

基于肾脑相关的龟鹿二仙膏抗阿尔茨海默病作用及其机制

祁晓鸣, 刘晓琴, 苏晓娟, 熊超, 郝永熙, 李港静, 孟祥龙, 张朔生*
(山西省中医药大学中药与食品工程学院, 中药炮制山西省重点实验室, 山西 晋中 030619)

[摘要] 目的: 基于“肾脑相关”理论, 探讨龟鹿二仙膏对氢化可的松联合 β 淀粉样蛋白($A\beta$)诱导的阿尔茨海默病(AD)大鼠模型的作用及其机制。方法: 采用腹腔注射氢化可的松并脑室注射 $A\beta$ 诱导大鼠AD模型, 龟鹿二仙膏不同浓度进行干预。测定大鼠的海马、肾脏和肾上腺指数; 采用Morris水迷宫实验观察大鼠空间学习记忆能力; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清样品中皮质酮(CORT)及睾酮(T)水平; 液相色谱-质谱联用(LC-MS)代谢组学技术采集和分析模型大鼠血清代谢数据; 利用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP)、中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)和中医药综合数据库(TCMID)收集龟鹿二仙膏活性成分及相应靶点; 利用人类基因数据库(GeneCards)和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)检索得到的AD相关靶标信息; 构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络, 进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路富集分析、基因本体论(GO)富集分析; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织中白细胞介素-6(IL-6)的表达水平。结果: 与模型组比较, 龟鹿二仙膏高、中、低剂量组海马指数、肾脏指数和肾上腺指数均显著升高, 其中龟鹿二仙膏高剂量组升高最为显著($P < 0.01$); 龟鹿二仙膏高、低剂量组大鼠穿越平台次数均显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), III象限路程(%)和III象限时间(%)均显著延长($P < 0.05$, $P < 0.01$); 龟鹿二仙膏高、中、低剂量组大鼠血清CORT含量均显著降低($P < 0.01$); 龟鹿二仙膏高、中、低剂量组大鼠海马组织中IL-6表达水平均显著降低($P < 0.01$)。代谢组学技术共鉴定了24个与AD相关的血清差异代谢物; 网络药理学方法共筛选出50个治疗AD的高频共性化合物, 高频共性靶点187个, 得出磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路在AD复杂的病理机制网络中起到重要作用。结论: 龟鹿二仙膏可显著改善氢化可的松并 $A\beta$ 诱导的AD模型大鼠认知功能障碍, 降低血清CORT, 抑制海马组织炎症因子IL-6表达, 并调节AD模型大鼠的代谢水平, 为其临床应用提供依据。

[关键词] 肾脑相关; 龟鹿二仙膏; 阿尔茨海默病; 代谢组学; 网络药理学

[中图分类号] R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0158-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220612

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220303.1951.007.html>

[网络出版日期] 2022-03-07 20:03

Effect of Guilu Erxiangao on Alzheimer's Disease and Its Mechanism Based on Kidney-brain Correlation

QI Xiao-ming, LIU Xiao-qin, SU Xiao-juan, XIONG Chao, HAO Yong-xi, LI Gang-jing,
MENG Xiang-long, ZHANG Shuo-sheng*

(Shanxi University of Chinese Medicine, College of Chinese Medicine and Food Engineering,
Shanxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Processing, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Guilu Erxiangao on Alzheimer's disease (AD) model rats induced by hydrocortisone and amyloid β -protein ($A\beta$) based on the theory of kidney-brain correlation. **Method:** Intraperitoneal injection of hydrocortisone and intracerebroventricular injection of

[收稿日期] 2021-10-27

[基金项目] 科技创新能力培育计划项目(2019PY-126); 山西省中医药大学中药炮制学科建设项目(2018-1); 山西省中医药大学中药炮制与方药配伍研究科技创新团队项目(2018TD-006); 山西省应用基础研究计划项目(201901D111342)

[第一作者] 祁晓鸣, 硕士, 讲师, 从事中药药理与毒理学研究, E-mail: qixiaomingxj@163.com

[通信作者] * 张朔生, 硕士, 教授, 从事中药炮制现代研究, E-mail: zhangshuosheng@aliyun.com

$A\beta$ were performed to induce AD in rats, and different concentrations of Guilu Erxiangao were used for intervention. The indexes of hippocampus, kidney and adrenal gland were measured, and the spatial learning and memory ability of AD rats was observed by Morris water maze experiment. The levels of testosterone (T) and corticosterone (CORT) in serum samples were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to collect and analyze the serum metabolic data of model rats. The active components and corresponding targets of Guilu Erxiangao were collected using Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), a Bioinformatics Analysis Tool for Molecular mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) and Traditional Chinese Medicine Integrated Database (TCMID). GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) were retrieved to obtain AD-related targets, and protein-protein interaction (PPI) network was constructed to perform gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis. The expression level of interleukin-6 (IL-6) in the hippocampus of rats was detected by Western blot. **Result:** Compared with the model group, the low-, medium- and high-dose groups of Guilu Erxiangao exhibited significantly increased hippocampus index, kidney index and adrenal gland index, reduced CORT levels in serum and down-regulated IL-6 levels in hippocampal tissues. According to the results of water maze experiment, as compared with the model group, the platform crossing times of rats was significantly increased in the low- and high-dose groups of Guilu Erxiangao, with evidently prolonged distance traveled in quadrant III (%) and time in quadrant III (%). A total of 24 serum differential metabolites associated with AD were identified by LC-MS, and 50 high-frequency common compounds and 187 high-frequency common targets for AD treatment were screened by network pharmacology method. Results demonstrated phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway plays an important role in the complex AD pathological mechanism. **Conclusion:** Guilu Erxiangao can significantly improve the cognitive dysfunction of AD model rats induced by hydrocortisone and $A\beta$, reduce serum CORT levels and IL-6 levels in hippocampal tissues, and regulate the metabolic level, which provides a reference for its clinical application.

