

基于核磁共振氢谱技术研究电针“内关”穴对心肌缺血再灌注损伤大鼠血清及心肌组织代谢物的影响

唐雅妮¹ 谭成富¹ 刘薇薇¹ 严洁¹ 王超¹ 刘密¹
林东海² 黄彩华³ 杜琳¹ 陈美琳¹ 李姣兰¹ 朱鼎铭¹

(¹湖南中医药大学针灸推拿学院,长沙 410007;

²厦门大学化学化工学院,福建厦门 361005;³厦门理工学院体育系,福建厦门 361005)

【摘要】 目的:基于核磁共振氢谱(¹H NMR)研究电针“内关”穴对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)大鼠血清和心肌组织代谢物的影响,探讨电针“内关”穴对MIRI大鼠代谢模式的影响。方法:30只SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、电针组。对照组:不予电针,仅用鼠板束缚大鼠,每次20 min,每日1次,持续7 d;模型组予心肌缺血再灌注造模:至第7天后结扎冠状动脉左前降支40 min后恢复血流60 min;电针组(频率10 Hz/50 Hz,脉冲宽度0.5 ms,强度1 mA):每日电针双侧“内关”穴1次,时间20 min,持续7 d,于第7天电针后造模。造模结束后,收集3组大鼠的血清和心肌组织。利用¹H NMR进行代谢物检测并利用多元统计方法主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘分析(OPLS-DA)进行模式识别。结果:与对照组相比,模型组大鼠血清的亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、赖氨酸、醋酸盐、N-乙酰糖蛋白、丙酮、乙酰乙酸、琥珀酸、谷氨酰胺、多不饱和脂肪酸、肌酸、甘油磷酸胆碱、甘氨酸均浓度下降,低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白、葡萄糖浓度上升;其中除丙酮、乙酰乙酸和多不饱和脂肪酸外,低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白在电针后下降到接近对照组水平,其它代谢物浓度均在电针后上升到接近对照组水平,电针组大鼠血清的代谢模式更接近对照组。与对照组相比,模型组大鼠心肌组织的乳酸、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘油磷酸胆碱、肌酸、牛磺酸、甘氨酸、苏氨酸、腺苷一磷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度下降,葡萄糖浓度明显上升;其中肌酸、甘油磷酸胆碱、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度在电针后上升,葡萄糖浓度在电针后下降;此外,电针组大鼠心肌组织苏氨酸、腺苷一磷酸浓度较模型组进一步下降;电针组大鼠心肌的代谢模式虽然有向对照组偏移的趋势,但与对照组差异还是较大。结论:电针“内关”穴可调节MIRI大鼠糖代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢及能量代谢,对心肌具有一定的保护作用,但其具体的代谢通路及机制需要进一步研究。

【关键词】 电针;心肌缺血再灌注损伤;特征代谢物;血清;左心室肌;代谢组学;核磁共振

【中图分类号】 R 245.9⁺7 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.13702/j.1000-0607.170436

Effect of Electroacupuncture at “Neiguan”(PC 6) on Serum and Myocardial Metabolites in Rats with Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Based on Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

TANG Ya-ni¹, TAN Cheng-fu¹, LIU Wei-wei¹, YAN Jie¹, WANG Chao¹, LIU Mi¹, LIN Dong-hai², HUANG Cai-hua³, DU Lin¹, CHEN Mei-lin¹, LI Jiao-lan¹, ZHU Ding-ming¹ (¹College of Acupuncture-moxibustion and Tuina, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; ²College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province; ³Department of Physical Education, Xiamen University of Technology, Xiamen 361005)

【ABSTRACT】 Objective We have repeatedly demonstrated that electroacupuncture (EA) of “Neiguan”(PC 6) can improve myocardial ischemia in rats. The present study was designed to investigate the metabolomic profile of peripheral blood serum and myocardium involving EA-induced improvement of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats by using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Methods** Thirty male SD rats were equally randomized into blank control, model and EA

项目来源:国家自然科学基金面上项目(No. 81574080);湖南省中医药管理局课题(No. 201521);湖南省高校创新平台开放基金项目(No. 15 k 093)

第一作者:唐雅妮,硕士研究生,研究方向:经脉-脏腑相关规律与机制研究。E-mail:478266078@qq.com

通信作者:王超,副教授,硕士生导师,研究方向:经脉(穴)脏腑相关。E-mail:592436380@qq.com

groups. Rats of the control group were only banded for 20 min, once a day for 7 days. The MIRI model was established by occlusion of the anterior descending branch of the left coronary artery for 40 min, followed by reperfusion for 60 min, and rats of the model group were banded as those in the control group. EA (10 Hz/50 Hz, 1 mA) was applied to bilateral PC 6 for 20 min, once daily for 7 days. The blood samples and left ventricular myocardial tissues were collected for assaying the profiles of differential metabolites using ^1H nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy and multivariate statistical analysis such as the principal components analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal PLS-DA (O-PLS-DA) with SIMCA-P software 12.0. **Results** A total of 19 differential metabolites (17 down-regulated, 2 up-regulated) in the serum and 14 differential metabolites (13 down-regulated and 1 up-regulated) in the ischemic left myocardium were identified after MIRI. Of the 19 serum differential metabolites, amino acids (leucine, isoleucine, valine, alanine, lysine, glycine, glutamine), 3-hydroxy butyric acid (3-HB), lactic acid, acetate, N-acetyl glycoprotein (NAC), acetone, acetoacetate, succinate, polyunsaturated fatty acids (PUFA), creatine, glycerophosphocholine (GPC) were down-regulated; while low density lipoprotein (LDL), LDL/very low density lipoprotein (LDL/VLDL) and glucose obviously up-regulated. Of the 14 myocardial differential metabolites, amino acids (alanine, lysine, glutamate, glutamine, aspartate, taurine, glycine, threonine), GPC, creatine, lactic acid, adenosine monophosphate (AMP), nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) were significantly decreased, and glucose was up-regulated. Following EA treatment, most of the decreased serum differential metabolites except acetone, acetoacetate and PUFA, and the increased serum LDL, LDL/VLDL and glucose recovered, basically close to the control level; and the decreased myocardial creatine, GPC and NAD^+ were also apparently up-regulated and the increased myocardial glucose was down-regulated. But, myocardial threonine and AMP still presented a decreasing state. Although the pattern of myocardial differential metabolites of the EA group had a trend to be close to the control group, the significant difference still existed, while the metabolic pattern of serum metabolites in the EA group was close to that of the control group. **Conclusion** EA stimulation of PC 6 can regulate serum or/and myocardial metabolites as amino acids, carbohydrates, lipids, etc. in MIRI rats, of which both serum and myocardial creatine, GPC and glucose may be jointly confer a favorable potential for EA-induced improvement of MIRI.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Myocardial ischemia reperfusion injury; Differential metabolites; Serum; Left ventricle myocardium; Metabonomics; Nuclear magnetic resonance

针灸因其疗效显著,适应症广泛,在世界范围得到了越来越多的认可^[1-4]。近年来代谢组学技术的应用,使现代研究技术与中医针灸的“整体观”和“动态观”特色形成了新的契合点^[5-9]。代谢组学强调把人或动物作为一个整体来研究,与中医针灸多靶点、多层次、多途径、多系统调节的“整体观”不谋而合;代谢组学强调用动态观点来研究生物体,这又与中医辨证论治的“动态观”有异曲同工之处。鉴于代谢组学技术的诸多优势,目前已被广泛应用于中医药研究领域^[10-16]。

冠心病是最常见的心血管疾病,严重影响人类的健康。心血管病大多发病隐蔽,早期诊断困难,发病机制尚不明确。代谢组学可以从代谢网络的角度进一步阐述缺血性心肌代谢的整体变化,是寻找心肌缺血与针刺效应的特征性代谢物的新技术。

