

基于网络药理学、分子对接和实验验证探究清金益气颗粒抗疲劳作用机制

张雨航, 温 涛, 杨志华, 潘桂赞, 宋志会, 郭泽慧, 孟琪峰, 李真真, 吕清波, 王 怡*

天津中医药大学, 天津 301617

摘要: 目的 探究清金益气颗粒抗疲劳的作用及潜在作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、高通量中药实验和参考指南数据库 (HERB)、PubChem、Swiss Target Prediction 等数据库获取药物活性成分和作用靶点; 通过 GeneCards、OMIM 数据库收集疲劳的作用靶点; 利用 VENNY 2.1 获取药物与疾病交集靶点, 再联合 Cytoscape 3.9.1 软件构建药物-活性成分-疲劳交集靶点相互关系网络; 将交集靶点导入 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络并利用 DAVID 数据库对交集靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 预测清金益气颗粒抗疲劳的作用机制; 选取关键活性成分和核心靶点进行分子对接。通过负重力竭游泳实验观察小鼠负重力竭游泳时间; 非负重游泳实验测定小鼠血清乳酸 (BLA)、尿素氮 (BUN)、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、肝糖原 (LG)、肌糖原 (MG)、葡萄糖 (GLU) 等指标评价清金益气颗粒抗疲劳药效。结果 网络药理学和分子对接结果显示清金益气颗粒抗疲劳的 210 个潜在作用靶点主要富集在磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-AKT)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、缺氧诱导因子 1 (HIF-1)、叉头框蛋白 O (FoxO) 等信号通路上, 其主要活性成分和关键靶点蛋白结合能力较好。动物实验结果表明, 清金益气颗粒可通过延长小鼠负重 5% 力竭游泳时间, 降低非负重游泳小鼠血清中 BLA、BUN、MDA 水平, 增加机体 LG、MG、GLU 水平储存和 LDH、SOD、GSH-Px 活性发挥抗疲劳作用。结论 清金益气颗粒可能通过调节 PI3K-AKT、MAPK、HIF-1、FoxO 等信号通路影响机体能量代谢和氧化应激发挥抗疲劳的作用。

关键词: 清金益气颗粒; 抗疲劳; 网络药理学; 分子对接; 能量代谢; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 09-1960-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.003

Exploring mechanism of action of Qingjin Yiqi Granules against fatigue based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation

ZHANG Yuhang, WEN Tao, YANG Zhihua, PAN Guiyun, SONG Zhihui, GUO Zehui, MENG Qifeng, LI Zhenzhen, LÜ Qingbo, WANG Yi

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: **Objective** To investigate the efficacy and potential mechanism of action of Qingjin Yiqi Granules against fatigue. **Methods** The active ingredients and targets of drug action were obtained through TCM Systematic Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), High-Throughput Experimental and Reference Guide Database for Traditional Chinese Medicines (HERB), PubChem, Swiss Target Prediction, and the disease-related targets of fatigue were collected through GeneCards and OMIM databases. VENNY 2.1 was used to obtain drug-disease intersection targets, and then the drug-active ingredient-fatigue-intersection target interrelationship network was constructed in conjunction with Cytoscape 3.9.1 software. The intersecting targets were imported into the STRING database to construct a protein-protein interaction (PPI) network and the intersecting targets were analyzed for gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment using the DAVID database, to predict the anti-fatigue mechanism of Qingjin Yiqi Granules. Key active ingredients and core targets were selected for molecular docking. The mice were observed in the weight-bearing exhaustion swimming experiment, and the mice were measured in the non-weight-bearing swimming experiment for serum lactate (BLA), urea nitrogen (BUN), lactate dehydrogenase (LDH),

收稿日期: 2024-04-26

基金项目: 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-C-202203)

第一作者: 张雨航 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为方剂学。E-mail: zhyuha1616@163.com

*通信作者: 王 怡, 女, 研究员, 研究方向为心血管疾病临床与实验研究和方剂现代药理研究。E-mail: wangyi@tjutc.edu.cn

malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), liver glycogen (LG), myoglobin (MG), glucose (GLU), and so on. The efficacy of Qingjin Yiqi Granules against fatigue was evaluated. **Results** The results of network pharmacology and molecular docking showed that the 210 potential targets of anti-fatigue of Qingjin Yiqi Granules were mainly enriched in the signaling pathways such as PI3K-AKT, MAPK, HIF-1, FoxO, etc, and the binding ability of its main active ingredients and key target proteins was good. The results of animal experiments showed that Qingjin Yiqi Granules could exert anti-fatigue effects by prolonging the weight-bearing 5% exhaustion swimming time of mice, decreasing the serum content of BLA, BUN, and MDA in non-weight-bearing swimming mice, and increasing the body's LG, MG, and GLU content storage and the activities of LDH, SOD, and GSH-Px. **Conclusions** Qingjin Yiqi Granules may exert anti-fatigue effects by regulating the signaling pathways such as PI3K-AKT, MAPK, HIF-1, FoxO and other signaling pathways that affect the body's energy metabolism and oxidative stress.

Key words: Qingjin Yiqi Granules; anti-fatigue; network pharmacology; molecular docking; energy metabolism; oxidative stress

疲劳是指持久或过度劳累后造成的身体不适和工作效率减退,主要以疲乏困倦、头晕、健忘、睡眠质量下降等为临床表现^[1]。流行病学研究显示,欧洲国家疲劳的患病率为22%~38%,德国甚至高达60%,若机体长期处于疲劳状态,可影响人的正常活动,严重者引发心肌梗死等疾病,危及生命^[2]。现代医学研究表明,疲劳的发生机制与能量耗竭、代谢产物堆积、氧化应激等有关^[3-4]。抗疲劳的化学药物有咖啡因、苯丙胺、哌甲酯等大脑皮层兴奋药物,具有成瘾性^[5-6]。因此,研发“多成分、多靶点、多途径”和不良反应小、疗效确切的抗疲劳中成药具有重要意义。

清金益气颗粒由张伯礼院士团队研制而成,在天津市新型冠状病毒肺炎恢复期中西医结合康复方案中被推荐使用^[7]。由人参、麦冬、五味子、陈皮、半夏、茯苓、甘草、苍术、芦根、玄参、薏苡仁、淡竹叶、马鞭草、柴胡、黄芩、升麻组成。功在益气养阴、健脾和中、清热利湿,主治心烦意懈、干咳少痰、动后气短、倦怠乏力、舌淡少津等气阴两虚兼痰湿郁热之证。现代药理研究表明,人参、麦冬皂苷D、薏苡仁多糖、茯苓提取物羧甲基茯苓多糖通过提高运动耐力、增加糖原储备、抑制疲劳代谢产物发挥抗疲劳作用^[8-11]。五味子多糖可作用于6种代谢物和2条代谢途径缓解慢性疲劳综合征^[12]。甘草的主要活性成分18 β -甘草次酸可通过促进肌肉能量产生和抗氧化对抗高强度运动引起的疲劳^[13]。前期临床研究表明,清金益气颗粒可有效改善新型冠状病毒后症状患者的疲劳症状,但未对其具体作用机制进行深入探索^[14]。经查阅相关文献发现^[15-17],红景天被广泛用于抗疲劳研究,红景天胶囊可通过增加能量储备、提高氧化应激能力缓解机体疲劳损伤,因此选取红景天胶囊为阳性对照药。本研究通过网络药理学和分子对接技术预测其作用机制,并采

