

健康人按摩前后尿液蛋白质组的变化

鲍艺今¹ 高友鹤^{1*}

¹ (北京师范大学基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875)

摘要:

本研究旨在探究按摩对健康人尿液蛋白质组造成的影响。在该项研究中,受试者接受时长为1h的全身按摩,在按摩前和按摩后2、24h收集尿液样本并使用液相色谱-串联质谱技术(LC-MS/MS)对尿蛋白进行分析。与按摩前相比,按摩后2h组共鉴定到41个差异蛋白,随机平均可产生的差异蛋白数为11个,可信度为73%,差异蛋白富集到的生物学过程有儿茶酚胺生物合成过程,该过程与促进代谢和神经活动调节有关;按摩后24h组鉴定到的差异蛋白降低到29个差异蛋白,随机平均可产生的差异蛋白数为10个,差异的可信度降低到65%,此时不能富集到有效的生物学过程。结果表明:按摩后2h尿蛋白的差异更大,而按摩后24h该差异逐渐变小。尿液蛋白质组有可能反映微小按摩刺激后机体的变化,这提供了一种有潜力评价按摩疗法作用的方法。

关键词: 蛋白质组学; 尿液; 按摩

Changes in the urine proteome after massage in healthy people

Bao Yijin¹ Gao Youhe^{1*}

¹(Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100871, China)

Abstract: This study aimed to explore the effect of massage on the urine proteome of healthy people. In this study, participants underwent 1-hour whole body massage. Urine samples were collected at 0, 2, and 24h after the massage and urine proteins were analyzed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Compared with the control (before massage), 41 differential proteins were identified in the group 2h after the massage, the random mean number of differentially produced proteins was 11 with 73% confidence, and the biological process of protein enrichment was catecholamine biosynthesis, which was related to the promotion of metabolism and the regulation of neural activities. While 29 differential proteins were identified in the group 24h after the massage, the random average number of differential proteins produced was 10, with the confidence of the difference decreased to 65%, and the effective biological process could not be enriched at this time. The results suggested that the difference in urine protein was greater at 2h after the massage and gradually decreased at 24h after the massage. The proteome of urine may reflect changes in the body following minor massage stimuli, providing a potential way to evaluate the effects of massage therapy.

Keywords: proteomics; urine; massage

基金项目: 国家重点研发计划课题(2018YFC0910202); 中央高校基本科研业务费专项资金(2020KJZX002); 北京师范大学(11100704)

作者简介: 鲍艺今(1999.02—),女,硕士研究生,主要研究方向:尿液生物标志物。

通信联系人: 高友鹤(1964.06—),男,教授,博士生导师,主要研究方向:尿液蛋白质组学与尿液生物标志物. E-mail: gaoyouhe@bnu.edu.cn.

引言

按摩是一种物理医疗手段,是指通过按、摩、推、拿、滚、揉等各种手法来达到促进血液循环、疏通经络的目的。近年来,渥太华专家组提出按摩的另一定义“用手或手持设备对软组织和关节进行操作”^[1]。该定义还包括机械设备的使用,强调通过用手或各种器械等按摩手法,减轻身体上的疼痛。按摩通过机械刺激,对操作部位的组织、细胞产生直接的形变作用,激活细胞信号通路,产生生物、化学效应。

