

## 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

史静超<sup>1,2</sup>, 王玉昆<sup>2</sup>, 于舒婷<sup>3</sup>, 张爱荣<sup>4</sup>, 高晓霞<sup>2\*</sup>, 秦雪梅<sup>2\*</sup>

(1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619; 2. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 3. 山西中医药大学太行本草研究院, 山西 晋中 030619; 4. 山西广誉远国药有限公司, 山西 太谷 030800)

**摘要:** 本研究旨在从肾脏代谢组学的角度探讨龟龄集 (GLJ) 改善大鼠轻度认知功能障碍 (MCI) 的作用机制。将大鼠随机分为对照组、模型组、阳性药 (银杏叶片、多奈哌齐) 组和龟龄集低、高剂量组, 采用颈背部皮下注射 D-半乳糖同时给予半高脂饲料共 8 周复制 MCI 大鼠模型, 从第 5 周开始给药至第 8 周末, 测试各组大鼠肾功指标、肾脏组织病理、并基于 LC-MS 肾脏代谢组学的方法探究各组大鼠肾脏内源性代谢物差异, 并分析代谢通路。结果显示, 龟龄集可调节 MCI 大鼠尿素氮水平、改善肾脏组织病理损伤。阳性药银杏叶片和多奈哌齐对肾功指标无显著调节作用, 银杏叶片可减轻肾脏组织病理损伤, 多奈哌齐对肾组织病理无明显改善作用。肾脏代谢组学共发现 23 个与 MCI 相关的差异代谢物, 龟龄集可回调其中 17 个代谢物。通路富集分析显示龟龄集主要通过影响肾脏半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、烟酸与烟酰胺代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、甘油磷脂代谢发挥改善 MCI 的作用。研究结果初步阐明了龟龄集“从肾治脑”的药理机制, 也为临床使用龟龄集治疗 MCI 提供了研究基础。本研究动物实验获得山西大学伦理委员会的批准 (批准号: 2020DW121)。

**关键词:** 轻度认知功能障碍; 龟龄集; 肾脏; 代谢组学; 通路分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-1017-11

## Mechanism of Guilingji to prevent the mild cognitive impairment in rats based on kidney metabolomics

SHI Jing-chao<sup>1,2</sup>, WANG Yu-kun<sup>2</sup>, YU Shu-ting<sup>3</sup>, ZHANG Ai-rong<sup>4</sup>, GAO Xiao-xia<sup>2\*</sup>, QIN Xue-mei<sup>2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Materia Medica and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Taihang Herbal Research Institute, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China; 4. Shanxi Guangyuyuan Chinese Medicine Co., Ltd., Taigu 030800, China)

**Abstract:** This study used kidney metabolomics to investigate the underlying mechanisms of Guilingji (GLJ) on mild cognitive impairment (MCI) rats. The rats were randomly divided into 6 groups ( $n = 8$ ), i.e., control group, model group, positive drug (*Ginkgo biloba* tablet, donepezil) group, GLJ group (low and high dose group). The MCI rat model was replicated using subcutaneous injection of D-galactose into the back of the neck along with a semi-high-fat diet for a total of 8 weeks, and drug was administered from the 5th week for 4 weeks. The kidney function and renal pathological changes of each group of rats were tested. And LC-MS based kidney metabolomics coupled with multivariate data analysis were conducted to explore the potential biomarkers, and corresponding metabolic pathways were then determined. After administration of GLJ, the level of urea nitrogen was decreased compared with those of the model group, and the abnormalities of morphology in kidney tissues were improved.

收稿日期: 2023-07-12; 修回日期: 2023-10-20.

基金项目: 山西中医药大学科技创新能力培育计划项目 (2020PY-JC-12); 山西中医药大学科技创新团队 (2022TD2007); 山西中医药大学博士科研启动基金项目 (2023BK39); 名优晋药再开发山西省重点实验室 (202104010910001).

\*通讯作者 Tel: 86-351-7019297, E-mail: gaoxiaoxia@sxu.edu.cn; qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0855

The positive drugs (ginkgo biloba tablet and donepezil) had no significant modulating effect on renal function indexes. Ginkgo biloba tablet can lessen the pathological injury of kidney tissue, and donepezil had no improvement on renal histopathology. A total of 23 MCI related differential metabolites were identified in kidney, and 17 metabolites were significantly restored by GLJ compared with those of the model group. Additionally, we found that the cysteine and methionine metabolism, nicotinate and nicotinamide metabolism, taurine and hypotaurine metabolism, glycerophospholipid metabolism were significantly involved in the regulatory effect of GLJ. The results illuminate the "cong shen zhi nao" mechanism of GLJ, and also provide a research basis for the clinical use of GLJ for the treatment of MCI. The animal experiment of this study was approved by the Ethics Committee of Shanxi University (approval number: 2020DW121).

**Key words:** mild cognitive impairment; Guilingji; kidney; metabonomics; pathway analysis

轻度认知功能障碍 (mild cognitive impairment, MCI) 是介于正常老化与痴呆之间的一种过渡状态, 其主要表现为记忆力下降、其他认知功能进行性衰退但不影响日常社会生活。研究表明近年来随着人口老龄化程度的加重, 年龄大于 60 岁老年人群中, MCI 患病率高达 19.6%, 且每年有 10%~15% 的 MCI 患者会发展为阿尔茨海默病 (AD), 将近 67% 的 AD 患者均由 MCI 转化而来, 而正常老年人群患 AD 的概率仅为 1%~2%<sup>[1]</sup>。由此可见 MCI 是 AD 的重要危险因素, 因此 MCI 的早期诊断与治疗意义重大。

龟龄集是我国传统中药名方, 诞生于明代皇宫, 是我国四大保密处方之一。2020 年版《中华人民共和国药典》公开其中 20 味药材<sup>[2]</sup>, 包括红参、鹿茸、海马等, 记载龟龄集具有强身补脑、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。现代临床和药理研究表明, 龟龄集在改善认知和记忆功能方面效果显著, 临床研究表明龟龄集可以降低轻中度 AD 患者的阿尔茨海默病评估量表-认知量表 (ADAS-cog) 评分和中医证候积分, 增加简易精神状态检查量表 (MMSE) 评分<sup>[3]</sup>, 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<sup>[4]</sup>, 还能改善轻-中度老年认知障碍患者的肾虚髓减证<sup>[5]</sup>。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<sup>[6]</sup>, 并能通过增加海马 CA1 区神经元数量, 调节脑源性神经营养因子及其高亲和力受体酪氨酸激酶受体 B (BDNF/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<sup>[7]</sup>。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; 调节血清、尿液、睾丸中小分子代谢物水平及相关代谢通路等改善衰老性记忆障碍动物的学习记忆功能<sup>[8,9]</sup>。同时, 还基于 D-半乳糖合并半高脂饲料致 MCI 大鼠模型考察了龟龄集改善 MCI

的药效作用, 并从分子生物学和血清、海马代谢组学层面探讨了其药理机制, 发现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, 并能影响机体脂质代谢、氨基酸代谢和能量代谢等改善 MCI 大鼠学习记忆障碍, 并减轻其脾胃失和、肝肾亏虚之证<sup>[10]</sup>。综上, 龟龄集可能通过调节多组织功能、协同作用, 从而影响衰老性认知功能障碍。

