

基于UPLC-Q-TOF-MS结合网络药理学探讨黑逍遥散改善失眠大鼠学习记忆能力的药效物质基础及作用机制

刘佳敏, 黄海, 梁朋朋, 王雅乐, 李桂云, 吴红彦*

(上海中医药大学 深圳医院, 广东 深圳 518004)

[摘要] 目的: 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)、网络药理学及药效学, 考察黑逍遥散改善失眠大鼠学习记忆能力的药效物质基础和作用机制。方法: 采用UPLC-Q-TOF-MS对黑逍遥散煎液的化学成分进行表征。应用网络药理学构建“活性成分-交集靶点-通路”网络, 对关键成分与核心靶点进行分子对接。选取8周龄雄性SD大鼠60只, 随机分为空白组、模型组、黑逍遥散低、中、高剂量组(3.82、7.65、15.30 g·kg⁻¹), 酒石酸唑吡坦组(0.5 mg·kg⁻¹), 每组10只, 除空白组外连续4 d腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)诱导大鼠失眠模型。各给药组按相应剂量灌胃给药, 1次/d, 连续14 d。以Morris水迷宫试验测试大鼠学习记忆能力, 透射电镜观察海马突触超微结构, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测海马组织5-羟色胺(5-HT)及白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织肿瘤蛋白p53(TP53)、大鼠肉瘤病毒(RAS)、表皮生长因子受体(EGFR)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)结合蛋白(CREBBP)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、蛋白激酶B1(Akt1)、一氧化氮合酶1(NOS1)、磷酸化(p)-Akt1、p-GSK-3 β 蛋白表达情况, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马组织TP53、RAS、EGFR、CREBBP、GSK-3 β 、Akt1、NOS1 mRNA表达情况。结果: 在黑逍遥散中鉴定出176个成分, 主要为黄酮类、三萜皂苷类、苯丙素类等化合物。网络药理学分析表明, TP53、V-Ha-Ras肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)、成神经细胞瘤肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)、EGFR、CREBBP、GSK-3 β 、Akt1、NOS1为黑逍遥散治疗失眠的核心靶点, 主要富集于环磷酸腺苷(cAMP)、RAS、Ras相关蛋白1(Rap1)、糖基化终产物(AGE)/糖基化终产物受体(RAGE)、EGFR等多条信号通路。8-姜烯酚、洋川芎内酯F、6-姜辣素、欧当归内酯A、川芎内酯E等5个成分为黑逍遥散煎液治疗失眠的关键活性成分。动物实验结果表明, 黑逍遥散中、高剂量组能显著升高失眠大鼠的体质量、缩短睡眠潜伏期、延长睡眠时间($P<0.01$); 显著缩短逃避潜伏期、增加穿越平台的次数($P<0.01$), 并能改善海马突触超微结构的病理变化。同时显著上调海马组织中5-HT含量、Akt1 mRNA表达、Akt1和p-Akt1蛋白表达的水平($P<0.01$); 显著下调海马组织中炎症因子含量($P<0.01$); 显著下调海马组织中TP53、RAS、NOS1、EGFR、CREBBP、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白, 以及TP53、RAS、NOS1、EGFR、CREBBP、GSK-3 β mRNA的表达水平($P<0.01$)。结论: 该研究确定了黑逍遥散中5种关键活性成分可能通过调控cAMP、RAS、EGFR等信号通路改善失眠大鼠的学习记忆能力, 为其机制研究与临床应用提供了重要参考。

[关键词] 黑逍遥散; 失眠; 学习记忆能力; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS); 网络药理学; 物质基础; 海马组织

[中图分类号] R22; R28; R256.23; O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0019-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250162 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20240624.1726.001>

[网络出版日期] 2024-06-25 08:37:49

Exploring Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Hei Xiaoyaosan in Improving Learning and Memory Ability of Insomnia Rats Based on UPLC-Q-TOF-MS and Network Pharmacology

LIU Jiamin, HUANG Hai, LIANG Pengpeng, WANG Yale, LI Guiyun, WU Hongyan*

(Shenzhen Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518004, China)

[收稿日期] 2024-03-27

[基金项目] 全国老中医药专家学术经验继承项目(国中医药人教函[2022]76号); 广东省名中医传承工作室建设项目(粤中医办函[2020]1号); 广东省自然科学基金项目(2020A1515010217); 广东省中医药管理局科研项目(20222198); 罗湖区软科学研究计划项目(LX202202129)

[第一作者] 刘佳敏, 在读博士, 从事中医药防治脑病的临床与试验研究, E-mail: 1587153481@qq.com

[通信作者] * 吴红彦, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治脑病的临床与试验研究, E-mail: wu.hy@163.com

[Abstract] **Objective:** Based on ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), network pharmacology and pharmacodynamics, to investigate the pharmacodynamic material basis and mechanism of Hei Xiaoyaosan in improving learning and memory ability of insomnia rats. **Method:** UPLC-Q-TOF-MS was used to characterize the chemical constituents of Hei Xiaoyaosan. Network pharmacology was applied to construct the network of active ingredients-intersecting targets-pathways, and molecular docking was performed on key ingredients and core targets. Sixty 8-week-old male SD rats were selected and randomly divided into blank group, model group, Hei Xiaoyaosan low, medium, and high dose groups (3.82, 7.65, 15.30 g·kg⁻¹), and zolpidem tartrate group (0.5 mg·kg⁻¹), with 10 rats in each group. Except for the blank group, the insomnia model was induced by intraperitoneal injection of *p*-chlorophenylalanine (PCPA) for 4 consecutive days. Rats in each dosing group were administered the corresponding dose by gavage, once a day for 14 consecutive days. Morris water maze test was utilized to assess the learning and memory ability of rats, transmission electron microscopy was employed to examine the ultrastructure of hippocampal synapses, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was conducted to analyze the levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in hippocampal tissues, and Western blot was performed to detect the expression levels of tumor suppressor protein p53 (TP53), rat sarcoma virus (RAS), epidermal growth factor receptor (EGFR), cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element binding protein (CREB) binding protein (CREBBP), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), protein kinase B1 (Akt1), nitric oxide synthase 1 (NOS1), phosphorylated (p)-Akt1, and p-GSK-3 β in hippocampal tissues. Additionally, real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to assess the mRNA expression levels of TP53, RAS, EGFR, CREBBP, GSK-3 β , Akt1 and NOS1. **Result:** A total of 176 components were identified in Hei Xiaoyaosan, mainly flavonoids, triterpene saponins, phenylpropanoids and other compounds. Network pharmacological analysis revealed that TP53, V-Ha-Ras Harvey Rat sarcoma viral oncogene homolog (HRAS), neuroblastoma sarcoma viral oncogene homolog (NRAS), EGFR, CREBBP, GSK-3 β , Akt1 and NOS1 were the key targets of Hei Xiaoyaosan in treating insomnia. The core targets were predominantly associated with cAMP, RAS, Ras-associated protein 1 (Rap1), advanced glycation end products (AGE)/receptor for AGE (RAGE), and EGFR signaling pathways, and the key active ingredients of Hei Xiaoyaosan in treating insomnia were 8-shogaol, ligustilide F, 6-gingerol, levistolide A and senkyunolide E. Animal experiment results demonstrated that Hei Xiaoyaosan medium and high dose groups significantly increased body weight, shortened sleep latency and prolonged sleep duration in insomnia rats ($P < 0.01$), significantly decreased escape latency and increased platform crossing frequency ($P < 0.01$), and improved the pathological changes of hippocampal synaptic ultrastructure. Meanwhile, the two groups could significantly elevate 5-HT level, Akt1 mRNA expression, Akt1 and p-Akt1 protein expression ($P < 0.01$), reduce inflammatory factor levels ($P < 0.01$), and down-regulate protein expression levels of TP53, RAS, NOS1, EGFR, CREBBP, GSK-3 β and p-GSK-3 β ($P < 0.01$), as well as mRNA expression levels of TP53, RAS, NOS1, EGFR, CREBBP and GSK-3 β in hippocampal tissues ($P < 0.01$). **Conclusion:** This study determined that the five key active ingredients (8-shogaol, ligustilide F, 6-gingerol, levistolide A and senkyunolide E) in Hei Xiaoyaosan may improve the learning and memory ability of insomnia rats by regulating signaling pathways such as cAMP, RAS, and EGFR, providing an important reference for its mechanism research and clinical application.

