

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.004

钩藤散改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆功能的代谢组学研究*

董晓红¹ 何其勇^{2Δ} 朱劲松² 姚 壮¹ 彭玉博¹

(1 黑龙江中医药大学佳木斯学院 黑龙江 佳木斯 154007; 2 佳木斯大学附属第一医院 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要 目的:采用非靶向的高通量尿液代谢组学技术对钩藤散改善淀粉样前体蛋白/早老素蛋白1基因,即 APP/PS1 双转基因小鼠的作用机制进行研究。**方法:**5月龄 APP/PS1 小鼠采用 Morris 水迷宫实验检测双转基因小鼠的空间学习能力,在确定出现空间记忆能力功能损伤地条件下采用基于非靶向的尿液代谢组学技术研究 APP/PS1 小鼠的代谢网络,聚焦关键通路,同时观察钩藤散在水迷宫和代谢水平上的治疗作用。**结果:**Morris 水迷宫对比发现 APP/PS1 小鼠的空间记忆能力明显长于同窝野生小鼠,给予钩藤散后呈现一定程度的回调趋势,经非靶向的代谢轮廓分析和核心代谢通路聚焦后,成功发现正常小鼠(同窝野生小鼠)和 APP/PS1 双转基因小鼠代谢轮廓间差异最大的信号,经质谱解析和权威数据库检索后鉴定6个与学习记忆相关的潜在生物标记物,分别是牛磺酸(taurine)、叶酸(pteroylglutamic acid)、新蝶呤(neopterin)、磺乙谷酰胺(glutaurine)、戊邻酮二酸盐(2-oxoglutarate)、二氢新蝶呤(dihydroneopterin),他们主要涉及牛磺酸代谢及叶酸代谢等,经钩藤散治疗后能有效回调。**结论:**钩藤散对 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力具有一定治疗作用,本次发现的6个生物标记物可能是 APP/PS1 双转基因小鼠发病的潜在靶点,为钩藤散的相关药效学研究提供实验依据。

关键词:钩藤散;APP/PS1 双转基因小鼠;Morris 水迷宫;代谢组学;潜在靶点

中图分类号:Q95-3;R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)23-4416-05

The Metabolomic Study of Learning and Memory Function of APP/PS1 Double Transgenic Mice Improved by Gouteng San*

DONG Xiao-hong¹, HE Qi-yong^{2Δ}, ZHU Jin-song², YAO Zhuang¹, PENG Yu-bo¹

(1 Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China;

2 First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China)

ABSTRACT Objective: The non targeted high-throughput urine metabolomics technology was used to study the pathogenesis of APP/PS1 double transgenic mice and the mechanism of action of Gouteng san. **Methods:** 5-month-old APP/PS1 double transgenic mice were test with Morris water maze for spatial learning ability. Then we employed the non targeted high-throughput urine metabolomics technology to study the pathogenesis of APP/PS1 double transgenic mice based on the metabolic network. The focus investigation of the key pathways and the observation of the treatment by Morris water maze and metabolic level have been used after spatial learning ability damaged confirmed. **Results:** The comparison between APP/PS1 double transgenic mice and normal mice suggested that a significant longer was existed in former, which was call-back by Gouteng san. With the non targeted high-throughput urine metabolomics analysis and pathway focused analysis, we found certain signals from metabolic profiling, which was identified to be 6 biomarkers associated with learning and memory function by mass spectrometry analysis or authoritative database. Respectively, they were taurine, pteroylglutamic acid, neopterin, glutaurine, 2-oxoglutarate and dihydroneopterin. They were mainly related to taurine metabolism and folate metabolism and represented an effective callback. **Conclusion:** Gouteng san possess a favorable effect on learning and memory ability of APP/PS1 double transgenic mice, 6 biomarkers may be a potential target for the pathogenesis of APP/PS1 double transgenic mice and provide experimental basis for the study of Gouteng san.

