

## 补骨脂改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的尿液代谢组学研究

乔月<sup>1</sup>, 薛傲<sup>1</sup>, 张悦<sup>1</sup>, 徐红丹<sup>2</sup>, 李光<sup>3</sup>, 赵继会<sup>4</sup>, 胡晶<sup>2</sup>, 张宁<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 无锡卫生高等职业技术学校药学院, 江苏 无锡 214028;  
3. 中国医学科学院药用植物研究所云南分所, 云南 景洪 666100; 4. 湖南医药学院药学院, 湖南 怀化 418000)

**摘要:** 运用尿液非靶代谢组学探究补骨脂改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的作用机制。所有动物实验均经过黑龙江中医药大学动物伦理委员会批准(批准号: 2020092502)。将 16 只 3 月龄雄性 APP/PS1 小鼠随机分为模型组和补骨脂组 (0.5 g·kg<sup>-1</sup>), 另取 8 只同背景 C57BL/6J 小鼠作为空白组, 以避暗实验和新物体识别实验为评价指标, 通过超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS) 测定各组小鼠尿液中内源性代谢物的变化, 筛选差异代谢物, 并进行代谢通路富集分析。实验结果显示, 与模型组相比, 补骨脂可明显减少 APP/PS1 小鼠的避暗潜伏期及错误次数 ( $P < 0.01$ ), 显著提高 APP/PS1 小鼠的新物体识别指数 ( $P < 0.01$ )。代谢组学分析鉴定出 15 个差异代谢物, 补骨脂能显著回调 9 个差异代谢物。代谢通路分析显示, 组氨酸代谢、柠檬酸循环、牛磺酸和次牛磺酸代谢和糖代谢途径是补骨脂发挥改善学习记忆能力作用的主要代谢途径。研究提示, 补骨脂改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力的机制可能与改善线粒体功能障碍、降低外周组胺水平、调节能量代谢紊乱及抗氧化水平等相关。

**关键词:** 补骨脂; 阿尔茨海默病; 代谢组学; 能量代谢; APP/PS1 小鼠

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-1010-07

## Urine metabolomics study of *Psoralea corylifolia* in improving learning and memory ability in APP/PS1 mice

QIAO Yue<sup>1</sup>, XUE Ao<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, XU Hong-dan<sup>2</sup>, LI Guang<sup>3</sup>, ZHAO Ji-hui<sup>4</sup>,  
HU Jing<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Department of Pharmacy, Wuxi Higher Health Vocational Technology School, Wuxi 214028, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development Yunnan Branch, Chinese Academy of Medical Sciences, Jinghong 666100, China; 4. College of Pharmacy, Hunan University of Medicine, Huaihua 418000, China)

**Abstract:** Urine nontargeted metabolomics technology was developed for investigating the effect and mechanism of improving learning and memory ability in APP/PS1 mice of *Psoralea corylifolia*. All animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Heilongjiang University of Chinese Medicine (Approval No.: 2020092502). Sixteen APP/PS1 mice were randomly divided into the model group and *Psoralea corylifolia* group (0.5 g·kg<sup>-1</sup>), and eight male C57BL/6J mice of the same background were selected as control group, step-through test and novel object recognition were used as evaluation indexes. Changes in urine endogenous metabolites of mice from each group were determined by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), and differential metabolites were screened, and metabolic

收稿日期: 2023-06-29; 修回日期: 2023-11-02.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82003975); 黑龙江省自然科学基金面上项目 (LH2020H101); 黑龙江中医药大学科研基金 (2017SEC02, 2015xy04); 无锡市卫生健康委科研项目面上项目 (M202170); 云南省王金辉专家工作站 (202105AF150057); 2022 江苏高校“青蓝”工程优秀青年骨干教师培养项目。

\*通讯作者 Tel: 18645083283, E-mail: zhangning0454@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0804

pathway enrichment analysis was performed. The results of pharmacodynamic investigation showed that *Psoralea corylifolia* can reduce the dark incubation period and number of errors in APP/PS1 mice ( $P < 0.01$ ) and improve the new object recognition index of APP/PS1 mice ( $P < 0.01$ ). Metabolomics analysis identified 15 differential metabolites, and 9 differential metabolites were significantly call back by *Psoralea corylifolia*. Metabolic pathway analysis showed that histidine metabolism, citric acid cycle, taurine and hypotaurine metabolism and glucose metabolism were the main metabolic pathways of *Psoralea corylifolia* in improving learning and memory ability. These studies suggest that *Psoralea corylifolia* improves the learning and memory ability of APP/PS1 mice, and its mechanism may be related to improving mitochondrial dysfunction, reducing peripheral histamine level, regulating energy metabolism disorders and antioxidant levels.