[Keywords] Hei Xiaoyaosan; insomnia; learning and memory ability; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); network pharmacology; material basis; hippocampal tissues

失眠是一种常见的睡眠障碍,主要表现为入睡困难和维持睡眠困难,同时伴有醒后疲劳、乏力、精

神不振、注意力不集中等症状,全球约有三分之一的成年人患有失眠症,多数患者失眠的病程长达数十年之久^[1]。失眠可以单独出现,也可以与其他疾病或心理健康障碍一起出现,若不及时治疗,可能成为其他疾病发展和恶化的危险因素^[2]。长期失眠诱发的认知能力下降近年来受到广泛关注^[3]。失眠使得认知障碍风险增加27%^[4],罹患痴呆的风险比常人增加2.14倍^[5]。研究表明失眠造成的认知损伤与激活海马中炎症因子,参与氧化应激反应导致活性氧的过度增加、脂质过氧化和DNA修饰等生理或病理过诱导的神经元损伤相关^[6-7]。加强对失眠的早期干预不仅能改善睡眠质量,并且对延缓失眠诱发的认知损伤具有重要意义。

失眠中医病名归属于“不寐”“不得卧”等,其发病与肝、脾、肾联系密切^[8]。肝气郁结,最易犯脾,脾为气血生化之源,脾气健旺则运化得力,水谷精微得以输布,则气血充足,神明得养;反之则气血亏虚,脑脉不充而夜卧不安。再者中焦健运失常,则肾精亏虚,肾水无以蒸上而脑髓失养。肝、脾、肾三脏失调,精血亏虚、脑脉失养而致不寐。黑逍遥散出自《医略六书·女科指要》,为肝、脾、肾同调的经典方剂^[9],由熟地黄、柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、煨姜、薄荷、甘草组成,全方重用熟地黄以“活血气,封填骨髓,滋肾水,补益真阴”(《雷公炮制药性解》)加强补肾之功。当归、白芍、柴胡补血养肝、滋阴柔肝、解郁疏肝,苓、术、姜、枣、草之属培土以制木,诸药合用,使肝气得疏,脾运得复,肾精得补,契合失眠发病病机。研究表明,黑逍遥散不仅可以有效改善失眠患者的睡眠质量^[10],并能通过调节 β 淀粉样蛋白(A β)沉积^[11]、减轻神经炎症^[12]、抗氧化应激损伤^[13]、抑制tau蛋白过度磷酸化^[12]等途径延缓阿尔茨海默病(AD)模型鼠的认知能力损伤。然而黑逍遥散发挥治疗作用的有效成分尚不明确,黑逍遥散能否改善失眠导致的学习记忆损伤,亟待深入探究。

系统阐释中药复方的物质内涵是探索其作用机制的基础,液质联用技术已成为中药多成分鉴定的常用工具,超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)具有广泛的选择性、超高的灵敏度、高分辨率质量测定等优点,近些年被用于中药复杂体系的表征与鉴定^[14]。本研究采用UPLC-Q-TOF-MS整体分析黑逍遥散煎液中的化学成分,并进一步结合网络药理学及动物实验进行研究,旨在揭示黑逍遥散治疗失眠导致学习记忆能力减退的主要活性成分和潜在靶点,为其临床应用奠

定科学依据。

1 材料

SCIEX Exion LC型超高效液相色谱仪、X500B Q-TOF mass spectrometer型质谱仪(美国爱博才思分析仪器贸易有限公司),AUW220D型十万分之一电子天平(日本岛津公司),LD5-2A型低速离心机(北京京立离心机有限公司),H1650R型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),MB-530型多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司),DHP-500型电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司),DYCZ-24DN型垂直电泳槽、DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、ChemiScope6100型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司),PIKOREAL96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Thermo公司),SA201型Morris水迷宫视频分析系统(江苏赛昂斯生物科技有限公司),JEM-1400FLASH透射电子显微镜[日本电子公司(JEOL)]。

5-羟色胺(5-HT)、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号分别为C0392060373、CSB-E04640r、CSB-E11987r),戊巴比妥钠、对氯苯丙氨酸(PCPA)(美国Sigma公司,货号分别为69020100、C6506-25G),聚山梨酯-80(上海生工生物工程股份有限公司,货号AL00442-0500),TRIzol试剂(美国Thermo公司,货号15596026),Exon Script First-Strand Synthesis Super Mix with ds DNase试剂盒(成都市蓉为基因生物科技有限公司,货号A502-01)、蛋白激酶B1(Akt1)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)结合蛋白(CREBBP)、表皮生长因子受体(EGFR)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、一氧化氮合酶1(NOS1)、肿瘤抑制蛋白p53(TP53)、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Proteintech公司,货号分别为60203-2-Ig、22277-1-AP、66455-1-Ig、22104-1-AP、29231-1-AP、60283-2-Ig、66009-1-Ig),磷酸化(p)-Akt1、大鼠肉瘤病毒(RAS)抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab81283、ab52939),p-GSK-3 β 抗体(美国CST公司,货号#5558),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠二抗、HRP标记山羊抗兔二抗、戊二醛、钨酸(美国Abiowell公司,货号分别为AWS0001、AWS0002、AWI0097、AWI0136),醋酸双氧铀、柠檬酸铅(北京中镜科仪技术有限公司,货号分别为GZ02625、GA10701-1)。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱级,其余试

剂均为分析级。

黑逍遥散组方为熟地黄(批号 A231009)、柴胡(批号 A231111)、当归(批号 A231127)、白芍(批号 A231112)、白术(批号 A231126)、茯苓(批号 A231124)、生姜(批号 A2401001)、薄荷(批号 A231101)、甘草(批号 A230927),饮片均购自上海中医药大学深圳医院中药房,由上海中医药大学吴红彦教授鉴定均符合2020年版《中华人民共和国药典》规定。酒石酸唑吡坦片(杭州赛诺菲制药有限公司,批号 HT1422, 10 mg/片)。

健康SD雄性8周龄大鼠(SPF级)60只,体质量(200±20)g,实验动物由珠海百事通生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(粤)2020-0051。大鼠饲养于深圳市人民医院 SPF 级实验动物中心,室内温度(23±2)℃,相对湿度 40%~60%,动物运抵饲养房后适应性喂养1周,动物可自由摄食、饮水,实验员定期更换垫料、饲料及饮用水。实验操作严格遵守实验动物管理与保护相关准则,由上海中医药大学深圳医院伦理委员会审核批准,批准号 2022-LHQZYYYYXLL-KY-046。

2 方法

2.1 黑逍遥散化学成分识别

2.1.1 黑逍遥散冻干粉制备 取熟地黄 15 g、柴胡 10 g、当归 10 g、白芍 10 g、白术 10 g、茯苓 10 g、生姜 10 g、薄荷 2 g(后下)、甘草 8 g,加入8倍量的水,煎煮2次,每次1 h,合并煎液,浓缩至 1.0 g·mL⁻¹的溶液,于-80℃预冻12 h,放入真空冻干设备进行冻干(-30℃抽真空48 h,30℃干燥24 h),制得冻干粉(得率33.07%),置于-80℃冰箱储存。

