

· 论著 ·

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

杨宗保^{1,2}, 王亚东¹, 刘密³, 马富强¹, 陈娇龙¹, 常小荣³

(¹厦门大学医学院中医系, 厦门 361005; ²厦门大学深圳研究院, 深圳 518057; ³湖南中医药大学针灸推拿学院, 长沙 410007)

摘要: 目的: 采用核磁共振氢谱技术(¹H NMR)研究电针胃经穴对应激性胃溃疡大鼠胃黏膜组织代谢物谱的表达。方法: 40只SD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, 光镜下观察大鼠胃黏膜组织病理形态学的变化, 采用¹H NMR技术获取胃黏膜组织¹H NMR谱, 并利用模式识别方法分析各组间的代谢物谱的差异。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜损伤和胃黏膜组织代谢轮廓差异明显, 胃黏膜组织乙酸、肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、甘氨酸、乙醇胺、赖氨酸、3-羟丁酸、缬氨酸、异亮氨酸、牛磺酸、亮氨酸和甘露醇含量上升($P<0.05$), 乳酸、甲硫氨酸和天冬氨酸含量下降($P<0.05$); 与模型组比较, 胃经组和胆经组大鼠胃黏膜得到明显修复, 胃经组大鼠胃黏膜组织代谢轮廓更接近正常大鼠, 胃黏膜组织甲硫氨酸、天冬氨酸含量上升($P<0.05$), 乙酸、肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、牛磺酸、乳酸、亮氨酸和甘露醇含量下降($P<0.05$); 胆经组大鼠胃黏膜组织3-羟丁酸、甲硫氨酸含量上升($P<0.05$), 肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、乙醇胺、异亮氨酸、乳酸、亮氨酸和甘露醇含量下降($P<0.05$)。结论: 电针胃经穴可调节胃溃疡大鼠胃黏膜组织特异代谢物的表达, 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; 代谢组

基金资助: 国家自然科学基金项目(No.81473751, No.81260556), 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(No.2015CB554502), 广东省自然科学基金项目(No.2014A030313005), 深圳市科技计划项目(No. JCYJ20160406140612883)

Effects of electropuncture of acupoints on the foot Yangming stomach meridian on metabolic profiling of gastric mucosa in gastric ulcer rats

YANG Zong-bao^{1,2}, WANG Ya-dong¹, LIU Mi³, MA Fu-qiang¹, CHEN Jiao-long¹, CHANG Xiao-rong³

(¹Department of Traditional Chinese Medicine, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China; ²Shenzhen Research College, Xiamen University, Shenzhen 518057, China; ³College of Acupuncture and Moxibustion of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: Objective: To research the effects of electropuncture of acupoints on the foot Yangming stomach meridian on metabolic profiling of gastric mucosa in rats of gastric ulcer induced by stress using the ¹H nuclear magnetic resonance (¹H NMR). Methods: Forty SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the stomach meridian group and the gallbladder meridian group. The rat model of gastric ulcer was induced by the restrained plus cold stress. The pathological changes in the rat gastric mucosa tissue were observed by light microscope. The ¹H NMR spectroscopy was determined with the ¹H NMR technique. And, meanwhile the differences in the metabolic profiling were identified with the pattern recognition method. Results: Compared to normal group, the gastric mucosa damage and gastric mucosa metabolic profiling are obvious, the concentration of acetic acid, choline, inositol phosphate, glutamic acid, glycine, ethanolamine, lysine, 3-hydroxy butyric acid, valine, isoleucine, taurine, leucine and mannitol increase and the concentration of lactic acid, methionine and aspartic acid decrease in model group rats ($P<0.05$). Compared to model group, the gastric mucosa damage have been recovered in stomach meridian group and gallbladder meridian group, the metabolic profiling of gastric mucosa tissue in stomach meridian group are similar to the normal

通讯作者: 常小荣, 湖南省长沙市韶山中路113号湖南中医药大学针灸推拿学院, 邮编: 410007, 电话: 0731-88458187
E-mail: xrchang1956@163.com

group. The concentration of methionine, aspartic acid increase and acetic acid, choline, inositol phosphate, glutamic acid, glycine, lysine, lactic acid, leucine, isoleucine, taurine, and mannitol decrease in stomach meridian group ($P<0.05$). The concentration of 3-hydroxy butyric acid, methionine increase and choline, inositol phosphate, lactic acid, leucine, isoleucine, glutamic acid, ethanol amine and mannitol decrease in gallbladder meridian group ($P<0.05$). Conclusion: The electropuncture of acupoints on the foot Yangming stomach meridian could regulate the metabolic profiling of gastric mucosa, resulting in improving the gastric mucosa repair of gastric ulcer rats.