用负重力竭游泳实验和非负重游泳实验,检测小鼠负重力竭游泳时间和血清中糖酵解、能量储备、氧化应激相关指标明确清金益气颗粒抗疲劳的药效和作用机制,旨在为清金益气颗粒的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级昆明小鼠178只,雌雄各半,体质量18~22 g。购于北京斯贝福生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。小鼠饲养于天津中医药大学实验动物中心,分笼饲养,每笼5只,普通饮食,自由饮水,环境温度为(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,环境湿度为(35 $\pm$ 5)%,24 h昼夜更替。适应性饲养1周后进行分组。本研究经天津中医药大学动物实验伦理委员会批准(伦理编号:TCM-LAEC2022237)。

1.2 药品与试剂

清金益气浸膏粉供试品(批号:21012811,神威药业集团有限公司);红景天胶囊(批号:221102,规格每粒0.38 g,江苏康缘药业股份有限公司);羧甲基纤维素钠(货号:D8740,北京索莱宝科技有限公司);乳酸(BLA)、尿素氮(BUN)、乳酸脱氢酶(LDH)、肝/肌糖原(LG/MG)、葡萄糖(GLU)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂检测盒(货号分别为A019-2-1、C013-2-1、A020-2-1、A043-1-1、TC0715、A003-1-2、A001-3-2、A005-1-1,南京建成生物工程研究所有限公司);硫酸(货号为7664-93-9,天津市大茂化学试剂厂)。

1.3 仪器

A1003型电子天平(上海衡平科学仪器有限公司);Legend Micro 17型离心机(Thermo Scientific公司);XMTD-4000型恒温水浴锅(上海科恒实业发展有限公司);Empire型多功能酶标

仪(PERKInElmer 公司)。

2 方法

2.1 基于网络药理学和分子对接的清金益气颗粒抗疲劳机制预测

2.1.1 清金益气颗粒活性成分及相关靶点的筛选 根据药物口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$, 类药性(DL) ≥ 0.18 标准^[18], 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和高通量中药实验和参考指南数据库(HERB, <http://herb.ac.cn/>)收集清金益气颗粒活性成分, 同时在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Swiss Target Prediction 数据库 (<https://www.swisstargetprediction.cn>)获取清金益气颗粒中药物活性成分的作用靶点。将各药物活性成分对应的作用靶点进行汇总去重后, 导入蛋白质数据库(Uniprot, <https://www.uniprot.org>)进行标准化处理^[18]。

2.1.2 疲劳靶点检索及筛选 以“fatigue”为关键词, 分别在 GeneCards (<https://www.genecards.org>)和 OMIM (<http://www.omim.org>)等数据库筛选疲劳的潜在靶点。Genecards 数据库中靶点的 Score 值越高, 表明其与疾病相关性越大, 将 Score 大于中位数的靶点作为疲劳的潜在靶点。

2.1.3 清金益气颗粒药物-活性成分-疲劳交集靶点网络构建 把清金益气颗粒的活性成分作用靶点和疲劳的靶点上传至 Venny 2.1 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)制作韦恩图获取交集靶点, 即为清金益气颗粒抗疲劳的靶点。将清金益气颗粒活性成分和交集靶点导入 Cytoscape 3.9.1, 构建清金益气颗粒药物-活性成分-疲劳交集靶点的相互关系网络。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 将“2.1.3”项所得交集靶点导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>)进行 PPI 网络构建, 物种选择“Homo sapiens”, 相互作用阈值设为 0.4, 其余为系统默认值, 得到蛋白相互作用网络信息, 下载 TSV 格式文件, 导入 Cytoscape 3.9.1 绘制 PPI 网络图。

2.1.5 富集分析 采用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)对交集靶点进行基因本体(GO)功能和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析, 导出富集分析信息上传至微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>)进行可视化处理, 结果以柱状图和气泡图显示。

2.1.6 分子对接 通过分析清金益气颗粒抗疲劳

PPI 网络图获得排名前 6 的核心靶点蛋白, 在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>)下载核心靶点蛋白的 PDB 格式文件, 作为分子对接的受体。通过清金益气颗粒药物-活性成分-疲劳交集靶点网络图获取排名前 5 的清金益气颗粒的关键活性成分, 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载关键活性成分的 SDF 格式文件, 使用 OpenBabelGUI 软件将化合物转换为 mol2 格式, 作为分子对接的配体。使用 Autodock 4 进行分子对接, 将对接结果导入 Pymol 中绘制 3D 图像。一般认为结合能量 $< -21 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 说明配体与受体有良好的结合能力^[19]。

2.2 动物实验验证

2.2.1 实验分组及给药 178 只昆明小鼠, 雌雄各半, 随机分为 2 个亚组, 每个亚组再分为 5 组: 对照组, 清金益气颗粒低、中、高剂量 (1.215、2.430、4.860 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和红景天胶囊 (0.7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组。第 1 亚组共 65 只, 进行负重力竭游泳实验; 第 2 亚组共 113 只, 进行非负重游泳实验。所有小鼠均适应性饲养 1 周后进行实验。

使用 0.5% CMC-Na 溶液稀释药物, 小鼠按照每 10 g 体质量 ig 给药 0.2 mL, 每日 1 次, 连续给药 7 d。清金益气颗粒日服生药量为 104 g, 出膏率约 18%, 折算成小鼠每日给药中剂量为 2.430 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、低剂量和高剂量分别是中剂量的 1/2 和 2 倍, 即 1.215 和 4.860 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 阳性药红景天胶囊给药剂量参考相关文献报道^[17]为 0.7 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2.2 负重力竭游泳实验 第 1 亚组小鼠末次给药 1 h 后, 小鼠尾部后 1/3 处悬挂约自身体质量 5% 的铅丝, 轻轻放入自制圆柱形水箱中, 水深 30 cm (小鼠四肢、尾巴及重物均无法接触缸底), 水温 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 。记录小鼠自放入游泳缸到沉入水中时间 8 s 以上的持续时间, 记为小鼠负重力竭游泳时间。

