

黑果枸杞改善睡眠的作用及机制研究^Δ

譙明^{1,2*}, 赵耀¹, 朱毅^{1,2}, 曹叶霞³, 文丽梅^{1,2}, 巩月红^{1,2}, 李想⁴, 汪娟成⁴, 王涛⁴, 杨建华^{1,2}, 胡君萍^{3#}
(1.新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011; 2.新疆药物临床研究重点实验室, 乌鲁木齐 830011; 3.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017; 4.新疆黑果枸杞生物科技有限公司, 新疆库尔勒 841009)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)01-0024-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.01.05



摘要 **目的** 探究黑果枸杞改善睡眠的作用及机制。**方法** 借助网络药理学挖掘黑果枸杞改善睡眠的活性成分及对应疾病靶点,并进行富集分析。以咖啡因诱导斑马鱼构建睡眠剥夺模型,分别给予0.1、0.2、0.4 mg/mL黑果枸杞提取物(LRME)干预24 h后,观察斑马鱼行为学变化和脑部神经元病理学变化,检测斑马鱼体内炎症因子[白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β 、IL-10、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)],氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)]和神经递质[5-羟色胺(5-HT)、 γ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)、多巴胺(DA)和去甲肾上腺素(NE)]水平,并检测斑马鱼体内蛋白激酶B1(AKT1)、磷酸化AKT1(p-AKT1)、表皮生长因子受体(EGFR)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、肉瘤原癌基因编码的非受体酪氨酸激酶(SRC)、热休克蛋白90 α 家族A类成员1(HSP90AA1)蛋白表达水平。**结果** 通过网络药理学挖掘共得到12个活性成分及176个疾病交集靶点,其中芹菜素、柚皮素等为核心活性成分,AKT1、EGFR等为核心靶点,EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路为关键通路。LRME低、中、高剂量组斑马鱼的睡眠改善率分别为54.60%、69.03%、77.97%,运动距离抑制比分别为0.57、0.83、0.95。与模型组比较,LRME中、高剂量组斑马鱼的静息次数、静息时间和静息距离均显著增加/延长($P<0.05$);脑部神经元损伤减轻;体内IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MDA、Glu、DA、NE水平和AKT1、p-AKT1、EGFR、SRC、HSP90AA1蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),IL-10、SOD、GSH-Px、CAT、5-HT、GABA水平和Bcl-2蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。**结论** 黑果枸杞具有改善睡眠的作用,其机制可能与调节炎症反应、氧化应激、神经递质平衡以及EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路有关。
关键词 黑果枸杞;改善睡眠;失眠;网络药理学;斑马鱼

Study on the effects and mechanisms of *Lycium ruthenicum* Murr. in improving sleep

QIAO Ming^{1,2}, ZHAO Yao¹, ZHU Yi^{1,2}, CAO Yexia³, WEN Limei^{1,2}, GONG Yuehong^{1,2}, LI Xiang⁴, WANG Juanchen⁴, WANG Tao⁴, YANG Jianhua^{1,2}, HU Junping³ (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Clinical Drug Research, Urumqi 830011, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 4. Xinjiang Black Wolfberry Biotechnology Co., Ltd., Xinjiang Korla 841009, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and mechanisms of *Lycium ruthenicum* Murr. in improving sleep. **METHODS** Network pharmacology was employed to identify the active components of *L. ruthenicum* and their associated disease targets, followed by enrichment analysis. A caffeine-induced zebrafish model of sleep deprivation was established, and the zebrafish were treated with *L. ruthenicum* Murr. extract (LRME) at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.4 mg/mL, respectively; 24 h later, behavioral changes of zebrafish and pathological alterations in brain neurons were subsequently observed. The levels of inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α)], oxidative stress markers [superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT)], and neurotransmitters [5-hydroxytryptamine (5-HT), γ -aminobutyric acid (GABA), glutamic acid (Glu), dopamine (DA), and norepinephrine (NE)] were measured. The protein expression levels of protein kinase B1 (AKT1), phosphorylated AKT1 (p-AKT1), epidermal growth factor receptor (EGFR), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), sarcoma proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase (SRC), and heat shock protein 90 α family class A member 1 (HSP90AA1) in the zebrafish were also determined. **RESULTS** A total of 12 active components and 176 intersecting disease targets were identified through network pharmacology analysis. Among these, apigenin, naringenin and others were recognized as core active compounds, while AKT1, EGFR and others served as key targets; EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance signaling pathway was identified as the critical pathway. The sleep improvement rates in zebrafish of LRME low-, medium-, and high-dose groups were 54.60%, 69.03% and 77.97%, respectively, while the inhibition ratios of locomotor distance

^Δ 基金项目 新疆维吾尔自治区科技创新领军人才项目(No. 2024TSYCLJ0048);新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目(No. 2022D01D14)

