

基于网络药理学的黄芪抗疲劳作用机制研究

张 瑞^{1,2,3,4}, 曹庆伟^{1,2,3,4}, 李爱平^{1,3,4}, 刘月涛^{1,3,4}, 李 科^{1,3,4*}, 秦雪梅^{1,3,4*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西大学 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

4. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

摘 要: **目的** 基于网络药理学方法探讨黄芪抗疲劳可能的作用机制。**方法** 根据课题组前期研究并结合中医药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 指认黄芪中的活性成分, 采用 PharmMapper 网络服务器预测其作用靶点; 在 GeneCards、OMIM 数据库中搜索抗疲劳靶点, 采用 Cytoscape 3.6.0 软件构建黄芪活性成分-抗疲劳靶点网络; 使用 String 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用分析, 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络, 通过度值 (degree) 筛选关键靶点并进行归属; 使用 DAVID 数据库对黄芪抗疲劳作用靶点进行基因本体 (GO) 富集分析和 KEGG 通路富集分析, 以探究黄芪抗疲劳的作用机制。**结果** 获得黄芪中 11 种活性成分, 包括毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、异黄酮、紫檀烷 6 种黄酮类成分, 黄芪皂苷 I、II、III、IV 4 种皂苷类成分及蔗糖。黄芪抗疲劳作用预测靶点有 76 个, 网络分析结果表明, 黄芪主要涉及一氧化氮的生物合成、过氧化氢反应、棕色脂肪细胞分化的正调节、活性氧代谢等生物过程, 通过调节癌症通路, FoxO、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt)、低氧诱导因子-1 (HIF-1)、血管内皮生长因子 (VEGF)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、Ca²⁺ 信号通路、氧化应激反应等来发挥抗疲劳作用。**结论** 本研究体现了黄芪多成分-多靶点-多途径的作用特点, 为进一步开展黄芪抗疲劳作用机制的研究提供了新思路和新方法。

关键词: 黄芪; 抗疲劳; 网络药理学; 分子机制; 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)08-1880-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.08.016

Mechanism of anti-fatigue of *Astragali Radix* based on network pharmacology

ZHANG Rui^{1,2,3,4}, CAO Qing-wei^{1,2,3,4}, LI Ai-ping^{1,3,4}, LIU Yue-tao^{1,3,4}, LI Ke^{1,3,4}, QIN Xue-mei^{1,3,4}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

4. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To explore the anti-fatigue mechanism of *Astragali Radix* based on network pharmacology. **Methods** The main active ingredients of *Astragali Radix* were obtained by TCMSP and the results of our previous work. GeneCards and OMIM were used to predict and screen the therapeutic targets of *Astragali Radix*. The Cytoscape 3.6.0 software was used to construct the active components-targets network of *Astragali Radix*. The protein interactions network was constructed using the String database and Cytoscape software. The GO and KEGG pathways involved in the targets were analyzed by using DAVID database. **Results** The results showed that 11 active components including six flavonoids (calycosin-7-O- β -D-glucoside, calycosin, ononin, formononetin,

收稿日期: 2018-12-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81872962); 山西省优秀人才科技创新项目 (201605D211030); 山西省优秀人才科技创新项目 (201705D211020); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D311101); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技攻关项目 (2014ZD0401)

作者简介: 张 瑞, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价研究。E-mail: 1358779225@qq.com

***通信作者** 李 科 Tel/Fax: (0351)7019297 E-mail: like@sxu.edu.cn

秦雪梅 Tel/Fax: (0351)7018379 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

7,2'-dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan, 3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan), four saponins (astragaloside I, II, III, IV) and sucrose and 76 targets of *Astragali Radix* were involved. The network analysis results showed that the process of nitric oxide biosynthesis, hydrogen peroxide reaction, positive regulation on brown adipocyte differentiation, and active oxygen metabolism were mainly involved by adjusting the cancer, FoxO, PI3K-Akt, HIF-1, VEGF, MAPK and other signaling pathways to exert its antifatigue effect. **Conclusion** This study reflects the characteristics of multi-components, multi-targets, and multi-pathways of *Astragali Radix*, which provides new ideas and clues for further research on the mechanism of anti-fatigue effects of *Astragali Radix*.

Key words: *Astragali Radix*; anti-fatigue; network pharmacology; molecular mechanism; signaling pathway

疲劳首见于《金匱要略》^[1], 随着现代生活节奏加快和社会竞争激烈, 疲劳已经成为普遍的问题。疲劳是一种常见而又复杂的症状, 生理性疲劳是由大量运动导致体内代谢物累积引起, 如果不能及时消除, 随着运动强度和运动量的增大, 会出现情绪变化、身体不适、脾胃症状和津液损失, 表现出亚健康疲劳, 这种状态的进一步发展必将导致五脏机能失调、精气血耗损, 出现慢性疲劳综合症^[2]。世界上约有 10% 的人患有慢性疲劳^[3], 然而其发病机制并不完全明确。有研究表明, 疲劳的产生可能与能量代谢、免疫和内分泌系统及抗氧化防御系统的炎症反应和功能障碍有关^[4-6]。

黄芪, 始载于《神农本草经》, 列为上品^[7], 为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 或蒙古黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* Bge. Hsiao 的干燥根, 归肺、脾经, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津止血等功效, 用于气虚乏力、食少便溏、中气下陷、气虚水肿等^[8]。黄芪中主要成分包括黄酮类、皂苷类、糖类、有机酸类、氨基酸类等^[9]。传统中医认为黄芪是补气良药, 素有“十药八芪”之称, 文献研究表明, 黄芪具有显著的抗疲劳^[10]、抗炎^[11]、抗免疫^[12]等作用, 但其作用的分子机制不十分明确。因此, 借助网络药理学的方法挖掘黄芪抗疲劳作用的靶点与通路, 从微观角度科学论证黄芪抗疲劳的作用机制有重要意义。

网络药理学融合了系统生物学、多向药理学、计算生物学、网络分析等多学科的技术和内容, 进行“疾病-表型-基因-药物”多层次网络的构建, 从整体的角度探索药物与疾病间的关联性, 具有整体性、系统性的特点, 特别适用于多成分、多靶点、多途径的中药药效机制和物质基础研究^[13-15]。本课题组前期研究通过力竭游泳及限制饮食复制疲劳大鼠模型, 给予黄芪后疲劳大鼠力竭游泳时间、血清生化指标、病理切片、肌肉代谢组学等结果均显示黄

