基于血清代谢组学探讨复方枣仁颗粒改善失眠的机制Δ

王泽琨[1*]，刘沈林[1]，于小聪[1]，李丹婷[1]，张凌峰[2]，赵毅萌[1]，陈　辰[3]，陈亚军[3]，束雅春[1#]（1.南京中医药大学附属医院药学部，南京　210029；2.中国药科大学中药学院，南京　211198；3.南京市妇幼保健院检验科，南京　210001）

中图分类号　R285.5　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）09-1093-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.09.13

摘　要　目的　研究复方枣仁颗粒改善失眠的机制。**方法**　将49只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组1（艾司唑仑片0.5 mg/kg）、阳性对照组2（舒眠胶囊0.6 g/kg）和复方枣仁颗粒低、中、高剂量组（2.5、5、10 g/kg），每组7只。通过慢性不可预见性温和应激刺激联合对氯苯丙氨酸建立小鼠失眠模型，通过小鼠旷场实验、戊巴比妥钠协同催眠实验考察小鼠行为学变化，通过苏木精-伊红染色观察小鼠下丘脑组织病理形态学变化。结合超高效液相色谱-飞行时间质谱技术对小鼠血清进行代谢组学分析及多元统计分析筛选差异代谢物，并基于MetaboAnalyst 5.0数据库进行代谢通路分析。**结果**　与空白组比较，模型组小鼠总行进距离、中央区域进入次数、中央区域移动距离显著减少（$P<0.05$），总静息时间比例显著升高（$P<0.05$），睡眠时长显著缩短（$P<0.05$），下丘脑神经细胞受损且空泡化严重。与模型组比较，复方枣仁颗粒低、中剂量组小鼠总行进距离显著增加（$P<0.05$）、总静息时间比例显著降低（$P<0.05$），复方枣仁颗粒高剂量组小鼠睡眠时长显著延长（$P<0.05$）；各给药组小鼠下丘脑组织神经细胞均不同程度恢复，其中复方枣仁颗粒高剂量组小鼠下丘脑组织细胞与空白组较为接近。通过代谢组学分析共得到18个差异代谢物（如苯基丙氨酸、牛磺酸、正缬氨酸、甲硫氨酸等）及4条重要的氨基酸代谢通路（L-苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成，牛磺酸和次牛磺酸代谢，L-苯丙氨酸代谢，半胱氨酸和甲硫氨酸代谢）。**结论**　复方枣仁颗粒可通过回调苯基丙氨酸、牛磺酸等差异代谢物及调节4种氨基酸代谢通路，使紊乱的体内代谢恢复正常，从而发挥改善失眠的作用。

关键词　复方枣仁颗粒；失眠；血清代谢组学；代谢通路；超高效液相色谱-飞行时间质谱

Investigation on the mechanism of Compound zaoren granules in improving insomnia based on serum metabonomics

WANG Zekun[1], LIU Shenlin[1], YU Xiaocong[1], LI Danting[1], ZHANG Lingfeng[2], ZHAO Yimeng[1], CHEN Chen[3], CHEN Yajun[3], SHU Yachun[1]（1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 3. Dept. of Clinical Laboratory, Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital, Nanjing 210001, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the mechanism of Compound zaoren granule in improving insomnia. **METHODS** Forty-nine mice were divided into blank group, model group, positive control group 1 (Estazolam tablets 0.5 mg/kg), control group 2 (Shumian capsule 0.6 g/kg), Compound zaoren granule low-dose, medium-dose and high-dose groups (2.5, 5, 10 g/kg), with 7 mice in each group. The insomnia model was established by chronic unpredictable mild stress combined with 4-chloro-DL-phenylacetic acid. The behavioral changes of mice were investigated through open field test and pentobarbital sodium synergistic hypnosis experiment, as well as the pathomorphology of mice hypothalamus tissue was observed by HE staining. The metabonomics analysis and multivariate statistical analysis of serum in mice were performed by UHPLC-Q-TOF-MS/MS, and the differential metabolites were screened out; the metabolic pathway analysis was conducted based on MetaboAnalyst 5.0 database. **RESULTS** Compared with blank group, the total travelling distance, the number of entering the central region and the moving distance in the central region of the model group were significantly reduced ($P<0.05$), the proportion of total rest time was significantly increased ($P<0.05$), the sleep duration of mice was significantly shortened ($P<0.05$), and hypothalamic nerve cells damaged and severely vacuolated. Compared with model group, the total travelling distance of Compound zaoren granule low-dose and medium-dose groups were increased significantly and the proportions of total rest time of those groups were decreased significantly ($P<0.05$), and the sleep duration of mice in Compound zaoren granule high-dose group was prolonged significantly ($P<0.05$); the hypothalamic nerve cells of mice in each administration group recovered to varying degrees, and the hypothalamus histiocytes of mice in the Compound zaoren granules high-dose group were closer to those in the blank

