

基于血清代谢组学和网络药理学研究二至丸 抗阿尔茨海默病的作用机制研究

刘国良^{1,2}, 李丽¹, 雷霞², 徐红丹³, 张宁², 姚远^{1*}

¹哈尔滨体育学院运动分子生物学实验室, 哈尔滨 150006; ²黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;

³无锡卫生高等职业技术学校, 无锡 214028

摘要:本研究采用高通量血清代谢组学及网络药理学技术探究二至丸对阿尔茨海默病的药效机制。将 60 只雄性 SD 大鼠按体重随机分 6 组, 每组 10 只, 即为假手术组、模型组、阳性药组、低剂量组、中剂量组和高剂量组。模型组和各给药组大鼠给与 *D*-半乳糖腹腔注射和双侧脑室注射 β 淀粉样蛋白 25-35 ($A\beta_{25-35}$) 建立阿尔茨海默病大鼠模型, 模型制备第 6 周后, 给药组每天给与相应药物进行干预, 其他组给与相同体积生理盐水(4 周), 采用 Morris 水迷宫实验观测各组大鼠空间学习记忆能力, 采用 Western blotting 检测大鼠海马 tau 蛋白表达。利用高通量血清代谢组学技术结合模式识别方法寻找内源性差异代谢物及相关代谢通路; 采用网络药理学技术探究二至丸的潜在活性成分、关键靶点, 进一步将代谢组学与网络药理学技术整合聚焦关键靶标及成分, 最终采用分子生物学技术靶向验证。通过水迷宫实验及大鼠海马 tau 蛋白程度, 证明模型制备成功。代谢组学结果显示模型组与假手术组代谢轮廓发生明显分离, 给药组处于假手术组和模型组间, 证明模型组大鼠的整体代谢发生显著变化, 给与二至丸后呈现回调趋势。代谢组学结果发现 16 个生物标记物, 主要涉及 10 个代谢通路。网络药理学结果显示二至丸内主要有 β -谷甾醇、山柰酚、紫杉醇等 13 个潜在有效成分、与阿尔茨海默病相关的直接作用靶标有毒蕈碱型乙酰胆碱受体 M1 等 11 个蛋白成分。基于以上可知, 二至丸对阿尔茨海默病大鼠有很好的干预作用, 其可能通过槲皮素对组织蛋白酶 D 直接调控作用达到干预疾病的目的。

关键词:二至丸; 阿尔茨海默病; 代谢组学; 网络药理学; 槲皮素; 组织蛋白酶 D

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)6-1027-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.6.012

Mechanism of Erzhi Pill against Alzheimer's disease based on serum metabolomics and network pharmacology

LIU Guo-liang^{1,2}, LI Li¹, LEI Xia², XU Hong-dan³, ZHANG Ning², YAO Yuan^{1*}

¹Molecular Biological Laboratory of Sports, Harbin Institute of Physical Education, Harbin 150006, China;

²Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

³Wuxi Higher Vocational and Technical School of Health, Wuxi 214028, China

Abstract: This present investigation uses high throughput serum metabolomics and network pharmacology techniques to explore the pharmacological mechanism of Erzhi Pill in treating Alzheimer's disease. Sixty male SD rats were randomly divided into 6 groups according to their body weight, with 10 in each group, namely, sham operation group, model group, positive drug group, low dose group, and medium dose combined high dose group. Rats in the model group and each administration group were given intraperitoneal injection of *D*-galactose and bilateral intraventricular injection β amyloid protein 25-35 ($A\beta_{25-35}$) to establish a rat model of Alzheimer's disease. After the sixth week of model preparation, the medication group was given corresponding drugs for intervention every day, while the other groups were given the same volume of physiological saline (4 weeks). The spatial learning and memory abilities of rats in each group were observed using Morris water maze experiment,

收稿日期: 2022-10-04 接受日期: 2023-04-25

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (LH2020H101); 黑龙江中医药大学校基金 (201516); 黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目 (2021KYYWF-FC04, 2021KYYWF-FC14); 无锡市卫生健康委科研项目面上项目 (M202170)

* 通信作者 Tel: 86-451-82766474; E-mail: yaoyuan841109@126.com

and the expression of tau protein in the hippocampus of rats was detected using Western blotting. Using high throughput serum metabolomics technology combined with pattern recognition methods to search for endogenous differential metabolites and related metabolic pathways; Using network pharmacology technology to explore the potential active ingredients and key targets of Erzhi Pills, further integrating metabolomics and network pharmacology technology to focus on key targets and components, and ultimately adopting molecular biology technology for targeted verification. The water maze experiment and the degree of tau protein in the hippocampus of rats proved that the model was successfully prepared. The metabolomics results showed that the metabolic profile of the model group and the sham operation group was significantly separated, and the administration group was between the sham operation group and the model group, which demonstrated that the overall metabolism of the model group rats had significant changes, and there was a trend of regression after administration of Erzhi Pill. The results of metabolomics revealed 16 biomarkers, mainly involving 10 metabolic pathways. The results of network pharmacology show that Erzhi Pill mainly contains 13 compounds including β -sitosterol, kaempferol, etc. and 11 protein components such as the toxic muscarinic acetylcholine receptor M1, a direct target associated with Alzheimer's disease. Based on the above, it can be seen that Erzhi Pill has a good intervention effect on Alzheimer's disease rats, which may achieve the purpose of intervention through the direct regulation of quercetin on cathepsin D.

Key words: Erzhi Pill; Alzheimer's disease; metabolomics; network pharmacology; quercetin; cathepsin D

二至丸出自明代经典方剂《医便》卷一,具有滋补肾精、止血、强身健骨等功效。二至丸由冬青子和旱莲草组成。药理研究表明,二至丸具有抗衰老、抗炎、抗肿瘤等作用^[1]。相关研究发现二至丸能改善D-半乳糖诱导衰老大鼠的学习记忆能力,具有抗衰老功能,清除脑自由基,保护神经元^[2]。二至丸的活性成分,如槲皮素、香叶醇、 β -谷甾醇、橙花醇和伊草地黄,可能改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),这些化合物的作用机制与PI3K/Akt信号通路密切相关。目前,二至丸的研究仅在整体疗效水平上进行,其抗AD机制尚未阐明,极大地阻碍了其临床应用。

