

# 基于网络药理学及分子对接分析当归-酸枣仁-茯神 治疗失眠的作用机制

董博华, 黄春元, 李学涛

(辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847)

**摘要:**目的 检索中药系统药理学平台获取核心组方的生物活性成分,根据ADEM分析,选择药物相似性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ 和口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ 为标准的成分收集为核心组方的生物活性成分,将鉴定出来生物活性成分相关的靶标,在Uniprot数据库中进行标准化。方法 通过PharmGKB、DisGeNET、OMIM和GeneCards数据库检索疾病相关靶点。将核心组方活性成分的靶点与疾病靶点取交集得到核心潜在靶点。通过Cytoscape软件构建成分-靶点等多层次网络关联图。使用R软件中的相关数据包(enrichplot、clusterProfiler、ggplot2、Enrichplot、pathview)对交叉靶标进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能富集分析。计算相应的P值,并应用错误发现率校正。采用Schrödinger分子对接软件用于测定配体-蛋白质的相互作用。结果 在满足筛选标准(OB  $\geq 30\%$ , DL  $\geq 0.18$ )后,通过TCMSP检索,最终获得核心组方中3种中药的生物活性成分及靶点,同时还发现了52个与这些成分相关的靶标。对疾病靶点预测共检索到6535个与疾病相关的靶标。对核心组方中的生物活性成分的靶点与检索到的疾病靶点通过R软件绘制的Venn图获得了总共48个交叉靶标基因。从GO本体分析结果中获得832个GO项( $P < 0.05$ ),包括638个生物过程GO项、60个细胞成分GO项、134个分子功能GO项。在KEGG分析中,以 $P < 0.05$ 为阈值,共获得86条信号通路。可以发现核心组方治疗疾病是多靶点、多途径的。结论 通过分析当归-酸枣仁-茯神的多成分、多靶点、多途径及其相关成分-靶点网络效应图,为其治疗失眠的机制研究提供了数据网络支持,也为后期实验研究奠定了基础。

**关键词:**失眠;网络药理学;靶点;分子对接

中图分类号: R285.5; R741

文献标志码: A

文章编号: 2097-5031(2025)02-0022-07

## Analysis of the Mechanism of Action of Danggui Suanzaoren Fushen in Treating Insomnia Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

DONG Bohua, HUANG Chunyuan, LI Xuetao

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

**Abstract:** *Objective* To retrieve the bioactive components of the core formula from the traditional Chinese medicine system pharmacology platform. Based on ADEM analysis, components with drug similarity (DL)  $\geq 0.18$  and oral bioavailability (OB)  $\geq 30\%$  were selected as the bioactive components of the core formula. The identified targets related to the bioactive components were standardized in the Uniprot database. *Methods* Retrieve disease-related targets from PharmGKB, DisGeNET, OMIM, and GeneCards databases. Finally, the intersection of the targets of the active ingredients in the core formula and the disease targets is further taken to obtain the core potential targets. Construct a multi-level network association diagram between components and targets using Cytoscape software. Perform GO and KEGG functional enrichment analysis on cross targets using relevant data packages in R software (enrichplot, clusterProfiler, ggplot2, Enrichplot, pathview). Calculate the corresponding P-value and apply error detection rate correction. Schrödinger molecular docking software was used to determine ligand protein interactions. *Results* After meeting the screening criteria (OB  $\geq 30\%$ , DL  $\geq 0.18$ ), the biological active ingredients and targets of three traditional Chinese medicines in the core formula were finally obtained through TCMSP retrieval, and 52 targets related to these ingredients were also discovered. A total of 6535 disease-related targets were retrieved for disease target prediction. A total of 48 cross target genes were obtained by plotting Venn maps using R software for the targets of bioactive ingredients in the core formula and the retrieved disease targets. 832 GO items

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(2024-MSLH-289)

作者简介: 董博华(1998-),女,辽宁本溪人,硕士在读,研究方向:中西医结合神经内科。

通讯作者: 黄春元(1973-),男,辽宁葫芦岛人,副主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合神经内科。E-mail:139403744535@163.com。

引用格式: 董博华,黄春元,李学涛. 基于网络药理学及分子对接分析当归-酸枣仁-茯神治疗失眠的作用机制[J]. 中西医结合慢性病杂志, 2025, 2(2): 22-27.

