

· 基础研究 ·

基于脾胃—脑相关理论研究电针对溃疡性结肠炎大鼠大脑皮层代谢物的影响

杨 阳^{1,2} 赵纪岚¹ 侯天舒¹ 韩晓霞^{1,3} 赵征宇¹ 彭晓华¹ 吴巧凤¹

摘要 目的 依据“脾胃—脑相关”理论,研究足阳明经穴位电针疗法对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)大鼠大脑皮层代谢物的影响,识别关键代谢物。方法 采用葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)法复制 UC 大鼠模型,并随机分为模型组、电针组,每组 13 只,另选取 13 只大鼠为空白对照组(空白组)。采用疏密波电针足三里、天枢和上巨虚穴 5 天后,所有动物处死取直结肠和回盲部行病理形态学观察;分离脑皮层,分别提取水溶性和脂溶性脑组织代谢物,运用¹H-NMR 技术进行代谢组学研究。结果 电针能明显改善 UC 大鼠模型的一般状况,降低 UC 大鼠的疾病活动指数(DAI)值($P < 0.05$),减轻 UC 大鼠肠道黏膜炎性细胞浸润,稳定线粒体、内质网等细胞结构。代谢组学研究显示,UC 大鼠模型脑皮层中谷氨酸、TC 和 VLDL 含量明显降低,而丙氨酸、LDL 明显升高;电针干预后乳酸、谷氨酸、TC 和 VLDL 均升高,而丙氨酸和 LDL 含量降低,与空白组接近。结论 采用足阳明经穴针刺对 UC 模型脑组织代谢物有一定影响,基于脾胃与脑相关理论针刺治疗 UC 有其特定的代谢组学物质基础和机制。

关键词 电针;脾胃—脑相关;足阳明经穴位;溃疡性结肠炎;代谢组学

Effect of Electro-acupuncture on Metabolites in the Cerebral Cortex of Ulcerative Colitis Rats Based on Pi/Wei-Brain Related Theory YANG Yang^{1,2}, ZHAO Ji-lan¹, HOU Tian-shu¹, HAN Xiaoxia^{1,3}, ZHAO Zheng-yu¹, PENG Xiao-hua¹, and WU Qiao-Feng¹ 1 Acupuncture and Tuina College, Chengdu University of TCM, Chengdu (610075), China; 2 Department of Rehabilitation, The People's Hospital of Dengzhou, Henan (474150), China; 3 Department of Acupuncture Rehabilitation, Xinjin Hospital of Traditional Chinese Medicine, Sichuan (611430), China

ABSTRACT Objective To study the effect of electro-acupuncture (EA) at points along Foot Yangming Channel on metabolite of ulcerative colitis (UC) rats' cerebral cortex and to identify key metabolites by referring to Pi/Wei-brain related theory in Chinese medicine (CM). Methods The UC rat model was set up by dextran sulfate sodium (DSS) method. Male SD rats were randomly divided into the model group and the EA group, 13 in each group. Another 13 rats were recruited as the blank control group. Rats in the blank control group and the model group received no EA. EA was performed at Zusanli (ST36), Shangjuxu (ST37), and Tianshu (ST25) for 5 days by using disperse-dense wave. Then all rats were sacrificed. Their recto-colon and the ileocecal junction were pathomorphologically observed by light microscope and transmission electron microscope (TEM). Cerebral cortexes were extracted. Water-soluble and lipid-soluble brain tissue metabolites were respectively extracted for metabolic research using ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). Results EA could obviously improve the general condition of UC model rats, decrease the value of DAI, reduce the infiltration of inflammatory cells in the intestinal tract, stabilize structures such as mitochondria, endoplasmic reticulum and so on ($P < 0.05$). ¹H-NMR a-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373737);教育部霍英东基础研究基金资助项目(No.141041);四川省教育厅课题资助项目(No.11ZA055, No.13ZB0310);成都中医药大学校级基金资助项目(No.ZRYY201213)

