基于代谢组学和斑马鱼模型探究西洋参抗疲劳的关键活性成分

刘慧茹[1,2], 汪海洋[2], 王　喆[2], 陈立国[2], 程贵东[2], 马智慧[1,2], 王松松[1], 李正国[1,3*], 韩利文[2*]

(1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355;　2. 山东第一医科大学药学与制药科学学院, 山东省医学科学院药物研究所, 卫生部生物技术药物重点实验室, 山东 济南 250000;　3. 山东省济宁市食品药品检验检测研究院, 山东 济宁 272027)

摘要: 探索西洋参皂苷类成分中抗疲劳关键活性成分。利用斑马鱼模型评价西洋参样本的抗疲劳活性; 运用代谢组学技术分析鉴定不同产地西洋参中主要皂苷类差异成分; 通过构建西洋参皂苷类成分-疾病靶点PPI蛋白互作网络初步筛选出西洋参发挥抗疲劳作用的活性物质和相关靶点, 利用分子对接的方法筛选出关键活性成分; 最后使用斑马鱼模型评价关键活性成分的抗疲劳活性, 动物实验获得山东省医学科学院伦理委员会的批准(SYXK20220005)。斑马鱼活性评价结果显示, 两个产地的西洋参样本的活性存在显著差异, 进一步经过代谢组学检测、模式判别共鉴定出其中10个差异皂苷类成分可能与抗疲劳活性有关。借助成分-疾病靶点的PPI筛选的抗疲劳的核心靶点, 结合类药性参数及分子对接技术发现其中pseudoginsenoside F11与5个靶点均具有较好的结合活性。经斑马鱼模型验证发现拟人皂苷F11具有显著的抗疲劳活性。本研究运用代谢组学和斑马鱼模型筛选出了西洋参发挥抗疲劳的关键活性物质, 为西洋参皂苷类抗疲劳的进一步研究提供参考。

关键词: 代谢组学; 西洋参; 抗疲劳; 斑马鱼; 拟人参皂苷F11

中图分类号: R917　　　**文献标识码**: A　　　**文章编号**: 0513-4870(2023)04-1024-09

Exploring the key anti-fatigue components of American ginseng based on metabolomics and zebrafish models

LIU Hui-ru[1,2], WANG Hai-yang[2], WANG Zhe[2], CHEN Li-guo[2], CHENG Gui-dong[2], MA Zhi-hui[1,2], WANG Song-song[1], LI Zheng-guo[1,3*], HAN Li-wen[2*]

(*1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;　2. School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences & Institute of Materia Medica, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, NHC Key Laboratory of Biotechnology Drugs (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250000, China;　3. Jining Food and Drug Inspection and Testing Research Institute, Jining 272027, China*)

Abstract: The aim of this paper is to explore the key anti-fatigue active components in the saponin-like composition of American ginseng. The anti-fatigue activity of western ginseng samples was evaluated using a zebrafish model; metabolomics techniques were used to identify the main saponins in western ginseng from different origins; the active substances and relevant targets of the anti-fatigue effect of western ginseng were initially screened by constructing a PPI protein interaction network between western ginseng saponins and disease targets, and the key active ingredients were screened using a molecular docking method; finally, the anti-fatigue

收稿日期: 2022-11-28;　修回日期: 2023-03-14.

基金项目: 中央本级重大增减支项目 (2060302-1907-09); 山东第一医科大学学术提升计划 (2019LJ003).

*通讯作者 Tel: 86-537-3165932, E-mail: lzgwh123@sina.com;

Tel: 86-531-59567223, E-mail: hanliwen08@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1277

activity of the key active ingredients was evaluated using a zebrafish, animal experiment was approved by the Ethics Committee of Shandong Academy of Medical Sciences (SYXK20220005). The anti-fatigue activity of the key active ingredients was evaluated using a zebrafish model. The results of the zebrafish activity evaluation showed that there were significant differences in the activities of the western ginseng samples from the two origins, and a total of 10 different saponins were identified as possibly related to the anti-fatigue activity after further metabolomic testing and pattern discrimination. The core anti-fatigue targets were screened with the help of component-disease target PPI, combined with pharmacophore-like parameters and molecular docking techniques, and pseudoginsenoside F11 was found to have good binding activity to five of the targets. Finally, the zebrafish model revealed that pseudoginsenoside F11 exhibited significant anti-fatigue activity. This study used metabolomics and zebrafish model to screen the key active substances of pseudoginsenoside F11 for its anti-fatigue activity, which will provide a reference for further research on the anti-fatigue of pseudoginsenosides.

Key words: metabolomics; American ginseng; anti-fatigue; zebrafish; pseudoginsenoside F11

疲劳 (fatigue) 通常被定义为难以开始或维持自愿的精神和身体活动。长时间的疲劳将会使机体进入亚健康状态, 从而导致机体平衡紊乱, 甚至引发如身体功能性障碍等多种继发性疾病[1]。随着生活节奏和生活压力的增加, 疲劳人群在不断扩大, 而且年轻化趋势明显[2,3]。疲劳引发后续效应以及对健康的持续影响也越来越引起研究者的关注[4,5]。

西洋参是人参属五加科植物西洋参 (*Panax quiquefolium* L.) 的根, 具有补气养阴, 清热生津, 消除烦倦, 固精安神等功效。在日趋紧张繁忙的现代生活中, 采用西洋参煎煮或泡水缓解疲劳, 已经成为目前白领阶层应用最为广泛的药食同源中药材。目前已经发现西洋参醇提物具有延缓疲劳产生和加速疲劳消除的作用[6]。此外, 有研究证明了西洋参中的蛋白与小分子寡肽具有显著的抗疲劳作用, 但是, 西洋参中明确的具有抗疲劳的关键药效物质仍然了解甚少[7,8]。

