



基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

晁亮, 王辉, 沈淑琦, 游飘雪, 冀凯宏, 洪战英

Study on the Pharmacological Effects and Mechanism of Gegen-Zhimu Herb Pair in Preventing and Treating Alzheimer's Disease by UHPLC-Q/TOF-MS Metabolomics Strategy

CHAO Liang, WANG Hui, SHEN Shuqi, YOU Piaoxue, JI Kaihong, HONG Zhanying

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202409035>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于网络药理学和分子对接技术探究定清片活性成分治疗白血病的作用机制

Mechanism of effective ingredients of Dingqing tablets in the treatment of leukemia based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 479-486 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202401073](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202401073)

基于NLRP1炎症小体探讨百合知母汤抗抑郁的作用机制

Exploration of the antidepressant mechanism of Baihe Zhimu decoction based on NLRP1 inflammasome

药学实践与服务. 2024, 42(8): 325-333 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202401033](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202401033)

山楂酸药理作用的研究进展

Research progress on the pharmacological effects of maslinic acid

药学实践与服务. 2024, 42(5): 185-189 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202307052](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202307052)

夜宁胶囊对小鼠镇静催眠作用及其机制的研究

Sedative and hypnotic effects and mechanism of Yening Capsules on mice

药学实践与服务. 2024, 42(8): 346-349 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202211047](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202211047)

巴戟天丸组方对A β 损伤成骨细胞的作用及基于网络药理学的机制研究

The roles of Bajitianwan formula on A β -injured osteoblasts and the mechanism based on network pharmacology

药学实践与服务. 2024, 42(7): 285-290, 296 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202305011](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202305011)

新斯的明与山莨菪碱联合应用对肺型氧中毒的保护作用及其机制的研究

Protective effect and mechanisms of neostigmine in combination with anisodamine against pulmonary oxygen toxicity

药学实践与服务. 2024, 42(10): 433-438, 444 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202310049](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202310049)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

晁亮^{1,3}, 王辉¹, 沈淑琦¹, 游飘雪⁴, 冀凯宏², 洪战英¹ (1. 海军军医大学药理学系, 上海 200433; 2. 海军军医大学第一附属医院消化内科, 上海 200433; 3. 武警江苏省总队医院药剂科, 江苏 扬州 225002; 4. 福建中医药大学药学院, 福建福州 350122)

[摘要] 目的 运用LC-MS血清代谢组学策略评价葛根-知母药对防治阿尔茨海默病(AD)的药效并探讨其潜在作用机制。方法 采用氯化铝($AlCl_3$)和D-半乳糖(D-gal)联合给药21周建立AD大鼠模型, 中药干预组分别予以葛根、知母和葛根-知母药对提取液灌胃8周, 通过Morris水迷宫实验和超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)以及丙二醛(MDA)等生化指标评价模型效果和药效; 开展基于UHPLC-Q/TOF-MS的代谢组学研究, 并通过MetaboAnalyst在线网站分析相关代谢通路。结果 AD模型组大鼠学习和记忆能力较对照组显著下降, 氧化应激和脂质过氧化物水平显著升高($P<0.05$), SOD含量极显著降低($P<0.01$), 葛根-知母药对干预能显著改善AD模型大鼠的学习记忆能力, 逆转氧化应激和脂质过氧化水平, 提高血清SOD含量, 且效果优于单药。通过代谢组学分析, 在AD模型组与对照组间共鉴定出70种差异代谢物, 主要涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成等10条通路; 葛根-知母药对干预可以回调其中47种代谢物, 20种回调代谢物组间差异具有统计学意义($P<0.05$), 涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等6条通路。结论 葛根-知母药对能够显著改善AD大鼠模型的学习和记忆能力, 其作用机制可能与改善氧化应激和脂质过氧化水平, 增加血清SOD含量, 调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等通路相关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 代谢组学; 葛根-知母; 中药药对; 作用机制

[文章编号] 2097-2024(2024)00-0001-11

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202409035

Study on the Pharmacological Effects and Mechanism of Gegen-Zhimu Herb Pair in Preventing and Treating Alzheimer's Disease by UHPLC-Q/TOF-MS Metabolomics Strategy

CHAO Liang^{1,3}, WANG Hui¹, SHEN Shuqi¹, YOU PiaoXue⁴, JI Kaihong², HONG Zhanying¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Jiangsu Provincial Corps Hospital, Chinese People's Armed Police Force; 4. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the efficacy of *Puerariae lobatae* radix (PLR) and *Anemarrhenae Rhizoma* (AR) in preventing and treating Alzheimer's disease (AD) and explore its potential mechanism of action by LC-MS serum metabolomics strategy. **Methods** The AD rat model was established by administering aluminum chloride ($AlCl_3$) and D-galactose (D-gal) for 20 weeks. The traditional Chinese medicine intervention group was given the PLR, AR, and PLR-AR extracts for 8 weeks by gavage. The model effect and efficacy were evaluated by Morris's water maze test and biochemical indicators including SOD, NO, and MDA; Metabolomics research based on the UHPLC-Q/TOF-MS method was conducted, and relevant metabolic pathways were analyzed through the MetaboAnalyst online website. **Results** The learning and memory abilities of AD model rats were significantly decreased compared with the control group, and the levels of oxidative stress and lipid peroxides were significantly increased ($P<0.05$), while the SOD content was decreased considerably ($P<0.01$). The learning and memory abilities of AD model rats were improved, oxidative stress and lipid peroxidation levels were reversed, and serum SOD content was increased significantly after the intervention of PLR-AR, with better effects than single drugs. Through metabolomics, 70 differential metabolites were

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82173777)

[作者简介] 晁亮, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础与药代动力学研究, Email: chaoliang216@163.com, Tel: 15952291137

[通信作者] 冀凯宏, 副教授, 研究方向: 临床代谢组学研究, Email: jkshmmu@163.com; 洪战英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药药代动力学与配伍规律研究, Email: hongzhy001@163.com, Tel: (021)81871269

identified between the AD model group and the control group, mainly involving 10 pathways, including phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis, phenylalanine metabolism, and unsaturated fatty acid biosynthesis, et.al. The intervention of PLR-AR could adjust 47 metabolites, with 20 metabolites showing significant differences ($P<0.05$). The significantly adjusted metabolites involve 6 pathways, including phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis, et.al. **Conclusion** The combination of PLR and AR could significantly improve the learning and memory abilities of AD rat models. The mechanism may be related to the improvement of oxidative stress and lipid peroxidation levels, the increase of serum SOD content, and the regulation of phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis pathways.

