

基于空间代谢组学方法研究人参治疗阿尔兹海默症大鼠的药效物质及作用机制

范宇婷^{1,2}, 刘志强^{1,2}, 邢俊鹏¹, 郑 重¹, 宋凤瑞^{1,2}, 刘 舒^{1,2}

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 长春质谱中心&吉林省中药化学与质谱重点实验室, 吉林 长春 130022;

2. 中国科学技术大学应用化学与工程学院, 安徽 合肥 230026)

摘要: 本文采用基于空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像(AFADESI-MSI)技术的空间代谢组学方法, 全面探讨了人参在分子水平上治疗阿尔兹海默症(AD)的药效物质基础及作用机制。药效学结果表明, 人参提取物可显著改善 AD 模型大鼠的脑病理损伤状态, 提高空间学习记忆能力; 代谢组学结果表明, 人参显著回调了与 AD 密切相关的 19 种生物标志物水平, 涉及精氨酸和脯氨酸代谢、嘌呤代谢、三羧酸(TCA)循环和脂肪酸代谢等 8 条代谢通路。最后, 在脑组织中检测出 7 种人参活性成分, 这些物质可能通过调节与神经炎症、神经元损伤、能量缺失以及脂肪酸异常代谢密切相关的代谢途径上游靶点发挥作用, 实现对关键代谢物水平的精确调控, 从而达到治疗 AD 的目的。利用质谱成像可以将内外源性物质的空间分布进行对应分析, 更清晰地阐释药物成分的具体作用机制。

关键词: 空间代谢组学; 质谱成像; 人参; 阿尔兹海默症(AD)

中图分类号: 0657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0723-16

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0070

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0070

Spatial Metabolomics Approach Reveals the Pharmacodynamic Substances and Mechanism of Panax ginseng in Alzheimer's Disease Mice

FAN Yu-ting^{1,2}, LIU Zhi-qiang^{1,2}, XING Jun-peng¹, ZHENG Zhong¹, SONG Feng-rui^{1,2}, LIU Shu^{1,2}

(1. National Center of Mass Spectrometry in Changchun and Jilin Province Key Laboratory of Chinese Medicine Chemistry and Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences,

Changchun 130022, China; 2. School of Applied Chemistry and Engineering, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: Panax ginseng, a venerable herb in traditional Chinese medicine, boasts a rich history of usage in the treatment of dementia, particularly in its various manifestations. However, despite its long-standing popularity and empirical evidence of effectiveness, the precise mechanisms underlying its therapeutic actions have remained elusive. Currently, research on pharmacodynamic components and mechanisms predominantly utilizes serum pharmacology and metabolomics research methods that are based on liquid chromatography-mass spectrometry technology. However, these methods are unable to capture the spatial distribution information of relevant substances, leading to a lack of

comprehensive understanding of the pharmacodynamic components and their underlying mechanisms. To bridge this gap in knowledge, a method of spatial metabolomics and air flow assisted desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging (AFADESI-MSI), was used to delve into the molecular mechanisms of Panax ginseng in treating Alzheimer's disease (AD). The pharmacodynamic results demonstrated that Panax ginseng extract can significantly improve the state of brain pathological damage and spatial learning memory ability in AD model rats. This finding highlights the potential of ginseng as a therapeutic agent in AD management. Furthermore, the metabolomics analysis revealed that Panax ginseng modulates the levels of 19 biomarkers that are intricately linked to AD. These biomarkers span across 8 key metabolic pathways, including arginine and proline metabolism, purine metabolism, the tricarboxylic acid (TCA) cycle, and fatty acid metabolism. These pathways are essential for maintaining neuronal health and function, and their dysregulation is often associated with the pathogenesis of AD. Importantly, the study identified 7 active ginseng constituents that accumulate in brain tissue. These compounds work in a holistic manner to treat AD by modulating metabolites related to neuroinflammation, neuronal damage, energy deficits, and abnormal fatty acid metabolism. The comprehensive approach suggests that Panax ginseng may offer a multifaceted therapeutic strategy for AD. The unique capabilities of mass spectrometry imaging allow to analyze the spatial distribution of both endogenous and exogenous substances in parallel. This correspondence not only provides a deeper understanding of the specific effects of drug components, but also sheds light on how these components interact with the body's endogenous metabolic networks to exert their therapeutic effects. In conclusion, the study provides new light on the mechanisms of action of Panax ginseng in treating AD and paves the way for future research and clinical applications of the ancient herb.

Key words: spatial metabolomics; mass spectrometric imaging; Panax ginseng; Alzheimer's disease (AD)

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与记忆、认知和行为障碍等相关的神经退行性疾病, 已成为老年人致死致残的主要原因之一。目前, 全世界有超过 5 000 万的老年痴呆患者, 随着人口老龄化加剧, 到 2050 年这一数字预计达到 15 200 万, 其中与 AD 相关的老年痴呆约占 80%^[1]。AD 的发病机制复杂, 目前的上市药物治疗有限, 无法延缓发病病程, 甚至还伴有毒副作用。因此, 寻找有效治疗 AD 的安全药物刻不容缓。

人参作为临床常用药物, 在治疗痴呆症状方面具有悠久的历史。神农本草经中记载, 人参具有补五脏、安精神、定魂魄、止惊悸、开心益智的功效^[2]。现代药理学研究表明^[3], 人参中的活性成分尤其是人参皂苷可显著改善 AD 症状, 缓解疾病病程, 且几乎不产生副作用。许多含人参的中药被开发用于治疗 AD, 如人参养荣汤^[4]、还脑益聪方^[5]等。但人参治疗 AD 的药效物质及作

用机制仍未完全明确, 这使人参在临床上的应用缺乏理论依据, 发展受限。

发现功能性内源性生物标志物对于理解 AD 复杂的病理过程及药物的治疗作用具有重要意义。代谢组学作为一种快速、灵敏、高通量的系统生物学研究手段, 广泛应用于研究生物系统中分子代谢物变化、发现药物的治疗性生物标志物^[6]。但这些代谢物在生物样品中的空间分布尚不明确, 而这对全面揭示药物治疗 AD 的作用机制至关重要。

质谱成像 (mass spectrometry imaging, MSI) 技术是一种很有前景的分子作图方法。与传统成像技术相比, 无需任何特异性标记和复杂的样品前处理过程, 借助质谱技术, 在进行成像的同时提供结构信息, 可实现对目标物的定性、定量和定位分析^[7]。在目前常用的质谱成像技术中, 解吸电喷雾电离质谱成像 (DESI-MSI) 适用于组织中小分子物质的成像分析, 可原位研究组织中内

源性成分及天然成分。贺玖明等^[8]基于 DESI-MSI 研制了新型常压敞开式空气动力辅助离子化(AFAI)技术,提高了远距离敞开式离子化的灵敏度和稳定性,扩展了待测样品的空间和操作灵活性,并成功应用空气动力辅助解吸电喷雾离子化质谱成像(AFADESI-MSI)技术结合代谢组学分析绘制了大鼠脑中参与多种代谢途径的数百种极性功能代谢物的图谱^[9]。基于质谱成像发展的空间代谢组学可对不同组织器官中的代谢物进行定性、定量、定位分析,突破了传统代谢组学研究中损失空间信息的瓶颈,为深入阐明疾病发病进程及药物治疗作用机制提供了新思路。

本研究将基于 AFADESI-MSI 技术的空间代谢组学方法研究人参在体内复杂的代谢机制,全面系统地理解人参治疗 AD 的药效物质基础及作用机制,为人参在 AD 治疗中的应用提供数据支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Acquity UPLC-Q-TOF MS 液相色谱-质谱联用仪:美国 Waters 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)、MassLynx V4.1 和 UNIFI 数据处理软件; AFADESI-MSI 平台:中国北京维克托科技有限公司产品,配有 MassImager 数据处理软件; Orbitrap 质谱仪:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品; Leica RM2255 型石蜡切片机、Leica EG1140 石蜡包埋机和 LEICA CM1950 冷冻切片机:德国 Leica 公司产品; Olympus BX51 光学显微镜:日本 Olympus 公司产品; NIS-ELEMENT BR 型图像分析系统:日本 NIKON 公司产品; SpectraMax i3 型酶标仪:美国 Molecular Devices 公司产品; TM-Vision 行为学实验系统:成都泰盟科技有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

人参药材:由吉林抚松参场提供,中国科学院长春应用化学研究所刘舒研究员鉴定为五加科植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)的干燥根;生理盐水:中国四川科伦药业股份有限公司产品; A β 25-35 和氨基甲酸乙酯:美国 Aladdin Reagent 公司产品;抗 β 淀粉样蛋白抗体(Anti- β -amyloid antibody)、抗 Iba1 抗体(Anti-Iba1 antibody)、抗

磷酸化 tau 蛋白抗体(Anti-p-tau antibody)、抗神经胶质纤维酸性蛋白抗体(Anti-GFAP antibody)、抗突触素抗体(Anti-synaptophysin antibody)和 HRP/DAB Decton IHC 试剂盒:美国 Abcom 抗体公司产品;大鼠 A β ELISA 试剂盒和 大鼠 tau 蛋白 ELISA 试剂盒:中国江莱生物产品;乙二胺四乙酸(EDTA)修复液:中国武汉博得士公司产品;过氧化氢:分析纯,中国北京化工厂产品;乙醇、氢氧化钠:中国西陇科学产品;乙腈、甲醇和甲酸:色谱纯,英国 Fisher Scientific 公司产品。

