

基于网络药理学及动物实验探究落花生枝叶治疗失眠症的作用机制

黄玉玲¹, 王寅¹, 王国华¹, 周婷婷², 张雯静^{1*}

1. 上海中医药大学附属市中医医院, 上海 200071

2. 中国人民解放军海军军医大学药学院 药物分析教研室, 上海 200433

摘要: **目的** 基于网络药理学和动物实验探究落花生 *Arachis hypogaea* 枝叶 (PSL) 治疗失眠症的作用机制。 **方法** 借助数据库和在线平台筛选 PSL 活性成分及其靶点, 以及失眠症相关靶点, 利用 Venny 2.1 工具获取 PSL 与失眠症交集靶点, 并通过 STRING 数据库对交集靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析。利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑分析筛选出核心靶点, 并对核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。通过构建对氯苯丙氨酸 (parachlorophenylalanine, PCPA) 诱导的失眠大鼠模型对网络药理学结果进行体内实验验证。 **结果** 网络药理学结果表明 PSL 治疗失眠症可能与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)、多巴胺 D1 受体 (dopamine receptor D1, DRD1)、多巴胺 D2 受体 (dopamine receptor D2, DRD2)、 γ -氨基丁酸 A 型受体 1 (γ -aminobutyric acid receptor A1, GABRA1) 等靶点以及血清素能突触、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 信号通路、谷氨酸能突触、多巴胺能突触及胆碱能突触等通路相关。动物实验结果显示, PSL 显著减少失眠大鼠的运动距离、运动速度和运动时间 ($P < 0.01$), 增加静止时间 ($P < 0.01$), 使其运动轨迹有序, 从而改善大鼠的失眠以及焦虑样行为; PSL 能够改善大鼠海马神经元病理形态, 显著上调下丘脑中 5-羟色胺 (serotonin, 5-HT)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、GABA/谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 水平以及 γ -氨基丁酸 A 型受体 $\alpha 1$ (γ -aminobutyric acid receptor A $\alpha 1$, GABAA $\alpha 1$)、AKT1 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并显著下调下丘脑中 Glu、多巴胺 (dopamine, DA) 水平及 DRD1 表达和血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** PSL 可能通过调节 5-HT、Glu、GABA 和 DA 等神经递质以及 AKT1、TNF- α 、IL-1 β 等炎症物质, 从而治疗失眠症。

关键词: 失眠症; 落花生枝叶; 花生脯吟; 网络药理学; 神经递质; 炎症因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)21-7347-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.015

Mechanism of *Arachis hypogaea* stems and leaves in treatment of insomnia based on network pharmacology and animal experiments

HUANG Yuling¹, WANG Yin¹, WANG Guohua¹, ZHOU Tingting², ZHANG Wenjing¹

1. Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of *Arachis hypogaea* stems and leaves (PSL) in treating insomnia based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** The active ingredients and targets of PSL, as well as insomnia related targets, were screened using databases and online platforms. The intersection targets of PSL and insomnia were obtained using Venny 2.1 tool, and protein-protein interaction (PPI) analysis was performed on the intersection targets using STRING database. Cytoscape 3.9.1 software was used to perform topology analysis for screening core targets, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on core targets were performed. The network pharmacology results were validated *in vivo* by constructing a rat model of insomnia induced by parachlorophenylalanine (PCPA). **Results** The results of network

收稿日期: 2024-07-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2501500); 上海市治未病优势技术规范项目 [ZY (2021-2023) -0104-02-GF-04]

作者简介: 黄玉玲, 硕士研究生, 从事中医药防治失眠及神志病研究。Tel: 18229795397 E-mail: 3035661827@qq.com

*通信作者: 张雯静, 主任医师, 从事中医药防治失眠及神志病研究。Tel: 18616360246 E-mail: zhangwenjing@shutcm.edu.cn

pharmacology showed that the treatment of insomnia with PSL may be related to targets such as serine/threonine protein kinase 1 (AKT1), dopamine receptor D1 (DRD1), dopamine receptor D2 (DRD2), γ -aminobutyric acid receptor A1 (GABRA1), as well as pathways such as serotonergic synapses, cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway, glutamatergic synapses, dopaminergic synapses and cholinergic synapses. Animal experiment results showed that PSL significantly reduced the movement distance, speed and time of insomnia rats ($P < 0.01$), increased the resting time ($P < 0.01$), and made their movement trajectory orderly, thereby improving insomnia and anxiety like behavior in rats; PSL could improve the pathological morphology of hippocampal neurons in rats, significantly up-regulate the levels of serotonin (5-HT), γ -aminobutyric acid (GABA), GABA/glutamate (Glu) as well as the expressions of γ -aminobutyric acid receptor A α 1 (GABAA α 1) and AKT1 in hypothalamus ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and significantly down-regulate the levels of Glu, dopamine (DA) and DRD1 expression in hypothalamus as well as the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in serum ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** PSL may treat insomnia by regulating neurotransmitters such as 5-HT, Glu, GABA and DA, as well as inflammatory substances such as AKT1, TNF- α and IL-1 β .

Key words: insomnia; *Arachis hypogaea* stems and leaves; 4-hydroxy-*N*-methylproline; network pharmacology; neurotransmitter; inflammatory factor

失眠症以频繁而持续的入睡和睡眠维持困难为主要特征^[1], 作为最常见的睡眠-觉醒障碍类型, 其发病率高, 在我国已达 30% 以上^[2], 同时给人们造成认知障碍、焦虑和抑郁、免疫功能障碍、心血管疾病发病率和全因死亡率增加的风险等多种不良后果^[3-6]。尽管目前镇静催眠类药物可以充分缓解症状, 但产生的过度镇静、耐药性、成瘾性和神经毒性^[7-8]等不良反应限制了其在临床上的应用。中医药治疗失眠症有较好的疗效和特色优势^[9], 越来越多学者将注意力集中在中药复方、单味药、中药单体及提取物等, 从而慢慢挖掘中药治疗失眠症的作用机制。

豆科植物落花生 *Arachis hypogaea* L. 的枝叶始载于《滇南本草》^[10]: “治跌打损伤, 敷伤处”。其性味寒, 微苦涩, 归肝经, 有清热解毒、平肝解郁、宁神降压之效, 主治失眠、痈肿疮毒、高血压。《常见病验方研究参考资料》中记载: “失眠: 取鲜花生叶 3 两, 煮水喝”。上海中医药大学附属市中医医院全国名老中医王翹楚教授带领课题组对 PSL 开展近 20 年的研究, 并将其应用于临床治疗失眠症近 30 余年, 前期药效以及大量临床研究证明其治疗失眠症安全有效^[11-14]。Deng 等^[15]采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用仪 (ultra performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 对 PSL 提取物进行定性分析, 共鉴定出 283 种化合物, 其中 207 种化合物为 PSL 的新鉴定化合物。张小利等^[16]采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对 PSL 成分进行定量分析, 鉴定出 1 种活性成分——*N*-甲基-反式-4-羟

基-*L*-脯氨酸。研究表明 PSL 提取物有镇静催眠作用, 其镇静催眠作用可能归功于高水平的芳樟醇及其分解产物, 后续研究发现其可能通过 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能系统增强戊巴比妥钠治疗大鼠的镇静作用^[17]。与其他中药一样, 因 PSL 作用机制尚不清楚, 故而不能进一步推广和使用。

