

针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血再灌注损伤大鼠钙网蛋白的影响

袁 叶¹ 田岳凤^{1*} 王 军¹ 李雷勇² 张斌仁¹ 王格洪¹

(1. 山西中医学院针灸推拿系, 太原市晋祠路一段 89 号, 030024; 2. 山西医科大学第二医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873240); 山西省自然科学基金资助项目(2010011056-1)

* 通讯作者: tyfsx@163.com, 13835128271

[摘要] **目的** 观察针刺手厥阴经穴在大鼠缺血再灌注损伤过程中对体内钙网蛋白(CRT)含量及蛋白表达的影响及其作用机理。**方法** 50 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注模型组、针刺内关治疗组、针刺郗门治疗组和针刺合谷对照组, 每组 10 只。假手术组只穿线不结扎冠状动脉, 其余各组制备缺血再灌注动物模型, 其中 3 个针刺穴位组分别于针刺 20 min 后结扎冠状动脉左前降支 40 min, 心电图监测, 再次针刺上述穴位 20 min, 松扎, 恢复冠脉灌注。假手术组于穿线后 100 min、模型组和各针刺穴位组于再灌注后 60 min, 腹腔静脉取血并摘取心脏, 观察血清 CRT 含量, 检测心肌组织 CRT 蛋白表达的变化。**结果** 缺血再灌注模型组心肌组织 CRT 表达与假手术组比较有统计学差异($P < 0.05$); 针刺内关治疗组、针刺郗门治疗组血清 CRT 含量明显升高, 心肌组织 CRT 表达呈高表达状态, 与缺血再灌注模型组比较均有统计学差异($P < 0.01$); 针刺合谷对照组与缺血再灌注模型组近似, 两者比较无统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 针刺手厥阴经穴可明显提高体内 CRT 含量, 促进 CRT 表达的上调, 减轻了缺血再灌注造成心肌损伤的程度。

[关键词] 针刺; 心肌缺血; 再灌注损伤; 钙网蛋白; 大鼠; 内关穴; 郗门穴

Effect of Electroacupuncture at Points of the Pericardium Meridian on Calreticulin Content and Expression in Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Rats

YUAN Ye¹, TIAN Yuefeng¹, WANG Jun¹, LI Leiyong², ZHANG Binren¹, WANG Gehong¹

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

ABSTRACT **Objective** To study the effect of electroacupuncture (EA) at points of the Pericardium Meridian of Hand-Jueyin on the calreticulin (CRT) content and expression in myocardial ischemia reperfusion injury rats and explore its mechanism. **Methods** Fifty Wistar rats were randomized into sham-operated group, ischemia reperfusion model group, EA Neiguan (PC⁶) group, EA Ximen (PC⁵) group, and EA Hegu (LI⁴) group, 10 in each. The sham-operated group was operated only with threading but without ligation of coronary artery, and the other groups were all made ischemia reperfusion models. The left descending anterior branch of the coronary artery of the three acupuncture groups were ligated twenty minutes after acupuncture for 40 minutes. Under the observation of electrocardiogram, the above-mentioned points were treated with acupuncture again for twenty minutes, and then the ligation was stopped for reperfusion. One hundred minutes after threading in the sham-operated group and 60 minutes after reperfusion in the model and all acupuncture groups, the abdominal venous blood and myocardial sample were taken for observing CRT content and expression. **Results** In the ischemia reperfusion model group, there was significant difference in the myocardial CRT expression, compared with the sham-operated group ($P < 0.05$). In the EA Neiguan (PC⁶) and EA Ximen (PC⁵) groups, the serum CRT content was significantly increased and myocardial CRT expression was strengthened, compared with the ischemia reperfusion model group ($P < 0.01$). In the EA Hegu (LI⁴) group, the result was similar with that of the ischemia reperfusion model group ($P > 0.05$), without statistical difference. **Conclusion** EA stimulation of points of the Pericardium Meridian can significantly increase the content and expression of CRT, making the myocardial injury caused by ischemia reperfusion reduced.

