

基于网络药理学与分子对接技术探讨三七方治疗失眠症的作用机制

张志腾, 史万忠, 元唯安*, 朱蕾蕾*

上海中医药大学附属曙光医院 临床研究中心, 上海 201203

摘要: **目的** 利用网络药理学和分子对接技术, 系统探讨名中医经验方三七方治疗失眠的潜在作用机制。 **方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 筛选三七方的药物活性成分及其潜在靶点, 并利用 GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库筛选失眠相关靶点, 结合韦恩图分析获取共有靶点; 使用 Cytoscape 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 筛选三七方的核心靶点蛋白, 并绘制药物-成分-靶点网络图, 确定主要活性成分。基于共有靶点, 进行了基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 揭示三七方治疗失眠的关键通路。为进一步验证分析结果, 采用了 Autodock 软件进行分子对接验证。 **结果** 三七方中的 4 味中药 (酸枣仁、鸡血藤、小蓟、三七) 共筛选得到 37 个活性成分和 233 个潜在靶点, 与失眠症共有靶点 82 个。根据 PPI 网络分析和药物-成分-靶点网络筛选出 29 个活性成分和 80 个失眠相关靶点, 其中关键靶点包括白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、细胞肿瘤抗原 P53 (TP53) 和 RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1)。核心活性成分为槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇和木犀草素。KEGG 及 GO 富集分析共得到 77 条信号通路, 主要涉及炎症反应、免疫应答、血脂代谢、动脉粥样硬化、活性氧产生及凋亡信号通路调控等分子机制。分子对接结果表明, 核心成分与核心靶点具有较强的结合稳定性, 可通过调控多个关键靶点发挥作用。 **结论** 三七方通过多成分、多靶点、多通路协同起效发挥对失眠症治疗作用, 其中抗炎作用及其可能的分子机制值得关注与进一步研究。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 三七方; 失眠; 作用靶点; 分子机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)02-0428-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.02.016

Anti-insomnia effect of Sanqifang Formula based on network pharmacology and molecular docking

ZHANG Zhiteng, SHI Wanzhong, YUAN Weian, ZHU Leilei

Clinical Research Unit, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of Sanqifang Formula in the treatment of insomnia using network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The active ingredients of Sanqifang Formula and the potential targets were screened through the Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the insomnia related targets were screened by GeneCards, OMIM and TTD databases, and the common targets were obtained by Venn diagram analysis. Cytoscape software was used to construct the PPI network, screen the core target proteins of Sanqifang Formula, and draw the drug-component-target network diagram to determine the main active components. Based on the common targets, Gene Ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed to disclose the key pathways of the Sanqifang Formula in treating insomnia. For the purpose of further validating the analysis results, Autodock software was adopted for molecular docking verification. **Results** A total of 37 active ingredients and 233 potential targets were screened from four Chinese herbs (*Ziziphi Spinosa Semen*, *Spatholobus Suberectus Dunn*, *Herba Cirsii* and *Panax Notoginseng*), and 82 targets were shared with insomnia. According to PPI network analysis and drug-component-target network

收稿日期: 2024-08-23

基金项目: 上海市 2022 年度“科技创新行动计划”生物医药科技支撑专项项目 (22S21900800, 22S21900700); 国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函 (2022) 76 号); 国家中医药管理局 2022 年全国名老中医药专家传承工作室建设项目“蒋健全国名老中医药专家传承工作室” (国中医药人教函 (2022) 75 号); 国家中医药管理局中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者项目 (国中医药办人教函 (2019) 62 号); 上海市卫生和计划生育委员会上海市名老中医学术经验研究工作室建设项目 (SHGZS-2017024)

作者简介: 张志腾, 男, 硕士研究生, 主要从事中医内科与中药新药研究。E-mail: mrziteng123@126.com

***通信作者:** 元唯安, 男, 博士, 主任医师, 主要从事中医骨伤临床与中药新药临床研究。E-mail: weian_1980@163.com

朱蕾蕾, 女, 博士, 主任医师, 主要从事中医内科临床与中药新药临床研究。E-mail: zhuleilei1981@163.com

diagram, 29 active ingredients and 80 targets related to insomnia were screened. Among them, the key targets include interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β), cellular tumor antigen P53 (TP53) and RAC- α serine/threonine protein kinase (AKT1). The core active ingredients were quercetin, stigmasterol, β -sitosterol and luteolin. A total of 77 signaling pathways were obtained by KEGG and GO enrichment analysis, which were mainly involved in molecular mechanisms such as inflammatory response, immune response, lipid metabolism, atherosclerosis, reactive oxygen species production, and apoptosis signaling pathway regulation. Molecular docking results showed that the core components had strong binding stability to the core targets and could play a role by regulating multiple key targets. **Conclusion** Sanqifang Formula has synergistic effect on insomnia through multi-component, multi-target and multi-pathway, and its anti-inflammatory effect and possible molecular mechanism deserve attention and further study.

Key words: network pharmacology; molecular docking; Sanqifang Formula; insomnia; targets; molecular mechanism

失眠是一种常见的睡眠障碍,指尽管有适当的睡眠环境和睡眠机会,仍对睡眠质量或睡眠时间不满意,并影响到正常社会功能的一种主观体验。失眠的临床分型为短期失眠障碍(≤ 3 个月)及慢性失眠障碍(> 3 个月)。临床症状主要表现为入睡困难、睡眠维持困难如早醒、中途易醒等,并伴有疲乏、困倦、紧张、焦虑易怒等日间症状^[1]。失眠相关流行病学调查显示,成年人群失眠患病率在 35%~50%^[2],妇女、老年人和有社会经济困难的人更容易失眠。失眠通常为慢性疾病,其 5 年持续率为 40%^[3]。目前,常用治疗失眠的化学药物包括褪黑素及其受体激动剂、苯二氮草类和非苯二氮草类镇静剂、巴比妥类药物,以及具有镇静效果的抗抑郁药、抗精神病药和抗组胺药等。尽管上述药物对急性失眠的治疗已经起到了较好的效果,对于慢性失眠的管控中,其安全性、疗效的不稳定、用药成瘾性及耐受性限制了它们的使用^[4],显示出了目前临床一线化学药物治疗的局限性。中医药治疗失眠具有优势及新药研发的巨大潜力。

三七方是首届中医药传承与创新“百千万”人才工程岐黄学者、上海市名中医——蒋健教授结合民间效验方、现代药理研究成果,经临床反复摸索与验证,创制治疗失眠的经验方。该方由酸枣仁、鸡血藤、小蓟、三七组成,经多年临床应用,并通过 2 项随机对照研究证实治疗失眠有效^[5-6],在改善睡眠效率和延长睡眠时间方面,其效果显著优于安慰剂,同时也优于复方枣仁胶囊^[7],且安全性良好。三七为方中佐使药,用量最小,但起到画龙点睛的作用,故蒋健教授将其命名为“三七方”。三七方治疗失眠疗效肯定但作用机制不明,有必要进一步探索明确。

