

· 基础研究 ·

三焦针法对快速老化模型小鼠海马神经元细胞骨架重组相关蛋白的影响

刘 涛¹ 何 佳¹ 张雪竹² 贾玉洁² 韩景献¹ 聂 坤²

摘要 **目的** 观察三焦针法对快速老化模型小鼠(SAMP8)海马神经元细胞骨架重组相关蛋白的影响,探讨针刺治疗阿尔茨海默氏病(AD)的可能细胞生物学机制。**方法** 以 7 月龄 SAMP8 为 AD 动物模型,随机分为对照组、针刺组和非穴组,每组各 20 只。针刺组给予三焦针法(取穴:膻中、中脘、气海、血海、足三里),非穴组以双侧胁肋下非经非穴点针刺处理,1 次/日,连续 6 日,第 7 日休息,连续干预 4 周。采用 Morris 水迷宫隐蔽平台试验检测小鼠逃避潜伏期,采用空间探索实验检测小鼠原平台象限停留时间。提取小鼠海马组织脂筏,采用液质联用蛋白质组学方法检测各组小鼠海马脂筏蛋白,分析其中募集的细胞骨架相关蛋白的差异表达;采用免疫荧光共定位法检测各组 β -tubulin 及 Cdc42 表达;采用 Western Blot 法检测各组 β -tubulin、 β -actin、neurofibrillary 蛋白表达。**结果** 三组小鼠 5 天逃避潜伏期逐渐缩短($F=8.61$, $P=0.0048$)。针刺组逃避潜伏期与对照组和非穴组均有显著差异($P<0.01$)。与对照组和非穴组比较,针刺组第 3 天开始逃避潜伏期时间差异有统计学意义($P<0.01$)。针刺组原平台象限停留时间[(19.14 ± 4.32)s]明显高于对照组[(11.38 ± 3.35)s]和非穴组[(13.51 ± 2.46)s],差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,针刺组与非穴组海马脂筏募集的蛋白在种类和数量上存在差异。针刺组脂筏募集的细胞骨架相关蛋白和小 G 蛋白明显多于非穴组,且表现出同步增多的特点;免疫荧光共定位提示,针刺组 β -tubulin 与 Cdc42 在细胞核周以及轴突部位高度富集;与对照组比较,针刺对 3 种细胞骨架蛋白表达量的影响未显示统计学意义。**结论** 三焦针法可调节海马神经元细胞骨架重组,这可能是其治疗 AD 的重要细胞生物学机制之一。

关键词 阿尔茨海默氏病;快速老化模型小鼠;三焦针法;细胞骨架;小 G 蛋白

Effect of Sanjiao Acupuncture on Cytoskeleton Recombination Related Proteins in Hippocampal Neurons of Senescence Accelerated Mouse LIU Tao¹, HE Jia¹, 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, National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin(300193); 2 Acupuncture Research Institute, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin(300193)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Sanjiao acupuncture on the cytoskeleton recombination related proteins in hippocampus neurons of senescence accelerated mouse(SAMP8), and to explore the possible cellular biological mechanism of acupuncture in the treatment of Alzheimer's disease(AD). **Methods** Seven-month-old SAMP8 was used as animal model of AD, and were randomly divided into control group, acupoint group and non-acupoint group, with 20 rats in each group. The acupoint group was treated with Sanjiao acupuncture[acupoints: Danzhong(CV17), Zhongwan(CV12), Qihai(CV6), Xuehai(ST36), Zusanli(SP10)]. Non-acupoint group was treated with non-meridian and non-acupoint needling

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81574049)