代谢组学是对生物系统内产生或消耗的小分子的研究, 旨在研究分子对生物系统的影响, 提供了一种全面的方法来探索整个生物体中各种因素引起的分子变化[9,10]。代谢组学专注于生物系统中代谢产物的全面分析和无偏见的同时鉴定和量化, 这与中医药的整体概念一致。本研究运用代谢组学技术分析鉴定了不同产地中西洋参根茎中主要差异皂苷类成分, 通过构建西洋参差异代谢物−疾病靶点互作可视化网络, 初步筛选西洋参抗疲劳有效成分及其作用靶点, 利用分子对接的方法进一步筛选出抗疲劳的关键活性成分, 最后采用斑马鱼模型验证拟人参皂苷F11抗疲劳活性, 确认西洋参发挥抗疲劳作用的关键药效成分。

材料与方法

实验试剂 西洋参分别自陕西汉中留坝、山东文登大水泊镇分批收集, 分别命名为SX1～5、SD1～5, 经山东第一医科大学韩利文副研究员鉴定为五加科植物西洋参 *Panax quiquefolium* L. 的根。拟人参皂苷F11对照品购至成都埃法生物科技有限公司 (纯度≥98%)。

无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 批号K1723046, 麦克林生物技术有限公司), 蒸馏水(屈臣氏), 甲醇 (HPLC纯度 > 99.8%, 安徽天地高纯溶剂有限公司), 乙腈 (HPLC纯度 > 99.8%, 安徽天地高纯溶剂有限公司) 和甲酸 (HPLC 纯度 > 99.8%, 太仓沪试试剂有限公司)。流动相用水为超纯水, 乙腈和甲酸为色谱纯, 其余的试剂采用分析纯。

仪器 超高效液相色谱 (Vanquish, UPLC, Thermo, USA), 高分辨质谱 (Q Exactive HFX, Thermo, USA), DFY-1000 (摇摆式) 多功能高速中药粉碎机 (鼎力有限公司), Sartorius GL224I-1SCN 分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司), RE-2000A 真空旋转蒸发仪 (郑州科泰实验设备有限公司) 和 JY10002 电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 斑马鱼养殖系统 (上海海圣生物实验设备公司)。

实验动物 本实验采用WT野生型成年斑马鱼, 由山东第一医科大学斑马鱼研究中心提供, 参照文献[11]方法养殖, 饲养环境为采用14 h光照/10 h黑暗, pH 7.0～8.0, 温度27 ± 0.5 ℃。动物实验获得山东省医学科学院伦理委员会的批准 (SYXK20220005)。

不同产地西洋参样本抗疲劳活性研究

样品制备 西洋参SD1、SX1粉碎, 称取粗粉适量, 采用10倍量甲醇超声提取30 min, 过滤后重复提取一次, 合并两次提取液离心取上清, 旋蒸至剩余10 mL左右, 放入真空干燥箱干燥24 h, 得到西洋参醇提物。分别精密称取提取物适量, 加入DMSO溶解, 配置成浓度为100 mg·mL^{-1}西洋参醇提物母液。

疲劳力竭游泳实验 疲劳力竭实验使用本实验自

制的开放式六通道斑马鱼疲劳游泳专利装置 (申请号: 202221704440.1), 该装置可同时供六个实验样本进行力竭游泳, 并可设置不同档位, 满足力竭游泳实验条件。将健康成年斑马鱼分为空白组, SD1低、高剂量组 (25和75 mg·L^{-1}), SX1低、高剂量组 (25和75 mg·L^{-1}), 红景天胶囊组 (HJT), 每组6条。打开装置电源, 按梯度 (1档: 10 cm·s^{-1}, 5 min; 2档: 20 cm·s^{-1}, 5 min; 3档: 30 cm·s^{-1}, 10 min; 4档: 40 cm·s^{-1}, 10 min; 5档: 50 cm·s^{-1}, 至鱼贴网)梯度提高泳道内水流流速, 斑马鱼在泳道内逆流对抗水流直至被水流推到泳道末端网板, 记录斑马鱼开始游泳直至贴网20 s时的时间为给药前游泳时间 (t_b), 并将斑马鱼放入编好号码的鱼缸中。结束后放入不同给药浓度的养鱼水中。给药4天后重复上述步骤, 得到给药后游泳时间 (t_a), 并按照公式计算: 增长率 = (t_a − t_b) / t_b × 100%, 使用Graphpad软件进行增长率的统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, P < 0.05认为具有显著性差异。

自主行为测试　斑马鱼进行力竭游泳后, 取出泳道至培养缸中休息30 min后进行自主行为能力测试。将各组一次放置到T迷宫适应5 min后, 进行自主行为录制30 min, 结束后使用Matelab软件进行行为学分析, 统计各组的平均速度以及运动总路程。

西洋参样本的代谢组学分析

供试品溶液制备　SD1～5、SX1～5采集时间、生长年限以及产地如表1所示。将SD1～5、SX1～5十个产地的西洋参磨碎成粉末, 过50目筛后, 取各个产地西洋参细粉0.2 g, 精密称定, 精密加入甲醇25 mL, 超声提取30 min, 放冷, 用甲醇定容, 摇匀, 0.22 μm滤膜滤过, 即得。

Tabel 1　American ginseng sample (five years) information. SD: Shandong; SX: Shanxi

Sample name	Collected time	Producing area
SD1	2021.02	Wendeng, Shandong
SD2	2021.09	Wendeng, Shandong
SD3	2021.10	Wendeng, Shandong
SD4	2021.11	Wendeng, Shandong
SD5	2021.12	Wendeng, Shandong
SX1	2020.02	Hanzhong, Shanxi
SX2	2020.09	Hanzhong, Shanxi
SX3	2020.10	Hanzhong, Shanxi
SX4	2020.11	Hanzhong, Shanxi
SX5	2020.12	Hanzhong, Shanxi

UPLC/Q-TOF/MS数据采集　色谱柱: Waters HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A相为0.1%甲酸-水溶液, B相为0.1%甲酸-乙腈-异丙醇; 流速0.3 mL·min^{-1}; 柱温40 ℃; 进样量2 μL; 洗脱梯度: 0.0～2.0 min A/B (90∶10, V/V), 6.0～15.0 min A/B (40∶60, V/V), 15.1～17.0 min水/乙腈 (90∶10, V/V); 整个分析过程中样品置于4 ℃自动进样器中。采用美国Thermo公司Q Exactive HFX高分辨质谱系统进行一级、二级谱图的采集。电喷雾离子源 (ESI) 条件如下: 鞘气40 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 辅助气10 psi; 离子喷雾电压3 000 V/−2 800 V; 温度350 ℃; 离子传输管温度320 ℃。扫描模式为full-scan MS2模式; 扫描方式为正离子/负离子。收集87～1 300 Da内的正负离子数据样本。