[Keywords] kidney-brain correlation; Guilu Erxiangao; Alzheimer's disease; metabolomics; network pharmacology

阿尔茨海默病(AD)是一种以老年斑沉积、神经纤维缠结和神经元功能缺失为主要特征的神经系统退行性疾病,表现为记忆力减退或丢失以及认知功能障碍^[1-2]。国际阿尔茨海默病协会(ADI)2020年发布的数据显示,全球AD及其他认知障碍患者至少达5 000万,且以每3 s新增1例患者的速度增长,预计2050年将达1.52亿。中国是AD患者数量最多、增速最快的国家之一。目前临床AD的治疗药物包括多奈哌齐、他克林、加兰他明、美金刚等,仅能改善或延缓发病进程,不能预防和治疗AD,且伴随较大的不良反应。中药以其多成分、多靶点、整体调节、综合治疗,且不易产生耐药性和不良反应等特点,在治疗AD这种复杂、难治、进行性疾病中具有治疗费用较低、患者接受程度较高、临床疗效较好的独特优势,近年来,越来越受到国内外AD研究领域专家和学者的青睐^[3]。

中医古籍没有AD(老年痴呆)的病名,中医多

将此病归于“痴呆”“健忘”范畴。中医认为老年痴呆主要由精、气、血亏损不足,髓海空虚,气血不足,神明失主,或气、火、痰、瘀诸邪内阻,上扰清窍所致。历代中医认为AD病因病机为“肾虚髓空为本,痰浊瘀血为标”,故多采用补肾益精,填髓充脑,补脾益气,豁痰开窍,行气活血等治法,临床疗效可靠。

龟鹿二仙膏由龟甲、鹿角、枸杞子、党参4味中药组成,最早记载于明代王三才《医便》^[4];具有温肾益精、补气养血的功效,临床用于衰老、阳痿、早泄、不孕不育、视力模糊减退等的治疗。刘相玲等^[5]研究发现龟鹿二仙汤加减联合针刺治疗阿AD临床疗效较好,建议在临床中应用;马俊杰等^[6]找到了“龟鹿二仙胶-补肾生髓-改善脑部血液循环-精生髓”的逻辑关系,且认为龟鹿二仙胶治疗AD疗效确切;有研究表明龟鹿二仙膏可改善由衰老引起的记忆障碍,但对其治疗AD的相关研究较少^[7]。本实验结

合代谢组学、网络药理学等系统生物医学方法,采用腹腔注射氢化可的松联合脑室注射 β -淀粉样蛋白(A β)诱导大鼠AD模型,从“肾脑相关”理论出发,初步研究龟鹿二仙膏抗AD作用及其相关机制,为今后其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器 龟鹿二仙膏(湖南千金协力药业有限公司,批号Z14020687);A β_{1-42} 、广谱磷酸酶抑制剂混合物(美国Med Chem Express公司,批号分别为HY-P1363、16L21C83);氢化可的松注射液(天津金耀药业有限公司,批号H12020886);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号H13020655);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、高效裂解液、蛋白酶抑制剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(HRP-羊抗兔IgG)、白细胞介素(IL)-6(博士德生物工程有限公司,批号分别为14I04A83、14K16B06、14J28C78、BST16E18B16E55、AA44161);10 \times 电转液、20 \times TBST缓冲液、ELC超敏发光液A、B(索莱宝科技有限公司,批号分别为20210315、20210712、20210629);酶联免疫吸附测定法(ELISA)Kit(贝茵莱生物科技有限公司,批号RA20748);乙腈(德国Merck公司,批号1499230-935)。

SynergHT型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),-4 $^{\circ}$ C冰箱、-20 $^{\circ}$ C冰箱、-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱(海尔电器公司),ECT4100型电子恒温加样台(中国莫纳生物科技有限公司),AX-60型制冰机(爱雪制冷电器有限公司),TGL21M型高速低温离心机、MT-13K-L手持均质仪(米欧仪器有限公司),SK-O180-E型圆周摇床(海谊科技有限公司),移液枪(德国Boeco公司),BE4084抗体孵育袋(柏奥易杰科技有限公司),XR-XZ2301型大小鼠自发活动旷场(欣软信息科技有限公司),GLBehv-MWMM型大小鼠通用Morris水迷宫(吉量软件科技有限公司),SHP-160型生化培养箱(江苏杰瑞尔电器有限公司),GeneGnome成像系统(中国香港基因有限公司)。

1.2 动物分组、造模及给药 SPF级雄性SD大鼠(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号201200004),实验期间保持自由饮水和进食,饲养温度(24 \pm 1) $^{\circ}$ C,湿度(50 \pm 5)%,光照昼夜交替。实验前适应性喂养2周。本实验通过,实验动物伦理委员会批准,批准号2020LL170。

药物制备:称取一定量的龟鹿二仙膏,溶解于

蒸馏水中,配制成质量浓度分别为0.9、0.45、0.225 g \cdot mL $^{-1}$ 的药液,临用前现配。

将60只大鼠随机分为6组,每组10只,分为空白组、模型组、假手术组(等体积生理盐水灌胃)、龟鹿二仙膏低、中、高剂量组(2.25、4.5、9 g \cdot kg $^{-1}$)。按照大鼠与人的体表面积换算及前期研究基础确定给药剂量。

采用腹腔注射氢化可的松(15 mg \cdot kg $^{-1}$)并脑室注射A β (每只5 μ L)诱导AD大鼠模型^[8]。自造模开始给予灌胃给药治疗,连续20 d。给药结束后,除空白组外,其余各组均用10%水合氯醛(3.5 mL \cdot kg $^{-1}$)将大鼠麻醉,固定其头部,颅骨区无菌皮肤准备,沿颅正中线切开2 cm切口,钝性解剖皮下组织及骨膜,完全暴露颅骨。在前囟门前3.3 mm,距中心线左右1.5 mm,用大鼠颅骨钻打孔,微量注射器将A β 5 μ L注入海马(假手术组注入生理盐水5 μ L),插入深度为3.0 mm,注射速度为1 μ L \cdot min $^{-1}$,总注射时间为5 min,注射完成后,以1 mm \cdot min $^{-1}$ 的速度抽出针头。缓慢地抽出针头,以防止药物从注射部位溢出。在缝合处涂抹青霉素钠,连续3 d,防止感染。

