

人参“补气”和三七“补血”抗疲劳的共同作用机制和效用比较

林子璇¹, 刘飞祥², 赵玉男^{1*}, 张怀亮², 郭迎树², 张道培², 张菁¹, 邵晓¹

(1. 南京中医药大学 医学院·整合医学院, 南京 210023;

2. 河南中医药大学 第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:基于网络药理学技术,分析人参“补气”和三七“补血”抗疲劳的共同活性成分、潜在靶基因和通路,并分别选取人参总皂苷和三七总皂苷两种化合物成分,对筛选出的关键靶基因进行体外实验验证。方法:通过中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP),筛选人参和三七的主要有效活性成分和相关作用靶标;依靠 GeneCards 综合数据库和人类孟德尔遗传综合数据库(OMIM),建立疲劳基因的数据集;通过 R 软件获取药物和疾病的交集基因;采用 Cytoscape 软件建立有效活性成分-药物靶标-疲劳靶基因之间的调控网络;通过 STRING 11.0 软件构建交集基因的 PPI 网络,采用 CytoHubba 软件和马修斯相关系数(MCC)算法筛选核心基因。基于网络分析结果,将 24 只 SPF 级 ICR 雄性小鼠随机分为空白组,人参总皂苷组(0.08 g·kg⁻¹)和三七总皂苷组(0.08 g·kg⁻¹),并给予相应药物治疗 3 周,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测肌肉组织中核心基因 mRNA 表达。结果:从 TCMSP 共筛选出 20 个有效活性成分,181 个药物靶标,经 R 软件与 GeneCards 和 OMIM 综合数据库比对,共获取 33 个疾病与药物的交集基因;MCC 算法共筛选出芳基羟受体(AHR),雄激素受体(AR),谷胱甘肽 S-转移酶 P1(GSTP1),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),细胞色素 P450 酶 3A4(CYP3A4),细胞间黏附分子 1(ICAM1)和核转录因子- κ B 抑制剂 α (NFKBIA)等 10 个核心基因。人参总皂苷和三七总皂苷对 GSTP1 和 ICAM1 基因无明显影响,但能明显抑制 AHR, CYP3A4, Caspase-3, NFKBIA 和 AR 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),且人参总皂苷和三七总皂苷组之间的抗疲劳效用没有明显差异。结论:通过网络分析和实验验证,揭示了人参和三七抗疲劳的共同作用机制,可能与对 AHR, CYP3A4 和 Caspase-3 等相关基因的调节有关,且二者抗疲劳的效用没有显著差异。

[关键词] 三七总皂苷;网络药理学;三七;人参;人参总皂苷;疲劳综合症

[中图分类号] R2-0;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0081-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201540

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200527.1157.006.html>

[网络出版日期] 2020-5-27 16:29

Anti-fatigue Analysis of Common Mechanisms of Interaction of Ginseng Radix et Rhizoma "Tonifying Qi" and Notoginseng Radix et Rhizoma "Enriching Blood"

LIN Zi-xuan¹, LIU Fei-xiang², ZHAO Yu-nan^{1*}, ZHANG Huai-liang², GUO Ying-shu², ZHANG Dao-pei²,
ZHANG Qiang¹, SHAO Xiao¹

(1. School of Medicine & Holistic Integrative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine,
Nanjing 210023, China;

2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the common active ingredients, potential target genes and pathways of Ginseng Radix et Rhizoma "Tonifying Qi" and Notoginseng Radix et Rhizoma "Enriching blood" in alleviating fatigue based on the network pharmacology technology. And the compound ingredients of total Ginsenoside Ginseng Root and Notoginseng total Saponins were selected to verify the core target genes *in vitro*. **Method:** The main

[收稿日期] 20200312(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873025);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18_1567)