芪有明显的抗疲劳效果。因此, 本研究以课题组发现的黄芪中主要的初级、次级代谢产物糖类、黄酮类、皂苷类成分为研究对象, 采用网络药理学方法阐释黄芪发挥抗疲劳药效的作用机制, 为后续实验提供理论依据。

1 方法

1.1 黄芪化学成分数据库的构建

本课题组前期从黄芪中指出 12 种次级代谢成分以及氨基酸、有机酸、糖等多种初级代谢成分, 结合中医药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/>, Version 2.3) 获取黄芪的化学成分, 并依照实验室建立的方法^[16]对其中的成分进行含量测定。

1.2 化合物分子结构的构建

将上述黄芪活性成分在 ChemBiodraw Ultra 12.0 软件中绘制出结构图, 并以 mol2 格式存储。利用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、TCMSP、ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>)、Chemical Book (<http://www.chemicalbook.com/>) 对其分子结构进行确证。

1.3 黄芪活性成分作用靶点的预测和筛选

将“1.2”项下得到的 11 个化合物分子结构的 mol2 格式文件导入到 PharmMapper, 选取黄芪的潜在作用靶点。利用 UniProt 数据库的 UniProt KB (<https://www.uniprot.org/uniprot/>) 搜索功能, 导入黄芪蛋白靶点的 PDB ID 号, 限定物种为人, 经检索和转化操作得到黄芪活性成分的基因靶点。下载每个成分反向对接预测结果, 将对接得分 (Z) 值按照降序排列, 选取每个成分的前 300 个靶点用于后续研究。

1.4 抗疲劳靶点筛选

通过在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>, Version 4.5.0) 和 OMIM 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) 中输入关键词 fatigue、anti-fatigue, 搜索已报道的与疲劳相关的基

因, 去除重复基因和假阳性基因, 与上述作用靶点进行匹配, 搜集黄芪活性成分抗疲劳的潜在作用靶点。

1.5 活性成分-抗疲劳作用靶点网络构建

将黄芪活性成分和抗疲劳作用靶点筛选结果, 去除无对应靶点的化学成分, 并删除重复的靶点。将数据导入 Cytoscape Version 3.6.0 软件, 构建黄芪活性成分-抗疲劳作用靶点网络。Cytoscape 软件的核心架构是网络, 每个节点 (node) 是基因、蛋白质或分子, 节点与节点之间的连接 (edge) 代表这些生物分子之间的相互作用, 节点的度值 (degree) 代表网络中节点与节点相连的数目, 度值越大, 这个靶点越有可能成为化合物的关键作用靶点。

1.6 蛋白相互作用网络构建与分析

String 数据库 (<https://string-db.org/>, Version 10.5) 是一种包含已知和预测的蛋白质-蛋白质相互作用的数据库。将黄芪的蛋白靶点导入 String 数据库, 限定物种为人, 获取蛋白相互作用关系, 结果保存成 TSV 格式, 保留文件中 node1、node2 和 Combined score 信息并导入 Cytoscape 软件绘制相互作用网络, 并对网络进行分析 (Cytoscape→Tools→Networkanalyzer→Networkanalysis→Analyze network), 保存网络分析结果, 使用 Cytoscape 中的 Generate style from statistics 工具 (Cytoscape→Tools→Network analyzer→Networkanalysis→Generate style from statistics) 将节点大小和颜色设置用于反映度值的大小, 边的粗细设置用于反映结合率评分 (Combine score) 的大小, 获得最终的蛋白相互作用网络。

1.7 作用靶点类型归属

DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/>

[web/DisGeNET/menu](http://www.disgenet.org/), Version 5.0) 是包含与人类疾病相关的基因和变体的平台之一。在 DisGeNET 数据库选用基因进行检索, 将上述黄芪的作用靶点依次导入数据库中, 获取靶点类型信息 (Protein Class)。

1.8 生物过程与通路分析

生物学信息注释数据库 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>, Version 6.8) 为大规模的基因或蛋白提供系统综合的生物功能注释信息, 能够找出最显著富集的生物学注释。将黄芪的作用靶点导入 DAVID 数据库, Select Identifier 设置为 OFFICIAL GENE SYMBOL, List Type 设置为 Gene List, 限定物种为人, 对黄芪作用靶点进行基因本体 (GO) 分析和 KEGG 通路分析, 保存结果。设定阈值 $P < 0.05$, 并按照涉及的靶点数目多少进行排序, 筛选排名靠前的生物过程或通路。

1.9 通路图绘制

利用 UniProt 数据库的 UniProt KB 搜索功能分别获取黄芪 76 个抗疲劳靶点的 Uniprot ID。利用 KEGG 数据库 (<http://www.kegg.jp>) KEGG mapping 中的 KEGG Mapper 工具, 将上述黄芪关键靶点的 UniProt ID 导入, 限定物种为人, 获取黄芪抗疲劳作用的通路图, 筛选排名靠前的几条通路并进行整合绘制最终的通路图。

2 结果

2.1 黄芪活性成分的筛选

本研究结合实验室前期工作共筛选到 11 种黄芪活性成分 (表 1), 包括 6 种黄酮类成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、异黄烷、紫檀烷, 4 种皂苷类成分黄芪皂苷 I、II、

表 1 黄芪活性成分

Table 1 Chemical compounds in *Astragali Radix*

编号	化合物	分子式	相对分子质量	CAS 号	质量分数/ (mg·g ⁻¹)	OB/%	DL	度	介数中心性
1	芒柄花苷 (ononin)	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	430.409	486-62-4	0.152	11.52	0.78	11	0.115 820 97
2	芒柄花素 (formononetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.268	485-72-3	—	69.67	0.21	14	0.181 537 97
3	毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-O-β-D-glucoside)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.408	20633-67-4	0.692	5.49	0.81	17	0.184 064 97
4	毛蕊异黄酮 (calycosin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.267	20575-57-9	0.043	47.75	0.24	10	0.054 564 23
5	异黄烷 (7,2'-dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan)	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	302.320	52250-35-8	0.007	4.56	0.27	19	0.218 451 66
6	紫檀烷 (3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan)	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	300.310	73340-41-7	0.186	64.26	0.42	14	0.122 182 42
7	黄芪皂苷 I (astragaloside I)	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	869.055	84680-75-1	0.552	46.79	0.11	19	0.125 904 90
8	黄芪皂苷 II (astragaloside II)	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	827.018	84676-89-1	0.254	46.06	0.13	15	0.079 425 64
9	黄芪皂苷 III (astragaloside III)	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.981	84687-42-3	0.665	31.83	0.10	22	0.232 776 63
10	黄芪皂苷 IV (astragaloside IV)	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.981	84687-43-4	1.317	22.50	0.15	16	0.099 735 47
11	蔗糖 (sucrose)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.300	57-50-1	—	7.17	0.23	9	0.097 019 74

