

基于方证代谢组学的脑灵片治疗失眠症药效物质基础研究

闫广利¹, 杨 宇¹, 陈 蔗¹, 孙 晖^{1*}, 王小宇², 张 洁², 王喜军^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 经方与现代中药融合创新全国重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江乌苏里江制药有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 分析脑灵片治疗失眠症的效应生物标记物及关联体内显效成分, 揭示脑灵片治疗失眠症的药效物质基础。**方法** 建立对氯苯丙氨酸诱导的失眠症大鼠模型, 利用 UPLC-Q/TOF-MS 技术鉴定血清生物标记物及脑灵片治疗的效应生物标记物, 同时利用 UPLC-Q/TOF-MS 技术表征脑灵片血中移行成分, 通过 Spearman 关联度分析构建脑灵片血中移行成分与效应生物标记物的关联热图, 提取高度关联的血中移行成分作为脑灵片治疗失眠症的药效物质基础。**结果** 脑灵片能够显著回调肾上腺酸、花生四烯酸、鹅去氧胆酸、*L*-乙酰肉碱、*L*-苯丙氨酸、*L*-色氨酸、*L*-酪氨酸、油酰胺、泛酸、视黄酯 10 个失眠症大鼠模型生物标记物, 与生物标记物高度相关的脑灵片血中移行成分为绿原酸、4-羟基肉桂酸、木兰花碱、远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、淫羊藿苷、远志皂苷 V、宝藿苷 I、五味子醇甲、五味子酸、3-表去氢土莫酸、茯苓酸、脱糖羟基化宝藿苷 I、二羟基化箭藿苷 B 硫酸酯、去甲基二氢化远志吡啶 III。**结论** 利用方证代谢组学方法鉴定了脑灵片治疗失眠症的效应生物标记物, 并发现了五味子醇甲、五味子酸、淫羊藿苷等为脑灵片治疗失眠症的药效物质基础, 为质量标志物筛选及质量标准提升提供了科学依据。

关键词: 方证代谢组学; 脑灵片; 失眠症; 药效物质基础; 五味子醇甲; 五味子酸; 淫羊藿苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)08-2700-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.08.007

Pharmacodynamic material basis of Naoling Tablets in treatment of insomnia based on chinmedomics

YAN Guangli¹, YANG Yu¹, CHEN Zhe¹, SUN Hui¹, WANG Xiaoyu², ZHANG Jie², WANG Xijun¹

1. State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Heilongjiang Wusuli River Pharmaceutical Co., Ltd., Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To analyze the biomarkers and associated *in vivo* components of Naoling Tablets (脑灵片) in treatment of insomnia, and reveal the pharmacodynamic material basis of Naoling Tablets in treatment of insomnia. **Methods** A rat model of insomnia induced by chlorophenylalanine was established. UPLC-Q/TOF-MS technology was used to identify serum biomarkers and effect biomarkers of Naoling Tablets. UPLC-Q/TOF-MS technology was also used to characterize the components of Naoling Tablets in the blood. Spearman correlation analysis was used to construct a heatmap of the correlation between the components of Naoling Tablets in the blood and the effect biomarkers, and the highly correlated components were extracted as the pharmacodynamic material basis for Naoling Tablets in treating insomnia. **Results** Naoling Tablets could significantly regulate 10 biomarkers of insomnia rat model, including adrenal acid, arachidonic acid, chenodeoxycholic acid, *L*-acetylcarnitine, *L*-phenylalanine, *L*-tryptophan, *L*-tyrosine, oleamide, pantothenic acid and retinol ester. The components of Naoling Tablets in the blood that were highly correlated with the biomarkers included chlorogenic acid, 4-hydroxycinnamic acid, magnoflorine, polygalaxanthone III, 3,6'-disinapoyl sucrose, icariin, onjisaponin V, baohuoside I, schisandrin, schisandronic acid, 3-epidehydrotumulosic acid, pachymic acid, deglycosylated hydroxylated baohuoside I, dihydroxylated sagittatoside B sulfate and dimethyl dihydrogen polygalaxanthone III. **Conclusion** This study used

收稿日期: 2025-01-14

基金项目: 黑龙江省重点研发计划 (2022ZX02C04); 国家自然科学基金重点项目 (81830110)

作者简介: 闫广利, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药血清药物化学及方证代谢组学研究。E-mail: gancaosuan@163.com

*通信作者: 王喜军, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: xijunw@sina.com

孙 晖, 教授, 博士生导师, 从事中药体内直接作用物质及中药质量标准研究。E-mail: sunhui7045@163.com

chinmedomics method to identify the effect biomarkers of Naoling Tablets in treatment of insomnia, and found that schisandrin, schisandric acid, icariin and other substances were the pharmacodynamic material basis of Naoling Tablets in treatment of insomnia, providing a scientific basis for the screening of quality markers and the improvement of quality standards.

Key words: chinmedomics; Naoling Tablets; insomnia; pharmacodynamic material basis; schisandrin; schisandrin acid; icariin

脑灵片由黄精(蒸)、淫羊藿、苍耳子、麦冬、红参、远志(制)、酸枣仁(炒)、五味子、枸杞子、鹿茸、龟甲(醋制)、茯苓、大枣(去核)、熟地黄、鹿角胶配伍而成,具有补气血、养心肾、健脑安神的功能,用于神经衰弱、健忘失眠、头晕心悸、身倦无力、体虚自汗、阳萎遗精^[1]。脑灵片现行质量标准仅制定了显微鉴别方法,缺少必要的含量测定项,专属性不强,难以控制脑灵片质量。刘峰等^[2]建立了脑灵片的质量控制方法,采用薄层色谱法对方剂中的淫羊藿、枸杞子、五味子这 3 种药材进行了定性鉴别。肖利辉等^[3]采用高效液相色谱法测定脑灵片中主要成分淫羊藿苷的含量,为脑灵片质量控制提供依据。脑灵片组方复杂,含有大量名贵中药,然而其药理作用及药效物质基础研究仍未见报道,导致临床应用缺乏依据,药品质量控制水平低。

