基于代谢组学研究蒙药苏格木勒-4对失眠大鼠的改善作用机制Δ

李艳佳[1*]，杨　蕊[2]，王　昇[3]，孙利东[4]，白东浩[4]，靳尚武[3#]（1.内蒙古医科大学公共卫生学院，呼和浩特　010020；2.呼和浩特市疾病预防控制中心质控科，呼和浩特　010010；3.鄂尔多斯市疾病预防控制中心，内蒙古 鄂尔多斯　017010；4.鄂尔多斯市第四人民医院，内蒙古 鄂尔多斯　017008）

中图分类号　R285；R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）01-0038-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.01.07

摘　要　目的　研究蒙药苏格木勒-4对失眠大鼠的代谢影响，初步探讨其改善失眠的可能机制。**方法**　采用夹尾刺激和腹腔注射对氯苯丙氨酸溶液复合造模法建立慢性应激失眠大鼠模型。将24只雄性大鼠随机分为正常组、模型组、地西泮组（阳性对照，0.92 mg/kg）和苏格木勒-4组（5.2 g/kg），每组6只。从夹尾刺激第7天开始，苏格木勒-4组、地西泮组大鼠开始灌胃给药，正常组、模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水，每天灌胃1次，连续14 d。利用水迷宫实验测试大鼠的学习和记忆能力，利用无创睡眠活动监测系统对大鼠24 h睡眠时间进行监测。采用超高效液相色谱串联质谱技术对大鼠血清和海马组织进行代谢组学研究。使用多元统计分析方法对各组大鼠血清和海马组织中差异代谢物进行分析，筛选各组间的差异代谢物以及代谢通路。**结果**　与正常组比较，模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数显著减少、平均24 h睡眠时间百分比显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，地西泮组和苏格木勒-4组大鼠上述指标水平均显著改善（$P<0.05$）。代谢组学研究发现，大鼠血清和海马组织中共鉴定出5-羟基吲哚乙酸、犬尿氨酸、犬尿喹啉酸、5-羟色胺、硫酸苯酚、1-羧基乙基酪氨酸、3-（4-羟基苯基）乳酸、*N*-乙酰基酪氨酸、酪氨酸共9个差异代谢物，主要涉及色氨酸和酪氨酸2条代谢通路。**结论**　苏格木勒-4可以改善失眠大鼠睡眠时间和行为学表现，其机制可能与调节色氨酸、酪氨酸等氨基酸代谢途径有关。

关键词　蒙药；苏格木勒-4；失眠；代谢组学；氨基酸代谢

Metabolomics-based study on the improvement mechanism of the Mongolian drug Sugemule-4 on insomnia rats

LI Yanjia[1], YANG Rui[2], WANG Sheng[3], SUN Lidong[4], BAI Donghao[4], JIN Shangwu[3]（1. School of Public Health, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010020, China; 2. Hohhot Center for Disease Control and Prevention, Hohhot 010010, China; 3. Ordos Center for Disease Control and Prevention, Inner Mongolia Ordos 017010, China; 4. The Fourth People's Hospital of Ordos, Inner Mongolia Ordos 017008, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of the Mongolian medicine Sugemule-4 on the metabolism of insomnia rats, and to preliminarily explore its possible mechanisms for improving insomnia. **METHODS** The rat model of chronic stress insomnia was established by tail clipping stimulation and intraperitoneal injection of p-chlorophenyl alanine solution. Twenty-four male rats were randomly divided into the normal group, model group, diazepam group (positive control, 0.92 mg/kg), and Sugemule-4 group (5.2 g/kg), with 6 rats in each group. Since the 7th day of tail clipping stimulation, the Sugemule-4 group and diazepam group began to be intragastrically administered with relevant medicine; the normal group and model group were intragastrically administered with an equal volume of distilled water, once a day, for 14 consecutive days. The learning and memory abilities of rats were tested using a water maze experiment, and the non-invasive sleep activity monitoring system was used to monitor the 24-hour sleep time of rats. A metabolomics study was conducted on rat serum and hippocampal tissue by using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The multivariate statistical analysis method was adopted to analyze the differential metabolites in serum and hippocampal tissue of rats, and screen for differential metabolites and metabolic pathways among those groups. **RESULTS** Compared with the normal group, the escape latency of rats in the model group was significantly increased, the times of crossing platforms were significantly reduced, and the percentage of average 24-hour sleep time was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the model group, the levels of the above indicators were significantly reversed in the diazepam group and Sugemule-4 group ($P<0.05$). Metabolomics studies found that a total of 9 differential metabolites were identified in rat serum and hippocampal tissue, including 5-hydroxyindoleacetic acid, canine urate, canine urinary quinolinic acid, 5-hydroxytryptamine, phenol sulfate, 1-carboxyethyltyrosine, 3-(4-hydroxyphenyl) lactate, *N*-acetyl tyrosine, tyrosine and phenol sulfate, mainly involving 2 metabolic pathways of tryptophan and tyrosine. **CONCLUSIONS** Sugemule-4 can improve the sleep time and behavioral performance of insomnia rats, and its mechanism

