

本文引用:曹佳男,钟欢,刘密,罗晓婷,王英姿,常小荣,冯芳.温针灸对慢性萎缩性胃炎大鼠局部穴区组织代谢的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(9):1054-1059.

温针灸对慢性萎缩性胃炎大鼠局部穴区组织代谢的影响

曹佳男¹,钟欢¹,刘密^{1,2},罗晓婷³,王英姿³,常小荣^{1*},冯芳^{3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.浏阳市中医医院,湖南浏阳410300;

3.郴州市第一人民医院西院,湖南郴州423000)

【摘要】目的 基于核磁共振氢谱(¹H nuclear magnetic resonance spectra, ¹H-NMR)代谢组学技术,观察温针灸对慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)大鼠局部穴区组织代谢的影响,从代谢物的差异性分析,以探究温针灸治疗CAG可能的作用机制。**方法** 42只大鼠随机分为正常组、模型组、模型+温针灸组,每组14只,正常组正常喂养,模型组、模型+温针灸组给予造模处理,造模12周后,每组各取2只处死,用于模型评价,造模成功后分别按各组受试因素干预。HE染色观察大鼠胃组织病理学变化评价造模情况以及温针灸干预后的病理变化,¹H-NMR技术检测大鼠局部穴区组织的代谢物,用Chenomx NMR Suite软件分析所得数据。**结果** 模型组大鼠胃组织病理符合CAG病理诊断标准,模型+温针灸干预后的大鼠胃组织病理变化有一定程度改善。温针灸可回调CAG大鼠局部穴区组织乳酸、N,N-二甲基甘氨酸、肌醇、一磷酸腺苷、腺苷、次黄嘌呤的含量,下降甜菜碱、苏氨酸、磷酸胆碱、甘氨酸、二磷酸腺苷、肌苷的含量。**结论** 从代谢的角度证实了温针灸对CAG大鼠有向愈性调整,温针灸主要调节大鼠的核酸及能量代谢。一磷酸腺苷、次黄嘌呤、肌苷、磷酸胆碱等可能是温针灸治疗CAG的代谢物质基础。

【关键词】 慢性萎缩性胃炎;针刺;温针灸;穴区组织;代谢组学

【中图分类号】R245

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.09.002

Effects of Warm Acupuncture on Tissue Metabolism of Local Acupoints of Rats with Chronic Atrophic Gastritis

CAO Jianan¹, ZHONG Huan¹, LIU Mi^{1,2}, LUO Xiaoting³, WANG Yingzi³, CHANG Xiaorong^{1*}, FENG Fang^{3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Liuyang City Traditional Chinese Medicine Hospital, Liuyang, Hunan 410300, China; 3. West Hospital of Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China)

【Abstract】Objective To observe the effect of warm acupuncture on tissue metabolism of local acupoints in rats with chronic atrophic gastritis (CAG) based on ¹H nuclear magnetic resonance spectra (¹H-NMR), and to explore the possible mechanism of warm acupuncture in the treatment of CAG through analysis of difference in metabolite. **Methods** A total of 42 rats were randomly divided into a normal group, a model group and a model + warm acupuncture group, with 14 rats in each group. The normal group was fed normally. The model group and the model + warm acupuncture group were treated with modeling. After 12 weeks of modeling, 2 rats in each group were killed for model evaluation. After successful modeling, intervention was conducted according to the test factors in each group. He staining was used to observe the pathological changes of gastric tissue in rats, and the pathological changes after warm needle moxibustion intervention were evaluated. ¹H-NMR was used to detect the metabolites in

【收稿日期】2020-06-24

【基金项目】国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2015CB554502);国家自然科学基金项目(81574082);郴州市科技发展计划项目(ZDYF2020098)。

【作者简介】曹佳男,女,在读博士研究生,研究方向:针灸应用研究。

【通讯作者】*冯芳,女,副主任护师,E-mail:583281550@qq.com;常小荣,女,教授,博士研究生导师,E-mail:xrchang1956@163.com。

the local acupoint area of rats. The data were analyzed by chenomx NMR suite software. **Results** The pathological changes of gastric tissue in the model group were in accordance with CAG pathological diagnostic criteria, and the pathological changes of gastric tissue in the model + warm acupuncture group were improved to some extent. Moreover, warm acupuncture can reverse the contents of lactic acid, N,N-Dimethylglycine, inositol, adenosine monophosphate, adenosine, hypoxanthine, and decrease the contents of betaine, threonine, phosphorylcholine, choline alfoscerate, adenosine diphosphate and inosine. **Conclusion** From the point of view of metabolism, it is confirmed that warm acupuncture has a healing effect on CAG rats. Warm acupuncture mainly regulates nucleic acid metabolism and energy metabolism in rats. adenosine monophosphate, hypoxanthine, inosine and choline phosphate may be the metabolic basis of warm acupuncture treatment of CAG.

