

# 电针“百会”“神庭”穴对血管性认知障碍大鼠海马泛素化修饰蛋白质组学的影响\*

曹娅军<sup>1</sup> 王思诺<sup>1</sup> 余燕<sup>1</sup> 丁妍怡<sup>1</sup> 戴雅玲<sup>1</sup> 杨敏光<sup>2</sup> 柳维林<sup>2,3</sup>

## 摘要

**目的:**探讨电针“百会”“神庭”穴对血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI)大鼠空间学习记忆和海马组织泛素化修饰蛋白质组学的影响。

**方法:**18只健康雄性Sprague-Dawley大鼠随机取12只结扎双侧颈总动脉制备VCI模型,6只进行假手术不结扎。术后第15天造模大鼠随机分为模型组(n=6)和电针组(n=6)。电针组电针百会、神庭穴4周。干预后用Morris水迷宫检测大鼠的空间学习记忆能力;通过泛素化修饰定量蛋白质组学鉴定泛素化蛋白质并进行生物信息学分析。

**结果:**水迷宫结果显示,模型组相比于假手术组逃避潜伏期延长( $P<0.01$ ),目标象限停留时间缩短( $P<0.01$ ),穿越平台次数减少( $P<0.01$ );电针组相比于模型组逃避潜伏期缩短( $P<0.01$ ),目标象限停留时间延长( $P<0.05$ ),穿越平台次数增加( $P<0.05$ )。泛素化修饰蛋白质组学结果显示,模型组相比于假手术组有53种蛋白质上55个位点的泛素化水平上调,14种蛋白质上15个位点的泛素化水平下调(差异倍数 $>1.5$ , $P<0.05$ );电针组相比于模型组有7种蛋白质上7个位点的泛素化水平上调,43种蛋白质上46个位点的泛素化水平下调(差异倍数 $>1.5$ , $P<0.05$ )。其中Syt11、Usp5、CaMKIIa等8种蛋白质上8个位点的泛素化修饰水平在两个比较组中均存在差异。GO分析结果显示,两比较组中差异泛素化蛋白质多与细胞进程和生物调节过程有关,具有结合和催化活性等功能。KEGG通路富集结果显示,模型组与假手术相比,泛素化蛋白质主要富集于胞吞作用通路等17个信号通路;电针组与模型组相比,泛素化蛋白质主要富集于胆碱能突触通路等3个信号通路。

**结论:**电针“百会”“神庭”穴对VCI空间学习记忆的改善作用可能与海马中突触相关蛋白的泛素化修饰调控有关。

**关键词** 血管性认知障碍;电针;泛素化;蛋白质组学

**中图分类号:**R493;R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-08-1025-010

Effects of electroacupuncture Baihui and Shenting acupoints on proteomics of hippocampal ubiquitination in rats with vascular cognitive impairment/CAO Yajun, WANG Sinuo, YU Yan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(8):1025—1034

## Abstract

**Objective:** To investigate effects of electroacupuncture (EA) at Baihui (GV20) and Shenting (GV24) acupoints on spatial learning and memory and the proteomics of hippocampal tissue in rats with vascular cognitive impairment (VCI).

**Method:** A total of 18 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 12 rats with bilateral common carotid artery ligation to establish VCI model, and 6 rats underwent sham operation without ligation. On the 15th day after operation, the rats were randomly divided into model group (n=6) and EA group (n=6). The EA group received EA at Baihui and Shenting acupoints for 4 weeks. Morris water maze was used to test the spatial learning and memory ability of rats after intervention. The ubiquitinated proteins were identified by quantitative proteomics and bioinformatics analysis was performed.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.08.001

\*基金项目:国家自然科学基金项目(82174478)

1 福建中医药大学康复医学院,福建省福州市,350122; 2 福建中医药大学康复产业研究院; 3 通讯作者  
第一作者简介:曹娅军,女,硕士研究生; 收稿日期:2022-08-14

**Result:** Compared with the sham operation group, the water maze showed that the model group had longer escape latency ( $P<0.01$ ), shorter target quadrant residence time ( $P<0.01$ ), and less frequency of crossing the platform ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the EA group had shorter escape latency ( $P<0.01$ ), longer target quadrant residence time ( $P<0.05$ ), and more times of crossing the platform ( $P<0.05$ ). The ubiquitination modified proteomics showed that the ubiquitination levels of 55 sites on 53 proteins were up-regulated and 15 sites on 14 proteins were down-regulated in the model group compared with the sham group (fold change  $>1.5, P<0.05$ ). Compared with the model group, the ubiquitination level of 7 sites on 7 proteins was up-regulated, and the ubiquitination level of 46 sites on 43 proteins was down-regulated in the EA group (fold change  $>1.5, P<0.05$ ). The ubiquitination modification levels of 8 sites on 8 proteins, including Syt11, Usp5 and CaMKIIa, were different between the two comparison groups. GO analysis results showed that the difference of ubiquitinated proteins between the two groups were mostly related to cell processes and biological regulatory processes, with functions including binding and catalytic activities. KEGG pathway enrichment results showed that the ubiquitinated proteins in the EA group were mainly enriched in 17 signal pathway compared with sham operation group, and were enriched in three signaling pathways compared with the model group.

**Conclusion:** The improvement effect of EA at Baihui and Shenting acupoints on VCI spatial learning and memory may be related to the regulation of ubiquitination of synaptic related proteins in hippocampus.

