

# 电针对大鼠肾缺血再灌注损伤的疗效及对肾组织中 caspase-3 表达的影响

白红梅 张杰 陈璐

(南京中医药大学附属医院, 江苏南京 210029)

**摘要** 目的:探讨电针治疗对肾缺血再灌注大鼠肾功能及组织中 Caspase-3 表达的影响。方法:将 30 只清洁级健康 SD 雄性大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组(IRI 组)和电针组,每组 10 只。采用右肾摘除,左肾肾蒂夹闭缺血 45min 后再灌注的方法制备动物模型。电针组于造模成功后给予电针肾俞和涌泉穴治疗。各组均于术后 24h 采用全自动生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)和肌酐(Scr),观察肾组织病理形态学改变,TUNEL 法检测肾组织细胞凋亡率和免疫组化检测肾组织细胞中 Caspase-3 的表达。结果:肾缺血再灌注后大鼠血清 BUN 和 Scr 明显升高,肾组织切片显示有明显的病理改变,肾组织细胞凋亡率及 Caspase-3 阳性细胞表达显著升高。与缺血再灌注组比较,电针组大鼠 BUN 和 Scr 显著下降,肾组织细胞凋亡率显著降低,Caspase-3 阳性细胞的 IOD 值显著降低。结论:电针对 IRI 所致肾功能损害具有显著的保护作用,能够抑制 Caspase-3 蛋白表达,具有抑制细胞凋亡的作用,该作用可能是电针对 IRI 后肾脏保护作用的重要机制之一。

**关键词** 肾缺血再灌注损伤 电针 细胞凋亡 caspase-3 表达 病理学 实验研究

**中图分类号** R245.97 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)01-0073-02

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是指缺血组织在重新获得血供后,组织细胞损伤未见减轻反而加重的一种病理生理现象。研究表明,IRI 可通过炎症、活性氧、内皮素和细胞凋亡等多种途径导致肾损害,而细胞凋亡是缺血再灌注致肾损伤的重要环节之一。因此,抑制细胞凋亡的发生,对 IRI 的防治具有重要的临床意义。目前认为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)依赖的细胞凋亡途径在 IRI 诱导的肾小管上皮细胞凋亡中发挥主要作用<sup>[1]</sup>。近年有研究表明,电针治疗可下调 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达,进而可抑制细胞凋亡<sup>[2]</sup>。针刺耳穴可以减少血管痴呆大鼠海马齿状回 Caspase-3 表达,减少脑缺血缺氧所致的大鼠海马齿状回颗粒细胞死亡<sup>[3]</sup>。本研究旨在评价电针对缺血再灌注损伤肾脏的保护作用和对 IRI 诱导的肾组织细胞 Caspase-3 活性表达、细胞凋亡等的影响以探讨电针对缺血再灌注损伤肾脏的保护机制及临床应用的可行性。

## 1 材料与方

**1.1 实验分组与模型制作** 将 30 只清洁级健康 SD 雄性大鼠(体重 180~200g,江苏省中医院药理实验室提供)随机分为假手术组、缺血再灌注组(IRI 组)和电针组,每组 10 只。参照文献<sup>[4]</sup>的方法建立肾缺血再灌注损伤模型,方法如下:采用 3.5%水合氯醛 1mL/100g 腹腔麻醉后,腹横切口入腹腔,切除右肾,显露左肾蒂,用无创伤血管夹夹闭左肾蒂 45min,造成肾缺血,然后松开血管夹再灌注。松开血管夹,数分钟内肾脏颜色由缺血时的暗红色逐渐转变为淡红色,表示肾缺血再灌注模型建立成功。IRI 组与电针组大鼠上法造模,假手术组做常规暴露左肾手术,不夹闭左肾蒂,45min 后关腹。

**1.2 电针治疗方法** 参照第 4 版《实验针灸学》大鼠标准穴

位图谱,选取肾俞和涌泉穴,常规消毒后,用直径为 0.22mm,长 13mm 的毫针,刺入 3mm 左右,接通华佗牌 SD-I 型电子针疗仪,留针 30min,采用连续波,频率为 3Hz,强度以大鼠尾巴轻微颤动为度。

## 1.3 检测指标及检测方法

**1.3.1 血清尿素氮(BUN)和肌酐(Scr)** 各组大鼠术后 24h 经下腔静脉取血 2~3mL,检测血清尿素氮(BUN)和肌酐(Scr)。

**1.3.2 肾脏组织病理形态学观察** 取左肾中间部位 0.5cm×1cm 大小,固定,脱水,包埋,5 $\mu$ m 厚度切片,HE 染色,400 倍光镜下观察肾组织病理形态的改变。

**1.3.3 末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)介导的原位末端标记法(TUNEL)测定细胞凋亡率** 肾组织标本常规处理,切片,TUNEL 染色,镜下细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性凋亡细胞。高倍镜下观察,对 8 个连续不重叠的视野中阳性细胞进行计数。细胞凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数/肿瘤细胞总数)×100%。

