

艾灸对大鼠胃黏膜损伤修复相关细胞信号蛋白质的影响

杨宗保^{1*} 王晨光² 龚 安² 谢宇锋³ 刘 琼²

(1. 厦门大学医学院, 福建省厦门市思明南路 422 号, 361005;

2. 江西中医药大学; 3. 深圳市福田区中医院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960484, 81260556); 江西省自然(青年)科学基金

资助项目(2008GZY0022); 江西省教育厅 2009 年度科技计划资助项目(GJJ09280)

* 通讯作者: yangzb@xmu.edu.cn, 18350211553

[摘要] 目的 研究艾灸对胃黏膜损伤修复相关细胞信号蛋白质的影响, 探讨艾灸促进胃黏膜损伤修复的分子机制。方法 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、胃经穴组和对照点组各 10 只, 采用束缚冷应激法建立应激性胃溃疡大鼠模型, 胃经穴组大鼠造模后鼠板束缚, 艾灸胃经“梁门”、“足三里”穴位; 对照点组鼠板束缚, 艾灸对照点; 空白组和模型组仅鼠板束缚, 各组均每次 20 min, 每日 1 次, 持续 12 天。应用蛋白质指纹图谱技术和疏水芯片、亲水芯片、金属离子螯合芯片检测各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质指纹图谱, 对比分析各组的差异蛋白质质荷比峰。结果 各组蛋白质指纹图谱比较, 3 个芯片共检测出 10 个标志蛋白质差异表达, 其中疏水芯片有 3 个标志蛋白质表达差异, 分子量分别是 2736Da、6985Da、7324Da; 亲水芯片有 1 个标志蛋白质表达差异, 分子量是 4561Da; 金属离子螯合芯片有 6 个标志蛋白质表达差异, 分子量分别是 1034Da、2136Da、3261Da、4871Da、7586Da、8267Da。结论 艾灸可调节胃黏膜损伤模型大鼠多种相关信号蛋白质的差异表达, 这可能是其促进胃黏膜损伤修复的分子机制之一。

[关键词] 艾灸; 蛋白质指纹图谱; 胃黏膜; 信号蛋白质

Research on the Effect of Moxibustion on Gastric Mucosal Injury Repair Related Cell Signaling Proteins with Protein Fingerprinting
YANG Zongbao¹, WANG Chengguang², GONG An², XIE Yufeng³, LIU Qiong²

(1. Medical College Xiamen University, Fujian Province 361005; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 3. TCM Hospital of Futian District, Shenzhen)

ABSTRACT Objective To study the effect of moxibustion on gastric mucosal injury repair related cell signaling proteins and its molecular mechanism. **Methods** Forty SD rats were randomized into the normal (blank) group, model group, stomach channel point group and control point group, with 10 in each. The stress ulcer rat models were established with restraint cold stress method. The stomach channel point group was given moxibustion on Liangmen (ST21) and Zusanli (ST36). The control point group was given moxibustion on the control points. The rats in the blank and model groups were tied with mouse board only. Each group was given corresponding measures 20min each time and once daily for 12 days. The mucosal cell protein fingerprint was detected with protein fingerprinting, hydrophobic chip, hydrophilic chip and metal ion chelating chip. The mass-to-charge ratio of differential protein in each group was compared and analyzed. **Results** Comparison of protein fingerprints in each group showed that 10 signs of differentially expressed proteins were detected in 3 chips. Three signs of differentially expressed proteins were detected in hydrophobic chip and their molecular weights were 2736 Da, 6985 Da and 7324 Da. One sign of differentially expressed protein was detected in hydrophilic chip and its molecular weight was 4561 Da. Six signs of differentially expressed proteins were detected in metal ion chelating chip and their molecular weights were 1034 Da, 2136 Da, 3261 Da, 4871 Da, 7586 Da and 8267 Da. **Conclusion** Moxibustion can regulate the differential expression in a variety of related signaling proteins and promote the repair of gastric mucosal injury.