**Author's address** College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian Province, 350122

**Key word** vascular cognitive impairment; electroacupuncture; ubiquitination; proteomics

血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是指由脑血管疾病及其危险因素引起的一类综合征, 包括从轻度认知障碍到由缺血性或出血性脑卒中引起的血管性痴呆<sup>[1]</sup>。VCI 的患病率极高, 约占所有痴呆症病例的 20%—40%<sup>[2]</sup>, 成为导致老年人生存质量下降的重要原因之一。早期诊断并积极采取有效治疗策略, 可预防和延缓 VCI 的发生, 甚至可以在进展为血管性痴呆之前逆转认知障碍<sup>[3]</sup>。

泛素化修饰是一种重要的蛋白质翻译后修饰, 广泛参与细胞内转运、代谢调节、蛋白质稳态的维持等过程<sup>[4]</sup>。泛素-蛋白酶降解体系作为泛素化底物蛋白的下游信号, 介导真核生物体内 80%—85% 的蛋白质降解<sup>[5]</sup>。蛋白质的合成与降解对突触重塑至关重要<sup>[6]</sup>, 慢性脑灌注不足的情况下, 蛋白质降解体系的过度激活会加重神经元的损伤并破坏认知功能。VCI 模型小鼠中, 内皮细胞过表达 E3 泛素连接酶加重了血脑屏障的高通透性, 同时加快了其认知功能的下降<sup>[7]</sup>。双侧颈总动脉闭塞大鼠的空间记忆障碍与泛素化的异常有关<sup>[8]</sup>。因此, 对泛素化修饰的调控可能是治疗 VCI 的一个重要靶点。

电针是一种将传统针刺与现代电刺激疗法相结合的治疗方法, 被证明对中枢神经系统具有神经保

护作用<sup>[9-11]</sup>。系统评价和 Meta 分析显示电针可显著改善 VCI 患者的整体认知功能和日常生活活动能力<sup>[12-13]</sup>。电针治疗 8 周后 VCI 患者的认知评分明显提高<sup>[14-15]</sup>, 认知功能得到极大改善。电针干预后 VCI 模型大鼠的学习记忆能力增强, 其机制可能是通过增加海马葡萄糖代谢<sup>[16]</sup>, 抑制氧化应激和炎症<sup>[17]</sup>, 增加突触相关蛋白表达<sup>[18]</sup>等途径促进突触可塑性的恢复, 但电针是否通过调控泛素化修饰提高突触可塑性改善 VCI 的认知功能, 目前尚未清楚。本研究采用基于液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 技术的无标记 (Label-free) 定量蛋白质组学分析方法进一步探讨电针百会、神庭穴对 VCI 模型大鼠认知行为及海马组织泛素化修饰的影响, 为电针治疗 VCI 的临床运用提供修饰组学证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:** 体质量 (250±10) g 的 SPF 级健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 饲养于福建中医药大学动物实验中心 [许可证号: SYXK(闽)2020-0002], 饲养环境温度、湿度适宜, 昼明夜暗循环, 食水供给充足。适应

性饲养1周后编号并开始实验。本次实验方案经福建中医药大学实验动物管理委员会批准并严格按照实验动物伦理规章的相关规定执行。

**1.1.2 试剂与主要仪器:**胰蛋白酶(Promega)、甲酸(Fluka)、乙腈(Thermo Fisher Scientific)、碘乙酰胺IAM(Sigma-Aldrich)、尿素(Sigma-Aldrich)、二硫苏糖醇 DTT(Sigma-Aldrich)、三氟乙酸 TFA(Sigma-Aldrich)、四乙基溴化铵 TEAB(Sigma-Aldrich)、去泛素化酶抑制剂(Selleck Chemicals)、BCA试剂盒(碧云天)、戊巴比妥钠(SIGMA公司)、动物用青霉素钠(山东鲁抗医药股份有限公司)、华佗牌电针仪及无菌针灸针(苏州医疗用品厂有限公司)、Morris水迷宫(上海欣软信息科技有限公司)

## 1.2 方法

**1.2.1 模型制备与分组:**参照Pan等<sup>[9]</sup>的方法,建立双侧颈总动脉闭塞(bilateral common carotid artery occlusion, 2VO)模型研究慢性脑低灌注引起的认知功能障碍。18只Sprague-Dawley大鼠按随机数字表法分为假手术组(n=6)和2VO组(n=12)。大鼠术前禁食不禁水12h,称重后腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.2ml/100g),大鼠仰卧固定于手术台上,颈部剃毛后75%的酒精消毒。沿大鼠颈部正中剪1.5—2cm的纵形切口,钝性分离皮下肌肉组织直至暴露颈总动脉,医用真丝缝线(4—0)结扎颈总动脉,用同样的方法分离并结扎另一侧颈总动脉。医用棉球擦拭伤口,缝合。假手术组仅分离两侧颈总动脉不做结扎。腹腔注射动物用青霉素钠溶液,置于装有木屑的托盘中待其自然苏醒。术后第15天<sup>[20]</sup>按随机数字表法将2VO组分为模型组(n=6)和电针组(n=6)。

**1.2.2 干预方法:**电针组采用电针“百会”“神庭”穴干预,参照Wang等<sup>[21]</sup>的取穴方法,百会:头顶正中,两耳尖连线与前后正中线的交点;神庭:前正中线上,额顶骨缝交界线前方。大鼠固定后,将直径0.3mm,长13mm的一次性无菌针灸针以45°角插入百会、神庭穴,深度2mm左右。电针参数设置:疏密波,频率4/20Hz,电流强度1—3mA,在大鼠耐受范围内针体轻轻抖动为宜。电针组于术后第15天开始干预,时间段为每日14—16时,1次/d,30min/次,每周5天,持续4周。其余两组大鼠每次固定相同时

长但无针刺。

**1.2.3 Morris水迷宫测试:**参考Wei等<sup>[25]</sup>的方案,向直径150cm,高55cm黑色圆形水池中注入26°C左右的温水,水深30cm。水池平分为四个象限,设定第三象限为目标象限,将一直径为6cm的逃生平台置于该象限水面下2cm处。该实验持续5天,第1—4天为定向航行实验,每天进行4次,每次从不同象限将大鼠面向池壁放入水中,记录其在60s内的逃避潜伏期及目标象限停留时间。第5天进行空间探索测试,移走逃生平台,将大鼠从第一象限面向池壁放入水中,记录其在60s内穿越平台所在区域的次数。该实验于术后第43—47天进行,测试时间段为9—12时。