OB-口服生物利用度; DL-类药性

OB-oral bioavailability; DL-drug likeness

III、IV 以及蔗糖。

2.2 黄芪活性成分-抗疲劳作用靶点预测

将 PharmMapper、ChEMBL 数据库得到的所有靶点,删除重复并去除假阳性,整合后得到 11 种活性成分靶点 231 个,由 GeneCards、OMIM 数据库检索整合得到疲劳/抗疲劳靶点 861 个,将黄芪

活性成分对应靶点与疲劳相关靶点取交集得到活性成分-疾病靶点 76 个,具体信息见表 2。

2.3 活性成分-作用靶点网络构建

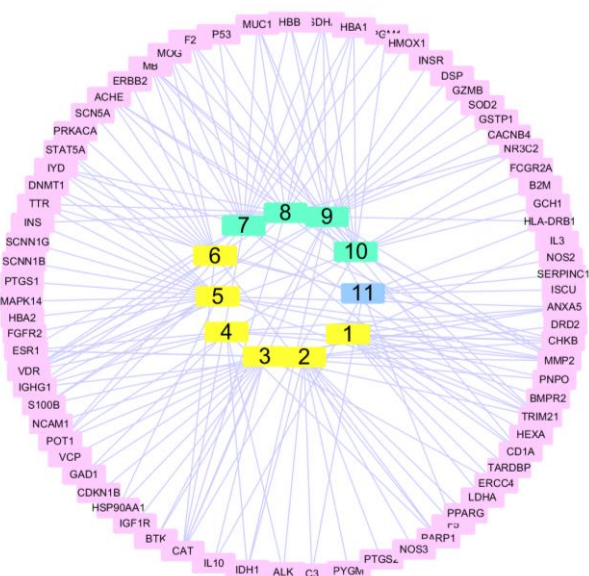
使用 Cytoscape 软件构建活性成分-抗疲劳作用靶点网络图,如图 1 所示,共有 87 个节点,166 条边,其中黄色表示 6 个黄酮类成分,绿色表示 4 种

表 2 黄芪潜在抗疲劳作用靶点

Table 2 Information of potential anti-fatigue targets from *Astragali Radix*

编号	基因	Uniprot	度	介数中心性	编号	基因	Uniprot	度	介数中心性
1	ACHE	P22303	4	0.009 389 61	39	INS	P01308	2	0.002 238 32
2	ALK	Q9UM73	2	0.001 927 28	40	INSR	P06213	1	0
3	ANXA5	P08758	4	0.020 079 92	41	ISCU	Q9H1K1	1	0
4	B2M	P61769	1	0	42	IYD	Q6PHW0	4	0.013 352 12
5	BMP2	Q13873	1	0	43	LDHA	P00338	1	0
6	BTK	Q06187	2	0.005 473 08	44	MAPK14	Q16539	1	0
7	C3	P01024	2	0.010 382 91	45	MB	P02144	5	0.019 160 66
8	CACNB4	O00305	1	0	46	MMP2	P08253	8	0.102 200 19
9	CAT	P04040	6	0.047 729 21	47	MOG	Q16653	3	0.008 120 52
10	CD1A	P06126	3	0.012 461 63	48	MUC1	P15941	4	0.006 591 04
11	CDKN1B	P46527	1	0	49	NCAM1	P13591	1	0
12	CHKB	Q9Y259	5	0.067 450 88	50	NOS2	P35228	1	0
13	DNMT1	P26358	2	0.002 792 66	51	NOS3	P29474	1	0
14	DRD2	P14416	1	0	52	NR3C2	P08235	3	0.003 809 36
15	DSP	P15924	1	0	53	PARP1	P09874	3	0.011 959 17
16	ERBB2	Q96RT1	1	0	54	PDE4A	P27815	2	0.000 710 00
17	ERCC4	Q92889	2	0.003 183 53	55	PGM1	P36871	2	0.003 183 53
18	ESR1	P03372	4	0.051 995 34	56	PNPO	Q9NVS9	4	0.013 724 47
19	F2	P00734	3	0.001 877 02	57	POT1	Q9NUX5	1	0
20	F5	P12259	2	0.010 382 91	58	PPARG	P37231	1	0
21	FCGR2A	P12318	1	0	59	PRKACA	P17612	1	0
22	FGFR2	P21802	1	0	60	PTGS1	P23219	1	0
23	GAD1	Q99259	2	0.002 163 9	61	PTGS2	P35354	1	0
24	GCH1	P30793	1	0	62	PYGM	P11217	3	0.018 342 23
25	GSTP1	P09211	1	0	63	S100B	P04271	1	0
26	GZMB	P10144	1	0	64	SCN5A	Q14524	1	0
27	HBA1	P69905	4	0.006 591 04	65	SCNN1B	P51168	1	0
28	HBA2	P69905	1	0	66	SCNN1G	P51170	4	0.006 591 04
29	HBB	P68871	3	0.003 809 36	67	SDHA	P31040	1	0
30	HEXA	P06865	1	0	68	SERPINC1	P01008	1	0
31	HLA-DRB1	P01911	2	0.020 960 89	69	SOD2	P04179	2	0.002 792 66
32	HMOX1	P09601	1	0	70	STAT5A	P42229	1	0
33	HSP90AA1	P07900	2	0.005 209 13	71	TARDBP	Q13148	2	0.015 465 57
34	IDH1	O75874	3	0.035 358 01	72	TP53	P04637	6	0.057 967 21
35	IGF1R	P08069	1	0	73	TRIM21	P19474	3	0.035 433 00
36	IGHG1	P01857	4	0.031 969 51	74	TTR	P02766	1	0
37	IL10	P22301	2	0.018 094 38	75	VCP	P55072	7	0.058 656 38
38	IL3	P08700	1	0	76	VDR	P11473	2	0.002 238 32