[第一作者] 林子璇, 硕士, 医师, 从事中药药理学研究, E-mail:3356376831@qq.com

[通信作者] * 赵玉男, 教授, 从事中药药理学研究, E-mail:zhaoyunan-js@163.com

active ingredients and related targets of Ginseng Radix et Rhizoma and Notoginseng Radix et Rhizoma were screened by traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP). The data of fatigue genes were established by GeneCards comprehensive database and Human Mendelian Genetic Integrated Database (OMIM). Depending, The data sets of fatigue-related genes are established based on the data bank of GeneCards and OMIM. The intersecting genes of drugs and disease were obtained by R software. Cytoscape software was used to establish the regulatory network among the active ingredients, drug targets and fatigue-related genes. PPI network of intersecting genes was constructed by STRING 11.0 software, and the core genes were screened by CytoHubba software and Matthews correlation coefficient (MCC) algorithm. Based on the results of network analysis, 24 male SPF ACR mice were randomly divided into control group, total Ginsenoside Ginseng Root group ($0.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Notoginseng total Saponins group ($0.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The corresponding drugs were given for 3 weeks. The expressions of core genes in muscle tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Result:** The 20 active components and 181 drug targets were screened from TCMSP. 33 intersecting genes of diseases and drugs were obtained when compared with GeneCards and OMIM comprehensive database using R software. 10 core genes including aryl hydrocarbon receptor (AHR), androgen receptor (AR), glutathione S-transferase P1 (GSTP1), cysteine proteinase-3 (Caspase-3), cytochrome p450 enzyme 3A4 (CYP3A4), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) and nuclear factor kappa B inhibitor alpha (NFKBIA) were screened out by the algorithm of MCC. Total Ginsenoside Ginseng Root and Notoginseng total Saponins had no significant effect on GSTP1 and ICAM1 genes, but they could significantly inhibit the expressions of AHR, CYP3A4, Caspase-3, NFKBIA and AR ($P<0.05$, $P<0.01$), and there were no significant difference in anti-fatigue effect between total Ginsenoside Ginseng Root and Notoginseng total Saponins groups. **Conclusion:** The mechanism of anti-fatigue of Ginseng Radix et Rhizoma and Notoginseng Radix et Rhizoma may be related to the regulation of AHR, CYP3A4 and Caspase-3 genes, and there is no significant difference in their anti-fatigue effects, through the analysis of network and experimental verification.

[Key words] Notoginseng total saponins; network pharmacology; Notoginseng Radix et Rhizoma; Ginseng Radix et Rhizoma; total Ginsenoside Ginseng Root; fatigue syndrome

慢性疲劳综合征是一种持续存在和反复发作, 伴随有多种神经、精神症状, 但无器质性及精神性疾病为特点的证候群^[1-2]。认知行为疗法和分级运动疗法是目前国际上治疗本病的主要措施, 但这种为了增加活动而采用的治疗方法存在一定的争议^[3-4]。人参和三七分别是传统中药当中补气和补血的代表性药物。人参甘温, 无毒, 气味俱薄, 浮而升, 阳中之阳, 为传统补虚强体的名贵药材, 历来被视为上品。《神农本草经》记载: “人参主补五脏, 安精神, 止惊悸, 除邪气, 明目, 开心益智”^[5]。三七甘温, 微苦, 归肝、胃经, 《本草从新》记载: “散血定痛, 治吐血衄血, 血痢血崩”^[6]。又因其有活血而不伤正、止血而不留瘀之功效, 故有“化瘀止血之圣药”的美称。清代医学家赵学敏则首次在《本草纲目拾遗》中对人参和三七的功效进行了比较, 曰: “人参补气第一, 三七补血第一, 味同而功亦等, 故称人参三七, 为中药之最珍贵者”^[7]。人参和三七都具缓解

机体疲劳状态的功效, 但前者补气而后者补血, 二者是否存在共同的作用机制及效用是否存在差异, 目前尚缺乏足够的研究。

达玛烷型人参皂苷是人参和三七的主要活性成分。人参当中的主要活性成分为人参皂苷 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rg₁, 其含量占人参总皂苷的90%以上^[8]。三七当中的主要活性成分为三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁, RM, Rd, Re 等, 其中以三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rb₁ 为代表的 20F(S)F-PPD 型和以人参皂苷 Rg₁ 为代表的 20F(S)F-PPT 型结构为主, 约占总含量的60%^[9]。三七皂苷 R₁ 是三七总皂苷区别于人参总皂苷的代表性活性成分^[10]。课题组前期的耐缺氧实验发现给予小鼠灌胃人参总皂苷和三七总皂苷后, 两组小鼠窒息死亡的时间均较对照组有明显的延长, 且人参总皂苷组和三七总皂苷组在耐缺氧中表现无显著性差异^[11]。这为二者抗疲劳的作用提供了一定依据, 但其发挥相同效用的分子机制尚未

阐明。因此本研究通过网络药理学手段,筛选二者抗疲劳的共同作用靶基因,然后给予小鼠相应的药物干预,观察其肌肉组织中相关基因的变化,从而阐明二者的作用机制和效用高低。

1 材料

1.1 资料 Cytoscape_3.6.1 版本软件及其插件 CytoHubba; 中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP: <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>); 人类孟德尔遗传综合数据库 (OMIM: <http://www.omim.org/search/advanced/geneMap>); RStudio 版本软件; STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>); GeneCards 综合数据库 (<https://www.genecards.org/>); UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 蛋白质数据库; 生物半导体 (Bioconductor: <http://www.bioconductor.org/>) 数据库。

1.2 动物 24 只 SPF 级 1 月龄 ICR 雄性小鼠, 体重 (23±3) g, 由江苏省南京市青龙山动物繁殖中心提供, 合格证号 SCXK(苏)2017-0001。小鼠饲养于南京中医药大学动物中心, 相对湿度为 (55.4±1.5)%, 每大笼 8 只, 自由饮水和摄食, 室温 (24.5±2.1) °C, 12 h 日夜交替循环。所有实验方案和操作流程, 均符合国际动物使用原则和欧盟制定的实验动物福利方针, 并取得了南京中医药大学动物伦理委员会的同意和批准 (伦理号 201904A010)。

