

# 复方人参对机体缺氧损伤的保护作用及其分子机制研究

陈卉<sup>1†</sup>, 郭衬衬<sup>1†</sup>, 潘雅琪<sup>1</sup>,

边爽<sup>1</sup>, 吉文鑫<sup>4</sup>, 龙超良<sup>2,3</sup>, 石永平<sup>1,2,4\*</sup>, 汪海<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>江苏师范大学健康科学学院; <sup>2</sup>江苏省内皮细胞靶向性心血管药物创制工程研究中心, 徐州 221116; <sup>3</sup>北京赛德维康医药研究院, 北京 100039; <sup>4</sup>江苏师范大学生命科学学院, 徐州 221116

**摘要:** 探究复方人参 (compound ginseng, CGS) 的抗缺氧作用及其分子机制。构建小鼠密闭缺氧模型、亚硝酸钠中毒模型、急性脑缺血模型以及全心缺血缺氧模型, 观察 CGS 对小鼠的存活时间、喘气时间、喘气次数、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活力、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性、乳酸脱氢酶 (lactic dehydrogenase, LDH) 活力和肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 活力。利用网络药理学预测 CGS 的抗缺氧相关机制, 并采用分子对接方法验证网络药理学筛选所得 CGS 活性成分与机体靶点之间的亲和性, 检测小鼠体内缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 表达量。结果显示, CGS 可以显著延长密闭缺氧实验、亚硝酸钠中毒实验和全心缺血缺氧实验小鼠的存活时间以及急性脑缺血实验的喘气时间和喘气次数; CGS 能够降低小鼠血清中的 MDA 含量、LDH 和 CK 活力, 提升 SOD、GSH-Px 活性。采用网络药理学预测出 226 条 CGS 抗缺氧通路, 其中关键通路有 HIF-1 $\alpha$  通路; 密闭缺氧实验结果证实 CGS 可以显著提升 HIF-1 $\alpha$  表达, 下调 VEGF 表达。综上, CGS 具有耐缺氧作用, 其作用可能与激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路, 提高血液携氧能力和氧利用率, 增强抗氧化活性有关。

**关键词:** 复方人参; 抗缺氧; 缺血性缺氧; 氧化应激

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

## Study on the protective effect of compound ginseng on hypoxic injury and its molecular mechanism

CHEN Hui<sup>1†</sup>, GOU Chen-chen<sup>1†</sup>, PAN Ya-qi<sup>1</sup>, BIAN Shuang<sup>1</sup>, JI Wen-xin<sup>4</sup>, LONG Chao-liang<sup>2,3</sup>, SHI Yong-ping<sup>1,2,4\*</sup>, WANG Hai<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>School of Health Science, Jiangsu Normal University; <sup>2</sup>Jiangsu Province Engineering Research Center of Cardiovascular Drugs Targeting Endothelial Cells, Xuzhou 221116, China; <sup>3</sup>Thadweik Academy of Medicine, Beijing 100039, China; <sup>4</sup>School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China

**Abstract:** This study aims to investigate the anti-hypoxic effect of compound ginseng (CGS) and its molecular mechanism. The atmospheric pressure hypoxia tolerance, the sodium nitrite poisoning model, the acute cerebral ischemia model and the whole heart ischemia-hypoxia model were constructed, and the effects of CGS on survival time, gasping time, gasping

frequency, malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) activity, glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, lactic dehydrogenase (LDH) activity, and creatine kinase (CK) activity. Network pharmacology was utilized to predict the anti-hypoxia related mechanism of CGS, and molecular docking method was used to verify the affinity between the active ingredients of CGS and the body targets obtained from network pharmacology screening, and to detect the activity of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in mice. endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression. The results showed that CGS significantly prolonged the survival time of mice in the atmospheric pressure hypoxia tolerance experiment, sodium nitrite intoxication experiment and whole heart ischemia-hypoxia experiment, as well as gasping time and gasping frequency in the acute cerebral ischemia experiment; CGS was able to reduce the serum levels of MDA, LDH, and CK viability, and elevate the activities of SOD and GSH-Px in mice. Network pharmacology was used to predict 226 anti-hypoxia pathways of CGS, among which the key pathways were the HIF-1 $\alpha$  pathway; the results of the confined hypoxia experiments confirmed that CGS could significantly elevate the expression of HIF-1 $\alpha$  and down-regulate the expression of VEGF. In conclusion, CGS has the anti-hypoxia effect, and its action may be related to the activation of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway, which improves the oxygen-carrying capacity of the blood and oxygen utilization, and enhances the antioxidant activity.

**Key words:** compound ginseng; anti-hypoxia; ischemia-hypoxia; oxidative stress

氧是机体获得能量的关键物质，组织供氧不足或者利用氧障碍时会导致缺氧，并且使机体产生一系列的变化，甚至产生各种急、慢性疾病，故有缺氧乃万病之源的说法<sup>[1]</sup>。缺氧引起机体产生大量 ROS，造成氧化与抗氧化系统失衡，大量自由基攻击机体 DNA、脂质和蛋白质，对心血管系统和神经系统造成损伤，氧化应激是缺氧损伤产生的主要原因<sup>[2]</sup>。

伴随航空运输业、旅游业和高原地区重大工程建设的快速发展，进入高原人数急剧增加，高原缺氧性脑病发病率增，成为危害高原地区人类活动能力和生命健康的主要因素。因此，研究开发具有预防和治疗急性高原病和高原脑水肿的有效药物迫在眉睫。治疗或预防机体缺氧的化学药品有乙酰唑胺<sup>[3]</sup>、硝苯地平<sup>[4]</sup>、地塞米松<sup>[5]</sup>、波生坦等，临床上发现存在个体差异大、不良反应多等缺点。中药防治高原反应及缺氧缺血方面临床应用历史悠久，具有疗效确切、毒副作用小等优势。单味中药人参<sup>[6]</sup>、丹参<sup>[7]</sup>、红景天<sup>[8]</sup>、黄芪<sup>[9]</sup>和三七<sup>[10]</sup>被证实通过减轻氧化应激反应、抑制炎症因子表达、抑制细胞凋亡等途径发挥抗缺氧作用。有关中药配伍改善缺氧缺血作用的研究鲜有报道，复方党参是我国批准的最早用于心肌缺血引起的心绞痛及胸闷等症状的中药复方制剂，这两种药的主要成分党参是一种补气类中药，和人参相似，但功力较弱。因此，本研究旨在复方党参的基础上进行改造，形成低毒高效的抗高原缺氧中药组合物——复方人参，并进行药效评价和作用机制研究，从而为临床研究提供一种新的方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

