

## 基于 UHPLC-MS 与网络药理学探讨杜仲雄花的抗疲劳机制

兰乾敏, 成翠, 王婷玉, 李佳思, 时小东\*

(成都大学食品与生物工程学院 成都 610106)

**摘要** 目的: 通过网络药理学和分子对接技术探讨杜仲雄花抗疲劳的作用机制, 明确其活性成分与关键靶点间的相互作用, 为其应用提供科学依据。方法: 采用 UPLC-MS 分析杜仲雄花活性成分, 结合数据库筛选成分靶点与疲劳相关靶点, 通过 Venn 分析确定共同靶点, 构建 PPI 网络及功能通路, 采用分子对接验证关键成分与靶点的结合能力。结果: 从杜仲雄花中鉴定出 63 种活性成分及 868 个作用靶点, 筛选出 170 个交集靶点。网络分析显示, EGFR、AKT1、TP53 等为关键靶点, 分子对接验证育亨酸一水化合物与关键靶点结合能力强。结论: 通过网络药理学和分子对接技术, 揭示了杜仲雄花抗疲劳的潜在作用机制。育亨酸一水化合物等活性成分可能通过与 EGFR、AKT1、TP53 等关键靶点的相互作用, 发挥抗疲劳效果。这为杜仲雄花在抗疲劳领域的深入研究和应用提供了理论基础。

**关键词** 杜仲雄花; 抗疲劳; 网络药理学; 分子对接

**文章编号** 1009-7848(2026)01-0268-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2026.01.024

2014 年, 原国家卫生和计划生育委员会将杜仲雄花(Male flower of *Eucommia ulmoides*)纳入新食品原料名单。作为一种天然植物资源, 杜仲雄花内含多种活性成分, 包括环烯醚萜类、苯丙素类以及黄酮类等物质, 这些活性成分赋予杜仲雄花多种功能, 包括调节血压和血脂, 抑菌, 抗氧化, 缓解体力疲劳, 抑制肿瘤生长以及延缓细胞衰老等<sup>[1-11]</sup>。在抗氧化方面, 杜仲雄花中的多酚类化合物能够有效清除自由基, 减少氧化应激<sup>[12]</sup>。在抗炎作用方面, 杜仲雄花提取物能够抑制促炎细胞因子, 进而减少炎症反应<sup>[13]</sup>。此外, 杜仲雄花还显示出对金黄色葡萄球菌等细菌具有较好的抑菌效果<sup>[14]</sup>。在调节血压方面, 杜仲雄花的水提取物可激活关键信号通路发挥降压作用<sup>[15]</sup>。它还能通过促进睾酮分泌, 改善相关生理生化指标, 达到抗疲劳的作用<sup>[16-17]</sup>。

现如今, 疲劳已成为影响人们健康和生活质量的普遍问题之一。机体疲劳是一个复杂的生理、生化过程, 通常由剧烈或长时间运动引起, 表现为肌肉疼痛、耐力下降和身体虚弱。在生理、生化指标上, 这种疲劳状态表现为肝糖原、肌糖原等能源

物质的消耗, 以及血乳酸、丙二醛、血尿素氮等代谢产物的积累, 同时伴随着血红蛋白水平的变化<sup>[18-25]</sup>。许多植物含有天然的抗疲劳成分, 例如: 虎奶菇菌核多糖具有改善肝脏生理功能, 增加糖原储备, 减少代谢物堆积及增强机体抗氧化能力, 从而起到减缓疲劳的作用<sup>[26]</sup>。槟榔次碱通过抑制代谢产物的积累, 缓解供氧不足, 降低能量物质的消耗, 提高组织通透性, 平衡中枢递质等多种途径来发挥抗疲劳作用<sup>[27]</sup>。在灌胃小鼠的实验中, 食用玫瑰花青素的小鼠抗疲劳能力显著提升<sup>[28]</sup>。寻找并开发有效的抗疲劳物质, 对于提高人们的生活质量和健康水平具有重要意义。

网络药理学是一种新兴的研究方法, 该方法从生物网络的角度出发, 分析药物与治疗对象之间的分子关联机制。网络药理学致力于挖掘药物与疾病间相互作用的靶点, 并通过模拟构建多靶点间的作用机制及可能的信号通路, 来预测药物的作用。这种方法不仅有助于原料的筛选和研究, 还能促进产品的开发<sup>[29-34]</sup>。

综上所述, 杜仲雄花的活性成分在医药和保健食品领域中具有广阔的应用前景。本研究运用生物信息学技术探讨杜仲雄花抗疲劳作用的分子机制, 以识别其关键的代谢物和信号通路, 以期为产品开发和应用提供理论依据。

收稿日期: 2025-02-08

基金项目: 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1078)

第一作者: 兰乾敏, 女, 硕士生

通信作者: 时小东 E-mail: shixiaodong@cdu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

杜仲雄花,四川广元;甲醇、乙腈、甲酸、纯水、丙醇(色谱纯级),美国赛默飞公司。

### 1.2 仪器与设备

SCIENITZ-12N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;BGZ-140 电热鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司;GP2310 微波炉,广东美的厨房电器制造有限公司;H1650R 离心机,湘仪仪器有限公司;EXION LC System 超高效液相色谱仪,美国 SCIEX 公司;SCIEX 6500 QTRAP+三重四极杆质谱仪,上海 SCIEX 爱博才思分析仪器贸易有限公司。

### 1.3 代谢物分析

1.3.1 样品的制备和提取 采用不同的干燥方式处理杜仲雄花,包括真空冷冻干燥(DG)、热风干燥(HG)、室温晾干(YG)和微波干燥(WB)。所有样本经统一真空冷冻干燥后,研磨(60 Hz, 30 s);称取 50 mg 的样本置于离心管中,加入提取液【甲醇:水=3:1(V/V),-40 °C 预冷,含内标】700  $\mu$ L;涡旋 30 s, 35 Hz 匀浆 4 min,冰水浴超声 5 min;重复匀浆超声 3 次;在混匀仪上 4 °C 过夜;将样本 4 °C, 12 000 r/min(离心力 13 800 $\times$ g,半径 8.6 cm)离心,15 min;小心取上清液,经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤;用提取液稀释上清液 20 倍,涡旋 30 s,每个样本各取 50  $\mu$ L,混合成质控(Quality control, QC)样本;-80 °C 贮存直到上机检测。

1.3.2 UHPLC-MS 分析 将杜仲雄花样本分为 4 组,分别是 DG 组、HG 组、YG 组和 WB 组,每组均包含 3 个生物学重复样本,共计 12 个样本,用于 LC-MS 的代谢分析。

使用 EXION LC System(SCIEX)超高效液相色谱仪,通过 Waters UPLC 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为含 0.1% 甲酸的水溶液,B 相为乙腈。柱温箱温度为 40 °C,自动进样器温度为 4 °C,进样体积为 2  $\mu$ L,时间单位为 min,流速单位为  $\mu$ L/min。