( $P < 0.05$ ) were obtained from the GO ontology analysis results, including 638 biological process GO items (BP), 60 cellular component GO items (CC), and 134 molecular functional GO items (MF). In KEGG analysis, a threshold of  $P < 0.05$  was used to obtain a total of 86 signaling pathways. It can be found that the core formula for treating diseases is multi-target and multi-pathway. **Conclusion** By analyzing the multi-component, multi-target, multi-pathway, and related component target network effect diagram of Danggui Suanzaoren Fushen, data network support is provided for the mechanism research of its treatment of insomnia, and the foundation is also laid for later experimental research.

**Keywords:** insomnia; network pharmacology; target; molecular docking

失眠的主要临床表现为睡眠质量显著下降,患者难以获得充足的休息,且睡眠结构紊乱。常见症状包括倦怠、精神萎靡等。当今社会,随着生活节奏加快和工作压力增大,情绪不稳定、思虑过度等现象日益普遍。若未能及时干预,这些症状可能进一步恶化,导致不寐(失眠)的发生。因此,防治失眠应引起公众的高度重视,以维护身心健康<sup>[1]</sup>。

中医对失眠的研究源远流长,早在古代经典文献中便有详细记载。《内经》对诸多不眠症的表现,如不得卧、卧不安、卧不得安、不得安卧、不卧、不能卧、少卧、目不瞑、夜不瞑、不夜瞑和不能眠等都有详细的描述。马王堆汉墓出土的《足臂十一脉灸经》已有“不能卧”的相关记载,是现存最早的文献之一。《灵枢》(如《营卫生会》《邪客》《大惑论》)和《素问》(如《逆调论篇》《病能论篇》《刺热论篇》)等20余篇经典文献,均对失眠的病因、病机及治法进行了深入探讨<sup>[2]</sup>。本研究基于网络药理学和分子对接技术,探讨当归-酸枣仁-茯神药对治疗失眠的作用机制,以期为后续临床研究提供理论依据<sup>[3]</sup>。

## 1 方法

### 1.1 核心组方活性成分的靶点及疾病靶点的筛选

核心组方的化学成分从中药系统药理学分析平台(TCMSP, <https://tcmsp.com/tcmsp.php>)获取核心组方的化学成分。根据ADME分析,选择药物相似性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ 和口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ 为标准的成分收集整理成为核心组方的生物活性成分,将鉴定出来与生物活性成分相关的靶标整理成数据,通过UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)对靶标基因进行标准化命名。通过使用PharmGKB、DisGeNET、OMIM、GeneCards等数据库进行疾病靶点的搜集,并总结为结构化数据表。最后,将得到的核心组方活性成分的靶点与筛选出的疾病靶点采用交集的方式进行数据处理,通过以上两者的交集对潜在的核心靶点进行相关数据的分析整理,并将得到的可用数据用于后续核心组方成分筛选等操作步骤的分析。

### 1.2 对核心组方核心成分的筛选与录入

研究使用R 4.0.3软件(<https://www.r-project.org>)对疾病靶点基因与核心组方活性化合物靶点进行交集分析,获取核心组方与疾病的共同作用靶点

并通过Venn图可视化展示交集结果。随后,将整理得到“处方-药材-活性化合物-靶标”(P-M-C-T)之间的多维关系数据导入到Cytoscape 3.7.0软件中进行分析,得到P-M-C-T网络图。最后基于网络拓扑分析计算各节点的度值(Degree),得到根据节点连接度识别网络中的关键活性化合物。

### 1.3 蛋白质-蛋白质相互作用网络图(protein-protein interaction networks, PPI)的构建

为了获得失眠的潜在靶点,将得到的交叉靶点数据导入STRING数据库(<https://string-db.org>)以建立PPI网络图。同时,在数据库系统中将选择的物种设置为智人(homo sapiens),把所需的最低相互作用置信度数值设置为0.9,并删除断开的节点,去除无法参与反应的部分,保留有效相互作用节点。将PPI网络导入Cytoscape 3.7.0软件,并使用插件CytoNCA计算网络拓扑参数节点Degree并以得出的度值为依据来筛选核心靶点。

