

# 基于网络药理学和动物实验探讨酸枣仁-远志药对治疗乳腺癌相关性失眠的作用机制

古春青<sup>1,2</sup>, 郭睿思<sup>3</sup>, 周勤勤<sup>1</sup>, 刘恒辉<sup>1</sup>, 巴婉玉<sup>1</sup>, 孙士玲<sup>4</sup>, 王冰<sup>4</sup>, 郑玉玲<sup>4</sup>, 吴宿慧<sup>5</sup>

(1. 河南中医药大学第一临床医学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院脑病医院, 河南 郑州 450099;

3. 莫斯科国立谢东诺夫第一医科大学, 俄罗斯 莫斯科 101135; 4. 河南中医药大学第一附属医院血液肿瘤科, 河南 郑州 450099;

5. 河南中医药大学医学院, 河南 郑州 450046)

**摘要:**目的 基于网络药理学和动物实验探讨酸枣仁-远志药对治疗乳腺癌相关性失眠(breast cancer related insomnia, BCRI)的作用机制。方法 通过TCMSP数据库、HERB数据库、DisGeNET数据库筛选酸枣仁-远志药对治疗BCRI的核心靶点;STRING数据库构建酸枣仁-远志药对治疗BCRI的核心靶点蛋白互作网络图;利用Metascape平台对核心靶点进行GO及KEGG富集分析。60只小鼠分为对照组、BCRI组、酸枣仁-远志药对组、地西洋组、酸枣仁-远志药对+LY294002(PI3K抑制剂)组,每组12只。对照组小鼠仅构建乳腺癌模型,不进行慢性不可预知刺激及腹腔注射环磷酰胺处理;其他组小鼠均通过乳腺癌模型+慢性不可预知刺激+腹腔注射环磷酰胺的方法构建BCRI模型,建模成功后给药,1次/d,持续7d。检测小鼠睡眠潜伏期、睡眠持续时长;HE染色检测下丘脑病理;ELISA检测下丘脑中4-氨基丁酸(4-aminobutyric acid, GABA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)水平;qRT-PCR检测下丘脑中脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白-1(brain and muscle arnt-like 1, BMAL1)、昼夜运动输出周期蛋白(circadian locomotor output cycles kaput, CLOCK) mRNA表达;检测下丘脑中磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(phosphorylated protein kinase B, p-AKT)蛋白。结果 酸枣仁-远志药对治疗BCRI的核心靶点分别为AKT1、TP53、TNF、ALB、HIF1A、STAT3、ESR1、BCL2、HSP90AA1、CASP3、PPARG、HSP90AB1、MAPK3、TGFB1、MMP9、MTOR、CCND1。对上述17个核心靶点进行GO富集分析得到酸枣仁-远志药对治疗BCRI的细胞组分(cellular component, CC)共23条,分子功能(molecular function, MF)共47条,生物过程(biological process, BP)共211条;KEGG富集分析得到116条通路,预测PI3K/AKT通路可能是酸枣仁-远志药对治疗BCRI的重要机制。动物实验表明,与对照组相比,BCRI组小鼠下丘脑病理损伤严重,睡眠潜伏期延长,睡眠持续时长减少,下丘脑中GABA、5-HT水平,BMAL1、CLOCK mRNA表达及p-PI3K、p-AKT蛋白降低( $P<0.05$ );与BCRI组相比,酸枣仁-远志药对组、地西洋组小鼠下丘脑病理损伤减轻,睡眠潜伏期缩短,睡眠持续时长增加,下丘脑中GABA、5-HT水平,BMAL1、CLOCK mRNA表达及p-PI3K、p-AKT蛋白升高( $P<0.05$ );LY294002逆转了酸枣仁-远志药对对BCRI小鼠下丘脑病理、神经递质及昼夜节律的影响。结论 酸枣仁-远志药对能改善BCRI小鼠下丘脑病理,促进神经递质平衡,恢复昼夜节律,进而改善睡眠,且其作用机制可能与调控PI3K/AKT通路有关。

**关键词:**酸枣仁-远志药对;乳腺癌相关性失眠;神经递质;昼夜节律

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

## Mechanism of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair in the treatment of breast cancer related insomnia based on network pharmacology and animal experiments

GU Chunqing<sup>1,2</sup>, GUO Ruishi<sup>3</sup>, ZHOU Qinqin<sup>1</sup>, LIU Henghui<sup>1</sup>, BA Wanyu<sup>1</sup>, SUN Shiling<sup>4</sup>,  
WANG Bing<sup>4</sup>, ZHENG Yuling<sup>4</sup>, WU Suhui<sup>5</sup>

(1. First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China;

2. Encephalopathy Hospital, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine,

收稿日期:2025-01-20

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2106);河南省卫生健康委国家中医临床研究基地科研专项(2021JDZY077);全国名老中医药专家传承工作室建设项目(豫财社[2021]177号)

通信作者:郑玉玲。E-mail:zhengyl@hactcm.edu.cn

Zhengzhou 450099, Henan, China; 3. I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow 101135, Russia; 4. Department of Hematology and Oncology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450099, Henan, China; 5. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China)

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair in the treatment of breast cancer related insomnia (BCRI) based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** The core targets of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair for treating BCRI were screened through TCMSP database, HERB database, and DisGeNET database. The STRING database was applied to construct an interaction network diagram of the core target proteins for the treatment of BCRI with Suanzaoren-Yuanzhi drug pair. The core targets were subjected to GO and KEGG enrichment analysis through the Metascape platform. Sixty mice were divided into control group, BCRI group, Suanzaoren-Yuanzhi drug pair group, diazepam group, Suanzaoren-Yuanzhi drug pair+LY294002 (PI3K inhibitor) group, with 12 mice in each group. The control group mice were only used to establish a breast cancer model, without undergoing chronic unpredictable stress or intraperitoneal injection of cyclophosphamide. In other groups, the BCRI models were established using the method of breast cancer modeling + chronic unpredictable stress + intraperitoneal injection of cyclophosphamide. After successful modeling, administration was performed once daily for 7 consecutive days. The latency and duration of sleep in mice were detected. HE staining was used to detect hypothalamic pathology. ELISA was used to detect the levels of 4-aminobutyric acid (GABA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the hypothalamus. QRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of brain and muscle arnt-like 1 (BMAL1) and circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) in the hypothalamus. The phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase (p-PI3K) and phosphorylated protein kinase B (p-AKT) proteins in the hypothalamus were detected. **Results** The core targets for the treatment of BCRI using Suanzaoren-Yuanzhi drug pair were AKT1, TP53, TNF, ALB, HIF1A, STAT3, ESR1, BCL2, HSP90AA1, CASP3, PPARG, HSP90AB1, MAPK3, TGFB1, MMP9, MTOR, and CCND1. GO enrichment analysis for the aforementioned 17 core targets revealed that the cellular component (CC) of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair for treating BCRI comprised 23 entries, the molecular function (MF) comprised 47 entries, and the biological process (BP) comprised 211 entries. KEGG enrichment analysis identified 116 pathways, predicting that the PI3K/AKT signaling pathway might be a crucial mechanism for Suanzaoren-Yuanzhi drug pair in the treatment of BCRI. Animal experiments indicated that, compared with the control group, the pathological damage to the hypothalamus of mice in the BCRI group was severe, the sleep latency extended, the duration of sleep decreased, the levels of GABA and 5-HT decreased, the expressions of BMAL1 and CLOCK mRNA, and p-PI3K and p-AKT proteins in the hypothalamus were reduced (all  $P < 0.05$ ). Compared with the BCRI group, the pathological damage to the hypothalamus of mice in the Suanzaoren-Yuanzhi drug pair group and diazepam group was reduced, the sleep latency shortened, the duration of sleep increased, the levels of GABA and 5-HT increased, the expressions of BMAL1 and CLOCK mRNA, and p-PI3K and p-AKT proteins in the hypothalamus were elevated (all  $P < 0.05$ ). LY294002 reversed the effects of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair on hypothalamus pathology, neurotransmitter and circadian rhythm in BCRI mice. **Conclusion** Suanzaoren-Yuanzhi drug pair can improve the hypothalamic pathology of BCRI mice, promote neurotransmitter balance, restore circadian rhythm, and improve sleep. Its mechanism of action may be related to the regulation of the PI3K/AKT pathway.