采用装备 IonDrive Turbo V ESI 离子源的 SCIEX 6500 QTRAP+三重四极杆质谱仪,以多反应监测(MRM)模式进行质谱分析。离子源具体参数如下:离子喷雾电压:+5 500/-4 500 V,帘气:35

psi,温度:400 °C,离子源气 1:60 psi,离子源气 2:60 psi,去簇电压: $\pm$ 100 V。

1.3.3 代谢物的定性分析 所有质谱数据的采集及目标化合物的定量分析工作均通过 SCIEX Analyst Work Station Software (Version 1.6.3) 来完成。使用 MSconventer 软件将质谱原始数据转成 TXT 格式。再使用自撰写 R 程序包并结合自建数据库完成提峰、注释等工作。

原始数据包含 2 个质控(Quality control, QC)样本和 12 个试验样本,从中提取 1 074 个 Peak 作为原始数据。为了更好地分析数据,对原始数据进行一系列的准备和整理。主要包括以下步骤:偏离值过滤:对单个 Peak 进行过滤,以去除噪音数据。具体是基于相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)对偏离值进行过滤。缺失值过滤:对单个 Peak 进行过滤,只保留在单组空值不多于 50%或在所有组中空值不多于 50%的峰面积数据。缺失值填补:对原始数据中的缺失值进行模拟(Missing value recoding),数值模拟方法为最小值乘以(0,0.5)区间内的随机数来进行填补。数据标准化处理(Normalization):利用内标(Internal standard, IS)对数据进行标准化处理。

### 1.4 网络药理学

1.4.1 杜仲雄花活性成分筛选 根据 UHPLC-MS 分析结果,筛选出可用的杜仲雄花代谢物。随后通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库查询代谢物的 SMILES 结构,并将其导入 Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>) 平台进行活性成分筛选,依据药物的吸收性为高(GI absorption: High)以及类药性(Druglikeness)全部为"yes"为标准,筛选出具有良好药物特性的活性成分。利用 Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 数据库筛选活性成分的潜在作用靶点,筛除 *P* 值小于 0 的靶点和重复靶点。

1.4.2 疲劳相关靶点筛选 在 GeneCard (<https://www.genecards.org>) 数据库中,以“fatigue”和“anti-fatigue”为关键词进行检索与汇总,并根据相关性原则筛选出所需的靶点。

1.4.3 杜仲雄花疲劳关键靶点筛选 为明确杜仲雄花活性成分与疲劳之间的潜在联系,采用 Ven-

ny2.1.0(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)分析,确定杜仲雄花活性成分潜在作用靶点与疲劳相关靶点之间的交集靶点。将交集靶点导入 STRING(<https://cn.string-db.org/>)数据库中,选择“多种蛋白”模式,物种为“Homo sapiens”,构建蛋白质互作网络(PPI网络),成功构建后将 PPI 网络信息导出,使用 Cytoscape3.10.2 软件进行网络分析,用 Centiscape 2.2 插件计算各靶点接近中心性(Closeness centrality)、中介中心性(Betweenness centrality)和度中心性(Degree centrality),基于度中心性的度值(Degree)筛选出关键靶点,最后绘制 PPI 网络图,利用颜色深浅展示关键靶点作用程度。

**1.4.4 杜仲雄花活性成分-疲劳靶点网络分析** 将疲劳相关靶点和杜仲雄花活性成分的作用靶点数据进行整合,形成一个数据集,随后将杜仲雄花活性成分和交集靶点信息导入 Cytoscape3.10.2 软件中,通过 Network Analyzer 分析相关信息,依据度值对相关的活性成分和疲劳靶点进行筛选,以确定它们在“杜仲雄花活性成分-疲劳靶点”网络中的重要性。基于这一筛选结果,构建“杜仲雄花活性成分-疲劳靶点”网络图。

**1.4.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析** 将杜仲雄花疲劳关键靶点导入 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库中,进行基因本体(GO)功能和京都基因和基因百科全书(KEGG)通路富集分析。GO 分析可用于基因产物的基本注释,生物过程(Biological process, BP)富集显示了蛋白质在生物途径中的偶联效应和运转模式,细胞成分(Cellular component, CC)分析显示交叉蛋白参与细胞环境,分子功能(Molecular function, MF)分析可以证明药物调节的某些蛋白受体的活性。利用微生物信在线平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/login/>)将 GO 功能和 KEGG 通路富集结果进行可视化<sup>[35-37]</sup>。

**1.4.6 分子对接** 利用 TC MSP(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)下载所需要对接的杜仲雄花活性成分的 mol2 格式文件,将其作为分子对接的配体。同时,通过 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/hnucm.opac.vip/>)下载高分辨率的关键靶点蛋白 3D 结构的 PDB 文件,将其作为分子对接

的受体。使用 Pymol 对受体进行预处理,除去水分子和原始配体,再用 Auto Dock 软件对其进行加氢和电荷的计算,并保存为 pdbqt 格式。将配体通过 OpenBabel 2.4.1 也转换为 pdbqt 格式。在分子对接过程中,选择 Docking 模块进行分子对接,并依据结合能和氢键的形成情况来判断活性成分与关键靶点的作用显著性。结合能最低且形成氢键的对接组合被认为具有最显著的作用。对接分数的阈值为<-4.25, <-5.0, <-7.0, 分别代表配体和受体之间存在、良好和强的结合能。氢键(Conventional hydrogen bond)在分子间的结合中起着至关重要的作用,不仅会影响分子之间的结合方式和结合位置,还能增强分子间的相互作用,从而提高分子结合的稳定性和效率。此外,氢键还能引导分子在空间中的取向,有助于寻找最佳的结合位置。最后,利用 Pymol 和 Discovery Studio 2019 软件对分子配体与蛋白质受体的对接结果进行可视化处理<sup>[38-39]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 杜仲雄花的代谢物分析

通过 UPLC-MS 平台对杜仲雄花中的代谢物进行定性分析,结果显示,从杜仲雄花中提取 1 074 个 Peak 作为原始数据,经过对原始数据的预处理,鉴定出 544 种代谢物。在这些代谢物中,黄酮类是杜仲雄花中最丰富的成分,包括黄酮和类黄酮。黄酮类化合物具有多种生物活性功能,包括抗氧化、抗炎和保护心血管等重要作用。生物碱是杜仲雄花中第 2 重要的代谢物类别,它们具有镇痛消炎等药理作用。此外,杜仲雄花中还含有其它类别的代谢物,如萜类和酚类,这些代谢物同样具有多种对人体有益的生理活性。

### 2.2 网络药理学分析

**2.2.1 杜仲雄花活性成分和关键靶点** 共获得杜仲雄花代谢物 544 个,通过 Swiss ADME 筛选出 63 个杜仲雄花活性成分,随后将这些成分导入 Swiss Target Prediction 数据库中,共得到 868 个作用靶点。为探究这些靶点与疲劳之间的关系,在 Genecard 数据库中检索并整理了 1 052 个与疲劳相关的靶点。通过韦恩分析(图 1),确定了杜仲雄花活性成分作用靶点和疲劳靶点之间有 170 个交

