

燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠功能及作用机制研究

郑海云, 王志钢, 王少南, 王斌

Effect of Sleep-improvement and Mechanism of Yanwo Ejiao Compound in Mice

ZHENG Haiyun, WANG Zhigang, WANG Shaonan, and WANG Bin

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024100331>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

L-茶氨酸改善睡眠作用研究进展

Research Progress on Improving Sleep Mechanism of L-theanine

食品工业科技. 2021, 42(16): 361-366 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070289>

基于网络药理学研究化橘红-蛹虫草复方止咳活性及作用机制

Activity and Mechanism of *Citri grandis* Exocarpium-*Cordyceps militaris* Compound on Reliving Cough Based on Network Pharmacology

食品工业科技. 2022, 43(13): 17-24 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100261>

基于网络药理学分析金钗石斛治疗神经系统疾病的药效物质基础及作用机制

Analysis of the Pharmacodynamic Material Basis and Mechanism of Dendrobium Nobile in the Treatment of Nervous System Diseases Using Integrative Network Pharmacology

食品工业科技. 2021, 42(13): 1-10 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110140>

复方钩藤口服液的制备及其对小鼠睡眠的改善

Preparation and Improvement Sleep Effects in Mice of Compound *Uncaria hirsute* Havil. Oral Liquid

食品工业科技. 2020, 41(2): 121-126 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.02.020>

基于网络药理学及分子对接技术探讨绞股蓝防治肥胖的作用机制

Mechanism of *Gynostemma pentaphyllum* on Prevention and Treatment of Obesity Based on Network Pharmacology and Molecular Docking Technology

食品工业科技. 2022, 43(4): 12-23 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021070083>

基于网络药理学及分子对接技术探讨辣木叶抗肥胖的作用机制

Study on the Anti-obesity Mechanism of Action of *Moringa oleifera* Lam. Leaves by Network-Based Pharmacology and Molecular Docking Techniques

食品工业科技. 2023, 44(15): 34-45 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022090318>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

郑海云, 王志钢, 王少南, 等. 燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠功能及作用机制研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(19): 388–397. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100331

ZHENG Haiyun, WANG Zhigang, WANG Shaonan, et al. Effect of Sleep-improvement and Mechanism of Yanwo Ejiao Compound in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 388–397. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100331

· 营养与保健 ·

燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠功能 及作用机制研究

郑海云^{1,*}, 王志钢², 王少南¹, 王 斌¹

(1. 中国中医科学院中医药科技合作中心, 北京 100700;

2. 国家中医药管理局科技司, 北京 100027)

摘要:目的: 评估燕窝阿胶复方对小鼠睡眠改善的作用及其作用机制。方法: 将 Balb-c 小鼠随机分为五组, 分别为空白对照组、阳性药物组、燕窝阿胶复方低剂量组 (5 g/kg)、中剂量组 (10 g/kg) 和高剂量组 (20 g/kg)。每组小鼠每日给药一次, 持续给药 30 d。通过直接睡眠实验、戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验、戊巴比妥钠睡眠时间延长实验以及巴比妥钠睡眠潜伏期实验评估燕窝阿胶复方对小鼠睡眠的改善效果。同时, 运用网络药理学方法初步探讨燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠的潜在作用机制。为了验证网络药理学的解析结果, 本研究采用酶联免疫分析试剂盒比色法, 测定小鼠脑组织中血清素 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺 (dopamine, DA)、色氨酸羟化酶 (tryptophan hydroxylase, TPH) 以及 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 的水平。结果: 燕窝阿胶复方并不能诱导小鼠直接进入睡眠状态, 而是通过改善小鼠睡眠质量来达到改善睡眠的效果。与空白对照组相比, 燕窝阿胶复方低、中、高剂量组分别使小鼠睡眠率提高了 50%、70% 和 80%; 三个剂量组均显著延长了小鼠戊巴比妥钠诱导的睡眠时间 ($P<0.01$); 中、高剂量组显著缩短了小鼠的睡眠潜伏期 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。网络药理学分析揭示, 燕窝阿胶复方主要通过调节 5-HT、GABA、DA 等神经递质的突触通路来改善睡眠。实验数据进一步证实, 与空白对照组相比, 燕窝阿胶复方中、高剂量组能显著增加小鼠脑组织中 TPH 含量 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 三个剂量组均显著提升了小鼠脑组织中 5-HT 和 GABA 的含量 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。另外, 相较于空白对照组, 燕窝阿胶复方的三个剂量组均显著降低了小鼠脑组织中 DA 的含量 ($P<0.01$)。结论: 燕窝阿胶复方对小鼠睡眠具有显著的改善作用, 其作用机制主要涉及调节 5-HT、GABA、DA 等神经递质的突触通路。

关键词: 燕窝阿胶复方, 改善睡眠, 作用机制, 网络药理学

中图分类号: R151.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)19-0388-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100331

本文网刊:



Effect of Sleep-improvement and Mechanism of Yanwo Ejiao Compound in Mice

ZHENG Haiyun^{1,*}, WANG Zhigang², WANG Shaonan¹, WANG Bin¹

(1. Science and Technology Collaborating Center for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China;

2. China Science and Technology Department of National Administration of Traditional Chinese Medicine,
Beijing 100027, China)

Abstract: Objective: To evaluate improvement of sleep function and mechanism of Yanwo Ejiao compound in mice. Methods: Balb-c mice were randomly assigned to five groups: A blank control group, a positive drug group, and three Yanwo Ejiao compound groups receiving low (5 g/kg), medium (10 g/kg), and high (20 g/kg) doses. The compound was

收稿日期: 2024-10-28

基金项目: 国家自然科学基金 (82274685)。

作者简介/通信作者*: 郑海云 (1980-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 中药及相关健康产品研究, E-mail: jenny0113@126.com。

administered once daily for 30 consecutive days. Sleep improvement was assessed by direct sleep test, subthreshold dose hypnosis test with pentobarbital sodium, pentobarbital sodium-induced sleep time extension test, and barbital sodium sleep latency test. Additionally, network pharmacology methods were employed to preliminarily investigate the compound's potential mechanism. To validate the findings, enzyme-linked immunosorbent assay kits were used to measure brain levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), tryptophan hydroxylase (TPH), and γ -aminobutyric acid (GABA). Results: Yanwo Ejiao compound did not induce mice directly into a hypnotic state, but significantly improved sleep quality in mice. Compared to the blank control group, the low, medium, and high-dose groups increased the sleep rate by 50%, 70%, and 80%, respectively. Three Yanwo Ejiao compound groups significantly prolonged pentobarbital sodium-induced sleep time ($P<0.01$). The medium and high-dose groups also significantly reduced sleep latency ($P<0.05$ or $P<0.01$). Network pharmacology analysis suggested that the compound improved sleep by modulating neurotransmitter synaptic pathways, including those of 5-HT, GABA, and DA. Experimental data confirmed that, compared to the control group, the medium and high-dose group significantly increased TPH levels ($P<0.01$ or $P<0.05$) and three compound groups elevated 5-HT and GABA levels in brain tissue ($P<0.01$ or $P<0.05$). Besides, three Yanwo Ejiao compound groups significantly decreased DA content ($P<0.01$). Conclusion: Yanwo Ejiao compound exerts a notable sleep-improvement effect in mice, primarily through the regulation of synaptic pathways involving neurotransmitters such as 5-HT, GABA, and DA.