### 1.4 富集分析

使用R 4.0.3软件中的相关数据包(enrichplot、clusterProfiler、ggplot2、pathview)对交叉靶标进行基因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)功能富集分析。运用公式去计算得到相应的P值,并应用错误发现率(false discovery rate, FDR)校正。在进行GO和KEGG功能富集分析的过程中对数据有着以下要求,即P值 $\leq 0.05$ 和Q值 $\leq 0.05$ ,仅保留同时满足上述标准的显著条目。筛选最具生物学意义的GO条目和KEGG通路,并用以上条目来绘制基因-功能条目关联图和通路-基因相互作用网络图。

### 1.5 分子对接

使用Schrödinger分子对接软件测定配体-蛋白质的相互作用,接下来进行配体制备的操作。在配体制备的操作过程中,需要从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)下载活性化合物的2D结构文件,然后将以上2D结构文件导入到

Schrödinger Maestro软件LigPrep模块进行优化分析,默认配置设定为力场OPLS4、生理pH(7.0±2.0)下的电位电离和配体的立体光学异构体,从而得到经过优化后的配体。从RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)筛选符合以下标准的蛋白质结构,分辨率<2.5 Å且具有完整口袋结构的蛋白质文件。将选出的蛋白质文件导入Schrödinger Maestro软件,通过选择默认设置对受体结构进行结构优化。最后一步,采用Schrödinger的Glide模块对结构优化后的受体进行分子对接研究。

## 2 结果

### 2.1 中药活性成分相关靶标

在满足筛选标准(OB≥30%, DL≥0.18)后,通过TCMSP检索,最终获得核心组方中3种中药的生物活性成分及靶点,同时,还发现了52个与这些成分相关的靶标。见图1。

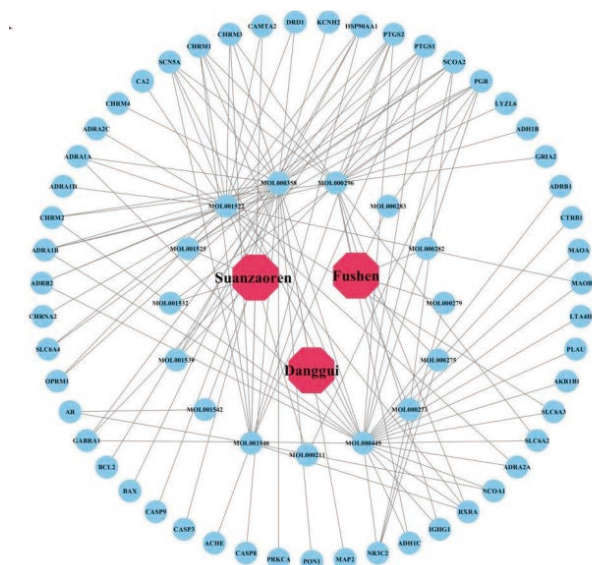


图1 中药活性成分、靶点、靶标

### 2.2 生物活性成分靶点与疾病靶点的交集

对疾病靶点预测共检索到6535个与疾病相关的靶标。把核心组方中的生物活性成分的靶点与检索到的疾病靶点汇总到R软件进行Venn图的绘制,得出的Venn图中显示了一共48个交叉靶标基因。这些结果表明核心组方可能通过与48个不同的靶向基因结合从而达到治疗疾病的目的。见图2、图3。

### 2.3 绘制P-M-C-T网络图与Degree排序

网络分析的主要方法和策略之一是可以分析每个节点的Degree来确定该节点所代表的活跃化合物或目标在整个网络分析中的重要性。Degree可以显示出在该网络中与该节点互连的节点数,分析得到的Degree越大表示该节点在网络中的重要性