**Key words:** Suanzaoren-Yuanzhi drug pair; Breast cancer related insomnia; Neurotransmitters; Circadian rhythm

乳腺癌是影响女性健康的最常见恶性肿瘤之一,也是妇科肿瘤中发病率较高的肿瘤之一<sup>[1]</sup>。在各种恶性肿瘤中,乳腺癌患者的失眠率最高(42%~69%),乳腺癌相关性失眠(breast cancer related insomnia, BCRI)通常会导致乳腺癌患者疲劳和抑郁,甚至会增加死亡风险<sup>[2]</sup>。目前,药物治疗仍然是BCRI患者最常见的治疗方法,苯二氮卓类受体激动剂、抗抑郁药、抗组胺药和褪黑激素受体激动剂等虽然能迅速改善BCRI患者失眠症状,但往往伴随着各种不良反应、身体依赖性和心理成瘾等<sup>[3-4]</sup>。

因此,亟需开发新的药物以改善BCRI。酸枣仁-远志药对是由酸枣仁、远志组成的中药,具有镇静安神之功效<sup>[5]</sup>。已有研究报道,酸枣仁-远志药对可延长失眠小鼠睡眠持续时间<sup>[6]</sup>,但关于酸枣仁-远志药对治疗BCRI的机制尚不清楚。故本研究借助网络药理学来探讨酸枣仁-远志药对关于BCRI的治疗作用及其潜在机制,并通过动物实验验证酸枣仁-远志药对对BCRI的改善作用及机制,旨在为酸枣仁-远志药对的机制研究及临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞及动物

小鼠乳腺癌细胞 4T1 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

体质量为 18~21 g 的 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠购自上海南方模式生物公司,生产许可证号为 SCXK(沪)2022-0062。本研究获得河南中医药大学动物伦理委员会批准(IACUC-202408007)。

#### 1.1.2 主要试剂

酸枣仁-远志药对购自江西安顺堂生物科技有限公司。酸枣仁-远志药对由酸枣仁与远志按质量比 1:1 配伍,采用水煎法制备。具体为:称取适量酸枣仁、远志药材,加 10 倍量蒸馏水浸泡后,加热回流提取两次,合并滤液并浓缩至生药质量浓度为 1.0 g/mL 的水煎剂,保存于 -20 °C 用于后续实验。

地西洋购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司;PI3K 抑制剂 LY294002 购自美国 MCE 公司;环磷酰胺购自通化茂祥制药有限公司;小鼠 4-氨基丁酸(4-aminobutyric acid, GABA)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)ELISA 试剂盒购自上海仁捷生物科技有限公司;兔源一抗 p-PI3K、p-AKT、GAPDH、PI3K、AKT 及二抗购自英国 Abcam 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 网络药理学分析

##### 1.2.1.1 酸枣仁-远志药对与 BCRI 共同靶点韦恩图的制作

在 TCMS 数据库中以“酸枣仁”为关键词搜索其活性成分(筛选标准:OB>30%、DL>0.18),在 HERB 数据库中以“远志”为关键词搜索其活性成分,Herb ID 为 HERB006798;在 Pubchem 数据库中,分别以“mairin”“(S)-coclaurine”“daucosterol”“phytosterol”“ceanothic acid”“swertisin”“ocimene”“benzoic acid”“citronellal”“quercitrin”等为关键词,搜索其 SMILES 式,然后将 SMILES 式导入 swiss target prediction 数据库中预测其基因靶点;去冗余后,得到酸枣仁-远志基因靶点。在 GeneCard 数据库中,同时以“breast cancer”“insomnia”为关键词,筛选疾病的基因靶点(筛选标准:score>5);在 DisGeNET 数据库中,同时以“乳腺癌”“失眠”为关键词,进行疾病靶点的筛选,筛选标准 score>0.5;两个数据库去冗余后,得到 BCRI 基因

靶点。“酸枣仁-远志”的靶点与“BCRI”的靶点导入 Venny2.1 在线数据处理平台,得到韦恩图。

##### 1.2.1.2 酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的共同靶点蛋白互作网络图及核心靶点蛋白互作网络分析

将酸枣仁-远志药对和 BCRI 的共同靶点上传至 STRING 数据库,获得酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的蛋白互作网络图,通过 Cytoscape 进行可视化处理。为从中筛选出关键靶点,本研究采用网络拓扑学中的“度值”作为核心指标,并以 degree > 90 为阈值筛选枢纽节点。该阈值的设定是基于对网络节点度值分布的统计分析,旨在筛选出网络中连接度最高、枢纽作用最显著的部分核心靶点,以聚焦于最关键的生物过程。最后,通过 Cytoscape 可视化酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的核心靶点蛋白互作网络图。

##### 1.2.1.3 酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的核心靶点 GO 及 KEGG 富集分析

利用 Metascape 平台对核心靶点进行 GO 富集分析及 KEGG 富集分析,通过微生信平台对分析结果进行可视化处理。

网络药理学分析表明 PI3K/AKT 通路可能是酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的重要机制。于是设置体内动物实验对上述分析结果加以验证。