Key Words electroacupuncture; myocardial ischemia reperfusion injury; calreticulin; rats; Neiguan (PC⁶); Ximen (PC⁵)

近年来研究发现, 钙网蛋白(calreticulin, CRT)在组织细胞氧化应激和缺血缺氧损伤中具有重要作用, CRT 过表达可抑制肾上皮 LLC-PK₁ 细胞内质网 Ca²⁺ 释放, 减轻胞浆钙超载, 增强细胞对 H₂O₂ 诱导氧化应激损伤的抵抗力^[1]。CRT 作为凝集素样分子伴侣, 协助蛋白质正确折叠、维持细胞 Ca²⁺ 稳态、参与调节细胞凋亡, 与多种人类疾病的发生、发展和预后密切相关。目前, CRT 在心血管疾病发生、发展及

防治中的作用已成为人们研究的热点。我们以往研究已证明针刺手厥阴心包经穴对心肌细胞有很好的保护作用^[2],本项研究在已有的工作基础上观察针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清CRT含量及心肌组织CRT蛋白表达的影响,以探讨针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血再灌注损伤发挥作用的机制。

1 材料

1.1 实验动物

Wistar大鼠50只,清洁级,体重250~300g,雌雄各半,由山西医科大学动物中心提供,动物许可证号:SCXK(晋)2009-0001。

1.2 试剂及仪器

大鼠CRT酶联免疫试剂盒(美国R&D公司,北京瑞尔欣德科技有限公司代理);免疫组化SP试剂盒(美国ZYMED公司,北京博奥森生物技术有限公司提供);浓缩型DAB显色剂(Solarbio公司,上海索莱宝生物技术公司提供);一抗(兔抗鼠抗体,英国Abcam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);BI-2000医学图象分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组及动物处理方法

按随机数字表法将50只大鼠分为假手术组、缺血再灌注模型组、针刺内关治疗组、针刺郄门治疗组、针刺合谷对照组,每组10只。动物称重,10%乌拉坦(1mg/kg)行腹腔注射麻醉后,固定在鼠板上,气管切开连接动物呼吸机,术前描记Ⅱ导联心电图。在胸部左侧3~4肋间或心脏搏动较明显处剪开皮肤,钝性分离各层肌肉,露出肋骨。在第3、4根肋骨下用止血钳将肌肉分离开,钳住并剪断第4肋骨,开胸器放入切口处,暴露心脏,打开心包膜,轻提心耳翻转心脏,暴露冠状动脉,在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,穿线处置一硅胶管后,与左前降支一并结扎,以左室前壁发绀并向外膨胀及心电图S-T段抬高为标志。止血钳关闭胸腔,心电图描记。40min后开胸,剪开硅胶管,恢复左前降支灌流,60min后腹腔静脉取血,摘取心脏。

假手术组:冠状动脉左前降支根部穿线后,心电图监测,记录100min内心电图S-T段变化,静脉取

血,摘取心脏。

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40min,松扎,再灌注60min后,静脉取血,摘取心脏。

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型治疗仪疏密波针刺20min,频率30~100Hz,强度1mA左右,以前肢出现与针刺频率相一致的轻微颤动为准,去针刺。心电图监测,结扎左前降支40min,再次针刺内关20min,松扎,再灌注60min后,静脉取血,摘取心脏。

针刺郄门治疗组和针刺合谷对照组分别取相应的穴位进行针刺刺激,方法同针刺内关治疗组。穴位定位参照林文注主编的《实验针灸学》^[3]常用动物穴位定位及拟人比照法。

2.2 标本的采集与保存

实验结束后,腹腔静脉取血5ml,3000r/min低速离心10min,移液枪吸取0.3ml上清,置于Eppendorf离心管中。标本取左心室结扎部位下方的心肌组织,大小10mm×7mm×3mm,生理盐水冲洗,称重,取约100mg放在10%中性甲醛中固定。

