

· 针灸推拿 ·

本文引用:陈日兰,何彦霖,江海燕,刘泓毅,韦秋娜,罗国馨,彭元霞,朱英. 基于尿液代谢组学探究刺血结合药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 234-240.

基于尿液代谢组学探究刺血结合药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠作用机制研究

陈日兰¹, 何彦霖², 江海燕², 刘泓毅², 韦秋娜², 罗国馨², 彭元霞², 朱英^{1*}

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530001; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001)

〔摘要〕 **目的** 通过观察刺血结合药线点灸对急性痛风性关节炎模型大鼠尿液代谢组学影响, 初步探讨刺血结合药线点灸对急性痛风性关节炎作用机制。**方法** 将 39 只 SD 大鼠随机分 3 组: 空白组、模型组、治疗组, 每组 13 只。模型组仅造模, 治疗组造模后给予刺血结合药线点灸治疗。记录各组大鼠的步态、关节肿胀度变化; 并运用气相色谱仪与飞行时间质谱仪的联用代谢组学技术分析大鼠尿液代谢产物, 进行主成分分析和偏最小二乘方判别分析对数据进行统计。**结果** 治疗后 3 组大鼠的步态评价和造模后各时间段的关节肿胀度比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 以 $VIP > 1$ 为标准寻找治疗组与模型组中的标志性差异性代谢物 16 个, 以 $P < 0.05$ 及质谱信息再鉴别出标志性差异代谢物 α -酮戊二酸、 γ -氨基丁酸 1、肌醇、半乳糖苷、柠檬酸 5 个; 经 MetPA 数据库进行二次分析, 发现急性痛风性关节炎模型大鼠治疗前后其尿液代谢组学变化涉及代谢通路 13 条, 其中丁酸代谢、三羧酸循环、半乳糖代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢这 4 条代谢途径影响值的临界点 > 0.10 。**结论** 刺血结合药线点灸可以改善急性痛风性关节炎大鼠步态及关节肿胀度。其作用机制可能是通过影响体内丁酸代谢、三羧酸循环、半乳糖代谢以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢通路从而抑制炎症因子转录生成, 加速局部代谢循环, 起到消炎、镇痛作用。

〔关键词〕 痛风性关节炎; 刺血; 药线点灸; 代谢组学

〔中图分类号〕 R245.31

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.020

Mechanism of Action of Blood-Pricking Therapy Combined with Medicated Thread Moxibustion in Rats with Acute Gouty Arthritis: A Study Based on Urine Metabolomics

CHEN Rilun¹, HE Yanlin², JIANG Haiyan², LIU Hongyi², WEI Qiuna², LUO Guoxin², PENG Yuanxia², ZHU Ying^{1*}

(1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China)

〔Abstract〕 **Objective** To explore the mechanism of action of blood-pricking therapy combined with medicated thread moxibustion (BPT+MTM) in the treatment of acute gouty arthritis by observing the effect of the above treatment on the urine metabolomics in a rat model of acute gouty arthritis. **Methods** In this study, a total of 39 Sprague-Dawley rats were randomized into blank group, model group, and treatment group, with 13 rats in each group. Rats in the model group were subjected to modelling only, while the rats in the treatment group were given BPT+MTM after modelling. The changes in gait and joint swelling were recorded for each group; the urine metabolites of the rats were analyzed by gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry; meanwhile, principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis were carried out to summarize the statistical data. **Results** There were significant differences between the three groups in gait evaluation results after treatment and the degree of joint swelling at different time points after modelling ($P < 0.05$). Sixteen metabolites with remarkable differences between

〔收稿日期〕 2018-05-21

〔基金项目〕 国家自然科学基金 (8146076)。

〔作者简介〕 陈日兰, 女, 教授, 主任医师, 研究方向: 针灸治疗痛症的预防研究。

〔通讯作者〕 * 朱英, 女, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 492355256@qq.com。

the treatment group and the model group were identified with $VIP>1$ as the criteria, and five more metabolites (α -ketoglutaric acid, γ -aminobutyric acid 1, inositol, galactoside, and citric acid) with remarkable differences between the above two groups were identified with $P<0.05$ and mass spectrometric data as the criteria. A secondary analysis of the MetPA database revealed 13 metabolic pathways involved in the changes of urine metabolomics after treatment in the rat model of acute gouty arthritis, among which four pathways (butyric acid metabolism; tricarboxylic acid cycle; galactose metabolism; and alanine, aspartic acid, and glutamic acid metabolism) had a critical point of influence of >0.10 . **Conclusion** BPT+MTM can improve the gait and joint swelling in rats with acute gouty arthritis, the mechanism of which may involve affecting *in vivo* butyric acid metabolism, tricarboxylic acid cycle, galactose metabolism, and alanine, aspartic acid, and glutamic acid metabolism, thus inhibiting the transcription and production of inflammatory factors, accelerating local metabolism and circulation, and finally reducing the inflammation and pain.