Δ**基金项目**　南京市科技计划项目（No.202002054）；江苏省研究生科研与实践创新计划项目（No.SJCX21_0669）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药分析与机制。E-mail：936563925@qq.com

＃**通信作者**　主任中药师，硕士生导师，博士。研究方向：中药炮制及中药产品研发。E-mail：guzheng0512@163.com

group. A total of 18 differential metabolites (such as phenylalanine, taurine, norvaline, methionine) and 4 important amino acid metabolic pathways (L-phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; taurine and hypotaurine metabolism; L-phenylalanine metabolism; cysteine and methionine metabolism) were identified through metabolomics analysis. **CONCLUSIONS** Compound zaoren granules can normalize the disordered metabolism *in vivo* by regulating differential metabolites such as phenylalanine, taurine, and four amino acid metabolic pathways, so as to improve insomnia.

KEYWORDS Compound zaoren granules; insomnia; serum metabonomics; metabolic pathway; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

失眠是常见的睡眠问题之一。2015年全国睡眠指数报告显示，世界上平均失眠率为27%，而中国人的失眠率达31.2%，高于世界平均水平[1]。长期的失眠不但会降低生活质量，还会引起精神及身体上的疾病。近年来，中医药在治疗失眠领域取得了许多新进展，通过辨证论治实现了个体化的治疗。相比化学药治疗，中药治疗失眠毒副作用小、疗效稳定，且不会导致药物依赖，容易被广大患者接受[2]。复方枣仁颗粒（原梦香饮）是江苏省中医院全国名中医刘沈林教授根据其40余年临床经验得到的治疗失眠的经验方，由酸枣仁汤合甘麦大枣汤的主要药味为基础方加减而来，包括酸枣仁、甘草、茯苓、大枣、百合、龙眼肉及淮小麦7味中药组方。复方枣仁颗粒临床用以治疗轻中度失眠疗效确切，但是其代谢途径尚不明确。研究其代谢途径和代谢过程中成分的变化对其合理应用有重要意义。

代谢组学是通过多元统计分析机体代谢物整体变化的一种手段，其不仅可以研究中药复方的药效成分在体内的代谢情况，还有助于揭示药物作用于机体的代谢机制[3]。超高效液相色谱-飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF-MS/MS）技术具有灵敏度高、分辨率高、准确性高、扫面范围广等优点，在鉴定中能够得到化合物的准确分子信息，为中药复方成分及代谢组学检测分析提供了良好的技术手段[4−5]。本研究通过慢性不可预见性温和应激刺激联合对氯苯丙氨酸（4-chloro-DL-phenylacetic acid，PCPA）构建小鼠失眠模型，然后通过小鼠行为学实验、组织病理形态学评价并结合血清代谢组学分析，初步阐释复方枣仁颗粒改善失眠的药效及其可能的作用机制，为该方的进一步应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有ExionLC型UPLC仪和Q-TOF 5600$^+$型高分辨质谱仪（美国AB SCIEX公司）、Heraeus Megafuge 8R型高速冷冻离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司）、CPA225D型电子天平（德国Sartorius公司）、ZH-OFT型小鼠旷场实验箱（安徽正华生物仪器设备有限公司）、SuperMaze动物行为分析系统（上海欣软信息科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

复方枣仁颗粒（批号20200927，规格10 g/袋）由江苏省中医院制备；PCPA（批号C13193186，纯度＞98%）购自上海麦克林生化科技有限公司；舒眠胶囊（批号20210912，规格0.4 g/粒）购自贵州大隆药业有限责任公司；艾司唑仑片（批号20210928，规格1 mg）购自常州四药制药有限公司；甲醇、乙腈为质谱级，甲酸为色谱级，水为屈臣氏蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用的动物为SPF级雄性ICR小鼠，共49只，体质量为18～22 g，由斯贝福（北京）生物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0010。饲养条件为温度（24±2）℃、相对湿度50%～65%，分笼饲养，饲养期间自由摄食、饮水。动物实验经南京中医药大学附属医院伦理委员会批准（批准号为2022DW-25-01）。

2 方法

2.1 复方枣仁颗粒改善失眠的药效学考察

2.1.1 动物分组、造模与给药 将49只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组1（艾司唑仑片0.5 mg/kg，为12倍临床等效剂量）、阳性对照组2（舒眠胶囊0.6 g/kg，为12倍临床等效剂量）和复方枣仁颗粒低、中、高剂量组（2.5、5、10 g/kg，分别为3、6、12倍临床等效剂量），每组7只。除空白组外，其余各组小鼠通过慢性不可预见性温和应激刺激联合PCPA建立小鼠失眠模型：每日随机接受不同的刺激方式，包括强迫游泳、湿笼、禁食、禁水、重复光照刺激、昼夜颠倒，连续2 d内不使用同一种刺激方式，持续7 d；第8天开始，每天腹腔注射PCPA 400 mg/kg，连续3 d。小鼠昼夜节律消失、易怒、毛发粗糙表明造模成功[6]。空白组小鼠不接受刺激，但在第8天开始连续3 d腹腔注射等体积生理盐水。第11天开始各给药组小鼠灌胃相应药物，空白组、模型组小鼠灌胃等体积水；每日1次，连续7 d。

