

血清化学与网络药理学关联研究酸枣仁的体内效应成分

李 强^{1,3}, 杜晨晖^{2*}, 张 敏^{1,3}, 闫 艳^{1*}, 高 耀^{1,3}, 秦雪梅¹

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西中医学院中药学院, 山西 太原 030619

3. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

摘要: 目的 研究酸枣仁的血清移行成分, 并构建入血成分-失眠靶点网络的效应物质研究模式。方法 应用 RSLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 技术建立大鼠口服酸枣仁水提物后含药血清样品的分析方法。通过对比空白血清与含药血清色谱图异同, 扣除内源性成分干扰, 鉴定血中主要移行成分及其代谢产物。采用 DrugBank 数据库检索失眠相关靶点, 并通过 String 数据库和 Cytoscape 软件绘制失眠蛋白-蛋白相互作用网络; 其次在 TCMSP 和 CoolGeN 数据库中分别检索酸枣仁入血成分所对应的靶点信息, 将以上靶点集合与失眠蛋白网络进行映射, 构建入血成分-失眠靶点网络。结果 鉴定与表征了大鼠血清中 15 个移行成分, 包括 6 个黄酮类及 1 个代谢物、5 个三萜皂苷类和 2 个生物碱类及 1 个代谢物。将入血成分靶点集合与失眠蛋白-蛋白相互作用网络进行映射, 筛选到乌药碱、酸李碱、芹菜素、斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 5 种入血成分与失眠蛋白靶点具有相关性。3 类不同成分所作用的失眠靶点有交集也各有特异性。皂苷类特异性靶点为 γ -氨基丁酸受体; 生物碱类特异性靶点为褪黑素受体。初步认为上述 5 种成分为酸枣仁治疗失眠的体内效应成分。结论 从体内化学成分群和潜在效应物质群 2 个层次共同锁定酸枣仁的效应物质, 为酸枣仁体内效应成分的研究进行了有益的研究模式探索。

关键词: 酸枣仁; 血清移行成分; 失眠蛋白网络; 效应成分筛选; 乌药碱; 酸李碱; 芹菜素

中图分类号: R284.1; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-1936-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.003

Investigation of effective components screening of *Ziziphi Spinosae Semen* based on serum pharmacochemistry and network pharmacology

LI Qiang^{1,3}, DU Chen-hui², ZHANG Min^{1,3}, YAN Yan¹, GAO Yao^{1,3}, QIN Xue-mei¹

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chinese Material Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective The methodology of serum chemistry was applied to screening the effective constituents in *Ziziphi Spinosae Semen* (ZSS). The combination of serum chemistry with network pharmacology might be a potent method for exploring the material basis of traditional Chinese medicine (TCM). **Methods** A RSLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS method was established for detecting the components in dosed serum after oral administration of the extract of ZSS. By comparative analysis of the chemical profiles of blank serum and dosed serum, the prototype compounds and metabolites in ZSS may be discovered. Firstly, the active target proteins of insomnia were searched in the DrugBank database and analyzed in String database. Cytoscape was used for the reconstruction and visualization of protein-protein interaction networks (PPI). Secondly, the targets of constituents absorbed into blood were searched in the TCMSP and CoolGeN database. Finally, the network of “constituents absorbed into blood-target” was constructed and analyzed using Cytoscape software. **Results** Fifteen compounds including 6 flavonoids and 1 metabolite, 5 triterpenoids saponins and 2 alkaloids and 1 metabolite from ZSS were discovered. Combined serum chemistry results, network pharmacology analysis revealed that

收稿日期: 2017-03-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (81603289); 山西省基础研究计划项目基金 (2012021031-5); 山西省卫生与计划生育委员会科技攻关项目 (2014097); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004)

作者简介: 李 强 (1991—), 男, 研究方向为中药药效物质基础。E-mail: kuailekafei2013@163.com

*通信作者 闫 艳 (1982—), 女, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及中药质量评价。E-mail: yanyan520@sxu.edu.cn

杜晨晖 (1981—), 男, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。13653412562@163.com

5 compounds including zizyphusine, spinosin, apigenin, jujuboside A and coclaurine might serve as the material basis for ZSS. Triterpenoids saponins were corresponding to GABA_A targets, while alkaloids were corresponding to melatonin target. **Conclusion** This work provides a novel strategy for investigation of effective components by combination of serum chemistry and network pharmacology. This attempt should be helpful for screening *in vivo* effective components for ZSS.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*; constituents absorbed into blood; protein interaction network of insomnia; effective components screening; zizyphusine; spinosin; apigenin

中药效应物质是指中药发挥药效作用的化学成分，是阐明中药作用奥秘的关键。中药效应物质的研究方法一直是仁者见仁，智者见智。近年来，国内学者提出了许多新的理论假说，如“等效成分群”假说^[1]、“药代标示物”假说^[2]、“显效形式”概念、“叠加作用”假说^[3]、“成分敲除/敲入”概念^[4]等。毋庸置疑，这些新的方法在中药效应物质的研究中取得了较大的成就。

