

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00191

电针刺激大鼠足三里穴对肝缺血再灌注损伤的保护作用

李叶晟^{1△}, 徐峰^{1△}, 李洪海², 吕欣³, 杨甲梅^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院特需治疗科, 上海 200438

2. 上海市肿瘤研究所, 上海 200240

3. 上海市肺科医院麻醉科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨电针刺激大鼠足三里穴对肝缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制。**方法** 40只雄性SD大鼠被随机分为假手术(A)组、肝缺血再灌注(B)组、非经络穴位电针刺激(C)组和足三里穴电针刺激(D)组, 每组10只。B组不予电针刺激; C、D两组于缺血前分别针刺非经络穴位和足三里穴, 强度均为4 mA、2/100 Hz的电刺激, 持续45 min。B、C、D组以3 cm血管阻断夹阻断左横叶及中叶的入肝血流, 保留右叶及尾叶血供, 造成70%的肝组织缺血, 90 min后恢复血供, 再灌注后8 h从下腔静脉抽血, 采用全自动生化分析仪测定血清丙氨酸转氨酶(ALT); 同时处死大鼠, 以实时定量PCR法检测肝组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10)等细胞因子mRNA的表达。**结果** B、C、D组与A组比较, ALT、TNF- α 和IL-10均有显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), D组ALT和TNF- α 升高幅度均显著低于B和C组($P < 0.05$); 而B、C、D组间IL-10差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 电针刺激足三里穴能有效减轻肝脏缺血再灌注损伤, 其作用机制可能与胆碱能抗炎通路有关。

[关键词] 电针; 足三里穴; 肝; 再灌注损伤

[中图分类号] R 575; R 245.97

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)02-0191-04

Electroacupuncture of Zusanli acupuncture point protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats

LI Ye-sheng^{1△}, XU Feng^{1△}, LI Hong-hai², LÜ Xin³, YANG Jia-mei^{1*}

1. Special Treatment Department, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200240, China

3. Department of Anesthesiology, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the protective effects of electroacupuncture of Zusanli acupuncture point on rat hepatic ischemia/reperfusion injury and the possible mechanism. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into 4 groups (each group $n=10$): sham(A), ischemia/reperfusion(B), ischemia/reperfusion + non-electroacupuncture(C), and ischemia/reperfusion + electroacupuncture of Zusanli acupuncture point(D). Animals in C and D groups received electroacupuncture of Zusanli acupuncture point (4 mA, 2/100 Hz) before ischemia for 45 min. Hepatic ischemia/reperfusion injury (70%) was induced by blocking blood inflow of the left transverse lobe and middle lobe for 90 min, then reperfusion was allowed for 8 h; blood samples were obtained from the inferior vena cava for determination of serum ALT. Meanwhile, real-time PCR was used to examine the hepatic expression of TNF- α and IL-10. **Results** B, C, and D groups demonstrated significantly higher levels of serum ALT and hepatic TNF- α and IL-10 compared with A group ($P < 0.05$), and the increase of ALT and TNF- α in D group was significantly lower than those in B and C group ($P < 0.05$). Expression of IL-10 was not significantly different between the 3 groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture of Zusanli acupuncture point can effectively protect against hepatic ischemia/reperfusion injury, which is possibly related to the cholinergic anti-inflammatory pathway.

[Key words] electroacupuncture; point ST36(Zusanli); liver; reperfusion injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2): 191-194]

[收稿日期] 2010-11-29

[接受日期] 2010-12-28

[作者简介] 李叶晟, 硕士生. E-mail: leeyesheng@163.com; 徐峰, 博士. E-mail: victorf2255@hotmail.com

Δ 共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875598, E-mail: JMyang@smmu.edu.cn

肝缺血再灌注损伤是一种严重的临床病征,常见于出血性休克、肝外伤、手术尤其是肝移植,发生的病理生理机制复杂,有诸多因素参与,且相互间形成制约和促进的关系^[1]。在肝缺血开始至再灌注后6 h之间为急性损伤期,主要病理变化为肝巨噬细胞(库普弗细胞)被激活,释放大量的前炎症细胞因子和产生大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[2-3]。再灌注6 h后为亚急性损伤期,主要病理变化为大量炎性细胞浸润、肝巨噬细胞功能受到抑制及肝细胞损伤^[4]。据报道,当炎症因子被中和之后,因肝缺血再灌注引起的肝损伤可显著减轻^[5-6]。因此,如何有效地控制肝缺血再灌注后的炎症反应可能是减轻肝损伤的一项重要措施。