* 第一作者 副教授,副主任药师,博士。研究方向:新疆特色药用植物开发与应用。E-mail: 1532527694@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:天然产物研究与开发。E-mail: hjp_yft@163.com

were 0.57, 0.83 and 0.95, respectively. Compared with the model group, the number of resting counts, resting time and resting distance were significantly increased/extended in LRME medium- and high-dose groups ($P<0.05$). Neuronal damage in the brain was alleviated. Additionally, the levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α , MDA, Glu, DA and NE, as well as the protein expression levels of AKT1, p-AKT1, EGFR, SRC and HSP90AA1, were markedly reduced ($P<0.05$), while the levels of IL-10, SOD, GSH-Px, CAT, 5-HT and GABA, as well as Bcl-2 protein expression, were significantly elevated ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** *L. ruthenicum* Murr. demonstrates sleep-improving effects, and its specific mechanism may be related to the regulation of inflammatory responses, oxidative stress, neurotransmitter balance, and the EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance signaling pathway.

KEYWORDS *Lycium ruthenicum* Murr.; improving sleep; insomnia; network pharmacology; zebrafish

失眠主要表现为入睡困难、早醒、睡眠质量下降和总睡眠时间减少。失眠的全球患病率为10%~30%,其不仅显著降低了患者生活质量,还与焦虑、抑郁、心血管疾病及神经退行性疾病密切相关^[1]。目前,临床上用于治疗失眠的药物主要包括苯二氮草受体激动剂、双食欲素受体拮抗剂、褪黑素及其受体激动剂、抗精神病药和抗抑郁药等^[2]。这些化学药物虽起效快,但长期服用会产生耐受性,或出现恶心、认知功能下降等不良反应,且停药后会引发戒断反应^[3]。许多传统中药已被证实具有改善睡眠障碍的作用。例如经典药方酸枣仁汤、天王补心丹等已被证实可通过下调促炎因子表达等作用来缓解失眠症状^[4];黄连、远志等中药可通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体的异常激活,减轻神经炎症,抑制细胞焦亡,从而改善睡眠质量^[5];夜交藤有效成分藤本皂苷可通过调控小鼠脑组织中去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)含量,抑制多巴胺(dopamine, DA)分泌,从而改善睡眠质量^[6]。在此背景下,兼具安神与抗炎潜力的传统中药逐渐在治疗失眠领域受到关注。

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 具有“软黄金”的美称,在我国藏医学(如《四部医典》《晶珠本草》)和维吾尔医学(如《维吾尔药志》)中均有用药历史^[7-8]。研究表明,黑果枸杞富含花青素、多糖、黄酮和多酚等多种生物活性成分,具有抗氧化、抗炎、调节免疫及保护神经等多重药理活性^[9]。另有研究显示,黑果枸杞粗多酚能显著缩短巴比妥钠诱导的失眠小鼠的睡眠潜伏期,具有改善睡眠的功能^[10]。然而,目前关于黑果枸杞改善睡眠的具体作用机制尚未系统阐明,其多成分、多靶点的协同调控网络仍有待揭示。

网络药理学可通过构建“药物-成分-靶点-疾病”多层次网络,系统阐释药物多成分协同作用的整体机制,已被广泛应用于中药复杂作用体系的机制研究。近年来,斑马鱼已被证实是研究疾病发病机制和筛选药物活性成分的重要模式生物,其基因组与人类基因组的相似度高达87%,且具有体积小、繁殖快、生命周期短、培养成本低、遗传背景清楚等多重优点^[11]。为此,本研究拟整合网络药理学与斑马鱼模型,系统探讨黑果枸杞改善睡眠的药效基础及潜在机制,旨在为其深度开发与应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有:Danio Vision型斑马鱼

行为轨迹跟踪系统(荷兰Noldus公司),ChemiDocTM MP型化学发光成像仪、Mini-PROTEAN[®] Tetra型电泳仪(美国Bio-Rad公司),SV48R型组织研磨仪[鼎昊源(天津)生物科技有限公司],Multiskan Go型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 主要药品与试剂

黑果枸杞提取物 [*L. ruthenicum* Murr. extract (LRME), 花色苷含量 $\geq 85\%$,批号20231209]由新疆黑果枸杞生物科技有限公司提供;褪黑素(批号CM34111416,纯度 $\geq 98\%$)购自北京酷来搏科技有限公司;咖啡因(批号C0750-5G,纯度 $\geq 99\%$)购自美国Sigma公司;5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、谷氨酸(glutamic acid, Glu)、DA、NE、白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(批号分别为YX-050820M、YX-E20434、YX-071219M、YX-E20298、YX-081601M、YX-E20012、YX-E20533、YX-E20005、YX-E20220、YX-E20348、YX-E20347、YX-071908M、YX-030120M)均购自上海优选生物科技有限公司;兔源蛋白激酶B1(protein kinase B1, AKT1)、磷酸化AKT1(p-AKT1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、B细胞淋巴瘤2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、肉瘤原癌基因编码的非受体酪氨酸激酶(sarcoma proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase, SRC)、热休克蛋白90 α 家族A类成员1(heat shock protein 90 α family class A member 1, HSP90AA1)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(货号分别YT0177、YP0005、YM8344、YM8319、YM8399、YT2257、YM8343、RS23920)均购自美国Affinity公司。

