

· 针灸推拿 ·

逆针灸关元穴对自然更年期大鼠子宫雌激素受体 α 和热休克蛋白 70 表达的影响

莫捷¹ 李晓泓¹ 郑玲² 何玉伟³ 王洪彬¹ 孙志芳¹ 张露芬¹

(1. 北京中医药大学针灸学院, 北京市北三环东路 11号, 100029;

2 北京医院针灸科; 3. 北京市护国寺中医医院针灸科)

[摘要] 目的 探讨预先针灸关元穴对更年期早期机体异常的预防和治疗作用。方法 以 4 月龄雌性 SD 大鼠为年轻对照组, 将 24 只通过阴道涂片筛查的 10 月龄 SD 雌性大鼠随机分为 4 组, 采用自然老化法制备大鼠更年期模型。观察 12 月龄自然更年期大鼠子宫雌激素受体 α (ER- α) 和热休克蛋白 70 (HSP-70) 表达的变化及逆针灸对其的影响。结果 自然更年期大鼠的子宫 ER- α 表达逐渐下降 ($P < 0.01$), 逆灸和逆针都可使大鼠子宫 ER- α 的表达水平明显提高 ($P < 0.01$)。自然更年期大鼠的子宫 HSP-70 表达波动升高 ($P < 0.01$), 逆灸和逆针都可使大鼠子宫 HSP-70 进一步升高 ($P < 0.05$)。结论 12 月龄自然更年期大鼠的子宫表达的 ER- α 减少, 逆针灸可以通过提高子宫 ER- α 水平和 HSP-70 表达, 从而保护子宫功能。

[关键词] 逆针灸; 大鼠; 更年期; 雌激素受体 α ; 热休克蛋白 70

Effect of Preventive Acupuncture and Moxibustion at Guanyuan (CV-4) on the Expressions of Estrogen Receptor- α and Heat Shock Protein-70 in the Uterus of Natural Climacteric Rats

MO Jie¹, LI Xiaohong¹, ZHENG Ling², HE Yuwei³, WANG Hongbin¹, SUN Zhifang¹, ZHANG Lufen¹

(1. Acupuncture School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Beijing Hospital; 3. Beijing Huguosi TCM Hospital)

ABSTRACT Objective To observe the effect of preventive acupuncture and moxibustion at Guanyuan (CV-4) on abnormal activity in early climacteric rats. **Methods** Using four-month-old female SD rats as young control group, the 24 ten-month-old SD female rats screened by vaginal smear were randomized into 4 groups. The climacteric models by natural aging were established. The changes of estrogen receptor (ER- α) and heat shock protein-70 (HSP-70) expressions resulted from the effect of preventive acupuncture and preventive moxibustion were observed. **Results** The expression of ER- α decreased gradually in the uterus of natural climacteric rats ($P < 0.01$), both preventive acupuncture and moxibustion could increase it significantly ($P < 0.01$). The expression of HSP-70 increased unsteadily ($P < 0.01$), and preventive acupuncture and moxibustion could increase it further ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of ER- α in the uterus of 12-month-old natural climacteric rats decreased. Preventive acupuncture and moxibustion can protect the uterus function through increasing the expressions of ER- α and HSP-70.

Key Words Preventive acupuncture and moxibustion; Rat; Climacteric; Estrogen receptor- α ; Heat shock protein 70

逆针灸是指在机体无病、疾病发生之前或疾病轻浅之时, 预先应用针灸方法, 激发经络之气, 增强机体的抗病与应变能力, 从而防止疾病的发生、减轻随后疾病的损害或保健延年的针灸方法, 是中医“治未病”的重要内容。关元为任脉穴, 与胞宫、冲脉、督脉、足三阴经等联系密切。更年期是机体走向衰老的启动期, 更年期女性子宫雌激素受体 α (ER- α) 和热休克蛋白 70 (HSP-70) 的变化被证明可能与更年期女性的生殖器官功能减退相关。本研究旨在通过雌性大鼠出现动情周期紊乱的 10 月龄时采用逆针灸关元穴方法干预, 观