[Key words] Alzheimer's disease; metabolomics; Gegen-Zhimu; herb pair; mechanism

阿尔茨海默病(AD)是一种以进行性记忆功能和神经行为障碍为表现的中枢神经系统退行性疾病。目前全球约有AD患者5000余万人,随着人口老龄化的进展,这一数字还将持续增加,给全球发展带来巨大的健康和经济负担^[1]。到目前为止,临床尚缺乏有效的AD治疗手段。胆碱酯酶抑制剂、NMDA拮抗剂等传统AD治疗药物效果有限,FDA新批准上市的A β 单克隆抗体仑卡奈单抗等疗效尚存争议,且治疗费用昂贵^[2]。因此,开发经济、有效的AD治疗药物仍是当前研究热点。

中药因其多靶点系统作用和低毒副作用的优势,近年来在AD等复杂疾病治疗药物发掘中发挥重要作用^[3]。中药葛根和知母临床应用历史悠久,葛根解肌退热、生津止渴,知母清热泻火、滋阴润燥,二者配伍可清热生津、滋阴润燥,改善代谢紊乱,对热邪灼津、痰浊阻窍所致的健忘呆钝、消渴等症具有治疗作用,主要代表方剂为玉液汤^[4-6]。近年来研究发现该药对的一些成分如葛根素^[7]、芒果苷^[8]、知母皂苷B II^[9]等对AD具有药效作用。作为一种复杂的异质性疾病,AD的发生与糖尿病存在紧密的因果关联,也被称为脑型糖尿病(3型糖尿病)^[10]。但是目前鲜见葛根与知母配伍后在AD治疗中作用效果的报道。因此,本研究拟通过建立AD大鼠模型考察葛根和知母配伍防治AD的效果,同时运用代谢组学策略探究葛根与知母作为药对配伍后防治AD潜在的作用机制,为中药防治AD研究提供参考借鉴。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity 液相色谱仪和 6538 UHD Accurate-Mass 四级杆飞行时间串联高分辨质谱仪(美国安捷伦公司);HERAEUS FRESCO 17 高速冷冻离心机(美国赛默飞公司);ANALOG 涡旋振荡器(美国奥豪斯公司);Milli-Q Integral 超纯水机(美国 Millipore 公司);十万分之一电子分析天平(日

本 A&D 公司);Digbehav 动物行为学分析系统-水迷宫(上海吉量软件科技有限公司)。

1.2 药物与试剂

葛根(批号:A220901)与知母药材饮片(批号:20220201)购自上海市白鹿堂中药店,经海军军医大学药理学系蒋益萍副教授鉴定为豆科植物野葛 *P. lobate*(Willd.)Ohwi 的干燥根和百合科植物知母 *A. asphodeloides* Bge.的干燥根茎;乙醇(分析纯,国药集团上海化学试剂有限公司);乙腈、甲酸(均为 LC-MS 级,赛默飞世尔科技中国有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,北京迪马科技有限公司);乌拉坦(批号:P2091859)、D-gal(批号:P1616089)和 AlCl₃(批号:P2391168)购自上海泰坦科技股份有限公司;生理氯化钠溶液(四川科伦药业股份有限公司);L-2-氯苯丙氨酸(98%,上海麦克林生化有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)试剂盒购自上海源桔生物科技公司。

1.3 实验动物

健康雄性清洁级 SD 大鼠(体质量 200 g \pm 20 g),购自浙江省实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0002。大鼠饲养于海军军医大学药理学系实验动物中心,笼饲养条件为:温度恒定 22 \pm 2 $^{\circ}$ C,湿度区间为 40%-60%,昼夜循环时间为 12h。

2 实验方法

2.1 中药提取液制备

分别取葛根、知母和葛根-知母药对(15:12)粉末适量,以 10 倍体积 70% 乙醇浸泡,在 85 $^{\circ}$ C 下加热回流提取 90 min,滤过,滤渣以同等条件重复提取 2 次。合并三次滤液,60 $^{\circ}$ C 减压浓缩至无乙醇味,制备得到用于灌胃的提取液,密封保存于-20 $^{\circ}$ C 待用。

2.2 AD 模型建立与药效评价

2.2.1 分组与给药

40 只 SD 大鼠适应性喂养一周后按照体重随机分为空白对照组、AD 模型组、葛根组、知母组

和葛根-知母药对组共5组($n=8$)。除对照组外,其余4组大鼠每日给予 *D*-gal 300 mg/kg 腹腔注射和 AlCl_3 200 mg/kg 灌胃,连续给药21周建立AD动物模型。对照组每日给予等量的生理盐水(灌胃+腹腔注射)。自第14周起,3个中药干预组分别给予葛根、知母和葛根-知母药对提取液灌胃(相当于生药量:葛根 6.25 g/(kg·d),知母 5 g/(kg·d),药对 11.25 g/(kg·d))。对照组和模型组大鼠灌胃等量纯水。

2.2.2 Morris 水迷宫实验

采用 Morris 水迷宫行为学实验评价大鼠的学习和记忆能力。水迷宫实验全程共6天,其中包括5天的定位航行训练和1天的空间探索试验。利用动物行为学分析系统记录大鼠在定位航行训练期间每日的逃避潜伏时间和空间探索训练中的运动轨迹、穿越站台次数、各象限的运动距离和停留时间等参数,供分析评价使用。

2.2.3 样本获取与前处理

行为学实验结束后,大鼠腹腔注射乌拉坦麻醉,经腹主动脉取血,静置后,在4℃、4000 rpm 转速下离心10 min,取上清分装冻存于-80℃,供后续分析用。

2.2.4 血清MDA、SOD和NO检测

使用ELISA试剂盒,按照说明书步骤检测大鼠血清中的SOD、MDA、NO等氧化应激和脂质过氧化相关指标。

2.3 代谢组学实验

2.3.1 含内标的甲醇溶液配制

精密称取 *L*-2-氯苯丙氨酸适量,加入甲醇溶解得浓度为5 mg/mL的内标母液,随后用甲醇稀释得到浓度为2 μg/mL的内标溶液。

2.3.2 分析样本制备

各取200 μL解冻后的血清样本置于1.5 mL的离心管中,加入600 μL预冷的含内标的甲醇溶液,涡旋2 min后,在4℃、12500 rpm 转速下离心15 min,取上清液供UPLC-Q/TOF-MS分析用。取各样本20 μL,混合得到质控(QC)样本。

2.3.3 色谱与质谱条件

色谱条件:反相色谱柱为Waters X Select HSS T3柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),亲水作用色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH HILIC柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);进样量:2 μL;柱温:40℃;流动相为0.1%甲酸-水(A)和0.1%甲酸-乙腈溶液(B);T3柱梯度洗脱模式:0~2 min, 2%B;2~17 min, 2%~98%B;17~19 min, 98%B。HILIC柱梯度洗

脱模式:0~2 min, 95%B;2~4 min, 95%~89%B;4~10 min, 89%B;10~12 min, 89%~66%B;12~15 min, 66%B。流速:0.4 mL/min;色谱柱平衡时间:5 min。

质谱条件:采用ESI离子源,正、负离子检测模式;干燥气温度,350℃,干燥气体流量:11 L/min;毛细管电压:正离子模式为4000 V,负离子模式为3500 V;碎裂电压:120 V;质谱扫描范围:50-1500 *m/z*。

2.3.4 数据预处理与分析

质谱数据用XCMS程序包进行预处理,按80%原则过滤无效数据并进行内标归一化处理。使用SIMCA 14.1(Umetrics公司,瑞典)进行偏最小二乘判别分析(PLS-DA)和正交矫正偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)并进行模型验证,结合 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 判断模型的拟合效果和预测效果。以变量权重值(VIP)>1、 $P<0.05$ 且差异倍数(fold change, FC)>1.2或<0.8作为筛选标准,获得AD疾病关联生物标志物。借助HMDB数据库(<https://hmdb.ca/>)等在线代谢物质谱数据库对筛选得到的差异代谢物进行比对和注释。借助MetaboAnalyst 6.0(<https://www.metaboanalyst.ca/>)网站进行代谢通路分析。