1.3 实验动物

野生型AB系斑马鱼购自中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心,饲养于新疆医科大学药学院斑马鱼研究平台,饲养、繁殖均在该平台完成。饲养条件:水温为(28.0 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,光14 h/暗10 h循环交替,水pH为7.0~8.0。实验选用受精后5 d(即5 dpf)的幼鱼,该时期的斑马鱼可从自身卵黄囊中获取营养,不需要人工喂

食。本研究动物实验已通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审批(审批号为K202407-30)。

2 方法

2.1 网络药理学预测黑果枸杞改善睡眠的作用靶点和通路

2.1.1 黑果枸杞活性成分及对应靶点的筛选

通过TCMSP平台(<http://tcmsp.91medicine.cn>,以口服利用度 $\geq 30\%$ 、类药性 ≥ 0.18 为筛选条件)和Swiss-ADME平台(<http://www.swissadme.ch/>,以胃肠道吸收得分为“high”、类药性至少通过2个“Yes”为筛选条件)筛选黑果枸杞活性成分^[12],并补充已有文献报道的具有改善睡眠作用的黑果枸杞活性成分。通过Swiss Target Prediction数据库检索活性成分靶点(probability参数 > 0),去除重复项后得到黑果枸杞活性成分对应靶点。将黑果枸杞的活性成分及其对应靶点录入Cytoscape软件,构建“药物-成分-靶点”网络,计算网络中各节点的度值,以度值排名前5位的活性成分作为核心成分。

2.1.2 黑果枸杞改善睡眠的潜在靶点筛选及其富集分析

以“insomnia”和“sleeplessness”为检索词,分别从GeneCards数据库(<http://www.genecards.org/>, score ≥ 10)和OMIM数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)收集疾病靶点。将活性成分对应靶点与疾病靶点取交集,得到黑果枸杞改善睡眠的潜在靶点。将潜在靶点导入DAVID数据库(<https://david.ncicrf.gov>)进行基因本体(Gene Ontology, GO)分析及京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。以富集到的相应通路的靶点个数和 $-\lg P$ 值来衡量富集程度,GO分析中选取排名前10位的条目绘制柱状图,KEGG通路富集分析中选取排名前15位的通路绘制气泡图。

2.1.3 黑果枸杞改善睡眠的核心靶点筛选

将黑果枸杞改善睡眠的潜在靶点导入STRING数据库(<http://string-db.org/>),将物种限定为“Homo sapiens”、交互分数限定为 > 0.4 ,绘制蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,并计算各靶点的度值,以度值排名前5位的靶点作为核心靶点。

2.1.4 核心靶点和核心成分的分子对接验证

采用AutoDock Vina软件对筛选出的核心靶点和核心成分进行分子对接验证。结合自由能越低,表明该核心成分与核心靶点的亲和力越高。

2.2 黑果枸杞改善睡眠的作用及机制研究

2.2.1 分组、给药与造模

本课题组前期通过对咖啡因造模(即睡眠剥夺模型)浓度以及斑马鱼的药物最大耐受浓度(maximum tolerated concentration, MTC)进行考察,确定咖啡因的造模浓度为 $350\text{ }\mu\text{mol/L}$,斑马鱼对LRME的MTC为 0.4 mg/mL 、对褪黑素的MTC为 0.8 mg/mL 。在显微镜下挑选发育正常的斑马鱼,随机分为空白对照组、模型组($350\text{ }\mu\text{mol/L}$ 咖啡因)、阳性对照组(0.4 mg/mL (1/2

MTC)褪黑素]及LRME低、中、高剂量组[0.1 、 0.2 、 0.4 mg/mL (1/4、1/2、1 MTC)]。各组斑马鱼的样本量因检测方法而异:行为学观察时每组15尾,Western blot检测时每组30尾,ELISA检测时每组60尾。采取体外水环境浸泡的方式给药,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育,具体为:空白对照组斑马鱼正常饲养24 h;模型组斑马鱼用 $350\text{ }\mu\text{mol/L}$ 咖啡因处理24 h;LRME组斑马鱼在咖啡因处理同时进行药物干预24 h。

2.2.2 斑马鱼行为学观察

药物干预结束后,应用斑马鱼行为轨迹跟踪系统分析斑马鱼在黑暗环境中的运动时间(T)、运动距离(D)以及静息次数、静息时间和静息距离,观察时间为1 h。计算睡眠改善率和运动距离抑制比:睡眠改善率($\%$)= $(T_{\text{模型组}} - T_{\text{药物治疗组}})/(T_{\text{模型组}} - T_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$;运动距离抑制比= $(D_{\text{模型组}} - D_{\text{药物治疗组}})/(D_{\text{模型组}} - D_{\text{空白对照组}})$ 。

2.2.3 样本收集与处理

行为学实验结束后,对斑马鱼施行安乐死。每组随机抽取6尾斑马鱼用4%多聚甲醛固定,其余斑马鱼冻存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.2.4 斑马鱼脑部神经元病理学观察

