

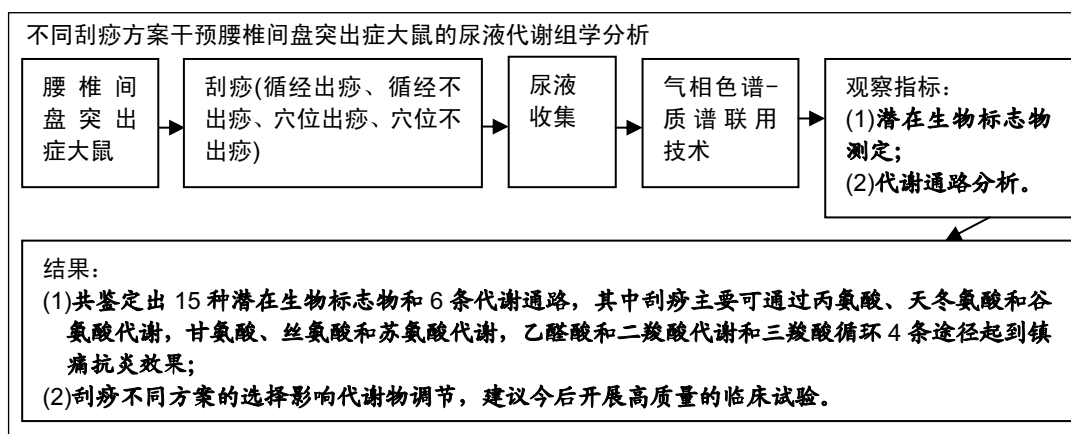
基于尿液代谢组学数据评价不同刮痧方案干预腰椎间盘突出症模型大鼠的效果

丁欢¹, 陈丽虹¹, 陈宇婧¹, 岳容兆¹, 杨敏¹, 徐桂华² (¹南京中医药大学护理学院, 江苏省南京市 210046; ²南京中医药大学, 江苏省南京市 210046)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1307

ORCID: 0000-0002-9726-4701(徐桂华)

文章快速阅读:



丁欢, 女, 1995年生, 江苏省常州市人, 汉族, 南京中医药大学护理学院在读硕士, 主要从事中医护理研究。

通讯作者: 徐桂华, 博士, 教授, 南京中医药大学, 江苏省南京市 210046

文献标识码: B
稿件接受: 2019-02-23



文题释义:

腰椎间盘突出症: 主要是因为椎间盘各部分(髓核、纤维环及软骨板), 尤其是髓核, 有不同程度的退行性改变后, 在外力因素的作用下, 椎间盘的纤维环破裂, 髓核组织从破裂之处突出(或脱出)于后方或椎管内, 导致相邻脊神经根遭受刺激或压迫, 从而产生腰部疼痛, 一侧下肢或双下肢麻木、疼痛等一系列临床症状。
刮痧: 是以中医经络穴位理论为指导, 通过特制的刮痧器具和相应的手法, 蘸取一定的介质, 在体表进行反复刮动、摩擦, 使皮肤局部出现红色粟粒状, 或暗红色出血点等“出痧”变化, 从而达到活血透痧的作用。

摘要

背景: 刮痧干预腰椎间盘突出症在临床得到广泛应用, 利用代谢组学等分析技术对其作用机制进行研究。
目的: 使用气相色谱-质谱联用技术的代谢组学方法, 探讨刮痧治疗腰椎间盘突出症大鼠尿液内源性代谢物的变化与其作用机制, 并分析不同刮痧方案的疗效差异, 以期规范标准化刮痧疗法, 为临床应用提供参考和依据。
方法: 将 48 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、循经出痧组、穴位出痧组、循经不出痧组以及穴位不出痧组, 各 8 只。选用自体髓核移植法复制腰椎间盘突出症大鼠模型, 从造模第 5 天始, 用不同刮痧方案干预, 隔日 1 次, 共 9 次。实验于 2017 年 1 月获得南京中医药大学实验动物伦理委员会审理批准。
结果与结论: ①同造模前相比, 刮痧组及造模后的模型组机械痛阈值下降($P < 0.01$); ②筛选后共得出 15 种潜在生物标志物和 6 条代谢通路。刮痧后 3-(3-羟苯基)丙酸、天冬氨酸和谷氨酰胺含量降低, 甘氨酸、柠檬酸、环腺苷酸含量上升, 通过调节丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酰胺代谢通路以镇痛, 甘氨酸, 丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢和三羧酸循环以抗炎; ③循经出痧组调节代谢物效果优于其他 3 组, 推测其为治疗最佳刮痧方案。

关键词:

尿液代谢组学; 刮痧; 循经取穴; 腰椎间盘突出; 气相色谱-质谱; 组织构建; 代谢通路; 国家自然科学基金

中图分类号: R454; R363

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81473791), 项目负责人: 徐桂华; 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX18_0444), 项目负责人: 陈丽虹

Ding Huan, Master candidate, School of Nursing, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Xu Guihua, MD, Professor, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China

Efficacy of different scraping protocols in the intervention of rat models of lumbar disc herniation based on urine metabolomics

Ding Huan¹, Chen Lihong¹, Chen Yujing¹, Yue Rongzhao¹, Yang Min¹, Xu Guihua² (¹School of Nursing, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China; ²Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Scraping has been extensively applied in the treatment of lumbar disc herniation, and the underlying mechanism was explored by metabolomics.