网络药理学是结合人工智能与大数据时代特点的跨学科新兴领域,聚焦于从系统层面和生物网

络整体视角,探讨药物与治疗目标之间的分子关联规律。该学科广泛应用于药物及中药活性成分地发现、整体作用机制的解析、药物组合和方剂配伍规律的研究等方面,不仅为中药复杂体系的研究提供了全新视角,还为临床合理用药和新药开发提供了重要的技术支持^[8]。分子对接技术作为一种药物辅助设计与筛选的手段,依托计算机智能模拟工具,精确预测分子与蛋白质间的相互作用、结合模式及其亲和力^[9-10],此技术不仅成果精确且具有良好的成本效益,近年来在中药方剂活性成分评估研究中应用日益广泛。本研究旨在通过联合应用网络药理学方法与分子对接技术,以期挖掘及预测三七方治疗失眠的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 三七方药物活性成分的筛选及相关靶点收集

通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://www.tcmsp-e.com>)分别输入三七方中 4 味中药名称,即酸枣仁、三七、鸡血藤、小蓟,搜索 4 味中药活性成分,通过设定口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 及类药性(DL) ≥ 0.18 的条件进行筛选^[11]。同时在 TCMSP 平台 Relate Targets 中直接收集三七方中 4 味药的相关靶点。

1.2 失眠相关靶点预测及药物-疾病共同靶点的获取

利用 Gene Cards (<https://www.genecards.org>)、OMIM (<https://omim.org>)以及 TTD (<http://db.idrblab.net/>) 3 个数据库^[12],以“Insomnia”为检索关键词,系统搜集与失眠相关的靶点信息,经过去重处理后,在 Uniprot 平台上将这些靶点转换为相应的基因名称。在 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 平台(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)上,将三七方的药物靶点与失眠相关靶点进行比对,提取二者的交集靶点,并通过绘制韦恩图直观

展示药物与疾病之间的共同靶点。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络分析

利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org>)，以“1.2”项筛选出的交集靶点构建靶点网络，物种设定为人类 (*Homo sapiens*)，并设置最高置信度为 > 0.7^[13]，随后，通过 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 网络进行分析，采用拓扑方法评估核心网络。根据“度值大于中位数的 2 倍”作为筛选标准，确定三七方发挥作用的关键靶点蛋白。

1.4 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

对核心靶点进行 GO 和 KEGG 通路富集分析，分析平台为 metascape 数据库 (www.metascape.org/)，对获得数据进行可视化分析，使用微生信平台^[14]使分析结果通过热图和气泡图的形式可视化，直观展示三七方治疗失眠可能的作用机制。将三七方-失眠的交集靶基因导入 Metascape 数据库进行分析，设定显著性水平为 $P < 0.01$ 。随后分别开展 GO 和 KEGG 通路富集分析，以挖掘相关基因在生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组分 (CC) 以及信号通路中的潜在作用和机制。

1.5 构建药物-成分-靶点网络图

基于 Cytoscape 3.9.1 软件，构建三七方的中药组成、活性成分及其作用靶点之间的相互作用网络图，并结合失眠相关靶点生成三七方与失眠相互作用的整合网络图。对生成的“药物-成分-靶点”网络进行分析与评估，采用“度值大于中位数的 2 倍”作为筛选标准，筛选出可能具有治疗失眠作用的关键活性成分。

1.6 核心靶点的分子对接模拟验证

采用 Autodock 1.5.7 软件，对“1.3”项中筛选的核心靶点与“1.5”项中确定的关键活性成分进行了分子对接模拟验证，并利用 Pymol 软件对对接结果进行三维可视化处理。这些核心靶点与关键活性成分的 3D 结构数据分别来源于 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 和 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)，确保数据的准确性和可靠性。

2 结果

2.1 三七方活性成分筛选结果

共收集到三七方 37 个活性成分，见表 1。去除重复靶点后共获得 233 个药物相关靶点。

表 1 三七方活性成分
Table 1 Active ingredients of Sanqifang Formula

编号	编码	化学成分	OB/%	DL	归属
A	MOL000358	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	36.91	0.75	三七、鸡血藤
B	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76	三七、小蓟、鸡血藤
C	MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28	三七、小蓟
JX1	MOL000296	蛇床素 (hederagenin)	36.91	0.75	鸡血藤
JX2	MOL000033	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78	鸡血藤
JX3	MOL000392	芒柄花素 (formononetin)	69.67	0.21	鸡血藤
JX4	MOL000417	毛蕊异黄酮苷 (calycosin)	47.75	0.24	鸡血藤
JX5	MOL000461	3,7-二羟基-6-甲氧基二氢黄酮醇 (3,7-dihydroxy-6-methoxy-dihydroflavonol)	43.80	0.26	鸡血藤
JX6	MOL000468	8-O-甲基雷氏草素 (8-O-methylreyusi)	70.32	0.27	鸡血藤
JX7	MOL000469	3-羟基斯的明-5-烯-7-酮 (3-hydroxystigmast-5-en-7-one)	40.93	0.78	鸡血藤
JX8	MOL000470	8-C-α-L-阿拉伯糖凝集素 (8-C-α-L-arabinosylluteolin)	35.54	0.66	鸡血藤
JX9	MOL000471	芦荟大黄素 (aloe-emodin)	83.38	0.24	鸡血藤
JX10	MOL000490	牵牛花色素 (petunidin)	30.05	0.31	鸡血藤
JX11	MOL000492	(+)-儿茶素 [(+)-catechin]	54.83	0.24	鸡血藤
JX12	MOL000493	菜油甾醇 (campesterol)	37.58	0.71	鸡血藤
JX13	MOL00497	甘草查尔酮 A (licochalcone A)	40.79	0.29	鸡血藤

表 1 (续)