作者单位: 1. 天津中医药大学第一附属医院针灸部, 国家中医针灸临床医学研究中心(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: 022-27987855, E-mail: nk637@hotmail.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20191104. 189

at bilateral subcostal. Both acupuncture groups were needled once daily, 6 times a week for 4 weeks. Morris Water Maze was used for analyzing the effect of acupuncture on learning and memory ability of SAMP8 by hidden platform test and spatial probing test. The hippocampal tissue lipid rafts were extracted, the changes of cytoskeleton-related proteins in hippocampal lipid rafts recruitment of three groups were detected by HPLC MS/MS proteomics method; the intracellular co-localization of cytoskeleton and related proteins was examined by immunofluorescence staining method. Three cytoskeleton proteins (β -tubulin, β -actin, neurofibrillary) were determined by Western Blot. Results The 5-day escape latency of three groups was gradually shortened, the difference was statistically significant among groups ($F=8.61$, $P=0.0048$). The escape latency of acupuncture group was significantly different from that of control group and non-acupoint group ($P<0.01$). Compared with the control group and the non acupoint group, there was a statistically significant difference in the time of escape latency on the third day in the acupuncture group ($P<0.01$). The retention time of original platform quadrant in acupuncture group [(19.14 ± 4.32) s] was significantly higher than that in control group [(11.38 ± 3.35) s] and non acupoint group [(13.51 ± 2.46) s], the difference was statistically significant ($P<0.01$). There were significant differences in the types and quantities of lipid raft proteins within two acupuncture groups. The cytoskeleton-related proteins and small GTP proteins recruited by lipid raft in acupoint group were significantly higher than that in non-acupoint group, and showed a synchronous increasing pattern. Immunofluorescence co-localization indicated that β -tubulin and Cdc42 were highly enriched in perinuclear and axon of the cells in acupoint group. Compared with control group, the expression of each cytoskeleton protein among three groups showed no statistical difference. Conclusion The activation and regulation of hippocampal neuron cytoskeleton reorganization may be an important cytological mechanism in the treatment of AD by Sanjiao acupuncture.

KEYWORDS Alzheimer's disease; senescence accelerated mouse; Sanjiao acupuncture; cytoskeleton; small G protein

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种多发于老年群体的神经退行性疾病。到 2030 年, 全球 AD 患者预计将达到 7 000 万^[1]。目前临床药物治疗不能改变疾病的进程或具有确切的疗效^[2]。基于韩景献教授“三焦气化异常导致痴呆”的创新性病机, 笔者团队多年致力于三焦针法治疗 AD 的研究。随机对照临床研究提示, 该针法可改善 AD 患者治疗前后 ADAS-cog、MMSE 测试评分^[3], 显示出良好临床疗效, 但针刺作用的关键靶点未知。

前期基础研究中, 笔者运用生物信息学工具, 分析针刺干预的基因芯片数据发现: 该针法上调基因的细胞定位和生物过程主要集中在“神经突触、细胞骨架和能量代谢”, 提示神经元细胞骨架可能是三焦针法治疗 AD 的关键靶点^[4]。

在神经元中, 细胞骨架结构的完整性对神经元发挥其正常生理功能有着非同寻常的意义。随着内外环境的改变, 细胞骨架不断进行组装和去组装的重组过程。近年的研究表明, 细胞骨架重组的异常改变与多种神经退行性疾病如痴呆、帕金森病、亨廷顿病等密切相关^[5]。本研究以快速老化模型小鼠 (senescence accelerated mouse prone 8, SAMP8) 为 AD 动物

模型, 探索针刺对海马神经元细胞骨架重组相关蛋白的影响, 为阐释针刺治疗 AD 的关键靶点提供实验依据。

材料与方法

1 动物 60 只清洁级 7 月龄 SAMP8 小鼠, 体重 24~28 g, 雌雄各半, 由天津中医药大学第一附属医院 SAM 鼠繁育中心提供, 动物许可证号: SXCK (津) 2015-0003。全部动物饲养在 25℃ 恒温 40%~60% 湿度条件下, 自由取食饮水。本研究经天津中医药大学伦理委员会批准 (No. TCM-LAEC2018008)。