作者单位:1.成都中医药大学针灸推拿学院(成都 610075);2.河南邓州市人民医院康复科(河南 474150);3.四川新津县中医院针灸康复科(四川 611430)

通讯作者:吴巧凤, Tel:0286-6875812, E-mail:rwqfrwqf@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1207

analysis showed that in the model group, contents of glutamic acid, cholesterol, very low density lipoprotein (VLDL) in the pallium obviously decreased, while alanine and low density lipoprotein (LDL) significantly increased. After EA, levels of lactic acid, glutamic acid, total cholesterol (TC), and VLDL all increased, and levels of alanine and LDL decreased. All indices were approximate to those of the blank control group. Conclusion EA at Foot Yangming channel was found to have some effect on metabolites in the brain tissue of UC model rats, which had specific metabonomic material basis and mechanism based on the Pi/Wei-brain related theory.

KEYWORDS electro-acupuncture; Pi/Wei - brain related; points along Foot Yangming Channel; ulcerative colitis; metabonomics

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种严重影响患者身体健康和生活质量的结肠慢性迁延性炎性肠病,近年来发病率明显增加,已逐渐成为全球性疾病^[1]。针灸治疗 UC 疗效确切,优势突出,可以从多个水平和环节缓解 UC 的临床症状和病理改变,但其机理尚未完全阐明^[2]。对 UC 常见中医证候及证候要素的现代文献研究显示,UC 的主要病位在脾、胃、肠,其主要证候因素是脾肾阳虚、湿热、肝郁脾虚和脾胃虚弱,因此调理脾胃是针灸治疗 UC 的主要措施^[3,4]。另一方面,中医学认为,精神紧张,忧虑过度,忧思气结是 UC 的主要病因,可谓“脾胃—脑相关”^[5,6];现代研究也显示,精神—神经—内分泌—免疫系统通过脑—肠轴对 UC 等炎性肠病发挥了重要作用,皮质及皮质下结构在心理应激时的异常反应与 UC 有显著相关性^[7,8],因此从“脾胃—脑相关”的角度出发有可能为探索针灸防治 UC 的机制提供新的线索^[9,10]。代谢组学技术是一种能够全面、快速、简捷反映体内代谢总体变化的技术手段,本研究拟运用质子核磁共振 (¹H Nuclear Magnetic Resonance, ¹HNMR) 技术,比较针刺治疗对脑组织代谢的影响,从整体代谢的角度为阐释“脾胃—脑相关”的脑代谢物质基础,为深入认识脾胃脑相关等理论提供新的实验依据。

材料与方法

1 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠 39 只,体重 (200 ± 20) g,由简阳市动物中心提供,使用许可证号:SCXK(川)2008-24,动物在实验前进行适应性饲养 2 周,自由进食和饮水,室温控制在 20 °C 左右,相对湿度 70%。饲养期模拟捕捉所有大鼠,每天 1 次。

2 主要试剂及仪器 葡聚糖硫酸钠 (MP Bio-medicals 公司,批号:160110);韩式穴位神经刺激仪 (Hans-200,南京济生科技有限公司);光学显微镜 (莱卡 DM600M,德国);电镜 (日立 H-600IV 型透射

电镜,日本);超导核磁共振谱仪 (INOVA 600 MHz,美国瓦里安公司)。

3 分组与造模 选择 SD 大鼠连续自由饮用 4% DSS 溶液 7 天,根据大便隐血、疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 及 HE 染色等指标判断模型成功^[11],预实验显示造模成功率约为 97%。剔除造模不成功者,符合 UC 模型的大鼠按随机数字表分为模型组、电针治疗组 (电针组),每组各 13 只。另选取 13 只大鼠作为空白对照组 (空白组)。