**1.2.4 蛋白提取与胰酶酶解:**术后第48天,各组大鼠异氟烷麻醉后取海马组织,每组3个样品用于提蛋白。将样品从-80°C取出,称取等量加入缓冲液(8M尿素、1% Triton X-100、10mM DTT、50μM去泛素酶抑制剂和1%蛋白酶抑制剂)。4°C,20000g,离心10min去除碎片。用预冷的20% TCA在4°C沉淀2h。4°C,12000g,离心3min去除上清液。用预冷的丙酮洗涤沉淀3次。将蛋白质重新溶解于缓冲液(100 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>、8M尿素、pH 8.0)中,用BCA试剂盒分析蛋白质溶液的浓度。向蛋白样品中加入5mM DTT,56°C还原30min。然后加入11mM IAM,室温避光烷基化15min。最后加入200mM TEAB稀释,并以1:50质量比(胰蛋白酶:蛋白质,m/m)加入胰蛋白酶,37°C下酶解12h。

**1.2.5 泛素化修饰富集:**将溶解在IP溶液(100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.5% NP-40, pH 8.0)中的胰蛋白酶样品加入预洗过的泛素化树脂(抗体树脂货号PTM-1104)中,4°C下孵育12h。IP缓冲溶液洗涤树脂4次,ddH<sub>2</sub>O洗涤2次,最后使用0.1% TFA洗脱液洗脱与树脂结合的肽段。肽段样品按照C18 ZipTips说明书进行纯化。

**1.2.6 液相色谱(LC)-串联质谱(MS/MS)联用分析:**将富集到的肽段用于LC-MS/MS分析。肽段先在流动相A(含0.1%甲酸和2%乙腈的水溶液)中溶解,然后在流动相B(0.1%甲酸和100%乙腈溶液)中以450nl/min速率在60min梯度上进行洗脱。梯度设置为:0—42min,7%—24%B;42—54min,24%—

32%B; 54—57min, 32%—80%B; 57—60min, 80%B。超高效液相系统对溶解后的肽段进行分离,然后进入离子源中电离,电离后采用质谱对肽段母离子和离子碎片进行分析。

**1.2.7 无标记定量:**基于质谱检测得到的总蛋白质组和泛素组的原始文件,采用Maxquant (v1.6.15.0)对具有泛素化修饰位点的肽段数据进行检索,检索数据库设置为 Rattus\_norvegicus\_10116\_PR\_20210721.fasta(29934条序列)。将谱图、蛋白质和位点鉴定的假阳性率(FDR)都设为0.01。每个肽的最大修饰数为5、最小长度为7个氨基酸残基。Cys上的烷基化为静态修饰, Met的氧化、Lys的泛素化为动态修饰,切割方式为胰蛋白酶,最大漏切位点为4。初次检索和主检索肽段母离子、碎片离子的质量误差容忍度都为20ppm。

**1.3 检测指标**

各组大鼠干预后 Morris 水迷宫测试逃避潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台次数;各组大鼠海马泛素化蛋白质和位点、泛素化蛋白质的GO功能分类和KEGG通路富集分析。

**1.4 统计学分析**

数据采用SPSS 22.0软件统计分析,以均数±标准差表示。数据符合正态分布且方差齐,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD法。P<0.05为差异有显著性意义。对质谱鉴定到的泛素化蛋白质和位点进行筛选,在三次重复样本中的相对定量值均值之比作为差异倍数。对相对定量值进行Log2对数转换,每个泛素化位点在比较组样本中的相对定量值进行t检验,P<0.05为差异具有显著性。本次实验以差异倍数>1.5且P<0.05为标准进行筛选,所得结果用于泛素化蛋白质的GO功能分类和KEGG通路富集分析。

**2 结果**

**2.1 Morris 水迷宫**

在第一到四天的定位航行实验中,三组大鼠的逃避潜伏期随着时间的延长而逐渐缩短。与假手术组相比,模型组大鼠逃避潜伏期延长(P<0.01);与模型组相比,电针组大鼠逃避潜伏期明显缩短(P<0.01),结果见表1。第五天的空间探索实验中,相比于假

手术组,模型组大鼠在目标象限的停留时间缩短(P<0.01)、穿越平台次数减少(P<0.01);相比于模型组,电针组大鼠在目标象限的停留时间延长(P<0.05)、穿越平台次数增加(P<0.05),结果见表2。

**2.2 质谱鉴定**

通过质谱分析共得到449079张谱图,与理论二级谱图匹配的有效谱图数为96131。通过谱图解析共鉴定到13111条肽段,其中泛素化肽段为7640条。根据泛素化肽段共鉴定到2645种蛋白质,其中2313个可定量;鉴定到7678个泛素化位点,其中6428个可定量,结果见图1。

表1 三组大鼠逃避潜伏期的比较 (x±s)

组别	例数	第一天	第二天	第三天	第四天
假手术组	6	42.59±3.63	30.20±7.17	18.89±4.71	10.64±3.01
模型组	6	55.83±4.03 <sup>①</sup>	42.86±5.36 <sup>①</sup>	32.46±4.89 <sup>①</sup>	20.82±3.61 <sup>①</sup>
电针组	6	42.77±7.53 <sup>①</sup>	32.39±2.06 <sup>①</sup>	22.40±3.56 <sup>①</sup>	12.57±4.22 <sup>①</sup>
F值		12.071	9.764	15.189	13.151
P值		0.001	0.002	<0.001	0.001

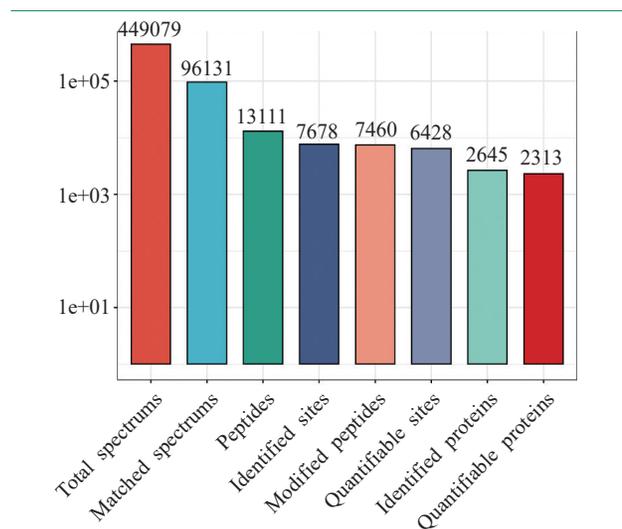
注:①P<0.01。

表2 三组大鼠目标象限停留时间和穿越平台次数的比较 (x±s)

