

基于网络药理学及分子对接技术探讨柏子养心丸治疗失眠症的作用机制

马贝贝¹, 田颖颖², 杨海润¹, 王婷婷¹, 张志聪¹, 杨硕¹, 曹欣垚¹, 左泽平^{1*}, 王志斌^{1*}

1. 北京同仁堂股份有限公司科学研究所, 北京 100079

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 采用网络药理学方法及分子对接技术探讨柏子养心丸治疗失眠症的潜在分子机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库收集柏子养心丸的主要化学成分, 经 ADME 筛选活性化合物并获取其作用靶点; 搜索 GeneCards、OMIM、PharmGKB、TTD、DrugBank 数据库归并失眠症相关疾病基因; 使用 R 语言程序对药物与疾病靶点取交集并上传至 STRING 平台构建蛋白相互作用 (PPI) 网络, 应用 Cytoscape 软件进一步判别其核心模块; 基于 R 语言平台对交集靶点进行基因本体 (GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析; 利用 Cytoscape 软件构筑“柏子养心丸活性成分-失眠症基因”网络, 并使用 CytoNCA 工具分析其关键药效组分与核心靶点; 运用 AutoDock 套件进行网络关键成分与靶点的分子对接验证, 并追溯 PPI 核心模块与其关联成分实行潜在成分与靶标的二次挖掘。**结果** 共筛选出槲皮素、山柰酚、木犀草素、黄芩素、柚皮素、β-谷甾醇、豆甾醇、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇、7-甲基-2-甲基异黄酮等柏子养心丸的有效成分, 治疗失眠症的作用靶点为前列腺素内过氧化物酶 2 (PTGS2)、雌激素受体 1 (ESR1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARG)、环加氧酶 1 (PTGS1) 等, 各靶点对应成分的对接活性较强。生物学通路主要涉及神经活性配体-受体相互作用通路、神经退行性变-多种疾病通路、脂质和动脉粥样硬化通路等。**结论** 从多角度全方位阐明柏子养心丸以“多成分、多靶点、多途径”的模式干预失眠症的潜在机制, 可为其质量标准完善和机制深入考察夯实基础。

关键词: 柏子养心丸; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 山柰酚; 木犀草素; 丝裂原激活的蛋白激酶; CXC 型趋化因子配体 8

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)08-1898-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.08.013

To study the mechanism of Baizi Yangxin Pills in treatment of insomnia based on network pharmacology and molecular docking technology

MA Bei-bei¹, TIAN Ying-ying², YANG Hai-run¹, WANG Ting-ting¹, ZHANG Zhi-cong¹, YANG Shuo¹, CAO Xin-yao¹, ZUO Ze-ping¹, WANG Zhi-bin¹

1. Research Institute of Beijing Tongrentang Co., Ltd., Beijing 100079, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Baizi Yangxin Pills in treatment of insomnia based on network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** To collect the primary chemical components of the Baizi Yangxin Pills through the TCMSP database, and screen the target by ADME. GeneCards, OMIM, PharmGKB, TTD, and DrugBank databases were searched and utilized to collate insomnia-related disease genes. R language program was applied to take the intersection of drug and disease targets and then uploaded to STRING platform to construct PPI network, and Cytoscape software was adopted to further discriminate its core modules. GO function and KEGG pathway enrichment analysis of intersectional targets were performed based on the R language interface. Cytoscape system was implemented to build up the network of “active components of Baizi Yangxin Pills - insomnia genes”, and CytoNCA tool was used to diagnose its key ingredients and core targets. AutoDock suites were adopted to carry out molecular docking validation of network critical components and targets, and the PPI core modules were traced back to their linked ingredients to conduct

收稿日期: 2023-05-26

基金项目: 国家科技重大专项 (民口) 课题 (2018ZX09301-011-003)

作者简介: 马贝贝, 男, 硕士, 研究方向为中药神经药理学。E-mail: bucm3679@163.com

*通信作者: 左泽平, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药生物活性测定。E-mail: zepingzuo@126.com

王志斌, 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药复方药理学。E-mail: wangzhibin4804@126.com

secondary mining of potential compositions and targets. **Results** The effective components of the Baizi Yangxin Pills, such as quercetin, kaempferol, luteolin, baicalin, naringenin, β -sitosterol, stigmaterol, 7-O-methylisomucronulatol, 7-methoxy-2-methyl isoflavone were selected. The therapeutic targets of insomnia are PTGS2, ESR1, PPARG, PTGS1, etc. Each target has strong docking activity with the corresponding components. Biological pathways mainly involve neuroactive ligand-receptor interaction pathways, neurodegeneration - multiple disease pathways, lipid and atherosclerotic pathways, etc. **Conclusion** This study elucidates the potential mechanism of Baizi Yangxin Pills intervention in insomnia with the mode of “multi-component, multi-target and multi-pathway” from multiple perspectives, which can lay a solid foundation for the improvement of its quality standards and in-depth investigation of its mechanism.

Key words: Baizi Yangxin Pills; network pharmacology; molecular docking; quercetin; kaempferol; luteolin; MAPK3; CXCL8

睡眠作为一种与人类健康息息相关的重要生理活动,有益于神经系统的能量储存与恢复,辅助机体学习记忆行为的顺利完成^[1]。近年来失眠症已成为临床最为常见的睡眠障碍^[2],持续的睡眠启动与维持困难导致的睡眠质量和时间无法满足日间需求的主观体验使大部分患者长期遭受焦虑、头痛、间歇性遗忘等症状的困扰^[3],并时刻暴露于罹患抑郁、心脏病、高血压、肥胖的风险之下^[4]。据世界卫生组织报告,全球约 1/3 的普通人群患有持久性睡眠障碍,约有 50%个体一生中均会经历失眠症状^[5]。现今医学界常用的失眠症治疗药物主要包括苯二氮草类、三环类抗抑郁药及褪黑素等,虽可发挥诱导催眠效果,但频繁使用会引发呼吸抑制、肾功能损害、反弹性失眠及戒断反应等,一些药物如氯硝西泮和格鲁米特甚至会导致认知功能丧失^[6]。中医药作为一种备受推崇的补充与替代医学手段可为失眠症医治提供可靠的选择方案。

柏子养心丸作为一类传承久远、应用广泛、普遍认可的中医经典名方,首载于明代医家彭用光所著的《体仁汇编》中,而后在《古今医统大全》《景岳全书》及《汤头歌诀》等诸典籍中多有出现,现今被收录于《全国中药成药处方集》《中华人民共和国药典》2020 年版一部及《国家基本药物目录》中。柏子养心丸全方具有补气、养血、安神之功,适用于心血亏损、怔忡惊悸、失眠健忘、盗汗多梦等症候,临床多用于治疗心脾两虚型失眠、慢性焦虑症及心律失常等。据报道,柏子养心丸可明显延长戊巴比妥干预小鼠的睡眠时间,增加其睡眠动物数(入睡率)^[7]。此外,柏子养心丸联合参芪五味子片、归脾汤及穴位针刺等治疗各种失眠症疗效均显著^[8]。但目前国内外学术界尚未有柏子养心丸作用机制研究的相关报道,且其质量标志物鲜有探讨,这将严重阻碍其质量标准建立与临床应用推广。

