

· 研究报告 ·

应用¹H NMR代谢组技术研究电针治疗胃溃疡的中枢响应机制

杨宗保^{1,2}, 沈佳成¹, 王亚东¹, 刘彩春¹, 董继扬³, 许晶晶³

(¹厦门大学中医系, 厦门 361005; ²厦门大学深圳研究院, 深圳 518057; ³厦门大学电子科学系, 福建省等离子体与磁共振研究重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 目的: 采用核磁共振氢谱技术(¹H NMR)研究电针胃经穴治疗应激性胃溃疡大鼠大脑皮质、下丘脑、延髓代谢物谱的表达。方法: 40只Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、胃经组和胆经组。利用束缚冷应激法制备应激性胃溃疡模型大鼠, 造模成功后用电针分别刺激胃经组和胆经组相关穴位。收集大鼠大脑皮质、下丘脑、延髓, 获取一维¹H NMR谱, 并利用模式识别方法分析各组间的代谢轮廓差异。结果: 模型组与正常组、胃经组、胆经组大鼠大脑皮质、下丘脑和延髓代谢物谱均有明显区分, 其中正常组与模型组分离最明显, 胃经组最接近正常组, 说明其代谢物谱趋向正常。与模型组比较, 胃经组大鼠大脑皮质乳酸、萘乙酸、甘露醇等表达上升($P<0.05$), 而肌酸、腺苷、肌苷等表达下降($P<0.05$), 下丘脑乳酸、肌醇、谷氨酸酯等表达上升($P<0.05$), γ -氨基丁酸等表达下降($P<0.05$), 延髓乳酸、谷氨酸脂、肌醇、丙氨酸等表达上升($P<0.05$), 而萘乙酸、肌酸等表达下降($P<0.05$)。结论: 电针胃经穴可调节胃溃疡大鼠大脑皮质、下丘脑、延髓的代谢产物表达, 大脑皮质、下丘脑和延髓是电针胃经穴治疗胃溃疡的中枢响应位点。

关键词: 电针; 胃溃疡; 核磁共振; 代谢组; 中枢机制; 胃经

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81473751, No.81260556), 广东省自然科学基金项目(No.2014A030313005), 深圳市科技计划项目(No.JCYJ20160406140612883)

Study on the central response mechanism in gastric ulcer rats treated by electroacupuncture using ¹H NMR metabolomics techniques

YANG Zong-bao^{1,2}, SHEN Jia-cheng¹, WANG Ya-dong¹, LIU Cai-chun¹, DONG Ji-yang³, XU Jing-jing³

(¹Department of Traditional Chinese Medicine, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²Shenzhen Research College, Xiamen University, Shenzhen 518057, China; ³Department of Electronic Science, Xiamen University, Fujian Provincial Key Laboratory of Plasma and Magnetic Resonance, Xiamen 361005, China)

Abstract: Objective: To study the metabolic profiling of the cerebral cortex, hypothalamus and medulla oblongata from irritable gastric ulcer rats treated with electroacupuncture on acupoints of the stomach meridian with ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy. Methods: Forty SD rats are randomly divided into the control group, the model group, the stomach meridian group and the gallbladder meridian group. The irritable gastric ulcer rat model was established by water-immersion and restraint stress method. After modeling, the rats from the stomach meridian group and the gallbladder meridian group were treated with electroacupuncture on the stomach meridian and gallbladder meridian respectively. ¹H NMR spectroscopy was applied to detect the metabolic profiling of the cerebral cortex, hypothalamus and medulla oblongata, then analyzed metabolic contour differences among the groups using pattern recognition method. Results: Obvious distinctions were found between the metabolites spectrum of the cerebral cortex, hypothalamus and medulla oblongata from the model group, the normal group, the stomach meridian group and the gallbladder meridian group. More significant differences were found between the normal group and the model group, while the metabolites spectrum of the stomach meridian group was more distinctly close to that in the normal group, indicating that metabolites spectrum of the stomach meridian group was likely to normal. Compared with the model group, the concentration of lactic acid, acetic acid, mannitol increased while creatine, adenosine and inosine decreased in cerebral cortex of the stomach meridian group ($P<0.05$), the concentration of lactic acid, glutamic acid, inositol and alanine increased while gamma aminobutyric acid decreased in hypothalamus of the stomach meridian group ($P<0.05$), the concentration of lactate, glutamate, myo-Inositol, alanine increased