2.2.3 非负重游泳实验 第 2 亚组小鼠给药第 4~6 天, 对其进行非负重游泳训练, 训练时程分别为第 4 天 30 min、第 5 天 60 min 和第 6 天 90 min, 除小鼠无负重外, 其余实验条件同负重力竭游泳实验。第 7 天, 小鼠游泳 90 min 后休息 30 min, 随即麻醉小鼠摘眼球取血, 全血于室温放置 1 h, 转移至 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 得到小鼠血清样本。处死后取小鼠肝小叶和右后侧腓肠肌组织, 用 0.9% 氯化钠溶液浸洗掉血渍, 放置于滤纸上吸干表面氯化钠溶液, 然后将组织迅速置于液氮中, 转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻保存备用。

2.2.4 血清生化指标 BLA、BUN、LDH、MDA、SOD、GSH-Px、GLU 检测 通过比色法测定血清 BLA、BUN、LDH 水平, TBA 法测定血清 MDA 水平, WST-1 法测定血清 SOD 水平, 生化法测定血清 GSH-Px 活性, 邻甲苯胺微板法测定血清 GLU 水平。

2.2.5 肝脏组织 LG 和腓肠肌组织 MG 检测 制备肝、腓肠肌组织血浆通过比色法测定 LG、MG 水平。

2.2.6 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件包进行资料分析, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 资料采用单因素方差分析 (ANOVA), 多个样本之间的两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学和分子对接结果

3.1.1 清金益气颗粒活性成分与靶点 在 TCMSP 和 Herb 数据库中检索清金益气颗粒组成药物, 共获得 337 种活性成分, 其中, 人参 22 种、麦冬 55 种、五味子 21 种、陈皮 5 种、茯苓 15 种、半夏 13 种、玄参 9 种、苍术 9 种、甘草 92 种、柴胡 17 种、升麻 17 种、薏苡仁 9 种、黄芩 36 种、马鞭草 12 种、芦根 1 种和淡竹叶 4 种。通过 TCMSP、PubChem 和 Swiss target prediction 数据库预测上述活性成分的潜在作用靶点 3 149 个, 去重处理后得到 995 个。

3.1.2 清金益气颗粒抗疲劳的潜在靶点 使用 GeneCards 数据库筛选获取疲劳相关靶点 8 743 个, 将 Score 大于中位数 2.08 的靶点作为疲劳的潜在靶点, 得到 1 124 个靶点。通过 OMIM 数据库获取疲劳潜在靶点 661 个。两个数据库汇总去重后得到 1 676 个疾病靶点。

将 995 个清金益气颗粒活性成分靶点和 1 676 个疲劳潜在靶点取交集, 得到共同靶点 210 个 (图 1)。

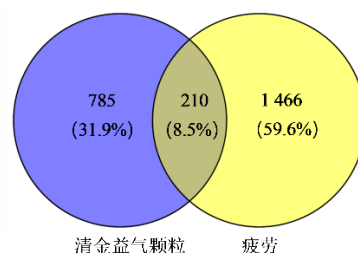


图1 清金益气颗粒与疲劳的靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of targets of Qingjin Yiqi Granules and fatigue

3.1.3 清金益气颗粒药物-活性成分-疲劳靶点网络构建 通过韦恩图和分析发现 210 个交集靶点对应清金益气颗粒的 258 个活性成分, 采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建清金益气颗粒药物-活性成分-疲劳靶点的相互关系网络 (图 2)。按照度值大小排序, 排名前 10 的活性成分有槲皮素、五味子酯乙、红门兰醇、罗布麻苷、甘乌内酯、苯代南蛇碱、南五味子木脂素 C、鲁斯可皂苷元、木犀草素、麦冬黄烷酮 E, 属于清金益气颗粒抗疲劳的关键活性成分。

3.1.4 清金益气颗粒抗疲劳潜在靶点的 PPI 网络构建 将清金益气颗粒抗疲劳的 210 个潜在靶点导入 STRING 数据库, 获取蛋白互作信息, 得到 210 个靶点的 5 021 个互作关系, 平均节点度为 47.8, 保存 TSV 格式。再将其导入 Cytoscape 3.9.1 软件分析并绘制 PPI 网络图 (图 3), 节点的大小代表度值的大

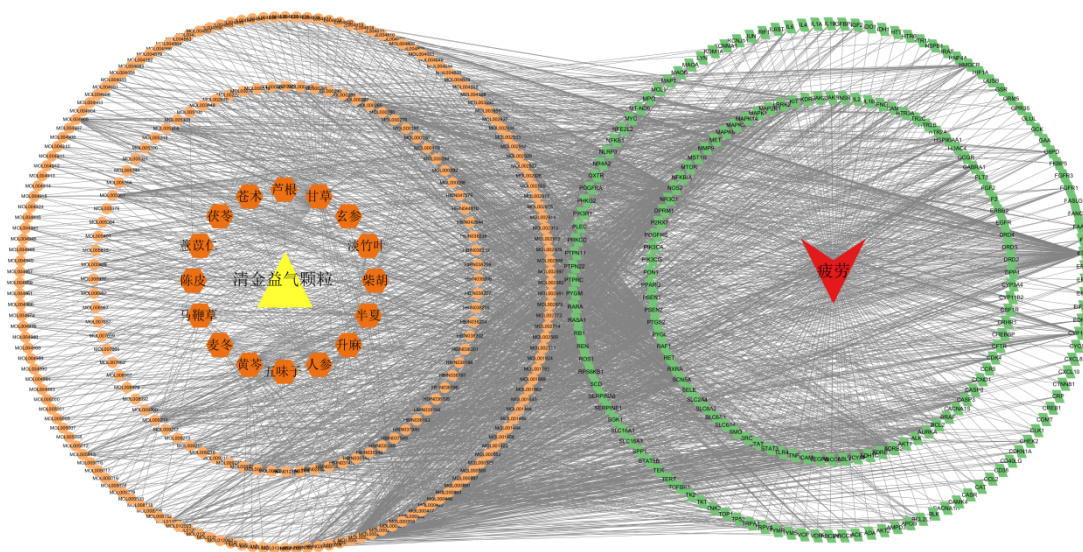


图2 药物-活性成分-疾病-靶点网络图

Fig. 2 Drug-active ingredient-disease-target network diagram

小,同时,度值越大,颜色越深,此靶点与其他靶点之间的联系越大,对疾病的影响也越大。以网络节点中的拓扑结构特征度值与中介中心度(BC)为条件,筛选出清金益气颗粒抗疲劳的关键核心靶点38个,其中,按照度值排名前10的有:AKT1、TP53、IL6、TNF、EGFR、STAT3、BCL2、IL1B、SRC、CTNNB1(图4)。

