

• 药理与临床 •

基于网络药理学的刺五加总苷抗疲劳作用机制研究

高 寒¹, 徐 伟^{1*}, 张宇航¹, 邱智东¹, 傅超美², 蔡晓娜³, 贾艾玲^{1,2*}

1. 长春中医药大学药学院 中药有效成分省部共建教育部重点实验室, 吉林 长春 130117

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

3. 北华大学附属医院 妇产科, 吉林 吉林 132000

摘要: **目的** 基于网络药理学方法探究刺五加总苷抗疲劳的潜在作用机制。**方法** 以刺五加总苷中 7 种主要活性成分为研究对象, 利用 Swiss Target Prediction 网络平台预测其作用靶点; 通过 GeneCards、OMIM、DiGseE 数据库获取与疲劳有关的靶标, 借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建“活性成分-抗疲劳靶点”网络图, 并通过度值筛选核心成分; 使用 String 平台进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 结合 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络图, 通过度值、节点紧密度、节点介度筛选关键靶点, 并利用 DisGeNET 数据库对靶点的类型进行归属; 使用 AutoDock vina 软件对核心成分与关键靶点进行分子对接; 采用 DAVID 数据库对刺五加总苷抗疲劳的作用靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。**结果** 获得刺五加总苷中 7 种主要活性成分包括刺五加苷 A、刺五加苷 B、刺五加苷 B1、刺五加苷 C、刺五加苷 D、刺五加苷 E 和芝麻素, 预测得到抗疲劳靶点 83 个, 筛选出核心成分 3 个, 包括刺五加苷 B、刺五加苷 B1、刺五加苷 C, 关键靶点 4 个, 包括热休克蛋白 90 α 家族 A 级成员 1 (heat shock protein 90 α family class A member 1, HSP90AA1)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9); 分子对接结果显示, 核心成分与关键靶点的结合能力与三磷酸腺苷二钠 (ATP-2Na) 相近; 基因富集分析得到 GO 功能条目 250 个 ($P < 0.05$), 通路 36 条 ($P < 0.05$); 网络药理学分析显示, 刺五加总苷主要通过药物反应、细胞增殖的正调控、缺氧反应等生物过程, 以及调节缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、胰岛素信号通路和物质代谢等发挥抗疲劳作用。**结论** 初步探究了刺五加总苷抗疲劳作用的潜在靶点和相关通路, 为刺五加抗疲劳作用机制的研究提供科学依据和参考。

关键词: 刺五加总苷; 抗疲劳; 网络药理学; 刺五加苷 B; 刺五加苷 B1; 刺五加苷 C**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)02-0413-09**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.014Anti-fatigue mechanism of *Acanthopanax senticosus* glycosides based on network pharmacologyGAO Han¹, XU Wei¹, ZHANG Yu-hang¹, QIU Zhi-dong¹, FU Chao-mei², QI Xiao-na³, JIA Ai-ling^{1,2}

1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Active Ingredient of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Department of Obstetrics and Gynecology, Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132000, China

Abstract: Objective To explore the anti-fatigue mechanism of *Acanthopanax senticosus* glycosides based on network pharmacology. **Methods** Seven main components in *A. senticosus* glycosides were used as research objects. Swiss Target Prediction was used to predict the potential targets of these components. The related targets of anti-fatigue were provided by GeneCards, OMIM, DiGseE

收稿日期: 2020-07-22**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81973712); 吉林省发改委项目 (2020C007); 吉林省科技厅项目 (20200602034ZP)**作者简介:** 高 寒 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。E-mail: 2353731484@qq.com***通信作者:** 贾艾玲 (1986—), 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向为从事中药制剂研究。E-mail: cczyjia@163.com

徐 伟 (1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药制剂新技术及中药新药开发研究。E-mail: 1272349594@qq.com

databases, and Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the active ingredients-anti-fatigue target network. Core components were selected by degree value. The protein interaction network (PPI) was constructed by String platform and Cytoscape 3.7.2. Key targets were selected by degree value, closeness, and betweenness, and the type of targets were attributed by DisGeNET database. AutoDock vina software was used to dock the molecules of the core components with the key targets. The geneontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathways involved in the targets were analyzed by DAVID database. **Results** A total of seven active components including eleutheroside A, eleutheroside B, eleutheroside B1, eleutheroside C, eleutheroside D, eleutheroside E, sesamin and 83 targets of *A. senticosus* glycosides were involved, three core components including eleutheroside B, eleutheroside B1 and eleutheroside C, four key targets including heat shock protein 90 α family class A member 1 (HSP90AA1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) were screened. Molecular docking showed that the binding ability of the core components to the key targets was close to that of ATP-2Na. After gene enrichment analysis, 250 GO terms ($P < 0.05$) and 36 KEGG pathways ($P < 0.05$) were obtained. The results showed that the process of response to drug, positive regulation of cell proliferation, response to hypoxia were mainly involved by adjusting the HIF-1, PI3K-Akt, insulin signaling pathway and material metabolism to exert its anti-fatigue effect. **Conclusion** Main targets and related pathways of anti-fatigue effects of *A. senticosus* glycosides were preliminarily investigated, which provided scientific basis and reference for study of anti-fatigue mechanism of *A. senticosus*.