Key words: Gouteng san; APP/PS1 transgenic mice; Morris water maze; Metabolomics; Potential target

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R749.16 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)23-4416-05

前言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),即老年性痴呆是一种中枢神经系统的退行性疾病,主要临床表现为进行性的记

忆和行为障碍,且发病机制尚不可知。建立合适的动物模型对探究 AD 发病机制及相关药物对其治疗的作用靶点研究。目前根据 AD 临床表现,结合生物信息学和遗传学方法模拟了一系列转基因小鼠动物模型^[1],其中包括与 AD 发病机制假说最为

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81373777,81173599)

作者简介:董晓红(1974-),副教授,博士研究生,主要从事中医药防治老年痴呆及风湿性关节炎方法的研究,电话:0454-8623377

Δ 通讯作者:何其勇(1966-),主任医师,从事中西防治老年病研究,电话:0454-8623377, E-mail:448047898@qq.com

(收稿日期:2017-02-27 接受日期:2017-03-25)

普遍认同的细胞外 β -淀粉样蛋白沉淀动物模型,最近建立的APP/PS1双转基因小鼠模型能最接近AD发生发展过程的病理变化,对AD的早期研究提供重要帮助^[2,3]。钩藤散出自宋·许叔微所撰《普济本事方》,由钩藤、白茯苓、黄芩、川升麻、白鲜皮、龙齿、玄参、石膏、寒水石组成。适用于治疗风痰上逆,感觉头晕头痛的经典方剂。近年来研究发现其对血管性痴呆(VD)和AD都有很好的改善作用^[4-6]。本研究以此模型为研究对象,采用经典的Morris水迷宫对其进行评价,在此基础上采用代谢组学技术研究其发病机制。

1 材料和方法

1.1 药材

钩藤散中各药材购于北京同仁堂制药集团哈尔滨药店,经黑龙江中医药大学陈孝忠副教授鉴定为正品。

1.2 实验动物和仪器药品

1.2.1 实验动物 5月龄APP/PS1双转基因小鼠及同窝野生小鼠共27只,体重25~35g,由南京大学模式动物研究所提供,合格证号:SCXK(苏)2010-0003。在SPF级环境下饲养,12h光照且给予自由饮食和进水。实验开始前进行1周时间适应环境。

1.2.2 仪器和试剂 Agilent 1200 6410 TripleQuadrupole 质谱仪(美国安捷伦公司);Morris水迷宫(北京众实迪创公司);Sartorius BSA124S 分析天平(德国赛多利斯艾科勒);高速大容量冷冻离心机H2100R(中国湘仪有限公司);Biosafer-40TD 纯水机(中国赛飞公司);Morris水迷宫(上海吉量软件科技有效公司)。

1.3 钩藤散提取液制备方法

遵照《普济本事方》原文,折合成现代剂量^[4-6],制备方法为:石膏15g先煎半小时,取钩藤9g、陈皮9g、半夏9g、麦门冬9g、茯苓9g、人参6g、菊花6g、防风6g、生姜3g、炙甘草3g,分别破碎为粗粉混合,加水800mL煮沸,保持沸腾1小时,趁

热用纱布过滤,再加水800mL煮沸,保持沸腾1小时,合并两次滤液即为钩藤散煎剂。

1.4 动物实验

5月龄APP/PS1双转基因小鼠及同窝野生小鼠共30只,其中同窝野生小鼠作为空白组、APP/PS1双转基因小鼠分为模型组及给药组。给药组每天给予800mg/kg的钩藤散溶液,空白组和模型组给予等体积蒸馏水,连续10周。

1.5 Morris水迷宫实验

Morris水迷宫由100cm×30cm的水池组装而成,共分为4个象限,实验开始前将圆形逃生平台置于其中,并高出水面1cm,水温控制在(30±5℃),水面导入少量奶粉,使逃生平台不能被直接观测到。采用Morris水迷宫视频分析系统监测APP/PS1双转基因小鼠的游泳轨迹,当实验动物准确找到平台即完成试验。重复以上过程共计5天,每天3次,如动物在120s内未发现平台,则由金属管引导至平台处,水迷宫最后一天出走平台,记录120s内小鼠游经逃生平台的时间及轨迹路线。

