

基于肝脏代谢组学研究龟龄集对轻度认知功能障碍大鼠肝保护作用

陈 乐¹, 倪玲凡¹, 史静超^{1,2*}, 秦雪梅^{2,3*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

2. 山西中医药大学太行本草研究院, 山西 晋中 030619

3. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 明确龟龄集对轻度认知功能障碍大鼠肝保护作用, 并基于代谢组学技术揭示其潜在机制。 **方法** 60 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和龟龄集高、低剂量 (150、75 mg/kg) 组、银杏叶片 (7.2 mg/kg) 组及多奈哌齐 (0.625 mg/kg) 组。采用 D-半乳糖合并半高脂饲料复制轻度认知功能障碍大鼠模型, 检测各组大鼠肝脏指数、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 水平, 苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察肝组织病理变化; 基于代谢组学筛选差异代谢物并进行代谢通路分析。 **结果** 与对照组比较, 模型组大鼠肝脏出现病理损伤, 并伴有肝脏指数下降、肝功指标 ALT 和 AST 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), ALP 显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 龟龄集高剂量组和银杏叶片组大鼠 AST、ALT 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 龟龄集低剂量组 ALT 显著降低 ($P < 0.01$), 多奈哌齐则对 3 项肝功指标均无显著调节作用。肝脏代谢组学发现 23 个差异代谢物, 龟龄集可显著回调所有差异代谢物, 主要涉及的代谢通路包括嘌呤代谢, D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢, 精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成。 **结论** 龟龄集对轻度认知功能障碍大鼠肝脏有显著保护作用, 且效果优于银杏叶片与多奈哌齐, 其机制与调节氨基酸代谢和脂代谢密切相关。

关键词: 龟龄集; 衰老; 轻度认知功能障碍; 肝保护作用; 肝脏代谢组学; 氨基酸代谢; 脂代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)06-1999-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.013

Mechanism of liver protective effects of Guilingji on mild cognitive impairment rats based on liver metabolomics

CHEN Le¹, NI Lingfan¹, SHI Jingchao^{1,2}, QIN Xuemei^{2,3}

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

2. Taihang Herbal Research Institute, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

3. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To clarify the protective effect of Guilingji on the liver of mild cognitive impairment (MCI) rats, and reveal its potential mechanism based on metabolomics technology. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into control group, model group, Guilingji high-dose group (150 mg/kg), Guilingji low-dose group (75 mg/kg), Ginkgo leaf tablets group (7.2 mg/kg) and donepezil group (0.625 mg/kg). The MCI rats was established by D-galactose combined with semi-high fat diet. Liver index, the level of glutamic-pyruvic transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were detected in each group, and hematoxylin eosin staining (HE) were used to observe the pathological changes of liver tissue. Based on metabolomics, differential metabolites were screened and metabolic pathways were analyzed. **Results** Compared with the rats in the control group, the rats in the model group had pathological liver injury, accompanied by a significant decrease in liver index, and the level of liver function indicators including ALT and AST were increased significantly ($P < 0.05$, 0.01), the level of ALP was decreased significantly

收稿日期: 2024-10-30

基金项目: 山西省科技厅基础研究计划面上项目 (202303021211175); 山西中医药大学博士科研启动基金项目 (2023BK39); 山西省研究生实践创新项目 (2023SJ269); 山西中医药大学科技创新团队 (2022TD2007); 中药生命组学与创新药物研发研究室 (zyyjs2024019)

作者简介: 陈 乐, 硕士研究生, 研究方向为中药质量标准。E-mail: chenle@stu.sxtcm.edu.cn

***通信作者:** 史静超, 副教授, 硕士生导师, 从事中药物质基础及药理机制研究。E-mail: shijingchao@sxtcm.edu.cn

秦雪梅, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制及中医药代谢组学研究。E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

($P < 0.05$); Compared with the model group, the high-dose Guilingji group and the Ginkgo leaf tablets group showed significant reductions in AST and ALT levels in rats ($P < 0.05, 0.01$), and the low-dose Guilingji group exhibited a significant decrease in ALT levels ($P < 0.01$), donepezil had no significant effect on the liver function indexes. The liver metabolomics identified 23 differential metabolites, all of which could be significantly reversed by Guilingji. The main metabolic pathways included purine metabolism, D-glutamine and D-glutamate metabolism, arginine biosynthesis, alanine, aspartate and glutamate metabolism, phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis. **Conclusion** Guilingji has a significant protective effect on the liver of MCI rats, and the effect is better than that of Ginkgo leaf tablets and donepezil. The mechanism is closely related to the regulation of amino acid metabolism and lipid metabolism.

Key words: Guilingji; aging; mild cognitive impairment; liver protection effect; liver metabolomics; amino acid metabolism; lipid metabolism

我国已进入人口中度老龄化阶段并呈现一种持续加深态势。目前,我国因老龄化造成的失能及半失能的老年人近 4 000 万,完全失能老年人达 1 200 万^[1]。此外,伴随着年龄的增加,记忆力从 50 岁开始呈下降趋势,70 岁以后显著减退。60 岁以上老人认知功能障碍的发病率达 56%~76%,80~89 岁老人发病率可达 86%^[2]。由此可见,认知功能障碍是衰老过程中不可避免的病症,同时也是很多疾病的伴发症,如糖尿病、帕金森氏病、中风等,严重影响患者的生活质量。而轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment, MCI)作为痴呆和正常之间的一种过渡状态,是痴呆发生的早期阶段,而痴呆不可逆转、尚无特效药物,在早期有效的介入治疗,将痴呆的发生、发展遏制在初期阶段、延缓痴呆发生的进程意义重大。

