

生、炒酸枣仁改善对氯苯丙氨酸诱导失眠大鼠模型学习记忆损伤的机制

牛泽佳¹, 韩 瑞¹, 衡依然¹, 裴香萍¹, 闫 艳^{2*}, 杜晨晖^{1*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 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 利用代谢组学技术探究生酸枣仁 (*Ziziphi Spinosae Semen*, ZSS) 和炒酸枣仁 (fried *Ziziphi Spinosae Semen*, FZSS) 对失眠大鼠内源性代谢物的影响, 并进一步分析其对学习记忆功能的改善效果及作用机制。方法 通过对氯苯丙氨酸 (*p*-chlorophenylalanine, PCPA) 诱导建立大鼠失眠模型, 给予 ZSS 和 FZSS 干预 7 d。通过旷场实验和 Morris 水迷宫实验评估大鼠的学习行为, 利用 ELISA 测定海马组织中 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 、褪黑素 (melatonin, MT)、谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 水平。采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-Orbitrap-MS/MS) 技术对大鼠海马和血清样本的代谢轮廓进行详细分析, 并结合多元统计方法筛选出内源性差异性代谢物。通过 MetaboAnalyst 5.0 数据库进行代谢通路和网络的分析, 多角度探讨 ZSS 和 FZSS 对学习记忆功能改善的代谢特征及其作用机制。结果 与模型组比较, ZSS 组和 FZSS 组大鼠的学习记忆表现显著提升, Morris 水迷宫实验中目标象限停留时间、穿越次数及运动路程均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 海马组织中 5-HT、GABA 和 NO 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 其中 FZSS 对 GABA 的回调效果更显著; 血清中 IL-6、TNF- α 、Glu 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), IL-1 β 、MT 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 海马神经元空化等病理损伤得到显著改善。ZSS 和 FZSS 显著回调海马相关代谢物 34 个以及血清中相关代谢物 22 个, 主要调控苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 3 个代谢通路, 且 FZSS 特异性调控鞘脂代谢通路, ZSS 特异性调控花生四烯酸代谢通路。结论 ZSS 和 FZSS 通过调节海马和血清中的内源性代谢物 (尤其是苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸通路), 显著改善 PCPA 诱导失眠导致的学习记忆损伤。炒制使 FZSS 中木兰花碱、斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 等有效成分含量增加, 增强其对鞘脂代谢的调控及 GABA 水平的回调能力, 因此在改善认知损伤方面优于 ZSS。为酸枣仁及其炮制品治疗失眠相关认知障碍提供了代谢水平的科学依据, 为临床治疗提供一种新的治疗策略。

关键词: 酸枣仁; 炒酸枣仁; 代谢组学; 学习记忆功能; 内源性代谢物; 乌药碱; 木兰花碱; 维采宁; 斯皮诺素; 6"-阿魏酰斯皮诺素; 酸枣仁皂苷 A; 酸枣仁皂苷 B; 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)22-8201-21

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.013

Mechanism of raw and fried *Ziziphi Spinosae Semen* in improving learning and memory impairment in *p*-chlorophenylalanine-induced insomnia rats model

NIU Zejia¹, HAN Rui¹, HENG Yiran¹, PEI Xiangping¹, YAN Yan², DU Chenhui¹

1. School of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

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

Abstract: Objective To explore the effects of Suanzaoren (*Ziziphi Spinosae Semen*, ZSS) and fried *Ziziphi Spinosae Semen* (FZSS) on endogenous metabolites in insomnia rats using metabolomics technology. In addition, the potential improvement effect and its mechanism on learning and memory function were further analyzed. **Methods** The rat insomnia model was induced by *p*-

收稿日期: 2025-07-16

基金项目: 山西省科学技术厅山西省科技创新人才团队项目 (202304051001020); 山西省科技成果转化引导专项计划项目 (202204021301063); 山西省中医药重点研究室建设项目 (zyyyjs2024024); 山西省中医药管理局中医药创新团队项目 (zyytd2024026); 山西中医药大学科技创新团队项目 (2022TD2009); 山西中医药大学 2024 年度科技创新能力培育计划项目 (2024PY-JL-11-01, 2024PY-JL-11-02)

作者简介: 牛泽佳, 硕士研究生, 研究方向为中药资源开发与品质评价。E-mail: 2484105270@qq.com

***通信作者:** 杜晨晖, 教授, 博士, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: dch@sxtcm.edu.cn

闫 艳, 副教授, 博士, 研究方向为中药质量控制及中药体内过程分析。E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

chlorophenylalanine (PCPA), ZSS and FZSS were given for 7 d. The learning behavior of rats was evaluated by open field test and Morris water maze test; The levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), γ -aminobutyric acid (GABA), nitric oxide (NO) in hippocampus and interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , melatonin (MT), and glutamic acid (Glu) in serum were measured by ELISA. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-Orbitrap-MS/MS) was used to analyze the metabolic profiles of rat hippocampus and serum samples in detail, and multivariate statistical methods were used to screen out differential metabolites. The metabolic pathway and network were analyzed by MetaboAnalyst 5.0 database to explore the metabolic characteristics and mechanism of ZSS and FZSS in improving learning and memory function from multiple perspectives. **Results** Compared with model group, rats in ZSS and FZSS groups showed significantly improved learning and memory performance. In the Morris water maze test, time spent in the target quadrant, number of platform crossings and total path length were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), levels of 5-HT, GABA and NO in hippocampal tissue were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), with FZSS demonstrating a more significant restorative effect on GABA level; The levels of IL-6, TNF- α and Glu in serum were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), levels of IL-1 β and MT were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), pathological damage such as neuronal vacuolation in hippocampus was ameliorated. ZSS and FZSS significantly restored 34 relevant metabolites in hippocampus and 22 relevant metabolites in serum, primarily regulated three metabolic pathways, which are phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis and metabolism. Notably, FZSS specifically regulated the sphingolipid metabolism pathway, while ZSS specifically regulated the arachidonic acid metabolism pathway. **Conclusion** ZSS and FZSS significantly ameliorate learning and memory impairments induced by PCPA insomnia through regulating endogenous metabolites in hippocampus and serum, particularly within the phenylalanine, tyrosine, and tryptophan pathways. The stir-frying process increased the contents of active components such as magnoflorine, spinosin and jujuboside A in FZSS, which enhanced its regulatory effect on sphingolipid metabolism and its restorative capacity on GABA level. Consequently, FZSS demonstrates superior efficacy over the raw ZSS in improving cognitive impairment. This study provides a scientific basis at the metabolic level for using ZSS and its processed product (FZSS) to treat insomnia-related cognitive disorders and offers a novel therapeutic strategy for clinical application.

Key word: *Ziziphi Spinosae Semen*; fried *Ziziphi Spinosae Semen*; metabolomics; learning and memory function; endogenous metabolites; coclaurine; magnoflorine; vicenin; spinosyn; 6"-feruloylspinosin; jujuboside A; jujuboside A; phenylalanine, tyrosine, and tryptophan pathways

酸枣仁为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的干燥成熟种子, 具有补肝、宁心、敛汗、生津的功效^[1]。酸枣仁中主要含有皂苷、黄酮、脂肪油和挥发油等多种成分^[2]。其主要成分为酸枣仁皂苷和酸枣仁黄酮, 已被证实具有镇静、催眠和抗焦虑作用^[3]。对《中药成方制剂》治疗失眠的 187 首处方进行数据挖掘, 发现共使用药物 234 味, 酸枣仁的使用频次排在前 10^[4]; 课题组前期研究^[5]发现酸枣仁活性成分可通过影响多巴胺、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 等神经递质, 产生镇静催眠、抗抑郁、抗焦虑等作用。酸枣仁经炒制后黄酮类、皂苷类成分溶出增加^[6], 相比生酸枣仁 (*Ziziphi Spinosae Semen*, ZSS), 炒酸枣仁 (fried *Ziziphi Spinosae Semen*, FZSS) 中斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 等有效成分含量增加, 使其镇静、抗焦虑及神经保护作用提升。

睡眠障碍不仅会损害学习记忆的形成和巩固, 还可能引发情绪障碍等多种精神健康问题, 影响个体的日常生活和工作能力。多项研究表明, 失眠或

睡眠剥夺会导致海马结构损伤, 包括齿状回新生神经元减少^[7]、CA1 区树突棘密度下降^[8]以及 CA3 区灰质密度降低^[9]; 神经递质系统出现明显失调^[10], 表现为谷氨酸活性增强、GABA 功能抑制、5-HT 水平下降以及皮质醇持续升高; 还会降低脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 表达和增加肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 释放, 影响分子水平的变化^[11]。失眠可诱发氧化应激反应, 降低海马区抗氧化防御能力, 导致活性氧过量积累和氧化损伤^[12]。研究证实, 失眠可引发海马区炎症反应, 破坏与学习记忆相关的关键脑区结构^[13], 建立了失眠-海马炎症-记忆损伤的明确因果关系。有研究表明抗炎药物可改善记忆功能^[14]。对氯苯丙氨酸 (*p*-chlorophenylalanine, PCPA) 失眠模型是评估药物镇静催眠作用的经典药理学模型。外源性 PCPA 注射可导致海马结构损伤和神经递质水平改变, 引起单胺类神经递质、氨基酸类神经递质及记忆相关细胞因子水平的变化, 最终导致学习记忆功能障碍。课题组前期研究^[15]发现酸枣仁总皂苷能够调节 PCPA 失眠大鼠模型海马组

织内的细胞因子和神经递质[5-HT、GABA、一氧化氮(nitric oxide, NO)]以及内源性差异代谢物(苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸)等水平,从而改善学习记忆。通过非靶向代谢组学技术,在肝脏、海马和血清中鉴定出多种与失眠相关的差异代谢物^[16]。发现酸枣仁可通过回调 PCPA 诱导失眠大鼠组织和血清内差异代谢物的水平,调节氨基酸代谢、能量代谢、脂质代谢等代谢通路,从而改善失眠。然而,对于 ZSS、FZSS 对 PCPA 诱导的失眠大鼠模型学习记忆损伤的改善效果及其作用机制,目前仍需进一步深入研究。

为进一步探究 ZSS、FZSS 对失眠大鼠学习记忆功能的影响及其潜在机制,通过构建 PCPA 诱导的失眠大鼠模型,采用旷场实验检测自主活动能力(总运动路程)和焦虑样行为(中心区域停留时间),结合血清 5-HT 水平测定,综合评价失眠模型的建立。采用 Morris 水迷宫实验系统分析空间学习记忆能力,观察逃避潜伏期、目标象限停留时间及运动轨迹、平均游泳速度以及穿越平台区域次数^[17]。同时,通过高效液相色谱-质谱联用技术分析海马组织及血清中神经递质和相关代谢物含量变化,深入探讨其潜在作用机制。本研究旨在探讨 ZSS、FZSS 对 PCPA 诱导的失眠大鼠模型学习记忆功能的影响,通过非靶向代谢组学,筛选与大鼠状态相关的差异代谢物,构建 ZSS 和 FZSS 改善 PCPA 诱导的学习记忆障碍的关键代谢调控网络。为 ZSS 和 FZSS 临床应用于失眠及相关认知功能障碍的治疗提供坚实的实验依据和创新的干预策略。

1 材料

1.1 动物

84 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体质量(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2016-0011。动物于相对湿度(50±10)%、温度(25±2)℃、自然光暗周期的环境中适应性饲养 7 d,垫料保持干燥,自由进食饮水,普通饲料按国家实验动物饲养成分统一标准配制,给药前禁食 12 h。动物实验经山西中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 2021DW172)。

1.2 药材

收集不同产地 10 批酸枣仁(表 1),经山西中医药大学杜晨晖教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Z. jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的

表 1 10 批酸枣仁信息

Table 1 Information of 10 batches of *Ziziphi Spinosae* Semen

样品编号	产地	批号	标本号
S1	河北赞皇	201910	SXTCM-ZH-NZJ-001
S2	河北赞皇	201907	SXTCM-ZH-NZJ-002
S3	河北赞皇	201908	SXTCM-ZH-NZJ-003
S4	河北赞皇	201910	SXTCM-ZH-NZJ-004
S5	河北赞皇	201909	SXTCM-ZH-NZJ-005
S6	山西灵石	201901	SXTCM-LS-NZJ-001
S7	山西灵石	201911	SXTCM-LS-NZJ-002
S8	山西灵石	201908	SXTCM-LS-NZJ-003
S9	陕西榆林	201913	SXTCM-YL-NZJ-001
S10	陕西榆林	201901	SXTCM-YL-NZJ-002

干燥成熟种子,样品标本保存于山西中医药大学中药资源与鉴定教研室。酸枣仁经检验质量符合《中国药典》2025 年版一部规定。

称取 ZSS 50 g,锅温设置为 170 ℃,稳定 10 min 后将酸枣仁平铺于锅底,不断翻炒,炒制 5 min 后取出,放凉,即得 FZSS^[6]。

1.3 药品与试剂

对照品乌药碱(批号 HR21517W4)、斯皮诺素(批号 72063-39-9)、木兰花碱(批号 HA061308198)、维采宁 II(批号 wkg19061803)、6'''-阿魏酰斯皮诺素(批号 HF173829198)、酸枣仁皂苷 B(批号 PS010872)、酸枣仁皂苷 A(批号 20160315)均购自宝鸡辰光生物科技有限公司,质量分数均>98%;戊巴比妥钠(批号 P11011)购自德国默克公司;地西洋(批号 220803)购自山东信谊制药有限公司;5-HT 试剂盒(批号 20231110)、GABA 试剂盒(批号 20231110)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;NO 试剂盒(批号 112223240529)购自上海碧云天生物科技股份有限公司;质谱级乙腈(批号 F2403M201)、甲醇(批号 F2401H202)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;PCPA(质量分数>98%,批号 C13205137)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(批号 20211105)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA 试剂盒(批号 20211105)、IL-1β ELISA 试剂盒(批号 20211105)、褪黑素(melatonin, MT)ELISA 试剂盒(批号 20211120)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)ELISA 试剂盒(批号 20211105)均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司。