($P<0.05$) and naphthylacetic acid and creatine decreased in medulla oblongata of the stomach meridian group ($P<0.05$). Conclusion: Electroacupuncture on acupoints of the stomach meridian could regulate specific metabolites in the cerebral cortex, hypothalamus and medulla oblongata, indicating that the cerebral cortex, hypothalamus and medulla oblongata as the central response site in the treatment of gastric ulcer by electroacupuncture on acupoints of the stomach meridian.

Key words: Electroacupuncture; Gastric ulcer; Nuclear magnetic resonance; Metabolome; Central mechanism; Stomach meridian

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81473751, No.81260556), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.2014A030313005), Science and Technology Program of Shenzhen (No.JCYJ20160406140612883)

胃溃疡是多种原因引起的胃黏膜炎性反应、糜烂、溃疡和出血等^[1]。诸多临床和实验研究证明针灸胃经穴对胃溃疡有很好的防治作用,能够激活胃黏膜保护因子,促进胃溃疡愈合^[2-3]。代谢组学是对某一生物所有代谢产物进行定性和定量分析的新学科,是系统生物学的研究方法^[4]。采用代谢组学方法来研究针灸作用机制,对针灸研究具有重要的探索意义。本研究采用¹H NMR技术研究胃溃疡大鼠脑组织代谢物谱的表达,探讨电针促进胃溃疡修复的代谢调节机制。

材料与方法

1. 动物 清洁级雄性Wistar大鼠40只,8周龄,体重(150±20)g。购自于厦门大学实验动物中心,许可证号:SCXK(闽)2008-0001,于厦门大学中医实验室中饲养。动物于实验前适应环境1周,控制室温20-22℃,相对湿度65%-70%,自然光暗周期,在厦门大学动物实验中心(SPF)分组饲养。实验过程中对动物的处置符合2006年科技部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

2. 模型制备 ①造模方法:采用国际公认的束缚-冷应激方法制作胃溃疡大鼠模型^[5],动物造模前禁食不禁水24h,将大鼠仰卧固定在鼠板上,所用线绳松紧适度,然后将鼠板直立浸于20℃的恒温水箱中,水平面保持在胸骨剑突部位,水浸10h后取出动物,吹风机吹干,标准条件下饲养。②模型检测:造模结束后第2天,予以断头处死,摘出全胃,沿胃底剪开胃腔,肉眼观察大鼠胃黏膜呈潮红充血状态,胃部有数处斑点状糜烂、溃疡、出血,组织病理检测胃黏膜见缺损、炎性浸润等,则说明成功复制胃溃疡模型。

3. 分组与处理 40只Wistar大鼠按随机数字表法随机分为4组,每组10只。①正常组:不造模,鼠板固定。②模型组:复制胃溃疡大鼠模型,鼠板固定。③胃经组:复制胃溃疡大鼠模型,鼠板固定,电针胃经梁门、足三里穴。④胆经组:复制胃溃疡大鼠模型,鼠板固定,电针胆经日月、阳陵泉穴。均为1次/d,30min/次,连续7d后进行核磁共振检测。

4. 干预方法

4.1 选经穴依据 根据经脉-脏腑相关规律,结合胃黏膜损伤在针灸治疗取穴原则和本课题组前期研究结果,选取与胃直接相关的经脉足阳明胃经为主试因素,足少阳胆经为对照经脉。选取足阳明经上、中、下水平节段四白、梁门、足三里为治疗穴位,与上述穴位同水平节段的足少阳经阳白、日月、阳陵泉

