

电针“内关”、“心俞”对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠血清白介素-1 β 、白介素-10 含量及心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达的影响*

蔡荣林¹, 胡 玲^{1,2}, 余 倩¹, 刘 磊¹, 张田宁¹, 雷 洋²

(1. 安徽中医药大学针灸经络研究所, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医药大学针灸骨伤临床学院, 安徽合肥 230038)

摘要:目的 探讨针刺“内关”、“心俞”穴对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达及相关炎症因子的影响。方法 按照随机数字表将 60 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型对照组、针刺“内关”+“心俞”组(针刺观察组)、针刺“太渊”+“肺俞”组(针刺对照组), 每组 15 只, 针刺观察组选取“内关”和“心俞”穴进行电针刺激, 刺激电流 1mA, 频率为 2 Hz, 每次刺激 20min, 1 次/d, 共 3d。针刺对照组选取“太渊”、“肺俞”, 电针方法同针刺观察组。假手术组、模型对照组不电针。分别检测各组大鼠心肌缺血面积、梗死面积, ELISA 法检测血清白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 含量, 免疫组织化学法检测心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达情况。结果 模型对照组大鼠的心肌缺血面积和梗死面积、NF- κ B p65 阳性细胞数和平均光密度、血清 IL-1 β 含量明显升高, IL-10 含量显著降低, 与假手术组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 针刺观察组大鼠的心肌缺血面积、梗死面积和 NF- κ B p65 表达较模型对照组和针刺对照组比较均显著减少 ($P < 0.05$), 血清 IL-1 β 含量较模型对照组和针刺对照组显著降低, IL-10 明显升高 ($P < 0.05$)。结论 电针“内关”、“心俞”穴可显著降低急性心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 IL-1 β 含量及心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达水平, 升高 IL-10 含量, 可能是其针刺抗急性心肌缺血再灌注损伤效应的作用机制之一。

关键词: 针刺效应; 内关; 心俞; NF- κ B p65; 心肌缺血再灌注损伤

中图分类号: R246.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)02-0006-04

穴位的配伍应用是针灸临床治疗的重要环节, 亦是针灸取得疗效的关键所在。选取具有类似效应的多个穴位针灸, 是否会产生如同中药方剂的协同作用, 以及其可能的内在机制, 已经逐步引起针灸界的广泛关注。大量的临床和实验研究以及我们前期的研究工作均表明针刺“内关”、“心俞”具有明确的抗心肌缺血再灌注损伤 (Myocardial ischemia reperfusion injury, MI/RI) 的作用^[1-3], 但是穴位组合针刺的协同效应机制尚不清楚。近年来研究表明 NF- κ B 信号通路在 MI/RI 中发挥着重要作用^[4], 而目前有关针刺抗 MI/RI 过程中 NF- κ B 信号通路影响的研究尚未见报道, 是值得深入研究和探讨的问题。本研究以 MI/RI 中炎症反应过程为研究主线, 以 NF- κ B p65 蛋白为切入点, 观察针刺前后缺血心

肌组织 NF- κ B p65 蛋白及相关炎症因子的变化, 探讨针刺抗 MI/RI 效应与 NF- κ B p65 蛋白变化之间的相互关系, 旨在进一步揭示针刺“内关”、“心俞”对 MI/RI 的抗炎效应及可能作用机制。

1 资料与方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体质量 (220 $\pm$ 20) g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(皖)2011-002, 术前 12h 禁食。根据随机数字表将大鼠随机分 4 组, 每组 15 只, 分别为假手术组、模型对照组、针刺“内关”+“心俞”组(针刺观察组)、针刺“太渊”+“肺俞”组(针刺对照组)。

1.2 模型复制

参照相关文献[5]进行模型复制。大鼠在末次电

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81303062), 安徽省自然科学基金 (1308085QH155), 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2012Z218), 安徽中医药大学自然科学研究项目 (2012zr009), 安徽中医药大学第二附属医院中医针灸学科开放研究课题资助项目 (2011zjxk011)

