

基于网络药理学及动物实验探究辣木籽油 – 天麻素复合物改善睡眠作用及机制

高文荣¹, 蔡建¹, 赵冬梅², 朱铃¹, 徐启贺¹, 刘威良¹

(1. 曲靖师范学院 云南省高原特色果酒技术创新与应用工程研究中心, 云南 曲靖 655011;

2. 云南中博食品科技集团有限公司, 云南 曲靖 655011)

摘要:旨在为辣木籽油高值化利用及辣木籽油 – 天麻素复合物改善睡眠功能食品、药品的开发提供理论指导,对辣木籽油中的微量伴随物和靶向代谢组学进行了分析,以辣木籽油 – 天麻素复合物为灌胃材料进行动物实验,探究其改善小鼠睡眠作用,利用网络药理学预测复合物改善睡眠作用机制。结果表明,辣木籽油中微量伴随物总黄酮、总多酚、维生素 E 含量分别为 0.94%、0.01%、74.35 $\mu\text{g/g}$,检测出 11 种内源性助眠物质且以腺苷含量最高。动物实验表明,辣木籽油 – 天麻素复合物能够显著降低小鼠自主活动次数,协同戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠效果较好,可降低戊四氮诱导的小鼠惊厥死亡率。网络药理学分析表明:辣木籽油 – 天麻素复合物主要活性成分天麻素、油酸、豆甾醇中分别预测出 1、11、7 个交集靶标基因;天麻素、油酸、豆甾醇的 KEGG 富集得到 90 条代谢通路,GO 分析显示复合物改善睡眠涉及轴突膜蛋白、神经相关膜蛋白和氯离子通道等生物过程;天麻素、油酸、豆甾醇中获取治疗睡眠障碍潜在基因分别为 1、14、10 个,由此构建蛋白 – 蛋白网络发现,AR、MAPK3、PPARG、PRKACA、NR3C1、SREBF1、RXRA、PTPN11、SLC6A3、SLC6A4、ESR1、GRIN2A、GRIN2B、GRIN2C、GRIN2D、CHRM2、RORA 可能为辣木籽油 – 天麻素复合物改善睡眠的核心靶点基因。综上,辣木籽油 – 天麻素复合物具有改善睡眠作用,可用于功能食品开发。

关键词:网络药理学;辣木籽油 – 天麻素复合物;改善睡眠;作用机制

中图分类号:TS225.1;TS221 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2025)09-0114-10

Sleep improving effect and its mechanism with *Moringa oleifera* seed oil – gastrodin compound based on network pharmacology and animal experiment

GAO Wenrong¹, CAI Jian¹, ZHAO Dongmei², ZHU Ling¹,
XU Qihe¹, LIU Weiliang¹

(1. Yunnan Plateau Characteristic Fruit Wine Technology Innovation and Application Engineering Research Center, Qujing Normal University, Qujing 655011, Yunnan, China; 2. Yunnan Zhongbo Food Technology Group Co., Ltd., Qujing 655011, Yunnan, China)

收稿日期:2024-05-20;修回日期:2025-04-20

基金项目:2022 年云南省科技厅青年基础研究专项(202201AU070212);2023 年度云南省地方本科高校基础研究联合专项——面上项目(202301BA070001-080, 202301BA070001-076);2023 年国家级大学生创新创业训练计划项目(G202310684011);曲靖市市校科技创新联合专项资金——重点项目(KJLH2023ZD04, KJLH2023ZD05)

作者简介:高文荣(1987),男,讲师,博士,主要从事分子生物学研究(E-mail)gaowenrong2012@163.com。

通信作者:刘威良,讲师,博士(E-mail)lwl2046@126.com。

Abstract: The aim is to provide theoretical guidance for the high-value utilization of *Moringa oleifera* seed oil and the development of functional foods and pharmaceuticals that improve sleep based on *Moringa oleifera* seed oil – gastrodin compound. The trace concomitant substances and targeted metabolomics in *Moringa oleifera* seed oil were analyzed. Animal experiments were conducted using the *Moringa oleifera* seed oil – gastrodin compound as the gavage material to investigate the sleep –

improving effect of the compound. Network pharmacology was used to predict the mechanism of the compound's sleep – improving effect. The results showed that trace concomitant of total flavones, total polyphenol and V_E in *Moringa oleifera* seed oil were 0.94%, 0.01%, 74.35 $\mu\text{g/g}$, respectively, and 11 endogenous sleep – improving substances were detected and adenosine content was the highest. Animal experiments revealed that the compound can significantly reduce the number of spontaneous locomotor activities in mice, the synergistic effect of pentobarbital sodium on inducing sleep in mice was better and reduce the seizure mortality rate in mice induced by pentylenetetrazol. Network pharmacology analysis showed that gastrodin, oleic acid, and stigmasterol were the main active component of the compound, and 1, 11 and 7 intersection targets were predicted respectively. The enrichment of KEGG of the three active components resulted in 90 signaling pathways, and GO analysis indicated that the improvement of sleep by the compound involved biological processes such as axonal membrane proteins, neuroassociated membrane proteins, and chloride ion channels. The potential genes number for treating sleep disorders obtained from gastrodin, oleic acid and stigmasterol were 1, 14 and 10, respectively. Thus, a protein – protein network was constructed and discovered. *AR*, *MAPK3*, *PPARG*, *PRKACA*, *NR3C1*, *SREBF1*, *RXRA*, *PTPN11*, *SLC6A3*, *SLC6A4*, *ESR1*, *GRIN2A*, *GRIN2B*, *GRIN2C*, *GRIN2D*, *CHRM2* and *RORA* might be the key target genes for improving sleep in the compound. In conclusion, *Moringa oleifera* seed oil – gastrodin compound has sleep – improving effect, and can be used in the development of functional foods.

