

· 基础研究 ·

电针刺激内关穴对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌细胞凋亡调控基因的影响

张红星 周利 张唐法

【摘要】目的 探讨电针刺激内关穴对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌细胞凋亡调控基因 Bax 和 Bcl-2 的影响。**方法** 将 36 只家兔随机分为假手术组、心肌缺血再灌注组(模型组)、电针刺激内关穴组(关穴组)和电针刺激列缺穴组(列缺组)。采用结扎左冠状动脉前降支 30 min 再灌注 60 min 的方法,建立心肌缺血再灌注损伤模型。关穴组和列缺组分别采用电针刺激实验动物双侧内关穴和列缺穴。应用免疫组织化学法观察电针对缺血再灌注损伤家兔心肌细胞凋亡调控基因 Bax 和 Bcl-2 的影响。**结果** 模型组家兔心肌 Bax 呈高表达,而内关组心肌 Bax 表达显著降低($P < 0.01$);内关组与模型组和列缺组比较,心肌 Bcl-2 表达显著增加($P < 0.01$ 或 0.05)。**结论** 电针刺激内关穴能抑制心肌 Bax 的表达,促进 Bcl-2 的表达,从而抑制缺血再灌注后细胞凋亡的发生,对心肌细胞起到保护作用。

【关键词】 电针; 内关穴; 心肌; 缺血再灌注损伤; Bax; Bcl-2

The effects of electro-acupuncture at Neiguan point on myocardial apoptosis controlling genes in the rabbit models of myocardial ischemia and reperfusion injury ZHANG Hong-xing, ZHOU Li, ZHANG Tang-fa. Wuhan Hospital of Integrating, Traditional Chinese Medicine and Western medicine, Wuhan 430022, China
Corresponding author: ZHANG Hong-xing, Email: zhxzj99@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To study the effects of electro-acupuncture (EA) on myocardial apoptosis controlling genes (Bax, Bcl-2) in the rabbit models of myocardial ischemia and reperfusion injury (MIRI). **Methods** Thirty-six rabbits were randomly divided into a sham-operation group, a model group, an EA at Neiguan group (N group) and an EA at Lieque group (L group). The MIRI models were established with ligation of the left anterior descending coronary artery lasting for 30 min and followed by reperfusion for 60 min, and rabbits in groups N and L were treated with EA at Neiguan or Lieque, respectively. Then the expression of Bax and Bcl-2 was measured by using immunohistochemical technique. **Results** The Bax was over-expressed in the model group, but significantly decreased in the N group ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 was markedly increased in the N group with comparison to that in the model and L groups ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** EA at Neiguan has protective effects on cardiac muscle cells by inhibiting the expression of Bax and increasing the expression of Bcl-2.

【Key words】 Electroacupuncture; Neiguan point; Myocardium; Ischemia, reperfusion injury; Bax; Bcl-2

冠心病是一种常见的心血管疾病,发病率高,严重危害中老年人身体健康。越来越多的动物实验和临床观察显示,缺血心肌再灌注后一段时间内心肌损伤会加重,即出现心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)。根据笔者多年的临床体会,针刺能有效缓解心肌缺血,单穴(内关)治疗有简单、显效快、实用的特点。内关穴是手厥阴心包经之络穴,又为八脉交会穴之一。针刺心包经内关穴对冠心病心绞痛患者有显著的临床疗效^[1]。为了明确针刺治疗对 MIRI 的作用及其机制,我们根据穴位特异性并结合临床经验及有关文献报道,以家兔心肌缺血再灌注模型为研究对

象,探讨电针刺激内关穴对 MIRI 时心肌细胞凋亡及其调控基因的影响,并与电针列缺穴组进行对照比较,以期针刺内关穴治疗 MIRI 提供有指导意义和实用价值的客观依据,为冠心病急诊治疗提供新方法。

