

基础医学研究

基于网络邻近度方法探讨枣仁五味苓志复方改善睡眠的作用机制

曹永军¹, 任爱蓉¹, 江建辉¹, 王雅溶¹, 张世勋¹, 赵宸², 梁泳茵¹, 崔国祯¹, 范庆³

(1. 遵义医科大学珠海校区 生物工程学院, 广东 珠海 519041; 2. 澳门大学中华医药研究院 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078; 3. 遵义医科大学珠海校区 基础教学部, 广东 珠海 519041)

[摘要] 目的 评估枣仁五味苓志复方(ZWLZ)对小鼠睡眠的改善作用, 采用网络邻近度方法探讨其促进睡眠的作用机制。方法 采用雄性 BALB/c 小鼠, 分为对照组、阳性药物组、ZWLZ 低剂量组(0.32 g/kg)及高剂量组(0.96 g/kg), 进行戊巴比妥钠睡眠时间延长实验和巴比妥钠睡眠潜伏期实验, 同时检测相关睡眠指标。采用液相色谱-质谱联用(LC-MS)的方法检测获得枣仁五味苓志复方的化学成分, 进一步利用网络邻近度计算方法, 分析 ZWLZ 改善睡眠的物质基础。结果 与空白组相比, 高剂量 ZWLZ 组在睡眠小鼠模型测试中, 显著延长戊巴比妥钠诱导小鼠的睡眠时间($P < 0.05$), 显著缩短巴比妥钠睡眠潜伏期($P < 0.05$), 并显著增加脑部 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸含量。网络邻近度计算结果表明, 茶氨酸、麦角胺、去氢骆驼蓬碱等 8 个成分的靶点集合与睡眠障碍相关蛋白的邻近度较小。结论 ZWLZ 可有效改善 BALB/c 小鼠睡眠, 茶氨酸、麦角胺、去氢骆驼蓬碱等 8 个成分为潜在的干预睡眠障碍的有效成分。

[关键词] 睡眠; 枣仁五味苓志复方; 保健食品; 网络邻近度

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-8159(2023)10-0955-09

Mechanism exploration of ZWLZ on sleep improvement based on network proximity approach

Cao Yongjun¹, Ren Airong¹, Jiang Jianhui¹, Wang Yarong¹, Zhang Shixun¹, Zhao Chen², Liang Yongyin¹, Cui Guozhen¹, Fan Qing³

(1. School of Bioengineering, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai Guangdong 519041, China; 2. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine and Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao 999078, China; 3. School of Basic Education, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai Guangdong 519041, China)

[Abstract] **Objective** This study aims to evaluate the effects of *Ziziphus Jujuba* and *Schisandra chinensis* Compound (ZWLZ) on sleep improvement in mice and investigate the underlying mechanism based on the network proximity method. **Methods** Male BALB/c mice were divided into control group, positive drug group, ZWLZ low-dose group (0.32 g/kg), and high-dose group (0.96 g/kg). Pentobarbital sodium-induced sleep extension experiments and barbital sodium-induced sleep latency experiments were conducted to monitor related sleep indices. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) was used to analyze the compounds of ZWLZ, which were further examined using network proximity approach to analyze the substance basis of ZWLZ for improving sleep. **Results** Compared to the control group, the high-dose of ZWLZ significantly prolonged sleep duration ($P < 0.05$) of the barbital sodium-induced sleep mouse model and shortened the sleep latency ($P < 0.05$) of the pentobarbital sodium-induced sleep mouse model, while notably increased the brain levels of 5-hydroxytryptamine and gamma-aminobutyric acid. Network proximity calculations showed that the target sets of 8 components, including theanine, ergotamine, and harmine, among others had a smaller proximity to sleep disorder-related pro-

[基金项目] 遵义医科大学博士科研启动资金资助项目(NO:F-ZH-012)。

[通信作者] 范庆, 男, 博士, 研究方向: 数据科学在生物医药中的应用, E-mail: fanqo@foxmail.com。

teins. **Conclusion** ZWLZ effectively improves sleep in mice, and the 8 components, including theanine, ergotamine, and harmine, are potential effective ingredients for intervening in sleep disorders.

[**Key words**] sleep; *Ziziphus Jujuba* and *Schisandra chinensis*; health food; network proximity

睡眠是人类维持生命活动的重要生理功能,保持良好的睡眠对人类健康至关重要^[1]。失眠作为最常见的睡眠障碍,已成为全球性的公共问题之一^[2],其症状包括入睡困难、睡眠恢复困难以及睡眠质量差等^[3]。在临床诊断中,每周至少出现3次、持续3个月以上的入睡困难或无法维持良好睡眠状态者被诊断为失眠^[4]。目前市面上的失眠治疗药物如苯二氮卓类、唑吡坦和多西他赛等,虽然疗效显著,但存在成瘾及耐药性等副作用,长期使用可能导致肌肉松弛、健忘和认知障碍等不良后果^[5]。相较而言,中草药干预失眠具有较低的药物依赖和成瘾,不良反应较少的优势^[6]。中医药治疗失眠由来已久,大量循证学证据表明中药复方治疗失眠效果良好^[7],改善失眠的复方主要是以补虚、安神用药为主,同时配伍清热药、平肝药、活血行气等药物,与中医学补虚泻实,调整阴阳的疗法不谋而合,故而产生较好的疗效^[8-9]。枣仁五味苓志复方(*Ziziphus Jujuba* and *Schisandra chinensis*, ZWLZ)是一种中草药制剂,由酸枣仁、五味子、远志、茯苓和 L-茶氨酸等组成。这些中药在中医传统中被广泛应用于治疗失眠和其他与精神状态相关的疾病,在临床实践中表现出显著的效果^[10-11]。然而,其成分复杂以及作用机制尚不明确的问题也引起了研究者的关注。