Key words: *Acanthopanax senticosus* glycosides; anti-fatigue; network pharmacology; eleutheroside B; eleutheroside B1; eleutheroside C

疲劳最早记载于《金匱要略》，是一种常见而复杂的疾病状态，随着现代生活节奏加快，由疲劳引发的慢性疲劳综合征发病率逐年上升，给社会造成了很大负担^[1]。世界卫生组织提出，疲劳已成为现今社会危害人类身心健康的主要因素之一，但其发病机制尚未完全阐明^[2]。研究表明，疲劳的产生可能与免疫系统异常、线粒体/能量代谢异常、心血管系统异常等过程有关^[3-5]。

刺五加为五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 的干燥根和根茎或茎^[6]。刺五加的应用历史悠久，历代本草著作中均有所记载。南朝陶弘景曾在《名医别录》中指出，刺五加以“五叶者良”，具有“补中、益精、坚筋骨、强志意”的功效。明代李时珍在《本草纲目》中记载“宁得五加一把，不要金玉满车”，称刺五加“久服轻身耐老”，被列为上品；刺五加性温，味辛、微苦，归脾、肾、心经，主治脾肾阳虚、腰膝酸痛、体虚乏力、食欲不振、失眠多梦等症^[7]。现代药理学研究表明，刺五加在免疫调节、抗疲劳、抗肿瘤、抗衰老、抗应激等方面均有良好表现^[8-11]。其中抗疲劳作用尤为显著，刺五加总苷是刺五加抗疲劳的主要活性成分，其作用较刺五加根提取物强 40~120 倍，且强于人参提取物和人参皂苷^[12]，但刺五加总苷发挥抗疲劳作用的分子机制尚不明确。网络药理学融合系统生物学、多向药理学等学科，借助计算机分析技术，通过“疾病-表型-基因-药物”多层次网络的构建，从整体角度探索药物与疾病间的关联，

进而多层次地阐明药物的作用机制，体现了中医辨证的特点和中药治疗的整体观，近年来已经成为中药研究的一种有效技术手段^[13-18]。本研究旨在通过网络药理学方法，基于“药物-靶点-通路”多层次网络模式，预测刺五加总苷抗疲劳作用的相关靶点及作用机制，并利用分子对接技术对预测的结果进行佐证，为刺五加的临床应用提供一定的理论依据。

1 方法

1.1 刺五加总苷活性成分的筛选

刺五加根茎的主要活性成分为酚苷类化合物，通过文献检索选取刺五加总苷中含量较高的苷类成分，使用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索得到各成分简化分子线性输入规范 (simplified molecular-input line-entry system, SMILES)。

1.2 刺五加总苷活性成分作用靶点的预测

Swiss Target Prediction (<http://www.swisstarget-prediction.ch/>) 是一种基于已知配体的 2D、3D 相似性度量的组合来预测小分子靶点的网络平台^[19]。输入 SMILES 式，并将属性设置为“homo sapiens”，获得所选成分潜在靶点的预测结果。

1.3 抗疲劳靶点筛选

在 GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>)、DiGSeE (<http://210.107.182.61/geneSearch/>) 数据库中搜索“fatigue”“anti-fatigue”，获得与疲劳相关的基因，合并 3 个数据库的查找结果并删除重复靶点，所得

靶点即为抗疲劳作用的相关靶点。

1.4 “活性成分-抗疲劳作用靶点”网络构建

将刺五加活性成分作用靶点和抗疲劳靶点的筛选结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件,进行可视化处理,构建“刺五加总苷活性成分-抗疲劳作用靶点”网络。网络图中,关键化合物和靶点用节点表示,节点之间相互作用的关系用边表示。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

String (<https://string-db.org/>) 是用来分析蛋白质之间相互作用的数据库,可进一步研究刺五加总苷抗疲劳的作用机制^[20]。将得到的抗疲劳靶点上传至 String 数据库,限定研究物种为“homo sapiens”,将最低相互作用评分设置为最高置信度 (highest confidence) = 0.900,隐藏没有相互联系的节点,获得蛋白互作关系,导出数据文件,保留文件中节点 1、节点 2、连接评分数据,并导入到 Cytoscape 3.7.2 软件中,设置参数使节点大小和颜色深浅反映度值大小,边的粗细反映结合率评分高低,建立 PPI 网络图。

1.6 作用靶点类型归属

DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/web/DisGeNET/menu>) 是包含与人类疾病相关的基因和变体的平台之一。在 DisGeNET 数据库中选择基因检索的方式,将刺五加活性成分的作用靶点依次导入到数据库中,获得靶点类型信息。