本研究借助 ^1H -核磁共振(^1H -nuclear magnetic resonance, ^1H NMR)波谱技术研究心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)大鼠血清和心肌组织内源性代谢物的变化,寻找心肌缺血再灌注的特异性代谢标记物及其代谢途径,探究电针“内关”穴对 MIRI 大鼠的预保护效

应,阐明电针“内关”穴对 MIRI 大鼠的代谢调控网络的影响及分子机制,从而揭示心包经与心脏相关的代谢物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由湖南中医药大学动物实验中心提供健康 SPF 级 SD 大鼠 30 只,雄性,体质量 250~350 g [动物许可证号:SYXK(湘)2013-0005]。大鼠于湖南中医药大学实验室中常规饲养,温度保持在 20~22 °C,相对湿度控制在 65%~70%,自然光暗周期适应性饲养 1 周再进行实验。

按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、电针组,每组 10 只。对照组:不予电针,仅用鼠板束缚大鼠,每次 20 min,每日 1 次,持续 7 d;模型组大鼠的处理方法同对照组,至第 7 天后行心肌缺血再灌注造模;电针组:术前每日电针双侧“内关”穴 1 次,时间 20 min,于第 7 天电针结束后,开胸造模。实验中对动物的处理符合中华人民共和国科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要仪器与试剂

汉医牌一次性使用无菌针灸针(0.25 mm×

13 mm, 长春爱泉医疗器械有限公司); 华佗牌 SDZ-V 型电子针疗仪(苏州医疗用品有限公司); ALC-V 108 型动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司); ECG-1106 G 数字式六道心电图机(深圳市凯沃尔电子有限公司); H 1850 型医用台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 组织匀浆机(Biospec Products Inc., 美国); Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振谱仪(Bruker, 德国); 氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司); GRANT 制冰机(上海民仪电子有限公司)。数据分析软件: MestReNova Version 6.1 (Mestrelab Research S. L., 西班牙); MATLAB 2011 b (Math Works, 美国); SIMCA-P Version 12.0 (Umetrics AB, 瑞典)。水合氯醛、4% 多聚甲醛(上海山浦化工有限公司); 0.9% 氯化钠注射液(武汉市滨湖双鹤药业有限公司); 氯仿(国药集团化学试剂有限公司); D₂O(99.9% 氘代, Sigma, 美国); TSP(Cambridge Isotope Laboratories, 美国)。

1.3 造模方法

MIRI 造模: 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g) 全身麻醉, 仰卧位固定在鼠台上。术前心电图检查(将电极刺于大鼠皮下, 标准电压 20 mm/mV, 走纸速度为 25 mm/s), 心电图异常的剔除出组。颈部去毛, 行气管切开术, 接动物人工呼吸机(呼吸频率 70 次/min, 呼吸比 1:2, 潮气量约 2~3 mL/100 g), 沿胸骨正中线左侧旁开 0.5~1 cm 处切开皮肤, 暴露肋骨, 从第三、四肋间隙处开胸, 暴露心脏, 用弯止血钳将心包膜前部挑开, 然后用无齿镊将左心耳轻轻提起, 用持针器持无创性小圆弯针在左冠状动脉前降支上、中 1/3 交界处穿一根零号医用缝合线, 在穿线处置一硅胶管结扎血管, 立即心电图监测。关闭胸腔, 结扎 40 min 后开胸, 松开硅胶管, 恢复左前降支灌注 60 min。

动物造模成功标准^[17]: 心肌缺血成模标准: 结扎下段血管膨出发绀、左室前壁发绀及心电图 II 导联 ST 段抬高伴 T 波高耸。再灌注成模标准: 松扎血管下段供血心肌颜色由发绀变浅或转为暗红色及 T 波下降超过 0.2 mV。

剔除具有下列情况之一的动物: ①术中出血过多; ②在稳定过程中, 动物出现较严重的心律失常; ③结扎冠状动脉失败或未发生再灌注; ④呼吸心跳停止超过 30 s 者; ⑤出现自发性室颤, 60 s 内不能自行恢复者。

1.4 电针方法与穴位定位

电针组取双侧“内关”穴, 针刺针直刺入穴位约 3 mm, 行平补平泻的提插捻转手法 1 min 后接电针

(穴位接负极, 正极接大鼠尾部)。电针参数: 疏密波, 频率 10 Hz/50 Hz, 脉冲宽度 0.5 ms, 强度 1 mA, 以上肢轻微颤动为度, 时间 20 min, 1 次/d, 共电针 7 d。“内关”穴定位参照《实验针灸学》^[18]: 前肢内侧、离腕关节约 3 mm 左右的尺桡骨缝间。

1.5 标本的采集与处理

血清的采集: MIRI 结束后, 腹主动脉取血 5 mL, 将血液放在冰中保存静置, 30 min 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, -80 °C 冰箱保存。

心肌组织的采集: MIRI 结束后, 摘取心脏, 置于预冷的 0.9% 氯化钠注射液中冲洗, 除去血液, 滤纸拭干, 取结扎下方左心室心肌组织 0.3 g, 用预冷的 0.9% 氯化钠注射液清洗干净后, 将心肌组织 100 mg 绞碎, 匀浆, 取 50 μL 放入匀浆瓶中, 依次加入 200 μL 甲醇和 65 μL 去离子水后, 0 °C 下匀浆 30 s。再向匀浆瓶依次加入 200 μL 氯仿和 200 μL 去离子水混匀 60 s, 于冰上静置分离 10 min。将混合液移至 1.8 mL 的玻璃离心管中, 在 4 °C 下以 5 000 r/min 离心 5 min。取出上清液, 转移入 2 个洁净的离心管中, 先用氮吹仪吹干大部分甲醇, 再在 -80 °C 冰箱冷冻 3 h 后, 置于冻干机冷冻干燥 24 h 以除去残余的甲醇、水和氯仿溶剂, 将干粉置 -80 °C 冰箱保存待用。

1.6 观察指标与检测方法

大鼠血清的¹H NMR 检测: (1) 样品预处理: 冰上解冻血清样品至常温, 取 400 μL 样品, 加入 200 μL 磷酸盐缓冲液稀释, 调整溶液 pH 值至 7.4, 同时加入 300 μL TSP 混合均匀后, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 550 μL 移入 5 mm NMR 管, 在 Bruker Avance III 600 MHz 谱仪上进行血清的核磁共振检测。(2) 实验序列和脉冲参数: 血清样品采用了 cpmgpr 1 d [RD-90°-(τ-180°-τ)n-acq] 脉冲序列(Bruker Biospin pulse program library), 通过 CPMG 自旋回波作用, 消除来自蛋白质等大分子的宽包信号, 在弛豫等待时间里进行水峰压制。一维 NMR 谱的采样数据点均为 64 k, 谱宽为 12 kHz, 累加次数为 64 次, 空采次数为 16 次。

大鼠心肌组织的¹H NMR 检测: (1) 样品预处理: 组织萃取物干粉中加入 550 μL 磷酸盐缓冲液, 使样品溶液 pH 值稳定在 7.4, 混合均匀后, 以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清移入 5 mm NMR 管, 在 Bruker Avance III 600 MHz 谱仪上进行心肌组织的核磁共振检测。(2) 实验序列和脉冲参数: 本实验采用的脉冲序列为 noesypr 1 d (RD-90°-t₁-90°-t_m-90°-acq, Bruker Biospin pulse program library), 水峰压制作用

在弛豫等待时间内,谱图的采样数据点为 64 k,谱宽为 12 kHz,累加次数为 32 次,空采次数为 4 次。

1.7 数据分析处理

图谱数据预处理:对所有图谱进行信号去噪、基线和相位校正,然后对数据分段积分,行、列归一化以及尺度标准化处理。所有数据预处理均由 Me-stReNova 软件和 MATLAB 2011 b 处理完成。

