

引用:粟洁莹,赵湘培,卢蓉萍,孙宗喜,杨梅.UPLC-Q-Orbitrap HRMS结合网络药理学分析宁心养神膏化学成分及治疗失眠的作用机制[J].中医药导报,2025,31(12):90-97.

UPLC-Q-Orbitrap HRMS结合网络药理学 分析宁心养神膏化学成分及治疗失眠的 作用机制^{*}

粟洁莹¹,赵湘培¹,卢蓉萍¹,孙宗喜¹,杨 梅^{1,2}

(1.广西中医药大学附属国际壮医医院壮瑶医药研究实验室,广西 南宁 530201;

2.广西壮医龙路病重点研究室,广西 南宁 530201)

[摘要] 目的:运用网络药理学和分子对接方法探讨宁心养神膏治疗失眠的相关靶点及其作用机制。方法:通过UPLC-Q-Orbitrap HRMS液质联用得到宁心养神膏的化合物成分,在SwissADME网站筛选并获取宁心养神膏的主要活性成分及其作用靶点;利用疾病基因网络(DisGeNet)、人类基因综合数据库(GeneCards)、药物靶标数据库(Drug Bank)、治疗靶点数据库(Therapeutic Target Database)、人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和蛋白质数据库(Uniprot)检索失眠相关靶点;绘制韦恩图获取药物与疾病的共同靶点;以String在线分析平台分析药物与疾病共同靶点,进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建;利用DAVID生物信息数据库对药物与疾病共同靶点进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并利用Cytoscape 3.10.2软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络图。通过AutoDock软件进行分子对接,并采用PyMol软件进行可视化分析。结果:宁心养神膏中共筛选出48个有效化学成分,其核心成分与失眠交集靶点615个。GO和KEGG分析结果显示宁心养神膏治疗失眠的作用机制主要涉及长时程抑制、β-丙氨酸代谢、脂肪酸降解、内分泌和神经元投射形态发生、常染色质、γ-氨基丁酸门控氯离子通道活性等调节通路。分子对接结果显示宁心养神膏中的化学成分黄芩苷元、山柰酚、棕榈酸、邻苯二甲酸二丁酯、橙皮素、棕榈油酸与丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARG)、半胱天冬酶3(CASP3)、雌激素受体α(ESR1)等核心靶点有较高的亲和力。结论:宁心养神膏中黄芩苷元、山柰酚、棕榈酸、邻苯二甲酸二丁酯、橙皮素、棕榈油酸等有效成分为治疗失眠的相关靶点,可通过调控失眠的信号通路以及其相关蛋白发挥缓解失眠的作用。

[关键词] 失眠;宁心养神膏;UPLC-Q-OrbitrapHRMS;网络药理学;分子对接

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)12-0090-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.014

Chemical Composition Analysis of Ningxin Yangshen Gao (宁心养神膏) and Its Mechanism in Treating Insomnia by UPLC-Q-Orbitrap HRMS Combined with Network Pharmacology

SU Jieying¹, ZHAO Xiangpei¹, LU Rongping¹, SUN Zongxi¹, YANG Mei^{1,2}

(1.Zhuang and Yao Medicine Research Laboratory, The Affiliated International Zhuang Medicine Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi 530201, China;2.Guangxi Key Research Laboratory For Longlu Disease of Zhuang Medicine, Nanning Guangxi 530201, China)

[Abstract] Objective: To explore the related targets and mechanisms of action of the medicine Ningxin Yangshen Gao in treating insomnia by network pharmacology and molecular docking methods. Methods: The main active components of Ningxin Yangshen Gao were screened and obtained through UPLC-Q-Orbitrap HRMS liquid chromatography -mass spectrometry. The main active ingredients and their action targets of Ningxin Yangshen Gao were Screened and obtained on the SwissADME website. Insomnia-related targets were

*基金项目:广西中医药管理局自筹经费科研课题(GXZYA20220166)

通信作者:杨梅,女,高级工程师,研究方向为民族药医疗机构制剂开发

retrieved using DisGeNet, GeneCards, Drug Bank, Therapeutic Target Database, OMIM, and Uniprot databases. The targets of drugs and diseases were plotted in a Venn diagram to obtain common targets. The protein–protein interaction (PPI) network was constructed using the String online analysis platform for the common targets of drugs and diseases. DAVID database was used for Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the common targets of drugs and diseases, and Cytoscape 3.10.2 software was used to construct a "drug–component–target–disease" network diagram. Molecular docking was performed using AutoDock software and visualization analysis was conducted using PyMol software. Results: A total of 48 effective chemical components were screened out from Ningxin Yangshen Gao, and their core components intersected with 615 insomnia targets. GO and KEGG analysis results showed that the mechanism of action of Ningxin Yangshen Gao in treating insomnia mainly involves long-term inhibition, β -alanine metabolism, fatty acid degradation, endocrine and neuronal projection morphogenesis, constitutive chromatin, GABA-gated chloride channel activity, etc. Molecular docking results showed that the chemical components of Ningxin Yangshen Gao such as baicalin, kaempferol, palmitic acid, dibutyl phthalate, naringenin and palmitoleic acid exhibit high affinity with the core targets such as mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), Caspase 3 (CASP3), and estrogen receptor alpha (ESR1). Conclusion: The effective components of Ningxin Yangshen Gao such as baicalin, kaempferol, palmitic acid, dibutyl phthalate, naringenin and palmitoleic acid, act on insomnia-related targets by regulating insomnia pathways and related proteins to alleviate insomnia.

