

· AD 的基础和临床研究专题 ·

6 月龄野生型和 APP/PS1 转基因小鼠海马和皮层神经递质

代谢组学研究

康美美 吕彩珍 王蓉

100053 北京,首都医科大学宣武医院中心实验室(康美美、吕彩珍、王蓉); 100053 北京市老年病医疗研究中心(王蓉); 100053 北京脑重大疾病研究院(王蓉)

通信作者: 王蓉, Email: rong_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.11.004

【摘要】 目的 探讨 6 月龄 APP/PS1 转基因小鼠相较于同月龄野生型小鼠海马和皮层组织神经递质代谢物的变化。方法 选取健康雌性 6 月龄野生型和 APP/PS1 转基因小鼠各 8 只, 3 只进行刚果红实验, 5 只利用超高效液相色谱串联质谱方法分析海马和皮层组织中神经递质代谢物的含量。在正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)模型主成分的差异权重贡献值(VIP) ≥ 1 的基础上, 以独立样本 *t* 检验 $P < 0.05$ 或差异倍数(FC) 值 ≥ 1.2 或 FC 值 ≤ 0.8 , 筛选组间差异代谢物。结果 6 月龄 APP/PS1 转基因小鼠海马和皮层组织中出現 β 淀粉样蛋白沉积; 两组小鼠的海马和皮层代谢轮廓呈现分离趋势。在小鼠海马中鉴定出 17 种差异代谢物, 分别为肾上腺素、去甲肾上腺素、左旋多巴、多巴胺、3, 4-二羟基苯乙酸酯(DOPAC)、3, 4-二羟基苯基二醇、3, 4-二羟基扁桃酸、甲氧基去甲肾上腺素(NMN)、4-羟基-3-甲氧基苯乙二醇(MHPG)、4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸/高香草酸(HVA)、谷氨酰胺、谷氨酸、 γ -氨基丁酸、5-羟色胺(5-HT)、羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、鸟氨酸、酪胺; 在小鼠皮层中鉴定出 12 种差异代谢物, 分别为多巴胺、DOPAC、NMN、3-甲氧酪胺、MHPG、HVA、5-HT、5-HIAA、乙醇胺、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸、苏氨酸。结论 APP/PS1 转基因小鼠海马和皮层神经递质代谢种类趋势变化不同, 可能作为 APP/PS1 转基因小鼠认知功能障碍早期病理改变的靶点。

【关键词】 认知功能障碍; 超高效液相串联质谱; 皮层; 海马; 神经递质; 代谢组学

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFA0108503); 首都卫生发展科研专项(首发 2020-2Z-1034)

Neurotransmitter metabolomics research on the hippocampus and cortex of six-month-old wild-type and APP/PS1 transgenic mice Kang Meimei, Lyu Caizhen, Wang Rong

Department of Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China (Kang MM, Lyu CZ, Wang R); Beijing Geriatric Medical Research Center, Beijing 100053, China (Wang R); Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100053, China (Wang R)

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong_wang72@aliyun.com

【Abstract】 Objective To analyze the changes of neurotransmitter metabolites in the hippocampus and cortex of six-month-old APP/PS1 transgenic mice and wild-type mice of the same age. **Methods** A total of 8 healthy female 6-month-old wild-type mice and 8 APP/PS1 transgenic mice were selected. Congo red test was conducted in 3 mice, and ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was used to analyze the content of neurotransmitter metabolites in hippocampus and cortex in 5 mice. The difference metabolites between groups were screened by independent sample *t* test $P < 0.05$ or the fold change (FC) ≥ 1.2 or FC ≤ 0.8 , on the basis of variable influence on projection (VIP) ≥ 1 of the principal component of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) model. **Results** Amyloid- β protein deposition appears in hippocampus and cortex of 6-month-old APP/PS1 transgenic mice. The metabolic profiles of hippocampus and cortex of the two groups of mice showed a trend of separation. A total of 17 different metabolites were identified in the hippocampus of mice, including epinephrine, norepinephrine, levodopa, dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylacetate (DOPAC), 3, 4-dihydroxyphenyl diol, 3, 4-dihydroxymandelic acid, methoxy norepinephrine (NMN), 4-hydroxy-3-methoxyphenylene glycol (MHPG), 4-hydroxy-3-methoxy-mandelic acid/homovanillic acid (HVA), glutamine, glutamate γ -aminobutyric acid, 5-hydroxytryptamine (5-HT), hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), ornithine and tyramine. A total of 12 different metabolites were identified in

the cortex of mice, including dopamine, DOPAC, NMN, 3-methoxy tyramine, MHPG, HVA, 5-HT, 5-HIAA, ethanolamine, L-tyrosine, L-phenylalanine and threonine. **Conclusions** The trend of neurotransmitter metabolism in hippocampus and cortex of APP/PS1 transgenic mice is different, which can be used as the target of early pathological changes in cognitive dysfunction of APP/PS1 transgenic mice.

【Key words】 Cognitive impairment; Ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS); Cortex; Hippocampus; Neurotransmitter; Metabolomics

Fund programs: National Key R&D Program of China (2018YFA0108503); Capital Health Research and Development of Special (2020-2Z-1034)

AD是一种年龄相关的中枢神经系统(central nerve system, CNS)疾病,是痴呆最常见的亚型^[1]。该病主要以记忆力减退为主要临床表现,并伴有其他精神症状或行为障碍,是老年群体中继心血管和恶性肿瘤后重要的死亡原因^[2]。AD主要病理特征是 β 淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)沉积和神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT),还伴有神经元丢失、神经炎症、代谢改变等^[3]。APP/PS1转基因小鼠是研究AD最常用的动物模型,可表达突变的人类早老素1(PS1-dE9)和人类淀粉样前蛋白(APP^{swe})融合体,在3月龄时首次出现认知缺陷,在6~7月龄时脑内形成A β 沉淀^[4]。

海马和皮层被认为在学习记忆中发挥重大作用,可能在AD早期受到影响,是AD早期被破坏的区域之一^[5]。CNS由数十亿神经元组成,是神经元之间信息传递的结构基础;突触中具有“信使”功能的化学物质为神经递质^[6],是突触之间信息传递的物质基础^[7]。神经递质在调节学习和记忆功能中发挥重要作用^[8],阐明海马和皮层组织神经递质的代谢改变,对AD早期诊断和机制研究至关重要。