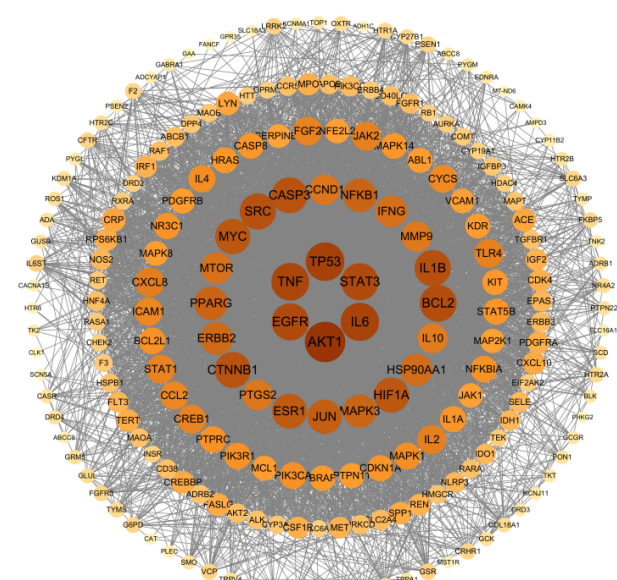


图3 清金益气颗粒抗疲劳潜在靶点的PPI网络图

Fig. 3 PPI network diagram of potential anti-fatigue targets of Qingjin Yiqi Granules

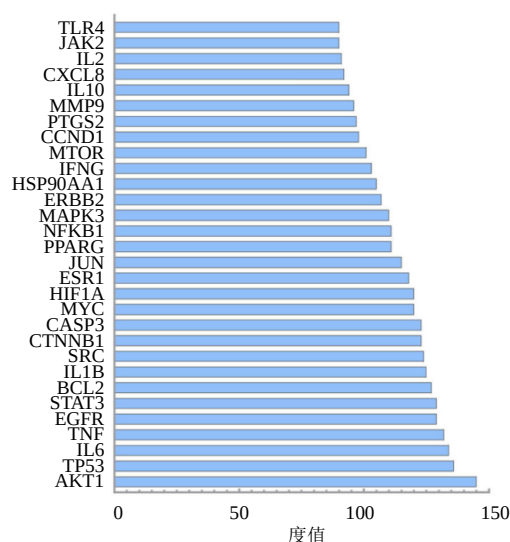


图4 度值排名前30的关键核心靶点

Fig. 4 Key core targets ranked in top 30 degree value

3.1.5 GO功能和KEGG通路富集分析 采用DAVID数据库对清金益气颗粒抗疲劳的210个靶点进行GO和KEGG富集分析。GO富集分析结果

包括生物过程(BP)945个条目、细胞成分(CC)111个条目、分子功能(MF)168个条目;KEGG富集分析结果包括174条通路。清金益气颗粒参与的BP主要包括对异生物刺激的反应、负向调节细胞凋亡过程、对ERK1和ERK2级联的正向调节等;在CC方面主要涉及质膜整体成分、质膜、受体复合物等;在MF方面主要富集于蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白质酪氨酸激酶活性、相同蛋白质结合等;选取排名前10的条目进行可视化(图5)。KEGG通路主要富集在PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路和HIF-1信号通路等。以上信号通路与能量代谢、氧化应激等有关,代表清金益气颗粒可能通过以上相关信号通路抗疲劳。选取排名前20的关键信号通路进行可视化(图6)。

3.1.6 清金益气颗粒活性成分和疲劳核心靶点的分子对接 将PPI网络图中度值排名前6的核心靶点蛋白AKT1、IL6、TNF、EGFR、TP53、STAT3与清金益气颗粒度值排名前5的关键活性成分槲皮素、五味子酯乙、红门兰醇、罗布麻苷、甘乌内酯进行分子对接。

结果显示(表1),活性成分和靶点的结合能 $\leq -21 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 说明有较好结合能力。选取结合能力最好的前4个进行分子对接,基于Pymol软件将对接结果进行可视化分析(图7)。甘乌内酯与EGFR上的氨基酸ARG-748形成1个氢键,甘乌内酯与IL6上的氨基酸ASN-213、GLN-103、GLN-101、LEU-102各形成1个氢键,甘乌内酯与TP53上的氨基酸TRP-1580形成1个氢键,槲皮素与TP53上的氨基酸GLU-1543、ARG-1595、GLN-1599各形成2个氢键,与氨基酸TYR-1600形成1个氢键。

3.2 动物实验结果

3.2.1 清金益气颗粒对负重5%力竭游泳小鼠力竭游泳时间的影响 与对照组相比,清金益气颗粒低、中、高剂量组和红景天胶囊组小鼠力竭游泳时间均显著延长($P < 0.01$)。见表2。

3.2.2 清金益气颗粒对非负重游泳小鼠血清糖酵解相关指标的影响 与对照组相比,清金益气颗粒低、中、高剂量组和红景天胶囊组小鼠血清BLA和BUN水平均降低,LDH活性升高。其中,清金益气颗粒低剂量组BLA水平显著降低($P < 0.05$);中剂量组BLA水平显著降低($P < 0.01$),BUN水平显著降低($P < 0.05$);高剂量组BLA和BUN水平显著降低($P < 0.01$);红景天胶囊组BLA水平显著降低($P < 0.01$)。见表3。

