

枳椇酸枣仁汤对围绝经期失眠小鼠海马神经元氧化应激损伤的改善作用及机制[△]

刘雨霏^{1*}, 张泽宇¹, 张永华², 胡霖霖², 张 蕊^{1#}(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 311402; 2. 浙江中医药大学附属杭州市中医院睡眠医学中心, 杭州 310007)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)19-2372-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.19.03



摘要 目的 探究枳椇酸枣仁汤(ZSD)对围绝经期失眠小鼠海马神经元氧化应激损伤的改善作用及机制。方法 利用TCMSP和TCMIP数据库预测ZSD中活性成分的潜在靶点,通过GeneCards、OMIM和DisGeNET数据库检索失眠相关靶点,构建两者交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用网络,对关键靶点进行基因本体、京都基因与基因组百科全书通路富集分析。将60只小鼠分为假手术组,模型组,ZSD低、中、高剂量组(11、22、33 g/kg)和右佐匹克隆组(阳性对照,1 mg/kg)。除假手术组外,其余各组均采用双侧卵巢切除术(OVX)构建围绝经期失眠小鼠模型。造模成功后,各组小鼠灌胃生理盐水或相应药液,每天1次,连续3周。通过戊巴比妥钠睡眠协同实验评估小鼠睡眠状况,并利用苏木精-伊红染色、免疫组化染色、免疫荧光染色、转录组测序技术和Western blot法观察小鼠海马神经元病理变化及其相关基因和蛋白表达。结果 网络药理学结果显示,ZSD与围绝经期失眠共有296个交集靶点,其中蛋白激酶B1(Akt1)是关键靶点之一。ZSD给药后,OVX小鼠睡眠潜伏期显著缩短、睡眠持续期显著延长、海马CA1区神经元特异性核蛋白平均光密度值显著升高($P<0.01$),且海马神经元损伤明显减轻。转录组测序结果显示,ZSD可显著上调OVX小鼠海马组织中*Nfe2l2*基因的转录水平($P<0.05$)。ZSD给药后,OVX小鼠海马组织中核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶1(HO-1)蛋白表达量以及Akt蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.01$)。结论 ZSD可通过激活Akt/Nrf2/HO-1信号通路,改善围绝经期失眠小鼠海马神经元氧化应激损伤。

关键词 枳椇酸枣仁汤;围绝经期失眠;海马神经元;基因组学;氧化应激

Improvement effects and mechanism of Zhichi suanzaoren decoction on oxidative stress injury of hippocampal neurons in perimenopausal insomnia mice

LIU Yufei¹, ZHANG Zeyu¹, ZHANG Yonghua², HU Linlin², ZHANG Xin¹(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China; 2. Sleep Medicine Center, Hangzhou TCM Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the improvement effects and mechanism of Zhichi suanzaoren decoction (ZSD) on hippocampal oxidative stress injury in hippocampal neurons of mice with perimenopausal insomnia. **METHODS** The potential targets of active ingredients in ZSD were predicted using TCMSP and TCMIP databases; the targets related to insomnia were searched through GeneCards, OMIM and DisGeNET databases; protein-protein interaction network of intersecting targets of ZSD ingredients and insomnia was constructed; Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analyses were conducted on key targets. Sixty mice were divided into sham operation group, model group, ZSD low-, medium-, and high-dose groups (11, 22, and 33 g/kg), and eszopiclone group (positive control, 1 mg/kg). Except for sham operation group, the perimenopausal insomnia model was constructed by ovariectomy (OVX) in the other groups. After successful modeling, mice in each group were gavaged with normal saline or the corresponding drug solution, once a day, for three consecutive weeks.

[△]基金项目 国家自然科学基金项目(No.82205000);浙江省中医药科技计划项目(No.2022ZB246)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中医药防治心系疾病的基础与临床研究。E-mail:19858162136@163.com

通信作者 副教授,硕士生导师。研究方向:中医药防治心系疾病的基础与临床研究。E-mail:drjanson@126.com

The sleep status of mice was evaluated through the pentobarbital sodium sleep synergy experiment, and the pathological changes of hippocampal neurons and the expressions of related genes and proteins in mice were observed by HE staining, immunohistochemistry staining, immunofluorescence staining, transcriptome sequencing

technology and Western blot. **RESULTS** The results of network pharmacology showed that there were 296 intersection targets between ZSD and perimenopausal insomnia. Protein kinase B1 (Akt1) was a key target for treating insomnia with ZSD. After administration of ZSD, the sleep latency of mice was shortened, the sleep duration was prolonged significantly, and the mean optical density value of neuron-specific nuclear protein in the hippocampal CA1 region was significantly increased ($P<0.01$). Additionally, hippocampal neuron damage in OVX mice was significantly alleviated. The results of transcriptome sequencing showed that ZSD significantly upregulated the transcriptional levels of *Nfe2l2* gene in hippocampal tissue of OVX mice ($P<0.05$). After administration of ZSD, protein expressions of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in hippocampal tissue of OVX mice, as well as the phosphorylated Akt level, were increased significantly ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** ZSD can ameliorate hippocampal oxidative stress injury of hippocampal neurons in perimenopausal insomnia mice by activating the Akt/Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEYWORDS Zhichi suanzaoren decoction; perimenopausal insomnia; hippocampal neurons; genomics; oxidative stress