[Keywords] insomnia; Ningxin Yangshen Gao; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; network pharmacology; molecular docking

睡眠是人类不可或缺的生理需求,占人生约1/3的时间。作为维持机体各项功能正常运转的基础保障,良好的睡眠对身心健康具有至关重要的调节作用。研究表明,全球大约有27%人群面临失眠的困扰^[1]。据相关统计,当前我国成人不同程度的失眠概率约为38%,严重者失眠可持续10年以上^[2]。在现代社会快节奏的生活环境下,失眠问题日益严重,发病率持续上升。除睡眠时间不足和心理压力外,越来越多的因素导致睡眠障碍。慢性失眠不仅降低生活质量和工作效率,还与多种慢性疾病密切相关,给个人和社会带来沉重的健康和经济负担。目前中医临幊上多采用中药联合针灸、耳穴贴压、推拿、穴位贴敷、穴位埋线等方法综合治疗失眠。酸枣仁汤、归脾汤、天王补心丹是中医药治疗失眠的经典名方,在临幊上被广泛应用于治疗失眠,且疗效确切。百乐眠胶囊、珍枣胶囊等中成药,因其具有适应证明确、疗效可靠、不良反应少等优势,常用于治疗失眠^[3-6]。

宁心养神膏是以酸枣仁汤结合临床经验拟定的方剂,可治疗失眠、多梦、健忘、烦躁易怒,但其化学成分及作用机制尚未明确。因此,本研究采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)液质联用技术对宁心养神膏的化学成分进行表征,结合网络药理学的内容分析其基因、蛋白、疾病以及药物之间的关联性,并通过分子对接进行虚拟验证,系统阐释宁心养神膏改善失眠的潜在药效物质及可能参与调控的分子机制,以期为宁心养神膏治疗失眠的药理机制研究提供理论依据。

1 材 料

1.1 主要仪器 UltiMate3000RS色谱仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];Q Exactive高分辨质谱仪[赛默飞世尔科技(中

国)有限公司];纯水/超纯水一体机系统(德国默克密理博);D3024R速微量冷冻离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司);MX-F涡旋振荡器(武汉赛维尔生物科技有限公司);JP-040S超声波清洗器(深圳洁盟清洗设备有限公司)。

1.2 药物与试剂

1.2.1 药物 炒酸枣仁(批号:20211101)、茯苓(批号:20211102)、首乌藤(批号:20211101)、制远志(批号:20210901)、柴胡(批号:20211102)、姜半夏(批号:20210901)、党参(批号:20210603)、黄芩(批号:20210801)、龙骨(批号:20211002)、牡蛎(批号:20210901)、醋郁金(批号:20200401)、合欢皮(批号:20210601)、龙眼肉(批号:20211101)、竹茹(批号:20210801)、麸炒枳实(批号:20210901)均购自广西仙茱中药有限公司,经广西中医药大学附属国际壮医医院陈少峰副主任药师鉴定为正品。

1.2.2 试剂 色谱甲醇[(赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号:2BC121802)];甲酸(重庆川东化工有限公司化学试剂厂,批号:20220223)。

2 方 法

2.1 宁心养神膏化学成分鉴定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Welch AQ-C₁₈(150.0 mm×2.1 mm, 1.8 μ m);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~1 min, 2% B; 1~5 min, 2%~20% B; 5~10 min, 20%~50% B; 10~15 min, 50%~80% B; 15~20 min, 80%~95% B; 20~27 min, 95% B; 27~28 min, 95%~2% B; 28~30 min, 2% B);柱温箱温度:35 °C;流速:0.30 mL/min;自动进样器温度:10.0 °C;进样量:5.0 μ L。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾电离源,正负离子切换扫描,电

喷雾电压为3.2 kV,毛细管温为300 °C,鞘气流速为40 Arb,辅助气流速为15 Arb,离子传输管温度为350 °C,一级分辨率为70 000,二级分辨率为17 500,扫描范围为 m/z 100~1 500,碰撞能量梯度依次为30、40、60 eV。

2.1.3 供试品溶液的制备 取宁心养神膏中15味中药加水煎煮两次,药液浓缩,取浓缩液加蜂蜜即得宁心养神膏。取宁心养神膏,干燥,即得宁心养神膏干膏粉。取宁心养神膏粉末0.1 g,加入1 mL 80%甲醇和研磨珠,研磨5 min,涡旋10 min。4 °C离心(20 000×g)10 min,取上层清液过滤后上机分析。

2.1.4 数据采集与分析 首先将供试品按照“2.1.1”及“2.1.2”项下的条件进行分析,高分辨液质采集的数据通过CD3.3(Compound Discoverer 3.3,Thermo Fisher)完成数据初步整理后进行数据库(mz Cloud)检索比对。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 信息收集及活性成分的筛选 将UPLC-Q-Orbitrap HRMS液质联用鉴定出的化合物导入PubChem数据库中以其化学名查找对应的Smile号;登录Swiss ADME网站,导入化合物的Smile号,满足Pharmacokinetics中GI absorption得分为“high”、Druglikeness项至少通过3个“Yes”进行筛选。在Swiss Target Prediction平台预测化合物潜在靶点。

2.2.2 相关靶点的筛选 以“Insomnia”为关键词,从疾病基因网络(DisGeNet)、人类基因综合数据库(GeneCards)、药物靶标数据库(Drug Bank)、治疗靶点数据库(Therapeutic Target Database)、人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和蛋白质数据库(Uniprot)中得到失眠靶点。将上述6个数据库得到的疾病靶点删除重复项后,通过微生信网站(<https://www.bioinformatics.com.cn>)生成韦恩图。

2.2.3 “成分-靶点”网络的构建 将上述得到的药物靶点和所有的疾病靶点分别删除重复项后,在Venny2.1.0网站生成韦恩图,得到宁心养神膏和失眠共同作用的靶点,并把靶点数据导出,建立Network和Type文件后导入到Cytoscape3.10.2软件中进行可视化,制成网络图。

2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将得到药物靶点和疾病靶点共有的关键靶点导入String(<https://en.string-db.org/cgi/input.pl>)数据库构建PPI网络,选择蛋白种属为“homosapiens”,制出蛋白相互作用关系的网络图,下载TSV