1.3 中药提取物制备

取适量的人参置于药材粉碎机中粉碎,过 50 目筛,加 8 倍量水浸泡 1 h,大火加热回流至沸腾,转小火继续沸腾 2 h,得到第 1 次提取液;再次加入 8 倍量水,以相同方法加热回流 2 h。随后,合并 2 次提取液,经纱布过滤得滤液,最后使用旋转蒸发器将滤液浓缩至 0.5 g 生药量/mL,备用。

1.4 AD 模型大鼠建立

SD 大鼠(200~220 g,许可证号 SCXK-liao-2020-0001):辽宁长生生物技术股份有限公司产品,动物实验遵循吉林省实验动物管理规定,并通过吉林大学动物伦理委员会批准。所有 SD 大鼠均饲养于光暗循环的标准条件下,自由进食和饮水,饲养温度(25 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(50 \pm 5)%。适应性饲养 1 周后随机分为 AD 模型组(AD)、假手术组(SO)和人参给药组(RT),每组 6 只。

β 淀粉样蛋白(A β)是 AD 神经炎斑块的主要成分,由残基 25-35(A β 25-35)构成的组装体是与速激肽或神经激肽类同源的序列,具有神经毒性^[10]。因此,本实验采用 A β 25-35 损伤海马方法建立 AD 大鼠模型。配制 2 g/L A β 25-35 水溶液,于 37 $^{\circ}$ C 摇床孵育 72 h,备用。使用 20%氨基甲酸乙酯溶液按 0.5 mL/100 g 剂量麻醉大鼠,随后将大鼠固定在脑立体定位仪上,剪开大鼠头顶皮肤,在大鼠囟门后 0.3 mm,左右各 0.2 mm 处使用颅骨钻钻孔,下针深度 0.26 mm,以 1 μ L/min 注射提前孵育好的 A β 25-35 水溶液,两边各注射 5 min,留针 5 min。最后,使用牙科水泥填补孔洞,青霉素粉末消炎,缝合。假手术组大鼠按照相同方法在海马区注射等量的生理盐水。手术后饲养 1 个月开始灌胃给药,RT 组的给药剂量按药典 2 倍量换算,每只大鼠 1.29 g 生药量/kg,SO 组大鼠灌胃等量生理盐水。

1.5 Morris 水迷宫行为学实验

在给药 4 周后,采用 Morris 水迷宫实验考察大鼠的空间学习记忆能力。

适应性实验:实验开始前 1 天,将所有大鼠面向池壁放入水中,120 s 后捞出,擦干毛发放回笼中。

定位巡航实验:在水迷宫装置(直径 120 cm 的圆形大盆)中装入适量水,水温(25±2)℃。将水盆等分为 4 个象限,在第 3 象限的中间位置放置圆形平台,平台约在水下 1~2 cm,随后,在水中加入适量黑色素使大鼠看不见平台。每只大鼠分别在 4 个象限的入水点面向池壁入水,记录大鼠在 120 s 内找到平台所需的时间,即逃避潜伏时间,大鼠在找到平台后允许其停留 20 s,每个象限之间的实验间隔 60 s。若在 120 s 内没有找到平台则将其引导至平台停留 20 s,逃避潜伏时间记为 120 s。同样的实验重复 4 天。

空间探索实验:在 Morris 水迷宫实验的第 5 天,标记平台位置,撤去平台。每只大鼠均从第 1 象限标记点入水,记录大鼠在 120 s 内的运动轨迹和经过平台有效区域的次数。

1.6 样品采集

行为学实验结束后,对所有大鼠进行最后一次大剂量给药,给药剂量为平时的 10 倍,分别在 2 h 和 5 h 后处死所有大鼠。腹主动脉取血,所得血浆于 4℃ 下以 5 000 r/min 离心 10 min,取上清液分装,-80℃ 保存,用于后续试剂盒检测和入血成分分析;断头取脑组织,对半切开,一半保存于 4%甲醛固定液中,另一半经液氮速冻,-80℃ 保存。

1.7 大鼠血清 ELISA 试剂盒检测

将分装好的血清从-80℃ 中取出,4℃ 融化,随后使用 ELISA 试剂盒检测血清中的 A β 和磷酸化 tau 蛋白(p-tau)含量。

1.8 大鼠脑组织苏木精-伊红染色和免疫组化检测

采用 4%甲醛固定液固定脑组织,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,用 Leica 全自动切片连续冠状切片,片厚 2 μ m,贴于预先防脱处理的载玻片上,于 60℃ 烤 40 min,进行苏木精-伊红(HE)和免疫组化染色,观察病理切片状态。

HE 染色方法:1)脱蜡:将脑组织切片浸入二甲苯中浸泡 10 min,更换二甲苯后再浸泡 10 min,去除切片上的石蜡;2)水化:使用梯度乙醇(100%、

95%、90%、80%)将组织从脱水状态逐渐恢复到接近其原始的水合状态,接着用自来水冲洗;3)苏木精染色:将水化后的切片放入苏木精染液中浸泡 5~20 min,用自来水冲洗 3~5 min;4)分化与返蓝:使用 1%盐酸酒精分化液分化 5~30 s 去除多余染料,自来水冲洗 1~3 min,并用弱碱性水溶液返蓝 30~60 s,自来水充分冲洗 5~10 min;5)伊红染色:充分水化后的切片直接浸入伊红染色液中;6)脱水与透明:使用梯度乙醇(90%、95%、100%)和二甲苯将切片重新脱水并变得透明;7)封片:使用中性树胶将切片封固。

免疫组化染色方法:1)脱蜡与水化:与 HE 染色方法相同,去除石蜡并恢复组织的水合状态,用 PBS 缓冲液(pH 7.4)冲洗 3 次,每次 3 min;2)阻断过氧化氢酶活性:每张切片加 1 滴过氧化氢阻断溶液,室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;3)抗原修复:Anti- β -Amyloid 1-16 antibody 采用 70%甲酸进行抗原修复;Anti-GFAP antibody 和 Anti-p-tau antibody 采用柠檬酸抗原修复液修复,抗原修复液 I 37℃ 孵育 30 min 进行二次修复;Anti-synaptophysin antibody 和 Anti-Iba1 antibody 采用 EDTA 修复液(将切片放置于 100℃ 的抗原修复液中 10 min,待切片自然冷却,使用 PBS 缓冲液反复冲洗)进行抗原修复;4)血清封闭:除去 PBS 缓冲液,每张切片加 1 滴正常非免疫动物血清,室温下孵育 30 min;5)第一抗体孵育:除去血清,每张切片加 1 滴第一抗体(Anti- β -Amyloid antibody 1: 200; Anti-GFAP antibody 1: 100; Anti-p-tau antibody 1: 100; Anti-synaptophysin antibody 1: 100; Anti-Iba1 antibody 1: 100),37℃ 孵育 60 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 3 min;6)第二抗体孵育:除去 PBS 缓冲液,每张切片加 100 μ L 辣根过氧化物酶(HRP)标记的第二抗体,室温下孵育 60 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 3 min;7)二氨基联苯胺(DAB)显色:除去 PBS 缓冲液,每张切片加 2 滴或 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 3~10 min;8)苏木精复染:用自来水冲洗切片,使用苏木精对切片进行复染,然后用自来水冲洗,返蓝;9)脱水、透明与封片:与 HE 染色方法相同,完成染色后的切片通过梯度乙醇、二甲苯脱水与透明,并使用中性树胶封片。空白对照用 PBS 缓冲液替代第一抗体,其他步骤同前。

1.9 大鼠脑组织切片的空间代谢组学分析

将经液氮速冻的脑组织取出, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 缓冻1 h左右, 使用LEICA CM1950冷冻切片在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下切片, 切片厚 $20\text{ }\mu\text{m}$, 切片位置在距离中线约2 mm处, 解冻吸附于载玻片上。将需要对比的脑组织切片放在同一玻片上, 所有玻片均保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 分析前使用氮气吹干。基于AFADESI-MSI平台进行脑组织的质谱成像分析, 正、负离子模式下, 喷雾溶剂分别采用乙腈-水溶液(8:2, V/V)和乙腈-0.1%甲酸水溶液(8:2, V/V), 流速 $6\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$, 喷雾气体为 N_2 , 喷雾电压 $\pm 7\text{ kV}$ 。喷雾探针在 x 轴方向以 $160\text{ }\mu\text{m}/\text{s}$, y 轴方向每行间隔 $200\text{ }\mu\text{m}$ 的方式连续匀速扫描样品切片, 分别获得正、负离子全扫描模式下的质谱图, 质量扫描范围分别为 $m/z\ 100\sim 1\ 000$ 和 $m/z\ 100\sim 1\ 500$ 。

所得原始数据由XCalibur软件获得并转换为.cdf格式, 接着导入MassImager软件, 在去除背景信号后获得样品表面代谢分子的二维分布图。随后, 选择相同载玻片上不同脑组织的海马区域作为感兴趣区域(ROI), 同时进行有监督的OPLS-DA多元统计学分析, 数据预处理方法为自然对数变换, 潜变量保留个数为3, 由得分图和分类预测结果显示2组样品的分离程度, 将质谱载荷图中获得的对差异具有显著贡献的离子作为潜在生物标志物, 并由HMDB、LipidMaps及在线数据库^[11]鉴定, 质荷比容差 0.01 u 。然后, 输入到MetaboAnalyst 5.0的Pathway analysis模块进行代谢通路分析。采用各生物标志物在样品表面的平均强度代表相对含量, 每个标志物的相对含量是经过对ROI绘制3次获得的, 以避免数据获得的偶然性。以上实验数据均采用GraphPad Prism 8进行统计学处理, 两组间数据采用 t 检验分析, $p < 0.05$ 被认为具有显著性差异。

