

逆灸“天枢”穴干预大鼠结肠组织基因表达谱的实验研究

黄艳¹ 顾沐恩² 翁志军¹ 张建斌³ 施茵¹ 马喆¹

窦传宇¹ 刘慧荣^{1,2} 吴焕淦^{1,2} 王晓梅¹ 李璟²

(1 上海中医药大学上海市针灸经络研究所, 上海, 200030; 2 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海, 200437; 3 南京中医药大学, 南京, 210023)

摘要 目的:探讨逆灸“天枢”穴干预对健康大鼠结肠组织基因表达谱的影响,本文首次从转录组学的角度探讨逆灸的作用机制。方法:16 只成年的雄性 SD 大鼠随机分成 2 组,正常组(NC)、正常+隔药灸组(NM),采用隔药灸天枢穴(双侧)7 d,在 2% 戊巴比妥钠麻醉下获取结肠组织。从大鼠的一般状况、体重、结肠组织病理学,观察隔药灸天枢穴对健康的正常大鼠的效应。每组各取 3 只提取总 RNA,采用 RNA-seq 的高通量测序的方法检测结合生物信息学,分析结肠组织的 mRNA 表达谱。结果:与 NC 组比较,隔药灸不导致的健康大鼠体重降低,不影响结肠组织病理学形态观察。与 NC 组比较,NM 组的结肠组织差异表达基因有 866 个,其中上调 604 个,下调 262 个。差异表达基因涉及的基因本体(GO)主要与细胞周期、免疫分子和蛋白质生物过程相关,基因通路(Pathway)主要与机体免疫和蛋白质代谢相关。结论:艾灸“天枢”穴不损伤健康成年大鼠的结肠组织的形态,或能通过影响结肠组织的差异表达基因的生物学过程及通路,调节机体免疫功能而发挥艾灸保健与养生的作用。

关键词 逆灸;结肠组织;基因表达谱;炎症性肠病;免疫

Genome-wide Gene Expressions under the Effect of Preventative Moxibustion at ST25 in Rats

Huang Yan¹, Gu Muen², Weng Zhijun¹, Zhang Jianbin³, Shi Yin¹, Ma Zhe¹,

Dou Chuanzi¹, Liu Huirong^{1,2}, Wu Huangan^{1,2}, Wang Xiaomei¹, Li Jing²

(1 Shanghai Research Institute of Acupuncture and Median, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai

200030, China; 2 Department of Acupuncture, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western

Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China;

3 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To investigate genome-wide gene expressions of preventative moxibustion at ST25 in healthy rats. **Methods:** A total of 16 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the normal group (NC) and the normal and herb-partitioned moxibustion group (NM). Starting from day 1, the NM group received herb-partitioned moxibustion at the Tianshu points (bilateral, ST25) for 7 days. On day 8, colon tissues were collected under anesthesia with 2% pentobarbital sodium. The effect of herb-partitioned moxibustion at the ST25 in rats was observed on the general conditions, body weights, and HE staining. Three samples from each group were selected for total RNA extraction. The gene expression profile in the colon tissues was analyzed by the RNA-seq combined with bioinformatics. **Results:** Compared with the NC group, herb-partitioned moxibustion did not take effect on weight and histopathological observation of the colon in healthy rats. The NM group had 866 differentially expressed genes in colon tissues compared to the NC group, of which 604 were up-regulated and 262 were down-regulated. KEGG pathway analysis indicated that these genes were involved in multiple pathways, including immunity and protein metabolism. **Conclusion:** Herb-partitioned moxibustion at ST25 alters genome-wide gene expressions in healthy rats, and affects the biological processes and pathways. The treatment can be used as a healthcare treatment against diseases.

Key Words Preventative moxibustion; Colon tissue; Gene expression profiling; Inflammatory bowel disease

中图分类号:R245.81 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.12.010

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(编号:2009CB522900;2015CB554501);国家自然科学基金青年项目(编号:81503659);中国博士后科学基金面上项目(编号:2015M570380);上海市针灸机制与穴位功能重点实验室资助(编号:14DZ2260500);上海市重点学科资助项目(编号:S30304-A17)

通信作者:王晓梅,副教授,硕士研究生导师,主要研究方向:针灸胃肠疾病的临床与基础;李璟,主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向:针灸胃肠疾病的临床与基础研究