网络药理学是近年来一种新兴的综合分析工具, 建立在大型数据库的基础上, 从“整体”视角预测药物、靶标和疾病之间的潜在关系, 从而全面挖掘中药治疗疾病的作用机制以及新药开发的指导^[18-20], 它所具有的整体性和系统性特征与中医药的“整体观念”不谋而合。故本研究基于网络药理学, 预测 PSL 治疗失眠症的潜在作用机制, 通过体内实验进行进一步的验证, 为 PSL 后续的实验研究提供基础, 也为临床治疗提供更充分的科学支撑。

1 材料

1.1 动物

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (150 ± 20) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证编号 20220004011382, 许可证号 SCXK (沪) 2022-0004。动物饲养于温度 24~27 °C、相对湿度 50%~80%、12 h 明暗循环的条件下, 自由进食饮水。动物实验经上海市中医医院实验中心动物实验伦理与福利委员会批准 (批准号 2021005)。

1.2 药材

PSL (批号 20220701) 购自安徽德昌药业股份有限公司, 经上海市中医医院王国华主管中药师鉴定为豆科落花生属植物落花生 *A. hypogaea* L. 的茎枝和叶。

1.3 药品与试剂

对氯苯丙氨酸(parachlorophenylalanine, PCPA, 批号 T07J12Y136788, 质量分数 $\geq 98\%$)购自源叶生物科技有限公司; 地西洋(国药准字 H31021151, 批号 14200101)购自上海上药信谊药厂有限公司; 5-羟色胺(serotonin, 5-HT) ELISA 试剂盒(批号 20221211036)、多巴胺(dopamine, DA) ELISA 试剂盒(批号 20221212014)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 20230206063)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) ELISA 试剂盒(批号 20230207013)、GABA ELISA 试剂盒(批号 ER9294M)、谷氨酸(glutamic acid, Glu) ELISA 试剂盒(批号 ET0060M)购自上海威奥生物科技有限公司; γ -氨基丁酸 A 型受体 $\alpha 1$ (γ -aminobutyric acid receptor A $\alpha 1$, GABAA $\alpha 1$)抗体(批号 ab252430)、多巴胺 D1 受体(dopamine receptor D1, DRD1)抗体(批号 AB81296)购自英国 Abcam 公司; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (serine/threonine-protein kinase 1, AKT1)兔抗(批号 9272S)购自美国 CST 公司; 山羊抗兔二抗(批号 G1213)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 AC220730012)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.4 仪器

Epoch 2 型酶标仪(美国 BioTek 公司); ChemiDoc XRS 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司); Neofuge 15R 型高速冷冻离心机(香港 Heal Force 公司); CX-43 型光学显微镜(日本奥林巴斯公司); Excelsior ES 型组织脱水机、HistoStar 包埋机(美国 Thermo 公司); R2245 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); XR-XZ301 型自发活动分析系统(上海欣软科技有限公司)。

2 方法

2.1 基于网络药理学探究 PSL 治疗失眠症的作用机制

2.1.1 PSL 活性成分及其靶点的筛选 通过中药系统药理学数据库与平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP)搜索 PSL 的化学组成成分, 并通过查阅国内外文献将其补全。运用 PubChem 数据库获取成分的化合物结构式或 Canonical SMILES 号, 未检索到的化合物通过 Swiss Target Prediction 数据库^[21]在线

绘制化合物结构式, 将 Canonical SMILES 导入 Swiss ADME, 以 Gi 为“High”且类药性预测(Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge)结果中至少满足 2 个“YES”进行初步筛选, 并导入 TCMSP 数据库中满足口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $> 30\%$ 、类药性(drug-likeness, DL) > 0.18 。将筛选出来的化合物再导入 Swiss Target Prediction, 以“homo sapiens”为研究物种, 选择“probability > 0 ”的靶点作为其作用的蛋白质靶点^[22], 然后通过 Uniprot 蛋白质数据库将筛选出的化合物作用的蛋白质靶点进行统一规范。

2.1.2 失眠症及其药物靶点基因的筛选 以“insomnia”为关键词, 在人类基因数据库(GeneCards)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)数据库、药物靶标数据库(TTD)中检索治疗失眠症的潜在靶点, 在 DrugBank 数据库检索治疗失眠症的化学药作用靶点予以补充^[23]。在 GeneCards 数据库中, Score 值越高则代表该靶点与疾病联系越密切, 若靶点过多则选取 Score 大于中位数的靶点为失眠的潜在靶点。合并 4 个疾病数据库靶点后删除重复靶点, 最终获得失眠靶点。

2.1.3 成分-疾病共有靶点的筛选 为明晰 PSL 成分靶点与失眠症靶点间的相互作用, 利用 Venny 2.1.0 在线工具导入 PSL 成分靶点和失眠症靶点, 取两者交集, 并绘制韦恩图。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将 PSL 成分-失眠症交集靶点导入 STRING 11.0 数据库构建 PPI 网络图^[24], 把生物种类设置成“Homo sapiens”, 最小互相作用阈值设定为“medium confidence (> 0.4)”, 其余设置均为默认设置, 得到 PPI 网络。利用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 网络图进一步分析, 其中度值越大, 节点颜色越深。运用 Centiscape 2.2 插件和“Network Analyzer”的功能进行拓扑分析, 计算出度中心性(degree centrality, DC)、中介中心性(betweenness centrality, BC)、紧密中心性(closeness centrality, CC)的平均值, 大于 3 者均值的靶点为核心靶点。

2.1.5 PSL 治疗失眠症的通路富集分析 将 PSL 治疗失眠的交集靶点录入 Metascape 平台, 设定 $P < 0.01$ 、最小基因数为 3、富集因子 > 1.5 , 对交集靶点进行基因本体(gene ontology, GO)功能注释及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of

genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 确定关键生物功能和相关信号通路^[25]。利用微生信在线平台对 GO 功能注释和 KEGG 通路富集结果进行可视化分析。

2.2 体内实验验证 PSL 治疗失眠症的作用机制

2.2.1 PSL 水煎剂的制备 精确称量 600 g PSL, 加水 7.2 L, 浸泡 30 min, 大火煮沸, 改文火继续煎煮 0.5 h, 稍冷却, 滤过药液; 再加入 6 000 mL 水, 进行煎煮, 方法同前。合并 2 次药液, 浓缩至以生药量计 3 g/mL。采用 HPLC 法对浓缩液进行定量分析, PSL 水煎剂含花生脯吟 5.07 g/L^[16]。

2.2.2 造模、分组及给药 将 PCPA 粉末用适量聚山梨酯 80 和生理盐水助溶, 配制质量浓度为 40 mg/mL 的混悬液。取 24 只 SD 大鼠, 每天 ip PCPA (400 mg/kg), 连续 3 d^[26]。另取 6 只大鼠作为对照组。造模第 3 天进行眼眶取血, 每组随机抽取 6 只, 血样于 4 ℃ 静置 30 min, 4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min, 获得血清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测对照组和造模后大鼠血清中 5-HT 水平, 模型组大鼠血清中 5-HT 水平显著低于对照组, 表明 PCPA 大鼠失眠模型复制成功^[27]。将造模成功的大鼠随机分成模型组、地西洋 (0.5 mg/kg, 相当于人体催眠剂量 5 mg/kg) 组和 PSL (3.125 g/kg, 相当于生药 30 g/kg)^[11]组, 每组 6 只, 各组大鼠 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 7 d。