已有多项研究表明按摩对多类疾病均具有积极作用,如抑郁症、自闭症等抑郁类疾病,关节炎和纤维肌痛等疼痛综合征,哮喘和多发性硬化等自身免疫性疾病等^[1,2]。但是这种积极影响的具体机制尚不明确。按摩对机体的影响是多方面且复杂的,通过对肌肉等软组织的按压不仅会使肌肉放松,而且会增加脊髓水平和皮层下核的神经活动^[3],从而产生疼痛和愉悦感^[4],这其中必然会涉及多种通路的激活。目前已知按摩可以引起的生理反应涉及多个方面,其中包括:加快乳酸的清除,增加淋巴流量、激活通路促进线粒体的生成,皮质醇减少和血清素和多巴胺增加^[1,5],这些都有可能是按摩消除疲劳并且使人心情愉悦的原因之一。以往研究对按摩作用的评价大多依赖于生理生化指标或量表评价的方法,而本研究通过蛋白质组学更加全面客观地对按摩对机体产生的影响进行评估,通过蛋白质表达与含量变化分析,从而检测到生物学过程的细微改变,进一步阐明按摩的作用机制。而尿液作为一种无创且容易获得的生物液体,正逐渐成为蛋白质组学研究的理想样本。尿液不受稳态机制的调节,可以容纳和积累更多体内的变化^[6]。此外,尿液蛋白质组的复杂性相对较低,更容易检测到低丰度蛋白质的变化特征^[7],具有灵敏反应机体变化的潜力。因此,尿蛋白质组可以更敏感地反映整个机体受按摩特别是微小刺激影响的情况。

本研究首次描述了健康人按摩前后尿液蛋白质组学的变化,收集受试者按摩前后的尿液进行非标记定量蛋白质组学分析,探究按摩对机体造成的影响,为按摩的作用机制研究提供了新的线索。

1 材料与方法

1.1 尿液样本的收集

6名志愿者(6女,22-26岁)在某附近按摩店进行按摩,选定该店内固定一位按摩师以受试者能承受的适中力度对受试者进行一个小时的全身按摩。在按摩前收集受试者尿液,随后收集其按摩后2h以及24h的尿液。志愿者均为身体健康、未患任何疾病的青年人。该研究通过北京师范大学生命科学学院伦理委员会的审查和批准,受试者均签署志愿者知情同意书。

本实验使用自身对照,受试者按摩前留存的尿液样本即为对照组,时间记为T0,按摩2h、24h后留存的尿液样本是实验组,时间分别记为T1、T2。最终共计取样18份。尿液用3000×g离心30min后放入-80℃冰箱保存。

1.2 尿液蛋白的提取和蛋白酶解

取出4ml尿样解冻,4℃,12000×g条件下离心30分钟,去除细胞碎片,取上清用3倍体积的乙醇沉淀过夜,然后12000g离心30分钟。将蛋白沉淀重悬于裂解液(8mol/L尿素,2mol/L硫脲,25mmol/L二硫苏糖醇和50mmol/L Tris)。用Bradford法测量蛋白浓度。使用滤器辅助样品制备(FASP)方法进行尿蛋白酶解。^[8]将尿蛋白加载到10kDa超滤管(PALL公司)

的滤膜上,用 UA (8mol/L 尿素)、0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.5) 和 25mmol/LNH₄HCO₃ 溶液洗涤两次;加入 20 mmol/L 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT, Sigma) 在 37℃中变性 1 小时,再与 50 mmol/L 碘乙酰胺 (Iodoacetamide, IAA, Sigma) 在黑暗中烷基化 30 分钟,用 UA 和 NH₄HCO₃ 溶液洗涤两次,以 1: 50 比例加入胰酶 (Trypsin Gold, Promega, Fitchburg, WI, USA), 37℃孵育过夜。过夜后离心收集酶解后的滤液即为多肽混合液。将多肽通过 HLB 柱 (Waters, Milford, MA) 除盐后用真空干燥仪进行抽干,置于-80℃保存。

1.3 LC-MS/MS 串联质谱分析

用 0.1%的甲酸水复溶肽段,使用 BCA 试剂盒对肽段浓度进行测定,将肽段浓度稀释至 0.5 μg/μL。取每个样品 9ul 制备混合多肽样,按照说明书,使用高 pH 反相肽分离试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行分离。离心收集十份流出液 (Fractions),使用真空干燥仪抽干后用 0.1%甲酸水复溶。以样品: iRT 为 10: 1 的体积比例加入 iRT (Biognosis 公司)。每个样品 (单个实验样品和十个 Fractions)取 1ug 使用 EASY-nLC1200 色谱系统(ThermoFisher Scientific, USA)进行数据采集。参数设定如下:洗脱时间 90 分钟,洗脱梯度为流动相 A: 0.1%甲酸;流动相 B: 80%乙腈。洗脱下来的肽段通过 Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, USA) 进行检测。对所有样品进行数据依赖 (DIA) 质谱数据采集,每个样本重复采集 3 次。