OBJECTIVE: To investigate the changes of endogenous metabolites in urine of rats with lumbar disc herniation and its mechanism of action by gas chromatography-mass spectrometry metabolomics method, and to analyze the difference in efficacy of different scraping schemes, in order to standardize the scraping therapy, and provide reference and basis for clinical application.

METHODS: Forty-eight male Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank, model and scraping groups (passing the sputum, acupuncture, sputum, and acupoint groups) ($n=8$ per group). The rat model of lumbar disc herniation was replicated by autologous nucleus pulposus transplantation. From the 5th day of modeling, the scraping group was intervened with different scraping schemes, once every other day, totally nine times. The study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine in January 2017.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with before modeling, the mechanical pain threshold in the scraping and the model groups after modeling was decreased ($P < 0.01$). (2) A total of 15 potential biomarkers and 6 metabolic pathways were obtained after screening. After scraping, the content of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, aspartic acid and glutamic acid decreased, and the content of glycine, citric acid and cyclic adenosine increased, by adjusting alanine, aspartic acid and glutamine. The acid metabolism pathway was anti-inflammatory with analgesic, glycine, serine and threonine metabolism, glyoxylic acid and dicarboxylic acid metabolism, and a tricarboxylic acid cycle. (3) To conclude, the effect of regulating metabolites in the sputum group is better than that in the other three groups, which is presumed to be the best cure plan.

Key words: urine metabolomics; scraping; sputum; lumbar disc herniation; gas chromatography-mass spectrometry; tissue construction; metabolic pathways; the National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81473791 (to XGH); the Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province, No. SJCX18_0444 (to CLH)

0 引言 Introduction

腰椎间盘突出是造成患者腰腿痛的最常见的原因^[1],其发病率逐年增长,并呈复杂化、年轻化的趋势^[2],严重影响患者生活质量。治疗腰椎间盘突出通常采用手术或保守治疗,其中由于手术治疗存在一定风险且费用较高,因而大多数患者通常选择保守治疗。有研究显示,80%~90%的腰椎间盘突出患者可通过保守治疗得到恢复^[3]。

中医护理技术因其简便易行价廉且安全有效的优势,逐步应用于临床^[4]。其中刮痧作为一项中医护理技术^[5],具有活血化瘀、疏通经络、调畅气血、解表祛邪等优势^[6],且腰椎间盘突出在中医理论中属于中医“痹症”范畴^[7],肾气虚疲、筋脉失养是其发病内因,加之外伤劳损,或外感风寒湿邪,致使经络阻滞,气血不调,不通则痛^[8]。故通过刮痧干预,可有效缓解其症状,是刮痧临床优势病种之一^[9]。

作者所在课题组前期研究已从临床试验与蛋白质组学的角度证实刮痧治疗腰椎间盘突出具有抗炎、提高免疫、即时镇痛的效果^[10-12]。此次实验拟从代谢组学的角度进一步探索刮痧干预腰椎间盘突出的生物代谢物及可能代谢途径,阐述其作用机制,并比较不同刮痧方案干预腰椎间盘突出大鼠代谢物的变化。目前已从腰椎间盘突出大鼠血液代谢物中分析,共找出14种潜在生物标志物和7条代谢通路以说明刮痧可通过抗炎、镇痛的效果来治疗腰椎间盘突出。此次实验拟进一步阐明刮痧干预腰椎间盘突出的代谢组学研究,从腰椎间盘突出大鼠的尿液代谢物中分析,完善临床应用刮痧治疗腰椎间盘突出提供理论基础,并为制定刮痧疗法的规范和标准提供参考。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 尿液代谢组学分析随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2017年7至12月在南京中医药大学SPF级动物实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 48只SPF级雄性健康SD大鼠,体质量180~250 g,均购自浙江省实验动物中心,动物合格许可证号:SCXK(浙)2014-0001。实验于2017年1月获得南京中医药大学实验动物伦理委员会审理批准。

1.3.2 实验用主要试剂和仪器 正己烷、吡啶购自美国Thermo公司,甲醇与乙腈购自美国Tedia公司,1,2-13C肉蔻酸购自德国Sigma-Alorch公司,甲氧胺盐购自德国Sigma-Aldrich公司,1%三甲基-氯硅烷的N,O-双三甲基三氟乙酰胺购自BSTFA公司,超纯水购自美国Millipore公司,尿素酶购自Sigma-Aldrich公司,刮痧板(水牛角MNJ-3412型)购自派朗公司,高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司,Tracel310/TSQ8000 GC-MS仪购自美国Thermo公司,Savant SPD 1010 SpeedVac浓缩仪购自美国Thermo公司,Electric Von Frey test电子Von Frey购自上海玉研科学仪器有限公司,样本均质仪购自美国Dragonlab公司,DMIL型倒置显微镜购自德国LEICA公司,TG-5MS毛细管色谱柱购自美国Thermo,电子测痛仪(IITC 2390)购自Life Science Inc.,代谢笼由南京中医药大学动物实验中心提供。