为对照刺激点。

4.2 穴位定位 穴位定位参照《实验针灸学》^[6],梁门:腹正中线与锁骨中线之间的中线上,脐上4寸;足三里:膝关节后外侧,在腓骨小头下约5mm处;日月:锁骨中线上,第七肋骨下缘;阳陵泉:足三里上外侧5mm处。

4.3 电针方法 采用0.5寸、30号华佗牌针灸针,络合碘消毒后分别针刺大鼠双侧穴位,足三里直刺0.3cm,梁门直刺0.2cm;阳陵泉直刺0.3cm,日月直刺0.2cm。各组针刺后,在G6805-2型电针治疗仪的输出线上正极接梁门或日月穴,负极接同侧的足三里或阳陵泉穴,1只大鼠共接两组输出线,采用疏密波(疏波时间为5s,密波时间为10s);输出脉冲幅度:接500Ω负载时2-4V;输出脉冲宽度:0.5ms,疏波4Hz,密波50Hz,强度以毫针出现轻颤为度,电针时间30min,1次/d,共7d。

5. 标本提取与处理 各组大鼠在治疗结束后第2天,用异氟醚麻醉后断头取脑,在冰盘上迅速分取大脑皮质、下丘脑、延髓,装入冻存管,先在液氮中冻存30s,然后再放入-80℃冰箱中保存。将大脑皮质、下丘脑、延髓各200mg绞碎,匀浆,取100μL,放入匀浆瓶中,依次加入400μL甲醇和125μL去离子水,用匀浆机于0℃下匀浆30s。再向匀浆瓶依次加入400μL氯仿和400μL去离子水后,混匀器混匀60s,于冰上静置分离10min。将混合液移至1.8mL玻璃离心管中,在4℃下以5000g转速离心5min。分别取出上、下层清液,转移入2个洁净的玻璃小瓶中,在-40℃冰箱冷冻3h后,置于冻干机冷冻干燥24h以除去甲醇、水和氯仿溶剂。实验时移入5mm NMR管,在Varian 500MHz谱仪上进行大脑皮质、下丘脑、延髓和胃黏膜的核磁共振检测。

6. 检测指标与方法 大鼠大脑皮质、下丘脑、延髓的核磁共振检测:采用核磁共振高分辨魔角旋转技术,取大脑皮质、下丘脑、延髓20mg,将样品装入直径4mm的氧化锆转子内,加入10μL重水锁场。设置MAS转速(2000±10)Hz。采用脉冲序列弛豫时间(2nτ)设置为360ms,回波时间(τ)为400μs。实验前均校正90°脉冲长度,实验温度固定于293K,采样128次,谱宽8kHz,傅里叶变换充零点数千。k。

7. 数据分析方法 ①谱图数据预处理:首先对所有谱图进行信号去噪、基线和相位校正,然后对数据分段积分、行和列归一化以及尺度标准化处理。本项目所有的数据预处理均由MestReNova软件(Version: 8.1.2 Mestrelab Research S.L.)处

理完成。②模式识别分析:采用非监督模式识别的主成分分析(PCA)法和监督性模式识别的分类分析(SIMCA)法。模式识别分析在SIMCA-P软件上完成。

8. 统计学方法 采用SPSS 13.0软件进行统计学处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较若方差齐时选择LSD法,方差不齐时选择Dunnett T3法进行方差分析和两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结果

1. 大鼠胃黏膜组织病理学 见图1。正常组大鼠胃黏膜上皮结构完整,细胞排列整齐;模型组大鼠胃黏膜结构破坏,可见大量细胞坏死,炎性细胞浸润,见血细胞;胃经组大鼠胃黏膜细胞排列相对整齐,未发现炎性细胞,核核恢复完整,仅少量难以分辨,未见毛细血管增生及出血;胆经组大鼠胃黏膜结构缺损,有少量毛细血管出血和增生,可见少量炎性细胞。