2.4 统计分析

使用SPSS Statistics 23(IBM公司,美国)和GraphPad Prism 8(Graphpad软件公司,美国)进行统计分析与绘图。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为组间差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 AD大鼠模型建立与药效评价

3.1.1 学习和记忆能力评价

以水迷宫实验中大鼠逃避潜伏期、穿越站台所在位置次数以及站台所在象限的停留时间作为评价指标,考察大鼠的学习和记忆水平。结果如图1所示,定位航行训练期间,各组大鼠的逃避潜伏期随训练时间增加均呈下降趋势,其中模型组逃避潜伏期下降趋势较为平缓,对照组和3个中药干预组下降趋势均较模型组显著,对照组和葛根-知母药对组第5日逃避潜伏期较模型组均有极显著差异($P<0.01$)。同样,空间探索实验中,模型组大鼠穿越站台次数以及站台所在象限的停留时间较对照组均显著减少,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。中药干预后各组大鼠穿越站台次数及目标象限停留时间均有所增加,其中葛根-知母药对组与模型组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。结果表明,造

模后大鼠的学习和记忆能力出现下降, 给予葛根、知母和葛根-知母药对干预均可不同程度改善大鼠

的学习和记忆能力, 以葛根-知母药对最为显著, 效果优于单药。

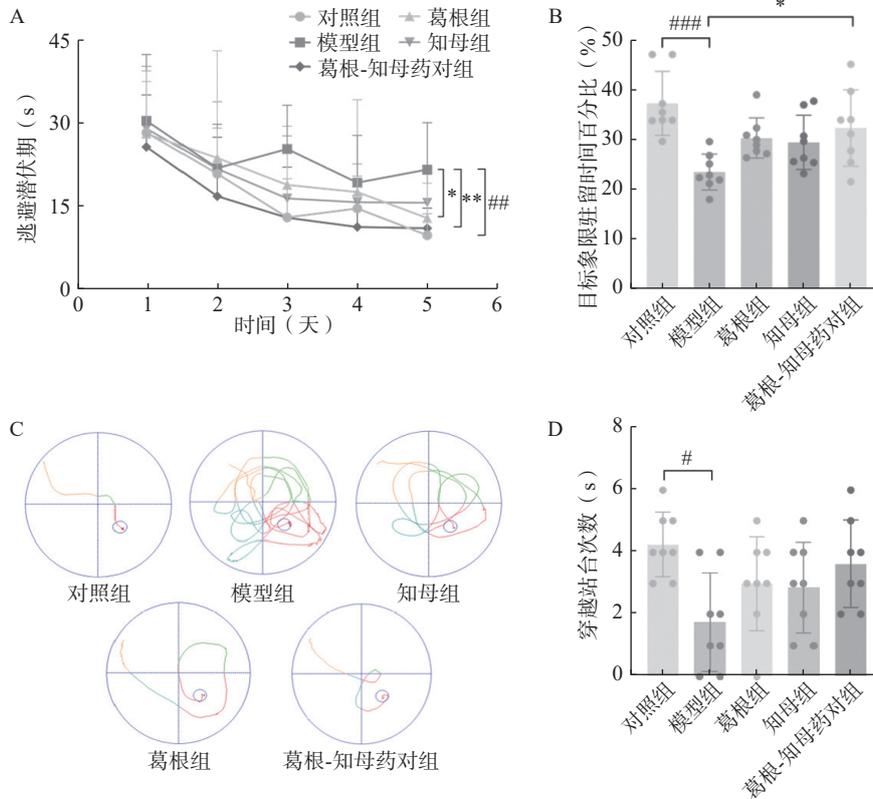


图1 不同组别大鼠水迷宫实验结果

(A)逃避潜伏期; (B)目标象限停留时间百分比; (C)各组大鼠水迷宫代表轨迹图; (D)穿越站台次数

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与模型组相比

$P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$, 与对照组相比

3.1.2 血清生化指标测定

与对照组相比, 模型组大鼠血清 NO 水平相对升高, MDA 水平显著升高($P<0.05$), SOD 含量极显著降低($P<0.01$)。中药干预后, 各给药组血清 NO 和 MDA 水平出现不同程度降低, 其中葛根-知母药

对组降低效果最为明显, 与模型组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。葛根、知母和葛根-知母药对给药组血清 SOD 含量较模型组均有所回调, 组间差异具有统计学意义($P<0.05$), 见图 2。

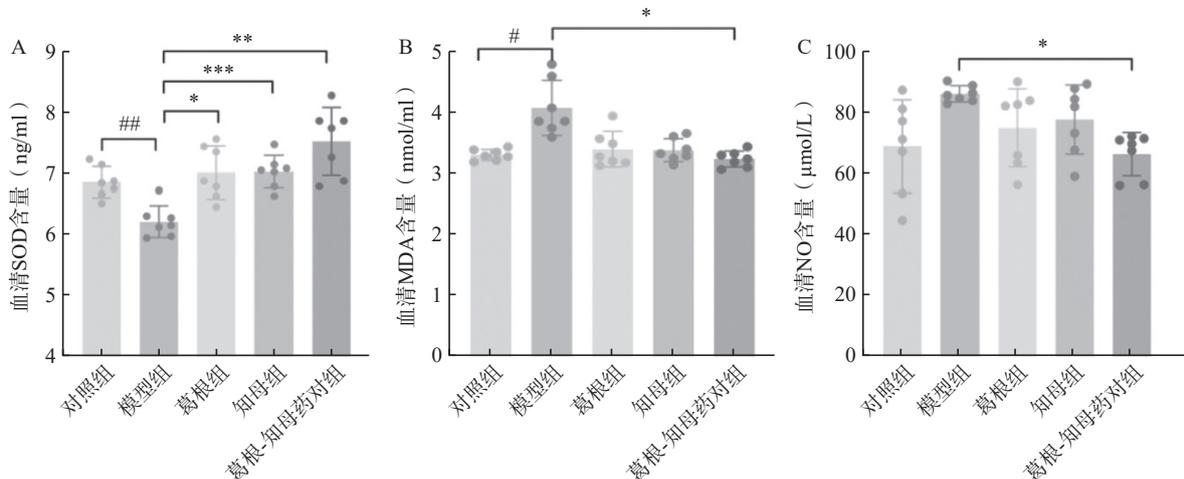


图2 不同组别大鼠血清 SOD(A)、MDA(B) 和 NO(C) 水平

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与模型组相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与对照组相比

3.2 血清代谢组学

3.2.1 血清代谢轮廓和多元统计分析

血清样本经UHPLC-Q/TOF-MS分析后得到各组大鼠血清代谢图谱,不同色谱柱分析条件下各组大鼠血清代谢轮廓存在一定差异。多元统计分析结果表明(图3),在PLS-DA多组分析模型中,空白对照组、AD模型组和3个中药干预组组间区分度较好,组内差异相对较小。PLS-DA模型200次

置换检验结果显示, Q^2 回归线与Y轴截距小于0, R^2 和 Q^2 曲线斜率始终为正值,且 $Q^2 < R^2$,表明模型未出现过拟合,具有相对可靠的解释和预测能力。在OPLS-DA模型中,不同分析条件下,AD模型组与空白对照组间完全分离,表明模型组与对照组间具有显著组间差异,CV-ANOVA验证结果证实所建立的OPLS-DA模型未出现过拟合,具备解释和预测能力。