Key words: Yanwo Ejiao compound; sleep improvement; mechanism; network pharmacology

失眠已成为全球性的健康问题,严重影响人们的身心健康和生活质量。根据美国精神病学学会诊断统计手册(第五版修订版)和国际睡眠障碍分类(第三版),失眠被定义为一种慢性疾病^[1]。目前,失眠已成为神经科门诊的第二大疾病,普遍存在于人们的日常生活中,是影响身体和心理健康的重要的危险因素^[2]。它与多种疾病密切相关,例如 I 型糖尿病、慢性疲劳综合征、肌痛性脑炎、哮喘和偏头痛等,在这些疾病患者中也经常出现失眠症状^[3]。此外,失眠也能加剧疾病的程度,这种双向关联可能导致失眠加剧病人的临床症状,形成恶性循环^[3-4]。《2023 年中国睡眠指数报告》显示,中国居民睡眠指数仅为 62.61,2022 年和 2021 年分别有 31.5% 和 35.6% 的人群出现失眠问题。

目前,成人失眠的治疗药物主要包括食欲素受体拮抗剂、苯二氮卓类药物、褪黑激素受体激动剂和苯二氮卓类似物等四大类。食欲素受体拮抗剂在延长总睡眠时间和提高睡眠效率方面表现突出,但可能引发头痛、嗜睡和头晕等副作用^[5];苯二氮卓类药物能显著改善睡眠质量,但存在安全性风险,容易引发不良事件和停药问题^[6],尤其是在老年人群中^[7];褪黑激素受体激动剂对于入睡困难的患者有效,但在维持睡眠或改善睡眠质量方面效果有限,且不同患者对其反应差异较大,有些人可能效果显著,而有些人则可能几乎没有效果^[8]。此外,褪黑激素受体激动剂会与其他药物相互作用,例如抗凝药和免疫抑制剂^[9],且不适合患有光敏感性疾病的患者^[10-11],以及正在服用某些抗抑郁药的患者^[12];苯二氮卓类似物药物虽然可以显著改善睡眠质量,但其安全性较差,容易引起依赖和产生戒断症状^[8]。相比之下,许多药食同源的中药具有改善睡眠质量的功效,且安全性较高^[13]。因此,从中药中探索能改善睡眠质量的药食同源复方是非常有前景的。

燕窝阿胶复方由燕窝、阿胶、西洋参、灵芝、大枣、玉竹、百合、桃仁、玫瑰花、茯苓、莲子、山药、

桑椹等 13 味药食同源中药组成。其中,燕窝^[14]、西洋参^[2]、灵芝^[15]和百合^[16]等中药已被证实具有改善睡眠的功效。尽管燕窝阿胶复方中多味药材在单独使用时已被证实具有一定的改善睡眠的功效,但关于多个药材复方配伍使用在改善睡眠方面的效果尚未见报道。本研究旨在系统评估该复方在改善睡眠方面的作用,并探索其潜在的作用机制,可为后续改善睡眠产品的开发提供实验基础。

因此,本研究通过改善睡眠功效的实验,包括直接睡眠实验、戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验、戊巴比妥钠对小鼠睡眠时间的影响实验以及巴比妥钠对小鼠睡眠潜伏期的实验,评估了燕窝阿胶复方在改善睡眠方面的功效。本研究运用超高效液相色谱-高分辨质谱技术,首次揭示了燕窝阿胶复方的化学成分。此外,本研究将网络药理学与实验验证方法相结合,首次阐明了该复方对小鼠睡眠改善的可能作用机制,并为进一步深入探究其作用机理及药效物质基础提供了坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF 级 Balb-c 健康雄性小鼠(8 周龄,18~20 g)

北京唯尚立德生物科技有限公司,实验动物生产许可合格证号 SYXK(京)2023-0011,已通过中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准伦理审批(审批号:2023B180)。小鼠饲养于昼夜节律光照条件下(温度 25~27 °C,相对湿度 50%~70%),实验前适应性饲养 7 d,自由进食进水;燕窝、西洋参、灵芝、大枣、玉竹、百合、桃仁、玫瑰花、茯苓、莲子、山药、桑椹饮片 亳州市惠康堂中药科技有限公司;阿胶 咏济堂药业有限公司;人参皂苷 Rg1(批号 110703-201128,93.4% 纯度)、人参皂苷 Rb1(批号 110704-201223,95.9% 纯度)、芦丁(批号 100080-201811,91.7% 纯度)、阿魏酸(批号 1110773-201614,99% 纯度)、咖啡酸(批号 110885-201703,

99.7% 纯度)、槲皮素(批号 100081-201610, 99.1% 纯度)、绿原酸(批号 110753-201817, 96.8% 纯度)、木犀草素(批号 111520-201605, 99.6% 纯度) 中国食品药品检定研究院; 人参皂苷 Re(批号 P27N6F6512, $\geq 98\%$ 纯度)、山奈酚(批号 C26J8Y38642, $\geq 98\%$ 纯度)、甜菜碱(批号 J0615YA13, $\geq 98\%$ 纯度)、表儿茶素没食子酸酯(批号 C13A7Q13017, $\geq 98\%$ 纯度) 上海源叶生物科技有限公司; 戊巴比妥钠(分析纯, 批号: 20170611) 上海伊卡生物技术有限公司; 艾司唑仑片(规格: 1 mg, 批号: 240508) 山东信谊制药有限公司; 巴比妥钠(分析纯, 批号: 570471) 北京虹湖联合化工产品有限公司; 羧甲基纤维素钠 天津市福晨化学试剂厂; 小鼠 5-羟色胺(5-HT)酶联免疫分析试剂盒(批号: 02410291)、小鼠多巴胺(DA)酶联免疫分析试剂盒(批号: 202410) 北京迈瑞达科技有限公司; 小鼠 γ -氨基丁酸(GABA) ELISA 检测试剂盒(批号: 202410)、小鼠色氨酸羟化酶(TPH)ELISA 检测试剂盒(批号: 202409) 北京倍特仁康生物医药科技有限公司; 乙腈(色谱纯)、甲酸($>99.99\%$ 纯度) ThermoFisher Scientific 公司; 无水乙醇($>99.5\%$ 纯度, 分析纯) 天津大茂化学试剂厂; 娃哈哈纯净水 杭州娃哈哈集团有限公司。

BT25S 电子天平(精度 0.01 mg) 德国赛多利斯公司; Epoch 型全波长酶标仪 BioTek 公司; 1-15PK 型高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司; UltiMate 3000 超高效液相色谱仪(DAD 检测器)、Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(Xcalibur 质谱工作站) Fisher 公司; ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m) Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 灌胃溶液制备和动物分组与给药

1.2.1.1 燕窝阿胶复方制备和灌胃溶液制备 燕窝阿胶复方制备: 将西洋参、灵芝、大枣、玉竹、百合、桃仁、玫瑰花、茯苓、莲子、山药、桑椹饮片分别粗粉碎, 按配方组成称取混合后的粗粉 156 g, 加入 10 倍量水煎煮提取 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并得提取液 1。阿胶粗粉碎后, 用温水 50 $^{\circ}\text{C}$ 烱化。燕窝粉碎至 80~100 目细粉, 用 3 倍量温水 50 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 2 h 后与烱化后的阿胶一起加入 10 倍量水煎煮提取 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并得提取液 2。混合提取液 1 和提取液 2, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 、-0.08 Mpa 真空减压浓缩, 流浸膏于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸至稠膏状约 100 mL。

燕窝阿胶复方灌胃溶液制备: 将上述稠膏用 0.5% 羧甲基纤维素钠复溶混悬制成生药量为 1 g/mL 的混悬液 200 mL, 取适量用 0.5% 羧甲基纤维素钠稀释, 得到 0.5 g/mL 和 0.25 g/mL 的混悬液, 1、0.5 和 0.25 g/mL 分别作为高、中、低剂量组灌胃液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

艾司唑仑灌胃溶液制备: 取一片艾司唑仑片, 研磨粉碎, 溶于 33.33 mL 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液