2.2.3 旷场实验 末次给药后 1 h, 采用自主活动分析系统进行大鼠自发活动分析。每只大鼠在实验室单独放置 10 min 以适应环境, 然后放入 50 cm×50 cm 活动箱中记录 10 min 内大鼠的活动情况, 并收集同步视频和时间记录, 每只大鼠记录结束后清洁箱内, 以免实验受到干扰。

2.2.4 血清样本收集及处理 末次给药前, 各组大鼠禁食 12 h, 给药后 1 h 麻醉, 取腹主动脉血、下丘脑以及海马, 腹主动脉血于 4 ℃ 静置 30 min, 4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min, 吸取上清液以获得血清, 血清和下丘脑均于 -80 ℃ 冷冻保存备用, 海马组织浸泡在 4% 多聚甲醛中备用。

2.2.5 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 观察海马组织病理变化 将固定在多聚甲醛的海马组织包埋在石蜡里, 并切成 5 μm 厚的切片, 将切片依次置于不同浓度的二甲苯、无水乙醇中浸泡脱水后, 浸泡于蒸馏水中, 流水冲洗后, 苏木素

染 8~9 min, 分化液 10 s, 反蓝液 5 min, 伊红染液 4~5 s, 甩干后用中性树胶封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.2.6 ELISA 检测血清中 5-HT、DA、GABA、Glu 水平 取各组大鼠血清样本, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 5-HT、DA、GABA、Glu 水平。

2.2.7 Western blotting 检测下丘脑 GABAA α 1、DRD1、AKT1 蛋白表达 取下丘脑称定质量, 按照 1:30 的比例加入含蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂的裂解液, 充分研磨后在冰上静置 30 min, 4 ℃、12 000×g 离心 15 min, 取上清液进行 BCA 蛋白定量, 其余上清液加入蛋白上样缓冲液, 煮沸使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 封闭液, 室温于摇床上封闭 90 min。加入一抗稀释液, 4 ℃ 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的二抗 (1:3 000), 于避光盒中常温孵育 60 min; TBST 洗膜 4 次, 每次 15 min, 滴加 ECL 发光液, 于化学发光成像仪上进行曝光, 并保存图片, 利用 Image J 软件获取各条带的灰度值。

2.2.8 统计学分析 运用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 服从正态分布, 多样本均数间比较则采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 不服从则用 Kruskal-Wallis H 检验, 两组间的比较采用 LSD-*t* 检验, 采用 GraphPad Prism 8 软件绘制统计图。

3 结果

3.1 PSL 潜在的活性成分及成分靶点

参考 Deng 等^[16]的 UPLC-QTOF-MS 方法对 PSL 进行定性分析, 共鉴定出 283 种化合物, 通过 PubChem、Swiss ADME 筛选出 14 种活性成分 (表 1), 运用 Swiss Target Prediction 平台预测 14 种活性成分的作用靶点, 合并后去重, 最终得到 501 个 PSL 的潜在作用靶点。

3.2 失眠症靶点的获取

通过 GeneCards、OMIM、TTD 和 DrugBank 数据库对失眠症靶点进行检索和汇总, 合并 4 个数据库靶点并删除重复值, 最终获得 2 011 个失眠相关靶点 (图 1)。

3.3 PSL 治疗失眠症的关键靶点

通过在线 Venny 2.1.0 工具导入 PSL 成分靶点 501 个和失眠症靶点 2 011 个, 取两者交集靶点 117 个 (图 2)。

表 1 PSL 主要活性成分

Table 1 Main active components of PSL

成分编号	成分名	OB/%	DL
MOL000279	橙黄决明素	31.55	0.37
MOL000380	葛花昔元	37.78	0.30
MOL002932	酒酵母甾醇	37.96	0.77
MOL002991	(-)-melilotocarpin D	38.96	0.48
MOL002997	丹参酮II _A	49.89	0.40
MOL005267	14-去氧穿心莲内酯	56.30	0.31
MOL005916	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚	57.53	0.81
MOL006472	anomalin	59.65	0.66
MOL007154	美迪紫檀素	60.46	0.34
MOL007563	(6aR,11aR)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷	64.26	0.42
MOL008226	野麦角碱	72.87	0.27
MOL011076	黄芩新素 I	76.26	0.29
MOL011732	降香黄炔	86.18	0.27

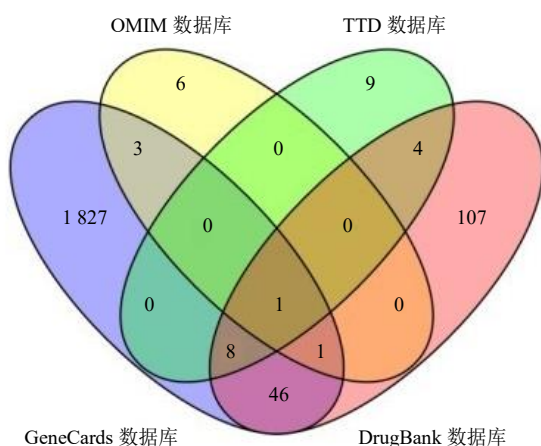


图 1 GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank 数据库疾病靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of disease target in GeneCards, OMIM, TTD and DrugBank databases

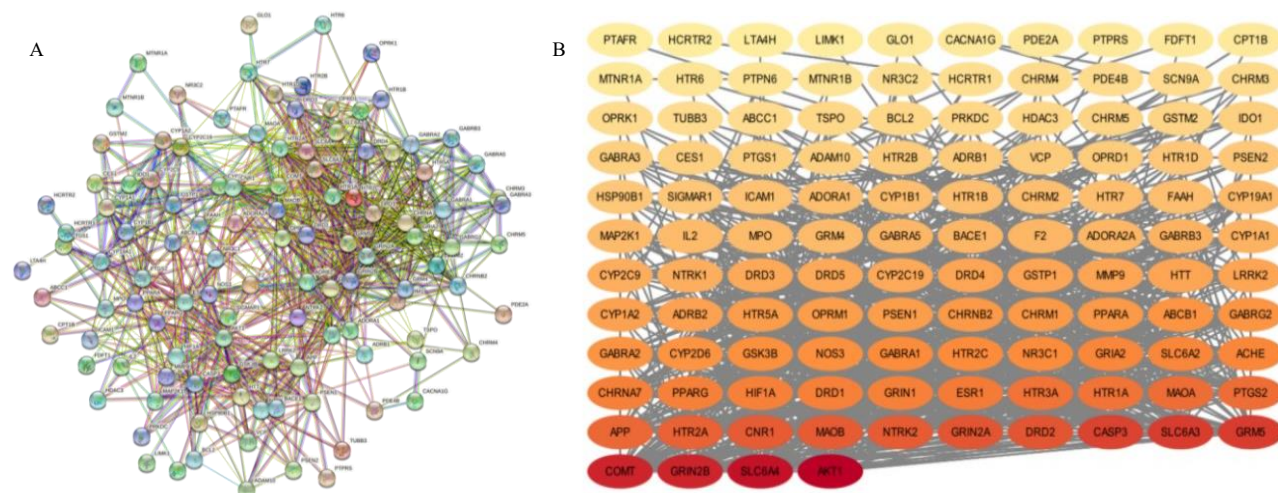


图 3 PSL 治疗失眠症的 PPI 网络 (A) 和关键靶点 (B)

