

· 基础研究 ·

利用生物信息学工具分析“益气调血扶本培元”
针法治疗老化痴呆的关键靶点刘 涛¹ 张雪竹² 贾玉洁² 韩景献¹ 聂 坤²

摘要 目的 分析“益气调血扶本培元”针法治疗老化痴呆的关键靶点,阐明针刺治疗老化痴呆的细胞生物学机制。**方法** 60 只 7 月龄快速老化痴呆 SAMP8 小鼠,随机分为对照组、针刺组和非穴组,每组各 20 只。针刺组以“益气调血扶本培元”针法针刺处理,非穴组处以非经非穴点针刺处理,对照组以单纯捉抓处理。采用 Morris 水迷宫方法观察各组小鼠学习记忆能力;提取各组小鼠海马组织的基因差异表达模式,利用 GEO2Enrichr 网络在线分析工具,分析差异表达基因的主要 KEGG 代谢网络途径,以及差异表达基因主要的细胞定位;提取各组小鼠海马组织的蛋白质组,利用 DAVID 在线注释工具,在蛋白质组水平分析各组小鼠海马组织差异表达蛋白质中线粒体相关蛋白质的数量。**结果** 针刺组小鼠逃避潜伏期成绩从 (79.90 ± 14.82) s 缩短到 (28.64 ± 12.71) s,较对照组和非穴组成绩显著缩短 ($P < 0.01$);针刺组和非穴组中均有多条代谢网络途径被活化,与非穴组比较,“氧化磷酸化”、“帕金森病”以及“蛋白质在内质网的加工”这 3 条代谢网络途径是针刺组特异的;针刺组表达上调的基因主要定位于神经元突起、线粒体和细胞骨架,非穴组的表达上调的基因主要定位于神经元突起;各组小鼠海马组织差异表达蛋白质中,表达上调的线粒体相关蛋白质数量,针刺组有 32 个,非穴组有 5 个。**结论** “益气调血扶本培元”针法治疗老化痴呆的靶点很广泛,神经元线粒体是针刺疗效的关键靶点。

关键词 老化痴呆;快速老年性小鼠;生物信息学;线粒体

Analysis of Key Targets of “Yi Qi Tiao Xue Fu Ben Pei Yuan” Acupuncture in Treatment of Senile Dementia Using Bioinformatics Tools LIU Tao¹, ZHANG Xue-zhu², JIA Yu-jie², HAN Jing-xian¹, and NIE Kun² 1 Department of Acupuncture, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193); 2 Acupuncture Research Institute, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin (300193)

ABSTRACT Objective To analyze the key targets of “Yi Qi Tiao Xue Fu Ben Pei Yuan” (YQTXFB-PY) acupuncture method in the treatment of senile dementia, and to elucidate the cellular biological mechanism of acupuncture in treatment of the disease. **Methods** As an animal model of senile dementia, 7-month-old 60 senescence-accelerated mice prone 8 (SAMP8) were randomly divided into the control group, the acupoint group and the non-acupoint group, with 20 in each group. Mice in the acupoint group were treated with YQTXFBPY acupuncture method. Mice in the non-acupoint group were acupunctured non-channel or non-acupoint. Mice in the control group were disposed with grasping alone. Morris water maze was used for analyzing the effect of acupuncture on the ability of learning and memory of SAMP8. Gene expression profiles of hippocampal tissue were extracted from each group. KEGG metabolic network pathways and cellular localization of differentially expressed genes were analyzed using GEO2Enrichr bioinformatics tools. Hippocampus tissue proteome were extracted from each group, and the numbers of mitochondria-associated proteins from each proteome were annotated using the DAVID

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81574049; No. 81473766)

作者单位:1.天津中医药大学第一附属医院针灸部(天津 300193);2.天津中医药大学第一附属医院针灸研究所(天津 300193)