编号	编码	化学成分	OB/%	DL	归属
JX14	MOL000500	维斯体素 (vestitol)	74.66	0.21	鸡血藤
JX15	MOL000501	密花豆细晶粒 (consume close grain)	68.12	0.27	鸡血藤
JX16	MOL000502	卡亚宁 (cajinin)	68.80	0.27	鸡血藤
JX17	MOL000503	苜猪酚 (medicagol)	57.49	0.60	鸡血藤
JX18	MOL000506	鹰爪豆碱 (lupinidine)	61.89	0.21	鸡血藤
JX19	MOL000507	胰靛黄素 (psi-baptigenin)	70.12	0.31	鸡血藤
JX20	MOL000006	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25	鸡血藤
XJ1	MOL001689	金合欢素 (acacetin)	34.97	0.24	小蓟
XJ2	MOL001790	蒙花苷 (linarin)	39.84	0.71	小蓟
XJ3	MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75	小蓟
SQ1	MOL001494	亚油酸乙酯 (mandenol)	42.00	0.19	三七
SQ2	MOL001792	食脂素 (DFV)	32.76	0.18	三七
SQ3	MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯 (diop)	43.59	0.39	三七
SQ4	MOL005344	人参皂苷 rh2 (ginsenoside rh2)	36.32	0.56	三七
SZ1	MOL001522	衡州乌药碱[(S)-coclaurine]	42.35	0.24	酸枣仁
SZ2	MOL001525	胡萝卜苷 (daucosterol)	36.91	0.75	酸枣仁
SZ3	MOL001532	植物甾醇 (phytosterol)	36.91	0.75	酸枣仁
SZ4	MOL001539	酸枣仁环肽 (sanjoinenine)	67.28	0.79	酸枣仁
SZ5	MOL001542	当药黄素 (swertisin)	31.83	0.75	酸枣仁
SZ6	MOL001546	酸李碱 (zizyphusine)	41.53	0.55	酸枣仁
SZ7	MOL000211	丁子香酚 (mairin)	55.38	0.78	酸枣仁

2.2 失眠相关靶点及药物-疾病共同靶点筛选

通过 GeneCards 数据库、在线人类孟德尔遗传数据库、TTD 数据库检索并以 relevance score>1 等条件^[15]筛选得到失眠症相关基因 3 263 个, 三七方药物靶点 233 个, 得到三七方-失眠共同靶点 82 个, 绘制韦恩图 (图 1)。

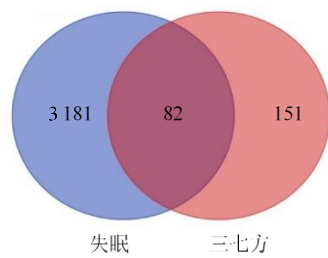


图 1 三七方-失眠靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of Sanqifang Formula and insomnia related targets

2.3 PPI 关系网络分析

将 82 个交集靶点输入 STRING 数据库中, 以最高置信度>0.7 的阈值筛选得到 PPI 网络的 TSV 格式文件, 保存后导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化, 进行 “network analyzer” 分析后选定度值作

为筛选条件, 通过筛选得到核心靶点, 度值越高表明该靶点越重要。共涉及 72 个节点, 413 条边, 见图 2。图中的节点表示靶蛋白, 边表示靶蛋白之间相互作用, 节点大小与颜色表示度值的大小。节点越大、颜色越深对应的度值越大。列举度值大于 2 倍中位数的靶点蛋白 17 个, 见表 2, 其中度值≥30 的 5 个高度值靶点蛋白可作为三七方治疗失眠的核心靶点, 分别为白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素-1β (IL-1β)、细胞肿瘤抗原 p53 (TP53)、RAC-α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1)。

2.4 GO 及 KEGG 通路富集分析

将三七方-失眠交集靶基因投射到 Metascape 数据库进行分析, 设置 $P<0.01$, 分别进行 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析, GO 分析所得结果见图 3, 共得到的 GO 条目 57 个, 包括 20 个 BP, 17 个 CC, 20 个 MF。其中 BP 主要涉及对无机物的反应 (response to inorganic substance)、对外来刺激的反应 (response to xenobiotic stimulus)、对低氧水平的反应 (response to decreased oxygen levels) 凋亡信号通路的调控 (regulation of apoptotic signaling pathway)、MAPK 级联正调控 (positive regulation