1.4 仪器

U3000 型超高效液相色谱仪、Exactive™

Orbitrap 质谱仪、DNA120-230 型离心浓缩仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CPA225D 型十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司); MMT-200 型大鼠水迷宫测试仪、OFT-100 型自主活动测试仪(成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 ZSS、FZSS 提取物的制备

精密称定 ZSS 或 FZSS 每批 50 g, 粉碎(过 1 号筛), 加 10 倍量水, 浸泡 30 min, 用煎药锅武火加热至煮沸后文火煎煮 30 min, 滤过; 滤渣加 8 倍量水, 加热回流提取 20 min, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩至 1 g/mL (以生药量计), 冷冻干燥, 得 ZSS 或 FZSS 提取物, 4 °C 冷藏备用。采用课题组建立的 HPLC-UV-ELSD 法^[6], 检测 ZSS、FZSS 提取物中乌药碱、木兰花碱、维采宁、斯皮诺素、6''-阿魏酰斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A、酸枣仁皂苷 B 的含量。

2.2 ZSS、FZSS 改善失眠大鼠学习记忆的药效学评价

2.2.1 失眠模型的建立 采用随机数字法将 84 只 SD 大鼠分为对照组 ($n=12$) 和造模组 ($n=72$)。以 0.5% 羧甲基纤维素钠生理盐水溶液 (pH 7~8) 为溶剂, 将 PCPA 粉末少量多次加入, 并不断搅拌, 冰浴超声, 制成质量浓度为 40 mg/mL 的 PCPA 悬浮液。对照组常规饲养, 造模组连续 4 d ip PCPA (400 mg/kg) 建立失眠模型。于造模第 3 天, 每组随机取 6 只大鼠, 经乙醚麻醉后经眼眶静脉丛采血。全血样本 4 °C 静置 30 min 凝血, 3 500 r/min 离心 10 min 分离血清, 分装后于 -80 °C 保存。按照 ELISA 试剂盒说明书测定正常大鼠与造模后大鼠血清中 5-HT 水平, 结果显示, 与对照组比较, 造模组大鼠血清中 5-HT 水平显著降低 ($P<0.001$)。

2.2.2 分组及给药 72 只造模成功的大鼠随机分为模型组、地西洋 (0.92 mg/kg) 组及 ZSS 低、高剂量 (10、20 g/kg) 组和 FZSS 低、高剂量 (10、20 g/kg) 组, 每组 12 只。分别将 S5 批次 ZSS、FZSS 提取物配制成 1.14、2.29 g/mL 的溶液, 用于 ZSS、FZSS 低、高剂量组给药。每日 8:00—9:00 时各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的水, 1 次/d, 连续给药 7 d。

2.2.3 旷场实验 给药第 3 天进行旷场实验, 采用 100 cm×100 cm×40 cm (长×宽×高) 旷场实验箱, 内壁涂黑, 底面平均分为 9 个 30 cm×30 cm 小方格, 区域通常分为四角、四周及中央区域, 实验

在安静的环境下进行^[18]。将大鼠放至箱内的底面中心区域, 同时启动摄像和计时设备, 观察并记录。在到达规定的时间后, 即可停止摄像, 观察时间设定为 6 min, 前 1 min 为适应期 (减少急性应激), 记录后 5 min 内大鼠自主活动总路程和中心区停留时间。在给药 30 min 后将大鼠放置于中心区域进行测试, 观察并记录大鼠的中央区域停留时间以及自主活动总路程。

2.2.4 Morris 水迷宫实验^[19] 给药第 4 天进行 Morris 水迷宫实验。实验在黑色内壁的圆形水池中进行, 水池等分为 4 个象限 (平面直角坐标系中里的横轴和纵轴所划分的 4 个区域, 右上的称为第 1 象限, 左上的称为第 2 象限, 左下的称为第 3 象限, 右下的称为第 4 象限), 目标平台位于第 4 象限水面下 1 cm。水温恒定 (22±2) °C, 无日光变化影响。实验过程采用视频跟踪分析系统进行记录。

(1) 定位航行实验: 实验训练大鼠在圆形水池中找到隐藏平台。水池深度 30 cm, 直径 100 cm, 水温维持在 24~26 °C。训练时将大鼠轻轻放入水中, 朝向水池内壁, 允许其定位目标平台。记录各组大鼠从进入水中到爬上目标平台停留 15 s 所用的时间, 即大鼠的逃避潜伏期。若大鼠在 60 s 内没有找到目标平台, 则对其进行引导, 并在平台上停留 15 s, 所有大鼠每天训练 2 次, 持续 3 d。

(2) 空间探索实验: 撤去平台, 将各组大鼠在同一位置面向池内壁放入水中, 记录大鼠在 60 s 内行动轨迹图、平均速度及其穿越目标象限的次数、时间、路程。

2.2.5 大鼠取材与处理 末次给药 1 h 后, 各组大鼠放入乙醚麻醉诱导箱中, 麻醉时间 3~4 min, 待麻醉稳定后, 取出大鼠, 腹部皮肤消毒, 打开腹腔, 暴露腹主动脉, 用含肝素抗凝的注射器在腹主动脉内取血, 离心, 取上清液, 分装, 于 -80 °C 备用。断头, 经颅前正中中线剪开头皮, 撬开颅骨, 在冰盒上取下大鼠脑组织, 剥离海马, 放入 4% 多聚甲醛固定液中, 每组 3 份。经石蜡切片后进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 在光学显微镜下对海马组织进行病理观察并采集图像。取各组大鼠海马组织, 称定质量后加入 10 倍量生理盐水, 4 °C 匀浆 180 s, 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定海马组织中 5-HT、GABA 和 NO 水平。血清实验前于冰上解冻, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、MT、Glu 水平。

2.3 代谢组学分析

2.3.1 样品的处理

(1) 海马组织样品的处理: 精密称取各组大鼠海马组织 30 mg, 加入 300 μ L 预冷的含 0.1% 甲酸的甲醇溶液, 4 $^{\circ}$ C 匀浆 3 min (频率 60 Hz), 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清液 250 μ L 置于离心浓缩仪中浓缩至干。加入 100 μ L 70% 甲醇水溶液复溶, 涡旋使其完全溶解, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜进行分析。

(2) 血清样品的处理: 取各组大鼠血清样品 100 μ L, 冰上解冻 30 min, 加入预冷的 300 μ L 甲醇-乙腈 (1:1), 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 400 μ L 置于离心浓缩仪中浓缩至干。加 200 μ L 70% 甲醇水溶液复溶, 涡旋 3 min, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行分析。

2.3.2 质控样品的处理 所有待测样品各取 20 μ L, 混合得到质控样品。在分析样品序列之前, 运行 6 个质控样品。质控样品在运行之前、期间 (每走完 1 组样本, 插入 1 针质控样本) 和运行之后进样, 以评估 UPLC-Q-Orbitrap-MS 整个分析过程的稳定性和重复性。

2.3.3 色谱条件

(1) 海马组织样本色谱条件: Acquity UPLC[®] HSS T3 柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 50 $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 15%~60% B; 3~15 min, 60%~100% B; 15~18 min, 100% B; 18~20 min, 100%~15% B; 20~23 min, 15% B。体积流量 0.35 mL/min; 进样量 5 μ L。

(2) 血清样本色谱条件: Y UPLC[®] HSS T3 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m), 柱温 50 $^{\circ}$ C; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 2% B; 1~3 min, 2%~50% B; 3~14 min, 50%~60% B; 14~18 min, 60~90% B; 18~19 min, 90%~100% B; 19~20 min, 100% B; 20~22 min, 100%~2% B。体积流量 0.35 mL/min; 进样量 2 μ L。

2.3.4 质谱条件 电喷雾电离源 (electrospray ionization, ESI); 正、负离子模式下分别扫描; 工作模式为 Full MS/dd ms²; 鞘气体积流量 35 arb; 辅助气体流量 10 arb; 喷雾电压 3.5 kV (ESI⁺)、2.5 kV (ESI⁻); 毛细管温度 320 $^{\circ}$ C; 离子源温度 350 $^{\circ}$ C (ESI⁺)、300 $^{\circ}$ C (ESI⁻); 一级全扫描分辨率 70 000 FWHM, 二级扫描分辨率 17 500 FWHM, 质荷比窗口宽度为 m/z 2.0; 扫描范围 m/z 100~1 500; 动态排除持续时间 8 s; 碰撞能量 30 eV。

2.3.5 代谢组学数据处理 UPLC-MS 数据收集完毕后, 导出 raw 格式文件, 采用 Compound Discoverer 3.3 软件进行图谱对比查看、去噪音、解卷积和归一化等数据预处理, 导出 csv 格式的二维数据矩阵, 包括 m/z 、保留时间和峰面积。使用 SIMCA-P 14.1 软件对处理数据依次进行主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 根据变量重要性投影 (variable importance projection, VIP) >1 及 $P<0.05$ 筛选出潜在代谢标记物, 将筛选的差异代谢物导入 Metabo Analyst 5.0 数据库进行高通量代谢通路分析。

2.4 统计学分析

所有数据采用 GraphPad Prism 9.5.1 软件作图, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性分析用独立样本 t 检验和 One-way ANOVA 分析。

3 结果

3.1 ZSS、FZSS 中 7 种化学成分的含量比较

采用课题组建立的 HPLC-UV-ELSD 法^[6], 测得 ZSS、FZSS 中 7 种化学成分的含量 (以生药量计), 结果见表 2。

3.2 ZSS、FZSS 治疗失眠大鼠的药效学评价

3.2.1 各组大鼠体重变化 如图 1-A 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠体重质量显著降低 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组大鼠体重质量显著升高 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

3.2.2 旷场实验结果 如图 1-B、C 所示, 与对照

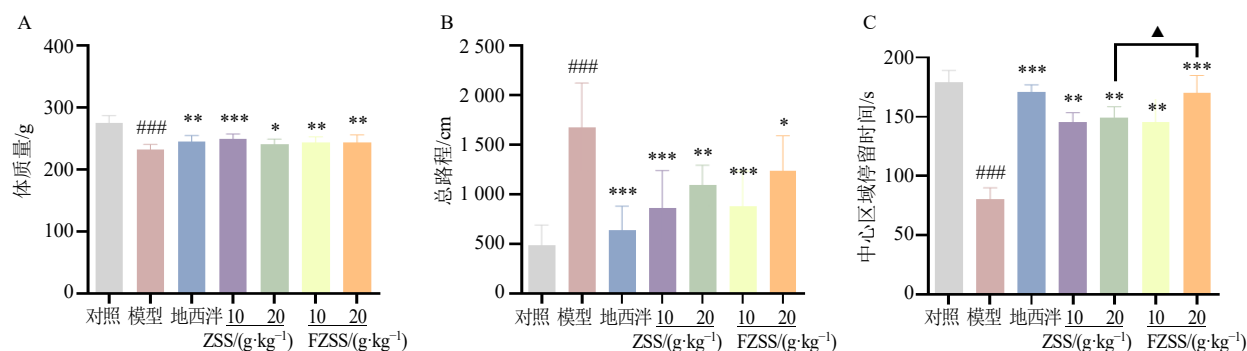
表 2 ZSS、FZSS 中 7 种化学成分的含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Contents of seven chemical components in ZSS and FZSS ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	乌药碱/ (mg·g ⁻¹)	木兰花碱/ (mg·g ⁻¹)	维采宁II/ (mg·g ⁻¹)	斯皮诺素/ (mg·g ⁻¹)	6"-阿魏酰斯皮诺素/ (mg·g ⁻¹)	酸枣仁皂苷A/ (mg·g ⁻¹)	酸枣仁皂苷B/ (mg·g ⁻¹)
ZSS	0.36 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.00	0.71 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.01
FZSS	0.44 $\pm$ 0.04*	0.33 $\pm$ 0.01**	0.06 $\pm$ 0.00	0.79 $\pm$ 0.01*	0.65 $\pm$ 0.01**	0.59 $\pm$ 0.02*	0.34 $\pm$ 0.02*

与 ZSS 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs ZSS。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与相同剂量的 ZSS 组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$, 下图同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs ZSS same dose group, same as below figures.