昆明小鼠，雄性，6 周龄，体质量 18~22 g，购自山东济南朋悦实验动物繁育有限公司，实验动物生产许可证号：SCXK（鲁）20190003。所有小鼠在实验开始前均适应性饲养 3~5 d，饲养环境保持 12 h 光照/12 h 黑暗周期，昼夜规律。该研究通过江苏师范大学动物伦理委员会审批（审批号：JSNU-IACUC-2024004）。

### 1.2 药物

党参、丹参、当归、北沙参、西洋参颗粒剂（批号分别为 A1089121、A1072291、A1079251、A2029151、A1021261，广东一方制药有限公司）；金果榄提取物（批号 SNT220705，扶风斯诺特生物科技有限公司）。

### 1.3 试剂

异丙肾上腺素（isoproterenol，ISO）（批号 I5627，美国 Sigma 公司）；丙二醛（malondialdehyde，MDA）测定试剂盒、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）测定试剂盒、乳酸脱氢酶（lactic dehydrogenase，LDH）测定试剂盒、肌酸激酶（creatine kinase，CK）测定试剂盒（批号分别为 20211124、20221008、20221012、20221123、20221202，南京建成生物工程研究所）。

### 1.4 仪器

FA1004 型电子天平（上海越平公司）；Flex Station3 型多功能酶标仪（Molecular Devices 公司）；XB70-FZ 型制冰机（Grant 公司）；MLS-3750 型高压蒸汽灭菌锅（三洋公司）；M-Q Reference 型超纯水机（Millipore 公司）；FlexStation 3 多功能酶标仪（Molecular Devices 公司）；ViiA™7 实时荧光定量 PCR 仪（赛默飞公司）。

### 1.5 动物分组与给药

复方党参（compound Dangshen，CDS）处方临床推荐人用中药剂量为每天 19.2 g，其中党参 10.56 g、丹参 2.88 g、当归 2.88 g、北沙参 1.92 g、金果榄 0.96 g。折算成小鼠每日复方党参给药量 3.2 g/kg，其中党参 1.76 g/kg、丹参 0.48 g/kg、当归 0.48 g/kg、北沙参 0.32 g/kg、金果榄 0.16 g/kg。使用颗粒剂和提取物配制复方党参，根据各药物的颗粒剂（提取物）：中药饮片的比例分别计算出小鼠每日服用复方党参颗粒剂（提取物）给药量为 2.5 g/kg，其中党参 1.76 g/kg、丹参 0.24 g/kg、当归 0.32 g/kg、北沙参 0.128 g/kg、金果榄 0.053 g/kg。

复方人参（compound ginseng，CGS）每日人用中药剂量与复方党参处方保持一致，即为每天 19.2 g，其中人参 10.56 g、丹参 2.88 g、当归 2.88 g、北沙参 1.92 g、金果榄 0.96 g。折算成小鼠每

日复方人参中剂量给药量 3.2 g/kg，其中人参 1.76 g/kg、丹参 0.48 g/kg、当归 0.48 g/kg、北沙参 0.32 g/kg、金果榄 0.16 g/kg。使用颗粒剂和提取物配制复方人参中剂量，根据各药物的颗粒剂（提取物）：中药饮片的比例分别计算出小鼠每日服用复方人参中剂量颗粒剂（提取物）给药量为 1.4 g/kg，其中人参 0.704 g/kg、丹参 0.24 g/kg、当归 0.32 g/kg、北沙参 0.128 g/kg、金果榄 0.053 g/kg；复方人参低剂量和高剂量分别为中剂量的 1/2 倍和 2 倍（即 0.7 g/kg 和 2.8 g/kg）。

密闭缺氧实验和亚硝酸钠中毒实验：将 120 只实验昆明雄性小鼠（ $20\pm 2$  g）随机分成 6 组，分别为空白对照组（control, Con）、模型组（model, Mod）、复方党参组（2.5 g/kg）、复方人参低、中、高剂量组（0.7、1.4、2.8 g/kg）。复方党参组、复方人参低、中、高剂量组灌胃对应受试药物，空白对照组、模型组给予等量生理盐水，每日一次，每次灌胃 10 mL/kg，连续灌胃 21 d。

急性脑缺血实验：将 50 只小鼠随机分为 5 组，分别为模型组、复方党参组（2.5 g/kg）、复方人参低、中、高剂量组（0.7、1.4、2.8 g/kg）。复方党参组、复方人参低、中、高剂量组灌胃对应受试药物，模型组给予等量生理盐水，每日一次，每次灌胃 10 mL/kg，连续灌胃 21 d。

全心缺血缺氧实验：将 70 只小鼠随机分为 7 组，分别为空白对照组、缺氧组（hypoxia, Hy）、模型组、复方党参组（2.5 g/kg）、复方人参低、中、高剂量组（0.7、1.4、2.8 g/kg）。复方党参组、复方人参低、中、高剂量组灌胃对应受试药物，空白对照组、缺氧组、模型组给予等量生理盐水，每日一次，每次灌胃 10 mL/kg，连续灌胃 7 d。

实验期间以标准饲料喂养，自由饮水、摄食。

## 1.6 构建缺氧损伤模型

### 1.6.1 密闭缺氧实验

于末次灌胃 1 h 后，除空白对照组外，将其余各组小鼠分别放入盛有 5 g 钠石灰的 250 mL 磨口瓶内（每瓶 1 只），用凡士林封瓶口，盖严，使之不漏气，立即计时，以呼吸停止为计时终点，观察并记录每只小鼠的常压密闭缺氧的存活时间。

### 1.6.2 亚硝酸钠中毒实验

于末次灌胃 1 h 后，除空白对照组外，各组动物按 240 mg/kg BW 剂量腹腔注射亚硝酸钠（注射量为 10 mL/kg），立即计时，记录动物存活时间。

### 1.6.3 急性脑缺血实验

于末次灌胃 1 h 后，各组动物自颈部逐只断头，立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停止时间和喘气次数。

### 1.6.4 全心缺血缺氧实验

于末次灌胃 0.5 h 后，除空白对照组、缺氧组外，皮下注射 20 mg/kg BW 剂量的异丙肾上腺素

(注射量为 10 mL/kg)。缺氧组小鼠注射生理盐水, 注射 15 min 后, 除空白组小鼠外, 将每只小鼠分别放入钠石灰密闭容器中, 以呼吸停止为指标建造全心缺血模型, 记录死亡时间。