数据处理分析　所有原始数据使用Xcalibur 2.2.0软件进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐等处理, 处理好的质谱原始数据使用Proteo Wizard软件进行转换, 将原始数据的raw格式统一转换成mz XL格式; 使用Metabo Analyst 5.0进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 等多变量统计分析, 并利用变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) > 1, P < 0.05为筛选条件, 筛选西洋参中的差异成分。借助一级和二级质谱以及文献对差异代谢物进行定性分析。

西洋参抗疲劳活性靶点筛选　根据代谢组学差异代谢分析出主要成分, 运用Swiss Target Prediction (http://www.swisstargetprediction.ch/) 数据库, 对分析出的差异皂苷类成分相关靶点进行预测, 构建西洋参靶点群。以"疲劳 (fatigue)"作为疾病的关键词在GeneCards数据库、OMIM数据库检索, 去除两个数据库的重复靶点后, 以剩余全部靶点构建疾病相关作用靶点群。对西洋参皂苷靶点群以及疲劳相关靶点做Venn图取交集作为核心靶点, 并将以上靶点和成分导入String数据库 (https://string-db.org/) 进行网络拓扑分析, 并将分析结果通过Cytoscape进行可视化处理, 构建"差异成分-核心靶点PPI"互作网络图。

分子对接方法筛选潜在关键成分　将筛选后的潜在活性化合物导入Pubchem数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) 获取小分子结构, 并采用chem3D进行能量最低处理并加氢; 选取"差异成分-核心靶点PPI"中degree较高的四个靶标带入RCSB PDB数据库 (https://www.rcsb.org/) 获取蛋白, 将蛋白导入AutoDock进行加氢、加电荷处理, 最后将小分子与蛋白导入AutoDock vina进行分子对接, 来验证潜在成药化合物的活性[12]。

斑马鱼模型评价关键单体成分的抗疲劳活性　将斑马鱼分以下5组, 分别为空白组、拟人参皂苷F11低、

高剂量组、红景天胶囊组。拟人参皂苷F11低、高剂量组给药浓度分别为12.5和25 mg·L^{-1}。采用疲劳力竭游泳实验和自主行为测试对拟人参皂苷F11药效进行评价。

结果

1　不同产地西洋参样本抗疲劳活性的比较研究

根据图1A可以看出, 与空白组 (Con.) 相比, SD1和SX1高剂量组均显著提高了斑马鱼力竭游泳时间的增长率, 进一步比较SD1和SX1两个产地的药效发现, SD1的抗疲劳效果显著优于SX1。由自主行为的实验结果可以看出 (图1B、C), 从自主游泳速度和路程两个方面可以看出, 两个产地都提高了斑马鱼的自主行为, 并表现出显著性差异; 同样比较发现SD1的抗疲劳效果优于SX1。

2　西洋参成分代谢组学分析

2.1　西洋参样品总离子色谱图　鉴于发现两个产地西洋参样本具有活性差异, 因此收集多批次进行代谢组学分析。按照上述实验条件进样, 对原始数据进行预处理, 得到总离子色谱图。使用保留时间的校准曲线可视化校准过程。使用XCMSonline软件进行预处理后, 共得到1 691个正离子模式下色谱峰和负离子模式下1 302个色谱峰。

2.2　PCA及OPLS-DA分析　PCA可以直接反映不同化学基团之间的差异, 并发现异常值。OPLS-DA是一种具有监督模式识别的多变量统计分析方法, 可以解决PCA对相关性小的变量不敏感的问题[13]。首先使用PCA来显示最大变化和模式识别, 以获得总体和分类, 然后进行OPLS-DA分析, 以获得两组之间的最大分离[14]。

如图2A、B所示, 正离子模式下以主成分1 (12.9%) 和主成分2 (17.9%) 构建散点图, 山东文登产地和陕西汉中产地被显著分开; 在负离子模式下, 山东文登产地和陕西汉中产地通过主成分1 (13.2%) 和主成分2 (22.6%) 构建散点图发现两个产地分离效果较差。进一步利用OPLS-DA探寻两产地的差异成分, 在该模型下, 正负离子模式均可显著分开, 正离子模型中R^2Y和Q^2值分别为0.93、0.74, 负离子模型中R^2Y和Q^2值分别为0.96、0.67, 表明OPLS-DA模型具有良好的可测量性和适用性。最终证明了两个产地的西洋参化学成分具有差异。