1.10 大鼠脑组织中人参皂苷成分鉴定

使用超高效液相色谱-四极杆串联飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF MS)分析各组大鼠血清成分。各取1 mL AD和RT组大鼠血清, 分别加入4 mL冰甲醇, 经涡旋、振荡、离心后去除蛋白沉淀, 上清氮吹去甲醇, 检测前加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇复溶。

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC液相色谱系统, Waters ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱($1.8\text{ }\mu\text{m}\times 2.1\text{ mm}\times 50\text{ mm}$); 流动相A为乙腈, B为

0.1%甲酸水溶液; 流速 $0.3\text{ mL}/\text{min}$; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。负离子模式下梯度洗脱程序: $0\sim 5\text{ min}$ (10%~15%A), $5\sim 15\text{ min}$ (15%~20%A), $15\sim 28\text{ min}$ (20%~30%A), $28\sim 40\text{ min}$ (30%~50%A), $40\sim 41\text{ min}$ (50%~60%A), $41\sim 43\text{ min}$ (60%~100%A), $43\sim 44\text{ min}$ (100%~10%A), $44\sim 45\text{ min}$ (10%A)。

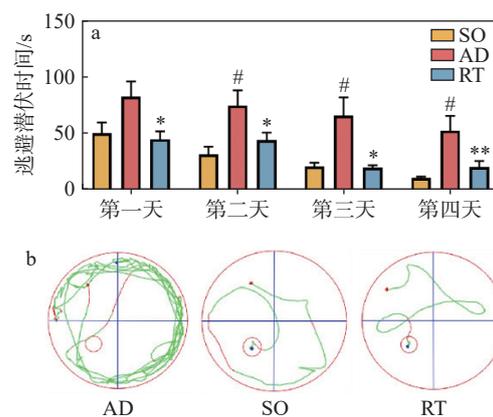
质谱条件: Q-TOF-SYNAPT-G2 HDMS质谱仪, ESI源, 质量扫描范围 $m/z\ 50\sim 1\ 500$, 去溶剂气(N_2)温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气流速 $500\text{ L}/\text{h}$, 锥孔电压 40 V , 锥孔气流速 $50\text{ L}/\text{h}$, 以He作为碰撞气进行 MS^E 分析, 使用甲酸钠溶液建立质量标准曲线, 亮氨酸脑啡肽(LE)实时校正。

基于质谱数据库(PubMed和Chemspider)建立人参皂苷数据库, 导入UNIFI数据分析软件, 数据库包括化合物名称、分子式、结构式和碎片离子信息。以AD大鼠血清为空白参比, 将血清检测结果文件导入UNIFI进行入血成分鉴定。进一步根据入血成分的精确分子质量在质谱成像结果中查找人参皂苷入脑成分。

2 结果与讨论

2.1 行为学实验结果

定位巡航实验中, 各组大鼠在规定时间内逃避潜伏时间和运动轨迹图示于图1。第1天, AD组大鼠多数在120 s内找不到平台, 逃避潜伏时间较其他组大鼠更长。经过学习后, 在第2、3、4天, 各组大鼠的逃避潜伏时间均逐渐缩



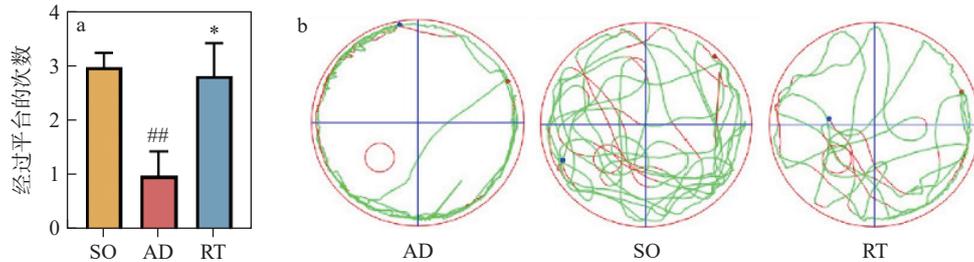
注: 与SO组相比, # $p < 0.05$; 与AD相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

图1 定位巡航实验各组大鼠的逃避潜伏时间(a)和运动轨迹图(b)

Fig. 1 Evasion latency time (a) and movement trajectory (b) of rats in each group traversing the platform area in the place navigation test

短,但与AD组相比发现,SO组和RT组大鼠始终表现出更短的逃避潜伏时间。从运动轨迹上看,AD组大鼠一直在水池周围进行无规则运动,且环绕时间更长,没有出现在平台所在象限长时间停留的情况,而SO组和RT组大鼠在入水环绕一周后能立即找到平台。定位巡航实验

结束后,撤去平台,记录大鼠在120 s内经过平台有效区域的次数,结果示于图2。AD组大鼠经过平台的次数明显少于SO组和RT组,且大鼠在四周进行无规则运动;经人参治疗的大鼠则在平台所在象限密集运动,表明人参能够显著改善AD大鼠的空间学习记忆能力。



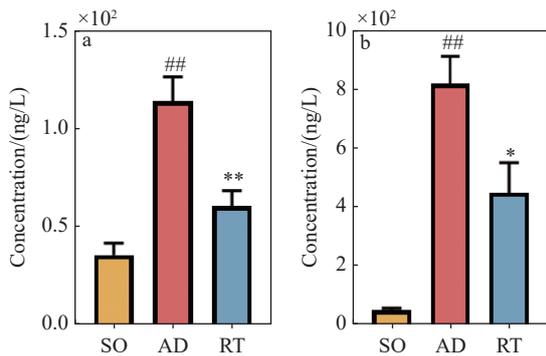
注:与SO组相比,## $p < 0.01$;与AD相比,* $p < 0.05$

图2 空间探索实验各组大鼠经过平台区域的次数(a)和运动轨迹(b)

Fig. 2 Times (a) and movement trajectory (b) of rats in each group traversing the platform area in the space exploration test

2.2 大鼠血清 ELISA 试剂盒结果

对各组大鼠血清中的A β 和p-tau含量进行检测,结果示于图3。AD组大鼠血清中p-tau浓度较高,RT组大鼠血清中的p-tau浓度与SO组趋势相同,均较AD组显著降低。此外,A β 浓度在AD大鼠血清中明显增高,经药物治疗后得到缓解。



注:与SO相比,## $p < 0.01$;与AD相比,* $p < 0.05$,** $p < 0.05$

图3 ELISA试剂盒结果得到的大鼠血清中A β (a)和p-tau(b)蛋白浓度

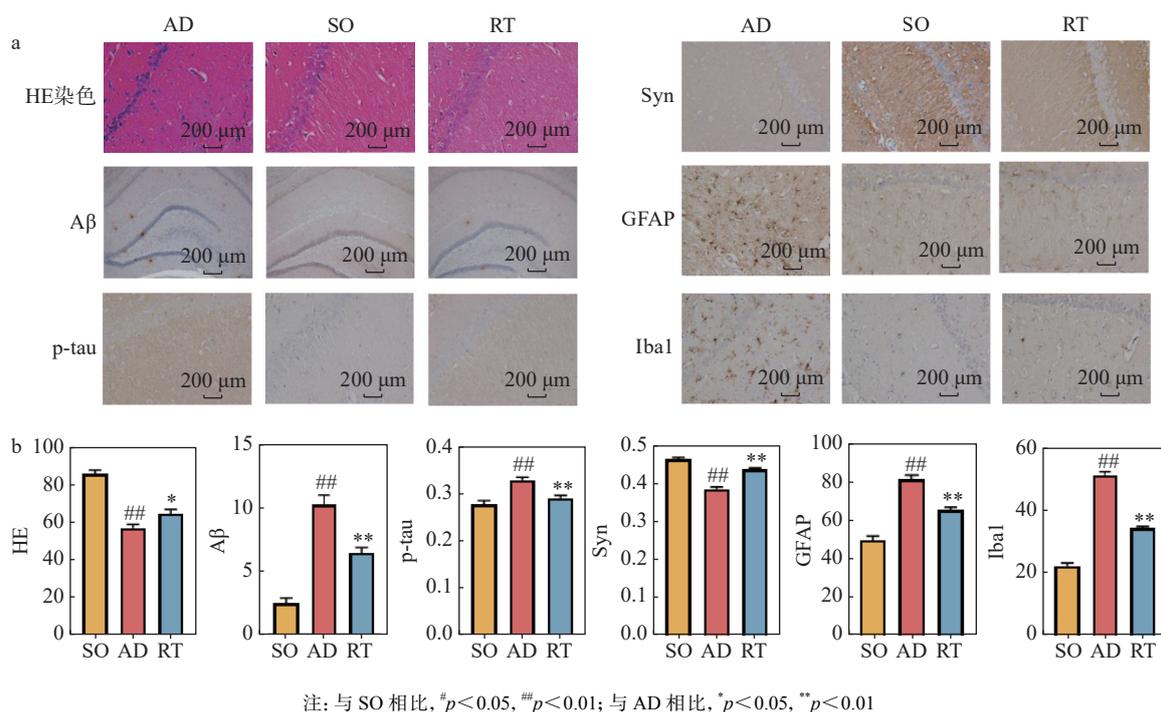
Fig. 3 Concentrations of A β (a) and p-tau (b) protein in rat serum as shown by ELISA kit results