代谢组学是继基因组学、蛋白质组学之后发展起来,用于对生物体或细胞特定生理时期内所有小分子代谢物进行定性和定量分析的方法^[9],被广泛应用于发病机制的研究^[10]、生物标志物的开发^[11]、中药成分和疗效的鉴定^[12]。本研究通过超高效液相色谱串联质谱(ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS)技术分析同月龄野生型和APP/PS1转基因小鼠海马和皮层的神经递质代谢特征,鉴别差异代谢物。

一、材料与方法

1. 研究材料: (1) 动物。健康雌性6月龄野生型和APP/PS1转基因小鼠各8只(5只用于代谢检测,3只用于刚果红染色),体重20~25 g,购于杭州子源实验动物科技有限公司,动物许可证号: SCK(浙)2019-0004。所有动物均饲养于屏障环境中,动物实验均遵照国家实验动物饲养和实验指南,实验已获

得首都医科大学宣武医院实验动物福利伦理委员会的审批(批准号: XW-2022-0422-1)。(2) 药品与试剂。1%戊巴比妥钠溶液(首都儿科研究所)、多聚甲醛固定液(索莱宝)、蔗糖(麦克林)、刚果红试剂盒(索莱宝)、乙腈(Merck); 甲酸(Fluka)、甲酸铵购于阿拉丁。标准品购于Sigma-Aldrich。(3) 仪器。冰冻切片机(美国Lecia)、显微镜及成像系统(日本Nikon)、超高效液相色谱仪(Agilent 1290 Infinity LC)、色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide C18(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m)、5500 QTRAP质谱仪(AB SCIEX)、低温高速离心机(Eppendorf5430R)、组织碎裂仪。

2. 刚果红实验: (1) 灌注取材。根据小鼠体重,按照50 mg/kg的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠。麻醉成功后,快速灌注生理盐水约50 ml,然后更换4%多聚甲醛前固定液约50 ml。灌注完毕后将大脑完整取出,放到多聚甲醛后固定液(含有30%蔗糖)中,4 $^{\circ}$ C保存。(2) 冰冻切片。鼠脑用OCT(optimal cutting temperature compound)包埋后,置于预冷的异戊烷中快速冷冻约30 s,取出进行冠状位切片,切片厚度为10~15 μ m。(3) 刚果红染色。用组化笔沿脑组织切片画圈,滴加适量的改良Highman染色液,染色20 min; 弃去染色液,滴加分化液分化2 s,立即入水终止分化; 自来水冲洗5 min,滴加Mayer苏木素染色液染色1 min; 自来水冲洗5 min,依次入50%、70%、80%、90%、95%、100%梯度乙醇脱水各3 min。二甲苯I、二甲苯II、二甲苯III各透明10 min。采用中性树胶封片,光镜下观察小鼠脑组织中皮层及海马区是否存在呈粉红色的A淀粉样物质。

3. 代谢物提取: 使用1%戊巴比妥钠溶液按照50 mg/kg的剂量腹腔注射麻醉小鼠,待麻醉成功后快速完整地分离海马和皮层,脑组织置于液氮中保存。称取小鼠新鲜脑组织,按照1:10=w:v的比例加入预冷的生理盐水中,冰上匀浆。14 000 g 4 $^{\circ}$ C离心20 min取上清50 μ l,加入500 μ l预冷的甲酸:乙腈=1:4(v/v)的混合液,涡旋混合,冰浴中超声20 min后于-20 $^{\circ}$ C静置1 h,后14 000 g 4 $^{\circ}$ C离心20 min取上清,

真空干燥。检测时加入含有1%甲酸的乙腈溶液:水=1:1(v/v)100 μ l复溶,14 000 g 4 $^{\circ}$ C离心20 min,取上清进样分析。

4. 色谱-质谱条件:(1)高效液相色谱条件。流动相A:含0.1%甲酸的25 mmol/L甲酸铵水溶液;流动相B:含0.1%甲酸的乙腈溶液。柱温45 $^{\circ}$ C,流速为300 μ l/min,进样量为1 μ l。洗脱条件:0~18.0 min,流动相B从90%线性变化至40%;18.0~18.1 min,流动相B从40%线性变化至90%;18.1~23.0 min,流动相B维持在90%。(2)质谱条件。电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI)条件:源温度450 $^{\circ}$ C;离子空间电压5 000 V;离子源气体1:60;离子源气体2:60。

5. 代谢组学数据分析方法:采用主成分分析(principal component analysis, PCA)法对野生型和APP/PS1转基因小鼠海马和皮层的神经递质代谢物的整体轮廓进行表征和比较,观察两组之间的总体分布情况。PCA得分的每个点代表1个样本,不同颜色代表不同组别之间的样本分布情况。在两组小鼠神经递质差异代谢的基础上采用正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA),筛选差异代谢物。筛选标准为在OPLS-DA模型主成分的差异权重贡献值(variable influence on projection, VIP) \geq 1的基础上,独立样本 t 检验 $P < 0.05$,或差异倍数(fold change, FC)值 ≥ 1.2 或FC值 ≤ 0.8 ,找出两组之间的差异代谢物。

6. 统计学方法:采用SPSS 26.0统计学软件进行数据分析。计数资料以频数表示。数据进行方差齐性检验和正态性检验,正态分布且方差齐的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;方差不齐且非正态分布的计量资料以中位数和四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$]表示,组间比较采用秩和检验。双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