2 方法

2.1 水迷宫实验 将大鼠随机放入水中,记录动物找到平台的时间(s)。第一阶段为定位航行实验:记录将大鼠放入水中至其找到平台并停留5 s所需时间,在第1天的训练中,平台高出水面1 cm,使大鼠能找到平台,如果大鼠无法找到平台,则引导其到平台,停留15 s;随后3 d继续训练,但将平台放置于水面以下,观察大鼠的探查情况,若仍无法找到平台,重复引导并停留15 s。第二阶段为空间探索实验:实验第5天去除平台,放入大鼠,按上述计划进行重复实验,记录大鼠在目标象限停留时间和穿越平台次数^[9]。

2.2 脏器指数 大鼠10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,取海马、肾脏、肾上腺,称质量,并计算海马指数、肾脏指数和肾上腺指数(脏器指数=脏器质量/体质量 \times 100%)。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 取海马组织,加入细胞裂解液(含1%磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂),反复研磨,离心(12 000 r \cdot min $^{-1}$,4 $^{\circ}$ C,15 min,离心半径8.359 6 cm,下同),取清液,BCA法测定蛋白浓度;SDS-PAGE电泳分离,硝酸纤维素膜转膜1.5 h。5%脱脂奶粉室温封闭2 h,IL-6一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜4次,每次15 min,加HRP-羊抗

兔IgG室温孵育5 h,同法洗膜^[10]。应用GeneGnome成像系统曝光,在线Image J平台(<https://imagej.nih.gov/ij/>)分析得蛋白相对表达量。

2.4 血清激素水平的测定 严格按照ELISA Kit说明书操作,检测血清样品中睾酮(T)及皮质酮(CORT)水平。

2.5 代谢组学研究 样本提取方法:血清样本于4 °C缓慢解冻,取适量样本加入预冷甲醇-乙腈-水(2:2:1)溶液,混匀,冰浴超声30 min,-20 °C静置10 min,离心(12 000 r·min⁻¹,4 °C,20 min),取上清真空干燥;加入乙腈-水(1:1)溶液100 μL复溶,涡旋,离心(12 000 r·min⁻¹,4 °C,15 min),取上清液进样分析。

色谱条件:Agilent 1290 Infinity LC超高效液相色谱系统(UHPLC)HILIC色谱柱;柱温25 °C;流速0.5 mL·min⁻¹;进样量2 μL;流动相A为水+25 mmol·L⁻¹乙酸铵+25 mmol·L⁻¹氨水,B为乙腈;梯度洗脱(0~0.5 min,95%B;0.5~7 min,95%~65%B;7~8 min,65%~40%B;8~9 min,40%B;9~9.1 min,40%~95%B;9.1~12 min,95%B^[11])。

2.6 网络药理学 利用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP,<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM,<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)和中医药综合数据库(TCMID,<http://119.3.41.228:8000/tcmid/>)收集龟鹿二仙膏中鹿角、龟板、人参及枸杞子的化学成分。基于类药性(DL)≥0.18和口服生物利用度(OB)≥30%进行筛选,从数据库中导出活性成分及相应靶点。利用UnitProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)查询靶标蛋白对应的基因名称。分别利用基因名片数据库(GeneCards,<https://www.genecards.org/>)和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM,<https://www.omim.org/>),以“AD”为关键词,对AD相关靶点进行检索^[12],将两个数据库导出的信息合并去重,得到AD的相关靶标信息。利用Perl软件5.32.1.1(Larry Wall),将所得药物活性成分靶点与AD靶点相映射,推出表示疾病靶标和有效成分靶点交集的Venn图,得到龟鹿二仙膏治疗AD的预测靶点。

将交集得到的靶点导入蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)数据库(String,<https://string-db.org/>),构建PPI网络,并用Cytoscape 3.7.1软件(美国系统生物学研究所、加州大学圣地亚哥分校等公司)对所得的PPI网络数据进行分析,得到龟鹿二仙膏治疗

AD的关键靶点。利用R语言自带的barplot函数画出柱状图,查找PPI网络核心基因。使用R语言软件将龟鹿二仙膏治疗AD的靶点进行ID转换,在R语言中调用如Bioconductor生物类的程序包,对关键靶点进行基因本体(GO)富集分析,分析预测龟鹿二仙膏治疗AD的可能机制并推测合理的作用通路。使用R语言对关键的靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析^[13],利用Perl语言进行处理后,运用Cytoscape构建“通路-关键靶点”关系网络,分析龟鹿二仙膏治疗AD的“通路-关键靶点”之间的关系^[3]。

2.7 统计学方法 SPSS 25.0软件对数据进行分析,数据资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,两组间均数比较用*t*检验。以*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 龟鹿二仙膏对AD模型大鼠脏器指数的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠的海马指数、肾脏指数和肾上腺指数均明显降低(*P*<0.05,*P*<0.01)。与模型组比较,大鼠海马指数(龟鹿二仙膏中剂量组*P*<0.05,龟鹿二仙膏高剂量组*P*<0.01)、肾脏指数(龟鹿二仙膏低、中、高剂量组*P*<0.01)和肾上腺指数(龟鹿二仙膏高剂量组*P*<0.01)均升高。以上结果表明,龟鹿二仙膏可明显改善氢化可的松并Aβ诱导的AD大鼠的海马指数、肾脏指数和肾上腺指数。见表1。

3.2 水迷宫法观察龟鹿二仙膏对AD模型大鼠行为学的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠穿越平台次数显著减少(*P*<0.01),Ⅲ象限路程、Ⅲ象限时间显著缩短(*P*<0.05),由此可见氢化可的松并Aβ诱导的AD模型成功。与模型组比较,大鼠穿越平台次数(龟鹿二仙膏低剂量组*P*<0.01,龟鹿二仙膏高剂量组*P*<0.05),Ⅲ象限路程(龟鹿二仙膏低、高剂量组*P*<0.01)、Ⅲ象限时间(龟鹿二仙膏低剂量组*P*<0.01,龟鹿二仙膏高剂量组*P*<0.05)显著延长,龟鹿二仙膏中剂量组的3个数值均有所升高,但差异无统计学意义。见表2和图1。