**Key words:** *Psoralea corylifolia* Linn.; Alzheimer's disease; metabolomics; energy metabolism; APP/PS1 mice

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的痴呆类型, 主要表现为记忆力减退和认知功能障碍<sup>[1]</sup>。目前, AD 病因尚不清楚, 全球批准用于 AD 临床治疗的药物仅有 2 类, 且只能控制症状而无法治愈或阻止病情的发展<sup>[2]</sup>。中医认为肾精亏虚所致的髓海不足是 AD 发病的关键<sup>[3]</sup>, 大量临床研究证实从“肾”论治, 补肾填精益髓法治疗 AD 是一种行之有效的疗法<sup>[4]</sup>。补骨脂作为经典的补肾中药, 课题组前期研究发现其有效成分补骨脂素可作用于雌激素受体  $\beta$  ( $ER\beta$ ) 介导 p-ERK 信号通路, 降低  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 对 PC12 细胞的损伤<sup>[5]</sup>。此外, 补骨脂提取物可通过增加  $ER\alpha$ 、 $ER\beta$  表达, 调节下丘脑-垂体-性腺轴负反馈系统、调控  $ER\beta$ -ERK1/2 途径, 改善淀粉样前体蛋白/早老素基因 1 (amyloid precursor protein/presenilin 1, APP/PS1) 双转基因小鼠的学习记忆能力<sup>[6,7]</sup>。另外, 有研究显示补骨脂有效成分可能通过抑制 caspase-3 凋亡因子表达, 提高线粒体膜电位、抗炎抗氧化的作用, 发挥对神经细胞的保护作用<sup>[8,9]</sup>。

尿液代谢组学是近年来发现非侵入性生物标志物的一个重要领域, 其可以检测出针对特定疾病或治疗干预的细微代谢差异<sup>[10]</sup>, 具有取样量少、实施方便、无创等优势<sup>[11]</sup>。超高效液相色谱与高分辨质谱相联用技术具有耗时少、分辨率高、特异性强和灵敏度高等特点, 能够进行更加准确可靠的分析<sup>[12]</sup>。目前尚缺少补骨脂对 APP/PS1 小鼠尿液代谢影响的相关研究。本研究将采用高分辨液质联用技术从非靶尿液代谢组学角度出发对补骨脂改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的作用机制提供全新依据。

## 材料与方法

**实验动物** SPF 级 3 月龄 APP/PS1 小鼠 16 只, C57BL/6J 小鼠 8 只, 雄性, 体重 ( $25 \pm 5$ ) g, 购自于南京大学南京生物药研究院, 实验动物生产许可证号:

SCXK (苏) 2015-0001。饲养环境温度为 ( $21 \pm 1$ ) °C, 相对湿度为 ( $55 \pm 1$ ) %, 实验期间保持小鼠自由饮水进食。上述动物实验遵循黑龙江中医药大学动物伦理委员会的规定并通过动物实验伦理审查 (批准号: 2020092502)。

**药物与试剂** 补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 购自于黑龙江中医药大学国医堂, 由黑龙江中医药大学张宁教授鉴定为正品。补骨脂提取物 (由本实验室自制), 提取方法参照文献<sup>[6]</sup>。甲酸 (HPLC-MS 级, 货号: 540-69-2, Sigma 公司)、甲醇、乙腈 (HPLC-MS 级, 货号分别为: W50164, W50163, Dikma 公司), 水为双蒸水。

**主要仪器** SCIEX ExionLC AD 液相色谱仪; SCIEX 5600+Q-TOF 质谱仪 (Applied Biosystems Sciex 公司); RD1106-SB-M 避暗设备和 RD1121-NR-M 新物体识别设备 (上海移数信息科技有限公司)。

**动物分组与给药** 将 APP/PS1 小鼠随机分为模型组和补骨脂组, C57BL/6J 小鼠为空白组, 每组 8 只。参考《中华人民共和国药典》2020 年版第一部<sup>[13]</sup>, 可知补骨脂的用法用量为成人煎服每日 6~10 g, 查阅其他资料<sup>[14-16]</sup>发现补骨脂在不同的病症之中用量不一, 且不同方剂中差异较大, 最终在药典的基础上适当增大剂量以保证药效, 为 6~15 g。按人临床日用药量折算及提取的出膏率最终计算并选择  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量灌胃给药。补骨脂组每日给予补骨脂提取物  $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 空白组与模型组每日给予等体积生理盐水, 各组均连续灌胃 90 天后进行行为学实验并采集尿样进行检测<sup>[6]</sup>。

**行为学实验** 避暗实验: 设备分为明暗两室, 两室间有拱形圆洞, 明室有灯照射, 暗室底部有通电铜栅。训练时将小鼠放入明室, 小鼠进入暗室时会被电击, 训练时间为 5 min。训练期间, 弃去避暗潜伏期大于 180 s 的小鼠。24 h 后测试, 记录小鼠 5 min 内第一次进入暗室的时间 (即为潜伏期) 和进入次数 (即为错误次数)。