Key words: network pharmacology; *Moringa oleifera* seed oil – gastrodin compound; sleep – improving; mechanism

睡眠是人体不可或缺的生命活动之一,人的一生大约有 1/3 的时间用于睡眠^[1]。但如今快节奏的社会生活、无形的工作压力、不良的生活习惯等因素均会诱发失眠。失眠是“睡眠障碍”的一种,临床主要表现为入睡困难、早醒、睡眠质量差。长期失眠会导致记忆力减退、肥胖、抑郁等疾病发生。近年来,失眠发病率逐年上升且趋于年轻化,已成为现代城市文明的流行病,严重影响人们的健康和日常生活^[2]。目前,药物是治疗失眠的首选,常用药物有巴比妥类、苯二氮卓类、褪黑素类等^[3],但长期服用有依赖性、成瘾性、戒断性或停药后出现反跳现象等副作用,故针对安全、高效地改善睡眠的功能食品和药品的研发刻不容缓。

天麻(*Gastrodia elata*),原名赤箭,始载于《神农本草经》,宋代《开宝本草》开始收载天麻之名,李时珍在《本草纲目》中将二者合并,统称为天麻。天麻主产于云南昭通,在贵州、湖北等地亦有分布^[4]。现代药理研究表明,天麻中的活性物质天麻素具有良好的镇静、抗惊厥等功效^[5]。辣木(*Moringa oleifera* Lam.),别名鼓槌树,是一种“药食两用”植物资源,民间常用于治疗风湿病、癫痫等病症^[6]。云南是我国辣木种植的核心产区之一。辣木籽油是从辣木种子中榨出的油,其富含不饱和脂肪酸、甾醇、生育酚等生物活性成分,具有抗氧化应激、神经

保护等生理活性^[7-8]。本课题组前期研究发现^[9],低温压榨辣木籽油中油酸、豆甾醇含量分别为 76.9%、0.54%,具有良好的改善睡眠作用。但目前关于辣木籽油 – 天麻素复合物改善睡眠作用的研究鲜见报道。网络药理学是一门由生物信息学、系统生物学和经典药理学理论组成的基础学科,可用于预测药物治疗疾病机制,近年来被广泛应用于功能食品领域研究^[10]。

因此,本文对辣木籽油的微量伴随物和代谢组学进行分析,通过动物实验体内评价辣木籽油 – 天麻素复合物改善睡眠的药效学作用,并采用网络药理学初步探究复合物中活性成分(天麻素、油酸、豆甾醇)改善睡眠的作用机制,以期对辣木籽油高值化利用及复合物改善睡眠功能食品、药品的研发提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

低温压榨辣木籽油,自制;天麻素(纯度 $\geq 90\%$),云南昆药集团有限公司;戊巴比妥钠、戊四氮,默克公司;艾司唑仑片,华中药业股份有限公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 实验小鼠

SPF 级 ICR 小鼠,雄性,体质量 18 ~ 22 g,湖南

斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证 SCXK(湘)2020-0003。实验期间遵守实验动物使用的“3R原则”(替代、减少、优化),确保给予小鼠人道关怀。

1.1.3 仪器与设备

秒表,深圳市惠波工贸有限公司;Vanquish 高效液相色谱仪、紫外可见分光光度计,赛默飞世尔科技公司;台式高速离心机,德国 Sorval 集团;YLS-1A 多功能小鼠自主活动记录仪,济南益延科技发展有限公司;超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC-QQQ-MS)仪,AB Sciex 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 辣木籽油微量伴随物含量测定

1.2.1.1 总黄酮含量测定

参考文献[11]测定辣木籽油中总黄酮含量。

1.2.1.2 总多酚含量测定

参考文献[12]并稍作修改测定辣木籽油中总多酚含量。

1.2.1.3 维生素 E(V_E)含量测定

采用高效液相色谱(HPLC)法对样品 V_E 含量进行检测。参考 GB 5009.82—2016 中第二法对样品进行预处理后进行 HPLC 分析。HPLC 条件:Ultimate ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m);柱温 30℃;流动相为甲醇-水(体积比 98:2),流速 1.2 mL/min;运行时间 20 min;检测波长 290 nm;进样量 10 μ L。

1.2.2 辣木籽油靶向代谢物分析

参考文献[13],以 UPLC-QQQ-MS-多反应监测(MRM)技术为分析平台,对辣木籽油代谢物进行靶向定量分析。

UPLC 条件:自动进样器温度 4℃;柱温 40℃;流速 0.3 mL/min;进样量 5 μ L;流动相为 pH 9.0 5% 乙腈水溶液(含 20 mmol/L 乙酸铵)(A 液)和 100% 乙腈(B 液);梯度洗脱程序为 0~1 min 95% B 液,1~14 min 95%~65% B 液,14~15 min 65%~35% B 液,15~17 min 35% B 液,17~17.1 min 35%~95% B 液,17.1~20 min 95% B 液。

MRM 质谱条件:离子源温度 550℃,正离子源载气压力 0.28 MPa,负离子源载气压力 0.34 MPa,气帘气压力 0.24 MPa,离子喷雾电压 5 500 V(正离子)/4 500 V(负离子)。

采用 MRM Analyzer 软件对数据进行处理,各代谢物含量以峰面积表示。

1.2.3 辣木籽油-天麻素复合物的制备

向辣木籽油中添加一定比例的天麻素,再滴加吐温-80(≤ 1 mL),于研钵中研磨使其乳化完全。

分装于无菌试管中,于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.4 实验动物分组及给药

参考文献[14]采用戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠模型,评价辣木籽油-天麻素复合物改善睡眠作用。实验小鼠先适应性饲养 3 d 后,随机分为空白对照组、阳性对照组、辣木籽油组(2 g/kg)、天麻素低剂量组(150 mg/kg)、天麻素高剂量组(300 mg/kg)、复合物低剂量组(150 mg/kg 天麻素+2 g/kg 辣木籽油)和复合物高剂量组(300 mg/kg 天麻素+2 g/kg 辣木籽油),每组 10 只小鼠,3 组平行样。其中,空白对照组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,阳性对照组仅实验当天灌胃 2 mg/kg 安定,其余时间段均灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。实验动物给药剂量根据预实验及相关文献确定。各组小鼠每日灌胃 1 次,连续 7 d,于末次给药 30 min 后进行相关指标的测定。

1.2.5 小鼠自主活动检测

将小鼠投入多功能小鼠自主活动记录仪检测室,适应环境 3 min 后,记录 5 min 内小鼠自主活动次数^[15]。

1.2.6 小鼠睡眠指标测定

1.2.6.1 睡眠率

对小鼠进行腹腔注射戊巴比妥钠溶液阈下剂量(30 mg/kg),当小鼠翻正反射消失持续 1 min 以上则记为入睡,睡眠率为注射后 15 min 内各组小鼠的入睡数量与小鼠总数量的比值。

1.2.6.2 睡眠潜伏期和睡眠持续时间

对小鼠进行腹腔注射戊巴比妥钠溶液阈剂量(50 mg/kg),记录小鼠睡眠潜伏期(从注射戊巴比妥钠溶液开始至小鼠翻正反射消失的时间)和睡眠持续时间(从小鼠翻正反射消失至恢复正常活动的时间)^[16]。

1.2.7 小鼠惊厥死亡率计算

对小鼠进行腹腔注射戊四氮溶液(100 mg/kg),观察并记录各组小鼠惊厥死亡情况^[17]。小鼠惊厥死亡率为各组死亡小鼠数量与小鼠总数量的比值,死亡保护率为空白对照组死亡小鼠数量与实验组死亡小鼠数量差值与空白对照组死亡小鼠数量的比值。