AD是一种进行性的神经退行性疾病,目前影响全球5 000多万人,预计将成为老龄化人口的主要问题,给患者、家庭和医疗系统带来巨大负担。AD是最常见的年龄相关性痴呆,约占所有痴呆病例的70%^[3]。虽然AD的最终阳性诊断仍需要对脑组织进行死后分析,但已经提出了越来越多的关于脑脊液、血液和正电子发射断层扫描成像生物标记物,并预计结合临床标准和评估,能够提供早期诊断,活体患者的敏感性和特异性诊断。AD的特征是细胞外淀粉样 β (A β)斑块、由微管稳定蛋白tau的截短和磷酸化形式组成的神经内包涵体(神经原纤维缠结)、营养不良的神经突起、突触和神经元的缺失,和一个突出的胶质增生,涉及小胶质细胞和星形胶质细胞的形态和功能的改变。近年来血液代谢组学技术已经在AD的疾病诊断及机制研究发明发挥巨大的作用,甚至可以作为筛查AD的特定检测

工具^[4]。AD的代谢基础知之甚少,代谢系统异常与AD发病机制之间的关系尚不清楚。了解整体代谢紊乱如何与AD神经病理学的严重程度以及AD症状在高危人群中的最终表达相关,对于开发有效的疾病改善治疗至关重要。网络药理学是人工智能和大数据时代药物系统性研究的新兴、交叉、前沿学科,强调从系统层次和生物网络的整体角度出发,解析药物及治疗对象之间的分子关联规律,被广泛应用于药物和中药活性化合物发现、整体作用机制阐释、药物组合和方剂配伍规律解析等方面,为中药复杂体系研究提供了新思路,为临床合理用药、新药研发等提供了新的科技支撑。因此本研究采用高通量代谢组学结合网络药理学技术对其进行研究,以期发现潜在成分及与疾病相关的核心代谢物,阐明药物的作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

超高效液相-飞行时间质谱UPLC-G2Si-Q/TOF-MS联用系统(Waters公司,美国);ME-T分析天平(梅特勒-托利多公司,瑞士);Aisrv-3.0超纯水机(雪莱生物科技有限公司,中国南京);WMT-100S型Morris水迷宫(泰盟仪器有限公司,中国)。D-半乳糖(批号g0625,美国Sigma公司); β 淀粉样蛋白25-35(A β ₂₅₋₃₅,批号A0331A,美伦生物公司);水合氯醛(批号20200709,上海源叶生物技术有限公司);抗 β 淀粉样蛋白1-42(批号ab101481:100,艾博抗(上海)贸易有限公司);一抗为兔抗鼠Cathepsin D抗体

(北京博奥生物公司);二抗为生物素标记的山羊抗兔 IgG 抗体(北京博奥生物公司);二至丸(江西仁丰药业有限公司);盐酸多奈哌齐(上海源叶生物科技有限公司)。

1.2 药材

木犀科植物女贞的果实女贞子(Ligustri Lucidi Fructus)、菊科鳢肠属植物鳢肠的地上干燥部分墨旱莲(Ecliptae Herba)于2022年1月购自哈尔滨同仁堂药店,经黑龙江中医药大学陈孝忠副教授鉴定为正品。

1.3 实验动物分组与用药

SPF级雄性SD大鼠60只,体重(170±10)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,动物合格证SCXK(黑)20210117,伦理审批号:SYXK(黑)2022-008。给予自由饮食和饮水,饲养条件:仿照自然环境给予明暗交替光照,温度设定为23±3℃,相对湿度设定为60%。适应环境1周后将其分成6组,即假手术组(sham operation group, So)、模型组(model group, Mod)、阳性药组(positive group, Pos)、低剂量组(Erzhi Pill low dose, EZ-L)、中剂量组(Erzhi Pill medium dose, EZ-M)、高剂量组(Erzhi Pill high dose, EZ-H)。大鼠灌胃体积为1 mL/100 g,二至丸按照临床等效剂量折算,得到大鼠的实际给药剂量为每天0.3 g/200 g^[5],以此为中剂量、1/2为低剂量、2倍为高剂量。盐酸多奈哌齐折算临床等效剂量,得到大鼠的实际给药剂量为每天0.09 mg/200 g。

1.4 AD大鼠模型复制及样本制备

各组大鼠适应性实验1周后根据体重随机分成6组,即假手术组、模型组、阳性药组、低剂量组、中剂量组、高剂量组。采用腹腔注射D-半乳糖联合双侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 方法复制AD大鼠模型。模型组及给药组大鼠每天腹腔注射1次D-半乳糖,剂量为150 mg/kg。6周后进行双侧脑室 $A\beta_{25-35}$ 注射实验。即,大鼠麻醉后给与常规备皮及消毒处理,钻开颅骨(正中矢状切口,前囟后3 mm,矢状缝左右旁开2.5 mm),微量注射器垂直向下3 mm,双侧脑室注射5 μ g的 $A\beta_{25-35}$ (1 μ g/ μ L),假手术组注射等量生理盐水;造模6周后灌胃给与二至丸进行干预(1.5 g/(kg·d)),共4周;实验第71 d早腹主动脉取血收集血液样本,静置30 min后离心(4℃、3 500 r/min、10 min),取100 μ L上层血清置于1.5 mL离心管

中,加入400 μ L的甲醇,涡旋30 s,震荡2 min,4℃,3 500 r/min离心10 min,取上清液,过0.22 μ m滤膜,取上清液即得,同时取海马组织进行后续检测。

1.5 Morris水迷宫实验

Morris水迷宫是由英国心理学家Morris设计并使用,包括定向航行实验和空间探索实验两个过程,并能通过逃避潜伏期、逃避潜伏路程、靶象限停留时间、穿越平台次数、平均游泳速度、游泳轨迹等体现动物的学习记忆能力。迄今为止,Morris水迷宫是研究动物海马损害所导致的空间学习记忆能力的公认为学方法,是检测空间位置感和方向感的学习记忆能力的首选经典实验方法。

首先是空间定向航行实验,即每天将大鼠从四个象限依次放入水中,仪器自动记录大鼠游到水中平台上时间,即为逃避潜伏期;若60 s内大鼠未能找到平台,则操作者需手动将其引至平台停留10 s;然后是空间搜索实验,即实验第6 d撤除平台,任其自由搜索60 s,记录总路程及平台滞留时间。

1.6 免疫印迹观察海马组织 $A\beta_{1-42}$ 沉积情况

各组提取海马组织蛋白。SDS电泳,转膜,一抗4℃(1:200)孵育过夜,二抗室温(1:10 000)孵育30 min,DBA显色。凝胶成像观察海马区 $A\beta_{1-42}$ 沉积情况并拍照。结果通过Image-Pro Plus 6.0对 $A\beta_{1-42}$ 的平均光密度(integrated optical density, IOD)值进行半定量分析。