新物体识别实验: 将小鼠置于实验箱内自由活动

5 min 使其熟悉测试环境。训练时将小鼠置于箱内 2 个完全相同物体的中间, 物体对称放置, 小鼠自由探索 5 min, 训练结束 1 h 后进行测试。将 2 个物体其中的 1 个用新物体取代, 记录 5 min 内小鼠嗅探新物体 ( $t_n$ ) 和旧物体 ( $t_p$ ) 的时间。计算相对识别指数 [识别指数 =  $(t_n - t_p) / (t_n + t_p)$ ] 来评价其学习记忆能力。

**样本采集与预处理** 给药第 90 天后, 收集小鼠 12 h 的夜尿。所有尿液均存于接尿管中, 接尿管置于湿冰上保持低温, 将收集的尿液置于离心管中,  $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 取上清液置于  $-80\ ^\circ\text{C}$  冰箱保存。分析前, 取出尿样室温下解冻。取尿液 200  $\mu\text{L}$ , 加入等量甲醇, 涡旋 2 min,  $4\ ^\circ\text{C}$  下  $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 后, 过  $0.22\ \mu\text{m}$  微孔滤膜, 取 5.0  $\mu\text{L}$  进样。

**质量控制样本的制备** 每个尿样吸取 10  $\mu\text{L}$ , 混合均匀后作为质量控制 (QC) 样本, 以用于检测 UPLC-Q-TOF-MS 的重复性和稳定性。QC 样本的制备方法同尿样的制备。

**分析条件** 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B), 洗脱程序: 0~1 min (2% B), 1~2 min (2%~5% B), 2~5 min (5%~12% B), 5~10 min (12%~20% B), 10~12 min (20%~30% B), 12~13 min (30%~50% B), 13~15 min (50%~100% B)。流速  $0.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温  $40\ ^\circ\text{C}$ , 进样量 5  $\mu\text{L}$ 。

**质谱条件:** 电喷雾离子化源 (ESI), 在正、负离子扫描模式下: 扫描范围  $m/z\ 50\sim 1\ 500$ ; 喷雾电压: (+) 3.0 kV, (-) 2.9 kV, 脱溶剂气流量  $900\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ , 脱溶剂气温度  $450\ ^\circ\text{C}$ , 锥孔反吹气流量  $50\ \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

**数据处理** 将所获得的原始数据导入 Progenesis QI 2.0 软件进行去噪音、峰匹配、峰提取及归一化处理, 通过查询 HMDB、Metlin 以及本地数据库和相关文献资料对差异代谢物进行鉴定。以  $m/z$ 、保留时间、峰面积保存到 Excel 文件, 将 excel 文件导入 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 在线数据库进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交

偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)。通过得分图比较空白组与 APP/PS1 之间的差异, 筛选差异代谢物 ( $\text{VIP} > 1$ ,  $P < 0.05$ )。通过 MetaboAnalyst 平台中 Pathway Analysis 模块对筛选出的差异代谢物进行代谢通路的富集分析。行为学数据采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计分析。采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。数据两组间比较, 满足正态性分布者采用独立样本  $t$  检验; 多组间比较, 满足正态性分布者采用单因素方差分析, 方差不齐者采用秩和检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

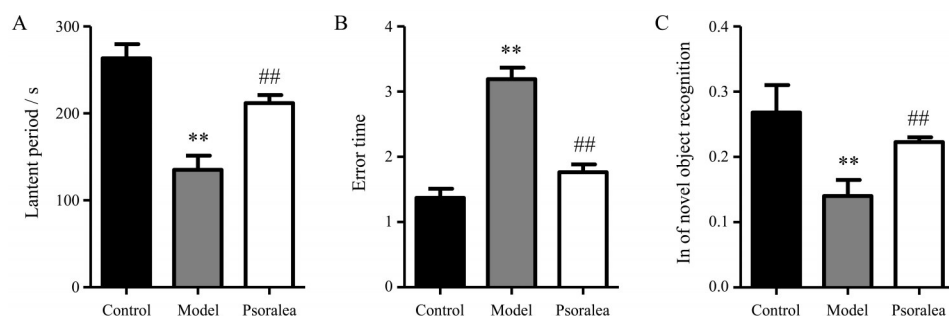
### 1 补骨脂提取物对 APP/PS1 小鼠学习记忆改善作用

**1.1 避暗实验** 与空白组比较, 模型组避暗潜伏期明显变长 ( $P < 0.01$ , 图 1A), 错误次数明显增加 ( $P < 0.01$ , 图 1B), 记忆消退现象较明显。与模型组比较, 补骨脂组避暗潜伏期明显缩短 ( $P < 0.01$ , 图 1A), 错误次数明显减少 ( $P < 0.01$ , 图 1B), 说明补骨脂组记忆消退现象减弱。以上结果说明, 补骨脂具有改善 APP/PS1 小鼠记忆消退的作用。