网络医学认为人体细胞中分子之间的功能呈现互相依赖,疾病表型通常反映了复杂网络中相互作用的多种病理生物学过程^[12-13],是大数据时代药物系统性研究的新兴交叉学科。其中,用于研究药物的网络邻近度方法是建立在人类蛋白相互作用组的网络框架之上^[14]。它构建了调控疾病的基因网络与药物靶点网络,并通过网络邻近度计算来量化疾病基因集(疾病模块)与药物靶点集(药物模块)之间的相互作用,从而达到快速筛选候选药物的目的^[13, 15]。本研究根据《保健食品功能检验与评价方法(2022 年版)》方法选用 BALB/c 小鼠作为实验模型,探究了 ZWLZ 对小鼠睡眠质量的改善作用。同时,采用液相色谱-高分辨质谱法(UP-LC-QTOF-MS)对其有效成分进行了检测。在此基础上,进一步运用网络医学中网络邻近度方法,深入探讨 ZWLZ 改善睡眠功效的物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验药品 5-羟色胺试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司(H104-1-2); γ -氨基丁酸检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司(H168-1-2);戊巴比妥钠购自山东西亚化学工业有限公司(F074);巴比妥钠购自山东西亚化学工业有限公司(E7038);地西洋片购自山东信谊制药有限公司(211205)。

1.1.2 ZWLZ 的制备 ZWLZ 制备工艺如下:分别将4种中药干燥粉碎,沸水提取经浓缩、干燥、粉碎,得到干膏粉(50目过筛2次)。干膏粉与 L-茶氨酸按 163:30 质量比例混合,即为 ZWLZ。酸枣仁、五味子、茯苓、远志生药与 L-茶氨酸质量比例为 3:3:3:2:0.3。

1.1.3 动物实验 雄性 BALB/c 小鼠,7~8 周龄,体重 18~20 g,购自广东省医学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(粤)2018-0002。本研究经过遵义医科大学实验动物福利伦理委员会的批准,伦理审批号为 ZMU21-2303-061。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与给药 按照参考文献[16],所有动物均被饲养在恒温(24 ± 2)℃、相对湿度($55\% \pm 15\%$)的空调房内。房间保持在 12 h 亮/12 h 暗交替循环中。实验前动物适应性饲养 5 d,自由饮食。实验动物随机分为溶媒对照组(Ctrl,蒸馏水)、阳性药物组(Diaz,地西洋水溶液,2.5 mg/kg),以及根据成人每日推荐 ZWLZ 摄入量的 10 倍和 30 倍分别设置的 ZWLZ 低剂量组(0.32 g/kg)和 ZWLZ 高剂量组(0.96 g/kg),每组 10 只动物。每只动物以 0.1 mL/10 g 的体积灌胃给药,连续 30 d,期间每周测定 1 次各组动物的平均体重。

1.2.2 直接睡眠实验 连续给药 30 d,所有实验小鼠末次灌胃后,观察各组小鼠 30 min 内是否有睡眠现象。观察时以灌胃结束的时刻为开始时间、翻正反射消失为判断标准。当正常小鼠处于仰卧位时,它们会立即将身体向右翻转。如果矫正时间超过 30~60 s,则认为翻正反射消失并进入睡眠状态。

1.2.3 延长戊巴比妥钠睡眠时间实验 实验小鼠

末次灌胃 30 min 后,腹腔注射戊巴比妥钠水溶液(剂量 54 mg/kg 注射,体积 0.1 mL/10 g),以翻正反射消失为指标,测量睡眠潜伏期(从戊巴比妥钠给药到小鼠翻正反射消失的时间)和睡眠时间(从翻正反射消失到其恢复的时间)。

1.2.4 巴比妥钠睡眠潜伏期实验 实验小鼠末次灌胃 30 min 后,腹腔注射巴比妥钠水溶液(剂量 250 mg/kg,体积 0.1 mL/10 g,药物剂量参考标准剂量 200 ~ 300 mg/kg 并通过预实验确定为 250 mg/kg),以翻正反射消失为指标,测量睡眠潜伏期(从巴比妥钠给药到小鼠翻正反射消失的时间)。

