

基于代谢组学技术研究绞股蓝总皂苷抑制 tau 蛋白过表达诱导的细胞损伤机制

杨翠翠¹, 程子昭², 姜新海², 胡朝英^{3*}

1. 首都医科大学附属北京天坛医院 临床试验中心, 北京 100070

2. 首都医科大学宣武医院 药学部, 北京 100053

3. 首都医科大学附属北京地坛医院 药物临床试验机构办公室, 北京 100015

摘要: 目的 研究绞股蓝总皂苷(GPs)对 tau 蛋白过表达细胞代谢的影响, 探讨 GPs 治疗阿尔茨海默病(AD)的机制。方法 通过采用 CRISPR/Cas9 技术构建微管相关蛋白 tau (MAPT) 过表达 N2a 细胞系 (MAPT 细胞); 用 CCK-8 法检测 GPs 对 N2a、MAPT 细胞存活率的影响; 体外培养 N2a (对照组)、MAPT 细胞 (模型组), 向 MAPT 细胞中加入 GPs (50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行干预, 共同孵育 24 h 后收集细胞, 采用 Western blotting 技术检测总 tau 蛋白量水平; 利用代谢组学技术检测 GPs 对 MAPT 细胞内源性代谢产物的影响, 明确差异代谢产物及通路。结果 50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 对 N2a 细胞活力无明显影响; 50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 对 MAPT 细胞活力无显著性影响; 与对照组相比, MAPT 细胞内 tau 蛋白水平明显增加 ($P<0.001$); 与模型组比较, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 可明显减少 MAPT 细胞内总 tau 蛋白含量 ($P<0.05$); 代谢组学结果显示, 按照差异代谢产物数量占比从高到底依次为脂质和类脂分子, 有机酸及其衍生物, 核苷、核苷酸和类似物等。通过京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析, 差异代谢产物主要富集在核苷酸代谢、氨基酸合成、甘油磷脂代谢等通路。与模型组比较, 给药后参与甘油磷脂代谢通路的胞磷胆碱和磷脂酰胆碱水平显著增加 ($P<0.001$), 甘油磷脂胆碱、甘油-3-磷乙醇胺水平显著降低 ($P<0.001$)。结论 GPs 可以减少细胞内 tau 蛋白的异常过表达, 通过增加胞磷胆碱和磷脂酰胆碱水平、减少甘油磷脂胆碱和甘油-3-磷乙醇胺水平调控甘油磷脂代谢通路。

关键词: 绞股蓝总皂苷; 阿尔茨海默病; tau 蛋白; 代谢组学; 甘油磷脂代谢

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 05-1030-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.013

Mechanism of gypenosides on tau overexpression induced cell damage based on metabonomics

YANG Cuicui¹, CHENG Zizhao², JIANG Xinhai², HU Chaoying³

1. Department of Clinical Trial Center, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

2. Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

3. Institute of Drug Clinical Trial, Beijing Ditan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100015, China

Abstract: Objective To investigate the effect of gypenosides (GPs) on improving the abnormal cell metabolism induced by abnormal tau protein overexpression, and to explore the mechanism of GPs in the treatment of Alzheimer's disease. **Methods** Microtubule-associated protein tau (MAPT) overexpressing N2a cell were constructed by CRISPR/Cas9 technique. The effects of GPs on the survival ratio of N2a and MAPT cells were detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) to determine the safe dose range of GPs. N2a and MAPT cells were cultured *in vitro*, and different concentrations of GPs (50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were added to MAPT cells for intervention. After co-incubation for 24 h, the cells were collected and the total tau protein levels were detected by western blotting. Metabolomics technology was used to detect the effects of GPs on metabolites of MAPT cells and identify the different metabolites and pathways. **Results** GPs (50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) had no significant effect on N2a cell viability. GPs (5, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) had no significant effect on MAPT cell viability. Compared with N2a control group, the tau protein level in MAPT

收稿日期: 2023-12-18

基金项目: 北京市医院管理中心“青苗”计划(QML20210806); 北京市第三批中药骨干人才

第一作者: 杨翠翠(1985—), 博士, 副研究员。E-mail: yectmg@126.com

*通信作者: 胡朝英, 女, 博士, 副主任药师, 从事神经药理及临床药理研究。E-mail: hucarol@126.com

cells was significantly increased ($P < 0.001$), and the total tau protein content in MAPT cells was significantly decreased by $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GPs. The metabolomics results showed that the different metabolites enriched in lipid and lipid molecules, organic acids, nucleosides, nucleotides and analogues, etc. KEGG pathway analysis demonstrated differential metabolites were mainly concentrated in nucleotide metabolism, amino acid synthesis, glycerol phospholipid metabolism and other pathways. After GPs treatment, the level of CDP-Choline and phosphocholine (PC) were increased ($P < 0.001$), while the contents of glycerophosphocholine (GPC) and glycerin-3-phosphoethanolamine were significantly decreased ($P < 0.001$). **Conclusion** GPs can attenuate the abnormal overexpression of tau protein, and regulate the metabolism pathway of glycerophospholipid by increasing CDP-Choline and PC, reducing GPC and sn-Glycerol-3-phosphoethanolamine.

Key words: gypenosides; Alzheimer's disease; tau protein; metabolomics; glycerophospholipid metabolism

阿尔茨海默病(AD)是痴呆的最常见类型,预计2050年,全球AD患者人数将超过1亿^[1]。中国AD患者超过700万人。2010年AD患者花费超过6 000亿美元,到2030年还将增加85%。AD不仅导致老年人生活质量下降,而且日益加重家庭和社会经济负担,严重阻碍社会的发展^[2]。AD主要病理特征为胞外 β 淀粉样斑块(A β)和神经元胞内tau蛋白形成的神经原纤维缠结(NFT)。已证明AD患者发生神经退行性变之前tau蛋白液滴逐步聚集成为不溶性聚集体,与患者认知功能损伤呈正相关^[3]。

代谢综合征患者有认知功能下降并向痴呆阶段进展的趋势^[4]。通过对患者脑组织的检测发现脂代谢和氨基酸代谢异常发生在由轻度认知障碍(MCI)向AD进展的人群中。Tau蛋白能够通过破坏线粒体中胆固醇转化为孕烯醇酮的代谢过程导致认知功能损害^[5]。通过改善代谢延缓治疗AD成为近几年的药物研发方向^[6-7]。代谢物是基因组、表观基因组和生理调控的下游,是细胞代谢的终产物或中间产物,参与能量转换、信号传导、表观修饰等过程,可为神经退行性细胞过程的研究提供可靠指标^[8]。代谢组学是一种强大的方法,可用于捕获复杂的动态代谢中与AD相关的变化。代谢指纹图谱能够提示细胞间通讯中断是AD进行性病理机制的基础,可用于药物作用机制的研究^[9]。

中医古籍文献中并没有关于AD相应的病名记载,但是根据临床症状将AD归属于中医学“呆病”“善忘”。《灵枢·天年》有云:“六十岁,心气始衰,……,血气懈惰,故好卧。七十岁,脾气虚,……。八十岁,肺气衰、魄离,故言善误”,指出了人体机能的衰减与脏腑、年龄有关^[10]。

绞股蓝作为野菜食用首载于《救荒本草》,《本草纲目》记载其名为“乌菰莓”,味苦、微甘,性凉;无毒,归肺脾肾经,具有补益脾气、祛痰化瘀、清热解毒,养心安神、补气生精之功效^[11]。现代研究发现,绞股蓝在抗炎、抗氧化、促进细胞新陈代谢等方面