2 试剂与仪器 Morris 水迷宫行为学分析系统 (中国科学院), 冰冻切片 (Leica CM3050 S, 德国), 超速离心机 (Hitachi Himac CP80WX, 日本), 荧光显微镜 (NIKON ECLIPSE, 日本)。GAPDH (sc-365062)、 β -tubulin (sc-166729)、 β -actin (sc-1616)、neurofibrillary (sc-12966) 抗体购自 Santa Cruz 公司; 蛋白酶抑制剂 (SRE0055)、蔗糖 (V900116)、Triton X-100 (T8787)、FITC 标记的 β -tubulin 抗体 (F2168) 和 TRITC 标记的 Cdc42 抗体 (SAB2100382) 均购自德国 SIGMA 公司。1.5 寸针

灸毫针(0.25 × 40 mm, 苏州医疗用品有限公司, 批号: 170483)

3 动物分组及干预方法 SAMP8 小鼠抓阉法随机分为对照组、针刺组和非穴组, 每组 20 只。针刺组选取膻中、中脘、气海、血海(双)、足三里(双)。定位以《实验针灸学》^[6]小鼠穴位图谱为依据, 采用 1.5 寸(40 mm)毫针, 操作: 膻中、中脘、气海、足三里直刺 2~3 mm, 小幅度(角度 < 90°)、高频率(> 120 次/分), 捻转补法 30 s。血海穴直刺 2~5 mm, 大幅度(角度 > 180°)、低频率(< 60 次/分), 捻转泻法 30 s; 非穴组取双侧肋下固定非经非穴点(与腹中线平行、过髂嵴尖端直上 2 mm), 左右各一, 斜刺 2~3 mm, 中等幅度针刺(角度 90°~180°, 速度 60~120 次/分), 每侧各 105 s。对照组行程度及时间相同的捉抓, 模仿针刺操作, 左手抓住小鼠, 但右手不行针刺操作。以上操作执行 1 次/日, 连续 6 日, 第 7 日休息, 连续 4 周。全部针刺操作由取得执业医师资格的贾玉洁针灸医师完成, 实验前由聂坤教授依据《实验针灸学》^[6]及上述相关内容对操作者指导培训。针刺环境条件与小鼠饲养环境相同。

4 检测指标及方法

4.1 Morris 水迷宫测试 针刺结束后进行为期 5 日的隐蔽平台实验和 1 日的空间探索实验^[7]。隐蔽平台测试: 将小鼠面朝池壁轻放入水, 利用行为学检测记录设备分析从入水至找到平台的游泳路线长度及时间(即逃避潜伏期)。120 s 为上限, 找到平台小鼠在平台上停留 20 s。每天在 2 个人水点各测试 1 次, 以 2 次逃避潜伏期的算术均值作为本次实验成绩。空间探索测试: 前述试验结束 24 h 后, 撤除平台, 将小鼠按任意入水点放入水中, 记录 90 s 内游泳路径, 分析小鼠在原平台象限的停留时间。

4.2 小鼠海马脂筏提取及检测 完成 Morris 水迷宫测试后, 每组选取 10 只小鼠, 脱颈处死, 立即剥取海马组织, 置于预冷的玻璃匀浆器中, 按 400 mg/mL 加入预冷的脂筏提取液(含 2% Triton X-100 的 PBS), 按 10 μL/mL 加入蛋白酶抑制剂, 于冰上充分匀浆。匀浆后 4 °C 静置 90 min, 1 000 ×g 离心 15 min。吸取上清液用于超速离心, 蔗糖密度梯度由上至下依次为 5%、30%、40%, 离心参数: 4 °C, 200 000 ×g, 20 h。离心结束后在 5% 和 30% 蔗糖分界处有乳黄色脂质即为脂筏。用液质联用蛋白质组学方法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, HPLC-MS/MS)得到脂筏蛋白种类数据库^[8], 在经过生物信

