

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.11.014

艾灸“足三里”“梁门”对胃热证、胃寒证模型大鼠脑皮质代谢的影响

杨锦兰¹, 谢宇锋[✉], 蔡润钿², 余云进¹, 魏谷行¹, 裴梦然¹, 冯军¹, 杨宗保³

1. 广州中医药大学深圳医院(福田), 广东省深圳市福田区北环大道 6001 号, 518048; 2. 广州中医药大学第一临床医学院;
3. 厦门大学医学院

[摘要] 目的 探讨艾灸“足三里”“梁门”对胃热证、胃寒证模型大鼠胃黏膜病理及脑皮质组织代谢物谱的影响。方法 42 只 SD 大鼠随机分为空白组 10 只、胃热模型组 16 只、胃寒模型组 16 只。胃热模型组采用辣椒液、乙醇灌胃方法复制胃热证大鼠模型, 胃寒模型组采用冰水+氢氧化钠(NaOH)灌胃方法复制胃寒证大鼠模型。造模后将各模型组随机抽取 6 只作为艾灸胃热组、艾灸胃寒组。空白组、胃热模型组、胃寒模型组不予干预, 艾灸胃热组、艾灸胃寒组大鼠于“足三里”“梁门”穴行温和灸干预, 每次 20 min, 每天 1 次, 连续干预 7 天。HE 染色观察胃黏膜组织病理学变化; 对脑皮质进行代谢组学检测, 分析所得数据及代谢通路。结果 胃热模型组、胃寒模型组胃黏膜组织符合胃热证、胃寒证的病理表现, 艾灸胃热组、艾灸胃寒组大鼠胃黏膜组织病理较模型组改善。代谢组学发现 12 个与胃热证密切相关、11 个与胃寒证密切相关的脑皮质代谢物。艾灸能调节胃热证 9 个、胃寒组 5 个代谢物的紊乱。艾灸主要调节脑皮质的牛磺酸-亚牛磺酸代谢、烟酸-烟酰胺代谢、磷酸肌醇代谢, 丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢对胃热证胃黏膜损伤起修复作用; 经缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成, 磷酸肌醇代谢对胃寒证胃黏膜损伤起修复作用。结论 艾灸对胃热证胃黏膜修复的主要效应机制涉及经中枢对抗氧化应激、氨基酸代谢和维持细胞形态的调节作用, 对胃寒证胃黏膜修复的主要效应机制涉及经中枢对生物体内氨基酸代谢、维持细胞形态调节。

[关键词] 胃热证; 胃寒证; 胃黏膜损伤; 艾灸; 足三里; 梁门; 代谢组学

寒热作为中医辨证的基本纲领, 能反映疾病的阴阳盛衰、病邪的阴阳属性, 正如《素问·阴阳应象大论篇》曰“阳胜则热, 阴胜则寒”, 在疾病诊断和治疗上具有重要的指导作用。胃热证^[1]是中医的基本证候之一, 临床症见面红身热, 口干、口苦、口臭, 喜冷饮, 烦躁易怒, 小便黄少, 大便秘结, 舌红苔黄, 脉滑数, 其病因病机多为外感热邪, 或是嗜食辛辣厚味, 亦或是气郁食积化热, 使机体表现出以机能亢进为主的证候, 临床多与实热证相符。胃寒证^[2]则是感受寒邪, 或机体本身脾阳不足, 过食生冷导致阴寒内盛而出现胃部机能衰减等证候, 临床多与实寒证型相符。胃热

证和胃寒证病理表现为胃黏膜损伤, 炎症细胞浸润^[1]或轻度胃炎表现^[2]。研究^[3-4]证明, 艾灸对胃黏膜损伤具有良好的修复作用。本实验拟通过建立胃寒证、胃热证模型, 在艾灸干预下, 借助代谢组学检测技术试分析艾灸是否有助于胃热证胃黏膜损伤修复, 并分析艾灸对胃热证和胃寒证的代谢调节机制的异同, 探讨艾灸对不同证型下胃黏膜损伤的可能调节机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 42 只, 体重 120 ~ 150 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证编号: 2015000539899, 实验动物生产许可证编号: SCXK(沪)2012-0002。分笼饲养于厦门大学医学院中医系动物房, 饲养温度 20 ~ 25℃, 湿度 65% ~ 70%, 自然光暗周期, 适应性饲养 1 周

基金项目: 广东省自然科学基金(2017A030313748); 深圳市卫生计生系统科研项目(201607061); 深圳市福田区卫生公益性科研项目(FTWS20160033)

* 通讯作者: 714732618@qq.com

后进行实验。

1.2 实验试剂与仪器

无水乙醇 (批号: 20170418, 国药集团化学试剂有限公司), 甲醇、氯仿 (分析纯级)、氢氧化钠 (NaOH, 批号: 20150215, 国药集团化学试剂有限公司), 水合氯醛 (批号: 20160225, 上海山浦化工有限公司), 4% 多聚甲醛 (批号: 20160118, 武汉赛维尔生物科技有限公司), 艾炙粒 (250g/盒, 225 粒/盒, 南阳仙草药业有限公司), 氧化氘 (D_2O , 批号: 8J452, 99.9% 氘代, 美国 Sigma 公司), 3-三甲基硅基-(2, 2, 3, 3- d_4)-1-丙酸钠 (TSP, 批号: L-17273, 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司), HE 染色试剂盒 (批号: G1120, Solarbio 公司)。