察其对 12 月龄自然更年期大鼠上述指标产生影响, 以进一步探讨逆针灸关元穴对更年期大鼠的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 雌性大鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京) 200223。其中中年后期 9.5 月龄鼠, 采用阴道涂片法^[1], 连续观察 3 个动情周期 (15d), 通过组织学检测筛选已经开始出现动情周期紊乱 (预示即将或开始进入更年期) 的 24 只 (10 月龄) 纳入实验, 体重 (380 $\pm$ 20) g。另选 4 月龄鼠 6 只, 体重 (240 $\pm$ 20) g。

1.2 仪器与试剂

电子秤: 日立 7600 全自动生化仪 (日本); Sanyo 超

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (90209026); 国家中医药管理局针灸特色疗法评价重点实验室基金

通讯作者: 李晓泓, xiaohong_l@ sina.com, (010) 64488350

低温冰箱(日本);Leitz1410型石蜡切片机(德国);Polaroid数码显微摄像机(美国);MIS-2000SP型3Y显微图像分析仪(美国)。ER-α试剂盒(中山试剂公司);HSP-70免疫组化试剂盒。

1.3 针灸材料

艾炷:大小:底托直径1.2cm,底托厚度0.4cm,底托中间有3mm的孔,艾炷直径0.7cm,高度1cm,重量约2g 易艾炷牌,由中国针灸学会针灸器材专业委员会监制,吴江市云龙医疗器械有限公司生产,批号:20050201 毫针:直径0.35mm,长25mm(1寸)“环球”牌,苏州环球针灸医疗器械有限公司生产,批号:20041005

1.4 分组

4月龄雌性大鼠6只,为年轻对照组;10月龄雌性大鼠24只,随机分4组:自然10月龄组、自然12月龄组、逆灸12月龄组、逆针12月龄组,每组6只。更年期模型制备:动情周期紊乱后自然老化

1.5 穴位定位与针法

关元穴定位参照大鼠标准穴位图谱定位,为两后肢根部连线的中点。灸法:灸前将以关元穴为中心直径约2cm区域的鼠毛剪净,暴露穴区皮肤,将大鼠仰躺在手掌上,待其安静,将艾炷点燃后,直接放置在穴位上,每次灸1壮,灸至艾炷烧完。灸后局部皮肤略红,但不发泡。针法:将大鼠仰躺在手掌上,待其安静,将针直刺大鼠关元穴约2分后斜向上完全刺入,留针20min 留针过程中让大鼠处于自然状态

1.6 处理方法

年轻对照组和自然10月龄组不做任何处理。自然12月龄组从大鼠10月龄开始,于治疗组治疗时同样抓取,但不针灸,持续8周。逆灸组和逆针组在10月龄时分别开始施灸和针刺,1周2次,共治疗8周。实验期间所有动物在同等条件下饲养。

1.7 取材

年轻对照组在4月龄时取材。其余组在相应月龄取材。大鼠左侧子宫切片测定ER-α,右侧子宫切片测定HSP-70

子宫切片制备:应用蓝格蠕动泵经大鼠左心室到主动脉进行灌注,先用0.9%生理盐水冲洗,再用4%多聚甲醛磷酸缓冲液初步固定,然后取出大鼠左、右侧子宫分别放在4%多聚甲醛磷酸缓冲液中,继续行常规固定、包埋、切片。切片厚度5~6μm

1.8 检测指标和方法

1.8.1 ER-α表达测定 采用ER-α免疫组化法加样显色。封片后用显微照相机在400倍下照相并用图像分析仪分析。在左、右侧室旁核各取1个视野(1个视野基本包括了全部核),取其平均值。观察指标为总灰度值(ZHD)

1.8.2 HSP-70表达测定 采用HSP-70免疫组化法加样显色。其余同上。

1.9 统计学方法

应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理。计量数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析,两两比较用LSD-t检验。