2.1.2 黑逍遥散供试品溶液制备 取黑逍遥散冻干粉2 g,加入70%甲醇10 mL,涡旋至膏状样溶解,超声(功率250 W、频率40 kHz)1 h,13 000 r·min⁻¹(离心半径5.94 cm)离心10 min后取上清进样。

2.1.3 色谱条件 Waters ACQUITY HSS T3 色谱柱(2.1 mm×150 mm,1.8 μm),以流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~5 min,3%~8%B;5~11 min,8%~30%B;11~20 min,30%~80%B;20~21 min,80%~95%B;21~27 min,95%B;预平衡7 min),柱温35℃,流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL。

2.1.4 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,喷雾电压5.5、-4.5 kV,气帘气压力35 psi(1 psi≈6.895 kPa),辅助气压力和雾化气压力均为55 psi,离子源温度550℃,簇裂解电压80 V,碰撞能量35 V,碰撞能量滚动区间15 V,正负离子的扫描

范围均为 m/z 100~1 250。

2.1.5 成分检测 取2.1.2项下黑逍遥散供试品溶液,按2.1.3和2.1.4项下条件进样检测,采用AB Library View 1.3.1软件对供试品溶液数据进行分析,借助Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、Chemspider数据库(<https://www.chemspider.com/>)、天然产物数据库(GNPS,<http://gnps.ucsd.edu>)并查阅相关文献,设置质量偏差绝对值10 ppm以内,初步选出匹配度高的化合物。利用AB SCIEX OS Q 1.6软件对数据库匹配所得的化合物进行峰提取定性分析,结合相关文献及Pubchem数据库提供的碎片离子信息及裂解规律进行鉴定分析,并通过比对制剂与各单味药材中总离子流图下各峰的保留时间、二级碎片离子信息,将化合物的来源进行药材归属。

2.2 网络药理学预测黑逍遥散治疗失眠相关靶点

2.2.1 黑逍遥散治疗失眠的潜在靶点收集 借助Swisstarget Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对UPLC-Q-TOF-MS分析的成分进行靶点预测;通过Gene Cards数据库(<https://www.genecards.org>)、在线人类孟德尔遗传数据系统(OMIM,<https://www.omim.org>)、Dis Ge NET数据库(<https://www.disgenet.org>),以“insomnia”“sleepless”“wakefulness”“insomniadisorder”为关键词,筛选疾病靶点;在UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)对药物成分靶点和疾病靶点进行基因注释获得靶点基因名称;利用Draw Venn Diagram(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)将成分与疾病的靶点取交集,并绘制韦恩图,得到黑逍遥散治疗失眠的潜在靶点,并筛选出交集靶点对应的活性成分。

2.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及关键靶筛选 通过互作基因检索工具数据库(String,<https://www.stringdb.org/>)构建PPI网络(设置最高置信度>0.9);将PPI数据文本导入到Cytoscape 3.8.0软件中,计算连接度(Degree)、节点介度(Betweenness)和连接紧密度的(Closeness)拓扑结构特征值,选择3个拓扑结构特征值均大于中位数的节点作为核心靶点。

2.2.3 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 通过DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)进行GO功能注释和KEGG通路分析,采用微生信在线数据分析平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对结果进行可

视化。

2.2.4 “活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络构建 选取活性成分、交集靶点和KEGG富集的前20条通路,采用CytoScape 3.8.0软件构建“活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络,并进行拓扑分析,根据Degree值的大小,筛选得到5个关键成分。

2.3 分子对接 分别在PDB数据(<https://www.rcsb.org>)、Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载核心靶点的蛋白晶体结构和核心成分的3D结构,分别导入Auto Dock Vina 1.2.0进行分子对接,得到对接结合自由能及对接结果,并使用Py Mol 2.4.0软件进行可视化分析。

2.4 黑逍遥散失眠大鼠学习记忆能力的影响

2.4.1 药液的制备 将熟地黄15 g,柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、生姜各10 g,甘草8 g,薄荷2 g加8倍纯水浸泡30 min,武火煮沸后,文火再煎煮40 min,薄荷后下煎煮5 min,滤出药液。随后加6倍纯水于药渣中,继续煮沸30 min,再次滤出药液,合并2次药液加热浓缩至含生药 $2.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4.2 造模、分组及给药 雄性SD大鼠60只,随机选取空白组10只,余下50只为造模组。采用PCPA诱导大鼠失眠模型^[15]。将PCPA加入生理盐水,滴加聚山梨酯-80助溶,研磨并配成 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混悬液。造模组每日同时时间段腹腔注射PCPA混悬液($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续4 d。于造模第4天ELISA检测各组大鼠血清5-HT水平,以模型组大鼠5-HT明显降低,昼夜节律消失、失眠作为造模成功依据^[15-19]。造模组随机分为模型组、酒石酸唑吡坦组($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和黑逍遥散低、中、高剂量组(3.82 、 7.65 、 $15.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只,给药组参考大鼠与70 kg成人临床用量的折算,其中以黑逍遥散中剂量组为临床等效剂量^[20]。各给药组按相应剂量灌胃药液,空白组和模型组灌胃等体积生理盐水,每日1次,连续14 d。

2.4.3 标本采集与保存 末次给药后第2天,大鼠禁食不禁水12 h,称取大鼠体质量,各组大鼠3%戊巴比妥钠 $45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉大鼠,断头,经颅前正中中线剪开头皮,小心撬开颅骨,在冰盒上取下大鼠脑组织,剥离海马,切成 1 mm^3 小块,放入预冷的2.5%戊二醛固定液内,每组3份,室温保存做透射电镜(TEM)样本备用。各组剩余大鼠取脑后冰上迅速分离海马组织,液氮冷冻后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。

2.4.4 睡眠量的监测 末次给药结束后50 min腹腔注射戊巴比妥钠 $35\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,记录注射结束时间,

将大鼠腹部朝上放在垫板上记录翻正反射消失时间,记录大鼠苏醒时间,从而计算睡眠潜伏期和睡眠时间,以动物翻正反射消失达1 min为入睡指标,以30 s内翻转达3次为睡眠结束指标。

2.4.5 Morris水迷宫试验 给药第9天开始进行Morris水迷宫试验,将大鼠专用站台置于其中一个象限,池内注入清水,清水高度为距离站台台面约2 cm。将每只大鼠抓住尾巴头朝池壁,分别从4个象限放入水池,每次120 s,如果120 s内没有找到站台则引领其在站台上站立15 s,如果120 s内找到站台则记录所用时间,并保持大鼠在站台停留15 s,每只大鼠4次训练结束,毛巾擦干水分,放回笼中。过程中用视频跟踪系统记录大鼠行动轨迹并作数据采集和处理。记录大鼠逃逸潜伏期,连续5 d。选取后2 d的登台时间作为逃避潜伏期。第6天进行空间探索实验,撤去平台,将各组大鼠在同一位置面向池内壁放入水中,记录大鼠在120 s内行动轨迹图及其穿越目标象限的次数。

2.4.6 TEM观察大鼠海马突触超微结构 将大鼠海马组织从2.5%戊二醛溶液中取出,经PBS冲洗后,1%四氧化锇再固定,逐级脱水、渗透、包埋,作60~90 nm超薄切片,置铜网上,用醋酸铀染色10~15 min,再用柠檬酸铅染色1~2 min,TEM视野下观察海马突触超微结构。

2.4.7 ELISA检测大鼠海马组织中5-HT及炎症因子含量 取大鼠海马组织,精确称取40 mg,加入10倍生理盐水, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 匀浆180 s, $3\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径9.5 cm,下同),取上清液,按ELISA说明书操作,于酶标仪450 nm下检测吸光度A,依据标准曲线计算5-HT及炎症因子IL-6、TNF- α 的含量。