1.6 样品采集与制备

实验第10周收集大鼠12h夜尿,离心(4℃、13000rpm、10min)取上清置于-80℃保存。实验开始前解冻,离心(4℃、13000rpm、10min)取上清过0.22μm微孔滤膜用于代谢组学分析。

1.7 分析条件

色谱条件:安捷伦SB2C18色谱柱,流动相A为0.1%甲酸乙腈、B为0.1%甲酸水,流速为0.4mL/min,进样量为4μL,柱温设定45℃,色谱条件如表1所示。

质谱条件离子源采用电喷雾离子源,其中ESI正离子模式下毛细管电压3KV;雾化器压力设定2.5kPa;干燥气流速设定10mL/min,干燥气温度设定350℃,采用全扫描模式采集尿液代谢轮廓。

表1 尿液代谢组学色谱分离条件

Table 1 Chromatographic condition of urine metabolomics

Time(min)	Flow(mL/min)	A(%)	B(%)	Curve
0	0.4	5	95	6
2	0.4	5	95	6
3	0.4	25	75	6
8	0.4	55	45	6
9	0.4	80	20	6
9.5	0.4	95	5	6
e	0.4	95	5	6
15	0.4	5	95	6

1.8 数据处理与潜在生物标记物筛选

行为学数据即代谢组学数据均采用SPSS 17.0对其进行统计学差异分析,以单因素方差分析方法及T检验对空白组和模型组间的行为学和生物标记物进行统计分析,其中P<0.05为显著性差异,P<0.01为极显著差异。针对海量的代谢组学数据,本实验采用MZmine(Metabolomics Fiehn Lab)分析系统进行数据预处理流程,将预处理结果进行模式识别分析,最终筛选差异离子作为生物标记物。

2 结果

2.1 Morris水迷宫实验^[7-10]

如图1所示,与正常组相比,模型组潜伏期边长,具有统计学意义(P<0.05)。与模型组相比,给药组的潜伏期减少,具有统计学意义(P<0.05)。实验动物穿越站台次数如图1所示,与空白组相比,模型组穿越站台次数显著减少,具有统计学意义(P<0.05)。与模型组相比,给药组则明显增加,具有统计学意义(P<0.05)。

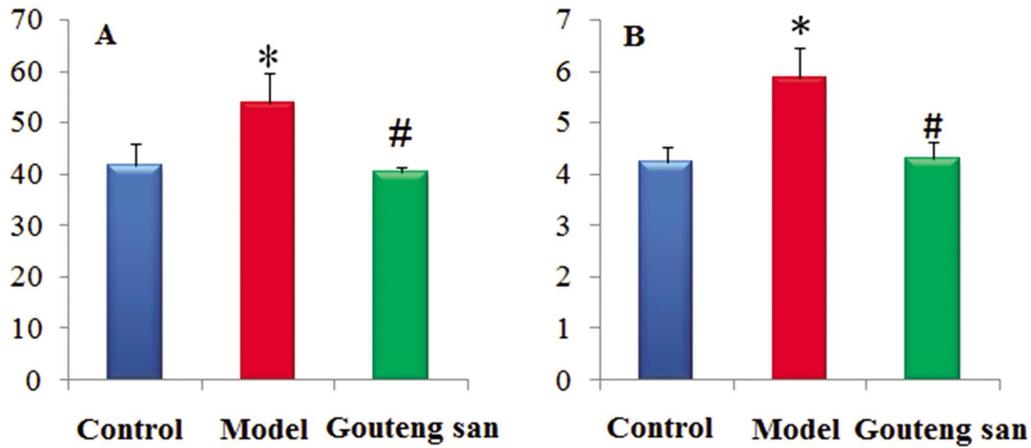


图 1 Morris 水迷宫中潜伏时间和穿越平台次数的相关结果

A: 潜伏时间; B: 穿越次数

Fig.1 The result of morris water maze latency and the number of times through the platform