认知功能障碍与中医的“呆病”相似, 《素问》载“肾主骨、生髓、通于脑”, 中医认为认知功能障碍的发生与脑髓消减有关, 而脑髓消减的首要原因是肾精不足, 且已通过量表和神经影像学证实肾虚证往往伴有认知功能障碍的发生<sup>[11,12]</sup>, 足见肾与认知之间关系密切。从西医角度看, 大量临床和药理研究证明肾病患者往往伴随认知功能减退, 且认知功能会随肾病的病程进展持续下降<sup>[12,13]</sup>。如慢性肾病患者的血清胱抑素 C 和尿白蛋白亦可作为认知能力下降的早期标志物<sup>[14]</sup>。同时, 慢性肾病还可能通过影响核因子- $\kappa$ B 相关因子 2/血红素氧合酶-1 (Nrf2/HO-1) 信号通路使海马和前额叶皮层神经元损伤从而影响认知功能<sup>[15]</sup>。由此可见, 神经系统和肾脏之间存在某些通信机制<sup>[16]</sup>。上述中医所讲的肾和西医解剖学的肾脏不同, 但在某些点上亦有相通之处, 如中医之肾主水, 调节人体水液代谢, 这与西医的肾作为泌尿系统主要器官的生理功能相吻合; 中医之肾主骨生髓, 影响骨骼生长发育, 化生脑髓, 西医的肾则能分泌促红细胞生成素、羟化维生素 D3 从而刺激骨髓造血和骨骼生长发育<sup>[17]</sup>。中医的“肾”是一个功能概念, 部分功能相当于西医的肾。那么龟龄集能否通过改善肾脏功能影响认知? 龟龄集说明书中“固肾补气, 用于肾亏阳弱症”与其改善认知功能是否存在关联? 为探明这一问题, 本研究基于前期建立的 MCI 大鼠模型, 通过西医之肾, 借助肾功指标、肾脏组织病理和肾脏 LC-MS 代谢组学阐释龟龄集可能通过调节肾功能、肾脏小分子代谢物水平从而改善 MCI 大鼠认知功能的作用机制, 发现中医之肾和西医之肾在对认

知功能影响上的相通之处,以现代药理学方法阐释“从肾治脑”,并为临床治疗MCI提供新思路。

## 材料与amp;方法

**实验动物** 健康雄性SPF级SD大鼠,体质量(180±20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0006。将大鼠置于昼夜节律光照条件下,自由进食进水,饲养环境温度为(24±1)℃,湿度为(50±5)%,适应性饲养7天后开始实验。该实验由山西大学伦理委员会批准(批号:2020DW121)。

**试剂和药品** 质谱级乙腈、色谱级甲酸、色谱级甲醇(美国Thermo公司),超纯水由MilliQ Integral Water Purification System制备(美国Millipore公司),龟龄集(山西广誉远国药有限公司,103171021),盐酸多奈哌齐片(安理申,卫材药业有限公司,1705045),银杏叶片(扬子江药业有限公司,10010321)。D-半乳糖(Sigma公司,102030630),羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(天津市凯通化学试剂有限公司),生理盐水(石家庄四药有限公司,1811153201),基础饲料(北京科澳协力饲料有限公司,19033211),半高脂饲料(配方:5%猪油+0.5%胆固醇+5%蛋黄粉+89.5%基础饲料,北京科澳协力饲料有限公司)。大鼠尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)ELISA试剂盒(北京安迪华泰科技有限公司,批号:AD190529,AD190524)。

**仪器** 超高效液相色谱-质谱联用仪(Thermo-Fisher Dionex Ulti Mate 3000 UHPLC-QExactiveOrbitrap-MS)、Xcalibur工作站(美国Thermo公司),色谱柱ACQUITYUPLC HSST3(2.1 mm×100 mm,1.8 μm,美国Waters公司),Heal Force高速冷冻离心机(Neofuge 13R,上海力申科学仪器有限公司),XW-80A漩渦混合器(上海青浦沪西仪器厂),DHG-9023A电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司),TG16KR冷冻离心干燥机(上海继谱电子科技有限公司)。

**分组、造模及给药** 适应性饲养1周后,随机将60只大鼠分为空白组(CON)、模型组(MOD)、龟龄集高剂量组(GLJ-H)、龟龄集低剂量组(GLJ-L)、银杏叶片组(GBT)与多奈哌齐组(DON),每组10只。MOD、GLJ-H、GLJ-L、GBT、DON组每天颈背部皮下注射D-半乳糖50 mg·kg<sup>-1</sup>,同时给予半高脂饲料,CON组每天颈背部皮下注射等量生理盐水,给予基础饲料,至第8周末止。第5周开始灌胃给药,GLJ-H组给予150 mg·kg<sup>-1</sup>龟龄集,GLJ-L组给予75 mg·kg<sup>-1</sup>龟龄集(临床等效剂量),GBT组给予7.2 mg·kg<sup>-1</sup>银杏叶片(以总黄酮苷计),DON组给予0.625 mg·kg<sup>-1</sup>多奈哌齐,上述药液均以

CMC-Na配成混悬液,CON组、MOD组给予等量CMC-Na溶液至第8周末止。

**样本收集** 大鼠腹主动脉取血,放置30 min后,3 500 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,取上清液,分装,-80℃保存备用;收集左侧肾脏组织并立即置液氮中冷冻,保存于-80℃冰箱待用,将右侧肾脏组织用多聚甲醛固定,待用。

**肾脏组织病理测试** 固定的肾脏组织经自来水冲洗固定液,酒精梯度脱水后,浸蜡、包埋、切片染色后镜检。

**肾功相关指标测定** 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)。按照试剂盒说明书先配制标准品,稀释标本并加样;配制液洗涤终止反应后进行测定。

**统计分析** 使用SPSS 22.0、Excel 2019、Graphpad prism 7软件对实验数据进行统计学分析,结果采用平均值±标准差(mean±SD)表示。组间比较使用Dunnett's-t检验,以及SPSS中多变量方差分析(ANOVA),以P<0.05表示差异具有统计学意义。

**LC-MS代谢组学数据采集** 肾组织样本制备 将肾组织于4℃解冻,精密称定80 mg肾组织,以提前预冷至0℃的甲醇-水溶液300 μL(1:1)匀浆1 min,涡旋2 min后,于4℃,13 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,将上清液转移至1.5 mL EP管中,将剩余沉淀物以上述方式提取后合并两次上清液,置冷冻离心干燥机中浓缩至干,残渣以300 μL甲醇-水(4:1)溶液复溶,涡旋5 min,于4℃、13 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液待测。另取上述测试样品上清液各10 μL并充分混合,作为质量控制(QC)样本,进样时每6个样品插入一个QC样品,考察仪器稳定性。

**LC-MS液相色谱条件** 流动相为0.1%甲酸水(A)和0.1%甲酸乙腈(B),流动相梯度为:0~0.5 min,1% B;0.5~3.5 min,1%~53% B;3.5~7.5 min,53%~70% B;7.5~9 min,70%~90% B;9~13 min,90% B;13~14 min,90%~1% B;14~16 min,1% B。流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL,柱温40℃。

**LC-MS质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式下分别扫描。扫描模式为Full Scan/dd-MS2,母离子扫描范围为m/z 100~1500,子离子扫描范围为m/z 50~1 000,分辨率设定为MS Full Scan 35 000 FWHM以及MS/MS 17 500 FWHM,碰撞能量为12.5、25和37.5 eV,离子喷雾电压5 500 V;去簇电压70 V;入口电压10 V;碰撞气压为medium;雾化气50 psi;辅助加热气50 psi;气帘气35 psi,去溶剂温度500℃。