网络药理学是一种源于系统生物学、多重药理

学和分子网络的新方法^[9-10],“网络靶点”作为其核心概念可从生物网络角度分析中药方剂的药效物质基础,运用现代生物信息学技术指导中药质量标志物的发现,剖析多组分药物在生物体内的作用机理,从分子水平整体阐释疾病、人类生物系统和药物靶标之间的复杂关系^[11],这正与中医药“多靶点、多途径调控”及“整体辨证论治”的理论观念相一致,从而成为全面、系统解析中药复方作用机制的强大工具,由此被广泛应用于各类中医药经典方剂的有效成分确定、潜在靶点识别及干预通路挖掘。分子对接是一种基于计算机智能模拟工具预测分子与蛋白质之间的相互作用、结合模式及亲和力的药物辅助设计和筛选技术,其结果准确,成本低廉,已被逐渐用于中药方剂的活性成分评价研究。因此,本研究通过整合网络药理学方法与分子对接技术对柏子养心丸的活性成分、调控靶标及作用机制进行多层次、多维度的全面探索,旨在明确其作用靶点,确认其质量标志物,为下一步的功效通路精准定位及质量评价体系构建提供科学参考。

1 资料与方法

1.1 柏子养心丸的活性成分筛选及靶点收集

通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索柏子养心丸整方中柏子仁、党参、黄芪、川芎、当归、茯苓、远志、酸枣仁、肉桂、五味子、半夏、甘草、朱砂 13 味药材的化学成分,以生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 及类药性(DL) ≥ 0.18 为界定值筛选活性化合物,并搜集其调控靶点,而后利用 Uniprot 数据库对所有靶点基因进行 ID 名称规范。

1.2 失眠症的治疗靶点收集

以“insomnia”“dyssomnia”“sleep disorder”等与失眠症定义相关的专业术语为关键词,在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>, Relevance score 值 ≥ 1)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)

org/)、PharmGKB 数据库 (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 检索失眠症关联调控基因,同时进入 DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com/>) 搜寻并整理用于失眠症治疗的临床一线药品作用靶点作为重要补充,合并以上 5 个数据库的靶点信息,剔除重复基因后即失眠症的治疗靶点库。

1.3 柏子养心丸活性成分-失眠症治疗靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络构建与分析

以柏子养心丸活性成分的调控靶点及失眠症的治疗靶点库为基础,使用 R 语言程序包“venn”将二者取交集并绘制韦恩图,并进一步将交集靶点上传到 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 进行蛋白相互作用分析,设定“Organisms”为“Homo sapiens”,设定“minimum required interaction score”为 0.9,生成的 PPI 网络图导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中,利用 CytoNCA 工具计算各网络节点的连接度 (degree)、介度 (betweenness) 及紧密度 (closeness) 等参数,以 R 语言程序对每个参数进行中位值过滤循环,寻找 PPI 网络中的核心靶点,并基于此构建 PPI 核心作用模块。

1.4 柏子养心丸治疗失眠症作用靶点功能与通路的富集分析

使用 R 语言中的“BiocManager”平台加载“org.Hs.eg.db”程序包,并将以上所述的柏子养心丸活性成分作用靶点与失眠症治疗靶点库的交集靶点基因 symbol 名称转换为 entrezID,而后再采用 R 语言“clusterProfiler”“enrichplot”“ggplot2”“pathview”等程序包对交集基因进行基因本体 (GO) 功能富集与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析,设置 P 值过滤条件为 0.05,选取 GO 富集结果中生物过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 3 个模块各前 10 个基因功能集合及 KEGG 富集结果中前 30 条通路以条形图 (barplot) 和气泡图 (bubble) 的形式进行可视化。

1.5 柏子养心丸活性成分-治疗失眠症作用靶点网络图的构建

使用 Cytoscape 3.9.1 软件将柏子养心丸治疗失眠症的作用靶点 (交集靶点) 与其关联的活性化合物的相互关系绘制成网络图,并采用内置的 CytoNCA 工具分析整个网络中成分与靶点各个代表节点的度、介度及紧密度,根据网络拓扑学参数探讨柏子养心丸治疗失眠症的关键药效成分与核

心作用靶点。

1.6 柏子养心丸关键成分与核心靶点的分子对接验证

将分析得到的柏子养心丸关键药效成分导入 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行检索,下载其 2D 结构后使用 ChemOffice 套件中的 Chem3D 软件转换为 3D 结构;同时,结合 Uniprot 数据库查询到的核心靶点的“Entry Identifier”进一步搜索 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载其三维空间结构,使用开源 Pymol 软件删除其中的水分子与有机小分子,而后导入 AutoDockTools 1.5.7 软件进行加氢、加电荷操作,设置 Gridbox 参数确定对接范围,最后采用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行分子对接验证,根据配体-蛋白对接模型的最低结合能判断成分与靶点的亲和能力,使用 Pymol 软件将对接结果可视化。

1.7 柏子养心丸关键活性成分与潜在靶点的二次挖掘

为了避免在网络药理学生物信息筛选过程中出现潜在活性成分与调控靶点的遗漏现象,本研究再次以 PPI 核心作用模块中的关键靶点为源头,反向追溯其关联的柏子养心丸化学成分,并使用 Pymol、AutoDockTools 1.5.7、AutoDock Vina 1.1.2 系列软件对这些化合物与核心靶点进行分子对接考察,根据结合能的大小确定潜在的活性成分与作用靶点,以期更全面阐释柏子养心丸治疗失眠症的作用途径,补充完善其质量标志物。

2 结果

2.1 柏子养心丸活性成分与靶点的筛选

利用 TCMSP 数据库初步提取并经 ADME 筛选后共得到柏子仁化学成分 5 种,半夏化学成分 13 种,川芎化学成分 7 种,当归化学成分 2 种,党参化学成分 21 种,茯苓化学成分 15 种,甘草化学成分 92 种,黄芪化学成分 20 种,酸枣仁化学成分 9 种,合并后共得到 167 个活性化合物,见表 1。进一步收集其相关作用靶点,合并后共得 264 个调控基因。

2.2 失眠症疾病相关靶点的获取

从 GeneCards 数据库收集疾病靶点 323 个,从 TTD 数据库收集疾病靶点 26 个,同时结合 OMIM 与 PharmGKB 数据库搜集结果补充相关靶点,最后,从 DrugBank 数据库收集用于失眠症治疗的临床一线药物治疗靶点 178 个。合并以上 5 个数据库