1.2.5 小鼠脑组织 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸含量测定 连续灌胃 30 d 后,颈椎脱臼处死小鼠,并迅速分离脑组织。将小鼠脑组织用预冷的磷酸盐缓冲液清洗,去除残留血液,称重后剪碎。将剪碎的组织与相应体积的生理盐水混合(质量/体积比为 1:9),充分匀浆并离心(8 000 g, 4 °C, 15 min)后,收集上清液。严格按照 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒检测小鼠脑中 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸的含量。

1.2.6 基于网络邻近度方法探讨 ZWLZ 改善睡眠功效的物质基础和作用机制

1.2.6.1 UPLC-QTOF-MS 质谱检测条件 根据文献方法进行修改和优化^[17]。采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μ m);柱温:40 °C;流动相:0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 2 min, 10% B → 10% B; 2 ~ 16 min, 10% B → 90% B; 16 ~ 17 min, 90% B; 17 ~ 18 min, 90% B → 10% B; 18 ~ 20 min, 10% B);流速:0.3 mL/min;进样量:2 μ L。质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正、负离子 MSe 连续扫描模式;扫描 50 ~ 1 200 m/z;毛细管电压 3.0 kV;离子源温度 150 °C;脱溶剂气温度 350 °C;脱溶剂气流速 600 L/h;锥孔电压 25 V;锥孔气流量 50 L/h;校正液使用化合物为亮氨酸-脑啡肽(正离子为 556.277 1,负离子为 554.262 0);数据采集软件使用 Masslynx V4.1 工作站。

1.2.6.2 化学成分鉴定 通过 PubMed^[18]、TC-MSP^[19]、Chemspider^[20] 等数据库对 ZWLZ 的化合物进行系统检索,建立化合物名称、分子式及结构式(mol 文件格式)数据库并导入 UNIFI 科学图书馆中,与 UNIFI 信息平台中内置的中药化学成分数据库共同作为筛选数据库。利用 UNIFI 1.8.0 软件自动筛查、计算分子式以及分析碎片断裂情况,

鉴定化合物以及匹配其碎片离子的结构特征。结合碎片离子理论精确质量数、相对保留时间及相关文献对化合物进行人工识别和确认。

1.2.6.3 有效成分靶点的收集 把 ZWLZ 中通过“UPLC-QTOF-MSE”检测到的每种化学成分的名称分别输入到 CTD^[21]、DrugBank^[22]、TTD^[23]、IUPHAR/BPS Guide to pharmacology^[24] 和 Binding-DB^[25] 数据库中检索“药物靶点”。合并每个成分在不同数据库中检索得到的所有“药物靶点”,并删除重复的靶点。每个“药物靶点”都在 NCBI 检索验证并统一命名,然后转换为 Entrez ID 并整理成 CSV 文件备用。所有包含的“疾病基因”和“药物靶点”都需要在数据库中被标识有实验证据才能纳入。

1.2.6.4 睡眠障碍相关直接调控基因的收集 通过医学主题词(MeSH)和统一医学语言系统(UMLS),获得与睡眠障碍相关的 4 个医学主题词:“sleep wake disorder”、“insomnia”、“circadian rhythm sleep disorders”和“sleep disorder”,并将它们作为关键词用于 Uniport^[26]、TTD^[23]、CTD^[21] 和 DisGeNET^[27] 中的“疾病靶点(基因)”检索。然后,将每个“疾病靶点”输入 NCBI^[28] 数据库进行统一验证和重命名,然后将其转换为 Entrez ID 并以 CSV 格式保存。

1.2.6.5 网络邻近度的计算 根据报道的方法(如式 1 所示),计算药物(配方药中的每一种组分)和疾病之间的网络邻近度^[13]。给定 s 为疾病靶点蛋白集 S 中的 1 个, t 为药物靶点蛋白集 T 中的 1 个。通过固定 T 中某个药物靶点(t),计算其与 1 组疾病靶点蛋白集(S)中不同靶点(s)的距离,找出最小值即为该药物靶点(t)与疾病靶点(s)的最近距离 $\min_{s \in S} d(s, t)$ 。对 T 中其他药物靶点进行同样的计算后,可以获得 $\|T\|$ 个药物靶点的距离;把这些距离相加,除以药物靶点个数即得到此有效成分靶点到疾病基因蛋白的邻近度 $d_c(S, T)$ 。

$$d_c(S, T) = \frac{1}{\|T\|} \sum_{t \in T} \min_{s \in S} d(s, t) \quad (1)$$

为了评估药物和疾病之间网络接近的重要性,构建参考距离分布。该参考距离分布对应于 1 000 对随机选择的 2 个蛋白质组之间的预期距离(两随机选择组之间的邻近度),这些蛋白质组的大小和度的分布与原始疾病蛋白和药物靶点的相同。然后在获得 1 000 个预期距离后,得到参考分布的平均距离 $\mu_d(S, T)$ 和标准差 $\sigma_d(S, T)$,将药物-疾病邻近度转换为标准距离来计算 Z 值(式 2),即相对网络邻近度。当计算距离大于平均距离时,可以

