# 电针对人重组肿瘤坏死因子诱导的气囊炎症模型大鼠环氧合酶基因和蛋白表达的影响

刘 芳[1] 方剑乔[2] 邵晓梅[2] 吴媛媛[3]

**摘要 目的** 探讨电针对人重组肿瘤坏死因子(hr TNF)诱导的环氧合酶(COX)基因和蛋白表达的影响。**方法** SPF 级大鼠背部埋植一个经灭菌的聚四氟乙烯圆柱体建立气囊模型，10 天后将确认无感染合格大鼠 90 只随机分为对照组、TNF 模型组(简称模型组)、TNF 电针组(简称电针组)，每组 30 只，分别注射生理盐水和 hr TNF 造模，电针组即刻电针双侧曲池穴(2Hz, 5mA, 30 min)，分别于造模后 1、5、24 h 抽取囊内液体，采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法及蛋白免疫印迹(Western blot)法检测各组各时间点 COX-2 mRNA 和蛋白表达。**结果** 与对照组比较，模型组、电针组差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$))，注射后 24 h 电针组 COX-2 mRNA 表达明显低于模型组($P<0.05$)，注射后 1 h 电针组 COX-2 蛋白表达明显低于模型组($P<0.01$)。**结论** 电针能有效干预 hr TNF-α 诱导的 COX-2mRNA 和蛋白的表达；电针对 COX-2 的干预可能通过前炎症细胞因子调控途径。

**关键词** 电针；气囊模型；前炎症细胞因子；环氧合酶

**Influence of Electroacupuncture on Human Recombination Tumor Necrosis Factor-α Induced Cycloxygenase Expression In Air Sac Model Rats** LIU Fang, FANG Jian-qiao, SHAO Xiao-mei, et al *Zhejiang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310003)*

**ABSTRACT Objective** To explore the intervention of electro-acupuncture (EA) on cycloxygenase (COX) mRNA and protein expression induced by human recombination tumor necrosis factor-α (hrTNF). **Methods** Air sac model was established by implanted an autoclaved teflon chamber into back of rat (SPF grade). Ten days after modeling, 90 qualified rats, in them inflammation not detected, were randomly divided into three groups, the control group, the TNF model (model) group and the TNF + EA (TE) group, with 30 cases in each. To rats in the control group, 1 mL of saline was injected into the sac, but to those in the model and TE groups, 2 ng/mL hrTNF in a volume of 1 mL was used instead to induce local inflammatory responses. Immediately after then, EA (2 Hz, 5 mA and persistent waves) was applied to bilateral Quchi points (LI11) of rats in the TE group for 30 min. Fluid in the sac was drawn out at various time points (1, 5 and 24 h) after injection to measure the COX-2 mRNA expression by RT-PCR and COX-2 protein expression by Western blot. **Results** Level of COX-2 mRNA expression in the control group was significantly different to that in the other two groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). COX-2 mRNA expression at the 24th hour and COX-2 protein expression at the 1st hour were significantly lower in the TE group than those in the model group ($P<0.05$ and $P<0.01$) respectively. **Conclusion** EA could effectively intervene the mRNA and protein expression of COX-2 induced by hrTNF, which is possibly by way of pro-inflammatory cytokine regulating.

**KEYWORDS** electroacupuncture; air sac model; pro-inflammatory cytokine; cyclooxygenase

在前期的工作中[1-3]，我们研究了电针对急慢性炎症大鼠的治疗作用及对炎症局部白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)的影响，以及电针对急慢性炎症诱导的环氧合酶-2(cycloxygenase-2, COX-2)表达的干预，结合前炎症细胞因子和 COX-2 两者的相关性，推测电针可能通过调控前炎症细胞因子 IL-1β 或 TNF-α 来抑制 COX-2 的表达，从而达到抗炎镇痛的作用。为了进一步探讨假说是否成立，我们建立了人重

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 30371802)