智能生物显微镜 (BX53 型, Olympus 公司), 核磁共振谱仪 (Bruker Avance III 600MHz 型, 德国 Bruker 公司), 低温高速离心机 (5418R 型, Eppendorf 公司), 氮吹仪 (HGC-12A 型, 杭州奥盛仪器有限公司)。

1.3 动物分组、造模

42 只大鼠按随机数字表分为空白组 10 只、胃热模型组 16 只、胃寒模型组 16 只。胃热证大鼠模型制备^[5]: 使用辣椒混悬液 20 ml/(kg·d) 经口腔灌入, 每天 2 次, 连续灌胃 6 天。最后一次灌胃后, 大鼠禁食不禁水 12h, 至第 7 天予无水乙醇 1 ml 灌胃 1 次。灌胃 3 h 后正常喂养。辣椒液制备方法: 辣椒干粉 80 g 混合于 1 L 超纯水中, 120 目过筛后, 制备出浓度为 80 mg/ml 的辣椒混悬液。

胃寒证大鼠模型制备^[5]: 以 10 ml/(kg·d) 4℃ 冰水灌胃, 每天 2 次, 连续灌胃 6 天。最后一次灌胃后, 大鼠禁食不禁水 12h, 至第 7 天予 0.3 mol/L NaOH 溶液 1 ml 灌胃 1 次, 3 h 后正常喂养。冰水制备方法: 常规冰水混合物为 0℃, 将冰块与水按质量 2:1 进行混合, 放置 20 min 后温度测量基本可达到 4℃。

造模后每组按随机数字表法抽取 4 只大鼠, 以 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔注射麻醉。取出全胃, 沿着胃大弯剪开翻转, 暴露全胃, 0.9% 氯化钠溶液冲洗, 肉眼观察胃黏膜损伤情况。在胃窦部损伤明显处取约 1 cm × 0.5 cm × 1 cm 组织, 4% 多聚甲醛中固定 48 h。梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜显微镜下观察胃黏膜组织的病理变化。

胃热证模型评定标准^[1]: 大鼠兴奋躁动、舌

质红、牙龈红肿、大便秘结、小便色黄、爪趾发红; 肉眼观察胃黏膜出现充血、水肿, 有点状或片状出血点及糜烂; 组织病理学观察有炎症细胞浸润或渗出, 上皮细胞、黏膜缺损。胃寒证模型评定标准^[2]: 喜群聚、神情淡漠、耳廓爪趾颜色变淡、大便黄软; 胃黏膜出现皱襞收缩, 颜色变浅变淡; 病理学观察具有胃黏膜炎症病变, 接近轻度胃炎病理病变。

两组大鼠均造模成功。胃热模型组和胃寒模型组均按随机数字表法分别选取 6 只大鼠作为艾炙胃热组、艾炙胃寒组。

1.4 干预方法

采用局部配合远端取穴方法, 参考《实验针灸学》^[6]选穴方法, 选取大鼠“足三里”“梁门”穴。“足三里”: 在大鼠膝关节后外侧, 距腓骨小头下方 5 mm 处。“梁门”: 根据类比原则, 大鼠胸骨柄与外生殖器连线 (腹部正中线上) 距胸骨柄上缘 3/4 处为脐, 胸剑联合到脐连线中点的水平线与锁骨中线相交处。穴位定位准确后穴区剃毛标记, 保证每次干预固定准确。空白组: 正常饲养, 不予任何干预。模型组: 造模结束后, 鼠板捆绑, 每次 20 min, 每天 1 次。艾炙胃热组和艾炙胃寒组: 鼠板捆绑四肢固定, 选取大鼠足部双侧足三里穴, 腹部梁门穴进行艾炙。艾粒固定于距穴区上方 2~3 cm 处行温和灸, 每次只灸单侧“足三里”“梁门”, 两侧交替进行, 艾炙每次 20 min, 每天 1 次。各组均连续干预 7 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般行为学观察 每日观察并记录各组大鼠一般情况, 包括情绪状态、反应力、毛发、牙龈、舌质、爪趾等颜色、饮水量、大小便情况等。

1.5.2 胃黏膜组织形态 取出各组大鼠胃组织后, 沿胃大弯剪开充分暴露胃黏膜组织, 冲洗干净, 肉眼观察各组胃黏膜组织形态及损伤程度。

1.5.3 胃黏膜组织病理学 将取下的胃组织置于 4% 的多聚甲醛中浸泡 48 h, 放置在包埋盒中流水冲洗 15 min 后浸泡在 75% 乙醇中, 脱水过夜; 脱水结束进行包埋、石蜡切片 (切片厚度 5 μm)、展片晾干, HE 染色。智能显微镜 400 倍数镜下观察胃黏膜各层组织腺体和细胞结构变化, 并用图像采集系统采集图片。

1.5.4 大鼠脑皮质组织代谢组学检测 取 200 mg 脑皮质组织, 在 300 ml 双蒸水和 600 ml 甲醇的混

合物中匀浆涡旋 1 min, 随后加入 300 ml 氯仿, 操作均在冰上进行。离心机 (10000 r/min, 4℃, 离心半径 3 cm) 离心 10 min。上层清液氮吹仪浓缩去除甲醇, 冷冻干燥后加入 600 μ l 含有 0.015% TSP 的 D₂O 溶液中。最后将 500 μ l 混合物收集到 5 mm NMR 管中进行分析。所有 ¹H-NMR 谱图均在 Bruker 600 MHz 核磁共振谱仪上。