[**Keywords**] gouty arthritis; blood-pricking therapy; medicated thread moxibustion; metabolomics

痛风性关节炎是因尿酸钠沉积于关节导致关节红肿、疼痛的关节疾病^[1]。严重影响患者生活,且近年来患病率明显升高并有年轻化趋势^[2]。刺血结合药线点灸疗法以其简便、快捷、显效在痛风性关节炎治疗中凸显优势,但是其机制的研究甚少,尤其在动物实验方面,因此,加强实验研究为临床应用提供理论依据,迫在眉睫^[3-6]。代谢组学能从整体水平研究生物体内源性小分子在内外环境或基因影响下的代谢物变化,可对比评价治疗前后的机体病理生理状态,解释生物体代谢的本质科学寻找有效的治疗措施,降低治疗的毒副作用,提高临床疗效^[7]。基于此,本研究使用代谢组学技术,通过检测、分析急性痛风性模型大鼠尿液中代谢产物,寻找差异性标志物,分析相关代谢通路,以探究刺血结合壮医药药线点灸治疗急性痛风性关节炎的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性SD大鼠39只,健康成年,体质量(200±20)g,购自广西医科大学动物实验中心[动物许可证号:SCXK(桂)2016-0002],根据动物伦理学于广西中医药大学实验室动物房适应性喂养10周后,按体质量分级随机分为空白组、模型组、治疗组,每组13只。

1.2 主要实验试剂与仪器

MODELDS-671 电子天平(大连星海电子衡器有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);L-2-氯苯丙氨酸(CAS号:103616-89-3,质量分数≥98%),购买于上海恒柏生物科技有限公司;双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)[含1%三甲基氯硅烷(TMCS),v/v],购买自美国REGIST科技公司;Agilent 7890A 气相色谱仪

(美国安捷伦科技公司);Pegasus HT 气相气相色谱-飞行时间质谱仪(美国LECO公司);壮医药药线(直径0.7 mm,长30 cm,购买自广西壮族自治区壮医医院)。

1.3 尿酸钠溶液制备

电子秤取1.000g微晶尿酸钠结晶,玻璃杯碾碎后放入烧杯,加9 mL生理盐水,再加1 mL吐温80,加热搅拌,配制成10 mL尿酸钠溶液^[8]。

1.4 模型制备

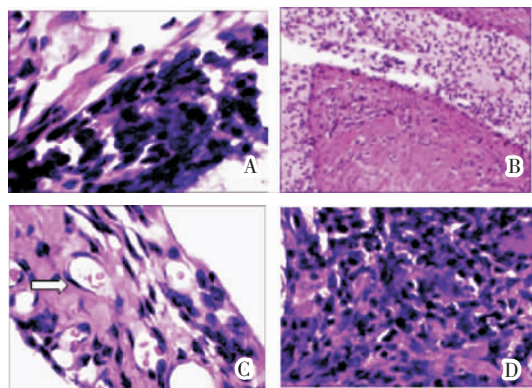
采用Coderre等^[8]的改良法对模型组、治疗组大鼠进行造模。使用4号注射针头的注射器将0.4 mL尿酸钠溶液注入到大鼠的右侧踝关节腔内。注射部位及方法^[9]:在操作台上固定大鼠,充分暴露右后侧踝关节,并将其摆放成直角后找到右后肢背侧正中胫腓骨与踝关节之间的间隙,将注射器针头倾斜45°通过此间隙插入关节腔内,将尿酸钠混悬液注射进关节腔,以对侧关节囊突出为标准。

1.5 造模成功判定^[8,10]