1.2.8 辣木籽油-天麻素复合物改善睡眠作用网络药理学分析

1.2.8.1 天麻素、油酸和豆甾醇的靶标预测

基于 PubChem 数据库^[18]获取复合物中天麻素、油酸和豆甾醇的结构,并通过 SwissTarget Prediction(STP)^[19]和 The Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine(ETCM)^[20]数据库对它们的靶向蛋白进行预测。

1.2.8.2 靶标预测的基因本体(GO)和京都基因与基因百科全书(KEGG)富集分析

为了探究天麻素、油酸和豆甾醇靶标在机体内可能涉及的功能和信号通路,通过 R 语言 ClusterProfiler package^[21] 分别对天麻素、油酸和豆甾醇靶标的并集基因进行 GO 和 KEGG 富集,并通过设置阈值校准后的 $p < 0.05$ 对富集条目进行筛选。

1.2.8.3 睡眠障碍相关基因(SDRGs)的获取

通过 MalaCards^[22]、OMIM^[23] 和 Phenolyzer^[24] 数据库检索了“Sleep disorder”,获取 SDRGs。

1.2.8.4 治疗睡眠障碍的潜在基因的获取

基于 Jvenn 插件^[25] 获取并集 SDRGs 分别与天麻素、油酸和豆甾醇并集靶标基因靶点的交集基因,以获取 3 个活性成分治疗睡眠障碍的可能靶点。

1.2.8.5 治疗睡眠障碍潜在基因的蛋白-蛋白互作(PPI)网络构建

通过 String 数据库进行 PPI 网络的构建,以探究交集靶点之间的相互作用。此外,通过 R 语言的 Count package 对每个靶标的作用次数进行记数及可视化。

1.2.9 统计学分析

实验数据采用 SPSS22 软件进行分析,计量资料组间比较采用 t 检验,结果以“平均值 $\pm$ 标准差”表示,计数资料采用卡方检验,若 $p < 0.05$ 则具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 辣木籽油微量伴随物含量

辣木籽油中总黄酮、总多酚、 V_E 含量见表 1。

表 1 辣木籽油中总黄酮、总多酚及 V_E 含量

Table 1 Contents of total flavonoids, total polyphenols and V_E in <i>Moringa oleifera</i> seed oil	
指标	含量
总黄酮/%	0.94
总多酚/%	0.01
$V_E/(\mu\text{g/g})$	74.35

由表 1 可知,辣木籽油中总黄酮、总多酚、 V_E 含量分别为 0.94%、0.01%、74.35 $\mu\text{g/g}$ 。黄酮类化合物广泛存在于植物组织中,具有神经保护、抗氧化等多种生理功效。Ogbunugafo 等^[11] 研究发现,辣木籽油中总黄酮、总多酚含量分别 18.24 mg/g、40.17 mg/g。Anwar 等^[26] 研究表明,巴基斯坦周边地区的辣木籽油中 V_E 含量在 247.21 ~ 289.12 mg/kg。这些研究与本文结果存在差异,原因在于样品种类、检测方法和地域存在差异。

2.2 辣木籽油靶向代谢物分析

正离子模式下,辣木籽油中主要靶向代谢物峰面积见表 2。

表 2 辣木籽油中主要靶向代谢物峰面积

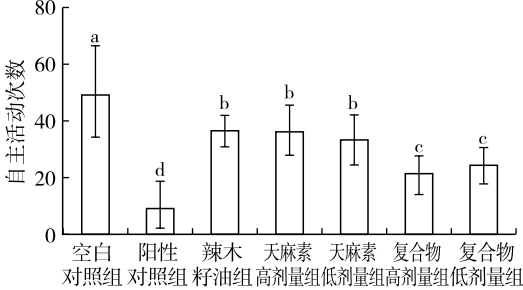
Table 2 The peak area of main targeted metabolites in *Moringa oleifera* seed oil

代谢物	质荷比	保留时间/min	峰面积
腺苷	268.11/136	4.81	51 910 952.510
色氨酸	205.1/146.3	7.97	2 329 470.586
γ -氨基丁酸	104.1/87	9.86	285 087.625
叶酸	442.1/295.1	8.04	15 293.436
甘氨酸	76/59	10.05	4 157 619.814
维生素 B ₁	265/81	15.34	306 486.750
维生素 B ₂	377/243.2	6.27	39 737.746
维生素 B ₃	123/106	2.14	658 952.375
维生素 B ₅	220.1/90.1	7.47	206 815.621
维生素 B ₆	170.1/134.1	2.05	1 817 789.750
维生素 B ₇	245.1/227.1	6.49	193 717.852

由表 2 可知,辣木籽油中主要靶向代谢物有腺苷、色氨酸、 γ -氨基丁酸、叶酸、甘氨酸、维生素 B₁、B₂、B₃、B₅、B₆、B₇,其中腺苷含量远高于其他物质。此外,有研究表明色氨酸、甘氨酸、 γ -氨基丁酸、腺苷、叶酸、维生素 B₁、维生素 B₆ 与睡眠调节相关^[27],这也为本文研究辣木籽油改善睡眠作用提供了理论基础。

2.3 辣木籽油-天麻素复合物对小鼠自主活动的影响

辣木籽油-天麻素复合物对小鼠自主活动的影响见图 1。



注:不同字母表示具有显著差异($p < 0.05$)。下同

Note: Different letters indicate significant differences($p < 0.05$).

The same below

图 1 辣木籽油-天麻素复合物对小鼠自主活动的影响
Fig.1 Effect of *Moringa oleifera* seed oil - gastrodin compound on spontaneous locomotor activities in mice

由图 1 可知,与空白对照组相比,各组小鼠的自主活动次数均显著降低($p < 0.05$)。与辣木籽油组和天麻素组相比,复合物组小鼠的自主活动次数显著降低,表明辣木籽油和天麻素均具有抑制睡眠障碍的作用,且复合物的抑制作用显著优于辣木籽油和天麻素的。

2.4 辣木籽油-天麻素复合物对小鼠睡眠的影响

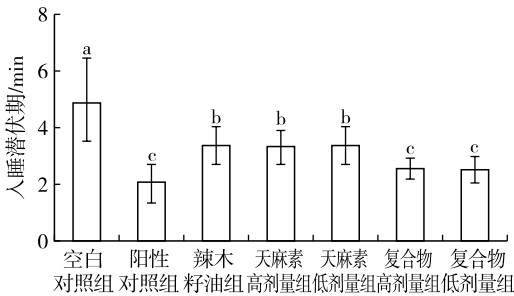
2.4.1 协同阈下剂量戊巴比妥钠对小鼠入睡率的影响

复合物协同阈下剂量戊巴比妥钠对小鼠入睡率的影响见表 3。

表3 复合物协同阈下剂量戊巴比妥钠对小鼠入睡率的影响
Table 3 Effect of compound on sleep rate in mice induced by subthreshold dose pentobarbital sodium

