否长期存在于活动动物体内, 本研究对其机械强度和循环拉伸性能进行了检测. 如图1D所示, 长7 cm的碳纳米管丝, 在超屈服应力达到3300 MPa时才会断裂, 拉伸应变可达12.23%, 可见碳纳米管丝的可拉伸强度较高, 能够抵挡动物体内的拉扯; 此外, 在50个定量弹性循环拉伸中, 其形变程度小于7.00%, 说明其在活动动物体内可以在一定范围内被反复拉伸, 而基本不影响其性能. 以上良好的机械性能保证了碳纳米管丝在动物体内的长期稳定性.

2.2 内关穴区正中神经电极植入与系统搭建

图2展示了CNTF作为刺激电极的植入图像, 以及在干预过程中, CNTF与外接刺激器的回路搭建. 图2A

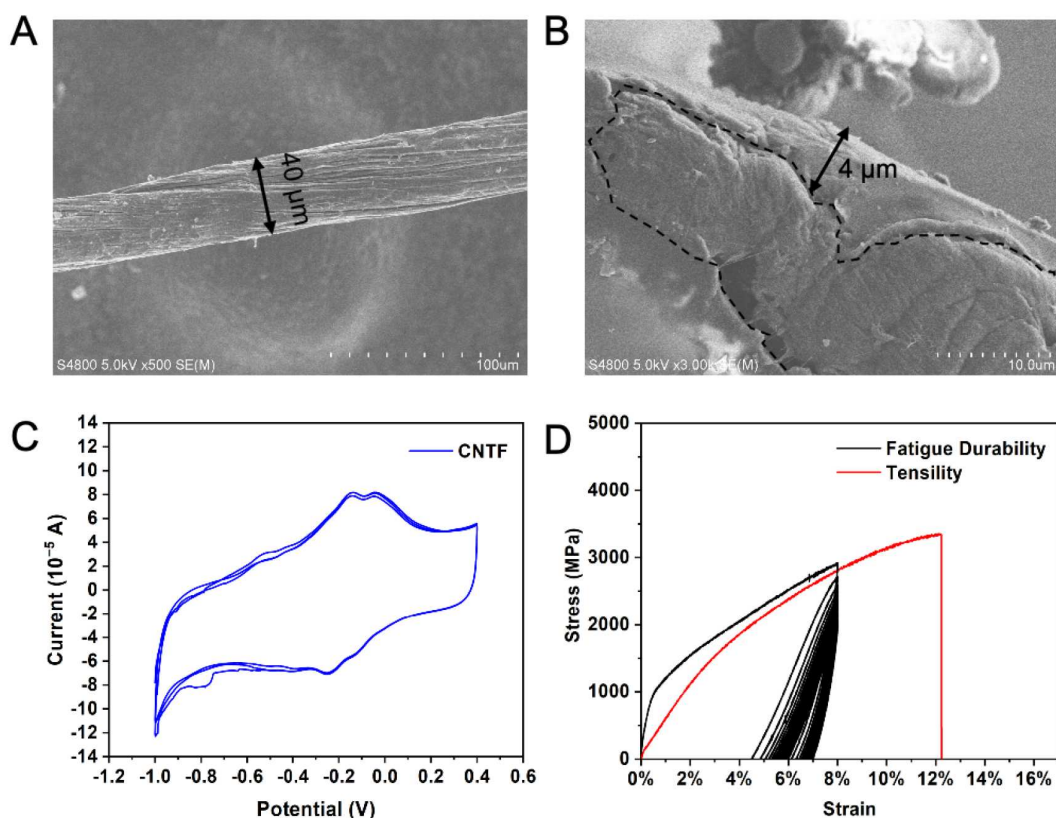


图 1 碳纳米管纤维的表征. A: CNTF的电子显微镜图像; B: CNTF的横截面图像; C: CNTF的循环伏安图; D: CNTF的力学表征“应力-应变”曲线

Figure 1 Characterization of carbon nanotube fibers. A: SEM of an un-insulated CNTF; B: cross-sectional SEM of CNTF; C: cycle voltammetric curves of CNTF; D: the mechanical characterization of CNTF (“stress-strain” curve)

和B显示了CNTF缠绕至正中神经, 留置于大鼠体表, 并在后期与皮肤生长融合. 图2C中, 黄色、绿色电极夹分别为刺激器正、负极, 负极为穴位旁开0.5 mm的皮下部位, 右下肢放置刺激系统的接地电极.

2.3 内关穴区正中神经电刺激对大鼠心肌缺血的改善作用

(1) 内关穴区正中神经电刺激对大鼠心电活动的调节作用. 心电图S-T段的异常变化通常是反映心肌缺血或心肌损伤的关键指标之一. 如图3A所示, 本研究记录了连续7天干预后各组大鼠的心电图, 发现Control组大鼠心电图S-T段清晰且基本符合正常成年大鼠心电图; 与Control组相比, Model组大鼠心电图S-T段显著抬高((0.14±0.01) mV>0.1 mV), 心率加快, 表明该方法有效完成了心肌缺血造模; Sham组则出现T波倒置现象, 提示该组处于缺血期/心梗陈旧期, 并存在室

性期前收缩的现象; EA组和MNS组大鼠心电图的S-T段均显著下降, 心率下降. 如图3B显示, 除Control组外, Model组、Sham组、EA组、MNS组大鼠在药理造模后, S-T段显著抬高, 增幅分别为: 0.14, 0.21, 0.12, 0.17 mV(>0.1 mV)($P<0.01$), 提示心肌缺血造模成功; 连续干预7天后, EA组和MNS组大鼠心电图的S-T段均显著下降(0.2, 0.18 mV; $P<0.01$), 而Model组和Sham组大鼠S-T段依然位于抬高阶段且出现心梗趋势.

