

电针对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌 ICAM-1 表达的影响*

张红星¹ 黄国付¹ 周利¹ 刘悦平¹

摘要 目的:研究电针对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响。方法:将心电图正常的 36 只家兔随机分为 4 组:假手术组、模型组、电针内关组、电针列缺组。采用结扎左冠状动脉前降支 30min,再灌注 60min,建立心肌缺血再灌注损伤模型。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 ICAM-1 表达的影响。结果:模型组家兔心肌 ICAM-1 表达明显升高,电针内关组心肌 ICAM-1 表达与模型组、电针列缺组比较显著降低($P<0.01$)。结论:电针内关能显著降低缺血再灌注损伤心肌 ICAM-1 表达,从而减轻缺血再灌注后炎性病理损害,达到心肌保护作用。

关键词 电针;内关;心肌缺血再灌注损伤;细胞间黏附分子-1

中图分类号:R49,R246.6,R542 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-09-0793-03

The influence of electroacupuncture on the expression of ICAM-1 of myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits/ZHANG Hongxing, HUANG Guofu, ZHOU Li, et al// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(9): 793—795

Abstract Objective: To study the influence of electroacupuncture (EA) on the expression of ICAM-1 of myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits. **Method:** Totally 36 rabbits with normo-electrocardiogram were divided into four groups: sham operating group, model group, EA at Neiguan points group, EA at Lieque points group. Myocardial ischemia reperfusion injury model was established by ligaturing anterior descending branch of left coronary artery for 30 minutes and reperfusion for 60 minutes in rabbits. Immunohistochemistry test was adopted to detect the expression of ICAM-1. **Result:** The expression of ICAM-1 in model group was significantly higher than sham operating group ($P<0.01$). Compared with model group and EA at Lieque points group, the expression of ICAM-1 in group of EA at Neiguan points was significantly lower. **Conclusion:** EA could significantly reduce the expression of ICAM-1 in ischemia reperfusion injury myocardium and protected cardiac muscle by decreasing the damage of ischemia reperfusion injury myocardium.

Author's address Dept. of Acupuncture and Moxibustion, Wuhan Municipal Hospital Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan, 430022

Key words electroacupuncture; Neiguan point; myocardial ischemia reperfusion injury; intercellular adhesion molecule-1

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加重,即心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)。笔者经过多年的临床经验认为针刺能有效缓解心肌缺血,使用单穴(内关)治疗具有简单、效捷、实用之功。为了明确针刺抗心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制,根据穴位特异性,并结合有关文献报道^[1],本研究选取内关穴,以家兔心肌缺血再灌注模型为研究对象,探讨针刺对心肌缺血再灌注损伤时黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达的影响,以期针刺内关治疗心肌缺血再灌注损伤提供有指导意义和实用价值的客观依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

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

1.2 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 4 组,每组 9 只,若冠状动脉结扎后未完成实验死亡者,或室颤经 2 次以上抢救(心内按摩),无论复

* 基金项目:武汉市科技晨光计划(武科计 2003138 号)

1 武汉市中西医结合医院针灸科,武汉,430022

作者简介:张红星,男,医学博士,副主任医师

收稿日期:2006-11-10

律成功与否均排除出实验组。4 组分别为: 假手术组、模型组、电针内关组、电针列缺组。

1.3 动物造模

参照 Simpson^[2]方法。动物经 20% 乌拉坦(4ml/kg)耳缘静脉注射麻醉, 仰卧固定于兔台上, 铺上消毒孔巾, 从胸骨柄稍下方至胸骨剑突上方约 2cm 处作正中皮肤切口, 沿胸骨左缘分离胸壁肌肉, 并剪断左侧第 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, 在心前壁左侧用穿 0 号丝线的细圆针小心缝穿一线, 并以此为引线使心脏略向右旋, 暴露左心耳及大部分左心室, 再在左心耳下缘仔细寻找冠状动脉前降支, 并于左室壁上、中 1/3 交界处以细圆针穿入血管下方缝一针, 将线的两端穿过直径约 3mm, 长 0.5cm 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, 放松结扎线造成再灌注。以收紧结扎线后, 左室前壁发绀并向外膨胀及心电图 ST 段抬高、T 波高耸为标准, 示模型成功。30min 后开胸取下硅胶管, 恢复左前降支血流, 再灌注 60min。

1.4 处理方法

1.4.1 模型组: 采用上述方法造模、取材。

1.4.2 假手术组: 按照上述方法只穿线不结扎冠状动脉, 90min 后取材。

1.4.3 电针内关组: 手术方法同模型组。在结扎左冠状动脉前降支(LAD)30min 时开始进行针刺, 取穴: 内关(双)。取穴方法参照《实验针灸学》^[3]取前肢腹侧远端两骨间, 距腕关节约 1.2cm 处。针刺后接 G6805-II 型电针治疗仪(上海医疗电子仪器厂), 疏密波、强度 1mA, 以肢体轻轻抖动为度, 留针 60min。