Keywords moxibustion; protein fingerprint; mucosa; signaling protein

胃黏膜损伤是消化系统疾病中常见的一种病理反应, 临床上艾灸对其有着较好的疗效^[1-3]。近年来随着蛋白质组学的发展, 在双向凝胶电泳和质谱基础上产生了一门新兴技术——蛋白质指纹图谱技

术即表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术(Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS), 该技术可广泛用于低丰度小分子生物标志蛋白质的筛

选^[4-5]。我们利用该技术检测艾灸促进胃黏膜损伤修复相关标志蛋白质的差异表达,旨在进一步探讨艾灸干预胃黏膜损伤修复的客观物质基础及其生物学机制,为临床上艾灸胃经(穴)治疗胃黏膜损伤疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

疏水芯片、亲水芯片、金属离子螯合芯片购自美国 Millipore 公司; SELDI-TOF-MS 仪购自美国 CIPHERGIN 公司; 蛋白抽提试剂盒(批号 P0028)和增强型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)购自上海碧云天生物技术有限公司; 硝酸镧(批号 289892)、乙腈(批号 34851)、 α -氨基-4-羟基肉桂酸(批号 C8982)、三氟乙酸(批号 302031)均购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠 40 只, 10~12 周, 雌雄各半, 由江西中医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: 医动检证字 2010-0005, 饲养温度 20~22℃, 相对湿度 65%~70%, 给予充足的标准饲料和饮用水, 在自然光暗周期的环境中饲养。

1.3 造模方法

采用束缚冷应激(WRS)法^[6]制作应激性胃溃疡大鼠模型, 实验动物造模前禁食不断水 24 h, 将大鼠仰卧固定在鼠板上, 所用线绳松紧适度, 然后将鼠板直立浸于 20℃ 的恒温水箱中, 水平面保持在胸骨剑突部位, 水浸 10 h 后取出动物。

1.4 动物分组及处理

40 只大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、胃经穴组、对照点组各 10 只。胃经穴组大鼠造模后, 鼠板束缚, 艾灸胃经梁门、足三里穴位; 对照点组大鼠造模后, 鼠板束缚, 艾灸对照点; 空白组、模型组大鼠仅鼠板束缚。各组均每次 20 min, 每日 1 次, 持续 12 天。

1.5 取穴方法

胃经穴组选取胃经“梁门”、“足三里”两穴, 对照点组选取“梁门”、“足三里”穴外侧旁开 0.5 cm 处为对照刺激点。穴位定位根据《实验针灸学》^[7]。“足三里”: 膝关节后外侧, 在腓骨小头下约 5 mm 处; “梁门”: 腹正中线与乳头线之间的中点, 脐上 4 寸。将大鼠固定, 用动物特用艾炷(南阳神农艾草艾条厂, 规格: 18 mm×27 mm), 持于“梁门”、“足三里”和对照点上 2 cm 处悬灸, 采用温和灸补法, 每次取单

侧, 两侧交替使用。

1.6 胃黏膜细胞蛋白质指纹图谱

大鼠麻醉后仰卧固定于鼠板上, 摘出全胃, 在胃底剪开一小口, 翻转使胃内面朝外, 用生理盐水冲洗, 于胃黏膜损伤明显处, 取 1 cm×0.5 cm 大小的胃黏膜组织作标本。

胃黏膜细胞蛋白质抽提、定量均按照试剂盒说明进行。采用 SELDI-TOF-MS 和疏水芯片、亲水芯片、金属离子螯合芯片等检测胃黏膜组织蛋白质的差异表达, 具体步骤如下: ①蛋白溶液酶切: 称取蛋白样品 100 μ g, 溶于 100 μ l 25 mmol NH_4HCO_3 中。加入分装保存的胰蛋白酶 3 μ g, 37℃、16 h 后取出部分稀释成所需浓度备用。②肽段富集: 分别取疏水芯片、亲水芯片、金属离子螯合芯片用 0.4% 乙酸/60% 乙腈/水溶液洗 4 次; 用 400 mmol $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 溶液洗 8 次, 用超纯水洗 4 次; 用 2% 乙酸/20% 乙腈/水溶液洗 4 次; 用 0.2% 乙酸/20% 乙腈/水溶液洗 6 次; 蛋白质酶解混合物用酸性溶液 20% 乙酸调 pH 至 3 以下, 再用化学芯片吸取、排出 14 次; 各芯片用 0.2% 乙酸/20% 乙腈/水溶液洗 6 次, 超纯水洗 4 次, 4 μ l 0.3% 氨水洗脱, 进行质谱分析。