2.1.2 旷场实验 各组小鼠在末次给药的前2 d进行旷场实验。在旷场实验当天给药1 h后，使用摄像机记录各小鼠在箱内的运动情况，记录时长5 min。之后使用SuperMaze动物行为分析系统对各组小鼠的行动轨迹进行分析（将每个旷场区域划分为等分的九宫格，且规定中间一格作为中央区域），记录总行进距离、总静息时间比例、中央区域进入次数、中央区域移动距离。

2.1.3 戊巴比妥钠协同催眠实验 各组小鼠末次给药的前1 d进行戊巴比妥钠协同催眠实验。在当天给药1 h后，各组小鼠腹腔注射戊巴比妥钠（50 mg/kg）进行催眠（剂量根据预实验结果设置）。以小鼠翻正反射消失1 min为开始睡眠时间，以30 s内小鼠翻正反射出现3次

为觉醒[7]。记录睡眠潜伏期和睡眠时长，其中腹腔注射结束至翻正反射消失时间为睡眠潜伏期（s），翻正反射消失至恢复时间为睡眠时长（min）。

2.1.4　小鼠生物样本收集、处理及下丘脑病理形态学观察　末次给药的前1 d，各组小鼠禁食不禁水。末次给药结束后，各组小鼠腹腔注射戊巴比妥钠（60 mg/kg）麻醉，眼球取血，室温静置1 h，然后在4 ℃下以3 500 r/min离心15 min，收集血清，置于－80 ℃冰箱中冻存。于冰上快速分离小鼠大脑及下丘脑组织，经4%多聚甲醛固定、包埋、切片（4 μm）、苏木精-伊红（HE）染色后，在光学显微镜下观察小鼠下丘脑病理损伤并采集图像。

2.2　复方枣仁颗粒的血清代谢组学研究

2.2.1　血清样本处理　取冻存的血清200 μL，加入预冷的乙腈600 μL，涡旋1 min后在4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液，氮吹至干。加入100 μL乙腈复溶，涡旋1 min后继续在4 ℃下以12 000 r/min离心15 min，取上清液进行分析。从每份上清液样品中各取20 μL，混合后作为质量控制（quality control，QC）样本，用以评估分析过程的稳定性和重现性。

2.2.2　色谱与质谱条件　色谱条件：采用ACQUITY UPLC® HSS T3色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），以0.05%甲酸水（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～1 min，2%B；1～3 min，2%B→50%B；3～14 min，50%B→60%B；14～18 min，60%B→90%B；18～19 min，90%B→100%B；19～20 min，100%B→2%B；20～22 min，2%B）；柱温为40 ℃；流速为0.3 mL/min；进样体积为2 μL。

质谱条件：采用电喷雾离子源（ESI），在正、负离子模式下进行检测；离子化温度为550.0 ℃；雾化气压力为55 psi；辅助加热气压力为55 psi；气帘气压力为30 psi；一级质谱采集范围为质荷比（*m/z*）50～1 500；去簇电压为60 V/－60 V；碰撞能量为45 eV/－45 eV。采用信息依赖性扫描模式采集二级质谱，采集范围为*m/z* 50～1 500；去簇电压为60 V；碰撞能量为45 eV。采用美国AB SCIEX公司的调谐液传递系统对化合物的相对分子量准确度进行自动校准。

2.2.3　数据处理与分析　将采集所得的代谢组学质谱原始数据通过Analysis Base File Converter软件转化为abf格式的文件，然后通过MS-DAIL 3.9软件及SEERF平台（https://slfan2013.github.io/SERRF-online/）进行色谱峰对齐及归一化预处理；再将数据导入SIMCA-P 14.1软件进行主成分分析（principal component analysis，PCA）及正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA），根据变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）＞1且P＜0.05筛选差异代谢物[8]。然后结合人类代谢组数据库（HMDB，https://hmdb.ca），最终确证潜在的生物标志物。将已鉴定的内源性差异代谢物利用MetaboAnalyst 5.0数据库，以impact＞0.1作为筛选条件进行相关代谢通路分析。

2.3　统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析，实验结果以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验，检验水准α＝0.05。

3　结果

3.1　复方枣仁颗粒改善失眠的药效学研究结果

3.1.1　小鼠旷场实验结果　与空白组比较，模型组小鼠总行进距离、中央区域进入次数、中央区域移动距离显著减少（P＜0.05），总静息时间比例显著升高（P＜0.05）。与模型组比较，复方枣仁颗粒低、中剂量组小鼠总行进距离显著增加（P＜0.05），阳性对照组1和复方枣仁颗粒低、中剂量组小鼠总静息时间比例显著降低（P＜0.05）。结果见表1。