4 干预方法 将大鼠抓取固定于自制大鼠固定器上,腧穴定位参照《实验针灸学》^[12] 大鼠定位方法确定,任选一侧斜刺“天枢” (2 mm),直刺“上巨虚”和“足三里” (3 mm)。针柄连接韩氏穴位神经刺激仪,采用疏密波型:频率 15 ~ 25 Hz,电流 0.1 mA,留针 15 min,每天固定时间治疗 1 次,穴位左右交替使用,共治疗 5 天。空白组和模型组大鼠只进行抓取和固定,不针刺。

5 检测指标及方法

5.1 一般状态观察 实验过程中观察并记录各组大鼠的体重变化、大便性状及出血情况,并参照文献采用 DAI 比较各组大鼠的一般活动状况;采用联苯胺法评价各组大鼠的粪便隐血情况。

5.2 回盲部及直结肠病理观察 干预结束后 1% 戊巴比妥钠麻醉处死大鼠,剖腹取回盲部及直结肠,10% 甲醛或 3% 戊二醛预固定,石蜡包埋切片 (6 μm) HE 染色,或环氧树脂包埋后电镜切片 (0.5 μm),镜下观察。

5.3 脑组织 ¹H NMR 检测 大鼠处死后剥取大脑皮层, -70 °C 固定保存。

5.3.1 样品预处理 脑组织水溶性代谢物:在化冻称重后的组织中加入 1:1 的乙腈 (CH₃CN): 水混合溶剂 2 mL,匀浆器匀浆后,4 °C, 10 000 r/min 离心 6 min,收集上清液,用 N₂ 吹干。冷冻干燥后,加入 550 μL 的磷酸缓冲液 (pH7.4) 和 10 μL 0.1% 的

TSP, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清移入 5 mm 的核磁管, 4 °C 保存待测。脑组织脂溶性代谢物: 离心后的沉淀部分加入 2 mL 氯仿/甲醇(CHCl₃:CH₃OH, 2:1 萃取), 4 °C, 10 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液冻干。加入 600 μL 的氘代氯仿/氘代甲醇(CDCl₃/CD₃OD, 2:1), 放置 10 ~ 15 min; 10 000 r/min, 离心 5 min, 取上清移入 5 mm 的核磁管, 4 °C 保存待测。

5.3.2 ¹H-NMR 检测 水溶性样品采用带预饱和的 NOESY 脉冲序, 弛豫延迟为 2 s, 混合时间为 150 ms, 在这两个时间段均采用低功率对水信号进行选择照射以抑制水峰。采样谱宽为 8 998.9 Hz, 采样点为 32 k 复数点, FID 累加次数为 64 次。脂溶性样品采用普通的单脉冲序列进行实验, 其余参数同水溶性样品。所有 FID 数据在进行傅立叶变换(FT)之前均乘以相当于 0.3 Hz 线增宽因子的窗函数, FT 数据点为 64 k。所得谱图经过相位和基线校正之后, 将 85.6 ~ 80.4 范围内的谱按每段 0.04 的宽度进行分段积分, 并将积分按每张谱的总积分进行归一化。将所得积分结果输出并转换成 Excel 格式, 供模式识别分析用数据分析。

6 统计学方法 所有数据输入 SIMCA-P + 软件(v10.04, Umetrics, Umea, Sweden) 进行分析。采用 Pareto 标度化(Pareto scaling) 进行预处理之后进行偏最小二乘法(partial least squares discriminate analysis, PLSDA) 分析。为了排除非相关因素使分组最大化, 进一步采用正交信号校正(orthogonal signal correction, OSC) 处理, 结果以得分图和载荷图表示。

