

## 基于整合网络药理学和实验验证探究九味补血口服液调控 Glu/GABA 动态平衡改善失眠大鼠睡眠机制的研究

韦洁<sup>1</sup>, 蓝晓东<sup>2</sup>, 李冬梅<sup>1</sup>, 何俊慧<sup>3</sup>, 蒙珍<sup>2</sup>, 韦冬梅<sup>1</sup>, 李懿<sup>1</sup>,  
彭富全<sup>2</sup>, 韦桂宁<sup>1</sup>, 黄若干<sup>2\*</sup>

(1. 广西壮族自治区中医药研究院, 广西南宁 530022; 2. 广西白云山盈康药业有限公司, 广西南宁 530002;  
3. 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

**摘要:** 本研究拟通过网络药理学分析、分子对接结合体内实验验证, 探究九味补血口服液对失眠大鼠的睡眠改善机制。利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析结合数据库获取九味补血口服液的化学成分及其候选靶标, 并通过蛋白质相互作用和网络分析, 筛选九味补血口服液治疗失眠的关键网络靶标和潜在活性成分, 进行生物功能富集及通路分析。再采用分子对接技术对上述关键靶标和活性成分进行结合能力预测; 通过对氯苯丙氨酸 (PCPA) 腹腔注射复制大鼠失眠模型, 给予九味补血口服液 (2、4、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 干预 7 天, 开展戊巴比妥钠阈上剂量诱导睡眠实验, 考察九味补血口服液协同助眠作用。检测海马和下丘脑组织中谷氨酸 (Glu)、 $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 含量, 比色法检测海马组织中谷氨酸脱羧酶 1 (GAD67) 酶活力, qRT-PCR 和免疫印迹法检测海马组织中 GAD67、 $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体  $\alpha$ 1 (GABRA1)、 $\gamma$ -氨基丁酸 A 受体  $\beta$ 2 (GABRB2) mRNA 和蛋白质表达水平。动物实验经广西壮族自治区中医药研究院实验动物伦理委员会批准 (编号 2022060802)。结果表明, 通过构建九味补血口服液中药-成分-失眠疾病靶点网络, 获得该品种治疗失眠的 16 个关键网络靶标和 16 个潜在活性成分。网络药理学和分子对接分析显示, 白术内酯 III 等 16 个潜在活性成分与 GABRA1、GABRB2 蛋白质具有潜在的结合能力。在动物实验验证中, 与失眠大鼠模型组相比, 九味补血口服液显著缩短失眠大鼠睡眠潜伏期, 延长睡眠时长, 并明显提高其海马组织中 GAD67 酶活力及 GABA 生成量, 以及 GAD67、GABA<sub>A</sub> 受体亚基 GABRA1、GABRB2 的 mRNA 和蛋白质表达水平, 而降低下丘脑组织中 Glu 含量, 最终降低下丘脑和海马中 Glu/GABA 比值, 保持脑内 Glu、GABA 动态平衡。综上所述, 九味补血口服液可以改善失眠大鼠症状, 促进海马、下丘脑内 Glu 和 GABA 平衡, 减轻失眠后脑内兴奋性神经毒性, 其机制可能与增强 GAD67 表达及酶活力, 促进海马 GABA<sub>A</sub> 受体亚基 GABRA1、GABRB2 介导的抑制性神经活动有关。

**关键词:** 九味补血口服液; 失眠; 氯苯丙氨酸; 戊巴比妥钠; 网络药理学; 分子对接;  $\gamma$ -氨基丁酸

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1484-12

## Sleep-improving mechanisms of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid on regulating Glu/GABA balance in insomnia rats based on network pharmacology and experimental verification

WEI Jie<sup>1</sup>, LAN Xiao-dong<sup>2</sup>, LI Dong-mei<sup>1</sup>, HE Jun-hui<sup>3</sup>, MENG Zhen<sup>2</sup>, WEI Dong-mei<sup>1</sup>,  
LI Yi<sup>1</sup>, PENG Fu-quan<sup>2</sup>, WEI Gui-ning<sup>1</sup>, HUANG Ruo-gan<sup>2\*</sup>

(1. Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning 530022, China; 2. Guangxi Baiyunshan Yingkang Pharmaceutical Co., Ltd., Nanning 530002, China; 3. Guangxi Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Quality Standards, Nanning 530022, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the mechanism of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid on insomnia rats

收稿日期: 2022-07-18; 修回日期: 2022-09-06.

基金项目: “科技助力经济 2020”重点专项 (SQ2020YFF0415765); 中央引导地方科技发展资金项目 (ZY21195045); 南宁市科技局重大科技专项 (20203053); 广西中医药重点学科建设项目 (GZXK-Z-20-75).

\*通讯作者 Tel: 19195622199, E-mail: huangruogan@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0878

combining the methods of network pharmacology, molecular docking and experimental verification. UPLC-Q-TOF-MS/MS method and TCMIP, TCMSP databases were used to collect the ingredients and targets of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid. Protein-protein interactions and network analysis were performed to screen the key network targets and putative active ingredients of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid in treatment of insomnia, and then following by biological function and KEGG pathway analysis. Then binding ability for key network targets and putative active ingredients were predicted with molecular docking. The prediction targets were validated in para-chlorophenylalanine (PCPA) induced insomnia rats with administration of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid (2, 4, 8 mL·kg<sup>-1</sup>) for 7 days. Pentobarbital sodium induced sleeping test were performed to evaluate the synergistic sleep-aiding effect of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid. Then glutamic acid (Glu),  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) content and glutamate decarboxylase 1 (GAD67) activity in hypothalamus or hippocampus were evaluated, and the expressions of GAD67,  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subunit  $\alpha$ 1 (GABRA1) and  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subunit  $\beta$ 2 (GABRB2) in hippocampus were detected by qRT-PCR and Western blot methods. Animal experiments were approved by the Institutional Committee on Animal Care of Guangxi Institute of Chinese Medicine & Pharmaceutical Science (the number of permission: 2022060802). Results showed that 16 key network targets and 16 putative active ingredients were obtained by analyzing the herbs-ingredients-targets network of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid in treatment of insomnia. Network pharmacology and molecular docking all indicated these active ingredients, for example atractylenolide III, showed better binding ability with GABRA1 and GABRB2. Animal study indicated that, compared to PCPA-induced insomnia model, Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid remarkably shortened the sleeping latency and increased the sleeping duration, increased GAD67 activity and the production of GABA in hippocampus of insomnia rats, as well as the expressions of GAD67, GABRA1 and GABRB2, while decreased Glu content in hypothalamus, leading to decreasing of Glu/GABA ratio and recovery of Glu-GABA balance. These results indicated that Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid improved insomnia symptoms and helped maintain the Glu-GABA balance within hypothalamus and hippocampus, and reduced the excitatory neurotoxicity within brain. The mechanism may due to the elevation of GAD67 expression and enzyme activity, and the enhancement of type-A GABA receptor (GABA<sub>A</sub>R)-mediated neurons inhibition.

**Key words:** Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid; insomnia; para-chlorophenylalanine; pentobarbital sodium; network pharmacology; molecular docking;  $\gamma$ -aminobutyrate

失眠属中医“不寐”的范畴,主要表现为长时间、高频次入睡困难或无法持续维持睡眠等特征。长期失眠可诱发一系列代谢综合征、抑郁、心血管疾病,严重影响患者正常生活<sup>[1,2]</sup>。现代医学研究显示,失眠疾病机制主要涉及大脑皮层、海马、下丘脑等脑内结构,与脑内 $\gamma$ -氨基丁酸/谷氨酸(GABA/Glu)神经递质水平失衡密切相关<sup>[3]</sup>。

九味补血口服液是根据传统中医药学理论和广西壮医药专家多年临床用药经验,以广西特有草药绞股蓝配以人参、黄芪等9味中药组方,具有益气补血、健脾益胃功效,尤其是对气血两虚所致的失眠健忘、心悸怔忡诸证具有良好治疗效果<sup>[4]</sup>。目前临床上疗效较好,但由于中药复方成分的复杂性,其作用机制往往不够明确。网络药理学是一种基于药物成分及作用靶标,与疾病的相关靶蛋白相互作用网络的分析方法,能从系统生物学角度出发,从多组分、多靶点、多途径的整体观揭示中药复杂体系治疗疾病的相关机制,近年来成为中药研究领域比较常用的研究技术<sup>[5]</sup>。本研究拟通过网络药理学分析、分子对接结合动物整体实验