炎症性肠病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) 是一种慢性非特异性肠道炎性反应性疾病,包括克罗恩病 (Crohn's Disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (Ulcerative Colitis, UC), 因慢性炎性反应不易治愈, 易复发, 影响机体对营养物质的吸收, 一直是消化道疾病中亟待解决的问题^[1]。肠道黏膜感染和正常的吸收和传输障碍, 使 IBD 患者的胃肠传输与健康人不同^[2]。结肠是 IBD 的好发部位, 伴有肠道的慢性炎性反应及微生物紊乱^[3]。由于 IBD 发病机制尚未完全阐明, 迄今为止, IBD 在临床上主要采取药物控制和手术为主的治疗方法, 尚缺乏有效的防治措施。

“逆灸”即用灸法保健防病, 是针灸“治未病”的主要预处理方法之一。明·高武在《针灸聚英》里说:“无病而先针灸曰逆, 逆, 未至而迎之也。”中医古籍记载了大量关于“逆灸”防病保健的案例与方法, 这种艾灸疗法被现代医家和百姓用以养生, 既可预防疾病发生又可既病防变。艾灸激发经络之气, 扶助正气, 提高机体抵御各种致病因子和应变的能力, 调节免疫功能^[4]。笔者所在团队前期研究表明, 艾灸“天枢”穴可缓解炎症性肠病, 调节免疫炎症反应因子^[5-8]。本实验采用系统生物学研究方法——转录组学, 以雄性 SD 成年健康大鼠为研究对象, 观察艾灸“天枢”穴对机体的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, 体重 (180 ± 20) g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物使用许可证号: SCXK (京) 2012-0001。饲养条件: 清洁级, 12 h 昼夜节律交替 (上午 7 点一下午 7 点照明), 室内温度 (20 ± 2) °C, 室内湿度 50% ~ 70%, 适应性饲养 1 周后开始正式实验。实验严格按照美国国立卫生研究院实验动物的使用指南执行, 实验过程中对动物的处置遵循科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》规定。

1.2 主要试剂与仪器 NanoDrop-2000 (Wilmington, DE, USA); TRIzol 试剂 (Life Technologies, Carlsbad, USA); TapeStation 2200 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA); Illumina TruSeqTM RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, CA, USA); Illumina HiSeq 2000 sequencer (Illumina, San Diego, CA, USA); TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina, San Diego, CA, USA); RNase inhibitor (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA); 实验用小艾条 (蕲艾, 湖北)。

1.3 艾灸干预 NM 组: 取天枢穴 (双), 穴位的定位参考《实验针灸学, 李忠仁》。药饼由中药粉 (黄连、附子、肉桂、木香、红花、丹参和当归) 结合黄酒混合搅拌成厚糊状, 采用模具做成直径 1 cm, 厚 0.45 cm 的药饼; 采用模具做成直径和高分别为 0.6 cm 的艾柱, 重 90 mg。采用固定器固定好大鼠, 暴露天枢穴 (双), 提前 1 d 将天枢穴的鼠毛剔除, 将做好的艾柱放在药饼的上面, 然后将药饼放置天枢穴位上 (双), 点燃艾绒, 每个穴位每次 2 个艾柱, 每天上午艾灸 1 次, 共干预 7 次。采用与 NM 组固定相同的方法 NC 组的大鼠固定, 固定时间相同。

1.4 样本采集 隔药灸干预 7 d 后, 所有大鼠在 2% 戊巴比妥钠 (30 ~ 40 mg/kg) 麻醉下, 在距离肛门 1 cm 处采集 6 ~ 8 cm 的远端结肠, 每个结肠分成 2 部分, 一部分用 4% 多聚甲醛固定, 另一部分剪碎后置于冻存管中, 用液氮冻存 1 h 后保存在 -80 °C 冰箱备用。

1.5 结肠的组织病理学观察 将固定于多聚甲醛的 24 h 的结肠组织取出, 清洁修片后脱水包埋, 切成 4 μm 薄片, 采用 HE 染色在光学显微镜下观察结肠的组织病理学变化。

1.6 总 RNA 抽提、质控及文库构建 每组取 3 只结肠组织采用 Trizol 的方法提取结肠组织的总 RNA, 采用 Nanodrop2000 检测其纯度和浓度, 采用安捷伦 2200 检测总 RNA 的完整性, 将 RIN 值大于 7 的总 RNA 用于文库构建。每个样本取 3 μg 总 RNA 建立小 RNA 文库, 根据 Illumina TruSeqTM RNA Sample Prep Kits (Illumina, San Diego, CA) 操作说明分别选取不同的 index 标签建库。建库完成后利用安捷伦 2200 检测文库的质量。