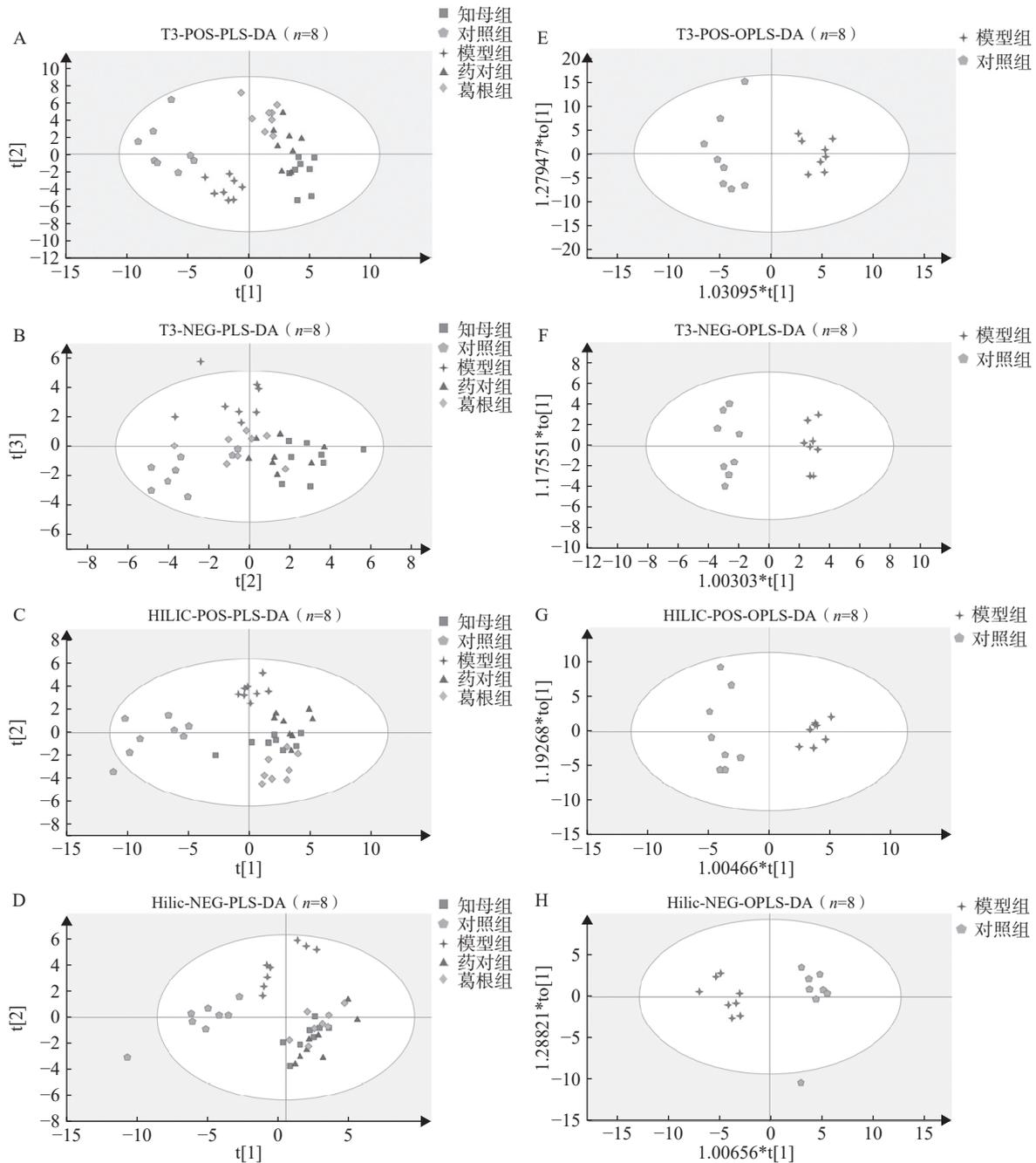


图3 UHPLC-Q/TOF-MS正、负离子模式下T3柱和HILIC柱的PLS-DA得分图(A-D)和OPLS-DA(模型组与对照组)得分图(E-H)