图 1 各组大鼠体重 (A) 及旷场实验 (B、C) 结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Body weight (A) and open field test (B, C) results of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组比较,模型组大鼠旷场的自主活动总路程显著增加 ($P < 0.001$),在旷场中心区停留时间显著减少 ($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组大鼠旷场的自主活动总路程显著减少 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),在旷场中心区停留时间显著增加 ($P < 0.01, 0.001$),其中 FZSS 高剂量组大鼠在旷场中心区停留时间显著高于 ZSS 高剂量组 ($P < 0.05$),表明 ZSS、FZSS 均具有镇静的作用。

3.2.3 Morris 水迷宫实验结果

(1) 定位航行结果:以逃避潜伏期为指标评价失眠大鼠空间学习能力。在经过 4 次的引导训练后,各组大鼠逃避潜伏期均有不同程度的下降,第 4 次训练即最终定位航行测试结果,见图 2。与对照组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著增加 ($P < 0.01$);

与模型组比较,各给药组大鼠逃避潜伏期均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),其中 FZSS 低剂量组大鼠逃避潜伏期显著低于 ZSS 低剂量组 ($P < 0.05$)。

(2) 空间探索结果:采用大鼠水迷宫测试仪跟踪成像系统对各组大鼠在水池中的运动轨迹进行记录,见图 3。原平台所在象限为第 4 象限,对照组大鼠入水后能够自主地去第 4 象限寻找平台,轨迹较为松散;模型组大鼠的轨迹集中分布在入水的第 1 象限内,较少去探索其他象限;地西洋组大鼠入水后活动减少,出现静止漂浮水面的现象;ZSS 低剂量组和 FZSS 低剂量组大鼠在平台所在的第 1 象限内,有时会去探索其他象限;ZSS 高剂量组和 FZSS 高剂量组大鼠在平台所在的第 4 象限内徘徊,并在入水后有直线进入第 4 象限的趋势,提示给予 ZSS、FZSS 干预后大鼠学习记忆能力有所恢复。在实验中观察到大鼠多在入水处徘徊或无目的的探索情况,理毛次数明显增多,反映了大鼠在面对复杂任务时产生焦虑样情绪;理毛次数较高的大鼠在 Morris 水迷宫实验中寻找隐藏平台的路径长度更长,表明大鼠的学习记忆能力受到了损害。

利用 GraphPad Prism 软件对目标象限停留时间、进入目标象限路程、平均速度和进入目标象限次数 4 个指标进行分析。如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠目标象限停留时间、目标象限移动距离、平均速度及进入目标象限次数均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),表明失眠模型大鼠不能准确定位平台具体位置甚至所在象限,产生了空间学习记忆能力障碍。与模型组比较,各给药组大鼠目标象

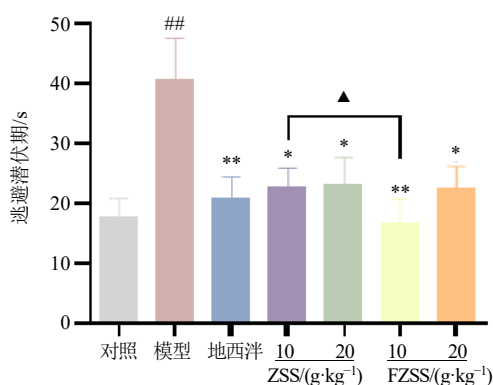


图 2 各组大鼠逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Comparison of escape latency periods of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

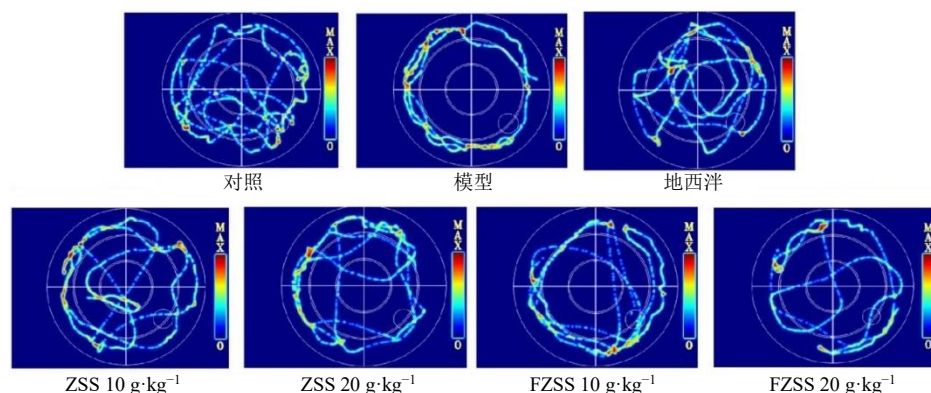


图 3 各组大鼠 Morris 水迷宫运动轨迹图

Fig. 3 Morris water maze movement trajectory diagram of rats in each group

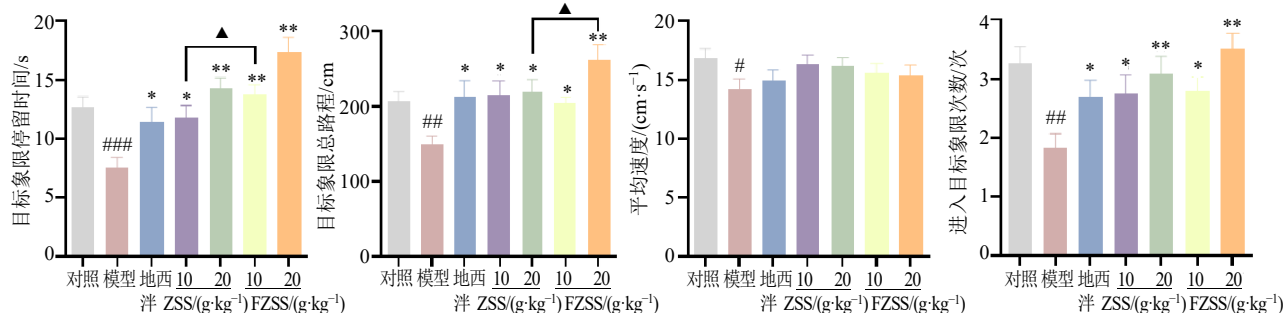


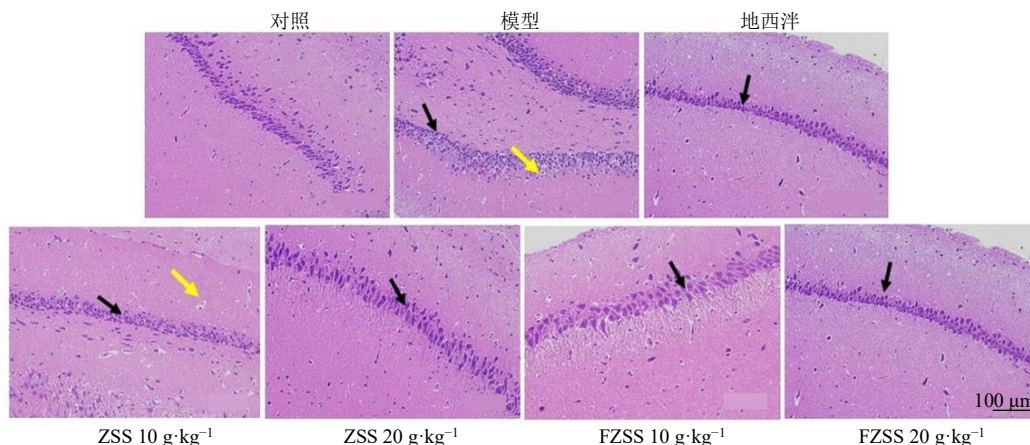
图 4 各组大鼠空间探索结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Results of spatial exploration of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

限停留时间显著延长 ($P < 0.05$ 、 0.01)，其中 FZSS 低剂量组大鼠在目标象限停留的时间显著长于 ZSS 低剂量组 ($P < 0.05$)；各给药组大鼠目标象限总路程显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)，其中 FZSS 高剂量组大鼠目标象限总路程显著长于 ZSS 高剂量组 ($P < 0.05$)；各给药组大鼠运动的平均速度有增加的趋势，但无显著性差异；各给药组大鼠进入目标象限

次数均显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2.4 各组大鼠海马组织病理变化 如图 5 所示，对照组大鼠海马体各区无明显损伤，神经元细胞形态正常。模型组大鼠海马出现明显损伤，在海马齿状回区胞质空泡化严重，同时神经元细胞出现皱缩，染色加深，胞核、胞质分界不清，可能影响信号传导及神经元形态变化。各给药组大鼠海马胞质



黑色箭头表示胞核胞质分界不清；黄色箭头表示神经元胞质空泡化。

Black arrows indicate unclear boundary between nucleus and cytoplasm; Yellow arrows indicate vacuolation of neuronal cytoplasm.

图 5 各组大鼠海马组织病理变化 (HE, $\times 200$)

Fig. 5 Pathological changes in hippocampal tissue of rats in each group (HE, $\times 200$)

空泡化损伤均有不同程度好转,神经元形态变化数目相对减少,但仍存在神经元萎缩现象,其中 FZSS 高剂量组大鼠海马组织形态较为接近对照组。表明失眠造成大鼠海马组织损伤,给药后海马组织病理损伤得到改善,与行为学结果一致。

3.2.5 各组大鼠海马组织中 5-HT、NO、GABA 水平以及血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Glu、MT 水平多种神经递质(如 5-HT、NO、GABA)在睡眠与觉醒的调控中扮演着角色。如图 6-A 所示,与对照组比较,模型组大鼠海马组织 5-HT、NO、GABA 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01),与课题组前期研究^[7]一致;与模型组比较,各给药组 5-HT、GABA 水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),地西洋组、ZSS 高剂量组和 FZSS 各剂量组 NO 水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01),其中 FZSS 高剂量组 GABA 水平显著高于 ZSS 高剂量组($P<0.05$)。如图 6-B 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、Glu

水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001),IL-1 β 、MT 水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 IL-6、TNF- α 、Glu 水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),IL-1 β 、MT 水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01),其中 FZSS 高剂量组 TNF- α 、Glu 水平显著低于 ZSS 高剂量组($P<0.05$)。

3.3 海马组织代谢组学结果

3.3.1 代谢轮廓分析 采用 SIMCA-P 软件对海马组织样品进行 PCA,在正、负离子模式下质控样品中分别有 100%、99% 峰的 RSD 值 $<30\%$,表明该方法有较好的稳定性及重复性,数据可靠。采用数学模型^[20]计算各给药组之间的相互距离,结果表明,ZSS 高剂量组和 FZSS 高剂量组距离对照组最接近,回调程度更好。该结果与药效学结果一致,所以选取 ZSS 高剂量组和 FZSS 高剂量组用于后续代谢组学分析。如图 7-A、B 所示,正、负离子模式下对照组与模型组明显分开,且组间距离较远,

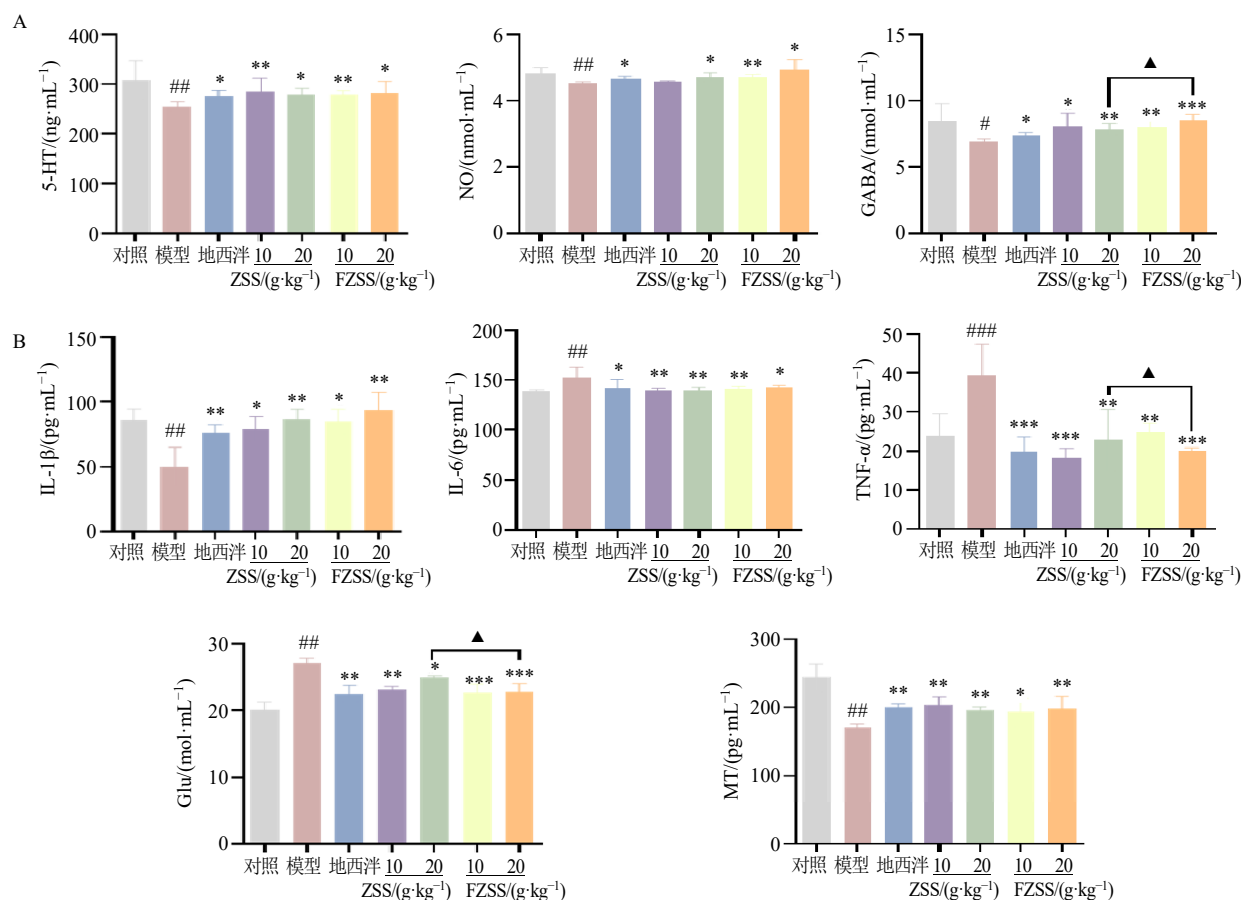


图 6 各组大鼠海马组织中 5-HT、NO、GABA 水平 (A) 以及血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、Glu、MT 水平 (B)