通讯作者:聂 坤, Tel: 13702195135, E-mail: nk637@hotmail.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20181029. 314

online annotation tools. Results The escape latency of the acupoint group was shortened from (79.90 ± 14.82) s seconds to (28.64 ± 12.71) s, which was significantly shorter than that of the control and the non-acupoint group ($P < 0.01$). There were multiple metabolic network pathways activated in both the acupoint group and the non-acupoint group. Compared with the non-acupoint group, the acupoint group had 3 specific metabolic pathways: "oxidative phosphorylation", "Parkinson's disease" and "protein processing in endoplasmic reticulum". The up-regulated genes in the acupoint group were mainly located in neurite protuberance, mitochondria and cytoskeletons, while those in the non-acupuncture group were mainly located in neurite protuberance. In the proteome of mouse hippocampus, there were 32 up-regulated proteins related with mitochondria in acupoint group, while only 5 in non-acupoint group. Conclusion YQTXFBPY acupuncture method had a wide range of targets for treatment of senile dementia, and neuronal mitochondria were the key target for acupuncture efficacy.

KEYWORDS Alzheimer's disease; senescence accelerated mouse; bioinformatics; mitochondrion

既往研究证明,针刺治疗的模式具有整体性、多层次、多靶点的特点,生物学机制非常复杂^[1]。基于中医学理论的“益气调血扶本培元”针法,能明显改善老年性痴呆患者的认知状况,显示出对老年性痴呆的临床治疗潜力^[2,3],然而其多靶点内涵和关键靶点未知。

生物信息学(bioinformatics)是研究生物信息的采集、处理、存储、传播,分析和解释等各方面的学科,也是随着生命科学和计算机科学的迅猛发展,生命科学和计算机科学相结合形成的一门新学科。它通过综合利用生物学、计算机科学和信息技术而揭示大量而复杂的生物数据所赋有的生物学奥秘。该学科的特点是基于系统生物学原理的大数据分析手段,与中医学“整体观念”特色非常吻合。

SAMP8 小鼠作为典型的早老化痴呆小鼠,在成年期出现伴随痴呆的快速老年性特征,是常用的 AD 动物模型^[4]。在本项研究中,以 SAMP8 小鼠为化性痴呆动物模型,以“益气调血扶本培元”针法为干预手段,提取小鼠海马组织的基因表达特征谱,利用多种生物信息学分析工具,在基因表达水平进行模式化分析,揭示“益气调血扶本培元”针法的多靶点作用模式和对老化痴呆的关键靶点,阐明针刺治疗老化痴呆的系统生物学机制。

材料和方法

1 动物 60 只 7 月龄 SAMP8 小鼠,雌雄各半,清洁级,小鼠饲养在完全相同条件下,25℃ 恒温、恒湿,自由取食饮水。动物均由天津中医学院第一附属医院老年性鼠繁育中心提供[许可证号 SXCK(津)2015-0003],动物实验的所有方法和程序均遵循天津中医药大学的相关规定,实验动物伦理号:TCM-LAEC2017008。

2 试剂与仪器 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;小鼠基因芯片 Affymetrix GeneChip Mouse Transcriptome Array1.0(货号:901169)购自 Affymetrix 公司。芯片杂交使用 Affymetrix 公司的 Affymetrix GeneChip 645 System;芯片信号扫描使用 Affymetrix 公司的 GeneChip 7G microarray scanner。

3 动物分组及干预方法 60 只 7 月龄 SAMP8 小鼠随机分为 3 组,即对照组、针刺组和非穴组,每组各 20 只。针刺组采用“益气调血扶本培元”针刺方法,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》^[5]中的动物穴位图谱。针刺手法:血海穴施捻转泻法 30 s,其他穴位均行捻转补法 30 s;非穴组取双侧肋下固定非经非穴点,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。各组每天做相应处理 1 次,第 7 天暂停 1 次,连续操作 1 个月。