皂苷类成分, 蓝色表示蔗糖, 粉色表示这些活性成分对应的抗疲劳作用相关靶点。边代表活性成分与抗疲劳靶点的相互作用。分析结果显示 11 种活性成分分别对应 11、14、17、10、19、14、19、15、22、16、9 个靶点。从韦恩图 (图 2) 中可以看出, 黄酮



黄色代表黄酮类成分, 绿色代表皂苷类成分, 蓝色代表蔗糖, 粉色代表靶点 1-芒柄花苷 2-芒柄花素 3-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 4-毛蕊异黄酮 5-异黄烷 6-紫檀烷 7-黄芪皂苷 I 8-黄芪皂苷 II 9-黄芪皂苷 III 10-黄芪皂苷 IV 11-蔗糖

The yellow square represent flavonoid, the green square represent saponin, the blue square represent sucrose, the pink square represent target of anti-fatigue 1-ononin 2-formononetin 3-calcycosin-7-O-β-D-glucoside 4-calcycosin 5-7,2-dihydroxy-3,4-dimethoxyisoflavan 6-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan 7-astragaloside I 8-astragaloside II 9-astragaloside III 10-astragaloside IV 11-sucrose

图 1 黄芪活性成分-抗疲劳靶点网络图

Fig. 1 Active ingredients-antifatigue target network of *Astragali Radix*

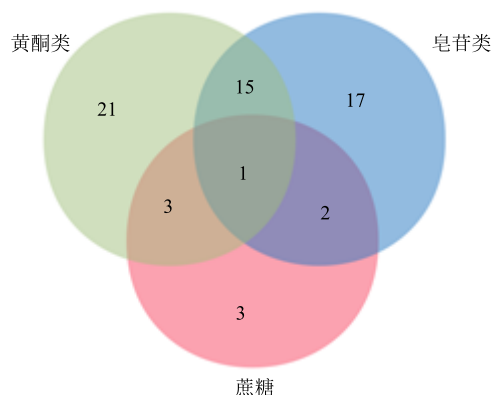


图 2 黄芪活性成分-抗疲劳作用靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of active ingredients-antifatigue target of *Astragali Radix*

类成分作用靶点 40 个, 皂苷类成分作用靶点 35 个, 糖类成分作用靶点 9 个, 其中黄酮类和皂苷类成分共同作用靶点 16 个, 黄酮类成分与蔗糖共同作用靶点 4 个, 皂苷类成分与蔗糖共同作用靶点 3 个, 3 类成分共同作用靶点只有 1 个。基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、维生素 D 受体 (VDR)、E3 泛素蛋白连接酶 (TRIM21)、过氧化氢酶 (CAT)、肌红蛋白 (MB)、胆碱激酶 β (CHKB) 等与化学成分关联度较大, 分别与 8、7、6、6、5、5 个活性成分相关联。每个活性成分可作用于多个靶点, 每个靶点也与多个化合物相关, 这说明黄芪在发挥药效作用时不同化合物具有共同的作用。

2.4 蛋白相互作用网络构建与分析

如图 3 所示, 图中节点表示蛋白, 边表示蛋白之间的关联, 共涉及 71 个节点, 367 个边。度值越大, 节点越大, 在整个网络中占的地位越大, 通过计算每个节点的拓扑性质寻找黄芪抗疲劳作用的关键靶点, 在蛋白相互作用网络中筛选出的度值排名靠前的靶蛋白在黄芪抗疲劳过程中发挥着重要作用。最后选择 21 个度值 ≥ 15 , 介数中心性 ≥ 0.020479 , 中心接近度 (closeness) ≥ 0.555555 的节点作为主要节点, 并将关键靶点依次导入 DisGeNET 数据库, 获取靶点对应的类型, 主要信息见表 3。结果表明黄芪抗疲劳过程中有胰岛素、信号转导因子、凝血因子 II、神经细胞黏附分子、受体 (过氧化物酶体增殖物激活受体、雌激素受体)、蛋白 (膜联蛋白、肿瘤蛋白 p53、微球蛋白、热休克蛋

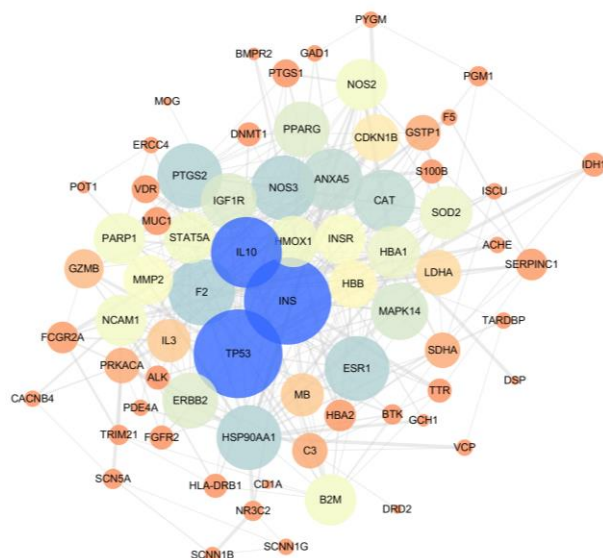


图 3 蛋白-蛋白相互作用网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network

表 3 黄芪抗疲劳作用的关键靶点及其拓扑性质

Table 3 Key target of anti-fatigue effect of *Astragali Radix* and its topological properties