1.4 数据分析

将反相色谱柱分离得到的 10 个组分进行 DDA 模式采集质谱数据,把 DDA 采集的结果导入 Proteome Discoverer 软件(版本 2.1)搜库。PD 搜库结果用于建立 DIA 采集方法,根据 m/z 分布密度计算窗口宽度和数量。将单个多肽样品进行 DIA 模式采集质谱数据。使用 Spectronaut X 软件对质谱数据进行处理和分析。导入每个样本 DIA 采集的 raw 文件进行搜库。高度可信蛋白标准为肽段 q value<0.01,采用二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量。

1.5 统计学分析

每一个样品均进行了 3 次技术重复,将获得的数据其用于统计学分析。将灌胃前后鉴定到的尿蛋白进行对比,进行差异蛋白筛选。筛选差异蛋白的条件如下: Fold change ≥2 或≤0.5,双尾配对 t 检验的 P 值 < 0.01。

1.6 随机分组分析

将按摩后 T1 组 (n=6) 和按摩前 T0 组 (n=6) 共 12 个样本随机分成两组,在总计 462 次随机组合中,按照相同的筛选条件计算所有随机次数的平均差异蛋白数目。按摩后 T2 组 (n=6) 和按摩前 T0 组 (n=6) 同上述操作。

1.7 生物信息学分析

使用悟空平台 (<https://www.omicsolution.org/wkomic/main/>) 进行非监督聚类分析 (HCA) [9],使用 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对鉴定到的差异蛋白进行生物学过程、细胞定位和分子功能 3 个方面的功能富集分析[10]。在基于公开数据库 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) 的报道研究中搜索了差异蛋白的功能。

2 结果与分析

2.1 按摩前后尿蛋白组变化

受试结束后，对所收集的共 18 个尿液蛋白样品（按摩前后）进行 LC—MS/MS 串联质谱分析。总共鉴定到 3 917 个蛋白（特异性多肽 ≥ 2 个，蛋白水平 FDR $<1\%$ ），将其进行非监督聚类分析，从这些数据中，大致可以区分按摩前与按摩后 2h 的样品，然而并不能区分按摩前与 24h 后的样品。图 1 展示了具体的样本非监督聚类结果。