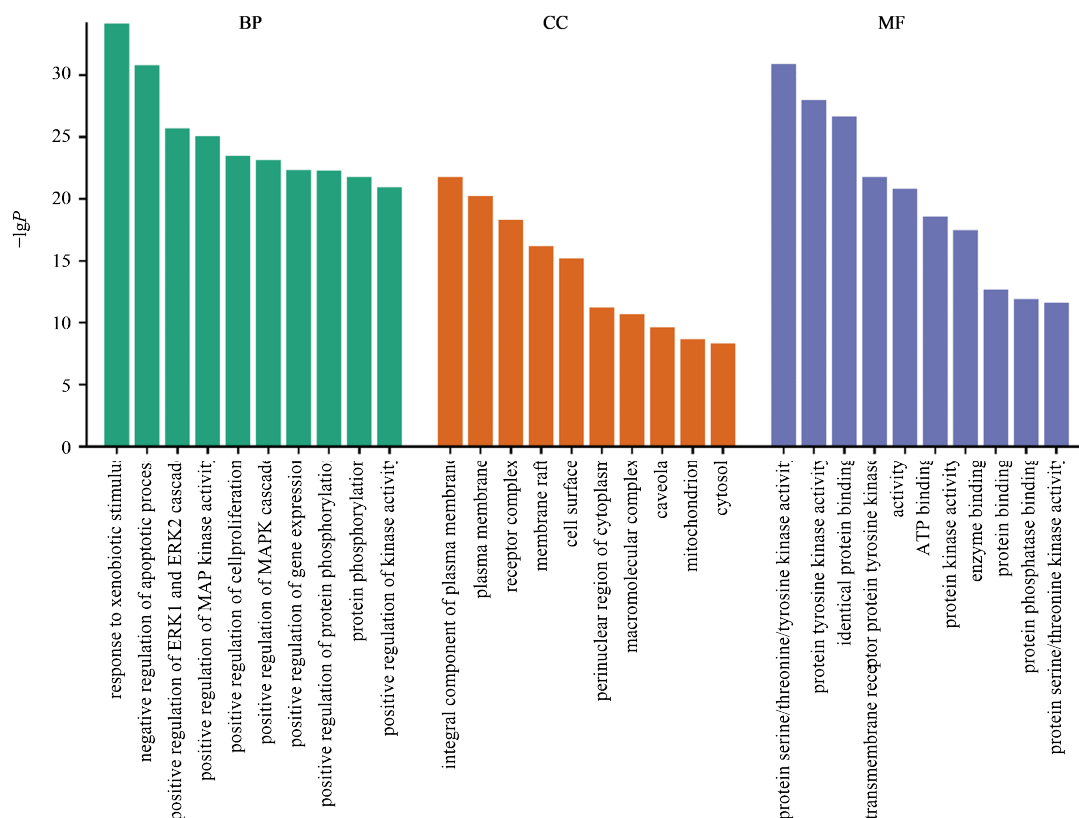


图5 清金益气颗粒抗疲劳的GO富集分析BP、CC和MF

Fig. 5 GO enrichment analyses of BP, CC and MF of Qingjin Yiqi Granules against fatigue

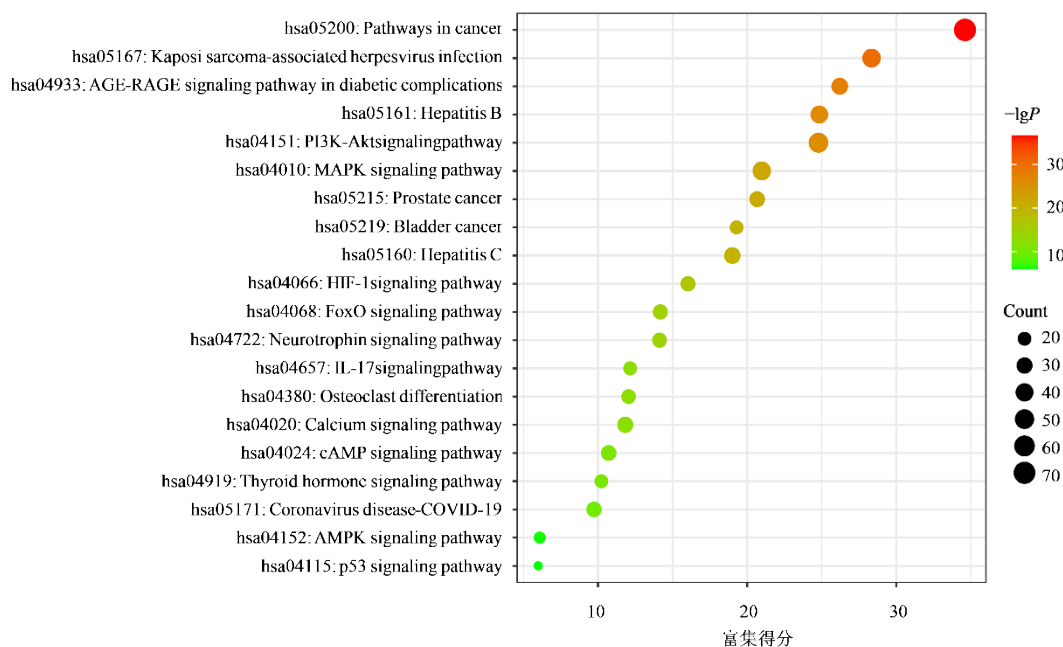


图6 清金益气颗粒抗疲劳的KEGG富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of Qingjin Yiqi Granules against fatigue

3.2.3 清金益气颗粒对非负重游泳小鼠肝、腓肠肌组织和血清中能量储备相关指标 LG、MG 及 GLU 水平的影响 与对照组相比,清金益气颗粒低、中、高剂量组和红景天胶囊组小鼠 LG、MG、GLU 水平

均升高。其中,清金益气颗粒中剂量组 GLU 水平显著升高($P<0.05$);清金益气颗粒高剂量组 LG、MG 和 GLU 水平显著升高($P<0.05, 0.01$);红景天胶囊组 GLU 水平显著升高($P<0.05$)。见表4。

表 1 清金益气颗粒关键活性成分和核心靶点蛋白分子对接结合能分数

Table 1 Molecular docking binding energy scores of key active ingredients and core target proteins of Qingjin Yiqi Granules

活性成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)					
	AKT1	TP53	IL6	TNF	EGFR	STAT3
槲皮素	-7.27	-28.60	-19.61	-13.23	-13.48	-13.44
五味子酯乙	-8.23	-12.56	-19.28	-10.12	-13.27	-10.54
红门兰醇	-9.16	-19.11	-16.80	-13.57	-17.47	-12.89
罗布麻苷	-6.80	-20.08	-20.62	-15.25	-19.74	-14.41
甘乌内酯	-14.70	-29.19	-24.74	-21.84	-23.31	-19.11

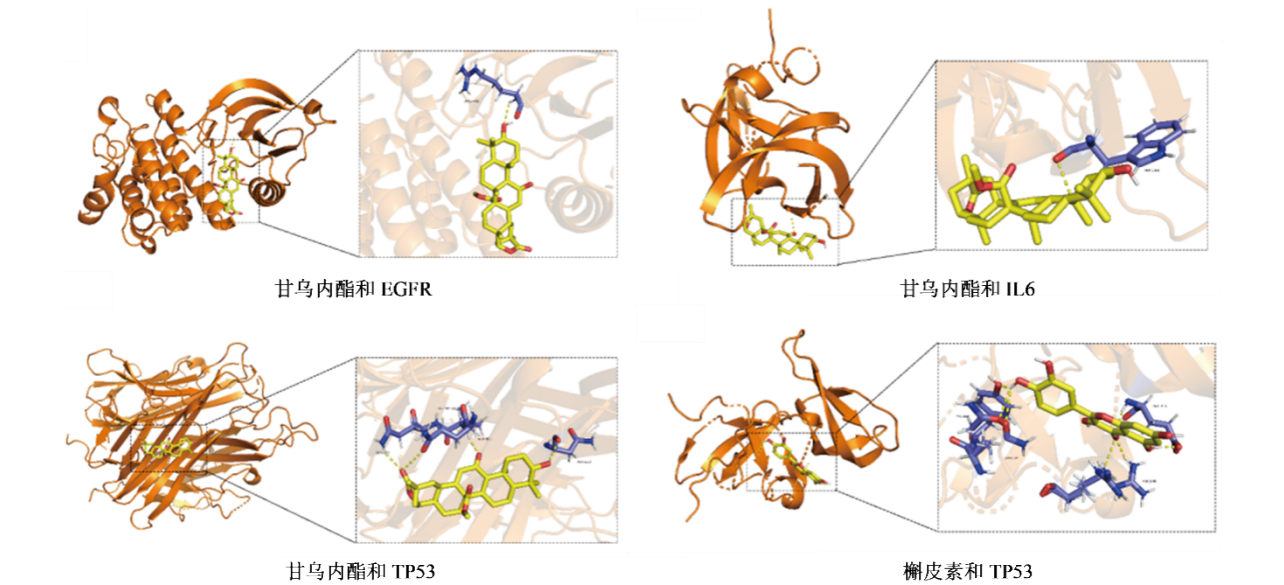


图 7 关键活性成分与核心靶点蛋白的分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram of key active ingredients with core target proteins

