

# 基于生物信息学与机器学习识别阿尔茨海默病铜死亡 生物标志物及临床验证与潜在中药预测

余郭芳, 赵晨玲, 田丽伟, 杨文明, 董婷\*  
(安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

**[摘要]** **目的:** 本研究旨在利用生物信息学与机器学习方法识别阿尔茨海默病(AD)中铜死亡相关基因生物标志物,并在临床标本水平进行验证及预测潜在中药。**方法:** 利用基因表达综合数据库(GEO)数据库获得AD组与正常组的差异表达基因,与已报告的铜死亡基因取交集,获取差异表达的铜死亡相关基因;运用机器学习方法识别AD核心铜死亡差异基因。收集临床AD患者的外周血单个核细胞,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)技术对基因相对表达量进行临床验证。通过COREMINE数据库预测潜在调控铜死亡治疗AD的中药。**结果:** 总共获得12个铜死亡相关标志物,主要参与三羧酸循环、2-氧羧酸代谢和碳代谢的通路。采用4种机器方法最终筛选得出5个核心基因,二氢硫辛酰胺脱氢酶(DLD)、谷氨酰胺酶(GLS)、丙酮酸脱氢酶E1亚基 $\beta$ (PDHB)、核因子(红细胞衍生2)相关因子2(NFE2L2)和二氢硫辛酰胺支链转酰酶E2(DBT)。临床收集正常组和AD患者各30例,与正常组比较,AD组中简易精神状态检查表(MMSE)、蒙特利尔认知评估量表(MoCA)显著降低( $P<0.01$ ),高半胱氨酸(Hcy)、白细胞介素-6(IL-6)、C反应蛋白(CRP)、 $\beta$ 淀粉样蛋白(A $\beta$ )指标显著上升( $P<0.01$ ),丙二醛(MDA)指标显著下降( $P<0.01$ ),超氧化物歧化酶(SOD)水平显著下降( $P<0.01$ ),NFE2L2和DBT mRNA相对表达量上调( $P<0.05$ ),DLD、GLS、PDHB mRNA相对表达量显著下调( $P<0.01$ )。调控铜死亡基因治疗AD的中药主要以温、平、寒四气,苦、甘、辛五味,归肝、脾、胃、肾经,功效以补气活血、祛痰化湿为主。**结论:** DLD、GLS、NFE2L2、PDHB和DBT可作为AD铜死亡相关基因的新型诊断分子标志物,对应的潜在治疗中药可为中医药治疗AD提供新思路。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 铜死亡; 生物信息学; 机器学习; 中药预测

**[中图分类号]** R741;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2025)20-0160-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20250812

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250709.1623.002>

**[网络出版日期]** 2025-07-10 10:19:05 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



## Identification of Cuproptosis-related Biomarkers in Alzheimer's Disease Based on Bioinformatics and Machine Learning and Clinical Validation and Prediction of Potential Traditional Chinese Medicine

YU Guofang, ZHAO Chenling, TIAN Liwei, YANG Wenming, DONG Ting\*

(The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to identify cuproptosis-related gene biomarkers in Alzheimer's disease(AD) using bioinformatics and machine learning methods, validate them at the clinical specimen level, and predict potential traditional Chinese medicine(TCM). **Methods:** Differentially expressed genes in the AD group and normal group were obtained using the Gene Expression Omnibus(GEO) database, and intersections were taken with reported cuproptosis-related genes to obtain differentially expressed cuproptosis-related genes. Machine learning methods were applied to identify core differential genes of cuproptosis in AD. Peripheral blood's single nucleated cells from clinical AD patients were collected, and the relative gene expression was clinically verified by real-time polymerase chain reaction(Real-time PCR). Potential TCM regulating cuproptosis for AD were

**[收稿日期]** 2025-06-06

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2023ZD0505801);第二批全国西医学习中医优秀人才研修项目(spyc20230088);安徽省研究生教育质量工程项目(2024xsx110)

**[第一作者]** 余郭芳,在读博士,从事中医脑病药理与临床研究,E-mail:YGF1815440896@126.com

**[通信作者]** \*董婷,博士,教授,主任医师,从事中医脑病药理与临床研究,E-mail:876786557@qq.com

predicted by COREMINE database. **Results:** A total of 12 cuproptosis-related genes were obtained, mainly involved in pathways of tricarboxylic acid cycle, 2-oxocarboxylic acid metabolism, and carbon metabolism. Five core cuproptosis-related genes, dihydrolipoamide dehydrogenase (DLD), glutaminase (GLS), pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta (PDHB), full name nuclear factor (erythroid-derived 2)-related factor 2 (NFE2L2), and dihydrolipoamide branched-chain transacylase E2 (DBT) were finally screened using four machine methods. Thirty cases each of normal and AD patients were collected clinically. Compared with those in the normal group, minimum mental state examination (MMSE) and Montreal cognitive assessment (MoCA) were significantly decreased in the AD group ( $P<0.01$ ), Homocysteine(Hcy), interleukin(IL)-6, C-reactive protein(CRP), and  $\beta$  amyloid protein( $A\beta$ ) indexes were significantly increased ( $P<0.01$ ), and malondialdehyde(MDA) indexes were decreased ( $P<0.05$ ). Superoxide dismutase(SOD) levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ). The mRNA relative expressions of NFE2L2 and DBT were up-regulated ( $P<0.05$ ), and those of DLD, GLS, and PDHB were significantly down-regulated ( $P<0.01$ ). The TCM regulating cuproptosis-related genes for the treatment of AD were mainly based on the four Qi such as warmth, calmness, and cold, and the five flavors including bitterness, sweetness, and pungency, and it was attributed to the meridians of the liver, spleen, stomach, and kidney, with the efficacy of tonifying Qi, activating blood, eliminating phlegm, and resolving dampness. **Conclusion:** DLD, GLS, NFE2L2, PDHB, and DBT can be used as novel diagnostic molecular markers for AD cuproptosis-related genes, and the corresponding potential therapeutic TCM can provide new ideas for the treatment of AD by TCM.