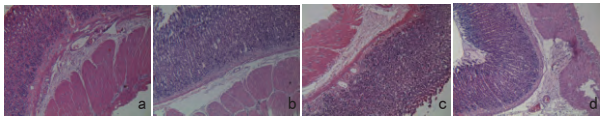


图1 大鼠胃黏膜组织光镜观察结果(×100)
注:a.正常组;b.模型组;c.胃经组;d.胆经组。

2. 大鼠大脑皮质代谢标志物的表达 见图2。模型组与正常组、胃经组、胆经组大鼠大脑皮质代谢物谱均有明显区分。其中,正常组与模型组分离最明显,说明大鼠胃溃疡后代代谢物谱与正常组相比发生明显变化,电针胃经穴或胆经穴对大鼠胃溃疡修复起到一定干预作用,两组大鼠大脑皮质代谢物谱逐渐向正常组靠近,其中胃经组最接近正常组,由此可以看出胃经组大鼠大脑皮质代谢产物物谱趋向很正常。

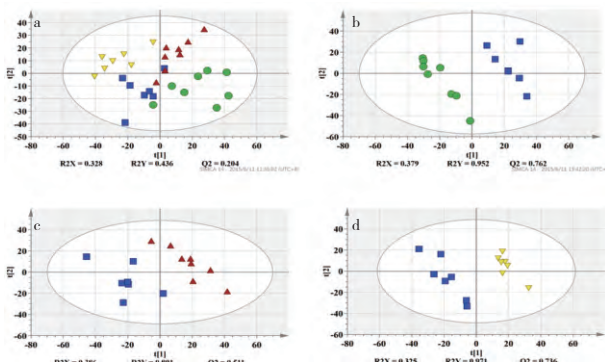


图2 大鼠大脑皮质¹H NMR代谢轮廓的PLSDA得分图

注:a.所有样本;b.模型组与正常组;c.模型组与胃经穴组;d.模型组与胆经穴组。●正常组;▲胃经组;▼胆经组;■模型组。图4、图6同。

与正常组比较,模型组大鼠大脑皮质乳酸、 γ -氨基丁酸、茶乙酸、磷酸胆碱、甘露醇、谷氨酸酯、牛磺酸、肌醇表达下降($P < 0.05$),而肌酸、腺苷、肌苷表达上升($P < 0.05$);与模型组比较,胃经组大鼠大脑皮质乳酸、 γ -氨基丁酸、茶乙酸、磷酸胆碱、甘露醇、牛磺酸、肌醇表达上升($P < 0.05$),而肌酸、

腺苷、肌苷表达下降($P < 0.05$),胆经组大鼠大脑皮质乳酸、肌酸、茶乙酸、谷氨酸酯、牛磺酸、腺苷表达下降($P < 0.05$),而 γ -氨基丁酸、磷酸胆碱、肌醇、肌苷表达并未发生显著变化。见图3。

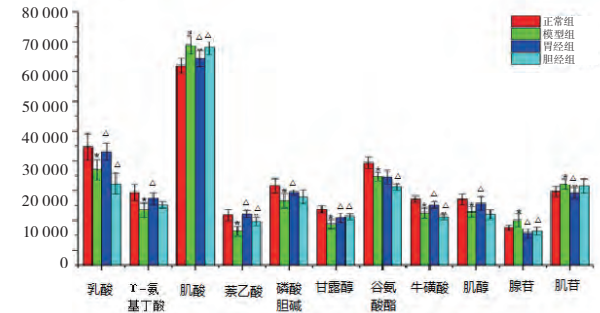


图3 大鼠皮质代谢物的浓度变化趋势柱状图

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,△ $P < 0.05$ 。图5、图7同。

3. 大鼠下丘脑代谢标志物的表达 见图4。模型组与正常组、胃经组、胆经组大鼠下丘脑代谢物谱均有明显分离,其中模型组与正常组离散度最大,区分最为明显,说明胃溃疡后代大鼠下丘脑代谢发生显著变化,胃经组与胆经组大鼠下丘脑代谢物谱向正常组靠近,说明针刺胃经穴与胆经穴对治疗胃溃疡有一定干预作用。其中胃经组向正常组靠近趋势更为明显,说明电针胃经穴能够对胃溃疡修复起到一定的调节作用。