获得正的标准化分数,反之则得到负的标准化分数, Z 值越小表示其相对距离越近。为了方便网络邻近度等相关网络医学的计算和分析,构建了在线网络计算平台,部署在 www.zmupredict.cn 域名下开放使用^[29]。用户可免费访问该平台,提交数据进行网络医学相关计算(现有邻近度计算、子网络提取、联合用药计算 3 个模块)。

$$Z(S,T) = \frac{d(S,T) - \mu_d(S,T)}{\sigma_d(S,T)} \quad (2)$$

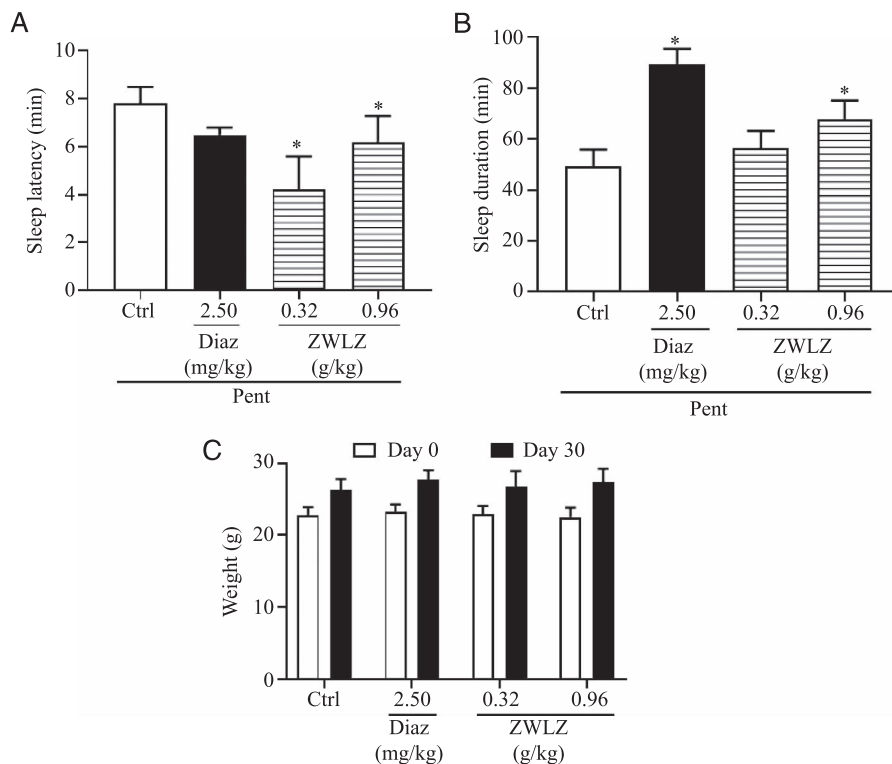
1.3 统计学分析 动物实验结果计算用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),应用 GraphPad Prism 8 统计分析软件绘制柱形图,并进行单因素方差分析(ANOVA),选择 Dunnett 方法进行多重比较以确定均值存在差异的组。根据方差分析结果,查看数据的方差齐性,若方差不齐则对实验数据进行 Brown-Forsythe and Welch ANOVA 检验,多重比较采用 DunnettT3 校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用 Python 语言中的 NetworkX 工具提取药物靶点-疾病基因网络,以 Gephi 0.9.2 软件绘制可视化网络图。

2 结果

2.1 ZWLZ 对实验小鼠的直接催眠实验结果

ZWLZ 处理组小鼠 30 min 内均未出现翻正反射消失现象,入睡动物和睡眠时间均为 0,表明 ZWLZ 对小鼠无直接睡眠作用。

2.2 ZWLZ 对戊巴比妥钠诱导睡眠实验结果和动物体重的影响 在戊巴比妥钠诱导的睡眠模型中,评价了 ZWLZ 对小鼠的睡眠潜伏期、睡眠时间和体重变化的影响(图 1)。如图 1A 所示,ZWLZ 干预后可缩短小鼠的睡眠潜伏期,低剂量组(0.32 g/kg)和高剂量组(0.96 g/kg)与对照组相比都有显著性差异($P < 0.05$)。ZWLZ 干预后可增加小鼠的睡眠时间,与空白组相比,高剂量组(0.96 g/kg)具有显著性差异($P < 0.05$,图 1B)。各组实验小鼠的体重变化无显著性差异(图 1C, $P > 0.05$),表明 ZWLZ 不会对小鼠的体重产生明显影响。



A: 小鼠睡眠潜伏期; B: 睡眠时间; C: 体重变化; Ctrl: 对照组; Diaz: 地西洋; ZWLZ: 枣仁五味苓志复方; Pent: 戊巴比妥钠; *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 ZWLZ 干预后各组小鼠睡眠潜伏期、睡眠时间及体重的情况

2.3 ZWLZ 对巴比妥钠诱导实验小鼠睡眠潜伏期的影响 巴比妥钠诱导睡眠模型下,ZWLZ 对实验小鼠睡眠潜伏期的影响如图 2 所示。ZWLZ 干预

后缩短了小鼠的睡眠潜伏期,其中高剂量组(0.96 g/kg)与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