结 果

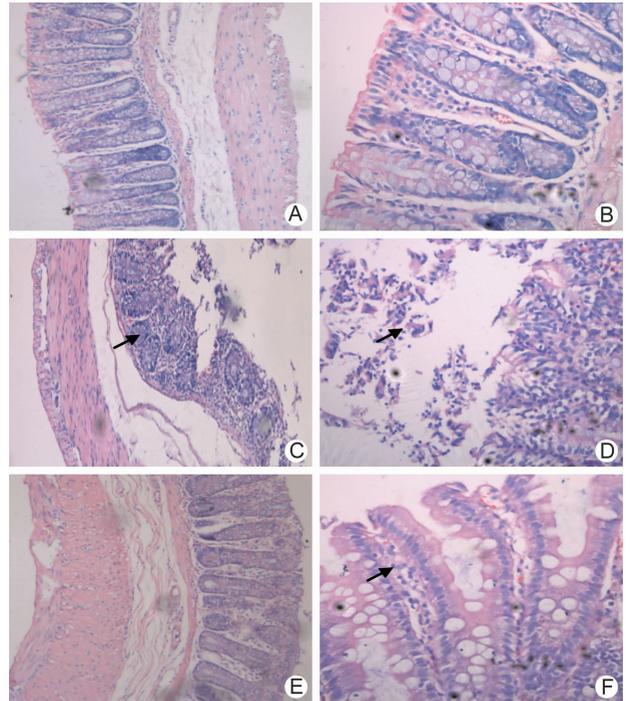
1 各组一般状态比较(表 1) 造模 3 天后模型组大鼠大便隐血实验阳性, 造模 7 天后模型大鼠出现黏液血便或脓血便, 有典型的 UC 症状, 恢复普通饮水后模型组和电针组大鼠 UC 症状均有减轻, 但电针组症状减轻更为明显, 各组大鼠无死亡。与空白组比较, 模型组 DAI 升高(P < 0.05)。与模型组比较, 电针组干预后一般状况改善, DAI 降低(P < 0.05)。

表 1 各组大鼠 DAI 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	DAI
空白	13	0*
模型	13	2.10 ± 0.25
电针	13	0.79 ± 0.22*

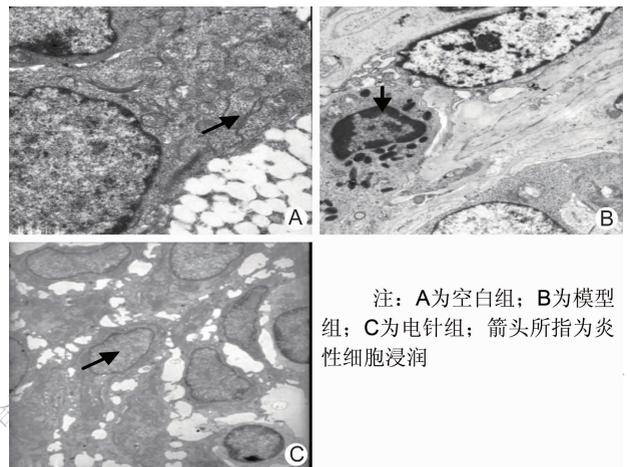
注: 与模型组比较, *P < 0.05

2 各组病理形态学结果比较(图 1、2) 光镜观察结果: 空白组肠道回盲部和直结肠部黏膜均完整, 腺体结构完好, 仅见极少量炎性细胞浸润; 模型组可见到黏膜层被破坏, 腺体样结构减少或消失, 并可见大量炎性细胞浸润, 有溃疡片及坏死区域, 黏膜下层有明显的充血水肿; 电针组肠黏膜充血水肿明显减弱, 只有少量炎性细胞浸润, 杯状细胞增生明显, 未见溃疡面。电镜观察结果: 空白组各细胞器正常; 模型组染色质边集, 基底部炎性细胞浸润, 线粒体肿胀明显, 细胞内大量空泡, 线粒体肿胀微绒毛稀疏缺损, 且有炎细胞浸润; 电



注: A、B 为空白组; C、D 为模型组; E、F 为电针组; A、C、E: ×100; B、D、F: ×400; 箭头所指为炎性细胞浸润

图 1 各组大鼠直结肠病理结果 (HE)



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为电针组; 箭头所指为炎性细胞浸润

图 2 各组大鼠回盲部电镜观察结果 (×8 000)