#### 1.2.2 动物实验验证

##### 1.2.2.1 BCRI 模型的制备

目前尚无标准的 BCRI 动物模型。为此,本研究通过整合多种建模方法,自行构建了 BCRI 复合模型:将处于对数生长期的 4T1 细胞制成  $2 \times 10^6$  个/mL 的单细胞悬液,接种 0.1 mL 细胞悬液于小鼠第四乳房垫。接种后,每天观察小鼠状态及接种部位肿瘤生长情况,触摸到有黄豆粒大小肿瘤即为乳腺癌模型构建成功,乳腺癌模型构建成功后,对小鼠每天进行足底电刺激为主的慢性不可预知刺激 3 次,每次 20 min,刺激时间随机,电刺激共持续 21 d。进行刺激的 2、6、10、14 天给予 150 mg/kg 的环磷酰胺进行腹腔注射。模型成功评判标准:在第 20 天刺激后,小鼠昼夜节律消失,白天持续活动不断,兴奋性和攻击性增加,食欲下降,毛发暗淡和蓬乱。

##### 1.2.2.2 分组及处理

实验开始前,将 60 只小鼠按体质量分成若干个区组,采用随机数字表法对每个区组内的小鼠进行完全随机化分配,使其均匀分为 5 组:对照组、BCRI

组、酸枣仁-远志药对组、地西洋组、酸枣仁-远志药对+LY294002组,每组12只。对照组小鼠仅构建乳腺癌模型,不进行慢性不可预知刺激及腹腔注射环磷酸胺处理;其他组小鼠均通过乳腺癌模型+慢性不可预知刺激+腹腔注射环磷酸胺的方法构建BCRI模型,建模成功后给药,酸枣仁-远志药对组小鼠灌胃2.5 g/kg 酸枣仁-远志;地西洋组小鼠灌胃1.35 mg/kg 地西洋<sup>[7]</sup>;酸枣仁-远志药对+LY294002组小鼠灌胃2.5 g/kg 酸枣仁-远志且腹腔注射3 mg/kg LY294002<sup>[8]</sup>(LY294002剂量是根据文献[8]的报道并经由本研究的预实验验证,能有效抑制目标信号通路且未观察到明显不良反应);对照组、BCRI组小鼠灌胃等量的生理盐水。给药1次/d,持续7 d。

### 1.2.2.3 小鼠睡眠持续时长、睡眠潜伏期的检测

末次处理24 h后,腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉所有小鼠,当小鼠处于静止状态时,翻转小鼠使其呈仰卧位状态,若小鼠保持仰卧位状态60 s以上,则判定其进入睡眠状态,记录小鼠从注射戊巴比妥钠到翻正反射消失所用的时间即为睡眠潜伏期。小鼠从翻正反射消失到觉醒的时间即为睡眠持续时长。

### 1.2.2.4 下丘脑的HE染色检测

各组随机取6只小鼠,处死小鼠并收集下丘脑,在4%多聚甲醛中固定下丘脑48 h。石蜡包埋下丘脑后,将下丘脑切成5 μm的切片,对下丘脑切片进行HE染色。图像于光学显微镜下获得。

### 1.2.2.5 下丘脑中GABA、5-HT水平的检测

各组取剩余的6只小鼠,处死小鼠并收集下丘脑,通过ELISA试剂盒检测下丘脑中GABA、5-HT水平。

### 1.2.2.6 下丘脑中BMAL1、CLOCK mRNA表达的检测

取1.2.2.5中的下丘脑,使用TRIzol获得下丘脑中的总RNA,将RNA合成cDNA后进行定量PCR,相对mRNA表达由 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。使用的引物序列:BMAL1正向:5'-ATAAGGACTTCGCCTC-TACCTGTTCA-3',反向:5'-CCTCGTTGTCTGGCT-CATTGTCTT-3';CLOCK正向:5'-GACGGCGAG-AACTTGGCATTGA-3',反向:5'-TGAGACTGCGGT-GTGAGATGACT-3';GAPDH正向:5'-AGAAGGTG-

GTGAAGCAGGCATCT-3',反向:5'-CGGCATCGAAG-GTGAAGAGTG-3'。

### 1.2.2.7 下丘脑中p-PI3K、p-AKT蛋白的检测

取1.2.2.5中的下丘脑,用RIPA缓冲液提取下丘脑总蛋白,蛋白浓度由BCA法测定。取30 μg蛋白进行电泳后转移到PVDF膜上。将膜在含5%脱脂干奶的PBS中封闭2 h,并与一抗p-PI3K(1:2 000)、p-AKT(1:3 000)、GAPDH(1:3 000)、PI3K(1:4 000)、AKT(1:5 000)在4℃下过夜孵育。次日,用二抗孵育膜(1:3 000)2 h。使用ECL试剂可视化蛋白。图像由ChemiScope 6100 Touch系统采集。使用Image J软件进行密度测定以量化蛋白信号强度。

### 1.3 统计学处理

使用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。以Shapiro-Wilk法对计量资料进行正态性检验,均符合正态分布以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对于睡眠潜伏期,睡眠持续时长,GABA、5-HT水平,BMAL1、CLOCK mRNA表达及p-PI3K、p-AKT蛋白表达等指标,满足正态分布和方差齐性,采用单因素方差分析,继之以SNK-*q*检验进行组间两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 酸枣仁-远志药对靶点与BCRI靶点交集分析

经数据库分析,酸枣仁-远志药对作用靶点基因有783个,BCRI靶点基因有1 633个。将“酸枣仁-远志”的783个靶点与“BCRI”的1 633个靶点导入Venny2.1在线数据处理平台,得到韦恩图及235个交集靶点。

### 2.2 酸枣仁-远志药对治疗BCRI的共同靶点蛋白互作网络图及核心靶点蛋白质-蛋白质互作网络分析

蛋白互作网络分析结果显示,酸枣仁-远志药对治疗BCRI的235个共同靶点构成了一个密集而有序的相互作用网络,见图1。得到degree>90的17个核心靶点,分别为AKT1、TP53、TNF、ALB、HIF1A、STAT3、ESR1、BCL2、HSP90AA1、CASP3、PPARG、HSP90AB1、MAPK3、TGFB1、MMP9、MTOR、CCND1,见图2。

