

## · 实验研究 ·

## 基于“肾脑相关”的龟龄集对阿尔茨海默病模型大鼠的作用及其机制研究

任可乐<sup>1,2</sup>, 孟祥龙<sup>1,2</sup>, 祁晓鸣<sup>1,2</sup>, 刘晓琴<sup>1,2</sup>, 苏晓娟<sup>1,2</sup>, 王佩义<sup>3</sup>, 张朔生<sup>1,2\*</sup>

1. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

2. 中药炮制山西省重点实验室, 山西 晋中 030619

3. 山西广誉远国药有限公司, 山西 晋中 030800

**摘要:**目的 基于“肾脑相关”理论, 探究龟龄集对氢化可的松与  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 诱导的阿尔茨海默病模型大鼠的作用, 并利用代谢组学的方法探讨其相关作用机制。方法 采用 ip 氢化可的松与 icv  $A\beta$  诱导的阿尔茨海默病模型, 选用 SD 雄性大鼠 60 只, 分为对照组、模型组、假手术组和龟龄集低、中、高剂量组。行为学实验结束后, 麻醉取血、肾上腺、脾、肾、胸腺、睾丸、脑和海马, 计算肾上腺指数及肾脏指数。采用新物体识别实验、Morris 水迷宫实验检测药物干预对大鼠认知功能的影响。酶联免疫试剂盒 (ELISA) 法检测各组组织上清液中睾酮和皮质酮 (CORT) 含量。蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 法测定大鼠海马组织中蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 的表达水平。利用非靶向代谢组学方法, 筛选出用药前后潜在代谢差异物并进行通路分析, 找到与龟龄集治疗阿尔茨海默病模型大鼠所涉及的相关代谢通路。结果 新物体识别结果显示, 与对照组相比, 模型组新物体辨别指数 (RI) 显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 龟龄集高、中剂量组新物体 RI 显著升高 ( $P < 0.05$ )。Morris 水迷宫实验显示, 与模型组相比, 龟龄集高、中、低剂量组大鼠在 III 象限路程、III 象限时间显著延长 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 龟龄集低、中、高剂量组肾脏指数和龟龄集高剂量肾上腺指数均显著升高 ( $P < 0.01$ )。血清激素水平结果显示: 与模型组相比, 龟龄集高、中、低剂量组 CORT 显著降低 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 结果显示, 与模型组相比, p-Akt/Akt 龟龄集高、中、低剂量组表达水平均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。用药前后共得到 23 种血清差异代谢物水平发生不同程度的回调, 主要涉及代谢途径为甜菜碱代谢、初级胆汁酸的生物合成、磷脂生物合成等代谢途径。结论 龟龄集对氢化可的松与  $A\beta$  诱导的阿尔茨海默病模型大鼠可明显改善认知功能障碍, 保护脑组织海马结构, 改善模型大鼠血清中 CORT 和睾酮水平。还可以通过调节阿尔茨海默病模型大鼠的整体代谢水平。

**关键词:** 龟龄集; 阿尔茨海默病; 代谢组学; 认知功能障碍; 睾酮; 皮质酮; 蛋白激酶 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)01-0001-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.01.001

## Effect and mechanism of Guilingji on Alzheimer's disease model rats based on "kidney-brain correlation"

REN Ke-le<sup>1, 2</sup>, MENG Xiang-long<sup>1, 2</sup>, QI Xiao-ming<sup>1, 2</sup>, LIU Xiao-qin<sup>1, 2</sup>, SU Xiao-juan<sup>1, 2</sup>, WANG Pei-yi<sup>3</sup>, ZHANG Shuo-sheng<sup>1, 2</sup>

1. College of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Shanxi Key Laboratory of TCM Processing, Jinzhong 030619, China

3. Shanxi Guangyuyuan Traditional Medicine Co. LTD, Jinzhong 030800, China

**Abstract: Objective** To study the effects of Guilingji on hydrocortisone and  $A\beta$  induced Alzheimer's Disease model rats, and the mechanism of action explore by metabomics based on the theory of "kidney - brain related". **Methods** Model of Alzheimer's disease induced by ip hydrocortisone and intraventricular injection of  $A\beta$  was used. Sixty male SD rats were selected and divided into control, model, sham operation, and Guilingji low-dose, medium-dose, and high-dose groups. After the behavioral experiment, the blood, adrenal gland, spleen, kidney, thymus, testis, brain, and hippocampus were collected under anesthesia, and the indexes of adrenal gland and kidney were calculated. New object recognition test and Morris water maze test were used to detect the effects of drug intervention

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 山西中医药大学科技创新能力培育计划 (2019PY-126); 山西省中医药大学中药炮制学科建设项目 (2018-1)

作者简介: 任可乐, 女, 在读研究生, 主要从事中药新产品开发与应用。E-mail: renkele19970206@126.com

\*通信作者: 张朔生, 男, 硕士, 主要从事中药炮制现代研究。E-mail: zhangshuosheng@aliyun.com

on the cognitive function of rats. The levels of testosterone and CORT in supernatant were determined by ELISA. The expression levels of protein kinase B (Akt) and phosphorylated protein kinase B (P-Akt) in hippocampal tissues of rats were determined by Western blotting. Non-targeted metabolomics was used to screen out potential metabolic differences before and after treatment, and pathway analysis was conducted to find the related metabolic pathways involved in Guilingji's treatment of Alzheimer's disease model rats.

**Results** The new object recognition results showed that the new object recognition index (RI) of model group was significantly lower than that of control group ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, RI of new objects in Guiling high and medium dose groups was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Morris water maze test showed that, compared with model group, the distance and time in quadrant III of Guilingji high-dose, medium-dose, and low-dose groups were significantly longer ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, kidney index in Guilingji low, medium, and high dose groups were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and adrenal index in Guilingji high dose group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The results of serum hormone level showed that, compared with model group, CORT of guilingji high-dose, medium-dose, and low-dose groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that compared with the model group, the expression levels of p-Akt/AKT in high, medium, and low dose groups were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ). A total of 23 serum metabolites were found to have different levels of callback before and after treatment, mainly involving the metabolic pathways of betaine metabolism, primary bile acid biosynthesis, phospholipid biosynthesis and so on.

**Conclusion** Guilingji can significantly improve the cognitive dysfunction, protect the hippocampal structure of brain tissue, and improve the levels of CORT and T in serum of hydrocortisone and A $\beta$ -induced Alzheimer's disease model rats. It can also regulate the overall metabolic level of Alzheimer's disease model rats.