1.3 药物与试剂 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒 (北京全式金生物科技有限公司, 批号 ER501); 三七总皂苷, 人参总皂苷 (上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为 B21102, S25997); cDNA 逆转录试剂盒以及反转录试剂盒 (上海翊圣生物科技有限公司, 批号分别为 11202ES08, 11123ES60); trizol 试剂 (赛默飞世尔科技有限公司, 批号 15596026)。

1.4 仪器 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); EnSpire 型酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); 5417R 型台式高速冷冻离心机, Mastercycler nexus 型基因扩增仪, BioPhotometer plus 型核酸蛋白检测仪 (德国 Eppendorf 公司); 十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

2 方法

2.1 药物有效活性成分和靶基因的筛选与建立在 TCMSP 数据库中, 通过设置类药性 (DL) ≥ 0.18 和生物利用度 (OB) ≥ 30 的控制标准, 筛选人参和三七当中的有效化合物成分以及相关化合物的作用基因, 并剔除目前缺乏对相关基因具有调节作用的活性成分, 分别建立有效活性成分数据集和靶基因数据集。

2.2 疾病靶基因集的建立 通过 OMIM 综合数据库和 GeneCards 综合数据库检索 “Fatigue” “Tired” “Exhaustion syndrome” 等关键词, 获取与本病相关的基因, 建立疾病基因数据集。

2.3 有效活性成分-药物靶点-疾病靶基因网络的构建 采用 R 语言技术, 比对和筛选疾病与药物的交集基因。通过 Cytoscape 3.6.1 软件分析疾病、药物、有效活性成分和交集基因的关系, 构建疾病、药物和靶基因的作用网络。

2.4 PPI 网络的构建 通过 STRING 软件, 构建交集基因的 PPI 网络。然后采用 Cytoscape 3.6.1 软件, 经马修斯相关系数 (MCC) 算法筛选关键基因, 分析基因之间的交互作用, 统计各基因的节点数目, 构建核心基因的 PPI 网络。

2.5 分组及给药 将 24 只小鼠根据随机分配的原则分为 3 组, 每组 8 只。分别给予纯水 (空白组), 0.08 g·kg⁻¹ 人参总皂苷和 0.08 g·kg⁻¹ 三七总皂苷, 并连续灌胃 3 周。给药结束后, 将小鼠颈椎脱臼处死后, 迅速投入到液氮罐中, 然后快速在冰上取下相同部位小鼠后肢肌肉, -80 °C 保存备用。

2.6 Real-time PCR 检测 小鼠肌肉组织中 MAPK8, STAT1 和 IL1B 等核心基因 mRNA 的表达

根据 RNA 试剂盒的操作流程, 提取肌肉组织总 RNA。其具体操作流程为肌肉组织称重, 按照组织质量 100 mg 加入 trizol 1 mL, 然后用组织研磨仪以 15 000 r·min⁻¹ 的速度匀浆 2 min, 静置 5 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清, 过纯吸柱, 并用多功能酶标仪检测其浓度, 保存备用。根据上海翊圣生物科技有限公司 Hifair™ II 1 Strand cDNA Synthesis SuperMix for Real-time PCR 试剂盒的操作流程, 配制 20 μL 的反应体系, 设置 85 °C 5 s, 42 °C 15 min 的参数, 将 RNA 进行逆转录为 cDNA, 反应结束后 -80 °C 冰箱保存备用。依据 Hieff™ Real-time PCR SYBR GREEN Master Mix 试剂盒的操作流程, 配制 20 μL Real-time PCR 反应体系, 采用两步法, 用 Real-time PCR 仪进行扩增, 其参数为变性温度 94 °C 30 s, 随后变性温度 94 °C 5 s, 退火温度 60 °C 30 s, 共 40 个循环。雄激素受体 (AR), 半胱氨酸蛋白水解酶-3 (Caspase-3), 细胞色素 P450 酶 3A4 (CYP3A4), 核转录因子-κB 抑制剂 α (NFKBIA), 芳基羟受体 (AHR), 胞间黏附分子 1 (ICAM1), 谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (GSTP1) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) PCR 引物序列由中国生工生物科技有限公司设计并合成, 引物序列见

表1,以GAPDH为内参对照。所有数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
AR	上游 TGGCGGTCTTCACTAATGTCAAC	101
	下游 CACTGGCTGTACATCCGAGACTTG	
NFKBIA	上游 AGACCTGGCCTTCTCAACTTCC	199
	下游 CTGCGTCAAGACTGCTACACTGG	
Caspase-3	上游 GTGGAGGCTGACTTCTGTATGC	181
	下游 ACTCGAATTCGTTGCCACCTTC	
CYP3A4	上游 TCATTGCTGTCTCCAACCTTACC	116
	下游 GGCTTGCCTGTCTCTGCTTCC	
AHR	上游 CGCTGCTGGTGAGGTTGACTTC	110
	下游 GCTGCTGGCAAGCCGAGTTC	
ICAM1	上游 CTGGCAGCAAGTAGGCAAGGAC	115
	下游 TGGCTGGCGGCTCAGTATCTC	
GSTP1	上游 AGCTGGAAGGAGGAGGTGTTAC	144
	下游 GCGGCCAAGGTGTCTCAAGATG	
GAPDH	上游 CGTTGACATCCGTAAGACC	125
	下游 AACAGTCCGCTAGAAGCAC	

