

基于网络药理学分析加味归脾汤治疗阴火失眠伴焦虑的机制

刘飞祥¹, 林子璇¹, 张怀亮^{1*}, 杨克勤¹, 张道培¹, 徐进¹, 范晓飞¹, 王永涛¹,
李丹¹, 赵玉男²

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000;
2. 南京中医药大学医学与生命科学学院, 南京 210023)

[摘要] 目的:借助网络药理学分析技术,探讨加味归脾汤治疗阴火失眠伴焦虑的作用机制。方法:采用中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP),筛选加味归脾汤的主要化合物成分和药物靶基因;通过GeneCards和人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM)建立失眠和焦虑的靶基因集;通过STRING 11.0软件分析交集基因之间的相互作用;采用Cytoscape_3.6.1软件分析和马修斯相关系数(MCC)算法筛选核心基因。基于网络分析结果,将48只SD雌性大鼠随机分配为空白组,模型组,右佐匹克隆片组(0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹),加味归脾汤低、中、高剂量组(0.31, 1.25, 5 g·kg⁻¹·d⁻¹)。采用氯苯丙氨酸(PCPA)腹腔注射方法,建立失眠伴焦虑动物模型,并给予相应药物治疗7 d;然后进行自主活动实验观察大鼠活动的次数、时间和路程;实时荧光定量聚合酶链式反应检测大鼠海马组织中RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt1),丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3),丝裂原活化蛋白激酶8(MAPK8)和白细胞介素-6(IL-6)mRNA表达。结果:从TCMSP数据库中共筛选出228个化合物活性成分;经与GeneCards和OMIM综合数据库比对,共获取181个疾病与药物的交集基因;STRING软件和MCC算法共获得MAPK3, MAPK8, Akt1, IL-6等9个关键基因。动物实验表明,与模型组比较,加味归脾汤高、中剂量组的活动次数、时间和路程显著减少($P < 0.01$),海马组织中MAPK3, MAPK8, Akt1, IL-6 mRNA表达显著降低($P < 0.01$),低剂量组差异无统计学意义。结论:加味归脾汤治疗阴火失眠伴焦虑作用机制,可能与对MAPK3, MAPK8, Akt1, IL-6基因的调节有关。

[关键词] 网络药理学; 加味归脾汤; 失眠; 焦虑

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0161-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201930

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1136.016.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 11:44

Analysis on Mechanisms of Modified Guipitang in Treatment of Yin-Fire Insomnia with Anxiety Based on Network Pharmacology

LIU Fei-xiang¹, LIN Zi-xuan¹, ZHANG Huai-liang^{1*}, YANG Ke-qin¹, ZHANG Dao-pei¹, XU Jin¹,
FAN Xiao-fei¹, WANG Yong-tao¹, LI Dan¹, ZHAO Yu-nan²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;
2. School of Medicine and Life Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of modified Guipitang in the treatment of Yin-Fire insomnia with anxiety with the help of network pharmacological analysis technology. **Method:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) was used to screen the main components and target genes of modified Guipitang. GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) were used to establish the target gene sets of insomnia and anxiety. STRING 11.0 software was used to analyze the interaction between the

[收稿日期] 20191205(020)

[基金项目] 全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2018]134号);吴阶平医学基金会临床科研专项(320.6750.18326)

[第一作者] 刘飞祥, 医师, 从事中医脑部疾病的研究, E-mail: 1353336582@qq.com

[通信作者] * 张怀亮, 主任医师, 从事中医脑部疾病的研究, E-mail: zh1121@126.com

overlapping genes, and Cytoscape_3.6.1 software analysis and Matthews correlation coefficient (MCC) algorithm were used to screen the core genes. Based on the results of network analysis, 48 SD female rats were randomly divided into blank control group, model group, eszopiclone tablets group ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), modified Guipitang low, medium, and high-dose groups ($0.31, 1.25, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The model of insomnia with anxiety was established by intraperitoneal injection of Para-chlorophenylalanine (PCPA) and these rats were treated with corresponding drugs for 7 days. Then the frequency, time and distance of the activities were observed in the experiment of autonomic activity. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the mRNA expressions of proactivated protein kinase 8 (MAPK8), RAC-alpha serine/threonine protein kinase (Akt1), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) and interleukin-6 (IL-6) in rat hippocampus. **Result:** A total of 228 active compounds were screened from TCMSp database and 181 intersecting genes of diseases and drugs were obtained by comparing with GeneCards and OMIM comprehensive database. 9 core genes, including MAPK3, MAPK8, Akt1 and IL-6 were identified by STRING software and MCC algorithm. Animal experiments showed that the number of activity times, time and distance of modified Guipitang in high and medium dose groups were significantly lower than those in the model group. The high and middle dose groups of modified Guipitang could significantly inhibit the mRNA expression of MAPK3, MAPK8, Akt1 and IL-6 in hippocampus ($P < 0.01$), while the low dose group had no significant effect. **Conclusion:** The mechanism of modified Guipitang in treating Yin-fire insomnia with anxiety may be related to the regulation of MAPK3, MAPK8, Akt1 and IL-6 genes.