Key words: Electropuncture; Acupoints on the foot Yangming stomach meridian; Gastric ulcer; Nuclear magnetic resonance (NMR); Metabolome

Funding: National Natural Science Foundation of China (No.81473751, No.81260556), National Key Basic Research Program of China (973 Program) (No.2015CB554502), Natural Science Foundation of Guangdong Province (No.2014A030313005), Technology Plan of Shenzhen City (No.JCYJ20160406140612883)

胃溃疡是临床常见疾病, 诸多临床和实验研究证明针灸胃经穴对胃黏膜损伤有很好的防治作用^[1-2], 能够激活胃黏膜细胞EGFR信号通路并能促进EGF、TGF- α 、EGFR等胃黏膜保护因子的释放, 促进胃溃疡的愈合^[3]。

代谢组学是系统生物学的重要研究方法, 与针灸对机体的整体调节有着异曲同工之处^[4]。本研究拟采用核磁共振氢谱(¹H NMR)研究胃溃疡大鼠胃黏膜组织代谢物组, 寻找胃黏膜损伤修复的特异性代谢标记物, 阐明电针促进胃溃疡修复的代谢调节机制。

材料与方

1. 动物 清洁级雄性Wistar大鼠40只, 体质量(150 \pm 20)g。购自于厦门大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(闽)2008-0001, 于实验前适应环境1周, 控制室温20-22 $^{\circ}$ C, 相对湿度65%-70%, 自然光暗周期, 在厦门大学动物实验中心分组饲养。

2. 模型制备 采用国际公认的束缚-冷应激法制作胃溃疡大鼠模型^[5], 肉眼观察大鼠胃黏膜呈潮红充血状态, 胃体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、炎性反应浸润等, 则说明成功复制急性胃黏膜损伤模型。

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: 鼠板固定1次/d, 30min/次, 连续7d; ②模型组: 复制胃溃疡大鼠模型, 鼠板固定1次/d, 30min/次, 连续7d; 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, 1次/d, 30min/次, 连续7d; 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, 1次/d, 30min/次, 连续7d。

4. 取穴方法 选取足阳明经中、下水平节段梁门、足三里为治疗穴位, 与上述穴位同水平节段的相应足少阳经穴日月、阳陵泉为对照刺激点。穴位定位参照李忠仁《实验针灸学》^[6]。

5. 电针方法 采用0.5寸、30号华佗牌针灸针, 以

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。

6. 检测指标与方法

6.1 大鼠胃黏膜组织病理学 各组大鼠干预结束后断头处死, 取胃, 在超净工作台下, 于胃窦部黏膜损伤明显处, 取1cm \times 0.5cm大小的组织块, 0.9%氯化钠溶液冲洗干净, 将标本放入10%甲醛固定24-48h, 常规石蜡包埋, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 切片厚5 μ m, HE染色, 光镜观察各组大鼠胃黏膜组织病理学改变。

6.2 大鼠胃黏膜组织的核磁共振检测 采用核磁共振高分辨魔角旋转技术, 取胃黏膜组织20mg, 将样品装入直径4mm的氧化锆转子内, 加入10 μ L重水锁场。实验时, 设置MAS转速(2 000 \pm 10)Hz。实验采用的脉冲序列弛豫时间(2n τ)设置为360ms, 回波时间(τ)为400 μ s。所有样品实验前均校正90 $^{\circ}$ 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32k。

7. 数据分析方法 ①谱图数据预处理: 采用MestReNova软件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。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(PLS-DA), 所有的模式识别分析均在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DunnettT3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. 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清晰可见,易着色,色彩明晰,细胞完整,排列整齐;模型组大鼠胃黏膜全层结构破坏,胃腺细胞大量坏死,细胞排列杂乱无章,胞核溶解难辨认,胞质模糊,炎性细胞浸润,见出血;胃经组大鼠胃黏膜上皮表层未发现炎性细胞,胃腺已基本愈合,细胞排列相对整齐,胞核恢复完整,仅少量难以分辨,未见毛细血管增生及出血;胆经组大鼠胃黏膜部分胃腺表面缺损,可见少量炎性细胞。