2.4 ZWLZ 对小鼠脑组织 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸

含量的影响 ZWLZ 干预后对小鼠脑组织中 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸含量的影响如图 3 所示。结果显示,ZWLZ 干预后增加了 5-羟色胺的含量(图 3A)和 γ -氨基丁酸的含量(图 3B),其中高剂量 ZWLZ 组(0.96 g/kg)与对照组比较都具有显著性差异($P < 0.05$)。

2.5 化学成分的鉴定 通过 PubMed、TCMSP、Chemspider 等数据库对 ZWLZ 的化合物进行系统检索,将化合物名称、分子式及结构式导入 UNIFI 科学图书馆中,与 UNIFI 信息平台中内置的中药化学成分数据库共同作为筛选数据库。利用 UNIFI 软件,鉴定化合物以及匹配其碎片离子的结构特征以进行人工识别和确认。最终鉴定出 ZWLZ 中的 222 个成分。ZWLZ 的基峰离子色谱如图 4 所示。

本文采用了 UPLC-Q/TOF-MS 分析方法对 ZWLZ 进行色谱图分析。图 4A 展示了 ZWLZ 的正离子峰色谱,图 4B 则展示了其负离子峰色谱。该

方法可以用于对中药复方的成分分析和质量控制。这些分析结果为 ZWLZ 的质量评价和临床应用提供了可靠的依据。

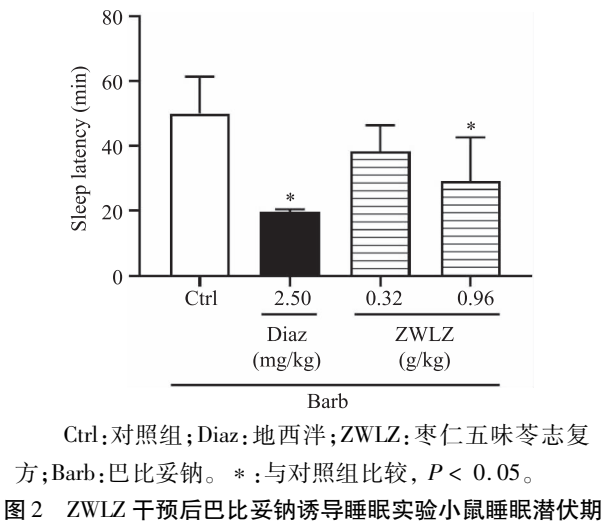
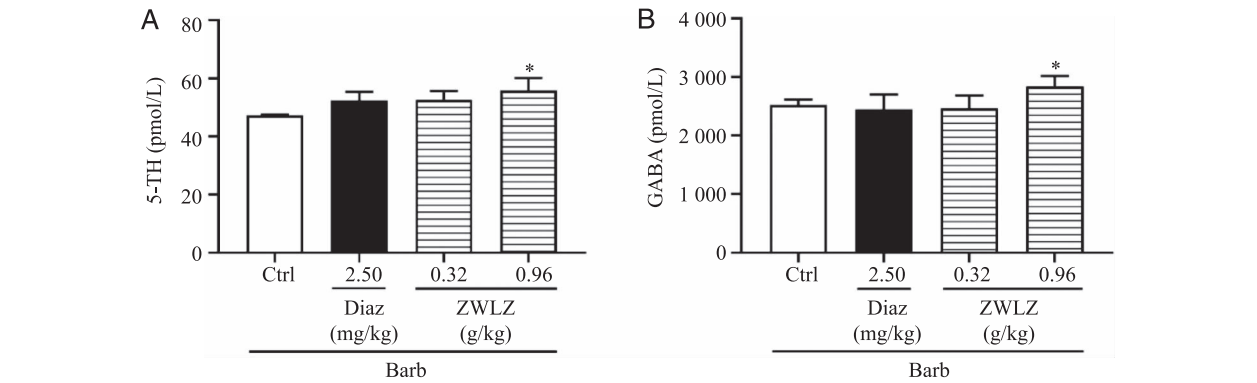
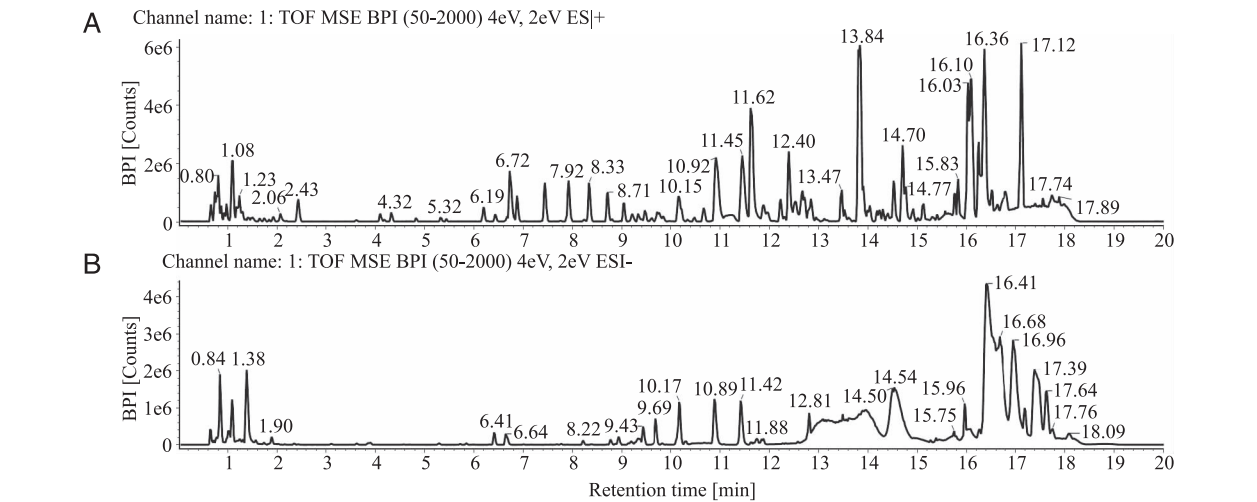