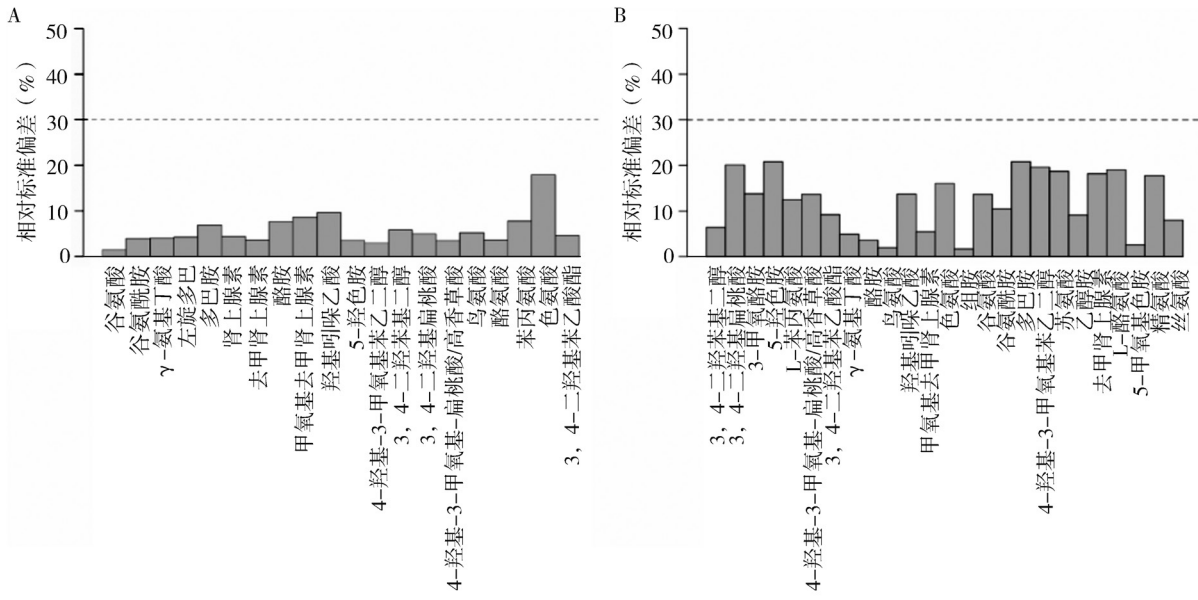
1. 小鼠脑组织A β 沉积情况:通过刚果红实验对两组小鼠皮层和海马CA3区的A β 沉积情况进行检测,结果显示野生型小鼠脑部无A β 沉积,APP/PS1转基因小鼠海马和皮层CA3区均有A β 沉积,见图1(见本期封二)。

2. 代谢组学方法的稳定性:为了验证代谢组学方法的稳定性,采用3个质量控制(quality control, QC)样本质控,QC样本全部特征峰的相对标准偏差

(relative standard deviation, RSD) $< 30\%$,说明仪器稳定,方法可靠,数据良好,见图2。

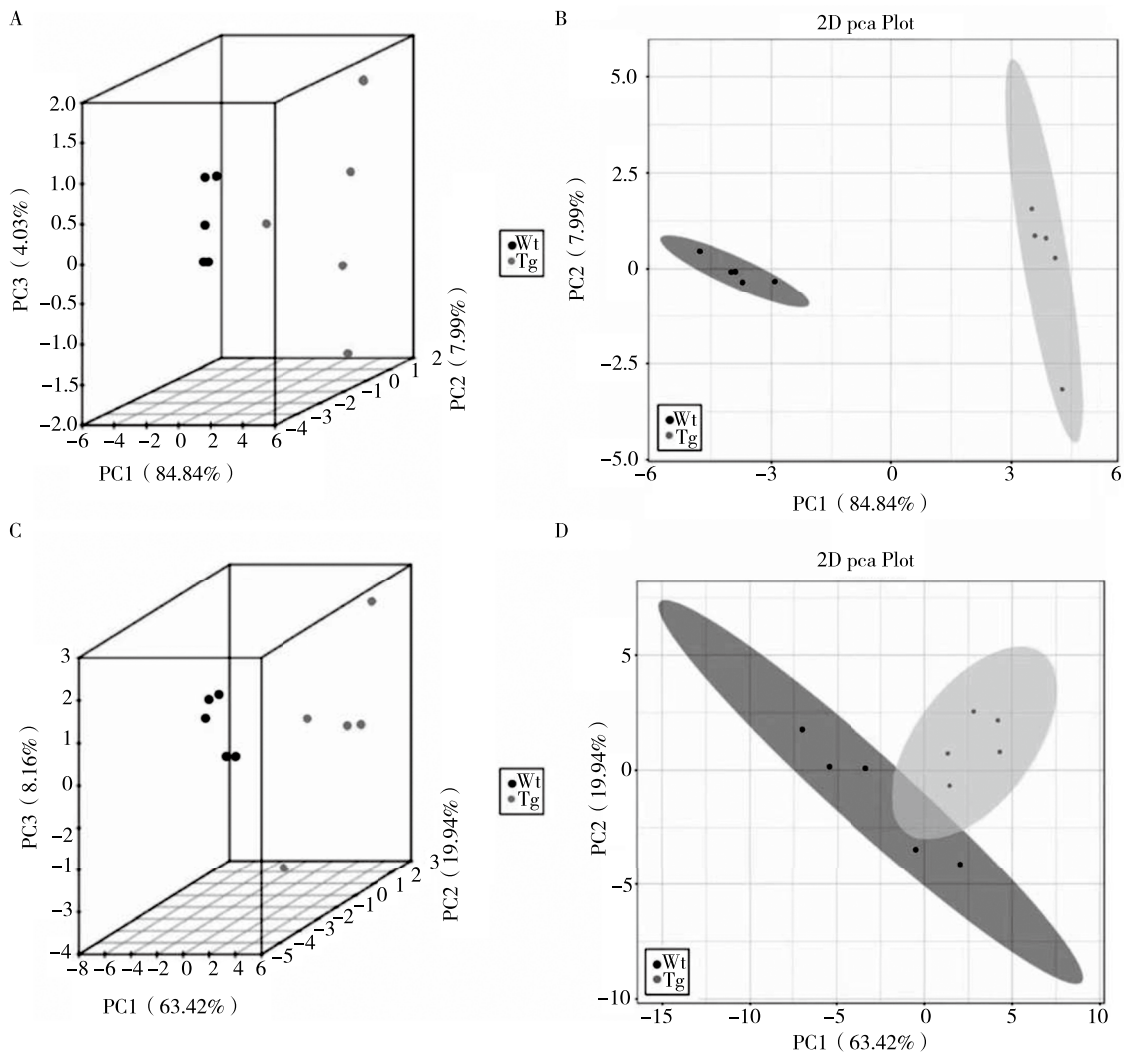
3. 代谢组学多元统计分析:(1)代谢组学海马皮层代谢轮廓分析,见图3。野生型和转基因小鼠的代谢轮廓有分离趋势,表明两组小鼠神经递质代谢轮廓有差异。(2)差异代谢物分析。OPLS-DA得分图及 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2 显示野生型和转基因小鼠分离,具有良好的区分和预测能力,见图4。结合OPLS-DA模型中的VIP值和 P 值。野生型和转基因小鼠海马中差异代谢物有17个(表1、2),分别为肾上腺素(epinephrine)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、左旋多巴(larodopa, DOPA)、多巴胺(dopamine)、3,4-二羟基苯乙酸酯(3,4-dihydroxyphenylacetate, DOPAC)、3,4-二羟基苯基二醇(3,4-dihydroxyphenyl glycol, DHPG)、3,4-二羟基扁桃酸(3,4-dihydroxymandelic acid, DHMA)、甲氧基去甲肾上腺素(normetanephrine, NMN)、4-羟基-3-甲氧基苯乙二醇(4-hydroxy-3-methoxyphenylethylene glycol, MHPG)、4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸/高香草酸(4-hydroxy-3-methoxymandelic acid, HVA)、谷氨酰胺(glutamine)、谷氨酸(glutamate)、GABA、5-HT、羟基吲哚乙酸(5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA)、鸟氨酸(ornithine)、酪胺(tyramine);皮层中差异代谢物有12个,分别为多巴胺、DOPAC、NMN、3-甲氧酪胺(3-Methoxytyramine hydrochloride, 3-MT)、MHPG、HVA、5-HT、5-HIAA、乙醇胺(ethanolamine)、L-酪氨酸(tyrosine)、L-苯丙氨酸(phenylalanine)、苏氨酸(threonine)。(3)海马和皮层差异代谢物变化比较。海马组织和皮层组织分别鉴定出17和12种差异代谢物,且APP/PS1转基因小鼠海马组织中差异代谢物较野生型小鼠海马组织多呈下降趋势,而皮层多呈表达增加趋势,见表3。(4)代谢物在两组小鼠海马和皮层中的相对含量。以热图的形式对标志物的相对含量进行可视化展示,横坐标为样本组别和编号,纵坐标为代谢物聚类分析结果。与野生型小鼠相比,APP/PS1转基因小鼠海马组织中的肾上腺素、NE、DOPA、多巴胺、DOPAC、DHPG、DHMA、MHPG、HVA、谷氨酰胺、谷氨酸、GABA、5-HT、5-HIAA、鸟氨酸和酪胺表达量降低,NMN表达量升高;APP/PS1转基因小鼠皮层中的多巴胺、DOPAC、NMN、3-MT、MHPG、HVA、5-HT、5-HIAA、乙醇胺、L-酪氨酸表达量升高、L-苯丙氨酸、苏氨酸表达量降低,见图5(见本期封三)。