4 检测指标和检测方法

4.1 小鼠学习记忆能力 各组小鼠在针刺结束后进行 1 个为期 5 天的 Morris 水迷宫隐蔽平台测试,逃避潜伏期的长短作为衡量小鼠学习记忆能力的指标。具体方法简单描述如下:将小鼠面朝池壁轻轻放入水中,利用行为学软件硬件记录分析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。如果 120 s 内找不到平台,潜伏期记为 120 s。每天在 2 个入水点各测试 1 次,以两次逃避潜伏期的算术均值作为这一天的成绩,进行统计分析。具体方法参照参考文献^[6]。

4.2 小鼠海马组织基因芯片差异表达模式(Signature) 抽提小鼠行颈椎脱臼法处死,快速剥取完

整海马组织。将新鲜剥离的海马组织置于预冷 Trizol 的玻璃匀浆器中匀浆,依照传统 Trizol 方法提取细胞总 RNA,并在紫外分光光度计中定量。总 RNA 样本首先经琼脂糖凝胶电泳检测样本质量,通过质量监控的总 RNA 样品,用于后续的基因芯片检测分析。检测使用的小鼠基因芯片版本号为 Affymetrix Gene-Chip Mouse Transcriptome Array 1.0。以下基因芯片检测过程由北京博朗生科技有限公司(BIOLAN-CET)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。

得到的基因芯片数据,使用基于集成式细胞网络特征库(LINCS)项目下 GEO2Enrichr 网络在线分析工具(amp.pharm.mssm.edu/g2e/)进行基因差异表达模式分析。按照该工具要求的数据格式预先转换好的待分析芯片数据文件,将数据文件直接导入到数据入口,统计学分析方法选择特征方向法(Characteristic Direction),点击 Extract Gene Lists 按钮,即可得到包括上调基因、下调基因的基因差异表达模式列表,抽提出基因差异表达模式。

4.3 小鼠海马组织蛋白质组中线粒体相关蛋白质的注释 新鲜剥离的海马组织立刻投入预冷细胞裂解液的玻璃匀浆器中匀浆,利用 BCA 蛋白质定量法对样品总蛋白质浓度定量分析。符合质量要求的样本保存在于-80℃下冰箱备用。总蛋白样本首先通过初步的高效液相色谱-质谱检测,来确定样本质量是否适合于后续的同位素标记相对和绝对定量蛋白质组学(iTRAQ)实验。通过质量监控的总蛋白样品,用于 iTRAQ 蛋白质组学检测分析。以下定量蛋白质组学分析(iTRAQ)检测过程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)高效液相色谱法偶联质谱分析(LC-MS/MS);(4)质谱数据初步分析。iTRAQ 蛋白质组中线粒体相关蛋白质的注释分析,采用 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 网络在线分析工具,网址:https://david.ncifcrf.gov/home.jsp,得到线粒体相关蛋白质的列表。

4.4 京都基因与基因组(KEGG)代谢网络途径和基因功能注释(GO)的细胞定位分析 将

GEO2Enrichr 的分析结果导入富集分析工具 Enrichr,在 UP 或 DOWN 基因列表下点击“Enrichr”的入口按钮,即可进入生物信息学分析界面,进行 KEGG 关键代谢网络途径和 Gene Ontology 细胞定位分析在内的分析界面,进行富集度分析,将有统计学意义的词条按照富集度大小汇总。

5 统计学方法 Morris 水迷宫数据应用 SPSS 13.0 软件进行数据统计分析,符合正态分布的变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Two-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠的学习记忆能力(表 1) 各组小鼠的逃避潜伏期比较,差异有统计学意义($F = 6.12$, $P < 0.01$)。与对照组比较,非穴组小鼠的逃避潜伏期 5 天中显著缩短($P < 0.01$);与对照组和非穴组比较,针刺组小鼠的逃避潜伏期 5 天中显著缩短($P < 0.01$)。