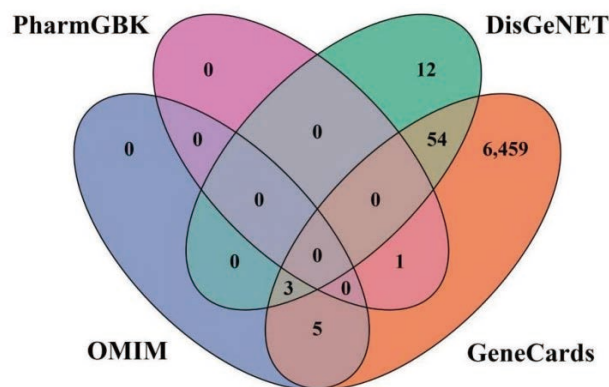


图2 疾病靶点图

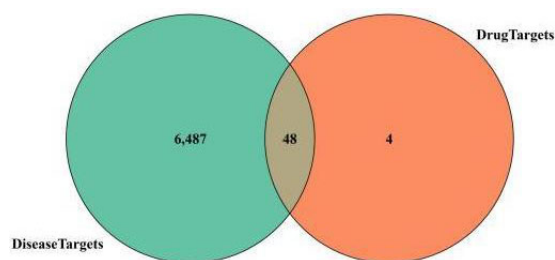


图3 Venn图

越高,因为与该节点相关的节点数更多。在P-M-C-T网络中,根据对活性成分的Degree进行排序,得出MOL000358的Degree最大为28。Degree越大,提示该化合物可能通过多靶点协同作用调控失眠相关通路, MOL000358具有最广谱的靶点作用范围,其多靶点特性可能对治疗失眠具有核心调控作用。见图4、图5。

### 2.4 构建PPI

将筛选获得的交叉靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org>)输出生成PPI关系文件。然后,通过将复杂的蛋白质相互作用关系文件导入到Cytoscape 3.7.0软件中以构建PPI网络图。并使用插件CytoNCA计算节点的拓扑参数,选取Degree排名前8的蛋白质,可以发现前列腺素内过氧化物合酶2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)的Degree最高,表明PTGS2在失眠相关蛋白互作网络中处于核心调控地位。见图6、图7。

### 2.5 GO本体分析

GO本体分析结果中已知有832个符合标准的GO条目( $P < 0.05$ ),并同时分析得到638个生物过程(biological process, BP)、60个细胞组分(cellular component, CC)、134个分子功能(molecular function, MF)。结果显示表明核心组方在治疗疾病的潜在靶点主要集中在腺苷酸环化酶调控G蛋白偶联受体信号通路(GO:0007188);CC分析发现主要涉及突触膜(GO:0097060);MF分析主要富集在G蛋白偶联膜

