

专题——针刺镇痛

痛记忆模型大鼠 ACC 脑区蛋白质组学研究
及电针干预

徐立雷 孙 晶 李 菲 何俏颖 何晓芬 沈 醉 刘伯宇 方剑乔 邵晓梅

(浙江中医药大学第三临床医学院针灸神经生物学实验室,浙江省针灸神经病学重点实验室,杭州,310053)

摘要 目的:采用蛋白质组学方法筛选痛记忆模型大鼠 ACC 脑区差异蛋白,并进一步筛选与电针干预痛记忆可能相关的差异蛋白,为电针干预痛记忆的深入研究提供理论支持。方法:将 18 只健康雄性 SD 大鼠随机分为空白组(生理盐水对照组)、模型组和电针组,每组 6 只。模型组及电针组大鼠通过二次角叉菜胶足跖注射建立痛记忆模型。对照组注射同等剂量的生理盐水。电针组于首次注射后 5 h、1~5 d 进行电针治疗。模型组与空白组仅作与电针组相同的束缚处理。分别检测 3 组大鼠造模前,首次注射后 4 h、5 d 和二次注射后 4 h、72 h 的机械痛阈。二次注射后第 3 天,大鼠处死后取 ACC 脑组织。以双向凝胶电泳分离,双向电泳后经不同波长光激发扫描得到不同样品的蛋白质组图谱,经 Image Master2D 6.0 软件进行分析后,筛选相差在 1.5 倍以上的蛋白作为差异表达的蛋白质,并进行质谱鉴定。结果:1)与空白组比较,模型组二次未注射角叉菜胶足跖痛阈显著下降($P < 0.05$);与模型组比较,电针组二次未注射角叉菜胶足跖痛阈显著上升($P < 0.05$)。2)经蛋白质组学分析共筛选出 18 个差异蛋白质。其中模型组有明显差异者有 11 个,4 个表达呈现下调,分别为微管蛋白 α -1A 链、DAB2 相互作用蛋白、NADH 脱氢酶的辅酶黄素蛋白 2、转凝蛋白-3;7 个表达呈现上调,分别为微管蛋白 β -3 链、肌动蛋白 1、磷酸甘油酸激酶 1、类固醇激素合成急性蛋白、肌动蛋白 2、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a。与空白组比较,电针组有明显差异者有 15 个,3 个表达呈现下调,分别为微管蛋白 α -1C 链、Rho GDP 解离抑制因子、NADH 脱氢酶的辅酶黄素蛋白 2;12 个表达呈现上调,分别为微管蛋白 β -2A 链、微管蛋白 β -3 链、肌动蛋白 1、乌头酸水合酶、丙酮酸激酶同工酶、异柠檬酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶 1、Ras 相关 Rab-19 蛋白、类固醇激素合成急性蛋白、肌动蛋白 2、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a。电针组与模型组比较后呈现明显差异的有 8 个差异蛋白,2 个呈现下调,分别是 Rho GDP 解离抑制因子、肌动蛋白 2。6 个呈现上调,分别是微管蛋白 α -1A 链、微管蛋白 β -2A 链、DAB2 相互作用蛋白、乌头酸水合酶、异柠檬酸脱氢酶、Ras 相关 Rab-19 蛋白。结论:经蛋白质组学分析发现,有 11 个差异蛋白参与痛记忆的唤醒过程;有 8 个差异蛋白参与电针干预痛记忆的过程。提示电针对痛记忆的干预可能与稳定神经细胞骨架蛋白,进而抑制神经突触可塑性改变有关。

关键词 电针;痛记忆;前扣带皮层;蛋白质组学;差异蛋白;角叉菜胶;全景式;大鼠

**Differential Proteomics Research on ACC of Pain Memory Rat Model Induced
by Carrageenan and the Intervention of Electroacupuncture**

Xu Lilei, Sun Jing, Li Fei, He Qiaoying, He Xiaofen, Shen Zui, Liu Boyu, Fang Jianqiao, Shao Xiaomei

(The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Key Laboratory
of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China)

Abstract Objective: To screen the differential protein of ACC brain region in pain memory model rats by proteomics method, to further screen the differential proteins related to electroacupuncture intervention pain memory, so as to provide theoretical support for the further study of electroacupuncture intervention pain memory. **Methods:** A total of 18 healthy male Sprague Dawley rats were divided into three groups, with 6 rats in each group, including a control group, a model group and an EA group. The pain memory model was made by twice cross-injection carrageenan in EA and model groups. The control group was given the same dose of normal saline in the same time point as the model and EA group. EA was applied to bilateral Zusanli (ST36) and given at 5 h, 1~5 days after the first injection for 30 min per time. The model group was taken the same measures except for EA. The pain withdrawal thresholds were detected before modeling and at 4 h, 120 h after the first injection and before second injection and at 4 h, 72 h after the second injection. Rats were killed at 3rd day after the second injection and taking the ACC of rats for preparation. Samples were separated by 2-D gel electrophoresis (2-DE). Then we got different samples of proteomic map by different excitation wavelength light scan. The gels were respectively image analyzed by Image Master 2D 6.0, to screen the protein changed in abundance more

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81574056);国家自然科学基金青年基金项目(81804183)

作者简介:徐立雷(1998.07—),男,本科,研究方向:中医针灸,Tel:(0571)86613768,E-mail:2546302588@qq.com

通信作者:邵晓梅(1977.02—),女,博士,研究员,研究方向:针刺镇痛效应基础研究,E-mail:13185097375@163.com

than 1.5 fold up or down compared with which in constitution of the control group as differential proteomics, and then had the mass spectrum identification. **Results:** 1) Compared with the blank group, the pain threshold of carrageenan ankle was significantly decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ankle pain threshold of electroacupuncture group without twice cross-injection carrageenan was risen significantly ($P < 0.05$). 2) After proteomic analysis, 18 differential proteins were screened out. Among them, there were 11 with significant difference in the model group, 4 of them had down expression, including Tubulin alpha-1C chain, DAB2 interacting protein, NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, Transglutinin-3; and 7 of them had up expression, including Tubulin beta-3, Phosphoglycerate kinase 1, Steroidogenic acute regulatory protein, Actin cytoplasmic 2, Cytochrome c oxidase subunit 6A1, Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a. Compared with the blank group, EA group had 15 proteins with significant differences, 3 of them had down expression, including Tubulin alpha-1C chain, Rho GDP-dissociation inhibitor 1, NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, and 12 of them had up expression, including Tubulin beta-2A chain, Tubulin beta-3A chain, Actin 1, aconitate hydratase, pyruvate kinase isoenzyme, isocitrate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase 1, Ras-related Rab-19 protein, steroid hormone synthesis of acute protein, actin 2, cells Pigment c oxidase 6A1 subunit, ubiquitin 40S ribosomal protein S27a. There were 8 differentially expressed proteins in the EA group compared with the model group, and 2 were down-regulated, which were Rho GDP dissociation inhibitor and actin 2. 6 were up-regulated, respectively, tubulin α -1A Chain, tubulin β -2A chain, DAB2 interacting protein, aconitate hydratase, isocitrate dehydrogenase, Ras-related Rab-19 protein.

