

胃溃疡大鼠在合募配穴针刺后胃组织的纳升级二维液相色谱

杨波, 严兴科

杨波, 长春中医药大学研究生学院 吉林省长春市 130117
严兴科, 长春中医药大学针灸推拿学院 吉林省长春市 130117
国家自然科学基金资助项目, No. 30873310
2009年度教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20092227120002
吉林省教育厅“十一五”科学研究基金资助项目, No. 2009-377
作者贡献分布: 杨波与严兴科对此文所作贡献均等; 此课题由严兴科与杨波设计; 研究过程由严兴科与杨波操作完成; 研究所用试剂及分析工具由严兴科提供; 数据分析由杨波完成; 本论文写作由杨波与严兴科完成。
通讯作者: 严兴科, 副教授, 130117, 吉林省长春市, 长春中医药大学针灸推拿学院. yanxk@126.com
收稿日期: 2010-03-21 修回日期: 2010-05-24
接受日期: 2010-06-02 在线出版日期: 2010-08-08

Nano-2D-LC analysis of proteomic alterations in rats with gastric stress ulcer after acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian

Bo Yang, Xing-Ke Yan

Bo Yang, Graduate School, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin Province, China
Xing-Ke Yan, School of Acupuncture-moxibustion and Massotherapy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30873310; the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20092227120002; and the Scientific Research Foundation of Education Department of Jilin Province during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2009-377
Correspondence to: Associate Professor Xing-Ke Yan, School of Acupuncture-moxibustion and Massotherapy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, Jilin Province, China. yanxk@126.com
Received: 2010-03-21 Revised: 2010-05-24
Accepted: 2010-06-02 Published online: 2010-08-08

Abstract

AIM: To investigate the therapeutic effect of acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian on gastric stress ulcer (SU) in rats and to explore potential mechanisms involved.

METHODS: Thirty-five Wistar rats were randomly divided into five groups: blank control

group, model group, He-Sea point (Zusanli) group, Front-Mu point (Zhongwan) group, and He-Sea and Front-Mu point (He-Mu) group. Gastric SU was induced in rats by water immersion and restraint. Proteomic alterations in the stomach of rats were analyzed by nano-two-dimensional liquid chromatography (nano-2D-LC).

RESULTS: Five chromatographic peaks at a retention time between 27 and 32 min were noted on the chromatograms in the model group and acupuncture treatment groups. The retention time of these five peaks was basically identical. The peak area was largest in the model group, followed by the Front-Mu point group, He-Sea point group and He-Mu group.

CONCLUSION: Acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point exerts a therapeutic effect on SU possibly by altering the expression of some proteins.

Key Words: Gastric stress ulcer; Matching acupoint; Nano-2D-LC; Spectrum peak

Yang B, Yan XK. Nano-2D-LC analysis of proteomic alterations in rats with gastric stress ulcer after acupuncture at He-Sea point and Front-Mu point of the stomach meridian. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(22): 2355-2358

摘要

目的: 揭示合募配穴法治疗胃溃疡特异性效应和协同机制。

方法: 大鼠35只随机分为空白对照组、应激性胃溃疡模型组、募穴组(中脘穴)、下合穴组(足三里组)和合募配穴组(中脘穴配足三里穴组), 利用水浸加捆绑法复制应激性胃溃疡模型大鼠, 借助纳升级二维液相色谱(Nano-2D-LC)技术研究大鼠胃经下合穴及募穴针刺后胃组织差异蛋白表达谱峰。

结果: 在保留时间27和32 min时, 模型组、募穴组、下合穴组和合募配穴组比空白对照组多出色谱峰5个, 并且色谱峰5个的峰面积依次

■背景资料

胃溃疡是全球性多发病、常见病, 也是世界范围内严重影响人类健康的常见病之一。针灸疗法因其简便、高效、安全、无不良反应等特点, 被广泛用于治疗胃溃疡及溃疡复发。

■同行评议者

王富春, 教授, 长春中医药大学针灸推拿学院; 沈克平, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科

■研发前沿

以整体的观念和角度,从基因、蛋白质和代谢物入手,构建针灸组穴治疗胃溃疡效应研究的技术平台和方法,为腧穴效应研究、脏腑病证治疗和中医药现代化提供新的技术和理论体系。