验证的手段,深入挖掘九味补血口服液治疗失眠的物质基础及具体作用机制,为九味补血口服液的临床精准和合理应用提供理论依据。

## 材料与amp;方法

**实验动物** SD大鼠60只,雄性,体重180~220 g, SPF级,购自湖南省长沙市天勤生物技术有限公司,许可证SCXK(湘)2019-0014。动物实验经广西壮族自治区中医药研究院实验动物伦理委员会批准(编号2022060802)。

**药物与试剂** 九味补血口服液,规格:每支10 mL,批号211218,广西白云山盈康药业有限公司提供;地西洋,每片2.5 mg,批号14210403,购自上海上药信谊药厂有限公司;对氯苯丙氨酸(PCPA,批号C12559564)、磷酸吡哆醛(批号C13047432)、GABA(批号C14107507)购自上海麦克林生化科技有限公司;聚山梨酯80(批号EZ7890C250)购自德国Biofrox公司; $\beta$ -actin(批号12w2944)购自Affinity Biosciences公司;谷氨酸脱羧酶1(GAD67)抗体(批号4000001879)、 $\gamma$ 氨基

基丁酸 A 型受体  $\alpha 1$  亚基 (GABRA1) 抗体 (批号 0100370201) 购自 Abcam 公司;  $\gamma$  氨基丁酸 A 型受体  $\beta 2$  亚基 (GABRB2) 抗体 (批号 GR297168-3)、山羊抗兔 IgG (H+L) HRP 偶联抗体 (批号 20000339)、山羊抗鼠 IgG (H+L) HRP 偶联抗体 (批号 20000374) 均购自 Proteintech 公司; 谷氨酸 (Glu) 试剂盒 (批号 202204)、GABA 试剂盒 (批号 202204) 均购自上海泛柯实业有限公司; 藜本内酯 (批号 111737-201910)、阿魏酸 (批号 110773-201915)、芦丁 (批号 100080-202012)、槲皮素 (批号 100081-201610)、人参皂苷 Rb1 (批号 110704-202129)、人参皂苷 Rg1 (批号 110703-202034)、黄芪甲苷 (批号 110781-202118) 对照品均购于中国食品药品检定研究院; 五味子甲素 (批号 7954)、五味子乙素 (批号 8366)、人参皂苷 Rd (批号 5826)、川陈皮素 (批号 6082)、橘皮素 (批号 10027)、橙皮苷 (批号 5836)、甘草苷 (批号 9654)、甘草酸铵 (批号 10845)、毛蕊异黄酮 (批号 10659) 对照品均购于上海诗丹德标准技术服务有限公司。

**主要仪器** Synergy H1 多功能检测仪, 美国 BIOTEK 公司; Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪、Mini Trans-Blot Cell 转膜仪, 伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司; 4600 化学发光成像仪, 上海天能科技有限公司; LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪, 罗氏诊断公司; Centrifuge 5427R 高速冷冻离心机, 德国艾本德股份公司; Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪、Waters Xevo G2-XS QTOF MS 高分辨质谱仪, 沃特世公司。

#### 九味补血口服液治疗失眠的网络药理学分析

**九味补血口服液潜在活性成分筛选** 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对九味补血口服液进行化学成分鉴定。色谱条件: 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu$ m) 为色谱柱; 正离子模式流动相为水 (A1)-乙腈 (B), 负离子模式流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A2)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 2% B; 5~30 min, 2%~80% B; 30~35 min, 80%~95% B); 柱温: 35  $^{\circ}$ C; 流速: 0.3 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ; 进样量: 1  $\mu$ L; TUV 检测波长: 203、254 nm。质谱条件: 离子源为电喷雾电离源 (ESI), 正、负离子两种模式分别测定。各参数分别为: 毛细管电压 +2.5 kV (ESI+), -2.0 kV (ESI-); 锥孔电压 +40 V (ESI+), -40 V (ESI-); 离子源温度 140  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气温度 500  $^{\circ}$ C; 锥孔气流量 50 L $\cdot$ h $^{-1}$ ; 脱溶剂气 (N<sub>2</sub>) 流速 800 L $\cdot$ h $^{-1}$ ; 氩气 (Ar) 作为碰撞气体; MSE 扫描模式检测, 低碰撞能量通道 6 eV, 高碰撞能量通道 10~40 eV 能量梯度, 质量数检测范围 50~1 250 Da。采用 Waters Masslynx 软件采集数据, 采用 Waters UNIFI 软件将质谱数据与所建数据库进行自动匹配, 并通过一

级和二级质谱信息分析, 结合相关文献及对应标准品, 对九味补血口服液样品图谱进行鉴定和表征。

为了充分挖掘和构建九味补血口服液的成分库, 除上述鉴定所得成分外, 另采用中医药整合药理学研究平台 (TCMIP, <http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/Login/login.html>)、中药系统药理学平台 (TCMSP, <https://old.tcmisp-e.com/tcmisp.php>) 在线数据库检索获得九味补血口服液 (简称: JWBXOL) 组方药材人参、黄芪、绞股蓝、五味子、当归、白术、陈皮、甘草、山楂的成分信息, 利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 核对成分结构及化合物名称。综合 2 种方法共同构建九味补血口服液的潜在有效化学成分库, 用于下一步网络药理学分析<sup>[6]</sup>。

**药物预测靶点筛选** 通过 TCMIP 数据库预测上述筛选出的化学成分的作用靶标, 筛选相似性阈值大于 0.8 的靶标作为成分的预测靶标, 构建九味补血口服液所含化合物-作用靶标数据库。

**失眠疾病靶标的收集** 检索 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 和 TCMIP 数据库, 以“insomnia”为筛选关键词, 获取失眠相关的疾病基因信息。去除重复基因后, 得到失眠疾病靶标数据库。

**九味补血口服液“中药-化合物-靶标”网络构建与分析** 将九味补血口服液成分预测靶点与失眠疾病靶点进行交集, 取交集部分靶点作为药物改善失眠的预测靶标。将上述交集靶标导入 STRING 平台构建其蛋白互作 (PPI) 网络, 并将 PPI 网络数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件进行网络特征值分析, 以网络节点中的拓扑结构特征值度 (degree) 值为重要参考, 选取网络中 degree 值大于中位数 1.5 倍的网络节点作为九味补血口服液治疗失眠的关键网络靶标 (Hub 节点), 用于后续 GO 分析和 KEGG 分析。将 9 种中药及其含有的化合物, 以及 Hub 节点进一步构建“中药-成分-Hub 靶标网络”, 筛选九味补血口服液干预失眠的潜在活性成分及其相应关键网络靶点。

**基因本体 (GO) 分析和 KEGG 通路富集分析** 利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>) 工具对上述关键网络靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析, 获得九味补血口服液治疗失眠的关键靶点蛋白在基因功能和信号通路中的作用。

**分子对接** 从 PubChem 数据库中获取潜在活性成分的 SDF 格式文件, 利用 OpenBabel 软件转化为 PDB 格式文件。筛选 KEGG 分析所获取的关键网络核心靶点, 从 AlphaFold 数据库 (AlphaFold,

phafold.ebi.ac.uk/) 中检索其相应的 3D 结构 PDB 格式文件。采用 AutodockFG 进行核心成分与核心靶标间的分子对接验证。利用结合能 (affinity) 评估药效分子与靶点的结合能力, 将结合能  $\leq -7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  的结合形式纳入选择。

### 九味补血口服液对失眠大鼠睡眠的改善作用

**动物分组、造模及给药** 适应性饲养 1 周后, 大鼠 60 只, 随机分为 6 组, 分别为对照组、模型组、阳性药地西洋  $3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组及九味补血口服液 2、4、8  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量组 (分别为临床日剂量的 4、8、16 倍)。除对照组外, 其余 5 组大鼠在给药前腹腔注射 PCPA  $450 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 连续 3 天, 以复制失眠大鼠模型<sup>[7]</sup>。造模后, 对所有大鼠腹腔注射  $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠溶液, 观察到模型组大鼠的睡眠维持时间较对照组明显缩短且入睡潜伏期延长明显, 显示造模成功。造模成功后, 地西洋组和九味补血口服液组大鼠灌胃给予相应药物, 连续 7 天。对照组和模型组大鼠给予等量生理盐水。