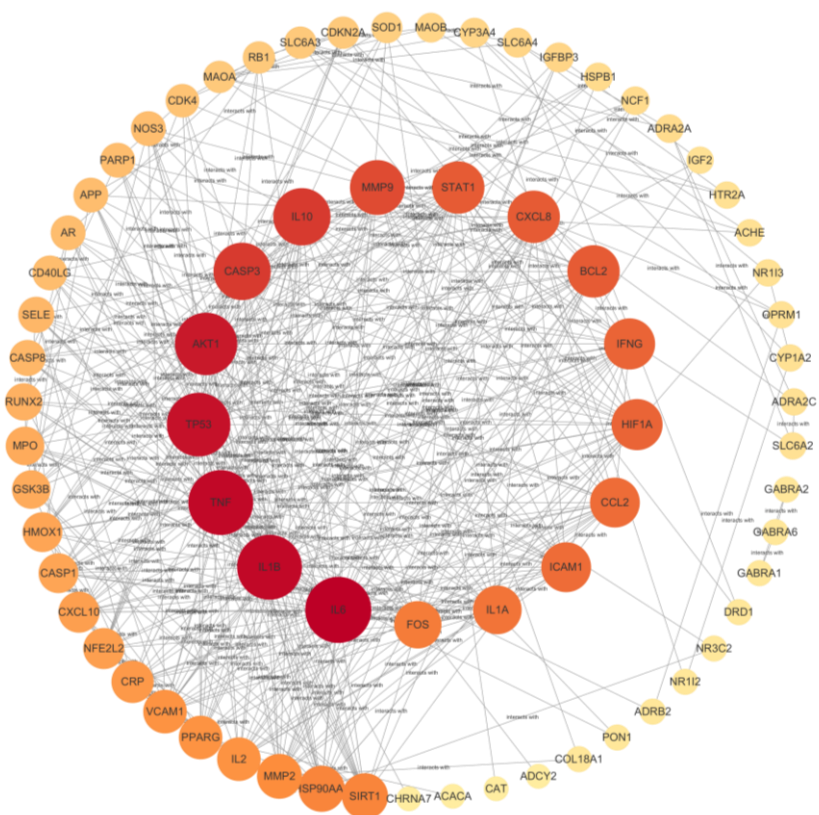


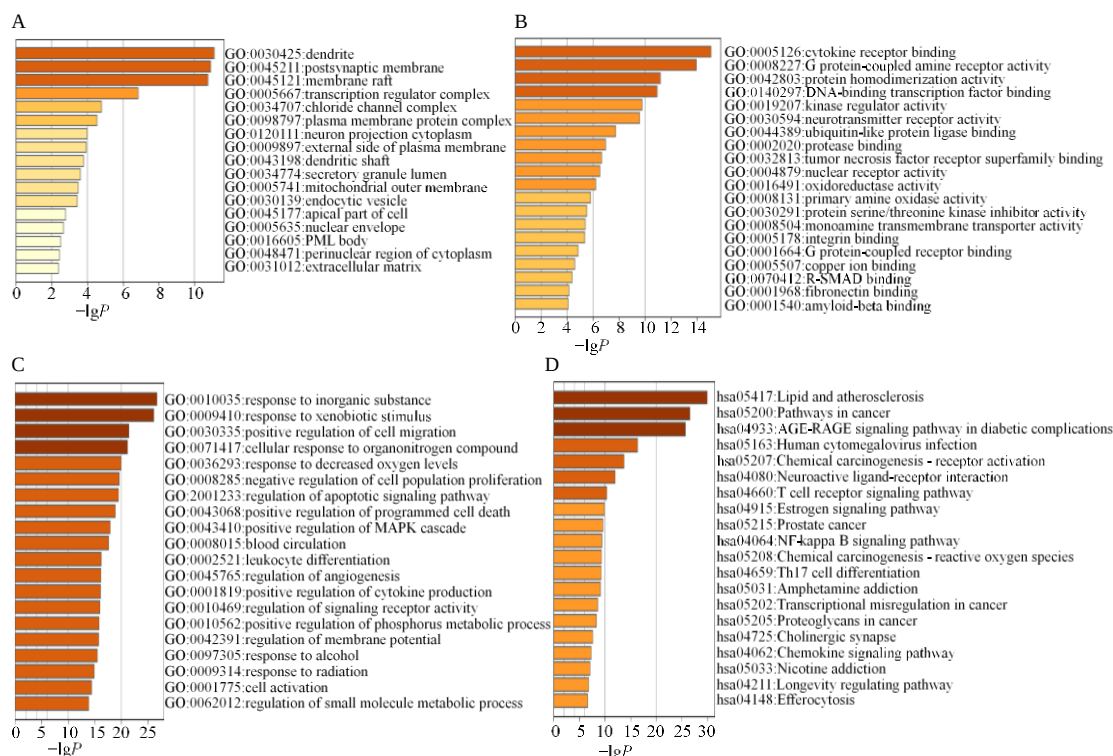
图 2 三七方-失眠靶蛋白的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of insomnia target proteins in Sanqifang Formula

表 2 三七方-失眠靶点蛋白网络的拓扑学性质

Table 2 Topological properties of Sanqifang Formula and insomnia target proteins network

靶点	名称	度值	中介中心度	接近中心性
IL6	白细胞介素-6 (interleukin-6)	34	0.052 430 459	0.531 250 000
TNF	肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor)	33	0.080 941 145	0.531 250 000
IL1β	白细胞介素-1β (interleukin-1β)	33	0.067 918 943	0.552 845 528
TP53	细胞肿瘤抗原 p53 (cellular tumor antigen p53)	32	0.104 153 634	0.548 387 097
AKT1	RAC-α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (RAC-α serine/threonine-protein kinase)	31	0.078 442 885	0.515 151 515
CASP3	半胱天冬蛋白酶-3 (caspase-3)	27	0.051 191 056	0.523 076 923
IL10	白细胞介素-10 (interleukin-10)	27	0.015 329 612	0.485 714 286
MMP9	基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9)	25	0.032 515 449	0.478 873 239
CXCL8	白细胞介素-8 (interleukin-8)	23	0.133 930 904	0.492 753 623
STAT1	信号转导子和转录激活子 1 (signal transducer and activator of transcription 1-α/β)	23	0.016 562 818	0.485 714 286
BCL2	B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2)	23	0.029 283 593	0.465 753 425
IFNG	丙型肝炎干扰素 (interferon gamma)	22	0.006 473 269	0.465 753 425
HIF1A	缺氧诱导因子 1-α (hypoxia-inducible factor 1-α)	22	0.017 667 611	0.482 269 504
CCL2	C-C 基序趋化因子 2 (C-C motif chemokine 2)	21	0.006 337 515	0.450 331 126
ICAM1	细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1)	21	0.007 111 730	0.456 375 839
IL1A	白细胞介素-1α (interleukin-1α)	20	0.003 893 156	0.441 558 442
FOS	FOS 原癌基因 (Fos proto-oncogene)	19	0.004 474 022	0.450 331 126



A-GO CC; B-GO MF; C-GO BP; D-KEGG.

图 3 GO 注释与 KEGG 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

of MAPK cascade)、血液循环 (blood circulation) 等, CC 主要集中于树突 (dendrite)、膜筏 (membrane raft)、突触后膜 (postsynaptic membrane) 等, MF 主要涉及细胞因子受体结合 (cytokine receptor binding)、G 蛋白偶联胺受体活性 (G protein-coupled amine receptor activity)、蛋白同型二聚化活性 (protein homodimerization activity)、DNA 结合转录因子结合 (DNA-binding transcription factor binding) 等, 提示三七方可能通过调节细胞对外来刺激的反应、适应低氧环境、调控凋亡信号通路、改善血液循环等方式发挥治疗失眠症的作用, 作用靶点主要分布在细胞的树突和突触后膜等部位。

根据 KEGG 通路富集分析共富集到 20 条与失眠相关的通路 (图 4), 其中靶基因显著富集于癌症的途径 (pathways in cancer)、血脂和动脉粥样硬化 (lipid and atherosclerosis)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、人巨细胞病毒感染 (human cytomegalovirus infection)、化学致癌—受体活化 (chemical carcinogenesis-receptor activation)、神经活性配体-受体相互作用 (neuroactive ligand-receptor

interaction)、T 细胞受体信号通路 (T cell receptor signaling pathway)、NF- κ B 信号通路 (NF- κ B signaling pathway) 等。

2.5 三七方药物-成分-靶点网络模型的构建及分析

通过 Cytoscape 3.9.1 软件进行计算分析, 得到三七方药物-活性成分-失眠疾病靶点可视化网络图 (122 个节点, 359 条边), 涉及 4 味中药, 37 个活性成分, 80 个交集靶点, 分别用圆形、正六边形和菱形表示 (图 5)。其中 JX2、JX5 等 8 个成分与失眠靶点无交集, 考虑可能不直接参与失眠的治疗机制故予去除, 剩余 29 个活性成分网络分析后度值排前 10 的活性成分见表 3, 其中度值 ≥ 30 的 4 个高度值活性成分可作为三七方的核心活性成分, 分别为槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇、木犀草素。

2.6 分子对接模拟验证

根据“2.3”项中筛选出三七方治疗失眠的核心靶点 IL6、TNF、IL1 β 、TP53、AKT1, 并在“1.6”项中 Protein Data Bank 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 中根据 resolution 值筛选出适宜用于对接的蛋白结构, 包括 IL6 (1ALU)、TNF (7KPB)、IL-1 β (4DEP)、TP53 (5O1H)、AKT1 (3O96) 作为分子对接靶点蛋白^[6]。