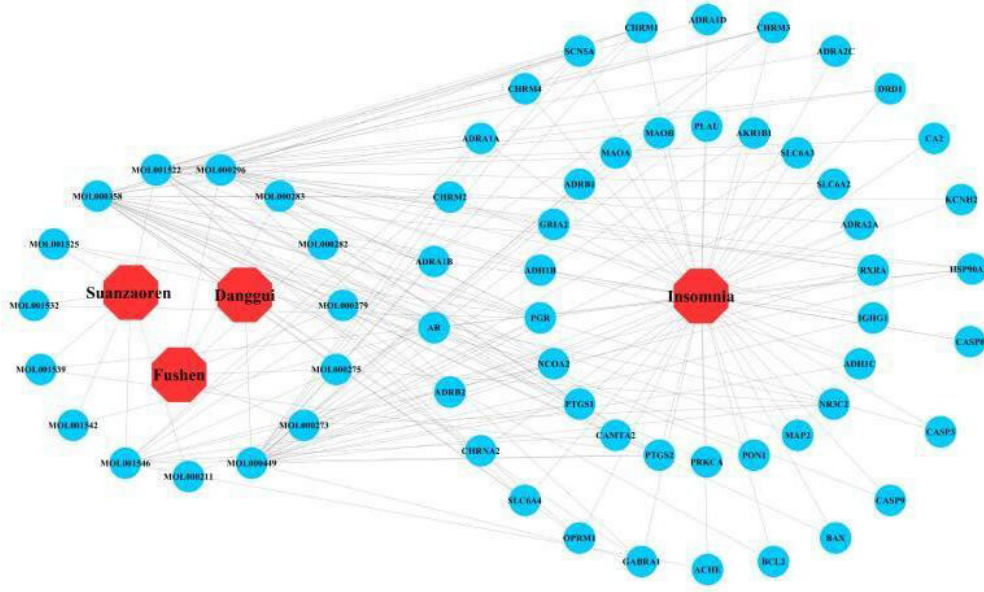


图4 P-M-C-T网络

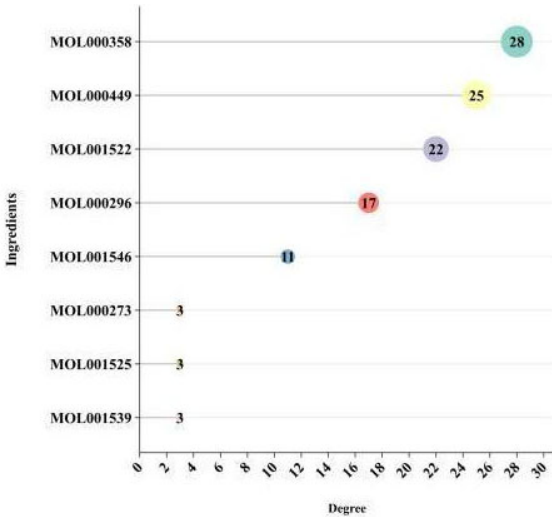


图5 Degree值排序

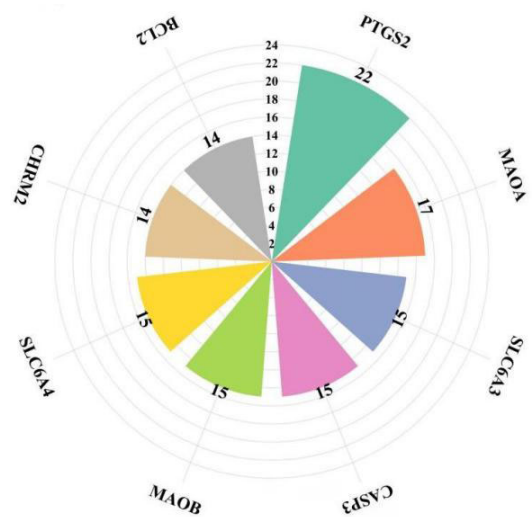


图7 蛋白质Degree排名

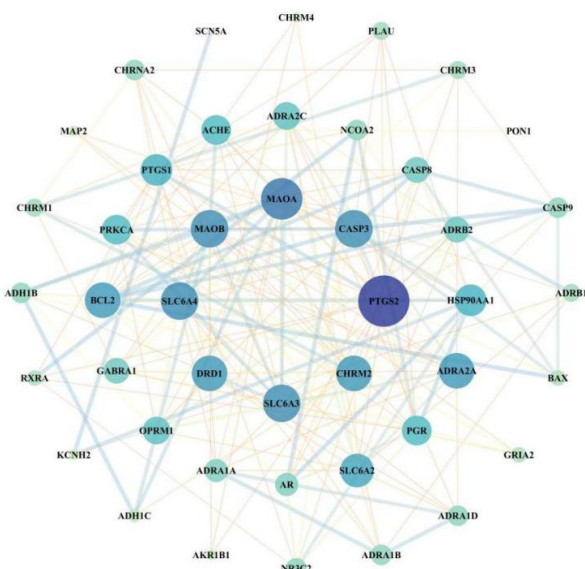


图6 PPI网络图

受体活性( GO:0008227)。GO分析的每个功能的前6项如图8所示,每个功能中富集的基因数量最多的靶点与GO条目之间的关系如图9所示。

### 2.6 KEGG 功能富集分析

在KEGG功能富集分析中,显著通路筛选以  $P < 0.05$  为阈值,共获得86条富集通路总数。对基因富集数量从大到小进行筛选,筛选出基因富集数量前15条信号通路。通过分析得出主要作用的核心基因,主要富集在神经活性配体-受体相互作用、神经退行性病变通路(多疾病关联)、钙信号通路等多条通路上。在呈现研究结果时需选择对前3条通路分析的结果来展示通路与靶点之间的关系。结果显示核心组方治疗疾病作用过程中是有多靶点、多途径参与的,体现中医药“多成分-多靶点-多通路”的整体调节特点。见图10、图11。

