

· 论 著 ·

基于 LINCS 转录组数据以囊泡谷氨酸转运体 1 为靶点的
抗阿尔茨海默病药物重定位谢宗杰^{1,2}, 王 静², 韩 露², 王同兴², 高圣乔², 程肖蕊^{1,2}, 周文霞², 张永祥²

(1. 南京中医药大学研究生学院, 江苏 南京 210023; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850)

摘要: 目的 利用基于网络细胞反应印记整合文库(LINCS)提供的药物扰动基因表达谱数据和阿尔茨海默病(AD)谷氨酸毒性发病机制,以囊泡谷氨酸转运体 1(VGLUT1)为靶点进行抗 AD 药物重定位预测。方法 利用 MetaCore 数据库构建 VGLUT1 调控基因集,基于 LINCS 提供的药物扰动基因表达谱数据,采用基因富集分析评估药物调控 VGLUT1 转录潜能,预测靶向调控 VGLUT1 转录的抗 AD 药物。以快速老化模型小鼠(SAMP8)为模型,用 Morris 水迷宫实验和新异物体识别实验评价小鼠学习记忆功能,对预测药物的抗 AD 作用进行验证。结果 获得了包括 16 个激活 VGLUT1 转录和 11 个抑制 VGLUT1 转录的基因集;富集分数排名前 5 具有促进 VGLUT1 转录作用的药物为氟尼缩松、谷氨酰胺、阿那曲唑、米非司酮和雷替曲塞。米非司酮可显著增加 SAMP8 在水迷宫目标象限的游泳时间($P<0.05$),而对新异物体识别实验中的偏好指数无显著影响。结论 基于 LINCS 转录组数据和 VGLUT1 特征基因集的药物重定位为抗 AD 药物发现提供了一个新的易实现的参考方法。米非司酮具有成为抗 AD 药物的前景。

关键词: 阿尔茨海默病; 药物重定位; 基因表达谱; 囊泡谷氨酸转运体; 米非司酮

中图分类号: R965.2, R971

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)09-0641-08

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.09.001

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种与衰老显著相关的神经退行性疾病,主要有认知障碍、记忆丧失和行为异常等临床特征。目前,治疗 AD 只有多奈哌齐(donepezil)、卡巴拉汀(rivastigmine)、加兰他敏(galanthamine)、美金刚(memantine)和美金刚-多奈哌齐(memantine ER/donepezil, Namzaric)5 个药物,均获美国食品药品监督管理局批准上市,但它们只能在一定程度上缓解 AD 症状的加剧,疗效并不理想。2019 年,国家药品监督管理局批准我国自主研发的糖类新药 GV-971 上市,在一定程度上填补了国产 AD 治疗药物的空白^[1]。然而寻求更有效的 AD 治疗药物仍然是一个亟待解决的全球性难题。

谷氨酸能系统是脑内重要的神经信号传导系统之一,其功能的正常和稳定受脑内神经元和胶质

细胞对谷氨酸合成、释放、摄取和代谢等多个环节的影响,其中任一环节异常均可导致局部谷氨酸浓度升高。突触间隙谷氨酸蓄积所引起的兴奋性毒性被认为是导致 AD 发生的机制之一^[2]。美金刚作为 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体(*N*-methyl-*D*-aspartic acid receptor, NMDA 受体)拮抗剂,正是通过阻止过多的谷氨酸与兴奋性受体结合引起的兴奋性毒性发挥治疗 AD 的作用。囊泡谷氨酸转运体 1(vesicular glutamate transporter 1, VGLUT1)位于谷氨酸能神经元的囊泡质膜上,能特异性地将胞浆中谷氨酸装填进囊泡中,是神经元释放谷氨酸的决定性因素之一。研究报道,银纳米粒子在诱导谷氨酸兴奋性毒性的同时伴随 VGLUT1 表达降低^[3],提示突触前转运谷氨酸进入囊泡的能力不足可能同样参与兴奋性毒性产生。而在 AD 相关研究中发现, β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)诱导淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)/早老蛋白 1(presenilin-1, PS1)转基因小鼠均存在 VGLUT1 表达下降^[4-6],临床研究中也同样观察到 AD 患者脑内 VGLUT1 表达呈年龄依赖性下降现象^[7]。本实验室前期研究发现,快速老化小鼠 P8

基金项目: 国家自然科学基金(81803431)**作者简介:** 谢宗杰,硕士,主要从事中药药理学研究, E-mail: xzj94318@163.com**通讯作者:** 张永祥, E-mail: zhangyx@bmi.ac.cn; 周文霞, E-mail: zhouwx727@163.com