2.4.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织相关蛋白表达水平 取大鼠海马组织,精确称取25 mg,加入RIPA裂解液300 μL ,低温匀浆后于冰上静置10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ 000 r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,取上清,BCA定量后, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴5 min使蛋白变性。制胶、上样、电泳、转至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入Akt1、EGFR、RAS、p-Akt1、TP53、 β -actin抗体(1:5 000),以及CREBBP、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、NOS1抗体(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日洗膜,加入二抗(1:5 000),孵育90 min,洗膜后滴加ECL发光液,曝光,Image J软件分析灰度值。

2.4.9 Real-time PCR检测大鼠海马组织相关mRNA表达水平 取大鼠海马组织,精确称取

20 mg, TRIzol提取总 RNA, 微量分光光度计检测各组浓度, 遵循试剂盒 Superscript III 说明书将 RNA 逆转录为 cDNA。随后开始 PCR 扩增, 扩增条件为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 40 次循环; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 延伸 30 s, 95 °C 灭活。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的 mRNA 的相对表达水平。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Akt1	上游 GTCACCTCTGAGACCGACACC	115
	下游 GCCTCCGTTCACTGTCCAC	
TP53	上游 GCTTCGAGATGTTCCGAGAG	119
	下游 AGACTGGCCCTTCTTGGTCT	
CREBBP	上游 CCCTGAGAAGCGCAAACCTGA	85
	下游 TCCATTCGCTTGCTCTCGT	
EGFR	上游 GGCATCATGGGGGAGAACAA	97
	下游 TCTTTGGCCCATAGGTACAGTT	
GSK-3 β	上游 CTGCCATCGAGACATTAAACCAC	228
	下游 CCTAGCAACAATTACAGCCAACACA	
NOS1	上游 AACCATGTCAAGTATGCCACC	83
	下游 TCATGTTTGCCGTCAGTCC	
RAS	上游 AGTGCCTTGACGATACAGCTA	150
	下游 TGCACGTACTCTCTTGACC	
β -actin	上游 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

2.5 统计学处理 采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据满足正态性和方差齐性, 多组间比较用单因素方差分析; 组间两两比较, 若方差齐则采用最小显著性差异法 (LSD), 若方差不齐采用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 黑逍遥散物质基础的鉴定 黑逍遥散总离子流见增强出版附加材料。共鉴定出黑逍遥散中 176 种化学成分, 包括黄酮类(38), 三萜皂苷类(35), 苯丙素类(20), 单萜类(19), 苯酚类(9), 有机酸类(8), 糖类(6), 核苷类(6), 倍半萜类(5), 酮类(5), 环烯醚萜类(4), 氨基酸类(3), 香豆素类(3), 鞣质类(3), 三萜类(3), 黄烷类(3), 芪类(2), 其他类(2), 醛类(1), 酚类(1)。其中甘草中检测到 62 种化学成分, 白芍中检测到 26 种化学成分, 当归中检测到 16 种化学成分, 熟地黄中检测到 15 种化学成分, 柴胡、白芍中各检测到 13 种化学成分, 10 种成分为所有药材共有成分, 薄荷中检测到 9 种化学成分,

生姜中检测到 6 种化学成分, 2 种成分为薄荷和白术的共有成分, 2 种成分为薄荷和当归的共有成分, 1 种成分为当归和甘草的共有成分, 茯苓中仅检测到 1 个化学成分, 成分具体归属及鉴定信息见增强出版附加材料^[21-28]。

3.2 网络药理学预测黑逍遥散治疗失眠相关靶点

3.2.1 黑逍遥治疗失眠的潜在靶点收集 将黑逍遥散化学表征鉴定得到的成分经过数据库筛选共获得黑逍遥散化学成分相关靶点 919 个, 失眠相关靶点 1 254 个。将黑逍遥散化学成分作用靶点和失眠相关靶点导入 Draw Venn Diagram 在线作图网站绘制韦恩图, 筛选出黑逍遥散治疗失眠靶点 181 个, 化学成分 115 个。见增强出版附加材料。

3.2.2 PPI 网络构建及关键靶点、核心成分筛选

共筛选得到 8 个核心靶点, 包括 TP53、V-Ha-Ras 肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)、成神经细胞瘤肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)、EGFR、CREBBP、GSK-3 β 、Akt1、NOS1, 这些靶点蛋白相互作用频率高, 表明其在蛋白互作网络中可能发挥重要作用, 推测其是黑逍遥散治疗失眠的核心靶点。见增强出版附加材料。

3.2.3 黑逍遥散治疗失眠的 GO 功能注释和 KEGG 富集分析

GO 富集结果显示, 黑逍遥散治疗失眠的生物过程主要富集到信号转导、化学突触传递和对外来刺激的反应等; 细胞组分富集到质膜、质膜的组成部分和树突等; 分子功能主要富集于蛋白结合, 蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性和酶结合等生物学过程。对上述交集靶点的 KEGG 通路富集分析显示, 其中 181 个交集靶点主要与环磷酸腺苷(cAMP)、RAS、Ras 相关蛋白 1(Rap1)、糖基化终产物(AGE)/糖基化终产物受体(RAGE)、EGFR 等多条信号通路相关。见增强出版附加材料。

3.2.4 构建“活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络

“活性成分-交集靶点-通路”相互作用网络见增强出版附加材料。根据拓扑分析, 筛选得到 5 个关键成分, 8-姜烯酚(8-shogaol)、洋川芎内酯 F(senkyunolide F)、6-姜辣素(6-gingerol)、欧当归内酯 A(levistilide A)、洋川芎内酯 E(senkyunolide E)。上述结果表明, 黑逍遥散的作用机制可能作用于整个生物网络系统, 而不是单个靶点, 主要通过 cAMP、RAS、Rap1、AGE-RAGE、EGFR 等关键信号通路发挥调节细胞生长繁殖和凋亡、抗氧化、抗炎等作用达到治疗失眠的目的。

3.3 分子对接 将拓扑分析排名前 4 的核心靶点

TP53、HRAS、NRAS、EGFR与“活性成分-交集靶点-通路”网络中Degree排名前5的核心成分8-姜烯酚、洋川芎内酯F、6-姜辣素、欧当归内酯A、川芎内酯E。进行20次对接。当结合能 $<0\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时($1\text{ kcal}\approx 4.186\text{ kJ}$),表示受体与配体可以自发地结合而无需外部能量,当结合能 $<-5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时说明结合情况优异,结合能 $<-7\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时则表示结合作用强烈。对接结果显示,8-姜烯酚、洋川芎内酯F、6-姜辣素、欧当归内酯A、川芎内酯E分别与HRAS、NRAS、EGFR蛋白的结合能均 $<-6\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,洋川芎内酯F、6-姜辣素、欧当归内酯A、川芎内酯E分别与TP53的结合能均 $<-5\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,8-姜烯酚与TP53的结合能为 $-4.9\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,说明网络药理学预测的关键成分与核心靶点的结合作用较强,两者的结合很有可能发挥相应的药效作用。将结合活性最强的前6个成分靶点的对接结果利用PyMOL 2.4进行可视化。见增强出版附加材料。

表2 黑逍遥散对失眠大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Hei Xiaoyaosan on body weight of insomnia rats ($\bar{x}\pm s, n=8$) g				
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	造模前	造模后	给药后
空白组		244.37 $\pm$ 6.78	281.63 $\pm$ 5.55	342.13 $\pm$ 7.32
模型组		251.00 $\pm$ 6.72	231.13 $\pm$ 7.04 ¹⁾	291.50 $\pm$ 9.49 ¹⁾
黑逍遥散高剂量组	15.3	242.75 $\pm$ 6.51	235.88 $\pm$ 3.94 ¹⁾	319.25 $\pm$ 13.31 ²⁾
黑逍遥散中剂量组	7.65	246.12 $\pm$ 7.60	236.50 $\pm$ 3.81 ¹⁾	336.13 $\pm$ 7.83 ²⁾
黑逍遥散低剂量组	3.82	248.00 $\pm$ 6.83	234.75 $\pm$ 5.06 ¹⁾	295.75 $\pm$ 6.78
酒石酸唑吡坦组	0.000 5	247.25 $\pm$ 6.04	237.38 $\pm$ 4.69 ¹⁾	332.13 $\pm$ 6.74 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.01$ (表3-表7同)