图2 ZWLZ 干预后巴比妥钠诱导睡眠实验小鼠睡眠潜伏期



A: 小鼠脑组织 5-羟色胺含量; B: γ -氨基丁酸含量; Ctrl: 对照组; Diaz: 地西洋; ZWLZ: 枣仁五味苓志复方; 5-HT: 5-羟色胺; GABA: γ -氨基丁酸; Barb: 巴比妥钠; *: 与对照组比较, $P < 0.05$ 。

图3 ZWLZ 干预后小鼠脑组织 5-羟色胺和 γ -氨基丁酸的含量



A: ZWLZ 正离子峰色谱; B: ZWLZ 负离子峰色谱。

图4 UPLC-Q/TOF-MS 法分析 ZWLZ 色谱

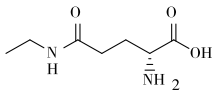
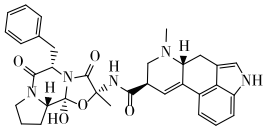
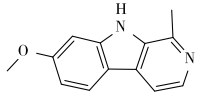
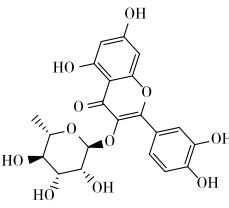
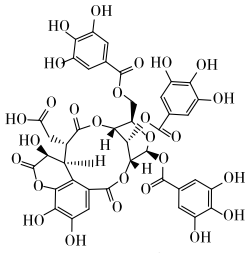
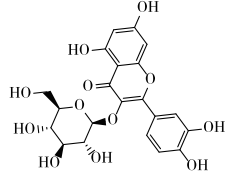
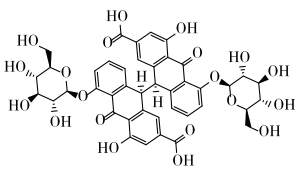
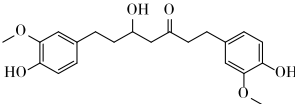
2.6 网络邻近度的计算

2.6.1 疾病基因和化学成分靶点的收集结果 将“UPLC-QTOF-MSE 分析”检测到的每个化学成分的名称导入 CTD、DrugBank、TTD、IUPHAR/BPS Guide to pharmacology 和 BindingDB 中进行“药物靶点”搜索。将不同数据库中每个成分的“药物靶点”合并,去除重复的目标。将“sleep wake disorder”、insomnia”、“circadian rhythm sleep disorders”和“sleep disorder”作为关键词用于 Uniport、TTD、CTD 和 DisGeNET 中的“疾病基因”检索。然后,将每个“药物靶点”输入 NCBI 进行统一验证和重命名,并将其转

换为 Entrez ID 以 CSV 格式保存。所有包含的“疾病目标”和“药物靶点”都需要经过“验证”或有实验证据。本研究获得了 236 个化学靶点和 90 个疾病靶点。

2.6.2 网络邻近度计算结果 将化学成分与疾病靶点关联至人类蛋白质相互作用网络,并计算疾病相关基因对应的蛋白集合与活性成分靶点集合之间的网络邻近度。接着,筛选出那些满足 $Z\text{-score} < -1.0$ 且 $P < 0.05$ 的成分。经过分析,结果显示茶氨酸、麦角胺和去氢骆驼蓬碱等 8 个成分均符合上述标准,详细数据见表 1。

表1 基于网络邻近度方法预测的ZWLZ中改善睡眠的活性成分

Ingredient	Structure	Mapped ingredient targets number (n)	Closest	Z	P
Theanine (茶氨酸)		10	0.90	-9.17	< 0.001
Ergotamine (麦角胺)		25	1.24	-8.11	< 0.001
Harmine (哈尔敏)		24	1.58	-3.36	0.006
Quercitrin (槲皮苷)		23	1.61	-3.20	0.006
Chebulinic acid (诃子酸)		6	1.50	-2.49	0.010
Isoquercitrin (异槲皮苷)		22	1.64	-2.49	0.013
Sennoside a (番泻苷a)		7	1.43	-1.85	0.016
Hexahydrocurcumin (六氢姜黄素)		5	1.40	-1.45	0.032

