

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

杨宗保¹, 王亚东¹, 董继扬¹, 刘琼², 王超², 马富强¹, 文磊¹, 全仁夫³, 许晶晶¹

(¹厦门大学, 厦门 361005; ²湖南中医药大学针灸推拿学院, 长沙 410007; ³杭州市萧山区中医院, 杭州 311201)

摘要: 目的: 采用核磁共振氢谱技术(¹H NMR)研究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。方法: 40只SD大鼠随机分为空白组、模型组、胃经穴组和胆经穴组, 每组10只。除空白组外, 利用束缚冷应激法制备大鼠胃溃疡模型, 造模成功后用电针分别刺激胃经组和胆经组相关穴位, 收集大鼠的血清和尿液, 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: 与模型组比较, 胃经穴组血清中的肌醇、甘氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、缬氨酸和尿液中的肌酸酐、乳酸、醋酸盐、肌酸、琥珀酸盐、牛磺酸、甘氨酸、苯乙酰甘氨酸、尿囊素、胆碱、三甲胺、甲酸盐、甜菜碱代谢物的表达水平得到了明显地恢复($P < 0.05$), 更接近空白组的代谢水平。结论: 电针胃经穴可通过调节胃溃疡大鼠的氨基酸代谢和脂肪代谢促进胃黏膜损伤的修复。

关键词: 电针; 胃经穴; 胃溃疡; 核磁共振; 代谢轮廓

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), 福建省自然科学基金项目(No.2015J05168), 福建省卫生厅科研项目(No.wzpw201301)

Effects of electro-acupuncture at stomach meridian acupoints on serum and urine metabolic profiles of gastric ulcer model rats

YANG Zong-bao¹, WANG Ya-dong¹, DONG Ji-yang¹, LIU Qiong², WANG Chao², MA Fu-qiang¹, WEN Lei¹, QUAN Ren-fu³, XU Jing-jing¹

(¹Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; ³Xiaoshan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 311201, China)

Abstract: Objective: To explore the effects of electro-acupuncture at stomach meridian acupoints on serum and urine metabolic profiles of gastric ulcer model rats by application of ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectroscopy. Methods: Forty SD rats were randomly divided into the control group, model group, stomach meridian group and gallbladder meridian group, with 10 rats in each group. The gastric ulcer rat model was established by the restrained cold stress method. After modeling, the model rats were treated with electro-acupuncture at the stomach meridian and gallbladder meridian respectively, the serum and urine of rats were collected to obtain one dimensional ¹H NMR spectrum, and the differences of metabolic profiles between these groups were analyzed by the pattern recognition method. Results: Compared to model group, the concentration of myo-inositol, glycine, glutamine, isoleucine, valine in serum from the stomach meridian group have obviously recovered and returning to normal level. The urinary metabolites such as Creatinine, lactic acid, acetic acid salt, acid, succinic acid salt, taurine, glycine, phenylacetyl glycine, allantoin, choline, trimethylamine, formate, betaine have also partly recovered after electro-acupuncture stimulation in the stomach meridian($P < 0.05$). Conclusion: Electro-acupuncture at stomach meridian acupoints could repair the gastric ulcer lesion by regulating the metabolism of lipid and amino acid in rats with gastric ulcer.

Key words: Electro-acupuncture; Acupoints in the stomach meridian; Gastric ulcer; Nuclear magnetic resonance; Metabolic profile

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81473751, No.81260556), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.2014A030313005), Natural Science Foundation of Fujian Province (No.2015J05168), Scientific Research Program of Fujian Provincial Health Department (No.wzpw201301)

胃溃疡是一种临床常见疾病,针灸治疗胃溃疡具有疗效显著、无副作用等特点^[1-2],相关实验研究表明,针灸胃经穴对胃黏膜损伤有很好的防治作用,可促进胃黏膜保护因子释放,证实肽类物质是针灸参与胃黏膜修复过程的重要物质基础^[3-4]。但针灸防治胃溃疡的整体代谢调节机制尚未清楚。代谢组学是近年来新兴和迅速发展起来的研究方法,可全面地研究机体新陈代谢活动链上的终端产物的变化,这与针灸对机体的整体调节特征有着异曲同工之处^[5-6]。本文拟用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)波谱技术研究胃溃疡大鼠血清和尿液内源性代谢物组,寻找胃黏膜损伤修复的特异性代谢标记物及其代谢通路,探索电针促进胃溃疡修复的代谢调节机制,从而揭示胃经与胃相关的代谢物质基础。