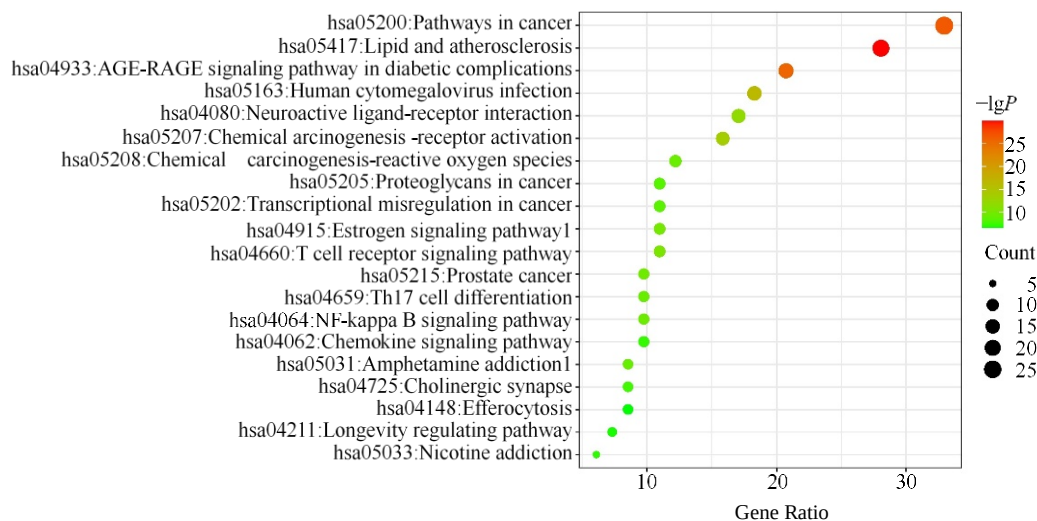


图 4 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis

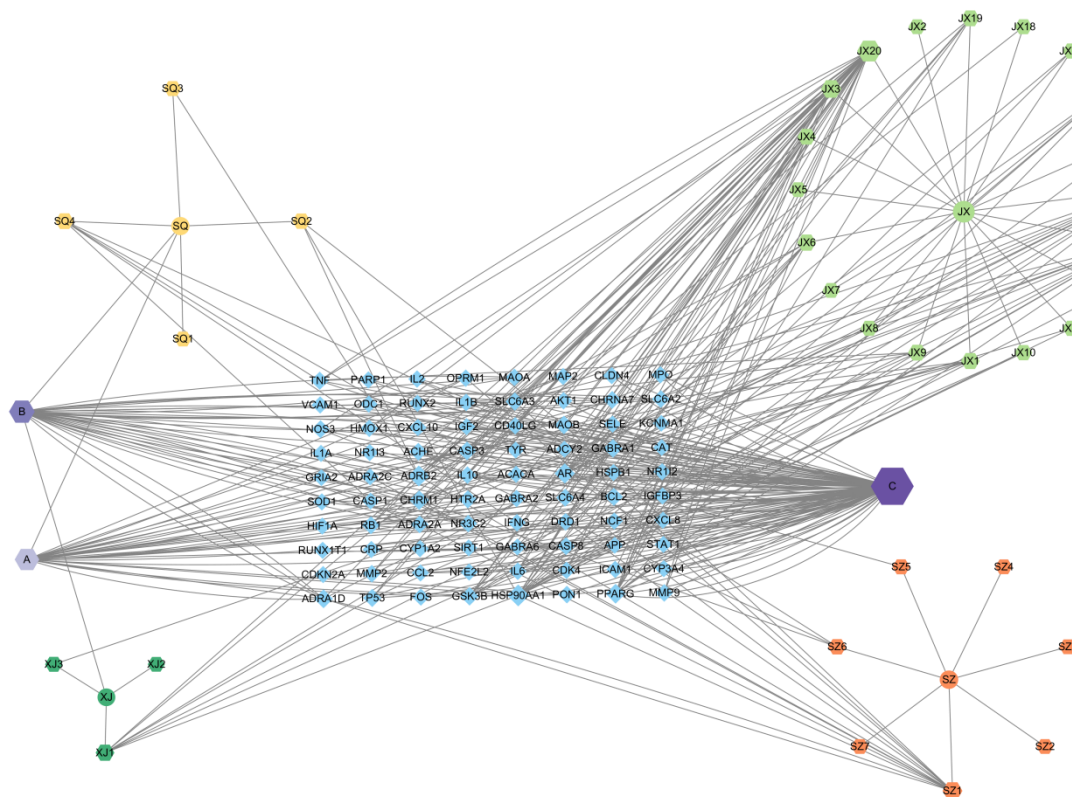


图 5 药物-成分-靶点网络图

Fig. 5 Drug-ingredient-target network diagram

利用 Pymol 软件对这些靶点蛋白进行预处理, 包括去水、去配体等操作, 随后导出文件。通过 Autodock 1.5.7 软件对蛋白进行加氢处理, 并与“2.5”项中筛选出的三七方核心活性成分槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇、木犀草素进行分子对接分析。

分子对接结果表明, 所有 5 个靶点蛋白与 4 个配体的最低结合能均小于 $-21 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (表 4), 表明配体与受体之间的结合为自发过程, 对接效果好。利用 Pymol 软件对对接结果进行了可视化, 具体见图 6。豆甾醇与 TP53: 在氨基酸残基 SER-99

表 3 三七方关键活性成分

Table 3 Key active components of Sanqifang Formula

名称	度值	中介中心度	接近中心性
槲皮素 (quercetin)	112	0.533 578 975	0.506 329 114
豆甾醇 (stigmasterol)	38	0.088 568 378	0.356 083 086
β-谷甾醇 (β-sitosterol)	33	0.097 231 461	0.385 852 090
木犀草素 (luteolin)	31	0.119 951 665	0.398 671 096
芒柄花黄素 (formononetin)	15	0.053 351 702	0.383 386 581
衡州乌药碱[(S)-coclaurine]	13	0.089 794 535	0.378 548 896
甘草查尔酮 A (licochalcone A)	11	0.029 135 665	0.376 175 549
维斯体素 (vestitol)	11	0.026 671 915	0.376 175 549
8-O-甲基雷氏草素 (8-O-methylreyusi)	8	0.014 318 524	0.369 230 769
金合欢素 (acacetin)	8	0.034 795 478	0.362 537 764
蛇床素 (hederagenin)	7	0.046 150 567	0.358 208 955