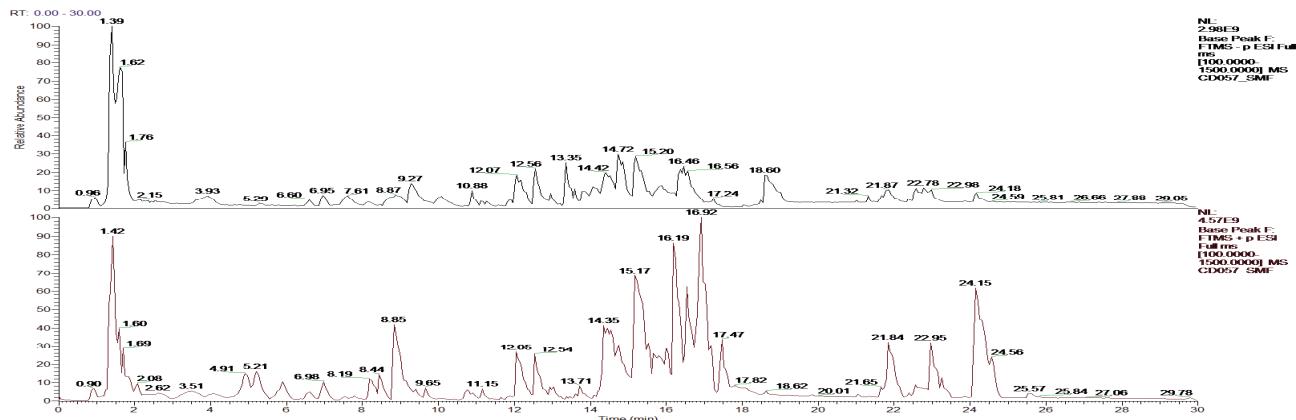
格式后导入到Cytoscape3.10.2软件,并使用插件Centiscape2.2功能,勾选Degree、Close以及Between后进行拓扑分析,删除Degree值小于中位数的靶点,获得核心靶点的PPI网络图。

2.2.5 基因本体论(gene ontology,GO)富集分析与京都基因与基因百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析 将核心靶点输入至DAVID在线分析数据库,选择 $P \leq 0.01$ 为前提进行GO的生物学过程(biological process,BP)、细胞组成(cellular component,CC)、分子功能(molecular function,MF)分析以及KEGG富集分析通路。导出富集分析数据,利用微生信(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)网站进行可视化绘制。GO选前10条富集数量绘制柱状统计图,KEGG选取排名前20的富集通路利用气泡图展示。

2.2.6 分子对接 从PubChem数据库中获取关键靶点的小分子2D结构,利用ChemDraw画出,导入Chem3D中保存为pdb格式。从PDB数据库(RCSB Protein Data Bank)中获取核心靶点的三维结构,对其进行删除水分子和加氢处理。通过查阅相关文献选择与药物成分结合能较小的小分子进行对接,再通过AutoDock Tools软件将药物成分配体和靶蛋白保存为“pdbqt”文件。用AutoDock Vina1.5.7对处理完毕的药物成分配体和关键靶蛋白进行分子对接验证,并计算关键点小分子与药物成分之间的最低结合能。最后利用PyMOL2.2.0软件对结合能最低结合模式进行可视化分析,建立模型图形。

3 结 果

3.1 宁心养神膏化学成分分析 采用UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术,分别在正离子和负离子模式下对宁心养神膏化学成分进行表征,其总离子流图(TIC)见图1。采集的数据通过CD3.3完成初步整理后与mzCloud数据库进行比对,共匹配到770个化合物,其中mzCloud best match中综合评分大于60分的化合物有405个。质谱信息结合对照品裂解规律,鉴定出60个化合物。化合物涵盖了有机酸(如己二酸、苯甲酸等)、酚类(如4-甲基邻苯二酚)、黄酮类(如黄芩素、橙皮素等)、酰胺(如苯甲酰胺、十六酰胺)、氨基酸(如L-苯丙氨酸、DL-精氨酸)、不饱和脂肪酸(如亚油酸)、生物碱(如夹竹桃麻素、荷尔蒙)、嘌呤碱(如鸟嘌呤、次黄嘌呤)、香豆素(如七叶亭)、三萜类(如柠檬苦素)、酯类(如肉桂酸甲酯)以及多种具有特定生物活性的化合物(如没食子酸、山柰酚、橘皮素等)。(见表1)



注:第1栏黑色为负离子模式总离子流图,第2栏红色为正离子模式总离子流图。

图1 宁心养神膏总离子流图(TIC)