**戊巴比妥钠诱导大鼠睡眠实验** 末次给药 2 h 后, 每组大鼠腹腔注射给予阈上剂量  $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  戊巴比妥钠, 观察各组大鼠翻正反射消失和恢复情况, 记录以下数据: ① 注射戊巴比妥钠时间; ② 入睡时间: 以 1 min 内翻正反射消失为标准; ③ 觉醒时间: 以 30 s 内翻正反射恢复为标准。计算入睡潜伏期和睡眠时长, 入睡潜伏期 = 入睡时间 - 注射戊巴比妥钠时间; 睡眠时长 = 觉醒时间 - 入睡时间<sup>[8]</sup>。

**ELISA 法检测海马及下丘脑中 Glu、GABA 含量水平** 末次给药 24 h 后, 以戊巴比妥钠麻醉大鼠, 取大鼠海马及下丘脑组织, 取一定重量组织按 1:9 (w/v) 加入生理盐水, 进行冰浴匀浆,  $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min, 收集上清, 按照 ELISA 试剂盒说明, 检测 Glu、GABA 含量水平。

**比色法检测 GAD67 酶活力** 取一定量海马组织, 按 1:9 (w/v) 加入 pH 4.8 的磷酸缓冲液, 研磨仪里研磨 30 s, 而后  $10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 15 min, 上清液即为粗酶液, BCA 法检测其中的蛋白浓度。另取 5 mL 的 EP 管中加入 0.15 mL 粗酶液 + 0.15 mL 底物溶液 (含  $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  L-Glu 和  $0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸吡哆醛), 混匀, 放入  $40\ ^\circ\text{C}$  烘箱内孵育 20 h, 冰浴终止反应。随后在冰浴中依次加入  $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硼酸盐缓冲液 (pH 10) 0.5 mL、6% 苯酚 1 mL, 混匀, 继续加入次氯酸钠溶液 (活性氯为 5.2%) 1 mL, 混匀后室温放置 5 min, 然后沸水浴 10 min, 立即冰浴 20 min, 待溶液出现蓝绿色后, 酶标仪测 640 nm 吸光度。另外, 配制含 GABA、L-Glu 的混合标准溶液 (GABA 浓度分别为 10、8、4、2、1、0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 按上述与硼酸、苯酚、次氯酸钠反应体系方法进行反

应, 读取 640 nm 吸光度, 建立 GABA 浓度与吸光度的标准曲线。利用标准曲线换算粗酶液中的 GABA 含量。最后以粗酶液中每 mg 蛋白通过与底物作用后产生的 GABA 含量作为 GAD67 酶活力的表征<sup>[9]</sup>。

**qRT-PCR 法检测海马中 GAD67、GABRA1、GABRB2 mRNA 水平** 根据网络药理学分析和分子对接所预测的关键网络靶点进行基因水平验证。取大鼠海马组织 30 mg 置于匀浆管中, 加入 Trizol 1 mL 充分研磨, 氯仿萃取,  $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min。吸取上清液, 加入等量异丙醇, 摇匀后移入  $-20\ ^\circ\text{C}$  冰箱保存 30 min。 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min, 弃去液体, 加入 75% 酒精洗涤沉淀,  $4\ ^\circ\text{C}$  离心 10 min, 弃去管中液体, 倒置晾干, 加入无酶水, 测 RNA 浓度。根据逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA, 再根据扩增试剂盒说明书进行扩增。GABRA1 上游引物: AGTGCCAGAAAT TCCCTCCCAAAG, 下游引物: CAATCAGAGCCGAG AACACGAAGG; GABRB2 上游引物: TTCCCTTAAT AATCGCCGCTGTCTG, 下游引物: CAGTCTGTCCA CCGTCTCTTTAACC; GAD67 上游引物: CATCATGG CGGCTCGGTACAAG, 下游引物: GTGACTGTGTTC TGAGGTGAAGAGG;  $\beta$ -actin 上游引物: TGTCACCA ACTGGGACGATA, 下游引物: GGGGTGTTGAAGGT CTCAA, 均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计合成。使用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法计算基因 mRNA 相对水平。

**免疫印迹法检测海马中 GAD67、GABRA1、GABRB2 蛋白表达** 取上述海马组织, 加入组织裂解液, 提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 混匀,  $95\ ^\circ\text{C}$  加热 15 min。配胶, 待胶凝固后加入  $40\ \mu\text{g}$  待测蛋白样本, 电泳, 转膜, 封闭 1 h, TBST 清洗, 加入 GAD67、GABRA1、GABRB2、 $\beta$ -actin 等一抗,  $4\ ^\circ\text{C}$  孵育过夜, TBST 清洗, 加入二抗 (1:5 000), 孵育 1 h, TBST 清洗, 显影, 拍照。Image J 获取各条带灰度值, 计算目的蛋白相对于内参  $\beta$ -actin 的相对表达量。

**统计学分析** 实验数据用  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 多组样本均数的两两比较采用单因素方差分析, 方差齐性采用 LSD 检验, 方差不齐采用非参数检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

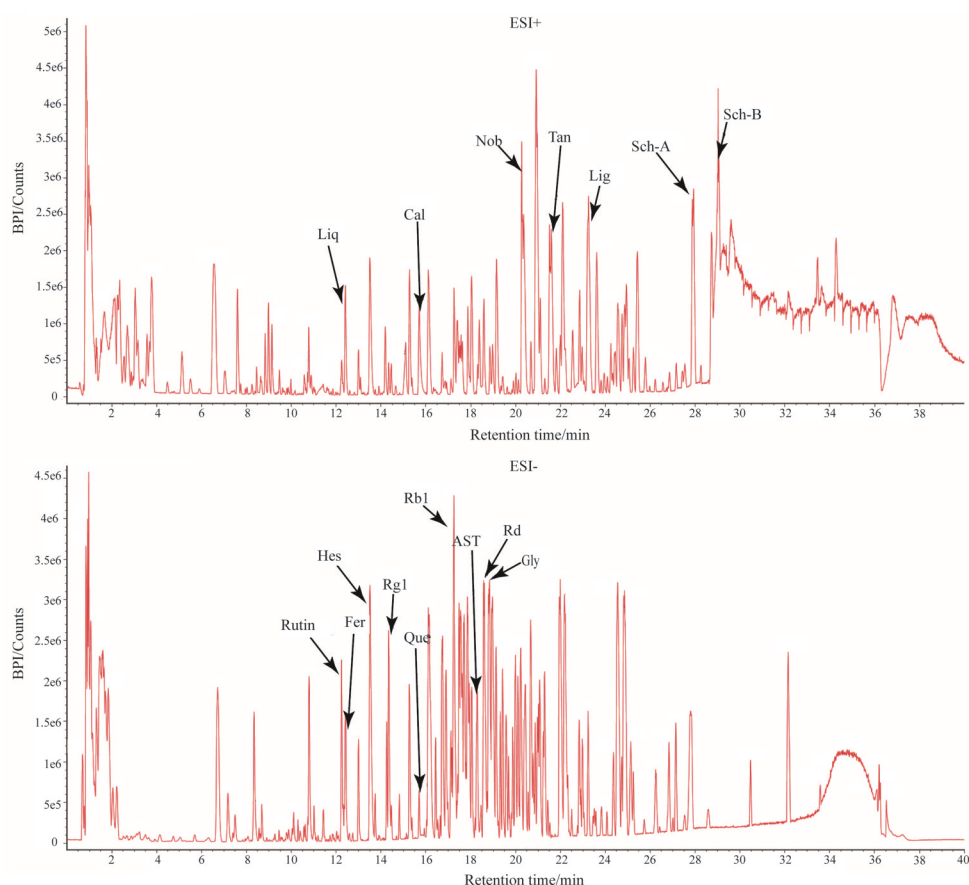
### 1 九味补血口服液的化学成分及预测靶标

本研究对九味补血口服液进行了 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析, 从中鉴定了 16 个药材指标性成分, 如表 1、图 1 所示。