1.4 方法

1.4.1 动物分组 48只大鼠随机分为空白组、模型组以及4种刮痧组(循经出痧组、循经不出痧组、穴位出痧组、穴位不出痧组),每组各8只。模型组及4种刮痧组手术建立腰椎间盘突出模型,模型组不予治疗,刮痧组采用不同刮痧方案干预。

1.4.2 刮痧干预 从造模后第5天起,对4组刮痧组使用刮痧板,从上到下依次刮拭。刮痧手法及选穴参考课题组前

腰椎间盘突出造模方法^[13-14]

模型名称:	自体髓核移植非压迫性腰椎间盘突出大鼠模型
动物来源及品系:	SPF 级雄性健康 SD 大鼠, 购自浙江省实验动物中心
麻醉方法:	体积分数 10%的水合氯醛(350 mg/kg)腹腔麻醉
方法:	(1)沿背部正中间(平髂棘)做一纵形切口, 上下各 1 cm, 依次切开皮肤、筋膜、肌肉, 切除大鼠的 L ₅ 下关节突、L ₆ 上关节突及 L ₅ 半椎板, 暴露其右侧 L ₅ 背根神经节; (2)在距肛门约 2 cm 处的大鼠尾巴根部切断尾椎, 取约 4 mg 的髓核, 缝合; (3)将自体取出的髓核置于 L ₅ 背根神经节处, 避免机械压迫, 最后逐层缝合伤口; (4)术后每只大鼠腹腔注射青霉素 40×10 ⁵ U, 连续注射 3 d, 防止发生感染
建模成功标准:	出现焦躁不安、撕扯肢体毛发等表现以及机械痛阈值明显下降
最终动物处理情况:	实验造模操作过程中动物无脱失和死亡, 全部建模成功

期研究^[12-13]。干预方案^[15]: ①循经出痧组: 后背督脉大椎穴(DU14)[解剖定位: 大鼠后正中线上, C₇椎棘下凹陷中]至后海穴(GV1)[解剖定位: 大鼠右侧髂后上棘上 2 cm, 脊柱旁开 5 cm 处]、大椎穴。右后肢(足太阳膀胱经), 刮至出痧; ②穴位出痧组: 选取命门穴(DU4)[解剖定位: 大鼠后正中线上, L₂棘突下凹陷中]、肾俞(BL23) [解剖定位: 在大鼠 L₂棘突旁开 4.5 cm 处]、委中穴(BL40)[解剖定位: 大鼠腓横纹中点, 当股二头肌腱与半腱肌肌腱的中间], 点刮至出痧; ③循经不出痧组: 同循经出痧组, 但不要求刮至出痧; ④穴位不出痧组: 同穴位出痧组, 但不要求刮至出痧。
干预时间: 每次干预间隔 1 d, 3 次为 1 疗程, 共 3 个疗程, 治疗 9 次, 即造模后 21 d 时结束干预。干预手法: ①循经刮痧: 自上而下按经脉循行走向, 每刮一次, 长度至少 5 cm; ②穴位刮痧: 以穴位处为圆心点压、按揉, 移动半径不超过 5 cm; ③出痧: 每次刮拭力度为 4.0-5.0 kg, 速度超过 30 次/min, 时间相对较长, 刮至皮肤出现紫红或暗紫色血斑、血泡为止; ④不出痧: 每次刮拭力度为 2.0-3.0 kg, 速度不超过 30 次/min, 刮痧时间相对较短, 至皮肤潮红或出现散在出血点为止。

1.4.3 行为学观察 评估者对动物分组情况盲。于每日 10:00 至 12:00 观察各组大鼠有无烦躁、食欲下降或者足外翻、步态不稳等行为症状^[16]。

1.4.4 机械缩足反射阈值 分别于造模前 1 d 和造模后的第 4 天, 把各组大鼠放进透明容器里适应 0.5 h, 用探棒等力均速刺激大鼠右后底中心部, 发生抬足或缩足反应^[17]。采用电子测痛仪重复记录 3 次, 每次间隔 10 min, 结果取平均值。

1.4.5 尿液内源性代谢物分析 第 9 次干预结束禁食不禁水 12 h 后, 采用代谢笼收集每组大鼠 24 h 尿液, 并迅速保存至 -80 °C 的冰箱内备用。代谢组学分析前, 把解冻后的尿液样本(37 °C), 离心 10 min 后(4 °C, 12 000 r/min), 取其上清液 200 μL, 加入 30 μL 尿素酶溶液(30 U)后, 置于

37 °C 孵育 20 min, 加入内标有 10 μg 的甲醇 800 μL, 涡旋 10 min, 最后再离心 10 min(4 °C, 12 000 r/min), 取上清 200 μL, 放于离心浓缩仪中挥干 2h 进样。