1.7 分子对接验证

将核心成分与关键靶点进行分子对接,并用临床治疗药物三磷酸腺苷二钠 (ATP-2Na) 进行对照分析^[21]。首先通过 PubChem 数据库获得化合物的 3D 结构,并利用 Open Babel 2.3.2 软件将获得的 SDF 文件转化为 PDB 格式。从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获得关键靶点的 3D 结构 PDB 格式,运用 PyMOL 2.3.4 软件对蛋白质进行去水、去配体等操作,使用 AutoDock 4.2.6 软件对关键靶点进行加氢和计算电荷处理,将化合物和靶蛋白格式转换为 pdbqt 格式,利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件进行对接,对结果进行分析处理。

1.8 生物过程与通路分析

生物学信息注释数据库 (DAVID, <https://david.ncicrf.gov/summary.jsp>) 作为最权威的数据库,可提供系统综合的生物功能注释信息。将刺五加总苷的抗疲劳靶点导入 DAVID 数据库,标识符设置为

“official gene symbol”,列表类型设置为“gene list”,限定物种为“homo sapiens”。对潜在靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析,以研究刺五加总苷抗疲劳的主要生物功能;进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路分析,以研究刺五加总苷抗疲劳的主要信号通路。设定 $P < 0.05$,并按照 P 值由小到大进行排序,选取前 15 条生物过程或通路,进行可视化处理。

2 结果

2.1 刺五加总苷抗疲劳活性成分的筛选

通过文献检索选取刺五加总苷中含量较高的苷类成分^[22],分别为刺五加苷 A (eleutheroside A)、刺五加苷 B (eleutheroside B)、刺五加苷 B1 (eleutheroside B1)、刺五加苷 C (eleutheroside C)、刺五加苷 D (eleutheroside D)、刺五加苷 E (eleutheroside E)、芝麻素 (sesamin),为刺五加根茎总苷的主要活性成分。因此,本研究选择以上 7 种苷类成分进行网络药理学分析。

2.2 “活性成分-抗疲劳作用靶点”网络构建

Swiss Target Prediction 数据库预测 7 种活性成分作用靶点共 154 个,由 GeneCards、OMIM、DiGSE 数据库筛选得到疲劳/抗疲劳靶点 4955 个,取交集得到刺五加总苷抗疲劳靶点 83 个。借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建“活性成分-抗疲劳靶点”网络图,见图 1。该网络中共有 90 个节点 (化合物 7 个、靶点 83 个),115 条相互作用的边,内圈代表刺五加总苷的活性成分,外圈代表这些活性成分对应的抗疲劳靶点,边代表两者的相互作用。度值较高的化合物刺五加苷 B、刺五加苷 B1、刺五加苷 C 可能是刺五加总苷抗疲劳的核心成分。

2.3 PPI 网络分析

如图 2 所示,图中节点表示靶蛋白,边表示蛋白之间的关联,网络图中共涉及 60 个节点、120 条边。节点越大,度值越大;边越粗表明连接评分越高。PPI 网络中度值的平均值为 4,节点紧密度的平均值为 0.33,节点介度的平均值为 0.07。经筛选,度值、节点紧密度、节点介度均大于平均值的靶点有 4 个,分别为热休克蛋白 90 α 家族 A 级成员 1 (heat shock protein 90 α family class A member 1, HSP90AA1)、信号传导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth

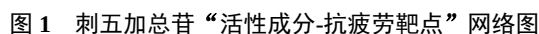


Fig. 1 “Active ingredient-antifatigue target” network of *A. senticosus* glycosides

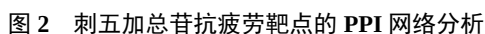


Fig. 2 PPI network of antifatigue targets of *A. senticosus* glycosides

factor A, VEGFA)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9), 提示它们可能是刺五加活性成分发挥抗疲劳作用的关键靶点。将以上关键靶点依次导入 DisGeNET 数据库, 获取靶点对应的类型, 基本信息见表 1。结果表明, 刺五加抗疲劳过程中有蛋白、转录因子、酶等物质的参与。

2.4 分子对接验证

核心成分、ATP-2Na 与关键靶点的分子对接结果见表 2。一般认为结合能小于 0，化合物与蛋白可自发结合，结合能越低，发生作用的可能性越大。分子对接结果显示，网络药理学所预测的核心成分与关键靶点均可自发结合，且与 ATP-2Na 结合能力相近，证实了网络药理学预测结果的可靠性。其中，核心成分刺五加苷 B、刺五加苷 B1 与关键靶点结合能均 ≤ -20.9 kJ/mol，与蛋白 HSP90AA1 的结合能力强于 ATP-2Na，表明这两个化合物与关键靶点结合活性更好^[23]，其与关键蛋白之间的相互作用见图 3。