组别	入睡数量(只)	入睡率/%
空白对照组	1	10
阳性对照组	10	100***
辣木籽油组	5	50*
天麻素高剂量组	5	50*
天麻素低剂量组	5	50*
复合物高剂量组	8	80**
复合物低剂量组	7	70**

注:与空白对照组相比,*表示具有显著差异($p < 0.05$),**表示具有高度显著差异($p < 0.01$),***表示具有极显著差异($p < 0.001$)。下同
Note: Compared with the blank group, * means a significant difference ($p < 0.05$), ** means a highly significant difference ($p < 0.01$), and *** means a extremely significant difference ($p < 0.001$). The same below



由表3可知,与空白对照组比较,各实验组小鼠的入睡率均显著升高($p < 0.05$, $p < 0.01$),复合物组小鼠的入睡率高于辣木籽油组和天麻素组,表明辣木籽油-天麻素复合物协同阈下剂量戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的作用更佳。

2.4.2 协同阈剂量戊巴比妥钠对小鼠睡眠潜伏期和睡眠持续时间的影响

复合物协同阈剂量戊巴比妥钠对小鼠入睡潜伏期和睡眠持续时间的影响见图2。

由图2可知,与空白对照组比较,各组小鼠的入睡潜伏期均不同程度缩短,小鼠睡眠持续时间均有不同程度延长。与辣木籽油组和天麻素组比较,复合物组小鼠的入睡潜伏期更短,睡眠持续时间更长,表明辣木籽油-天麻素复合物协同阈剂量戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠的作用更佳。

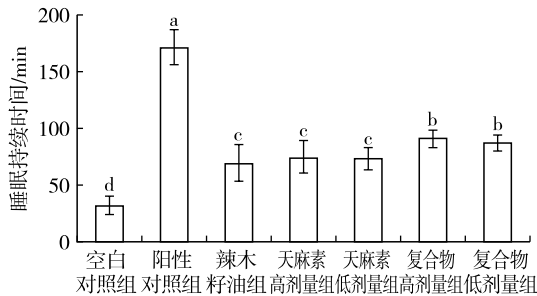


图2 复合物协同阈剂量戊巴比妥钠对小鼠入睡潜伏期和睡眠持续时间的影响

Fig. 2 Effect of compound synergistic threshold dose pentobarbital sodium on the latency and duration of sleep in mice

2.5 辣木籽油-天麻素复合物对小鼠惊厥死亡率的影响

复合物对小鼠惊厥作用的影响见表4。

表4 复合物对小鼠惊厥死亡率和死亡保护率的影响
Table 4 Effect of compound on seizure mortality rate and mortality protection rate in mice

组别	死亡数(只)	死亡率/%	死亡保护率/%
空白对照组	10	100	0
阳性对照组	0	0***	100***
辣木籽油组	7	70	30
天麻素高剂量组	6	60*	40*
天麻素低剂量组	5	50**	50**
复合物高剂量组	4	40**	60**
复合物低剂量组	3	30***	70***

由表4可知,与空白对照组相比,各组小鼠的惊厥死亡率均不同程度降低,死亡保护率有不同程度上升,其中辣木籽油组小鼠死亡率与空白对照组相比无显著差异($p > 0.05$),其余实验组均与空白对照组存在显著差异($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$)。与

辣木籽油组和天麻素组比较,复合物组的小鼠死亡率较低,死亡保护率升高,但不具有显著差异($p > 0.05$)。

2.6 复合物活性成分的网络药理学分析

2.6.1 天麻素、油酸和豆甾醇的作用靶点

基于STP和ETCM数据库预测复合物中天麻素、油酸和豆甾醇的作用靶标,结果见图3。

由图3a可知,STP和ETCM数据库分别预测天麻素存在16个和33个可能性大于0的靶标基因,STP和ETCM数据库共有1个交集靶标基因,48个并集靶标基因。

由图3b可知,STP和ETCM数据库分别预测油酸存在82个和64个可能性大于0的靶标基因,STP和ETCM数据库共有11个交集靶标基因,135个并集靶标。

由图3c可知,STP和ETCM数据库分别预测豆甾醇存在41个和44个可能性大于0的靶标基因,STP和ETCM数据库共有7个交集靶标基因,78个并集靶标基因。

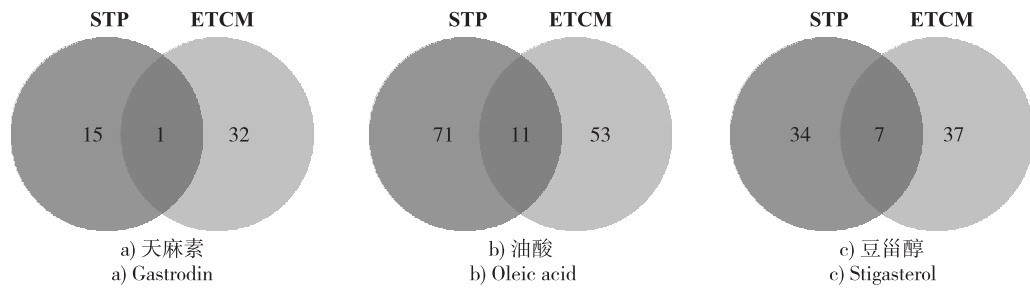


图 3 基于 STP 和 ETCM 数据库预测天麻素、油酸和豆甾醇的作用靶标基因

Fig.3 Predicted targets gene of gastrodin, oleic acid and stigasterol based on STP and ETCM databases

2.6.2 天麻素、油酸和豆甾醇靶标基因的 GO 和 KEGG 富集分析

GO 富集分析旨在确定一组基因在这些功能类别中的显著性,帮助研究者理解基因表达数据中的生物学意义;KEGG 富集分析侧重于分析基因在代谢通路和其他生物通路中的功能,它不仅关注单个基因的功能,还考虑了基因之间的相互作用和整个生物系统的功能。天麻素、油酸和豆甾醇并集靶标基因的 GO 和 KEGG 富集结果分别见图 4 和图 5。图中气泡越大代表该 GO 条目 (GO Term) 或该 KEGG 通路富集到的基因数量 (靶点数量) 越多,颜色代表富集的显著性,颜色越深代表富集越显著。

