

基于网络药理学及实验验证探究桂枝加龙骨牡蛎汤 治疗失眠的作用机制

易 顺^{1,2,3}, 魏桃荣^{1,2}, 张文耀^{1,2,3},
张小军^{1,2,3}, 刘建鑫⁴, 王立平^{1,2*}, 巩子汉^{1,2*}

¹宁夏回族自治区中医医院(宁夏回族自治区中医研究院);²宁夏医科大学附属自治区中医医院, 银川 750021;

³宁夏医科大学中医学院, 银川 750004; ⁴山东第二医科大学, 潍坊 261000

摘要: 基于网络药理学、分子对接及实验验证探究桂枝加龙骨牡蛎汤 (Guizhi Jia Longgu Muli Decoction, GLMD) 治疗失眠的作用机制。基于 TCSP 和 BATMAN-TCM 等数据库筛选 GLMD 治疗失眠的潜在靶点, 对核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 通过分子对接和动力学模拟评估活性成分和靶点的结合能力。采用复合多平台水环境法 (modified multiple platform water environment, MMPE) 诱导失眠, 利用 ELISA 和 Western blot 等实验验证 GLMD 对失眠的治疗作用。拓扑分析显示白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 等核心靶点与失眠病理机制密切相关, 槲皮素、山柰酚等关键成分通过调控 TNF、磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/AKT 等信号通路实现抗炎效应。分子对接表明, 活性成分与靶点的结合能均小于 -5.0 kcal/mol, 分子动力学模拟进一步证实其结合稳定性。基于 MMPE 模型的体内实验表明, GLMD 可显著改善焦虑样行为, 抑制血清促炎细胞因子 (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) 及海马谷氨酸 (glutamate, Glu) 水平的升高。此外, GLMD 能够恢复 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 阳性表达, 抑制海马区离子化钙结合衔接分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA-1) 和胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的阳性表达, 并上调磷酸化 PI3K 和 AKT 的蛋白表达。综上所述, GLMD 可能通过调控 PI3K/AKT 信号通路并抑制神经炎症, 从而发挥镇静及神经保护作用。

关键词: 桂枝加龙骨牡蛎汤; 失眠; 神经炎症; PI3K/AKT 信号通路; 网络药理学

中图分类号: R256.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)9-2008-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.9.015

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.9.015

Mechanism of Guizhi Jia Longgu Muli Decoction in treating insomnia based on network pharmacology and experimental verification

YI Shun^{1,2,3}, WEI Tao-rong^{1,2}, ZHANG Wen-yao^{1,2,3},
ZHANG Xiao-jun^{1,2,3}, LIU Jian-xin⁴, WANG Li-ping^{1,2*}, GONG Zi-han^{1,2*}

¹Ningxia Hui Autonomous Region Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Hui

Autonomous Region Academy of Traditional Chinese Medicine; ²Ningxia Autonomous Region Traditional Chinese

Medicine Hospital Affiliated to Ningxia Medical University, Yinchuan 750021, China; ³School of Traditional Chinese

Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; ⁴Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China

Abstract: This study aims to investigate the mechanism of Guizhi Jia Longgu Muli Decoction (GLMD) in treating insomnia by integrating network pharmacology, molecular docking, and experimental validation. Potential targets of GLMD against insomnia were screened using databases including TCSP and BATMAN-TCM, followed by GO and KEGG enrichment analyses of core targets. Binding affinities between active constituents and targets were evaluated via molecular docking and molecular dynamics (MD) simulations. Insomnia was induced using a modified multiple platform water environment (MMPE) model, and the

收稿日期: 2025-12-16 接受日期: 2026-06-08

基金项目: 宁夏回族自治区卫生健康自主创新项目 (2024-NWZC-B014); 宁夏回族自治区自然科学基金 (2024AAC03727); 宁夏回族自治区重点研发计划 (2025BEG02009, 2025BEH04134)

* 通信作者 E-mail: nx_wanglp@163.com, gzh0414@163.com

therapeutic effects of GLMD were validated through experimental assays, including ELISA and Western blot. Topological analysis revealed that core targets, such as interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, serine/threonine kinase 1 (AKT1), and tumor necrosis factor (TNF), are closely linked to the pathological mechanisms of insomnia. Key components, such as quercetin and kaempferol, exert anti-inflammatory effects by modulating signaling pathways, including TNF and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT. Molecular docking indicated that the binding energies of active constituents to these targets were consistently below -5.0 kcal/mol, with binding stability further confirmed by MD simulations. *In vivo* experiments based on the MMPE model demonstrated that GLMD significantly attenuated anxiety-like behaviors and suppressed the elevation of serum pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and TNF- α) and hippocampal glutamate (Glu) levels. Furthermore, GLMD restored the positive expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT), inhibited the positive expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the hippocampus, and upregulated the protein expression of phosphorylated PI3K and AKT. In conclusion, GLMD likely exerts sedative and neuroprotective effects by modulating the PI3K/AKT signaling pathway and inhibiting neuroinflammation.

Key words: Guizhi Jia Longgu Muli Decoction; insomnia; neuroinflammation; PI3K/AKT signaling pathway; network pharmacology

失眠作为一种以入睡困难、睡眠维持障碍及睡眠质量下降为特征的慢性疾病,其与神经炎症的病理关联正成为睡眠医学研究的前沿领域。我国已成为全球失眠高发地区,2024年《中国居民睡眠健康白皮书》数据显示,全国失眠患病率高达59.8%,且呈现显著的年龄和疾病双重特征-中青年群体及慢性病患者的失眠发生率较普通人群高出37%~52%^[1]。现有药物主要通过作用于 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)能系统实现短期镇静效应,但难以干预神经炎症驱动因素,导致长期疗效衰减及依赖性风险上升^[2]。因此,探索既能靶向炎症通路,又能恢复睡眠稳态的新型治疗策略,成为当前研究的迫切需求。

桂枝加龙骨牡蛎汤(Guizhi Jia Longgu Muli Decoction, GLMD)出自《金匱要略·血痹虚劳病篇》,其组方以桂枝汤调和营卫为基础,加入龙骨、牡蛎以“镇潜安神”,体现了“调和营卫、潜阳敛阴”的治疗思想。现代研究表明,该方剂能显著改善不寐模型大鼠的睡眠结构,增加快速眼动睡眠比例,并调节血清及脑组织中5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平^[3]。但其具体分子机制,尤其是在调控神经炎症这一核心病理环节中的分子靶点,仍需深入阐明。近年来,神经炎症被认为是促进失眠发生发展的重要机制^[4],其相关炎症标志物如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、C反应蛋白(c-reactive protein, CRP)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)在失眠患者中水平异常^[5]。同时,小胶质细胞作为中枢神经系统的主要免疫细胞,其异常活化及介导的神经炎症在失眠病理过程中扮演关键角

色^[6]。Wang等^[7]研究表明,睡眠剥夺会通过激活海马小胶质细胞引发神经炎症、抑制磷酸肌醇3激酶/丝氨酸/苏氨酸激酶(phosphoinositide 3-kinase/serine/threonine kinase, PI3K/AKT)信号通路、减少海马神经发生,最终导致小鼠认知功能下降。这提示调控神经炎症可能是中药复方起效的重要途径。本研究采用网络药理学与分子对接技术,系统探究GLMD治疗失眠的现代药理学机制,并通过ELISA、免疫荧光及Western blot等实验深入阐明其作用机制,旨在为GLMD治疗失眠的潜在作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

78只SPF级健康雄性小鼠,8周龄,体质量20 $\pm$ 2 g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司(许可证号:SCXK(豫)2020-0005),饲养于山东第二医科大学SPF级动物实验中心,动物房内光照周期为12 h/12 h,温度22~25 $^{\circ}$ C,相对湿度60%,动物在适应性饲养7 d后进行实验。本实验经山东第二医科大学医学伦理委员会批准(伦理批件号:2025SDL793)。