[Key words] network pharmacology; modified Guipitang; insomnia; anxiety

失眠是神经内科临床常见的睡眠障碍性疾病,严重影响了患者的生活、工作、学习和健康,长期不愈的失眠更容易诱发焦虑、抑郁等精神紊乱的症状^[1]。ZHENG等^[2]开展的一项流行病学调查显示,中国城市居民自报失眠症状的发病率为23.4%,而农村居民的流行率为21.2%。焦虑是一种情绪状态,其特征是紧张、忧虑或恐惧的感觉,以及身体变化,如肌肉紧张、胃肠道、呼吸和循环系统不适以及自主神经功能障碍^[3]。根据2017年世界卫生组织的流行病学调查,全球人口中焦虑症的患病率高达3.6%,发达国家的患病率较高,发展中国家患病率较低^[4]。失眠与焦虑之间是相互作用,但又相对独立的关系,失眠可引起焦虑加重,焦虑也会引起失眠的反复发作。失眠与焦虑共病对患者的日常生活、学习和工作造成巨大影响,甚至引起自杀事件的发生^[5]。

目前,西药治疗失眠的药物从作用时间长短上可以分为超短效类药物、短效或中效类药物、长效类药物;根据药物性质和作用倾向,可以分为 r -氨基下酸AF复合体激动药、褪黑素受体激动剂、镇静类抗抑郁药物、镇静类抗精神病药物、抗组胺类药物等^[6]。这些药物对于缓解失眠及其伴随的焦虑、抑郁症状具有明显的治疗的作用,但是这些药物长期服用后易引起耐药性、依赖性、胆碱能效应及认知、

精神等方面的不良反应,影响了患者的身体健康^[7-8]。

归脾汤出自明代薛己《正体类要》卷下,对于本方主治病证,其云:“思虑伤脾,血虚火动,寤而不寐……其功甚捷”。加味归脾汤是河南中医药大学第一附属医院脑病医院院长张怀亮教授五代家传验方,又名“三调汤”。本方以归脾汤为主方,合小柴胡汤及逍遥散化裁而来,由北柴胡、黄芩、当归、白芍、茯神、白术、酸枣仁、龙眼肉、枸杞子、栀子和炙甘草共同组成,具有疏肝解郁清热、健脾养心安神的作用,能够显著改善阴火失眠伴焦虑患者的临床症状。前期的临床观察表明,加味归脾汤对于阴火失眠伴轻度焦虑患者疗效颇佳^[9-10],然而其发挥治疗作用的分子机制尚未阐明。因此,本研究希望借助网络药理学技术,系统分析加味归脾汤的主要活性成分、核心作用靶基因,并通过动物实验验证,阐释本方抗阴火失眠伴焦虑的作用机制,为加味归脾汤的现代挖掘提供依据。

1 材料

1.1 资料 中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSp, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); GeneCards综合数据库(<https://www.genecards.org/>); 人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM, <http://www.omim.org/search/advanced/geneMap>); STRING

11.0 蛋白交互网络(<https://string-db.org/>);生物半导体(Bioconductor, <http://www.bioconductor.org/>)数据库;Cytoscape_3.6.1 版本软件;CytoHubba 插件;R×64 3.5.3 版本软件;UniProt(<https://www.uniprot.org/>)数据库。

1.2 动物 48 只 SPF 级 3 月龄 SD 雌性大鼠, 体重(255±25)g, 由河南省郑州市实验动物中心, 合格证号 SCXK(豫)2010-0002。大鼠饲养于河南中医药大学第一附属医院动物实验中心, 相对湿度为(53.4±2.5)%, 室温(25.4±1.8)°C, 每笼 4 只, 自由饮水和摄食, 12 h 日夜交替循环。所有实验方案和操作流程, 均符合国际动物使用原则和欧盟制定的实验动物福利方针, 并得到河南中医药大学第一附属医院动物伦理委员会批准, 伦理号 2018YI-018。