($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Levels of 5-HT, NO, GABA in hippocampus (A) and IL-1 β , IL-6, TNF- α , Glu, MT in serum (B) of rats in each group

($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

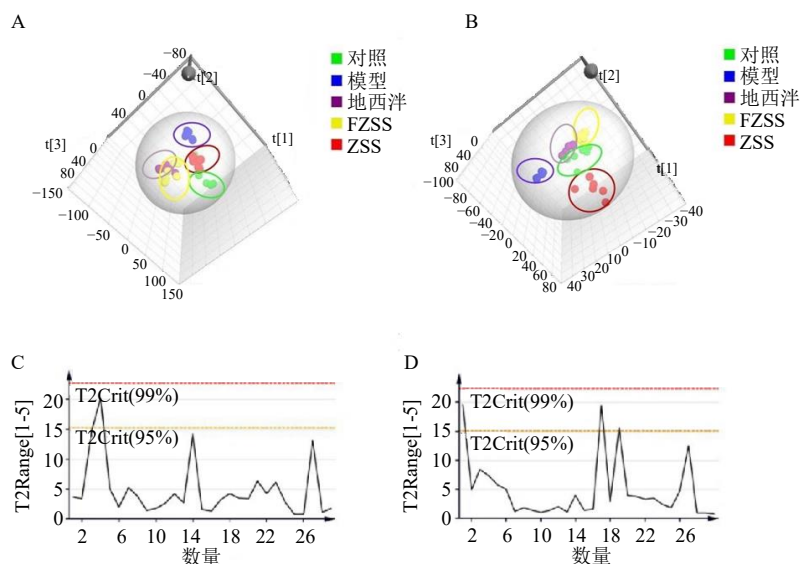


图 7 正、负离子模式下 PCA 图 (A、B) 以及各组数据的置信区间 (C、D)

Fig. 7 PCA (A, B) under positive and negative ion modes and confidence interval of data in each group (C, D)

表明模型组与对照组大鼠的内源性代谢物存在较大差异, 而各给药组均可回调这种差异。图 7-C、D 显示各组数据均在 99% 的置信区间内, 表明数据可信。

3.3.2 海马组织潜在标志物预测分析 为了对比 ZSS、FZSS 对大鼠海马组织内源性代谢物的影响, 进一步对对照组和模型组进行有监督的 OPLS-DA, 结合 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 筛选潜在生物标志物。OPLS-DA 结果见图 8-A、D, 2 组可沿 X 轴明显分开, 组间差异较大, 表明模型组大鼠代谢轮廓发生改变, 即在正、负离子模式下, ip PCPA 显著影响了大鼠海马中的内源性代谢物。200 次模型验证结果 (图 8-B、E) 显示, 正离子模式下 $R^2 = 0.994$ 、 $Q^2 = 0.945$,

负离子模式下 $R^2 = 0.993$ 、 $Q^2 = 0.963$, 表明模型可靠, 具有良好的预测能力, 可用于后续差异代谢物的筛选。S-plot 图 (图 8-C、F) 中红色点即为 $VIP > 1$ 的代谢物, 这些代谢物对组间贡献度较大, 可能是 2 组间的差异代谢物。

3.3.3 海马组织差异代谢物的确定 将筛选得到的差异性代谢物与 mzcloud、mzvault、HMDB 等数据库进行比对, 共鉴定出 39 个差异代谢物。为了进一步分析模型组、ZSS 组及 FZSS 组海马组织中 34 个内源性差异代谢物的动态变化规律, 将各组差异性代谢物的峰面积数据导入 Graphpad 软件绘制箱图。如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组精氨酸、

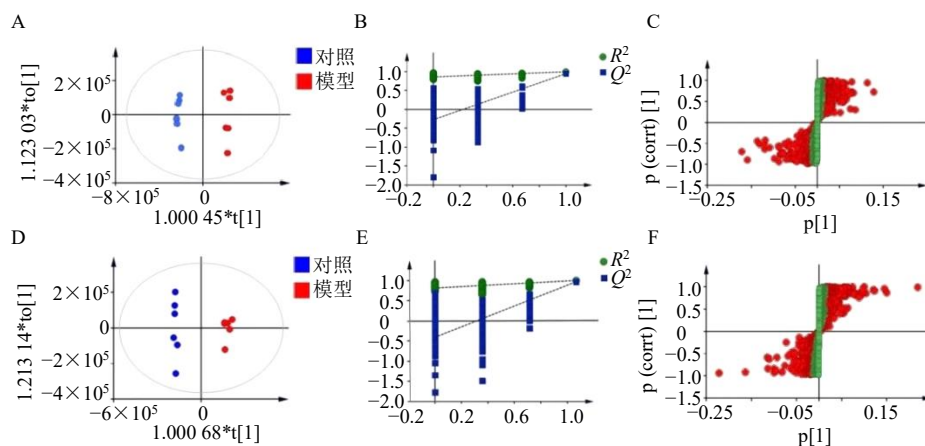
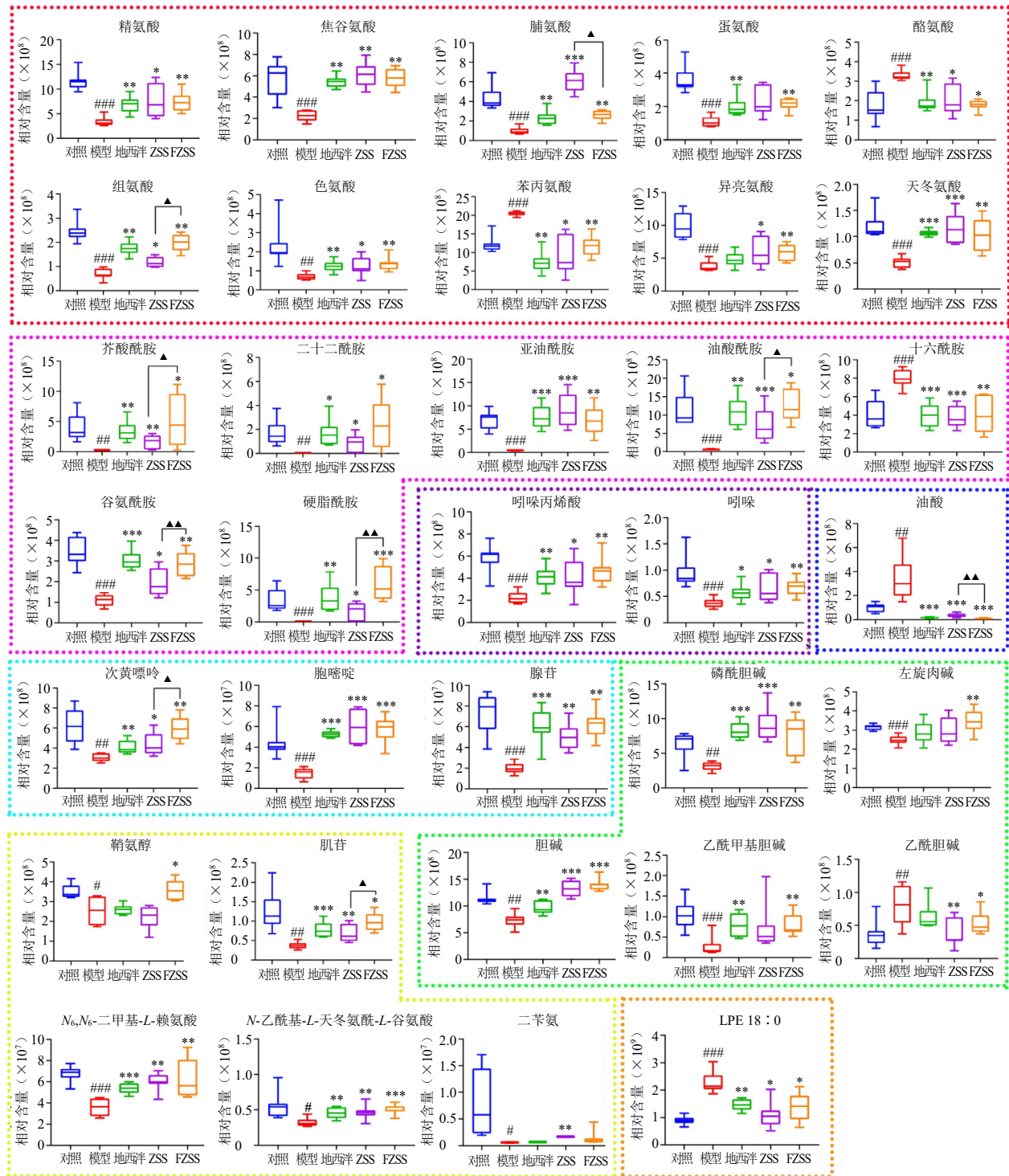


图 8 正、负离子模式下对照组和模型组海马组织的 OPLS-DA 得分图 (A、D)、200 次置换检验图 (B、E) 及 S-plot 图 (C、F)

Fig. 8 OPLS-DA score plots (A, D), 200 permutation test plots (B, E) and S-plot plots (C, F) of hippocampal tissues in control group and model group under positive and negative ion modes



红色框内为氨基酸类成分, 粉色框内为酰胺类成分, 紫色框内为吲哚类, 蓝色框内为脂肪酸类, 青色框内为核苷类成分, 绿色框内为胆碱类成分, 橘色框为溶血磷脂胆碱类成分, 黄色框为其他类成分。

Components within red box are amino acid types, those within pink box are amide types, those within purple box are indole types, those within blue box are fatty acid types, those within blue box are nucleotide types, those within blue box are choline types, those within orange box are lysophosphatidylcholine types, those within yellow box are other types.

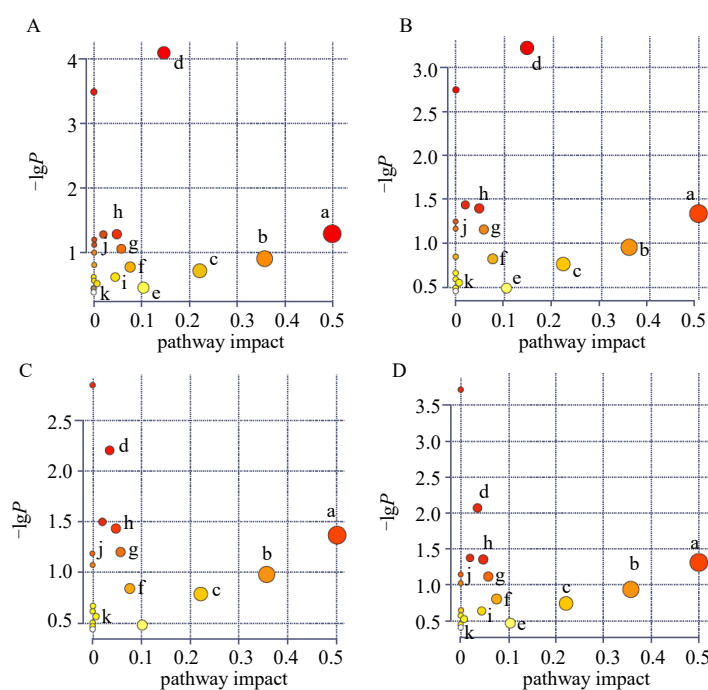
图9 各组大鼠海马组织差异代谢物相对含量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Changes in relative content of differential metabolites in hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

焦谷氨酸、脯氨酸、蛋氨酸、芥酸酰胺、二十二酰胺、亚油酰胺、吡啶丙烯酸、吡啶、次黄嘌呤等 28 种差异代谢物含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，6 种差异代谢物 (酪氨酸、苯丙氨酸、十六酰胺、油酸、乙酰胆碱、LPE 18:0) 含量显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001)。与模型组比较，ZSS 组精氨酸、焦谷氨酸、脯氨酸、组氨酸、色氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、芥酸酰胺等 24 种差异代谢物含量显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，酪氨酸、苯丙氨酸、十六酰胺、油酸、乙酰胆碱、LPE 18:0 共 6 种差异代谢物含量显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)；FZSS 组精氨酸、焦谷氨酸、脯氨酸、组氨酸、色氨酸、异亮氨酸、天冬氨酸、芥酸酰胺、二十二酰胺等 26 种差异代谢物含量显著上调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)，酪氨酸、苯丙氨酸、十六酰胺、油酸、乙酰胆碱、LPE 18:0 共 6 种差异代谢物含量显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。ZSS 组与 FZSS 组相比较，脯氨酸回调趋势更为显著 ($P < 0.05$)；而 FZSS 组在油酸、组氨酸、芥酸酰胺、油酸酰胺、谷氨

酰胺、硬脂酰胺、次黄嘌呤以及肌昔共 8 种代谢差异物体现出更为明显的回调趋势 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.3.4 海马组织代谢通路分析 将海马组织中鉴定出的差异代谢物分别导入 MetPA 数据处理中心进行通路富集和网络构建，分析对照组 vs 模型组、模型组 vs ZSS 组、模型组 vs FZSS 组之间差异代谢物相关的代谢通路，每个气泡代表 1 条代谢通路 (图 10)。横坐标和气泡大小表示拓扑分析的影响因素，气泡越大，影响因素越大。纵坐标和气泡颜色表示富集分析的 P 值，颜色越深， P 值越小，富集程度越显著。如图 10 所示，通过对 Holm P 、误判率 (FDR) 及通路影响值 (pathway impact) 的综合分析，剔除 $P > 0.05$ 的通路，选择影响因子大于 0 的代谢通路被认为是潜在的靶标通路。对照组 vs 模型组有 11 条 ZSS、FZSS 与失眠有关的代谢通路。ZSS 组和 FZSS 组调控的代谢通路不同，两者共同调控 9 条代谢通路，此外，FZSS 组还单独调控鞘脂代谢通路及半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路。



A-对照组 vs 模型组海马代谢通路分析；B-模型组 vs 地西洋组海马代谢通路分析；C-模型组 vs ZSS 组海马代谢通路分析；D-模型组 vs FZSS 组海马代谢通路分析；a-苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸合成；b-苯丙氨酸代谢；c-组氨酸代谢；d-甘油磷脂代谢；e-半胱氨酸和蛋氨酸代谢；f-精氨酸和脯氨酸代谢；g-精氨酸生物合成；h-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢；j-嘌呤代谢；i-鞘脂代谢；k-谷胱甘肽代谢。

A-analysis of hippocampal metabolic pathways between control group and model group; B-analysis of hippocampal metabolic pathways between model group and diazepam group; C-analysis of hippocampal metabolic pathways between model group and ZSS group; D-analysis of hippocampal metabolic pathways between model group and FZSS group; a-phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis; b-phenylalanine metabolism; c-histidine metabolism; d-glycerophospholipid metabolism; e-cysteine and methionine metabolism; f-arginine and proline metabolism; g-arginine biosynthesis; h-alanine, aspartate, and glutamate metabolism; i-purine metabolism; j-sphingolipid metabolism; k-glutathione metabolism.