息学分析过滤掉杂蛋白, 以对照组为参照背景, 得到针刺组和非穴组小鼠海马组织脂筏蛋白变化谱, 并利用生物信息学工具对特异蛋白进行注释分析。

4.3 海马神经元微管与小 G 蛋白免疫荧光共定位分析 完成 Morris 水迷宫测试后, 每组选取 5 只小鼠, 10% 水合氯醛(400 mg/kg)腹腔麻醉小鼠, 开胸并主动脉插管, 冷生理盐水经升主动脉冲洗血管, 以预冷的 4% 多聚甲醛溶液灌注, 开颅取脑置于 4% 多聚甲醛溶液固定过夜。用 0.1 mol/L PB(pH 7.4)冲洗固定过的脑, 在梯度蔗糖溶液中逐步脱水。于冠状位用冰冻切片连续切片, 片厚 5 μm, 每隔 120 μm 取切片 5 张, 共取 5 个切面。干燥后保存于 -20 °C 冰箱。免疫荧光染色: 室温下放置冰冻切片 30 min, 滴加事先准备好的兔抗小鼠抗体工作液(1:200), 以标记绿色 FITC 的 β-tubulin 抗体显示微管, 以红色 TRITC 标记的 Cdc42 抗体显示小 G 蛋白, 37 °C 孵育 1 h, PBS 中洗 3 次, 封片后在荧光显微镜高倍镜下(放大倍数 400 倍)观察海马组织神经元的荧光显微图像并照相。

4.4 海马神经元 β-tubulin、β-actin、neurofilament 蛋白表达检测 采用 Western Blot 法。完成 Morris 水迷宫测试后, 每组选取 5 只小鼠, 脱颈处死, 立即剥取海马组织, 每只小鼠海马组织按 40 mg/mL 加入裂解液匀浆, 按 5 μL/mL 加入蛋白酶抑制剂冰上匀浆。4 °C 匀浆后悬浊液静置 90 min, 4 °C、1 000 ×g 低速离心 15 min。吸取上清液, 采用 BCA 进行蛋白定量。将定量后样品按每孔 60 μg 上样, 常规方法进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离并电转至 PVDF 膜。兔抗小鼠一抗孵育, 二抗以 HRP 标记羊抗兔 IgG 多克隆抗体。化学发光底物显色, 凝胶成像仪采集显色后图像。图像经灰度分析并统计学处理。

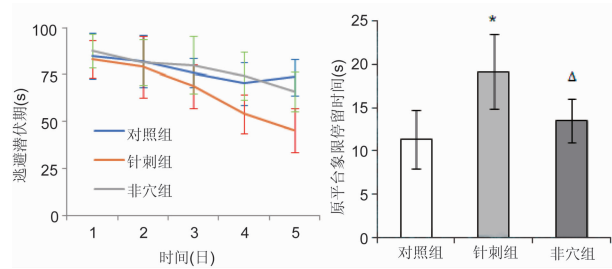
5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件, 数据均行正态分布和方差齐性检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。Morris 水迷宫数据采用重复测量数据的双因素方差分析方法进行统计学分析, 组间多重比较采用 LSD-t 检验(方差齐时)/Dunnett's T3 法(方差不齐时)。Western Blot 数据组间比较采用 t 检验进行统计学分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组逃避潜伏期及原平台象限停留时间比较 (图 1) 双因素方差分析组间因素统计结果显示, 各组小鼠 5 天逃避潜伏期差异有统计学意义($F = 8.61$, $P = 0.0048$); 针刺组逃避潜伏期由 (83.27 ± 9.87) s 降至 (45.34 ± 11.65) s, 对照组由 (85.18 ± 12.27) s

降至 (73.56 ± 9.74) s, 非穴组逃避潜伏期从 (87.76 ± 9.11) s 降至 (65.91 ± 10.51) s。针刺组与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 针刺组与非穴组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 非穴组与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组和非穴组比较, 针刺组第 3 天开始逃避潜伏期降低 ($t = 4.067$, $t = 3.646$, $P < 0.01$)。时间因素统计结果显示, 5 天中小鼠每天逃避潜伏期差异有统计学意义 ($F = 6.119$, $P = 0.016$)。

