

doi: 10.12452/j.fxcxb.26050605

基于UPLC-MS/MS的多脑区神经递质同步定量及参斛西红花方干预睡眠剥夺的应用研究

张锐迪¹, 吴风云², 徐竞超², 张泉龙¹, 朱波¹, 张巧艳¹, 秦路平¹,
陆颖洁^{2*}, 韩婷^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053; 2. 中国人民解放军海军军医大学 药学院, 上海 200433)

摘要: 该研究建立了一种基于超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术的小鼠海马、皮层、下丘脑微量组织中神经递质(NTs)同步定量方法。结果显示, 多巴胺、去甲肾上腺素、5-羟色胺、 γ -氨基丁酸、乙酰胆碱及谷氨酸在0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好($r^2 \geq 0.995$), 检出限为5~50 ng/mL, 定量下限为100~250 ng/mL。96 h睡眠剥夺后, 下丘脑中多巴胺、海马中 γ -氨基丁酸和皮层中乙酰胆碱出现代偿性升高, 3个脑区其余NTs整体下调, 跨脑区相关性网络显著破坏。参斛西红花方干预后, 上述NTs紊乱均显著回调, 基本恢复至接近正常组水平, 主成分与相关性分析进一步证明样本向正常组回归、跨脑区相关性网络得到修复, 表明该方可多靶点调控关键脑区递质水平, 恢复兴奋-抑制平衡, 发挥养心安神、抗中枢疲劳作用。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 脑区特异性; 神经递质; 睡眠剥夺; 参斛西红花方

中图分类号: O657.7; R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)11-0001-08

Simultaneous Quantitation of Neurotransmitters in Multiple Brain Regions and the Intervention Effect of Shenhu Xihonghua Formula Against Sleep Deprivation Based on UPLC-MS/MS

ZHANG Rui-di¹, WU Feng-yun², XU Jing-chao², ZHANG Quan-long¹, ZHU Bo¹,
ZHANG Qiao-yan¹, QIN Lu-ping¹, LU Ying-jie^{2*}, HAN Ting^{1,2*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: This study established an ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitation of neurotransmitters (NTs) in microdissected hippocampal, cortical, and hypothalamic tissues of mice. The results showed that dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, γ -aminobutyric acid, acetylcholine, and glutamate exhibited excellent linearity within the concentration range of 0.1–10 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 \geq 0.995$), with limits of detection and quantification being 5–50 ng/mL and 100–250 ng/mL, respectively. After 96 h of sleep deprivation, dopamine in the hypothalamus, γ -aminobutyric acid in the hippocampus, and acetylcholine in the cortex showed compensatory increases. By contrast, the remaining NTs in these three brain regions were generally downregulated, and the interregional correlation network was significantly disrupted. Treatment with the Shenhu Xihonghua formula significantly reversed these NT abnormalities, restoring them to near-normal levels. Principal component analysis and correlation analysis further demonstrated that the treatment shifted the sample profiles back toward those of the control group and restored the interregional correlation network. These findings suggest that the Shenhu Xihonghua formula regulates neurotransmitter levels in key brain regions through multiple targets, restores the excitation-inhibition balance, and combats central nervous system fatigue by nourishing the heart and calming the mind.

收稿日期: 2026-05-06; **修回日期:** 2026-06-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82174091)

* **通讯作者:** 韩婷, 博士, 教授, 研究方向: 中药活性物质及品质调控, E-mail: hanting@smmu.edu.cn
陆颖洁, 博士, 讲师, 研究方向: 中药活性物质的原位表征, E-mail: yingjielu@smmu.edu.cn

#该文为2025分析测试青年创新大赛优秀参赛成果

Key words: UPLC-MS/MS; brain region specificity; neurotransmitters; sleep deprivation; Shen-hu Xihonghua Formula

睡眠剥夺(SD)所致疲劳已成为现代社会常见的健康问题,影响着全球超过33%人口的生活^[1]。SD短期内会对基础代谢、学习记忆和情绪健康产生负面影响,长期发展还会导致焦虑和抑郁,并引发一系列免疫系统疾病^[2-4]。其病理机制涉及中枢神经系统多个脑区的功能紊乱,尤其是学习记忆相关海马、认知执行相关皮层以及睡眠-觉醒调控相关下丘脑的神经环路受损^[5-7]。而神经递质(NTs)作为介导上述脑区信息传递的关键信使,其含量变化直接反映中枢疲劳状态^[8]。但不同种类神经递质在不同脑区的合成、代谢及功能调控模式存在显著差异^[9-10],因此,分别阐明其在海马、皮层及下丘脑中的动态变化有助于解析睡眠剥夺疲劳++发生调控机制。

然而,神经递质在脑内属低丰度物质,检测易受干扰,且往往在神经环路中处于更新和代谢的动态平衡中,定量分析面临挑战^[11]。常用技术如超高效液相色谱(HPLC)存在灵敏度低、基质干扰强等局限;气相色谱-质谱联用(GC-MS)则因衍生化繁琐,易造成待测物损失^[12]。而超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)兼具高效分离与高灵敏检测优势,无需衍生化即可实现多种神经递质的同步精准定量,确保低含量检测的准确性与重复性^[13-15]。但现有研究多针对全脑匀浆或外周血,难以精准解析SD的脑区特异性神经化学机制。海马、皮层和下丘脑等微量脑组织存在明显异质性,各脑区基质效应与内源性干扰程度差异显著,对兼顾多脑区、高灵敏检测的方法建立提出了更高要求。