1.2 药物与试剂

GLMD药物组成:桂枝9 g,白芍9 g,甘草6 g,生姜9 g,大枣9 g,牡蛎9 g,龙骨9 g组成,由宁夏回族自治区中医医院中药房提供。

艾司唑仑片(1 mg/片,批号:H32020699,常州四药制药有限公司);甲苯胺蓝染色液、苏木素伊红染色液(批号G1012、G1401,武汉赛维尔生物科技有限公司);IL-6、IL-1 β 、TNF- α 检测试剂盒(批号:

YJ063159、YJ106733、YJ002095A,上海源桔生物科技有限公司);谷氨酸(glutamate, Glu)检测试剂盒(批号:GLU-W96-N(1620),上海酶联生物科技有限公司);离子化钙结合衔接分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, IBA-1)抗体、胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、5-HT抗体、CY3标记山羊抗兔IgG抗体、牛血清白蛋白(批号:GB113502、GB11096、GB114285、GB21303、GC305010,武汉赛维尔生物科技有限公司);3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody, GAPDH)抗体、AKT抗体、磷酸化AKT(p-AKT)抗体、PI3K抗体、磷酸化PI3K(p-PI3K)抗体(批号:ab128915、ab182729、ab38449、ab302958、ab278545,英国Abcam Plc公司);山羊抗兔IgG抗体(批号:042-206,普诺森生物科技有限公司);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(批号:P1200,北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 仪器

IC10040015102501蛋白免疫印迹电泳设备(武汉赛维尔生物科技有限公司);NIKON ECLIPSE C1正置荧光生物显微镜(日本尼康公司);C300凝胶成像与分析系统(美国Azure Biosystems公司);SuperMax 3100全波长酶标仪(美国PerkinElmer股份有限公司);2-16KL圆周脱色摇床(德国Sigma公司)。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 获取GLMD的活性成分和作用靶点

通过TCMSP数据库(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)和BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/bat-man-tcm>)获取GLMD的成分,设定筛选标准为口服生物利用度(oral bioavailability, $OB \geq 30\%$)和类药性(drug-likeness, $DL \geq 0.18$),筛选出符合药代动力学特性的有效成分。整合2个数据库中涉及的所有活性成分和相应靶点,利用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)对预测靶点进行功能验证,并统一靶点名称为基因符号。

1.4.2 筛选失眠的疾病靶点

通过GeneCards数据库(<https://www.genecards.org>)和OMIM数据库(<https://www.omim.org>)分别进行检索。以“Insomnia”为关键词在2个数据库中独立搜索,获取与失眠相关的靶点列表。整合2个数据库中的基因并去除重复值来获得疾病相关靶点。

1.4.3 筛选GLMD与失眠的交集靶点

将GLMD的作用靶点与失眠相关靶点数据导入Gene Denovo在线分析平台(<https://www.omicshare.com>),筛选药物与疾病的交集靶点,获得GLMD治疗失眠的潜在作用靶点。

1.4.4 构建GLMD治疗失眠的药物-活性成分-靶点可视化网络图

利用Cytoscape 3.9.1软件和CytoNCA插件构建了药物-活性成分-靶点三维网络模型,以筛选GLMD治疗失眠的核心活性成分。研究采用节点度值作为核心评价指标,该数值与节点连接边的数量呈正相关关系。节点度值越高,表明该成分或靶点在网络调控中发挥的作用越关键。

1.4.5 GLMD治疗失眠核心靶点的拓扑分析

将筛选出的交集靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org>),构建蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。将结果导入Cytoscape 3.9.1软件,使用CytoNCA插件进行2次分析,基于节点中心性指标评估靶点的重要性^[8]。结合网络拓扑结构,筛选出节点度值排名靠前的核心靶点,绘制核心网络图,以明确GLMD调控失眠的关键靶点。

1.4.6 GO分析和KEGG通路富集分析

基于筛选获得的核心靶点,本研究整合DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)与R语言环境进行GO及KEGG通路富集分析。在R分析流程中,通过clusterProfiler、org.Hs.eg.db及enrichplot等生物信息学包,将靶点基因Symbol统一转换为Entrez ID格式。GO富集分析采用enrichGO函数,同步评估生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)3个功能维度,显著性阈值设定为 $P < 0.05$ 。KEGG通路分析通过enrichKEGG函数实现,采用相同显著性阈值。富集结果通过ggplot2包生成条形图与气泡图进行可视化;关键通路的基因表达映射则利用pathview包将差异表达数据整合至KEGG参考通路图谱中。

1.4.7 分子对接

将GLMD作用于失眠的核心成分与其核心靶点进行分子对接。通过Protein Data Bank(<https://www.rcsb.org>)和PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获取核心靶点及活性成分的3D构象文件。利用AutoDock Tools 1.2.0进行

分子对接,对接计算采用 AutoDock Vina 1.2.0,进行 10 次独立对接运行,结合能以 kcal/mol 为单位量化配体-靶点结合亲和力。结果通过 PyMOL 2.5.0 进行可视化呈现。

1.4.8 分子动力学模拟

模拟基于 GROMACS 20.6 平台,其中蛋白质采用 CHARMM36 力场^[9],小分子配体通过 GAFF2 参数化。体系采用 TIP3P 水模型进行溶剂化,并添加 Na^+/Cl^- 离子以中和电荷。经过标准的能量最小化和 NVT/NPT 平衡后,在 310 K、1 atm 条件下进行了 100 ns 的无约束模拟^[10]。轨迹分析包括:均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)、回转半径 (radius of gyration, Rg)、氢键 (hydrogen bond, H-bond) 动态分析以及 MMGBSA 计算蛋白质与配体间的结合自由能 (ΔG),从而全面评估复合物的构象稳定性与结合强度。

1.5 动物实验验证

1.5.1 实验分组及模型制备

将 78 只 SPF 级健康雄性小鼠随机分为造模组 ($n = 66$) 与空白 (control, Con) 组 ($n = 12$),在适应性饲养后 3 d 后对造模组小鼠采用复合多平台水环境法进行适应性睡眠剥夺,每日睡眠剥夺 3 h,连续 3 d。睡眠剥夺期间小鼠自由摄食饮水,可在平台间自由活动。Con 组小鼠放入家笼中进行正常饲养,确保有充足的睡眠条件。实验开始后,将小鼠放入 330 mm × 215 mm × 170 mm 的睡眠剥夺箱中,箱内放置 16 个直径 6 cm 的平台。向箱内注水,保持水面低于平台 2 cm;当小鼠进入睡眠状态时,肌张力下降,掉落平台进入水环境而惊醒,从而实现睡眠剥夺。造模期间于每日下午 13:00 给药,当日 18:00 至次日 14:00 放入箱内睡眠剥夺,每日睡眠剥夺 20 h,连续 4 周。研究表明^[11],失眠模型小鼠存在焦虑样行为和自主活动亢进,这是失眠模型常见的神经行为学表现。本研究中,Mod 组小鼠在旷场实验中表现出总运动距离显著增加、中央区停留时间显著缩短,与 Yan 等^[12]建立的小鼠失眠模型表现一致,提示小鼠失眠模型制备成功。此过程中有 72 只小鼠造模成功,另外 6 只小鼠死亡,模型成功率为 92.30%。模型制备成功后将造模组随机分为模型 (model, Mod) 组、高剂量 (high-dose GLMD, GLMD-H) 组、中剂量 (medium-dose GLMD, GLMD-M) 组、低剂量 (low-dose GLMD, GLMD-L) 组、艾司唑仑 (es-tazolam, Est) 组。

1.5.2 实验给药及取材

本研究中 GLMD 临床等效剂量参考《金匮要略》原方折算。根据体表面积法,小鼠的临床等效剂量约为 7.5 g/kg。GLMD-L、GLMD-M、GLMD-H 分别灌胃 3.75、7.5、15.0 g/kg;艾司唑仑阳性对照药剂量 0.125 mg/kg,研究发现^[13]该剂量在小鼠失眠模型中具有较好镇静催眠效果,适合作为阳性对照。所有干预组均在每日下午 13:00 灌胃给药,每日 1 次,持续 28 d。Mod 组和 Con 组给予等体积的生理盐水。末次给药后 12 h,1% 戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg 麻醉处死小鼠,小鼠眼眶采血 0.5 mL,离心收集血清。冰上取脑并分为两部分,一部分液氮速冻后贮存于 -80 ℃,另一部分 4% 多聚甲醛固定。

