

基于¹H-NMR代谢组学的酸枣仁改善失眠大鼠睡眠作用机制研究

杜晨晖¹, 裴香萍¹, 张敏², 闫艳^{2*}, 秦雪梅^{2*}

1. 山西中医药大学中药学院, 山西 太原 030619

2. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要:目的 利用氢核磁共振(¹H-NMR)代谢组学技术研究酸枣仁对对氯苯丙氨酸(PCPA)诱导的失眠大鼠血清内源性代谢物的影响,探讨酸枣仁改善睡眠的作用机制。方法 大鼠ip PCPA溶液(400 mg/kg)制备失眠模型,采用¹H-NMR代谢组学技术,以主成分分析(PCA)、偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)及正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析方法为手段,对各组大鼠血清代谢物进行分析,筛选出潜在生物标志物;借助MatPA分析构建潜在靶标代谢通路和代谢网络。结果 ¹H-NMR代谢组学分析方法共筛选11种与失眠相关的潜在生物标志物;通过MatPA分析得到8条潜在靶标代谢通路,包括谷氨酸和谷氨酰胺代谢,牛磺酸和亚牛磺酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,丙酮酸代谢,色氨酸代谢,三羧酸(TCA)循环。酸枣仁中剂量(15 g/kg)和高剂量(30 g/kg)均可显著回调11种潜在生物标志物。结论 酸枣仁可通过调控失眠大鼠的能量代谢和氨基酸代谢,使大鼠内源性代谢物趋近正常水平,为进一步阐明酸枣仁改善睡眠的作用机制提供依据。

关键词: 酸枣仁; 改善睡眠; 氢核磁共振; 代谢组学; 对氯苯丙氨酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2405-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.022

¹H-NMR based metabolomic study of sedative and hypnotic effect of *Ziziphi Spinosae Semen* in rats

DU Chen-hui¹, PEI Xiang-ping¹, ZHANG Min², YAN Yan², QIN Xue-mei²

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective ¹H-NMR based metabolomic approach has been employed to study the intervention effects of *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS) on *p*-chlorophenylalanine (PCPA)-induced insomnia using a rat model. **Methods** ¹H-NMR analysis was used to identify the various compounds of ZSS, and the quantitative data were further processed by principal component analysis (PCA), partial least squares discrimination analysis (PLS-DA), and orthogonality PLS-DA to find potential biomarkers. In addition, MetPA analysis was used for pathway analysis. **Results** Multivariate analysis revealed that 11 perturbed endogenous metabolites in the serum could be reversed by ZSS at dosage of 15 g/kg and 30 g/kg, and MetPA analysis revealed that the anti-hypnotic effect of ZSS was probably related with regulation of glutamate and glutamine metabolism, taurine and taurine metabolism, alanine, aspartic acid and glutamate metabolism, glyoxylic acid, and dicarboxylic acid metabolism, glycine, serine and threonine metabolism, pyruvate metabolism, tryptophan metabolism, and tricarboxylic acid cycle. ZSS at dosage of 15 g/kg and 30 g/kg both can significant callback 11 potential biomarkers. **Conclusion** These metabolic changes indicated that ZSS facilitated recovery from insomnia by regulating the amino acid metabolism and energy metabolism, which provides the basis for elucidating therapeutic mechanisms underlying the efficiency of ZSS for insomnia treatment.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; improving sleeping; ¹H-NMR; metabolomics; *p*-chlorophenylalanine

收稿日期: 2019-01-13

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(81603289); 国家自然科学基金青年基金资助项目(81603251); 山西省重点研发计划项目(201803D31087); 山西省科技攻关计划-振东专项(2016ZD0104); 山西省科技攻关计划-振东专项(2016ZD0105); 山西省基础研究计划项目自然科学基金项目(2015011105); 山西省教育厅研究生联合培养基地人才培养项目(2017JD01); 山西省教育厅研究生教育改革研究课题(2017JD01); 晋药综合开发利用协同创新中心项目(2017-JYXT-25); 山西中医药大学科技创新团队(2018TD-009)

作者简介: 杜晨晖, 男, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0351)3179935 E-mail: duchenxi_2001@163.com

***通信作者** 闫艳, 女, 副教授, 研究方向为中药药效物质基础及中药质量评价。Tel: (0351)7018379 E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

秦雪梅, 女, 教授, 研究方向为中医药代谢组学。Tel: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

世界卫生组织 WHO 资料显示,全球有近 1/5 的人受失眠困扰。失眠是指睡眠的始发和睡眠维持发生障碍,致使睡眠质量不能满足个体生理需要而显著影响患者白天活动的一种睡眠障碍综合征^[1]。失眠会导致生活质量下降,且会引起阿尔茨海默病、帕金森综合征、高血压、糖尿病等严重疾病^[2]。目前用于治疗失眠的化学药多以中枢神经系统镇静催眠药物为主,但长时间使用会出现药物依赖、呼吸抑制、损伤认知和精神系统等副作用^[3]。中医药治疗失眠已有 2 000 多年的历史,具有绿色、安全、有效的特性,由于其在临床上显示出对失眠显著的疗效,在失眠治疗研究领域受到国内外学者的广泛关注^[4-6]。