表1 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定宁心养神膏化学成分

序号	t/min	加合离子	实测m/z	分子式	分子量	化合物
1	1.325	[M+H]+1	175.118 9	C ₆ H ₁₄ N4O ₂	174.111 65	DL-精氨酸(DL-Arginine)
2	1.408	[M+H]+1	114.091 6	C ₆ H ₁₁ NO	113.084 30	己内酰胺(Caprolactam)
3	2.089	[M+H]+1	124.039 5	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032 22	烟酸(Nicotinic acid)
4	2.118	[M+H]+1	138.091 4	C ₈ H ₁₁ NO	137.084 08	酪胺(Tyramine)
5	2.714	[M+H]+1	169.035 6	C ₅ H ₄ N ₂ O ₃	168.028 32	尿酸(Uric acid)
6	3.212	[M+H]+1	166.122 8	C ₁₀ H ₁₁ NO	165.115 48	大麦芽碱(Hordenine)
7	5.297	[M-H]-1	125.023 2	C ₆ H ₆ O ₃	126.030 43	连苯三酚(Pyrogallol)
8	5.304	[M+FA-H]-1	169.013 3	C ₇ H ₆ O ₅	124.015 08	没食子酸(Gallic acid)
9	5.352	[M+H]+1	166.086 3	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.079 04	L-苯丙氨酸(L-Phenylalanine)
10	5.795	[M+NH4]+1	152.056 7	C ₅ H ₅ N ₃ O	134.022 88	鸟嘌呤(Guanine)
11	5.864	[M+H]+1	137.045 8	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.038 52	次黄嘌呤(Hypoxanthine)
12	6.192	[M-H]-1	123.043 9	C ₇ H ₈ O ₂	124.051 19	4-甲基邻苯二酚(4-Methylcatechol)
13	6.597	[M-H]-1	241.082 8	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₅	242.090 23	胸苷(Thymidine)
14	6.600	[M+H]+1	127.050 2	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	126.042 95	胸腺嘧啶(Thymine)
15	7.655	[M+H]+1	220.118 0	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	219.110 72	反式玉米素(trans-Zeatin)
16	7.698	[M+H]+1	167.070 3	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063 04	罗布麻宁(Apocynin)
17	7.755	[M-H]-1	145.049 5	C ₆ H ₁₀ O ₄	146.056 75	己二酸(Adipic acid)
18	8.165	[M-H]-1	167.034 0	C ₈ H ₈ O ₄	168.041 23	尿黑酸(Homogentisic acid)
19	8.456	[M+H]+1	199.060 1	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.052 61	丁香酸(Syringic acid)
20	8.457	[M+H]+1	122.060 3	C ₇ H ₇ NO	121.053 01	苯甲酰胺(Benzamide)
21	9.058	[M+H+MeOH]+1	163.075 4	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	130.041 90	肉桂酸甲酯(Methyl cinnamate)
22	9.237	[M-H]-1	153.018 2	C ₇ H ₆ O ₄	154.025 47	龙胆酸(Gentisic acid)
23	9.689	[M-H]-1	121.028 1	C ₇ H ₆ O ₂	122.035 37	苯甲酸(Benzoic acid)
24	9.707	[M+H]+1	138.055 0	C ₇ H ₇ NO ₂	137.047 67	邻氨基苯甲酸(Anthranilic acid)
25	9.947	[M-H]-1	165.018 3	C ₈ H ₆ O ₄	166.025 62	间苯二甲酸(Isophthalic acid)
26	9.984	[M+H]+1	179.034 1	C ₉ H ₆ O ₄	178.026 78	七叶亭(Esculetin)
27	10.300	[M+H]+1	291.086 4	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.079 21	儿茶素(Catechin)
28	11.243	[M-H]-1	165.054 7	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.061 92	3-苯基乳酸(3-Phenyllactic acid)
29	11.456	[M+H]+1	193.049 7	C ₁₀ H ₈ O ₄	192.042 32	7-羟基-6-甲氨基-2H-苯并吡喃-2-酮(7-hydroxy-6-methoxy-2H-chromen-2-one)
30	11.564	[M+H]+1	229.086 0	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.078 71	顺式白藜芦醇(cis-Resveratrol)
31	11.835	[M-H]-1	173.081 0	C ₈ H ₁₄ O ₄	174.088 26	辛二酸(Suberic acid)
32	11.907	[M+H]+1	225.075 5	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.068 16	芥子酸(Sinapinic acid)
33	12.208	[M+H]+1	176.070 6	C ₁₀ H ₈ NO ₂	175.063 28	吲哚-3-乙酸(Indole-3-acetic acid)
34	12.638	[M+H]+1	287.054 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.047 44	山柰酚(Kaempferol)
35	12.688	[M+H]+1	611.195 9	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.188 95	橙皮苷(Hesperidin)
36	12.918	[M-H]-1	137.023 2	C ₇ H ₆ O ₃	138.030 44	水杨酸(Salicylic acid)
37	13.213	[M-H]-1	609.182 6	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.190 09	新橙皮苷(Neohesperidin)
38	13.366	[M-H]-1	187.096 7	C ₉ H ₁₀ O ₄	188.104 03	壬二酸(Azelaic acid)
39	13.624	[M+H]+1	257.080 5	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.073 30	异甘草素(Isoliquiritigenin)
40	13.625	[M+H]+1	285.075 5	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.068 25	大豆苷元(Glycitein)
41	14.211	[M+H-H ₂ O]+1	161.059 6	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178.062 84	4-甲氧基肉桂酸(4-Methoxycinnamic acid)
42	14.298	[M+H]+1	471.200 7	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	470.193 62	柠檬苦素(Limonin)
43	14.702	[M+H-H ₂ O]+1	417.117 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	434.120 62	大豆苷(Daidzin)
44	14.737	[M+H]+1	447.091 3	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446.084 21	黄芩苷(Baicalin)
45	14.761	[M-H]-1	301.071 5	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.078 62	橙皮素(Hesperetin)
46	15.374	[M+H]+1	207.065 0	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	206.057 73	东莨菪内酯(Scoparone)
47	15.710	[M+H]+1	271.059 7	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052 42	黄芩素(Baicalein)
48	16.553	[M+H]+1	285.075 3	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.068 11	汉黄芩素(Wogonin)
49	16.918	[M+H]+1	403.138 0	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402.130 69	川陈皮素(Nobiletin)
50	17.132	[M+H]+1	149.096 1	C ₁₀ H ₁₂ O	148.088 78	枯茗醛(Cuminaldehyde)
51	17.468	[M+H]+1	373.127 7	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.120 38	橘皮素(Tangeritin)
52	18.522	[M+H]+1	279.159 1	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.151 76	邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate)
53	18.646	[M-H]-1	269.045 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052 69	染料木素(Genistein)
54	21.507	[M+H]+1	256.263 2	C ₁₆ H ₃₁ NO	255.255 91	十六酰胺(Hexadecanamide)
55	21.786	[M-H]-1	253.217 1	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	254.224 40	棕榈油酸(Palmitoleic acid)
56	21.849	[M-H]-1	455.353 1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360 32	齐墩果酸(Oleanolic acid)
57	22.088	[M-H]-1	279.233 0	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 11	亚油酸(Linoleic Acid)
58	22.586	[M-H]-1	255.232 8	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.240 10	棕榈酸(Palmitic acid)
59	22.685	[M+H]+1	284.294 7	C ₁ H ₃₇ NO	283.287 36	硬脂酰胺(Stearamide)
60	22.804	[M-H]-1	281.248 5	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.255 78	油酸(Oleic acid)

3.2 宁心养神膏网络药理学分析

3.2.1 收集化合物信息与筛选活性成分 60个主要化合物由质谱鉴定得出后进行Swiss ADME筛选,共有48个满足上述标准条件的化合物,故将这48个化合物的SMILES号导入Swiss Target Prediction在线网站并下载活性化合物潜在靶点表格。

3.2.2 疾病相关靶点的筛选 以“Insomnia”为关键词,删除数据库中的重复基因后,疾病基因网络(DisGeNet)获得174个靶点,人类基因综合数据库(GeneCards)获得2 265个靶点,人类孟德尔遗传数据库(OMIM)获得98个靶点,治疗靶点数据库(TherapeuticTargetDatabase)获得27个靶点,蛋白质数据库(Uniprot)获得619个靶点,药物靶标数据库(DrugBank)获得147个靶点。将上述6个数据库得到的疾病靶点通过JVEEN网站生成韦恩图,直观显示其关系。(见图2)