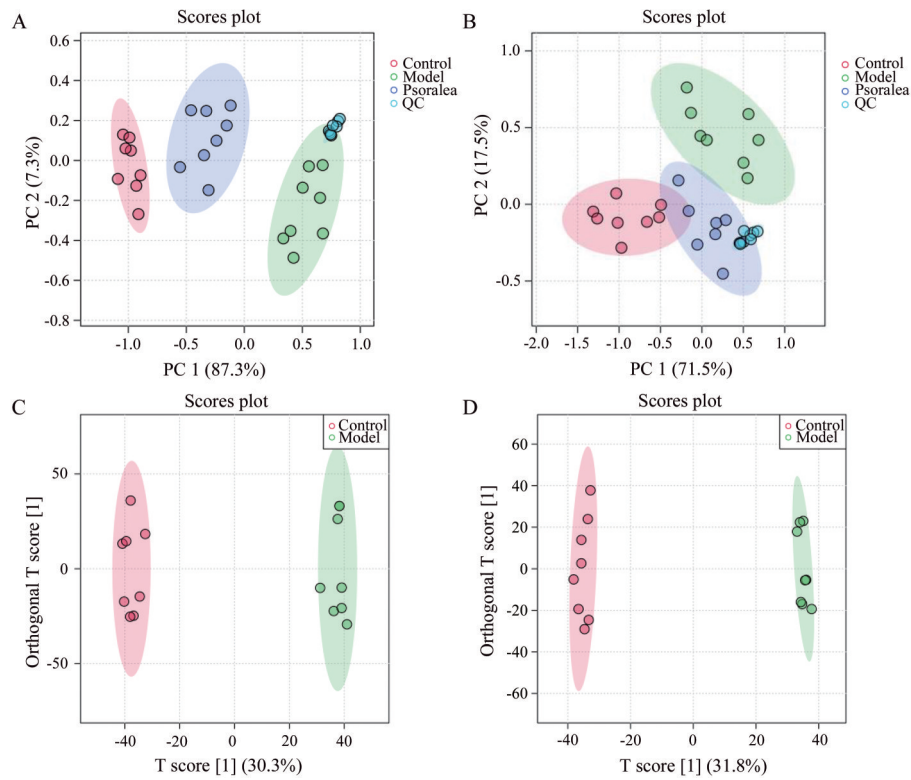
**1.2 新物体识别实验** 与空白组比较, 模型组新物体识别指数明显减小 ( $P < 0.01$ , 图 1C), 说明模型组没有保留对旧物体的记忆, 无法辨别新旧物体, 其识别记忆能力损伤。与模型组相比, 补骨脂组新物体识别指数明显增大 ( $P < 0.01$ , 图 1C), 说明补骨脂组识别记忆能力有明显的好转。以上结果说明, 补骨脂具有改善 APP/PS1 小鼠识别记忆损伤的作用。

### 2 补骨脂干预 APP/PS1 小鼠尿液代谢组学分析

**2.1 小鼠尿液代谢轮廓分析** 各组尿样正、负离子模式下的主成分分析 (PCA) 结果见图 2A、B 所示。从 PCA 得分图可见, QC 样本聚为一簇, 表明所建立的代谢组学分析方法有较好的稳定性和重复性。正、负离子模式下空白组和模型组明显分离, 说明模型组小鼠的尿样已发生明显的差异代谢变化。经补骨脂提取物



**Figure 1** Effect of *Psoralea corylifolia* on dark avoidance experiment and new object recognition experiment of APP/PS1 mice.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs Control, ## $P < 0.01$  vs Model. Control: control group; Model: model group; Psoralea: *Psoralea corylifolia* group



**Figure 2** PCA, OPLS-DA diagram of urine metabolism in mice of each group under positive ion mode (A, C) and negative ion mode (B, D)

