

## 基于网络药理学、分子对接及动物实验探讨防己黄芪汤抗疲劳的作用机制

李茹超, 吴韩锦, 石檬涯, 邵 娴, 陆 琳, 林 萍, 方 芳, 杨丽霞\*  
绍兴市人民医院, 浙江 绍兴 312000

**摘要:** 目的 基于网络药理学、分子对接技术及动物实验, 探讨防己黄芪汤抗疲劳的作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 和 HERB 数据库以及文献检索, 获取防己黄芪汤的活性成分; 利用 TCMSP 数据库和 Swiss Target Prediction 平台确定其作用靶点, 并通过 Uniprot 数据库对靶点进行标准化处理; 以 Genecards 数据库获取疲劳主要靶点; 从 Venny 2.1.0 获取防己黄芪汤与疲劳的交集靶点后, 将其导入 STRING 11.0 平台进行蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 分析, 并利用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 网络进行可视化处理; 利用 Metascape 平台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) 分析; 借助 Cytoscape 3.9.1 软件构建“药物-成分-靶点”网络图; 使用 Auto Dock Tools 1.5.6 软件对活性成分与靶点进行分子对接; 构建疲劳大鼠模型, 并通过动物实验验证防己黄芪汤抗疲劳的作用机制。**结果** 获得防己黄芪汤活性成分 156 个, 相应靶点 889 个; 获得疲劳靶点 849 个; 将疾病靶点与活性成分相关靶点取交集, 获得防己黄芪汤抗疲劳的潜在作用靶点 197 个。从防己黄芪汤中筛选出槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、白桦脂酸等主要活性成分, SRC 原癌基因 (SRC)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸 3-激酶催化亚基  $\alpha$  (PIK3CA)、磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1) 等 4 个核心靶点。KEGG 富集通路主要包括磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt)、缺氧诱导因子 1 (HIF-1)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE (AGE-RAGE in diabetic complications) 等信号通路。分子对接显示关键活性成分与核心靶点具有强烈的结合活性。动物实验显示, 防己黄芪汤及阳性对照组可提升疲劳大鼠力竭游泳时间、体质量、脾脏及胸腺指数, 改善大鼠尿素 (UREA)、乳酸 (LA)、肌酸激酶 (CK)、血尿素氮 (BUN)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 及肌纤维形态改变、肌细胞损伤及退化情况, 并通过上调疲劳大鼠肌肉组织中 PI3K、Akt 的表达量, 下调 p-PI3K、p-Akt、SRC、STAT3 的表达量从而调控 PI3K/Akt 信号通路, 以防己黄芪汤高剂量组效果最为显著。**结论** 初步提示防己黄芪汤的核心活性成分槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇及白桦脂酸等可能通过调节氧化应激及能量代谢, 作用于 SRC、STAT3、PIK3CA、PIK3R1 等核心靶点及 PI3K/Akt 信号通路发挥抗疲劳的作用。

**关键词:** 防己黄芪汤; 抗疲劳; 网络药理学; PI3K/Akt 信号通路; 白桦脂酸; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)04-1220-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.04.012

## Mechanism of Fangji Huangqi Decoction in anti-fatigue based on network pharmacology, molecular docking, and animal experiments

LI Ruchao, WU Hanjin, SHI Mengya, SHAO Xian, LU Lin, LIN Ping, FANG Fang, YANG Lixia  
Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Fangji Huangqi Decoction in anti-fatigue based on network pharmacology, molecular docking, and animal experiments. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) and HERB databases, as well as literature searches, was used to obtain the active ingredients of Fangji Huangqi Decoction. Acquire the target sites from the TCMSP database and the Swiss Target Prediction platform, and standardize the target sites through the UniProt database. The main targets for fatigue were obtained from the Genecards database. After obtaining the intersection targets of Fangji Huangqi Decoction and fatigue using Venny 2.1.0, they were imported into the STRING 11.0 platform for protein-protein interaction (PPI) analysis. The PPI network was then visualized using Cytoscape 3.9.1 software. Enrichment analysis of GO functions and KEGG pathways for intersecting targets was conducted using the Metascape platform database. Construct the “drug-component-target”

收稿日期: 2025-11-26

基金项目: 浙江省自然科学基金探索项目 (LB24H290001); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2025KY1653); 绍兴市科学技术局 (2024A14033); 绍兴市卫生健康科技计划 (2022KY007)

作者简介: 李茹超, 硕士研究生, 研究方向为方剂的现代药理作用及其物质基础。E-mail: 724618327@qq.com

\*通信作者: 杨丽霞, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中药分子生物学机制。E-mail: rmyy04224@usx.edu.cn

network diagram using Cytoscape 3.9.1 software. The active ingredients were docked with the target using AutoDock Tools version 1.5.6 software. Establish a fatigue rat model and validate the anti-fatigue mechanism of Fangji Huangqi Decoction through animal experiments. **Results** A total of 156 active ingredients were obtained from Fangji Huangqi Decoction, corresponding to 889 targets; A total of 849 targets were also related to fatigue. By intersecting disease targets with targets related to active ingredients, a total of 197 potential anti-fatigue targets of Fangji Huangqi Decoction were identified. The primary active components isolated from Fangji Huangqi Decoction include quercetin,  $\beta$ -sitosterol, and mairin (betula platyphylla fatty acid). The top four core targets identified were the SRC proto-oncogene (SRC), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), and phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1). The KEGG enriched pathways mainly include the PI3K-Akt signaling pathway (PI3K-Akt signaling pathway), HIF-1 signaling pathway (HIF-1 signaling pathway), AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications), and other signaling pathways. Molecular docking reveals that the key active ingredients demonstrate strong binding affinity to the core target. Animal experiments have shown that both Fangji Huangqi Decoction and the positive control group can extend the exhaustive swimming time, increase body weight, and enhance spleen and thymus indices in fatigued rats. Additionally, they improved levels of urea (UREA), lactic acid (LA), creatine kinase (CK), blood urea nitrogen (BUN), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), as well as mitigated morphological changes in muscle fibers, myocyte damage, and degeneration. By upregulating the expression of PI3K and Akt while downregulating p-PI3K, p-Akt, SRC, and STAT3 in the muscle tissues of fatigued rats, they regulated the PI3K/Akt signaling pathway. The high-dose group of Fangji Huangqi Decoction demonstrated the most significant effects. **Conclusion** In summary, this study initially indicates that the principal active compounds of Fangji Huangqi Decoction, such as quercetin,  $\beta$ -sitosterol, and betula platyphylla fatty acids, may exert anti-fatigue effects by regulating oxidative stress and energy metabolism, targeting core elements including SRC, STAT3, PIK3CA, PIK3R1, and the PI3K/Akt signaling pathway.

**Key words:** Fangji Huangqi Decoction; anti-fatigue; network pharmacology; PI3K/Akt signaling pathway; betula platyphylla; oxidative stress

疲劳是长时间或过度劳累引发的身体与精神不适状态,常导致工作及生活效率降低。它主要表现为身体与心理症状,如疲倦、困倦、头晕、记忆力衰退、注意力难集中、睡眠质量下降等。这些症状可能劳累后立即出现,也可能一段时间后逐步显现,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。现代医学认为疲劳发生机制主要集中在能量耗尽、代谢产物积聚、氧化应激等相关因素。在探讨抗疲劳化学药物时,咖啡因、苯丙胺、哌甲酯等中枢神经系统兴奋剂被广泛研究。这些药物作用于大脑皮层,能够提高警觉性和注意力,但它们具有潜在的成瘾性。因此,开发“多成分、多靶点、多途径”,且不良反应较低、疗效确切的抗疲劳中药,具有重要的研究意义。

在中医理论中,疲劳被归属于“虚损”这一范畴,它涉及到人体的多种生理功能的不足和虚弱,病位涉肝、心、脾、肾等脏腑,其中以脾脏为主。脾居中焦,为后天之本,气血生化之源,主运化水谷精微,是人体能量代谢的重要器官。因此,在治疗疲劳症状时,中医往往会从调理脾胃入手,通过健脾益气、祛湿化浊等方法,恢复脾胃的运化功能,提高机体的抗疲劳能力,从而改善疲劳症状、恢复