(senescence-accelerated mouse prone 8 strain, SAMP8)脑组织 VGLUT1 表达亦增龄性降低^[8],其原因一方面可能是引起降解 VGLUT1 的胱天蛋白酶 3 增加而造成突触前囊泡膜上 VGLUT1 减少,另一方面可能是突触后谷氨酸受体、清除突触间隙谷氨酸的转运体以及谷氨酸再合成相关酶表达降低,从而引起反馈,使得突触前囊泡膜上 VGLUT1 减少^[9]。上述研究表明,作为控制囊泡中谷氨酸填充速度的 VGLUT1 表达下降可能是导致 AD 发生发展的重要因素之一。因此,本研究以 VGLUT1 为靶点进行抗 AD 药物重定位研究。

药物重定位技术作为一种周期短、风险低的新药发现策略,近年来得到了抗 AD 药物研发领域的青睐。截止 2020 年,全球约有 30% 在研抗 AD 药物采用了药物重定位的策略(Clinicaltrials.gov),其基本思想是“一药多靶”和“一靶多治”^[10]。2006 年,布罗德研究所(Broad Institute)提出的连接图(Connectivity Map, CMap)项目通过获取药物扰动后细胞基因表达谱信息,构建的“药物-基因-疾病的关联网络”在基于药物重定位药物研发策略中得到了广泛应用。通过比较药物对细胞基因表达谱扰动作用的相似性,研究人员成功发现了多种现有药物的新用途^[11-12]。而鉴于 CMap 的成功应用,美国国立卫生研究院于 2010 年启动了该项目的升级版——基于网络细胞反应印记整合文库(the Library of Integrated Network - Based Cellular Signatures, LINCS)计划。截止 2018 年, LINCS 计划公布了包含 4 万多种小分子化合物在不同剂量下与多个细胞系反应产生的上百万个细胞基因表达谱信息,这为基于药物基因关联网络的重定位策略提供了丰富的数据基础。通过分析候选药物对细胞基因表达谱的影响,如根据候选药物对细胞基因表达谱的扰动效果与已知药物的相似性,或根据药物对细胞基因表达谱的影响与疾病状态下的相反性,则可预测得到药物潜在的新功效。

本研究以 VGLUT1 为靶点,利用高可信度 MetaCore 数据库(<https://portal.genego.com/>)构建 VGLUT1 的特征基因集合,通过计算 VGLUT1 特征基因集在 LINCS 中 L1000 平台收录的 623 种药物扰动基因表达谱中的富集情况,进行潜在靶向 VGLUT1 调控药物的快速筛选和预测,并以 SAMP8 为散发型 AD(sporadic AD, SAD)模型,通过学习记忆行为学实验对所预测药物改善认知的作用进行初步验证,旨在为寻找 AD 治疗药物提供线索。

1 材料与方法

1.1 动物、药物和仪器

雄性 SPF 级 SAMP8 和抗快速老化小鼠(senescence - resistant mouse prone 1 strain, SAMR1),9 月龄,体重 28.5~40.5 g,繁殖于军事医学研究院实验动物中心,饲养环境温度为 21~23℃,湿度为 50%~60%,每日光照和黑暗各 12 h,饲养期间所有小鼠自由饮水及进食。美金刚,北京偶合科技有限公司;米非司酮(mifepristone),国药集团化学试剂有限公司;以 10 mL·kg⁻¹ 的给药体积计算,实验开始前每次用容量瓶分别配制 100 mL 美金刚(1.0 g·L⁻¹)和米非司酮(0.325 g·L⁻¹)于 4℃ 冰箱中保存待用,给药前取出适量并平衡至室温后再 ig 给药。Morris 水迷宫装置(包括迷宫宫体)(DNS-2),中国医学科学院;新异物体识别装置(包括活动测试箱)(30 cm×30 cm×30 cm,黑色不透明有机玻璃箱),本室定制;学习物体(图 1A 和 B,黑色实心锥体)、新物体(图 1C 和 D,装有红色墨水的水瓶)和 SuperMaze 动物行为学视频分析系统,上海欣欣信息科技有限公司。

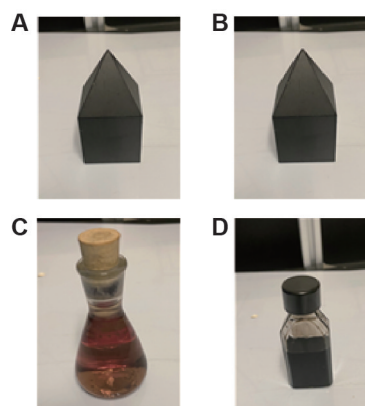


Fig.1 Object used in object recognition memory test. A and B: two same objects for the learning phase; C: novel object for the 1-hour test phase; D: novel object for the 24-hour test phase.