我国围绝经期女性的失眠发病率不断攀升,并伴随焦虑、抑郁和情绪波动等情绪调节不良问题,对个人工作、生活和社会均产生了严重的负面影响^[1]。目前对于围绝经期失眠采取的措施主要为激素补充或替代治疗以及镇静催眠类药物,但以上治疗方式存在较多禁忌证或药物依赖等风险^[2]。研究表明,睡眠作为一种保护机制可抵御氧化应激带来的损伤,长期失眠会导致体内氧化应激水平升高,进而损害海马体的细胞结构和功能^[3]。因此,通过调节氧化应激来探索更为有效的围绝经期失眠及其相关损伤的治疗方法,具有重要的临床意义和社会价值。

枢鼓酸枣仁汤(Zhichi suanzaoren decoction, ZSD)是浙江省名中医张永华教授基于中医经典理论并结合多年临床经验总结而成的经验方,由酸枣仁、知母、川芎、茯苓、焦栀子、淡豆豉、生地黄的炙甘草8味中药组成,具有清火养阴、除烦安神的功效,尤其是对围绝经期失眠、焦虑性失眠的治疗具有独特优势^[4]。本团队前期研究表明,ZSD可对失眠患者的睡眠和焦虑情绪进行双重调节,降低觉醒水平,改善睡眠深度与持续时间,且停药后无明显的失眠反跳和戒断症状^[5-6];其机制可能与调节5-羟色胺转运体^[7]、下丘脑-垂体-肾上腺轴有关,但具体机制仍需进一步研究。网络药理学通过构建“化合物-蛋白/基因-疾病”网络,可以提供一种高效的方法来识别化学成分并探究药理作用。该方法已被广泛应用于中药作用机制研究、证候生物学基础研究以及新药开发,体现了综合药理学策略的应用价值^[8]。基于此,本研究以网络药理学为基础,结合基因组学与动物实验,进一步探析ZSD缓解围绝经期失眠导致氧化应激损伤的作用机制,为ZSD治疗围绝经期失眠提供药理学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有Allegra X-30型台式高速凝型离心机(美国Beckman Coulter公司),Arcadia H

型石蜡包埋机(德国Leica公司),HM-340E型石蜡切片机、Gemini AS型染色机(美国Thermo Fisher Scientific公司),VS200型数字切片扫描仪(日本Olympus公司),AXIO SCOPE.A1型正置荧光显微镜(德国Zeiss公司),12-0625型电泳仪(美国Bio-Rad公司),GD50202型化学发光成像仪[莫纳(苏州)生物科技有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

酸枣仁、知母、川芎、茯苓、焦栀子、淡豆豉、生地黄的炙甘草饮片(批号均为221201)均购自浙江中医药大学中药材饮片有限公司,并由浙江中医药大学药学院中草药栽培与鉴定教研室沈晓霞教授鉴定均为真品;右佐匹克隆片(批号H20100074,规格为3 mg)购自成都康弘药业集团股份有限公司;兔抗神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)抗体、兔抗核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)抗体和兔抗血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体(批号分别为26975-1-AP、16396-1-AP、10701-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、Alexa Fluor 488标记的山羊抗兔免疫球蛋白G多克隆抗体(批号分别为ET1609-51、HA1121)均购自杭州华安生物技术有限公司;兔抗磷酸化Akt(p-Akt)抗体(批号4060)购自美国CST公司;兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号GB15003-100)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号S0001)购自江苏亲科生物研究中心有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级雌性C57BL/6小鼠,共60只,6~8周龄,体重(20 ± 2) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,生产许可证号为SCXK(沪)2022-0004。小鼠饲养于浙江中医药大学实验动物中心,环境温度 $20\sim 23$ °C、相对湿度为40%~60%、12 h明暗交替。所有小鼠随机分笼(每笼5只)饲养,饲养期间可自