讨论 目前,我国AD患者已经接近1 000万,预计到2050年,该数字将达到2 000万以上^[13]。AD



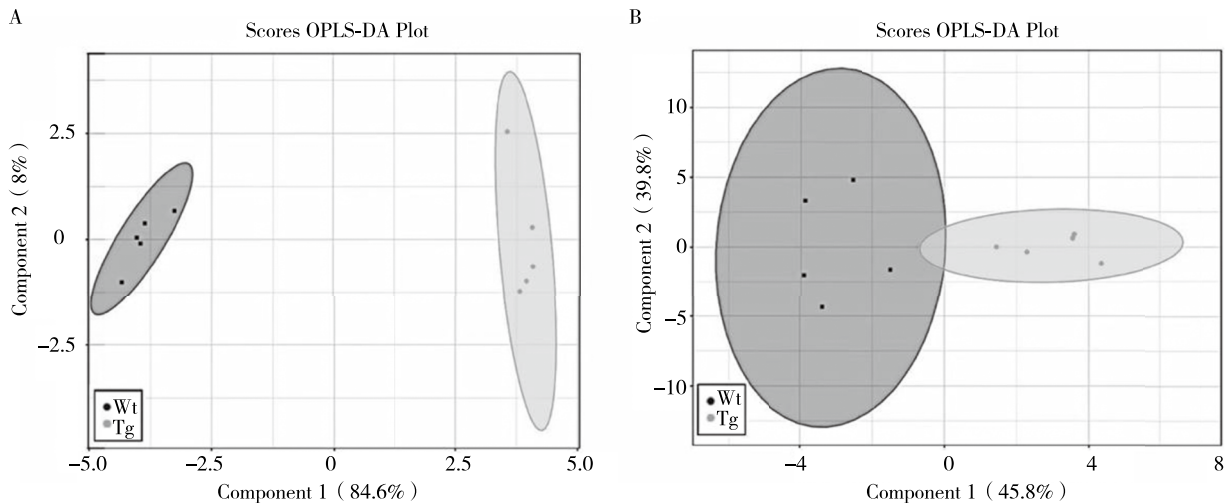
注: A为海马组织; B为皮层组织

图2 质量控制样本的相对标准偏差分析



注: A、B为海马组织主成分分析得分图; C、D为皮层组织主成分分析得分图; PC 主成分; Wt 野生型小鼠; Tg APP/PS1转基因小鼠

图3 野生型小鼠(n=5)和APP/PS1转基因小鼠(n=5)海马、皮层代谢轮廓图



注: A为海马组织OPLS-DA得分图, $R^2X=0.846, R^2Y=0.99, Q^2=0.987$; B为皮层组织OPLS-DA得分图, $R^2X=0.458, R^2Y=0.725, Q^2=0.63$; Wt野生型小鼠; Tg APP/PS1转基因小鼠; OPLS-DA 正交偏最小二乘判别分析

