

人参皂苷 Re 对阿尔茨海默病模型小鼠脑组织生物标记物调控作用的研究

李菁媛 王喆 刘颖 李伟 李乃静

【摘要】 目的 通过超高速液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 技术研究人参皂苷 Re (G-Re) 对阿尔茨海默病 (AD) 模型小鼠生物标记物的调控作用以及机制, 为 AD 的中药治疗提供新思路。 **方法** 将小鼠随机分为对照组、AD 模型组和 G-Re 治疗组, 通过免疫组化实验观察小鼠脑部海马区细胞的病理学改变, 运用以 UPLC-MS 为基础的代谢组学技术研究 G-Re 对 AD 模型小鼠脑组织生物标记物的调控作用。 **结果** 免疫组化实验发现, 对照组小鼠海马区无 A β 沉积, AD 模型组小鼠海马区可见大量 A β 沉积, 经 G-Re 治疗后小鼠海马区 A β 沉积明显减少。代谢组学分析发现, AD 模型组小鼠脑组织中存在次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷、苯丙氨酸、16 碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、溶血磷脂酰胆碱 C16:0、溶血磷脂酰胆碱 C18:1、溶血磷脂酰胆碱 C18:0 等 9 种生物标记物。与对照组比较, AD 组次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷和苯丙氨酸的含量明显升高 ($P < 0.05$), 16 碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、溶血磷脂酰胆碱 (C16:0、C18:1、C18:0) 的含量明显降低 ($P < 0.05$)。经 G-Re 干预后, AD 组小鼠脑组织中次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷和苯丙氨酸的含量明显降低 ($P < 0.05$), 16 碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、溶血磷脂酰胆碱 (C16:0、C18:1、C18:0) 的含量明显升高 ($P < 0.05$)。 **结论** G-Re 可以干预 AD 小鼠体内氨基酸、核酸及脂质等代谢途径, 减少小鼠海马区的 A β 沉积, 从而对 AD 起到治疗作用。

【关键词】 人参皂苷 Re; 阿尔茨海默病; 生物标记物; 超高速液相色谱-质谱联用

【中图分类号】 R 749.16 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1003-9198.2017.10.007

Protective effect of ginsenoside Re on biomarkers in mice with Alzheimer's disease LI Jing-yuan, WANG Zhe, LI Nai-jing. Department of Gerontology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China; LIU Ying. Department of Emergency Medicine, Laboratory of PLA Wound and Trauma Center, the General Hospital of Shenyang Military, Shenyang 110016, China; LI Wei. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ginsenoside Re (G-Re) on biomarkers in an Alzheimer's disease (AD) mouse model based on UPLC-MS, and to provide new ideas for traditional Chinese medicine treatment of AD. **Methods** Twenty-four mice were randomly divided into control group, AD model group and G-Re treatment group with eight mice in each group. Pathological changes in the hippocampus were assessed by immunohistochemistry. UPLC/MS-based metabolomics was used to identify biomarkers which were differentially expressed in the brains of AD mice. **Results** The

基金项目: 国家自然科学基金 (81203002)

作者单位: 110004 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院干诊科 (李菁媛, 王喆, 李乃静); 110016 辽宁省沈阳市, 沈阳军区总医院急诊医学部全军重症战创伤救治中心实验室 (刘颖); 110016 辽宁省沈阳市, 沈阳药科大学药学院药物分析教研室 (李伟)

通讯作者: 李乃静, Email: lnjlw2003@163.com

hippocampal amyloid deposition increased in AD mice, and it was ameliorated by the treatment of G-Re. A total of 9 potential biomarkers were identified, which were associated with the metabolism of purine, amino acids, sphingolipids and lysophosphatidylcholines in AD mice. Compared to control group, the peak intensities of 9 biomarkers give a pronounced change in AD ($P < 0.05$). G-Re treatment affected all these metabolic pathways. **Conclusions** These results indicate that G-Re can reduce the hippocampal amyloid deposition in AD mice by regulation of related brain metabolic pathways. In a word, G-Re plays a positive role in the treatment of AD.