采用尼氏染色法观察。取“2.2.3”项下经4%多聚甲醛固定的斑马鱼,经冠状切片(厚 $5\text{ }\mu\text{m}$)、1%尼氏染色液染色后,进行分化、二甲苯透明,再以中性树胶封片。将切片置于显微镜下拍照,并观察斑马鱼脑部神经元及尼氏小体的变化。阳性染色表现为神经元细胞质内出现深蓝色及斑块状的尼氏物质。

2.2.5 斑马鱼体内炎症因子、氧化应激指标和中枢神经递质检测

取“2.2.3”项下冻存的斑马鱼适量,进行匀浆处理,将匀浆液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 $3\text{ }500\text{ r/min}$ 离心15 min,收集上清液。按ELISA试剂盒说明书方法操作,检测上清液中IL-6、IL-1 β 、IL-10、TNF- α 、SOD、MDA、GSH-Px、CAT、5-HT、GABA、Glu、DA和NE水平。

2.2.6 斑马鱼体内核心靶点蛋白表达检测

取“2.2.3”项下斑马鱼适量,加入RIPA裂解液提取总蛋白。测定蛋白的浓度并将其高温变性,取变性后的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,经转膜、封闭后,加入一抗(AKT1、p-AKT1、EGFR、SRC、HSP90AA1、Bcl-2、 β -actin的稀释比例分别为1:2 000、1:5 000、1:10 000、1:10 000、1:2 000、1:10 000、1:10 000),在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;加入二抗(稀释比例为1:10 000),在室温下孵育1 h;经TBST缓冲液洗涤后,加入ECL显影并检测。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以各目的蛋白与内参(β -actin)蛋白条带灰度值的比值表示各目的蛋白的表达水平。

2.2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 10.1.2软件绘图,采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。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,组间两两比较采用LSD- t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 网络药理学预测结果

3.1.1 黑果枸杞核心成分及潜在靶点筛选结果

通过平台筛选及文献查询,最终得到12个黑果枸杞活性成分,具体为白杨素、芹菜素、山柰酚、槲皮素、杨梅酮、柚皮素、矢车菊素、矮牵牛素、黄豆苷元、金雀异黄酮、表儿茶素和橄榄脂素。“药物-成分-靶点”网络中度值排前5位的成分(即核心成分)分别为芹菜素(度值=63)、柚皮素(度值=59)、黄豆苷元(度值=51)、山柰酚(度值=43)、槲皮素(度值=41)。通过Swiss Target Prediction数据库筛选得到活性成分靶点308个,通过GeneCards和OMIM数据库检索得到疾病靶点5367个,将活性成分靶点与疾病靶点取交集后得到176个黑果枸杞活性成分改善睡眠的潜在靶点。

3.1.2 潜在靶点的功能和通路富集分析结果

从图1可知,黑果枸杞改善睡眠的生物过程主要与信号转导、凋亡负调控等有关,主要涉及EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药、血管内皮生长因子等信号通路。

3.1.3 核心靶点筛选结果及分子对接验证结果

PPI网络共包含175个节点和2394条边,度值排前5位的核心靶点分别为AKT1(度值=116)、EGFR(度值=103)、Bcl-2(度值=94)、SRC(度值=92)和HSP90AA1(度值=89)。分子对接验证结果显示,核心靶点(AKT1、EGFR、Bcl-2、SRC和HSP90AA1)与核心成分(芹菜素、柚皮素、黄豆苷元、山柰酚、槲皮素)的结合

能均小于-2.66 kJ/mol,表明配体分子均能和受体蛋白较好地结合,其中Bcl-2与黄豆苷元的结合性最好(结合能为-5.90 kJ/mol)。

3.2 动物实验结果

3.2.1 黑果枸杞对睡眠剥夺斑马鱼行为学的影响

与空白对照组比较,模型组斑马鱼的*T*、*D*均显著延长/增加($P<0.05$),静息次数、静息时间和静息距离显著减少/缩短($P<0.05$)。与模型组比较,LRME低、中、高剂量组和阳性对照组斑马鱼的*T*、*D*均显著缩短/减少($P<0.05$),静息次数、静息时间和静息距离显著增加/延长($P<0.05$);LRME低、中、高剂量组和阳性对照组斑马鱼的睡眠改善率分别为54.60%、69.03%、77.97%和79.89%,运动距离抑制比分别为0.57、0.83、0.95和1.03。结果见表1。

3.2.2 黑果枸杞对斑马鱼脑部神经元的影响

空白对照组斑马鱼脑部神经元数目正常,视盖区细胞集中分布在中央灰质层,尼氏小体染色深且数目多、分布均匀。与空白对照组比较,模型组斑马鱼脑部神经元出现水肿,周围裂隙增宽,尼氏小体染色浅且数目较少、分布不均。与模型组比较,LRME给药组斑马鱼脑部神经元较为饱满,尼氏小体部分可见、着色加深,且LRME高剂量组的效果优于LRME中、低剂量组;阳性对照组斑马鱼脑部神经元数目增加,损伤减轻。结果见图2。