**Key words:** Guilingji; Alzheimer's disease; metabolomics; cognitive dysfunction; testosterone; CORT; AKT

阿尔茨海默病是经常发生在老年人群体中的存在于中枢神经系统的疾病,且不可逆转并有一定的致死率<sup>[1]</sup>。现阶段阿尔茨海默病的治疗主要依靠 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体拮抗剂和乙酰胆碱酯酶抑制剂<sup>[2]</sup>,但这两类药仅可缓解症状,对于疾病的根除还尚无解决方案。阿尔茨海默病的临床表现为认知障碍,严重降低老年人的生活质量,同时也给很多家庭和社会带来沉重的负担<sup>[3]</sup>。中医认为本病位在脑,脑以髓为体、以神为用,髓是人体思维、精神活动的物质基础。而肾主藏精,主骨生髓,通于脑,化髓养神。补肾填精是防治痴呆的基础治法<sup>[4]</sup>。中药及其复方治疗阿尔茨海默病遵循中医传统理论的整体观念,以其独特的多角度、多成分,多靶点,为阿尔茨海默病预防与治疗提供新思路<sup>[5]</sup>。龟龄集作为补肾填精传统名方,具有补肾填精、壮阳培本的功效,也是清代宫廷抗衰老、延年益寿的秘方,用于治疗肾亏阳弱、夜梦精溢、腰酸腿软、五更溏泻、记忆减退等病症<sup>[6-7]</sup>。有动物实验研究证实,龟龄集是补肾抗衰老复方,在治疗阿尔茨海默病方面具有重要的应用价值<sup>[8]</sup>。有学者从形态学和行为学方面探讨“肾-髓-脑”之间的密切关系<sup>[9]</sup>,得出“肾生髓,通于脑”<sup>[8]</sup>的结论,肾精和肾气的盛衰,影响脑的结构和功能,为脑病从补肾论治提供了理论依据。代谢组学具备客观性、即时性、整体性的优势,与中医推崇的整体观念颇有相似之处,越来越多地用于探索中医药的药理作用和作用机

制<sup>[10]</sup>。高效液相色谱-质谱联用技术(HPLC-MS)具有选择性好,分辨率高等优势,是代谢组学方法中常用的有效手段<sup>[11]</sup>。本研究通过肾脑之间的密切关系,探讨龟龄集这一传统固肾补脑药物对阿尔茨海默病的治疗作用,并通过代谢组学的方法探究龟龄集治疗阿尔茨海默病模型大鼠的作用机制,从而为脑病从补肾论治提供事实依据。

## 1 实验材料

### 1.1 实验药物和试剂

龟龄集(山西广誉远国药有限公司,批准文号 Z14020687,生产批号 1031807171);氢化可的松(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); $\beta$  淀粉样蛋白(1-42)(A $\beta$ ,美国 MedChemExpress 公司,批号 HY-P1363);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(博士德生物工程有限公司,批号 14104A38);高效裂解液(博士德生物工程有限公司,批号 16D16B02);HRP-羊抗兔 IgG(博士德生物工程有限公司,批号 BST16E55);磷酸化蛋白激酶 B(P-Akt,博士德生物工程有限公司);蛋白激酶 B(Akt,博士德生物工程有限公司);广谱磷酸酶抑制剂混合物(美国 MedChemExpress 公司);酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司,批号 RA20748)。

### 1.2 实验器材及仪器

SynergHT 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限

公司); GLBehv-MWMM 大小鼠通用 Morris 水迷宫 (上海吉量软件科技有限公司); SHP-160 生化培养箱 (江苏杰瑞尔电器有限公司); GeneGnome 成像系统 (基因有限公司); AB Triple TOF 6600 质谱仪 (美国应用生物系统公司); Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司)。

### 1.3 动物

SD 雄性大鼠, 60 只, 由解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 实验动物合格证号: 201200004, 体质量 (200±20) g, 实验期间保持大鼠自由饮水和进食, 饲养温度为 (24±1) °C, 湿度 (50±5) %, 光照昼夜交替。实验前适应性饲养 1 周。

## 2 实验方法

### 2.1 动物分组及给药

将大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 即龟龄集低剂量[100 mg/(kg·d)]、中剂量[200 mg/(kg·d)]、高剂量[300 mg/(kg·d)]组, 对照组、模型组和假手术组。根据人与大鼠的药物剂量折算系数, 算出各组大鼠的给药剂量。每日上午 ig 给药, 除对照组、模型组、假手术组均 ig 同等体积的生理盐水, 其余组 ig 相对应药物, 下午除对照组其余各组 ip 氢化可的松 25 mg/(kg·d)<sup>[13]</sup>。连续给药 20 d。

### 2.2 造模

称重后, 用 10% 水合氯醛 (3.5 μL/g) 麻醉大鼠, 将其头部固定。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。对照组 (无)、假手术组 (生理盐水, 5 mL)、模型组和龟龄集各给药组 (Aβ, 5 mL)。在前凶门前 3.3 mm, 距中心线左右 1.5 mm, 用大鼠颅骨钻打孔, 用微量注射器将 Aβ (5 mL) 注入海马, 插入深度为 3.0 mm, 注射速度为 1 mL/min, 总注射时间为 5 min, 注射完成后, 以 1 mm/min 的速度抽出针头<sup>[13]</sup>。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。脑室内注射 (icv) Aβ 后, 用 Morris 水迷宫来测试动物的学习记忆能力, 出现学习能力明显受损, 视为造模成功。

### 2.3 取材

大鼠需禁食 12 h, 行为学实验结束后按每只大鼠的体质量, 用 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 静置 30 min 后, 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清

液, 冰上取脑、海马体、肾上腺、脾、肾、胸腺、睾丸分装, -80 °C 保存, 留作备用。

### 2.4 行为学实验

**2.4.1 新物体识别** 参照文献<sup>[14]</sup>进行新物体识别行为学实验, 训练时记录对 A 物体识别时间 ( $t_A$ )、对 B 物体识别时间 ( $t_B$ ); 正式试验时记录对 A 物体识别时间 ( $t_A'$ )、对 C 物体识别时间 ( $t_C$ ); 统计大鼠对新旧物体的偏好指数 (LI) 和认知指数 (RI)。

$$LI = t_A/t_B$$

$$RI = t_C / (t_A' + t_C)$$

**2.4.2 Morris 水迷宫** 参照文献方法<sup>[15]</sup>进行 Morris 水迷宫行为检测, 定位航行实验中将大鼠随机放入水中, 记录动物找到平台的时间, 空间探索实验中记录动物在目标象限所花的时间和穿越原先站台位置的次数, 保留数据用作结果分析。