Δ**基金项目** 内蒙古自治区科技计划项目（No.2019GG120）

＊**第一作者** 医师，硕士。研究方向：药效物质基础。E-mail：15771377839@163.com

＃**通信作者** 主任技师，硕士生导师，博士。研究方向：药物药性理论及药效物质基础。E-mail：swjsw1981@163.com

may be associated with affecting amino acid metabolic pathways such as tryptophan and tyrosine.
KEYWORDS Mongolian medicine; Sugemule-4; insomnia; metabolomics; amino acid metabolism

失眠是指睡眠的发生和维持发生了障碍，是一种主观体验，即睡眠的质量或时间不能满足正常需要[1]。在普通人群中，失眠的患病率约为10%～15%[2]。目前国内外治疗失眠的常用药物有苯二氮䓬类药物和非苯二氮䓬类药物，但大多具有耐受性、成瘾性、戒断症状等不良反应[3]。与化学药相比，中药与民族药治疗失眠的依赖性小、副作用少、疗效满意，故而成为临床治疗失眠的重要替代疗法[4]。

苏格木勒-3是蒙医传统方，出自蒙医经典著作《四部医典》。本研究中的苏格木勒-4是在苏格木勒-3基础上的改良方，即在原方——白豆蔻15 g、白芨胜10 g、茸菱5 g的基础上，添加了15 g炒酸枣仁。方中白豆蔻味苦、辛，性温，酸枣仁味甘、性平，为镇赫依（指一类以疲惫、失眠、精神紊乱等为主要症状的临床证候）主药；白芨胜味甘，性平，为镇赫依辅助药；加配调理体素药茸菱，四药相互协调，在临床中具有较好的治疗失眠的效果[5]。本课题组前期通过动物实验证实了苏格木勒-4具有镇静催眠作用，并验证了其对失眠相关神经递质的影响，即升高失眠小鼠大脑中5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）、γ-氨基丁酸（γ-aminobutyric acid，GABA）的含量，降低多巴胺（dopamine，DA）的含量，证实了其具有改善失眠的作用[6]。

代谢组学方法把机体作为一个完整的系统来研究，与蒙药侧重整体性和多靶点的机制相似。采用代谢组学方法能够快速、有效地分析多条代谢通路，从而为蒙药药用机制研究提供科学的数据支撑[7]。为了进一步明确苏格木勒-4的抗失眠药效及作用机制，本研究采用夹尾刺激和腹腔注射对氯苯丙氨酸（parachlorophenylalanine，PCPA）溶液复合造模法构建慢性应激失眠大鼠模型[8]，并根据睡眠监测数据、行为学指标对药物改善失眠的作用进行评价。此外，本研究利用超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）技术对大鼠血清和海马进行代谢组学研究，并利用多元统计分析方法对差异代谢物进行通路分析，以初步揭示苏格木勒-4的抗失眠作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器与设备

本研究所用的主要仪器与设备有：Comm 8型无创睡眠活动监测系统（美国Signal Solutions公司）、WMT-100S型Morris水迷宫分析系统（成都泰盟软件有限公司）、ACQUITY 2D UPLC型UPLC-MS仪（美国Waters公司）、Q Exactive型高分辨MS仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

1.2 主要药品与试剂

白豆蔻（批号19101302）、白芨胜（批号18080302）、茸菱（批号20101202）药材均购自内蒙古衍嘉医药有限公司，炒酸枣仁（批号20190301）饮片购自安国宏仁药业有限公司，上述药材均由鄂尔多斯市第四人民医院蒙医查干夫教授鉴定为真品；地西泮片（批号20200817，规格2.5 mg/片）购自山东信谊制药有限公司；PCPA（批号SHBL0057）购自美国Sigma公司；碳酸盐缓冲液（批号0713A21）购自安徽雷根生物技术有限公司；2%聚山梨酯80（批号EZ7890D114）购自上海赛格生物科技有限公司；实验用水为自制蒸馏水。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级健康成年雄性SD大鼠，共24只，体重（200±20）g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2019-0010。动物饲养室温度为（25±3）℃，相对湿度为45%左右，自然昼夜节律光照。饲养期间大鼠自由进食、进水。内蒙古医科大学动物实验伦理委员会审议并通过了本实验，伦理批准号为YKD202202103。