有药理学活性,此外还有研究表明其在抗衰老过程中有一定的药理作用^[12]。绞股蓝总皂苷(GPs)是绞股蓝的主要活性成分,其基本化学结构为四环三萜的达玛烷型。目前已分离得到80多种皂苷,其中79种命名为绞股蓝皂苷I~LXXIX^[13]。GPs对一些代谢性疾病有治疗作用,如能够通过调节三酰甘油、甘油磷脂、不饱和脂肪酸代谢调节高脂血症大鼠的血脂水平^[14]。近年研究证明GPs具有抗氧化作用,减少A β 沉积,能够保护AD模型小鼠海马神经元,改善认知能力^[15-17]。

GPs是否能够通过影响代谢途径减少AD病理损伤尚不清楚。本研究结合代谢组学研究GPs对tau过表达损伤细胞中代谢产物的影响,并探索代谢产物如何整合到生物学相关途径,为寻找有效治疗AD的药物提供新的思路。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

GPs(货号15588-68-8,批号HR1137W1,质量分数 $\geq 98\%$),购自辰光生物科技有限公司。乙腈、甲醇、甲酸、特超敏ECL发光液(Millipore公司); Minimum Eagle's medium (MEM)培养基、胎牛血清(FBS, Gibco公司);嘌呤霉素、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术有限公司); Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(日本同仁);BCA蛋白检测试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司);tau-5抗体、 β -actin抗体(Abcam公司)。

1.2 主要仪器

质谱仪(Thermo Scientific Q Exactive Plus);超高压液相色谱仪(Shimadzu Nexera X2 LC-30AD);色谱柱(Waters ACQUITY UPLC® HSS T3, 100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm);超声波系统(Diagenode Bioruptor);真空离心浓缩仪(Eppendorf Concentrator plus);离心机(Eppendorf Centrifuge 5424R);CO₂恒温培养箱(日本SANYO);垂直电泳转印系统(Biorad);全

自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

小鼠神经母细胞瘤 N2a 购于北京协和细胞库;采用 CRISPR/Cas9 技术在 *CL-ZQ2-003-B* 基因 Exon2 上敲入 CMV-Promoter-*CL-ZQ2-003-B* (P301S)-loxP puroDeltatk-loxP, 构建 tau 蛋白(MAPT)过表达 N2a 细胞系(MAPT 细胞)^[18]。正常 N2a 培养在含 10% 胎牛血清(FBS)、1% 青霉素和链霉素的 MEM 培养基中, MAPT 细胞培养在含 10% FBS、1% 双抗、6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素的 MEM 培养基中。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

分析天平称取 0.1 g GPs 粉末, 溶于细胞培养用磷酸缓冲盐溶液(PBS), 至完全溶解后定容至 10 mL, 使用无菌 0.22 μm 滤膜滤过, 得到 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 储备液。

将 N2a 或 MAPT 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔细胞 1×10^5 个, 细胞液终体积为 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞贴壁长至 70%~80% 进行药物干预。向 N2a 细胞中加入 50、100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs, 向 MAPT 细胞中加入 5、50、100、200、300、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs, 对照组中加入相同体积的 PBS, 空白组不接种细胞, 每组设置 10 个复孔, 共同孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 混匀, 置于细胞培养箱中继续孵育 120 min。置于多功能酶标仪上检测细胞吸光度(*A*)值, 检测波长为 450 nm, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 药物干预

N2a 和 MAPT 细胞分别接种于 6 孔板中, 每孔细胞 1×10^6 个, 培养体系为每孔 2 mL, 培养 24 h 使细胞贴壁后, 设置对照组(N2a 细胞)、模型组(MAPT 细胞)和 GPs(50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组, 每组设 6 个复孔, 培养 24 h, 弃去培养液, 收集细胞。

2.4 Western blotting 法

提取“2.3”项各组细胞总蛋白。配制 10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 将配制好的凝胶固定在电泳槽上, 在凹槽内加满电泳缓冲液后缓慢拔下梳子。在各加样孔中分别加入 20~30 μL 样品。先用 70 V 电压让样品在恒压条件下电泳, 待样本进入下层分离胶后, 将电压升至 120 V, 继续电泳直至目的蛋白分离完全, 关闭电源, 然后进行恒流湿转法转膜。设

定电流为 300 mA, 在冰浴条件下恒流转膜 90 min。电转结束后将 PVDF 膜转移至 10% 脱脂奶粉封闭液中, 置于摇床上室温震荡 1 h 后倾去封闭液, 将 PVDF 膜浸于 TBST 缓冲液中, 置于摇床上室温震荡 6 min, 重复 3 次。加入一抗 Tau 蛋白抗体(tau 5), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育过夜。将 PVDF 膜浸于 TBST 中, 置于摇床上室温震荡 6 min, 重复 3 次。加入一抗对应种属的辣根过氧化物酶偶联的二抗, 置于摇床震荡, 室温孵育 1.5 h。将 PVDF 膜浸于 TBST 缓冲液中, 置于摇床上室温清洗 6 min, 重复 3 次。将 ECL 发光液滴到 PVDF 膜上浸润 1~2 min 后, 放于凝胶成像系统中观察并拍照, 采用 Image J 软件进行半定量分析。

2.5 代谢组学分析

2.5.1 样本处理 已有文献详细报道 tau 蛋白过度表达引起的代谢组学的变化, 差异代谢产物主要富集在氨基酸、嘌呤、谷胱甘肽、脂代谢等方面^[19]。本实验重点探究 GPs 对 tau 过表达引起的代谢组的改变, 然后对照文献, 分析药物调节代谢产物改变的生物学意义。

将 MAPT 细胞接种于细胞培养瓶中, 使用的培养基为含有 10% FBS 的 MEM 培养基, 设置模型组和 GPs(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组, 每组设 6 个重复, MAPT 组则加入等量 PBS。培养 24 h 后移除培养基, 使用预冷 PBS 清洗后, 在冰上用细胞刮刀轻柔收集贴壁细胞, 每个样本收集 1×10^7 个细胞, 350 $\times g$ 离心 1 min 去除多余缓冲液, 加入 200 μL 预冷水和 800 μL 预冷的纯甲醇, 涡旋混匀, 冰浴中超声 20 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴中孵育 1 h。然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 $\times g$ 离心 20 min, 取其上清。

2.5.2 色谱条件 色谱柱采用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm), 进样量 4 μL , 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 体积流量 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 以流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱; 色谱梯度洗脱程序为: 0~2 min, 100% A; 2~6 min, 100%→52% A; 6~10 min, 52%→100% A; 10~12 min, 100% B; 12~12.1 min, 100%→0% B, 12.1~15 min, 100% A。

2.5.3 质谱条件 样品分别采用电喷雾电离(ESI)正离子和负离子模式进行质谱检测分析。采用 HESI 源进行离子化, 母离子扫描范围 m/z 75~1 050, 喷雾电压 3.8 kV; 氮气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱信息采集时间 15 min。

2.5.4 多元统计分析 采用 MSDIAL 软件对代谢

物离子峰进行提取,对正、负离子数据分别进行总峰面积归一化,整合正、负离子峰并应用Python软件进行模式识别,数据经Unit variance scaling(UV)预处理后,进行无监督的主成分分析(PCA),经7次循环交互验证,观察有无异常数据。然后进行有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)探究模型组和GPs组代谢轮廓的变化,并进行200次的置换检验,以 R^2 和 Q^2 的截距评判数据是否拟合,确定模型的可靠性。

