

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.07.014

电针“梁门” — “足三里”对急性胃黏膜损伤模型大鼠血清代谢物动态表达的影响

连林宇^{1,2}, 刘彩春¹, 钱林超¹, 刘密³, 何其达^{1,2}, 张媛^{1,3},
沈佳成¹, 黄妙森^{1,2}, 张珑宾¹, 杨宗保^{*}

(1. 厦门大学深圳研究院/医学院, 广东省深圳市南山区高新南四道 19 号虚拟大学园 R4 - A600, 518000; 2. 福建中医药大学针灸学院; 3. 湖南中医药大学针灸推拿学院)

[摘要] 目的 采用核磁共振氢谱技术 (¹H NMR) 探讨电针梁门-足三里治疗急性胃黏膜损伤的可能作用机制。方法 54 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、电针组, 各组又分为干预 1、4、7 天 3 个时间点, 每个时间点 6 只。除正常组外其余各组采用 75% 乙醇灌胃法复制急性胃黏膜损伤大鼠模型。造模成功后电针组大鼠用鼠板捆绑固定, 采用疏密波 (4 Hz, 50 Hz), 电针“梁门”(负极) “足三里”(正极), 每次 30 min, 每日 1 次。正常组和模型组大鼠用鼠板捆绑固定 30 min, 每日 1 次。分别于干预 1、4、7 天后光镜观察胃黏膜病理形态, 检测大鼠血清¹H NMR 谱, 并利用模式识别方法分析不同干预时间下代谢物谱的差异, 用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 模型和独立样本 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 筛选潜在的生物代谢标志物。结果 病理结果显示, 正常组大鼠胃黏膜表面细胞完整, 未见溃疡性损害。干预 1、4 天时模型组大鼠可见胃黏膜上皮结构破坏严重, 毛细血管增生及出血; 干预 4 天时电针组大鼠胃黏膜的黏膜结构恢复较为完整, 较模型组明显改善。血清代谢组学结果显示, 正常组与模型组分离出差异代谢物 6 个: 甘油磷酸胆碱、谷氨酰胺、甜菜碱、葡萄糖、乙酸盐和胆碱。与模型组比较, 干预 1 天时电针组胆碱、甘油磷酸胆碱、葡萄糖、乙酸盐、谷氨酰胺和甜菜碱均升高; 干预 4 天时胆碱、葡萄糖、谷氨酰胺和甜菜碱升高, 甘油磷酸胆碱和乙酸盐降低; 干预 7 天时甘油磷酸胆碱降低, 葡萄糖、乙酸盐、谷氨酰胺和甜菜碱升高, 胆碱无明显变化。结论 电针“梁门”-“足三里”可有效回调急性胃黏膜损伤大鼠血清相关差异代谢物, 恢复相应代谢通路稳定, 以电针 4 天效果最佳, 可能是其逆转胃黏膜损伤的作用机制之一。

[关键词] 急性胃黏膜损伤; 电针; 梁门; 足三里; 核磁共振; 血清代谢组学

针灸作为中国传统医学的重要组成部分, 已广泛应用于临床上的各种胃肠道病症。现代研究表明, 多种难治性胃病首先表现为胃黏膜损伤, 进一步可导致胃黏膜坏死、腺体萎缩、穿孔、癌变等恶劣后果, 严重危害人类健康^[1]。胃黏膜损伤后机体氨基酸、糖和脂质等代谢出现紊乱, 代谢异常是胃黏膜损伤的关键病理环节之一^[2]。有研究证明, 电针胃经穴能对与胃相关的中枢及外周神经电生理、胃运动、胃分泌等起到调整作用^[3]。代谢组学是针对生物或细胞所有代谢产物进行定性和定量分析的学科, 它从机体的整体代谢状态来观察生物