如图 4 所示:纵坐标 GO Term 将基因的功能分为 3 个主要部分,即分子功能 (Molecular function, MF)、细胞组分 (Cellular component, CC) 和生物学过程 (Biological process, BP);横坐标基因比率 (Gene ratio)反映了特定 GO Term 在富集分析中的相对丰富度。天麻素的并集靶标基因共富集到 196 个 GO Term,其中 134 个 GO Term 具有显著性 ($p < 0.05$),取前 10 条可视化结果,见图 4a。由图 4a 可知:在 BP 中,显著富集于碳水化合物分解代谢过程 (Carbohydrate catabolic process)、G 蛋白偶联腺苷受体信号通路 (G protein - coupled adenosine receptor signaling pathway)、嘌呤能核苷酸受体信号通路 (Purinergic nucleotide receptor signaling pathway) 等;在 CC 方面,显著富集于轴突膜蛋白 (Axolemma);在 MF 维度,显著富集于碳水化合物代谢 (Carbohydrate binding)、糖代谢 (Glucose binding) 等生物过程调控。天麻素的并集靶标基因共富集到 10 个 KEGG 通路,其中 6 个 KEGG 通路具有显著性 ($p < 0.05$),如图 5a 所示,包括淀粉和蔗糖代谢 (Starch and

sucrose metabolism)、碳水化合物消化吸收 (Carbohydrate digestion and absorption)、半乳糖代谢 (Galactose metabolism)、氨基糖和核苷酸糖代谢 (Amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、胰岛素信号通路 (Insulin signaling pathway)、调控糖酵解 (Glycolysis/Gluconeogenesis) 等。

油酸的并集靶标基因共富集到 1 252 个 GO Term,其中 971 个 GO Term 具有显著性 ($p < 0.05$),取前 12 条可视化结果,见图 4b。由图 4b 可知:在 BP 中显著富集于脂肪酸代谢过程 (Fatty acid metabolic process)、脂质的定位 (Lipid localization)、脂质运输 (Lipid transport)、细胞内受体信号通路 (Intracellular receptor signaling pathway) 等;在 CC 方面,显著富集于编码神经相关膜蛋白 (Neuronal cell body)、膜微区 (Membrane microdomain)、膜筏 (Membrane raft) 等;在 MF 维度,显著富集于配体转录因子活性 (Ligand - activated transcription factor activity)、核受体活性 (Nuclear receptor activity)、类固醇在内的脂肪代谢 (Steroid binding) 等生物过程调控。油酸的并集靶标基因共富集到 56 个 KEGG 通路,其中 42 个 KEGG 通路具有显著性 ($p < 0.05$),取前 10 条可视化结果,见图 5b。由图 5b 可知,包括调控脂质代谢 (PPAR signaling pathway),花生四烯酸代谢 (Arachidonic acid metabolism),脂肪消化吸收 (Fat digestion and absorption),亚油酸代谢 (Linoleic acid metabolism),脂肪酸代谢 (Fatty acid metabolism), α - 亚麻酸代谢 (α - Linolenic acid metabolism),卵巢类固醇的合成 (Ovarian steroidogenesis),血管发育 (Vascular smooth muscle contraction),甲状旁腺激素合成、分泌和作用 (Parathyroid hormone synthesis, secretion and action) 等代谢通路。

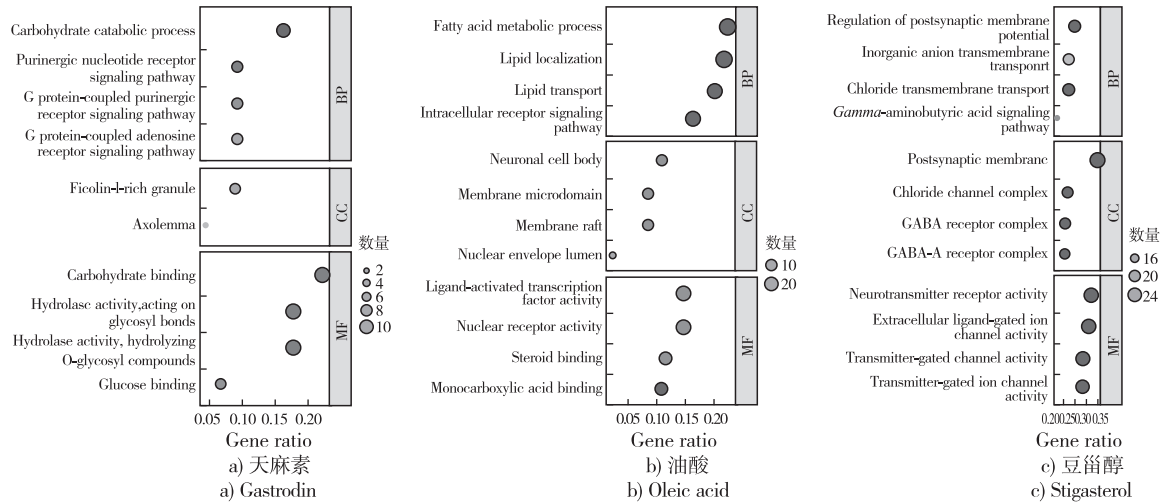


图4 天麻素、油酸和豆甾醇并集靶标基因的 GO 富集气泡图

Fig. 4 GO dotplot of the union target genes of gastrodin, oleic acid and stigasterol

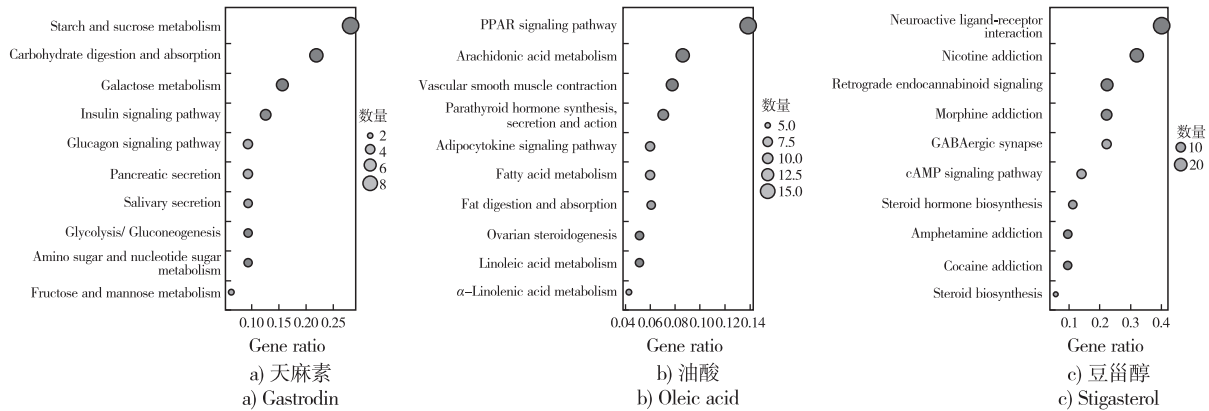


图5 天麻素、油酸和豆甾醇并集靶标基因的 KEGG 富集气泡图

Fig. 5 KEGG dotplot of the union target genes of gastrodin, oleic acid and stigasterol