心率是反映心脏功能和全身血液循环状态的一个重要生理指标. 进一步对各组大鼠心率变异性(HRV)频谱分析发现, 与Control组相比, Model组大鼠造模后LF/HF显著升高($P<0.01$); EA组大鼠在7天干预后, LF/HF较Model组显著下降; MNS组大鼠在7天干预后, LF/HF较Sham组大鼠显著下降($P<0.01$); EA组和MNS组与Control组相比均无显著差异($P>0.05$); 7天干预后EA组和MNS组大鼠LF/HF之间亦无显著性差异

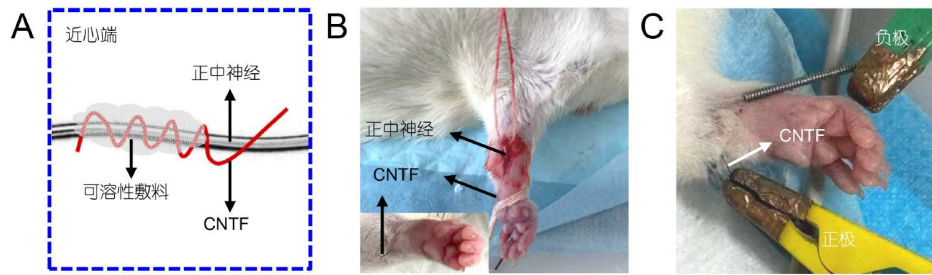


图2 大鼠内关穴正中神经刺激电极的植入与系统搭建. A: 电极植入示意图; B: 电极植入图片. 左下为术后伤口恢复情况且电极与皮肤融合; C: 刺激系统回路的构建

Figure 2 Implantation and system construction of median nerve stimulation electrode at Neiguan point (PC 6) in rats. A: Schematic diagram of electrode implantation. The left bottom figure shows the recovery of the postoperative wound and the fusion of the electrode with the skin; B: image of implantation; C: construction of the circuitry of the stimulation system

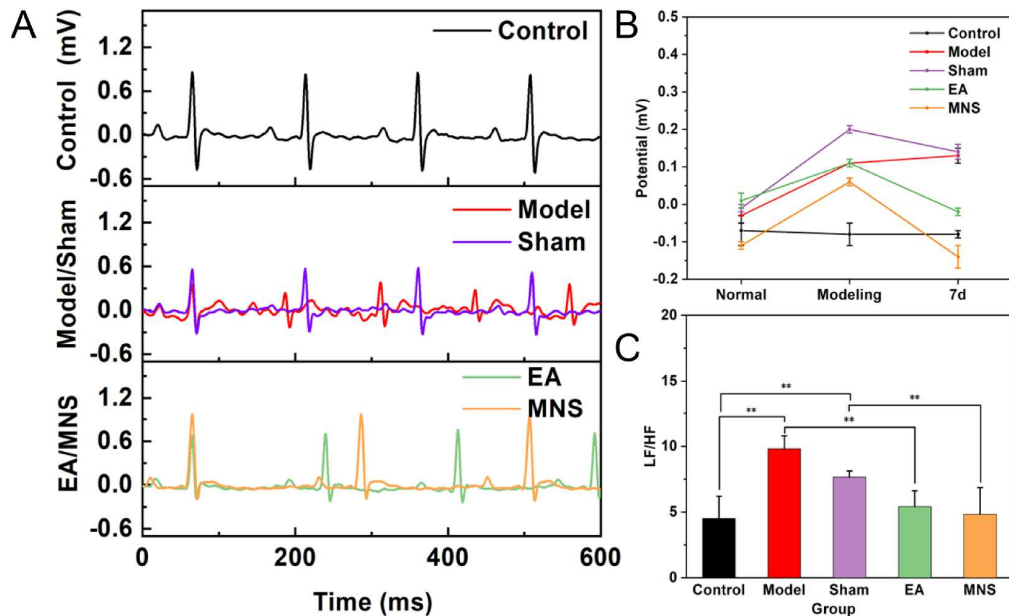


图3 内关穴区正中神经电刺激对大鼠心电图的影响($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组). A: 7次干预后各组大鼠的心电图; B: 不同时期大鼠S-T值的变化; C: 7次干预后各组大鼠心率变异性的LF/HF比值. **, $P < 0.01$

Figure 3 Effects of MNS at PC6 on electrocardiogram in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$). A: Electrocardiograms of rats in each group after the 7th intervention; B: changes of S-T values in rats at different periods; C: LF/HF ratio of heart rate variability of rats in each group after 7th intervention. **, $P < 0.01$

($P > 0.05$, 如图3C), 说明EA和MNS干预均可抑制交感神经过度兴奋, 调节自主神经系统动态平衡, 缓解慢性应激造成的缺血症状.