2.5.5 差异代谢物分析 根据OPLS-DA模型得到的变量权重值(VIP)来衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力,挖掘具有生物学意义的差异代谢物。本实验以VIP>1为筛选标准,初步筛选出各组间的差异物。进一步采用单变量统计分析,验证代谢物是否具有显著性差异。选择同时具有多元统计分析VIP>1和单变量统计分析 $P<0.05$ 的代谢物。

2.5.6 代谢通路分析 依据代谢物的结构与功能,采用网络开源数据库HMDB对差异代谢物进行

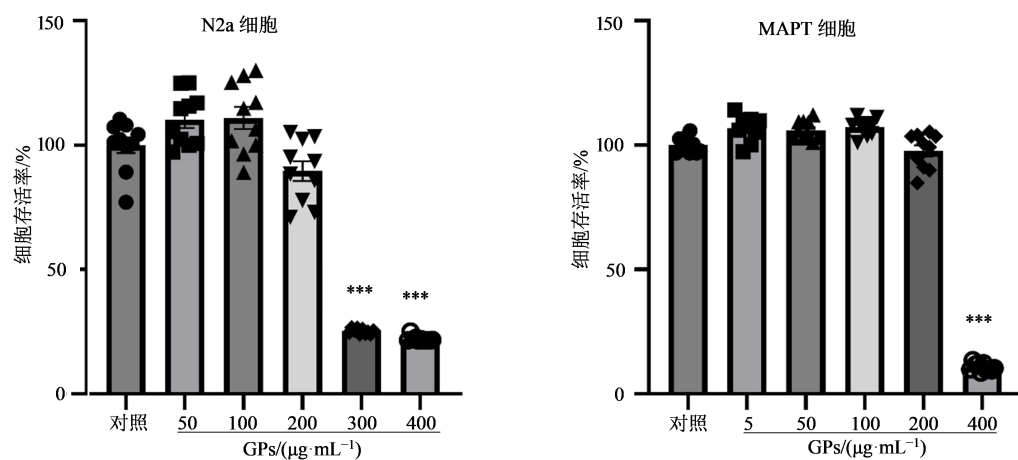
分类统计。通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析差异代谢产物和功能之间的关系,以 $P<0.05$ 为筛选条件进行代谢通路富集分析。

2.5.7 统计学分析 使用SPSS 25.0版本统计学软件对数据进行分析,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较使用单因素方差分析(ANOVA),两组间比较采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 GPs对N2a及MAPT细胞活力影响

采用CCK-8法测定不同浓度GPs对N2a及MAPT细胞活力的影响,以确定药物的安全剂量范围。图1实验结果表明,与对照组相比,50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs对N2a细胞活力无明显影响,300、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs可显著抑制N2a细胞活性($P<0.001$);5、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs对MAPT细胞活力无显著影响,随着剂量加大,400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs对细胞活力的抑制作用显著($P<0.001$)。



与对照组比较:*** $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group.

图1 GPs对N2a及MAPT细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 1 Effects of GPs on viability of N2a and MAPT cells ($\bar{x}\pm s, n=10$)

3.2 GPs对tau蛋白含量的影响

如图2所示,与对照组相比,MAPT细胞内tau蛋白含量显著增加($P<0.001$);与模型组比较,GPs(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)能够显著降低MAPT细胞内tau蛋白水平($P<0.05$)。

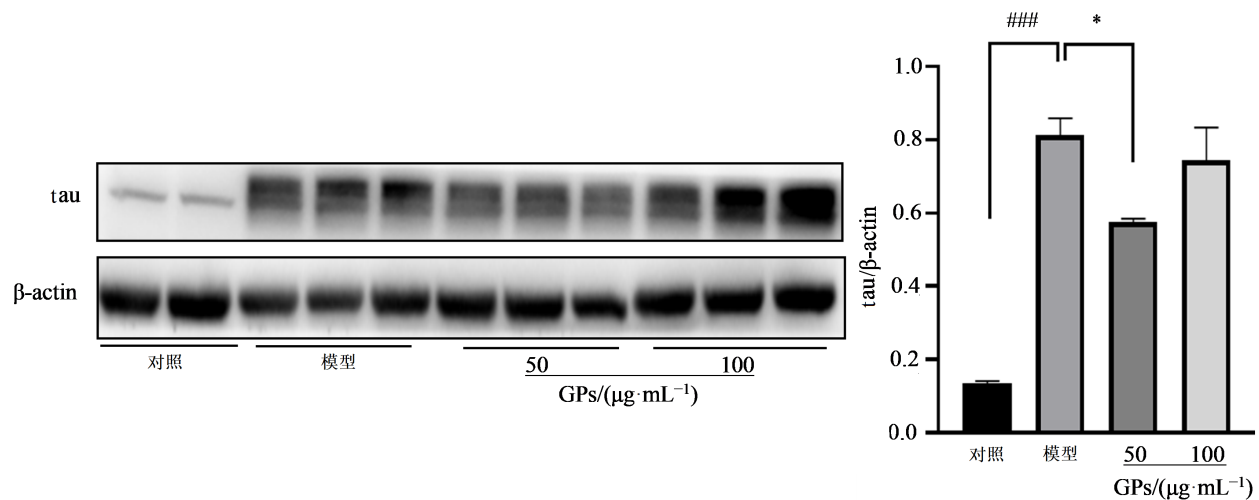
3.3 PCA和OPLS-DA评价各组样本代谢产物的差异性

基于超高效液相色谱-质谱联用技术的非靶向代谢组学检测GPs对MAPT细胞代谢的影响。如图

3所示,通过PCA发现2组代谢物分离较好,无离散点。该实验建立的OPLS-DA模型, Q^2 回归线截距小于0,表明模型稳定可靠,解释能力和预测能力较好,可用于进一步数据分析。OPLS-DA得分图结果显示模型组和GPs组代谢物分离良好,存在显著的差异代谢产物,表明给药后MAPT细胞内的代谢产物发生明显变化。

3.4 差异代谢产物表达分析

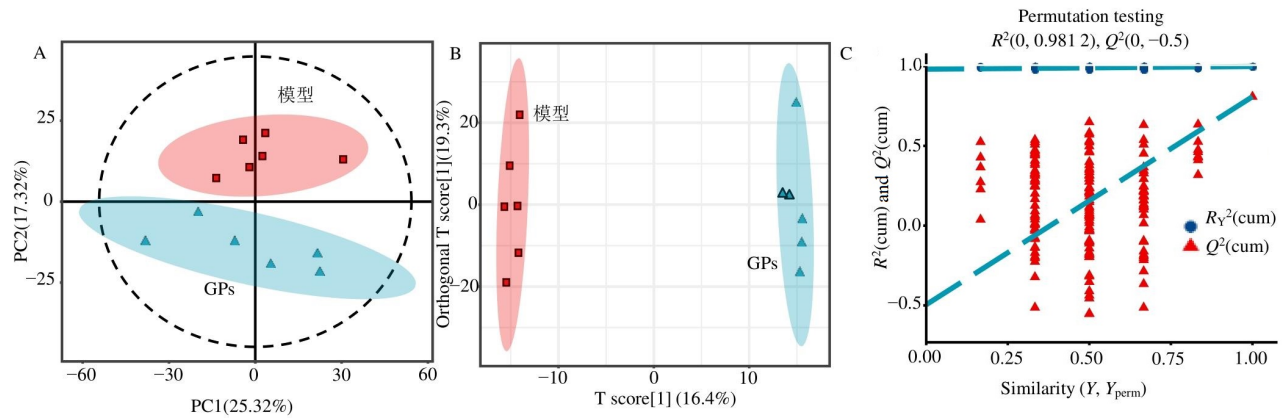
依据OPLS-DA模型,以VIP>1且 $P<0.05$ 为筛



与对照组比较:### $P<0.001$;与模型组比较: * $P<0.05$ 。
$P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ vs model group.