2.3 CRT水平测定

应用双抗体夹心酶标免疫分析法测定标本中CRT水平,往包被单抗的微孔中依次加入CRT抗原、生物素化的抗-IgG抗体、HRP标记的链酶亲和素,经过彻底洗涤后用底物TMB显色。TMB在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色(测定在加中止液15min以内进行),颜色的深浅和样品中的CRT呈正相关。用酶标仪在450nm波长下测定吸光度(OD值),以标准物的浓度为横坐标(对数坐标),OD值为纵坐标(普通坐标),在半对数坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

2.4 CRT基因表达检测方法

全部标本10%中性甲醛固定(固定时间不超过24h),常规石蜡包埋制片,切片厚度5μm,石蜡切片行免疫组化染色。步骤如下:石蜡切片至水洗脱蜡,蒸馏水冲洗,PBS冲洗5min,3%H₂O₂孵育10min阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS冲洗3次,每次2min,滴加试剂A(生物素标记过氧化物酶),室温孵育15min,加入一抗(1:100稀释),室温过夜,PBS冲洗3次,每次3min,滴加试剂B(链霉亲和素和酶耦

联物), 37℃ 孵育 20min, PBS 冲洗 3 次, 每次 2min, 滴加试剂 C(蛋白阻断剂), 37℃ 孵育 20min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3min, 3, 3-二氨基联苯胺(DAB) 显色 5min, 苏木素染色, 自来水充分冲洗, 复染, 脱水透明, 树脂胶封片。每张切片取上、下、左、右、中相对固定的 5 个视野, 读取平均灰度值, 灰度值越高, 说明蛋白表达率越低。

2.5 统计学方法

采用 SAS 8.2 统计软件进行分析。计量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行比较。

3 结果

3.1 各组大鼠血清 CRT 含量变化

表 1 示, 假手术组与缺血再灌注模型组血清 CRT 含量比较无统计学差异($P > 0.05$); 针刺内关治疗组、针刺郄门治疗组与假手术组、缺血再灌注模型组比较均有统计学差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 针刺合谷对照组与其他各组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 针刺内关治疗组与针刺郄门治疗组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示针刺内关、郄门穴可明显提高血清 CRT 含量, 从而减轻心肌缺血再灌注损伤。

表 1 各组大鼠血清 CRT 含量比较($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CRT 含量
假手术组	10	161.789±25.164
缺血再灌注模型组	10	172.696±14.979
针刺内关治疗组	10	195.617±16.270*△
针刺郄门治疗组	10	200.651±22.109*△
针刺合谷对照组	10	170.550±24.914

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与缺血再灌注模型组比较, △ $P < 0.05$

3.2 各组大鼠心肌组织 CRT 蛋白表达的变化

在染色过程中, 个别标本有脱落现象, 每组按 8 只大鼠进行统计。图 1 及表 2 示, 心肌细胞中 CRT 的表达呈棕黄(褐) 色。假手术组黄褐色的表达几乎看

不到, 说明在正常情况下, CRT 呈低表达状态。缺血再灌注模型组出现明显的黄褐色表达, 灰度值降低, 阳性表达率明显增高, 与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。针刺内关治疗组、针刺郄门治疗组黄褐色的表达数量显著增多, 颜色明显加重, 灰度值降低, 说明此时心肌组织 CRT 呈高表达状态, 与假手术组及缺血再灌注模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。针刺合谷对照组的表达与模型组的表达近似, 两组比较其灰度值无统计学差异($P > 0.05$)。大鼠心肌组织 CRT 灰度值越低, 说明其蛋白表达率越高, 从结果中可以看出针刺内关、郄门穴后, 大鼠心肌组织 CRT 呈高表达状态, 针刺合谷穴未见到高表达, 说明了腧穴对靶器官的特异性作用。