1.4.4 电针列缺组: 手术方法同模型组。在结扎左冠状动脉前降支(LAD)30min 时开始进行针刺, 取穴: 列缺(双)。取穴方法采用拟人比照法, 取内关旁开, 相当于列缺处, 电针参数、留针与取材时间同电针内关组。

1.5 标本提取

实验结束后, 分别处死各组动物, 取结扎线以下损伤心肌组织, 生理盐水冲洗干净血液后, 吸干水分, 立即置于 4% 多聚甲醛液固定。

1.6 指标检测

免疫组化 SABC 法。按武汉博士德生物工程有限公司提供的 ICAM-1 免疫组化染色试剂盒使用说明操作。4 μ m 厚切片常规脱蜡后至水, 蒸馏水新鲜配制 3% H₂O₂ 室温 10min, 蒸馏水洗 2min $\times$ 3 次, 浸入 0.1MPH6.0 的枸橼酸盐缓冲液中, 置微波炉中加

热至沸腾后断电, 间隔 5min, 反复 2 次。冷却后 PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 滴加抗原修复液 10min。蒸馏水洗 2min $\times$ 3 次。滴加山羊血清封闭液, 室温 20min, 吸出山羊血清后滴加兔抗 ICAM-1 基因抗原的抗体, 37 $^{\circ}$ C 温育 60min, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 再滴加生物素化山羊抗兔抗体 IgG, 37 $^{\circ}$ C 温育 20min, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 滴加试剂 SABC, 37 $^{\circ}$ C 温育 20min, PBS 洗 5min $\times$ 4 次, DAB 显色, 室温下显色 25min, 自来水洗 3min, 最后用苏木素轻度复染, 脱水、封片、镜检。

1.7 计算机辅助图像分析

采用同济医科大学千屏影像工程公司 HPIA-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统(OLYMPUS BX-5.0 biological microscope, JVC-TK-C1381 显微摄影仪), 切片在光学显微镜放大 400 倍、光源 2 档的条件下, 显微摄影, 经免疫组化半定量分析系统检测。以面密度为指标。

1.8 统计学分析

所有数据均以均数 $\pm$ 标准误表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计处理, 组间比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

免疫组化 SABC 法染色后, 切片在放大 400 倍光学显微镜下观察: ICAM-1 阳性细胞染色为胞膜和胞浆着色呈棕黄色。心肌组织 ICAM-1 阳性表达(图 1, 见前置彩色插页 8): 模型组与电针列缺组表达较多, 假手术组与电针内关组表达较少, 各组心肌组织 ICAM-1 的表达见表 1。模型组家兔心肌组织 ICAM-1 表达与假手术组比较显著升高($P<0.01$), 电针内关组心肌组织 ICAM-1 表达与模型组、电针列缺组比较显著降低($P<0.01$)。

表 1 各组心肌组织 ICAM-1 表达的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	ICAM-1
假手术组	8	0.0846 $\pm$ 0.0121
模型组	8	0.3350 $\pm$ 0.0272 ^①
电针内关组	8	0.1345 $\pm$ 0.0067 ^{②③}
电针列缺组	8	0.2116 $\pm$ 0.0290

①与假手术组比较: $P<0.01$; ②与模型组比较: $P<0.01$; ③与电针列缺组比较: $P<0.01$

3 讨论

ICAM-1 为相对分子质量 76000—114000 的细胞表面黏附分子, 属免疫球蛋白超基因家族的单链跨膜糖蛋白, 是介导中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMNs)紧密黏附的关键性的黏附分子^[4], 在介导 PMNs 参与的缺血再灌注损伤中起着重要作用^[5-9]。ICAM-1 分布十分广泛, 包括各种上皮细胞、

血管内皮细胞、心肌细胞、成纤维细胞、单核细胞和淋巴细胞等,在血管内皮细胞表达最强^[10]。心肌细胞在正常情况下仅表达极少量 ICAM-1^[11-12],但在某些病理因素刺激下,如心脏遭受致命性损伤、心脏移植排斥反应、心肌缺血再灌注等因素刺激下,心肌细胞膜表面 ICAM-1 可成倍增加^[13-14]。Anthony J 等^[15]的研究表明抗 CD18 和抗 ICAM-1 单抗在心肌缺血再灌注损伤中发挥良好的保护作用。

近年来,核因子 κ B(NF- κ B)被认为是 ICAM-1 诱导活化过程中关键的转录因子^[16-18]。核因子 κ B 能通过识别 ICAM-1 基因启动子的某一特定序列,启动 ICAM-1 的基因转录以及蛋白合成。Jialin 等^[19]的研究表明缺血导致 NF- κ B 因子的激活引起 ICAM-1 的表达,从而引起缺血再灌注损伤。抑制 NF- κ B 的活化对心肌可起保护作用^[20]。