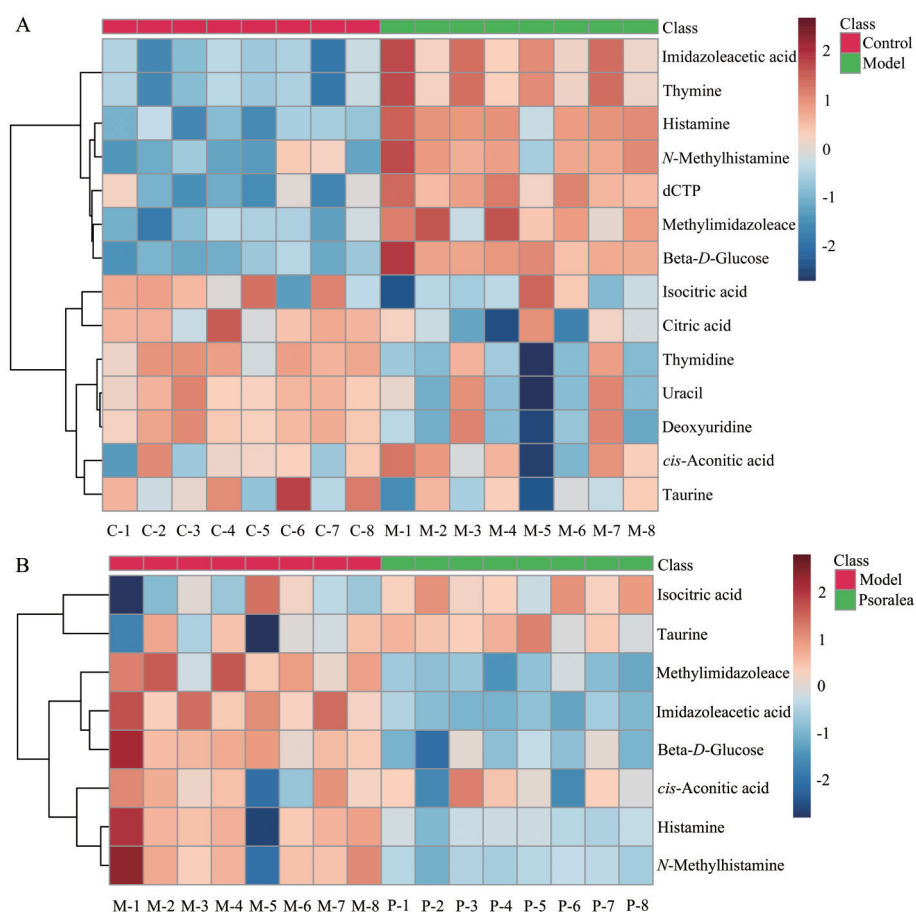
干预后, 模型组小鼠的尿样代谢轮廓均有明显回调趋势, 提示补骨脂对模型组小鼠代谢紊乱有一定的改善作用。进一步进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 结果见图 2C、D 所示。聚焦影响分组明显的小分子代谢产物, 正离子模式下空白组与模型组明显分离, 结果显示模型参数  $R^2Y$  (表示 OPLS-DA 模型解释率) = 0.995,  $Q^2$  (表示 OPLS-DA 模型预测率) = 0.950; 负离子模式下,  $R^2Y$ 、 $Q^2$  值分别为 0.998、0.968, 表明拟合模型的准确度和预测能力良好。正离子模式下共筛选出 8

个差异代谢物, 负离子模式下筛选出 7 个差异代谢物, 结果列于表 1。结合代谢热图分析, 见图 3A、B。图中颜色表示含量, 红色表示含量高表达, 蓝色表示含量低表达, 补骨脂给药干预后显著回调组胺、咪唑乙酸、柠檬酸、异柠檬酸、顺式-乌头酸和牛磺酸。

**2.2 小鼠代谢通路富集分析** 在富集通路图中, 结果如图 4。每个圆的颜色和大小是基于  $P$  值和通路影响因子决定的, 即节点颜色越深参与此通路的代谢物越多, 节点越大则它在此次机体的整体代谢轮廓中占的

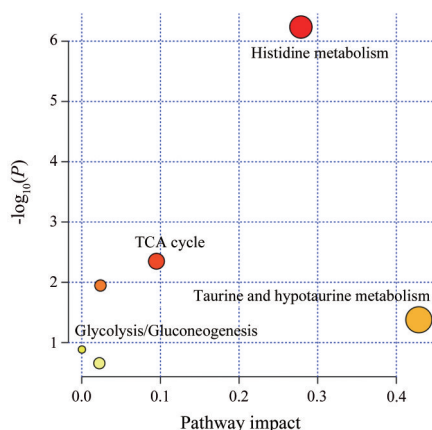
**Table 1** Information of urine differential metabolites in APP/PS1 mice under positive and negative ion mode. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs C; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs M

No.	Mode of ion	$m/z$	$t_R/min$	Component	Chemical formula	VIP	Tendency	
							C vs M	P vs M
1	[M+H] <sup>+</sup>	112.086 6	0.96	Histamine	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	2.873 07	↑**	↓##
2	[M+H] <sup>+</sup>	127.050 2	1.45	Imidazoleacetic acid	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.786 02	↑**	↓##
3	[M+H] <sup>+</sup>	141.065 9	1.54	Methylimidazoleacetic acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.073 6	↑*	↓#
4	[M+H] <sup>+</sup>	193.034 5	1.91	Citric acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	1.462 04	↓**	↑##
5	[M+H] <sup>+</sup>	115.050 0	1.51	Dihydrouracil	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.071 18	↓*	-
6	[M+H] <sup>+</sup>	127.050 2	1.45	Thymine	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.776 08	↑*	-
7	[M+H] <sup>+</sup>	113.034 7	4.11	Uracil	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.011 17	↓*	-
8	[M+H] <sup>+</sup>	126.102 5	0.98	N-Methylhistamine	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub>	1.619 75	↑**	↓#
9	[M-H] <sup>-</sup>	179.056 7	1.15	Beta-D-Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1.101 76	↑**	↓#
10	[M-H] <sup>-</sup>	124.008 6	0.99	Taurine	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	3.787 8	↓**	↑##
11	[M-H] <sup>-</sup>	191.019 6	1.88	Isocitric acid	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	10.457 6	↓**	↑##
12	[M-H] <sup>-</sup>	173.009 6	2.21	cis-Aconitic acid	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	2.453 64	↓**	↑##
13	[M-H] <sup>-</sup>	465.982 9	6.08	dCTP	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub>	1.231 4	↑**	-
14	[M-H] <sup>-</sup>	227.066 9	4.18	Deoxyuridine	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.808 33	↓*	-
15	[M-H] <sup>-</sup>	241.082 4	4.82	Thymidine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2.086 78	↓**	-