体生理和病理情况下代谢产物的改变^[4]。因此, 本研究使用代谢组学方法观察代谢物的动态变化, 以探讨电针治疗急性胃黏膜损伤的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠 54 只, 鼠龄 6~8 周, 体重 (200 ± 20) g, 购自吴氏实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK (浙) 160803004。在厦门大学动物实验中心适应饲养 1 周后进行实验, 饲养室温 (20 ± 2) °C 相对湿度 65% ± 5%, 自然光暗周期。

1.2 主要试剂及仪器

乙醇、甲醇、氯仿 (分析纯级, 国药集团化学试剂有限公司); HE 染色试剂盒 (批号: G1120, Solarbio 公司); 水合氯醛 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81473751); 深圳市科技计划 (JCYJ20160406140612883)

* 通讯作者: yzblq@163.com (0592) 2183069

20160215, 上海山浦化工有限公司); 4% 多聚甲醛 (批号: 181745, 武汉赛维尔生物科技有限公司); 重水 (D_2O , 批号: 8J-452, 99.9% 氘代, 美国 Sigma 公司); 氘代三甲基硅烷丙酸钠 (TSP, 批号: L-17273, 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司)。

石蜡包埋机 (EG1160 型, 德国 Leica 公司); 旋转切片机 (RM 2135 型, 德国 Leica 公司); 智能生物显微镜 (BX53 型, Olympus 公司); 核磁共振谱仪 (Bruker Avance III 型, 德国 Bruker 公司); 氮吹仪 (HGC-12A 型, 杭州奥盛仪器有限公司); 电针治疗仪 (G6805-2 型, 上海医疗器械高技术公司); 一次性无菌针灸针 (汉医牌 0.25 mm × 25 mm, 长春爱康医疗器械有限公司)。

1.3 造模方法

采用乙醇灌胃的方法建立急性胃黏膜损伤模型^[5], 造模前先将大鼠禁食不禁水 24 h, 然后用灌胃针以 75% 乙醇 4 ml/kg 口腔灌胃, 3 h 后恢复大鼠自由饮食。预实验大鼠次日予断头处死, 摘出全胃, 沿胃底剪开暴露胃腔, 肉眼观察可见黏膜呈潮红充血状态, 胃体数处出现出斑点状溃烂、糜烂、出血, 病理检测可见黏膜缺损, 有炎性细胞浸润, 上皮细胞坏死等, 说明模型复制成功^[5]。

1.4 干预方法

按随机数字表法将 54 只大鼠分为正常组、模型组、电针组, 每组 8 只, 并将每组根据干预时间分为 1、4、7 天 3 个时间点, 每个时间点 6 只。正常组和模型组大鼠用鼠板捆绑固定 30 min, 每日 1 次。电针组大鼠造模后用鼠板捆绑固定, 电针“梁门”“足三里”, 每次 30 min, 每日 1 次。穴位定位参考模拟人体经络穴位的大鼠穴位定位法^[6], 用针灸针刺穴位, 深度约 5 mm, 连接电针治疗仪, 输出线接胃经同侧“足三里”(正极)、“梁门”(负极); 输出参数: 采用疏密波 (疏波时间为 5 s, 密波时间为 10 s); 输出脉冲幅度: 接 500 Ω 负载时 2~4 V; 输出脉冲宽度: 0.5 ms, 疏波 4 Hz, 密波 50 Hz, 强度以毫针出现轻颤为度, 电针时间 30 min, 每日 1 次。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 胃黏膜病理学观察 分别于各时间点用 10% 水合氯醛 (0.3 ml/100 g) 麻醉大鼠, 麻醉后先腹主动脉采血, 再解剖摘取全胃, 沿胃底将胃腔剪开, 暴露胃内侧面, 用 0.9% NaCl 溶液冲洗, 肉眼观察胃黏膜损伤情况, 在胃黏膜损伤明显处切取

1 cm × 0.5 cm 大小组织, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 随后进行常规石蜡包埋切片, HE 染色, 并用光学显微镜进行检查。