2 基因芯片差异表达模式(表 2) 针刺组与非穴组有相似的差异表达模式,主要特点是上调基因远多于下调基因。

3 针刺效应基因差异表达模式的 KEGG 代谢网络靶点分析(表 3,图 1) 两组小鼠的基因差异表达模式中,表达下调基因列表的 KEGG 代谢网络分析结果均无统计学意义(校正 P 值 > 0.05);两组小鼠的基因差异表达模式中,表达上调基因的 KEGG 代谢网络分析结果有统计学意义(校正 P 值 < 0.05),针刺组中的表达上调代谢网络明显不同,6 个代谢网络有统计学意义,按照富集度从大到小依次为氧化磷酸化、帕金森病、脂肪酸侧链延长,蛋白质在内质网的加工、内源性大麻素反向信号以及不饱和脂肪酸生物合成,其中,针刺组特异的代谢网络有 3 个,分别是氧化磷酸化、帕金森病以及蛋白质在内质网的加工。

4 差异基因表达模式中表达上调基因的 GO 细胞定位分析(表 4) 两组小鼠基因差异表达模式中表达上调基因的 GO 细胞定位分析结果(校正 P 值 < 0.05),针刺组中表达上调基因编码的功能蛋白主要细胞内定位:a,神经元突起(髓鞘,轴索侧支,神经投射

表 1 各组小鼠在 Morris 水迷宫测试中的逃避潜伏期比较 ($s, \bar{x} \pm s$)

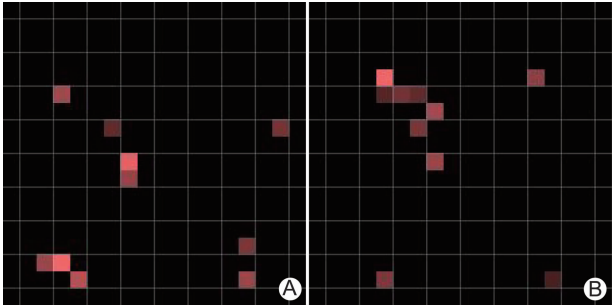
组别	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照	20	80.51 ± 12.12	66.35 ± 17.51	55.68 ± 15.33	65.21 ± 14.93	64.75 ± 15.66
非穴	20	80.20 ± 16.42	58.59 ± 19.22	66.30 ± 14.23	55.24 ± 11.86	51.75 ± 8.71
针刺	20	79.90 ± 14.82	59.73 ± 13.43	51.76 ± 15.29	32.42 ± 8.48	28.64 ± 12.71

表 2 两组小鼠基因差异表达模式上调、
下调基因数目比较 (个)

组别	n	上调基因数目	下调基因数目
针刺	20	896	420
非穴	20	932	513

表 3 两组小鼠表达上调基因中有统计学意义的
KEGG 代谢网络 (排序依照富集度大小)

序号	非穴组(n=20)	针刺组(n=20)
1	尼古丁成瘾	氧化磷酸化
2	脂肪酸侧链延长	帕金森病
3	内源性大麻素反向信号	脂肪酸侧链延长
4	三羧酸循环	蛋白质在内质网的加工
5	致病性大肠杆菌感染	内源性大麻素反向信号
6	γ-氨基丁酸能突触	不饱和脂肪酸生物合成
7	碳水化合物代谢	
8	不饱和脂肪酸的生物合成	



注:A 为针刺组;B 为非穴组

图 1 两组小鼠表达上调基因中有统计学意义的
KEGG 代谢网络网格图

表 4 两组 Signature 中表达上调基因的细胞内
定位分析结果

序号	非穴(n=20)	针刺(n=20)
1	膜蛋白复合物	髓鞘
2	膜系统	轴索侧支
3	突触	神经投射终端
4	细胞器界膜	轴突终端
5	突触部分	树突近端
6	髓鞘	轴突部分
7	神经元部分	磷酸丙酮酸水合酶复合体
8	跨膜转运蛋白复合物	突触囊泡
9	神经元投射	线粒体内膜
10	转运复合物	微管蛋白复合物