1.2 Metacore 数据库和 VGLUT1 特征基因集抽取

MetaCore 数据库是一个系统的生物信息知识库和分析工具,其收录内容主要包括分子相互作用、代谢物和毒理等信息及通路富集分析、基因与疾病关联分析等工具。MetaCore 数据库的一大特点是其所收录的信息由大量专业科研人员进行人工数据校正,具有高精度度和高可信度。MetaCore 数据库迄今已收录>170 万条分子相互作用信息,其中多数标记了明确的作用方向和机制(上调或下调、抑制或激活、拮抗或激动等)。因此,利用

MetaCore 数据库能够准确找到直接调控 *VGLUT1* 基因的相关分子,并可将这部分数据作为 *VGLUT1* 特征基因集。而为构建 *VGLUT1* 特征基因集,本研究使用 MetaCore 数据库(检索日期:2020 年 03 月)并选用一步扩展算法(Expand by One Interaction Algorithm)(该算法能够将与 *VGLUT1* 直接相关的基因扩展出来),将对 *VGLUT1* 转录具有直接上调或下调作用的节点构建出来获得 *VGLUT1* 的特征基因集。

1.3 基于基因表达谱分析的 *VGLUT1* 靶向药物筛选

VGLUT1 特征基因集反映相关的调控通路,为寻找能够对该通路具有正向调控作用的药物,本研究整理了 LINCS 计划的 L1000 平台中收录的 623 个常见药物对 PC3 细胞不同时间和不同浓度条件下完整的表达谱数据^[13]。将上述药物表达谱基因的表达式相较于对照组的差异变化转化为 z-score 形式。由于 *VGLUT1* 转录调控基因对 *VGLUT1* 作用分为“激活”和“抑制”2 种,因此如果某药物能够上调“激活”基因和下调“抑制”基因的表达,则其有望能够对 *VGLUT1* 的表达实现正向调节。本研究采用基因富集分析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)^[14-16]法,将“激活”类调控基因作为上调基因(upV),将“抑制”类基因作为下调基因(downV),计算在药物完整表达谱秩序列(profile ranked list, PRL)中的反映特征基因集富集程度指标富集分数(enrichment score, ES)值。GSEA 法首先将完整表达谱基因 z-score 的排序转化为 PRL 形式,通过 Kolmogorov-Smirnov 检验计算 *VGLUT1* 特征基因集“激活”基因和“抑制”基因在药物表达谱 PRL 中累计分布程度的 ES^{up} 和 ES^{down} ,然后综合考虑得到总体富集分数 ES 值,其范围在 -1 ~ 1 之间。 ES 值越高,表示药物促进 *VGLUT1* 转录程度越高,负值则表示抑制 *VGLUT1* 转录的倾向。

本研究使用基于 Kolmogorov-Smirnov 统计的 GSEA 法来量化 *VGLUT1* 特征基因集在被比较药物的表达谱 PRL 中的富集程度(包括顶部或底部),并将结果用 ES 呈现。本研究用 {upV, downV} 表示 *VGLUT1* 特征基因集的“激活”基因和“抑制”基因,用 ES^{up} 和 ES^{down} 分别表示“激活”基因和“抑制”基因集在药物表达谱 PRL 中的富集程度。如 PRL 长度为 m ,且包含的 n 个基因在 PRL 中排名为 $R_1, R_2, R_3, \dots, R_k$,则可得如下 ES^{up} :

$$a = \max \left[\frac{i}{k} - \frac{R(i)}{n} \right] \quad (1)$$

$$b = \max \left[\frac{R(i)}{k} - \frac{i-1}{k} \right] \quad (2)$$

如 $a > b$, 则 $ES^{up} = a$; 如 $b > a$, 则 $ES^{up} = -b$ 。

ES^{down} 计算原理相同。包含上下调基因的总体的 ES 表示为:

$$ES = \frac{ES^{up} - ES^{down}}{2} \quad (3)$$

1.4 行为学评价

1.4.1 动物分组和处理

将小鼠在本实验室适应性饲养 1 周后进行自主活动性测试,随后依据自主活动性和体重将 SAMP8 随机分为对照组($n=12$)、阳性药物美金刚组(ig, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n=9$)和米非司酮组(ig, $3.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $n=9$),同时设 SAMR1 对照组($n=13$); SAMP8 和 SAMR1 对照组 ig 给予去离子水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 每天 1 次,共 3 个月。米非司酮给药剂量参考临床剂量即每天 25 mg,据《实验动物及人的体表面积比例表》换算而得。

1.4.2 Morris 水迷宫实验测定小鼠空间学习记忆能力

参考 Wang 等^[17-18]方法,在给药 3 个月后采用 Morris 水迷宫实验评价 SAMP8 和 SAMR1 空间学习记忆能力。实验分为定向航行阶段(空间学习期)和空间探索阶段(空间测试期)。在学习期记录逃避潜伏期,测试期记录逃避潜伏期、穿越平台次数和目标象限游泳时间。