2 方法

2.1 药物制备

苏格木勒-4由白豆蔻15 g、白芨胜10 g、茸菱5 g、炒酸枣仁15 g组成。称取以上4味饮片（共20副），粉碎，加6倍量水，浸泡1 h后煎煮，煮沸1 h后滤过；药渣加6倍量水煎煮，煮沸1 h后滤过；合并2次滤液，用冻干机冻干后得到冻干粉140 g，提取率为15.6%。

2.2 动物分组、造模与给药

将大鼠以普通饲料适应性喂养5 d后，按体重随机分为正常组、模型组、苏格木勒-4组（5.2 g/kg，按临床人体用量与鼠体表面积换算后得到）、地西泮组（阳性对照，0.92 mg/kg[9]），每组6只。采用慢性夹尾刺激和腹腔注射PCPA溶液复合造模法构建慢性应激失眠大鼠模型[8]：将每组的6只大鼠置于同一笼内，用尖端包扎纱布的止血钳分别夹大鼠尾部，每天刺激45 min，控制刺激强度，以不破皮流血为度，连续20 d；在夹尾刺激的第16、17天，对除正常组外的其他3个实验组的大鼠均按400 mg/kg腹腔注射PCPA溶液，每天1次。从夹尾刺激第7天开始，苏格木勒-4组、地西泮组大鼠开始灌胃给药，正常组、模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水，每天灌胃1次，连续14 d。

2.3 行为学评价

在夹尾刺激的第16～19天进行定位航行实验。将大鼠放入水池第三象限平台，平台高度为露出水面1 cm。实验第1天（夹尾刺激的第16天），每只大鼠在平台上适应30 s后，以大鼠头朝第一象限池壁方向放入池内的瞬间开始计时，直到大鼠找到平台为止，这段时间称

为大鼠逃避潜伏期。若大鼠5 min内没有完成独立登台则逃避潜伏期记为5 min，需辅助大鼠停驻平台20 s。每天测量3个象限（平台所在象限不测），最终用4 d的逃避潜伏期数据作为判断大鼠学习能力的指标。在夹尾刺激第20天时进行为期1 d的空间探索实验：先将平台移除，沿第一象限池壁将大鼠放入池内，将大鼠5 min内穿越平台所在区域的次数作为评定大鼠空间记忆能力的指标。

2.4 睡眠监测

在全部行为学实验完成后，将大鼠放入无创睡眠活动监测系统，每只大鼠单独关在1个笼子里。白天采用自然光线，晚上7：00后使用窗帘制造完全黑暗的环境。监测大鼠24 h的睡眠时间，计算各组大鼠的平均24 h睡眠时间百分比：大鼠的平均24 h睡眠时间百分比（%）＝各组大鼠24 h内平均睡眠时间/24 h×100%。

2.5 样本收集与处理

末次给药24 h后，经大鼠腹主动脉收集血液，在冰台上处死大鼠并快速分离海马组织。血液经3 500 r/min离心15 min制备血清。将血清和海马组织用液氮速冻，于－80 ℃冰箱中保存。

2.6 血清和海马组织代谢组学分析

将“2.5”项下海马组织样本在4 ℃条件下缓慢解冻后（海马组织经钢珠匀浆后取匀浆液），按照1∶4（*V*/*V*）的比例，向样本中加入甲醇。振荡3 min混匀后，设置离心机参数为温度20 ℃、转速4 000 r/min，离心10 min沉淀不溶物。离心完成后从每个样品中取4份（各100 μL）上清液至4个样板中，以氮气吹干，用于后续UPLC-MS/MS检测。

为实现最大限度的代谢物覆盖，本研究基于UPLC结合高分辨MS平台，依据代谢物性质差异，采用4种不同的UPLC-MS/MS方法进行检测。方法1：强极性反相柱正离子电喷雾方法——采用C_{18}色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 mm），以含0.05%全氟戊酸和0.1%甲酸的水溶液为流动相A、含0.05%全氟戊酸和0.1%甲酸的甲醇为流动相B进行梯度洗脱（0～4 min，0→70%B；4～5.5 min，70%B→98%B；5.5～7 min，98%B）。方法2：弱极性反相柱正离子电喷雾方法——采用C_{18}色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 mm），以含0.05%全氟戊酸和0.1%甲酸的水溶液为流动相A、含0.05%全氟戊酸和0.1%甲酸的甲醇-含50%甲醇的乙腈溶液为流动相B进行梯度洗脱（0～4 min，0→70%B；4～5.5 min，70%B→98%B；5.5～7 min，98%B）。方法3：反相柱负离子电喷雾方法——采用C_{18}色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.7 mm），以含6.5 mmol/L碳酸氢铵的水为流动相A、含6.5 mmol/L碳酸氢铵的甲醇-水（含95%甲醇）为流动相B进行梯度洗脱（0～4 min，0→70%B；4～5.5 min，70%B→99.5%B；5.5～7 min，99.5%B）。方法4：正向亲水作用色谱（hydrophilic interaction chromatography，HILIC）柱负离子电喷雾方法——采用HILIC柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm），以含10 mmol/L甲酸铵的乙腈-水-甲醇（乙腈、水、甲醇体积比为80∶15∶5）溶液为流动相A、含10 mmol/L甲酸铵的乙腈-水（含50%乙腈）溶液为流动相B进行梯度洗脱（0～4 min，100%B→80%B；4～5.5 min，80%B→20%B；5.5～7 min，20%B）。4种方法的柱温均为40 ℃，流速均为0.35 mL/min，进样量均为5 μL。