1.5.2 血清代谢组学观察 血清样品后在分析前储存在 -80℃, 分析前先于冰上解冻样品至常温, 取 400 μl 血清样品, 加入磷酸盐缓冲液将 pH 值调至 7.4; 同时加入 300 μl TSP 作为定标物, 混合均匀后, 4℃ 10000 r/min 离心 10 min, 离心半径 13.5 cm, 取上清 550 μl 移入 5 mm NMR 管, 在 Bruker 600 MHz 核磁共振谱仪上进行血清检测, 所有血清 1H NMR 光谱中的代谢物均按照 HMDB 数据库 (<http://www.hmdb.ca/>) 进行查找。

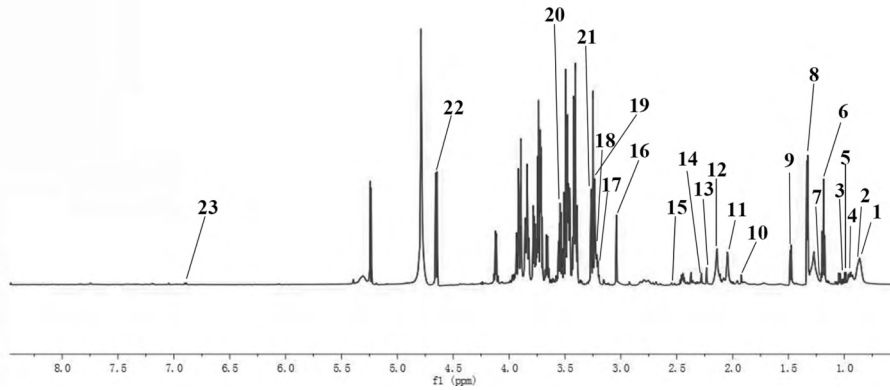
1.6 统计学分析

通过 MestReNova v9.0.1 软件 (Mestrelab Research, Santiago de Compostella, 西班牙) 对血清样本的所有核磁共振氢谱技术 (1H NMR) 图谱进行分阶段和基线校正。在 1H NMR 谱中, 参考了 0.0 ppm 处 TSP 的单峰。为了克服峰值转移问题, 所有光谱都进行了峰值对齐。将范围 δ 4.70 ~ 5.2 ppm 的水峰去除后, 光谱在 δ 处在 0.5 ~ 9.0 ppm 的区域以 0.01 间隔进行分割。为了弥补样品间显著的浓度差异, 来自每个谱图的积分值被归一化为谱中所有积分的和, 再用于进一步的多变量分析。 1H NMR 光谱数据被引入 SIMCA-P14.1 (Umetrics, 瑞典) 软件中多变量分析。在数据处理过程中, 先用主成分分析 (PCA) 对所有组别进行直观的组间分离, 然后用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 最大化组间差异。同时, OPLS-DA 模型通过模型适应性 (R^2) 和预测能力 (Q^2) 的参数来评估, 并使用 S-plot 图获得对相应的 OPLS-DA 模型用于区分的潜在变量。最后, 根据结果中变量的重要性 ($VIP \geq 1.00$) (OriginProver. 8.1) 建立的 OPLS-DA 模型和独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 将潜在的生物代谢标志物筛选出来。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜病理学结果

正常组大鼠干预 1、4、7 天时胃黏膜显示: 胃黏膜表面细胞完整, 未见溃疡性损害, 组织结构正常, 未见萎缩、脱落或变形。干预 1 天时 (图 1), 模型组大鼠可见胃黏膜上皮结构破坏严重, 大量细胞坏死、脱落, 电针组的胃黏膜上皮结构皆损伤较严重, 黏膜细胞稀疏甚至出现空洞, 说明胃溃疡模型造模成功, 电针组与模型组胃黏膜未见明显差