**LC-MS数据分析** 将所得到的LC-MS/MS原始

数据导入 Compound Discoverer 3.0 软件, 获取匹配和对齐的峰值数据, 主要参数的设置为: 质量偏差  $5 \times 10^{-6}$ , 保留时间偏差 0.05 min; 信噪比阈值 3。将归一化后的峰面积数据导入 SIMCA-P 13.0 软件进行主成分分析 (PCA), 偏最小二乘判别分析 (PLS-DA) 和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。

**代谢物鉴定及通路分析** 利用数据库包括 HMDB (<http://www.hmdb.ca>)、m/z cloud (<https://www.mzcloud.org>)、Massbank (<http://www.massbank.jp>)、Lipid Maps (<http://www.lipidmaps.org>)、Metlin (<http://metlin.scripps.edu>) 等完成, 其次进一步通过和文献比对化合物的分子量、二级碎片等信息进行鉴定。将鉴定得到的代谢物采用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) 并结合 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) 在线数据库进行通路分析。

**差异代谢物与行为学相关分析** 将分析得到的差异代谢物峰面积数据和前期实验得到认知相关行为学指标<sup>[10]</sup>, 包括 Morris 水迷宫实验中逃逸潜伏期、目标象限滞留时间和穿越平台次数的数据应用 IBM SPSS 25.0 (芝加哥, 美国) 软件经标准化处理后进行 Spearman 相关分析, 并采用 GraphPad Prism 7.0 (圣地亚哥, 美国) 软件绘制相关性分析热图。

## 结果

### 1 各组大鼠肾功指标及给药后干预作用

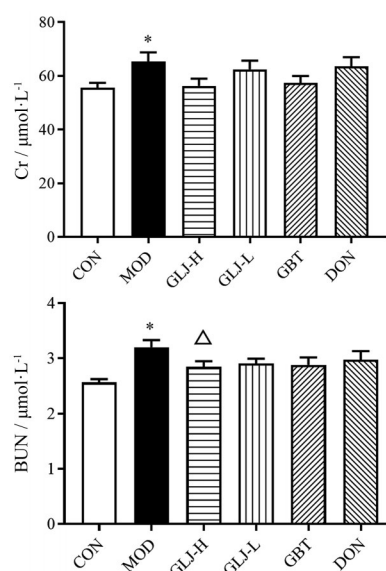
MOD 组大鼠血清肌酐 (Cr) 和尿素氮 (BUN) 较 CON 组显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ), GLJ-H 组较 MOD 组 BUN 显著降低 ( $P < 0.05$ ), GLJ-L、GBT 和 DON 组较 MOD 组两肾功指标均无显著变化 (图 1)。

### 2 各组大鼠肾脏组织病理分析

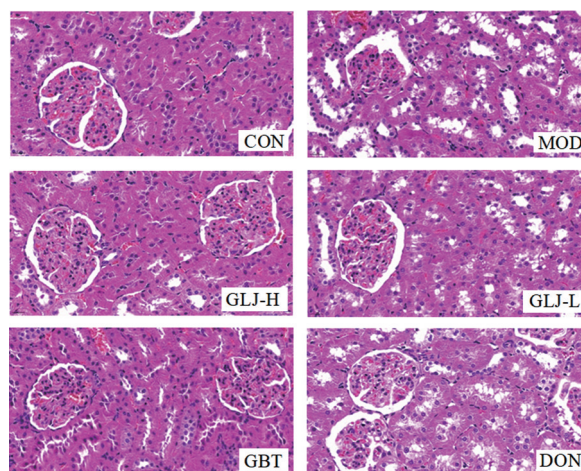
光学显微镜下观察肾组织 HE 染色结果 (图 2), CON 组大鼠肾小球形状规则, 肾小球内细胞排列整齐, 数量及细胞基质均匀, 肾小管上皮细胞圆润、饱满, 刷状缘排列整齐规则; MOD 组大鼠肾小球形状不规则, 肾小球内细胞排列紊乱, 肾小管上皮细胞出现空泡样变性、胞质疏松、刷状缘脱落。GLJ-H 和 GBT 组较 MOD 组肾小球形状规则, 肾小球系膜细胞恢复, 基底膜改善, 肾小管上皮细胞饱满、刷状缘排列整齐规则。GLJ-L 和 DON 组肾小管上皮细胞存在空泡样变性、刷状缘脱落。

### 3 龟龄集改善 MCI 大鼠 LC-MS 肾脏代谢组学分析

**3.1 仪器系统稳定性监测** 在肾脏样本分析过程中, 每 6 针样品之后进一针 QC, 共进 8 针 QC 样本, 将各组数据与 QC 数据进行 PCA 分析, PCA 得分图显示 (图 3) 各组呈明显分离趋势, 且 QC 样品 (橙色) 聚集在一起,



**Figure 1** The blood renal function indexes of rats in various group. CON: Control group; MOD: Model group; GLJ-L: Guilingji low dose group; GLJ-H: Guilingji high dose group; GBT: *Ginkgo biloba* tablet group; DON: Donepezil group; Cr: Serum creatinine; BUN: Blood urea nitrogen.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ . \* $P < 0.05$  vs CON,  $\Delta P < 0.05$  vs MOD



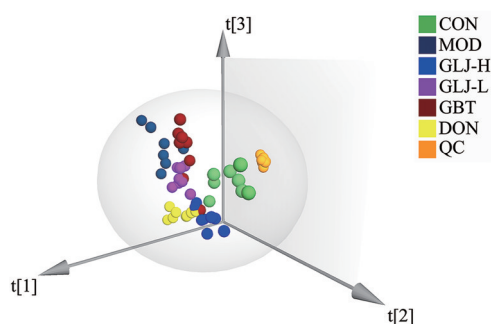
**Figure 2** Pathological changes of kidney tissue of rats in various group (200 $\times$ )

反映了仪器的稳定性和数据的重现性。同时, 在正、负离子模式下分别选择 QC 样本中保留时间位于前、中、后段且质荷比在 200~600 之间的离子为代表离子, 计算其提取离子的保留时间及峰面积的 RSD 值, 监督和评价 LC-MS 系统的稳定性。10 个提取离子保留时间的 RSD 为  $1.49 \times 10^{-3}\%$ ~ $2.45 \times 10^{-2}\%$ ,  $m/z$  的 RSD 为  $1.55 \times 10^{-7}\%$ ~ $2.18 \times 10^{-3}\%$ , 相对峰面积的 RSD 为  $3.87 \times 10^{-2}\%$ ~ $1.25 \times 10^{-1}\%$  (表 1), 结果表明 LC-MS 系统稳定, 测定结果可靠。