**[Keywords]** Alzheimer'disease; cuproptosis; bioinformatics; machine learning; traditional Chinese medicine prediction

阿尔茨海默病(AD)是一种表现为记忆功能衰退和认知能力损伤的神经退行性疾病。病情呈持续性进展<sup>[1]</sup>,其发病人群多为中老年人。随着人口老龄化的不断加剧,AD已成为全球第五大死亡原因<sup>[2]</sup>。但AD的发病机制复杂,目前市面上研发的抗AD药物疗效仍不显著,且不良反应众多<sup>[3]</sup>,因此探索安全有效的药物刻不容缓。中医药治疗AD在我国长期临床实践中验证了其具有的独特优势,如多成分、多靶点的特点有助于全面调节机体功能,天然药物的特点也在一定程度上保证了安全性,因此本研究聚焦中药与AD病理机制,旨在为AD治疗提供新的分子靶点和中药候选药物。

近年来,诸多研究表明不同类型的细胞程序性死亡以单独或联合串扰模式参与了AD的发生、发展及预后<sup>[4-5]</sup>。铜死亡是一种区别于凋亡、焦亡、铁死亡等传统细胞程序性死亡的新型细胞死亡途径,其分子机制主要涉及大量铜离子在细胞内累积并与乙酰化蛋白发生结合,导致三羧酸循环受阻,进而大量产生活性氧化物质,最终引起细胞死亡<sup>[6]</sup>。铜稳态失衡已被证明与AD密切相关。SCALI等<sup>[7]</sup>曾报道铜离子可以影响外周中性粒细胞的增殖与分裂,且与AD的严重程度呈正相关。CHEN等<sup>[8]</sup>提出铜能够直接与 $\beta$ 淀粉样蛋白( $A\beta$ )结合,进而促进其聚集和寡聚体的形成,这一过程加剧了活性氧(ROS)的产生,并抑制了线粒体脱氢酶的活性,从而导致神经元损伤。此外,铜的过量存在会激发星形胶质细胞,触发神经炎症和 $A\beta$ 的沉积,减少星形胶质细胞的活性,损害线粒体功能,积累氧化产物,对大脑的认知功能产生负面影响<sup>[9-10]</sup>。本研究利用生物信息学方法筛选AD与铜死亡相关基因(CRGs),

并收集一定的临床样本进行临床验证,预测调控铜死亡治疗AD的潜在中药,为中医药治疗AD提供新的思路与方法。

## 1 材料

**1.1 研究对象** 选择2022年6月至2024年10月期间在安徽中医药大学第一附属医院脑病中心接受诊疗的患者。依据纳入和排除标准,对参与者的外周血中关键铜死亡指标水平及其基本信息进行了系统性收集,包括性别、年龄、既往病史及神经心理学量表评分等。同时,选取与AD组在基线资料上具有可比性的健康体检者作为健康组。所有研究对象均签署了知情同意书,本研究方案已通过安徽中医药大学第一附属医院医学伦理委员会的审查与批准,伦理审批编号2022AH-01。

**1.2 纳入标准** ①符合美国国立老化研究所和阿尔茨海默病学会(NIAAA-2024)制定的最新诊断标准<sup>[11]</sup>及国家“十四五”规划教材《中医内科学》痴呆诊断标准(2021年版)<sup>[12]</sup>;②年龄55~85岁;③简易精神状态检查表(MMSE)量表评分:小学、中学及以上患者分数分别低于20、24分;④有知情者陪同参与,能配合进行血样采集、递交知情同意书。

**1.3 排除标准** ①严重的贫血、肝肾功能异常;②不能配合相关检查及全套神经心理学测试者;③患有其他类型痴呆及重大心脑血管疾病和精神疾病病史。

**1.4 试剂与仪器** 白细胞介素-6(IL-6)、C反应蛋白(CRP)、高半胱氨酸(Hcy)试剂盒(上海科艾博生物技术有限公司,货号分别为CB10373-Hu、CB10116-Hu、CB11376-Hu); $A\beta$ 试剂盒(北京百奥莱特科技有限公司,货号LA10421);超氧化物歧化

酶(SOD)试剂盒(陕西普因特生物公司,货号SF1002);丙二醛(MDA)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号BC0025);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美国 Gene Copeia 公司,批号QP056T);RNA提取试剂盒说明书、转录试剂盒(广州信天翁生物科技有限公司,货号分别为400-100、500-101);新贝 2×S6 Universal SYBR qPCR Mix 试剂盒(上海新贝生物科技有限公司,货号Q204);L4-5K型台式低速离心机(湖南可成仪器设备有限公司);LightCycler 480 Instrument II 型 Real-time PCR 仪(德国罗氏诊断有限公司)。

## 2 方法

**2.1 差异表达 CRGs 识别和功能分析** CRGs 数据来源于已发表的文献<sup>[6,13]</sup>,并从基因表达综合数据库(GEO)中提取了公开数据集(GSE5281)。使用R中的“limma”包对AD组与健康组之间的差异表达CRGs进行分析,显著性阈值设定为 $P<0.05$ 。此外,为了更好地解释差异表达CRGs(DE-CRGs)潜在生物学作用,使用R中“clusterProfiler”包进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,显著性阈值设定均为 $P<0.05$ 。