参斛西红花方(SHX)由人参、铁皮石斛和西红花组成,具“大补元气、益气滋阴、养心安神”之效,现代研究已证实,其含有的人参皂苷、石斛多糖和西红花苷等多种活性成分可通过多靶点协同发挥作用,通过提升多种神经递质活力,改善神经细胞功能、减轻神经炎症等进而缓解睡眠剥夺疲劳,并保护神经系统^[16-20]。因此,本研究旨在建立一种适用于不同脑区组织的UPLC-MS/MS同步定量分析方法,系统考察SD小鼠海马、皮层、下丘脑中多种神经递质的脑区特异性变化规律,并比较正常组、SD模型组、SHX治疗组的干预效应,初步揭示该方抗SD疲劳的作用机制与配伍增效科学内涵。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Vanquish超高效液相色谱仪、Q Exactive高分辨质谱仪(美国Thermo公司);5430R低温高速离心机(德国Eppendorf公司);Tissuelyser-48组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司);十万分之一分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);ZC-100S智能超声波仪(北京中环北方仪器仪表有限公司);ZLS-1台式快速离心浓缩干燥器(湖南赫西仪器装备有限公司);Milli-QA10超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药物与试剂

人参、铁皮石斛、西红花均购自上海雷允上药业有限公司,经浙江中医药大学药学院秦路平教授分别鉴定为五加科植物人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)的干燥根和根茎、兰科植物铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)的干燥茎、鸢尾科植物番红花(*Crocus sativus* L.)的干燥柱头。去甲肾上腺素(NE)、 γ -氨基丁酸(GABA)、乙酰胆碱(Ach)、谷氨酸(Glu)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)均购自美国Sigma公司(纯度 $\geq 98\%$)。甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级)均购自上海安谱实验科技股份有限公司,甲酸铵(液相色谱-质谱联用级)购自美国Sigma公司,甲酸(色谱级)购自国药集团化学试剂有限公司。实验用水为超纯水。

1.3 给药样品的制备

称取人参、铁皮石斛药材置于煎煮装置中,加入10倍量纯化水,煎煮1 h,滤过,取滤渣加入6倍量纯化水再次煎煮30 min,在第二次煎煮的最后15 min加入西红花,合并两次煎液,滤过,将滤液浓缩至每10 mL药液相当于6.3 g生药,即得SHX水煎液。

1.4 实验动物设计

清洁级雄性C57BL/6J小鼠,购自杭州子源实验动物科技有限公司,许可证编号SCXK(浙)2024-0004。全部实验在SPF级动物实验室内开展,并通过海军军医大学动物伦理委员会审核(批准号

ECNMU2024-127), 符合动物伦理要求。小鼠适应性饲养一周后随机分为 3 组: 空白对照组(NC)、模型组(Model)、SHX 组。SHX 组给予相应水煎液(灌胃量为 0.1 mL/10 g), 对照组及模型组给予等量蒸馏水。除对照组外, 其余各组小鼠均放入特制的多平台水环境睡眠剥夺笼中, 采用多平台水环境法连续剥夺睡眠 96 h, 以建立小鼠睡眠剥夺疲劳模型。造模期间, 小鼠自由饮食饮水, 并继续按上述方法分别灌胃给予 SHX 溶液及蒸馏水。造模成功后, 分离下丘脑、海马及皮层组织, 液氮速冻后于 -80°C 保存备用。

1.5 样品前处理

精确称量皮层(47.31 ± 4.48) mg、海马(28.66 ± 8.99) mg、下丘脑(18.28 ± 5.17) mg 至离心管中, 加入 0.2 mL 水溶液匀浆, 涡旋 60 s 后充分混匀, 再加入 0.8 mL 甲醇/乙腈(1:1, 体积比)提取液, 涡旋 60 s, 冰上超声提取 30 min, 重复提取 2 次。于 -20°C 下放置 1 h 沉淀蛋白, 以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行冷冻真空浓缩干燥, 最后加入 0.2 mL 20% 甲醇溶液进行复溶, 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清进行检测, 最终神经递质含量以每毫克脑组织质量校正(ng/mg)。

1.6 标准溶液和质控样品的配制

分别准确称量 NE、GABA、Ach、Glu、DA、5-HT 标准品适量, 各加入 20% 甲醇溶液配制成 10 mg/mL 的单标母液。

取适量各单标母液混合配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混标溶液, 用 50% (体积分数) 乙腈溶液逐级稀释, 配制成 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液系列。6 种神经递质均以 0.3、5.0、8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为低、中、高 3 个不同浓度的质控样品。

取适量 2-氯-L-苯丙氨酸为内标, 以甲醇/乙腈(1:1)稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.7 色谱条件

色谱柱为 Waters BEH Amide(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相为 25 mmol/L 甲酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸), B 相为乙腈溶液(含 0.1% 甲酸); 洗脱梯度程序: 0~1.0 min, 10% A; 1.0~12 min, 10%~40% A; 12.1~15 min, 40%~10% A; 15 min, 10% A; 流速 0.3 mL/min; 柱温 45°C ; 进样体积 2 μL ; 整个分析过程中, 样品置于 4°C 的自动进样器中。

1.8 质谱条件

电喷雾离子源(ESI), 质谱参数设置如下: 鞘气 40 arb, 辅助气 10 arb, 离子喷雾电压 $-2800/+3000$ V, 温度 350°C , 离子传输管温度 320°C 。扫描模式为 Full scan-ddMS², 扫描方式为负离子/正离子, 一级质谱扫描范围为 50~300 Da。6 种神经递质的具体质谱参数见表 1。