模式识别分析:采用非监督模式识别的主成分分析(principal components analysis, PCA)法和监督性模式识别方法,如偏最小二乘分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)、正交偏最小二乘分析(orthogonal PLS-DA, O-PLS-DA)进行模式识别。所有的模式识别分析均在 SIMCA-P 软件上完成。

1.8 统计学方法

将所有图谱数据输入到 SIMCA-P 12.0 软件中进行 PCA。为了消除相关因素如个体差异等对分组的影响,强化组间差异,进一步采用正交信号校正处理,再进行 PLS-DA,即 O-PLS-DA。结果以得分图和载荷图体现,根据变量权重值(VIP>1)筛选出差异代谢物。

2 结果

2.1 血清、心肌组织的¹H NMR 谱

图 1 为血清样品检测的¹H NMR 谱。图 1 中标出了一些常见的代谢物:低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白、葡萄糖、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、赖氨酸、醋酸盐、N-乙酰糖蛋白、丙酮、乙酰乙酸、琥珀酸、谷氨酰胺、多不饱和脂肪酸、肌酸、甘油磷酸胆碱、甘氨酸等。

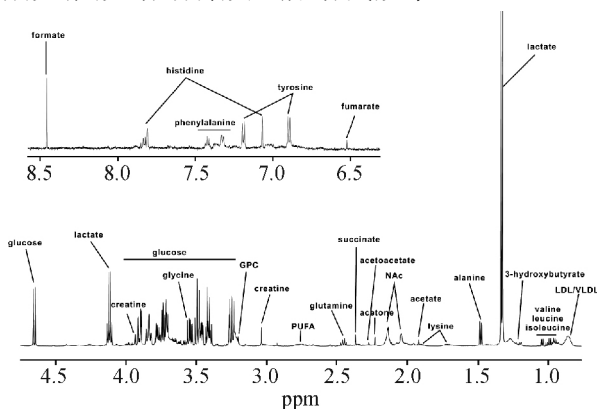


图 1 大鼠血清样品的典型核磁共振氢(¹H NMR)谱

图 2 为心肌组织样品检测的¹H NMR 谱。图 2 中标出了一些常见的代谢物:葡萄糖、乳酸、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、肌酸、牛磺酸、

甘氨酸、苏氨酸、腺苷一磷酸、甘油磷酸胆碱、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸等。

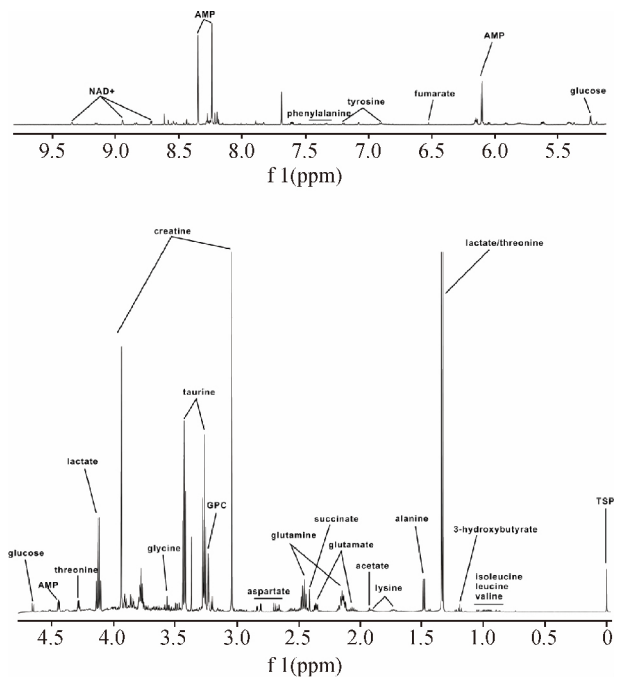


图 2 大鼠心肌组织样品的¹H NMR 谱

2.2 电针对 MIRI 大鼠血清和心肌组织代谢模式的影响

PCA 被用来分析大鼠血清和心肌组织样品,得分图中的每一个点代表一个样本的¹H NMR 图谱,观察样品聚集、离散及离群点。为了找出 3 组大鼠血清和心肌组织代谢物的差异,观察 3 组大鼠血清和心肌组织的代谢模式是否有区别,我们采用 PCA 方法对血清和心肌组织样品的数据矩阵进行统计分析,PC 1-PC 2-PC 3 代表数据矩阵中最显著的特性,一般 PC 1 包含了数据的绝大部分方差,其数值越大表示其提取的原有信息越多。

图 3 为血清样品的 PCA 得分图,从图 3 B、图 3 C、图 3 D 可见对照组与模型组、对照组与电针组、模型组与电针组的 PCA 得分能够明显地区分开,说明 3 组的血清代谢物存在显著差异,其代谢模式是有差异的。对图 3 A 进行进一步的分析还可以发现,其中第 1、第 2 和第 3 主成分分别解释了 54.40%、17.27%和 6.81%的数据方差,可以看到电针组的样本点较模型组有向对照组靠近的趋势。

图 4 为心肌组织样品的 PCA 得分图,从图 4 B、图 4 C 可见对照组与模型组、对照组与电针组能够明显地区分开,图 4 D 可见模型组与电针组 PC 1 数值偏低,未能很好地提取其信息。对图 4 A 进行进一步的分析还可以发现,其中第 1、第 2 和第 3 主成

分别解释了 53.34%、12.53% 和 7.36% 的数据方差,模型组和电针组样品分布的点有交叉,未能区分,这说明电针对心肌缺血再灌注模型大鼠心肌组织的代谢影响相对较小,可能与造模过程中对心肌组织损伤大有关。