1.5.3 旷场实验评估各组小鼠的自主探索行为

小鼠移至实验场所后,置于可控的环境中适应 1 h。实验期间维持环境安静,按分组依次将小鼠背向操作者放置于旷场箱 (40 cm × 40 cm × 35 cm) 中心区域 (20 cm × 20 cm)。通过 TopScan 2.0 软件实时记录 5 min 内的总运动轨迹长度及中央区停留时间。每只动物实验结束后,立即清理排泄物并用 75% 乙醇喷雾彻底擦拭箱体表面,确保实验环境无交叉污染。

1.5.4 ELISA 法测定各组小鼠血清和海马组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、Glu 的水平

眼眶取血后 13 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min,取上层血清,依据 ELISA 试剂盒说明书步骤测定各组小鼠血清和海马组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 Glu 的水平。

1.5.5 免疫荧光法检测各组小鼠海马组织中 IBA-1、GFAP 蛋白及 5-HT 的表达水平

小鼠灌注后取全脑,经 4% 多聚甲醛固定、蔗糖溶液脱水、包埋后冰冻切片。PBS 漂洗,以 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性 30 min。10% 山羊血清封闭,IBA-1 (1:1 000)、5-HT (1:500)、GFAP (1:500),一抗 4 ℃ 避光孵育过夜。CY3 标记的山羊抗兔二抗 (1:500) 室温避光孵育 1 h。DAPI 复染 10 min 后抗荧光淬灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下采集图像,进行阳性细胞计数。

1.5.6 Western blot 法检测各组小鼠海马组织中 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 的蛋白表达水平

取 100 mg 脑组织,组织裂解液抽提法提取总蛋白,通过 BCA 法测定蛋白浓度。将蛋白样品与 4 × 蛋白上样缓冲液按比例混合后,于沸水浴中煮沸 10

min 完成蛋白变性。经垂直电泳分离后,采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜。室温下以 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,依次加入以下一抗(稀释比例):AKT(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-AKT(1:1 000)、p-PI3K(1:2 000)及 GAPDH(1:5 000),4 ℃ 孵育过夜。随后加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,使用 ECL 化学发光法显影。利用 ImageJ 1.53 软件分析条带平均灰度值,以 GAPDH 为内参,计算 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 蛋白水平。

1.6 统计学方法

数据处理与统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件完成。所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;多组间比较采用单因素方差分析,两组独立样本间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 判定差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 GLMD 的活性成分及作用靶点

通过 TCMSP 及 BATMAN-TCM 数据库系统检索,最终确定 GLMD 的主要活性成分共 132 个,其中桂枝 6 个、白芍 8 个、生姜 4 个、大枣 19 个、甘草 88 个、龙骨 2 个、牡蛎 5 个。利用 UniProt 数据库对预测靶点进行标准化处理,去除重复值,最终获得 315 个靶点。

2.1.2 GLMD 治疗失眠的交集靶点

GeneCards 数据库和 OMIM 数据库系统检索与

失眠相关的靶点蛋白。对两组数据进行去重处理,合并后获得 1 023 个非冗余失眠相关疾病靶点。将上述失眠靶点与 GLMD 活性成分预测的潜在靶点进行交集运算,最终筛选出 97 个共有靶点。利用 Venny 2.1 在线工具绘制韦恩图(见图 1)。

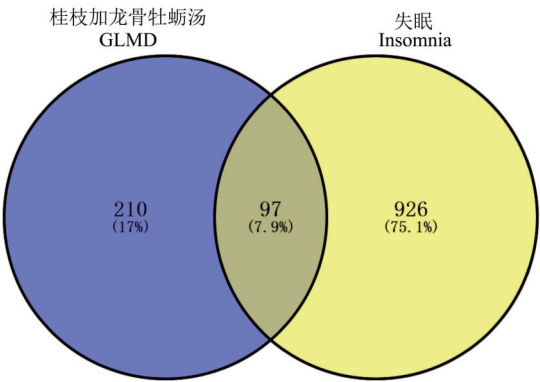


图1 GLMD 和失眠的交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of overlapping targets between GLMD and insomnia

2.1.3 GLMD 治疗失眠的药物-活性成分-靶点网络图

通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建了药物-活性成分-靶点三维网络模型,以可视化 GLMD 的成分-靶点相互作用网络图(见图 2)。该模型基于节点度中心性进行拓扑分析,数值越高表明该节点在调控网络中的连接重要性越显著。其中槲皮素的度值最高,显著高于其他成分,提示其可能在 GLMD 干预失眠的病理过程中可能发挥核心调控作用。

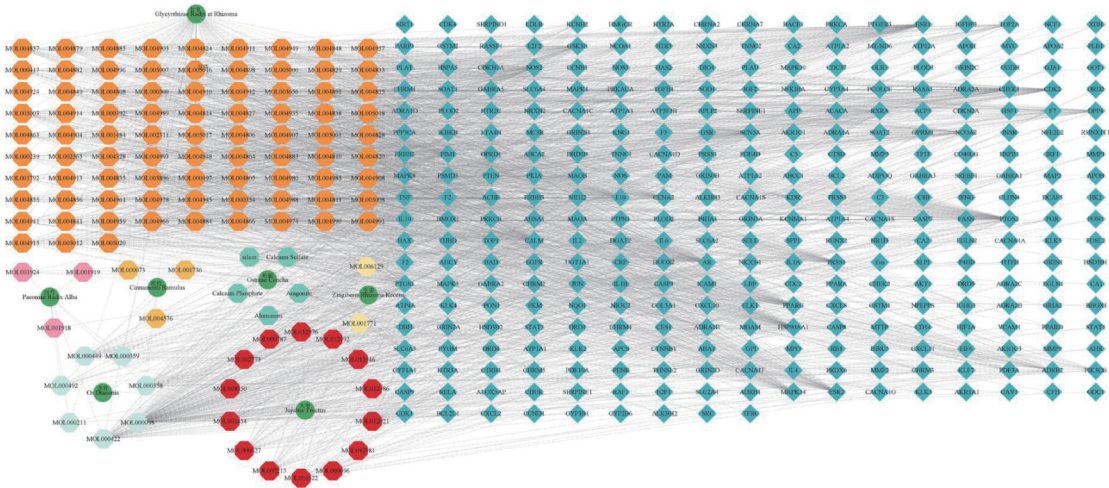


图2 药物-活性成分-靶点网络图

Fig. 2 Drug-active ingredient-target network

注:图中绿色节点分别代表桂枝、甘草、白芍、牡蛎、龙骨、大枣、生姜。Note:The green nodes in the figure represent Cinnamomi Ramulus, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Paeoniae Radix Alba, Ostreae Concha, Os Draconis, Jujubae Fructus, and Zingiberis Rhizoma Recens, respectively.

