

[文章编号] 1671-587X(2025)05-1165-12

DOI:10.13481/j.1671-587X.20250502

## 铁皮石斛西洋参颗粒对过度训练小鼠的抗疲劳作用及其机制

寇卫兵<sup>1</sup>, 刘巧慧<sup>1</sup>, 姚大红<sup>2</sup>, 郭亚萍<sup>2</sup>, 王航宇<sup>1</sup>, 张珂<sup>1</sup>, 王金辉<sup>1,3</sup>, 李涵<sup>4</sup>, 邵丹<sup>4</sup>

(1. 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室 红花产业研究院, 新疆 石河子 832003;

2. 深圳技术大学药学院中药系, 广东 深圳 518060; 3. 哈尔滨医科大学药学院药物化学教研室, 黑龙江

哈尔滨 150081; 4. 澳诺制药有限公司研发部, 河北 保定 071000)

**[摘要]** **目的:** 探讨铁皮石斛西洋参颗粒(DPQG)对过度训练小鼠的抗疲劳作用, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 48只小鼠随机分为对照组(等体积蒸馏水)、低剂量DPQG组(400 mg·kg<sup>-1</sup> DPQG)、中剂量DPQG组(800 mg·kg<sup>-1</sup> DPQG)和高剂量DPQG组(1 600 mg·kg<sup>-1</sup> DPQG), DPQG灌胃干预35 d, 末次给药30 min后各组小鼠进行转棒实验和游泳耐力实验。采集各组小鼠血清、肝组织与肌肉组织, 采用ELISA法检测各组小鼠血清中乳酸(LAC)水平和乳酸脱氢酶(LDH)活性及肌肉组织中丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性及肌糖原和肝糖原水平, 采用HE染色观察小鼠肌肉组织病理形态表现。利用转录组学与代谢组学技术鉴定对照组和高剂量DPQG组小鼠肌肉组织中关键基因与代谢产物并分析差异表达基因(DEGs)与差异代谢物的相关性。**结果:** 与对照组比较, 各剂量DPQG组小鼠转棒时间明显增加( $P<0.05$ ), 高剂量DPQG组小鼠游泳力竭时间明显增加( $P<0.05$ )。与对照组比较, 中和高剂量DPQG组小鼠LDH、SOD和GSH-Px活性升高( $P<0.01$ )。与对照组比较, 中和高剂量DPQG组小鼠MDA和肝糖原水平明显降低( $P<0.01$ )。转录组学测序, DPQG主要作用于*Trib3*和*Olf495*等DEGs; 基因本体(GO)功能富集分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析, DEGs主要富集于嗅觉相关过程与信号通路; 代谢组学KEGG分析, 差异代谢物主要富集于炎症介质对色氨酸(TRP)的调节通路; 转录组学与代谢组学联合分析, *piezo1*基因与差异代谢物β1-卡茄碱( $r=-1, P<0.05$ )和鞣树碱( $r=1, P<0.05$ )相关度较高。**结论:** DPQG通过调节LAC代谢和糖原平衡以及维持体内氧化/抗氧化平衡对过度训练小鼠发挥一定的抗疲劳作用, 其作用机制与*Olf495*和*piezo1*基因以及炎症介质对TRP的调节通路有关。

**[关键词]** 铁皮石斛西洋参颗粒; 抗疲劳; 转录组学; 代谢组学; 氧化; 抗氧化; 乳酸

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A

## Anti-fatigue effect of Dendrobium and Panax Quinquefolius Granules on overtrained mice and its mechanism

KOU Weibing<sup>1</sup>, LIU Qiaohui<sup>1</sup>, YAO Dahong<sup>2</sup>, GUO Yaping<sup>2</sup>, WANG Hangyu<sup>1</sup>, ZHANG Ke<sup>1</sup>,  
WANG Jinhui<sup>1,3</sup>, LI Han<sup>4</sup>, SHAO Dan<sup>4</sup>

(1. Safflower Industry Research Institute, Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

[收稿日期] 2024-11-15 [录用日期] 2024-12-21

[基金项目] 国家卫健委“重大新药创制”国家科技重大专项(2018ZX09735-005)

[作者简介] 寇卫兵(2000—), 男, 甘肃省天水市人, 在读硕士研究生, 主要从事天然产物提取分离和活性方面的研究。

[通信作者] 张珂, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: tcm\_zk@163.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

2. Department of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Shenzhen Technology University, Shenzhen 518060, China; 3. Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150081, China; 4. Department of Research and Development, Onuo Pharmaceutical Co., LTD., Baoding 071000, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the anti-fatigue effect of Dendrobium and Panax Quinquefolius Granules (DPQG) on the overtrained mice, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** A total of 48 mice were randomly divided into control group (equal volume of distilled water), low dose of DPQG group ( $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  DPQG), medium dose of DPQG group ( $800 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  DPQG), and high dose of DPQG group ( $1600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  DPQG). The DPQG were administered by gavage for 35 d, and the rotarod test and swimming endurance test were performed 30 min after last administration. Serum, liver tissue, and muscle tissue were collected from the mice in various groups. ELISA method was used to detect the serum lactic acid (LAC) levels and lactate dehydrogenase (LDH) activities, and the malondialdehyde (MDA) levels, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, and the liver glycogen and muscle glycogen levels in muscle tissue of the mice in various groups; HE staining was used to observe the pathomorphology of muscle tissue of the mice. Transcriptomics and metabolomics technologies were used to identify the key genes and metabolites in muscle tissue of the mice in control group and high dose of DPQG group and to analyze the correlations between differentially expressed genes (DEGs) and differentially expressed metabolites. **Results:** Compared with control group, the rod turning exhaustion time of the mice in different doses of DPQG groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the swimming exhaustion time of the mice in high dose of DPQG group was increased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the LDH, SOD, and GSH-Px activities of the mice in medium and high doses of DPQG groups were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the levels of MDA and liver glycogen of the mice in medium and high doses of DPQG groups were decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The transcriptomics sequencing results showed that DPQG mainly acted on DEGs such as *Trib3* and *Olf495*; the Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis results showed that the DEGs were mainly enriched in olfactory-related processes and signaling pathways; the metabolomics KEGG analysis results showed that the differential metabolites were mainly enriched in the regulation pathway of inflammatory mediators on tryptophan (TRP); the combined analysis of transcriptomics and metabolomics results showed that the *piezo1* gene had high correlations with the differential metabolites  $\beta$ 1-solamarine ( $r = -1$ ,  $P < 0.05$ ) and tilidine ( $r = 1$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** DPQG can exert an anti-fatigue effect on the overtrained mice by modulating LAC metabolism and glycogen homeostasis, as well as maintaining the oxidative/antioxidant balance in the body; its anti-fatigue mechanism is related to the *Olf495* and *piezo1* genes and the regulation pathway of inflammatory mediators on TRP channels.