表 1 刺五加总苷抗疲劳关键靶点的基本信息

Table 1 Basic information on key antifatigue targets of *A. senticosus* glycosides

靶点	蛋白类别	度值	节点紧密度	节点介度
HSP90AA1	分子伴侣	10	0.344 370 86	0.221 214 41
STAT3	核酸结合、转录因子	11	0.358 620 69	0.224 987 43
VEGFA	信号分子	8	0.344 370 86	0.111 229 95
MMP9	水解酶、蛋白酶	9	0.348 993 29	0.329 595 73

表 2 刺五加总苷抗疲劳核心成分与关键靶点的分子对接结果

Table 2 Molecular docking results of core antifatigue components of *A. senticosus* glycosides with key targets

化合物	CAS 号	结合能/(kJ·mol ⁻¹)			
		HSP90AA1	MMP9	STAT3	VEGFA
刺五加苷B	118-34-3	-36.8	-27.2	-27.2	-20.9
刺五加苷B1	16845-16-2	-34.7	-28.9	-28.0	-22.6
刺五加苷C	15486-24-5	-23.4	-25.5	-21.7	-19.7
ATP-2Na	51963-61-2	-33.0	-33.0	-30.5	-24.3

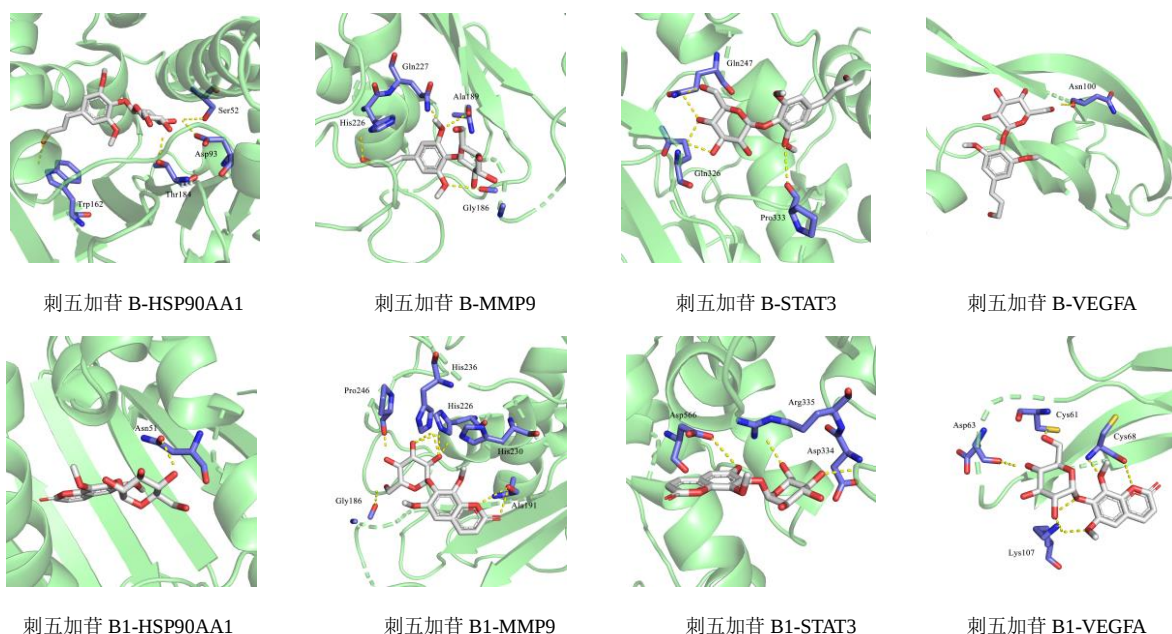


图 3 刺五加苷 B、刺五加苷 B1 与关键靶点的对接构象

Fig. 3 Docking conformations of eleutheroside B and eleutheroside B1 with key targets

2.5 GO 功能富集分析

GO 分析分为生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组分 (cellular component, CC) 3 个部分, 共同描述基因产物的功能。借助 DAVID 数据库对刺五加总苷发挥抗疲劳作用的 83 个潜在靶点进行 GO 富集分析, 设定 $P < 0.05$, 共获得 250 条生物过程或通路, 其中 175 个与 BP 相关、51 个与 MF 相关、24 个与 CC 相关。根据 P 值从小到大排序, 选取前 15 条 GO 条目, 利用 Omicshare 数据库 (<http://www.omicshare.com/>) 绘制高级气泡图, 如图 4~6 所示。气泡表示富集在该条 GO 条目上的基因个数, 气泡越大, 表示富集在该条 GO 条目上的基因个数越多。