(2) 内关穴区正中神经电刺激对大鼠迷走神经活动的影响. 迷走神经是副交感神经系统的核心部分, 在心脏的自主神经调节中发挥着重要调节作用. 本研究利用双极金属钩状电极测量大鼠颈部迷走神经电生理活动, 衡量穴区MNS对大鼠自主神经功能的影响. 放电面积积分(firing area integral)是指通过测量神经

放电的电位变化并计算一定时间内放电信号的面积, 从而量化其电活动的强度或变化, 最终得到神经活动的某些生理或病理特征. 如图4A~E, 在第7次干预后, 各组大鼠颈迷走神经实时放电情况(如尖峰电位、簇状放电间期和频率等)显示, 与Control组相比, MI组尖峰电位和簇状放电频率增加, Sham组尖峰电位可达15 μV 以上, 这些现象说明MI造模成功后, 机体为了维持内稳态, 可反射性地引发迷走神经活动增强; 与MI组相比, EA组主要体现为簇状放电频率下降, 尖峰电

位仍位于 $10\ \mu\text{V}$ 以上; 而MNS组体现为尖峰电位整体性下降趋势, 即放电强度减弱, 簇状放电频率则变化不明显。因此, EA和MNS均可以调节自主神经活动, 拮抗MI效应。

如图4F, 与Control组相比, MI组和Sham组放电积分明显增加($P<0.001$); 与MI组和Sham组相比, EA组和MNS组放电积分面积下降($P<0.001$), 且MNS组低于EA组($P<0.05$)。以上面积积分量化结果重点强调了迷走神经场电位活动的强弱, 提示EA和MNS两种干预方式均可以改善自主神经活动, 减少机体过度代偿, 从而降低心肌损害程度。

(3) 心肌纤维的组织形态是心脏功能的基础, 其结

构和排列方式对于保证心脏的正常功能至关重要。本研究取各组大鼠心尖部组织进行HE染色观察其超微结构, 结果如图5所示, Control组大鼠心肌细胞纤维排列整齐、闰盘清晰, 肌节紧密、大小一致、形状规则; 而Model组和Sham组大鼠部分心肌细胞紊乱、心肌纤维断裂、间质水肿并呈现出炎性渗出现象; MNS组和EA组大鼠心肌组织的病理损伤较Model组大鼠和Sham组大鼠有明显改善, 心肌细胞排列相对整齐, 细胞间质相对完整, 炎性细胞浸润减少, 病理改变得到有效改善。

(4) 内关穴区正中神经电刺激对大鼠血清中cTn-T的影响。血清中cTn-T是心脏损伤的关键生物标志物,

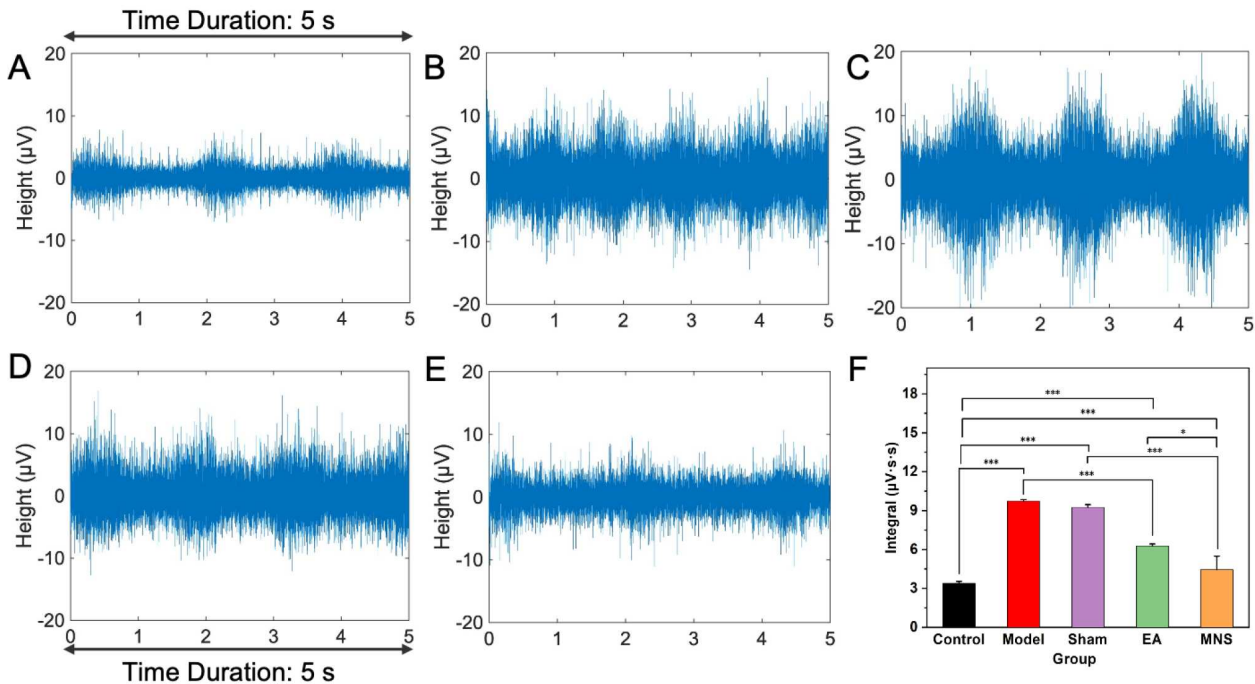


图4 内关穴区正中神经电刺激对大鼠迷走神经活动的影响($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组)。A: Control组; B: Model组; C: Sham组; D: EA组; E: MNS组; F: 神经放电活动面积积分。*, $P<0.05$; ***, $P<0.001$