2 结果

2.1 自然更年期大鼠子宫ER-α表达变化及逆针灸对其影响

表1示,自然更年期大鼠的子宫ER-α表达随着月龄的增加而下降,自然10月龄组与年轻组比较、自然12月龄组与自然10月龄组比较均有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。逆灸和逆针均可以使12月龄大鼠的子宫ER-α表达增高,与自然12月龄组相比有统计学差异($P < 0.01$)。逆灸组和逆针组之间无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 自然更年期大鼠子宫HSP-70表达水平的变化及逆针灸对其的影响

表1示,自然更年期大鼠的子宫HSP-70表达随着月龄增长而波动升高。自然10月龄组与年轻对照组相比无统计学差异($P > 0.05$)。自然12月龄组较自然10月龄组增高($P < 0.01$)。逆灸和逆针均使子宫HSP-70表达进一步增高,与自然12月龄组比较有统计学差异。逆灸组和逆针组之间无统计学差异($P > 0.05$)。

表1 逆针灸对自然更年期大鼠子宫ER-α、HSP-70表达的影响(ZHD值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ER-α	HSP-70
年轻对照组	6	15262.3±585.671	5834.933±942.939
自然10月龄组	6	10198.89±545.910	4470.116±1262.847
自然12月龄组	6	6771.496±419.261 [△]	8115.850±2036.101 [△]
逆灸12月龄组	6	12517.89±494.382 ^{△▲▲}	10680.210±2425.946 ^{△▲}
逆针12月龄组	6	10238.03±510.534 ^{▲▲}	11072.050±2801.529 ^{△▲}

注:与年轻对照组比较,* $P < 0.01$;与自然10月龄组比较,[△] $P < 0.01$;与自然12月龄组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

3 讨论

“无病而先针灸曰逆,逆,未至而迎之也”《针灸聚英》。《医经理解》认为,关元为“男子藏精,女子蓄血之处,是人生之关要,真元之所存”,具有培肾固本,补益精血,调理冲任之功,是古今保健强壮的要穴。更年期是妇女自生育旺盛的性成熟期过渡到老年期的一段较长岁月,是妇女衰老进程中的关键启动期,此期由于肾气渐衰,天癸将竭,导致机体内环境变化急剧,稳态失衡,出现多系统功能紊乱;若失治或调适不当,极易诱发肿瘤、心脑血管疾病、糖尿病、骨质疏松及精神神志病等,严重威胁中老年妇女的生命质量。运用逆时针灸关元穴的方法在更年期之前提早介入,振奋真阳,补肾培元,启动机体内源性保护适应机制,调整机体动荡紊乱的状态,使此期平稳过渡,将对更年期及随后易诱疾病的防治具有重大意义。

雌激素的生理作用非常广泛,其主要的生理功能有促进卵细胞的生成和发育,维持卵巢和女性性器官的发育和功能。雌激素需和靶组织、靶器官上的雌激素受体结合后,才能发挥相应的效应。子宫中雌激素受体 ER α 含量较丰富,是雌激素效应较明显的器官之一^[2]。研究表明,ERKO(ER α 基因敲除)鼠的主要发育缺陷是幼稚型的乳腺和子宫,无生育能力和缺乏性行为^[3],说明 ER α 对子宫的发育和功能有较大的影响。HSP-70是热休克蛋白中最保守、含量最丰富的一类,广泛分布于正常女性的子宫内膜功能层、基底层及子宫肌层,与性激素和性激素受体的调节密切相关^[4]。研究表明,HSP-70参与子宫内膜的增生及分泌过程,对腺上皮细胞的损伤有保护作用^[5]。HSP-70虽不直接与性激素受体结合,但能与 HSP-90及其他伴侣蛋白形成复合物,影响性激素受体(雌激素受体、孕激素受体等)的功能活动,从而影响性激素的转录活性及效应发挥,在子宫内膜生长及激素对内膜生长的调控中起重要作用^[6]。

