

本经取穴针刺法对肝阳上亢型无先兆偏头痛患者 MME 基因表达的影响

黄银兰¹ 万明雨² 梁希森¹ 梁繁荣³

摘要 目的 观察本经取穴针刺法调控肝阳上亢型无先兆偏头痛患者膜金属肽链内切酶(membrane metallo-endopeptidase, MME)基因的差异表达。**方法** 将20例肝阳上亢型无先兆偏头痛患者随机分为经穴组(针刺患侧经穴)和非经非穴组(针刺患侧非经非穴),每组各10例,每天针刺1次,连续10天。利用基因芯片技术,获得两组的基因表达谱,并对其进行Gene Ontology(GO)分析。**结果** 与本组治疗前比较,经穴组治疗后MME基因表达量下降($P=0.0023$),该基因富集于 β -淀粉样蛋白代谢过程(beta-amyloid metabolic process, $P=3.16E-05$)以及肽代谢过程(peptide metabolic process, $P=0.009612$),该基因在非经非穴组治疗后各样本中未见表达。**结论** 本经取穴对肝阳上亢型无先兆偏头痛的效应可能通过对MME基因的调控实现。

关键词 本经取穴;膜金属肽链内切酶基因;脑啡肽酶;无先兆偏头痛

Effect of Acupuncture along Affected Meridian on the MME Gene Expression of Migraine Patients without Aura of Gan-yang Hyperactivity Syndrome HUANG Yin-lan¹, WAN Ming-yu¹, LIANG Xi-sen¹, and LIANG Fan-rong³ 1 College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan(750003), China; 2 Eastern College, Beijing University of Chinese Medicine, Hebei (065001), China; 3 College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of acupuncture along affected meridian on the membrane metallo-endopeptidase (MME) gene expression of migraine patients without aura (MO) of Gan-yang hyperactivity syndrome (GYHS). **Methods** Totally 20 MO patients of GYHS were randomly assigned to the acupoint group (acupuncture along affected meridian) and the non-acupoint group, 10 cases in each group. Needling was performed once per day for 10 consecutive days. Gene chip technology was used to obtain two sets of gene expression profiles and analyzed using Gene Ontology (GO). **Results** In the acupoint group, MME gene expression decreased after needling ($P=0.0023$). That gene was rich in the beta-amyloid metabolic process ($P=3.16E-05$) and the peptide metabolic process ($P=0.009612$). Its expression was not seen in the non-acupoint group. **Conclusion** The effect of point selection along affected meridian could be achieved possibly by regulating the MME gene expression.

KEYWORDS point selection along affected meridian; membrane metallo-endopeptidase gene; enkephalinase; migraine without aura

无先兆偏头痛(migraine without aura, MO)的

发作过程是多步骤、多种因素参与的极复杂过程,涉及多个基因表达及其表达产物的改变来共同参与离子通道的开放、多种神经肽类的合成、分解、代谢等。膜金属肽链内切酶(membrane metallo-endopeptidase, MME)基因又称脑啡肽酶(enkephalinase, NEP)基因,研究表明该基因编码的酶类与MO的关系密切^[1,2]。本研究通过针刺本经穴位,观察MME基因在肝阳上亢型偏头痛患者中的表达变化,希望揭示经穴效应在分子水平体现的机制,现报道如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30960485);国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(No. 2012CB518500)

作者单位:1.宁夏医科大学中医学(银川 750003);2.北京中医药大学东方学院(河北 065001);3.成都中医药大学推拿学院(成都 610075)

通讯作者:梁繁荣, Tel: 028-87781314, E-mail: lfr@cducm.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2015.03.0294

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 MO 诊断参照 2004 年国际头痛学会 (HIS) 制定的“头痛疾患的国际分类” (ICHD-2)^[3] 相关标准。中医辨证分型标准参照《针灸治疗学》^[4] 头风肝阳上亢证辨证标准: 头痛而胀, 或抽掣而痛。痛时常有烘热, 面红目赤, 耳鸣如蝉, 心烦口干。舌红, 苔黄, 脉弦。

2 纳入及排除标准 纳入标准: 年龄 18~65 岁; 符合 MO 诊断标准, 每月发作 1~6 次, 有 1 年以上偏头痛病史; 符合头风肝阳上亢型辨证标准; 神经系统检查阴性, 头颅 CT 或 MRI 正常; 患者本人签署或由其直系亲属代签知情同意书。排除标准: 合并心血管、肝、肾、消化、造血系统等严重原发性疾病者, 精神病患者, 未经控制的高血压; 易合并感染及出血; 过敏体质; 孕妇。