A: Latency time; B: number of crossing

2.2 尿液代谢组学研究

以超高分辨质谱采集小鼠尿液代谢轮廓数据 (图 2), 经 MZmine 软件数据预处理后, 生成含有各项代谢组数据的数据矩阵, 进而进行无监督模式的主成分分析, 从主成分得分图中可以看出 (图 3), 在主成分最大的成分 1 和成分 2 构成的二维矩阵中, 空白组和模型组组间离散明显, 组内聚集程度较好, 提示在实验第 10 周模型组小鼠的代谢已经发生巨大变化, 由此使空白组和模型组的组间代谢发生明显差异。提示此时两组间的差异离子对分组及模型组代谢具有重要生理意义。

给药组处于空白组和模型组间, 通过在主成分 1 和主成分 2 构成的矩阵界面上可以清晰看出, 给药组的代谢轮廓正逐渐向空白组发展, 证明钩藤散对模型组小鼠具有一定程度的回调作用, 能很好的改善 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力。

在此基础上, 为挖掘 APP/PS1 双转基因小鼠与正常小鼠的差异代谢物, 本实验采用有监督模式的偏最小二乘判别分析进行筛选, 选组空白组和模型组间 T 检验及重要变量投影值大于 1 的离子 (图 4), 结合人类代谢组数据库 (HMDB) 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 进行检索 (图 5), 最终鉴定 6 个离子作为 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆功能的潜在生物标记物, 并由此构建 APP/PS1 双转基因小鼠尿液代谢的网络分析图 (图 6)。

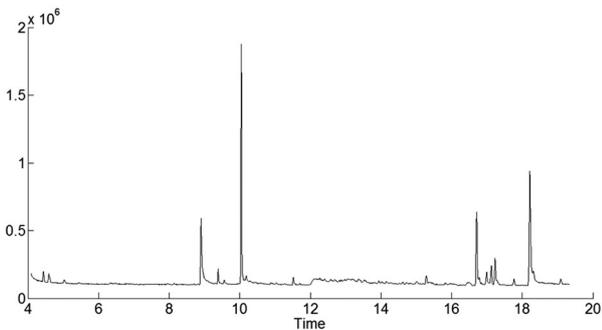


图 2 APP/PS1 小鼠尿液代谢轮廓图

Fig.2 Metabolic fingerprint of APP/PS1 double transgenic mice

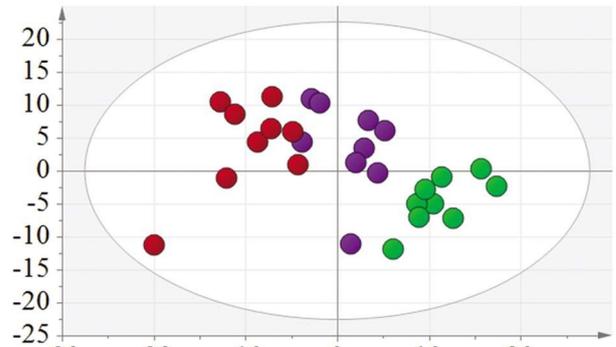


图 3 APP/PS1 双转基因小鼠第 10 周尿液代谢 PCA 得分图

● 空白组 ● 模型组 ● 给药组

Fig.3 PCA score of APP/PS1 double transgenic mice

● Control group ● Model group ● Gouteng san

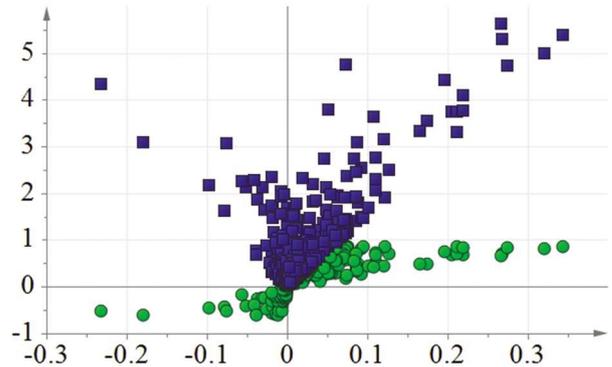


图 4 APP/PS1 双转基因小鼠 VIP-S 分析

■ VIP ● S 图

Fig.4 VIP-S plot of APP/PS1 double transgenic mice

■ VIP ● S-plot

3 讨论

β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 沉积形成是 Alzheimer's disease (AD) 的主要病理特点, 同时也是现阶段对 AD 诊断的金指标^[11-17]。APP 是跨膜糖蛋白, 他的突变会导致与 β 分泌酶结合位点的结构产生特异性变化, 最终导致 $A\beta$ 的沉积。基于以上理论, 目前