注：1，低密度脂蛋白；2，极低密度脂蛋白；3，异亮氨酸；4，亮氨酸；5，缬氨酸；6，乙醇；7，3-羟基丁酸盐；8，乳酸盐；9，丙氨酸；10，乙酸盐；11，谷氨酸盐；12，谷氨酰胺；13，丙酮；14，乙酰乙酸盐；15，柠檬酸盐；16，肌苷；17，胆碱；18，磷酸胆碱；19，甘油磷酸胆碱；20，甘氨酸；21，甜菜碱；22，葡萄糖；23，酪氨酸

图 4 血清 23 个代谢物¹H NMR 谱图

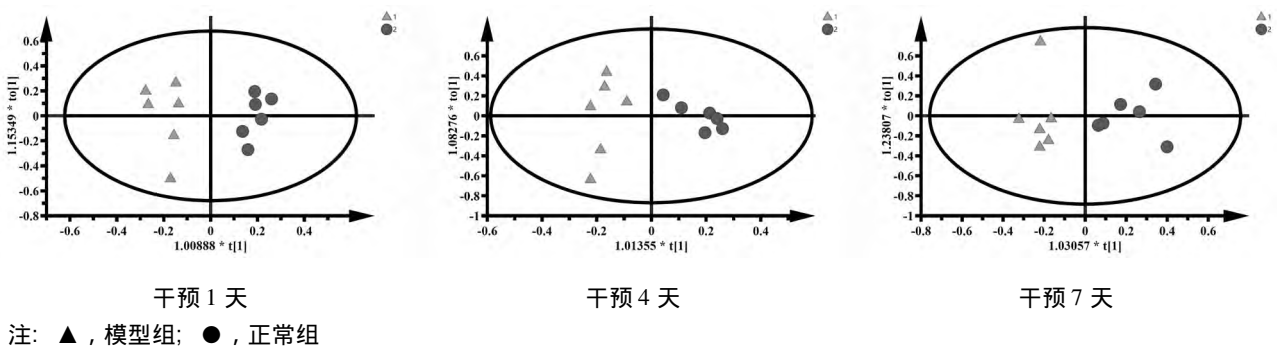


图 5 正常组与模型组 OPLS-DA 得分图

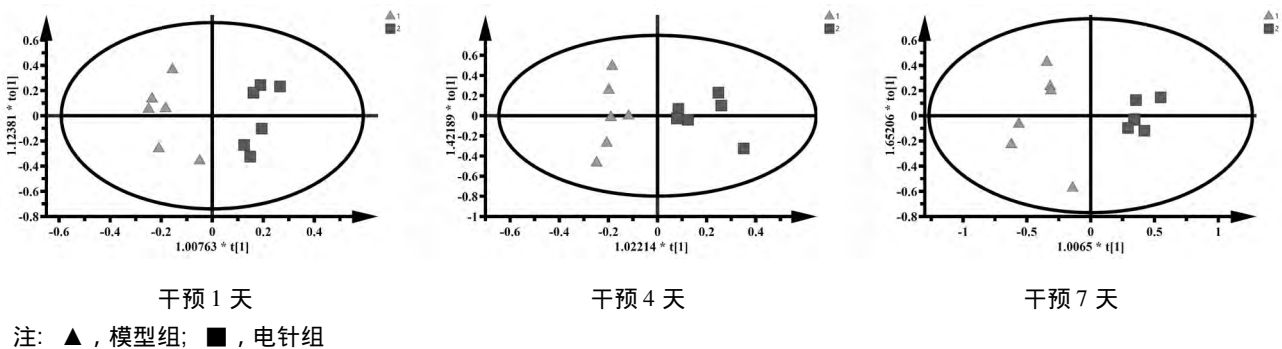


图 6 模型组与电针组 OPLS-DA 得分图

碱、甘油磷酸胆碱、葡萄糖、乙酸盐、谷氨酰胺和甜菜碱均升高。干预 4 天时，与模型组相比，电针组胆碱、葡萄糖、谷氨酰胺和甜菜碱升高，甘油磷酸胆碱和乙酸盐降低。干预 7 天时，与模型组相比，电针组甘油磷酸胆碱降低，葡萄糖、乙酸盐、谷氨酰胺和甜菜碱升高，胆碱无明显变化。