失眠症是临床常见病、多发病,随着社会节奏的加快,其发病率呈逐年上升趋势。我国超 3 亿人存在睡眠障碍,青少年、成人和老年人失眠率分别为 26%、38.2%和 35.9%^[4]。作为一种危险因素及情绪、焦虑和精神障碍共病状况,失眠影响逐渐扩大,严重影响人们的日常生活、工作和身心健康^[5]。失眠症属于中医学“不寐”范畴,病因主要有外邪所感,七情内伤,思虑劳倦太过或暴受惊恐,亦可因禀赋不足,房劳久病或年迈体虚所致;主要病机是阴阳、气血失和,脏腑功能失调,以致神明被扰,神不安舍^[6]。健脑安神法能够有效治疗失眠症^[7]。脑灵片具有补气血、养心肾、健脑安神的功能,与失眠症的病机及治法相应。因此,本研究以失眠症为切入,制备失眠症大鼠模型,采用方证代谢组学的研究策略,发现脑灵片治疗失眠症的效应生物标记物及高度关联的药效物质基础,为脑灵片临床应用及质量标准提升提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

72 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200±20) g,6 周龄,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号 SCXK(辽)2020-0001。动物于温度(23±2)℃、相对湿度 50%~70%、12 h 光照/黑暗循环的环境中饲

养,自由进食饮水。动物实验经黑龙江中医药大学伦理委员会批准(批准号 2023050602)。

1.2 药品与试剂

脑灵片按照《卫生部药品标准》脑灵片标准 WS3-B-1000-91 自制;地西洋片(国药准字 H37023038,批号 190405,2.5 mg/片)购自山东信谊制药有限公司;对氯苯丙氨酸(4-chloro-DL-phenylalanine, PCPA,批号 J2114475,质量分数为 98%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;质谱纯甲醇、乙腈购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;色谱级甲酸购自天津科密欧化学试剂有限公司;蒸馏水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司。

1.3 仪器

Acquity™ UPLC 液相色谱仪、Synapt™ G2-Si 质谱仪、MassLynx V4.1 工作站(美国 Waters 公司);Sorvall ST 16R 型低温超高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 失眠症大鼠模型的制备与给药

将 72 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、地西洋(0.9 mg/kg)组和脑灵片低、中、高剂量(0.2、0.4、0.8 g/kg,分别相当于临床等效剂量的 1、2、4 倍)组,每组 12 只。除对照组外,其余各组大鼠每日 9:00 时 ip 4.5% PCPA 混悬液(450 mg/kg),连续 3 d 制备失眠症大鼠模型;对照组大鼠 ip 等体积的生理盐水。各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠水悬液,1 次/d,连续给药 7 d^[8]。末次给药 60 min 后麻醉,经腹主动脉采血,分离血清进行代谢组学分析和脑灵片血中移行成分分析。

2.2 代谢组学分析

2.2.1 血清样品的处理 精密吸取大鼠血清 200 μL,加入甲醇 800 μL,涡旋 1 min 混匀后,4℃、13 000 r/min 离心 15 min,取上层清液经 0.22 μm 滤膜,滤液供 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析。

2.2.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温 35℃,体积流量 0.4 mL/min,进样量 4 μL。流动相为 0.1%甲

酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~2 min, 1%~30% A; 2~5 min, 30%~60% A; 5~7 min, 60%~80% A; 7~10 min, 80%~99% A; 10~11 min, 99% A。

2.2.3 质谱条件 电喷雾电离(ESI)离子源;正、负离子模式下,毛细管电压为2.8 kV,锥孔电压为40 V,源温度为110 ℃,去溶剂气体积流量为800 L/h,锥孔反吹气体积流量为50 L/h。亮氨酸-脑啡肽([M+H]⁺ *m/z* 556.277 1、[M-H]⁻ *m/z* 554.277 1)锁定质量,数据采集间隔为0.2 s,扫描延迟为0.1 s,数据采集质量范围 *m/z* 50~1 500,以Centriod MS^E模式进行数据采集,碰撞能量动态范围10~30 V。

2.2.4 数据分析与处理 采集的UPLC-Q/TOF-MS数据利用Progenesis QI软件进行峰识别、峰提取及标准化处理后,利用EZinfo 3.0软件对所有离子进行非监督的主成分分析(principal component analysis, PCA)和有监督的正交偏最小二乘-判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),综合投影重要性(variable importance in projection, VIP) > 1 且 *P* < 0.05 的离子作为潜在生物标记物离子。对潜在生物标记物离子一级质谱精准分子质量数据计算分子式,综合HMDB等数据库和MS/MS二级质谱碎片离子解析进行鉴定。结合MetaboAnalyst 5.0与京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库,对已鉴定的生物标记物代谢通路进行分析。

2.3 脑灵片血中移行成分分析

2.3.1 血清样品的处理 精密吸取大鼠血清1.0

mL,加入20 μL磷酸,涡旋振荡1 min,加至预先用2 mL甲醇活化、2 mL水平衡后的Waters OASIS HLB固相萃取小柱上,加压使通过小柱后用2 mL水冲洗,弃去洗脱液,再用2 mL甲醇冲洗,上样和洗脱液体积流量为1 mL/min。收集甲醇洗脱液,于40 ℃真空吹干,残渣加50%甲醇200 μL,涡旋使其复溶,离心,取上清液进行UPLC-MS分析。

2.3.2 色谱条件 采用Waters Acquity™ UPLC HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~7 min, 1%~25% A; 7~11 min, 25%~30% A; 11~12 min, 30%~40% A; 12~13 min, 40%~41% A; 13~15 min, 41%~42% A; 15~16 min, 42%~54% A; 16~20 min, 54%~99% A。体积流量0.4 mL/min,柱温35 ℃,进样量4 μL。

2.3.3 质谱条件 同“2.2.3”项下质谱条件。

3 结果

3.1 失眠症大鼠模型生物标记物分析

按照“2.2”项下分析条件,采集模型制备成功时的模型组和对照组大鼠血清UPLC-Q/TOF-MS总离子流色谱图,代表性图谱如图1所示。将液质数据导入Waters Progenesis QI软件,对液质数据进行峰提取、峰对齐及标准化处理后,利用EZinfo 3.0软件进行多变量统计分析。对对照组和模型组大鼠代谢轮廓进行PCA,得分图可见两组显著分离(图2)。进行OPLS-DA,筛选VIP > 1且两组间*t*检验分析*P* < 0.05的离子进行鉴定,共筛选鉴定了26个失眠症大鼠血清生物标记物(表1)。