Fig. 3 PPI network (A) and key targets (B) of PSL in treating insomnia

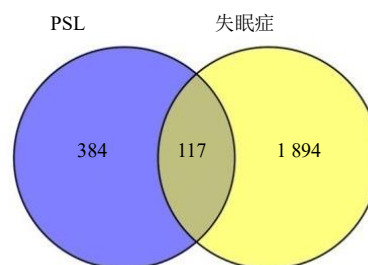


图 2 PSL 成分-失眠症靶点的 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of PSL component-insomnia target

3.4 PSL 治疗失眠症的 PPI 网络分析

通过 STRING 数据库对 117 个交集靶点进行 PPI 分析, 结果显示 PSL 治疗失眠症共有 113 个节点和 1 846 条边 (图 3-A)。通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建 PPI 网络图进行可视化, 其中度值越大, 节点颜色越深, 说明该基因靶点参与的生物功能越多。DC、BC 以及 CC 的平均值分别为 32.456、136.930 和 0.004, 大于三者均值的靶点有 35 个 (图 3-B)。主要包括 AKT1、溶质载体家族 6 成员 4 (solute carrier family 6 member 4, SLC6A4)、N-甲基-D-天冬氨酸离子能谷氨酸受体 2B (N-methyl-D-aspartate ionotropic glutamate receptor 2B, GRIN2B)、儿茶酚胺-O-甲基转移酶 (catechol-O-methyltransferase, COMT)、代谢型谷氨酸受体 5 (glutamate receptor metabotropic 5, GRM5)、SLC6A3、多巴胺 D2 受体 (dopamine receptor D2, DRD2)、DRD1、GRIN2A、GABRA1 等靶点, 大多数是 5-HT、GABA、Glu、DA 等神经活性配体受体以及细胞增殖、凋亡相关受体, 这些靶点可能在 PSL 治疗失眠症中发挥重要作用。

3.5 GO 功能注释和 KEGG 通路分析

通过 Metascape 平台对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路分析,得到具有统计学意义($P < 0.01$ 、最小基因数为 3、富集因子 > 1.5)的富集结果。GO 功能分析条目总共 1 390 条,包括 1 120 条生物过程(biological process, BP)、114 条细胞组分(cellular component, CC)、156 条分子功能(molecular function, MF),选取排名前 10 的条目进行可视化

分析(图 4)。结果显示,PSL 可能通过调控神经受体活性、谷氨酸受体活性、肾上腺素能受体活性等发挥抗失眠作用。KEGG 通路结果显示交集靶点涉及 121 条通路,将排名前 20 的通路绘制成气泡图(图 5),PSL 治疗失眠症可能与血清素能突触、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)信号通路、谷氨酸能突触、多巴胺能突触及胆碱能突触等信号通路等相关。

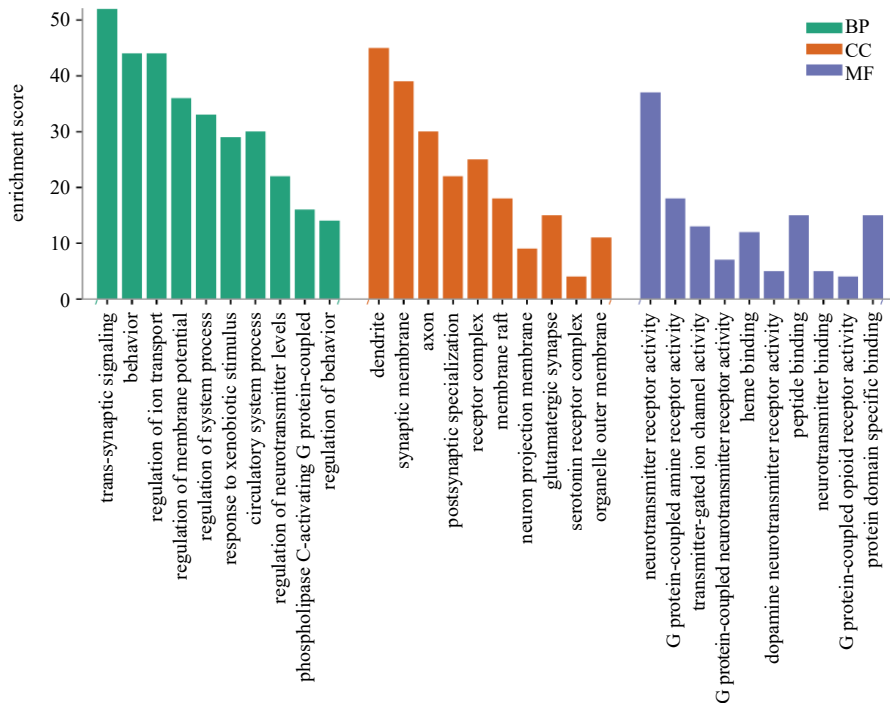


图 4 PSL 成分-失眠症交集靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function enrichment analysis of PSL component-insomnia intersection target

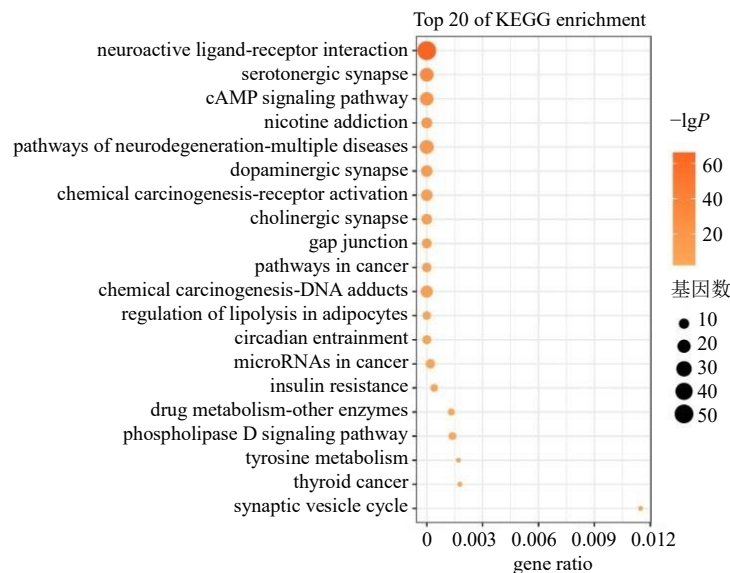


图 5 PSL 成分-失眠症交集靶点的 KEGG 通路富集分析

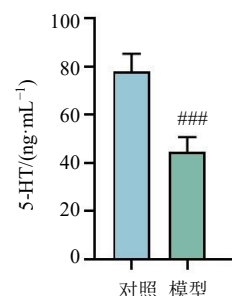
Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of PSL component-insomnia intersection target