1.4.3 新异物体识别实验测定小鼠物体识别记忆能力

参考 Wang 等^[17]和 Leger 等^[19]的方法,采用新异物体识别实验评价 SAMP8 和 SAMR1 的物体识别记忆能力。实验分为适应期、学习期和测试期。学习期所用物体为相同的黑色实体组合体 A 和 B,1 h 测试期采用的物体 C 为装有红色墨水的锥形瓶,24 h 测试期采用的物体 D 为装有黑色墨水的小细胞培养瓶(图 1)。记录指标分别为物体探索时间和偏好指数。偏好指数=新异物体探索时间/总探索时间。

1.4.4 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析。分别采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Dunnett t 检验进行多组和两组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *VGLUT1* 特征基因集构建

通过 MetaCore 数据库选用一步扩展算法对

VGLUT1 特征基因进行抽取, 结果获得了 16 个对 *VGLUT1* 转录具有激活作用的基因, 11 个对 *VGLUT1* 转录具有抑制作用的基因(表 1)。

2.2 基于 LINCS 的促进 *VGLUT1* 转录候选药物预测及筛选

为寻找潜在的可上调 *VGLUT1* 表达的药物, 本研究基于 LINCS 收录的药物表达谱信息, 对 *VGLUT1* 特征基因集在药物扰动后表达谱上调基因的富集情况进行分析, 以对 *VGLUT1* 调控基因集具有促进作用的药物为目标, 对候选药物进行筛选预测。

富集分析所得 *ES* 值表示药物对 *VGLUT1* 调控通路的作用。正值表示可促进上调基因或抑制下调基因, 即促进 *VGLUT1* 转录; 负值表示可抑制上调基因或促进下调基因, 即抑制 *VGLUT1* 转录; 绝对值大小表示促进或抑制程度。预测结果中对

VGLUT1 转录具有潜在促进作用的药物排名前 5 的为氟尼缩松(flunisolid)、谷氨酰胺、阿那曲唑(anastrozole)、米非司酮和雷替曲塞(raltitrexed)(表 2)。全部预测结果见附件《促进 *VGLUT1* 转录的药物预测》(<http://cjpt.magtechjournal.com/CN/item/downloadFile.do?id=10056>)。

在 GSEA 结果(图 2)中可见, upV 主要富集于米非司酮的上调基因区域, downV 主要富集于米非司酮的下调基因区域, 提示米非司酮对 *VGLUT1* 调控通路具有促进作用, 即可能促进其转录。

2.3 米非司酮对 SAMP8 小鼠认知功能的影响

2.3.1 对 SAMP8 空间学习记忆的影响

Morris 水迷宫实验时, 除 SAMR1 组外, 3 组 SAMP8 均有 4 只死亡。实验结果(图 3)显示, 在空间学习期第 3~6 天及空间测试期, SAMP8 逃避潜

Tab.1 Gene sets with direct regulatory effect on vesicular glutamate transporter 1 (*VGLUT1*) transcription

Gene symbol	Description	Effect
<i>SLC17A7</i>	Solute carrier family 17 member 7	Activation
<i>MYO6</i>	Myosin VI	Activation
<i>GPR56</i>	G protein-coupled receptor 56	Activation
<i>ACTA2</i>	Actin alpha 2, smooth muscle	Activation
<i>GJB1</i>	Gap junction protein beta 1	Activation
<i>MXRA7</i>	Matrix remodeling associated 7	Activation
<i>CACNA1H</i>	Calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H	Activation
<i>FGF12</i>	Fibroblast growth factor 12	Activation
<i>SCD2</i>	Stearoyl-CoA desaturase 2	Activation
<i>NRARP</i>	NOTCH regulated ankyrin repeat protein	Activation
<i>KLHDC8B</i>	Kelch domain containing 8B	Activation
<i>TIMP2</i>	Tissue inhibitors of metalloproteinase 2	Activation
<i>CRHSP-24</i>	Calcium-regulated heat-stable protein 24	Activation
<i>CORO1A</i>	Coronin 1A	Activation
<i>IRX3</i>	Iroquois homeobox 3	Activation
<i>LEF1</i>	Lymphoid enhancer binding factor 1	Activation
<i>NKX2-5</i>	NK2 homeobox 5	Inhibition
<i>HB9</i>	Motor neuron and pancreas homeobox 1	Inhibition
<i>GJA1</i>	Gap junction protein alpha 1	Inhibition
<i>RBP2</i>	lysine demethylase 5A	Inhibition
<i>FOXF1</i>	Forkhead box F1	Inhibition
<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit	Inhibition
<i>miR-499</i>	MicroRNA 499a	Inhibition
<i>HEY1</i>	Hes related family BHLH transcription factor with YRPW motif 1	Inhibition
<i>SUZ12</i>	SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit	Inhibition
<i>miR-377-3p</i>	MicroRNA 377-3p	Inhibition
<i>JARID2</i>	Jumonji and AT-rich interaction domain containing 2	Inhibition

Based on the MetaCore database, one step expansion algorithm was adopted to extract the *VGLUT1* gene sets. 16 activation genes and 11 inhibition genes were obtained. Effect represented activation or inhibition on *VGLUT1* transcription.