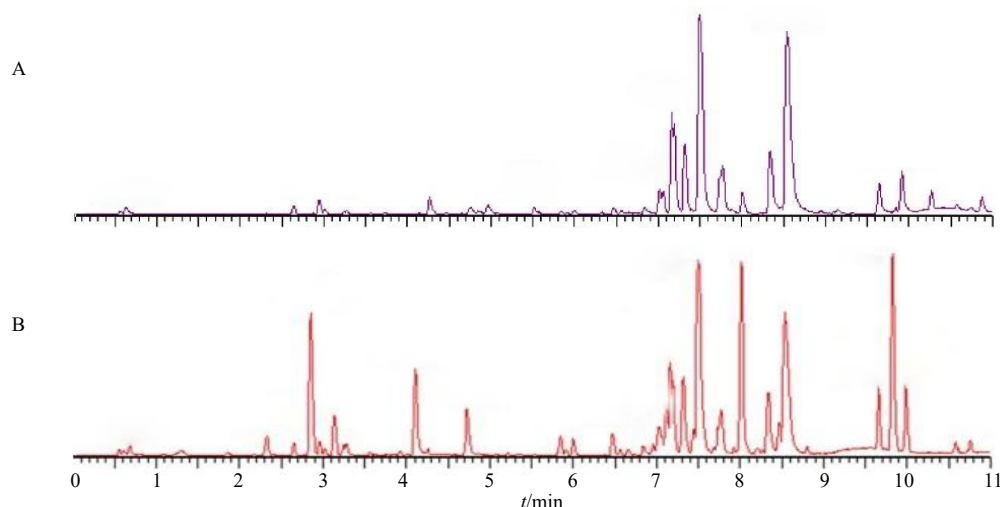


图1 正(A)、负(B)离子模式下失眠症大鼠模型血清样本UPLC-Q/TOF-MS总离子色谱图

Fig. 1 UPLC-Q/TOF-MS total ion chromatograms of serum sample from insomnia rat model in positive (A) and negative ion modes (B)

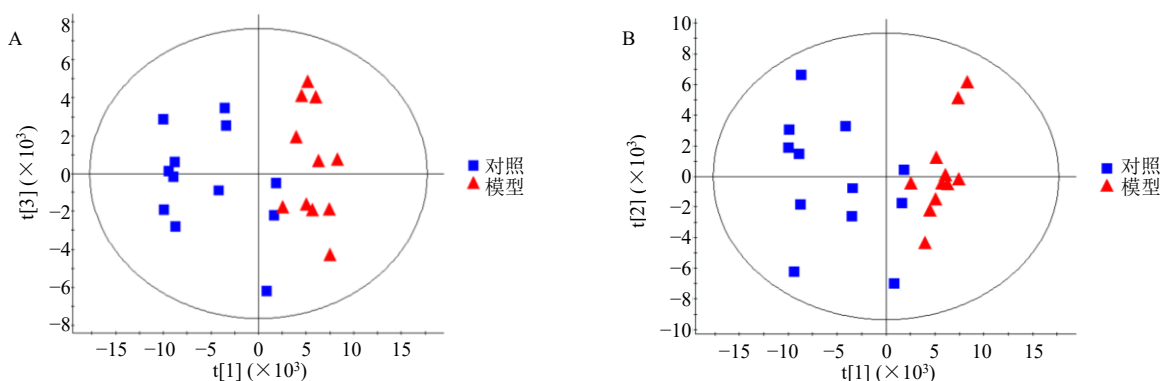


图 2 正 (A)、负 (B) 离子模式下失眠症大鼠模型血清样本 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score plots of serum sample from insomnia rat model in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 失眠症大鼠模型血清生物标记物

Table 1 Serum biomarkers in insomnia rat model

序号	t_R/min	分子式	加合离子	质荷比 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	生物标记物	趋势
1	1.16	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	204.124 1	5.00	<i>L</i> -乙酰肉碱	↓ *
2	1.30	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	169.036 6	5.90	尿酸	↓ *
3	1.84	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	180.066 1	-3.12	<i>L</i> -酪氨酸	↑ **
4	2.32	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	164.071 3	-2.17	<i>L</i> -苯丙氨酸	↑ **
5	2.32	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	147.044 6	-3.44	肉桂酸	↑ **
6	2.40	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	218.102 5	-4.24	泛酸	↑ **
7	2.63	$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	188.071 6	5.56	吡咯丙烯酸	↓ **
8	2.63	$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	146.061 1	7.63	1 <i>H</i> -吡咯-3-甲醛	↓ **
9	2.64	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	203.082 2	-2.09	<i>L</i> -色氨酸	↓ **
10	4.26	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	217.118 9	2.89	脯氨酰苏氨酸	↑ **
11	6.56	$\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	282.279 8	2.29	油酰胺	↑ **
12	7.10	$\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	391.284 3	-2.80	鹅去氧胆酸	↑ *
13	7.14	$\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	424.341 8	-0.78	亚油基肉碱	↑ **
14	7.15	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	327.231 6	-4.14	二十二碳六烯酸酯	↓ **
15	7.30	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	255.232 2	-2.81	棕榈酸	↓ **
16	7.49	$\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{NO}_7\text{P}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	480.308 8	-1.65	溶血 PC(15 : 0)	↓ **
17	7.50	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	184.074 1	5.01	色氨酸	↑ **
18	7.58	$\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	426.357 6	-0.47	油酰肉碱	↑ **
19	7.76	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	281.247 9	-2.48	油酸	↓ **
20	8.03	$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	307.263 0	-4.05	二十碳二烯酸	↓ **
21	8.06	$\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	428.373 1	-0.88	硬脂酰肉碱	↑ **
22	8.53	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	283.263 5	-2.59	硬脂酸	↓ **
23	9.22	$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	301.216 6	-2.39	视黄酯	↓ **
24	9.64	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	327.232 4	-1.76	二十二碳六烯酸	↓ **
25	9.84	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	303.232 3	-2.04	花生四烯酸	↓ **
26	10.60	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	331.263 4	-2.63	肾上腺酸	↓ *

