

针灸推拿 •

针刺手厥阴经穴对缺血再灌注损伤心肌细胞蛋白激酶 C 表达的影响

田岳凤¹ 王 荣¹ 李雷勇² 靳聪妮¹ 郝重耀¹ 王 军¹

(1. 山西中医学院针灸推拿系, 太原市晋祠路169号, 030024; 2. 山西医科大学第二医院)

[摘 要] **目的** 研究针刺手厥阴经穴对缺血再灌注损伤过程中心肌细胞蛋白激酶 C(PKC) 表达的影响, 探讨 PKC 介导的信号转导机制在心肌缺血再灌注损伤中的作用。**方法** 电针大鼠手厥阴经穴位20分钟后, 结扎左冠状动脉前降支40分钟, 心电图监测, 再电针穴位20分钟, 松扎, 恢复灌流60分钟, 摘取心脏, 免疫组化方法分析细胞蛋白激酶 C 的表达。**结果** 缺血再灌注模型组 PKC 表达的阳性率明显增高, 针刺手厥阴经穴后阳性表达率明显降低($P < 0.01$)。**结论** 针刺手厥阴经穴对 PKC 表达有明显的抑制作用, 从而发挥对心肌细胞的保护作用。

[关键词] 心肌再灌注损伤; 针刺疗法; 手厥阴经穴; 蛋白激酶 C

Effect of Needling at Points of Pericardium Meridian of Hand Jueyin on the Expression of Protein Kinase C in Cardiocyte of Ischemical Reperfusion Injury

TIAN Yue-feng¹, WANG Rong¹, LI Lei-yong², et al.

(1. Shanxi College of Chinese Medicine, Taiyuan 030024; 2. The Second Hospital of Shanxi Medical University)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of needling at points of Pericardium Meridian of Hand Jueyin on the expression of protein kinase C (PKC) and signal transduced mechanism mediated by PKC in cardiocyte of ischemical reperfusion injury. **Methods** Points of Pericardium Meridian of Hand Jueyin of rats were given electro-acupuncture for 20 minutes. Ramus descendens anterior arteriae coronariae sinistae was ligated for 40 minutes with electrocardiogram monitoring. Ligation ceased after another 20 minutes of electro-acupuncture. Heart was extracted after 60 minutes of reperfusion. The expression level of PKC was tested by immunohistochemical method. **Results** The expression level of PKC increased in model group but decreased significantly after acupuncture ($P < 0.01$). **Conclusion** Needling points of Pericardium Meridian of Hand Jueyin can obviously inhibit the expression level of PKC and protect cardiocyte.

Key Words Myocardial reperfusion injury; Acupuncture therapy; Points of Pericardium Meridian of Hand Jueyin; Protein kinase C

广泛分布于真核细胞特别是哺乳类动物细胞中的蛋白激酶 C(PKC) 作为机体信号传导通路的一个重要环节引起了人们的关注^[1]。我们在观察针刺对缺血再灌注损伤心肌细胞内游离钙(Ca^{2+}) 超载抑制作用的基础上, 采用免疫组化方法观察了 PKC 在此过程中的变化, 旨在研究 PKC 介导的信号传导机制在心肌缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠 50 只, 清洁级, 体重 250~280g, 由山西省中医药研究院动物中心提供(动物合格证号: A00-002)。

1.2 试剂与仪器

DAB 显色剂、连接抗体(福建迈新生物技术公司), 一抗(美国 Neomarker 公司); G6805-1 型治疗仪(上海医疗器械高技术公司); DH-150 动物人工呼吸机(浙江大学医学仪器厂); ECG-6511 心电图机(日本); Olympus-CX40 显微镜(日本); MIAS-2000 图像分析软件(四川川大智胜软件股份有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及处理

50 只大鼠随机分为 5 组: 假手术组、缺血再灌注模型组、针刺内关治疗组、针刺郄门治疗组、针刺支沟对照组, 每组 10 只。10% 乌拉坦(1mg/kg) 腹腔麻醉, 接动物人工呼吸机, 第三、四肋间隙处开胸, 暴露心脏, 冠状动脉左前降支根部用无创性小圆针穿零号医用缝合线, 心电图监测, 穿线处置硅胶管结扎左前降支, 以左