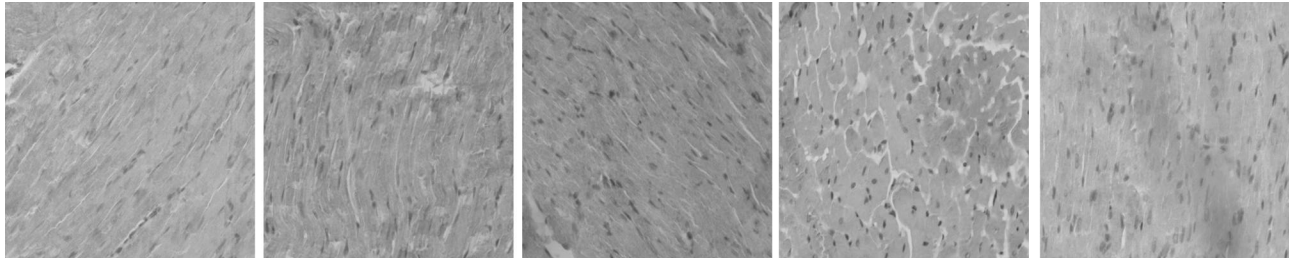
表 2 各组大鼠心肌组织 CRT 灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CRT 灰度值
假手术组	8	193.962±10.262
缺血再灌注模型组	8	184.887±8.3239*
针刺内关治疗组	8	169.366±5.728**△
针刺郄门治疗组	8	164.113±10.196**△
针刺合谷对照组	8	182.400±3.908*

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与缺血再灌注模型组比较, △ $P < 0.01$

4 讨论

CRT 属于 KDEL(作为内质网滞留信号的四肽序列) 蛋白家族, 存在于高等生物除红细胞以外所有细胞中。CRT 作为分子伴侣, 参与 Ca^{2+} 稳态、细胞黏附、抗原递呈、类固醇敏感性基因表达调节、细胞凋亡和自身免疫反应等^[1]。钙是细胞内重要的第二信使, 内质网是重要的细胞内代谢相关 Ca^{2+} 调节器, 内质网腔 Ca^{2+} 浓度约 400 μmol , 是主要的“ Ca^{2+} 存储器”。内质网 CRT 有两个 Ca^{2+} 结合位点: 一个在 P 区, 高亲和力、低容量; 一个在 C 区, 低亲和力、高容量。CRT 通过 C 结构域 Ca^{2+} 呈高容量性结合, 增加内质网 Ca^{2+} 的储存能力, CRT 是细胞“ Ca^{2+} 缓冲剂”^[5]。目前 CRT 在缺血、缺氧等细胞损伤中的作用



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 针刺合谷对照组

图 1 各组大鼠心肌组织 CRT 阳性表达比较(免疫组化, ×40)

存在争议,有研究证明CRT的高表达可保护细胞,减轻氧化应激或一氧化氮诱导的细胞凋亡^[6]。但也有报道CRT过表达增加H^{9c2}成心肌细胞对养护应激的敏感性,加重细胞损伤^[7]。研究显示,缺氧预处理24h后心肌细胞内CRT表达增加,提示CRT可能通过维持细胞内Ca²⁺稳态参与预处理的心肌细胞保护作用^[8]。

酶联免疫吸附实验用酶标记物作为指示物,以抗原-抗体的特异性结合反应为基础,在酶标记物同抗原-抗体结合后,通过酶的催化放大作用,使得酶联免疫吸附试验既保持抗原抗体反应的特异性,又体现酶催化放大的敏感性,应用双抗体夹心法测定标本中大鼠CRT水平。通过免疫组化法来检测大鼠心肌组织中的CRT表达量,是利用其高度特异性、高敏感性和能对抗原进行精确定位的独特优势,揭示针刺不同经穴对心肌组织中的CRT表达量的影响。