综上, PSL 治疗失眠症的潜在靶点主要包括 AKT1、SLC6A4、GRIN2B、COMT、GRM5、SLC6A3、DRD1、DRD2、GRIN2A、GABRA1 等 35 个靶点。通过文献检索发现, SLC6A4 是 5-HT 转运体基因^[28], GABRA1 是 GABAA1 型受体^[29], GRM5、GRIN2A 以及 GRIN2B 是 Glu 受体基因之一^[30-32], COMT 是 DA 主要代谢酶之一, SLC6A3、DRD1、DRD2 分别是 DA 转运蛋白及其受体^[33-35]。5-HT、GABA、DA、Glu 等神经递质与睡眠有着密切联系。推测 PSL 治疗失眠症与 5-HT、GABA、DA、Glu 等神经递质的调节有关。AKT1 在炎症和免疫调节过程中扮演重要角色^[36], 有研究表明 AKT1 基因敲除导致觉醒增加, 非快眼动睡眠增加^[37]。同时近年来研究发现免疫系统和睡眠之间也存在一定联系, AKT1 和 IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子与睡眠调节存在一定联系; 同时 KEGG 通路结果也显示 PSL 治疗失眠症主要与血清素能突触、cAMP 信号通路、谷氨酸能突触、多巴胺能突触及胆碱能突触等多途径相关。PSL 可能通过神经递质和炎症这 2 条途径治疗失眠症, 因此本研究进一步通过体内实验探究 PSL 对失眠大鼠 5-HT、GABA、Glu、DA 等神经递质及其相关受体 GABAA α 1、DRD1, 以及 AKT1、TNF- α 、IL-1 β 等炎症相关物质的影响。

3.6 动物实验验证

3.6.1 模型评价结果 与对照组比较, 造模大鼠表

现出毛发黄糙蓬乱、大便变稀、体质量变轻以及攻击性增强等一般状态和行为的改变, 且造模大鼠血清中 5-HT 水平显著降低 ($P<0.001$, 图 6), 表明失眠模型制备成功。



与对照组比较: ### $P<0.001$ 。
$P<0.001$ vs control group.

图 6 大鼠血清中 5-HT 水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Fig. 6 5-HT level in serum of rats in each group
($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.6.2 旷场实验 如表 2 和图 7 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠的运动距离、运动速度、运动时间明显增加 ($P<0.01$), 静止时间明显减少 ($P<0.01$), 运动轨迹无序, 再次证明 PCPA 诱导的失眠模型复制成功。与模型组比较, PSL 组大鼠的运动距离、运动速度、运动时间明显减少 ($P<0.01$), 静止时间明显增多 ($P<0.01$), 运动轨迹变有序。表明 PSL 可以减少失眠大鼠自发活动, 缓解其焦虑样行为。

表 2 PSL 对失眠大鼠自主活动情况的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of PSL on autonomous activity in insomnia rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	运动距离/mm	运动速度/(mm·s ⁻¹)	运动时间/s	静止时间/s
对照	—	19 513.13 $\pm$ 1 635.75	32.54 $\pm$ 2.73	344.59 $\pm$ 17.63	255.00 $\pm$ 17.72
模型	—	36 324.70 $\pm$ 3 313.72 ^{###}	60.89 $\pm$ 5.59 ^{###}	454.62 $\pm$ 22.96 ^{###}	142.15 $\pm$ 22.62 ^{###}
PSL	1.325	21 684.12 $\pm$ 3 021.22 ^{**}	36.25 $\pm$ 5.09 ^{**}	355.96 $\pm$ 31.13 ^{**}	242.79 $\pm$ 31.59 ^{**}
地西洋	5 $\times$ 10 ⁻⁴	25 651.33 $\pm$ 5 172.42 [*]	42.75 $\pm$ 8.62 [*]	384.71 $\pm$ 36.25	215.28 $\pm$ 36.25

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 表 3 同。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as Table 3.

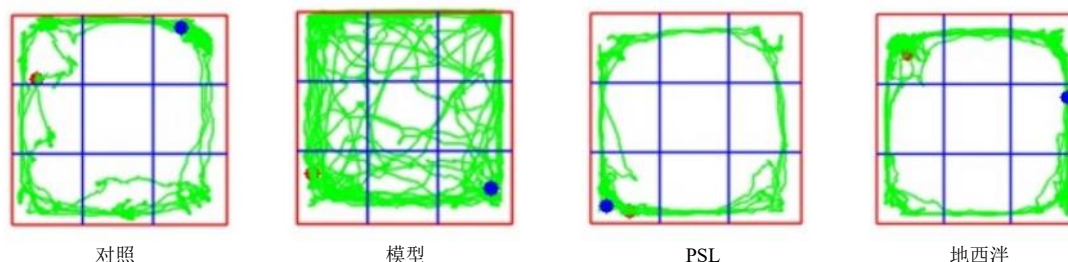


图 7 各组大鼠运动轨迹情况

Fig. 7 Movement track of rats in each group

3.6.3 对失眠大鼠海马组织病理变化的影响 如图 8 所示, 对照组大鼠海马神经元细胞排列紧密、整齐, 形态规则; 与对照组比较, 模型组大鼠神经元排列稀疏、紊乱, 神经元数量减少, 出现核固缩现象; 与模型组比较, PSL 组和地西洋组大鼠海马神经元数量增加, 排列较整齐。表明 PSL 可以改善失眠大鼠海马神经元损伤。

3.6.4 对失眠大鼠下丘脑中 5-HT、GABA、Glu、GABA/Glu、DA 以及血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 如表 3 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠下

丘脑中 5-HT、GABA 以及 GABA/Glu 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 下丘脑中 Glu、DA 以及血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, PSL 组大鼠下丘脑中 5-HT、GABA 以及 GABA/Glu 水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 下丘脑中 Glu、DA 以及血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01); 地西洋组大鼠下丘脑中 GABA 水平显著升高 ($P<0.01$), 下丘脑中 Glu 水平显著降低 ($P<0.01$), 但下丘脑中 5-HT、DA 以及血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平无明显变化。

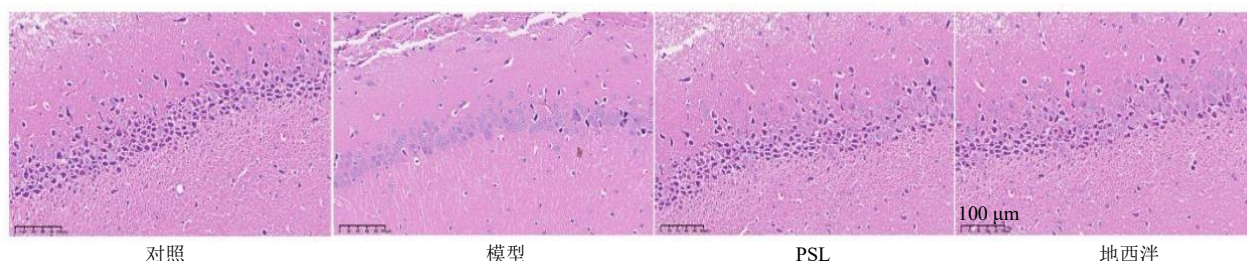


图 8 PSL 对失眠大鼠海马组织病理变化的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 8 Effect of PSL on pathological changes in hippocampus of insomnia rats (HE, $\times 100$)