色谱条件: 石英毛细管色谱柱(0.25 μm/min×0.25 mm×30 m), 高纯氦气, 流速恒定(1.2 L/min), 分流模式(分流比 20:1), 柱前压 100 kPa, 进样量 1 μL, 进样口 250 °C。升温程序: 0-1.0 min, 60 °C; 2.0-5.0 min, 50-320 °C。质谱条件: 电离方式 EI, 碰撞能量 70 eV, 离子源温度 280 °C, 离子传输线温度 250 °C, 溶剂延迟时间 4 min。扫描方式: 全扫描, 60-600 m/z(质荷比)。

1.5 主要观察指标 ①大鼠行为; ②机械痛阈值; ③尿液内源性代谢物。

1.6 统计学分析 利用 MS-DIAL 软件(LECO 公司)和 NIST 数据库(<http://srdata.nist.gov/>), 对质谱原始数据进行基线校正、峰提取、对齐、计算面积等预处理^[18]。用对矩阵数据集进行总离子流和 Pareto scalling 归一化, 并将得到的数据导入 SIMCA-P13.0 进行主成分分析、正交偏最小二乘判别分析等多元统计分析。使用 MetaboAnalysis 3.6 网页版(<https://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>)和 SPSS 22.0(美国 IBM SPSS 公司)软件确定差异性代谢物(fold change>1.2 且单因素方差分析结果 P<0.05 时, 差异有显著性意义)。最后使用 MetaboAnalyst 3.6 分析得出相关代谢通路。另外使用 SPSS 22.0 软件分析造模前后大鼠的机械痛阈值, P<0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验大鼠数量分析 共纳入 48 只大鼠无一死亡, 状态良好, 均纳入结果分析。

2.2 不同刮痧方案对腰椎间盘突出模型大鼠行为的影响 干预前各组大鼠均出现焦躁不安、撕扯肢体毛发等表现, 刮痧后大鼠症状明显改善, 且造模创面无明显炎症反应和瘢痕。

2.3 不同刮痧方案对腰椎间盘突出模型大鼠机械痛阈的影响 与造模前相比, 造模后大鼠的机械痛阈值明显下降(P<0.01), 见表 1。

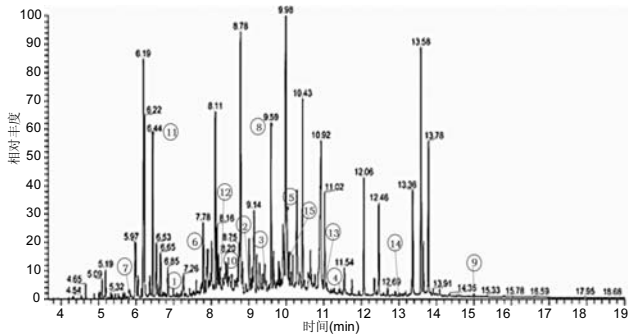
表 1 不同刮痧方案对腰椎间盘突出模型大鼠造模前后机械痛阈比较的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=8, g)

Table 1 Comparison of mechanical pain threshold in rat models of lumbar disc herniation treated by different scraping protocols before and after modeling

组别	造模前 1 d	刮痧前 1 d(造模后的第 4 天)	P 值
模型组	59.31±4.93	29.78±8.08	< 0.01
循经出痧组	59.22±7.69	25.60±8.03	< 0.01
穴位出痧组	52.28±10.39	30.99±7.81	< 0.01
循经不出痧组	48.82±15.47	23.28±10.93	< 0.01
穴位不出痧组	61.82±13.77	30.38±6.25	< 0.01

2.4 不同刮痧方案对腰椎间盘突出模型大鼠尿液内源性代谢物的影响 GC-MS 分析结果显示, 模型组、空白组、

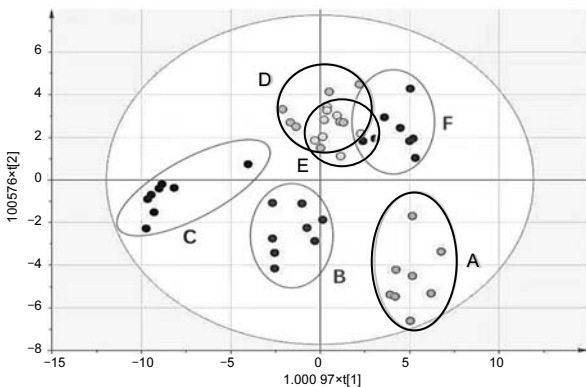
循经出痧组、穴位出痧组、循经不出痧组和穴位不出痧组的总离子流图见图1，保留时间集中在0-15.33 min。



图注：图中 1-15 分别为 2-甲基戊二酸、3-(3-羟基苯基)丙酸、3-羟基苯乙酸、5-羟基-3-吡啶乙酸、尿酸、天冬氨酸、左旋肉碱、柠檬酸、环腺苷酸、谷氨酰胺、甘氨酸、嗜糖细胞、鸟嘌呤、肌苷、赖氨酸的特征峰。