2.7 统计学分析 使用SPSS 19.0软件(美国IBM公司)进行数据分析,结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 三七和人参有效化合物和靶基因的筛选结果

在 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的条件下,共从TCMSP数据库中筛选出 β -谷甾醇(beta-sitosterol),豆甾醇(Stigmasterol)和人参皂苷Rh₂(Ginsenoside Rh₂)等20个人参和三七的有效化合物(表2)。同时,从三七和人参当中分别筛选出89和92个药物靶点基因。

3.2 对疲劳综合征靶基因和药物基因的交集数据集的分析 通过在GeneCards综合数据库和OMIM综合数据库中搜索关键词疲劳和疲劳综合症,共得到包括AHR,AR和GSTP1等5442个与本病相关的基因。人参和三七有效化合物的靶基因集与疲劳综合征相关基因集通过R软件进行比对,共得到包括获得Caspase-3,CYP3A4及NFKBIA在内的33个药物与疾病的交集靶基因。见表3。

表2 三七和人参的有效活性成分

Table 2 Active constituents of Notoginseng Radix et Rhizoma and Ginseng Radix et Rhizoma

No.	ID	化合物	相对分子质量	CAS	OB/%	DL	中药
1	MOL001494	十八碳-6,9-二烯酸乙酯(mandenol)	308.56	544-35-4	42.00	0.19	三七
2	MOL001792	(2s)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)色满-4-酮(DFV)	256.27	578-86-9	32.76	0.18	三七
3	MOL005399	亚历山大qt(alexandrin_qt)	414.79	474-58-8	36.91	0.75	人参
4	MOL005308	阿朴天仙子碱(aposiopolamine)	271.34	N/A	66.65	0.22	人参
5	MOL005320	花生四烯酸(arachidonate)	304.52	506-32-1	45.57	0.20	人参
6	MOL000358	β -谷固醇(Beta-sitosterol)	414.79	149-91-7	36.91	0.75	三七/人参
7	MOL005317	脱氧三尖杉酯碱(deoxyharringtonine)	515.66	36804-95-2	39.27	0.81	人参
8	MOL005318	石竹胺(dianthramine)	289.26	136945-65-8	40.45	0.20	人参
9	MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯(diop)	390.62	25103-50-8	43.59	0.39	三七/人参
10	MOL005321	氟丁酮A(frutinone A)	264.24	38210-27-4	65.90	0.34	人参
11	MOL000787	蓝堇碱(fumarine)	353.40	130-86-9	59.26	0.83	人参
12	MOL005344	人参皂苷Rh ₂ (Ginsenoside Rh ₂)	622.98	112246-15-8	36.32	0.56	三七/人参
13	MOL005348	人参皂苷(Rh ₄)Ginsenoside-Rh ₄ _qt	458.80	174721-08-5	31.11	0.78	人参
14	MOL005356	吉九里香碱(girinimbin)	263.36	23095-44-5	61.22	0.31	人参
15	MOL003648	山槐素(inermin)	284.28	19908-48-6	65.83	0.54	人参
16	MOL000422	山柰酚(kaempferol)	286.25	520-18-3	41.88	0.24	人参
17	MOL005376	人参二醇(panaxadiol)	460.82	19666-76-3	33.09	0.79	人参
18	MOL000098	槲皮素(querctin)	302.25	73123-10-1	46.43	0.28	三七
19	MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	412.77	83-48-7	43.83	0.76	三七/人参
20	MOL005384	苏齐内(suchilactone)	368.41	50816-74-5	57.52	0.56	人参

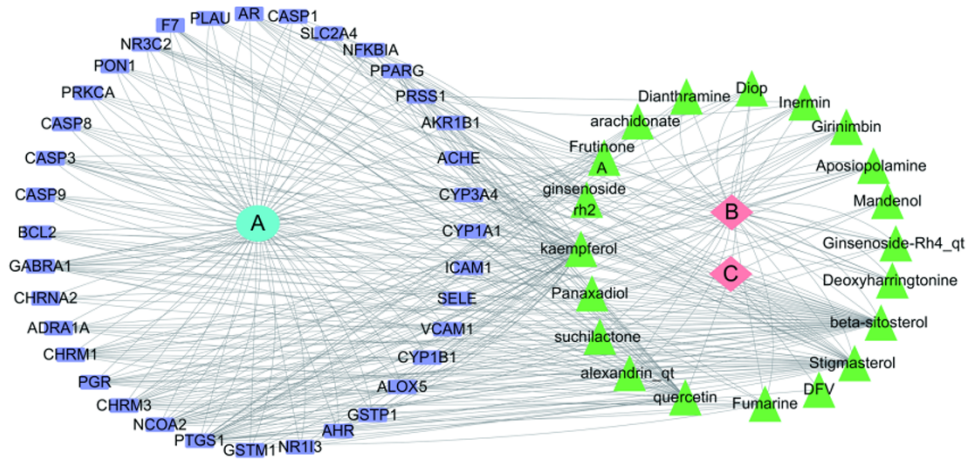
表3 药物靶基因和疾病靶点的交集基因(前15)