材料与方 法

1. 动物 从厦门大学实验动物中心[许可证号: SCXK(闽)2008-0001]采购40只清洁级SD雄性大鼠,体质量200-220g,于厦门大学中医实验室中饲养。提供充足的饮用水与标准饲料,温度保持在20-22℃,相对湿度控制在65%-70%,在自然光暗周期内,进行适应性饲养1周后再进行实验。

2. 模型制备 采用国际公认的束缚-冷应激方法^[7]制作胃溃疡大鼠模型,实验动物造模前禁食不断水24h,将大鼠仰卧固定于鼠板上,用绳索系紧,然后将鼠板直立浸于20℃的恒温水箱中,标记入水实践,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。

3. 动物分组及处理 按照随机数字表法将40只SD大鼠随机分为空白组、模型组、胃经穴组和胆经穴组,每组10只。空白组:不予电针,仅用鼠板束缚大鼠,每次30min,每日1次,持续1周;模型组:造胃溃疡模型,不予电针,仅用鼠板束缚大鼠,每次30min,每日1次,持续1周;胃经穴组:造胃溃疡模型,用鼠板束缚大鼠,电针胃经梁门、足三里穴,每次30min,每日1次,持续1周;胆经穴组:造胃溃疡模型,用鼠板束缚大鼠,电针胆经日月、阳陵泉穴,每次30min,每日1次,持续1周。

4. 电针方法 参考李忠仁主编《实验针灸学》^[8]的常用动物穴位定位法。胃经穴组选取梁门、足三里穴,胆经穴组选取日月、阳陵泉穴。在对大鼠两侧穴位用络合碘消毒后,用0.5寸30号华佗牌针灸针针刺。梁门、日月分别向外斜刺0.2cm,足三里、阳陵泉分别直刺0.3cm。针刺后,用G6805-2型电针治疗仪输出线,正极接梁门或日月,负极接同侧足三里或阳陵泉,每只大鼠接两组输出线,应用疏密波(密波时间10s,疏波时间5s)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,强度以针灸针出现轻度颤动为限,电针30min,每日1次,持续1周。

5. 样品采集与处理

5.1 大鼠血液采集与处理 各组大鼠实验结束后第2天,用异氟醚麻醉后尾动脉采集血液1mL,采血前,将注射器和针头用

肝素钠溶液浸润,在真空干燥机中干燥。加入0.5mL 2%Na₃N₃溶液做防腐剂,4℃,4 000r/min离心10min,吸取血清样本装入冻存管,先在液氮中冻存30s,然后再放入-80℃冰箱中保存。

5.2 大鼠尿液采集与处理 各组大鼠干预结束当天放在代谢笼单独喂养,收集24h尿液,代谢笼集尿器置于冰上,加入0.5mL 2%Na₃N₃溶液做防腐剂,4℃,14 000r/min离心10min后,取上清液-80℃保存。

6. 检测指标

6.1 血清核磁共振检测 解冻血清样品至常温,取400μL样品,加入200μL重水配置的磷酸盐缓冲液,调整溶液pH值至7.4;以CPMG自旋回波片段[RD-90°-(τ-180°-τ)_n-ACQ],抑制蛋白和脂蛋白等大分子信号的影响。在4℃下,以10 000r/min离心10min,取上清550μL移入5mm NMR管,在Varian 500MHz谱仪上进行血清的核磁共振检测。

6.2 尿液核磁共振检测 解冻尿样常温,取400μL样品,加入200μL重水配置的磷酸盐缓冲液,调整溶液pH值至7.4;采用基于1D NOESY序列的预饱和实验,实验序列:[RD-90°-t_m-90°-t_m-90°-ACQ],谱宽10kHz,混合时间t_m=100ms, t₁=4μs,采样时间1s,采样点数32K,累加次数64次。同时加入0.3mmol/L TSP作为定标物,混合均匀后,在4℃下,以10 000r/min离心10min,取上清550μL移入5mm NMR管,在Varian 500MHz谱仪上进行尿液的核磁共振检测。

7. 数据分析方法 用MestReNova软件(V.8.1.2 Mestrelab Research S.L.)将样品的¹H NMR谱进行手动调相、基线校正和谱峰对齐。在SIMCA-P软件(v12.0.1, Umetrics AB, Umeå, Sweden)上,对尿液和血清数据集分别进行偏最小二乘判别式(PLSDA)分析。

8. 统计学方法 所有数据应用SPSS 18.0统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠血清代谢轮廓比较 见图1-图2。血清中各组样本均相对集中,且不同组之间具有一定的距离,即不同组别血清样品的代谢模式之间存在显著差异,说明电针胃经穴或