表1　各组小鼠的旷场实验测试结果（$\bar{x}\pm s$，n＝7）

组别	总行进距离/mm	总静息时间比例/%	中央区域进入次数/次	中央区域移动距离/mm
空白组	28 387.28±3 687.27	22.41±7.03	6.00±2.24	1 202.56±390.31
模型组	14 747.87±4 629.34[a]	44.26±9.94[a]	2.71±1.38[a]	523.87±321.26[a]
阳性对照组1	20 900.59±10 856.35	29.04±14.68[b]	4.86±5.87	851.71±994.32
阳性对照组2	18 596.95±8 945.55	40.05±14.11	2.29±3.20	428.63±572.59
复方枣仁颗粒低剂量组	24 352.29±6 537.79[b]	27.31±11.32[b]	4.86±3.29	856.07±646.63
复方枣仁颗粒中剂量组	21 955.75±5 482.74[b]	32.19±6.77[b]	4.57±3.36	882.15±804.89
复方枣仁颗粒高剂量组	19 715.83±5 370.75	35.03±10.14	2.71±1.80	679.04±534.54

a：与空白组比较，P＜0.05；b：与模型组比较，P＜0.05

3.1.2　小鼠戊巴比妥钠协同催眠实验结果　与空白组比较，模型组小鼠的睡眠潜伏期有所延长，但差异无统计学意义（P＞0.05）；睡眠时长显著缩短（P＜0.05）。与模型组比较，各给药组小鼠的睡眠潜伏期均不同程度缩短，但差异无统计学意义（P＞0.05）；阳性对照组1、2和复方枣仁颗粒高剂量组小鼠睡眠时长显著延长（P＜0.05）。结果见表2。

表2　各组小鼠的戊巴比妥钠协同催眠实验结果（$\bar{x}\pm s$，n＝7）

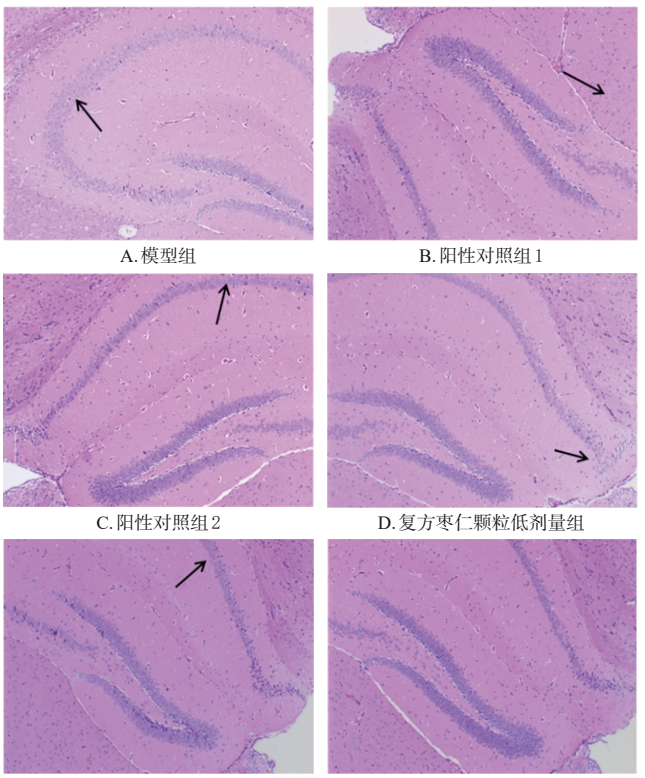
组别	睡眠潜伏期/s	睡眠时长/min
空白组	205.57±23.56	98.57±11.79
模型组	219.29±25.34	67.86±19.13[a]
阳性对照组1	193.57±21.12	167.00±48.93[b]
阳性对照组2	193.00±31.46	143.71±43.48[b]
复方枣仁颗粒低剂量组	198.57±15.73	94.57±34.33
复方枣仁颗粒中剂量组	188.29±45.39	99.14±38.34
复方枣仁颗粒高剂量组	201.57±10.42	121.29±26.98[b]

a：与空白组比较，P＜0.05；b：与模型组比较，P＜0.05

3.1.3　小鼠下丘脑病理形态学观察结果　与空白组比较，模型组小鼠下丘脑神经细胞受损且空泡化严重，表明模型组小鼠下丘脑组织出现损伤。与模型组比较，各给药组小鼠下丘脑组织神经细胞均不同程度恢复，其中阳性对照组2和复方枣仁颗粒高剂量组小鼠下丘脑组织细胞与空白组较为接近。结果见图1。