众所周知，许多中药化学成分尽管在中药材中量较高，但由于代谢消除迅速等原因难以在体内达到有效浓度，且可能通过代谢转化生成活性产物而发挥药效作用。中药血清药物化学^[5]是快速、准确地研究效应物质的有效途径之一。通过分析口服给药后血液中的成分，确定中药的体内直接作用物质。然而进入体内的成分是否为有效成分？网络药理学可以用于预测并辨识治疗疾病的中药有效成分群^[6]。通过寻找疾病靶点和成分群的关系，建立体内化学成分与疾病关键靶点的相互关系网络，并对可能的效应成分进行预测。因此，建立血清药物化学与网络药理学结合发现效应成分的研究模式，可以为阐明中药效应物质提供新的研究思路。

酸枣仁为鼠李科 (Rhamnaceae) 植物酸枣 *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的成熟干燥种子，始载于《神农本草经》，为常用的滋补性安神药，主治心肝血虚引起的失眠^[7]，是各类治疗失眠的中药制剂中最常用的组分^[8]。现代药理研究表明，酸枣仁具有镇静催眠、抗心律失常、抗氧化和提高免疫等多方面的作用。本实验以酸枣仁作为研究实例，采用快速分离色谱-四级杆-静电场轨道高分辨质谱 (RSLC-Q Exactive HR-MS) 技术快速鉴定了 15 个血中移行成分，包括 6 个黄酮类及 1 个代谢物、5 个三萜皂苷类和 2 个生物碱类及 1 个代谢物。并将入血成分与失眠蛋白网络映射，从体内吸收和网络虚拟分析两个维度筛选到乌药碱、酸李碱、芹菜素、斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 5 种潜在效应成分。本研究将为酸枣仁药用资源及含有酸枣仁中药复方制剂的质量评价提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo fisher U3000 快速分离色谱仪，配置在线脱气机、四元梯度泵、温箱、自动进样器 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)，Thermo Scientific Q Exactive 质谱仪 (Thermo Scientific, 德国); Xcalibur 3.0 软件; CPA 225 D 十万分之一天平 (德国赛得利斯集团)。

1.2 试剂与药品

乙腈 (迪马科技有限公司) 为色谱纯; 水为娃哈哈纯净水，其余试剂均为分析纯。

对照品具体信息见表 1。1、5、6 均购于中国食品药品检定研究院，2、3、4 均购于四川省维克奇生物科技有限公司。

表 1 酸枣仁对照品信息

Table 1 Reference substances information of ZSS

编号	对照品	质量分数	批号
1	斯皮诺素	>98%	131217
2	当药黄素	>98%	140516
3	芹菜素	>98%	140426
4	6'''-阿魏酰斯皮诺素	>98%	140215
5	酸枣仁皂苷 A	>98%	A0274
6	酸枣仁皂苷 B	>98%	A0275

酸枣仁购自山西振东道地药材有限责任公司。经山西中医学院中药鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为鼠李科植物酸枣 *Ziziphus jujube* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的成熟干燥种子，标本于山西大学中医药现代研究中心留样。

1.3 实验动物

SD 大鼠 14 只，雄性，体质量 180~200 g，SPF 级，动物许可证号 SCXK (京) 2012-0001，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。将大鼠置于昼夜节律光照条件下，自由进食进水，适应性饲养 7 d。

2 方法

2.1 酸枣仁水提物的制备

取酸枣仁药材粉碎，称取 500 g，加 8 倍量水，加热回流提取 1 h，滤过，残渣加 8 倍量水，继续回

流提取 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 浓缩, 60 °C 水浴蒸干得浸膏 (得率为 28.12%)。

2.2 对照品的制备

分别取对照品适量, 精密称定, 加甲醇制备成含斯皮诺素, 酸枣仁皂苷 A、B, 当药黄素, 6'''-阿魏酰斯皮诺素, 芹菜素质量浓度分别为 1 220、1 240、1 260、1 130、1 260、1 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单一对照品储备液。各取适量, 制成混合对照品溶液。

2.3 分析条件

2.3.1 液相条件 色谱柱 Agilent Poroshell 120 mm (100 mm \times 3.0 mm, 2.7 μm); 流动相为乙腈 (A) - 0.1% 甲酸水 (B); 梯度洗脱: 0~10 min, 2%~17% A; 10~12 min, 17% A; 12~14 min, 17%~19% A; 14~25 min, 19%~33% A; 25~30 min, 33%~100% A; 30~35 min, 100% A; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 25 °C; PDA 扫描范围 190~400 nm。

2.3.2 质谱条件 离子源为 ESI 源; 扫描方式: 正负离子同时扫描; 喷雾电压 3.5 kV, 鞘气体积流量为 241 kPa, 辅助气体积流量为 69 kPa, 毛细管温度 320 °C, 探头加热器温度 300 °C, 最大喷雾电流 100 A, S-Lens 分辨率: 55, 扫描范围 m/z 100~1 500, 质量分辨率 70 000。