作者单位：1. 浙江省中西医结合医院针灸科(杭州 310003)；2. 浙江中医药大学第三临床医学院；3. 浙江林学院

通讯作者：方剑乔，Tel：0571 - 87238112，E-mail：fangjianqiao@yahoo.com

万方数据

组 TNF-α 诱导的大鼠气囊炎症模型，通过观察电针对人重组 TNF-α 诱导的 COX-2 表达的影响，验证该调控途径的可能性。

## 材料与方法

1　动物　SPF 级（未感染特定微生物和寄生虫）雌性 Wistar 大鼠 90 只，体重（150 ± 20）g，由浙江中医药大学 SPF 动物房提供和饲养。

2　试剂及仪器　人重组细胞因子 TNF-α 由美国 Peprotech 公司提供；抗大鼠 COX-2 多克隆抗体由美国 Cayman 公司提供；抗大鼠 β-actin 多克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供；HRP 标记的二抗由北京中杉金桥进口分装；ECL 显色试剂盒购于以色列 EZ-ECL 公司；LH202H 韩氏穴位神经刺激仪购自北京华卫产业开发公司；PCR 扩增仪购于美国 TECHNE 公司；SmartSpec™plus 紫外分光光度计、半干转印槽、垂直电泳槽及电泳仪均购于美国 BioRAD 公司；GIS-2009 凝胶成像分析系统由上海天能科技有限公司提供。

3　造模及分组给药方法　在无菌条件下大鼠背部皮下埋植 1 个经高压灭菌的聚四氟乙烯空心圆柱体（容积 1.5 mL，管壁密布 100 个供注射抽液用细孔），伤口缝合后观察愈合理想者第 10 日抽取大鼠囊内液体，经白细胞计数确认无感染后，定为合格的实验动物。将 90 只合格大鼠按随机数字表分为 3 组：对照组、TNF 模型组（简称模型组）和 TNF 电针组（简称电针组），每组 30 只。对照组：囊内注射生理盐水 1 mL，不作治疗，但给予电针组大鼠相似的手抓固定 30 min；模型组：囊内注射 2 ng/ mL hrTNF-α 1 mL 后立即给予手抓固定 30 min。电针组：囊内注射 2ng/ mL hrTNF-α 1 mL 后立即将大鼠手抓固定，取双侧曲池穴用 LH202H 韩氏穴位神经刺激仪刺激 30 min（参数为：连续波，频率 2Hz，强度 5mA）。各组分别于注射后的 1、5、24 h 各取 10 只抽取囊内液体约 0.3 mL/只。

4　观察项目及检测方法

4.1　COX-2mRNA 表达的检测　采用逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）法，将不同时间点各组抽取的囊内液 1 500 r/ min，离心 15 min，去上清留细胞沉淀，采用氯仿一步法抽提总 RNA（严格按上海生工试剂盒说明），经紫外分光光度计测量其 260 nm 及 280 nm 吸光度比值在 1.8 ~ 2.0，记录总 RNA 浓度。取总 RNA 2 μg，逆转录为 cDNA 备用于扩增反应（严格按美国 BBI 公司逆转录试剂盒、扩增试剂盒说明）。COX-2 循环参数：95 ℃预变性 3 min。变性 94 ℃ 0.5 min，退火 60 ℃ 0.5 min，延伸 72 ℃ 1 min，27 个循环。最后延伸 10 min，4 ℃保存至电泳。β-actin 循环参数同 COX-2。引物设计（上海生工合成）如下：COX-2 上游（5′-3′）：TTC AAA AGA AGT GCT GGA AAA GGT；COX-2 下游（5′-3′）：GAT CAT CTC TAC CTG AGT GTC TTT；β-actin 上游（5′-3′）：CTA TCG GCA ATG AGC GGT TC；β-actin 下游（5′-3′）：CTT AGG AGT TGG GGG TGG CT。产物分析：将含 10 μL 扩增产物的 1.6% 琼脂糖凝胶在 TBE 缓冲液中电泳。GIS-2009 凝胶成像分析系统（上海天能）采集图片并分析 COX-2 与 β-actin 面积灰度值的比值，作为 COX-2mRNA 的表达量参数。