Tab.2 Top five drugs with potential to promote *VGLUT1* transcription on PC3 cells

Drug	Incubation time/h	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ES
Flunisolide	6	10	0.47
Glutamine	6	10	0.46
Anastrozole	6	10	0.44
Mifepristone	24	10	0.44
Raltitrexed	24	10	0.44

The top 5 drugs with enrichment score (ES) value in Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) were supposed to have the potential to promote *VGLUT1* transcription.

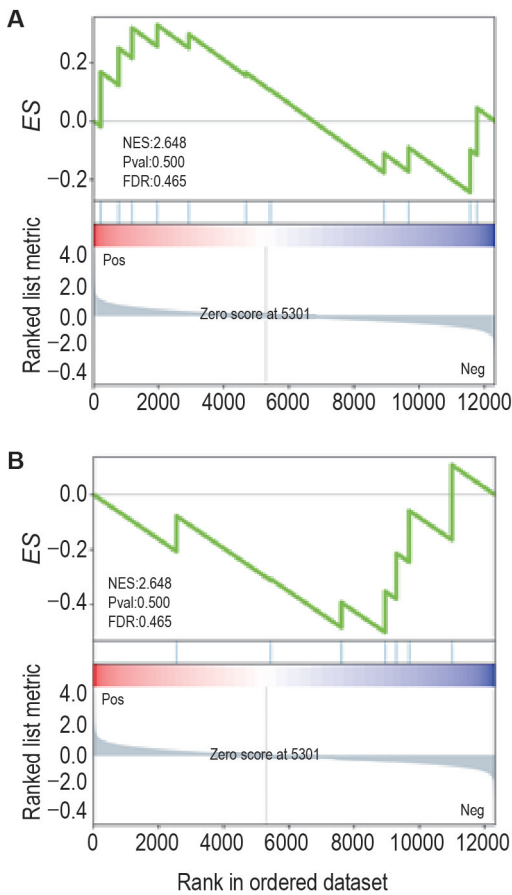


Fig.2 *VGLUT1* gene sets in mifepristone gene expression profile. A: genes with up-regulated effect on the transcription of *VGLUT1* in GSEA (upV); B: genes with down-regulated effect on the transcription of *VGLUT1* in GSEA (downV). NES=-1.753.

伏期均显著长于 SAMR1 ($P<0.01$),且在空间测试期穿越平台次数和目标象限游泳时间均显著少于 SAMR1 ($P<0.01$)。给予美金刚和米非司酮对 SAMP8 逃避潜伏期和穿越平台次数未产生明显影响,但 SAMP8 在目标象限的游泳时间均显著延长 ($P<0.05$)。提示 SAMP8 空间记忆能力出现损伤,美金刚和米非司酮均可显著改善 SAMP8 的空间记忆能力。

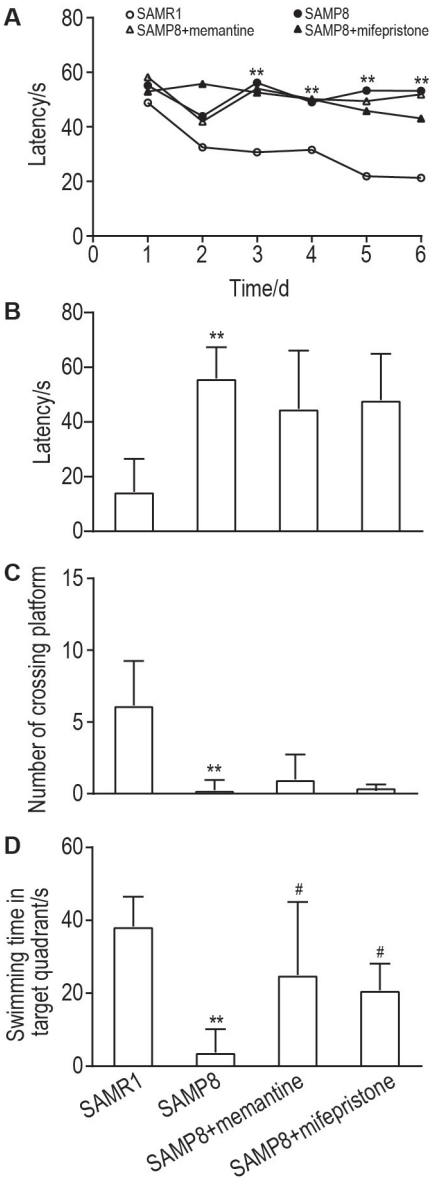


Fig.3 Effect of mifepristone on spatial learning and memory in senescence-accelerated mouse prone 8 strain (SAMP8). SAMP8 were ig administrated with deionized water ($100\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), memantine ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and mifepristone ($3.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), respectively. Senescence-accelerated mice resistant-1 strain (SAMR1) were ig administrated with deionized water ($100\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$). Three months later, behavioral tests were conducted with Morris water maze. A: latency in learning phase; B: latency in probe phase; C: number of crossing platform in probe phase; D: swimming time in target quadrant in probe phase. $x\pm s$, $n=13$ (SAMR1), 8 (SAMP8) and 5 (SAMP8+memantine and SAMP8+mifepristone). ** $P<0.01$, compared with SAMR1 group; # $P<0.05$, compared with SAMP8 group.