活性,如抗氧化、抗炎、抗肿瘤和心血管保护特性^[36]。由网络分析图可发现,ZWLZ 中多个成分可能共同对应一个疾病基因,进一步分析可发现 8 个药物成分中有 6 个可对应疾病基因高亲和力神经生长因子受体(NTRK1),NTRK1 编码神经源性酪氨酸激酶受体,可与神经生长因子结合,有研究表明其与抑郁、焦虑、睡眠障碍等症状存在相关性^[37]。有研究报道,MEIS1 是与失眠关系最为紧密的基因(该基因与药物成分中槲皮苷、番泻苷 α 有直接联系)。这个基因编码了 1 个转录因子,能够控制与激活其他基因的表达,可能调节抑制性神经元分化,从而导致失眠^[38]。Spieler 等^[39]报道在小鼠模型中,MEIS1 的表达导致昼夜节律亢进,这是一种与不宁腿综合征相容的表型,进而产生失眠效应。因此可以推测 ZWLZ 可能通过其主要成分槲皮苷、番泻苷 α 以及六氢姜黄素来干预 NTRK1 和 MEIS1 等基因的表达,进而干预睡眠。

地西洋作为一种经典的苯二氮类药物,广泛用于治疗失眠和焦虑等疾病。其临床效果明确、作用速度快,因此在研究中常作为用于改善睡眠的阳性药物^[29,40]。有趣的是,在本研究中,观察到以中草药和天然产物组成的 ZWLZ 在高剂量(0.96 g/kg)下能显著改善戊巴比妥钠诱导的小鼠睡眠潜伏期,并提升小鼠脑组织中 5-羟色胺与 γ -氨基丁酸的水平。相较之下,地西洋组与对照组相比在统计学上并没有显著差异。这些差异性可能源于 ZWLZ 配方具有多成分和多靶点作用机制。大量的研究结果表明, γ -氨基丁酸具有改善焦虑、缓解高血压和糖尿病等功能^[41]。本课题组研究结果结合最近的研究进展,提示了 ZWLZ 在改善睡眠之外,可能具有更广泛的治疗适应症,这为未来的研究提供了新的方向。针对这一现象,未来值得进一步深入研究,不仅可以全面评估 2 种治疗方法的优劣,还有可能促成两者在临床应用中的互补与整合。

综上所述,ZWLZ 以多成分和多靶点为特点,可能通过不同的调控网络机制来改善睡眠质量。这一研究成果有助于拓展中药在睡眠障碍领域的应用,为相关领域的研究与开发提供新的方向。同时,研究提示网络医学的方法为中药的研发提供了新的思路和方法,为发掘更多的天然药物资源奠定了基础。未来研究可进一步探讨各成分之间的协同作用机制,以提高药物的疗效。此外,还可针对不同类型的睡眠障碍开展研究,为临床治疗提供更为精确的治疗方案。

[参考文献]

- [1] Blum I D, Bell B, Wu M N. Time for Bed: Genetic mechanisms mediating the circadian regulation of sleep [J]. Trends Genet, 2018, 34(5): 379-388.
- [2] Aernout E, Benradia I, Hajo J B, et al. International study of the prevalence and factors associated with insomnia in the general population [J]. Sleep Med, 2021, 82: 186-192.
- [3] Perez M N, Salas R M E. Insomnia [J]. Continuum (Minneapolis Minn), 2020, 26(4): 1003-1015.
- [4] Patel D, Steinberg J, Patel P. Insomnia in the elderly: A review [J]. J Clin Sleep Med, 2018, 14(6): 1017-1024.
- [5] Doghranji K, Jangro W C. Adverse effects of psychotropic medications on sleep [J]. Sleep Med Clin, 2016, 11(4): 503-514.
- [6] Bulman A, D'cunha N M, Marx W, et al. Nutraceuticals as potential targets for the development of a functional beverage for improving sleep quality [J]. Beverages, 2021, 7(2): 33.
- [7] 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.
- [8] 李敏, 王阶, 何庆勇, 等. 《中华人民共和国药典》收载治疗失眠中成药的配伍规律 [J]. 中医杂志, 2016, 57(7): 558-562.
- [9] 何鸽. 归脾汤加味治疗顽固性不寐 57 例 [J]. 河南中医, 2013, 33(11): 2020-2021.
- [10] Chen Z W, Peng C B, Pei Z, et al. Effects of tenuifolin on rest/wake behaviour in zebrafish [J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 2326-2334.
- [11] Cao Q, Jiang Y, Cui S Y, et al. Tenuifolin, a saponin derived from radix polygalae, exhibits sleep-enhancing effects in mice [J]. Phytomedicine, 2016, 23(14): 1797-1805.
- [12] Barabasi A L, Gulbahce N, Loscalzo J. Network medicine: a network-based approach to human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(1): 56-68.
- [13] Guney E, Menche J, Vidal M, et al. Network-based in silico drug efficacy screening [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10331.
- [14] Luck K, Kim D K, Lambourne L, et al. A reference map of the human binary protein interactome [J]. Nature, 2020, 580(7803): 402-408.
- [15] Fang J, Zhang P, Zhou Y, et al. Endophenotype-based in silico network medicine discovery combined with insurance record data mining identifies sildenafil as a candidate drug for Alzheimer's disease [J]. Nature Aging,