1.7 统计学方法

采用蛋白质芯片阅读机读取数据(每天用标准多肽和低于 200×10^3 的蛋白质标准分子校正, 系统的质量偏差为 1%), 每次收集数据前以标准蛋白质芯片校正分子量。采用 Proteinchip 3.0 自带的 Biomarker Wizard 3.1 软件对各组大鼠蛋白质指纹图谱数据进行比较和 t 检验, 检测有表达差异的蛋白质质荷比峰。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质差异表达的疏水芯片检测结果

表 1 示, 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质指纹图谱疏水芯片结果比较, 发现有 3 个标志蛋白质表达差异, 分子量分别是 2736Da、6985Da、7324Da, 其中模型组与空白组比较, 2736Da 标志蛋白表达增高 ($P < 0.01$)。胃经穴组、对照点组与模型组比较, 2736Da 标志蛋白表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 6985Da、7324Da 标志蛋白表达增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。胃经穴组 2736Da 标志蛋白低于对照组, 6985Da、7324Da 标志蛋白高于对照点组 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质差异表达的疏水芯片检测结果(质荷比, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	2736Da	6985Da	7324Da
空白组	10	3.76 ± 0.74	2.86 ± 0.54	3.22 ± 0.64
模型组	10	78.32 ± 3.87*	4.73 ± 1.25	3.56 ± 0.98
胃经穴组	10	66.47 ± 1.36 $\Delta\Delta\Delta$	26.87 ± 2.39 $\Delta\Delta\Delta$	11.89 ± 1.12 $\Delta\Delta\Delta$
对照点组	10	74.29 ± 5.28 Δ	9.75 ± 3.01 Δ	17.31 ± 2.56 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与对照点组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质差异表达的亲水芯片检测结果

表 2 示,各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质指纹图谱亲水芯片结果比较,发现有 1 个标志蛋白质表达差异,分子量是 4561Da,其中模型组与空白组比较,4561Da 标志蛋白表达增高($P < 0.05$);胃经穴组与模型组比较,4561Da 标志蛋白表达下降($P < 0.01$);对照点组与模型组比较,4561Da 标志蛋白表达增高($P < 0.05$)。胃经穴组和对照点组 4561Da 标志蛋白表达差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质差异表达的亲水芯片检测结果(质荷比, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	4561Da
空白组	10	81.95 ± 5.89
模型组	10	89.26 ± 3.75*
胃经穴组	10	24.91 ± 6.37 $\Delta\Delta\Delta$
对照点组	10	93.66 ± 10.19 Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与对照点组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质差异表达的金属离子螯合芯片检测结果

表 3 示,各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质指纹图谱金属离子螯合芯片结果比较,发现有 6 个标志蛋白质表达差异,分子量分别是 1034Da、2136Da、3261Da、4871Da、7586Da、8267Da,其中模型组与空白组比较,1034Da、7586Da、8267Da 标志蛋白表达增高,3261Da 标志蛋白表达下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。胃经穴组与模型组比较,2136Da、4871Da、7586Da 标志蛋白表达下降,1034Da、3261Da、8267Da 标志蛋白表达增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠胃黏膜细胞蛋白质差异表达的金属离子螯合芯片检测结果(质荷比, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1034Da	2136Da	3261Da	4871Da	7586Da	8267Da
空白组	10	11.23 ± 1.99	89.65 ± 10.45	12.56 ± 2.46	48.74 ± 2.99	37.86 ± 3.11	67.54 ± 12.13
模型组	10	21.65 ± 4.72**	92.51 ± 7.48	8.98 ± 1.98*	50.61 ± 7.54	45.87 ± 1.12*	92.38 ± 10.63*
胃经穴组	10	28.98 ± 5.98 Δ	23.46 ± 9.54 $\Delta\Delta\Delta$	32.98 ± 6.33 $\Delta\Delta\Delta$	13.66 ± 5.12 $\Delta\Delta\Delta$	10.12 ± 2.31 $\Delta\Delta\Delta$	96.14 ± 9.87 $\Delta\Delta$
对照点组	10	31.75 ± 3.65 $\Delta\Delta$	88.52 ± 11.87 Δ	16.44 ± 4.12 Δ	39.42 ± 4.38 $\Delta\Delta$	32.75 ± 2.89 Δ	91.43 ± 13.99