【Key words】 ginsenoside Re; Alzheimer's disease; biomarkers; ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种致死性的神经系统退行性疾病,其临床特点包括渐进性的记忆减退、情绪改变、沟通及推理方面障碍,最终病人将失去独立生活的能力^[1]。AD 不仅严重影响老年人的社交、工作与生活,其医疗和护理也给病人家庭和社会带来沉重的经济负担^[2]。因此,研究 AD 的发生机制,探索有效的预防和治疗策略,具有重要的临床意义。人参皂苷 Re (ginsenoside Re, G-Re) 作为人参的生物活性成分之一,具有改善脑缺血缺氧,提高学习和记忆能力等作用^[3]。关于 G-Re 治疗 AD 的代谢组学研究,国内外均未见报道。本研究首次将超高速液相色谱-质谱联用 (ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS) 为基础的代谢组学技术,用于研究 G-Re 对 AD 生物标记物的调控作用及其机制,以期 AD 的防治指明新方向。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 G-Re (上海源叶生物科技有限公司); β 淀粉样肽 25-35 (amyloid β -protein 25-35, $A\beta_{25-35}$)、兔抗鼠 $A\beta_{42}$ (美国 Sigma 公司); 山羊抗兔/鼠免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 色谱乙腈, 色谱甲醇 (美国 Fisher 公司)。TGL-16 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 液相系统 Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatography system, 质谱仪 Quattro micro™ API Mass Spectrometers (美国 Waters 公司)。

1.2 实验动物及分组 健康 12 周龄雄性昆明小鼠 24 只, 体质量为 18~22 g, 由沈阳药科大学实验动物中心提供, 动物使用许可证号 [SYXK (辽) 2014-004]。将 24 只小鼠随机分为对照组、AD 模型组和 G-Re 治疗组, 每组各 8 只。小鼠置于室温 23 °C ~ 25 °C, 光照 12 h/12 h 昼夜循环的条件下饲养, 自由饮水和进食。

1.3 实验方法

1.3.1 AD 模型制备: AD 组和 G-Re 组小鼠经 5% 水合氯醛麻醉后, 选取右侧侧脑室为注射位点, 缓慢注射凝聚态的 $A\beta_{25-35}$ 溶液 5 μ l。对照组小鼠侧脑室内注射等体积生理盐水。

1.3.2 给药方法: 造模成功后 3 d 开始灌胃给药, G-Re 治疗组小鼠给予 G-Re 4 mg/(kg · d), 对照组和 AD 组均给予生理盐水 10 ml/(kg · d)。1 次/d, 连续给药 30 d。

1.3.3 免疫组化实验: 实验小鼠经乙醚麻醉后, 采用断头取脑的方法获取脑组织。取脑后置于 4% 多聚甲醛液中, 固定 3 d, 将脑组织常规包埋并制成石蜡切片, 切片厚度为 2.5 μ m。切片置于 60 °C 恒温箱内过夜。切片脱蜡处理后, 用 PBS 洗去酒精。将切片放在抗原修复液中, 37 °C 温箱中修复 30 min 以暴露抗原。漂洗后 3% 过氧化氢溶液室温孵育 40 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性。漂洗后滴加山羊血清封闭抗原, 室温孵育 40 min。漂洗后滴加兔抗鼠 $A\beta_{1-42}$ (1:100), 4 °C 孵育过夜。漂洗后滴加聚合物辅助剂, 室温孵育 20 min。滴加辣根酶标记的抗鼠/兔 IgG 聚合物, 室温孵育 20 min。应用 DAB 显色、苏木素复染后, 自来水充分冲洗返蓝, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 封片后光镜下观察。