1.9 数据处理与分析

采用 SPSS 软件进行数据处理, 以标准品浓度为横坐标(X), 对应的色谱峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归拟合, 得到回归方程与相关系数(r^2), 并计算各神经递质含量。所有指标结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经多重检验校正后, 以 $P < 0.05$ 表示所测数据的差异具有显著统计学意义。实验数据经 Z-score 标准化后进行主成分及热图分析, 相关性热图中各指标间的两两相关系数采用 Spearman 秩相关分析计算。

2 结果与讨论

2.1 神经递质定量条件的优化

内源性代谢物的测定易受到基质效应的干扰, 因此检测难度较高。为实现小鼠多脑区中多种神经递质的高灵敏度、高准确度同步检测, 首先对各目标物的极性特征及离子化行为进行评估。其中, NE 在负离子模式下具有更高的响应与信噪比, 而其余 5 种神经递质在正离子模式下的离子化效率更优, 因此采用正负离子同时采集的模式进行分析。

所检测的神经递质多为高极性小分子, 采用传统反相 C₁₈ 色谱柱进行检测时, 目标物的峰形显著拖

表 1 6 种神经递质的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of six neurotransmitters

Compound	Retention time/min	Precursor ion(m/z)	Quantitative ion(m/z)
NE	7.504 8	168.0	150.1
GABA	5.919 6	104.0	87.1
Ach	0.882 9	146.1	87.0
Glu	8.189 5	148.0	84.0
DA	5.707 5	154.0	137.1
5-HT	5.301 5	177.1	160.1

尾、基线噪声增大且保留时间不稳定,主要原因是硅羟基($-\text{Si}-\text{OH}$)会与带正电的氨基发生次级离子交换吸附,导致峰严重拖尾、峰宽变大,低浓度的内源性递质甚至会出现“分岔峰”。Waters BEH Amide (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm)酰胺基键合相色谱柱一方面可有效避免碱性或酸性神经递质在固定相上的非特异性吸附,显著缓解拖尾现象,提升峰形对称性,从而确保低浓度内源性递质定量的准确性;另一方面,该柱具备宽 pH 耐受范围和高物理化学稳定性,适用于含甲酸/甲酸铵的流动相体系,支持正负离子模式的灵活切换与稳定检测,并能够有效分离脑组织基质中的极性杂质,降低基质效应。此外,1.8 μm 的小粒径填料提供了超高柱效与分辨率,可实现结构相似、极性相近的神经递质之间的良好分离。综上,本方法通过正负离子同步采集模式联合 Waters BEH Amide 酰胺柱,解决了高极性神经递质峰形差、保留时间不稳及脑组织基质干扰等技术瓶颈,可实现小鼠多脑区多种神经递质稳定、可靠的同步定量。

所有目标化合物的质谱参数均通过注入其纯标准品溶液进行优化确定。首先对各目标物的母离子、子离子进行全扫描,选择响应高、特异性强的离子对作为定量离子对,并对裂解能量、碰撞能量等参数进行逐一优化,以获得最佳灵敏度和信噪比,并通过方法学验证。最后优化的条件如“1.8”所示,在该条件下获得 6 种神经递质的提取离子色谱图(图 1),经分析,所选 NE、DA、5-HT、Ach 定量碎片为氨基/季铵侧链 β -裂解,同步伴随脱水、脱氨、三甲胺中性丢失重排过程;GABA 与 Glu 定量碎片以脱羧、 α 位 C—N 键断裂及碳链脱氢重排为主。

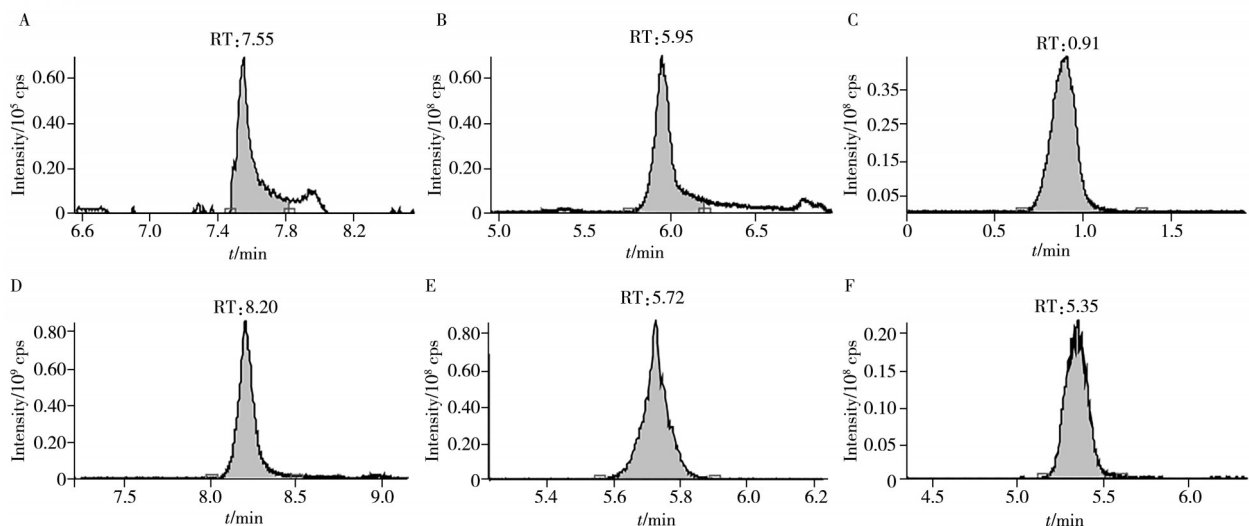


图 1 UPLC-MS/MS 获得脑样提取物中 6 种神经递质的提取离子流图

Fig. 1 UPLC-MS/MS extracted ion chromatograms of six neurotransmitters in brain tissue extracts