扫描模式为全扫描和数据依赖性的二级扫描。离子源模式根据不同液相方法采取正离子电子喷雾（ESI^+）或负离子电子喷雾（ESI^-）。一级MS扫描范围为质荷比（*m*/*z*）70～1 000，喷雾电压为4 000 V，毛细管温度为350 ℃，鞘气压力为60 arb，流速为40 L/min，辅助气压力为20 arb，流速为5 L/min，碰撞电压为60 eV；采用数据依赖性的扫描模式采集二级MS，采集范围为*m*/*z* 70～1 000，碰撞电压为60 eV。

2.7 数据处理与分析

睡眠监测和行为学数据统计由SPSS 22.0软件完成，实验结果用$\bar{x} \pm s$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检验。检验水准α＝0.05。

在统计分析代谢数据之前，先对原始峰面积进行归一化处理，以适应不同运行日之间的系统波动。然后对归一化后的峰面积进行对数转换（$\log_2$），以降低数值的偏态分布，并使其呈近似正态分布。使用所有样本中某一代谢产物的最小检测值估算峰面积矩阵中的缺失值。代谢数据通过无监督的主成分分析（principal component analysis，PCA）和有监督的正交偏最小二乘判别分析（orthogonal partial least-squares discrimination analysis，OPLS-DA）进行分析，组间差异代谢物根据Wilcoxon符号秩和检验P＜0.05和代谢物差异倍数≥1.2或≤0.833 3[10]为标准进行筛选。代谢数据的统计分析和数据可视化均使用R 3.4.1软件完成。基于京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）数据库和R 3.4.1软件中的Pathview工具包和MetPA工具包进行通路富集分析。

3 结果

3.1 行为学评价结果

与正常组比较，模型组大鼠逃避潜伏期显著延长（P＜0.05），穿越平台次数显著减少（P＜0.05）；与模型组比较，地西泮组和苏格木勒-4组大鼠的逃避潜伏期显著缩短（P＜0.05），穿越平台次数显著增加（P＜0.05）。结果见表1。

3.2 睡眠监测结果

与正常组[平均24 h睡眠时间百分比为（53.17±1.94）%，n＝6]比较，模型组大鼠平均24 h睡眠时间百分比[（46.83±2.32）%]显著降低（P＜0.05）；与模型组比

表1　各组大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
正常组	47.68±27.57	13.00±7.48
模型组	176.64±79.62[a]	4.83±2.23[a]
地西泮组	41.72±11.83[b]	7.00±4.00[b]
苏格木勒-4组	116.74±34.86[b]	9.33±2.50[b]
F	7.704	3.298
P	0.004	0.042

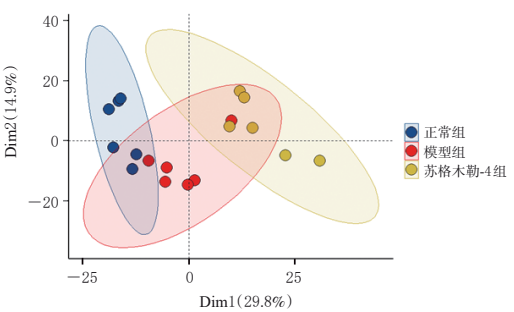
a：与正常组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。

较，地西泮组和苏格木勒-4组大鼠的平均24 h睡眠时间百分比[分别为(51.50±1.52)%、(50.00±3.90)%，$n=6$]均显著升高($P<0.05$)。