中医认为肝是人体衰老的启动因子,《灵枢·天年》曰:“五十岁,肝气始衰,肝叶始薄,胆汁始灭减,目始不明,六十岁,心气始衰……”,表明人体衰老以肝为先导^[3]。而肝与 MCI 亦有密切关联,中医从“肝”论治轻度认知功能障碍的理论认为肝藏血调节血量,肝肾同源,精血互化,肝藏之血不足必导致肾精不足,而肾又与脑通过督脉相联,肾精不足日久可致髓海不足而致 MCI 发生^[4-5]。肝主疏泄调畅一身之气机,肝气条达,五脏之气血才可至脑窍而防止脑营养缺失^[6]。中医中的“肝”虽不等同于解剖学的“肝脏”,但二者亦有相同之处。随着现代医学对中医藏象学说认识的进步,发现“肝藏血”意为肝具有储存血液,调节血量的功能,包含了肝脏作为身体储存血液最多器官的功能。《素问·六节藏象论》曰:“肝者……以生血气”,认为肝促进气血化生,这与肝脏内合成血浆凝血和溶血因子的功能相契合。“肝主疏泄”意为肝具有调节气血津液的输布和促进脾胃的运化等的功能,

这与现代医学中肝脏是机体能量代谢中枢,具有将物质转换为能量并供给人体利用的功能亦有部分相同^[7]。因此,从肝论治 MCI 的研究可从肝脏入手。已有临床研究也证实了肝脏和认知疾病的具有密切关系,一项前瞻性队列研究发现肝功标志物与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)密切相关,AD 患者丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)水平显著降低,且与认知功能呈显著正相关关系,提示肝酶的改变在认知功能障碍的发病机制中发挥重要作用^[8-9]。中医药从肝论治认知功能障碍也取得了很好的效果,如柴胡疏肝汤可调节癫痫合并认知障碍大鼠神经元突触传递和突触可塑性,促进神经元损伤后的再生,恢复受损的认知功能,并能改善记忆^[10]。解毒通络调肝方可通过调控海马组织脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、葡萄糖转运蛋白 4(recombinant glucose transporter 4, GLUT4)蛋白表达,影响磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)信号通路提高 2 型糖尿病认知障碍大鼠的认知能力^[11]。再用柔肝调神针刺法可通过影响脑卒中后认知障碍患者突触相关微核糖核酸的表达水平改善认知功能^[12]。肝脏与认知功能障碍的病理机制存在联系,而肝和脑之间亦存在沟通途径。

龟龄集是我国传统中药名方,《中国药典》2020 年版记载其具有强身补脑、固肾补气、增进食欲之功效,可用于治疗肾亏阳弱、记忆减退、夜梦精溢、腰酸腿软、气虚咳嗽、五更溏泻、食欲不振之症^[13]。现代临床和药理研究也证实了龟

龄集在改善认知和记忆功能方面效果显著,如龟龄集可以降低轻中度 AD 患者的老年痴呆量表-认知评分 (AD assessment scale-cognitive score, ADAS-cog) 和中医证候积分,增加简易智力状态检查量表 (mini-mental state examination, MMSE) 评分^[14],并能改善血管型 MCI 患者的认知功能和中医证候,调节胆碱能系统、炎症反应和细胞因子水平^[15],还能改善轻-中度老年认知障碍患者的肾虚髓减证^[16]。药理研究发现,龟龄集可通过保护海马组织,调节皮质酮和睾酮水平改善 AD 大鼠认知功能障碍^[17],并能通过增加海马 CA1 区神经元数量,调节 BDNF/酪氨酸激酶受体 B (tropomyosin receptor kinase B, TrkB) 信号通路,促进突触、髓鞘相关蛋白表达改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力^[18]。本课题组前期基于多种衰老动物模型发现龟龄集可通过调节氧化应激、胆碱能和性激素水平,调节多条代谢通路改善衰老性记忆障碍^[19-20],并基于 *D*-半乳糖 (*D*-galactose, *D*-gal) 合并半高脂饲料复制了衰老型 MCI 大鼠模型,明确了龟龄集改善轻度认知功能障碍的药效作用和潜在的机制^[21-22]。基于肝脏与大脑认知的密切关系,龟龄集作为传统中药大复方,具有多成分、多靶点的特点,在改善轻度认知功能障碍的同时是否对 MCI 大鼠的肝脏发挥了保护作用尚未知。据此,本研究通过检测肝功能、肝组织病理,并结合肝脏代谢组学探讨龟龄集肝保护作用及其机制,根据课题组前期发现的龟龄集可通过调节氧化应激、炎症反应、胆碱能、细胞凋亡和神经营养,并改善肾功、调节肾脏代谢通路紊乱改善 MCI 大鼠认知功能^[21-22],进一步综合分析龟龄集靶向“肝-肾-脑轴”治疗轻度认知功能障碍的潜在作用。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体质量为 (180±20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK (京) 2019-0006。大鼠饲养于温度 (24±1) °C、湿度 (50±5) %、12 h 明暗交替的环境,自由进食饮水,适应性饲养 7 d 后开始实验。本研究动物实验经山西大学伦理委员会批准 (批准号 2020DW121)。

1.2 药品与试剂

龟龄集 (国药准字 Z14020687, 批号

103171021) 购自山西广誉远国药有限公司;盐酸多奈哌齐片 (安理申, 国药准字 H20050978, 批号 1705045) 购自卫材 (中国) 药业有限公司;银杏叶片 (国药准字 Z20044573, 批号 10010321) 购自扬子江药业有限公司;羧甲基纤维素钠 (批号 H10950294) 购自天津市凯通化学试剂有限公司;*D*-gal (批号 102030630, 质量分数≥98%) 购自美国 Sigma 公司;AST、ALT、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) ELISA 试剂盒 (批号分别为 AD190524、AD190218、AD190516) 购自北京安迪华泰科技有限公司。

1.3 仪器

Ulti Mate 3000 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 超高效液相色谱-串联质谱联用仪、Xcalibur 工作站 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);色谱柱 ACQUITYUPLC HSST3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司);TG16KR 型高速冷冻离心机 (上海继谱电子科技有限公司);Nexera LC-40 型超高效液相系统 (日本岛津公司);XH-B 型旋涡混匀仪 (上海秉越电子仪器有限公司);Bionoon-48 型高通量组织研磨仪 (上海般诺生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将 60 只大鼠随机分为对照组、模型组和龟龄集高、低剂量 (150、75 mg/kg) 组、银杏叶片 (以总黄酮苷计 7.2 mg/kg) 组、多奈哌齐 (0.625 mg/kg) 组。除对照组外其余各组每天颈背部 sc *D*-gal (50 mg/kg), 并给予半高脂饲料, 对照组 sc 等量生理盐水, 并给予基础饲料, 连续 8 周。从第 5 周开始各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积羧甲基纤维素钠, 1 次/d, 至第 8 周末。