**1.3.4 免疫组化检测 Caspase-3 的表达** 光学显微镜下观察组织细胞中 Caspase-3 蛋白的表达情况,每张切片随机采集 5 个高倍视野(400 $\times$ ),采用美国 Media Cybernetics 公司专业图片分析软件 Image-Pro Plus,检测 Caspase-3 表达的平均光密度值(IOD),所有视野均在同一光强度下检测。

**1.4 统计学方法** 计量资料用( $\bar{x}\pm s$ )表示,对符合正态分布和方差齐性的资料进行单因素方差分析(SPSS 软件),不符合单因素方差分析的资料进行秩和检验。 $P<0.05$  为差异有显著统计学意义。

## 2 实验结果

**2.1 肾功能指标检测结果** 与假手术组比较,IRI 组和电针组大鼠 BUN 和 Scr 明显升高( $P<0.01$ );与 IRI 组比较,电针

组大鼠 BUN 和肌酐 Scr 显著下降( $P<0.01$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 BUN 和 Scr 含量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数	BUN(mmol/L)	Scr( $\mu$ mol/L)
假手术组	10	11.14 $\pm$ 2.55	36.1 $\pm$ 3.1
IRI 组	10	32.30 $\pm$ 3.62*	109.4 $\pm$ 8.6*
电针组	10	22.18 $\pm$ 3.02**	62.3 $\pm$ 3.1**

注:与假手术组比较,\* $P<0.01$ ;与 IRI 组比较,# $P<0.01$ 。

2.2 肾脏组织病理形态学观察 肾脏组织切片光镜下显示假手术组肾管细胞大致正常;IRI 组大部分肾小管上皮细胞肿胀,出现不同程度的变性与坏死,间质有充血、水肿及炎性细胞浸润;电针组肾小管病变减轻较为明显,仅见部分肾小管上皮细胞轻度肿胀,少量变性与坏死,肾间质无明显改变及炎细胞浸润(见图 1)。

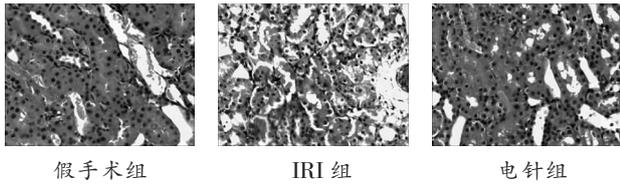


图 1 各组大鼠肾脏组织病理图片( $\times 400$ )

2.3 TUNEL 检测细胞凋亡率结果 TUNEL 阳性细胞表现为细胞核呈黄褐色,细胞质无染色,位于肾小管上皮细胞,肾小球无表达(见图 2)。图像分析后,结果见表 2。缺血再灌注损伤后,与假手术组比较,IRI 组和电针组细胞凋亡率明显升高( $P<0.01$ );与 IRI 组比较,电针组大鼠肾脏组织细胞凋亡率显著降低( $P<0.01$ )。

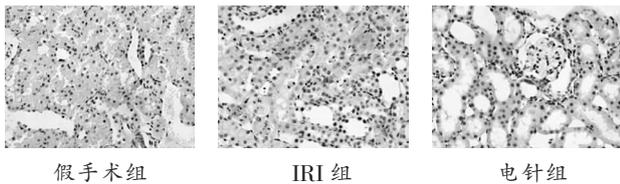


图 2 各组大鼠肾脏组织细胞凋亡情况( $\times 400$ )

2.4 Caspase-3 蛋白表达检测结果 Caspase-3 阳性细胞表现为细胞质呈棕黄色,细胞核无着色,图中细胞核呈深蓝色系苏木素复染的结果(见图 3)。图像分析后,结果见表 2。与假手术组比较,IRI 组和电针组大鼠 Caspase-3 表达 IOD 值显著升高( $P<0.01$ );与 IRI 组比较,电针组大鼠 Caspase-3 表达 IOD 值显著降低( $P<0.01$ )。

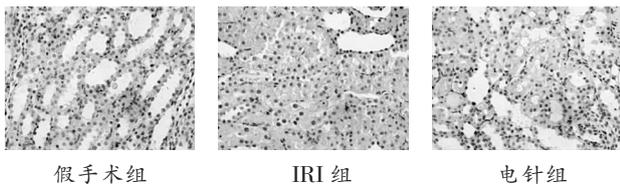


图 3 各组大鼠肾脏组织细胞 Caspase-3 表达图( $\times 400$ )