中, 制成浓度为 0.03 mg/mL 的混悬液。

1.2.1.2 分组与灌胃 Balb-c 小鼠共 50 只, 随机分为 5 组, 分别为空白组(给予蒸馏水)、阳性药组(艾司唑仑, 0.3 mg/kg)和燕窝阿胶复方组。燕窝阿胶复方按生药重量计, 设置三个剂量组, 分别为燕窝阿胶复方低剂量组(5 g/kg)、中剂量组(10 g/kg)、高剂量组(20 g/kg)。每次灌胃体积为 10 mL/kg, 连续灌胃 30 d。每天对每组小鼠的一般情况(整体精神状态、皮毛颜色、对外界的反应、摄食量、饮水量、有无死亡等)进行观察并记录。在给药前、给药 14 d 和试验结束后分别称定并记录各组小鼠的体重, 并且在给药结束后取小鼠心、肝、肾、肺、脑, 测定重量, 计算脏器指数, 脏器指数=小鼠器官重量/小鼠体重 $\times 100$ 。

1.2.2 Balb-c 小鼠睡眠实验 参考文献 [2,14-15] 的实验方法, 评价燕窝阿胶复方对小鼠睡眠的改善作用。

1.2.2.1 直接睡眠实验 各组动物每天分别给予相应的受试物, 末次给药结束后观察灌胃后 60 min 内, 小鼠是否出现睡眠现象。以动物的翻正反射消失超过 60 s 判为进入睡眠, 翻正反射恢复即为动物觉醒。记录各组入睡动物数及各自的睡眠时间, 以评估燕窝阿胶复方是否对小鼠产生了直接的促眠效果。

1.2.2.2 戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验 小鼠末次给药 30 min 后, 以 30 mg/kg 剂量(以小鼠体重计, 小鼠 80%~90% 未入睡剂量)腹腔注射戊巴比妥钠, 以翻正反射消失 60 s 作为入睡判断标准, 以翻正反射再现为睡眠结束。观察记录各组小鼠的睡眠持续时间(翻正反射消失至翻正反射再现的时间), 计算睡眠率。

1.2.2.3 戊巴比妥钠睡眠时间延长实验 小鼠末次给药 30 min 后, 以 50 mg/kg 剂量(以小鼠体重计, 小鼠 100% 入睡但睡眠时间不长)腹腔注射戊巴比妥钠, 观察记录各组小鼠的睡眠持续时间(翻正反射消失至翻正反射再现的时间), 并进行各组间睡眠时间比较。

1.2.2.4 巴比妥钠睡眠潜伏期实验 末次给药 30 min 后, 以 230 mg/kg 剂量(以小鼠体重计, 小鼠 100% 入睡)腹腔注射巴比妥钠, 以翻正反射消失 60 s 为指标, 记录腹腔注射至小鼠翻正反射消失之间的时间作为睡眠潜伏期, 比较阳性药组和实验组睡眠潜伏期的差别。

1.2.3 超高效液相色谱-高分辨质谱(ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS)鉴定燕窝阿胶复方中的主要化学成分

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m); 流动相: A 相(乙腈)-B 相(0.1% 甲酸-水); 梯度洗脱: 0~1 min, 95% B $\rightarrow$ 90% B; 1~4 min, 90% B $\rightarrow$ 85% B; 4~18 min,

85% B→70% B; 18~24 min, 70% B→60% B; 24~28 min, 60% B→50% B; 28~31 min, 50% B→35% B; 31~35 min, 35% B→25% B; 35~40 min, 25% B→15% B; 40~45 min, 15% B→10% B; 45~50 min, 10% B→5% B; 50~52 min, 5% B。柱温 35 ℃, 流速 0.30 mL/min, 进样量 8 μL。

1.2.3.2 质谱条件 电喷雾电离源(HESI), 正、负离子检测模式; 质量扫描范围 m/z 100~1500; 喷雾电压+3.8 kV(正离子模式)、-3.2 kV(负离子模式); 鞘气压力 35 Pa; 辅助气压力 15 Pa; 辅助气温度 300 ℃; 离子传输管温度 350 ℃; Full MS/dd-MS² 扫描模式, Full MS 分辨率 70000, dd-MS² 分辨率 17500; 碰撞能量 20、40、60 eV。

1.2.3.3 质谱鉴定 采用 Xcalibur 4.0 软件进行质谱数据采集与分析, 通过质谱裂解碎片分析(母离子和二级碎片)、对照品保留时间(t_R)对比, 以及参考文献和 OTCML 数据库比对, 并借助 Xcalibur 4.0 系统对总离子流图上的峰进行精确相对分子质量识别, 鉴定燕窝阿胶复方中的化学成分。

1.2.4 网络药理学分析

1.2.4.1 燕窝阿胶复方中主要化学成分作用靶点预测 利用 PubChem 数据库收集已鉴定活性成分的 SMILES 号, 导入 Swiss Target Prediction 平台, 以“Homo sapiens”为选择物种, 预测各成分的潜在作用靶点。

1.2.4.2 收集与睡眠相关的已知疾病靶点 运用 GeneCards 数据库以“insomnia”作为关键词检索失眠相关靶点。

1.2.4.3 构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络 利用 Venny 分析工具将成分靶点与失眠靶点取交集, 并绘制 Venny 图。将所获取的成分-疾病交集靶点导入 STRING 12.0 数据库中, 物种选择为“Homo sapiens”, 最小互相作用阈值设定为“high confidence”(≥0.7), 其余设置保持初始状态, 获得蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)关系。将结果进一步导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行拓扑学分析并构建 PPI 网络, 并利用 Cytoscape 插件 MCODE 对 PPI 网络进行聚类构建功能模块。

1.2.4.4 关键靶点功能与通路富集分析 将成分-疾病交集靶点导入 Metascape 平台, 分别进行其主要的基因本体论(GO)与京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析, 物种设置“Homo sapiens”, 筛选标准为 $P<0.01$ 。

1.2.5 小鼠脑组织相关指标测定

1.2.5.1 收集脑组织上清液 取材: 将所有组别的小鼠麻醉后, 沿颈部进行断头处理, 暴露出颅骨, 从延髓处下刀沿着正中中线剪开颅骨, 使用骨钳小心地去除颅骨, 暴露出大脑, 使用镊子后端小心地将大脑从颅腔

中取出; 清洗: 将脑组织放入烧杯中, 用 4 ℃ 生理盐水反复冲洗, 以去除血液和其他杂质。然后用滤纸轻轻吸干脑组织表面的多余水分; 匀浆: 将脑组织放入预冷的离心管中, 加入 3 倍量(m/v)4 ℃ 生理盐水冰浴匀浆; 离心: 将匀浆液转移到离心管中, 离心 10 min 左右(3000~4000 r/min, 4 ℃); 收集上清液: 仔细收集上清液, 并分装到预冷的离心管中, 分装后一份待检测, 其余-20 ℃ 冷冻备用。

1.2.5.2 5-HT、TPH、GABA、DA 含量的测定 将待测样品(脑组织匀浆液上清液)及小鼠 5-HT 标准品(0、15、30、60、120、240 pg/mL)、TPH 标准品(0、6.25、12.5、25、50、100 pg/mL)、GABA 标准品(0、0.5、1、2、4、8 μmol/L)、DA 标准品(0、3、6、12、24、48 pg/mL)分别按照 ELISA 操作步骤测定其 5-HT、TPH、GABA、DA 含量。5-HT、TPH、GABA、DA 测定的具体操作步骤按照试剂盒的标准操作流程进行, 反应后在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。以各标准品的浓度设为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘得标准曲线的回归方程式。5-HT 标准曲线和 DA 标准曲线: $y=0.005x-0.0462$ ($R^2=0.9942$) 和 $y=0.043x+0.0236$ ($R^2=0.9914$); TPH 标准曲线和 GABA 标准曲线: $y=0.0202x+0.1481$ ($R^2=0.9763$) 和 $y=0.1944x+0.1511$ ($R^2=0.9461$)。

1.3 数据处理

网络药理学数据库与可视化软件包括: GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Swiss Target Prediction 平台(<http://swisstargetprediction.ch/>)、Venny 分析工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)、STRING 12.0 数据库(<https://cn.string-db.org/>)、Cytoscape (Version 3.9.1) 数据可视化软件、Metascape 平台(<http://metascape.org/gp/index.html>)。统计分析采用 JMP 平台实现(SAS Institute Inc., 版本 16.0.0), 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析比较均值, 以 $P<0.05$ (*)和 $P<0.01$ (**)为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠功效实验