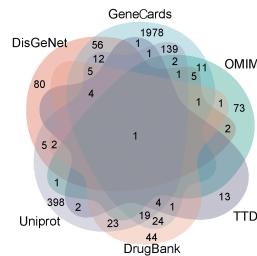


图2 失眠疾病靶点韦恩图

3.2.3 成分-靶点网络的构建 删除药物靶点和疾病靶点的重复项后,在Venny2.1.0网站生成韦恩图,得到宁心养神膏和失眠共同作用靶点有615个(见图3)。将这615个靶点建立网络和属性文件,并分别导入Cytoscape3.10.2软件中进行可视化处理。该网络由705个节点和2 169条边组成。(见图4)

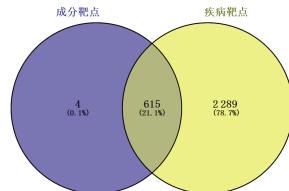


图3 “宁心养神膏成分-失眠”交集靶点韦恩图

3.2.4 PPI网络的构建 将药物靶点和疾病靶点共有的靶点导入String数据库构建PPI网络,将得到的数据文件导入

Cytoscape3.10.2软件,此时有612个节点,11 139条边。使用插件Centiscape2.2功能进行数据分析,以Betweenness值为818.836 601 3,Closeness值为0.000 711 53,Degree值为36.401 960 78筛选得到122个节点,2734条边。获得核心靶点的PPI网络图节点越大,颜色越深,dgree值越高,表明这些基因越重要。(见图5)

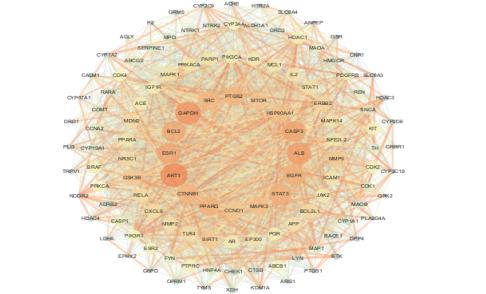
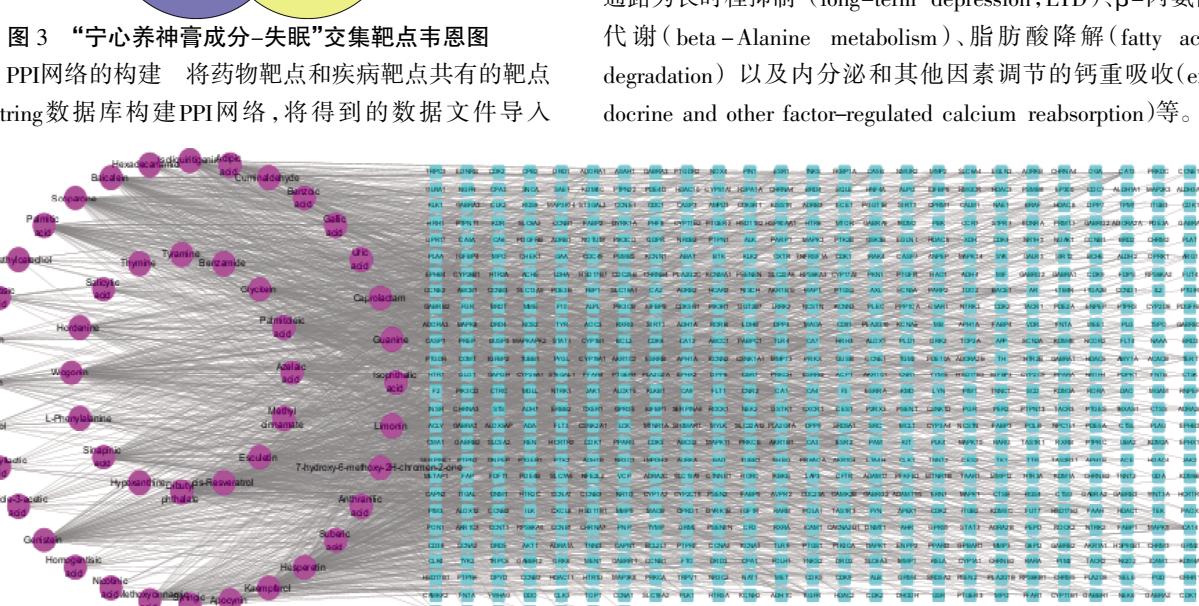


图5 “宁心养神膏-失眠”交集靶点 PPI 网络图

3.2.5 GO富集分析与KEGG通路富集分析 在DAVID在线分析数据库中选择Functional Annotation Clustering将交集靶点导入,物种选择Homo species,下载BP、CC和MF的Chart文件。通过P值富集分析,选取前10条GO通路(即BP、CC、MF)进行可视化,绘制富集数量统计柱状图(见图6)。BP涉及神经元投射形态发生(neuron projection morphogenesis)、整合素介导的信号通路(integrin-mediated signaling pathway)、对病毒的响应(response to virus)等;CC包括常染色质(euchromatin)、包涵体(inclusion body)、GABA-A受体复合物(GABA-A receptor complex)等;MF包括GABA门控氯离子通道活性(GABA-gated chloride ion channel activity)、天冬氨酸型内肽酶活性(aspartic-type endopeptidase activity)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)结合活性(NAD binding)等。对KEGG通路进行富集分析以P值筛选前20条,通过微生物网站做出气泡图(见图7)。宁心养神膏治疗失眠的主要信号通路为长时程抑制(long-term depression, LTD)、 β -丙氨酸代谢(beta-Alanine metabolism)、脂肪酸降解(fatty acid degradation)以及内分泌和其他因素调节的钙重吸收(endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption)等。