组别	例数	目标象限停留时间(s)	穿越平台次数(次)
假手术组	6	32.98±5.31	5.83±1.47
模型组	6	20.99±4.10 <sup>①</sup>	2.33±1.03 <sup>①</sup>
电针组	6	28.09±5.70 <sup>②</sup>	4.17±1.47 <sup>②</sup>
F值		8.431	10.216
P值		0.004	0.002

注:与假手术相比,①P<0.01;与模型组相比,②P<0.05

图1 质谱数据结果统计图



### 2.3 质谱质量控制

基于数据库进行肽段长度的质控分析,结果显示大部分肽段长度分布在7—20个氨基酸,符合基于酶解和质谱碎裂方式的一般规律,说明质谱鉴定到的肽段长度的分布符合质控要求,结果见图2。

### 2.4 样本重复性检验

本次实验对3个生物学重复样本进行了3个技术重复,采用皮尔森相关性(Pearson's correlation coefficient, PCC)统计分析方法评估重复性。结果显示三组样本两两之间的皮尔森系数在0.937—1之间,表明数据相关性高,样本重复性好,见图3。

图2 肽段长度分布图

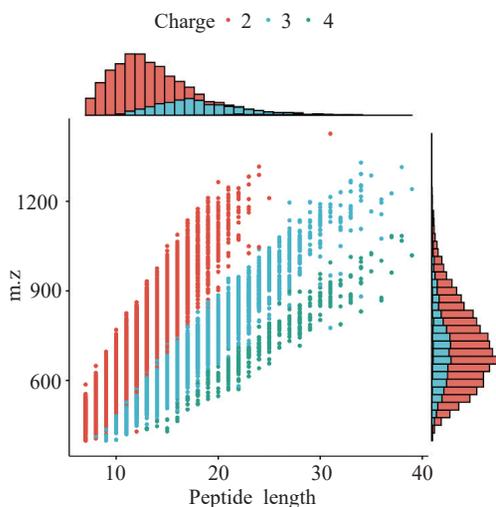
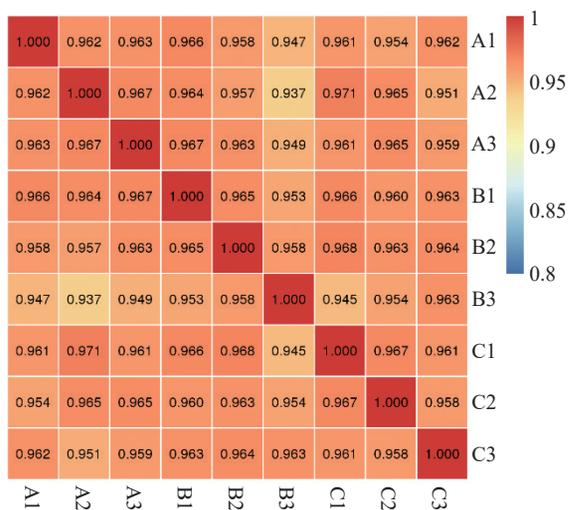


图3 重复样本间皮尔森相关性分析 heatmap



### 2.5 泛素化蛋白质组鉴定

使用LC-MS/MS蛋白组学技术分析和鉴定三组大鼠海马中泛素化蛋白质和位点。筛选标准为差异倍数(fold change, FC)>1.5且P<0.05。结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠海马有53种蛋白质上55个泛素化位点上调;14种蛋白质上15个泛素化位点下调,见图4。与模型组相比,电针组大鼠海马有7种蛋白质上7个泛素化位点上调,43种蛋白质46个泛素化位点下调,见图5。将两个比较中产生的差异泛素化蛋白质进行整合,结果显示8种蛋白质上8个位点的泛素化水平在两组比较中共同存在差异,见表3。

图4 模型组相比于假手术组海马差异泛素化位点火山图

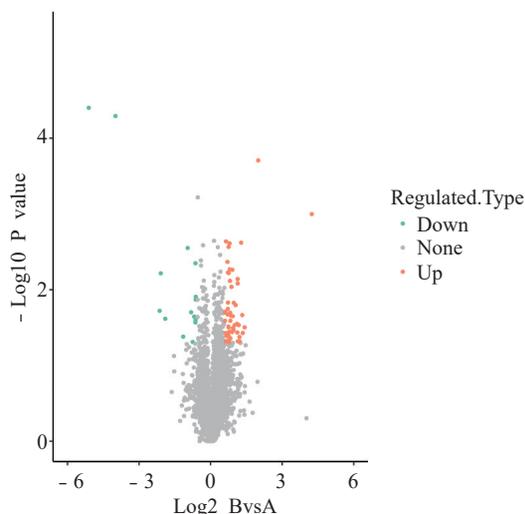


图5 电针组相比于模型组海马差异泛素化位点火山图

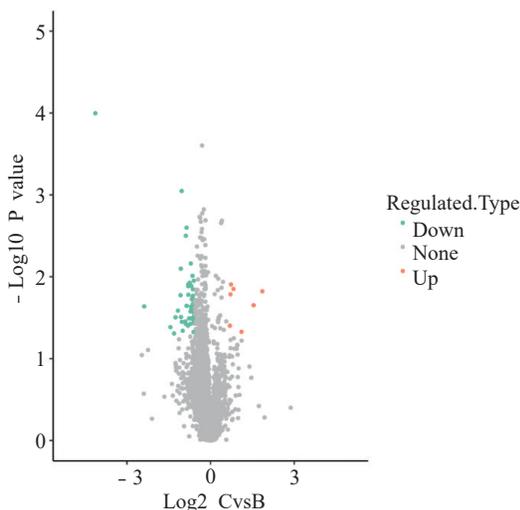


表3 两组比较中均差异泛素化位点对应的蛋白质

序号	泛素化位点	蛋白名称	比值 (B/A)	上调或下调	P值 (B/A)	比值 (C/B)	上调或下调	P值 (C/B)
1	K72	Syt11	18.898	上调	0.001	0.057	下调	0.000
2	K79	Tom112	1.907	上调	0.032	0.5	下调	0.046
3	K195	Actr2	1.88	上调	0.005	0.657	下调	0.036
4	K408	Acbd5	1.834	上调	0.009	0.643	下调	0.017
5	K170	Diras2	1.688	上调	0.003	0.659	下调	0.011
6	K112	Cfl1	1.684	上调	0.041	0.619	下调	0.013
7	K825	Usp5	1.521	上调	0.026	0.573	下调	0.013
8	K56	CaMKIIa	0.235	下调	0.006	2.911	上调	0.022