**KEYWORDS** Dendrobium and Panax Quinquefolius Granules; Anti-fatigue; Transcriptomics; Metabolomics; Oxidation; Anti-oxidation; Lactic acid

疲劳是指身体或特定器官无法维持预定强度运动的生理状态<sup>[1]</sup>,根据发生部位可分为中枢疲劳和外周疲劳。中枢疲劳主要与大脑皮层细胞功能减弱和神经递质改变有关联,外周疲劳则与能量代谢紊乱有关联<sup>[2-3]</sup>。能量代谢紊乱主要由运动期间营养物质代谢产生的乳酸和尿素氮等积累引起,通过改变体内微环境导致细胞酸中毒,进而破坏肌糖原稳

态,影响机体能量供应和恢复能力,导致机体疲劳<sup>[4-6]</sup>。除消耗能量外,长时间或高强度运动通常会破坏机体内的氧化/抗氧化系统平衡,产生的过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)会攻击生物大分子和细胞,引起氧化应激损伤<sup>[7]</sup>。目前,抗疲劳的治疗策略主要集中在营养补充和中枢神经系统兴奋两方面,然而神经系统兴奋剂因存在成瘾

性和精神类不良反应限制了其临床应用。具有“药食同源”优势的天然植物中含有多种对人体健康有益的生物活性成分, 目前已成为抗疲劳功能制剂开发的重要来源<sup>[8-9]</sup>。

铁皮石斛西洋参颗粒(Dendrobium and Panax Quinquefolius Granules, DPQG)是由西洋参、灵芝和铁皮石斛三味中药按照一定配比制备而成的复方制剂。西洋参为五加科人参属, 研究<sup>[10-11]</sup>显示: 西洋参中的活性成分主要包括皂苷、多糖、多酚类物质和其他次生代谢产物, 其具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗老化及免疫调节等多种作用。灵芝作为具有几千年应用历史的传统药用真菌, 含有大量生物活性成分, 具有清除自由基和抗衰老的效果, 其中灵芝多糖具有良好的抗疲劳效果<sup>[12]</sup>。药用铁皮石斛为兰科植物铁皮石斛的干燥茎, 其主要活性成分为多糖、生物碱、氨基酸和微量元素等, 具有抗疲劳、增强耐力及抗应激的效果<sup>[13]</sup>, 被誉为“药中黄金”和“救命仙草”。

既往研究<sup>[10-13]</sup>显示: 西洋参、灵芝和铁皮石斛单味药均具有一定的抗疲劳作用, 但复方制剂DPQG的协同抗疲劳作用及其机制尚未见报道。鉴于复方制剂多成分和多靶点的作用特点, 本研究通过转棒实验及游泳耐力实验建立过度训练致疲劳小鼠模型, 并结合转录组学与代谢组学技术, 探讨DPQG对疲劳小鼠的影响及其机制, 为DPQG开发为抗疲劳功能制剂和保健品提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

**1.1 实验动物、药物、主要试剂和仪器** 48只5~8周龄SPF级雄性BALB/c小鼠, 体质量(22±3)g, 购自新疆医科大学实验中心[实验动物生产许可证号: SCXK(新)2018-0001]。DPQG由河北澳诺制药有限公司提供。乳酸(lactic acid, LAC)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒、二喹啉甲酸检测法(bicinchoninic acid assay, BCA)总蛋白定量试剂盒和肝/肌糖原试剂盒均购自南京建成生物工程有限公司。ZB-200疲劳转棒仪购自成都泰盟软件有限公司, Thermo 3001酶标仪和Legend Micro 21R高速冷冻离心机购自美国Thermo公司, 自制游泳缸(50 cm×50 cm)由石河子大学药学院新疆植物

药资源利用教育部重点实验室提供。

**1.2 实验动物分组和处理** 将48只小鼠随机分为对照组、低剂量DPQG组(400 mg·kg<sup>-1</sup> DPQG)、中剂量DPQG(800 mg·kg<sup>-1</sup> DPQG)和高剂量DPQG(1 600 mg·kg<sup>-1</sup> DPQG), 每组12只。适应性饲养7 d后开始给药干预, 饲养期间小鼠可自由饮水和进食, 规律光照/黑暗交替(12 h/12 h)。各组小鼠灌胃给予相应剂量DPQG蒸馏水混合溶液, 对照组小鼠给予等量体积蒸馏水, 每日1次, 连续给药35 d。

**1.3 转棒实验和游泳耐力实验评估各组小鼠耐力情况** 转棒实验可分为适应性训练期和正式测试期, 用于评估各组小鼠运动耐力<sup>[14]</sup>。每组选取12只小鼠, 于正式实验前3天对各组小鼠进行适应性训练, 每天1次, 转速为20 r·min<sup>-1</sup>。3 d后末次给药30 min后, 将各组小鼠置于转速为20 r·min<sup>-1</sup>转棒上进行正式测试, 各组小鼠自测试开始至从该通道的转棒上掉落的时间作为转棒力竭时间。

另选取每组12只小鼠, 于末次给药30 min后进行游泳耐力实验。于各组小鼠尾根部负荷其体质量10%的铅块后, 将小鼠置于内壁光滑的自制游泳缸, 水深25 cm, 水温(25±2)℃, 以小鼠头部持续浸入水中超过10 s且无法返回水面作为力竭判定的标准<sup>[15]</sup>, 记录各组小鼠游泳力竭时间。

**1.4 试剂盒检测各组小鼠血清中LAC水平和LDH活性及肌肉组织中MDA水平、SOD和GSH-Px活性以及肌糖原和肝糖原水平** 耐力评估实验结束后, 采用腹腔注射戊巴比妥钠麻醉各组小鼠, 摘眼球取血, 于4℃、8 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min以分离血清。颈椎脱臼处死各组小鼠, 取肝脏组织和肱四头肌组织, 制备组织匀浆。严格按试剂盒说明书操作, 取各组小鼠血清与肌肉组织样本检测血清中LAC水平和LDH活性及肌肉组织中MDA水平、SOD和GSH-Px活性以及肌糖原和肝糖原水平。

**1.5 HE染色观察各组小鼠肌肉组织病理形态表现** 各组小鼠肌肉组织标本置于4%甲醛中固定24 h后, 进行石蜡包埋处理, 制备厚度为4 μm切片。切片经脱蜡和脱水后进行HE染色, 于光学显微镜下观察各组小鼠肌肉组织病理形态表现。

## 1.6 2组小鼠肌肉组织转录组RNA测序分析

取对照组和高剂量DPQG组小鼠肌肉组织各50 mg, 液氮保护下将样品研磨成粉末, 加入TRIzol试剂, 静置5 min, 4℃、12 000 g离心5 min。取上清, 加

入氯仿/异戊醇(24:1), 4℃、12 000 g离心8 min。取上清, 加入异丙醇, 于-20℃静置3 h, 4℃、17 500 g离心25 min。弃上清, 加入75%乙醇洗涤沉淀, 4℃、17 500 g离心3 min。弃上清, 晾干3~5 min, 加入DEPC水或RNase-free水溶解沉淀获得RNA样品。

每只小鼠取100~500 ng RNA样品, 经适温变性解除二级结构后, 采用oligo-dT磁珠纯化样品。加入打断试剂将mRNA片段化, 依次进行一链cDNA合成和二链cDNA合成, 在cDNA 3'末端加A碱基并修复双链cDNA。采用Agilent 2100 Bioanalyzer检测文库插入片段大小, 使用ABI Step One Plus实时荧光PCR系统(TaqMan探针法)定量检测文库浓度, 检测合格的文库经cBot平台完成桥式PCR扩增后, 使用Illumina HiSeq™ 2500平台进行测序。