2.2 样本的收集和制备

末次给药后, 禁食不禁水 12 h, 以 10% 水合氯醛 ip 麻醉 (5 mL/kg) 后, 腹主动脉取血, 静置 30 min 后, 3 500 r/min 离心 20 min, 取上清。剖取肝脏组织左叶以 4% 多聚甲醛固定。取肝脏组织中叶置液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱, 备用。

将收集的肝脏组织样本在 4 °C 下解冻, 取 80 mg 肝组织样本在预冷至 0 °C 的甲醇-水 (1:1) 溶液 300 μL 匀浆 1 min, 之后涡旋 2 min, 于 4 °C、15 000 r/min 离心 15 min, 取上清转移至 1.5 mL EP

管,置冷冻离心干燥机中浓缩至干,残渣以 300 μ L 甲醇-水(4:1)溶液复溶,涡旋 5 min,于 4 $^{\circ}$ C、15 000 r/min 离心 15 min,取上清待测。

2.3 检测指标

2.3.1 生化指标检测 按照试剂盒说明书测定各组大鼠血清肝功指标 ALT、AST 和 ALP。

2.3.2 肝脏指数测定 肝脏组织以冷生理盐水漂洗后,吸干水分,称定,计算肝脏指数。

肝脏指数=肝脏质量/体质量

2.3.3 肝脏组织病理学观察 经 4%多聚甲醛固定的大鼠肝脏左叶,乙醇脱水后石蜡包埋,切片,用 HE 染色,于显微镜下观察。

2.4 肝脏代谢组学分析

2.4.1 色谱条件 流动相为 0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B);采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m);流动相梯度为 0~2.5 min, 5% B; 2.5~4.5 min, 5%~45% B; 4.5~12.0 min, 45%~75% B; 12.0~17.5 min, 75%~95% B; 17.5~20.0 min, 95% B; 20.0~21.5 min, 95%~5% B; 21.5~25.0 min, 5% B。体积流量为 0.3 mL/min,进样体积为 5 μ L,柱温为 40 $^{\circ}$ C。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),采用 Full Scan/dd-MS₂ 模式,离子喷雾电压正离子为 3 500 V、负离子为 2 500 V,辅助气和鞘气均为高纯氮气,毛细管温度 320 $^{\circ}$ C,加热器温度 300 $^{\circ}$ C,一级质荷比检测范围为 m/z 100~1 500,去簇电压 70 V,入口电压 10 V,去溶剂温度 350 $^{\circ}$ C。

2.4.3 数据处理 将原始数据导入 Compound Discoverer 3.0 软件,获得相应的峰面积数据。通过 SPSS 软件进行峰面积归一化,将峰面积数据

导入 SIMCA-P13.0 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。模型验证采用交互验证的方差分析(cross-validation analysis of variance, CV-ANOVA)。以 VIP>1 及 t 检验 $P<0.05$ 筛选对照组和模型组的差异代谢物,并根据分子式和二级碎片离子与人类代谢组数据库(human metabolome database, HMDB)进行比对鉴定,将鉴定的差异代谢物导入 MetaboAnalyst 数据库进行代谢通路富集分析,并结合京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)对涉及到的通路进行关联分析。

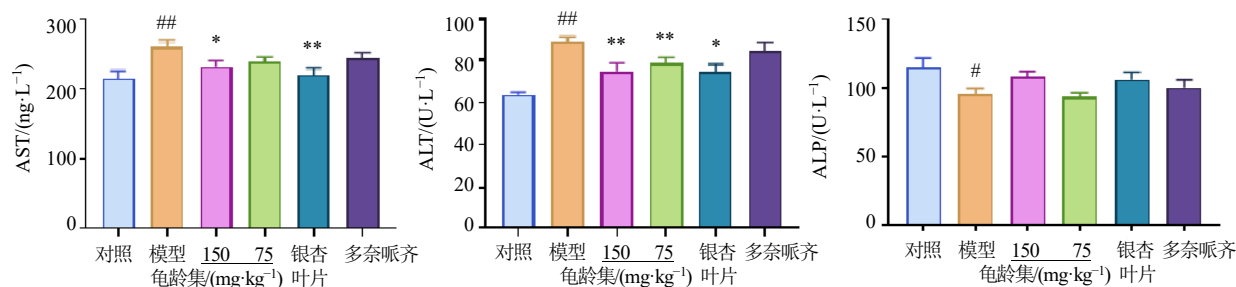
2.5 统计学分析

数据使用 SPSS 22.0、Excel 2019、Graphpad prism 7 软件进行统计学分析,均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 MCI 大鼠肝功能指标的影响

龟龄集对 MCI 大鼠血清生化指标的影响如图 1 所示。与对照组比较,模型组大鼠 AST、ALT 显著升高($P<0.01$),ALP 显著降低($P<0.05$);与模型组比较,龟龄集高剂量组和银杏叶片组大鼠 AST、ALT 显著降低($P<0.05$ 、 0.01),龟龄集低剂量组 ALT 显著降低($P<0.01$)。结果表明,龟龄集和银杏叶片能够改善肝功能指标。



与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下图同。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group, ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 龟龄集对 MCI 大鼠肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 1 Effects of Guilingji on liver function index of MCI rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.2 对 MCI 大鼠肝脏指数的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠肝脏指数显著下降 ($P<0.05$),高剂量龟龄集、银杏叶片和多奈哌齐均能显著提高 MCI 大鼠的肝脏指数 ($P<0.05$)。

