

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.12.014

实验研究

三焦针法对阿尔茨海默病模型小鼠学习和记忆功能及相关基因的影响

张雪竹, 刘涛, 贾玉洁, 韩景献, 聂坤*

(天津中医药大学第一附属医院, 天津市西青区昌凌路 88 号, 300112)

摘要 目的 探讨三焦针法治疗阿尔茨海默病 (AD) 的可能作用机制。方法 以 SAMP8 小鼠为 AD 动物模型。60 只 SAMP8 小鼠随机分为对照组、针刺组和非穴组, 每组 20 只。针刺组小鼠给予三焦针法干预, 穴位选取“膻中”“中脘”“气海”及双侧“血海”“足三里”。非穴组取双侧肋下固定非经非穴点, 左右各 1 个。对照组进行与以上两组相同时间、程度的提抓刺激。每天 1 次。干预 1 个月后连续 5 天每天采用 Morris 水迷宫隐蔽平台测试检测各组小鼠学习记忆能力, 再提取各组小鼠海马组织的总 RNA 用于基因芯片检测。基因芯片检测数据导入 LINCS 项目下 CREEDS 网络在线分析工具进行模拟效应、反向效应模式的基因差异表达模式分析。提取各组小鼠海马组织, 采用等重同位素多标签相对定量蛋白质组分析 (iTRAQ) 法, 以对照组海马蛋白质谱为背景, 寻找针刺组与非穴组差异表达蛋白, 并在 DAVID 在线生物信息学注释工具中检索相应蛋白生物学功能。结果 针刺组小鼠第 1-5 天逃避潜伏期均较对照组和非穴组显著缩短 ($P < 0.05$); 反向效应模式分析结果显示, 针刺组反向效应相关的疾病是亨廷顿舞蹈病和胎儿酒精发育失调疾病; 单基因反向效应模式分析结果显示, 与针刺组基因表达模式相反度最高排名前 2 的基因分别是 Pde10a 和 Pink1; 单基因模拟效应模式分析显示, 针刺效应在基因表达水平与 Wfs1 和 Psap 基因过表达的效应相似; 小分子药物模拟效应模式分析显示, 针刺组在基因表达水平与小分子药物 D 型丝氨酸的表达特征最相似。对 iTRAQ 定量分析蛋白质组的注释, 发现针刺上调了神经元突起以及线粒体相关蛋白的表达。结论 三焦针法可明显改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力, 可能是通过触发一种包含调节神经元突触可塑性、激发神经元内质网细胞应激反应和神经保护、逆转神经退行性病变进程等多个功能模块的复杂反应模式实现。

关键词 阿尔茨海默病; 三焦针法; 学习记忆能力; 基因分析

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病, 其病理表现主要是神经元内神经纤维缠结形成和淀粉样蛋白沉积形成的老年斑, 临床表现多为伴随衰老出现明显的记忆障碍、失语、认知能力下降等^[1]。三焦针法能很好地改善 AD 患者的认知状况且能延缓 AD 病理进程^[2]。然而人体对该针法产生何种特异反应模式来延缓 AD 病理进程还未有描述。网络集成式细胞内特征的公共数据库 (LINCS) 是近几年美国国立卫生研究院 (NIH) 资助建立的系统生物学综合数据库^[3]。SAMP8 小鼠作为典型的早老化痴呆小鼠, 是常用的 AD 动物模型^[4]。本研究以 SAMP8 小鼠

作为 AD 动物模型, 以三焦针法干预 SAMP8 小鼠的学习记忆衰退进程, 并提取小鼠海马组织的基因。利用 LINCS 对基因表达水平进行模式化分析, 阐明机体对三焦针法治疗 AD 在细胞水平的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SAMP8 小鼠 60 只, 7 月龄, 雌雄各半, 雌雄合笼, 每笼 5 只, 每周换 1 次笼, 室温 (25 ± 2) °C, 湿度 (40% ~ 60%) 自由取食饮水。动物由天津中医药大学第一附属医院快速老化鼠繁育中心提供, 实验动物许可证号 SXCK (津) 2015-0003。

1.2 主要试剂与仪器

Trizol 试剂 (批号: 15596026), 美国 Invitro-

基金项目: 国家自然科学基金 (81574049, 81473766)

