基于网络药理学和动物实验探讨大补肝汤抗运动性疲劳的作用机制

张禄璐[1]， 芦文娟[1]， 张李香[1]， 梁永林[1,2*]
(1. 甘肃中医药大学基础医学院，甘肃 兰州 730030；2. 敦煌医学与转化部重点实验室，甘肃 兰州 730030)

摘要：目的 基于网络药理学和动物实验探讨大补肝汤抗运动性疲劳作用。**方法** 通过 TCMSP 数据库获取大补肝汤有效药物成分及靶点；GeneCard、OMIM、DrugBank、PharmGKB 数据库获取疾病靶标基因；利用 Venny2.1.0 工具绘制药物-疾病靶点韦恩图，获取交集靶点，并通过 STRING 数据库建立蛋白互作网络，筛选核心靶点，Cytoscape 软件建立“药物-活性成分-疾病靶点”网络；使用 R 语言软件进行 GO 生物功能注释和 KEGG 通路富集分析；运用 AutoDock 软件以及 PyMol 软件对药物核心成分及疾病关键靶点进行分子对接验证。小鼠分为空白组，模型组，大补肝汤低、中、高剂量组（0.17、0.34、0.68 g/mL），红景天组（0.09 g/kg），通过小鼠负重游泳训练建立运动性疲劳模型，电镜下观察小鼠肝细胞损伤，生化法检测血清 LD、BUN 水平，肝组织 SOD 活性和 MDA、肝糖原、肌糖原水平，Western blot 法检测小鼠肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达。**结果** 共筛选得到大补肝汤活性成分 70 种，药物-疾病交集靶点 165 个，槲皮素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇、异鼠李素等为主要核心成分，HSP90AA1、TP53、MAPK1、Akt1、RELA 等为关键靶点；GO 富集分析得出生物过程涉及 2 286 个条目、细胞组成涉及 82 个条目、分子功能涉及 205 个条目，与运动性疲劳较为密切的通路为 PI3K-Akt、TNF、HIF-1 信号通路等；分子对接结果表明大补肝汤核心有效成分与疾病关键靶点基因具有较稳定的结合活性。与模型组比较，各给药组小鼠负重游泳力竭时间延长（$P<0.01$），血清 LD、BUN 水平降低（$P<0.05$，$P<0.01$），肝糖原、肌糖原水平升高（$P<0.05$），肝组织 SOD 活性升高（$P<0.01$），MDA 水平降低（$P<0.01$），肝细胞形态结构正常，线粒体肿胀减轻，肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达升高（$P<0.01$）。**结论** 大补肝汤可能通过调控 Akt/Nrf2 信号通路，减轻肝脏氧化应激损伤，促进代谢废物 LD、BUN 排除，提高机体肝糖原、肌糖原水平，改善机体能量代谢平衡，发挥抗运动性疲劳的作用。

关键词：大补肝汤；运动性疲劳；Akt/Nrf2 信号通路；网络药理学；分子对接
中图分类号：R285.5；R966 **文献标志码**：B **文章编号**：1001-1528(2025)06-2026-07
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.040

第 5 届国际运动生物化学会议将运动性疲劳定义为机体的生理过程不能持续其机能在一特定水平或不能维持预定的运动强度。当疲劳持续累积将引起内分泌系统紊乱、免疫力下降、抑郁等病理变化，导致机体器质性损伤，严重危害人体健康[1-2]。运动性疲劳的产生由涉及氧化应激、能量代谢、代谢产物堆积等多种生物过程共同导致，而中药复方具有多靶点、整体调节、疗效稳定的特点，在改善机体疲劳状态及加强运动能力方面日益突显重要作用。

中医将其归属为“劳倦”“虚损”的范畴，并认为肝是机体耐受和消除疲劳的根本，历代医家言“肝为罢极之本”“肝主筋，人之运动皆由乎筋力”“肝者，将军之官，如熊罴之任劳”，表明肝与疲劳的产生密切相关[3-4]。大补肝汤出自陶弘景所著《辅行诀五脏用药法要》[5]，由桂枝、干姜、五味子、牡丹皮、薯蓣、旋覆花、竹叶组成，具有滋养肝体、濡养经筋、强健筋力的功效，又有补益肝用、增强肝疏泄的功能，能调节气血运行与运动相适应。现代药理学研究表明，方中药物具有抗氧化、调节能量代谢平衡等作用，能改善机体疲劳。故本研究通过网络药理学及实验验证，探讨大补肝汤抗运动性疲劳的可能作用机制，以期为疲劳药物使用及开发提供更多的实验支撑。

1 材料

1.1 药物 大补肝汤由桂枝 9 g、干姜 9 g、五味 9 g 子、牡丹皮 9 g、山药 3 g、旋覆花 3 g、竹叶 3 g 组成，所有饮片均购自甘肃中医药大学附属医院中药房，经甘肃中医药大学药剂科专家鉴定为正品。加入 10 倍量纯水，浸泡 30 min，大火煮沸后改用小火慢煎 20 min，过滤；药渣复加 8 倍量纯水煎煮 15~20 min，重复 2 次，合并 3 次所得药汁，浓缩至生药量为 0.17、0.34、0.68 g/mL，冷却至室温后放入 4 ℃冰箱保存备用。红景天胶囊购自四川省佳汇泰生物科技开发有限公司，规格 3 g/粒，批号 G20120266，加入