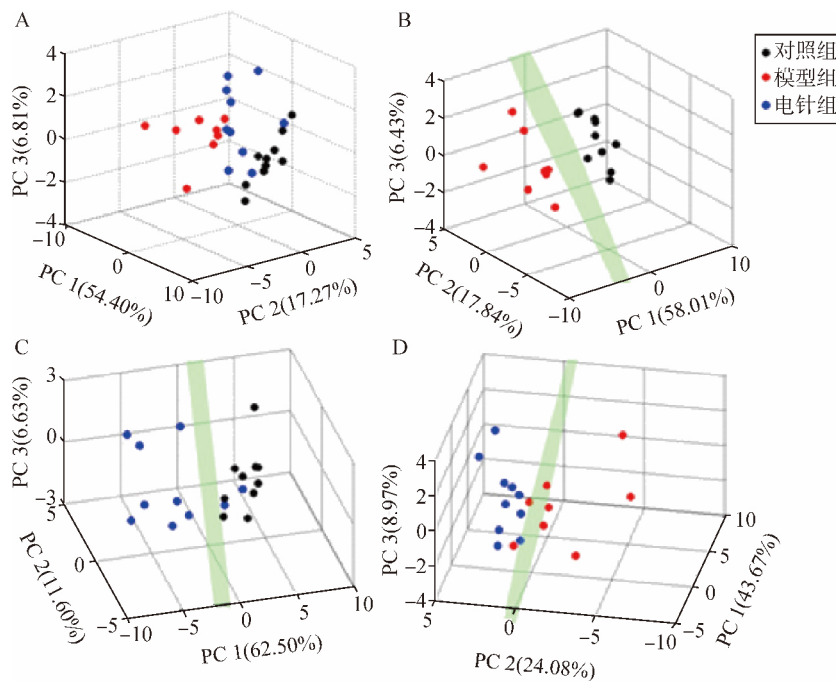


图3 大鼠血清样品代谢物的主成分分析(PCA)得分图

注:A:所有组样本(10只鼠/组);B:对照组与模型组;C:对照组与电针组;D:模型组与电针组。

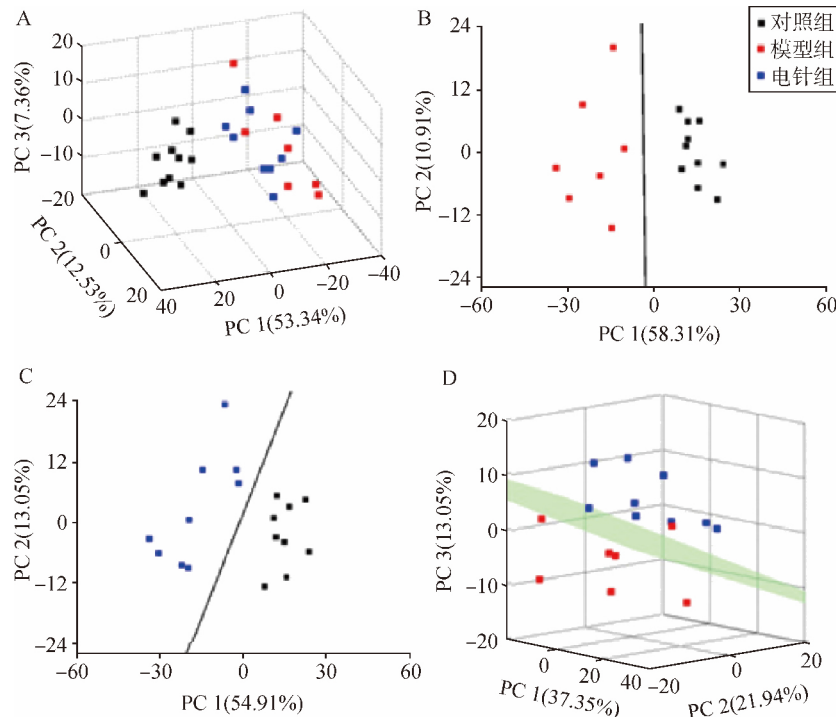


图4 大鼠心肌组织样品代谢物的PCA得分图

注:A:所有组样本(10只鼠/组);B:对照组与模型组;C:对照组与电针组;D:模型组与电针组。

2.3 电针治疗对 MIRI 大鼠血清和心肌组织特征代谢物的影响

为进一步找出各组间的差异,我们使用 O-PLS-DA 进行分析。在 O-PLS-DA 之前,先使用 PLS-DA 进行模型的验证。Q² 的意义和线性回归分析中的决定系数 R² 相似,R² 反映的是模型的拟合效果,Q² 反映的是模型的预测能力。Q² 的取值可以是负值($-\infty < Q^2 \leq 1$),其值越接近 1 说明模型的预测效果越好,如果其值为负值则表示预测能力差或完全没有预测能力。

从图 5 a、图 5 b 可见,对照组与模型组、模型组与电针组能明显地区分,模型组的样品点分布比较分散,说明其差异性比较大,考虑与心肌缺血损伤模型的病理特点有关。经过电针治疗后,样品点分布趋于集中,更趋向于对照组大鼠血清的代谢模式。从图 5 c、图 5 d 对应的置换排序实验(RPT)验证图中可见回归线斜率大,没有过拟合,且 $Q^2 > 0$,表明 PLS-DA 模型质量高,预测效果好,模型可靠。

从图 6 a、图 6 b 可见两组的样品点沿中线分开,水平方向表示组间差异,垂直方向表示组内差异,表明各组之间有一定的差异。图 6 c 横坐标表示化学位移,纵坐标内的正值区间表示该区间内代谢物在对照组的浓度偏高,纵坐标内的负值区间表示该区间代谢物在模型组的浓度偏高,见表 1;图 6 d 横坐标表示化学位移,纵坐标内的正值区间表示该区间内代谢物在模型组的含量偏高,纵坐标内的负值区间表示该区间代谢物在电针组的含量偏高,见表 2。

从表 1、表 2 中 VIP(阈值 > 1)筛选出差异代谢物,与对照组相比,模型组大鼠血清的亮氨酸、异

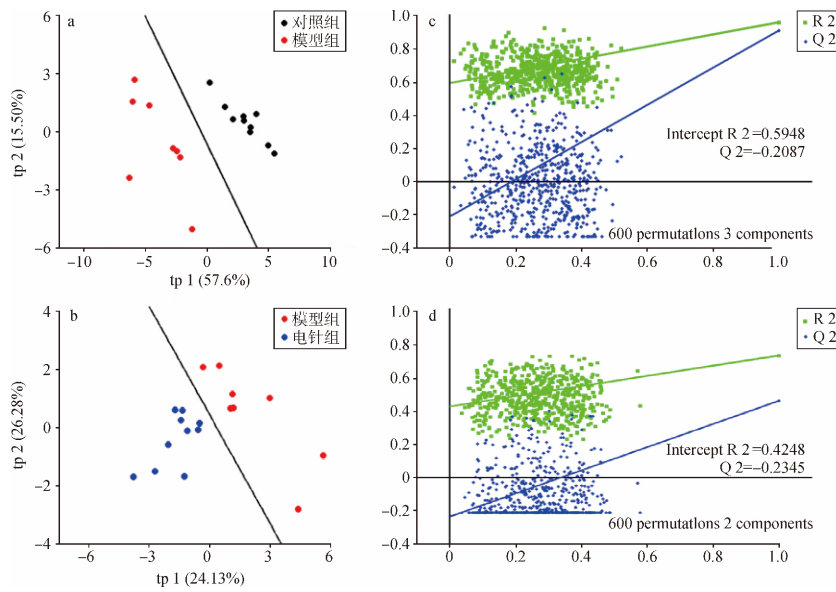


图5 大鼠血清代谢物偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)得分图(a,b)及对应的置换排序实验(RPT)的验证图(c,d)

注:a,c为对照组与模型组(10只鼠/组);b,d为模型组与电针组(10只鼠/组)。

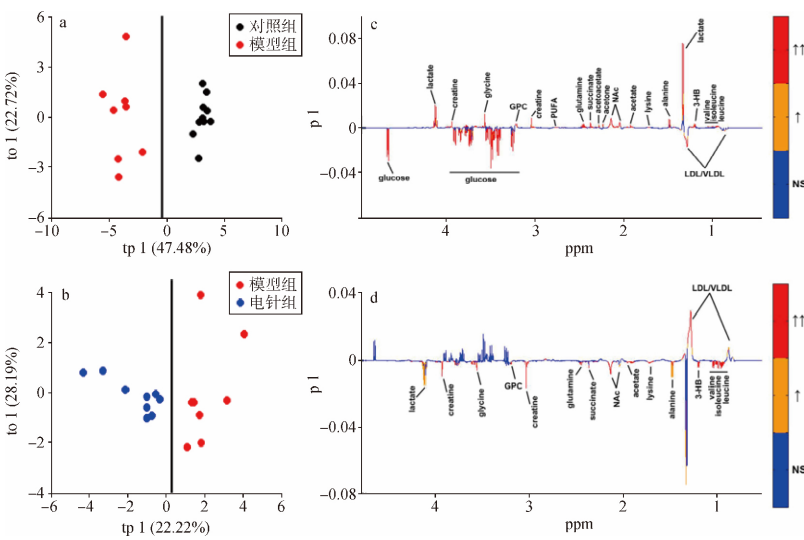


图6 大鼠血清代谢物正交偏最小二乘分析(O-PLS-DA)得分图(a,b)及对应的O-PLS-DA的载荷图(c,d)