**2.2 机器学习筛选** 利用R语言中的“caret”“dalex”“randomForest”和“xgboost”库,本研究成功构建了4种机器学习模型预测函数:随机森林(RF)<sup>[14]</sup>、支持向量机(SVM)<sup>[15]</sup>、广义线性模型(GLM)<sup>[16]</sup>及极端梯度提升(XGB)<sup>[17]</sup>。运用R语言“ROC”包绘制的受试者工作特征下曲线面积(AUC)评估预测模型准确性,AUC值越大说明预测越准确。

**2.3 观察指标检测** 受试者空腹状态下采集静脉血5 mL,采用低速离心机 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径10 cm,下同),分层,吸取上清液,按照酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒说明书分别检测IL-6、CRP、 $\alpha\beta$ 、SOD、MDA水平,酶循环法检测Hcy。下层红细胞加入磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL,充分吹打后加至红细胞裂解液中 $2\ 300\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后收集外周血单核细胞(PBMC),随后采用RNA提取试剂盒提取外周血中RNA,并检测其浓度与质量,逆转录为cDNA。使用试剂盒进行Real-time PCR 扩增,反应体系为2×SYBR qPCR SuperMix Plus 5  $\mu\text{L}$ , Primer1 0.2  $\mu\text{L}$ , Primer 2 0.2  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , RNase Free ddH<sub>2</sub>O 3.6  $\mu\text{L}$ ,反应条件为95 °C预变性2 min,共扩增40个循环,其中每个循环95 °C扩增15 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸

30 s。所有样品均重复检测6次,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对目的基因进行相对定量分析,内参引物由通用生物公司合成。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 GAGAAGGCTGGGGCTCATTT	231
	下游 AGTGATGGCATGGACTGTGG	
DLID	上游 CAAGACAGTCTGCATTGAGAAAAA	367
	下游 AACTTCTGAACCCGTGGCTAT	
PDHB	上游 TGAAGAGCGCTTTCACCTG	391
	下游 CCATTGGGCCCTCTGAAGAC	
GLS	上游 TTCAGTCCCGATTGTGGGG	893
	下游 AAGGAATGCCTTTGATCACCA	
NFE2L2	上游 AGTCACTTGTTCCTGATATTCCC	372
	下游 GGTTGGGGTCTTCTGTGGAG	
DBT	上游 GCCTCCAGAAATTGGGCTCT	261
	下游 AGCGTGACATTGTAGCACCA	

**2.4 核心基因验证分析** 使用R语言中“limma”包读取数据集GSE33000中AD组与健康组的表达数据,以验证核心基因在AD组与健康组之间是否有差异表达,并进行可视化分析。

**2.5 AD中DECRGs的中药预测** 在COREMINE数据库中设定 $P<0.05$ 的阈值,分别搜索关键DECRGs获得相关的中药。对筛选出的中药参照2020年版《中华人民共和国药典》和《中药学》<sup>[18]</sup>进行对比,对比内容包括中药名称及四气、五味、归经、功效等属性,删除不规范药物,利用中医药数据挖掘平台统计中药的性味归经和药物功效分类。

**2.6 统计学分析** 使用R4.3.0和GraphPad Prism 9.5.0软件来绘制图表。通过SPSS 25.0软件对搜集到的病人基本信息进行统计分析。计数数据以个案数呈现,并通过 $\chi^2$ 检验来比较组间数据。对于符合正态分布的计量数据,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并使用独立样本t检验来比较组间差距。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 DE-CRGs 识别及功能分析** 为了阐明CRGs在AD进展中的作用,使用GSE5281数据集评估了87名AD患者和74名健康者样本中的基因表达谱。与健康组比较,AD患者的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子2A(CDKN2A)、二氢硫辛酰胺支链转氨酶E2(DBT)、全称核因子(红细胞衍生2)相关因子

2(NFE2L2)、甘氨酸裂解系统蛋白H(GCSH)、丙酮酸脱氢酶E1亚基 $\alpha$ 1(PDHA1)、金属调节转录因子1(MTF1)基因表达水平升高,同时溶质载体家族31成员1(SLC31A1)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)、二氢硫辛酰胺脱氢酶(DLD)、谷氨酰胺酶(GLS)、二氢硫辛酰胺S-乙酰转移酶(DLAT)、丙酮酸脱氢酶E1亚基 $\beta$ (PDHB)基因表达水平降低。并对DE-CRGs进行相关性分析,其中呈正相关包括DLD与DLAT、NLRP3、PDHB、GLS、DLAT;SLC31A1与DLAT、PDHB、GLS、GCSH、NLRP3、MTF1;DLAT与PDHB、GLS、MTF1;PDHA1与CDKN2A、DBT;MTF1与NFE2L2、GCSH;GLS与PDHB、NLRP3;CDKN2A与GCSH、NFE2L2、DBT;DBT与GCSH;GCSH与NFE2L2;呈负相关的包括:DBT与NFE2L2、NLRP3、SLC31A1、DLD、DLAT、PDHB、GLS;CDKN2A与NLRP3、SLC31A1、DLD、DLAT、PDHB等;GO富集分析显示在生物过程(BP)方面,DE-CRGs在三羧酸循环、葡萄糖代谢和氧化应激中表现出富集。细胞组分(CC)的结果表明,线粒体基质可能涉及其中。此外,在分子功能(MF)方面,丙酮酸脱氢酶(NAD<sup>+</sup>)活性被突出显示。KEGG富集分析显示,DE-CRGs主要集中在三羧酸循环、2-氧羧酸代谢和碳代谢的通路中。见增强出版附加材料。