表3 黑逍遥对失眠大鼠睡眠质量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Hei Xiaoyaosan on sleep quality of insomnia rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	睡眠潜伏期/s	睡眠时间/s
空白组		256.63 $\pm$ 30.26	3 821.00 $\pm$ 128.37
模型组		354.50 $\pm$ 23.19 ¹⁾	3 296.63 $\pm$ 149.64 ¹⁾
黑逍遥散高剂量组	15.3	266.88 $\pm$ 30.94 ²⁾	3 772.00 $\pm$ 108.70 ²⁾
黑逍遥散中剂量组	7.65	253.75 $\pm$ 29.31 ²⁾	3 887.38 $\pm$ 94.07 ²⁾
黑逍遥散低剂量组	3.82	333.25 $\pm$ 34.16	3 217.50 $\pm$ 149.83
酒石酸唑吡坦组	0.000 5	272.88 $\pm$ 48.80 ²⁾	3 643.75 $\pm$ 200.85 ²⁾

3.4.2 黑逍遥散对失眠大鼠学习记忆能力的影响

与空白组比较,模型组大鼠逃避潜伏期时间显著延长,穿台次数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,黑逍遥散高、中剂量组,酒石酸唑吡坦组显著缩短了其逃避潜伏期,增加了穿越平台的次数($P<0.01$)。采用大鼠水迷宫测试仪跟踪成像系统对各组大鼠

3.4 动物实验验证

3.4.1 黑逍遥散对各组大鼠宏观体表特征及睡眠的影响 造模组大鼠血清中5-HT(72.95 ± 13.90) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 较空白组(122.19 ± 7.12) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 显著降低($P<0.01$),表明PCPA大鼠失眠模型制备成功。空白组小鼠毛质光泽,精神状态良好,活动、睡眠、饮食、体质量正常,睡眠节律明显,表现为昼伏夜动。造模后,与空白组比较,其余各组均出现体质量下降($P<0.01$),毛色黯淡,出现嘶叫打斗等现象。给药后,与模型组比较,黑逍遥散高、中剂量组、酒石酸唑吡坦组体质量显著升高($P<0.01$),睡眠潜伏期显著缩短($P<0.01$),睡眠时间显著延长($P<0.01$)。以上结果表明,黑逍遥散高、中剂量组能有效调节失眠大鼠的精神状态和行为表现,提高其体质量,缩短睡眠潜伏期,延长睡眠时间。实验过程中模型组大鼠及高剂量组各死亡2只(可能为注射PCPA导致),故后续其他组均随机取8只动物数据进行计算。见表2、表3。

在水池中的运动轨迹进行记录,结果表明黑逍遥散干预失眠模型大鼠的学习记忆能力有所改善,见表4及增强出版附加材料。

表4 黑逍遥散失眠大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

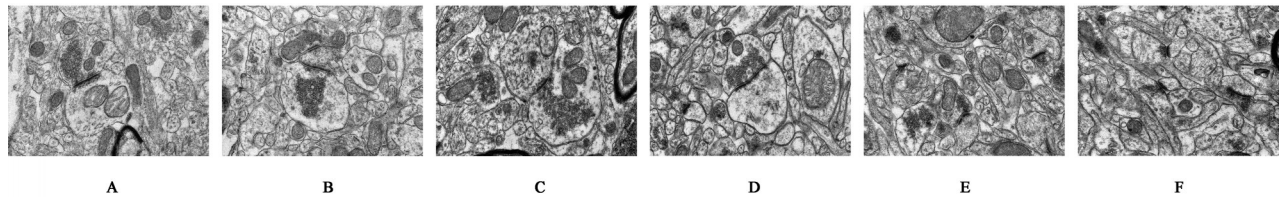
Table 4 Effect of Hei Xiaoyaosan on escape latency and crossing platform times of insomnia rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
空白组		25.39 $\pm$ 3.15	6.00 $\pm$ 0.93
模型组		51.06 $\pm$ 3.64 ¹⁾	2.00 $\pm$ 0.93 ¹⁾
黑逍遥散高剂量组	15.3	31.39 $\pm$ 4.31 ²⁾	3.88 $\pm$ 0.35 ²⁾
黑逍遥散中剂量组	7.65	24.96 $\pm$ 2.65 ²⁾	5.25 $\pm$ 0.46 ²⁾
黑逍遥散低剂量组	3.82	49.70 $\pm$ 2.61	2.25 $\pm$ 0.89
酒石酸唑吡坦组	0.000 5	24.24 $\pm$ 2.60 ²⁾	5.13 $\pm$ 0.64 ²⁾

3.4.3 黑逍遥散对海马突触超微结构的影响 通过透射电镜观察,空白组大鼠海马突触间隙清晰可

见,突触后密度厚度大,突触前膜聚集有突触囊泡,形态结构正常;模型组大鼠海马突触数量少,突触间隙模糊不清。给药后,各组大鼠的海马突触间隙

清晰可见,突触后致密物(PSD)厚度增加,突触前聚集丰富的突触囊泡,且结构清晰,其中以黑逍遥散中、高剂量、酒石酸唑吡坦组最为明显。见图1。



注:A.空白组;B.模型组;C~E.黑逍遥散高、中、低剂量组;F.酒石酸唑吡坦组(图2同)

图1 黑逍遥散对失眠大鼠海马突触超微结构的影响(TEM,×15 000)

Fig. 1 Effect of Hei Xiaoyaosan on ultrastructure of hippocampal synapses in insomnia rats (TEM,×15 000)

3.4.4 黑逍遥散对失眠大鼠海马中5-HT及炎症因子水平的影响 与空白组比较,模型组海马组织中5-HT水平显著降低,IL-6及TNF-α水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黑逍遥散高、中剂量组,酒石酸唑吡坦组显著增加了海马组织5-HT的水平,显著降低了海马组织中IL-6及TNF-α的水平($P<0.01$)。见表5。

表5 黑逍遥散对失眠大鼠海马组织5-HT、IL-6、TNF-α水平的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Hei Xiaoyaosan on 5-HT, IL-6 and TNF-α levels in hippocampal tissues of insomnia rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	5-HT/μg·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹
空白组		139.37±9.46	20.19±2.73	50.89±2.31
模型组		60.59±5.34 ¹⁾	45.72±2.95 ¹⁾	80.05±1.57 ¹⁾
黑逍遥散高剂量组	15.3	86.16±4.05 ²⁾	37.36±1.46 ²⁾	59.84±2.13 ²⁾
黑逍遥散中剂量组	7.65	118.00±6.13 ²⁾	27.38±2.02 ²⁾	49.78±3.17 ²⁾
黑逍遥散低剂量组	3.82	60.64±2.76	45.33±0.93	77.63±1.61
酒石酸唑吡坦组	0.000 5	98.70±5.97 ²⁾	31.07±1.65 ²⁾	52.17±1.40 ²⁾

3.4.5 黑逍遥散对失眠大鼠海马组织相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠Akt1、p-Akt1的蛋白表达水平显著降低,TP53、RAS、EGFR、CREBBP、GSK-3β、p-GSK-3β、NOS1的蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黑逍遥散高、中剂量组、酒石酸唑吡坦组Akt1、p-Akt1蛋白表达量显著增加,TP53、RAS、EGFR、CREBBP、GSK-3β、p-GSK-3β、NOS1的蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。见图2、表6。

3.4.6 黑逍遥散对失眠大鼠海马组织相关mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠Akt1的mRNA表达量显著降低,TP53、RAS、EGFR、