集靶点。

为深入探究杜仲雄花在抗疲劳方面的作用机制,将交集靶点导入 STRING 进行 PPI 网络分析, PPI 网络由 169 个节点和 3 020 条边组成,通过接近中心性(Closeness)、中介中心性(Betweenness)和度值进行筛选,最终确定了 30 个关键靶点,这些靶点构成了包含 382 条边的 PPI 网络。图 2 按度值对关键靶点进行排序,度值越高颜色越深,表明这些靶点在抗疲劳中可能发挥重要作用。通过分析,筛选得到度值排名前 5 位的关键靶蛋白基因(见表 1),蛋白激酶 B(AKT1)、肿瘤蛋白 p53(TP53)、肿瘤坏死因子(TNF)、表皮生长因子受体(EGFR)、B 细胞淋巴瘤 2(BCL2)。

其中,AKT1 位于 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的核心位置,该信号通路参与调控细胞增殖、分化和凋亡等生命过程。AKT 信号通路通过 mTORC1 和 FOXO1 信号共同控制蛋白质合成和氧化代谢,从而影响肌肉生理,包括肌肉萎缩、肌肉减少症和不使用导致的肌肉功能下降<sup>[40]</sup>。TP53 通过调节线粒体功能、氧化应激反应以及细胞凋亡和生存能力,参与细胞能量代谢的调控,这对于维持细胞在正常及应激状态下的功能、增强细胞生存能力并提升机体耐疲劳性至关重要<sup>[41]</sup>。TNF 靶点则通过调节免疫反应、细胞凋亡、能量代谢和炎症反应来对抗疲劳,帮助身体维持正常的生理功能和恢复能力,从而在面对疲劳时保持活力和效率<sup>[42]</sup>。EGFR 通过调节免疫反应、能量代谢和细胞凋亡信号,以及直接抑制肿瘤生长,来发挥其在抗疲劳方面的作用。这种多方面的调节作用有助于减轻肿瘤患者的疲劳感,并可能改善其整体健康状况和<sup>[43]</sup>。BCL2 则通过抑制细胞凋亡、增强抗氧化能力以及调节线粒体功能,帮助细胞维持正常的生理状态和能量代谢,从而在细胞层面对抗疲劳,保护机体免受过度疲劳的影响<sup>[44]</sup>。

2.2.2 杜仲雄花活性成分-疲劳靶点网络结果 利用 Cytoscape3.10.2 软件将杜仲雄花的活性成分与交集靶点集进行绘图与分析,该网络由 231 个节点和 1 063 条边组成,具体如图 3 所示。通过软件的 Network Analyzer 分析功能,可以观察到活性成分与疲劳靶点之间的连接情况。其中,活性成分与疲劳靶点相连的边越多,度值越高,颜色也会相

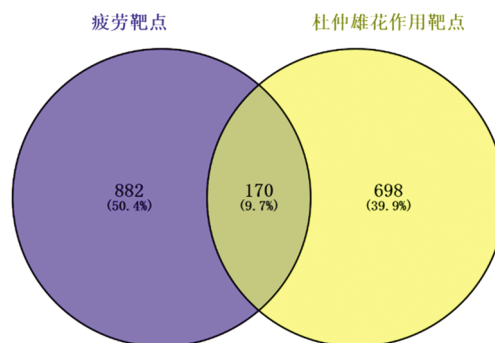


图 1 杜仲雄花作用靶点与疲劳靶点交集图

Fig.1 Intersection diagram of action target of male flower of *Eucommia ulmoides* and the target of fatigue

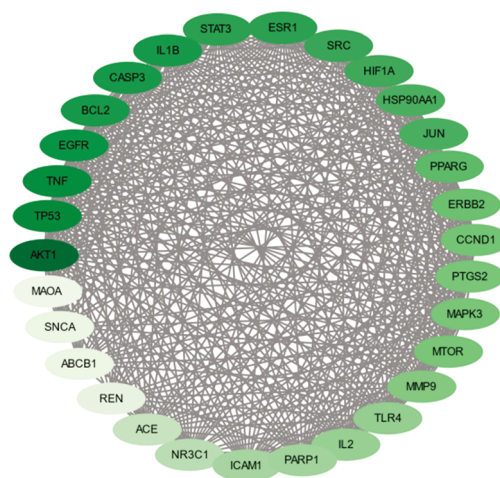


图 2 关键靶点 PPI 网络图

Fig.2 PPI network diagram of key targets

表 1 度值排名前 5 位的关键靶蛋白基因

Table 1 Top five key target protein genes ranked by degree value

蛋白名称	中介中心性	接近中心性	度值
AKT1	1 595.69	0.0044	113
TP53	932.96	0.0041	101
TNF	914.21	0.0041	100
EGFR	1 479.76	0.0041	97
BCL2	574.58	0.0040	95

应加深。在构建的网络中,度值排名中前 5 的活性成分分别是阿朴阿托品 (Apoatropine)、辣根碱 (Cochlearine)、去氧拉巴醌 (Deoxylapachol)、育亨酸一水化合物 (Yohimbic acid monohydrate) 和高

澀任素(Homoferreirin),这些成分在网络中占据重要地位,表明它们可能在杜仲雄花抗疲劳方面发挥着关键作用。

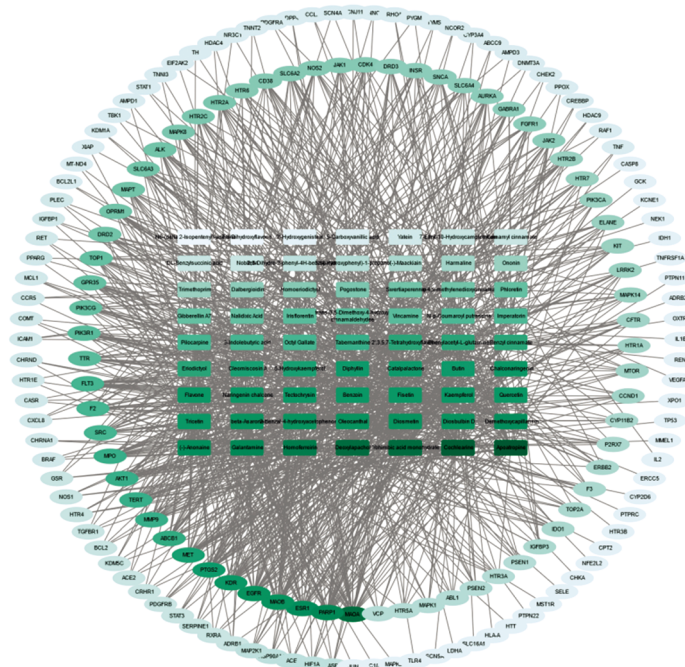


图3 杜仲雄花活性成分-疲劳靶点网络图

Fig.3 Network diagram of active components in male flower of *Eucommia ulmoides*-fatigue targets

2.2.3 GO功能与KEGG通路的富集分析 为进一步了解杜仲雄花抗疲劳的潜在机制,使用DAVID对筛选出的30个关键靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析。从GO富集结果来看,BP分析获得了305个条目,主要涉及RNA聚合酶II