3 讨论

急性胃黏膜损伤属于中医学“胃脘痛”的范畴，十二经脉中的足阳明经内合于胃腑，临床上常使用刺激循行于体表的胃经穴治疗与胃相关的诸多

疾病，本课题组前期研究证明了电针胃经穴能有效促进胃黏膜损伤的修复^[7]。足三里为足阳明经的下合穴，下合穴是六腑气血深注于下肢三阳经的部位，且阳明经乃后天之本，生化之源，气多血多，所以和胃腑的关系密切；梁门近食物出入胃腑之门户，属于近部取穴，能有效调节足阳明经的气血循行，从而达到治疗所属腑脏疾病的作用。

急性胃黏膜损伤后的黏膜修复是由多条代谢通路及代谢物协同参与调节的，而血液作为生命系统中最基础的组织层次，可以作为代谢研究的入口。本实验通过对胃黏膜病理图片的观察发现，与正常

组相比,模型组损伤的胃黏膜随着时间的推移,表现出了一定的自愈趋势。而相比于模型组,干预 1 天后电针对胃黏膜及腺体的恢复并没有明显的疗效;干预 4 天后,与同期模型组相比,可观察到胃黏膜有更明显的修复痕迹;干预 7 天后,与正常组相比,模型组大鼠的胃黏膜开始通过自身调节,修复损伤的胃黏膜,而电针治疗对胃黏膜的修复作用仍比较明显。

差异代谢物中,谷氨酰胺是人体含量最高的氨基酸,作为机体神经系统中最丰富的内源性快速兴奋性神经递质——谷氨酸类神经递质的前体^[8-9],能够促进中枢神经敏化减少脑部抑制性神经递质的生成,同时还能增加肠道的血流量和氧耗量,在维持胃肠黏膜的完整性中起着重要的作用^[10]。醋酸盐主要以乙酰辅酶 A 的形式被生物利用,而乙酰辅酶 A 是许多生物广泛活跃的前提,是线粒体能量供应及脂肪酸合成和脂质代谢的核心^[11]。甜菜碱又称三甲基甘氨酸,存在于细胞之中,维持蛋白质结构以及细胞膜的完整性及其对脂质的代谢具有突出的调控作用,能够降低和重新分配体内脂肪^[12-13]。胆碱是甜菜碱合成的主要来源,是构成生物细胞膜的重要组成部分,有维持细胞膜完整性及细胞信号传导的功能^[14-15]。磷酸胆碱可由胆碱转化而来,可进一步合成磷脂酰胆碱(卵磷脂),成为细胞膜的重要组成部分^[16-17],甘油磷酸胆碱可由卵磷脂分解获得,是一种细胞内渗透调节剂,含量依赖于肌醇的摄取^[18]。本研究结果显示,胃黏膜损伤后胆碱大量表达,谷氨酰胺虽干预 1 天时降低,干预 4 天和干预 7 天时在机体自身调节机制的作用下又明显升高,甜菜碱的浓度则明显降低;而通过电针刺激胃经穴位后能显著提高胆碱、谷氨酰胺和甜菜碱的浓度。本实验初期,电针能够一定程度上逆转胃黏膜损伤大鼠血清中的甘油磷酸胆碱和乙酸盐浓度,然而随着实验的进行,在大鼠自我修复系统的参与下,在 7 天时未能出现一致的波动趋势,考虑与代谢物之间复杂的联系和相互转化、调节有关。后期补充实验应当缩短检测间隔,以获得更加清晰的代谢物变化曲线。