图2 GPs对MAPT细胞内tau蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of GPs on expression of tau protein in MAPT cells($\bar{x}\pm s, n=6$)



A-PCA散点图;B-OPLS-DA散点图;C-OPLS-DA置换检验图。

A-Scatter plot of PCA;B-scatter plot of OPLS-DA;C-permutation test of OPLS-DA.

图3 模型组与GPs组细胞样本的PCA

Fig. 3 PCA of cell samples from control group and GPs group

选标准,筛选出组间的差异代谢物。如图4所示, GPs组与模型组比较得到226个差异代谢产物,含量上调的代谢物为152个,下调的代谢物为74个。VIP排名前50的代谢产物主要为3-*O*-甲基化黄酮类化合物、脂肪酰基、6-氨基嘌呤、7-羟基香豆素 α, β

不饱和羧基化合物、氨基酸及其衍生物、芳香族苯胺类、苯甲酰胺类、生物素及其衍生物、红豆蔻内酯及其衍生物、环化合物及其衍生物、二萜类化合物、三萜糖苷、三萜类化合物等(表1)。

表1 VIP排名前50的代谢产物信息

Table 1 VIP top 50 metabolites information

Alignment ID	全称	t_R /min	m/z	$\lg_2FC$	VIP	归类	GPs vs 模型
POS9090	chretiolide	8.72	437.34	15.32	2.24	triterpenoids	↑ ***
POS8848	白桦脂醇	9.53	425.38	14.98	2.15	triterpenoids	↑ ***
POS6480	isoabienol	8.30	313.25	13.38	2.31	diterpenoids	↑ ***
POS9215	人参二醇	9.08	443.39	13.15	2.30	triterpenoids	↑ ***
POS9045	油酸	8.14	435.33	12.95	2.33	cycloartanols and derivatives	↑ ***

第 47 卷 第 5 期 2024 年 5 月		药物评价研究	Drug Evaluation Research	Vol. 47 No. 5 May 2024		· 1035 ·	
表 1 (续)							
Alignment ID	全称	t_R / min	m/z	lg_2FC	VIP	归类	GPs vs 模型
NEG12153	[1,6-dihydroxy-8-(hydroxymethyl)-4,12,12,15-tetramethyl-13-(2-methylpropanoyloxy)-5-oxo-14-tetracyclo[8.5.0.02,6.011,13]pentadeca-3,8-dienyl](<i>E</i>)-2-methylbut-2-enoate	8.82	515.27	12.49	2.25	tigliane and ingenane diterpenoids	↑ ***
POS10454	2a-acetoxy-3,22-stictandione	8.07	516.40	11.94	2.35	sesquiterpenoids	↑ ***
NEG16341	藤黄皂苷 C	8.91	957.51	11.64	2.10	triterpene glycosides	↑ ***
NEG16440	大豆皂苷 I	8.55	987.51	11.11	2.12	triterpene glycosides	↑ ***
POS9177	22-hydroxy-2-hopen-1-one	10.46	441.37	10.97	2.36	hopanoids	↑ ***
NEG16268	大蒜糠苷 A	8.13	933.47	10.57	2.22	steroidal saponins	↑ ***
NEG14137	2-hydroxy-2-[9-hydroxy-5a,5b,8,11a,13b-pentamethyl-8-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]-1,2,3,3a,4,5,6,7,7a,9,10,11,11b,12,13,13a-hexadecahydrocyclopenta[a]chrysen-3-yl]propanoic acid	9.41	651.41	10.43	2.21	triterpene glycosides	↑ ***
NEG16294	(3beta,5xi,9xi)-23-hydroxy-16-oxo-13,28-epoxyoleanan-3-yl beta- <i>D</i> -xylopyranosyl-(1->2)-beta- <i>D</i> -glucopyranosyl-(1->4)-alpha- <i>L</i> -arabinopyranoside	8.14	943.49	10.38	2.24	triterpenoids	↑ ***
POS14445	(3beta,5xi,9xi,18xi,22beta)-22,25-dihydroxyolean-12-en-3-yl 6-deoxy-alpha- <i>L</i> -mannopyranosyl-(1->2)-beta- <i>D</i> -xylopyranosyl-(1->2)-beta- <i>D</i> -glucopyranosiduronic acid	8.69	930.54	10.32	2.28	triterpene glycosides	↑ ***
NEG16384	柴胡皂苷 H	8.15	971.52	9.97	2.33	triterpene glycosides	↑ ***
NEG16239	皂莢苷 B	8.75	927.50	9.93	2.13	triterpenoids	↑ ***
POS14454	五加皂苷 H	8.69	935.50	9.91	2.34	triterpenoids	↑ ***
NEG14583	脱氧鸟苷酸	1.006	693.12	9.83	2.14	purine deoxyribonucleoside monophosphates	↑ ***
NEG13236	黄麻皂苷 A	7.60	579.28	9.71	2.34	cardenolides and derivatives	↑ ***
POS7352	百里香葡萄糖苷	9.13	351.13	9.64	2.29	terpene glycosides	↑ ***
POS9409	(<i>E</i> ,6 <i>S</i>)-7-hydroxy-2-methyl-6-[(10 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>S</i> ,17 <i>S</i>)-4,4,10,13,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,11,12,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]hept-2-enoic acid	8.14	453.34	9.49	2.37	triterpenoids	↑ ***
NEG4884	5,3'-二羟基黄酮	7.18	253.05	9.31	2.26	flavones	↑ ***
NEG5343	4'-羟基-3'-甲氧基黄酮	8.24	267.07	9.03	2.18	3'- <i>O</i> -methylated flavonoids	↑ ***
POS3126	2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇	8.71	191.18	8.52	2.24	alpha,beta-unsaturated carbonyl compounds	↑ ***

表1 (续)