Figure 4 Representative traces of VN discharges after 7th intervention ($\bar{x} \pm s$, $n=6$). A: Control group; B: Model group; C: Sham group; D: EA group; E: MNS group; F: the firing area integral of neural activity. *, $P<0.05$; ***, $P<0.001$

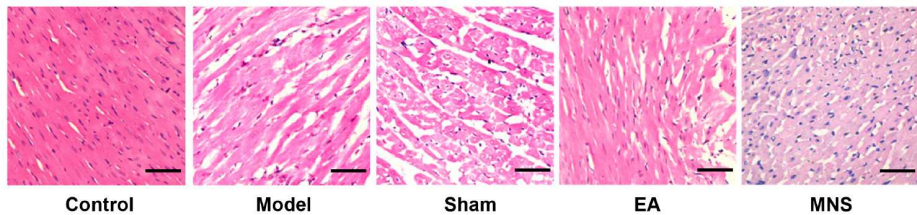


图5 不同组($\times 400$)心尖部组织超微结构变化。比例尺为 $50\ \mu\text{m}$
Figure 5 The ultrastructural changes of apex cordis in different groups ($\times 400$). The scale bar is $50\ \mu\text{m}$

其浓度的升高通常与心肌损伤(如心肌缺血)密切相关. 本研究使用ELISA方法检测血清中cTn-T的含量, 如图6所示. 结果表明, 与Control组相比, Model组和Sham组大鼠在进行异丙肾上腺素腹腔注射造模后, 其血清中cTn-T浓度显著上升($P<0.01$); EA组和MNS组大鼠在经历连续7天干预后, 其血清中cTn-T浓度显著下降($P<0.01$). 其中, Model组和Sham组大鼠血清cTn-T浓度无显著性差异($P>0.05$); EA组和MNS组大鼠血清cTn-T浓度亦无显著性差异($P>0.05$).

2.4 碳纳米管神经刺激电极的安全性评价

安全性是植入式外周神经电极设计和使用中的一个至关重要的考虑因素, 因此对长时间植入到活动大鼠体内的碳纳米管的安全性进行表征十分必要. 中性粒细胞浸润是评估电极生物安全性的重要指标之一, 尤其在研究电极带来的组织损伤或炎症反应时. 适度的免疫反应(包括中性粒细胞浸润)通常可以接受, 但如果浸润过度, 可能意味着电极对组织造成了较大

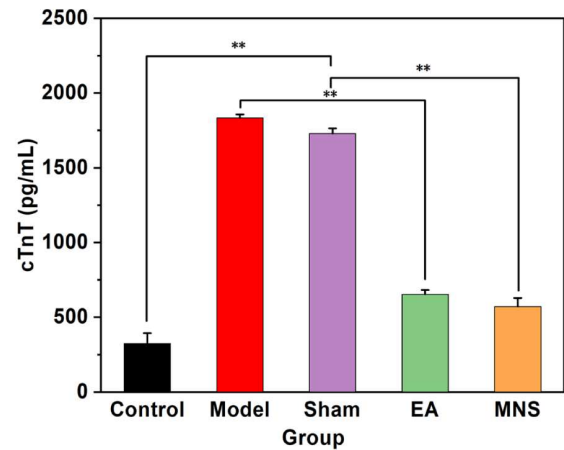


图6 各组大鼠血清cTn-T浓度直方图($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组). **, $P<0.01$

Figure 6 Histogram of the serum cTn-T concentrations of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$). **, $P<0.01$