本项研究表明,缺血再灌注模型组血清CRT含量虽有升高,但与假手术组比较无统计学意义,在CRT蛋白基因表达中,表达量增加,出现了差异,显示缺血再灌注损伤增强了CRT的敏感性。针刺内关、郄门后,血清CRT含量明显升高,蛋白基因过量表达,与假手术组、缺血再灌注模型组比较均有统计学差异。我们以往的研究发现,针刺手厥阴心包经内关、郄门穴可减轻细胞内钙超载^[2],本次研究结果与国内外CRT的高表达可保护心肌细胞的报道相一致^[6],说明CRT的丰富表达对心肌细胞钙离子的调

节具有重要的意义,而CRT参与细胞保护作用的相关机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1]Fu HM, Liu CZ, Flutter B, et al. Calreticulin maintains the low threshold of peptide required for efficient antigen presentation [J]. Mol immunol, 2009, 46 (16): 3198-3206.
- [2]田岳凤,王荣,李雷勇,等.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[J].中医杂志, 2007, 48(8): 713-715.
- [3]林文注,王佩,刘元亮,等.实验针灸学[M].上海:上海科学技术出版社,1994:215.
- [4]汤晓燕.钙网蛋白的生物学功能及其与自身免疫疾病的关系[J].国外医学免疫学分册,2005, 28(4): 230-233.
- [5]秦联萍,高俊虹,付卫星,等.针刺预处理改善缺血性心律失常的机制——抑制心肌细胞内钙振荡的发生[J].针刺研究,2008, 33(2): 75-79.
- [6]Hung CC, Ichimura T, Stevens JL, et al. Protection of renal epithelial cells against oxidative injury by endoplasmic reticulum stress preconditioning is mediated by ERK1/2 activation [J]. J Biol Chem, 2003, 278(31): 29317-29326.
- [7]Ihara YS, Urata YS, Goto SJ, et al. Role of calreticulin in the sensitivity of myocardial H^{9c2} cells to oxidative stress caused by hydrogen peroxide [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(1): 208-221.
- [8]徐菲菲,刘秀华,祝筱梅.低氧预处理通过上调钙网蛋白表达减轻大鼠心肌细胞氧化应激损伤[J].生理学报, 2008, 60(1): 29-37.

(收稿日期:2010-04-20;修回日期:2010-07-12)

[编辑:崔京艳]

(上接第226页)

- [3]金光亮,南睿,郭霞珍.慢性应激肝郁证大鼠模型的建立[J].北京中医药大学学报,2003, 26(2): 18-21.
- [4]张安玲.论调肝治百病[J].山东中医药大学学报,2000, 24(6): 417-419.
- [5]李建军.血管内皮功能障碍及其检测与防治[J].中国动脉硬化杂志,2001, 9(2): 175-178.
- [6]钟海兰,卢新政.血管内皮功能障碍与高血压[J].心血管病学进展,2009, 30(1): 62-65.
- [7]夏城东,殷惠军,陈可冀.他汀类药物改善内皮功能的多效应研究进展[J].心血管病学进展,2008, 29(6): 956-960.
- [8]韩晓春.下丘脑-垂体-肾上腺在慢性应激过程中的调节作用[J].医学综述,2006, 12(2): 73-75.
- [9]Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. Ex-

pression of angiotensin and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability [J]. Circulation, 2000, 101(12): 1372-1378.

- [10]邵枫,林文娟.外周交感神经系统在情绪应激体液免疫调节中的作用[J].中国行为医学科学,2001, 10(5): 401-403.
- [11]侯静,杨军平.心理应激与下丘脑-垂体-肾上腺-免疫轴功能关系的研究进展[J].实用临床医学,2006, 7(11): 202-204.
- [12]温进坤,韩梅.血管平滑肌细胞[M].北京:科学出版社, 2005:191-275.

(收稿日期:2010-05-31;修回日期:2010-09-15)

[编辑:行之]