Table 3 Intersection of drug genes and disease targets (top 15)

No.	基因中英文全称	基因英文缩写
1	芳基烃受体(aryl hydrocarbon receptor)	AHR
2	α -1A 肾上腺素能受体(alpha-1A adrenergic receptor)	ADRA1A
3	雄激素受体(androgen receptor)	AR
4	凋亡调节因子B淋巴瘤细胞瘤-2(apoptosis regulator Bcl-2)	Bcl-2
5	谷胱甘肽S-转移酶P(glutathione S-transferase P)	GSTP1
6	半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)	Caspase-3
7	半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)	Caspase-8
8	细胞色素p450酶1B1(cytochrome p450 1B1)	CYP1B1
9	细胞色素p450酶3A4(cytochrome p450 3A4)	CYP3A4
10	γ -氨基丁酸受体亚单位 α -1(gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1)	GABRA1
11	谷胱甘肽S-转移酶Mu 1(glutathione S-transferase Mu 1)	GSTM1
12	胞间黏附分子1(intercellular adhesion molecule 1)	ICAM1
13	核转录因子- κ B抑制剂 α (NF-kappa-B inhibitor alpha)	NFKBIA
14	前列腺素G/H合成酶1(prostaglandin G/H synthase 1)	PTGS1
15	血管细胞黏附蛋白1(vascular cell adhesion protein 1)	VCAM1

3.3 人参和三七有效成分-药物靶基因-疾病基因的调控网络 在Kappa评分设为0.4,并排除没有关联基因的条件下,33个交集基因和20个有效化

合物成分经Cytoscape软件分析处理,构建了以人参和三七为核心的药物与疾病之间的调控网络。见图1。



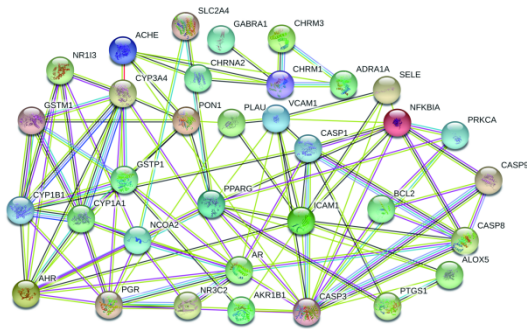
A. 疲劳综合征; B. 人参; C. 三七; 四边形. 基因; 三角形. 有效活性成分
图1 人参和三七有效活性成分-药物靶基因-疾病基因的网络调控

Fig. 1 Network regulation map of active ingredients, drug targets and disease genes of Ginseng Radix et Rhizoma and Notoginseng Radix et Rhizoma

3.4 蛋白交互网络分析 交集基因数据集经STRING 11.0软件分析,获得了基因之间的PPI网络图(图2)。MCC算法处理经STRING 11.0软件分析后的核心基因数据,获得了CYP1A1, AHR, CYP3A4, GSTP1, CYP1B1, GSTM1, Caspase-3, NFKBIA, ICAM1和AR 10个关键基因及其交互网

络节点评分。见图3,表4。

3.5 对小鼠肌肉中AHR, CYP3A4, GSTP1, Caspase-3, NFKBIA, ICAM1和AR mRNA的影响 与空白组比较,人参总皂苷和三七总皂苷组小鼠后腿肌肉组织中AHR, CYP3A4, Caspase-3, NFKBIA和AR mRNA表达水平均明显降低,差异



天蓝色.来自数据管理库;紫色.实验测定;黄色.文本挖掘证据;黑色.共表达证据;浅蓝色.蛋白同源性证据;深蓝色.基因共进化证据;红色.基因融合证据;绿色.基因邻接证据

图2 疾病和药物靶基因交集基因的交互作用

Fig. 2 Interaction diagram of disease targets and drug genes

具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 ICAM1 和

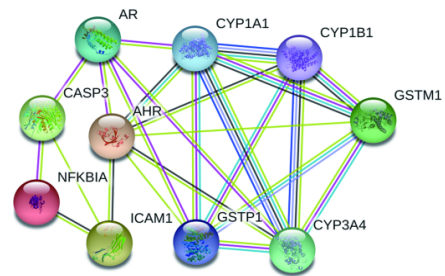


图3 10个核心基因交互网络

Fig. 3 Interaction network diagram of 10 core genes

GSTP1 mRNA 表达没有明显变化, 差异未见显著统计学意义, 见表5。与人参总皂苷组比较, 三七总皂苷组小鼠肌肉组织中 AHR, CYP3A4, Caspase-3, NFKBIA 和 AR mRNA 表达水平无明显变化, 差异无统计学意义。见表5。