1.3 药物与试剂 总 RNA 快速提取试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司, 批号 YFXM0013); 右佐匹克隆片(江苏天士力帝益药业有限公司, 国药准字 H20070069); 加味归脾汤组成: 北柴胡 100 g, 黄芩 90 g, 当归 100 g, 白芍 150 g, 茯神 150 g, 炒白术 150 g, 酸枣仁 150 g, 枸杞子 200 g, 栀子 100 g 和炙甘草 100 g, 其颗粒剂与生药材换算比值分别为 1:11, 1:11, 1:10, 1:21, 1:17, 1:7, 1:21, 1:7, 1:11 和 1:7(四川新绿色药业科技发展有限公司, 批号分别为 19080042, 19100076, 19110144, 19080026, 19080214, 19120064, 191001035, 19090205, 19070058, 19120115); 龙眼肉 1 500 g 由河南中医药大学第一附属医院提供, 药材质量经河南中医药大学第一附属医院药剂科李学林主任药师鉴定均为正品; cDNA 逆转录试剂盒以及反转录试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司, 批号分别为 11202ES08, 11123ES60); 对氯苯丙氨酸(PCPA, 美国 Sigma 公司, 批号 C6506)。

1.4 仪器 Spectramax M3 型美谷酶标仪(美国美谷分子仪器有限公司); Applied Biosystems Veriti 型 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); 5417R 型台式高速冷冻离心机(德国 Sartorius 公司); BioPhotometer plus 型核酸蛋白检测仪(德国 Eppendorf 公司); BW-OIF301 型自主活动视频分析系统(上海软隆科技发展有限公司); Roche LightCycler®480 II 型实时荧光定量 PCR 系统(德国罗氏公司)。

2 方法

2.1 有效活性成分和药物靶基因筛选 通过 TCMSP 数据库, 筛选北柴胡、黄芩、当归、白芍、茯

神、白术、酸枣仁、龙眼肉、枸杞子、栀子和炙甘草 11 味药物中口服生物利用度(OB)≥30%, 类药性(DL)≥0.18 的活性成分以及药物靶点, 并删除没有靶基因的活性成分。将所有药物的活性成分和活性成分的靶基因汇总, 删除重复部分, 分别建立化合物成分数据集和药物靶基因数据集。在 UniProt 数据库中搜索人类基因, 建立人基因数据集。

2.2 失眠-焦虑靶点基因的获取 分别在 GeneCards 综合数据库和 OMIM 综合数据库中输入“失眠(insomnia)”“不寐(wakefulness)”“失眠(agrypnia)”“焦虑(anxiety)”“焦虑(anxious)”“焦虑(inquietude)”“焦虑(dysphoria)”, 搜索相应的疾病基因, 然后进行汇总, 删除重复基因, 建立疾病靶基因数据集。

2.3 核心基因的筛选和蛋白互作网络的构建 通过 R 软件将药物靶基因和疾病靶基因进行比对, 筛选二者交集基因。将疾病和药物之间的交集基因输入到 STRING 网络中, 分析共有基因之间的交互作用, 统计各基因的节点数目评分。然后使用在 Cytoscape_3.6.1 软件中使用 cytoHubba 插件, 通过马修斯相关系数(MCC)算法, 筛选交互作用节点数目在前 10 的基因, 构建关键基因之间的蛋白互作网络(PPI)。

2.4 药物制备 龙眼肉 150 g 加超纯水 1 500 mL, 煎煮 1.5 h, 然后将加味归脾汤其他颗粒剂药物按照比例加入到龙眼肉水煎剂中, 浓缩至含 1 g·mL⁻¹ 加味归脾汤, -20 °C 保存备用。右佐匹克隆粉粉碎后, 加入纯水, 配制成 0.2 g·L⁻¹ 的混悬液。PCPA 用 0.9% NaCl 配成 0.5 g·mL⁻¹ 的混悬液。

2.5 分组及给药 48 只雌性大鼠正常饲养 1 周后被随机分配为空白组、模型组, 右佐匹克隆组, 加味归脾汤高、中、低剂量组, 每组 8 只。造模组大鼠均在每天上午 9:00 至 9:30 给予腹腔注射 PCPA 溶液(350 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 连续给药 5 d。当大鼠出现昼夜节律异常, 睡眠减少直至消失, 易激惹, 攻击性强, 毛发蓬松杂乱, 精神萎靡, 进食减少时, 表明造模成功^[9]。之后分别给予超纯水, 右佐匹克隆片(0.2 mg·kg⁻¹·d⁻¹), 加味归脾汤低、中、高剂量(0.31, 1.25, 5 g·kg⁻¹·d⁻¹), 连续灌胃 1 周。第 7 天灌胃结束后, 进行自主活动实验。实验结束后, 所有大鼠在 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉下处死, 取大鼠双侧海马, -80 °C 保存备用。