表 3 PSL 对失眠大鼠下丘脑中 5-HT、GABA、Glu、GABA/Glu、DA 以及血清中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of PSL on levels of 5-HT, GABA, Glu, GABA/Glu, DA in hypothalamus and levels of TNF- α , IL-1 β in serum of insomnia rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	5-HT/ (ng·mL ⁻¹)	GABA/ (pg·mL ⁻¹)	Glu/ (ng·mL ⁻¹)	GABA/Glu	DA/ (ng·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)	IL- β / (pg·mL ⁻¹)
对照	—	137.14 $\pm$ 5.79	579.27 $\pm$ 84.88	1.79 $\pm$ 0.09	0.32 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.10	344.98 $\pm$ 26.87	364.12 $\pm$ 11.87
模型	—	85.21 $\pm$ 22.61 [#]	327.34 $\pm$ 26.33 ^{##}	2.59 $\pm$ 0.18 ^{##}	0.13 $\pm$ 0.01 ^{###}	1.99 $\pm$ 0.24 [#]	507.62 $\pm$ 5.21 ^{##}	650.26 $\pm$ 122.18 [#]
PSL	1.325	163.35 $\pm$ 13.73 ^{**}	499.58 $\pm$ 28.47 [*]	2.17 $\pm$ 0.10 [*]	0.23 $\pm$ 0.01 [*]	1.45 $\pm$ 0.02 [*]	344.66 $\pm$ 27.31 ^{**}	333.05 $\pm$ 21.49 ^{**}
地西洋	5 $\times$ 10 ⁻⁴	126.92 $\pm$ 7.30	543.85 $\pm$ 15.36 ^{**}	1.97 $\pm$ 0.06 ^{**}	0.28 $\pm$ 0.01 ^{**}	1.87 $\pm$ 0.05	548.02 $\pm$ 44.49	809.12 $\pm$ 27.51

3.6.5 对失眠大鼠下丘脑中 GABAA α 1、DRD1 和 AKT1 蛋白表达的影响 如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠下丘脑中 GABAA α 1、AKT1 蛋白表达水平明显下降 ($P<0.01$ 、 0.001), DRD1 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, PSL 组大鼠下丘脑中 GABAA α 1、AKT1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), DRD1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$); 地西洋组下丘脑中 GABAA α 1、AKT1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), DRD1 蛋白表达水平无明显变化。

4 讨论

失眠症作为最常见的睡眠-觉醒障碍类型, 其发病率正在逐年攀升, 造成的各种不良后果也严重影响着人们的身体健康和生活质量。但由于失眠症的

病因多样、表型复杂及发病机制不明^[38], 临床上现有的失眠症干预措施比较局限, 亟需安全、有效、易于推广、低成本的治疗手段。PSL 来源广泛, 治疗失眠症安全有效, 然而其作用机制尚未明确。故本研究基于网络药理学并通过构建 PCPA 诱导的失眠大鼠模型进行体内实验验证, 对 PSL 治疗失眠症的作用机制进行初步探究。

PCPA 主要通过特异性抑制色氨酸羟化酶, 阻碍 5-HT 的合成, 从而诱导失眠^[39], 其操作简单、效果明确, 在研究中应用广泛^[40]。焦虑与失眠高度相关, 睡眠剥夺降低了压力耐受性的心理阈值^[41-42]。有文献报道 PCPA 诱导的失眠大鼠具有焦虑样行为^[43]。旷场实验主要用于观察大鼠在新环境中的探索行为和兴奋性, 通过大鼠运动距离、运动速度、

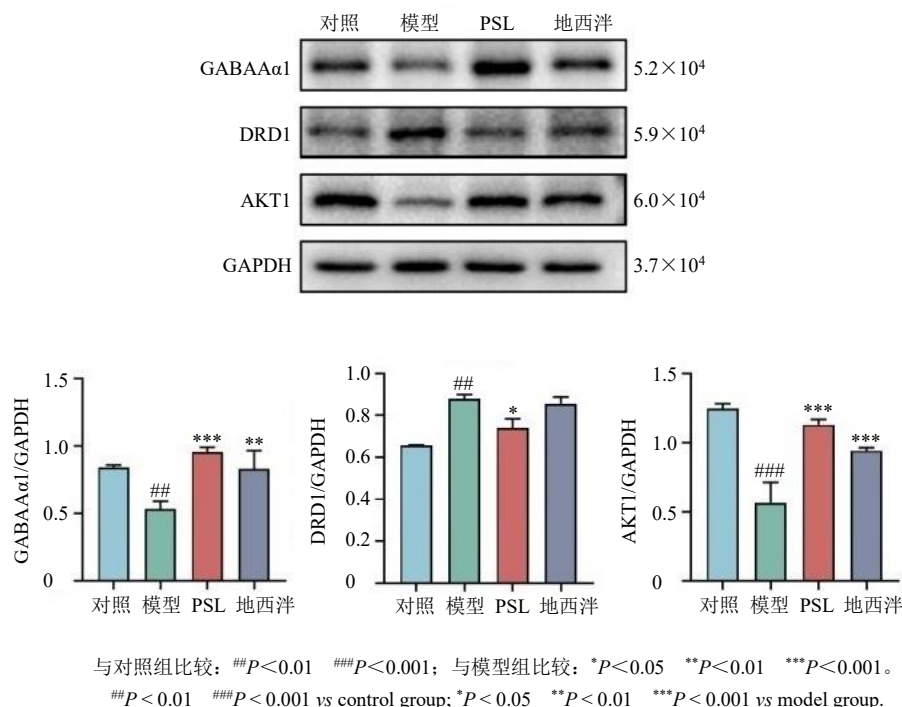


图9 PSL对失眠大鼠下丘脑中GABAα1、DRD1和AKT1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of PSL on expressions of GABAα1, DRD1 and AKT1 protein in hypothalamus of insomnia rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

运动时间以及运动轨迹反映其兴奋性和紧张度^[44], 以此评估大鼠的焦虑样行为。本研究结果表明, PCPA 诱导的失眠大鼠具有焦虑样行为, 而 PSL 可以减少失眠大鼠自主活动, 改善失眠大鼠焦虑样行为。有研究表明海马神经元可塑性损伤同睡眠障碍密切相关, 睡眠剥夺会增加氧化应激导致海马损伤, 最终导致大脑的神经元凋亡^[45-46]。本研究表明失眠大鼠的海马神经元排列稀疏、紊乱, 数量减少, 而 PSL 可以改善海马神经元的损伤。

网络药理学结果显示, PSL 治疗失眠症的潜在靶点主要包括 AKT1、SLC6A4、GRIN2B、COMT、GRM5、SLC6A3、DRD1、DRD2、GRIN2A、GABRA1 等 35 个靶点, 通过 KEGG 通路富集分析, PSL 治疗失眠症可能与谷氨酸能突触、血清素能突触、多巴胺能突触及胆碱能突触等多途径相关。5-HT、GABA、DA、Glu 以及去甲肾上腺素等神经递质与睡眠密切相关。SLC6A4 是 5-HT 转运体基因之一, 研究显示夜间睡眠时间较短和抑郁情绪较高的年轻人比其他人更可能携带低表达的 SLC6A4 基因突变体^[27], 也会影响老年人睡眠发作潜伏期^[47]。GABA 和 Glu 分别是抑制性和兴奋性神经递质, 两者均可调节睡眠^[48]。研究表明镇静催眠药物的作用主要是由 GABAα1 受体介导的, 其分子机制可能是通过