Alignment ID	全称	t_R / min	m/z	$\lg_2FC$	VIP	归类	GPs vs 模型
POS3464	1-methyl-4-methylidene-7-(propan-2-yl)-1,2,3,3a,4,5,6,8a-octahydroazulen-1-ol	10.38	203.18	7.13	2.21	guaianes	↑ ***
POS9136	白桦醛	8.50	439.36	6.57	2.34	triterpenoids	↑ ***
POS8785	刺毛烯	9.63	423.36	6.31	2.33	triterpenoids	↑ ***
POS4859	阿利本多	5.87	252.12	5.87	2.41	hydroxybenzoic acid derivatives	↑ ***
NEG924	焦谷氨酸	1.96	128.03	5.81	2.35	amino acids and derivatives	↑ ***
POS10088	地衣黄素酸	5.15	492.14	2.71	2.24	amino acids and derivatives	↑ ***
POS10107	美洲槭皮酚B	5.15	493.15	2.63	2.20	phenylbenzo-1,4-dioxanes	↑ ***
NEG4579	生物素	5.91	243.08	2.59	2.22	biotin and derivatives	↑ ***
NEG3695	泛酸	5.15	218.10	2.18	2.22	amino acids and derivatives	↑ ***
NEG5842	红乳菇素	5.15	281.10	2.11	2.33	terpene lactones	↑ ***
POS4497	异丁香素	4.92	240.08	2.02	2.18	7-hydroxycoumarins	↑ ***
NEG7081	1-甲基腺苷	5.15	316.08	2.01	2.17	nucleosides	↑ ***
POS4007	福美胺	5.16	222.12	1.84	2.32	phenyl methylcarbamates	↑ *
NEG123	β -丙氨酸	5.15	88.04	1.73	2.14	amino acids and derivatives	↑
NEG7989	FT-磺酸	5.15	342.97	1.72	2.28	PFSA	↑ ***
NEG9034	全氟磺酸酯-H	5.15	380.94	1.69	2.34	PFSA	↑ ***
NEG5664	<i>N</i> -(3-甲氧基苯基)-9 <i>H</i> -嘌呤-6-胺	5.15	276.06	1.30	2.13	6-aminopurines	↑ ***
POS9298	2-hydroxycyclohexyl 2- <i>O</i> -[(2 <i>E</i>)-3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoyl]- β -D-glucopyranoside	8.32	447.16	1.28	2.29	hydroxycinnamic acid esters	↑ ***
NEG7125	methyl 2-[(4-chloro-3-nitrophenyl)carbonylamino]acetate	5.15	317.02	1.28	2.24	benzamides	↑ ***
POS6260	3-羟基辛酸肉碱	6.23	304.21	0.93	2.22	fatty acyls	↑ ***
POS10108	6-[2-hydroxy-3-methyl-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybutyl]-5,7-dimethoxychromen-2-one	7.52	493.17	0.77	2.27	fatty acyl glycosides	↑ ***
NEG7275	胞苷膜磷酸	1.01	322.04	-0.81	2.14	pyrimidine ribonucleoside monophosphates	↓ ***
NEG1738	3-羟甲基戊二酸	3.56	161.04	-0.83	2.22	fatty acyls	↓ ***
NEG10934	(3,5-dimethoxyphenyl)- <i>N</i> -{3-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]-5-methoxyphenyl}carboxamide	2.71	460.06	-1.00	2.41	aromatic anilides	↓ ***
POS6023	2-methylidene-4-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybutanoic acid	5.25	296.14	-1.00	2.15	saccharolipids	↓ ***
NEG9762	<i>N</i> -(4-bromophenyl)-2-[4-(<i>N</i> -methylcarbamoyl)-2-oxohydroquinolyl]acetamide	0.89	412.03	-1.57	2.27	quinoline carboxamides	↓ ***

↑ -上调; ↓ -下调; *** $P < 0.001$ 。↑ -up-regulation; ↓ -down-regulation; *** $P < 0.001$ 。

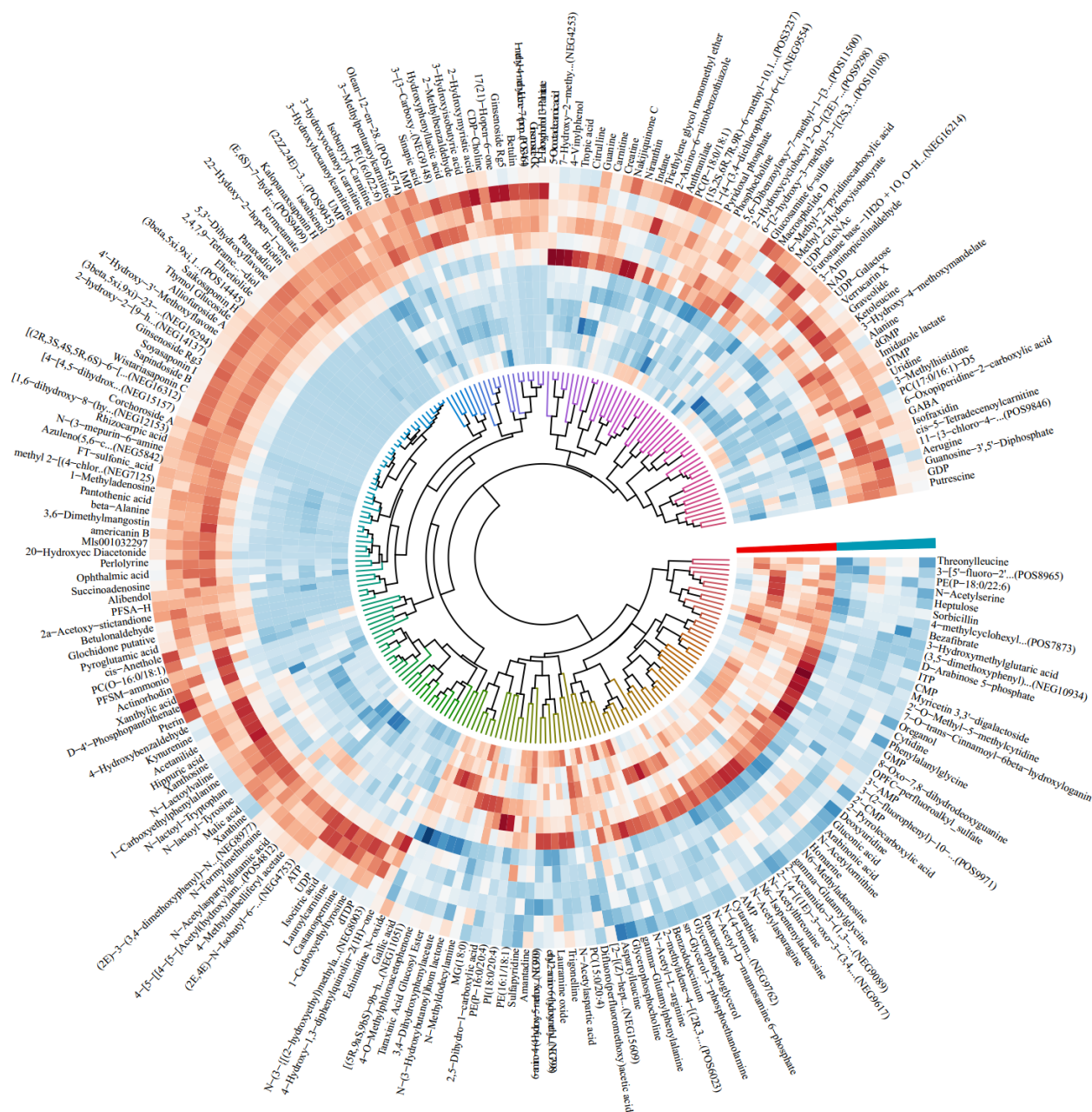


图4 差异代谢产物环状热图

Fig. 4 Circheatmap of differential metabolite analysis

3.5 差异代谢产物的功能分析

依据代谢物的结构与功能,对各组的差异代谢物进行分类统计(图5)。结果表明代谢产物主要为脂质和类脂分子(占比28.77%),有机酸及其衍生物(占比18.26%),核苷、核苷酸和类似物(占比12.79%)等。通过KEGG通路分析,差异代谢产物主要富集在嘌呤、嘧啶代谢,丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸合成,甘油磷脂代谢等。