**3.2 机器学习筛选结果** 基于上述得到的DE-CRGs,利用4种机器学习模型构建预测函数,分析残差箱线图和残差反向累积分布图,发现XGB模型的残差均方根最大,RF模型的残差中位数最大,而GLM模型的曲线下面积最小。基因重要性分析显示,GLM模型中前5位重要基因是DLD、GLS、PDHB、NFE2L2和DBT;RF模型中是DLAT、MTF1、GLS、NFE2L2和DBT;SVM模型中是SLC31A1、GLS、DLAT、NFE2L2和DBT;XGB模型中是MTF1、GLS、DLAT、NFE2L2和DBT。ROC曲线表明,RF模型的曲线下面积为0.843,SVM为0.832,XGB为0.811,GLM为0.876。因此,选择GLM模型中评分最高的前5位基因进行临床验证。

表4 AD组与健康组外周血指标比较( $\bar{x}\pm s, n=30$ )

Table 4 Comparison of peripheral blood indices between AD group and health group ( $\bar{x}\pm s, n=30$ )

组别	A $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>	IL-6/ng·L <sup>-1</sup>	CRP/ng·L <sup>-1</sup>	Hcy/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	MDA/ $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	SOD/U·L <sup>-1</sup>
健康组	7.25 $\pm$ 2.06	4.67 $\pm$ 3.07	1.32 $\pm$ 0.55	20.97 $\pm$ 4.62	2.64 $\pm$ 0.52	156.50 $\pm$ 9.76
AD组	17.85 $\pm$ 3.04 <sup>2)</sup>	14.35 $\pm$ 3.01 <sup>2)</sup>	8.91 $\pm$ 1.90 <sup>2)</sup>	23.71 $\pm$ 5.38 <sup>2)</sup>	3.06 $\pm$ 0.61 <sup>2)</sup>	92.39 $\pm$ 10.10 <sup>2)</sup>

**3.3.3 核心基因验证分析** 通过验证发现核心基因在验证数据集GSE33000的表达水平与训练集表

见增强出版附加材料。

**3.3 临床样本验证结果**

**3.3.1 基线资料** 根据纳入标准、排除标准,分别收集AD组和健康组各30例,其中AD组女性17人,男性13人,有高血压病史18人,有糖尿病病史8人,平均年龄(67.13 $\pm$ 7.48)岁,平均体质量指数(BMI)(23.17 $\pm$ 3.42) kg·m<sup>2</sup>。两组患者在性别、年龄、病史、BMI等基线资料上基本一致,具有一定的可比性。见表2。

表2 AD组与健康组患者基线资料比较

Table 2 Comparison of baseline data between AD group and health group

组别	性别/例		病史/例		年龄( $\bar{x}\pm s$ ) /岁	BMI( $\bar{x}\pm s$ )
	女	男	高血压病	糖尿病		
健康组	15	15	17	7	63.50 $\pm$ 9.79	23.48 $\pm$ 2.41
AD组	17	13	18	8	67.13 $\pm$ 7.48	23.17 $\pm$ 3.42
$\chi^2/t$	0.268		0.069	0.089	1.614	-0.402
<i>P</i>	0.605		0.793	0.766	0.112	0.689

注:两组患者性别、病史、年龄、BMI的*P*均>0.05

**3.3.2 临床指标** 与健康组比较,AD组患者蒙特利尔认知评估量表(MoCA)、MMSE显著降低(*P*<0.01),见表3。Hcy、IL-6、CRP、A $\beta$ 指标水平显著上升(*P*<0.01),MDA水平显著上升(*P*<0.01);SOD水平显著下降(*P*<0.01),见表4。通过运用Real-time PCR技术,对AD组和健康组的外周血样本中DLD、GLS、PDHB、NFE2L2及DBT mRNA相对表达水平进行了测定。研究结果显示,AD组中NFE2L2和DBT mRNA相对表达水平呈现上升趋势(*P*<0.05, *P*<0.01),而DLD、GLS、PDHB mRNA相对表达水平则显著降低(*P*<0.01)。见表5。

表3 AD组与健康组患者MoCA、MMSE比较( $\bar{x}\pm s, n=30$ )

Table 3 Comparison of MoCA and MMSE between AD group and health group patients ( $\bar{x}\pm s, n=30$ )

组别	MoCA	MMSE
健康组	22.2 $\pm$ 2.83	25.57 $\pm$ 2.58
AD组	12.2 $\pm$ 2.59 <sup>2)</sup>	13.4 $\pm$ 2.76 <sup>2)</sup>

注:与健康组比较<sup>1)</sup>*P*<0.05,<sup>2)</sup>*P*<0.01(表4、表5同)

达水平趋势基本一致。结果显示在AD样本中,NFE2L2与DBT表达上调,DLD、PDHB、GLS表达

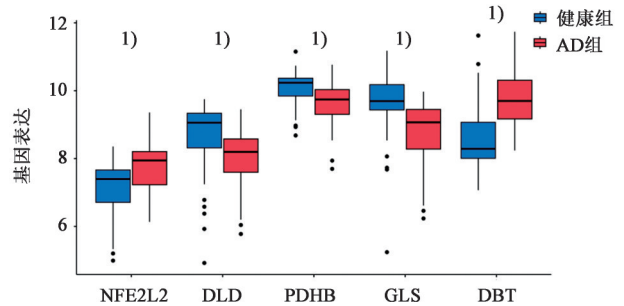
表5 AD组与健康组核心基因的mRNA在外周血相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n=30$ )