**Figure 3** Heat maps of differential metabolites between C and M (A), between M and P (B). C: Control; M: Model; P: Psoralea

比重越大,作用越明显<sup>[17]</sup>。提示补骨脂提取物主要影响组氨酸代谢、柠檬酸循环、牛磺酸和次牛磺酸代谢和糖代谢等代谢通路。



**Figure 4** Enrichment pathway diagram of differential metabolites. TCA cycle: Tricarboxylic acid cycle

### 讨论

APP/PS1 双转基因小鼠是目前研究 AD 分子机制及治疗作用的常用模型,能够较好地模拟类似 AD 的

病理特点,本研究沿用课题组常用的补肾中药补骨脂干预治疗 APP/PS1 小鼠。根据之前的大量研究<sup>[18]</sup>,APP/PS1 小鼠最早可以在 3 月龄时出现认知行为学变化,5 月龄脑内可以出现 A $\beta$  斑块,病理改变随年龄增长逐渐加重。因此,选择 3 月龄 APP/PS1 小鼠作为模型动物,可以更加直接地考察补骨脂对 AD 发病早期的潜在治疗途径。

研究结果显示 APP/PS1 小鼠的尿液中与能量相关的代谢物发生了明显变化。作者发现在 APP/PS1 小鼠尿液中葡萄糖含量明显升高,这与临床 AD 患者尿液中葡萄糖含量变化一致,且患者体内葡萄糖含量会随着病情的发展呈线性升高<sup>[19]</sup>。同时,在模型组小鼠尿液中柠檬酸、异柠檬酸和顺乌头酸的浓度明显低于空白组,Yu<sup>[20]</sup>和 Zheng 等<sup>[21]</sup>对 APP/PS1 小鼠尿液的研究中也报道了其含量的降低。葡萄糖代谢在很大程度上依赖于线粒体在细胞中产生的能量,当线粒体功能出现障碍时,表现为葡萄糖代谢紊乱。此外,还观察到牛磺酸含量在 APP/PS1 小鼠尿液中降低,Dong 等<sup>[22]</sup>对 APP/PS1 小鼠尿液的研究中也得到了同样的结果。有研究表明,牛磺酸可通过影响线粒体 tRNA 的修饰而

使线粒体编码蛋白合成受阻,影响线粒体功能<sup>[23]</sup>。同时,牛磺酸作为抗氧化剂,其在尿液中含量的降低可能预示着体内抗氧化水平下降。研究表明,线粒体和生物能量变化在时间上先于 A $\beta$  稳态的可检测变化<sup>[24]</sup>,线粒体生物发生调节线粒体内 A $\beta$  的产生,而三羧酸循环途径的下调以及牛磺酸含量的降低进一步提示线粒体功能障碍在诱导 AD 病理学中起着关键的上游作用。经补骨脂干预后,尿样中代谢物水平有明显回调,提示补骨脂显著改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力,其机制可能与改善线粒体功能障碍,调节体内的能量代谢紊乱及抗氧化水平有关。

组胺是炎症介质,也是中枢神经系统中的一种重要的神经递质或神经调质,可通过调节长时程增强(long-term potentiation, LTP)和保护皮层海马神经元来改善 AD 引起的认知功能的下降<sup>[25]</sup>。组胺在 APP/PS1 小鼠尿液中具有明显的变化。有研究报道外周中组胺升高的原因可能是嗜碱性粒细胞、肥大细胞释放组胺,也可能是由于携带载脂蛋白 epsilon4 等位基因的 AD 患者中存在血脑屏障渗漏的结果<sup>[26]</sup>。组氨酸是组胺的前体物质,肠道菌群可将组氨酸降解产生组胺<sup>[27]</sup>。研究表明,尿嘧啶水平下降预示着肠道中菌群数量降低<sup>[28]</sup>。本实验中,APP/PS1 小鼠尿样中尿嘧啶水平下降,其含量变化提示 APP/PS1 小鼠可能存在肠道环境的变化,补骨脂干预后,尿液中组胺含量显著降低,组氨酸及尿嘧啶含量无显著变化,提示补骨脂可能通过抗炎或是修复血脑屏障泄露,降低外周组胺水平,而不是通过改善肠道菌群紊乱,发挥改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的作用。