综上所述,电针梁门-足三里可有效治疗急性胃黏膜损伤。在血清的代谢组学研究中发现,急性胃黏膜损伤会影响机体的神经递质、能量代谢和组织修复等相关代谢通路。虽然电针对部分代谢物的调节作用并不明显,或与机体自身的调节机制相互影响,导致谱图显示出来的浓度上下波动与所预测的结果相悖,但仍有少数代谢物对此刺激反应敏

感,因此相关的分子响应机制及更深入的代谢组分析需要更进一步的探索研究。

参考文献

- [1] XU J, ZHENG X, CHENG KK, et al. NMR-based metabolomics reveals alterations of electro-acupuncture stimulations on chronic atrophic gastritis rats[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:45580. doi: 10.1038/srep45580.
- [2] 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[J].*中华中医药杂志* 2016, 31(10):4180-4183.
- [3] 黄裕新,王景杰,王晓斌,等.胃经穴位电针调节胃运动的神经作用机制[J].*胃肠病学和肝病杂志* 2004, 13(4):358-362.
- [4] 隆琦,陈楠.代谢组学在疾病中的应用进展[J].*医学综述* 2010, 16(9):1300-1302.
- [5] PRADEEPKUMAR SINGH L, KUNDU P, GANGULY K, et al. Novel role of famotidine in downregulation of matrix metalloproteinase-9 during protection of ethanol-induced acute gastric ulcer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(2):289-299.
- [6] 李忠仁.实验针灸学[M].2版.北京:中国中医药出版社 2007:255-257.
- [7] 张媛,刘彩春,连林宇,等.电针促进胃黏膜损伤修复的时效关系及分子机制[J].*中国针灸* 2018, 38(7):747-752.
- [8] 贾怡昌,钟才云,王颖明,等.铝对大鼠海马氨基酸类神经递质含量的影响[J].*中华预防医学杂志* 2001, 35(6):397-400.
- [9] 张蕴琨,王斌,蒋晓玲,等.补充谷氨酰胺对大鼠力竭运动后血、脑游离色氨酸和脑 5-羟色胺含量的影响[J].*中国运动医学杂志* 2004, 23(6):634-638.
- [10] 王秋菊,许丽,范明哲,等.谷氨酸和谷氨酰胺转运系统的研究进展[J].*动物营养学报*, 2011, 23(6):901-907.
- [11] BRISSETTE CA, HOUDEK HM, FLODEN AM, et al. Acetate supplementation reduces microglia activation and brain interleukin-1 β levels in a rat model of Lyme neuroborreliosis[J]. *J Neuroinflammation*, 2012, 9:249. doi: 10.1186/1742-2094-9-249.
- [12] KUMAR R, ZHAO S, VETTING MW, et al. Prediction and biochemical demonstration of a catabolic pathway for the osmoprotectant proline betaine[J]. *Mbio*, 2014, 5(1):e00933-13. doi: 10.1128/mBio.00933-13.
- [13] 周静雅,王丽君,侯孟君,等.甜菜碱对非酒精性脂肪肝小鼠肝脏脂代谢的影响[J].*营养学报*, 2014, 36(4):371-376.
- [14] BARAK AJ, BECKENHAUER HC, JUNNILA M, et al. Dietary betaine promotes generation of hepatic S-adenosyl-

- methionine and protects the liver from ethanol-induced fatty infiltration [J]. *Alcohol Clin Exp Res* ,2010 ,17(3) : 552-555.
- [15] GLIER MB , GREEN TJ , DEVLIN AM. Methyl nutrients ,DNA methylation , and cardiovascular disease [J]. *Mol Nutr Food Res* ,2014 ,58(1) : 172-182.
- [16] ABOAGYE EO , BHUJWALLA ZM. Malignant transformation alters membrane choline phospholipid metabolism of human mammary epithelial cells [J]. *Cancer Res* , 1999 ,59(1) : 80-84.
- [17] FAGONE P , JACKOWSKI S. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2013 , 1831(3) : 523-532.
- [18] GALLAZZINI M , FERRARIS JD , BURG MB. GDPD5 is a glycerophosphocholine phosphodiesterase that osmotically regulates the osmoprotective organic osmolyte GPC [J]. *Proc Nati Acad Sci U S A* , 2008 , 105 (31) : 11026-11031.