通过 MestReNovav 9.0.1 软件对大脑皮质所有 ¹H-NMR 谱进行信号去噪、分阶段和基线校正。在谱图中, 为克服峰值转移问题, 所有光谱参考 0.0 ppm 处 TSP 单峰进行了峰值对齐。将化学位移 (δ) 4.6 ~ 5.2 ppm 的水峰去除后, 光谱在 δ 0.8 ~ 9.0 ppm 区域以 0.01 间隔进行分割。为了弥补样品之间显著的浓度差异, 对数据分段积分和归一化等标准化处理。谱图中被归一化后的积分值为谱图中所有积分的和, 再进一步进行多变量分析。将数据引入 SIMCA-P V 14.1 软件(瑞典 Umetrics 公司)中, 先使用 pareto-scaling(Par) 减少模型中的伪影和噪声影响, 而后进行非监督模式识别的主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。PCA 能对所有组别进行直观的组间分离, 并目测评估得分图; OPLS-DA 用于最大化组间差异。同时, OPLS-DA 模型通过模型适应性 (R²) 和预测能力 (Q²) 的参数来评估, 并使用 S-plot 图区分潜在变量。并根据结果中变量的重要性 (VIP $\geq$ 1.00) 和独立样本 *t* 检验 ($P < 0.05$) 将潜在的生物代谢标志物筛选出来。利用网站 MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>) 进行代谢通路分析, 筛选出重要的代谢通路 (impact 值 > 0.1)。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐时选择 LSD 法, 方差不齐时选择 Dunnett *T*³ 法 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 各组大鼠一般行为学观察结果

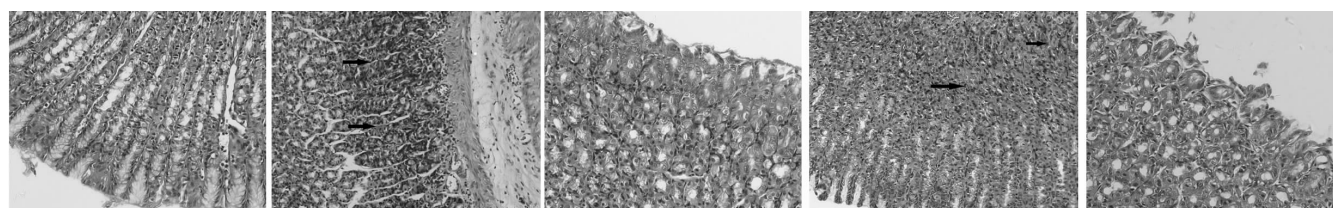
空白组大鼠状态良好, 体质量稳步增加, 活动灵敏, 毛色发亮。胃热模型组大鼠第 4 天开始出现活动频繁, 躁动不安, 多数大鼠出现牙龈红肿出血伴声音嘶哑, 饮水量增加, 灌胃难度增大, 大便排出困难, 干燥坚硬色黑, 喜争斗。胃寒模型组大鼠灌胃后逐渐出现精神萎靡, 喜抱团, 活动次数减少, 大便质稀, 毛色暗淡, 牙龈舌质色淡, 体质量下降。艾灸胃热组状态较胃热模型组改善, 大便秘结缓解、大便颜色由黄黑转向黄褐, 争斗现象减少, 声嘶改善, 牙龈、爪趾红转淡。艾灸胃寒组大鼠较胃寒模型组精神状态转好, 聚集减少, 活动次数、饮水量增加。

2.2 各组大鼠胃黏膜组织肉眼观察结果

空白组大鼠胃黏膜光滑顺畅, 皱襞明显, 色泽淡红, 未出现出血点或黏膜破损。与空白组相比, 胃热模型组大鼠胃黏膜有明显的点状出血灶形成, 严重可出现条带状出血点, 部分出血点周围可见血痂形成, 胃窦部可见胃黏膜破损, 黏膜色泽暗红; 胃寒模型组大鼠胃黏膜有破损, 黏膜皱襞消失, 黏膜色泽黯淡苍白; 艾灸胃热组大鼠胃黏膜破损程度减轻, 点状出血灶较胃热模型组减少, 黏膜色泽较胃热模型组正常, 暗红程度减轻, 颜色逐渐向空白组靠近; 艾灸胃寒组破损减少, 胃黏膜结构较胃寒模型组完整, 黏膜色泽恢复红润。提示胃热证、胃寒证下胃黏膜均有不同程度的损伤, 艾灸干预 7 天后, 对胃热证、胃寒证胃黏膜损伤均有修复作用。

2.3 各组大鼠胃黏膜组织病理学结果

图 1 示, 空白组大鼠胃黏膜柱状上皮结构完整清晰, 无破损, 细胞完整, 排列整齐, 染色均匀。胃热模型组大鼠胃黏膜柱状上皮结构破坏, 有大量细胞坏死, 排列混乱, 炎症细胞浸润, 部分细胞核溶解难以辨认, 细胞质模糊, 有点状出血灶形成。



空白组

胃热模型组

艾灸胃热组

胃寒模型组

艾灸胃寒组

图 1 各组大鼠胃黏膜组织病理学结果 (HE 染色, $\times 400$)