由获取水和食物。本动物实验经浙江中医药大学动物管理与伦理委员会批准(批号:IACUC-20230130-03)。

2 方法与结果

2.1 网络药理学预测ZSD抗失眠的作用机制

2.1.1 ZSD中枢活性成分筛选及失眠相关靶点筛选

由于失眠与中枢神经系统密切相关,以血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)评分 ≥ -0.3 分(BBB评分越高,表明血脑屏障渗透性越好)^[9]、口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和药物相似度 ≥ 0.18 作为筛选标准,利用TCMSP数据库(<http://tcmspnw.com>)获取ZSD的活性成分^[10]。同时,利用TCMIP数据库(<http://www.tcmip.cn/>)补充ZSD的化学成分信息,筛选出药物类特性(quantitative estimate of drug-likeness, QED)评分为中等和良好(QED评分 ≥ 0.49 分)、BBB评分 ≥ -0.3 分的成分。将TCMIP和TCMSP数据库获得的ZSD的有效成分进行合并,通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行标准化处理,并删除重复和无效数据,得到ZSD的中枢活性成分。将这些中枢活性成分输入SwissTarget-Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)进行潜在靶点预测。以“insomnia”“sleep initiation dysfunction”“sleeplessness”“early awakening”为关键词,在GeneCards(<https://www.genecards.org>)、OMIM(<https://www.omim.org>)和DisGeNET(<https://www.disgenet.org>)数据库中检索失眠相关靶点,汇总整理并去重后,获取失眠相关靶点。利用Jvenn在线平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/index.html>)对ZSD中枢活性成分的潜在靶点和失眠相关靶点取交集,得到两者的交集靶点。使用Cytoscape 3.7.2软件构建“药物-活性成分-作用靶点”网络。

结果显示,通过检索TCMSP和TCMIP数据库共得到103个中枢活性成分,共对应915个潜在靶点。利用GeneCards、DisGeNET、OMIM数据库获得失眠相关靶点共2 516个,其中得到的交集靶点共296个(图略)。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建与关键靶点筛选

将交集靶点数据导入STRING数据库(<https://string-db.org>),限定物种为“人”,设置最低置信度分数为0.9分,构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络。将PPI网络图导入Cytoscape 3.7.2软件进行可视化分析,利用Cytoscape 3.7.2中的AnalysisNetwork模块对复杂网络关系进行分析,通过Centiscape 2.2插件计算接近中心性(closeness centrality, CC)、中介中心性(betweenness centrality, BC)、度中心性

(degree centrality, DC),分别以大于CC、BC、DC中位数为阈值筛选得到关键靶点^[11]。

结果显示,ZSD治疗失眠的潜在靶点的PPI网络包含295个节点和609条边,平均度值为4.13,平均局部聚类系数为0.482。通过插件Centiscape 2.2计算得CC、BC、DC,选取CC $>0.001\ 159$ 、BC $>694.816\ 901$ 、DC $>5.586\ 854$ 的靶点作为关键靶点,结果共筛选出35个关键靶点,包含Akt1等(图略)。

2.1.3 基因本体和京都基因与基因组百科全书通路富集分析

将筛选出的关键靶点输入Metascape在线平台(<http://www.metascape.org/>)用于基因本体(Gene Ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析,限定物种为“人”,以 $P<0.01$ 、富集因子 >1.5 为筛选标准^[12]。通过在线绘图网站微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化分析。结果显示,GO富集分析得到4 138个具有代表性的功能簇,保留前20个富集结果进行分析,这些功能簇主要富集于氧化应激、激素调控等通路。KEGG通路富集分析共得到244条信号通路($P<0.01$),前20条信号通路中包括氧化应激通路,与GO富集分析结果一致。使用Metascape在线平台对交集靶点进行KEGG通路富集分析,结果显示,交集靶点主要富集于磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/Akt信号通路(图略)。

2.2 动物实验验证ZSD抗失眠的作用机制

2.2.1 ZSD的制备

取酸枣仁15 g、知母10 g、川芎10 g、茯苓15 g、焦栀子10 g、淡豆豉10 g、生地黄10 g、炙甘草6 g,混合,加10倍量水浸泡40 min,煎煮1 h后倒出;药渣再加5倍量水,煎煮40 min后倒出。合并2次水煎液,抽滤后浓缩,分别制备成质量浓度为11、22、33 g/kg(以饮片总量计)的ZSD水煎液,备用。

2.2.2 分组与造模

小鼠适应性喂养1周后,将其随机分为假手术组(Sham组),模型组(OVX组),ZSD低、中、高剂量组(ZSD-L、ZSD-M、ZSD-H组)和右佐匹克隆组(阳性对照,ESZ组),每组10只。除Sham组外,其余各组小鼠均采用卵巢切除术(ovariectomy, OVX)构建围绝经期失眠模型,具体步骤如下:将小鼠固定在手术台上,用凡士林保护眼睛;用异氟烷将小鼠麻醉后,沿背部中线剃毛并消毒;在背部下方两侧剪开约0.5 cm的皮肤切口,分离脂肪和肌层,小心摘除卵巢并结扎输卵管;伤口用青霉

素消毒,并用可吸收线和丝线缝合,最后涂抹红霉素软膏^[13]。Sham组小鼠不摘除卵巢,其余处理与各造模组小鼠相同。术后进行动情周期检测,若阴道涂片显示无正常动情周期变化或动情周期紊乱表明小鼠进入围绝经期,提示造模成功^[14]。本研究用于造模的50只小鼠均造模成功。