* 通讯作者: nk637@hotmail.com, (022) 27987855

gen 公司。芯片杂交仪 (Affymetrix GeneChip 645 System), 芯片信号扫描仪 (GeneChip 7G Scanner), 小鼠基因芯片 Affymetrix GeneChip® Mouse Transcriptome Array 1.0, 均购自美国 Affymetrix 公司; Morris 水迷宫小动物行为学检测系统 (版本 1.0), 购自中国医学科学院药物研究所; Spectra Max i3 型紫外分光光度计, 购自美国 Molecular Devices 公司; 针灸针, 0.25 mm × 40 mm, 苏州医疗用品有限公司, 批号: 170483。

1.3 动物分组及干预方法

60 只 SAMP8 小鼠采用抓阄法随机分为对照组、针刺组和非穴组, 每组 20 只。针刺组小鼠给予三焦针法干预, 穴位选取“膻中”“中脘”“气海”及双侧“血海”“足三里”, 穴位定位参考《实验针灸学》^[8] 中的动物穴位图谱。针刺方法: “血海”穴, 毫针向上平刺 2 ~ 5 mm, 小幅度 (角度小于 90°) 快速捻转 (> 120 次/min) 补法 30 s; 其他穴位均直刺 2 ~ 3 mm, 小幅度快速捻转补法 30 s。非穴组参考文献 [6] 取双侧肋下固定非经非穴点, 左右各 1 个, 位置与腹中线平行、过髂嵴尖端直上 2 mm, 向下斜刺 2 ~ 3 mm, 中等幅度 (角度介于 90° ~ 180°)、速度 (60 ~ 120 次/min), 每侧各 105 s, 用平补平泻捻转手法各 30 s。对照组进行与以上两组相同时间、程度的捉抓刺激, 但不针刺。各组每天 1 次, 每周持续 6 天休息 1 天, 连续 1 个月。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 逃避潜伏期 各组小鼠在针刺结束后进行 Morris 水迷宫隐蔽平台测试^[9], 评价针刺干预对 SAMP8 小鼠学习记忆能力的影响。每次测试时, 将小鼠由同一位置面朝池壁轻轻放入水中, 利用 Morris 水迷宫小动物行为学检测系统 1.0 记录小鼠从入水至找到平台的游泳路线的长度及找到平台的时间 (逃避潜伏期), 然后让小鼠在平台上停留 20 s 记忆平台的空间位置。如果 120 s 内找不到平台, 则逃避潜伏期记为 120 s。每天在 2 个入水点各测试 1 次, 以两次潜伏期的算术平均值作为该天的成绩, 实验共进行 5 天。

1.4.2 小鼠海马组织基因芯片表达谱 水迷宫试验结束 2 天后, 抓阄法每组随机取 9 只小鼠, 颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速剥取完整海马组织, 将 3 个小鼠海马混在一起, 作为 1 个 RNA 样本, 共 3 个 RNA 样本, 分别置于预冷 Trizol 的玻璃匀浆器中匀浆, 依照文献 [8] 方法提取细胞总 RNA, 并在紫

外分光光度计中定量。每组 3 个 RNA 样本用于芯片检测。通过质量监控的 RNA 样品, 最终经过沉淀浓缩, 再稀释到 5 μg/μl 用于基因芯片检测分析。基因检测由北京博朗生科技有限公司 (BIO-LANCET) 提供技术服务: 1) 探针合成; 2) 芯片杂交与洗染; 3) 芯片扫描; 4) 数据初步分析。基因芯片数据的种属选择小鼠, 数据库版本号 Mouse Transcriptome Array1.0。

1.4.3 针刺组基因差异表达模式的反向效应和模拟效应 使用 LINCS 项目下 GEO2Enrichr 网络在线分析工具 (<http://amp.pharm.mssm.edu/g2e/>), 按照该工具要求的数据格式预先转换好芯片数据文件, 将数据文件直接导入到数据入口, 抽提出特征性的表达模式谱, 用于表达模式定性分析。针刺组基因表达模式的定性分析。使用 LINCS 项目下 CREEDS 网络在线分析工具 (<http://amp.pharm.mssm.edu/CREEDS/>)。

CREEDS 分析工具的反向效应模式分析是指从 LINCS 数据库中查询与未知样本有相反特征的基因差异表达模式。基于针刺组基因差异表达模式的反向效应模式分析, 能揭示针刺干预可能产生疗效的疾病类型和基因类型。使用 LINCS 项目下 CREEDS 网络在线分析工具, 分析模式选择反向效应模式, 进行反向效应模式分析。