3.3 龟鹿二仙膏对AD模型大鼠血清激素水平的影响 与空白组和假手术组比较,模型组大鼠血清中CORT含量显著升高(*P*<0.01)、T含量明显降低(*P*<0.05),表明AD模型大鼠血清中存在高CORT、低T现象。与模型组比较,龟鹿二仙膏低、中、高剂量组血清中CORT含量显著降低(*P*<0.01),T含量相较于模型组略有回升但差异无统计学意义。

表1 龟鹿二仙膏对AD大鼠脏器指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Guilu Erxiangao on organ index in AD model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

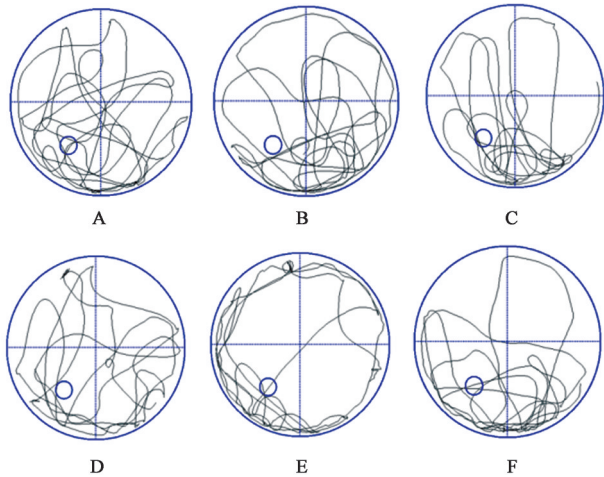
组别	剂量/g·kg ⁻¹	海马指数	肾脏指数	肾上腺指数
空白组		50.611±4.524	6.291±0.345	0.169±0.012
模型组		45.633±3.714 ¹⁾	5.785±0.295 ¹⁾	0.152±0.025 ²⁾
假手术组		50.845±1.710 ³⁾	6.375±0.409 ³⁾	0.174±0.039 ³⁾
龟鹿二仙膏低剂量组	2.25	48.541±2.707	6.405±0.316 ⁴⁾	0.161±0.031
龟鹿二仙膏中剂量组	4.5	50.991±1.651 ³⁾	6.646±0.383 ⁴⁾	0.158±0.017
龟鹿二仙膏高剂量组	9.0	51.719±3.862 ⁴⁾	6.489±0.306 ⁴⁾	0.227±0.032 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表2、表3同)

表2 龟鹿二仙膏对AD大鼠的水迷宫实验 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Morris water maze experiment of Guilu Erxiangao in AD model rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台次数/次	Ⅲ象限路程/%	Ⅲ象限时间/%
空白组		3.250±1.500	37.809±2.115	40.590±4.150
模型组		1.000±1.414 ²⁾	33.004±1.804 ¹⁾	32.997±3.119 ¹⁾
假手术组		3.333±1.154 ³⁾	38.995±3.367 ³⁾	38.611±1.796
龟鹿二仙膏低剂量组	2.25	3.250±0.500 ⁴⁾	42.285±5.988 ⁴⁾	44.118±6.445 ⁴⁾
龟鹿二仙膏中剂量组	4.5	2.333±0.577	37.298±3.472	37.630±2.784
龟鹿二仙膏高剂量组	9.0	3.333±0.577 ³⁾	41.083±6.250 ⁴⁾	42.778±7.081 ³⁾



注:正式实验时各组大鼠游泳轨迹图中选取的具有代表性的1只大鼠游泳轨迹

图1 龟鹿二仙膏对AD大鼠的水迷宫轨迹

Fig. 1 Rats Morris water maze track of Guilu Erxiangao in AD model rats

3.4 龟鹿二仙膏对大鼠睾丸组织代谢轮廓分析
对各组样本进行主成分分析(PCA),空白组、模型组、龟鹿二仙膏高、低剂量组有显著分离的趋势,说明模型建立成功,见图2。

将数据采用正交偏最小二乘法(OPLS-DA)进行判别分析后,发现空白组与模型组,模型组与龟鹿二仙膏高、低剂量组样本明显分离,提示了模型稳定且可信度高,见图2。

本研究模型中 R^2 、 Q^2 值均小于右端, R^2 值在 Q^2 值之上,并且 Q^2 回归直线与纵轴截距为负值,确定了模型有效可靠,未产生过拟合现象,见图2。

根据VIP>1且P<0.05筛选出贡献最大的差异变量,在S-plot图中,距离中心越远的点所代表的贡献差异越大,见图3。

分析结果表明,龟鹿二仙膏用药后血清中有24种代谢物发生变化,其中棕榈酰鞘磷脂、磺胺二甲嘧啶、2-氨基-N,N-二乙基乙酰胺盐酸、UR-144 N-庚基类似物、1-甲基-L-组氨酸、十六碳酰胺、黄素单核苷酸7种代谢物水平上升, α -亚麻酸、油酰胺、甜菜碱、尿刊酸4种代谢物含量较用药前下降,见表4。