2.4 给药方案及样品的采集

实验动物分为空白组 6 只和给药组 8 只。给药组 ig 给予酸枣仁水提取物 30 g/kg (按生药量计), 连续给药 3 d, 于第 4 天给药前 12 h 禁食不禁水, 于给药后 2、4、6、12 h 眼眶采血, 每个时间点 0.5 mL, 样品离心 10 min (4 °C, 3 500 r/min), 取上清液, 得血清样本-80 °C 保存。空白组 ig 给予生理盐水, 其他实验步骤同给药组大鼠。

2.5 血清样本的预处理

分别精密吸取空白血清和含药血清各 800 μL , 加入 4 倍量乙腈, 涡旋 3 min, 离心 10 min (4 °C, 15 000 r/min), 取上清液 N_2 吹干, 残渣分别加 100 μL 甲醇复溶, 离心 5 min (4 °C, 15 000 r/min), 取上清液, 供 MS 分析。

2.6 构建失眠蛋白-蛋白相互作用网络

数据来源与处理: 在 DrugBank 数据库^[9] (<http://www.drugbank.ca/>) 中, 输入关键词“#Insomnia”, 找到治疗失眠症的药物, 确定治疗失眠症的靶标。并设定筛选药物标准“FDA-Approve”, 归纳总结有明确治疗失眠的药物作用靶点, 列出不同靶点出现的频率。

网络构建: 将靶点信息导入 STRING 工具^[10] (<http://string-db.org/cgi/input.pl>), 进行靶点蛋白的相互关联, 在 Organism (物种) 选项中选为 Homo sapiens (人类), 寻找靶点蛋白之间的相互作用。使用 Cytoscape 3.2.1^[11-12] (<http://cytoscape.org/>) 进行网络构建、分析和可视化工作, 软件绘制失眠蛋白-蛋白网络 (PPI)。

2.7 构建入血成分-失眠靶点网络

网络靶点分析: 将入血成分带入 TCMSP 数据库^[13] (<http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>) 和 CoolGeN 数据库收集并整理所对应的作用靶点信息。TCMSP 是一个全面的中药成分系统药理学数据库, 用于查询作用靶点等信息。

网络构建: 将入血成分挖掘出的靶点集合与失眠蛋白网络进行映射, 得到入血成分靶点中与失眠相关的部分, 使用 Cytoscape 3.2.1 软件绘制, 即得酸枣仁入血成分-失眠靶点网络。

3 结果

3.1 血清样品处理方法及最佳采血时间点的确定

本实验考察了甲醇和乙腈沉淀蛋白 2 种血清样品预处理方法。以血清中内源性物质的干扰少, 入血成分信息多为标准, 选取最佳的血清处理方法。最终选择乙腈沉淀蛋白法更为适合本样品的处理。另外, 考察不同时间血清样本。最终确定时间点为给药后 4 h 和 6 h, 其样品信息更丰富。

3.2 大鼠口服酸枣仁水提取物后血中移行成分分析

建立 RSLC-Q Exactive HR-MS 方法, 通过对比研究酸枣仁水提取物^[14]、空白血清以及含药血清样品的色谱图, 分析各色谱峰的 MS、MS/MS 数据, 并参考文献鉴定了大鼠口服酸枣仁水提取物后血清中 15 个成分, 其中包括 6 个黄酮及 1 个代谢物, 5 个三萜皂苷和 1 个生物碱及 1 个代谢物, 结果见图 1、表 2。

3.2.1 黄酮类化合物 负离子模式下, 化合物 6 产生分子离子峰 m/z 607.165 75 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 丢失 1 分子葡萄糖 (Glu) 产生碎片峰 m/z 445; 丢失中性分子 H_2O 产生碎片离子 m/z 427; 丢失 120 产生碎片离子 m/z 307, 120 为黄酮碳糖特征裂解碎片; 脱去 CH_3 产生碎片离子 m/z 292。与对照品及酸枣仁水提取物信息比较, 鉴定为斯皮诺素。正离子模式下, 化合物 9 和 12 分别产生 m/z 785.228 74 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 m/z 271.060 10 分子离子峰。与对照品比较, 分别鉴定为 6'''-阿魏酰斯皮诺素和芹菜素。采用提取离子流