收稿日期：2024-11-11
基金项目：国家社会科学基金（18XMZ031）
作者简介：张禄璐（1995—），女，硕士生，从事中医藏象理论及其应用研究。Tel：18714464275，E-mail：1742001052@qq.com
*通信作者：梁永林（1975—），男，博士，主任医师，从事中医基础理论教学与研究。Tel：18993031885，E-mail：875532437@qq.com

纯水制成 0.09 g/kg 药液，装入高压蒸汽灭菌后的药瓶中，4 ℃冰箱保存备用。

1.2 *动物* SPF 级雄性 KM 小鼠 70 只，体质量（30±2）g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司［实验动物生产许可证号 SCXK（京）2019-0010］，饲养于甘肃中医药大学动物实验中心［实验动物使用许可证号 SYKX（甘）2020-0009］，温度（23±2）℃，相对湿度（55±5）%，光照黑暗各 12 h，噪音小于 50 dB。实验经单位甘肃中医药大学动物实验中心动物伦理审批通过（伦理审察表编号 2022-805）。

1.3 *试剂* 尿素氮（blood urea nitrogen，BUN）、乳酸（lactic acid，LD）、糖原、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）生化试剂盒（南京建成生物工程研究所有限公司，货号 C013-2-1、A019-2-1、A043-1-1、A001-3、A003-1）；p-Akt 抗体（美国 Proteintech 公司，货号 66444-1-Ig）；Nrf2 抗体（美国 Immunoway 公司，货号 YT3189）；HO-1 抗体［艾博抗（上海）贸易有限公司，货号 ab85309］；β-actin 抗体（武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号 AC026）。

1.4 *仪器* SpectraMAX Plus384 型酶标仪［美谷分子仪器（上海）有限公司］；JY200C 型电泳仪（北京君意东方电泳设备有限公司）；5200 型化学发光凝胶成像仪（上海天能科技有限公司）；H2050R 型高速低温离心机（湘潭湘仪仪器有限公司）；UV752N 型紫外可见分光光度计（上海佑科仪器仪表有限公司）；JEM-1400FLASH 型透射电子显微镜（日本电子株式会社）。

2 方法

2.1 网络药理学及分子对接分析

2.1.1 *药物活性成分及靶点筛选* 通过 TCMSP 数据库检索大补肝汤所含中药“桂枝”“干姜”“五味子”“薯蓣（山药）”“旋覆花”“牡丹皮”“竹叶”的化学成分，以口服生物利用度（OB）≥30% 和类药性（DL）≥0.18 为筛选标准，并通过 CNKI 数据库查询，补充上述药物活性成分。采用 TCMSP 数据库预测活性成分及对应的靶点蛋白，导入 UniProt 平台，物种来源选择“*Homo sapiens*”，寻找与作用靶点相对应的基因名称。

2.1.2 *运动性疲劳靶点收集* 以“exercise -induced fatigue”“sport fatigue”为检索词，在 GeneCard、OMIM、DrugBank、PharmGKB 等数据库中获取运动性疲劳疾病靶点，删除重复项，构建运动性疲劳疾病靶点数据库。

2.1.3 *构建大补肝汤-运动性疲劳靶点网络* 通过 Venny2.1.0 工具绘制大补肝汤活性成分靶点与运动性疲劳疾病靶点的韦恩图，获取交集靶点，导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建“大补肝汤-运动性疲劳”靶点网络。

2.1.4 *疾病核心靶点筛选* 将“2.1.3”项下交集基因输入 STRING 数据库，选择“*Homo sapiens*”，构建蛋白质互作网络（protein-protein interaction networks，PPI）。通过 CytoNCA 插件，以度中心性（degree centrality，DC）、接近中心性（closeness centrality，CC）、介度中心性（betweenness centrality，BC）、网络中心性（network centrality，NC）、特征向量中心性（eigenvector centrality，EC）、局部边连通性（local average connectivity，LAC）为节点关键指标，筛选获取大补肝汤干预运动性疲劳的关键核心靶点。

2.1.5 *GO 和 KEGG 通路富集分析* 运用 R Studio 软件中 Bioconductor 数据包，以“$P<0.01$”为筛选条件，对药物与疾病共有靶点进行 GO、KEGG 通路富集分析，并生成条形图和气泡图。

2.1.6 *分子对接* 运用 PubChem 数据库和 Chem3D 软件将药物成分转化为 3D 结构，并根据其最小自由能对其结构进行优化，获取小分子配体。通过 UniProt 数据库查找靶点基因对应蛋白并使用 PDB 数据库下载蛋白受体 3D 结构，再通过 PyMol 软件提取蛋白质的原始配体结构。运用 AutoDock Tool 软件对小分子配体和蛋白受体进行格式转化，确定活性口袋范围，进一步通过 AutoDock Vina 软件进行分子对接。最后利用 PyMol 软件对对接结果进行分析。