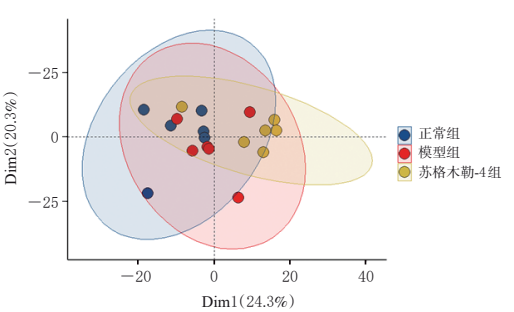
3.3　大鼠血清和海马组织代谢组学分析结果

3.3.1　大鼠血清和海马组织代谢物的PCA结果

PCA结果如图1所示，正常组与模型组、模型组与苏格木勒-4组大鼠血清和海马组织代谢物的PCA散点均能分开，说明各组间代谢物有明显差异性。



A. 血清

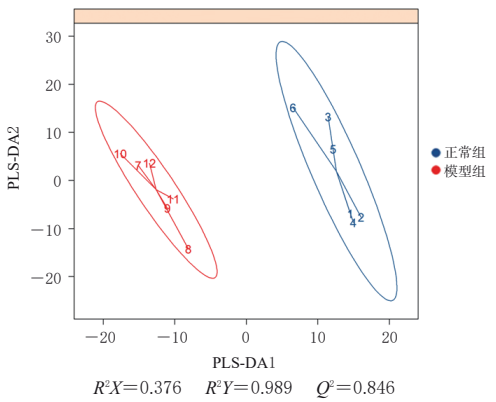


B. 海马

图1　各组大鼠血清和海马组织中代谢物的PCA得分图

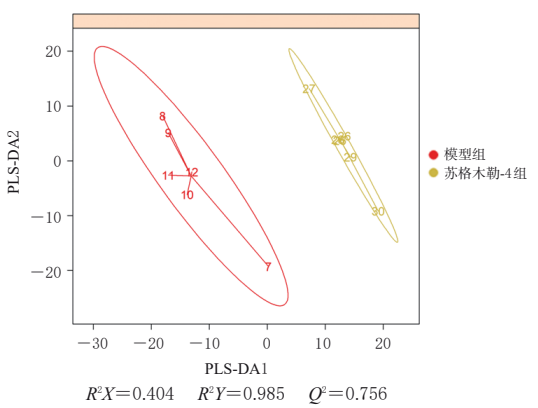
3.3.2　大鼠血清和海马组织差异代谢物的筛选及代谢通路分析结果

大鼠血清代谢物OPLS-DA结果如图2所示，正常组与模型组的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）、Q^2（表示模型的预测能力）分别为0.376、0.989、0.846，模型组与苏格木勒-4组的R^2X、R^2Y、Q^2分别为0.404、0.985、0.756。以代谢物差异倍数≥1.2且$P<0.05$或代谢物差异倍数≤0.833 3且$P<0.05$为筛选条件，共鉴定出5个差异代谢物。与正常组比较，模型组大鼠血清中5-羟基吲哚乙酸、犬尿氨酸、5-HT、硫酸苯酚4种差异代谢物的水平均显著下调($P<0.05$)，犬尿喹啉酸的水平显著上调($P<0.05$)；与模型组比较，苏格木勒-4组大鼠血清中5-羟基吲哚乙酸、犬尿氨酸、5-HT、硫酸苯酚4种差异代谢物的水平均显著上调($P<0.05$)，犬尿喹啉酸的水平显著下调($P<0.05$)。结果见表2。



$R^2X=0.376$　$R^2Y=0.989$　$Q^2=0.846$

A. 正常组与模型组



$R^2X=0.404$　$R^2Y=0.985$　$Q^2=0.756$

B. 模型组与苏格木勒-4组

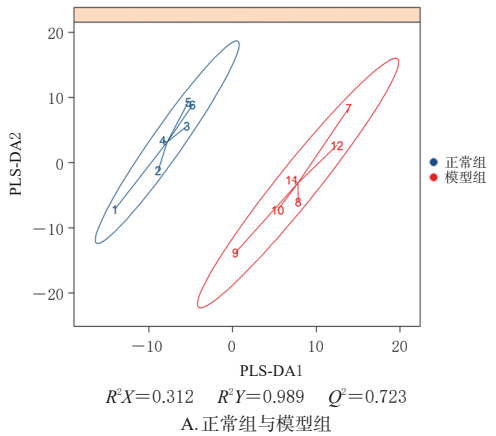
图2　各组大鼠血清样本的OPLS-DA得分图

表2　大鼠血清差异代谢物鉴定结果

差异代谢物	HMDB ID	分子式	母离子*m/z*	子离子*m/z*	模型组vs.正常组	苏格木勒-4组vs.模型组
5-羟基吲哚乙酸	HMDB0000763	$C_{10}H_9NO_3$	192.065 5	146.060 0，91.054 2	↓	↑
犬尿氨酸	HMDB0000684	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	188.035 3	144.045 5，56.995 6	↓	↑
犬尿喹啉酸	HMDB0000715	$C_{10}H_7NO_3$	209.092 1	146.060 0，94.065 7	↑	↓
5-HT	HMDB0000259	$C_{10}H_{12}N_2O$	177.102 2	160.075 6，91.054 8	↓	↑
硫酸苯酚	HMDB0060015	$C_6H_6O_4S$	172.991 4	93.034 5，79.957 3	↓	↑