注: B/A, 模型组/假手术组; C/B, 电针组/模型组

### 2.6 泛素化蛋白质的功能分类

基于生物进程(biological process, BP), 细胞组成(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)对鉴定的泛素化蛋白进行GO功能分类。我们的研究表明, 模型组和假手术组、电针组和模型组两个比较组中, 泛素化水平存在差异的蛋白质主要涉及细胞进程(cellular process)、生物调节(biological regulation)等过程, 参与细胞(cell)及细胞内(intracellular)结构的组成, 具有结合(binding)活性和催化活性(catalytic activity)等分子功能。见图6—7。

### 2.7 泛素化蛋白质的KEGG通路富集分析

对模型组与假手术组, 电针组与模型组的比较中产生的差异泛素化蛋白质进行KEGG通路富集分析, 观察差异泛素化蛋白质在某些通路的富集趋势。结果显示, 与假手术组相比, 模型组海马差异泛素化蛋白质主要富集于17条KEGG信号通路, 主要包括胞吞作用(endocytosis)通路、帕金森病(Parkinson disease)通路、坏死性凋亡(necroptosis)通路、钙信号通路(calcium signaling pathway)等, 见图8。与模型组相比, 电针组海马差异泛素化蛋白质主要富集于帕金森病通路、胆碱能突触(cholinergic synapse)、上皮细胞受细菌侵袭(bacterial invasion of epithelial cells)通路等3条信号通路, 见图9。

## 3 讨论

VCI由大脑供血减少引起, 导致海马等重要脑区的结构和功能受损, 并表现为认知障碍<sup>[22]</sup>。在中医理论体系中, VCI属于“呆证”“善忘”“神志病”范畴<sup>[23]</sup>。VCI病因在脑, 督脉行于人体背部正中, 是唯一直接进入大脑的经络, 其通过调节、储存阳气, 维

图6 模型组相比于假手术组海马组织中差异泛素化蛋白质在GO分类中的统计分布图

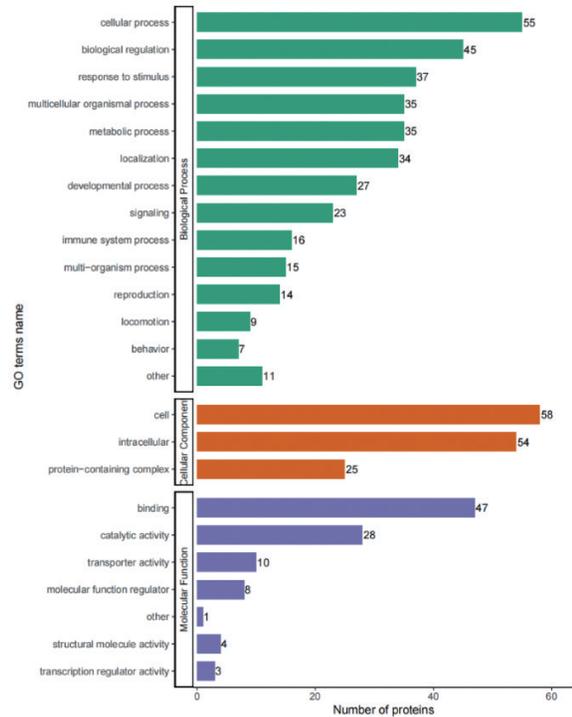
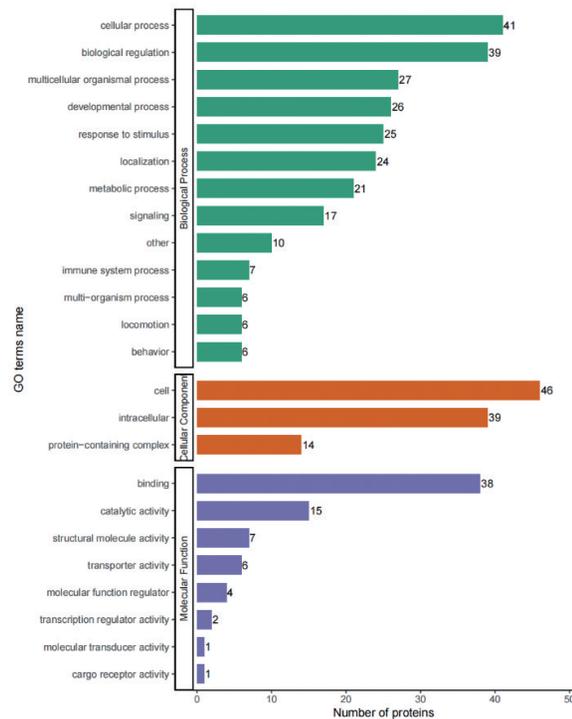


图7 电针组相比于模型组海马中差异泛素化蛋白质在GO分类中的统计分布图



持人体脏腑器官的正常功能活动<sup>[24]</sup>。本研究所选用的百会、神庭穴是督脉上的两个重要穴位,具有提神醒脑、理气活络的作用<sup>[25]</sup>。百会穴位于头顶正中,所有阳经交汇于此;神庭穴位于头部前正中线上,是督脉通络之处<sup>[26]</sup>。多项研究报告,百会穴和神庭穴是治疗认知障碍使用频率最高的穴位组合<sup>[27-29]</sup>。结合百会穴和神庭穴的刺激可以加强督脉协调阴阳平衡、调节脏腑的功能<sup>[30]</sup>。头皮电针百会、四神聪、风池、神庭穴治疗8周后,MCI患者的MMSE和时钟绘图测试的得分明显提高<sup>[15]</sup>。电针百会、大椎、水沟、神庭等穴,每天治疗20min,20天后VCI大鼠海马血管内皮生长因子的表达上调,在跳台实验中反复跳下平台的错误次数减少,学习记忆增强<sup>[31]</sup>。前期研究发现电针百会、神庭穴可激活海马、前额叶等认知相关脑区,提升了VCI大鼠在Y迷宫测试中的自发交替率<sup>[32]</sup>。本研究显示,电针百会、神庭穴4周后缩短了VCI大鼠在水迷宫测试中的逃避潜伏期,增加了其在目标象限的探索时间和穿越平台次数,空间记忆显著增强。