↑ 表示升高, ↓ 表示降低; 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

↑ indicates up-regulated, ↓ indicates down-regulated; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

3.2 脑灵片治疗失眠症大鼠模型的效应生物标记物分析

采集给药治疗后的正、负离子模式下各组大鼠血清样本 UPLC-Q/TOF-MS 总离子色谱图, 经 Waters Progenesis QI 软件进行峰提取、峰对齐及标准化处理后, 利用 EZinfo 3.0 软件进行多变量统计分析, PCA 得分图如图 3 所示, 可见对照组与模型

组样本分离, 给药组样本趋近于对照组, 显示一定的代谢轮廓回调趋势。提取其中失眠症生物标记物离子进行组间比较分析, 发现脑灵片能够显著回调 10 个失眠症血清生物标记物 (图 4), 分别为肾上腺酸、花生四烯酸、鹅去氧胆酸、*L*-乙酰肉碱、*L*-苯丙氨酸、*L*-色氨酸、*L*-酪氨酸、油酰胺、泛酸、视黄酯。

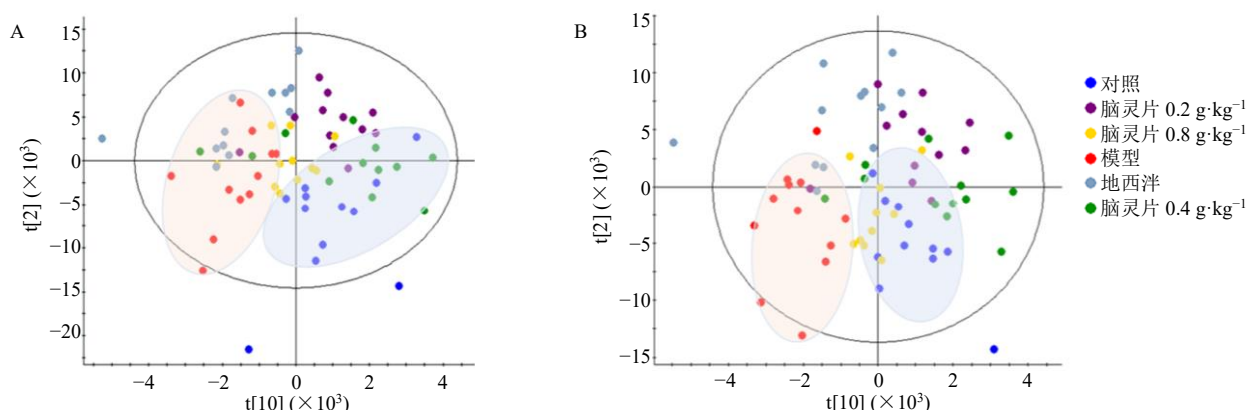
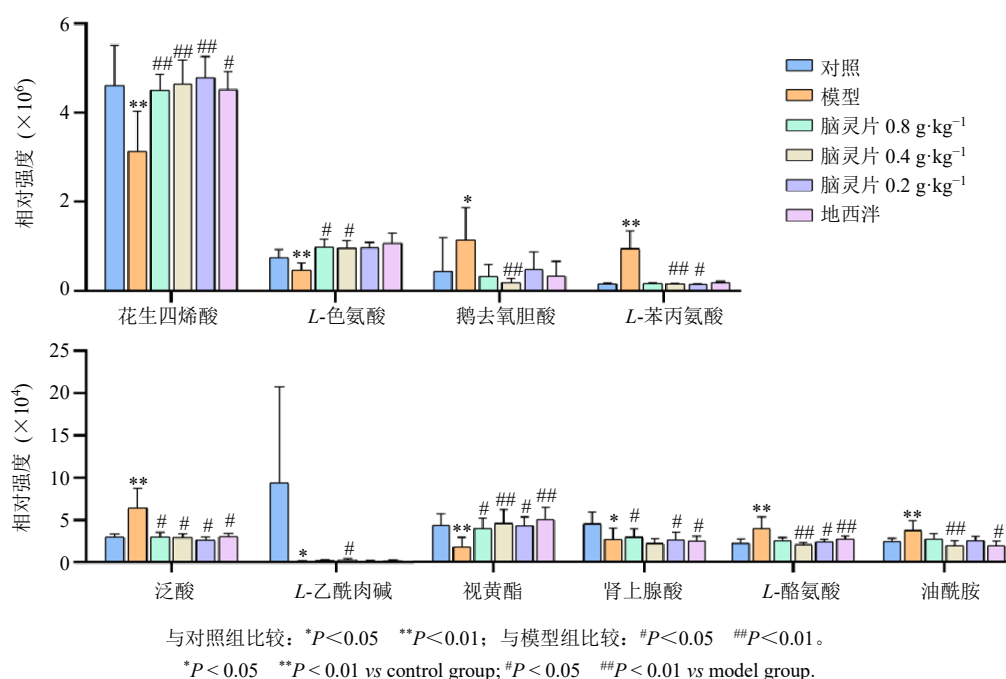


图 3 正 (A)、负 (B) 离子模式下各组血清样本 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plots of serum sample in each group in positive (A) and negative (B) ion modes

图 4 脑灵片对失眠症大鼠模型血清生物标记物的调节作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Fig. 4 Regulatory effect of Naoling Tablets on serum biomarkers in insomnia rat model ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

使用 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行代谢通路的拓扑特征分析, 得到与脑灵片治疗失眠症密切相关的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成、苯丙氨酸代谢、花生四烯酸代谢、视黄醇代谢、色氨酸代谢、酪氨酸代谢等 11 条代谢通路 (图 5)。

3.3 脑灵片治疗失眠症大鼠模型的血中移行成分分析

取模型组大鼠和脑灵片高剂量组大鼠血清, 按照“2.3”项下方法进行处理后, 采集 UPLC-Q-TOF-MS/MS 总离子色谱图。由于内源性代谢物的严重干扰, 脑灵片体内成分峰难以直观辨识, 本研究采用多变量统计分析方法^[9], 对模型组大鼠和脑灵片高