注:粉色圆形图为主要成分,蓝色矩形图为靶点蛋白。

图4 成分-靶点网络图

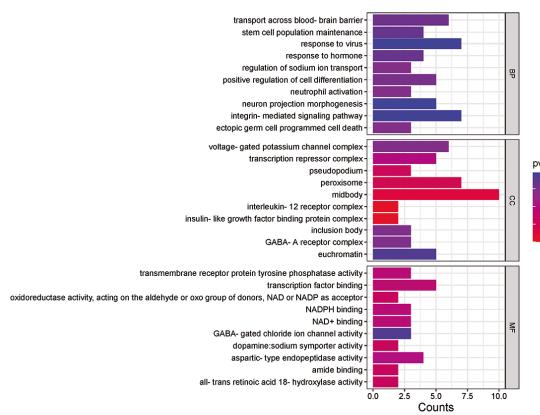


图6 GO功能富集分析

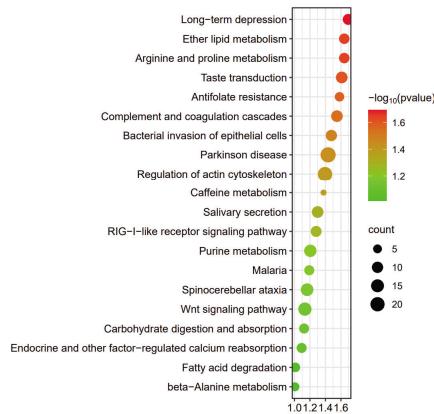


图7 KEGG通路富集分析

3.2.6 核心靶点分子对接验证 对PPI筛选的前5%的6个核心靶点与6个核心成分进行分子对接验证，即将丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPARG)、半胱天冬酶3(CASP3)、雌激素受体α(ESR1)、B细胞淋巴瘤因子2(BCL2)与黄芩苷元、山柰酚、棕榈酸、邻苯二甲酸二丁酯、橙皮素、棕榈油酸分别进行分子对接验证。结合能越小，则对接效果越好。所有核心靶点与核心成分均具有良好的结合活性(见表2)。利用Pymol 2.2.0软件将对接分数较高的复合物可视化，结果见图8。

表2 宁心养神膏药物成分与核心靶点的结合能

关键靶点	药物成分	PDB ID	结合能/(kcal/mol)
MAPK3	黄芩苷元(baicalin)	2OK1	-7.0
PTGS2	山柰酚(kaempferol)	6Y3C	-6.9
PPARG	棕榈酸(palmitic acid)	3GWX	-4.2
CASP3	邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)	6PDQ	-8.5
ESR1	橙皮素(hesperetin)	4J24	-8.0
BCL2	棕榈油酸(palmitoleic acid)	4UP5	-3.9

4 讨论

中医药治疗失眠(不寐)有较大优势。中医学以整体观念为主导思想，以调节脏腑阴阳为主则，并根据病因病机进行辨证施治^[7]。国医大师郭诚杰认为“失眠病本于心神失安”，即失眠病位在心，神不守舍为失眠核心病机。治神为关键，同时“疏通调补，正心守神”，心理情感疏通是治疗失眠重要环节。情志愉悦，气机舒畅，气血津液输布正常，经络脏腑才能发挥正常功能，因而疏通肝气是治疗失眠的重要措施之一^[8]。不寐最主要病因在于情绪失调，其主要病机是脏腑功能失调，其病机核心在肝。情志不遂，肝气郁结，郁而化火，邪火扰动心神，心神不安而不寐。辨证类型可分为肝气郁结、胃失和降、心脾两虚、心肾不交、心神不宁。宁心养神膏中炒酸枣仁、茯苓养肝宁心，健脾渗湿，共为君药；党参、姜半夏、制远志、竹茹、枳实益气健脾，化痰祛湿，共为臣药；柴胡、醋郁金、黄芩、合欢皮疏肝解郁，清热泻火，首乌藤、龙眼肉、龙骨、牡蛎养血安神，定惊，共为佐使药。全方补虚泻实、调和阴阳，具有养肝血以宁心安神，清内热以除虚烦的功效。

失眠的发病机制较为复杂。睡眠与大脑皮层、脑干、海马、下丘脑、视交叉上核等脑区密切相关，而神经递质、炎症反应和生物钟效应在调控睡眠障碍中发挥着关键作用^[9-12]。本研究利用UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术分析得出宁心养神膏的化学成分后，结合网络药理学方法，从成分角度出发，以“药物-成分-靶点-疾病”网络模式预测核心成分的作用通路和靶点。KEGG通路富集分析结果显示，宁心养神膏可通过调节神经元突触传递效率、内分泌介导的钙重吸收、碳水化合物消化与吸收，以及细胞代谢、增殖与迁移等多条通路，共同改善失眠症状。内分泌及其他因素可调控钙重吸收(endocrine