2.2 动物实验验证

2.2.1 *分组、造模与给药* 适应性喂养 1 周后，剔除水性较差的小鼠，采用随机数字表法将剩余小鼠分为空白组，模型组，大补肝汤低、中、高剂量组（0.17、0.34、0.68 g/mL），红景天组（0.09 g/kg）。除空白组外，其余各组小鼠采用 3% 负重游泳训练建立小鼠运动疲劳模型。每天固定时间游泳，第 1 周每天 30 min，每周递增 10 min，每 6 d 休息 1 d，共 28 d。游泳装置为 60 cm×44 cm×35 cm 的水箱，水温（30±2）℃，负重物为铅皮，质量为小鼠体质量的 3%。空白组小鼠放入温度相同的浅水中，不进行游泳运动。为防止小鼠在水面漂浮，实验过程中不间断搅动水面，使小鼠保持持续性游泳运动。每组小鼠一池水，各组间互不干扰。造模成功标准为小鼠游泳姿势不协调，潜入水底反弹跳起的次数增多或小鼠头潜入水底 3 s；参照 2003 年版《保健食品检验与评价技术规范》检测 BUN、糖原、LD 等疲劳相关指标[6-9]。造模同时灌胃给予相应药物，空白组和模型组小鼠灌胃给予等体积纯水，每天 1 次，连续 28 d。

2.2.2 *取材* 末次给药 24 h 后摘取小鼠眼球取血，颈椎脱臼法处死，取小鼠肝组织、骨骼肌组织，用生理盐水清洗后放入 EP 管中，一部分用 3% 戊二醛固定，用于电镜检测；另一部分组织于-80 ℃冰箱中冷冻保存。

2.2.3 *记录小鼠负重游泳力竭时间* 每天同一时间观察小鼠的精神状态、活动状态和游泳运动状态。在负重游泳训练结束后，负重 5% 进行力竭游泳实验，记录小鼠负重力竭游泳时间。

2.2.4 *小鼠生化检测* 严格按照试剂盒说明书步骤，检测小鼠血清 LD、BUN 水平，肝组织肝糖原、骨骼肌组织肌糖原水平，肝组织 SOD 活性、MDA 水平。

2.2.5 *透射电镜观察肝组织线粒体超微结构* 取各组小鼠肝组织，3% 戊二醛预固定，脱水，渗透，包埋，切片，染色，电镜下观察肝脏线粒体等超微结构。

2.2.6 Western blot 法检测小鼠肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解小鼠肝组织，提取蛋白，BCA 法检测蛋白含量，取等质量蛋白进行变性，加入蛋白上样缓冲液后冷冻保存备用。制备 SDS-PAGE 凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2 h，分别加入 HO-1（1∶2 000）、Nrf2（1∶2 000）、p-Akt（1∶5000）抗体，4 ℃孵育过夜，次日加入二抗（1∶1 000）室温孵育 2 h，化学发光法暗室曝光显影，以 β-actin 为内参，通过 ImageJ 软件计算蛋白相对表达量。

2.3 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件处理，数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学及分子对接结果

3.1.1 大补肝汤活性成分及靶点 大补肝汤所含中药有效成分共 70 种，其中桂枝 7 种、干姜 5 种、五味子 8 种、薯蓣 16 种、牡丹皮 11 种、旋覆花 19 种、淡竹叶 4 种。

3.1.2 运动性疲劳靶点筛选 共获取疾病相关基因 3 726 个，韦恩图见图 1。

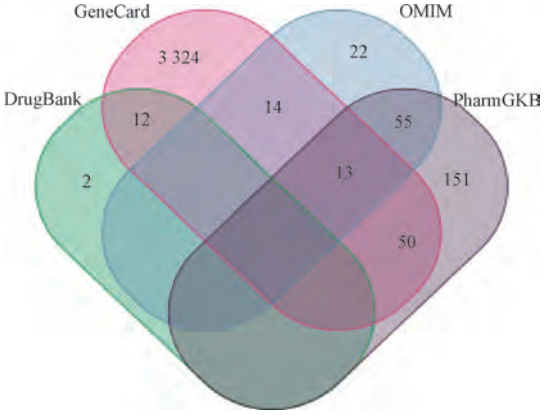


图 1 运动性疲劳疾病相关基因韦恩图

3.1.3 大补肝汤-运动性疲劳靶点的网络建设与分析 获取大补肝汤与运动性疲劳交集靶点 165 个，见图 2。大补肝汤-运动性疲劳靶点网络图见图 3，可知共有 211 个节点，包含 46 个药物成分靶点，165 个疾病点，497 条边。根据 Network Analyer 插件进行分析获得度值排名前 5 的成分分别为槲皮素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇、异鼠李素，可能是大补肝汤发挥药理作用的主要活性成分。