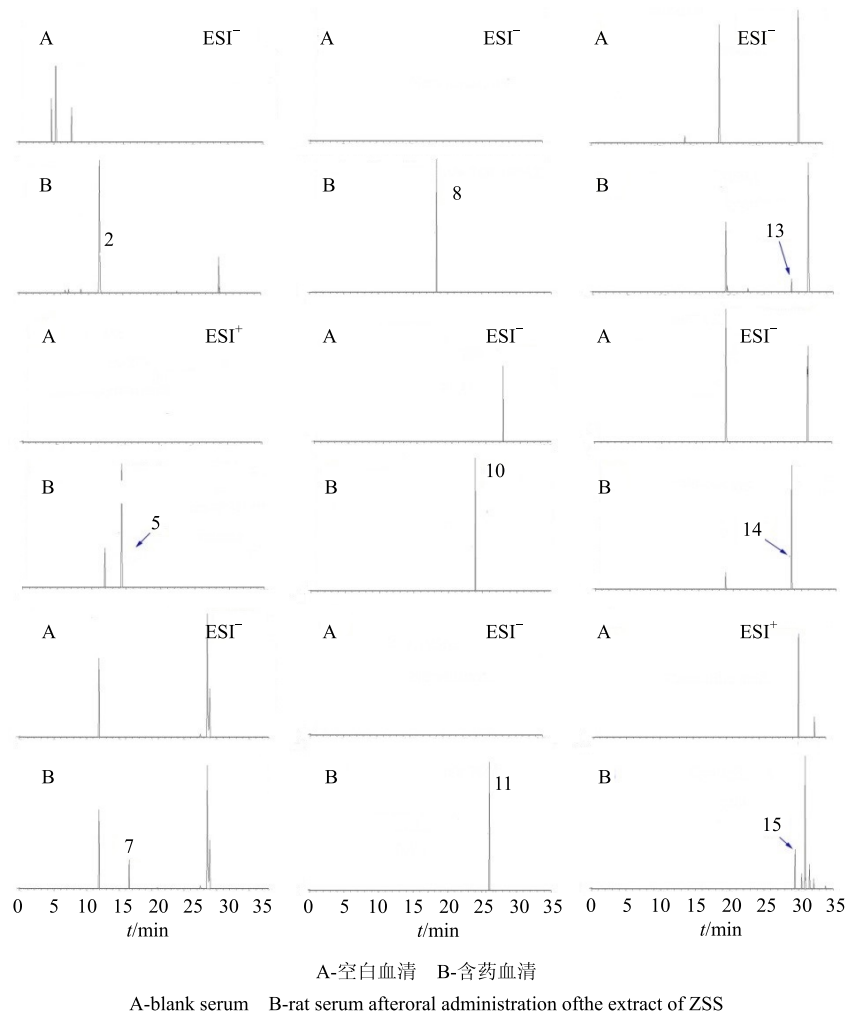


图 1 9 种入血成分提取离子流图
Fig. 1 EIC for nine prototype compounds in ZSS

(EIC)法,与对照品比较,鉴定化合物 7 为当药黄素。

值得注意的是,6''-阿魏酰斯皮诺素应该发生了脱阿魏酰基反应,生成斯皮诺素;进而发生脱糖基反应,生成当药黄素;当药黄素继续发生脱糖基及碳氧键断裂反应,生成脱糖 O-脱甲基化代谢产物芹菜素。可见,斯皮诺素和当药黄素在体内既可称之为原型化合物也可是代谢产物。即黄酮类化合物在体内主要参与了肠道水解反应和肝脏 I 相脱烷基代谢反应。具体途径见图 2。

正离子模式下,化合物 3 和 5 均产生 m/z 595 $[M+H]^+$ 分子离子峰。化合物 3 产生碎片离子 m/z 433 $[M+H-Glu]^+$ 和 m/z 313 $[M+H-Glu-120]^+$; 故推测为文赛宁 II^[14]。采用 EIC 法,结合文献报道^[15-17]及水提物鉴定结果^[14],推断化合物 5 为异牡荆黄素-2''-O-β-D-葡萄糖苷。在负离子模式下,化合物 8 产生分子离子峰 m/z 769.195 62,推测为青天

葵黄酮 J^[14]。化合物 3、5 和 8 均为原型化合物。

3.2.2 三萜皂苷类 在正、负离子模式下含药血清中三萜皂苷类化合物响应均较低。采用 EIC 法,负离子模式下,化合物 13 产生 m/z 1 251.599 61 $[M-H+HCOO]^-$ 的分子离子峰;化合物 14 产生 m/z 1 045.531 25 $[M+H]^+$ 分子离子峰。结合对照品及水提物质谱信息^[14],分别鉴定为酸枣仁皂苷 A 和 B。负离子模式下,化合物 10 产生分子离子峰 m/z 1 223.604 37 $[M-H]^-$;化合物 11 产生 m/z 1 107.559 81 $[M-H+HCOO]^-$ 峰。参考文献报道^[18]和水提物质谱信息^[14],推测二者分别为酸枣仁皂苷 H 和 G。在正离子模式下,化合物 15 产生 m/z 487.339 26 $[M+H]^+$ 分子离子峰,结合文献报道^[19]推测为美洲茶酸。前期研究表明^[14],酸枣仁皂苷 A 可脱去 1 分子 Glu,生成酸枣仁皂苷 B。化合物 10、11、13 和 15 均为原型化合物。

表 2 RSLC-Q Exactive HR-MS 鉴定正常大鼠口服酸枣仁水提取物后入血成分

Table 2 Identification of metabolites in rats serum after oral administration of extract of ZSS by RSLC-Q Exactive HR-MS