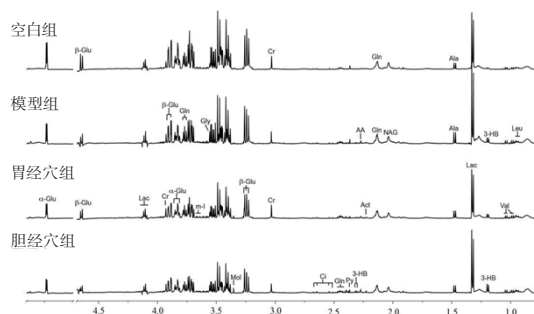


图1 各组大鼠血清的代表性¹H NMR谱

胆经穴后,胃溃疡大鼠血清的代谢模式有往健康方向回复的趋势,也在一定程度上说明了电针胃经穴或胆经穴对大鼠胃溃疡具有一定的恢复作用。从图2A还可见,胃经穴组的样本比胆经穴组的样本更靠近空白组样本,说明电针胃经穴对胃溃疡大鼠的恢复作用比胆经穴更明显。图2B、C和D分别给出了模型组与空白组、模型组与胃经穴组、模型组与胆经穴组等两两之间的PLSDA模型得分图。从图中可见,各组样本之间均明显可分,且模型的预测能力Q2分别高达0.898、0.746和0.851,说明两两之间的代谢差异是显著的。3个PLSDA模型的R2X值分别达到了0.505、0.432和0.528,说明各组间差异信息占数据集总方差比例比较高。

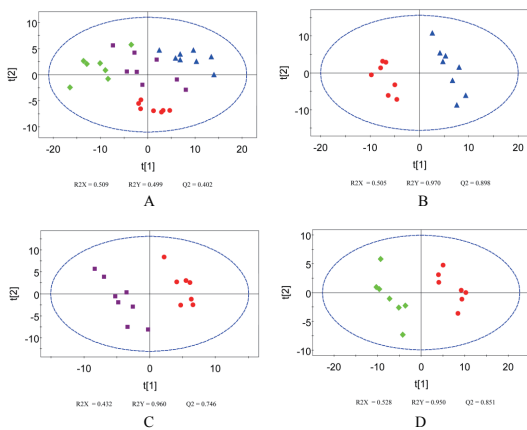


图2 各组血清代谢谱PLSDA得分图

注: A. 所有样本; B. 模型组与空白组; C. 模型组与胃经穴组; D. 模型组与胆经穴组。▲空白组; ●模型组; ■胃经穴组; ◆胆经穴组。图5同。

从图3可见,与模型组比较,胃经穴组大鼠血液部分代谢物的浓度得到恢复,如肌醇、甘氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、缬氨酸

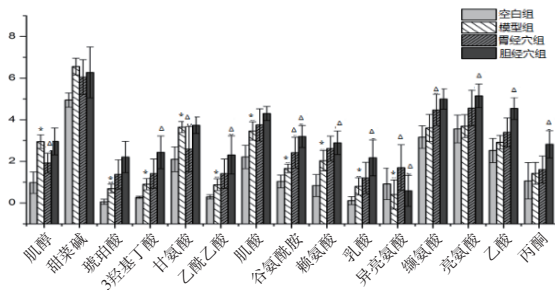


图3 各组大鼠血清代谢物的浓度变化趋势柱状图

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$ 。图6同。

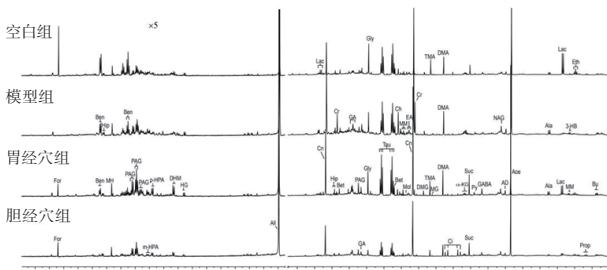


图4 各组大鼠尿液的代表性¹H NMR谱

酸($P < 0.05$);一部分代谢物没有显著变化如甜菜碱、琥珀酸、3-羟基丁酸、乙酰乙酸、肌酸、乳酸、赖氨酸、丙酮、乙酸、亮氨酸;还有一些代谢物在电针胆经穴后,与模型组比较,浓度发生了显著变化,如3-羟基丁酸、乙酰乙酸、谷氨酰胺、赖氨酸、乳酸、异亮氨酸、亮氨酸、乙酸、丙酮($P < 0.05$)。