3.3 对 MCI 大鼠肝脏组织病理的影响

如图 3 所示,对照组大鼠肝细胞形态正常,胞质均匀淡染,细胞核居中,中央静脉内皮细胞较完整,肝窦结构正常,未见明显淤血扩张及炎性浸润。模型组大鼠肝细胞变大,出现脂滴空泡,肝索排列

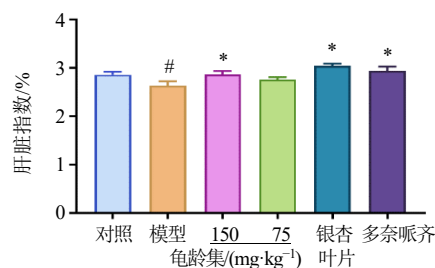


图 2 龟龄集对 MCI 大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effects of Guilingji on liver index of MCI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

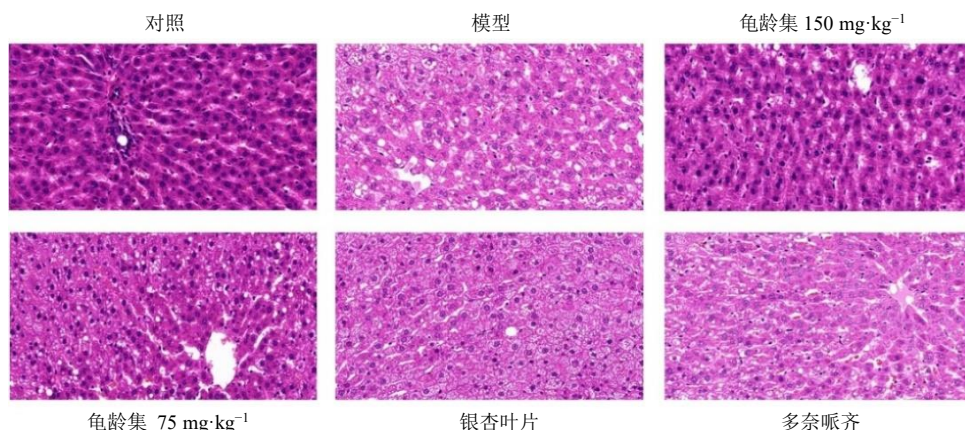


图 3 各组大鼠肝组织病理图 (HE, ×400)

Fig. 3 Pathological changes of liver tissue of rats in various group (HE, ×400)

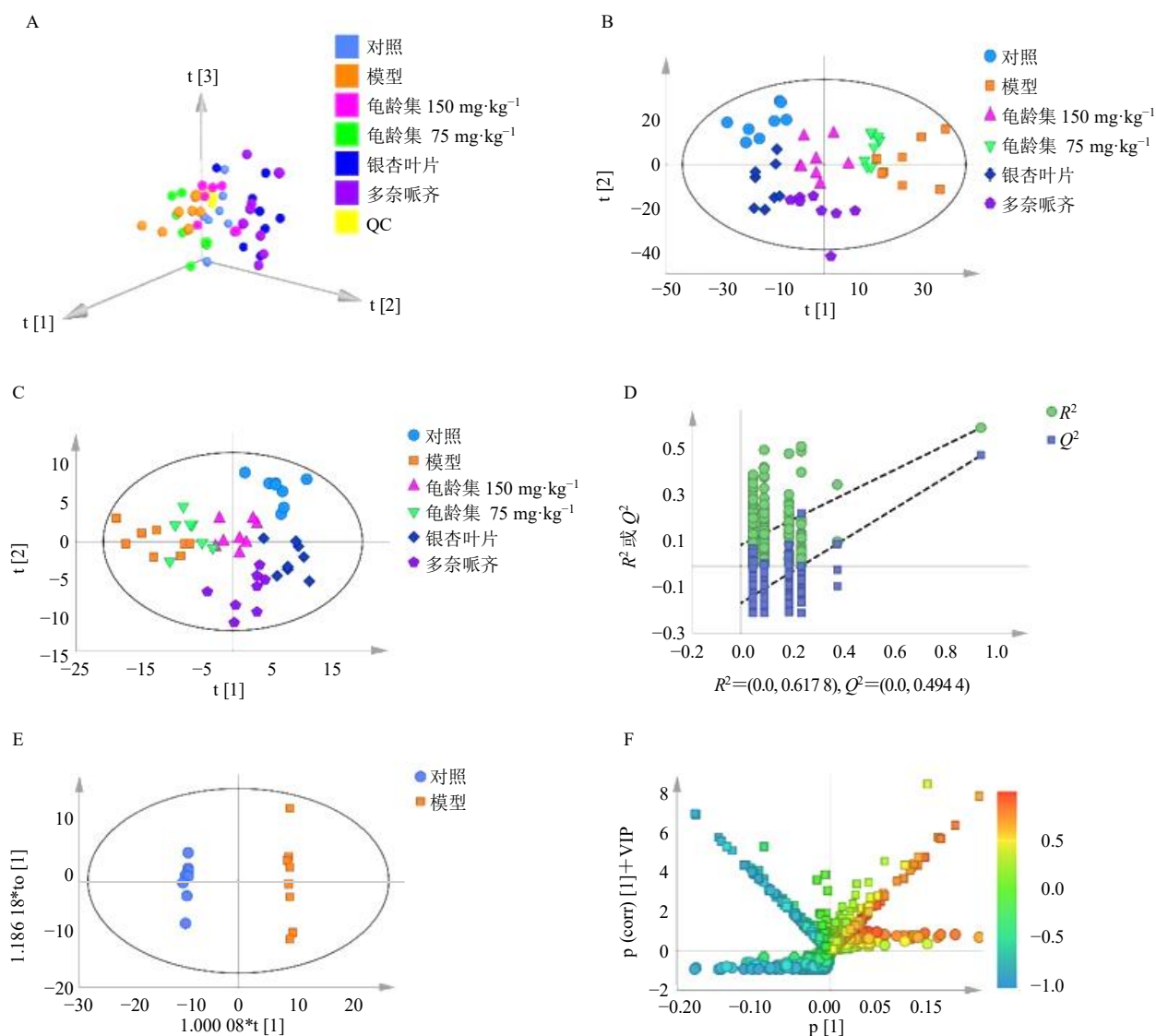
紊乱,细胞核偏向一侧,肝血窦扩大。龟龄集高剂量组大鼠肝细胞病变明显减轻,大部分肝细胞形态接近正常,脂滴空泡现象减少,肝索排列显著改善;龟龄集低剂量组肝组织病理较模型组未见明显改善;银杏叶片组大鼠肝索排列较模型组有所改善,但肝细胞脂滴空泡较多;多奈哌齐组肝组织病理较模型组未见明显改善。结果表明,高剂量龟龄集对肝组织病理的改善效果更好。