Table 5 Comparison of relative mRNA expression levels of core genes in peripheral blood between AD group and health group ( $\bar{x} \pm s, n=30$ )

组别	PDHB	DLD	GLS	DBT	NFE2L2
健康组	1.00±0.10	1.00±0.05	1.00±0.16	1.00±0.06	1.00±0.28
AD组	0.49±0.05 <sup>2)</sup>	0.85±0.06 <sup>2)</sup>	0.54±0.18 <sup>2)</sup>	1.35±0.16 <sup>2)</sup>	1.60±0.40 <sup>1)</sup>

下调,这与临床验证结果一致,证明本研究具有一定可靠性。见图1。

**3.3.4 中药预测结果** 将关键 DECRGs (DLD、GLS、PDHB、NFE2L2 和 DBT) 导入 COREMINE 数据库,规范中药名后共得到包括人参、黄芪、川芎、丹参、苍术、石斛等 161 种中药,见增强出版附加材

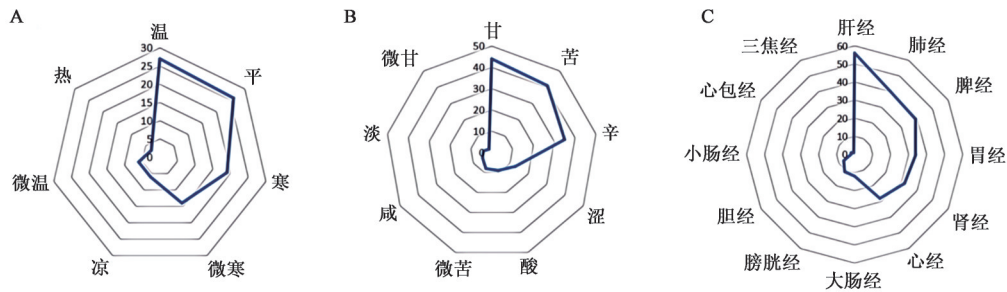


注: <sup>1)</sup>  $P < 0.01$

图1 外部验证分析箱形

Fig. 1 External validation analysis box plot

料。将预测中药导入中医药数据挖掘平台进行用药规律分析,显示中药四气以温、平、寒为主,五味以甘、苦、辛味为主,主归肝、脾、胃、肾经,见图2,主要功效以补气活血、祛痰化湿药为主,见表6。



注: A. 四气; B. 五味; C. 归经

图2 中药的性味归经

Fig. 2 Nature, flavor and meridian tropism of traditional Chinese medicine

表6 中药功效类别统计

Table 6 Statistics of categories of efficacy of traditional Chinese medicines

No.	功效类别	频数/次	No.	功效类别	频数/次
1	补气药	15	14	补阳药	6
2	活血化瘀药	14	15	利水渗湿药	6
3	收涩药	12	16	清热凉血药	5
4	化痰止咳平喘药	11	17	清热泻火药	5
5	清热解毒药	9	18	辛凉解表药	5
6	理气药	8	19	养心安神药	4
7	祛风湿药	8	20	息风止痉药	3
8	补阴药药	7	21	补血药	3
9	止血药药	7	22	峻下逐水药	2
10	清热燥湿药	7	23	攻毒杀虫止痒药	2
11	温里药	6	24	清虚热药	2
12	芳香化湿药	6	25	平抑肝阳药	1
13	辛温解表药	6	26	消食药	1

#### 4 讨论

AD因其发病机制尚未明确,病理复杂多样,目

前仍缺乏AD疾病进展及预后评估的有效方法,生物标志物对于AD的早期诊断至关重要<sup>[19-20]</sup>,相较于以往主要依据临床症状、影像学、认知评估量表来诊断AD,近年来外周血相关的生物标志物因简便易得在AD诊断中越来越重要<sup>[21]</sup>。最新研究表明铜代谢能够影响AD的发病机制<sup>[22-23]</sup>。因此本研究旨在整合GEO生物信息资源和机器学习策略,初步识别AD铜死亡相关的候选生物标志物,纳入临床患者检测指标进行验证,并筛选AD铜死亡基因相关的潜在中药,为中医药治疗AD的早期诊断和治疗提供新的思路。

通过整合GEO数据集、筛选处理后最终获得12个AD铜死亡相关基因。根据富集分析,这些差异表达的铜死亡相关基因主要参与三羧酸循环、2-氧羧酸代谢和碳代谢机制。利用机器学习技术确定了5个与AD核心铜死亡密切相关的生物标志物(DLD、GLS、PDHB、NFE2L2和DBT)。Real-time PCR分析显示,与健康组比较,AD患者的DLD、

GLS、PDHB mRNA水平有所降低,而NFE2L2和DBT的表达则有所增加,这与生物信息学分析的结果大致相同。结合ROC曲线分析进一步验证了这5个标志物在诊断AD方面的显著效能。