2.3 大鼠脑组织病理学检查结果

大鼠脑组织病理切片染色图示于图4。对脑组织切片进行HE染色后,观察大鼠脑海马区神

经细胞损伤状态。SO组大鼠海马CA1区的细胞排列较规整,细胞核清晰,呈圆形或椭圆形,细胞层数较多,整体细胞分布不分散,具有极性分布,且细胞轴突密集分布,轴突较长。AD组大鼠海马CA1区的细胞排列紊乱,细胞分散,细胞层内细胞极性消失,细胞层数显著减少,有的仅有1层,细胞总量明显减少,细胞核仁不清楚,有多个细胞出现核固缩的现象,细胞轴突缩短,且散乱分布。经治疗后,海马CA1区神经细胞状态倾向正常。

对大鼠脑组织进行免疫组化检测,考察与AD密切相关的生化指标变化。A β 斑块在镜下呈黄色颗粒状分布,分布区域为皮层和海马。SO组大鼠在海马区内少见A β 斑块沉积,而AD组脑组织中A β 阳性物分布较多,染色较深。可见,人参对减少A β 阳性物质沉积的作用较明显。大鼠海马区p-tau的检测结果显示了大鼠的病理改变。AD组大鼠的p-tau表达明显高于另外2组,RT组这种病理趋势明显回调。血浆胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是星形胶质细胞损伤的标志物,GFAP水平升高是AD和其他神经退行性疾病病理生理学的核心特征^[12]。本实验检测发现,AD组大鼠的GFAP阳性细胞水平明显高于SO组和RT组,人参提取物显著降低了GFAP水平,缓解了星形胶质细胞损伤情况。小胶质细



注: 与 SO 相比, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$; 与 AD 相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

图 4 大鼠脑组织病理切片染色图(a)和海马区神经细胞数量、Aβ 阳性细胞数量、p-tau 光密度、Syn 光密度、GFAP 阳性细胞数量、Iba1 阳性细胞数量(b)

Fig. 4 Staining maps of histopathological sections of rat brain (a) and number of neuronal cells in hippocampus, number of Aβ-positive cells, p-tau optical density, Syn optical density, number of GFAP-positive cells, number of Iba1-positive cells (b)

胞是中枢神经系统的常驻髓系细胞,对大脑的发育和稳态至关重要。离子钙结合接头分子 1 (Iba1)是经典的髓系细胞标志物,在 AD 患者脑内 Iba1 阳性表达增加^[13],这一现象在本实验得到验证。由图 4a 可见, Iba1 的阳性细胞呈深棕黄色,短小分支状,AD 大鼠海马区的 Iba1 阳性表达显著增加,且细胞足突较长,细胞呈 1~4 个分支状足突。经人参提取物治疗后,小胶质细胞分布和激活的数量显著下降。神经突触可塑性是神经系统中重要的生命现象,与信息传递和加工、学习、记忆等生理和病理过程密切相关。研究表明^[14], Aβ 会影响突触小泡的运输,引起突触素(Syn)密度下降,进而破坏神经突触的可塑性,引发一系列的 AD 症状。在本实验中,与 SO 组相比,AD 组大鼠的 Syn 水平明显下降,神经突触可塑性被破坏。经人参治疗后,AD 大鼠海马区的 Syn 水平显著升高。

2.4 AFADESI-MSI 可视化代谢物空间分布

以 AFADESI-MSI 负离子模式下的脑组织为例,展示了代谢物在组织微区内的特异性分布,示于图 5。柠檬酸(Citric acid, m/z 192.027 0)在小脑、

海马区、大脑皮层和纹状体强度较高;花生四烯酸(AA, m/z 303.233 0)在全脑范围内广泛分布;二十二碳六烯酸(DHA, m/z 328.240 2)在小脑区域内较丰富;腺嘌呤核糖核苷酸(AMP, m/z 347.063 1)主要分布在大脑皮层。

2.5 差异内源性标志物分析

为揭示人参提取物对 AD 代谢轮廓的影响,选择与 AD 发病密切相关的海马区作为目标区域,利用 MassImager 软件进行基于图像素点的多元统计学分析,以获得差异性内源标志物,结果示于图 6。得分图和分类预测图结果表明,AD 组和 SO 组可明显分离;质谱载荷图显示了对差异具有贡献的离子质谱图,将质谱载荷图中的离子数据导出,获得包含 m/z 和载荷信息的二维矩阵数列。使用 t 检验统计各离子在海马区域的平均强度,选择 $p < 0.05$ 的 23 种物质作为 AD 的潜在生物标志物,并根据精准质量数及脑内源性物质数据库鉴定^[11]。随后,利用 t 检验考察生物标志物在 RT 组和 AD 组大鼠海马区的平均强度差异,确定人参提取物对其中 19 个标志物具有显著回调作用。代谢物鉴定结果及变化趋势列

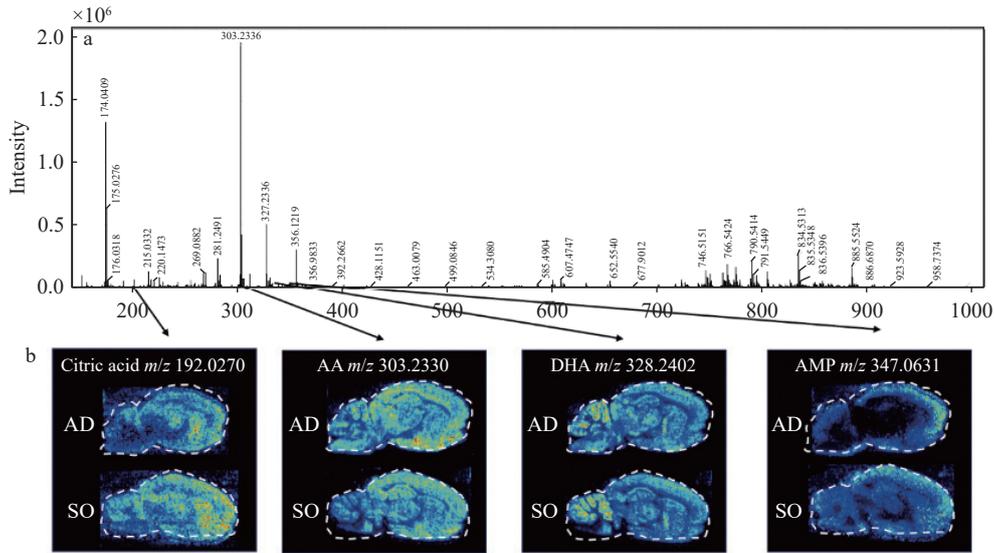


图5 负离子模式下,大鼠海马区的质谱图(a)及代表性代谢物在整个脑区的空间分布(b)
Fig. 5 Mass spectrum of the rat hippocampus (a) and the spatial distribution of representative metabolites throughout the brain region (b) under negative ion mode

于表1,代谢物在海马区的相对强度示于图7。

2.6 代谢通路分析

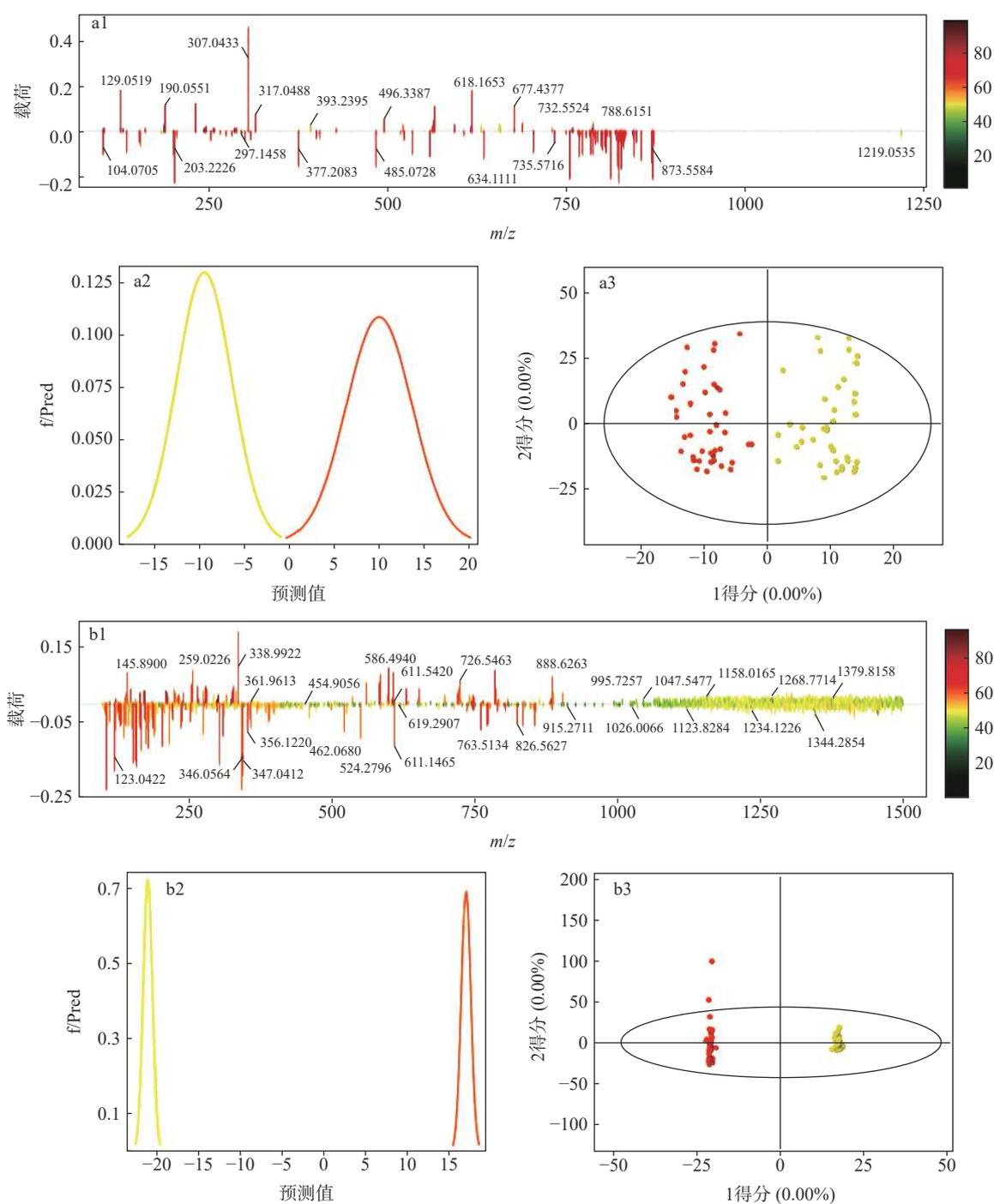
代谢通路分析结果表明,以上生物标志物共涉及8条代谢通路,包括精氨酸和脯氨酸代谢、天冬氨酸和谷氨酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢、脂肪酸代谢、甘氨酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、谷胱甘肽代谢和三羧酸循环,示于图8。