[Keywords] chronic atrophic gastritis; acupuncture; warm acupuncture; acupoint tissue; metabolomics

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是临床上一种常见的消化系统疾病,其主要病理特征为胃黏膜固有腺体萎缩、数目减少,胃黏膜变薄,黏膜基层增厚等。CAG基础上伴有肠腺化生或胃黏膜异型增生等病理表现的已经被归为胃癌的癌前病变状态,且有报道证实CAG患者发生胃癌的风险偏高^[1-2]。查阅相关文献^[3],临床证据显示针灸治疗CAG的效果明显,主要包括针刺、艾灸、针刺-艾灸相结合、电针等疗法。课题组前期研究^[4-7]证实针刺与艾灸对胃黏膜具有保护作用,且从代谢角度证实,不同干预手段下机体的代谢产物有差异,从而治疗疾病。

代谢组学是继基因组学、蛋白质组学之后的一种新兴学科,是对生物体或者组织内的代谢物进行定量分析,并通过代谢物的差异分析代谢物与生理病理相对关系的一种技术^[8]。同时也可反映机体在整体环境下因不同干预方式引起代谢变化产生紊乱功能等。这一特性与中医学治疗疾病的“整体思维”有着异曲同工之妙,提示代谢组学层面分析疾病状态,可能有助于为中医治疗疾病提供循证依据^[9-10]。本课题组前期有实验证实^[6],针刺与艾灸分别对CAG大鼠胃组织、局部穴区组织代谢有着不同的影响,但对于将针刺与艾灸结合的温针灸疗法的相关论述目前暂缺乏考证。温针灸属于中医外治疗法的一种,它是将针刺与艾灸有机结合起来,既有作用于穴位的刺激又有艾灸的灸热刺激,共同起到活血化瘀、温经通络的作用。陈智昌等^[11]采用穴位埋线联合温针灸治疗CAG的临床研究证实穴位埋线联合温针灸可有效改善临床症状,且可修复胃黏膜,但对于作用机制尚不明确。随着课题组研究的逐渐深入,对温针灸对于治疗CAG的具体机制存在疑问。由此本文将立足于代谢组学技术,观察温针灸对CAG大鼠的治疗作用,并分析对大鼠局部组织代谢物差异,以期为其临床深入研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

42只SPF级雄性SD大鼠,体质量(200±20)g,由湖南中医药大学动物实验中心提供,许可证号:SYXK(湘)2013-0005。适应性喂养1周后,将大鼠分为正常组、模型组、模型+温针灸组,每组14只。每组分笼饲养。本实验对动物的处理符合2006年中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》相关规定。

1.2 主要试剂与仪器

N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N-nitro-N-nitroso guanidine, MNNG,日本东京化成工业株式会社,75F7I-TF);苏木素-伊红(Wellbio);BA110S万分之一电子天平(德国Sartorius公司);TGL16M台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪有限公司);组织病理包埋仪(德国Leica公司);核磁共振仪Bruker AVANCE III HD 850 MHz(德国Bruker公司)。

1.3 模型制备

参考相关文献并加以改进^[12-13],42只SPF级SD大鼠,适应性喂养1周,分别采用MNNG癌诱变剂、不规律进食以及40%无水乙醇灌胃制备CAG大鼠模型:配制150 μg/mL MNNG液体装于包裹着锡箔纸的饮水瓶中,供各模型组大鼠饮用,并以第1天足量饮食第2天禁食为1个循环,如此反复来制造不规律进食的模型。此外,各模型组大鼠用40%的乙醇灌胃,每周2次,间隔2~3 d以模仿长期饮酒习惯,连续处理12周。

第12周每组大鼠随机各取2只处死,取胃组织,经过甲醛固定、梯度乙醇脱水、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,在光镜下观察胃黏膜组织有无出现固有腺体萎缩,判断造模成功与否^[14]。