1.5.1 大鼠行为 造模前大鼠精神良好,毛色白,饮食饮水正常、体质量正常增加,关节炎的发生率为百分之百。造模后,精神欠佳,毛色发黄干枯,踝关节在炎症高峰期可触到痛风结节,行动可见跛行,饮食量和饮水次数均明显减少,体质量增长减缓明显。

1.5.2 右后肢踝关节形态学改变 注射尿酸钠溶液24 h后,每组随机抽取3只大鼠进行HE染色。通过图1的病理切片图片可以看出:在光镜下,造模后的大鼠踝关节软组织周围的毛细血管扩张、充血,关节滑膜增厚并伴有大量以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润,局部软组织遭到破坏,新生小血管上有较多的成骨纤维细胞形成,肉芽组织中出现较多的异物多核巨细胞。而正常的大鼠踝关节在光镜下是结构

清晰、无病理性改变的,所以通过肉眼观察和 HE 染色光镜观察,均提示造模成功^[11]。



注:A.毛细血管增生;B.踝关节周围软组织炎症;C.踝关节滑膜增厚图;D.踝关节渗出性炎症

图1 各组大鼠右后肢踝关节形态学改变光镜图(HE,×400)

1.6 干预方法

空白组、模型组不做任何治疗性干预;治疗组:在肿胀的踝关节局部取老鼠造模一侧踝关节上红肿最明显的地方作为阿是穴,常规消毒后,用5号一次性注射器针头在该处点刺放血,放血量使用注射器吸取以精确出血量达 (0.30 ± 0.04) mL。造模12 h后每天放血1次,连续3 d。药线点灸:刺血结束后在肿胀踝关节局部沿肿胀外围向中心点灸,3壮,每壮相隔2 mm。连续3 d。

1.7 步态观察和关节肿胀度分析

1.7.1 步态观察 参照步态分级标准表(见表1)^[12],对空白组、模型组、治疗组进行步态观察,并记录。

表1 大鼠步态分级标准表

分级等级	分级标准
0级	可正常行走
I级	受试下肢略弯曲病轻微跛行
II级	受试下肢刚可触及地面且中度跛行
III级	受试下肢离地,3组着地重度跛行

1.7.2 关节肿胀度观察 分别于造模前、造模后12、24、48、72 h用皮尺测量踝关节肿胀度(关节肿胀度=造模后关节周径-造模前的关节周径),取2次测量所得数值的平均值,比较各组大鼠造模前后踝关节肿胀变化程度^[9]。

1.8 尿液代谢组学检测

1.8.1 样本收集 收集24 h尿液,以8 000 r/min离心10 min,用2 mL冻存管收集上层尿液,收集完成以后及时密封置于-80℃的液氮罐保存,送检。

1.8.2 样本处理 (1)代谢物萃取:取100 μL尿液

样本,加入20 μL尿素酶(80 mg/mL),振荡混匀30 s,37℃烘箱孵育1 h;加入0.35 mL甲醇,再加入20 μL L-2-氯苯丙氨酸,漩涡混匀30 s;将上述二者混匀后,在4℃,13 000 r/min的环境下离心15 min;缓慢取出0.39 mL上清液放入2 mL进样瓶(甲烷硅基化的)中,供检验。(2)代谢物衍生化:将提取的代谢物放入真空浓缩器中进行干燥并提取;在干燥后的代谢物中加入80 μL甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐,溶于吡啶20 mg/mL),轻轻混匀后,放入烘箱中80℃孵30 min;向每个样品中迅速加入100 μL BSTFA(含有1% TCMS,v/v)后70℃孵育120 min;冷却至室温,向混匀的样本中加入10 μL FAMES(饱和脂肪酸甲酯标准混合液,溶于三氯甲烷C8-C16:1 mg/mL;C18-C24:0.5 mg/mL);混匀,上机检测。(3)质谱条件:选择不分流模式下的进样量1 μL,初始的柱温为60℃保持1 min后开始以升温速度为每分钟10℃的速率上升至330℃,持续10 min;前进口样的温度保持在280℃,传输药线温度在280℃,离子源温度220℃;电离电压:-70 eV;载气使用氦气,前进样口吹扫流速为3 mL/min,柱流速为1 mL/min;扫描方式为全扫描85~600 m/z,频率保持为20 spec/s。溶剂延迟时间366 s。