Conclusion: There were 11 differential proteomics involved in pain memory of awakening process through proteomics analysis. And 8 differential proteomics were involved in the intervention of EA on pain memory. The intervention effect of electroacupuncture (EA) pretreatment on pain memory may be related to inhibition of synaptic plasticity. And the inhibition may be related to reinforce nerve cytoskeleton structure.

Key Words Electroacupuncture; Pain memory; Anterior cingulate cortex; Proteomics; Differential proteins; Carrageenan; Pano-ramic; Rat

中图分类号: R245 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.06.001

痛记忆目前被认为是慢性痛形成的主要原因之一,主要表现为炎性反应、创伤等引起疼痛的初始病因消除后,伤害性感受仍然存在的现象^[1-3]。对这类疼痛的治疗目前临床仍以抗炎镇痛药物为主,但临床效果不明显,并且长期恐惧、回避行为将导致患者的生活能力下降、肢体废用、肌力下降等^[4],对于疼痛患者的生命质量产生重大影响。因此对痛记忆的干预已逐渐成为疼痛治疗的新热点。

研究发现前扣带皮层(Anterior Cingulate Cortex, ACC)是人类疼痛研究中激活频率最高的脑区^[5-7],我们以往研究也已发现电针可有效缓解痛记忆,并且其作用与抑制 ACC 脑区活性有关^[8]。尽管既往研究初步说明电针是干预痛记忆的有效方法,但是目前对于针灸治疗痛记忆的认识极其有限,有下列问题急需解决:1)缺乏蛋白质组学层面对编码痛记忆的关键脑区(ACC)可能涉及的调控网络和细胞通路的证据。尽管有报道了与痛记忆变化密切相关的通路或因子包括 cAMP/PKA/CERB 通路、ERK 磷酸化、NMDA 受体等^[9-11],以及与痛感觉密切相关 MAPK 信号通路、P2X 嘌呤受体、TRPV 等^[12-14]。但是尚未开展就 ACC 脑区全景式的蛋白质组学差异蛋白比较研究。2)缺乏蛋白质组学层面针灸抗痛记忆机制认识。我们的前期工作以痛记忆模型研究对象,有力说明了电针对痛记忆早期的干预优势,遗憾

的是我们仅关注了 p-CREB 在痛记忆唤醒过程及电针干预中的作用,没有采用更加合适的蛋白质组学技术全景式揭示电针对痛记忆的干预机制。针灸作为镇痛公认有效的作用多靶点传统疗法,对于揭示针灸镇痛原理的研究多数仍然集中在针灸对特定通路或蛋白的研究,极大限制了本领域的发展。因此,目前的研究成果不能完全阐释针灸对痛记忆干预的原理。本研究基于比较蛋白质组学技术,系统分析痛记忆唤醒阶段 ACC 脑区差异蛋白表达,并进一步观察电针对差异蛋白表达的影响,这对初步构建针灸干预痛记忆调制网络尤为必要,将为深入了解痛记忆唤醒机制及针灸干预奠定夯实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选用购自中国科学院上海实验动物中心的 18 只健康雄性 SD 大鼠,由浙江中医药大学实验动物中心饲养(实验动物质量合格证号为 SYXK(浙)2008-0115),体质量(180 ± 20)g。

1.1.2 药物 角叉菜胶、0.9%生理盐水。

1.1.3 试剂和仪器 Von Frey 纤维丝测痛仪(美国 stoelting 公司),韩式 HANS-200A 穴位神经刺激仪(联创科技(集团)南京济生医疗科技有限公司),EttanTM DALTSix 垂直板电泳仪(GE 公司),Typhoon 9400 多功能扫描成像系统(GE 公司),DeCyder Im-

age Quant™ V6.5 凝胶图像析软件(GE 公司),基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱仪(美国应用生物系统公司),MultiTemp III 温控循环水浴系统(美国 BioSciences 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 18 只,体质量(180 ± 20)g,适应性喂养 1 周后,将大鼠随机分为空白组(生理盐水对照组)、模型组、电针组 3 组,每组 6 只。

本研究通过 2 次角叉菜胶注射诱导炎性痛,建立疼痛记忆模型。模型组与电针组大鼠首次造模于左后足跖皮下注射 2% 角叉菜胶 0.1 mL,首次造模后 14 d,以同样的方法在 2 组大鼠右后足跖皮下注射 2% 角叉菜胶 0.1 mL。空白组在相应时间点注射等剂量的生理盐水。

1.2.2 干预方法 参照《实验动物穴位图谱》进行穴位定位,将 0.3 mm × 13 mm 毫针针刺电针组大鼠双侧“后三里”穴,将参考电极置于“后三里”下 1 cm 处,使用韩氏穴位神经刺激仪连接针灸针,电针仪的刺激参数设定如下:波形为疏密波,频率 2/100 Hz;波宽 0.2 ms;电流强度以动物局部皮肤轻微颤动为度(1 mA ~ 2 mA),起始强度为 1 mA,每 10 min 增加 0.5 mA,直至 2 mA,共计 30 min。电针时间为首次造模后 5 h 及第 1 ~ 5 天。空白组与模型组大鼠仅作与电针组相同的束缚处理。

1.2.3 指标检测与方法 1) 机械缩足阈检测:采用 von frey 检测大鼠双侧后足缩足阈(Paw Withdrawal Thresholds, PWTs)作为机械痛阈。检测时间段为上午 9 点至 12 点,保持室内温度 23 ~ 25 ℃,湿度 45% ~ 55%,噪声 40 dB 以下。痛阈检测时间点为首次造模前、首次造模后 4 h、120 h,2 次造模前、2 次造模后 4 h、72 h。每次测痛连续检测 5 次,每次间隔 5 min,取后面 4 次缩足阈的平均值作为 1 个时间点痛阈。各组大鼠于基础痛阈测量前,进行两天适应性痛阈的检测,以减少环境对实验大鼠痛阈的影响。2) 提取总蛋白及电泳:3 组大鼠在第 2 次角叉菜胶注射后的第 4 天,麻醉状态下经心灌注预冷生理盐水后,取大鼠左侧前扣带皮层 20 mg ACC 组织,加入 200 μL 裂解液,匀浆后静置于冰盒 30 min。再置于高速低温离心机中设定 11 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,结束后提取上清液。并采用 BCA 法检测蛋白浓度,再进行双向电泳和银染法蛋白质点的检测。3) 凝胶银染后图像扫描与软件分析:凝胶电泳之后使用 MilliQ 纯水冲洗数次,运用 Typhoon9400