在精氨酸和脯氨酸代谢通路中,AD组大鼠脑海马区的肌酸、肌酸酐和精胺(spermine)含量较SO组显著上升,经给药治疗后,各组指标均显著回调。天冬氨酸(Asp)和谷氨酸(Glu)均是兴奋性神经递质,在AD组中,Asp和Glu的下游产物N-乙酰-L天冬氨酸(N-Acetyl-L-aspartic acid, NAA)和 γ -氨基丁酸(GABA)的含量发生改变,表明AD大鼠的天冬氨酸和谷氨酸代谢途径发生紊乱,人参可显著提升GABA和NAA的水平。三羧酸(TCA)循环是能量来源的主要途径,AD组中参与TCA循环的柠檬酸显著减少,表明AD大鼠的能量供应明显不足,在RT组中得到明显缓解。甘氨酸(Gly)作为一种抑制性神经递质,在脑组织的正常生理活动中发挥重要作用,本研究AD组中Gly相关代谢发生严重改变,RT组对Gly的代谢物胆碱有显著回调作用。在人体内,嘌呤主要以嘌呤核苷的形式存在,它们对机体能量供应、代谢调节和辅酶组成等有重要作用^[15]。与SO组大鼠相比,AD组大鼠的肌

苷、黄嘌呤、腺嘌呤核糖核苷酸(AMP)和肌苷酸(IMP)水平发生代谢紊乱,经药物治疗后,黄嘌呤、AMP和IMP水平显著回调。在嘧啶代谢中,AD组大鼠尿苷水平显著升高,经治疗后,尿苷水平趋于正常。在AD组大鼠脑组织中脂肪酸代谢出现异常,主要涉及肉碱(Carnitine)、花生四烯酸(AA)、二十二碳六烯酸(DHA)、磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰胆碱(PC)的改变,人参对肉碱、PE和PC水平有显著改善作用。

2.6.1 与神经炎症有关的调节 19种生物标志物的空间分布图示于图9。以精胺为代表的多胺是生物体内普遍存在的有机阳离子,可能与神经元变性中神经元和神经胶质细胞的串扰有关。神经元合成多胺,而神经胶质细胞会积累多胺,因此,多胺代谢的变化引起神经元和胶质细胞功能失衡,进而引起神经炎症及神经元的退行性改变。由图9可见,精胺浓度在AD组中增大,尤以小脑和海马为甚。有研究表明^[16],AD患者中带负电荷的磷酸化tau蛋白使其与正电荷的多胺亲和力增加,导致多胺聚集。在本研究中得到证实,海马区域精胺增多伴随tau蛋白磷酸化。此外,精胺在小脑、海马等区域的空间变化特征与文献报道^[17]一致。

2.6.2 与神经元损伤有关的调节 大脑的正常生理活动依赖于神经递质在不同神经元或神经元与效应器之间的信号传递,神经递质的失衡可



注: a. 正离子模式; b. 负离子模式

图6 对海马区质谱数据进行OPLS-DA分析获得的质谱载荷图(a1, b1)、分类预测图(a2, b2)和得分图(a3, b3)
Fig. 6 Mass loading plots (a1, b1), classification plots (a2, b2) and scores plots (a3, b3) obtained from OPLS-DA analysis of hippocampal mass spectrometry data

能会导致各种神经系统疾病,如AD。Glu和Asp是神经系统中主要的兴奋性神经递质,通过与突触后受体结合使神经元细胞膜两侧的电位差减少,发生膜去极化,从而产生兴奋性突触后电位。相反,抑制性神经递质GABA、Gly等则

主要抑制动作电位的产生,2种神经递质相互作用从而保证中枢神经系统的正常运转。AD发病的一种重要机制是由神经递质失衡导致的兴奋性毒性^[18]。本研究发现,AD大鼠脑内GABA和胆碱水平下降,表明AD大鼠缺少抑制性神经递

表1 生物标志物鉴定结果及变化趋势表
Table 1 Identification results and trends of biomarker

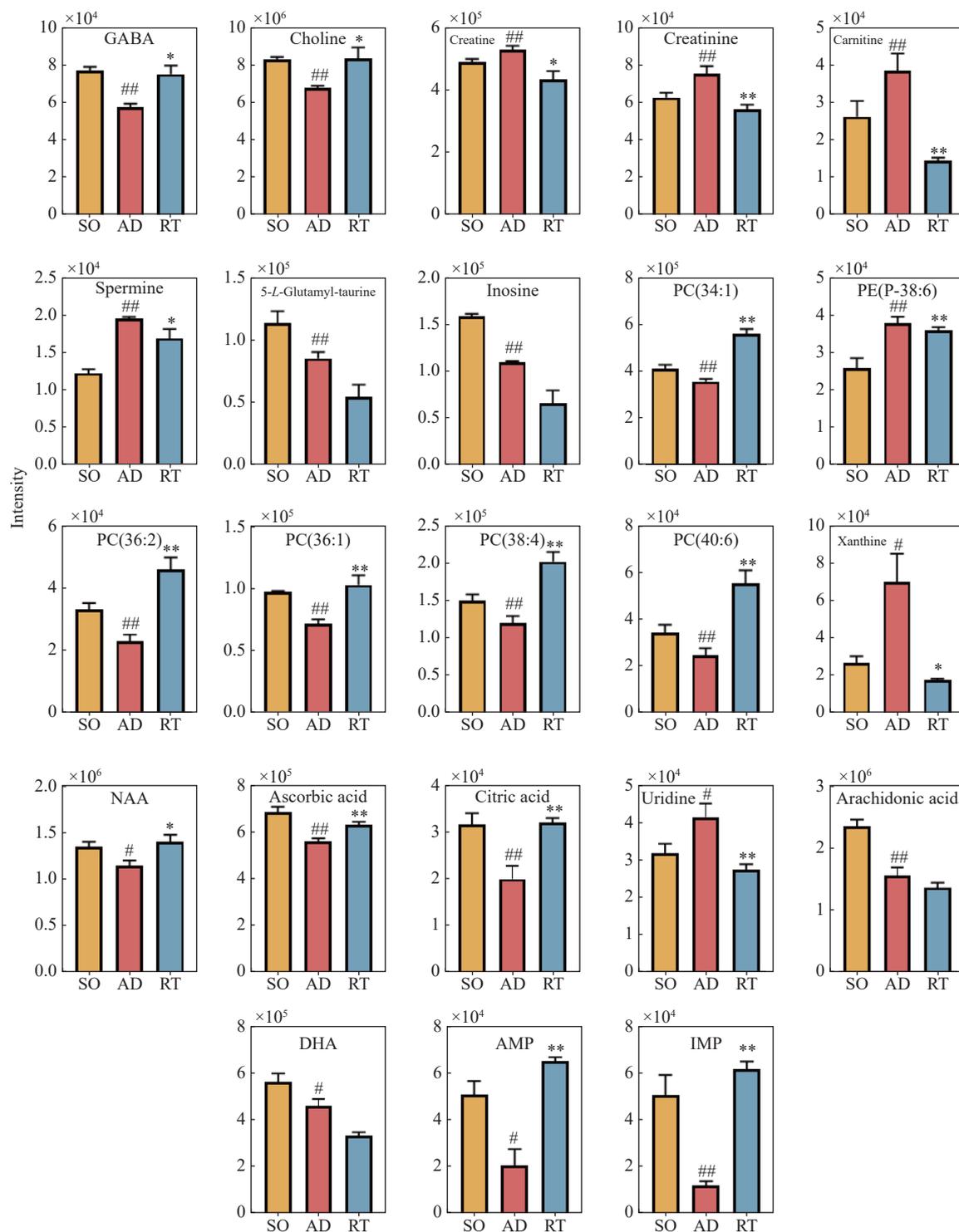
离子模式 Ion mode	代谢物 Metabolite	分子式 Molecular formula	加和离子 Additive ion	测量值 Measured value (<i>m/z</i>)	变化趋势Variation trend	
					AD	RT
ESI ⁺	γ-氨基丁酸	C ₄ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	104.0706	↓ ^{##}	↑*
	胆碱	C ₅ H ₁₄ NO	[M+H] ⁺	104.1069	↓ ^{##}	↑*
	肌酸	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	[M+H] ⁺	132.0767	↑ ^{##}	↓*
	肌酸酐	C ₄ H ₇ N ₃ O	[M+Na] ⁺	136.0481	↑ ^{##}	↓**
	肉碱	C ₇ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	162.1125	↑ ^{##}	↓**
	精胺	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	[M+H] ⁺	203.2230	↑ ^{##}	↓*
	5-L-谷氨酰牛磺酸	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₆ S	[M+H] ⁺	255.0631	↓ ^{##}	—
	肌酐	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₃	[M+Na] ⁺	307.0440	↓ ^{##}	—
	磷脂酰胆碱(34:1)	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	[M+H] ⁺	760.5854	↓ ^{##}	↑**
	磷脂酰乙醇胺(P-38:6)	C ₄₃ H ₇₄ NO ₇ P	[M+Na] ⁺	770.5107	↑ ^{##}	↓**
	磷脂酰胆碱(36:2)	C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	786.6016	↓ ^{##}	↑**
	磷脂酰胆碱(36:1)	C ₄₄ H ₈₆ NO ₈ P	[M+H] ⁺	788.6167	↓ ^{##}	↑**
	磷脂酰胆碱(38:4)	C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	810.6004	↓ ^{##}	↑**
	磷脂酰胆碱(40:6)	C ₄₈ H ₈₄ NO ₈ P	[M+H] ⁺	834.5974	↓ ^{##}	↑**
	ESI ⁻	黄嘌呤	C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	[M-H] ⁻	152.0334	↑ [#]
N-乙酰-L天冬氨酸		C ₆ H ₉ NO ₅	[M-H] ⁻	175.0481	↓ [#]	↑*
抗坏血酸		C ₆ H ₈ O ₆	[M-H] ⁻	176.0321	↓ ^{##}	↑**
柠檬酸		C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	192.0270	↓ ^{##}	↑**
尿苷e		C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	[M-H] ⁻	244.0695	↑ [#]	↓**
花生四烯酸		C ₂₀ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	304.2402	↓ [#]	—
二十二碳六烯酸		C ₂₂ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	328.2402	↓ ^{##}	—
腺嘌呤核糖核苷酸		C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	[M-H] ⁻	347.0631	↓ [#]	↑**
肌苷酸		C ₁₀ H ₁₃ N ₄ O ₈ P	[M-H] ⁻	348.0471	↓ ^{##}	↑**