材料与方法

一、实验动物

选择日本大耳白兔 36 只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,体重 2.0 ~ 2.5 kg,雌、雄不限。实验前饲养于安静、通风和光线充足的环境中,室温 15 ~ 25℃。

二、动物分组

按照随机分组原则,将心电图正常的 36 只家兔分为假手术组、心肌缺血再灌注组(模型组)、电针刺激内关穴

基金项目:武汉市科技晨光计划(武科计 2003138 号)

作者单位:430022 武汉,武汉市中西医结合医院针灸科

通讯作者:张红星, Email: zhxzj99@yahoo.com.cn

组(内关组)、电针刺激列缺穴组(列缺组),每组 9 只。

三、动物造模

参照 Simpson 等^[2]的方法制作 MIRI 模型。用 20% 乌拉坦以 4 ml/kg 体重经耳缘静脉注射麻醉家兔后,仰卧固定于兔台上,铺消毒孔巾;从胸骨柄稍下方至胸骨剑突上方约 2 cm 处作正中皮肤切口,沿胸骨左缘分离胸壁肌肉,剪断左侧第 3,4 肋软骨,注意紧贴胸骨左缘开胸,以免伤及左侧内乳动脉和造成气胸;然后用开胸器暴露心脏,用眼科剪将心包膜前部剪开,于心前壁左侧用穿 0 号丝线的细圆针小心缝穿一线,并以此为引线将心脏略向右旋,暴露左心耳及大部分左心室;再于左心耳下缘寻找冠状动脉前降支,于左室壁上、中 1/3 交界处用细圆针穿入血管下方缝一针;将线的两端穿过直径约 3 mm、长 0.5 cm 的硅胶管,用纹式钳向下推动硅胶管压向冠状动脉,收紧结扎线,阻断冠状血流。以左室前壁发绀并向外膨胀以及心电图 S-T 段抬高、T 波高耸为标准,表示模型成功。家兔心肌缺血 30 min 后开胸取下硅胶管,恢复左前降支血流,实现再灌注 60 min。排除实验过程中死亡者,或室颤经 2 次以上抢救(心内按摩)者。

四、电针治疗方法

内关组与列缺组手术方法同模型组,在结扎左冠状动脉前降支 30 min 时开始进行针刺,分别取双侧内关和列缺穴位。内关取穴方法参照文献^[3],取兔前肢腹侧远端两骨间,距腕关节约 1.2 cm 处;列缺取穴方法采用拟人比照法,取内关旁开相当于列缺处。针刺后接上海产 G6805 II 型电针治疗仪(上海医疗电子仪器厂),疏密波(疏波 30 Hz,密波 100 Hz),强度 1 ~ 2 mA,进针深度约 0.5 cm,以肢体轻轻抖动为度,留针 60 min。

五、标本的采集

模型组造模完毕后取材,假手术组只穿线不结扎冠状动脉,90 min 后取材,内关组与列缺组电针治疗结束后取材。分别处死各组动物,取结扎线以下损伤心肌组织,用生理盐水将血液冲洗干净后吸干水分,立即置于 4% 多聚甲醛液固定。

六、凋亡调控基因的检测

应用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(strept-avidin-biotin-enzyme complex, SABC)法测定凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 蛋白,采用武汉博士德生物工程有限公司提供的 Bcl-2 和 Bax 免疫组织化学染色试剂盒,按使用说明书进行操作。(1)Bcl-2 蛋白:取 4 μ m 厚切片常规脱蜡至蒸馏水,加入蒸馏水新鲜配制的 3% H_2O_2 ,室温下作用 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 2 min $\times$ 3 次,然后浸入 0.1 mol/L、pH 值 6.0 的枸橼酸盐缓冲液中,于微波炉中加热至沸腾,