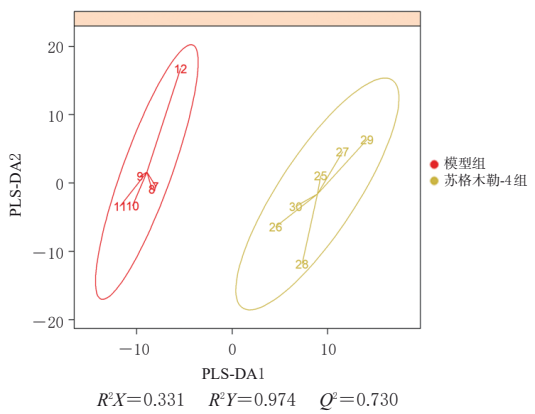
↓：前组较后组差异代谢物水平显著下调($P<0.05$)；↑：前组较后组差异代谢物水平显著上调($P<0.05$)。

大鼠海马组织OPLS-DA结果如图3所示，正常组与模型组的R^2X、R^2Y、Q^2分别为0.312、0.989、0.723，模型组与苏格木勒-4组的R^2X、R^2Y、Q^2分别为0.331、0.974、0.730。以代谢物差异倍数≥1.2且$P<0.05$或代谢物差异倍数≤0.833 3且$P<0.05$为筛选条件，共鉴定出6个差异代谢物。与正常组比较，模型组大鼠海马组织中犬尿氨酸、1-羧基乙基酪氨酸、3-(4-羟基苯基)乳酸、*N*-乙酰基酪氨酸、酪氨酸、硫酸苯酚6种差异代谢物的水平均显著下调($P<0.05$)；与模型组比较，苏格木勒-4组大鼠海马组织中上述6种差异代谢物的水平均显著上调($P<0.05$)。结果见表3。



R^2X=0.312　R^2Y=0.989　Q^2=0.723

A. 正常组与模型组



R^2X=0.331　R^2Y=0.974　Q^2=0.730

B. 模型组与苏格木勒-4组

图3　各组大鼠海马组织样本的OPLS-DA得分图

表3　大鼠海马组织差异代谢物鉴定结果

差异代谢物	HMDB ID	分子式	母离子 *m/z*	子离子 *m/z*	模型组vs.正常组	苏格木勒-4组vs.模型组
犬尿氨酸	HMDB0000684	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	188.035 3	144.045 5、56.995 6	↓	↑
1-羧基乙基酪氨酸	HMDB0242159	$C_{12}H_{15}NO_5$	252.087 7	119.050 2、88.040 5	↓	↑
3-(4-羟基苯基)乳酸	HMDB0000755	$C_9H_{10}O_4$	181.050 6	135.045 3、72.993 1	↓	↑
N-乙酰基酪氨酸	HMDB0000866	$C_{11}H_{13}NO_4$	222.077 2	119.050 2、58.029 7	↓	↑
酪氨酸	HMDB0000158	$C_9H_{11}NO_3$	182.081 2	136.075 7、91.054 8	↓	↑
硫酸苯酚	HMDB0060015	$C_6H_6O_4S$	172.991 4	93.034 5、79.957 3	↓	↑

↓：前组较后组差异代谢物水平显著下调（P<0.05）；↑：前组较后组差异代谢物水平显著上调（P<0.05）。

将血清和海马组织的9个差异代谢物（血清和海马组织中有2个相同差异代谢物——犬尿氨酸和硫酸苯酚）进行KEGG通路富集分析，共得到6条代谢通路，详见图4。其中，与失眠相关的代谢通路为色氨酸代谢通路和酪氨酸代谢通路。