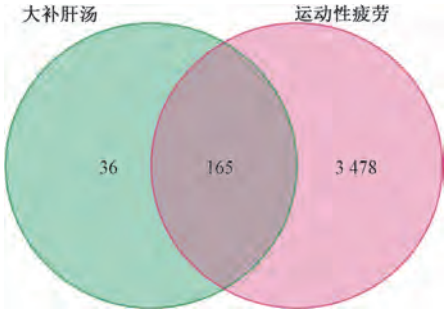
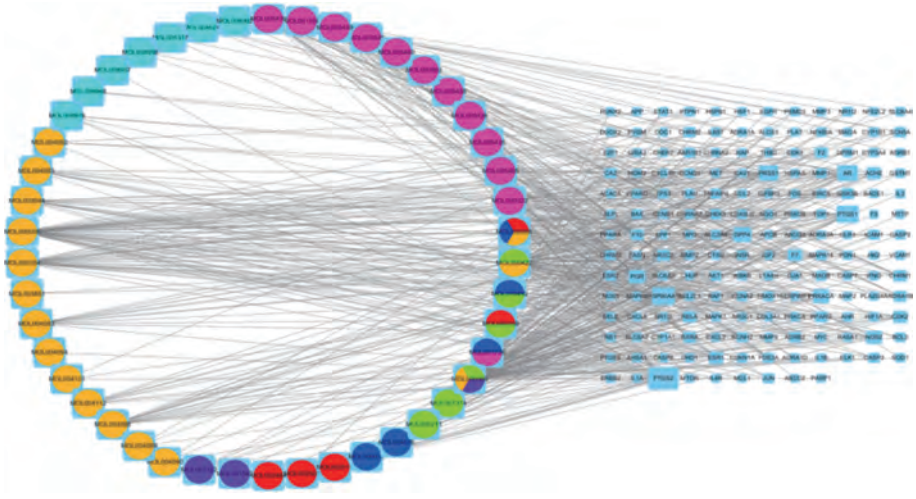


图 2 大补肝汤-运动性疲劳交集靶点



注：圆形代表药物成分（蓝色代表桂枝、红色代表干姜、青色代表五味子、粉色代表薯蓣、绿色代表牡丹皮、黄色代表旋覆花、紫色代表竹叶），方形代表疾病靶点，线条代表节点间的相互作用关系。

图 3 大补肝汤-运动性疲劳靶点网络图

3.1.4 PPI 网络构建及分析 共有 149 个节点和 539 条边，见图 4A。第一次筛选以 DC≥5、CC≥0.466、BC≥1.446、EC≥0.054、LAC≥2.571、NC≥2.666 为条件，得出 43 个节点和 263 条边，见图 4B；第二次筛选以 DC≥12、CC≥0.6、BC≥16.917、EC≥0.14、LAC≥5.833、NC≥7.178 为条件，得出 14 个节点和 63 条边，按照 DC 值的排名进行筛选，颜色越深，靶点相关性越高，见图 4C。排名前 5 的核心靶点分别为 HSP90AA1、TP53、MAPK1、Akt1、RELA，可定义为大补肝汤作用于运动性疲劳的核心靶点。

3.1.5 GO 及 KEGG 通路富集分析结果 GO 功能富集分析共得到 2 573 个条目，预测为大补肝汤治疗运动性疲劳的作用机制。其中生物过程有 2 286 个条目，涉及活性氧代谢过程、对缺氧的反应、对氧化应激的反应等；细胞组成有 82 个条目，涉及膜筏、膜微区、质膜筏等；分子功能有 205

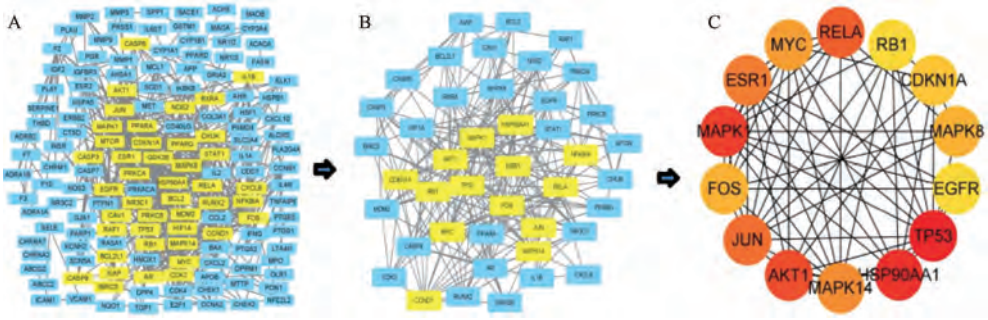


图 4 蛋白互作 PPI 网络关系图

个条目，涉及核受体活性、配体激活的转录因子活性、DNA 结合转录因子结合等。选取三者中排名前 10 的条目进行可视化处理并绘制气泡图，见图 5。细胞生物过程富集基因数较多，提示大补肝汤可能主要通过调节细胞生物过程抗运动性疲劳。

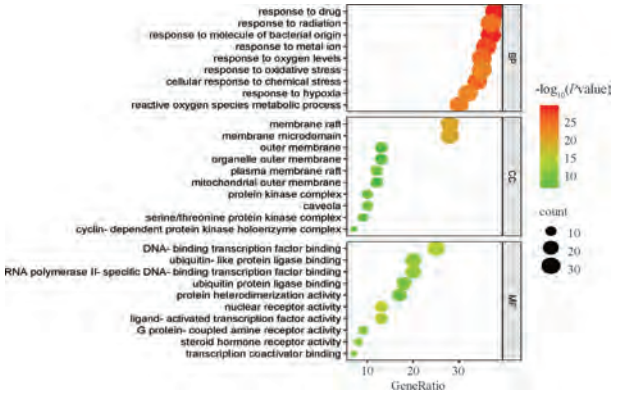


图 5 大补肝汤抗运动性疲劳的 GO 富集结果

KEGG 通路富集分析共获取 154 条信号通路（$P<0.05$），选取前 10 条与运动性疲劳相关的信号通路进行可视化处理并绘制气泡图，见图 6。其中 PI3K-Akt 信号通路上的基因最多，同时影响最显著，其他相关信号通路还包括 TNF 信号通路、细胞凋亡信号通路、P53 信号通路、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路等。