整体健康状态。防己黄芪汤益气健脾、利水消肿,为中医经典名方,由防己、黄芪、白术、甘草、生姜、大枣组成<sup>[1-2]</sup>。相关研究表明,黄芪水提物能够通过缓解氧化应激、促进牛磺酸及亚牛磺酸代谢、激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路以及核因子 E2 相关因子 2/血红素氧合酶-1 (Nrf2/HO-1) 抗氧化途径,发挥其抗疲劳效应<sup>[3]</sup>。白术中白术多糖能够显著延长小鼠负重游泳的持续时间,并且能够显著提高小鼠血清中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力,同时降低丙二醛 (MDA) 含量,具有显著的抗疲劳效果<sup>[4]</sup>。甘草中异甘草素能够调节过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 和雌激素受体相关受体  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) 这 2 种关键蛋白的表达和活性,发挥其抗疲劳和抗氧化应激的作用<sup>[5]</sup>。生姜中的生姜多糖 (ZOPA) 及其纯化的 ZOPA-1 能够激活 Keap1-Nrf2/抗氧化反应元件通路 (Keap1-Nrf2/ARE) 和腺苷酸激活蛋白激酶/过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子 1 $\alpha$  (AMPK/PGC-1 $\alpha$ ) 信号通路,增强糖原储存、提高抗氧化能力、减少代谢废物的积累以及调节腓肠肌中的能量代谢,从而发挥抗疲劳作用<sup>[6]</sup>。大枣中大枣多糖能够显著延长小鼠的游泳时长,降低小鼠体

内血乳酸 (LA) 与血尿素氮 (BUN) 的含量, 提升小鼠体内肝糖原和肌糖原的含量, 具备较强的抗氧化与抗疲劳功效<sup>[7]</sup>。本研究通过网络药理学和分子对接技术预测其作用机制, 并采用动物实验探索防己黄芪汤抗疲劳的相关靶点、通路和作用机制, 为其临床应用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 42 只, 体质量 (180±20) g, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物许可证号 SCXK (沪) 2022-0004。大鼠分笼饲养于绍兴市人民医院动物房, 自由饮水饮食, 勤换垫料。所有实验程序均经绍兴市人民医院生物医学伦理委员会批准 (批准号 2025Z040)。

### 1.2 药品与试剂

防己 *Stephania tetrandra* S. Moore、黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao、白术 *Atractylodes Macrocephala* Koidz、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 均购自绍兴市人民医院中医科, 由该院主管中医师周旭峰鉴定为正品。红景天口服液 (批号 210904), 购于西藏藏药集团股份有限公司。PI3-kinase p85 $\alpha$  兔多克隆抗体 (ES1494)、Akt (phospho Tyr326) 兔多克隆抗体 (ES1433)、Akt 兔多克隆抗体 (ES1628)、信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 兔多克隆抗体 (ES3511) 均采购于科鹿 (武汉) 生物科技有限责任公司。

### 1.3 仪器

KDC-160HR 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科技仪器有限公司; JB-P5 石蜡包埋机, 武汉俊杰电子有限公司; Tanon 5200 自动曝光成像仪, 上海天能科技有限公司。

### 1.4 统计分析

SPSS 27.0 软件程序进行统计学分析。数据采用单因素方差分析, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, 在  $P < 0.05$  时, 差异有统计学意义。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学

2.1.1 防己黄芪汤活性成分的筛选及靶点预测 从中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3) 中获得防己、黄芪、白术、甘草、生姜、大枣的活性成分,

并根据其口服生物利用度 (OB)  $\geq 30\%$ 、类药性 (DL)  $\geq 0.18$  的要求, 进行活性成分的筛选<sup>[8]</sup>。在此基础上, 利用 TCMSP 筛选出相应的靶点, 并将其输入到 UniProt 数据库中, 得到相应的靶点的基因名, 并将其物种基因限定为 “Homo sapiens”。

2.1.2 疲劳相关的靶基因信息获取 将抗疲劳的英文名称 “fatigue resistance” 输入 OMIM、Genecard 数据库中, 通过关键词检索端口, 检索与疲劳关联的基因, 分别从对应数据库中获取相应基因信息, 进一步运用 Excel 软件将获取所有数据整合剔除 (相同 Entry ID), 从而得到疲劳对应的靶基因信息。

2.1.3 防己黄芪汤抗疲劳的交集靶点 使用 E Venn 作图工具, 在 list1 中导入药物成分靶点, 在 list2 中导入疲劳基因靶点, 即可获得防己黄芪汤成分靶点和疲劳靶点基因的韦恩图与交集, 整合交集靶点, 作为防己黄芪汤抗疲劳的潜在作用靶点。

2.1.4 中药-成分-靶点网络构建 在 Cytoscape 3.9.1 软件中, 分别导入中药、活性成分以及抗疲劳的潜在靶点 (即交集靶点)。网络图中的节点 (node) 代表中药、活性成分及其对应的靶点。药物中具有疲劳的主要活性成分, 主要通过网络中最大度值决定, 代表该化合物与靶点之间相关性最强。

2.1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 构建与核心靶点筛选 运用 STRING 来分析药物抗疲劳重要靶点。将药物与疾病的交集靶点导入 STRING 数据库, 并将物种类型设定为 “Homo sapiens” 进行深入分析, 设置最高置信度  $> 0.9$ , 并得到网络结果。将 PPI 数据文本导入到 Cytoscape 软件中, 计算度 (degree) 值、节点介度 (Betweenness) 和连接紧密度 (Closeness) 等拓扑结构特征值, 并从中选取排名前 4 位的节点作为核心靶点。

2.1.6 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析 通过 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), 对药物抗疲劳的潜在靶点, 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析, 并对分析结果进行可视化。

2.1.7 分子对接验证 通过 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取小分子配体的二维结构, 并将该二维结构导入 ChemOffice 20.0 软件以构建其三维结构, 随后保存为 mol2 格式文件。接着, 利用 RCSB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 筛选出分辨率较高的蛋白靶点晶体结构作为分子对接的受体。使用 PyMOL 2.6.0 软件对蛋白质

进行去水、去磷酸根等预处理操作,并保存为 PDB 文件。随后,采用 Molecular Operating Environment 2019 软件对化合物进行能量最小化,并对靶点蛋白进行预处理,以寻找活性口袋。最后,使用 MOE 2019 软件进行分子对接,运算次数设置为 50 次。通过结合能的大小来评估两者的结合活性,并通过 PyMOL 2.6.0 和 Discovery Studio 2019 软件对结果进行可视化处理。

## 2.2 体内实验

**2.2.1 分组、造模及给药** 采用数字随机分组法将 42 只 SD 大鼠分为 6 组,每组 7 只,即对照组、模型组、阳性对照(红景天)组和防己黄芪汤低、中、高剂量组。防己黄芪汤制备按黄芪:防己:白术:甘草 4:5:3:2 比例,另加生姜、大枣。将药材以 10 倍体积的水浸泡 2 h,用武火煮沸,继续文火煎煮 30 min。第 2 次用 8 倍水体积浸泡,以相同方法煎煮,纱布滤过,合并滤液,蒸馏浓缩至所需浓度(2 mg·L<sup>-1</sup>),药液中指标性有效成分含量不低于 0.12 mg·mL<sup>-1</sup>。静置冷却后,4 ℃ 保存备用,用前将药液置水浴箱加温摇匀即可<sup>[1,9]</sup>。

除对照组外,采用“饮食不节+负重力竭游泳”复合因素诱导建立疲劳大鼠模型,采用隔日禁食、隔日少量给食及每日负重游泳(在鼠尾缠绕约体质量 10%的铁丝),水温(20±2)℃,游至口鼻没入水中 3~4 s 捞出记为游泳总时长,连续 4 周。造模结束后,药物剂量通过体表面积换算法进行确定。最终,大鼠的给药剂量分别设定为低、中、高剂量(2.2、4.4、8.8 g·kg<sup>-1</sup>)<sup>[1,9]</sup>,红景天组的剂量为 2 g·kg<sup>-1</sup>,对照组和模型组大鼠 ig 给予同体积的 0.9%氯化钠溶液,连续 14 d。