PDHB是丙酮酸复合物的的重要组成部分,存在于线粒体中可以介导细胞的氧化磷酸化<sup>[24]</sup>,有人通过敲除脂质酰化蛋白靶标发现细胞可免受铜死亡<sup>[6]</sup>,这证实了PDHB在铜诱导的细胞死亡中发挥着重要的调节作用。此外,PDHB的表达与一系列复杂通路及包括AD在内的多种神经退行性疾病紧密相关<sup>[25-26]</sup>,该基因可成为AD早期诊断与治疗的潜在候选靶点之一。DLD是一种高度保守的多功能线粒体酶<sup>[27]</sup>,其主要作用是催化硫辛酸的氧化反应,生成还原型辅酶NADH。这一过程对于细胞的能量代谢和功能调节至关重要,从而保障细胞能够维持其正常的能量代谢和功能状态<sup>[28]</sup>。有学者指出DLD的变异与晚发型AD相关,证实了能量代谢在AD的重要性<sup>[29]</sup>。此外DLD是硫辛酸途径中的1个关键酶,而硫辛酸的三羧酸循环蛋白是铜死亡的必要靶点。这提示DLD可能是AD治疗的进步提供潜在的治疗靶点。谷氨酸介导的神经元兴奋性毒性是AD患者认知损伤的基础,GLS又可分为GLS1和GLS2两种,GLS2是一种p53诱导型谷氨酰胺代谢和活性氧调节因子,可以抵御氧化应激,降低ROS水平<sup>[30-32]</sup>。NFE2L2又称核转录因子红系2相关因子2(Nrf2),参与调节多个通路<sup>[33]</sup>。因此,DLD、GLS、PDHB、NFE2L2和DBT5个基因可以调节AD进展,可能是AD的潜在诊断及治疗靶点。

临床指标提示Hcy、IL-6、CRP、A $\beta$ 、SOD、MDA具有统计学意义。结合既往研究证实Hcy是导致痴呆或加速痴呆进程的关键因素之一,能够通过多种机制对患者的认知功能造成损害<sup>[34]</sup>。IL-6作为一种可溶性介质,在炎症和免疫反应中发挥多效性作用<sup>[35]</sup>。A $\beta$ 过度沉积是AD的病理特征之一,是AD疾病进展的主要原因。在AD患者中,淀粉样斑块周围的小胶质细胞被激活<sup>[36]</sup>,导致血清中促炎因子CRP和IL-6表达升高,进而会加剧A $\beta$ 在脑内的沉积<sup>[37]</sup>。SOD与MDA作为关键的抗氧化酶,其主要功能在于清除体内自由基,对抗并预防氧自由基所引起的细胞损害<sup>[38]</sup>。此外,这些酶类还表现出抗炎、抗癌以及抗衰老等生物学特性<sup>[39]</sup>,因此,他们可作为AD及相关疾病的诊断生物标志物。综上,炎症、氧化应激可能与铜死亡协同参与AD的进展。

中医古籍对AD没有明确记载,我国传统医学

将其归纳在“痴呆”“神呆”“健忘”“呆病”等范畴。《黄帝内经》载“脑为髓海……则脑转耳鸣”“血并于下,气并于上,乱而喜忘”“热气妄……善忘”,提示AD与肾精、气血、六淫相关;张仲景指出“其人喜忘者,必有蓄血”,认为健忘与瘀血有关;隋代巢元方认为健忘还与虚劳相关;金元时期的朱丹溪开创性地提出痰为致病因素,此诸多医家提出痴呆与“肾虚、痰、瘀”密切相关<sup>[40]</sup>,核心在于肾虚。肾为先天之本,脾胃为后天之本,肾精不足,脾气虚弱,痰湿内生,阻窍脑络;脾气不足,气血生化不畅,无法滋养脑髓,脑髓失养,发为痴呆。脾弱肝滞,气机运行不畅,瘀阻脑窍。故治法多以滋补肝肾、益气健脾、燥湿化痰、活血化瘀为主<sup>[41]</sup>。杨文明教授秉承新安医学思想创制的智脑胶囊,药物组成包括党参、川芎、黄精、石菖蒲等,具有健脾益气,化湿祛痰等功效,对AD临床疗效确切<sup>[42]</sup>。这与本次研究共预测的161种潜在中药基本一致,涉及补气药(人参、党参、黄芪、西洋参等)、活血化瘀药(川芎、红花、郁金、川牛膝等)、化痰药(款冬花、白果、旋覆花等)、祛湿药(黄芩、苍术、藿香、佩兰等)及安神药(远志、茯神、酸枣仁等),四性以温、平、寒为主,五味以甘、苦、辛味为主,苦寒燥湿以化痰,甘平补益脾胃,辛温行气化瘀血,主归肝、脾、胃、肾经,这些药物在临床治疗AD过程中应用广泛,例如常见黑逍遥散<sup>[43]</sup>、黄连解毒汤<sup>[44]</sup>、开心散<sup>[45]</sup>等,这恰好证实了本研究预测的中药具有一定有效性,也为今后临床中医药治疗AD及新药研发提供了新的角度和思路。

本研究基于生物信息学及机器学习方法,在AD患者中发现了5个铜死亡相关基因存在差异表达,推测这5个基因可能成为AD诊断、治疗的潜在靶点,并依据相关基因预测治疗AD的中药以甘、苦、辛味为主,主归肝、脾、胃、肾经。同时本研究通过现代科学手段验证了传统中医药理论,具有一定创新性,并与临床实践基本一致,这为中医药治疗AD提供了科学依据,推动了中医药现代化进程,有一定参考价值。但由于本研究样本量较少,后续需要扩大样本量并进一步完善细胞或动物实验阐明机制。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

#### 【参考文献】

- [1] 曾志远,王永红.阿尔茨海默症临床治疗的研究进展[J].现代医药卫生,2021,37(13):2240-2244,2289.  
ZAN Z Y, WANG Y H. Research progress in clinical treatment of Alzheimer's disease [J]. J Mod Med Health,