3.4 代谢组学

3.4.1 多元统计分析 PCA 结果 (图 4-A) 表明,各组呈明显分离趋势,且 QC 样品 (黄色) 聚集在一起,反映出仪器稳定性和数据重现性较好。根据各组数据 PCA-X、PLS-DA 得分图 (图 4-B、C),对照组和模型组之间明显分开,龟龄集高剂量组和银杏叶片组与模型组分离较明显,更接近对照组,表明龟龄集和银杏叶片对模型大鼠肝脏代谢轮廓调控作用较多奈哌齐好。PLS-DA 得分图的参数为 $R^2_X=0.487$ 、 $R^2_Y=0.938$ 、 $Q^2=0.884$,对模型数据进行 200 次置换检验 (图 4-D),结果显示 R^2 与 Q^2 参

数接近,模型斜率稍大且与纵轴截距为负值,表明模型未产生过分拟合,结果可靠。为了使组间差异最大化,消除组内变异对分类的负面影响,对对照组和模型组数据进行了 OPLS-DA (图 4-E),模型参数为 $R^2_X=0.558$ 、 $R^2_Y=0.999$ 、 $Q^2=0.874$, CV-ANOVA 检验 $P=4.56 \times 10^{-3}$,表明模型无过拟合,能够预测分类数据,计算各变量对 OPLS-DA 模型的贡献得到 VIP+S-plot 图 (图 4-F),通过 $|p(\text{corr})|$ 值和 VIP 值筛选出主要差异代谢物。

3.4.2 差异代谢物分析 将筛选得到的差异变量进行结构鉴定,共指认出 23 个差异代谢物 (表 1),与对照组比较,模型组大鼠肝脏中谷氨酰胺、焦谷氨酸、葡萄糖酸、阿糖酸、苹果酸、尿嘧啶、乙酰左旋肉碱、烟酰胺、次黄嘌呤、肌苷、黄嘌呤、黄嘌呤核苷 12 种代谢物含量显著升高 ($P<0.5$ 、 0.01 、 0.001);谷氨酸、谷胱甘肽、酪氨酸、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、血小板激活因子等 11 种代谢物含量显著下降 ($P<0.5$ 、 0.01 、 0.001)。龟龄集可回调所有差异代谢物,银杏叶片、多奈哌齐分别能



A-各组大鼠肝脏样本和 QC 样本 PCA 得分图; B-PCA-X 得分图; C-PLS-DA 得分图; D-PLS-DA 模型验证图; E-OPLS-DA 得分图; F-OPLS-DA 的 VIP+S-plots 图。

A-score plots of PCA analysis of each group and QC samples; B-PCA-X score plot; C-PLS-DA score plot; D-PLS-DA model validation diagram; E-OPLS-DA score plot; F-VIP+S-plots of OPLS-DA.

图 4 各组大鼠肝脏样本 LC-MS 数据多元统计分析图

Fig. 4 Multivariate data analysis of liver samples from LC-MS

够回调 21 和 20 个差异代谢物。以回调率评价药物对代谢物的回调程度, 高、低剂量龟龄集的平均回调率分别为 67.55%、30.66%, 银杏叶片平均回调率为 95.78%, 多奈哌齐平均回调率为 59.76%。高、低剂量龟龄集的总回调率分别为 1 553.65%、674.54%, 银杏叶片总回调率为 2 011.46%, 多奈哌齐总回调率为 1 195.20%。

回调率=(给药组相对峰面积-模型组相对峰面积)/(对照组相对峰面积-模型组相对峰面积)

3.4.3 代谢通路分析 将差异代谢物导入 MetaboAnalyst 数据库进行代谢通路富集分析, 以 $-\lg P > 1$ 和 Impact value > 0.05 为条件, 共筛选出 5 条关键代谢通路: 嘌呤代谢 (purine metabolism), D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (D-glutamine and D-glutamate metabolism), 精氨酸生物合成 (arginine biosynthesis), 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (alanine, aspartate and glutamate metabolism), 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 (phenylalanine,