表 1 柏子养心丸中的活性成分

Table 1 Active ingredients in Baizi Yangxin Pills

MOL ID	名称	OB/%	DL	来源
MOL000006	木犀草素	36.16	0.25	党参
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	黄芪、甘草
MOL000211	白桦脂酸	55.38	0.78	酸枣仁、黄芪、甘草
MOL000239	华良姜素	50.83	0.29	黄芪、甘草
MOL000275	栓菌酸	38.71	0.80	茯苓
MOL000276	去氢茯苓酸	35.11	0.81	茯苓
MOL000279	啤酒甾醇	37.96	0.77	茯苓
MOL000283	过氧麦角甾醇	40.36	0.81	茯苓
MOL000289	茯苓酸	33.63	0.81	茯苓
MOL000290	茯苓新酸 A	30.61	0.76	茯苓
MOL000291	茯苓新酸 B	30.52	0.75	茯苓
MOL000292	茯苓新酸 C	38.15	0.75	茯苓
MOL000296	常春藤皂苷元	36.91	0.75	茯苓、黄芪
MOL000300	去氢齿孔酸	44.17	0.83	茯苓
MOL000354	异鼠李素	49.60	0.31	黄芪、甘草
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75	半夏、当归
MOL000378	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇	74.69	0.30	黄芪
MOL000379	黄芪紫檀烷苷	36.74	0.92	黄芪
MOL000387	联苯双酯	31.10	0.67	黄芪
MOL000392	刺芒柄花素	69.67	0.21	黄芪、甘草
MOL000417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	黄芪、甘草
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	黄芪、甘草
MOL000433	叶酸	68.96	0.71	川芎、黄芪
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	半夏、当归、党参
MOL000497	甘草查尔酮 A	40.79	0.29	甘草
MOL000519	松柏苷	31.11	0.32	半夏
MOL001484	高丽槐素	75.18	0.54	甘草
MOL001521	美洲茶酸	33.41	0.77	酸枣仁
MOL001522	乌药碱	42.35	0.24	酸枣仁
MOL001525	胡萝卜苷	36.91	0.75	酸枣仁
MOL001527	酸枣仁皂苷 A	34.96	0.62	酸枣仁
MOL001539	酸枣仁环肽	67.28	0.79	酸枣仁
MOL001542	当药黄素	31.83	0.75	酸枣仁
MOL001546	酸李碱	41.53	0.55	酸枣仁
MOL002135	杨梅酮	40.60	0.51	川芎
MOL002140	川芎咪	65.95	0.27	川芎、党参
MOL002151	洋川芎醌	47.66	0.24	川芎
MOL002157	川芎萜呋内酯	42.31	0.71	川芎
MOL002311	新甘草酚	90.78	0.67	甘草
MOL002565	美迪紫檀素	49.22	0.34	甘草
MOL002670	卡维丁	35.64	0.81	半夏
MOL002714	黄芩素	33.52	0.21	半夏
MOL002776	黄芩苷	40.12	0.75	半夏
MOL003578	环阿屯醇	38.69	0.78	半夏
MOL003656	黄羽扇豆魏特酮	51.64	0.37	甘草
MOL003896	7-甲氧基-2-甲基异黄酮	42.56	0.20	党参、甘草
MOL004328	柚皮素	59.29	0.21	甘草
MOL004492	菊黄素	38.72	0.58	党参
MOL004814	异槲皮酚	31.94	0.42	甘草
MOL004827	半甘草异黄酮 B	48.78	0.55	甘草
MOL004833	菜豆异黄素	32.01	0.45	甘草
MOL004835	刺果甘草查耳酮	61.60	0.19	甘草
MOL004855	甘草利酮	63.58	0.47	甘草
MOL004860	甘草苷 E	32.89	0.27	甘草
MOL004879	格里西轮	52.61	0.47	甘草
MOL004882	甘草香豆酮	33.21	0.36	甘草

续表 1

MOL ID	名称	OB/%	DL	来源
MOL004885	甘草异黄酮	52.47	0.54	甘草
MOL004891	新翼果苷	80.30	0.73	甘草
MOL004903	甘草苷	65.69	0.74	甘草
MOL004904	甘草吡喃香豆素	80.36	0.65	甘草
MOL004907	光甘草轮	61.07	0.35	甘草
MOL004908	光甘草定	53.25	0.47	甘草
MOL004910	光甘草宁	52.90	0.31	甘草
MOL004911	光甘草素	46.27	0.44	甘草
MOL004912	光果甘草酮	52.51	0.50	甘草
MOL004915	黄甘草异黄酮 A	43.28	0.37	甘草
MOL004917	黄甘草苷	37.25	0.79	甘草
MOL004924	美迪紫檀素葡萄糖苷	40.99	0.95	甘草
MOL004935	乌拉尔宁	34.88	0.41	甘草
MOL004948	异甘草酚	44.70	0.84	甘草
MOL004949	异甘草黄酮醇	45.17	0.42	甘草
MOL004957	异刺芒柄花素	38.37	0.21	甘草
MOL004980	胀果香豆素甲	39.71	0.33	甘草
MOL005000	甘草宁 G	60.44	0.39	甘草
MOL005001	甘草宁 H	50.10	0.78	甘草
MOL005008	甘草黄酮醇 A	41.28	0.60	甘草
MOL005016	芳香膜菊素	49.95	0.30	甘草
MOL005020	去氢粗毛甘草素 C	53.82	0.37	甘草
MOL005321	灌木远志酮 A	65.90	0.34	党参
MOL006554	蒲公英赛醇	38.40	0.77	党参
MOL008400	黄豆黄素	50.48	0.24	党参
MOL008411	11-羟基兰金断肠草碱	40.00	0.66	党参

的搜集结果，剔除重复基因，共计得到失眠症干预靶点 475 个，各数据库靶点的收集合并情况见图 1。

2.3 柏子养心丸作用靶点 - 失眠症基因 PPI 网络分析

使用 R 语言平台将收集到的柏子养心丸调控靶点与失眠症基因取交集，绘制韦恩图，见图 2，获得二者的共同靶点 69 个。将共同靶点上传到 STRING 平台绘制 PPI 网络，见图 3。为了更准确剖析柏子养心丸治疗失眠症的潜在分子机制，将

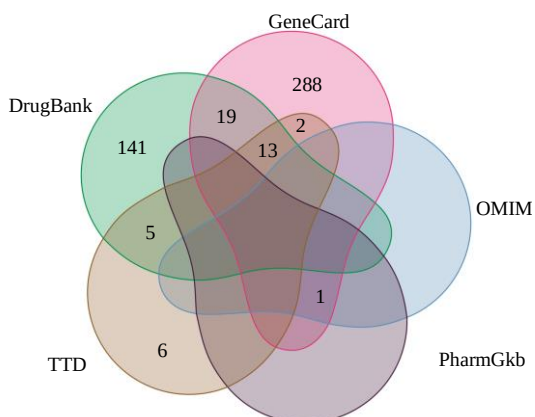


图 1 失眠症相关靶点

Fig. 1 Related targets of insomnia

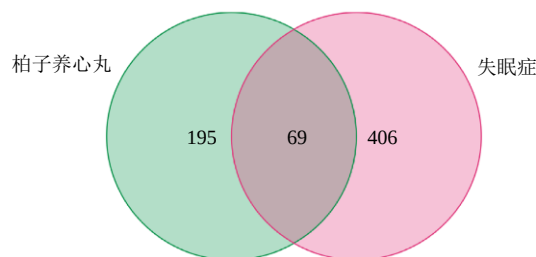


图 2 柏子养心丸作用靶点与失眠症基因交集韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of the intersection between the targets of Baizi Yangxin Pills and insomnia genes