1.4 样品的采集与预处理 样品采集: 各组小鼠经乙醚麻醉后, 断头取脑置于 EP 管中, 分别称重并记录, 放入 -80 °C 冰箱待用。预处理: 每 0.1 g 脑组织加入 1 ml 水, 冰浴中匀浆。取 150 μ l 匀浆液, 加入 600 μ l 甲醇沉淀蛋白, 涡旋 5 min, 在 4 °C 条件下 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于氮气下吹干。临测时用 100 μ l 初始流动相 (乙腈-水, v:v 2:98) 复溶, 取 10 μ l 注入 UPLC 系统。

1.5 色谱和质谱条件 色谱分析条件: 色谱柱为 ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (1.7 μ m, 2.1 × 50

mm, Waters), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水, 流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈, 流速为 0.25 ml/min。梯度洗脱条件如下: 0 min, 98% A; 0~3 min, 98%~80% A; 3~4 min, 80%~45% A; 4~13 min, 45%~0% A; 13~14 min, 0%~98% A。进样量为 10.0 μ l, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。质谱分析条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 离子源温度为 120 $^{\circ}$ C, 正离子模式检测, 扫描方式为全扫描, 扫描范围为 100~1000 m/z; 毛细管电压为 3.2 kV, 锥孔电压为 30 V; 脱溶剂气为氮气, 流速为 600 L/h, 温度为 350 $^{\circ}$ C。在运用 MS/MS 的方式进行二级扫描时, 碰撞气为氦气。

1.6 代谢组学数据处理 将原始图谱导入 Markerlynx V 4.1 软件分析, 收集每个色谱图的总离子强度数据, 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)。经 PCA 分析输出得分图和载荷图, 对数据进行分组, 找出对分组贡献较大的物质, 进行二级扫描以获得更多质谱碎片信息, 根据 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)、KEGG (<http://www.kegg.jp/>) 和 LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/>) 等数据库, 确定 AD 的生物标记物。3 组间各生物标记物的峰强度比较采

用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学实验 对照组小鼠大脑海马区神经元细胞排列紧密, 细胞核大而规则, 可观察到明显的核仁, 细胞间无 A β 沉积。AD 组小鼠大脑海马部位神经元细胞稀疏, 排列紊乱, 细胞核深染, 细胞间有明显深褐色的大块 A β 沉积。G-Re 组小鼠与 AD 组比较, 小鼠海马部位神经元细胞排列较为整齐, 细胞核染色变淡, A β 沉积明显减少。见图 1。