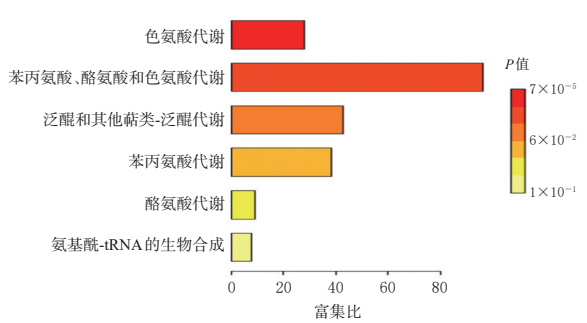


图4　血清和海马组织中差异代谢物的通路富集分析图

4　讨论

Morris水迷宫实验常被用来评价动物的空间学习和记忆能力。苯二氮䓬类药物地西泮常被用于镇静催眠，故本研究将其作为阳性对照药物。本研究通过Morris水迷宫实验发现，模型组大鼠的学习和记忆能力下降，苏格木勒-4、地西泮均可以改善模型大鼠的学习记忆能力，使慢性应激失眠大鼠的睡眠节律恢复正常，延长大鼠的睡眠时间，表明上述药物均有抗失眠的作用。

本研究通过对失眠模型大鼠的血清和海马组织进行代谢组学分析，发现了9个差异代谢物[5-羟基吲哚乙酸、犬尿氨酸、犬尿喹啉酸、5-HT、硫酸苯酚、1-羧基乙基酪氨酸、3-(4-羟基苯基)乳酸、*N*-乙酰基酪氨酸、酪氨酸]和2条代谢通路（色氨酸代谢通路和酪氨酸代谢通路）。

5-HT是一种具有复杂生物学功能的单胺类神经递质。研究发现，失眠大鼠脑中5-HT会明显减少[11]。色氨酸代谢途径中，5-HT可由色氨酸在色氨酸羟化酶和四氢生物蝶呤的作用下，经羟化和脱羧反应代谢而成[11]。在本研究中，与正常组比较，模型组大鼠血清中5-HT水平显著降低；经苏格木勒-4干预后，模型组大鼠血清中5-HT水平及5-HT分解产物5-羟基吲哚乙酸水平均显著升高，这提示苏格木勒-4可以作用于色氨酸向5-HT转变的代谢过程，解除PCPA对色氨酸氢化酶的抑制来提高海马组织中5-HT水平，从而干预失眠。

犬尿氨酸可由色氨酸经色氨酸吡咯酶的作用转变为甲酰犬尿酸原，最后代谢为犬尿氨酸[12]。发生睡眠障碍时，犬尿氨酸途径受到影响会激活色氨酸的酶降解，导致脑部不同区域犬尿喹啉酸的产生和积累增加，而犬尿喹啉酸是一种稳定的代谢产物[13]。犬尿喹啉酸含量增多会抑制突触外多种受体的电流传导，包括*N*-甲基-D-天冬氨酸受体[14]和α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体介导的电流[15]，这可能是造成失眠大鼠学习和记忆能力下降的主要物质。本研究发现，模型大鼠海马区犬尿氨酸水平显著降低，血清中犬尿喹啉酸水平显著升高；经苏格木勒-4干预后逆转了上述变化。由此可知，苏格木勒-4可能是通过抑制犬尿氨酸转变为犬尿喹啉酸，升高犬尿氨酸水平，从而达到改善大鼠睡眠、学习和记忆能力的目的。

酪氨酸是人体的条件必需氨基酸，已有的临床研究表明L-酪氨酸可以缓解抑郁，对抑郁症的治疗有积极作用[16]。酪氨酸容易通过血脑屏障在多巴胺神经元胞质内酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，TH）和芳香族氨基酸脱羧酶的作用下，转化为神经递质DA，而进入囊泡的DA经酶催化生成去甲肾上腺素，再经酶催化生成肾上腺素[17]。现有的动物实验证明，大脑DA含量降低后会导致大鼠行动迟缓和情绪低落[17]，而在动物处于应激状态时也需要更多的酪氨酸来缓解应激造成的去甲肾上腺素耗竭[18]。由此可知，肾上腺素、DA和去甲肾上腺

素的本质都是酪氨酸代谢产物，而酪氨酸含量降低，就会引起这些神经递质合成变少，造成实验动物运动活性降低，出现忧郁和沮丧的消极情绪。本研究结果表明，与正常组比较，模型组大鼠海马区酪氨酸代谢紊乱，酪氨酸及其多种相关代谢产物表达下调，表明模型组大鼠脑中的TH可能被抑制；经苏格木勒-4干预后，这些改变被逆转，说明药物可能上调酪氨酸代谢中的TH活性来改善模型组大鼠的睡眠紊乱和情绪低落。

综上，色氨酸、酪氨酸等氨基酸代谢途径可能是苏格木勒-4抗失眠作用的重要靶点。

参考文献

[1] MORIN C M, JARRIN D C. Epidemiology of insomnia: prevalence, course, risk factors, and public health burden [J]. Sleep Med Clin, 2022, 17(2): 173-191.

[2] HUMER E, PIEH C, BRANDMAYR G. Metabolomics in sleep, insomnia and sleep apnea[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(19): 7244.