1.4 干预方法

腧穴选择:中脘穴,足三里穴(双),穴位定位参考实验针灸学^[5]。

温针灸方法:消毒大鼠针刺穴位部位,将华佗牌一次性针灸针 0.18 mm×25 mm 不锈钢毫针刺入所选穴位上,直刺深度为 5 mm,留针 20 min,将规格为 5.3 mm×85 mm 的细支艾炷(湖南高圣生物有限公司)裁剪为 5.3 mm×15 mm 的艾柱,置于针灸针上,点燃,1次/d,持续治疗 14 d。

1.5 标本采集及指标检测

胃组织病理学观察^[4]:分别在模型评价时以及治疗后观察大鼠胃组织变化。HE染色:每次取材前需将大鼠禁食 24 h,腹腔注射 10%水合氯醛麻醉后剖腹,钝性分离胃体,剪开胃部,PBS冲洗,在出现明显病变处剪取胃组织标本,于 4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋、切片、HE染色,400倍光镜下观察标本病理变化。

代谢组学检测局部穴区组织的采集及样本制备:大鼠麻醉后以足三里为中心,5 mm×5 mm×5 mm 的体积摘取大鼠局部穴区组织,液氮淬灭并保存在-80℃冰箱中。在处理样品前,提前在-20℃冰箱中预冷,再从-80℃冰箱中取出穴区组织样本,称重,取(100±50)mg的穴区组织。在 0℃条件下,按照 4 mL/g 的比例加入甲醇、氯仿,2.85 mL/g 的比例加入双蒸水匀浆、离心。取上层清液(水相 0.5 mL)转移到新的离心管中,经氮吹仪浓缩去甲醇,冷冻干燥后溶于 PBS 液中,并将上层清液 550 μL 转移到新的核磁管中,离心待检测(1 000 r/min,5 min)4℃保存待检测。

使用核磁共振仪 Bruker Avance III NMR 谱仪(850 MHz),使用 1Dnoesygppr1d 谱脉冲序列(Bruker-Biospin pulse program library)采集 ¹H-NMR。实验参数:实验温度为 25℃,采样点数(TD)为 65 536,混合时间(τ_m)为 120 ms,谱宽(SWH)16 ppm,弛豫延迟时间(D1)4 s,混合时间(D8)0.01 s,采样时间(AQ)3.27 s,累加次数 NS=128 次,空扫次数 DS=4 次。用 Chenomx NMR Suit 软件(Chenomx Inc.,Edmonton, Canada)结合相关文献及 BMRB(<http://www.bmrwisc.edu/metabolomics/>),HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)等化合物化学位移数据库,指认代谢物的共振信号,并挑选代表性样品,采用 COSY、TOCSY、J-resolved 等 2D NMR 谱认代谢物的指认。使用 MestReNova 6.1 处理 ¹H-NMR 谱。

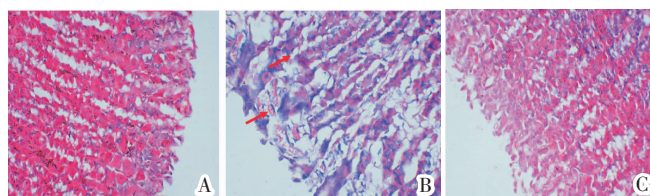
1.6 统计学分析

计算机采集 ¹H-NMR 氢谱图,并对代谢物谱峰进行积分,通过主成分分析(PCA 分析)、偏最小二乘法(PLS-DA)分析,对个组大鼠代谢模式识别,结合正交偏最小二乘法(OPLS-DA)对差异物进行筛选。最后统计以变量的重要性值>1 且满足 P<0.05 作为差异具有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 胃组织病理学检查

各模型组大鼠胃组织较正常组相比,组织黏膜层变薄,大量淋巴细胞浸润,组织充血、水肿,腺体结构排列紊乱,以上符合 CAG 病理诊断。治疗 2 周后,同模型组相比,模型+温针灸组表现为固有腺体保持相对较完整,黏膜下有少量淋巴细胞浸润。见图 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.模型+温针灸组