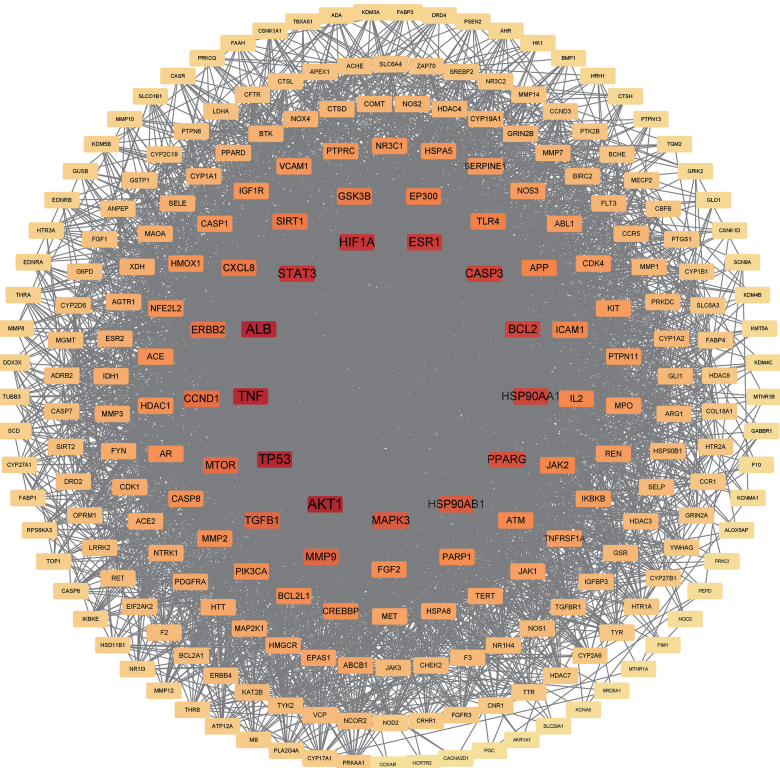


图 1 酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的共同靶点蛋白互作网络图  
 Figure 1 Protein interaction network diagram of common targets of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair in BCRI treatment

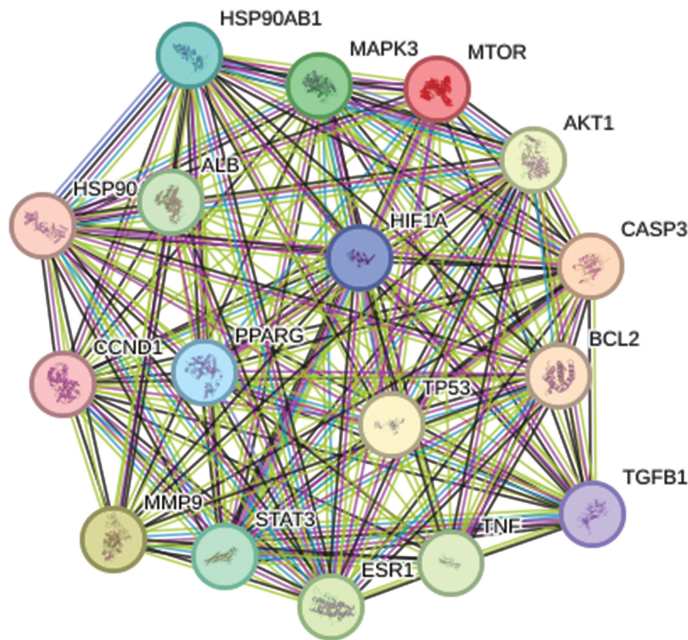


图 2 酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的核心靶点蛋白互作网络图  
 Figure 2 Protein interaction network diagram of core targets of Suanzaoren-Yuanzhi drug pair in BCRI treatment

**2.3 酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的核心靶点 GO 及 KEGG 富集分析**

对 17 个核心靶点进行 GO 富集分析,得到酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的细胞组分 (cellular component, CC) 共 23 条,分子功能 (molecular function,

MF) 共 47 条,生物过程 (biological process, BP) 共 211 条,GO-CC 选择前 10 条 (涉及细胞核、细胞质、细胞溶质、核质等)、GO-MF 选择前 13 条 (涉及蛋白质结合、相同蛋白质结合、酶结合、蛋白激酶结合等)、GO-BP 选择前 11 条 (涉及 RNA 聚合酶 II 介导

的转录正调控、对外源性刺激的反应、基因表达正调控、DNA模板转录的正调控等),利用“微生信”在线软件进行可视化,见图3。KEGG富集分析得到116条通路,对前13条结果进行可视化(涉及癌症

中的通路、癌症中的蛋白聚糖、脂质与动脉粥样硬化、前列腺癌等),预测PI3K/AKT通路可能是酸枣仁-远志药对治疗BCRI的重要机制,见图4。

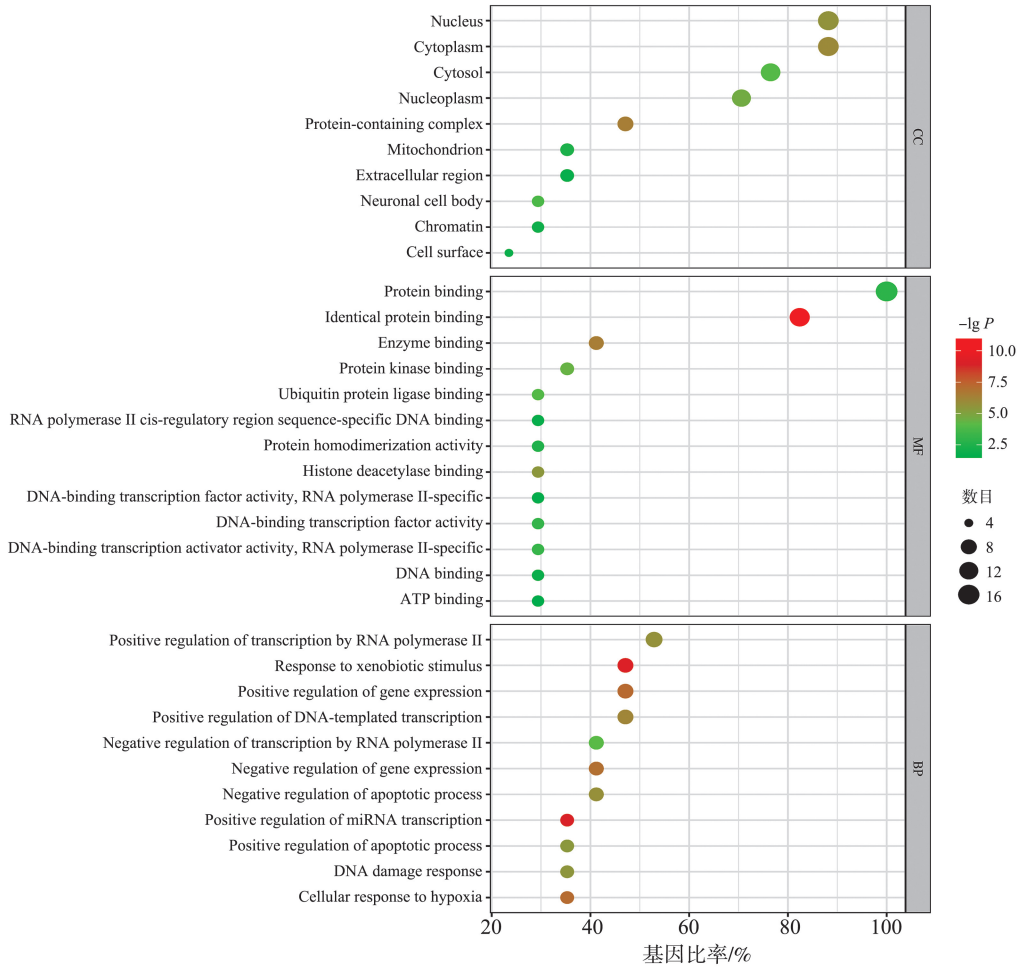


图3 酸枣仁-远志药对治疗BCRI的核心靶点GO富集分析结果

Figure 3 GO enrichment analysis results of the core targets of BCRI treated by Suanzaoren-Yuanzhi drug pair