2.6 自主活动实验 使用 BW-OIF301 型自主活动

视频分析系统,观察大鼠的各种自发活动及状态。详细记录各实验组大鼠在进入陌生封闭环境后在120 s内的自发活动,分析其活动频率、活动时间和运动路程等数据。

2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测海马中 MAPK3, MAPK8, Akt1, IL-6 mRNA 的表达 海马总 RNA 的提取,称质量,加入组织裂解液,用组织研磨仪快速研磨,12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,然后取上清,酶标仪检测其浓度,-80 °C 保存备用。RNA 进行逆转录为 cDNA 的操作,是按照 Hifair™ II 1 Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒的说明书进行。其步骤:按比例配置 20 μL 的体系,设置 85 °C 5 s,42 °C 15 min 的反应参数进行逆转,结束后-80 °C 保存备用。cDNA 的扩增按照 Hieff™ qPCR SYBR GREEN Master Mix 试剂盒的操作说明进行。按照比例配制 20 μL 的 Real-time PCR 反应体系,采用两步法,设置变性温度为 94 °C 30 s,随后变性温度为 94 °C 5 s,退火温度为 60 °C 30 s,共 40 个循环的反应参数,然后用 Roche LightCycler® 480 II Real-time PCR 系统进行扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计,见表 1,采用甘油醛 3 磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参。所有的数据分析采用 2^{-ΔΔC_t} 方法。

2.8 统计学分析 所有数据通过 SPSS 19.0 软件进行分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 *T* 检验(两组比较)或单因素方差分析与纽曼-凯尔斯测验(多组间)

表 2 加味归脾汤的有效活性成分(前 10)

Table 2 Active constituents of modified Guipitang (top 10)

| 序列 | 化合物 ID | 化合物名称 | 相对分子量 | OB/% | DL | 来源 |
|----|-----------|--|--------|-------|------|------------|
| 1 | MOL000098 | 槲皮素(Quercetin) | 302.25 | 46.43 | 0.28 | 北柴胡、枸杞子、栀子 |
| 2 | MOL002714 | 黄芩素(Baicalcin) | 270.25 | 33.52 | 0.21 | 黄芩 |
| 3 | MOL000422 | 山柰酚(Kaempferol) | 286.25 | 41.88 | 0.24 | 北柴胡 |
| 4 | MOL004328 | 柚皮苷(Naringenin) | 272.27 | 59.29 | 0.21 | 甘草 |
| 5 | MOL008400 | 大豆黄素(Glycitein) | 284.28 | 50.48 | 0.24 | 枸杞子 |
| 6 | MOL000358 | β-谷甾醇(Beta-sitosterol) | 414.79 | 36.91 | 0.75 | 当归、栀子 |
| 7 | MOL000072 | 8β白术内酯Ⅲ-甲氧基(8β-ethoxy atractylenolide Ⅲ) | 276.41 | 35.95 | 0.21 | 白术 |
| 8 | MOL001928 | 芍药内酯苷(Albiflorin_qt) | 318.35 | 66.64 | 0.33 | 白芍 |
| 9 | MOL000296 | 常春藤皂苷元(Hederagenin) | 414.79 | 36.91 | 0.75 | 茯神 |
| 10 | MOL001522 | S-乌药碱(S-coclaurine) | 285.37 | 42.35 | 0.24 | 酸枣仁 |

3.2 对疾病和药物交集基因的分析 通过 GeneCards 综合数据库和 OMIM 综合数据库,共获得与失眠和焦虑相关的靶基因 3 381 个。R 软件将

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|-------|---------------------------|-------|
| MAPK3 | 上游 GGGAGGTGGAGGTGGTGAAGG | 100 |
| | 下游 GCTGAGCTGACCATGCCGTAC | |
| MAPK8 | 上游 TCTCAGCATCCGGTCTCTTCGC | 122 |
| | 下游 CTACAGCAGCCAGAGGTCCAG | |
| Akt1 | 上游 GGCAGGAGGAGGAGACGATGG | 109 |
| | 下游 TTCATGGTCACACGGTGCTTGG | |
| IL-6 | 上游 GGTGTTGCTGCTGCCCTTC | 134 |
| | 下游 AGATGCCGTCGAGGATGTACCG | |
| GAPDH | 上游 AGTTC AACGGCACAGTCAAGG | 121 |
| | 下游 ACATACTCAGCACCAGCATCAC | |