酸枣仁为鼠李科枣属植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子,始载于《神农本草经》,具有养心补肝、宁心安神、敛汗、生津之功效^[7]。酸枣仁是中医药临床治疗失眠的首选药物,在治疗失眠的中药复方中使用频率高达 71.95%^[8]。酸枣仁作为国家卫生部首批列入药食两用名单的物质,被广泛用于改善睡眠功能保健食品。截至 2016 年 9 月,原国家食品药品监督管理总局共计批准了 585 个具有改善睡眠功能的保健食品,其中超过 260 个使用酸枣仁及其提取物作为原料,远超同样具有改善睡眠功能的褪黑素^[9]。

现代药理研究表明,酸枣仁中总皂苷^[10-11]、总黄酮^[11]、总生物碱^[12-13]是其发挥镇静催眠的主要活性成分。且多数学者对酸枣仁改善睡眠的药效实验及机制研究多采用经典的药理学实验,通过观察酸枣仁协同戊巴比妥钠干预睡眠实验^[14]及酸枣仁干预失眠大鼠的睡眠时相^[15]、神经递质^[16]、炎症反应因子^[17-18]、自主活动^[19]、步态行为^[20]和脑组织超微结构^[21]指标进行评价。以上研究为酸枣仁改善睡眠药理作用提供了实验基础和依据。

代谢组学拓宽了传统中医药研究的技术手段,可以全面地反映机体受到刺激或干扰后内源性代谢产物所发生的整体变化,其研究思路与中医药的整体观不谋而合。基于 ¹H-NMR 代谢组学技术样品预处理简单,样品用量少,能全面分析生物体的内源性代谢物,具有整体性、动态性和系统性的特点^[22]。本实验借助 ¹H-NMR 代谢组学技术,以酸枣仁为研究对象,分析酸枣仁对对氯苯丙氨酸(PCPA)诱导的失眠大鼠血清中内源性代谢物及代谢通路的影响,通过代谢组学技术从整体角度探讨酸枣仁治疗失眠的可能机制,为酸枣仁治疗失眠作用机制的深

入研究奠定一定的基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只,体质量(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001。动物饲养室温保持(25±3)℃,相对湿度 45%左右,自然昼夜节律光照,自由进食进水。

1.2 药品与试剂

酸枣仁(批号 20161013)购于山西振东道地药材有限公司,经山西中医药大学中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子。按照《中国药典》2015 年版方法对酸枣仁进行水分测定,水分为 6.62%。按干燥品计,酸枣仁中斯皮诺素含量为 0.095%,酸枣仁皂苷 A 为 0.080%,均符合药典标准。

重水购于美国 Sigma-Adlrlich 公司;氘代甲醇和三甲基硅烷丙酸钠盐(TSP),青岛腾龙微波科技有限公司;PCPA(批号 GK01-JBQH),梯希爱(上海)化成工业发展有限公司;地西洋(DXP,批号 H34024042),安徽城市药业有限责任公司。

1.3 仪器

Bruker 600-MHz AVANCE III NMR Spectrometer (600.13 MHz 质子频率),德国布鲁克公司。

2 方法

2.1 酸枣仁水提物的制备

取酸枣仁药材,粉碎为细粉,加入 8 倍量水,浸泡 30 min,加热至沸,回流提取 1 h,滤过,滤渣加 8 倍量水,加热回流提取 1 h,滤过,合并滤液,浓缩得浸膏(浸膏得率 28.12%,乌药碱、木兰花碱、斯皮诺素、6'''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 质量分数分别为 0.02%、0.29%、0.12%、0.063%、0.038%、0.023%)^[23],4℃保存。

2.2 模型复制、分组及给药

大鼠适应性饲养 1 周后,随机选取 12 只作为对照组,ip 生理盐水,其余大鼠按 400 mg/kg ip 新鲜配制的 PCPA 溶液,连续 3 d,末次给药后,大鼠眼底静脉丛取血,分取血清。采用 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血清中 5-羟色胺(5-HT)水平^[24-25],模型组大鼠血清中 5-HT 水平[(0.64±0.02) ng/mL]显著低于对照组[(3.88±0.50) ng/mL](*P*<0.001)。此外,除对照组外,其余大鼠昼夜节律消失,表明

失眠模型造模成功。将造模成功的大鼠随机分成 5 组，每组 12 只，分别为模型组（生理盐水），DXP 组（1 mg/kg），酸枣仁低、中、高剂量（7.5、15.0、30.0 g/kg）组，各组大鼠按 10 mL/kg ig 给药，连续给药 7 d。

2.3 血清样本收集及处理

末次给予酸枣仁水提取物前，各组大鼠禁食 12 h，给药后 1 h，以 4% 水合氯醛麻醉，股动脉取血，4 °C 静置 30 min，离心 25 min（4 °C，3 500 r/min），分离血清于 -80 °C 冷冻保存。