表 1 差异代谢物鉴定结果

Table 1 Results of differential metabolites

序号	离子模式	代谢物	t _R /min	m/z	分子式	模型组 vs 对照组	回调率/%			
							龟龄集 高剂量	龟龄集 低剂量	银杏 叶片	多奈 哌齐
1	正离子	谷氨酰胺	0.885	147.043 9	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	↑***	34.13	24.92	11.21	12.85
2	负离子	焦谷氨酸	0.897	128.035 5	C ₅ H ₇ NO ₃	↑**	49.35	33.77	49.45	18.52
3	负离子	谷氨酸	0.907	146.045 9	C ₅ H ₉ NO ₄	↓*	6.24	29.14	—	—
4	负离子	葡萄糖酸	0.912	195.302 9	C ₆ H ₁₂ O ₇	↑**	86.02*	44.82	47.93	85.67**
5	负离子	阿拉伯糖酸	0.917	165.040 6	C ₅ H ₁₀ O ₆	↑**	56.33*	34.41	105.51**	93.74**
6	负离子	苹果酸	0.977	133.013 1	C ₄ H ₆ O ₅	↑***	76.97**	2.90	83.45**	75.96**
7	负离子	氧化型谷胱甘肽	0.979	611.145 2	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	↓***	43.13	82.15*	—	—
8	正离子	尿嘧啶	1.546	113.033 9	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	↑**	89.81*	34.18	151.89*	55.31**
9	正离子	乙酰-L-肉碱	1.633	204.123 0	C ₉ H ₁₇ NO ₄	↑**	62.92*	13.23	73.07**	55.47*
10	正离子	烟酰胺	1.697	123.054 5	C ₆ H ₆ N ₂ O	↑**	123.22**	79.57*	111.15**	58.45*
11	负离子	酪氨酸	1.792	180.068 6	C ₉ H ₉ NO ₃	↓*	42.46	—	9.56	—
12	正离子	次黄嘌呤	3.219	137.045 6	C ₅ H ₄ NaO	↑*	55.53**	42.36*	91.46**	55.22**
13	正离子	肌苷	3.220	269.102 1	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	↑***	54.45**	25.88	94.68**	39.11*
14	正离子	黄嘌呤	3.321	153.039 8	C ₅ H ₄ NaO ₂	↑***	76.67**	34.27*	95.23**	96.67**
15	正离子	黄苷	3.323	285.141 8	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₆	↑***	104.58**	23.64	124.36**	99.83**
16	负离子	LysoPE[18:2(9Z,12Z)/0:0]	8.118	476.278 7	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	↓***	70.91**	27.52*	92.53**	55.62*
17	正离子	LysoPC[20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0]	8.226	570.353 7	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	↓***	97.90**	8.43	148.17**	87.54*
18	负离子	LysoPE[20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/0:0]	8.428	500.278 7	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	↓***	70.78**	28.58*	95.04**	46.46**
19	负离子	LysoPC(18:2/0:0)	8.488	462.299 6	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	↓***	89.93**	18.71	178.62**	68.51**
20	负离子	LysoPC(0:0/16:0)	8.963	496.273 2	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	↓***	65.37**	26.56	108.25**	43.06**
21	正离子	LysoPE(18:0/0:0)	9.097	482.289 2	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	↓***	72.04**	12.73	130.87**	49.92**
22	正离子	LysoPE[18:1(9Z)/0:0]	9.450	480.305 7	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	↓***	68.93**	30.72*	101.82**	54.66**
23	正离子	血小板活化因子	10.760	524.370 7	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	↓***	55.98**	16.05	107.21**	42.63**

“↑”表示上调，“↓”表示下调，“—”表示无显著变化；与对照组比较：**P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001。

“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation, “—” indicates no significant change; **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001 vs control group.

tyrosine and tryptophan biosynthesis), 龟龄集对上述 5 条代谢通路均有调节作用 (图 5)。

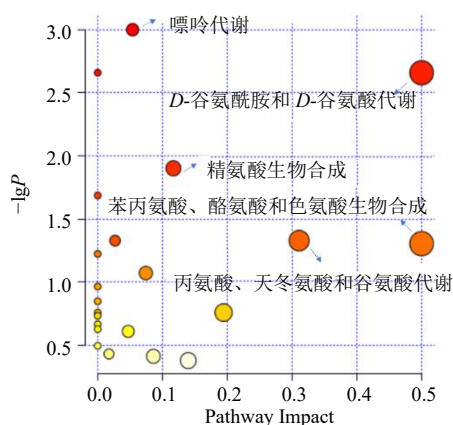


图 5 肝脏差异代谢物相关代谢通路富集分析图

Fig. 5 Enrichment analysis of differential metabolite-related metabolic pathways in liver

4 讨论

本研究基于 *D*-gal 合并半高脂饲料诱导的 MCI 大鼠模型,探讨了龟龄集对 MCI 大鼠肝保护作用 and 潜在机制。MCI 大鼠肝脏出现显著肝功指标异常、肝组织病理损伤及肝脏代谢轮廓异常。龟龄集和银杏叶片能够回调 2 项肝功能指标。龟龄集还能显著改善肝组织病理,效果较银杏叶片好。肝脏代谢组学研究结果表明,龟龄集可回调 23 个差异代谢物,较银杏叶片和多奈哌齐多,但银杏叶片对差异代谢物的总回调率和平均回调率较龟龄集更高,主要原因是银杏叶片广泛的药理作用,包括抑制血小板聚集、降低血液黏度、改善微循环等,对肝组织中大量嘌呤类和脂类代谢物具有强的调节作用。综合肝功能、肝组织病理以及肝脏代谢轮廓调节作用,龟龄集和银杏叶片均表现出保肝作用,但龟龄集效果更优。

肝脏代谢组学结果显示, 龟龄集对 MCI 大鼠肝脏 5 条关键代谢通路: 嘌呤代谢, *D*-谷氨酰胺和 *D*-谷氨酸代谢, 精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成均有调节作用。肝脏是氨基酸、溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 合成和代谢的主要场所, 肝脏功能下降必然会引起机体 LPC、氨基酸的水平和代谢轮廓的变化。

嘌呤是一种氨基酸类成分, 嘌呤代谢与神经系统疾病存在密切联系, 如黄嘌呤及其衍生物可作为腺苷受体拮抗剂, 调节神经递质和神经调节剂的释放, 并调控海马血红蛋白基因表达, 从而影响空间记忆^[23]。研究表明帕金森患者的嘌呤类代谢物, 包括肌苷、黄嘌呤核苷、黄嘌呤、次黄嘌呤含量均显著增加^[24-25]。嘌呤类代谢物受黄嘌呤氧化还原酶 (xanthine oxidoreductase, XOR) 调控, 该酶以黄嘌呤脱氢酶 (xanthine dehydrogenase, XDH) 和黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase, XO) 2 种形式存在。次黄嘌呤经 XO 作用生成黄嘌呤, 黄嘌呤经 XO 作用生成尿酸。由于 XDH 在肝脏中大量表达, 故肝脏出现损伤后, XDH 可从肝细胞释放到血液循环, 并被血浆蛋白酶快速转化为 XO, 从而增加肝脏和大脑内自由基形成, 导致脑血管功能障碍和认知功能减退^[26-27]。本研究 MCI 大鼠出现肝脏功能下降, 并伴有嘌呤类代谢物含量升高, 与文献中神经退行性疾病中嘌呤类代谢物的含量变化趋势一致, 龟龄集可显著下调肝脏嘌呤类代谢物的含量, 这可能是龟龄集发挥肝保护作用从而改善认知功能的原因之一。