表4 核心基因交互网络节点评分(前10)

Table 4 Core gene interaction network node scores (Top 10)

No.	结点1	结点2	同源性	共表达证据	实验获得性证据	数据库证据	文本挖掘证据	综合评分
1	CYP1A1	AHR	0	0.061	0	0.900	0.975	0.997
2	CYP1A1	GSTM1	0	0.061	0.077	0.650	0.892	0.962
3	CYP1A1	CYP3A4	0.605	0.129	0	0.900	0.895	0.950
4	CYP1B1	AHR	0	0.095	0	0	0.939	0.943
5	CYP1B1	CYP1A1	0.893	0.277	0	0.900	0.936	0.935
6	GSTP1	CYP1A1	0	0	0.077	0.650	0.738	0.908
7	CYP1B1	GSTM1	0	0.054	0.077	0.650	0.672	0.886
8	CYP1B1	GSTP1	0	0	0.077	0.650	0.674	0.885
9	CYP3A4	GSTM1	0	0	0.064	0.650	0.555	0.841
10	GSTP1	CYP3A4	0	0	0.064	0.650	0.551	0.840

表5 人参总皂苷和三七总皂苷对肌肉组织中 AHR, CYP3A4, GSTP1, Caspase-3, NFKBIA, ICAM1 和 AR mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of total Total Ginsenoside Ginseng Root and Notoginseng total Saponins on levels of mRNA of AHR, CYP3A4, GSTP1, Caspase-3, NFKBIA, ICAM1 and AR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	AHR	CYP3A4	Caspase-3	NFKBIA	AR	GSTP1	ICAM1
人参总皂苷	0.08	0.14 \pm 0.05 ²⁾	0.44 \pm 0.15 ²⁾	0.19 \pm 0.07 ²⁾	0.82 \pm 0.09 ¹⁾	0.64 \pm 0.10 ²⁾	1.24 \pm 0.15	1.23 \pm 0.22
三七总皂苷	0.08	0.21 \pm 0.03 ²⁾	0.48 \pm 0.09 ²⁾	0.18 \pm 0.05 ²⁾	0.59 \pm 0.08 ²⁾	0.71 \pm 0.07 ²⁾	0.96 \pm 0.19	1.12 \pm 0.16

注: 设空白组各 mRNA 表达量均为 1; 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

《黄帝内经·素问·调经论》云:“人之所有者, 血与气耳”, 气和血是人体内 2 大类基本物质, 在人体生命活动中占有重要的地位。气具有防御、抗邪和调节等作用, 其盛衰与机体功能的正常发挥有密切

的关系。人体之气, 根据其生成来源、分布部位及功能主治特点的不同, 可分为元气、宗气、营气和卫气。元气足, 则能推动和调控机体发育、五脏六腑、经络及官窍的生理活动的正常运行, 不足则发育迟缓、生殖机能减退及未老先衰; 宗气足, 则呼吸均

匀、声音洪亮、血气运行通畅,不足则气短懒言、声音低微及神疲倦怠;营气充,则血液化生之源足,五脏六腑、四肢百骸得以濡养,不足则经脉、百骸无以为养;卫气足,则机体正气充沛,能够防御外邪和温养全身,不足则易自汗、外感及乏力。血对机体有濡养和化神作用。《黄帝内经·素问·五藏生成》云:“肝受血而能视,足受血而能步,掌受血而能握,指受血而能摄”,说明机体各生理功能的发挥均是在血的濡养作用下完成的。血液充盈,则肌肉壮实、感觉灵敏、运动自如及精力充沛;血液亏虚,濡养功能减弱,则肌肉瘦削、肢体麻木、运动无力及倦怠乏力。气与血之间存在密切的关系,气为血之帅,气能生血,血液的化生离不开气的推动和激发。血为气之母,血能养气,气的充盈及功能发挥离不开血液的濡养。人参补气第一,三七补血第一,一侧重补气,一侧重补血,二者常被用来提高机体功能,缓解疲劳状态,充分体现了中医气血互生互的关系。

三七总皂苷是三七主要有效活性成分,含有多种与人参皂苷类似的成分,具有抗疲劳、调节免疫及抗氧化功效。其作用机制可能与有效改善肝脏微循环,增强细胞SOD活力,减轻细胞损伤,提高肝脏耐缺血缺氧能力有关^[12]。临床实验研究表明,在高原环境下,三七能够显著增加机体的抗氧化能力,明显抑制脂质过氧化反应,具有延缓运动后疲劳症状发生,加速疲劳症状消除,提高人体运动的能力的作用^[13-14]。是人参的主要有效活性成分,其抗疲劳作用的生物学机制可能与提高血红蛋白水平及改善肌肉中的线粒体代谢有关^[15]。有学者研究表明,人参提取物对健康成人和长期慢性疲劳患者具有明显的抗疲劳作用^[16-17]。