本实验观察了雌性大鼠在更年期初期(12月龄)时的子宫 ER α 和 HSP-70的变化以及逆灸和逆针对其

的影响。结果显示,大鼠的子宫 ER α 表达随着月龄的增加而下降,这表示子宫的细胞和组织结合雌激素的能力降低,提示雌激素对子宫功能的促进和保护作用在逐渐减低。而10月龄介入逆灸和逆针的方法后,可使12月龄大鼠子宫 ER α 的表达水平明显提高,提示逆灸和逆针能够增强更年期大鼠子宫结合雌激素的能力,从而在更年期逐渐减少的雌激素发挥更大作用,维持子宫的功能。自然更年期大鼠的子宫 HSP-70表达随着月龄增长而波动升高,提示更年期内分泌剧烈变化,导致子宫处于动荡的应激状态,10月龄介入逆灸和逆针后均能进一步升高12月龄大鼠子宫的 HSP-70水平,提示逆灸和逆针能够增强子宫细胞的抗伤害刺激的能力,进而保护子宫。

总之,在雌性大鼠出现动情周期紊乱的10月龄介入逆时针灸关元穴的方法后,可以有效地调整12月龄自然更年期大鼠子宫的 HSP-70和 ER α 的表达水平,对更年期早期机体稳态的维护有较明显的保护作用。

参考文献

- [1] 施新遵. 现代医学实验动物学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000 330- 332.
- [2] Dobrzycka B, Kinalski M, Piechocka D, et al. The role of estrogens in angiogenesis in the female reproductive system [J]. Endokrynol Pol, 2009, 60(3): 210- 214.
- [3] Hill RA, Boon WC. Estrogens, brain, and behavior: lessons from knockout mouse models [J]. Semin Reprod Med, 2009, 27(3): 218- 228.
- [4] 陆金春, 黄宇烽, 张锡然. 热休克蛋白与女性生殖的研究进展 [J]. 国外医学计划生育分册, 2001, 20(1): 37- 41.
- [5] Vydra N, Winiarski B, Rak-Raszewska A, et al. The expression pattern of the 70-kDa heat shock protein Hsp α 2 in mouse tissues [J]. Histochem Cell Biol, 2009, 132(3): 319- 330.
- [6] 白晓霞, 王文栋. 苯甲酸雌二醇对离体子宫内膜腺上皮细胞中热休克蛋白 70及 90表达的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(11): 747- 751.

(收稿日期: 2009- 09- 24; 修回日期: 2009- 12- 31)

[编辑: 行之]

第四届聚医杰全国中医特效疗法百佳名医暨民间中医论坛通知

北京聚医杰医药科学研究院等单位定于 2010年 10月下旬在北京召开本次会议, 特邀请各级中医药特色医疗名医、优秀民间中医投稿并报名参加会议。

1. 征文范围: 运用中医药和民间疗法治疗各种疑难症、常见病、多发病的特色疗法和经验及民间特技、单方验方等。文稿须打印, 附 100字左右作者简介。入选论文将安排在有关杂志上发表, 并邀请作者参会。2. 会议内容: (1) 邀请有关领导介绍国家对民间中医、民营中医医疗机构的政策, 听取代表意见及建议; (2) 表彰“中医药特色疗法百佳名医”、“百佳特色中医诊所”等; (3) 请名老中医、专家介绍中医药特色疗法及经验; (4) 学术交流。3. 会议颁发: (1) “聚医杰中华百佳名医”“聚医杰百佳中医特色诊所”“优秀民间中医”等证书及奖品; (2) 优秀论文证书; (3) 教育学分证书; (4) 纪念品; (5) 有关书刊及资料; (6) 会议代表合影留念。4. 会议费用: 每位代表须交会务费 750元, 纪念品及资料费 500元, (各项评优均不收评审费) 会期食宿、参观统一安排, 费用自理。5. 参会报名方法: 请在 10月 20日前将交流论文及申报“百佳名医”“百佳中医特色诊所”等材料、个人 2寸彩照 4张、预交的报名费 500元 (抵会费总额) 从邮局寄汇: 北京 100073信箱 77分箱“百佳名医”会务组李莹莹收, 邮编: 100073, 电话: 010- 87013859 13366005273, E-mail 100036- 9@ 163.com 会议详情见: www. zgtsyl.com