3.1.6 分子对接模拟计算结果 将“3.1.4”项下核心靶点在药物调控网络中对应药物成分 DC 值排名前 5 的成分（槲皮素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇、异鼠李素）进行分子对接验证，见图 7。结合能数值越小，受体与配体自发结合的倾向性越明显，当结合能小于−7 kcal/mol 时，受体与配体可以紧密结合。结果表明，大补肝汤核心有效成分与疾病靶点基因均有具有良好的结合能力，见表 1。

3.2 *动物实验结果*

3.2.1 大补肝汤对运动性疲劳小鼠游泳力竭时间的影响 与空白组比较，模型组小鼠力竭游泳时间缩短（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠力竭游泳时间延长（$P<0.01$），见表 2。

3.2.2 大补肝汤对运动性疲劳小鼠血清 LD、BUN 水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠血清 LD、BUN 水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠血清 LD、BUN 水平降低（$P<0.05$，$P<0.01$），见表 3。

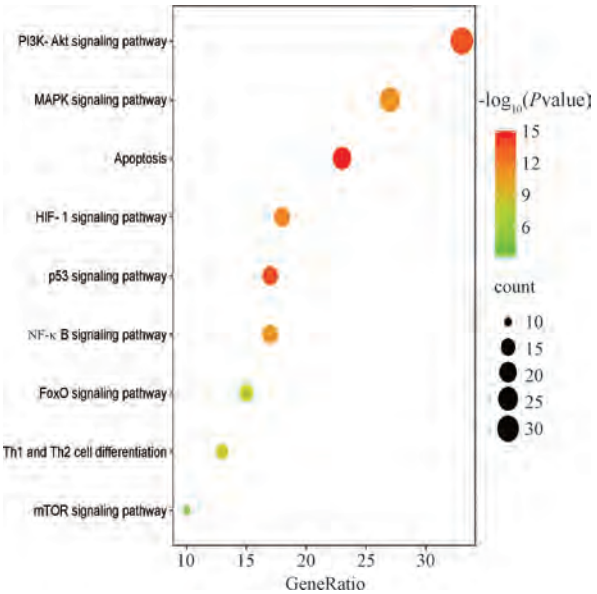


图 6 大补肝汤抗运动性疲劳的 KEGG 富集结果

表 1 大补肝汤抗运动性疲劳分子对接结合能

有效成分与靶点基因	结合能/(kcal·mol^{-1})
槲皮素—HSP90AA1	−7.2
木犀草素—HSP90AA1	−7.6
山柰酚—HSP90AA1	−7.0
β-谷甾醇—HSP90AA1	−7.2
异鼠李素—HSP90AA1	−7.3
槲皮素—TP53	−7.1
木犀草素—TP53	−7.7
槲皮素—MAPK1	−8.2
木犀草素—MAPK1	−8.8
槲皮素—Akt1	−9.5
木犀草素—Akt1	−10.2
山柰酚—Akt1	−9.3
槲皮素—RELA	−7.9
木犀草素—RELA	−8.1
山柰酚—RELA	−7.3

3.2.3 大补肝汤对运动性疲劳小鼠肝组织肝糖原和骨骼肌组织肌糖原水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠肝糖原、肌糖原水平降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝糖原水平升高（$P<0.05$，$P<0.01$）；大补肝汤高剂量组、红景天组小鼠肌糖原水平升高（$P<0.01$），见表 4。