3.2.2 差异代谢物筛选与鉴定

对T3柱和HILIC柱正、负离子模式下的代谢

物信息进行差异化分析,以VIP值 >1 、 $P < 0.05$ 和 $FC > 1.2$ 或 $FC < 0.8$ 作为筛选标准,对不同模式下空

白对照组与AD模型组的差异代谢物进行筛选,并以火山图形式呈现(图4)。图中橙色标记点为显著上调代谢物,蓝色标记点为显著下调代谢物。

利用HMDB数据库对差异代谢物质谱信息进行匹配和鉴定,在AD模型组与对照组间鉴定出70个AD相关的潜在生物标志物,其中由HILIC

柱鉴定得到31个代谢物,T3柱鉴定得到45个代谢物,T3和HILIC柱共同鉴定得到的代谢物6个,具体如表1所示。

3.2.3 药物的干预效果

利用各组间的FC值变化情况判断药对干预后的回调代谢物。对于具有回调趋势的代谢物多组

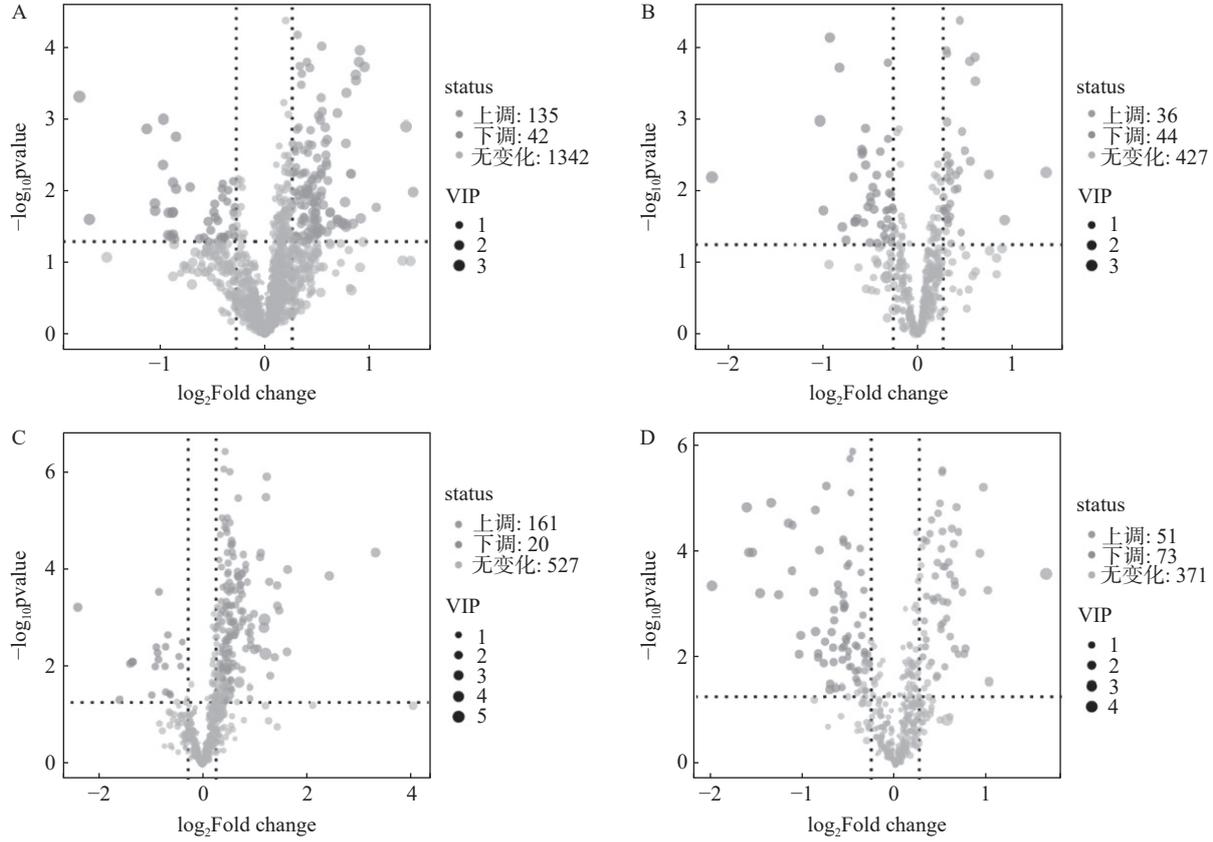


图4 正负离子模式下差异代谢物筛选火山图

A. T3 正离子模式; B. T3 负离子模式; C. HILIC 正离子模式; D. HILIC 负离子模式

表1 差异代谢物鉴定、趋势和相关通路分析结果

序号	代谢物	色谱柱	分子量 (m/z)	化学式	加合离子	趋势	相关通路	P 值
1	2-羟基丁酸	T3	127.0362	C ₄ H ₈ O ₃	M+Na	↑	丙酸代谢	1.22E-03
2	肌酸	T3	132.0781	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	M+H	↑ [#]	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	6.98E-03
3	脯氨酸	T3、HILIC	138.0553	C ₅ H ₉ NO ₂	M+Na	↓ ^{#*}	精氨酸和脯氨酸代谢	4.20E-03
4	L-天冬氨酸	T3	133.0606	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	M+H	↑ [#]	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	2.36E-02
5	L-乙酰基肉碱	T3	204.1218	C ₉ H ₁₇ NO ₄	M+H	↑	不饱和和脂肪酸的生物合成	1.26E-03
6	棕榈酰肉碱	T3	400.3424	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	M+H	↑ ^{#*}	脂肪酸降解	2.38E-04
7	喹啉酸	T3	168.0271	C ₇ H ₅ NO ₄	M+H	↑	烟酸和烟酰胺代谢	4.97E-04
8	焦谷氨酸	T3	128.0329	C ₅ H ₇ NO ₃	M-H	↓ [#]	谷胱甘肽代谢	2.89E-02
9	3b-羟基-5-胆酸	T3	357.2789	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	M+H-H ₂ O	↑	-	1.01E-02
10	香草酸	T3	151.0361	C ₈ H ₈ O ₄	M+H-H ₂ O	↑	-	3.05E-03
11	肌酸酐	T3	136.0491	C ₄ H ₇ N ₃ O	M+Na	↑ [#]	-	1.89E-04
12	戊烯二酸	T3	153.0198	C ₅ H ₆ O ₄	M+Na	↑	-	8.96E-03

(续表 1)

序号	代谢物	色谱柱	分子量 (<i>m/z</i>)	化学式	加合离子	趋势	相关通路	<i>P</i> 值
13	亚油酸	T3	303.2327	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	M+Na	↑ [#]	亚油酸代谢	2.45E-02
14	4-羟基丁酸	T3	103.0382	C ₄ H ₈ O ₃	M-H	↑ [#]	-	4.49E-03
15	糖原	T3	689.2111	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	M+Na	↑	淀粉和蔗糖代谢	2.24E-02
16	肉豆蔻酸	T3	211.2038	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	M+H-H ₂ O	↑ [#]	脂肪酸生物合成	4.15E-02
17	丙酰肉碱	T3	218.1383	C ₁₀ H ₁₉ NO ₄	M+H	↓ [#]	支链脂肪酸的氧化	1.97E-02
18	硬脂酰肉碱	T3	428.3734	C ₂₅ H ₅₀ NO ₄	M+H	↑ ^{#*}	长链饱和脂肪酸的 线粒体β氧化	2.84E-04
19	花生四烯酸	T3	327.232	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	M+Na	↑ ^{#*}	花生四烯酸代谢	1.53E-02
20	N1乙酰精胺	T3	267.208	C ₁₂ H ₂₈ N ₄ O	M+Na	↑ [#]	赖氨酸降解	3.71E-02
21	N6, N6, N6-三甲基-L-赖氨酸	T3	189.16	C ₉ H ₂₀ N ₂ O ₂	M+H	↑ [#]	α-亚麻酸代谢	4.44E-02
22	α-亚麻酸	T3	279.2316	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	M+H	↑ ^{#*}	初级胆汁酸生物合成	2.80E-02
23	24羟基胆固醇	T3	425.343	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	M+Na	↑ [#]	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	8.17E-04
24	2-氧代-4-甲硫基丁酸	T3	131.0189	C ₅ H ₈ O ₃ S	M+H-H ₂ O	↑	不饱和脂肪酸的生物合成	1.14E-02
25	二十碳五烯酸	T3	285.2212	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	M+H-H ₂ O	↑ [#]	-	2.45E-02
26	油酰乙醇酰胺	T3	348.2891	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	M+Na	↑ [#]	-	8.42E-03
27	吲哚-3-丙酸	T3	190.0858	C ₁₁ H ₁₁ NO ₂	M+H	↓ [#]	-	4.79E-04
28	棕榈油酸	T3	237.2193	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	M+H-H ₂ O	↑ ^{#*}	-	5.79E-03
29	15(S)-羟基二十碳三烯酸	T3	345.2341	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	M+Na	↑ [#]	-	9.83E-03
30	十四酰肉碱	T3、 HILIC	372.3103	C ₂₁ H ₄₁ NO ₄	M+H	↑ [#]	-	1.15E-02
31	3-羟基马尿酸	T3	178.0501	C ₉ H ₉ NO ₄	M+H-H ₂ O	↓ ^{#*}	-	9.53E-03
32	18-羟基花生四烯酸	T3	343.225	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	M+Na	↑ [#]	-	3.91E-02
33	亚麻酰基肉碱	T3	424.3414	C ₂₅ H ₄₆ NO ₄	M+H	↑ [#]	-	4.25E-04
34	LysoPC(15:0/0:0)	T3	526.3057	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	M+FA-H	↓ ^{#*}	-	2.55E-02
35	PC(18:1(9Z)e/2:0)	T3	550.3872	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	M+H	↑ ^{#*}	-	2.11E-03
36	7-酮胆固醇	T3	401.3455	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	M+H	↑ ^{#*}	-	1.08E-04
37	9-十六碳烯酰肉碱	T3	398.3152	C ₂₃ H ₄₃ NO ₄	M+H	↑ [#]	-	9.43E-05
38	16(17)-EpDPE	T3	343.2219	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	M-H	↑ ^{#*}	-	3.33E-02
39	十八烯酰肉碱	T3	426.3578	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	M+H	↑ [#]	-	1.84E-04
40	肉豆蔻酰肉碱	T3	370.2951	C ₂₁ H ₃₉ NO ₄	M+H	↑	-	4.25E-03
41	DL-乙酰肉碱	T3	204.1227	C ₉ H ₁₇ NO ₄	M+H	↑	嘧啶代谢	1.85E-03
42	胞苷一磷酸	HILIC	368.0407	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	M+FA-H	↓ [#]	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	2.74E-02
43	胆碱	HILIC	86.0963	C ₅ H ₁₄ NO	M+H-H ₂ O	↑	初级胆汁酸生物合成	1.20E-02
44	甘胆酸	HILIC	466.33	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	M+H	↑ ^{#*}	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	2.43E-04
45	L-酪氨酸	HILIC	182.0812	C ₉ H ₁₁ NO ₃	M+H	↑ ^{#*}	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	2.89E-03
46	苯丙氨酸	HILIC	166.0862	C ₉ H ₁₁ NO ₂	M+H	↑	嘌呤代谢	1.68E-03
47	肌苷酸	HILIC	383.0262	C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P	M+Cl	↓ ^{#*}	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	9.85E-04
48	L-天门冬氨酸	HILIC	134.0433	C ₄ H ₇ NO ₄	M+H	↑	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	5.14E-04
49	苯丙酮酸	HILIC	165.0546	C ₉ H ₈ O ₃	M+H	↑ ^{#*}	嘧啶代谢	6.25E-03
50	乳酸	HILIC、 T3	179.0029	C ₃ H ₄ N ₂ O ₄	M+Na	↓ ^{#*}	鞘脂代谢	3.04E-02
51	鞘氨醇	HILIC	302.3059	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	M+H	↑ [#]	酪氨酸代谢	6.59E-04