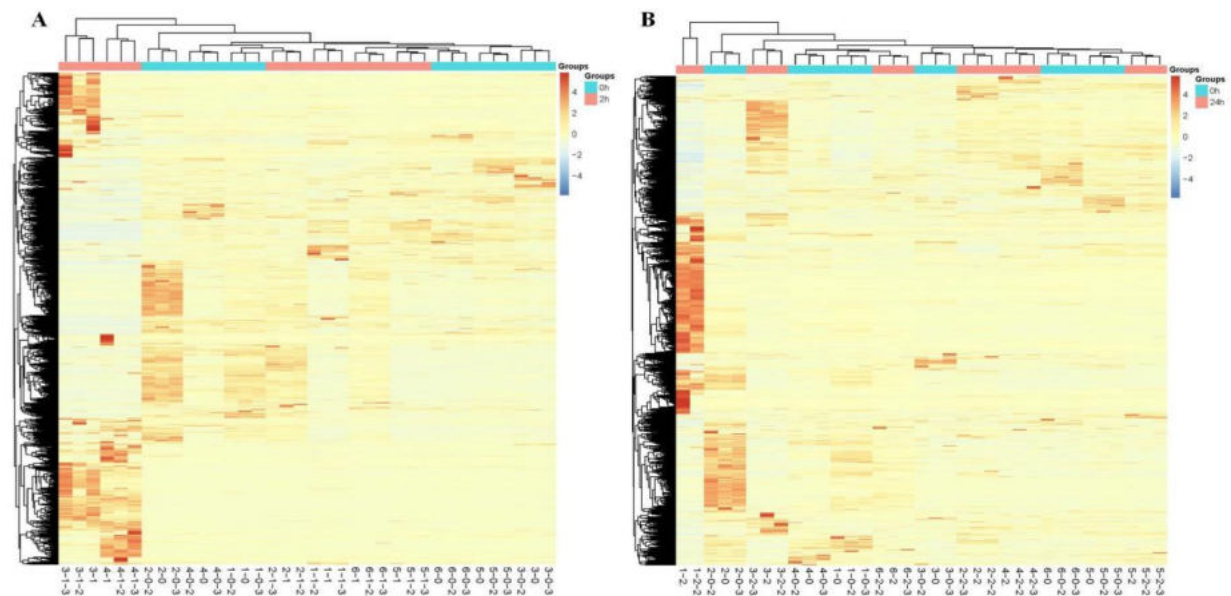


图 1 按摩前后整体尿液蛋白质组的非监督聚类分析

Figure 1 Unsupervised cluster analysis of all proteins in control and experimental groups. (A) 0-2h . (B)0-24h.

采用自身对照的方法，将 T1、T2 的尿蛋白分别与 T0 进行比较，筛选标准：组间变化倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 ， $P<0.01$ ，高丰度组的平均蛋白谱图数 ≥ 3 ，且高丰度组每个样品的蛋白谱图都高于低丰度组。相对于 T0 时刻，T1 时刻鉴定到 41 个差异蛋白，其中 3 个上调，38 个下调；在 T2 时刻鉴定到 29 个差异蛋白，其中 1 个上调，28 个下调。T1 时刻鉴定到的差异蛋白多于 T2 时刻鉴定到的差异蛋白。不同时间点鉴定到的差异蛋白的详细信息列于表 1（T1 时刻）和表 2（T2 时刻）。

表 1 T1 时刻鉴定到的尿液差异蛋白

Table 1 The differential proteins identified at T1 .

Accession	Protein name	Trend	Fold change	P-value
A0A075B6Q2	Formin-binding protein 1-like (Fragment)	↓	0.45	9.55E-03
A0A087WV24	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	↓	0.33	7.03E-04
A0A0B4J1R4	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	↓	0.27	6.71E-03
A0A0U1RQQ1	F-actin-uncapping protein LRRC16A (Fragment)	↓	0.26	6.04E-03
A0A7I2V676	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	↓	0.37	9.46E-03
C9JIF9	Acyl-peptide hydrolase	↓	0.48	8.64E-03
J3KND8	Phe-4-monooxygenase	↓	0.39	4.55E-03
M0R0Y3	RuvB-like helicase	↓	0.44	5.94E-03
O60494	Cubilin	↓	0.36	8.80E-03
O75936	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	↓	0.44	1.89E-03

P12955	Xaa-Pro dipeptidase	↓	0.43	1.41E-03
P13716	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	↓	0.47	9.85E-03
P21281	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	↓	0.44	8.80E-03
P46926	Glucosamine-6-phosphate isomerase 1	↓	0.42	2.22E-03
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type	↓	0.28	5.58E-03
Q14353	Guanidinoacetate N-methyltransferase	↓	0.46	6.16E-03
Q5R3I4	Tetratricopeptide repeat protein 38	↓	0.41	4.20E-03
Q8NB37	Glutamine amidotransferase-like class 1 domain-containing protein 1	↓	0.37	4.60E-03
Q96C23	Aldose 1-epimerase	↓	0.41	8.85E-03
Q9BUT1	3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2	↓	0.42	5.81E-03
Q9Y2S2	Lambda-crystallin homolog	↓	0.49	6.15E-03
A0A087WTY7	Cytosolic beta-glucosidase	↓	0.00	1.48E-01
A0A1B0GVY1	HECT-type E3 ubiquitin transferase	↓	0.00	1.06E-01
B5MBZ0	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4	↓	0.00	1.23E-01
D6RAN1	PDZ and LIM domain protein 7 (Fragment)	↓	0.00	1.07E-01
E9PMR4	Tetraspanin	↓	0.00	5.02E-02
F5GZ09	Intraflagellar transport protein 27 homolog (Fragment)	↓	0.00	1.04E-01
F5H0T7	Solute carrier family 22 member 6	↓	0.00	1.10E-01
P11678	Eosinophil peroxidase	↓	0.00	1.29E-01
P61081	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	↓	0.00	1.27E-01
P62633	Cellular nucleic acid-binding protein	↓	0.00	9.82E-02
Q01970	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	↓	0.00	1.88E-01
Q14410	Glycerol kinase 2	↓	0.00	1.08E-01
Q53T59	HCLS1-binding protein 3	↓	0.00	6.75E-02
Q96PQ0	VPS10 domain-containing receptor SorCS2	↓	0.00	3.18E-02
Q96SL1	Solute carrier family 49 member 4	↓	0.00	3.16E-02
Q9HCE7	E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1	↓	0.00	1.64E-01
Q9P206	Uncharacterized protein KIAA1522	↓	0.00	1.69E-01
Q9NRX4	14 kDa phosphohistidine phosphatase	↑	2.85	2.73E-03
F8W7A7	Coiled-coil domain-containing protein 178	↑	∞	2.76E-01
O94782	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1	↑	∞	1.53E-01