### 2.5 脏器指数

各组大鼠取血处死后, 常规解剖, 摘取大鼠肾脏及肾上腺组织, 称定质量, 计算肾脏指数、肾上腺指数。

$$\text{肾脏指数} = \text{肾脏质量} / \text{体质量}$$

$$\text{肾上腺指数} = \text{肾上腺质量} / \text{体质量}$$

### 2.6 血清激素水平测定

按照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书操作, 检测血清样品中睾酮及皮质酮 (CORT) 水平。

### 2.7 蛋白免疫印记法

取各组海马组织加入到标记好的 1.5 mL 的 EP 管内, 加入 RIPA 裂解液在 4 °C 的电子恒温加样台裂解。待充分裂解后, 用低温离心机离心 (15 000 r/min、15 min、4 °C), 取上清液。计算所需工作液并配制, 将蛋白质标准品和待测蛋白各 25 mL, 加入 250 mL BCA 工作液, 孵育 (37 °C、30 min)。将样品浓度调整到等浓度, 置于 -20 °C 冰箱保存。确定所需 8% 分离胶体积和上层胶, 并配制。按顺序加样, 从左到右依次加入对照组、模型组、假手术组、龟龄集高、中、低组组织液分别 20 mL, 在最左槽加入 marker。加样完成后, 选择适当的电压进行电泳, 采用恒压浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V, 电泳样品跑到样品直至接近玻璃板底部时停止电泳。裁剪适当大小的 PVDF 膜提前浸泡在电转缓冲液中 1 h, 做好转运印夹, 120 V 转膜 2 h。取出转运膜, 放入封闭液 (5% 脱脂牛奶, 用 TBST 配制) 内, 摇床轻微摇晃封闭 (2 h)。封闭后的转运膜放入孵育

袋中，加入一抗，4 ℃过夜。次日用 TBST 洗膜，同时回收一抗供多次使用，将转运膜放入标记（羊抗兔-HRP）的二抗中，室温孵育 5 h。结束后使用凝胶成像系统进行显影分析。

### 2.8 代谢组学处理

**2.8.1 样本处理** 取适量血清样本加入预冷甲醇-乙腈-水溶液（2:2:1），涡旋混合，冰浴超声 30 min，-20 ℃静置 10 min，14 000×g、4 ℃离心 20 min，取上清真空干燥；加入 100 μL 50% 乙腈水溶液复溶，涡旋，14 000 g×g、4 ℃离心 15 min，取上清液进样分析。

**2.8.2 色谱条件** 样品采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统（UHPLC）HILIC 色谱柱进行分离；柱温 25 ℃；体积流量 0.5 mL/min；进样量 2 μL；流动相组成 A：水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水，B：乙腈；梯度洗脱程序如下：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；整个分析过程中样品置于 4 ℃自动进样器中。仪器检测信号波动容易对实验结果造成的影响，为了避免此影响，采用随机顺序的方法对样本进行连续的分析。

**2.8.3 数据分析** 原始文件导入 Compound Discoverer 2.0 软件（美国 Thermo Fisher 公司），以获取匹配和对齐的峰值数据，最后将峰面积归一化后的数据导入 SIMCA-P 14.0（瑞典 Umetrics 公司）进行主成分分析（PCA）、偏最小二乘判别分析（PLS-DA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）。同时结合 S-plot 图中的 VIP>1 和独立样本 t 检验的 P<0.05 筛选贡献最大的差异性变量。将鉴定所得差异代谢物数据通过 Metabo Analyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行通路分析，筛选出与龟龄集治疗阿尔茨海默病模型大鼠作用相关的最主要代谢途径。

## 3 实验结果

### 3.1 新物体识别实验结果

各组 LI 均接近 0.50，可以排除 LI 对新物体 RI 的影响。通过观察新物体 RI 可以得出：与对照组和假手术组相比，模型组新物体 RI 显著降低（P<0.05）；与模型组相比，龟龄集高、中剂量组新物体 RI 显著升高（P<0.05），龟龄集低组有所升高，但无统计学差异，见表 1。

表 1 各组大鼠新物体识别结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
Table 1 New object recognition results of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg kg <sup>-1</sup> )	LI	RI
对照	—	0.501±0.256	0.626±0.085
假手术	—	0.539±0.030	0.622±0.036
模型	—	0.494±0.073	0.496±0.115*#
龟龄集	100	0.515±0.133	0.571±0.151
	200	0.539±0.064	0.579±0.134▲
	300	0.486±0.102	0.620±0.134▲

与对照组比较：\*P<0.05；与假手术组比较：#P<0.05；与模型组比较：▲P<0.05

\*P<0.05 vs control group; #P<0.05 vs sham-operated group; ▲P<0.05 vs model group

### 3.2 Morris 水迷宫实验结果

与对照组相比，模型组大鼠在 III 象限路程、III 象限时间均明显缩短（P<0.05），此情况说明对氢化可的松与 Aβ 诱导的阿尔茨海默病模型大鼠的记忆力低下、认知存在明显障碍；与模型组相比，假手术组在 III 象限路程显著延长（P<0.05）、III 象限时间有所升高，说明大鼠脑部手术并不影响其学习记忆能力，故排除阿尔茨海默病模型大鼠脑部手术造成认知功能损伤的可能；与模型组相比，龟龄集高、中、低剂量组大鼠在 III 象限路程、III 象限时间显著延长（P<0.05）。以上结果说明龟龄集对大鼠阿尔茨海默病导致的空间认知能力下降起到改善作用，见图 1 和表 2。

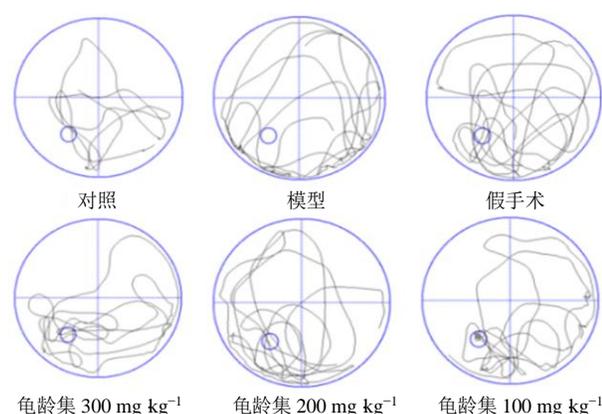


图 1 大鼠水迷宫轨迹图

Fig. 1 Rat water maze track diagram

### 3.3 脏器指数

与对照组和假手术组相比，模型组肾脏指数和

表 2 各组大鼠水迷宫实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 2 Results of water maze experiment in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg kg <sup>-1</sup> )	III 象限路程百分比/%	III 象限时间百分比/%	站台穿越次数
对照	—	38.32±1.35	41.57±6.55	2.60±1.95
假手术	—	39.09±3.88	37.32±2.51	2.75±1.50
模型	—	32.30±3.51 <sup>#</sup>	33.93±3.01 <sup>*</sup>	1.40±1.52
龟龄集	100	39.65±5.59 <sup>▲</sup>	45.24±6.47 <sup>▲</sup>	3.00±0.00
	200	42.12±6.12 <sup>▲</sup>	40.86±6.79	2.40±1.34
	300	39.18±5.54 <sup>▲</sup>	42.03±5.80	3.25±1.50