扫描仪进行扫描成像。所获得的蛋白质组图谱采用 DeCyderImage Quant™ V6.5 图像分析软件进行点识别、点匹配、背景消除以及差异蛋白质分析。确定差异蛋白质后,使用 250 μL 枪头剪去其前端部分,将感兴趣的蛋白质点对准后,轻压切下,置于离心管中备用。4) 胶内酶解:将进行银染后切下的蛋白质点置于离心管中,再用 ddH₂O 将蛋白质凝胶反复冲洗后,依次进行洗胶脱色、分解和剩余物中半胱氨酸烷基化、酶解、萃取、纯化和结合。5) 质谱分析(MALDI-TOF-TOF-MS 检测):用 4800 串联飞行时间质谱仪(4800 Plus MALDI TOF/TOF™ Analyzer)进行质谱分析,设定激光强度为 3 880,采集数据方式采用反射模式和自动获取数据的模式,每张图谱共采集 1 000 点,肽段扫描范围为 900 ~ 4 000 Da,选择信噪比大于 5 000 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析,每个样品点上选择 2 个母离子,二级 MS/MS 激光激发碰撞能量 2 KV。每个样品采集 3 个 ~ 5 个谱图。质谱数据用 Data Explorer(4.0) 分析软件去除同位素峰后,用 Mascot 检索在 NCBI 引擎中进行检索。最后,结合 2-D 图谱上初步的蛋白质的分子量、等电点信息鉴定蛋白质。

2 结果

2.1 电针对痛记忆模型大鼠机械痛阈的影响 首次造模前,空白组、模型组和电针组大鼠双侧足跖基础痛阈组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠左侧足跖首次造模后 4 h 痛阈显著下降($P < 0.01$)并延续至造模后 120 h($P < 0.01$)。电针组痛阈在 4 h 均显著低于空白组($P < 0.01$)。与模型组比较,电针组造模后 4 h 痛阈无统计学意义($P > 0.05$),但在造模后 120 h 痛阈显著上升($P < 0.01$)(见图 1A)。未造模侧足跖痛阈在各时间点均无统计学意义($P > 0.05$)(见图 1B)。

14 d 之后,当大鼠右后足跖痛阈恢复到基础痛阈,进行右后足跖 2 次角叉菜胶造模(首次未注射侧足跖),2 次造模后右后足跖痛阈变化类似于首次造模侧足跖,与空白组比较,模型组与电针组大鼠痛阈在 2 次造模后 4 h 至 72 h 均有显著下降($P < 0.01$)。模型组与电针组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)(见图 1C)。在大鼠 2 次未造模侧足跖即首次造模侧足跖,与空白组比较,模型组痛阈在 2 次造模后 4 h、72 h 显著下降($P < 0.01$)(见图 1D);电针组痛阈在 2 次造模后 4 h、72 h 痛阈无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,电针组 2 次造模后 4 h 及 72 h 痛阈均有显著升高($P < 0.01$, $P < 0.01$)。

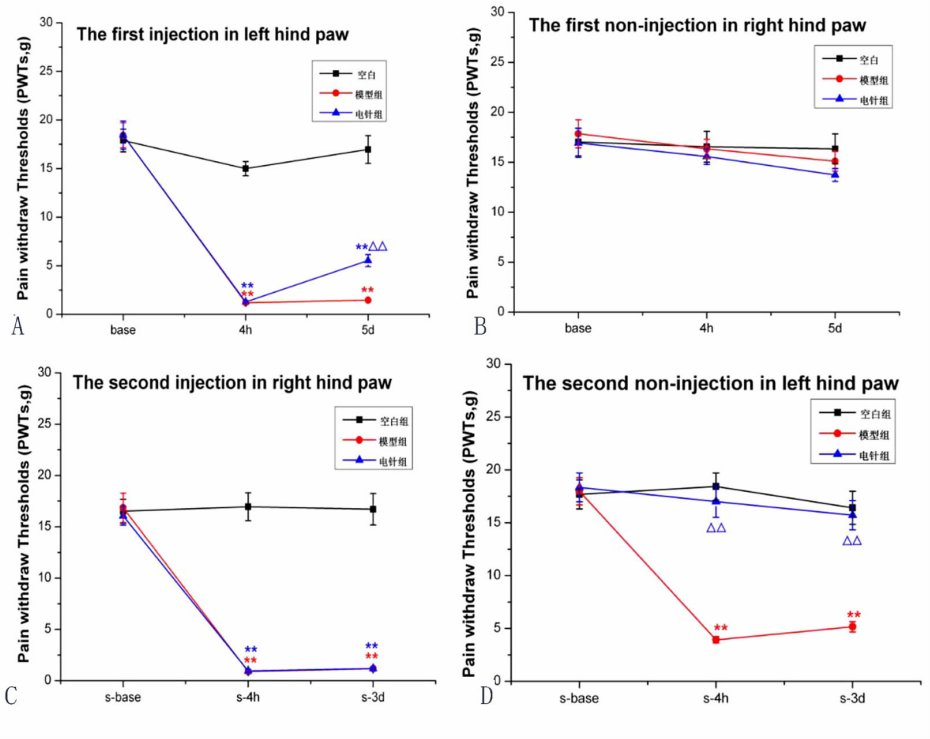


图1 各组大鼠双侧机械痛阈的变化($\bar{x} \pm s, g$)

注: ** 与空白组比较, $P < 0.01$; 与模型组比较, $P < 0.01$

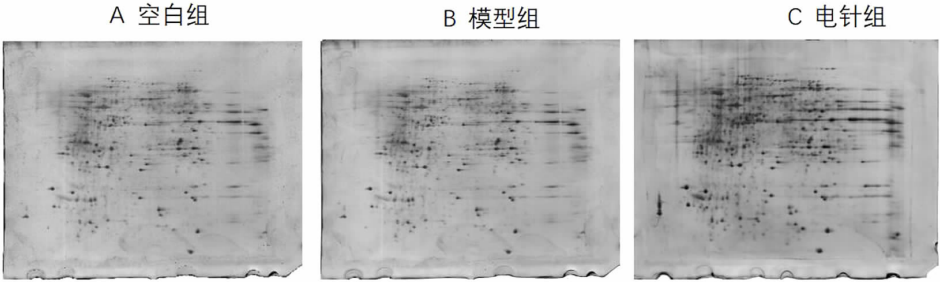


图2 银染后各组样品的蛋白质图谱

与此同时,空白组各时间点机械痛阈均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 电泳图谱分析 图2显示了经过差异蛋白质组分析后的银染蛋白质图谱。可以看出各蛋白质在A空白组、B模型组、C电针组表达量的变化(余蛋白质图谱见附图)。