**1.7 2组小鼠肌肉组织差异代谢物分析** 取对照组和高剂量DPQG组小鼠肌肉组织50 mg, 加入预冷沉淀剂, 涡旋振荡匀浆, 冰浴超声10 min后于-20℃静置120 min, 4℃、25 000 g离心15 min。取上清, 放入冷冻抽干机去除溶剂, 加入适量10%甲醇溶液于冰浴下超声复溶, 4℃、25 000 g离心15 min。取上清, 经0.22 μm微孔滤膜过滤后进行质谱检测。取等体积待检样本, 充分混合作为质量控制样本。色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, Waters, UK), 柱温为50℃, 流速为0.4 mL·min<sup>-1</sup>。流动相A为水(含0.1%甲酸), 流动相B为甲醇(含0.1%甲酸)。代谢物采用梯度洗脱: 0~2 min, 100%流动相A; 2~11 min, 0~100%流动相B; 11~13 min, 100%流动相B; 13~15 min, 0~100%流动相A, 上样体积5 μL。质谱条件: 采用高分辨串联质谱Xevo G2-XS QTOF(Waters, UK)分别进行正、负离子模式采集。正离子模式下, 毛细管电压3.0 kV, 锥孔电压40.0 V; 负离子模式下, 毛细管电压2.0 kV, 锥孔电压40.0 V。

采用MSE模式进行数据采集, 一级扫描范围为50~1 200, 扫描时间为0.2 s, 对所有母离子按照20~40 eV的能量进行碎裂, 采集所有碎片信息, 每3 s对LE信号进行实时质量校正, 每隔10个样本进行1次混合质控样本的采集, 评估仪器状态稳定性。采用Progenesis QI(v2.2)软件进行峰提取、峰对齐、归一化、去卷积与峰识别, 生成包括

质荷比(m/z)、保留时间(R<sub>T</sub>)及峰面积的数据矩阵。采用最小值法填充缺失值, 删除缺失超过50%的变量, 利用样本总面积法归一化, 对所得数据采用主成分分析(principal component analysis, PCA)方法建立分类模型, 观察样本组间聚类趋势和离群样本, 采用偏最小二乘法判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)模型筛选组间差异变量。

**1.8 差异代谢基因和差异代谢物筛选、通路分析及关联分析** 使用HISAT2(v2.2.1)软件将筛选的基因组数据与参考数据库进行比对, 参考数据库由华大基因提供。收集比对后的转录组数据, 通过RSEM(v1.2.12)软件计算基因表达水平, 使用DESeq2(v1.4.5)软件分析差异倍数(fold change, FC), 以 $|\log_2FC|>1.5$ 且 $P<0.05$ 为筛选条件确定差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。使用R软件、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)同源基因注释系统(KEGG Orthology Based Annotation System, KOBAS)(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)及注释、可视化和综合发现数据库(Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, DAVID)对所得DEGs进行基因本体(Gene Ontology, GO)功能富集分析及KEGG信号通路富集分析。

采用Progenesis QI和代谢组学R语言metaX软件包对质谱数据进行统计学分析, 获得组间差异代谢物, 其中代谢物辨识基于数据库KEGG(<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)、人类代谢组数据库(Human Metabolome Database, HMDB)(<https://www.hmdb.ca>)和LipidMaps(<https://www.lipidmaps.org/>)进行分析, 采用单变量分析FC和P值来筛选差异代谢物(筛选条件为 $FC\geq 1.2$ 或 $FC\leq 0.8333$ ,  $P<0.05$ )。采用Fisher's精确检验法, 基于MetaboAnalyst 5.0数据库对差异代谢物进行KEGG信号通路富集分析。采用mixOmics软件包block.splsda函数对DEGs与差异代谢物进行关联分析, 使用PlotVar函数对DEGs和差异代谢物关联结果进行可视化处理。

**1.9 统计学分析** 采用GraphPad Prism 9.5统计软件进行统计学分析。各组小鼠转棒时间、游泳力竭时间、小鼠血清中LAC水平和LDH活性及肌肉组织中MDA水平、SOD和GSH-Px活性以及肌糖

原和肝糖原水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 Tukey 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠运动耐力情况** 转棒实验结果显示: 与对照组比较, 低、中和高剂量 DPQG 组小鼠转棒力竭时间均明显增加, 分别提高 2.3、3.3 和 5.4 倍 ( $P < 0.01$ )。游泳耐力实验结果显示: 与对照组比较, 低和中剂量 DPQG 组小鼠游泳力竭时间无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 高剂量 DPQG 组小鼠游泳力竭时间明显增加 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 各组小鼠血清中 LAC 水平和 LDH 活性及肌肉组织中 MDA 水平和 SOD 及 GSH-Px 活性** 与对照组比较, 低和中剂量 DPQG 组小鼠血清中 LAC 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 高剂量 DPQG 组小鼠血清中 LAC 水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 低、中和高剂量 DPQG 组小鼠血清中 LDH 活性均明显升高 ( $P < 0.01$ )。与对照组比较, 低剂量组 DPQG 小鼠肌肉组织中 SOD 和 GSH-Px 活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 中和高剂量 DPQG 组小鼠 SOD 及 GSH-Px 活性均明显升高 ( $P < 0.01$ ); 低、中和高剂量 DPQG 组小鼠肌肉组织中 MDA 水平均

表 1 各组小鼠运动耐力情况

Tab. 1 Exercise endurance performance of mice in various groups ( $n=8, \bar{x} \pm s, t/s$ )

Group	Rod turning exhaustion time	Swimming exhaustion time
Control	52.9±8.7	164.8±123.7
DPQG		
Low dose	121.9±22.9**	331.3±155.5
Medium dose	173.1±36.5**	357.0±94.3
High dose	284.8±25.8**	371.0±108.8*

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

**2.3 各组小鼠肌糖原和肝糖原水平** 糖原水平检测结果显示: 对照组与低、中和高剂量 DPQG 组小鼠肌糖原水平比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与对照组比较, 中和高剂量 DPQG 组小鼠肝糖原水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**2.4 各组小鼠肌肉组织病理形态表现** 对照组小鼠骨骼肌细胞紊乱排列, 细胞间存在炎性细胞浸润, 肌纤维间缝隙变大, 血管扩张, 骨骼肌水肿。与对照组比较, 低、中和高剂量 DPQG 组小鼠骨骼肌纤维排列有所改善, 炎性细胞浸润明显减少。见图 1。

表 2 各组小鼠血清中 LAC 水平和 LDH 活性及肌肉组织中 MDA 水平和 SOD 及 GSH-Px 活性

Tab. 2 Serum LAC levels and LDH activities and MDA, SOD and GSH-Px activities in muscle tissue of mice in various groups

Group	LAC [ $c_B / (mmol \cdot L^{-1})$ ]	LDH [ $\lambda_B / (U \cdot g^{-1})$ ]	MDA [ $m_B / (mol \cdot g^{-1})$ ]	SOD [ $\lambda_B / (U \cdot mg^{-1})$ ]	GSH-Px [ $m_B / (mmol \cdot g^{-1})$ ]
Control	10.6±2.2	2 240.0±109.3	5.3±0.9	36.3±7.2	1.3±0.3
DPQG					
Low dose	10.5±0.6	2 505.0±123.6*	3.4±0.7**	48.5±10.2	1.9±0.6
Medium dose	8.9±0.8	2 517.0±96.6*	2.7±0.7**	56.4±11.5**	2.4±0.5*
High dose	8.1±1.5*	2 624.0±194.7**	2.7±0.9**	61.5±16.5**	2.7±1.0**

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group.