对转录的正调控(Positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、对外源性刺激的反应(Response to xenobiotic stimulus)、凋亡过程负调控(Negative regulation of apoptotic process)和信号转导(Signal transduction)等;CC富集结果显

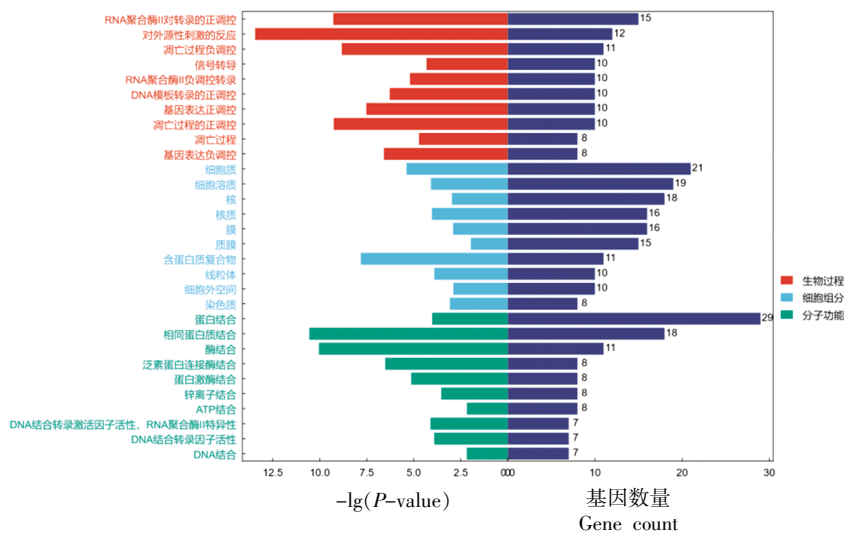


图4 杜仲雄花抗疲劳的GO富集分析BP、CC和MF

Fig.4 GO enrichment analysis of BP, CC and MF of anti-fatigue male flower of *Eucommia ulmoides*

示有 38 个条目, 主要靶标集中在细胞质(Cytoplasm)、细胞溶质(Cytosol)、核(Nucleus)和核质(Nucleoplasm)等; MF 包含了 59 个条目, 靶标集中在蛋白结合(Protein binding)、相同蛋白质结合(Identical protein binding)、酶结合(Enzyme binding)、泛素蛋白连接酶结合(Ubiquitin protein ligase binding)和蛋白激酶结合(Protein kinase binding)等。为了更直观地展示这些富集结果, 根据富集因子值和每条通路涉及的基因数量, 选取了 BP、CC 和 MF 条目中排名前 10 的富集条目进行可视化处理, 具体如图 4 所示。

为了深入分析关键靶点在抗疲劳过程中的作用和重要性, 根据 KEGG 富集分析中的基因数和  $P$  值, 筛选出了 20 个主要通路, 并进行可视化处理(图 5)。结果显示, 这些通路主要涉及癌症中的通路(Pathways in cancer)、癌症中的蛋白聚糖(Proteoglycans in cancer)、脂质与动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)、内分泌抗性(Endocrine resistance)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)、人类巨细胞病毒感染(Human cytomegalovirus infection)、癌症中的 microRNAs(MicroRNAs in cancer)、乙型肝炎(Hepatitis B)、化学致癌作用-受体激活(Chemical carcinogenesis-receptor activation)、志贺氏菌病(Shigellosis)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、前列腺癌(Prostate cancer)、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路(AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications)、麻疹(Measles)、流体切应力与动脉粥样硬化(Fluid shear stress and atherosclerosis)、结直肠癌(Colorectal cancer)、HIF-1 信号通路(HIF-1 signaling pathway)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、雌激素信号通路(Estrogen signaling pathway)及乳腺癌(Breast cancer)等。这些通路和疾病可能通过影响人体的代谢、激素水平、免疫功能、炎症反应和能量消耗等方面, 参与疲劳的发生与发展。

此外, 还使用 Cytoscape 软件绘制 KEGG 信号通路富集图, 即“杜仲雄花-活性成分-靶点-疲劳-信号通路”图(图 6), 以进一步展示这些关键通路在网络中的位置及其与药物-活性成分-靶点-疲

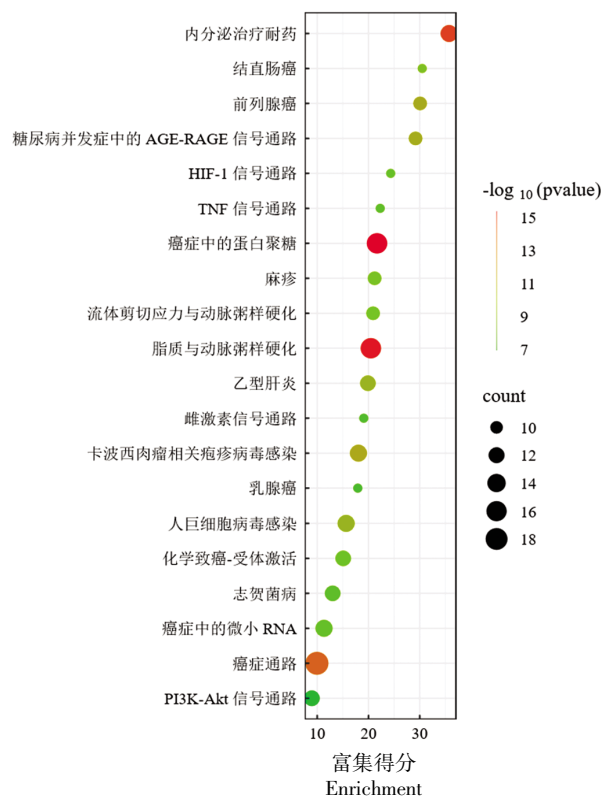


图 5 杜仲雄花抗疲劳的 KEGG 富集分析

Fig.5 KEGG enrichment analysis of anti-fatigue of male flower of *Eucommia ulmoides*

劳-信号通路之间的关系, 这一可视化图表为更深入地理解杜仲雄花抗疲劳的潜在机制提供了有力支持。

2.2.4 分子对接结果 将度值排名前 5 的关键靶点 AKT1、BCL2、TNF、TP53 和 EGFR, 与杜仲雄花活性成分度值排名前 5 的活性成分阿朴阿托品、辣根碱、去氧拉巴醌、育亨酸-水化合物和高淝任素进行分子对接分析。图 7 为杜仲雄花活性成分和关键靶点分子对接的结合能分数 (kJ/mol), 其中, 红色比绿色具有更强的结合能力, 颜色越深表示结合能力越强。

如图 8 所示, 选取了结合能力强且存在氢键的前 8 个对接组合, 利用 Pymol 和 Discovery Studio2019 软件对对接结果进行可视化分析。育亨酸-水化合物与 EGFR 上的氨基酸 ASP-807 形成 3 个氢键; 辣根碱与 EGFR 上的氨基酸 LYS-713 形成 1 个氢键; 育亨酸-水化合物与 AKT1 上的氨基酸 SER-396 形成 2 个氢键, 与 ALA-50 形成 1