2.1.1 燕窝阿胶复方对小鼠体重的影响 如表 1 所示, 给药前各组小鼠初始体重无显著性差异($P>0.05$); 灌胃给药 14 d 和 30 d 后, 与空白组比, 各组小

表 1 给药对小鼠体重的影响(n=10)

Table 1 Effect of administration on body weight of mice (n=10)

组别	0 d(g)	14 d(g)	30 d(g)
空白组	22.90±0.63	26.11±0.89	29.70±0.68
阳性药组	22.75±0.50	26.33±0.70	29.61±0.65
低剂量组	21.94±0.76	26.30±0.79	29.87±0.87
中剂量组	22.78±0.64	26.42±0.73	30.08±0.75
高剂量组	23.02±0.49	26.11±0.59	29.81±0.72

鼠体重均无显著性变化($P>0.05$)。实验结果显示阳性药组和三个剂量组的燕窝阿胶复方对小鼠体重无明显影响。

2.1.2 燕窝阿胶复方对小鼠脏器指数的影响 如表 2 所示, 给药 30 d 后, 各组小鼠精神状态良好, 毛发光泽, 对外界的反应、摄食量与饮水量均正常, 且无死亡小鼠。取各组小鼠的心、肝、肾、肺、脑进行称重, 对脏器指数进行评价。实验结果显示, 与空白组比, 阳性药组和三个剂量组的燕窝阿胶复方对小鼠脏器指数均无显著性影响。燕窝阿胶复方对小鼠体重和脏器指数没有影响, 间接说明了本复方的安全性。

表 2 燕窝阿胶复方对小鼠脏器指数的影响($n=10$)
Table 2 Effect of Yanwo Ejiao compound on organ index of mice ($n=10$)

组别	心脏指数	肝脏指数	肾脏指数	肺脏指数	脑指数
空白组	4.92±0.23	40.02±2.24	14.69±0.74	5.28±0.36	15.07±0.77
阳性药组	4.85±0.31	38.50±2.42	14.40±1.03	5.31±0.44	15.39±1.11
低剂量组	4.93±0.32	37.67±3.98	13.62±1.16	5.13±0.48	14.83±1.12
中剂量组	4.69±0.42	38.87±4.58	14.51±1.16	5.01±0.59	14.75±0.70
高剂量组	5.09±0.53	39.96±4.20	14.73±0.83	5.24±0.55	15.41±1.13

2.1.3 燕窝阿胶复方对小鼠直接睡眠的影响 本实验对小鼠进行了燕窝阿胶复方的灌胃处理, 并在给药后 60 min 观察了小鼠的睡眠状况。结果显示, 各组小鼠活动表现正常, 未见翻正反射消失的现象, 入睡率均为 0%。实验结果显示, 燕窝阿胶复方并不能通过诱导小鼠直接进入睡眠状态来达到改善睡眠的效果。

2.1.4 燕窝阿胶复方对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠影响 实验结果如表 3 所示, 空白组小鼠的睡眠率为 10%, 阳性药组的小鼠睡眠率达到了 90%, 而燕窝阿胶复方低剂量、中剂量和高剂量组的小鼠睡眠率分别为 60%、80% 和 90%。与空白对照组相比, 燕窝阿胶复方低、中、高三个剂量组的小鼠睡眠率分别提高了 50%、70% 和 80%。由结果可知, 三个剂量组的燕窝阿胶复方均能够有效提高小鼠的睡眠率, 并且这一效果随着剂量的增加而增强, 呈现出明显的剂量依赖性。

表 3 燕窝阿胶复方对小鼠戊巴比妥钠阈下剂量催眠的影响
Table 3 Effect of Yanwo Ejiao compound on subthreshold hypnosis of pentobarbital sodium induced sleep of mice

组别	小鼠数量(只)	睡眠小鼠数量(只)	睡眠率(%)
空白组	10	1	10
阳性药组	10	9	90
低剂量组	10	6	60
中剂量组	10	8	80
高剂量组	10	9	90

2.1.5 燕窝阿胶复方对小鼠戊巴比妥钠睡眠时间延长的影响 如表 4 所示, 相较于空白组, 阳性药组以及不同剂量的燕窝阿胶复方给药组(低、中、高剂量)

均极显著增加了小鼠的睡眠时间($P<0.01$)。这些给药组分别使睡眠时间延长了 1.50、0.81、1.11 和 2.00 倍。此外, 小鼠睡眠时间的延长与燕窝阿胶复方的剂量呈现依赖性。

表 4 燕窝阿胶复方对小鼠戊巴比妥钠睡眠时间延长的影响
Table 4 Effect of Yanwo Ejiao compound on prolonging the sleep time induced by pentobarbital sodium in mice

组别	小鼠数量(只)	睡眠小鼠数量(只)	睡眠率(%)	睡眠时间(min)
空白组	10	9	90	26.07±8.55
阳性药组	10	10	100	65.26±15.45**
低剂量组	10	10	100	47.16±10.39**
中剂量组	10	9	90	55.08±9.51**
高剂量组	10	10	100	78.25±18.34**

注: 和空白组相比, **表示 $P<0.01$ 。

2.1.6 燕窝阿胶复方对小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响 如表 5 所示, 与空白组相比, 阳性药组以及中、高剂量的燕窝阿胶复方给药组均显著缩短了小鼠的睡眠潜伏期($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。然而, 低剂量燕窝阿胶复方组对小鼠睡眠潜伏期的缩短作用并不显著($P>0.05$)。阳性药组以及中、高剂量燕窝阿胶复方组分别将睡眠潜伏期缩短了 39.0%、22.6% 和 36.3%。本研究结果显示, 燕窝阿胶复方能明显缩短小鼠睡眠潜伏期, 且呈现剂量依赖性。

表 5 燕窝阿胶复方小鼠巴比妥钠睡眠潜伏期的影响
Table 5 Effect of Yanwo Ejiao compound on sleep latency of mice induced by barbital sodium

组别	小鼠数量(只)	睡眠小鼠数量(只)	睡眠率(%)	睡眠潜伏期时间(min)
空白组	10	9	90	5.23±1.15
阳性药组	10	10	100	3.19±0.39**
低剂量组	10	10	100	4.33±0.57
中剂量组	10	10	100	4.05±0.67*
高剂量组	10	10	100	3.33±0.75**

注: 和空白组相比, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, 表 7 同。

本研究表明, 燕窝阿胶复方对小鼠睡眠功能具有显著的改善作用, 同时不影响小鼠体重和脏器指数, 间接证明了该复方的安全性。该复方不会直接诱导小鼠睡眠, 说明它并非通过引起立即的催眠状态来发挥作用。相反, 它通过改善正常睡眠过程来提升睡眠质量。此外, 不同参考文献中关于戊巴比妥钠使用的剂量相差较大^[14, 17-18], 本研究基于文献研究和预实验验证, 确定戊巴比妥钠阈下催眠实验剂量为 30 mg/kg (80%~90% 的小鼠翻正反射不消失) 和戊巴比妥钠对小鼠睡眠时间延长实验剂量为 50 mg/kg (100% 的小鼠睡眠, 但睡眠时间不长) 是合适的剂量。

2.2 UPLC-HRMS 解析燕窝阿胶复方化学成分

采用 Xcalibur 4.0 软件进行质谱数据采集与分析, 通过质谱裂解碎片分析(母离子和二级碎片)、对照品保留时间(t_R)对比, 以及参考文献 [19-21] 和 OTCML 数据库比对, 并借助 Xcalibur 4.0 系统对总

离子流图上的峰进行精确相对分子质量识别,共鉴定出 71 种化学成分,包括氨基酸类成分、有机酸类成分、黄酮类成分、三萜皂苷类成分、脂肪酸类成分与其他类型成分。化学成分鉴定结果如表 6 所示。解析燕窝阿胶复方化学成分的结构,再导入网络药理学计算平台,为预测燕窝阿胶复方改善睡眠的作用机制奠定了数据基础,复方中的这些化学成分可能是燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠功效的物质基础。