表 2 T2 时刻鉴定到的尿液差异蛋白

Table 2 The differential proteins identified at T2.

Accession	Protein name	Trend	Fold change	P-value
A0A7I2V676	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	↓	0.27	8.31E-03
O43865	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like protein 1	↓	0.48	8.29E-03
O60271	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	↓	0.44	6.57E-03
O94903	Pyridoxal phosphate homeostasis protein	↓	0.32	3.26E-03
Q5H8C1	FRAS1-related extracellular matrix protein 1	↓	0.44	8.87E-03
Q96AT9	Ribulose-phosphate 3-epimerase	↓	0.26	8.13E-03
Q9NWX4	CXXC motif containing zinc binding protein	↓	0.42	9.54E-03
A0A087WZR3	Lys-63-specific deubiquitinase	↓	0.00	8.72E-02
A0A087X2D8	C-Jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	↓	0.00	3.93E-03

A0A0A6YYH1	Arpin	↓	0.00	1.65E-01
A0A7I2V5M7	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	↓	0.00	1.00E-01
A0A804HKA7	Phosphomannomutase	↓	0.00	4.84E-02
C9JQ41	Coiled-coil domain-containing protein 58	↓	0.00	1.12E-01
D6RAN1	PDZ and LIM domain protein 7 (Fragment)	↓	0.00	1.07E-01
F8VPD4	CAD protein	↓	0.00	1.69E-01
F8W726	Ubiquitin-associated protein 2-like	↓	0.00	1.07E-01
P22059	Oxysterol-binding protein 1	↓	0.00	8.68E-02
P61081	NEDD8-conjugating enzyme Ubc12	↓	0.00	1.27E-01
P62266	40S ribosomal protein S23	↓	0.00	2.70E-01
Q15404	Ras suppressor protein 1	↓	0.00	1.62E-01
Q53T59	HCLS1-binding protein 3	↓	0.00	6.75E-02
Q5T6W2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)	↓	0.00	1.38E-01
Q8TD55	Pleckstrin homology domain-containing family O member 2	↓	0.00	1.81E-01
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1	↓	0.00	1.87E-01
Q9NPH2	Inositol-3-phosphate synthase 1	↓	0.00	5.90E-02
Q9UBS4	DnaJ homolog subfamily B member 11	↓	0.00	1.13E-01
Q9UEE9	Craniofacial development protein 1	↓	0.00	8.43E-02
Q9Y5G2	Protocadherin gamma-B2	↓	0.00	1.36E-01
H0YDF8	Single Ig IL-1-related receptor (Fragment)	↑	∞	1.31E-01