**3.2 多元统计分析** 采用 PCA 分析初步明确各组大

**Table 1** UHPLC-TOF-MS stability monitoring results of kidney QC samples

No.	$t_R$ /min	RSD of retention time/%	$m/z$	RSD of $m/z$ /%	RSD of relative peak areas/%	Ion
1	0.85	$6.06 \times 10^{-3}$	124.007 5	$3.63 \times 10^{-7}$	$5.46 \times 10^{-2}$	[M-H] <sup>-</sup>
2	1.62	$1.72 \times 10^{-2}$	118.086 3	$5.60 \times 10^{-7}$	$1.25 \times 10^{-1}$	[M+H] <sup>+</sup>
3	2.73	$2.45 \times 10^{-2}$	132.101 8	$1.07 \times 10^{-6}$	$3.87 \times 10^{-2}$	[M+H] <sup>+</sup>
4	3.35	$7.12 \times 10^{-3}$	269.112 2	$2.37 \times 10^{-6}$	$4.86 \times 10^{-2}$	[M+H] <sup>+</sup>
5	3.88	$3.06 \times 10^{-3}$	158.082 4	$1.55 \times 10^{-7}$	$9.40 \times 10^{-2}$	[M-H] <sup>-</sup>
6	4.31	$2.75 \times 10^{-3}$	323.200 0	$2.18 \times 10^{-3}$	$7.21 \times 10^{-2}$	[M-H] <sup>-</sup>
7	6.50	$4.92 \times 10^{-3}$	280.263 1	$4.88 \times 10^{-7}$	$5.41 \times 10^{-2}$	[M+H] <sup>+</sup>
8	8.92	$2.98 \times 10^{-3}$	255.233 2	$2.73 \times 10^{-7}$	$1.21 \times 10^{-1}$	[M-H] <sup>-</sup>
9	10.41	$1.49 \times 10^{-3}$	524.370 4	$1.48 \times 10^{-6}$	$6.32 \times 10^{-2}$	[M+H] <sup>+</sup>
10	11.83	$9.54 \times 10^{-3}$	352.290 4	$3.46 \times 10^{-5}$	$6.26 \times 10^{-2}$	[M-H] <sup>-</sup>

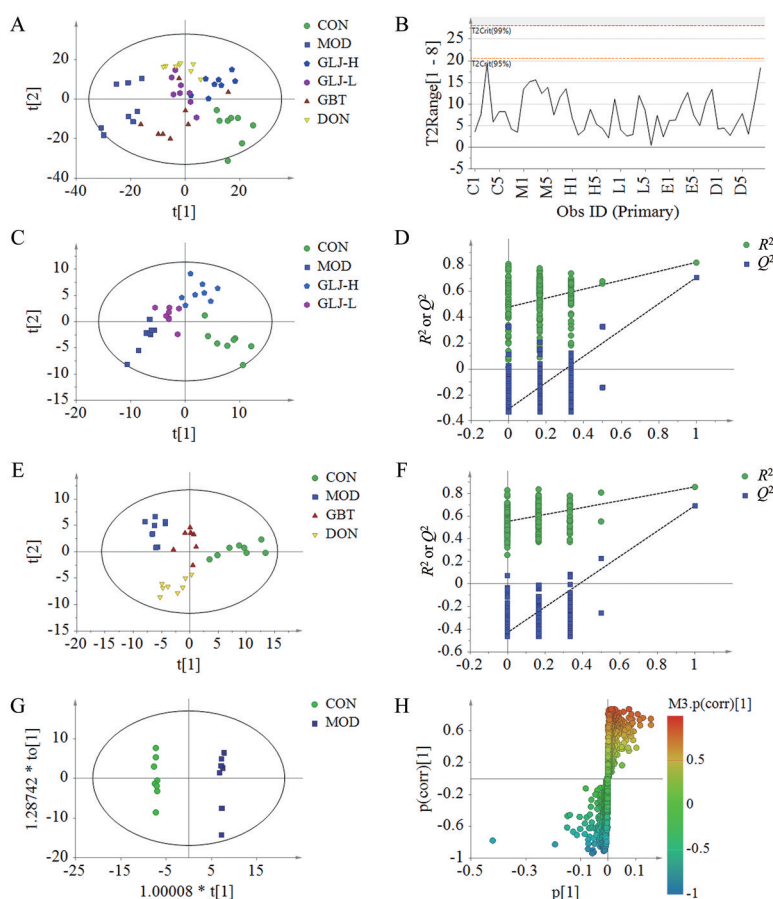
**Figure 3** Score plots of PCA analysis of the six groups and QC samples

鼠肾脏代谢轮廓差异并检查有无异常值,从PCA-X得分图可以看出对照组与模型组可明显分开,各给药组亦能明显分开(图4A),说明MCI大鼠肾脏内源性代谢物发生变化,给药后对模型大鼠的肾脏代谢轮廓有一定的调节作用。所有样本hotelling  $T_2$ 检验95%置信区均在2倍标准偏差范围内(图4B),表明无异常值。为获取有效分离的样本和增强对样本的识别,进一步采用PLS-DA对数据进行分析。将MOD、CON、GLJ-H和GLJ-L进行PLS-DA分析,模型参数为 $R^2X = 0.325$ , $R^2Y = 0.781$ , $Q^2 = 0.506$ ,得分图显示COD组和MOD组明显分开(图4C),给药组也均与MOD组明显分开,且GLJ-H组更接近对照组,表明龟龄集对模型大鼠肾脏代谢轮廓有调控作用,且高剂量调控作用更优。将CON、MOD组和GBT、DON组进行PLS-DA分析,模型参数为 $R^2X = 0.407$ , $R^2Y = 0.847$ , $Q^2 = 0.480$ ,得分图显示两阳性药组均能与MOD组明显分开(图4D)。其中,GBT组与模型组分分离较明显,更趋于CON组,表明银杏叶片和多奈哌齐对模型大鼠肾脏代谢轮廓有一定的调控作用,且银杏叶片调控作用更强。为验证模型可靠性,对上述两模型数据进行200次随机排列实验,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(图4E、F),表明模型未产生过分拟合,结果可靠。为进一步明确模型和对照组的差异代谢物,对CON组和MOD组数据进行OPLS-DA分析。OPLS-DA得分

图显示模型组和对照组显著分离(图4G),模型参数为 $R^2Y = 0.999$ , $Q^2 = 0.902$ ,CV-ANOVA检验 $P = 1.785 \times 10^{-3}$ ,表明所建立的模型拟合良好,能够预测分类数据,计算LC-MS数据中各变量对OPLS-DA模型的贡献得到S-plot图(图4H),以 $t$ 检验 $P < 0.05$ 、VIP > 1.5、S-plot中 $p(\text{corr}) > 0.58$ 为条件筛选差异变量。

**3.3 差异代谢物分析** 将得到的差异变量进行鉴定指认,共得到23个与MCI相关的潜在生物标志物(表2),以回调率表示药物对差异代谢物的回调程度,回调率 = (相对峰面积给药组 - 相对峰面积模型组) / (相对峰面积空白组 - 相对峰面积模型组) × 100%。由表2可知,MOD较CON组赖氨酸、哌啶甲酸、牛磺酸、葡萄糖酸、唾液酸、酮戊二酸单酰胺、烟酰胺、甘油磷酸胆碱、亮氨酸、脱氧肌苷共10种代谢物含量降低;胞苷、胞嘧啶、甲硫氨酸、肌酸、黄嘌呤核苷、亚油酰胺、7种溶血磷脂包括溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)共13种代谢物含量升高。其中,高剂量龟龄集除对葡萄糖酸、唾液酸、胞苷、胞嘧啶、亚油酰胺、LysoPC(16:0/0:0)无回调作用,或无显著回调作用,对其余17种差异代谢物均有显著回调作用;低剂量龟龄集仅对甘油磷酸胆碱、脱氧肌苷和LysoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0)共3种代谢物有显著回调作用;银杏叶片对唾液酸、酮戊二酸单酰胺、甲硫氨酸、烟酰胺、正亮氨酸共5种代谢物有显著回调作用;多奈哌齐对酮戊二酸单酰胺、甘油磷酸胆碱、脱氧肌苷、LysoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0)和LysoPC(18:1(9Z)/0:0)共5种代谢物有显著回调作用。其中高剂量龟龄集对差异代谢物的平均回调率为86.13%,总回调率为1636.18%;较其他给药组均最高,低剂量龟龄集平均回调率和总回调率最低。银杏叶片平均回调率为45.88%,总回调率为1055.15%;多奈哌齐平均回调率为51.30%,总回调率为820.80%,银杏叶片的总回调率较多奈哌齐高,但平均回调率稍低,主要是由于多奈哌齐对个别指标的回调率超过100%。