### 1.7 氧化应激指标检测

小鼠死亡后, 眼球取血, 放入 1.5 mL EP 管中, 3 500 r/min, 离心 10 min, 收集上清液, 得血清。按照相应试剂盒说明书步骤操作, 测定血清中 MDA 含量、SOD 活性和 GSH-Px 活力。

### 1.8 LDH 和 CK 活力测定

小鼠死亡后, 眼球取血, 放入 1.5 mL EP 管中, 3 500 r/min, 离心 10 min, 收集上清液, 得血清。测定小鼠血清中 LDH 和 CK 活力。

### 1.9 复方人参抗缺氧作用的网络药理学分析

#### 1.9.1 复方人参活性成分和靶点预测

通过 TCMSp 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 筛选出复方人参主要活性成分, 筛选条件为口服利用度 (oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ , 耐药性 (drug likeness, DL)  $\geq 0.18$ ; 再通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 匹配出各活性成分对应的靶点。

#### 1.9.2 缺氧疾病的作用靶点预测

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org>) 和 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 中对疾病靶点进行线索, 关键词为“hypoxia”, 检索后合并各数据库的靶点, 去除重复的靶点, 最终获得缺氧疾病靶点。

#### 1.9.3 复方人参活性成分靶点与缺氧疾病靶点网络图的构建与分析

利用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 分析复方人参和缺氧疾病的交集靶点, 绘制成 Venn 图。将复方人参活性成分和关键作用靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件中, 建立“药物-活性成分-关键靶点”调控网络。

#### 1.9.4 交集作用靶点的蛋白-蛋白互相作用网络构建与分析

将交集靶点输入到 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>), 生物种类选择“Homo sapiens”, 得到 PPI 网络, 将其对应的 TSV 文件导入 Cytoscape3.7.2 软件中建立可视化蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 交互网络。

#### 1.9.5 GO 和 KEGG 分析

将交集靶点导入到 Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>), 利用数据库中的 GO 基因功能, 从分子功能 (molecular function, MF), 生物过程 (biological process, BP) 和细胞分子功能 (cellular component, CC) 三个方面阐述复方人参抗缺氧能力的作用靶点蛋白在基因功能中的作用。为了进一步解释复方人参抗缺氧作用的作用靶点在信号通路中的作用, 进行

KEGG 富集分析。最后将所有结果保存，并通过微生信平台对结果进行分析，从而预测复方人参抗缺氧能力的可能作用机制。

### 1.9.6 复方人参对缺氧疾病作用活性成分与作用靶点分子对接分析

通过 MOE 2022 对核心活性成分与对应靶点进行分子对接以验证成分与靶点的结合性强弱：在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取核心活性成分的 2D 结构并保存至 MOE 中，使用内部优化模块对成分结构进行能量最小化处理以获取最稳定的分子构象。在 PDB 数据库 (<http://www1.rcsb.org/>) 中以 AKT1、HIF1A、JUN、ESR1、为关键词检索靶点的 3D 蛋白晶体结构，筛选条件为分辨率小于 3，且有多个小分子配体。结构导出至 MOE 中删除结构中的水分子，添加非极性氢，生成对接空腔口袋。靶点蛋白与成分对接方式为全原子对接，每个靶点计算输出 10 个对接稳定构象，选择结合能小于 -5 kcal/mol 的构象为对接较好构象。

### 1.10 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF 基因 mRNA 表达量检测

小鼠死亡后，剖取小鼠的脑组织，提取脑组织总 RNA。本实验采用 RT-qPCR 研究复方人参对密闭缺氧实验后小鼠脑组织中缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 基因和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 基因 mRNA 表达的影响。首先在 PubMed 上找到待测基因的序列和 GAPDH 内参序列，然后利用引物设计软件 Premier 5.0 对引物进行设计，引物见表 1 所示。接着对小鼠脑组织中的中 RNA 进行逆转录过程，最后逆转录得到的 cDNA 产物进行 RT-qPCR 检测。

表 1 RT-qPCR 目的基因引物序列及反应条件

Table 1 Primer sequences used for quantitative real-time PCR reactions and reaction conditions

基因 Gene	序列 Sequence
HIF-1 $\alpha$	F: 5'-TGCGTGCATGTCTAATCTGTTCC-3' R: 5'-AAGATTCTGACATGCCACATAGCTC-3'
VEGF	F: 5'-GAGCGTTCACTGTGAGCCTTGT-3' R: 5'-TTAACTCAAGCTGCCTCGCCT-3'
GAPDH	F: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' R: 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'

### 1.11 统计学处理方法

数据分析采用 SPSS 26.0 软件，并用 GraphPad Prism 8.0 软件作图；实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示；多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)， $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 复方人参对不同缺氧模型上小鼠存活时间和喘气时间的影响

密闭缺氧实验和亚硝酸钠中毒实验结果如图 1 所示。在密闭缺氧实验中，与模型组相比，复方人参低、中、高剂量组可以显著延长小鼠的存活时间 ( $P<0.05$ )，而复方党参仅有延长趋势 (见图 1A)。在亚硝酸钠中毒实验，复方人参中、高剂量组可以明显提高小鼠的存活时间，与模型组相比具有统计学意义 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )，复方党参对小鼠的存活时间没有明显的延长作用 (见图 1B)。急性脑缺血实验结果如图 2 所示。与模型组相比，复方党参和复方人参中、高剂量组小鼠的喘气时间明显延长 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ) (见图 2A)，但喘气次数仅有复方人参高剂量组显著升高 ( $P<0.05$ ) (见图 2B)。以上实验结果表明，复方人参具有提高机体耐缺氧作用。