A. NE; B. GABA; C. Ach; D. Glu; E. DA; F. 5-HT

2.2 神经递质定量方法学验证

按照“1.9”方法对 6 种神经递质的线性关系、线性范围、 r^2 、检出限(LOD)及定量下限(LOQ)进行考察,结果列于表 2。6 种神经递质在 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,相关系数(r^2)为 0.995 8~0.999 8,检出限和定量下限分别为 5~50 ng/mL 和 100~250 ng/mL,满足取材范围内的微量脑组织检测需求。

表 2 6 种神经递质的线性方程、线性范围、相关系数(r^2)、检出限与定量下限

Table 2 Linear equations, linear ranges, coefficients of determination(r^2), LODs, and LOQs of six neurotransmitters

Compound	Linear equation	Linear range/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	r^2	LOD/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
NE	$Y=122\,578X+852\,824$	0.1~10	0.999 8	50	100
GABA	$Y=155\,169X+1\,656\,465$	0.1~10	0.995 8	5	250
Ach	$Y=9\,140\,658X+340\,845\,034$	0.1~10	0.997 5	5	100
Glu	$Y=52\,116X+241\,716$	0.1~10	0.996 8	50	100
DA	$Y=472\,202X+2\,395\,536$	0.1~10	0.999 7	50	100
5-HT	$Y=413\,312X+2\,178\,238$	0.1~10	0.999 6	5	100

日内精密度以同一质控样品每天制备 6 个平行并计算相对标准偏差(RSD)进行评价; 日间精密度则通过同一质控样品连续测定 3 天并计算 RSD 进行评价。取 6 份不同来源的空白脑基质, 分别于提取前、提取后加入等量质控样品与内标, 经前处理、定容进样得到峰面积, 通过二者峰面积比值计算提取回收率。表 3 结果显示, 各成分的日内和日间 RSD 均低于 10%, 选取高浓度质控 8.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为代表性加

标水平, 提取回收率为 71.3%~100%, 表明本方法精密度良好, 提取回收率符合内源性代谢物分析要求。实验全程加入等量同位素内标同步前处理并上机检测, 经同位素内标校正后, 不同脑区基质差异引发的离子干扰得到有效补偿, 可实现准确定量, 内源性本底通过基质匹配标准曲线结合零点外推扣除。

2.3 参斛西红花干预前后不同脑区神经递质含量变化

基于所建方法, 本研究系统考察了 96 h 睡眠剥夺后小鼠下丘脑、海马及皮层中 6 种神经递质的含量变化, 并评价了参斛西红花方的干预效应。表 4 结果显示, SD 导致 3 个脑区的神经递质谱发生显著且具有脑区特异性的紊乱。

表 4 下丘脑、海马及皮层中 6 种神经递质水平 ($n=3$)

Table 4 Levels of six neurotransmitters in the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex ($n=3$) $w/(\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1})$

Brain region	Group	NE	GABA	Ach	Glu	DA	5-HT
下丘脑	正常组	0.602 $\pm$ 0.131	58.507 $\pm$ 6.315	0.942 $\pm$ 0.038	594.768 $\pm$ 19.510	0.067 $\pm$ 0.025	0.850 $\pm$ 0.073
	模型组	0.325 $\pm$ 0.107 [#]	48.057 $\pm$ 1.007 [#]	0.418 $\pm$ 0.217 ^{##}	355.807 $\pm$ 17.908 ^{###}	0.215 $\pm$ 0.060 ^{##}	0.430 $\pm$ 0.081 ^{##}
	参斛西红花组	0.550 $\pm$ 0.033	56.322 $\pm$ 4.065	0.817 $\pm$ 0.024 [*]	582.907 $\pm$ 19.857 ^{***}	0.191 $\pm$ 0.003	0.720 $\pm$ 0.159 [*]
海马	正常组	0.027 $\pm$ 0.003	29.808 $\pm$ 2.934	0.591 $\pm$ 0.069	688.362 $\pm$ 15.017	0.082 $\pm$ 0.051	0.238 $\pm$ 0.040
	模型组	0.013 $\pm$ 0.007 ^{##}	38.885 $\pm$ 4.537 [#]	0.392 $\pm$ 0.056 [#]	422.191 $\pm$ 124.524 ^{##}	0.012 $\pm$ 0.004	0.127 $\pm$ 0.054
	参斛西红花组	0.035 $\pm$ 0.001 ^{***}	34.455 $\pm$ 2.544	0.501 $\pm$ 0.064	728.025 $\pm$ 33.566 ^{**}	0.015 $\pm$ 0.004	0.348 $\pm$ 0.061
皮层	正常组	0.029 $\pm$ 0.002	26.161 $\pm$ 0.690	0.352 $\pm$ 0.056	736.169 $\pm$ 32.643	0.631 $\pm$ 0.054	0.385 $\pm$ 0.034
	模型组	0.012 $\pm$ 0.002 ^{###}	17.559 $\pm$ 0.395 ^{###}	0.517 $\pm$ 0.072 [#]	468.341 $\pm$ 68.922 ^{###}	0.453 $\pm$ 0.128	0.272 $\pm$ 0.011 [#]
	参斛西红花组	0.028 $\pm$ 0.001 ^{***}	22.118 $\pm$ 1.145 [*]	0.398 $\pm$ 0.012	708.554 $\pm$ 7.193 ^{***}	0.381 $\pm$ 0.077	0.408 $\pm$ 0.059 [*]