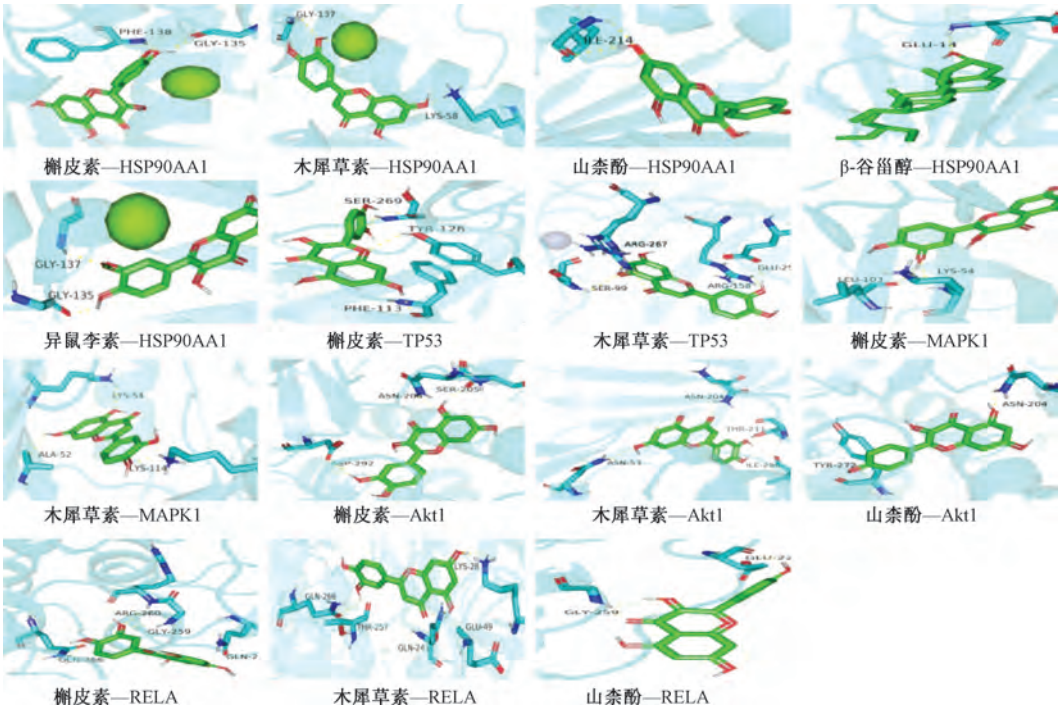


图 7 大补肝汤抗运动性疲劳核心靶点分子对接 3D 图

表 2 大补肝汤对运动性疲劳小鼠游泳力竭时间的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

组别	力竭游泳时间/min
空白组	18.67±2.12
模型组	9.12±1.32**
大补肝汤低剂量组	14.53±1.58##
大补肝汤中剂量组	18.34±1.36##
大补肝汤高剂量组	20.76±2.02##
红景天组	21.61±1.76##

注：与空白组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，## $P<0.01$。

表 3 大补肝汤对运动性疲劳小鼠血清 LD、BUN 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	LD/（mmol·L^{-1}）	BUN/（mmol·L^{-1}）
空白组	7.01±1.09	5.27±0.75
模型组	15.99±1.48**	12.55±1.35**
大补肝汤低剂量组	13.89±1.62#	11.27±1.32#
大补肝汤中剂量组	12.53±1.47##	7.35±1.17##
大补肝汤高剂量组	11.45±1.8##	6.68±1.12##
红景天组	10.06±1.96##	8.05±0.53##

注：与空白组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$。

表 4 大补肝汤对运动性疲劳小鼠肝糖原、肌糖原水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	肝糖原/（mg·g^{-1}）	肌糖原/（mg·g^{-1}）
空白组	17.39±1.6	1.72±0.08
模型组	9.60±0.76**	1.38±0.08**
大补肝汤低剂量组	12.79±1.66#	1.46±0.04
大补肝汤中剂量组	15.45±1.26##	1.52±0.11
大补肝汤高剂量组	15.87±1.03##	1.60±0.08##
红景天组	13.52±0.97##	1.64±0.09##

注：与空白组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$。

3.2.4 大补肝汤对运动性疲劳小鼠肝组织 SOD 活性、MAD 水平的影响 与空白组比较，模型组小鼠肝组织 SOD 活性降低（$P<0.01$），MDA 水平升高（$P<0.01$）；与模型组比较，各给药组小鼠肝组织 SOD 活性升高（$P<0.05$，$P<0.01$），MDA 水平降低（$P<0.01$），见表 5。

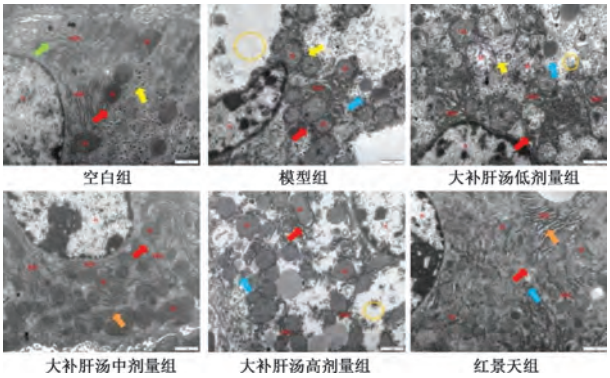
表 5 大补肝汤对运动性疲劳小鼠肝组织 SOD 活性、MAD 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	SOD/（U·mg prot^{-1}）	MDA/（nmol·mg prot^{-1}）
空白组	150.69±9.26	1.65±0.09
模型组	122.28±6.53**	2.38±0.19**
大补肝汤低剂量组	133.14±4.64#	1.92±0.19##
大补肝汤中剂量组	136.02±7.52##	1.71±0.19##
大补肝汤高剂量组	139.79±7.75##	1.71±0.22##
红景天组	143.56±8.54##	1.78±0.18##

注：与空白组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$。

3.2.5 大补肝汤对运动性疲劳小鼠肝组织线粒体形态结构变化的影响 空白组小鼠肝组织超微结构基本正常。模型组小鼠肝细胞核呈不规则形，线粒体轻度肿胀，嵴间腔扩大，嵴溶解断裂，基质颗粒减少，粗面内质网减少，核糖体大量丢失。大补肝汤低剂量组小鼠肝组织核膜出现不规则变化，线粒体发生肿胀，嵴变短、碎裂和数目减少，粗面内质网减少。大补肝汤中剂量组小鼠肝组织细胞形态结构正常，少量核膜出现不规则变化，线粒体形态结构较正常，基质电子密度均匀，粗面内质网呈层状排列。大补肝汤高剂量组小鼠肝组织线粒体形态结构较正常，基质电子密度均匀，粗面内质网断裂、减少，规则分布消失。红景天组肝组织超微结构基本正常，见图 8。

3.2.6 补肝汤对运动性疲劳小鼠肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 与空白组比较，模型组小鼠肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达降低（$P<0.01$）；与模型组比