由于鉴定的成分数量不足以展开充分的网络药理学分析及筛选, 故本研究拟从 TCMIP、TCMSP 数据库

**Table 1** Identified ingredients of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid (JWBXOL)

No.	Chemical name	Observed $m/z$	Observed retention time/min	Molecular formula	Adduct
1	Astragaloside IV (AST)	829.460 2	18.29	$C_{41}H_{68}O_{14}$	+HCOO
2	Calycosin (Cal)	285.075 9	15.72	$C_{16}H_{12}O_5$	+H, +Na
3	Ginsenoside Rb1 (Rb1)	1 153.602 1	17.25	$C_{54}H_{92}O_{23}$	+HCOO, -H
4	Ginsenoside Rg1 (Rg1)	845.490 8	14.35	$C_{42}H_{72}O_{14}$	+HCOO
5	Ginsenoside Rd (Rd)	991.549 7	18.59	$C_{48}H_{82}O_{18}$	+HCOO, -H
6	Ferulic acid (Fer)	193.051 1	12.48	$C_{10}H_{10}O_4$	-H
7	Ligustilide (Lig)	191.106 8	23.24	$C_{12}H_{14}O_2$	+H, +Na
8	Schisandrin A (Sch-A)	417.227 6	27.91	$C_{24}H_{32}O_6$	+H, +Na
9	Schisandrin B (Sch-B)	401.196 2	29.04	$C_{23}H_{28}O_6$	+H, +Na
10	Hesperidin (Hes)	609.182 4	13.51	$C_{28}H_{34}O_{15}$	-H, +HCOO
11	Nobiletin (Nob)	403.139 3	20.29	$C_{21}H_{22}O_8$	+H, +Na
12	Tangeretin (Tan)	373.129 0	21.57	$C_{20}H_{20}O_7$	+H, +Na
13	Quercetin (Que)	301.035 8	15.80	$C_{15}H_{10}O_7$	-H
14	Rutin (Rutin)	609.146 4	12.24	$C_{27}H_{30}O_{16}$	-H
15	Liquiritin (Liq)	441.115 8	12.42	$C_{21}H_{22}O_9$	+Na, +H
16	Glycyrrhizic acid (Gly)	821.397 6	18.81	$C_{42}H_{62}O_{16}$	-H

**Figure 1** Base peak ion chromatogram of JWBXOL

中进一步检索和补充九味补血口服液9味中药的化学成分, 共计373个, 主要为黄酮、皂苷、木酯素、苯酚、有机酸等类型的化合物, 其中人参102个, 甘草103个, 当归49个, 五味子43个, 黄芪39个, 绞股蓝22个, 山楂28个, 陈皮19个, 白术11个。经TCMIP数据库(相似性大于0.8)预测成分候选靶标, 获得各组方药材预测

靶标共计923个, 分别为: 人参783个, 黄芪332个, 绞股蓝156个, 当归265个, 白术91个, 五味子92个, 陈皮82个, 甘草164个, 山楂419个。通过构建中药-成分网络(图2)并分析发现, degree值排前5位的成分包括 $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol)、山柰酚(kaempferol)、槲皮素(quercetin)、棕榈酸(palmitic acid)、琥珀酸(succinic

acid), 说明这些成分可能是九味补血口服液 9 味中药协同发挥药效的潜在物质基础。上述成分与中药的对应信息表、中药-成分网络分别如表 2、图 2 所示。

**Table 2** Putative active ingredients of JWBXOL

Ingredient	Herb
$\beta$ -Sitosterol	Gan cao, Chen pi, Dang gui, Huang qi, Jiao gu lan, Ren shen
Kaempferol	Gan cao, Dang gui, Huang qi, Ren shen
Quercetin	Gan cao, Huang qi, Jiao gu lan, Shan zha
Palmitic acid	Dang gui, Huang qi, Ren shen
Succinic acid	Dang gui, Ren shen, Shan zha

## 2 九味补血口服液“中药-成分-靶点”网络的构建与分析

进一步从 DisGenet、OMIM、DrugBank、GeneCards 等数据库获取失眠疾病靶点 273 个, 获取九味补血口服液靶标与失眠疾病靶标的交集, 共计 56 个。运用 STRING 数据库构建上述交集靶点 PPI 网络, 通过 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化并计算, 显示所有节点的 degree 值中位数为 8.5, 选取 degree 值 > 12.7 的靶标节点作为九味补血口服液治疗失眠的关键网络靶标 (Hub 节点), 共计 16 个。进一步构建中药-成分-失眠靶点网络和计算, 将中药、关键成分与 Hub 节点的相互关系进行可视化, 并筛选该网络中 degree 值 > 8 (中位数 1.5 倍) 的节点, 作为九味补血口服液发挥治疗失眠的关键网络靶标和潜在活性成分。筛选后的网络由 9 味中药、16 个关键网络靶标及 16 种潜在活性成分组成, 详见图 3。Degree 值排名前 6 的靶点包括: GABRB2、肿瘤坏死因子 (TNF)、GABRA1、白介素 6 (IL6)、 $\gamma$  氨基丁酸 A 型受体  $\alpha 2$  亚基 (GABRA2)、 $\gamma$  氨基丁酸 A 型受体  $\alpha 6$  亚基 (GABRA6)。上述 16 种活性成分包括:  $\beta$ -谷甾醇、白术内脂 III (atractylenolide III)、菜油甾醇 (campesterol)、豆甾醇 (stigmasterol)、山柰酚、槲皮素、麦角甾-4,6,8,22-四烯-3-酮 (ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one)、齿孔醛 (eburical)、齿孔醇 (eburicol)、羊毛甾醇 (lanosterol)、齿孔酸 (eburicoic acid)、脱氢齿孔酸 (dehydroeburicoic acid)、熊果酸 (ursolic acid)、麦角固醇 (ergosterol)、(24S)-乙基胆甾-5,22,25-反-3 $\beta$ -醇 [(24S)-ethylcholesta-5,22,25-trans-3 $\beta$ -ol]、邻甲苯酚 (o-cresol)。上述潜在活性成分与中药的对应关系如表 3 所示。综上所述, 九味补血口服液的 9 种中药可能通过 16 个潜在活性成分与 16 个关键网络靶标发生相互作用, 充分体现了九味补血口服液是通过多成分、多靶点的方式来干预失眠的。

## 3 关键靶标的 KEGG 通路及 GO 生物过程富集分析

选取上述筛选出的 16 个关键网络靶标, 利用

**Table 3** Correlation of active ingredients and herbs for JWBXOL

Active ingredient	Herb
$\beta$ -Sitosterol	Ren shen, Jiao gu lan, Gan cao, Dang gui, Huang qi, Chen pi
Atractylenolide III	Bai zhu
Campesterol	Ren shen, Jiao gu lan
Stigmasterol	Ren shen, Dang gui
Kaempferol	Ren shen, Dang gui, Huang qi, Gan cao
Quercetin	Huang qi, Jiao gu lan, Shan zha, Gan cao
Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one	Shan zha
Eburical	Shan zha
Eburicol	Shan zha
Lanosterol	Shan zha
Eburicoic acid	Shan zha
Dehydroeburicoic acid	Shan zha
Ursolic acid	Shan zha
Ergosterol	Shan zha
(24S)-Ethylcholesta-5,22,25-trans-3 $\beta$ -ol	Jiao gu lan
o-Cresol	Dang gui

DAVID 数据库进行生物功能富集及通路分析。选取通路富集分析排名前 18 的通路 ( $P < 0.01$ )。结果显示, 九味补血口服液治疗失眠的关键靶标主要富集于尼古丁成瘾、GABA 能突触、神经活性配体-受体相互作用、内源性大麻素逆向信号、多巴胺能突触等信号通路。

生物功能富集结果显示, 九味补血口服液治疗失眠的关键网络靶标主要参与的生物学过程包括氯离子跨膜转运、 $\gamma$ -氨基丁酸信号、化学突触传递、神经系统过程、抑制性突触的组装、GABA 能突触传递等过程; 在分子功能上, 九味补血口服液主要与 GABA 门控氯离子通道活性、GABA<sub>A</sub> 受体活性、氯离子通道活性、胞外门控离子通道活性、抑制性胞外媒体门控离子通道活性等相关; 在细胞组分方面, 其主要作用于突触后膜、氯离子通道复合体、GABA<sub>A</sub> 受体复合体、胞浆膜组成、神经投射、胞浆囊泡膜等 (图 4)。

## 4 分子对接技术预测九味补血口服液活性成分与关键靶点的结合能力

为了综合考虑九味补血口服液所有组方中药抗失眠协同作用, 本研究将五味子药材中与 GABAergic synapse 信号通路关键靶点具有潜在作用的成分五味子丙素 (schisandrin C) 也纳入九味补血口服液抗失眠的潜在活性成分, 共计 17 个。进一步将上述 17 个潜在活性成分与 GABAergic synapse 信号通路关键靶点 GABRA1、GABRB2 靶点进行结合能力预测。一般认为结合能小于  $-4.25 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  提示配体与受体有一定的结合能力, 小于  $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  有较好的结合能力, 小于  $-7.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  有强烈的结合能力<sup>[10]</sup>。结果发现, 白术内脂 III、菜油甾醇、豆甾醇、山柰酚、槲皮素、五味子