(续表 1)

序号	代谢物	色谱柱	分子量 (<i>m/z</i>)	化学式	加合离子	趋势	相关通路	<i>P</i> 值
52	香草扁桃酸	HILIC	233.0192	C ₉ H ₁₀ O ₅	M+Cl	↑ ^{**}	酪氨酸代谢	6.72E-05
53	酪胺	HILIC	120.079	C ₈ H ₁₁ NO	M+H-H ₂ O	↑	-	2.50E-03
54	3-氧代-4,6-胆二烯酸	HILIC	393.2315	C ₂₄ H ₃₄ O ₃	M+Na	↑ [#]	初级胆汁酸生物合成	1.46E-02
55	鹅去氧胆酸	HILIC	437.2877	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	M+FA-H	↑ ^{**}	丙氨酸、天冬氨酸和 谷氨酸代谢	7.30E-04
56	谷氨酰胺	HILIC	169.0584	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	M+Na	↑ [#]	-	5.06E-04
57	亮氨酸	HILIC	133.0855	C ₆ H ₁₂ O ₃	M+H	↑	-	5.18E-03
58	高- <i>L</i> -精氨酸	HILIC	189.1292	C ₇ H ₁₆ N ₄ O ₂	M+H	↑ ^{**}	-	1.22E-02
59	马尿酸	HILIC、 T ₃	178.0516	C ₉ H ₉ NO ₃	M-H	↓ [#]	-	2.94E-02
60	牛磺胆酸3-硫酸盐	HILIC	596.2653	C ₂₆ H ₄₅ NO ₁₀ S ₂	M+H	↑	-	1.78E-05
61	鹅去氧胆酸3-硫酸盐	HILIC	455.2515	C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S	M+H-H ₂ O	↑	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	2.76E-03
62	硫代半胱氨酸	HILIC	187.9645	C ₃ H ₇ NO ₂ S ₂	M+Cl	↓ [#]	亚油酸代谢	8.23E-05
63	13- <i>L</i> -过氧化氢亚油酸	HILIC	311.2187	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	M-H	↓ [#]	-	4.63E-03
64	S-亚硝基谷胱甘肽	HILIC	381.0763	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₇ S	M+FA-H	↓ ^{**}	鞘脂代谢	8.86E-05
65	LacCer(d18:1/12:0)	HILIC	806.5705	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₃	M+H	↑	花生四烯酸代谢	1.30E-04
66	LysoPC(14:0/0:0)	HILIC、 T ₃	512.3009	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	M+FA-H	↓	-	3.34E-02
67	2-(14,15-环氧二十碳三烯酰基) 甘油	HILIC	395.2749	C ₂₃ H ₃₈ O ₅	M+H	↑	-	1.41E-03
68	赖氨酸苯丙氨酸	HILIC	294.1891	C ₁₅ H ₂₃ N ₃ O ₃	M+H	↑	醚脂代谢	2.52E-04
69	二十四碳四烯酸肉碱	HILIC、 T ₃	526.3786	C ₃₁ H ₅₃ NO ₄	M+Na	↑	-	2.98E-05
70	1-(11Z二十二碳烯酰基)-3-磷 酸甘油酯	HILIC	515.3163	C ₂₅ H ₄₉ O ₇ P	M+Na	↑	-	8.91E-07

注: ↑表示模型组较对照组相对升高趋势, ↓表示模型组较对照组相对下降趋势, *P*值为模型组与对照组间代谢物水平的 t 检验计算结果;
#表示代谢物经葛根-知母药对干预后具有回调趋势(共47个), *表示代谢物(共20个)经葛根-知母药对干预后回调差异具有统计学意义
($P<0.05$)

间变化情况进行单因素方差分析, $P<0.05$ 的代谢物确定为药对干预后显著回调的差异代谢物。结果显示, 葛根-知母药对干预后出现回调的差异代谢物共计 47 个, 其中显著回调代谢物 20 个(表 1 和图 5)。

对 70 个 AD 相关的差异代谢物和葛根-知母药对干预后显著回调的 20 个差异代谢物分别进行通路富集分析后发现(图 6), AD 模型大鼠潜在疾病生物标志物涉及通路主要包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、精氨酸生物合成、酪氨酸代谢、嘧啶代谢等。葛根-知母药对干预可对苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、酪氨酸代谢和初级胆汁酸生物合成等通路产生回调影响。

4 讨论

AD 是一种复杂的中枢神经系统异质性疾病,

具体病因尚不明确。目前已知可导致 AD 的因素包括基因突变、氧化应激、神经炎症以及多种环境和疾病因素^[11]。衰老被认为是 AD 最相关的危险因素^[12], 啮齿类动物长期摄入 *D*-gal 可产生包括氧化应激、炎症反应在内的多种与人类相似的衰老相关变化^[13]。铝元素可通过促进中枢神经系统炎症反应、降低脑中 SOD 活性, 影响胆碱能神经传递、促进 Tau 蛋白磷酸化等形式诱导神经毒性, 过量铝暴露与 AD 等中枢神经系统退行性疾病进展相关^[14]。研究表明, *D*-gal 与 AlCl₃ 联合应用可产生类似于自然衰老的变化及 AD 相关特征^[15]。因此, 本研究选取 *D*-gal 与 AlCl₃ 联合造模, 通过大鼠长程给药模拟和还原 AD 相关的病程和病理变化, 力求更加精准地反映 AD 患者体内代谢分子水平变化。药效学实验表明, *D*-gal 和 AlCl₃ 联合给药后大鼠学习和记忆能力明显下降, 体内氧化应激和炎症相关因子水平发生变化, 表明该模型成功模拟 AD 相关的病理变化和特征。而葛根-知母药对干预可显著