室前壁发绀并向外膨胀及心电图 S-T 段抬高为标志。(1) 假手术组:冠状动脉左前降支根部穿线后,记录100分钟内心电图 S-T 段变化,摘取心脏,取左心室肌结扎部位下方心肌组织进行 PKC 蛋白的表达检测。(2) 缺血再灌注模型组:冠状动脉左前降支根部穿线后,心电图监测,结扎左前降支40分钟,再灌注60分钟后,摘取心脏,取左心室肌结扎部位下方心肌组织进行 PKC 蛋白的表达检测。(3) 针刺内关治疗组:冠状动脉左前降支根部穿线后,心电图监测,关闭心电图机。取双侧内关穴, G6805-1型治疗仪疏密波电针20分钟,频率30~100Hz,强度20~30V,以前肢出现与电针频率相一致的轻微颤动为准,去电针,心电图监测,结扎左前降支40分钟,再电针内关穴20分钟,再灌注60分钟后,摘取心脏,取左心室肌结扎部位下方心肌组织进行 PKC 蛋白的表达检测。内关穴定位采取拟人比照法。(4) 针刺郄门治疗组和针刺支沟对照组除取穴不同外与针刺内关治疗组方法相同。

2.2 染色

实验结束取结扎下方左心室肌,大小为1cm × 0.8 cm × 0.3cm;10%中性甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋后,制成石蜡切片;贴片后在二甲苯中脱蜡2次,分别为15分钟、10分钟;梯度酒精脱苯,时间依次为5分钟、3分钟、3分钟、3分钟;自来水冲洗2次;PBS 冲洗3次,每次3分钟;用酶法对组织抗原进行修复15分钟;加3%双氧水,室温孵育10分钟;每张切片滴加1 μl 的第一抗体50 μl,4℃孵育过夜;PBS 冲洗3次,每次3分钟;每张切片滴加50 μl Max 试剂,37.5℃孵育15分钟;除去 PBS 液,每张切片加100 μl DAB 显色剂, Olympus-CX40显微镜下观察3~5分钟;自来水冲洗,苏木素复染;再用 PBS 液冲洗反蓝;梯度酒精脱水、二甲苯透明各3分钟;中性树胶封片。

2.3 图像分析

应用 MIAS-2000图像分析软件进行分析,每组取4张切片,每张切片取上、下、左、右相对固定的4个视野,面积范围1.5~2.0 μm²,测量其灰光度值。灰光度值越高,说明表达率越低。

2.4 统计学方法

各组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 8.0软件进行处理,进行方差分析及组间比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

染色结果示,心肌细胞中 PKC 的表达位于细胞膜,呈棕黄(褐)色。假手术组未见黄褐色条状带或区域,缺血再灌注模型组多处呈现深褐色宽带,部分连接

成片,灰光度降低,阳性表达率明显增高,与假手术组比较差异有显著性意义($P < 0.01$);针刺内关治疗组与针刺郄门治疗组可散见片状浅褐色的区域,灰光度均较高,阳性表达率明显降低,与缺血再灌注模型组比较差异均有显著性意义($P < 0.01$);针刺支沟对照组出现大片褐色区域,阳性表达率与缺血再灌注模型组比较差异无显著性意义($P > 0.05$),说明针刺手厥阴经穴位对损伤心肌具有特异性的作用。在染色过程中,个别标本有脱落现象,每组按8只进行统计。见附表。

附表 各组大鼠心肌细胞 PKC 表达灰光度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	灰光度
假手术组	8	154.41 ± 3.82*
缺血再灌注模型组	8	118.52 ± 9.60
针刺内关治疗组	8	131.70 ± 3.69*
针刺郄门治疗组	8	133.84 ± 3.84*
针刺支沟对照组	8	124.76 ± 3.64

与缺血再灌注模型组比较,* $P < 0.01$

4 讨论

PKC 是一种依赖于 Ca^{2+} 和磷脂的蛋白激酶,在静息的细胞中,PKC 存在于胞质中,活性很低。当细胞受到刺激时,第二信使二酰甘油(DAG)在质膜上短暂形成,使 PKC 与质膜上的磷脂酰丝氨酸结合,使 PKC 对 Ca^{2+} 的依赖性明显降低,该酶激活,并从胞质转到胞膜上。PKC 分子中含有自身抑制区或假底物序列,能像酶底物一样与酶的催化区结合,从而抑制酶的活性。假底物序列位于 PKC 的氨基端,平时它与羧基端催化核心的底物结合位点结合而使 PKC 处于非活化状态。当第二信使如脂质、DAG、 Ca^{2+} 与 PKC 结合可使其构象改变,假底物系列不再与催化区结合,底物能够进入酶活性中心,从而使酶激活^[2]。PKC 被激活后可催化某些蛋白的磷酸化反应,以此改变细胞的功能^[3]。

PKC 参与的生理过程极为广泛,既涉及到许多如分泌作用、肌肉收缩等细胞的短期生理效应,又参与细胞 DNA 的蛋白合成、细胞的生长分化等与基因表达相关的长期生理过程。对膜离子转运功能的调节是 PKC 参与调节的主要细胞效应之一。许多具有重要生理功能的膜蛋白可作为 PKC 的底物,其中 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} -ATP 酶)是质膜上 Ca^{2+} 转移系统的重要成员之一,它可把细胞内 Ca^{2+} 泵出细胞外。外界刺激引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,加入可激活 PKC 的佛波醇脂可降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,这一过程可能是通过 PKC 对 Ca^{2+} 泵的磷酸化而使其激活实现的^[4]。