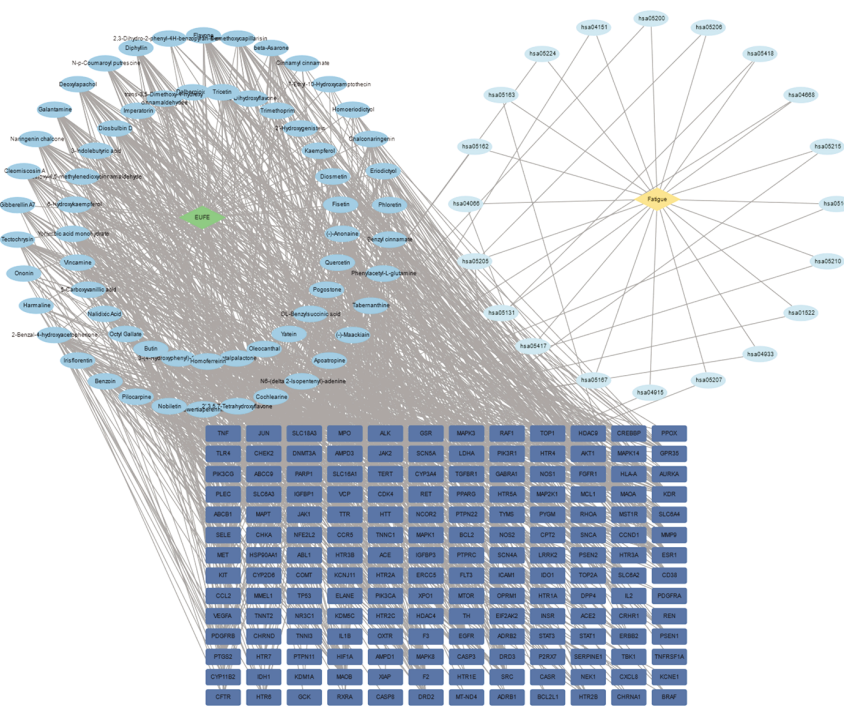


图6 杜仲雄花-活性成分-靶点-疲劳-信号通路

Fig.6 Male flower of *Eucommia ulmoides*-active ingredient-target-fatigue-signaling pathway

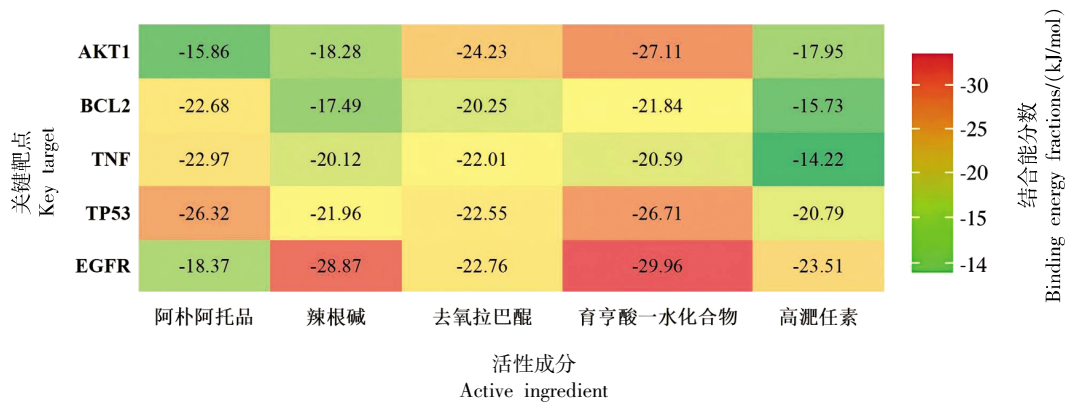


图7 杜仲雄花活性成分和关键靶点分子对接结合能分数(kJ/mol)

Fig.7 Molecular docking binding energy fractions of active components in male flowers of *Euonymus ulmoides* and key targets (kJ/mol)

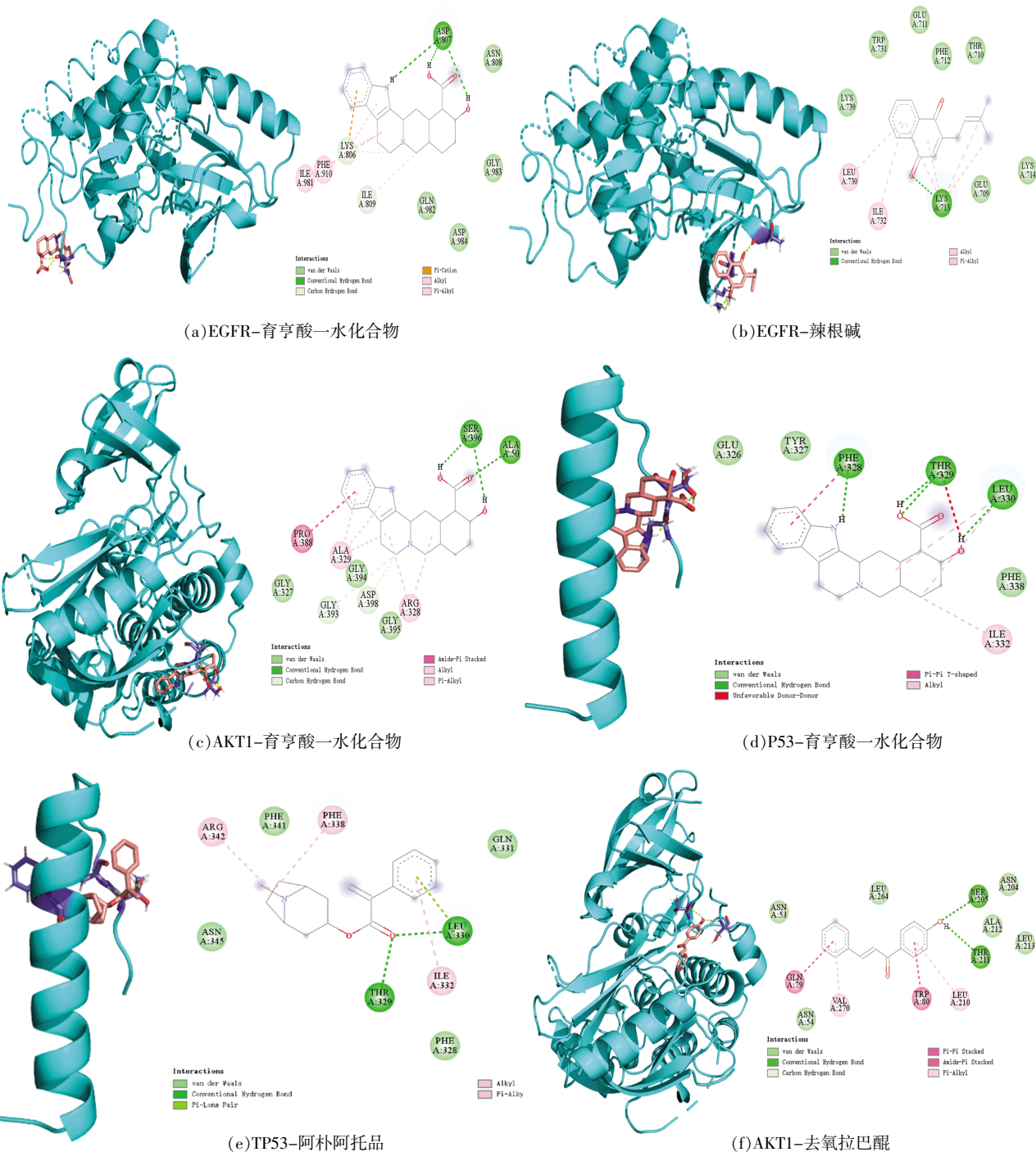
个氢键; 育亨酸一水化合物与 TP53 上的氨基酸 PHE-328 形成 1 个氢键,THR-329 形成 2 个氢键,以及 LEU-330 形成 1 个氢键;阿朴阿托品与 TP53 上的氨基酸 THR-329 和 LEU-33 各形成 1 个氢键; 去氧拉巴醌与 AKT1 上的氨基酸 SER-205 和 THR-211 各形成 1 个氢键; 高澗任素与 EGFR 上的氨基酸 GLN-812 和 ASN-816 各形成