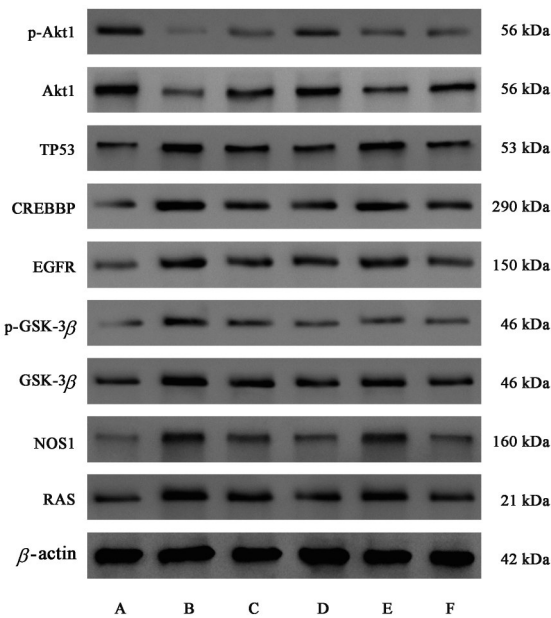


图2 失眠大鼠海马组织中相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of related protein expression in hippocampus of insomnia rats

CREBBP、GSK-3β、NOS1 mRNA表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黑逍遥散高、中剂量组、酒石酸唑吡坦组Akt1 mRNA表达量显著增加,TP53、RAS、EGFR、CREBBP、GSK-3β、NOS1 mRNA表达量显著降低($P<0.01$)。见表7。

4 讨论

失眠作为一种常见疾病,给人们的正常工作和生活带来严重影响,对学习记忆的影响尤为突出^[29]。睡眠剥夺会导致机体氨基酸类、单胺类、胆碱能、肽类神经递质的变化,5-HT等单胺类神经递质的变化不仅是评判失眠症状改善的关键指标,并通过调节慢波睡眠与快速眼动睡眠巩固学习记忆的形成^[15,30-31]。本研究发现黑逍遥散可以调节失眠大鼠的5-HT、RAS、EGFR等指标的表达,缩短睡眠潜伏期,延长睡眠时间,有效改善失眠大鼠的脑组

表6 黑逍遥散对失眠大鼠海马组织相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Hei Xiaoyaosan on expression of related proteins in hippocampus tissues ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Akt1 /β-actin	p-Akt1 /β-actin	TP53 /β-actin	CREBBP /β-actin	EGFR /β-actin	GSK-3β /β-actin	p-GSK-3β /β-actin	NOS1 /β-actin	RAS /β-actin
空白组		0.45±0.02	0.34±0.02	0.08±0.01	0.06±0.02	0.05±0.02	0.07±0.05	0.03±0.01	0.05±0.02	0.07±0.04
模型组		0.14±0.01 ¹⁾	0.02±0.00 ¹⁾	0.45±0.02 ¹⁾	0.41±0.55 ¹⁾	0.40±0.05 ¹⁾	0.45±0.01 ¹⁾	0.31±0.03 ¹⁾	0.46±0.06 ¹⁾	0.45±0.04 ¹⁾
黑逍遥散高剂量组	15.3	0.22±0.01 ²⁾	0.12±0.01 ²⁾	0.32±0.02 ²⁾	0.22±0.11 ²⁾	0.22±0.03 ²⁾	0.31±0.07 ²⁾	0.13±0.03 ²⁾	0.24±0.03 ²⁾	0.28±0.05 ²⁾
黑逍遥散中剂量组	7.65	0.35±0.03 ²⁾	0.19±0.01 ²⁾	0.14±0.03 ²⁾	0.16±0.02 ²⁾	0.17±0.02 ²⁾	0.14±0.06 ²⁾	0.07±0.01 ²⁾	0.17±0.06 ²⁾	0.22±0.05 ²⁾
黑逍遥散低剂量组	3.82	0.13±0.03	0.03±0.01	0.43±0.01	0.37±0.04	0.39±0.05	0.40±0.03	0.29±0.01	0.41±0.11	0.42±0.04
酒石酸唑吡坦组	0.000 5	0.28±0.02 ²⁾	0.13±0.01 ²⁾	0.18±0.02 ²⁾	0.17±0.02 ²⁾	0.14±0.01 ²⁾	0.21±0.06 ²⁾	0.11±0.01 ²⁾	0.15±0.03 ²⁾	0.20±0.04 ²⁾

织病理改变及学习记忆能力。目前针对黑逍遥散改善失眠相关学习记忆能力减退的报道相对较少,本研究分析了黑逍遥散煎液的化学成分,并结合网络药理学与分子对接探讨了黑逍遥散改善失眠大鼠学习记忆能力的药效物质及作用机制,可为黑逍遥散复方的研究开发与临床用药提供借鉴。

表7 黑逍遥散对失眠大鼠海马组织相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Hei Xiaoyaosan on expression of related mRNAs in hippocampal tissue of insomnia rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Akt1	TP53	CREBBP	EGFR	GSK-3β	NOS1	RAS
空白组		0.96±0.12	1.20±0.29	0.86±0.15	0.85±0.14	1.12±0.19	0.94±0.20	1.04±0.20
模型组		0.23±0.04 ¹⁾	6.75±0.60 ¹⁾	8.61±1.07 ¹⁾	5.23±0.81 ¹⁾	6.64±0.71 ¹⁾	6.14±0.69 ¹⁾	5.63±0.48 ¹⁾
黑逍遥散高剂量组	15.3	0.36±0.07 ²⁾	4.00±0.43 ²⁾	3.35±0.73 ²⁾	2.37±0.56 ²⁾	3.63±0.52 ²⁾	2.57±0.21 ²⁾	2.40±0.43 ²⁾
黑逍遥散中剂量组	7.65	0.83±0.11 ²⁾	2.39±0.39 ²⁾	3.05±0.81 ²⁾	1.93±0.41 ²⁾	2.09±0.36 ²⁾	2.06±0.30 ²⁾	2.08±0.26 ²⁾
黑逍遥散低剂量组	3.82	0.24±0.04	6.35±1.00	8.16±1.53	5.16±1.22	6.51±0.83	5.91±0.93	5.14±1.00
酒石酸唑吡坦组	0.000 5	0.55±0.10 ²⁾	3.46±0.46 ²⁾	3.33±1.04 ²⁾	2.08±0.63 ²⁾	3.17±0.34 ²⁾	2.23±0.36 ²⁾	2.28±0.51 ²⁾

本研究从黑逍遥散中共鉴定出176个成分,结合网络药理学及分子对接表明6-姜辣素、8-姜烯酚、洋川芎内酯F、川芎内酯E、欧当归内酯A共5个关键成分为黑逍遥散煎液治疗失眠的关键活性成分。研究表明,6-姜辣素、8-姜烯酚、洋川芎内酯F、川芎内酯E、欧当归内酯A均有较强的神经保护作用^[32-38]。在细胞实验中,6-姜辣素通过减少氧化应激和炎症反应、抑制GSK-3β的活化和增强Akt的活化,对PC12细胞中Aβ₁₋₄₂诱导的细胞凋亡表现出保护作用,从而保护海马神经元^[33]。洋川芎内酯类化合物则在抗氧化损伤、抗炎等方面有较好的应用前景^[39]。欧当归内酯A是一种有效的神经保护和改善认知能力的神经炎症抑制剂,可抑制神经元凋亡、恢复胆碱能系统功能并降低体内神经炎症,从而改善东莨菪碱引起的学习和记忆缺陷,可用于神经保护和认知改善^[40]。以上研究结果表明,黑逍遥散中含有多种改善失眠及认知损伤的药效物质基础,为黑逍遥散进一步的基础研究提供了方向。