2.3 质谱分析 对上述3块胶蛋白质组图谱中相匹配的点进行统计学分析,选择模型组、2/100 Hz电针组与空白组相较表达差值绝对值异超过50%的蛋白质,再将这些蛋白点经胶内酶解后用基质辅助激光电离质谱进行检测,与蛋白质文库进行比对分析后,将蛋白质CI值 <60 者剔除后,即为本实验所获得差异蛋白质。结果共筛选出18个差异蛋白质,这18种差异蛋白分别是微管蛋白 α -1A链(Tubulin alpha-1A chain, Tuba1a)、微管蛋白 α -1C链(Tubulin alpha-1C chain, Tuba1c)、微管蛋白

β -2A链(Tubulin beta-2A chain, Tubb2a)、DAB2相互作用蛋白(Disabled homolog 2-interacting protein, Dab2ip)、微管蛋白 β -3链(Tubulin beta-3 chain, Tubb3)、Rho GDP解离抑制因子(Rho GDP-dissociation inhibitor 1; Arhgdia, rho GDI)、NADH脱氢酶的辅酶黄素蛋白2, (NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, NDUVF2)、肌动蛋白1(Actin, cytoplasmic1, Actb1)、乌头酸水合酶(Aconitate hydratase)、丙酮酸激酶同工酶(Pyruvate kinase, PKM)、异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase)、磷酸甘油酸激酶1(Pgk1)、Ras相关Rab-19蛋白(Ras-related protein Rab-19, Rab19)、类固醇激素合成急性蛋白(Steroidogenic acute regulatory protein, Star)、转凝蛋白-3(Transgelin-3)、肌动蛋白2(Actin, cytoplasmic2, Actb2)、细胞色素c氧

化酶 6A1 亚基 (Cytochrome c oxidase subunit 6A1, Cox6a1)、泛素 40S 核糖体蛋白 S27 a (Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a, Rps27a) 等 18 个差异