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与假手术组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs sham-operated group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs model group

肾上腺指数均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 龟龄集高、低、中剂量组肾脏指数均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 龟龄集高剂量组肾上腺指数显著升高 ( $P < 0.01$ )。以上结果表明, 龟龄集可明显改善氢化可的松与 A $\beta$  诱导的阿尔茨海默病大鼠肾脏指数和肾上腺指数, 见表 3。

表 3 各组大鼠脏器指数 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Viscera index of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg kg <sup>-1</sup> )	肾脏指数	肾上腺指数
对照	—	6.343±0.228	0.176±0.005
假手术	—	6.376±0.492	0.172±0.027
模型	—	5.606±0.316 <sup>#</sup>	0.135±0.013 <sup>#</sup>
龟龄集	100	6.447±0.410 <sup>▲▲</sup>	0.150±0.032
	200	6.569±0.544 <sup>▲▲</sup>	0.166±0.008
	300	6.522±0.322 <sup>▲▲</sup>	0.184±0.010 <sup>▲▲</sup>

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与假手术组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs sham-operated group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs model group, <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs model group

### 3.4 血清激素水平

与对照组相比, 模型组大鼠血清中睾酮水平显著降低, CORT 显著升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 龟龄集高、中、低剂量组 CORT 显著降低, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 龟龄集给药组大鼠血清中睾酮含量虽有上升但不显著, 无统计学意义, 见表 4。

### 3.5 p-Akt/Akt 蛋白表达

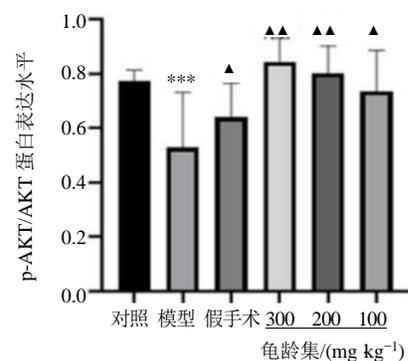
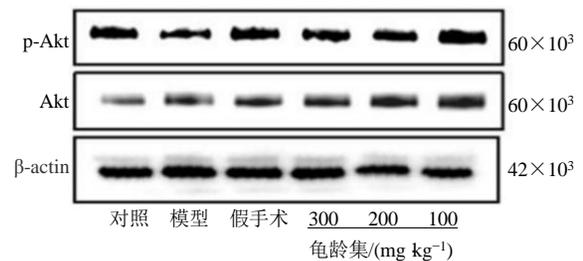
通过采用 Western blotting 检测大鼠海马中 p-Akt/Akt 的表达水平, 结果见图 2。与对照组相比, 模型组大鼠的 p-Akt/Akt 的表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ )。与模型组相比, p-Akt/Akt 龟龄集高、中、低剂量组表达水平均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ )。研究结果表明, 龟龄集可明显改善氢化可的松与 A $\beta$  诱导的阿尔茨海默病大鼠大鼠海马的蛋白表达水平。

表 4 各组大鼠血清激素水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Serum hormone levels of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg kg <sup>-1</sup> )	睾酮/(ng·mL <sup>-1</sup> )	CORT/(ng·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	0.241±0.007	423.053±120.844
假手术	—	0.239±0.009	633.450±102.886
模型	—	0.232±0.022 <sup>*</sup>	608.244±108.453 <sup>*</sup>
龟龄集	100	0.234±0.006	585.915±59.450 <sup>▲</sup>
	200	0.233±0.008	492.667±123.317 <sup>▲</sup>
	300	0.231±0.006	459.063±158.462 <sup>▲</sup>

与对照组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs model group



与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$

<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs model group

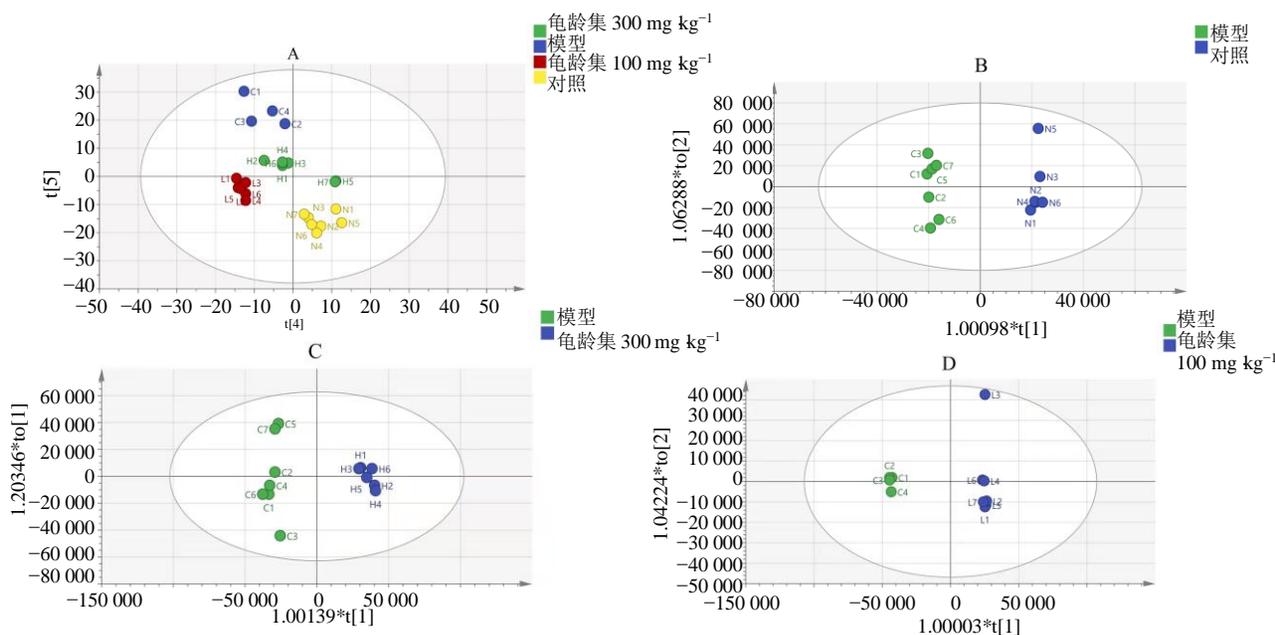
图 2 各组大鼠海马 p-AKT/AKT 蛋白表达与量化统计  
Fig. 2 Expression and quantification of p-Akt/AKT protein in hippocampus of rats in each group