注:与SO相比,[#]*p*<0.05,^{##}*p*<0.01;与AD相比,^{*}*p*<0.05,^{**}*p*<0.01

质的调节,从而引发兴奋性毒性的神经元死亡。脑组织成像结果表明,GABA主要分布于中脑、下丘脑和纹状体,胆碱则富集在小脑、胼胝体、下丘脑和纹状体区域。经治疗后,脑微区的GABA和胆碱水平均显著提升。

NAA是哺乳动物中枢神经系统中第二丰富的游离氨基酸衍生物,由于NAA几乎只存在于神经元中,因此其减少被认为反映了神经元疾病中的神经元损伤和死亡^[19]。由图9可见,NAA广泛存在于大脑各个微区,AB₂₅₋₃₅诱导的AD大脑海马区中的NAA水平显著下降,脑神经元可能受到严重损伤,经人参治疗后得到明显缓解。以上结果结合病理学结果表明,人参可以通过对关键代谢物的调节实现保护神经元的作用,从而治疗AD相关症状。

2.6.3 与能量代谢有关的调节 肌酸和磷酸肌酸是哺乳动物大脑中的重要化合物,二者通过肌酸激酶相互转化,储存利用磷酸盐,从而维持大脑能量稳态^[20]。肌酐是肌酸的代谢产物,主要经血液由尿排出。研究表明^[21],AD患者脑内的Aβ会诱导脂质过氧化,从而产生烯醛。烯醛通过迈克尔加成使肌酸激酶构象改变,进而影响其正常功能。此外,脑屏障(包括血脑屏障和血脑脊液屏障)对胍基化合物的异常转运也会影响神经系统的正常功能,例如癫痫^[22]。胍基化合物积累导致的神经元异常放电可能是最有影响力的因素。本实验中,AD组大鼠脑中的肌酸和肌酐增多,特别是海马区域,表明大脑能量稳态遭到破坏,脑屏障通透性发生改变导致神经毒性物质积累可能是导致神经系统病变的重要因素。经给



注：与 SO 相比，# $p < 0.05$ ，## $p < 0.01$ ；与 AD 相比，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$

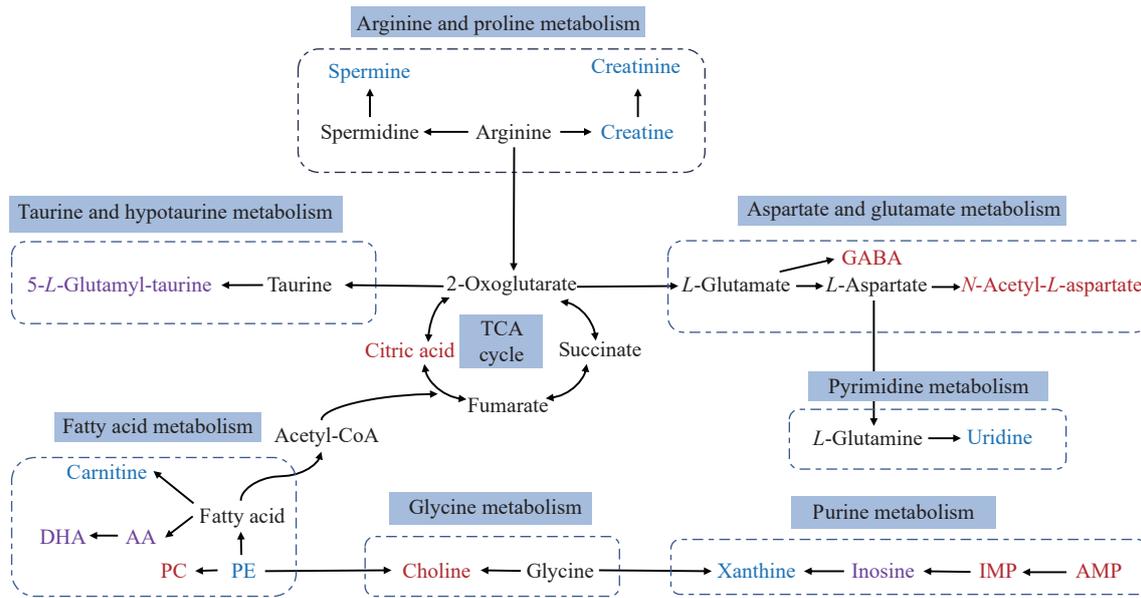
图 7 23 种生物标志物在海马区的相对强度

Fig. 7 Relative intensity of 23 biomarkers in the hippocampus

药治疗后，异常升高的肌酸和肌酐水平显著回调，能量损伤状态得到改善。

线粒体功能障碍是 AD 发生的一种重要机制^[23]。AD 患者脑内能量供应不足改变了神经系

统应对不良环境的能力，引起各种神经毒性物质的积累。此外，神经毒性肽 A β 在线粒体中积累，并对线粒体功能产生有害影响，包括能量衰竭、呼吸链损伤和活性氧产生等^[24]。相反，星形



注: 红色代表在 RT 组中上调的代谢物; 蓝色代表在 RT 组中下调的代谢物; 紫色代表在 RT 组中无明显变化的代谢物

图 8 23 种生物标志物的代谢通路图

Fig. 8 Metabolic pathway maps of 23 biomarkers

胶质细胞的能量代谢紊乱会加剧 A β 积累, 引发更严重的神经毒性^[25]。TCA 循环是线粒体内能量代谢的主要方式, 同时也是各种能源物质的转换中介, 对大脑功能至关重要。柠檬酸是 TCA 循环的中间产物, 主要分布在小脑、大脑皮层、海马和纹状体中。对大鼠脑内的柠檬酸进行成像, 观察到 AD 组大鼠的柠檬酸水平在各脑区均显著下调。经治疗后, 海马区和纹状体内的柠檬酸含量得到显著提升, 表明人参可通过调节 TCA 代谢通路异常从而维持脑内能量稳态。

Kambe 等^[26]发现黄嘌呤可直接影响神经元细胞, 诱导血红蛋白基因的表达, 进而引发海马依赖性空间认知缺陷和焦虑样症状。本实验发现, AD 大鼠海马区黄嘌呤水平升高, 这可能是海马损伤的标志之一; AMP 和 IMP 水平在整个大脑中心部分下降, 这可能会引起大脑能量供应不足。人参可显著降低海马区域的黄嘌呤含量, 并提升海马区域的 AMP 和 IMP 水平, 通过调节能量转换关键代谢物, 缓解 AD 异常能量供应情况。

2.6.4 与脂肪酸代谢有关的调节 磷脂是生物膜的主要成分, 在神经系统中最丰富, 对大脑的成熟和功能发挥重要作用^[27]。有研究发现^[28], AD 患者中的磷脂酰乙醇胺-N-甲基转移酶 (PEMT) 活性升高, 由此导致与 PEMT 相关的代谢产物变化, 即 PC 水平下降, PE 水平升高, 这在

本研究中得到证实。肉碱主要通过介导脂肪酸的运输和代谢, 在细胞能量分配中具有重要作用^[29]。长链脂肪酸经肉碱运输到线粒体内膜进行 β -氧化提供能量, 生成的乙酰-CoA 可参与 TCA 循环。因此, AD 大鼠中肉碱的积累不仅反映了脂肪酸代谢和 TCA 代谢的紊乱, 也可能与线粒体功能障碍有关。由图 9 可知, 人参提取物对脂肪酸异常代谢物均有显著回调作用, 特别是海马区域, 表明人参可作用于脂质代谢通路, 调控与脂质相关的神经系统功能, 缓解 AD 症状。