CREEDS 分析工具的模拟效应模式分析, 是指从 LINCS 数据库中查询与未知样本有相似特征的基因差异表达模式。基于针刺组基因差异表达模式的模拟效应模式分析, 能揭示与针刺干预疗效相似的小分子药物和基因类型。将针刺组基因差异表达模式数据导入 LINCS 整合分析工具 CREEDS, 分析模式选择模拟效应模式 (similar), 进行模拟效应模式分析。Jaccard 指数代表模式相似度, 指数越高, 模式相似度越高。

1.4.4 蛋白质组的生物学功能注释 等重同位素多标签相对定量蛋白质组学分析 (iTRAQ): 水迷宫试验结束 2 天后, 抓阄法每组随机取 9 只小鼠。颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速剥取完整海马组织并投入液氮中冷冻保存。每 3 个小鼠海马混在一起, 作为 1 个样本, 每组共 3 个样本用于蛋白质组学检测。冻存样品送至上海中科新生命科技公司用于 iTRAQ 蛋白质组学检测分析, 每组取得 3 个重复样品用于统计学分析。以下步骤由上海中科新生命科技公司提供技术服务: 1) 酶解; 2) iTRAQ 肽段标记; 3) 高效液相色谱联合质谱分析; 4) 差异

表 1 各组 SAMPS 小鼠不同时间 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	20	80.51 ± 12.12	66.35 ± 17.51	55.68 ± 15.33	65.21 ± 14.93	64.75 ± 15.66
非穴组	20	80.20 ± 16.42	58.59 ± 19.22	66.30 ± 14.23	55.24 ± 11.86	51.75 ± 8.71
针刺组	20	79.90 ± 14.82	59.73 ± 13.43	51.76 ± 15.29	32.42 ± 8.48	28.64 ± 12.71

表达蛋白质初步分析。以对照组海马蛋白质谱为背景, 针刺组或非穴组质谱数据与之比较, 蛋白质表达量差异倍数 > 1.2 倍 (上、下调), 且 $P < 0.05$ 的蛋白质视为差异表达蛋白质。差异表达蛋白质的生物学功能的注释使用 DAVID 在线生物信息学注释工具 (<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的变量以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用多因素方差分析, 并用 post hoc 检验中的 LSD 法作组间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠逃避潜伏期比较

表 1 示, 对照组小鼠的逃避潜伏期一直维持在较高的水平, 而针刺组和非穴组小鼠的逃避潜伏期 5 天中均逐渐缩短。时间因素的方差分析结果显示, 不同时间点之间小鼠逃避潜伏期差异有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 7.67, P < 0.05$), 提示小鼠逃避潜伏期随时间发生显著改变。组间因素的方差分析结果显示, 各组小鼠组间逃避潜伏期差异有统计学意义 ($F_{\text{组间}} = 9.22, P < 0.05$)。组间多重比较结果显示, 除第 3 天外, 针刺组和非穴组各时间点的逃避潜伏期比对照组显著缩短, 除第 2 天外针刺组各时间点的逃避潜伏期比非穴组显著缩短。

2.2 各组小鼠基因差异表达结果

针刺组的基因差异表达模式中, 有 896 个表达上调基因和 420 个表达下调基因; 非穴组的基因差异表达模式中, 有 932 个表达上调基因和 513 个表达下调基因。

2.2.1 反向效应模式结果 表 2、表 3 示, 与针刺组基因差异表达模式相反度很高的疾病类型是亨廷顿舞蹈病和胎儿酒精发育失调疾病; 而非穴组基因差异表达模式相反度很高的疾病类型是 I 型 SMA 病; 与针刺组基因差异表达模式相反度很高的单基因排名前 2 位的分别是 Pde10a 基因和 Pink1 基因, 而非穴组基因差异表达模式相反度很高的单基因排名前 2 位的分别是 Pde10a 基因、Wfs1 基因。结果提示, 三焦针法可能有逆转亨廷顿舞蹈病

和胎儿酒精发育失调疾病的疾病进程的疗效, 可能是在细胞水平抑制 Pde10a 基因或 Pink1 基因过表达产生的影响; 非穴刺激也可能在细胞水平抑制 Pde10a 基因或 Wfs1 基因过表达。