1 个氢键; 去氧拉巴醌与 TP53 上的氨基酸 LEU-330 和 ARG-342 形成 1 个氢键。结果表明,育亨酸一水化合物与关键靶点 AKT1、TP53 和 EGFR 展现出较强的结合力,其中 EGFR 与育亨酸一水化合物结合能最高,这表明育亨酸一水化合物在调节 EGFR 活性方面具有较强的潜力。相比之下,高澗任素在多个靶点中显示出相对较低的结合

能。由于 EGFR 信号通路与能量代谢、氧化应激过程密切相关,而这些过程又与抗疲劳作用相关联,推测育亨酸一水合物和辣根碱可能通过激活 EGFR 信号通路来影响细胞的分裂、迁徙以及对应激的反应,从而产生抗疲劳作用。

### 3 结论

本研究通过网络药理学和分子对接技术,深入探讨了杜仲雄花中活性成分在抗疲劳方面的潜在作用机制。通过 GO 和 KEGG 分析,揭示了这些活性成分可能通过影响特定的生物过程和代谢途径来发挥抗疲劳作用。具体而言,杜仲雄花中关键



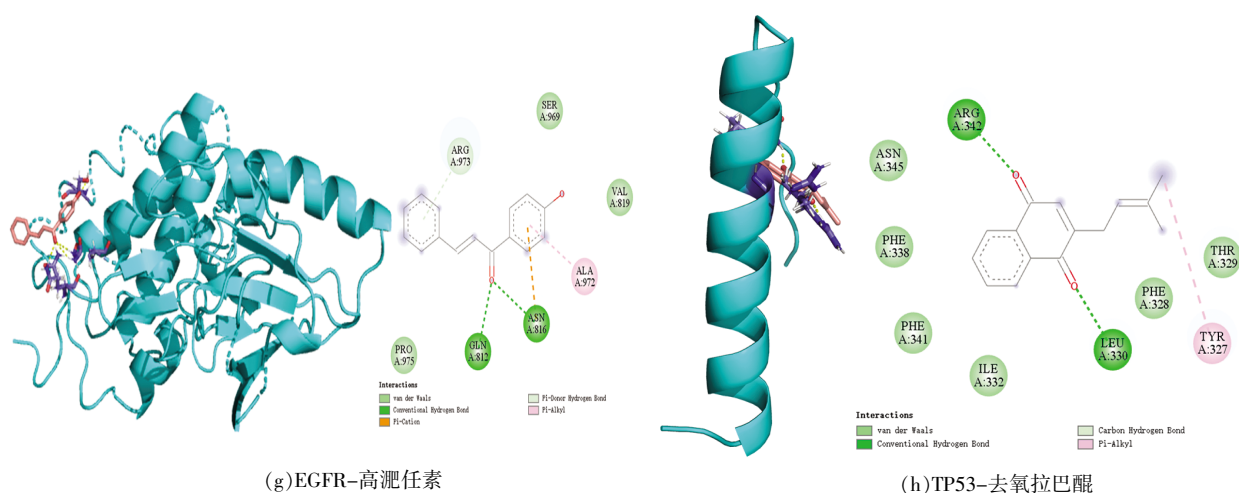


图8 分子对接

Fig.8 Molecular docking

的活性成分——育亨酸一水化合物、去氧拉巴醌、阿朴阿托品、辣根碱和高澗任素,在基因调控、细胞凋亡、DNA 转录和外源性刺激等生物学过程中扮演着重要角色,这些过程均与抗疲劳作用密切相关。在分子对接分析中,发现育亨酸一水化合物与多个关键靶点,AKT1、TP53 和 EGFR 的结合能力尤为突出,尤其与 EGFR 的结合力最高,这表明育亨酸一水化合物在调节 EGFR 活性方面具有显著潜力。同时,辣根碱、去氧拉巴醌等其它活性成分也与不同的靶点形成了稳定的相互作用,这些相互作用可能共同促进了杜仲雄花的抗疲劳效果。综上所述,本研究不仅为杜仲雄花的加工和应用提供了科学指导,也为开发新型抗疲劳产品奠定了理论基础,后续可通过体内、外试验进一步验证上述活性成分的具体作用机制,并评估其在抗疲劳产品中的应用潜力。

### 参 考 文 献

- [1] DING Y X, DOU D Q, GUO Y J, et al. Simultaneous quantification of eleven bioactive components of male flowers of *Eucommia ulmoides* oliver by HPLC and their quality evaluation by chemical fingerprint analysis with hierarchical clustering analysis [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2014, 10(40): 435.
- [2] HUANG L C, LYU Q, ZHENG W Y, et al. Traditional application and modern pharmacological research of *Eucommia ulmoides* oliv [J]. *Chinese Medicine*, 2021, 16: 73.
- [3] 李沛慷, 艾连中, 夏永军, 等. 杜仲雄花活性成分的提取、活性机制及质量标志物的研究进展[J]. *工业微生物*, 2024, 54(3): 1-3.  
LI P K, AI L Z, XIA Y J, et al. Research progress on the extraction, activity mechanism and quality markers of active ingredients of *Eucommia ulmoides* male flowers [J]. *Industrial Microbiology*, 2024, 54(3): 1-3.
- [4] 杜庆鑫, 魏艳秀, 刘攀峰, 等. 分光光度法测定杜仲雄花和叶中的总黄酮[J]. *中南林业科技大学学报*, 2017, 37(5): 96-100.  
DU Q X, WEI Y X, LIU P F, et al. Determination on total flavonoids in male flowers and leaves of *Eucommia ulmoides* by spectrophotometry [J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2017, 37(5): 96-100.
- [5] 郭洋静, 丁艳霞, 许兰波, 等. HPLC 法同时测定杜仲雄花中 5 种活性成分[J]. *中成药*, 2014, 36(10): 2131-2134.  
GUO Y J, DING Y X, XU L B, et al. Simultaneous determination of five compounds in male flowers of *Eucommia ulmoides* oliv by HPLC [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2014, 36(10): 2131-2134.
- [6] 孟益德, 吕庚鑫, 刘攀峰, 等. 不同产地杜仲雄花的非靶向代谢组学比较与分析[J]. *中南林业科技大学学报*, 2022, 42(1): 156-166.  
MENG Y D, LÜ G X, LIU P F, et al. Comparison