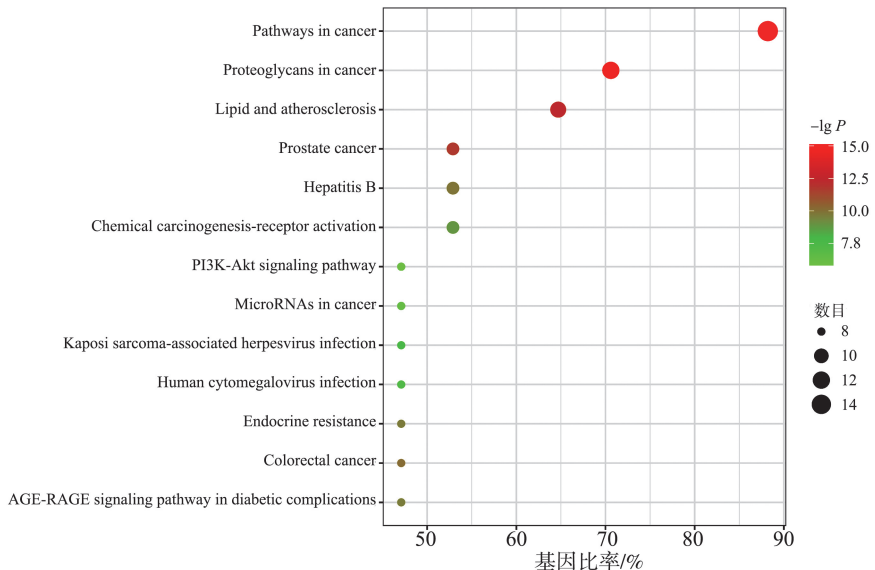


图4 酸枣仁-远志药对治疗BCRI的核心靶点KEGG富集分析结果

Figure 4 KEGG enrichment analysis results of the core targets of BCRI treated by Suanzaoren-Yuanzhi drug pair

## 2.4 酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠睡眠潜伏期、睡眠持续时长的影响

与对照组相比,BCRI 组小鼠睡眠潜伏期延长 ( $q = 33.846, P < 0.001$ ),睡眠持续时长减少 ( $q = 42.679, P < 0.001$ );与 BCRI 组相比,酸枣仁-远志药对组小鼠睡眠潜伏期缩短 ( $q = 23.846, P < 0.001$ ),睡眠持续时长增加 ( $q = 28.409, P < 0.001$ );与 BCRI 组

相比,地西洋组小鼠睡眠潜伏期缩短 ( $q = 24.769, P < 0.001$ ),睡眠持续时长增加 ( $q = 28.328, P < 0.001$ );与酸枣仁-远志药对组相比,酸枣仁-远志药对+LY294002 组小鼠睡眠潜伏期延长 ( $q = 11.077, P < 0.001$ ),睡眠持续时长减少 ( $q = 17.662, P < 0.001$ ),见表 1。

表 1 各组小鼠睡眠潜伏期、睡眠持续时长比较

Table 1 Comparison of sleep latency and sleep duration for mice in each group of mice

| 组别                  | 睡眠潜伏期/min              | 睡眠持续时长/min              |
|---------------------|------------------------|-------------------------|
| 对照组                 | 3.81±0.16              | 58.43±2.19              |
| BCRI 组              | 6.01±0.27 <sup>*</sup> | 32.26±1.58 <sup>*</sup> |
| 酸枣仁-远志药对组           | 4.46±0.21 <sup>#</sup> | 49.68±2.37 <sup>#</sup> |
| 地西洋组                | 4.40±0.22 <sup>#</sup> | 49.63±2.41 <sup>#</sup> |
| 酸枣仁-远志药对+LY294002 组 | 5.18±0.25 <sup>▲</sup> | 38.85±1.96 <sup>▲</sup> |
| <i>F</i>            | 169.247                | 279.845                 |
| <i>P</i>            | <0.001                 | <0.001                  |

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs. 对照组; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs. BCRI 组; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs. 酸枣仁-远志药对组。

## 2.5 酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠下丘脑病理的影响

对照组小鼠下丘脑神经元结构正常,排列整齐;BCRI 组小鼠下丘脑神经元排列紊乱,大量神经元空泡化,核固缩严重;与 BCRI 组比较,酸枣仁

-远志药对组小鼠下丘脑神经元损伤有所改善;与 BCRI 组比较,地西洋组小鼠下丘脑神经元损伤减轻;与酸枣仁-远志药对组比较,酸枣仁-远志药对+LY294002 组小鼠下丘脑神经元损伤严重,见图 5。

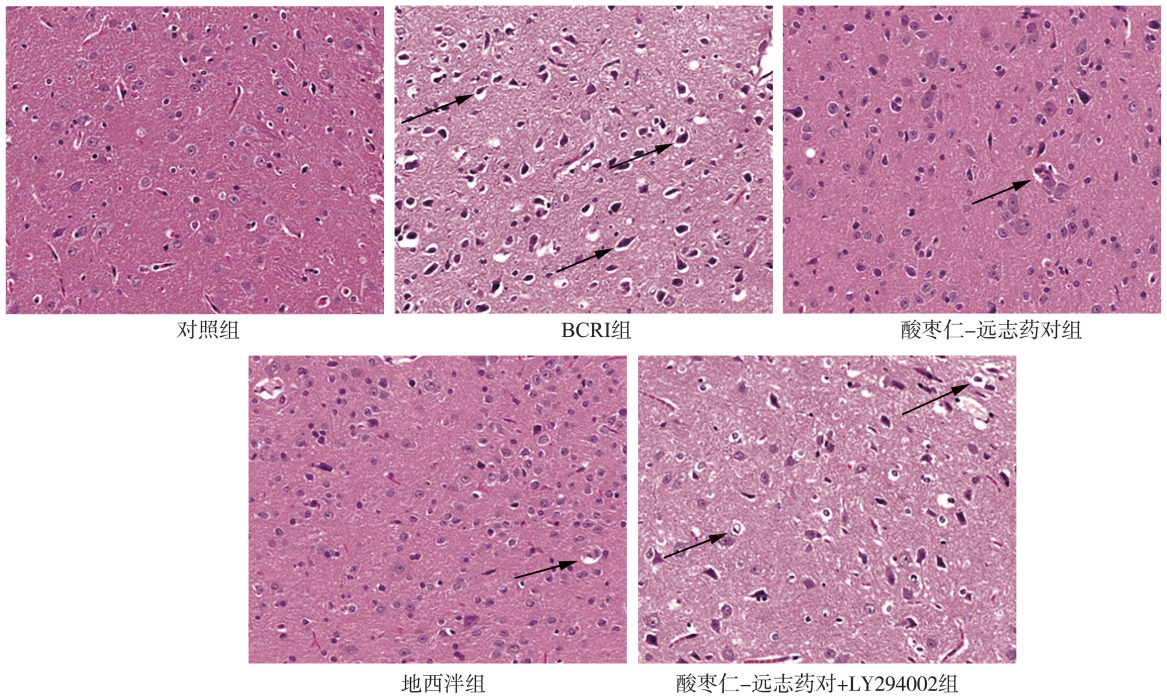


图 5 小鼠下丘脑病理的 HE 染色检测,箭头指示神经元空泡化( $\times 200$ )