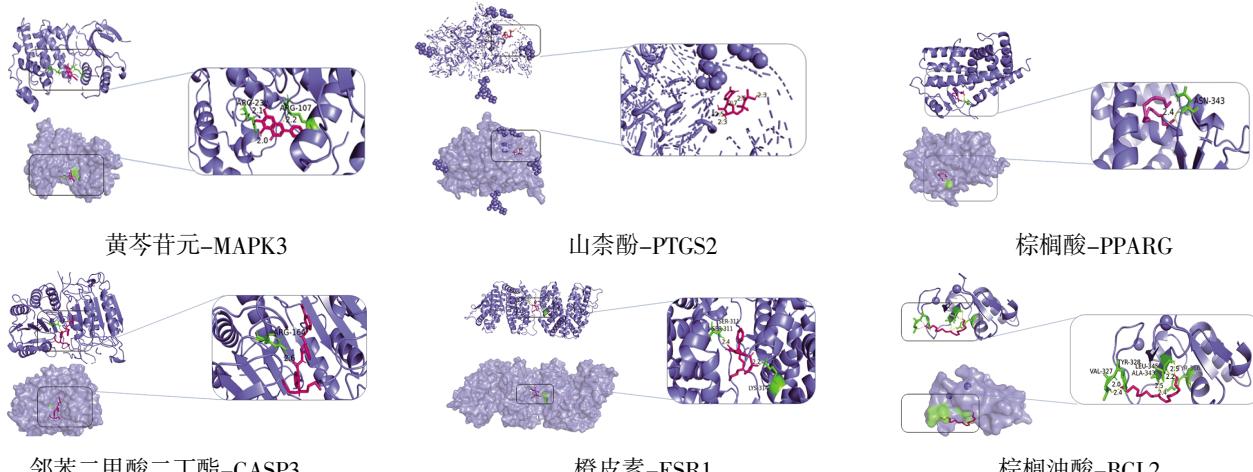


图8 宁心养神膏核心成分与核心靶点的分子对接

and other factor-regulated calcium reabsorption)与神经元突触传递效率。而钙离子通过突触前膜内流是神经递质释放的关键步骤,同时钙离子可参与突触后膜的信号转导。此外,LTD的机制也涉及钙离子通道的调控,这一过程与神经元可塑性直接相关。富含纤维的碳水化合物能够降低失眠风险并提升睡眠质量,减少夜间的觉醒次数^[13]。此外,低血糖指数的碳水化合物如燕麦、全谷物和糙米,消化吸收较慢,有助于维持稳定的血糖水平,从而对睡眠产生积极影响。GO通路富集分析发现多条与神经元密切相关信息通路,如神经元投射形态发生(neuron projection morphogenesis)、GABA-A受体复合物(GABA-A receptor complex)、GABA门控氯离子通道活性(GABA-gated chloride ion channel activity)等。神经元投射形态的发生对于睡眠的调控至关重要。如前额叶皮层(mPFC)可通过投射到下丘脑和脑干等区域,参与快速眼动睡眠(REM)的维持^[14]。此外,海马区的神经元投射也与睡眠稳态调控相关,如海马注射黑色素聚集激素可促进记忆,并在睡眠期间被激活^[15]。GABA-A受体是中枢神经系统中主要的抑制性神经递质受体,其激活有助于睡眠。GABA-A受体激动剂和GABA-A受体选择性激动剂能够减少清醒时间并增加慢波睡眠。这些受体由5个亚基组成,至少有19种亚基亚型,其差异化组装决定了睡眠-觉醒功能的调整^[16]。GABA门控氯离子通道的去极化会增强电压门控钾通道的招募,从而促进与睡眠相关的振荡活动^[17]。此外,GABA-A受体的激活直接抑制谷氨酸受体介导的兴奋性突触传递,有助于促进安定和睡眠。以上依据表明本次研究探索的靶点具有一定的可靠性。

为了进一步明确宁心养神膏改善失眠的作用机制,本研究经过PPI网络筛选出核心靶点,并结合现有研究,选出6个核心靶点进行分子对接。MAPK3基因编码的蛋白质是MAP激酶家族的一员,也称为细胞外信号调节激酶(ERK)^[18]。它可作用于一个信号级联,调节各种细胞过程,如细胞增殖、细胞分化和细胞周期进程,以响应各种细胞外信号。这种激酶被上游激酶激活后,会移位到细胞核,磷酸化核靶点,从而调节下游基因的表达。MAPK3可通过磷酸化一系列底物蛋白,将细胞外信号转导至细胞核内,影响细胞的生长、分化、应激反应等多种生物学过程^[19-20]。PTGS2为双加氧酶和过氧化物酶,是前列腺素生物合成过程中的关键酶。PTGS2可介导花生四烯酸形成前列腺素,在炎症反应过程中起到特殊作用。它是诱导型表达酶,受特定刺激事件的调节。如应对感染和炎症等生理应激反应,PTGS2可产生前列腺素。在血管内皮细胞中,PTGS2可以将二十二碳五烯酸(DPA)转化为分解素(RvTs)的前体,在细菌感染期间激活巨噬细胞的吞噬作用^[21]。PTGS2为非甾体抗炎药(NSAID)的靶标,抑制PTGS2可以迅速减少炎症、疼痛和发热反应^[22]。PPARG基因为过氧化物酶体增生激活受体γ编码基因,属于核受体过氧化物酶体增生激活受体亚家族。它可以与类维生素A受体(RXR)结合形成异性二聚物,然后通过与特异DNA序列(过氧化物酶体增殖反应元件)的结合调控多种基因的转录。PPARG主要负责脂类的分解代谢,与多种疾病相关,如肥胖症、糖尿病、动脉硬化和癌症等。它通过调控相关基因的转录,参与体内多种生理及病理过程,如脂肪

细胞的分化、炎症反应、凋亡等^[23]。不仅如此,PPARG可以通过调控代谢途径抑制肿瘤进程。它被激活后可以通过抑制糖酵解水平来抑制黑色素瘤细胞的生长和迁移^[24-25]。CASP3是一种重要的半胱氨酸蛋白酶,在细胞凋亡中具有关键的执行功能。它参与了细胞凋亡信号通路中的多个步骤。主要功能是诱导特定的蛋白底物的裂解,包括细胞器中的各种结构蛋白、DNA修复相关蛋白等。CASP3激活后可引发凋亡过程的级联反应,最终导致细胞核DNA的断裂和细胞凋亡的发生。CASP3重组蛋白在科研和临床应用中具有重要价值,可用于研究细胞凋亡机制及疾病治疗^[26-28]。ESR1是介导雌激素发挥生物学作用的核内生物大分子。雌激素与其受体结合后形成二倍体,经过与多种核内蛋白质的相互作用,与DNA分子上特定的部位结合,激活靶基因进行转录,从而产生基因产物^[29]。ESR1可通过基因组途径和非基因组途径两种信号传导途径发挥作用,参与调节骨骼、乳腺、心血管和神经系统的生理和病理过程^[30]。BCL2基因是一种癌基因,具有明显抑制细胞凋亡的作用^[31]。BCL2可以通过多种机制抑制细胞凋亡,包括抑制活性氧损伤、调节胞内钙离子浓度^[32]。BCL2的过度表达能增强细胞对大多数细胞毒素的抵抗性,抑制由多种因素引起的细胞凋亡^[33]。此外,BCL2还与其他凋亡相关蛋白相互作用,共同调节细胞的生死平衡。