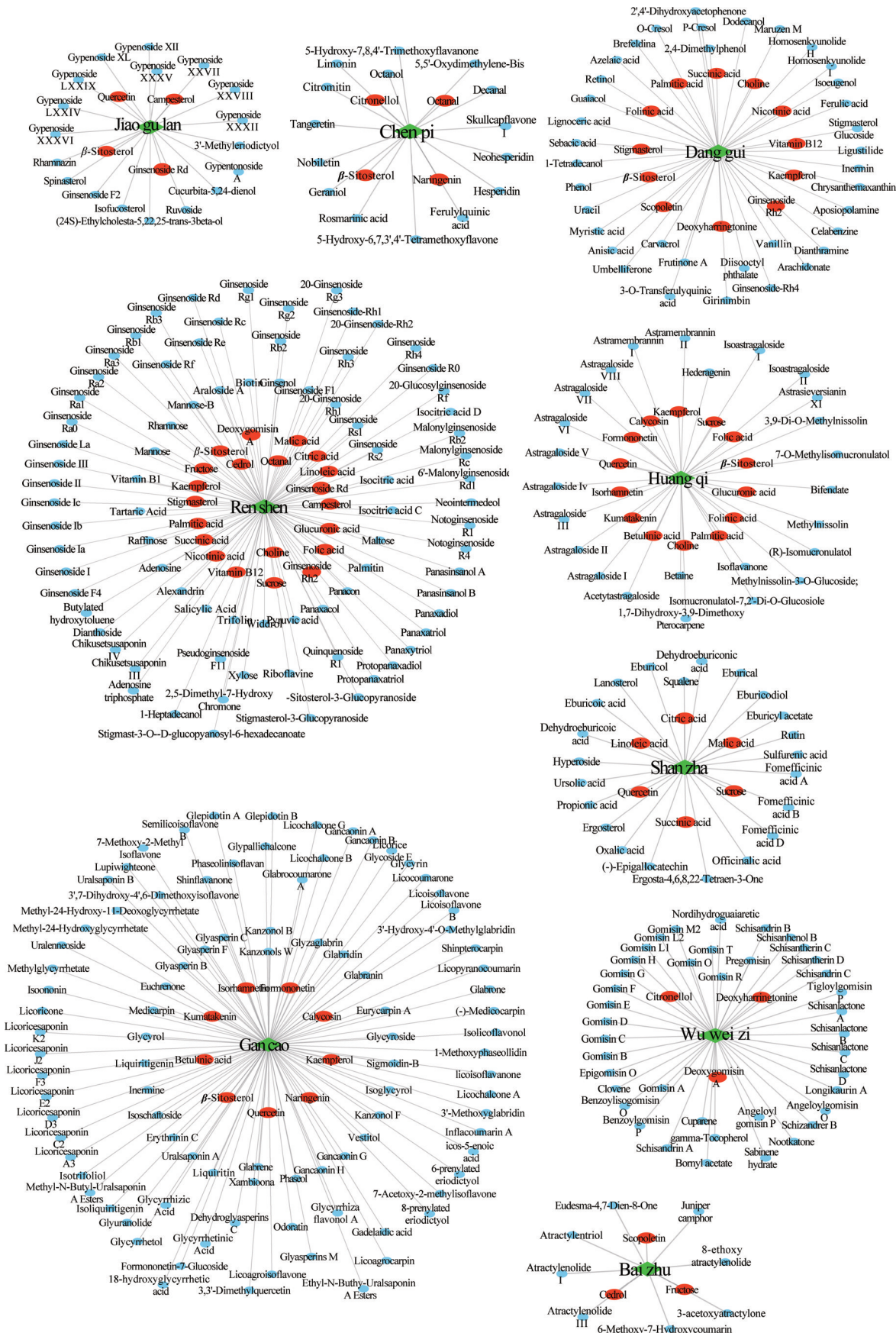
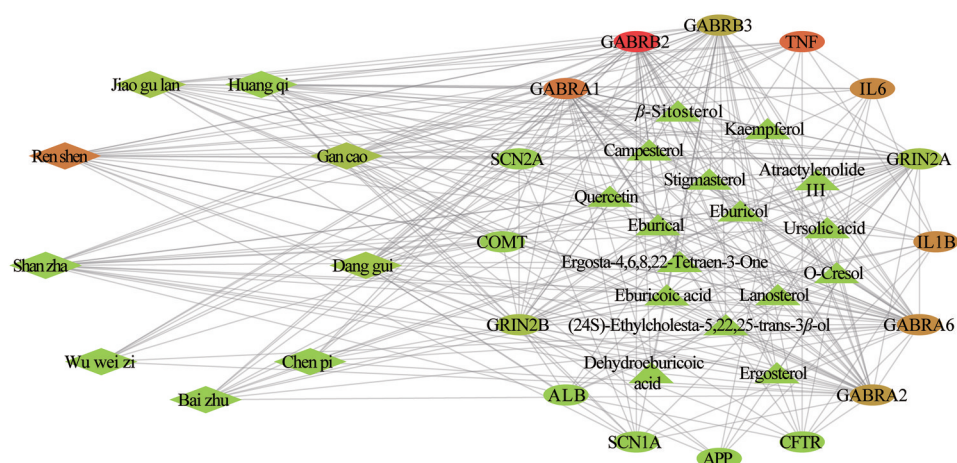
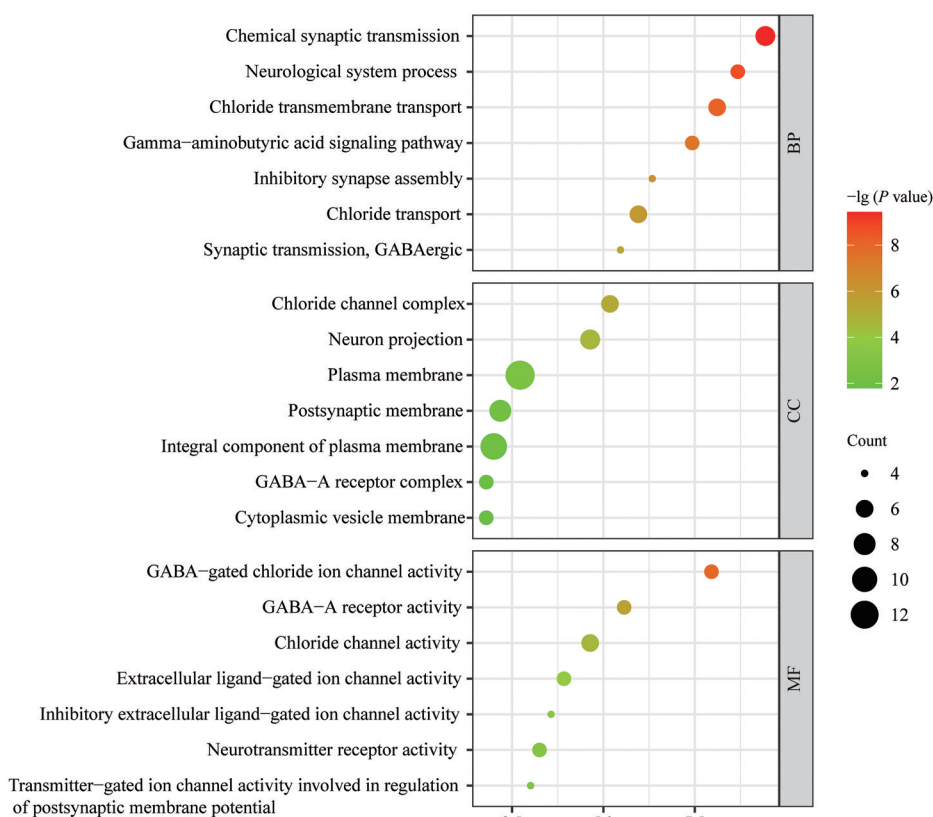


Figure 2 Herbs-ingredients network of JWBXOL. Green diamond shape: Herbs; Red ellipse shape: Common ingredients; Blue ellipse shape: Ingredients