豆甾醇的并集靶标基因共富集到 581 个 GO Term, 其中 459 个 GO Term 具有显著性 ($p < 0.05$), 取前 12 条可视化结果, 见图 4c。由图 4c 可知: 在 BP 中显著富集于编码突触膜蛋白 (Regulation of postsynaptic membrane potential)、氯离子跨膜运输 (Chloride transmembrane transport) 等; 在 CC 方面, 显著富集于突触后膜 (Postsynaptic membrane)、 γ -氨基丁酸-A 受体 (GABA-A receptor complex)、调控 γ -氨基丁酸-A 受体 (GABA receptor complex)、氯离子通道 (Chloride channel complex) 等; 在 MF 维度, 显著富集于神经递质受体活性 (Neurotransmitter receptor activity)、细胞外离子通道活性 (Extracellular ligand-gated ion channel activity)、门控离子通道 (Transmitter-gated channel activity) 等生物过程调控。豆甾醇的并集靶标基因共富集到 24 个 KEGG 通路, 其中 20 个 KEGG 通路具有显著性 ($p < 0.05$), 取前 10 条可视化结果, 见图 5c。由图 5c 可

知, 包括尼古丁成瘾 (Nicotine addiction)、神经配体-受体结合 (Neuroactive ligand-receptor interaction)、 γ -氨基丁酸神经递质传递 (GABAergic synapse)、吗啡成瘾性 (Morphine addiction)、内源性大麻素系统 (Retrograde endocannabinoid signaling)、类固醇生物合成 (Steroid hormone biosynthesis)、可卡因成瘾 (Cocaine addiction)、苯丙胺成瘾 (Amphetamine addiction)、环磷酸腺苷信号通路 (cAMP signaling pathway) 等代谢通路。

2.6.3 SDRGs 的获取

MalaCards、OMIM 和 Phenolyzer 数据库分别获取了 57、53 个和 566 个潜在的 SDRGs。为了解这 3 个数据库中 SDRGs 的相关性, 通过韦恩图进行了可视化, 结果如图 6 所示。

由图 6 可知, MalaCards、OMIM 和 Phenolyzer 数据库具有 6 个交集 SDRGs 和 606 个 (未包括交集部分数量) 并集。

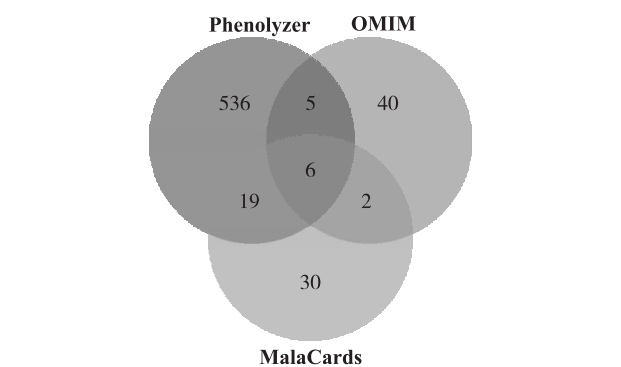


图 6 睡眠障碍相关基因的韦恩图

Fig. 6 Venn map of genes associated with sleep disorders

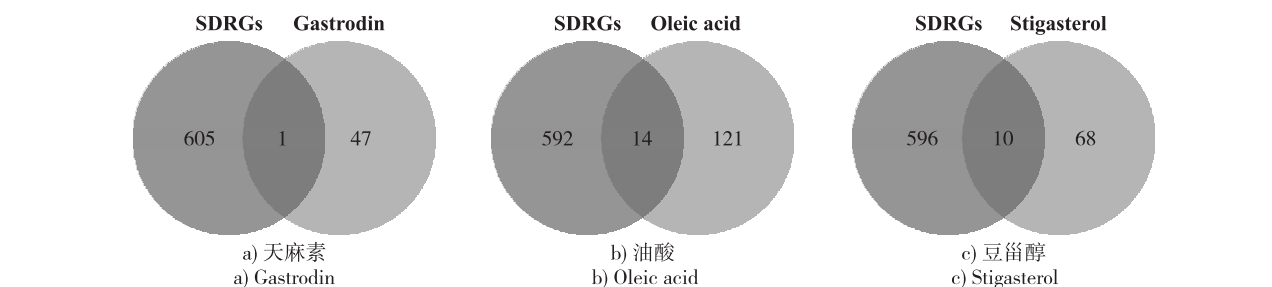


图 7 并集睡眠障碍相关基因与天麻素、油酸、豆甾醇并集靶标基因靶点的交集基因

Fig. 7 Intersection genes of union sleep disorder related genes and gastrodin, oleic acid and stigasterol union target genes

2. 6. 5 油酸和豆甾醇治疗睡眠障碍的潜在基因的 PPI 网络构建

由于天麻素治疗睡眠障碍的潜在基因仅有 1 个 (AR), 无法构建 PPI 网络。因此, 仅构建油酸、豆甾醇治疗睡眠障碍潜在基因的 PPI 网络, 并确定各潜

2. 6. 4 天麻素、油酸和豆甾醇治疗睡眠障碍潜在基因的获取

并集 SDRGs 与天麻素、油酸、豆甾醇并集靶标基因靶点的交集基因见图 7。

由图 7 可知, 天麻素治疗睡眠障碍的可能靶标基因有 1 个, 为 AR。油酸治疗睡眠障碍的可能靶标基因有 14 个, 包括 PRKACA、MAPK3、AR、PTPN11、CALM1、RORA、RXRA、ABL1、CHRM2、SREBF1、NR3C1、PPARG、SLC6A3、SLC6A4。豆甾醇治疗睡眠障碍的可能靶标基因有 10 个, 包括 AR、RORA、ESR1、GRIN2A、GRIN2B、GRIN2C、GRIN2D、CHRM2、NR3C1、SLC6A4。

在基因在 PPI 网络中的靶点连接度 (靶点与其他靶点相互作用关系数量), 结果分别见图 8 和图 9。图 8 中每个圆圈代表 1 个靶点, 不同圆圈间连线代表靶标之间相互作用。