Figure 5 Hypothalamic pathology of mice was detected by HE staining, and the arrows indicated neuronal vacuolation ( $\times 200$ )

## 2.6 酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠下丘脑中 GABA、5-HT 水平的影响

与对照组相比,BCRI 组小鼠下丘脑中 GABA、

5-HT 水平降低 ( $q_{\text{GABA}} = 27.465, P_{\text{GABA}} < 0.001; q_{\text{5-HT}} = 31.080, P_{\text{5-HT}} < 0.001$ );与 BCRI 组相比,酸枣仁-远志药对组小鼠下丘脑中 GABA、5-HT 水平升高

( $q_{GABA} = 18.558, P_{GABA} < 0.001; q_{5-HT} = 25.244, P_{5-HT} < 0.001$ ); 与 BCRI 组相比,地西洋组小鼠下丘脑中 GABA、5-HT 水平升高 ( $q_{GABA} = 19.053, P_{GABA} < 0.001; q_{5-HT} = 24.660, P_{5-HT} < 0.001$ ); 与酸枣仁-远志药对组相比,酸枣仁-远志药对+LY294002 组小鼠下丘脑中 GABA、5-HT 水平降低 ( $q_{GABA} = 7.176, P_{GABA} < 0.001; q_{5-HT} = 11.382, P_{5-HT} < 0.001$ ), 见表 2。

表 2 各组小鼠下丘脑中 GABA、5-HT 水平比较  
Table 2 Comparison of GABA and 5-HT levels in hypothalamus of mice in each group

| 组别                  | GABA/( $\mu\text{mol/L}$ ) | 5-HT/(ng/mL)           |
|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 对照组                 | 1.68±0.11                  | 4.19±0.18              |
| BCRI 组              | 0.57±0.05*                 | 2.06±0.12*             |
| 酸枣仁-远志药对组           | 1.32±0.10#                 | 3.79±0.18#             |
| 地西洋组                | 1.34±0.12#                 | 3.75±0.19#             |
| 酸枣仁-远志药对+LY294002 组 | 1.03±0.10 <sup>▲</sup>     | 3.01±0.16 <sup>▲</sup> |
| F                   | 105.533                    | 151.086                |
| P                   | <0.001                     | <0.001                 |

注: \* $P < 0.05$  vs. 对照组; # $P < 0.05$  vs. BCRI 组; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs. 酸枣仁-远志药对组。

### 2.7 酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠下丘脑中 BMAL1、CLOCK mRNA 表达的影响

与对照组相比, BCRI 组小鼠下丘脑中 BMAL1、CLOCK mRNA 表达降低 ( $q_{BMAL1} = 25.158, P_{BMAL1} < 0.001; q_{CLOCK} = 48.078, P_{CLOCK} < 0.001$ ); 与 BCRI 组相比,酸枣仁-远志药对组小鼠下丘脑中 BMAL1、CLOCK mRNA 表达升高 ( $q_{BMAL1} = 16.772, P_{BMAL1} < 0.001; q_{CLOCK} = 28.603, P_{CLOCK} < 0.001$ ); 与 BCRI 组相比,地西洋组小鼠下丘脑中 BMAL1、CLOCK mRNA 表达升高 ( $q_{BMAL1} = 17.655, P_{BMAL1} < 0.001; q_{CLOCK} = 29.820, P_{CLOCK} < 0.001$ ); 与酸枣仁-远志药对组相比,酸枣仁-远志药对+LY294002 组小鼠下丘脑中 BMAL1、CLOCK mRNA 表达降低 ( $q_{BMAL1} = 7.062, P_{BMAL1} < 0.001; q_{CLOCK} = 14.606, P_{CLOCK} < 0.001$ ), 见表 3。

表 3 各组小鼠下丘脑中 BMAL1、CLOCK mRNA 表达比较  
Table 3 Comparison of BMAL1 and CLOCK mRNA expressions in hypothalamus of mice in each group

| 组别                  | BMAL1 mRNA             | CLOCK mRNA             |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组                 | 1.00±0.00              | 1.00±0.00              |
| BCRI 组              | 0.43±0.04*             | 0.21±0.02*             |
| 酸枣仁-远志药对组           | 0.81±0.07#             | 0.68±0.05#             |
| 地西洋组                | 0.83±0.08#             | 0.70±0.06#             |
| 酸枣仁-远志药对+LY294002 组 | 0.65±0.05 <sup>▲</sup> | 0.44±0.04 <sup>▲</sup> |
| F                   | 89.961                 | 327.704                |
| P                   | <0.001                 | <0.001                 |

注: \* $P < 0.05$  vs. 对照组; # $P < 0.05$  vs. BCRI 组; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs. 酸枣仁-远志药对组。

### 2.8 酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠下丘脑中 PI3K/AKT 通路蛋白表达的影响

与对照组相比, BCRI 组小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ( $q_{p-PI3K} = 19.840, P_{p-PI3K} < 0.001; q_{p-AKT} = 32.249, P_{p-AKT} < 0.001$ ); 与 BCRI 组相比,酸枣仁-远志药对组小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达升高 ( $q_{p-PI3K} = 13.766, P_{p-PI3K} < 0.001; q_{p-AKT} = 20.466, P_{p-AKT} < 0.001$ ); 与 BCRI 组相比,地西洋组小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达升高 ( $q_{p-PI3K} = 12.956, P_{p-PI3K} < 0.001; q_{p-AKT} = 21.706, P_{p-AKT} < 0.001$ ); 与酸枣仁-远志药对组相比,酸枣仁-远志药对+LY294002 组小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达降低 ( $q_{p-PI3K} = 5.668, P_{p-PI3K} < 0.001; q_{p-AKT} = 9.923, P_{p-AKT} < 0.001$ ), 见图 6 和表 4。