图4 野生型小鼠(n=5)和APP/PS1转基因小鼠(n=5)海马、皮层差异代谢物分析

表1 野生型和APP/PS1转基因小鼠海马组织神经递质代谢物差异

序号	代谢物	脑组织含量 [ng/g, $\bar{x} \pm s$ 或 $M(P_{25}, P_{75})$]		保留时间 (min)	母离子和子离子对应的离子对 ^a	差异权重贡献值	差异倍数	P值
		野生型(n=5)	APP/PS1转基因(n=5)					
1	肾上腺素	$0.002 \pm 4.491 \times 10^{-5}$	$0.001 \pm 7.182 \times 10^{-6}$	9.77	883.2/537.0	1.09	0.56	<0.001
2	去甲肾上腺素	$0.003 \pm 3.883 \times 10^{-5}$	$0.002 \pm 7.764 \times 10^{-5}$	9.48	869.2/851.0	1.08	0.62	<0.001
3	左旋多巴	0.015(0.015, 0.015)	0.009(0.009, 0.009)	9.30	897.2/618.0	1.08	0.62	<0.001
4	多巴胺	$4.214 \times 10^{-4} \pm 0.720 \times 10^{-4}$	$2.284 \times 10^{-4} \pm 0.220 \times 10^{-4}$	9.83	853.2/619.0	1.03	0.55	0.024
5	3,4-二羟基苯乙酸酯	0.033 ± 0.001	0.021 ± 0.001	8.19	635.2/401.0	1.08	0.63	<0.001
6	3,4-二羟基苯基乙醇	$0.002 \pm 2.969 \times 10^{-5}$	$0.001 \pm 2.443 \times 10^{-5}$	7.81	651.1/170.1	1.08	0.69	<0.001
7	3,4-二羟基扁桃酸	$0.006 \pm 4.070 \times 10^{-4}$	$0.003 \pm 8.711 \times 10^{-5}$	7.50	651.1/170.1	1.08	0.55	<0.001
8	甲氧基去甲肾上腺素	0.006 ± 0.001	0.020 ± 0.002	8.04	650.2/170.0	1.05	3.51	<0.001
9	4-羟基-3-甲氧基苯乙醇	$0.002 \pm 1.354 \times 10^{-4}$	$0.002 \pm 7.764 \times 10^{-5}$	5.58	637.2/386.0	1.06	0.66	<0.001
10	4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸/高香草酸	$0.011 \pm 2.496 \times 10^{-4}$	$0.007 \pm 1.103 \times 10^{-4}$	6.21	416.1/171.1	1.09	0.61	<0.001
11	谷氨酰胺	2.616 ± 0.165	1.552 ± 0.040	3.94	380.1/170.1	1.08	0.61	<0.001
12	谷氨酸	2.594 ± 0.094	2.197 ± 0.082	4.11	381.1/252.2	1.02	0.84	0.009
13	γ -氨基丁酸	1.514(1.467, 1.535)	0.897(0.896, 0.948)	4.60	337.1/157.1	1.08	0.62	<0.001
14	5-羟色胺	$0.002 \pm 1.248 \times 10^{-4}$	$0.001 \pm 5.648 \times 10^{-5}$	8.36	643.2/299.0	1.06	0.65	<0.001
15	羟基吲哚乙酸	0.058 ± 0.003	0.040 ± 0.001	5.98	425.1/170.2	1.08	0.71	<0.001
16	鸟氨酸	$0.009 \pm 3.436 \times 10^{-4}$	$0.006 \pm 3.193 \times 10^{-4}$	6.55	599.2/303.1	1.07	0.65	<0.001
17	酪胺	$0.016 \pm 5.127 \times 10^{-5}$	$0.008 \pm 7.476 \times 10^{-5}$	8.75	604.2/170.0	1.08	0.51	<0.001

注:^a野生型小鼠比APP/PS1转基因小鼠

患者生活无法自理。有研究报道,痴呆患者治疗和照护费用约为2万美元/(人·年),2050年,我国痴呆相关总费用将达到1.89万亿美元/年^[14-15],给家庭和社会带来沉重的经济负担和精神压力。AD发病机制复杂,目前缺乏有效的干预和逆转措施,对AD的早期诊断和干预成为重点。

APP/PS1转基因小鼠是目前公认的AD动物模型,基于UPLC-MS代谢组学技术对APP/PS1转基因小鼠海马和皮层神经递质代谢物进行检测,分析其

差异代谢物和代谢变化可能为AD标志物和机制研究提供帮助。本研究经过多元统计分析,可见野生型和APP/PS1转基因模型小鼠神经递质代谢物分离良好,OPLS-DA模型可以很好地区分和预测两组小鼠海马和皮层神经递质代谢物的差异;在海马和皮层中各发现17和12个差异代谢物。

神经递质在维持大脑正常功能表达中发挥着重要作用,神经递质的变化与多种神经疾病密切相关,如精神分裂症、抑郁症^[16]等。AD患者也具有显著

表2 野生型和APP/PS1转基因小鼠皮层组织神经递质代谢物差异

序号	代谢物	脑组织含量(ng/g, $\bar{x} \pm s$)		保留时间(min)	母离子和子离子对应的离子对 ^a	差异权重贡献值	差异倍数	P值
		野生型(n=5)	APP/PS1转基因(n=5)					
1	多巴胺	0.253 ± 0.033	0.719 ± 0.461	9.91	853.2/619.0	1.11	2.84	0.055
2	3,4-二羟苯基乙酸酯	0.407 ± 0.080	2.364 ± 1.195	8.28	635.2/401.0	1.41	5.81	0.006
3	甲氧基去甲肾上腺素	0.674 ± 0.532	6.513 ± 1.416	8.10	650.2/170.0	1.35	9.14	<0.001
4	3-甲氧酪胺	0.192 ± 0.036	0.531 ± 0.311	8.64	634.2/170.0	1.16	2.76	0.042
5	4-羟基-3-甲氧基苯乙二醇	0.132 ± 0.027	0.211 ± 0.022	5.65	418.1/171.0	1.33	1.60	<0.001
6	4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸/高香草酸	0.620 ± 0.207	2.944 ± 1.304	6.29	416.1/171.1	1.40	4.75	<0.001
7	5-羟色胺	0.049 ± 0.008	0.165 ± 0.112	8.45	643.2/299.0	1.20	3.36	0.049
8	羟基吲哚乙酸	0.220 ± 0.118	1.597 ± 0.599	6.11	425.1/170.2	1.37	7.26	<0.001
9	乙醇胺	56.618 ± 9.066	83.550 ± 4.716	4.41	295.1/280.1	1.28	1.48	<0.001
10	L-酪氨酸	4.681 ± 2.964	35.170 ± 5.887	7.98	648.2/340.2	1.37	7.51	<0.001
11	L-苯丙氨酸	58.511 ± 25.162	97.643 ± 4.965	5.99	399.1/157.1	1.08	1.67	0.009
12	苏氨酸	63.526 ± 25.130	101.050 ± 16.012	4.38	353.1/157.1	1.04	1.59	0.022

注：^a野生型小鼠比APP/PS1转基因小鼠

表3 野生型和APP/PS1转基因小鼠海马、皮层组织神经递质代谢物变化趋势

序号	海马组织		皮层组织	
	代谢物	变化趋势	代谢物	变化趋势
1	肾上腺素	↓	多巴胺	↑
2	去甲肾上腺素	↓	3,4-二羟苯基乙酸酯	↑
3	左旋多巴	↓	甲氧基去甲肾上腺素	↑
4	多巴胺	↓	3-甲氧酪胺	↑
5	3,4-二羟苯基乙酸酯	↓	4-羟基-3-甲氧基苯乙二醇	↑
6	3,4-二羟苯基二醇	↓	4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸/高香草酸	↑
7	3,4-二羟扁桃酸	↓	5-羟色胺	↑
8	甲氧基去甲肾上腺素	↑	羟基吲哚乙酸	↑
9	4-羟基-3-甲氧基苯乙二醇	↓	乙醇胺	↑
10	4-羟基-3-甲氧基-扁桃酸/高香草酸	↓	L-酪氨酸	↑
11	谷氨酰胺	↓	L-苯丙氨酸	↓
12	谷氨酸	↓	苏氨酸	↓
13	γ-氨基丁酸	↓	-	-
14	5-羟色胺	↓	-	-
15	羟基吲哚乙酸	↓	-	-
16	鸟氨酸	↓	-	-
17	酪胺	↓	-	-