注:a,c为对照组与模型组(10只鼠/组);b,d为模型组与电针组(10只鼠/组);红色表示代谢物显著性升高,橙色表示升高,蓝色表示没有显著性变化。

亮氨酸、缬氨酸、3-羟基丁酸、乳酸、丙氨酸、赖氨酸、醋酸盐、N-乙酰糖蛋白、丙酮、乙酰乙酸、琥珀酸、谷氨酰胺、多不饱和脂肪酸、肌酸、甘油磷酸胆碱、甘氨酸的浓度下降,低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白、葡萄糖浓度上升。其中,除丙酮、乙酰乙酸、多不饱和脂肪酸外低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白在电针后下降到接近对照组水平,其它代谢物浓度均在电针“内关”穴治疗后上升到接近对照组水平。

从图7a可见对照组与模型组能明显地区分。从图7b可见模型组与电针组未能明显区分,说明模型组和电针组心肌组织之间的代谢模式差别相对较小。从图7c、图7d对应的RPT验证图中可见回

归线斜率较大,没有过拟合,且 $Q^2 > 0$,表明PLS-DA模型质量较高,预测效果较好,模型可靠,但心肌组织回归线的斜率较血清小,且心肌组织 $Q^2 < 血清 Q^2$,表明心肌组织的模型预测效果没有血清好。

从图8a可见对照组和模型组之间的样品点沿中线分开,图8b可见模型组和电针组之间的样品点未沿中线分开,表明对照组和模型组之间有一定的差异,而模型组与电针组的差异不大。图8c横坐标表示化学位移,纵坐标内的正值区间表示该区间内代谢物在对照组的浓度偏高,纵坐标内的负值区间表示该区间代谢物在模型组的浓度偏高,见表3;图8d横坐标表示化学位移,纵坐标内的正值区间表示该区间内代谢物在模型组的含量偏高,纵坐标内的负值区间表示该区间代谢物在电针组的含量偏高,见表4。

从表3、表4中VIP(阈值 > 1)筛选出差异代谢物,与对照组相比,MIRI模型组大鼠心肌组织的乳酸、丙氨酸、赖氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘油磷酸胆碱、肌酸、牛磺酸、甘氨酸、苏氨酸、腺苷一磷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度下降,葡萄糖浓度明显上升。经电针“内关”穴后,MIRI大鼠心肌组织的肌酸、甘油磷酸胆碱、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸浓度上升到接近对照组水平,葡萄糖浓度下降到接近对照组水平。此外,苏氨酸、腺苷一磷酸浓度在电针后进一步下降。

3 讨论

本课题组前期已经做了大量针刺“内关”穴对MIRI的保护及其机制的动物实验研究^[19-29]。心肌缺血是临床上常见的症状,心脏泵血需要消耗能量,心肌在

表 1 模型组与对照组相比大鼠血清中差异性代谢物及代谢途径

代谢物	¹ H NMR 化学位移	载荷权重系数(r)	变量权重值(VIP)	模型组 vs. 对照组	途径
低密度脂蛋白/ 极低密度脂蛋白	0.86(br), 1.31(br)	0.664	2.084	↑↑	脂肪酸代谢
亮氨酸	0.96(t), 1.70(m), 3.73(m)	0.649	1.302	↓↓	氨基酸代谢
异亮氨酸	0.92(t), 1.00(d), 1.24(m), 1.45(m), 1.97(m), 3.66(d)	0.951	1.425	↓↓	氨基酸代谢
缬氨酸	0.98(d), 1.03(d), 2.26(m), 3.61(d)	0.841	1.164	↓↓	氨基酸代谢
3-羟基丁酸	1.18(d), 2.31(dd), 2.39(dd)	0.893	1.486	↓↓	能量代谢
乳酸	1.33(d), 4.12(dd)	0.724	6.802	↓↓	能量代谢
丙氨酸	1.48(d), 3.77(dd)	0.642	2.722	↓↓	氨基酸代谢
赖氨酸	1.70(m), 1.90(m), 3.02(t), 3.75(t)	0.862	1.111	↓↓	氨基酸代谢
醋酸盐	1.92(s)	0.788	2.207	↓↓	能量代谢
N-乙酰糖蛋白	2.04(br), 2.14(br)	0.976	3.337	↓↓	糖代谢
丙酮	2.22(s)	0.774	2.471	↓↓	能量代谢
乙酰乙酸	2.27(s)	0.818	1.341	↓↓	能量代谢
琥珀酸	2.45(s)	0.945	2.383	↓↓	能量代谢
谷氨酰胺	2.14(m), 2.43(m), 3.76(t)	0.937	1.459	↓↓	氨基酸代谢
多不饱和脂肪酸	2.75(br)	0.804	1.100	↓↓	脂肪酸代谢
肌酸	3.03(s), 3.92(s)	0.821	4.184	↓↓	能量代谢
甘油磷酸胆碱	3.22(s), 3.60(m), 3.68(m), 3.86(m), 3.90(m), 3.94(m)	0.758	1.369	↓↓	脂肪酸代谢
甘氨酸	3.57(s)	0.942	1.731	↓↓	氨基酸代谢
葡萄糖	3.23(m), 3.45(m), 3.83(m), 3.90(m), 4.64(d), 5.23(d)	0.793	2.404	↑↑	糖代谢

注:s表示单峰;d表示双峰;dd表示双二峰;t表示三重峰;m表示多重峰;br表示宽峰;↑↑表示代谢物在模型组的浓度显著性升高;↓↓表示代谢物在对照组的浓度显著性升高。

表 2 电针组与模型组相比大鼠血清中差异性代谢物及代谢途径

代谢物	¹ H NMR 化学位移	载荷权重系数(r)	变量权重值(VIP)	电针组 vs. 模型组	途径
低密度脂蛋白/ 极低密度脂蛋白	0.86(br), 1.31(br)	0.536	3.498	↓	脂肪酸代谢
亮氨酸	0.96(t), 1.70(m), 3.73(m)	0.739	3.188	↑↑	氨基酸代谢
异亮氨酸	0.92(t), 1.00(d), 1.24(m), 1.45(m), 1.97(m), 3.66(d)	0.787	2.128	↑↑	氨基酸代谢
缬氨酸	0.98(d), 1.03(d), 2.26(m), 3.61(d)	0.759	1.296	↑↑	氨基酸代谢
3-羟基丁酸	1.18(d), 2.31(dd), 2.39(dd)	0.744	2.416	↑↑	能量代谢
乳酸	1.33(d), 4.12(dd)	0.486	2.341	↑	能量代谢
丙氨酸	1.48(d), 3.77(dd)	0.631	1.722	↑↑	氨基酸代谢
赖氨酸	1.70(m), 1.90(m), 3.02(t), 3.75(t)	0.869	1.748	↑↑	氨基酸代谢
醋酸盐	1.92(s)	0.514	1.207	↑	能量代谢
N-乙酰糖蛋白	2.04(br), 2.14(br)	0.716	2.831	↑↑	糖代谢
琥珀酸	2.45(s)	0.655	1.604	↑↑	能量代谢
谷氨酰胺	2.14(m), 2.43(m), 3.76(t)	0.703	1.296	↑↑	氨基酸代谢
肌酸	3.03(s), 3.92(s)	0.802	1.748	↑↑	能量代谢
甘油磷酸胆碱	3.22(s), 3.60(m), 3.68(m), 3.86(m), 3.90(m), 3.94(m)	0.893	1.890	↑↑	脂肪酸代谢
甘氨酸	3.57(s)	0.638	1.499	↑↑	氨基酸代谢

注:s表示单峰;d表示双峰;dd表示双二峰;t表示三重峰;m表示多重峰;br表示宽峰;↑表示代谢物在电针组的浓度升高;↑↑表示代谢物在电针组的浓度显著升高;↓表示代谢物在模型组的浓度升高。