进行计算和分析数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对加味归脾汤活性成分和靶基因筛选的分析 在 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的条件下,在 TCMSP 数据库中,共筛选出槲皮素(quercetin),汉黄芩素(wogonin)以及大豆黄素(glycitein)等 228 个有效化合物成分,见表 2。筛选出前列腺素 G/H 合成酶 2 (PTGS2),丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8),RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt1) 等 235 个药物靶点基因。龙眼肉未在 TCMSP 和其他中药数据库中检索到,化合物成分和主要作用靶基因缺失。

疾病靶基因数据集和药物靶基因数据集进行比对,共得到包括基质金属蛋白酶 9 (MMP9),血管内皮生长因子 A (VEGFA),及白细胞介素-8 (IL-8) 在内

的181个药物和疾病交集基因,药物和疾病交集基因前10位,见表3。

表3 药物和疾病交集基因(前10)

Table 3 Intersection of drug genes and disease targets (top 10)

| 序列 | 基因 | 简称 |
|----|--|-------|
| 1 | 转录因子 AP-1(transcription factor AP-1) | JUN |
| 2 | 前列腺素 G/H 合成酶 2(Prostaglandin G/H synthase 2) | PTGS2 |
| 3 | 血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A) | VEGFA |
| 4 | 基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase 9) | MMP9 |
| 5 | 丝裂原活化蛋白激酶 3(mitogen-activated protein kinase 3) | MAPK3 |
| 6 | 丝裂原活化蛋白激酶 8(mitogen-activated protein kinase 8) | MAPK8 |
| 7 | 白细胞介素 -6(interleukin-6) | IL-6 |
| 8 | 白细胞介素 -8(interleukin-8) | IL-8 |
| 9 | 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3) | CASP3 |
| 10 | RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) | Akt1 |

3.3 对蛋白互作网络构建和核心基因筛选结果的分析 在 Kappa 评分设为 0.4 的条件下,181 个交集基因数据集经 STRING 11.0 软件分析,获得了基因之间的交互作用评分。经 Cytoscape_3.6.1 版本软件分析和 MCC 算法筛选,得到了交互作用评分在前 10 的基因,分别为 Akt1, VEGFA, PTGS2, MMP9, MAPK8, IL-8, 丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3), 转录因子 AP-1(JUN), 白细胞介素 -6(IL-6) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 各结点之间的交互作用及综合评分,见图 1,表 4。

3.4 对大鼠自发活动的影响 与空白组比较,模型组大鼠的活动次数、时间和路程显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,右佐匹克隆组、加味归脾汤中、高剂量组大鼠的活动次数、时间和路程显著降低($P <$

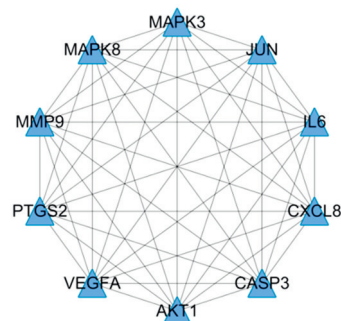


图1 10个核心基因交互网络图

Fig. 1 Interaction network diagram of 10 core genes

0.01), 加味归脾汤低剂量组相关指标差异无统计学意义;与右佐匹克隆组比较,加味归脾汤中、高剂量组大鼠的活动次数、时间和路程差异无统计学意义。见表 5。

表4 核心基因交互网络结点评分(前10)

Table 4 Core gene interaction network node scores (Top 10)

| 结点1 | 结点2 | 共表达 | 实验确定的相互作用 | 来自数据库 | 文本挖掘证据 | 综合评分/分 |
|-------|-----------|-------|-----------|-------|--------|--------|
| MAPK8 | JUN | 0 | 0.788 | 0.9 | 0.985 | 0.999 |
| JUN | MAPK3 | 0 | 0.402 | 0.9 | 0.929 | 0.995 |
| VEGFA | MMP9 | 0 | 0 | 0.8 | 0.946 | 0.989 |
| IL-6 | IL-8 | 0.581 | 0 | 0 | 0.966 | 0.985 |
| IL-6 | JUN | 0.053 | 0 | 0.9 | 0.850 | 0.984 |
| VEGFA | JUN | 0.066 | 0.261 | 0.9 | 0.794 | 0.983 |
| IL-6 | MAPK3 | 0 | 0 | 0.9 | 0.771 | 0.976 |
| JUN | IL-8 | 0.095 | 0.294 | 0.8 | 0.799 | 0.971 |
| Akt1 | Caspase-3 | 0.055 | 0.393 | 0 | 0.950 | 0.969 |
| VEGFA | Akt1 | 0.063 | 0.342 | 0 | 0.950 | 0.966 |