注：↑表示APP/PS1转基因小鼠神经递质脑组织中含量比野生型高；↓表示APP/PS1转基因小鼠神经递质脑组织中含量比野生型低；-无数据

的神经递质变化^[17],如乙酰胆碱、谷氨酸、GABA等。

中枢神经递质主要包括胆碱类、单胺类、氨基酸类以及具有信息传递作用的生物活性肽、组胺、前列腺素等。单胺类神经递质(monoamine neurotransmitter)包括儿茶酚胺类(catecholamines, CAs)、5-HT、酪胺等。

CAs物质是一类含有儿茶酚和胺基的神经递质,包括肾上腺素、NE、多巴胺等,主要由交感神经和肾上腺髓质产生和释放。其代谢过程包括酪氨酸由酪氨酸羟化酶转化为DOPA, DOPA在二羟苯丙氨

酸脱羧酶作用下生成多巴胺,多巴胺在多巴胺β-羟化酶作用下进而转化为NE, NE在酶的作用下转化为肾上腺素,代谢过程的中间产物有DOPAC、DHPG、DHMA、NMN和3-MT^[18-19],代谢终产物为MHPG、HVA和MHPC^[20-21]。CAs神经递质在生物体内分布广泛,对多种生理活动具有调节作用。相关研究显示,儿茶酚胺类神经递质与多种心理过程有关^[22]。有研究观察到AD患者脑内儿茶酚胺类物质含量降低^[23]。肾上腺素能神经传递与AD和认知功

能障碍也存在密不可分的关系^[24-26],儿童肾上腺素发育促使儿童认知发育,老年男性肾上腺素排泄增加会导致认知功能障碍^[27]。蓝斑去甲肾上腺素能与认知功能下降密切相关^[28],具有调节认知功能的作用^[29]。研究显示,认知功能增强与NE和多巴胺呈倒置“U”型关系,抑制NE和多巴胺再摄取会导致高多巴胺/NE能状态,进而导致认知功能下降^[30]。多巴胺与认知功能也具有密不可分的关系^[31],认知功能依赖于多巴胺信号转导,多巴胺神经转运能力增强可以改善认知,认知训练也会改变多巴胺的功能^[32-33]。

本研究结果显示,在转基因小鼠海马区,儿茶酚胺类物质含量下降,皮质组织中含量升高。血管活性物质5-HT和其代谢产物5-HIAA在APP/PS1转基因小鼠海马和皮质组织中的表达变化趋势与儿茶酚胺类变化趋势相似。5-HT是色氨酸的主要代谢产物,与免疫功能和神经系统调节具有密切关系,广泛存在于CNS和胃肠道^[34]。5-HT在神经系统内含量较少,参与大脑多种过程,包括情绪、焦虑、感觉、昼夜节律、睡眠觉醒等,与神经系统疾病密切相关,如抑郁、焦虑、精神分裂症等^[35]。5-HT由轴突末端产生,其代谢过程为色氨酸在色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase)作用下生成5-羟色氨酸,该步骤是体内生成5-HT的限速步骤;5-羟色氨酸由氨基脱羧酶还原成5-HT。5-HT储存在囊泡中,当兴奋性冲动抵达轴突末梢时,囊泡与突触前膜融合,5-HT释放到突触间隙,与突触后膜上5-HT受体相结合,发挥生物学效应。未与受体结合的5-HT被重新摄取储存在囊泡中,未能储存在囊泡中的5-HT被单胺氧化酶(monoamine oxidase)降解,生成终代谢产物5-HIAA。5-HIAA是中枢和外周神经系统中5-HT的活性指标^[36]。有研究证明,相较于男性,女性更容易罹患情感和认知障碍的原因是女性5-HT的合成率低于男性^[37]。伏地西汀抑制5-HT转运、拮抗5-HT受体对抑郁患者的认知功能有改善作用^[38]。

氨基酸类神经递质包括兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸两类,前者包括谷氨酸和天冬氨酸,后者包括GABA、甘氨酸等。谷氨酸其受体参与调节突触可塑性和记忆形成^[39],而谷氨酸是哺乳动物脑内含量最高的氨基酸,是体内物质代谢的中间产物,也是合成GABA的前体物质。GABA是CNS中重要的抑制性神经递质,在认知、学习、记忆、神经发育等生理、生化过程中发挥重要作用,广泛非均匀分布于哺乳动物脑内(大脑皮层、海马和小脑)。GABA经由谷氨酸脱羧酶脱羧形成,在认知、学习、记忆、神经发育

等生理、生化过程中发挥重要作用。有研究显示,AD患者大脑和脑脊液中的GABA含量降低^[15],在AD患者颞回中也发现了GABA传导受损^[40]。GABA和谷氨酸之间的平衡改变是导致突触功能障碍的病理因素之一^[41],两者之间的平衡是神经元功能正常的必要条件^[42]。

APP/PS1转基因小鼠鸟氨酸含量表达下降,可能与鸟氨酸具有促进生长激素分泌、提高基础代谢的作用有关。鸟氨酸是一种非蛋白源性氨基酸,在鸟氨酸循环中可将血液中的氨转化成为尿素,其也是体内鸟氨酸循环中精氨酸的代谢中间体,鸟氨酸循环改变可能是APP/PS1小鼠的早期病理改变之一。

乙醇胺是磷脂代谢的产物,可影响细胞免疫功能,与脑内血浆激素的神经保护作用 and 神经退行性疾病相关^[43]。以上结果显示,儿茶酚胺类物质的代谢改变是APP/PS1转基因小鼠最主要的变化。此外,谷氨酸和GABA的平衡、鸟氨酸循环、磷脂代谢等也与APP/PS1转基因小鼠早期代谢改变相关。

APP/PS1转基因小鼠海马和皮质组织中神经递质代谢物和野生型小鼠呈现不同变化趋势,可能与小鼠脑组织中存在“补偿回路”有关^[44],即在早期记忆功能区的认知障碍,通过功能重组,用其他组织的活动增强代偿,当损害达到一定程度或补偿认知任务的困难程度超出某个程度时,则表现为活动强度下降。有脑功能磁共振研究显示,AD患者海马部分较老年人激活明显降低,顶叶和扣带回部分则有较大增加,揭示了AD患者可能存在皮质组织的早期补偿。