2.3.2 对 SAMP8 物体识别记忆能力的影响

新异物体识别实验时, SAMR1 组有 4 只死亡。实验结果(图 4A)显示,学习期间受试小鼠对 2 个相同物体的探索时间相近,表明测试系统正确。学习后 1 和 24 h 分别更换新物体测试结果(图 4B 和 C)显示,在 1 h 测试期时,各组小鼠偏好指数无明显差

异;在 24 h 测试期时, SAMP8 偏好指数显著低于 SAMR1 ($P<0.05$), 给予美金刚和米非司酮 SAMP8 未提高其偏好指数。

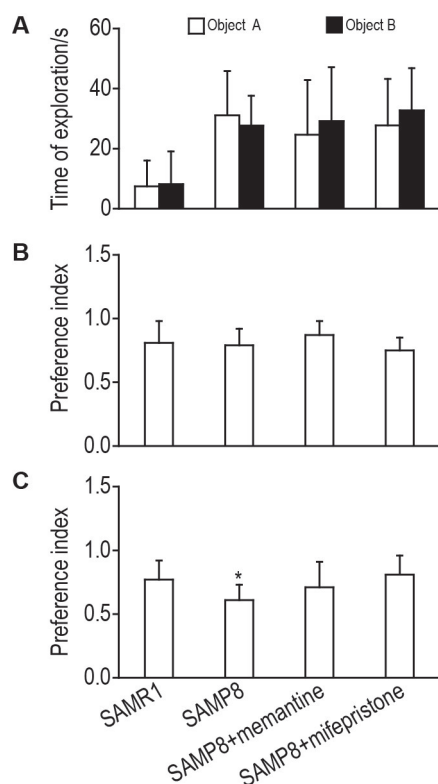


Fig. 4 Effect of mifepristone on object recognition memory in SAMP8. See Fig. 1 for the mouse treatment. A: exploring time in learning phase; B and C: preference index in 1 and 24 h after training, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n=9$ (SAMR1), 8 (SAMP8) and 5 (SAMP8+memantine and SAMP8+mifepristone). * $P<0.05$, compared with SAMR1 group.

3 讨论

本研究以 *VGLUT1* 为靶点,通过 MetaCore 高可信度生物信息数据库获取对 *VGLUT1* 转录具有直接调控作用的特征基因集合,并进一步通过 GESA 富集分析得到 *VGLUT1* 特征基因集在 LINCS 计划中 L1000 平台收录的 623 个常见药物表达谱 PRL 中的累计分布程度,以富集分数 ES 值评估药物对 *VGLUT1* 转录潜在的促进或抑制作用。结果显示, *VGLUT1* 调控基因集在氟尼缩松、谷氨酰胺、阿那曲唑、米非司酮和雷替曲塞 5 个药物中具有较高的富集得分,它们对 *VGLUT1* 转录可能具有促进作用。

氟尼缩松是一种具有抗炎作用皮质类固醇,临床上主要用于过敏性鼻炎和哮喘。雷替曲塞是一种用于化疗的抗代谢药物,是一种胸苷酸合酶抑制剂。

目前暂无两者与 AD 或认知功能相关的研究报道。阿那曲唑是一种非甾体芳香酶抑制剂,是临床上治疗绝经后女性乳腺癌的首选内分泌药物。据报道,阿那曲唑给药增加雌性 APP/PS1/Tau 三转基因小鼠脑内 $A\beta$ 斑块面积^[20],可能是雌激素对 AD 典型病理特征的影响。谷氨酰胺作为一种非必需氨基酸,广泛存在于全身,参与多种代谢过程。最近有研究报道,谷氨酰胺可通过激活 Wnt3a/ β 联蛋白信号通路改善 SAMP8 氧化应激损伤和在跳台实验中的学习记忆能力^[21]。米非司酮是一种强抗孕激素和糖皮质激素受体拮抗剂,目前临床上用于抗早孕以及治疗糖皮质激素分泌过多导致的库欣综合征 (Cushing syndrome)。Baglietto-Vargas 等^[22] 研究认为,循环糖皮质激素增多与衰老和 AD 有关,糖皮质激素过高可导致 APP 错误剪切,加速 $A\beta$ 沉积,引起 Tau 蛋白过度磷酸化。而米非司酮可通过诱导 APP 裂解为 17 ku 片段阻止 $A\beta$ 形成,并降低 Tau 蛋白磷酸化,改善 APP/PS1/Tau 三转基因 AD 模型小鼠空间学习记忆能力。此外, Pedrazzoli 等^[23] 同样发现,米非司酮具有抑制 APP/PS1/Tau 三转基因 AD 模型小鼠脑内小胶质细胞活化和增加树突棘密度的作用。上述研究提示,米非司酮具有成为抗 AD 药物的潜力,但其对 AD 模型动物和 AD 患者谷氨酸能系统的调节作用尚未见报道。