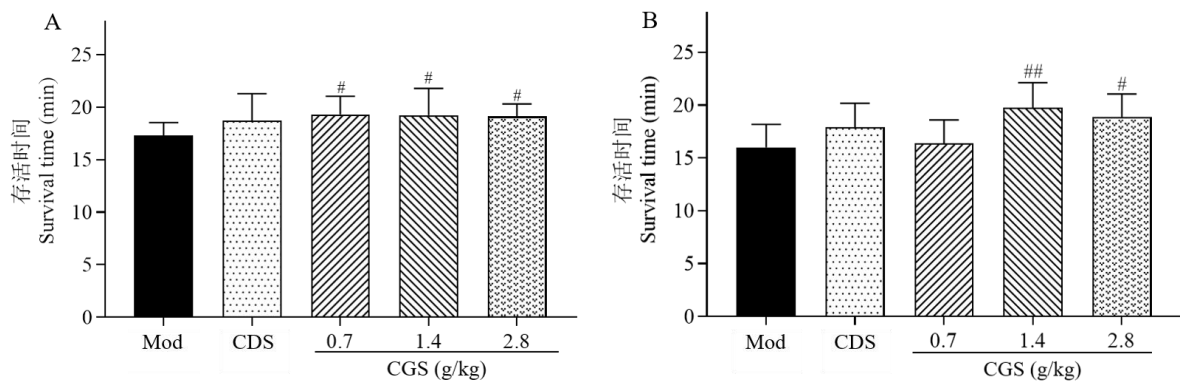


图 1 复方人参对密闭缺氧实验和亚硝酸钠中毒实验中小鼠存活时间的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8-10$ )

Fig.1 Effect of CGS on the survival time of atmospheric pressure hypoxia tolerance experiment and sodium nitrite poisoning experiment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8-10$ )

注：(A) 密闭缺氧实验；(B) 亚硝酸钠中毒实验。与模型组比较， $\#P<0.05$ ， $\#\#P<0.01$ 。Note: (A) Atmospheric pressure hypoxia tolerance experiment; (B) Sodium nitrite poisoning experiment. Compared with Mod,  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$ .

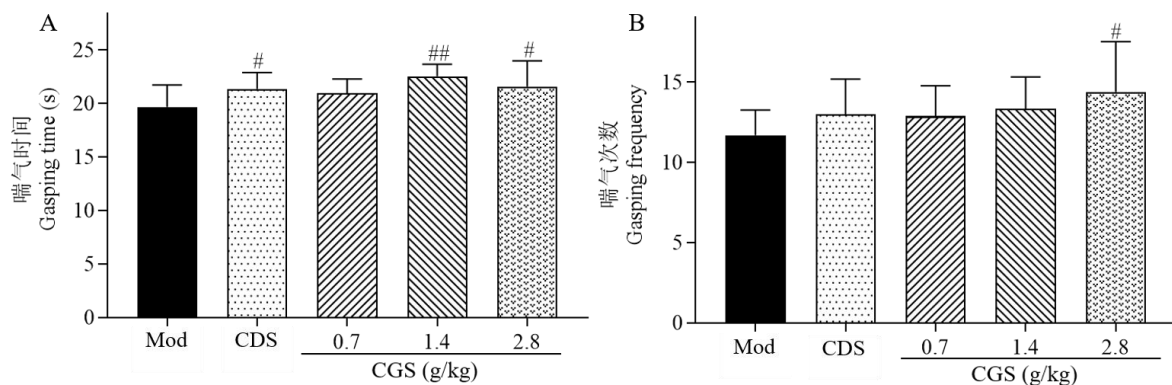


图 2 复方人参对急性脑缺血实验中小鼠喘气时间和喘气次数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9、10$ )

Fig. 2 Effect of CGS on the gasping time and gasping frequency of acute cerebral ischemia experiment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9, 10$ )

注：与模型组比较， $\#P<0.05$ ， $\#\#P<0.01$ 。Note: Compared with Mod,  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$ .

## 2.2 复方人参对全心缺血缺氧实验中小鼠存活时间的影响

全心缺血缺氧实验见图 3。与缺氧组相比，模型组小鼠存活时间显著缩短 ( $P<0.001$ )，表明异丙肾上腺素造模引起小鼠心肌缺血缺氧，降低了机体抵抗密闭缺氧的能力；与模型组相比，复方人参中剂量组小鼠存活时间明显延长 ( $P<0.05$ )，表明复方人参对异丙肾上腺素所致小鼠心肌缺血缺

氧损伤具有一定的保护作用。

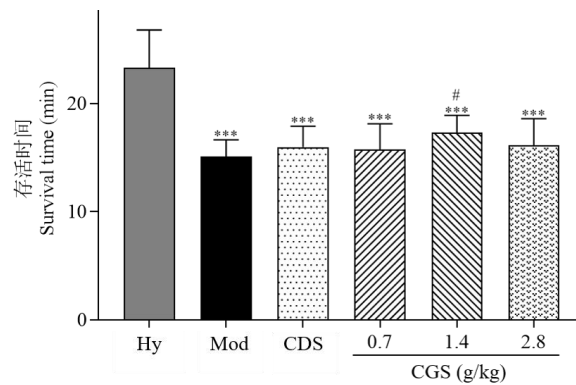


图3 复方人参对全心缺血缺氧实验中小鼠存活时间的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9、10$ )

Fig.3 Effect of CGS on the survival time of whole heart ischemia and hypoxia experiment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9, 10$ )

注: 与缺氧组比较, \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。Note: Compared with Hy, \*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with Mod, # $P < 0.05$ .

### 2.3 密闭缺氧和亚硝酸钠中毒实验中复方人参对小鼠血清中氧化应激指标的影响

MDA 含量结果见图 4, 在密闭缺氧实验中, 与空白对照组相比, 模型组实验小鼠血清中 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 复方党参和复方人参低、中、高剂量组小鼠血清中 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) (见图 4A)。在亚硝酸钠中毒实验中, 与空白对照组相比, 模型组实验小鼠血清中 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 复方党参和复方人参中、高剂量组小鼠血清中 MDA 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) (见图 4B)。

SOD 活性结果见图 5, 在密闭缺氧实验中, 模型组小鼠血清中 SOD 活性与空白对照组相比显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 复方人参低、中、高剂量组小鼠血清中的 SOD 活性显著升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (见图 5A)。在亚硝酸钠中毒实验中, 与空白对照组相比, 模型组小鼠血清中 SOD 活性明显下降 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 复方党参和复方人参低、中、高剂量组小鼠血清中的 SOD 活性都明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) (见图 5B)。

GSH-Px 活力结果见图 6, 在密闭缺氧实验中, 模型组小鼠血清中 GSH-Px 活力与空白对照组相比显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 复方党参和复方人参低、中、高剂量组小鼠血清中的 GSH-Px 活力显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) (见图 6A)。在亚硝酸钠中毒实验中, 与空白对照组相比, 模型组小鼠血清中 GSH-Px 活力明显下降 ( $P < 0.001$ ); 与模型组相比, 复方人参低、中、高剂量组小鼠血清中 GSH-Px 活力明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ) (见图 6B)。