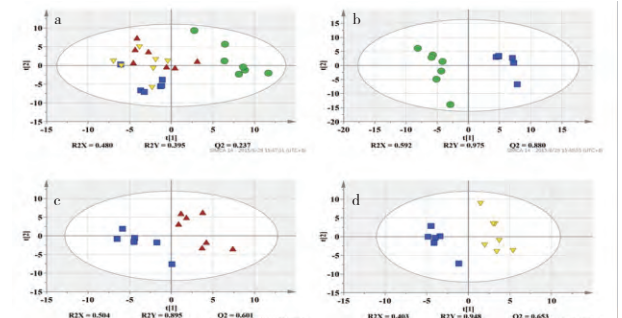


图4 大鼠下丘脑¹H NMR代谢轮廓的PLSDA得分图

与正常组比较,模型组大鼠下丘脑乙酸、 γ -氨基丁酸表达上升($P < 0.05$),乳酸、肌酸表达下降($P < 0.05$);与模型组比较,胃经组大鼠下丘脑乳酸、肌醇、谷氨酸酯、甘露醇表达

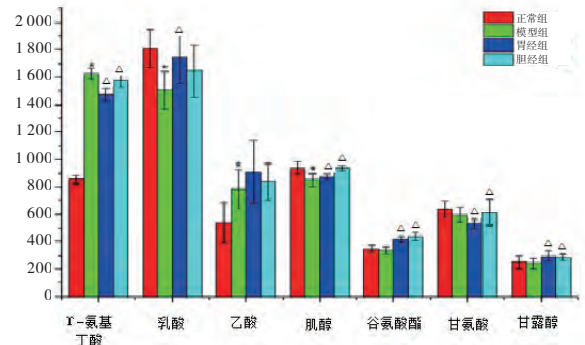


图5 大鼠下丘脑代谢物的浓度变化趋势柱状图

上升 ($P<0.05$), γ -氨基丁酸、甘氨酸表达下降 ($P<0.05$), 胆经组大鼠下丘脑肌醇、谷氨酸酯、甘氨酸、甘露醇表达上升 ($P<0.05$), γ -氨基丁酸表达下降 ($P<0.05$), 其他代谢产物无明显变化。见图5。

4. 大鼠延髓代谢标志物的表达 见图6。模型组与正常组、胃经组、胆经组大鼠延髓代谢物谱之间区分明显, 这表明造模和针灸治疗前后, 延髓的代谢发生了改变。模型组、胃经组、胆经组与正常组离散明显, 代谢物谱区别显著, 其中正常组与模型组离散度最大, 区分最为显著, 说明造成胃溃疡模型后, 大鼠延髓代谢轮廓发生显著的变化。而胃经组和胆经组大鼠延髓代谢物谱皆接近正常组, 说明电针刺激后延髓代谢特征与正常组更接近, 与模型组的差异较大, 提示针刺胃经和胆经后代代谢趋于正常。