APP/PS1 双转基因小鼠是国际上公认的最佳 AD 动物模型,但国内对其研究较少,基于尿液代谢组学的研究更是少有报道,本实验采用此动物模型及同窝野生小鼠用于深入挖掘能够表征 AD 阶段性的尿液生物标记物,为阐明 AD 发展及相关药物对其治疗的作用机制研究提供实验参考。

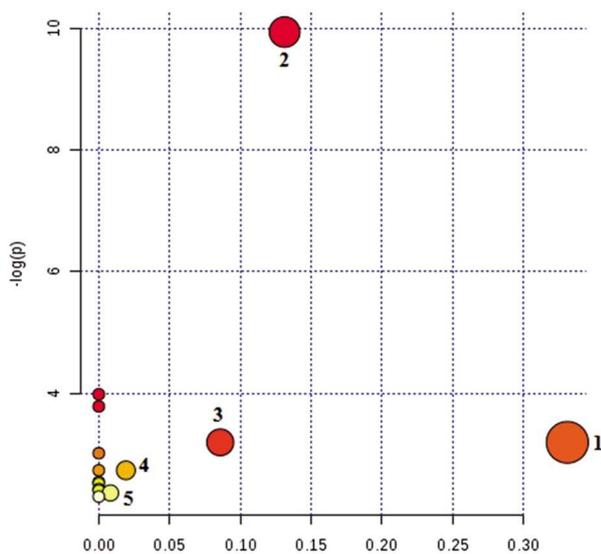


图 5 APP/PS1 双转基因小鼠尿液代谢 MetPA 分析

1 牛磺酸和亚牛磺酸代谢、2 叶酸合成、3 三羧酸循环代谢、4 维生素 B6 代谢、5 触及胆汁酸生物合成

Fig.5 MetPA analysis of urine metabolomics of APP/PS1 double transgenic mice

1 Taurine and taurine metabolism, 2 Folic acid synthesis, 3 TCA cycle, 4 Vitamin B6 metabolism, 5 Primary bile acid biosynthesis

治疗 AD 的上市药物主要分为胆碱酯酶抑制剂和 NMDA 受体拮抗剂两大类,这些药物能在一定程度上改善 AD 患者的认知和记忆能力,但不能达到最终治疗的目的,因此探寻 AD 新型治疗药物对阻断其病理的发生和发展具有极为重要的作用。钩藤散收录于宋代·许叔微的《普济本事方》,是中医治疗风痰上逆、肝厥头晕头痛的经典方剂。现在药理学研究表明其具有抗高血压、头痛眩晕肩凝和痴呆等功效。由此提示钩藤散可能对 AD 具有一定的治疗作用,但目前对钩藤散治疗 AD 的报道较少、作用机制尚不可知,本实验采用的高通量的尿液代谢组学技术对其进行阐明,研究表明钩藤散通过对相关代谢物及代谢通路的有效回调,能够达到延缓 AD 发展的目的,牛磺酸及亚牛磺酸代谢和叶酸代谢可能是其相关作用机制。

牛磺酸及亚牛磺酸代谢是人体内重要的代谢机制。近年来研究表明,在除改善与老化和 Aβ 相关的疾病外,牛磺酸被证明对其他形式的痴呆症也有一定疗效:缺氧缺血性脑卒中引起的学习障碍、化学诱导阿尔茨海默型痴呆和酒精引起的脑损害。研究结果一致认为牛磺酸具有提高认知正常小鼠空间学习和记忆的效果。牛磺酸具有痴呆症的特异性,这对认知阿尔兹海默病具有很好的作用。研究结果表明牛磺酸在 AD 小鼠模型以防止认知功能障碍方面可能发挥的作用,然而确切的机制尚不清楚。我们的研究表明,牛磺酸有潜在的治疗 AD 的认知功能的作用。牛磺酸已经在临床上用于充血性心脏衰竭和肝脏疾病,没有已知的副作用。有牛磺酸缺乏长期使用不利的证据。