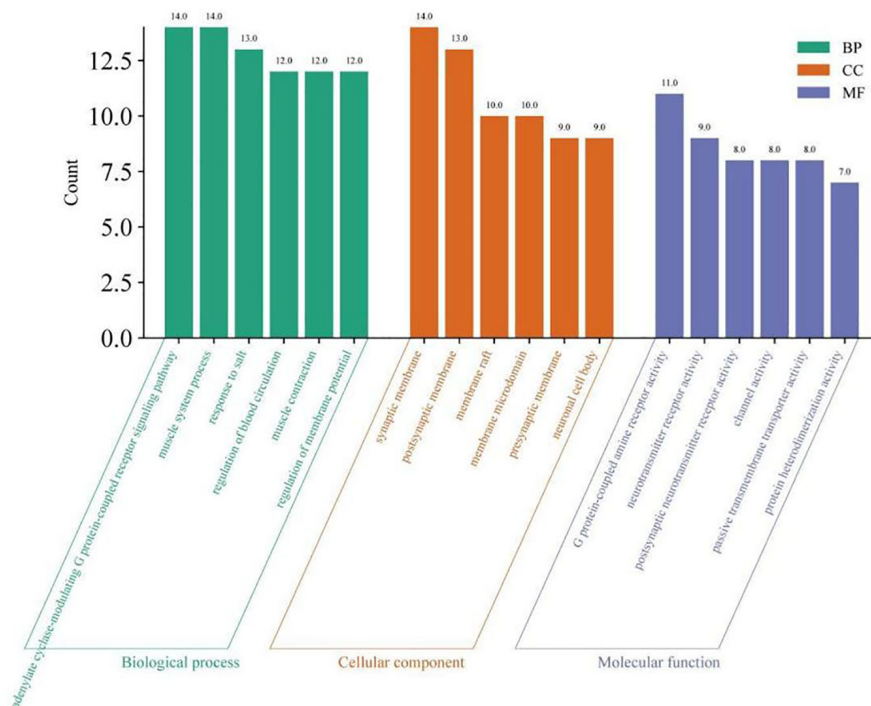


图8 GO本体分析前6项功能

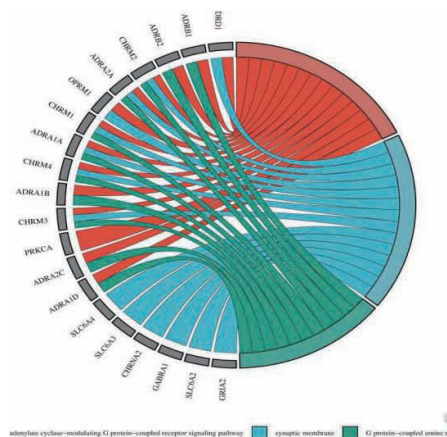


图9 靶点与GO条目之间的关系

### 2.7 分子对接验证

配体和受体之间的结合能越低,结构就越稳定。通过分析核心成分与核心靶点对接的具体情况,可以发现β-谷甾醇可以嵌入在PTGS2蛋白中,并且与多个氨基酸残基发生作用,其中与ASP-125残基形成氢键作用力,其氢键距离分别为2.56 Å,这些都表明β-谷甾醇与PTGS2蛋白的结合更紧密、更牢固,从而形成了相对稳定的复合物。见图12。