2.2.3 给药

造模成功后,Sham组和OVX组小鼠灌胃生理盐水;ZSD-L、ZSD-M、ZSD-H组小鼠分别灌胃ZSD水煎液11、22、33 g/kg,分别为临床等效剂量的1、2、3倍;ESZ组小鼠灌胃右佐匹克隆1 mg/kg(以水为溶剂)。连续灌胃3周,每天1次,灌胃体积均为10 mL/kg。

2.2.4 睡眠潜伏期及睡眠持续期检测

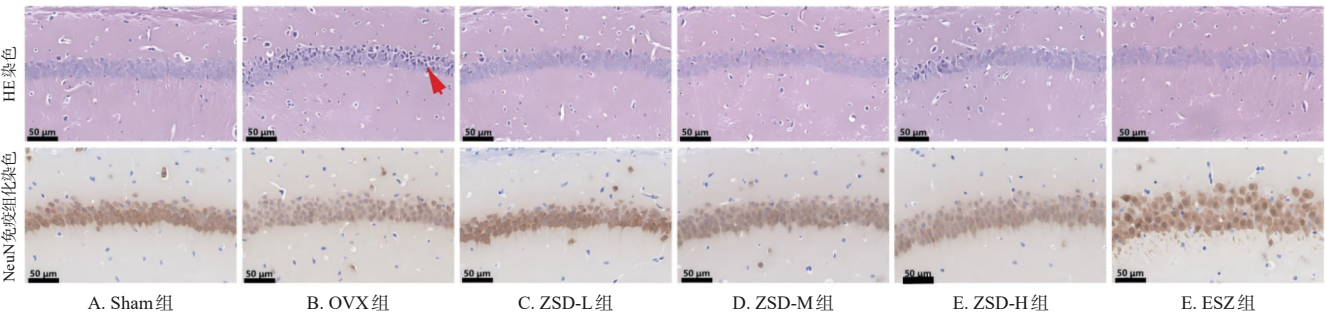
采用戊巴比妥钠睡眠协同实验检测。给药结束前1 d(灌胃结束1 h后),腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),记录每只小鼠翻正反射消失和恢复的时间。睡眠潜伏期指从注射戊巴比妥钠到翻正反射消失的时间,睡眠持续期指翻正反射消失和恢复的时间间隔。采用Graph-Pad Prism 8软件进行统计分析;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,进一步组间两两比较采用LSD-*t*检验;检验水准 $\alpha=0.05$ (后文各指标的统计分析方法均同此处)。

结果(表1)显示,与Sham组比较,OVX组小鼠的睡眠潜伏期显著延长($P<0.01$),睡眠持续期显著缩短($P<0.01$);与OVX组比较,各给药组小鼠的睡眠潜伏期均显著缩短($P<0.01$),睡眠持续期均显著延长($P<0.01$)。

表1 各组小鼠的睡眠潜伏期和睡眠持续期测定结果比较($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

组别	睡眠潜伏期	睡眠持续期
Sham组	298.50±66.65	5 029.75±1 806.70
OVX组	482.50±89.43 ^a	673.50±103.72 ^a
ZSD-L组	313.38±41.58 ^b	3 016.63±744.18 ^b
ZSD-M组	358.50±59.00 ^b	3 166.63±897.14 ^b
ZSD-H组	353.13±56.62 ^b	3 496.25±384.42 ^b
ESZ组	307.00±66.65 ^b	2 967.75±786.52 ^b

a: 与Sham组比较, $P<0.01$; b: 与OVX组比较, $P<0.01$ 。



注:箭头所指表示神经元细胞变形损伤。

图1 各组小鼠海马组织HE染色和NeuN免疫组化染色结果

2.2.5 神经元形态观察与NeuN蛋白免疫组化检测

末次给药后禁食24 h,将小鼠(每组取3只)用10%戊巴比妥钠完全麻醉后置于解剖台上,取出全脑用4%多聚甲醛固定24 h,制备小鼠海马石蜡切片(厚4 μm),进行苏木精-伊红(HE)染色。将染色后的切片脱水透明,用中性树胶封片后,用VS200型数字切片扫描仪扫描并观察组织病理学变化。另取小鼠海马石蜡切片进行免疫组化染色,先用pH6.0的柠檬酸盐缓冲液在高温、高压下进行抗原修复,然后用5%牛血清白蛋白在室温下封闭30 min;加入NeuN一抗(稀释比例1:10 000),在4℃湿盒中孵育过夜;磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,加入HRP标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(稀释比例1:200),在室温下孵育1 h后,DAB显色,苏木精复染,脱水透明,并用中性树胶封片,显微镜观察并采集图像。采用Image J软件对小鼠海马CA1区NeuN蛋白阳性表达区域(呈黄褐色或棕黄色)进行光密度分析,并计算NeuN的平均光密度值(平均光密度值=累积光密度值/区域面积×100%)。