足三里穴属足阳明胃经的合穴,主治消化系统疾病,具有镇痛、提高免疫力、调节膈肌功能和抗炎的功用。研究表明通过电针刺刺激足三里穴可对内毒素所致的全身炎症反应产生较好的治疗作用^[7-8],其作用机制与 Tracey 等已发现的“胆碱能抗炎通路”^[9-10]类似。本研究探讨了大鼠肝缺血再灌注损伤模型电针刺刺激足三里穴减轻肝缺血再灌注损伤的疗效及可能机制,结果令人满意。

1 材料和方法

1.1 动物模型 雄性SD大鼠40只,体质量(200±20)g。根据随机数字表分为假手术(A)组、缺血再灌注(B)组、非经络穴位电针刺刺激治疗(C)组和足三里穴电针刺刺激治疗(D)组,每组10只。腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,正中开腹,仔细分离肝门部。A组不阻断入肝血流。B、C和D组均用3 cm血管阻断夹阻断左横叶及中叶的入肝血流,保留右叶及尾叶血供,仅使70%的肝组织的血供被阻断,以保证术中血压稳定,阻断90 min后解除阻断夹恢

复血供^[11];根据大鼠穴位定位图谱分别定位于大鼠双后肢膝关节内下侧5 mm的非经络穴位(C组)和后肢膝关节外侧腓骨小头下约5 mm的足三里穴(D组),进针深度均为7 mm^[12],并接通电针仪持续电针刺刺激45 min,强度为4 mA,2/100 Hz^[13-14]。

1.2 指标检测和方法 大鼠肝血流再灌注后8 h从下腔静脉抽血5 ml,静置取血清;同时处死大鼠,取肝中叶标本。采用全自动生化分析仪测定血清丙氨酸转氨酶(ALT);肝组织标本行H-E染色;以ABI 7300实时定量PCR仪检测大鼠肝组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-10(IL-10)的mRNA,测得Ct值利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式换算^[15],B、C和D组所得结果均以A组作为基线矫正(A组自我矫正值为1)。

1.3 统计学处理 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS 13.0统计软件,采用ANOVA完全随机方差分析进行多组比较,组间两两比较采用LSD-多重比较,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 肝脏功能指标 ALT升高在各组间比较相差显著($P < 0.01$)。LSD-多重比较结果显示,与A组比较,B组和C组ALT均有显著升高($P < 0.01$),D组ALT也有升高($P = 0.007$);B组和C组两组之间ALT差异无统计学意义($P = 0.151$);而D组ALT升高分别显著低于B组及C组($P < 0.01$)。结果详见表1。

2.2 肝中叶组织病理 A组显示为正常对照肝组织;B和C组可见肝细胞肿胀充血,部分肝细胞破裂,中央静脉周围可见炎细胞浸润;D组可见肝细胞肿胀充血程度较B和C组轻,少量细胞破裂,炎细胞浸润较少(图1)。

表1 各组大鼠血清ALT比较
Tab 1 Serum ALT of rats in each group

Group	$\bar{x} \pm s$	95%CI(Min-Max)	F	P value
A	62.08±12.79	52.93-71.23	36.650	<0.01
B	1 610.91±385.90*△△	1 334.85-1 886.97		
C	1 364.31±612.50*△△	926.16-1 802.46		
D	539.22±201.96**	394.74-683.70		

A: Sham group; B: Ischemia/reperfusion(I/R) group; C: Ischemia/reperfusion+non-electroacupuncture group; D: Ischemia/reperfusion+electroacupuncture of Zusanli acupuncture point group. ** $P < 0.01$ vs group A; △△ $P < 0.01$ vs group D