不同 AD 模型动物如家族型 AD 模型 APP/PS1 转基因小鼠以及 $A\beta$ 诱导的 AD 模型小鼠脑内 VGLUT1 表达均降低^[4-6],且 AD 患者脑内 VGLUT1 表达亦呈年龄依赖性下降^[7],表明作为谷氨酸能神经传递系统的重要参与者, VGLUT1 对 AD 发生发展具有重要意义。本研究结果表明,米非司酮对 *VGLUT1* 调控基因集具有正向促进作用,即具有促进 *VGLUT1* 转录的作用。本实验室前期研究结果表明, SAD 模型 SAMP8 脑内谷氨酸能神经传递异常,表现为兴奋性毒性和 VGLUT1 表达降低^[9]。本研究以 SAMP8 为模型,发现米非司酮具有提高 SAMP8 空间学习记忆能力的作用,进一步验证了其抗 AD 作用,并提示通过上调 VGLUT1 表达维持谷氨酸能系统稳定可能是其发挥抗 AD 作用机制之一。但由于 SAMP8 加速老化和寿命较短的局限导致实验过程中 SAMP8 死亡,行为学实验中阳性药美金刚和米非司酮组只有 5 只小鼠,所得阳性结果还需进一步验证,但对于重定位预测结果仍具有一定的参考价值。后续拟进一步对氟尼缩松和雷替曲塞改善 AD 模型动物认知能力的作用进行验证,该作用尚无文献报道。

综上所述,本研究基于 *VGLUT1* 调控基因集和 LINCS 药物表达谱数据进行抗 AD 药物筛选,发现抗 AD 药物可导致与促进 *VGLUT1* 转录相似的表达谱变化,从而发现潜在的抗 AD 候选药物。该方法既可全面考察药物对细胞作用的整体特征,又可避免细胞基因表达涨落和芯片噪声的影响,是药物重定位研究的理想策略之一。此外,SAMP8 为 SAD 的典型模型,SAD 在 AD 患者中占比>90%。本研究以 SAMP8 为模型,对米非司酮抗 AD 作用进行验证,不仅进一步提示其作为抗 AD 药物的潜力,同时也为阐明其抗 AD 作用机制提供了新的探索方向。

参考文献:

- [1] Pu MM. New light on the horizon of Alzheimer's disease[J/OL]. *Natl Sci Rev*, 2020, 7(5):831 (2020-05-25) [2021-07-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/346-92102/>. DOI: 10.1093/nsr/nwaa008.
- [2] Wang R, Reddy PH. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4): 1041-1048.
- [3] Begum AN, Aguilar JS, Elias L, et al. Silver nanoparticles exhibit coating and dose-dependent neurotoxicity in glutamatergic neurons derived from human embryonic stem cells[J]. *Neurotoxicology*, 2016, 57: 45-53.
- [4] Zolezzi JM, Lindsay CB, Serrano FG, et al. Neuroprotective effects of ferruginol, jatrophone, and junicedric acid against amyloid-beta injury in hippocampal neurons [J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 63(2): 705-723.
- [5] Méndez JA, Ortega A. Toward a dissection of β -amyloid localized effects on glutamatergic hippocampal repertoire: an editorial highlight for "amyloid-beta 1-42 induced glutamatergic receptor and transporter expression changes in the mouse hippocampus" on <https://doi.org/10.1111/jnc.15099> [J/OL]. *J Neurochem*, 2020, 155(1):7-9 [2021-07-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32681746/>. DOI: 10.1111/jnc.15111.
- [6] Minkeviciene R, Ihalaenen J, Malm T, et al. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in *APP/PS1* transgenic and wild-type mice[J]. *J Neurochem*, 2008, 105(3): 584-594.
- [7] Mitew S, Kirkcaldie MTK, Dickson TC, et al. Altered synapses and gliotransmission in Alzheimer's disease and AD model mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(10): 2341-2351.
- [8] Cheng XR, Yang Y, Zhou WX, et al. Expression of VGLUTs contributes to degeneration and acquisition of learning and memory[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2011, 95(3): 361-375.
- [9] 王静. 快速老化模型小鼠脑中谷氨酸能系统异常及 LW-AFC 对其调节作用的研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [10] 张永祥, 程肖蕊, 周文霞. 药物重定位——网络药理学的重要应用领域 [J]. 中国药理学与毒理学杂志 (*Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*), 2012, 26(6): 779-786.
- [11] Sirota M, Dudley JT, Kim J, et al. Discovery and preclinical validation of drug indications using compendia of public gene expression data[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2011, 3(96): 96ra77 (2011-08-17) [2021-07-19]. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001318>.
- [12] Qu XA, Rajpal DK. Applications of connectivity map in drug discovery and development[J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(23-24): 1289-1298.
- [13] Subramanian A, Narayan R, Corsello SM, et al. A next generation connectivity map: L1000 platform and the first 1,000,000 profiles[J]. *Cell*, 2017, 171(6): 1437-1452.
- [14] Aravind S, Pablo T, Vamsi KM, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(43): 15545-15550.
- [15] Han L, He H, Li F, et al. Inferring infection patterns based on a connectivity map of host transcriptional responses[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 15820 (2015-10-28) [2021-07-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26508266/>. DOI: 10.1038/srep15820.
- [16] Han L, Li K, Jin C, et al. Human enterovirus 71 protein interaction network prompts antiviral drug repositioning [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43143 (2017-02-21) [2021-07-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28220872/>. DOI: 10.1038/srep43143.
- [17] Wang J, Ye F, Cheng X, et al. The effects of LW-AFC on intestinal microbiome in senescence-accelerated mouse prone 8 strain, a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 53(3): 907-919.
- [18] Wang J, Lei X, Xie Z, et al. CA-30, an oligosaccharide fraction derived from Liuwei Dihuang decoction, ameliorates cognitive deterioration via the intestinal microbiome in the senescence-accelerated mouse prone 8 strain[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(11): 3463-3486.
- [19] Leger M, Quiedeville A, Bouet V, et al. Object recognition test in mice[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(12): 2531-2537.