注：红色箭头指示线粒体，蓝色箭头指示脂滴，黄色箭头指示糖原颗粒，绿色箭头指示初级溶酶体，橙色箭头指示粗面内质网排列较规则，黄色圆圈指示核糖体，N 表示细胞核，Mi 表示线粒体，RER 表示粗面内质网。

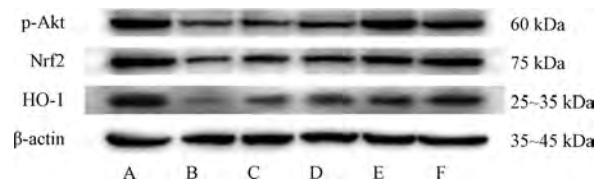
图 8 各组小鼠肝线粒体形态结构变化电镜图（×20 000）

较，各给药组小鼠肝组织 Nrf2 蛋白表达升高（$P<0.05$，$P<0.01$），大补肝汤中、高剂量组和红景天组小鼠肝组织 p-Akt、HO-1 蛋白表达升高（$P<0.05$，$P<0.01$），见表 6、图 9。

表 6 大补肝汤对运动性疲劳小鼠肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-Akt	Nrf2	HO-1
空白组	1.02±0.06	1.10±0.03	0.96±0.13
模型组	0.47±0.12**	0.48±0.08**	0.30±0.13**
大补肝汤低剂量组	0.60±0.05	0.62±0.09#	0.41±0.22
大补肝汤中剂量组	0.69±0.10##	0.80±0.07##	0.58±0.09#
大补肝汤高剂量组	1.00±0.07##	0.86±0.05##	0.61±0.09##
红景天组	0.92±0.11##	1.00±0.07##	0.82±0.19##

注：与空白组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$，## $P<0.01$。



注：A 为空白组，B 为模型组，C～E 分别为大补肝汤低、中、高剂量组，F 为红景天组。

图 9 各组小鼠肝组织 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达条带图

4 讨论

基于网络药理学获取大补肝汤核心成分为槲皮素、木犀草素、山柰酚、β-谷甾醇、异鼠李素。研究表明，槲皮素能恢复星形胶质细胞和小胶质细胞，降低 5-HT 表达，延缓或消除中枢疲劳[10]。Davis 等[11]实验发现，槲皮素通过激活 SIRT1、PGC-1 增加线粒体生成，从而提高运动耐受性。木犀草素和山柰酚具有强氧化性，能升高 SOD、CAT 活性，有效改善骨骼肌细胞氧化应激损伤[12-13]。蒋琼凤等[14]研究证实，β-谷甾醇能促进线粒体谷胱甘肽氧化还原，增强线粒体呼吸，促进 ATP 生成以缓解疲劳。本研究结果显示，各给药组小鼠游泳力竭时间延长，表明大补肝汤能有效缓解疲劳提高小鼠运动能力，是通过多种成分共同发挥作用实现的。

GO 富集分析显示，细胞生物过程主要与活性氧代谢过程、对缺氧的反应、对氧化应激的反应等相关，提示大补肝汤可能是通过改善机体氧化应激损伤而改善疲劳。KEGG 通路富集分析显示，PI3K-Akt 信号通路对运动性疲劳的影响最为显著，Akt 作为核心蛋白，经分子对接表发现其与大补肝汤核心有效成分结核性强。研究表明，Akt 在抵抗氧化应激损伤方面具有重要意义[15-16]。Akt 磷酸化促使 Nrf2 表达增加，作为维持细胞氧化还原平衡的中枢调节因子，Nrf2 启动 *HO*-1、*SOD* 等抗氧化基因，清除 MDA，构建了细胞的抗氧化防御体系，抵御脂质过氧化损伤[17-21]。结果显示，模型组小鼠游泳力竭后 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达和 SOD 活性降低，MDA 水平升高，表明力竭状态下机体氧化与抗氧化系统失衡，各给药组小鼠 p-Akt、Nrf2、HO-1 蛋白表达和 SOD 活性升高，MDA 水平降低，提示大补肝汤通过提高机体抗氧化能力，加快自由基清除，减缓疲劳的产生。

代谢产物堆积、能量耗竭与氧化应激多种机制共同作用引发疲劳。LD 过量堆积使血液 pH 值降低，抑制 ATP 酶活性，阻碍 ATP 合成，使细胞能量供应不足，引发疲劳。同时，酸性环境抑制 Ca^{2+} 与肌钙蛋白结合，使肌肉收缩减弱，疲劳进一步加重[22-23]。BUN 水平升高，为机体能量消耗大于供给，反映了机体的疲劳现象[24-25]。本研究结果显示，与模型组比较，各给药组 LD、BUN 水平降低，提示大补肝汤可通过调节 LD、BUN 等代谢产物代谢平衡，改善机体能量供应。维持充足的糖原储备是延缓疲劳的重要途径[26-28]。本研究结果显示，与模型组比较，给药组小鼠肝糖原、肌糖原水平均有升高，表明大补肝汤能提高机体能源储备，保证运动过程中的能量供应，有效延缓疲劳的发生。

本研究表明大补肝汤可能是通过调控 Akt/Nrf2 信号通路，升高 SOD、HO-1 活性，减少机体氧化应激损伤，并促进 LD、BUN 等代谢产物排除，增加机体糖原储存，改善机体能量代谢平衡，发挥抗疲劳的作用。

参考文献：

[1] Twomey R, Aboodarda S J, Kruger R, *et al*. Neuromuscular fatigue during exercise: Methodological considerations, etiology and potential role in chronic fatigue[J]. *Neuro Physiol Clin*, 2017, 47(2): 95-110.