$P<0.05$, ## $P<0.01$ and ### $P<0.001$ vs normal group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$ vs model group (与正常组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

下丘脑是睡眠-觉醒调控的核心脑区, 其神经递质水平变化直接反映中枢疲劳状态。经 96 h 睡眠剥夺后, 与正常组相比, 模型组小鼠下丘脑中 NE、GABA、Ach、Glu、5-HT 的含量明显下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$), DA 含量显著上升($P<0.01$); 与模型组相比, SHX 组小鼠下丘脑中 Ach、Glu 和 5-HT 含量均显著回升, 其中 Ach 和 5-HT 含量升高具有显著性差异($P<0.05$), Glu 含量升高具有极显著性差异($P<0.001$), NE 和 GABA 虽有一定升高趋势但无统计学差异, DA 略有降低亦无统计学意义。这一结果提示, 慢性睡眠剥夺可能抑制下丘脑内多种神经递质的合成释放, 同时激活多巴胺能通路。DA 的异常升高可能反映了机体对持续觉醒状态的代偿性应激反应, 但长期而言可能加剧神经环路功能失调。给予 SHX 后, Ach、Glu 和 5-HT 水平均显著回升, NE 和 GABA 呈现升高趋势, DA 呈下降趋势, 表明该方能有效逆转下丘脑的递质耗竭, 从而改善睡眠紊乱, 缓解机体持续性疲劳, 恢复下丘脑对睡眠-觉醒周期的调控能力。

海马是学习记忆的关键脑区, 其兴奋/抑制平衡对认知功能维持至关重要。经 96 h 睡眠剥夺后, 与正常组相比, 模型组小鼠海马中 NE、Ach、Glu 的含量明显下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$), GABA 的含量显著上升($P<0.05$); 与模型组相比, SHX 组小鼠海马中 NE、Glu 的含量显著上升, 其中 NE 升高具有极显著性差异($P<0.001$), Glu 升高具有非常显著性差异($P<0.01$)。兴奋性递质 Glu 的减少与抑制性递质 GABA 的增多, 破坏了海马区兴奋/抑制平衡, 这可能是 SD 导致学习记忆损伤的分子基础。SHX 干预后, NE 和 Glu 的含量显著回升, GABA 趋向正常化, 提示该方可改善睡眠剥夺疲劳所致学习记忆损伤和认知功能下降, 帮助机体在疲劳状态下恢复认知效率, 缓解认知层面的疲劳表现, 改善认知功能。

额叶皮层负责认知执行功能, 其递质网络紊乱与注意力下降、思维迟缓密切相关。经 96 h 睡眠剥

夺后, 与正常组相比, 模型组小鼠额叶皮层中 NE、GABA、Glu、5-HT 的含量明显下降 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$), Ach 的含量显著上升 ($P < 0.05$); 与模型组相比, SHX 组小鼠额叶皮层中 NE、GABA、Glu、5-HT 的含量显著上升 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$), 其中 NE 和 Glu 具有极显著性差异 ($P < 0.001$), GABA 和 5-HT 具有显著性差异 ($P < 0.05$), Ach 和 DA 虽有一定变化但无统计学差异。Ach 的升高可能与皮层在疲劳状态下维持注意力的代偿机制有关。SHX 治疗后, NE、GABA、Glu、5-HT 均显著回升, Ach 有所回落, 显示该方能够逆转睡眠剥夺所致的皮层递质紊乱, 恢复皮层正常的认知执行功能, 帮助机体恢复认知活力, 减轻疲劳带来的认知负担。

2.4 参酌西红花干预前后不同脑区神经递质 PCA 分布及聚类分析

主成分分析(PCA)结果表明, 正常组、SD 组及 SHX 组在下丘脑、海马、皮层中组间区分良好、离散度清晰; SD 组与正常组空间分布差异显著, 提示 SD 可诱导小鼠多脑区神经递质整体表达谱发生异常紊乱。SHX 干预后, 各脑区样本在主成分空间内均明显向正常组靠拢, 且以海马、皮层的回调趋势更为突出, 说明 SHX 可有效逆转 SD 介导的神经递质谱异常改变, 并对海马和皮层整体神经递质网络具有更强的靶向修复能力与特异性调控效果。结合聚类热图进一步分析神经递质表达特征与组间相关性发现, SD 组各脑区神经递质表达模式发生明显聚类偏移, 5-HT、NE、Glu 呈广泛异常波动, GABA、DA、Ach 则表现出脑区特异性紊乱, 脑内兴奋性与抑制性递质稳态失衡、单胺类及胆碱能递质调控网络紊乱, 神经信号传导功能异常。经 SHX 干预后, 小鼠下丘脑、皮层递质表达轮廓显著恢复, 递质丰度及聚类模式与正常组趋于一致, Glu、GABA 兴奋-抑制平衡得以有效纠正, DA、5-HT、NE、Ach 等关键神经递质的异常表达同步改善; 海马递质紊乱虽得到一定缓解, 但修复作用相对温和, 提示 SHX 在单一分子层面对下丘脑和皮层具有更为精准的靶向修复效应(图 2)。