基因	蛋白	蛋白分类	度	介数中心性	中心接近度
TP53	tumor protein p53	transcription factor	40	0.170 574	0.673 076
INS	insulin	null	39	0.180 655	0.679 611
IL10	nterleukin 10	signaling molecule	28	0.085 877	0.603 448
F2	coagulation factor II, thrombin	Protease、hydrolase	25	0.061 820	0.583 333
ESR1	estrogen receptor 1	transcription factor、receptor、nucleic acid binding	24	0.044 828	0.560 000
HSP90AA1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1	chaperone	24	0.098 027	0.573 770
NOS3	nitric oxide synthase 3	null	24	0.056 097	0.573 770
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	oxidoreductase	24	0.028 184	0.564 516
ANXA5	annexin A5	null	22	0.020 479	0.569 105
CAT	catalase	oxidoreductase	22	0.032 151	0.555 555
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	Transferase、kinase	19	0.004 305	0.534 351
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	null	18	0.014 903	0.551 181
PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma	transcription factor、receptor、nucleic acid binding	18	0.006 760	0.526 316
HBA1	hemoglobin subunit alpha 1	transfer/carrier protein	16	0.040 562	0.530 303
SOD2	superoxide dismutase 2	oxidoreductase	16	0.012 881	0.510 949
β2M	beta-2-microglobulin	defense/immunity protein	15	0.054 458	0.510 949
HMOX1	heme oxygenase 1	oxidoreductase	15	0.014 738	0.526 316
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	cell adhesion molecule、phosphatase、hydrolase、defense/immunity protein; receptor	15	0.042 386	0.514 706
NOS2	nitric oxide synthase 2	null	15	0.008 583	0.526 316
PARP1	poly(ADP-ribose) polymerase 1	ligase、nucleic acid binding	15	0.012 362	0.518 519
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	transcription factor、nucleic acid binding	15	0.007 264	0.503 597

白等)、酶(过氧化氢酶、酪氨酸激酶、一氧化氮合酶、聚合酶、蛋白酶、血红素加氧酶 I、凝血酶)等物质的参与。

2.5 基因功能与通路分析

对筛选得到的 21 个关键靶点进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。GO 富集分析包括生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)3 个分支。设定阈值 $P < 0.05$, 共富集到 134 条生物过程或通路, 筛选靠前的生物过程或通路, 用 GraphPad Prism 5.0 绘图, 见图 4~7。

如图 4 所示, 这些靶点主要涉及一氧化氮(NO)的生物合成过程(positive regulation of nitric oxide biosynthetic process)、过氧化氢反应(response to hydrogen peroxide)、棕色脂肪细胞分化的正调节(positive regulation of brown fat cell differentiation)、活性氧代谢过程(positive regulation of reactive oxygen species metabolic process)等生物过程。疲

劳产生的原因一部分是由于机体能量供应不足, 线粒体产生机体中几乎所有的能量和热, NO 为一种血管扩张剂, 可以刺激新的线粒体的合成, 能直接调控氧与血红素的结合与释放, 而且以这种方式控制对线粒体的氧的供给, 从而发挥抗疲劳的作用^[17]。黄芪总皂苷抗运动性疲劳作用可能与其抑制运动氧化应激所致的自由基增加和改善海马神经元损伤有关^[18]。

MF 分析(图 5)中可以看出, 靶点主要涉及蛋白质结合(protein binding)、酶结合(enzyme binding)、血红素结合(heme binding)、蛋白磷酸酶结合(protein phosphatase binding)等分子功能。血红素加氧酶-1(HO-1)是一种诱导性限速酶, 它有助于抑制炎症细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-6 的产生, 并且已经成为调节炎症反应和各种疾病中的氧化应激关键分子^[19]。

CC 分析(图 6)可以看出, 靶点主要涉及细胞

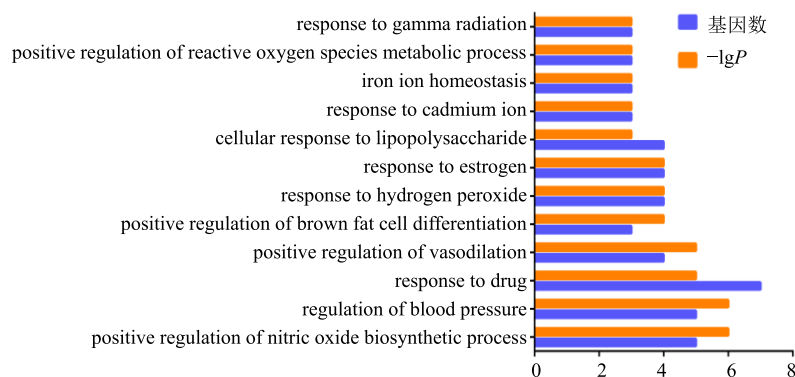


图 4 黄芪活性成分抗疲劳靶点的 BP 富集分析

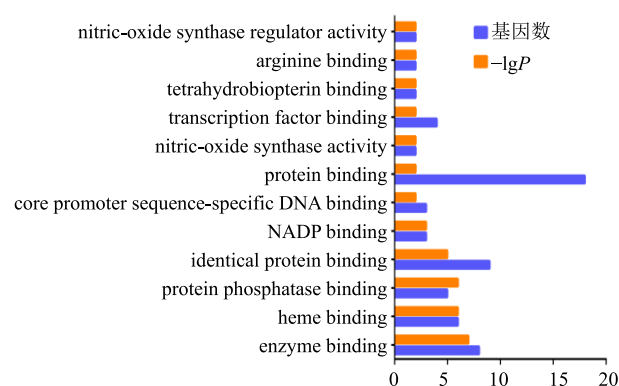
Fig. 4 Enriched gene ontology terms for BP of potential anti-fatigue targets from main active ingredients of *Astragali Radix*

图 5 黄芪活性成分抗疲劳靶点的 MF 富集分析

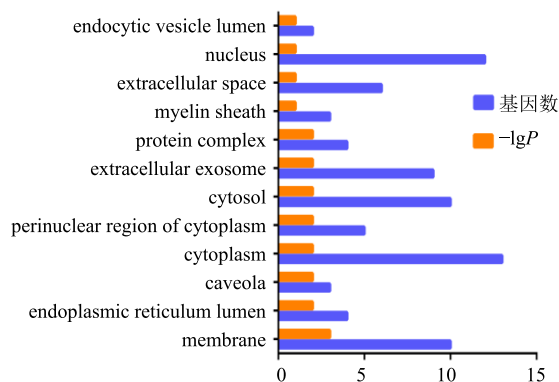
Fig. 5 MF enrichment analysis of potential anti-fatigue targets from main active ingredients of *Astragali Radix*

图 6 黄芪活性成分抗疲劳靶点的 CC 富集分析

Fig. 6 CC enrichment analysis of potential anti-fatigue targets from active ingredients of *Astragali Radix*