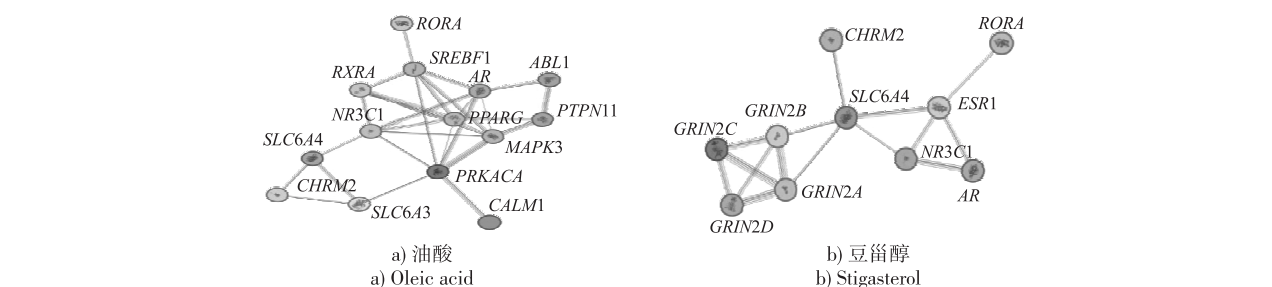


图 8 油酸、豆甾醇治疗睡眠障碍潜在基因的 PPI 网络

Fig. 8 PPI network of potential genes of oleic acid and stigasterol for treatment of sleep disorders

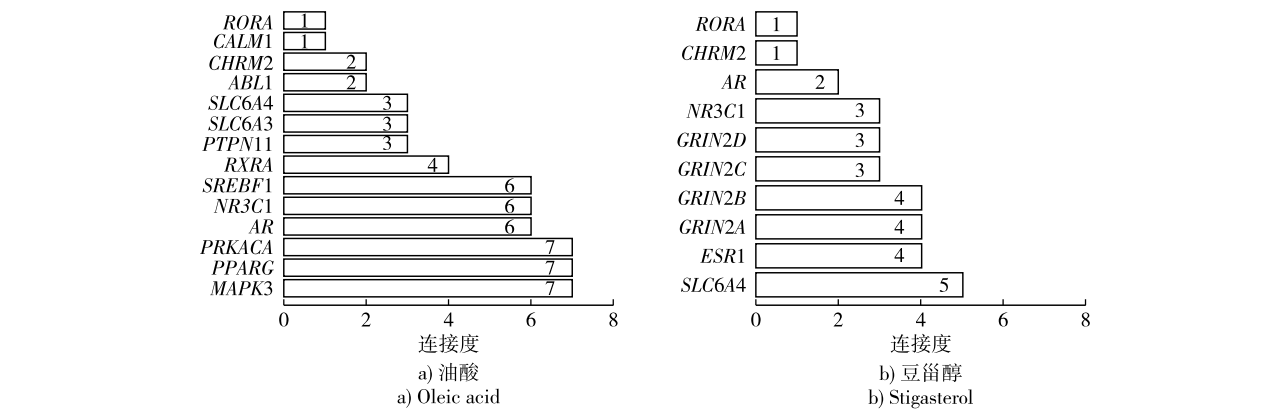


图 9 油酸、豆甾醇治疗睡眠障碍潜在基因的 PPI 网络中的靶点连接度

Fig. 9 Target connectivity of PPI network of potential genes of oleic acid and stigasterol for treatment of sleep disorders

如图 8a 所示,油酸治疗睡眠障碍潜在基因的 PPI 网络中包含 14 个靶点和 29 条边(互作关系对),其中 *MAPK3*、*PPARG*、*PRKACA*、*AR*、*NR3C1*、*SREBF1*、*RXR*A、*PTPN11*、*SLC6A3*、*SLC6A4* 是连接度排名前十的交集靶标(图 9a),表示它们在油酸治疗睡眠障碍中极有可能是核心/关键靶标基因。值得注意的是,已有研究表明,*MAPK3*、*PPARG*、*NR3C1*、*SREBF1*、*RXR*A、*SLC6A3*、*SLC6A4* 可能与睡眠障碍的发展有关^[28-29]。*MAPK3* 是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族的成员之一,主要参与脂代谢、介导炎症反应发生等生理生化过程;*PPARG* 属于过氧化物酶体增殖物激活受体,主要参与炎症和糖脂代谢等反应;*SLC6A3*、*SLC6A4* 是调控色氨酸途径的关键基因,由此推测复合物主要通过调控色氨酸合成及抗炎作用等途径发挥改善睡眠作用^[30]。

如图 8b 所示,豆甾醇治疗睡眠障碍潜在基因的 PPI 网络中包含 10 个靶点和 15 条边(互作关系对),其中 *SLC6A4*、*ESR1*、*GRIN2A*、*GRIN2B*、*GRIN2C*、*GRIN2D*、*NR3C1*、*AR*、*CHRM2*、*RORA* 是连接度排名前十的交集靶标(图 9b),即它们在豆甾醇治疗睡眠障碍中极有可能是关键靶标基因。值得注意的是,已有研究表明,*SLC6A4*、*ESR1*、*GRIN2A*、*GRIN2B*、*GRIN2C*、*GRIN2D*、*NR3C1*、*CHRM2*、*RORA* 可能与睡眠障碍的发展有关^[31-32]。

3 结 论

辣木籽油总黄酮、总多酚、 V_E 含量分别为 0.94%、0.01%、74.35 $\mu\text{g/g}$ 。通过靶向代谢组学分析发现,辣木籽油中含有一些助眠活性成分如色氨酸、甘氨酸、 γ -氨基丁酸、腺苷等,其中腺苷含量远高于其他成分。采用灌胃给予小鼠不同剂量的辣木籽油-天麻素复合物 7 d 后,小鼠的自主活动数显著降低($p < 0.05$),协同戊巴比妥钠诱导小鼠睡眠效果较好,戊四氮诱导的小鼠惊厥死亡率显著降低($p < 0.05$)。采用网络药理学探究辣木籽油-天麻素复合物改善睡眠作用机制,选取天麻素、油酸、豆甾醇进行潜在靶点 PPI 网络构建和核心靶点筛选发现,*AR*、*MAPK3*、*PPARG*、*PRKACA*、*NR3C1*、*SREBF1*、*RXR*A、*PTPN11*、*SLC6A3*、*SLC6A4*、*ESR1*、*GRIN2A*、*GRIN2B*、*GRIN2C*、*GRIN2D*、*CHRM2*、*RORA* 可能为辣木籽油-天麻素复合物改善睡眠的核心靶点基因。本研究初步探讨了辣木籽油-天麻素复合物改善睡眠作用及机制,体现了中药复合物多成分、多靶点、多层次的整体疗效,后期可对主要信号通路作进一步验证。

参考文献:

[1] 张芳铭,郑慧,郑淘,等. 改善睡眠功能的食药资源及

保健食品应用[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 303 - 310.