2.2 尿液样本随机分组的结果

鉴于样本中鉴定出的蛋白质组学特征数量高于样本数量，两组之间的差异可能是随机产生的。开发了随机分组统计分析策略以确认这些差异蛋白是否由按摩引起。将按摩后 T1 组（n=6）和按摩前 T0 组（n=6）共 12 个样本随机分成两组，在总计 462 次随机组合中，按照相同的筛选条件计算所有随机次数的平均差异蛋白数目为 11（详见附表 1）。这些结果表明只能随机生成 11 个差异蛋白，进一步表明 73% 的差异蛋白是可靠的。将按摩后 T2 组（n=6）和按摩前 T0 组（n=6）按以上操作进行计算，所有随机次数的平均差异蛋白数目为 10（详见附表 2），该结果表明 65% 的差异蛋白是可靠的，可见按摩后 T2 组差异蛋白的可信度较低。

2.3 组间差异蛋白的功能注释

基于上述分析得知，按摩后 2h 与按摩前相比表现出更为显著的差异。因此，进一步使用 DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/>）对 T1 时刻鉴定到的差异蛋白从生物学过程、细胞成分和分子功能三个方面进行功能富集分析（图 2）。从图中可以看出，这些差异蛋白主要参与了几茶酚胺生物合成过程。在细胞成分上，这些差异蛋白大多来自胞外和胞质，而在分子功能中，我们发现这些差异蛋白大多具有蛋白质结合、氧化还原酶活性、泛素-蛋白转移酶活性等功能。为了鉴定差异蛋白参与的主要代谢通路，进行了 KEGG 通路富集分析（图 2）。结果显示，共有 3 个代谢通路被显著富集，其中包括代谢途径、苯丙氨酸代谢、半乳糖代谢。

这说明按摩引起机体内的系列反应，在 2h 后即可影响尿蛋白质组发生变化，而在 24h 后随着按摩刺激的消失，尿蛋白质组的变化也随之消失。

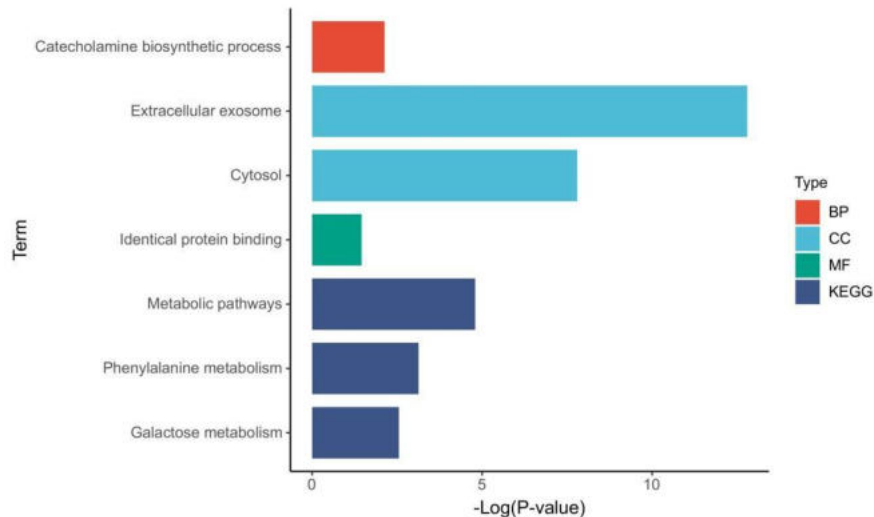


图 2 T1 时刻差异蛋白的功能注释

Figure 2 Functional enrichment analysis of differential proteins at T1. (A) Biological process. (B) Cellular component. (C) Molecular function. (D) Pathways.

2.4 单个人按摩前后尿液蛋白质组变化

为了探究单个人按摩前后的尿液蛋白质组变化是否有一致性，将单个人 T1 时刻与 T0 时刻鉴定到的尿液蛋白质进行对比。筛选差异蛋白条件为：组间变化倍数 ≥ 2 或 ≤ 0.5 ，双尾配对 t 检验的 $P < 0.01$ 。差异蛋白筛选结果如下：1 号共筛选到了 851 个差异蛋白，其中 294 个蛋白呈上调趋势，557 个蛋白呈下调趋势；2 号共筛选到了 383 个差异蛋白，其中 26 个蛋白呈上调趋势，357 个蛋白呈下调趋势；3 号共筛选到了 428 个差异蛋白，其中 168 个蛋白呈上调趋势，260 个蛋白呈下调趋势；4 号共筛选到了 694 个差异蛋白，其中 261 个蛋白呈上调趋势，433 个蛋白呈下调趋势；5 号共筛选到了 383 个差异蛋白，其中 74 个蛋白呈上调趋势，209 个蛋白呈下调趋势；6 号共筛选到了 443 个差异蛋白，其中 340 个蛋白呈上调趋势，103 个蛋白呈下调趋势。