1.7 血清代谢组学分析条件

色谱柱:Waters UPLCTM HSS T₃ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μ m),柱温45℃,流动相A为0.1%乙腈,流动相B为0.1%甲酸水,流速为0.3 mL/min,进样体积为4 μ L,色谱洗脱梯度见表1。

表1 AD大鼠血液代谢组学色谱条件

Table 1 Blood metabolomic chromatographic conditions of AD rats

时间 Time(min)	流速 Flow(mL/min)	A(%)	B(%)
0.0	0.30	1	99
1.0	0.30	15	85
3.5	0.30	71	29
6.0	0.30	72	28
11.5	0.30	99	1
12.0	0.30	1	99
15.0	0.30	1	99

1.8 网络药理学分析

1.8.1 二至丸数据库信息获取及体内作用靶标预测

基于中药系统药理学数据库与分析平台 TCM-SP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 和 Way2drug 数据库 (<http://www.way2drug.com/PAS-SONline/>), 将二至丸组方药材, 即女贞子和墨旱莲的英文名称带入其中, 并设置口服药物生物利用度 (oral bioavailability, OB) 大于 30% 和类药性 (drug-likeness, DL) 大于 0.18 值域, 筛选符合标准的潜在药效成分。

1.8.2 AD 相关靶点信息获取

基于比较毒素基因组学数据库 CTD (<http://ctdbase.org/>) 数据库, 以关键词为“Alzheimer disease”检索相关已知的发病靶标。

1.8.3 维恩分析法获取同时满足条件的靶标成分并富集分析

采用维恩分析法分析获取同时满足条件的靶标作为研究对象, 并采用 R 语言进行 Go 富集分析, 富集分析的条件是选择前 20 位成分进行富集分析, 明确其发病通路。

1.9 数据处理

Morris 水迷宫数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析 (SPSS 公司, 美国芝加哥), T' TETS < 0.05 被认为具有统计学意义; 代谢组学研究采用 MassLynx V4.1 (Waters 公司, 美国) 对含有代谢数据进行数据预处理, 将生成的 USP 文件转至 EZinfo 2.0 (Waters 公司, 美国), 以重要变量投影 VIP > 1 值及 T 检验 T' TETS < 0.05 值作为依据进行筛选, 并根据人类代谢组数据库 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 对符合标准的成分进行筛选, 通过内源性 & 在线质谱数据库进行匹配, 最后通过代谢物富集分析。

2 结果

2.1 定向航行实验结果

AD 模型造模成功的标准为是发现逃避潜伏期显著延长、空间搜索减少及海马组织中 $A\beta_{1,42}$ 明显聚集^[8-10]。如表 2 所示, 与假手术组相比, 模型组第 3 d 的逃避潜伏期出现延长 ($P < 0.05$), 第 4、5 d 的逃避潜伏期程度加大 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 实验第 3 d 的低剂量和中剂量组逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$), 第 4、5 d 低剂量、中剂量和高剂量的逃避潜伏期均明显缩短 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期测试结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Results of Morris water maze escape latency test of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	逃避潜伏期时间 Escape latency time (s)				
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
So	31.67 ± 1.68	30.59 ± 1.77	28.18 ± 1.69	20.19 ± 1.64	10.58 ± 1.04
Mod	33.96 ± 8.13	33.05 ± 2.69	31.59 ± 2.56*	30.23 ± 3.68**	28.58 ± 3.65**
Pos	33.68 ± 1.19	32.49 ± 1.13	25.11 ± 1.58 [#]	20.67 ± 1.65 ^{##}	18.01 ± 1.73 ^{###}
EZ-L	32.58 ± 1.11	32.01 ± 2.68	27.65 ± 2.68 [#]	23.59 ± 1.69 ^{##}	20.58 ± 3.65 ^{###}
EZ-M	31.56 ± 4.65	32.11 ± 4.98	28.01 ± 2.65 [#]	24.11 ± 5.95 ^{##}	24.65 ± 3.33 ^{###}
EZ-H	32.61 ± 4.33	30.94 ± 2.54	29.58 ± 4.51	23.61 ± 3.49 ^{##}	15.65 ± 4.31 ^{###}

注: 与 So 组比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与 Mod 组比, * $P < 0.05$; [#] $P < 0.01$, 下同。

Note: Compared with So, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with Mod, * $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$, the same below.

2.2 空间搜索实验结果

如表 3 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠 60 s 内总路程、停留时间及有效区域进入次数均出现极

显著差异性的减少 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 各给药组大鼠 60 s 内总路程、停留时间、有效区域进入次数均显著回调 ($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠第 6 天 Morris 水迷宫空间搜索测试结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Morris water maze spatial search test results of rats in each group on the 6th day ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	60s 内总路程 Total distance within 60s (mm)	目标平台停留时间 Target platform dwell time (s)	有效区域进入次数 Number of valid area entries (次)
So	20 214.94 ± 4 953.68	30.58 ± 9.13	6.94 ± 1.94
Mod	115 58.95 ± 5 693.15**	10.64 ± 5.48**	1.64 ± 0.11**

续表 3 (Continued Tab. 3)

组别 Group	60s 内总路程 Total distance within 60s (mm)	目标平台滞留时间 Target platform dwell time (s)	有效区域进入次数 Number of valid area entries (次)
Pos	19 528.58 ± 5 485.13 ^{##}	19.64 ± 6.96 ^{##}	4.65 ± 1.90 ^{##}
EZ-L	18 598.54 ± 3 694.58 ^{##}	21.53 ± 5.95 ^{##}	5.61 ± 1.25 ^{##}
EZ-M	19 717.42 ± 4 258.58 ^{##}	22.69 ± 4.98 ^{##}	5.19 ± 1.31 ^{##}
EZ-H	20 014.11 ± 3 986.43 ^{##}	23.69 ± 5.68 ^{##}	6.01 ± 0.96 ^{##}

2.3 各组大鼠海马组织 p-p38/p38 表达结果

如图 1 和表 4 所示,与假手术组比,模型组大鼠海马组织 Aβ₁₋₄₂ 的表达出现极显著差异性升高 (P < 0.01)。与模型组相比,给药组大鼠海马组织中 Aβ₁₋₄₂ 的表达出现回调 (P < 0.05)。