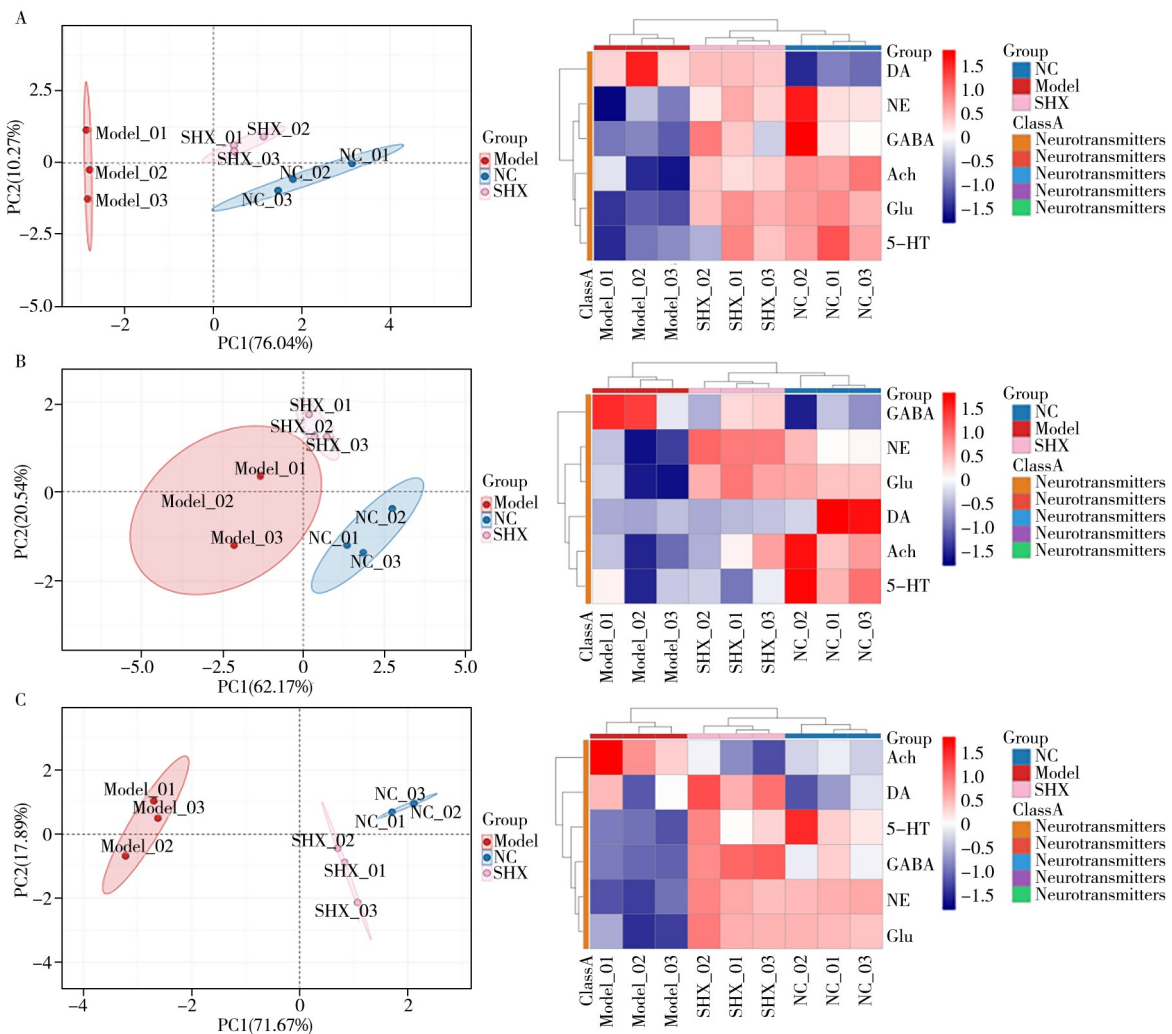


图 2 6 种神经递质在不同脑区的 PCA 分布及聚类热图 ($n=3$)

Fig. 2 PCA plots and heatmaps of six neurotransmitters in different brain regions ($n=3$)

A. hypothalamus; B. hippocampus; C. cerebral cortex (A. 下丘脑; B. 海马; C. 皮层)

2.5 参斛西红花干预前后不同脑区神经递质相关性分析

对正常组、SD 组及 SHX 组 3 个脑区中 6 种神经递质含量进行相关性分析(图 3), 发现正常组中神经递质在不同脑区间构成了高度有序的协同网络。Glu 及 5-HT 在 3 个脑区两两之间均呈显著正相关, 其中以海马与皮层的相关性最为突出; 此外, NE 与 Glu 在海马及皮层中互呈高度正相关, 海马及皮层 Ach 与 3 个脑区的 Glu、海马 Ach 与 3 个脑区的 5-HT、皮层 Ach 与海马 NE、下丘脑 5-HT 与海马皮层 Glu 间同样呈现强正相关。相反, GABA 及 5-HT、Glu 在 3 个脑区两两之间均呈显著负相关, 海马及皮层中 GABA 与 NE 呈极强负相关, 海马中 DA 与三脑区中的 5-HT 以及海马及皮层中的 Ach 也存在明显负相关。上述结果表明, 正常生理状态下, 不同种神经递质在下丘脑、海马、皮层三大脑区之间存在固有的跨脑区功能调控关系。不同脑区的单胺能、胆碱能、Glu 及 GABA 递质系统, 既存在功能协同耦合, 又形成多组反向制衡的调控模式。GABA 作为中枢重要抑制性递质, 与 NE、Glu 等兴奋性递质本身存在天然的兴奋-抑制动态平衡关系, 同时, DA、Ach 及 5-HT 等递质在不同脑区存在功能分化与代偿调节特点, 可通过跨脑区递质表达的此消彼长维持中枢神经功能稳态, 最终形成多脑区、多递质间正向协同与反向拮抗的复杂调控网络, 共同维持中枢兴奋-抑制平衡、情绪稳定、认知唤醒及正常睡眠-觉醒的生理稳态。