- and analysis of untargeted metabolomics of male flowers of *Eucommia ulmoides* from different origins [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2022, 42(1): 156-166.
- [7] ZHAI Z, NIU K M, LIU Y, et al. The gut microbiota-bile acids-TGR5 axis mediates *Eucommia ulmoides* leaf extract alleviation of injury to colonic epithelium integrity [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 727681.
- [8] WU M F, LIU P Y, WANG S Y, et al. Ultrasonic microwave-assisted micelle combined with fungal pretreatment of *Eucommia ulmoides* leaves significantly improved the extraction efficiency of total flavonoids and gutta-percha [J]. Foods, 2021, 10(10): 2399.
- [9] CHEN Q, ZHANG Q, AMROUCHE A T, et al. Asperuloside, the bioactive compound in the edible *Eucommia ulmoides* male flower, delays muscle aging by daf-16 mediated improvement in mitochondrial dysfunction [J]. Food & Function, 2023, 14(12): 5562-5575.
- [10] DING Y X, WU Y T, CHEN J, et al. Protective effect of *Eucommia ulmoides* oliver male flowers on ethanol-induced DNA damage in mouse cerebellum and cerebral cortex [J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(8): 2794-2803.
- [11] LI Z H, YANG P, XUE S, et al. Testosterone promotion effect of *Eucommia ulmoides* staminate flower via the steroidogenic pathway and potential hormonal mechanism [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 18765.
- [12] 邢敏, 费鹏, 史恩聪, 等. 响应面法优化杜仲雄花多酚提取工艺及其抗氧化活性 [J]. 食品科技, 2021, 46(7): 201-207, 214.
- XING M, FEI P, SHI E C, et al. Optimization of extraction and antioxidant activity of polyphenols from *Eucommia ulmoides* male flower by response surface methodology [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(7): 201-207, 214.
- [13] WANG J Y, CHEN X J, ZHANG L, et al. Anti-inflammatory effects of *Eucommia ulmoides* oliv. male flower extract on lipopolysaccharide-induced inflammation [J]. Chinese Medical Journal, 2019, 132(3): 319-328.
- [14] XING M, LIU S, YU Y P, et al. Antibacterial mode of eucommia ulmoides male flower extract against *Staphylococcus aureus* and its application as a natural preservative in cooked beef [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 846622.
- [15] DING Z J, LIANG C, WANG X, et al. Antihypertensive activity of *Eucommia ulmoides* oliv: Male flower extract in spontaneously hypertensive rats [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 2020(1): 6432173.
- [16] LI X K, DENG S, LI J R, et al. UPLC-MS analysis and network pharmacology-based investigation into the active ingredients and molecular mechanisms of anti-fatigue of male flowers with *Eucommia ulmoides* oliv [J]. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2022, 36(6): 1083-1098.
- [17] 杨萍. 杜仲雄花对睾丸间质细胞睾酮分泌的影响及其机制研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- YANG P. Effect and mechanism of *Eucommia ulmoides* male flowers on testosterone secretion in leydig cells [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2021.
- [18] LUO C H, XU X R, WEI X C, et al. Natural medicines for the treatment of fatigue: Bioactive components, pharmacology, and mechanisms [J]. Pharmacological Research, 2019, 148(1): 104409.
- [19] ZHOU S S, HE C, ZHANG X Q. Anti-fatigue effects of active ingredients from traditional Chinese medicine: A review [J]. Current Medicinal Chemistry, 2019, 26(10): 1833-1848.
- [20] LEI Z W, SHI Y J, ZOU J B, et al. A review of the polysaccharides against fatigue and the underlying mechanism [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 275(Pt.2): 133601.
- [21] 李英基, 裴水廷, 熊鹏. 川赤芝多糖对运动疲劳状态下小鼠心肌组织的保护作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 366-375.
- LI Y J, PEI S T, XIONG P. Protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on myocardial tissue in mice under exercise fatigue [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 366-375.
- [22] LIU S W, MENG F N, ZHANG D, et al. *Lonicera caerulea* berry polyphenols extract alleviates exercise fatigue in mice by reducing oxidative stress, inflammation, skeletal muscle cell apoptosis, and by increasing cell proliferation [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 853225.