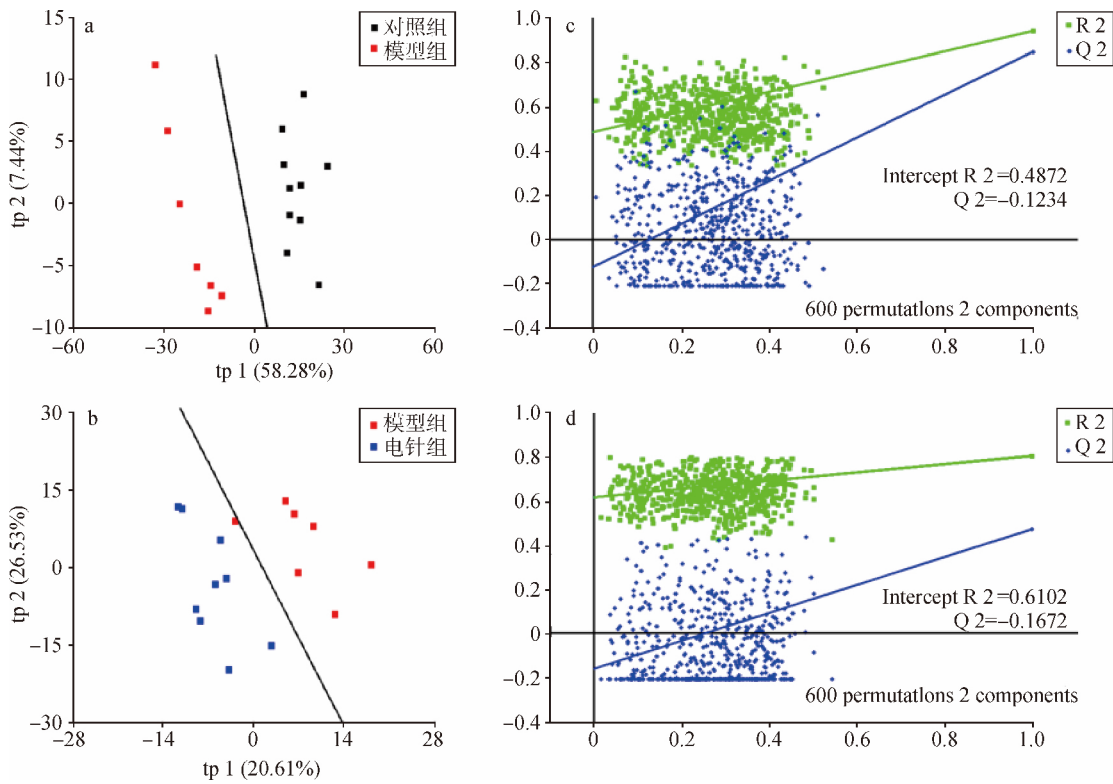


图7 大鼠心肌组织代谢物 PLS-DA 得分图(a,b)及相应的 RPT 验证图(c,d)

注:图 a,c 为对照组与模型组(10 只鼠/组);图 b,d 为模型组与电针组(10 只鼠/组)。

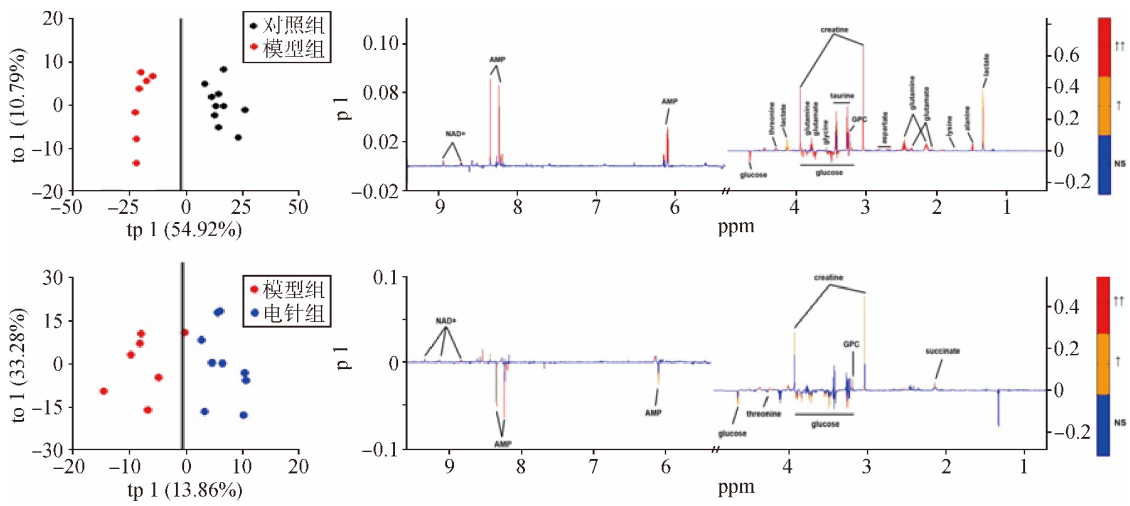


图8 大鼠心肌组织代谢物 O-PLS-DA 得分图(a,b)及对应的 O-PLS-DA 的载荷图(c,d)

注:a,c 为对照组与模型组(10 只鼠/组);b,d 为模型组与电针组(10 只鼠/组);红色表示代谢物显著性升高,橙色表示升高,蓝色表示没有显著性变化。

正常有氧的情况下,所需要的能量主要依靠游离脂肪酸和碳水化合物提供,当心肌发生缺血时,机体内的糖代谢、脂质代谢、氨基酸代谢、能量代谢均会发生紊乱,而代谢紊乱产生的过程是缺血性心脏病的关键病理环节之一。代谢组学技术从代谢的角度进一步揭示心肌缺血时心肌的病理生理变化,从生物信息学的方面分析生物标志物的变化,有助于为缺

血性心脏病提供新的治疗靶点。

本研究的代谢物检测发现,MIRI 大鼠血清低密度脂蛋白/极低密度脂蛋白、葡萄糖浓度上升。心肌缺血损伤时,机体产生一系列的生理应激反应,刺激肾上腺皮质,表现为交感神经兴奋,使血中的儿茶酚胺和糖皮质激素分泌增加,使机体的合成代谢降低,分解代谢亢进,使脂肪、糖原的分解加快,脂质、

表3 模型组与对照组相比大鼠心肌组织中差异性代谢物及代谢途径

代谢物	¹ H NMR 化学位移	载荷权重系数(r)	变量权重值(VIP)	模型组 vs. 对照组	途径
乳酸	1.33(d), 4.12(dd)	0.521	8.117	↓	能量代谢
丙氨酸	1.48(d), 3.77(dd)	0.728	1.984	↓↓	氨基酸代谢
赖氨酸	1.70(m), 1.90(m), 3.02(t), 3.75(t)	0.952	1.491	↓↓	氨基酸代谢
谷氨酸	2.04(m), 2.12(m), 2.33(m), 3.75(dd)	0.885	1.401	↓↓	氨基酸代谢
谷氨酰胺	2.14(m), 2.43(m), 3.76(t)	0.982	4.337	↓↓	氨基酸代谢
天冬氨酸	2.68(dd), 2.80(dd), 3.89(dd)	0.853	2.117	↓↓	氨基酸代谢
甘油磷酸胆碱	3.22(s), 3.60(m), 3.68(m), 3.86(m), 3.90(m), 3.94(m)	0.883	2.164	↓↓	脂肪酸代谢
肌酸	3.02(s), 3.92(s)	0.947	2.429	↓↓	能量代谢
牛磺酸	3.25(t), 3.42(t)	0.759	9.616	↓↓	氨基酸代谢
甘氨酸	3.57(s)	0.714	1.867	↓↓	氨基酸代谢
苏氨酸	1.33(d), 4.25(dd)	0.886	1.304	↓↓	氨基酸代谢
葡萄糖	3.23(m), 3.45(m), 3.83(m), 3.90(m), 4.64(d), 5.23(d)	0.748	2.742	↑↑	糖代谢
腺苷一磷酸	8.25(s), 8.57(s)	0.950	1.146	↓↓	能量代谢
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	8.84(d), 9.14(d), 9.33(s)	0.623	1.747	↓↓	能量代谢