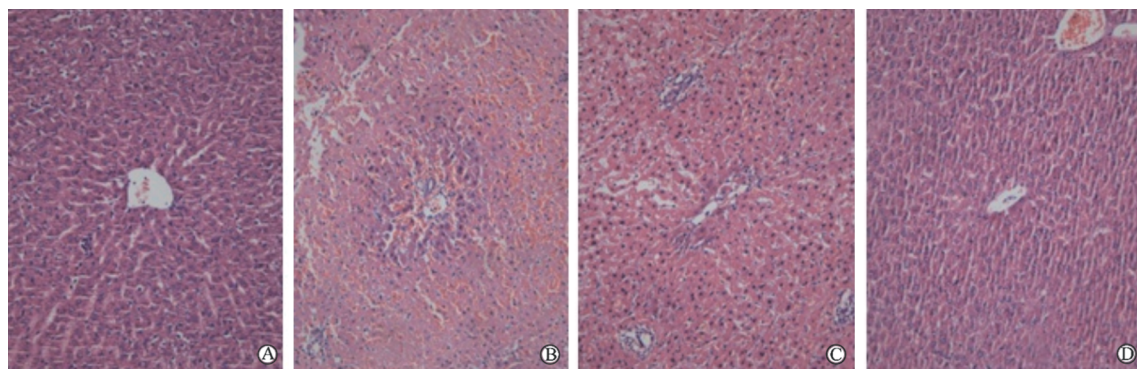


图 1 大鼠肝中叶病理 H-E 染色

Fig 1 The H-E staining of middle hepatic lobe

A: Sham group; B: Ischemia/reperfusion(I/R) group; C: Ischemia/reperfusion + non-electroacupuncture group; D: Ischemia/reperfusion + electroacupuncture of *Zusanli* acupuncture point group. Original magnification; $\times 100$

2.3 TNF- α 及 IL-10 mRNA 的表达 TNF- α 、IL-10 升高在各组间比较相差显著 ($P < 0.01$)。B 组和 C 组 TNF- α 升高, 显著高于 A 组 ($P < 0.01$), C 组与 B 组比较、D 组与 A 组比较 TNF- α 升高无显著差异 (P 值分别为 0.664、0.209)。D 组 TNF- α 升高明显

低于 B 和 C 组 (P 值分别为 0.003 和 0.001)。B、C、D 组 IL-10 显著高于 A 组 (P 值分别为 0.008、0.013、0.001)。但 B 组与 C 组比较、B 组与 D 组比较、C 组与 D 组比较 IL-10 升高均无统计学差异 (P 值分别为 0.848、0.431、0.329)。结果详见表 2。

表 2 大鼠肝组织 TNF- α 及 IL-10 mRNA 的表达Tab 2 Expression of TNF- α and IL-10 mRNA in hepatic tissues of rats

(n=10)

Group	TNF- α				IL-10			
	$\bar{x} \pm s$	95%CI(Min-Max)	F	P value	$\bar{x} \pm s$	95%CI(Min-Max)	F	P value
A	1 \pm 0	1-1	11.827	<0.01	1 \pm 0	1-1	4.915	0.006
B	3.32 \pm 1.11* $\Delta\Delta$	2.53-4.11			2.24 \pm 0.94*	1.57-2.91		
C	3.55 \pm 1.86* $\Delta\Delta$	2.21-4.88			2.16 \pm 1.24*	1.27-3.04		
D	1.66 \pm 0.76	1.11-2.20			2.33 \pm 1.11*	1.91-2.75		

A: Sham group; B: Ischemia/reperfusion(I/R) group; C: Ischemia/reperfusion+non-electroacupuncture group; D: Ischemia/reperfusion + electroacupuncture of *Zusanli* acupuncture point group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group A; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group D

3 讨论

本研究利用大鼠 70% 肝组织缺血再灌注模型^[11]和穴位模型^[12]所设计的探讨电针刺激足三里穴对减轻肝缺血再灌注损伤的治疗作用, 结果发现足三里穴电针刺激组血清 ALT 升高和前炎症因子 TNF- α 升高均显著低于单独肝缺血再灌注组及非经络穴位电针刺激组, 而病理 H-E 染色显示足三里穴电针刺激组的大鼠肝中叶组织损伤程度较单独肝缺血再灌注组及非经络穴位电针刺激组轻。

ALT 作为肝细胞内氨基转移酶, 在肝缺血再灌注损伤引起肝细胞破裂时, 可大量释放入血。本研究中 D 组大鼠 ALT 升高显著低于其他肝缺血再灌注组, 病理 H-E 染色结果均提示电针刺激足三里穴