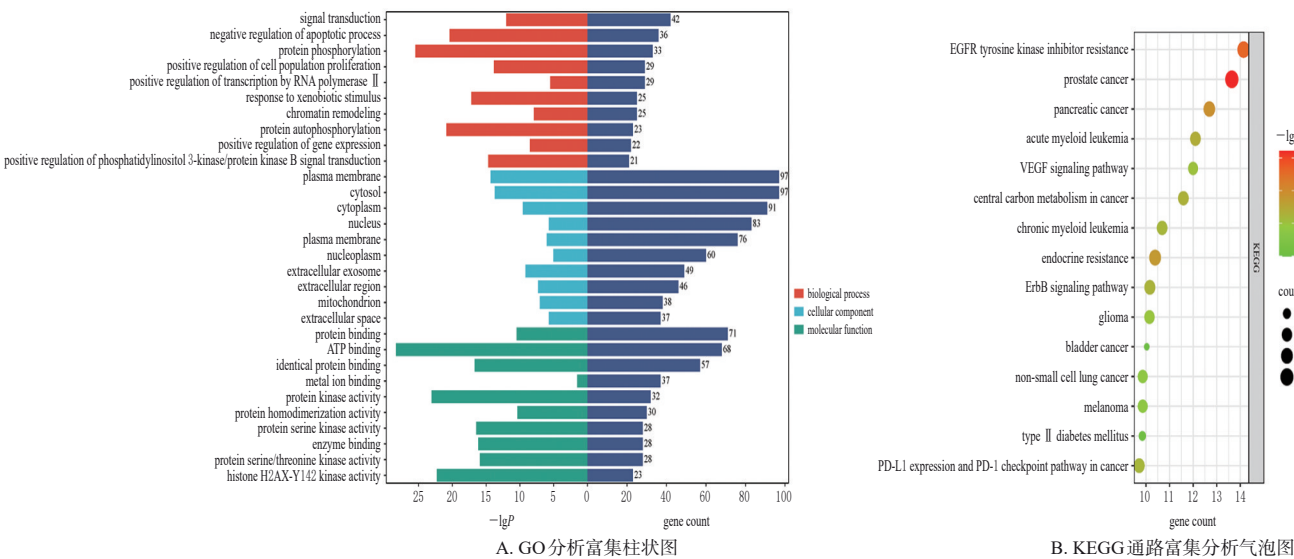
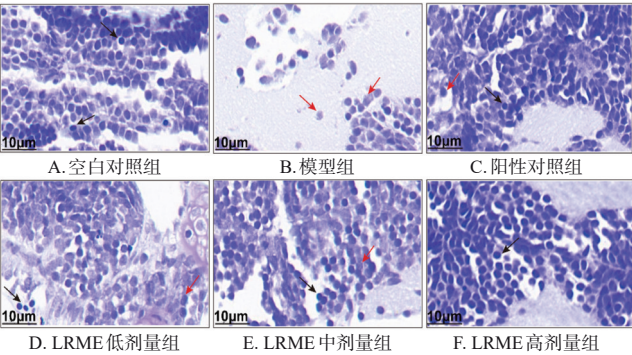


图1 潜在靶点的GO分析和KEGG通路富集分析结果

表1 各组斑马鱼的*T*、*D*、静息次数、静息时间及静息距离比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	<i>T</i> /s	睡眠改善率/%	<i>D</i> /mm	运动距离抑制比	静息次数/次	静息时间/s	静息距离/mm
空白对照组	720.43 ± 169.23	—	2 885.96 ± 343.31	—	406.61 ± 84.97	2 879.57 ± 270.13	1 491.13 ± 135.13
模型组	1 789.30 ± 193.53 ^a	—	6 022.42 ± 538.72 ^a	—	316.83 ± 93.92 ^a	1 810.70 ± 132.72 ^a	1 165.22 ± 228.12 ^a
阳性对照组	935.46 ± 186.25 ^b	79.89	2 787.12 ± 401.69 ^b	1.03	415.23 ± 69.13 ^b	2 664.54 ± 128.47 ^b	1 568.84 ± 207.09 ^b
LRME低剂量组	1 280.69 ± 124.80 ^b	54.60	4 861.25 ± 562.63 ^b	0.57	369.16 ± 82.37 ^b	2 319.31 ± 125.37 ^b	1 266.18 ± 269.10 ^b
LRME中剂量组	1 109.33 ± 291.01 ^b	69.03	3 875.33 ± 448.19 ^b	0.83	398.34 ± 74.30 ^b	2 490.67 ± 132.52 ^b	1 348.94 ± 223.38 ^b
LRME高剂量组	1 003.14 ± 118.12 ^b	77.97	3 462.51 ± 420.50 ^b	0.95	415.01 ± 84.52 ^b	2 596.86 ± 148.88 ^b	1 525.56 ± 166.90 ^b

a: 与空白对照组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$ 。



注:黑色箭头所指为尼氏小体;红色箭头所指为神经元水肿所致的空泡现象。

图2 各组斑马鱼脑部神经元观察结果

3.2.3 黑果枸杞对斑马鱼体内炎症因子的影响

与空白对照组比较,模型组斑马鱼体内 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$),IL-10 水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,LRME 低、中、高剂量组和阳性对照组斑马鱼体内 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均显著降低($P<0.05$),IL-10 水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组斑马鱼体内炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=60, \text{pg/mL}$)