细胞培养和体外实验均已证明,PKC 存在于细胞膜和细胞质中,细胞质中的呈钝化状态,在细胞质中

Ca^{2+} 浓度稍升高的情况下可以从细胞质转移到细胞膜上而呈待激状态, 细胞内 Ca^{2+} 升高而导致 PKC 从细胞质向细胞膜重新分布的现象是 PKC 激活过程中一个非常重要的步骤^[5]。PKC 一旦被激活, 将通过多种传导途径调节转录因子、基因表达、 Na^+/H^+ 交换以及细胞内蛋白的表达。

细胞内 Ca^{2+} 浓度增高称为钙超载, 细胞内钙稳态主要是靠细胞膜 Ca^{2+} 泵、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换、肌浆网 Ca^{2+} 摄取与释放, 以及线粒体能量依赖的 Ca^{2+} 转运机制来维持的。钙超载在心肌缺血再灌注损伤发病机理中起关键作用, 缺血期由于缺血细胞膜去极化以及电压敏感性和配位体把守的慢钙通道的开放, 一部分 Ca^{2+} 会进入细胞内。这些内流的 Ca^{2+} 能否增加细胞的 Ca^{2+} 水平, 很大程度上依赖于内流的 Ca^{2+} 量与细胞内隔离室分隔 Ca^{2+} 和将 Ca^{2+} 排出细胞外能力的平衡。这些 Ca^{2+} 作为一种信号激发代谢活动, 最终有效到再灌注损伤的严重程度^[6]。

研究再灌注损伤与 PKC 关系的实验表明, 心肌细胞缺血时细胞 PKC 的活性显著增加, 再灌注抑制了 PKC 活性的继续激活^[7]。我们以往的实验研究证明, 针刺手厥阴经穴可明显抑制心肌缺血再灌注损伤过程中 Ca^{2+} 超载^[8], 本项研究表明, 针刺可明显影响此过程中 PKC 的表达, 然而针刺抑制 PKC 的活化作用是在缺血阶段还是再灌注阶段, 尚无法确定, 需要进行深入的动态观察研究, 以探明心肌细胞保护作用在信号转导

机制过程中针刺对 PKC 的作用机理。

参考文献

- [1] Hunter T, Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. Cell, 1992, 70(3): 375~387.
- [2] Sun G, Ramdas L, Wang W, et al. Effect of autophosphorylation on the catalytic and regulatory properties of protein tyrosine kinase Src. Arch Biochem Biophys, 2002, 397(1): 11~17.
- [3] Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Circ Res, 1993, 72(4): 757~767.
- [4] Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, et al. Roles of protein kinase C and Ca^{2+} -dependent signaling in angiotensin II-induced adrenomedullin production in rat cardiac myocytes. J Hypertens, 2001, 19(4): 757~763.
- [5] 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导. 北京: 科学出版社, 2000: 83~86.
- [6] 郭志凌, 赵华月, 郑信华. 局限缺血一再灌注心肌细胞内钙超负荷发生机制的探讨. 同济医科大学学报, 1995, 24(3): 198~200.
- [7] 乌立晖, 张宝仁, 朱家麟, 等. 缺血和药物预处理对模拟缺血再灌注培养心肌细胞蛋白激酶 C 活性的影响. 第二军医大学学报, 1997, 18(增刊): 78~81.
- [8] 田岳凤, 吴富东, 乔海法, 等. 针刺手厥阴经穴对心肌缺血再灌注损伤心肌细胞钙超载的影响. 针刺研究, 2005, 30(3): 161~163.

(收稿日期: 2006-03-15; 修回日期: 2006-08-12)



YZN-50多功能真空(提取 分离 蒸馏)浓缩机



中医中药中国行公益事业杰出贡献奖
中医中药中国行特约赞助单位

适用范围

广泛适用于诊所、药店、中医院、综合医院、药物研发、临床应用、研究机构、食品饮料加工业、化工行业等及其分支行业的制剂室、实验室、中试阶段研究、小批量生产以及为终端客户服务。

主要功能

- 真空低温煎药;
- 蒸馏浓缩中药, 制作膏剂、粉剂;
- 有机溶剂提取(酒精、乙醚等);
- 果酱、凝胶体(成冻体)等的低温浓缩和提取;
- 芳香剂的提取、各种精油成分的分离;
- 红参制造功能(蒸熟和炖)等。

全国免费垂询热线: 800-810-0359



北京东华原医疗设备有限公司

电话: 010-89718013

传真: 010-89718021

地址: 北京市中关村昌平科技园园区振超路1号

邮编: 102200

网址: www.donghuagroup.com



行业内唯一通过ISO9001: 2000和ISO13485: 2003认证的企业