网络药理学分析结果进一步揭示黑逍遥散可能通过TP53、HRAS、NRAS、EGFR、CREBBP、GSK-3β、Akt1、NOS1核心靶点发挥改善失眠及学

习记忆能力的作用。由于RAS基因包括KRAS、NRAS及HRAS 3种亚型^[41],课题组前期证实黑逍遥散可能通过RAS/RAF激酶(RAF)/有丝分裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路干预氧化应激,降低Aβ和p-tau水平,抑制海马神经元损伤,从而改善学习记忆能力^[13],为了进一步验证RAS在失眠相关学习记忆减退中的作用,选取RAS作进一步验证。核心靶点TP53、RAS、EGFR、CREBBP、GSK-3β、Akt1、NOS1主要涉及神经炎症、氧化应激、突触可塑性、神经元损伤等生物过程。失眠会使机体处于炎性状态,长时间睡眠剥夺的小鼠会表现出多器官损伤和炎症细胞浸润,而IL-6被认为是细胞因子风暴产生的驱动因子^[42]。促炎细胞因子的持续积累和炎症信号通路Toll样受体4(TLR4)/核转录因子-κB(NF-κB)的激活,可诱导中枢神经炎症、小胶质细胞的活化及突触蛋白的丢失,神经炎症和淀粉样纤维会诱导小胶质细胞激活EGFR,EGFR则进一步触发下游磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)、RAS/RAF/MEK/ERK与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号级联,抑制神经干细胞分化并促进神

经干细胞的存活和增殖,进而影响机体的认知功能^[43-45]。本研究结果中,黑逍遥散高、中剂量组可显著改善失眠大鼠的睡眠及学习记忆能力,降低海马中IL-6、TNF- α 水平,改善海马突触的超微结构,下调失眠大鼠的EGFR水平,表明黑逍遥散可能通过参与抗炎反应,抑制EGFR的激活而改善了失眠大鼠的认知能力。研究证实EGFR抑制剂可以抑制小胶质细胞的表达和激活进而延缓认知损伤^[45],这也进一步支持了本研究结果。本研究模型组大鼠的Akt1、p-Akt1降低、而GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达水平升高,提示PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路可能处于抑制状态,而给药干预后,黑逍遥散逆转了Akt1、GSK-3 β 蛋白及磷酸化的表达,提示黑逍遥散改善失眠引起的学习记忆减退可能与激活PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路相关。该信号通路的激活可减轻慢性睡眠剥夺后的神经炎症与氧化应激反应^[46],并对神经元凋亡产生保护作用^[47-48]。Akt是PI3K的下游关键效应分子,Akt被磷酸化后,可以激活下游产生抗凋亡因子如B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),降低Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、p53、NOS1蛋白的表达,从而抑制神经元的凋亡^[49-55]。其中p53不仅参与调节生物钟,在失眠模型大鼠中表现出高表达^[51],其磷酸化和激活与神经元凋亡高度相关,而敲除p53则能在很大程度上逆转哺乳动物STE20样激酶1/2(MST1/2)诱导的AD样认知缺陷^[56]。此外,长期失眠诱导脑内大量氧自由基堆积产生细胞毒性,直接损害神经元^[57]。CREBBP蛋白的重构可以影响神经元的生长和发育,下调该基因的表达可减缓脑损伤^[58]。本研究结果证实,给药干预后模型组的TP53、RAS、CREBBP表达下调,揭示黑逍遥散在抗炎、抑制氧化损伤、神经元保护方面具有潜在优势,为了进一步阐明潜在的机制,笔者对核心靶点进行了KEGG途径富集分析,主要富集于cAMP、RAS、Rap1、AGE-RAGE、EGFR等多条信号通路,而这些通路均与神经炎症、氧化应激等密不可分^[59],表明黑逍遥散可能通过多条信号通路发挥多方面的抗失眠、神经保护作用。

综上所述,本研究基于UPLC-Q-TOF-MS基本明确了黑逍遥散煎液的化学成分,结合网络药理学及分子对接初步阐明了黑逍遥散改善失眠大鼠学习记忆能力的关键成分为6-姜辣素、8-姜烯酚、洋川芎内酯F、川芎内酯E、欧当归内酯A,并通过动物实验证实了TP53、RAS、EGFR、CREBBP、GSK-3 β 、Akt1、NOS1可能是潜在靶点。这为进一步探索黑

逍遥散改善失眠相关学习记忆损伤的机制提供了重要的线索和理论基础。然而,本研究仍存在一定局限性,黑逍遥散改善失眠相关的学习记忆损伤疗效背后的确切机制尚不明晰,后续可结合体外细胞实验、多组学、分子动力学模拟等多种技术手段进一步验证。

〔利益冲突〕 本文不存在任何利益冲突。

〔参考文献〕

- [1] PERLIS M L, PIGEON W R, GRANDNER M A, et al. Why treat insomnia? [J]. J Prim Care Community Health, 2021, 12: 21501327211014084.
- [2] GRANDNER M A. Sleep, health, and society [J]. Sleep Med Clin, 2017, 12(1): 1-22.
- [3] KIM W H, KIM J H, KIM B S, et al. The role of depression in the insomnia of people with subjective memory impairment, mild cognitive impairment, and dementia in a community sample of elderly individuals in South Korea [J]. Int Psychogeriatr, 2017, 29(4): 653-661.
- [4] XU W, TAN C C, ZOU J J, et al. Sleep problems and risk of all-cause cognitive decline or dementia: An updated systematic review and Meta-analysis [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(3): 236-244.
- [5] HUNG C M, LI Y C, CHEN H J, et al. Risk of dementia in patients with primary insomnia: A nationwide population-based case-control study [J]. BMC psychiatry, 2018, 18(1): 38.
- [6] WADHWA M, PRABHAKAR A, RAY K, et al. Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48 h of sleep deprivation [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 222.
- [7] GUPTA Y K, GUPTA M, KOHLI K. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain [J]. Indian J Physiol Pharmacol, 2003, 47(4): 373-386.
- [8] 刘殿龙, 丁洪磊, 崔述生. 崔述生教授运用角药理论辨治神经性失眠经验总结 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(31): 111-114.
- [9] 王虎平, 米彩云, 李明成, 等. 基于“三阴并调”探讨黑逍遥散对AD模型大鼠海马神经元及PP2A的影响及作用机制 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(4): 40-45.
- [10] 黄晓青, 黎飞猛, 梁兆球. 黑逍遥散联合舒乐安定治疗女性围绝经期失眠的临床疗效及对内分泌系统的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(9): 1688-1691.
- [11] 马春林, 吴红彦, 兰美华, 等. 黑逍遥散干预APP/PSI