表 6 UPLC-HRMS 解析燕窝阿胶复方化学成分
Table 6 Identification of chemical constituents in Yanwo Ejiao compound by UPLC-HRMS

序号	t _R (min)	准分子离子峰	离子类型	分子式	误差(ppm)	碎片离子	鉴定结果
1	0.76	156.0766	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ O ₂ N ₃	-1.109	110.07, 95.06	组氨酸
2	0.76	175.1187	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ O ₂ N ₄	-1.212	158.09, 116.07, 70.07, 60.06	精氨酸
3	0.85	118.0864	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO ₂	1.057	59.07, 58.07	甜菜碱 ^a
4	0.87	136.0618	[M+H] ⁺	C ₅ H ₅ N ₅	0.207	119.04, 94.04	腺嘌呤
5	0.90	152.0566	[M+H] ⁺	C ₅ H ₅ ON ₅	-0.700	135.03, 128.05, 110.04	鸟嘌呤
6	0.96	191.0188	[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	1.052	111.01, 87.01, 85.03	柠檬酸
7	0.97	132.1019	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-0.191	86.10	亮氨酸
8	0.97	268.1036	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	-1.680	136.06	腺苷
9	1.10	132.1018	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-0.494	86.10	异亮氨酸
10	1.10	182.0809	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₃	-1.317	165.05, 136.08, 123.04, 119.05	酪氨酸
11	1.10	284.0983	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ O ₅ N ₅	-2.165	152.06, 135.03	鸟苷
12	1.73	218.1029	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₇ NO ₅ · 1/2 Ca	2.801	146.08, 88.04, 71.05	泛酸钙
13	3.41	353.0880	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.516	191.06, 179.04, 135.05	隐绿原酸
14	3.51	151.0390	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₃	0.128	134.06, 125.06, 111.04, 93.03, 65.04	香兰素
15	3.83	456.1514	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	3.054	323.10, 221.07, 179.06, 161.04	苦杏仁苷
16	4.81	340.1037	[M+COOH] ⁻	C ₁₄ H ₁₇ O ₆ N	3.049	188.06, 161.04, 101.02, 71.01	野黑樱苷
17	4.87	353.0879	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.431	191.06, 179.04, 173.05, 135.05	新绿原酸
18	4.97	289.0719	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1.205	245.08, 203.07, 123.04, 109.03	儿茶素
19	5.19	353.0879	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.431	191.06	绿原酸 ^a
20	5.24	293.0290	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₈ O ₈	-0.593	247.02, 219.03, 191.03, 163.04	短叶苏木酚酸
21	5.43	577.1351	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	1.867	451.10, 425.09, 407.08, 289.07, 125.02	原花青素B ₂
22	5.94	179.0341	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	1.032	135.05	咖啡酸 ^a
23	5.99	153.0547	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₃	0.069	125.06, 111.04, 93.03, 65.04	异香兰素
24	8.94	627.1553	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	-0.306	303.05	槲皮素3-O-(2"-O-β-D-葡萄糖基)-β-D-半乳糖苷
25	9.08	627.1549	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	-0.666	303.05	槲皮素-3-O-槐二糖苷
26	9.09	193.0497	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0.905	178.03, 149.06, 134.04	阿魏酸 ^a
27	10.46	187.0966	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₆ O ₄	0.612	169.09, 125.10, 97.07	壬二酸
28	10.51	287.0545	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1.688	153.02, 121.03	山奈酚异构体
29	10.53	609.1466	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1.539	284.03, 255.03, 227.03	芦丁的异构体
30	10.63	300.9988	[M-H] ⁻	C ₁₄ H ₆ O ₈	3.045	284.00, 257.01, 245.01, 229.01	鞣花酸
31	10.93	609.1466	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1.599	300.03, 271.03, 255.03, 151.00	芦丁 ^a
32	11.50	465.1026	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-0.152	303.05, 229.05	异槲皮苷
33	11.67	465.1025	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-0.272	303.05, 229.05	金丝桃苷
34	12.25	441.0827	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	2.509	289.07, 169.01, 125.02	表儿茶素没食子酸酯 ^a
35	12.60	287.0545	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1.897	153.02, 121.03	山奈酚异构体
36	13.00	435.0917	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	-0.448	303.05, 229.05	槲皮素3-O-α-L-阿拉伯糖苷
37	13.39	449.1073	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.538	287.05, 153.02, 85.03	紫云英苷
38	14.28	845.4915	[M+COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	2.540	799.49, 637.43, 475.38, 179.06, 161.05	人参皂苷Rg1 ^a
39	14.54	991.5503	[M+COOH] ⁻	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	3.095	799.49, 637.44, 475.38, 179.06, 161.05	人参皂苷Re ^a
40	15.02	419.0968	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	-0.503	287.05	山奈酚3-O-α-L-阿拉伯糖苷
41	15.20	287.0545	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-1.897	153.02, 121.03	山奈酚异构体
42	19.03	799.4858	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	2.435	653.43, 635.42, 491.37, 161.04	拟人参皂苷F11
43	19.91	285.0406	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	4.299	175.04, 151.00, 133.03	木犀草 ^a
44	20.62	301.0718	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	3.605	191.03, 179.03, 151.00, 125.02	橙皮素异构体
45	20.79	301.0353	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	3.325	178.90, 151.00, 121.03, 107.01	槲皮素 ^a
46	20.86	301.0354	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	3.624	178.90, 151.00, 121.03, 107.01	桑黄素

续表 6

序号	t _R (min)	准分子离子峰	离子类型	分子式	误差(ppm)	碎片离子	鉴定结果
47	21.38	595.1439	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	-0.757	287.05, 147.04	山奈酚3-O-(3"-O-E-p-香豆酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷
48	21.82	1107.59	[M-H] ⁻	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	0.366	945.55, 783.50, 621.44, 459.39	人参皂苷Rb1 ^a
49	22.09	829.4970	[M+COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	3.077	637.43, 619.42, 475.38, 391.29	人参皂苷Rg2
50	23.94	991.5501	[M+COOH] ⁻	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	2.853	783.49, 621.44, 459.39, 375.29	人参皂苷Rd
51	24.25	269.0456	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	4.349	225.06, 151.00, 149.02, 117.03	芹菜素
52	24.40	403.1381	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	-0.684	373.09, 327.09, 211.02, 183.03	川陈皮素
53	24.68	991.5502	[M+COOH] ⁻	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	3.035	783.49, 621.44, 323.10, 221.07	七叶胆苷XVII
54	24.88	793.4391	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	2.782	631.39, 569.38, 497.37, 455.35	竹节参皂苷IVa
55	25.19	287.0544	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-2.106	153.02, 121.03	山奈酚 ^a
56	27.12	829.4968	[M+COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	2.932	621.44, 459.38, 380.07	人参皂苷F2
57	28.76	829.4967	[M+COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	2.414	621.43, 459.39, 375.29	人参皂苷Rg3
58	28.94	829.4968	[M+COOH] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	2.932	621.43, 459.38, 336.37	人参皂苷Rg3异构体
59	29.38	279.2312	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-2.244	149.02, 95.09, 81.07, 67.05	α-亚麻酸
60	29.50	513.32214	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₆	2.093	481.33, 466.31, 452.28	茯苓新酸 F
61	29.94	497.3274	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	2.491	419.3	茯苓新酸A异构体
62	32.27	483.3116	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	2.233	409.27, 365.28	茯苓新酸B
63	32.42	279.2313	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-2.137	137.13, 95.09, 81.07, 67.05	α-亚麻酸异构体
64	32.91	497.3276	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	2.813	423.29	茯苓新酸A
65	33.78	279.2314	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-1.815	147.11, 95.09, 81.07, 67.05	α-亚麻酸异构体
66	33.81	485.3618	[M+H] ⁺	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	-1.476	467.35, 449.34, 311.24, 293.23	去氢土莫酸
67	33.88	473.3618	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-1.577	437.34, 409.35, 249.18, 203.18	山楂酸
68	35.47	515.3722	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	-1.768	437.34, 295.24, 173.13, 121.10	3-O-乙酰基-16α-羟基-氢化松苓酸
69	36.30	529.3381	[M+H] ⁺	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	-1.306	511.38, 451.36, 355.26, 295.24	茯苓酸
70	37.36	279.2328	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	3.450	261.22, 231.06, 96.96	亚油酸
71	38.61	299.2591	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	3.303	281.25, 253.25, 225.22	十八烷二酸