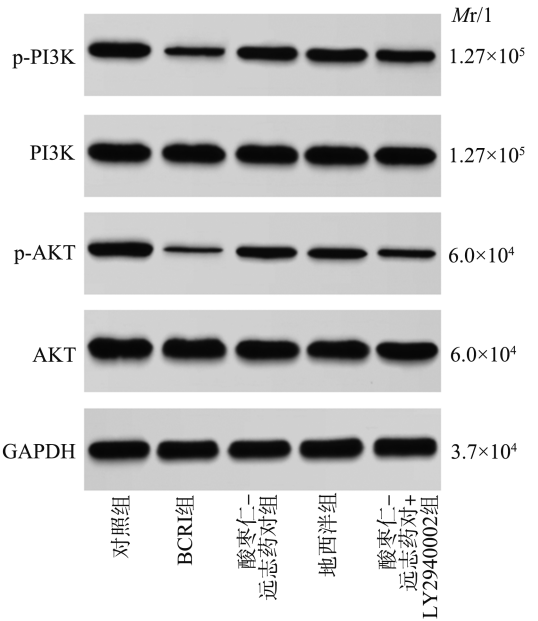


图 6 Western blotting 检测小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白  
Figure 6 Western blotting analysis of p-PI3K and p-AKT proteins in the hypothalamus of mice

表 4 各组小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达比较  
Table 4 Comparison of p-PI3K and p-AKT proteins expressions in hypothalamus of mice in each group

| 组别                  | p-PI3K/PI3K            | p-AKT/AKT              |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组                 | 0.86±0.08              | 0.65±0.06              |
| BCRI 组              | 0.37±0.03*             | 0.13±0.01*             |
| 酸枣仁-远志药对组           | 0.71±0.07#             | 0.46±0.04#             |
| 地西洋组                | 0.69±0.06#             | 0.48±0.04#             |
| 酸枣仁-远志药对+LY294002 组 | 0.57±0.05 <sup>▲</sup> | 0.30±0.03 <sup>▲</sup> |
| F                   | 54.754                 | 149.346                |
| P                   | <0.001                 | <0.001                 |

注: \* $P < 0.05$  vs. 对照组; # $P < 0.05$  vs. BCRI 组; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs. 酸枣仁-远志药对组。

### 3 讨论

失眠严重影响乳腺癌患者的生活质量<sup>[9]</sup>,目前通常用药物治疗 BCRI,但有潜在风险<sup>[10]</sup>。因此,开发新的药物以改善 BCRI 具有重要意义。酸枣仁与远志是中医经典安神药对。酸枣仁甘平,主入心肝,长于养心补肝、益阴安神;远志辛温,主入心肾,功擅交通心肾、化痰开窍。两药配伍,体现“补泻兼施、心肾同调”之旨:酸枣仁补阴血之虚,远志祛痰浊之扰,一补一泻,一敛一开,使阴血得充、心肾交济,共奏宁神定志之效,对于病机属本虚标实的 BCRI 证候尤为契合<sup>[11-14]</sup>。研究显示,酸枣仁汤可改善围绝经期失眠大鼠症状<sup>[15]</sup>;远志可改善原发性失眠<sup>[16]</sup>;酸枣仁是治疗乳腺癌术后伴失眠患者核心处方中有效成分之一<sup>[17]</sup>;酸枣仁+远志是用于改善乳腺癌术后患者生活质量的常用药对<sup>[18]</sup>。以上研究表明,酸枣仁或远志单味药均具有改善失眠的效果,二者联合可能会对 BCRI 产生积极的改善效应。但关于二者合为药对后对 BCRI 的具体影响及机制尚不清楚。

为了研究酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的药效学基础和潜在的生物学机制,本研究首先从网络药理学角度预测酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 的共同靶点,结果共筛选出 235 个酸枣仁-远志治疗 BCRI 的共同作用靶点。通过 STING 数据库蛋白互作网络分析,进一步筛选出 degree>90 的核心靶点 17 个,包括 AKT1、TP53、TNF、ALB、HIF1A、STAT3、ESR1、BCL2、HSP90AA1、CASP3、PPARG、HSP90AB1、MAPK3、TGFB1、MMP9、MTOR 及 CCND1。对上述核心靶点进行 GO 功能富集分析,结果显示其在 CC 方面显著富集 23 条, MF 方面富集 47 条, BP 方面富集 211 条。KEGG 通路富集分析共获得 116 条信号通路,发现 PI3K-AKT 信号通路具有显著富集性,提示其可能是酸枣仁-远志药对发挥治疗作用的关键机制之一。有研究报道,PI3K/AKT 通路的激活改善了小鼠的失眠症状<sup>[19]</sup>,进一步证明了酸枣仁-远志药对治疗 BCRI 具有可行性。

大量研究证明,神经递质失衡是失眠的重要发病机制<sup>[20]</sup>。GABA 是哺乳动物中枢神经系统中的主要抑制性神经递质,人类正常睡眠和觉醒的维持取决于脑干网状结构的上升激活系统和下降抑制系统的动态平衡,而 GABA 是维持这种动态平衡的主要物质基础<sup>[21]</sup>;5-HT 作为一种抑制性神经递质,参与昼夜节律系统和认知功能的调节,有利于睡眠<sup>[22]</sup>。此外,失眠还与生物钟基因表达紊乱有关,而生物钟基因 BMAL1、CLOCK 可参与对昼夜节律

的调控<sup>[23]</sup>。本研究通过体内动物实验验证了酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠睡眠潜伏期、睡眠持续时长、下丘脑病理、下丘脑中 GABA 及 5-HT 水平和 BMAL1 及 CLOCK mRNA 表达的影响,结果显示,酸枣仁-远志药对能缩短 BCRI 小鼠睡眠潜伏期,延长睡眠持续时长,改善下丘脑病理,上调下丘脑中 GABA、5-HT 水平及 BMAL1、CLOCK mRNA 表达,表明酸枣仁-远志药对能改善 BCRI 小鼠下丘脑病理,促进神经递质平衡,恢复昼夜节律,进而改善睡眠。

PI3K/AKT 信号通路在调节细胞生存、代谢及神经可塑性中发挥核心作用,其功能抑制被认为是失眠的重要病理机制之一<sup>[24-27]</sup>。据报道,激活 PI3K/AKT 通路对皮质酮诱导的大鼠失眠具有改善作用<sup>[28]</sup>;在睡眠剥夺小鼠模型中,同样观察到 PI3K/AKT 信号通路的抑制,而激活该通路可有效改善认知功能<sup>[29]</sup>。本研究中,酸枣仁-远志药对能上调 BCRI 小鼠下丘脑中 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达,说明酸枣仁-远志药对改善 BCRI 小鼠睡眠的机制可能与激活 PI3K/AKT 通路有关。此外,酸枣仁-远志药对组与酸枣仁-远志药对+LY294002 组的各指标变化说明 LY294002 逆转了酸枣仁-远志药对对 BCRI 小鼠下丘脑病理、神经递质及昼夜节律的影响。以上结果明确了 PI3K/AKT 通路在酸枣仁-远志药效中的关键地位。本研究的体内动物实验验证了网络药理学预测的结果,并揭示了酸枣仁-远志药对在治疗 BCRI 中的可能机制。