针刺组的原平台象限停留时间 [(19.14 ± 4.32) s] 明显高于对照组 [(11.38 ± 3.35) s, $t = 6.38$, $P < 0.01$] 和非穴组 [(13.51 ± 2.46) s, $t = 5.205$, $P < 0.01$]。



注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与针刺组比较, $^{\Delta}P < 0.01$; $n = 20$

图 1 各组逃避潜伏期及原平台象限停留时间比较

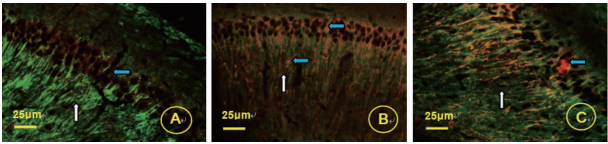
2 各组脂筏蛋白组学检测结果 (表 1、2) 从对照组海马脂筏中 449 种蛋白中, 鉴定出脂筏蛋白 319 种; 针刺组 570 种蛋白中, 鉴定出脂筏蛋白 361 种; 非穴组 455 种蛋白中, 鉴定出脂筏蛋白 301 种。

与对照组比较, 针刺组有 158 种脂筏蛋白为特有, 主要包括结合蛋白和跨膜细胞信号转导相关蛋白, 还有催化活性的酶、细胞骨架相关蛋白和转运蛋白等。其中包括细胞骨架相关蛋白 10 种, 小 G 蛋白 11 种,

离子通道蛋白 14 种, G 蛋白 8 种, 跨膜信号受体 8 种, 激酶 9 种。与对照组比较, 非穴组有 113 种脂筏蛋白为特有。细胞骨架相关蛋白 1 种, 小 G 蛋白 2 种, 离子通道蛋白 9 种, G 蛋白 8 种, 跨膜信号受体 3 种, 激酶 1 种。

表 1 针刺和非穴组脂筏特异蛋白						
组别	<i>n</i>	细胞骨架 相关蛋白	小 G 蛋白	离子通道 蛋白	G 蛋白	跨膜信号 受体
针刺	10	10	11	14	8	8
非穴	10	1	2	9	8	3

3 各组海马神经元微管与小 G 蛋白免疫荧光共定位结果比较 (图 2) 对照组 Cdc42 主要定位于细胞核周位置, 在 β -tubulin 富集的轴突位置极少出现; 非穴组 Cdc42 散见于细胞核周以及轴突, 在 β -tubulin 富集的轴突区呈稀疏零散分布, 两者间缺乏规律和完整性; 针刺组 Cdc42 在细胞核周围以及轴突位置大量均匀分布, 且随 β -tubulin 富集的轴突规律延伸至远端, 两种蛋白的共定位关系高度提示骨架重组过程的活化。



注: A 为对照组; B 为针刺组; C 为非穴组; 蓝色箭头指示红色 TRITC 标记的 Cdc42; 白色箭头指示绿色 FITC 标记的 β -tubulin; $n = 5$

图 2 各组小鼠海马神经元微管与小 G 蛋白免疫荧光共定位结果 (免疫荧光染色, $\times 400$)

4 各组小鼠海马神经元 β -tubulin、 β -actin、neurofibrillary 蛋白表达比较 (图 3) 各组 β -tubulin、 β -actin、neurofibrillary 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 针刺组脂筏特异细胞骨架蛋白和小 G 蛋白			
细胞骨架蛋白		小 G 蛋白	
蛋白名称	蛋白描述	蛋白名称	蛋白描述
Epb4.9	Epb4.9 Dematin	Cdc42	Cell division control protein 42 homolog precursor
Dync111	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain	Ralb	Ras-related protein Ral-B precursor
Actc1	Actin, alpha cardiac muscle 1	Srgap3	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 3
ADD3	Gamma-adducin	Diras1	GTP-binding protein Di-Ras1
pfn2	Profilin-2	Mras	Ras-related protein M-Ras precursor
MBP	Myelin basic protein	Gnb5	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 5
NEFH	Neurofilament heavy polypeptide	Arhgap33	TC10/CDC42 GTPase-activating protein
Eml5	Echinoderm microtubule-associated protein-like 5-like	Rapgef2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2
KIF5A	hypothetical Kinesin motor domain containing protein	GRB2	SH3-containing GRB2-like protein 2
MAPRE3	Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	Gnb4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 4
		RhoC	Rho-related GTP-binding protein RhoC