在补骨脂改善 APP/PS1 小鼠的血清代谢组学的研究中,主要通过花生四烯酸代谢、色氨酸代谢、甘油磷脂代谢、甘油脂代谢等代谢通路发挥促进能量代谢、降低氧化损伤、减少神经炎症等作用<sup>[29]</sup>。Xu 等<sup>[30]</sup>从补骨脂的乙醇提取物中共鉴定出 45 种化合物,包括 34 种黄酮类、7 种香豆素类、3 种萘酚类和 2 种其他类,补骨脂中不同类别化学成分具有多种药理作用。研究表明,香豆素中的补骨脂素和异补骨脂素可使 TCA 循环中间产物含量显著升高<sup>[31]</sup>,且异补骨脂素还对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导氧化损伤的线粒体超微结构有保护作用<sup>[32]</sup>。香豆素类成分中的补骨脂定,黄酮类成分中的补骨脂宁、补骨脂二氢黄酮甲醚、异补骨脂二氢黄酮等具有良好的抗氧化作用,其中以补骨脂定抗氧化作用最强<sup>[33]</sup>。还有萘酚类中的补骨脂酚,补骨脂酚 A 和补骨脂酰脂酚 F 具有明显的抗炎作用<sup>[34]</sup>。除此之外,补骨脂还具有抗菌、抗肿瘤、促进骨生长等多种药理作用。

综上所述,补骨脂改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆

能力可能通过改善线粒体功能障碍,调节能量代谢紊乱及抗氧化水平、降低外周组胺水平等方面发挥作用。今后,可与靶向代谢组学、蛋白组学等联合进一步探究补骨脂改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的作用机制,更全面地了解补骨脂治疗阿尔茨海默病认知障碍的潜在治疗途径。

**作者贡献:** 乔月是本文的主要撰写者,完成数据分析和撰写草稿;薛傲、张悦、徐红丹协助完成动物实验;李光、赵继会负责本文思路的提出;胡晶负责图表制作;张宁负责实验设计思路指导并修改论文。所有作者阅读并认可终稿。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Li YQ. Rs28834970 in PTK2B is Associated With Late-Onset Alzheimer's Disease: A Case-Control Study and Meta-Analyses (PTK2B 基因 rs28834970 与迟发型阿尔茨海默病相关性研究) [D]. Qingdao: Qingdao University, 2017.
- [2] Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. Clin Med (Lond) [J]. 2016, 16: 247-253.
- [3] Liu J, Wang ZQ, Wang QH, et al. The effect and mechanism of Bushen Yiniao Pill on the improvement of learning and memory impairment in Alzheimer's disease model mice [J]. Ginseng Res (人参研究), 2022, 34: 12-18.
- [4] Zhao ZJ, Huang YW, Zhang XX, et al. Clinical application of "renal medullary system" [J]. Mod Tradit Chin Med Mater World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化), 2017, 19: 753-757.
- [5] Gao HN, Liu B, Liu GL, et al. Protective effects of psoralen on A $\beta$ -induced PC12 cells injury [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2019, 42: 174-177.
- [6] Tong YL, Guan YJ, Sun HF, et al. Effect of improvement of *Psoralea corylifolia* extract on learning and memory ability of APP/PS1 mice [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2020, 43: 946-950.
- [7] Wu F, Liu JC, Xu HD, et al. Effects of Psoraleae Fructus extract on learning and memory ability and estrogen receptor expression in hippocampus of APP/PS1 mice [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2022, 45: 1699-1704.
- [8] Xiao HY, Fu DY, Yuan CH, et al. Effects of psoralen flavonoids on  $\beta$ -amyloid<sub>25-35</sub> neural stem cell proliferation and apoptosis [J]. Eval Anal Drug Use Hosp China (中国医院用药评价与分析), 2016, 16: 1613-1615.
- [9] Yang L, Li S, Wang YQ, et al. Protective effect of bavachinin A on PC12 cells injury induced by A $\beta$  and its mechanism [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2021, 32: 68-72.
- [10] Wu RJ, Huang YG, Luo LX. Metabolomics in childhood asthma [J]. Chin Gen Pract (中国全科医学), 2022, 25: 1014-1020, 1026.
- [11] Sun J, Qiu JX, Zhang XT. Study on urine metabolomics of Yiqi