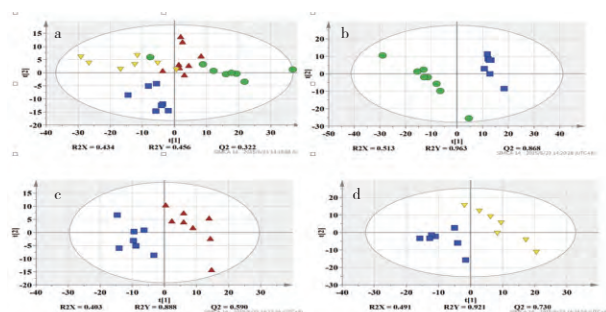


图6 大鼠延髓H NMR代谢轮廓的PLSDA得分图

与正常组比较, 模型组大鼠延髓茶乙酸、肌酸、肌苷、甘露醇、抗坏血酸盐、胆胺、尿囊素表达上升 ($P<0.05$), 乳酸、甘油磷酸酰胆碱 (GPC)、谷氨酸酯、肌醇、丙氨酸、腺苷、磷酸胆碱表达下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 胃经组大鼠延髓乳酸、GPC、谷氨酸酯、肌醇、丙氨酸、磷酸、胆碱表达上升 ($P<0.05$), 而茶乙酸、肌酸、甘露醇、胆胺、尿囊素表达下降 ($P<0.05$), 其余代谢产物变化不明显, 胆经组大鼠延髓茶乙酸、GPC、肌醇表达下降 ($P<0.05$), 乳酸、丙氨酸、腺苷、抗坏血酸盐表达上升 ($P<0.05$), 其余代谢产物未发生显著变化。见图7。

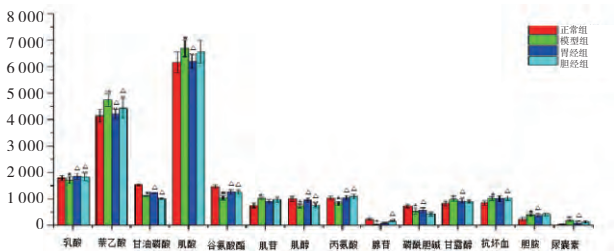


图7 大鼠延髓代谢物的浓度变化趋势柱状图

讨论

胃溃疡是一种多因素多途径参与的胃黏膜损伤疾病。现代研究认为, 当胃溃疡发生后, 机体的糖代谢、脂质代谢和氨基酸代谢均会出现紊乱。胃黏膜屏障受损, 胃黏膜血循环减少, 胃

黏膜细胞代谢障碍, 无氧糖酵解增强, 三羧酸循环紊乱, 炎性介质大量释放。某些必需氨基酸, 如亮氨酸、苯丙氨酸等显著下降, 脂肪酸如软脂酸、硬脂酸、胆甾醇等显著增加, 可导致细胞线粒体功能障碍, 进一步加重胃黏膜的损伤。彭树灵等^[7]研究发现, 胃溃疡大鼠胃黏膜和尿液出现能量代谢、氨基酸代谢及脂类代谢异常, 维胃方通过调节机体的代谢过程能有效治疗胃溃疡。邹忠杰等^[8]发现, 黄连总生物碱能有效地缓解胃黏膜损伤大鼠机体氨基酸、脂质和糖代谢失衡。周丹等^[9]研究发现, 募配穴对应激性胃溃疡大鼠血清和尿液代谢物谱有一定的特异性协同作用, 针刺不同腧穴可产生不同的标志性代谢物。诸多研究揭示, 胃黏膜出现溃疡后机体氨基酸、糖和脂质等代谢出现紊乱, 代谢异常是胃溃疡的关键病理环节之一。

代谢组学是以基因组学和蛋白组学为基础而发展起来的系统生物学方法, 通过定性和定量全面研究机体活动链上终端产物的变化, 反映生物体系的整体状态。针灸对机体的作用具有良性、整体和综合调整的特点。因此, 中医针灸作用的整体调节特点与代谢组学的技术优势相契合。目前利用代谢组学方法研究针灸作用机制已有诸多报道^[10-12], 吴巧凤等^[13]发现针刺足三里、天枢、上巨虚对溃疡性结肠炎大鼠脑皮层代谢物有明显影响, 而针刺非经非穴对溃疡性结肠炎大鼠脑皮层代谢物的影响不明显。