### 3.6 代谢组学结果

**3.6.1 多元统计分析** 对各组样本数据进行无监督主成分分析 (PCA), 代谢组学中 PCA 图能在整体上反映几组样本代谢差异的变异度大小, 将数据处理后得到 4 组血清样本 PCA 得分图, 见图 3-A。由 PCA 得分图可见, 对照组、模型组、龟龄集高、低剂量组有明显分离的趋势。采用正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA) 对各组样本数据进行主成分分析, 发现对照组与模型组、模型组与龟龄集高剂量

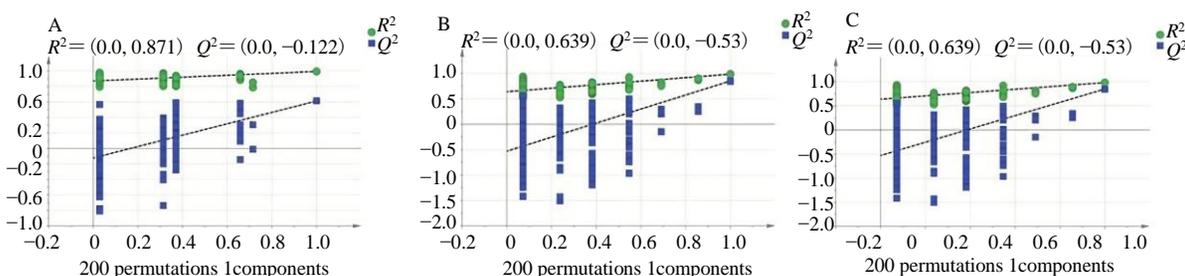
组、模型组与龟龄集低剂量组样本明显分离, 提示了模型稳定且可信度高, 见图 3-B~D。本研究模型  $Q^2$  intercept < 0, 且所有的  $R^2$ 、 $Q^2$  值均小于右端,  $R^2$  值在  $Q^2$  值之上, 表明模型未产生过分拟合现象, 确定了模型有效可靠, 见图 4。

**3.6.2 差异代谢物筛选** 分别做出 OPLS-DA 模型中的得分图 (S-plot) 图, 进而得到 VIP 值, 进一步结合  $t$  检验进行组间差异比较, 根据  $VIP > 1$  且  $P < 0.05$  筛选出贡献最大的差异变量, 见图 5。



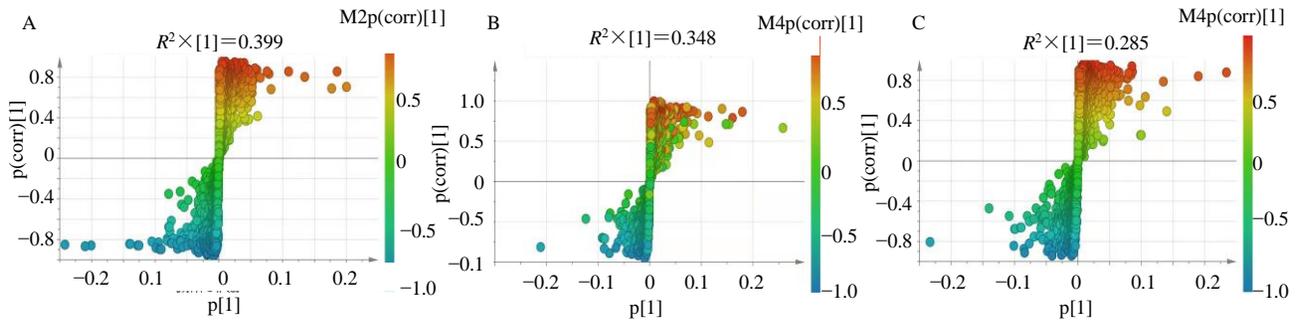
A-对照、模型、龟龄集高低剂量 PCA 图; B-对照、模型组 OPLS-DA 图; C-模型、龟龄集高剂量组 OPLS-DA 图; D-模型、龟龄集低剂量组 OPLS-DA 图  
A-PCA plots of control, model, Guilingji high and low dose group; B-OPLS-DA diagram of control and model group; C-OPLS-DA diagram of model and Guilingji high-dose group; D-OPLS-DA diagram of model and Guilingji low-dose group

图 3 各组大鼠 PCA 和 OPLS-DA 图  
Fig. 3 PCA and OPLS-DA plots of rats in each group



A-对照组、模型组随机排列试验图; B-模型组、龟龄集高剂量组随机排列试验图; C-模型组、龟龄集低剂量组随机排列试验图  
A-Randomly arrange test chart of control and model group; B-Randomly arrange test chart of model and Guilingji high-dose group; C-Randomly arrange test chart of model and Guilingji low-dose group

图 4 模型验证图  
Fig. 4 Model validation diagram



A-对照组与模型组 S-plot 图 B-模型组与龟龄集高剂量组 S-plot 图 C-模型组与龟龄集低剂量组 S-plot 图  
A-S-plot of control and model group B-S-plot of model and Guilingji high-dose group C-S-plot of model and Guilingji low-dose group

图 5 血清代谢组学 S-plot 图  
Fig. 5 S-plot of serum metabolomics

分析结果表明, 龟龄集用药后血清中有 23 种代谢物在发生变化, 其中棕榈酰鞘磷脂、磺胺二甲嘧啶、油酰胺、花生四烯酸、胞嘧啶核苷、DL-色氨酸、亚麻酸甲酯等代谢物水平上升。邻羟基苯乙酸、6-氨基己酸、二十二烷六喜酸乙酯、*D*-(+)葡萄糖 [*D*-(+)-glucose]、脱氧胆酸、乙酰左旋肉碱等代谢物水平下降, 见表 5, 结合代谢热图分析见图 6。用药后龟龄集高剂量干预后显著回调乙酰左旋肉碱、棕榈酰鞘磷脂、6-氨基己酸。