对应缩小。

结论:针刺对应激性胃溃疡的治疗机制可能与5种多肽含量的减小有关。

关键词:应激性胃溃疡;合募配穴;纳升级二维液相色谱;差异多肽谱峰

杨波,严兴科.胃溃疡大鼠在合募配穴针刺后胃组织的纳升级二维液相色谱.世界华人消化杂志 2010; 18(22): 2355-2358
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2355.asp>

0 引言

针灸疗法被广泛用于治疗胃溃疡及溃疡复发^[1,2]。蛋白质组学技术已经被用于针灸防治胃溃疡的机制研究^[3]。本文从合募配穴治疗胃溃疡的有效性出发^[4],对应激性胃溃疡大鼠进行针刺治疗,利用纳升级二维液相色谱(nano-two-dimensional liquid chromatograph, nano-2D-LC)技术对针刺治疗后的胃组织匀浆液进行蛋白质组研究,以揭示针灸防治胃溃疡的现代生物学机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠35只,♂,体质量200 g±30 g,由长春高新医学动物实验研究中心提供,实验动物合格证号:0003845。乙腈(ACN, G.R., Fisher Scientific Fair Lawn),甲酸(FA, G.R., Fluka),胰蛋白酶(Trypsin, Sigma, St. Louis, MO),牛血清白蛋白(BSA, A.R., Sigma),苯甲基磺酰氟(PMSF, A.R., Amresco),醋酸铵(NH₄AC, A.R., 北京化工厂),碳酸氢铵(NH₄HCO₃, A.R., 北京化工厂)。Agilent 1100纳升级的多维液相分析系统,美国Agilent公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组:将35只大鼠分为如下5组($n=7$),分别是:空白对照组;应激性胃溃疡模型组;募穴(中脘)组;下合穴(足三里)组;合募配穴(中脘穴配足三里穴)组。

1.2.2 穴位选取和针刺治疗:“足三里”、“中脘”的选取参照大鼠常用针灸穴位定位标准^[5]。按照分组要求,各组大鼠依照分组所取穴位,合募配穴组取“足三里穴”加“中脘穴”针刺,下合穴组取“足三里穴”针刺,募穴组取“中脘穴”针刺,均采用平补平泻针法治疗,每日1次,每次留针20 min,连续施术2 d;模型组每日同样抓取,不针刺;空白对照组正常喂养,不予处理。

1.2.3 模型复制:依据文献进行模型复制^[6,7],将所

有实验大鼠造模前禁食不禁水24 h,将模型组,募穴组,下合穴组,合募配穴组大鼠四肢捆绑固定于木板上,将木板直立浸于23℃±1℃的恒温水槽中,液面保持在大鼠胸骨剑突水平;空白对照组大鼠不予处理;模型组,募穴组,下合穴组,合募配穴组大鼠同时浸泡;5组大鼠于24 h后颈椎脱臼法处死。

1.2.4 鼠胃组织蛋白提取:将35只大鼠用颈椎脱臼法处死后,迅速剪取溃疡部胃组织,用冰的生理盐水冲洗3次以除去体液及血液中一些可能的污染物。用滤纸吸净多余水分,将鼠胃组织切成约3 mm³小块,接着称质量,以1:8(g:mL)的比例加入提取液(含1 mmol/L PMSF的水溶液)后用玻璃匀浆器对胃组织进行匀浆。匀浆液在冰浴中混悬20 min,然后在4℃条件下以13 000 r/min离心10 min。收集上清液,贮存在-80℃冰箱留待下一步使用。

1.2.5 鼠胃组织匀浆液总蛋白含量测定:采取Bradford法^[8],以牛血清白蛋白作标准品,用SmartSpec3000分光光度计进行定量。

1.2.6 酶解反应:取10 μL样品,用100 mmol/L NH₄HCO₃水溶液调节其pH值至7.5-8后,煮沸5 min,加入15% ACN,冷至室温,将胰蛋白酶加入该溶液中,使样品与胰蛋白酶的质量比为40:1。该样品液在37℃水浴条件下过夜后,滴入FA使pH值至3-4以终止酶解反应。