收稿日期: 2014-02-28

作者简介: 蔡荣林 (1982-), 男, 安徽霍邱人, 讲师, 主要从事腧穴主治规律与作用机理研究。E-mail: ronglincai@163.com

针 24h 后腹腔注射 20%乌拉坦(5mL/kg)麻醉,仰卧位固定后实时记录标准 II 导联心电图。颈部、胸前部剃毛,切开气管接动物呼吸机(呼吸频率 70 次/min,吸呼比 1:2,潮气量 9mL/kg)。自左侧第 3~4 肋间剪开皮肤,钝性分离肌肉组织,打开胸腔,剪开心包膜,在冠状动脉左前降支起点外约 1~2mm 处,以 5-0 号无菌带线缝合针刺入约 0.5mm 结扎左前降支血管(在丝线与心肌间放一根聚乙烯小管),见缺血心肌壁呈现发钳、膨出,心电图 ST 段弓背上抬,T 波高耸,确定心肌缺血形成。30min 后松开结扎线后关闭胸腔,再灌注 120min,心电图示 ST 段回落 1/2 以上。假手术组开胸后不结扎冠脉,仅在相应部位用针空穿 1 次即可。各组大鼠实验前心电图不正常,或未到观察终点而死亡以及造模不成功者剔除。

1.3 实验方法

针刺观察组选取“内关”(穴位处置两根针灸针,刺入深度 2~3mm,间隔 2~3mm,接电针仪)和“心俞”穴(针刺方法同“内关”穴),用华佗牌 SDZ-V 型电子针疗仪进行电针刺激,刺激电流 1mA,频率为 2 Hz,每次刺激 20min,每天 1 次,共 3d。针刺对照组选取“太渊”、“肺俞”,电针方法同针刺观察组。假手术组、模型对照组不电针。实验结束后,剪开腹部正中皮肤及肌肉,分离腹主动脉,采集动脉血,3 000r/min,离心 15min,吸取上清液,分装,-20℃保存待测。随机选取每组 9 只大鼠开胸取出心脏用 4℃生理盐水冲洗,冰盘上切取左冠状动脉供血区心肌组织,置入 4%多聚甲醛固定。

1.4 观察指标

(1)心肌梗死面积、缺血面积测定:大鼠缺血 30min 再灌注 40min 时,将每组未取心脏的剩余 6 只大鼠重新结扎左冠状动脉前降支,0.5%伊文氏蓝 1.5mL 舌静脉注射,充分染色后迅速取出心脏用冰冻生理盐水冲洗,-20℃冰冻,将心脏垂直切成 1mm 薄片,置入 2mL 氯化三苯基四氮(Sigma 公司,美国)中 37℃孵育 10min,采用 HPIAS-2000 图像分析系统测定缺血区和坏死区面积。

(2)ELISA 法检测血清炎症因子 IL-1 β 及 IL-10 含量:按 ELISA 试剂盒说明测定大鼠血清 IL-1 β 及 IL-10 的含量。

(3)免疫组织化学法检测心肌 NF- κ B p65 蛋白表达:取心肌组织包埋后冰冻切片(厚 6 μ m),滴加

一抗(兔 IgG,1:200 比例稀释),37℃孵育 2h,滴加山羊抗兔二步法二抗,37℃ 30min,PBS 液清洗,2min $\times$ 3 次。DAB 显色,冲洗后伊红复染,脱水封片。采用 Leica Qwin 图像分析系统进行检测,每张切片随机选取 5 个高倍视野检测($\times$ 400),计算每个视野的阳性细胞数和相对光密度,取其平均值。

1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析,所有数据均用($\bar{x}\pm s$)表示,各组间均数的两两比较采用方差分析 One-way ANOVA(LSD 法),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌缺血面积和梗死面积比较

表 1 各组大鼠心肌缺血面积、梗死面积比较($\bar{x}\pm s$,n=6)

组别	缺血面积/%	梗死面积/%
假手术组	5.29 $\pm$ 0.75	7.48 $\pm$ 0.81
模型对照组	40.21 $\pm$ 8.42 ^{▲▲}	44.25 $\pm$ 9.54 ^{▲▲}
针刺观察组	20.35 $\pm$ 4.67 ^{□□}	22.57 $\pm$ 5.17 ^{□□}
针刺对照组	34.18 $\pm$ 6.18 ^{□□△△}	39.88 $\pm$ 6.85 ^{□□△△}