4.2　COX-2 蛋白表达的检测　采用蛋白免疫印迹（Western blot）法，囊内液低速离心后提取细胞沉淀，依次加入 4 ℃预冷的裂解缓冲液超声粉碎裂解后离心提取总蛋白。于紫外分光光度仪（美国 BioRAD）上测定各样品蛋白质含量（BCA 试剂盒由上海申能博采公司提供）。取 40 μg 蛋白质样品加 2 × 上样缓冲液沸煮变性后，进行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），并转移至硝酸纤维素膜（美国 Gelman Laboratory 公司）上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液（150 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris · HCl，pH 7.4，0.2% Tween - 20）室温封闭 1 h，1 × TBST 洗膜 3 次，每次 15 min，分别加入抗大鼠 COX-2 多克隆抗体（1∶1 000，）和抗大鼠 β-actin 多克隆抗体（1∶500），4 ℃孵育过夜，洗膜 4 次，每次 15 min；加辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗（1∶ 5 000），室温孵育 2 h；洗膜后作 ECL（增强化学发光）显影，X 片（日本 Kodak 公司）曝光显影。以 GIS-2009 凝胶成像分析 COX-2 与 β-actin 面积灰度值的比值，作为 COX-2 蛋白的表达量参数。

5　统计学方法　采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组数据的比较采用单因素方差分析，组间的两两比较用 $q$ 检验。

## 结　果

1　各组不同时间点大鼠囊内液 COX-2mRNA 表达比较（表 1）　注射造模后 1、5、24 h 各组大鼠囊内液 COX-2 mRNA 均有表达。注射造模后 1、5、24 h，模型组与对照组比较，COX-2mRNA 表达差异有统计学意义（$P < 0.01$），注射造模后 1、5 h，电针组与模型组比较，差异无统计学意义（$P > 0.05$）；注射造模后 24 h，电针组明显低于模型组（$P < 0.05$），说明在注射造模后 24 h，电针对 COX-2mRNA 表达有下调作用。

万方数据

**表 1** 各组不同时间点大鼠囊内液 COX-2mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | COX-2mRNA 表达 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 h | 5 h | 24 h |
| 对照 | 10 | 1.29 ±0.17 | 1.35 ±0.11 | 1.41 ±0.62 |
| 模型 | 10 | 1.93 ±0.13** | 1.96 ±0.21** | 3.02 ±0.24** |
| 电针 | 10 | 1.87 ±0.39 | 1.79 ±0.15 | 2.24 ±0.28△ |

注：与对照组同期比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与模型组同期比较，△$P<0.05$；下表同

2 各组不同时间点大鼠囊内液 COX-2 蛋白表达比较(表 2) 注射造模后 1、5、24 h 各组大鼠囊内液 COX-2 蛋白均有表达。注射造模后 1 h，模型组 COX-2蛋白表达明显高于对照组($P<0.05$)，且电针组明显低于模型组($P<0.05$)；注射造模后 5、24 h，模型组、电针组与对照组比较，差异均无统计学意义($P>0.05$)，且电针组与模型组比较，差异亦无统计学意义($P>0.05$)；说明在注射造模后 1 h，电针对 COX-2 蛋白表达有下调作用。

**表 2** 各组不同时间点大鼠囊内液 COX-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | COX-2 蛋白表达 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 h | 5 h | 24 h |
| 对照 | 10 | 1.79 ±0.16 | 1.01 ±0.06 | 0.28 ±0.09 |
| 模型 | 10 | 2.18 ±0.35* | 1.07 ±0.16 | 0.35 ±0.16 |
| 电针 | 10 | 1.71 ±0.14△ | 0.95 ±0.22 | 0.32 ±0.12 |

## 讨 论

本实验在气囊模型的基础上，建立由人重组 IL-1β 和 TNF-α 诱导的在体局限性炎症，主要受 Masami N 等[4]小鼠气囊炎症实验启发，他们将高压灭菌过的聚四氟乙烯埋植于小鼠背部，10 天后注射 1% 酵母多糖 300 μL于囊内，观察氯仿抽提的雷公藤对炎症介质的影响。

前炎症细胞因子 TNF-α 被证实与急慢性炎症疼痛的产生密切相关，并可能与具有促炎症和免役调节作用的多肽类细胞因子 IL-1β 共享一个或者相似的信号转导通路[5]。针灸尤其电针已广泛应用于急慢性炎症疼痛的治疗，但其治疗通过何种机制发挥作用尚不明了，更深层次的机理还在研究之中。我们的前期研究发现[1]，电针对角叉菜胶致炎大鼠足爪炎症组织 TNF-αmRNA 表达有明显下调趋势。同时我们[2,3]观察到电针对影响前列腺素合成的重要限速酶 COX-2 有明显的干预。许多研究证实具有促炎症和免役调节作用的多肽类细胞因子 IL-1 和 TNF-α 在介导炎症的过程中诱导 COX-2 的高表达[6]。结合电针对急慢性炎症的治疗作用及 TNF-α 与 COX-2 的关系，我们设计了前炎症细胞因子调控途径(人重组 TNF-α 诱导的炎症)，观察了电针对其诱导的 COX-2 的基因和蛋白表达的影响。我们为了观察电针除抑制前炎症细胞因子的表达外，是否还能拮抗前炎症细胞因子的生物学效应，即电针的抗炎镇痛是否通过前炎症细胞因子调控途径，建立了 hr TNF-α 诱导的在体局限性气囊炎症模型，观察电针对其诱导的 COX-2 的基因和蛋白表达的影响。