峰号	t_R/min	$[M-H]^-/[M+H]^+$		偏差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	分子式	化合物	采血时 间/h
		实测值	理论值					
1	11.34	314.138 21	314.138 68	-0.475	297, 282, 265, 237	$C_{18}H_{19}NO_4$	酸李碱-N-脱烃产物 (M2)	4, 6
2	11.64	286.142 36	286.143 37	-0.235		$C_{17}H_{19}NO_3$	乌药碱	4, 6
3	11.94	595.164 49	595.165 75	-1.257	433, 313	$C_{27}H_{30}O_{15}$	文赛宁 II	4, 6
4	12.42	342.169 71	342.169 98	-0.803	297, 282	$C_{20}H_{23}NO_4$	酸李碱	4, 6
5	14.33	595.166 63	595.161 28	0.883		$C_{27}H_{30}O_{15}$	异牡荆黄素-2''-O- β -D-葡萄糖苷	4, 6
6	15.31	607.167 05	607.165 75	2.147	445, 427, 307, 292	$C_{28}H_{32}O_{15}$	斯皮诺素*	4, 6
7	16.58	447.128 39	447.128 57	-0.410		$C_{22}H_{22}O_{10}$	当药黄素*	6
8	18.40	769.195 62	769.197 44	-2.367		$C_{37}H_{38}O_{18}$	青天葵黄酮 J	4, 6
9	19.66	785.228 21	785.228 74	-0.676		$C_{38}H_{40}O_{18}$	6'''-阿魏酰斯皮诺素	4, 6
10	23.95	1 223.604 37	1 223.605 52	-0.943		$C_{58}H_{96}O_{27}$	酸枣仁皂苷 H	4, 6
11	26.25	1 107.559 81	1 107.560 52	-9.218		$C_{52}H_{86}O_{22}$	酸枣仁皂苷 G	6
		$[M-H+COOH]^-$	$[M-H+COOH]^-$					
12	27.63	271.059 69	271.060 10	-0.410		$C_{15}H_{10}O_5$	芹菜素	4, 6
13	28.54	1 251.599 61	1 251.602 78	-2.631		$C_{58}H_{94}O_{26}$	酸枣仁皂苷 A*	4, 6
		$[M-H+COOH]^-$	$[M-H+COOH]^-$					
14	28.74	1 045.531 25	1 045.557 79	2.118		$C_{52}H_{84}O_{21}$	酸枣仁皂苷 B*	4, 6
15	29.45	487.339 26	487.337 33	-5.214		$C_{30}H_{46}O_5$	美洲茶酸	6

*与对照品比较

*compare with reference substance

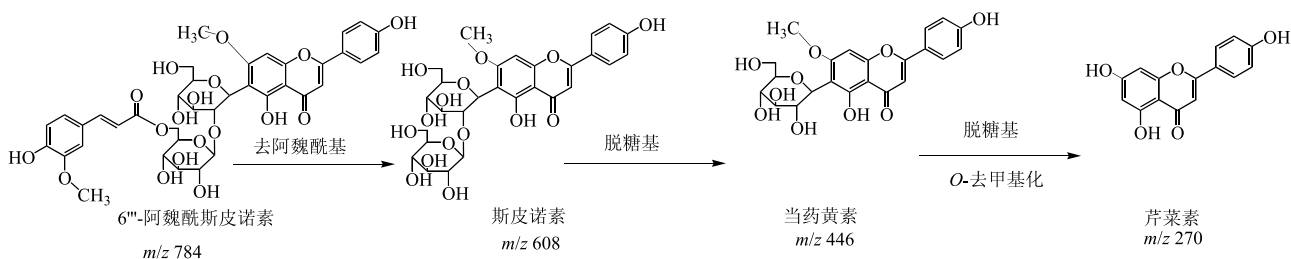


图 2 黄酮类化合物代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathway of flavonoids

3.2.3 生物碱类 正离子模式下, 化合物 2 产生分子离子峰 m/z 286.142 36 $[M+H]^+$ 。化合物 4 产生分子离子峰 m/z 342.169 71 $[M]^+$ 及碎片离子 m/z 297 $[M-3CH_3]^+$ 和 m/z 282 $[M-4CH_3]^+$, 与水提物质谱信息^[14]对比, 推测化合物 2 和 4 分别为乌药碱和酸李碱。另外, 化合物 1 产生 m/z 314.138 68 $[M+H]^+$ 峰, 其准分子离子峰比酸李碱少了 2 个 m/z 14, 由此推测其应该是酸李碱发生 N-脱烃反应, 其碎片离子依次为 m/z 297 $[M-NH_3]^+$, 282 $[M-NH_3-CH_3]^+$, 265 $[M-NH_3-CH_3-OH]^+$, 237 $[M-2CH_2O]^+$ 。可见, 酸李碱主要发生了肝脏 I 相代谢反

应。具体途径见图 3。

3.3 失眠蛋白-蛋白相互作用网络 (PPI)