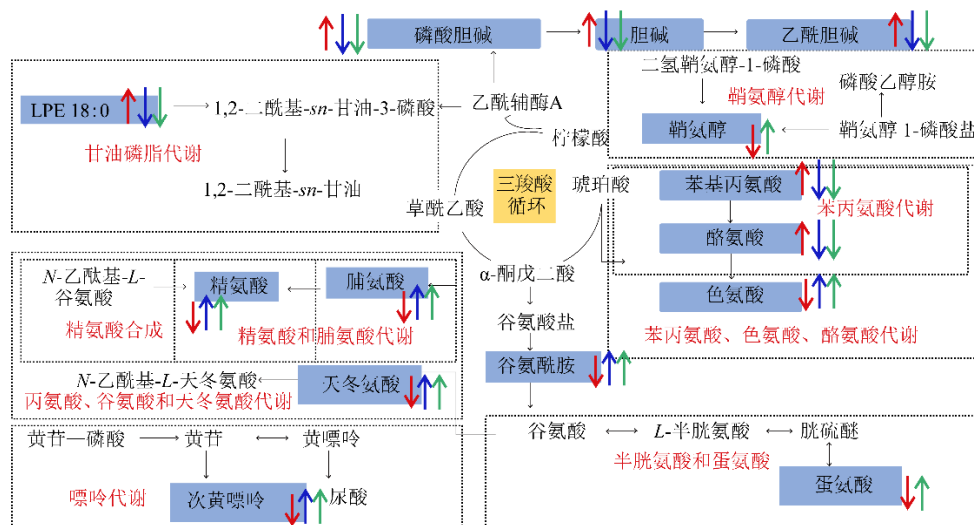
图 10 各组大鼠海马样品代谢通路分析

Fig. 10 Metabolic pathway analysis of hippocampal samples of rats in each group

海马组织代谢组学结果表明, ZSS、FZSS 能够通过多种途径调控失眠大鼠体内异常代谢, 主要涉及 11 条相关代谢通路, 为了进一步明确 ZSS、FZSS 体内代谢机制, 结合 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, 并绘制代谢途径网络图, 见图 11。

3.3.5 相关性分析 采用皮尔逊相关, 对 Morris 水迷宫实验空间探索中评价学习记忆能力指标包括目标象限停留时间 (target quadrant residence time,

TQST)、到目标象限总距离(target quadrant distance, TQD)、平均速度 (average speed, AS)、穿越平台次数 (number of crossing, NC)、逃逸潜伏期 (escape latency, EL), 睡眠相关指标包括自主活动总路程 (total distance, TD)、中心区停留时间 (central time, CT), 海马组织中神经递质 5-HT、GABA、NO 等水平以及海马中内源性差异代谢物含量进行相关性分析。海马组织中差异代谢物和生化指标相关性结果表明 (图 12), 与 ZSS 相比, FZSS 显著回调



蓝色框为差异代谢物; 红色箭头表示模型组与对照组比较; 蓝色箭头表示 ZSS 组与模型组比较; 绿色箭头表示 FZSS 组与模型组比较; “↑”表示上调的代谢产物, “↓”表示下调的代谢产物, 图 17 同。

Blue boxes indicate differentially expressed metabolites; Red arrows indicate model group vs control group; Blue arrows indicate ZSS group vs model group; Green arrows indicate FZSS group vs model group; “↑” indicates up-regulated metabolites; “↓” indicates down-regulated metabolites, same as Fig. 17.

图 11 海马组织代谢途径网络图

Fig. 11 Network diagram of metabolic pathways in hippocampus

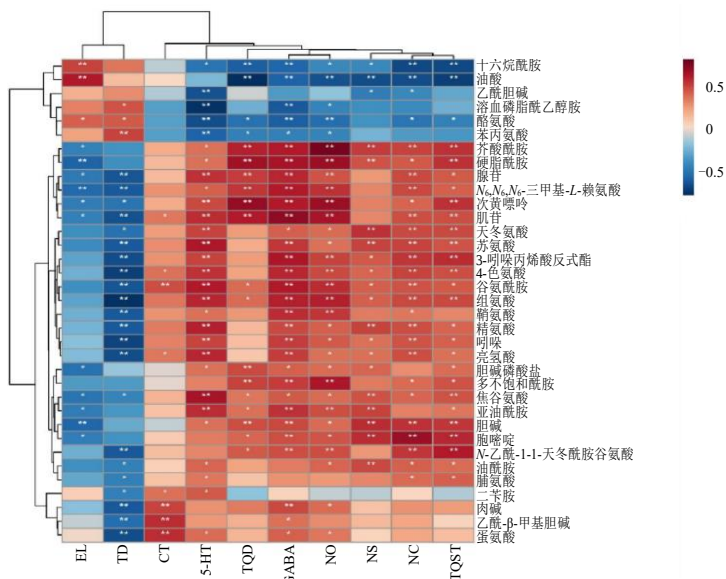


图 12 海马组织差异代谢物与行为学及生化指标的相关性分析

Fig. 12 Correlation analysis between differential metabolites in hippocampal tissue and behavioral and biochemical indicators

胺类成分(谷氨酰胺、芥酸酰胺、硬脂酰胺),氨基酸类组氨酸,含氮类(肌苷及次黄嘌呤)等均与药效指标 5-HT、GABA 及 NO 呈显著正相关,与行为学指标 TQD、NC、TQST 呈显著正相关,油酸则与上述指标呈显著负相关。鞘氨醇与蛋氨酸只在 FZSS 中显著回调,与 5-HT、GABA 及 NO 呈显著正相关,肉碱与 GABA 及 NO 呈显著正相关、乙酰甲基胆碱与 GABA 呈显著正相关。与 FZSS 相比, ZSS 显著回调脯氨酸,与 NC 及 TQST 及 5-HT 呈显著正相关;油酰胺与 5-HT、NO 指标以及 AS、TQST 及 NC 呈显著正相关。二卞胺只在 ZSS 中显著回调,与 5-HT 及 ST 呈显著正相关。

3.4 血清代谢组学结果

3.4.1 代谢轮廓分析 为考察各组大鼠体内代谢

组学的整体变化,对原始数据进行预处理,采用 SIMCA-P 软件对血清样品进行 PCA,如图 13-A、B 所示,正、负离子模式下对照组与模型组明显分开,且组间距离较远,表明模型组与对照组大鼠的内源性代谢物存在较大差异,而各给药组均可回调这种差异。图 13-C、D 显示各组数据均在 99%的置信区间内,表明数据可信。

3.4.2 潜在标志物预测分析 进一步对对照组和模型组进行有监督的 OPLS-DA,结合 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 筛选潜在生物标志物的候选变量。OPLS-DA 结果见图 14-A、D,2 组可沿 X 轴明显分开,组间差异较大,表明模型组大鼠代谢轮廓发生改变,即在正、负离子模式下,ip PCPA 显著影响了大鼠血清中的内源性代谢物。200 次模型验证结果(图 14-B、

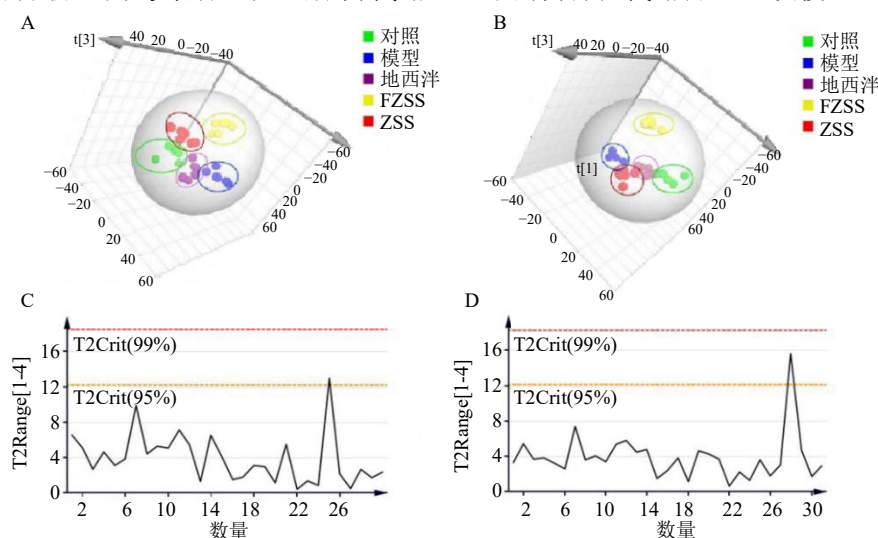


图 13 正、负离子模式下 PCA 图 (A、B) 以及各组数据的置信区间 (C、D)

Fig. 13 PCA (A, B) under positive and negative ion modes and confidence interval of data in each group (C, D)

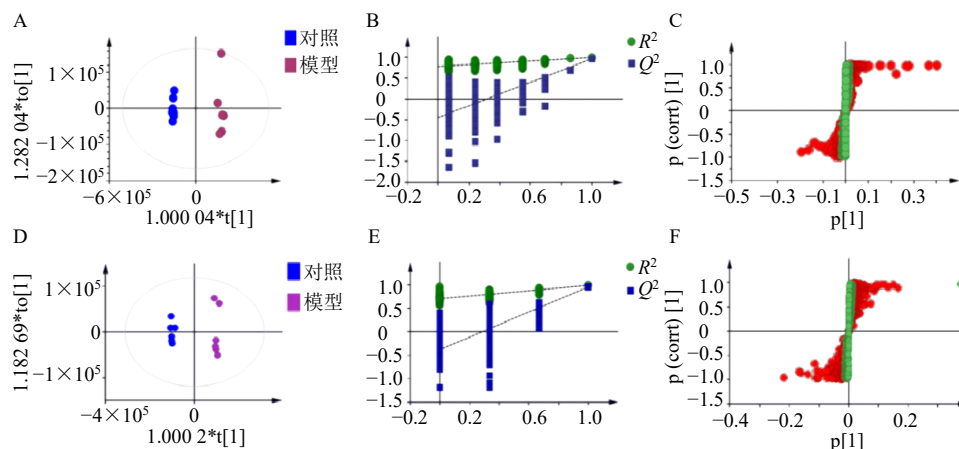


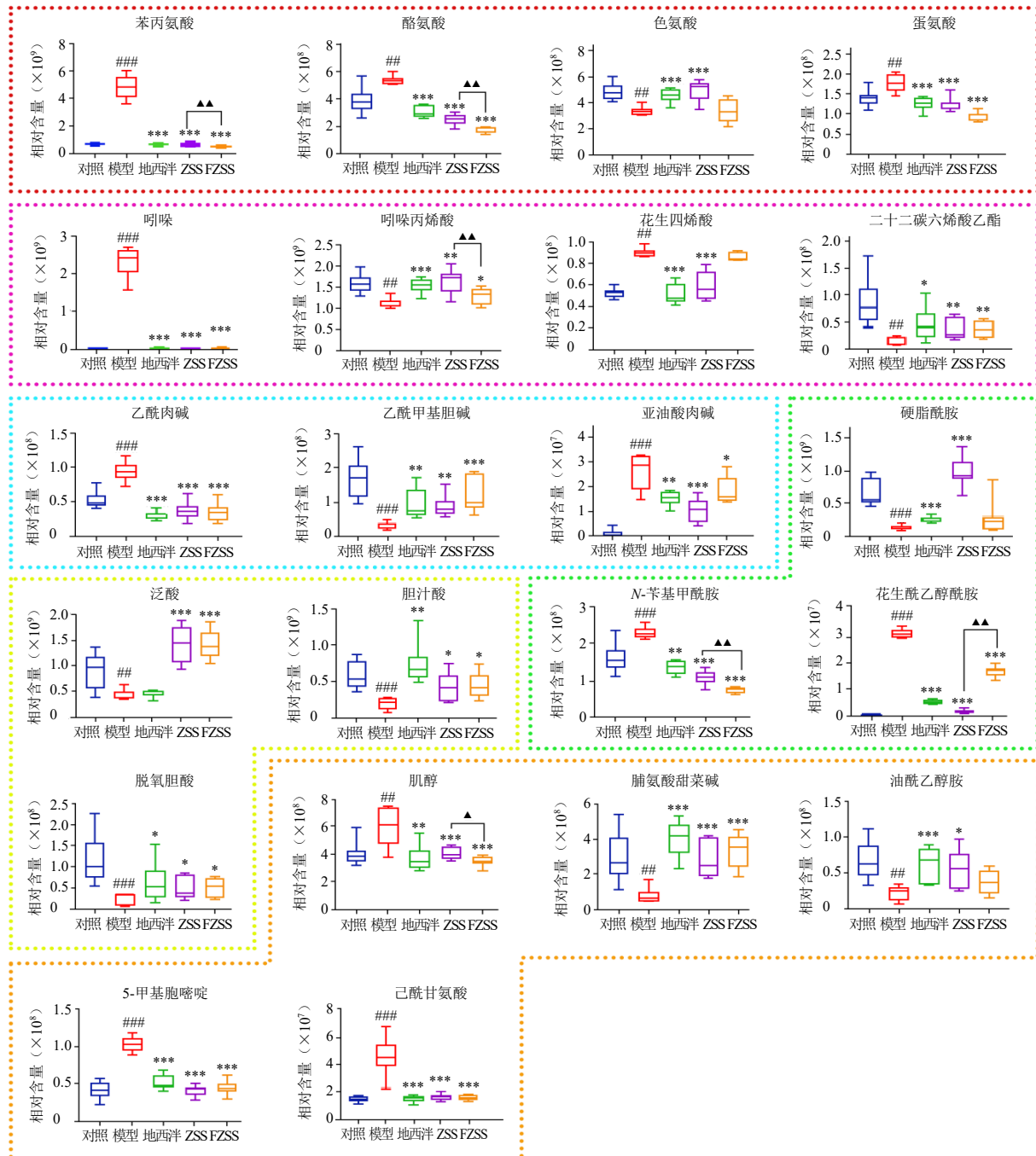
图 14 正、负离子模式下对照组和模型组血清样品的 OPLS-DA 得分图 (A、D)、200 次置换检验图 (B、E) 及 S-plot 图 (C、F)