PPI 网络导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行节点区分与区域可视化，采用内置的 CytoNCA 工具计算各节点的 degree、betweenness、closeness 参数，以 R 语言程序对每个参数进行中位值过滤循环，发现 PPI 网络中的核心靶点包括丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK3)、CXC 型趋化因子配体 8 (CXCL8)、细胞色素 P450 3A4 酶 (CYP3A4)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、细胞色素 P450 家族成员 1A1 (CYP1A1) 等，PPI 核心互作模块见图 4。

2.4 GO 功能与 KEGG 通路的富集分析

使用 R 语言平台对柏子养心丸治疗失眠症的作用靶点进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析，结果

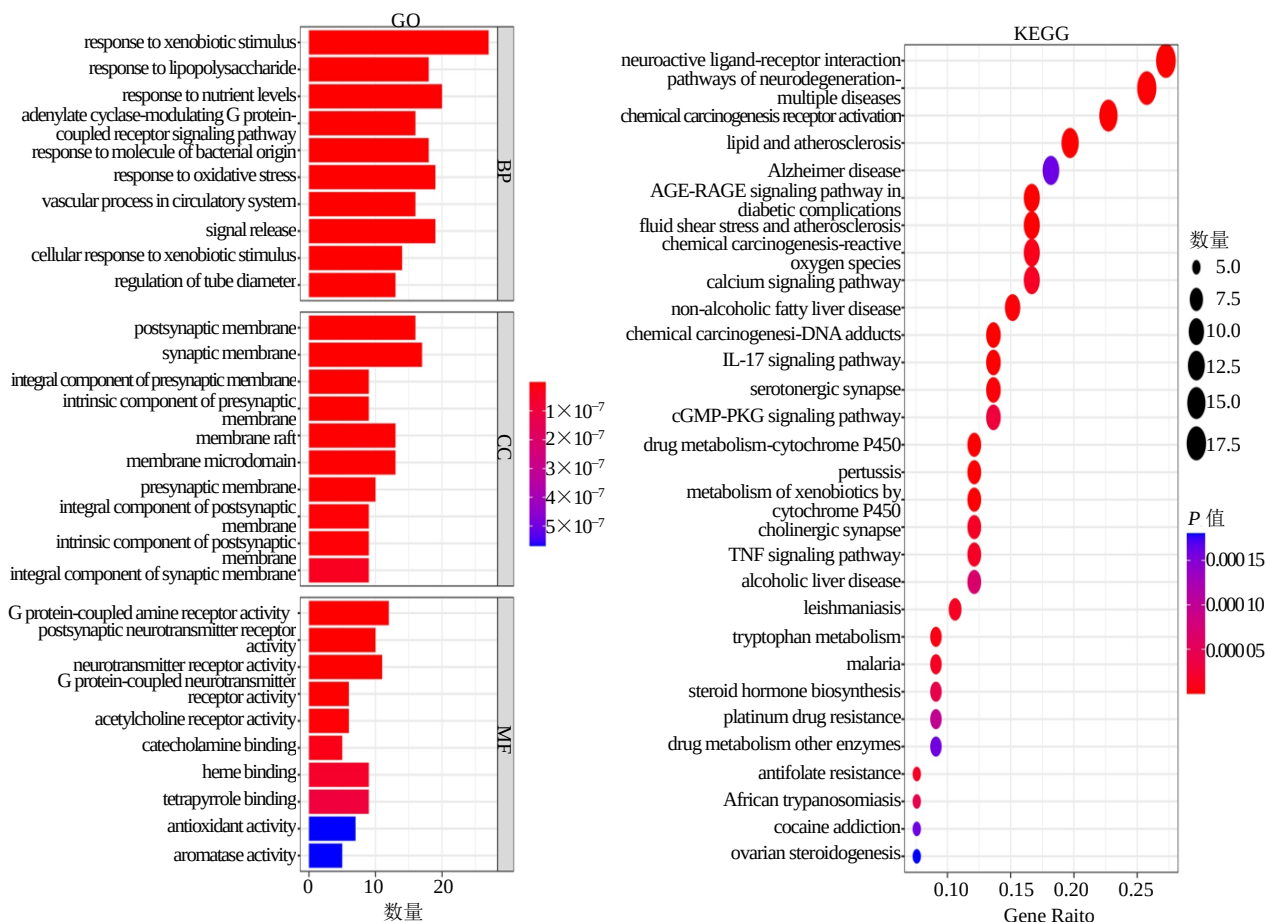


图 5 柏子养心丸调控失眠症作用靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析

Fig. 5 GO enrichment analysis and KEGG pathway of the action targets of Baizi Yangxin Pills in regulating insomnia

行分子对接验证,以结合能的大小评价活性分子与靶点蛋白结合能力,结合能 ≤ -7 kcal/mol (1 cal=4.4 J)时表明二者有较强的结合力。结果显示,7个关键药效成分与9个核心靶点均有较好的结合活性,进一步说明柏子养心丸的关键活性成分对失眠症的核心调控靶点有较强的亲和力,由此在失眠症的干预过程中发挥“多成分-多靶点-多途径”的治疗效果。“成分-靶点”的分子对接结果见表4,活性成分与靶点蛋白结合形成的代表性稳定构象见图7。

2.7 潜在活性化合物与作用靶点的二次挖掘

为了更全面、准确、深度剖析柏子养心丸的质量标志物与体内作用机制,本研究使用PPI网络核心互作模块中的关键靶点反向追溯其关联的活性化合物,而后进一步施行分子对接结合力考察,以多层次挖掘潜在的药效成分与治疗靶点。结果显示,除柚皮素、槲皮素、山柰酚外,木犀草素与黄芩素亦为柏子养心丸潜在的活性组分,见表5。且

根据“成分-靶点”的结合力可判别出MAPK3、CXCL8、CYP19A1、CYP3A4、CYP1A1、HIF1A、VEGFA为柏子养心丸治疗失眠症的潜在调控靶标,由此对接生成的稳定分子构象见图8。

3 讨论

失眠症在中医古籍中多以“不寐”“不瞑”“不得眠”“不得卧”等症候词出现^[12]。《景岳全书》有云:“神安则寐,神不安则不寐,劳倦思虑太过者,必致血液耗亡,神魂无主,所以不眠。”《素问》又云:“胃不和,则卧不安。”《类经》曾指出:“凡人之寤寐,由于卫气,卫气者,昼行于阳,则动而为寤;夜行于阴,则静而为寐。”又言:“思虑伤脾,脾血亏虚,经年不寐。”《灵枢》记载曰:“卫气不得入于阴,常留于阳,故目不瞑。”《太平圣惠方》述曰:“夫胆虚不得睡者,是五脏虚邪之气干淫于心。心有忧悲,伏气在胆,所以睡卧不安。心多惊惧,精神怯弱,盖心气忧伤,肝胆虚冷,致不得睡也。”由此可见,失眠症在中医理论下解析的病因多在于