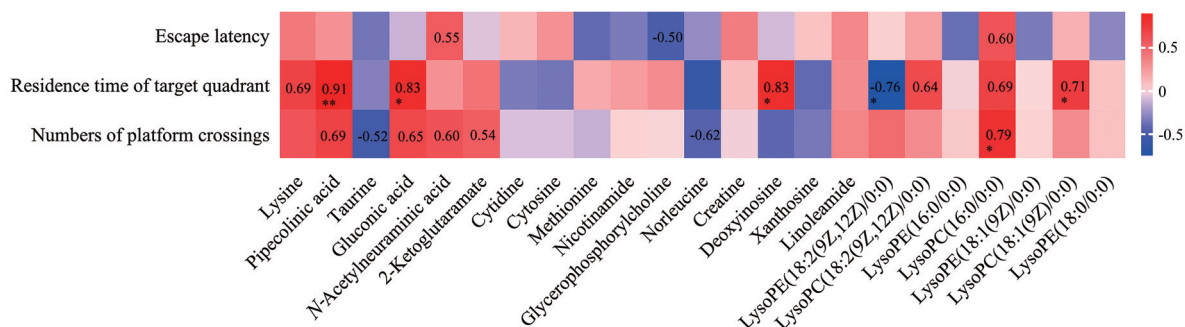
**3.4 差异代谢物和行为学相关分析** 相关分析结果如图5所示,图中红色表示正相关,蓝色表示负相关,



**Figure 4** Multivariate data analysis from UPLC-MS/MS. A: PCA score plots from six group; B: Hotelling T2 test of all samples; C: PLS-DA score plots from control group, model group and GLJ group; D: Permutation test form PLS-DA; E: PLS-DA score plots from control group, model group, ginkgo biloba tablet group and donepezil group; F: Permutation test form PLS-DA; G: OPLS-DA score plots from control group and model group; H: S-plot of OPLS-DA

相关系数范围为 1.0 (最大正相关) 到 -1.0 (最大负相关), 0 表示不相关,  $|r| > 0.5$  且  $P < 0.05$  则具有显著相关性, 图中将  $|r| > 0.5$  的数据标出。由图 5 可知, 目标象限滞留时间和 5 个差异代谢物具有显著或极显著相关性, 其中与哌啶甲酸、葡萄糖酸、脱氧肌苷和溶血磷脂酰胆碱为正相关关系, 与亚油酰胺为负相关关系; 穿越平台次数与溶血磷脂酰胆碱呈显著正相关关系, 其余指标虽显示出一定相关性, 但无显著性。

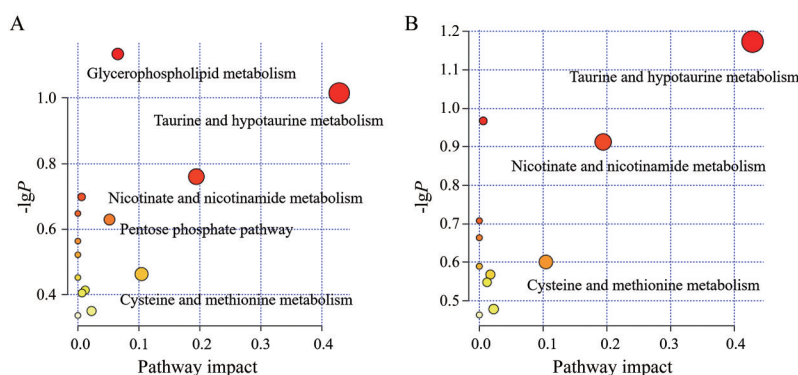
**3.5 代谢通路分析** 将发现的 23 个与 MCI 相关潜在生物标志物以及龟龄集可显著回调的 17 种生物标志物导入 MetaboAnalyst 数据库进行代谢通路分析。以代谢通路影响值 (impact value)  $> 0.05$  和代谢通路显著性水平 ( $-\lg P$ )  $> 0.4$  为条件筛选出主要代谢通路。共得到 5 条与 MCI 相关的代谢通路 (图 6A), 包括甘油磷脂代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、磷酸戊糖通路、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢; 龟龄集能调节



**Figure 5** Spearman correlation analysis of "behavior-differential metabolites" in model rats. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

**Table 2** The differential metabolites in rat kidney identified by LC-MS.  $t_R$ : Retention time;  $\uparrow$  Means that the relative peak area is raised;  $\downarrow$  Means that the relative peak area is lowered. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 

No.	Name	$t_R$ /min	$m/z$	Ion	MOD	GLJ-H	GLJ-L	GBT	DON	Recovery rate/%			
					vs CON	vs MOD	vs MOD	vs MOD	vs MOD	GLJ-H	GLJ-L	GBT	DON
1	Lysine	0.76	146.105 5	[M-H] <sup>-</sup>	↓***	↑***	↑	↑	↑	89.19	46.74	29.53	39.39
2	Pipecolinic acid	0.77	129.079 1	[M-H] <sup>-</sup>	↓***	↑**	↑	↑	↑	66.05	22.88	24.49	35.51
3	Taurine	0.85	125.014 7	[M-H] <sup>-</sup>	↓*	↑*		↑		82.66		19.83	
4	Gluconic acid	0.89	196.058 5	[M-H] <sup>-</sup>	↓**		↑	↑			29.03	56.32	
5	N-Acetylneuraminic acid	0.94	309.106 2	[M-H] <sup>-</sup>	↓**			↑***				96.75	
6	2-Ketoglutarate	0.96	145.037 6	[M-H] <sup>-</sup>	↓***	↑**	↑	↑*	↑*	55.63	35.38	49.65	55.97
7	Cytidine	1.64	243.085 3	[M+H] <sup>+</sup>	↑***		↓				32.58	42.80	3.45
8	Cytosine	1.64	111.043 4	[M+H] <sup>+</sup>	↑***			↓				57.69	
9	Methionine	1.67	149.051 0	[M+H] <sup>+</sup>	↑*	↓*		↓*	↓	98.62		87.13	37.43
10	Nicotinamide	1.77	122.048 1	[M] <sup>+</sup>	↓**	↑*	↑	↑*	↑	74.87	42.40	116.92	3.58
11	Glycerophosphorylcholine	2.38	257.101 0	[M+H] <sup>+</sup>	↓*	↑***	↑*	↑	↑***	126.41	85.12	24.71	126.06
12	Norleucine	2.65	131.094 7	[M+H] <sup>+</sup>	↓***	↑***	↑	↑*	↑	59.00	12.67	31.50	27.04
13	Creatine	2.94	131.069 7	[M-H] <sup>-</sup>	↑***	↓***	↓	↓	↓	79.61	43.18	31.41	39.65
14	Deoxyinosine	3.27	252.085 7	[M+H] <sup>+</sup>	↓***	↑***	↓*	↑	↑*	195.46	96.08	59.35	112.84
15	Xanthosine	3.31	284.076 0	[M+H] <sup>+</sup>	↓**	↓***	↓	↓	↓	95.72	45.51	32.92	26.35
16	Linoleamide	6.53	279.256 0	[M+H] <sup>+</sup>	↑*	↓	↓	↓	↓	51.46	25.52	38.30	59.79
17	LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0)	8.13	477.285 6	[M+H] <sup>+</sup>	↑***	↓*	↓	↓	↓	81.59	41.61	32.50	41.24
18	LysoPC(18:2(9Z,12Z)/0:0)	8.50	519.332 5	[M+H] <sup>+</sup>	↑***	↓**	↓*	↓	↓*	74.06	94.55	41.99	85.09
19	LysoPE(16:0/0:0)	8.98	453.285 8	[M-H] <sup>-</sup>	↑***	↓**	↓	↓	↓	83.27	0.62	58.43	
20	LysoPC(16:0/0:0)	9.11	495.332 5	[M+H] <sup>+</sup>	↑*	↓	↓	↓	↓	89.91	11.09	12.05	56.45
21	LysoPE(18:1(9Z)/0:0)	9.48	479.301 6	[M+H] <sup>+</sup>	↑***	↓*	↓	↓	↓	68.31	18.36	52.56	
22	LysoPC(18:1(9Z)/0:0)	9.60	521.348 5	[M+H] <sup>+</sup>	↑**	↓*	↓	↓	↓*	90.70	36.89	10.73	70.96
23	LysoPE(18:0/0:0)	10.59	481.317 0	[M-H] <sup>-</sup>	↑***	↓*		↓		73.86		47.59	