1.9 数据处理及生物标志物筛选

等级资料采用 χ^2 检验;计量结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,数据采用SPSS 22.0软件。采用方差分析,多重两两比较采用LSD或SNK检验,方差不齐者采用Dunnett T3法检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。代谢组学采用LECO公司的Chroma TOF4.3X软件和LECO-FiehnRtx5数据库对尿液质谱图信息进行峰匹配,峰提取及数据导出等处理。将上述得到的数据导入SIMCA-P软件进行无监督模式是别的主成分分析(principal component analysis, PCA)和非监督的正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)辨别分析。通过得分图比较各组样本组间差异,初步判断各组尿液代谢产物差异。

2 结果

2.1 步态观察

治疗结束后对大鼠进行步态评价,模型组与空白组、治疗组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

2.2 关节肿胀度

通过观察大鼠关节肿胀度的改变,分析并且观

表 2 3 组大鼠步态观察结果 (n=10,只)

组别	0 级	I 级	II 级	III 级
空白组	10	0	0	0
模型组	0 [▲]	0 [▲]	2 [▲]	8 [▲]
治疗组	8 ^{▲*}	1 ^{▲*}	1 ^{▲*}	0 ^{▲*}

注:与空白组比较,▲P<0.05;与模型组比较,*P<0.05

察刺血结合药药线点灸对关节肿胀度的缓解作用。各组大鼠造模后关节周径均有不同程度的增加,与空白组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$);造模后 12、24、48、72 h,治疗组关节肿胀程度低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 治疗过程中各组关节肿胀度的变化($\bar{x}\pm s$,n=10,mm)

组别	造模前	造模后 12 h	造模后 24 h	造模后 48 h	造模后 72 h
空白组	23.93±0.68	23.86±0.73	23.62±0.71	23.77±0.77	23.65±0.82
模型组	24.01±0.68	29.21±1.52 [#]	28.71±1.70 [#]	28.30±0.57 [#]	27.32±0.45 [#]
治疗组	23.97±0.77	28.08±0.58 [*]	26.16±0.75 [*]	25.41±1.14 [*]	24.86±0.77 [*]

注:与空白组比较,#P<0.05,与模型组比较,*P<0.05

2.3 主成分分析(PCA)

PCA 分析是一种无监督的多元变量统计分析方法,可以从多维空间反应各组样本之间的代谢差异和组间样本差异,是原始数据最初呈现的一种基本原始状态。本研究取空白组、模型组、治疗组大鼠治疗后的 24 h 尿液样本进行 PCA 分析,结果如图 2。在 PCA 得分图上 3 组的样本点分散于不同区域,3 组大鼠代谢图谱具有明显差异趋势,说明本实验造模方法可行。空白组的样本点主要分布在第一、四象限且比较集中具有一定的聚类性,说明组内大鼠内源性代谢物差异较小,代谢状态和变化趋势相对稳定;模型组样本点主要分布在第二、三象限且比较分散,治疗组样本点主要分布在第二象限且较,3 组样本点无明显的交叉和重叠。治疗组大鼠代谢状态、变化趋势逐渐向空白组大鼠靠近。

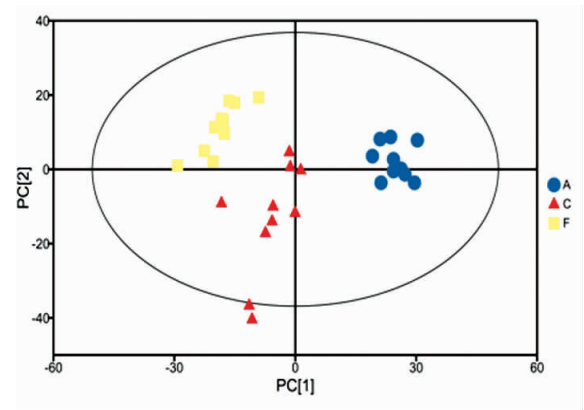
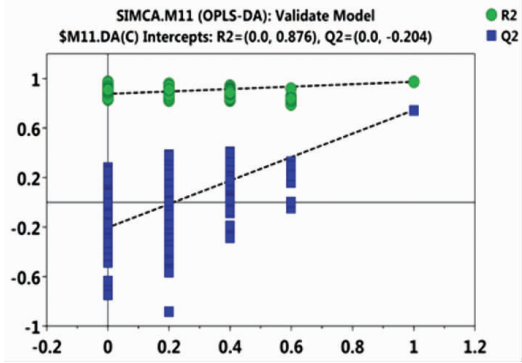