表5 加味归脾汤对大鼠自发活动的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of modified Guipitang on autonomous activities of rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | 活动次数 | 活动时间/s | 活动路程/cm |
|-------|--|-------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 空白 | - | 3.25±0.71 | 72.38±7.69 | 883.25±55.01 |
| 模型 | - | 7.88±1.24 ¹⁾ | 105.38±10.65 ¹⁾ | 1 254.63±73.05 ¹⁾ |
| 右佐匹克隆 | 0.000 2 | 4.13±0.83 ²⁾ | 78.38±7.25 ²⁾ | 890.37±60.57 ²⁾ |
| | 0.31 | 7.50±0.93 | 102.63±8.11 | 1 218.63±80.60 |
| 加味归脾汤 | 1.25 | 4.25±0.89 ²⁾ | 79.88±5.57 ²⁾ | 894.75±54.59 ²⁾ |
| | 5 | 3.63±0.74 ²⁾ | 76.63±6.70 ²⁾ | 890.88±52.27 ²⁾ |

注:与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01。

3.5 对大鼠海马组织中 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组中 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 mRNA 的表达显著升高(P<0.01)。与模型组比较,右佐匹克隆组以及加味归脾汤高、中剂量组均能显著降低 MAPK3,

MAPK8, Akt1 和 IL-6 mRNA 表达(P<0.01)。与右佐匹克隆组比较,加味归脾汤高、中剂量组对 MAPK3, MAPK8 和 IL-6 mRNA 表达差异无统计学意义,加味归脾汤高剂量组对 Akt1 mRNA 的表达高于右佐匹克隆组(P<0.05)。见表6。

表6 加味归脾汤对海马中 MAPK3, MAPK8, Akt1, IL-6 mRNA 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of modified Guipitang on mRNA levels of MAPK3, MAPK8, Akt1 and IL-6 in hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ | MAPK3 | MAPK8 | Akt1 | IL-6 |
|-------|--|-------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 模型 | - | 5.55±1.09 ¹⁾ | 4.51±0.61 ¹⁾ | 9.17±1.09 ¹⁾ | 15.19±1.25 ¹⁾ |
| 右佐匹克隆 | 0.000 2 | 1.14±0.15 ²⁾ | 2.08±0.48 ²⁾ | 0.92±0.07 ²⁾ | 0.89±0.22 ²⁾ |
| | 0.31 | 5.13±1.15 | 3.90±0.43 | 8.81±0.49 | 13.93±2.08 |
| 加味归脾汤 | 1.25 | 1.46±0.20 ²⁾ | 2.65±0.38 ²⁾ | 1.98±0.27 ²⁾ | 1.90±0.36 ²⁾ |
| | 5 | 2.09±0.13 ²⁾ | 2.71±0.25 ²⁾ | 3.38±1.73 ^{2,3)} | 2.96±0.07 ²⁾ |

注:设空白组 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 mRNA 相对表达为 1;与空白组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.01;与右佐匹克隆组比较³⁾P<0.05。

4 讨论

阴火是指由于饮食劳倦,思虑伤脾导致的脾胃虚弱、气血阴阳不足、脏腑功能失调、阳气浮动,气火失调的一种致病性火邪^[11]。阴火失眠的发生以脾胃虚衰、元气耗损及阴火扰心为基础,以入睡困难,胡思乱想,梦多,急躁易怒,肢体沉重,四肢不收,怠惰嗜卧,气短,纳差,精神衰少等为主要临床表现^[12-13]。形体不足和脾胃消化吸收功能障碍是阴火失眠定型和区别其它类型失眠的主要特征。阴火失眠,常见于平素学习、生活、工作压力较大者。《黄帝内经》云:“思者气结,思虑伤脾”。患者长期处于紧张状态,致使思虑多重而伤脾,脾虚不足,阴火承之,则心神不安而难寐。周慎斋《慎斋遗书》亦云:“凡读书人……汗出不睡……病虽不一,要之皆发于心脾”。在治疗上,李东垣根据《黄帝内经》“劳者温之”“损者益之”的原则,提出甘温除大热,创制补中益气汤等。并谆谆告诫:“内伤不足之病,苟勿认作外感有余之病,而反泻之,则虚其虚也……惟

当以甘温之剂,补其中升其阳,甘寒以泻其火则愈……”。周慎斋则云:“盖思虑多则心火乘脾,君不主令,相火用事,倘不清其源,正其本,阳气愈陷,病气愈盛,归脾汤之类,是为对证”。因此,阴火失眠伴焦虑患者,应主以甘温之剂升阳益脾安神,次以甘寒之剂疏肝泻火。肝为将军之官,在志为怒,喜调达,焦虑症患者临床表现为失眠,急躁易怒,纳差不食,神疲倦怠,大便不调等症,与中医肝木太盛而克脾土的病理机制在某种程度上相符合。