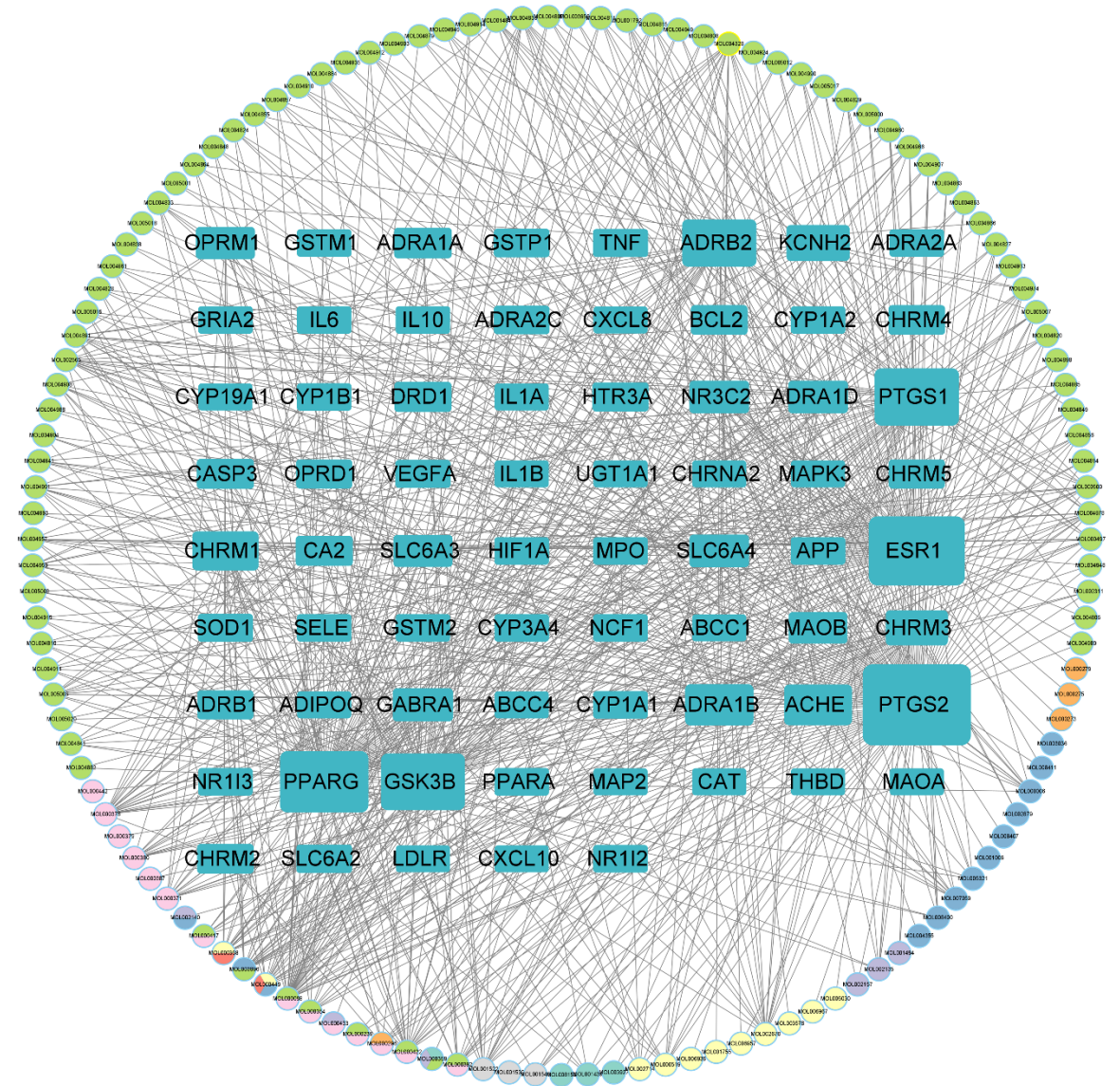


图 6 柏子养心丸活性成分 - 失眠症调控靶点网络图

Fig. 6 Network image of the active ingredients in Baizi Yangxin Pills and insomnia regulatory targets

表 2 柏子养心丸调控失眠症的关键药效成分

Table 2 Key medicinal ingredients of Baizi Yangxin Pills for regulating insomnia				
MOL ID	化合物名称	度	介度	紧密度
MOL000098	槲皮素	34	5 672.932 405	0.467 625 899
MOL000422	山柰酚	22	2 112.199 533	0.440 180 587
MOL000378	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇	22	975.063 412	0.448 275 862
MOL003896	7-甲氧基-2-甲基异黄酮	19	611.606 273	0.442 176 871
MOL000358	β-谷甾醇	18	1 224.493 780	0.432 372 506
MOL000449	豆甾醇	16	3 833.517 867	0.446 224 256
MOL004328	柚皮素	16	3 145.014 935	0.432 372 506

营卫失和、情志内伤、饮食不调、脏腑损伤、气血亏虚、心神失养等^[13]。柏子养心丸全方共 13 味药材，其中柏子仁养心安神，党参健脾益肺、养血生津；黄芪益气补中；川芎活血行气；当归补血活血；

茯苓健脾宁心；远志安神益智、交通心肾；酸枣仁养心补肝、宁心安神；肉桂补火助阳、温经通脉；五味子益气生津、补肾宁心；半夏曲燥湿和胃化痰；朱砂清心镇惊、安神明目；炙甘草补脾和胃、益气

表 3 柏子养心丸调控失眠症的核心作用靶点
Table 3 Core targets of the Baizi Yangxin Pills in regulating insomnia

靶点	度	介度	紧密度
PTGS2	108	14 401.875 450 0	0.647 840 532
ESR1	84	4 269.766 691 0	0.460 992 908
PPARG	69	3 589.135 464 0	0.476 772 616
PTGS1	61	5 038.363 351 0	0.493 670 886
GSK3B	60	1 748.991 530 0	0.395 537 525
ADRB2	41	1 701.246 971 0	0.428 571 429
ADRA1B	29	631.185 212 3	0.387 673 956
ACHE	28	666.198 888 9	0.383 104 126
CHRM1	25	506.140 981 7	0.381 604 697

复脉又可调和诸药，全方共奏补气、养血、安神之功，且与“不寐”之病机逐一相符，因而成为医治失眠症的经典名方。

通过网络药理学分析、拓扑学参数计算及潜在活性成分的二次挖掘，槲皮素、山柰酚、木犀草素、黄芩素、柚皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇、7-O-甲基异微凸剑叶莎醇及 7-甲氧基-2-甲基异黄酮被确定为柏子养心丸的有效成分，各个成分在筛选过程中即可追溯相应原药材归属，且与多个核心靶点具有良好的对接活性，来源方剂配伍理论牢靠，为柏子养心丸专有且可进行定性定量检测，符合刘昌孝院士关

表 4 柏子养心丸活性成分与核心靶点的结合能力
Table 4 Binding ability of the active ingredients of Baizi Yangxin Pills to the core targets

靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)						
	槲皮素	山柰酚	7-O-甲基异微凸剑叶莎醇	7-甲氧基-2-甲基异黄酮	β-谷甾醇	豆甾醇	柚皮素
PTGS2	-9.6	-9.2	-7.5	-9.0	-9.2	-9.8	-9.1
ESR1	-8.4	-9.2	-6.7	-8.6	-7.8	-8.1	-9.6
PPARG	-8.6	-8.3	-7.6	-8.4	-9.9	-10.1	-8.0
PTGS1	-8.9	-8.8	-8.0	-8.1	-7.3	-7.7	-8.7
GSK3B	-10.5	-8.4	-7.2	-8.1	-9.1	-9.4	-8.9
ADRB2	-9.3	-9.3	-7.8	-9.6	-8.8	-7.6	-9.8
ADRA1B	-8.8	-8.5	-7.2	-8.0	-7.7	-8.7	-7.9
AChE	-8.3	-7.9	-7.9	-7.2	-7.8	-8.5	-7.6
CHRM1	-8.1	-8.0	-7.0	-7.7	-8.3	-9.3	-7.9

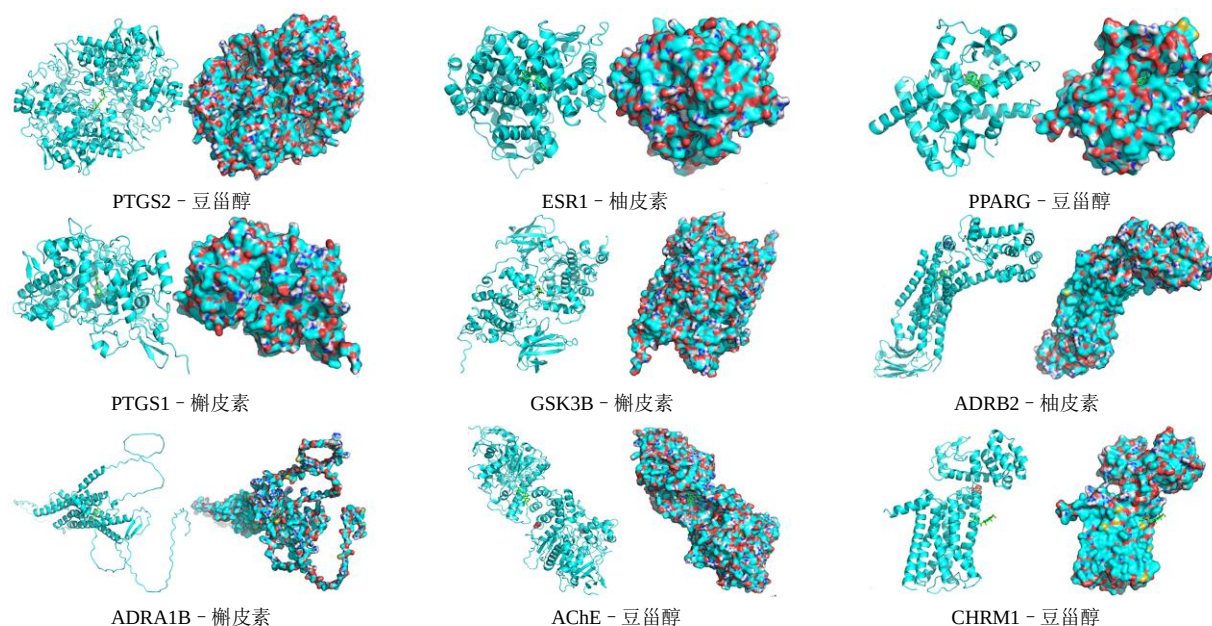


图 7 柏子养心丸关键药效成分与核心靶点的代表性对接构象

Fig. 7 Representative docking conformations of key pharmacodynamic components of Baizi Yangxin Pills and core targets

于中药 Q-Maker “有效性” “特有性” “质量传递与溯源” “可测性” “配伍环境” 所阐释的科学内涵^[14]。据报道，槲皮素可明显缩短失眠模型小鼠

的睡眠潜伏期，延长睡眠时间，可使白细胞介素-6 (IL-6)、 γ -氨基丁酸 (GABA) 和 γ -氨基丁酸受体亚基 $\alpha 1$ (GABRA1) 的 mRNA 表达显著增加^[15]。此

表 5 PPI 网络核心靶点与关联成分的结合能力
Table 5 Binding capacity of core targets of PPI network with associated components

靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	柚皮素	槲皮素	木犀草素	山柰酚	黄芩素
MAPK3	-8.6	—	—	—	—
IL-1B	—	-7.2	—	—	—
CXCL8	—	-7.6	—	—	—
IL-10	—	-6.7	-6.7	—	—
TNF	—	-6.9	-7.3	-6.8	—
IL-6	—	-6.9	-7.2	—	—
CYP19A1	-8.5	—	—	—	—
CYP3A4	—	-10.8	—	-10.7	—
CYP1A1	—	-8.9	—	-8.5	—
HIF1A	—	-8.0	—	—	-7.7
VEGFA	—	-7.5	-7.8	—	-7.7