蛋白。其相关性质见表 1。图 3~图 10 为 K2、K4、K5、K10、K19、K21、L1、L9, 等 8 个差异蛋白的肽指纹图谱。

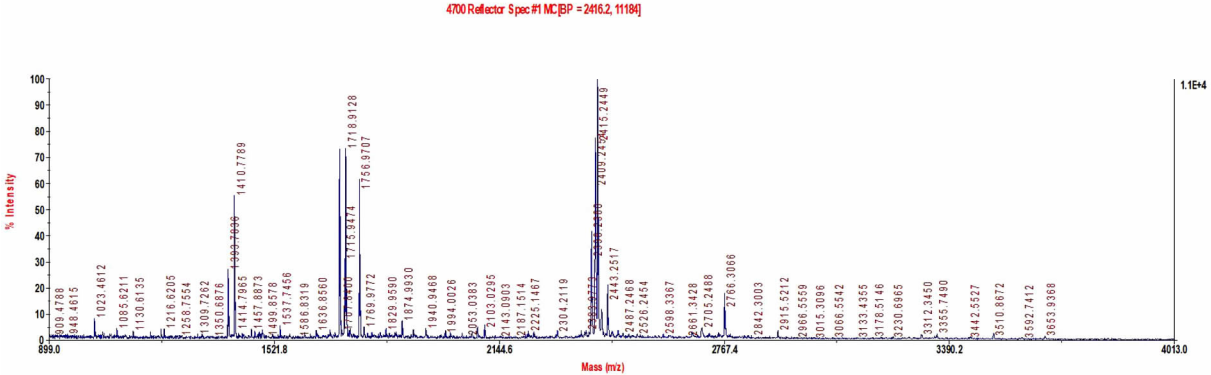


图 3 编号 K2 微管蛋白 α -1A 链蛋白肽指纹图谱

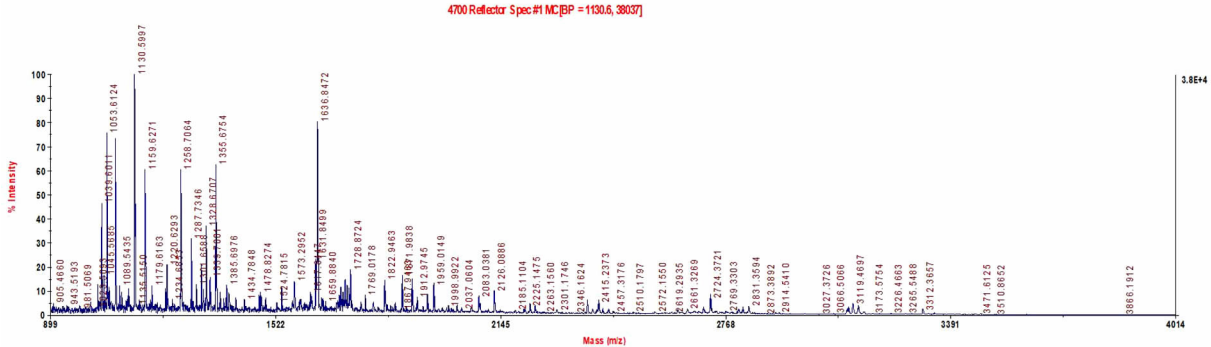


图 4 编号 K4 微管蛋白 β -2A 链蛋白肽指纹图谱

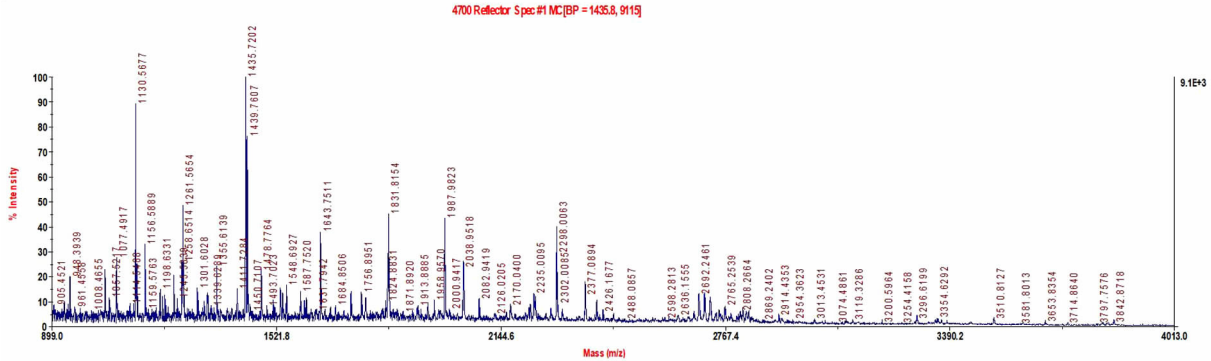


图 5 编号 K5DAB2 相互作用蛋白蛋白肽指纹图谱

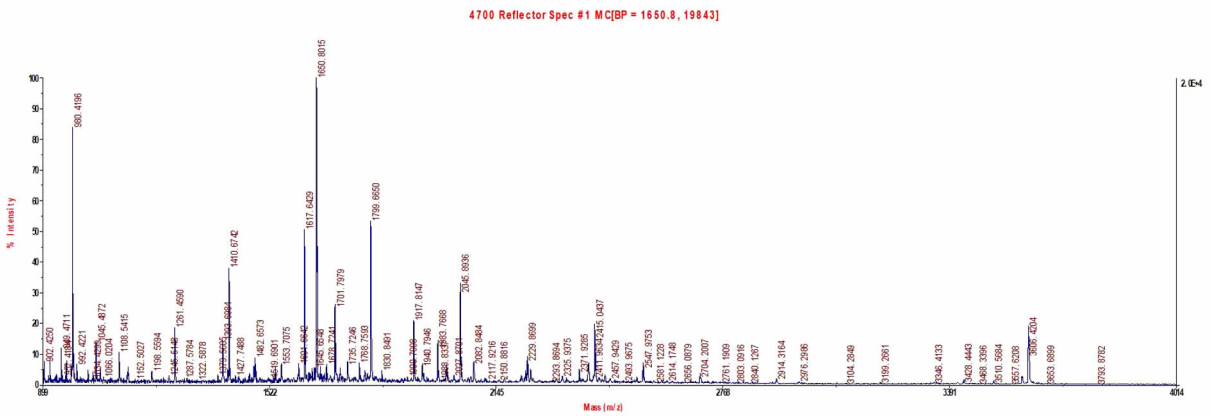


图 6 编号 K10 Rho GDP 解离抑制因子肽指纹图谱

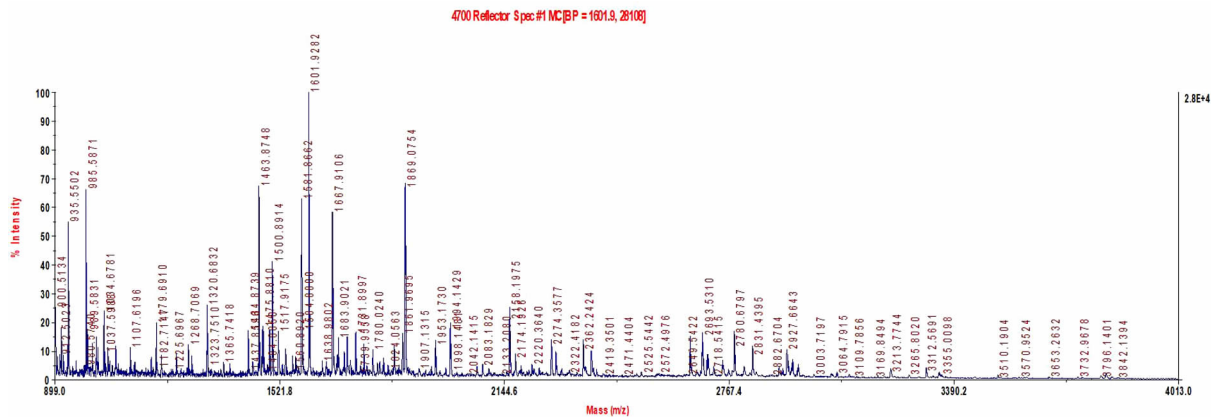


图7 编号 K19 乌头酸水合酶肽指纹图谱

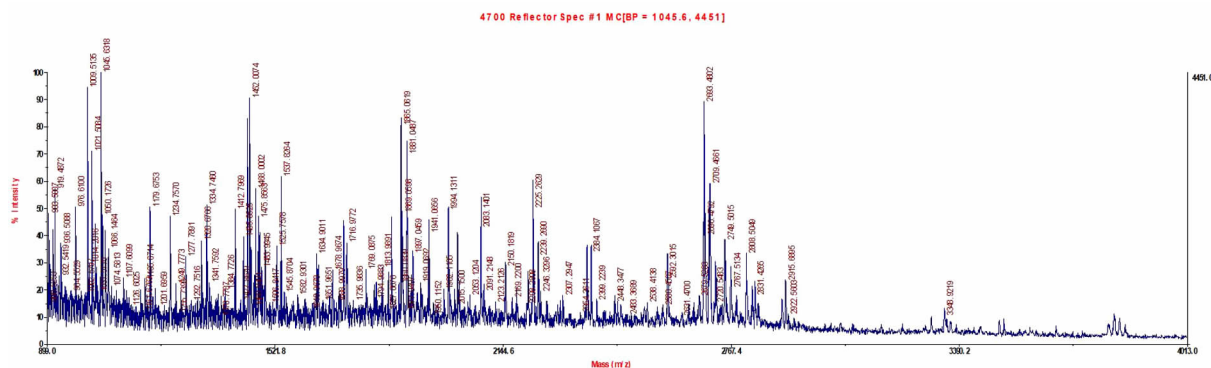


图 8 编号 K21 异柠檬酸脱氢酶肽指纹图谱

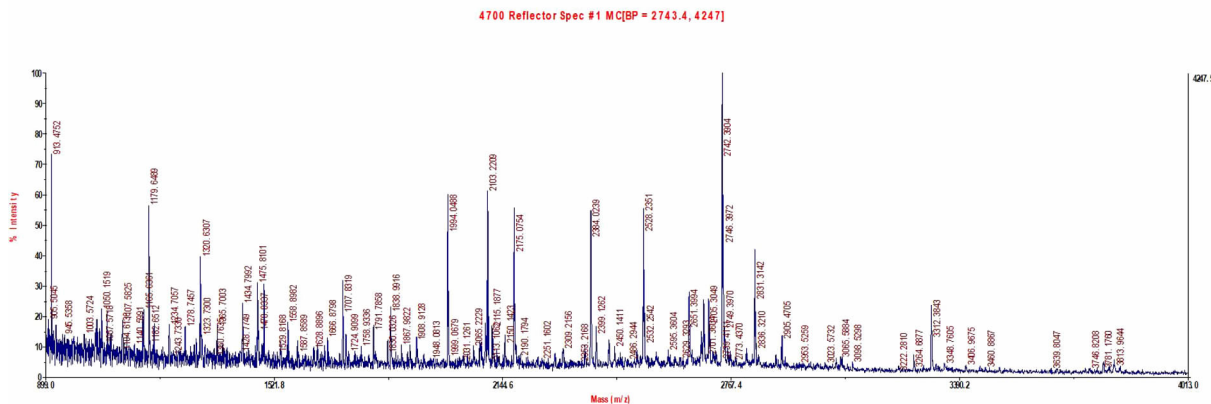


图 9 编号 L1 Ras 相关 Rab-19 蛋白肽指纹图谱

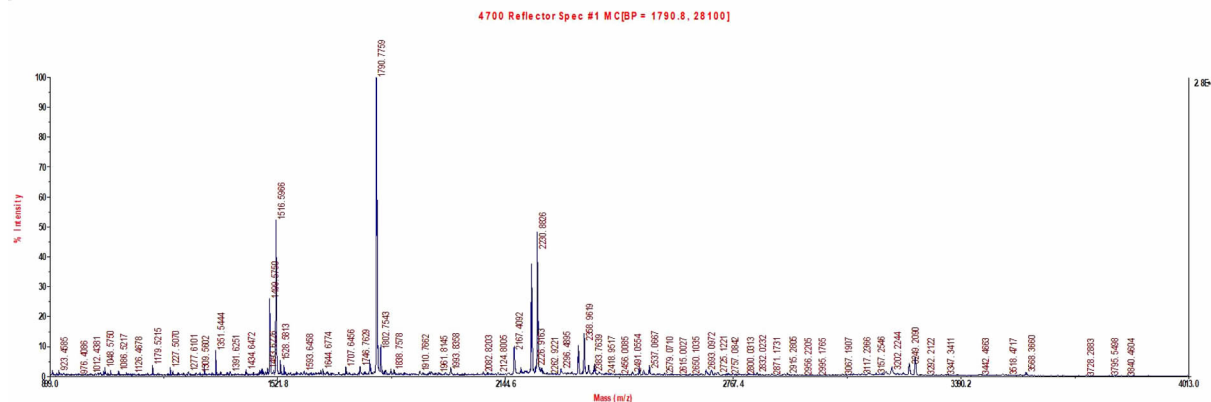


表 1 蛋白质点相关信息及质谱鉴定结果

差异蛋白编码	名称	中文名称	Accession NO.	MW	protein PI
K2	Tubulin alpha-1A chain	微管蛋白 α-1A 链	P68370	50 103. 6	4. 94
K3	Tubulin alpha-1C chain	微管蛋白 α-1C 链	Q6AYZ1	49 905. 5	4. 96
K4	Tubulin beta-2A chain	微管蛋白 β-2A 链	P85108	49 875. 0	4. 78
K5	Disabled homolog 2-interacting protein	DAB2 相互作用蛋白	Q6P730	109 936. 1	6. 70
K7	Tubulin beta-3 chain	微管蛋白 β-3 链	Q4QRB4	50 386. 2	4. 82
K10	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Rho GDP 解离抑制因子	Q5X173	23 392. 8	5. 12
K11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2	NADH 脱氢酶	p19234	27 360. 9	6. 23
K12	Actin, cytoplasmic 1	肌动蛋白 1	P60711	41 709. 7	5. 29
K19	Aconitate hydratase	乌头酸水合酶	Q9ER34	85 380. 0	7. 87
K20	Pyruvate kinase PKM	丙酮酸激酶同工酶	P11980	57 780. 9	6. 63
K21	Isocitrate dehydrogenase	异柠檬酸脱氢酶	P41562	46 704. 5	6. 53
K22	Phosphoglycerate kinase 1	磷酸甘油酸激酶 1	P16617	44 510. 0	8. 02
L1	Ras-related protein Rab-19	Ras 相关 Rab-19 蛋白	Q5M7U5	24 430. 4	6. 06
L2	Steroidogenic acute regulatory protein	类固醇激素合成急性蛋白	P97826	31 481. 2	8. 93
L6	Transgelin-3	转凝蛋白-3	P37805	22 486. 2	6. 84