综上所述,应用代谢组学方法研究野生型和APP/PS1转基因小鼠神经递质代谢变化是可靠的。本研究构建了两种OPLS-DA模型,通过差异代谢物筛选,最终在海马和皮质鉴定出17、12种差异代谢物,对研究APP/PS1转基因小鼠早代谢改变具有一定价值。但本研究未能进行海马和皮质组织的功能磁共振分析以及各种差异代谢物变化的深入研究。在后续实验中,将进一步研究每种差异代谢物在不同脑区的变化机制和影响,为AD的机制和早期诊断提供帮助。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 实验设计为王蓉、康美美,实验实施为康美美、吕彩珍,论文撰写为康美美,论文修订为王蓉

参 考 文 献

[1] Jia L, Du Y, Chu L, et al. Prevalence, risk factors, and

- management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study[J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): e661-e671. DOI: 10.1016/S2468-2667(20)30185-7.
- [2] A R, Yue R, Chen B, et al. Moxibustion for the treatment of Alzheimer's disease: a protocol for a systematic reviews and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(6): e24657. DOI: 10.1097/MD.00000000000024657.
- [3] Ettcheto M, Sánchez-López E, Pons L, et al. Dexibuprofen prevents neurodegeneration and cognitive decline in APPswe/PS1dE9 through multiple signaling pathways[J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 345-352. DOI: 10.1016/j.redox.2017.06.003.
- [4] Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models[J]. *Front Genet*, 2014, 5: 88. DOI: 10.3389/fgene.2014.00088.
- [5] Gage FH. Adult neurogenesis in mammals[J]. *Science*, 2019, 364(6443): 827-828. DOI: 10.1126/science.aav6885.
- [6] Li Q, Zheng J, Xu S, et al. The neurotoxicity induced by PM(2.5) might be strongly related to changes of the hippocampal tissue structure and neurotransmitter levels[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7(6): 1144-1152. DOI: 10.1039/c8tx00093j.
- [7] Wu X, Wang K, Cui S, et al. Electroacupuncture ameliorates acute myocardial ischemia: a potential role of the locus coeruleus[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4298657. DOI: 10.1155/2020/4298657.
- [8] Kundap UP, Kumari Y, Othman I, et al. Zebrafish as a model for epilepsy-induced cognitive dysfunction: a pharmacological, biochemical and behavioral approach[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 515. DOI: 10.3389/fphar.2017.00515.
- [9] Shi M, Liao P, Nile SH, et al. Biotechnological exploration of transformed root culture for value-added products[J]. *Trends Biotechnol*, 2021, 39(2): 137-149. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.06.012.
- [10] Wen Z, He M, Peng C, et al. Metabolomics and 16S rRNA gene sequencing analyses of changes in the intestinal flora and biomarkers induced by *Gastrodia-Uncaria* treatment in a rat model of chronic migraine[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1425. DOI: 10.3389/fphar.2019.01425.
- [11] Roberts LD, Gerszten RE. Toward new biomarkers of cardiometabolic diseases[J]. *Cell Metab*, 2013, 18(1): 43-50. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.05.009.
- [12] Zhou J, Yin Y. Strategies for large-scale targeted metabolomics quantification by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Analyst*, 2016, 141(23): 6362-6373. DOI: 10.1039/c6an01753c.
- [13] Jia J, Zuo X, Jia XF, et al. Diagnosis and treatment of dementia in neurology outpatient departments of general hospitals in China[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(4): 446-453. DOI: 10.1016/j.jalz.2015.06.1892.
- [14] Jia L, Quan M, Fu Y, et al. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 81-92. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30290-X.
- [15] Jia J, Wei C, Chen S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.12.006.
- [16] Saha MR, Dey P, Begum S, et al. Effect of *Acacia catechu* (L.f.) Willd. on oxidative stress with possible implications in alleviating selected cognitive disorders[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150574. DOI: 10.1371/journal.pone.0150574.
- [17] Sun Z, Li Q, Bi K. Rapid HPLC-ESI-MS/MS analysis of neurotransmitters in the brain tissue of Alzheimer's disease rats before and after oral administration of *Xanthoceras sorbifolia bunge*[J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3111. DOI: 10.3390/molecules23123111.
- [18] 李艳, 许舒欣, 刘海培, 等.液相色谱-串联质谱法测定血浆中甲氧基肾上腺素和甲氧基去甲肾上腺素[J]. *分析科学学报*, 2020, 36(3): 374-378. DOI: 10.13526/j.issn.1006-6144.2020.03.010. Li Y, Xu SX, Liu HP, et al. Determination of metanephrine and nometanephrine in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Analytical Science*, 2020, 36(3): 374-378.
- [19] 秦嘉倩, 彭颖斐, 陈方俊, 等.液相色谱-串联质谱检测血浆3-甲氧酪胺方法的建立[J]. *检验医学*, 2017, 32(11): 1046-1050. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2017.011.024. Qin JQ, Peng YF, Chen FJ, et al. Establishment of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of plasma 3-methoxytyramine[J]. *Laboratory Medicine*, 2017, 32(11): 1046-1050.
- [20] 王聪, 赵晓宇, 孙磊, 等.高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定猪肉及肝脏中肾上腺素代谢物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(21): 7909-7914.
- [21] 刘岩, 胡志飞, 黄带发, 等.超高效液相色谱-串联质谱法检测2型糖尿病伴胰岛素抵抗患者血浆儿茶酚胺及其代谢物含量[J]. *中国临床保健杂志*, 2021, 24(4): 459-464. DOI: 10.3969/j.issn.1672-6790.2021.04.006. Liu Y, Hu ZF, Huang DF, et al. The relationship between catecholamine and its metabolites determined by UPLC-MS/MS and type 2 diabetes mellitus with insulin resistance[J]. *Chinese Journal of Clinical Healthcare*, 2021, 24(4): 459-464.
- [22] Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, et al. Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(7): 796-840. DOI: 10.2174/092986709787549271.
- [23] Kornum BR, Weikop P, Moller A, et al. Serotonin depletion results in a decrease of the neuronal activation caused by rivastigmine in the rat hippocampus[J]. *Brain Res*, 2006, 1073-1074: 262-268. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.12.030.
- [24] Webber MA, Marder SR. Better pharmacotherapy for schizophrenia: what does the future hold?[J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2008, 10(4): 352-358. DOI: 10.1007/s11920-008-0056-8.
- [25] Cheng YJ, Lin CH, Lane HY. Involvement of cholinergic, adrenergic, and glutamatergic network modulation with cognitive dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5). DOI: 10.3390/ijms22052283
- [26] Shi Y, Luo H, Liu H, et al. Related biomarkers of neurocognitive impairment in children with obstructive sleep apnea[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2019, 116: 38-42. DOI: 10.1016/j.ijporl.2018.10.015.
- [27] Havakuk O, King KS, Grazette L, et al. Heart failure-induced brain injury[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(12): 1609-1616. DOI: 10.1016/j.jacc.2017.01.022.
- [28] Eldar E, Cohen JD, Niv Y. The effects of neural gain on attention and learning[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(8): 1146-1153. DOI: 10.1038/nn.3428.