针组线粒体形态基本正常,粗面内质网增多,但组织间隙存在少量空泡样结构,炎性细胞浸润明显减轻。

3 各组大鼠脑皮层水溶性代谢物比较(图 3-5) 各组乳酸(Lactate)、缬氨酸(Valine)、 γ -氨基丁酸(GABA)等物质含量不同,采用 OPLS 分析后获得得分图,可见样本主要在 PC1 和 PC2 方向上,空白组主要分布在第一、第四象限,模型组分布在

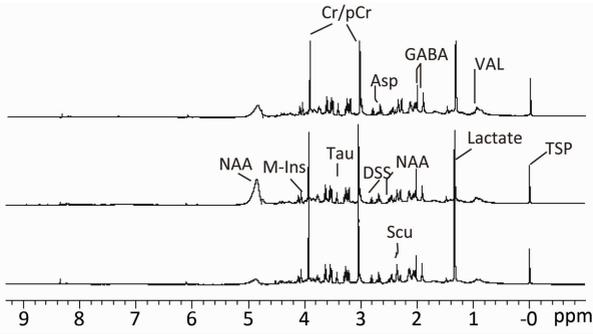


图 3 各组大鼠脑皮层水溶性代谢物的¹H NMR 代谢谱图

第三象限,两组无交集。电针组样本主要分布在第二象限,并且有向空白组靠近的趋势,但仍离模型组较近。与空白组比较,模型组乳酸(Lactate, δ 1.33, 1.35)和谷氨酸(Glutamate, δ 2.35, 2.36)含量明显降低,而丙氨酸(Alanine, δ 3.76)明显升高。电针组乳酸、谷氨酸均升高,丙氨酸降低,与空白组接近。

4 各组大鼠脑皮层脂溶性代谢物比较(图 6-8) 电针组TC、LDL、VLDL 含量介于模型组与空白组之间。与空白组比较,模型组 TC (δ 0.81 - 0.85)、 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ (主要为 VLDL, δ 1.54 - 1.59)含量明显降低,lipid(CH_3)_n(主要为 LDL, δ 1.24 - 1.27)含量明

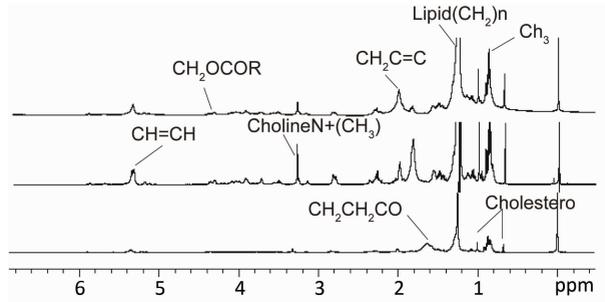
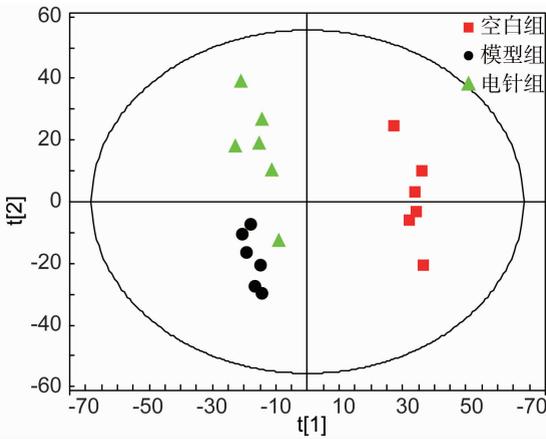