L9	Actin, cytoplasmic 2	细胞肌动蛋白 2	P63259	41 765. 8	5. 31
L11	Cytochrome c oxidase subunit 6A1	细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基	P10818	12 293. 2	9. 30
L12	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	泛素 40S 核糖体蛋白 S27a	P62982	17 939. 5	9. 68

表 2 差异蛋白表达程度(灰度值)

差异蛋白编码	中文名称	空白组	模型组	电针组	模型-空白 表达差异	电针-空白 表达差异	电针-模型 表达差异
K2	微管蛋白 α-1A 链	2. 679 38	1. 246 56	1. 863 75	↓		▲
K3	微管蛋白 α-1C 链	6. 433 02	3. 459 21	3. 185 83		↓	
K4	微管蛋白 β-2A 链	1. 013 90	0. 986 50	1. 905 96		▲	▲
K5	DAB2 相互作用蛋白	2. 816 10	1. 106 96	1. 750 22	↓		▲
K7	微管蛋白 β-3 链	1. 227 87	2. 535 63	2. 278 81	▲	▲	
K10	Rho GDP 解离抑制因子	3. 531 25	3. 654 80	1. 524 28		↓	↓
K11	NADH 脱氢酶	3. 857 73	1. 187 02	1. 261 16	↓	↓	
K12	肌动蛋白 1	1. 993 42	5. 552 76	3. 850 43	▲	▲	
K19	乌头酸水合酶	0. 724 02	0. 570 86	1. 811 56		▲	▲ *
K20	丙酮酸激酶同工酶	2. 164 34	2. 722 70	3. 833 47		▲	
K21	异柠檬酸脱氢酶	0. 644 61	0. 864 12	1. 751 80		▲	▲
K22	磷酸甘油酸激酶 1	0. 975 09	1. 884 78	2. 025 63	▲	▲	
L1	Ras 相关 Rab-19 蛋白	1. 493 79	1. 675 15	3. 152 37		▲	▲
L2	类固醇激素合成急性蛋白	0. 750 78	2. 141 67	2. 158 57	▲	▲	
L6	转凝蛋白-3	2. 112 51	0. 733 93	1. 092 01	↓		
L9	肌动蛋白 2	0. 332 67	6. 158 96	2. 768 16	▲ *	▲ *	↓
L11	细胞色素 c 氧化酶亚基蛋白	1. 304 55	1. 972 40	2. 861 41	▲	▲	
L12	泛素 40S 核糖体蛋白 S27a	2. 677 61	6. 446 49	6. 644 55	▲	▲	

注：↓ 下调表达差异绝对值比例 > =50%；▲ 上调表达差异绝对值比例 > =50%；* 差异有统计学意义

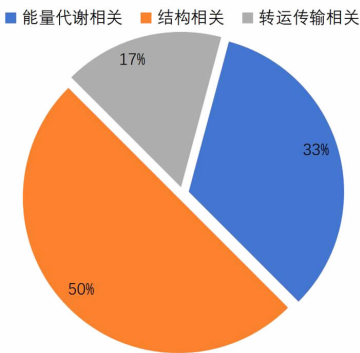


图 11 各组差异蛋白比例

经质谱鉴定后各蛋白质在 3 组间表达程度(灰度值)及差异如表 2(差异绝对值比例 > 50% 为有统计学意义),表述如下:微管蛋白 α-1A 链,在空白组表达值为 2. 679 38,模型组 1. 246 56,电针组 1. 863 75;与空白组比较,模型组明显下调,电针组无统计学意义,电针组与模型组比较明显上调;微管蛋白 α-1C,在空白组表达值为 6. 433 03,模型组 3. 459 21,电针组 3. 185 83;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显下调,电针组与模型组比