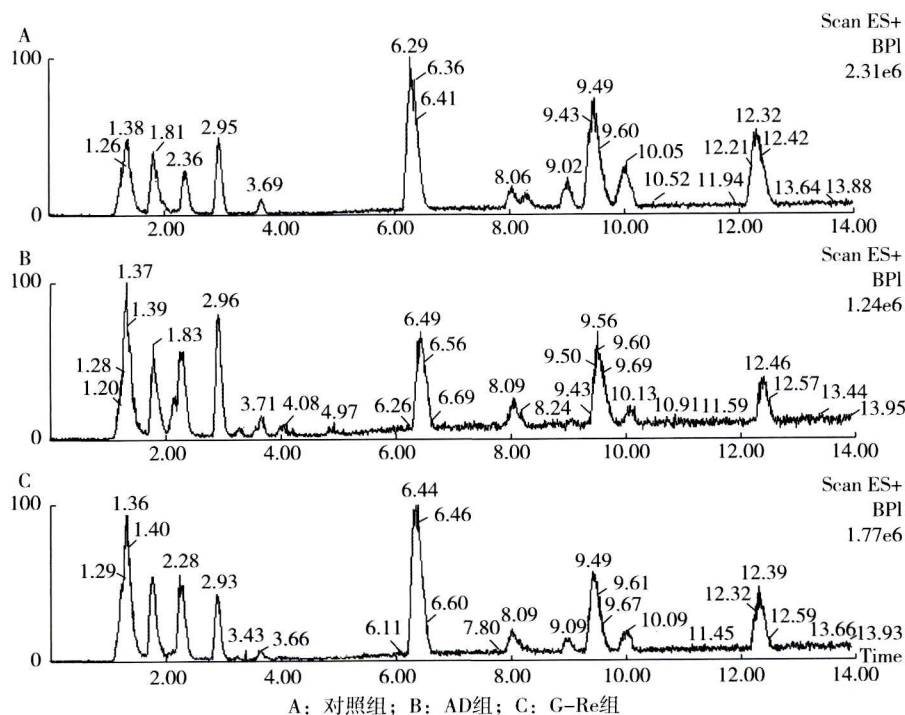


A: 对照组; B: AD组; C: G-Re组

图 1 小鼠脑组织海马区免疫组化染色结果 (PV 法, $\times 400$)

2.2 小鼠脑组织代谢组学分析

2.2.1 UPLC-MS 代谢产物图谱: 对照组、AD 组和 G-Re 组小鼠脑组织正离子模式下的基峰色谱图见图 2。



A: 对照组; B: AD组; C: G-Re组

图 2 小鼠脑组织正离子模式下的基峰色谱图

2.2.2 UPLC-MS 数据分析: 将对照组、AD 组和 G-Re 组小鼠脑组织的代谢物谱数据进行 PCA 分析, 得到得分图 (图 3A, 横纵坐标分别代表 PCA 模型中的两个主

成分的打分向量) 和载荷图 (图 3B, 横纵坐标分别代表的是两个主成分的载荷向量)。得分图可见对照组与 AD 组界限明显, 无任何交集, 而 G-Re 组处于对照组

和 AD 组之间,证明 G-Re 干预后 AD 小鼠脑组织代谢物发生明显变化。载荷图中分散于外围的变量为对分组贡献较大的变量,即 AD 的生物标志物。

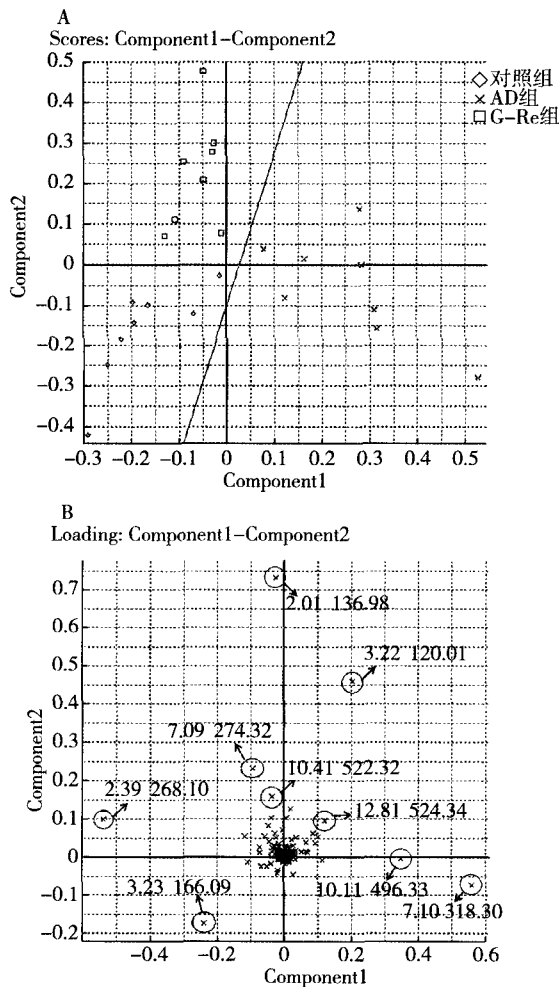
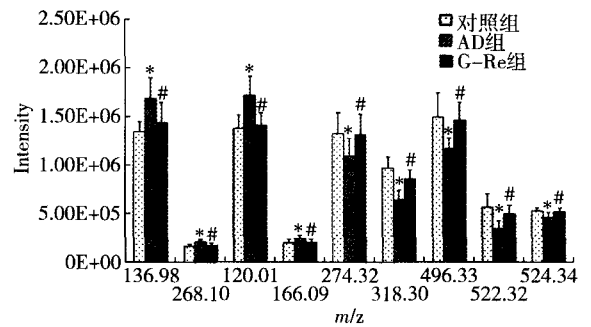