胃寒模型组可见局部胃黏膜坏死破损,有炎症细胞浸润,以淋巴细胞浸润为主,符合轻度慢性胃炎病理改变。艾灸胃热组柱状上皮层破损较模型组减轻,胃黏膜上皮细胞及固有层腺体排列较规则,有炎症细胞,但程度较胃热模型组减轻,未见明显出血点。艾灸胃寒组黏膜破损程度、炎症细胞浸润程度较胃寒模型组减轻。

2.4 各组大鼠脑皮质组织¹H-NMR 代谢组学检测结果

2.4.1 大鼠脑皮质组织代谢物谱结果

根据内部开发的 NMR 数据库、结合已发表的文献 [7-9] 及人类代谢组数据库 (HMDB: <http://www.hmdb.ca/>) 进行比对筛选。经筛选,脑皮质共有 30 个代谢物质: 异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、乳酸盐、赖氨酸、 γ -氨基丁酸盐、乙酸盐、N-乙酰天

冬氨酸盐、焦谷氨酸盐、谷氨酸盐、谷氨酰胺、琥珀酸盐、天冬氨酸盐、肌酸、乙醇胺、磷酸胆碱、磷酸乙醇胺、甘油磷酸胆碱、牛磺酸、苯丙氨酸、甘氨酸、肌醇、丙氨酸、糖原、丝氨酸、次黄嘌呤核苷、延胡索酸盐、酪氨酸、尿嘧啶、烟酰胺。

2.4.2 大鼠脑皮质组织代谢物的组间区分

由于核磁共振谱图的复杂性,主成分分析中各组间的差异不明显。为了更好地评估各组数据的差异,使用 OPLS-DA 对每组数据进行聚类分析。图 2A—D 示,各组间均能明显区分,胃热模型组、胃寒模型组均能与空白组区分开。由图 2E—F 可看出,经艾灸干预后,艾灸胃热组和艾灸胃寒组分别介于胃热模型组和胃寒模型组与空白组之间,有向空白组靠近的趋势,表明艾灸干预对胃热证或胃寒证造成的大鼠脑皮质代谢紊乱具有调控作用。