图 1 大鼠尿液的总离子流图
Figure 1 Total ion flow diagram of rat urine

把各组大鼠尿液代谢物的数据矩阵输入SIMCA-P13.0中构建主成分分析，以此考察模型的可靠程度。此模型参数 $R^2_X=0.759$ ， $R^2_Y=0.809$ ， $Q^2=0.245$ ，因为样本量较小，故模型的解释度好但预测性一般。从图2中可以看出各组区分明显，并且没有交叉重叠，表示通过刮痧可影响腰椎间盘突出大鼠尿液中的物质代谢。



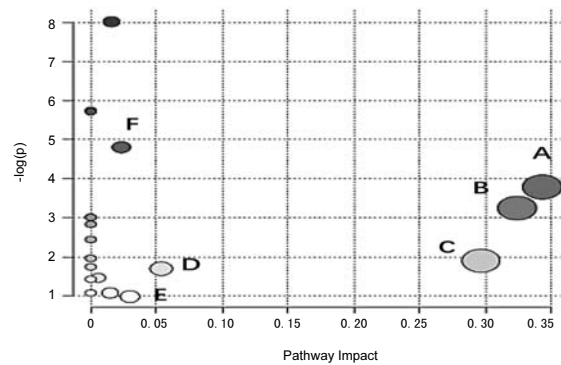
图注：图中 A-F 分别为空白组、模型组、穴位不出痧组、穴位出痧组、循经出痧组、循经不出痧组。X 轴为第一主成分，Y 轴为第二主成分， R^2 表示模型解释能力， Q^2 表示模型预测能力。

图 2 不同刮痧方案后腰椎间盘突出模型大鼠尿液中代谢物的分布
Figure 2 Distribution of metabolites in urine of rats with lumbar disc herniation after different scraping protocols

根据主成分分析与潜在结构判别分析，得出与疾病联系紧密的异常代谢物(潜在结构判别分析模型中变量投影重要度 >1 ，且单因素方差分析结果 $P < 0.05$)。共发现38个差异内源性代谢物，并根据在线数据库和相关文献，共鉴定出15种潜在差异内源性代谢物及含量见图3：①天冬氨酸：循经出痧组含量最低，穴位不出痧组含量最高；②谷氨酰胺：循经出痧组的谷氨酰胺含量最低；③甘氨酸：除了循经出痧组，其余3个刮痧组均与模型组差异无显著性意义；④3-(3-羟基苯基)丙酸：除穴位不出痧组，其余3组均与模型组差异有显著性意义($P < 0.01$)；⑤柠檬酸：刮痧组

与模型组相比差异有显著性意义，且循经出痧组柠檬酸含量最高；⑥环腺苷酸：刮痧组与模型组相比差异有显著性意义，且循经出痧组柠檬酸含量最高($P=0.00$)。据此推测，循经出痧组的干预效果优于其他刮痧3组。

2.5 不同刮痧方案影响的腰椎间盘突出模型大鼠尿液代谢通路 将鉴定出的15个差异代谢物导入MetaAnalyst3.0进行代谢通路分析，代谢通路重要值 > 0.02 的通路则选作潜在靶标路径。共发现6条代谢通路，见图4。按代谢通路重要值从高到低排列，分别为：①丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢；②甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢；③乙醛酸和二羧酸代谢；④三羧酸循环；⑤原发性胆汁酸生物合成；⑥精氨酸和脯氨酸代谢。其中，与刮痧干预腰椎间盘突出最为相关是前4种。