泛素化修饰是一种调节神经发育、突触可塑性、学习和记忆的蛋白质翻译后修饰<sup>[33-34]</sup>,与神经退行性疾病的发展有关<sup>[35]</sup>。Abreha等<sup>[36]</sup>在AD患者脑中发现与细胞骨架相关蛋白的泛素化水平增加,揭示了泛素化修饰可能通过改变细胞骨架结构和完整性来影响认知功能。海马是与记忆相关的重要脑区,海马中蛋白质降解失调与空间记忆受损有关<sup>[37]</sup>。Briz等<sup>[38]</sup>表明海马CA3区I型代谢型谷氨酸受体依赖性长时程抑制的产生与泛素化和蛋白酶体介导的GluA1降解有关。但是电针是否是通过调控海马泛素化修饰改善空间记忆功能目前尚未清楚。本研究进一步通过泛素化肽段富集、高分辨率质谱等技术对三组大鼠的海

马组织进行泛素化修饰定量组学分析。经检验,本次实验所使用样本的重复性及肽段长度分布符合质控要求。共鉴定到7640条泛素化肽段,对应2645种蛋白质和7678个泛素化位点,其中2313种蛋白质上6428个泛素化位点可用于定量分析。将搜库结果按差异倍数大于1.5倍, $P < 0.05$ 为标准筛选各组间差异显著的泛素化修饰蛋白和位点,结果显示,相比于假手术组,VCI模型大鼠海马中共有53种蛋白质上55个泛素化位点上调;14种蛋白质上15个泛素化位点下调。相比于模型组,电针组共有7种蛋白质上7个泛素化位点上调,43种蛋白质46个泛素化

图8 模型组相比于假手术组海马差异泛素化蛋白质KEGG通路富集分布气泡图

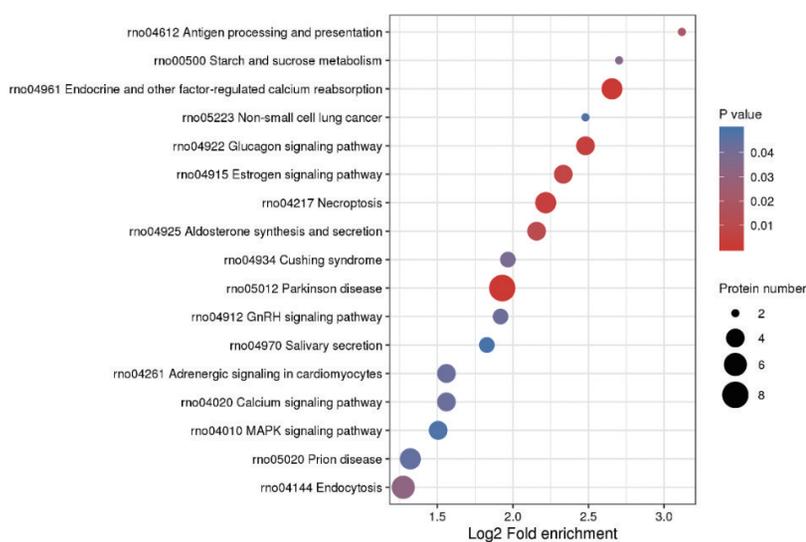
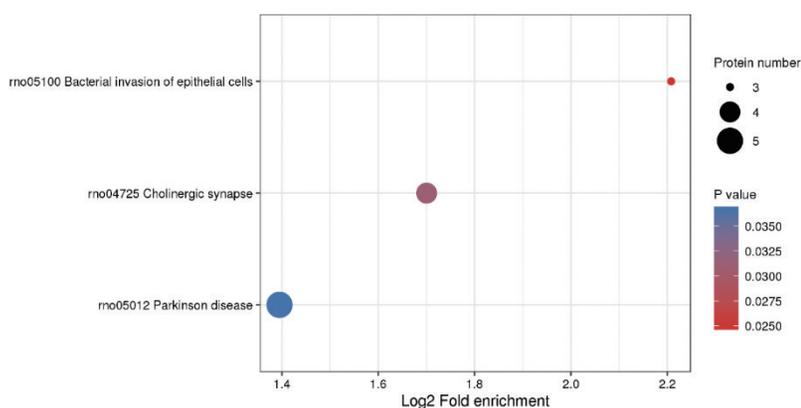


图9 电针组相比于模型组海马差异泛素化蛋白质KEGG通路富集分布气泡图



位点下调。我们的结果表明VCI大鼠海马蛋白质泛素化水平整体上升,而电针百会、神庭穴可逆转这种上升。

对鉴定出来的泛素化蛋白质进行整合,筛选假手术组与模型组、电针组与模型组的比较中有显著差异的泛素化蛋白质。结果显示, Syt11、Usp5、CaMKIIa等8种蛋白质的泛素化水平在两个比较组中均存在差异,它们多与内吞作用、细胞骨架和突触可塑性有关。Syt11即突触结合蛋白11,可介导突触传递过程中活性依赖的质膜转运,参与调节内吞作用和囊泡循环过程,对神经传递、突触形成和空间学习记忆至关重要<sup>[39]</sup>。本研究中,相比于假手术组,模型组中Syt11的泛素化程度显著升高,这表明脑缺血低灌注时可能会诱导海马中突触结合蛋白的降解增加,破坏正常的突触功能,进而导致认知功能受损。Usp5是一种与海马突触蛋白酶体相关的去泛素化酶,通过回收未与靶蛋白结合的泛素,参与维持泛素化与去泛素化稳定,对海马突触功能的调节至关重要<sup>[40]</sup>。本研究结果显示,电针干预后大鼠海马组织中Usp5的泛素化水平下调,其可能通过抑制海马中突触相关蛋白的泛素化并促进其表达,从而增强VCI大鼠的学习记忆功能。CaMKII是一种异聚丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,在皮质和海马神经元中含量丰富<sup>[41]</sup>。研究发现CaMKII可作为蛋白质降解的上游,通过调节蛋白酶体的活性来控制记忆重新巩固过程的启动<sup>[42]</sup>。CaMKIIa是CaMKII的主要亚基之一,与突触可塑性有关,其以活性依赖性方式将蛋白酶体募集到树突棘并增加其活性,进而调控泛素-蛋白酶体途径介导的蛋白质降解<sup>[43]</sup>。本研究中,电针组大鼠海马中CaMKIIa上赖氨酸56残基(K56)处的泛素化水平上调,表明电针可能通过抑制该位点上蛋白降解信号的传递,减轻蛋白质合成受阻导致的记忆障碍。