如图 4 所示, 靶点主要涉及药物反应 (response to drug)、细胞增殖的正调控 (positive regulation of cell proliferation)、MAP 激酶活性的正调控 (positive regulation of MAP kinase activity)、缺氧反应 (response to hypoxia) 等生物过程。体内短暂缺氧, 糖酵解过程增强, 产生大量乳酸、尿素等代谢产物, 从而产生疲劳^[24]。刺五加总苷抗疲劳的作用机制可能是通过增强机体运动时的摄氧能力, 从而改变机体供能方式, 延缓运动性疲劳的产生。如图 5 所示, 靶点主要集中于药物结合 (drug binding)、多巴胺结合 (dopamine binding)、金属内肽酶活性 (metalloendopeptidase activity)、神经递质受体活性 (neurotransmitter receptor activity) 等分子功能。多

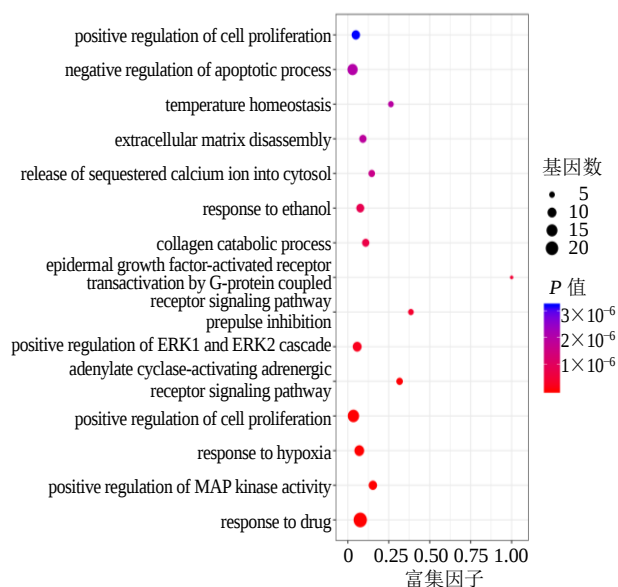


图 4 BP 富集分析

Fig. 4 BP enrichment analysis

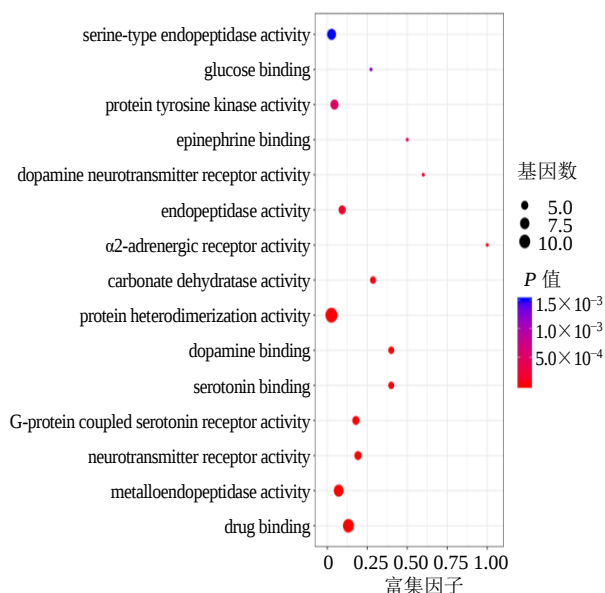


图 5 MF 富集分析

Fig. 5 MF enrichment analysis

巴胺 (dopamine, DA) 是中枢神经系统的重要神经递质之一, 可通过调节情绪从而缓解疲劳。徐明等^[25]研究表明, 在运动过程中保持 DA 的合成与代谢, 可延迟疲劳发生。如图 6 所示, 靶点主要涉及质膜 (plasma membrane)、胞液 (cytosol)、蛋白质细胞外基质 (proteinaceous extracellular matrix) 等细胞组分。关键靶点 HSP90AA1 可在胞液中维持蛋白质稳态并实现细胞保护功能^[26]。