## 3 讨论

### 3.1 中医对失眠的认识

失眠的中医病名对应为不寐,难以入睡伴睡眠

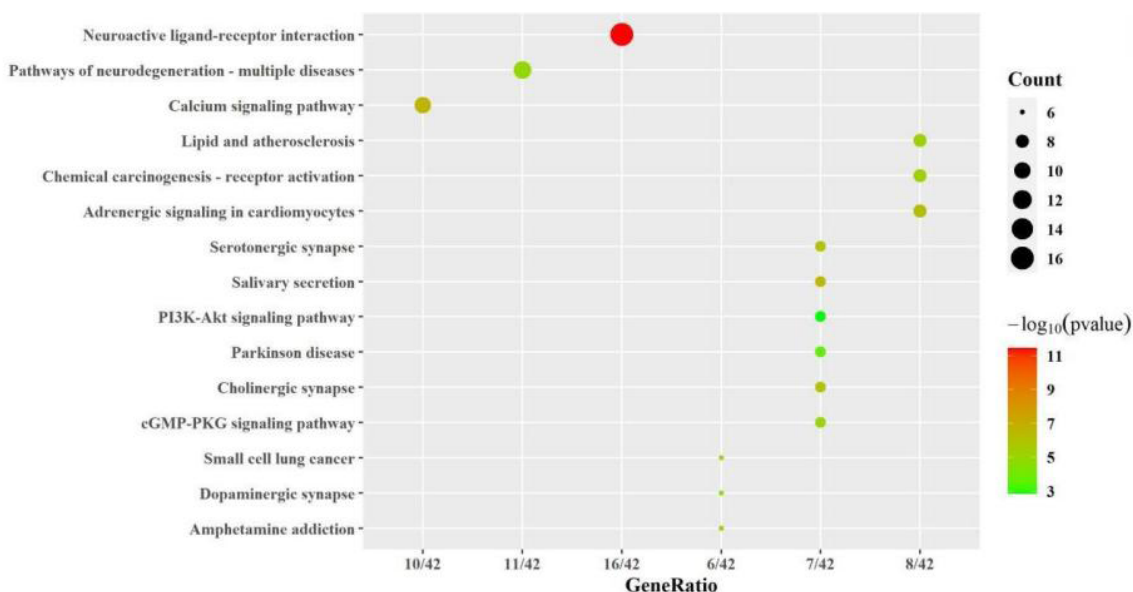


图10 基因富集数量前15条信号通路

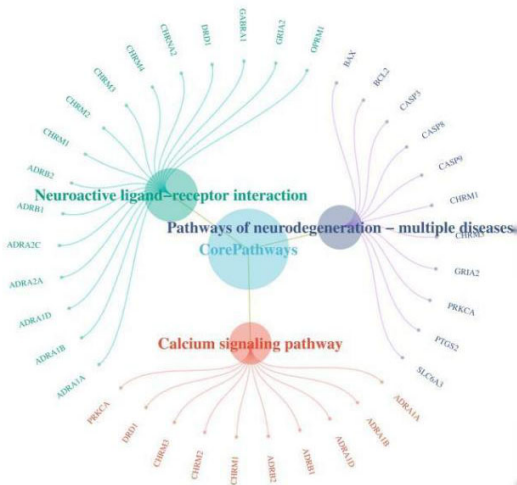


图 11 通路与靶点之间的关系

维持困难为主要临床表现。中医治疗不寐往往从五脏六腑的整体作用机制进行分析。当归,归肝、心、脾经;酸枣仁,入心、脾、肝胆经;茯神主入心、脾两经,以上药对主要作用于心脾两经。心为君主之官,五脏六腑之大主,主宰人体生命活动,在志为喜、其华在面、在液为汗、开窍于舌等特点,并与小肠互为表里。脾为意之所藏、仓廩之官<sup>[4]</sup>。曹庭栋《老老恒言》云:“寤则神栖于目,寐则神栖于心。”<sup>[5]</sup>唐宗海曰:“寐者,神返舍,息归根之谓也。”<sup>[6]</sup>脾可升清、运化、统血,主肌肉与四肢。脾胃为后天之本、气血生化之源,能运化水谷精微而输布周身<sup>[7]</sup>。脾虚则气血生化乏源,故可见心血不足,神魂失主所致难以入睡<sup>[8]</sup>。林珮琴云:“思虑伤脾,脾血亏损,经年不