的刺激或损伤. 如图7A所示, 对大鼠正中神经横断位切片进行IF染色发现, Control组大鼠正中神经上的阳

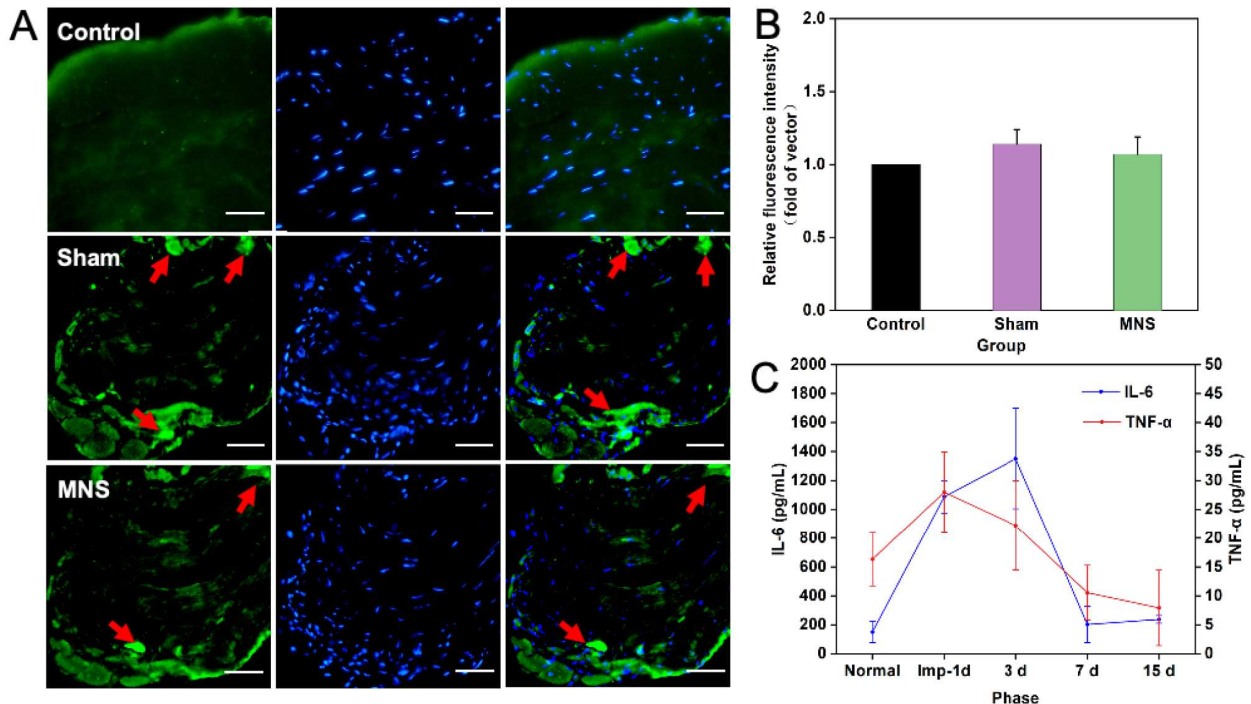


图7 CNTF的生物相容性评价($\bar{x} \pm s$, 6只鼠/组). A: Control组和电极植入组中性粒细胞(NIMP-R14)的免疫荧光图像($\times 400$), 比例尺为50 μm ; B: NIMP-R14的相对荧光强度; C: 大鼠血清IL-6和TNF- α 的表达量 (Imp-1 d: 植入第1天)

Figure 7 Biocompatibility evaluation of CNTF ($\bar{x} \pm s$, $n=6$). A: The IF images of neutrophils (NIMP-R14) in Control and implanting groups ($\times 400$), and scale bar is 50 μm ; B: the relative fluorescence intensity of NIMP-R14; C: the concentration of IL-6 and TNF- α in serum (Imp-1 d: day 1 after implantation)

性信号较弱,无明显中性粒细胞表达;碳纳米管丝植入组在植入2周后神经外膜及其周围神经纤维束膜中出现了少量的NIMP-R14信号(绿色),但炎症信号并未扩散至局部神经束丛间,可见在体碳纳米管丝电极植入炎症反应较小,生物相容性良好。图7B相对荧光强度结果显示,Control组、Sham组和MNS组大鼠正中神经NIMP-R14信号表达的相对荧光强度无明显差异($P>0.05$),提示CNTF对植入处的正中神经无明显损伤。

在炎症反应和免疫反应过程中,IL-6和TNF- α 是最常见的炎症标志物^[19]。因此,本研究将CNTF植入于正常大鼠正中神经,观察Control组和正常大鼠术后不同时期,大鼠血清中促炎因子IL-6和TNF- α 的浓度变化,从而进一步表征CNTF电极的安全性。如图7C所示,与Control组相比,术后1~3天为IL-6和TNF- α 浓度的高峰期($P<0.001$),提示该段时间为术后炎症急性期;植入7天后,二者浓度恢复至正常水平($P<0.001$),说明CNTF作为C-基材料不会引起严重的炎症反应,CNTF电极具有一定安全性。

3 讨论

本研究旨在通过使用新型碳纳米管丝(CNTF)电极对大鼠内关穴区正中神经进行电刺激来探讨其对心肌缺血的改善作用。实验结果表明,碳纳米管丝电极能够有效开展正中神经电刺激,显著改善心肌缺血大鼠的心电情况、心肌组织病理损伤以及血清cTn-T水平,且在体实验表现出了良好的安全性,证明了该方法在心肌缺血治疗中的潜在价值。具体如下:

(1) 碳纳米管丝电极具有优异的机械强度、良好的导电性、良好的电化学性能和长期安全性,是作为神经刺激电极的理想材料之一^[20]。由上述实验结果可见,碳纳米管丝的电导率高达 2×10^6 S/m,电化学性能良好,能够有效进行神经电刺激,同时具有足够的拉伸强度和循环拉伸性能,能够保证其在大鼠体内长期使用的稳定性。与传统金属电极相比,碳纳米管丝电极具有高度柔软性,更适合与神经组织紧密接触,大大降低了由于机械适配带来的组织损伤,该方法解决了大多数神经刺激电极无法实现长期在体应用的现状^[5]。