**2.2.2 负重力竭游泳时间、体质量及脏器指数** 末次给药后,将相当于大鼠体质量 10%的铁丝缠在其尾部,放于 80 cm 深的游泳桶中进行负重游泳。当大鼠鼻尖在水中淹没 3~4 s 且无法浮出水面时,停止游泳并记录时长。同时记录各组大鼠体质量变化,取大鼠脾、胸腺及后肢双腿骨骼肌,用冷 0.9%氯化钠溶液漂洗,除去血液,滤纸拭干、称质量,计算脏器指数。

胸腺指数=胸腺质量/体质量

脾脏指数=脾质量/体质量

**2.2.3 血液生化指标** 末次给药后,大鼠禁食不禁水 12 h,腹主动脉采血,静置、离心(4 ℃,3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min)、取上清,进行血尿素(UREA)、LA、肌

酸激酶(CK)、BUN、MDA、SOD、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等相关指标的检测。

**2.2.4 病理组织学检查** 末次给药后,大鼠禁食不禁水 12 h,用 2.5%即型三溴乙醇溶液麻醉大鼠,采集大鼠腓肠肌组织样本后,以 0.9%氯化钠溶液进行彻底清洗,并将清洗后的样本保存于 4%多聚甲醛溶液中固定。随后,通过苏木精-伊红(HE)染色技术处理组织切片,并利用光学显微镜对组织的病理形态进行观察分析。

**2.2.5 蛋白免疫印迹法检测肌肉组织中 PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、SRC、STAT3 蛋白表达** 取 50 mg 大鼠肌肉组织样本,研磨后以 100:1 体积比加入 RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂,经匀浆和离心提取上清,BCA 法测定蛋白浓度。制备适宜浓度的浓缩胶与分离胶,将蛋白质样本通过电泳转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。随后进行封闭 2 h 处理,加入特异性的一抗(1:1 000),于 4 ℃ 条件下进行过夜孵育。孵育后,进行洗膜并添加相应的二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,通过显色反应进行可视化处理,最终利用成像系统进行图像捕获并保存,采用 Image J 软件统计分析灰度值。

## 3 结果

### 3.1 防己黄芪汤活性成分及靶点

通过 TCMSP 平台获取防己黄芪汤各组方中药的活性成分及其作用靶点,借助 Uniprot 数据库对相关靶点蛋白名称进行标准化处理,最终获得的活性成分 156 个(防己 3 个、黄芪 20 个、白术 7 个、甘草 92 个、生姜 5 个、大枣 29 个),去重后得到相应靶点 889 个。部分成分信息见表 1。

### 3.2 疲劳相关靶点的获取

整合 OMIM、Genecard 数据库获得疲劳的疾病靶点总数为 849 个。将疾病靶点与活性成分相关靶点取交集,获得防己黄芪汤抗疲劳的潜在作用靶点 197 个。见图 1。

### 3.3 构建中药-成分-靶点网络

将防己黄芪汤抗疲劳的潜在作用靶点和其对应的活性成分、中药导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化,构成“中药-活性成分-潜在靶点”网络图。见图 2。

### 3.4 PPI 网络图构建与核心靶点筛选

将共有的靶点提交至 STRING 数据库,进行网络拓扑属性分析,并依据靶点的度值进行降序排列,

表 1 防己黄芪汤部分药物活性成分

Table 1 Active ingredients of some medicinal components in Fangji Huangqi Decoction

中药	编码	活性成分	OB/%	DL
防己	MOL002333	四内酯素 A (tetraeurin A)	35.40	0.31
防己	MOL002341	橙皮素 (hesperetin)	70.31	0.27
防己	MOL000358	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	36.91	0.75
黄芪	MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28
黄芪	MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31
黄芪	MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24
黄芪	MOL000417	毛蕊异黄酮 (calycosin)	47.75	0.24
白术	MOL000033	[(2R,5S)-5-propan-2-yloctan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
白术	MOL000020	12-千里光光酰基-8-顺式白术三醇 (12-senecieryl-2E,8E,10E-atractylentriol)	62.40	0.22
甘草	MOL000211	白桦脂酸 (mairin)	55.38	0.78
甘草	MOL000239	华良姜素 (jaranol)	50.83	0.29
甘草	MOL004841	甘草查尔酮 B (licochalcone B)	76.76	0.19
生姜	MOL000358	β-谷甾醇 (β-sitosterol)	36.91	0.75
生姜	MOL001771	poriferast-5-en-3beta-ol	36.91	0.75
大枣	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76
大枣	MOL001522	乌药碱 (coclaurine)	42.35	0.24

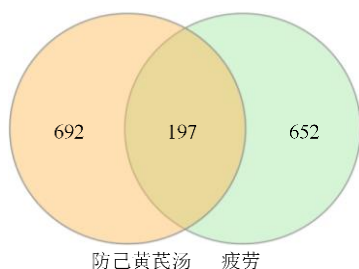


图 1 防己黄芪汤成分-疲劳靶点 Venn 图

Fig. 1 Fangji Huangqi Decoction composition-fatigue target Venn diagram

选取度值排名前 50 位 (度值 > 44) 的靶点。通过 CytoScape 3.9.1 软件进行可视化处理, 构建了防己黄芪汤抗疲劳的关键靶点 PPI 网络, 见图 3。其中度值前 4 位的靶点分别为 SRC 原癌基因 (SRC)、STAT3、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基 1 (PIK3R1), 可视为防己黄芪汤抗疲劳的核心靶点。

### 3.5 GO 与 KEGG 通路富集分析

GO 功能富集分析选取生物过程 (BP)、细胞组成 (CC)、分子功能 (MF) 3 个部分中可信度前 10 位的条目进行注释, 见图 4。在 BP 中, 潜在作用靶点主要富集在激酶活性的正向调控 (positive regulation of kinase activity)、对营养水平的反应

(response to nutrient levels)、MAPK 级联的正向调控 (positive regulation of MAPK cascade) 等; 在 CC 中, 靶点蛋白集中在膜筏 (membrane raft)、膜微区 (membrane microdomain)、囊泡腔内 (vesicle lumen) 等; 在 MF 中, 潜在作用靶点主要富集在跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性 (transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity)、跨膜受体蛋白激酶活性 (transmembrane receptor protein kinase activity)、蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity) 等。KEGG 通路富集分析的结果选出与疲劳密切相关通路有 10 条, 并绘制气泡图, 见图 5。结果包括 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路 (AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications) 等 10 条通路, 提示防己黄芪汤可能通过作用于多种信号传导途径发挥抗疲劳作用。绘制通路之间的相互关系图 (图 6), 显示 PI3K-Akt 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、前列腺癌、内分泌抵抗、胰腺癌及催乳素信号通路均有关联, 且该通路中有 4 个靶点属于防己黄芪汤抗疲劳核心靶点, 提示该通路在防己黄芪汤抗疲劳过程中扮演关键角色。将防己黄芪汤抗疲劳靶点映射到 PI3K-