组别	IL-10	IL-6	IL-1 β	TNF- α
空白对照组	501.28 $\pm$ 1.36	35.65 $\pm$ 7.65	25.54 $\pm$ 10.15	219.38 $\pm$ 6.72
模型组	148.68 $\pm$ 34.70 ^a	151.56 $\pm$ 6.54 ^a	87.73 $\pm$ 7.79 ^a	674.35 $\pm$ 7.47 ^a
阳性对照组	377.06 $\pm$ 6.53 ^b	65.98 $\pm$ 9.95 ^b	39.22 $\pm$ 7.25 ^b	400.10 $\pm$ 19.68 ^b
LRME低剂量组	206.45 $\pm$ 17.43 ^b	124.05 $\pm$ 5.80 ^b	78.06 $\pm$ 6.85 ^b	578.95 $\pm$ 10.81 ^b
LRME中剂量组	283.43 $\pm$ 19.01 ^b	109.30 $\pm$ 12.16 ^b	70.13 $\pm$ 10.48 ^b	443.73 $\pm$ 16.11 ^b
LRME高剂量组	329.26 $\pm$ 4.73 ^b	77.92 $\pm$ 8.53 ^b	54.81 $\pm$ 9.07 ^b	405.53 $\pm$ 9.26 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.4 黑果枸杞对斑马鱼体内氧化应激指标的影响

与空白对照组比较,模型组斑马鱼体内 MDA 水平显著升高($P<0.05$),SOD、GSH-Px、CAT 水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,LRME 中、高剂量组和阳性对照组斑马鱼体内 MDA 水平均显著降低($P<0.05$),SOD、GSH-Px、CAT 水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组斑马鱼体内氧化应激指标水平比较($\bar{x} \pm s, n=60$)

组别	SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)	GSH-Px/(U/L)	CAT/(U/mL)
空白对照组	318.70 $\pm$ 6.87	4.34 $\pm$ 1.96	170.70 $\pm$ 6.99	81.31 $\pm$ 6.96
模型组	150.26 $\pm$ 15.46 ^a	6.53 $\pm$ 0.91 ^a	83.73 $\pm$ 11.19 ^a	47.82 $\pm$ 6.30 ^a
阳性对照组	266.02 $\pm$ 17.18 ^b	4.39 $\pm$ 0.36 ^b	147.70 $\pm$ 8.72 ^b	73.95 $\pm$ 7.06 ^b
LRME低剂量组	179.23 $\pm$ 13.92	5.87 $\pm$ 0.85	88.27 $\pm$ 8.98	50.76 $\pm$ 5.15
LRME中剂量组	189.20 $\pm$ 9.53 ^b	5.46 $\pm$ 0.72 ^b	102.52 $\pm$ 7.57 ^b	58.26 $\pm$ 7.47 ^b
LRME高剂量组	228.42 $\pm$ 13.10 ^b	5.27 $\pm$ 0.78 ^b	115.02 $\pm$ 6.45 ^b	66.54 $\pm$ 7.86 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.5 黑果枸杞对斑马鱼中枢神经递质的影响

与空白对照组比较,模型组斑马鱼体内 Glu、DA、NE 水平均显著升高($P<0.05$),5-HT、GABA 水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,LRME 低、中、高剂量组和阳性对照组斑马鱼体内 Glu、DA、NE 水平均显著降低($P<0.05$),5-HT、GABA 水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表4。

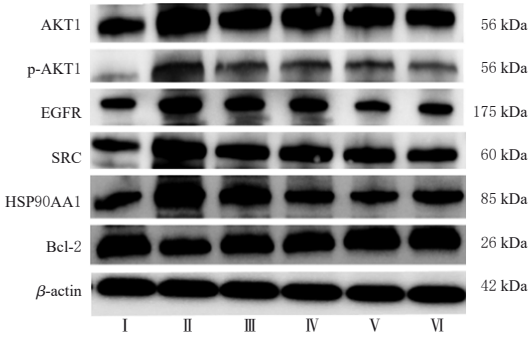
表4 各组斑马鱼体内中枢神经递质水平比较($\bar{x} \pm s, n=60$)