注: a表示经过与标准品比对确定。

2.3 网络药理学解析燕窝阿胶复方改善睡眠作用机制

2.3.1 燕窝阿胶复方改善睡眠靶点预测 将上述 UPLC-HRMS 鉴定的化学成分的 SMILES 号上传至 Swiss Target Prediction 数据库, 预测其作用靶点并去除重复, 共得到 855 个潜在药物作用靶点, 对应 50 个活性组分; 同时收集得到 6256 个失眠靶点。将 855 个药物靶点与 6256 个失眠靶点取交集, 并绘制 Venny 图, 得到 249 个药物-疾病交集靶点(图 1)。

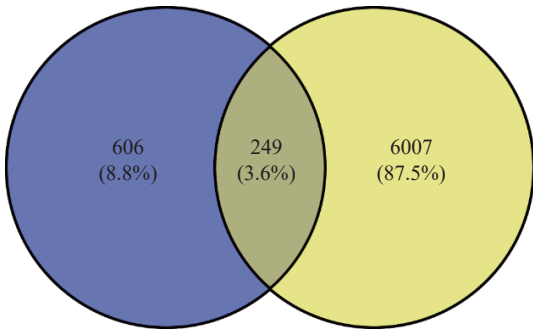


图 1 靶点相关的 Venny 图
Fig.1 Target-related Venny diagram

2.3.2 交集靶点 PPI 网络及模块分析 如图 2 所示, 构建的 PPI 网络显示包含 214 个节点和 1598 条边。拓扑分析后得到度值前 10 位的基因, 分别为 TP53、IL6、TNF、GAPDH、NFKB1、ESR1、MMP9、

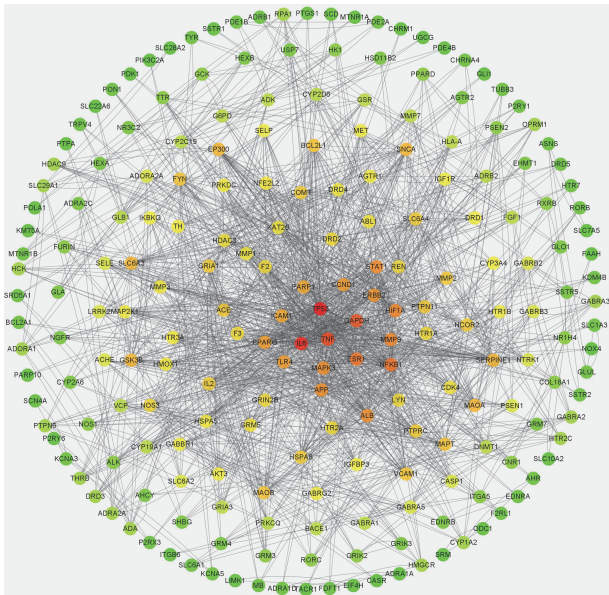


图 2 关键靶点 PPI 图
Fig.2 Key target PPI diagram

HIF1A、STAT1、ALB。这些基因可能是燕窝阿胶复方治疗失眠的关键基因。采用 Cytoscape 插件 MCODE 对 PPI 网络进行聚类构建功能模块。通过 degree cutoff 值 ≥ 2, K-core > 4 限制条件筛选出 6 个模块。选取每个模块中的靶点导入 Metascape 作 KEGG 信号通路分析。交集靶点 PPI 网络分析显

示, 燕窝阿胶复方改善睡眠的作用通路涉及 GABA 能突触(GABAergic synapse)、5-羟色胺能突触(Serotonergic synapse)和多巴胺能突触(Dopaminergic synapse)等几个神经相关的通路。

2.3.3 交集靶点功能与通路分析 将得到的交集靶点导入 Metascape 平台(<http://metascape.org/gp/index.html>), 分别进行其主要的功能与通路的富集分析。通路富集分析发现, 靶点显著富集在 120 条通路上 ($P<0.01$), 显示排名前 20 的富集通路如图 3 所示。GO 富集分析发现, 靶点显著富集在 173 条生物过程(BP)、14 条细胞组分(CC)、6 条分子功能(MF)上 ($P<0.01$)。通过对交集靶点 PPI 网络所获得所有交集靶点进行聚类 and 富集分析, 图 3 分析结果仍然包括 Serotonergic synapse 和 Dopaminergic synapse 两个通路, 这进一步说明这几个神经相关的通路可能是燕窝阿胶复方改善睡眠的作用通路。其他通路也被报道与失眠相关, 但因为这两条通路在前后两次分析中均出现, 且与失眠有明确报道, 因此本研究重点关注这两个通路。

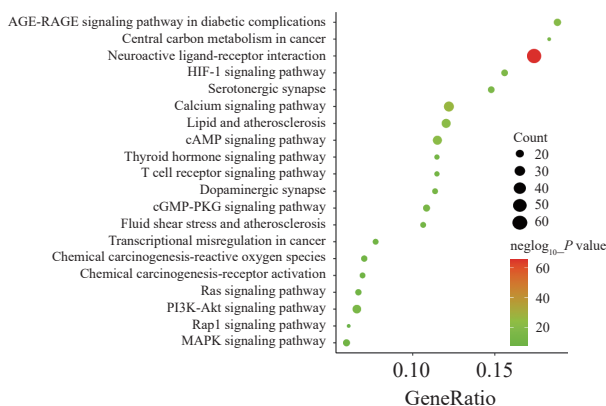


图 3 通路富集分析气泡图

Fig.3 Bubble in enrichment analysis of pathway

2.3.4 成分-靶点-通路网络 将活性组分、交集靶点和通路导入 Cytoscape 中, 构建“成分-关键靶点-通路”网络, 见图 4。“成分-关键靶点-通路”网络由 317 个节点组成, 包括 48 个成分, 20 条通路和 249 个靶点, 其中靶点用绿色节点表示, 成分用红色节点表示, 通路用蓝色节点表示。应用 Cytoscape 对该图进行进一步的拓扑分析, 从而得到各个节点的度值, 其中度值排名前十的成分是酪氨酸(Tyrosine)、亮氨酸(Leucine)、异亮氨酸(Isoleucine)、人参皂苷 Rb1(Ginsenoside Rb1)、组氨酸(L-Histidine)、拟人参皂苷 F11(Pseudoginsenoside F11)、人参皂苷 Rd(Ginsenoside Rd)、人参皂苷 Rg3(Ginsenoside Rg3)、人参皂苷 Rg2(Ginsenoside Rg2)、精氨酸(Arginine), 计算结果提示着这些化学成分可能是燕窝阿胶复方改善睡眠的功效成分。