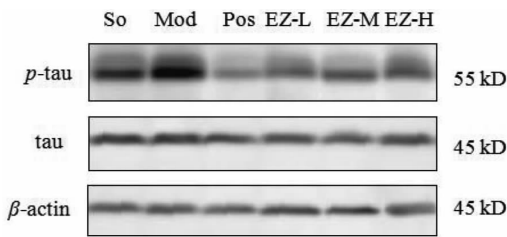


图 1 二至丸对鼠海马 p-p38/p38 表达的影响

Fig. 1 Effect of Erzhi Pill on the expression of p-p38/p38 in rat hippocampus

2.4 代谢组学结果

采用 MassLynx 对代谢组数据进行数据预处理和降维处理后,采用 EZinfo 软件可视化整体代谢分布。如图 2 所示,假手术组和模型组分离明显,证明 AD 大鼠与正常状态下的整体代谢状态已经发生明显异常变化,给药组处于假手术组和模型组间证明二至丸对 AD 大鼠的干预作用明显,使 AD 大鼠的整体代谢轮廓向假手术组方向发展,虽然整体代谢轮廓和假手术组的代谢分布还有一定距离,但已与模型组大鼠分离明显。此时,针对假手术组和模型组的所有代谢成分进行有监督的正交偏最小二乘判别分析,从该模块中的 S 图分析中,选择远离原点的成分作为对假手术组和模型组分组明显的贡献性成分进行进一步研究(见图 3 中红色图标),同时结合 VIP 值大小和 T'TEST 值对代谢物进行筛选。

经上述分析,最终得到与 AD 发生发展密切相关的 16 个血液生物标记物(见表 5)。分别得到尿苷、3-羟基邻氨基苯甲酸、对甲酚硫酸盐、对甲酚、N-乙酰 5-羟色胺、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸盐、4-胍基丁酸、腺苷、肌酐、香草基扁桃酸、牛磺酸、硫酸吡啶氧基、高香草酸、柠檬酸、甘氨酸、天冬氨酸。代谢通路富集分析结果显示主要涉及色氨酸代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、能量代谢、乙醛酸和二羧酸代谢(见图 4)。

表 4 大鼠海马 p-p38/p38 表达结果 (x ± s, n = 10)

Table 4 Expression of p-p38/p38 in rat hippocampus (x ± s, n = 10)

组别 Group	IOD
So	0.119 ± 0.011
Mod	0.328 ± 0.022 * *
Pos	0.271 ± 0.017 [#]
EZ-L	0.264 ± 0.031 [#]
EZ-M	0.259 ± 0.046 [#]
EZ-H	0.231 ± 0.034 ^{##}

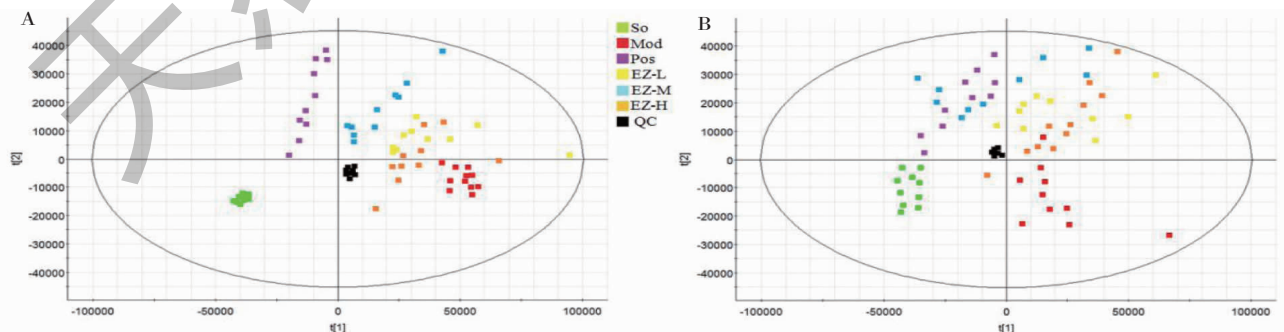


图 2 AD 大鼠模型血液主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of blood in AD rat model

注:A. 正离子模式;B. 负离子模式。Note:A. Positive ion mode;B. Negative ion mode.

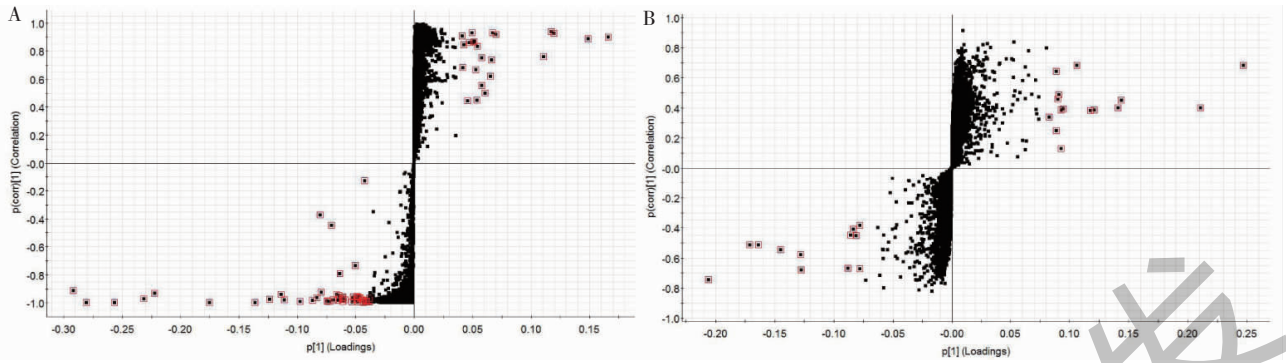


图3 AD大鼠模型血液 OPLS-DA 分析

Fig. 3 Analysis of OPLS-DA in blood of AD rat model

注:A. 正离子模式;B. 负离子模式。Note:A. Positive ion mode;B. Negative ion mode.