表 2 清金益气颗粒对负重 5% 小鼠力竭游泳时间的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Qingjin Yiqi Granules on duration of forceful swimming in mice swimming at 5% forcefulness with weight bearing($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	力竭游泳时间/min
对照	—	12	13.69±2.19
清金益气颗粒	1.215	13	21.20±5.07**
	2.430	13	21.32±5.09**
	4.860	13	24.96±5.73**
红景天胶囊	0.700	14	25.70±7.02**

与对照组比较:** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

3.2.4 清金益气颗粒对非负重游泳小鼠血清氧化应激反应的影响 与对照组相比,清金益气颗粒低、中、高剂量组和红景天胶囊组小鼠 MDA 水平均降低,SOD、GSH-Px 活性均升高。其中,清金益气颗粒低、中剂量组 SOD 活性显著升高($P < 0.01$);清金益气颗粒高剂量组和红景天胶囊组 MDA 水平降

低($P < 0.05$),SOD、GSH-Px 活性显著升高($P < 0.01$)。结果见表 5。

4 讨论

疲劳常发生在剧烈运动之后,可通过休息等方式自行缓解;也可作为许多疾病的常见症状出现,如新型冠状病毒感染后状态、间质性肺疾病、糖尿病、急性高原病等,在不使用药物等方法干预的情况下无法自行消除,严重者会影响人的生活质量和工作效率^[20-21]。网络药理学结果显示,清金益气颗粒通过多成分、多靶点、多通路发挥抗疲劳作用。本文通过构建药物-活性成分-疲劳-靶点网络图发现,槲皮素、木犀草素等是清金益气颗粒发挥抗疲劳作用的物质基础。研究表明,木犀草素具有较强的抗氧化作用^[22],槲皮素可通过降低 MDA 水平、增加 SOD 活性,发挥抗氧化作用,提高运动耐力,从而抗疲劳^[23-24]。

PPI 网络图分析,AKT1、TP53 等为清金益气颗粒抗疲劳的关键核心靶点。AKT1 在机体组织中广

表 3 清金益气颗粒对非负重游泳小鼠血清糖酵解相关指标的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effects of Qingjin Yiqi Granules on serum glycolysis-related indexes in non-weight-bearing swimming mice($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	BLA/(mmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	LDH/(U·mL ⁻¹)
对照	—	22	14.38±2.98	15.90±1.96	2.66±0.51
清金益气颗粒	1.215	23	12.82±1.52*	15.06±2.05	2.73±0.36
	2.430	23	12.67±1.58**	14.41±2.56*	2.80±0.43
	4.860	23	12.15±2.02**	13.92±1.33**	2.82±0.34
红景天胶囊	0.700	22	11.55±2.06**	14.90±1.66	2.80±0.46

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

表 4 清金益气颗粒对非负重游泳小鼠肝、腓肠肌组织和血清中能量储备相关指标 LG、MG 及 GLU 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effects of Qingjin Yiqi Granules on content of LG, MG and GLU, energy reserve related indexes in liver and gastrocnemius muscle tissues and serum of non-weight-bearing swimming mice($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	LG/(mg·g ⁻¹)	MG/(mg·g ⁻¹)	GLU/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	22	6.60±1.67	0.96±0.26	7.00±1.32
清金益气颗粒	1.215	23	6.79±1.88	1.03±0.16	7.38±1.21
	2.430	23	6.92±2.07	1.08±0.23	8.15±1.83*
	4.860	23	8.00±2.50*	1.14±0.19**	8.61±1.56**
红景天胶囊	0.700	22	7.40±2.13	1.06±0.19	7.87±1.33*

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

泛表达,对于维持葡萄糖稳态和促进生长发育具有重要作用^[25]。TP53 可影响 ATP 的合成,调节机体能量代谢^[26]。

富集分析显示,清金益气颗粒抗疲劳的潜在作用机制包括 PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路等,涉及能量代谢、氧化应激等机制。PI3K-Akt 信号通路与葡萄糖代谢密切相关,GSK-3 是 Akt 调控的重要下游分子,在维持体内葡萄糖稳态中发挥重要作用,磷酸化的 Akt 通过调控 GSK-3 的活性影响机体的糖代谢功能^[27]。研究表明,碳水化合物可通过激活 PI3K/Akt/GSK-3 信号通路,影响糖原合成,从而改善大鼠过度训练后体能下降的状态^[28]。MAPK 信号通路在维持机体氧化-抗氧化动态平衡发挥重要作用^[29]。

表 5 清金益气颗粒对非负重游泳小鼠血清氧化应激反应的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effects of Qingjin Yiqi granules on serum oxidative stress in non-weight-bearing swimming mice($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n/只	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	22	4.42±1.55	50.20±5.03	454.80±81.37
清金益气颗粒	1.215	23	4.27±1.83	54.04±4.29**	488.58±70.03
	2.430	23	3.64±1.56	54.85±3.99**	502.77±79.97
	4.860	23	3.44±1.28*	57.13±4.24**	543.99±74.91**
红景天胶囊	0.700	22	3.45±1.20*	54.63±4.50**	567.60±86.99**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

研究指出,姜黄素可通过调控 MAPK 通路,减轻过度训练所致的骨骼肌氧化应激损伤,从而改善大鼠运动疲劳状态^[30]。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成的异二聚体,介导机体对低氧适应的重要调节因子,剧烈运动时引发的低氧可影响 HIF-1 α 高表达,抗氧化蛋白表达量随之增加,从而提高小鼠高强度运动状态时的耐力水平^[31]。FoxO 转录因子是 Forkhead 蛋白家族的 1 个亚群,在哺乳动物细胞中有 4 个基因编码:FoxO1、FoxO3、FoxO4、FoxO6,