图3 3组脑组织代谢物谱的得分图(A)和载荷图(B)

2.2.3 生物标记物的确认:经PCA分析及相关代谢组学数据库,确定了9种AD的生物标志物,分别是次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷、苯丙氨酸片段、苯丙氨酸、16碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、溶血磷脂酰胆碱(Lyso-phosphatidylcholine, LPC) C16:0、LPC C18:1、LPC C18:0,这9种生物标记物在各组小鼠脑组织中的峰强度变化见图4。与对照组比较,AD组次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷和苯丙氨酸的含量明显升高($P<0.05$),16碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、LPC(C16:0、C18:1、C18:0)的含量明显降低($P<0.05$)。经G-Re干预后,小鼠脑组织中次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷和苯丙氨酸的含量明显降低($P<0.05$),16碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、LPC(C16:0、C18:1、C18:0)的含

量明显升高($P<0.05$)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与AD组比较,# $P<0.05$ 。m/z 136.98:次黄嘌呤;m/z 268.10:次黄嘌呤核苷;m/z 120.01:苯丙氨酸片段;m/z 166.09:苯丙氨酸;m/z 274.32:16碳鞘氨醇;m/z 318.30:植物鞘氨醇;m/z 496.32:LPC C16:0;m/z 522.32:LPC C18:1;m/z 524.34:LPC C18:0。

图4 对照组、AD组和G-Re组生物标记物的峰强度

3 讨论

研究表明,G-Re能通过减少AD细胞模型中活性氧的生成、抑制AD小鼠脑组织糖原合成酶激酶-3 β 的活性等途径,对神经元起到保护作用,缓解AD的病理过程^[4-5]。而代谢组学以相对分子质量<1000的小分子代谢物质为研究对象,着重研究机体受内外因素扰动后(如基因改变或环境变化等),代谢物的种类、数量变化及其规律^[6]。换言之,代谢组学可以从宏观层面来理解疾病的发展过程,与中医的整体观思维方式不谋而合。因此,代谢组学可用来研究G-Re对AD模型小鼠体内内源性代谢物及异常代谢通路的调控作用,进一步阐明G-Re治疗AD的作用机理。

AD的特征性病理改变包括A β 沉积形成的老年斑(senile plaques,SPs)和tau蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFTs),常伴有神经元丢失。本研究通过免疫组化的方法,在AD小鼠大脑海马区观察到神经细胞减少、排列紊乱,细胞核呈现凋亡的特征性改变(核质固缩、边集及碎裂),并有明显的SPs,提示AD模型小鼠具备与AD病人脑部类似的病理学改变。G-Re组与对照组比较,虽然神经元细胞似乎仍有减少,但相对于AD组,小鼠海马区A β 沉积明显减少,仅能观察到少量SPs。以上结果说明了G-Re可以减弱A β 蛋白对海马区神经元的毒害作用,对神经元具有保护作用。

本研究通过UPLC-MS技术来研究AD小鼠脑组织中代谢物谱的变化,确定了9种AD生物标记物。与对照组比较,AD小鼠脑组织中次黄嘌呤、次

黄嘌呤核苷和苯丙氨酸的含量明显增加,而 16 碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、LPC (C16:0、C18:1、C18:0) 的含量明显降低。经 G-Re 干预后,与 AD 组比较,次黄嘌呤、次黄嘌呤核苷和苯丙氨酸的含量明显降低,16 碳鞘氨醇、植物鞘氨醇、LPC (C16:0、C18:1、C18:0) 的含量明显升高。说明 G-Re 可以干预 AD 小鼠体内氨基酸、核酸及脂质等代谢途径,对 AD 起到治疗作用。