本实验观察到在基因表达方面，注射造模后 1、5、24 h COX-2mRNA 均表达。在造模后 24 h 电针能明显下调两者诱导的 COX-2mRNA 表达($P<0.01$)，在 1、5 h 时则调控不显著。在蛋白表达方面，注射后 1 h 电针对人重组 TNF-α 诱导的 COX-2 蛋白表达有明显的干预，在 5、24 h 时不显著；结果证实：电针可抑制前炎症细胞因子 TNF-α 刺激的单核细胞 COX-2 表达，表明电针不仅可抑制炎症介质诱导的前炎症细胞因子的表达，同时还能拮抗前炎症细胞因子的生物学效应。电针对细胞因子分泌的抑制可能是电针治疗炎症的作用途径之一，它可能是通过下调前炎症细胞因子对 COX-2 表达达到抗炎镇痛的作用。提示电针具有多方面抗炎作用。不过电针治疗炎症的机制十分复杂，本实验只从一个侧面初步证实了部分机制，关于此路径的具体机制及其他具体机制则有待更深入研究。

## 参 考 文 献


[1] 方剑乔，刘芳，邵晓梅，等. 电针对角叉菜胶致炎大鼠的抗炎效应及对白细胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α 的影响[J]. 针刺研究，2007，32(8)：224-228.
Fang JQ, Liu F, Shao XM, et al. Effect of electroacupuncture on carrageenan-induced inflammation, IL-1β and TNF-α concentration and their mRNA expression in toe tissue in rats[J]. Acupunct Res, 2007, 32(8):224-228.

[2] 方剑乔，邵晓梅，梁宜，等. 电针治疗 CIA 大鼠慢性炎症及对 COX-2 的选择性抑制作用[J]. 浙江中医药大学学报，2006，30(2)：169-173.
Fang JQ, Shao XM, Liang Y, et al. Therapeutic effect of electroacupuncture on chronic inflammation in collagen-induced arthritic rats and its selective inhibitory action on COX-2[J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2006, 30(2):169-173.

[3] 方剑乔，刘芳，梁宜，等. 不同时期电针对大鼠急性炎症及 COX-2 表达的影响[J]. 上海针灸杂志，2007，26(5)：42-45.
Fang JQ, Liu F, Liang Y, et al. Anti-inflammatory effect of electroacupuncture at different stages on carrageenan-induced inflammation in rats and its influence on cyclooxygenase-2 expression[J]. Shanghai J Acu-mox, 2007, 26


万方数据

(5):42-45.

[4] Masami N, Fand JQ, Kazuhito A, et al. Effect of tripterygium wilfordii hook f, a Chinese traditional herb, on macrophage function in mice. Ⅱ. Inhibition of inflammatory mediator production *in vivo*[J]. Showa Univ J Med Sci, 1998, 10(2): 179-185.

[5] Fan XM. Interleukin-1 beta induces cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer by the p38 and p 44/42 mitogen-activated protein signling pathways [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16 (10) :1098-1104.

[6] Cai ZY, Yan Y, Chen R, et al. Minocycline reduces astrocytic reactivation and neuroin-flammation in the hippocampus of a vascular cognitive impairment rat model[J]. Neurosci Bull, 2010,26(1):28-36.