- 2021,1(12):1175-1188.
- [16] 魏静,李婷英,张莹,等. 羧甲基 β -葡聚糖联合阿霉素抗乳腺癌以及减轻心脏毒性的实验研究 [J]. 中国临床药理学杂志,2021,37(3):275-279.
- [17] 朱洪莹,黄天养,余孝云,等. 花旗参在大鼠体内的药代动力学特征研究 [J]. 遵义医科大学学报,2022,45(4):438-443.
- [18] White J. PubMed 2.0 [J]. Med Ref Serv Q,2020,39(4):382-387.
- [19] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform,2014,6:13.
- [20] Hettne K M, Williams A J, Van Mulligen E M, et al. Automatic vs. manual curation of a multi-source chemical dictionary: the impact on text mining [J]. J Cheminform,2010,2(1):3.
- [21] Davis A P, Grondin C J, Johnson R J, et al. Comparative toxicogenomics database (CTD): update 2021 [J]. Nucleic Acids Res,2021,49(D1):D1138-D1143.
- [22] Wishart D S, Knox C, Guo A C, et al. DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. Nucleic Acids Res,2008,36(Database issue):D901-906.
- [23] Chen X, Ji Z L, Chen Y Z. TTD: Therapeutic target database [J]. Nucleic Acids Res,2002,30(1):412-415.
- [24] Pawson A J, Sharman J L, Benson H E, et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their ligands [J]. Nucleic Acids Res,2014,42(Database issue):D1098-1106.
- [25] Liu T, Lin Y, Wen X, et al. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities [J]. Nucleic Acids Res,2007,35(Database issue):D198-201.
- [26] Uniprot C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. Nucleic Acids Res,2019,47(D1):D506-D515.
- [27] Pinero J, Bravo A, Queralt-Rosinach N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. Nucleic Acids Res,2017,45(D1):D833-D839.
- [28] Pruitt K D, Tatusova T, Maglott D R. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins [J]. Nucleic Acids Res,2005,33(Database issue):D501-504.
- [29] Ren A, Wu T, Wang Y, et al. Integrating animal experiments, mass spectrometry and network-based approach to reveal the sleep-improving effects of Ziziphi Spinosa Semen and γ -aminobutyric acid mixture [J]. Chin Med,2023,18(1):99.
- [30] Nobre A C, Rao A, Owen G N. L-theanine, a natural constituent in tea, and its effect on mental state [J]. Asia Pac J Clin Nutr,2008,17 Suppl 1:167-168.
- [31] Du G H, Ma Y Z, Qiang G F, et al. Ergometrine and Ergotamine [M]. Singapore: Springer Singapore,2018:237-242.
- [32] Fortunato J J, Réus G Z, Kirsch T R, et al. Effects of beta-carboline harmine on behavioral and physiological parameters observed in the chronic mild stress model: further evidence of antidepressant properties [J]. Brain Res Bull,2010,81(4-5):491-496.
- [33] Kang T H, Jeong S J, Kim N Y, et al. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of Albizia julibrissin Durazz [J]. J Ethnopharmacol,2000,71(1-2):321-323.
- [34] Onasanwo S, Faborode S, Agrawal M, et al. Antidepressant and anxiolytic potentials of chebulinic acid in laboratory rodent [J]. Ann Depress Anxiety,2014,1(7):1032.
- [35] Le J, Jia W, Sun Y. Sennoside A protects mitochondrial structure and function to improve high-fat diet-induced hepatic steatosis by targeting VDAC1 [J]. Biochem Biophys Res Commun,2018,500(2):484-489.
- [36] Huang Y, Cao S, Zhang Q, et al. Biological and pharmacological effects of hexahydrocurcumin, a metabolite of curcumin [J]. Arch Biochem Biophys,2018,646:31-37.
- [37] Young E E, Kelly D L, Shim I, et al. Variations in COMT and NTRK2 Influence symptom burden in women undergoing breast cancer treatment [J]. Biol Res Nurs,2017,19(3):318-328.
- [38] Lam D D, Antic Nikolic A, Zhao C, et al. Intronic elements associated with insomnia and restless legs syndrome exhibit cell-type-specific epigenetic features contributing to MEIS1 regulation [J]. Hum Mol Genet,2022,31(11):1733-1746.
- [39] Spieler D, Kaffé M, Knauf F, et al. Restless legs syndrome-associated intronic common variant in Meis1 alters enhancer function in the developing telencephalon [J]. Genome Res,2014,24(4):592-603.
- [40] Ren A, Ma M, Liang Y, et al. GSZ formula enhances sleep quality: exploring its active ingredients and mechanism using a network medicine approach [J]. Clin Complement Med Pharmacol,2023:100107.
- [41] 许吉怡,王志鹏,邹宇川,等. 食源性 GABA 对人体各系统的保护作用 and 机制的研究进展 [J]. 2022,24(10):3835-3843.

[收稿 2023-05-02;修回 2023-09-24]

(编辑:王福军)