表 4 核心靶点与活性成分结合能

Table 4 Binding energy of core targets and active components

靶点	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
	槲皮素 (quercetin)	豆甾醇 (stigmasterol)	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	木犀草素 (luteolin)
IL6	-24.411 2	-29.594 4	-32.227 8	-25.330 8
TNF	-23.491 6	-24.369 4	-23.575 2	-21.025 4
IL-1β	-21.485 2	-24.912 8	-23.951 4	-22.572 0
TP53	-29.092 8	-34.735 8	-24.703 8	-30.472 2
AKT1	-26.584 8	-34.777 6	-40.295 2	-28.883 8

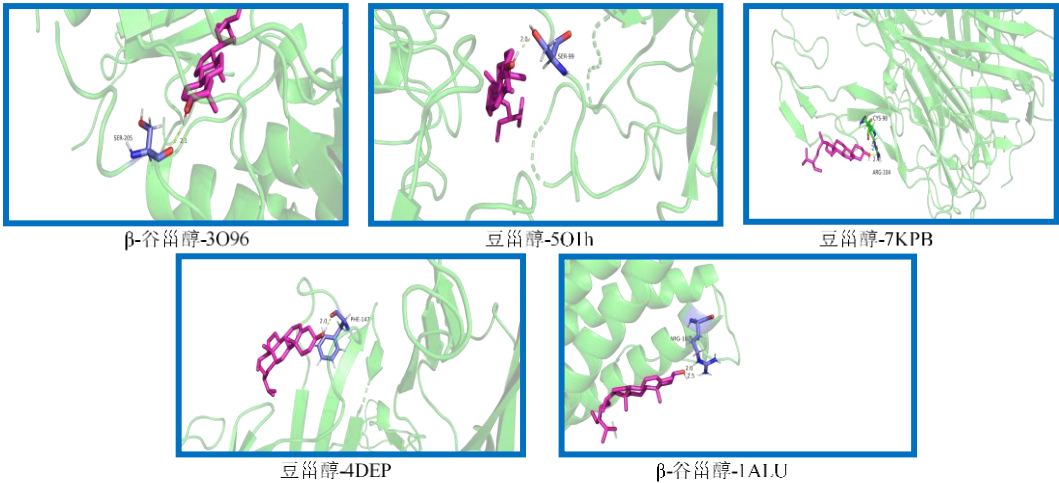


图 6 分子对接结果可视化

Fig. 6 Visualization analysis of molecular docking results

处形成氢键，键长为 2 Å（1 Å=0.1 nm）。β-谷甾醇与 AKT1：在氨基酸残基 SER-205 处形成氢键，键长为 2.1 Å。豆甾醇与 TNF：分别在 ARG-104 和 CYS-98 处形成氢键，键长为 2.4 Å 和 2.6 Å。豆甾醇与 IL-1β：在氨基酸残基 PHE-147 处形成氢键，键长为 2.0 Å。β-谷甾醇与 IL6：在氨基酸残基 ARG-182 处形成氢键，键长为 2 Å 和 2.5 Å 分析结果显

示，所有氢键距离均在 1~3 Å，表明活性成分与靶点蛋白之间的结合较紧密。这种稳定的相互作用可能为三七方在治疗失眠症中的分子机制提供了直接证据。分子对接分析进一步揭示，三七方的核心活性成分（槲皮素、豆甾醇、β-谷甾醇、木犀草素）能够与核心靶点蛋白 IL6、TNF、IL-1β、TP53 和 AKT1 产生显著的结合亲和力。结合亲和力的强弱

以及结合模式均表明这些活性成分可能通过调控炎症信号、神经递质代谢或细胞凋亡相关通路发挥治疗失眠的作用。

3 讨论

失眠属于中医“不寐”“目不瞑”“不得眠”“不得卧”等范畴^[17]。中医学认为失眠病位在心，因心主血脉，主神志，而血又是人体精神活动的主要物质基础，人的精神充沛、正常睡眠均有赖于心气血的充盈，血脉的调和与流利，故不论何种原因所形成的血虚、血瘀或血热引起的心神不安均可导致失眠。正如《景岳全书·不寐》的“劳倦思虑太过者，必致血液耗亡，神无所主，所以不眠”，王清任《医林改错》的“夜不安者，将卧则起，……此血府血瘀”，其所创名方血府逐瘀汤针对“夜不能睡，用养血安神药治之不效者，此方若神”；《医学入门》的“加血瘀者……烦躁少寐”，《症因脉治·内伤不得卧》的“肝藏血，阳火扰动血室，则夜不宁矣”。在临床中采用活血化瘀方法治疗失眠有效报道也颇多^[18-20]，也有研究认为血瘀是导致顽固性失眠的重要原因^[21]。蒋健教授所创三七方中包含酸枣仁、鸡血藤、小蓟、三七 4 味药，酸枣仁，其味甘、酸，性平，归经于肝、胆、心三脏，善养心补肝，宁神定志；鸡血藤，味苦、甘，性温，入心、肝、肾三经，既能活血补血，又可养心安神，养血而不凝滞，活血而不伤正；小蓟，其味甘、苦，性偏凉，入心、肝二经，有清热凉血之效，使血静神安，兼能散瘀；三七，味甘微苦，性温，归经于肝、胃二脏，擅化瘀血而不伤心血，使心得所养，神安于内。4 味药配伍成方，共奏养血活血、凉血安神之效，使血得理，而烦自除，热得清，而心神安，终达活血凉血、养心安神之功。经由拆方研究验证，三七方确有显著的镇静催眠作用。酸枣仁、鸡血藤、三七和小蓟均影响着全方镇静催眠作用的发挥，是三七方不可或缺的组成部分^[22]。课题组前期机制研究显示三七方能显著减少小鼠海马单胺类神经递质去甲肾上腺素（NE）、多巴胺（DA）的含量，能显著增加小鼠海马 γ -氨基丁酸（GABA）- $\alpha 1$ mRNA、TNF- α mRNA 的表达^[23-25]，提示三七方的镇静催眠作用可能是部分通过减少海马中 NE 和 DA 的含量，增加与促进 GABA $\alpha 1$ 、TNF- α 的表达而实现的。

本研究通过网络药理学的方法进一步筛选出三七方可能的核心活性成分为槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇和木犀草素，核心作用靶点为 IL6、TNF、IL1 β 、TP53、AKT1。现代药理研究表明，槲皮素具