3 一般资料 20 例均为 2011 年 10 月—2012 年 3 月宁夏医科大学中医门诊部针灸科 MO 患者。按随机数字表法分为经穴组和非经非穴组, 每组各 10 例。其中经穴组男 5 例, 女 5 例; 年龄 24~53 岁, 平均 (28±4) 岁; 病程 3 个月~10 年, 平均 (3.3±1.2) 年, 轻度疼痛 2 例, 中度疼痛 4 例, 重度疼痛 4 例。非经非穴组男 4 例, 女 6 例; 年龄 22~53 岁, 平均 (29±5) 岁; 病程 2 个月~8 年, 平均 (2.8±0.9) 年; 轻度疼痛 2 例, 中度疼痛 5 例, 重度疼痛 3 例。两组患者一般资料比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

4 治疗方法 经穴组针刺患侧少阳经穴: 角孙、外关、阳陵泉、丘墟。非经非穴组针刺患侧 4 个非经非穴点: (1) 肘内侧, 肘尖与腋窝连线中点直刺 0.5~1 寸; (2) 肱骨内上髁与尺骨腕部之间中点, 尺侧缘: 直刺 0.5~1 寸; (3) 臂内前缘三角肌和二头肌交接处: 直刺 0.5~1 寸; (4) 足三里水平旁开 1~2 cm, 胫骨外侧缘处: 直刺 0.5~1 寸。两组均采用平补平泻法, 每天 1 次, 连续治疗 5 次后休息 2 天, 共针刺 10 次。

5 观察指标及方法

5.1 总 RNA 抽提及芯片实验前准备 治疗前后患者采肘静脉血 5 mL, 用红细胞裂解液 (中国 Solarbro 公司) 提取、清洗白细胞, 然后用 trizol (美国 Invitrogen 公司) 法抽提白细胞总 RNA, 并进行琼脂糖凝胶电泳, 余下 -80℃ 冷藏备用。Illumina Total Prep RNA 扩增试剂盒 (美国 Illumina 公司) 合成 cDNA, Illumina Total Prep RNA 扩增试剂盒 (美国 Illumina 公司) 进行纯化, Illumina Total Prep RNA 扩增试剂盒 (美国 Illumina 公司) 反转录成 cRNA, Illumina Total Prep RNA 扩增试剂盒 (美国 Illumina

公司) 再进行纯化。基因芯片主要采用美国 Illumina 公司开发的第三代 HumanHT-12 微珠芯片。

5.2 芯片及杂交 将纯化后的 cRNA 与杂交试剂 (美国 Illumina 公司) 混合, 杂交试剂由 GEX-HBY 和无 RNA 酶的水组成。在 Sentrix Bead Chip 杂交舱杂交箱 58℃ (美国 Illumina 公司) 进行样本杂交, 用 E1BC 洗液 (美国 Illumina 公司) 在 250 mL 染色缸进行室温孵育。再用高温洗液 (美国 Illumina 公司) 和无 RNA 酶的水在 Hybex 加热器及 Hybex 水浴槽中进行高温洗涤, 然后用 E1BC 洗液 (美国 Illumina 公司) 和 250 mL 染色缸进行第 1 次室温洗涤, 后用乙醇洗液 (美国 Illumina 公司) 和 250 mL 染色缸进行乙醇洗涤, 再进行 1 次室温洗涤, 其方法及试剂同上。再用 Block 主要使用末端转移酶在单链和未被切割的 oligo 的 3' 端加上 ddNTPs, 避免非特异性延伸。探查信号, 在 BeadChip 洗碟 (美国 Illumina 公司) 中用 SA-Cy3 (FluoroLink™ Cy3™) 及 Block E1 缓冲液 (美国 Illumina 公司) 操作, 后再进行 1 次室温洗涤和前两次室温洗涤的操作及试剂完全相同。再将产物用台式离心机 (美国 Sigma 公司) 进行干燥。