间隔 5 min 后重复上述步骤两次;冷却后用 PBS 洗 2 min $\times$ 3 次;滴加抗原修复液,作用 10 min;以 PBS 洗 2 min $\times$ 3 次;滴加山羊血清封闭液,室温下作用 20 min;吸出山羊血清后滴加兔抗 Bcl-2 基因抗原的抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 60 min;PBS 洗 2 min $\times$ 3 次;滴加生物素化山羊抗兔抗体 IgG,37 $^{\circ}$ C 下温育 20 min;PBS 洗 2 min $\times$ 3 次;滴加 SABC 试剂,37 $^{\circ}$ C 下温育 20 min;PBS 洗 5 min $\times$ 4 次;室温下 DAB 显色 25 min,用自来水洗 3 min;最后用苏木素轻度复染,脱水、封片、镜检。(2)Bax 蛋白:除兔抗 Bax 蛋白抗体与兔 Bcl-2 基因抗原抗体不同外,其余试验步骤、试剂均同上。

七、计算机辅助图像分析

应用同济医科大学千屏影像工程公司产 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统,包括 OLYMPUS BX-5.0 型生物显微镜和 JVC-TK-C1381 显微摄影仪,切片在光学显微镜下放大 400 倍摄像,以免疫组织化学半定量分析系统检测面密度(阳性目标总面积/统计场总面积)。

八、统计学分析

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 10.0 版统计软件,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、动物死亡情况

假手术组术中死亡 1 只;模型组术中 1 只家兔出现室颤,经抢救(心内按摩)存活,被排除;内关组术后约 6 min 死亡 1 只;列缺组术中 1 只家兔出现室颤,经抢救(心内按摩)存活,被排除。

二、形态学观察结果

免疫组织化学染色后光镜下观察到:Bax 和 Bcl-2 阳性细胞染色为胞膜和胞浆呈棕黄色。模型组心肌组织 Bax 阳性表达较多,Bcl-2 阳性表达较少(图 1,2);假手术组心肌组织 Bax 阳性表达较少,Bcl-2 阳性表达较少(图 3,4);内关组心肌组织 Bax 阳性表达较少,Bcl-2 阳性表达较多(图 5,6);列缺组心肌组织 Bax 阳性表达较多,Bcl-2 阳性表达较少(图 7,8)。

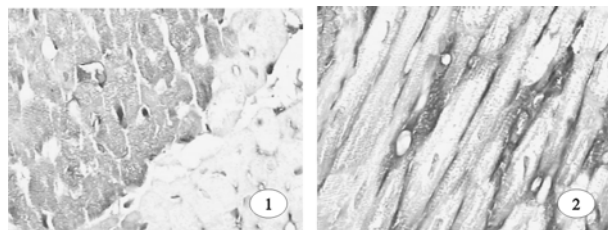


图 1 模型组心肌组织 Bax 的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

图 2 模型组心肌组织 Bcl-2 的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

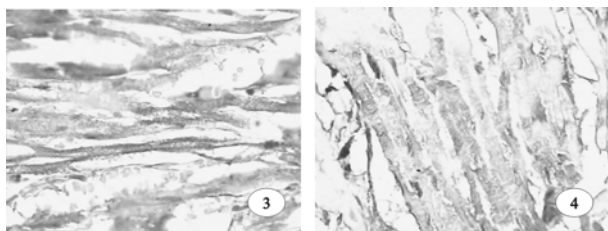


图 3 假手术组心肌组织 Bax 的表达(免疫组织化学染色, ×400)

图 4 假手术组心肌组织 Bcl-2 的表达(免疫组织化学染色, ×400)

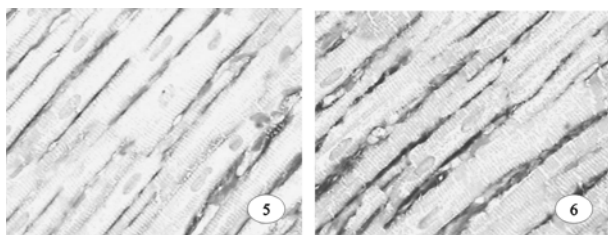


图 5 内关组心肌组织 Bax 的表达(免疫组织化学染色, ×400)