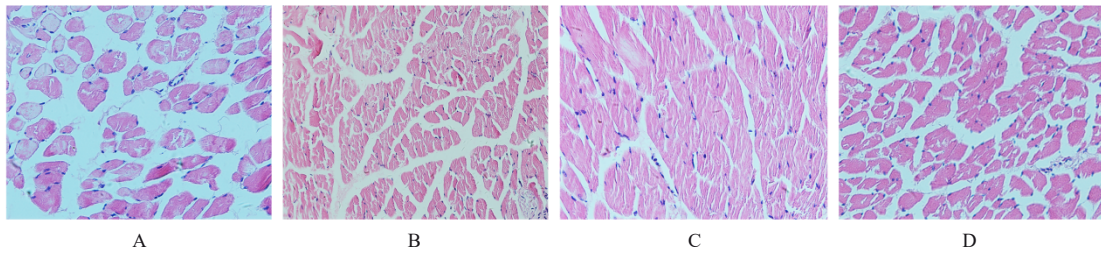
表 3 各组小鼠肌糖原和肝糖原水平

Tab. 3 Levels of muscle glycogen and liver glycogen of mice in various groups [ $n=8, \bar{x} \pm s, w_B / (mg \cdot g^{-1})$ ]

Group	Muscle glycogen	Liver glycogen
Control	0.4±0.1	4.3±0.6
DPQG		
Low dose	0.3±0.1	3.8±0.7
Medium dose	0.3±0.1	2.1±0.4*
High dose	0.4±0.1	1.8±0.5*

\* $P < 0.01$  compared with control group.

**2.5 2组小鼠肌肉组织转录组 RNA 测序** 本研究共完成 6 个样品的转录组测序分析, 包括对照组 3 个样品和高剂量 DPQG 组 3 个样品。质量控制分析数据显示: 测序数据碱基质量值  $Q20 > 97\%$ ,  $Q30 > 93\%$ ; 碱基质量分布图和含量分布  $> 30\%$ , A、T、C 和 G 4 种碱基序列含量相近, 组成均衡。PCA 分析结果显示: 2 组样本在主成分空间中呈现出明显的分离趋势, 表明样本间存在显著的转录组差异, 样本分组合理且测序数据稳定性较高, 满足



A:Control group;B:Low dose of DPQG group;C:Medium dose of DPQG group;D:High dose of DPQG group.

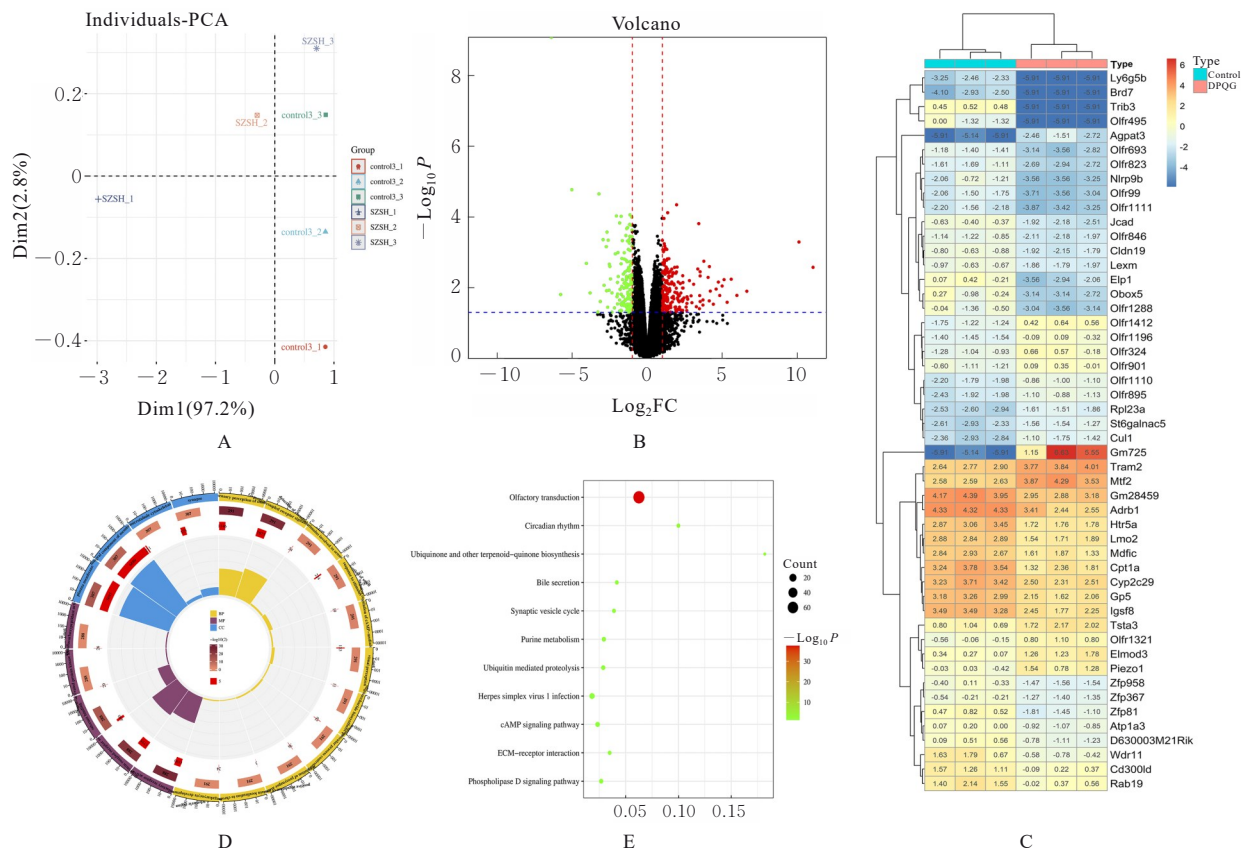
图1 各组小鼠肌肉组织病理形态表现(HE,×200)

Fig. 1 Pathomorphology of muscle tissue of mice in various groups (HE, ×200)

转录组学分析要求。见图2A。

基因差异表达分析结果显示：对照组与高剂量DPQG组小鼠肌肉组织中共筛选出338个DEGs ( $P < 0.05$  和  $|\log_2FC| \geq 1$ )，其中表达上调191个，表达下调147个。见图2B。与对照组比较，高剂量DPQG组小鼠肌肉组织中 *Trib3* 和 *Olf495* 基因表达明显下调，*Gm725* 基因表达明显上调 ( $|\log_2FC| > 5$ ,  $P < 0.05$ )。见图2C。GO功能富集分析结果显示：

2组小鼠肌肉组织中与分子功能和生物过程相关的DEGs主要富集在嗅觉和G蛋白偶联受体信号通路，与细胞成分相关的DEGs主要富集于胞膜。见图2D。KEGG功能注释结果显示：对照组和高剂量DPQG组小鼠肌肉组织中DEGs主要富集于2个信号通路，即嗅觉传导和泛素介导的蛋白水解作用。见图2E。嗅觉传导相关分子过程见图3。



A:PCA analysis of six samples;B:Volcano plot of DEGs;C:Heatmap of DEGs;D:Bubble graph of GO enrichment analysis;E:Bubble graph of KEGG signaling enrichment analysis.