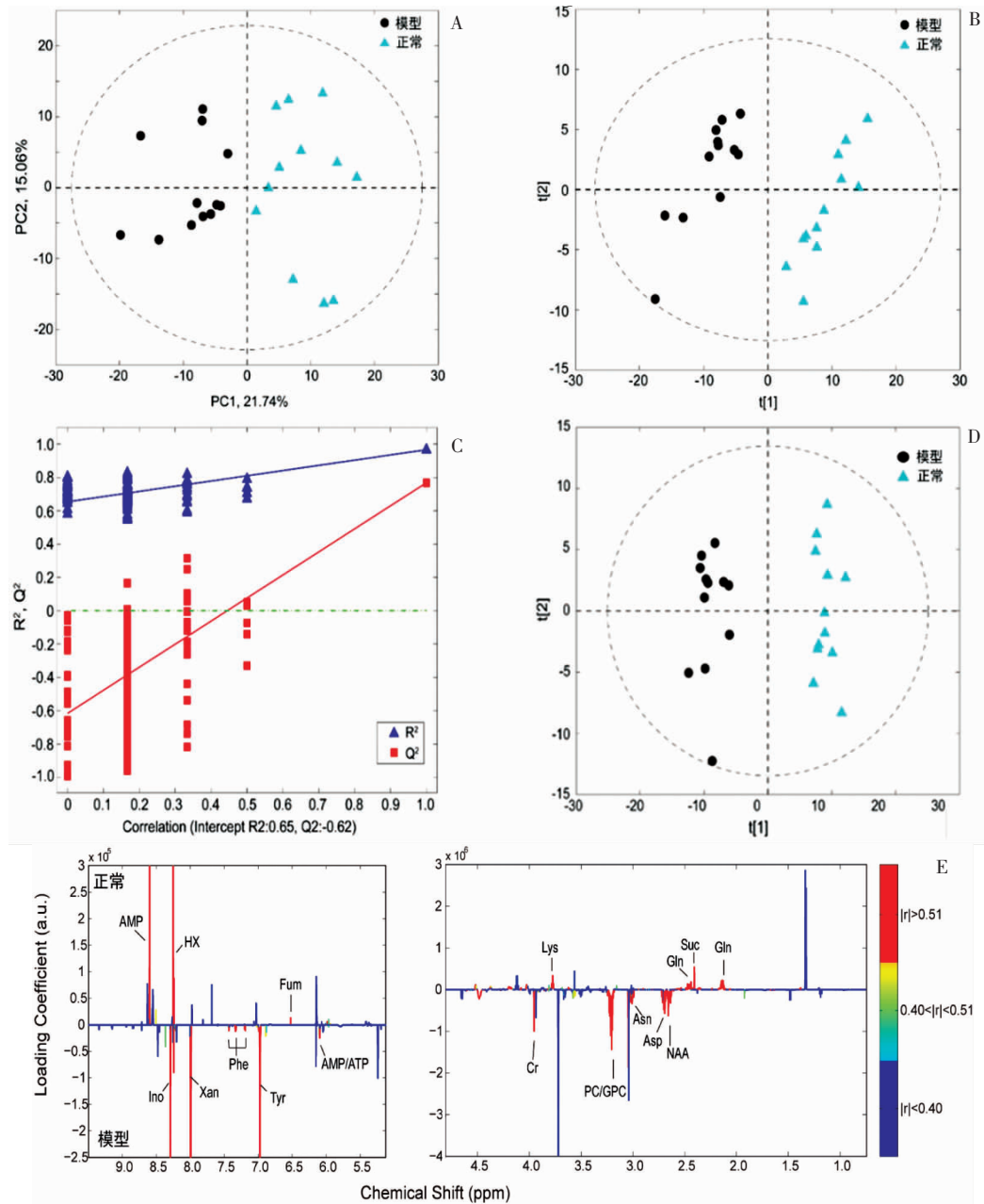
图 1 各组大鼠胃组织 HE 染色图(×400)