次黄嘌呤核苷又称肌苷,是核酸代谢的中间产物,由腺苷脱氨后产生,在核苷磷酸化酶的作用下生成次黄嘌呤。有研究表明,AD 病人脑中磷酸腺苷脱氨酶活性升高,加速磷酸腺苷降解生成腺苷^[7],因而肌苷和次黄嘌呤的浓度随之升高。嘌呤能信号在 AD 的发展过程中发挥重要的作用^[8]。次黄嘌呤可以通过抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶的活性来诱导大鼠纹状体氧化应激^[9]。氧化应激在 AD 中起重要作用,多种可能的发病机制或病理生理改变都与氧化应激反应有关^[10]。Kaddurah-Daouk 等^[11]研究表明,嘌呤代谢紊乱可能与 tau 蛋白及 A β 蛋白的病理发展过程相关。因此,次黄嘌呤和肌苷可以作为 AD 的生物标记物。本研究表明,AD 小鼠脑组织内次黄嘌呤、肌苷的含量均高于对照组小鼠。G-Re 给药后,与 AD 组比较,次黄嘌呤和肌苷水平均明显下调,证明 G-Re 可通过介导核酸代谢发挥作用。

苯丙氨酸是人体必需氨基酸之一,主要存在于血浆和脑组织内。Wissmann 等^[12]的研究表明,AD 病人的血清中苯丙氨酸浓度升高,且苯丙氨酸/色氨酸的比值也升高,这与慢性免疫激活紧密相关,免疫应答激活有关的苯丙氨酸的代谢障碍可能与 AD 的炎症机制相关。本研究中,与对照组相比,AD 组小鼠脑组织中苯丙氨酸浓度显著升高,这和之前的报道相一致。因此,苯丙氨酸可以作为 AD 一个的生物标记物。G-Re 组与 AD 组比较,小鼠脑组织内苯丙氨酸的含量明显降低,提示 G-Re 可以干预苯丙氨酸代谢发挥治疗作用。

鞘氨醇又称神经鞘氨醇,属于鞘脂类。鞘脂类是体内重要的信号分子,参与多种生理功能调节,例如细胞的生长与老化、细胞识别、信号转导等,在细胞功能的维持中起着一系列至关重要作用^[13]。神经酰胺是鞘脂类的中间代谢产物,由神经鞘氨醇长链碱基与脂肪酸组成。鞘氨醇作为鞘脂的分解产物,它通过再酰化被回收利用,生成神经酰胺及其衍生物^[14]。有报道称,在以 AD 为代表的神经退行性疾病中,膜相关的氧

化应激异常活跃,导致神经酰胺的大量蓄积,而作为合成原料的鞘氨醇含量明显降低^[15]。本研究中,AD 小鼠脑组织中 16 碳鞘氨醇和植物鞘氨醇的含量均显著下降。经 G-Re 干预后,与 AD 组比较,二者的含量均明显升高,说明 G-Re 可以改变异常的鞘氨醇代谢通路。

LPC 是磷脂代谢的中间产物,是体内重要的生物活性物质,可作为第二信使来参与多种细胞功能的调节,包括信号转导、基因表达和细胞增殖等^[16]。神经细胞膜上的磷脂代谢异常是 AD 的特征性病理改变,它会导致细胞膜崩解^[17],这可能与 AD 发病过程中的神经元丢失有关。磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 是磷脂代谢的关键酶。PLA₂ 的过度活化会刺激磷脂酰胆碱(PC)变性生成 LPC, LPC 迅速水解产生甘油磷酸胆碱(GPCh),磷酸胆碱(PCh),最后变为胆碱(Ch),并释放游离脂肪酸^[18]。有研究表明, LPC 在 AD 病人的脑脊液^[19]、脑组织^[20]和血浆^[21]中均显著降低。本实验结果表明,AD 小鼠脑组织中 LPC C16:0、LPC C18:1、LPC C18:0 的含量较对照组显著降低。经 G-Re 干预后,与 AD 组比较, LPC (16:0、C18:1、C18:0) 的含量明显升高,说明 G-Re 能通过调控磷脂代谢起到抗 AD 的效果。