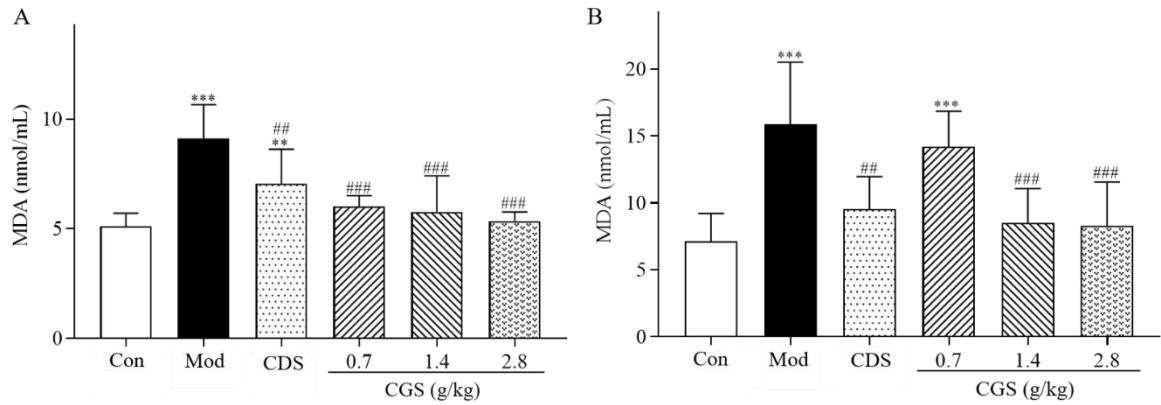


图4 复方人参对小鼠血清中的MDA含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig.4 Effect of CGS on MDA content in serum of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

注: (A) 密闭缺氧实验; (B) 亚硝酸钠中毒实验。与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , 下同。Note: (A) Atmospheric pressure hypoxia tolerance experiment; (B) Sodium nitrite poisoning experiment. Compared with Con, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with Mod, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , the same below.

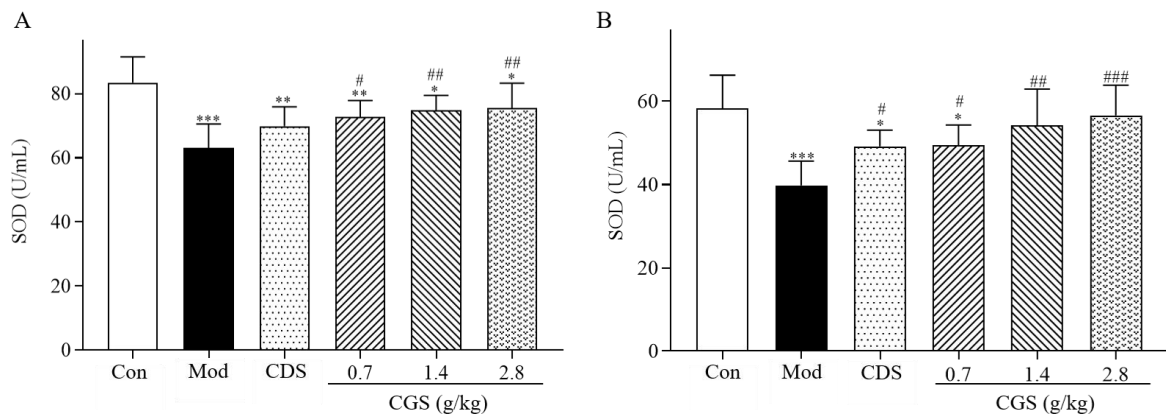


图5 复方人参对小鼠血清中的SOD活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig.5 Effect of CGS on SOD activity in serum of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

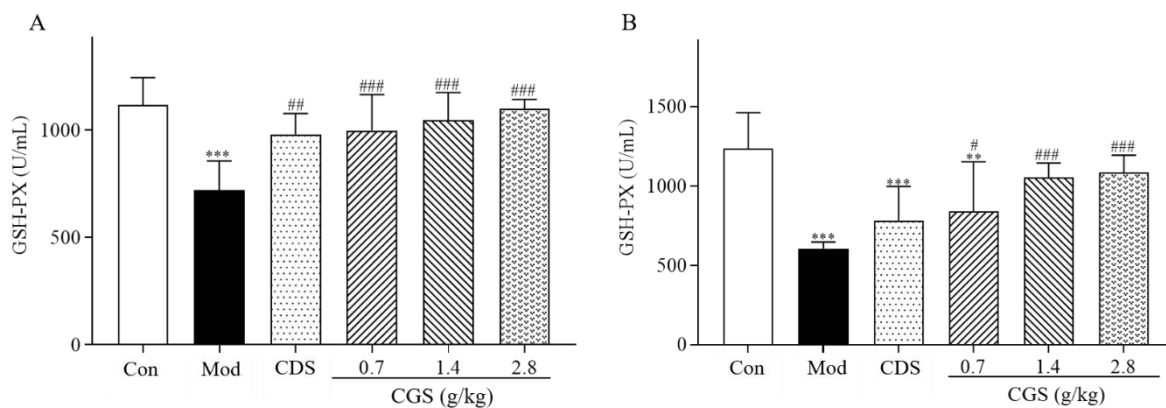


图6 复方人参对小鼠血清中GSH-PX活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig.6 Effect of CGS on GSH-Px activity in serum of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 2.4 复方人参对心肌缺血缺氧小鼠血清中LDH和CK活力的影响

结果见图 7。与空白对照组相比，异丙肾上腺素所致心肌缺血缺氧模型组小鼠血清中 LDH 和 CK 活力显著升高 ( $P<0.001$ )。与模型组相比，复方党参和复方人参低、中、高剂量组均能显著降低小鼠血清中的 LDH 和 CK 活力 ( $P<0.001$ )。