2.2 CAG 大鼠“足三里”穴区组织代谢的变化

PCA 分析对比正常组与模型组,二者代谢模式能够较好区分,提示模型组大鼠局部穴区组织代谢模式发生了变化(图 2A)。再将两组结果进行 PLS-DA 建模,结果表明两组样本也可以被正确区分,且交叉验证模型可靠(图 2B-2C)。由于进行 CAG 大鼠“足三里”局部穴区组织差异性代谢物分析之前需要进行 OPLS-DA,结果分析表明正常组与模型组大鼠穴区组织代谢模式在第一预测主成分上可以很好区分(图 2D)。OPLS-DA 维载荷图表明,相对于正常组,模型组穴区组织中谷氨酰胺(Gln)、琥珀酸(Suc)、赖氨酸(Lys)、富马酸(Fum)、次黄嘌呤(HX)、一磷酸腺苷(Amp)显著降低;N-乙酰天门冬氨酸(NAA)、天冬氨酸(Asp)、天冬酰胺(Asn)、磷酸胆碱/甘氨酸胆碱(PC/GPC)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)、黄嘌呤(Xan)、肌苷(Ino)显著升高(图 2E)。

2.3 温针灸对 CAG 大鼠局部穴区组织代谢的影响

如图 3A 所示,模型组与模型+温针灸组对比,显示模型+温针灸组有两个样本与模型组重叠,但



注:A.PCA图;B.PLS-DA分析图;C.交叉验证;D.OPLS-DA分析图;E.代谢模式分析 OPLS-DA 一维载荷图,图中渐变的红、黄、蓝峰分别表示差异极显著、显著和不显著