2.4 ¹H-NMR 样品的制备

精密吸取 450 μL 血清样品，加入 2 倍量甲醇，涡旋混匀，冰箱（-20 °C）中放置 20 min 使蛋白沉淀，4 °C 离心（13 000 r/min，20 min），定量移取上清液 1 mL 氮气吹干，残渣加 600 μL 磷酸盐缓冲液（含 0.1 mol/L KH₂PO₄/Na₂HPO₄，pH 7.0，0.01% TSP 作为内标，D₂O 锁场）复溶，4 °C 离心（13 000 r/min，5 min），定量移取 550 μL 于 5 mm 核磁管中待测。

2.5 ¹H-NMR 测定及条件

样品于 25 °C 下通过 600 MHz NMR 仪测定，测定频率为 600.13 MHz，采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 脉冲序列，扫描次数为 64，谱宽 12 019.21 Hz，脉冲时间为 14 μs，采样时间为 2.65 s，延迟时间为 1.0 s，采样数据点为 65 536，采样间隔为 1 s。

2.6 数据分析

NMR 图谱采用软件 MestReNova (version 8.0.1) 进行处理。NMR 谱图中，手动进行相位、基线调整，以 TSP 为标准进行化学位移校正，以 0.01 积分

段对化学位移区间 δ 0.50~8.88 进行分段积分，其中 δ 4.68~5.16（残余水峰）不进行积分，积分数据进行面积归一化。将导入 Excel 中的数据用 SIMCA-P 13.0（瑞典 Umetrics 公司）软件进行主成分分析（PCA）、偏最小二乘法判别分析（PLS-DA）及正交偏最小二乘法判别分析（OPLS-DA）。通过对对照组与模型组的 S-plot 图进行分析，结合 VIP>1 及 SPSS 16.0 进行 *t* 检验，确定潜在生物标志物。

3 结果与讨论

3.1 大鼠血清 ¹H-NMR 图谱归属

通过分析每个化合物的化学位移、偶合常数及峰形等信息，结合文献并参照 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库对本实验图谱进行指认，共鉴定 35 种化合物（图 1），其化学位移及谱峰归属见表 1。

3.2 PCPA 致失眠大鼠血清中潜在生物标志物的发现

为了获得对照组和模型组之间的代谢差异，采用多元统计分析方法对 ¹H-NMR 数据进行多变量数据分析。首先采用无监督的 PCA，得分散点图（图 2-A）共解释了 56.8% 的变量（PC1=37.2%，PC2=19.6%），从图中可以看出，对照组和模型组明显分开，说明 2 组间的代谢轮廓存在差异，即正常大鼠经 PCPA 造模后血清中内源性代谢物发生了显著变化。继而，模型验证（permutation）排列实验（*n*=200）中左端任何 1 次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于右端（ $R^2_X=0.725$ ， $R^2_Y=0.988$ ， $Q^2=0.836$ ，图 2-B），说明原始模型的预测能力大于任何 1 次随机排列 *Y* 变量的预测能力，即证明模型有效。

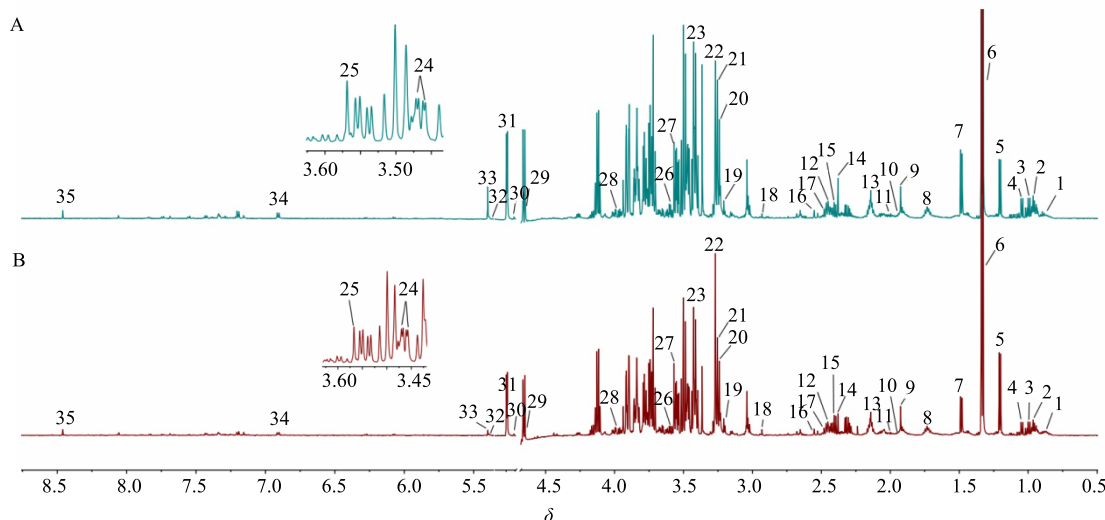


图 1 对照组 (A) 与模型组 (B) 大鼠血清 ¹H-NMR 图

Fig. 1 Typical ¹H-NMR spectra of rat serum from control group (A) and model group (B)