表 2 各组大鼠肾脏组织细胞凋亡率和 Caspase-3 表达 IOD 值比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数	凋亡率(%)	IOD
假手术组	10	3.98 $\pm$ 1.47	2001 $\pm$ 606
IRI 组	10	51.38 $\pm$ 7.92*	7681 $\pm$ 870*
电针组	10	28.39 $\pm$ 7.80**	3538 $\pm$ 840**

注:与假手术组比较,\* $P<0.01$ ;与 IRI 组比较,# $P<0.01$ 。

### 3 讨论

肾脏为高灌注器官,对缺血及缺血后再灌注均较敏感,因此在肾移植、肾血管手术、体外碎石、休克复苏后很容易发生肾脏缺血再灌注,是缺血性急性肾衰竭(acute renal failure, ARF)的重要损伤环节,也是移植肾功能延迟恢复与慢性移植肾丧失功能的关键因素之一<sup>[5-6]</sup>。缺血如果能够及时纠正,并且能够尽可能避免或减少再灌注性损伤,肾功能可不受影响或很快恢复正常,但当肾脏局部缺血不能在机体自身神经体液等因素的调节下进行有益的平衡时,该缺血和随后的再灌注损伤可导致不正常的信号转导或细胞功能的异常,引发一系列凋亡事件和坏死。细胞凋亡是缺血再灌注组织和器官损伤的重要途径<sup>[7]</sup>,而 Caspase-3 位于细胞凋亡的下游,是各种凋亡通路的必经之路,在细胞凋亡中发挥关键性作用<sup>[8]</sup>。

经络学说研究人体经络系统的循环分布、生理功能、病理变化及其与脏腑相互关系,是中国古代医学家们在长期实践中,经过对“针感”的传导、俞穴疗效的体表病理现象的推测与了解,生理知识总结而启发创立出来的。“肾俞”为肾的背俞穴,为肾气输注于背部的腧穴,具有补益肾气的作用;“涌泉”穴为肾经的井穴,具有益肾、滋阴的作用。二穴在临床上为治疗肾脏及相关疾病的常用穴,具有较好的临床疗效。有研究表明,电针“肾俞”穴可升高肾血流量<sup>[9]</sup>。

本研究采用电针“肾俞”、“涌泉”两穴治疗缺血再灌注致肾损伤大鼠,结果表明经电针组大鼠血清 BUN 和 Scr 显著下降,肾组织细胞凋亡率显著降低,Caspase-3 阳性细胞表达的 IOD 值显著降低,提示电针对 IRI 所致肾功能损害具有显著的保护作用,其深入机制有待进一步探讨。

### 4 参考文献

- [1] Saikumar P, Venkatachalam MA. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. *Semin Nephrol*, 2003, 23(6): 511
- [2] 张志英, 余安胜, 严振国. 电针对脊髓损伤早期 caspase-3 mRNA 及蛋白表达的影响. *解剖学杂志*, 2002, 25(6): 548
- [3] 潘娅, 戴桃李, 杨琼, 等. 针刺耳穴对血管性痴呆大鼠海马 caspase-3 表达的影响. *四川中医*, 2008, 26(8): 17
- [4] 刘秉乾, 武玉东, 马腾骧, 等. 血红素氧和酶-1 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(12): 1531
- [5] Gill N, Nally JV Jr, Fatica RA. Renal failure secondary to acute tubular necrosis: epidemiology, diagnosis, and management. *Chest*, 2005, 128: 2347
- [6] Brian JN, Jeremy RC. Chronic Allograft Nephropathy: Current Concepts and Future Directions. *Transplantation*, 2006, 81: 643
- [7] 张冰, 王禾, 杨晓剑, 等. 缺血预处理对严重缺血/再灌注损伤的大鼠移植肾脏功能恢复的影响. *第四军医大学学报*, 2006, 27(5): 448
- [8] Huang X, Brown C, Ni W, et al. Critical role for the Ets transcription factor ELF-1 in the development of tumor angiogenesis. *Blood*, 2006, 107(8): 3153
- [9] 许能贵, 许冠荪, 朱崇斌. 电针“肾俞”穴对家兔肾血流量的影响. *针刺研究*, 1995, 20(2): 48

第一作者:白红梅(1965-),女,医学学士,主任医师,麻醉学专业。1007gh@163.com

收稿日期:2013-04-08

编辑:吴宁