- 2021,37(13):2240-2244,2289.
- [ 2 ] MA C, HONG F, YANG S. Amyloidosis in Alzheimer's disease: Pathogeny, etiology, and related therapeutic directions [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1210.
- [ 3 ] DROOGSMA E, VAN ASSELT D, DIEKHUIS M, et al. Initial cognitive response to cholinesterase inhibitors and subsequent long-term course in patients with mild Alzheimer's disease [J]. *Int Psychogeriatr*, 2015, 27(8): 1323-1333.
- [ 4 ] CHAVOSHINEZHAD S, BEIRAMI E, IZADPANAH E, et al. Molecular mechanism and potential therapeutic targets of necroptosis and ferroptosis in Alzheimer's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115656.
- [ 5 ] QIU Z, ZHANG H, XIA M, et al. Programmed death of microglia in Alzheimer's disease: Autophagy, ferroptosis, and pyroptosis [J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2023, 10(1): 95-103.
- [ 6 ] TSVETKOV P, COY S, PETROVA B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [ 7 ] SCALI C, PROSPERI C, BRACCO L, et al. Neutrophils CD11b and fibroblasts PGE2 are elevated in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2002, 23(4): 523-530.
- [ 8 ] CHEN L, MIN J, WANG F. Copper homeostasis and cuproptosis in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 378.
- [ 9 ] WITT B, STIBOLLER M, RASCHKE S, et al. Characterizing effects of excess copper levels in a human astrocytic cell line with focus on oxidative stress markers [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2021, 65: 126711.
- [ 10 ] COLOMBO E, TRIOLO D, BASSANI C, et al. Dysregulated copper transport in multiple sclerosis may cause demyelination via astrocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(27): e2025804118.
- [ 11 ] JACK C R, ANDREWS J S, BEACH T G, et al. Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's association workgroup [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(8): 5143-5169.
- [ 12 ] 吴勉华, 石岩. 国家“十四五”规划教材《中医内科学》[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 122-128.
- WU M H, SHI Y. National 14<sup>th</sup> five-year plan textbook "Internal medicine of traditional Chinese medicine" [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2021: 153-159.
- [ 13 ] JIA F, HAN W, GAO S, et al. Novel cuproptosis metabolism-related molecular clusters and diagnostic signature for Alzheimer's disease [J]. *Front Mol Biosci*, 2024, 11: 1478611.
- [ 14 ] SPEISER J L, WOLF B J, CHUNG D, et al. BiMM forest: A random forest method for modeling clustered and longitudinal binary outcomes [J]. *Chemometr Intell Lab Syst*, 2019, 185: 122-134.
- [ 15 ] SANZ H, VALIM C, VEGAS E, et al. SVM-RFE: Selection and visualization of the most relevant features through non-linear kernels [J]. *BMC Bioinformatics*, 2018, 19(1): 432.
- [ 16 ] 卓桂锋, 陈炜, 朱健敏, 等. 血管性痴呆铜死亡关键差异基因的生物信息学分析及防治中药筛选 [J]. *中草药*, 2023, 54(21): 7120-7129.
- ZHUO G F, CHEN W, ZHU J M, et al. Bioinformatics Bioinformatics analysis of cuproptosis in vascular dementia and screening of traditional Chinese medicine for prevention and treatment [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2023, 54(21): 7120-7129.
- [ 17 ] CHEN T, GUESTRIN C. XGBoost: A scalable tree boosting system. *Proceedings of the 22<sup>nd</sup> ACM SIGKDD international conference on knowledge discovery and data mining* [M]. New York: Association for Computing Machinery, 2016: 785-794.
- [ 18 ] 钟赣生. 中药学 [M]. 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2023.
- ZHONG G S. *Chinese Materia Medica* [M]. 5<sup>th</sup> Edition. Beijing: China Press of Chinese Medicine, 2023.
- [ 19 ] LAM B, MASELLIS M, FREEDMAN M, et al. Clinical, imaging, and pathological heterogeneity of the Alzheimer's disease syndrome [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2013, 5(1): 1.
- [ 20 ] BYUN M S, KIM S E, PARK J, et al. Heterogeneity of regional brain atrophy patterns associated with distinct progression rates in Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142756.
- [ 21 ] 段贤, 郑庆, 梁力晖, 等. 阿尔茨海默病血清外泌体 miRNA 生物标志物的筛选研究 [J]. *陆军军医大学学报*, 2024, 46(15): 1803-1810.
- DUAN X, ZHENG Q, LIANG L H, et al. Screening of serum exosomal miRNAs as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease [J]. *J Army Med Univ*, 2024, 46(15): 1803-1810.
- [ 22 ] 刘丹丹, 秦合伟. 线粒体自噬、铁死亡、铜死亡和双硫死亡在阿尔茨海默病中的作用机制及进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(19): 4132-4144.
- LIU D D, QIN H W. Mechanism of action and progress of mitophagy, ferroptosis, cuproptosis, and disulfidptosis in Alzheimer's disease [J]. *Chin J Tissue Engineer Res*, 2025, 29(19): 4132-4144.
- [ 23 ] LI X, CHEN X, GAO X. Copper and cuproptosis: New therapeutic approaches for Alzheimer's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1300405.
- [ 24 ] SOLMONSON A, DEBERARDINIS R J. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(20): 7522-7530.
- [ 25 ] WANG H, YANG Z, HE X, et al. Cuproptosis related gene PDHB is identified as a biomarker inversely associated with the progression of clear cell renal cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2023, 23(1): 804.
- [ 26 ] JIA D, WANG F, YU H. Systemic alterations of tricarboxylic acid cycle enzymes in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1206688.
- [ 27 ] BABADY N E, PANG Y P, ELPELEG O, et al. Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(15): 6158-6163.