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与对照点组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$

对照点组与模型组比较,4871Da、7586Da 标志蛋白表达下降,1034Da、3261Da 标志蛋白表达增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。胃经穴组 2136Da、3261Da、4871Da、7586Da 和 8267Da 标志蛋白与对照点组比较,差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

胃黏膜损伤是多种胃疾病的始动环节,胃黏膜在受到一定程度的损伤刺激后,可启动修复机制使胃黏膜迅速恢复其完整性,以避免损伤向深层发展,这是胃黏膜抵抗疾病的一种重要屏障能力^[8]。然而在应激状态下胃黏膜的更新发生异常,易引起急性胃黏膜糜烂、出血、坏死、脱落、浅表溃疡形成^[9-10]。胃黏膜损伤属中医学“胃痛”、“呕吐”范畴,主要由寒邪客胃、饮食伤胃、肝气犯胃、脾胃虚弱等原因引起,针灸对胃痛有着很好的防治作用。足阳明胃经与胃腑密切相关,足三里为胃经合穴、胃腑下合穴,具有调理脾胃、补中益气、通经活络、疏风化湿、扶正祛邪之功能,《灵枢》曰:“邪在脾胃,则病肌肉痛,阳气有余,阴气不足,则热中善饥;阳气不足,阴气有余,则寒中肠鸣腹痛。阴阳俱有余,若俱不足,则有寒有热,皆调于足三里”;梁门为足阳明胃经位于腹部的穴位,根据“经脉所过,主治所及”的原理,可治疗胃腑病。大量研究表明,针灸可以通过调节体内失衡的免疫功能,抑制炎症细胞因子的基因表达,降低免疫细胞对炎症的反应,实现抗感染、减轻炎症反应的作用^[11-12]。本课题组前期研究也发现,针灸胃经穴对消化系统疾病具有良好的双向调节作用,能促进胃黏膜损伤的修复,提高胃幽门括约肌的张力,促进胃运动及其分泌功能^[13-14],揭示了针灸可通过调节

机体中多种活性物质的表达,进而促进胃黏膜损伤的修复。

蛋白质组是指由一个细胞或一个组织基因组所表达的全部蛋白质,是从整体水平探索蛋白质的作用模式、功能机制以及蛋白质群体内相互作用。SELDI-TOF-MS技术是一种高通量、高灵敏度、高特异性且微型化的蛋白质分析技术,可以在同一时相分析整个蛋白质组,通过比较正常与疾病状态的蛋白质组,有可能发现新的效应特异性相关蛋白^[15]。严洁等^[16]采用 SELDI-TOF-MS 技术和 WCX2 蛋白芯片获得各组大鼠胃黏膜细胞的蛋白质指纹图谱,对比分析各组的差异蛋白质质荷比峰,结果发现针刺治疗后大鼠胃黏膜细胞蛋白质指纹图谱与模型组比较共有 4 个蛋白质质荷比峰差异有统计学意义,其中 1 个蛋白质质荷比峰明显升高,3 个蛋白质质荷比峰明显降低。本研究采用 3 种化学芯片观察了艾灸胃经穴对胃黏膜细胞信号蛋白质的差异表达,研究结果显示,艾灸胃经穴可促进应激性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞相关信号蛋白质的表达,3 种化学芯片中共检测出 10 个标志蛋白质出现差异表达。疏水芯片有 3 个标志蛋白质表达差异,其中艾灸可调节分子量 2736Da 标志蛋白表达降低和 6985Da、7324Da 标志蛋白表达增高,艾灸胃经穴调节分子量 2736Da 和 6985Da 标志蛋白质的表达比艾灸对照点更为显著;亲水芯片有 1 个标志蛋白质表达差异,艾灸胃经穴可使上升的分子量 4561Da 标志蛋白质表达下降,而艾灸对照点对上升的 4561Da 标志蛋白质表达无下调作用,反而有所上调;金属离子螯合芯片有 6 个标志蛋白质表达差异,其中艾灸胃经穴可调节分子量 2136Da、4871Da、7586Da 标志蛋白表达下降,1034Da、3261Da、8267Da 标志蛋白表达增高,艾灸对照点可调节分子量 4871Da、7586Da 标志蛋白表达下降,1034Da、3261Da 标志蛋白表达增高。上述 10 个标志蛋白质可能是艾灸胃经穴促进胃黏膜损伤修复的特异效应物质,艾灸胃经穴和艾灸对照点可调节不同特异效应蛋白质的表达,但对于上述蛋白质的组成及其功能尚需做进一步的深入研究。本实验研究亦表明艾灸对胃黏膜损伤修复不是针对一种或两种蛋白质的调节而发挥治疗作用,而可能是多种蛋白质参与的复杂级联反应。