5.3 荧光扫描和结果判定 用 Illumina BeadChip Reader 进行读取及获取图像, 用 Illumina Bead Studio Application 进行数据分析并输出图像和文本文件。针对多芯片结果进行芯片间及差异表达基因之间的双向聚类, 同时对新基因的功能进行预测, 目的是对不同的样本进行分类, 并对差异基因进行相似性分析。再将差异表达的基因, 按照基因本体论分析 (Gene Ontology, GO) 的数据库中的 3 大独立的 ontology: 生物过程 (biological process, BP), 分子功能 (molecular function) 及细胞组分 (cellular component) 进行分类。而这 3 个 ontology 又可以独立出不同的亚层次, 层层向下构成一个 ontologies 的树型分支结构。观察两组治疗前后 MME 基因的表达差异。

6 统计学方法 表达谱原始数据采用 Illumina Bead Studio Application 软件进行预处理并得到标准化数据, 然后使用 SAS 9.1 软件包筛选差异表达基因以及 GO 功能分析, 使用 Student's *t* test 计算差异表达基因 *P* 值, 使用 Benjamini Hochberg FDR 进行多重校正 (阈值: adjust $P < 0.05$, 差异倍数 > 2 或 < 0.5), GO 功能分析采用超几何分布累积算法计算显著性 *P* 值 (阈值: $P < 0.05$)。基因芯片数据采用 Cluster 3.0 软件做聚类分析。

结果

1 电泳检测 (图 1) 琼脂糖凝胶电泳显示未见

明显降解条带,各条带清晰,比例正常,总 RNA 纯度较高,说明所提取的总 RNA 完整性好。

2 芯片结果聚类分析(图 2,表 1) 其中 MME 基因在经穴组表现为绿色,表明该基因治疗后下调,该基因于非经非穴组治疗后未见表达。经穴组患者治疗后 MME 基因的表达总体呈下降趋势($P=0.0023$)。

3 经穴组 GO 分析结果(表 2) 经穴组 BP 共 14 条。MME 基因功能在 14 条通路中占首位和第八位,该基因与经穴调控 MO 的关联性较大。

表 1 经穴组治疗前后 MME 基因的表达情况

探针号	患者编号	基因名称	治疗前	治疗后
ILMN_1678170	2 号	MME	2 288.895	1 174.161
ILMN_1786319	21 号	MME	3.028	2.626
ILMN_1696162	5 号	MME	54.141	27.159
ILMN_1678170	8 号	MME	1 549.245	1 107.903
ILMN_1678170	9 号	MME	1 342.113	1 157.117
ILMN_1786319	12 号	MME	8.606	7.827
ILMN_1696162	14 号	MME	37.613	15.378
ILMN_1678170	16 号	MME	2 298.489	1 286.624
ILMN_1678170	18 号	MME	1 919.378	975.207
ILMN_1696162	19 号	MME	109.319	7.738