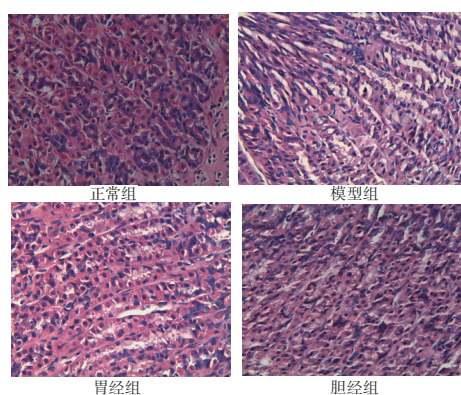


图1 胃黏膜组织光镜观察结果(HE×400)

2. 大鼠胃黏膜组织代谢轮廓的表达 胃黏膜组织¹H NMR代谢轮廓PLSDA得分图见图2。各组大鼠胃黏膜组织代谢物谱相互有明显区分,其中模型组与正常组大鼠胃黏膜组织代谢物谱离散比较明显,代谢产物发生显著变化,说明造成胃溃疡模型后,大鼠胃黏膜组织的代谢发生显著变化。胃经组大鼠胃黏膜组织代谢物谱接近正常组,而胆经组大鼠胃黏膜组织代谢物谱接近模型组。

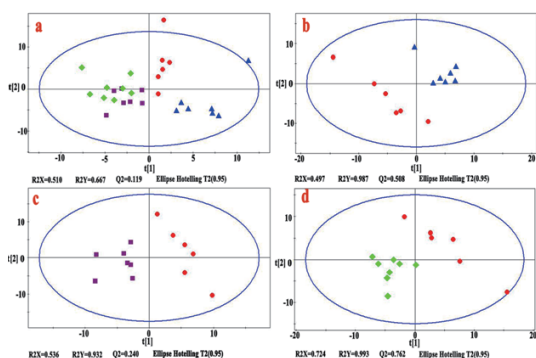


图2 胃黏膜组织¹H NMR代谢轮廓的PLSDA得分图

注: a. 所有样本; b. 模型组与正常组; c. 模型组与胃经组; d. 模型组与胆经组。▲正常组; ●模型组; ■胃经组; ◆胆经组。

3. 大鼠胃黏膜组织代谢标志物表达 胃黏膜组织¹H NMR谱结果显示,见图3。与正常组比较,

模型组大鼠胃黏膜组织乙酸、肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、甘氨酸、乙醇胺、赖氨酸、3-羟基丁酸、缬氨酸、异亮氨酸、牛磺酸、亮氨酸和甘露醇表达上升($P<0.05$),乳酸、甲硫氨酸和天冬氨酸的表达下降($P<0.05$);与模型组比较,胃经组大鼠胃黏膜组织甲硫氨酸、天冬氨酸的表达上升($P<0.05$),乙酸、肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、牛磺酸、乳酸、亮氨酸和甘露醇表达下降($P<0.05$);胆经组大鼠胃黏膜组织3-羟基丁酸、甲硫氨酸的表达上升($P<0.05$);肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、乙醇胺、异亮氨酸、乳酸、亮氨酸和甘露醇的表达下降($P<0.05$)。

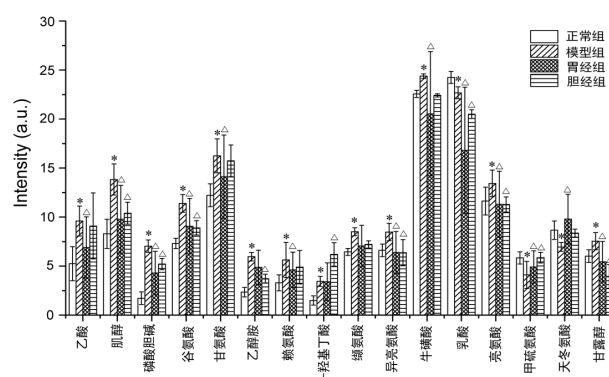


图3 各组大鼠胃黏膜组织3-代代谢物浓度变化趋势柱状图
注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。

讨论

胃溃疡是一种多因素、多途径参与的常见疾病,是一系列神经内分泌改变引起胃壁屏障保护作用减弱和损伤因素增加的结果。中医针灸治疗胃溃疡具有疗效明显、不良反应少等特点^[7]。俞竹青等^[8]采用针灸治疗胃溃疡、十二指肠溃疡32例,发现有效率为87.5%,不良反应少,依从性好,并且在治疗中未发现不良反应。刘琼等^[9]研究发现,艾灸胃经穴可以调节胃黏膜细胞多种相关信号蛋白质的磷酸化水平,从而达到治疗胃溃疡胃黏膜损伤的目的。魏庆兴等^[10]研究发现针灸可预防胃溃疡大鼠胃黏膜血流量下降、胃黏液分泌低下,其治疗作用是通过作用于副交感神经末梢而产生的。