2.6 KEGG 通路富集分析

KEGG 分析共获得 36 条通路 ($P < 0.05$), 按照 P 值从小到大筛选出前 15 条通路, 利用 GraphPad

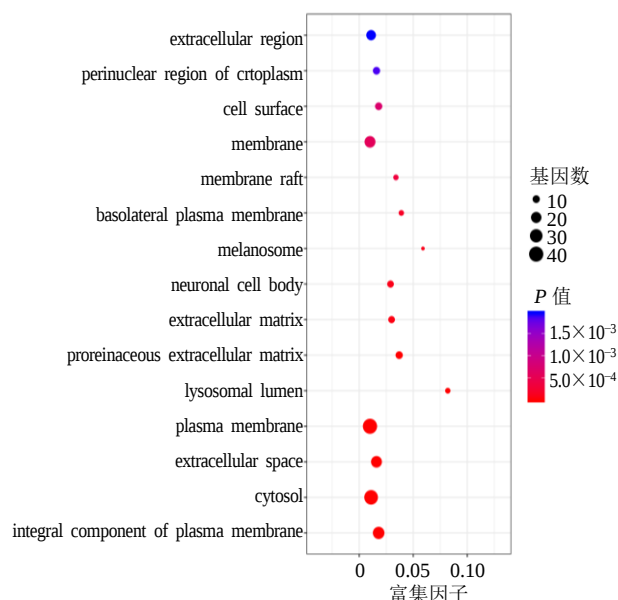


图 6 CC 富集分析

Fig. 6 CC enrichment analysis

Prism 7 绘图, 如图 7 所示。主要通路有钙信号通路 (calcium signaling pathway)、缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、胰岛素信号通路 (insulin signaling pathway)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway) 等, 涉及淀粉、蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 和氮代谢 (nitrogen metabolism) 等, 涉及神经活性配体-受体相互作用和钙离子信号传导途径, 具体信息见表 3。HIF-1 信号通路与无氧运动引起的细胞缺氧应激有关, 可导致乳酸等代谢物质堆积, 产生疲劳感^[27]; 胰岛素信号通路与疲劳关系密切, 运动中胰岛 β 细胞分泌胰岛素减少, 肌肉群收缩, 胰岛素摄取量增多, 胰岛素可促进运动过程中的脂质代谢, 抑制肝脏糖异生, 从而促进运动中的能量供应^[28]。

3 讨论

《本草纲目》中记载刺五加“久服轻身耐老”, 与现代药理学研究中刺五加的抗疲劳作用密切相关, 网络药理学体现了中医辨证的特点和中药治疗的整体观, 有助于多层次地阐明药物的作用机制。本研究基于网络药理学方法, 借助相关数据库和软件对刺五加总苷抗疲劳的核心成分与作用机制进行了科学探讨。

“活性成分-作用靶点”网络表明刺五加总苷抗疲劳具有多成分、多靶点的特点, PPI 网络表明刺五加总苷的靶蛋白之间相互关联, 共同发挥作用。7

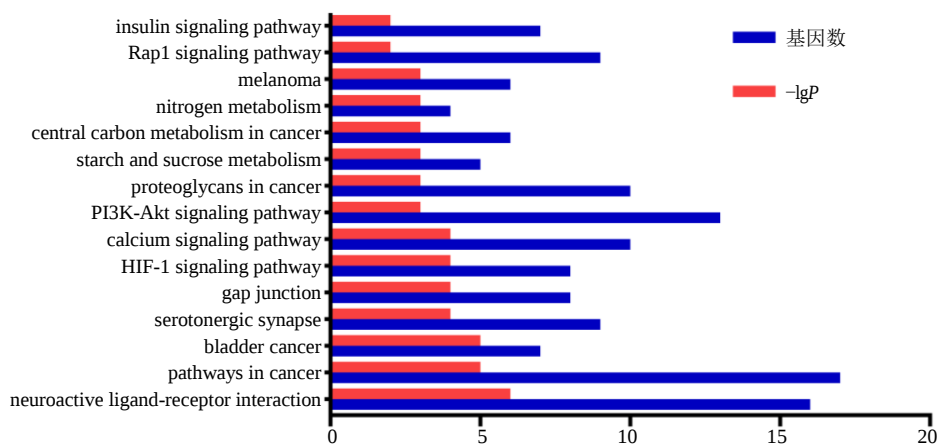


图 7 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis

表 3 KEGG 通路富集分析

Table 3 KEGG pathway enrichment analysis

ID	通路信息	基因数	P值
hsa04080	neuroactive ligand-receptor interaction	16	1.19×10^{-7}
hsa05200	pathways in cancer	17	2.04×10^{-6}
hsa05219	bladder cancer	7	3.58×10^{-6}
hsa04726	serotonergic synapse	9	1.81×10^{-5}
hsa04540	gap junction	8	3.31×10^{-5}
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	8	5.81×10^{-5}
hsa04020	calcium signaling pathway	10	9.28×10^{-5}
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	13	2.11×10^{-4}
hsa05205	proteoglycans in cancer	10	2.16×10^{-4}
hsa00500	starch and sucrose metabolism	5	3.59×10^{-4}
hsa05230	central carbon metabolism in cancer	6	5.15×10^{-4}
hsa00910	nitrogen metabolism	4	6.73×10^{-4}
hsa05218	melanoma	6	8.31×10^{-4}
hsa04015	Rap1 signaling pathway	9	1.47×10^{-3}
hsa04910	insulin signaling pathway	7	3.08×10^{-3}