2.7 人参治疗阿尔兹海默症的药效物质

各组大鼠血清的质谱总离子流图示于图 10, 经 UNIFI 软件鉴定后的入血成分列于表 2。根据精准分子质量, 利用 MassImager 软件在 RT 组的脑组织中查找人参活性成分, 共有 7 种人参皂苷进入大鼠脑内, 示于图 11。值得注意的是, 这 7 种人参皂苷在脑内的分布具有区域特异性。人参皂苷 Rg₅/Rg₆ 在脑组织中广泛分布, 这可能与广泛的生物活性有关; 西洋参皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rb₁ 呈零散的分布模式; 人参皂苷 Rg₂ 在脑内含量较少, 零星分布在整个脑组织中; 人参皂苷 F₅ 含量较多, 并富集在海马、大脑皮层、纹状体、中脑、下丘脑和小脑附近; 给药人参后, 精胺、柠檬酸、IMP 和 AMP 的脑内分布与人参皂苷 F₅ 相似, 表明人参皂苷 F₅ 可能对神经炎症和

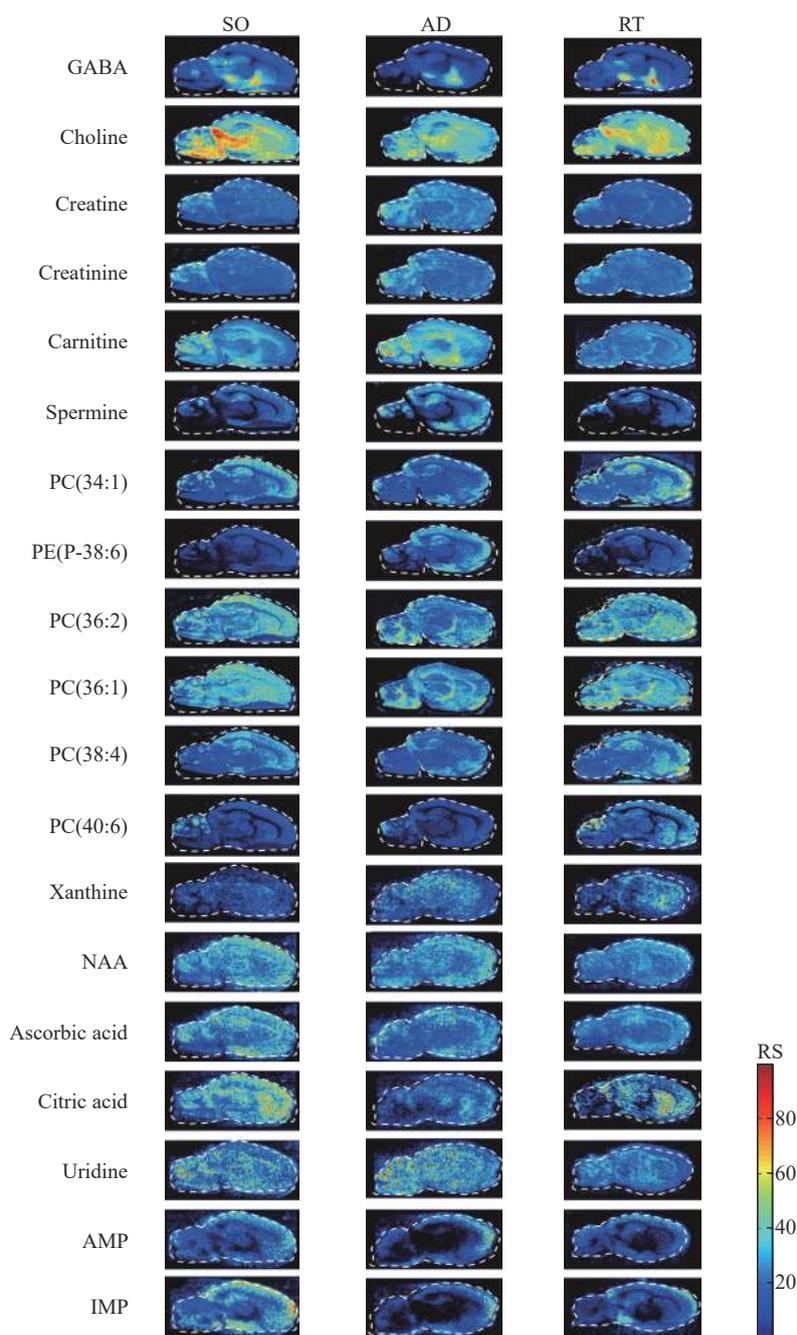
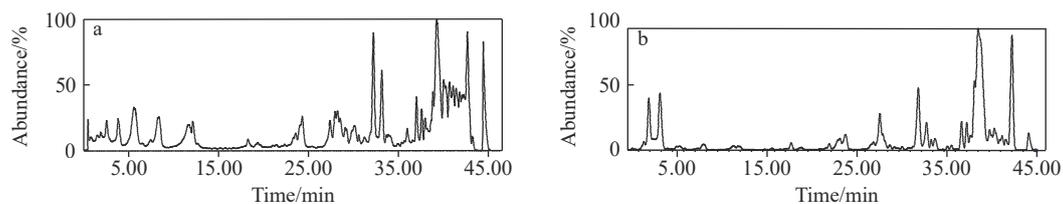


图 9 19 种生物标志物的空间分布图

Fig. 9 Spatial distribution of 19 biomarkers



注：a. 给药 2 h 血清样品；b. AD 模型大鼠血清样品

图 10 负离子模式下的大鼠入血成分分析图

Fig. 10 Blood component analysis chart of rats under negative ion mode

表2 人参皂苷质谱信息及入血成分

Table 2 Mass spectrometry information and blood entry composition of ginsenoside

序号 No.	保留时间 Retention time/min	分子式 Molecular formula	中性分子质量 Neutral mass/u	实测值 Measured value (m/z)	相对误差 Relative error/ $\times 10^{-6}$	鉴定结果 Identification result
1	19.11	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	932.5344	977.5342	1.6	三七皂苷R ₁
2	27.14	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	766.4867	811.4835	-1.4	(20E)-人参皂苷F ₄
3	27.17	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	766.4867	811.4878	2.8	人参皂苷Rg ₆
4	27.39	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	1194.6033	1239.6081	6.5	丙二酰-人参皂苷Rb ₁
5	27.69	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784.4972	783.4898	-0.2	人参皂苷Rg ₂
6	28.00	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	770.4816	769.4778	3.5	人参皂苷F ₅
7	28.15	C ₅₄ H ₉₀ O ₂₄	1122.5822	1167.5845	4.1	西洋参皂苷IV
8	28.51	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	766.4867	811.4861	1.2	人参皂苷Rg ₅
9	37.47	C ₆₂ H ₁₀₄ O ₂₄	1232.6917	1231.6867	2.3	西洋参皂苷II
10	38.17	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	800.4922	845.4827	-7.7	人参皂苷Rf
11	39.34	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1032.5505	1031.5467	3.5	丙二酰-人参皂苷Rd
12	39.96	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₉	948.5293	947.5304	8.3	珠子参皂苷F ₅
13	39.97	C ₅₂ H ₈₆ O ₁₉	1014.5763	1059.5710	-3.5	西洋参皂苷I
14	40.70	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1108.6029	1153.5984	-2.8	人参皂苷Rb ₁
15	41.96	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₉	948.5293	947.5219	-0.2	越南参皂苷R ₆
16	42.14	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	916.5395	915.5309	-1.4	竹节人参皂苷III
17	44.41	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₄	1150.6135	1149.6065	0.3	西洋参皂苷R ₁

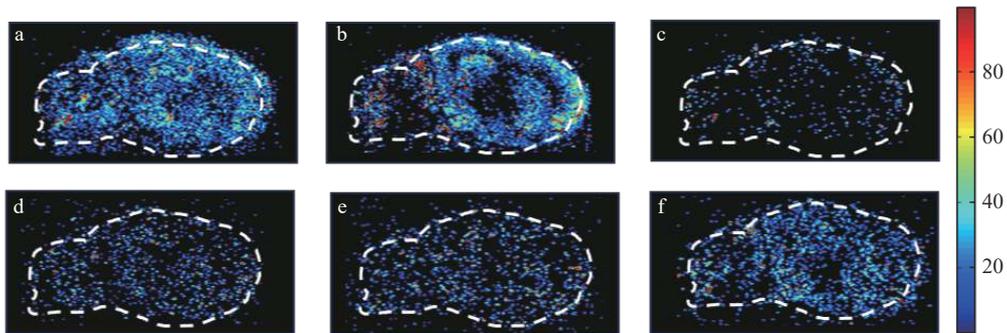
注: a. 人参皂苷 Rg₅/Rg₆; b. 人参皂苷 F₅; c. 人参皂苷 Rg₂; d. 西洋参皂苷 R₁; e. 人参皂苷 Rb₁; f. 人参皂苷 Rf

图 11 人参皂苷在大鼠脑组织中的空间分布图

Fig. 11 Spatial distribution of ginsenosides in rat brain tissues

能量代谢的调节更显著; 人参皂苷 Rf 主要分布在海马、纹状体、中脑和下丘脑等区域, 这些区域与记忆、情感和学习等高级神经功能密切相关, 可能通过调节这些脑区的功能发挥其在 AD 治疗中的潜在作用。

海马区是 AD 病理过程中受损最严重的脑区之一, 与记忆和认知功能密切相关。综上, 人参皂苷在海马区的显著富集为在治疗 AD 中的潜在应用提供了有力证据。

3 结论

本研究基于 AFADESI-MSI 技术的原位空间代谢组学方法全面阐述了人参治疗 AD 的药效物质基础及作用机制。Morris 水迷宫行为学实验结果表明, AD 大鼠模型建立成功, AD 组大鼠找到平台的逃避潜伏时间较长, 空间学习记忆能力受到破坏, 在人参给药治疗后, 大鼠能在较短时间内找到平台, 学习记忆能力得到显著改善。ELISA 试剂盒、HE 染色和免疫组化结果表明, 人参可以促进