表 1 大鼠血清中内源性代谢物 $^1\text{H-NMR}$ 图谱归属Table 1 Peak assignment in $^1\text{H-NMR}$ spectra for endogenous metabolites in rat serum

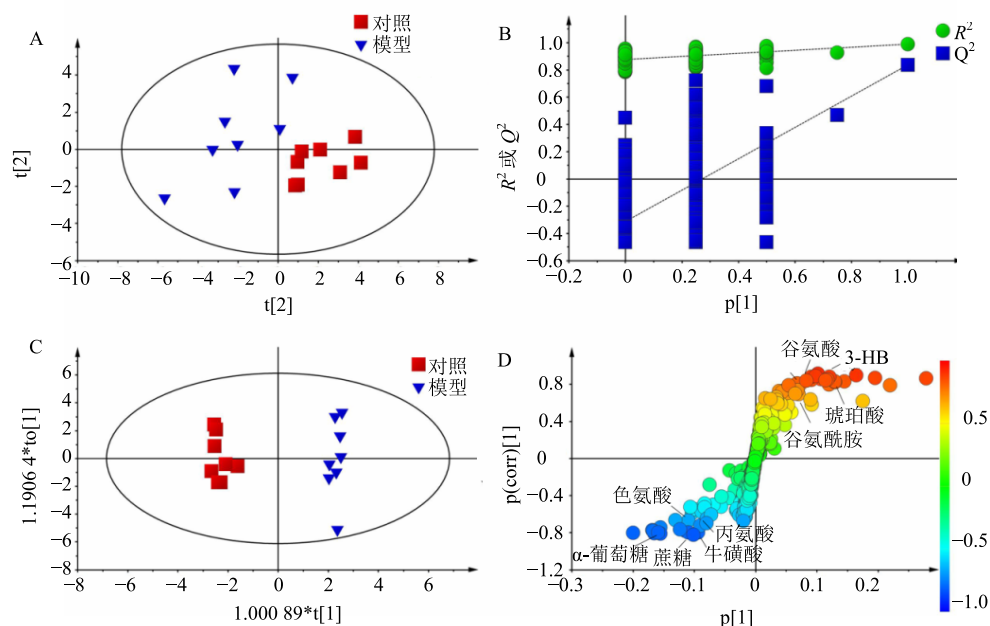
编号	代谢物	δ_{H} (J in Hz)
1	极低密度脂蛋白 (lipoprotein, LDL/VLDL)	0.89 (m)
2	异亮氨酸 (isoleucine)	0.99 (d, 7.2)
3	亮氨酸 (leucine)	0.97 (t, 6.0, 6.0)
4	缬氨酸 (valine)	1.05 (d, 7.2)
5	3-羟基丁酸 (3-hydroxybutyrate, 3-HB)	1.20 (d, 6.0), 2.31 (dd, 13.8, 6.6)
6	乳酸 (lactate)	1.33 (d, 6.6), 4.12 (q, 6.6)
7	丙氨酸 (alanine)	1.49 (d, 7.2)
8	赖氨酸 (lysine)	1.73 (m), 2.93 (t, 6.0, 6.0)
9	醋酸 (acetic acid)	1.92 (s)
10	乙酸 (acetate)	1.93 (s)
11	谷氨酸 (glutamate)	2.05 (m), 2.34 (m)
12	谷氨酰胺 (glutamine)	2.14 (m), 2.45 (m)
13	蛋氨酸 (methionine)	2.12 (m)
14	丙酮酸 (pyruvate)	2.38 (s)
15	琥珀酸 (succinate)	2.39 (s)
16	柠檬酸 (citrate)	2.54 (d, 15.0), 2.67 (d, 15.0)
17	二甲酮肟 (dimethylamine, DMA)	2.48 (s)
18	<i>N,N</i> -二甲基甘氨酸 (dimethylglycine, DMG)	2.93 (s)
19	胆碱 (choline)	3.21 (s)
20	肉毒碱 (carnitine)	3.22 (s)
21	甜菜碱 (betaine)	3.25 (s)
22	氧化三甲胺 (trimethylamine oxide, TMAO)	3.26 (s)
23	牛磺酸 (taurine)	3.26 (t, 8.4), 3.42 (t, 9.6)
24	色氨酸 (tryptophan)	3.47 (dd, 15.4, 4.8), 7.32 (s), 7.55 (d, 7.8), 7.74 (d, 7.8)
25	甘氨酸 (glycine)	3.57 (s)
26	磷酸胆碱 (phosphorylcholine)	3.61 (t), 4.21 (t)
27	蔗糖 (sucrose)	3.55 (dd, 3.6, 9.6), 3.71 (s), 3.84 (s)
28	苯丙氨酸 (phenylalanine)	3.98 (m), 7.33 (m), 7.38 (m), 7.43 (m)
29	β -葡萄糖 (β -glucose)	4.65 (d, 7.8)
30	α -甘露糖 (α -mannose)	5.19 (d, 1.2)
31	α -葡萄糖 (α -glucose)	5.24 (d, 7.8)
32	糖原 (glycogen)	5.39 (m)
33	尿囊素 (allantoic acid)	5.40 (s)
34	酪氨酸 (tyrosine)	6.9 (d, 8.4), 7.20 (d, 8.4)
35	甲酸 (formate)	8.46 (s)