可有效减轻肝细胞损伤; 而 B 组和 C 组之间 ALT 升高无明显差别, 说明非经络穴位电针刺激对肝损伤无明显保护作用。

炎症因子的大量释放是引起和加重肝缺血再灌注损伤的重要因素^[1-3]。本研究结果提示实验治疗组的 ALT 升高不显著可能与炎症因子 TNF- α 释放减少, 而减轻了肝细胞损害有关。据报道激活迷走神经胆碱能抗炎通路可较好地对抗内毒素引起的全身炎症反应, 电针刺激足三里穴对内毒素引起的全身炎症反应可能也有一定的抑制作用。因此, 电针刺激足三里穴后血清 ALT 升高明显低于其他对照组可能与明显抑制 TNF- α 的 mRNA 表达, 进一步影响 TNF- α 的蛋白合成有关。

本研究中 A 组 IL-10 的 mRNA 显著低于 B、C

和D组,而3组间IL-10升高无明显差异,提示该保护作用可能并非通过激活抗炎因子介导,本研究结果与其他学者报道一致^[7-8]。研究发现乙酰胆碱(ACh)可以抑制受内毒素感染的体外培养的巨噬细胞释放TNF- α 和IL-6等前炎症因子;而直接刺激迷走神经也在载体实验上得到同样的结果,阻断迷走神经后,该作用会减弱或消失^[16]。因此,将其命名为“胆碱能抗炎通路”。但直接刺激迷走神经操作复杂,危险性大。随后研究发现,经皮电针刺刺激足三里穴也可达到类似直接刺激迷走神经的效果,切断迷走神经后,该作用同样会减弱或消失,由此认为电针刺刺激足三里穴对抗全身炎症反应的主要机制之一可能是通过迷走神经介导激活了胆碱能抗炎通路。

综上所述,本研究发现,电针刺刺激足三里穴可明显减轻肝缺血再灌注损伤,其作用机制可能与胆碱能抗炎通路有关。

[参考文献]

[1] Carden D L, Granger D N. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury[J]. *J Pathol*, 2000, 190:255-266.
 [2] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284:G15-G26.
 [3] Jaeschke H, Smith C W. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury[J]. *J Leukoc Biol*, 1997, 61:647-653.
 [4] Mosher B, Dean R, Harkema J, Remick D, Palma J, Crockett E. Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury[J]. *J Surg Res*, 2001, 99:201-210.
 [5] Colletti L M, Kunkel S L, Walz A, Burdick M D, Kunkel R G, Wilke C A, et al. Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95:134-141.
 [6] Lentsch A B, Yoshidome H, Cheadle W G, Miller F N, Edwards M J. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion in-

jury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells[J]. *Hepatology*, 1998, 27:507-512.
 [7] 胡森,宋琪,王磊,吕艺,周国勇,盛志勇.电针兴奋胆碱能抗炎通路对内毒素引起的细胞因子释放和脏器功能损害作用的研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15:205-208.
 [8] Huang C L, Tsai P S, Wang T Y, Yan L P, Xu H Z, Huang C J. Acupuncture stimulation of ST36(*Zusanli*) attenuates acute renal but not hepatic injury in lipopolysaccharide-stimulated rats[J]. *Anesth Analg*, 2007, 104:646-654.
 [9] Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina G I, Watkins L R, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. *Nature*, 2000, 405:458-462.
 [10] Wang H, Yu M, Ochani M, Amella C A, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation[J]. *Nature*, 2003, 421:384-388.
 [11] Young C S, Palma J M, Mosher B D, Harkema J, Naylor D F, Dean R E. Hepatic ischemia/reperfusion injury in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 double-mutant mice [J]. *Am Surg*, 2001, 67:737-744.
 [12] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:327-328.
 [13] Wang X R, Xiao J, Sun D J. Myocardial protective effects of electroacupuncture and hypothermia on porcine heart after ischemia/reperfusion[J]. *Acupunct Electrother Res*, 2003, 28(3-4):193-200.
 [14] Wang X R, Lin H, Wang Z H. Protective effect of electroacupuncture and *Salviae Miltiorrhizae* on myocardial ischemia/reperfusion in rabbits[J]. *Acupunct Electrother Res*, 2003, 28(3-4):175-182.
 [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25:402-408.
 [16] Crockett E T, Galligan J J, Uhal B D, Harkema J, Roth R, Pandya K. Protection of early phase hepatic ischemia-reperfusion injury by cholinergic agonists[J]. *BMC Clin Pathol*, 2006, 6:3.

[本文编辑] 周燕娟,邓晓群