组别	5-HT/(pg/mL)	GABA/(\u003Cmu\text{mol/L})	Glu/(mg/L)	DA/(pg/mL)	NE/(ng/mL)
空白对照组	2 237.86 $\pm$ 5.05	6.52 $\pm$ 0.92	25.38 $\pm$ 3.96	58.12 $\pm$ 5.88	4.90 $\pm$ 0.52
模型组	1 010.24 $\pm$ 21.93 ^a	4.31 $\pm$ 0.52 ^a	44.85 $\pm$ 4.11 ^a	104.08 $\pm$ 11.14 ^a	7.46 $\pm$ 0.86 ^a
阳性对照组	1 873.62 $\pm$ 9.79 ^b	6.37 $\pm$ 0.77 ^b	30.54 $\pm$ 3.74 ^b	52.20 $\pm$ 7.98 ^b	4.88 $\pm$ 0.65 ^b
LRME低剂量组	1 454.46 $\pm$ 14.97 ^b	5.74 $\pm$ 1.02 ^b	33.11 $\pm$ 4.99 ^b	68.14 $\pm$ 8.17 ^b	5.99 $\pm$ 0.79 ^b
LRME中剂量组	1 650.40 $\pm$ 10.58 ^b	5.90 $\pm$ 0.46 ^b	32.63 $\pm$ 8.83 ^b	53.48 $\pm$ 7.78 ^b	5.88 $\pm$ 0.97 ^b
LRME高剂量组	1 755.68 $\pm$ 14.08 ^b	6.44 $\pm$ 0.54 ^b	30.30 $\pm$ 3.34 ^b	50.96 $\pm$ 8.75 ^b	5.54 $\pm$ 0.52 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

3.2.6 黑果枸杞对斑马鱼体内核心靶点蛋白表达水平的影响

与空白对照组比较,模型组斑马鱼体内 AKT1、p-AKT1、EGFR、SRC、HSP90AA1 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,LRME 低、中、高剂量组和阳性对照组斑马鱼体内 AKT1、p-AKT1、EGFR、SRC、HSP90AA1 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图3、表5。



I:空白对照组;II:模型组;III:阳性对照组;IV:LRME低剂量组;V:LRME中剂量组;VI:LRME高剂量组。

图3 各组斑马鱼体内核心靶点蛋白的电泳图

表5 各组斑马鱼核心靶点蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	AKT1/ β -actin	p-AKT1/ β -actin	EGFR/ β -actin	SRC/ β -actin	HSP90AA1/ β -actin	Bcl-2/ β -actin
空白对照组	0.97 $\pm$ 0.10	0.29 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.07	1.06 $\pm$ 0.08
模型组	1.41 $\pm$ 0.09 ^a	0.94 $\pm$ 0.06 ^a	0.91 $\pm$ 0.06 ^a	1.59 $\pm$ 0.10 ^a	1.83 $\pm$ 0.10 ^a	0.47 $\pm$ 0.04 ^a
阳性对照组	1.05 $\pm$ 0.11 ^b	0.43 $\pm$ 0.08 ^b	0.59 $\pm$ 0.08 ^b	1.03 $\pm$ 0.07 ^b	1.39 $\pm$ 0.08 ^b	0.88 $\pm$ 0.05 ^b
LRME低剂量组	1.15 $\pm$ 0.11 ^b	0.52 $\pm$ 0.07 ^b	0.61 $\pm$ 0.06 ^b	1.08 $\pm$ 0.07 ^b	1.23 $\pm$ 0.09 ^b	0.75 $\pm$ 0.05 ^b
LRME中剂量组	1.10 $\pm$ 0.09 ^b	0.56 $\pm$ 0.09 ^b	0.48 $\pm$ 0.09 ^b	1.16 $\pm$ 0.08 ^b	1.21 $\pm$ 0.16 ^b	1.02 $\pm$ 0.08 ^b
LRME高剂量组	1.04 $\pm$ 0.08 ^b	0.38 $\pm$ 0.08 ^b	0.44 $\pm$ 0.08 ^b	0.95 $\pm$ 0.09 ^b	1.20 $\pm$ 0.12 ^b	1.16 $\pm$ 0.12 ^b

a:与空白对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

本研究通过网络药理学挖掘出了黑果枸杞改善睡眠的5个核心成分(芹菜素、柚皮素、黄豆苷元、山柰酚、槲皮素)和5个核心靶点(AKT1、EGFR、Bcl-2、SRC、HSP90AA1)。其中,EGFR作为一种受体酪氨酸激酶,其被激活后,会招募SRC,进而通过磷脂酰肌醇3激酶/AKT信号通路向下游传递信号;该通路中的AKT1能够进一步激活核因子 κ B,最终驱动促炎因子的合成与释

放,加剧炎症反应^[13]。HSP90AA1属于HSP90 α 亚型,主要在缺氧等应激条件下高表达,并与炎症、肿瘤等的发生发展密切相关^[14]。Bcl-2是一个抗凋亡因子,具有保护神经细胞的功能,能够有效抑制凋亡蛋白激活,减轻神经元损伤^[15]。