剂量组大鼠血清 UPLC-MS 数据进行 OPLS-DA, 挖掘只有在脑灵片高剂量组大鼠血清中存在而在模型组大鼠血清中几乎检测不到的离子, 作为潜在脑灵片血中移行成分离子。如图 6 所示, 图中各点为潜在入血成分在大鼠血清中的相对表达强度, 它们在脑灵片给药组大鼠血清中能够检测到, 而在模型组大鼠血清中基本检测不到。进一步利用一级质谱获取准分子离子精确分子质量计算分子式, 利用二级质谱进行结构表征, 并与脑灵片体外成分 UPLC-MS 色谱图进行比对^[10], 最终鉴定 24 个脑灵片血中移行成分, 正、负离子模式下血中移行成分提取色谱图见图 7, 具体成分信息见表 2。

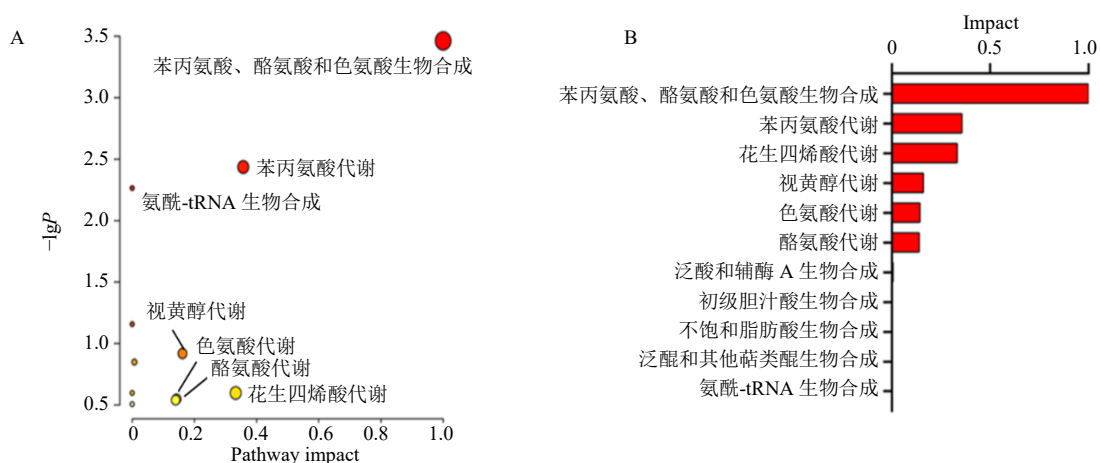


图 5 脑灵片治疗失眠症大鼠模型生物标记物 MetPA 代谢路径 (A) 及影响值 (B) 分析

Fig. 5 MetPA metabolic pathway (A) and its impact value (B) analysis of biomarkers in insomnia rat model treated with Naoling Tablets

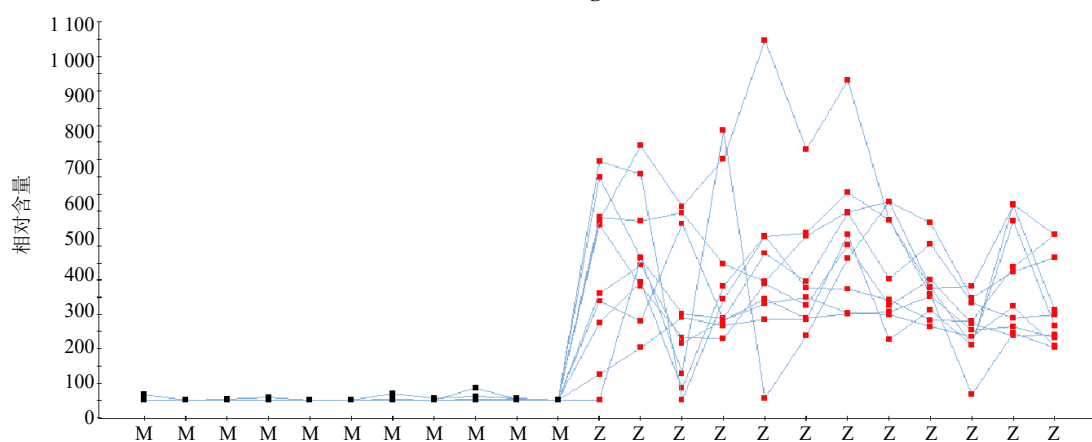


图 6 模型组 (M) 和脑灵片高剂量组 (Z) 提取离子相对含量趋势图

Fig. 6 Relative content trend chart of extracted ions from model group (M) and Naoling Tablets high-dose group (Z)