Effects of Electroacupuncture at “Liangmen” (ST 21) and “Zusanli” (ST 36) on Dynamic Expression of Serum Metabolites in Acute Gastric Mucosal Injury Model Rats

LIAN Linyu^{1,2} , LIU Caichun¹ , QIAN Linchao¹ , LIU Mi³ , HE Qida^{1,2} , ZHANG Yuan^{1,3} , SHEN Jiacheng¹ , HUANG Miaosen^{1,2} , ZHANG Longbin¹ , YANG Zongbao¹

(1. Shenzhen Research Institute/Medical College of Xiamen University , Shenzhen 518000; 2. Acupuncture and Moxibustion College , Fujian University of Traditional Chinese Medicine; 3. School of Acupuncture , Moxibustion and Tuina , Hunan University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of electroacupuncture at Liangmen (ST 21) and Zusanli (ST 36) in the treatment of acute gastric mucosal injury by nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR) . **Methods** A total of 54 SD rats were randomly divided into normal group , model group and electroacupuncture group. Each group was divided into three subgroup treated for 1 , 4 and 7 days respectively , with 6 rats at each subgroup. Except for the normal group , the rat models of acute gastric mucosal injury were replicated by 75% ethanol. After successful modeling , the rats in the electroacupuncture group were fixed with the rat plates , and the electroacupuncture at “Liangmen” (ST 21) (negative polar) and “Zusanli” (ST 36) (positive polar) were performed 30 mins , once a day. Dilatational wave (4 Hz , 50 Hz) was used. Rats in the normal group and the model group were fixed with a rat plate for 30 min once a day. The pathological morphology of gastric mucosa was observed by light microscopy after 1 , 4 , and 7 days of intervention , and the serum ¹H NMR spectra were detected. The pattern recognition method was used to analyze the differences of metabolite profiles under different intervention time. The orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) and independent sample *t*-test were used to screen the potential biometabolism markers at the level *P* < 0. 05. **Results** Pathological results showed that the surface of the gastric mucosa of the normal group was intact and no ulcerative damage was observed. After 1 and 4 days of intervention , the gastric mucosal epithelial structure was severely damaged , and capillary proliferation and hemorrhage occurred in the model group. The mucosal structure of the gastric mucosa in the electroacupuncture group was completely intact after 4 days of intervention , which was significantly improved compared with the model group. Serum metabolomics results showed that the normal group and the model group were separated from 6 metabolites: glycerol phosphate , glutamine , betaine , glucose , acetate and choline. Compared with the model group , choline , glycerophosphocholine , glucose , acetate , glutamine and betaine were increased in the electroacupuncture group after 1 day of intervention; After 4 days of intervention , choline , glucose , glutamine and glycine phosphorylcholine and acetate increased , and betaine , glycerol phosphate choline decreased; After 7 days of intervention , glycerophosphoryl choline decreased , glucose , acetate , glutamine and betaine increased , and choline did not change significantly. **Conclusion** Electroacupuncture at Liangmen (ST 21) and Zusanli (ST 36) can effectively alleviate the serum-related differential metabolites in rats with acute gastric mucosal injury and restore the stability of the corresponding metabolic pathway. The effect of electroacupuncture is best for 4 days , which may be one of the mechanisms of its reversal of gastric mucosal injury.

Keywords acute gastric mucosal injury; electroacupuncture; Liangmen (ST 21) ; Zusanli (ST 36) ; nuclear magnetic resonance; serum metabolomics

(收稿日期: 2018 - 07 - 29; 修回日期: 2018 - 10 - 21)

[编辑: 邓 媛]