本研究发现, 模型组与正常组大鼠大脑皮质、下丘脑和延髓代谢物谱有明显区分, 这表明造模后, 大鼠大脑皮质、下丘脑和延髓的代谢物谱发生了明显改变。胃经组与模型组、胆经组大鼠大脑皮质、下丘脑和延髓代谢物谱亦有显著分离, 但与正常组最接近, 电针胃经穴后大鼠大脑皮质、下丘脑和延髓代谢物谱趋向正常, 其趋势明显强于电针胆经穴, 提示胃经穴与胃腑存在一定的特异相关性。与正常组比较, 模型组大鼠大脑皮质乳酸、 γ -氨基丁酸、茶乙酸、磷酸胆碱、甘露醇、谷氨酸酯、牛磺酸、肌醇表达下降, 而肌酸、腺苷、肌苷表达上升; 下丘脑乙酸、 γ -氨基丁酸表达上升, 乳酸、肌酸表达下降; 延髓茶乙酸、肌酸、肌苷、甘露醇、抗坏血酸盐、胆胺、尿囊素表达上升, 乳酸、GPC、谷氨酸酯、肌醇、丙氨酸、腺苷、磷酸胆碱表达下降。与模型组比较, 胃经组大鼠大脑皮质乳酸、 γ -氨基丁酸、茶乙酸、磷酸胆碱、甘露醇、牛磺酸、肌醇表达上升, 而肌酸、腺苷、肌苷表达下降; 下丘脑乳酸、肌醇、谷氨酸酯、甘露醇表达上升, γ -氨基丁酸、甘氨酸表达下降; 延髓乳酸、GPC、谷氨酸酯、肌醇、丙氨酸、磷酸胆碱表达上升, 而茶乙酸、肌酸、甘露醇、胆胺、尿囊素表达下降。胆经组大鼠大脑皮质乳酸、肌酸、茶乙酸、谷氨酸酯、牛磺酸、腺苷代谢物表达下降; 下丘脑肌醇谷氨酸酯、甘氨酸、甘露醇表达上升, γ -氨基丁酸表达下降; 延髓茶乙酸、GPC、肌醇表达下降, 乳酸、丙氨酸、腺苷、抗坏血酸盐表达上升。上述结果表明当胃溃疡形成时, 中枢神经系统大脑皮质-交感-肾上腺髓质及下丘脑-垂体-肾上腺皮质

轴的强烈兴奋并伴有其他多种内分泌激素改变,儿茶酚胺通过兴奋 α 受体而使胰岛素分泌减少,通过兴奋 β 受体而使胰高血糖素分泌增加,糖原分解增加,血糖升高并促进脂肪动员使血糖游离脂肪酸增加。电针胃经穴可通过调节脑组织内神经递质氨基酸等代谢变化,影响脑肠轴多种相关代谢物质的表达,促进胃黏膜损伤的修复,大脑皮质、下丘脑和延髓可能是电针胃经穴在中枢的响应位点,足阳明经与胃相关有特异相关的代谢物质基础。