Fig. 14 OPLS-DA score plots (A, D), 200 permutation test plots (B, E) and S-plot plots (C, F) of serum samples in control group and model group under positive and negative ion modes

E) 显示, 正离子模式下 $R^2=0.996$ 、 $Q^2=0.965$, 负离子模式下 $R^2=0.994$ 、 $Q^2=0.963$, 表明模型可靠, 具有良好的预测能力, 可用于后续差异代谢物的筛选。S-plot 图 (图 14-C、F) 中红色点即为 $VIP>1$ 的代谢物, 这些代谢物对组间贡献度较大, 可能是

2 组间的差异代谢物。

3.4.3 血清样品差异代谢物的鉴定 血清样品共鉴定出 22 个内源性差异代谢物。将各组差异性代谢物的峰面积数据导入 Graphpad 软件绘制箱图, 结果见图 15。与对照组比较, 模型组色氨酸、吲哚丙



红色框内为氨基酸类成分, 粉色框内为吲哚类酰胺类成分, 蓝色框内为脂肪酸类及其衍生物类, 青色框内为胆碱类, 绿色框内为酰胺类成分, 黄色框为有机酸类成分, 橘色框为其他类成分。

Red boxes are amino acid derivatives, pink boxes are indole and amide compounds, blue boxes are fatty acids and their derivatives, cyan boxes are choline-related compounds, green boxes are amide constituents, yellow boxes are organic acids, orange boxes are other miscellaneous compounds.

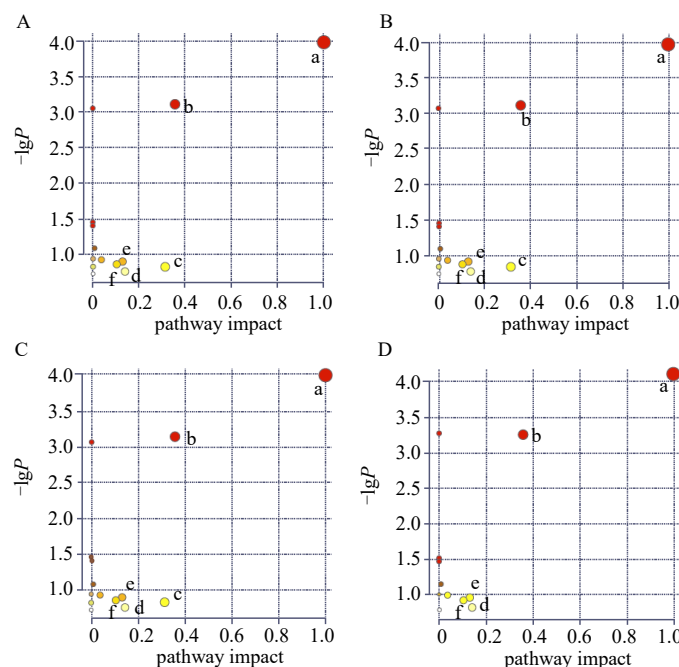
图 15 各组大鼠血清样品差异代谢物的相对含量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 15 Changes in relative content of differential metabolites in serum samples of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

烯酸、二十二碳六烯酸乙酯、乙酰甲基胆碱等 10 种代谢物含量均显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001)，苯丙氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、吡咯、花生四烯酸、乙酰肉碱、亚油酸肉碱等 12 种差异代谢物显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001)；ZSS 组和 FZSS 组均可显著上调 8 种差异代谢物 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)，同时显著下调 11 种差异代谢物 ($P<0.05$ 、 0.001)。与 ZSS 相比，FZSS 可显著回调苯丙氨酸、酪氨酸、*N*-苄基甲

酰胺、肌醇含量 ($P<0.05$ 、 0.01)；与 FZSS 相比，ZSS 对吡咯丙烯酸、花生酰乙醇酰胺的回调较为显著 ($P<0.01$)。

3.4.4 血清代谢通路分析 分析各组之间相关的代谢通路，如图 16 所示，对照组和模型组相比有 6 条 ZSS、FZSS 与失眠有关的代谢通路，ZSS 组和 FZSS 组调控的代谢通路不同，两者共同调控 5 条代谢通路，此外，ZSS 组还单独调控花生四烯酸代谢。



A-对照组 vs 模型组血清代谢通路分析；B-模型组 vs 地西洋组血清代谢通路分析；C-模型组 vs ZSS 组血清代谢通路分析；D-模型组 vs FZSS 组血清代谢通路分析；a-苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸生物合成；b-苯丙氨酸代谢；c-花生四烯酸代谢；d-酪氨酸代谢；e-肌醇磷酸代谢；f-半胱氨酸和蛋氨酸代谢。

A-analysis of serum metabolic pathways between control group and model group; B-analysis of serum metabolic pathways between model group and diazepam group; C-analysis of serum metabolic pathways between model group and ZSS group; D-analysis of serum metabolic pathways between model group and FZSS group; a-phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis; b-phenylalanine metabolism; c-arachidonic acid metabolism; d-tyrosine metabolism; e-inositol phosphate metabolism; f-cysteine and methionine metabolism.

图 16 各组大鼠血清样品代谢通路分析

Fig. 16 Metabolic pathway analysis of serum samples from rats in each group

ZSS、FZSS 能够通过多种途径调控失眠大鼠体内异常代谢，主要涉及 6 条相关代谢通路，结合 KEGG 及相关富集分析方法得潜在生物标志物相关代谢通路绘制代谢途径网络图（图 17），进一步明确 ZSS、FZSS 在体内代谢机制。

3.4.5 相关性分析 采用皮尔逊相关对药效指标与血清中 ZSS、FZSS 的差异内源性成分进行相关性分析（图 18）。与 ZSS 相比，FZSS 显著下调苯丙氨酸、酪氨酸、*N*-苄基甲酰胺、肌醇，与 IL-1 β 及行为学指标 TQST、TQD、AS、NC 呈显著负相关，与 Glu 及炎症因子 IL-6 及 TNF- α 呈显著正相关。

只在 ZSS 中显著下调的花生四烯酸与 TQST、TQD、NC 指标呈显著负相关，与 Glu 和 TNF- α 呈显著正相关。

3.5 整合血清和海马代谢组学结果

通过整合血清和海马组织的代谢组学结果，绘制代谢物以及代谢通路韦恩图。结果发现海马样本中筛选到的差异代谢物的数量较多，共筛选鉴定出 34 个差异代谢物，主要以氨基酸类、酰胺类以及胆碱类代谢物为主；血清样本中共筛选鉴定 22 个差异代谢物，主要以氨基酸类代谢物为主。海马和血清中共有的差异代谢物有 8 个，分别为苯丙氨酸、

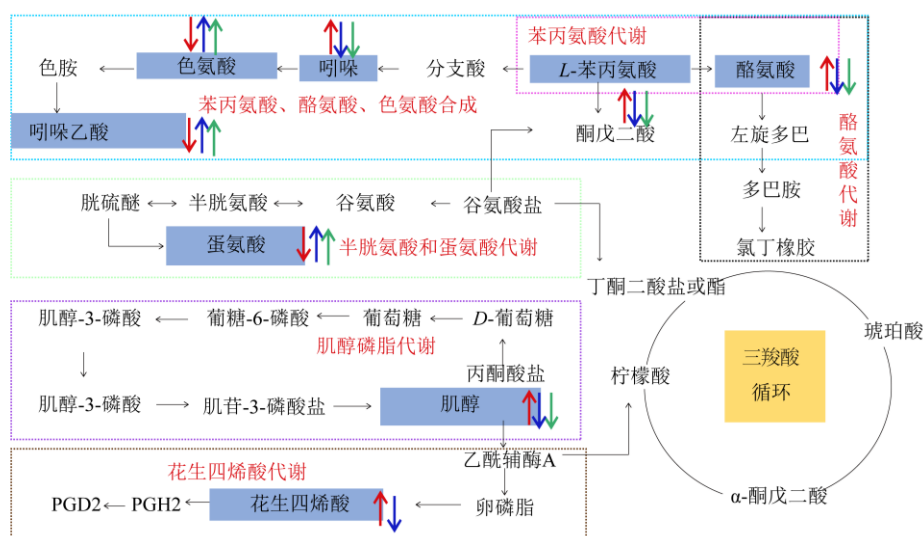


图 17 血清代谢途径网络图

Fig. 17 Network diagram of serum metabolic pathways

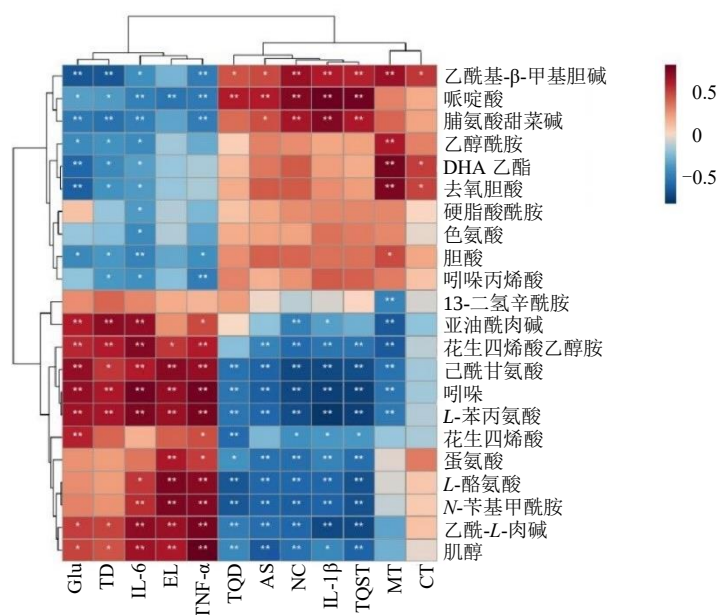


图 18 血清差异代谢物与药效行为学及生化指标的相关性分析

Fig. 18 Correlation analysis of serum differential metabolites with pharmacobehavioral and biochemical indexes

蛋氨酸、硬脂酰胺、酪氨酸、色氨酸、乙酰基胆碱、吲哚丙烯酸、吲哚（图 19-A）。其中，苯丙氨酸、酪氨酸、硬脂酰胺、乙酰甲基胆碱、吲哚丙烯酸在海马与血清样本中显著下调，色氨酸显著上调；蛋氨酸、吲哚在海马样品中显著上调，在血清中显著下调。ZSS、FZSS 在海马中共同回调的 26 个差异代谢物中，ZSS 组脯氨酸、油酸回调效果优于 FZSS 组；FZSS 组组氨酸、芥酸酰胺、油酸酰胺、谷氨酰胺、硬脂酰胺、次黄嘌呤、肌苷回调效果优于 ZSS 组。ZSS、FZSS 在血清中共同回调的 14 个差异代谢物中，ZSS 组吲哚丙烯酸、花生酰乙醇酰胺回调

效果优于 FZSS 组；FZSS 组苯丙氨酸、酪氨酸、N-苄基甲酰胺、肌醇回调效果优于 ZSS 组。代谢组学结果中显示 ZSS 回调效果优于 FZSS 的共计 4 种差异代谢物，FZSS 回调效果优于 ZSS 的共计 11 种差异代谢物。此外，在海马样品中，ZSS 组单独回调二苄胺；FZSS 单独回调蛋氨酸、左旋肉碱、鞘氨醇、乙酰甲基胆碱。在血清样品中，ZSS 组单独回调色氨酸、花生四烯酸、硬脂酰胺、油酰乙醇胺。