较,差异无统计学意义;链微管蛋白 β -2A 链,在空白组表达值为 1.013 90,模型组 0.986 50,电针组 1.905 96;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显上调,模型组与电针组比较明显上调;DAB2 相互作用蛋白,在空白组表达值为 2.816 10,模型组 1.106 96,电针组 1.750 22;与空白组比较,模型组明显下调,电针组无统计学意义,电针组与模型组比较明显上调;微管蛋白 β -3 链,在空白组表达值为 1.227 87,模型组 2.535 63,电针组 2.278 81;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;Rho GDP 解离抑制因子,在空白组表达值为 3.531 25,模型组 3.654 80,电针组 1.524 28;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显下调,电针组与模型组比较明显下调;NADH 脱氢酶,在空白组表达值为 3.857 73,模型组 1.187 02,电针组 1.261 16;与空白组比较,模型组明显下调,电针组明显下调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;肌动蛋白 1,在空白组表达值为 1.993 42,模型组 5.552 76,电针组 3.850 43;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;乌头酸水合酶,在空白组表达值为 0.724 02,模型组 0.570 86,电针组 1.811 56;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显上调,电针组与模型组比较明显上调;丙酮酸激酶同工酶,在空白组表达值为 2.164 34,模型组 2.722 70,电针组 3.833 47;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;异柠檬酸脱氢酶,在空白组表达值为 0.644 61,模型组 0.864 12,电针组 1.751 80;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显上调,电针组与模型组比较明显上调;磷酸甘油酸激酶 1,在空白组表达值为 0.975 09,模型组 1.884 78,电针组 2.025 63;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;Ras 相关 Rab-19 蛋白,在空白组表达值为 1.493 79,模型组 1.675 15,电针组 3.152 37;与空白组比较,模型组无统计学意义,电针组明显上调,电针组与模型组比较明显上调;类固醇激素合成急性蛋白,在空白组表达值为 0.750 78,模型组 2.141 67,电针组 2.158 57;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;转凝蛋白-3,在空白组表达值为 2.112 51,模型组 0.733 93,电针组 1.092 01;与空白组比较,模型

组明显下调,电针组无统计学意义,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;肌动蛋白 2,在空白组表达值为 0.332 67,模型组 6.158 96,电针组 2.768 16;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较明显下调;细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基,在空白组表达值为 1.304 55,模型组 1.972 40,电针组 2.861 41;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义;泛素 40S 核糖体蛋白 S27a,在空白组表达值为 2.677 61,模型组 6.446 49,电针组 6.644 55;与空白组比较,模型组明显上调,电针组明显上调,电针组与模型组比较,差异无统计学意义。

3 讨论

疼痛是一种跟机体组织受到伤害或者跟潜在性伤害有关的不愉快的主观感觉和情绪体验(IASP 1994)。疼痛的定义中包含了疼痛感觉和疼痛情绪等两方面。Apkarian 等^[15]认为记忆是人们不由自主的行为,疼痛的发生会与学习和记忆相关联。随着疼痛的发生,记忆就可以被唤醒而恢复。本次实验我们所使用的痛记忆模型是参照 Igor 的方法^[16]建立的,在前人的研究结果中已经确认角叉菜胶 2 次交叉注射大鼠足跖方法,将其作为疼痛记忆的评价模型^[17-21]。前期研究工作中,本研究小组发现 2/100 频率早期电针对痛记忆有较好的干预作用。

本研究经质谱仪共筛选出 18 个差异蛋白依其功能大致可以分为 3 类,即结构相关蛋白、传导转运相关蛋白、能量代谢相关蛋白。依其数量结构相关蛋白占总数的 50%,传导转运相关蛋白占总数的 17%、能量代谢相关蛋白占总数的 33%。各组差异蛋白所占比例如图 11 所示。

将空白组、模型组与电针组比较,表达差异值绝对值超过 50%,并符合质谱鉴定后蛋白质 CI 值 > 60 者,为最终被确定的差异蛋白质,共获得 18 种差异蛋白,分别是微管蛋白 α -1A 链、微管蛋白 α -1C 链、微管蛋白 β -2A 链、DAB2 相互作用蛋白、微管蛋白 β -3 链、Rho GDP 解离抑制因子、NADH 脱氢酶 2、肌动蛋白 1、乌头酸水合酶、丙酮酸激酶同工酶、异柠檬酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶 1、Ras 相关 Rab-19 蛋白、类固醇激素合成急性蛋白、转凝蛋白-3、肌动蛋白 2、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a。

痛记忆产生后(模型组)有 11 个差异蛋白表达比较有统计学意义。分别是结构相关:转凝蛋白-3、微管蛋白 α -1A 链、DAB2 相互作用蛋白、微管蛋白

β -3 链、肌动蛋白 1、肌动蛋白 2;转运传输相关:类固醇激素合成急性蛋白、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a;能量代谢相关:NADH 脱氢酶、磷酸甘油酸激酶 1、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基蛋白等。此 11 个差异表达蛋白质的组合性变化与痛记忆唤醒有关。

电针干预后有 15 个差异蛋白表达比较有统计学意义。分别为微管蛋白 α -1C 链、Rho GDP 解离抑制因子、NADH 脱氢酶 2、微管蛋白 β -2A 链、微管蛋白 β -3 链、肌动蛋白 1、乌头酸水合酶、丙酮酸激酶同工酶、异柠檬酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶 1、Ras 相关 Rab-19 蛋白、类固醇激素合成急性蛋白、肌动蛋白 2、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a。此 15 个差异表达蛋白质的组合性变化与电针干预有关。

电针组与模型组比较后有 8 个差异蛋白表达比较有统计学意义。微管蛋白 α -1A 链、DAB2 相互作用蛋白、Rho GDP 解离抑制因子、微管蛋白 β -2A 链、肌动蛋白 2、Ras 相关 Rab-19 蛋白、乌头酸水合酶、异柠檬酸脱氢酶等。此 8 个差异表达蛋白质的组合性变化与电针干预痛记忆有关。

模型组的 11 个差异蛋白,与电针组的 15 个差异蛋白中,有 8 个差异蛋白相同,而此 8 个差异蛋白经由模型组与电针组比较后,只有肌动蛋白 2 一个蛋白质比较有统计学意义。且差异表达趋势与动物实验结果相同;提示肌动蛋白 2 在痛记忆唤醒过程及电针干预痛记忆中扮演主要角色。

电针组与模型组比较后,电针组中有 9 个差异蛋白表达无统计学意义。分别是微管蛋白 α -1C 链、NADH 脱氢酶 2、微管蛋白 β -3 链、肌动蛋白 1、丙酮酸激酶同工酶、磷酸甘油酸激酶 1、类固醇激素合成急性蛋白、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a。此 9 个差异表达蛋白质的组合性变化其表达为电针干预后反应,与电针干预痛记忆无关。