进一步将差异泛素化蛋白质进行生物信息学分析,GO功能分类结果表明,假手术组与模型组,模型组与电针组这两个比较组中差异显著的泛素化蛋白质多与细胞进程和生物调节过程有关,具有结合作用、催化活性等功能,对蛋白质合成与降解平衡的维持至关重要。因此,电针增强海马突触可塑性改善VCI空间记忆可能与其调节泛素化突触结合蛋白

的功能和去泛素化酶的活性有关。KEGG通路富集结果显示泛素化蛋白质广泛参与VCI相关的17条信号通路,其中钙信号通路、坏死性凋亡通路、胞吞作用通路等参与突触功能的调节,表明VCI所致的认知损伤可能主要与钙信号通路过度激活诱导蛋白降解增强、细胞凋亡增加及信号转导异常有关。胆碱能突触通路可通过调控海马神经元的兴奋性和抑制性来影响记忆形成<sup>[44]</sup>,胆碱能突触的增强可改善记忆能力<sup>[45]</sup>。Lee等<sup>[46]</sup>发现针刺可以减缓记忆相关胆碱乙酰转移酶的下降,促进多种转运蛋白的表达,最终恢复胆碱能突触通路。Latina等<sup>[47]</sup>表明泛素-蛋白酶体降解体系在胆碱能突触相关信号传导中具有重要作用。本研究显示电针干预后泛素化蛋白质在胆碱能突触信号通路的富集程度最强,表明电针可能通过泛素化降解途径调控该通路介导的神经元兴奋性,进而增强海马的突触可塑性。

综上所述,VCI大鼠的空间记忆受损可能与海马中泛素介导的蛋白质降解异常有关,本研究在三组大鼠海马组织中鉴定到泛素化差异显著的底物蛋白在维持突触可塑性、胞吞作用、细胞骨架等方面发挥重要作用,表明电针对VCI空间学习记忆的改善作用可能与其调控蛋白质稳态相关的细胞内过程有关。后续将结合鉴定出来的泛素化蛋白质和泛素化位点对组学结果进行验证,进一步确定电针百会、神庭穴对海马泛素化修饰的调控靶点。本研究从蛋白质翻译后修饰角度探讨电针百会、神庭穴调控海马突触可塑性的潜在机制,为电针治疗VCI的临床运用提供修饰组学证据。

## 参考文献

- [1] Skrobot OA, Black SE, Chen C, et al. Progress toward standardized diagnosis of vascular cognitive impairment: guidelines from the vascular impairment of cognition classification consensus study[J]. *Alzheimers Dement*, 2018,14(3): 280—292.
- [2] Rundek T, Tolea M, Ariko T, et al. Vascular cognitive impairment (VCI)[J]. *Neurotherapeutics*, 2022,19(1):68—88.
- [3] Cai YY, Jiang WM. Research progress of traditional Chinese medicine intervention vascular cognitive impairment[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2017,42(10):1837—1841.
- [4] Lopez-Castejon G. Control of the inflammasome by the ubiquitin system[J]. *FEBS J*, 2020,287(1):11—26.

- [5] Galves M, Rathi R, Prag G, et al. Ubiquitin signaling and degradation of aggregate-prone proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2019,44(10):872—884.
- [6] Soykan T, Haucke V, Kuijpers M. Mechanism of synaptic protein turnover and its regulation by neuronal activity[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2021,69:76—83.
- [7] Gueniot F, Rubin S, Bougaran P, et al. Targeting Pdzrn3 maintains adult blood-brain barrier and central nervous system homeostasis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2022, 42(4):613—629.
- [8] Fang C, Li Q, Min G, et al. MicroRNA-181c ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. *Mol Neurobiol*, 2017,54(10):8370—8385.
- [9] Feng Q, Bin LL, Zhai YB, et al. Long-term efficacy and safety of electroacupuncture on improving MMSE in patients with Alzheimer's disease[J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2019,39(1):3—8.
- [10] Xu W, OuYang S, Chi Z, et al. Effectiveness and safety of electroacupuncture in treating Parkinson disease: a protocol for systematic review and meta-analyses[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021,100(10):e25095.
- [11] Yang K, Zhang H, Hu G, et al. Electroacupuncture for patients with spasticity after stroke: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021,100(7):e24859.
- [12] Su XT, Wang LQ, Li JL, et al. Acupuncture therapy for cognitive impairment: a delphi expert consensus survey[J]. *Front Aging Neurosci*, 2020,12:596081.
- [13] Kim H, Kim HK, Kim SY, et al. Cognitive improvement effects of electro-acupuncture for the treatment of MCI compared with Western medications: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019,19(1):13.
- [14] Park HK, Song MK, Kim JH, et al. A randomized controlled trial to evaluate the effectiveness and safety of electro acupuncture and transcranial direct current stimulation with computerized cognitive rehabilitation in patients with vascular cognitive impairment[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020,99(29):e21263.
- [15] Huang L, Yin X, Li W, et al. Effects of acupuncture on vascular cognitive impairment with no dementia: a randomized controlled trial[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 81(4): 1391—1401.
- [16] Yang EJ, Cai M, Lee JH. Neuroprotective effects of electroacupuncture on an animal model of bilateral common carotid artery occlusion[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 7228—7236.
- [17] Du SQ, Wang XR, Zhu W, et al. Acupuncture inhibits TXNIP-associated oxidative stress and inflammation to attenuate cognitive impairment in vascular dementia rats[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018,24(1):39—46.
- [18] Dai Y, Zhang Y, Yang M, et al. Electroacupuncture increases the hippocampal synaptic transmission efficiency and long-term plasticity to improve vascular cognitive impairment[J]. *Mediators Inflamm*, 2022,2022:5985143.
- [19] Pan P, Ma Z, Zhang Z, et al. Acupuncture can regulate the peripheral immune cell spectrum and inflammatory environment of the vascular dementia rat, and improve the cognitive dysfunction of the rats[J]. *Front Aging Neurosci*, 2021,13:706834.
- [20] Jian WX, Zhang Z, Zhan JH, et al. Donepezil attenuates vascular dementia in rats through increasing BDNF induced by reducing HDAC6 nuclear translocation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020,41(5):588—598.
- [21] Wang HL, Liu FL, Li RQ, et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation[J]. *Neural Regen Res*, 2021,16(6): 1011—1016.
- [22] Hort J, Valis M, Kuca K, et al. Vascular cognitive impairment: information from animal models on the pathogenic mechanisms of cognitive deficits[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(10):2405.
- [23] 林尔正, 林丹红. 针灸治疗认知功能障碍经穴的古代文献研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016,31(11):4835—4837.
- [24] Wu J, Wang J, Zhang J. [Theoretic basis on the same therapeutic program for different degenerative brain diseases in terms of the governor vessel: Alzheimer's disease and Parkinson's disease][J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2015, 35(5):489—492.
- [25] Huang J, Gong Z, Kong Y, et al. Electroacupuncture synergistically inhibits proinflammatory cytokine production and improves cognitive function in rats with cognitive impairment due to hepatic encephalopathy through p38MAPK/STAT3 and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021,2021:7992688.
- [26] Bai L, Zhang D, Cui TT, et al. Mechanisms underlying the antidepressant effect of acupuncture via the CaMK signaling pathway[J]. *Front Behav Neurosci*, 2020,14:563698.
- [27] Su KQ, Gao J, Li JY, et al. Acupoint selection rules of post-stroke cognitive impairment treated with acupuncture based on ancient and modern medical record cloud platform [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2022,42(1):99—103.
- [28] Yu Z, Xu JC, Qin QJ, et al. Analysis on acupoint selec-