- [20] Overk CR, Lu PY, Wang YT, *et al.* Effects of aromatase inhibition *versus* gonadectomy on hippocampal complex amyloid pathology in triple transgenic mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1): 479-487.
- [21] Wang Y, Wang Q, Li J, *et al.* Glutamine improves oxidative stress through the Wnt3a/beta-catenin signaling pathway in Alzheimer's disease *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 4690280 (2019-04-16)[2021-07-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31119171/>. DOI: 10.1155/2019/4690280.
- [22] Baglietto-Vargas D, Medeiros R, Martinez-Coria H, *et al.* Mifepristone alters amyloid precursor protein processing to preclude amyloid beta and also reduces tau pathology[J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 74(5): 357-366.
- [23] Pedrazzoli M, Losurdo M, Paolone G, *et al.* Glucocorticoid receptors modulate dendritic spine plasticity and microglia activity in an animal model of Alzheimer's disease[J / OL]. *Neurobiol Dis*, 2019, 132: 104568 (2019-08-05) [2021-07-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31394203/>. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.104568.

Drug repurposing for treatment Alzheimer disease based on LINCS and vesicular glutamate transporter 1 gene sets

XIE Zong-jie^{1,2}, WANG Jing², HAN Lu², WANG Tong-xing², GAO Sheng-qiao², CHENG Xiao-rui^{1,2}, ZHOU Wen-xia², ZHANG Yong-xiang²

(1. Graduate School, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasure, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To predict anti-Alzheimer disease (AD) drugs using vesicular glutamate transporter 1 (*VGLUT1*) as a target based on the glutamate excitotoxicity in pathogenesis of AD and expression profile data of the Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures (LINCS). **METHODS** *VGLUT1* gene sets were constructed based on Metacore database. The *VGLUT1* transcription regulating potential of the compound was assessed via Gene Set Enrichment Analysis based on gene expression profiles induced by compounds from LICNS. Senescence-accelerated mouse prone 8 strain (SAMP8) was adopted as an AD model. Morris water maze test and novel object recognition were used to evaluate spatial learning memory and object recognition memory. **RESULTS** *VGLUT1* gene sets consisted of 16 activation genes and 11 inhibition genes. Flunisolid, glutamine, anastrozole, mifepristone and raltrexed were the top five drugs, which might up-regulate *VGLUT1* transcription. The result of behavior test showed that mifepristone significantly increased the swimming time of SAMP8 mice in the target quadrant. **CONCLUSION** Drug repurposing based on LINCS and *VGLUT1* gene sets provides a new and accessible anti-AD drug discovery strategy and mifepristone has the potential to become an anti-AD drug.

Key words: Alzheimer disease; drug repurposing; gene expression profiles; vesicular glutamate transporter; mifepristone

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81803431)

Corresponding author: ZHANG Yong-xiang, E-mail: zhangyx@bmi.ac.cn; ZHOU Wen-xia, E-mail: zhouwx727@163.com

(收稿日期: 2021-07-20 接受日期: 2022-08-04)

(本文编辑: 齐春会)