为了进一步发现 PCPA 诱导的失眠大鼠的潜在生物标志物, 通过有监督的 OPLS-DA, 得分散点图和 S-plot 图见图 2-C、D。OPLS-DA 中选择 VIP>1 的变量作为潜在生物标志的候选变量, 最终筛选出 13 个符合要求的变量, 结合 S-plot 图 ($|\text{Pcorr}|>0.58$) 和 *t* 检验 ($P<0.05$) 对候选变量进行分析, 最终筛选出 11 种潜在生物标志物。与对照组比较, 模型组 3-HB、谷氨酸、丙酮酸、谷氨酰胺、琥珀酸和甘氨酸水平显著升高 ($P<0.01$), 丙氨酸、牛磺酸、色氨酸、蔗糖

和 α -葡萄糖水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 见图 3。

3.3 酸枣仁对 PCPA 诱导的失眠模型大鼠血清紊乱的干预作用

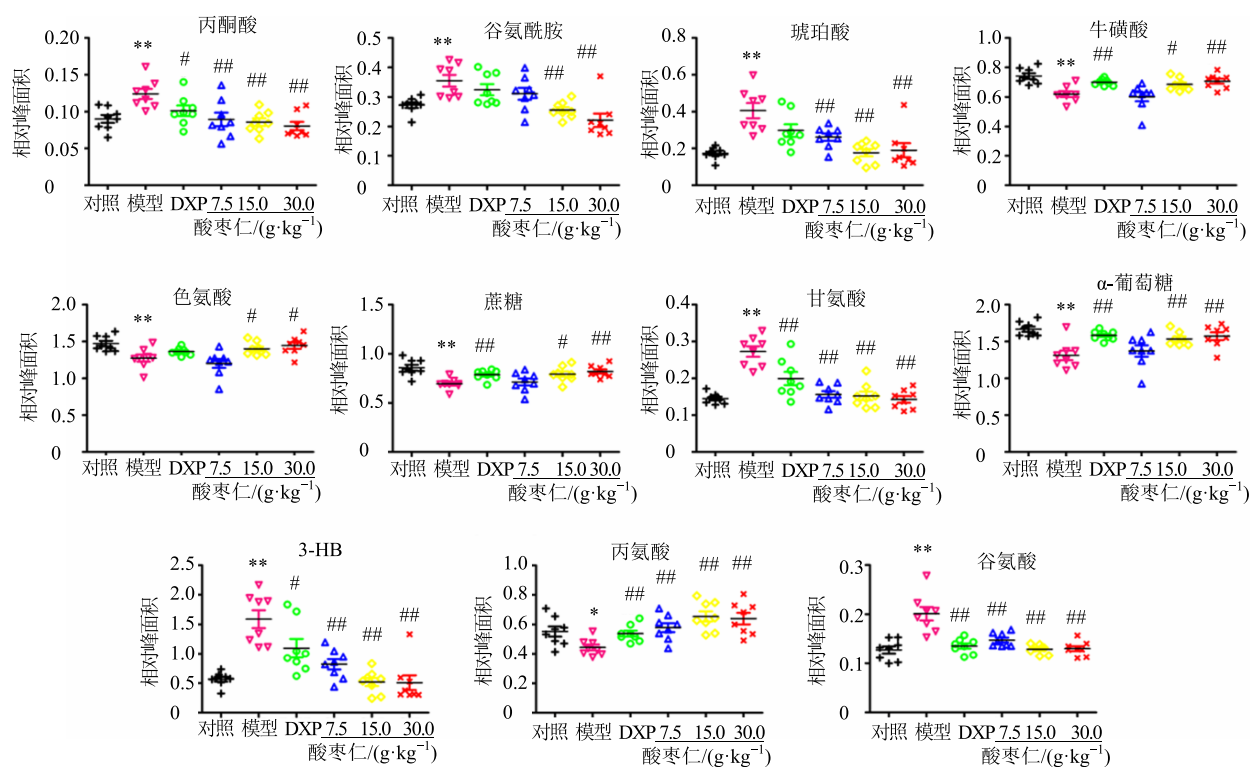
为了评价酸枣仁改善睡眠的有效性, 对对照组、模型组、DXP 组和酸枣仁各剂量组大鼠的血清代谢谱进一步进行 PLS-DA (图 4), 结果显示, 各给药组位于对照组与模型组之间, 趋近于对照组, 表明酸枣仁对 PCPA 失眠大鼠的代谢紊乱有回调作用。为了进一步分析酸枣仁对 11 种潜在生物标志物的



A-PCA 得分图 B-permutation 模型验证 C-OPLS-DA 散点图 D-S-plot 图
A-PCA score plots B-permutation test C-OPLS-DA score plots D-S-plot

图 2 对照组和模型组大鼠血清样本 $^1\text{H-NMR}$ 多元统计分析

Fig. 2 Multiple statistical analysis from $^1\text{H-NMR}$ spectra of rat serum in control group and model group