在抗氧化应激方面发挥重要作用^[32]。研究发现,FoxO1 和 FoxO4 可通过调控组织细胞的抗氧化能力影响慢性疲劳综合征孕鼠的胎盘结构^[33]。此外,利用分子对接技术对清金益气颗粒的主要活性成分与核心靶点进行对接验证,结果显示,来源于甘草的槲皮素、甘乌内酯与关键核心靶点 TP53、IL-6、EGFR 结合力较高,说明清金益气颗粒具有较好的抗疲劳作用。

动物实验中评价药物是否具有抗疲劳效果的

方法包括运动耐力实验和生化指标测定^[34]。负重力竭游泳实验是评价动物运动耐力的经典实验^[35]。本研究结果显示,清金益气颗粒可显著延长小鼠负重5%力竭游泳时间,表明清金益气颗粒具有抗疲劳作用。糖、脂肪、蛋白质是机体的3大供能物质。糖在体内可分为葡萄糖、肝糖原和肌糖原3种形式^[36]。当机体剧烈运动时,代谢活动增强,首先会大量消耗体内的糖类物质。有研究表明,疲劳的发生常伴随着肝糖原、肌糖原的耗竭和血糖水平的降低^[4, 37]。增加机体肝糖原、肌糖原储备和血糖水平可提高运动耐力水平。同时,长时间剧烈运动导致机体对氧和能量的需求剧增,糖的有氧氧化途径减弱,无氧酵解和蛋白质代谢随之增强,产生乳酸、尿素氮等代谢产物,从而导致疲劳^[38]。因此,乳酸和尿素氮可反映机体的疲劳程度。LDH作为一种清除乳酸的酶类物质,可反映机体的抗疲劳能力^[17]。本研究结果发现,清金益气颗粒可通过降低非负重游泳小鼠血清中BLA、BUN水平,增加机体LG、MG、GLU储存和LDH水平发挥抗疲劳作用。有研究显示,氧化应激是导致疲劳发生的另一个重要机制^[4]。短时间剧烈运动时,会产生过量的自由基引起机体损伤;SOD和GSH-Px是机体主要的抗氧化酶,可减轻机体氧化损伤;MDA作为主要的脂质过氧化产物,间接反映组织损伤的程度^[39]。有研究表明可通过提高SOD和GSH-Px酶水平和减少MDA水平减轻机体疲劳^[40]。本研究结果也证实清金益气颗粒可显著增加SOD和GSH-Px酶的活性和减少MDA水平发挥抗疲劳作用。

根据《保健食品功能学评价程序和检验方法》,若一项或一项以上的耐力运动实验(负重游泳和爬杆)和两项或两项以上的生化指标(血乳酸、血清尿素氮、肝/肌糖原等)为阳性,即可判定受试物具有抗疲劳活性。综合以上运动耐力实验和血清生化指标测定结果,可认为清金益气颗粒有明显的抗疲劳作用,其潜在作用机制与能量代谢、氧化应激有关,这与网络药理学预测结果相一致。证明了清金益气颗粒治疗疲劳具有多成分、多靶点、多通路的特点,为清金益气颗粒的进一步开发和临床应用提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周宝宽. 中医对疲劳的认识 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(11): 2385-2387.
- [2] Maisel P, Baum E, Donner-Banzhoff N. Fatigue as the chief complaint-epidemiology, causes, diagnosis, and treatment [J]. Dtsch Arztebl Int, 2021, 118(33/34): 566-576.
- [3] Glaister M. Multiple sprint work: Physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness [J]. Sports Med, 2005, 35(9): 757-777.
- [4] Zhang X Y, Jing S, Lin H J, et al. Anti-fatigue effect of anwulignan via the NRF2 and PGC-1 α signaling pathway in mice [J]. Food Funct, 2019, 10(12): 7755-7766.
- [5] Saimaiti A, Zhou D D, Li J H, et al. Dietary sources, health benefits, and risks of caffeine [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(29): 9648-9666.
- [6] Liang M, Zhu L, Wang R, et al. Methamphetamine exposure in adolescent impairs memory of mice in adulthood accompanied by changes in neuroplasticity in the dorsal hippocampus [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 892757.
- [7] 天津市新型冠状病毒肺炎恢复期中西医结合康复方案(试行) [J]. 天津中医药, 2022, 39(3): 275-277.
Tianjin novel coronavirus rehabilitation program of integrated traditional Chinese and western medicine in recovery period (trial) [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2022, 39(3): 275-277.
- [8] Zhang G L, Lu B F, Wang E H, et al. *Panax ginseng* improves physical recovery and energy utilization on chronic fatigue in rats through the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2023, 61(1): 316-323.
- [9] 沈宁宁, 刘昱甫, 茹毅, 等. 麦冬皂苷D对小鼠力竭游泳抗疲劳作用的研究 [J]. 中国药物警戒, 2023, 20(7): 749-753.
Shen N N, Liu Y F, Ru Y, et al. Antifatigue effect of ophiopogonin D on exhaustive swimming in mice [J]. Chin J Pharmacovigil, 2023, 20(7): 749-753.
- [10] 肖志勇. 薏苡仁多糖对小鼠缓解体力疲劳作用研究 [J]. 中国医药指南, 2010, 8(8): 38-40.
Xiao Z Y. Study on anti-fatigue effect of coixan polysaccharide in mice [J]. Guide China Med, 2010, 8(8): 38-40.
- [11] 符辉, 吴奇辉, 王广兰, 等. 羧甲基茯苓多糖抗疲劳作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(3): 403-406.
Fu H, Wu Q H, Wang G L, et al. Anti-fatigue effect of carboxymethyl-pachyman [J]. Nat Prod Res Dev, 2014, 26(3): 403-406.
- [12] Chi A P, Zhang Y, Kang Y J, et al. Metabolic mechanism of a polysaccharide from *Schisandra chinensis* to relieve