叶酸作为一种重要的水溶性 B 族维生素,其参与多条代谢通路,在细胞代谢、增殖中扮演不可替代的作用。大脑中叶酸含量丰富,对脑细胞发育及生长代谢具有及其重要的作用。近年

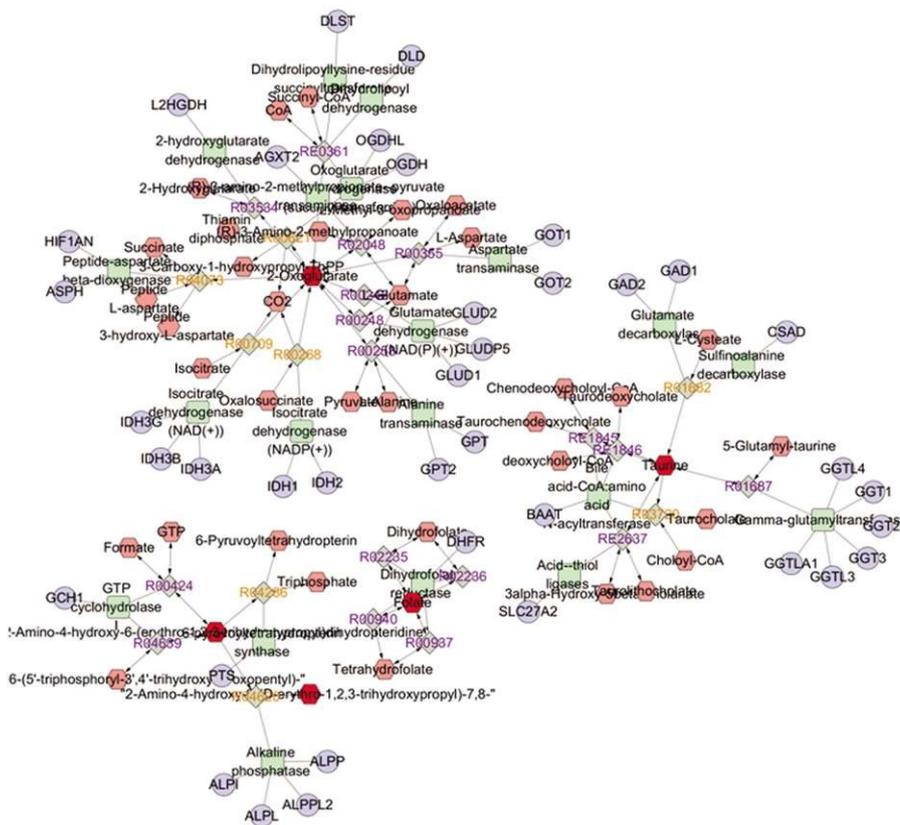


图 6 APP/PS1 双转基因小鼠尿液代谢网络分析图

Fig.6 Analysis of the metabolic network of APP/PS1 double transgenic mice

来研究表明阿尔兹海默病患者脑部的叶酸代谢呈异常状态,本次实验采用无监督的代谢组学技术对 APP/PS1 双转基因小鼠的尿液进行分析,从机体内的终端代谢产物角度分析入手,为阐明阿尔兹海默病的发病机制及钩藤散作用机制提供参考。

参考文献(References)

[1] Hsiao K K, Borchelt D R, Olson K, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins[J]. *Neuron*, 1995, 15(5): 1203-1218

[2] Matsumoto K, Zhao Q, Niu Y, et al. Kampo formulations, chotosan, and yokukansan, for dementia therapy: existing clinical and preclinical evidence [J]. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2013, 122(4): 257-269

[3] Suzuki T, Futami S, Igari Y, et al. A Chinese herbal medicine, choto-san, improves cognitive function and activities of daily living of patients with dementia: a double-blind, randomized, placebo-controlled study[J]. *Journal of the American Geriatrics Society*, 2005, 53 (12): 2238-2240