—代表靶点与成分无关联

— indicates that the target is not associated with the component

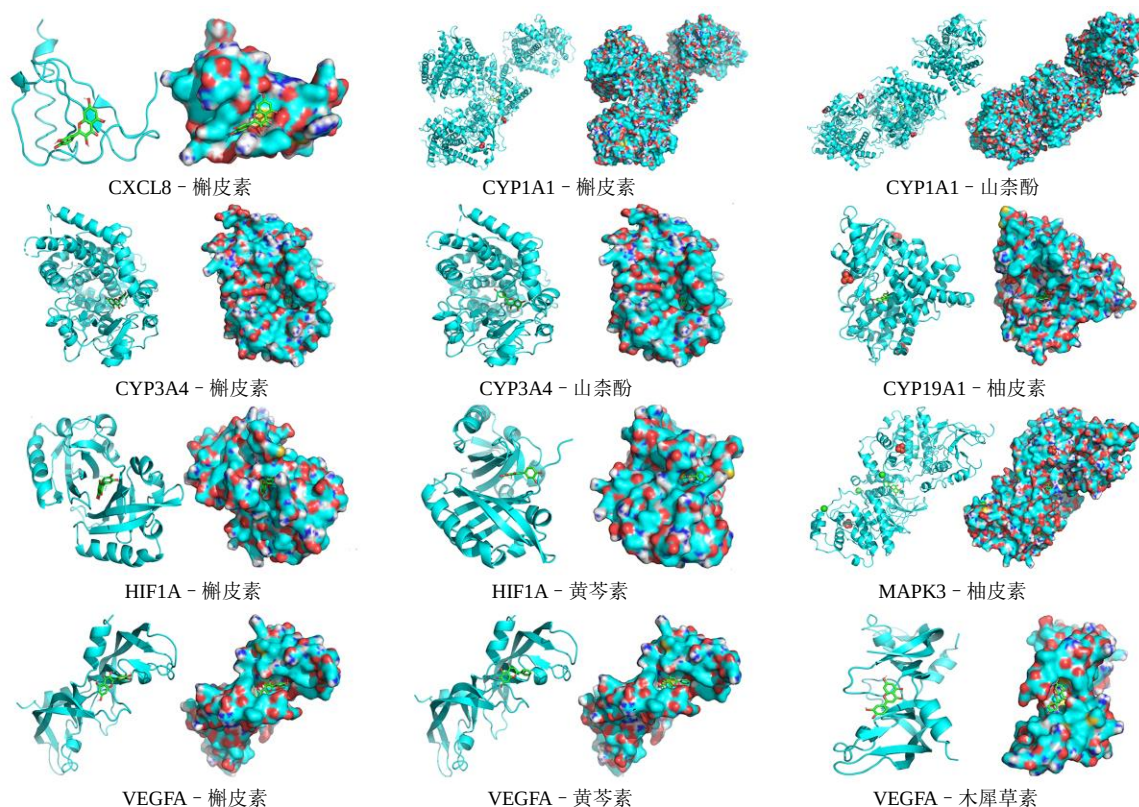


图 8 PPI 网络核心靶点与其关联成分对接的分子构象

Fig. 8 Molecular conformations of the core targets of the PPI network docked with their associated components

达,促进细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2 和 α CaMK II 的磷酸化^[22]。豆甾醇可显著升高小鼠下丘脑 γ -氨基丁酸水平,降低谷氨酸含量,镇静催眠作用优良。以上研究报告为基于“物质-功能”理论确定柏子养心丸的质量标志物提供了充足的科学依据。

通过“活性成分-调控靶点”网络与 PPI 网络的构建分析,PTGS2、ESR1、PPARG、PTGS1、

外,槲皮素还可通过 CYP1A 途径抑制褪黑素在大鼠肝微粒体中的代谢消除^[16]。山柰酚通过调节 GABA 能系统可增强戊巴比妥诱导的小鼠睡眠行为^[17]。木犀草素能降低睡眠剥夺大鼠海马区的热休克蛋白(HSP)90 表达,增加 HSP70 表达,以剂量相关方式恢复睡眠剥夺所致的空间记忆障碍^[18],可通过与腺苷 A1 及 A2A 受体结合发挥催眠作用^[19]。将黄芩素注射到大鼠的中枢神经系统可延长乙酰诱导的睡眠持续时间,且具有良好的抗焦虑和镇静作用^[20]。柚皮素可改善睡眠剥夺并发症大鼠的记忆和情绪,减少脑组织细胞凋亡,且可有效缓解依法韦仑所诱导的睡眠障碍^[21]。 β -谷甾醇可延长睡眠诱导与睡眠干扰模型小鼠的睡眠时间,降低睡眠潜伏期,增加脑组织内的褪黑素受体 1 和 2 的 mRNA 表

GSK3 β 、ADRB2、ADRA1B、AChE、CHRM1 等基因被确定为柏子养心丸治疗失眠症的核心调控靶点,MAPK3、CXCL8、CYP19A1、CYP3A4、CYP1A1、HIF1A 及 VEGFA 为柏子养心丸的潜在作用靶标。据报道,在急性异相睡眠剥夺过程中,小鼠前额叶皮层富集在 TNF 信号通路中的关键基因 PTGS2 上调^[23]。ESR1 基因在调节失眠对围绝经

期和绝经后妇女认知功能的影响中发挥着重要作用^[24],其甲基化比例增加与睡眠障碍显著相关^[25]。PPARG 基因与中国汉族人群中阻塞性睡眠呼吸暂停综合征的发病率存在明显关联^[26]。PTGS1 为皮层及海马组织中的主要炎症反应介质,可介导炎症反应参与睡眠调节^[27]。GSK-3 β 参与情绪与昼夜节律调节,是干预睡眠-觉醒周期和昼夜运动行为的重要基因^[28]。在阿尔茨海默病的斑马鱼模型中,短长度的 A β 寡聚体可通过 ADRB2 受体诱导急性觉醒,进而导致动物的睡眠活动紊乱^[29]。对大鼠进行异相睡眠剥夺 72 h 后,脑组织中的 AChE 活性显著地增加^[30],而通过修复胆碱能系统功能(抑制 AChE 表达)可治疗失眠^[31]。CHRM1 被认为是调节快速眼动睡眠的一个至关重要基因^[32]。MAPK3 是 MAP 激酶信号转导通路的重要组成部分,其磷酸化与睡眠持续时间密切相关,且睡眠剥夺会减少海马体中 MAPK3 的表达损害记忆^[33]。CXCL8 在重度阻塞性睡眠呼吸暂停综合征患者中表达异常,并导致免疫反应与细胞因子-受体信号通路的改变^[34]。CYP19A1 是中枢神经系统中一种不可或缺的酶,可催化雌激素合成,而雌激素在维持大脑稳态和功能方面起着重要作用^[35]。CYP1A1 的活性升高可导致苯巴比妥诱导小鼠的睡眠时间减少^[36]。HIF1A 是褪黑素合成相关信息传递过程中一种重要的昼夜节律基因^[37],可介导睡眠过程中间歇性缺氧发生^[38]。VEGFA 是一种与血管生成和神经发生相关的神经营养因子,可影响突触可塑性,并参与睡眠周期调节^[39]。由此可知,经多维分析所挖掘的柏子养心丸作用靶点均与失眠的分子机制关联紧密。