本研究尚存在一定局限性。首先,PI3K/AKT 通路虽是本研究验证的核心机制,但网络药理学预测所提示的其他潜在通路在 BCRI 中的作用未被排除,其与 PI3K/AKT 的交互关系需进一步阐明。其次,实验仅设置了酸枣仁-远志药对单一给药剂量,缺乏完整的剂量梯度,未能揭示酸枣仁-远志药对的量效关系及最佳有效剂量。此外,研究观察周期较短,未能评估该药对的长期疗效与安全性。未来将在多通路层面进行系统性机制探索,并开展详细的剂量与时间效应研究。

综上所述,酸枣仁-远志药对能改善 BCRI 小鼠下丘脑病理,促进神经递质平衡,恢复昼夜节律,进而改善睡眠,且其作用机制可能与调控 PI3K/AKT 通路有关。

### 参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.
- [2] Yin P, Fan Q, Liu L, et al. Efficacy of acupuncture treatment for breast cancer-related insomnia: study protocol for

- a multicenter randomized controlled trial [J]. *Front Psychiatry*, 2024, 15(1): 1301338-1301348.
- [3] Zhang J, Zhang Z, Huang S, et al. Acupuncture for cancer-related insomnia: a systematic review and meta-analysis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102(1): 154160-154170.
- [4] Liu L, Yin P, Dong Y, et al. Neurological mechanism and efficacy of acupuncture for breast cancer-related insomnia: a study protocol for randomized clinical trial [J]. *Front Neurol*, 2023, 14(1): 1278564-1278572.
- [5] 雷后亮. 酸枣仁-远志催眠组方制备工艺及药效配伍研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [6] 孙胜杰. 酸枣仁-远志活性部位镇静安神作用与机理研究[D]. 晋中: 山西中医药大学, 2019.
- [7] 陈燕, 许晓丽, 陈亚萍, 等. 半夏秫米汤对失眠大鼠下丘脑 5-HT 介导的 cAMP/CREB/BDNF 通路的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 1(1): 1-15.
- CHEN Yan, XU Xiaoli, CHEN Yaping, et al. Effects of Banxia Shumi decoction on hypothalamic 5-HT-mediated cAMP/CREB/BDNF pathway in insomniac rats [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2024, 1(1): 1-15.
- [8] 朱霞, 张亮, 印晓星, 等. PI3K 抑制剂对 2 型糖尿病小鼠脑组织中乙酰胆碱酯酶表达的影响 [J]. *山东医药*, 2019, 59(14): 35-38.
- ZHU Xia, ZHANG Liang, YIN Xiaoxing, et al. Effect of PI3K inhibitor on AchE expression in brain tissues of T2DM mice [J]. *Shandong Medical Journal*, 2019, 59(14): 35-38.
- [9] Ma Y, Hall DL, Ngo LH, et al. Efficacy of cognitive behavioral therapy for insomnia in breast cancer: a meta-analysis [J]. *Sleep Med Rev*, 2021, 55(1): 101376-101403.
- [10] 赵维哲. 通任督调阴阳针刺法治疗乳腺癌患者失眠的临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [11] 李旭, 和建政, 陈彻, 等. 酸枣仁镇静催眠活性成分及药理作用研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(2): 23-31.
- LI Xu, HE Jianzheng, CHEN Che, et al. Research progress on sedative-hypnotic effect of active components in Suanzaoren (Semen Ziziphi Spinosae) [J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 40(2): 23-31.
- [12] 任海琴, 孔祥鹏, 王颖莉. 基于古今方剂数据挖掘的酸枣仁-远志药对配伍特点及外延分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(13): 4065-4074.
- REN Haiqin, KONG Xiangpeng, WANG Yingli. Compatibility characteristics and epitaxy analysis of Ziziphi Spinosae Semen-Polygalae Radix herb pair based on data mining of ancient and modern TCM prescriptions [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53(13): 4065-4074.
- [13] Luo H, Sun SJ, Wang Y, et al. Revealing the sedative-hypnotic effect of the extracts of herb pair Semen Ziziphi spinosae and Radix Polygalae and related mechanisms through experiments and metabolomics approach [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 206-220.
- [14] 张晓美. 归脾汤治疗不寐合并焦虑抑郁临床观察 [J]. *中国中医药现代远程教育*, 2021, 19(4): 94-96.
- ZHANG Xiaomei. Clinical observation on Guipi decoction in the treatment of insomnia with anxiety and depression [J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2021, 19(4): 94-96.
- [15] 邓元香, 彭雄, 贺婷. 酸枣仁汤调节 PI3K/AKT/BDNF 信号通路改善围绝经期大鼠失眠作用机制 [J]. *陕西中医*, 2024, 45(7): 897-901.
- DENG Yuanxiang, PENG Xiong, HE Ting. Action mechanism of Suanzaoren decoction regulates PI3K/AKT/BDNF signaling pathway to improve insomnia in perimenopausal rats [J]. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 45(7): 897-901.
- [16] 陈旭, 张星平, 梁瑞宁, 等. 基于网络药理学及分子对接技术分析远志治疗原发性失眠作用机制 [J]. *新中医*, 2022, 54(24): 7-14.
- CHEN Xu, ZHANG Xingping, LIANG Ruining, et al. Analysis of mechanism of Polygalae Radix in treating primary insomnia based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. *Journal of New Chinese Medicine*, 2022, 54(24): 7-14.
- [17] 陈晨. 刘胜教授辨治乳腺癌术后伴失眠的数据挖掘研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- [18] 范逸群. 徐斌治疗乳腺癌术后用药规律的数据挖掘分析 [J]. *中医临床研究*, 2019, 11(31): 22-24.
- FAN Yiqun. A data analysis of postoperative medication in treating breast cancer by Xu Bin [J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2019, 11(31): 22-24.
- [19] 李典育, 房星宇, 李辉, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨小分子肽-SMT(S)改善失眠的分子作用机制 [J]. *中国医院药学杂志*, 2024, 44(17): 2001-2007.
- LI Dianyue, FANG Xingyu, LI Hui, et al. Molecular mechanism of action of small molecule peptide-SMT (S) for ameliorating insomnia based upon PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2024, 44(17): 2001-2007.
- [20] Lv YB, Zhou Q, Yan JX, et al. Enzymolysis peptides from *Mauremys mutica* plastron improve the disorder of neurotransmitter system and facilitate sleep-promoting in the PCPA-induced insomnia mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 274(1): 114047-114055.
- [21] Xiang T, Liao J, Cai Y, et al. Impairment of GABA inhibition in insomnia disorders: evidence from the peripheral blood system [J]. *Front Psychiatry*, 2023, 14(1): 1134434-1134440.