通过燕窝阿胶复方中化学成分分析及网络药理学方法, 进一步揭示了该复方改善睡眠的作用成分和

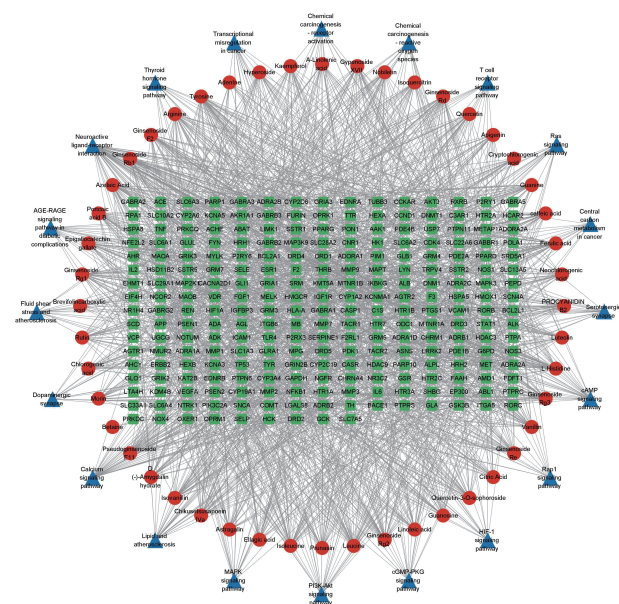


图 4 “成分-关键靶点-通路”网络

Fig.4 "Component-key target-pathway" network diagram

潜在作用机制。网络药理学分析发现, 燕窝阿胶复方主要通过调节 5-HT、GABA、DA 等神经递质的突触通路来发挥改善睡眠的作用(图 2 和图 3)。网络药理学分析显示燕窝阿胶复方的主要作用靶标为 *MMP2*、*MMP9*、*ADORA1*、*MET*、*ADORA2A*、*IGF1R*、*VEGFA*、*F2*、*GSK3B*、*GABRG2*, 主要的活性成分为氨基酸类成分(酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸和精氨酸)和人参皂苷类成分(人参皂苷 Rb1、拟人参皂苷 F11、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Rg3 和人参皂苷 Rb2)。文献研究也证实了多个氨基酸类成分和人参皂苷成分具有明确的改善睡眠的活性, 这与本文中网络药理学的分析是一致的。例如, 文献 [22-23] 显示色氨酸和谷氨酸可分别促进褪黑激素和 GABA 的合成, 进而发挥改善睡眠的功效。Elliott 等 [24] 的临床研究也初步证实了氨基酸补充剂能够改善患有创伤性脑损伤人群的睡眠质量。研究表明, 燕窝和阿胶的主要成分均为氨基酸类物质 [25-27], 这些氨基酸类成分可能是本复方发挥改善睡眠作用的主要活性成分。此外, 文献研究也证实了多个人参皂苷成分能有效地改善睡眠质量。Xu 等 [28] 的研究表明, 人参皂苷 Rg1 可能通过 GABA 通路, 从而诱导从清醒到睡眠的转变并维持大鼠睡眠状态。Lee 等 [29] 的研究也证实了人参皂苷 Rg3 对 GABA 受体通道活性有明显的影响。Chen 等 [30] 研究证实人参皂苷 Rg5 改善了 A1RA2AR 的表达, 并调节了 GABA1 α 和 mGluR5 的表达水平, 从而改善了大鼠的睡眠。

2.4 燕窝阿胶复方对小鼠脑组织指标的影响

网络药理学分析发现, GABA 能突触、5-羟色胺能突触和多巴胺能突触通路可能是燕窝阿胶复方改善小鼠睡眠的作用通路(图 2、图 3)。5-HT、DA、TPH 和 GABA 是上述三个神经通路中关键的神经递质和

合成酶,因此,本研究通过测定小鼠脑组织中这些神经递质的水平来进一步验证网络药理学预测的结果。小鼠脑组织中 5-HT、DA、TPH 和 GABA 含量测定结果如表 7 所示。与空白对照组相比,燕窝阿胶复方中、高剂量组能显著增加小鼠脑组织中 TPH 含量($P<0.05$ 、 $P<0.01$);三个剂量组均显著提升了小鼠脑组织中 5-HT 和 GABA 的含量($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。另外,相较于空白对照组,燕窝阿胶复方的三个剂量组均极显著降低了小鼠脑组织中 DA 的含量($P<0.01$)。这些结果表明,燕窝阿胶复方可能通过调节 GABA 能突触、5-羟色胺能突触和多巴胺能突触通路,影响小鼠脑组织中神经递质(5-HT、DA 和 GABA)及其合成相关物质(TPH)的含量,从而发挥改善睡眠的作用。

表 7 燕窝阿胶复方对小鼠脑组织指标的影响($n=10$)
Table 7 Effect of Yanwo Ejiao compound on brain tissue indices in mice ($n=10$)

组别	5-HT (ng/mL)	DA (ng/mL)	TPH (pg/mL)	GABA (μ mol/L)
空白组	1982.88 $\pm$ 136.37	4.06 $\pm$ 0.19	321.51 $\pm$ 8.72	1.06 $\pm$ 0.05
阳性药组	2781.40 $\pm$ 107.37**	3.35 $\pm$ 0.33**	347.23 $\pm$ 5.78**	1.29 $\pm$ 0.14**
低剂量组	2325.31 $\pm$ 119.13**	3.71 $\pm$ 0.22**	327.33 $\pm$ 20.17	1.18 $\pm$ 0.13*
中剂量组	2514.42 $\pm$ 129.47**	3.47 $\pm$ 0.30**	344.95 $\pm$ 25.96*	1.27 $\pm$ 0.08**
高剂量组	2618.00 $\pm$ 121.27**	3.50 $\pm$ 0.24**	372.22 $\pm$ 15.61**	1.33 $\pm$ 0.11**

5-HT、DA 和 GABA 都是脑内重要的神经递质,5-HT 和 GABA 含量相对较高时对睡眠具有改善作用^[20]。相反,研究表明,DA 含量降低更有利于睡眠^[31]。此外,TPH 是 5-HT 生物合成过程中的关键催化酶,因此脑组织中 TPH 含量越高,会催化产生更高水平的 5-HT^[32]。网络药理学的分析与本研究中燕窝阿胶复方能显著提高小鼠脑组织中 5-HT、TPH 和 GABA 的含量,并显著降低脑组织中 DA 水平的实验结果是一致的。

3 结论

本研究通过直接睡眠实验、戊巴比妥钠阈下剂量催眠实验、戊巴比妥钠睡眠时间延长实验以及巴比妥钠睡眠潜伏期实验,确定了燕窝阿胶复方在改善小鼠睡眠方面具有显著的效果。利用 UPLC-HRMS 技术,鉴定了燕窝阿胶复方中 71 种化学成分的结构,为该复方的物质基础研究提供了重要的参考数据。进一步通过整合网络药理学与实验验证,揭示了燕窝阿胶改善睡眠的潜在机制,可能是通过调节 5-HT、GABA 和 DA 等关键神经递质的突触通路实现。此外,网络药理学分析结果还提示,复方中的氨基酸和人参皂苷类成分可能是其改善睡眠的主要功效成分,为后续复方的活性成分研究和产品开发提供了有力的科学依据。