代谢组学是针对生物或细胞所有低分子量代谢产物进行定性定量分析的一门学科,是系统生物学的重要研究方法,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,针灸刺激影响整个机体的功能通过代谢物反应出来^[11]。因此,针灸作用的整体调节特点与代谢组学的技术优势相契合。吴巧凤等^[12]研究发现,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,而针刺非经非穴的作用不明显。周丹等^[13]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。

诸多研究证实当胃溃疡发生后,机体的糖、脂质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,三羧酸循环紊乱,胃黏膜组织的乳酸、苹果酸水平显著升高,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,而谷氨酸、酪氨酸、组氨酸对胃黏膜有直接的保护作用,氨基酸能促进胃黏膜细胞损伤修复。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。彭树灵等^[14]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^[15]研究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。本研究发现胃黏膜损伤大鼠的胃黏膜组织代谢轮廓与正常大鼠差异明显,电针胃经穴后大鼠胃黏膜组织代谢轮廓接近正常大鼠,而电针胆经穴后大鼠胃黏膜组织代谢轮廓较接近胃黏膜损伤大鼠,说明电针胃经穴可有效促进胃溃疡大鼠胃黏膜损伤的修复。大鼠胃溃疡后,胃黏膜组织中的乙酸、肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、甘氨酸、乙醇胺、赖氨酸、3-羟基丁酸、缬氨酸、异亮氨酸、牛磺酸、亮氨酸和甘露醇含量上升,乳酸、甲硫氨酸和天冬氨酸的含量下降,表明胃溃疡后胃黏膜血循环减少,三羧酸循环障碍,无氧代谢增强;电针胃溃疡大鼠胃经穴后,大鼠胃黏膜组织甲硫氨酸、天冬氨酸的含量上升,乙酸、肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、甘氨酸、赖氨酸、异亮氨酸、牛磺酸、乳酸、亮氨酸和甘露醇含量下降,说明电针胃经穴后胃黏膜损伤得到修复,三羧酸循环趋于正常;电针胃溃疡大鼠胆经穴后,大鼠胃黏膜组织3-羟基丁酸、甲硫氨酸的含量上升;肌醇、磷酸胆碱、谷氨酸、乙醇胺、异亮氨酸、乳酸、亮氨酸和甘露醇的含量下降,提示胃黏膜损伤有一定的修复,代谢部分恢复正常。本文采用基于核磁共振的代谢组学方法观察了电针胃经穴对胃溃疡模型大鼠胃组织代谢轮

廓的影响,进一步揭示了胃溃疡损伤和修复代谢机制的科学内涵,从生物系统角度阐释了针灸对于胃溃疡的治疗作用机制。

参 考 文 献

- [1] 陈程,崔海福,严兴科,等.针灸治疗消化性溃疡Meta分析.世界华人消化杂志,2011,19(22):2399-2404
- [2] 马杭琨,李天娇,崔良慧,等.电针公孙和内关穴对胃溃疡大鼠血清SOD及胃窦前壁粘膜影响的实验研究.针灸临床杂志,2012,28(5):53-55
- [3] Z B Yang, J Yan. Effects of the serum derived from rats treated with electroacupuncture at different meridian acupoints on EGFR signal transduction pathway in gastric mucosal cells. World Journal of Acupuncture and Moxibustion, 2009, 19(1): 41-48
- [4] 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
- [5] Megala J, Geetha A. Anticarcinogenic activity of hydroalcoholic fruit extract of *Pithecellobium dulce* in different experimental ulcer models in rats. J Ethnopharmacol, 2012, 142(2): 415-421
- [6] 李忠仁.实验针灸学.北京:中国中医药出版社,2003
- [7] 魏桂双.中药黄芪建中汤与常规西医疗疗胃溃疡疗效比较.现代中西医结合杂志,2014,32(14):1524-1525
- [8] 俞竹青,毛水泉.针灸治疗胃、十二指肠溃疡32例临床研究.光明中医,2005,20(2):31-32
- [9] 刘琼,杨宗保,王晨光,等.艾灸梁门、足三里穴对应激性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞相关蛋白质磷酸化水平的影响.中医杂志,2014,50(24):2129-2133
- [10] 魏庆兴,菊地一博,郑义弘,等.针灸预防大鼠应激性胃溃疡作用的实验研究.中国针灸,1997,17(10):608-610
- [11] 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
- [12] 吴巧凤,杨阳,赵纪岚,等.基于HNMR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
- [13] 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
- [14] 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
- [15] 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

(收稿日期:2016年1月3日)