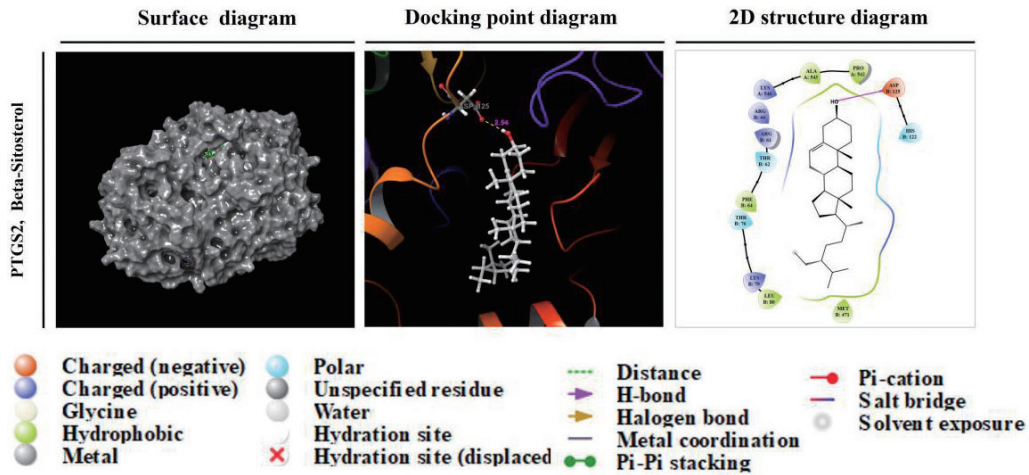


图 12 分子对接验证

寐。”且脾胃为表里,脾虚则胃虚,脾胃受乘水谷精微并化生为气血的功能也会受损,从而导致一身气血不足,进而影响人体各脏器的主要功能,使失眠与头晕头痛等伴随症状加重,从而使失眠的治疗长期化与难治化。基于历史医案记载,中医治疗失眠临床效果往往翔实有效。

### 3.2 当归-酸枣仁-茯神治疗失眠的机制预测

通过对该药对的分析得出其生物活性成分主要有当归多糖(主要来自当归)、茯苓多糖(主要来自茯神)、酸枣仁皂苷(主要来自酸枣仁)、酸枣仁脂肪酸(主要来自酸枣仁)等。研究表明当归多糖通过以下途径改善失眠症状,免疫调节促进自然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 神经调节抑制血栓素 A2 (thromboxane A2, TXA2) 生成、成纤维细胞生长因子受体 1 (fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1) 表达、调节 5 羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 释放及调脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 水平,抑制中枢神经系统过度兴奋来

改善失眠的症状<sup>[10-12]</sup>。茯苓多糖的作用机制为增加三磷酸腺苷、二磷酸腺苷或腺苷二磷酸、血清三磷酸腺苷、血栓素 B2 水平以发挥镇静作用,改善失眠症状<sup>[13]</sup>。酸枣仁多糖和酸枣仁脂肪酸的神经递质系统调节以减少脑内氨基酸毒性,调节 5-HT 释放、降低多巴胺和去甲肾上腺素水平及增加 GABA<sub>A</sub> 受体表达;下丘脑功能调节为促进黑色素浓集激素表达、提高一氧化氮含量、增强一氧化氮合酶活性;神经保护作用为调节中脑中缝背核 B 淋巴细胞瘤-2 基因表达及调控 BDNF mRNA 表达量及抑制谷氨酸诱导的细胞内钙离子升高<sup>[14-20]</sup>。该药对通过以上生物活性成分的作用机制来达成对失眠的治疗。

本研究通过综合运用分子对接技术、GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,系统揭示了当归-酸枣仁-茯神药对治疗失眠具有多种有效生物活性成分、多种作用靶点、多种信号通路的作用特点,这些发现为临床应用该药对治疗失眠提供了重要的理论依据,同时也为开发新型抗失眠药物提供了潜在的药物靶点和作用通路。