1.7 RNA-seq 高通量测序和数据分析 本实验采用 TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina) 试剂在 cBot 上生成簇, 接着在 HiSeq2000 测序平台上运行单端测序程序。测序过程由 Illumina 提供的 Data collection software 进行控制, 实时数据分析。与参考序列比对, 采用 DESeq 进行分析, 计算变化倍数和 *P* 值, 设定 Fold Change ≥ 2 为上调, ≤ 0.5 为下调, *P* 值 < 0.05, 并将表达低于 0.01 的数值过滤掉。

1.8 基因通路分析和 GO 分析 利用 <https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp> 分析了基因本体 (Gene Ontology, GO) 和基因通路 (Pathway) 的富集分析, *P* 值 < 0.05 为显著富集。

1.9 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件分析, 对数据资料进行正态分布检验, 若服从正态分布用

均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异采用独立样本 t 检验, 统计检验水准均为 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 隔药灸“天枢”穴对大鼠体重及结肠组织形态的影响 大鼠一般情况比较, 发现 2 组大鼠均毛色密集光泽, 大便成形, 无便血、腹泻, 行动活跃、反应灵敏。大鼠在隔药灸“天枢”穴后从第 1 天到第 7 天, 体重共增加了 35 g, 正常组增长了 33 g。与 NC 组比较, NM 组体重增长差异无统计学意义。见图 1。

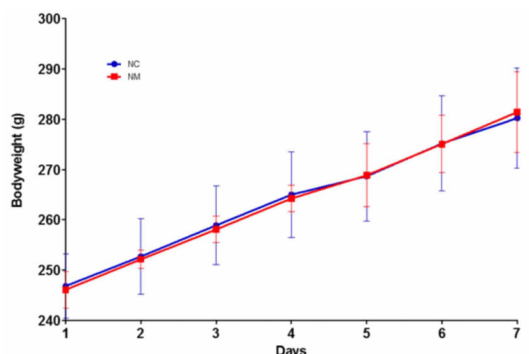


图 1 不同时间点 2 组大鼠体重比较

注: NC, 正常组; NM, 正常 + 隔药灸组。(每组 $n = 8$)。

采用光学显微镜进一步观察 HE 染色后的结肠组织病理学微观变化, NC 组与 NM 组的肠黏膜及腺体结构均完整, 排列整齐规则, 无充血、水肿及坏死, 无浆细胞及中性粒细胞的浸润。见图 2。

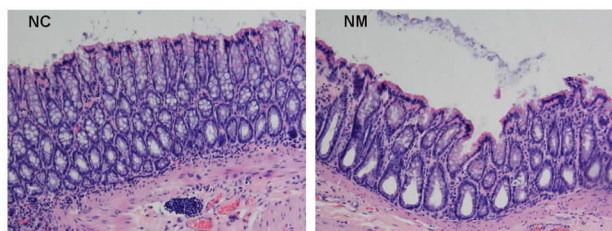


图 2 2 组结肠组织病理学比较

注: 代表性 HE 染色 (HE, $\times 200$)。NC, 正常组; NM, 隔药灸组。(每组 $n = 8$)。

以上通过对体重和组织病理学观察, 我们发现隔药灸天枢穴对大鼠的体重及结肠的组织病理学形态无明显影响。

2.2 隔药灸“天枢”穴对大鼠结肠组织基因表达谱的影响 每组取 3 只大鼠的结肠组织总 RNA 采用 RNA-seq 测序, 观察隔药灸“天枢”穴对大鼠结肠组织基因表达谱的影响。与 NC 组比较, NM 组的结肠组织差异表达基因有 866 个, 其中上调 604 个, 下调 262 个。见图 3。