质 (cytoplasm)、核 (nucleus)、膜 (membrane)、细胞外分泌物 (extracellular exosome)。核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 通常存在于细胞质中, Wang 等^[20]指出药物抗疲劳可能与 Nrf2 介导的氧化应激有关。

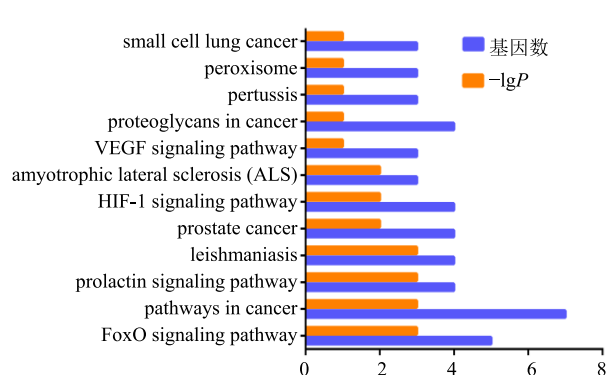


图 7 黄芪抗疲劳靶点的 KEGG 通路

Fig. 7 KEGG pathway of anti-fatigue targets of *Astragali Radix*

KEGG 通路分析结果 (图 7) 显示, 黄芪抗疲劳靶点主要涉及 FoxO 信号通路 (5 个靶点/23%)、癌症相关通路 (7 个靶点/33%)、低氧诱导因子 (HIF-1) 信号通路 (4 个靶点/19%), 过氧化物酶体 (3 个靶点/14%) 等信号通路。说明黄芪主要活性成分的作用靶点分布在不同的代谢通路, 多成分、多靶点相互调节是抗疲劳的可能作用机制。

2.6 靶点通路分析

利用 KEGG Mapper 工具获取黄芪抗疲劳的通路图, 将 KEGG 得出的前 10 条通路整合绘制通路图 (图 8)。图中箭头表示促进作用, T-箭头表示抑制作用, 不同颜色箭头表示不同的通路。通路靶点标记为蓝色, 黄芪抗疲劳靶点标记为粉色。图中显示出黄芪抗疲劳作用主要涉及了癌症通路、FoxO、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt)、HIF-1、血管内皮生长因子 (VEGF)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、Ca²⁺ 信号通路、氧化应激反应、DNA 修复过程等, 涉及 10 个黄芪抗疲劳靶点 (占黄芪抗疲劳关键靶点的 49%)。提示黄芪抗疲劳靶

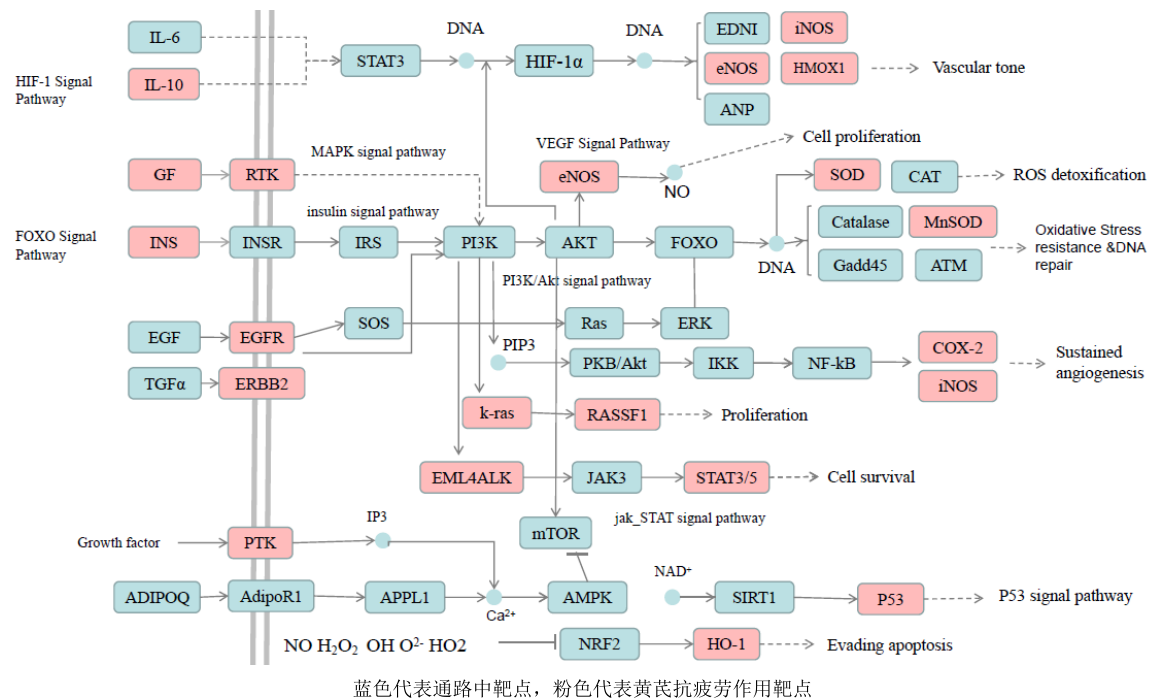


图 8 黄芪抗疲劳通路

Fig. 8 Anti-fatigue pathway of *Astragali Radix*

点位于这几条通路中, 通过调节其中的几个环节发挥作用, 绝大多数靶点在多条通路中发挥作用, 如 PI3K、Akt 等。

3 讨论

黄芪作为补气良药, 有明显的抗疲劳作用, 然而其作用机制尚不明确。网络药理学与中医药整体观的思想基本一致, 有助于系统全面地阐释黄芪抗疲劳的作用机制。本研究以课题组前期指认出的主要初级、次级代谢成分作为活性成分, 共筛选得到毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、异黄烷、紫檀烷、黄芪皂苷 I、II、III、IV 以及蔗糖共 11 种活性成分, 包括 6 种黄酮类、4 种皂苷类以及蔗糖。有研究表明, 黄芪皂苷明显提高运动性疲劳大鼠骨骼肌的过氧化物酶 (POD) 水平、总抗氧化能力 (T-AOC) 和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性, 降低乳酸脱氢酶 (LDH) 的含量, 具有保护运动性疲劳大鼠肌组织的作用^[21]。黄芪中黄酮类成分与一些其他类成分 (包含皂苷类) 指纹图谱色谱峰对抗疲劳呈增强作用^[22]。黄芪多糖可延长小鼠负重力竭游泳时间, 降低机体血乳酸的积累, 增加肝糖原的储备, 起到延缓疲劳发生/提高运动能力的作用, 能提高小鼠肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性, 具有抗氧