2.4 单个人差异蛋白的功能注释

进一步对单个人 T1 时刻鉴定到的差异蛋白所参与的生物学过程进行分析（图 3），发现蛋白水解作用（Proteolysis）在 6 个个体中均被富集到，另外有 3 条生物学过程在 5 个个体中被富集到，分别为糖酵解过程、对过氧化氢的反应、碳水化合物代谢过程。可见，每个个体按摩后 2h 差异蛋白所参与的生物学过程主要表现为糖和蛋白的代谢。

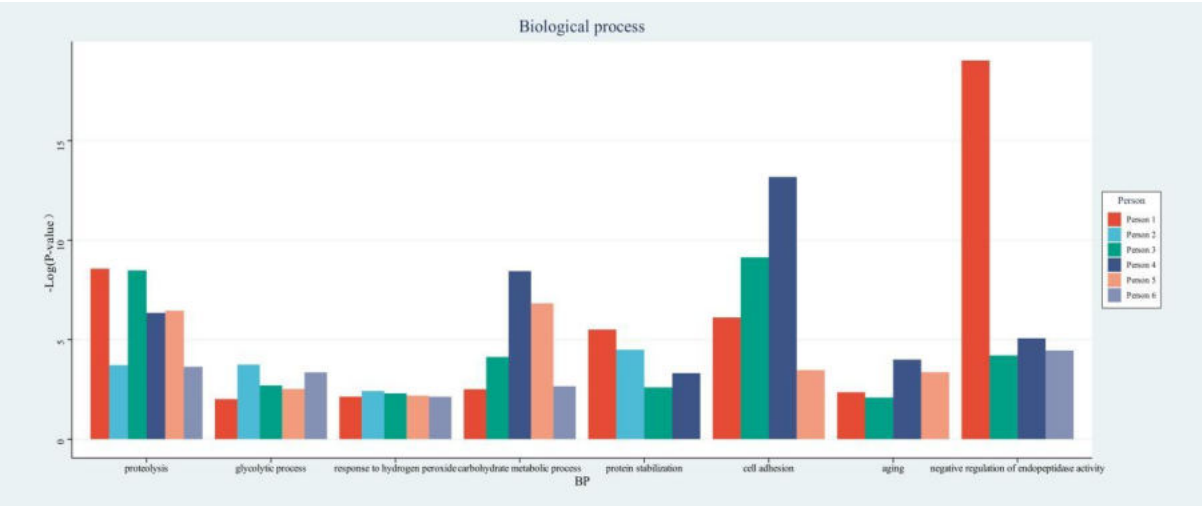


图 3 T1 时刻单个人差异蛋白所参与的生物学过程
Figure 3 Biological process analysis of differential proteins at T1.

3 讨论

按摩后 T1 时刻差异蛋白富集到的生物学过程为儿茶酚胺生物合成过程，而 T2 时刻差异蛋白没有富集到任何生物学过程。其中，儿茶酚胺（catecholamines,CAs）是一系列含有儿茶酚和胺基的神经类物质^[11]，主要包括肾上腺素（epinephrine,E）、去甲肾上腺素（norepinephrine,NE）和多巴胺（dopamine,DA）。已有多项研究发现按摩可以引起受试者血液中皮固醇水平降低^[12]，去甲肾上腺素水平降低^[13]，血清素和多巴胺浓度升高^[2]，被按摩者焦虑减轻，情绪改善。这说明本研究中按摩刺激确实引起了机体内的系列反应，促进了代谢，加快了体内循环，从而导致尿蛋白质组的改变。按摩后一段时间是机体“损伤后修复”过程，在这期间，体内循环保持加快的状态促进修复，一段时间后机体可以得到恢复。同时也有研究^[14,15]证实了按摩疗法对运动疲劳可以起到很好的缓解与消除作用，能有效改善运动性疲劳指标，促进运动性疲劳的恢复，预防延迟性肌肉酸痛，且即时效果明显。这提示我们尿液蛋白质组有潜力用于按摩消除运动性疲劳、促进运动恢复的作用机制研究。