图 6 各组大鼠脑组织脂溶性代谢物的¹H NMR 代谢谱图



注:t[1]/t[2]分别代表第一和第二主成分,椭圆形表示 Hotelling 检验的 95% 置信区域

图 4 各组大鼠脑组织水溶性代谢物的¹H NMR 得分图

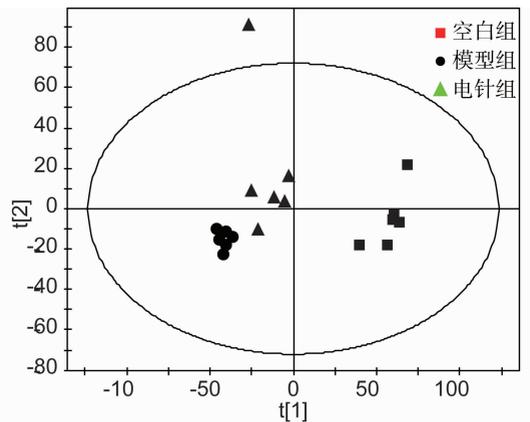
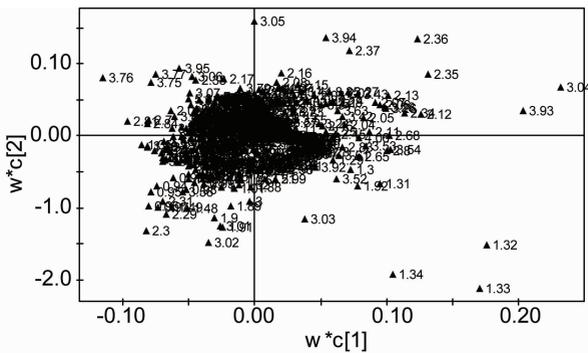


图 7 各组大鼠脑组织脂溶性代谢物的 OPLS 得分图



注:w*c代表与主成分相应的载荷,显示导致这些差异的相应代谢物

图 5 各组动物脑组织水溶性代谢物的¹H NMR 因子载荷图

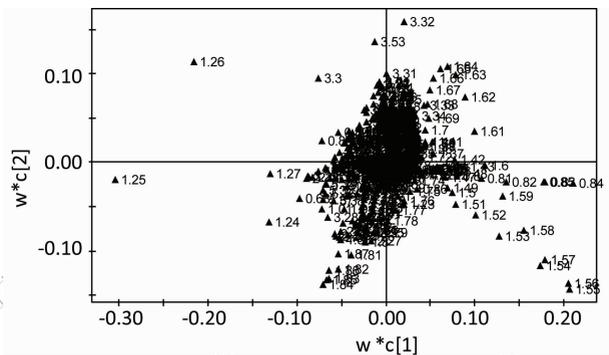


图 8 各组大鼠脑组织脂溶性代谢物的 OPLS 因子载荷图

显升高,电针治疗后上述代谢物有明显改善,TC、VLDL、LDL 含量均与空白组接近。

讨 论

传统针灸理论认为“五脏有俞,六腑有合,循脉之分,各有所发。”五脏六腑通过所循行的经脉与脑密切相关,正所谓“心藏神,肺藏魄,肝藏魂,脾藏意,肾藏志。”其中,脾胃自古就认为与脑功能的正常发挥密切相关。在功能方面,胃主受纳、腐熟水谷,推陈降浊;脾主运化水谷精微,化生气血,布升清阳;肠主吸收精微,导浊排秽。胃、脾、肠的纳、化、出功能协调,气血充盛而通和,水谷精微及化生的气血才能使脑窍充养,神机灵活,从而维持脑的正常生理功能。如果脾胃虚弱,纳运无权,可导致气血津精来源匮乏,气血阴阳失调,升降降浊功能紊乱,致使气血不荣于巅,痰湿、水饮、瘀血等病理产物留聚并上扰脑神,甚至壅塞脑窍,从而影响脑的功能,导致脑系疾病的产生^[4,6,13]。