**Figure 6** Summary diagram of pathway analysis with MetaboAnalyst. A: The metabolic pathways associated with MCI; B: Regulation of metabolic pathway of GLJ-H

其中3条代谢通路(图6B),包括牛磺酸和亚牛磺酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢。利用KEGG数据库对MCI大鼠肾脏差异代谢物及主要相关代谢通路进行关联分析(图7),发现MCI涉及多条代谢途径紊乱,龟龄集可通过调控多条代谢通路发挥治疗MCI的作用,可调节代谢物和通路多于两阳性药。

## 讨论

本研究选择中药银杏叶片和西药多奈哌齐作为阳性对照药,其中银杏叶片由银杏叶提取物制成,属于中药制剂,临床研究证实了银杏叶提取物可改善MCI患

者认知功能、神经精神症状、日常生活能力,其机制涉及降低血黏度、增强微灌注、调节大脑血清素水平、增加多巴胺水平、减少 $\beta$ 淀粉样蛋白纤维形成等<sup>[18]</sup>。多奈哌齐是美国食品和药物管理局唯一批准用于治疗AD的药物,其药理机制明确,可通过抑制乙酰胆碱酯酶,减轻胆碱能损伤导致的神经病变发挥神经保护的作用;并能减轻 $A\beta$ 的神经毒性,影响烟碱受体、降低谷氨酸神经毒性、对抗自由基并减轻氧化应激<sup>[19]</sup>,上述药理机制均与MCI病理机制密切相关。

本研究基于D-半乳糖合并半高脂饲料致MCI大鼠模型,发现MCI大鼠血清BUN和Cr异常,并出现肾脏组织病理损伤。给予龟龄集可显著回调BUN水平,

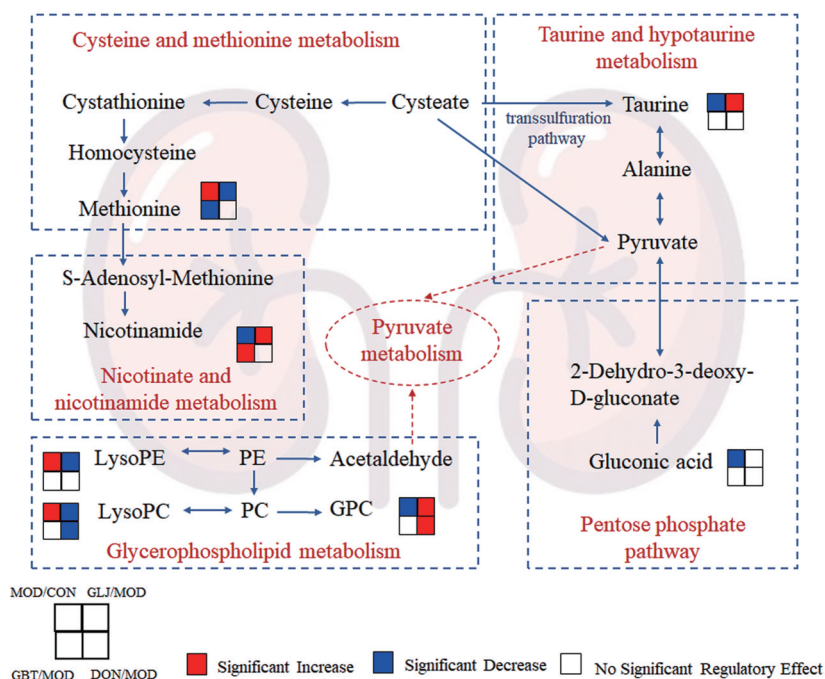


Figure 7 Correlation analysis of differential metabolite pathway in kidney of MCI rats

对Cr有回调趋势, 银杏叶片和多奈哌齐对BUN和Cr均有回调趋势, 但较模型无显著差异。同时, 高剂量龟龄集和银杏叶片亦可显著改善肾组织病理损伤, 而多奈哌齐对肾组织病变未见明显改善作用。提示龟龄集对MCI相关肾功异常和肾组织病变有一定的调节和改善作用, 且效果较两种阳性药更好。

代谢组学研究结果表明, MCI大鼠肾脏23个内源性代谢物含量发生显著改变, 而行为是内源性代谢物的外在表现, 故本研究将认知相关行为学数据和肾脏差异代谢物进行相关分析, 并可视化其潜在关系。结果显示Morris水迷宫实验中目标象限滞留时间与肾脏中哌啶甲酸、葡萄糖酸和脱氧肌昔水平呈显著正相关关系, 即这三个差异代谢物水平降低, 目标象限滞留时间缩短, 大鼠空间记忆受损, 而模型组大鼠确实出现了哌啶甲酸、葡萄糖酸和脱氧肌昔水平显著降低的情况; 但也有部分指标如目标象限滞留时间、穿越平台次数均与溶血磷脂酰胆碱呈显著正相关关系, 而溶血磷脂酰胆碱水平在模型组大鼠中显著升高; 相关分析结果虽不能阐明认知与肾脏代谢物之间的具体函数关系, 但能在一定程度上反应两者之间的潜在关联, 并能对后期动物实验的指标选择起到指导作用。

通路富集分析表明, MCI主要影响了半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、甘油磷脂代谢、磷酸戊糖通路共5条代谢通路。