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 3 各组大鼠血清中潜在生物标志物的变化

Fig. 3 Changes of potential biomarkers in each group of rats

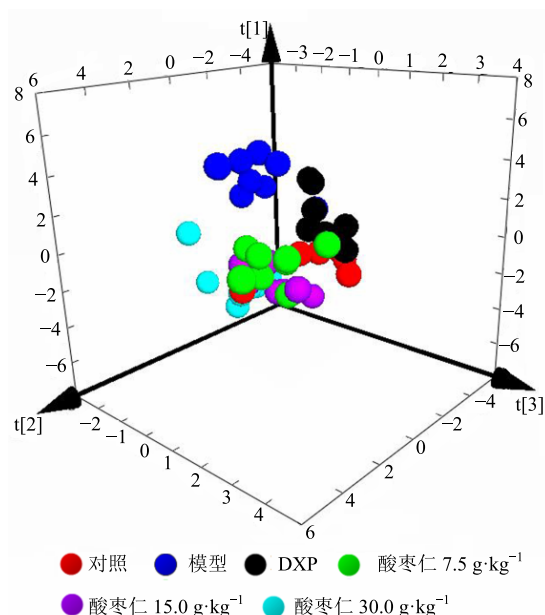


图 4 各组大鼠血清样本 PLS-DA 散点图

Fig. 4 PLS scores plot of serum of rats in each group

回调趋势, 本实验对潜在生物标志物的相对含量进行 t 检验分析。如图 3 所示, 酸枣仁中、高剂量均可显著回调 11 种代谢物, 包括氨基酸 (谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丙氨酸、牛磺酸和色氨酸)、有机酸 (3-HB、琥珀酸和丙酮酸) 和糖 (蔗糖和 α -葡萄糖)。酸枣仁低剂量可显著回调 3-HB、丙氨酸、谷氨酸、丙酮酸、琥珀酸和甘氨酸 6 种代谢物。

3.4 潜在生物标志物体内代谢分析

构建代谢通路的优势在于独特的代谢通路分析能够从整体层面反映出 PCPA 诱导的失眠大鼠的生物学化学扰动, 为作用机制的分析提供更为全面的信

息依据。将 11 种潜在生物标志物输入到 MetPA (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 数据库中构建代谢通路, 把 $\text{impact} > 0.1$ 的代谢通路作为潜在的靶标通路, 共筛选得到 PCPA 诱导的失眠模型大鼠有 8 条代谢通路发生显著变化 (图 5), 分别为谷氨酸和谷氨酰胺代谢, 牛磺酸和亚牛磺酸代谢, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 乙醛酸和二羧酸代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 丙酮酸代谢, 色氨酸代谢, 三羧酸 (TCA) 循环。综合 KEGG 及相关富集分析方法得到潜在生物标志物相关代谢通路, 见图 6。

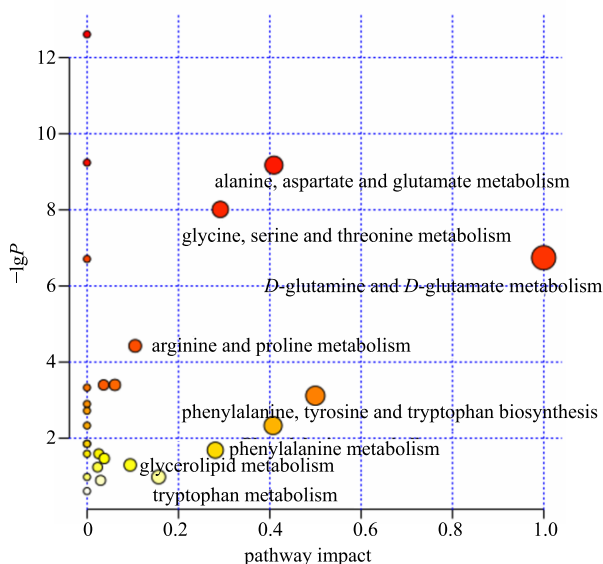
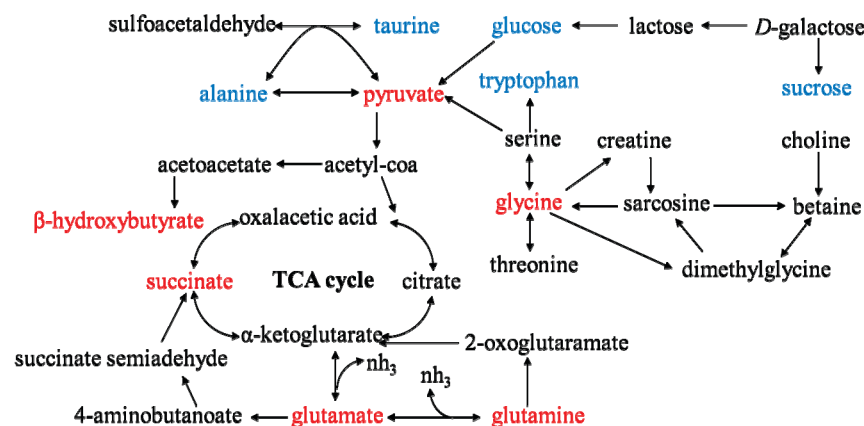