- [29] López-Picón FR, Kirjavainen AK, Forsback S, et al. In vivo characterization of a novel norepinephrine transporter PET tracer [¹⁸F]NS12137 in adult and immature Sprague-Dawley rats[J]. *Theranostics*, 2019, 9(1): 11-19. DOI: 10.7150/thno.29740.
- [30] Napoletano F, Schifano F, Corkery JM, et al. The psychonauts' world of cognitive enhancers[J]. *Front Psychiatry*, 2020, 11: 546796. DOI: 10.3389/fpsy.2020.546796.
- [31] Cools R, Miyakawa A, Sheridan M, et al. Enhanced frontal function in Parkinson's disease[J]. *Brain*, 2010, 133(Pt 1): 225-233. DOI: 10.1093/brain/awp301.
- [32] Avlar B, Kahn JB, Jensen G, et al. Improving temporal cognition by enhancing motivation[J]. *Behav Neurosci*, 2015, 129(5): 576-588. DOI: 10.1037/bne0000083.
- [33] DeBattista C, Hawkins J. Utility of atypical antipsychotics in the treatment of resistant unipolar depression[J]. *CNS Drugs*, 2009, 23(5): 369-377. DOI: 10.2165/00023210-200923050-00002.
- [34] 李小兰, 江敏, 阮征, 等. 色氨酸及其代谢产物 5-HT 对肠道功能的作用综述[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014(7): 1997-2002.
Li XL, Jiang M, Ruan Z, et al. Review of effects of L-tryptophan and its metabolite 5-hydroxytryptamine on intestinal function[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2014(7): 1997-2002.
- [35] Scheiner R, Baumann A, Blenau W. Aminergic control and modulation of honeybee behaviour[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2006, 4(4): 259-276. DOI: 10.2174/157015906778520791.
- [36] Baek JY, Trinh TA, Huh W, et al. Electro-acupuncture alleviates cisplatin-induced anorexia in rats by modulating ghrelin and monoamine neurotransmitters[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 624. DOI: 10.3390/biom9100624.
- [37] Hiroi R, Weyrich G, Koebele SV, et al. Benefits of Hormone Therapy Estrogens Depend on Estrogen Type: 17β-Estradiol and Conjugated Equine Estrogens Have Differential Effects on Cognitive, Anxiety-Like, and Depressive-Like Behaviors and Increase Tryptophan Hydroxylase-2 mRNA Levels in Dorsal Raphe Nucleus Subregions[J]. *Front Neurosci*, 2016, 10: 517. DOI: 10.3389/fnins.2016.00517.
- [38] Bishop MM, Fixen DR, Linnebur SA, et al. Cognitive effects of vortioxetine in older adults: a systematic review[J]. *Ther Adv Psychopharmacol*, 2021, 11: 20451253211026796. DOI: 10.1177/20451253211026796.
- [39] Kern A, Mavrikaki M, Ullrich C, et al. Hippocampal Dopamine/DRD1 signaling dependent on the ghrelin receptor[J]. *Cell*, 2015, 163(5): 1176-1190. DOI: 10.1016/j.cell.2015.10.062.
- [40] Govindpani K, Turner C, Waldvogel HJ, et al. Impaired expression of GABA signaling components in the Alzheimer's disease middle temporal gyrus[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8704. DOI: 10.3390/ijms21228704.
- [41] Dulla CG, Coulter DA, Ziburkus J. From molecular circuit dysfunction to disease: case studies in epilepsy, traumatic brain injury, and Alzheimer's disease[J]. *Neuroscientist*, 2016, 22(3): 295-312. DOI: 10.1177/1073858415585108.
- [42] Wang LS, Tao X, Liu XM, et al. Cajaninstilbene acid ameliorates cognitive impairment induced by intrahippocampal injection of amyloid-β 1-42 oligomers[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1084. DOI: 10.3389/fphar.2019.01084.
- [43] Sibomana I, Grobe N, DelRaso N, et al. Influence of myo-inositol plus ethanolamine on plasmalogens and cell viability during oxidative stress[J]. *Chem Res Toxicol* 2019, 32(2): 265-284. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.8b00280
- [44] 侯淑莲, 高永春, 岂云开, 等. 脑功能磁共振成像技术对 Alzheimer 病的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(2): 193-195. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2007.02.048.

(收稿日期: 2022-02-16)
(本文编辑: 赵金鑫)

· 消息 ·

欢迎订阅 2023 年《神经疾病与精神卫生》杂志

《神经疾病与精神卫生》杂志是神经、精神科学及精神卫生领域的学术性期刊, 国内外公开发行人, 2006 年被中国科学技术信息研究所收录为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。本刊坚持党的出版方针和卫生工作方针, 遵循学科发展规律, 以提高杂志质量、扩大社会效益为使命, 及时反映科学研究的重大进展, 更好地促进国内外学术交流。主要读者对象为广大神经科学、精神科学及精神卫生领域中从事基础、临床医学、教学、科研的工作者及学生。报道内容包括相关各学科领先的教学、科研成果及临床诊疗经验。主要栏目有专家论坛(述评)、论著、学术交流、短篇报道、综述、病例报告、会议纪要、国内外学术动态等。

《神经疾病与精神卫生》杂志国内邮发代号为 82-353, 由北京市邮政局发行; 国外发行代号 BM1690, 由中国国际图书贸易总公司发行。每期定价 15.00 元, 全年 180.00 元。欢迎直接通过本社订阅。

银行汇款: 开户行: 中国建设银行建华支行 户名: 《神经疾病与精神卫生》杂志社
账号: 23001626251050500949
联系电话: (010)83191160 传真: (010)83191161