半胱氨酸和甲硫氨酸代谢可通过甲基化作用参与肌酸、磷脂酰胆碱等的合成, 并通过转硫化作用参与半

胱氨酸的合成, 进而影响谷胱甘肽抗氧化应激作用发挥, 与机体生长、免疫和能量代谢密切相关<sup>[20, 21]</sup>。研究发现甲硫氨酸水平长期处在高位可致氧化应激增加, 而限制甲硫氨酸摄入量可延长寿命, 其可能的机制涉及减少氧化应激、炎症反应、调节肠道菌群等<sup>[22, 23]</sup>。在一项针对60岁以上中国老年人的调查中发现, 因饮食导致的甲硫氨酸循环代谢产物升高可致MCI, 细胞和动物实验也显示, 限制甲硫氨酸摄入量可增加糖酵解、提高大脑中脑源性神经营养因子(BDNF)水平, 从而保护神经元免受损伤, 起到改善认知的作用<sup>[24, 25]</sup>。本实验研究结果表明MCI大鼠肾脏甲硫氨酸水平升高, 和上述文献研究结果一致, 说明甲硫氨酸和半胱氨酸代谢通路紊乱可能是导致MCI的原因之一, 而龟龄集、银杏叶片能通过下调甲硫氨酸水平, 调控甲硫氨酸和半胱氨酸代谢通路, 发挥治疗MCI的作用。

烟酸和烟酰胺代谢在体内氧化还原平衡、脂质代谢、葡萄糖糖酵解、碳水化合物代谢、蛋白质和氨基酸代谢中起着关键作用<sup>[26]</sup>。其中烟酰胺(NAM)可通过多种机制改善学习记忆和认知功能减退, 如减轻线粒体氧化应激、调节细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸水平和细胞凋亡、改善脑能量代谢和突触可塑性等<sup>[27]</sup>。本实验中MCI大鼠肾脏NAM水平显著降低, 龟龄集、银杏叶片可能通过回调NAM水平直接调节烟酸和烟酰胺代谢通路发挥治疗作用。

牛磺酸及次牛磺酸代谢主要涉及半胱氨酸、半胱亚磺酸、次牛磺酸以及牛磺酸等多个化合物的代谢, 其

牛磺酸是体内重要的游离氨基酸,在体内分布广泛,是一种有效的内源性抗氧化剂,具有改善细胞糖脂代谢、免疫调节、抗炎、抗氧化等多种生理功能<sup>[28]</sup>,尤其在神经系统中发挥重要作用,是脑发育的营养因子,可促进脑细胞增殖,保护药物诱导的脑组织损伤,并对多种神经系统疾病包括阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病等有治疗作用<sup>[29]</sup>。临床研究发现老年MCI患者唾液中牛磺酸含量显著低于健康老年人,药理实验也证实了AD动物脑中牛磺酸水平显著降低,且牛磺酸水平降低与海马体积减少具有相关性,说明牛磺酸水平降低可能与认知功能障碍相关<sup>[30,31]</sup>。研究表明,牛磺酸可通过减轻炎症和氧化应激介导的损伤,调节内质网应激、能量代谢、基因表达、Ca<sup>2+</sup>稳态和渗透发挥神经保护作用并改善认知功能<sup>[32,33]</sup>。本实验中MCI大鼠肾脏牛磺酸水平较对照组显著降低,和上述文献研究结果一致,给予龟龄集可显著提高牛磺酸水平,说明龟龄集可能通过调节牛磺酸和亚牛磺酸代谢通路改善MCI大鼠认知功能障碍。

甘油磷脂是机体含量最多的一类磷脂,可构成生物膜,是胆汁和膜表面活性物质等的成分之一,并参与细胞膜对蛋白质的识别和信号传导,甘油磷脂代谢是维持机体内稳态最重要的组成部分之一<sup>[34]</sup>。参与该代谢途径的代谢物溶血磷脂酰胆碱(LysoPC)可致脑中少突胶质细胞脱髓鞘和周细胞丢失,损害内皮的屏障功能,促进神经毒性 $\beta$ 淀粉样肽寡聚体形成神经毒性蛋白聚集,导致神经退行性疾病的发生,在反复轻度脑外伤小鼠模型中也观察到LysoPC水平显著升高<sup>[35,36]</sup>,提示LysoPC和认知密切相关。甘油磷脂酰胆碱(GPC)是肾髓质细胞的主要有机渗透物之一,可减轻高渗应激保护肾脏<sup>[37]</sup>。研究表明,GPC可作为营养补充剂改善记忆、认知障碍并逆转健忘症,现已被用于治疗AD<sup>[38,39]</sup>。本实验中MCI大鼠LysoPC水平显著升高,与包良等<sup>[40]</sup>在LysoPC促动脉粥样硬化研究中长期高脂饮食致LysoPC水平升高结果一致,本研究中给予龟龄集可显著降低肾脏LysoPC水平,并升高GPC水平,阳性药多奈哌齐亦能调节LysoPC和GPC水平,说明龟龄集、多奈哌齐可能通过调节甘油磷脂代谢,保护肾脏并发挥改善MCI大鼠认知功能障碍的作用。

同时,各代谢通路之间还存在密切关联,如甲硫氨酸可经S-腺苷甲硫氨酸合成酶(SAM)作用得到烟酰胺,间接影响烟酸和烟酰胺代谢;甲硫氨酸和半胱氨酸代谢通路中半胱氨酸可经转硫途径生成牛磺酸,或可通过脱硫酶的作用分解得到丙酮酸,进而影响牛磺酸和亚牛磺酸代谢、丙酮酸代谢。甘油磷脂代谢通路中溶血磷脂酰乙醇胺(LysoPE)经溶血磷脂酰乙醇胺

酰基转移酶作用得到磷脂酰乙醇胺,再继续经乙醇胺磷酸酯裂解酶作用得到乙醛,直接参与丙酮酸代谢。葡萄糖酸与认知虽无直接关系,但葡萄糖酸可在葡萄糖酸激酶的作用下被磷酸化生成6-磷酸葡萄糖酸,再经6-磷酸葡萄糖酸脱水酶作用生成2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸,最后裂解生成丙酮酸和3-磷酸甘油醛,间接影响丙酮酸代谢。

综上,龟龄集可改善MCI大鼠肾功和肾组织病理损伤,调节半胱氨酸和甲硫氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、牛磺酸和亚牛磺酸代谢、甘油磷脂代谢紊乱发挥治疗MCI的作用,起效机制涉及能量代谢、脂代谢、氧化应激和炎症反应。阳性药银杏叶片和多奈哌齐对MCI大鼠肾脏指标及代谢轮廓调控作用较弱,是由于银杏叶片起效机制主要通过调节血脂及脂代谢,而多奈哌齐主要通过调节胆碱能系统起效。龟龄集作为大复方中药,集补益药、活血祛瘀药、芳香化湿药于一体,其机制较单一中药制剂或西药都更加复杂,作用靶点更加多样。本研究从龟龄集补肾益精的角度,基于“从肾治脑”的理论探讨了龟龄集改善MCI的作用机制,为临床治疗MCI提供了新思路。

**作者贡献:** 史静超、王玉昆负责完成相关的实验研究、数据处理分析及论文的撰写;于舒婷负责数据的采集;秦雪梅、高晓霞、张爱荣负责本课题整体实验的设计、指导与文章修改工作。

**利益冲突:** 所有作者均不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Yu RQ, Topiwala A, Jacoby R, et al. Aggressive behaviors in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Geriatr Psychiat*, 2019, 27: 290-300.
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2020, 1055.
- [3] Liu NY, Pei H, Liu MX, 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: 577-582.
- [4] Zhang HQ, Chen HQ, 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, 25: 4778163.
- [5] Pei H, Wang HC, Feng XZ, et al. Guilingji Capsule for mild-to-moderate cognitive impairment with shen-marrow deficiency syndrome: a multicenter, randomized, double-blind, controlled