3.2　复方枣仁颗粒的血清代谢组学研究结果

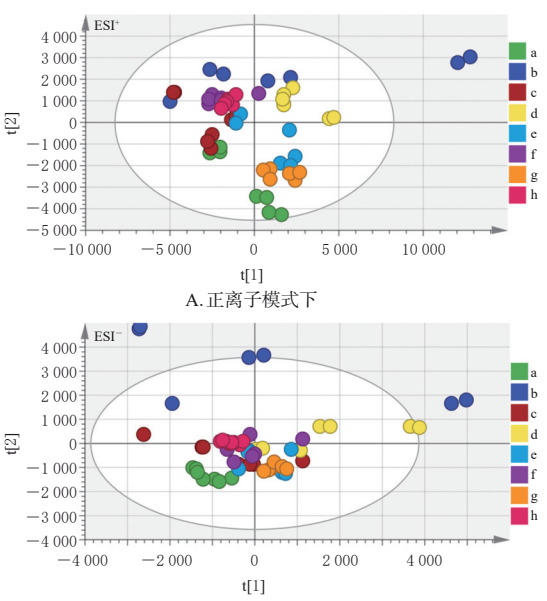
3.2.1　PCA结果　PCA结果表明，QC样本在正、负离子模式下均聚集良好，表明该检测方法具有良好的稳定性



注：箭头所指为病变部位；空白组略

图 1　各组小鼠下丘脑组织病理形态学观察显微图（HE 染色，×100）

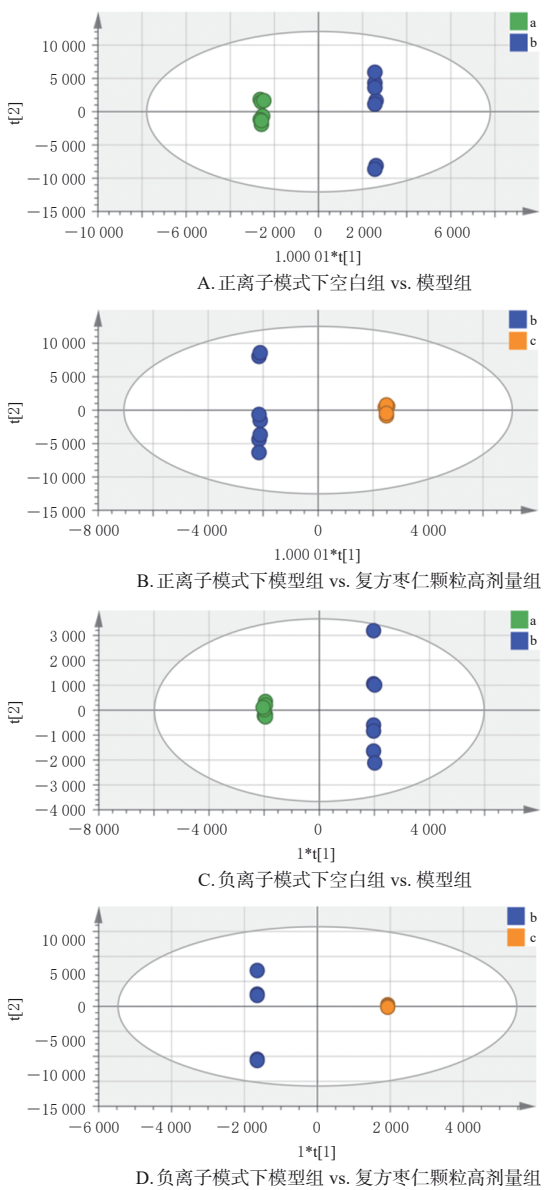
与重复性，检测系统可靠。空白组、模型组及各给药组小鼠的 PCA 散点均能分开，且给药组小鼠的 PCA 散点处于空白组与模型组 PCA 散点之间，表明经过治疗后失眠小鼠的代谢由紊乱趋于正常。结果见图 2。



a：空白组；b：模型组；c：阳性对照组 1；d：阳性对照组 2；e：复方枣仁颗粒低剂量组；f：复方枣仁颗粒中剂量组；g：复方枣仁颗粒高剂量组；h：QC 样本

图 2　不同离子模式下各组样本的 PCA 图

3.2.2　潜在生物标志物的筛选及代谢通路分析　由“3.1”项下结果可知，复方枣仁颗粒高剂量组的药效作用较低、中剂量组更为明显，因此选取空白组、模型组及复方枣仁颗粒高剂量组来进行差异代谢物的筛选。OPLS-DA 结果如图 3 所示，负离子模式下空白组和模型组的 R^2X（表示所建模型对 X 矩阵的解释率）、R^2Y（表示所建模型对 Y 矩阵的解释率）及 Q^2（表示模型的预测能力）分别为 0.970、1、0.985，模型组和复方枣仁颗粒高剂量组的 R^2X、R^2Y、Q^2 分别为 0.948、1、0.989；正离子模式下空白组和模型组的 R^2X、R^2Y、Q^2 分别为 0.890、1、0.935，模型组和复方枣仁颗粒高剂量组的 R^2X、R^2Y、Q^2 分别为 0.879、1、0.950。随机置换测试 200 次结果显示，左边的 R^2、Q^2 点低于右边的 R^2、Q^2 点，Q^2 点的回归线与纵轴相交于原点以下，表明未产生过拟合，模型可靠[8]。采用“2.2.3”项下数据处理方式，共鉴定出 18 个差异代谢物，其中正离子模式下 8 个，负离子模式下 10 个，结果见表 3。