- 双转基因小鼠海马区 $\alpha\beta$ 降解相关基因和蛋白表达效应的研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(3): 115-118.
- [12] 李晓, 胡亦明, 韦春昕, 等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨黑逍遥散对AD模型大鼠神经炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 33-41.
- [13] 王虎平, 吕育洁, 胡韵韵, 等. 基于RAS/RAF/MEK/ERK信号通路探讨黑逍遥散干预AD模型大鼠氧化应激的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(17): 35-42.
- [14] WU Q, OU C, WANG J, et al. Jiawei Kongsheng Zhenzhong pill: Marker compounds, absorption into the serum (rat), and Q-markers identified by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1328632.
- [15] 衡依然, 段慧竹, 杜鹤, 等. 酸枣仁皂苷改善对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠模型学习记忆损伤机制的研究[J]. 中草药, 2022, 53(21): 6759-6770.
- [16] 夏天吉, 闫明珠, 王智, 等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 428-435.
- [17] YAN Y, LI Q, DU H Z, et al. Determination of five neurotransmitters in the rat brain for the study of the hypnotic effects of Ziziphi Spinosa Semen aqueous extract on insomnia rat model by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Nat Med, 2019, 17(7): 551-60.
- [18] MURRAY N M, BUCHANAN G F, RICHESON G B. Insomnia caused by serotonin depletion is due to hypothermia[J]. Sleep, 2015, 38(12): 1985-1993.
- [19] 徐波, 王平, 夏婧, 等. 基于OX1R/PLC β -1/PC α /ERK1/2信号通路探讨安寐丹对失眠模型大鼠肝脏神经递质和昼夜节律的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(15): 11-20.
- [20] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 920.
- [21] SHAKERI A, MASULLO M, D'URSO G, et al. In depth chemical investigation of *Glycyrrhiza triphylla* Fisch roots guided by a preliminary HPLC-ESI MSⁿ profiling[J]. Food Chem, 2018, 248: 128-136.
- [22] 李葆林, 麻景梅, 田宇柔, 等. 甘草中新发现化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2438-2448.
- [23] 孙学. 硫磺熏蒸对白术药材质量的影响研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [24] SUN X, CUI X B, WEN H M, et al. Influence of sulfur fumigation on the chemical profiles of *Atractylodes macrocephala* Koidz. evaluated by UFLC-QTOF-MS combined with multivariate statistical analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 141: 19-31.
- [25] ZHENG Y F, QI L W, ZHOU J L, et al. Structural characterization and identification of oleanane-type triterpene saponins in *Glycyrrhiza uralensis* Fischer by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(22): 3261-3270.
- [26] YU J Q, DENG A J, WU L Q, et al. Osteoclast-inhibiting saikosaponin derivatives from *Bupleurum chinense*[J]. Fitoterapia, 2013, 85: 101-108.
- [27] JI S, WANG Q, QIAO X, et al. New triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis* and their rapid screening by LC/MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 90: 15-26.
- [28] LUO S Q, LIN L Z, CORDELL G A. Saikosaponin derivatives from *Bupleurum wenchuanense* [J]. Phytochemistry, 1993, 33(5): 1197-1205.
- [29] 王欢欢, 马青, 于爽, 等. 中药改善睡眠障碍动物学习记忆的物质基础及机制研究[J]. 中国药物依赖性杂志, 2022, 31(5): 365-368, 374.
- [30] REN X J, WANG G Y, ZHANG X P, et al. Sedative and hypnotic effects and transcriptome analysis of *Polygala tenuifolia* in aged insomnia rats [J]. Chin J Integr Med, 2020, 26(6): 434-441.
- [31] 黄红, 陈碧清, 姜宁, 等. 鲜天麻对睡眠干扰诱导小鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2509-2516.
- [32] EL-BASSOSSY H M, ELBERRY A A, GHAREIB S A, et al. Cardioprotection by 6-gingerol in diabetic rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(4): 908-914.
- [33] YAHYAZADEH R, BARADARAN RAHIMI V, YAHYAZADEH A, et al. Promising effects of gingerol against toxins: A review article [J]. Biofactors, 2021, 47(6): 885-913.
- [34] ZHANG F, MA N, GAO Y F, et al. Therapeutic Effects of 6-gingerol, 8-gingerol, and 10-gingerol on dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in rats [J]. Phytother Res, 2017, 31(9): 1427-1432.
- [35] TOPIC B, TANI E, TSIAKITZIS K, et al. Enhanced maze performance and reduced oxidative stress by combined extracts of *Zingiber officinale* and *Ginkgo biloba* in the aged rat [J]. Neurobiol Aging, 2002, 23(1): 135-143.
- [36] SUTALANGKA C, WATTANATHORN J. Neuroprotective and cognitive-enhancing effects of the combined extract of *Cyperus rotundus* and *Zingiber officinale*[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 135.

- [37] CHENG X L, RUAN Y L, DAI J Y, et al. 8-shogaol derived from dietary ginger alleviated acute and inflammatory pain by targeting TRPV1 [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155500.
- [38] JO S, SAMARPITA S, LEE J S, et al. 8-Shogaol inhibits rheumatoid arthritis through targeting TAK1 [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 178: 106176.
- [39] 徐兰兰, 车仙花, 李宁, 等. 洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2022, 36(2): 98-102.
- [40] NI H, LIAO Y, ZHANG Y, et al. Levistilide A ameliorates neuroinflammation via inhibiting JAK2/STAT3 signaling for neuroprotection and cognitive improvement in scopolamine-induced Alzheimer's disease mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110783.
- [41] 梁嘉莉, 蔡妍, 李常兴. 1型神经纤维瘤病发病机制及治疗进展[J]. *皮肤科学通报*, 2024, 41(1): 70-78.
- [42] SANG D, LIN K, YANG Y, et al. Prolonged sleep deprivation induces a cytokine-storm-like syndrome in mammals [J]. *Cell*, 2023, 186(25): 5500-5516.
- [43] MEI J, WANG Y, SONG X, et al. The needle in the haystack: Identifying and validating common genes of depression, insomnia, and inflammation [J]. *J Affect Disord*, 2023, 342: 45-53.
- [44] COCHARD L M, LEVROS L C, JOPPÉ S E, et al. Manipulation of EGFR-induced signaling for the recruitment of quiescent neural stem cells in the adult mouse forebrain [J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 621076.
- [45] TAVASSOLY O, SATO T, TAVASSOLY I. Inhibition of brain epidermal growth factor receptor activation: A novel target in neurodegenerative diseases and brain injuries [J]. *Mol Pharmacol*, 2020, 98(1): 13-22.
- [46] 万亚会, 吕梦嶝, 李征, 等. $\alpha 7$ -nAChR/PI3K/AKT/GSK-3 β 通路在慢性睡眠剥夺后的保护作用及其机制研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2021, 38(5): 392-398.
- [47] WANG M M, ZHANG M, FENG Y S, et al. Electroacupuncture inhibits neuronal autophagy and apoptosis via the PI3K/AKT pathway following ischemic stroke [J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 134.
- [48] CAO Y, LI Q, LIU L, et al. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(9): 1282-1297.
- [49] 余蕾, 石明娟. Akt/PKB在肿瘤发生、发展过程的作用及其机制[J]. *陕西医学杂志*, 2013, 42(10): 1410-1411.
- [50] TSIMBERIDOU A M, SKLIRIS A, VALENTINE A, et al. Akt inhibition in the central nervous system induces signaling defects resulting in psychiatric symptomatology [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1): 56.
- [51] 李莉, 刘茹, 何晶, 等. 基于网络药理学及动物实验探究温胆汤治疗失眠潜在靶点[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2023, 25(7): 2450-2464.
- [52] NA D, LIM D H, HONG J S, et al. A multi-layered network model identifies Akt1 as a common modulator of neurodegeneration [J]. *Mol Syst Biol*, 2023, 19(12): e11801.
- [53] SPINELLI M, FUSCO S, GRASSI C. Brain insulin resistance and hippocampal plasticity: Mechanisms and biomarkers of cognitive decline [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 788.
- [54] 芦玥, 贾跃进, 柴智, 等. 枢机安神汤对氯苯丙氨酸失眠大鼠神经递质和焦虑的影响[J]. *世界中医药*, 2024, 19(2): 185-190.
- [55] ZHU L, LI L, ZHANG Q, et al. NOS1 S-nitrosylates PTEN and inhibits autophagy in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17011.
- [56] WANG H, SHANG Y, WANG E, et al. MST1 mediates neuronal loss and cognitive deficits: A novel therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2022, 214: 102280.
- [57] 刘美君. 基于Ras/Raf/MEK/ERK通路研究针刺干预睡眠剥夺大鼠认知功能的机制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [58] 吴红彦, 李海龙, 顾静, 等. 黑逍遥散对阿尔茨海默病大鼠海马基因表达谱的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(11): 1345-1351.
- [59] FABBRIO M. The mechanisms of sleep function and regulation for health and cognitive performance [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(12): 1680.

[责任编辑 李嘉麟]