1.2.7 蛋白质酶解物的nano-2D-LC分离:第一维强阳离子交换(Strong Cation-Exchange, SCX)色谱柱采用Agilent ZORBAX Bio-SCX Series II (50 mm×0.8 mm, 3 μm),上样液与纳升级分析型反相液相色谱流动相A相同,即流动相A: H₂O-ACN-FA(体积比为95:5:0.1)溶液。洗脱液为0.5 mol/L的NH₄Ac,洗脱15 min,流速:10 μL/min。富集柱: C18柱为Agilent ZORBAX 300SB(50×0.3 mm, 5 μm)。样品的预浓缩和除盐时所用的溶液与纳升级液相色谱流动相A相同。第二维纳升级分析型RPLC柱: C18柱为Agilent ZORBAX SB(150×0.5 mm, 5 μm)。所用流动相A为H₂O-ACN-FA(体积比为95:5:0.1)溶液; B液为H₂O-ACN-FA(体积比为5:95:0.1)溶液,线性梯度洗脱程序: 0-15 min, 上样除盐; 15-25 min, 0%B-50%B; 25-35 min, 50%B-99%B; 35-45 min, 99%B-0%B, 流速4 μL/min, 多波长检测器(Multiwavelength Detector, MWD), 检测波长214 nm。鼠胃组织蛋白提取液的酶解样品由在线的nano-2D-LC系统完成分离。第一维

■创新盘点

本实验利用nano-2D-LC技术,筛选并分离合募配穴法防治应激性胃溃疡大鼠胃组织中的特定效应蛋白,揭示合募配穴法防止胃溃疡的作用机制。此法改变了以往单个蛋白的静态研究,从蛋白质组整体变化研究胃溃疡针灸效应的物质基础,阐明针灸疗效的现代生物学机制。

表 1 4组样品共有色谱峰保留时间比较 (min, mean \pm SD)

	模型组	募穴组	下合穴组	合募配穴组	平均
峰1	27.286 \pm 0.68	27.189 \pm 0.79	27.045 \pm 0.54	26.894 \pm 0.47	27.1035 \pm 0.62
峰2	28.023 \pm 0.88	27.947 \pm 0.53	27.909 \pm 0.38	27.811 \pm 0.65	27.9225 \pm 0.61
峰3	28.980 \pm 0.89	28.850 \pm 0.92	28.700 \pm 0.71	28.606 \pm 0.76	28.7840 \pm 0.82
峰4	30.934 \pm 0.31	30.859 \pm 0.24	30.814 \pm 0.41	30.749 \pm 0.28	30.8390 \pm 0.31
峰5	31.546 \pm 0.87	31.386 \pm 0.77	31.338 \pm 0.62	31.262 \pm 0.70	31.3830 \pm 0.74

表 2 4组样品共有色谱峰峰面积比较 (mAu, mean \pm SD)

分组	共有峰峰1面积	共有峰峰2面积	共有峰峰3面积	共有峰峰4面积	共有峰峰5面积
模型组	1 711.8 \pm 2.89 ^a	18 734.1 \pm 5.87 ^d	12 339.8 \pm 4.28 ^d	4 464.9 \pm 8.95 ^d	4 163.4 \pm 1.56 ^d
募穴组	868.2 \pm 6.23 ^{bd}	7 322.9 \pm 4.64 ^{bd}	5 929.0 \pm 6.75 ^{bd}	2 543.3 \pm 6.31 ^{bd}	2 361.3 \pm 2.35 ^{bd}
下合穴组	786.9 \pm 5.21 ^{bdf}	3 604.7 \pm 7.21 ^{bdf}	3 656.3 \pm 5.37 ^{bdf}	1 608.3 \pm 7.39 ^{bdf}	1 554.9 \pm 2.61 ^{bdf}
合募配穴组	549.6 \pm 4.68 ^b	1 565.7 \pm 6.88 ^b	1 080.0 \pm 6.26 ^b	694.5 \pm 6.27 ^b	701.3 \pm 1.43 ^b

^b $P < 0.01$ vs 模型组; ^a $P < 0.01$ vs 合募配穴组; ^f $P < 0.01$ vs 募穴组。

是基于静电作用的离子交换色谱分离, 第二维是基于疏水作用的反相液相色谱分离。

2 结果

第一维采用SCX柱, 通过0.25 mol/L的NH₄Ac溶液置换, 由富集柱除盐吸附组分后反冲入反相液相色谱柱线形洗脱, 最后进入多波长检测器分析。

5组酶解液所有成分的色谱峰在40 min内出完, 比较5组色谱图(图1)。图1是5组样品重叠比较的色谱图。观察空白对照组、模型组和各治疗组色谱图, 在保留时间27-32 min时, 模型组和各治疗组比空白对照组多出5个色谱峰, 即模型组、下合穴组、募穴组及合募配穴组具有保留时间基本一致的5个多肽峰, 详细数据见表1, 各峰在4组间的保留时间差小于0.5 min, 峰1、2、3、4、5的保留时间在4组间均无显著差异(均 $P > 0.05$), 故确定为共有多肽峰。在空白对照组中未见这5个共有峰, 提示共有峰属于大鼠病理状态下产生的5种特异性多肽。