a：空白组；b：模型组；c：复方枣仁颗粒高剂量组

图 3　不同离子模式下各组 OPLS-DA 图

表3　血清内源性差异代谢物鉴定结果

编号	代谢物(英文名)	HMDB ID	分子式	加和离子	相对分子量(*m/z*)	保留时间/min	碎片信息(*m/z*)	模型组 vs. 空白组	复方枣仁颗粒高剂量组 vs. 模型组
1	正缬氨酸(norvaline)	HMDB13716	$C_5H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	118.064 2	0.982	–	↑	↑
2	L-高丝氨酸(L-homoserine)	HMDB00719	$C_4H_9NO_3$	$[M+H]^+$	121.070 0	4.671	77.039 7、60.852 8、59.894 9	↑	↓
3	3-甲基组胺(3-methylhistamine)	HMDB01861	$C_6H_{11}N_3$	$[M+NH_4]^+$	126.103 0	0.773	109.077 0、101.145 6、93.042 6、80.047 0、65.038 5、53.000 7	↑	↓
4	硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate)	HMDB00682	$C_8H_7NO_4S$	$[M-H]^-$	212.004 6	1.320	146.024 1、139.121 0、104.052 1、102.031 7、65.038 8、63.958 0、61.992 7、53.036 9	↑	↓
5	甲硫氨酸(methionine)	HMDB00696	$C_5H_{11}NO_2S$	$[M+H]^+$	150.057 8	7.070	150.075 4、133.032 4、128.983 9、119.036 0、109.054 3、102.055 7、92.023 5、82.038 3、70.994 7、53.041 4	↑	↓
6	苯基丙氨酸(phenylalanine)	HMDB00159	$C_9H_{11}NO_2$	$[M-H]^-$	164.072 4	3.265	150.789 4、147.046 1、119.053 8、101.046 6、91.056 8、77.041 3、72.005 7	↑	↓
7	苯乙酰甘氨酸(phenylacetylglycine)	HMDB00821	$C_{10}H_{11}NO_3$	$[M+H]^+$	194.081 3	2.791	146.059 8、120.080 6、90.774 3、76.032 6、61.005 8、51.022 2	↑	↓
8	吲哚乳酸(indolelactic acid)	HMDB00671	$C_{11}H_{11}NO_3$	$[M-H]^-$	204.065 7	2.154	186.051 0、158.060 8、140.049 7、130.066 5、128.049 5、114.093 9、72.991 1	↓	↑
9	*N*-乙酰-L-苯丙氨酸(*N*-acetyl-L-phenylalanine)	HMDB00512	$C_{11}H_{13}NO_3$	$[M+H]^+$	208.097 0	3.979	193.165 7、170.094 5、162.094 6、149.057 3、137.113 9、131.047 5、117.056 3、102.043 0、90.038 2、83.420 8、77.037 3、73.029 5、65.038 3、50.014 7	↑	↓
10	硫唑嘌呤(azathioprine)	HMDB15128	$C_9H_7N_7O_2S$	$[M+H]^+$	278.045 5	10.727	–	↑	↓
11	苯氨酮(phenazone)	HMDB15503	$C_{11}H_{12}N_2O$	$[M+H]^+$	189.102 2	4.712	167.472 8、142.062 2、122.057 8、114.700 0、103.054 7、89.041 1、89.034 4、77.040 7、63.026 6、53.039 3	↑	↓
12	3-羟基戊酸(3-hydroxyvaleric acid)	HMDB00531	$C_5H_{10}O_3$	$[M-H]^-$	117.056 0	1.897	71.049 9	↑	↓
13	牛磺酸(taurine)	HMDB00251	$C_2H_7NO_3S$	$[M-H]^-$	124.007 5	7.341	124.005 6、79.956 3	↑	↓
14	L-苯丙氨酸(L-phenylalanine)	HMDB00159	$C_9H_{11}NO_2$	$[M-H]^-$	164.071 7	1.398	147.046 1、119.053 8、101.046 6、91.056 8、77.041 3、72.005 7	↑	↓
15	3-苯基乳酸(3-phenyllactic acid)	HMDB00779	$C_9H_{10}O_3$	$[M-H]^-$	165.055 5	1.941	147.045 1、117.033 3、101.040 1、96.958 6、91.056 1、77.036 9、72.993 3、65.043 6	↑	↓
16	D-(-)-3-磷酸甘油酸[D-(-)-3-phosphoglyceric acid]	HMDB00807	$C_3H_7O_7P$	$[M-C_6H_{10}O_4-H]^-$	184.984 6	13.084	–	↑	↑
17	*N*-乙酰胞壁酸酯(*N*-acetylmuramate)	HMDB60493	$C_{11}H_{19}NO_8$	$[M-H]^-$	292.004 4	3.692	211.990 8、184.020 6、152.005 7、148.037 3、219.281 0、132.046 1、124.006 4、106.980 2、105.034 3、79.956 9、64.979 1	↑	↓
18	12-HEPE	HMDB10202	$C_{20}H_{30}O_3$	$[M-H]^-$	317.212 2	12.114	299.214 3、255.214 1、219.847 6、208.115 5、203.830 7、179.106 9、135.116 1、69.033 9、59.010 9	↑	↓