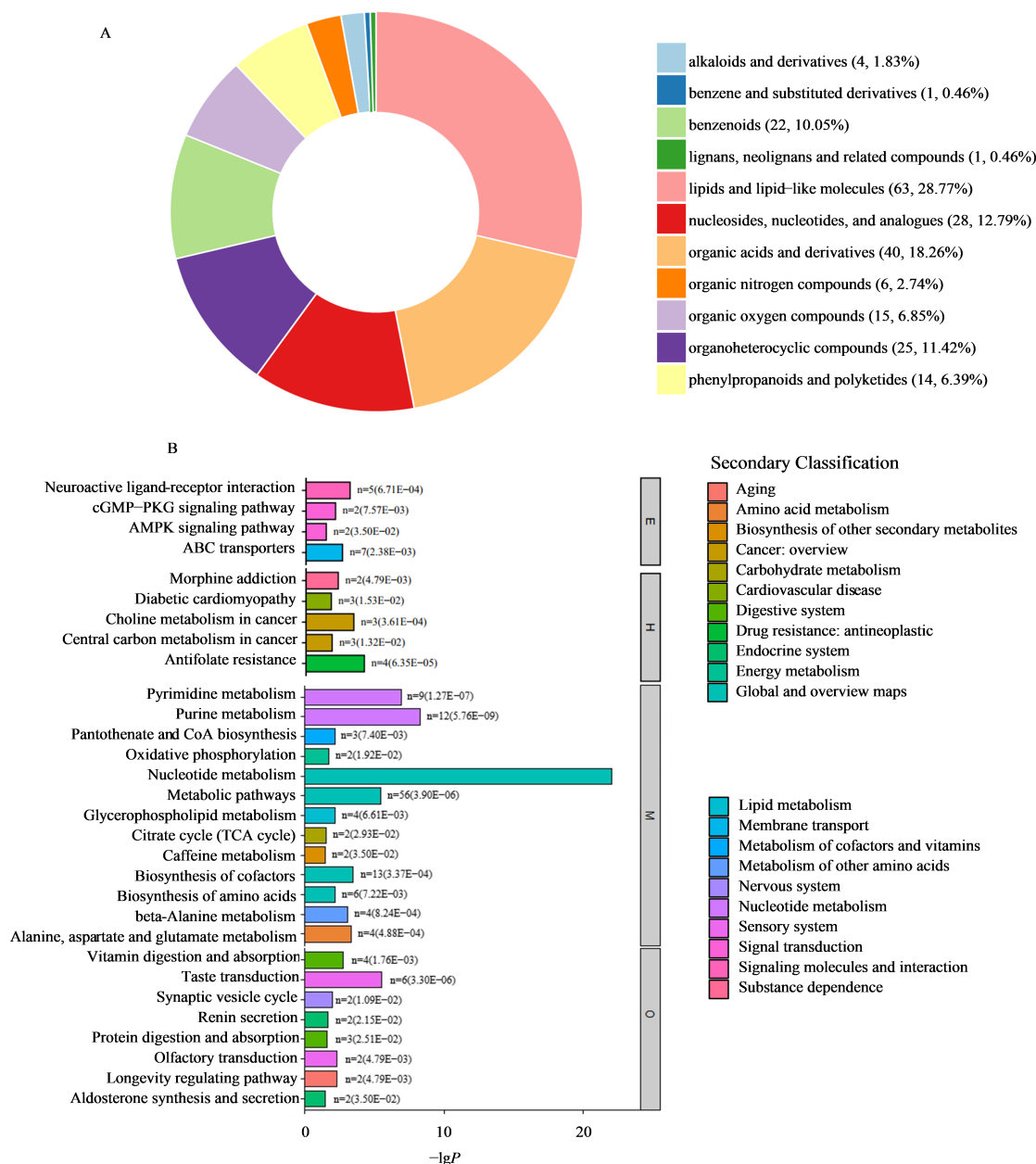
3.6 差异代谢物的含量变化

如图6所示,与模型组相比,GPs组代谢产物中脂质和类脂分子的变化占比较高,主要富集在甘油

磷脂代谢通路中。胞磷胆碱、甘油磷酸胆碱、甘油-3-磷酸乙醇胺、磷脂酰胆碱参与该信号通路。如图7所示,给药后胞磷胆碱和磷脂酰胆碱含量显著增加($P < 0.001$),甘油磷酸胆碱及甘油-3-磷酸乙醇胺含量显著降低($P < 0.001$)。

4 讨论

目前认为干预tau蛋白是治疗AD重要的手段之一^[20]。具有认知功能损伤或AD的患者和正常人群相比,其脑内的代谢产物会发生异常改变^[21]。Tau蛋白的异常改变能够引起代谢紊乱,加重认知功能损伤的程度。开发可同时调节tau蛋白及代谢



A-差异代谢物分类环图; B-KEGG通路富集条形图。

A-Circle diagram of classification; B-enriched bar graph for KEGG pathway.

图5 模型组与GPs组差异代谢产物功能分析

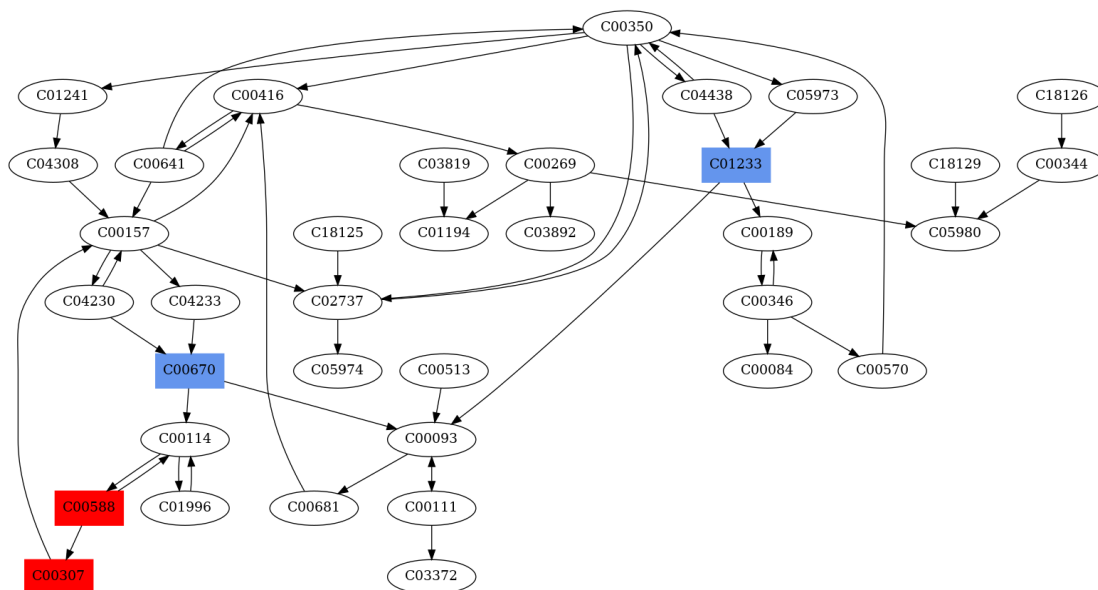
Fig. 5 Functional analysis of different metabolites between model group and GPs group

通路的多靶点药物成为抗AD的重点研究方向。

以往研究发现 $25 \sim 150 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 可阻断晚期糖基化终末产物 (AGEs) 诱导下人肾小球系膜细胞 (HMCs) 中晚期糖基化终末产物受体介导的氧化应激信号通路^[22]。在 $10 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量范围内, GPs 抑制脂多糖 (LPS) 诱导的人脐静脉内皮细胞内炎症因子水平, 并具有剂量-效应关系^[23]。 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 能够减少泡沫巨噬细胞内胆固醇的含量^[24]。本研究细胞活力检测结果表明 GPs 在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

剂量范围内对 N2a 及 MAPT 细胞均无明显损伤。结合药效及安全实验数据, 选择 50 、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 进行实验。研究发现 GPs $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量可明显减少 MAPT 过表达的细胞模型中 tau 蛋白的异常过表达, 但是 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ GPs 对 tau 蛋白的过表达无明显影响。

代谢组学结果表明, 给予 GPs 干预 tau 蛋白过表达模型后, 丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等氨基酸合成发生明显改变。Roberto 等^[25]的研究发现氨基酸代



C01233: 甘油-3-磷乙醇胺; C00670: 甘油磷酸胆碱; C00588: 磷脂酰胆碱; C00307: 胞磷胆碱; 红色-与模型组相比含量升高; 蓝色-与模型组相比含量降低。

C01233: sn-glycerol-3-phosphoethanolamine; C00670: glycerophosphocholine; C00588: phosphocholine; C00307: CDP-Choline; Red box-an increase in abundance compared to model group; blue box-a decrease in abundance compared to model group.