(2) 内关穴区正中神经电刺激可以显著改善大鼠心肌缺血情况。通过7天的电刺激干预,我们观察到内

关穴区正中神经电刺激显著降低了心肌缺血大鼠S-T段。S-T段异常改变是心肌缺血的重要标志,Model组和Sham组大鼠的心电图均表现为S-T段显著抬高,而经过电刺激干预后,EA组和MNS组的S-T段均显著下降,表明穴区神经电刺激和穴位电刺激均能够有效改善心肌缺血所导致的心电异常。值得注意的是,与“Modeling”时相比,实验结束时(7 d)Sham组S-T段呈下降趋势,而Model组并无下降趋势,说明CNTF的预针刺效应和穴位埋线效应在一定程度上改善了大鼠心肌缺血心电图。然而,进一步研究发现,在7天的干预周期内,Sham组在“Modeling”和“7 d”时的S-T水平并没有明显差异($P>0.05$),其他电生理指标、组织形态染色及血清cTn-T浓度也呈现出相似的结果,说明尽管存在上述预针刺和穴位埋线效应,但相比于MNS,其作用效应并不显著。

HRV频谱结果进一步表明,MNS组和EA组大鼠的LF/HF比值在经过7天干预后恢复到了正常水平,表明内关穴区正中神经电刺激和穴位电针有助于调节心脏自主神经功能。同样地,大鼠颈迷走神经电生理结果显示,MI组和Sham组迷走神经放电活动增强,EA和MNS组降低,有效改善了自主神经活动,降低了机体过度代偿,进而降低了心肌损害程度。这是由于ISO作为一种 β 受体激动剂,可以引起血管扩张、心率增加和心肌收缩力增强等一系列交感神经兴奋的效果^[21]。然而,正常状态下的交感过度激活,可能引发心肌损害。机体为了维持交感和副交感系统的平衡性通常会提高副交感系统的兴奋性,并增强对交感系统活动的抑制,因此MI可以引发躯体反射性自主神经活动,以维持心脏功能^[22]。而EA和MNS可以将这种自发性代偿现象维持在一定水平,恢复自主神经平衡性,但并不会造成过度激活或抑制的现象,从而改善心肌状态。放电面积积分值可衡量迷走神经在一定时间内的放电活动总量,该值越大意味着神经放电活动越强,反之亦然。结果显示,干预7次后,MNS组的放电面积积分值低于EA组($P<0.05$)。我们推测造成该现象的原因可能是不同干预方法在调节自主神经功能活动时的调控特点不同。MNS更倾向于通过调节放电强度进而影响神经整体活动,而EA则侧重于调控簇状放电的频率。然而目前尚未明确该现象的潜在机制,未来需要开展实验周期更长的研究。在组织学方面,HE染色结果进一步证实,与Sham组和Model组相比,MNS组和EA组大鼠的

心肌组织病理损伤得到了明显改善, 心肌纤维较为完整, 炎性细胞浸润减少, 心肌纤维断裂与水肿现象得到了有效抑制, 说明内关穴区正中神经电刺激不仅改善了大鼠的电生理还改善了大鼠心肌的组织形态. 此外, 心肌损伤后, 心肌细胞坏死或膜通透性增强导致心肌细胞酶释放进入血液, cTn-T是临床常用于诊断心肌损伤的血生化指标之一^[23]. ELISA结果提示, Model组和Sham组血清cTn-T浓度较高, 说明心肌细胞损伤, 细胞膜通透性增强, 心肌酶释放到细胞外间质和血液中. 经过电刺激干预后, EA组和MNS组浓度较低, 两组无显著性差异($P>0.05$), 提示穴区电针和穴区神经电刺激均可一定程度上修复受损的心肌组织.

(3) 碳纳米管丝电极的长期在体安全性. 通过对植入2周后的碳纳米管丝电极安全性进行表征, 我们发现, 碳纳米管丝电极在大鼠体内仅存在轻微免疫反应, 主要表现为少量的中性粒细胞浸润, 而未见明显的神经损伤、神经瘢痕或者神经功能丧失等. 此外, CNTF在体15天后, 大鼠血清中促炎因子IL-6和TNF- α 的浓度与术后急性炎症期相比, 可以恢复至正常水平. 结合其高柔软性、强机械强度等优异性能, 碳纳米管丝电极在大鼠体内的使用是相对安全的, 该材料具备良好的生物相容性, 从而保证了长期在体应用的安全性和稳定性.

(4) 前景. 本研究的结果为建立基于传统中医经络穴位理论的外周神经刺激疗法提供了新的思路. 穴区正中神经电刺激是基于穴位的外周神经电刺激疗法. 与迷走神经刺激疗法相比, 内关穴区正中神经电刺激具有更高的靶向性和更低的操作风险, 且其疗效能够得到保障, 这是因为: 针刺手厥阴心包经上的穴位(以内关穴为代表)治疗心肌缺血的疗效已得到广泛证实; 而手厥阴心包经大致并行于正中神经, 因此, 针刺/电针内关穴治疗心肌缺血的最主要传入神经为正中神经; 现代研究发现, 正中神经的脊髓传入节段(C5~C8和T1)与心脏神经支配区(C4~T1)以及颈部交感神经节在解剖位置关系和所支配功能活动上存在重叠^[24,25]. 因此, 正中神经电刺激可以激活共同的脊髓节段, 从而调节自主神经系统和相关的神经-内分泌-免疫通路, 最终改善心脏功能. 而迷走神经刺激尽管在治疗心肌缺血的临床实验和基础研究中均取得