2.1.4 GLMD 治疗失眠的核心靶点网络图

基于 STRING 数据库构建失眠相关靶点的 PPI 网络,将数据导入 Cytoscape 3.9.1 平台进行可视化与拓扑分析(见图3)。利用 CytoNCA 插件系统计算节点度值、介数中心性及紧密中心性等拓扑参数,其中度值作为核心筛选指标。网络可视化中,节点尺寸与颜色深浅依据度值进行梯度映射。综合拓扑分析,AKT1 展现出高度值及显著的中心性特征,确定为核心枢纽靶点。依据药物-活性成分-靶点相互作用网络,筛选出与 AKT1 存在直接连接的核心活性成分,开展分子对接验证以评估其结合可行性。

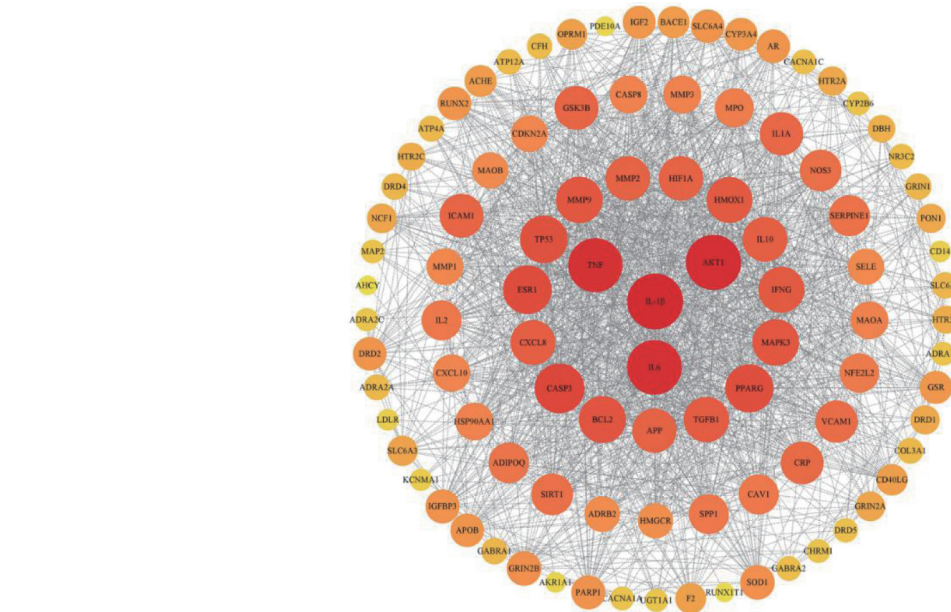


图3 GLMD 治疗失眠的核心靶点网络图

Fig.3 Core target network of GLMD for insomnia

2.1.5 GO 和 KEGG 富集分析

GO 分析结果显示,生物过程 (biological process,BP)上,靶点显著富集于对异生物质刺激的反应、凋亡信号通路的调控以及膜电位的调控等过程。细胞组分 (cellular component,CC)上,靶蛋白主要定位于突触后膜和突触膜等结构。分子功能 (molecular function,MF)上,靶点显著参与神经递质受体活性、细胞因子活性以及细胞因子受体结合等功能。分别选取前10个显著条目,按*P*值由小到大排序,绘制 GO 分析的 BP、CC、MF 柱状图(见图4A)。

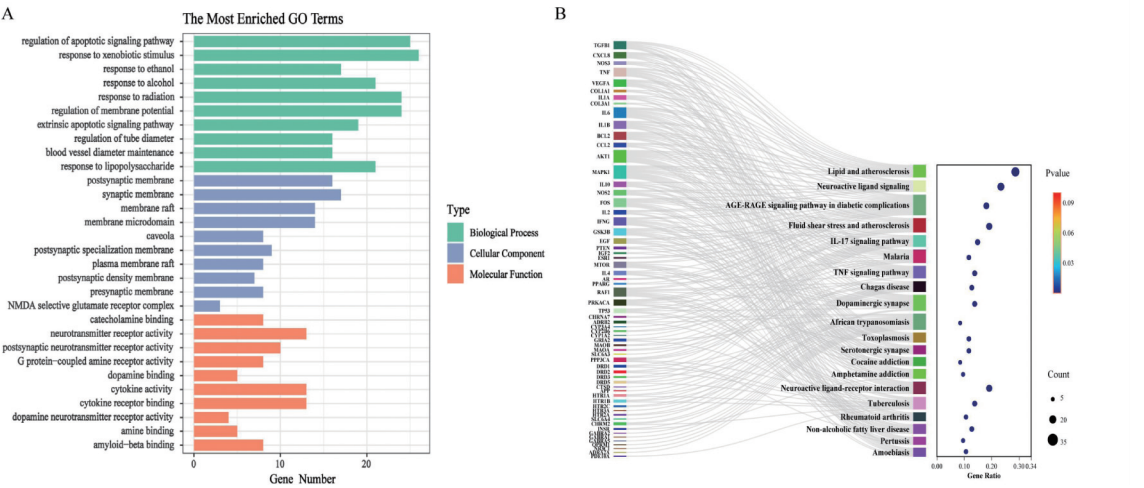


图4 核心靶点的 GO 功能(A)和 KEGG 通路(B)富集分析

Fig.4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of core targets

KEGG 分析结果显示,靶点主要富集在糖尿病并发症中高糖基化终产物-高糖基化终产物受体信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、IL-17 信号通路及 TNF 信号通路等。选取排名前 20 的通路,由 *P* 值进行排序,绘制桑基气泡图(见图 4B)。

2.1.6 分子对接结果分析

利用 AutoDock Tools 1.5.6 与 AutoDock Vina 1.1.2 软件,对核心靶点 AKT1 (PDB ID:4GV1) 与其在相互作用网络中直接关联的 4 个核心活性成分槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、柚皮素 (naringenin)、异鼠李素 (isorhamnetin) 进行分子对接。

结果显示,各成分与 AKT1 的结合自由能分别为 -7.5、-7.5、-7.1 和 -6.9 kcal/mol。结合自由能作为评价配体-受体相互作用稳定性的关键热力学参数,其负值表明结合过程符合自发反应($\Delta G < 0$);依据文献标准^[14], $\Delta G \leq -5.0$ kcal/mol 提示具有较好结合活性, $\Delta G \leq -7.0$ kcal/mol 则表征强结合潜力。本研究中槲皮素与山柰酚达到 -7.5 kcal/mol,符合强结合活性阈值,证实活性成分与 AKT1 具有较强结合稳定性。通过 PyMOL 对关键对接构象进行可视化(见图 5)。该结果为 GLMD 通过调控 AKT1 介导的 PI3K/AKT 信号通路改善失眠的分子机制提供了实验依据。

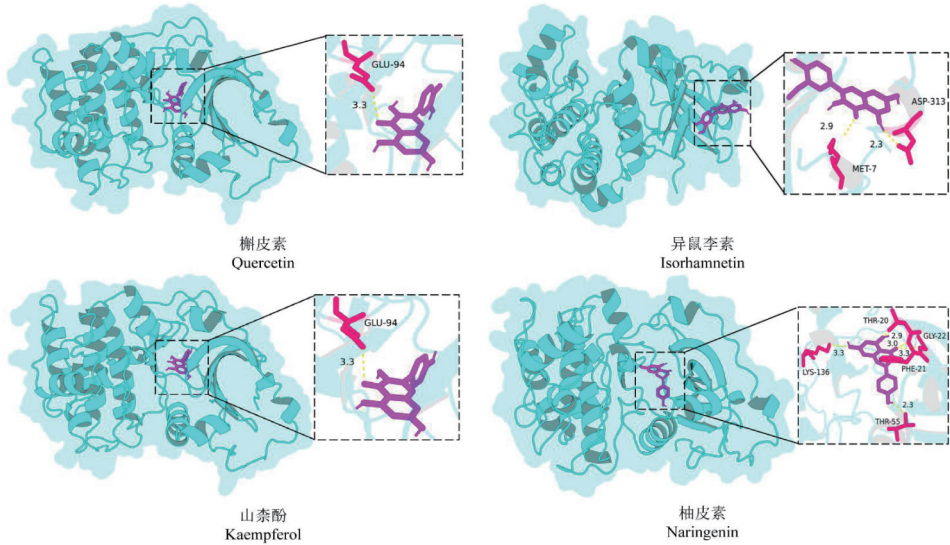


图 5 GLMD 核心活性成分与 AKT1 的分子对接图

Fig. 5 Molecular docking of GLMD core active ingredients with AKT1

2.1.7 分子动力学模拟结果分析

本研究通过分子动力学模拟系统评估 GLMD 活性成分与靶蛋白复合物的稳定性,并结合以下参数进行定量分析 RMSD 用于表征复合物在模拟过程中的构象稳定性,其波动范围越小表明体系结构越稳定(见图 6);Rg 反映复合物整体构象的紧凑性,数值越小表示体系维持紧密结构(见图 7);H-bond 则表征蛋白质-配体间氢键的动态稳定性,持续较高的氢键数量表明结合界面存在强相互作用(见图 8)。通过 GROMACS 软件计算复合物的吉布斯自由能,并基于 RMSD、Rg 及自由能数据绘制自由能景观图(见图 9)。该图若出现多个能量最小值簇,表明复合物存在构象异质性;而单一能量簇的形成则指示配体与靶点结合具有显著稳定性。GLMD 核心成分与靶点的自由能景观显示单一能量簇,结