图2 2组小鼠肌肉组织转录组RNA测序分析

Fig. 2 Transcriptomic RNA sequencing analysis on muscle tissue of mice in two groups

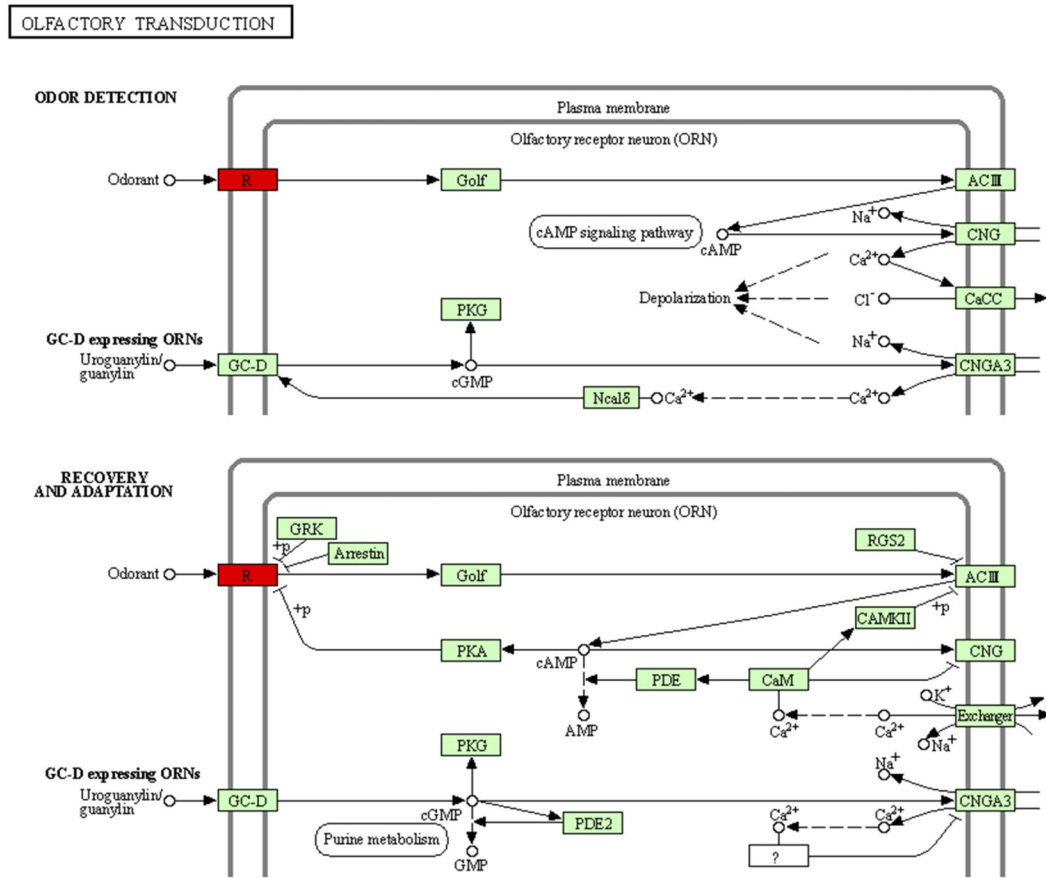
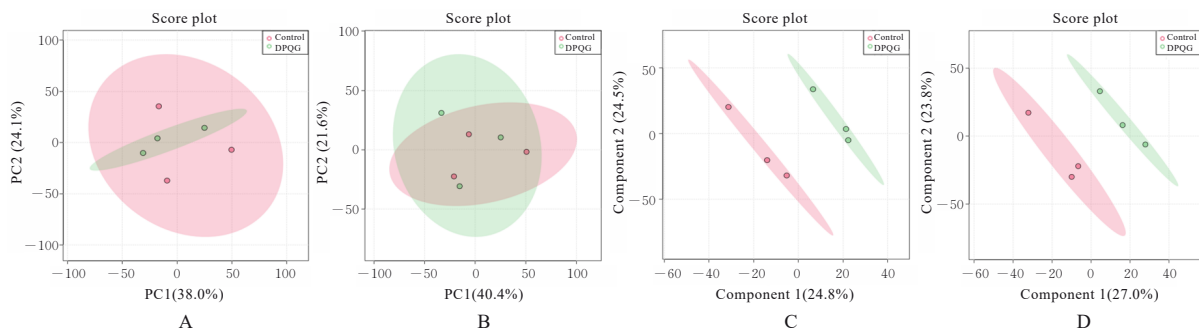


图3 嗅觉转录相关分子过程

Fig. 3 Molecular processes associated with olfactory transduction

2.6 2组小鼠肌肉组织中差异代谢物 PCA主成分分析结果显示: 各组样本分离, 其中对照组样本与高剂量DPQG组样本之间分离程度较高, 正离子模式下的各组分散度优于负离子模式。见图4A和图4B。PLS-DA模型分析结果显示: 对照组样本与高剂量DPQG组的PLS-DA分析无交叉重叠现象, 两组样品组成存在明显差异。见图4C和图4D。

正离子模式下, PLS-DA模型的 $R^2$ 值为0.9986,  $Q^2$ 值为-1.6253。负离子模式下, PLS-DA模型的 $R^2$ 值为0.9977,  $Q^2$ 值为-1.1475。PLS-DA分析中, 正离子模式的解释能力劣于负离子模式, 预测能力优于负离子模式。因此, 后续分析主要采用正离子模式。



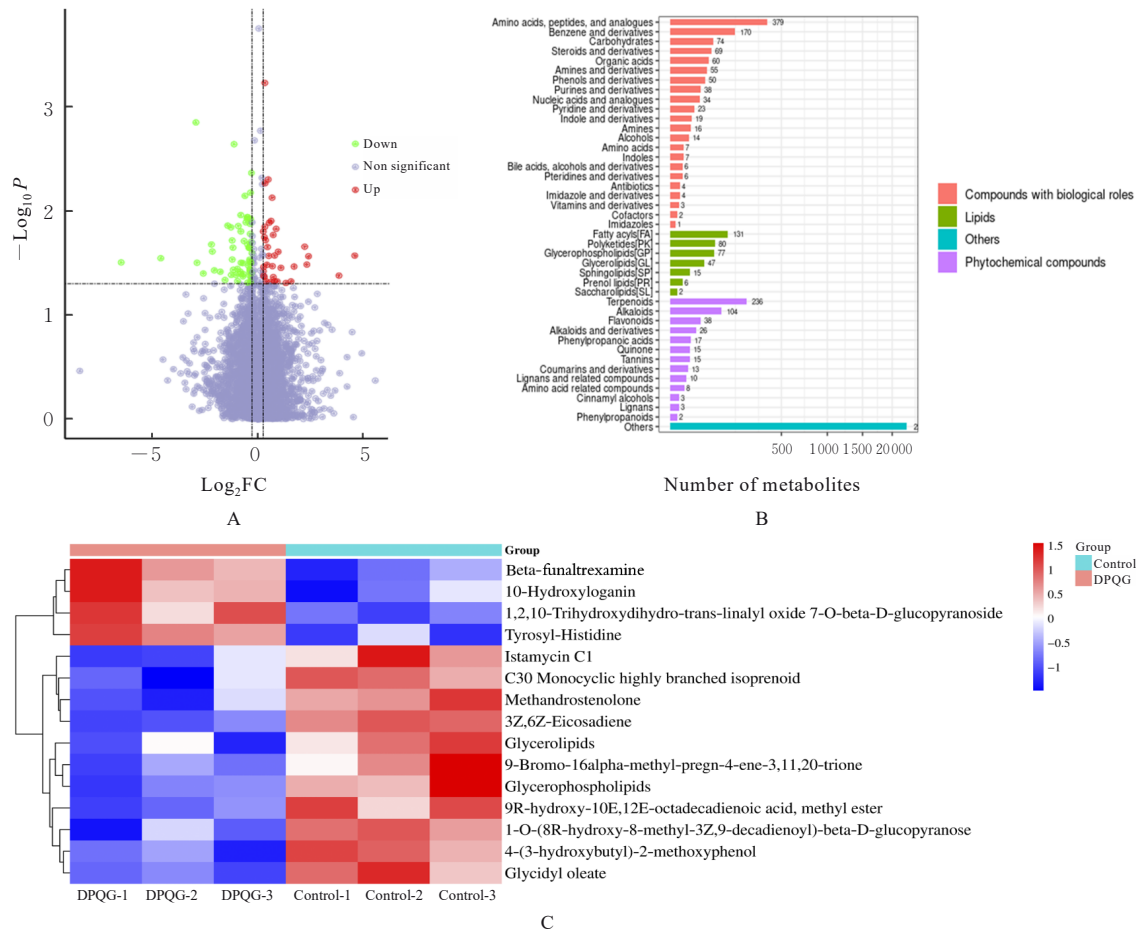
A, B: PCA score plots; C, D: PLS-DA models; A, C: Positive ionization; B, D: Negative ionization.

