

针刺手厥阴心包经穴对缺血/再灌注大鼠心肌离子泵的影响

田岳凤¹, 李雷勇², 王 军¹, 靳聪妮¹, 王 荣¹, 郝重耀¹

(1. 山西中医学院针推系, 山西 太原 030024; 2. 山西医科大学第二医院, 山西 太原 030024)

【摘要】 目的: 观察针刺心包经穴对大鼠心肌缺血/再灌注损伤过程中心肌细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的影响, 探讨其心肌保护作用的机制。方法: 50 只大鼠随机分为 5 组。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电针大鼠内关穴、郄门穴或支沟穴 20 min 后, 结扎冠状动脉左前降支 40 min, 心电图监测, 再电针相应穴位 20 min, 恢复灌注。假手术组于穿线后 100 min, 模型组和各针刺穴位组于再灌注 60 min 摘取心脏, 取心室肌制备心肌细胞膜, 定磷法观察 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的变化。结果: 针刺心包经穴(内关、郄门)组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性均明显升高, 与模型组比较差异均非常显著 (P 均 < 0.01)。结论: 针刺手厥阴心包经穴可提高 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性, 减轻心肌细胞钙超载程度, 有效地保护心肌。

【关键词】 缺血/再灌注损伤, 心肌; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶; 针刺; 手厥阴经穴

中图分类号: R245.9; R256.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)02-0067-03

Effect of acupuncture at acupoints of hand-Jueyin (手厥阴心包经穴) on activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury TIAN Yue-feng¹, LI Lei-yong², WANG Jun¹, JIN Cong-ni¹, WANG Rong¹, HAO Chong-yao¹. 1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, Shanxi, China; 2. The Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030024, Shanxi, China

【Abstract】 Objective: To study the effects of acupuncture at the acupoints of hand-Jueyin (手厥阴心包经穴) on the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ during the process of ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats and investigate its mechanism. **Methods:** Fifty rats were randomly divided into five groups with 10 rats in each group. In the sham-operated group, a thread was passed through the artery, but I/R model was not established. The other groups were replicated I/R model, in which the three acupuncture groups were given acupuncture at the acupoints of Neiguan (内关穴), Ximen (郄门穴) or Zhigou (支沟穴) respectively for 20 minutes, followed by ligation of the left anterior descending branch of the coronary artery for 40 minutes with electrocardiogram monitoring, afterwards, the acupoints were acupunctured again for 20 minutes, and then reperfusion was performed for 60 minutes. The myocardial tissue samples (below the ligation site) of the left cardiac ventricle were processed into cell membranes, and the two kinds of ATPase were examined by the method of fixing phosphorus. **Results:** In the acupuncture groups, the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ were increased obviously compared with that of the model group (all $P < 0.01$). **Conclusion:** Acupuncture at the acupoints of hand-Jueyin can obviously improve the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$. Thus, it may reduce the degree of intracellular calcium overload, and protect myocardial performance.

【Key words】 myocardial ischemia/reperfusion injury; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$; acupuncture; acupoints of hand-Jueyin

心肌缺血/再灌注时, 细胞内 Ca^{2+} 急剧增强, 原

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371803); 山西省自然科学基金资助项目(20041123)

作者简介: 田岳凤(1963-), 女(汉族), 山西五台人, 医学博士后, 教授, 主要从事经脉-脏腑相关规律的研究, 主持国家自然科学基金等多项课题, 发表学术论文 30 余篇。

因之一是与 Ca^{2+} 转运密切相关的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性发生了明显的变化。本研究中观察了缺血/再灌注损伤大鼠心肌细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的变化, 以及针刺手厥阴经穴对酶活性的干预作用, 探讨针刺手厥阴经穴对心肌的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 雄性清洁级 Wistar 大鼠 50 只, 体重 250~280 g, 由山西省中医药研究院动物中心提供。按随机数字表法分为假手术组、模型组、针刺内关治疗组、针刺郄门治疗组和针刺支沟对照组 5 组, 每组 10 只。