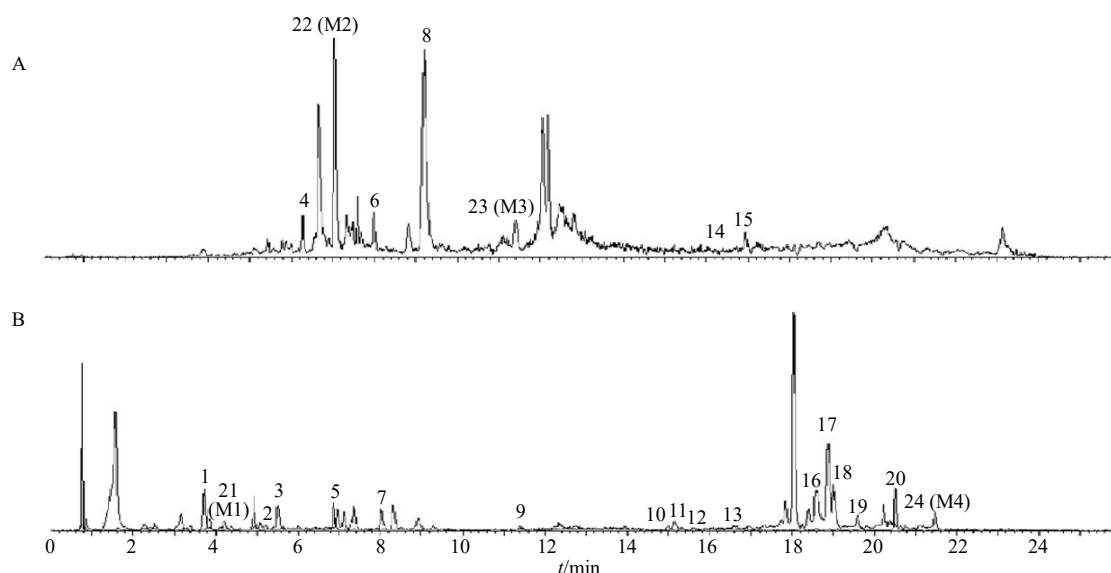


图 7 正 (A)、负 (B) 离子模式下模型组和脑灵片组血清样本提取离子色谱图

Fig. 7 Extraction ions chromatograms of serum sample in model group and Naoling Tablets treatment group in positive (A) and negative (B) ion modes

表 2 脑灵片治疗失眠症大鼠血中移行成分 UPLS-Q/TOF-MS/MS 鉴定信息

Table 2 Identification information of UPLC-Q/TOF-MS/MS of components absorbed into blood of insomnia rats treated with Naoling Tablets

峰号	t _R /min	质荷比 (m/z)	加和离子	分子式	化合物	碎片离子 (m/z)	来源
1	3.71	137.024 2	M-H	C ₇ H ₆ O ₃	水杨酸	93.035 0	黄精
2	5.49	353.088 1	M-H	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	113.022 8, 134.059 7, 178.050 6, 191.055 5, 195.065 9	淫羊藿、苍耳子
3	5.53	163.040 1	M-H	C ₉ H ₈ O ₃	4-羟基肉桂酸	93.033 3, 119.051 1	大枣、枸杞子
4	6.27	342.173 8	M+H	C ₂₀ H ₂₃ O ₄ N	木兰花碱	191.086 9, 238.095 4, 265.089 0, 282.092 9, 297.115 4	淫羊藿、酸枣仁
5	6.97	567.135 6	M-H	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₅	远志吡啶 III	272.031 8, 297.041 7, 315.050 5, 345.061 6	远志
6	7.99	777.221 0	M+Na	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	3,6'-二芥子酰基蔗糖	205.051 6, 312.130 8, 529.161 9, 547.167 5	远志
7	8.02	165.055 5	M-H	C ₉ H ₁₀ O ₃	丹皮酚	107.049 9, 121.066 7, 147.046 1	枸杞子
8	9.25	831.273 7	M+Na	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	朝藿定 B	273.073 8, 313.081 3, 369.140 0, 410.180 1, 531.194 9	淫羊藿
9	11.37	721.239 9	M+FA-H	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	淫羊藿苷	513.177 1, 529.171 7, 530.175 2	淫羊藿
10	14.99	1 761.768 1	M-H	C ₈₂ H ₁₂₂ O ₄₁	远志皂苷 V	425.762 5	远志
11	15.32	1 485.661 4	M-H	C ₇₁ H ₁₀₆ O ₃₃	远志皂苷 E	455.316 9	远志
12	15.62	1 587.699 2	M-H	C ₇₅ H ₁₁₂ O ₃₆	远志皂苷 F	237.076 8, 425.306 2, 455.314 4, 669.226 0	远志
13	16.22	513.176 4	M-H	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	宝藿苷 I	163.113 6, 179.103 0, 366.110 3	淫羊藿
14	16.41	455.205 3	M+Na	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	五味子醇甲	58.041 1, 298.086 0	五味子
15	16.94	401.161 0	M+H	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	戈米辛 R	311.096 3, 326.120 8, 337.110 7, 341.105 9, 352.135 6	五味子
16	18.80	499.341 3	M+FA-H	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	五味子酸	271.234 9, 295.243 0, 377.252 4, 438.320 4	五味子
17	18.87	483.347 8	M-H	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	3-表去氢土莫酸	193.091 2, 242.093 6, 271.241 1, 319.243 4, 377.260 3, 429.320 6	茯苓
18	19.01	485.362 9	M-H	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	土莫酸	279.227 4, 407.296 4, 423.325 7	茯苓
19	19.57	483.347 8	M-H	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	去氢土莫酸	250.158 0, 295.242 7, 347.276 1, 431.331 1	茯苓
20	20.45	527.372 1	M-H	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	茯苓酸	171.109 0, 255.233 5, 461.365 1	茯苓
21 (M1)	3.82	383.110 6	M-H	C ₂₁ H ₂₀ O ₇	宝藿苷 I-C ₆ H ₁₀ O ₄ +O	277.060 8, 301.059 4	淫羊藿
22 (M2)	7.04	497.112 0	M+H	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁ S	戈米辛 R+O+SO ₃	86.102 9, 146.069 7, 174.063 3, 359.194 2	五味子
23 (M3)	11.45	759.175 1	M+H	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉ S	箭藿苷 B+2O+SO ₃	98.962 8, 158.969 2	淫羊藿
24 (M4)	21.48	557.151 8	M-H	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₅	远志吡啶 III-CH ₂ +2H	209.095 2	远志

3.4 脑灵片血中移行成分与失眠症标记物相关性分析

将脑灵片组大鼠血中移行成分的相对强度作为一组变量,治疗前后失眠症标记物相对强度差值作为另一组变量,进行 Spearman 相关性分析,得到 2 组变量中各成分之间的关联度热图及 2 个变量之间关联关系的统计学显著性差异(图 8)。筛选与脑灵片治疗失眠症效应标记物显著相关的血中移行成分作为潜在药效物质基础,包括绿原酸、4-羟基肉桂酸、木兰花碱、远志吡啶 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、淫羊藿苷、远志皂苷 V、宝藿苷 I、五味子醇甲、五味子酸、3-表去氢土莫酸、茯苓酸、脱糖羟基化宝藿苷 I、二羟基化箭藿苷 B 硫酸酯、去甲基二氢化远志吡啶 III。其中,五味子醇甲与 L-乙酰肉碱极度相关($r=0.79, P<0.01$),五味子酸与 L-苯丙氨酸极度相关($r=0.81, P<0.01$),淫羊藿苷与肾上腺酸极度相关($r=0.77, P<0.01$),为脑灵片