合 RMSD 和 Rg 曲线的平稳趋势,证实复合物在动力学模拟中维持高度结构稳定性。为定量评估 GLMD 核心成分与靶点蛋白的长期结合稳定性,本研究采用 MM/GBSA 方法,对体系稳定期(90 ~ 100 ns)内 3 组复合物的平均结合自由能进行计算(见图 10)。其中,槲皮素与 AKT1、IL-1 β 和 TNF 的平均结合自由能分别为 -8.95、-12.37、-10.09 kcal/mol,表明 GLMD 活性成分与靶点蛋白具有强结合亲和力。上述结果进一步验证了分子对接预测的可靠性,为网络药理学提供了分子动力学支持。

2.2 实验验证结果

2.2.1 GLMD 对失眠模型小鼠探索行为的影响

在开放旷场实验中(见图 11),与 Con 组相比,Mod 组小鼠中央区停留时间显著缩短($P < 0.01$);而 Est 组及 GLMD-L、GLMD-M、GLMD-H 组的中央

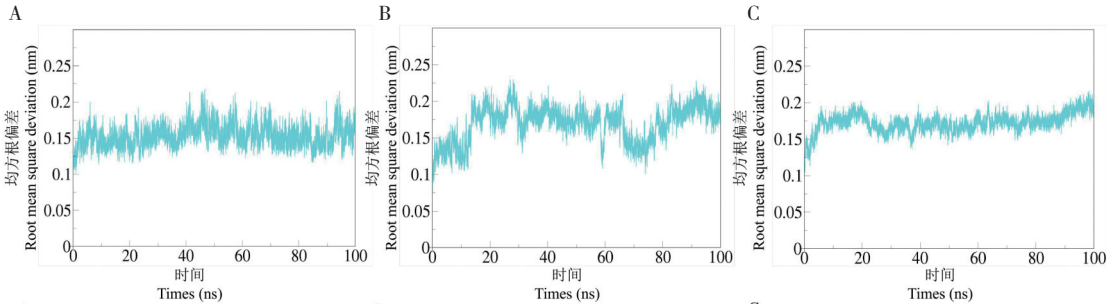


图 6 GLMD 活性成分与靶蛋白复合物的均方根偏差分析

Fig. 6 RMSD analysis of GLMD active ingredient-target protein complexes

注:(A) 槲皮素-AKT1;(B) 槲皮素-IL-1 β ;(C) 槲皮素-TNF- α ,下同。Note:(A) Quercetin-AKT1;(B) Quercetin-IL-1 β ;(C) Quercetin-TNF- α ,the same below.

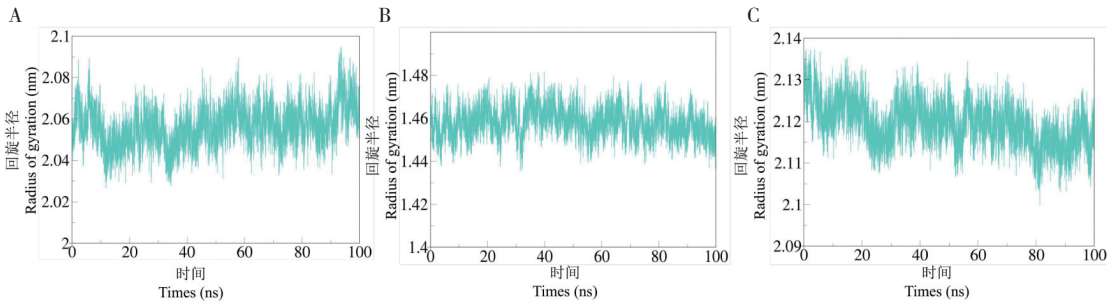


图 7 GLMD 活性成分与靶蛋白复合物的回旋半径分析

Fig. 7 Radius of gyration analysis of GLMD active ingredient-target protein complexes

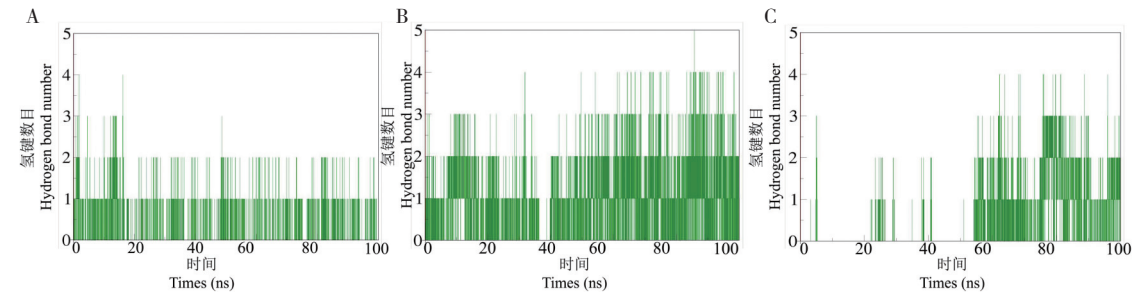


图 8 GLMD 活性成分与靶蛋白复合物的氢键数量分析

Fig. 8 Hydrogen bond number analysis of GLMD active ingredient-target protein complexes

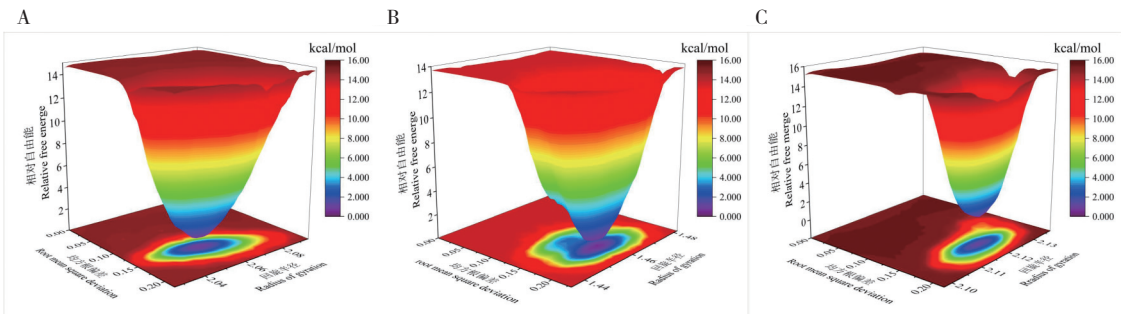


图 9 GLMD 活性成分结合靶蛋白复合物的自由能景观分布图

Fig. 9 Free energy landscape of the GLMD active ingredient-target protein complexes

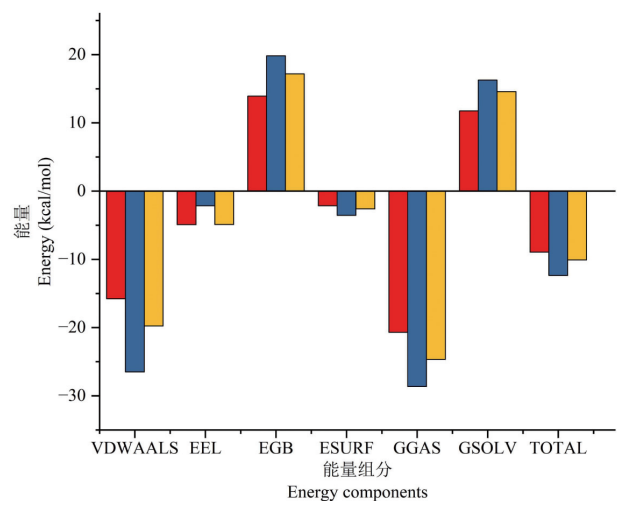


图 10 GLMD 活性成分结合靶蛋白复合物的能量组分图

Fig. 10 Binding free energy components of GLMD active ingredient-target protein complexes

注:图中红色、蓝色、黄色依次代表槲皮素-AKT1、槲皮素-IL-1β、槲皮素-TNF-α 复合物的各能量组分;其中 VDWAAALS、EEL、EGB、ESURF、GGAS、GSOLV、TOTAL 分别对应范德华能、静电能、极性溶剂化能、非极性溶剂化能、气相分子力学能、溶剂化能及平均结合自由能。Note: In the figure, the red, blue, and yellow colors represent the energy components of quercetin-AKT1, quercetin-IL-1β, and quercetin-TNF-α complexes in sequence. Among them, VDWAAALS, EEL, EGB, ESURF, GGAS, GSOLV, and TOTAL correspond to van der waals energy, electrostatic energy, polar solvation energy, non-polar solvation energy, gas-phase molecular mechanics energy, solvation energy, and average binding free energy, respectively.