↑：上升；↓：下降；–：无信息

由表3可知，失眠小鼠血清中正缬氨酸等17个差异代谢物的含量显著上调，吲哚乳酸的含量显著下调；经过复方枣仁颗粒干预后，失眠小鼠血清中L-高丝氨酸、吲哚乳酸等16个差异代谢物含量显著回调。

将这18个差异代谢物输入MetaboAnalyst 5.0数据库进行代谢通路分析，以impact＞0.1作为筛选条件，共得到4条重要通路，分别为L-苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成，牛磺酸和次牛磺酸代谢，L-苯丙氨酸代谢，半胱氨酸和甲硫氨酸代谢。结果见图4。

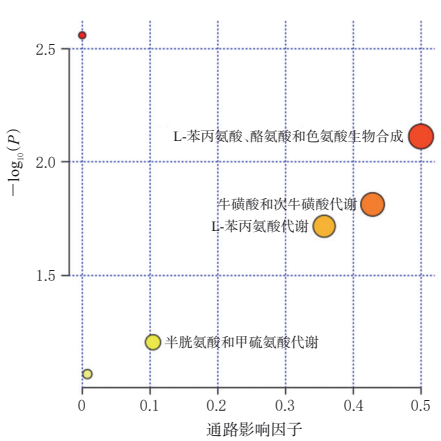


图4　代谢通路富集分析结果

4　讨论

发生失眠的影响因素较多，故对于失眠的治疗方法也各有不同。艾司唑仑片作为苯二氮䓬类临床常用化学药物，治疗失眠的效果良好[9]。而舒眠胶囊同样是临床常用的治疗失眠的中成药之一[10]。本研究通过建立失眠小鼠模型，选用2种不同类型的阳性对照药物作为对照，可更加全面地评估受试药物复方枣仁颗粒改善失眠的药效作用。

本研究在小鼠旷场实验中发现，模型组小鼠总行进距离、中央区域进入次数、中央区域移动距离均显著减少，总静息时间比例显著升高，表明造模后失眠小鼠呈现兴趣缺乏、探索欲望降低等抑郁样特征。这说明长期失眠会使抑郁发生的可能性增大，失眠会进一步诱发抑郁症出现。经复方枣仁颗粒治疗后，可不同程度地改善模型小鼠的上述症状。但在行为学实验中，复方枣仁颗粒高剂量组小鼠较模型组小鼠的行为学特征无显著变化，表明其为非线性量-效关系。笔者推测这是由于中药成分复杂，产生了拮抗作用，或是由于助眠效果起效导致小鼠探索欲望降低，具体原因有待进一步验证。而戊巴比妥钠协同催眠实验则证明，经复方枣仁颗粒给药后确实可以延长失眠模型小鼠的睡眠时长。且小鼠下

丘脑组织HE染色结果显示，失眠小鼠下丘脑组织细胞有损伤，而阳性对照组2及复方枣仁颗粒高剂量组小鼠细胞形态接近空白组，表明失眠小鼠经舒眠胶囊和高剂量复方枣仁颗粒治疗后可以一定程度上恢复小鼠下丘脑组织细胞形态。以上结果证明，复方枣仁颗粒确实可以改善失眠小鼠症状，延长失眠小鼠的睡眠时长。