有抗炎和神经保护作用，能够显著降低脑缺血再灌注大鼠海马组织中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的水平，减轻神经炎症反应^[26]；豆甾醇和 β -谷甾醇作为植物甾醇，具有抗炎、抗氧化的作用^[27]，有研究显示 β -谷甾醇能够抑制 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子引发的炎症反应^[28]；木犀草素通过清除活性氧（ROS）减轻炎性细胞的氧化损伤，同时调节 NF- κ B 和 STAT3 等炎症信号通路^[29]。近年也有越来越多的研究显示慢性炎症在失眠的发生与进展中起关键作用^[30]，炎症因子通过多种信号通路与失眠相互影响，形成复杂的病理网络。研究表明睡眠剥夺可显著升高大鼠脑中 IL-6 和 TNF- α 水平^[31]；也可引发 NF- κ B 表达的显著上调，从而促进炎症因子的分泌，进一步加剧失眠相关的神经炎症^[31]；失眠患者血清中 TNF- α 水平显著升高，这可能与神经炎症的加剧密切相关^[32]；在失眠模型小鼠中，也发现脑组织中 TP53 和 AKT1 的 mRNA 表达量显著降低，而 TP53 可能对细胞周期调节有影响，通过抑制 CLOCK-ARNTL/BMAL1 介导的 PER2 转录激活来调节生物钟，AKT1 可能通过调节细胞增殖与凋亡，影响睡眠的恢复和维持^[33]。本研究通过分子对接技术，发现三七方 4 个核心活性成分槲皮素、豆甾醇、 β -谷甾醇和木犀草素，与 5 个核心作用靶点 IL6、TNF、IL1 β 、TP53、AKT1 能够产生显著的结合亲和力，提示三七方可能通过降低 IL6、TNF、IL1 β 等炎症因子的表达水平，减轻神经炎症对睡眠的负面影响，调节细胞周期和细胞增殖与凋亡，从而达到治疗失眠症的作用。

本研究通过关键靶点的富集分析共得到 77 条信号通路，主要涉及炎症反应、免疫应答、脂质代谢、动脉粥样硬化、活性氧产生及凋亡信号通路调控等分子机制，其中特别值得关注三七方治疗失眠的核心靶点 TNF、TP53 和 AKT1 显著富集于 NF- κ B 信号通路，NF- κ B 信号通路是炎症调控的核心通路^[34]，其通过调控下游细胞因子的表达，促进炎症反应的级联放大，从而加剧睡眠障碍；AKT1 在 MAPK 信号通路富集，MAPK 信号通路通过外部刺激（如氧化应激或炎症因子）激活下游转录因子，如 NF- κ B，从而启动炎症相关基因的表达^[35]，这一激活过程直接促进 TNF- α 、IL-6 等炎症细胞因子的产生，加重炎症反应，并可能进一步扰乱神经炎症的平衡，影响睡眠调控网络。

本研究通过网络药理学方法结合分子对接技术，系统筛选并分析了三七方的核心活性成分及其

治疗失眠症核心靶点和信号通路的网络关系,提示三七方关键活性成分槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇和木犀草素可能通过 IL-6、IL-1 β 、TNF、TP53 和 AKT1 等关键靶点,调控 NF- κ B、MAPK 等炎症相关信号通路,降低炎症因子表达,减轻神经炎症从而达到治疗失眠症的作用。当然本研究结果还仅限于网络药理学与分子对接技术的分析预测,未来需结合多组学技术(如转录组学、代谢组学)和体内外实验,进一步验证三七方治疗失眠症作用的分子机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Riemann D, Benz F, Dressle R J, et al. Insomnia disorder: State of the science and challenges for the future [J]. J Sleep Res, 2022, 31(4): e13604.
- [2] Huang B Q, Xu G X, Luo L. The effect of acupuncture on emotional disorders in patients with insomnia: A protocol for systemic review and Meta-analysis [J]. Medicine, 2020, 99(51): e23754.
- [3] Morin C M, Jarrin D C. Epidemiology of insomnia: Prevalence, course, risk factors, and public health burden [J]. Sleep Med Clin, 2022, 17(2): 173-191.
- [4] 邵欣欣, 崔雪, 陈聪, 等. 基于失眠症状群分类的失眠处方分析与应用 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4490-4499. Shao X X, Cui X, Chen C, et al., Analysis and application of insomnia prescription based on classification of insomnia symptom clusters [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(13): 4490-4499.
- [5] 贺敏, 曹在焕, 蒋健. 三七方治疗失眠症 36 例临床观察 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3106-3107. He M, Cao Z H, Jiang J. Clinical observation on 36 cases of insomnia treated by Sanqi recipe [J]. Shizhen Med Mater Med Res, 2009, 20(12): 3106-3107.
- [6] 王之通, 贺敏, 蒋健. 三七颗粒治疗失眠心虚瘀热内扰证随机双盲对照临床研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(12): 2289-2292. Wang Z T, He M, Jiang J. Sanqi granule the treatment of insomnia of deficiency heart blood and stagnant heat type randomized double-blind clinical curative effect observation [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2010, 37(12): 2289-2292.
- [7] 贺敏, 金若敏, 田雪松, 等. 三七颗粒镇静催眠作用的初步研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(8): 1418-1419. He M, Jin R M, Tian X S, et al. A preliminary research on the sedative and hypnotic function of Sanqi Granules [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2009, 36(8): 1418-1419.
- [8] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213. Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [9] 王文军, 丁一, 窦芳, 等. 分子对接在中药药效物质筛选及作用机制研究中的应用进展 [J]. 中国药师, 2018, 21(6): 1020-1023. Wang W J, Ding Y, Dou F, et al. Application of molecular docking in the studies on screening and mechanism of pharmacodynamic substances of traditional Chinese medicine [J]. China Pharm, 2018, 21(6): 1020-1023.
- [10] Yuriev E, Holien J, Ramsland P A. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review [J]. J Mol Recognit, 2015, 28(10): 581-604.
- [11] 侯长周, 张建锋, 安海, 等. 梔子抗呼吸道合胞病毒作用及基于网络药理学和分子对接的机制研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(9): 1985-1994. Hou C Z, Zhang J F, An H, et al. Anti-respiratory syncytial virus effect of *Gardeniae Fructus* and investigation of mechanism based on network pharmacology and molecular docking [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(9): 1985-1994.
- [12] Zhou Y, Zhang Y T, Zhao D H, et al. TTD: Therapeutic Target Database describing target druggability information [J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(D1): D1465-D1477.
- [13] Wang Y, Yuan Y, Wang W T, et al. Mechanisms underlying the therapeutic effects of Qingfeiying in treating acute lung injury based on GEO datasets, network pharmacology and molecular docking [J]. Comput Biol Med, 2022, 145: 105454.
- [14] Tang D D, Chen M J, Huang X H, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing [J]. PLoS One, 2023, 18(11): e0294236.
- [15] 高利东, 刘佳, 黄宇虹, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨滋脾饮治疗糖尿病肾病的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12): 3339-3347. Gao L D, Liu J, Huang Y H, et al. Mechanism of Zicui Decoction in treatment of diabetic kidney disease based on network pharmacology and molecular docking [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(12): 3339-3347.
- [16] 王亮, 王鹏, 侯晓圆, 等. 和胃安神方治疗失眠的网络药理学和分子对接机制研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(5): 671-677. Wang L, Wang P, Hou X Y, et al. Mechanism of Heweianshen formula in treating insomnia based on network pharmacology and molecular docking [J]. World Chin Med, 2022, 17(5): 671-677.
- [17] 霍晓晓, 苏志伟, 鲍倩, 等. 中医药治疗失眠障碍研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2019, 28(15): 1696-1701. Huo X X, Su Z W, Bao Q, et al. Research progress in TCM treatment of insomnia disorders [J]. J Mod Integr Chin