本次研究发现,人参和三七中OB \geq 30%,DL \geq 0.18的化合物有 Ginsenoside Rh₂, Ginsenoside Rh₄_qt 和 Stigmasterol 等 20 个。二者有效化合物成分对应的靶基因,经与 GeneCards 和 OMIM 综合数据库中疲劳综合症的靶基因比对,共得到包括 33 个药物和疾病的交集基因。通过 MCC 算法,共获得 AHR, CYP3A4, GSTP1 和 AR 等在内的 10 个核心基因。这说明人参和三七在抗疲劳方面存在共同的作用靶向。经小鼠体内实验研究,发现人参总皂苷和三七总皂苷对关键基因 GSTP1 和 ICAM1 无明显影响,但均能显著抑制 AHR, CYP3A4, Caspase-3, NFKBIA 和 AR 的表达,且两组之间不存在明显的差异。这从基因层面佐证了医家赵学敏对三七和人参“味同而功亦等”的论述,即人参总皂苷和三七

总皂苷组在抗疲劳的效用高低方面没有明显差异。

Caspase-3 参与半胱天冬酶的激活级联,负责凋亡的执行, Caspase-3 多态性与癌症风险之间存在明显的关联^[18-19]。CYP1A1, CYP1B1 和 CYP3A4 是细胞色素 P450 家族的酶,在非肝细胞和乳腺组织中表达,它们能够参与 NADPH 依赖性电子转运途径,促进类固醇和异种生物进行各种氧化反应^[20-22]。研究表明, CYP1A1, CYP1B1 和 CYP3A4 基因在癌因性疲劳症状的发生中起着重要的作用,且与癌症后机体疲劳的级别有明显相关性^[23-25]。AHR 参与细胞周期调节,能够激活 CYP1A1, CYP1B1 和 CYP3A4 基因的表达, AHR 和细胞色素 P450 代谢酶的基因多态性频率明显高于正常人^[26-27]。NFKBIA 在免疫和促炎反应的细胞刺激下,能够磷酸化,使二聚体 RELA 转移到细胞核并激活转录, NFKB1 变异是 2 型糖尿病发生的独立危险因素,而疲劳是 2 型糖尿病患者的一种持续临床症状^[28]。AR 是配体激活的转录因子,其在导致乳腺癌发病机制中起着重要作用,而给予 AR 拮抗剂或减少雄激素产生的药物在不同程度上具有临床疗效^[29]。GSTP1 能够还原谷胱甘肽与大量外源性和内源性疏水性亲电细胞的结合,通过 p25/p35 易位负性调节 CDK5 活性以防止神经变性^[30]。ICAM1 是白细胞黏附蛋白整合素 α -L/ β -2 的配体,参与细胞与细胞之间及细胞与细胞外基质之间的相互作用^[31]。CHALAH 等^[32]研究表明,多发性硬化症性疲劳患者与炎症外周标志物可溶性 ICAM1 之间没有明显的相关性。因此,一方面,基于 AHR 和细胞色素 P450 家族酶的关系,人参总皂苷和三七总皂苷发挥抗疲劳作用的机制,可能是先通过抑制上游 AHR 基因的表达,然后下调 CYP1A1, CYP1B1 和 CYP3A4 基因的表达实现的;另一方面,基于中药的多成分、多靶点和多通路调节作用,人参总皂苷和三七总皂苷发挥抗疲劳作用的机制,也可能与对 Caspase-3, NFKBIA 和 AR 基因的调节有关。但目前这些基因与疲劳综合征发生的直接关系以及能否作为治疗本病的靶基因还需进一步深入研究。