[3] QASEEM A, KANSAGARA D, FORCIEA M A, et al. Management of chronic insomnia disorder in adults: a clinical practice guideline from the American College of Physicians[J]. Ann Intern Med, 2016, 165(2): 125-133.

[4] SINGH A, ZHAO K C. Treatment of insomnia with traditional Chinese herbal medicine[J]. Int Rev Neurobiol, 2017, 135: 97-115.

[5] 果佳霖. 苏格木勒-4味汤药效物质基础及抗失眠作用研究[D]. 呼和浩特：内蒙古医科大学，2019.
GUO J L. Study on the composition analysis and anti-insomnia effects of Mongolian medicine Sugemule-4 decoction[D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2019.

[6] 杨蕊，果佳霖，孙利东，等. 苏格木勒-4精油多成分-多靶点-多途径抗失眠作用机制研究[J]. 中医药导报，2022，28(2)：17-23.
YANG R, GUO J L, SUN L D, et al. Study on anti-insomnia mechanism of Sugemul-4 essential oil by multi-component, multi-target and multi-pathway[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 28(2): 17-23.

[7] 王泽琨，刘沈林，于小聪，等. 基于血清代谢组学探讨复方枣仁颗粒改善失眠的机制[J]. 中国药房，2023，34(9)：1093-1098.
WANG Z K, LIU S L, YU X C, et al. Investigation on the mechanism of Compound zaoren granules in improving insomnia based on serum metabonomics[J]. China Pharm, 2023, 34(9): 1093-1098.

[8] 叶钰娟，李昕蓉，曹梦琪，等. 中医失眠证候模型的研究述评[J]. 中国中医基础医学杂志，2021，27(1)：178-181.
YE Y J, LI X R, CAO M Q, et al. Research progress on animal models of TCM syndromes of isomnia[J]. J Basic Chin Med, 2021, 27(1): 178-181.

[9] 赵仁云，郑竹宏，丁玉婷，等. 栀子厚朴汤对失眠模型小鼠行为学及脑内单胺类神经递质的影响[J]. 国际药学研究杂志，2018，45(6)：436-442.
ZHAO R Y, ZHENG Z H, DING Y T, et al. Effects of Zhizi-Houpu decoction on the behavior and monoamine neurotransmitter levels of insomnia mice model[J]. J Int Pharm Res, 2018, 45(6): 436-442.

[10] 杜珍蓉. 失眠症肝郁脾虚证的血清代谢组学研究[D]. 成都：成都中医药大学，2020.
DU Z R. Serum metabolomics study on the liver depression and spleen deficiency syndrome of insomnia[D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2020.

[11] SI L G, WANG Y H, WUYUN G, et al. The effect of Mongolian medical acupuncture on cytokines and neurotransmitters in the brain tissue of insomniac rats[J]. Eur J Integr Med, 2015, 7(5): 492-498.

[12] SCHWARCZ R. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target[J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(1): 12-17.

[13] KONRADSSON-GEUKEN A, WU H Q, GASH C R, et al. Cortical kynurenic acid bi-directionally modulates prefrontal glutamate levels as assessed by microdialysis and rapid electrochemistry[J]. Neuroscience, 2010, 169(4): 1848-1859.

[14] PLITMAN E, IWATA Y, CARAVAGGIO F, et al. Kynurenic acid in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis[J]. Schizophr Bull, 2017, 43(4): 764-777.

[15] VÉCSEI L, SZALÁRDY L, FÜLÖP F, et al. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions[J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(1): 64-82.

[16] ALABSI A, KHOUDARY A C, ABDELWAHED W. The antidepressant effect of L-tyrosine-loaded nanoparticles: behavioral aspects[J]. Ann Neurosci, 2016, 23(2): 89-99.

[17] 乎宝力格，苏日古嘎，高玉峰. 蒙医灸疗对失眠模型大鼠行为学及脑干组织多巴胺的影响[J]. 中医药导报，2019，25(13)：39-41，49.
Hubaolige, Suriguga, GAO Y F. Effect of Mongolian medicine moxibustion therapy on behavior and brain stem tissue dopamine in insomniac model rats[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 25(13): 39-41, 49.

[18] 刘帆. 基于UPLC/Q-TOF-MS的慢性睡眠剥夺大鼠脑脊液代谢组学研究[D]. 哈尔滨：黑龙江中医药大学，2018.
LIU F. Metabolomic study of cerebrospinal fluid in rats with chronic sleep deprivation based on UPLC/Q-TOF-MS[D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2018.

（收稿日期：2023-06-12　修回日期：2023-11-20）
（编辑：林　静）