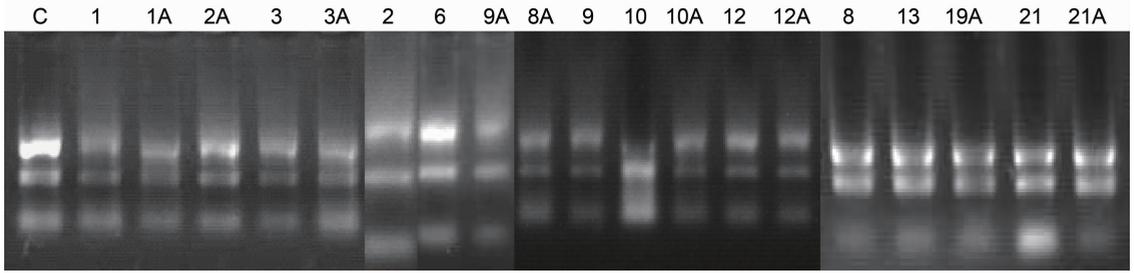
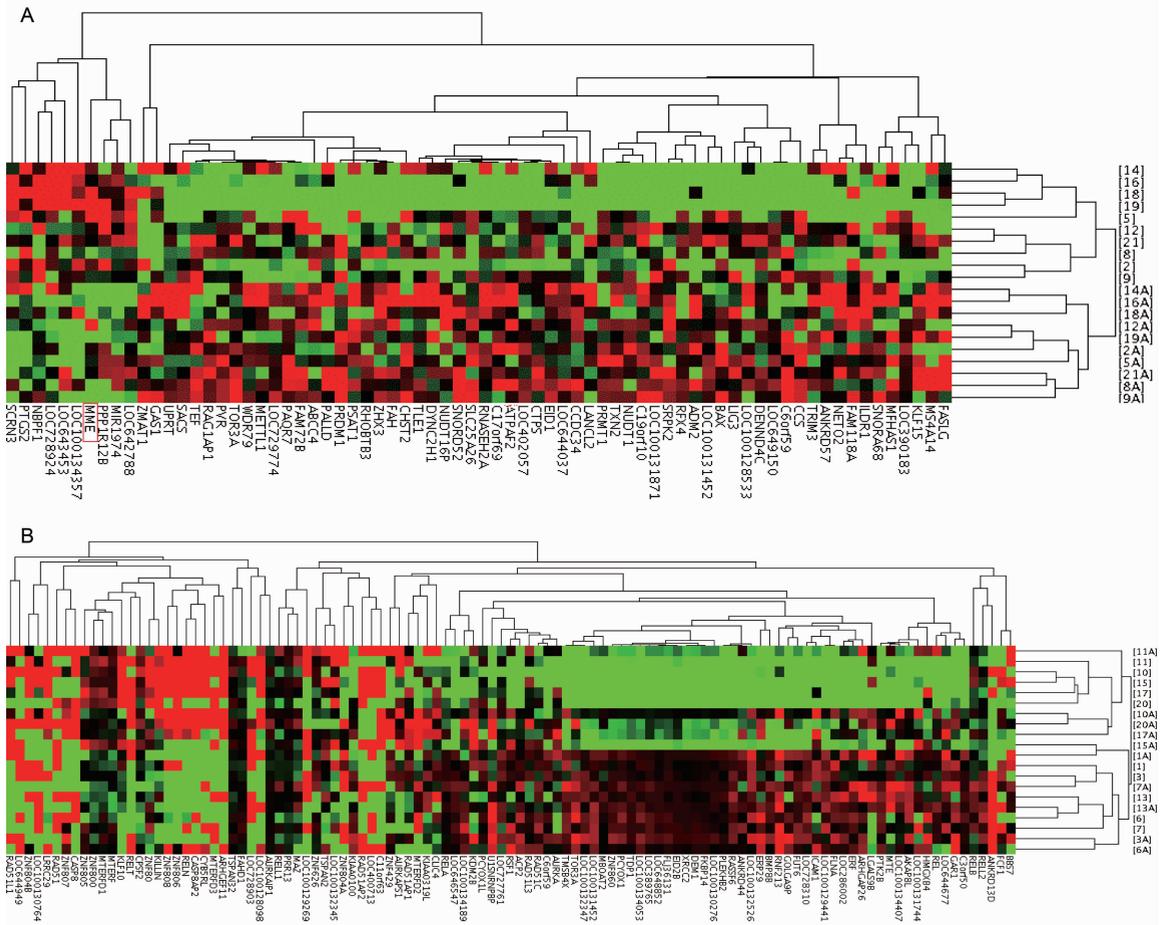


图 1 电泳检测结果



注:A 为经穴组;B 为非经非穴组;红色表示上调;绿色表示下调;黑色表示治疗前后没有变化;右标数字后附“A”为治疗后的样本,不附“A”为治疗前;下标为基因名称

图 2 芯片结果聚类分析

表 2 经穴组 GO 分析结果

GO 小类编号	当前 GO 小类的名称	基因名称	P 值	log_odds_ratio
GO:0050435	beta-amyloid metabolic process	MME/MME/MME/MME	3.16E-05	6.068 347
GO:0043461	proton-transporting ATP synthase complex assembly	ATPAF2//ATPAF2//ATPAF2	0.000 287	7.709 893
GO:0070272	proton-transporting ATP synthase complex biogenesis	ATPAF2//ATPAF2//ATPAF2	0.000 287	7.709 893
GO:0070071	proton-transporting two-sector ATPase complex assembly	ATPAF2//ATPAF2//ATPAF2	0.000 693	7.224 466
GO:0009072	aromatic amino acid family metabolic process	FAH//FAH//FAH//FAH//FAH	0.000 960	4.768 787
GO:0051085	chaperone mediated protein folding requiring cofactor	TOR3A//TOR3A//TOR3A//TOR3A	0.001 088	5.588 878
GO:0061077	chaperone-mediated protein folding	TOR3A//TOR3A//TOR3A	0.003 986	5.089 307
GO:0006518	peptide metabolic process	MME/MME/MME/MME	0.009 612	3.948 608
GO:0051084	'de novo' posttranslational protein folding	TOR3A//TOR3A//TOR3A//TOR3A	0.016 898	4.402 465
GO:0006458	'de novo' protein folding	TOR3A//TOR3A//TOR3A	0.021 726	4.297 112
GO:0001893	maternal placenta development	PRDM1//PRDM1//PTGS2	0.034 329	5.124 931
GO:0009155	purine deoxyribonucleotide catabolic process	NUDT1//NUDT1	0.042 789	6.861 896
GO:0009215	purine deoxyribonucleoside triphosphate metabolic process	NUDT1//NUDT1	0.042 789	6.861 896
GO:0031665	negative regulation of lipopolysaccharide-mediated signaling pathway	PRDM1//PRDM1	0.042 789	6.861 896