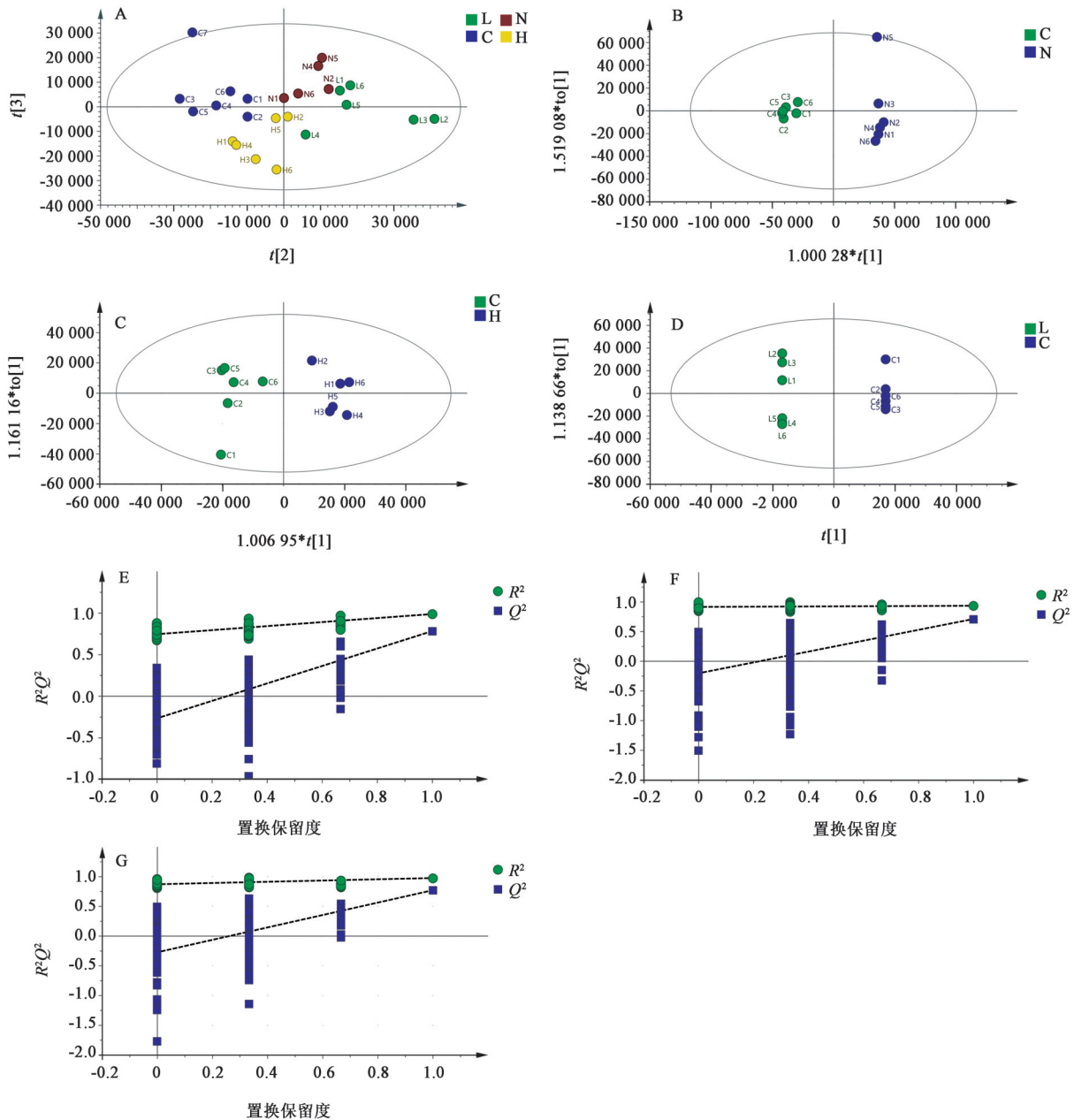
对各组样本进行层次聚类(Hierarchical Clustering)分析,发现空白组与模型组同组样本能够通过聚类出现在同一簇,模型组与治疗组同组样本也能够通过聚类出现在同一簇,说明筛选出的差异代谢物合理准确,见图4。

将筛选出的差异代谢物导入到Metabo Analyst 5.0数据库进行代谢通路富集分析发现,差异代谢物所涉及的代谢途径包括甜菜碱代谢、 α -亚麻酸和亚油酸代谢、蛋氨酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等9条相关代谢途径。其中甜菜碱代谢途径、 α -亚麻酸和亚油酸代谢途径和磷脂生物合成途径等3条代谢途

表 3 龟鹿二仙膏对 AD 大鼠皮质激素水平 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

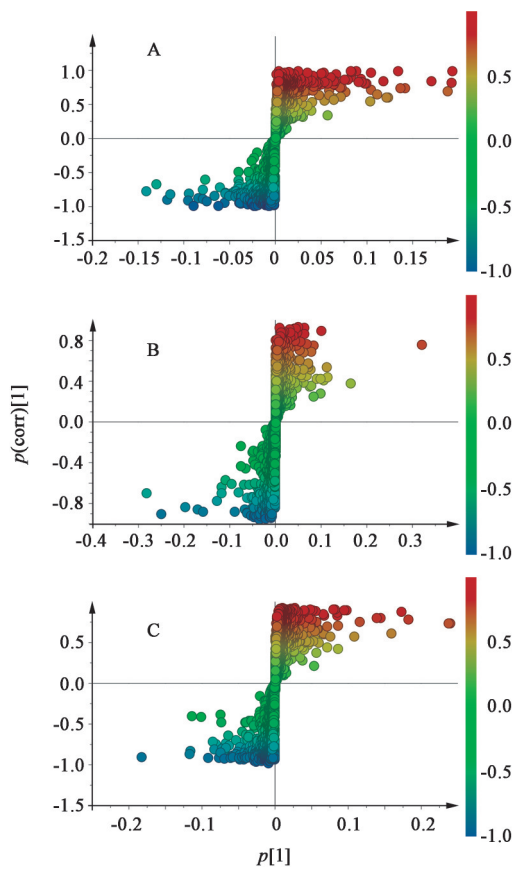
Table 3 Results of serum hormone levels of Guilu Erxiangao in AD model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CORT/μg·L ⁻¹	T/μg·L ⁻¹
空白组		421.454±100.484	9.135±1.019
模型组		657.958±82.578 ²⁾	7.521±0.210 ¹⁾
假手术组		574.081±52.967	9.344±0.342 ³⁾
龟鹿二仙膏低剂量组	2.25	495.734±83.244 ⁴⁾	7.678±0.638
龟鹿二仙膏中剂量组	4.5	451.204±60.432 ⁴⁾	8.058±0.945
龟鹿二仙膏高剂量组	9.0	402.877±87.800 ⁴⁾	7.806±1.875



注: N. 空白组; C. 模型组; H. 龟鹿二仙膏高剂量组; L. 龟鹿二仙膏低剂量组; A. 空白组、模型组、龟鹿二仙膏高剂量组、龟鹿二仙膏低剂量组 PCA 得分; B. 空白组、模型组 OPLS-DA 得分; C. 模型组、龟鹿二仙膏高剂量组 OPLS-DA 得分; D. 模型组、龟鹿二仙膏低剂量组 OPLS-DA 得分; E. 空白组、模型组随机排列试验图; F. 模型组、龟鹿二仙膏高剂量组随机排列实验; G. 模型组、龟鹿二仙膏低剂量组随机排列实验
图 2 不同组别成分 PCA、OPLS-DA 得分及排列实验