终端,轴突终端,树突近端,轴突部分,突触囊泡);
b,线粒体(磷酸丙酮酸水合酶复合体,线粒体内膜);
c,细胞骨架(微管蛋白复合物)。非穴组中表达上调
基因编码的功能蛋白主要细胞内定位,主要是神经
元突起(突触,突触部分,髓鞘),以及其他部位膜蛋
白。与非穴组比较,线粒体和细胞骨架是针刺组特

异的。
5 针刺效应定量蛋白质组中线粒体相关蛋白质
的注释(表 5) 与对照组比较,针刺组有统计学意义
的表达上调蛋白质有 299 个,非穴组中有 286 个。通
过 DAVID 注释工具对这些表达上调蛋白质进行注释
分析,发现针刺组 299 个蛋白质中,线粒体相关蛋白
质有 32 个;非穴组 286 个表达上调蛋白质中,线粒体
蛋白质只有 5 个。

表 5 各组 iTRAQ 样本中上调的线粒体相关蛋白列表

组别	n	线粒体蛋白质符号
非穴	20	Grn;Gtpbp10;Hadh;lreb2;Krt5 Atp5a1;Bag1;Bnip3;Gtpbp10;Ndufaf4;dufv3; Rpusd3;Adh1;Amacr;Anxa6;Gcsh;Grn; Ldhd;Mpdu1;Mrps17;Mrps34;Pnkd;Gm4705; P4ha1;Ppm1k;Ptpn11;Rpl34;Sds;Neu4; Slc22a4;Slc25a35;Stx17;Tmem223;Tpp1; Tusc3;Uqcr11;Ubb
针刺	20	

讨 论

“益气调血扶本培元”针法从三焦论治入手,认为
老年性痴呆病变涉及上(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,因此在治疗上,运用“益气调血、扶本培元”针
法,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,其义在补上、中、下三
焦之气,活血化瘀,扶本培元^[7]。

本研究运行生物信息学工具发现,“益气调血扶
本培元”针法治疗老化痴呆的关键靶点是神经元线
粒体。

Morris 水迷宫逃避潜伏期结果显示,“益气调血
扶本培元”针法可明显改善 SAMP8 小鼠学习记忆能
力,其效果优于非穴针刺,显示针刺疗效有明显的穴位
特异性。KEGG 代谢网络靶点分析结果显示,与非穴
效应比较,针刺效应特异的代谢网络靶点有 3 个:氧化
磷酸化、帕金森病以及蛋白质在内质网的加工,提示针
刺疗效的穴位特异性与以上 3 个代谢网络靶点的活化
密切相关。其中,富集度最靠前的两项是氧化磷酸化
和帕金森病,提示了两者在针刺疗效中的关键作用。
氧化磷酸化是指包括糖、脂、氨基酸等有机物在分解过
程中的氧化步骤所释放的能量,驱动 ATP 合成的过
程,在真核细胞中,氧化磷酸化在线粒体中发生,其功
能是进行电子传递、H⁺传递及氧的利用,产生 H₂O 和
ATP^[8];帕金森病是一种神经退行性运动障碍疾病,
病因主要是 α-突触核蛋白和 PINK1 的基因突变或表