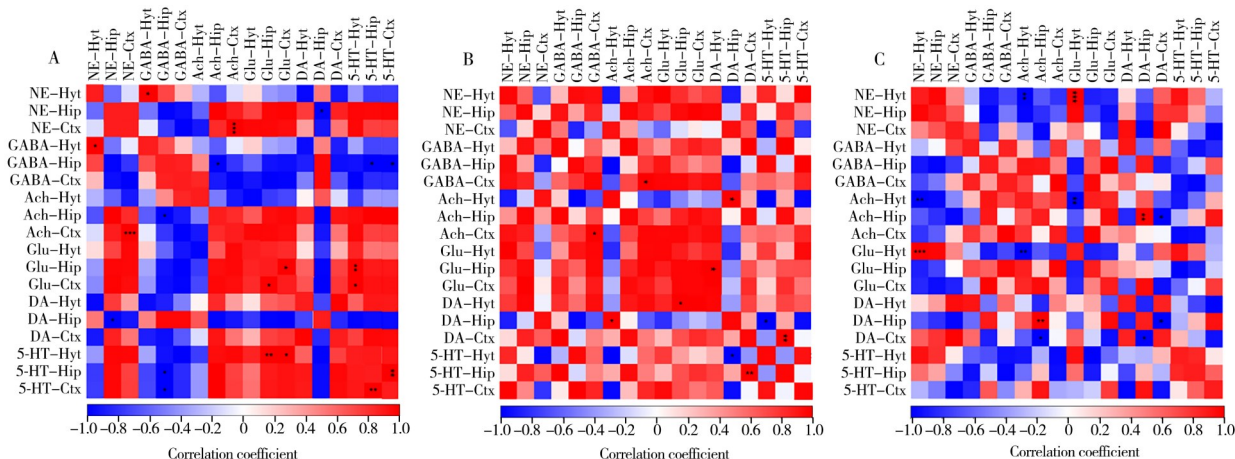


图 3 6 种神经递质在不同脑区的相关性热图($n=3$)

Fig. 3 Correlation heatmaps of six neurotransmitter levels across different brain regions($n=3$)

A. normal group; B. SD group; C. SHX group; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; Hyt: hypothalamus; Hip: hippocampus; Ctx: cerebral cortex(A. 正常组; B. SD 组; C. SHX 组; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; Hyt: 下丘脑; Hip: 海马; Ctx: 皮层)

而 SD 组中上述相关网络发生明显重构, 各脑区内多数递质之间的相关性增强, 但原有 Glu、NE、Ach 间的跨脑区强正相关及 GABA 与 Glu 的反向制衡关系明显减弱或消失, 说明 SD 不仅改变了单个脑区内部的递质平衡, 还进一步扰乱了脑区间递质协同模式, 导致不同神经递质系统 & 不同脑区之间出现异常同步化和调控失衡, 破坏中枢神经递质网络的固有稳态, 使抑制性递质调控功能减弱、兴奋性递质过度活化。此外与正常组相比, SD 小鼠下丘脑与其他脑区神经递质相关性大部分由负相关转为正相关, 提示下丘脑作为核心调控脑区, 与海马及皮层之间的神经递质网络联动异常增强。

经 SHX 干预后, 跨脑区相关性模式较 SD 组得到不同程度纠正, 部分过强的正相关被削弱, Glu 与 GABA 的负相关关系较模型组显著增强, 接近正常组水平, 提示药物可部分重建兴奋-抑制系统的动态平衡; 同时, 给药组中出现了新的调控关联, 如下丘脑 Glu 与海马 GABA 及 NE、皮层 DA 与海马 Ach 的跨脑区强正相关, 海马 GABA 与 3 个脑区 NE 的负相关等, 提示药物有助于重建抑制性递质对跨脑区信号传递的调节作用, 在修复原有网络的基础上, 还可诱导形成代偿性递质调控模式, 通过多靶点协同调控, 使紊乱的神经递质网络向有序稳态回调, 进而发挥改善睡眠剥夺所致中枢神经功能紊乱的作用。

上述结果相互印证表明, SHX 不依赖单一递质靶点调控, 而是通过多脑区、多靶点、网络化的调控方式, 重塑紊乱的神经递质表达相关性与平衡格局, 系统性逆转睡眠剥夺所致的大脑神经递质网络失调, 进而发挥中枢神经保护与情绪、认知功能改善的作用。其作用机制可能涉及人参皂苷、石斛多糖、西红花苷等活性成分对神经递质合成酶、转运体或受体的调节, 具体分子通路有待进一步研究。