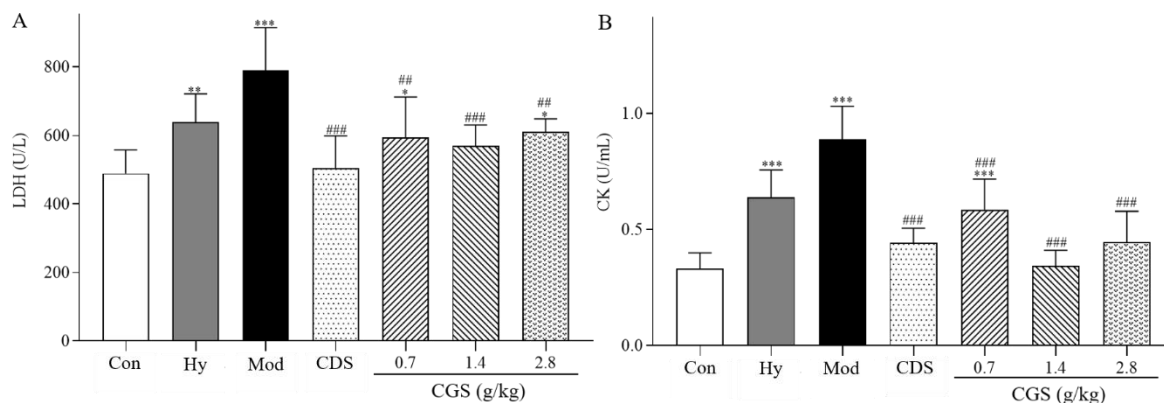


图 7 复方人参对全心缺血缺氧实验后小鼠血清中 LDH 和 CK 活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig.7 Effect of CGS on LDH and CK activity in serum of mice after whole heart ischemia and hypoxia experiment ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

## 2.5 网络药理学分析结果

### 2.5.1 复方人参和缺氧疾病相互作用靶点的筛选

利用 TCMSP 数据库对复方人参活性成分及靶点进行检索，经 Uniprot 数据库校正后，得到复方人参活性成分 98 个，对应的靶点 1 364 个，去除重复靶点并校正后，共筛选出 227 个复方人参活性成分作用靶点（见图 8）。从 GeneCards、DisGeNET 及 OMIM 数据库获得缺氧疾病靶点，合并后删除重复值，最终得到 6 121 个缺氧相关靶点。将复方人参活性成分靶点与疾病作用靶点整合，通过韦恩图得到交集靶点 94 个（见图 9）。将韦恩图得到的交集靶点通过 Cytoscape 3.7.2 软件建立药物-活性成分-关键靶点网络，该网络由 156 个节点和 479 条边组成，菱形节点代表药物，蓝色圆形节点代表活性成分，红色圆形节点代表目标蛋白，每条边代表活性成分、靶点与药物之间的相互作用关系（见图 10）。网络关系图显示，药物-活性成分-关键靶点之间有着密切的关系，根据节点度值将网络关系图中的活性成分进行排序，排名前 5 的活性成分为槲皮素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、丹参酮 IIA（见表 2），表中编号与图 10 中的活性成分编号相对应。