注:P 值为富集度,其值越小,GO 富集度与 MO 相关性越大;log_odds_ratio 代表 log 比值比(LR)

讨 论

在本研究中,通过针刺少阳经穴后,MME 基因表达量下降,MME 酶活性降低或者表达削弱, β -淀粉样蛋白(A β)降解减慢,抑制毛细血管内皮细胞(capillary endothelial cell, CEC) Na⁺-K⁺-ATP 酶过度活跃,阻止皮质扩散性抑制(cortical spreading depression, CSD)发生,从而阻止 MO 发作。

从 MME 基因 GO 分析中可以得出 MME 基因的表达主要通过影响 A β 蛋白的代谢来影响对 MO 的作用通路。MME 基因编码的蛋白质被认为是最重要的 A β 蛋白降解酶,因而在阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)的研究中占有重要的地位^[5]。MME 酶活性降低能导致 A β 蛋白在大脑中的聚集,导致 MME 酶活性降低的原因有 NEP 基因变异、疾病或者年龄导致其表达量的改变或者活性的改变^[6]。还有研究证明 MME 基因编码的 NEP-2 是最重要的 A β 蛋白降解酶^[7]。Iwata N 等^[8]表明 MME 是脑内 A β 的主要降解酶,它可能和 AD 的发生发展有关。结果显示 MME NEP 基因的表达呈下降趋势,MME 酶活性也会随之降低或者表达削弱,则 A β 蛋白降解减慢。

Boresa GM 等^[9]研究认为脑内 A β 蛋白有抑制脑内 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶的功能。又有研究在 APP 加 PS1 转基因小鼠中发现大脑的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性能够直接被高浓度的可溶性的 A β 蛋白抑制^[10]。我们还需说明 Na⁺-K⁺-ATP 酶与偏头痛的关系,有研究表明 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶转运子的体内平衡与偏头痛的发病机制,在偏头痛的过程中脑脊液 Na⁺ 浓度增加,而 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶转运子的活性增加是

脑脊液 Na⁺ 浓度增加的主要原因,所以当 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶转运子活性在正常范围限度之外,分别产生偏头痛及先兆^[11],其机制可能为:(1)当 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶转运子活性低于其正常范围的下极限时,细胞外钾离子增加,促进皮层扩散性抑制及产生先兆。(2)当 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶转运子活性高于其正常范围的上极限时,提高细胞外钠离子浓度,增加神经元兴奋性,导致偏头痛。(3)MO 可能归因于 CEC Na⁺-K⁺-ATP 酶过度活跃,它的结果就是皮层扩散性抑制。CSD 指各种刺激因素使大脑皮质局部神经元去极化,导致神经元电活动受抑制,并且以波的形式自发源处向周围组织扩散,与 MO 相关,尤其与 MA 关联性最大,是偏头痛脑神经障碍的最显著的病因^[12]。

针刺少阳经穴后,NEP 基因表达量下降,NEP 酶活性降低或者表达削弱,脑啡肽降解减少,镇痛作用增强,从而实现治疗 MO 的作用。

MME 基因表达的 NEP 在中枢神经系统它是一种神经肽的降解酶,主要调节脑啡肽诱发的镇痛作用。针刺镇痛的基本原理被论述得最多的是:针刺产生使内源性的脑啡肽增多^[13]。早在 1986 年就有研究者论证过 NEP 在偏头痛发作的病理生理过程中产生的作用^[14]。后来又有研究发现抑制 NEP 会促进神经源性炎症的发展,如促进降钙素基因相关肽的释放^[15]。MO 的发病机制早已经被证明是一种神经源性炎症,三叉神经血管学说在偏头痛病理生理机制中占主导地位。该学说认为偏头痛的发病涉及三种机制:供应脑膜的颅内脑外血管扩张、血管周围神经释放血管活性肽引起神经源性炎症以及中枢痛觉传导的抑