以失眠症的英文名 “Insomnia” 为关键词在

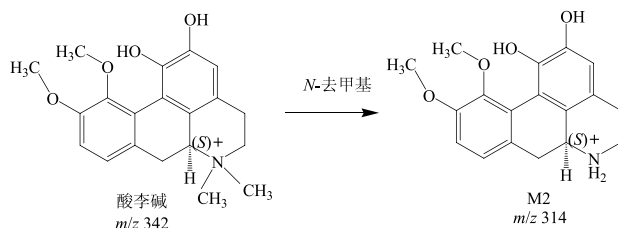


图 3 酸李碱代谢途径

Fig. 3 Metabolic pathway of zizyphusine

DrugBank 数据库中检索,并记录每个靶点的类别及出现的频率,去重后,共计找到 143 个靶点(Target),频次共计 555 次。失眠相关蛋白靶点主要包括 γ -氨基丁酸类受体(168 次)、5-羟色胺类受体(65 次)、肾上腺素类受体(61 次)、乙酰胆碱类受体(47 次)、多巴胺类受体(28 次)、谷氨酸受体类(23 次)和去甲肾上腺素受体(16 次),其中 γ -氨基丁酸类受体和 5-羟色胺类受体出现频次最多。采用 Cytoscape 3.2.1 绘制 PPI;其次,通过 Network analysis 计算网络参数,其中节点数目(number of nodes)为 118 个,网络度(network density)为 0.086,平均相邻节点数(average number of neighbors)为 10.068,特征路径长度(characteristic path length)、最短路径(shortest paths)为 10 944 (79%)。将节点(Node)接近中心性大于等于 0.25 的节点形状设置为椭圆形,颜色设置为蓝色;其他形状设置为方形,颜色设置为绿色。结果见图 4。

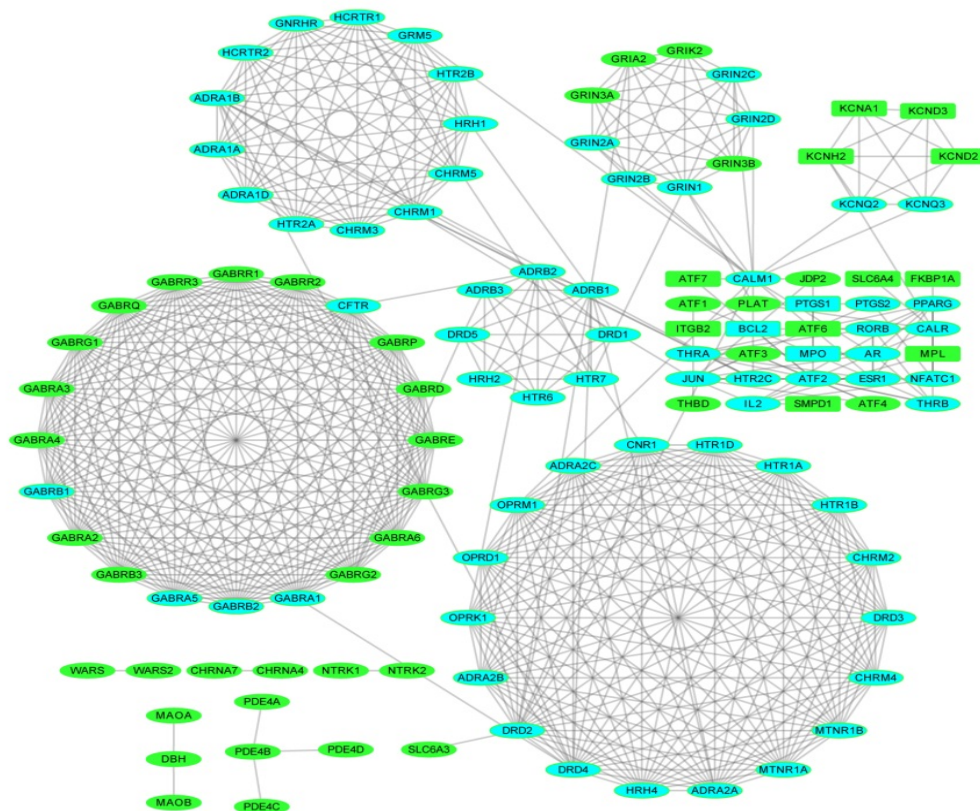
3.4 入血成分-靶点网络

将酸枣仁 15 个入血成分输入 TCMSP 和

CoolGeN 数据库,分别检索所对应靶点,仅检索到 10 个成分有对应靶点,共计 108 个。采用 Cytoscape 中 Merge 组合功能,筛选出乌药碱、酸李碱、芹菜素、斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A 5 个入血成分与失眠靶点具有直接相关性,并在失眠网络中找出相互作用靶点。其中包括 γ -氨基丁酸受体、肾上腺素类受体、乙酰胆碱类受体、5-羟色胺类受体、谷氨酸受体类和多巴胺类受体等。乌药碱对应 51 个失眠相关靶点,酸李碱对应 37 个失眠相关靶点,酸枣仁皂苷 A 对应 15 个失眠相关靶点,斯皮诺素对应 11 个失眠相关靶点,芹菜素对应 7 个失眠相关靶点。采用 Cytoscape 3.2.1 软件绘制入血成分-失眠蛋白网络。结果见图 5。