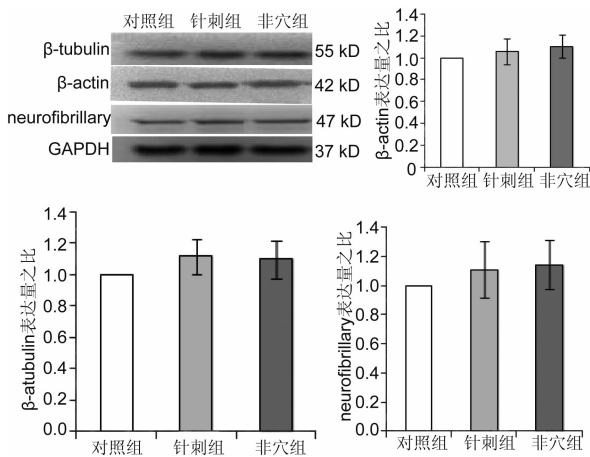


图3 各组海马神经元 β -tubulin、 β -actin、neurofibrillary 表达比较 ($n=5$)

讨 论

认知障碍是 AD 最突出的表现,基础研究发现,尽管发病机理复杂, $A\beta$ 、Tau 的过度磷酸化、氧化应激等毒性损伤最终造成神经突触功能异常和结构的退化丢失是导致 AD 认知改变的直接原因^[9]。神经细胞骨架的异常改变和小 G 蛋白 Rho 家族在此过程中起到了关键作用^[10]。

由微管、微丝和中间丝组成的纤维网络被称为细胞骨架。细胞骨架具有维持细胞的形态结构,稳定细胞器位置,构成细胞动力系统,运输生物大分子和营养物质,参与细胞分裂迁移等重要作用^[11]。细胞骨架不是固定不变的,其聚散受到小 G 蛋白 Rho 家族的调节^[10]。在形成突触联系的神经末梢,由于细胞内外不同信号的综合作用,突触和树突棘内的骨架处于不断地组装和去组装过程,这种动态改变是形成突触功能可塑性的关键^[12]。

干预 Rho 信号途径不同靶点治疗 AD 的药物研发是目前重要的研究方向^[13]。有报道论述了中药有效成分对不同细胞骨架功能的调节作用^[14],但针刺对细胞骨架的影响鲜有报道。本研究基于前期细胞骨架可能是针刺作用靶点的结论^[4],通过观察针刺作用下,海马脂筏蛋白中募集的细胞骨架相关蛋白的差异表达,以及针刺敏感细胞骨架相关蛋白的细胞共定位和定量分析,探讨针刺作用的关键靶点。

Morris 隐蔽平台实验和空间探索实验结果提示,针刺明显缩短了 SAMP8 的逃避潜伏期时间,增加了在原平台象限停留时间,再次从行为学角度验证了三焦针法提高 SAMP8 小鼠海马相关的学习和记忆能力的有效性。

脂筏作为信号转导、跨膜物质转运、蛋白质相互作

用的平台,提供了一个观察细胞内生化过程的窗口^[15]。在对海马组织脂筏募集蛋白质组的注释和功能分析中,笔者发现与对照组比较,针刺组募集的细胞骨架和信号蛋白总计 21 种,而非穴组仅有 3 种,针刺组呈现“细胞骨架相关蛋白”(微管组装相关蛋白以及动力蛋白 microtubule-associated protein RP/EB family member 3、Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain、hypothetical Kinesin motor domain containing protein)和“小 G 蛋白”(Ras、Rho 家族)同步增多的模式。上述结果提示针刺可能活化了细胞骨架重组所需的相关蛋白。