表 2 针刺组基因差异表达模式的反向效应模式分析结果

代号	名称	GEO 数据库代号	Jaccard 指数
基因: 2916	Pde10a	GSE40377	-0.04989
基因: 2263	Pink1	GSE60413	-0.03895
疾病: 526	胎儿酒精发育失调	GSE34305	-0.0303
基因: 2274	Pink1	GSE60413	-0.02995
基因: 470	Snca	GSE19534	-0.02762
疾病: 528	亨廷顿舞蹈病	GSE19780	-0.02575
基因: 2962	Htt	GSE19780	-0.02575

表 3 非穴组基因差异表达模式的反向效应模式分析结果

代号	名称	GEO 数据库代号	Jaccard 指数
基因: 2916	Pde10a	GSE40377	-0.04178
基因: 831	Wfs1	GSE33372	-0.03576
基因: 3103	Rnh1	GSE48146	-0.02977
疾病: 126	沃德尼格·霍夫曼病	GSE3075	-0.02898
基因: 1731	Ighmbp2	GSE3075	-0.02898
基因: 2274	Pink1	GSE60413	-0.02535
药物: 3033	Phenytoin	GSE2880	-0.02514

2.2.2 模拟效应模式结果 表 4、表 5 示, 与针刺组基因差异表达模式相似度最高的小分子药物是 D 型丝氨酸 (D-serine), 而非穴组基因差异表达模式相似度最高的小分子药物也是 D 型丝氨酸; 与针刺组基因差异表达模式相似度很高的单基因排名前 2 位的分别是 Wfs1 基因和 Psap 基因, 而非穴组基因差异表达模式相似度很高的单基因排名前 2 位的分别是 Ache 基因和 Glo1 基因。结果表明, 针

表 4 针刺组基因差异表达模式的反向效应模式分析结果

代号	名称	GEO 数据库代号	Jaccard 指数
基因: 831	Wfs1	GSE33372	0.03811
基因: 2497	Psap	GSE8307	0.03334
药物: 3389	D 型丝氨酸	GSE10748	0.03277
药物: 3388	D 型丝氨酸	GSE10748	0.03240
基因: 1613	Pafah1b1	GSE35366	0.03198
基因: 386	Prnp	GSE21718	0.03174
基因: 2433	Ache	GSE31458	0.03067

刺对海马组织基因表达产生的影响与小分子药物 D 型丝氨酸相似, 并且可能在细胞水平模拟 Wfs1 基因或 Psap 基因过表达产生的影响。

表 5 非穴组基因差异表达模式的反向效应模式分析结果

代号	名称	GEO 数据库 代号	Jaccard 指数
基因: 2433	Ache	GSE31458	0.03793
疾病: 526	胎儿酒精发育失调	GSE34305	0.03537
基因: 573	Glo1	GSE36819	0.03529
药物: 3389	D 型丝氨酸	GSE10748	0.03345
基因: 386	Prnp	GSE21718	0.02757
药物: 3388	D 型丝氨酸	GSE10748	0.02422
基因: 898	Sod1	GSE3343	0.02387

2.3 蛋白质组的生物学功能

为验证基因差异表达模式分析结果, 对各组小鼠海马组织进行了 iTRAQ 定量蛋白质组学分析。与对照组比较, 针刺组小鼠海马组织有 286 种蛋白质表达上调, 319 种蛋白质表达下调; 非穴组有 299 种蛋白质表达上调, 有 179 种蛋白质表达下调。将上调蛋白质数据导入 DAVID 生物信息学在线分析工具, 对这些蛋白质生物学功能进行生物学信息注释分析, 发现在针刺组表达上调蛋白质中, 与神经元突触和线粒体功能相关的蛋白质数目大大多于非穴组。针刺组表达上调的 286 种蛋白质中, 与神经元突起相关的蛋白质总计有 47 种, 占 16.4%; 与线粒体功能相关的蛋白质总计有 32 种, 占 11.2%。非穴组表达上调的 299 种蛋白质中, 与神经元突起相关的蛋白质只有 11 种, 占 3.7%; 与线粒体功能相关的蛋白质有 5 个, 占 1.7%。将表达下调蛋白质数据导入 DAVID 生物信息学在线分析工具, 发现在针刺组表达下调的 319 种蛋白质中, 与神经元突起相关的蛋白质总计有 10 种, 占 3.1%; 与线粒体功能相关的蛋白质总计有 0 种。非穴组表达下调的 179 种蛋白质中, 与神经元突起相关的蛋白质有 3 种, 占 1.7%; 与线粒体功能相关的蛋白质有 16 个, 占 8.9%。