海马区神经细胞再生、缓解 A β 蛋白沉积和 tau 蛋白磷酸化、增强突触再生能力以及抑制星形胶质细胞和小胶质细胞活化带来的炎症反应。应用非靶向代谢组学研究人参在分子水平上的作用机制, 结果表明, AD 大鼠中共有 19 种生物标志物被显著回调, 涉及天冬氨酸和谷氨酸代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢、脂肪酸代谢、甘氨酸代谢、嘌呤代谢、嘧啶代谢、谷胱甘肽代谢和三羧酸循环等代谢通路。进一步分析外源性物质的空间分布, 共发现 7 种药效成分。结合内外源性物质的离子分布图可知, 人参中的人参皂苷 R_{g5}、人参皂苷 R_{g6}、人参皂苷 F₅、西洋参皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g2}、人参皂苷 R_{b1} 和人参皂苷 R_f 可调节与神经炎症、神经元损伤、能量失衡、氧化应激及脂质异常代谢相关的通路, 从而达到治疗 AD 的作用。

参考文献:

- [1] PORSTEINSSON A P, ISAACSON R S, KNOX S, SABBAGH M N, RUBINO I. Diagnosis of early Alzheimer's disease: clinical practice in 2021[J]. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 2021, 8(3): 371-386.
- [2] 杜正彩, 胡润华, 李瑞林, 郝二伟, 侯小涛, 邓家刚. 治疗阿尔茨海默病中药化学成分及机制的研究概况[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(5): 236-245.
DU Zhengcai, HU Runhua, LI Ruilin, HAO Erwei, HOU Xiaotao, DENG Jiagang. Chemical components of traditional chinese medicine in treating Alzheimer's disease and its mechanism: a review[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2024, 30(5): 236-245(in Chinese).
- [3] KIM H J, JUNG S W, KIM S Y, CHO I H, KIM H C, RHIM H, KIM M, NAH S Y. Panax ginseng as an adjuvant treatment for Alzheimer's disease[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2018, 42(4): 401-411.
- [4] 吕馨, 蒋蒙蒙, 朱梦姚, 袁海阳, 郭自贺, 王伟, 贡岳松. 人参养荣汤改善阿尔兹海默症小鼠学习记忆损伤的作用[J]. *中成药*, 2022, 44(12): 3 823-3 829.
LYU Xin, JIANG Mengmeng, ZHU Mengyao, YUAN Haiyang, GUO Zihe, WANG Yi, GONG Yuesong. Effects of Renshen Yangrong Decoction on learning and memory impairment in Alzheimer's disease mouse model[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2022, 44(12): 3 823-3 829(in Chinese).
- [5] YANG Y, LIU J P, FANG J Y, WANG H C, WEI Y, CAO Y, LIU J G, LIU L T, LI H. Effect and safety of Huannaoyi formula in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: a randomized, double-blinded, donepezil-controlled trial[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2019, 25(8): 574-581.
- [6] WEI M, LIU Z, LIU Y, LI S, HU M, YUE K, LIU T, HE Y, PI Z, LIU Z, SONG F. Urinary and plasmatic metabolomics strategy to explore the holistic mechanism of lignans in *S. chinensis* in treating Alzheimer's disease using UPLC-Q-TOF-MS[J]. *Food & Function*, 2019, 10(9): 5 656-5 668.
- [7] AHLF WHEATCRAFT D R, LIU X, HUMMON A B. Sample preparation strategies for mass spectrometry imaging of 3D cell culture models[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2014(94): e52313.
- [8] HE J, TANG F, LUO Z, CHEN Y, XU J, ZHANG R, WANG X, ABLIZ Z. Air flow assisted ionization for remote sampling of ambient mass spectrometry and its application[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25(7): 843-850.
- [9] PANG X, GAO S, GA M, ZHANG J, LUO Z, CHEN Y, ZHANG R, HE J, ABLIZ Z. Mapping metabolic networks in the brain by ambient mass spectrometry imaging and metabolomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(17): 6 746-6 754.
- [10] BOND J P, DEVERIN S P, INOUE H, EL-AGNAF O M A, TEETER M M, KIRSCHNER D A. Assemblies of Alzheimer's peptides A β 25-35 and A β 31-35: reverse-turn conformation and side-chain interactions revealed by X-ray diffraction[J]. *Journal of Structural Biology*, 2003, 141(2): 156-170.
- [11] ZHU Y, ZANG Q, LUO Z, HE J, ZHANG R, ABLIZ Z. An organ-specific metabolite annotation approach for ambient mass spectrometry imaging reveals spatial metabolic alterations of a whole mouse body[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(20): 7 286-7 294.
- [12] CHIOTIS K, JOHANSSON C, RODRIGUEZ-VIEITEZ E, ASHTON N J, BLENNOW K, ZETTERBERG H, GRAFF C, NORDBERG A. Tracking reactive astrogliosis in autosomal dominant and sporadic Alzheimer's disease with multi-modal PET and plasma GFAP[J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2023, 18(1): 60.
- [13] KENKHUIS B, SOMARAKIS A, KLEINDOUWEL L R T, van ROON-MOM W M C, HÖLLT T, van der WEERD L. Co-expression patterns of microglia markers Iba1, TMEM119 and P2RY12 in Alzheimer's disease[J]. *Neurobiology of Disease*, 2022, 167: 105 684.

- [14] JOHN A, REDDY P H. Synaptic basis of Alzheimer's disease: focus on synaptic amyloid beta, p-tau and mitochondria[J]. *Ageing Research Reviews*, 2021, 65: 101-208.
- [15] HUANG Z, XIE N, ILLES P, Di VIRGILIO F, ULRICH H, SEMYANOV A, VERKHRATSKY A, SPERLAGH B, YU S G, HUANG C, TANG Y. From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1): 162.
- [16] IVANOV S M, ATANASOVA M, DIMITROV I, DOYTCHINOVA I A. Cellular polyamines condense hyperphosphorylated Tau, triggering Alzheimer's disease[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 10 098.
- [17] VEMULA P K, JING Y, CICOLINI J, ZHANG H, MOCKETT B G, ABRAHAM W C, LIU P. Altered brain arginine metabolism with age in the APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neurochemistry International*, 2020, 140: 104-798.
- [18] ALIJANPOUR S, MIRYOUNESI M, GHAFOURIFARD S. The role of excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) in epilepsy and other neurological disorders[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2023, 38(1): 1-16.
- [19] YAN H D, ISHIHARA K, SERIKAWA T, SASA M. Activation by *N*-acetyl-*L*-aspartate of acutely dissociated hippocampal neurons in rats via metabotropic glutamate receptors[J]. *Epilepsia*, 2003, 44(9): 1 153-1 159.
- [20] DURAN-TRIO L, FERNANDES-PIRES G, SIMICIC D, GROSSE J, ROUX-PETRONELLI C, BRUCE S J, BINZ P A, SANDI C, CUDALBU C, BRAISSANT O. A new rat model of creatine transporter deficiency reveals behavioral disorder and altered brain metabolism[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 1 636.
- [21] ALLAN BUTTERFIELD D, CASTEGNA A, LAUDERBACK C M, DRAKE J. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death[J]. *Neurobiology of Aging*, 2002, 23(5): 655-664.
- [22] GUPTA R, CHRISTIAN S, KESELMAN P, HABIGER J, BROOKS W M, HARRIS J L. Evaluation of taurine neuroprotection in aged rats with traumatic brain injury [J]. *Brain Imaging and Behavior*, 2019, 13(2): 461-471.
- [23] DEVAL M, MILL J, LUNNON K. The mitochondrial epigenome: a role in Alzheimer's disease?[J]. *Epigenomics*, 2014, 6(6): 665-675.
- [24] DU H, SHIDU YAN S. Unlocking the door to neuronal woes in Alzheimer's disease: a β and mitochondrial permeability transition pore[J]. *Pharmaceuticals*, 2010, 3(6): 1 936-1 948.
- [25] FU W, SHI D, WESTAWAY D, JHAMANDAS J H. Bioenergetic mechanisms in astrocytes may contribute to amyloid plaque deposition and toxicity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(20): 12 504-12 513.
- [26] KAMBE J, MIYATA S, LI C, YAMAMOTO Y, NAGAOKA K. Xanthine-induced deficits in hippocampal behavior and abnormal expression of hemoglobin genes[J]. *Behavioural Brain Research*, 2023, 449: 114 476.
- [27] SCHVERER M, O'MAHONY S M, O'RIORDAN K J, DONOSO F, ROY B L, STANTON C, DINAN T G, SCHELLEKENS H, CRYAN J F. Dietary phospholipids: Role in cognitive processes across the lifespan[J]. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 2020, 111: 183-193.
- [28] GUAN Z. Activity of phosphatidylethanolamine-*N*-methyltransferase in brain affected by Alzheimer's disease[J]. *Neurochemistry International*, 1999, 34(1): 41-47.
- [29] CRISTOFANO A, SAPERE N, La MARCA G, ANGIOLILLO A, VITALE M, CORBI G, SCAPAGNINI G, INTRIERI M, RUSSO C, CORSO G, Di COSTANZO A. Serum levels of acyl-carnitines along the continuum from normal to Alzheimer's dementia[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155694.

(收稿日期: 2024-05-09; 修回日期: 2024-09-09)