- trial [J]. *Chin J Integr Tradit West Med* (中国中西医结合杂志), 2022, 42: 151-159.
- [6] Ren KL, Meng XL, Qi XM, et al. Effect and mechanism of Guilingji on Alzheimer's disease model rats based on "kidney-brain correlation" [J]. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2022, 37: 1-10.
- [7] Wang HC. The Clinical Effectiveness of Guilingji on the Treatment of Patients with AD and the Effect of Guilingji on the Learning and Memory Ability of SAMP8 Mice and the Expression of Synapse and Myelin Associated Protein (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]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2020.
- [8] Zhao SJ, Zhao XZ, Liu HL, et al. Effects of Guilingji on improving learning and memory dysfunction caused by aging [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2018, 49: 5352-5357.
- [9] Zhao SJ, Tian JS, Tai G, et al. <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics revealed the protective effects of Guilingji on the testicular dysfunction of aging rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 238: 111839.
- [10] Shi JC. The Research on the Chemical Analysis of Guilingji and Its Improvement in Mild Cognitive Impairment (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]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [11] Wu C, Wei JH, Chen H, et al. Prediction and verification of biological basis and mechanism for traditional Chinese drugs of reinforcing kidney for supplementing essence in treating diseases related to deficiency of kidney essence [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 463-472.
- [12] Murtaza A, Dasgupta I. Chronic kidney disease and cognitive impairment [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2021, 30: 105529.
- [13] Ning YZ, Yin DG, Jia WB, et al. Cognitive impairment on patients with kidney deficiency syndrome: a resting-state fMRI study [J]. *Eur J Integr Med*, 2018, 24: 49-53.
- [14] Wei Y, Wei YK, Zhu J. Early markers of kidney dysfunction and cognitive impairment among older adults [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 15: 209-214.
- [15] Hamidzad Z, Kadkhodae M, Karimian SM, et al. Therapeutic effects of CORM3 and NaHS in chronic kidney disease induced cognitive impairment *via* the interaction between carbon monoxide and hydrogen sulfide on Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 1: 110217.
- [16] Tanaka S, Okusa MD. Crosstalk between the nervous system and the kidney [J]. *Kidney Int*, 2020, 97: 466-476.
- [17] Cheng GB, Lin LL. Explore the combination of traditional Chinese and Western medicine from the essence of kidney [J]. *Inf Tradit Chin Med* (中医药信息), 2003, 5: 4-5.
- [18] Kandiah N, Ong PA, Yuda T, et al. Treatment of dementia and mild cognitive impairment with or without cerebrovascular disease: expert consensus on the use of Ginkgo biloba extract, EGb 761 [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25: 288-298.
- [19] Li Q, He S, Chen Y, et al. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 158: 463-477.
- [20] Elango R. Methionine nutrition and metabolism: insights from animal studies to inform human nutrition [J]. *J Nutr*, 2020, 150: 2518S-2523S.
- [21] Paul BD. Cysteine metabolism and hydrogen sulfide signaling in Huntington's disease [J]. *Free Radical Bio Med*, 2022, 186: 93-98.
- [22] Jia MZ, Wang YJ, Liu ZG, et al. Methionine restriction-association with redox homeostasis and implications on aging and diseases [J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102464.
- [23] Cummings NE, Lamming DW. Regulation of metabolic health and aging by nutrient-sensitive signaling pathways [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 455: 13-22.
- [24] Fu JZ, Liu Q, Zhang ML, et al. Association between methionine cycle metabolite-related diets and mild cognitive impairment in older Chinese adults: a population-based observational study [J]. *Nutr Neurosci*, 2022, 25: 1495-1508.
- [25] Antony R, Li YF. BDNF secretion from C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells is enhanced by methionine restriction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 533: 1347-1351.
- [26] Pissios P. Nicotinamide N-methyltransferase: more than a vitamin B3 clearance enzyme [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28: 340-353.
- [27] Liu D, Pitta M, Jiang HY, et al. Nicotinamide forestalls pathology and cognitive decline in Alzheimer mice: evidence for improved neuronal bioenergetics and autophagy procession [J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34: 1564-1580.
- [28] Yu RL, Pan C, Ma TT, et al. Prediction of clinical efficacy of subcutaneous immunotherapy for *Artemisia sieversiana* pollen allergic rhinitis by serum metabolomics [J]. *J Formos Med Assoc*, 2022, 121: 2465-2480.
- [29] Chen CR, Xia SF, He JL, et al. Roles of taurine in cognitive function of physiology, pathologies and toxication [J]. *Life Sci*, 2019, 231: 116584.
- [30] Zhu MM, Akimana C, Wang E, et al. <sup>1</sup>H-MRS quantitation of age-dependent taurine changes in mouse brain [J]. *Mol Imaging Biol*, 2019, 21: 812-817.
- [31] Karakelle NA, Dinçer S, Sağlam AS. The effect of intracerebroventricular amyloid beta 1-42 application on cognitive functions in aged rats supplemented with taurine and the change of peroxisomal proteins in this process [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 172: 89-97.
- [32] Reeta KH, Singh D, Gupta YK. Chronic treatment with taurine after intracerebroventricular streptozotocin injection improves cognitive dysfunction in rats by modulating oxidative stress, cholinergic functions and neuroinflammation [J]. *Neurochem Int*, 2017, 108: 146-156.
- [33] Jakaria M, Azam S, Haque ME, et al. Taurine and its analogs

- in neurological disorders: focus on therapeutic potential and molecular mechanisms [J]. *Redox Biology*, 2019, 24: 101223.
- [34] Wang XL, Xu YY, Song X, et al. Analysis of glycerophospholipid metabolism after exposure to PCB153 in PC12 cells through targeted lipidomics by UHPLC-MS/MS [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 169: 120-127.
- [35] Law SH, Chan ML, Marathe GK, et al. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1149.
- [36] Tzekov R, Dawson C, Orlando M, et al. Sub-chronic neuropathological and biochemical changes in mouse visual system after repetitive mild traumatic brain injury [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0153608.
- [37] Lin L, Huang ZZ, Gao Y, et al. LC-MS-based serum metabolic profiling for genitourinary cancer classification and cancer type-specific biomarker discovery [J]. *Proteomics*, 2012, 12: 2238-2246.
- [38] Lee SH, Choi BY, Kim JH, et al. Late treatment with choline alfoscerate (l-alpha glycerylphosphorylcholine,  $\alpha$ -GPC) increases hippocampal neurogenesis and provides protection against seizure-induced neuronal death and cognitive impairment [J]. *Brain Res*, 2017, 1654: 66-76.
- [39] Marcus L, Soileau J, Judge LW, et al. Evaluation of the effects of two doses of alpha glycerylphosphorylcholine on physical and psychomotor performance [J]. *J Int Soc Sport Nutr*, 2017, 14: 39.
- [40] Bao L. Study on the Mechanism of Atherogenic Effects by Lyso-phosphatidylcholin (溶血磷脂酰胆碱的促动脉粥样硬化作用及其机制研究) [D]. Hohhot: Inner Mongolia University, 2018.