注:s表示单峰;d表示双峰;dd表示双二峰;t表示三重峰;m表示多重峰;↑↑表示代谢物在模型组的浓度显著升高;↓表示代谢物在对照组的浓度升高;↓↓表示代谢物在对照组的浓度显著升高。

表4 电针组与模型组相比大鼠心肌组织中差异性代谢物及代谢途径

代谢物	¹ H NMR 化学位移	载荷权重系数(r)	变量权重值(VIP)	电针组 vs. 模型组	途径
琥珀酸	2.45(s)	0.491	2.192	↑	能量代谢
肌酸	3.02(s), 3.92(s)	0.488	1.998	↑	能量代谢
甘油磷酸胆碱	3.22(s), 3.60(m), 3.68(m), 3.86(m), 3.90(m), 3.94(m)	0.489	1.593	↑	脂肪酸代谢
葡萄糖	3.23(m), 3.45(m), 3.83(m), 3.90(m), 4.64(d), 5.23(d)	0.495	3.474	↓	糖代谢
苏氨酸	1.33(d), 4.25(dd)	0.714	2.350	↓↓	氨基酸代谢
腺苷一磷酸	8.25(s), 8.57(s)	0.701	1.221	↓↓	能量代谢
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	8.84(d), 9.14(d), 9.33(s)	0.698	1.508	↑↑	能量代谢

注:s表示单峰;d表示双峰;dd表示双二峰;m表示多重峰;↑表示代谢物在电针组的浓度升高;↑↑表示代谢物在电针组的浓度显著升高;↓表示代谢物在模型组的浓度升高;↓↓表示代谢物在模型组的浓度显著升高。

血糖水平增高。殷仁富等^[30]发现心肌缺血可引起交感神经兴奋,通过β受体,使体内脂肪组织分解,血中非酯化脂肪酸增高,心肌内非酯化脂肪酸也随之上升。某些必需氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸等显著下降,而氨基酸对心肌具有保护作用,氨基酸的缺乏不利于心肌细胞的修复。张永亮等^[31]的研究结果认为游离氨基酸总量、苏氨酸、甘氨酸、精氨酸以及组织氨水平的降低是缺血心肌氨基酸代谢的特征性变化,与本研究结果一致。此外,本研究发现 MIRI 后,3-羟基丁酸、乳酸、醋酸盐、N-乙酰糖蛋白、丙酮、乙酰乙酸、琥珀酸、谷氨酰胺、多不饱和脂肪酸、肌酸、甘油磷酸胆碱浓度下降。心肌

发生缺血时,心肌微循环障碍,供血不足,使心肌细胞的无氧糖酵解增强,三羧酸循环紊乱,释放大量的炎性介质。心肌缺血后心肌细胞代谢和利用乳酸的能力下降,使乳酸堆积,加剧心肌细胞的受损程度^[32]。乳酸是体内三羧酸循环的中间产物,在心肌氧化磷酸化过程中起核心作用,它所提供的能量参与心肌三磷酸腺苷生成,其代谢异常是能量代谢紊乱的标志。3-羟基丁酸是脂肪不完全氧化时的产物,有文献报道其可以改善缺血过程中的能量代谢,并抑制再灌注后的脂质过氧化,对中枢具有保护作用^[33]。心肌缺血时,丙酮、乙酰乙酸不能进入三羧酸循环,从而还原成乳酸堆积于心肌细胞。经电针

“内关”后,大部分代谢物浓度得到了恢复,表明电针“内关”后心肌的防御功能和修复功能增强,体内的氨基酸、糖原、脂肪酸和能量合成趋于正常,三羧酸循环无明显障碍,儿茶酚胺和糖皮质激素得到恢复。

MIRI大鼠心肌组织的葡萄糖浓度明显上升,心肌缺血后机体由于缺氧处于无氧糖酵解的应激代谢状态,葡萄糖的跨膜转运是调控心肌葡萄糖代谢的一种方式^[34]。经电针“内关”后,葡萄糖、苏氨酸、腺苷一磷酸浓度下降,心肌经过短暂的缺血再灌注后,对葡萄糖的利用减少,说明电针“内关”后可以保护缺血心肌和改善再灌注后心肌功能的恢复。苏氨酸作为必需的氨基酸,具有特有的脱氨基作用,可以释放大量的自由能,其浓度下降,可能与糖酵解的增强有关。腺苷一磷酸是三磷酸腺苷(ATP)合成的基础,ATP是心肌收缩能量的直接形式,腺苷一磷酸减少直接影响着ATP的合成及其在心肌细胞内的含量,ATP的缺乏使 Na^+/K^+ -ATP酶活性受抑制,细胞内 Na^+ 的浓度不能及时排出, Na^+ 浓度升高启动 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换,从而使线粒体 Ca^{2+} 增多,使细胞内呼吸链功能受损,ATP进一步减少形成恶性循环,加速心肌细胞的死亡^[35-36]。电针“内关”后腺苷一磷酸的浓度仍呈下降趋势,表明心肌的能量合成受到障碍,这与文献报道心肌缺血时血清中ATP、一磷酸腺苷、腺苷浓度显著降低一致^[37]。

本文借助于核磁共振的代谢组学方法观察电针“内关”对MIRI模型大鼠血清和心肌组织代谢产物的变化及代谢模式的影响,进一步揭示了MIRI的损伤和修复代谢机制以及心包经与心脏相关的科学内涵,也印证了中医“心包代君受邪”的理论。同时从生物化学角度初步阐释电针“内关”穴对MIRI大鼠心肌具有潜在保护作用的整体作用机制,但其具体的代谢通路及机制需要进一步研究。