图 5 相关代谢通路

Fig. 5 Summary diagram of pathway analysis with MetPA



红色-与对照组比较, 模型组含量升高 蓝色-与对照组比较, 模型组含量降低

Red-model group content increased vs control group blue-model group content decreased vs control group

图 6 潜在生物标志物的相关代谢通路的网络示意图

Fig. 6 Metabolic networks of potential biomarkers in relevant metabolic pathways

谷氨酸、谷氨酰胺代谢：代谢物谷氨酸、谷氨酰胺、琥珀酸和延胡索酸共处一条代谢通路。谷氨酸分布最为广泛，遍布于机体内各个角落^[26-27]，为一种兴奋性神经递质，促进神经元释放化学信号。与睡眠的质量呈现负相关性。 γ -氨基丁酸（GABA）作为谷氨酸的拮抗性神经递质，在谷氨酸脱羧酶的作用下谷氨酸转化成 GABA。GABA 为中枢内主要的抑制性神经递质^[28]。二者对中枢神经分别起兴奋和抑制作用，又在体内相对保持平衡^[29-32]，共同调控机体睡眠。谷氨酰胺在酶的作用下脱氨转变为谷氨酸，谷氨酸进一步影响酮戊二酸的生成。酮戊二酸和琥珀酸为 TCA 循环中的 2 种主要成分，维持 TCA 循环的能量供应。与对照组比较，模型组中谷氨酸、谷氨酰胺和琥珀酸含量显著升高（ $P<0.01$ ）；谷氨酸、谷氨酰胺和琥珀酸体内含量升高将导致机体能量充沛，机体处于亢奋状态，难以入眠。地西洋组中 3 种代谢物水平均有不同程度的回调，酸枣仁低剂量组中谷氨酸和琥珀酸水平显著降低，酸枣仁中、高剂量组中上述 3 种代谢物含量均显著降低（ $P<0.01$ ）。

甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢：代谢物胆碱、甘氨酸、肌酸和甜菜碱共同存在于此条代谢通路中，肌酸广泛存在于骨骼肌中，主要由甘氨酸、精氨酸和甲硫氨酸体内合成，为机体运动提供能量。甜菜碱，是体内活性甲基供体，体内可生物合成甘氨酸，二甲基甘氨酸和肌氨酸是生成甘氨酸的中间体化合物。胆碱可影响乙酰辅酶 A（CoA）的生成，CoA 参与 TCA 为机体提供 ATP 的生物过程。与对照组比较，模型组甘氨酸含量显著升高（ $P<0.01$ ）；各给药组中甘氨酸含量显著降低（ $P<0.01$ ），表明失眠与能量生成存在很大的依存关系。

色氨酸代谢：色氨酸，在体内酶的催化下氧化脱核转变为 5-HT，进一步生成 *N*-乙酰色胺和 5-羟基吲哚乙醛，二者又可分别产生褪黑素和 5-羟基吲哚乙酸等神经递质。当色氨酸代谢失调时，可引起神经系统的功能障碍^[33]，导致失眠的产生。研究证明，5-HT 有利于维持动物慢波睡眠^[34]。Python 等^[35]研究者发现脑内 5-HT 的变化与动物觉醒呈现正相关，即 5-HT 含量增加有利于维持睡眠状态。与对照组比较，模型组中色氨酸含量显著降低（ $P<0.01$ ），酸枣仁中、高剂量组中色氨酸含量均显著升高（ $P<0.05$ ），表明失眠可引起神经系统的功能障碍。

4 结论

本实验采用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学技术对 PCPA 诱

导的失眠大鼠血清进行分析，通过 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 等多元统计分析方法共筛选 11 种与失眠相关的潜在生物标志物。通过 MatPA 分析得到 8 条潜在靶标代谢通路，涉及能量代谢和氨基酸代谢。大鼠体内内源性代谢产物含量的变化在一定程度上反映了 PCPA 诱导的失眠大鼠体内代谢水平的变化，为监测疾病状态下体内代谢物的变化提供了一定依据。酸枣仁中、高剂量均可显著回调失眠大鼠血清中 11 种潜在生物标志物趋近正常水平，说明酸枣仁可有效地逆转模型大鼠机体的能量代谢和氨基酸代谢，并能显著影响神经系统。本实验运用 $^1\text{H-NMR}$ 代谢组学的方法探讨酸枣仁对失眠大鼠内源性物质代谢的影响，从整体代谢角度研究中药多种成分对疾病的治疗作用，为酸枣仁治疗失眠作用机制的深入研究奠定一定基础。