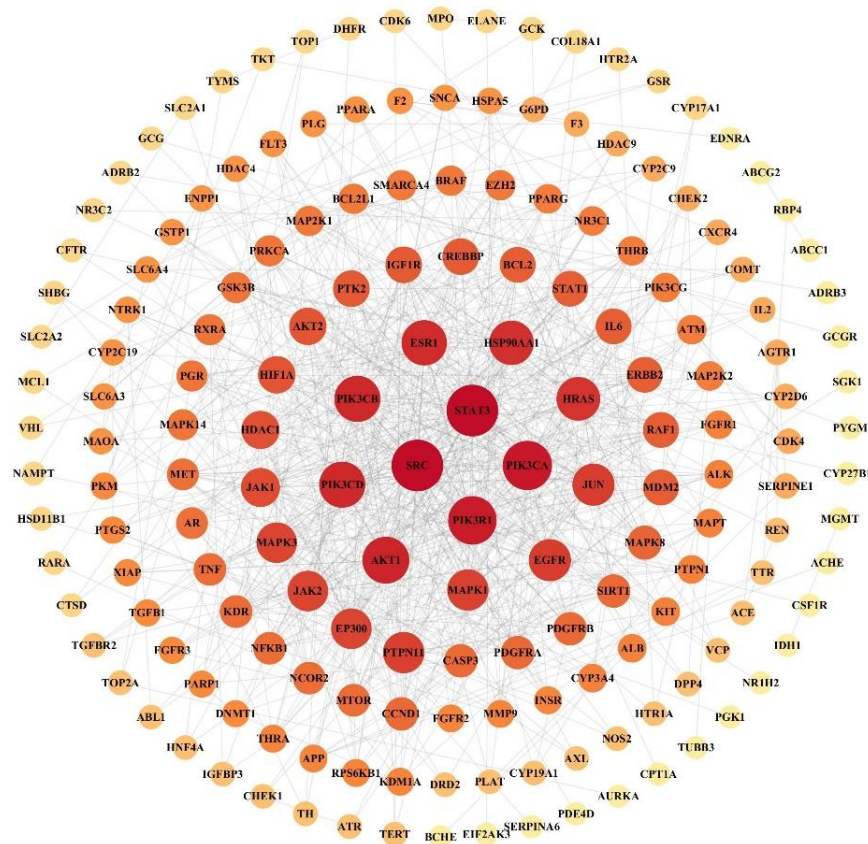


图 3 防己黄芪汤抗疲劳潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of potential anti-fatigue targets of Fangji Huangqi Decoction

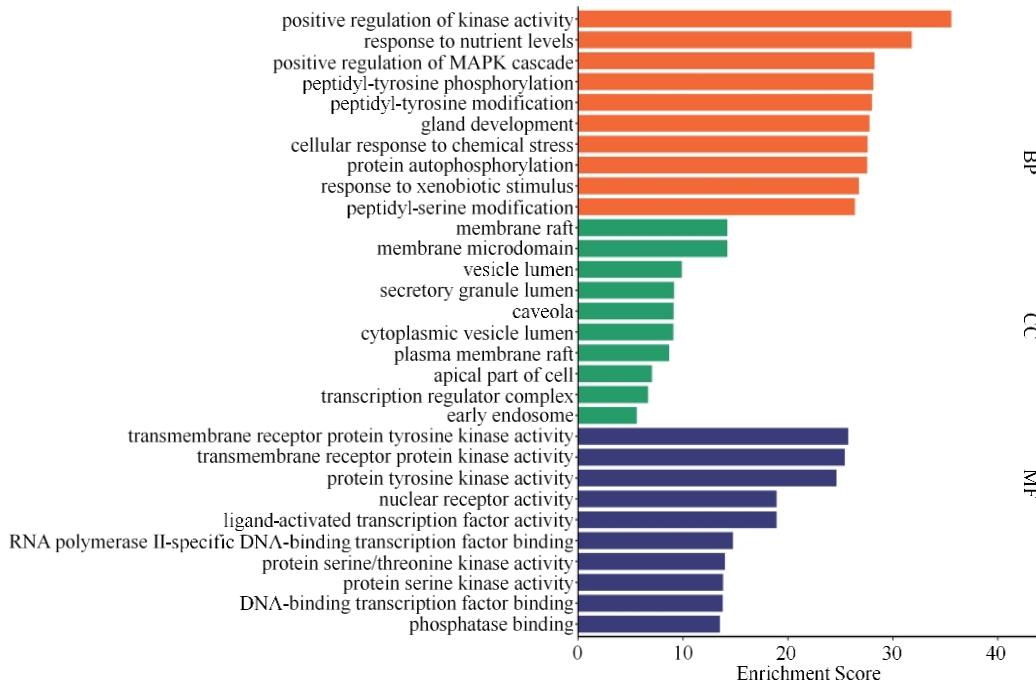


图 4 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

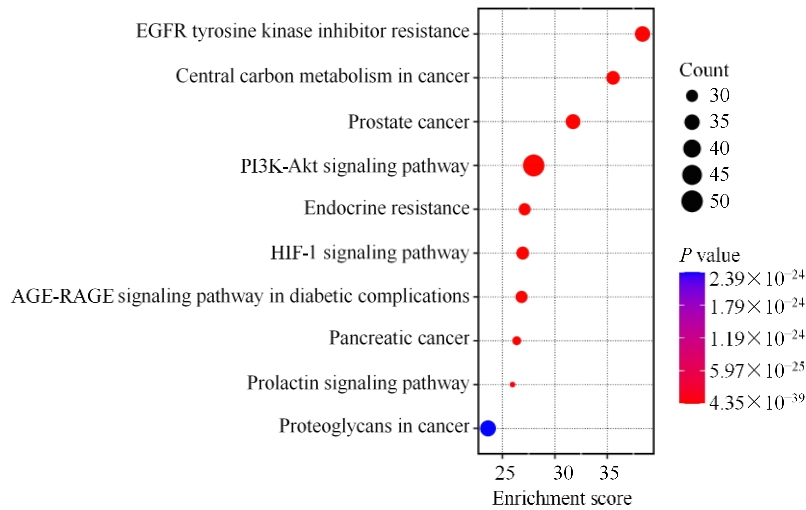


图 5 KEGG 通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

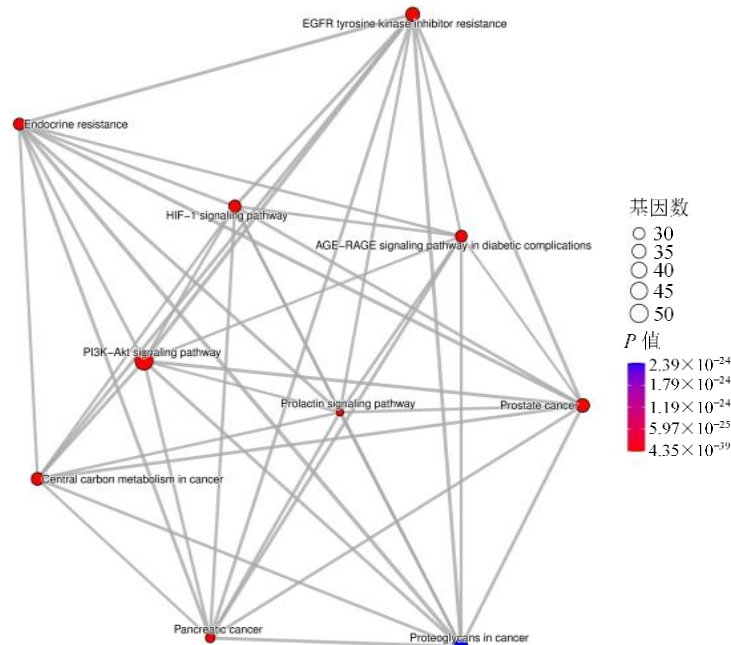


图 6 KEGG 通路网络关系

Fig. 6 KEGG pathway network relationship

**3.7.3 各组大鼠腓肠肌病理切片** 对照组肌肉组织中, 可见呈横切面的肌细胞及数个边界清晰的肌纤维束, 肌束内肌纤维排列紧密规则, 无明显炎症细胞或脂肪浸润, 也无萎缩、纤维化等异常。模型组肌肉组织可见横切面的肌细胞呈嗜酸性均质状, 部分肌纤维出现排列紊乱, 这可能与疲劳状态下肌肉组织的结构适应性调整有关, 表明机体在处于剧烈运动的疲劳状态时会引起肌纤维形态发生改变以及肌细胞的损伤及退化。防己黄芪汤低、中、高