对海马组织及血清的代谢通路进行分析，海马与血清中共回调 14 条代谢通路，其中 ZSS、FZSS 对海马中回调的代谢通路较多（图 19-B）。ZSS、

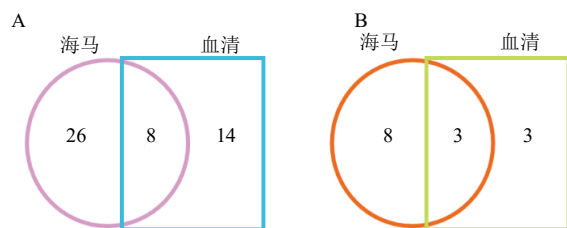


图 19 海马组织与血清差异代谢物 (A) 及代谢通路 (B) 的韦恩图

Fig. 19 Venn diagram of differentially metabolized substances (A) and metabolic pathways (B) in hippocampus and serum

FZSS 共回调海马中 14 条代谢通路, 回调血清中 6 条代谢通路。在海马组织和血清样品中共同回调的代谢通路为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸合成通路、苯丙氨酸代谢及半胱氨酸及蛋氨酸代谢通路。在海马样品中, ZSS、FZSS 共同调控组氨酸代谢, 甘油磷脂代谢, 精氨酸和脯氨酸代谢, 精氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 嘌呤代谢, 谷胱甘肽代谢; 此外, FZSS 还单独调控鞘脂代谢及半胱氨酸和蛋氨酸代谢。在血清样品中, ZSS、FZSS 共同调控肌醇磷酸代谢, 酪氨酸代谢通路。并且 ZSS 还单独调控花生四烯酸代谢通路。以上结果表明, ZSS、FZSS 可能通过调节海马与血清共有的苯丙氨酸、酪氨酸及色氨酸合成通路, 苯丙氨酸代谢通路及半胱氨酸和蛋氨酸代谢 3 条代谢通路发挥整体回调作用。

4 讨论

本研究通过代谢组学技术深入探讨了 ZSS 和 FZSS 对失眠大鼠学习记忆损伤的改善作用及其潜在机制。研究表明, ZSS 和 FZSS 能够显著改善由 PCPA 诱导的失眠大鼠的学习记忆功能减退, 其作用机制可能涉及调节神经递质水平、抑制炎症反应以及调控多种代谢通路, 尤其是通过调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸相关代谢通路发挥重要作用。

研究表明, 慢性睡眠剥夺会导致焦虑水平升高与学习记忆能力受损, 其机制可能涉及炎症细胞因子、转录因子及星形胶质细胞与小胶质细胞活化蛋白的上调。因此这些因子成为开发有效治疗方案的潜在靶点^[21]。5-HT 是一种单胺类神经递质, 在昼夜节律、情绪、认知和伤害性感受等生理功能中发挥重要作用^[22]。5-HT 水平升高有利于充分与其受体结合, 从而发挥改善睡眠的作用^[23]。GABA 是一种在中枢神经系统中起到抑制性作用的神经递质, 能

够通过与 GABA 受体结合, 增加氯离子通道的开放, 使细胞内氯离子浓度增加, 从而抑制神经元的活动, 有助于诱导和维持非快速眼动睡眠, 并减少快速眼动睡眠的发生, 而几种不同类型记忆的处理大多数实际上可能依赖于非快速眼动睡眠^[24-25]。先前研究表明 NO 对不同的学习和记忆过程具有调节作用, 包括被动回避和空间学习^[26]。本研究结果显示, ZSS、FZSS 可显著回调海马组织中 5-HT、GABA 与 NO 水平, 从而发挥直接改善学习记忆损伤的作用。并且在行为学实验中发现, ZSS、FZSS 均能显著增加大鼠旷场实验的总路程, 目标象限停留时间均明显降低; ZSS、FZSS 能显著增加水迷宫实验中目标象限停留时间、进入目标象限路程和平均速度和目标象限穿越次数, 且 FZSS 在增加目标象限停留时间比 ZSS 效果更为明显。ZSS、FZSS 均能显著提高海马组织中 5-HT、GABA、NO 的水平, FZSS 效果稍优于 ZSS, 在 GABA 回调效果方面 FZSS 比 ZSS 更为明显。

综合运用代谢组学技术, 对 ZSS、FZSS 在治疗 PCPA 诱导的失眠大鼠模型的改善学习记忆方面进行了深入探讨。通过 MetaboAnalyst 5.0 数据库, 从脂质代谢、氨基酸代谢、能量代谢等角度分析了 ZSS、FZSS 对海马和血清样本中代谢物的影响, 以及它们如何通过调节特定的代谢途径来改善学习记忆损伤。

通过绘制海马以及血清组织中代谢途径网络图 (图 20), 发现 ZSS、FZSS 主要影响失眠大鼠的氨基酸代谢。苯丙氨酸在体内可经苯丙氨酸羟化酶的作用转化为酪氨酸。而酪氨酸是合成多巴胺、去甲肾上腺素等神经递质的前体物质^[27]。这些神经递质在大脑中起到调节情绪、注意力、认知功能等作用, 与学习记忆密切相关^[28]。色氨酸是合成神经递质 5-HT 的前体物质, 5-HT 在调节情绪、睡眠和认知功能中起重要作用, 其代谢异常与认知功能障碍有关^[29]。NO 在神经信号传递中起重要作用, 精氨酸是合成 NO 的前体物质, 精氨酸的代谢会影响 NO 的合成和释放, 从而影响大鼠的学习记忆功能^[30]。脯氨酸在胶原蛋白合成和细胞外基质形成中起重要作用, 这些过程对神经元的结构和功能至关重要^[31]。谷氨酸和天冬氨酸可以通过谷氨酸转氨酶相互转化, 谷氨酸的过度释放是导致神经元损伤的主要机制之一, 这种现象在缺血性脑损伤、癫痫等疾病中较为常见^[32-33]。蛋氨酸合成酶基因敲除小鼠大脑中

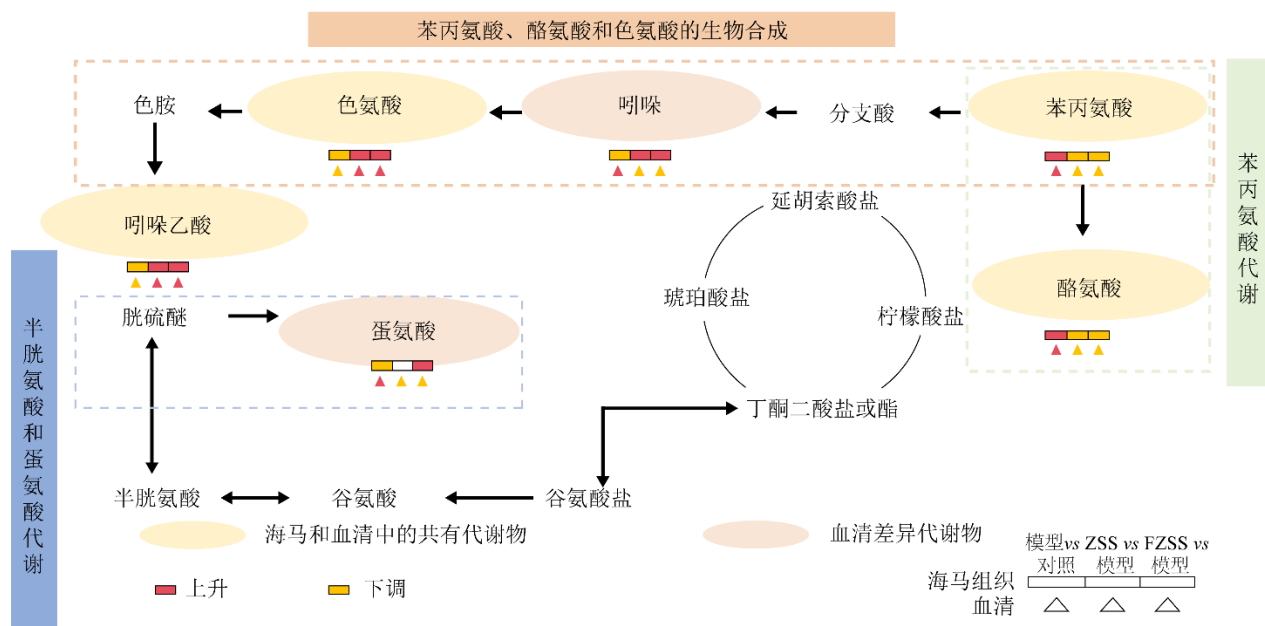


图 20 代谢途径网络图

Fig. 20 Metabolic pathway network diagram

蛋氨酸和 S-腺苷蛋氨酸的含量显著降低,而同型半胱氨酸的含量显著升高。这表明蛋氨酸合成酶的活性受到抑制,导致蛋氨酸循环的紊乱,影响大鼠的学习记忆^[34]。吡啶类化合物通过抗氧化和抗炎机制对认知和学习记忆功能产生积极影响,减少活性氧的释放,增加线粒体活性和细胞活力,降低乳酸脱氢酶的释放。从而改善认知功能^[35]。本研究发现模型组大鼠海马中氨基酸类成分的含量均有显著变化,其中苯丙氨酸、酪氨酸的含量显著上升,色氨酸、精氨酸、脯氨酸、天冬氨酸以及蛋氨酸的含量显著下降;血清中苯丙氨酸、酪氨酸、蛋氨酸、吡啶显著上升,吡啶丙烯酸、色氨酸的含量显著下降。ZSS、FZSS 均有显著回调效果,说明两者均可以通过改善海马和血清中氨基酸类成分的代谢,改善神经可塑性,进而改善大鼠的学习记忆功能。

将海马和血清的代谢通路结果进行联合分析,发现 ZSS、FZSS 在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成通路、苯丙氨酸代谢通路以及半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路中的代谢物具有显著关键回调效果。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成通路,苯丙氨酸代谢通路,半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路中的半胱氨酸和蛋氨酸是体内必需氨基酸,它们在抗氧化、神经递质合成和炎症反应调节中起着重要作用^[36-37]。在本研究中 ZSS 和 FZSS 通过调控上述 3 条代谢通路,能够减轻氧化应激损伤,调节炎症

反应,从而改善学习记忆功能。这些氨基酸不仅是蛋白质的组成部分,还参与神经递质的合成。通过调控这些氨基酸的生物合成通路,ZSS和FZSS能够调节神经递质的水平,发挥改善学习记忆的功能。色氨酸是5-HT合成的前体,5-HT在情绪调节和认知功能中起着重要作用^[38]。酪氨酸是多巴胺和去甲肾上腺素的直接前体,通过酪氨酸羟化酶转化为左旋多巴,进而合成多巴胺。苯丙氨酸则通过苯丙氨酸羟化酶转化为酪氨酸,间接参与多巴胺和去甲肾上腺素的合成^[39]。多巴胺和去甲肾上腺素可通过调节神经元的活动和突触可塑性,共同影响大鼠的学习和记忆能力^[40-41]。本研究代谢组学结果显示,PCPA诱导失眠大鼠的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成途径紊乱。与对照组比较,模型组大鼠血清中苯丙氨酸、酪氨酸的水平显著升高,色氨酸、吲哚的水平显著下降;给药后均能通过苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成途径,调控苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等氨基酸及代谢途径中间产物多巴胺、去甲肾上腺素等神经递质水平改善失眠,进而改善模型动物的学习记忆损伤。

结果表明, 苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸在血清和海马中的变化以及给药组回调趋势是保持一致的, 但是蛋氨酸以及组氨酸在血清以及海马中呈现相反的趋势, 并且 ZSS 组在海马中的蛋氨酸含量并没有显著回调。蛋氨酸作为一种必需氨基酸, 能够通

过血脑屏障进入大脑^[42]。其在海马中的含量上升可能是因为它在脑内参与神经递质合成和抗氧化防御等生理功能。在给药后,蛋氨酸优先被运输到海马等脑组织中,以满足其在神经保护和神经递质合成中的需求,导致血清中蛋氨酸含量相对下降。FZSS 在炮制后使得皂苷类成分等更易被吸收,从而协助蛋氨酸合成,在海马中显示出优于 ZSS 的回调效果。吡啶及其代谢产物可以通过血脑屏障进入大脑,其在脑内参与调节神经递质水平和神经炎症反应,从而在海马中积累^[43]。与此同时,由于其被优先摄取到脑组织中或其在血清中的代谢速率加快导致血清中的含量相对减少。

脂质代谢分析揭示了 ZSS、FZSS 对脂质代谢,特别是甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、肌醇磷脂代谢和花生四烯酸代谢的显著影响。甘油磷脂代谢主要参与细胞膜的形成,在能量储存、膜流动性和通透性的调节以及信号转导中起着关键作用,其代谢紊乱会导致脑部及神经退行性疾病^[44]。磷脂酰胆碱是参与信号传导和免疫调节的重要膜成分^[45]。研究表明,甘油磷脂胆碱通过肯尼迪途径刺激磷脂酰胆碱合成,参与维持细胞膜结构的完整性。甘油磷酸胆碱可刺激磷脂酰胆碱的生物合成并激活突触后胆碱能受体,从而增强中枢神经系统的中枢胆碱能功能^[46]。本研究中,模型组甘油磷酸胆碱水平显著升高,磷脂酰胆碱水平显著下调,给药后均显著回调,说明 ZSS、FZSS 均可以通过调控甘油磷脂代谢调节中枢系统的紊乱改善睡眠,进而改善学习记忆损伤。鞘脂代谢通路是维持脂质稳态的重要代谢通路^[47]。同时也是 FZSS 特有的代谢通路。其通路主要代谢物鞘氨醇是鞘脂代谢的中间产物,而鞘脂参与炎症过程、神经退行性变化,维持鞘脂的代谢平衡对于细胞的生长和发育至关重要^[48-49]。研究表明 AD 患者中与学习记忆有关的 2 个脑区海马 CA1 区和颞回灰质和白质中检测到鞘氨醇表达减少,提示鞘氨醇的水平变化可能与学习记忆损伤有关^[49]。本研究结果显示,模型组大鼠鞘氨醇显著下降,给予 ZSS、FZSS 后显著上升,提示 FZSS 可通过回调鞘氨醇的水平,调控鞘脂代谢,改善学习记忆损伤。模型组大鼠血清中肌醇、花生四烯酸水平显著上升,在 ZSS 组和 FZSS 组中均有下降趋势。其中,花生四烯酸代谢作为 ZSS 中独有的代谢通路,在体内广泛分布并具有重要生物活性的不饱和脂肪酸成分,在神经传递和神经炎症等过程发挥着重要的生物学作用