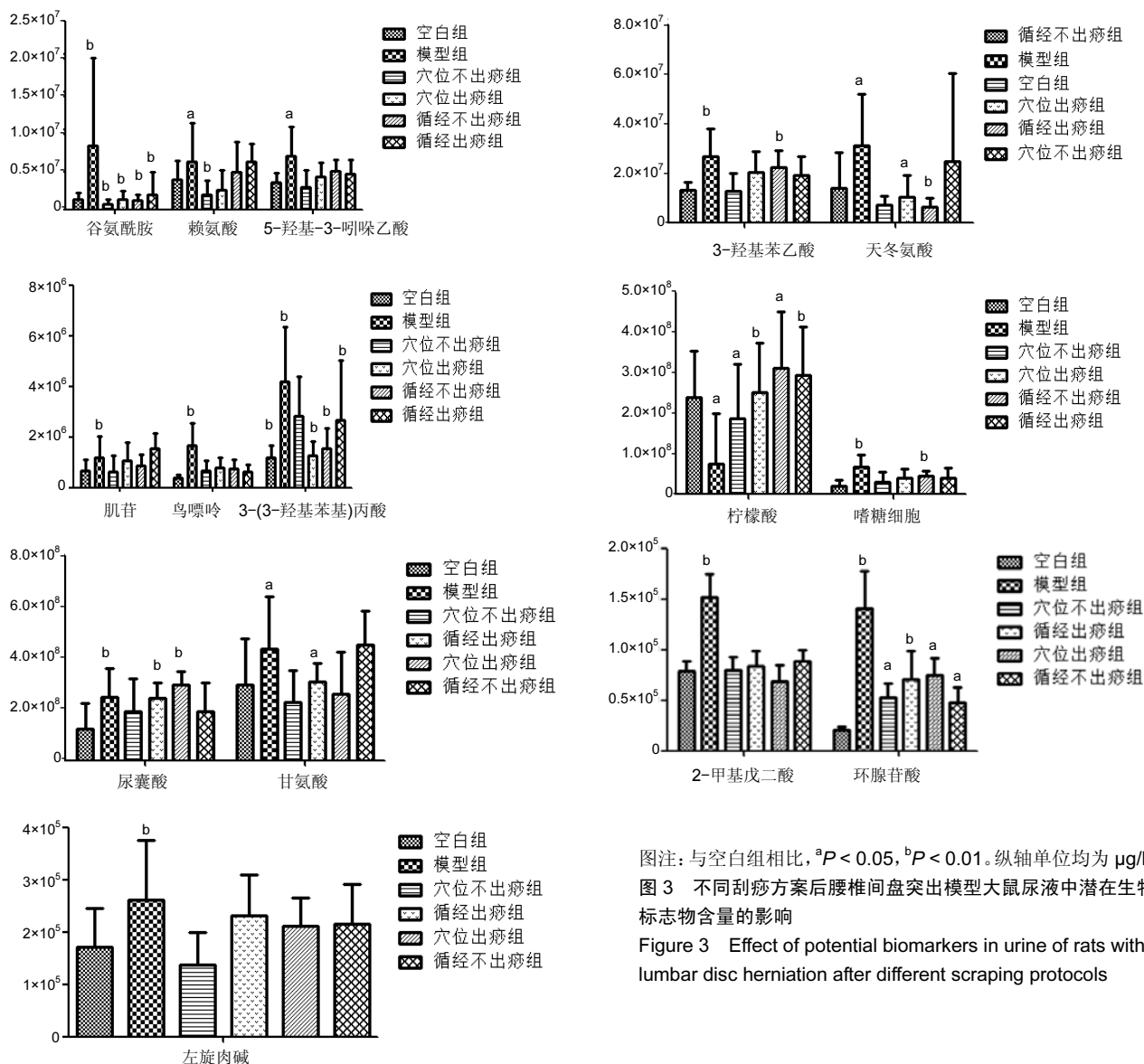


图注：图中 A 为丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢，代谢通路重要值=0.34；B 为甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢，代谢通路重要值=0.32；C 为乙醛酸和二羧酸代谢，代谢通路重要值=0.30；D 为三羧酸循环，代谢通路重要值=0.05；E 为原发性胆汁酸生物合成，代谢通路重要值=0.03；F 为精氨酸和脯氨酸代谢，代谢通路重要值=0.02。

图 4 不同刮痧方案影响的腰椎间盘突出模型大鼠尿液代谢通路
Figure 4 Urine metabolic pathway in rat models of lumbar disc herniation affected by different scraping protocols

3 讨论 Discussion

刮痧治疗腰椎间盘突出有镇痛效果，天冬氨酸、谷氨酰胺参加丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。在谷氨酰胺酶的催化下，谷氨酰胺可转成谷氨酸^[19]，作为中枢神经系统的兴奋性神经递质^[20]，谷氨酸和天冬氨酸共同参与神经元通信、神经可塑性以及神经病理异常等生命进程^[21]。它们能促成并维持神经病理性痛敏，诱导自发性疼痛和痛觉过敏等神经病理性疼痛的发生^[22]。因此，通过抑制其释放或拮抗其同有关受体的结合，可达到减轻疼痛的目的。模型组大鼠天冬氨酸、谷氨酰胺含量较空白组明显升高($P < 0.05$)，提示造模成功。刮痧干预后，尿液中天冬氨酸、谷氨酰胺含量下降，其合成和释放神经病理性痛敏能力减弱。闫丽萍等^[23]采用电针干预神经病理性痛大鼠，并对大鼠氨基酸类递质水平进行研究，发现通过减少兴奋性氨基酸递质的释放，大鼠疼痛改善，与此次研究结论一致，提示刮痧可减轻机体疼痛，且根据代谢通路的代谢通路重要值，说明刮痧对腰椎间盘突出的镇痛效果最为显著。



图注:与空白组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。纵轴单位均为 $\mu\text{g/L}$ 。

图3 不同刮痧方案后腰椎间盘突出模型大鼠尿液中潜在生物标志物含量的影响
Figure 3 Effect of potential biomarkers in urine of rats with lumbar disc herniation after different scraping protocols

刮痧治疗腰椎间盘突出能起到抗炎作用。甘氨酸参与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢。甘氨酸是中枢神经系统的抑制性神经递质^[24],作为全身炎症级联调节剂^[25],能调节炎症细胞因子转录、减少炎症因子合成、抗氧化应激^[26]。模型组比空白组甘氨酸含量高($P < 0.05$),原因是模型组大鼠受炎症刺激,合成大量炎症因子,激活甘氨酸转录因子表达增加,从而抑制炎症的发生^[15],侧面表明造模成功。经刮痧干预,尿液中甘氨酸含量增加,机体抗炎效果增强。沈淑洁等^[27]的实验得出,通过提高甘氨酸含量,可增强机体抗氧化应激、减少细胞损伤,从而达到抗炎效果,与此次实验的结果相符,提示刮痧可调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,增强机体抗炎反应。