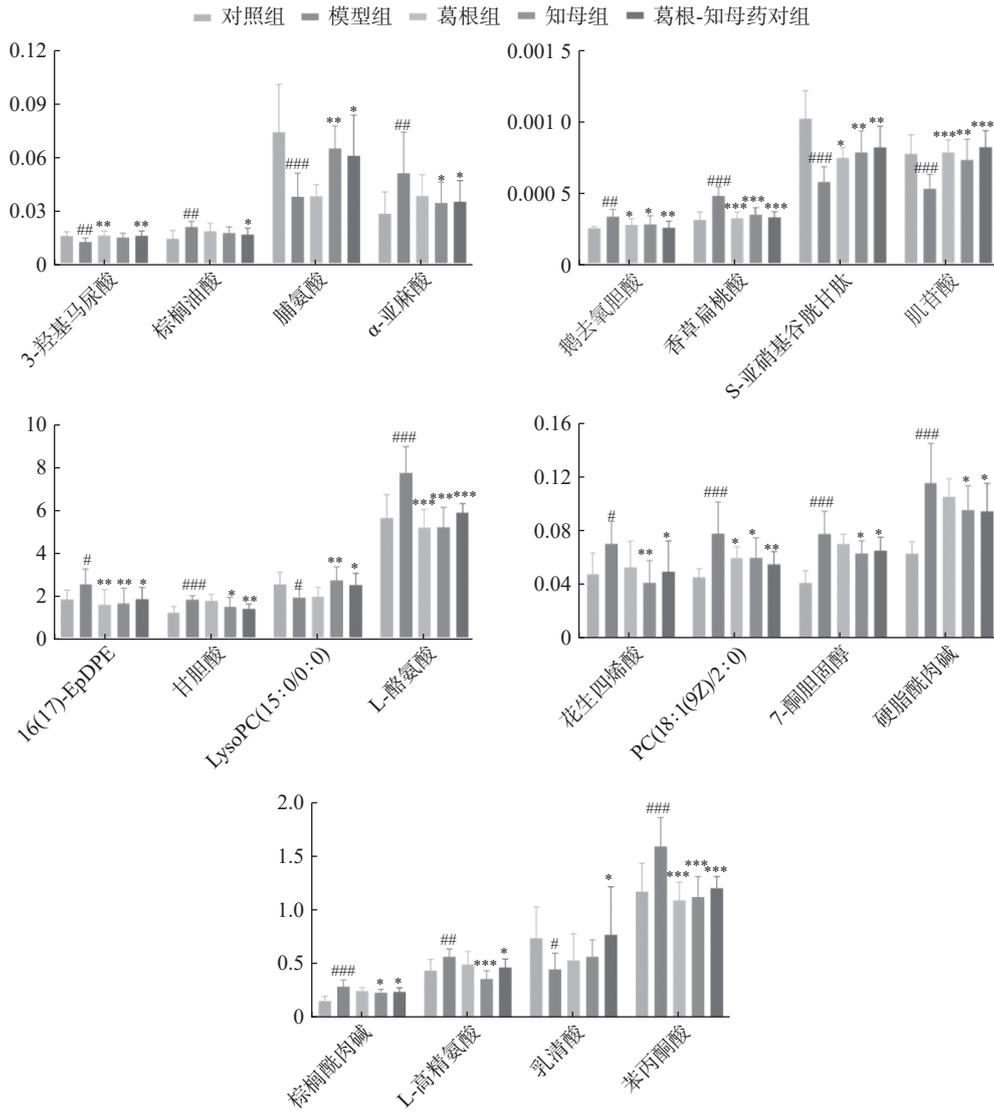


图5 20个显著下调代谢物在不同组间的相对信号强度

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与模型组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与对照组相比

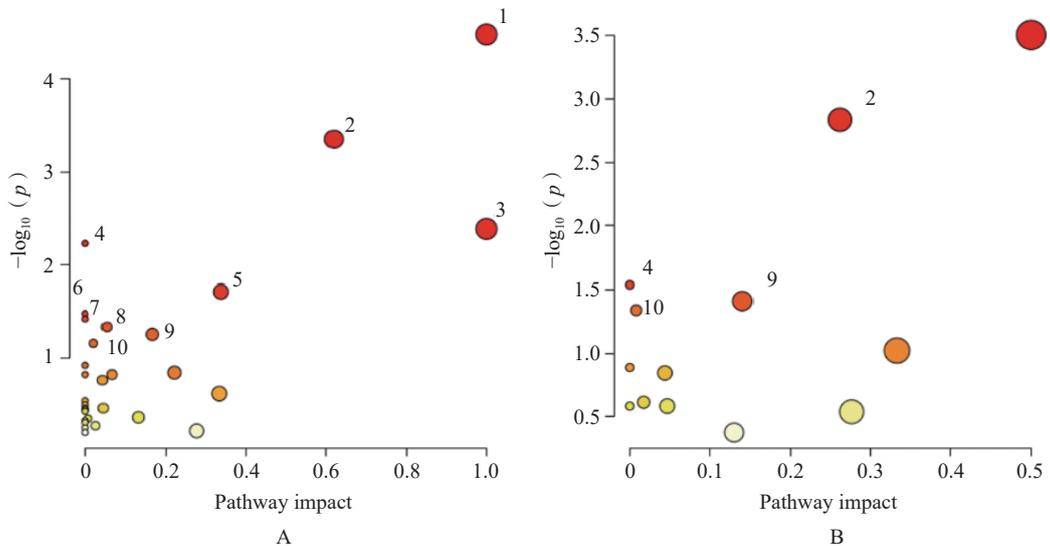


图6 各组间血清差异代谢物 KEGG 通路富集分析

A: 模型组与对照组; B: 葛根-知母药对干预后回调通路(1.苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成; 2.苯丙氨酸代谢; 3.亚油酸代谢; 4.不饱和脂肪酸的生物合成; 5.丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 6.精氨酸生物合成; 7.烟酸和烟酰胺代谢; 8.嘧啶代谢; 9.酪氨酸代谢; 10.初级胆汁酸生物合成)

改善 AD 模型大鼠的学习和记忆能力,并回调 SOD、NO 和 MDA 等相关生化指标,改善和回调效果优于单药,表明葛根和知母配伍后在 AD 防治中具有一定的增效作用,具备进一步研究的价值。

代谢组学结果表明,葛根-知母药对可以显著回调血清中 20 种代谢物,主要涉及苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、酪氨酸代谢等途径。酪氨酸是一些神经递质或者神经调节剂的前体。Liu^[16] 等对尸源样本进行非靶向和靶向代谢组学分析发现,AD 患者海马中苯丙酮酸含量普遍上调,表明苯丙氨酸代谢失调可能是 AD 病理形成的重要机制。本研究同样发现 AD 模型大鼠血清中苯丙酮酸水平较对照组显著升高,葛根-知母药对可以显著回调苯丙酮酸至生理水平。脯氨酸是一种非必需氨基酸,参与氧化还原调控和细胞凋亡,既是活性氧(ROS)清除剂,也是 ROS 生产者,因此,平衡脯氨酸水平和脯氨酸相关代谢酶活性对维系细胞生理功能至关重要。脯氨酸代谢可能会通过 ROS、细胞衰老和细胞免疫等机制影响神经元功能^[17]。Xu 等^[18] 整合代谢组学与蛋白质组学结果发现,脱脂核桃粉可以通过升高小鼠脑组织中脯氨酸等多种氨基酸水平发挥对东莨菪碱诱导的 AD 小鼠神经保护机制。这与本实验结果相似,葛根-知母药对可以通过回调脯氨酸水平发挥 AD 防治作用。