不同剂量组及红景天组肌纤维形态发生改变及肌细胞的损伤及退化程度有所缓解。见图 11。

**3.7.4 蛋白免疫印迹法检测腓肠肌中 PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、SRC、STAT3 蛋白表达信号通路** 与对照组对比, 模型组大鼠中 p-PI3K、p-Akt、SRC、STAT3 的表达水平显著上升 ( $P < 0.01$ ), 而 PI3K、Akt 的表达水平则显著下降 ( $P < 0.01$ )。与模型组对比, 防己黄芪汤高剂量组及阳性对照组均能显著下调大鼠 p-PI3K、p-Akt、SRC、STAT3 的表达, 并

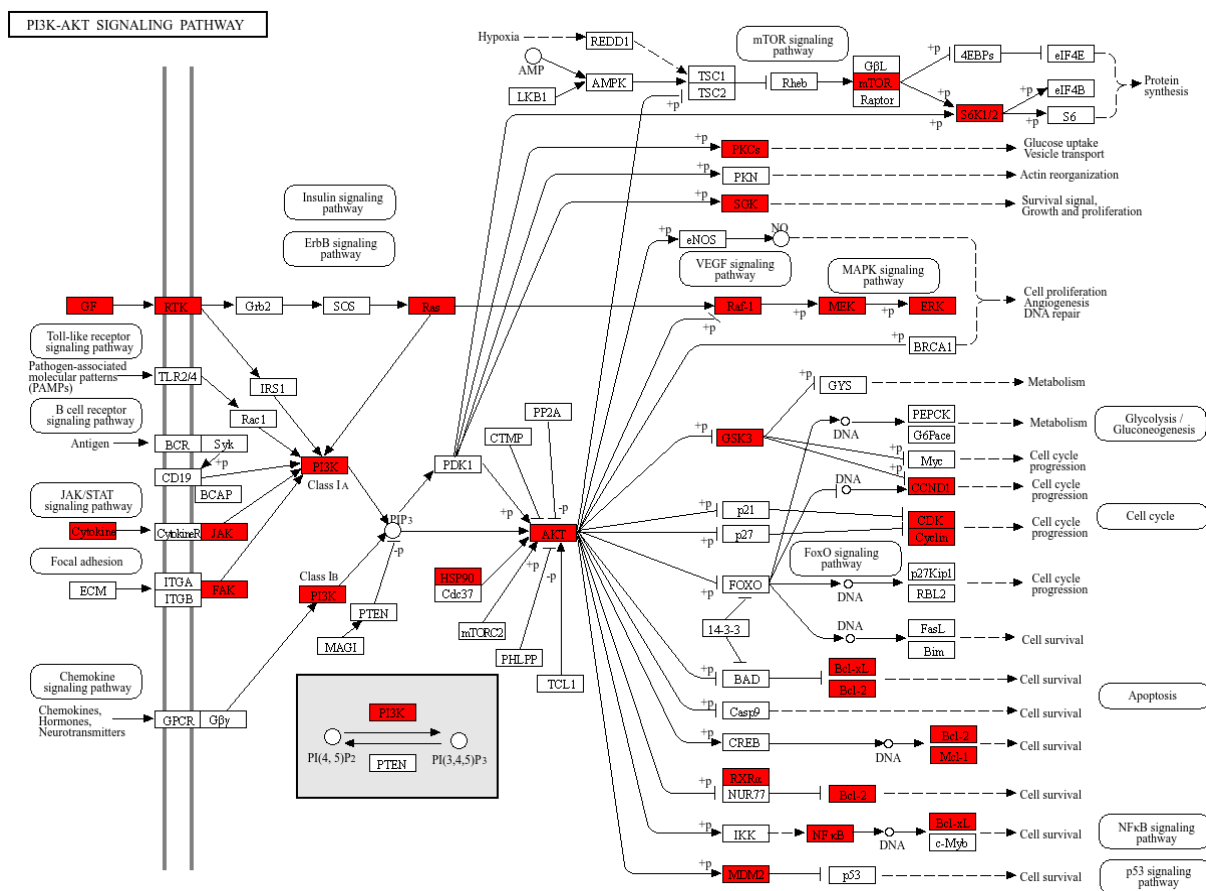


图 7 PI3K-Akt 信号通路  
Fig. 7 PI3K-Akt signaling pathway

表 2 防己黄芪汤关键活性成分与核心靶点的分子对接结果

**Table 2 Molecular docking results of key active ingredients and core targets in Fangji Huangqi Decoction**

蛋白	结合能/(kJ·mol <sup>-1</sup> )		
	槲皮素	β-谷甾醇	白桦脂酸
PIK3CA	-29.10	-30.00	-26.48
SRC	-25.75	-29.31	-28.73
STAT3	-23.37	-28.63	-24.75

提升 PI3K、Akt 的表达水平 ( $P < 0.01$ )。见图 12。

#### 4 讨论

在中医理论中，疲劳被归属于“虚损”这一范畴，它涉及到人体的多种生理功能的不足和虚弱，其发病与感受外邪、饮食失常、情志刺激、劳逸失度等相关，病位涉肝、心、脾、肾等脏腑，其中以脾脏为主。脾居中焦，为后天之本，气血生化之源，主运化水谷精微，是人体能量代谢的重要器官。脾胃虚弱，运化水谷精微无力，五脏六腑失于濡养，机体脏腑功能减退，得不到足够的营养和能量供给，日久而见乏力疲劳。脾虚失其健运，水液代谢

障碍，湿邪阻滞四肢关节则见关节酸痛、身体沉重、倦怠体软等躯体疲劳症状，阻滞中焦则见食欲不振、腹胀便溏等消化系统症状，进一步影响营养的吸收与气血的生成，加剧疲劳感；阻滞上部清窍则见视物模糊、思维迟钝、健忘失眠等精神疲劳症状。这种由脾虚引起的疲劳，往往伴随着面色苍白、舌淡苔白等体征，是中医临床上较为常见的一种证候。因此，在治疗疲劳症状时，中医往往会从调理脾胃入手，通过健脾益气、祛湿化浊等方法，恢复脾胃的运化功能，提高机体的抗疲劳能力，从而改善疲劳症状、恢复整体健康状态。防己黄芪汤是中医经典名方，其主要功效在于“益气健脾，利水消肿”，在《伤寒杂病论》中是益气利水法的代表方剂。防己黄芪汤通过补益人体的正气，增强脾脏的功能，从而改善消化吸收，提高身体的代谢能力，达到消除疲劳的效果。同时，该方还能利水消肿，帮助身体排除多余的水分和代谢废物，进一步缓解因水湿停滞所导致的疲劳感。