图 2 3 组大鼠治疗后 24 h 尿液样本 PCA 分析图

2.4 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)

PLS-DA 是一种有监督的多元变量统计分析方法,该方法与 PCA 相比,主要是在分析的过程中引入了一个新的变量 (Y 变量),此变量具有分类信息,从而减少或删除组内差异对分类造成的干扰,其判别能力优于 PCA 分析。本实验使用 SIMCIA-P12.0 软件对空白组大鼠和模型组大鼠采用 PLS-DA 分析法从整体上进行了尿液代谢谱数据的模式识别,同时运用响应置换检验验证模型。PLS-DA 分析的得分图和 200 次模型响应置换结果,如图 3 所示。治疗组与模型组的 PLS-DA 模型相关参数为: $R^2=0.926$, $Q^2=0.645$,得分图中的 R^2 值代表模型的解释能力, Q^2 值代表模型的预测能力, $Q^2>0.5$ 说明模型预测能力较好,模型有效; $Q^2>0.9$ 说明此模型效果突出。模型响应置换结果为: $R^2=0.876$, $Q^2=-0.262$,响应置换检验中的 $Q^2<0$ 则说明建模成功,没有出现过度拟合。本实验得分图中各组内的样本点也趋于集中,空白组与模型组之间分隔更远。通过置换检验,说明该模型的拟合度较好,进一步验证了本实验 PLS-DA 模型的构建是成功的。



注:R2 绿色圆圈;Q2 蓝色方块。绿药线代表 R2 的回归药线;蓝色药线代表 Q2 的回归药线

图 3 治疗组与模型组置换检验图

2.5 正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)

OPLS-DA 是 PLS-DA 的一种衍生运算分析方法,主要结合了正交矫正信号(OSC)和 PLS 两种方法,通过将 X 轴矩阵信息分解成与 Y 相关和不相关的两类信息,能够排除与分组不相关的一些变量,更准确的筛选出有价值的差异性变量从而使判别能力更优。通过 OPLS-DA 分析过滤掉不相关的正交信号,结合差异性变量的重要性投影值(VIP)值,从而使获得的差异性代谢物更加可靠^[9]。

本实验对空白组、模型组、治疗组大鼠进行了 OPLS-DA 分析,模型相关参数显示为: $R^2Y=0.841$, $Q^2=0.732$,均大于 0.5,说明此模型构建成功,具有很

好的拟合度和预测能力。从 OPLS-DA 得分图(如图 4)中可以看出空白组、模型组、治疗组呈现出明显的区分。其中,治疗组接近空白组。

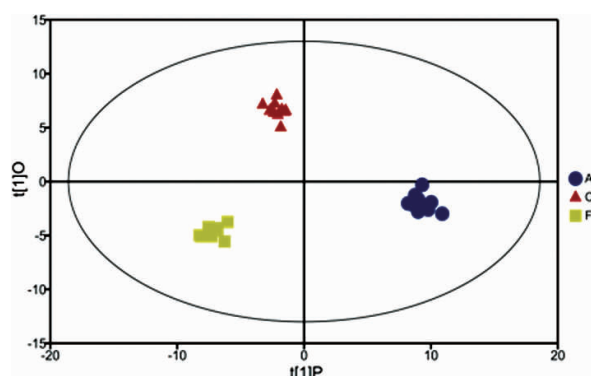


图 4 3 组大鼠 OPLS-DA 平面得分图

2.6 差异性代谢物的筛选及鉴定

通过上述模型的识别与分析,确定本实验中 3 组大鼠尿液内源性代谢物存在显著的代谢差异,根

据 OPLS-DA 分析中的 VIP 值显示出各变量的 VIP 值。VIP 值越大,说明贡献作用越大。由于变量的平均 VIP 值都接近于 1,故常将 VIP>1 的变量视为对模型具有重要意义。因此本实验筛选出 16 个 VIP 值大于 1 的变量,见表 4。再以 VIP>1 和 P-value<0.05 为标准,并结合载荷图和 T 检验筛选候选变量,通过这些变量所代表的化合物的质谱信息,从 HMDB、KEGG 等数据库中查找出 5 个潜在生物标志物。见表 5。