1.2 缺血/再灌注模型制备: 动物以质量分数为 10% 的乌拉坦 1 mg/kg 腹腔注射麻醉, 接动物人工呼吸机, 于第 3、4 肋间隙处开胸, 暴露心脏, 冠状动脉(冠脉)左前降支根部用无创性小圆针穿 0-0 医用缝合线, 穿线处置一硅胶管, 心电图监测结扎左前降支, 以左室前壁发绀、向外膨胀及心电图 ST 段抬高为心肌缺血标志。关闭胸腔, 40 min 后开胸, 剪开硅胶管, 恢复左前降支血流。60 min 后取心脏, 取心肌制备心肌细胞膜, 定磷法观察 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的变化。

假手术组只行冠脉左前降支根部穿线而不结扎。模型组按上法制备缺血/再灌注动物模型。针刺内关穴、郄门穴和支沟穴组在冠脉左前降支根部穿线后, 监测心电图; 关闭心电图机, 取双侧内关穴、郄门穴或支沟穴, 用 G6805-1 型治疗仪疏密波电针 20 min, 频率 30~100 Hz, 强度 20~30 V, 以前肢出现与电针频率一致的轻微颤动为准; 去电针, 监测心电图, 结扎左前降支 40 min, 电针相应穴位 20 min, 行再灌注。各穴位定位采用拟人比照法。

1.3 心肌细胞膜制备: 假手术组于穿线后 100 min, 其余各组于再灌注 60 min 后摘取心脏, 取心肌 0.2 g 液氮冻存。从液氮中将已称重的冻存心肌取出, 加入 9 倍试剂 I [蔗糖 0.1 mol/L, 乙二胺四乙酸(EDTA) 2 mmol/L, 咪唑 1 mmol/L, pH 7.4], 冰浴中剪碎、匀浆, 两层纱布过滤, 制成质量分数为 10% 的匀浆滤液。将滤液以 10 000 r/min 离心 20 min。沉淀物中加入 5 ml 试剂 I, 洗 2 次, 每次均以 10 000 r/min 离心 20 min。在沉淀物中加入 10 ml 试剂 II [尿素 1.3 mol/L, 咪唑 12 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.6 mmol/L, pH 7.4], 混匀后 0 °C 放置 48 h。将沉淀物混悬液以 10 000 r/min 离心 20 min, 用试剂 III (咪唑 25 mmol/L, 组氨酸 125 mmol/L, EDTA 13 $\mu\text{mol/L}$, pH 6.8) 洗 2 次, 沉淀物即为心肌细胞膜。将其悬于 10 ml 试剂 IV (咪唑 25 mmol/L, 组氨酸 50 mmol/L, EDTA 0.3 $\mu\text{mol/L}$, pH 6.8) 中, 置于 0 °C 下保存, 48 h 内测定 ATP 酶活性。

1.4 ATP 酶检测方法: 用定磷法进行检测。ATP

酶可将 ATP 分解成 ADP 和无机磷, 测定无机磷的量可判断 ATP 酶活性的高低。心肌组织中 ATP 酶的计算以每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷(Pi) 的量为 1 个 ATP 酶活性单位, 即 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。用考马斯亮蓝法测定组织匀浆蛋白, 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.5 统计学方法: 采用 SAS 8.0 统计软件处理数据。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 进行方差分析及组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示: 模型组的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性均明显降低(P 均 < 0.01)。针刺内关穴、郄门穴治疗组的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶以及 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性均较模型组显著增高(P 均 < 0.01); 组间比较差异无显著性($P > 0.05$); 针刺支沟穴对照组与针刺内关穴、郄门穴治疗组间比较差异均非常显著(P 均 < 0.01)。提示针刺手厥阴经穴可改变心肌细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶的活性, 减轻心肌细胞钙超载程度, 有效保护心肌。