化损伤作用, 能保护运动诱导的氧化应激^[23]。

活性成分-作用靶点网络显示了黄芪抗疲劳多成分、多靶点的特点, 蛋白相互作用网络表明黄芪的靶蛋白之间存在着相互关系, 是一个复杂交错的网络, 并非单独发挥作用。本研究结果表明 11 种活性成分均具有抗疲劳作用, 其中黄芪皂苷 I、III 及毛蕊异黄酮葡萄糖苷、异黄烷连接较多靶点数。胰岛素 (INS)、IL-10、TP53、CAT 等度值较大, 是黄芪抗疲劳的主要作用靶点, 预测其在黄芪抗疲劳活性中发挥主要作用。INS、CAT 是黄酮类和皂苷类化合物的主要作用靶点, INS 是多功能的蛋白质激素, 对糖、脂肪和蛋白质的代谢起着重要的调节作用^[24]。较高的 CAT 活性有较高的抗氧化功能, 可以及时清除体内自由基, 减轻过氧化对机体组织细胞的损害和促进疲劳的恢复^[25]。IL-10、TP53 是蔗糖的主要作用靶点, IL-10 是要由 Th2 细胞所产生的一种细胞因子, 是以抑制 Th 细胞克隆细胞因子合成为特点的多效免疫调节因子, 对运动性疲劳的恢复有重要作用^[26]。P53 是一种肿瘤抑制基因, 它所介导的细胞信号转导途径在调节细胞正常生命活动中起重要作用, 有研究表明, 通过抑制大鼠骨骼肌 p53 蛋白的表达, 可减少运动所引起的肌肉细胞凋亡的发生^[27]。

富集分析和靶点归属分析结果表明,黄芪抗疲劳涉及细胞过程、代谢过程和对应激的应答等生物过程,涉及细胞器、细胞膜和细胞质等细胞组分,涉及小分子、阳离子、金属离子等分子,有信号分子、转录因子、受体、蛋白和酶等多种物质的参与,是一个复杂的过程。

从通路中可以看出,黄芪抗疲劳主要涉及癌症通路、FOXO、Nrf2、HIF-1、MAPK、PI3K/Akt、VEGF、Ca²⁺、腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)/p53 及 insulin 信号通路,涉及氧化应激、DNA 修复、细胞增殖、活性氧(ROS)解毒等反应。有研究表明 FoxO 转录因子作为 Fox 家族主要成员,是胰岛素/胰岛素样生长因子(INS/IGF-1)信号通路中的关键因子,通过转录调控和信号转导途径在动物的生理调节、代谢和细胞周期等方面起重要作用^[28]。Hribal 等^[29]发现,在成肌细胞 c2c12 中,通过 siRNA 抑制 Foxo1 的表达来增加肌浆球蛋白的表达有利于肌细胞分化;在依赖于 Akt 的肌浆蛋白生成过程中, FoxO1 蛋白发挥关键作用,提示黄芪可以通过 FoxO 通路影响疲劳大鼠的肌肉分化从而缓解疲劳。Nrf2 是转录水平细胞氧化的关键调节因子,它直接控制 SOD、HO-1 和 CAT 的浓度。HO-1 有助于将血红素转化为胆红素,胆红素是一种有效的抗氧化剂。当 ROS 过度积累时, Nrf2 被激活并积聚在细胞质中。通过改善体内 Nrf2 的活性,可以有效地预防氧化应激损伤,从而缓解疲劳^[20]。HIF-1 是低氧条件下组织细胞产生的一种核蛋白,用于维持氧稳态的关键物质,它与其下游靶基因结合,使得机体低氧耐受能力增强。运动会造成机体组织细胞的运动性缺氧,骨骼肌中 HIF-1 α 蛋白含量与基因表达会上升^[30]。MAPK 信号系统在机体对环境应激适应及维持机体内氧化抗氧化动态平衡状态中发挥着重要的作用。有研究表明^[31],黑果枸杞子可以有效缓解过度训练导致的机体内环境失衡,提高机体尤其是骨骼肌的氧自由基清除能力,抑制 MAPK 信号通路的蛋白表达,预防和延缓运动疲劳的发生与发展。PI3K 在磷酸激酶家族中的占有重要地位,它可以调节细胞的生长、凋亡, Akt 是丝氨酸/苏氨酸激酶,是 PI3K 下游最主要的效应分子之一。任增辉^[32]研究发现大强度递增负荷训练会使大鼠海马组织中 PI3K、Akt 蛋白及 mRNA 表达水平上升,能够说明大强度递增负荷运动能够激活 PI3K/Akt 信号转导通路,发挥其抗凋亡作用。AMPK 是细胞能量代谢中的关键调节

蛋白, AMPK 激活可调节细胞凋亡^[33-34]。AMPK 活化导致 p53 的积累从而诱导肌肉组织细胞凋亡,通过抑制 AMPK/p53 信号通路可以抑制肌肉组织细胞的凋亡,减少组织细胞损伤,从而缓解肌肉疲劳。INS 是糖与脂肪能量代谢过程中主要的调控激素。INS 首先与细胞表面胰岛素受体(INSR)结合,激活其 β 亚基的蛋白酪氨酸激酶(PTK)。胰岛素受体底物蛋白(IRS)作为一种锚定蛋白可以激活至少 2 条已知信号途径:一是通过 IRS 激活 PI3K 途径;另一条是通过生长因子受体结合蛋白 2(Grb2)/SOS 和 RAS 蛋白活化 MAPK 途径^[35]。

综上所述,本研究结果显示黄芪的 11 个活性成分作用于 76 个靶点,涉及多种过程、分子和通路,体现了黄芪多成分-多靶点-多途径的作用特点。通过蛋白相互作用网络预测了黄芪抗疲劳作用的 21 个重要靶蛋白,并对关键靶点作用进行归属,绘制通路图,通过文献调研对各条通路进行验证,但还应进一步对相关靶点进行实验验证。