控制抑制性突触后电流的持续时间来调节抑制性突触的强度^[29]。GRM5、GRIN2A、GRIN2B 是 Glu 受体基因, 研究表明睡眠慢波系统包括具有高可用性 GRM5 的皮质和皮质下脑区, 如内侧上额叶皮质、背外侧前额皮质、下顶叶皮质和楔前叶等^[30-32]。GRM5 与睡眠觉醒周期也相关, 睡眠缺失诱导了 GRM5 信号下游的改变^[49]。而 GABA/Glu 值反映神经细胞的抑制与兴奋间平衡, 常用于中枢神经系统功能兴奋和抑制状态的研究和评价, 二者保持相对平衡^[50], 从而维持一种正常的睡眠-觉醒状态。DA 是一种觉醒促进剂, 是调控睡眠和觉醒的重要组成部分^[51-52]。此外, 一些研究集中在遗传儿茶酚胺标记物的作用, 包括 COMT、DRD1 和 DRD2。大脑 DA 水平主要由纹状体中的 DAT 和前额皮质中的 COMT 调节^[34], 并显示其与睡眠剥夺的神经行为脆弱性有关^[53-54]。DA 主要通过 D1R 和 D2R 发挥促觉醒作用^[55]。DAT1 和 DRD2 C957T 基因型已被证明明显调节睡眠剥夺诱导的清醒脑电图中主观嗜睡、精神运动警觉任务睡眠时间的变化^[56]。有学者认为 COMT 基因常见功能的变异会影响睡眠-觉醒的调节, 其遗传多态性与睡眠剥夺的高脆弱性或高弹性有关^[34-35]。本研究表明 PSL 可以上调血清中 5-HT、GABA、GABA/Glu 水平, 并下调 DA、Glu 水

平; Western blotting 结果显示 PSL 能增加下丘脑中 GABAA α 1 的表达,降低 DRD1 的表达。表明 PSL 通过调控多种神经递质发挥治疗失眠症的作用。

Akt 包括 AKT1、AKT2 和 AKT3,在炎症和免疫调节过程中扮演重要角色^[36]。有研究表明脂多糖会诱导下丘脑 AKT1 的激活,而 AKT1 基因敲除后导致觉醒增加,非快眼动睡眠增加,可能通过增加食欲素神经元活性逆转脂多糖引起的睡眠觉醒变化^[37]。近年来研究发现免疫和睡眠之间存在一定联系,人体免疫系统随着睡眠觉醒周期而发生改变,其中炎症因子水平也具有昼夜节律,与睡眠觉醒周期变化相一致,这更能说明炎症因子在睡眠调节中的重要作用^[57]。许多证据表明睡眠剥夺可以上调促炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的产生^[58-59]。同样有研究表明炎症因子 IL-4、IL-10、IL-13 的释放可能会影响慢波睡眠,甚至引起失眠^[60]。本研究结果表明 PSL 可以下调血清中 TNF- α 、IL-1 β 的水平,Western blotting 结果显示 PSL 能增加下丘脑中 AKT1 的表达。表明 PSL 通过抑制炎症相关物质,从而达到治疗失眠症的作用。

综上,PSL 能够通过多成分、多靶点、多途径来治疗失眠症。本研究证实 PSL 可以改善受损的海马神经元,通过调节 5-HT、GABA、Glu、DA 等神经递质及其相关受体 GABAA α 1、DRD1,以及 AKT1、TNF- α 、IL-1 β 等炎症相关物质,共同发挥治疗失眠症的作用。本研究为后续 PSL 治疗失眠症机制的深入研究提供了理论依据,也为 PSL 的临床治疗提供更充分的科学支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张斌. 中国失眠障碍诊断和治疗指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 2-3.
- [2] 中医科学院失眠症中医临床实践指南课题组. 失眠症中医临床实践指南 (WHO/WPO) [J]. 世界睡眠医学杂志, 2016, 3(1): 8-25.
- [3] LeBlanc M, Mérette C, Savard J, *et al.* Incidence and risk factors of insomnia in a population-based sample [J]. *Sleep*, 2009, 32(8): 1027-1037.
- [4] Taylor D J, Lichstein K L, Durrence H H. Insomnia as a health risk factor [J]. *Behav Sleep Med*, 2003, 1(4): 227-247.
- [5] Trauer J M, Qian M Y, Doyle J S, *et al.* Cognitive behavioral therapy for chronic insomnia: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Ann Intern Med*, 2015, 163(3): 191-204.
- [6] Morin C M. Cognitive behavioral therapy for chronic insomnia: State of the science versus current clinical practices [J]. *Ann Intern Med*, 2015, 163(3): 236-237.
- [7] Schutte-Rodin S, Broch L, Buysse D, *et al.* Clinical guideline for the evaluation and management of chronic insomnia in adults [J]. *J Clin Sleep Med*, 2008, 4(5): 487-504.
- [8] Tan K R, Rudolph U, Lüscher C. Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction [J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(4): 188-197.
- [9] Richey S M, Krystal A D. Pharmacological advances in the treatment of insomnia [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(15): 1471-1475.
- [10] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1977: 2323.
- [11] 王翹楚, 徐建, 施明, 等. 落花生枝叶制剂治疗失眠症疗效观察 [J]. 上海中医药杂志, 2001, 35(5): 8-10.
- [12] 王义方, 李华芳, 徐一峰, 等. 落花生枝叶制剂治疗失眠症的临床全盲验证观察 [J]. 上海中医药杂志, 2001, 35(5): 11-14.
- [13] 严晓丽, 张雯静, 许红, 等. 落花配方颗粒治疗失眠症 60 例 [J]. 陕西中医, 2011, 32(6): 692-693.
- [14] 张雯静, 王国华. 落花安神口服液治疗失眠症疗效的随机双盲安慰剂对照临床试验 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2801-2804.
- [15] Deng L, Shi A M, Liu H Z, *et al.* Identification of chemical ingredients of peanut stems and leaves extracts using UPLC-QTOF-MS coupled with novel informatics UNIFI platform [J]. *J Mass Spectrom*, 2016, 51(12): 1157-1167.
- [16] 张小利, 路发凯, 马梦杰. HPLC-ELSD 法测定花丹安神剂中 N-甲基-反式-4-羟基-L-脯氨酸的含量 [J]. 江苏科技信息, 2020, 37(18): 44-47.
- [17] Zu X Y, Xiong G Q, Geng S R, *et al.* *Arachis hypogaea* L. stem and leaf extract improves the sleep behavior of pentobarbital-treated rats [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(3): 388-391.
- [18] Wang K P, Miao X Y, Kong F H, *et al.* Integrating network pharmacology and experimental verification to explore the mechanism of effect of Zuojin Pills in pancreatic cancer treatment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3749-3764.
- [19] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [20] 宫贺, 罗嘉仪, 高雪, 等. 雷公藤多苷片生物碱类成分抗肝癌作用网络药理学探讨及诱导肝癌细胞毒性验证 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(1): 17-25.
- [21] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, *et al.* SwissTargetPrediction: A web server for target prediction