2. 大鼠大鼠尿液代谢轮廓比较 大鼠尿液的高分辨¹H NMR谱图如图4所示,并对主要代谢物谱峰进行归属。从图5A可见,空白组与其它3组的样本在PLSDA模型第一成分t[1]上可以明显区分,说明造成胃溃疡模型后,大鼠尿液代谢轮廓发生显著的变化,而电针胃经穴和胆经穴不能完全逆转代谢模式的改变。在PLSDA模型第一成分t[1]上,模型组、胃经穴组和胆经穴组三者完全交叠在一起,不可区分。但PLSDA模型第二成分t[2]上,模型组、胃经穴组和胆经穴组可以得到很好区分,且在t[2]上胃经穴组比和胆经穴组和模型组更靠近空白组。

将模型组与空白组、模型组与胃经穴组、模型组与胆经穴组分别进行两两PLSDA建模,其PLSDA得分图分别为图5B-图5D。从这些得分图可见,各组样本间存在明显差异,模型的预测能力(Q2的值)都相对较高。但模型组和胃经穴组的样本聚集程度不太理想,如图5D中的模型组样本,明显裂分成两部分。这可能是由于部分尿液样品在收集过程中受到污染所致,

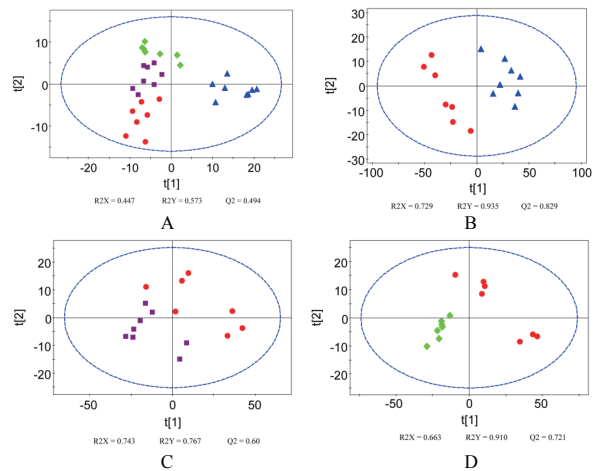


图5 各组大鼠尿液代谢谱PLSDA得分图

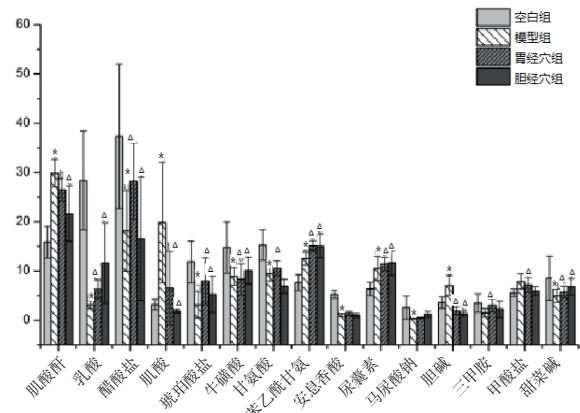


图6 各组大鼠尿液代谢物的浓度变化趋势柱状图

如尿液中混入粪便。

从图6可见,在尿液代谢特征谱中,与模型组比较,电针胃经穴后大鼠尿液肌酸酐、乳酸、醋酸盐、肌酸、琥珀酸盐、牛磺酸、甘氨酸、苯乙酰甘氨酸、尿囊素、胆碱、三甲胺、甲酸盐、甜菜碱代谢物的浓度有了一定程度的恢复($P<0.05$);而安息香酸、马尿酸钠代谢物的浓度没有恢复或显著变化。电针胆经穴后,大鼠尿液肌酸酐、乳酸、醋酸盐、肌酸、琥珀酸盐、牛磺酸、苯乙酰甘氨酸、尿囊素、胆碱、甜菜碱浓度发生了显著变化($P<0.05$),而甘氨酸、安息香酸、马尿酸钠、三甲胺、甲酸盐的浓度没有显著变化。

讨论

胃溃疡是临床常见疾病,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,胃黏膜组织的乳酸、苹果酸水平显著升高,炎性介质大量释放。某些必需氨基酸如亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸与酪氨酸等显著下降,谷氨酸、酪氨酸、组氨酸对胃黏膜有直接的保护作用,氨基酸的缺乏不利于胃黏膜的修复。脂肪酸如软脂酸、硬脂酸、亚油酸、油酸、花生四烯酸和胆甾醇等显著增加,可导致细胞线粒体功能障碍,进一步加重胃黏膜的损伤^[9]。目前国内对中医治疗胃溃疡的代谢组学研究尚处于起步阶段。彭树灵等^[10]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^[11]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,代谢组学技术可以从整体上揭示黄连总生物碱对大鼠胃黏膜损伤的保护作用与机制。周丹等^[12]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物代谢物。这些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。