采用 Cluster3.0 和 Tree view 软件对差异表达的 mRNAs 聚类分析、热图, 直观的比较每组样本之间

均一性和组间的差异。2 组共 6 个样本采用 hierarchical 的聚类方法, 分别分析上调和下调的差异表达基因, 结果提示 NC 组和 NM 组各 3 个样本的差异表达基因, 均按组别聚类。见图 4、图 5; 两个热图中可见每组 3 个样本的表达较为一致, 2 组之间有明显的差异。见图 4、图 5, 图 4 为上调的差异表达基因的聚类分析、热图; 图 5 为下调的差异表达基因的聚类分析和热图。其中, 差异表达基因的差异倍数大于 10 的基因有 14 个, Gbgt1 (FC = 62.11)、Klhl14 (FC = 35.63)、LOC102547612 (FC = 34.30)、LOC102552171 (FC = 17.72)、LOC102554698 (FC = 14.72)、Pnmt (FC = 14.07)、LOC102548299 (FC = 13.71)、LOC103693435 (FC = 13.67)、Lgsm (FC = 12.42)、LOC103694852 (FC = 11.66)、LOC102551762 (FC = 11.63)、Crtam (FC = 11.60)、LOC102555917 (FC = 10.52)、LOC684998 (FC = 10.01)。差异表达基因的差异倍数小于 0.01 的基因有 17 个, Hist1h2aa、LOC100361543、LOC100362185、LOC102547455、LOC102552851、LOC102554579、LOC103691297、LOC103692050、LOC103693135、LOC103693516、LOC103693531、LOC103694465、LOC679565、LOC683573、Pabpc11、Serpib2、Slc25a21。其中 Gbgt1 上调了 62.11 倍, 是变化最大的基因。

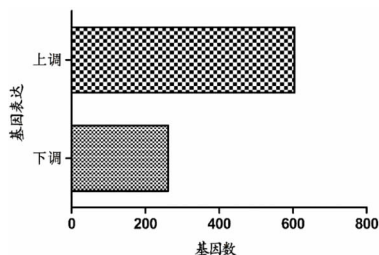


图 3 结肠组织差异表达基因的数目

2.3 隔药灸“天枢”穴对大鼠结肠组织差异表达基因的 GO 和 Pathway 的影响 隔药灸影响了 NC 大鼠结肠组织的 mRNAs 表达, GO 分析结果提示, 差异表达基因主要与 MHC I 类蛋白复合物、MHC Ib 类蛋白复合物、细胞周期蛋白密切相关, 其中上调的 604 个基因主要与 MHC I 类蛋白复合物、MHC Ib 类蛋白复合物、细胞周期蛋白相关; 下调的 262 个基因主要与细胞外的蛋白质基质、分泌颗粒相关。见图 6。Pathway 分析提示, 差异表达基因主要与免疫炎症反应、类固醇和吞噬小体的作用关系密切。上调基因相关的通路有 22 个, 其中主要与 TNF- α 信号通路、NOD 样受体信号传导途径、抗原提呈、Toll 样受体信号传导途径、P53 信号通路、合成类固醇、吞噬小体相关; 下调基