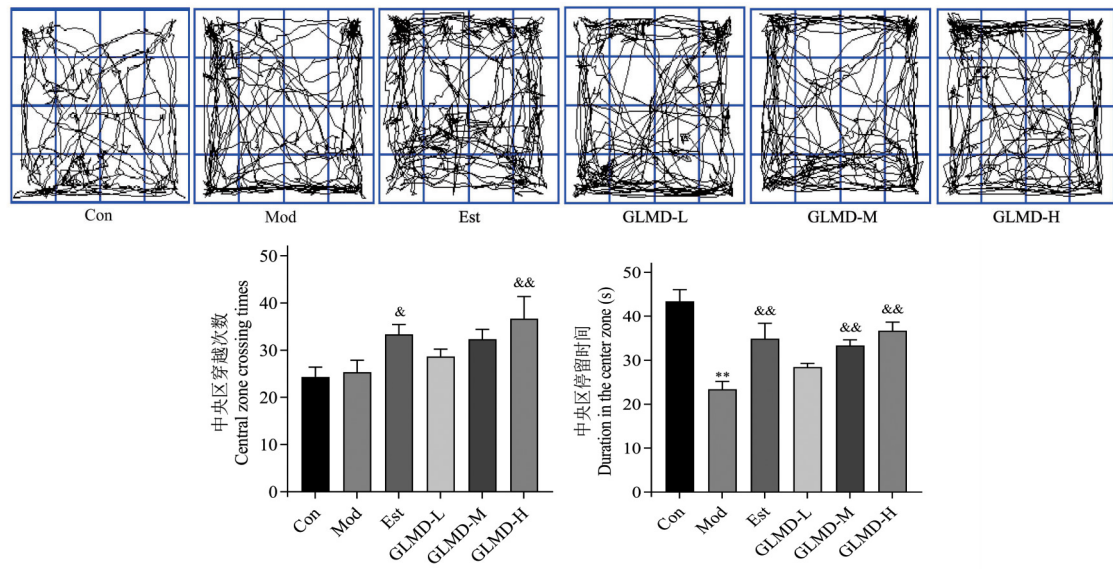


图 11 GLMD 对失眠模型小鼠 5 min 中央区停留时间和中央区穿越次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 11 Effects of GLMD on the time spent in center and entries into the center zone within 5 min in mice with insomnia insomnia model mice($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注:与 Con 组相比, ** $P < 0.01$; 与 Mod 相比, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, 下同。Note: Compare with Con group, ** $P < 0.01$; compare with Model group, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$, the same below.

区停留时间均显著长于 Mod 组($P < 0.01$)。中央区穿越次数方面, Est 组($P < 0.05$)及 GLMD-H 组($P < 0.01$)的穿越次数显著高于 Mod 组。上述结果提示 GLMD 可改善失眠模型小鼠的探索行为。

2.2.2 GLMD 对失眠模型小鼠血清及海马组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、Glu 水平的影响

通过 ELISA 法检测小鼠血清及海马组织中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 和 Glu 的水平。结果表

明,与 Con 组相比,Mod 组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 Glu 水平显著升高 ($P < 0.01$),提示失眠模型小鼠存在明显炎症反应增强。与 Mod 组相比,Est 组及 GLMD-L、GLMD-M、GLMD-H 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α

和 Glu 水平均显著降低 ($P < 0.01$),提示该汤剂可能通过抑制炎症因子释放和调节神经递质平衡来改善失眠症状(见图 12)。

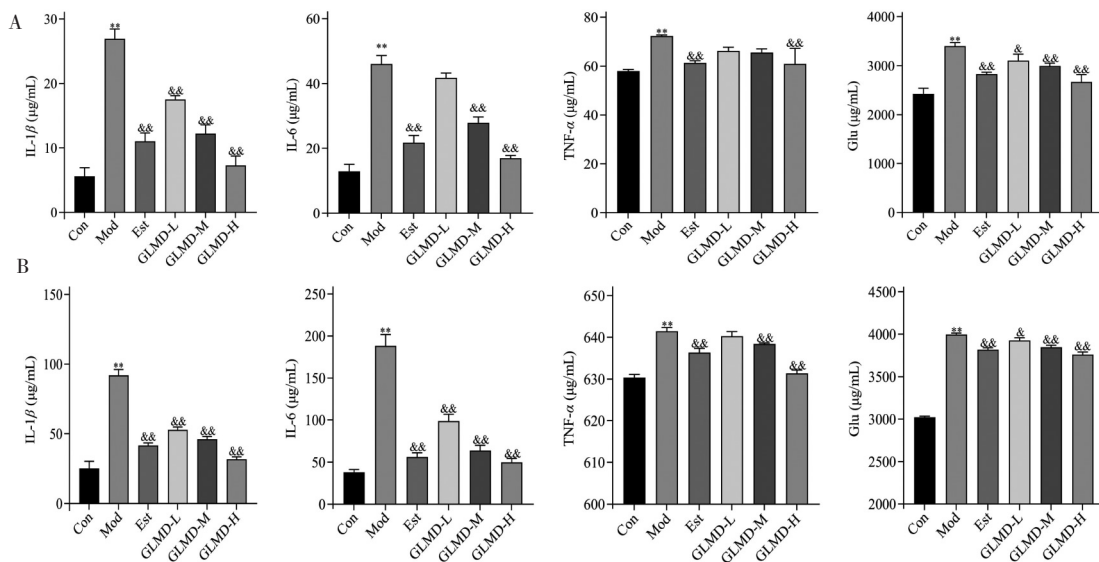


图 12 GLMD 对失眠模型小鼠血清 (A) 及海马组织 (B) 中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 Glu 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Effects of GLMD on the levels of inflammatory factors IL-6, IL-1 β , TNF- α and glu in serum (A) and hippocampal tissue (B) of insomnia model mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.2.3 GLMD 对失眠模型小鼠海马组织中 IBA-1、GFAP 蛋白及 5-HT 免疫荧光表达的影响

通过免疫荧光法检测各组小鼠海马组织中 GFAP、IBA-1 及 5-HT 的阳性表达水平(见图 13)。结果表明,与 Con 组相比,Mod 组 GFAP、IBA-1 阳性表达水平显著升高 ($P < 0.01$),5-HT 阳性表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 Mod 组相比,GLMD-M、GLMD-H 组可显著下调 IBA-1 和 GFAP 阳性表达,并上调 5-HT 阳性表达 ($P < 0.01$)。提示该汤剂通过抑制神经胶质细胞活化和恢复 5-HT 平衡来改善失眠症状。

2.2.4 GLMD 对失眠模型小鼠海马组织中 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 蛋白表达的影响

采用 Western blot 法检测小鼠海马组织中 AKT 及 p-AKT、PI3K 及 p-PI3K 的蛋白表达水平(见图 14)。结果显示,Mod 组小鼠海马组织中上述蛋白表达水平较 Con 组显著下调 ($P < 0.05$)。与 Mod 组相比,GLMD-M、GLMD-H 组相关蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。表明该中药复方可通过调节 PI3K/AKT 信号通路的关键分子表达,从而改善睡眠障碍的病理状态。