HE染色结果(图1)显示,Sham组小鼠神经元细胞条理清晰、分布整齐,细胞核与细胞膜结构完整,细胞数量较多;与Sham组比较,OVX组小鼠神经元细胞排列不规整,细胞膜边缘模糊,细胞数量减少,神经元出现了明显的损伤;与OVX组比较,各给药组小鼠神经元损伤明显改善,细胞结构完整。免疫组化染色结果(图1)显示,与Sham组[(20.782±0.589)%]比较,OVX组小鼠海马CA1区NeuN平均光密度值[(13.232±0.685)%]显著降低($P<0.01$);与OVX组比较,ZSD-L、ZSD-M、ZSD-H组和ESZ组小鼠海马CA1区NeuN平均光密度值[分别为(20.680±1.463)%、(20.338±1.140)%、(18.377±0.614)%、(20.699±0.246)%]均显著升高($P<0.01$)。

2.2.6 海马组织转录组测序分析差异表达基因

根据前面的实验确定ZSD的低剂量为最佳有效剂量,故本研究选择ZSD-L组的样本进行后续研究。取Sham组、OVX组、ZSD-L组小鼠各3只,处死后取脑内

海马组织,采用 Trizol 试剂提取组织中的总 RNA,使用 NanoDrop 2000 软件测定 RNA 的浓度和纯度。使用 Bioanalyzer 2100 软件评估 RNA 的完整性,并使用变性琼脂糖凝胶电泳进行确认。本研究使用的所有 RNA 样品均经过质量评估,满足相关标准。本研究委托杭州联川生物技术股份有限公司进行转录组测序。对转录组测序的原始数据进行过滤,筛选得到高质量数据信息;以 $|\log_2$ 差异倍数(fold change, FC) >0.263 、 $P<0.05$ 为标准筛选差异表达基因^[15]。对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析,从而获取关键通路信息,并对关键基因进行聚类热图分析。

结果显示,与 Sham 组比较,OVX 组小鼠海马组织中共有 1 248 个差异表达基因,其中 381 个上调、867 个下调。与 OVX 组比较,ZSD-L 组小鼠海马组织中共有 1 829 个差异表达基因,其中 1 206 个上调、623 个下调。KEGG 通路富集分析结果显示,差异表达基因主要富集于神经活性配体-受体相互作用、磷脂酰肌醇信号系统等信号通路。与 OVX 组比较,ZSD-L 组小鼠海马组织中抗氧化应激关键转录因子 Nrf2 的基因 *Nfe2l2* 的转录水平显著升高($P<0.05$),提示 ZSD 能够激活 Nrf2 信号通路。此外,与 Akt 相关的基因 *Akt2* 及 HO-1 的基因 *Hmox1* 的转录水平在 ZSD-L 组小鼠海马组织中均有所上调,表明 ZSD 给药后 Akt/Nrf2/HO-1 信号通路明显激活,与网络药理学研究结果基本一致,体现了本研究分析方法的可靠性。结果见图 2。

2.2.7 海马组织中 Nrf2 蛋白表达的免疫荧光法检测

根据网络药理学和转录组测序结果可知,氧化应激信号通路在 ZSD 治疗围绝经期失眠中发挥重要作用,而 Nrf2 是调控抗氧化应激的关键转录因子。为验证 ZSD 是否通过激活 Nrf2 缓解 OVX 小鼠海马组织氧化应激损伤,本研究采用免疫荧光法检测小鼠海马组织中 Nrf2 蛋

白的表达。将 Sham 组、OVX 组、ZSD-L 组小鼠(每组 3 只)的海马组织石蜡切片脱蜡至水,用抗原修复液(pH7.4)预处理,3% H_2O_2 孵育 15 min 以阻断内源性过氧化物酶,再用 PBS 冲洗 3 次。逐滴加入 Nrf2 一抗(稀释比例为 1:500),4℃孵育过夜。PBS 冲洗后,加入荧光二抗(稀释比例为 1:500)避光孵育 50 min,再用 PBS 冲洗,滴加 DAPI 避光孵育 10 min,用 PBS 冲洗后加入抗荧光淬灭封片剂封片。将切片置于荧光显微镜下观察并采集图像,采用 Image J 软件分析,以 Nrf2 蛋白荧光强度与 DAPI 荧光强度的比值表示 Nrf2 的荧光强度,Nrf2 的荧光强度越强表明蛋白表达水平越高。

结果(图 3)显示,与 Sham 组(0.992 ± 0.009)比较,OVX 组小鼠海马组织中 Nrf2 的荧光强度(0.852 ± 0.051)显著降低($P<0.01$);与 OVX 组比较,ZSD-L 组小鼠海马组织中 Nrf2 的荧光强度(0.977 ± 0.018)显著升高($P<0.01$)。