图6 甘油磷脂代谢通路(KEGG信号通路ID为rn00564)

Fig. 6 Glycerolphospholipid metabolic pathway (ID of KEGG signaling pathway is rn00564)

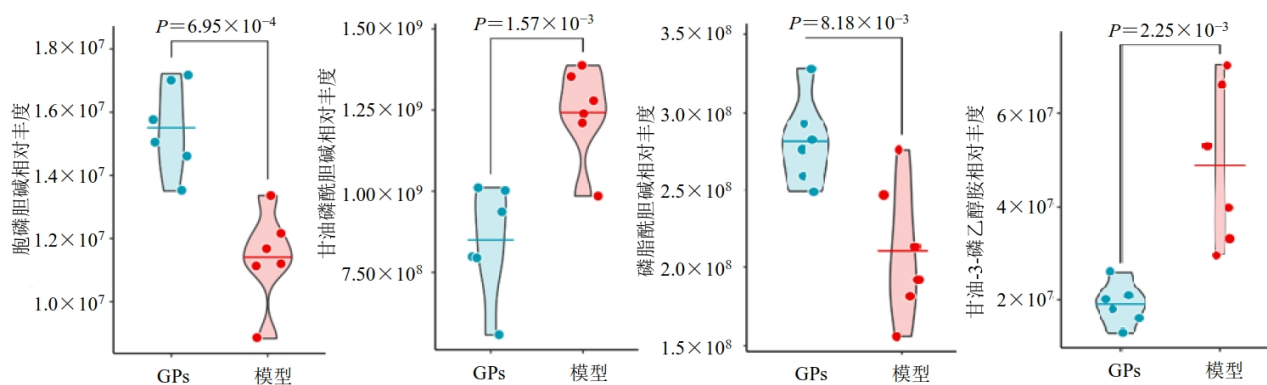


图7 模型组与GPs干预组中甘油磷脂代谢通路中差异代谢产物的表达

Fig. 7 Expression of differential metabolites in glycerophospholipid metabolic pathways

代谢变化可能对突触的可塑性和活性产生负面影响,补充特定的氨基酸可改善脑内代谢平衡并缓解神经退行性病变。脂质在许多生物过程中发挥着至关重要的作用,在大脑中尤其重要,大脑富含脂质,至少占大脑干重的50%,仅次于脂肪组织。研究发现脂质异常代谢是AD的早期事件^[26],本研究中代谢组学数据提示GPs干预后的MAPT细胞内主要的代谢产物富集在脂质,表明GPs可能通过调控脂代谢保护神经。进一步分析结果显示GPs主要作用于甘油磷脂代谢,涉及胞磷脂胆碱、甘油磷酸胆碱、甘油-3-磷酸乙醇胺、磷脂酰胆碱含量变化。

胞胆碱是胞磷-胆碱(CDP-choline)的总称,是

存在于所有活细胞中的天然代谢物。胞胆碱在体内可分解为胞苷和胆碱,其中胆碱是乙酰胆碱和磷脂的前体,是一种神经递质,对学习和记忆至关重要。胞苷在人体内很容易转化为尿苷,尿苷对突触功能有积极作用,支持突触膜的形成。胆碱缺乏与记忆功能障碍有关。磁共振波谱研究表明,摄取胞胆碱可以改善老年人大脑对胆碱的吸收,这表明它有助于逆转早期与年龄相关的认知变化^[27]。在认知正常的中老年人的随机、安慰剂对照试验中,发现胞胆碱对记忆疗效有积极作用^[28]。GPs可能通过增加内源性胞磷胆碱,进而转化为乙酰胆碱和尿苷,从而促进突触膜形成及神经递质信号传递过程,改善认知功能。

Tg2576转基因小鼠血清中胆碱和磷脂酰胆碱的含量与AD发生的严重程度呈负相关^[29]。磷脂酰胆碱是膜和脂蛋白上的主要脂质成分,是胆碱、肌醇、磷脂以及必需脂肪酸的主要来源,促进海马中突触素的合成,介导神经递质信息传导,增强记忆功能。磷脂酰胆碱明显改善拟AD小鼠记忆获得障碍、记忆巩固障碍、记忆再现障碍,具有增强记忆效能的作用^[30]。磷脂酰胆碱还能够直接穿过血脑屏障参与乙酰胆碱的合成参与记忆重塑^[31]。因此GPs增加磷脂酰胆碱一方面可以为乙酰胆碱的形成提供前体成分胆碱,也能够为突触信号传递提供突触素,增强记忆功能。

甘油磷脂酰胆碱或甘油-3-磷乙醇胺是甘油磷脂分子经过磷脂酶A2(PLA2)水解后的产物。在AD、血管性痴呆等疾病中均能发现PLA2的表达量明显增加,且其水平与认知功能评分呈负相关^[32-33]。在本实验中,GPs处理后的细胞内甘油磷脂酰胆碱及甘油-3-磷乙醇胺的含量减少,间接反应PLA2的水解活性降低。提示GPs可能通过干预PLA2活性或相关通路减少细胞损伤,此方面作用有待进一步挖掘。