本研究运用 UPLC-MS 技术,对 G-Re 干预的 A β_{25-35} 所致 AD 模型小鼠的脑组织代谢物谱进行分析,确定了 9 种 AD 的生物标志物,并发现 G-Re 通过干预 AD 小鼠体内氨基酸、核酸及脂质等代谢途径,发挥对 AD 的治疗作用。

[参考文献]

- [1] Pan X, Nasaruddin MB, Elliott CT, et al. Alzheimer's disease-like pathology has transient effects on the brain and blood metabolome[J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 38:151-163.
- [2] Graham SF, Chevallier OP, Roberts D, et al. Investigation of the human brain metabolome to identify potential markers for early diagnosis and therapeutic targets of Alzheimer's disease[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(3):1803-1811.
- [3] 姜红柳, 杨振, 孟勤, 等. 人参皂苷 Re 对小鼠学习记忆障碍的作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(10): 1399-1400.
- [4] Huang GD, Zhong XF, Deng ZY, et al. Proteomic analysis of ginsenoside Re attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Food Funct*, 2016, 7(5):2451-2461.
- [5] 贾立云, 潘晓华, 刘晶, 等. 人参皂苷 Rb1、Re 对 A β_{25-35}

- 诱导 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用[J]. 山东大学学报: 医学版, 2011, 49(4): 33-37.
- [6] Alnouti Y. Metabolomics [M]. Springer New York, 2014: 10.
- [7] González-Domínguez R, García-Barrera T, Vitorica J, et al. Metabolomic screening of regional brain alterations in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease by direct infusion mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 102: 425-435.
- [8] Kaddurah-Daouk R. Metabolomic changes in autopsy-confirmed Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Dement, 2011, 7(3): 309-317.
- [9] Wyse AT, Bavarese CS, Reis EA, et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat hippocampus [J]. Physiol Behav, 2004, 80(4): 475-479.
- [10] 林玉坤, 曾园山, 曲泽强, 等. 氧化应激与阿尔茨海默病 [J]. 解剖学研究, 2009, 31(1): 67-70.
- [11] Kaddurah-Daouk R, Zhu H, Sharma S, et al. Alterations in metabolic pathways and networks in Alzheimer's disease [J]. Transl Psychiatry, 2013, 3: e244.
- [12] Wissmann P, Geisler S, Leblhuber F, et al. Immune activation in patients with Alzheimer's disease is associated with high serum phenylalanine concentrations [J]. J Neurol Sci, 2013, 329(1/2): 29-33.
- [13] Alesenko AV. The potential role for sphingolipids in neuro-pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Biomed Khim, 2013, 59(1): 25-50.
- [14] Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun Y. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling [J]. Cell Signal, 2008, 20(6): 1010-1018.
- [15] Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, et al. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuro-pathogenesis [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(8): 878-886.
- [16] Farooqui AA, Horrocks LA. Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad, and the ugly [J]. Neuroscientist, 2006, 12(3): 245-260.
- [17] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease [J]. J Proteomics, 2014, 104(1): 37-47.
- [18] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Using direct infusion mass spectrometry for serum metabolomics in Alzheimer's disease [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(28): 7137-7148.
- [19] Mulder C, Wahlund LO, Teerlink T, et al. Decreased lysophosphatidylcholine/phosphatidylcholine ratio in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease [J]. J Neural Transm (Vienna), 2003, 110(8): 949-955.
- [20] Grimm MO, Grösgen S, Riemenschneider M, et al. From brain to food: Analysis of phosphatidylcholins, lyso-phosphatidylcholins and phosphatidylcholin-plasmalogens derivatives in Alzheimer's disease human post mortem brains and mice model via mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(42): 7713-7722.
- [21] Liu Y, Li N, Zhou L, et al. Plasma metabolic profiling of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using liquid chromatography/mass spectrometry [J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2014, 14(2): 113-120.

(收稿日期: 2016-12-12)