参考文献

- [1] YU J S, ZENG B Y, HSIEH C L. Acupuncture stimulation and neuroendocrine regulation[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2013 (111): 125-140.
- [2] LU Z, DONG H, WANG Q, et al. Perioperative acupuncture modulation; more than anaesthesia[J]. *Br J Anaesth*, 2015, 115(2): 183-193.
- [3] 杨媛,刘云霞.薄氏腹针治疗肥胖型2型糖尿病临床观察[J]. *中国针灸*, 2015, 35(4): 330-334.
- [4] 钟欢,余畅,吕安林,等.基于¹H-NMR技术探讨艾灸与针刺对血清代谢物的调节作用[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(3): 402-409.
- [5] 陈勤,吴巧凤,方剑乔.代谢组学技术在针灸作用机制研究中的进展及展望[J]. *浙江中医药大学学报*, 2016, 40(3): 223-226.
- [6] 杜小正,袁博,张星华,等.基于代谢组学研究热补针法治疗类风湿关节炎寒证家兔的作用机制[J]. *针刺研究*, 2017, 42(3): 202-208.
- [7] 高骏,刘旭光,颜贤忠,等.代谢组学研究针灸关键问题的初步策略分析与探讨[J]. *针刺研究*, 2011, 36(4): 296-301.
- [8] 赵珊,王鹏程,冯健,等.代谢组学技术及其在中医药研究中的应用[J]. *中草药*, 2015, 46(5): 756-765.
- [9] 吴巧凤,毛森,蔡玮,等.针刺俞、募穴对功能性消化不良大鼠血清大分子代谢产物的影响[J]. *针刺研究*, 2010, 35(4): 287-292.
- [10] 陈婷,朱永康.代谢组学在中医药领域中研究与应用[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2015, 17(5): 184-187.
- [11] 李先娜,董辉,孙晖.代谢组学在中医药现代化研究中的应用[J]. *中医药信息*, 2016, 33(5): 114-117.
- [12] 邓淑芳,吴巧凤,杨明晓,等.代谢组学技术及其在针灸关键科学问题研究中的应用[J]. *世界中医药*, 2015, 10(4): 472-476.
- [13] 马婷婷,刘迈兰,梁繁荣.系统生物学与针灸现代化[J]. *针刺研究*, 2008, 33(6): 413-415.
- [14] GU J P, HU X M, SHAO W, et al. Metabolomic analysis reveals altered metabolic pathways in a rat model of gastric carcinogenesis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60053-60073.
- [15] YAN B, DENG Y, HOU J, et al. UHPLC-LTQ-Orbitrap MS combined with spike-in method for plasma metabolomics analysis of acute myocardial ischemia rats and pretreatment effect of Danqi Tongmai tablet [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(2): 486-496.
- [16] ZOU H M, ZHANG B, XU X C, et al. Urinary metabolomic strategy to evaluate Compound Danshen Dripping Pills for myocardial ischaemia in rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 112: 98-105.
- [17] 王砚青,江时森,刘平,等.大鼠心肌缺血-再灌注模型心电图变化分析[J]. *医学研究生学报*, 2006, 19(8): 700-702.
- [18] 李忠仁.实验针灸学[M]. 2版,北京:中国中医药出版社, 2007: 255-257.
- [19] 严洁,杨孝芳,易受乡,等.电针“内关”对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞膜钠泵活性及其基因表达的影响[J]. *针刺研究*, 2007, 32(5): 296-300.
- [20] 严洁,刁利红,易受乡,等.电针内关穴对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌能量代谢及组织形态学的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2007, 11(47): 9443-9447.
- [21] 王超,谢文娟,刘密,等.针灸预处理对不同时间心肌缺血再灌注损伤兔血浆内皮素、血清肌酸激酶和心肌组织热休克蛋白70表达的影响[J]. *针刺研究*, 2014, 39(5): 372-376.
- [22] 王超,张佳丽,刘昭,等.电针内关穴预处理对兔心肌缺血再灌注CK及心肌细胞活性的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2015, 34(1): 67-69.
- [23] 林海波,严洁,常小荣,等.针灸内关穴预处理对缺血再灌注损伤心肌细胞死亡受体通路Fas/FasL蛋白表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1286-1290.
- [24] 王超,田岳凤,周丹,等.电针“内关”穴对心肌缺血再灌注大鼠心肌组织一氧化氮、一氧化氮合酶和细胞内钙的影响[J].

- 针刺研究, 2010, 35(2): 113-117.
- [25] 成泽东, 陈以国, 李晓梅, 等. 电针“内关”穴对急性心肌梗死小鼠心肌组织氯离子通道蛋白表达的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(5): 423-428.
- [26] 白增华, 吴兆利, 苏妆, 等. 电针“内关”穴对心肌梗死大鼠心肌氯离子通道相关基因表达的影响[J]. 针刺研究, 2015, 40(6): 439-443.
- [27] 张江玲, 陈杰, 王祥瑞, 等. 电针“内关”穴预处理对缺血再灌注大鼠心肌的保护作用[J]. 针刺研究, 2010, 35(3): 182-187.
- [28] 谭成富, 严洁, 王超, 等. 针灸预处理对心肌梗死再灌注损伤兔不同时间热休克蛋白 27、70、90 表达的影响[J]. 针刺研究, 2017, 42(1): 31-38.
- [29] 宋瑾, 王超, 阳仁达, 等. 电针内关穴预处理对心肌梗死再灌注损伤大鼠 NO、NOS 及腺苷 A₁ 受体的影响[J]. 中国中医急症, 2017, 26(4): 565-567.
- [30] 殷仁富, 陈金明. 心脏能量学代谢与治疗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 51-55.
- [31] 张永亮, 吴家, 李灵芝, 等. 心肌氨基酸代谢与早期急性心肌梗死的关系[J]. 中国法医学杂志, 1993, 8(2): 83-86.
- [32] JIANG M, KANG L, WANG Y, et al. A metabonomic study of cardioprotection of ginsenosides, schizandrin, and ophiopogonin D against acute myocardial infarction in rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 350.
- [33] SUZUKI M, SUZUKI M, KITANMURA Y, et al. Beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, protects rat brain against ischemic damage caused by permanent and transient focal cerebral ischemia[J]. Jap J Pharmacol, 2002, 89(1): 36-43.
- [34] 王璟, 杭涛, 江时森. 短暂缺血再灌注促进心肌葡萄糖转运体基因表达[J]. 医学研究生学报, 2005, 18(4): 17-20.
- [35] 钟承华. Na⁺-H⁺ 交换抑制剂对心肌梗死再灌注损伤的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(2): 243-245.
- [36] 罗红鹤, 庄梅, 汪礼旭, 等. 先天性心脏病合并心功能不全患者心肌 AMP 分解途径的探讨[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(1): 68-71.
- [37] LI F, XU Q, ZHENG T, et al. Metabonomic analysis of *Alilium macrostemon* Bunge as a treatment for acute myocardial ischemia in rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 88: 225-234.

(收稿日期:2017-06-22 修回日期:2017-12-10)

[本文编辑:刘婉宁]

《针刺研究》2018 年“针灸免疫”专栏征稿通知

随着针灸对机体相关免疫效应的影响研究的日渐深入,关于针灸免疫效应的各项基础与临床研究取得了显著进展,结合近期的研究热点,本刊拟组织一批前沿性、高水平、原创性的论文,系统呈现“针灸免疫”领域的新成果、新观点、新思路。邀请成都中医药大学余曙光研究员作为特邀主编,承担本专栏的组稿工作。

一、专栏主题范围(包括但不限于以下内容)

1. 针灸参与免疫调节的实验研究及其机制探讨;
2. 针灸调节免疫性疾病的临床研究及其机制探讨;
3. 针灸防治疾病的作用及其免疫调节机制;
4. 针灸对免疫系统相关作用的研究进展;
5. 针灸对机体局部或全身免疫调节的影响及其机制探讨;
6. 关于针灸免疫调节效应的关键问题分析、研究思路及相关理论探讨。

二、投稿要求

1. 投稿方式: 请通过《针刺研究》采编系统在线投稿,本刊网址为 www.zhenciyanjiu.cn。首次投稿需注册用户名和密码。投稿时请务必在投稿系统标题栏中题目后注明“(2018 年针灸免疫专栏)”字样。
2. 格式要求: 来稿需严格按照本刊最新已发表文章格式撰写。
3. 版权声明: 投稿文章应未在正式出版物上发表过,也不在其他刊物或会议的审稿过程中,不存在一稿多投现象;必须保证文章的真实性。在本刊发表的文章,所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权由本刊编辑部所有。
4. 发表费和稿费: 专栏发表文章将按照《针刺研究》相关规定收取发表费并支付作者稿酬,杂志出版后赠送作者 2 本样刊。

三、稿件处理及发表时间

1. 投稿截止日: 2018 年 7 月 31 日
2. 审稿定稿截止日: 2018 年 9 月 25 日
3. 预期发表日: 2018 年 12 月 25 日

四、联系方式

- (1) 针刺研究编辑部
电话: 010-64089344 或 010-64089342
E-mail: zcyj2468@sina.com
- (2) 成都中医药大学
电话: 13980887928 或 17340120309
E-mail: 672110678@qq.com

联系人: 尹海燕 陈莎莎
特邀主编: 余曙光 研究员 成都中医药大学