3 讨论

阿尔茨海默病具有智力低下、情感异常、呆傻愚痴以及生活不能自理等特点, 属于中医学“呆病”“痴呆”等范畴。目前大多数学者认为 AD 的病位在脑, 涉及五脏, 证属本虚标实。张玉莲等^[9]认为, AD 的主要证候要素为精亏、阳虚、阴虚, 病位主要在肾, 其发病以肾虚为基础, 瘀、痰等因素为其发展和加重的关键。陈可冀提出“浊毒”说, 认为 AD 之病位虽在心、脑, 但肾虚精

亏、浊毒痹阻脑络是其主要的病机基础, 并且贯穿该病的始终^[10]。我们认为, AD 是由于衰老导致三焦气化失常, 气血精津衰败, 痰瘀浊毒滋生, 阴阳失调, “阳气者, 精则养神”, 清阳不升则神失所养, 浊阴不降则神明被扰, 病损元神, 发为痴呆。因而, 提出“三焦气化失司”是 AD 的关键病机^[11]。基于该理论的三焦针法从 AD 病机的整体出发, 认为 AD 病变涉及上(心肺)、中(脾胃)、下(肝肾)三焦多个脏腑, 任何一个脏腑气化功能异常, 均可导致三焦整体气化失常, 气血津液出入不畅, 元神受损而发为呆病, 故选用主穴膻中、中脘、气海、足三里、血海。除血海施捻转泻法外, 其余诸穴用捻转补法, 其意在补上中下三焦之气, 活血化瘀, 扶本培元。

本研究通过 Morris 水迷宫隐蔽平台测试发现, 三焦针法能显著改善老化痴呆 SAMP8 小鼠的学习记忆能力; 进一步的基因差异表达模式定性分析发现, 老化痴呆 SAMP8 小鼠对三焦针法干预产生的整体反应模式是一种包含调节神经元突触可塑性、激发神经元内质网细胞应激反应和神经保护以及逆转神经退行性病变进程等多个功能模块的复杂反应模式。

对比各组小鼠基因差异表达模式, 针刺组和非穴组上调基因和下调基因在数量和组成上均有明显不同; 进一步基因差异表达模式定性分析结果显示, 无论是反向效应还是模拟效应, 针刺组和非穴组表现出不同的基因差异表达模式, 提示该针法的穴位特异性。Morris 水迷宫实验结果也表明, 针刺组比非穴组改善痴呆小鼠学习记忆能力的效果更强, 提示三焦针法对痴呆的疗效有明显的穴位特异性。

反向效应模式分析结果显示, 三焦针法对神经退行性病变的疗效有特异性。Pde10a 或 Pink1 基因的过表达均与神经系统退行性病变相关。Pde10a 存在于神经元中, 可降解多巴胺信号传导所触发的细胞内第二信使, Pde10a 表达量异常升高与多种涉及基底神经节神经传递的神经系统疾病的发生有关, 如强迫症和亨廷顿舞蹈病等^[12]; Pink1 是一种蛋白激酶, 能在整个身体的细胞里表达, 在大脑等耗能高的器官中的表达尤为突出, 在神经元内, Pink1 主要位于线粒体的内膜中^[13]。Pink1 触发线粒体自噬的复杂过程, 是线粒体损伤的标志, 这种基因的突变会导致早发性帕金森病^[14]。本研究中反向效应模式分析结果显示, 针刺对老化痴呆 SAMP8 小鼠海马组织基因表达的影响与 Pde10a 和

Pink1 基因过表达的模式类型相反, 显示出老化痴呆 SAMP8 小鼠海马组织对三焦针法的整体反应模式有逆转神经退行性病变进程的特性, 提示该针法对神经退行性病变的特异性。对各组小鼠海马组织蛋白质组的生物学功能注释结果发现, 针刺大幅度上调线粒体相关蛋白质的表达, 从蛋白质表达水平验证了这个结果。