2.2.8 海马组织中 Akt/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白表达检测

为进一步验证 ZSD 治疗围绝经期失眠的作用机制,根据网络药理学预测和转录组测序结果,采用 Western blot 法检测小鼠海马组织中 Akt/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白的表达。取 Sham 组、OVX 组、ZSD-L 组小鼠(每组 3 只)的海马组织,提取组织中总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度,并将蛋白进行高温变性。取 20 μ g 蛋白上样进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(在 80 V 电压下预电泳 20 min,随后将电压调至 120 V 直至电泳结束),将分离后的蛋白转移至 0.22 μ m 的 PVDF 膜上(电流 350 mA,时间 90 min),用 5% 牛血清白蛋白在室温下封闭 1 h。加入 Nrf2、HO-1、Akt、p-Akt、 β -actin 一抗(稀释比例分别为 1:2 000、1:5 000、1:5 000、1:2 000、1:5 000),在 4℃下孵育过夜;洗膜,加入二抗

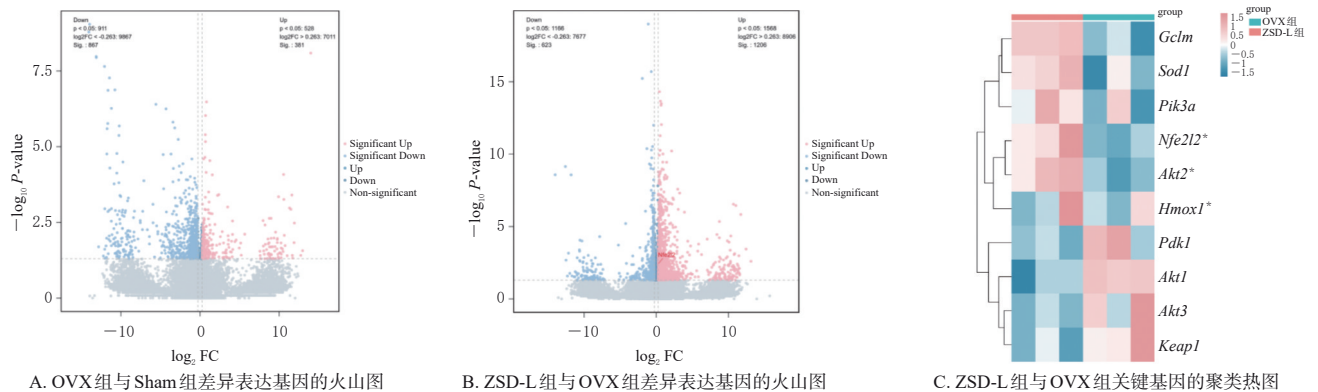


图2 转录组测序结果

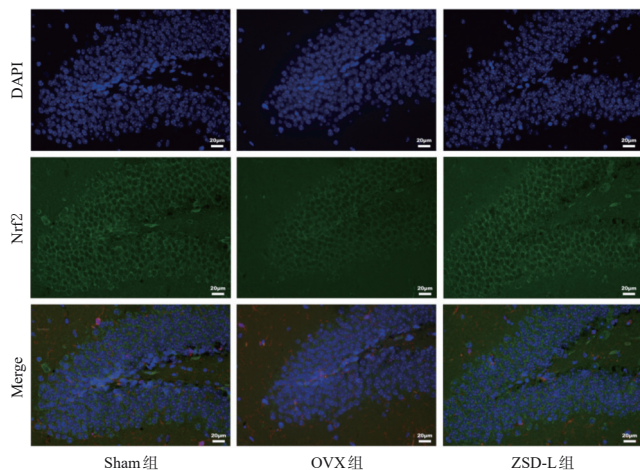


图3 各组小鼠海马组织中Nrf2免疫荧光检测结果(标尺:20 μm)

(稀释比例为1:10 000),在室温下孵育2 h。利用化学发光成像系统进行显影成像,采用Image J图像分析系统测定条带灰度值。以目的蛋白条带与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达量,以p-Akt蛋白与Akt蛋白表达量的比值表示Akt蛋白的磷酸化水平。

结果(图4、表2)显示,与Sham组比较,OVX组小鼠海马组织中Nrf2、HO-1蛋白表达量及Akt蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.01$)。与OVX组比较,ZSD-L组小鼠海马组织中Nrf2、HO-1蛋白表达量及Akt蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.01$)。