表5 AD大鼠血液生物标志物

Table 5 Blood biomarkers of AD rats

编号 No.	相对保留时间 Relative retention time	<i>m/z</i>	代谢物 Metabolite	人类代谢组数据库编号 HMDB ID	VIP	模型组 Mod	
						<i>t</i> 检验 <i>t</i> -test	与假手术组相比 Compared with So group
1	1.35	244.201 4	尿苷 Uridine	HMDB0000296	1.65	0.013	↑
2	2.68	153.135 4	3-羟基邻氨基苯甲酸 3-Hydroxyanthranilic acid	HMDB0001476	2.68	0.025	↑
3	3.06	188.201 0	对甲酚硫酸盐 <i>p</i> -Cresol sulfate	HMDB0011635	1.52	0.016	↑
4	3.16	108.137 8	对甲酚 <i>p</i> -Cresol	HMDB0001858	9.82	0.001	↑
5	3.95	218.251 8	<i>N</i> -乙酰 5-羟色胺 <i>N</i> -Acetylserotonin	HMDB0001238	8.28	0.009	↑
6	4.59	264.252 0	3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸盐 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate	HMDB0000559	6.81	0.029	↑
7	4.94	145.159 7	4-胍基丁酸 4-Guanidinobutanoic acid	HMDB0003464	5.28	0.002	↑
8	5.59	267.241 3	腺苷 Adenosine	HMDB0000050	4.59	0.019	↑
9	6.95	113.117 9	肌酐 2-Ketobutyric acid	HMDB0000562	9.29	0.049	↑
10	6.99	198.172 7	香草基扁桃酸 Vanillylmandelic acid	HMDB0000291	6.58	0.041	↓
11	7.01	125.147 0	牛磺酸 Taurine	HMDB0000251	4.59	0.018	↓
12	7.28	213.210 0	硫酸吲哚氧基 Indoxyl sulfate	HMDB0000682	11.58	0.003	↑
13	8.59	182.173 3	高香草酸 Homovanillic acid	HMDB0000118	2.94	0.065	↓
14	9.05	192.123 5	柠檬酸 Citric acid	HMDB0000094	3.94	0.028	↑
15	9.65	75.066 6	甘氨酸 Glycine	HMDB0000123	6.36	0.035	↑
16	11.05	133.102 7	天冬氨酸 Aspartic acid	HMDB0006483	1.66	0.056	↑

注:“↑”表示含量升高;“↓”表示含量降低。

Note:“↑”indicates an increase in content;“↓”indicates a decrease in content.

2.5 网络药理学结果

2.5.1 主要成分及 ADME 性质

TCMSP 中药成分数据库 (<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>) 中二至丸符合毒物动力学吸收、分布、代谢及排泄 (absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME) 的潜在成分有 12 个 (见表 6)。

基于此基础上,进行以“Alzheimer disease”为关键词的检索,快速锁定与之先关的 11 个靶点 (孟德尔遗传数据库、<https://www.omim.org/>),分别为毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1、组织蛋白酶 D、髓过氧化物酶、前列腺素 G/H 合酶 2、神经元乙酰胆碱受体蛋白、 γ -氨基丁酸受体 α -5 亚单位、淀粉样 β A4 蛋白、毒蕈碱乙酰胆碱受体 M2、丝裂原活化蛋白激酶 14、

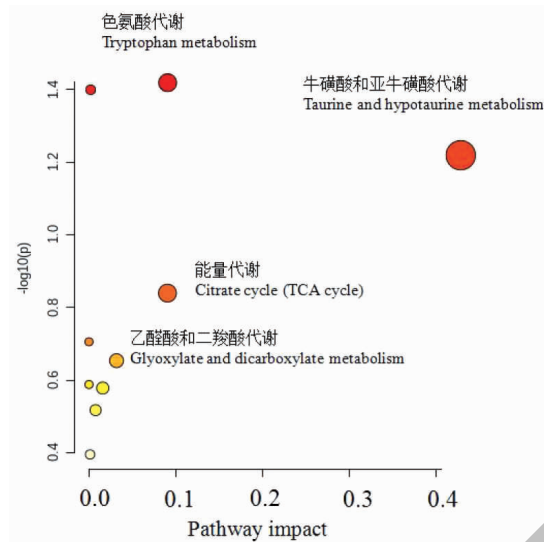


图4 AD大鼠血液代谢通路富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of blood metabolic pathway in AD rats

糖原合成酶激酶-3 β 、乙酰胆碱酯酶。通过对符合标准的20个成分进行分子对接进行筛查 ([http://](http://www.way2drug.com/PASSOnline/)

www.way2drug.com/PASSOnline/), 最终发现12个潜在靶标(见图5)。

表6 二至丸符合ADME标准的潜在成分

Table 6 Potential components of Erzhi Pills in accordance with ADME standards

序号 No	MOL文件序列 Mol ID	成分 Component	分子量 Molecular weight	OB(%)	DL
1	MOL001790	β -谷甾醇 β -Sitosterol	592.6	39.84	0.71
2	MOL001689	金合欢素 Acacetin	284.28	34.97	0.24
3	MOL002975	芸香甙 Butin	272.27	69.94	0.21
4	MOL003378	二氢槲皮素 Taxifolin	300.23	33.94	0.43
5	MOL003389	3'-O-甲基香豌豆苷元 3'-O-Methylorobol	300.28	57.41	0.27
6	MOL003398	红车轴草素 Pratensein	299.27	39.06	0.28
7	MOL003402	去甲螞蝗菊内酯 Demethylwedelolactone	302.25	72.13	0.43
8	MOL003404	螞蝗菊内酯 Wedelolactone	314.26	49.6	0.48
9	MOL000006	木犀草素 Luteolin	286.25	36.16	0.25
10	MOL000098	槲皮素 Quercetin	302.25	46.43	0.28
11	MOL001790	圣草酚 Eriodictyol	592.6	39.84	0.71
12	MOL001689	山奈酚 Kaempferol	284.28	34.97	0.24

2.5.2 富集分析结果

在此基础上,对同时满足条件的12个靶标进行富集分析,结果见图6,KEGG富集分析结果见图7。通过对图6分析可知二至丸治疗AD过程中,涉及前二十位的通路分别为胆碱能突触、AD、神经活性配体-受体相互作用、IL-17信号通路等。其中前两位直接与目前发现的AD发病机制,即“胆碱能损伤假说”密切相关。通过KEGG富集分析(见图7)可

知,该通路中多处参与AD的靶蛋白活动。

2.6 验证分析

如图8所示,我们通过Western blot分析检测组织蛋白酶 Cathepsin D 的表达,分析结果显示,与假手术组比较,模型组 Cathepsin D 表达明显增高($P < 0.05$),与假手术组比较,给药组 Cathepsin D 表达明显减少($P < 0.05$)。