参考文献

[1]彭亮,杨舟,文琼,等. 艾灸对胃黏膜损伤的保护作用研究

概况[J]. 中医杂志,2013,54(4):345-347.

- [2]高希言,饶红,王燕,等. 针针对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃粘膜保护作用的实验研究[J]. 中医杂志,2002,43(5):344-345.
- [3]胡敏. 电针加隔姜灸治疗寒邪客胃型胃痛 68 例[J]. 成都中医药大学学报,2010,33(2):23-24.
- [4]Kiehnopf M, Siegmund R, Deufel T. Use of SELDI-TOF mass spectrometry for identification of new biomarkers: potential and limitations [J]. Clin Chem Lab Med, 2007,45(11):1435-1449.
- [5]Ortsater H, Sundsten T, Lin JM, et al. Evaluation of the SELDI-TOF MS technique for protein profiling of pancreatic islets exposed to glucose and oleate[J]. Proteomics,2007,7(17):3105-3115.
- [6]张洪峰,薛英威. 水浸-束缚应激法对大鼠胃壁细胞能量代谢的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报,2010,44(3):216-220.
- [7]李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:314-319.
- [8]Sekiguchi F, Saito S, Takaoka K, et al. Mechanisms for prostaglandinE2 formation caused by proteinase-activated receptor-1 activation in rat gastric mucosal epithelial cells [J]. Biochem Pharmacol,2007,73(1):103-114.
- [9]Li YH, Li J, Huang Y, et al. Gastroprotective effect and mechanism of amtolmetin guacyl in mice[J]. World J Gastroenterol,2004,10(24):3616-3620.
- [10]严洁,黎喜平,黄艾,等. 电针对大鼠胃粘膜损伤的修复机制研究[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(5):20-22.
- [11]牟向东,谢鹏雁,刘建湘,等. 电针刺大鼠足三里穴对 LESP 血浆胃泌素和胃动素的影响[J]. 世界华人消化杂志,2005,13(9):1069-1073.
- [12]易受乡,阳仁达,严洁,等. 针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(7):1721-1723.
- [13]杨宗保,严洁,邹晓平,等. 针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶 C γ -1 活性的影响[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(10):985-988.
- [14]杨宗保,严洁,邹小平,等. 电针大鼠胃经后血清对其胃黏膜细胞表皮生长因子受体表达的影响及浓度效应[J]. 中国临床康复,2006,10(35):87-89.
- [15]晏光荣,曹亚. 蛋白质组学在信号转导研究中的应用[J]. 生命的化学,2004,24(1):10-12.
- [16]严洁,张英进,田浩梅,等. 电针对大鼠胃黏膜损伤相关信号分子的影响[J]. 中医杂志,2009,50(11):1002-1005.

(收稿日期:2013-05-10;修回日期:2013-08-02)

[编辑:邓媛]