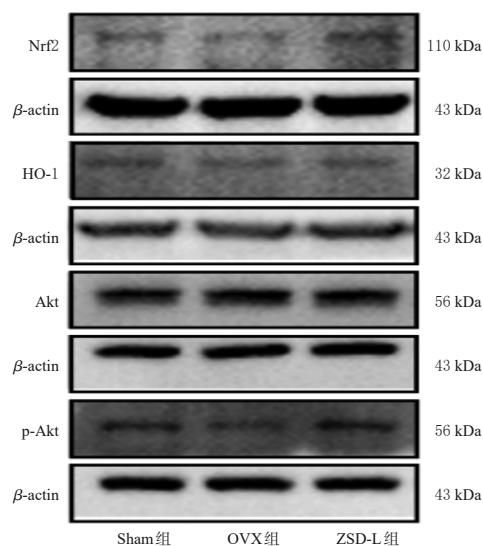


图4 各组小鼠海马组织中Akt/Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达的电泳图

3 讨论

失眠与情绪调节不良互为因果,相互影响,尤其是围绝经期失眠常伴有潮热、汗出、心烦易怒等症状,属于中医学“绝经前后诸证”“不寐”“不得眠”等范畴^[16]。失

表2 各组小鼠海马组织中Akt/Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin	p-Akt/ β -actin	p-Akt/Akt
Sham组	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000	1.000 $\pm$ 0.000
OVX组	0.159 $\pm$ 0.026 ^a	0.331 $\pm$ 0.021 ^a	0.906 $\pm$ 0.018	0.800 $\pm$ 0.019 ^a
ZSD-L组	0.517 $\pm$ 0.078 ^b	0.468 $\pm$ 0.015 ^b	1.267 $\pm$ 0.020	1.099 $\pm$ 0.024 ^b

a: 与Sham组比较, $P<0.01$; b: 与OVX组比较, $P<0.01$ 。

眠引起肝肾阴虚,导致内热上扰心神,从而出现心烦易怒等情志失调;同时,阴虚火旺导致津液外泄,出现潮热汗出。ZSD在主“虚劳、虚烦不得眠”的酸枣仁汤基础上,合主“烦热”“心中懊侬”的栀子豉汤,并配“疗虚清热,补肾水真阴不足”之生地,全方共奏清火养阴、除烦安神之效。

在评估睡眠障碍时,睡眠潜伏期是衡量入睡速度的关键指标,睡眠持续期则反映总睡眠量和睡眠片段化程度^[17]。本研究构建的OVX小鼠模型,成功模拟了围绝经期女性常见的入睡困难和睡眠结构紊乱症状,表现为睡眠潜伏期显著延长和睡眠持续期显著缩短。ZSD给药后,小鼠的睡眠潜伏期显著缩短、睡眠持续期显著延长,证明ZSD具有改善围绝经期失眠小鼠失眠状况的潜力。海马区在睡眠、情绪和认知功能中扮演着核心角色,其神经元的完整性对维持以上功能至关重要。本研究的HE染色结果显示,OVX小鼠海马区神经元排列紊乱、数量减少;NeuN免疫组化染色结果也显示,OVX小鼠海马CA1区神经元出现明显损伤,NeuN平均光密度值降低。ZSD给药后能显著减轻OVX小鼠的神经元损伤,提示改善海马神经元损伤可能是ZSD缓解围绝经期小鼠失眠的机制之一。

为深入探讨ZSD治疗围绝经期失眠的潜在分子机制,本研究运用网络药理学方法预测发现Akt1可能是ZSD治疗失眠的关键靶点,且氧化应激和PI3K/Akt信号通路可能是核心作用通路。转录组测序结果显示,ZSD给药后小鼠海马组织中抗氧化应激关键转录因子Nrf2的基因 *Nfe2l2* 的转录水平显著升高,同时其上游Akt相关基因 *Akt2* 和下游HO-1的靶基因 *Hmox1* 的转录水平均有一定程度上调。该结果从基因表达层面提示,ZSD能够激活Akt/Nrf2/HO-1信号通路。

Akt/Nrf2/HO-1信号通路是一条重要的细胞内信号传导途径,在抗氧化应激和细胞保护中发挥关键作用。Nrf2作为调控抗氧化应激反应的关键转录因子,通过激活抗氧化基因维持细胞的抗氧化能力,从而保护细胞免受氧化损伤^[18],其上游激酶Akt通过磷酸化调控Nrf2的核转位和转录活性^[19],影响细胞的抗氧化能力。HO-1是Nrf2的关键下游抗氧化酶之一,其表达水平直接受Nrf2活性调节^[20]。本研究结果显示,OVX小鼠海马组织Akt

蛋白的磷酸化水平及Nrf2和HO-1蛋白表达量均显著降低,表明Akt/Nrf2/HO-1信号通路在OVX小鼠海马组织中受到抑制。ZSD给药后,小鼠海马组织中Akt蛋白的磷酸化水平及Nrf2和HO-1蛋白表达量均显著升高,提示ZSD能有效激活Akt/Nrf2/HO-1信号通路,从而增强OVX小鼠海马组织的抗氧化能力,减轻氧化应激对神经细胞的损伤。