4 讨论

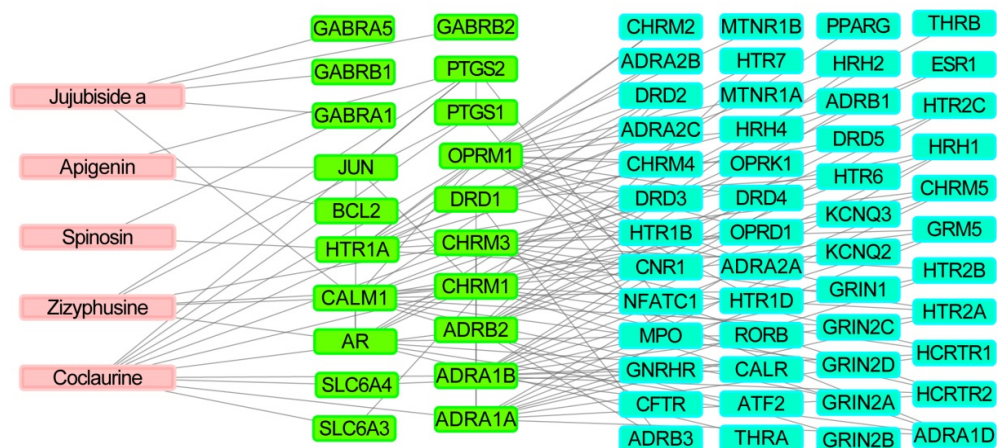
通过酸枣仁入血成分所对应的靶点集合与失眠蛋白网络进行映射,筛选到 5 个入血成分乌药碱、酸李碱、芹菜素、斯皮诺素、酸枣仁皂苷 A 与失眠蛋白靶点相关。黄酮和生物碱类成分共同作用于 5-羟色胺受体、肾上腺素受体、谷氨酸受体、多巴胺



椭圆表示节点接近中心性大于或等于 0.25, 方形代表节点出现频次小于 0.25, 蓝色代表成分所对应的靶点在失眠网络中的位置
 Ellipse represents the closeness centrality of greater than 0.25; Rectangle represents the closeness centrality of less than 0.25; Blue color represents the place of components-insomnia targets in insomnia PPI

图 4 失眠蛋白-蛋白相互作用网络

Fig. 4 Protein-protein interaction (PPI) networks of insomnia



粉色表示成分，绿色表示成分直接作用靶点，蓝色表示成分间接作用靶点

Pink color represents components; Green indicates direct Insomnia targets of the component; Blue indicates indirect Insomnia targets of the component

图 5 酸枣仁水提取物入血成分-失眠蛋白网络

Fig. 5 Compound-network target of prototype compounds from ZSS

受体和乙酰胆碱受体；皂苷类成分主要作用靶点为 γ -氨基丁酸受体、多巴胺受体和谷氨酸受体；生物碱类成分主要作用靶点为 5-羟色胺受体、褪黑素受体、乙酰胆碱受体和肾上腺素受体。由此可见，黄酮和生物碱类成分共同作用于 5-羟色胺受体、肾上腺素受体和乙酰胆碱受体；皂苷和黄酮类共同作用于多巴胺受体和谷氨酸受体，3 类成分未见共同交集的靶点。另外，皂苷类特异性靶点为 γ -氨基丁酸受体；生物碱类特异性靶点为褪黑素受体。

将入血成分作用靶点预测结果进行文献验证。斯皮诺素通过 5-羟色胺 (5-HT) 能系统增强戊巴比妥钠诱导的大鼠睡眠，延长睡眠时间，缩短以翻正反射消失为评价指标的睡眠潜伏期，而这些效应均以 5-HT 的前体 5-羟色胺酸 (5-HTP) 的存在为前提^[20-22]。进一步研究发现，斯皮诺素对戊巴比妥钠诱导的睡眠增强作用可能与突触后的 5-HT_{1A} 受体有关。斯皮诺素也具有抗焦虑作用，其作用机制与 γ -氨基丁酸受体 A (GABA_A) 和 5-HT_{1A} 受体调节有关^[23]。有研究表明^[24]，芹菜素具有温和的镇静和抗焦虑作用。体内外实验研究表明^[25]，酸枣仁皂苷 A 可影响海马区由谷氨酸介导的兴奋性信号通路。另外，还有抑制小鼠自发活动的作用。酸枣仁皂苷 A 和地西洋对 GABA_A 受体各个亚型表达的调节作用既相似也有不同之处。另有研究表明，乌药碱和酸李碱不能延长环巴比妥钠诱导的小鼠睡眠时间，认为其无镇静催眠作用^[26]，与网络分析结果不一致。分析原因为乌药碱和酸李碱的网络预测靶点