治疗失眠症的核心药效物质基础。

4 讨论

中药药效物质基础是表达其临床疗效的化学成分,由此,评价中药疗效是发现药效物质基础的前提。由于中药发挥疗效过程中药物成分与机体之间的相互作用,中药药效物质基础应该存在于中药发挥疗效的体内成分之中。本研究利用方证代谢组学的研究策略,设计脑灵片疗效评价与体内成分分析同步的实验方案,在利用代谢组学技术分析脑灵片治疗失眠症的效应生物标记物,利用中药血清药物化学方法表征脑灵片发挥疗效的血中移行成分,进而将脑灵片治疗失眠症大鼠模型的血中移行成分与效应生物标记物进行表达量的关联度分析,从而发现与疗效相关的脑灵片药效物质基础。

课题组前期报道了使用一般体征、旷场行为学实验、生化指标及协同睡眠实验对模型制备和脑灵片药效评价的结果^[8]。结果显示,失眠症模型大鼠

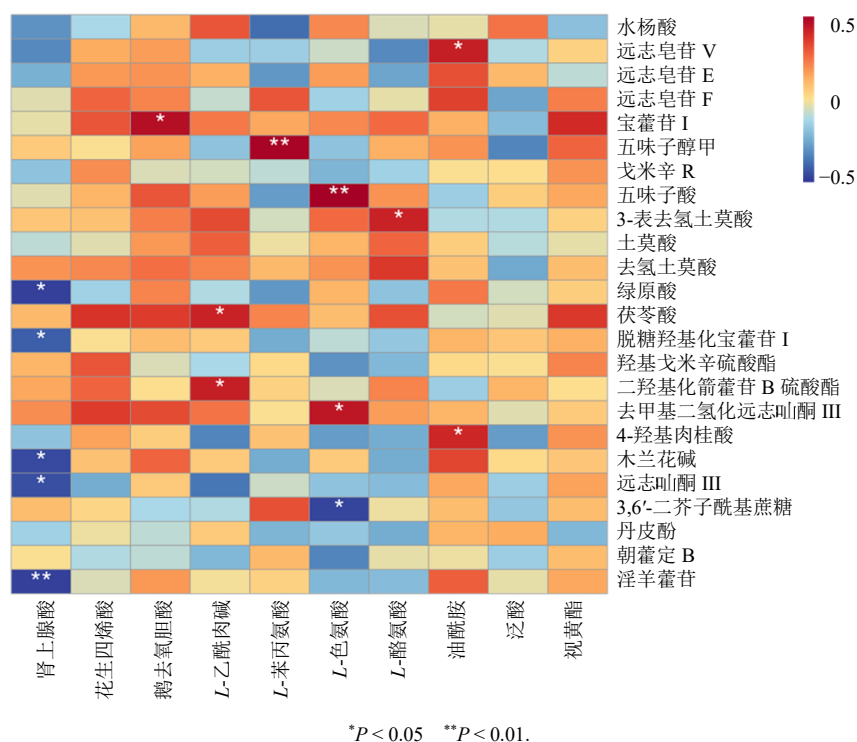


图 8 脑灵片中血中移行成分与失眠症生物标志物的相关性分析热图

Fig. 8 Correlation analysis heatmap between components absorbed into blood of Naoling Tablets and insomnia biomarkers

体质量显著下降,入睡潜伏期显著延长,睡眠持续时间显著降低,旷场中出现自发活动明显减少,认知功能下降,脑组织中神经递质含量发生显著变化。脑灵片能够显著缩短失眠大鼠的入睡潜伏期,并延长其睡眠持续时间,增加失眠症模型大鼠的体质量及摄食量,显著回调脑内神经递质 5-羟色胺、谷氨酸、 γ -氨基丁酸、多巴胺、去甲肾上腺素水平,显著回调饮食量、饮水量、氧气消耗速率、水分呼出速率、呼吸熵、能量消耗速率等基础代谢各项指标,大鼠自主行为增加,探索能力增强,表明脑灵片对失眠症大鼠模型有较好的治疗作用^[8]。本研究利用代谢组学技术揭示了脑灵片治疗失眠症大鼠模型的 10 个效应标记物,包括肾上腺酸、花生四烯酸、鹅去氧胆酸、L-乙酰肉碱、L-苯丙氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、油酰胺、泛酸、视黄酯。L-乙酰肉碱是由肉碱乙酰转移酶催化乙酰辅酶 A 与左旋肉碱合成,对大脑和生殖系统具有良好的生理活性,临床上已应用于治疗男性不孕症、阿尔茨海默病、肝性脑病、抑郁症、帕金森病、糖尿病周围神经病变等^[11]。L-苯丙氨酸是具有生物活性的芳香族氨基酸,苯丙氨酸在苯丙氨酸羟化酶的催化下形成酪氨酸,并与酪氨酸一起合成与失眠密切相关的神经递质多巴胺和去甲肾上腺素。失眠症患者体内苯丙氨

酸水平降低,使多巴胺、去甲肾上腺素的合成减少,从而影响睡眠^[12]。色氨酸是一种可通过血脑屏障的必需氨基酸,色氨酸在色氨酸羟化酶及五羟色氨酸脱羧酶的作用下生成 5-羟色胺,5-羟色胺是调节机体睡眠-觉醒的关键神经递质,同时体内 5-羟色胺水平与抑郁、焦虑、情绪、情感系统等的调节有关^[13-14]。肾上腺酸是一种 22-碳的不饱和脂肪酸,广泛存在于肾上腺、肝、脑、肾和血管系统中,在多种病理生理过程中发挥调节作用,如炎症反应、脂质代谢、氧化应激、血管功能和细胞死亡等,是多种疾病的潜在生物标志物,包括代谢性、神经退行性和心血管疾病以及癌症^[15]。摄入花生四烯酸在体内能够转化为肾上腺酸^[16]。油酰胺是一种睡眠诱导物质,具有催眠活性,其在脑中含量与睡眠周期密切相关,缺乏睡眠时含量增加,恢复睡眠时含量减少^[17]。另外,初级胆汁酸^[18]、视黄醇^[19]也与失眠有着密切的联系,有研究表明大鼠松果体中视黄醇的合成和活性存在昼夜变化并受昼夜节律控制^[20]。