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

[3] 苏亮,陆峥. 2017 年中国失眠症诊断和治疗指南解读[J]. 世界临床药物, 2018, 39(4): 217 - 222.

[4] ZHOU H B, LU S Z, YU Z S, et al. Mechanisms for the biological activity of *Gastrodia elata* Blume and its constituents: A comprehensive review on sedative - hypnotic, and antidepressant properties [J/OL]. Phytomedicine, 2024, 123: 155251 [2024 - 05 - 20]. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.155251>.

[5] 李燕,谢森,邵明莎,等. 近 10 年来天麻的药理作用及化学成分研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 2987 - 2993.

[6] ALEGBELEYE O O. How functional is *Moringa oleifera*? A review of its nutritive, medicinal, and socioeconomic potential[J]. Food Nutr Bull, 2018, 39(1): 149 - 170.

[7] ALY A A, MARAEI R W, ALI H G M. Fatty acids profile and chemical composition of Egyptian *Moringa oleifera* seed oils[J]. J Am Oil Chem Soc, 2016, 93(3): 397 - 404.

[8] LEONE A, SPADA A, BATTEZZATI A, et al. *Moringa oleifera* seeds and oil: Characteristics and uses for human health [J/OL]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): E2141 [2024 - 05 - 20]. <https://doi.org/10.3390/ijms17122141>.

[9] LIU W L, WU B F, SHANG J H, et al. *Moringa oleifera* Lam seed oil augments pentobarbital - induced sleeping behaviors in mice via GABAergic systems [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(10): 3149 - 3162.

[10] SU Y, BAI Q, TAO H, et al. Prospects for the application of traditional Chinese medicine network pharmacology in food science research[J]. J Sci Food Agric, 2023, 103(11): 5183 - 5200.

[11] OGBUNUGAFO H A, ENEH F U, OZUMBA A N, et al. Physico - chemical and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed oil [J]. Pakistan J Nutr, 2011, 10(5): 409 - 414.

[12] 何玉柱,王琼琼,崔瑞国,等. 不同提取方法对红花籽油品质的影响及其抗氧化性的研究[J]. 食品工业科技, 2024, 45(20): 262 - 270.

[13] CAI Y, WENG K, GUO Y, et al. An integrated targeted metabolomic platform for high - throughput metabolite profiling and automated data processing[J]. Metabolomics, 2015, 11(6): 1575 - 1586.

[14] 兰天,汪玲,余贤娟,等. 蜂王浆及其提取物对失眠小鼠的睡眠改善作用[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(20): 83 - 90.

[15] 刘威良,黄艾祥. 贯筋藤水提物对小鼠的镇静催眠作

- 用[J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(5): 39–46.
- [16] 欧慧瑜, 吕道俊, 李瑞鹏, 等. 巴戟天和天麻复合物改善睡眠作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(10): 3199–3202.
- [17] 穆朝娟, 张涛. 天麻素对戊四氮致痫大鼠脑内血管的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(14): 2226–2229.
- [18] KIM S, CHEN J, CHENG T, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(d1): D1388–D1395.
- [19] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357–W364.
- [20] XU H Y, ZHANG Y Q, LIU Z M, et al. ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D976–D982.
- [21] WU T, HU E, XU S, et al. ClusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J/OL]. Innovation, 2021, 2(3): 100141 [2024–05–20]. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>.
- [22] RAPPAPORT N, TWIK M, PLASCHKES I, et al. MalaCards: An amalgamated human disease compendium with diverse clinical and genetic annotation and structured search[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(d1): D877–D887.
- [23] AMBERGER J S, HAMOSH A. Searching online mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2017, 58: 1.2.1–1.2.12.
- [24] YANG H, ROBINSON P N, WANG K. Phenolyzer: Phenotype – based prioritization of candidate genes for human diseases[J]. Nat Methods, 2015, 12(9): 841–843.
- [25] BARDOU P, MARIETTE J, ESCUDIÉ F, et al. Jvenn: An interactive Venn diagram viewer [J/OL]. BMC Bioinform, 2014, 15: 293 [2024–05–20]. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>.
- [26] ANWAR F, ASHRAF M, BHANGER M I. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan[J]. J Am Oil Chem Soc, 2005, 82(1): 45–51.
- [27] YAMADERA W, INAGAWA K, CHIBA S, et al. Glycine ingestion improves subjective sleep quality in human volunteers, correlating with polysomnographic changes [J]. Sleep Biol Rhythms, 2007, 5(2): 126–131.
- [28] KALKMAN H O. Potential opposite roles of the extracellular signal – regulated kinase (ERK) pathway in autism spectrum and bipolar disorders [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2012, 36(10): 2206–2213.
- [29] JI Q, LI S J, ZHAO J B, et al. Genetic and neural mechanisms of sleep disorders in children with autism spectrum disorder: A review[J/OL]. Front Psychiatry, 2023, 14: 1079683 [2024–05–20]. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2023.1079683>.
- [30] 朱丽云, 钟钰, 柳小莉, 等. 基于网络药理学研究当归挥发油治疗失眠的作用机制 [J]. 中成药, 2022, 44(3): 1000–1005.
- [31] DEN HOLLANDER B, VEENVLIET A R J, ROTHUIZEN – LINDENSCHOT M, et al. Evidence for effect of l – serine, a novel therapy for GRIN2B – related neurodevelopmental disorder[J/OL]. Mol Genet Metab, 2023, 138(3): 107523 [2024–05–20]. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107523>.
- [32] LAHTINEN A, HÄKKINEN A, PUTTONEN S, et al. Differential DNA methylation in recovery from shift work disorder[J/OL]. Sci Rep, 2021, 11(1): 2895 [2024–05–20]. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82627-0>.
-
- (上接第 106 页)
- [8] WANG Y, JIANG Z, LAI Z, et al. The self – adaption capability of microalgal biofilm under different light intensities: Photosynthetic parameters and biofilm microstructures [J/OL]. Algal Res, 2021, 58: 102383 [2024–07–18]. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102383>.
- [9] WANG Z, CHENG J, GUO D, et al. A novel simulation calculation model based on photosynthetic electron transfer for microalgal growth prediction in any photobioreactor [J/OL]. Appl Energy, 2023, 334: 120713 [2024–07–18]. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2023.120713>.
- [10] CHENG J, MAO Y, GUO H, et al. Synergistic and efficient catalysis over Brønsted acidic ionic liquid [BSO₃HMIIm] [HSO₄] – modified metal – organic framework (IRMOF – 3) for microalgal biodiesel production[J/OL]. Fuel, 2022, 322: 124217 [2024–07–18]. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.124217>.
- [11] LAM M K, LEE K T. Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production[J]. Chem Eng J, 2012, 191: 263–268.