近年来研究发现,人体免疫系统随睡眠-觉醒周期发生节律性变化,其中炎症因子和氧化应激指标亦表现出昼夜波动,与睡眠-觉醒节律一致,这证实了炎症因子和氧化应激指标在睡眠调节中的重要作用^[16]。巨噬细胞能够分泌包括IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 在内的多种细胞因子,其中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 是关键的促炎介质,而IL-10则发挥抗炎与免疫调节作用。这些细胞因子的表达水平常被作为评价药物活性成分抗炎的重要指标^[17]。SOD、GSH-Px和CAT是抗氧化防御系统中至关重要的抗氧化酶;MDA是脂质过氧化的终产物,是氧化应激的生物标志物^[18]。此外,神经递质在睡眠-觉醒周期中亦发挥重要作用,其微量的变化都可能对睡眠产生重大的影响。在睡眠调控中,5-HT和GABA主要发挥促进和维持睡眠的作用,Glu、DA和NE则主要促进觉醒与警觉,这些递质通过复杂的相互作用共同维持着睡眠-觉醒周期的稳定^[19]。斑马鱼实验结果表明,黑果枸杞能够显著抑制促炎因子(IL-6、IL-1 β 、TNF- α)的释放,促进抗炎因子(IL-10)的生成,同时降低MDA水平,提高抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性;升高抑制性神经递质(5-HT、GABA)水平,降低兴奋性神经递质(Glu、DA、NE)水平;下调AKT1、p-AKT1、EGFR、SRC和HSP90AA1蛋白表达,上调Bcl-2蛋白表达。这表明黑果枸杞可能通过调节炎症反应、氧化应激、神经递质平衡以及EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路改善睡眠。

综上所述,黑果枸杞具有改善睡眠的作用,其机制可能与调节炎症反应、氧化应激、神经递质平衡以及EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路有关。然而,本研究结果仍有待哺乳动物实验验证,且黑果枸杞改善睡眠的活性成分在体内的代谢过程也有待进一步研究。

参考文献

[1] RIEMANN D, DRESSLE R J, BENZ F, et al. Chronic insomnia, REM sleep instability and emotional dysregulation: a pathway to anxiety and depression?[J]. J Sleep Res, 2025, 34(2): e14252.

[2] ZOLFAGHARI S, KEIL A, PELLETIER A, et al. Sleep disorders and mortality: a prospective study in the Canadian longitudinal study on aging[J]. Sleep Med, 2024, 114: 128-136.

[3] ROSENBERG R P, BENCA R, DOGHRAJMI P, et al. A 2023 update on managing insomnia in primary care: insights from an expert consensus group[J]. Prim Care Companion CNS Disord, 2023, 25(1): 22nr03385.

[4] 张洪雄,高太祥,赵峰,等.药效学结合网络药理学研究酸枣仁汤对不同疾病模型的干预作用及其作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(7): 2465-2478.

[5] FAN K, YANG J J, GONG W Y, et al. NLRP3 inflamma-

some activation mediates sleep deprivation-induced pyroptosis in mice[J]. Peer J, 2021, 9: e11609.

[6] 龙盼,胡晓霞,胡琦兰,等.天麻素对氯苯丙氨酸(PCPA)致失眠小鼠的镇静催眠作用研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(5): 33-38.

[7] YAO R Y, HEINRICH M, WECKERLE C S. The genus *Lycium* as food and medicine: a botanical, ethnobotanical and historical review[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 212: 50-66.

[8] MA L J, HUO P C, SUN M R, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Lycium ruthenicum*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51: 5884-5893.

[9] LU L, MI J, JIN B, et al. Inhibitory effects of the anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray on angiotensin-I-converting enzyme: *in vitro* and molecular docking studies[J]. J Sci Food Agric, 2023, 103(14): 7164-7175.

[10] 杨冬彦. 黑果枸杞速溶粉的制备及其品质评价[D]. 北京: 中国科学院大学(中国科学院过程工程研究所), 2018.

[11] ALTENHOFEN S, BONAN C D. Zebrafish as a tool in the study of sleep and memory-related disorders[J]. Curr Neuropharmacol, 2022, 20(3): 540-549.

[12] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.

[13] 徐琼,张恒,王辉. 基于EGFR介导的信号通路探讨中药活性成分抗肿瘤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(6): 246-253.

[14] WANG J H, CUI S Z, ZHANG X L, et al. High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62876.

[15] 刘佳敏,王雅乐,黄海,等. 基于转录组学探讨黑逍遥散调控PI3K/Akt通路改善肝郁型失眠大鼠学习记忆能力的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(16): 114-125.

[16] IRWIN M R, OPP M R. Sleep health: reciprocal regulation of sleep and innate immunity[J]. Neuropsychopharmacology, 2017, 42(1): 129-155.

[17] YANG D W, SUN X L, WANG H, et al. TREM2 depletion in pancreatic cancer elicits pathogenic inflammation and accelerates tumor progression via enriching IL-1 β ⁺ macrophages[J]. Gastroenterology, 2025, 168(6): 1153-1169.

[18] ZHENG Y D, ZHANG L Y, BONFILI L, et al. Probiotics supplementation attenuates inflammation and oxidative stress induced by chronic sleep restriction[J]. Nutrients, 2023, 15(6): 1518.

[19] WANG W F, WANG Y C, GUO Q T, et al. Valerian essential oil for treating insomnia via the serotonergic synapse pathway[J]. Front Nutr, 2022, 9: 927434.

(收稿日期:2025-08-19 修回日期:2025-11-25)

(编辑:林 静)