参考文献

- [1] RIEMANN D, BENZ F, DRESSLE R J, et al. Insomnia disorder: State of the science and challenges for the future[J]. *Journal of Sleep Research*, 2022, 31(4): e13604.
- [2] 张梓萱,申旻,朱晨辉.西洋参水提物改善睡眠功能的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(11): 3494–3498. [ZHANG Z X, SHEN M, ZHU C H. Study on improving sleep function of water extract of *Panax quinquefolium* [J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(11): 3494–3498.]
- [3] SIVERTSEN B, HYSING M, HARVEY A G, et al. The epidemiology of insomnia and sleep duration across mental and physical health: The SHoT study[J]. *Frontiers in Psychology*, 2021, 12: 662572.
- [4] MAO T, GUO B, RAO H. Unraveling the complex interplay between insomnia, anxiety, and brain networks[J]. *Sleep*, 2024, 47(3): zsad330.
- [5] 黎越丹,崔冬晓,孙彦,等.食欲素受体拮抗剂治疗失眠症研究进展[J]. *药学报*, 2018, 53(7): 1068–1079. [LI Y D, CUI D X, SUN Y, et al. Recent advances in orexin receptor antagonists for the treatment of insomnia[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2018, 53(7): 1068–1079.]
- [6] 施慎逊.应客观评估及合理使用苯二氮革类药物[J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(35): 2745–2747. [SHI S X. Benzodiazepines: Objective evaluation and rational use[J]. *Natl Med J China*, 2021, 101(35): 2745–2747.]
- [7] PERKOVIĆ-VUKČEVIĆ N, VUKOVIĆ-ERCEGOVIĆ G, ŠEGRT Z, et al. Benzodiazepine poisoning in elderly[J]. *Vojnosanitetski Pregled*, 2016, 73(3): 234–238.
- [8] YUE J L, CHANG X W, ZHENG J W, et al. Efficacy and tolerability of pharmacological treatments for insomnia in adults: A systematic review and network meta-analysis[J]. *Sleep Medicine Reviews*, 2023, 68: 101746.
- [9] REBAI R, JASMIN L, BOUDAH A. Agomelatine effects on fat-enriched diet induced neuroinflammation and depression-like behavior in rats[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 135: 111246.
- [10] VANDEWALLE G, HÉBERT M, BEAULIEU C, et al. Abnormal hypothalamic response to light in seasonal affective disorder[J]. *Biological Psychiatry*, 2011, 70(10): 954–961.
- [11] MARUANI J, GEOFFROY P A. Bright light as a personalized precision treatment of mood disorders[J]. *Frontiers in Psychiatry*, 2019, 10: 85.
- [12] 洪武,司天梅,李凌江,等.阿戈美拉汀治疗抑郁症临床应用专家建议[J]. *中国新药与临床杂志*, 2018, 31(11): 601–607. [HONG W, SI T M, LI L J, et al. Clinical application recommendation on agomelatine in treatment of major depressive disorder[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2018, 31(11): 601–607.]
- [13] 李睿敏,侯强,铁鑫,等.药食同源物质对改善睡眠和记忆的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(4): 304–306. [LI R M, HOU Q, TIE X, et al. Research progress on the effects of medicine-food homologous substances on improving sleep and memory[J]. *Journal of Jilin Medical University*, 2022, 43(4): 304–306.]
- [14] 冯艳钰,范群艳,王德华,等.红参-燕窝-酸枣仁复合助眠饮料的研制及功效评估[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(9): 275–284. [FENG Y Y, FAN Q Y, WANG D H, et al. Development and efficacy evaluation of a red ginseng-bird's nest-jujube seed compound sleep aid drink[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(9): 275–284.]

- [15] 刘春芳, 林永禄, 陈亮, 等. 灵芝多糖 γ -氨基丁酸片剂研究及其改善睡眠功能验证[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(16): 119–124, 138. [LIU C F, LIN Y L, CHEN L, et al. Preparation of tablet composed of polysaccharide and γ -aminobutyric acid and its assessment of sleep improvement function[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(16): 119–124, 138.]
- [16] 张玉林, 李阳. 百合水提物对对氯苯丙氨酸失眠模型大鼠睡眠改善作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(15): 252–258. [ZHANG Y L, LI Y. Effects of water extract of lily on sleep improvement of p-chlorophenylalanine insomnia model rats[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2023, 14(15): 252–258.]
- [17] SHAO J, ZHENG X, QU L, et al. Ginsenoside Rg5/Rk1 ameliorated sleep via regulating the GABAergic/serotonergic signaling pathway in a rodent model[J]. Food & Function, 2020, 11(2): 1245–1257.
- [18] 叶辉宇, 李强明, 张玉英, 等. 灵芝子实体不同提取物对小鼠睡眠改善作用的比较[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 350–356. [YE H Y, LI Q M, ZHANG Y Y, et al. Compared with the effect of sleep improvement by different extracts from ganoderma lucidum fruit bodies in mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 350–356.]
- [19] 隋振宇, 侯朋艺, 王波. 基于 UPLC-Q-Orbitrap 联用技术对玉竹中化学成分进行快速鉴定[J]. 中国药师, 2022, 25(4): 626–630. [SUI Z Y, HOU P Y, WANG B. Rapid identification of the components in polygonatum odoratum based on UPLC-Q-Orbitrap platform[J]. China Pharmacist, 2022, 25(4): 626–630.]
- [20] 王艺霏, 陈晶, 马启凤, 等. 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱法测定米炒人参炮制前后皂苷成分及其裂解规律的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 235–245. [WANG Y F, CHEN J, MA Q F, et al. Determination of saponin components and their cleavage laws in rice-fried ginseng before and after concoction by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap-mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2024, 15(8): 235–245.]
- [21] 赵佳宇, 吕悦广, 辛通, 等. 中药复方九味汤化学成分鉴定及质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报, 2025, 46(1): 11–25. [ZHAO J Y, LÜ Y G, XIN T, et al. Identification of chemical components in the traditional chinese medicine formula of jiuwei decoction and investigation of mass spectrometric fragmentation pathways[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2025, 46(1): 11–25.]
- [22] 珠娜, 郝云涛, 刘欣然, 等. 核桃低聚肽改善睡眠作用及机制[J]. 中国生育健康杂志, 2020, 31(2): 147–150, 173. [ZHU N, HAO Y T, LIU X R, et al. Effects of walnut oligopeptides on sleep and its mechanism[J]. China Journal of Reproductive Health, 2020, 31(2): 147–150, 173.]
- [23] YEOM J W, CHO C H. Herbal and natural supplements for improving sleep: A literature review[J]. Psychiatry Investigation, 2024, 21(8): 810–821.
- [24] ELLIOTT J E, KEIL A T, MITHANI S, et al. Dietary supplementation with branched chain amino acids to improve sleep in veterans with traumatic brain injury: A randomized double-blind placebo-controlled pilot and feasibility trial[J]. Frontiers in Systems Neuroscience, 2022, 16: 854874.
- [25] DAUD N A, MOHAMAD Y S, BABJI A S, et al. Edible bird's nest: Physicochemical properties, production, and application of bioactive extracts and glycopeptides[J]. Food Reviews International, 2021, 37(2): 177–196.
- [26] 宋咏辉, 林咏惟, 张娜. 不同类型燕窝营养成分检测现状及营养成分分析[J]. 中国食物与营养, 2024, 30(2): 42–51. [SONG Y Y, LIN Y W, ZHANG N. Detection status and composition difference of nutritional components in different types of edible bird's nests[J]. Food and Nutrition in China, 2024, 30(2): 42–51.]
- [27] 蒲健, 杨帅, 祝扬帆, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定阿胶中 20 种氨基酸含量及其化学模式识别分析[J]. 中国药业, 2024, 33(22): 87–94. [PU J, YANG S, ZHU Y F, et al. Simultaneous determination of 20 amino acids in asini corii colla by UPLC-MS/MS and its chemical pattern recognition[J]. China Pharmaceuticals, 2024, 33(22): 87–94.]
- [28] XU Y P, CUI X Y, LIU Y T, et al. Ginsenoside Rg1 promotes sleep in rats by modulating the noradrenergic system in the locus coeruleus and serotonergic system in the dorsal raphe nucleus[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 116: 109009.
- [29] LEE B H, KIM H J, CHUNG L, et al. Ginsenoside Rg3 regulates GABAA receptor channel activity: Involvement of interaction with the $\gamma 2$ subunit[J]. European Journal of Pharmacology, 2013, 705(1-3): 119–125.
- [30] CHEN J B, LI M J, HUO X H, et al. Ginsenoside Rg5 improves sleep by regulating energy metabolism in sleep-deprived rats[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2023, 51(7): 1845–1864.
- [31] THANGALEELA S, SIVAMARUTHI B S, KESIKA P, et al. Neurological insights into sleep disorders in Parkinson's disease[J]. Brain Sciences, 2023, 13(8): 1202.
- [32] MORDHORST A, DHANDAPANI P, MATTHES S, et al. Phenylalanine-hydroxylase contributes to serotonin synthesis in mice[J]. FASEB Journal, 2021, 35(6): e21648.