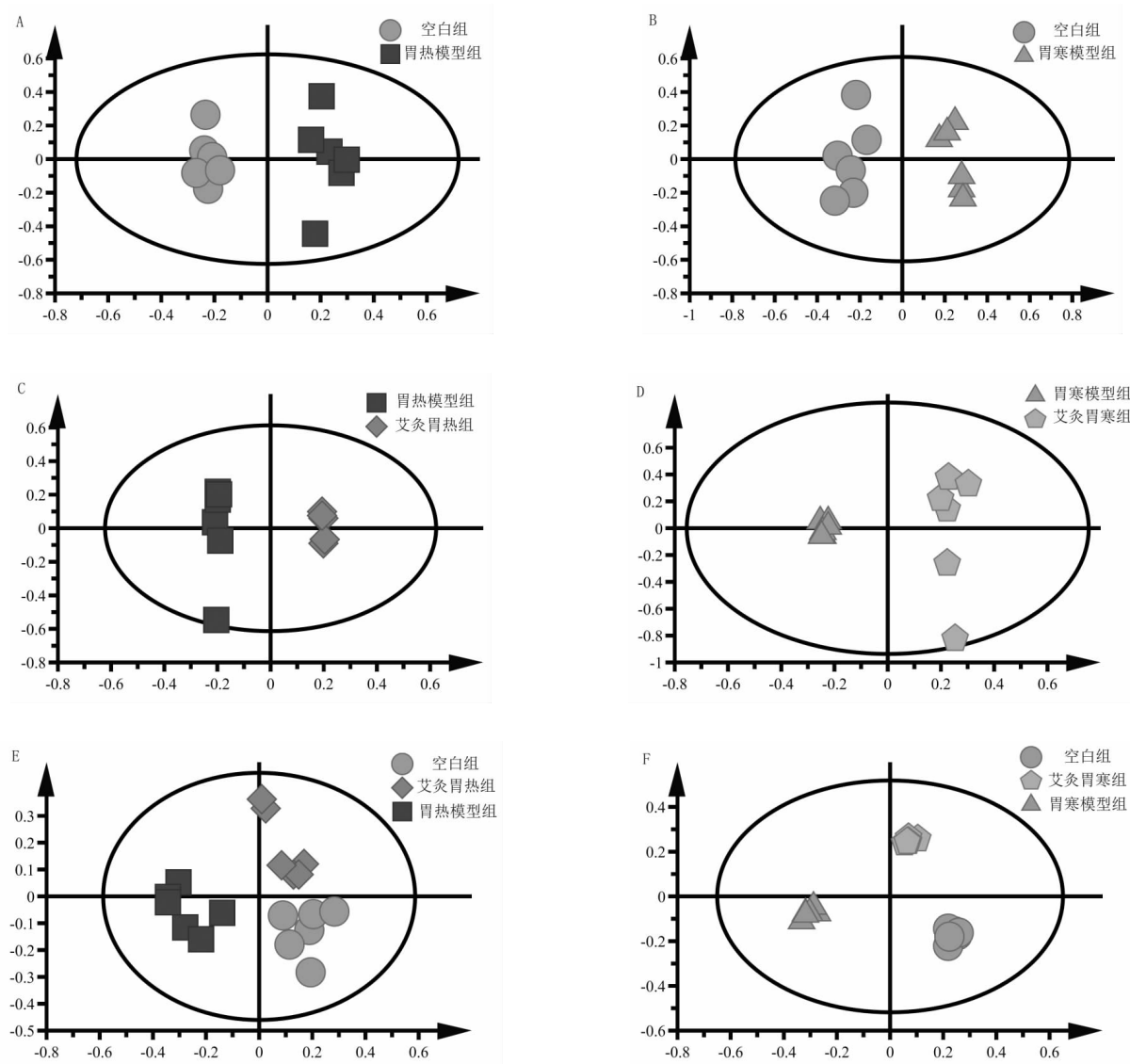


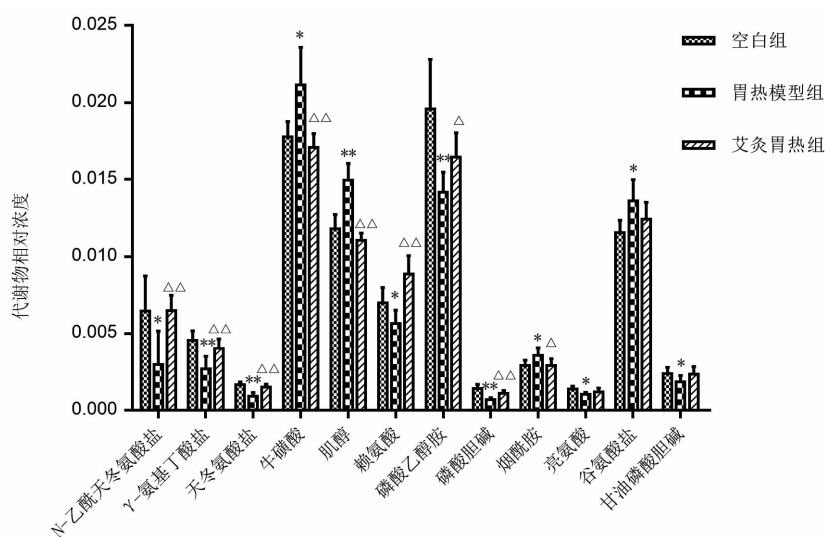
图 2 各组大鼠脑皮质组织 OPLS-DA 得分图

2.4.3 各组大鼠脑皮质组织效应标志物的结果

随后进行 S-plots 图分析以及 t 检验, 找出变化明显的代谢物质。图 3 示, 与空白组相比, 胃热模型组中共有 N-乙酰天冬氨酸盐、 γ -氨基丁酸盐、天冬氨酸盐、牛磺酸、肌醇、赖氨酸、磷酸乙醇胺、磷酸胆碱、烟酰胺、亮氨酸、谷氨酸盐、甘油磷酸胆碱 12 个物质发生变化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与胃热模型组相比, 艾灸胃热组 N-乙酰天冬氨酸盐、 γ -氨基丁酸盐、天冬氨酸盐、赖氨酸、磷酸乙醇胺、磷酸胆碱含量上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 牛磺酸、肌醇、烟酰胺含量下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

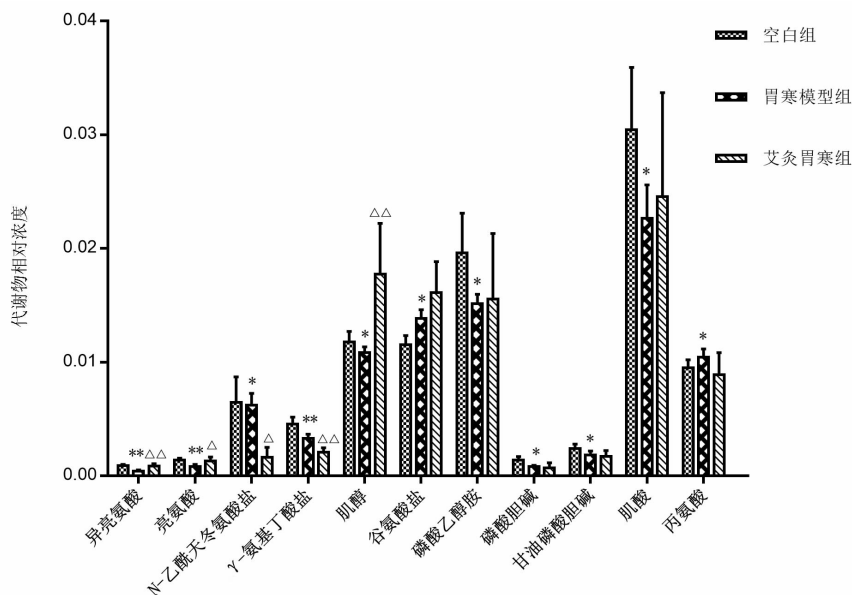
图 4 示, 与空白组比较, 胃寒模型组中共有异亮氨酸、亮氨酸、N-乙酰天冬氨酸盐、 γ -氨基丁酸盐、肌醇、谷氨酸盐、磷酸乙醇胺、磷酸胆碱、肌酸、甘油磷酸胆碱、丙氨酸 11 个代谢物质出现变化 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与胃寒模型组对比, 艾灸胃寒组异亮氨酸、亮氨酸、N-乙酰天冬氨酸盐干预后含量上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肌醇、 γ -氨基丁酸盐含量下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.4.4 各组大鼠脑皮质组织代谢物代谢通路 筛选影响值 > 0.1 的代谢通路视为艾灸调节的主要影响通路。与空白组比较, 胃热模型组共有 6 条代谢通路发生变化 (注: 括弧中为 impact 值), 分别为:



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与胃热模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 3 空白组、胃热模型组及艾灸胃热组大鼠脑皮质组织代谢物相对浓度比较



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与胃寒模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 4 空白组、胃寒模型组及艾灸胃寒组大鼠脑皮质组织代谢物相对浓度比较

D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (1.0)、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢 (0.45253)、牛磺酸-亚牛磺酸代谢 (0.42857)、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成 (0.33333)、烟酸-烟酰胺代谢 (0.2381)、磷酸肌醇代谢 (0.13525)。经艾灸干预有效调节其中 4 条代谢通路: 牛磺酸-亚牛磺酸代谢 (0.42857)、烟酸-烟酰胺代谢 (0.2381)、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢 (0.19304)、磷酸肌醇代谢 (0.13525)。

与空白组比较, 胃寒模型组有 5 条相关代谢通路出现变化 (注: 括弧中为 impact 值): D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (1.0)、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成 (0.66666)、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢 (0.25949)、磷酸肌醇代谢 (0.13525)、精氨酸-脯氨酸代谢 (0.10545)。艾灸有效干预缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成 (0.66666)、磷酸肌醇代谢 (0.13525)。

3 讨论

“热证可灸”思想源自《黄帝内经》,《素问·骨空论篇》曰“灸寒热之法,……当灸二十九处”,认为灸法不仅可治疗寒证,也可以用于热证治疗。现代药理研究^[10]发现,艾灸产生的红外线可有效为生物体细胞及免疫提供能量,具有抗炎退热、改善微循环、促进黏膜修复、增强机体免疫功能。但由于“热证禁灸”理念对后世影响深远,针对热证是否可灸开展的实验较少,临床应用受限。

足三里是足阳明胃经经气汇集壮大的重要穴位,也是五输穴中的合穴,即胃腑下合穴^[11]。《灵枢·邪气脏腑病形》曰“胃病者,腹胀,胃脘当心而痛,上支两胁,膈咽不通,饮食不下,取之三里也”,《千金翼方》曰“胃中热,灸三里三十壮”,说明足三里可调节寒热、平衡阴阳,治疗胃腑不适疾病。实验研究证明,刺激足三里穴区可促进胃动力^[12],并且艾灸足三里可以明显改善胃黏膜形态,起修复作用^[13]。梁门穴为食物出入胃腑之门户^[14]，“经脉所过,主治所及”,刺激梁门穴能有效改善气血循环,属近端取穴,临床常与足三里配伍治疗脾胃疾病^[15]。本研究结果显示,胃热模型组大鼠脑皮质代谢水平紊乱,艾灸有效调节代谢物水平,说明艾灸可对胃黏膜损伤大鼠脑皮质代谢产生良性影响,热证可灸具有代谢物质基础。结合病理学,艾灸对胃热证胃黏膜具有修复作用,可进一步说明热证可灸具有科学性。胃寒模型组大鼠模型艾灸胃经穴后观察,胃黏膜损伤程度也有所改善,

且脑皮质代谢物质也有所回调。以上结果说明艾灸胃经穴能调节脑-胃肠间内分泌水平,帮助生物体恢复到平衡状态。

经代谢通路分析可见,艾灸有效调节胃热证 4 条代谢通路,分别为牛磺酸-亚牛磺酸代谢、烟酸-烟酰胺代谢、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、磷酸肌醇代谢;有效调节胃寒证中缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成、磷酸肌醇代谢。胃热证、胃寒证出现的胃黏膜损伤,艾灸胃经穴后经中枢调节机体代谢水平从而促进胃黏膜修复的途径不完全相同。而磷酸肌醇代谢可能为艾灸经脑皮质实现胃黏膜修复的特异性代谢途径。

代谢物牛磺酸涉及牛磺酸-亚牛磺酸代谢通路,牛磺酸作为神经递质,主要起抑制作用。研究^[16-17]证明,牛磺酸可抗炎、抗氧化,调节细胞内钙离子、渗透压水平,维持细胞膜稳态,提高缺血组织抗氧化能力等作用。烟酰胺是辅酶 I 和辅酶 II 的组成部分,参与体内脂质代谢、组织呼吸的氧化过程和糖类无氧分解的过程^[18]。烟酰胺核糖是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH) 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 的组成部分,是烟酰胺的前体,它对氧化应激过程具有保护作用, NADPH 能持续保持抗氧化酶的活性,从而保护内皮细胞的功能;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADP) 可抑制磷脂酶 A2 (PLA2) 活性,降低神经酰胺的产生,减轻机体因氧化应激而产生的黏膜损坏^[19]。本研究结果显示,胃热模型大鼠脑皮质中牛磺酸、烟酰胺含量上升,经艾灸胃经穴后含量下降,考虑生物体在应激状态下氧化应激反应增强,代谢紊乱。艾灸能经中枢调节生物体抗氧化应激水平,使代谢维持在相对正常的范围。

丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢涉及到的脑皮质代谢物有天冬氨酸盐、N-乙酰天冬氨酸盐。天冬氨酸乙酰化有利于谷氨酸转化为 α -酮戊二酸,该物质能进入三羧酸循环为生物体提供能量。N-乙酰天冬氨酸盐是神经元中天冬氨酸和乙酰辅酶 A 合成的具有神经特异性的代谢物,同样具有产生生物能量的作用^[20]。实验证明,纹状体内注射 N-乙酰天冬氨酸盐可增强体内多巴胺释放量^[21]。多巴胺及其受体在胃肠运动、调节胃酸分泌、增加胃黏膜供氧及促进胃黏膜血流等起重要调节作用,是胃黏膜保护因子^[22]。本实验结果显示,与空白组相比,胃热证大鼠脑皮质中天冬氨酸盐、N-乙酰天冬氨酸盐含量下降,说明胃热证能引起生物体内氨基酸代谢,并可引起神经递质紊乱,而艾灸干预后代谢物