加味归脾汤是由经典名方归脾汤、小柴胡汤和逍遥散三方加减化裁而来。方中茯神、白术甘温补脾胃之不足,二者共为君药。当归、白芍滋阴柔肝而养血安神,酸枣仁、龙眼肉之甘温酸苦补心安神,柴胡味辛、苦,性微寒,入心、肝、脾三经,疏肝经之郁热,散胆经之火邪,黄芩味苦,性寒,归肺、胆、脾经,清肝胆之郁热,以上共为臣药。栀子苦寒,入心、三焦经,清泻三焦之郁火,导心经之热下行,从小便而出,枸杞子味甘,性平,入肝肾经,补肝肾之

阴,以济心阴,以上共为佐药。甘草补中益气,调和诸药。诸药合用,共奏疏肝清热、养心健脾安神之功效。本方配伍特色,甘温为主,补脾生血养心,苦寒为次,疏肝清热安神,心、肝、脾三脏与神、魂、魄三神共调。

本实验共从加味归脾汤中筛选出 quercetin, wogonin, kanzonols W 等 228 种化合物成分,这些化合物主要影响了 MAPK3, MAPK8, Akt1 等基因。药物的 PPI 网络分析显示 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 各结点的综合评分高于 0.966,说明各结点之间的交互作用存在密切关系。动物实验表明,加味归脾汤高、中剂量组均能显著改善造模后大鼠的焦虑、躁动症状,降低其兴奋性,并抑制了 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 mRNA 的表达,而低剂量均未见明显影响,说明本方存在一定的剂量差异。同时,加味归脾汤高、中剂量组和右佐匹克隆组对 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 mRNA 没有明显差异,说明加味归脾汤和右佐匹克隆片在治疗失眠大鼠方面有相近的功效。

MAPK3 和 MAPK8 是 MAP 激酶信号转导途径的重要组成部分,在细胞外刺激引起的细胞反应级联中起重要作用^[14-15]。慢性神经病理性疼痛与焦虑和抑郁样疾病有关,坐骨神经慢性收缩引起的神经性疼痛的 c57bl6 小鼠中,MAPK 表达明显升高,而给予磺胺治疗,则能明显降低 MAPK 的表达^[16]。NAKATANI 等^[17]研究指出,阿尔兹海默症伴失眠及焦虑患者血清中,常伴随 MAPK 表达的升高,而当失眠及焦虑症状缓解后,MAPK 的表达也随之降低。Akt1 参与调节包括代谢、增殖、生长和血管的生成等过程^[18]。YANG 等^[19]对 461 名中国汉族抑郁症患者血清中的 Akt1 基因进行观察,发现 Akt1 多态性与抑郁症的严重程度、焦虑症状有明显相关。IL-6 具有多种生物学功能的细胞因子,是急性期反应的有效诱导剂。NIRAULA 等^[20]研究表明大鼠体循环当中的 IL-6 浓度升高,会引起焦虑等神经行为症状的发生,且伴随 MMP9 信号的增强。焦虑严重程度与睡眠质量存在明显的正相关,焦虑易引起失眠,失眠久治不愈亦常合并焦虑症状。对于失眠伴焦虑患者,当睡眠或焦虑状态的其中一方得到改善,另一方也会随之得到缓解^[21]。焦虑患者的 Akt1, MAPK3, MAPK8 和 IL-6 基因表达常明显升高,但这些基因表达的变化在失眠患者当中尚缺乏独立的试验观察。对于失眠伴焦虑患者, Akt1, MAPK3, MAPK8 和 IL-6 等与焦虑相关基因的降低,

是否会引起睡眠质量的改善亦缺乏深入的研究。在陌生封闭环境当中,大鼠的活动的频率、时间和路程的增加被认为是焦虑样行为的行为学标记之一^[22]。本次实验显示,加味归脾汤能显著下降大鼠的活动的频率、时间和路程,且下调了失眠伴焦虑大鼠的 Akt1, MAPK3, MAPK8 和 IL-6 的表达,这也从基因层面说明了本方治疗失眠的作用机制可能与对焦虑相关基因的抑制有关。焦虑症引起失眠,阴火亦引起失眠的发生,二者的临床表现都有心烦急躁易怒,纳差,疲倦无力等,因此,焦虑与阴火是否存在一定的相关性,还需要进一步论证。