**Figure 3** Herbs-ingredients-targets network of JWBXOL. Diamond shape: Herbs; Ellipse shape: Hub nodes; Triangle shape: Active ingredients. The redder the color, the larger the degree value



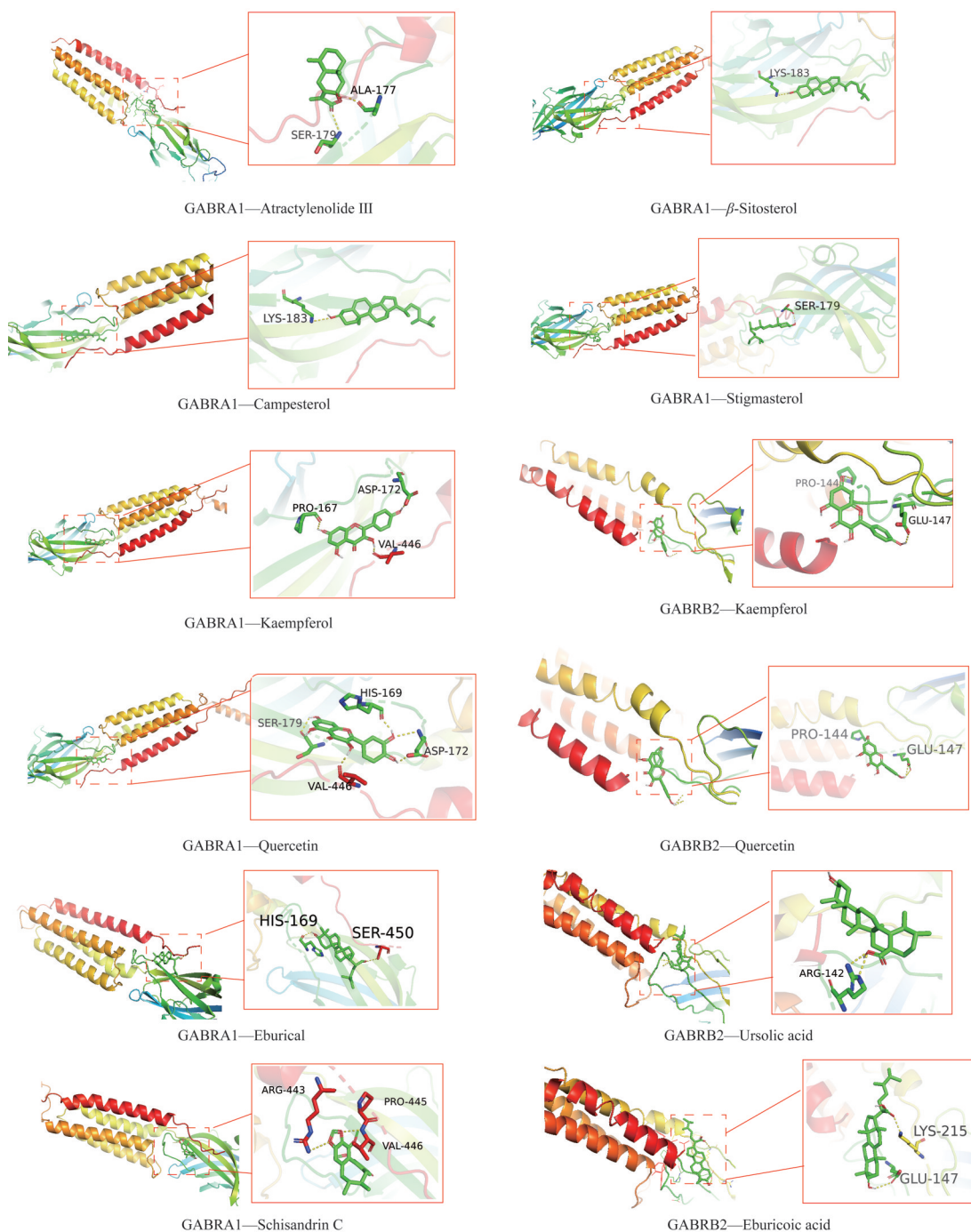
**Figure 4** GO analysis of key targets of JWBXOL in treatment of insomnia. The redder the color, the larger the  $P$  value. The size of each bubble reflects the number of genes enriched in the GO terms

丙素、麦角固醇、 $\beta$ -谷甾醇等 15 种成分与 GABRA1 有强烈的结合能力, 山柰酚、槲皮素、熊果酸、麦角固醇等 6 种成分与 GABRB2 有强烈结合能力 (表 4), 用 PyMOL 软件对有强烈结合能力 (结合能  $\leq -7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) 的部分成分与靶点对接结果进行可视化 (图 5)。

## 5 九味补血口服液对失眠大鼠睡眠的改善作用

### 5.1 九味补血口服液对失眠大鼠睡眠的影响 造模

给药期结束后, 与对照组相比, PCPA 可诱导模型组大鼠睡眠潜伏期明显增长 ( $P < 0.01$ ), 睡眠时长缩短 ( $P < 0.05$ ); 给药 7 天后, 与模型组比较, 地西洋组和九味补血口服液 ( $2, 4, 8 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 干预组大鼠睡眠潜伏期显著缩短, 睡眠时长明显增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。表明九味补血口服液对戊巴比妥钠具有协同对抗失眠作用 (表 5)。



**Figure 5** Molecular docking of active ingredients to  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subunit  $\alpha 1$  (GABRA1),  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor subunit  $\beta 2$  (GABRB2)

**5.2 九味补血口服液对失眠大鼠海马及下丘脑中 Glu、GABA 含量的影响** 根据网络药理学分析和分子对接的预测结果,九味补血口服液抗失眠作用可能与 GABA 能神经突触相关,结合失眠疾病机制的相关研究,提示九味补血口服液有调控 GABA、Glu 神经递质稳态的潜在可能。检测结果显示,与对照组比较,PCPA 诱导失眠大鼠海马组织中 GABA 含量显著降低

( $P < 0.01$ ), Glu/GABA 比值显著升高 ( $P < 0.01$ ), Glu 含量有所升高,但未达到显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 给药 7 天后,与模型组相比,九味补血口服液 ( $2.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 可明显逆转失眠大鼠海马中 GABA 含量及 Glu/GABA 比值变化 ( $P < 0.05$ ) (表 6)。

结果还显示,PCPA 诱导失眠大鼠下丘脑组织中 Glu 含量及 Glu/GABA 明显升高 ( $P < 0.01$ ), GABA 含

**Table 4** Binding ability of active ingredients and GABRA1 and GABRB2

Active ingredient	Binding ability with GABRA1/kcal·mol <sup>-1</sup>	Binding ability with GABRB2/kcal·mol <sup>-1</sup>
Atractylenolide III	-7.1	-6
Campesterol	-10.2	-5.4
Kaempferol	-7.6	-7.4
Quercetin	-8	-7.4
$\beta$ -Sitosterol	-9.9	-5.6
Stigmasterol	-8.9	-6.1
Ursolic acid	-6.6	-7
Schisandrin C	-8.1	-6.1
Dehydroeburicoic acid	-7	-2.9
Eburical	-8.7	-7.2
Eburicoic acid	-7.1	-7.3
Eburicol	-8.6	-4.7
Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-one	-10.4	-3.2
Ergosterol	-10	-8.0
Lanosterol	-9.3	-4.0
(24S)-Ethylcholesta-5,22,25-trans-3 $\beta$ -ol	-8.2	-3.9
o-Cresol	-4.5	-3.9

**Table 5** Effects of JWBXOL on pentobarbital sodium induced sleeping.  $\bar{x} \pm s$ . Number of rats were indicated in the table, which were consistent in the following analysis unless specific notification. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs model group

Group	Number of rats	Dosage /mL·kg <sup>-1</sup>	Sleep latency /min	Sleep duration /min
Control	9	-	3.55 ± 0.33	69.81 ± 9.00
Model	8	-	5.40 ± 0.70**	52.84 ± 12.65*
Diazepam	10	3 mg·kg <sup>-1</sup>	3.78 ± 0.62 $^{\Delta\Delta}$	79.15 ± 24.05 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	10	8	4.21 ± 0.40 $^{\Delta\Delta}$	95.23 ± 20.61 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	10	4	4.39 ± 0.67 $^{\Delta\Delta}$	75.65 ± 12.66 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	10	2	4.74 ± 0.98 $^{\Delta}$	86.56 ± 18.30 $^{\Delta\Delta}$