图 6 内关组心肌组织 Bcl-2 的表达(免疫组织化学染色, ×400)

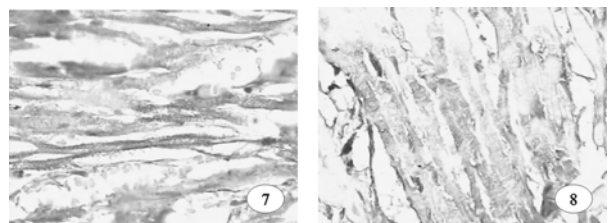


图 7 列缺组心肌组织 Bax 的表达(免疫组织化学染色, ×400)

图 8 列缺组心肌组织 Bcl-2 的表达(免疫组织化学染色, ×400)

三、心肌组织 Bax、Bcl-2 的表达

各组心肌组织 Bax 和 Bcl-2 的表达情况见表 1。模型组家兔心肌 Bax 呈高表达,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);内关组与模型组比较,心肌 Bax 表达显著降低($P < 0.01$);内关组与模型组和列缺组比较,心肌 Bcl-2 表达显著增加($P < 0.01$ 或 0.05)。

表 1 各组心肌组织 Bax 和 Bcl-2 的面密度比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Bax	Bcl-2
假手术组	8	0.103 2 ± 0.012 1	0.183 0 ± 0.024 5
模型组	8	0.255 9 ± 0.018 1 ^a	0.187 1 ± 0.027 1
内关组	8	0.174 5 ± 0.021 7 ^b	0.290 2 ± 0.037 7 ^{cd}
列缺组	8	0.205 5 ± 0.020 6	0.153 4 ± 0.029 1

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与列缺组比较,^d $P < 0.01$

讨 论

细胞凋亡区别于细胞坏死的一个显著特征即其受到基因的调控,MIRI 过程中的细胞凋亡同样受基因调控。尽管对缺血再灌注损伤中细胞凋亡的调节机制还不甚明确,但有资料表明,细胞凋亡的触发是一个级联式的基因表达结果,有许多基因参与这一过程,主动合

成新的大分子蛋白质,对凋亡的发生、发展起到促进或抑制作用。其中,Bcl-2 家族和 P53 等参与了细胞凋亡的调节。Bcl-2 是一种原癌基因,具有维持细胞生存和抗凋亡的作用;Bax 是 Bcl-2 家族成员之一,其作用与 Bcl-2 作用相反,能诱导细胞凋亡。Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白的比值决定了细胞受诱导刺激后的状态,即凋亡或存活。若 Bax 蛋白占优势,则细胞凋亡,反之则细胞存活^[4]。Misao 等^[5]通过对急性心肌梗死、陈旧性心肌梗死患者及正常心脏的尸体解剖研究发现,在急性心肌梗死阶段,被挽救存活的心肌细胞中有 Bcl-2 蛋白表达,而在陈旧性心肌梗死患者中,Bax 蛋白过度表达;认为在缺血再灌注所引起的人心肌细胞凋亡过程中,Bcl-2 的表达和 Bax 过度表达起了重要的病理生理作用。Artling 等^[6]认为,Bcl-2 基因之所以能抑制细胞凋亡,是通过抑制凋亡的诱导基因(如 P53)来起作用。有研究证实,P53 基因为心肌细胞凋亡的激活因子,能指导凋亡促进基因 Bax 的转录,而且由 P53 激活的心肌细胞凋亡可以被抗凋亡基因 Bcl-2 所阻断,这说明 Bcl-2 是一个强有力的抗凋亡因子^[7]。Selvakumaran 等^[8]认为,Bcl-2 和 Bax 可作为 P53 的调节基因。因此,本研究通过检测 Bcl-2 和 Bax 的表达来探讨电针内关穴对 MIRI 家兔心肌细胞凋亡调控基因的影响。