注:与假手术对照组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与模型对照组比较,□ $P<0.05$,□□ $P<0.01$;与针刺观察组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$,下同。

由表 1 可见,模型对照组大鼠的心肌缺血面积和梗死面积明显高于假手术组($P<0.05$),针刺观察组大鼠的心肌缺血面积和梗死面积与模型对照组和针刺对照组比较均显著减少($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠血清 IL-1 β 及 IL-10 含量比较

模型对照组大鼠血清 IL-1 β 水平明显升高,IL-10 含量显著降低,与假手术组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。针刺观察组大鼠血清 IL-1 β 含量较模型对照组和针刺对照组显著降低,IL-10 明显升高,其间差异有统计学意义($P<0.05$);针刺对照组大鼠血清 IL-1 β 含量与模型对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 及 IL-10 含量比较($\bar{x}\pm s$,n=15)

组别	IL-1 β /(ng/L)	IL-10/(pg/mL)
假手术组	38.26 $\pm$ 6.54	87.13 $\pm$ 7.69
模型对照组	80.87 $\pm$ 10.25 ^{▲▲}	58.67 $\pm$ 6.41 ^{▲▲}
针刺观察组	42.15 $\pm$ 7.95 ^{□□}	77.25 $\pm$ 7.88 ^{□□}
针刺对照组	70.38 $\pm$ 12.59 ^{□□△△}	63.09 $\pm$ 6.13 ^{△△}

2.3 各组大鼠心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达比较

由免疫组织化学法检测可见 NF- κ B p65 阳性细胞表达呈棕黄色或黄褐色,镜下可见染色质深染聚集成块或碎裂、核边聚集。模型对照组大鼠与假手术组比较,阳性细胞数明显增多,光密度值明显升高($P>0.05$);针刺观察组大鼠阳性细胞数较模型组减少,光密度值较模型组明显降低($P>0.05$)。详见表 3,图 1。

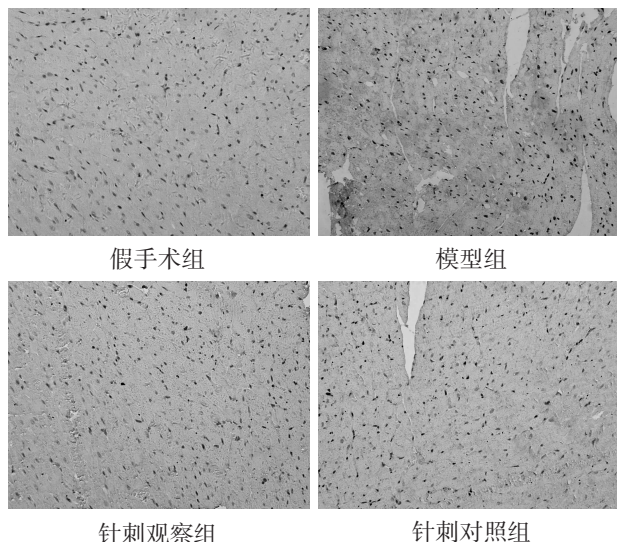


图 1 各组大鼠心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达

表 3 各组大鼠心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	NF- κ B p65	
	阳性细胞数	平均光密度值
假手术组	7.24 $\pm$ 1.24	0.195 $\pm$ 0.067
模型对照组	28.15 $\pm$ 5.63 ^{▲▲}	0.341 $\pm$ 0.071 ^{▲▲}
针刺观察组	12.19 $\pm$ 3.84 ^{□□}	0.251 $\pm$ 0.059 ^{□□}
针刺对照组	19.72 $\pm$ 4.78 ^{△△□□}	0.328 $\pm$ 0.062 ^{△△□□}

3 讨论

近年来,我国人群心血管疾病发病率和死亡率呈显著上升的趋势,严重威胁着人们的生命健康^[6]。大量临床研究已经证实,针灸治疗缺血性心脏病疗效肯定^[7-8]。国内外许多学者也分别从中枢神经系统、心血管活性物质、改善微循环作用、抗氧自由基作用、对细胞因子的调节、对 NOS 和 NO 的影响,以及调节热休克蛋白表达等方面对针灸干预心肌缺血再灌注损伤的作用及机制进行了有益的探讨^[9]。