了一定成就, 然而其临床转化的难度系数较高^[11,26]. 主要原因包括: (i) 人体颈部具有丰富的血管和神经组织, 长期在体刺激疗法的集合电路系统多放置在几何平面较为平坦的胸部, 这不仅使应用受限, 还会增加手术风险、设备翻新难度及术后不良事件的发生率; (ii) 由于迷走神经分布较广, 支配范围较大, 常常会造成脱靶效应, 微量刺激即可募集多种或大量神经纤维, 由此可能引发多种副作用, 例如, VNS可能会涉及周围咽喉部肌肉或神经, 从而影响发声. 综上, 内关穴区正中神经电刺激作为一种靶向性强、安全性高的外周神经刺激方法, 具有显著的疗效, 有望成为未来心肌缺血等心血管疾病的有效治疗手段之一^[27]. 同时, 与传统针刺疗法相比, 神经电刺激疗法具有更高的精准性, 且一次植入可长期使用, 未来结合微创植入技术有望开发更加简便、长效、安全、高效的植入式针刺系统.

(5) 局限性. 尽管本研究结果证实了内关穴区正中神经电刺激对心肌缺血大鼠的显著改善作用, 但未来仍需要进一步验证其在临床中的有效性和安全性, 尤其碳纳米管丝电极的长期稳定性、安全性需要更多的临床考量. 此外, 正如上述所述, 目前采用的植入方式仍为有创, 未来需要开发微创方式来实现长期、便捷刺激.

4 结论

本研究选取高强度、高导电、电化学性能优异、生物安全性良好的碳纳米管丝作为外周神经刺激材料, 证实了内关穴区正中神经电刺激对大鼠心肌缺血的显著改善作用, 尤其在对心电S-T段、HRV、心肌组织结构及血清cTn-T水平等指标方面均显示出正向的干预效应, 说明正中神经电刺激不仅可以调节心肌缺血大鼠的电生理功能, 在改善心肌组织形态、缓解心肌细胞应激炎症反应方面均具备一定优势. 本研究为建立基于传统中医经络穴位理论的外周神经刺激疗法提供了新的思路, 有望成为一种靶向性强、安全性高、疗效显著的外周神经刺激方法, 为未来心肌缺血等心血管疾病的有效治疗提供新途径, 但其长期安全性和微创植入仍值得进一步探索.

参考文献

- 1 Damluji A A, van Diepen S, Katz J N, et al. Mechanical complications of acute myocardial infarction: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2021, 144: e16
- 2 Smith S, Rossignol P, Willis S, et al. Neural modulation for hypertension and heart failure. *Int J Cardiol*, 2016, 214: 320–330
- 3 Famm K, Litt B, Tracey K J, et al. A jump-start for electroceuticals. *Nature*, 2013, 496: 159–161
- 4 Hord E D, Evans M S, Mueed S, et al. The effect of vagus nerve stimulation on migraines. *J Pain*, 2003, 4: 530–534
- 5 Günter C, Delbeke J, Ortiz-Catalan M. Safety of long-term electrical peripheral nerve stimulation: review of the state of the art. *J Neuroeng Rehabil*, 2019, 16: 13
- 6 Eleftheriades J A, Quin J A, Hogan J F, et al. Long-term follow-up of pacing of the conditioned diaphragm in quadriplegia. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2002, 25: 897–906
- 7 Zhao Q, Zhang S, Zhao H, et al. Median nerve stimulation prevents atrial electrical remodelling and inflammation in a canine model with rapid atrial pacing. *EP Europace*, 2018, 20: 712–718
- 8 Tang R, Zhang C, Liu B, et al. Towards an artificial peripheral nerve: liquid metal-based fluidic cuff electrodes for long-term nerve stimulation and recording. *Biosens Bioelectron*, 2022, 216: 114600
- 9 Capilupi M J, Kerath S M, Becker L B. Vagus nerve stimulation and the cardiovascular system. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2020, 10: a034173
- 10 Lu Y, Chen K, Zhao W, et al. Magnetic vagus nerve stimulation alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by the inhibition of pyroptosis through the M2AChR/OGDHL/ROS axis in rats. *J Nanobiotechnol*, 2023, 21: 421
- 11 Giordano F, Zicca A, Barba C, et al. Vagus nerve stimulation: surgical technique of implantation and revision and related morbidity. *Epilepsia*, 2017, 58: 85–90
- 12 Wu X, Wang K, Cui S, et al. Electroacupuncture ameliorates acute myocardial ischemia: a potential role of the locus coeruleus. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020(1): 4298657
- 13 Zhang F, Wang Q, Zhou J, et al. Electroacupuncture attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting microglial engulfment of dendritic spines. *iScience*, 2023, 26: 107645
- 14 Maharjan A, Peng M, Russell B, et al. Investigation of the optimal parameters of median nerve stimulation using a variety of stimulation methods and its effects on heart rate variability: a systematic review. *Neuromodulation*, 2022, 25: 1268–1279
- 15 Shang Y, Wang Y, Li S, et al. High-strength carbon nanotube fibers by twist-induced self-strengthening. *Carbon*, 2017, 119: 47–55
- 16 Jiao J, Ma X Y, Fu Q, et al. Effect and mechanism of Yandan capsule on isoproterenol induced myocardial ischemia in rats (in Chinese). *Chin Patent Mater Med*, 2021, 43: 908–913 [焦杰, 马星月, 傅强, 等. 延丹胶囊对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血的作用及机制. *中成药*, 2021, 43: 908–913]
- 17 Li Z R. Experimental Acupuncture (in Chinese). 2nd ed. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing, 2003. 135–137 [李忠仁. 实验针灸学. 第二版. 北京: 中国中医药出版, 2003. 135–137]
- 18 Xue N, Martinez I D, Sun J, et al. Flexible multichannel vagus nerve electrode for stimulation and recording for heart failure treatment. *Biosens Bioelectron*, 2018, 112: 114–119
- 19 Wang L. Preparation and properties of bio-inspired anti-inflammatory dressing based on polypropylene carbonate (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Changchun: Jilin University, 2024 [王丽. 基于聚碳酸亚丙酯的仿生抗炎医用敷料制备及性能研究. 博士学位论文. 长春: 吉林大学, 2024]
- 20 Gregg A, De Volder M, Baumberg J J. Kinetics of light-responsive CNT/PNIPAM hydrogel microactuators. *Small*, 2024, 20: e2305034
- 21 Kumar M, Kasala E R, Bodduluru L N, et al. Animal models of myocardial infarction: mainstay in clinical translation. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2016, 76: 221–230
- 22 Zhou J, Zhang B, Zhou X, et al. Electroacupuncture pretreatment mediates sympathetic nerves to alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury via CRH neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Chin Med*, 2024, 19: 43
- 23 An Q, Zhao J, Liu P D, et al. Effect of electroacupuncture combined with salvianolate on cardiac function and drug tissue distribution in rats with acute myocardial infarction (in Chinese). *Chin J Integr Trad Chin West Med*, 2012, 42: 334–340 [安琪, 赵佳, 刘佩东, 等. 电针联合丹参多酚酸盐对急性心肌梗死大鼠心功能及药物组织分布的影响. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42: 334–340]