前额叶皮层谷氨酸能神经传递活性低下是认知功能障碍的主要病理特征。谷氨酸 (glutamic acid, Glu) -谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 稳态直接影响谷氨酸能活性, 是维持认知功能的重要因素^[28]。研究表明, Glu 的浓度会随着神经元密度和神经退行性变化而改变, AD 小鼠的 Glu 水平显著降低, 且谷氨酸能神经元变化先于 γ -氨基丁酸能神经元, Glu 水平的改变可作为 MCI 早期诊断的重要标志^[29-30]。大脑中 Glu-Gln 循环和 Glu-Gln 水平的改变可导致谷氨酸能神经传递受损和认知功能障碍^[28], Gln 还能通过调节氧化应激和炎症反应来影响神经功能, 研究表明具有抗氧化特性的 Gln 可能会中断氧化应激和淀粉样蛋白积累的有害循环, 从而减缓认知损伤的进展^[31]。本研究 MCI 大鼠肝脏 Gln 水平降低, Glu 含量升高, 说明其 Glu-Gln 稳态被打破, 致谷氨酸

能神经传递受损, 龟龄集可调节肝脏 Glu-Gln 稳态发挥肝保护作用并影响认知功能。

LPC 是体内卵磷脂代谢的中间产物, 大量研究表明在药源性肝损伤、酒精性肝损伤和非酒精性脂肪性肝炎等肝疾病中均伴有 LPC 水平的降低, 血浆 LPC 水平是急性肝衰竭预后不良的关键指标^[32-35]。本研究中 MCI 大鼠肝脏 LPC 水平显著降低, 与上述文献研究结果一致。另有研究表明, 通过膳食补充 Sn-2 棕榈酸盐, 可增加肝脏 LPC 及其长链脂肪酸 (very long-chain fatty acids, VLCPUFAs) 的合成, LPC 和溶血磷脂酰乙醇胺 (lysophosphatidylethanolamine, LPE) 作为肝脏 VLCPUFAs 通过转运蛋白穿越血脑屏障, 增加脑内 VLCPUFAs 的浓度, 从而改善认知行为^[36]。LPE 是磷脂酶 A1/A2 诱导的磷脂酰乙醇胺水解的脱酰产物, 在嗜铬细胞瘤细胞中, LPE 可通过丝裂原激活的蛋白激酶信号通路发挥神经营养激活剂的作用, 并参与刺激皮质神经元的神经突生长^[37-38]。有研究发现, 高脂饮食诱导的脂肪肝小鼠血清 LPE (18:2) 和 LPE (20:4) 的水平均显著降低, 且 LPE 还参与诱导肝细胞脂滴形成^[39]。本研究中 MCI 大鼠肝脏 LPE 水平显著降低, 可能与肝细胞出现脂滴空泡病理改变相关, 并可能影响神经系统从而影响认知功能, 龟龄集能够调节 LPC 和 LPE 水平发挥肝保护作用。

中医认为 MCI 的临床症状与中医学“呆病”相似, 其病机为脑髓髓空、肝肾阴虚、气血双亏、瘀血痹阻。病位虽在脑, 但却由肝肾亏虚引起, 因此 MCI 可从肝肾论治。本研究基于肝脏代谢组学发现龟龄集能够调节肝脏脂类、氨基酸类等小分子代谢物从而影响肝脏脂代谢、嘌呤代谢和能量代谢发挥肝保护作用。课题组前期基于 MCI 大鼠肾脏代谢组学发现龟龄集可调节肾脏脂类、氨基酸类和牛磺酸等小分子代谢物从而影响脂代谢和能量代谢发挥肾保护作用^[22]。肝和肾代谢组学研究结果表明龟龄集改善 MCI 可能的机制涉及肝、肾功调节, 肝、肾脂代谢和氨基酸代谢调节。该结果提示可进一步靶向脂类和氨基酸类代谢物的定量分析, 从而发现关键差异标志物、代谢通路以及关键靶点, 为探明龟龄集靶向“肝-肾-脑”系统治疗 MCI 的潜在机制提供研究方向和科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 吴献中, 郭敏, 马春莲. 健康中国视域下运动促进老年