手厥阴心包经与心在生理上紧密相连,《素问·灵兰秘典论》曰:“膻中者,臣使之官,喜乐出焉;”《灵枢·经脉》:“心主手厥阴心包络之脉,起于胸中,出属心包络,下膈,历络三焦……”;《圣济总录·小儿心痛》:“包络者,心之别脉,邪气客之,则厥气上逆。痞而不散,故发为心痛”。由于手厥阴心包经与心在生理上的特异性联系,决定了二者在病理上的相互影响。内关穴为手厥阴心包经络穴,别走手少阳三焦经。通于阴维脉。《针灸甲乙经》:“实则心暴痛,虚则烦心,心惕惕不能动,失智,内关主之;心澹澹而善惊恐,心悲,内关主之。”因此内关穴是治疗心胸疾病的首选穴^[1]

本研究结果显示:模型组家兔心肌组织 ICAM-1 表达与假手术组比较明显升高($P<0.01$),电针内关组心肌组织 ICAM-1 表达与模型组、电针列缺组比较显著降低($P<0.01$)。电针内关能显著降低缺血再灌注损伤心肌 ICAM-1 表达,从而减轻缺血再灌注后炎性病理损害,对心肌有良好的保护作用,且具有穴位的相对特异性。

参考文献

- [1] 张红星,周利,黄国付,等.电针对心肌缺血再灌注损伤家兔心肌细胞凋亡的影响[J].中国康复,2006,21(4):222—224.
- [2] Simpson PJ,Fanlone JC,Mickelson KP,et al.Identification of a time window for therapy to reduce experimental canine myocardial injure:suppression of neutrophil activation during 72 hours of reperfusion[J].Circ Res,1988,63:1070—1079.
- [3] 邓春雷,殷克敬.实验针灸学[M].北京:人民卫生出版社,1998.143.
- [4] 陈莉,杨波,李建军,等.氟伐他汀对缺血再灌注损伤兔心肌细胞间粘附分子的影响[J].微循环学杂志,2005,15(2):18—20.

- [5] Hartman JC,Anderson DC,Wiltse AL,et al.Protection of ischemic/reperfused canine myocardium by CL18/6,a monoclonal antibody to adhesion molecule ICAM-1[J].Cardiovasc Res,1995,30(1):47—54.
- [6] Shyu KG,Chang H,Lin CC,et al.Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke[J].Neurol,1997,244:90—93.
- [7] Ignarro LJ.Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system:a historical overview[J].J Physiol Pharmacol,2002,53:503—514.
- [8] 韩笑,刘建勋,马晓斌,等.双参通冠方对急性心肌缺血再灌注损伤时 TNF- α ,ICAM-1 的影响[J].中国中药杂志,2005,29(11):1073—1075.
- [9] 王文生,王占明,徐世安,等.四氢生物蝶呤的心肌保护作用及对细胞间粘附分子-1 表达的影响[J].中华实验外科杂志,2005,22(2):211—213.
- [10] Bhindi R,Khachigian LM,Lowe HC,et al.DNAzymes targeting the transcription factor Egr-1 reduce myocardial infarct size following ischemia-reperfusion in rats[J].J Thromb Haemost.2006,4(7):1479—1483.
- [11] 贾俊海,陈素仙,张志坚,等.肾脏缺血预处理对心肌缺血再灌注粘附分子表达的影响[J].江苏大学学报(医学版),2005,15(5):384—386.
- [12] 顾建军,孙华.己酮可可碱对内毒素诱导大鼠心肌细胞细胞间粘附分子 1 表达的影响及其机制[J].中国危重病急救医学,2006,18(2):109—112.
- [13] Komtsu S,Panes J,Russell JM,et al.Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo[J].Hypertension,1997,29:683—689.
- [14] Hubbard AK,Rothlein R.Intercellular adhesion molecule1 expression and cell signaling cascades[J].Free Radic Biol Med,2000,28:1379—1386.
- [15] Anthony J,PalazzoH,Steven P,et al.Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18 and ICAM-1 deficient mice[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,1998,275(6):2300—2307.
- [16] Kupatt C,Habazettl H,Goedecke A,et al.Tumor necrosis factor a contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts[J].Circ Res,1999,84:392—400.
- [17] 刘建勋,韩笑,马晓斌,等.双参通冠方对急性心肌缺血再灌注模型核因子- κ B 信号途径及细胞间隙连接通讯的影响[J].中国中西医结合杂志,2005,25(3):228—231.
- [18] 金戈,陈珊,单江,等.大鼠心肌缺血缺氧损伤核转录因子-JB 与细胞间粘附分子-1 的表达[J].毒理学杂志,2005,19(2):120—122.
- [19] Bao JL,Kaori S,Li M,et al. PR-39 and PR-11 Peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated IkB degradation[J].Am J Physiol Hert Circ Physiol,2001,281(6):2612—2618.
- [20] 张良清,徐军发,蔡康荣,等.腺苷预处理对缺血再灌注心肌细胞凋亡及核因子 JB 表达的影响[J].中国危重病急救医学,2004,16:158—160.