此外,本研究发现多种回调代谢物与脂质代谢密切相关。花生四烯酸和 α -亚麻酸是由多不饱和脂肪酸氧化产生的脂氧化物,广泛参与机体炎症、免疫等多种生理病理进程。花生四烯酸升高可进一步提高氧化应激水平,与 AD 等疾病进程紧密相关^[19]。AD 与胆汁酸代谢异常之间存在紧密关联,这可能与肠-肝-脑轴机制相关。有研究表明 AD 患者血浆中胆汁酸水平升高^[20]。磷脂是保持细胞膜完整性的主要物质,溶血磷脂酰胆碱是磷脂的降解产物,与磷脂代谢密切相关,磷脂代谢异常可导致溶血磷脂酰胆碱下调,表现为细胞凋亡及信号转导异常,是 AD 的潜在诱因之一^[21]。本研究表明,葛根-知母药对的 AD 防治作用效果可能与显著回调血清中花生四烯酸、 α -亚麻酸、甘胆酸、鹅去氧胆酸和溶血磷脂酰胆碱水平相关。

ROS 产生与消除之间的不平衡被称为氧化应激,氧化应激是 AD 等疾病的关键因素和共同点。NO 是 ROS 的一种,也是神经传递和炎症相关的重要因素。高水平 ROS 会触发不饱和脂肪酸的脂质过氧化,导致 MDA 等高反应性化合物的产生,因

此 MDA 是脂质过氧化和氧化应激的标志。SOD 是抵消 ROS 有害影响最有效的一线防御机制。SOD 可以通过去除超氧自由基防止更具破坏力的过氧亚硝酸盐生成,并维持体内 NO 在生理相关水平^[22,23]。代谢组学结果提示,葛根-知母药对回调干预的多种途径与氧化应激和脂质过氧化相关。ELISA 实验结果进一步表明,葛根-知母药对干预可提高 AD 大鼠体内 SOD 水平,回调 NO 和 MDA 至生理水平,提示葛根-知母药对可以通过调节氧化应激和脂质过氧化,维持体内 NO 的生理水平对 AD 产生防治作用。

综上,本文通过建立 AD 大鼠模型考察了葛根-知母药对防治 AD 的作用效果,药对药效优于单药;运用代谢组学策略揭示其改善 AD 大鼠学习和记忆能力相关的潜在代谢物和代谢路径,其作用机制可能与调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成等代谢通路、改善氧化应激和脂质过氧化水平等相关,为中药药对防治 AD 的临床应用和进一步开发提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] SCHELTEN P, De STROOPE B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. *The Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [2] KIM A Y, JERDI S A, MACDONALD R, et al. Alzheimer's disease and its treatment-yesterday, today, and tomorrow[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1399121.
- [3] YAN H Y, FENG L N, LI M Q. The role of traditional Chinese medicine natural products in β -amyloid deposition and tau protein hyperphosphorylation in Alzheimer's disease[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2023, 17: 3295-3323.
- [4] 郭凤, 郝蕊, 陈鹏德, 等. 基于肠道菌群和肠黏膜屏障探讨玉液汤防治气阴两虚证糖尿病肾病大鼠的作用研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2024, 26(05): 1308-1319.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-二部: 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 329-527.
- [6] 韩莉花, 袁欣, 杨真儿, 等. 葛根知母药对调控 HMGB1/RAGE/NF- κ B 通路改善糖尿病大鼠认知障碍 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(1): 124-130.
- [7] LIU X, HUANG R, WAN J Y. Puerarin: a potential natural neuroprotective agent for neurological disorders[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114581.
- [8] ZHANG Q, YAN Y P. The role of natural flavonoids on neuroinflammation as a therapeutic target for Alzheimer's disease: a narrative review[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(12): 2582-2591.
- [9] CHEN W Y, LI R T, ZHU S Q, et al. Nasal timosaponin BII dually sensitive *in situ* hydrogels for the prevention of Alzheimer's disease induced by lipopolysaccharides[J]. *Int J Pharm*, 2020,

- 578; 119115.
- [10] CHUNG Y, LEE H, INITIATIVE T A D N. Correlation between Alzheimer's disease and type 2 diabetes using non-negative matrix factorization[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 15265.
- [11] ZHAI W J, ZHAO M, WEI C X, et al. Obesity-induced chronic low-grade inflammation in adipose tissue: a pathway to Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 99: 102402.
- [12] KELLER J N. Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease[J]. *Ageing Res Rev*, 2006, 5(1): 1-13.
- [13] FIRDAUS Z, SINGH N, PRAJAPATI S K, et al. *Centella asiatica* prevents D-galactose-Induced cognitive deficits, oxidative stress and neurodegeneration in the adult rat brain[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(3): 1417-1426.
- [14] TYCZYŃSKA M, GĘDEK M, BRACHET A, et al. Trace elements in Alzheimer's disease and dementia: the current state of knowledge[J]. *J Clin Med*, 2024, 13(8): 2381.
- [15] CHIROMA S M, MOHD MOKLAS M A, MAT TAIB C N, et al. D-galactose and aluminium chloride induced rat model with cognitive impairments[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 103: 1602-1608.
- [16] LIU P, YANG Q, YU N, et al. Phenylalanine metabolism is dysregulated in human hippocampus with Alzheimer's disease related pathological changes[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 83(2): 609-622.
- [17] YAO Y X, HAN W P. Proline metabolism in neurological and psychiatric disorders[J]. *Mol Cells*, 2022, 45(11): 781-788.
- [18] XU X J, DING Y, LIU M H, et al. Neuroprotective mechanisms of defatted walnut powder against scopolamine-induced Alzheimer's disease in mice revealed through metabolomics and proteomics analyses[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 1): 117107.
- [19] XU M T, LIU D, WANG L L. Role of oxylipins in ovarian function and disease: a comprehensive review[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117242.
- [20] SHAO Y P, OUYANG Y, LI T B, et al. Alteration of metabolic profile and potential biomarkers in the plasma of Alzheimer's disease[J]. *Aging Dis*, 2020, 11(6): 1459-1470.
- [21] 周玲, 刘颖, 贡盈歌, 等. 阿尔茨海默病模型小鼠脑组织生物标记物代谢组学分析 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(6): 459-465.
- [22] JOMOVA K, ALOMAR S Y, ALWASEL S H, et al. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants[J]. *Arch Toxicol*, 2024, 98(5): 1323-1367.
- [23] SEIDITA A, CUSIMANO A, GIULIANO A, et al. Oxidative stress as a target for non-pharmacological intervention in MAFLD: could there be a role for EVOO?[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(6): 731.
- [收稿日期] 2024-09-13 [修回日期] 2024-11-06
[本文编辑] 蔺森