本研究通过网络药理学对防己黄芪汤抗疲劳

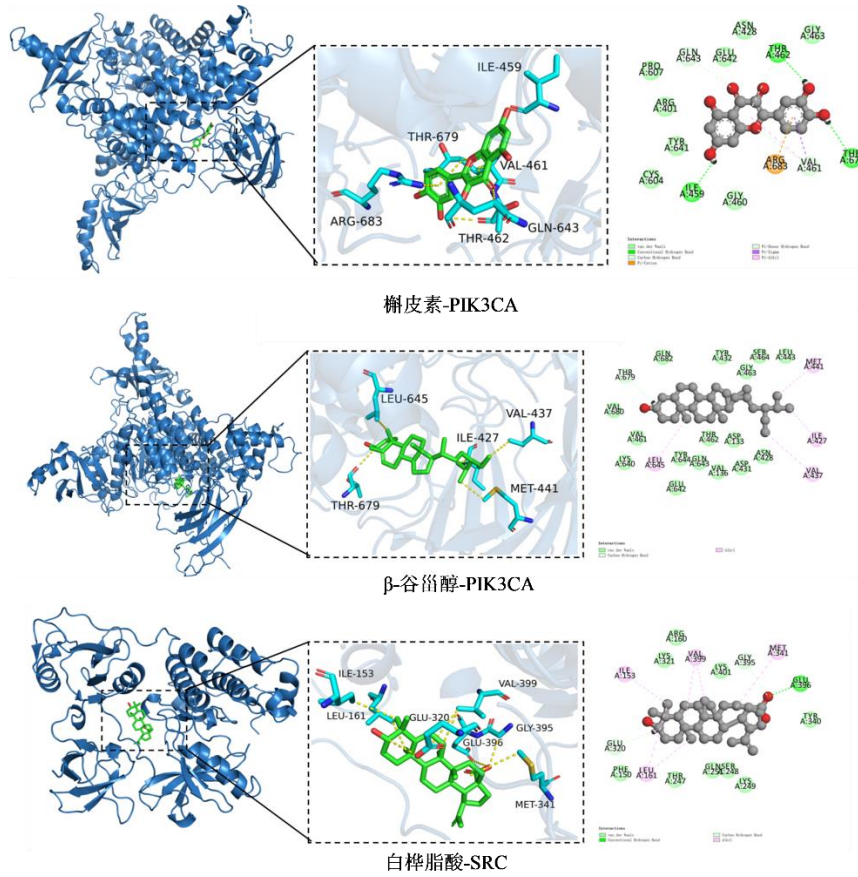
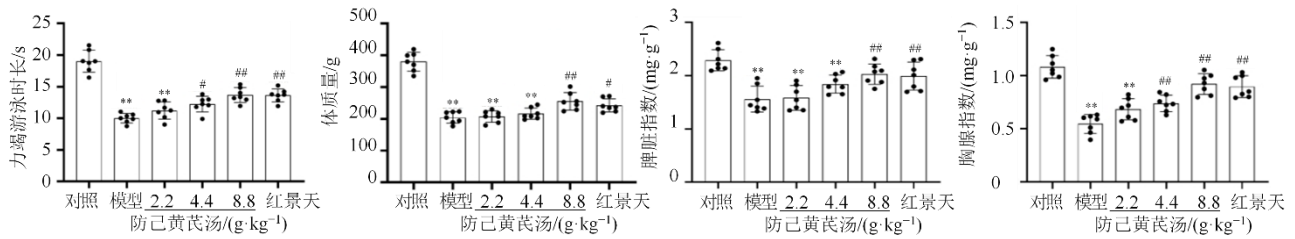


图 8 关键活性成分与核心靶点蛋白的分子对接

Fig. 8 Molecular docking of key active ingredients with core target proteins



与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ 。

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs model group.

图 9 防己黄芪汤对疲劳大鼠力竭游泳时长、体质量及脏器指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Fig. 9 Effect of Fangji Huangqi Decoction on exhaustive swimming duration, body weight, and organ coefficients in fatigue-induced rats ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

活性成分进行分析,通过“中药-活性成分-潜在靶点”网络图发现槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、白桦脂酸等可能是防己黄芪汤抗疲劳的主要成分。林安贵等<sup>[10]</sup>研究揭示,槲皮素能够调节负重游泳小鼠的能量代谢,发挥抗疲劳效应,其主要作用机制涉及促进脂肪动员、抑制蛋白质分解以及强化三羧酸循环。刘根平<sup>[11]</sup>研究揭示,补充槲皮素能够显著降低运动过程

中 MDA 的含量,有效减轻脂质过氧化损伤。进一步地,槲皮素通过抑制运动过程中 SOD、GSH-Px 活性的降低,增强了机体的抗氧化防御机制,进而延缓了疲劳的产生。Ullah 等<sup>[12]</sup>研究揭示,柑橘皮中所蕴含的生物活性成分,特别是橙皮素与谷甾醇,通过与 AKT1、鼠类肉瘤病毒癌基因 (KRAS) 及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (MTOR) 的相互作用,能够激

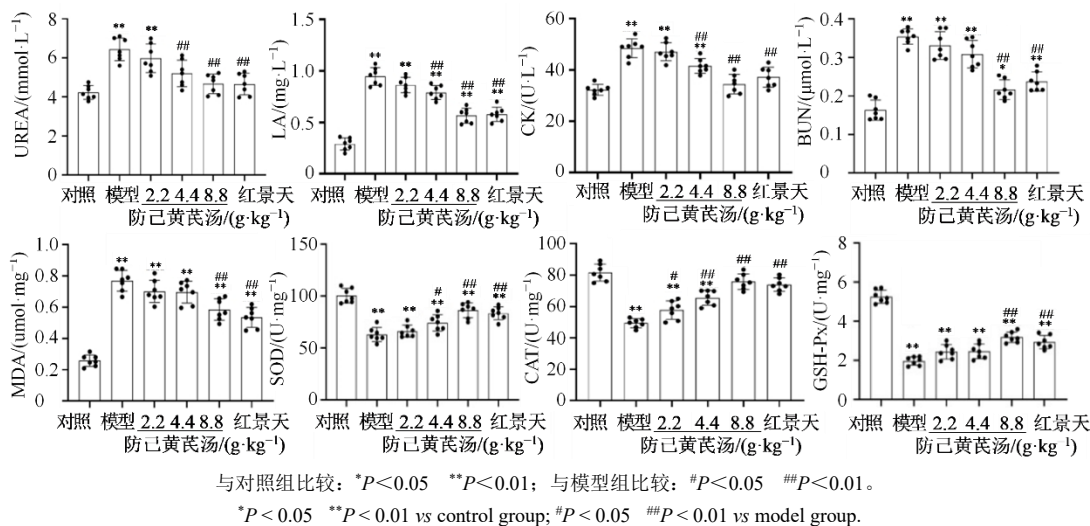


图 10 防己黄芪汤对疲劳大鼠血清生化指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

Fig. 10 Effect of Fangji Huangqi Decoction on serum biochemical indices in fatigue-induced rats ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

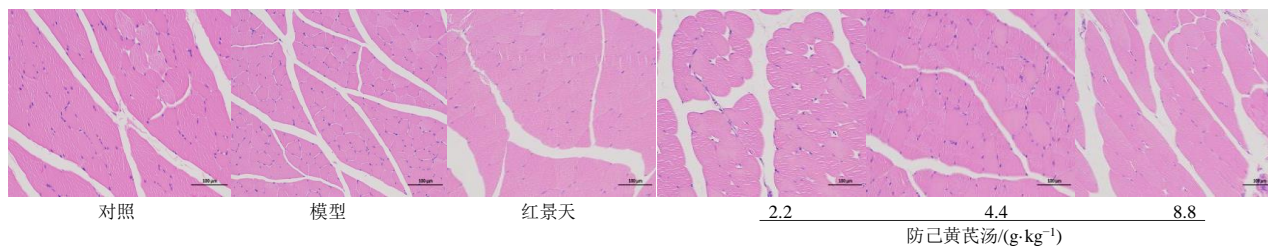


图 11 各组镜下腓肠肌的组织形态 ( $\times 200$ )

Fig. 11 Histomorphology of gastrocnemius muscle tissue in each group ( $\times 200$ )

活 PI3K-Akt 信号传导通路, 从而发挥缓解机体疲劳的效应。李志兴<sup>[13]</sup>研究揭示, 白桦脂醇显著延长小鼠负重游泳的持续时间, 降低运动前后血乳酸的曲线下面积, 并提升肝糖原的含量, 表明白桦脂醇具备缓解机体体力疲劳的潜在功能。

通过对关键靶点进行 PPI 网络构建发现, SRC、STAT3、PIK3CA、PIK3R1 等蛋白的度值较高。SRC 是一种在细胞生长与分化进程中扮演着至关重要的角色的基因, SRC 原癌基因的异常表达可能与机体的能量代谢失衡、炎症反应加剧以及组织修复能力下降等病理过程密切相关。Gilad 等<sup>[14]</sup>研究揭示, SRC 通过调节核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路及调控免疫细胞, 能够有效增强机体免疫功能, 提升其对病原体的防御能力, 同时缓解过度炎症反应和氧化损伤, 从而在维护身体健康和预防疾病方面发挥关键作用。STAT3 在细胞内扮演着关键角色, 其通过调节腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 合酶的活性以及白细胞介素的表达水平, 对机体的能量代谢和炎症反应产生影响, 该因子也参与了多种生理和病理过程的