- [23] LI K X, LIU W Z, WU C H, et al. The anti-fatigue and sleep-aiding effects vary significantly among different recipes containing *Ganoderma lucidum* extracts[J]. *Heliyon*, 2024, 10(10): e32392.
- [24] ZHENG H, ZHANG W, WANG S, et al. Anti-fatigue effects and mechanism of ginseng combined with caffeine in rats[J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance*, 2024, 21(8): 863.
- [25] FENG S W, LI T, WEI X R, et al. The antioxidant and anti-fatigue effects of rare ginsenosides and  $\gamma$ -aminobutyric acid in fermented ginseng and germinated brown rice puree[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(19): 10359.
- [26] 邹思, 吴岩斌, 吴锦忠, 等. 虎奶菇菌核多糖功能化纳米硒抗疲劳功效研究[J]. *药学实践与服务*, 2024, 42(10): 426-432.
- ZOU S, WU Y B, WU J Z, et al. Anti-fatigue activity of selenium nanoparticles functionalized by polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* sclerotium [J]. *Journal of Pharmaceutical Practice and Service*, 2024, 42(10): 426-432.
- [27] 刘书伟, 张田田, 王燕, 等. 槟榔次碱速效抗疲劳活性及其通过调控血脑屏障发挥抗疲劳机制研究[J]. *陕西科技大学学报*, 2024, 42(5): 67-76.
- LIU S W, ZHANG T T, WANG Y, et al. Study on the quick acting antifatigue activity of arecaine and its mechanism of anti-fatigue by regulating the blood brain barrier[J]. *Journal of Shaanxi University of Science & Technology*, 2024, 42(5): 67-76.
- [28] 赵冬, 金仓. 玫瑰花青素提取工艺优化及其抗疲劳研究[J]. *中国调味品*, 2024, 49(10): 205-209, 215.
- ZHAO D, JIN C. Optimization of extraction process of rose anthocyanins and their anti-fatigue study[J]. *China Condiment*, 2024, 49(10): 205-209, 215.
- [29] ZHAO W B, WANG B Y, LI S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence[J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2024, 16(4): 558-560.
- [30] ZHANG P, ZHANG D F, ZHOU W A, et al. Network pharmacology: Towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2024, 25(1): 518.
- [31] 孙若岚, 梁研, 赵凡, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨芪术抗癌方治疗结直肠癌的作用机制[J]. *中医杂志*, 2024, 65(4): 404-413.
- SUN R L, LIANG Y, ZHAO F. Exploring the mechanism of action of Qizhu Kang'ai formula for the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental validation[J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 65(4): 404-413.
- [32] 范晓旭, 唐琴, 于雪, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 $\alpha$ -VEGF 通路的调节作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2023, 35(5): 867-878.
- FANG X X, TANG Q, YU X, et al. Study on regulation of honokiol on HIF-1 $\alpha$ -VEGF pathway in PC12 cells based on network pharmacology and experimental verification[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2023, 35(5): 867-878.
- [33] 高耀, 高丽, 高晓霞, 等. 基于网络药理学的逍遥散抗抑郁活性成分作用靶点研究[J]. *药学报*, 2015, 50(12): 1589-1595.
- GAO Y, GAO L, GAO X X, et al. An exploration in the action targets for antidepressant bioactive components of Xiaoyaosan based on network pharmacology[J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(12): 1589-1595.
- [34] WU Y, LIU B W, CAO Y S, et al. Exploring the prescription patterns and molecular mechanism of tonifyingkidney therapy for insomnia using data mining, network pharmacology and molecular docking[J]. *Modern Chinese Clinical Medicine*, 2024, 31(4): 30-37.
- [35] 侯敏, 高文静, 杜阳, 等. 降糖消脂片治疗 NAFLD 的分子作用机制分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(5): 147-157.
- HOU M, GAO W J, DU Y, et al. Molecular mechanism analysis of Jiangtang Xiaozhi tablets in treatment of NAFLD[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(5): 147-157.
- [36] 步润峰, 张浩然, 龙思雨, 等. 基于网络药理学和实验验证探究肉苁蓉治疗阿尔茨海默症作用机制[J/OL]. *海南医学院学报*, 1-15 (2024-12-09) [2025-02-08]. <https://link.cnki.net/doi/10.13210/j.cnki.jhmu.20241209.002>.
- BU R F, ZHANG H R, LONG S Y, et al. Mechanism of *Cistanche deserticola* treating Alzheimer's disease based on network pharmacology and experi-

- mental validation[J/OL]. Journal of Hainan Medical University, 1-15 (2024-12-09) [2025-02-08]. <https://link.cnki.net/doi/10.13210/j.cnki.jhmu.20241209.002>.
- [37] 豆佳红, 王梓颖, 杨娟, 等. 基于网络药理学和分子对接分析赤芍抗氧化应激作用的活性成分及其机制[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(3): 1229-1240.
- DOU J H, WANG Z Y, YANG J, et al. Analysis of the active ingredients and mechanism of *Radix paeoniae* Rubra antioxidative stress based on network pharmacology and molecular docking[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(3): 1229-1240.
- [38] 李静荣, 梁冰宜, 彭维, 等. 基于生物信息学和分子对接技术研究当归六黄汤治疗溃疡性结肠炎潜在活性成分及分子机制[J]. 药学研究, 2022, 41(9): 561-569.
- LI J R, LIANG B Y, PENG W, et al. Study on the potential active components and molecular mechanism of Danggui Liuhuang decoction in the treatment of ulcerative colitis based on bioinformatics and molecular docking technology [J]. Journal of Pharmaceutical Research, 2022, 41(9): 561-569.
- [39] 李丽梅, 于虹敏, 黄美霞, 等. 基于网络药理学与实验验证探讨连翘苷治疗脓毒症的作用及机制[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(9): 64-70.
- LI L M, YU H M, HUANG M X, et al. Effect and mechanism of phillyrin in the treatment of sepsis based on network pharmacology and experimental validation [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2024, 40(9): 64-70.
- [40] JAISWAL N, GAVIN M, LORO E, et al. AKT controls protein synthesis and oxidative metabolism via combined mTORC1 and FOXO1 signalling to govern muscle physiology [J]. Cachexia Sarcopenia Muscle, 2022, 13(1): 495-514.
- [41] 张禄璐, 梁永林, 张李香, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨旋覆花治疗运动性疲劳的作用机制[J]. 中国现代医药杂志, 2022, 24(8): 6-12.
- ZHANG L L, LIANG Y L, ZHANG L X, et al. Mechanism of *Inula japonica* Thunb in the treatment of exercise-induced fatigue based on network pharmacology and molecular docking[J]. China Academic Journal Electronic Publishing House, 2022, 24(8): 6-12.
- [42] 何婵, 罗华丽, 季晖. 基于TNF- $\alpha$ 的脑缺血再灌注损伤机制及相关药物研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(28): 4016-4020.
- HE C, LUO H L, JI H. Research progress on the mechanism of cerebral ischemia-reperfusion injury and related drugs based on TNF- $\alpha$ [J]. China Pharmacy, 2016, 27(28): 4016-4020.
- [43] 陈丹娜, 吴绮丽. EGFR/HER-1抑制剂通过能量代谢重编程发挥心肌细胞毒性作用[J]. 循证医学, 2023, 23(6): 371-377.
- CHEN D N, WU Q L. EGFR/HER-1 inhibitor exert cardiotoxicity through energy metabolic reprogramming[J]. The Journal of Evidence-Based Medicine, 2023, 23(6): 371-377.
- [44] PARK S Y, HAN J S. Neuroprotective effect of bcl-2 on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in cortical neural stem cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(12): 6399.

### Anti-fatigue of Male Flower of *Eucommia ulmoides* Based on UHPLC-MS and Network Pharmacology

LAN Qianmin, CHENG Cui, WANG Tingyu, LI Jiasi, SHI Xiaodong\*  
(School of Food and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106)

**Abstract** Objectives: The purpose of this study was to explore the anti-fatigue mechanism of male flower of *Eucommia ulmoides* by network pharmacology and molecular docking technology, to clarify the interaction between its active components and key targets, and to provide scientific basis for its application. Methods: UPLC-MS technology was used to analyze the active components of male flower of *Eucommia ulmoides*, combined with database screening component targets and fatigue related targets, identified common targets by Venn analysis, constructed PPI network and functional pathway analysis, and verified the binding ability of key components and targets by molecular docking. Results: 63 active com-

ponents and 868 targets were identified and 170 intersection targets were screened. Network analysis showed that EGFR, AKT1 and TP53 were the key targets, and the molecular docking were verified to have strong binding to these targets. Conclusions: This study revealed the potential mechanism of anti-fatigue of male flowers of *Euonymus ulmoides* by network pharmacology and molecular docking techniques. Active ingredients such as Yohimbic acid monohydrate may exert anti-fatigue effects through interactions with key targets such as EGFR, AKT1, TP53, etc. These findings provide a theoretical basis for further research and application of male flower of *Eucommia ulmoides* in the field of anti-fatigue.

**Keywords** male flower of *Eucommia ulmoides*; anti-fatigue; network pharmacology; molecular docking