2.3　差异成分分析　以VIP > 1, $P < 0.05$的标准进行

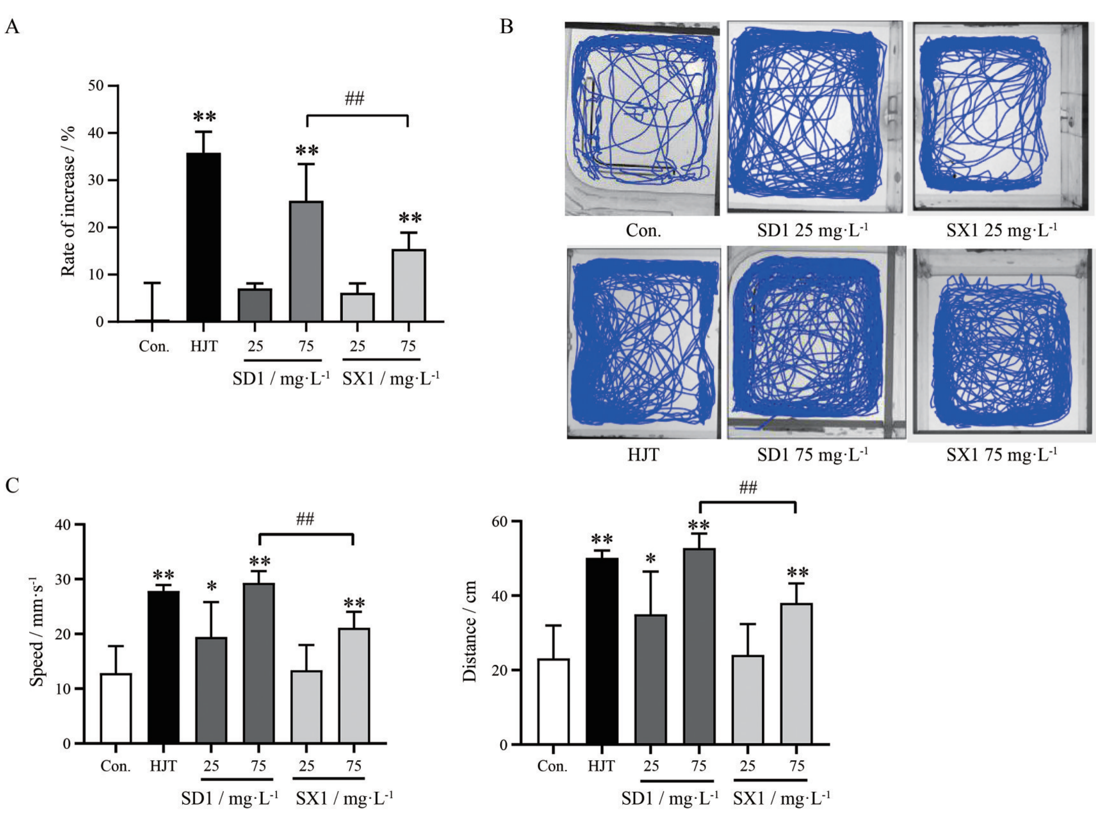

Figure 1　Comparison of the anti-fatigue efficacy of SD1 and SX1. A: Rate of increase; B: Autonomous behavioural trajectory map; C: Speed and distance of autonomous behaviour. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* Con.; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$. SD1: American ginseng from Shandong 1; SX1: American ginseng from Shanxi 1; Con.: Control group, HJT: HongJingTian capsule group

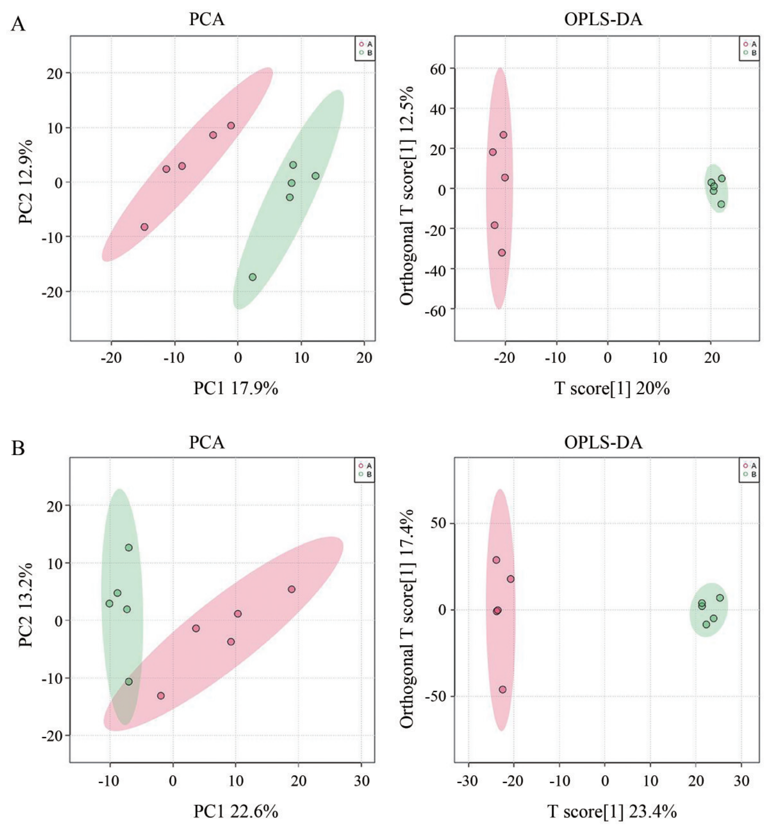

Figure 2　PCA and OPLS-DA analysis. A: A scatter plot of PCA and OPLS-DA scores in positive ion mode; B: A scatter plot of PCA and OPLS-DA scores in negative ion mode. PCA: Principal component analysis; OPLS-DA: Orthogonal partial least-squares discrimination analysis

筛选, 共筛选出10个差异西洋参皂苷类成分。经TOF质谱数据结合文献信息, 鉴定出10个皂苷类成分, 分别为人参皂苷Ra1、丙二酰人参皂苷Rb1、丙二酰人参皂苷Rb2、拟人参皂苷F11、人参皂苷Re、人参皂苷Rh3、人参皂苷Rf、人参皂苷Rg2、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1 (表2)。由图3的热图可以看出, 两个产地中以上10种皂苷成分含量差异明显, 该10种皂苷均在SD1～5含量较高。

3　西洋参中抗疲劳有效成分初步筛选

从中药系统药理学数据库与分析平台 (traditional

Tabel 2　Analysis of differential saponin components. VIP: Variable importance in project