- West Med, 2019, 28(15): 1696-1701.
- [18] 高治理, 贺娟. 论血瘀与失眠 [J]. 天津中医药, 2019, 36(4): 371-373.
Gao Z L, He J, On blood stasis and insomnia [J]. Tianjin Chin Med, 2019, 36(4): 371-373.
- [19] 刘艳骄. 血瘀可以致病, 化瘀可解失眠: 王清任活血化瘀治疗睡眠障碍的特色 [J]. 内蒙古中医药, 2002, 21(5): 31-32.
Liu Y J. Blood stasis can cause disease, removing blood stasis can solve insomnia-Characteristics of Wang Qingren's treatment of sleep disorder by promoting blood circulation and removing blood stasis [J]. Nei Mongol J Tradit Chin Med, 2002, 21(5): 31-32.
- [20] 姚高磊, 郑晓燕, 陆丽明, 等. 血府逐瘀汤加味治疗顽固性失眠的 Meta 分析 [J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(9): 67-72.
Yao G L, Zheng X Y, Lu L M, et al. Meta-analysis of Xuefuzhuyu Decoction in treating intractable insomnia [J]. Chin Manip Rehabil Med, 2021, 12(9): 67-72.
- [21] 马鹤, 王泽平, 刘龙涛. 从瘀血理论探讨顽固性失眠诊治规律 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(1): 155-157.
Ma H, Wang Z P and Liu L T, Study the diagnosis and treatment of intractable insomnia from the theory of blood stasis [J]. J Cardio-Cerebrovascular Dis Integr Chin West Med, 2021, 19(1): 155-157.
- [22] 贺敏, 金若敏, 符胜光, 等. 三七方的拆方研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 253-255.
He M, Jin R M, Fu S G, et al. Study on the disassembling of Sanqi formula. Chin J Exp Form, 2013, 19(9): 253-255.
- [23] 贺敏, 金若敏, 符胜光, 等. 三七方对小鼠海马 γ -氨基丁酸 A 受体 mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(9): 1766-1768.
He M, Jin R M, Fu S G, et al. Effects of Sanqifang on expression of GABAA mRNA in hippocampus of mice [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2011, 38(9): 1766-1768.
- [24] 贺敏, 金若敏, 符胜光, 等. 三七方对小鼠海马 TNF- α mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(6): 1218-1219.
He M, Jin R M, Fu S G, et al. Effects of Sanqifang on expression of TNF- α mRNA in hippocampus of mice [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2011, 38(6): 1218-1219.
- [25] 贺敏, 王猛猛, 过林, 等. 三七方对小鼠海马单胺类递质的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(9): 1796-1797.
He M, Wang M M, Guo L, et al. Effect of Sanqifang on monoamine transmitters in hippocampus of mice [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2015, 42(9): 1796-1797.
- [26] 李叶, 张燕燕, 吴迪, 等. 整合网络药理学和动物实验研究三七皂苷 R_1 抗抑郁的作用与分子机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5599-5609.
Li Y, Zhang Y Y, Wu D, et al. Antidepressant effect and molecular mechanism of notoginsenoside R_1 based on network pharmacology and animal experiments [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(20): 5599-5609.
- [27] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
Chen Y K, Zeng A, Luo Z H, et al. Progress in the pharmacological effects of β -sitosterol [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2021, 37(1): 148-153.
- [28] Yang Q, Yu D L, Zhang Y. β -sitosterol attenuates the intracranial aneurysm growth by suppressing TNF- α -mediated mechanism [J]. Pharmacology, 2019, 104(5/6): 303-311.
- [29] 胡泽香, 佟雷, 耿艳萌, 等. 木犀草素的药理活性及其制剂研究进展 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(10): 141-145.
Hu Z X, Tong L, Geng Y M, et al. A review on pharmacological activities and preparations of luteolin [J]. Clin J Chin Med, 2022, 14(10): 141-145.
- [30] Barnes A, Spizzo P, Bampton P, et al. Examining the influence of inflammatory bowel disease medications on sleep quality [J]. JGH Open, 2023, 7(3): 190-196.
- [31] Su H, Zhang C, Zou X, et al. Jiao-Tai-Wan inhibits inflammation of the gut-brain-axis and attenuates cognitive impairment in insomnic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112478.
- [32] Irwin M R, Olmstead R, Carroll J E. Sleep disturbance, sleep duration, and inflammation: A systematic review and Meta-analysis of cohort studies and experimental sleep deprivation [J]. Biol Psychiatry, 2016, 80(1): 40-52.
- [33] 李莉, 刘茹, 何晶, 等. 基于网络药理学及动物实验探究温胆汤治疗失眠潜在靶点 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(7): 2450-2464.
Li L, Liu R, He J et al. Explored potential targets of Wentan Decoction in treating insomnia based on network pharmacology and animal experiments [J]. World Sci Technol-Modern Chin Med, 2023, 25(7): 2450-2464.
- [34] 韩朝军, 袁诗宇, 曹珊珊, 等. 滋水清肝饮对脂多糖诱导的抑郁小鼠的改善作用及对 ERK/NF- κ B 通路的影响 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(5): 1042-1050.
Han C J, Yuan S Y, Cao S S, et al. Ameliorating effect of Zishui Qinggan Yin on lipopolysaccharide-induced depressed mice and its effect on ERK/NF- κ B pathway [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(5): 1042-1050.
- [35] Ganguly P, Macleod T, Wong C, Harland M, McGonagle D. Revisiting p38 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) in Inflammatory Arthritis: A narrative of the emergence of MAPK-activated protein kinase inhibitors (MK2i). Pharmaceuticals (Basel). 2023;16(9):1286. Published 2023 Sep 12. doi:10.3390/ph16091286.

[责任编辑 齐静雯]