[4] 齐元富. 钩藤散研究进展[J]. *国际中医中药杂志*, 1998, (6): 8-11
Qi yuan-fu. Research progress of Gou teng san [J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 1998, (6): 8-11

[5] Itoh T, Shimada Y, Terasawa K. Efficacy of Choto-san on vascular dementia and the protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death [J]. *Mechanisms of Ageing & Development*, 1999, 111(2-3): 155-173

[6] 山口修平, 桤坤. 钩藤散对额叶功能的改善作用 [J]. *国际中医中药杂志*, 2004, 26(5): 297-298
Shankou xiu-ping, Chen kun. Gou teng san effect on frontal lobe function [J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine* 2004, 26(5): 297-298

[7] Park T S, Ryu Y K, Park H Y, et al. *Humulus japonicus* inhibits the progression of Alzheimer's disease in a APP/PS1 transgenic mouse model[J]. 2016

[8] Zhang L, Chao FL, Luo YM, et al. Exercise prevents cognitive function decline and demyelination in the white matter of APP/PS1 transgenic AD mice[J]. *Current Alzheimer research*, 2016

[9] Rabey J, Dobronevsky E, Aichenbaum S, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation combined with cognitive training for the treatment of Alzheimer's disease: A long-term follow-up[J]. *Alzheimers & Dementia*, 2011, 7(4): S663-S663

[10] Tremblay C, Stamour I, Schneider J, et al. Accumulation of TAR DNA Binding Protein-43 (TDP-43) in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(9):

788-798

[11] Mapstone M, Cheema A K, Fiandaca M S, et al. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults [J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(4): 415-418

[12] 刘英, 高璐, 马丽香, 等. APP/PS1 双转基因小鼠大脑皮质老年斑的病变对其学习记忆能力的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2007, 23(3): 225-231
Liu Ying, Gao Lu, Ma Li-xiang, et al. Effect of the pathology of senile plaques in cerebral cortex on the learning and memory abilities of the APP/PS1 double transgenic mice [J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2007, 23(3): 225-231

[13] 朱斌, 陈静, 秦红芳, 等. APP/PS1 双转基因老年性痴呆小鼠早期病理和认知行为变化 [J]. *广州中医药大学学报*, 2012, 29 (2) : 193-226
Zhu Bin, Chen Jing, Qin Hong-fang, et al. Early Changes of Pathology and Cognitive Behavior in APP/PS1 Transgenic Mice with Alzheimer's Disease [J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 29(2): 193-226

[14] 张琴. 可穿膜重组 TAT-tCNTF 的透膜机制及对 A β 损伤小鼠的作用机制研究[M]. 军事医学科学院, 2014
Zhang Qin. Study of Transmembrane Mechanism of Transducible TAT-tCNTF and Effect of TAT-tCNTF on Mice Injured by A β [M]. *Academy of military medical sciences*, 2014

[15] 周天, 费洪新, 田冰, 等. 通天草水提物对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆及海马 IL-1 β 和 TNF- α 水平影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, (3): 10-14
Zhou Tian, Fei Hong-xin, Tian Bing, et al. Effects of Aqueous Extract from Waternut Herb on Learning and Memory Ability and Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α of Hippocampal in APP/PS1 Double Transgenic Mice [J]. *Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, 2016, (3): 10-14

[16] 杜徽, 费洪新, 张英博, 等. 通天草水提物对阿尔茨海默病小鼠海马白介素-1 β 水平的影响[J]. *黑龙江科学*, 2015, (1): 14-15
Du Wei, Fei Hong-xin, Zhang Ying-bo, et al. Effects of aqueous extract from waternut herb on Interleukin-1 β of Hippocampal Alzheimer's disease mice[J]. *Heilong jiang Science*, 2015, (1): 14-15

[17] 李宝龙. 通天草提取物对 β -淀粉样蛋白诱导的 AD 大鼠的保护作用及分子机制研究[D]. 黑龙江中医药大学, 2012
Li Bao-long. The protective effectives of waternut herb extracts on the Alzheimer's disease (AD) induced by b-amyloid protein (AB) and the molecular mechanisms in rats [D]. *Heilongjiang University of Chinese Medicine*, 2012