No.	Metabolite	Retention time/min	Formula	*m/z*	MSE fragment ion	Error ($\times10^{-6}$)	VIP
1	Ginsenoside-Ra1	6.61	$C_{58}H_{98}O_{26}$	1 209.627 3 $[M-H]^-$	945.557 5 $[M-H-Xyl-Ara]^-$ 459.432 9 $[M-H-Xyl-Ara-3Glu]^-$	5.217	1.113
2	Malonyl-ginsenoside Rb1	6.37	$C_{57}H_{94}O_{26}$	1 193.596 0 $[M-H]^-$	783.496 1 $[M-H-mal-2Glu]^-$ 621.441 6 $[M-H-mal-3Glu]^-$	5.229	1.358
3	Malonyl-ginsenoside Rb2	6.46	$C_{56}H_{92}O_{25}$	1 163.585 4 $[M-H]^-$	1 077.599 0 $[M-H-Mal]^-$ 783.498 4 $[M-H-Glu-Ara-Mal]^-$ 621.441 7 $[M-H-2Glu-Ara-Mal]^-$	7.722	1.392
4	Pseudoginsenoside F11	6.41	$C_{42}H_{72}O_{14}$	783.488 9 $[M+H-H_2O]^+$	457.366 9 $[M+H-Glu-Rha]^+$ 439.356 3 $[M+H-Glu-Rha-H_2O]^+$	1.189	1.385
5	Ginsenoside- Re	6.99	$C_{48}H_{82}O_{18}$	947.557 3 $[M+H]^+$	783.489 2 $[M+H-Glu]^+$ 475.377 3 $[M+H-2Glu-Rha]^+$	1.110	2.02
6	Ginsenoside Rh3	7.74	$C_{36}H_{60}O_7$	605.441 1 $[M+H]^+$	441.370 7 $[M+H-Gh1]^+$	0.744	1.477
7	Ginsenoside Rf	5.13	$C_{42}H_{72}O_{14}$	783.488 9 $[M+H-H_2O]^+$	475.379 0 $[M-H-2Glu]^-$	1.517	1.385
8	Genosinside Rg2	6.33	$C_{42}H_{72}O_{13}$	785.504 5 $[M+H-H_2O]^+$	475.381 7 $[M-H-Ghu-Rha]^-$	1.008	1.745
9	Ginsenoside Rg1	6.42	$C_{42}H_{72}O_{14}$	783.488 9 $[M+H-H_2O]^+$	637.434 8 $[M-H-Glu]^-$ 475.377 2 $[M-H-2Glu]^-$	0.939	1.385
10	Ginsenoside Rb1	6.32	$C_{54}H_{92}O_{23}$	1 091.599 6 $[M+H-H_2O]^+$	784.518 7 $[M+H-2Gh]^+$	1.824	1.071

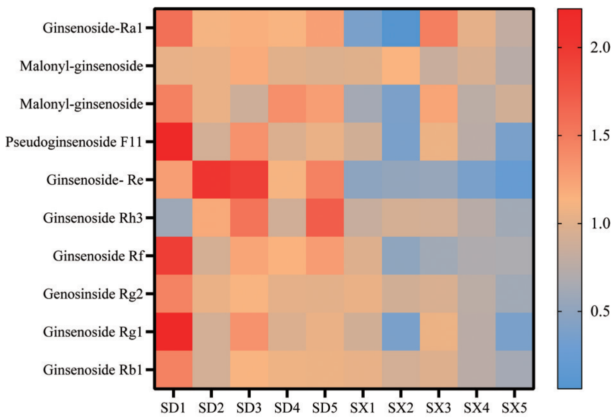

Figure 3 Heat map of differential saponin components

Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 中按类药性 (drug-likeliss, DL) > 0.18 筛选得到活性差异成分 5 种, 分别为拟人参皂苷 F11、人参皂苷 Rf、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rh3、人参皂苷 Rg2。通过西洋参皂苷靶点群以及疲劳相关靶点取交集, 获得核心靶点共计 270 个。根据 String 数据库网络拓扑分析构建核心靶点 PPI 网络借助 Cytoscape 软件, 最终构建出“差异成分-核心靶点 PPI”网络图 (图 4), 结果中 degree > 50 的靶点包括 VEGFA、STAT3、PIK3CA、BCL2、HSP90AA1、AKT1、EGFR、JUN。同时, PPI 结果显示连接度较高的化合物是拟人参皂苷 F11 和人参皂苷 Rf。

4 分子对接筛选关键活性成分

为进一步筛选有效成分, 对所获取的潜在活性化合物以及核心靶点蛋白进行分子对接处理, 其中对接小分子选 5 个潜在化合物, 核心蛋白选用 degree 最高的 VEGFA、STAT3、PIK3CA、BCL2, 获得西洋参抗疲劳潜在成分与关键靶点的分子对接结果 (表 3)。当结合能 < 0 时, 可以认为化合物与蛋白间的结合可自发进行, 同时结合能越低, 越有较大可能发生作用。

分子对接结果显示, 差异成分与筛选出的关键靶点都可以自发结合, 且与靶蛋白结合能力相近, 其中, 拟人参皂苷 F11 与关键靶点结合能相对较低, 结合效果最好, 因此采用 Pymol 绘图, 对分子对接结果进行展示 (图 5)。

Tabel 3 Binding of potential active ingredients of American ginseng to core anti-fatigue targets

Compound	VEGFA	STAT3	PIK3CA	BCL2
	Binding energy value/kcal·mol^{-1}			
The original ligand	−7.7	−10	−9.2	−12.1
Pseudoginsenoside F11	−5.5	−6.7	−9.2	−7.0
Ginsenoside Rg1	−6.1	−6.0	−7.1	−6.9
Ginsenoside Rf	−5.3	−6.4	−7.7	−7.1
Ginsenoside Rh3	−5.5	−6.0	−5.8	−6.3
Genosinside Rg2	−6.1	−6.5	−6.3	−6.9

5 利用斑马鱼模型评价拟人参皂苷 F11 抗疲劳作用

根据图 6A 可以看出, 经过拟人参皂苷 F11 给药后, 以剂量依赖的形式增长率显著增加; 再根据图 6B 可以看出, 与空白组相比, 模型组的行为轨迹显著较少, 表现出疲劳样状态, 而拟人参皂苷 F11 高剂量组可显著提高疲劳斑马鱼的行为轨迹, 显著提高了斑马鱼