参考文献

- [1] 林仲辉. 失眠症的诊断与治疗研究进展 [J]. 中医药通报, 2012, 11(3): 63-66.
- [2] Sarris J, Panossian A, Schweitzer I, et al. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2011, 21(12): 841-860.
- [3] Richey S M, Krystal A D. Pharmacological advances in the treatment of insomnia [J]. *Current Pharm Design*, 2011, 17(15): 1471-1475.
- [4] 郭 岳. 交泰汤治疗心肾不交型不寐临床观察 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1174-1175.
- [5] 张如意, 游秋云, 王 平, 等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺老年失眠大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1691-1693.
- [6] 张飞燕, 李晶晶, 周 莹, 等. 安神类中药及其有效成分对神经递质镇静催眠机制的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4320-4327.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [8] 曹文聪, 海 英, 任 路. 基于数据挖掘中药复方治疗失眠用药规律分析 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(9): 1851-1853.
- [9] 吕辰鹏, 王丽斐, 何泉泉, 等. 改善睡眠功能保健食品的研究进展 [J]. 食品工业, 2017, 38(8): 238-243.
- [10] Cao J X, Zhang Q Y, Cui S Y, et al. Hypnotic effect of jujubosides from *Semen Ziziphi Spinosae* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 163-166.
- [11] Jiang J G, Huang X J, Chen J, et al. Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and

- polysaccharides extracted from *Semen Ziziphus jujube* [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(4): 310-320.
- [12] Ma Y, Han H, Nam S Y, *et al.* Cyclopeptide alkaloid fraction from *Zizyphi Spinosi Semen* enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 117(2): 318-324.
- [13] Shergis J L, Ni X, Sarris J, *et al.* *Ziziphus spinosa* seeds for insomnia: A review of chemistry and psychopharmacology [J]. *Phytomed Int J Phytother Phytopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.phymed.2017.07.004.
- [14] 吴传芳. 酸枣仁对地西洋的增效减毒作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [15] 翟旭峰, 肖小春, 娄勇军, 等. 生酸枣仁及其炮制品镇静催眠作用及对失眠大鼠脑电图的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6): 94-97.
- [16] 张舜波, 王 平, 田代志, 等. 酸枣仁总皂苷对失眠老年大鼠脑氨基酸类神经递质及受体表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(4): 124-127.
- [17] 张林挺. 酸枣仁汤对虚劳失眠大鼠干预机理的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [18] 季文博. 酸枣仁-五味子“药对”提取物镇静催眠作用的药效学及机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2013.
- [19] 张军武, 田 凡, 邹文信, 等. 酸枣仁汤对 DL-4-氯苯基丙氨酸所致失眠的药效学研究 [J]. *河南中医*, 2016, 36(6): 985-987.
- [20] 张亚宁. 基于步态分析的酸枣仁汤抗失眠、抗焦虑作用研究 [D]. 咸阳: 陕西中医学院, 2014.
- [21] 陈金锋, 高家荣, 季文博, 等. 酸枣仁-五味子药对镇静催眠作用及机制研究 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4): 128-131.
- [22] 李爱平, 范玛莉, 张 松, 等. 山西老陈醋对大鼠机体影响的代谢组学研究 [J]. *食品科学*, 2015, 36(23): 268-274.
- [23] 张 敏, 杜晨晖, 马 敏, 等. 酸枣仁饮片汤剂质量评价研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4520-4527.
- [24] 赵 芳, 李 强, 梁梅丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定大鼠血清中 8 种神经递质 [J]. *分析化学*, 2018, 46(1): 121-128.
- [25] He W, Liu G, Cai H, *et al.* Integrated pharmacokinetics of five protoberberine-type alkaloids in normal and insomnic rats after single and multiple oral administration of Jiao-Tai-Wan [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3): 635-644.
- [26] 郑诏谦. 原络配穴为主针药结合治疗心肾不交型失眠症的临床研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [27] 张 妍, 解军波, 张彦青, 等. 镇静催眠药物的主要作用机制研究进展 [J]. *中国药房*, 2011, 22(41): 3906-3908.
- [28] 邓元江, 刘卫英, 梁伟雄, 等. 穴位埋线对青霉素致痫大鼠海马氨基酸类神经递质的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2006, 24(5): 827-829.
- [29] 孙春宇. 天王补心丸与磁朱丸对失眠大鼠睡眠时相影响的比较研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2007.
- [30] Lee R S, Steffensen S C, Henriksen S J. Discharge profiles of ventral tegmental area GABA neurons during movement, anesthesia, and the sleep-wake cycle [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(5): 1757-1766.
- [31] Manfredi A, Brambilla D, Mancina M. Sleep is differently modulated by basal forebrain GABA(A) and GABA(B) receptors [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 281(1): R170-R175.
- [32] 刁远明. 安寐汤促睡眠药效研究及机理初探 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [33] 许海玉, 王松松, 杨洪军, 等. 基于网络药理学探析复方阿胶浆辅助治疗肿瘤的作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(16): 3148-3151.
- [34] Wishart D S, Craig K, Guo A C, *et al.* DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. *Nucl Acid Res*, 2008, doi: 10.1093/nar/gkm958.
- [35] Python A, Steimer T, Hilaire Z D S, *et al.* Extracellular serotonin variations during vigilance states in the preoptic area of rats: A microdialysis study [J]. *Brain Res*, 2001, doi: 10.1016/S0006-8993(01)02477-5.