种苳类成分均具有抗疲勞作用，其中刺五加苳 B、刺五加苳 B1、刺五加苳 C 的度值较高，可能是刺五加总苳发挥抗疲勞作用的核心成分。HSP90AA1、STAT3、VEGFA、MMP9 为刺五加总苳抗疲勞的关键靶点，分子对接结果显示，核心成分与关键靶点均可自发结合，且与临床药物 ATP-2Na 结合能力相近，与网络药理学的预测结果一致。刺五加苳 B、刺五加苳 B1 与关键靶点结合活性更高，与蛋白 HSP90AA1 的结合能力强于 ATP-2Na。研究表明，刺五加苳 B 可明显减轻高强度运动对大鼠肝脏、心肌等的损伤，有利于减少含氮化合物的分解代谢供能，可延缓机体运动性疲勞的发生并促进疲勞的消除^[29]。骨骼肌细胞中的酶、激素和其他相关因子的变化对疲勞的产生和恢复有重要的影响，刺五加苳 B 可促进骨骼生成，其分子机制可能与核转录因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、PI3K/Akt 信号通路有

关^[30-31]。有关刺五加苳 B1、刺五加苳 C 的抗疲勞作用报道较少，本研究可为 2 个化合物的抗疲勞作用研究提供科学依据。

长时间的运动会产生大量的超氧阴离子自由基，破坏肌细胞膜的脂质双分子层，导致膜上一些重要的蛋白质失活，从而影响肌细胞膜的正常功能^[32]。热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 是一类高度保守的蛋白质，参与多种生物过程，HSP90AA1 作为家族的重要成员，可通过其 C 末端结构域嵌入脂质双层中，在应激条件下对膜稳定具有重要作用^[33]。白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 是由辅助 T 细胞 2 (T helper 2, Th2)、CD4⁺T 等多种适应性免疫细胞分泌的一种多效价细胞因子，可促进运动性疲勞的恢复，其表达受 STAT3 调控^[34-35]。VEGFA 是血小板衍生生长因子家族的成员，可增强血管通透性，缺血/缺氧条件下通过诱导

VEGFA 表达可促进血管生成,对组织含氧量的恢复和器官功能的修复具有重要意义^[36]。 Ca^{2+} 过量蓄积可抑制线粒体呼吸,使三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合成下降,导致肌肉疲劳^[32]。金属蛋白酶是可降解细胞外基质的具有钙、锌依赖性的内源性蛋白酶家族,MMP9 是家族中重要一员,其结构中存在与结构功能相关的钙离子和锌离子结合位点,其表达可能与疲劳有关。

GO 功能分析结果表明,刺五加总苷抗疲劳广泛涉及细胞过程,物质、能量代谢过程,对应激的应答等多种生物学过程,且包括神经递质、金属离子、蛋白等多种物质的参与,表明了疲劳发生机制的复杂性。KEGG 富集分析表明,刺五加总苷抗疲劳过程中主要通路有 HIF-1、 Ca^{2+} 、PI3K-Akt、癌症、胰岛素信号通路,且与氮代谢、淀粉和蔗糖代谢等物质代谢过程有关。HIF-1 是细胞在缺氧条件下产生的蛋白性调节因子,运动会致机体组织细胞的运动性缺氧,骨骼肌中 HIF-1 α 蛋白和基因表达显著上升^[37]。运动产生过量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),诱导机体氧化应激,引起肌肉疲劳,PI3K-Akt 通路可调节糖代谢和脂肪代谢,调节细胞凋亡,是机体抵抗氧化应激的重要通路^[38]。抑制 PI3K/Akt 通路会使 HIF-1 活性降低,表明 PI3K/Akt 通路可能参与 HIF-1 活化^[39]。运动时离子代谢的紊乱,也会导致疲劳的产生。研究表明,大鼠急性运动后线粒体 Ca^{2+} 含量增加,ATP 水平下降,导致膜脂质过氧化反应加强,促进疲劳的发生,提示钙离子通路的调节对机体抗疲劳具有重要意义。刺五加总苷主要通过作用于细胞凋亡、炎症反应、氧化应激等过程共同发挥抗疲劳作用。

综上所述,刺五加总苷抗疲劳的作用是通过多成分、多靶点、多通路的协同作用来实现的。本研究预测的潜在活性成分、靶点、生物功能和通路文献报道基本符合,分子对接结果验证了预测的核心成分和关键靶点具有较好的结合活性,表明本研究的预测较为准确可靠,可从分子层面为阐释刺五加“久服轻身耐老”的抗疲劳作用机制提供一定理论基础和参考依据,课题组后续将进一步对相关靶点和通路进行验证。

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] 徐艺园, 王凯, 王佳音, 等. 疲劳产生相关机制研究进展 [J]. 科学技术创新, 2019, 24(23): 50-51.

[3] Saha A K, Schmidt B R, Wilhelmy J, et al. Red blood cell deformability is diminished in patients with chronic fatigue syndrome [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2019, 71(1): 113-116.

[4] Morris G, Maes M. Mitochondrial dysfunctions in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome explained by activated immuno-inflammatory, oxidative and nitrosative stress pathways [J]. *Metab Brain Dis*, 2014, 29(1): 19-36.

[5] Miwa K, Fujita M. Small heart with low cardiac output for orthostatic intolerance in patients with chronic fatigue syndrome [J]. *Clin Cardiol*, 2011, 34(12): 782-786.