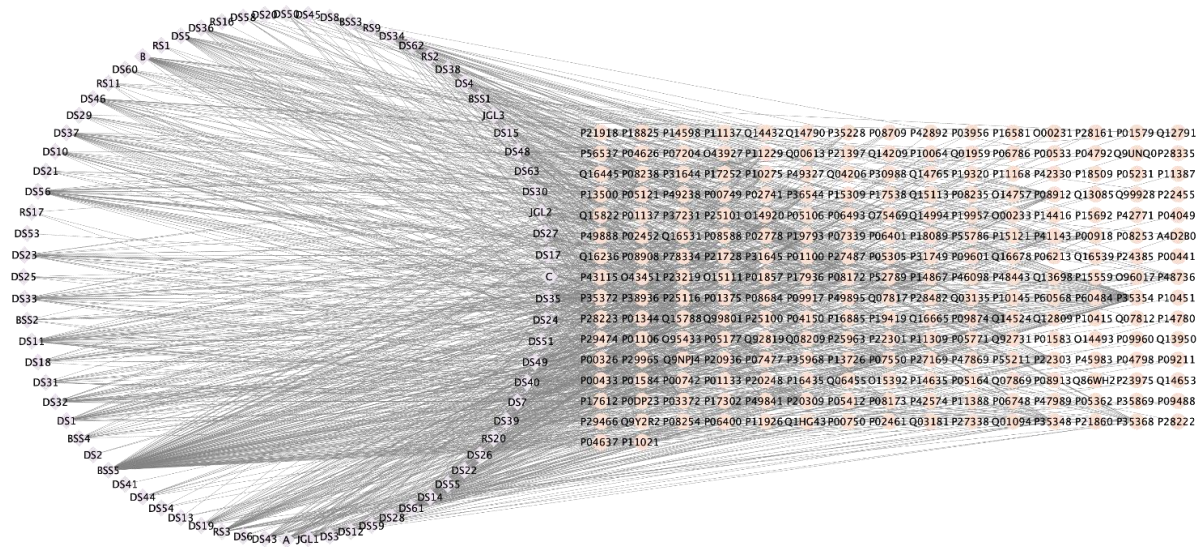


图 8 复方人参活性成分-靶点图

Fig.8 Active ingredient-target map of CGS

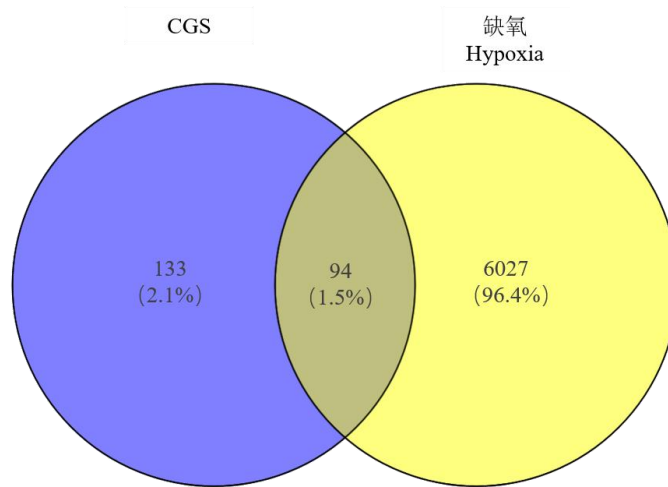


图 9 缺氧作用靶点与复方人参活性成分靶点韦恩图

Fig.9 Venn diagram of hypoxia action target and CGS active ingredient target

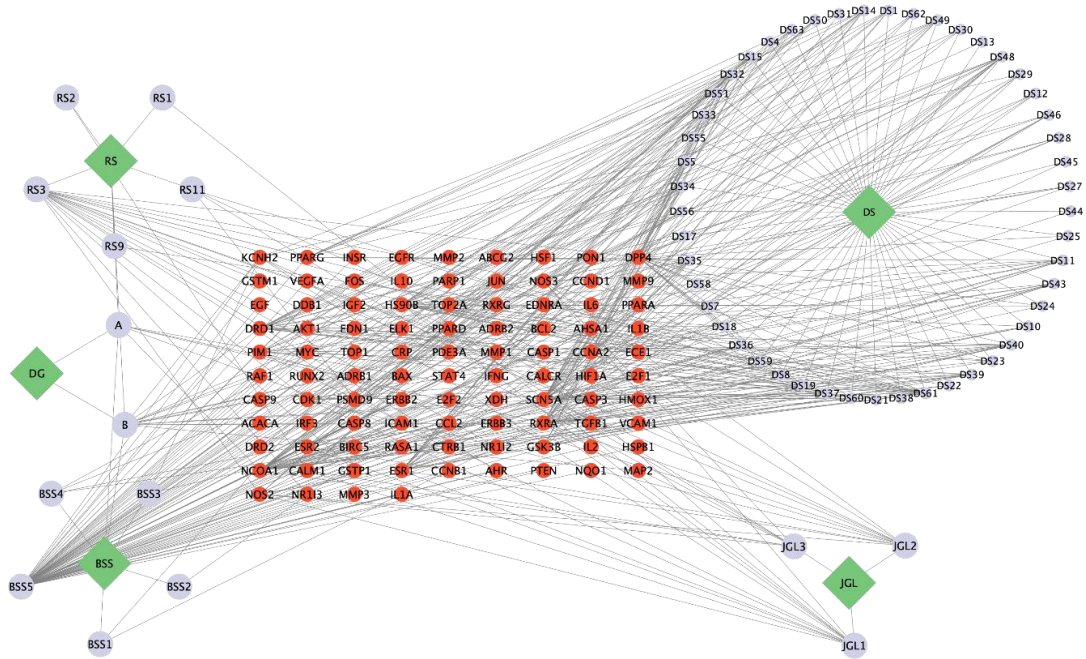


图 10 药物-活性成分-关键靶点网络

Fig.10 Drug-active ingredient-key target network

注：RS：人参；DG：当归；BSS：北沙参；DS：党参；JGL：金果榄。Note: RS: Ginseng Radix et Rhizoma; DG: Angelicae Sinensis Radix; BSS: Glehniae Radix; DS: Codonopsis Radix; JGL: Tinosporae Radix.

表 2 复方人参抗缺氧主要活性成分

Table 2 The main active ingredient of CGS for anti-hypoxia

编号 No.	成分 Ingredient	度值 Degree value	紧密度 Tightness
BSS5	槲皮素 Quercetin	43	1.000
RS3	山柰酚 Kaempferol	19	0.574
B	$\beta$ -谷甾醇 $\beta$ -sitosterol	14	1.000
A	豆甾醇 Stigmasterol	10	1.000
DS61	丹参酮 IIA Tanshinone IIA	10	0.500
DS8	多酚黄酮 Polyphenol flavonoids	5	0.422
RS11	人参皂苷 Rh <sub>2</sub> Ginsenoside Rh <sub>2</sub>	5	0.393
RS20	金英花碱 Chrythaline	3	0.376
DS1	1,2,5,6-四溴己烷 1,2,5,6-Tetrabromohexane	2	0.386
DS11	2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮	2	0.386
DS15	2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-(3-羟丙基)-7-甲氧基-3-苯并呋喃甲醚 2-Isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3-benzofuran	2	0.386

formaldehyde			
DS4	柳杉酚 Taxol	2	0.386
DS5	脱氢丹参酮 IIA Dehydrotanshinone IIA	2	0.386
DS56	丹酚 Salvianol	2	0.386
RS1	己二酸二异辛酯 Diisooctyl adipate	2	0.368
RS16	人参二醇 Ginsediol	2	0.368
RS17	苏齐内酯 Suzinolide	2	0.368
RS2	苦参 Sophora sophora	2	0.368

### 2.5.2 复方人参抗缺氧能力核心靶点的筛选

为了探寻复方人参活性成分与缺氧疾病的交集靶点之间的作用关系，将 94 个交集靶点导入 String 数据库形成 PPI 关系网。得到节点 94 个，边 1 356 条，平均度值 28.9（见图 11A）。将数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件中，绘制出交集靶点之间的蛋白互作网络（见图 11B）。分别以大于平均度值和大于 2 倍平均度值为筛选标准筛选靶点，将大于 2 倍平均度值的靶点作为核心靶点，筛选出 8 个靶点作为核心靶点，分别为 AKT1、HIF1A、JUN、ESR1、CASP3、IL6、EGFR、MYC。

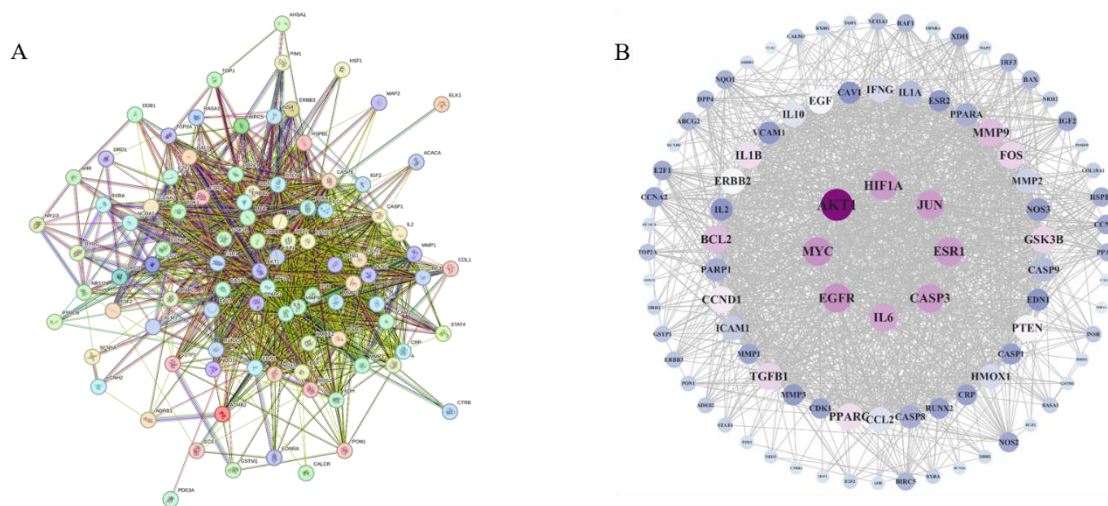


图 11 抗缺氧成分-缺氧疾病交集靶点图

Fig.11 Target diagram of the intersection of anti-hypoxic components and hypoxic diseases