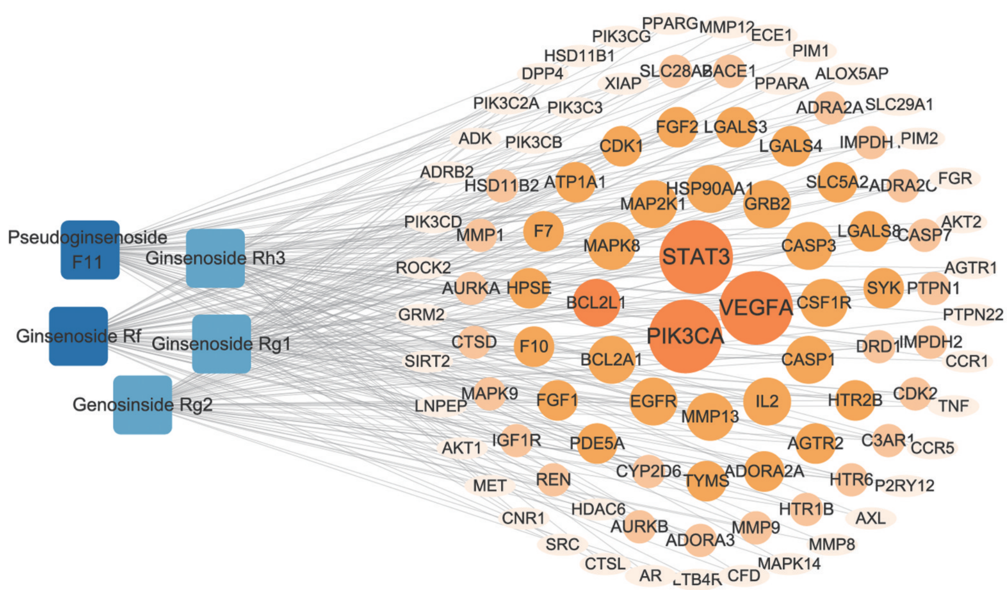

Figure 4 "Saponin component - core target PPI" network diagram. VEGFA: Vascular endo- thelial growth factor A; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; BCL2: B-cell lymphoma 2-like protein; HSP90AA1: Heat shock protein 90 alpha family class A member 1; AKT1: AKT serine/threonine kinase 1; EGFR: Epidermal growth factor recepter; JUN: Jun proto-oncogene

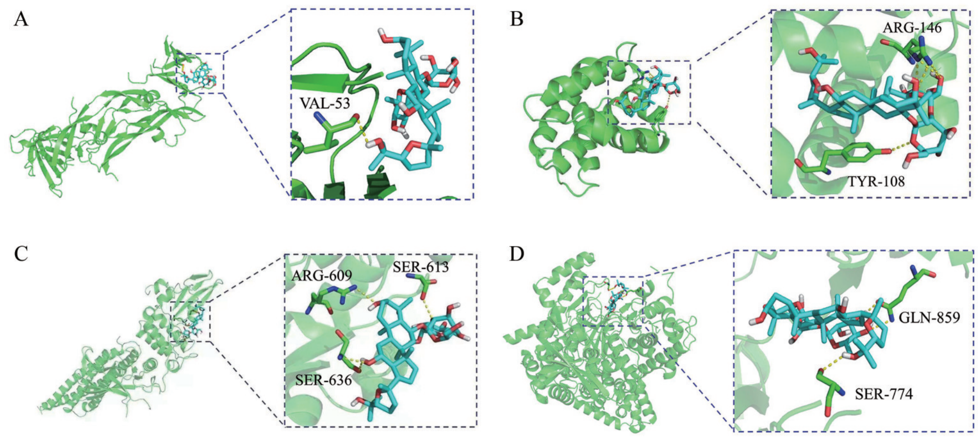

Figure 5　Compound-to-target protein docking diagram. A-D: Docking results of pseudoginsenoside F11 with VEGFA, STAT3, PIK3CA and BCL2, respectively. VAL: Valine; ARG: Arginine; TYR: Tryosine; SER: Serine; GLN: Glutamine

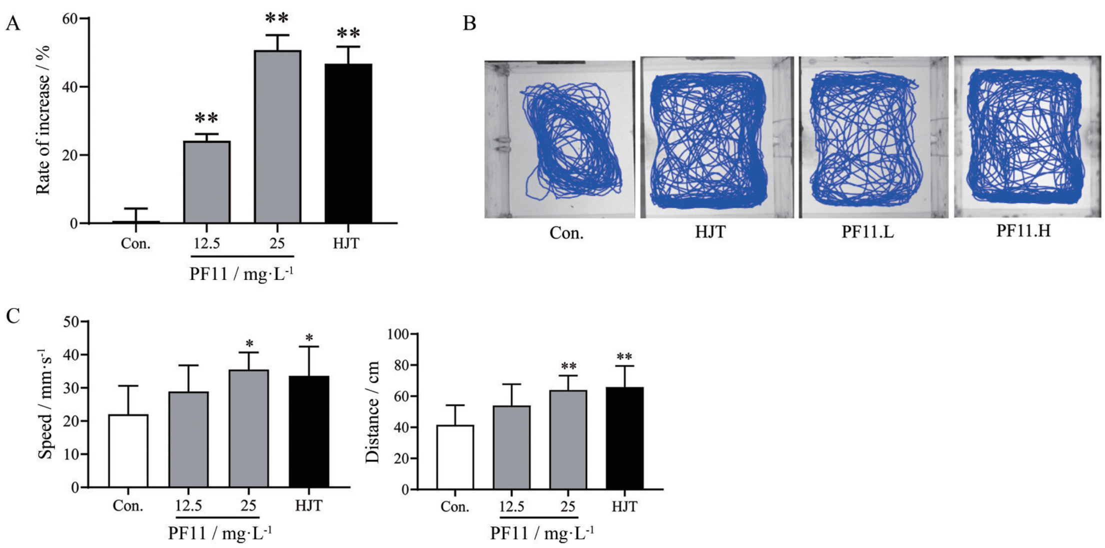

Figure 6　Evaluation of anti-fatigue effect of PF11. A: Rate of increase; B: Autonomous behavioural trajectory map; C:Speed and distance of autonomous behaviour. n=6, $\bar{x}\pm s$. $^{*}P$< 0.05, $^{**}P$< 0.01 *vs* Con. PF11: Pseudoginsenoside F11; PF11.L: Pseudoginsenoside F11 low-dose group; PF11.H: Pseudoginsenoside F11 high-dose group