- 人健康衰老的困境与对策 [J]. 当代体育科技, 2022, 12(29): 188-194.
- [2] Muscat S M, Barrientos R M. Lifestyle modifications with anti-neuroinflammatory benefits in the aging population [J]. *Exp Gerontol*, 2020, 142: 111144.
- [3] 吕瑞雪, 崔静轩, 龚治安, 等. 二甲双胍对 D-半乳糖诱导的衰老小鼠肝脏组织的影响 [J]. 高师理科学刊, 2024, 44(8): 77-82.
- [4] 李欣宁, 施圣杰, 沈劫, 等. 基于“肾生髓通脑”理论探讨补肾方药在认知障碍中的应用 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(11): 1070-1075.
- [5] 孙海洋, 孙景波, 程骁, 等. 基于“填精补髓、清脑通络法”探讨血管性认知障碍中医证治规律 [J]. 陕西中医, 2023, 44(8): 1098-1101.
- [6] 关徐涛, 胡翔燕, 徐立然, 等. “肝”与认知功能障碍相关理论探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(4): 1116-1120.
- [7] 张效收, 李红专, 李晶, 等. 基于“肝藏血主疏泄”理论探讨肝及肝脏疾病与绝经后骨质疏松的关系 [J]. 现代中医药, 2024, 44(1): 32-36.
- [8] Han S W, Park Y H, Jang E S, *et al*. Implications of liver enzymes in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 88(4): 1371-1376.
- [9] Lu Y F, Pike J R, Selvin E, *et al*. Low liver enzymes and risk of dementia: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 79(4): 1775-1784.
- [10] 于云红, 谢炜, 闵存云, 等. “从肝论治”复方柴胡疏肝汤对氯化锂-匹罗卡品诱导的难治性癫痫大鼠认知障碍及海马区 BDNF 蛋白表达的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(12): 2932-2937.
- [11] 苏婧, 崔镇海, 金美英. 基于 PI3K/AKT/GSK3 β 通路探讨解毒通络调肝方对 2 型糖尿病认知障碍大鼠的影响 [J]. 中国兽医学报, 2023, 43(11): 2347-2353.
- [12] 彭天忠, 黄学娣, 林星镇, 等. 柔肝调神针刺法治疗脑卒中后认知障碍及对突触相关 miRNAs 表达的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(17): 3247-3251.
- [13] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1055.
- [14] Liu N Y, Pei H, Liu M X, *et al*. Efficacy and safety of guilingji capsules for treating mild-to-moderate cognitive impairment: Study protocol for A randomized, double-blind, positive-controlled, multicenter and noninferiority trial [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(8): 577-582.
- [15] Zhang H Q, Chen H Q, Pei H, *et al*. The effect of guilingji capsules on vascular mild cognitive impairment: A randomized, double-blind, controlled trial [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 4778163.
- [16] 裴卉, 王慧婵, 冯兴中, 等. 龟龄集胶囊治疗轻-中度老年认知障碍肾虚髓减证多中心随机双盲对照研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(2): 151-159.
- [17] 任可乐, 孟祥龙, 祁晓鸣, 等. 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 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(1): 1-10.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Zhao S J, Tian J S, Tai G, *et al*. ¹H NMR-based metabolomics revealed the protective effects of Guilingji on the testicular dysfunction of aging rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111839.
- [21] 史静超. 龟龄集的化学分析和对轻度认知功能障碍的改善作用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- [22] 史静超, 王玉昆, 于舒婷, 等. 基于肾脏代谢组学探究龟龄集改善大鼠轻度认知功能障碍作用机制 [J]. 药学报, 2024, 59(4): 1017-1027.
- [23] Kambe J, Miyata S, Li C M, *et al*. Xanthine-induced deficits in hippocampal behavior and abnormal expression of hemoglobin genes [J]. *Behav Brain Res*, 2023, 449: 114476.
- [24] de Lope E G, Loo R T J, Rauschenberger A, *et al*. Comprehensive blood metabolomics profiling of Parkinson's disease reveals coordinated alterations in xanthine metabolism [J]. *NPJ Parkinsons Dis*, 2024, 10(1): 68.
- [25] Munasinghe M, Afshari R, Heydarian D, *et al*. Effects of cocoa on altered metabolite levels in purine metabolism pathways and urea cycle in Alzheimer's disease in *C. elegans* [J]. *Transl Med Aging*, 2022, 6: 14-24.
- [26] Prabhu S, Burrage E, Luthman J, *et al*. Xanthine oxidase mediates stress-induced Alzheimer's Disease progression in triple transgenic mice [J]. *Physiology*, 2023, 38(S1): 5730102.
- [27] Prabhu S, Oudomvilay C, Burrage E, *et al*. Cerebrovascular function is protected in hepatic xanthine oxidase knockout mice under chronic stress [J]. *Physiology*, 2023, 38(S1): 5731121.
- [28] Baek J H, Kang J S, Song M, *et al*. Glutamine supplementation preserves glutamatergic neuronal activity in the infralimbic cortex, which delays the onset of mild cognitive impairment in 3 $\times$ tg-AD female mice [J]. *Nutrients*, 2023, 15(12): 2794.
- [29] Velu L, Pellerin L, Julian A, *et al*. Early rise of glutamate-glutamine levels in mild cognitive impairment: Evidence

- for emerging excitotoxicity [J]. *J Neuroradiol*, 2024, 51(2): 168-175.
- [30] Chen X, Gong T, Chen T, *et al*. Altered glutamate-glutamine and amide proton transfer-weighted values in the hippocampus of patients with amnesic mild cognitive impairment: A novel combined imaging diagnostic marker [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1089300.
- [31] Baek J H, Jung S, Son H, *et al*. Glutamine supplementation prevents chronic stress-induced mild cognitive impairment [J]. *Nutrients*, 2020, 12(4): 910.
- [32] 赵梅玉, 史欣悦, 周姝伶, 等. 非酒精性脂肪性肝病大鼠的血清溶血磷脂酰胆碱和氨基酸代谢轮廓研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(4): 477-484.
- [33] 余雪纯, 胡聪, 赵梅玉, 等. 雷公藤多苷诱导肝损伤大鼠的血清溶血磷脂酰胆碱代谢轮廓 [J]. *毒理学杂志*, 2024, 38(1): 36-42.
- [34] Trovato F M, Zia R, Artru F, *et al*. Lysophosphatidylcholines modulate immunoregulatory checkpoints in peripheral monocytes and are associated with mortality in people with acute liver failure [J]. *J Hepatol*, 2023, 78(3): 558-573.
- [35] Peschel G, Krautbauer S, Weigand K, *et al*. Rising lysophosphatidylcholine levels post-hepatitis C clearance [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1198.
- [36] Wei T, He Y Z, Tan D F, *et al*. Dietary Sn-2 palmitate influences cognitive behavior by increasing the transport of liver-produced lysophosphatidylcholine VLCPUFAs to the brain [J]. *Food Chem*, 2025, 462: 140955.
- [37] Hisano K, Yoshida H, Kawase S, *et al*. Abundant oleoyl-lysophosphatidylethanolamine in brain stimulates neurite outgrowth and protects against glutamate toxicity in cultured cortical neurons [J]. *J Biochem*, 2021, 170(3): 327-336.
- [38] Hisano K, Kawase S, Mimura T, *et al*. Structurally different lysophosphatidylethanolamine species stimulate neurite outgrowth in cultured cortical neurons *via* distinct G-protein-coupled receptors and signaling cascades [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 179-185.
- [39] Yamamoto Y, Sakurai T, Chen Z, *et al*. Lysophosphatidylethanolamine affects lipid accumulation and metabolism in a human liver-derived cell line [J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 579.

[责任编辑 罗 曦]