本研究结果显示:胃溃疡大鼠血清肌醇、甜菜碱、琥珀酸、3-羟基丁酸、甘氨酸、乙酰乙酸、肌酸表达明显升高,表明胃溃疡后胃黏膜蛋白质变性,黏膜下微血管循环障碍、供血不足,致使胃黏膜细胞无氧糖酵解增强,三羧酸循环紊乱,胃壁损伤,导致炎性介质大量释放。电针胃经穴后大鼠血清代谢物中的肌醇、甘氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、缬氨酸的表达水平得到了明显地恢复,表明胃黏膜的防御能力和修复功能明显增强,体内脂肪酸和能量合成正常,三羧酸循环已无障碍,机体代谢产物向正常大鼠代谢产物靠近,儿茶酚胺的合成及神经调节功能恢复正常。电针胆经穴组大鼠血液代谢物乳酸、琥珀酸、尿囊素、柠檬酸、苯乙酰甘氨酸、甜菜碱、乙酰乙酸酯表达升高,肌酸酐、肌酸、胆碱、乙酸、牛磺酸表达下降,较模型组有所好转。胃溃疡大鼠尿样肌酸酐、肌酸、苯乙酰甘氨酸、尿

囊素、胆碱表达升高致细胞线粒体功能障碍,胃黏膜细胞无氧糖酵解增强,三羧酸循环紊乱。乳酸、醋酸、琥珀酸、牛磺酸、甘氨酸、甲酸、安息香酸、马尿酸、甜菜碱、 α -酮戊二酸、乙醇表达下降导致促进胃黏膜损伤修复的必需氨基酸明显减少,脂质和糖代谢失衡,胃黏膜细胞抵御损伤功能下降。电针胃经穴大鼠的胃经穴后大鼠尿液代谢物肌酸酐、乳酸、醋酸盐、肌酸、琥珀酸盐、牛磺酸、甘氨酸、苯乙酰甘氨酸、尿囊素、胆碱、三甲胺、甲酸盐、甜菜碱的表达水平得到了明显恢复,表明胃黏膜修复功能增强,体内氨基酸形增多,能量及脂肪酸合成正常,三羧酸形成恢复正常。电针胆经穴组大鼠尿液代谢物乳酸、醋酸、琥珀酸、甜菜碱表达升高,同时尿液中肌酸酐、肌酸表达下降,电针胆经穴组大鼠较模型组代谢产物表达有所好转。

本文采用基于核磁共振的代谢组学方法观察电针胃经穴对胃溃疡模型大鼠的血清和尿液代谢轮廓的影响,探讨电针胃经穴干预胃溃疡模型的代谢物变化规律,进一步揭示了胃溃疡损伤和修复的代谢机制以及足阳明经与胃相关的科学内涵,从生物系统角度阐释了针灸的整体作用机制具有重要的研究意义。

参考文献

- [1] 陈程,崔海福,严兴科,等.针灸治疗消化性溃疡的Meta分析.世界华人消化杂志,2011,19(22):2399-2404
- [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] Z B Yang, J Yan, X R Chang, et al. Effect of acupuncture serum on gastric mucosal cell epidermal growth factor receptor gene expression of stress-induced gastric ulcer in rat. World Journal of Gastroenterology, 2006, 12(34): 1557-1562
- [4] 杨宗保,王晨光,龚安,等.杨青艾灸调节急性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞相关标志蛋白质表达的研究.中国针灸,2013,33(11): 1017-1022
- [5] 姜辉,吕肖芳,张丽,等.代谢组学在中医药现代化研究中的应用.中华中医药杂志,2013,28(3):588-590
- [6] 刘萍,王平,陈刚,等.应用代谢组学探讨中医药复杂理论体系的研究思路和方法.中华中医药杂志,2011,26(5):993-998
- [7] 张洪峰,薛英威.水浸-束缚应激对大鼠胃壁细胞能量代谢的影响.哈尔滨医科大学学报,2010,44(3):216-220
- [8] 李忠仁.实验针灸学.北京:中国中医药出版社,2003:314-319
- [9] Takeuchi K, Ohishi M, Ota S, et al. Metabolic profiling to identify potential serum biomarkers for gastric ulceration induced by nonsteroid anti-inflammatory drugs. J Proteome Res, 2013, 12(3): 1399-1407
- [10] 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
- [11] 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
- [12] 周丹,高颖,王朝辉.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

(收稿日期:2015年7月15日)