[2] 瞿超艺，冯亦唯，徐旻霄，等. 不同氧疗手段对机体运动能力的影响及相关机理研究进展[J]. 中国运动医学杂志，2021，40(5)：393-401.

[3] 马 莳. 黄帝内经素问注证发微[M]. 北京：学苑出版社，2003：116.

[4] 高士宗. 黄帝素问直解[M]. 北京：科学技术文献出版社，1998：58-60.

[5] 衣之镖，衣玉品，赵怀舟. 辅行诀五脏用药法要研究[M]. 北京：学苑出版社，2009：53-55.

[6] 肖 然. 根皮苷对力竭性小鼠的抗疲劳作用及机制研究[D]. 遵义：遵义医科大学，2022.
[7] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京：中华人民共和国卫生部，2003：87-93.
[8] 李平靖，张 婷，王晓莹，等. 伪人参皂苷 GQ 对力竭运动小鼠抗疲劳作用研究[J]. 中国实验诊断学，2009，13(7)：869-871.
[9] Yang Q，Jin W W，Lv X Y，*et al*. Effects of macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice[J]. *Pharm Biol*，2016，54(5)：827-834.
[10] Luo C H，Xu X R，Wei X C，*et al*. Natural medicines for the treatment of fatigue：Bioactive components，pharmacology，and mechanisms[J]. *Pharmacol Res*，2019，148：104409.
[11] Davis J M，Murphy E A，Carmichael M D，*et al*. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*，2009，296(4)：R1071-R1077.
[12] 夏 庚，韩 芸. 毛竹木犀草素-6-*C*-新橙皮苷通过调节 IRF4PTG 糖原途径促进力竭运动小鼠的糖原合成[J]. 分子植物育种，2022，20(15)：5143-5149.
[13] Chen Y F，Li T X，Tan P，*et al*. Kaempferol from *Penthorum chinense* Pursh attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inflammation through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*，2022，13：857015.
[14] 蒋琼凤，袁志辉，李 进，等. 蓼蓝中 β-谷甾醇的提取及其抗氧化性研究[J]. 食品工业科技，2015，36(6)：108-112.
[15] 李兴太，纪 莹. 线粒体氧化应激与天然抗氧化剂研究进展[J]. 食品科学，2015，36(7)：268-277.
[16] Fu Y，Zhou J D，Sang X Y，*et al*. Gualou-Xiebai-Banxia Decoction protects against type Ⅱ diabetes with acute myocardial ischemia by attenuating oxidative stress and apoptosis *via* PI3K/Akt/eNOS signaling[J]. *Chin J Nat Med*，2021，19(3)：161-169.
[17] Nguyen T，Nioi P，Pickett C B. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress[J]. *J Biol Chem*，2009，284：13291-13295.
[18] Hybertson B M，Gao B F，Bose S K，*et al*. Oxidative stress in health and disease：the therapeutic potential of Nrf2 activation[J]. *Mol Aspects Med*，2011，32(4-6)：234-246.
[19] Fukuda S，Nojima J，Motoki Y，*et al*. A potential biomarker for fatigue：Oxidative stress and anti-oxidative activity.[J] *Biol Psychol*，2016，118：88-93.
[20] 贾瑞真，姜 超，金其贯，等. 左旋肉碱、泛酸、辅酶 Q_{10} 联合干预有氧运动疲劳模型小鼠的作用及机制[J]. 中国组织工程研究，2022，26(2)：173-178.
[21] 张 陵，万 宁. 氧自由基脂质过氧化反应所致运动性疲劳产生机制研究进展[J]. 中国实验诊断学，2006，10(9)：1104-1108.
[22] 余金橙，付梦凡，崔 楠，等. 植物多酚缓解运动疲劳作用机制研究进展[J]. 食品工业科技，2022，43(3)：472-478.
[23] 石展望. 运动疲劳产生机制研究进展[J]. 南阳师范学院学报，2009，8(3)：93-96.
[24] 杨 涛. 金针菇氨基酸抗运动性疲劳研究[J]. 中国食用菌，2020，39(7)：41-44.
[25] Xu Z X，Shan Y. Anti-fatigue effects of polysaccharides extracted from *Portulaca oleracea* L. in mice[J]. *Indian J Biochem Biophys*，2014，51(4)：321-325.
[26] Vigh-Larsen J F，Ørtenblad N，Spriet L L，*et al*. Muscle glycogen metabolism and high-intensity exercise performance：A narrative review[J]. *Sports Med*，2021，51(9)：1855-1874.
[27] LóPez-Soldado I，Guinovart J J，Duran J. Increased liver glycogen levels enhance exercise capacity in mice[J]. *J Biol Chem*，2021，297(2)：100976.
[28] 谷 枫，孙国辉，麻 浩，等. 天然多糖抗运动性疲劳的研究进展[J]. 中国新药杂志，2013，22(6)：636-642.