因相关通路有 4 条,其中主要与花生四烯酸代谢、蛋白质的消化与吸收和黏着相关。见图 7。

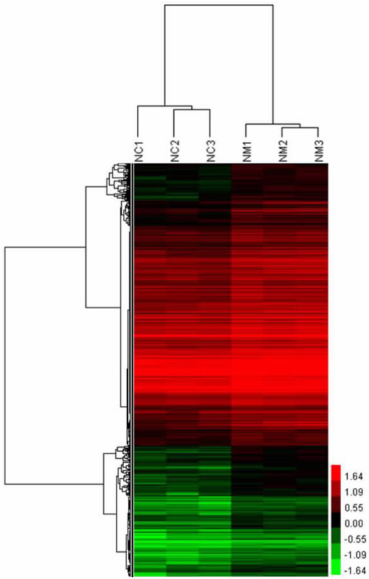


图 4 上调差异表达基因的聚类分析和热图

注:与 NC 组比较,NM 组基因表达上调;NC,正常组;NM,正常 + 隔药灸组。(每组 $n = 3$)。

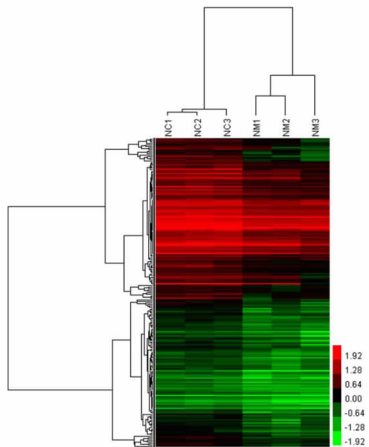


图 5 下调差异表达基因的聚类分析和热图

注:与 NC 组比较,NM 组基因表达下调;NC,正常组;NM,正常 + 隔药灸组。(每组 $n = 3$)。

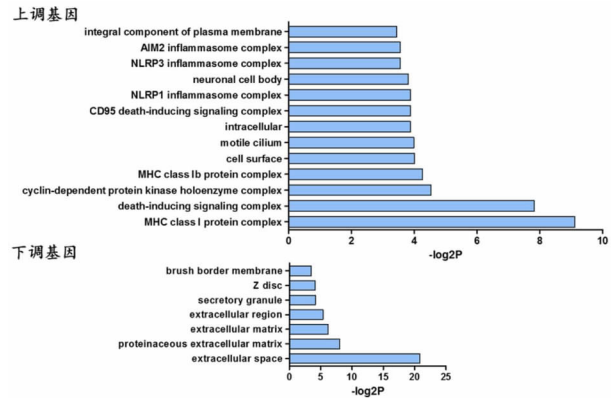


图 6 2 组差异表达基因的 GO 分析

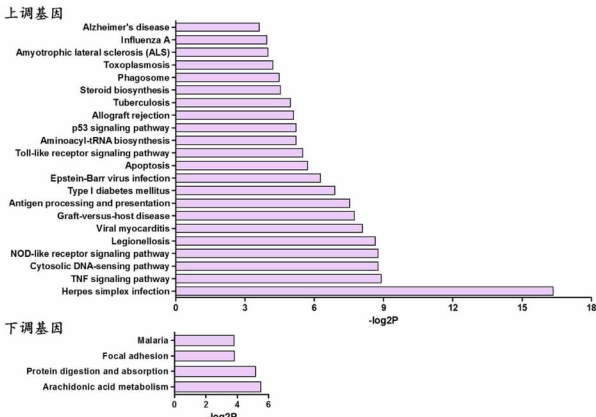


图 7 2 组差异表达基因的 Pathway 分析

3 讨论

炎症性肠病发病率较高,每年的 IBD 预防保健费用巨大^[9]。目前研究结果表明,炎症性肠病与机体内环境——肠道微生物群的异常免疫应答密切相关,树突状细胞存在调节 Th1 和 Th17 细胞介导免疫应答^[10]。国外学者 Joos 观察到针对 CD 和 UC 均有较好的疗效^[11-12];针灸具有抗炎调节免疫的作用已被证实^[13];研究者所在团队前期开展了隔药灸对 CD 和 UC 的临床和实验研究,观察到艾灸对 IBD 的良好效应,该效应可能与调节了结肠免疫炎症反应因子有关^[14-17]。基于前期研究的基础,本研究采用 RNA-seq 高通量测序技术与方法,从转录组学的角度,探讨艾灸“天枢”穴是否影响健康大鼠结肠组织全基因组表达。

艾灸健康大鼠“天枢”穴对体重及结肠组织形态的均无明显影响,从组织病理学观察未见充血、水肿和炎性反应细胞浸润,表明艾灸不引起对健康大鼠结肠组织形态学改变。然艾灸具有逆灸的保健作用,其机制尚未阐明。本实验从系统生物学转录组学的角度,观察了艾灸对健康大鼠结肠组织的全基因组表达谱的影响。研究结果表明,艾灸能影响结肠组织的基因表达谱,既有上调也有基因下调的差异表达基因,总体上调基因数较下调的基因数多。采用 GO 和 Pathway 分析,发现差异表达基因所涉及的主要与细胞周期、机体免疫功能和蛋白质代谢等密切相关。炎性反应对机体感染和损伤的局部组织所呈现的反应,是十分常见而又重要的基本病理过程,相关的免疫因子在结肠的免疫调节扮演重要角色。艾灸调节了多条免疫相关的通路:TNF- α 信号通路、NOD 样受体信号传导途径、抗原提呈、Toll 样受体信号传导途径等。目前研究证实,针灸具有调节免疫发挥抑制炎症反应的作用^[13],同时艾灸不仅能抑制结肠炎^[18-20],也能调节正常大鼠的免疫功能

相关的因子,或可防止肠道炎性反应。另外,隔药灸调节了正常大鼠结肠组织 P53 信号通路,参与细胞周期、蛋白质代谢,或可防止肠道的癌变^[21]。

隔药灸调节正常大鼠结肠组织全基因组表达谱,影响多条免疫信号通路,或可调节机体的免疫功能,预防炎症性肠病的发生。后续将进一步观察逆灸“天枢”穴对炎症性肠病的防治作用,以及逆灸“天枢”穴在病理状态的影响的作用机制,以期逆灸的临床应用提供详实的客观依据。