针刺的模拟效应模式分析显示, 针刺对海马基因表达的影响与 Wfs1 基因和 Psap 基因过表达的基因表达模式类型相似。Wfs1 基因是一个内质网跨膜蛋白基因, 该基因在细胞中主要调节内质网应激反应, 它的表达上调由细胞内质网应激引起, 是消除内质网过度应激的关键蛋白^[5]。Psap 是一种鞘脂激活蛋白原基因, 该基因编码一个高度保守的糖蛋白, 在神经系统中分泌型的鞘脂激活蛋白原蛋白是一种神经营养因子和髓鞘营养因子, 其鞘脂激活蛋白 C 区域的 N 末端 14 个氨基酸残基具有营养活化功能。脑损伤后, 鞘脂激活蛋白原蛋白有神经保护和神经营养的双重特性^[6]。针刺效应的单基因模拟效应模式分析结果提示, 老化痴呆 SAMP8 小鼠海马组织对三焦针法的整体反应模式有激发神经元内质网细胞应激反应和神经保护的特性, 其疗效机制涉及内质网细胞应激反应相关细胞过程。

针刺的模拟效应模式分析还显示, 针刺效应在基因表达水平与小分子药物 D 型丝氨酸对神经元的效应模式相似。D 型丝氨酸是一种非必需氨基酸, 在神经系统中, 它是 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (NMDA) 的有效激动剂。NMDA 的激活具有调节神经元的存活, 调节神经元的树突、轴突结构发育及参与突触可塑性的形成的功能, 参与学习和记忆过程^[7]。对各组小鼠定量蛋白质组生物学功能的注释结果表明, 针刺能大幅度上调神经元突起和细胞骨架相关蛋白的表达, 二者均是突触可塑性的结构和功能基础, 提示老化痴呆 SAMP8 小鼠海马组织对三焦针法的整体反应模式有调节神经元突触可塑性的特性。

综上, 机体对三焦针法干预产生的整体反应模式十分复杂, 该模式包含了包括调节神经元突触可塑性、激发神经元内质网细胞应激反应和神经保护以及逆转神经退行性病变进程等功能模块。这些模块对神经元的存活以及维持神经元突触的正常功能都十分重要。我们推测, 三焦针法对 AD 的最终疗效可能是依赖这种复杂的整体反应模式来实现的; 通过触发这种反应模式, 针刺实现激发神经元内质

网细胞应激反应和神经保护以及调节神经元突触可塑性的功能, 最终达到延缓疾病进程和改善 AD 患者学习和记忆的效果。

本研究利用最新的系统生物学工具 LINCS 数据库, 从基因差异表达模式的角度阐明了机体对三焦针法治疗 AD 在细胞水平产生的整体反应模式类型, 研究结果能在一定程度上揭示针刺疗法治疗 AD 的生物学机制。然而, 本研究还没有在细胞功能层次、个体层次研究三焦针法治疗 AD 产生的整体反应模式类型, 而且人体对针刺的反应比小鼠反应的复杂度要高得多, 因此, 还需要更多更深入的研究来验证。

参考文献

- [1] LIBARD S, LAURELL K, CESARINI KG, et al. Progression of Alzheimer's disease-related pathology and cell counts in a patient with idiopathic normal pressure hydrocephalus [J]. J Alzheimers Dis, 2018, 61(4): 1451-1462.
- [2] 胡起超, 孙兆元, 孟媛, 等. “三焦”针法治疗阿尔茨海默病 40 例 [J]. 陕西中医, 2010, 31(3): 343-344.
- [3] VEMPATI UD, CHUNG C, MADER C, et al. Metadata standard and data exchange specifications to describe, model, and integrate complex and diverse high-throughput screening data from the Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS) [J]. J Biomol Screen, 2014, 19(5): 803-816.
- [4] TAKAHASHI R. Anti-aging studies on the senescence accelerated mouse (SAM) strains [J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130(1): 11-18.
- [5] 李忠仁. 实验针灸学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-329.
- [6] 刘涛, 于建春, 韩景献. 快速老化痴呆小鼠海马、皮层 P130 表达的增龄变化及针刺的影响 [J]. 针刺研究, 2008, 33(4): 223-228.
- [7] LIU CZ, YU JC, CHENG HY, et al. Spatial memory performance and hippocampal neuron number in osteoporotic SAMP6 mice [J]. Exp Neurol, 2006, 201(2): 452-460.
- [8] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 345-355.
- [9] 张玉莲, 张连城, 李强, 等. 660 例老年性痴呆患者中医证候学研究 [J]. 中医杂志, 2015, 56(3): 235-238.
- [10] 陈可冀. 老年性痴呆发病机理及诊治 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1998: 263-265.
- [11] 韩景献. “三焦气化失常-衰老”相关论 [J]. 中医杂志, 2008, 49(3): 193-197.
- [12] KALASH L, VAL C, AZUAJE J, et al. Computer-aided