表 1 各组大鼠心肌组织 ATP 酶的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of ATPase of myocardium in rats of each group($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

| 组别 | 动物数(只) | $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 | $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶 |
|----------|--------|---|--|
| 假手术组 | 10 | 5.061±1.215* # | 3.605±0.573* # |
| 模型组 | 10 | 2.290±0.402 | 1.802±0.440 |
| 针刺内关治疗组 | 10 | 4.946±0.792* # | 3.678±0.842* # |
| 针刺郄门治疗组 | 10 | 4.342±1.014* # | 3.462±0.746* # |
| 针刺支沟穴对照组 | 10 | 2.556±0.417 | 2.081±0.345 |
| F 值 | | 25.29 | 21.57 |
| P 值 | | <0.01 | <0.01 |

注: 与模型组比较: * $P < 0.01$; 与针刺支沟穴对照组比较: # $P < 0.01$

3 讨论

在细胞逆浓度梯度运输物质的功能中, 细胞膜能利用代谢驱动物质进行逆浓度梯度的主动运输。细胞膜上的 ATP 酶被称为离子泵, 在有 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 存在时, ATP 水解成 ADP 和焦磷酸, 同时, Na^+ 和 K^+ 以逆浓度方向进行穿膜运输。酶的活性与泵的活动成正比, 当 Na^+ 、 K^+ 浓度改变时, 会对酶的活性和离子传送速度有平行的影响。

ATP 酶在质膜上有很多种, 且作用专一, 不同的 ATP 酶运送不同的离子, 运送 Na^+ 、 K^+ 的称为 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶(钠泵), 它是嵌在质膜类脂双层中的蛋白质, 具有载体和酶的活性。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$

酶必须有 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 存在时才能被激活,催化 ATP 水解,提供能量驱动 Na^+ 和 K^+ 的对向运输。细胞内约有 1/3 ATP 用来供钠泵活动,以维持细胞内外的离子浓度。为维持细胞低 Ca^{2+} 浓度,质膜上有 2 个 Ca^{2+} 转移系统将 Ca^{2+} 排至胞外,即高亲和力、低容量的 Ca^{2+} -ATP 酶(钙泵)与低亲和力、高容量的 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器。钙泵分解 1 个 ATP 分子可将 1~2 个 Ca^{2+} 跨膜转移到胞外,同时以 1:2 比例将 H^+ 转移到胞内,钙泵转移 Ca^{2+} 水解 ATP 酶时需要 Mg^{2+} 存在,称 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶,它是一种 Ca^{2+} 依赖性高亲和力 ATP 酶。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器在心肌细胞膜上特别活跃,它对 Ca^{2+} 亲和力低,但转运能力高,在维持 Ca^{2+} 浓度中起主导作用。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器利用 Na^+ 的电化学梯度从胞内排出 Ca^{2+} ,而 Na^+ 的电化学梯度由 ATP 驱动的 Na^+ - K^+ -ATP 酶产生。 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶对 Ca^{2+} 稳态起重要作用^[1,2]。

心肌发生缺血/再灌注时能量代谢出现障碍, Na^+ - K^+ -ATP 酶活性降低,细胞水肿, Na^+ 异常增加, Na^+ - H^+ 交换增强, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性下降,大量 Ca^{2+} 从胞外流入胞内^[3,4]。由于钙泵活性降低,静息电位下降,细胞膜上电压依赖性 Ca^{2+} 通道易于激活,继发胞浆内 Ca^{2+} 浓度上升^[5,6]。心肌细胞膜上的 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶直接参与了心肌舒缩过程的调控,ATP 酶功能下降导致细胞内 Ca^{2+} 浓度增高,发生钙超载,钙超载是心肌缺血/再灌注损伤发生的主要原因之一^[7,8]。

我们前期的研究证明,针刺手厥阴心包经穴对心肌细胞的保护作用已得到证实^[9];同时也显示针刺对心肌缺血/再灌注损伤所致钙超载有明显的抑制作用^[10]。本研究结果显示:缺血/再灌注模型组 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性明