[6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 215.

[7] 陈士林, 林余霖. 中草药大典: 原色中草药植物图鉴 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2006: 309.

[8] 潘景芝, 金莎, 崔文玉, 等. 刺五加的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 353-360.

[9] Huang L Z, Huang B K, Ye Q, et al. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(1): 213-219.

[10] Zhang X L, Ren F, Huang W, et al. Anti-fatigue activity of extracts of stem bark from *Acanthopanax senticosus* [J]. *Molecules*, 2010, 16(1): 28-37.

[11] 涂正伟, 周渭渭, 单淇, 等. 刺五加的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.

[12] 曲中原. 刺五加总苷抗疲劳实验研究 [J]. 中成药, 2009, 31(3): 474-476.

[13] 王萍, 唐仕欢, 苏瑾, 等. 基于整合药理学的中药现代研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(7): 1297-1302.

[14] 王乐琪, 张云帆, 李莎莎, 等. 丹参治疗微循环障碍作用机制的“成分-靶点-通路”多层次互作网络模型研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 439-450.

[15] 郑义蕾, 王潇, 刘芳, 等. 基于网络药理学的厚朴“发汗”科学内涵探究 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1857-1862.

[16] Zhang G B, Li Q Y, Chen Q L, et al. Network pharmacology: A new approach for Chinese herbal medicine research [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2013, 2013: 621423.

[17] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.

[18] Li S, Ding Q Y. New progress of interdisciplinary research between network toxicology, quality markers and TCM network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 347-348.

- [19] Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, *et al.* Swiss target prediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: W32-W38.
- [20] von Mering C, Jensen L J, Snel B, *et al.* STRING: Known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: D433-D437.
- [21] 栾海云, 杨清宝, 杨茗, 等. 左卡尼汀通过改变小鼠乳酸和糖原含量延缓疲劳的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(8): 1017-1020.
- [22] 高彦宇, 李文慧, 寇楠, 等. 刺五加化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2019, 36(2): 113-116.
- [23] 朱晓芹, 刘志强, 王博龙. 基于生物分子网络和分子对接研究槲皮素抗宫颈癌的机制 [J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(1): 23-31.
- [24] 潘翔, 徐峰. 刺五加抗疲劳功能实验研究的进展 [J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2): 39-43.
- [25] 徐明, 蔡国梁, 李若愚. 运动性疲劳分子生物学机制的研究进展 [J]. 成都体育学院学报, 2005, 31(4): 91-94.
- [26] Stebbins C E, Russo A A, Schneider C, *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent [J]. *Cell*, 1997, 89(2): 239-250.
- [27] Le Moine C M, Morash A J, McClelland G B. Changes in HIF-1 α protein, pyruvate dehydrogenase phosphorylation, and activity with exercise in acute and chronic hypoxia [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301(4): R1098-R1104.
- [28] 阮亦, 王欢, 顾伟, 等. 基于网络药理学的萆参合剂抗运动性疲劳作用机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(3): 650-655.
- [29] 吴丽群, 叶齐, 齐荔红. 刺五加苷 B 抗运动性疲劳作用的实验研究 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(1): 50-53.
- [30] 赵星龙, 吴晓光, 尹瑞欣. 运动性疲劳与肝脏、骨骼肌细胞的关系研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(19): 59-63.
- [31] Liu J, Zhang Z, Guo Q, *et al.* Syringin prevents bone loss in ovariectomized mice via TRAF₆ mediated inhibition of NF- κ B and stimulation of PI3K/AKT [J]. *Phytomedicine*, 2018, 42: 43-50.
- [32] Lamb G D, Stephenson D G. Effects of intracellular pH and Mg²⁺ on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibres of the rat [J]. *J Physiol*, 1994, 478(2): 331-339.
- [33] Li P P, Wang J J, Zou Y, *et al.* Interaction of Hsp90AA1 with phospholipids stabilizes membranes under stress conditions [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2019, 1861(2): 457-465.
- [34] Govender U, Corre B, Bourdache Y, *et al.* Type I interferon-enhanced IL-10 expression in human CD4⁺T cells is regulated by STAT3, STAT2, and BATF transcription factors [J]. *J Leukoc Biol*, 2017, 101(5): 1181-1190.
- [35] 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.
- [36] 张学弟, 孙慧林, 高连泽, 等. 长链非编码 RNA 在器官缺血/缺氧诱导血管生成中作用研究进展 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2020, 34(2): 207-209.
- [37] 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.
- [38] 吴丽君, 赵静, 孙卓, 等. 运动氧化应激与 PI3K-Akt 通路研究进展 [J]. 体育研究与教育, 2019, 34(2): 1-5.
- [39] 张荣天, 雷鸣, 刘伟, 等. Hif-1 α 及 ERK 信号通路在缺血再灌注损伤组织中的表达研究现状 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(19): 23-24.

[责任编辑 李亚楠]