比较4组间5个色谱峰峰面积大小(图1), 可见模型组与治疗组相比, 5个共有峰的各个峰面积对应减小, 详细数据见表2。共有峰1、2、3、4、5的峰面积积分在模型组、募穴组、下合穴组和合募配穴组中呈现逐渐减小趋势, 组间峰面积积分比较均有非常显著性差异(均 $P < 0.01$), 并且合募配穴组峰面积积分最小, 最接近正常状态。

3 讨论

中医针灸疗法在治疗胃溃疡中具有很好的疗效,

■应用要点

现代科技手段与针灸研究的基础工作相融合将成为针灸效应研究新的发展方向, 必将为腧穴效应研究、脏腑病证治疗和中医药现代化提供新的技术和理论体系, 也将为解决当代中医药学的重大疑难问题提供可寻求的新途径。

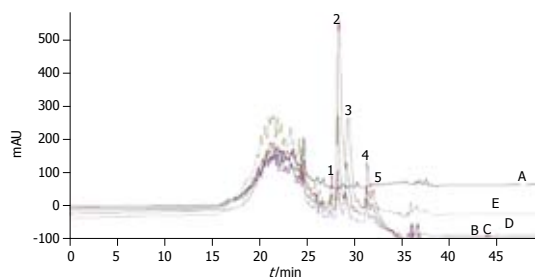


图 1 5组鼠胃组织酶解多肽的SCX-RPLC二维分离图(重叠)。A: 空白对照组; B: 模型组; C: 募穴组; D: 下合穴组; E: 合募配穴组。1-5为B、C、D、E组的共有色谱峰。

特别是选取中脘、足三里等穴配伍治疗胃溃疡等疾病效果显著^[9]。研究表明: 针刺足三里、中脘穴可有效改善胃肠运动失调, 其调整作用可使胃分泌功能协调, 使胃窦部位运动趋于正常, 胃节律恢复正常, 胃排空不受阻碍; 还能使处于病理状态下的胃电振幅恢复正常^[10]。针刺胃经穴对胃的运动、分泌以及胃黏膜损伤修复皆有明显的调节作用^[11], 研究发现针刺治疗胃溃疡的机制可能与针刺参与胃黏膜细胞分裂和增殖的信号转导机制有关^[12]。但目前针刺防治胃溃疡机制研究大都局限于以胃或胃局部改变为对象, 或以单一的指标改变进行观察, 研究结果难以体现中医“胃腑”的整体功能变化规律, 更难反映“胃腑”与其他脏腑的密切联系和相互作用。由于针灸效应的整体性, 仅从单个蛋白的静态研究难以全面反映针灸效应的整体变化, 因此改变以往单个蛋白的静态研究而从蛋白质组的整体变化研究针灸的效应将是针灸学研究的一

■同行评价

本文方法先进, 文字表达流畅, 为针灸效应研究提供了新的思路和技术。

个突破口. 蛋白质组首先由澳大利亚Macquarie大学的Williams和Wilkins于1994年提出, 指的是“一个细胞或组织所表达的全部蛋白质”^[13]. 蛋白质组学(Proteomics)即以蛋白质组为研究对象, 从蛋白质组的水平进一步认识生命活动的机制和疾病发生的分子机制, 是对生物体在蛋白质水平定量、动态、整体性的研究. 蛋白质组所体现的时空性与整体性, 与中医精髓的整体观念亦十分贴近^[14]; 同时, 蛋白质组学通过采用高分辨率的蛋白质分离手段, 结合高效率的蛋白质鉴定技术, 全景式地研究在各种特定情况下的蛋白质谱^[15], 这一主要特点为中医针灸的整体调节效应研究提供了有利的理论指导与技术支持.