质含量上升,说明艾灸可经中枢调节机体内氨基酸代谢水平,促进胃黏膜修复。

缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸的生物合成代谢途径涉及胃寒证脑皮质代谢物中的异亮氨酸和亮氨酸。缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸属支链氨基酸 (BCAA),是机体内重要的能源物质。区别于其他氨基酸,BCAA 类氨基酸的主要代谢场所多集中于肌肉、脂肪组织及脑^[23]。研究表明,BCAA 可通过调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路起作用^[24],调节线粒体的数量和活性,控制细胞自噬^[25],降低细胞的氧化损伤^[26]。胃寒证大鼠模型胃组织中异亮氨酸、亮氨酸代谢水平均下降,经艾灸后大鼠代谢物含量上升,说明艾灸能增加机体内支链氨基酸含量,减轻生物体内因强刺激引起的细胞损伤,对胃黏膜损伤修复具有良性作用。

磷酸肌醇代谢包括磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰肌醇-4-磷酸 (PIP) 和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP2),其中 PIP2 的代谢在细胞信息传递、维持细胞骨架运动中充当重要角色^[27]。PI 可由肌醇生成,其代谢增强会激活 Ca^{2+} 受体,刺激细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[28]。 Ca^{2+} 能以不同方式参与壁细胞泌酸受体-组胺 H2 受体、胃泌素受体和乙酰胆碱 M2 受体兴奋过程,从而促进胃酸分泌。研究证实, Ca^{2+} 通道阻滞剂可通过钙拮抗效应增加胃黏膜血流量、改善局部循环,从而保护胃细胞^[29]。因此降低细胞中 Ca^{2+} 浓度,阻止细胞内出现钙超载现象,能保护胃黏膜。本实验结果显示,脑皮质代谢物肌醇含量上升,艾灸后含量下降,说明艾灸或许能经磷酸肌醇代谢途径调节生物体内 Ca^{2+} 含量,从而促进胃黏膜修复。

综上,经一般行为学观察、组织病理学、代谢组学检验,热证可灸具有一定科学性;艾灸对不同证候造成的胃黏膜损伤均能发挥其修复作用,起效机制主要通过抗氧化应激、调节氨基酸代谢、维持细胞形态等展开。然而,由于代谢物谱非常庞大,在本研究中未能较好阐述关键代谢物或关键代谢通路的作用,在研究过程中如何抓住关键代谢物,结合中医基本理论和作用特点进一步探索,需要深入研究。

参考文献

- [1] 杨万斌,文彬,张凌杭,等. 大鼠胃热证模型造模方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(18): 3644-3649.
- [2] 杨万斌,文彬,张凌杭,等. 大鼠胃寒证模型造模方法探索 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 4031-4036.
- [3] 龚安,杨宗保,施彬彬,等. 艾灸对急性胃溃疡大鼠胃黏

- 膜组织形态学和血流量的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 2001-2003.
- [4] 杨宗保,王晨光,龚安,等. 艾灸调节急性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞相关标志蛋白质表达的研究 [J]. 中国针灸, 2013, 33(11): 1017-1021.
- [5] ZOU Z, HAN B, GONG M, et al. NMR-Based metabolomic studies on stomach heat and cold syndromes and intervention effects of the corresponding formulas [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 528396. doi: 10.1155/2014/528396.
- [6] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 314-319.
- [7] 陈娇龙. 基于代谢组学研究电针治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2018.
- [8] 张媛. 基于代谢组学研究艾灸促进胃黏膜损伤修复的时效响应机制 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [9] LIU CC, CHEN JL, CHANG XR, et al. Comparative metabolomics study on therapeutic mechanism of electro-acupuncture and moxibustion on rats with chronic atrophic gastritis (CAG) [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14362.
- [10] 吴静,蔡圣朝. “热证可灸”理论的发展 [J]. 中医药临床杂志, 2017, 29(4): 455-458.
- [11] 罗廖君,李涓,陈姣,等. 近十年足三里穴位敏化研究的文献计量学分析 [J]. 中医杂志, 2018, 59(15): 1332-1336.
- [12] 潘小丽,王计雨,康朝霞,等. 电针“足三里”对功能性消化不良模型大鼠胃窦 Cajal 间质细胞自噬的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(16): 1407-1411.
- [13] 宋家薇,陈果,方倩,等. 艾灸、电针足三里对腓总神经横断术后大鼠胃黏膜损伤修复的影响 [J]. 上海针灸杂志, 2019, 38(1): 6-11.
- [14] 连林宇,刘彩春,钱林超,等. 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 [J]. 中医杂志, 2019, 60(7): 602-607.
- [15] 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.
- [16] 曹东敏,关琴笑,刘雅莉,等. 基于 ¹H-NMR 的人参总皂苷治疗缺血性脑中风的血清代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1142-1148.
- [17] OJA SS, SARANSAARI P. Open questions concerning taurine with emphasis on the brain [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 803: 409-413. doi: 10.1007/978-3-319-15126-7_31.
- [18] 李伟霞,黄美艳,唐于平,等. 基于代谢组学研究佛手散对血虚小鼠的养血补血作用机制 [J]. 药学报, 2013, 48(8): 1301-1306.
- [19] LIU A, CHU Y, WANG X, et al. Serum metabolomics study based on LC-MS and antihypertensive effect of uncaria on spontaneously hypertensive rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018: 9281946. doi: 10.