的速度和路程, 证明拟人参皂苷F11具有较好的抗疲劳活性。

讨论

疲劳是最常见的生理反应之一, 多发于抑郁症、衰老、肿瘤、HIV感染、多发性硬化症和帕金森综合征等, 其作用机制较为复杂[15]。持续性疲劳还会导致慢性疲劳综合征的发生, 并可能是心脏骤停、心肌炎和其他疾病引起死亡的诱发因素[16-18]。疲劳的潜在机制是多因素和多维的, 同时, 对定义缺乏共识使其成为一种不断被低估的症状。疲劳初期的发病机制主要包括能量代谢异常、代谢产物过度积累, 免疫失衡, 随着疲劳程度的加深, 还会导致神经内分泌系统失调。除了基本的疾病治疗、对症治疗和非药物干预外, 疲劳没有任何特效药物来治疗[19]。目前抗疲劳动物模型主要是大小鼠, 造模周期长, 长时间的造模对模型动物的机体会造成一定的损伤, 且无法应用于药物的快速筛选。斑马鱼与人类基因高同源性, 实验操作相对简单[20], 斑马鱼具有逆水游的特性, 在运动操作上更加稳定方便, 具有明显的优势[21]。

西洋参自古就被用于补气生津, 具有较好的抗疲劳功效。现代药理学表明, 西洋参含有多种生物活性成分, 如皂苷、多糖、黄酮类、挥发油、蛋白质、肽等[22,23], 具有抗炎、抗肿瘤、降血糖、免疫调节、抗疲劳等药理作用[24-26]。皂苷作为西洋参的主要活性成分, 在多种疾病中发挥着重要作用。研究证实人参皂苷可

能通过作用于BCL2蛋白, 减少细胞凋亡, 增强纤维活性, 减轻疲劳[27,28]。人参皂苷Rb1可通过PI3K/Akt作用途径, 减轻SH-SY5Y细胞中甲基乙二醛诱导的氧化应激和细胞凋亡作用, 进而减少组织损伤[29]。人参皂苷Rh3可抑制心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞的凋亡[30]。已有研究表明, 人参皂苷Rg1可以改善小鼠疲劳相关生化指标和调节骨骼肌的氧化应激、改善线粒体功能发挥抗疲劳作用[31]。但是作为西洋参的奥克梯隆型特有皂苷是否具有抗疲劳作用, 目前尚未见相关报道。

传统的网络药理学是运用系统生物学和计算机技术构建了“疾病基因-靶点-药物”相互作用网络, 系统地展示了药物对疾病的影响[32]。该方法十分适合研究中药的复杂作用, 但对于后续实验研究缺乏成熟的理论指导。而利用靶点筛选药物是网络药理学驱动策略的关键步骤, 是发现中药关键活性成分的快速方法[33]。根据成分靶点主要筛选出以下几种与疲劳密切关联的靶点。VEGFA是血小板衍生生长因子族成分, 可增强血管通透性, 促进血管生成, 对恢复组织含氧量和修复器官有较大作用[34]。PIK3CA蛋白为PI3K通路中关键靶标蛋白, 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, 发挥其抗凋亡作用, 减少组织细胞损伤, 缓解组织疲劳状态[35]。氧自由基的存在对运动型疲劳的产生存在重要作用, 高强度运动会使自由基生成增多, 当生成速率超出代谢速率时, 便会在体内产生堆积, 从而导致线粒体产能减少, 产生疲惫[36]。而BCL2蛋白是NRF2通路中一种主要抗氧化和抗凋亡的调节剂, 长时间处于疲劳状态可以促进BCL2蛋白表达上调。炎症反应为疲劳的发病机之一, STAT3靶点与白细胞介素相关靶点连接度较高, 有研究表明白细胞介素是免疫细胞分泌的一种效价因子, STAT3靶点可以通过调控白细胞介素表达[37]。分子对接技术已经成为药物发现和研发的重要技术。分子对接技术可以在原子水平上模拟小分子和蛋白质之间的相互作用, 能够表征小分子在目标蛋白质结合部位的行为, 并阐明基本的生化过程[38]。初步筛选出的皂苷类成分中, 人参皂苷Rg1抗疲劳作用已有相关报道。本研究分子对接筛选结果发现西洋参特有皂苷拟人参皂苷F11与疲劳相关靶点具有较好的结合性能, 并在斑马鱼模型上发现确实具有显著的抗疲劳活性。

本研究运用代谢组学、成分-靶点互作和分子对接技术, 并结合斑马鱼模型验证的方法, 对西洋参抗疲劳的关键活性成分进行筛选, 首次发现了拟人参皂苷F11可能为西洋参发挥抗疲劳作用的关键活性物质, 为西洋参抗疲劳研究提供了新的物质基础。

作者贡献: 刘慧茹为本研究的主要完成人和论文撰写者; 王喆、陈立国、程贵东和马智慧参与部分实验工作; 汪海洋、王松松、李正国指导实验过程及论文写作; 韩利文设计研究方案并组织实施。

利益冲突: 所有作者均不存在利益冲突。

References

[1] Yu S, Dan BL, Han DY, et al. Study on the effect and mechanism of CAC for anti-fatigue [J]. Food Res Dev (食品研究与开发), 2020, 41: 15-21.

[2] Brataas HV, Evensen AE. Life stories of people on sick leave from work because of mild mental illness, pain and fatigue [J]. Work, 2015, 53: 285-291.

[3] Prins JB, van der Meer JW, Bleijenberg G. Chronic fatigue syndrome [J]. Lancet, 2006, 367: 346-355.

[4] Jackson ML, Butt H, Ball M, et al. Sleep quality and the treatment of intestinal microbiota imbalance in chronic fatigue syndrome: a pilot study [J]. Sleep Sci, 2015, 8: 124-133.

[5] Okamoto M, Tan F, Suyama A, et al. The characteristics of fatigue symptoms and their association with the life style and the health status in school children [J]. J Epidemiol, 2000, 10: 241-248.

[6] Zhou SM, Tian HJ, Huang QY, et al. Anti-fatigue function of *Panax Quinquefoiuml* in mice under simulated plateau conditions [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army (解放军药学学报), 2013, 29: 297-300.