且对认知有影响。花生四烯酸在脂加氧酶及脱水酶的作用下生成大量白三烯,进而导致神经退行性变、炎症和细胞死亡^[50]。ZSS 可以通过降低花生四烯酸的水平,减少脑区炎症和细胞死亡,发挥改善学习记忆损伤的功能。综上所述,ZSS、FZSS 都可通过调控甘油磷脂代谢、甘油磷脂代谢、鞘脂代谢、肌醇磷脂代谢和花生四烯酸代谢显著回调磷脂类代谢物的水平,从而改善学习记忆损伤。二者独特之处在于 ZSS 单独调控血清中的花生四烯酸代谢;而 FZSS 可单独调控海马组织中的鞘脂代谢。

能量代谢分析中,嘌呤代谢作为维持大脑能量稳态平衡的重要代谢通路。嘌呤能信号的改变会导致神经退行性变和认知缺陷^[51]。腺苷是 ATP 的代谢物,广泛分布于脑内,腺苷能够调控神经递质的释放和突触反应,具有镇静、抗惊厥、抗损伤活性及抗焦虑作用。腺苷受体激活后可抑制神经元兴奋性传导进而发挥促进睡眠的作用^[52]。肌苷是一种内源性嘌呤核苷,由腺苷脱氨酶对腺苷脱氨形成,已被证明具有神经保护、抗炎和抗氧化特性^[53]。次黄嘌呤也是嘌呤通路的中间代谢产物^[54]。本研究中模型组腺苷、肌苷、次黄嘌呤水平显著降低,说明嘌呤代谢紊乱,给予 ZSS、FZSS 后均回调腺苷、次黄嘌呤、肌苷等代谢物的水平,通过调控嘌呤代谢通路改善睡眠作用进而改善学习记忆损伤,且 FZSS 回调的效果显著优于 ZSS。

本研究通过整合海马与血清代谢组学,揭示 ZSS 及 FZSS 改善 PCPA 诱导失眠大鼠学习记忆损伤的作用机制。二者均能显著改善行为学指标,调节神经递质水平,抑制神经炎症,并通过协同调控海马及血清中的氨基酸代谢、脂质代谢和能量代谢发挥功能。研究发现 FZSS 因炮制导致木兰花碱、酸枣仁皂苷 A 等有效成分含量提升,使其在调控鞘脂代谢和改善记忆方面较 ZSS 展现出更强优势。FZSS 特异性调节海马及血清中鞘脂代谢,而 ZSS 则特异性调控血清中花生四烯酸代谢。本研究为临床应用 ZSS 和 FZSS 治疗失眠引起的认知损伤提供了科学依据,下一步将深入解析炮制引发的成分转化规律及其与血脑屏障通透性的关联,并对鞘氨醇、花生四烯酸等核心代谢靶点开展分子机制验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 394
- [2] Ruan W, Liu J L, Zhang S X, *et al.* Sour jujube (*Ziziphus*

- jujuba* var. *spinosa*): A bibliometric review of its bioactive profile, health benefits and trends in food and medicine applications [J]. *Foods*, 2024, 13(5): 636.
- [3] 崔小芳. 酸枣仁总皂苷的肠道菌群体外代谢转化研究 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2020.
- [4] 张琦, 翁家俊, 陈浩, 等. 基于数据挖掘的中成药治疗失眠的用药规律研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(12): 1502-1507.
- [5] 杜晨晖, 崔小芳, 裴香萍, 等. 酸枣仁皂苷类成分及其对神经系统作用研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1258-1268.
- [6] 李泽, 杜鹤, 解玉军, 等. 基于多元统计分析和网络药理学的炒酸枣仁饮片质量标志物预测分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(16): 4811-4824.
- [7] Meerlo P, Mistlberger R E, Jacobs B L, *et al.* New neurons in the adult brain: The role of sleep and consequences of sleep loss [J]. *Sleep Med Rev*, 2009, 13(3): 187-194.
- [8] Abel T, Havekes R, Saletin J M, *et al.* Sleep, plasticity and memory from molecules to whole-brain networks [J]. *Curr Biol*, 2013, 23(17): R774-R788.
- [9] Neylan T C, Mueller S G, Wang Z, *et al.* Insomnia severity is associated with a decreased volume of the CA3/dentate gyrus hippocampal subfield [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 68(5): 494-496.
- [10] Bairy L K, Kumar S. Neurotransmitters and neuromodulators involved in learning and memory [J]. *Int J Basic Clin Pharmacol*, 2019, 8(12): 2777.
- [11] Şahin T D, Karson A, Balci F, *et al.* TNF- α inhibition prevents cognitive decline and maintains hippocampal BDNF levels in the unpredictable chronic mild stress rat model of depression [J]. *Behav Brain Res*, 2015, 292: 233-240.
- [12] Juszczak G, Mikulska J, Kasperek K, *et al.* Chronic stress and oxidative stress as common factors of the pathogenesis of depression and Alzheimer's disease: The role of antioxidants in prevention and treatment [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(9): 1439.
- [13] 程曼, 刘朝琦, 董志萍, 等. 炎症因子在缺血再灌注大鼠海马各亚区表达研究 [J]. *军事医学*, 2017, 41(12): 956-961.
- [14] 刘家峰, 胡金莲, 张颖, 等. 左归丸对慢性睡眠剥夺老年大鼠学习记忆及海马组织炎症因子的影响 [J]. *医学信息*, 2023, 36(6): 73-76.
- [15] 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.
- [16] Chu Y X, Zhang Y J, Liu J X, *et al.* An integrated liver, hippocampus and serum metabolomics based on UPLC-Q-TOF-MS revealed the therapeutical mechanism of *Ziziphi Spinosae Semen* in *p*-chlorophenylalanine-induced insomnia rats [J]. *Biomed Chromatogr*, 2024, 38(3): e5796.
- [17] 栗时颖, 向德标, 曾娅玲, 等. 阿司匹林姜黄素酯对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响 [J]. *中国药师*, 2018, 21(8): 1347-1351.
- [18] Seibenhener M L, Wooten M C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice [J]. *J Vis Exp*, 2015(96): e52434.
- [19] Othman M Z, Hassan Z, Che Has A T. Morris water maze: A versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory [J]. *Exp Anim*, 2022, 71(3): 264-280.
- [20] Martin-Lorenzo M, Zubiri I, Maroto A S, *et al.* KKL1 and ZG16B proteins and arginine-proline metabolism identified as novel targets to monitor atherosclerosis, acute coronary syndrome and recovery [J]. *Metabolomics*, 2015, 11(5): 1056-1067.
- [21] Manchanda S, Singh H, Kaur T, *et al.* Low-grade neuroinflammation due to chronic sleep deprivation results in anxiety and learning and memory impairments [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 449(1/2): 63-72.
- [22] Rancillac A. Serotonin and sleep-promoting neurons [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(48): 78222-78223.
- [23] Bonaventure P, Kelly L, Aluisio L, *et al.* Selective blockade of 5-hydroxytryptamine (5-HT) $_7$ receptors enhances 5-HT transmission, antidepressant-like behavior, and rapid eye movement sleep suppression induced by citalopram in rodents [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 321(2): 690-698.
- [24] Rashmi D, Zanan R, John S, *et al.* γ -aminobutyric acid (GABA): Biosynthesis, role, commercial production, and applications [A] // *Studies in Natural Products Chemistry* [M]. Amsterdam: Elsevier, 2018: 413-452.
- [25] Ackermann S, Rasch B. Differential effects of non-REM and REM sleep on memory consolidation? [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2014, 14(2): 430.
- [26] Harooni H E, Naghdi N, Sepehri H, *et al.* The role of hippocampal nitric oxide (NO) on learning and immediate, short- and long-term memory retrieval in inhibitory avoidance task in male adult rats [J]. *Behav Brain Res*, 2009, 201(1): 166-172.
- [27] 邓媛媛, 王军, 姚佳希, 等. 双酚 S 暴露对小鼠脑-肠-菌轴神经递质代谢稳态的影响 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2020, 40(5): 663-668.
- [28] Xiao F, Du Y, Lv Z Q, *et al.* Effects of essential amino acids on lipid metabolism in mice and humans [J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 57(4): 223-231.

- [29] He W L, Wu G Y. Metabolism of amino acids in the brain and their roles in regulating food intake [A] // *Amino Acids in Nutrition and Health* [M]. Cham: Springer International Publishing, 2020: 167-185.
- [30] Anaeigoudari A, Shafei M N, Soukhtanloo M, *et al.* The effects of *L*-arginine on spatial memory and synaptic plasticity impairments induced by lipopolysaccharide [J]. *Adv Biomed Res*, 2015, 4: 202.
- [31] Patriarca E J, Cermola F, D'Aniello C, *et al.* The multifaceted roles of proline in cell behavior [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 728576.
- [32] Patri M. *Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction* [M]. London: IntechOpen, 2019: 1-11.
- [33] Alzoubi K H, Khabour O F, Al-Azzam S I, *et al.* Metformin eased cognitive impairment induced by chronic *L*-methionine administration: Potential role of oxidative stress [J]. *Curr Neuroparmacol*, 2014, 12(2): 186-192.
- [34] Jadavji N M, Bahous R H, Deng L Y, *et al.* Mouse model for deficiency of methionine synthase reductase exhibits short-term memory impairment and disturbances in brain choline metabolism [J]. *Biochem J*, 2014, 461(2): 205-212.
- [35] Barresi E, Baglini E, Poggetti V, *et al.* Indole-based compounds in the development of anti-neurodegenerative agents [J]. *Molecules*, 2024, 29(9): 2127.
- [36] Usuda K, Kawase T, Shigeno Y, *et al.* Hippocampal metabolism of amino acids by *L*-amino acid oxidase is involved in fear learning and memory [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 11073.
- [37] Tan T H, Li S W, Chang C W, *et al.* Rat hair metabolomics analysis reveals perturbations of unsaturated fatty acid biosynthesis, phenylalanine, and arachidonic acid metabolism pathways are associated with amyloid- β -induced cognitive deficits [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(8): 4373-4395.
- [38] Riedel W J, Klaassen T, Schmitt J A J. Tryptophan, mood, and cognitive function [J]. *Brain Behav Immun*, 2002, 16(5): 581-589.
- [39] Fernstrom J D, Fernstrom M H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain [J]. *J Nutr*, 2007, 137(6 Suppl 1): 1539S-1547S.
- [40] 荣霏, 温晓飒, 马文领. 慢性睡眠剥夺对大鼠学习记忆功能及海马、下丘脑多巴胺含量和 D₁ 受体表达的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(9): 959-964.
- [41] 王君, 魏景宽, 戚仁莉, 等. 去甲肾上腺素通路的研究进展及其在迷走神经电刺激改善难治性癫痫学习记忆中的潜在作用 [J]. 生命科学, 2023, 35(5): 678-688.
- [42] Martínez Y, Li X, Liu G, *et al.* The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(12): 2091-2098.
- [43] Pappolla M A, Perry G, Fang X, *et al.* Indoles as essential mediators in the gut-brain axis. Their role in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 156: 105403.
- [44] Frisardi V, Panza F, Seripa D, *et al.* Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: A complex meshwork in Alzheimer's disease pathology [J]. *Prog Lipid Res*, 2011, 50(4): 313-330.
- [45] Saito R F, Andrade L N S, Bustos S O, *et al.* Phosphatidylcholine-derived lipid mediators: The crosstalk between cancer cells and immune cells [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 768606.
- [46] 张文明, 唐静月, 费倩倩, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive-MS/MS 的酸枣仁总皂苷对失眠大鼠血清代谢物的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(7): 86-92.
- [47] Quinville B M, Deschenes N M, Ryckman A E, *et al.* A comprehensive review: Sphingolipid metabolism and implications of disruption in sphingolipid homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(11): 5793.
- [48] Alaamery M, Albeshar N, Aljawini N, *et al.* Role of sphingolipid metabolism in neurodegeneration [J]. *J Neurochem*, 2021, 158(1): 25-35.
- [49] Zheng X J, Li W, Ren L W, *et al.* The sphingosine kinase-1/sphingosine-1-phosphate axis in cancer: Potential target for anticancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 195: 85-99.
- [50] Wang T Q, Fu X J, Chen Q F, *et al.* Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3683.
- [51] Kundu D, Dubey V K. Purines and pyrimidines: Metabolism, function and potential as therapeutic options in neurodegenerative diseases [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2021, 22(2): 170-189.
- [52] Huang L S, Zhu W W, Li N X, *et al.* Functions and mechanisms of adenosine and its receptors in sleep regulation [J]. *Sleep Med*, 2024, 115: 210-217.
- [53] Jeyaraj F T, Voruganti V S. Multifaceted role of inosine in complex diseases and human health [J]. *Nutr Rev*, 2025, 83(2): e506-e517.
- [54] Furuhashi M. New insights into purine metabolism in metabolic diseases: Role of xanthine oxidoreductase activity [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, 319(5): E827-E834.

[责任编辑 李亚楠]