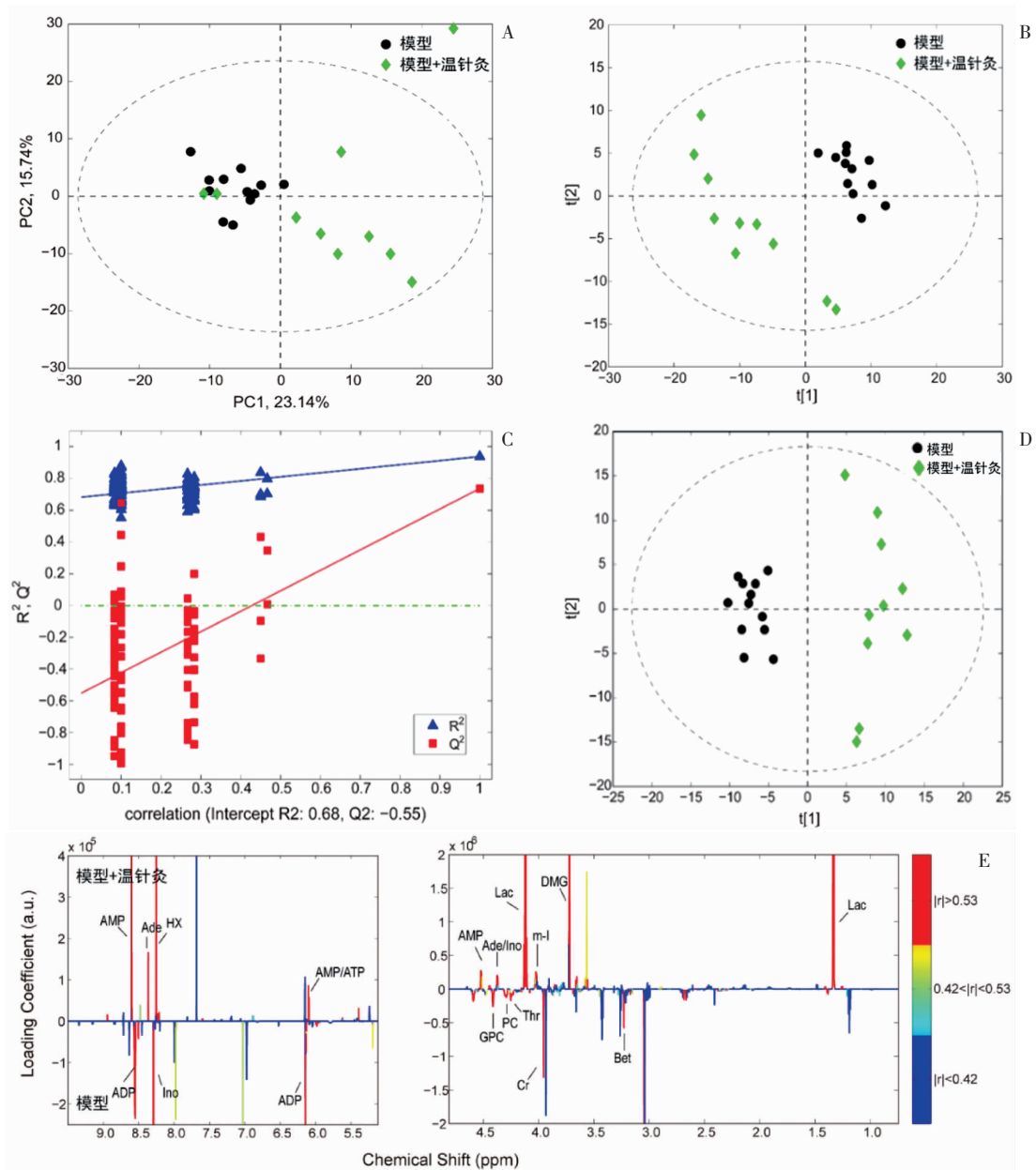
图 2 正常组和模型组大鼠穴区组织代谢模式图

整体区分趋势清晰;随后对两组进行 PLS-DA 建模,如图 3B 所示,两组样本明显区分,且交叉验证(图 3C)表明模型可靠。OPLS-DA 得分(图 3D)结果表明,两组大鼠穴区组织代谢模式在第一预测主成分上可以很好区分可以。而维载荷图中,模型+温针灸组大鼠穴区组织产生的差异性代谢物为乳酸(Lac)、N,N-二甲基甘氨酸(DMG)、肌醇(m-I)、一磷酸腺苷(AMP)、腺苷(Ade)、次黄嘌呤(HX)显著升高,而 Bet、苏氨酸(Thr)、磷酸胆碱(PC)、甘磷胆碱(GPC)、二磷酸腺苷(ADP)、肌苷(Ino)显著降低(图 3E)。

3 讨论

代谢组学是一种兼顾检测和评估由于疾病或其他刺激方式引起生物体机体内源性代谢成分变化的技术^[16],通过检测代谢物的变化进行代谢谱分析检测和诊断生物标志物来了解人体整个生命过程中发生的改变^[17-18]。本实验基于代谢组学技术从代谢物层面分析总结当机体在接受到相应刺激时,代谢模式发生的变化,出现的差异性代谢物以及各代谢物之间变化的相关性。

同正常组大鼠相比,模型组大鼠局部穴区组织



注:A.PCA图;B.PLS-DA分析图;C.交叉验证;D.OPLS-DA分析图;E.代谢模式分析 OPLS-DA 一维载荷图,图中渐变的红、黄、蓝峰分别表示差异极显著、显著和不显著

图3 模型组和模型+温针灸组大鼠穴区组织代谢模式图

有 14 个差异性代谢物。其中浓度降低的代谢物有: 谷氨酰胺、琥珀酸、赖氨酸、富马酸、次黄嘌呤、一磷酸腺苷, 升高的代谢物: N-乙酰天门冬氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、磷酸胆碱/甘磷酸胆碱、酪氨酸、苯丙氨酸、黄嘌呤、肌苷。谷氨酰胺分解产生的谷氨酸可通过增加一氧化氮生成、超氧化物歧化等一系列反应减少黏膜损伤^[19], 谷氨酰胺、谷氨酸和天冬氨酸的代谢为肠道完整性和功能维持提供大量的三磷酸腺苷^[20], 参与能量代谢与炎症反应密切相关^[21]。以上提示 CAG 病理状态下大鼠局部穴区组织的能量代谢出现紊乱。

同模型组相比, 温针灸干预后, 大鼠“足三里”局

部穴区组织的代谢发生了改变: 甜菜碱、苏氨酸、磷酸胆碱、甘磷酸胆碱、二磷酸腺苷、肌苷含量降低; 乳酸、N,N-二甲基甘氨酸、肌醇、一磷酸腺苷、腺苷、次黄嘌呤的含量有所升高。一磷酸腺苷是一种腺嘌呤核糖核苷酸, 由三磷酸腺苷两次水解得到, 在能量代谢上起着重要作用。而腺苷是用于合成三磷酸腺苷、腺嘌呤、腺苷酸等重要的中间体, 在温针灸干预后磷酸腺苷、腺苷含量回调, 提示温针灸可以增加局部组织的能量代谢。次黄嘌呤是核酸代谢的产物, 在次黄嘌呤氧化酶的作用下转化成黄嘌呤, 温针灸回调次黄嘌呤的含量同样证实温针灸可增强 CAG 大鼠机体的核酸代谢^[22]。以上分析提示, 温针灸干预