达改变,导致线粒体损伤以及自噬障碍^[9]。两者都与线粒体正常功能直接相关,提示神经元线粒体是针刺疗效的关键靶点。

GO 细胞内定位和蛋白质组注释分析结果提供了进一步的证据。针刺组上调的 896 个基因主要编码神经元突起、线粒体以及细胞骨架蛋白。其中,富集度最高的细胞定位是神经元突起,这提示针刺疗效与针刺改善神经元突起功能直接相关。线粒体和细胞骨架的密切协作是维持神经元突起正常功能的关键机制,而 GO 细胞内定位分析结果显示,线粒体和细胞骨架蛋白是针刺组特异的,提示“益气调血扶本培元”针法改善认知功能的疗效和改善神经元线粒体功能密切相关,这进一步证实了线粒体是针刺疗效的关键靶点。等重同位素标记的相对与绝对定量蛋白质组学技术(iTRAQ)^[10]分析结果显示,针刺干预能显著上调线粒体相关蛋白质的表达,这从蛋白质表达水平充分验证来基因芯片的分析结果。

线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器,是细胞进行有氧呼吸的主要场所,是细胞中制造能量的结构。线粒体分布方向与微管一致,在神经元中,大量线粒体以细胞骨架微管为导轨、由马达蛋白提供动力向突触前膜区域迁移聚集,与细胞骨架蛋白一起,参与神经递质囊泡的转运和分泌过程,维持神经元的正常功能^[11]。线粒体在细胞的衰老过程起到关键作用,线粒体功能下降对人类衰老起着推动作用,已知帕金森氏病^[12],阿尔茨海默病^[13]以及亨廷顿病^[14]等衰老相关的神经退行性疾病,都与线粒体功能障碍相关。本研究通过生物信息学分析发现,“益气调血扶本培元”针法能大范围上调多种海马组织神经元的线粒体功能相关基因的表达,表明线粒体相关的细胞功能是该针法治疗老化痴呆的关键靶点,“益气调血扶本培元”针法可能通过调节神经元线粒体功能达到改善神经元功能的疗效。研究不仅从基因表达水平提供了针刺治疗老年性痴呆疗效的分子证据,更进一步提示该针法对其他线粒体相关疾病如帕金森氏病有潜在治疗价值。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 袁青,余瑾,靳瑞.论现代的针刺补泻[J].中国针灸,2007,27(4):303-305.
- [2] 李涓,于建春,于涛,等.韩景献治疗痴呆的经验介绍

[J].辽宁中医杂志,2011,38(5):837-838.

- [3] 胡起超,孙兆元,孟媛,等.“益气调血、扶本培元”针法治疗老年性痴呆 40 例[J].陕西中医,2010,31(3):343-344.
- [4] Takahashi R. Anti-aging studies on the senescence accelerated mouse (SAM) strains [J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130(1): 11-18.
- [5] 李忠仁主编.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003:327-329.
- [6] 孔林林,张军,乔枫,等.基于小鼠 Morris 水迷宫和 Y 迷宫联合试验的多任务行为学测试研究[J].神经解剖学杂志,2013,29(4):365-368.
- [7] 韩景献.“三焦气失常-衰老”相关论[J].中医杂志,2008,49(3):193-197.
- [8] KEGG. Oxidative phosphorylation-Homo sapiens (human) [OL]. http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa00190+1537.
- [9] Xiao B, Deng X, Lim GGY, et al. Superoxide drives progression of Parkin/PINK1-dependent mitophagy following translocation of Parkin to mitochondria [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3097.
- [10] Ross PL, Huang YN, Marchese JN, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents [J]. Mol Cell Proteomics, 2004, 3(12): 1154-1169.
- [11] Bernard-Marissal N, Médard JJ, Azzedine H, et al. Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration [J]. Brain, 2015, 138(4): 875-890.
- [12] Anderson G, Maes M. Neurodegeneration in Parkinson's disease: interactions of oxidative stress, tryptophan catabolites and depression with mitochondria and sirtuins [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(2): 771-783.
- [13] Bhat AH, Dar KB, Anees S, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases: a mechanistic insight [J]. Biomed Pharmacotherapy, 2015, 74: 101-110.
- [14] Carmo C, Naia L, Lopes C. Mitochondrial dysfunction in Huntington's disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1049: 59-83.

(收稿:2018-03-11 在线:2018-11-17)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