- 24 Liu Q, Yang L, Li Z H, et al. Projection and con-origin of the rat heart and point neiguan nerve and the neural transmitter property of the con-origin neurons (in Chinese). *J Shandong Univ (Health Sci)*, 2004, 1: 99–102 [刘强, 杨琳, 李振华, 等. 大鼠心脏神经与内关穴区正中神经投射同源关系及其递质属性的实验研究. *山东大学学报(医学版)*, 2004, 1: 99–102]
- 25 Li P, Pitsillides K F, Rendig S V, et al. Reversal of reflex-induced myocardial ischemia by median nerve stimulation. *Circulation*, 1998, 97: 1186–1194
- 26 Chen M, Li X, Yang H, et al. Hype or hope: vagus nerve stimulation against acute myocardial ischemia-reperfusion injury. *Trends Cardiovasc Med*, 2020, 30: 481–488
- 27 Zhai Z, Zhao S, Tang M, et al. Chronic median nerve modulation reduces ventricular arrhythmia and improves ventricular function in a postmyocardial infarction rabbit model. *Cardiovasc Ther*, 2018, 36: e12437

Investigating the effect of peripheral nerve electrical stimulation at acupoint area on myocardial ischemia in rats based on novel carbon nanotube fiber electrodes

YU AoTian¹, Li PengWei¹, Yuan JunGe², Fu QiXuan¹, Ning SiMin¹ & XU WenJing^{1*}

¹ School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China

² School of Physics, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

* Corresponding author, E-mail: jingwenxu2013@pku.edu.cn

Myocardial ischemia is one of the most common cardiovascular adverse events with a relatively high risk, underscoring the urgent need to identify safe and efficacious therapeutic strategies. In recent years, peripheral nerve stimulation (PNS) has emerged as a non-pharmacological intervention increasingly utilized in treating cardiovascular ailments, demonstrating notable therapeutic potential. However, its safety and targeting precision require further enhancement. Drawing from the theory of meridian and acupoint in traditional Chinese medicine, this study explored the therapeutic benefits of median nerve electrical stimulation at the Neiguan acupoint, utilizing carbon nanotube fiber electrodes with micron-scale diameters, high flexibility and strength, conductivity, and biocompatibility in rats' model of myocardial ischemia. Through the detection of the outcomes such as the electrocardiogram of rats, the morphological changes of myocardial tissues, and the level of serum cardiac troponin-T, we observed that electrical stimulation of the median nerve at the Neiguan acupoint area could significantly improve the abnormal electrocardiogram S-T segment, abnormal heart rate, myocardial tissue damage, and cardiac function caused by myocardial ischemia. Moreover, the implanted carbon nanotube electrodes did not cause obvious tissue damage or loss of nerve function. This study provided valuable insights into integrating traditional Chinese medicine theory with modern peripheral nerve stimulating techniques, paving the way for a targeted, safe, and effective therapy for myocardial ischemia and various cardiovascular disorders. Further researches were warranted to assess the long-term safety and feasibility of minimally invasive implantation methods for this promising approach.

carbon nanotube fiber, peripheral nerve electrode, peripheral nerve stimulation, electroacupuncture, myocardial ischemia

doi: [10.1360/SSV-2024-0349](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0349)