Fig. 2 PCA, OPLS-DA score plots and arrangement test plot of different group



注:A.空白组与模型组;B.模型组与龟鹿二仙膏高剂量组;C.模型组与龟鹿二仙膏低剂量组

图3 不同组别比较S-plot

Fig. 3 S-plot compairs of different group

径与龟鹿二仙膏治疗AD作用机制相关性最高。见增强出版附加材料。

3.5 网络药理学研究及验证 通过TCMSP, TCMID, BATMAN-TCM数据库共得到活性化合物95个,其中人参22个,枸杞子45个,龟板19个,鹿角13个;共有对应疾病靶点187个。通过OMIM、GeneCards数据库得到AD相关靶点24 574个,去重后共24 392个。将龟鹿二仙膏活性成分靶点和AD靶点上传至在线韦恩图得出活性化合物与AD的交集基因,见增强出版附加材料;最终得到与龟鹿二仙膏-AD相关高频共性化合物50个,共同靶点187个,选取前10个靶点,见表5。

将获得的交集基因导入Cytoscape 3.7.1软件中,构建龟鹿二仙膏与“AD”的“药物-活性成分-疾病靶点”网络图,网络中共239个节点(187个基因,50个高频共性化合物,1个疾病名称,1个药物名称)。其中粉色菱形表明50种关键活性成分,包括香豆素、黄酮类等。绿色椭圆形代表187个交集基因。按照节点度数进行排序,排名前五位

的分别是羟基苯甲酸类化合物、花生四烯酸、山柰酚、aposiopolamine(东莨菪碱的代谢物)、frutinone A(色原酮香豆素类化合物),排名前四位的靶点为前列腺素内过氧化物合酶1(PTGS1),前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2),视黄酸受体gamma(RXRG),人源重组蛋白(NCOA2)。

将映射所得的187个靶点利用蛋白质相互作用关系数据库构建龟鹿二仙膏与AD的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图。根据PPI网络图分析,频率较高的是IL-6,选取前30个蛋白构建柱状图。这些蛋白对于AD的治疗起关键作用。

将龟鹿二仙膏治疗AD的共性蛋白靶点上传至DAVID数据库,在线得到GO条目,共筛选出20条GO高频共性基因,前四条为细胞因子受体结合(cytokine receptor binding),RNA聚合酶II转录因子结合(RNA polymerase II transcription factor binding),DNA结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)。

将龟鹿二仙膏治疗AD的共性蛋白靶点上传至DAVID数据库在线得到KEGG通路,按照P值由大到小进行排序,选取前15条关键通路,见表6。

采用蛋白免疫印迹法检测大鼠海马中IL-6的表达水平,验证网络药理学所得龟鹿二仙膏改善氢化可的松并A β 诱导的AD模型大鼠的作用机制。

与空白组和假手术组比较,模型组大鼠IL-6的表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,大鼠海马中IL-6(龟鹿二仙膏中剂量组 $P < 0.001$,龟鹿二仙膏高剂量组 $P < 0.0001$)的表达水平均显著降低,见图6和表7。以上结果表明,龟鹿二仙膏可明显改善氢化可的松并A β 诱导的AD大鼠海马组织IL-6的蛋白表达水平。

4 结论与讨论

中医学认为脑髓由肾精化生而成,肾精构成脑髓的物质基础,肾精不足会出现痴呆、行动迟缓^[14-15]。由此可见,肾虚、髓海不足是导致AD的重要原因^[16]。A β 聚集是AD发生的始动因素^[17];而氢化可的松是制备肾虚动物模型的经典方法^[18]。基于此,本实验采用腹腔注射氢化可的松并脑室注射A β 的造模方法建立AD模型。结果显示,龟鹿二仙膏可明显改善模型的肾虚状态,并提高AD模型大鼠的学习记忆能力,这可能与抑制AD模型大鼠海马组织中炎症因子IL-6的表达有关。

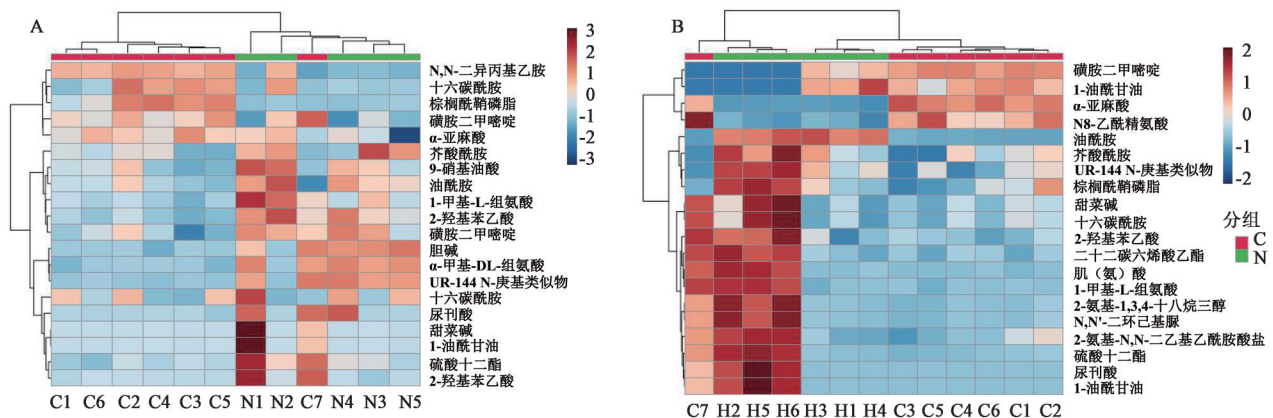
代谢组学技术共鉴定了24个与AD相关的血清差异代谢物,主要为氨基酸类、胆汁酸类、脂质类,

表4 龟鹿二仙膏治疗AD相关的差异代谢物

Table 4 Differential metabolites related to the treatment of AD with Guilu Erxiangao