综上所述,本研究发现 11 个差异蛋白参与痛记忆的唤醒过程。分别是结构相关:转凝蛋白-3、微管蛋白 α -1A 链、DAB2 相互作用蛋白、微管蛋白 β -3 链、肌动蛋白 1、肌动蛋白 2;转运传输相关:类固醇激素合成急性蛋白、泛素 40S 核糖体蛋白 S27a;能量代谢相关:NADH 脱氢酶、磷酸甘油酸激酶 1、细胞色素 c 氧化酶 6A1 亚基蛋白等;本研究发现 8 个差异蛋白参与电针干预痛记忆的过程。分别是结构相关:微管蛋白 α -1A 链、DAB2 相互作用蛋白、Rho GDP 解离抑制因子、微管蛋白 β -2A 链、肌动蛋白 2;

转运传输相关:Ras 相关 Rab-19 蛋白;能量代谢相关:乌头酸水合酶、异柠檬酸脱氢酶等;电针对痛记忆的干预可能与稳定神经细胞骨架蛋白,进而抑制神经突触可塑性改变有关,但其作用的具体机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Choi D S, Choi D Y, Whittington R A, et al. Sudden amnesia resulting in pain relief: the relationship between memory and pain [J]. *Pain*, 2007, 132(1): 206-210.
- [2] Terry R, Brodie E E, Niven C A. Exploring the Phenomenology of Memory for Pain: Is Previously Experienced Acute Pain Consciously Remembered or Simply Known? [J]. *Journal of Pain*, 2007, 8(6): 467-475.
- [3] 韩济生, 疼痛学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2012.
- [4] Hylands-White N, Duarte R V, Raphael J H. An overview of treatment approaches for chronic pain management [J]. *Rheumatology International*, 2016, 37(1): 1-14.
- [5] Chen T, Taniguchi W, Chen Q Y, et al. Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex [J]. *Nature Communications*, 2018, 5: 235.
- [6] Bliss T V P, Collingridge G L, Kaang B K, et al. Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2016, 10: 350.
- [7] Barthas F, Sellmeijer J, Hugel S, et al. The Anterior Cingulate Cortex Is a Critical Hub for Pain-Induced Depression [J]. *Biological Psychiatry*, 2014, 77(3): 786.
- [8] Xiao-Mei S, Jing S, Yong-Liang J, et al. Inhibition of the cAMP/PKA/CREB Pathway Contributes to the Analgesic Effects of Electroacupuncture in the Anterior Cingulate Cortex in a Rat Pain Memory Model [J]. *Neural Plasticity*, 2016, 2016: 1-16.
- [9] Cao H, Ren W H, Zhu M Y, et al. Activation of glycine site and GluN2B subunit of NMDA receptors is necessary for ERK/CREB signaling cascade in rostral anterior cingulate cortex in rats: Implications for affective pain [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2012, 28(1): 77-87.
- [10] Zheng W. Activation of mu opioid receptor inhibits the excitatory glutamatergic transmission in the anterior cingulate cortex of the rats with peripheral inflammation [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 628(1-3): 91-95.
- [11] Cao H, Gao Y J, Ren W H, et al. Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in the Anterior Cingulate Cortex Contributes to the Induction and Expression of Affective Pain [J]. *Journal of Neuroscience*, 2009, 29(10): 3307-3321.
- [12] Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O, et al. P2X receptor-mediated excitatory synaptic currents in somatosensory cortex [J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2003, 24(3): 0-849.
- [13] Fang J Q, Fang J F, Yi Liang, et al. Electroacupuncture mediates extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathways in the spinal cord of rats with inflammatory pain [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14(1): 541.
- [14] Malek N, Pajak A, Kolosowska N, et al. The importance of TRPV1-

sensitisation factors for the development of neuropathic pain[J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2015, 65:1-10.

[15] Apkarian A V. Pain perception in relation to emotional learning[J]. Current Opinion in Neurobiology, 2008, 18(4):464-468.

[16] Kissin I, Freitas C F, Jr B E. Memory of pain; the effect of perineural resiniferatoxin[J]. Anesthesia & Analgesia, 2006, 103(3):721-728.

[17]Coderre T J, Melzack R. Increased pain sensitivity following heat injury involves a central mechanism[J]. Behavioural Brain Research, 1985, 15(3):259-262.

[18]Levine J. Reflex neurogenic inflammation. I. Contribution of the peripheral nervous system to spatially remote inflammatory responses that follow injury[J]. Neuroscience, 1985, 5:234.

[19]Kayser V, Guilbaud G. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat[J]. Pain, 1987, 28(1):99-107.

[20]Rivat C, Laulin J P, Corcuff J B, et al. Fentanyl Enhancement of Carrageenan-induced Long-lasting Hyperalgesia in Rats[J]. Anesthesiology, 2002, 96(2):381-391.

[21]Fletcher D, Kayser V, Guilbaud G. The influence of the timing of bupivacaine infiltration on the time course of inflammation induced by two carrageenin injections seven days apart[J]. Pain, 1997, 69(3):303-309.

(2019-06-04 收稿 责任编辑:徐颖)

投稿须知:关于摘要与关键词

摘要:论著类的文章,均须附中文和英文摘要。中、英文摘要的内容要一致。采用第三人称撰写,不用“本文”等主语。论著类文稿的摘要形式使用结构式。结构式摘要主要分目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)4 部分。

关键词:选词要规范,应尽量从美国国立医学图书馆编辑的最新版 Index Medicus 的 Medical Subject Heading(MeSH)词表中选用规范用词,中文译名可参照中国医学科学院医学信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。中医药词汇以中国中医研究院图书情报研究所编著的《中医药学主题词表》为准。未被词表收录的词,如确有必要可作为关键词标注。关键词数目一般 3~5 个,关键词之间用“;”分隔。无摘要的文稿,只需标注中文关键词,关键词置于正文之前;附中英文摘要的文稿须中英文关键词,中文关键词置于中文摘要下方;英文关键词应与中文词相对应,置于英文摘要下方。

投稿须知:关于表格

凡能用文字说明者,尽量不用表格。一篇文章中,表格应控制在 3~5 个之内。表格均应有简要的表题。表序号一律用阿拉伯数字,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码,并在正文中标示。即使只有 1 张表,也须标示“表 1”。

表:表附在正文内,一律采用“三线表”,其内容不可与文字有差异。表内不设备注栏,如有需说明的事项(如 P 值等),以简练文字写在表的下方,表内依次用 *、[△]、[▲]、[□]、[■]号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同,放在表的右上方;如各栏参数的单位不同,则放在各栏的表头内。均值 ± 标准差,用($\bar{x} \pm s$)表示,置于表题后的括号内。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多 1 位。统计学处理结果统一用 *、[△]、[▲]、[□]、[■]表示 $P < 0.05$; **、^{△△}、^{▲▲}、^{□□}、^{■■}表示 $P < 0.01$, P 为大写,斜体。