调控, 包括肿瘤发生、免疫应答以及组织修复等。张松江等<sup>[15]</sup>研究揭示, 茶多酚具有缓解运动性疲劳引发的中枢神经系统炎症反应的功效, 能够延长小鼠的耐疲劳时间, 其作用机制涉及 STAT3/核因子  $\kappa$ Bp65 信号传导途径。上述研究表明 SRC、STAT3、PIK3CA 等信号分子在调节能量代谢、氧化应激反应及组织修复过程中的关键作用, 这些过程与疲劳状态密切相关。因此, 这些分子可能构成防己黄芪汤发挥抗疲劳效应的关键靶点。本研究进一步将关键靶点与核心成分进行分子对接, 结果显示槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、白桦脂酸与关键核心靶点 SRC、STAT3、PIK3CA 结合力较高, 说明防己黄芪汤具有较好的抗疲劳作用。

对筛选后的靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 结果显示防己黄芪汤抗疲劳涉及 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路等, 其中 P13K/Akt 信号通路富集基因数最多。PI3K 是一种在真核细胞中广泛分布的酶类, 其在细胞的能量代谢、抗氧化应激、细胞增殖与分

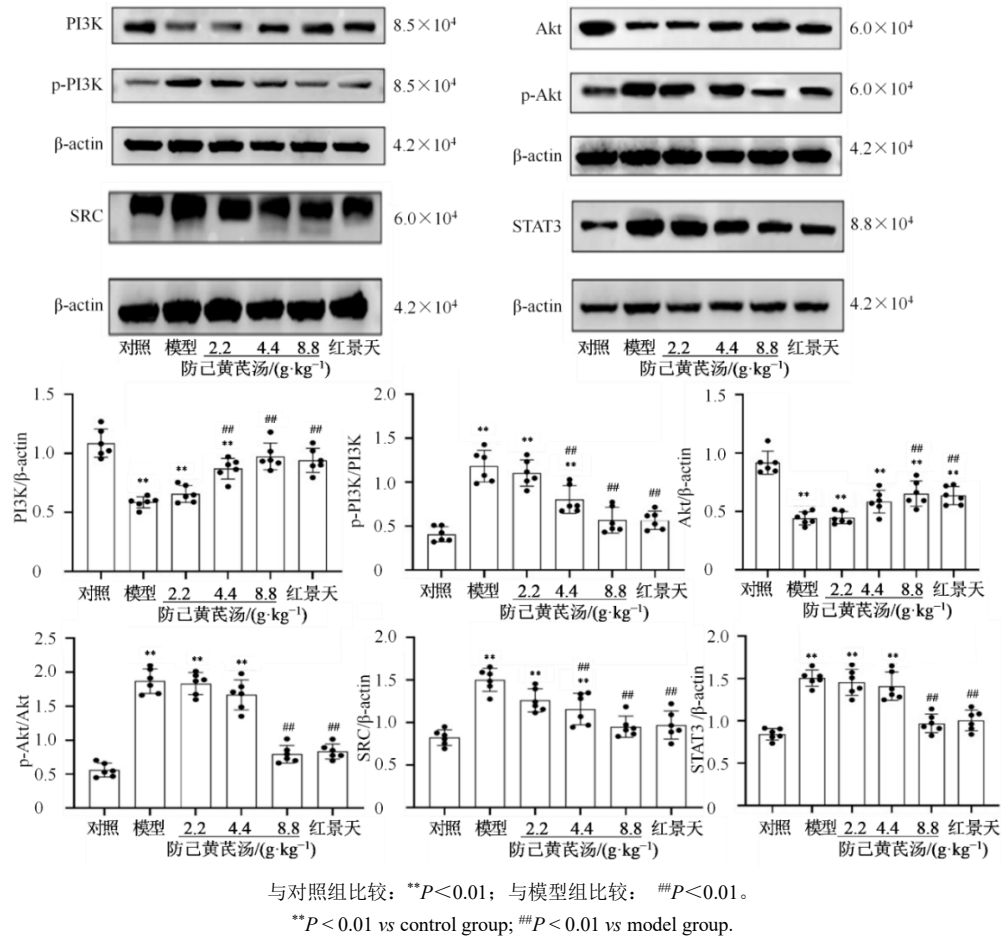


图 12 防己黄芪汤对疲劳大鼠腓肠肌中 PI3K、Akt、SRC 及 STAT3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 12 Effects of Fangji Huangqi Decoction on PI3K, Akt, SRC, and STAT3 protein expression in gastrocnemius muscle of fatigued rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

化等关键生理过程中发挥着核心作用。PI3K 通过激活其下游效应分子 Akt, 进而调控一系列细胞功能。Akt 作为 PI3K 信号通路中的关键效应分子, 参与了细胞存活、代谢、生长、分化以及细胞骨架重组等多种生物学过程, 从而在细胞生理活动中扮演着至关重要的角色。近年来的研究表明, PI3K/Akt 信号通路的异常激活或抑制与多种疾病的发生和发展密切相关, 如肿瘤、糖尿病、心血管疾病以及神经退行性疾病等<sup>[16]</sup>。特别是在疲劳相关的研究中, 疲劳的产生往往伴随炎症反应, 并且会对机体的能量代谢和免疫系统产生影响。因此, PI3K/Akt 信号通路在保持细胞健康状态以及应对疲劳等生理应激中发挥着至关重要的调节作用。施亚宁等<sup>[17]</sup>研究揭示, 枸杞子与人参的配伍通过调控 Akt、PI3K、HIF-1 $\alpha$  等关键靶点, 激活 PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  信号通路, 显著增强小鼠运动耐力、减少代谢产物积累以及提升糖原储备水平, 发挥抗疲劳功效。李红玉等<sup>[18]</sup>研

究揭示, 绞股蓝通过调控 STAT3、肿瘤蛋白 P53 (TP53)、SRC、AKT1、热休克蛋白 (HSP90AA1) 等关键靶点以及 PI3K/Akt 信号传导通路, 发挥其治疗慢性疲劳综合征的疗效。

为了进一步探究防己黄芪汤抗疲劳的机制, 通过“饮食限制+负重游泳”建立疲劳大鼠模型。在动物实验中, 评估药物抗疲劳作用的方法涵盖了运动耐力测试以及生化指标的测定。负重力竭游泳试验是一种经典的实验方法, 用于评估和衡量动物在运动过程中的耐力水平。本研究结果显示, 防己黄芪汤高剂量组可显著提升大鼠负重 10% 力竭游泳时间、体质量、脾脏及胸腺指数, 表明防己黄芪汤具有抗疲劳作用。UREA、LA、CK、BUN 是评估运动疲劳的重要生物标志物, 其水平的变化可以反映疲劳程度。本研究结果显示, 模型组中疲劳大鼠的 UREA、LA、CK、BUN 水平显著上升。相对地, 防己黄芪汤高剂量组在这些指标上表现出显著的

降低效应。这表明防己黄芪汤可通过调节机体代谢产物的累积以及减轻相关组织的损伤程度,发挥其抗疲劳的生物学效应。氧化应激是指体内活性氧(ROS)的生成与抗氧化防御机制之间的不平衡状态。这种失衡已被广泛认为是导致疲劳的重要机制之一。在疲劳状态下,骨骼肌中的氧化产物,如MDA,其水平会显著升高,这表明氧化损伤的程度增加。与此同时,抗氧化酶系统,包括SOD、CAT和GSH-Px,其活性会显著下降。这种氧化应激状态的存在,可能会进一步加重肌肉损伤,从而加剧疲劳感。因此,氧化应激在疲劳的发生和发展中扮演着关键角色,其影响不仅限于肌肉功能,还可能涉及其他生理系统的紊乱。本研究结果显示,防己黄芪汤高剂量组可显著降低MDA含量,减轻机体脂质过氧化程度,增加SOD、CAT、GSH-Px活力,提升机体清除自由基和过氧化氢等有害物质的能力。说明防己黄芪汤可提高大鼠抗氧化能力,保护机体防治氧化应激引起的损伤,恢复正常机体氧化还原平衡。此外,通过对大鼠腓肠肌进行HE染色观察,研究发现防己黄芪汤高剂量组及阳性对照组的肌纤维形态改变、肌细胞损伤及退化情况与模型组相比有显著改善。Western blotting结果显示,防己黄芪汤高剂量组能够提升PI3K、Akt的表达量,降低p-PI3K、p-Akt、SRC、STAT3的表达量,这一系列的变化进一步证实了PI3K/Akt信号通路在防己黄芪汤抗疲劳机制里的关键作用。具体而言,PI3K作为细胞信号传导的关键分子,其激活状态(p-PI3K)的降低意味着信号传导的减弱,这有助于减少因过度激活可能导致的细胞功能紊乱。同时,Akt及其磷酸化形式(p-Akt)的变化趋势与PI3K相似,表明防己黄芪汤通过调节Akt的活性,进而影响下游信号分子的表达,达到抗疲劳的效果。SRC和STAT3作为与细胞增殖、分化及凋亡密切相关的信号分子,其表达量的降低可能意味着防己黄芪汤在调节肌肉细胞稳态、减少损伤方面发挥着积极作用。