目前,有关腧穴间配伍规律及协同效应的研究受到了越来越多的重视,我们也开展了腧穴配伍

及协同作用机制的一系列相关研究,取得了一定的研究成果。我们通过前期的相关工作已经证实电针“内关”、“心俞”穴对急性心肌缺血家兔的心电图、血液流变学参数和心率变异性有协同改善作用^[10-11],针刺内关和心俞穴对缺血性心脏病的心肌细胞皆有一定的保护作用。

内关为心包经络穴,心俞为心的背俞穴。《灵枢·经脉》有云:“手心主之别,名曰内关,去腕二寸,出于两筋之间……心系实则心痛,虚则为头强,取之两筋间也。”《千金方》云:“治心风寒方,灸心俞各五十壮”等,两穴均为治疗心系疾患的有效穴位,我们前期的研究亦证实内关与心俞配伍针刺可有效提高临床疗效,本研究旨在前期研究工作的基础上从多角度、多方面进一步揭示针刺内关和心俞穴抗心肌缺血再灌注损伤效应的机制。

现代研究表明,过度的炎症反应是心肌缺血再灌注损伤的主要机制之一,炎性细胞因子的大量释放在损伤的过程中发挥重要的作用。NF- κ B 信号通路参与介导细胞增殖、炎症、凋亡等多种生理过程,对于心肌缺血再灌注损伤的发生、发展具有关键作用^[12-14]。NF- κ B 转录调控的下游炎性因子 IL-1 β 、IL-10 等在心肌缺血再灌注损伤中具有重要的作用^[15-16]。NF- κ B 信号通路可能参与了针刺抗 MI/RI 的效应,而目前关于其在 MI/RI 防治机制中的相关研究却鲜见报道。

本研究以 MI/RI 中炎症反应过程为研究主线,以 NF- κ B p65 蛋白为切入点,观察针刺“内关”、“心俞”对缺血心肌组织 NF- κ B p65 蛋白及致损伤因子的影响,并探讨针刺抗 MI/RI 效应与 NF- κ B p65 蛋白变化之间的相互关系,旨在进一步揭示针刺“内关”、“心俞”抗 MI/RI 的效应及可能作用机制。结果发现,针刺“内关”、“心俞”穴可显著降低急性心肌缺血再灌注损伤大鼠血清 IL-1 β 含量及心肌组织 NF- κ B p65 蛋白表达水平,升高 IL-10 含量,其效应与针刺“太渊”、“肺俞”穴比较差异均有统计学意义。提示针刺“内关”、“心俞”穴可调节缺血心肌 NF- κ B p65 蛋白表达及其转录调控的下游炎性因子 IL-1 β 、IL-10 含量,其效应显著优于“太渊”、“肺俞”穴。综上所述,针刺“内关”、“心俞”对急性心肌缺血再灌注损伤的保护效应与 NF- κ B 信号通路有一定的关系,为今后进一步揭示“内关”、“心俞”穴协同针刺效应的机制奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 马育轩,郭蕊珠,周海纯,等. 心肌缺血再灌注损伤的中医药治疗研究进展[J]. 中医药信息,2013,30(5):116-117.
- [2] 谢文娟,严洁,常小荣,等. 针灸防治心肌缺血/再灌注损伤的细胞信号转导机制的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2012,30(11):2414-2417.
- [3] 李梦,胡玲,蔡荣林,等. 电针内关、心俞穴对急性心肌缺血大鼠脊髓背根神经电活动及下丘脑室旁核去甲肾上腺素、多巴胺浓度的影响[J]. 中西医结合学报,2012,10(8):874-879.
- [4] 刘小雨,杨勇,夏韵. NF- κ B 在心血管疾病中的作用[J]. 同济大学学报(医学版),2012,33(5):119-124.
- [5] 唐丹丽,刘寨华,张华敏,等. 血府逐瘀汤对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中药杂志,2010,35(22):3077-3079.
- [6] 姚震,陈林. 我国心血管疾病现状与展望 [J]. 海南医学,2013,24(13):1873-1896.
- [7] 刘建荣,谭英,潘文举. 针灸治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 新中医,2010(5):68-70.
- [8] Magnusson G, Ballegaard S, Karpatschhof B, et al. Long-term effects of integrated rehabilitation in patients with stroke: a nonrandomized comparative feasibility study [J]. J Altern Complement Med. 2010, 16(4):369-374.
- [9] 李容,王友京. 针灸改善心肌缺血作用机理研究概况[J]. 中国针灸,2002,22(8):566-569.
- [10] 李梦,胡玲,蔡荣林,等. 电针内关、心俞改善急性心肌缺血大鼠心率变异性的协同作用 [J]. 中华中医药学刊,2008,26(8):1760-1761.
- [11] 李梦. 电针内关、心俞改善急性心肌缺血大鼠血流变参数的协同作用[J]. 甘肃中医学院学报,2008,25(2):11-13.
- [12] Sun B, Fan H, Honda T, et al. Activation of NF- κ B And expression of ICAM-1 in ischemic: Reperfused canine myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33:109-119.
- [13] 喻田,尹光明,余志豪,等. 核转录因子 κ B 抑制剂对犬体外循环炎性因子的影响[J]. 中华外科杂志,2005,43(2):103-105.
- [14] Mustapha S, Kirshner A, De Moissar D, et al. A direct requirement of nuclear factor kappa B for suppression of apoptosis in vent IR myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279:939-945.
- [15] L. X. Zhang, Y. Zhao, G. Cheng, et al. Targeted deletion of NF- κ B p50 diminishes the cardioprotection of histone deacetylase inhibition[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298:H2154-H2163.
- [16] J Yang, H Jiang, J Yang, et al. Valsartan preconditioning protects against myocardial ischemia - reperfusion injury through TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Molecular and cellular. 2009, 330(1-2):39-46.