本研究充分整合网络药理学方法与分子对接技术,对失眠医治古方柏子养心丸的核心活性成分与主要作用靶标进行了多层次反复挖掘与精准识别,确认了 9 个有效成分、9 个关键作用靶点与 7 个潜在作用靶点。经过文献检索与信息收集,各个质量标志物与作用靶点均与睡眠障碍息息相关。通过 GO 功能与 KEGG 富集分析发现,柏子养心丸调控失眠涉及的生物学过程如外源性刺激的反应、对养分水平的响应、氧化应激反应等。因此,未来针对柏子养心丸的研发除却推进质控方法建立与质量标准体系优化外,还应结合多种心脑血管疾病与代谢类疾病整体研判疗效,以此为基础进行靶点验证、通路定位、基因网络绘制、体内小分子或大分子代谢扰动等干预分子机制的深入探索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel J M. Clues to the functions of mammalian sleep [J]. *Nature*, 2005, 437(7063): 1264-1271.
- [2] Wu Q, Chen X, Gan G, *et al*. Visual analysis and evaluation of clinical research on traditional Chinese medicine compounds in treating insomnia of Yin deficiency syndrome [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 298: 115669.
- [3] Lin S S, Feng Y, Hu L F, *et al*. Jiaotaiwan increased GABA level in brain and serum, improved sleep via increasing NREM sleep and REM sleep, and its component identification [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114866.
- [4] Cunningham D, Junge M F, Fernando A T. Insomnia: Prevalence, consequences and effective treatment [J]. *Med J Aust*, 2013, 199(8): S36-S40.
- [5] Taylor D J, Lichstein K L, Durrence H H. Insomnia as a health risk factor [J]. *Behav Sleep Med*, 2003, 1(4): 227-247.
- [6] Lin T F, Qiu J N, Zhang S, *et al*. Screening out the anti-insomnia components from *Prunella vulgaris* L. based on plasma pharmacchemistry combined with pharmacodynamic experiments and UPLC-MS/MS analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 279: 114373.
- [7] 齐凤琴, 李滨, 刘石磊, 等. 柏子养心丸镇静催眠作用实验研究 [J]. *黑龙江医药*, 2006(2): 95.
- [8] 梅全喜, 郑依玲, 金艳, 等. 金世元教授谈安神类中成药的合理应用 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(8): 2000-2003.
- [9] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [10] Hopkins A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [11] Boezio B, Audouze K, Ducrot P, *et al*. Network-based approaches in pharmacology [J]. *Mol Inform*, 2017, 36(10): 1700048.
- [12] 杨鹏, 刘志勇, 吴怡曼, 等. 失眠发病机制的理论浅析 [J]. *江西中医药*, 2019, 50(8): 14-16.
- [13] 黄冰羽, 侯玉铎, 张文超. 失眠障碍的中西医诊疗现状探析 [J]. *临床医药实践*, 2022, 31(7): 535-538.
- [14] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径 [J]. *中草药*, 2018, 49(1): 1-13.
- [15] 刘毅, 李菲, 贾跃进, 等. 基于网络药理学探讨酸枣仁汤治疗睡眠障碍的作用机制 [J]. *山西中医药大学学报*, 2021, 22(5): 351-357.
- [16] Jana S, Rastogi H. Effects of caffeic acid and quercetin on *in vitro* permeability, metabolism and *in vivo* pharmacokinetics of melatonin in rats: Potential for herb-drug interaction [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2017, 42(5): 781-791.

- [17] Liu W L, Wu B F, Shang J H, *et al.* *Moringa oleifera* seed ethanol extract and its active component kaempferol potentiate pentobarbital-induced sleeping behaviours in mice via a GABAergic mechanism [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 810-824.
- [18] Rahimpour P, Nasehi M, Zarrindast M R, *et al.* Dose-dependent manner of luteolin in the modulation of spatial memory with respect to the hippocampal level of HSP70 and HSP90 in sleep-deprived rats [J]. *Gene*, 2023, 852: 147046.
- [19] Kim T H, Custodio R J, Cheong J H, *et al.* Sleep promoting effect of luteolin in mice via adenosine A1 and A2A receptors [J]. *Biomol Ther* (Seoul), 2019, 27(6): 584-590.
- [20] de Carvalho R S M, Duarte F S, de Lima T C M. Involvement of GABAergic non-benzodiazepine sites in the anxiolytic-like and sedative effects of the flavonoid baicalein in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(1): 75-82.
- [21] Olufunke D, Edidiong A, Oluwatomisin F, *et al.* Therapeutic activities of naringenin on efavirenz-induced sleep-like disorder in the midbrain of white albino mice [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(11): 1462-1470.
- [22] Kim R E, Mabunga D F, Kim H J, *et al.* Novel therapeutics for treating sleep disorders: New perspectives on *Maydis stigma* [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14612.
- [23] Liu H, Huang X, Li Y, *et al.* TNF signaling pathway-mediated microglial activation in the PFC underlies acute paradoxical sleep deprivation-induced anxiety-like behaviors in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2022, 100: 254-266.
- [24] Bojar I, Raczkiewicz D, Gujski M, *et al.* Oestrogen receptor α gene polymorphisms, insomnia, and cognitive functions in perimenopausal and postmenopausal women in non-manual employment [J]. *Arch Med Sci*, 2020, 18(5): 1318-1328.
- [25] Gardini E S, Fiacco S, Mernone L, *et al.* Sleep and methylation of estrogen receptor genes, ESR1 and GPER, in healthy middle-aged and older women: Findings from the women 40+ healthy aging study [J]. *Nat Sci Sleep*, 2020, 12: 525-536.
- [26] Jiao X, Yang S, Yang Y, *et al.* Targeted sequencing analysis of PPARG identifies a risk variant associated with obstructive sleep apnea in Chinese Han subjects [J]. *Sleep Breath*, 2020, 24(1): 167-174.
- [27] Michele S, Salluzzo M G, Calogero A E, *et al.* Association study of COX-2 (PTGS2)-765 G/C promoter polymorphism by pyrosequencing in Sicilian patients with Alzheimer's disease [J]. *Arch Med Sci*, 2014, 10(6): 1235-1238.
- [28] Ahnaou A, Drinkenburg W. Disruption of glycogen synthase kinase-3-beta activity leads to abnormalities in physiological measures in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 221(1): 246-252.
- [29] Özcan G G, Lim S, LA Leighton P, *et al.* Sleep is bi-directionally modified by amyloid beta oligomers [J]. *Elife*, 2020, 9: e53995.
- [30] Todorović J, Dinčić M, Krstić D Z, *et al.* The simultaneous action of acute paradoxical sleep deprivation and hypothyroidism modulates synaptosomal ATPases and acetylcholinesterase activities in rat brain [J]. *Sleep Med*, 2023, 105: 14-20.
- [31] Srichomphu P, Wattanathorn J, Thukham-Mee W, *et al.* Anxiety, insomnia, and memory impairment in metabolic syndrome rats are alleviated by the novel functional ingredients from *Anacardium occidentale* [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(11): 2203.
- [32] Niwa Y, Kanda G N, Yamada R G, *et al.* Muscarinic acetylcholine receptors Chrm1 and Chrm3 are essential for REM sleep [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(9): 2231-2247.
- [33] He X, Du X, Chen J. Study on the molecular mechanism of Guipi decoction against sleep deprivation based on integrated pharmacology analysis and gene expression profiling [J]. *Acta Neurobiol Exp* (Wars), 2022, 82(4): 409-423.
- [34] Li H Y, Tsai M S, Huang C G, *et al.* Alterations in Alzheimer's disease-associated gene expression in severe obstructive sleep apnea patients [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(9): 1361.
- [35] Ghosh D, Egbuta C, Kanyo J E, *et al.* Phosphorylation of human placental aromatase CYP19A1 [J]. *Biochem J*, 2019, 476(21): 3313-3331.
- [36] Chan W H, Liao J W, Chou C P, *et al.* Induction of CYP1A1, 2B, 2E1 and 3A in rat liver by organochlorine pesticide dicofol [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 190(2): 150-155.
- [37] Li T, Liu Z, Wang Y, *et al.* Multiplexed visualization method to explore complete targeting regulatory relationships among circadian genes for insomnia treatment [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 877802.
- [38] Carney DPhil R S E. Neurocognitive and synaptic potentiation deficits are mitigated by inhibition of HIF1a signaling following intermittent hypoxia in rodents [J]. *eNeuro*, 2020, 7(6): ENEURO.0449-20.2020.
- [39] Wang L, Wang P, Chen Y, *et al.* Utilizing network pharmacology and experimental validation to explore the potential molecular mechanisms of BanXia-YiYiRen in treating insomnia [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 3148-3170.

[责任编辑 高源]