编号	差异代谢物	差异变化	
		N vs. C	C vs. H
1	芥酸酰胺 erucamide	↑	-
2	棕榈酰鞘磷脂 palmitoyl sphingomyelin	↑	↑
3	UR-144 N-庚基类似物 UR-144 N-heptyl analog	↑	↑
4	磺胺二甲嘧啶 sulfamethazine	↑	↑
5	α-亚麻酸 α-linolenic acid	↑	↓
6	1-油酰甘油 1-linoleoyl glycerol	↑	-
7	2-氨基-N,N-二乙酰乙酰胺盐 2-amino-N,N-diethylacetamide	↓	↑
8	油酰胺 oleamide	↓	↓
9	硫酸十二酯 dodecyl sulfate	↓	-
10	2-氨基-1,3,4-十八烷三醇 2-amino-1,3,4-octadecanetriol	↑	-
11	9-硝基油酸 9-nitrooleate	↑	-
12	N8-乙酰精氨酸 N8-acetylspermidine	↓	-
13	甜菜碱 betaine	↓	↓
14	黄素单核苷酸 flavin mononucleotide (FMN)	-	↑
15	尿刊酸 urocanic acid	↓	↓
16	N,N-二异丙基乙胺 N,N-diisopropylethylamine (DIPEA)	↓	-
17	1-甲基-L-组氨酸 1-methylhistidine	↓	↑
18	2-油酰甘油 2-linoleoyl glycerol	↑	-
19	胆碱 choline	↓	-
20	十六碳酰胺 hexadecanamide	-	↑
21	尿刊酸 urocanic acid	-	↓
22	肌(氨)酸 creatine	↑	-
23	胆酸 cholic acid	↑	-
24	2-羟基苯乙酸 2-hydroxyphenylacetic acid	↓	-

注: ↑. 代谢差异物上调; ↓. 代谢差异物下调; N. 空白组; C. 模型组; H. 龟鹿二仙膏高剂量组



注:A: 空白组和模型组代谢差异物热图; B: 模型组和龟鹿二仙膏高剂量组代谢差异物热图

图4 不同组别比较的代谢差异物热

Fig. 4 Heat map of metabolic differences of different group

涉及了甜菜碱代谢、α-亚麻酸和亚油酸代谢、磷脂生物合成、胆汁酸生物合成、磷脂酰胆碱的生物合成

等代谢途径的紊乱。已有研究表明胆碱、甜菜碱、glycine、phosphocholine/glycerolphosphocholine等均

表5 龟鹿二仙膏治疗AD交集基因

Table 5 Guilu Erxiangao to treat AD intersection gene

序号	基因
1	前列腺素内过氧化物合酶1 (PTGS1)
2	前列腺素内过氧化物合酶2 (PTGS2)
3	视黄酸受体(gamma RXRG)
4	人源重组蛋白(NCOA2)
5	一氧化氮合酶(NOS2)
6	雄激素受体基因(AR)
7	过氧化物酶体增殖物激活受体(γ PPARG)
8	丝氨酸蛋白酶1 (PRSS1)
9	孕酮受体(PGR)
10	胆碱能受体M1 (CHRM1)

表6 龟鹿二仙膏治疗AD的关键信号通路

Table 6 Key signaling pathway in the treatment of AD with Guilu Erxiangao

编号ID	信号通路名称	P	数量/个
hsa05417	脂质和动脉粥样硬化	2.17×10^{-27}	40
hsa05418	流体剪切应力和动脉粥样硬化	5.58×10^{-25}	32
hsa05167	卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染	2.55×10^{-20}	32
hsa05161	乙型肝炎	1.25×10^{-21}	31
hsa05163	人类巨细胞病毒感染	2.75×10^{-17}	31
hsa04010	丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)	3.62×10^{-13}	30
hsa04151	磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路	4.34×10^{-11}	30
hsa04933	糖尿病并发症中的AGE/RAGE信号通路	7.87×10^{-26}	29
hsa05022	多种神经退行性疾病的通路	5.96×10^{-7}	28
hsa05160	丙型肝炎	1.31×10^{-16}	26
hsa05169	EB病毒感染	6.90×10^{-14}	26
hsa05166	人类T细胞白血病病毒1感染	4.78×10^{-13}	26
hsa04668	肿瘤坏死因子(TNF)信号通路	2.74×10^{-19}	25
hsa04657	IL-17信号通路	4.90×10^{-20}	24
hsa05215	前列腺癌	1.10×10^{-19}	24

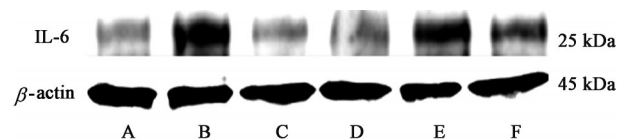


图5 龟鹿二仙膏对AD大鼠海马中蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of Guilu Erxiangao on protein expression level in hippocampus of AD model rats

被鉴定为AD模型大鼠血清中的生物标志物^[4],这与本研究结果相一致,提示AD可能会引起小鼠血清中脂质类、氨基酸类、胆汁酸类物质代谢的变化。

表7 龟鹿二仙膏对AD大鼠海马中蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 7 Effect of Guilu Erxiangao on protein expression level in hippocampus of AD model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/ β -actin
空白组	-	0.51 \pm 0.10
模型组	-	1.67 \pm 0.20 ²⁾
假手术组	-	0.82 \pm 0.11 ³⁾
龟鹿二仙膏低剂量组	2.25	1.66 \pm 0.16
龟鹿二仙膏中剂量组	4.5	0.84 \pm 0.15 ³⁾
龟鹿二仙膏高剂量组	9	0.44 \pm 0.10 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$