大量的研究提示,我们可以从细胞凋亡调控基因的角度对缺血再灌注后的心功能恢复状况及心肌保护作用进行研究,即采用相应的治疗措施抑制促凋亡基因、激发抑凋亡基因的表达,对 MIRI 的防治有重要价值。有研究表明,老年人急性心肌梗死时梗死区心肌细胞存在明显的凋亡现象,同时伴有 P53 mRNA 表达明显增加,Bcl-2 mRNA 表达降低,Bcl-2 与 P53 基因在心肌细胞凋亡中的变化呈负相关,共同调节老年患者急性心肌梗死时细胞的凋亡^[9]。Yamamura 等^[10]的研究提示,胰岛素样生长因子-1 可调节 Bcl-xl 和 Bax 的水平,从而发挥抗 MIRI 的心肌细胞保护作用。张志英等^[11]的研究结论表明,电针大椎、命门穴可上调 Bcl-22 mRNA 及蛋白的表达,从而抑制细胞凋亡,保护神经细胞。张泓等^[12]的研究结果提示,电针刺激足阳明经穴能上调胃窦组织中胆囊收缩素受体基因的表达。李珉等^[13]研究发现,针刺涌泉穴对衰老大鼠的 p53 基因表达有抑制作用。

本研究结果显示:模型组家兔心肌 Bax 蛋白呈高表达,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);内关组与模型组比较,Bax 表达显著降低($P < 0.05$),与列缺组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);内关组与模型组和列缺组比较,心肌 Bcl-2 表达显著提高($P < 0.01$ 或 0.05)。因此我们认为,电针刺激内关穴可通过抑制心肌 Bax 的表达、促进 Bcl-2 的表达来抑制 MIRI 后细胞凋亡的发生,对心肌细胞起到保护作用。

参 考 文 献

- [1] 王华,吴绪平,王述菊,等. 延髓腹外侧区在电针内关穴抗急性心肌梗死中的作用. 中华物理医学与康复杂志,2005,27:149-150.
- [2] Simpson PJ, Fanlone JC, Mickelson KP, et al. Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injury: suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion. Circ Res, 1988, 63:1070-1079.
- [3] 邓春雷,殷克敬. 实验针灸学. 北京:人民卫生出版社,1998:143.
- [4] 范谦,张鹏,王文勇,等. 大剂量硝酸甘油对大鼠离体缺血再灌注心肌细胞凋亡和 Bax 及 Bcl-2 的影响. 中国临床康复,2005,9:34-35.
- [5] Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, et al. Expression of Bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. Circulation, 1996, 94:1506-1512.
- [6] Artling B, Hol J, Darmer D, et al. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction. Basic Res Cardiol, 1998, 93:71-75.
- [7] 彭黎明,王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床. 北京:人民卫生出版社,2000:369.
- [8] Selvakumaran M, Lin HK, Sjin RT, et al. The novel primary response gene MyD118 and the protooncogenes myb, myc, and Bcl-2 modulate transforming growth factor beta1-induced apoptosis of myeloid leukemia cells. Mol Cell Biol, 1994, 14:2352-2360.
- [9] Bour ES, Ward LK, Cornman GA, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in hepatocytes in long-term culture. Am J Pathol, 1996, 148:485-495.
- [10] Yamamura T, Otani H, Nakao Y, et al. IGF-I differentially regulates Bcl-xl and Bax and confers myocardial protection in the rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280:1191-1200.
- [11] 张志英,余安胜,严振国. 电针对脊髓损伤早期 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达的影响. 中国针灸,2003,23:473-476.
- [12] 张泓,严洁,易受乡,等. 电针足阳明经穴对胃窦胆囊收缩素受体基因表达的影响. 中国针灸,2004,24:717-719.
- [13] 李珉,王刚,张卫,等. 电针涌泉穴对衰老大鼠 p53 和 Bcl-2 基因表达的影响. 中国临床康复,2004,8:1788-1789.