参 考 文 献

- [1] 金玉. 四联药物治疗幽门螺旋菌相关性胃溃疡疗效观察. 中国现代药物应用, 2015, 9(1): 124-125
- [2] 董莉莉, 刘安国, 王军燕, 等. 针灸治疗急性胃炎随机对照临床试验的Meta分析. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(1): 30-34
- [3] Peng Li, Wang Yadong, Chang Xiaorong, et al. Protective role of moxibustion treatment against stress-induced gastric ulcer by inhibiting cell apoptosis and promoting cell proliferation in rats. J Tradit Chin Med, 2016, 36(3): 340-346
- [4] Jing-jing Xu, Kian-Kai Cheng, Zong-bao Yang, et al. ¹H NMR metabolic profiling of biofluids from rats with gastric mucosal lesion and electroacupuncture treatment. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 6: 1-13
- [5] Megala J, Geetha A. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic fruit extract of *Pithecellobium dulce* in different experimental ulcer models in rats. J Ethnopharmacol, 2012, 142(2): 415-421
- [6] 郭义. 实验针灸学. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 415
- [7] 彭树灵, 刘晓伟, 张真瑞, 等. 从代谢组学的角度探讨维胃方对大鼠实验性胃溃疡的疗效机制. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(10): 1073-1077
- [8] 邹忠杰, 龚梦鹃, 谢媛媛, 等. 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤保护作用的代谢组学研究. 中华中医药杂志, 2013, 28(3): 807-810
- [9] 周丹, 高颖, 王朝辉, 等. 合募配穴对应激性胃溃疡大鼠血清代谢物谱表达调节的影响. 长春中医药大学学报, 2012, 28(4): 752
- [10] 杨宗保, 王亚东, 刘密, 等. 电针胃经穴对胃溃疡大鼠胃黏膜组织代谢物谱表达的影响. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1033-1036
- [11] 杨宗保, 王亚东, 董继扬, 等. 电针胃经穴对胃溃疡模型大鼠血清和尿液代谢轮廓的影响. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4180-4183
- [12] Jing-jing Xu, Xu-juan Zheng, Kian-Kai Cheng, et al. ¹H NMR-based metabolomics reveals alterations of electro-acupuncture stimulations on chronic atrophic gastritis rats. Scientific Reports, 2017, 3: 1-12
- [13] 吴巧凤, 杨阳, 赵纪岚, 等. 基于¹H NMR代谢组学技术研究针刺经穴治疗溃疡性结肠炎的脑代谢物质基础. 北京中医药大学学报, 2014, 37(8): 572-576

(收稿日期: 2016年5月12日)

· 研究报告 ·

基于CaMK4水平探讨解毒祛瘀滋阴方对MRL/lpr小鼠Th17/Treg平衡机制的影响

水冰洁, 魏静, 高俊, 丁兴红

(浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的: 考察解毒祛瘀滋阴方通过钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶-4 (CaMK4) 来调控Th17/Treg细胞免疫平衡的作用机制。方法: 将40只8周龄雌性MRL/lpr小鼠随机分为模型组、解毒祛瘀滋阴方组(中药组)、CaMK4抑制组(KN-93组)以及醋酸泼尼松组(西药组), 另选10只8周龄雌性C57BL/6J小鼠作为对照组。连续给药10周, 进行尿蛋白含量测定; 剥取小鼠淋巴结和肾脏, 计算脏器指数; HE染色观察小鼠肾脏组织病理学变化情况; 检测小鼠血清中NO浓度; RT-PCR以及Western blot检测脾脏T细胞中CaMK4的表达水平; 流式细胞术检测Th17细胞和Treg细胞的百分率以及两者的比例。结果: 解毒祛瘀滋阴方能有效缓解MRL/lpr小鼠淋巴结、脾脏肿大($P<0.01$), 显著降低尿蛋白以及血清NO浓度($P<0.01$, $P<0.05$), 改善淋巴结和肾脏病理状态。并且, 中药组小鼠脾脏T细胞中CaMK4 mRNA及蛋白表达水平与模型组比较, 显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), 脾脏中Th17细胞显著下调($P<0.01$), Treg细胞显著上调($P<0.01$)。结论: 解毒祛瘀滋阴方能够降低MRL/lpr小鼠脾脏T细胞中CaMK4的表达水平, 促使Th17/Treg细胞比值趋向于正常水平, 提示解毒祛瘀滋阴方通过CaMK4信号通路调控Th17/Treg细胞的免疫平衡可能是其治疗系统性红斑狼疮作用机制之一。

通讯作者: 丁兴红, 浙江省杭州市滨江区滨文路548号浙江中医药大学89号信箱, 邮编: 310053, 电话: 0571-86613587

E-mail: zmk1978@126.com