现代医学认为,精神心理因素等对脾胃系统的功能会造成损害,而很多胃肠道疾病除表现为躯体症状,精神心理症状也非常突出^[3-5,8]。例如,精神—神经—内分泌—免疫系统通过脑—肠轴对 UC 等炎性肠病发挥了重要作用,愤怒、抑郁、思虑过多等均可影响脾胃;另一方面,皮质及皮质下结构在心理应激时的异常反应与 UC 也有显著相关性,很多 UC 患者的发病与工作压力大,精神紧张,忧虑过度,时常熬夜等密切相关,通过调理脾胃可对相应模型动物脑内的一些神经递质、神经肽、环核苷酸、第三信使物质等的含量及其基因表达起到广泛的调节作用,从而为 UC 等疾病的治疗带来好处^[1,7,8]。新近的影像学资料也发现,功能性以及静止期的肠道炎性疾病最主要的区别在于 IBS 将边缘脑区或边缘脑区周边过度激活,而 UC 则通过右侧前皮质抑制了该区域的激活^[7],因此皮质区可能是观察 UC 转归的良好靶点。

本研究从“脾胃—脑相关”的角度出发,采用代谢组学技术比较了足阳明经针刺治疗对 UC 模型脑皮层组织代谢的影响,与空白组大鼠比较,模型组大鼠脑皮层水溶性代谢物的乳酸、谷氨酸、TC 和 VLDL 含量明显降低,而丙氨酸和 LDL 含量明显升高。采用调理脾胃的方法电针治疗后,电针组的乳酸、谷氨酸以及 TC 均有所升高,而丙氨酸和 LDL 含量均有所下降。乳酸是脑能量稳态和能源物质的感受变量,在神经元活动增强的情况下,细胞外升高的谷氨酸浓度能够影响星形胶质细胞对乳酸的释放和葡萄糖的摄取利用,从而

可以为神经元提供更多能源物质^[14];谷氨酸是动物脑内含量较多的一种氨基酸,在物体内的蛋白质代谢过程中占重要地位。因此,采用足阳明经穴电针治疗提高乳酸、谷氨酸、磷酸肌酸等的作用可能与电针提高大脑能量代谢、蛋白合成及各种化学反应等有关,提示基于脾胃理论针刺治疗 UC 有一定的生物学基础,但是其进一步的机制尚待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(1): 46-54.
- [2] 王德华,罗永岚,李畅. 艾灸治疗溃疡性结肠炎疗效的 Meta 分析[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 35(11): 2247-2248.
- [3] 魏伟. 脾胃虚弱型慢性溃疡性结肠炎针刺治疗 45 例临床报告及分析[J]. *中医临床研究*, 2011, 3(18): 91-92.
- [4] 岳宏,王天芳,陈剑明,等. 溃疡性结肠炎常见中医证候及证候要素的现代文献研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 5(33): 306-308.
- [5] 王希利,彭艳红,孙明炜. 溃疡性结肠炎的中医藏象观[J]. *中国中医基础医学杂志*. 2007, 13(5): 338-339.
- [6] 邓大鹏. 略论从脾论治慢性溃疡性结肠炎[J]. *中外医疗*, 2010, 29(25): 124.
- [7] Agostini A, Filippini N, Cevolani D, et al. Brain functional changes in patients with ulcerative colitis: a functional magnetic resonance imaging study on emotional processing[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(8): 1769-1777.
- [8] 朱雪萍,陈卫昌,朱晓黎,等. 脑肠肽、脑肠轴在肠易激综合征模型中作用机制研究[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(3): 236-239.
- [9] 黄和,张士福,杜庆. 探析胃脑相关论[J]. *中医研究*, 2011, 24(8): 10-12.
- [10] 于晓艳. 中医脾脑相关浅谈[J]. *福建中医药*, 2006, 37(2): 48-50.
- [11] 谢艳,魏兵,欧阳钦. 疾病活动指数在炎症性肠病诊治中的应用[J]. *中国消化杂志*, 2001, 21(9): 599-560.
- [12] 林文注,王佩. 实验针灸学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1999:288-290.
- [13] 梁海凌. 从脾脑相关阐释心身疾病的发病机理[J]. *新中医*, 2012, 44(12): 3-5.
- [14] Serres S, Bczancon E, Franconi JM, et al. Ex vivo analysis of lactate and glucose metabolism in the rat brain under different states of depressed activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 47881.

(收稿:2013-09-11 修回:2014-07-08)