- chronic fatigue syndrome [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 93(Pt A): 322-332.
- [13] Ma X, Chen H, Cao L X, et al. 18 β -glycyrrhetic acid improves high-intensity exercise performance by promoting glucose-dependent energy production and inhibiting oxidative stress in mice [J]. Phytother Res, 2021, 35(12): 6932-6943.
- [14] Pang W T, Yang F W, Zhao Y B, et al. Qingjin Yiqi Granules for post-COVID-19 condition: A randomized clinical trial [J]. J Evid Based Med, 2022, 15(1): 30-38.
- [15] Wei W, Li Z P, Zhu T, et al. Anti-fatigue effects of the unique polysaccharide marker of *Dendrobium officinale* on BALB/c mice [J]. Molecules, 2017, 22(1): 155.
- [16] Dun Y S, Liu S X, Zhang W L, et al. Exercise combined with *Rhodiola sacra* supplementation improves exercise capacity and ameliorates exhaustive exercise-induced muscle damage through enhancement of mitochondrial quality control [J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017: 8024857.
- [17] 王艺博, 王峰, 肖智勇, 等. 大株红景天胶囊提高小鼠耐常压缺氧能力和抗疲劳作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(6): 420-426.
- Wang Y B, Wang F, Xiao Z Y, et al. Large plant *Rhodiola capsulae* improve normobaric hypoxia tolerance and anti-fatigue action in mice [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2021, 35(6): 420-426.
- [18] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [19] Li X, Wei S, Niu S, et al. Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis [J]. Comput Biol Med, 2022, 144: 105389.
- [20] Oliva Ramirez A, Keenan A, Kalau O, et al. Prevalence and burden of multiple sclerosis-related fatigue: A systematic literature review [J]. BMC Neurol, 2021, 21(1): 468.
- [21] 杨言言, 李惠珍, 艾志福, 等. 中药防治疲劳作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(7): 2309-2318.
- Yang Y Y, Li H Z, Ai Z F, et al. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of fatigue [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(7): 2309-2318.
- [22] 郭静, 王浩然, 沈周媛, 等. 3种竹叶抗氧化有效成分分析 [J]. 中成药, 2019, 41(11): 2688-2694.
- Guo J, Wang H R, Shen Z Y, et al. Analysis of antioxidant effective components in three kinds of bamboo leaves [J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(11): 2688-2694.
- [23] 蔡文锋. 植物型运动饮料对运动员运动性疲劳的缓解作用 [J]. 食品研究与开发, 2021, 42(22): III-IV.
- Cai W F. Alleviating effect of plant-based sports drinks on athletes' sports fatigue [J]. Food Res Dev, 2021, 42(22): III-IV.
- [24] 余良昆, 李勇, 钟发明, 等. 槲皮素调控 Nrf2/HO-1 信号通路抗氧化应激的机制研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2023, 35(6): 78-82, 88.
- Yu L K, Li Y, Zhong F M, et al. Quercetin regulates Nrf2/HO-1 signaling pathway against oxidative stress [J]. J Jiangxi Univ Chin Med, 2023, 35(6): 78-82, 88.
- [25] 孙冠聪, 焦丹, 谢忠奎, 等. PI3K/AKT 通路在动物葡萄糖代谢中的研究进展 [J]. 生命科学, 2021, 33(5): 653-666.
- Sun G C, Jiao D, Xie Z K, et al. Research progress of PI3K/AKT pathway in animal glucose metabolism [J]. Chin Bull Life Sci, 2021, 33(5): 653-666.
- [26] 邵月. P53 调节细胞信号转导通路的运动适应性研究 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(16): 4697-4699.
- Shao Y. Study on exercise adaptability of P53 regulating cell signal transduction pathway [J]. Chin J Gerontol, 2014, 34(16): 4697-4699.
- [27] Xie Y B, Shi X F, Sheng K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review) [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(2): 783-791.
- [28] Coutinho de Oliveira C V, Barbosa C V, Massa N M, et al. Carbohydrate supplementation attenuates decrement in performance in overtrained rats [J]. Physiol Appl Nutr Metab, 2016, 41(1): 76-82.
- [29] 罗则华, 杜倩, 奚鑫, 等. 基于网络药理学的淫羊藿抗疲劳作用机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2997-3004.
- Luo Z H, Du Q, Xi X, et al. Mechanism of anti-fatigue of *Epimedium Folium* based on network pharmacology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(11): 2997-3004.
- [30] 李影, 郭标. 姜黄素改善过度训练所致的骨骼肌氧化应激损伤及运动疲劳的研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 5(22): 2887-2889.
- Li Y, Guo B. Effect of curcumin on oxidative stress injury and exercise fatigue of skeletal muscle induced by overtraining [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 5(22): 2887-2889.
- [31] 王林佳, 张纓. 一次性力竭运动对 HIF-1 α 转基因鼠骨骼肌 Nrf2 抗氧化信号的影响 [J]. 体育科学, 2018, 38(11): 60-65.
- Wang L J, Zhang Y. Effects of acute exhaustive exercise

- on the antioxidant signal of Nrf2 in skeletal muscle of HIF-1 α transgenic mice [J]. China Sport Sci, 2018, 38 (11): 60-65.
- [32] 迟毓婧, 李晶, 管又飞, 等. PI3K-Akt信号传导通路对糖代谢的调控作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(10): 879-885.
- Chi Y J, Li J, Guan Y F, et al. PI3K/Akt signaling axis in regulation of glucose homeostasis [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2010, 26(10): 879-885.
- [33] 赵海, 吴延军, 吴曙光, 等. 慢性疲劳综合征孕鼠胎盘细胞增殖、凋亡情况及其分子机制探讨 [J]. 中国现代医药杂志, 2020, 22(9): 1-6.
- Zhao H, Wu Y J, Wu S G, et al. Exploring the proliferation and apoptosis of placental cells and its mechanisms in pregnant mice with chronic fatigue syndrome [J]. Mod Med J China, 2020, 22(9): 1-6.
- [34] 李鹏飞, 李志鹏, 于婷, 等. 杏鲍菇多糖抗疲劳作用的研究 [J]. 延边大学学报 (自然科学版), 2014, 40(2): 177-181.
- Li P F, Li Z P, Yu T, et al. Study on anti-fatigue effect of *Pleurotus eryngii* polysaccharides [J]. J Yanbian Univ Nat Sci Ed, 2014, 40(2): 177-181.
- [35] 林松毅, 刘静波, 程胜, 等. 抗疲劳功能食品的综合评价方法研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(2): 178-181.
- Lin S Y, Liu J B, Cheng S, et al. Methods of evaluating anti-fatigue functional food comprehensively with multi-targets [J]. J Shenyang Agric Univ, 2007, 38(2): 178-181.
- [36] 马莉. 红景天苷抗疲劳作用及其机制的实验研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
- Ma L. Experimental study on anti-fatigue effect and mechanism of salidroside [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2006.
- [37] 王佳. 人参多糖抗疲劳和抗抑郁作用及其机制的研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2010.
- Wang J. Study on anti-fatigue and anti-depression effects of ginseng polysaccharide and its mechanism [D]. Changchun: Northeast Normal University, 2010.
- [38] 郭时印. 辣椒素抗疲劳作用及其机理研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- Guo S Y. Study on anti-fatigue effect and mechanism of capsaicin [D]. Changsha: Central South University, 2009.
- [39] Zhou Y P, Chu Z X, Luo Y, et al. Dietary polysaccharides exert anti-fatigue functions via the gut-muscle axis: Advances and prospectives [J]. Foods, 2023, 12(16): 3083.
- [40] Kim J H, Cho H D, Won Y S, et al. Anti-fatigue effect of *Prunus mume* vinegar in high-intensity exercised rats [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1205.

[责任编辑 齐静雯]