综上所述,宁心养神膏可通过多成分-多靶点-多通路协同作用调控LTD通路、内分泌及其他因素调控的钙重吸收通路,从而改善失眠的症状。黄芩苷元、山柰酚、棕榈酸、邻苯二甲酸二丁酯、橙皮素、棕榈油酸等关键活性成分可作用于MAPK3、PTGS2、PPARG、CASP3、ESR1及BCL2核心靶标,涉及神经元投射形态发生、GABA-A受体复合物和GABA门控氯离子通道活性等机制。这些成分可通过不同的途径相互作用,共同发挥促进睡眠的作用。研究结果为阐释宁心养神膏改善失眠症状提供了理论依据,但后续研究还需通过实验验证关键靶点与通路。

参考文献

- [1] WINKELMAN J W. CLINICAL PRACTICE. Insomnia Disorder[J]. The New England journal of medicine, 2015, 373(15): 1437-1444.
- [2] 中国中医科学院失眠症中医临床实践指南课题组.失眠症中医临床实践指南(WHO/WPO)[J].世界睡眠医学杂志, 2016, 3(1): 8-25.
- [3] 庞怀霞,郝丽娟,马祯,等.百乐眠胶囊联合自助认知行为疗法对慢性失眠症的疗效观察[J].世界睡眠医学杂志, 2020, 7(11): 1909-1910.
- [4] 韩旭,李七一,郭宏敏,等.珍枣胶囊治疗阴虚火旺型老年失眠患者33例临床研究[J].中医杂志, 2014, 55(2): 125-128.
- [5] 陈永华,张波,黄为,等.乌灵胶囊联合右佐匹克隆治疗心肾不交型失眠临床观察[J].安徽中医药大学学报, 2021, 40 (1): 18-21.
- [6] 焦雨欢,闫寒,逯波,等.失眠的中成药治疗[J].中国中医基础医学杂志, 2013, 19(9): 1049-1051.

- [7] 郑雯雯,刘华,王百娟,等.从心肝论治不寐[J].中医研究,2019,32(2):51-53.
- [8] 陆健,苗铺,刘娟,等.国医大师郭诚杰教授中医康复治疗失眠经验撷菁[J].时珍国医国药,2020,31(9):2272-2274.
- [9] PAVLOVA M K, LATREILLE V. Sleep disorders[J]. Am J Med,2019,132(3):292-299.
- [10] 秦嘉欣,王威宇,王玉昆,等.中药治疗睡眠障碍的药理作用机制和临床应用研究进展[J].中草药,2025,56(14):5237-5247.
- [11] VELEZ H. Sleep and inflammation: Bidirectional relationship[J]. Sleep Med Clin,2023,18(2):213-218.
- [12] 严雪,周文月,周森林,等.中药调节细胞因子水平治疗失眠研究进展[J].成都大学学报(自然科学版),2024,43(2):120-129.
- [13] LANCEL M. Role of GABAA receptors in the regulation of sleep: Initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists[J]. Sleep,1999,22(1):33-42.
- [14] HONG J, LOZANO D E, BEIER K T, et al. Prefrontal cortical regulation of REM sleep[J]. Nat Neurosci,2023,26(10):1820-1832.
- [15] CALAFATE S, ZTURAN G, THRUSS N, et al. Early alterations in the MCH system link aberrant neuronal activity and sleep disturbances in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Nat Neurosci,2023,26(6):1021-1031.
- [16] 崔素颖,秦宇,张永鹤.睡眠调控与睡眠调节药物研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2022,36(11):801-811.
- [17] ADAMANTIDIS A R, GUTIERREZ HERRERA C, GENT T C. Oscillating circuitries in the sleeping brain[J]. Nat Rev Neurosci,2019,20(12):746-762.
- [18] 姜勇,罗深秋.细胞信号转导的分子基础与功能调控[M],北京:科学出版社,2005.
- [19] PAECH K, WEBB P, KUIPER G G J M, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites[J]. Science,1997,277(5331):1508-1510.
- [20] FANG W J, ZHOU X P, WANG J K, et al. Wogonin mitigates intervertebral disc degeneration through the Nrf2/ARE and MAPK signaling pathways[J]. Int Immunopharmacol,2018,65:539-549.
- [21] CHEN Y, JIAN X, ZHU L, et al. PTGS2: A potential immune regulator and therapeutic target for chronic spontaneous urticaria[J]. Life Sci,2024,344:122582.
- [22] 袁岸,刘淇,饶志粒,等.基于网络药理学的荆芥挥发油主要成分抗炎机制研究[J].中国药理学通报,2020,36(1):97-103.
- [23] LI D H, LIU X K, TIAN X T, et al. PPARG: A promising therapeutic target in breast cancer and regulation by natural drugs[J]. PPAR Res,2023,2023:4481354.
- [24] 郭鑫,宗欢欢,李杜达,等.PPAR γ 在肿瘤中的双重作用[J].中国细胞生物学学报,2021,43(2):460-468.
- [25] ZHANG W X, SHAO W, DONG Z W, et al. Cloxiquine, a traditional antituberculosis agent, suppresses the growth and metastasis of melanoma cells through activation of PPAR γ [J]. Cell Death Dis,2019,10(6):404.
- [26] ROGERS C, FERNANDES-ALNEMRI T, MAYES L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death[J]. Nat Commun,2017,8:14128.
- [27] WANG Y P, GAO W Q, SHI X Y, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature,2017,547(7661):99-103.
- [28] JIANG M X, QI L, LI L S, et al. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer[J]. Cell Death Discov,2020,6:112.
- [29] 张颖,张师前.ESR1突变在雌激素依赖性恶性肿瘤中的研究进展[J].中华医学杂志,2023,103(28):2198-2201.
- [30] DUSTIN D, GU G W, BEYER A R, et al. RON signalling promotes therapeutic resistance in ESR1 mutant breast cancer[J]. Br J Cancer,2021,124(1):191-206.
- [31] 贾岩波,刘万林,任逸众.激素性股骨头坏死发病机制中细胞凋亡的研究进展[J].中国组织工程研究,2012,16(13):2444-2450.
- [32] WANG H G, REED J C. Mechanisms of bcl-2 protein function[J]. Histol Histopathol,1998,13(2):521-530.
- [33] 田方,李春海,颜春洪,等.高表达bcl-2卵巢癌细胞系参与药物抵抗和细胞凋亡作用的研究[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2000,7(2):106-108.

(收稿日期:2025-02-27 编辑:蒋凯彪)