2.7 潜在生物标志物的代谢途径变化

将涉及的潜在生物标志物代入 MetPA 数据库进行分析,构建代谢通路,可知急性痛风性关节炎模型大鼠涉及的代谢通路包括:三羧酸循环、丁酸代谢、谷氨酸代谢、吡哆醇代谢等 13 条(见表 6)。代谢通路影响值的临界点设置为>0.10,高于这个值将被选择作为潜在的靶标路径,从图 5 可以看出丁酸代谢、三羧酸循环、半乳糖代谢,以及丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢这 4 条代谢途径在刺血结合药线灸改善急性痛风

表 4 治疗组与模型组中的差异代谢产物基本注释表

查询	匹配	HMDB 数据库	PubChem 数据库	KEGG 数据库
D-Arabitol	D-Arabitol	HMDB00568	827	C01904
Galactonic acid	Galactonic acid	HMDB00565	128869	C00880
Myoinositol	Myoinositol	HMDB00211	NA	C00137
4-Pyridoxic acid	4-Pyridoxic acid	HMDB00017	6723	C00847
Oxoglutaric acid	Oxoglutaric acid	HMDB00208	51	C00026
Galactinol	Galactinol	HMDB05826	439451	C01235
Citric acid	Citric acid	HMDB00094	311	C00158
Gamma-Aminobutyric acid	Gamma-Aminobutyric acid	HMDB00112	119	C00334
Mesaconic acid	Mesaconic acid	HMDB00749	638129	C01732
3-Hydroxymethylglutaric acid	3-Hydroxymethylglutaric acid	HMDB00355	1662	C03761
Tartaric acid	Tartaric acid	HMDB00956	444305	C00898
Nebularine	Nebularine	HMDB29956	248425	C01736
3-Aminoisobutanoic acid	3-Aminoisobutanoic acid	HMDB03911	64956	C05145
Maleic acid	Maleic acid	HMDB00176	444266	C01384
Adenine	Adenine	HMDB00034	190	C00147
D-Tagatose	D-Tagatose	HMDB03418	92092	C00795

表 5 治疗组与模型组中有重要贡献的差异性代谢物结果

序号	代谢物	相关代谢通道	VIP	P-Value	变化趋势	
					模型组 vs 空白组	治疗组 vs 模型组
C00026	α-酮戊二酸	丁酸代谢, 三羧酸循环	2.81225	0.000277467	上升	下降
C00334	γ-氨基丁酸 1	丁酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	1.30896	0.028045398	上升	下降
C00158	柠檬酸;枸橼酸	丙氨酸、天冬氨酸谷, 氨酸代谢, 三羧酸循环	2.29684	0.003175019	上升	下降
C00137	肌醇	半乳糖代谢	1.4296	0.03683565	下降	上升
C01235	半乳糖苷 1	半乳糖代谢	2.55454	0.003723977	上升	下降

注:对于 GC-Quad FiehnLib 数据库,有越来越多的根据保留指数命名的衍生物,如丝氨酸 1,丝氨酸 2 和丝氨酸 3

表 6 通过 MetPA 得到的通路分析结果

Pathway Name	Total	Expected	Hits	Raw p	-log(p)	Holm adjust	FDR	Impact	Details
Butanoate metabolism	20	0.22825	2	0.020589	3.883	1	0.68529	0.02899	KEGG
Citrate cycle (TCA cycle)	20	0.22825	2	0.020589	3.883	1	0.68529	0.12155	KEGG
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	24	0.27389	2	0.029123	3.5362	1	0.68529	0.17721	KEGG
Galactose metabolism	26	0.29672	2	0.033842	3.3861	1	0.68529	0.03729	KEGG
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	5	0.057061	1	0.055852	2.8851	1	0.9048	0	KEGG
Ascorbate and aldarate metabolism	9	0.10271	1	0.098413	2.3186	1	1	0	KEGG
Vitamin B6 metabolism	9	0.10271	1	0.098413	2.3186	1	1	0	KEGG
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	16	0.1826	1	0.1686	1.7802	1	1	0.2963	KEGG
beta-Alanine metabolism	19	0.21683	1	0.19708	1.6241	1	1	0	KEGG
Inositol phosphate metabolism	26	0.29672	1	0.26002	1.347	1	1	0.13525	KEGG
Pyrimidine metabolism	41	0.4679	1	0.37965	0.96849	1	1	0	KEGG
Arginine and proline metabolism	44	0.50214	1	0.40129	0.91306	1	1	0.01198	KEGG
Purine metabolism	68	0.77603	1	0.55062	0.59671	1	1	0.00472	KEGG