制降低^[16]。神经源性炎症是关键环节,以脑膜血管扩张、血浆外渗、血小板活化及肥大细胞脱颗粒为特征^[17]。

综上,本经取穴对肝阳上亢型 MO 的效应机制可能是通过对 MME 基因的调控实现的。调控 MME 基因成为近几年治疗 MO 的目标之一。本研究通过分析治疗前后经穴组 MME 基因的表达差异体现了经穴效应的物质基础,这只是从一个微观的方面进行了探讨,进一步的研究将从宏观与微观的互应方面体现经穴效应的作用路径。

参 考 文 献

- [1] 赵永烈,王玉来,高颖,芑芷地龙汤对偏头痛模型动物血液和脑中 β -EP、CGRP 的影响[J].世界中西医结合杂志,2009,4(7):473-475.
- [2] 张志坚,慕容慎行,许国英,等.偏头痛患者血中神经肽含量的观察[J].临床神经病学杂志,2001,14(2):67-70.
- [3] Headache Classification Committee. The international classification of headache disorders [J]. Cephalalgia, 2004, 24(Suppl 1): 1-160.
- [4] 石学敏. 针灸治疗学[M].第6版.上海:上海科学技术出版社,1998:91.
- [5] Miners S, van Helmond Z, Barker R, et al. Genetic variation in MME in relation to neprilysin protein and enzyme activity, A β levels and Alzheimer's disease risk[J]. Int J Mol Epidemiol Genet, 2012, 3(1): 30-38.
- [6] El-Amouri SS, Zhu H, Yu J, et al. Neprilysin protects neurons against A β peptide toxicity [J]. Brain Res, 2007, 1152(6): 191-200.
- [7] Hafez D, Huang JY, Huynh AM, et al. Neprilysin-2 is an important β -amyloid degrading enzyme [J]. Am J Pathol, 2011, 178(1): 306-312.
- [8] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, et al. Metabolic regulation of brain A β by neprilysin [J]. Science, 2001, 292(3): 1550-1552.
- [9] Bores GM, Smith CP, Wirtz-Brugger F, et al. Amyloid β -peptides inhibit Na⁺/K⁺-ATPase: tissue slices versus primary cultures [J]. Brain Res Bull, 1998, 46(5): 423-427.
- [10] Dickey CA, Gordon N, Wilcock DM, et al. Dysregulation of Na⁺/K⁺-ATPase by amyloid in APP + PS1 transgenic mice [J]. BMC Neurosci, 2005, 6(7): 1-11.
- [11] Harrington MG, Fonteh AN, Arakaki X, et al. Capillary endothelial Na⁺-K⁺-ATPase transporter homeostasis and a new theory for migraine pathophysiology [J]. Headache, 2010, 50(3): 459-478.
- [12] Bolay H, Reuter U, Dunn AK, et al. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model [J]. Nat Med, 2002, 8(2): 136-142.
- [13] 吴玉芳,刘浩,郝建军,等.针刺镇痛对结肠镜检查患者疼痛程度及体内 β -内啡肽、P 物质水平的影响 [J]. 中西医结合研究, 2012, 4(2): 57-60.
- [14] Sicuteri F, Renzi D, Geppetti P. Substance P and enkephalins: a creditable tandem in the pathophysiology of cluster headache and migraine [J]. Adv Exp Med Biol, 1986, 198 Pt B: 145-152.
- [15] Krämer HH, Schmidt K, Leis S, et al. Inhibition of neutral endopeptidase (NEP) facilitates neurogenic inflammation [J]. Exp Neurol, 2005, 195(1): 179-184.
- [16] Williamson DJ, Hargreaves RJ. Neurogenic inflammation in the context of migraine [J]. Microsc Res Tech, 2001, 53(3): 167-178.
- [17] Levy D, Burstein R, Kainz V, et al. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache [J]. Pain, 2007, 130(1-2): 166-176.

(收稿:2014-03-18 修回:2014-11-10)