防己黄芪汤的核心活性成分槲皮素、β-谷甾醇及白桦脂酸等可能通过调节氧化应激及能量代谢,作用于SRC、STAT3、PIK3CA等多个靶点,并精准调控PI3K/AKT信号通路及其相关分子的表达,从而为抗疲劳提供了新的分子机制解释。这些发现为理解防己黄芪汤的抗疲劳机制提供了重要的分子生物学证据,揭示了其在调节相关信号通路方面

的潜在作用机制。通过深入研究这些活性成分及其作用机制,可以更好地理解防己黄芪汤在抗疲劳方面的应用价值,为开发新的抗疲劳药物提供了新的思路 and 方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 高丽,严文允,李茹超,等. 防己黄芪汤对气虚水负荷模型大鼠的利尿作用及对肾脏 AQP1~4 表达的影响 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2023, 41(5): 615-621.  
Gao L, Yan W Y, Li R C, et al. Diuretic effect and the expression of AQP1-4 in kidney of Fangji Huangqi Decoction on rats with *qi*-deficiency and saline-loading [J]. J Shihezi Univ Nat Sci, 2023, 41(5): 615-621.
- [2] 苏贝贝,卢凯,张鑫渝,等. 防己黄芪汤干预脾虚肾性水肿小鼠的药效评价及活性相态筛选 [J]. 中草药, 2025, 56(22): 8175-8187.  
Su B B, Lu K, Zhang X Y, et al. Efficacy assessment and bioactive fraction screening of Fangji Huangqi Tang in treating spleen deficiency-induced renal edema in mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(22): 8175-8187.
- [3] 朱云峰,边祥雨,常燕云,等. 高原低氧环境下仿野生黄芪和平裁黄芪水提物的抗疲劳作用及机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2025, 39(4): 241-251.  
Zhu Y F, Bian X Y, Chang Y Y, et al. Anti-fatigue effect and mechanism of action of aqueous extracts of imitation wild *Astragalus* and cultivated *Astragalus* under high-altitude low oxygen environments [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2025, 39(4): 241-251.
- [4] 张岑容,方思佳,徐伟,等. 不同产地白术抗疲劳作用研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2022, 41(4): 23-27.  
Zhang C R, Fang S J, Xu W, et al. Anti-fatigue effect of *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae* from different producing areas [J]. J Tradit Chin Vet Med, 2022, 41(4): 23-27.
- [5] 王光元,马博威. 异甘草素对小鼠运动性疲劳和氧化应激能力的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(14): 2103-2107.  
Wang G Y, Ma B W. Effects of isoliquiritigenin on exercise-induced fatigue and oxidative stress in mice [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2024, 40(14): 2103-2107.
- [6] Jing Y S, Li M S, Li Y Q, et al. Structural characterization and anti-fatigue mechanism based on the gut-muscle axis of a polysaccharide from *Zingiber officinale* [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 283(Pt 1): 137621.
- [7] 马晓宁,秦令祥,冀晓龙,等. Design-Expert 软件设计优化内黄大枣多糖的硒化修饰及其抗氧化、抗疲劳作

- 用研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(10): 164-172.
- Ma X N, Qin L X, Ji X L, et al. Optimization of selenization modification of Neihuang *Ziziphus jujuba* polysaccharides by design-expert software design and its anti-oxidant and anti-fatigue effects [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(10): 164-172.
- [8] Zhao W B, Wang Bo Y, Li S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence artificial intelligence [J]. Chin Herb Med, 2024, 16(4): 558-560.
- [9] 李茹超, 魏楠楠, 路荣荣, 等. 基于 PI3K/Akt 通路探讨防己黄芪汤对气虚水负荷模型大鼠胃肠道水通道蛋白的影响 [J]. 时珍国医国药, 2023, 34(04): 810-813.
- Li R C, Wei N N, Lu R R. et al. Effects of Fangji Huangqi Decoction on water channel proteins in the gastrointestinal tract of *qi* deficiency and water retention model rats via the PI3K/Akt pathway [J]. Shizhen Tradit Chin Med Pharm, 2023, 34(04): 810-813.
- [10] 林安贵, 杨灵灵. 植物提取物槲皮素调节小鼠的能量代谢和氧化应激 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 320-325.
- Lin A G, Yang L L. Plant extract quercetin regulates energy metabolism and oxidative stress in mice [J]. Genom Appl Biol, 2020, 39(1): 320-325.
- [11] 刘根平. 食品级槲皮素粉对机体最大摄氧量和耐力的影响 [J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 314-319.
- Liu G P. Effect of food grade quercetin powder on maximal oxygen uptake and endurance of the body [J]. Genom Appl Biol, 2020, 39(1): 314-319.
- [12] Ullah A, Sun Q X, Li J T, et al. Bioactive compounds in *Citrus reticulata* peel are potential candidates for alleviating physical fatigue through a triad approach of network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics modeling [J]. Nutrients, 2024, 16(12): 1934.
- [13] 李志兴. 白桦脂醇对小鼠的抗疲劳及耐缺氧作用研究 [D]. 吉林: 吉林大学, 2011.
- Li Z X. Anti-fatigue and hypoxia effects of betulininmice [D]. Jilin: Jilin University, 2011.
- [14] Gilad Y, Lonard D M, O'Malley B W. Steroid receptor coactivators—their role in immunity [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1079011.
- [15] 张松江, 李龙洋, 周春光, 等. 茶多酚干预运动疲劳模型小鼠的中枢抗炎作用与机制 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(30): 6474-6481.
- Zhang S J, Li L Y, Zhou C G, et al. Central anti-inflammatory effect and mechanism of tea polyphenols in exercise fatigue model mice [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2025, 29(30): 6474-6481.
- [16] 傅由芸, 陈婷, 蔺晓菁, 等. 27-羟基胆固醇激活 LXR 信号通路调节肺癌细胞的增殖 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(2): 267-272.
- Fu Y Y, Chen T, Lin X J, et al. 27-Hydroxycholesterol modulates lung cancer cell proliferation by activation of LXR signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(2): 267-272.
- [17] 施亚宁, 高芳芳, 宿树兰, 等. 基于网络药理学和实验验证的枸杞子配伍人参协同抗疲劳作用与机制研究 [J]. 药学学报, 2025, 60(4): 989-1000.
- Shi Y N, Gao F F, Su S L, et al. Study on the synergistic anti-fatigue effect and mechanism of *Lycium barbarum* and Ginseng based on network pharmacology and experimental verification [J]. Acta Pharm Sin, 2025, 60(4): 989-1000.
- [18] 李红玉, 赵冰洁, 李悦宁, 等. 基于网络药理学和动物模型验证探讨绞股蓝治疗慢性疲劳综合征的作用机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(12): 2168-2182, 2153.
- Li H Y, Zhao B J, Li Y N, et al. Mechanism of *Gynostemma pentaphyllum* against chronic fatigue syndrome based on network pharmacology and animal model validation [J]. Nat Prod Res Dev, 2023, 35(12): 2168-2182, 2153.

[责任编辑 齐静雯]