- design of multi-target ligands at A1R, A2AR and PDE10A, key proteins in neurodegenerative diseases [1]. J Cheminform, 2017, 9(1): 67-68.
- [3] FIESEL FC, JAMES ED, HUDEC R, et al. Mitochondrial targeted HSP90 inhibitor Gamitrinib-TPP (G-TPP) induces PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. Oncotarget, 2017, 8(63): 106233-106248.
- [4] LEE Y, STEVENS DA, KANG SU, et al. PINK1 primes Parkin-Mediated ubiquitination of PARIS in dopaminergic neuronal survival [J]. Cell Rep, 2017, 18(4): 918-932.
- [5] DE FRANCO E, FLANAGAN SE, YAGI T, et al. Dominant ER stress-inducing WFS1 mutations underlie a genetic syndrome of neonatal/infancy-onset diabetes, congenital sensorineural deafness, and congenital cataracts [J]. Diabetes, 2017, 66(7): 2044-2053.
- [6] NABEKA H, SAITO S, LI X, et al. Interneurons secrete prosaposin, a neurotrophic factor, to attenuate kainic acid-induced neurotoxicity [J]. IBRO Reports, 2017, 3: 17-32. doi: 10.1016/j.ibror.2017.07.001.
- [7] FAIJERSON J, THORSELL A, STRANDBERG J, et al. Adult neural stem/progenitor cells reduce NMDA-induced excitotoxicity via the novel neuroprotective peptide pentinin [J]. J Neurochem, 2010, 109(3): 858-866.

Effect of *Sanjiao* Acupuncture on Learning and Memory Function and Related Genes in Alzheimer's Disease Model Mice

ZHANG Xuezu, LIU Tao, JIA Yujie, HAN Jingxian, NIE Kun

(First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Sanjiao* acupuncture in the treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** SAMP8 mice were selected as animal models of AD. Sixty SAMP8 mice were randomly divided into a control group, an acupuncture group and a non-acupoint group, with 20 rats in each group. The mice in the acupuncture group were given *Sanjiao* acupuncture method, and the acupuncture points were selected as "Danzhong (RN17)", "Zhongwan (RN12)", "Qihai (RN6)" and bilateral "Xuehai (SP10)" and "Zusanli (ST36)". The non-acupoint group selected fixed non-acupoint under the bilateral ribs, one point in each side. The control group was subjected to the same time and degree of capture stimulation as the above 2 groups, once a day. Morris water maze concealed platform test was used to test the learning and memory ability of each group for 5 days after 1 month intervention. Total RNA from hippocampus of each group of mice was extracted for gene chip detection. The gene chip detection data was imported into the CREEDS network online analysis tool under the Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures (LINCS) project to analyze the gene differential expression patterns of the simulated effect and the reverse effect mode. The hippocampus tissues of each group were extracted, and the isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) method was used to find the differentially expressed protein between the acupuncture group and the non-acupoint group in the background of the hippocampus protein spectrum of the control group. The corresponding protein biological function was retrieved in DAVID online bioinformatics annotation tool. **Results** The escape latency on the first to fifth day of the acupuncture group was significantly shorter than that of the control group and the non-acupoint group ($P < 0.05$). The reverse effect pattern analysis showed that the reverse effect related disease of the acupuncture group was Huntington's disease and fetal alcohol development disorders; single gene reverse effect pattern analysis showed that the top 2 genes with the opposite degree of gene expression pattern in the acupuncture group were Pde10a and Pink1; the single gene simulation effect pattern analysis showed that the acupuncture effect was similar to those of Wfs1 and Psap gene overexpression in the gene expression levels; small molecule drug simulation effect pattern analysis showed that the gene expression level of the acupuncture group was most similar to that of the small molecule drug D-serine. An iTRAQ quantitative analysis of the proteome revealed that acupuncture up-regulated neuronal processes and expression of mitochondria-associated proteins. **Conclusion** *Sanjiao* acupuncture can significantly improve the learning and memory ability of SAMP8 mice, possibly achieved by complex reaction mode of the functional modules of triggering a process including regulating neuronal synaptic plasticity, stimulating neuronal endoplasmic reticulum cell stress response and neuroprotection, and reversing the process of neurodegenerative diseases.

Keywords Alzheimer's disease; *Sanjiao* acupuncture; learning and memory function; gene analysis

(收稿日期: 2018-03-29; 修回日期: 2018-09-27)

编辑: 王利芬