- 1155/2018/9281946.
- [20] MOFFETT JR, ROSS B, ARUN P, et al. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 81(2): 89-131.
- [21] PETROV VI, SERGEYEV VS, ONISHCHENKO NV. The effect of N-acetyl-L-aspartic acid dilithium salt on dopamine release and synthesis in the rat striatum in vivo [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 416(1-2): 69-73.
- [22] 张晓媛, 徐华. 多巴胺及其受体与消化道疾病的研究进展 [J]. *临床消化病杂志*, 2014, 26(5): 309-311.
- [23] ZHENYUKH O, CIVANTOS E, RUIZ-ORTEGA M, et al. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 165-177. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.009.
- [24] YAMANE T, MORIOKA Y, KITAURA Y, et al. Branched-chain amino acids regulate type I tropocollagen and type III tropocollagen syntheses via modulation of mTOR in the skin [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(4): 611-615.
- [25] 朱坤, 丁米娜, 李月, 等. 蒲公英萜醇通过 mTOR 信号通路诱导乳腺癌细胞自噬 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(21): 32-37.
- [26] 宫碧霜, 任曼, 靳二辉, 等. 异亮氨酸对大鼠血清抗氧化水平及脾脏组织结构的影响 [J]. *安徽科技学院学报*, 2015, 29(6): 1-5.
- [27] 刘彦, 王寅, 朱正美, 等. 脂多糖增加小鼠巨噬细胞多磷酸肌醇脂代谢转换 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, 14(3): 57-62.
- [28] 农艺, 王苏. 新的第二信使三磷酸肌醇和甘油二酯: 在细胞代谢和增殖中的调节作用 [J]. *国外医学(分子生物学分册)*, 1986, 8(1): 9-12.
- [29] 张俊杰, 林庚庭, 周庚生, 等. 芩连合剂对急性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞内钙离子含量影响的实验研究 [J]. *中国中医药科技*, 2008, 15(1): 22-23.

Effects of Moxibustion “Zusanli” (ST 36) and “Liangmen (ST 21)” on Cerebral Cortex Metabolism of Model Rats with of Stomach Heat Syndrome and Stomach Cold Syndrome

YANG Jinlan¹, XIE Yufeng¹, CAI Runtian², YU Yunjin¹, WEI Guhang¹, PEI Mengran¹, FENG Jun¹, YANG Zongbao³

1. Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen, 518048; 2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine; 3. Medical College of Xiamen University

ABSTRACT Objective To study the effects of “Zusanli (ST 36)” and “Liangmen (ST 21)” on pathology of gastric mucosa and metabolite profile of cerebral cortex in rats with stomach heat syndrome, and stomach cold syndrome. **Methods** A total of 42 male SD rats were randomly divided into a blank group (n = 10), a stomach heat model group (n = 16), and a stomach cold model group (n = 16). In the model of stomach heat syndrome, the rat model of stomach-heat syndrome was replicated by gavage with chili liquid and ethanol, and the rat model of stomach-cold syndrome was replicated by gavage with ice water and sodium hydroxide (NaOH). After modeling, 6 rats from each model group were randomly selected as moxibustion stomach heat group and moxibustion stomach cold group. The blank group, stomach heat model group and stomach cold model group did not intervene, and the rats in moxibustion stomach heat group and moxibustion stomach cold group underwent mild moxibustion intervention at “Zusanli (ST 36)” and “Liangmen (ST 21)” for 20 min, once daily for 7 days. HE staining was used to observe the histopathological changes of gastric mucosa; metabolomic examination of the cerebral cortex was performed to analyze the data and metabolic pathways. **Results** The gastric mucosal tissues in the stomach heat model group and the stomach heat model group conformed to the pathological manifestations of the stomach heat syndrome and the stomach cold syndrome. The pathology of the gastric mucosa in the moxibustion stomach heat group and the moxibustion stomach cold group was improved compared with the model group. Metabolomics found that 12 cerebral cortex metabolites were closely related to the stomach heat syndrome and 11 were closely related to the stomach cold syndrome. Moxibustion mainly regulates the metabolism of taurine and hypotaurine, niacinamide and phosphatidylinositol metabolism, and metabolism of alanine aspartic acid and glutamic acid in the cerebral cortex. And it can repair the gastric mucosal damage of stomach heat syndrome. Through the biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, phosphoinositide metabolism can repair the gastric mucosal damage in patients with stomach cold syndrome. **Conclusion** The main effects mechanism of moxibustion on the repair of gastric mucosa in stomach heat syndrome involves the regulation of antagonism against oxidative stress, amino acid metabolism and maintenance of cell morphology. The main effect mechanism of gastric mucosal repair on stomach cold syndrome involves the amino acid in vivo metabolism, and maintaining cell morphology regulation.

Keywords stomach heat syndrome; stomach cold syndrome; gastric mucosal injury; moxibustion; Zusanli (ST 36); Liangmen (ST 21); metabolomics

(收稿日期: 2019-09-17; 修回日期: 2020-02-14)

[编辑: 王利芬]