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] 王景利. 运动性疲劳的产生及中医调节机制 [J]. 辽宁体育科技, 2005, 27(6): 42-45.
- [3] Son C G. Review of the prevalence of chronic fatigue worldwide [J]. *Korean Orient Med*, 2012, 33: 25-33.
- [4] De Meirleir K L, Khaiboullina S F, Frémont M, et al. Plasmacytoid dendritic cells in the duodenum of individuals diagnosed with myalgic encephalomyelitis are uniquely immunoreactive to antibodies to human endogenous retroviral proteins [J]. *In Vivo*, 2013, 27(2): 177-187.
- [5] Norheim K B, Jonsson G, Omdal R. Biological mechanisms of chronic fatigue [J]. *Rheumatology*, 2011, 50(6): 1009-1018.
- [6] Cho H J, Kivimäki M, Bower J E, et al. Association of C-reactive protein and interleukin-6 with new-onset fatigue in the Whitehall II prospective cohort study [J]. *Psychol Med*, 2013, 43(8): 1-11.
- [7] Chu C, Qi L W, Liu E H, et al. *Radix Astragalus* (Astragalus): Latest advancements and trends in chemistry, analysis, pharmacology and pharmacokinetics [J]. *Cur Org Chem*, 2010, 14(16): 1792-1807.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [9] 刘傲雪, 王晶娟, 张贵君, 等. 基于大鼠体内多成分代谢的黄芪质控成分遴选 [J]. 药物评价研究, 2018,

- 41(2): 216-222.
- [10] 张 瑞, 李 科, 李爱平, 等. 基于 ^1H NMR 技术黄芪抗疲劳作用的肌肉代谢组学研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(5): 782-790.
- [11] 郭 泽, 邹 娟, 张 贤, 等. 黄芪总黄酮小鼠体内抗炎作用研究 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 64-66.
- [12] 刘 莎, 符 州. 黄芪的免疫调节作用及其临床应用 [J]. 国际中医中药杂志, 2006, 28(4): 203-206.
- [13] 卢紫娟, 刘海霞, 李 昆, 等. 基于网络药理学的脑震宁颗粒治疗脑外伤的机制分析 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3531-3540.
- [14] 许文倩, 秦雪梅, 刘月涛. 基于网络药理学的黄芪建中汤治疗慢性萎缩性胃炎作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(15): 3550-3561.
- [15] 张王宁, 高 耀, 李 科, 等. 基于网络药理学的黄芪总黄酮治疗肾病综合征的机制研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(9): 1429-1441.
- [16] 高四云, 李 科, 熊一峰, 等. 恒山仿野生黄芪绝对生长年限鉴别及黄酮和皂苷积累规律研究 [J]. 药学报, 2018, 53(1): 147-154.
- [17] 李凤娜, 陈晓安. 一氧化氮对线粒体生物合成的积极影响 [J]. 生物技术通报, 2005(2): 57.
- [18] 冯毅翀, 许金叶, 赵自明. 黄芪总皂苷对运动性疲劳大鼠海马功能和形态的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(5): 420-423.
- [19] Duan F F, Guo Y, Li J W, *et al.* Antifatigue effect of luteolin-6-C-neohesperidoside on oxidative stress injury induced by forced swimming of rats through modulation of Nrf2/ARE signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, doi: 10.1155/2017/3159358.
- [20] Wang X, Qu Y D, Zhang Y F, *et al.* Antifatigue potential activity of sarcodon imbricatusin acute excise-treated and chronic fatigue syndrome in mice via regulation of Nrf2-mediated oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/9140896.
- [21] 李 爽, 艾英伟, 阿拉木斯, 等. 黄芪总苷对运动性疲劳大鼠骨骼肌抗氧化能力、ATP 酶活性及乳酸含量的影响 [J]. 吉林体育学院学报, 2010, 26(3): 68-69.
- [22] 邓书鸿, 宋 丽, 段小菊, 等. 黄芪提取物 HPLC 指纹图谱与抗疲劳作用的相关分析 [J]. 中药材, 2013, 36(2): 260-264.
- [23] 吴 铭, 周桃英, 陈年友. 黄芪多糖抗疲劳作用研究 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(1): 175-177.
- [24] 王亚坤, 孙文敬, 刘敬泽. D-核糖对大鼠负载游泳后胰岛素、去甲肾上腺素、肾上腺素的影响及其抗疲劳、抗缺氧能力研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(11): 591-596.
- [25] 徐小仙, 熊正英. 紫草提取物有效成分测定及对骨骼肌自由基代谢和抗疲劳能力影响的实验研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 444-450.
- [26] 陈英松, 卢 峻, 吴七柱, 等. 艾灸对疲劳模型大鼠血清 IL-6 和 IL-10 的影响 [J]. 山东中医杂志, 2008, 27(6): 404-405.
- [27] 姜 振, 张 林. 高压氧对递增负荷训练大鼠腓肠肌 P53、Bcl-2 蛋白表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1309-1312.
- [28] 杨燕军, 徐海伟, 代 奇. FoxO 调控细胞增殖、分化与凋亡 [J]. 生理科学进展, 2008, 39(4): 362-364.
- [29] Hribal M L, Nakae J, Kitamura T, *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(4): 535-541.
- [30] 郝少伟. 高原低氧环境大强度运动后增压辅助方法对大鼠骨骼肌中 HIF-1 α 及骨骼肌能量代谢的影响 [D]. 西宁: 青海师范大学, 2014.
- [31] 崔笑梅, 曹建民, 周海涛, 等. 黑果枸杞子对过度训练大鼠骨骼肌 MAPK 信号通道蛋白表达及抗氧化应激损伤能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 122-128.
- [32] 任增辉. 大强度递增负荷运动对大鼠海马细胞凋亡 PI3K/AKT 信号通路的影响 [D]. 济南: 山东体育学院, 2015.
- [33] Chen L, Xu B, Liu L, *et al.* Hydrogen peroxide inhibits mTOR signaling by activation of AMPK α leading to apoptosis of neuronal cells [J]. *Lab Invest*, 2010, 90(5): 762-773.
- [34] Towler M C, Hardie D G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling [J]. *Circ Res*, 2007, 100(3): 328-341.
- [35] 常 盛. PI3K/Akt 信号通路与胰岛素抵抗的研究进展 [J]. 中医药导报, 2008, 14(9): 113-115.