- tion rules of acupuncture for Alzheimer's disease based on complex network[J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2019, 39(5): 551—555.
- [29] Li S, Tan J, Zhang H, et al. Discussion on rules of acupoint selection for vascular dementia[J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2017, 37(7):785—790.
- [30] Fan Y, Kai-tao L, Jia-hao Z, et al. Effect of long-time needle retaining at Baihui (GV 20) on cognitive impairment in post-stroke patients[J]. *Journal of Acupuncture and Tuina Science*, 2017, 15(6):398—402.
- [31] Cai RL, Cheng HL, Zhou T, et al. Effects of electroacupuncture on learning-memory ability and expression of hippocampal vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptor 1 and 2 genes in vascular cognitive impairment rats[J]. *Zhen Ci Yan Jiu*, 2015, 40(1):25—29.
- [32] 丁妍怡, 张胜行, 刘雨露, 等. 电针对血管性认知障碍大鼠脑功能局部一致性的效果[J]. *中国康复理论与实践*, 2022, 28(1):55—61.
- [33] Redondo J, Popik B, Casagrande M, et al. Hippocampal HECT E3 ligase inhibition facilitates consolidation, retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2020, 167: 107135.
- [34] Teuber J, Mueller B, Fukabori R, et al. The ubiquitin ligase Prajal reduces NRAGE expression and inhibits neuronal differentiation of PC12 cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63067.
- [35] Schmidt MF, Gan ZY, Komander D, et al. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(2):570—590.
- [36] Abreha MH, Dammer EB, Ping L, et al. Quantitative analysis of the brain ubiquitylome in Alzheimer's disease[J]. *Proteomics*, 2018, 18(20):e1800108.
- [37] McFadden T, Musaus M, Nelsen JL, et al. Dysregulation of protein degradation in the hippocampus is associated with impaired spatial memory during the development of obesity[J]. *Behav Brain Res*, 2020, 393:112787.
- [38] Briz V, Liu Y, Zhu G, et al. A novel form of synaptic plasticity in field CA3 of hippocampus requires GPER1 activation and BDNF release[J]. *J Cell Biol*, 2015, 210(7): 1225—1237.
- [39] Shimojo M, Madara J, Pankow S, et al. Synaptotagmin-11 mediates a vesicle trafficking pathway that is essential for development and synaptic plasticity[J]. *Genes Dev*, 2019, 33(5—6):365—376.
- [40] Kowalski JR, Juo P. The role of deubiquitinating enzymes in synaptic function and nervous system diseases[J]. *Neural Plast*, 2012, 2012:892749.
- [41] Shibata A, Ueda HH, Eto K, et al. Photoactivatable CaMKII induces synaptic plasticity in single synapses[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):751.
- [42] Jarome TJ, Ferrara NC, Kwapis JL, et al. CaMKII regulates proteasome phosphorylation and activity and promotes memory destabilization following retrieval[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2016, 128:103—109.
- [43] Bingol B, Wang CF, Arnott D, et al. Autophosphorylated CaMKIIalpha acts as a scaffold to recruit proteasomes to dendritic spines[J]. *Cell*, 2010, 140(4):567—578.
- [44] Fuenzalida M, Chiu CQ, Chavez AE. Muscarinic regulation of spike timing dependent synaptic plasticity in the hippocampus[J]. *Neuroscience*, 2021, 456:50—59.
- [45] Maurer SV, Williams CL. The cholinergic system modulates memory and hippocampal plasticity via its interactions with non-neuronal cells[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1489.
- [46] Lee B, Sur B, Shim J, et al. Acupuncture stimulation improves scopolamine-induced cognitive impairment via activation of cholinergic system and regulation of BDNF and CREB expressions in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14:338.
- [47] Latina V, Caioli S, Zona C, et al. NGF-dependent changes in ubiquitin homeostasis trigger early cholinergic degeneration in cellular and animal AD-model[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12:487.