- of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(Web Server issue): W32-W38.
- [22] 赵少磊, 原震, 朱艳茹, 等. 基于网络药理学和分子对接探究地骨皮调血脂的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1487-1497.
- [23] Shang L R, Wang Y C, Li J X, *et al.* Mechanism of Sijunzi Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302(Pt A): 115876.
- [24] Liang J H, Huang Y J, Mai Z X, *et al.* Integrating network pharmacology and experimental validation to decipher the mechanism of action of Huanglian Jiedu Decoction in treating atherosclerosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 1779-1795.
- [25] An H M, Huang D R, Yang H, *et al.* Comprehensive chemical profiling of Jia-Wei-Qi-Fu-Yin and its network pharmacology-based analysis on Alzheimer's disease [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 189: 113467.
- [26] 杜晨晖, 裴香萍, 张敏, 等. 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 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2405-2412.
- [27] Luo H, Sun S J, Wang Y, *et al.* Revealing the sedative-hypnotic effect of the extracts of herb pair *Semen Ziziphi Spinosae* and *Radix Polygalae* and related mechanisms through experiments and metabolomics approach [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 206.
- [28] Carskadon M A, Sharkey K M, Knopik V S, *et al.* Short sleep as an environmental exposure: A preliminary study associating 5-HTTLPR genotype to self-reported sleep duration and depressed mood in first-year university students [J]. *Sleep*, 2012, 35(6): 791-796.
- [29] Swanson A M, Allen A G, Shapiro L P, *et al.* GABA α 1-mediated plasticity in the orbitofrontal cortex regulates context-dependent action selection [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2015, 40(4): 1027-1036.
- [30] Ametamey S M, Treyer V, Streffer J, *et al.* Human PET studies of metabotropic glutamate receptor subtype 5 with 11C-ABP688 [J]. *J Nucl Med*, 2007, 48(2): 247-252.
- [31] Dang-Vu T T, Schabus M, Desseilles M, *et al.* Spontaneous neural activity during human slow wave sleep [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(39): 15160-15165.
- [32] Hefti K, Holst S C, Sovago J, *et al.* Increased metabotropic glutamate receptor subtype 5 availability in human brain after one night without sleep [J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(2): 161-168.
- [33] Valomon A, Holst S C, Bachmann V, *et al.* Genetic polymorphisms of DAT1 and COMT differentially associate with actigraphy-derived sleep-wake cycles in young adults [J]. *Chronobiol Int*, 2014, 31(5): 705-714.
- [34] Dauvilliers Y, Tafti M, Landolt H P. Catechol-O-methyltransferase, dopamine, and sleep-wake regulation [J]. *Sleep Med Rev*, 2015, 22: 47-53.
- [35] Erblang M, Drogou C, Gomez-Merino D, *et al.* Genetics and cognitive vulnerability to sleep deprivation in healthy subjects: Interaction of ADORA2A, TNF- α and COMT polymorphisms [J]. *Life*, 2021, 11(10): 1110.
- [36] El-Shitany N A, Eid B G. Icarin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109567.
- [37] 熊越. Akt1 介导脂多糖诱导睡眠觉醒行为改变的作用与机制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [38] Morin C M, Drake C L, Harvey A G, *et al.* Insomnia disorder [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15026.
- [39] Borbély A A, Neuhaus H U, Tobler I. Effect of p-chlorophenylalanine and tryptophan on sleep, EEG and motor activity in the rat [J]. *Behav Brain Res*, 1981, 2(1): 1-22.
- [40] Xie G J, Huang P P, Wang P. Mechanism of modified Tianwang Buxindan on TRX system oxidative damage in PCPA insomnia model rats [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(6): 32-38.
- [41] Li C, Mai Y Q, Dong M S, *et al.* Multivariate pattern classification of primary insomnia using three types of functional connectivity features [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 1037.
- [42] Tranoulis A, Georgiou D, Soldatou A, *et al.* Poor sleep and high anxiety levels in women with functional hypothalamic amenorrhoea: A wake-up call for physicians? [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol X*, 2019, 3: 100035.
- [43] 衡依然, 段慧竹, 杜鹤, 等. 酸枣仁总皂苷改善对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠模型学习记忆损伤机制的研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(21): 6759-6770.
- [44] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 463(1/2/3): 3-33.
- [45] Zuo J X, Li M, Jiang L, *et al.* Hydrogen sulfide prevents sleep deprivation-induced hippocampal damage by upregulation of Sirt1 in the hippocampus [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 169.
- [46] Villarreal D M, Derrick B, Vathy I. Prenatal morphine exposure attenuates the maintenance of late LTP in lateral perforant path projections to the dentate gyrus and the CA3 region *in vivo* [J]. *J Neurophysiol*, 2008, 99(3): 1235-1242.
- [47] Polito L, Davin A, Vaccaro R, *et al.* Serotonin transporter

- polymorphism modifies the association between depressive symptoms and sleep onset latency complaint in elderly people: Results from the 'InveCe.Ab' study [J]. *J Sleep Res*, 2015, 24(2): 215-222.
- [48] Hirshkowitz M, Bhandari H. *Sleep Disorders Medicine* [M]. New York: Springer, 2017: 103-118.
- [49] Holst S C, Sousek A, Hefti K, *et al.* Cerebral mGluR5 availability contributes to elevated sleep need and behavioral adjustment after sleep deprivation [J]. *Elife*, 2017, 6: e28751.
- [50] 蒋晓江, 许志强, 刘娟. 内因性失眠症患者中枢抑制源 GABA 震荡的脑电涨落变化 [J]. 中国临床神经科学, 2005, 13(3): 236-238.
- [51] Herrera-Solis A, Herrera-Morales W, Nunez-Jaramillo L, *et al.* Dopaminergic modulation of sleep-wake states [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2017, 16(4): 380-386.
- [52] 吴成挺, 张青萍, 周娇娇, 等. 中药有效成分及方剂调控神经递质治疗失眠的研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(10): 207-209.
- [53] Satterfield B C, Hinson J M, Whitney P, *et al.* Catechol-O-methyltransferase (COMT) genotype affects cognitive control during total sleep deprivation [J]. *Cortex*, 2018, 99: 179-186.
- [54] Holst S C, Müller T, Valomon A, *et al.* Functional polymorphisms in dopaminergic genes modulate neurobehavioral and neurophysiological consequences of sleep deprivation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45982.
- [55] Belda X, Armario A. Dopamine D1 and D2 dopamine receptors regulate immobilization stress-induced activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis [J]. *Psychopharmacology*, 2009, 206(3): 355-365.
- [56] Whitney P, Hinson J M, Satterfield B C, *et al.* Sleep deprivation diminishes attentional control effectiveness and impairs flexible adaptation to changing conditions [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16020.
- [57] Redwine L, Dang J, Irwin M. Cellular adhesion molecule expression, nocturnal sleep, and partial night sleep deprivation [J]. *Brain Behav Immun*, 2004, 18(4): 333-340.
- [58] Irwin M R, Opp M R. Sleep health: Reciprocal regulation of sleep and innate immunity [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2017, 42(1): 129-155.
- [59] Irwin M. Effects of sleep and sleep loss on immunity and cytokines [J]. *Brain Behav Immun*, 2002, 16(5): 503-512.
- [60] Krueger J M. The role of cytokines in sleep regulation [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(32): 3408-3416.

[责任编辑 李亚楠]