是褪黑素受体。褪黑素是一种内源性物质^[27]，它是通过对内分泌系统的调节而起作用的，提示乌药碱和酸李碱的作用途径不同于其他类化合物。为后期酸枣仁不同类型化合物作用机制的研究提供了新的研究思路。

本实验采用血清化学与网络药理学结合的策略，在体内化学成分辨识的基础上，通过关联网构建及分析，初步阐释了酸枣仁治疗失眠的体内潜在效应物质，分别为乌药碱、酸李碱、芹菜素、斯皮诺素和酸枣仁皂苷 A。研究方法聚焦于辨析体内整体成分群变化与生物效应间的内在关联，可为中药效应物质提供新的研究视角。

参考文献

[1] 杨 华, 齐炼文, 李会军, 等. 以“等效成分群”为标示量的中药质量控制体系的构建 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 510-513.

[2] 许海玉, 黄璐琦, 卢 鹏, 等. 基于体内 ADME 过程和网络药理学的中药现代研究思路 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 142-145.

[3] 徐 风, 杨东辉, 尚明英, 等. 中药药效物质的“显效形式”、“叠加作用”和“毒性分散效应”——由中药体内代谢研究引发的思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 688-703.

[4] 肖小河, 鄢 丹, 袁海龙, 等. 基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1345-1348.

[5] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792.

- [6] 宋阔魁, 毕天, 展晓日, 等. 网络药理学指导下的中药有效成分发现策略 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(1): 27-31.
- [7] 崔祝梅. 酸枣仁的药理研究及临床应用 [J]. 甘肃中医学院学报, 1987(3): 49-52.
- [8] 郑晔, 钱苏瑜, 游自立. 酸枣仁药理作用研究进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2006, 28(1): 35-37.
- [9] Wishart D S, Knox C, Guo A C, *et al.* DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 901-906.
- [10] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, *et al.* STRING v9. 1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: 808-815.
- [11] 吴磊宏, 王毅, 范晓辉. 网络药理学技术工具: 网络可视化及网络分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(21): 2923-2925.
- [12] Li L, Cheng W Y, Glicksberg B S, *et al.* Identification of type 2 diabetes subgroups through topological analysis of patient similarity [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(311): 1-15.
- [13] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [14] 闫艳, 李强, 杜晨晖, 等. 基于体内-体外物质组关联分析酸枣仁潜在效应物质 [J]. 药学报, 2017, 52(2): 283-290.
- [15] Sun S, Liu H, Xu S, *et al.* Quality analysis of commercial samples of *Ziziphi spinosae* semen (suanzaoren) by means of chromatographic fingerprinting assisted by principal component analysis [J]. *J Pharm Anal*, 2014, 4(3): 217-222.
- [16] Ren Y, Wang P Y, Wu C S, *et al.* Identification of the metabolites after oral administration of extract of *Ziziphi spinosae* semen to rats or dogs by high-performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(1): 17-26.
- [17] Niu C Y, Wu C S, Sheng Y X, *et al.* Identification and characterization of flavonoids from semen *Ziziphi spinosae* by high-performance liquid chromatography/linear ion trap FTICR hybrid mass spectrometry: Original article [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2010, 12(4): 300-312.
- [18] Ma J J, Kang L P, Zhou W B, *et al.* Identification and characterization of saponins in extract of *Ziziphi spinosae* Semen (ZSS) by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF-MS^E) [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(26): 6152-6159.
- [19] Yang B, Yang H S, Chen F, *et al.* Phytochemical analyses of *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* seed by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Analyst*, 2013, 138(22): 6881-6888.
- [20] Jung I H, Lee H E, Park S J, *et al.* Ameliorating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid, on scopolamine-induced memory impairment in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behavior*, 2014, 120(5): 88-94.
- [21] Wang L E, Zhang X Q, Yin Y Q, *et al.* Augmentative effect of spinosin on pentobarbital-induced loss of righting reflex in mice associated with presynaptic 5-HT 1A₁ receptor [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(2): 277-282.
- [22] Wang L E, Cui X Y, Cui S Y, *et al.* Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of *Semen Ziziphi spinosae*, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT 1A receptors [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(6): 404-409.
- [23] Liu J, Zhai W M, Yang Y X, *et al.* GABA and 5-HT systems are implicated in the anxiolytic-like effect of spinosin in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behavior*, 2015, 128: 41-49.
- [24] Ibibia E K. Plant-derived compounds with potential sedative and anxiolytic activities [J]. *Inter J Basics Appl Sci*, 2013, 2(1): 63-78.
- [25] You Z L, Xia Q, Liang F R, *et al.* Effects on the expression of GABA_A receptor subunits by jujuboside A treatment in rat hippocampal neurons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(2): 419-423.
- [26] Han B H, Park M H. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinosa* [J]. *Arch Pharm Res*, 1987, 10(4): 203-207.
- [27] 袁光辉, 郑晓惠. 失眠症治疗药物的研究进展 [J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(6): 772-773.