3-(3-羟基苯基)丙酸、柠檬酸、环腺苷酸参与三羧酸循环。3-(3-羟基苯基)丙酸可在3-甲氧基-4-羟基-苯乙醇酸单加氧酶的催化下转化为2,3-二羟基苯丙酸酯,后经水解酶将环一裂变产物转化为琥珀酸,丙酮酸和乙酰辅酶A^[28-29]。作为三羧酸循环的重要组分,柠檬酸被发现是氧化

代谢中的中间物质^[30],可通过减少多形核细胞脱颗粒、减少髓过氧化物酶、弹性蛋白酶、白细胞介素 1β 和血小板因子4的释放,降低脂质过氧化,降低炎症反应^[31]。环腺苷酸是细胞内重要的生物活性物质,有抗炎及免疫调节作用^[32]。研究证实,三羧酸循环是炎症发展的中间代谢途径^[31],其在循环过程中,产生一些代谢中间体是炎症信号。此次实验中,同空白组相比,在模型组大鼠中与三羧酸循环相关的3-(3-羟基苯基)丙酸、环腺苷酸含量有不同程度升高,而柠檬酸则出现下降趋势($P < 0.01$),可能与机体糖代谢加速有关。在炎症过程中,释放大量炎症因子,模型组大鼠的能量需求急剧增加,代谢增强,导致过度柠檬酸过度消耗,三羧酸循环受抑制,故模型组中柠檬酸含量降低,而由3-(3-羟基苯基)丙酸转化成的琥珀酸无法及时参与代谢,含量升高。经刮痧干预后,3-(3-羟基苯基)丙酸含量降低、柠檬酸、环腺苷酸含量升高,表明刮痧对腰椎间盘突出有良好的抗炎作用。同时,柠檬酸也参与乙醛酸和二羧酸代谢。乙醛酸和二羧酸代谢与体内的氧化反应有关,

可通过影响三羧酸循环关键酶的活性导致三羧酸循环中的各种反应物和产物水平异常^[33]。此次实验中,模型组大鼠柠檬酸含量较空白组大鼠降低($P < 0.01$),能量消耗增加,三羧酸循环加速,各种反应物和产物消耗过度,导致与乙醛酸和二羧酸代谢通路相关的代谢产物含量均有所降低,而刮痧后,柠檬酸等相关生物代谢物回调,起到抗炎作用。

综上所述,通过气相色谱-质谱方法分析得出,刮痧对腰椎间盘突出症模型大鼠相关代谢紊乱有调节作用,具体可通过丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸代谢、甘氨酸,丝氨酸和苏氨酸代谢、乙醛酸和二羧酸代谢和三羧酸循环4条途径,下调3-(3-羟基苯基)丙酸、天冬氨酸和谷氨酰含量,升高甘氨酸、柠檬酸、环腺苷酸含量,以达镇痛抗炎效果。另外,循经出痧对相关代谢物调节作用优于其他3组,推测其临床疗效也较好。建议临床以作者所在课题组的实验研究为理论基础,针对腰椎间盘突出开展循经出痧的刮痧手法,进行多中心大样本的高质量临床试验以期更全面的解释刮痧干预腰椎间盘突出症的疗效。但此次实验同时也存在以下不足:①未对腰椎间盘突出症的4种证型进行分型研究;②尚未对一次刮拭的长短、次数进行规范性探究;③尚未对刮痧全程的总时间进行研究。

致谢:感谢南京中医药大学护理学院实验室及南京中医药大学江苏省儿童呼吸疾病(中药)重点实验室谢彤、彭琳秀等各位老师提供的技术帮助。

作者贡献:丁欢设计与撰写文章,丁欢、陈丽虹、陈宇婧负责实验实施,岳容兆、杨敏进行代谢组学技术指导,通讯作者审核。

经费支持:该课题接受了“国家自然科学基金资助项目(81473791)”“江苏省研究生科研与实践创新计划项目(SJCX18_0444)”的基金资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章中治疗干预手段采用水牛角刮痧板、电子 Von Frey。文章的全部作者声明,没有接受该器械的任何资助,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