- [28] PURROY R, MEDINA-CARBONERO M, ROS J, et al. Frataxin-deficient cardiomyocytes present an altered thiol-redox state which targets actin and pyruvate dehydrogenase [J]. *Redox Biol*, 2020, 32: 101520.
- [29] AHMAD W, EBERT P R. Suppression of a core metabolic enzyme dihydrolipoamide dehydrogenase (dld) protects against amyloid beta toxicity in *C. elegans* model of Alzheimer's disease [J]. *Genes Dis*, 2021, 8(6): 849-866.
- [30] SUZUKI S, TANAKA T, POYUROVSKY M V, et al. Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(16): 7461-7466.
- [31] LONG Y, ZHAO Z, XIE W, et al. Kallistatin leads to cognition impairment via downregulating glutamine synthetase [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 202: 107145.
- [32] CHANTONG B, KRATSCHMAR D V, LISTER A, et al. Dibutyltin promotes oxidative stress and increases inflammatory mediators in BV-2 microglia cells [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 230(2): 177-187.
- [33] LI J, JIN J, LI M, et al. Role of Nrf2 in protection against triptolide-induced toxicity in rat kidney cells [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 213(2): 194-202.
- [34] 韩卫, 赵亚琦, 李志宁, 等. 生物学标志物联合同型半胱氨酸和 ApoB/LDL-C 检测在阿尔茨海默病早期鉴别诊断中的应用 [J]. *实用检验医师杂志*, 2023, 15(1): 64-68.
- HAN W, ZHAO Y Q, LI Z N, et al. Application of biological markers combined with homocysteine and ApoB/LDL-C in early differential diagnosis of Alzheimer's disease [J]. *Chin J Clin Patho*, 2023, 15(1): 64-68.
- [35] 戴蓉芳, 徐明然, 胡颖, 等. 血清尿酸、白介素 6、p-tau181 与阿尔茨海默病患者认知功能、日常生活能力和预后的关系分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2023, 23(8): 1447-1452.
- DAI R F, XU M G, HU Y, et al. Relationship analysis between serum uric acid, interleukin-6, p-tau181 and cognitive function, ability of daily living and prognosis in patients with Alzheimer's disease [J]. *Biomed Cnjournals Com Progress In Mod Biomed*, 2023, 23(8): 1447-1452.
- [36] JORFI M, MAASER-HECKER A, TANZI R E. The neuroimmune axis of Alzheimer's disease [J]. *Genome Med*, 2023, 15(1): 6.
- [37] XU M, ZHANG X, REN F, et al. Essential oil of *Schisandra chinensis* ameliorates cognitive decline in mice by alleviating inflammation [J]. *Food Funct*, 2019, 10(9): 5827-5842.
- [38] NIYOMPLOY P, BOONSOMBAT R, KARNCHANATAT A, et al. A superoxide dismutase purified from the roots from *Stemona tuberosa* [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2014, 44(7): 663-679.
- [39] 邱海鹏, 高燕军, 张晓璇, 等. 认知障碍患者血清超氧化物歧化酶和同型半胱氨酸水平及其与认知功能相关性 [J]. *中国临床保健杂志*, 2017, 20(4): 408-410.
- QIU H P, GAO Y J, ZHANG X X, et al. The correlation of cognitive function and serum superoxide dismutases, serum Hcy in patients with Alzheimer's disease or vascular dementia [J]. *Chin J Clin Healthc*, 2017, 20(4): 408-410.
- [40] 张译戈, 梁雨晴, 李雅黎, 等. 从“肾虚痰瘀”浅谈阿尔茨海默病的中医病机演变 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(1): 159-164.
- ZHANG Y G, LIANG Y Q, LI Y L, et al. From "Kidney deficiency and phlegm stasis" to discuss the evolution of TCM pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Materia-World Sci Technol*, 2021, 23(1): 159-164.
- [41] 马洪明. 田金洲教授学术思想与临床经验总结及其治疗阿尔茨海默病用药规律研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- MA H M. Summary of academic thoughts and clinical experience of professor Tian Jinzhou and research on medication patterns in the treatment of Alzheimer's disease [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.
- [42] 姜辉, 马艳珍, 汪永忠, 等. 智脑胶囊对阿尔茨海默病小鼠认知功能的影响及机制初探 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(2): 13-18.
- JIANG H, MA Y Z, WANG Y Z, et al. Effect and mechanism of Zhinao (智脑) capsules on cognitive function of mice with Alzheimer's disease [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2023, 39(2): 13-18.
- [43] 王虎平, 杨娇, 陈怡琴, 等. 基于细胞凋亡机制探讨黑逍遥散对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(9): 108-115.
- WANG H P, YANG J, CHEN Y Q, et al. Exploring the improvement effect of Heixiaoyao powder on learning and memory ability in Alzheimer's disease rats based on the apoptosis mechanism [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(9): 108-115.
- [44] 程炜, 杨硕, 何章欣, 等. 基于 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 通路探讨黄连解毒汤改善 APP/PS1 小鼠细胞焦亡、神经炎症和学习认知功能的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(12): 11-19.
- CHENG W, YANG S, HE Z X, et al. Exploring the mechanism of Huanglian Jiedu decoction in ameliorating pyroptosis, neuroinflammation, and learning-cognitive function in APP/PS1 mice via the NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(12): 11-19.
- [45] 何晓明, 王晓彤, 闵冬雨, 等. 探讨开心散改善阿尔茨海默病的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(1): 20-29.
- HE X M, WANG X T, MIN D Y, et al. Exploring the Mechanism of Kaixin powder in improving Alzheimer's disease [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(1): 20-29.

[责任编辑 顾雪竹]