本实验结果显示, 空白对照组与模型组和治疗组色谱图, 在保留时间27-32 min时, 模型组、下合穴组、募穴组及合募配穴组具有5个多肽峰保留时间基本一致, 各峰在4组间的保留时间差小于0.5 min, 峰1、2、3、4、5的保留时间在4组间均无显著差异(均 $P>0.05$), 故确定为共有多肽峰. 在空白对照组中未见这5个共有峰, 提示共有峰属于大鼠病理状态下产生的5种特异性多肽.

比较4组间5个色谱峰峰面积积分, 共有峰1、2、3、4、5的峰面积积分在模型组、募穴组、下合穴组和合募配穴组中呈现逐渐减小趋势, 组间峰面积积分比较有非常显著性差异(均 $P<0.01$), 并且合募配穴组峰面积积分最小, 最接近正常状态. 通过比较发现, 针刺后5种特异性多肽峰的峰面积积分都明显减小, 并且针刺足三里穴比针刺中脘穴的减小程度大, 合募配穴组比单纯针刺中脘或足三里穴对其峰面积积分减小的程度更大, 表明针刺能够减小这5种多肽的含量, 并且针刺中脘穴、足三里穴及中脘穴配足三里穴对5种多肽含量减小的程度依次增大, 合募配穴比单纯选用下合穴或募穴对5种特异性多肽的作用强, 提示针刺对应激性胃溃疡的治疗机制可能与这5种多肽含量的减小有关, 合募配穴比单用下合穴或募穴对应激性胃溃疡

的治疗作用更强, 即合募配穴的疗效优于单纯针刺中脘穴或足三里穴, 同时单纯针刺足三里穴的疗效优于单纯针刺中脘穴^[16], 这与胃溃疡等胃腑疾病的临床表现和针灸治疗胃腑疾病的实践相一致.

4 参考文献

- 1 陈平国, 张泓. 消化性溃疡的针灸治疗与研究近况. 中医药导报 2008; 14: 81-83
- 2 高洋, 杨波, 严兴科. 针灸治疗胃溃疡的机理研究进展. 上海针灸杂志 2008; 27: 48-50
- 3 杨波, 高洋, 张燕, 严兴科. 针灸治疗胃溃疡蛋白质组学效应研究平台技术优化与策略研究. 时珍国医国药 2009; 20: 1398-1400
- 4 俞竹青, 毛水泉. 针灸治疗胃、十二指肠溃疡32例临床观察. 光明中医 2005; 20: 31-32
- 5 李辞蓉, 华兴邦, 周浩良, 宋大鲁, 胡元亮. 豚鼠针灸穴位图谱的研制. 上海针灸杂志 1992; 11: 30-32
- 6 卢文丽, 方肇勤, 潘志强, 刘小美, 廖明娟. 应激等致大鼠实验性胃溃疡的“同病异证”与“异病同证”. 浙江中医药大学学报 2008; 32: 318-320
- 7 翁泰来, 张锡流, 叶星江, 赵利华. 豚鼠应激性胃溃疡模型的制作与验证的实验研究. 广西中医学院学报 1999; 16: 80
- 8 海广范, 张慧, 牛秉轩, 尹志奎. 水的酸碱度对Bradford法检测蛋白质含量的影响. 新乡医学院学报 2009; 26: 144-145
- 9 赵艳鸿, 王富春. 下合穴与脏腑相关性探析. 针灸临床杂志 2002; 18: 4-5
- 10 李铁, 王富春, 项柏东, 周丹, 段晓英, 郭明. 不同针法针刺中脘、足三里对应激性胃溃疡模型大鼠胃电作用的研究. 针灸临床杂志 2005; 21: 47-48
- 11 Sherman KJ, Cherkin DC, Eisenberg DM, Erro J, Hrbek A, Deyo RA. The practice of acupuncture: who are the providers and what do they do? *Ann Fam Med* 2005; 3: 151-158
- 12 Lu W. Acupuncture for side effects of chemoradiation therapy in cancer patients. *Semin Oncol Nurs* 2005; 21: 190-195
- 13 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16: 1090-1094
- 14 李喜悦, 张文生, 王永炎. 蛋白质组学技术在方证相关理论研究中的应用探讨. 中医研究 2007; 20: 5-6
- 15 王若光. 蛋白质组学研究中医药学的原创性发展. 中国医药学报 2003; 18: 619-620
- 16 黄琴峰. 针灸治疗胃肠病症用穴规律探讨. 中国针灸学会第八届全国中青年针灸推拿学术研讨会论文集汇编 2008: 59-61

编辑 李军亮 电编 何基才