表 5 与龟龄集治疗阿尔茨海默病作用相关的差异代谢物  
Table 5 Differential metabolites associated with the treatment of Alzheimer's disease by Guilingji

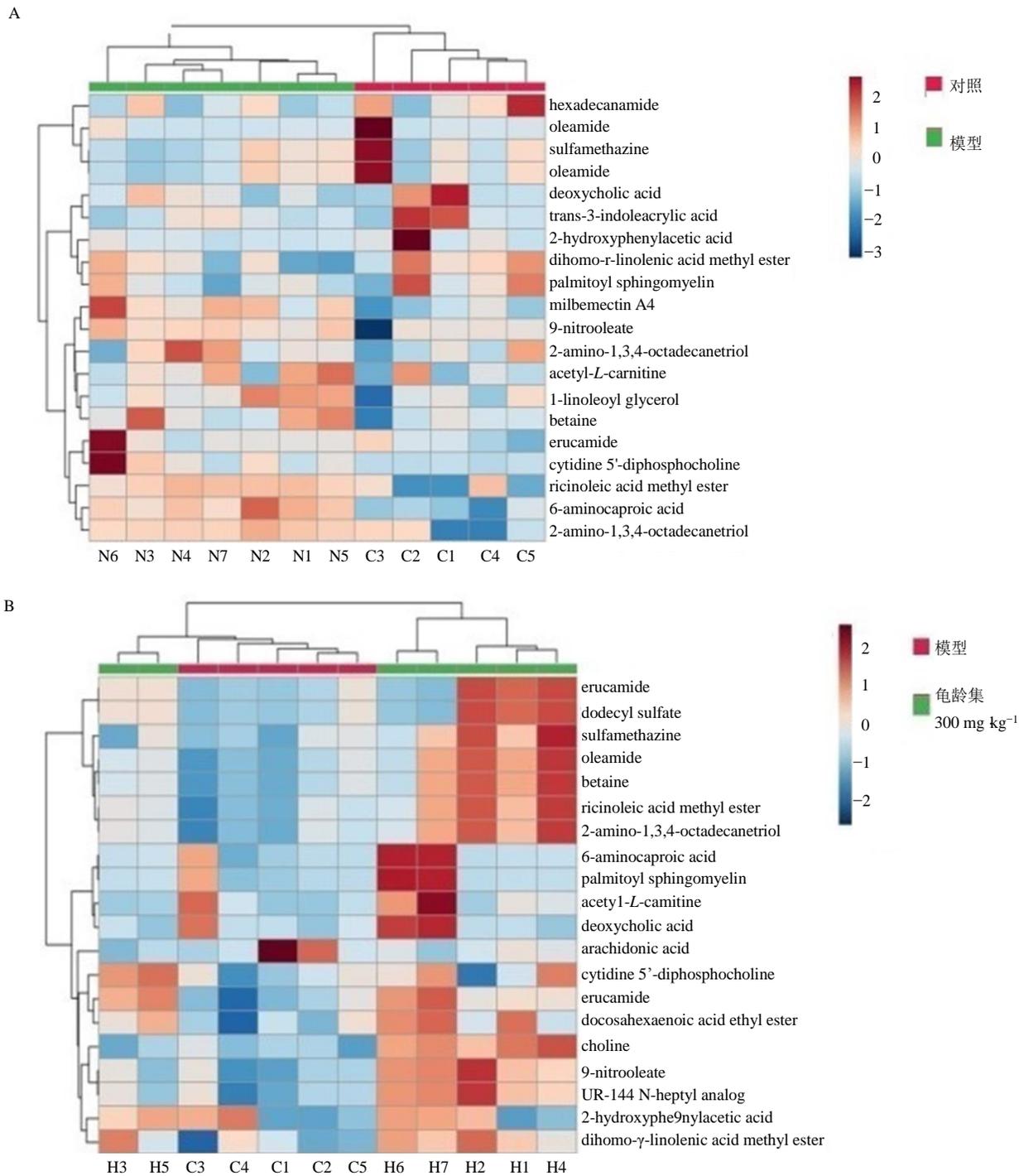
差异代谢物	对照 vs 假手术	对照 vs 龟龄集高剂量
erucamide	下调	上调
palmitoyl sphingomyelin	上调	上调
dihomo- $\gamma$ -linolenic acid methyl ester	—	上调
ricinoleic acid methyl ester	—	上调
sulfamethazine	上调	—
2-hydroxyphenylacetic acid	下调	下调
6-aminocaproic acid	下调	下调
2-amino-1,3,4-octadecanetriol	上调	—
dodecyl sulfate	—	上调
oleamide	上调	上调
9-nitrooleate	下调	—
docosahexaenoic acid ethyl ester	下调	下调
$\alpha$ -methyl-DL-histidine	上调	—
trans-3-indoleacrylic acid	上调	—
milbemectin A4	下调	下调
betaine	—	上调
arachidonic acid	上调	上调
cytidine 5'-diphosphocholine	上调	上调
choline	上调	—
<i>D</i> -(+)-glucose	下调	—
deoxycholic acid	下调	下调
DL-tryptophan	—	上调
acetyl-L-carnitine	—	下调

### 3.6.3 差异代谢物通路分析

运用 Metabo Analyst 5.0 数据库对筛选出的差异代谢物进行代谢通路富集分析, 得到用药前后差异代谢通路, 见图 7, 根据结果分析发现, 差异代谢途径主要包括花生四烯酸代谢、磷脂酰胆碱的生物合成、甜菜碱代谢、 $\alpha$  亚麻酸和亚油酸代谢、磷脂生物合成、蛋氨酸代谢、超长链脂肪酸的  $\beta$  氧化、支链脂肪酸氧化、甘氨酸和丝氨酸代谢、胆汁酸生物合成 10 条相关代谢途径。

## 4 讨论

阿尔茨海默病是最常见的老年性痴呆, 多由于年老体衰, 脏腑亏虚, 使痰湿内生, 瘀血内停, 闭阻脑窍, 扰乱神明所致。肾精亏虚、痰浊阻窍为其的主要证型<sup>[16]</sup>。病理特征主要为  $A\beta$  在细胞外沉积促使神经元凋亡<sup>[17]</sup>。从“肾脑相关”整体出发, 脑作为元神之府, 滋养元神同时主导着人体的运动、感知、记忆、思维等基本功能<sup>[18]</sup>。肾脑相互依存, 肾中所藏之精可随督脉、脊髓而上汇于脑, 充养髓海, 肾精充盈与否, 决定了脑髓化生的多少。脑髓充足与否, 则决定了脑的功能能否正常发挥<sup>[19]</sup>。肾精亏虚则不能上充于脑, 脑髓渐空则表现出记忆力衰退、行动迟缓、判断力下降等现象<sup>[20]</sup>。只有精足髓充, 髓满脑健, 神机聪慧, 才能保证脑神之用主持有度, 使其综合分析、学习记忆的功能正常发挥。*D*-半乳糖致亚急性衰老模型、 $A\beta$  诱导模型均为研究学习记忆功能障碍和阿尔茨海默病的诱导性衰老模型<sup>[21]</sup>。*D*-半乳糖诱导的模型虽有类老年斑的病理改变, 在海马区可见神经元变性坏死, 但未出现神经纤维缠结及老年斑样病理改变; 而  $A\beta$  诱导模型出现神经纤维缠结, 且  $A\beta$  是阿尔茨海默病形成