综上所述,本研究通过中药网络药理学分析技术,筛选出了加味归脾汤抗阴火失眠伴焦虑的主要有效化合物成分及核心靶基因,并通过动物实验验证,表明加味归脾汤抗阴火失眠伴焦虑的作用机制可能与对 MAPK3, MAPK8, Akt1 和 IL-6 等与焦虑相关基因的调节有关。

[参考文献]

- [1] JANSEN R P, WATANABE K, STRINGER S, et al. Genome-wide analysis of insomnia in 1, 331, 010 individuals identifies new risk loci and functional pathways[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(3):394-403.
- [2] ZHENG W, LUO X N, LI H Y, et al. Regional differences in the risk of insomnia symptoms among patients from general hospital outpatient clinics [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2018, doi: 10.2147/NDT.S184216.
- [3] MIKOLAJEWSKI A J, SCHEERINGA M S, WEEMS C F. Evaluating diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition posttraumatic stress disorder diagnostic criteria in older children and adolescents [J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2017, 27(4):374-382.
- [4] BAXTER A J, SCOTT K M, VOS T, et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression[J]. *Psychol Med*, 2013, 43(5): 897-910.
- [5] NÉMETH G, LASZLOVSZKY I, CZOBOR P, et al. Cariprazine versus risperidone monotherapy for treatment of predominant negative symptoms in patients with schizophrenia: a randomised, double-blind, controlled trial[J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1103-1113.
- [6] SMITH M T, MCCRAE C S, CHEUNG J, et al. Use of actigraphy for the evaluation of sleep disorders and

- circadian rhythm sleep-wake disorders: an American academy of sleep medicine clinical practice guideline [J]. *J Clin Sleep Med*, 2018, 14(7): 1231-1237.
- [7] 谢光璟,黄攀攀,王平. 天王补心丹加减改善PCPA失眠大鼠Trx系统氧化损伤的机制探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 32-38.
- [8] 蔡艳,叶玉妹,张涛,等. 桂枝甘草龙骨牡蛎汤加减治疗阴虚火旺型更年期失眠疗效及对患者睡眠质量、神经递质的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9): 38-42.
- [9] 刘贯华,闫东艳,张怀亮. 张怀亮应用三调汤、四调汤经验[J]. *中国民间疗法*, 2018, 26(12): 50-51.
- [10] 秦合伟,张怀亮. 张怀亮教授论治失眠的思想探析[J]. *光明中医*, 2010, 25(1): 13-14.
- [11] 王永涛,张怀亮. 相火、阴火、龙雷之火、浮游之火统一论[J]. *国医论坛*, 2019, 34(4): 10-11.
- [12] 魏砚君,卞宏生,叶晓楠,等. 睡眠剥夺动物模型及其在中医药改善睡眠研究中的应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(10): 227-234.
- [13] 陈裕曦. 《脾胃论》中失眠病机治则浅析[J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(18): 35-36.
- [14] HUI L, BAKIRI L, MAIRHORFER A, et al. P38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway [J]. *Nat Genet*, 2007, 39(6): 741-749.
- [15] FAN H Y, LIU Z, SHIMADA M, et al. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility [J]. *Science*, 2009, 324 (5929) : 938-941.
- [16] XU P, ZHANG G, HOU S, et al. MAPK8 mediates resistance to temozolomide and apoptosis of glioblastoma cells through MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.084.
- [17] NAKATANI Y, AMANO T, YAMAMOTO H, et al. Yokukansan enhances the proliferation of B65 neuroblastoma [J]. *J Tradit Complement Med*, 2017, 7(1): 34-44.
- [18] BRASTIANOS P K, HOROWITZ P M, SANTAGATA S, et al. Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and Akt1 mutations [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(3): 285-289.
- [19] YANG C, SUN N, REN Y, et al. Association between Akt1 gene polymorphisms and depressive symptoms in the Chinese Han population with major depressive disorder [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(3): 235-239.
- [20] NIRLAULA A, WITCHER K G, SHERIDAN J F, et al. Interleukin-6 induced by social stress promotes a unique transcriptional signature in the monocytes that facilitate anxiety [J]. *Biol Psychiatry*, 2019, 85(8) : 679-689.
- [21] VIEIRA F, BACHION M M, COELLO A S, et al. The use of NANDA's Taxonomy II for assessing puerperal anxiety within a community [J]. *Revista Gaucha de Enfermagem*, 2010, 31(3): 544-551.
- [22] VOLLERT C, ZAGAAR M, HOVATTA I, et al. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 224(2) : 233-240.

[责任编辑 张丰丰]