- Fuyuan ointment intervention in people with Qi deficiency [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2022, 33: 262-267.
- [12] Zhao CX, Wang N, Huang X, et al. Characteristics and whole genome sequencing analysis of ginsenoside Rb1 transformed by *Bacillus subtilis* JLGA-SD-28 [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2021, 43: 518-523.
- [13] National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. 2020 Ed. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2020: 201.
- [14] An D. Effect and Mechanisms of BGS3, an Extractive of Fructus Psoraleae in Rats with Glucocorticoid-induced Osteoporosis (补骨脂提取物BGS3对糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松症的作用及机制探讨) [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2016.
- [15] Jin JF, He WY, Sun K, et al. The effects of water extract form *Psoralea corylifolia* Linn on the TGF- $\beta$ 1/Smad4 signaling pathway in ovariectomized rats [J]. *Chin J Tradit Med Traumatol Orthop (中国中医骨伤科杂志)*, 2020, 28: 1-5.
- [16] Zhang ZZ, Wang KY, Liu L, et al. Study on the inhibitory effect of major active ingredients of Buguzhi (Psoraleae Fructus) on prostatic hyperplasia in mice [J]. *Shandong J Tradit Chin Med (山东中医杂志)*, 2020, 39: 504-508+529.
- [17] Xia J, Wishart DS. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 2342-2344.
- [18] Shi M, Zhang ZJ, Hao L, et al. Identification of APP/PS1 double transgenic mice and their biological functions research [J]. *J Henan Univ Nat Sci (河南大学学报 自然科学版)*, 2022, 52: 64-72.
- [19] Jang N, Zhou WX, Zhang YX, et al. Preliminary study of urine metabolomics in patients with Alzheimer's disease [C]. 2011 National Academic Conference on Senile Dementia and Senile Related Diseases The Third Shandong Provincial Neurologists (Academic) Forum, 2011 National Academic Conference on Alzheimer's Disease and Aging-related Diseases Third Shandong Provincial Neurologists (Academic) Forum Paper Compilation (2011全国老年痴呆与衰老相关疾病学术会议第三届山东省神经内科医师(学术)论坛论文汇编), 2011: 142.
- [20] Yu MY. Study on Urine and Plasma Target Metabolomics of APP/PS1 Double Transgenic AD mice by Moxibustion and Moxa Smoke (艾灸及艾烟对APP/PS1双转基因AD小鼠的尿液、血浆靶标代谢组学研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2017.
- [21] Zheng YQ, Zhang XQ, Chen JX, et al. Metabonomics studies of urine from APP/PS1 mice with early-stage Alzheimer's disease [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci (浙江大学学报 医学版)*, 2018, 47: 636-642.
- [22] Dong XH, Heng QY, Zhu JS, et al. The metabolomic study of learning and memory function of APP/PS1 double transgenic mice improved by Gouteng San [J]. *Prog Mod Biomed (现代生物医学进展)*, 2017, 17: 4416-4420.
- [23] Li KJ, He BL, Tian ZY, et al. Progress of protective effect of taurine on cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Mod Prev Med (现代预防医学)*, 2014, 41: 3967-3969.
- [24] Swerdlow RH. Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62: 1403-1416.
- [25] Chen Z, Hu WW. Histamine and central nervous system diseases [J]. *J Zhejiang Univ Med Sci (浙江大学学报 医学版)*, 2004, 33: 185-188.
- [26] Zlomuzica A, Dere D, Binder S, et al. Neuronal histamine and cognitive symptoms in Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 106: 135-145.
- [27] Chen P, Yu YB, Shen QB, et al. Metabolic profiling of damp and hot constitution using ultra high performance liquid chromatography coupled with orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报)*, 2017, 38: 541-550.
- [28] Wang X, Xu C, Wu XY, et al. Nuclear magnetic resonance metabolomics study on the effect of *Euphorbia fischeriana* on fecal metabolites in rats [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2019, 47: 669-677.
- [29] Gu JM, Xue H, Xue A, et al. Serum metabolomics study of Psoraleae Fructus in improving learning and memory ability in APP/PS1 mice [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2023, 48: 4039-4045.
- [30] Xu MJ, Wu B, Ding T, et al. Simultaneous characterization of prenylated flavonoids and isoflavonoids in *Psoralea corylifolia* L. by liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26: 2343-2358.
- [31] Yang K. Sex Difference Characteristics and Serum Metabonomics Study of Liver Injury in Rats Caused by Psoralen and Isopsoralen (补骨脂素和异补骨脂素诱导的性别差异性肝损伤和血清代谢组学研究) [D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine, 2021.
- [32] Lin PP, Chen MZ, Zhang Y. Hypoglycemic mechanism of Psoraleae Fructus and its main chemical constituents [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2022, 47: 2392-2399.
- [33] Lu YQ, Zhang X, Wang JJ. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of Psoraleae Fructus [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2019, 25: 180-189.
- [34] Xiao G, Li X, Wu T, et al. Isolation of a new meroterpene and inhibitors of nitric oxide production from *Psoralea corylifolia* fruits guided by TLC bioautography [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83: 1553-1557.