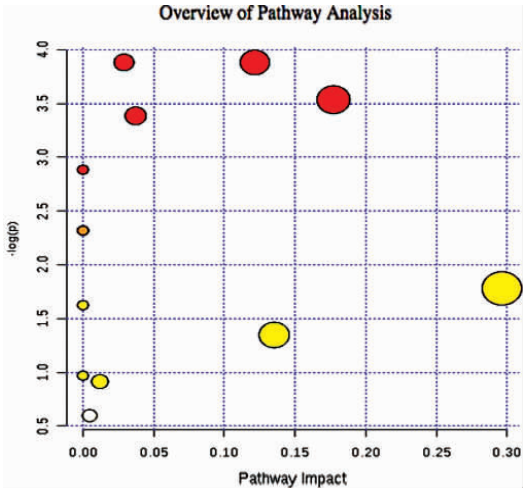


图 5 通过 MetPA 得到的通路分析概要图

性关节炎模型大鼠内源性代谢中起到重要作用。

3 讨论

壮医药线灸疗法是在中医学传统直接灸如麦粒灸、灯火灸等基础上,结合岭南地域气候等特点,经岭南壮民族长期特色医疗实践特点加以发展起来的^[12]。其综合麦粒灸、灯火灸优势,再利用经药物浸渍后的特制苈麻线点灸相应穴位起到更为独特和广泛的作用。而刺血疗法又称刺络法、放血疗法,是中医学中最古老的治疗疾病方法之一,历代医家多用于急证、热证、实证,通过泻热排毒,疏通龙火两路达到阴阳平衡起到治疗作用^[13]。付琳琳^[14]等人认为此法可加快局部血液循环使关节沉积尿酸结晶代谢加快,从而缓解急性痛风性关节炎疼痛。

本实验通过对 3 组大鼠关节肿胀度、步态分析及尿液 PCA 分析,证明刺血结合药线点灸对急性痛风性关节炎有较好疗效。通过对急性痛风性关节炎

大鼠尿液 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 等分析,从 16 种差异代谢性代谢物中筛选出 5 种与急性痛风性关节炎相关的潜在生物标志物及 4 条最可能的代谢通路,分别是:丁酸代谢;三羧酸循环;丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;半乳糖代谢。

其中丁酸代谢通路与炎症反应关系最为密切,具有增强免疫力,抑制炎症反应,维护肠道健康的作用,可抑制内皮细胞的活化,减少细胞间粘附分子-1、血管细胞粘附分子-1 释放^[15],从而抑制白细胞在血管内边集,并伸出伪足迁移至炎症组织中^[16]。同时影响补体激活,阻碍炎症旁途径的激活^[17]。结合本研究结果可考虑刺血结合药线点灸通过影响模型大鼠体内具有抗炎作用的 γ -氨基丁酸,以及可降低应激状态中炎症因子 IL-6 等水平的 α -酮戊二酸,使丁酸代谢通路逐渐恢复正常,从而发挥抗炎作用,达到治疗急性痛风性关节炎的效果。

三羧酸循环、半乳糖代谢,能反映机体能量代谢水平^[18],急性痛风性关节炎期间,模型大鼠对能量的需求大大增加,炎症反应明显,机体的能量代谢异常^[19], α -酮戊二酸、柠檬酸、半乳糖苷 1 的含量升高,肌醇下降,导致三羧酸循环、半乳糖代谢发生障碍,而当大鼠经过刺血结合药线点灸治疗后,尿液中的 α -酮戊二酸、柠檬酸、半乳糖苷 1,的含量开始向正常值回调,体内异常的三羧酸循环开始恢复正常,机体的能量代谢趋向于恢复正常,炎性症状得到缓解、疼痛减轻。

丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢可刺激机体内的谷氨酰胺(合成 γ -氨基丁酸的重要原料)生成增