A-对照组和模型组代谢差异物热图 B-模型组和龟龄集高剂量组代谢差异物热图  
A-Heat map of metabolic differences in control and model group B-Heat map of metabolic differences in model and Guilingji high-dose group

图 6 代谢差异物热图

Fig. 6 Heat map of metabolic differences

和发展的关键因素，氢化可的松是最常用的肾阳虚动物模型<sup>[22-23]</sup>。因此，基于“肾脑相关”理论，本实验以肾精化生髓理论的提出为基础，通过氢化可的松并 A $\beta$  诱导大鼠阿尔兹海默症，所表现出行

为、认知、记忆等一系列障碍。结果显示，龟龄集可明显改善阿尔茨海默病模型大鼠肾脏指数及肾上腺指数。用动物行为学实验对不同组别的动物模型进行行为认知分析，结果显示阿尔茨海默病模型大鼠

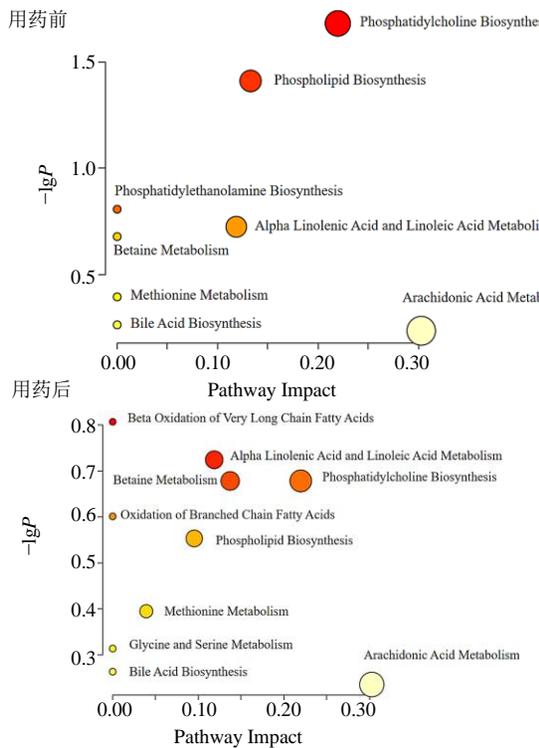


图 7 代谢通路图

Fig. 7 Metabolic pathway diagram

在学习认知方面能力严重缺失显著减少, 给药后大鼠各项行为学指标有所改善。根据血清激素水平结果显示, 龟龄集可以明显降低阿尔茨海默病大鼠血清中的 CORT ( $P < 0.05$ ) 水平, 对血清中的睾酮水平有所提高。而龟龄集对给药大鼠海马中免疫蛋白 p-Akt/Akt 的表达有明显提高, 以上说明龟龄集在阿尔茨海默病治疗过程中起到积极作用。p-Akt/Akt 高表达可以有效的对抗氢化可的松并  $A\beta$  诱导的细胞毒性, 减少细胞凋亡<sup>[24]</sup>。罗浩铭等<sup>[25]</sup>研究发现, 龟龄集中的人参水提取物中糖蛋白和人参皂苷均能明显改善记忆获得障碍, 增强小鼠学习能力。有研究表明, 发现龟龄集中的肉苁蓉可以改善胆碱能神经系统功能<sup>[26-27]</sup>。王少峡等<sup>[28]</sup>研究表明补骨脂素能改善  $\beta$  淀粉样蛋白对海马神经元的损伤。牛膝多肽可以促进海马神经元生长, 保护神经系统<sup>[29]</sup>。龟龄集还具有延缓衰老, 保护中枢神经系统内突触小泡蛋白的作用<sup>[6, 30]</sup>, 各种研究均直接或间接显示龟龄集对阿尔兹海默症有改善作用, 这与本实验相符。

本实验对氢化可的松并  $A\beta$  诱导大鼠阿尔茨海默病模型, 探讨龟龄集对大鼠阿尔茨海默病的作用机制。运用高效液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS) 对各组大鼠的血清样本进行代谢轮廓分析, 筛选差

异代谢物和相关代谢通路, 共找到用药前后 23 种血清差异代谢物, 10 条差异代谢通路途径, 其中磷脂酰胆碱的生物合成途径、甜菜碱代谢途径、 $\alpha$  亚麻酸和亚油酸代谢途径与龟龄集治疗阿尔茨海默病的相关性最高, 对此展开讨论。查阅相关文献, 磷脂酰胆碱是真核生物细胞膜上含量丰富的磷脂<sup>[31]</sup>。然而, 阿尔茨海默病的主要发病机制是  $A\beta$  的降解异常,  $A\beta$  异常降解后, 在脑实质聚集、沉积形成的不溶性淀粉样斑块具有神经毒性<sup>[32-33]</sup>。甜菜碱 (三甲基甘氨酸) 属季胺型生物碱, 是一种来源于日常食物的天然小分子, 能在体内稳定循环, 可参与蛋白质代谢、脂肪代谢以及能量代谢<sup>[34-35]</sup>。脂肪酸最主要的功能是参与胆固醇的代谢, 主要有亚油酸和  $\alpha$ -亚麻酸, 异常升高的胆固醇可导致肝内有毒物质积聚, 从而产生病理生理效应, 包括线粒体功能失调, 氮和活性氧的过度产生。因此, 本实验推测阿尔茨海默病可能导致  $\alpha$ -亚麻酸和亚油酸代谢途径的紊乱, 进而导致胆固醇升高, 肝内有毒物质积聚而产生病理效应。

龟龄集对氢化可的松并  $A\beta$  诱导的阿尔茨海默病模型大鼠可明显改善其认知功能障碍, 提高 p-AKT/AKT 的表达, 保护脑组织海马结构, 改善阿尔茨海默病模型大鼠血清中 CORT 和 T 水平。还可以通过调节大鼠的整体代谢水平