显降低;针刺内关或郄门穴治疗组 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性均明显提高,而两组间差异却无显著性;针刺支沟穴不能提高两个酶的活性,与另两个针刺穴位治疗组比较差异均有显著性。提示针刺手厥阴心包经穴可以改变心肌细胞膜 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性,抑制心肌缺血/再灌注过程中细胞内的钙超载。由此也充分证明针刺手厥阴心包经穴可有效保护心肌,减轻缺血/再灌注所引起的损伤。

参考文献:

- [1] 杨括华,胡以平. 医学细胞生物学[M]. 第 4 版. 北京:科学出版社,2002:78-88.
- [2] 冯力,邱健,马骏,等. 缺血/再灌注不同时间点给予尼可地尔对犬心肌梗死范围的影响[J]. 中国危重病急救医学,2005,17:157-160.
- [3] Chen W J, Lin S Y, Huang H C, et al. Ischemia-induced alternation of myocardial Na^+ - K^+ -ATPase activity and ouabain binding sites in hypercholesterolemic rabbits [J]. Atherosclerosis, 1996,127:59-64.
- [4] 李鹏,沈宝藩,何立人. 心痛宁加味方对实验性急性心肌梗死大鼠血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志,2005,12:177-180.
- [5] David M. Active Na^+ and Ca^{2+} transport, Na^+ and Ca^{2+} content in hypertensive rat [J]. Cardiovasc Pharmacol, 1986,8:130-132.
- [6] 李笑萍,喻培先,赵冬. 珍珠钙对衰老小鼠 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶及 Na^+ - K^+ -ATP 酶的影响[J]. 中药药理与临床,2002,18:33-34.
- [7] 丁康,王凤芝,梁安国. 心脏病患者红细胞钙泵、钠泵及离子转运与功能的关系[J]. 中华心血管病杂志,1998,26:462-464.
- [8] 张海港,李晓辉. 三七总皂苷对烫伤大鼠心肌细胞及红细胞 ATP 酶活性的影响[J]. 中国急救医学,2001,21:574-576.
- [9] 田岳凤,吴富东,乔海法,等. 针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血/再灌注损伤肌钙蛋白 T 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2003,10:3-5.
- [10] 田岳凤,吴富东,乔海法,等. 针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血/再灌注损伤心肌细胞钙超载的影响[J]. 针刺研究,2005,30:161-163.

(收稿日期:2005-10-27)

(本文编辑:郭方)

· 消息 ·

第 11 次全国中西医结合危重病急救医学学术会议征文通知

中国中西医结合学会急救医学专业委员会拟于 2006 年 10 月在海南省海口市召开第 11 次全国中西医结合危重病急救医学学术会议。主要内容:①国内脓毒症基础研究、临床诊断及治疗研究成果;②介绍脓毒症国际、国内研究的新进展;③讨论、交流脓毒症中西医结合治疗临床成果;④交流、推广急救医学领域的各项成果;⑤介绍国际和国内危重病、急救医学的研究动态、进展和成果。

征文内容: 西医、中医、中西医结合内科、外科、儿科、妇科、神经内科、麻醉科、急诊科、ICU、医学检验、医学影像、窥镜、创伤、烧伤、微创治疗及护理等专业的基础和临床研究论文;感染、非感染性全身炎症反应综合征(SIRS)并发脓毒症、多器官功能障碍综合征(MODS)、临床监测新技术、急救用药、急诊、ICU 质量控制标准、急救医学管理和危重病急救医学领域循证医学方面的论文。

征文要求: 全文 3 000 字以内(附 500 字摘要,包括目的、方法、结果、结论)。尽量以电子信件方式发出,并于发出后 72 h 内确认是否收到。也可邮寄全文及摘要各 1 份。征文截止时间:2006 年 5 月 31 日(以邮戳为准)。邮寄地址:天津市和平区睦南道 122 号,天津市天和医院急救中心;联系人:乔佑杰,夏欣华;邮政编码:300050。Email:youjieq@yahoo.com。联系电话:(022)23042084,23042098,13207663933;传真:(022)23114748。

(中国中西医结合学会)