综上所述,人参补气和三七补血,其抗疲劳的共同作用机制可能与对 AHR, CYP3A4, Caspase-3, NFKBIA 和 AR 基因的抑制有关,且二者之间在抗疲劳的效用方面没有存在明显差异。这一方面阐释了中医补气和补血均能抗疲劳的共同作用机制,另一方面也为中医气血互生互用的关系提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 卢焱, 苏志超, 李华南, 等. 补肾抗衰片治疗慢性疲劳综合征脾肾亏虚证的疗效观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21): 84-89.
- [2] BOFFA G, TACCHINO A, SBRAGIA E, et al. Preserved brain functional plasticity after upper limb task-oriented rehabilitation in progressive multiple sclerosis[J]. *Eur J Neurol*, 2020, 27(1): 77-84.
- [3] REINERTSEN K V, LOGE J H, BREKKE M, et al. Chronic fatigue in adult cancer survivors[J]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2017, doi: 10. 4045/tidsskr. 17. 0040.
- [4] STRAKA I, MINÁR M, ŠKORVÁNEK M, et al. Adherence to pharmacotherapy in patients with Parkinson's disease taking three and more daily doses of medication[J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 799.
- [5] 师帅, 胡元会, 吴华芹, 等. “丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 192-197.
- [6] 徐冬英. 三七药用考[J]. 中药材, 2002, (7): 510-513.
- [7] 杨月, 陈艳姣, 张爱琛, 等. 土壤无机元素含量与三七药材品质的关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 47-53.
- [8] 许妍. 人参二醇组皂苷制备二醇型拟人参皂苷的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [9] 王海燕, 容蓉, 吕青涛, 等. 三七总皂苷中活性单体的检测及体内代谢研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(12): 93-95.
- [10] 占颖, 刘春生, 刘洋洋, 等. 人参和三七活性成分与药理作用对比研究进展[J]. 中国中医药科技, 2014, 21(6): 711-712.
- [11] 张蕾. 人参总皂苷与三七总皂苷抗炎活性的比较研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [12] 谭为, 余克强, 刘艳艳, 等. 三七预防疲劳型亚健康体的实验研究[J]. 江苏中医药, 2012, 44(2): 69-71.
- [13] 崔建华, 高亮, 张钢, 等. 三七提高高原人体作业能力的现场研究[J]. 解放军药学学报, 2014, 30(6): 497-501.
- [14] 高亮, 崔建华, 王琰, 等. 3种药物对提高高原人体运动能力的实验研究[J]. 西北国防医学杂志, 2014, 35(4): 301-304.
- [15] 朱珂璇. 人参皂苷骨骼肌组织内作用靶点肌酸激酶的确证与阐释[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [16] LEE N, LEE S H, YOO H R, et al. Anti-fatigue effects of enzyme-modified ginseng extract: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *J Altern Complement Med*, 2016, 22(11): 859-864.
- [17] LI Z, CHEN X, NIWA Y, et al. Involvement of Ca²⁺-activated K⁺ channels in ginsenosides-induced aortic relaxation in rats [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2001, 37(1): 41-47.
- [18] PANINA S B, GUTSENKO O I, MILYUTINA N P, et al. SkQ1 controls Caspase-3 gene expression and caspase-3-like activity in the brain of rats under oxidative stress [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2018, 83(10): 1245-1254.
- [19] HASHEMI M, MOAZENI-ROODI A, GHAVAMI S. Association between Caspase-3 polymorphisms and overall cancer risk: a meta-analysis of case-control studies [J]. *J Cell Biochem*, 2018, doi: 10. 1002/ jcb. 27994.
- [20] ZHOU S F, LIU J P, CHOWBAY B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact [J]. *Drug Metab Rev*, 2009, 41(2): 289-295.
- [21] WARING R H. Cytochrome p450: genotype to phenotype [J]. *Xenobiotica*, 2020, 14: 9-18.
- [22] PEI J, JUNI R, HARAKALOVA M, et al. Indoxyl sulfate stimulates angiogenesis by regulating reactive oxygen species production via CYP1B1 [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(8): E454.
- [23] ESHRAGH J, DHRUVA A, PAUL S M, et al. Associations between neurotransmitter genes and fatigue and energy levels in women after breast cancer surgery [J]. *J Pain Symptom Manage*, 2017, 53(1): 67-84.
- [24] KHALILI-TANHA G, BARZEGAR A, NIKBAKHSH N, et al. Association of CYP1A1 M2 (A2455G) polymorphism with susceptibility to breast cancer in mazandaran province, Northern Iran: a case-control study [J]. *Int J Prev Med*, 2019, 10: 92.
- [25] SMALL B J, JIM H S L, EISEL S L, et al. Cognitive performance of breast cancer survivors in daily life: role of fatigue and depressed mood [J]. *Psychooncology*, 2019, 28(11): 2174-2180.
- [26] CIRILLO F, LAPPANO R, BRUNO L, et al. AHR and GPER mediate the stimulatory effects induced by 3-methylcholanthrene in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 335.
- [27] CACCAMO D, CESAREO E, MARIANI S, et al. Xenobiotic sensor and metabolism-related gene variants in environmental sensitivity-related illnesses: a survey on the Italian population [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 831969.
- [28] COTO E, DÍAZ-CORTE C, TRANCHEE S, et al. Gene variants in the NF-κB pathway (NFKB1, NFKBIA,

- NFKBIZ) and their association with type 2 diabetes and impaired renal function[J]. *Hum Immunol*, 2018, 79(6):494-498.
- [29] GUCALP A, TRAINA T A. The androgen receptor: is it a promising target? [J]. *Ann Surg Oncol*, 2017, 24(10):2876-2880.
- [30] NISSAR S, SAMEER A S, RASOOL R, et al. Promoter methylation and ile105val polymorphism of GSTP1 gene in the modulation of colorectal cancer risk in ethnic kashmiri population[J]. *Indian J Cancer*, 2019, 56(3):248-253.
- [31] GREGORY M A, MANUEL-APOLINAR L, SÁNCHEZ-GARCIA S, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) as a biomarker of vascular cognitive impairment in older adults [J]. *Dement Geriatr Cogn*, 2019, 47(4-6):243-253.
- [32] CHALAH M A, AYACHE S S. Is there a link between inflammation and fatigue in multiple sclerosis? [J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11:253-264.
- [责任编辑 孙丛丛]