多。在治疗组大鼠接受刺血结合药线点灸治疗后,其尿液代谢物中的 γ -氨基丁酸的含量与模型组相比下降,而 γ -氨基丁酸是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,能通过调 Ca^{2+} 通道,减少神经末梢递质释放,减轻痛觉^[20]。可初步推断刺血结合药线点灸疗法通过降低机体中 γ -氨基丁酸的表达,从而减少谷氨酰胺合成,使异常的丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢逐渐恢复正常。

综上所述,本实验通过液质联用技术对急性痛风性关节炎大鼠尿液进行代谢组学分析,说明这几种内源性物质与人体代谢机制联系较为紧密。一定程度上反映急性痛风性关节炎大鼠体内代谢水平的变化,为监测疾病生理状态下体内代谢物的变化和痛风发作的预防和改善提供一定依据,为刺血结合壮药药线点灸对急性痛风性关节炎大鼠作用机制的深入研究奠定了一定基础,从而促进民族医药外治法发展。

参考文献

- [1] 曾小峰,陈耀龙.2016 中国痛风诊疗指南[J].浙江医学,2017,39(21):1823-1832.
- [2] VINOLO M A, RODRIGUES H G, NACHBAR R T, et al. Regulation of inflammation by short chain fatty acids [J]. *Nutrients*, 2011, 3(10): 858-76.
- [3] 李迎春,徐建华.急性痛风性关节炎的发病机制及研究进展[J].安徽医学,2013,34(1):96-98.
- [4] 廖子龙,陈日兰,朱英,黄琪琳,等.不同壮医疗法治疗急性痛风性关节炎临床疗效对比研究[J].内蒙古中医药,2014,33(20):92-93.
- [5] 李凤珍,钟丽雁,梁艳,等.壮医刺血疗法治疗急性痛风性关节炎的临床研究[J].中医学报,2014,29(1):134-136.
- [6] 朱英,陈日兰,庞学丰,等.刺络放血结合壮医药线点灸治疗痛风急性关节炎期的观察[J].广西中医药,2010,33(4):8-10.
- [7] 李倩倩,刘秋萍,韦双双,等.代谢组学在痛风中医药研究中的应用[J].中国中医急症,2017,26(8):1405-1408.
- [8] CODERRE T J, WALL P D. Ankle joint arthritis in rats provide a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritic agents[J]. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 1988, 29(3):261.
- [9] CODERRE T J, WALL P D. Ankle joint urate arthritis in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant[J]. *Pain*, 1987, 28(3):379-393.
- [10] 梁莎,夏有兵,朱毅,等.急性痛风性关节炎大鼠局部造模方法的改良[J].中国现代医学杂志,2014,24(2):10-13.
- [11] 曹燕亚,郭瑞新.尿酸盐致大鼠痛风模型的制备[J].现代中药研究与实践,2011,25(1):32-33.
- [12] 黄瑾明.壮医药线点灸疗法[M].广西:广西人民出版社,1986:23.
- [13] 吕凯露,夏有兵,程洁,等.刺血疗法对急性痛风性关节炎大鼠局部 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-10 启动子甲基化的影响[J].南京中医药大学学报,2017,33(5):509-514.
- [14] 付琳琳.放血疗法缓解急性痛风性关节炎的临床观察[D].广州:广州中医药大学,2016.2-4.
- [15] MENZEL T, LUHRS H, ZIRLIK S, et al. Butyrate Inhibits Leukocyte Adhesion to Endothelial Cells Via Modulation of VCAM-1[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2004, 10(2):122-128.
- [16] ZAPOLSKA-DOWNAR D, SIENNICKA A, KACZMARCZYK M, et al. Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF- κ B and PPAR α [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15(4):220-228.
- [17] ANDOH A, TSUJIKAWA T, FUJIYAMA Y, et al. Role of Dietary Fiber and Short-chain Fatty Acids in the Colon[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(4):347-358.
- [18] PUERTOLLANO E, KOLIDA S, YAQOOB P. Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome[J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2014, 17(2):139-144.
- [19] STEMPERLJ M, KEDINGER M, AUGENLICHT L, et al. Essential role of the JAK/STAT1 signaling pathway in the expression of inducible nitric-oxide synthase in intestinal epithelial cells and its regulation by butyrate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(13):9797-9804.
- [20] ZIMMERMAN M A, SINGH N, MARTIN P M, et al. Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(12): G1405-G1415.

(本文编辑 匡静之)