在小鼠血清代谢组学研究中共筛选出18个差异代谢物，包括正缬氨酸、L-高丝氨酸、3-甲基组胺等。这些差异代谢物中有17个差异代谢物含量显著上调，1个差异代谢物含量下调；而经复方枣仁颗粒治疗后，可显著回调其异常变化。MetaboAnalyst 5.0数据库分析得到的4条重要通路中，L-苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成途径是本研究中最为主要的一条代谢途径。L-苯丙氨酸是人体的必需氨基酸，属于芳香族氨基酸，可以通过体内代谢在苯丙氨酸羟化酶催化下生成酪氨酸，再由酪氨酸羟化酶转化为二羟基苯丙氨酸，进一步生成去甲肾上腺素、多巴胺等兴奋性神经递质，这些神经递质均与失眠有关[11-12]。L-苯丙氨酸在缺乏苯丙氨酸羟化酶时可转化为苯丙酮酸，进而通过分枝酸变位酶、邻氨基苯甲酸合酶生成色氨酸，色氨酸再在色氨酸羟化酶及五羟色氨酸脱羧酶作用下生成5-羟色胺[13]。这2种氨基酸共同参与睡眠调节，同时也是导致失眠、抑郁的重要诱因[14-15]。牛磺酸作为γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）受体激动剂，通过激活GABA受体从而产生睡眠调节作用[16]。有研究显示，睡眠剥夺会导致大脑皮质牛磺酸水平升高[17]，本研究代谢组学结果同样显示模型组小鼠牛磺酸水平升高，而经复方枣仁颗粒治疗后又降低。半胱氨酸和甲硫氨酸代谢过程中会产生一种重要中间产物——同型半胱氨酸，这是一种含硫氨基酸，可以在甲硫氨酸合成酶的作用下合成甲硫氨酸。研究表明，同型半胱氨酸水平上升会大幅增加脑血管疾病及神经系统疾病的发病风险[18]。

综上所述，本研究运用代谢组学技术确定了复方枣仁颗粒可通过回调苯基丙氨酸、牛磺酸、甲硫氨酸等差异代谢物及调节4种氨基酸代谢通路，使紊乱的体内代谢恢复正常，从而发挥改善失眠的作用。后期本研究团队将在此基础上通过神经递质含量及体内外实验，从蛋白、细胞等分子水平进一步探讨复方枣仁颗粒改善轻中度失眠的作用机制。

参考文献

[1] 王娴，刘爱华. 迷走神经刺激调节睡眠的机制研究进展[J]. 中风与神经疾病杂志，2015，32(12)：1140-1141.

[2] 张兰杰，李晓川，胡娅婷，等. 中医治疗原发性失眠的研究进展[J]. 长春中医药大学学报，2019，35(4)：802-804.

[3] 王杰，隗鑫，陈威，等. 代谢组学技术在中药复方配伍规律研究中的应用[J]. 中草药，2022，53(5)：1528-1539.

[4] 张宁，高霞，周宇，等. UPLC-Q-TOF-MS/MS快速分析杏贝止咳颗粒化学成分[J]. 中国中药杂志，2018，43(22)：4439-4449.

[5] 吴信华，李长印，曹园，等. 基于LC/Q-TOF-MS整合网络药理学探讨潜阳育阴颗粒防治高血压肾损害的药效物质基础与作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(2)：116-129.

[6] 夏天吉，闫明珠，王智，等. 大小鼠失眠模型和评价方法研究进展[J]. 中国实验动物学报，2022，30(3)：428-435.

[7] 王婷婷，郝蕾，王芮，等. 酸枣仁-延胡索配伍对肝郁型失眠小鼠的作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理，2021，32(5)：619-626.

[8] 刘佳星，李佳涵，杜晨晖，等. 经典名方酸枣仁汤对PCPA致失眠大鼠的血清代谢组学研究[J]. 中国中药杂志，2022，47(6)：1632-1641.

[9] 赵成洁. 艾司唑仑的药理和临床应用[J]. 中国当代医药，2012，19(7)：66，68.

[10] 夏路风，李六水，张琪，等. 舒眠胶囊与艾司唑仑治疗失眠症的临床疗效比较[J]. 安徽医药，2015，19(2)：367-371.

[11] TRUSHINA E，DUTTA T，PERSSON X M，et al. Identification of altered metabolic pathways in plasma and CSF in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using metabolomics[J]. PLoS One，2013，8(5)：e63644.

[12] 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.

[13] 李怿霞，徐建，李欧，等. 睡眠-觉醒机制的相关因素及中药对其调节的研究进展[J]. 上海中医药杂志，2019，53(12)：89-92.

[14] ENNIS M A，RASMUSSEN B F，LIM K，et al. Dietary phenylalanine requirements during early and late gestation in healthy pregnant women[J]. Am J Clin Nutr，2020，111(2)：351-359.

[15] YOUNGBLOOD B D，SMAGIN G N，ELKINS P D，et al. The effects of paradoxical sleep deprivation and valine on spatial learning and brain 5-HT metabolism[J]. Physiol Behav，1999，67(5)：643-649.

[16] STAHL B A，PECO E，DAVLA S，et al. The taurine transporter eaat2 functions in ensheathing glia to modulate sleep and metabolic rate[J]. Curr Biol，2018，28(22)：3700-3708.e4.

[17] 涂星，郜红利，卢映，等. 荧光高效液相色谱法测定三种失眠模型大鼠脑组织氨基酸类神经递质的含量[J]. 中国实验动物学报，2013，21(5)：74-77.

[18] MUNTJEWERFF J W，KAHN R S，BLOM H J，et al. Homocysteine，methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia：a meta-analysis[J]. Mol Psychiatry，2006，11(2)：143-149.

（收稿日期：2023-02-22　修回日期：2023-04-05）

（编辑：林　静）