**Table 6** Effects of JWBXOL on glutamic acid (Glu) and  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) content in the hippocampus of insomnia rats.  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta}P < 0.05$  vs model group

Group	Dosage /mL·kg <sup>-1</sup>	GABA / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	Glu / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	Glu/GABA
Control	-	34.95 ± 13.48	9.89 ± 1.88	0.32 ± 0.15
Model	-	21.87 ± 3.26**	11.47 ± 3.42	0.53 ± 0.17**
Diazepam	3 mg·kg <sup>-1</sup>	28.00 ± 3.79	12.14 ± 2.52	0.44 ± 0.10
JWBXOL	8	30.79 ± 9.20 $^{\Delta}$	10.11 ± 2.20	0.36 ± 0.14 $^{\Delta}$
JWBXOL	4	25.17 ± 3.21	10.83 ± 2.00	0.44 ± 0.11
JWBXOL	2	32.36 ± 10.55 $^{\Delta}$	8.97 ± 1.83	0.30 ± 0.10 $^{\Delta}$

量有所波动,但未达到显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 给药 7 天后,与模型组相比,地西洋、九味补血口服液 (2、4、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 可明显下调失眠大鼠下丘脑组织中 Glu 含量和 Glu/GABA 比值变化 (表 7)。

**5.3 九味补血口服液对失眠大鼠海马组织 GAD67 酶活力的影响** GAD67 蛋白是 Glu 转化为 GABA 的关键酶,检测 GAD67 酶活力可以有效评估九味补血口服

**Table 7** Effects of JWBXOL on Glu and GABA content in the hypothalamus of insomnia rats.  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs model group

Group	Dosage /mL·kg <sup>-1</sup>	GABA / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	Glu / $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	Glu/GABA
Control	-	5.14 ± 0.39	250.51 ± 12.50	49.00 ± 4.50
Model	-	5.12 ± 0.52	285.13 ± 20.83**	56.30 ± 7.48**
Diazepam	3 mg·kg <sup>-1</sup>	5.87 ± 0.20	259.18 ± 14.27 $^{\Delta\Delta}$	44.19 ± 2.08 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	8	5.81 ± 0.71	242.23 ± 15.57 $^{\Delta\Delta}$	42.30 ± 6.05 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	4	5.96 ± 0.38	258.47 ± 18.39 $^{\Delta\Delta}$	43.51 ± 3.63 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	2	5.47 ± 0.60	260.24 ± 17.04 $^{\Delta\Delta}$	48.02 ± 5.10 $^{\Delta\Delta}$

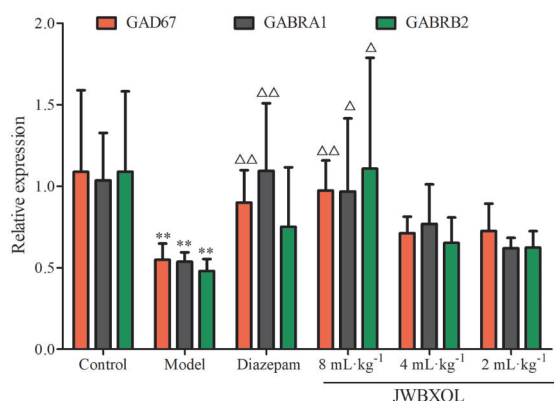
液对 GABA 合成的影响。比色法检测结果显示,PCPA 可显著减少一定重量海马组织经 GAD67 催化生成 GABA 的含量 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,九味补血口服液 (2、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 可明显提高失眠大鼠海马组织中经 GAD67 催化生成 GABA 含量 ( $P < 0.05$ ),表明九味补血口服液 (2、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 可明显提高海马组织中 GAD67 酶活力,促进 GABA 的合成 (表 8)。

**Table 8** Effects of JWBXOL on glutamate decarboxylase 1 (GAD67) activity in the hippocampus of insomnia rats.  $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group;  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs model group

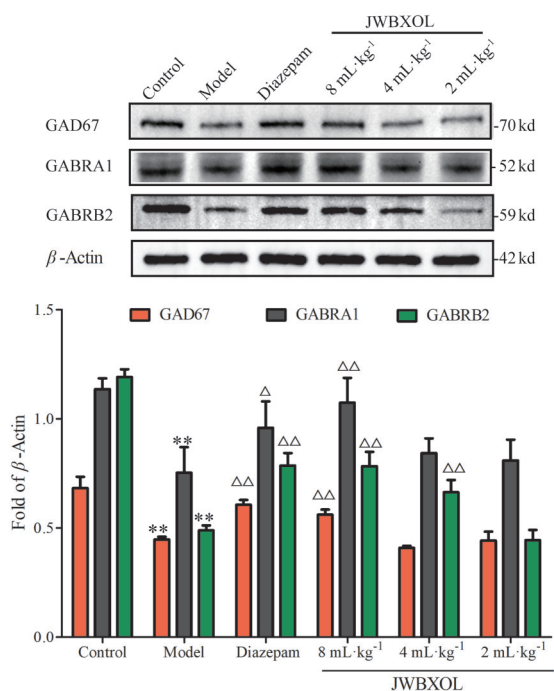
Group	Dosage /mL·kg <sup>-1</sup>	GAD67 activity ( $\mu$ mol GABA/mg protein)
Control	-	59.17 ± 7.13
Model	-	47.30 ± 6.22**
Diazepam	3 mg·kg <sup>-1</sup>	58.54 ± 7.70 $^{\Delta\Delta}$
JWBXOL	8	55.62 ± 9.31 $^{\Delta}$
JWBXOL	4	46.72 ± 10.60
JWBXOL	2	53.77 ± 3.89 $^{\Delta}$

**5.4 九味补血口服液对失眠大鼠海马 GAD67、GABRB2、GABRA1 mRNA 水平的影响** GABA 通过与其相应受体结合,如 GABA<sub>A</sub> 受体中的  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基 (由 GABRA1、GABRB2 等基因编码),可介导对神经兴奋的抑制。PCR 结果显示,PCPA 可诱导模型组大鼠海马组织中 GAD67、GABRB2、GABRA1 mRNA 水平降低,提示 PCPA 可能通过抑制 GABA 合成及其受体介导的神经抑制作用,进而诱导动物神经兴奋,产生失眠样行为。给药 7 天后 (图 6),与模型组相比,九味补血口服液 (8 mL·kg<sup>-1</sup>) 和地西洋可显著性升高海马中 GAD67、GABRB2、GABRA1 mRNA 相对水平 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结合分子对接的结合力分析,提示九味补血口服液可能正调控失眠大鼠海马区 GABA 合成及其神经抑制信号的转导。

**5.5 九味补血口服液对失眠大鼠海马 GAD67、GABRB2、GABRA1 蛋白表达** 结果显示 (图 7),与对照组相比,模型组大鼠海马中 GAD67、GABRB2、GABRA1 蛋白表达均出现了明显下调 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比,九



**Figure 6** Effects of JWBXOL on mRNA level of GAD67, GABRB2 and GABRA1 in the hippocampus of insomnia rats.  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group



**Figure 7** Effects of JWBXOL on expressions of GAD67, GABRA1 and GABRB2 in the hippocampus of insomnia rats.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group

味补血口服液 (2、4、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 可不同程度升高海马中 GAD67、GABRB2、GABRA1 蛋白表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。表明九味补血口服液可增强 GABA 神经递质的合成, 促进 GABA 与受体结合所介导的兴奋抑制作用。该结果与海马 GABA 含量水平及 mRNA 水平结果基本吻合。

### 讨论

九味补血口服液主要由人参、黄芪、绞股蓝、五味子、当归、白术、陈皮、山楂、甘草这 9 味中药组方而成,

目前临床上主要用于气血两虚所致的失眠健忘、心悸怔忡诸证。本研究网络药理学研究初步揭示, 九味补血口服液中可能通过 β-谷甾醇、白术内脂 III、菜油甾醇、豆甾醇、山柰酚、槲皮素等 16 个化合物发挥抗失眠作用, 其主要作用靶标包括 GABRB2、TNF-α、GABRA1、IL6、GABRA2、GABRA6 等 16 个。GO 分析结果显示, 九味补血口服液药效成分作用靶点主要涉及 GABA 能突触传递、GABA 门控氯离子通道活性等生物功能, 这些与临床上失眠症的治疗思路相契合, 如苯二氮卓类药物。网络药理学分析和分子对接结果显示, GABRA1 和 GABRB2 可能是九味补血口服液发挥抗失眠作用的关键靶点, 由于 GABRA1 和 GABRB2 基因分别编码 GABA<sub>A</sub> 受体的 α、β 亚基, 表明九味补血口服液可能通过调控 GABA<sub>A</sub> 受体所介导的神经抑制作用, 进而发挥抗失眠作用。