参考文献

- [1] Huppertz-Hauss G, Lie HM, Jelsness-Jørgensen LP, et al. Health-related Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease 20 Years After Diagnosis: Results from the IBSEN Study[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2016, 22(7): 1679-1687.
- [2] 陈宇洲, 王东凯. 炎症性肠病的结肠生理特征和结肠定位给药[J]. *中国药理学杂志*, 2006, 41(2): 86-90.
- [3] Dolan KT, Chang EB. Diet, gut microbes, and the pathogenesis of inflammatory bowel diseases[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, Jun 27. doi: 10. 1002/mnfr. 201600129.
- [4] Hong J, Zhang CH, Ma XP. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and the Action Mechanism of Moxibustion[J]. *J Acupunct Tuina Sci*, 2012, 10(3): 174-180.
- [5] 施茵, 包春辉, 吴焕淦, 等. 隔药灸结合针刺对克罗恩病患者肠黏膜 TNF- α 、TNFR1、TNFR2 表达及肠上皮细胞凋亡的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2011, 54(1): 46-50.
- [6] 王晓梅, 黄艳, 王圆圆, 等. 艾灸对溃疡性结肠炎大鼠结肠 TLR4 和 TNF- α 蛋白及其 mRNA 表达影响的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2016, 18(3): 374-380.
- [7] 翁志军, 吴璐一, 吕婷婷, 等. 隔药灸对克罗恩大鼠结肠 IL-17、IL-23 及其 mRNA 的调节作用研究[J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2016, 14(3): 156-163.
- [8] 杨玲, 赵继梦, 关鑫, 等. 不同隔药灸治疗溃疡性结肠炎临床观察[J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2016, 14(4): 231-241.
- [9] Burisch J, Jess T, Martinato M, et al. The burden of inflammatory bowel disease in Europe[J]. *Journal of Crohns & Colitis*, 2013, 7(4): 322-337.
- [10] 黄艳, 窦传宇, 黄任佳, 等. 从表观遗传修饰角度探讨艾灸对炎症性肠病的调控机制[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(2): 294-299.
- [11] Joos S, Wildau N, Kohnen R, et al. Acupuncture and moxibustion in the treatment of ulcerative colitis: a randomized controlled study[J]. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 2006, 41(9): 1056-1063.
- [12] Joos S, Brinkhaus B, Maluche C, et al. Acupuncture and moxibustion in the treatment of active Crohn's disease: a randomized controlled study[J]. *Digestion*, 2004, 69(3): 131-139.
- [13] Chavan SS, Tracey KJ. Regulating innate immunity with dopamine and electroacupuncture[J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(3): 239-241.
- [14] 黄艳, 窦传宇, 刘慧荣, 等. 表观遗传修饰与溃疡性结肠炎[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(7): 1099-1103.
- [15] 杨玲, 吴璐一, 窦传宇, 等. 隔药灸对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 MyD88 及 TRAF6 表达的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(9): 1864-1866.
- [16] Zhou EH, Liu HR, Wu HG, et al. Down-regulation of protein and mRNA expression of IL-8 and ICAM-1 in colon tissue of ulcerative colitis patients by partition-herb moxibustion[J]. *Digestive diseases and sciences*, 2009, 54(10): 2198-2206.
- [17] Wu HG, An GQ, Liu HR, et al. Clinical Study on the Prevention and Treatment of Intestinal Fibrosis in Ulcerative Colitis by Moxibustion[J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2003, 1(2): 14-17.
- [18] Lim HD, Kim MH, Lee CY, et al. Anti-Inflammatory Effects of Acupuncture Stimulation via the Vagus Nerve[J]. *Plos One*, 2016, 11(3): e0151882.
- [19] Ma TM, Xu N, Ma XD, et al. Moxibustion regulates inflammatory mediators and colonic mucosal barrier in ulcerative colitis rats[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(8): 2566-2575.
- [20] Han Y, Ma TM, Lu ML, et al. Role of moxibustion in inflammatory responses during treatment of rat ulcerative colitis[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(32): 11297-11304.
- [21] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis[J]. *Gut*, 2001, 48(4): 526-535.

(2016-12-07 收稿 责任编辑:洪志强)