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 周兰秀. 治疗阿尔兹海默症的药物设计与合成研究 [D]. 昆明: 云南大学, 2018.
- [3] Andrieu S, Coley N, Lovestone S, et al. Prevention of sporadic Alzheimer's disease: Lessons learned from clinical trials and future directions [J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(9): 926-944.
- [4] 王晶, 靳冬. 补髓固脑治呆方结合针刺治疗老年痴呆的临床疗效及部分机制研究 [J/OL]. 中华中医药学刊: 1-9. [2021-07-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210205.1504.004.html>.
- [5] 张运辉, 周小青, 伍大华, 等. 中药复方治疗阿尔兹海默病的临床研究进展 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(10): 1275-1278.
- [6] 段雨娟, 范慧君, 邢婕, 等. 龟龄集延缓果蝇衰老的作用研究 [J]. 山西医科大学学报, 2021, 52(3): 317-321.
- [7] 赵思俊, 赵晓喆, 柳花兰, 等. 龟龄集对衰老引起的学

- 习记忆功能障碍的改善作用 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5352-5357.
- [8] 王慧婵. 龟龄集对 AD 认知功能的疗效评价及突触和髓鞘相关作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [9] 贺文彬, 张俊龙, 陈乃宏. “肾-髓-脑”生物轴理论初探 [J]. 中医杂志, 2015, 56(14): 1182-1184.
- [10] 王翠, 贾雪洋, 侯璐文, 等. 基于 GC-MS 代谢组学研究抑郁大鼠血浆代谢物变化规律 [J]. 药学学报, 2018, 53(6): 980-986.
- [11] 张玺恩, 王笛, 许风国. 化学衍生化技术在靶向代谢组学 LC-MS 中的应用与进展 [J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1): 31-37.
- [12] 乐娜, 侯燕, 张建军, 等. 霍山石斛不同提取物对肾阴虚证和肾阳虚证小鼠温度趋向性、环核苷酸及甲状腺激素的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(2): 705-710.
- [13] 杜艳军, 汤双红, 肖佳欢, 等. 电针益肾调督法对  $A\beta_{1-42}$  诱导的阿尔兹海默病模型大鼠海马  $A\beta$  相关清除酶的影响 [J]. 世界针灸杂志, 2018, 28(3): 185-190, 232-233.
- [14] 李玉姣, 王海霞, 陈善广, 等. 基于物体认知法研究慢性睡眠干扰对小鼠学习记忆的影响 [J]. 航天医学与医学工程, 2021, 34(1): 25-30.
- [15] Wei X, Xu X, Chen Z, *et al.* Protective effects of 2-dodecyl-6-methoxycyclohexa-2, 5-diene-1, 4-dione isolated from *Averrhoa carambola* L.(Oxalidaceae) roots on neuron apoptosis and memory deficits in Alzheimer's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(3): 1064-1073.
- [16] 张淼, 张思琪, 逢静, 等. 中医药治疗阿尔兹海默病的研究进展 [J]. 河北中医, 2020, 42(11): 1746-1750.
- [17] 林丽, 杨杰, 刘尚志, 等. 基于 APP 调控探讨补肾化痰益智法对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 模型大鼠认知障碍的改善及分子机制 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(5): 1355-1361.
- [18] 高玲, 胡亚男. 基于肾-脑相关理论谈血管性痴呆从肾论治 [J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(9): 46-49.
- [19] 韩诚, 张俊龙. 从“肾脑相关”论衰老学习记忆功能障碍 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 5112-5116.
- [20] 冯睿, 赫明超, 李钺, 等. 基于“肾脑相济”理论探讨补肾中药调控脑作用的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 2179-2183.
- [21] 卢延华, 管博文, 孟爱民. 衰老动物模型及其研究进展 [J]. 中国比较 1 医学杂志, 2019, 29(9): 109-113.
- [22] 闫蓉, 常翔, 杨从, 等. 阿尔兹海默病  $\beta$  淀粉样蛋白形成和沉积的发病机制及中医药干预的可能途径 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(6): 629-632.
- [23] 杜仕静, 王蕾, 苏萍, 等. 中药成分影响阿尔兹海默病  $\beta$ -淀粉样蛋白靶点的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1989-1995.
- [24] 尹刚. PI3K/AKT 信号通路在 AD 发病中的作用 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [25] 罗浩铭, 陈英红, 周婷婷, 等. 人参糖蛋白对小鼠学习和记忆能力的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2016, 42(3): 439-444.
- [26] 刘美虹, 赵国君, 陈哲. 肉苁蓉苯乙醇苷对东莨菪碱致记忆障碍小鼠保护作用的研究 [J]. 包头医学院学报, 2011, 27(6): 9-10.
- [27] 尹刚, 龚道恺, 刘帮会, 等. 肉苁蓉多糖对阿尔兹海默病模型大鼠的学习记忆能力及海马神经元 Bcl-2 和 caspase-3 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1091-1092.
- [28] 王少峡, 柴丽娟, 李晋, 等. 补骨脂素对淀粉样蛋白损伤海马神经元胆碱能系统的保护作用研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(10): 2083-2084.
- [29] 袁颖, 周松林, 顾晓松, 等. 牛膝多肽促大鼠海马神经元突起的生长 [J]. 解剖学报, 2009, 40(5): 696-701.
- [30] 任占川, 杨迎春, 田林. 龟龄集对大鼠小脑皮质和脊髓前角内突触小泡蛋白变化的影响 [J]. 解剖学研究, 2014, 36(6): 433-435.
- [31] Estela A G, Schon E A. Alzheimer disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 997: 149-156.
- [32] Yamamoto S, Kota S, Senoo N, *et al.* Differences in phosphatidylcholine profiles and identification of characteristic phosphatidylcholine molecules in meat animal species and meat cut locations.[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2021, 85(5): 1205-1214.
- [33] 林文娟, 尹大川. 姜黄素抑制 TAU 蛋白聚集治疗阿尔兹海默症的研究进展 [J]. 当代医学, 2021, 27(9): 190-194.
- [34] 杨芷, 杨雨, 阳金金, 等. 甜菜碱对鹅胚原代肝细胞脂肪代谢和 DNA 甲基化的影响及调控机制 [J]. 动物营养学报, 2021, 33(5): 2918-2926.
- [35] 胡钰慧, 何玲. 线粒体功能障碍与阿尔兹海默病发病的相关性研究进展 [J]. 药学研究, 2020, 39(2): 101-104.

[责任编辑 高源]