此外，本研究也说明了尿液的敏感性远远超过我们以往的认知，即使是对机体进行短暂的、微小的刺激，尿蛋白质组同样可以快速地表现出变化并富集到相关的生物学过程，但是这种变化也会随着微小刺激的消失而逐渐消失。因此在开展涉及到尿液敏感性的研究时，要做到尽可能早的第一时间进行收尿，刺激后尿蛋白质组不发生改变很有可能是收取尿液时间偏晚。同样，该实验结果也更增加了尿液能够反应疾病早期微小变化的可信度，是尿液能够作为新一代生物标志物来源的有力论证。

4 结论

本研究首次描述了按摩对健康人尿液蛋白质组的影响，证明了按摩通过机械刺激引起了体内发生系列反应，包括糖和蛋白代谢、神经递质分泌以及神经活动调节等。这些结果为按摩疗法缓解运动疲劳、促进运动损伤修复的作用机制研究提供了新思路。

参考文献

- [1] Bervoets D C, Luijsterburg P A J, Alessie J J N, et al. Massage therapy has short-term benefits for people with common musculoskeletal disorders compared to no treatment: a systematic review[J]. *Journal of physiotherapy*, 2015, 61(3):106–116.
- [2] Field T, Hernandez-Reif M, Diego M, et al. Cortisol decreases and serotonin and dopamine increase following massage therapy[J]. *The International journal of neuroscience*, 2005, 115(10):1397–1413.
- [3] Furlan A D, Giraldo M, Baskwill A, et al. Massage for low-back pain[J]. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2015, 2015(9):CD001929.
- [4] Tsuji S, Yuhi T, Furuhashi K, et al. Salivary oxytocin concentrations in seven boys with autism spectrum disorder received massage from their mothers: a pilot study[J]. *Frontiers in psychiatry*, 2015, 6:58.
- [5] Field T. Massage therapy research review[J]. *Complementary therapies in clinical practice*, 2016, 24:19–31.
- [6] Gao Y. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?[J]. *Science China. Life sciences*, 2013, 56(12):1145–1146.
- [7] Paul P, Antonydhason V, Gopal J, et al. Bioinformatics for Renal and Urinary Proteomics: Call for Aggrandization[J]. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21(3).
- [8] Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis[J]. *Nature methods*, 2009, 6(5):359–362.
- [9] Wang S, Zheng W, Hu L, et al. MixProTool: A Powerful and Comprehensive Web Tool for Analyzing and Visualizing Multigroup Proteomics Data[J]. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 2018, 25(10):1123–1127.
- [10] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nature protocols*, 2009, 4(1):44–57.
- [11] Perlman R L, Chalfie M. Catecholamine release from the adrenal medulla[J]. *Clinics in endocrinology and metabolism*, 1977, 6(3):551–576.
- [12] Adib-Hajbaghery M, Rajabi-Beheshtabad R, Abasi A. Effect of Whole Body Massage by Patient's Companion on the Level of Blood Cortisol in Coronary Patients[J]. *Nursing and midwifery studies*, 2013, 2(3):10–15.
- [13] Field T, Morrow C, Valdeon C, et al. Massage reduces anxiety in child and adolescent psychiatric patients[J]. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 1992, 31(1):125–131.
- [14] 刘建宇,刘黎明,李广周等.经穴推拿抗运动性疲劳的实验研究[J].*中国体育科技*,2012,48(01):141-145.
- [15] Imtiyaz S, Veqar Z, Shareef M Y. To Compare the Effect of Vibration Therapy and Massage in Prevention of Delayed Onset Muscle Soreness (DOMS)[J]. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 2014, 8(1):133–136.