3 讨论与结论

本研究采用网络药理学方法,系统阐释 GLMD 治疗失眠的多成分-多靶点-多通路协同作用机制。网络拓扑学分析显示,在构建的药物-活性成分-靶点相互作用网络中,IL-6、IL-1 β 、AKT1 及 TNF 等靶点表现出较高的节点度,提示其在失眠病理调控网络中发挥核心枢纽作用。GO 功能富集分析表明,靶点在细胞组分上显著富集于突触后膜等结构;在分子功能上,主要涉及神经递质受体活性与细胞因子活性;在生物过程上,则聚焦于炎症反应调控及细胞凋亡。此外,KEGG 通路富集分析揭示靶点在 AGE-RAGE、IL-17 及 TNF 等信号通路中显著富集。上述通路 with 失眠过程中的神经炎症激活、氧化应激及神经元功能障碍密切相关。通过分子对接技术,筛选出槲皮素、山柰酚、柚皮素、异鼠李素等核心活性成分,这些成分协同构建了抗炎-抗氧化-神经保护的调控网络。槲皮素通过抑制核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 通路降低 IL-6 和 TNF- α 表达^[15];异鼠李素靶向调控 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体^[16];山柰酚抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) / NF- κ B 信号通

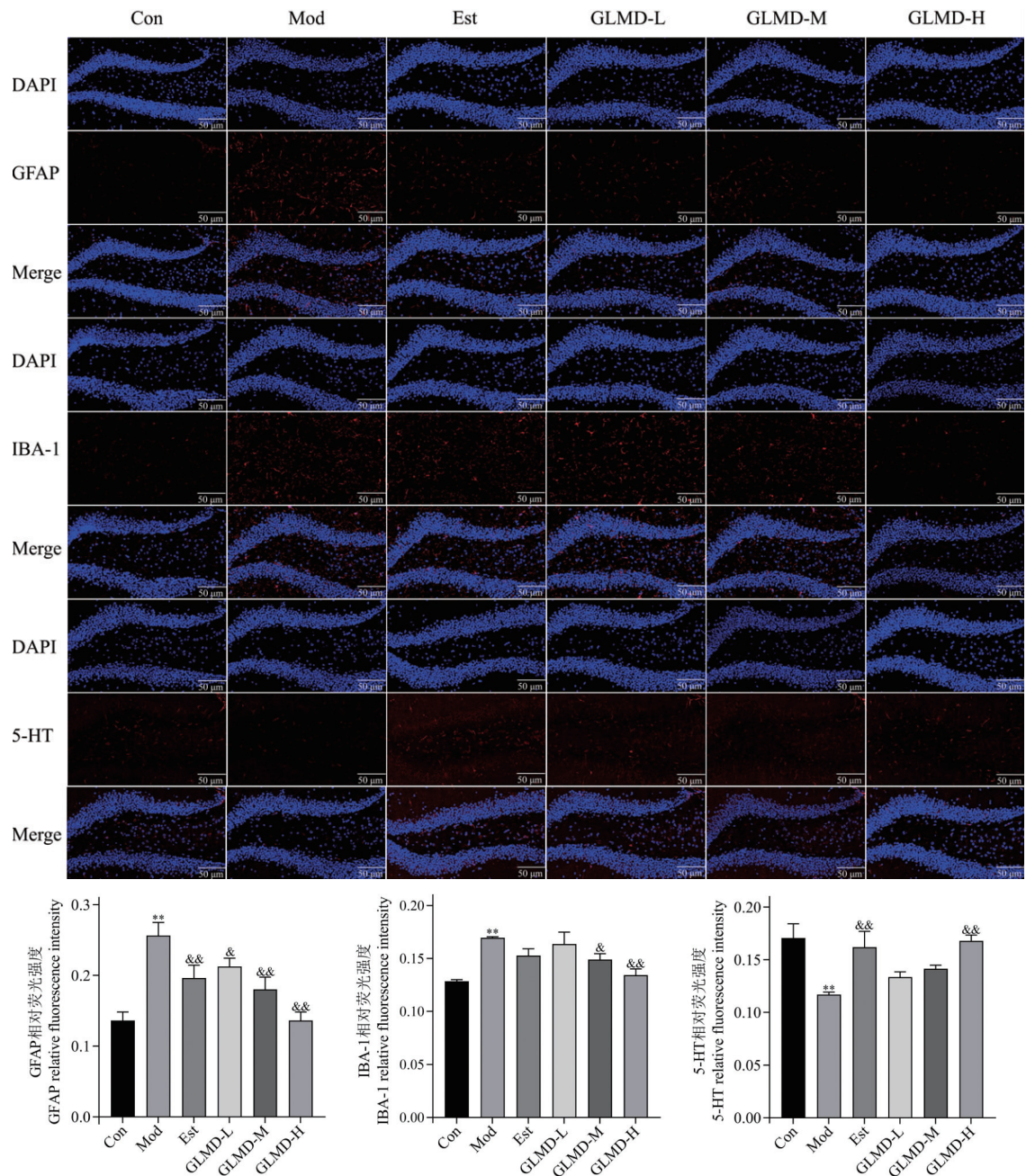


图 13 GLMD 对失眠模型小鼠海马组织中 GFAP、IBA-1 蛋白及 5-HT 免疫荧光表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 13 Effects of GLMD on immunofluorescence expression of GFAP, IBA-1 proteins and 5-HT in hippocampal tissues of insomnia model mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

路^[17];柚皮素具有抗炎、抗氧化等多种药理作用^[18]。分子动力学模拟显示, 槲皮素与 PI3K/AKT 通路关键靶点 AKT1 形成的复合物在 100 ns 模拟中构象稳定, 提示其可能具备潜在的靶点抑制能力。结合网络药理学预测, 这些成分可能通过调控 PI3K/AKT 通路相关节点, 影响 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 等炎症因子的表达水平, 但其对神经炎症的调控作

用及改善失眠的生物学机制, 仍需通过动物实验进一步验证。

Hou 等^[19]研究表明 PI3K-AKT 信号通路在失眠病理过程中的核心调控作用, 且该通路 IL-17、TNF- α 等炎症通路及癌症转移相关通路存在显著网络交互。AKT1 作为该通路的关键节点蛋白, 其活性降低通过磷酸化级联反应加剧神经炎症反应^[20],

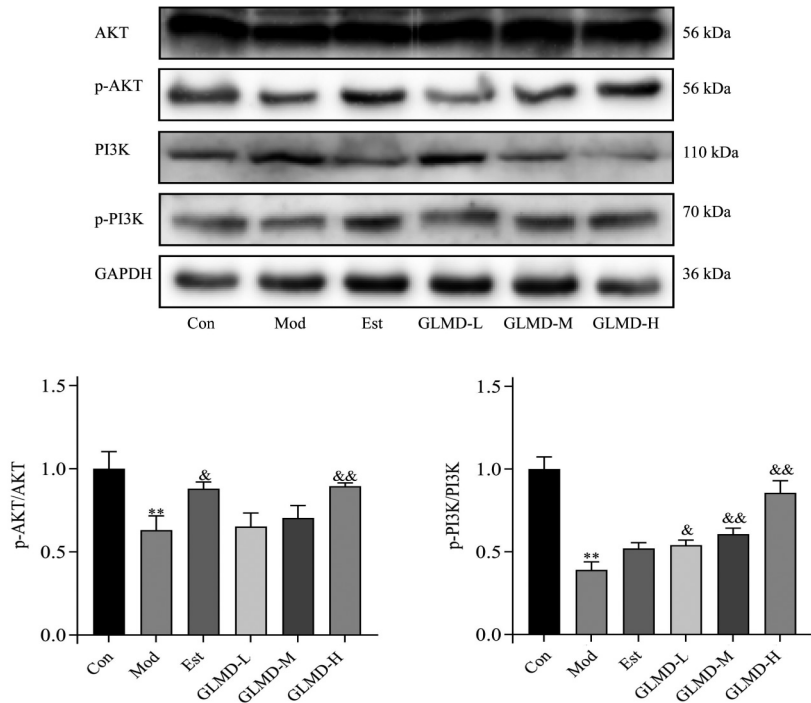


图 14 GLMD 对失眠模型小鼠海马组织中 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Effects of GLMD on AKT, p-AKT, PI3K, and p-PI3K protein expression in hippocampal tissue of insomnia model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