为进一步揭示脑灵片治疗失眠症的药效物质基础,进行有效状态下的血中移行成分及与疗效的相关性分析。结果显示,脑灵片可通过绿原酸、4-羟基肉桂酸、木兰花碱、远志吡酮 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖、淫羊藿苷、远志皂苷 V、宝藿苷 I、五味

子醇甲、五味子酸、3-表去氢土莫酸、茯苓酸、脱糖羟基化宝藿苣 I、二羟基化箭藿苣 B 硫酸酯、去甲基二氢化远志吡啶 III 等血中移行成分, 调节肾上腺酸、花生四烯酸、鹅去氧胆酸、L-乙酰肉碱、L-苯丙氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸的表达, 其中, 五味子醇甲与 L-乙酰肉碱的表达极度相关, 五味子酸与 L-苯丙氨酸的表达极度相关, 淫羊藿苷与肾上腺酸的表达极度相关, 为脑灵片治疗失眠症的核心药效物质基础。已有研究表明, 淫羊藿苷可调节动物模型中下丘脑-垂体-肾上腺轴的亢进及血清素能系统功能减退, 通过降低促肾上腺皮质激素释放因子改善边缘-下丘脑-垂体-肾上腺应激回路^[21]。脑灵片调节的效应标记物油酰胺、泛酸、视黄酯没有高度关联的血中移行成分, 可能是由于检测技术局限, 黄精、麦冬、红参、鹿茸、龟甲、鹿角胶等药味的体内成分没有得到表征, 从而没有发现来源于这些药味的药效物质基础, 有待进一步的分析。

综上, 本研究利用方证代谢组学方法^[22], 鉴定了脑灵片治疗失眠症的效应生物标记物, 并发现了五味子醇甲、五味子酸、淫羊藿苷等为脑灵片治疗失眠症的药效物质基础, 为脑灵片临床用于失眠症的治疗, 以及确定质量标志物, 提升脑灵片质量标准提供了科学依据, 也为其他中成药的研究和开发提供了有益的借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第五册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 137.
- [2] 刘峰, 杨秀峰, 常芳. 脑灵片的薄层色谱鉴别 [J]. 中国药业, 2008, 17(21): 37.
- [3] 肖利辉, 肖爱平. HPLC 法测定脑灵片中淫羊藿苷的含量 [J]. 长沙大学学报, 2009, 23(5): 34-35.
- [4] Liang M J, Guo L, Huo J, *et al.* Prevalence of sleep disturbances in Chinese adolescents: A systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0247333.
- [5] Palagini L, Hertenstein E, Riemann D, *et al.* Sleep, insomnia and mental health [J]. *J Sleep Res*, 2022, 31(4): e13628.
- [6] 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.
- [7] 赵婷, 徐辉, 赵腾, 等. 健脑安神法针刺治疗失眠及对磁共振脑功能成像的影响 [J]. 中国针灸, 2021, 41(7): 767-773.
- [8] Yang Y, Chen Z, Yan G L, *et al.* Mass spectrum oriented metabolomics for evaluating the efficacy and discovering the metabolic mechanism of Naoling Pian for insomnia [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 236: 115756.
- [9] 闫广利, 韩莹, 王喜军. 基于 LC-MS 分析的中药体内成分辨识技术 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1765-1770.
- [10] Chen Z, Yan G L, Yang Y, *et al.* Rapid characterization of chemical constituents in Naoling Pian by LC-MS combined with data processing techniques [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(18): 3431-3442.
- [11] 张素姬, 胡晓植, 郑昆, 等. 乙酰左旋肉碱的临床应用进展 [J]. 世界临床药物, 2017, 38(9): 652-656.
- [12] 李文慧, 朱陵群, 郭蓉娟. 基于代谢组学研究痰热内扰型慢性失眠病人血清代谢物及中药干预作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(23): 4236-4243.
- [13] 魏砚君, 全睿, 王慧, 等. 中缝核 NG2 细胞及 5-HT 的共同作用对大鼠睡眠-觉醒功能的调节 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(10): 1764-1773.
- [14] 张雪怡, 贾淑蕾, 谷宇昂, 等. 杏仁核 5-HT 神经环路在失眠障碍及抑郁症共病机制中的功能磁共振成像研究进展 [J]. 磁共振成像, 2024, 15(10): 165-170.
- [15] Wang Z, Gao H Y, Ma X T, *et al.* Adrenic acid: A promising biomarker and therapeutic target (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2025, 55(2): 20.
- [16] Wijendran V, Lawrence P, Diau G Y, *et al.* Significant utilization of dietary arachidonic acid is for brain adrenic acid in baboon neonates [J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(5): 762-767.
- [17] 郭长彬, 宋宏锐. 内源性睡眠诱导物质油酰胺的研究进展 [J]. 中国药物化学杂志, 2000, 10(4): 300-304.
- [18] 闫天月, 黄运芳, 王雪, 等. 两种失眠症小鼠模型胆汁酸组成和含量差异比较 [J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(9): 4346-4351.
- [19] Beydoun M A, Gamaldo A A, Canas J A, *et al.* Serum nutritional biomarkers and their associations with sleep among US adults in recent national surveys [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e103490.
- [20] Ashton A, Stoney P N, Ransom J, *et al.* Rhythmic diurnal synthesis and signaling of retinoic acid in the rat pineal gland and its action to rapidly downregulate ERK phosphorylation [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(11): 8219-8235.
- [21] Pan Y, Wang F M, Qiang L Q, *et al.* Icariin attenuates chronic mild stress-induced dysregulation of the LHPA stress circuit in rats [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2010, 35(2): 272-283.
- [22] 刘鸿达, 孔玲, 孙晖, 等. 方证代谢组学理论及方法的形成和发展 [J]. 中草药, 2025, 56(8): 2629-2637.

[责任编辑 李亚楠]