机构伦理问题:实验方案经南京中医药大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在水合氯醛麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审:文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明:文章统计学方法已经由南京中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- Pourahmadi MR, Taghipour M, Ebrahimi Takamjani I, et al. Motor control exercise for symptomatic lumbar disc herniation: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2016;6(9):e012426.
- Gotecha S, Ranade D, Patil SV, et al. The role of transforaminal percutaneous endoscopic discectomy in lumbar disc herniations. *J Craniovertebr Junction Spine*. 2016;7(4):217-223.
- 李林,詹红生,陈博,等.针灸治疗腰椎间盘突出症概况[J]. *江苏中医药*, 2011,43(1):89-91.
- 曾业龙,陈东,赖美桂,等.体重指数对腰椎牵引治疗腰椎间盘突出症效果影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2013,35(1):32-33.
- 王俊杰,杨郁文,汪丽娟,等.中医护理操作技术临床应用现状的调查分析[J]. *中华护理杂志*, 2009,44(11):1020-1022.
- 陈华,姜荣荣.刮痧法治疗腰椎间盘突出症理论探讨[J]. *长春中医药大学学报*, 2013,29(4):643-645.
- 司誉豪,马勇,郭杨,等.扶阳宣痹汤治疗中老年寒湿型腰椎间盘突出症临床疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2018,33(12):5726-5730.
- 林明发.推拿治疗腰椎间盘突出症的文献研究[D].北京:北京中医药大学,2007.
- 姜荣荣,徐桂华,陈华,等.从文献计量学角度探讨刮痧治疗的优势病种[J]. *中医学报*, 2014,29(5):756-758.
- 李洁,徐桂华,姜荣荣,等.刮痧法治疗腰椎间盘突出症临床疗效观察[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013,15(5):176-178.
- 张鸿嫻.基于差异蛋白质组学研究刮痧干预腰椎间盘突出症的效应机制[D].南京:南京中医药大学,2017.
- 杨敏.基于血清蛋白质组学技术研究刮痧干预腰椎间盘突出症的效应机制[D].南京:南京中医药大学,2017.
- 赵丽云,姜会梨,任秀君,等.针刺对腰椎间盘突出大鼠模型痛行为和脊神经根组织形态学的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2014,37(8):551-555.
- Shamji MF, Allen KD, So S, et al. Gait abnormalities and inflammatory cytokines in an autologous nucleus pulposus model of radiculopathy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(7):648-654.
- 陈丽虹,岳容兆,张永怡,等.刮痧治疗腰椎间盘突出症不同方案疗效差异:基于血清代谢组学的评价[J]. *中国组织工程研究*, 2018,22(32):5110-5116.
- 谭明生,齐英娜,姜良海,等.球囊导管构建大鼠脊髓损伤型上颈脊髓损伤模型的研究[J]. *中医正骨*, 2016,28(12):1-5.
- Di W, Zheng ZY, Xiao ZJ, et al. Pregabalin alleviates the nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience*. 2015;284:11-17.
- Kind T, Wohlgenuth G, Lee DY, et al. FiehnLib: mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 2009;81(24):10038-10048.
- 曾佳,张弛,柏斗胜.谷氨酰胺与肿瘤[J]. *国际外科学杂志*, 2017,44(1):48-51.
- 郭延红,杜薇,陈江,等.人参皂甙Rg1对慢性应激抑郁模型大鼠谷氨酸及其受体表达的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2019,39(2):137-141.
- 宋杨,于涛,庞磊,等.HPLC法测定大鼠脑组织游离天门冬氨酸、谷氨酸、肌肽及γ-氨基丁酸[J]. *辽宁医学院学报*, 2010,31(4):314-316.
- Ma C, Li CX, Yi JL, et al. Effects of electroacupuncture on glutamate and aspartic acid contents in the dorsal root ganglion and spinal cord in rats with neuropathic pain. *Zhen Ci Yan Jiu*. 2008;33(4):250-254.
- 闫丽萍,吴辛甜,殷忠勇,等.电针对坐骨神经慢性压迫性损伤大鼠脊髓氨基类递质水平的影响[J]. *针刺研究*, 2011,36(5):353-356.
- 郭云翻,李祥,米卫东.侧脑室注射GT-0198对坐骨神经慢性压迫性损伤大鼠的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2018,28(25):6-10.
- Vieira CP, De Oliveira LP, Da Ré Guerra F, et al. Glycine improves biochemical and biomechanical properties following inflammation of the achilles tendon. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015;298(3):538-545.
- Perego MC, Caloni F, Cortinovis C, et al. Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Chemosphere*. 2017;188:274-279.
- 沈淑洁,水素芳,肖炳坤,等.基于¹H-NMR及LC-MS技术研究金铃子散对炎症大鼠模型调节机制的影响[J]. *中国中药杂志*, 2017,42(2):363-369.
- Torres B, Porras G, Garcia JL, et al. Regulation of the mhp cluster responsible for 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2003;278(30):27575-27585.
- Arai H, Yamamoto T, Ohishi T, et al. Genetic organization and characteristics of the 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid degradation pathway of *Comamonas testosteroni* TA441. *Microbiology*. 1999;145(Pt 10):2813-2820.
- 毛妍丽.基于代谢组学的子宫内腺异位症发病机制研究[J]. *中国妇幼保健*, 2018,33(7):1606-1609.
- Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol*. 2014;24(5):313-320.
- Abdel-Salam OM, Youness ER, Mohammed NA, et al. Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. *J Med Food*. 2014;17(5):588-598.
- 张宁,于栋华,王宇,等.穿山龙抗急性痛风性关节炎的肾脏代谢组学研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017,32(5):2034-2039.