导致睡眠质量下降。研究证实^[21],慢性炎症在失眠病理进程中的关键作用。动物实验数据显示,Mod 组小鼠血清及海马组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平较 Con 组显著升高 ($P < 0.01$),证实慢性炎症反应在失眠病理进程中的核心地位^[22]。Li 等^[23]研究发现失眠模型小鼠脑组织中 AKT1 蛋白表达水平较对照组显著降低,且其表达水平与睡眠效率呈显著正相关,提示 AKT1 活性下调可能是失眠发生的关键分子机制。在中枢神经系统中,PI3K 通过磷酸化作用激活 AKT1,进而调控多种下游靶点维持神经元存活和突触可塑性。当 AKT1 活性被抑制时,PI3K/AKT 通路失活导致抗凋亡蛋白 B 细胞淋巴瘤因子 2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 表达下降,同时解除对 NF- κ B 通路的负调控作用,促使 IL-6、TNF- α 等促炎因子过量释放^[24]。本研究证实 GLMD 各剂量组不仅显著降低炎症因子水平,还可恢复 AKT1 蛋白表达,这种双重调控效应可能源于其多组分协同作用。

胶质细胞异常活化作为失眠相关神经炎症的核心病理机制,其调控机制涉及多个信号轴。作为中枢神经系统免疫监视的关键效应细胞,小胶质细胞的过度激活可显著诱导 IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子的释放,并通过环氧合酶 2/诱导型一氧化氮合酶 (cy-

cloxygenase-2/inducible nitric oxide synthase, COX-2/iNOS) 信号通路介导过量一氧化氮的生成,进而引发氧化应激反应并造成神经元损伤^[25]。值得注意的是,星形胶质细胞的持续性激活在慢性炎症进程中同样发挥关键作用,其标志物 GFAP 的异常表达已被证实与神经退行性疾病存在显著相关性^[26]。免疫荧光定量分析显示,Mod 组小鼠海马区 IBA-1 阳性表达水平较 Con 组显著升高 ($P < 0.01$),提示神经炎症反应呈现系统性激活特征。经 GLMD-M、GLMD-H 组干预后,Mod 组小鼠 IBA-1 和 GFAP 阳性表达水平显著下降,证实该方剂可通过抑制胶质细胞活化有效缓解神经炎症反应。

Glu 作为中枢神经系统的主要兴奋性神经递质,其与 GABA 的稳态失衡被普遍认为是睡眠-觉醒节律紊乱的关键神经生物学机制^[27]。当谷氨酸浓度异常升高时,可能引发神经元钙超载和氧化应激反应,从而导致突触传递功能障碍与睡眠-觉醒周期紊乱。5-HT 则并非单纯的抑制性神经递质,而是一种具有广泛调节功能的神经递质,其合成神经元的胞体主要位于脑中缝核群。5-HT 系统通过中缝核-蓝斑核环路精细调控睡眠结构,5-HT_{2A} 受体促进非快速眼动睡眠,5-HT_{1A} 受体维持睡眠稳定性,

尾部中缝核 5-HT 神经元更通过抑制去甲肾上腺素能神经元触发快速眼动睡眠。当 5-HT 转运体过度表达或受体敏感性下降时,5-HT 信号通路功能减弱,将导致睡眠维持障碍^[28]。实验结果显示 Mod 组小鼠海马区 5-HT 阳性表达显著降低($P < 0.01$),血清及海马组织 Glu 水平升高($P < 0.01$)。经 GLMD-M、GLMD-H 组干预后,5-HT 阳性表达显著回升,Glu 水平显著降低,提示 GLMD 可能通过“抑制胶质细胞活化-降低炎症因子-缓解递质代谢紊乱”的级联调控,协同重建睡眠节律调控网络。

综上所述,本研究通过网络药理学、分子对接、分子动力学模拟及动物实验,揭示了该复方可以通过降低血清及海马组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子水平,干预 PI3K/AKT 信号通路的异常激活状态,抑制 IBA-1 和 GFAP 的异常表达,调节 Glu/5-HT 神经递质失衡,从而恢复正常的睡眠-觉醒节律。这些发现为中医药治疗失眠提供了新的分子机制依据和药物开发方向。但本研究仅完成成分与靶点的生物信息学预测分析,相关结果尚未经体外细胞实验验证。后续将采用高分辨质谱技术对 GLMD 活性成分进行系统性筛查,围绕筛选所得核心成分与关键靶点,通过体外细胞实验明确核心成分对 PI3K/AKT 信号通路炎症反应的调控关联,以期失眠治疗提供科学的理论依据与潜在药效物质基础。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00038>) 中访问获取。

参考文献

1 Chinese Sleep Research Society. White Paper on the Sleep Health of Chinese Residents in 2024 (2024 中国居民睡眠健康白皮书) [M]. Beijing: Chinese Sleep Research Society, 2024.

2 Shen YY, Zhou JY. Progress in drug therapy for insomnia [J]. Chin J Clinicians (中国临床医生杂志), 2023, 51: 1394-1397.

3 Yan DQ, Zhang XP, Zhang WH, et al. Effect of Guizhi Longgu Muli Decoction on sleep, serum and brain 5-HT level in insomnia model rats with lung failing to store corporeal soul syndrome [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2022, 63: 1865-1871.

4 Xiong HJ, Yu CQ. Research progress on sleep disorders and chronic inflammation [J]. Chin J Prev Med (中国预防医学杂志), 2023, 24: 1247-1251.

5 Liu Y, Tang YH, Zhai JX, et al. Research progress on chronic

low-grade inflammation and sleep disorders [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg (中国现代神经疾病杂志), 2023, 23: 674-677.

6 Cao WD, Hu NN, Li L, et al. Mechanisms of microglial polarization in inflammatory responses of the nervous system [J]. J New Med (新医学), 2025, 56: 316-322.

7 Wang M, Liu YE, Su DP, et al. Study on the effect of asperosaponin VI on neurogenesis and cognitive function in sleep-deprived mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2023, 35: 733-740.

8 Zhang ZT, Shi WZ, Yuan WA, et al. Anti-insomnia effect of Sanqifang formula based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2025, 48: 428-438.

9 Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, et al. CHARMM36: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins [J]. Biophys J, 2017, 112: 175a-176a.

10 Zhao CT, Zhu XF, He J, et al. Molecular dynamics simulation and experimental verification reveal processing detoxification mechanism of Pinelliae Rhizoma Praeparatum [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2026, 51: 430-443.

11 Chen Y, Xu XL, Chen YP, et al. Effects of Banxia Shumi Decoction on hypothalamic 5-HT-mediated cAMP/ CREB/BDNF pathway in insomniac rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2024, 40: 10-14.

12 Yan MZ, Wang Z, et al. Research progress on animal models of insomnia and evaluation methods [J]. Acta Lab Anim Sci Sin (中国实验动物学报), 2022, 30: 428-435.

13 Li L, Liu R, He J, et al. Effects of Wendan Decoction on mitochondrial structure and function in brain tissue of insomnia mice [J]. Chin J Gerontol (中国老年学杂志), 2022, 42: 5294-5298.

14 Liu G, Yang WD, Li J, et al. Exploring the mechanism of action of BLJZF in the treatment of lipid abnormalities [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2025, 30: 464-476.

15 Li Y, Zhang YY, Wu D, et al. Antidepressant effect and molecular mechanism of notoginsenoside R1 based on network pharmacology and animal experiments [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 5599-56 09.

16 Sun YL, Guo Y, Wang XY, et al. Mechanism of isorhamnetin in alleviating acute lung injury by regulating pyroptosis mediated by NLRP3/ASC/caspase-1 axis [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2025, 50: 4120-4128.

17 Liang RS, Wen YM, Tian L, et al. Protective effect of kaempferol on lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice [J]. J Trop Med (热带医学杂志), 2025, 25: 157-161, 290.