综上所述,ZSD可通过激活Akt/Nrf2/HO-1信号通路,改善围绝经期失眠小鼠海马神经元氧化应激损伤。但本研究未完全阐明ZSD中各活性成分的具体作用机制,特别是各活性成分对Akt/Nrf2/HO-1信号通路的精确调控,也未对ZSD活性成分的体内药代动力学特性开展系统研究,未来需设计更为严谨的实验来进一步完善。

参考文献

- [1] SCHIEL J E, HOLUB F, PETRI R, et al. Affect and arousal in insomnia: through a lens of neuroimaging studies[J]. *Curr Psychiatry Rep*, 2020, 22(9): 44.
- [2] 中华预防医学会更年期保健分会, 中国人体健康科技促进会妇科内分泌和生育力促进专委会, 北京中西医结合学会更年期专业委员会, 等. 绝经相关失眠临床管理中国专家共识[J]. *中国全科医学*, 2023, 26(24): 2951-2958.
- [3] KONAKANCHI S, RAAVI V, ML H K, et al. Impact of chronic sleep deprivation and sleep recovery on hippocampal oligodendrocytes, anxiety-like behavior, spatial learning and memory of rats[J]. *Brain Res Bull*, 2023, 193: 59-71.
- [4] 任丹丹, 胡霖霖, 张永华. 加味酸枣仁汤治疗阴虚火旺型焦虑性失眠障碍的临床研究[J]. *云南中医学院学报*, 2016, 39(1): 95-98.
- [5] 胡霖霖, 刘文娟, 张蕾, 等. 加味酸枣仁汤对焦虑性失眠患者躯体过度觉醒水平的影响[J]. *浙江临床医学*, 2020(8): 1123-1125.
- [6] HU L L, ZHANG X, LIU W J, et al. Suanzaoren tang in combination with Zhizichi tang as a treatment protocol for insomniacs with anxiety: a randomized parallel-controlled trial[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 913252.
- [7] 方芳, 罗伏钢, 李静, 等. 加味酸枣仁汤对高中生失眠症的治疗作用以及5-HTTLPR基因多态性对疗效的影响[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(9): 1575-1578.
- [8] LI S, WANG P, YANG W Z, et al. Characterization of the components and pharmacological effects of mountain-cultivated ginseng and garden ginseng based on the integrative pharmacology strategy[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:

659954.

- [9] ZENG P, FANG M, ZHAO H, et al. A network pharmacology approach to uncover the key ingredients in Ginkgo Folium and their anti-Alzheimer's disease mechanisms[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(14): 18993-19012.
- [10] GUO S X, YANG L, ZHOU J L, et al. Mechanistic insights into *Ganoderma lucidum* for diabetes treatment via network pharmacology and validation[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2025, 18: 1263-1284.
- [11] DUAN Z L, WANG Y J, LU Z H, et al. Wumei wan attenuates angiogenesis and inflammation by modulating RAGE signaling pathway in IBD: network pharmacology analysis and experimental evidence[J]. *Phytomedicine*, 2023, 111: 154658.
- [12] 邓浩健, 曾春晖, 陈益清, 等. 基于网络药理学的双氢杨梅树皮素抗金黄色葡萄球菌活性和作用机制研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(10): 23-31.
- [13] 蔡熙, 黄晖, 王岚. 围绝经期动物模型的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2007, 13(10): 71-73.
- [14] 李珊珊, 李翔, 柯碧莲, 等. 高脂饮食结合VCD药物诱导围绝经期肥胖小鼠模型的研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(6): 2172-2178.
- [15] GUO Y X, MA J J, QI R C, et al. snCED-seq: high-fidelity cryogenic enzymatic dissociation of nuclei for single-nucleus RNA-seq of FFPE tissues[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 4101.
- [16] 胡晓玲, 秦谊, 庞金榜, 等. 靳三针联合百乐眠胶囊治疗围绝经期失眠肝郁阴虚证的疗效观察[J]. *现代中医临床*, 2021, 28(3): 6-9, 33.
- [17] MUNNS L B, DEMNITZ-KING H, ANDRÉ C, et al. Associations between repetitive negative thinking and objective and subjective sleep health in cognitively healthy older adults[J]. *Nat Sci Sleep*, 2024, 16: 233-245.
- [18] GHAREGHOMI S, MOOSAVI-MOVAHEDI F, SASO L, et al. Modulation of Nrf2/HO-1 by natural compounds in lung cancer[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(3): 735.
- [19] TAIRA J, TSUDA R, MIYAGI-SHIOHIRA C, et al. Cytoprotective effect of pteryxin on insulinoma MIN6 cells due to antioxidant enzymes expression via Nrf2/ARE activation[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(3): 693.
- [20] KATADA K, TAKAGI T, IIDA T, et al. Role and potential mechanism of heme oxygenase-1 in intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(3): 559.

(收稿日期: 2025-04-11 修回日期: 2025-08-26)

(编辑: 林 静)