主要调节 CAG 大鼠穴区组织的核酸代谢及能量代谢方面。

综上所述,温针灸可调节 CAG 大鼠局部穴区组织代谢物的含量。虽然目前代谢组学技术已经广泛应用到中医各领域,但由于代谢组学技术的特性,其后期数据挖掘较复杂且困难,准确寻找作用机制还需深入研究,以期为临床选择治疗方法提供强有力的依据,从而进一步提高针灸治疗疾病的临床疗效。

参考文献

- [1] GIANNAKIS M, CHEN S L, KARAM S M, et al. Helicobacter pylori evolution during progression from chronic atrophic gastritis to gastric cancer and its impact on gastric stem cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(11): 4358-4363.
- [2] YOON H, KIM N, SHIN C M, et al. Risk factors for metachronous gastric neoplasms in patients who underwent endoscopic resection of a gastric neoplasm[J]. Gut and Liver, 2015, 10(2): 228-236.
- [3] 朱倩倩,洪靖,谭辉.中医药治疗慢性萎缩性胃炎研究进展[J].陕西中医药大学学报,2020,43(5):88-93.
- [4] 朱伟,胡小珍,钟欢,等.基于经脉-脏腑相关的慢性萎缩性胃炎模型大鼠足三里穴区代谢组学特点分析[J].中华中医药杂志, 2019,34(2):768-772.
- [5] 马明珠.艾灸与针刺对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜 COX-2、EGF 及 EGFR 表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2018.
- [6] 刘霞,余畅,钟欢,等.基于代谢组学技术研究艾灸“足三里”对慢性萎缩性胃炎大鼠胃组织代谢物的影响[J].针刺研究,2019,44(2):113-119.
- [7] 杨青.艾灸与针刺对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2018.
- [8] XU J J, ZHENG X J, CHENG K Kai, et al. NMR-based metabolomics reveals alterations of electro-acupuncture stimulations on chronic atrophic gastritis rats. [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 45580.
- [9] 张永怡.基于代谢组学技术研究艾灸干预类风湿关节炎大鼠的效应机制[D].南京:南京中医药大学,2018.
- [10] LAO Y M, JIANGJ G, YAN L. Application of metabonomic analytical techniques in the modernization and toxicology research of traditional Chinese medicine[J]. British Journal of Pharmacology, 2009, 157(7): 1128-1141.
- [11] 陈智昌,苏秋菊,邢建伟.穴位埋线联合温针灸治疗慢性萎缩性胃炎的疗效观察[J].中国临床医生杂志,2020,48(9):1119-1121.
- [12] 钟国新.针刺对慢性萎缩性胃炎模型大鼠 NF- κ B 转导系统影响的研究[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [13] 陆为民,单兆伟,吴静,等.大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变气虚血瘀证动物模型的研制[J].南京中医药大学学报(自然科学版), 2000(3):156-158.
- [14] 李俊青,李纯,刘希,等.参七消痞颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠血清 GH、EGF、GAS 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(12): 172-175.
- [15] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2007:255-257.
- [16] BUJAK R, STRUCK-LEWICKA W, MARKUSZEWSKI M J, et al. Metabolomics for laboratory diagnostics[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 113: 108-120.
- [17] CUI J, LIU Y, HU Y, et al. NMR-based metabolomics and correlation analysis reveal potential biomarkers associated with chronic atrophic gastritis[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2017, 132: 77-86.
- [18] 马宁,杨亚军,刘希望,等.基于液质平台代谢组学生物样本的采集和制备[J].中国兽医学报,2017,37(6):1193-1200.
- [19] MARQUES C, JOSÉ L MAURIZ, SIMONETTO D, et al. Glutamine prevents gastric oxidative stress in an animal model of portal hypertension gastropathy[J]. Annals of Hepatology Official Journal of the Mexican Association of Hepatology, 2011, 10(4): 531-539.
- [20] 王晓青,王大中.谷氨酰胺对晚期胃癌患者化疗期间免疫功能及胃肠道反应的影响[J].实用癌症杂志,2014,29(6):666-668.
- [21] WATFORD M. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation[J]. The Journal of Nutrition, 2008, 138(10): 2003S-2007S.
- [22] YUE D, ZHANG Y, CHENG L, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by 1 H-NMR-based metabolomics[J]. Entific Reports, 2016, 6: 24430.

(本文编辑 苏维)