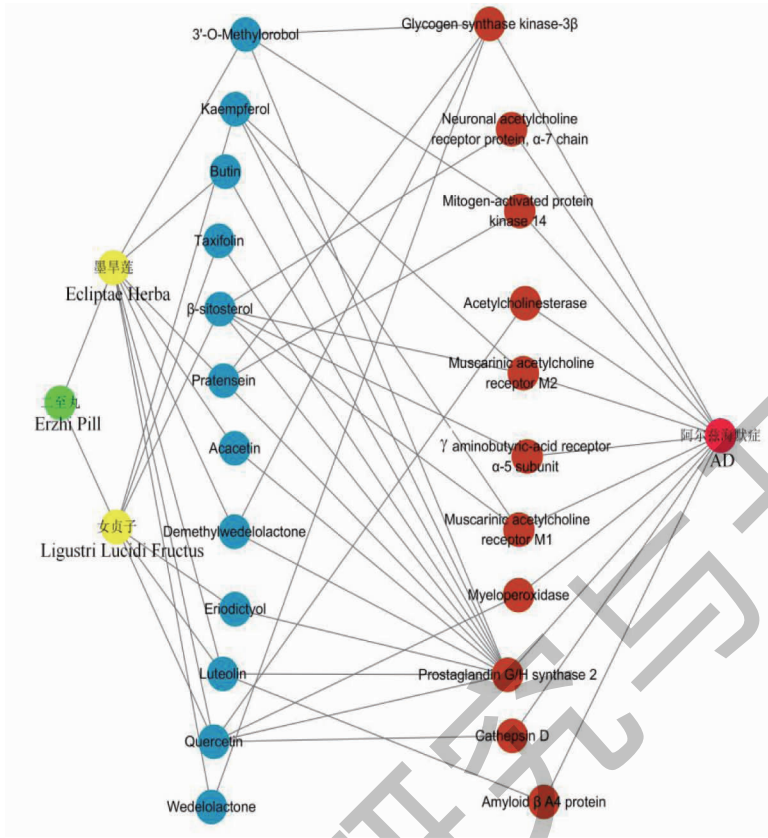


图 5 二至丸治疗 AD 的网络示意图

Fig. 5 Network diagram of Erzhi Pill in treating AD

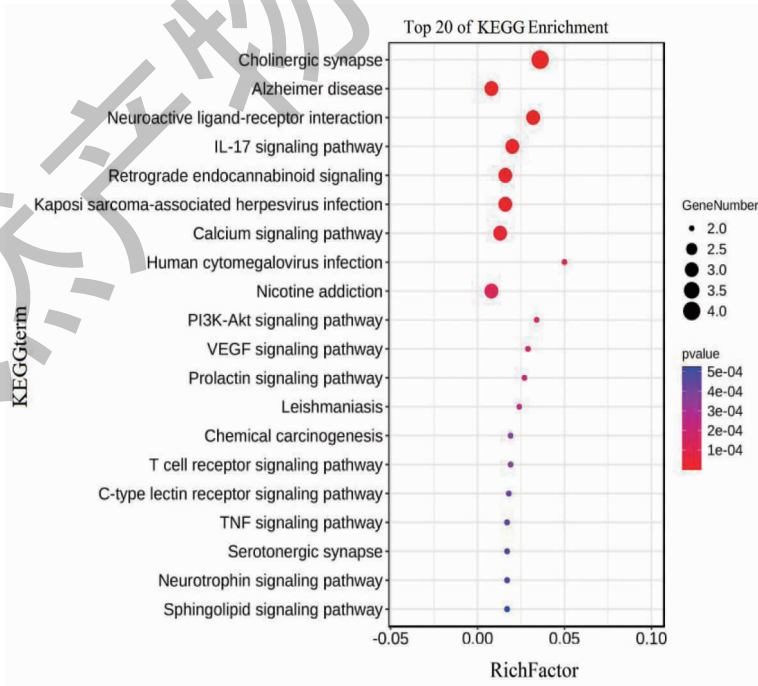


图 6 二至丸治疗 AD 核心靶标 KEGG 富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of the core target of Erzhi Pill in treating AD

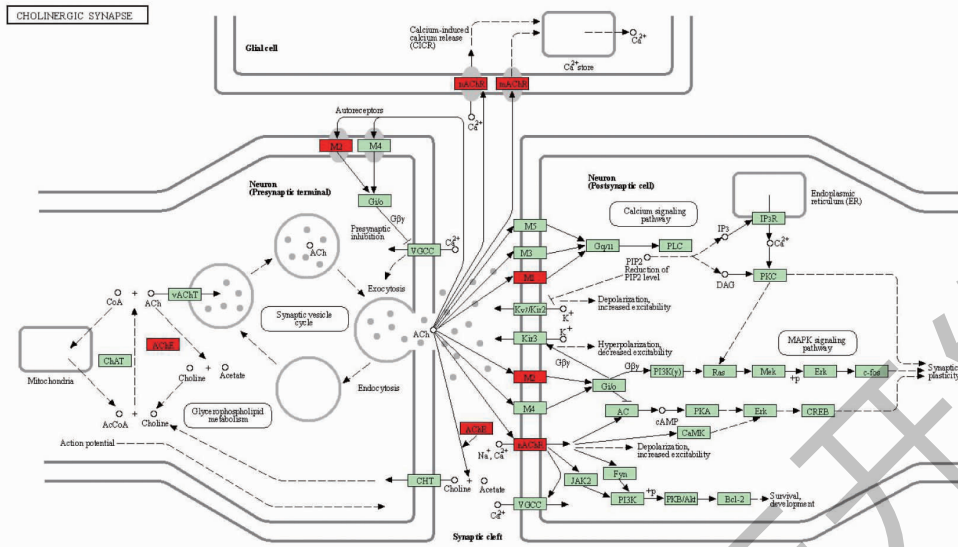


图 7 胆碱能突触的 KEGG 通路图

Fig. 7 KEGG pathway map of cholinergic synapse

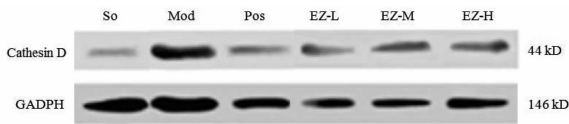


图 8 各组大鼠脑皮层中 Cathepsin D 蛋白表达

Fig. 8 Cathepsin D protein expression in cerebral cortex of rats in each group

2.7 代谢组学和网络药理学结果整合分析

通过将 16 个生物标记物带入 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>), 手动检索与之相关的所有蛋白名称, 并进行总结和整理。同时将网络药理学预测靶蛋白结果与代谢组学结果相关的靶点进行维恩分析, 取二者交集, 结果显示为组织蛋白酶 D (cathepsin D), 其为女贞子和墨旱莲共有成分中槲皮素的对接靶标, 同时, 生物标记物腺苷 adenosine 与网络药理学预测靶标组织蛋白酶 D 同属于糖尿病心肌病代谢通路 (diabetic cardiomyopathy pathway)。因此, 此交集结果即为整合分析结果。