其中 MAP 调节微管装配过程,对于诱导和促进微管蛋白亚基聚合、延长、成束、稳定微管发挥重要作用^[16]。dynein、kinesin 分别为驱动蛋白和动力蛋白,与微管结合而起运输神经递质、线粒体和各种生物大分子的作用;Profilin-2 对于维持调节肌动蛋白的聚合解聚是必需的。还可与多种配体,如聚脯氨酸蛋白、磷脂酰肌醇等相互作用,联系信号转导与骨架蛋白反应^[17]。

在增多的小 G 蛋白中,Cdc42 (cell division control protein 42 homolog precursor)是具有针刺特异性的敏感蛋白之一。小 G 蛋白是一类分子量只有 20~30 kD,且具有 GTP 酶活性的超家族。按同源性的程度又分为 Ras、Rho、Arf、Sar、Ran、Rab 等家族,参与有丝分裂、基因表达、离子通道调节、细胞骨架重组、囊泡运输等重要生理过程。已知微管蛋白 β 亚基本身就是一种小 G 蛋白,被微管组装刺激信号激活后与 α 亚基按比例结合形成微管。小 G 蛋白 Rho 家族代表成员有 RhoA、Rac1 和 Cdc42。Rho GTPases 在神经元形态发生和极化事件发挥重要作用,包括细胞分裂、迁移、轴突萌芽、伸长以及突触再生和可塑性^[18]。研究发现 IGF-1 可以活化 PI3K、Cdc42, Cdc42 通过和 par3-par6-apkc (极性复合体)相互作用活化 Rac,并引导极性复合体定位于生长锥。这种调节系统的主要下游效应器是细胞骨架的重要组成部分——微管(tubulin),从而在新轴突生长锥的突出、充盈和推进中起重要作用^[19]。Cdc42 基因敲除缺失强烈抑制了在体和细胞培养中轴突的形成,并且 cofilin 在这一过程中是一个重要的下游效应器^[20]。Cdc42 突变会导致树突突细缺失、空间分支减少、树突棘数量大幅下降多方面改变^[21]。

通过微管与 Cdc42 共定位分析发现,SAMP8 对照组中 Cdc42 主要在细胞核富集,轴突区看不到明显的 Cdc42 分布,显示出处于未活化状态,而针刺组

Cdc42 从细胞核周移位到 β -tubulin 组装为微管的轴突远端。针刺组 Cdc42 和 β -tubulin 高度富集于轴突部位。Cdc42 与 β -tubulin 共定位于轴突是细胞骨架重组活化的标志,这些结果为针刺促进细胞骨架重组的活化提供了证据。

Tubulin、actin、neurofibrillary 三种骨架蛋白为“细胞管家基因”调控,发挥着维持细胞形态、有丝分裂和营养运输的基本功能,其表达基本保持稳定的组成性表达模式。在针刺对三种细胞骨架蛋白表达水平的研究中,试图探讨针刺是否改变了细胞骨架蛋白表达量。结果发现,三种细胞骨架蛋白的表达水平未显示组间差异。该结果提示,三焦针法改善认知的疗效与细胞骨架蛋白表达量的改变无直接关系。

从突触可塑性角度研究针刺治疗 AD 机制是当今一个重要方向。目前研究多集中在针刺对突触超微结构、传递效能、可塑性相关受体及蛋白等方面^[22]。本次实验结果提示,三焦针法可促进 SAMP8 小鼠海马神经元细胞骨架重组相关蛋白,但不影响细胞骨架蛋白的表达。有文章论述了细胞骨架重组相关蛋白异常(Cdc42/RAC-PAKs-LIMK/cofilin)造成 AD 突触和树突棘的病理改变,通过影响突触可塑性与 AD 发病密切相关^[23]。因此,三焦针法可能有效调动了细胞骨架修复重组所需要的“信号转导、底物募集和组装辅助”系统,从而对海马突触可塑性损伤起到良性调节和保护作用,达到改善认知障碍的作用。本研究为针刺治疗 AD 提供了一定的实验证据,而神经元细胞骨架可能是临床针刺治疗 AD 的关键靶点。