(收稿日期:2006-05-19)

(本文编辑:吴倩)

· 短篇论著 ·

窄中波紫外线照射治疗玫瑰糠疹的疗效观察

郭盛华 张春梅 蒋英

紫外线照射是治疗皮肤病的重要手段之一,波长约 311 nm 的窄中波紫外线(narrow band ultraviolet B, NB-UVB)因其治疗效果好、副作用小、照射时间短而得到广泛的应用^[1]。我们于 2003 年 9 月至 2005 年 9 月采用波长为(311±2)nm 的 NB-UVB 照射治疗玫瑰糠疹患者 68 例,取得了满意效果,并与综合用药治疗者进行对照观察,现报道如下。

一、资料与方法

(一)临床资料

入选患者来源于我院皮肤科门诊,均符合玫瑰糠疹的诊断标准^[2],发病后均未做任何治疗,2 周内未因其它疾病而使用过皮质激素、免疫抑制剂、抗组胺药等。排除对紫外线过敏者、妊娠和哺乳期妇女,严重心、肝、肾等疾病者,前列腺肥大者,以及高空作业、驾车等工作。116 例患者中,男 49 例,女 67 例;年龄 18~52 岁,平均(33.2±9.5)岁;病程 3~10 d。将患者随机分为光疗组 68 例和对照组 48 例。光疗组男 29 例,女 39 例;平均年龄(33.5±9.9)岁;平均病程(6.2±1.8)d。对照组男 18 例,女 30 例;平均年龄(32.7±8.9)岁;平均病程(6.3±1.6)d。2 组患者性别、年龄、病程等差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

(二)治疗方法

光疗组采用德国产 UV-100L 型窄中波紫外线治疗仪(半舱),波长为(311±2)nm,对患者进行全身照射(裸体),要做好眼、脸、生殖器防护。初始照射剂量为 0.35~0.50 mJ/cm²(根

据皮肤颜色的浅深调节,皮肤嫩白者剂量小),以后每次照射剂量增加 0.1 mJ/cm²,每 2 天照射 1 次,5 次为 1 个疗程。若照射后皮肤发红明显并伴灼痛,则下次照射时剂量保持不变或减低,治疗期间还应嘱患者尽量避免日晒。

对照组口服中成药郁金银屑片(每日 3 次,每次 1.2 g)和抗组胺药息斯敏片(每日 1 次,每次 9 mg),同时外用皮质激素皮康霜(每日 2 次),10 d 为 1 个疗程。

(三)临床表现的评分方法

治疗前及治疗 1 个疗程后,根据患者的瘙痒程度、红斑片数及颜色等自拟评分标准。瘙痒程度:0 分为无瘙痒;1 分为轻度瘙痒;2 分为明显瘙痒;3 分为剧烈瘙痒。红斑片数:0 分为原红色斑全部消退,并无新生红斑;1 分为 1~19 片(包括新疹);2 分为 20~29 片;3 分为 30~39 片;4 分为 40~49 片;5 分为≥50 片。红斑颜色:0 分为无红斑;1 分为色素沉着;2 分为暗棕色红斑;3 分为淡玫瑰色红斑;4 分为典型玫瑰色红斑;5 分为深玫瑰色红斑。

(四)疗效判定

疗效指数=(治疗前总分-治疗后总分)/治疗前总分×100%。疗效指数≥90%为痊愈,疗效指数 89%~70%为显效;疗效指数 69%~50%为有效;疗效指数<50%为无效。

(五)统计学分析

2 组治疗前、后临床表现积分比较采用 t 检验,疗效比较采用 χ^2 检验。

二、结果

治疗前,2 组各项临床表现总分比较,差异无统计学意义($P>0.05$);各组组长内治疗前、后各项临床表现总分比较,差异均有统计学意义($P<0.01$);治疗后 2 组间各项临床表现总分比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。治疗 1 个疗程

作者单位:213003 常州,南京医科大学附属常州市第二人民医院皮肤科

通讯作者:郭盛华,Email:czeygsh@163.com