3 讨论和结论

本研究通过代谢组学技术发现 15 个与 AD 密切相关的血液生物标记物, 其代谢机制及生理学意义不同程度上都与 AD 的发展相关, 阐述如下。

机体的学习记忆机制与 5-HT 等代谢物密切相关。酪氨酸是苯丙氨酸在人和动物体内羟基化产生的一种非必需氨基酸。它是肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺等单胺类神经递质的前体。多巴胺通过

中脑边缘、中脑皮层、黑质纹状体和结节-漏斗通路调节心理活动、情绪、识别、思维和推理, 间接影响记忆。3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸盐、高香草酸均为多巴胺代谢途径系统的代谢产物^[6]。在本研究中, 模型组大鼠血清中 3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸盐和 *N*-乙酰 5-羟色胺含量显著高于假手术组, 而模型组的高香草酸和香草扁桃酸的水平低于假手术组。二至丸可调节 AD 大鼠内源性代谢产物水平 ($P < 0.05$), 提示二至丸可能通过调节单胺类神经递质及其代谢产物水平, 增强 AD 大鼠的学习记忆能力。

神经系统中主要的抑制性氨基酸神经递质 γ -氨基丁酸也被认为与认知功能有关。 γ -氨基丁酸在维持大脑兴奋平衡和抑制神经传导方面起着重要作用^[7]。尸检和动物模型研究表明, 在 AD 的病理过程中存在 γ -氨基丁酸能系统功能障碍。4-胍基丁酸是 γ -氨基丁酸的前体^[8]。在精氨酸酶缺乏症患者中, 4-胍基丁酸水平升高导致多种临床综合征, 如智力低下、神经发育停滞和癫痫。在本研究中, 二至丸降低了 AD 大鼠血液中 4-胍基丁酸的含量, 推断增加了海马中的 γ -氨基丁酸含量, 表明二至丸可以促进 γ -氨基丁酸的合成, 减少高氨血症对神经系统造成的损伤, 从而发挥神经保护作用。

谷氨酸和天冬氨酸是两种主要的兴奋性氨基酸神经递质, 在神经系统兴奋性信息的传递中起着重要作用。它们与神经元的存活、突触形成和可塑性

有关。谷氨酸和天冬氨酸是突触前膜释放的兴奋性氨基酸,选择性地结合 G 蛋白介导的谷氨酸受体和 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸 (NMDA) 受体,导致钙通道开放。这增加了突触后膜中 Ca^{2+} 的内流,并参与突触传递长时程增强 (LTP) 的产生和维持。LTP 被认为是记忆形成和巩固过程中神经元生理活动的指标。模型组甘氨酸、天冬氨酸含量显著升高 ($P < 0.01$), 给药组甘氨酸、天冬氨酸含量显著降低 ($P < 0.01$)。结果表明,二至丸能抑制脑内兴奋性氨基酸的合成,从而对神经细胞起到保护作用。

牛磺酸是一种条件性必需氨基酸,特别分布于大脑皮层、海马和小脑。在中枢神经系统中,牛磺酸作为第二丰富的内源性氨基酸,在神经调节、渗透调节、钙稳态维持、膜稳定、抗氧化功能、抗炎过程和神经保护中发挥作用^[9-11]。牛磺酸在许多病理条件下也显示出神经保护作用,如 AD 和亨廷顿病。在 AD 进展过程中, $\text{A}\beta$ 单体聚集成神经毒性可溶性寡聚体 $\text{A}\beta$,导致认知障碍。据报道,AD 患者大脑中的牛磺酸含量降低,牛磺酸可抑制 $\text{A}\beta$ 的积累^[12]。此外,牛磺酸对大鼠的智力发育有显著影响。体内注射牛磺酸可以增加大脑中乙酰胆碱的含量,长期使用牛磺酸没有毒性或其他副作用^[13]。在本研究中,给予二至丸后,模型组大鼠血液牛磺酸浓度降低,二至丸治疗后显著升高。这一结果表明,二至丸可通过调节牛磺酸代谢抑制 $\text{A}\beta$ 蛋白的积累。

腺苷负责调节、整合和微调神经元活动,并影响相关的大脑功能,包括睡眠和觉醒、认知和记忆以及神经元损伤和退化。尿苷作为膜磷脂生物合成的前体^[14],已被证明可通过减少新生儿早期凋亡细胞死亡来增加脑突触的数量并长期改善学习和记忆^[15]。与假手术相比,模型组中的腺苷和尿苷水平显著升高,给药组中的腺苷和尿苷水平远低于模型组。腺苷和尿苷恢复到健康水平可能是二至丸可以通过影响神经元的结构和功能来改善 AD 大鼠的学习记忆。

色氨酸是人体必需的氨基酸,参与蛋白质和一些重要活性物质(血清素、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和烟酸)的合成,犬尿氨酸途径的不平衡与 AD 有关^[16]。犬尿氨酸途径由两个分支组成,导致黄嘌呤酸和犬尿氨酸的形成或 3-羟基邻氨基苯甲酸酯和 3-甲氧基邻氨基苯甲酸酯的产生。犬尿酸作为 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体拮抗剂被认为具有神经保护作用,而其他分支的代谢产物,包括 3-羟基邻氨基

苯甲酸和 3-甲氧基邻氨基苯甲酸酯被认为具有神经毒性。3-羟基邻氨基苯甲酸和 3-甲氧基邻氨基苯甲酸酯的积累可能导致星形胶质细胞和某些神经细胞的凋亡,从而削弱小胶质神经网络的工作,减少神经营养因子的合成,并使整个神经系统受到损伤。二至丸降低 AD 大鼠尿中 3-羟基邻氨基苯甲酸酯的含量,提示二至丸可通过减少神经毒性物质保护神经细胞。

除此之外,有研究表明组织蛋白酶 D 可能是 AD 的重要诊断因素^[17-20]。研究对照受试者和认知障碍患者的血浆样本检查了与 AD 发病机制有关的选定蛋白质水平的变化。为了对疾病进行精确分类,56 名参与者接受了临床认知测试、淀粉样蛋白正电子发射断层扫描和磁共振成像评分的白质高信号。通过免疫印迹和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检查受试者的血浆组织蛋白酶 D 水平。通过统计分析检查血浆组织蛋白酶 D 水平与 AD 相关因素和临床特征的相关性。通过定量免疫印迹和 ELISA 分析,我们发现与对照组相比,脑部淀粉样斑块沉积组织蛋白酶 D (一种主要的溶酶体蛋白酶) 的血浆水平降低。血浆组织蛋白酶 D 水平与临床痴呆评定量表总和和评分呈负相关。综合多变量逻辑回归模型表明血浆组织蛋白酶 D 水平在区分 AD 和非 AD 方面具有很高的性能。这些结果表明,血浆组织蛋白酶 D 水平与 AD 密切相关,其可以开发为 AD 的诊断生物标志物候选物。