利益冲突: 笔者同其他任何人或组织不存在经济和个人关系,该论文不涉及任何性质或类型利益冲突。

参 考 文 献

- [1] McDade E, Bateman RJ. Stop Alzheimer's before it starts[J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 153-155.
- [2] 运会喜. 阿尔茨海默病治疗药物研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(24): 6269-6272.
- [3] 贾玉洁, 孟丹, 孙梦鹿, 等. 三焦针法治疗轻中度阿尔茨海默病的随机对照临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2017, 22(9): 1911-1914.
- [4] 刘涛, 张雪竹, 韩景献, 等. 以生物信息学工具探讨“三焦”针法治疗老年性痴呆的细胞生物学机制[J]. *针刺研究*, 2019, 44(6): 424-429.
- [5] 王鹏, 安思训, 温玉新, 等. 微管蛋白和微管作用物质研究及其在神经退行性疾病中的机制探讨[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(51): 8353-8357.
- [6] 李忠仁主编. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 327-329.
- [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] Xu G, Li ZJ, Wang LL, et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially expressed proteins in high risk childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *J Proteomics*, 2017, 150: 1-8.
- [9] Lista S, Hampel H. Synaptic degeneration and neurogranin in the pathophysiology of Alzheimer's disease[J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17: 47-57.
- [10] Bolognin S, Lorenzetto E, Diana G, et al. The potential role of rho GTPases in Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50(2): 406-422.
- [11] 林抒豪, 石玉秀, 韩芳. 细胞凋亡与真核细胞骨架蛋白相关性的研究进展[J]. *解剖科学进展*, 2015, 21(2): 207-210.
- [12] 林丹枫, 赵东岳. LIMK1/Cofilin 信号通路阿尔茨海默病[J]. *中国细胞生物学报*, 2018, 40(12): 2077-2082.
- [13] Aguilar BJ, Zhu Y, Lu Q. Rho GTPases as therapeutic targets in Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2017, (9): 97.
- [14] 胡洋, 张媛媛, 李芳, 等. 中药有效成分调节细胞骨架功能的研究进展[J]. *药学研究*, 2018, 37(4): 187-139.
- [15] 张红梅, 李昱. 脂筏在阿尔茨海默病发病机制中的作用[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(4): 308-310.
- [16] 王永生, 朱虹. 神经细胞骨架在神经细胞迁移中作用的研究进展[J]. *东南国防医药*, 2018, 20(1): 54-56.
- [17] 程晋芳, 倪国华, 胡长平, 等. Profilin-I 与心血管疾病[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(5): 564-566.
- [18] Chen C, Wirth A, Ponimaskin E. Cdc42: an important regulator of neuronal morphology[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(3): 447-451.
- [19] Gonzalez-Billault C, Muñoz-Llanca P, Henriquez DR. The role of small gtpases in neuronal morphogenesis and polarity[J]. *Cytoskeleton(Hoboken)*, 2012, 69(7): 464-485.
- [20] Garvalov BK, Flynn KC, Neukirchen D, et al. Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(48): 13117-13129.
- [21] Scott EK, Reuter JE, Luo L. Small GTPase Cdc42 is required for multiple aspects of dendritic morphogenesis[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(8): 3118-3123.
- [22] 孙忠人, 吕晓琳, 尹洪娜, 等. 针刺调节脑可塑性的机制研究进展[J]. *针刺研究*, 2018, 43(10): 674-677.
- [23] 邵媛, 梁涛, 徐祖才, 等. p21 活化激酶参与神经系统疾病的研究进展[J]. *医学综述*, 2019, 25(3): 434-438.

(收稿: 2019-04-24 在线: 2019-11-21)

责任编辑: 赵芳芳