(收稿:2009-03-06　修回:2010-01-06)

## 第五届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会在杭州召开

2010 年 5 月 15—16 日,第五届全国中西医结合围手术期医学专题研讨会在杭州隆重召开。本次会议经中国中西医结合学会批准,由中西医结合学会围手术期专业委员会主办,浙江省中医院、杭州市中医院、浙江省中西医结合学会共同承办。

会议汇聚了国内外围手术期研究领域的著名专家学者,来自各地的 120 余名代表参加了此次会议。会议主要围绕快速康复外科主题展开了广泛而深入的学术交流。

国内著名中西医结合外科专家、专业委员会主任委员陈志强教授作了"围手术期研究与快速康复外科的新进展"的专题报告,对快速康复外科新进展、快速康复外科与围手术期处理、围手术期中西医结合研究的新进展进行了回顾和展望,认为目前我国的围手术期中西医结合研究正在进入一个新的阶段,但高质量、高论证强度的临床研究仍缺乏,缺乏多中心、大样本、随机对照等研究资料,难以得到公认及走向世界;有关论文以临床报道较多,基础研究不足,缺乏研究深度;多数未对现有治疗方案或措施进行卫生经济学分析;较多关注近期症状或功能状态的改善,很少涉及远期疗效和生活质量研究。提出必须正确认识围手术期研究的定位与目的,认为深入开展围手术期研究的前提是正确的手术决策和过硬的手术技术(微创方向);中西医结合围手术期研究的核心理念是快速康复;手术越大、病情越复杂、越危重,就更加显示围手术期处理的重要性。围手术期研究的重点应重视共性问题。中西医结合的理论突破是围手术期研究发展的基础。中医药学源远流长,优势在于整体辨证论治思维与传统的诊疗方法,对症与辨证特色明显;但在当代医学以"病"为切入点的新形势下,如何实现病证的有机结合,有待中西医结合理论的新突破。

日本国福井县立病院山本信一郎教授介绍了冠状动脉旁路手术和胸主动脉瘤手术在福井的应用现状,他们通过微创冠脉搭桥术新技术,使冠脉 1 年通畅率达 94.9%,2 年通畅率为 91.7%。提示通过采用深低温和选择性脑血流灌注的全弓置术对降低病死率和脑并发症发生率有良好效果,单变量分析显示急诊手术和过长的体外循环时间是早期死亡的重要决定因素。山本信一郎教授还介绍了福井县立医院质子刀治疗中心和离子线治疗的新进展。

美国俄亥俄大学医学中心外科的 Needleman 教授重点介绍了腔内手术新进展。其中一项经自然腔道内镜手术的研究,主要是评估经胃入路所造成腹腔感染的风险和微生物学分析。

美国俄亥俄大学医学中心麻醉科的夏云教授专题讲座为快通道手术进展。主要内容包括日间手术的选择;改善患者手术转归的可能因素有劳累、睡眠、胃肠功能、恶心、疼痛、恢复正常活动的时间等;早期康复治疗可降低发病率,快通道手术可以减少疲劳和平均住院时间;在快通道手术中需要注意的原则是了解快通道和常规手术的区别,使外科医生、护士、麻醉医生熟悉相应的程序系统,将微创手术和快通道相结合;在组织管理方面,应制定可行的计划,有术前准备的具体内容,制定麻醉和镇痛方案,使手术应激维持在最低程序,调整术后治疗,确定术后复查计划,做好总结,了解患者的满意度,修正和改善已有的方案;最重要的是组织和团队精神,受过专业训练的,有积极性的护理人员,有好的术前教育的患者,负责的外科医生,负责的麻醉医生。

天津市南开医院孔棣教授、中日友好医院刘鹏教授、浙江省中医院裘华森教授、广东省中医院谭志健教授、中山大学任东林教授等分别在大会专题发言,他们分别就心脏手术的最新技术理念、内镜外科的进展、围手术期管理规范、快速康复外科的实践等内容进行学术交流。使与会者耳目一新、获益匪浅。为广大中西医结合临床工作者如何发挥中医药优势、开创中医特色的快速康复外科提供了新思路。

会议期间召开了围手术期专业委员会全体委员会议。会议由中国中西医结合学会穆大伟秘书长、围手术期专业委员主任委员陈志强教授主持。会议对本年度专业委员会工作进行了回顾,包括在总会领导和支持下,学会组织建设工作、学术活动计划、学术内涵建设等方面所取得的进步;再次明确围手术期研究的目的是为了提高临床疗效,促进快速康复;必须瞄准世界医学前沿,发挥中西医结合的特色和优势,推动围手术期医学不断进步。建议各位委员积极推动当地专业委员会建设工作,繁荣本地区在该领域的学术活动。

(张　勤　曹立幸供稿)

(收稿:2010-06-20)

万方数据