图4 2组小鼠肌肉组织差异代谢物分析

Fig. 4 Analysis on differential metabolites in muscle tissue of mice in two groups

采用单变量分析差异代谢物,结果显示:对照组与高剂量DPQG组小鼠肌肉组织中差异代谢物96个。见图5A。差异代谢物鉴定分析结果显示:差异代谢物主要为脂质、生物分子和天然产物,脂肪酰基、多酮类化合物和甘油磷脂为脂质类代谢物的主要物质,氨基酸和多肽类似物为生物分子的主要物质;生物碱和萜类化合物为天然产物的主要

物质。见图5B。对差异最明显的前30位差异代谢物构建热图,结果显示:排名前4的差异代谢物分别为1-O-(8R-羟基-8-甲基-3Z,9-癸二烯酰)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、油酸缩水甘油酯、1,2,10-三羟基二氢-反-烯丙基氧化物7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷和酪氨酸-组氨酸二肽。见图5C。



A: Volcano plot; B: Identification of differential metabolites; C: Heatmap of differential metabolites.

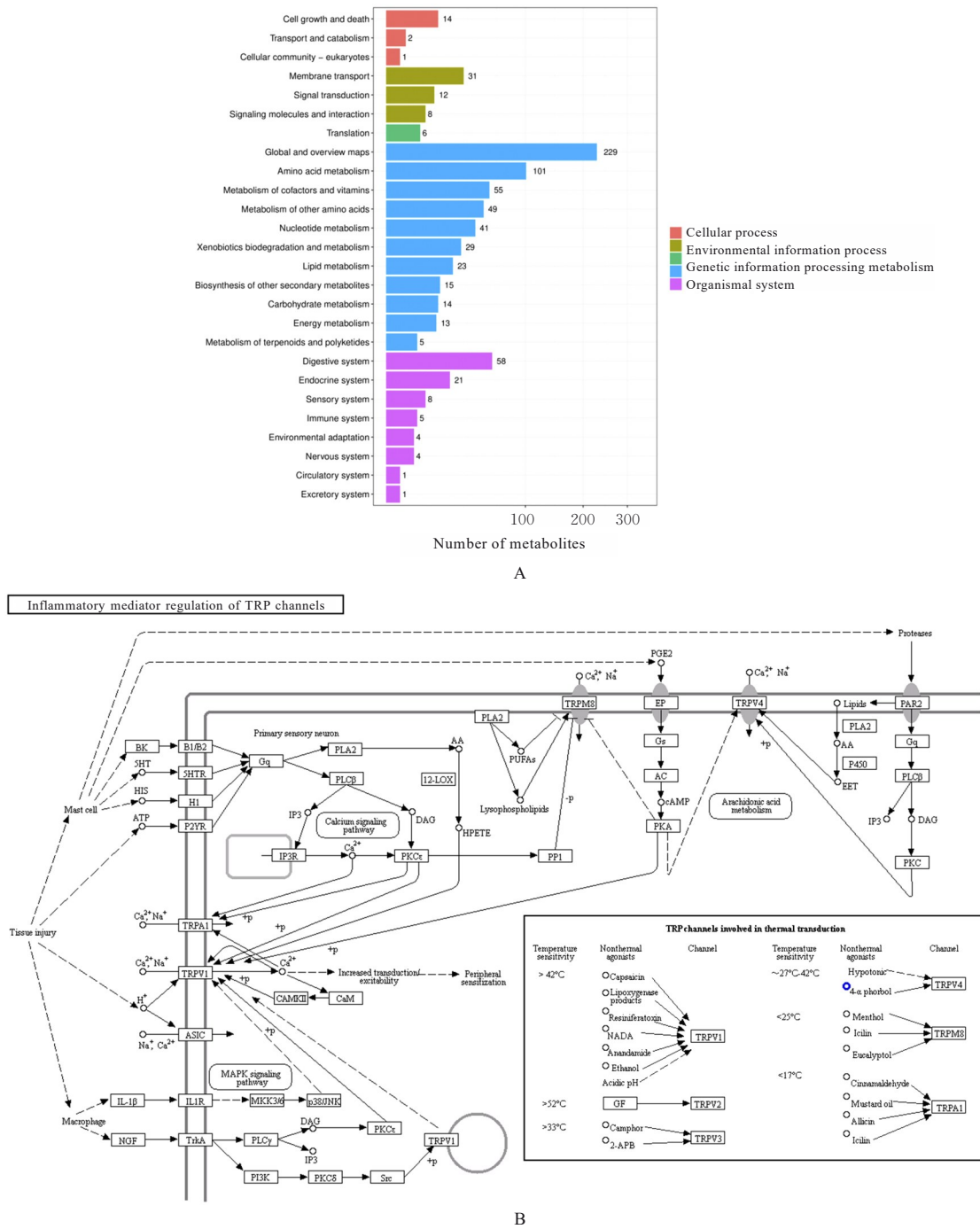
### 图5 2组小鼠肌肉组织中差异代谢物的代谢组学分析

Fig. 5 Metabolomics analysis of differential metabolites in muscle tissue of mice in two groups

**2.7 2组小鼠肌肉组织中差异代谢物富集分析** 2组差异代谢物GO功能富集分析结果显示:差异代谢物在细胞过程中主要分布于细胞生长与死亡;代谢过程中主要富集于氨基酸及其他次生代谢产物代谢过程。见图6A。KEGG信号通路富集分析结果显示:差异代谢物主要富集在炎症介质对色氨酸(tryptophan, TRP)通道的调节通路上。该通路调控机制见图6B。

**2.8 转录组学和代谢组学关联分析** 关联分析结

果显示:2组小鼠肌肉组织中的差异代谢物与DEGs共存在702 801条关联线,其中23 222个相关关系显著( $P < 0.05$ ),包括11 923个负相关关系和11 300个正相关关系。高度负相关( $r = -1$ )关系个数为508个,高度正相关( $r = 1$ )关系个数为690个。结合排名前30位DEGs可知,*piezo1*基因与代谢物 $\beta$ 1-卡茄碱( $r = -1, P < 0.05$ )和椴树碱( $r = 1, P < 0.05$ )呈现高度的关联性。见图7A。2种化合物结构信息见图7B和图7C。



A: GO functional enrichment analysis of differential metabolites; B: Inflammatory mediator regulation of TRP channels.