研究认为, 睡眠-觉醒机制的稳态受 GABA 和 Glu 水平双重调节, Glu-GABA 动态失衡可能进一步诱发失眠<sup>[11]</sup>。兴奋性神经递质 Glu 通过与其相应受体结合发挥神经兴奋作用<sup>[12]</sup>。GABA 神经元是脑内重要的抑制性神经元, 主要分布在大脑皮层、海马、下丘脑等部位。Glu 通过谷氨酸脱羧酶 (GAD65 和 GAD67) 合成 GABA, 并通过囊泡释放, 与突触后膜受体结合而发挥神经抑制作用<sup>[13]</sup>。脑内参与睡眠节律调控的 GABA 受体主要有 γ-氨基丁酸 A 型受体 (gamma-aminobutyric-acid type A receptor, GABA<sub>A</sub>R), 这是一类具有 5 次跨膜结构的配体门控离子通道蛋白, 由 α、β 和 γ 等 8 种亚基组成, 受 GABRA1、GABRA2、GABRB2、GABRB3 等 19 种基因编码<sup>[14,15]</sup>。有研究指出, 失眠大鼠海马和下丘脑中均出现 GABA<sub>A</sub>R 水平下调的情况, 通过上调 GABA<sub>A</sub>R 水平, 可加强大脑抑制性神经元活动和减弱兴奋性神经元的活动, 有利于缓解失眠症状<sup>[16,17]</sup>。

本研究通过戊巴比妥钠阈上剂量刺激诱导睡眠实验发现, 九味补血口服液 (2、4、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 能够缩短模型大鼠的睡眠潜伏期, 延长大鼠的睡眠时间, 提示九味补血口服液 (2、4、8 mL·kg<sup>-1</sup>) 能缓解大鼠的失眠症状。进一步对失眠大鼠海马和下丘脑组织进行检测, 显示 PCPA 可下调海马组织中 GAD67 酶活力并减少 GABA 合成, 升高下丘脑中 Glu 含量, 进而提高海马和下丘脑内 Glu/GABA 比值, 表明 PCPA 诱导了脑内神经递质水平失衡。九味补血口服液通过增强海马组织 GAD67 酶活力并升高海马中 GABA 含量, 下调下丘脑 Glu 含量, 降低 Glu/GABA 比值, 进而逆转海马和下丘脑中 GABA 和 Glu 动态紊乱, 维持兴奋性和抑制性神经递质的平衡。由于网络药理学分析显示九味补血口服液在 GABA 能信号通路上具有显著富集, 结合神经递质

GABA 含量在海马和下丘脑组织中含量变化, 本研究进一步选择在海马组织中对 GABA 能信号通路相关靶点表达水平进行验证。结果显示, 九味补血口服液可以有效上调 GABA 合成酶—谷氨酸脱羧酶 GAD67 蛋白、GABA<sub>A</sub>R 受体中  $\alpha$  亚基 (GABRA1)、 $\beta$  亚基 (GABRB2) 的蛋白和 mRNA 表达水平, 促进抑制性神经活动, 进而缓解失眠症状。该结果也较好地验证了网络药理学和分子对接的预测结果。

本研究还发现了九味补血口服液在对戊巴比妥钠诱导的睡眠时长、海马区 GABA 含量、GAD67 酶活力等干预作用表现出剂量非依赖性, 其原因可能与中药复方基于多成分、多作用靶点产生的药理多效性有关。复方中可能含有相互协同或者相互拮抗的多种成分, 当剂量叠加时, 这些成分所发挥的药效可能增加、维持或者抵消, 故而呈现出较为复杂的剂量与效应关系。

综上所述, 本研究通过网络药理学分析、分子对接结合体内研究的手段, 初步阐明了九味补血口服液通过增强 GAD67 活力及其介导的 GABA 的合成, 维持脑内 GABA 和 Glu 的动态平衡, 并通过上调 GABA<sub>A</sub>R 表达, 促进抑制性神经活动, 缓解大鼠失眠症状。该研究将有助于充实九味补血口服液治疗失眠的相关研究, 为九味补血口服液的临床应用提供更多实验依据。

**作者贡献:** 韦洁负责论文撰写; 蓝晓东、蒙珍、彭富全负责成分分析; 韦洁、李冬梅、何俊慧负责网络药理学分析及分子对接; 韦洁、李冬梅、何俊慧、韦冬梅、李懿负责动物实验; 韦冬梅、李懿负责分子学实验; 韦桂宁、黄若干提供课题资金资助及研究思路指导。

**利益冲突:** 所有作者声明不存在任何与本稿件相关的利益冲突。

## References

- [1] Jiang JX, Li N, Zhao LR, et al. Advances in research on mechanism of Chinese medicine for preventing and treating insomnia [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2022, 24: 178-181.
- [2] Zhou L, Ruan CY, Zhou XL, et al. The correlation between sleep duration, sleep quality and cardiovascular disease risk factors in elderly [J]. *Chin J Gen Pract* (中华全科医学), 2020, 18: 1035-1039.
- [3] Zhang FY, Li J, Zhou Y, et al. Review for sedative and hypnotic mechanism of sedative traditional Chinese medicine and relative active components on neurotransmitters [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2016, 41: 4320-4327.
- [4] Guangxi Baiyunshan Yingkang Pharmaceutical Ltd. Quality control method of Jiu Wei Bu Xue Oral Liquid: CN, 101015614 [P]. 2007-08-15.
- [5] Zhong RX, Ding ZH, Yang YN, et al. Study on the pharmacodynamic material basis and mechanisms of Ju-Hong Tan-Ke liquid for the treatment of "phlegm, cough, and asthma" based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2020, 55: 2134-2144.
- [6] 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.
- [7] Liu JX, Li JH, Du CH, et al. Metabonomic study of biochemical changes in serum of PCPA-induced insomnia rats after treatment with Suanzaoren Decoction [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2022, 47: 1632-1641.
- [8] Liu C, Huan HZ, Zhao HQ, et al. Effects of compound Chaijin Jieyu tablets on expression of GABA receptor in brain regions of depressive insomnia rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2021, 37: 724-730.
- [9] Yang SY, Lu ZX, Lv FX, et al. Colorimetric determination of GABA in GAD activity assay [J]. *Food Sci* (食品科学), 2006, 27: 205-209.
- [10] Hsin KY, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e83922.
- [11] Lin BQ. Study on the Mechanism and Treatment of Insomnia with Liver Qi Stagnation Syndrome with Traditional Chinese Medicine based on GABA Energy Conduction System (基于 GABA 能传导系统探讨失眠肝气郁滞证的相关机制及中药干预作用研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2018.
- [12] Zhao RY. Mechanism of Zhi-Zi-Hou-Pu Decoction in Treating Insomnia (栀子厚朴汤治疗失眠的作用及机制研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [13] Pehrson AL, Sanchez C. Altered  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmission in major depressive disorder: a critical review of the supporting evidence and the influence of serotonergic antidepressants [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 603-624.
- [14] Ghit A, Assal D, Al-Shami AS, et al. GABA<sub>A</sub> receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2021, 19: 123.
- [15] Zhu S, Noviello CM, Teng J, et al. Structure of a human synaptic GABAA receptor [J]. *Nature*, 2018, 559: 67-72.
- [16] Li XR. Effects of "Shugan Tiaoshen" Acupuncture Method on Expressions of 5-HT<sub>1A</sub>R, 2AR in Hippocampus and GABA<sub>A</sub>R- $\alpha$ 1 in Hypothalamus of Sleep Deprived Rats ("疏肝调神"针法对失眠大鼠海马 5-HT<sub>1A</sub>R、2AR 和下丘脑 GABA<sub>A</sub>R- $\alpha$ 1 表达的影响) [D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2021.
- [17] Wang M, Li N, Jing S, et al. Schisandrin B exerts hypnotic effects in PCPA-treated rats by increasing hypothalamic 5-HT and  $\gamma$ -aminobutyric acid levels [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20: 142.