(编辑:岳胜难)

Effects on Contents of Interleukin-1 β and Interleukin-10 and Expression of NF- κ B p65 in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Rats with Acupuncture at PC6 and BL15

CAI Rong-lin¹, HU Ling^{1,2}, YU Qing¹, LIU Lei¹, ZHANG Tian-ning¹, LEI Yang²

(1. Research Institute of Acupuncture and Moxibustion, Anhui University of TCM, Hefei 230038, China;

2. School of Acupuncture & Osteology, Anhui University of TCM, Hefei 230038, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effects on expression of NF- κ B p65 and correlative inflammatory factors in myocardial ischemia reperfusion injury rats with acupuncture at PC6 and BL15. **Methods** 60 rats were randomly divided into sham operation group, model control group, acupuncture PC6 and BL15 group (acupuncture observation group) and acupuncture LU9 and BL13 group (acupuncture control group) according to random number table, 15 in each group. The rats of acupuncture observation group were treated by electro-acupuncture at PC6 and BL15 with 1mA, 2Hz, 20min of each stimulus, 1 time a day, a total of 3 days. The rats of acupuncture control group were treated by electro-acupuncture at LU9 and BL13 with methods same as acupuncture observation group. The rats of sham operation group and model control group did not use electro-acupuncture. The myocardial ischemic area, infarction area, contents of IL-1 β and IL-10, expression of NF- κ B p65 in each group were detected. **Results** The myocardial ischemic area, infarction area, content of IL-1 β and expression of NF- κ B p65 in model group significantly increased, the content of IL-10 decreased, which shown significant difference compared with sham operation group ($P < 0.05$). The myocardial ischemic area, infarction area, content of IL-1 β and expression of NF- κ B p65 significantly decreased, content of IL-10 increased compared with model control group and acupuncture control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture at PC6 and BL15 could significantly decrease the content of IL-1 β and expression level of NF- κ B p65, and increase the content of IL-10, which may be one of the mechanism of acupuncture effect in anti-myocardial ischemia.

KEY WORDS: acupuncture effect; PC6; BL15; NF- κ B p65; myocardial ischemia reperfusion injury