GPs可抑制tau蛋白的异常过表达,并且可以改善细胞甘油磷脂代谢相关通路,从而保护神经细胞。该研究明确了GPs对AD影响的潜在作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Monteiro A R, Barbosa D J, Remião F, et al. Alzheimer's disease: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and disease-modifying drugs [J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 211: 115522.
- [2] Jia J P, Wei C B, Chen S Q, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491.
- [3] Peng Y S, Tang C W, Peng Y Y, et al. Comparative functional genomic analysis of Alzheimer's affected and naturally aging brains [J]. *Peer J*, 2020, 8: e8682.
- [4] 李雅萍, 李霞. 代谢综合征与阿尔茨海默病的相关性及机制研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2024, 27(3): 268-272.
Li Y P, Li X. Research progress of correlation and underlying mechanisms between metabolic syndrome and Alzheimer's disease [J]. *Chin Gen Pract*, 2024, 27(3): 268-272.
- [5] Horgusluoglu E, Neff R, Song W M, et al. Integrative metabolomics-genomics approach reveals key metabolic pathways and regulators of Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(6): 1260-1278.
- [6] Mill J, Li L J. Recent advances in understanding of Alzheimer's disease progression through mass spectrometry-based metabolomics [J]. *Phenomics*, 2022, 2 (1): 1-17.
- [7] Liu Y, Du T, Zhang W L, et al. Modified Huang-Lian-Jie-du Decoction ameliorates $\alpha\beta$ synaptotoxicity in a murine model of Alzheimer's disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8340192.
- [8] Zhang Y Z, Liu Z, Ji B, et al. Metabolite profile of Alzheimer's disease in the frontal cortex as analyzed by HRMAS ¹H NMR [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 10: 424.
- [9] Nasab A S, Noorani F, Paeizi Z, et al. A comprehensive investigation of the potential role of lipoproteins and metabolite profile as biomarkers of Alzheimer's disease compared to the known CSF biomarkers [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2023, 2023: 3540020.
- [10] 谢芳, 谢宁. 中医药治疗老年痴呆的临床研究进展 [J]. *辽宁中医杂志*, 2020, 47(6): 203-206.
Xie F, Xie N. Clinical research progress on traditional Chinese medicine treatment senile dementia [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2020, 47(6): 203-206.
- [11] 刘慧, 邢韶芳, 崔伟业, 等. 绞股蓝中新达玛烷型皂苷成分及其神经保护作用 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(2): 380-387.
Liu H, Xing S F, Cui W Y, et al. A novel dammarane-type saponin from *Gynostemma pentaphyllum* and its neuroprotective effect [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(2): 380-387.
- [12] 张荣浩, 陆丹, 马世蓉. 基于网络药理学探讨传统中药绞股蓝的抗衰老作用 [J]. *生物化工*, 2023, 9(1): 96-99.
Zhang R H, Lu D, Ma S R. Exploring the anti-aging effect of traditional Chinese medicine *Gynostemma pentaphyllum* based on network pharmacology [J]. *Biol Chem Eng*, 2023, 9(1): 96-99.
- [13] 张若青, 张继洪, 张国伟. 绞股蓝总苷的药理作用及其临床应用进展 [J]. *临床合理用药杂志*, 2015, 8(11): 174-176.
Zhang R Q, Zhang J H, Zhang G W. Pharmacological action and clinical application progress of *Gynostemma pentaphyllum* total glycosides [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*, 2015, 8(11): 174-176.
- [14] 曾迪, 周昌园, 龙健, 等. 基于脂质组学的绞股蓝总苷调血脂作用研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(4): 1149-1156.
Zeng D, Zhou C Y, Long J, et al. Effect of gypenosides on regulating blood lipid based on lipidomics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(4): 1149-1156.
- [15] Gao M, Heng X, Jin J, et al. Gypenoside XLIX ameliorate high-fat diet-induced atherosclerosis via regulating intestinal microbiota, alleviating inflammatory response and restraining oxidative stress in ApoE^{-/-} mice [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 15(9): 1056.
- [16] 姚柏春, 敖云, 张戈, 等. 绞股蓝皂甙对痴呆小鼠学习记

- 忆能力影响及机制[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(12): 1708-1711.
- Yao B C, Ao Y, Zhang G, et al. Effect and mechanism of *Gynostemma pentaphyllum* Makino on learning and memory ability in dementia mice [J]. Chin J Public Health, 2017, 33(12): 1708-1711.
- [17] 刘梅讯, 孙天敏. 绞股蓝皂苷对痴呆小鼠认知能力的作用及其机制[J]. 中国医药导报, 2017, 14(13): 17-20.
- Liu M X, Sun T M. Function and its mechanism of gypenoside on improving cognitive competence of dementia mice [J]. China Med Her, 2017, 14(13): 17-20.
- [18] Yang C C, Zheng C C, Luo Y, Guo K W, Gao D, Zhang L, Li L, Zhang L. Cornel iridoid glycoside and its effective component regulate ATPase Vps4A/JNK to alleviate autophagy deficit with autophagosome accumulation[J]. Am J Chinese Med, 2022, 50(6): 1599-1615.
- [19] Batra R, Krumsiek J, Wang X, et al. Comparative brain metabolomics reveals shared and distinct metabolic alterations in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy [J]. medRxiv, 2023, doi: 10.1101/2023.07.25.23293055.
- [20] Singh H, Das A, Khan M M, et al. New insights into the therapeutic approaches for the treatment of tauopathies [J]. Neural Regen Res, 2024, 19(5): 1020-1026.
- [21] Conde R, Oliveira N, Morais E, et al. NMR analysis seeking for cognitive decline and dementia metabolic markers in plasma from aged individuals [J]. J Pharm Biomed Anal, 2024, 238: 115815.
- [22] 王艳, 唐灵, 周康, 等. 绞股蓝皂苷对晚期糖基化终末产物诱导人肾小球系膜细胞晚期糖基化终末产物受体表达及氧化应激水平的影响[J]. 中草药, 2015, 46(20): 3060-3064.
- Wang Y, Tang L, Zhou K, et al. Effect of gypenosides on RAGE expression and oxidative stress in human mesangial cells induced by AGEs [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(20): 3060-3064.
- [23] 吴迪, 焦雪, 袁泽利, 等. 绞股蓝总皂苷抑制脂多糖诱导的血管内皮损伤[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(3): 323-328.
- Wu D, Jiao X, Yuan Z L, et al. Gypenosides attenuated LPS-induced endothelial cell inflammatory injury [J]. Chin J N Drugs, 2020, 29(3): 323-328.
- [24] 寿迪飞, 卢德赵, 王萍儿, 等. 绞股蓝总皂苷调节 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇平衡的作用机制[J]. 浙江中医药大学学报, 2011, 35(2): 297-300.
- Shou D F, Lu D Z, Wang P E, et al. The mechanism of gypenosides regulate cholesterol homeostasis in foam cells [J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2011, 35(2): 297-300.
- [25] Aquilani R, Cotta Ramusino M, Maestri R, et al. Several dementia subtypes and mild cognitive impairment share brain reduction of neurotransmitter precursor amino acids, impaired energy metabolism, and lipid hyperoxidation [J]. Front Aging Neurosci, 2023, 15: 1237469.
- [26] Fonteh A N, Chiang A J, Arakaki X, et al. Accumulation of cerebrospinal fluid glycerophospholipids and sphingolipids in cognitively healthy participants with Alzheimer's biomarkers precedes lipolysis in the dementia stage [J]. Front Neurosci, 2020, 14: 611393.
- [27] Świątkiewicz M, Grieb P. Citicoline for supporting memory in aging humans [J]. Aging Dis, 2023, 14(4): 1184-1195.
- [28] Amenta F, Tayebati S K. Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(5): 488-498.
- [29] 黎冰林, 卢鑫, 李江超, 等. 阿尔茨海默病转基因模型 Tg2576 小鼠血清的代谢组学研究[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(2): 218-224.
- Li B L, Lu X, Li J C, et al. Serum metabolic changes in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2017, 25(2): 218-224.
- [30] 罗建, 王晔, 程薇波. 磷脂酰胆碱对小鼠记忆障碍模型的影响[J]. 现代预防医学, 2011, 38(3): 446-448.
- Luo J, Wang Y, Cheng W B. Effect of phosphatidyl choline (pc) on mice model of dysmnnesia [J]. Mod Prev Med, 2011, 38(3): 446-448.
- [31] 张文平, 苏林梁, 仇玉兰, 等. 乙酰胆碱对大鼠海马学习和空间记忆的影响[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(11): 961-964.
- Zhang W P, Su L L, Qiu Y L, et al. Acetylcholine regulates the ability of learning and spatial memory in rats [J]. J Shanxi Med Univ, 2008, 39(11): 961-964.
- [32] Alekseeva A S, Boldyrev I A. Alternative targets for sPLA2 activity: Role of membrane-enzyme interactions [J]. Membranes, 2023, 13(7): 618.
- [33] 贾东佩, 朱风俊, 任应国. 脂蛋白相关磷酸酶 A2 和炎性蛋白在诊断脑梗死后血管性痴呆及判断预后中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(1): 55-58, 73.
- Jia D P, Zhu F J, Ren Y G. Application of lipoprotein-associated phosphatase A2 and inflammatory proteins in diagnosing vascular dementia and predicting prognosis after cerebral infarction [J]. J Mol Diagn Ther, 2020, 12(1): 55-58, 73.