AD 大鼠给予二至丸干预后可使尿苷、3-羟基邻氨基苯甲酸、对甲酚硫酸盐、对甲酚、*N*-乙酰血清素、3-甲氧基-4-羟基苯乙二醇硫酸盐、4-胍基丁酸、腺苷、肌酐、香草醛酸、牛磺酸、硫酸吡啶氧基、高钒酸、柠檬酸、苯乙酰甘氨酸水平恢复正常状态。通过通路富集分析结果可知二至丸可能通过调节色氨酸代谢、牛磺酸和低牛磺酸代谢、柠檬酸循环 (TCA 循环)、乙醛酸和二羧酸代谢等过程达到协同干预 AD 的目的。网络药理学结果显示方中多个成分共同起效,涉及与 AD 相关的多个靶标,体现了中药方剂多成分多靶标的协同增效过程。最重要的发现为代谢组学和网络药理学的交集结果,即组织蛋白酶 D,其可能为二至丸治疗 AD 的核心作用靶标和起效关键,与之相关的直接作用成分为槲皮素同时存在于女贞子和旱莲草中,已证实是该方剂的有效成分之一^[1]。基于以上结果,本研究认为其与治疗 AD 有重大的研究意义,进一步的验证研究会逐步聚焦在

槲皮素对组织蛋白酶 D 的相关工作。本研究的结论为二至丸抗 AD 机制研究提供了理论依据,进一步的研究仍需要进行。

参考文献

- 1 Huang SJ, Chen HX, Mu F, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of Erzhi Pills[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志),2021,36:6617-6619.
- 2 Gao HL, Wang DQ, Wang XY, et al. Effect of Erzhi Pill(二至丸) on improving cerebral nerve cell apoptosis in aging rats[J]. Chin J Integr Med(中国结合医学杂志),2010,16:504-509.
- 3 Yao bing, Hou bin, Li wenyan, et al. Effects and mechanism of tetrahydrocorysamine on apoptosis of AD cell model induced by $A\beta_{25-35}$ [J]. Nat Prod Re Dev(天然产物研究与开发),2019,31:49-54.
- 4 Zetterberg H, Burnham SC. Blood-based molecular biomarkers for Alzheimer's disease[J]. Mol Brain,2019,28,12:26.
- 5 Xie Y, Yan B, Hou M, et al. Erzhi pills ameliorate cognitive dysfunction and alter proteomic hippocampus profiles induced by *D*-galactose and $A\beta_{1-40}$ injection in ovariectomized Alzheimer's disease model rats[J]. Pharm Biol,2021,59:1402-1414.
- 6 Rich BE, Jackson JC, de Ora LO, et al. Alternative pathway for dopamine production by acetogenic gut bacteria that *O*-demethylate 3-methoxytyramine, a metabolite of catechol *O*-methyltransferase [J]. J Appl Microbiol, 2022, 133: 1697-1708.
- 7 Li H, Wang L, Nie L, et al. Sensitivity intensified ninhydrin-based chromogenic system by ethanol-ethyl acetate: application to relative quantitation of GABA metabolites[J], 2023, 13:283.
- 8 Andersen JV, Schousboe A. Milestone review: metabolic dynamics of glutamate and GABA mediated neurotransmission—the essential roles of astrocytes [J]. J Neurochem, 2023. DOI:10.1111/jnc.15811.
- 9 Terrill JR, Huchet C, Le Guiner C, et al. Muscle pathology in dystrophic rats and zebrafish is unresponsive to taurine treatment, compared to the *mdx* mouse model for duchenne muscular dystrophy[J]. Metabolites,2023,13:232.
- 10 Boerboom GM, Navarro-Villa A, van Kempen TATG. Metabolic analysis of wooden breast myopathy shows a disturbed lipid metabolism[J]. Metabolites,2022,13:20.
- 11 Wang Z, Aweya JJ, Yao D, et al. Taurine metabolism is modulated in *Vibrio*-infected *Penaeus vannamei* to shape shrimp antibacterial response and survival [J]. Microbiome, 2022, 10:213.
- 12 Muñoz-Moreno E, Simões RV, Tudela R, et al. Spatio-temporal metabolic rewiring in the brain of TgF344-AD rat model of Alzheimer's disease[J]. Sci Rep,2022,12:16958.
- 13 Ben-Azu B, Adebayo OG, Jarikre TA, et al. Taurine, an essential β -amino acid insulates against ketamine-induced experimental psychosis by enhancement of cholinergic neurotransmission, inhibition of oxidative/nitrergic imbalances, and suppression of COX-2/iNOS immunoreactions in mice [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37:2807-2826.
- 14 Brandt MJV, Nijboer CH, Nessel I, et al. Nutritional supplementation reduces lesion size and neuroinflammation in a sex-dependent manner in a mouse model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Nutrients, 2021, 14:176.
- 15 de Leeuw FA, Tijms BM, Doorduijn AS, et al. LDL cholesterol and uridine levels in blood are potential nutritional biomarkers for clinical progression in Alzheimer's disease: The NUDAD project [J]. Alzheimers Dement (Amst), 2020, 12: e12120.
- 16 Martins LB, Silveira ALM, Teixeira AL. The involvement of kynurenine pathway in neurodegenerative diseases [J]. Curr Neuropharmacol,2023,21:260-272.
- 17 Chai YL, Liang NHP, Chong JR, et al. Serum cathepsin D is a potential biomarker for Alzheimer's disease dementia and cognitive decline [J]. J Alzheimers Dis,2023,91:989-998.
- 18 Suire CN, Leissring MA. Cathepsin D: a candidate link between amyloid β -protein and tauopathy in Alzheimer disease [J]. J Exp Neurol,2021,2:10-15.
- 19 Bchir S, Boumiza S, Ben Nasr H, et al. Impact of cathepsin D activity and C224T polymorphism(rs17571) on chronic obstructive pulmonary disease: correlations with oxidative and inflammatory markers [J]. Clin Exp Med,2021,21:457-465.
- 20 Kim JW, Jung SY, Kim Y, et al. Identification of cathepsin D as a plasma biomarker for Alzheimer's disease [J]. Cells, 2021, 10:138.