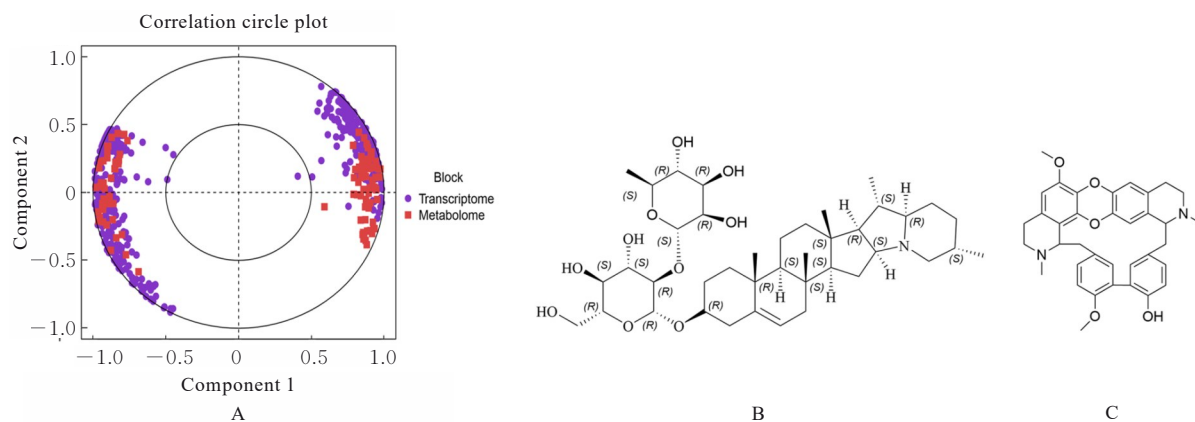
图6 2组小鼠肌肉组织DEGs与差异代谢物的通路分析

Fig. 6 Pathway analysis on DEGs and differential metabolites in muscle tissue of mice in two groups

### 3 讨论

肌肉疲劳由能量物质耗尽、氧化应激增加和炎症反应激活等因素导致，运动耐力下降是疲劳最直接的表现，运动耐力的评估方式包括攀爬和游泳等<sup>[16]</sup>。本研究结果显示：高剂量DPQG组小鼠的转棒力竭时间和游泳力竭时间均优于对照组，表明

DPQG能增强小鼠的运动耐力。机体在高强度运动时，有氧呼吸产生的能量逐渐耗尽，此时机体主要靠无氧糖酵解供能，LAC作为糖酵解的最终产物会持续增多，进而影响血液和肌肉的pH值及酶活性<sup>[17]</sup>。LDH可以促进丙酮酸和LAC的氧化还原反应，抑制LAC的堆积<sup>[18]</sup>。糖原的含量与机体的运动耐力密切相关<sup>[19]</sup>，当糖类物质消耗过度时，机



A: Concentric circles of correlation between DEGs and differential metabolites; B: Beta1-chaconine structure; C: Tiliacorine structure.

图7 2组小鼠肌肉组织转录组学和代谢组学关联分析

Fig. 7 Transcriptomics and metabolomics association analysis on muscle tissue of mice in two groups

体会动员糖原产能。本研究中经DPQG干预后,疲劳小鼠血清中LDH活性升高, LAC堆积和糖原代谢失调得到明显改善。在运动过程中,能量需求和氧气消耗增加,产生大量ROS。正常情况下,机体的抗氧化系统可以清除这些ROS,但在剧烈运动时,ROS的产生速度可能超过机体的清除能力,导致氧化应激,进而损伤细胞膜、蛋白质和DNA,影响肌肉功能,这是导致运动性疲劳的重要因素。本研究中DPQG组小鼠机体的氧化与抗氧化平衡明显改善。炎症反应是运动性疲劳的重要因素之一,与肌肉损伤、能量耗竭、代谢产物积累以及氧化应激等因素共同影响运动后的恢复。在运动过程中,肌肉剧烈活动可能导致肌肉纤维的微损伤,激活免疫系统,引发炎症反应。本研究通过HE染色结果发现DPQG可明显改善小鼠骨骼肌炎性细胞浸润情况,促进疲劳的恢复。

为探讨DPQG抗疲劳作用的潜在分子机制,本研究采用转录组学与代谢组学相结合的方法,转录组学研究结果表明:*Trib3*、*Olfir495*和*Gm725*是DPQG抗疲劳的关键靶点,嗅觉传导是DPQG发挥抗疲劳作用的关键信号通路。研究<sup>[20-21]</sup>表明:大脑皮质负责响应疲劳,嗅觉转导中枢也位于大脑皮质,而*Olfir495*是嗅觉转导过程的关键基因,DPQG可能通过作用于*Olfir495*调节嗅觉传导,影响机体皮质对于疲劳的响应,干预疲劳的发生发展。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种神经递质,在大脑发挥自主活动功能中起至关重要的作用,其活性升高时会导致身体机能下降<sup>[22]</sup>。TRP是5-HT的前体物质,中枢神经系统(central

nervous system, CNS)的脑5-HT主要由CNS内TRP合成,外周TRP对血脑屏障具有低渗透性,只能通过特定载体转运至中枢,因此,游离TRP的循环量反映了脑中TRP水平<sup>[23]</sup>。运动会致外周和CNS中TRP浓度升高,CNS中的5-HT水平也随之升高。支链氨基酸(branched-chain  $\alpha$ -amino acids, BCAAs)与TRP竞争相同载体以通过血脑屏障,但BCAAs在运动过程中被消耗<sup>[24]</sup>,其水平降低有利于游离TRP转运至CNS以合成5-HT<sup>[25-26]</sup>。本研究代谢组学分析显示:炎症介质对TRP通道的调节是DPQG影响疲劳的关键通路,表明DPQG可影响TRP代谢,进而影响机体对5-HT的中枢敏感性。机体的三大供能物质为脂质、蛋白质和糖类,其中蛋白质是机体供能的“非常手段”。本研究结果显示:DPQG影响的关键代谢物为氨基酸,显著差异代谢产物为1-O-(8R-羟基-8-甲基-3Z,9-癸二烯酰)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖、油酸缩水甘油酯、1,2,10-三羟基二氢-反-烯丙基氧化物7-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷和酪氨酸-组氨酸二肽,表明DPQG可通过调节上述4个关键代谢物的水平来调节能量物质代谢平衡。关联分析发现:差异基因*piezo1*与 $\beta$ 1-卡茄碱和椴树碱关联性较高。*piezo1*蛋白离子通道是新发现的一种机械敏感性离子通道, $Ca^{2+}$ 可通过*piezo1*蛋白离子通道<sup>[27]</sup>。本研究结果显示:DPQG组小鼠肌肉组织中*piezo1*上调,可能使调控的下游蛋白表达增加,调节 $Ca^{2+}$ 内外流从而延缓疲劳的发生发展<sup>[28]</sup>,而与*piezo1*基因呈强关联的 $\beta$ 1-卡茄碱和椴树碱可能为DPQG发挥抗疲劳作用的关键药效物质。