3 结 论

本研究建立了一种适用于微量多脑区的 UPLC-MS/MS 同步定量分析方法, 可同时检测海马、皮层、

下丘脑三类异质性基质中的6种神经递质,方法灵敏度高、重复性好。同时系统揭示了睡眠剥夺致中枢疲劳的脑区特异性神经化学机制,阐明了海马、皮层、下丘脑中NE、GABA、Ach、Glu、DA、5-HT的动态变化:下丘脑呈DA上调、多数递质下调的特征;海马表现为GABA上调,NE、Ach、Glu下调;皮层则呈现Ach上调、其余递质广泛下调。SD不仅引起单个神经递质水平的异常变化,更重要的是破坏了下丘脑、海马及皮层之间的神经递质跨区相关性关联,引起兴奋/抑制平衡失调和神经网络异常同步化;而SHX通过多脑区、多递质协同调控,显著回调紊乱神经递质,有效改善睡眠剥夺所致中枢疲劳。但受实验条件限制,本次在造模设计上未设置大平台对照组,且动物数量及有效统计样本量有限,可能引入水环境应激等混杂因素并影响统计结果的稳健性,后续拟扩大样本量并进一步验证睡眠剥夺诱导神经递质变化的专属效应。本研究为该方临床用于缓解睡眠障碍、抗中枢疲劳提供了科学依据与实验支撑。

参考文献:

- [1] Shockey T M, Wheaton A G. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, **2017**, 66(8): 207–213.
- [2] Chang C H, Wu H C, Hsieh Y R, Lai W D, Tung T H, Huang J J, Kao W Y, Huang S Y. *Food Funct.*, **2023**, 14(13): 5977–5993.
- [3] Liu X, Yu H, Wang Y, Li S, Cheng C, Al-Nusaif M, Le W. *Neurosci. Bull.*, **2022**, 38(10): 1170–1182.
- [4] Åkerstedt T, Olsson T, Alfredsson L, Hedström A K. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2023**, 94(5): 331–336.
- [5] Vanrobaeys Y, Peterson Z J, Walsh E N, Chatterjee S, Lin L C, Lyons L C, Nickl-Jockschat T, Abel T. *Nat. Commun.*, **2023**, 14(1): 7095.
- [6] Konakanchi S, Raavi V, Harendra Kumar M L, Shankar M S V. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **2022**, 187: 107559.
- [7] Raven F, Vega Medina A, Schmidt K, He A, Vankampen A A, Balendran V, Aton S J. *Sleep*, **2025**, 48(6): zsaf064.
- [8] Sulaman B A, Kudlak T, Eban-Rothschild A. *Neuron*, **2024**, 112(1): 4–6.
- [9] Yang J X, Sun J H, Liu Z L, Tang X, Hu Y Y, Shen W D, Xie Y C, Jin Y, Li H F, Li X K, Jiang Y J, Chan M T V, Wu W K K, Liu Z G, Liu X D, Hu Y Q, Zhu J P, Ma D Q. *Theranostics*, **2025**, 15(17): 9073–9090.
- [10] Picciotto M R, Higley M J, Mineur Y S. *Neuron*, **2012**, 76(1): 116–129.
- [11] Gu J J. *Study on In-situ Derivatization Method of MALDI Mass Spectrometry for Neur-Otransmitter Imaging*. Shenzhen: University of Chinese Academy of Sciences(顾俊杰. MALDI质谱技术对神经递质成像的原位衍生化方法研究. 深圳: 中国科学院大学), **2023**.
- [12] Kim Y, Lee J, Lee D Y, Park S, Kim J, Cho S H. *Talanta*, **2026**, 296: 128421.
- [13] Becker S, Schulz A, Kreyer S, Dreßler J, Richter A, Helmschrodt C. *Talanta*, **2023**, 253: 123965.
- [14] Peng M Z, Wang M Y, Cai Y N, Liu L. *Clin. Chim. Acta*, **2023**, 548: 117453.
- [15] Sun B, Xia Z, Wang C, Tie R, Wu M, Ru Y. *Talanta Open*, **2025**, 11: 100449.
- [16] Zheng Y F, Li T, Zhao Y Q. *Drug Eval. Res.*(郑怡菲, 李涛, 赵余庆. 药物评价研究), **2023**, 46(11): 2496–2504.
- [17] Yang H N, Zhang B L, Zhang N, Shen X J, Sheng J, Wang X J, Zi C T. *Guangdong Chem. Ind.*(杨豪男, 张帮磊, 张宁, 沈晓静, 盛军, 王宣军, 字成庭. 广东化工), **2020**, 47(11): 87–88.
- [18] Zhang S Q, Wang Y, Lü W H, Wang Y J. *J. Hangzhou Norm. Univ.: Nat. Sci. Ed.*(张淑倩, 王玥, 吕文豪, 王永杰. 杭州师范大学学报: 自然科学版), **2024**, 23(5): 504–511.
- [19] Zhang Z B, Yu C Y, Wang H Y, Jia X B, Wu W, Pang S T, Li W, Zahoor S, Khan W, Liu Y C, Yang B, Feng L. *Food Med. Homol.*, **2025**, 2: 9420059.
- [20] Ye X S, Tian W J, Wang G H, Lin K, Zhu S X, Xia Y Y, Sun B L, Shu X J, Liu W, Chen H F. *Food Med. Homol.*, **2025**, 2: 9420033.

(责任编辑: 丁 岩)

大赛获奖选手介绍:

陆颖洁, 海军军医大学药学系讲师。研究方向为多模态分子成像技术的开发与应用。以第一作者及通讯作者在Food Chemistry、Analytical Chemistry等期刊发表SCI论文6篇, 中文核心2篇。申请专利13项, 授权8项, 授权软件著作权2项。主持国家自然科学基金青年项目(C类)1项、西南特色中药资源国家重点实验室开放基金1项。多次参加学术会议作青年论坛报告, 并获2025年上海市植物学会青年论文报告会一等奖、2024年上海市药学会青年论文报告会二等奖。曾获2022年度上海市分析测试协会科学技术奖特等奖, 校一等奖学金、优秀毕业生等荣誉称号。2025年获得分析测试青年创新大赛三等奖。