网络药理学共筛选出50个治疗AD的高频共性化合物,高频共性靶点187个;经“药物-活性成分-疾病-靶点”网络分析可知,dianthramine、arachidonate、kaempferol、aposiopolamine、frutinone A可能是龟鹿二仙膏治疗AD的关键活性成分。龟鹿二仙膏的主要有效成分可通过多个靶点基因影响AD的发病;kaempferol可通过AChE靶点作用于cAMP信号通路;frutinone A可通过PTRS2靶点作用到PI3K/Akt信号通路上,PI3K/Akt信号通路在AD复杂的病理机制网络中起到重要作用^[7,11]。结合代谢组学和网络药理学研究结果发现,龟鹿二仙膏可能通过调节脂质代谢而发挥治疗AD作用。有研究表明,降低脑内炎症因子IL-1 β 、IL-6的过度表达,抑制磷酸化(p)-p38 MAPK的表达,可消除由脂肪组织分泌的瘦素对Tau磷酸化的还原作用,瘦素则可通过激活PI3K/Akt信号通路来加强突触可塑性与长时程增强效应,并减少A β 的神经毒性,从而减轻AD海马组织炎症损伤^[19-20]。

本实验与龟鹿二仙膏加味可治疗年老体衰的肾精不足、髓海失济的老年痴呆症中记忆障碍,可明显改善AD模型大鼠的认知障碍,提高其学习记忆能力等报道相符^[21-22]。

龟鹿二仙膏可显著升高腹腔注射氢化可的松并脑室注射A β 诱导的AD模型大鼠的海马指数、肾脏指数和肾上腺指数,显著增加大鼠穿越平台次数,显著延长III象限路程、III象限时间,显著降低大鼠血清CORT含量和海马组织中IL-6表达水平,具有明显改善其认知功能障碍,保护脑组织海马结构的作用;代谢组学技术共鉴定了24个与AD相关的血清差异代谢物;网络药理学方法共筛选出50个治疗AD的高频共性化合物,高频共性靶点187个,得出PI3K/Akt信号通路在AD复杂的病理机制网络中

起到重要作用,说明龟鹿二仙膏还可调节AD模型大鼠的微循环损伤及调节组织整体代谢水平,为其临床应用提供了借鉴思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZAMANIAN J, KHOSHBIN Z, ABNOUS K, et al. Current progress in aptamer-based sensing tools for ultra-low level monitoring of Alzheimer's disease biomarkers [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 197: 113789.
- [2] 于蕾,贺晓丽.阿尔茨海默病和轻度认知障碍常用实验动物模型的初步评价[J].中国药理学通报,2020,36(1):1-5.
- [3] 周艳,柴艺汇,秦忠,等.中医药防治阿尔茨海默病的研究进展[J].贵州中医药大学学报,2020,42(2):74-78.
- [4] 宾东华,李玲,唐宇,等.基于中医哲学思维探析龟鹿二仙胶组方及临床运用[J].中医杂志,2020,61(17):1559-1561,1564.
- [5] 刘相玲,徐长江,杨玲玲.龟鹿二仙汤加减联合针刺治疗阿尔茨海默病疗效观察[J].中医临床研究,2020,12(21):92-93.
- [6] 马俊杰,周春祥,王小龙.基于龟鹿二仙胶干预阿尔茨海默病血管周围间隙探讨"精生髓"内涵[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(11):106-111.
- [7] 黄增强.龟鹿二仙膏加味治疗老年性记忆障碍症26例[J].中国民间疗法,2010,18(11):38.
- [8] DU Y J, TANG S H, XIAO J H, et al. Influence of electroacupuncture therapy of tonifying the kidney and regulating governor vessel on $A\beta$ related degradation enzymes in the hippocampus of a rat model of alzheimer's disease induced by $A\beta_{1-42}$ [J]. World J Acupuncture-Moxibustion, 2018,28(3):185-190.
- [9] 杨丹,乔晶,王嘉欣,等. B-GOS对阿尔茨海默病转基因小鼠认知行为和抑郁情绪的影响[J].中国应用生理学杂志,2021,37(3):240-246,253.
- [10] 钱晓路,王懿,孙蓉.中药抗AD药理学研究方法与其药效学评价的思考[J].中国药物评价,2013,30(1):6-8.
- [11] 张翠,台晶杰,崔文静,等.基于UPLC-MS技术的阿尔茨海默病模型大鼠尿液代谢组学[J].沈阳药科大学学报,2018,35(3):199-206.
- [12] 易娅静,于颖,刘旭,等.中医药治疗阿尔兹海默病研究进展[J].中医药学报,2021,49(4):99-105.
- [13] 朱宁,马晓珊,陈春丽,等.益智醒脑方对阿尔兹海默病大鼠学习记忆能力及炎症因子的影响[J].陕西中医,2021,42(7):831-835.
- [14] 盛望,王瑾茜,李旭华,等.肾脑复元汤对阿尔兹海默病大鼠海马区神经保护作用及对碱性成纤维生长因子、脑源性神经营养因子表达的影响[J].世界中医药,2018,13(11):2835-2838.
- [15] 杨晓敏,鲍天昊,阮治.阿尔兹海默病发病危险因素概况[J].四川精神卫生,2020,33(6):560-565.
- [16] 任晨斌.国医大师刘祖贻用温肾活血法治疗阿尔兹海默病经验[J].中医药导报,2016,22(16):14-15,25.
- [17] MENÉNDEZ GONZÁLEZ M. Mechanical dilution of beta-amyloid peptide and phosphorylated Tau protein in Alzheimer's disease: Too simple to be true? [J]. Cureus,2017,9(2):e1062.
- [18] 黄丽萍,熊玉洁,赵梦岚,等.覆盆子对肾阳虚型AD大鼠学习记忆的影响[J].中药药理与临床,2013,29(04):111-113.
- [19] 黄德弘,刘孟渊,闫小峰.加味当归芍药散对纤维状 $A\beta_{42}$ 诱导脑内炎症因子及磷酸化MAPK信号分子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):143-148.
- [20] GRECO S J, SARKAR S, JOHNSTON J M, et al. Leptin regulates Tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,380(1):98-104.
- [21] 黄增强.龟鹿二仙膏加味治疗老年性记忆障碍症26例[J].中国民间疗法,2010,18(11):38.
- [22] 刘江华,杨晶,张京兰,等.开心散对 $A\beta_{1-42}$ 诱导Alzheimer病大鼠模型Keap-1/Nrf2/MnSOD信号通路的作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(5):25-32.

[责任编辑 顾雪竹]