[7] Li D, Ren JW, Zhang T, et al. Anti-fatigue effects of small-molecule oligopeptides isolated from *Panax quinquefolium* L. in mice [J]. Food Funct, 2018, 9: 4266-4273.

[8] Qi B, Liu L, Zhang H, et al. Anti-fatigue effects of proteins isolated from *Panax quinquefolium* [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153: 430-434.

[9] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli *via* multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29: 1181-1189.

[10] Wang XJ, Ren JL, Zhang AH, et al. Novel applications of mass spectrometry-based metabolomics in herbal medicines and its active ingredients: current evidence [J]. Mass Spectrom Rev, 2019, 38: 380-402.

[11] Pei WQ, Shan Y, Zhang YG, et al. Antiepileptic effect and potential mechanism of Gastrodiae Rhizoma based on zebrafish model and integrated pharmacology of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2003-2010.

[12] Qu XH, Ji WJ, Wang ZY, et al. Evaluation and application of small molecule docking software based on structure [J]. Chin J Mar Drugs (中国海洋药物), 2018, 37: 23-30.

[13] Ota M, Xu F, Li YL, et al. Comparison of chemical constituents among licorice, roasted licorice, and roasted licorice with honey [J]. J Nat Med, 2018, 72: 80-95.

[14] Zhu H, Lin H, Tan J, et al. UPLC-QTOF/MS-based nontargeted metabolomic analysis of mountain- and garden-cultivated ginseng of different ages in Northeast China [J]. Molecules, 2018, 24: 33-57.

[15] Tan W, Yu KQ, Liu YY, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from Radix Rehmanniae Preparata [J]. Int J Biol Macromol, 2012, 50: 59-62.

[16] Sandler CX, Lloyd AR. Chronic fatigue syndrome: progress and possibilities [J]. Med J Aust, 2020, 212: 428-433.

[17] Flythe JE, Hilliard T, Lumby E, et al. Fostering innovation in symptom management among hemodialysis patients: paths forward for insomnia, muscle cramps, and fatigue [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2019, 14: 150-160.

[18] Su Y, Yuki M, Otsuki M. Non-pharmacological interventions for post-stroke fatigue: systematic review and network meta-analysis [J]. J Clin Med, 2020, 9: 621-636.

[19] Wang R, Huang X, Wu Y, et al. The benefits of Qigong exercise for symptoms of fatigue: a protocol for systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100: e23983.

[20] Gao XY, Li K, Jiang LL, et al. Developmental toxicity of auranofin in zebrafish embryos [J]. J Appl Toxicol, 2017, 37: 602-610.

[21] Sun CC, Zhou ZQ, Chen ZL, et al. Identification of potentially related genes and mechanisms involved in skeletal muscle atrophy induced by excessive exercise in zebrafish [J]. Biology (Basel), 2021, 10: 761-777.

[22] Trammell RA, Cox L, Pikora J, et al. Evaluation of an extract of North American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) in *Candida albicans*-infected complement-deficient mice [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139: 414-421.

[23] Lemmon HR, Sham J, Chau LA, et al. High molecular weight polysaccharides are key immunomodulators in North American ginseng extracts: characterization of the ginseng genetic signature in primary human immune cells [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142: 1-13.

[24] Kochan E, Nowak A, Zaklos-Szyda M, et al. *Panax quinquefolium* L. ginsenosides from hairy root cultures and their clones exert cytotoxic, genotoxic and pro-apoptotic activity towards human colon adenocarcinoma cell line caco-2 [J]. Molecules, 2020, 25: 2262-2284.

[25] Biondo PD, Goruk S, Ruth MR, et al. Effect of CVT-E002 (COLD-fX) *versus* a ginsenoside extract on systemic and gut-associated immune function [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8: 1134-1142.

[26] Dou HC, Chen JY, Ran TF, et al. *Panax quinquefolius* saponin inhibits endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis and neurite injury and improves functional recovery in a rat spinal cord injury model [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 212-220.

[27] Jacobs JM, Marcus EL, Stessman J. Prolonged mechanical ventilation: symptomatology, well-being, and attitudes to life [J]. J Am Med Dir Assoc, 2021, 22: 1242-1247.

[28] Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health [J]. Crit Rev Toxicol, 2015, 45: 765-798.

[29] Nan F, Sun G, Xie W, et al. Ginsenoside Rb1 mitigates oxidative stress and apoptosis induced by methylglyoxal in SH-SY5Y cells *via* the PI3K/Akt pathway [J]. Mol Cell Probes, 2019, 48: 101469.

[30] Wang JD, Cui Y, Wang JG, et al. Ginseng saponin Rh3 pretreatment to protect myocardial ischenmia reperfysion injury in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35: 2783-2786.

[31] Kong FX, Yang Q, Dong JP, et al. Effects of ginsenoside Rg1 on gene expression of TFAM and NRF-1 in skeletal muscle of fatigued mice [J]. J Food Sci Biotechnol(食品与生物技术学报), 2022, 41: 67-72.

[32] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11: 110-120.

[33] Zhang YG, Liu XX, Zong JC, et al. Investigation driven by network pharmacology on potential components and mechanism of DGS, a natural vasoprotective combination, for the phytotherapy of coronary artery disease [J]. Molecules, 2022, 27: 4075-4080.

[34] Zhang XD, Sun HL, Gao LZ, et al. Long non-coding RNA in organ ischemia/hypoxia induced angiogenesis [J]. J Chin Pract Diagn Ther (中华实用诊断与治疗杂志), 2020, 34: 207-209.

[35] Ren ZH. Sports Fatigue Rays Hippocampal Cells Apoptosis PI3K/AKT Signaling Pathway(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]. Jinan: Shandong Institute of P.E. and Sports, 2015.

[36] Zhang X, Jing S, Lin H, et al. Anti-fatigue effect of anwulignan *via* the NRF2 and PGC-1alpha signaling pathway in mice [J]. Food Funct, 2019, 10: 7755-7766.

[37] 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: 1181-1190.

[38] Meng XY, Zhang HX, Mezei M, et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery [J]. Curr Comput Aided Drug Des, 2011, 7: 146-157.