综上所述, DPQG 可通过调节氧化-抗氧化平衡、LAC 代谢和糖原平衡来延缓过度训练小鼠疲劳的发生或加速疲劳恢复, 其作用机制与 *Olf495* 及 *piezo1* 基因、炎症介质对 TRP 通道的调节通路和嗅觉信号转导过程有密切关联。DPQG 具有作为新型抗疲劳食品或药物的开发潜力。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

寇卫兵参与研究设计和论文撰写, 刘巧慧参与数据整理, 姚大红、郭亚萍和王航宇参与实验数据采集及分析, 张珂和王金辉参与论文修改及审阅, 李涵和邵丹参与实验药材提供及实验指导。

#### [参考文献]

- [1] YANG M, TAO L, ZHAO C C, et al. Antifatigue effect of *Panax notoginseng* leaves fermented with microorganisms: *in-vitro* and *in-vivo* evaluation [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 824525.
- [2] GUO M X, LIU X B, ZHANG W W, et al. Preparation and anti-fatigue effects of *Vicatia thibertica polysaccharide*[J]. *Phcog Mag*, 2022, 18(77): 133.
- [3] KIM J, BEAK S, AHN S, et al. Effects of taurine and ginseng extracts on energy metabolism during exercise and their anti-fatigue properties in mice [J]. *Nutr Res Pract*, 2022, 16(1): 33-45.
- [4] HUANG W, HUI H Q, XU J P, et al. Study on the antifatigue effect of compound amino acid capsules [J]. *Cell Microbiol*, 2022, 2022(1): 6593811.
- [5] CHEN Y, WANG J J, JING Z H, et al. Anti-fatigue and anti-oxidant effects of curcumin supplementation in exhaustive swimming mice *via* Nrf2/Keap1 signal pathway[J]. *Curr Res Food Sci*, 2022, 5: 1148-1157.
- [6] LIU G Y, YANG X, ZHANG J X, et al. Synthesis, stability and anti-fatigue activity of selenium nanoparticles stabilized by *Lycium barbarum polysaccharides* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 179: 418-428.
- [7] ZHANG Y H, ZHANG W J, SHEN C H, et al. Anti-fatigue effect of pigeon meat hydrolysate on exercise mice and its underlying mechanism: Related to oxidative stress and energy metabolism [J]. *Food Biosci*, 2024, 62: 105407.
- [8] ZHU H K, WANG R Y, HUA H Y, et al. Network pharmacology exploration reveals gut microbiota modulation as a common therapeutic mechanism for anti-fatigue effect treated with maca compounds prescription[J]. *Nutrients*, 2022, 14(8): 1533.
- [9] LIU C, HUA H Y, ZHU H K, et al. Study of the anti-fatigue properties of macamide, a key component in maca water extract, through foodomics and gut microbial genomics[J]. *Food Biosci*, 2022, 49: 101876.
- [10] LIU S L, GENG J N, CHEN W J, et al. Isolation, structure, biological activity and application progress of ginseng polysaccharides from the *Araliaceae* family [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 276: 133925.
- [11] LI D, REN J W, ZHANG T, et al. Anti-fatigue effects of small-molecule oligopeptides isolated from *Panax quinquefolium L.* in mice[J]. *Food Funct*, 2018, 9(8): 4266-4273.
- [12] 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): e30907.
- [13] CAI M, ZHU H, XU L, et al. Structure, anti-fatigue activity and regulation on gut microflora *in vivo* of ethanol-fractional polysaccharides from *Dendrobium officinale*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 234: 123572.
- [14] JIA L M, ZHAO F. Evaluation of silymarin extract from *Silybum marianum* in mice: anti-fatigue activity [J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2022, 11(4): 914-921.
- [15] YAN K, GAO H Y, LIU X H, et al. Establishment and identification of an animal model of long-term exercise-induced fatigue [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 915937.
- [16] ZHOU Y P, CAO F L, WU Q, et al. Dietary supplementation of octacosanol improves exercise-induced fatigue and its molecular mechanism[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(27): 7603-7618.
- [17] XIAO R, WEI Y, ZHANG Y P, et al. Trilobatin, a naturally occurring food additive, ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice: involvement of Nrf2/ARE/ferroptosis signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 913367.
- [18] MAO S Y, SUO S K, WANG Y M, et al. Systematical investigation on anti-fatigue function and underlying mechanism of high Fischer ratio oligopeptides from Antarctic krill on exercise-induced fatigue in mice[J]. *Mar Drugs*, 2024, 22(7): 322.
- [19] JING Y S, LI M S, LI Y Q, et al. Structural characterization and anti-fatigue mechanism based on the gut-muscle axis of a polysaccharide from *Zingiber officinale*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 283(Pt 1): 137621.

- [20] DAVIS L A, FOGARTY M J, BROWN A, et al. Structure and function of the mammalian neuromuscular junction[J]. *Compr Physiol*, 2022, 12(4): 3731-3766.
- [21] ITO S, KIMURA T, GOMI H. Attribution of sensory prediction error to perception of muscle fatigue[J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 16708.
- [22] SHI C, LIANG Z H, LI T, et al. Metabolome and microbiome analyses of the anti-fatigue mechanism of *Acanthopanax senticosus* leaves[J]. *Food Funct*, 2024, 15(7): 3791-3809.
- [23] SHAO J J, QU L L, LIU Y, et al. Ginsenoside Rk3 regulates tryptophan metabolism along the brain-gut axis by targeting tryptophan hydroxylase and remodeling the intestinal microenvironment to alleviate depressive-like behavior in mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(13): 7100-7120.
- [24] XUAN Q W, RUAN Y, CAO C B, et al. Effect of ultrasonic penetration with volatile oil of *Olibanum* and *Chuanxiong Rhizoma* on acute knee synovitis induced by sports training: an open-label randomized controlled study[J]. *Pain Res Manag*, 2022, 2022: 6806565.
- [25] ALFARO-RODRÍGUEZ A, REYES-LONG S, ROLDAN-VALADEZ E, et al. Association of the serotonin and kynurenine pathways as possible therapeutic targets to modulate pain in patients with fibromyalgia[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(9): 1205.
- [26] TORNERO-AGUILERA J F, JIMENEZ-MORCILLO J, RUBIO-ZARAPUZ A, et al. Central and peripheral fatigue in physical exercise explained: a narrative review[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(7): 3909.
- [27] LIN Z D, XU G Y, LU X, et al. Piezo1 exacerbates inflammation-induced cartilaginous endplate degeneration by activating mitochondrial fission *via* the  $Ca^{2+}$ /CaMKII/Drp1 axis[J]. *Aging Cell*, 2025, 24(4): e14440.
- [28] 李梦佳. 异常应力通过机械门控Piezo1促进软骨细胞 $Ca^{2+}$ 内流引起颞下颌关节骨关节炎的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2024.