注：（A）复方人参抗缺氧的 PPI 网络；（B）药物-疾病核心靶点图。Note: (A) PPI network of CGS for anti-hypoxia; (B) Drug disease core target map

### 2.5.3 复方人参抗缺氧能力主要通路分析

为了进一步探究复方人参活性成分对缺氧疾病的影响及作用机制，对 113 个关键靶点通过 Metascape 平台进行 GO 和 KEGG 分析。分别得到 4 445 个生物进程，627 个分子功能，381 个细胞

组成，利用微生信在线平台，对前 20 条 GO 富集数据进行了气泡图的绘制。每张图左侧为排名靠前的富集名称，气泡的颜色由绿色到红色表示  $\log(P\text{-value})$  从最小到最大，气泡越大表示该通路的基因计数 (count) 越大。涉及的主要 GO 进程 (见图 12A~12C)。

为了揭示复方人参活性成分对缺氧疾病的相关通路，通过 KEGG 分析，得到 226 个相关通路，包括：癌症信号通路、脂质与动脉粥样硬化信号通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、乙型肝炎途径、化学致癌-受体活化信号通路、癌症中的蛋白聚糖信号通路、HIF1 信号通路、细胞衰老信号通路、松弛素信号通路等，筛选了前 20 条途径，并通过微生信在线平台绘制了气泡图 (见图 12D) 结果显示配方对缺氧相关途径有着密切联系，并符合 PPI 与 GO 富集结果。选取其中参与靶点数多且可信度高的 HIF-1 $\alpha$  信号通路进行后续验证。

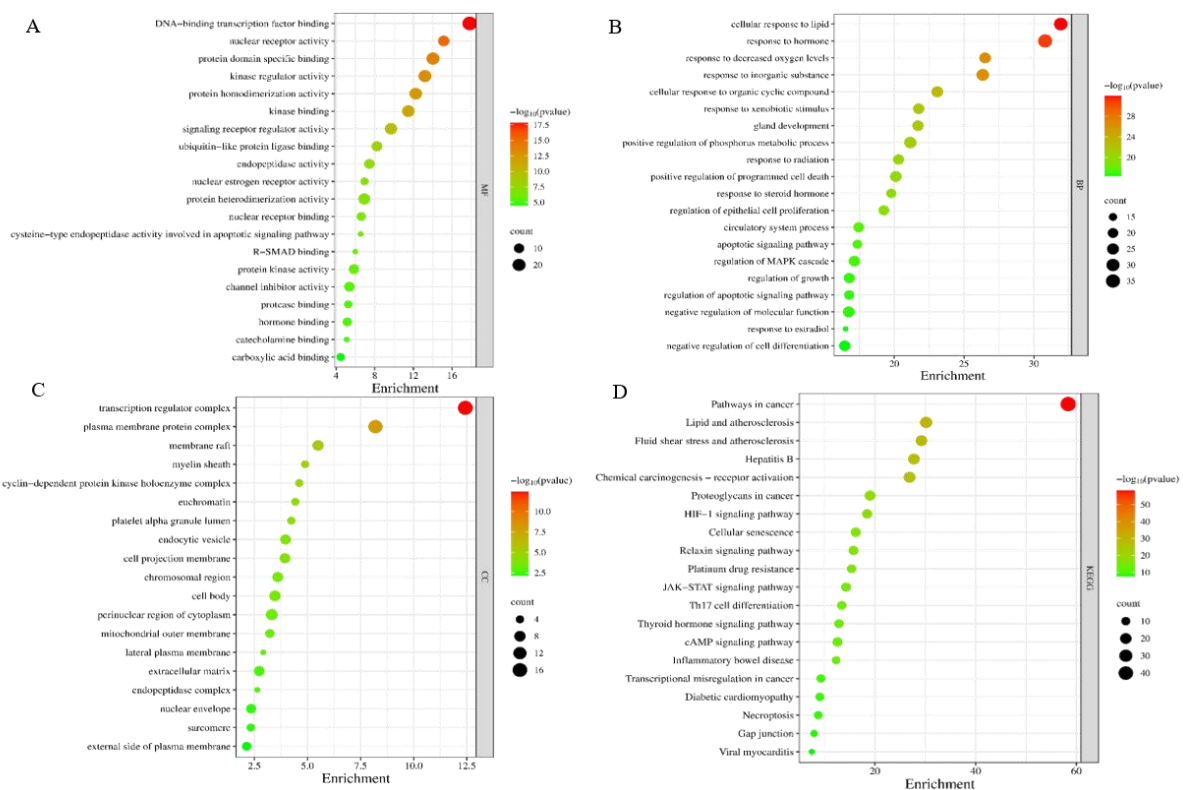


图 12 复方人参抗缺氧能力主要通路分析图

Fig.12 Analysis of main pathways of anti-hypoxia ability of CGS

注：(A) GO-MF；(B) GO-BP；(C) GO-CC；(D) KEGG。

#### 2.5.4 复方人参活性成分与作用靶点分子对接分析

为了验证复方人参中活性成分与机体内作用靶点间的亲和性，选取核心靶点的前 4 位与对应活性成分进行分子对接，靶点与成分间的对应关系见表 3。在 PDB 数据库中，对 AKT1、HIF1A、JUN、ESR1 这四个关键靶点进行检索，预处理后与能量最低化的成分分子构象进行全原子对接，对接时，结合能越小，结合越稳定。活性成分与靶点分子对接最佳构象见图 13。结果显示：AKT1

与木犀草素、HIF1A 与槲皮素、JUN 与丹参酮 IIA 以及 ESR1 与氢丹参内酯对接活性较高，其相互作用方式主要有：氢键、芳烃链间的相互作用等，提示复方人参中的这些活性成分可能起到内源性配体的作用，与机体内对应靶蛋白特异性结合，发挥抗缺氧作用。

**表 3 复方人参抗缺氧关键靶点对应活性成分**

Table 3 Active ingredients corresponding to key targets of CGS for anti-hypoxia

基因 Gene	活性成分 Active ingredient	活性成分来源 Source of active ingredient
AKT1	山柰酚、木犀草素、槲皮素	人参、丹参、北沙参
HIF1A	槲皮素	北沙参
JUN	$\beta$ -谷甾醇、丹参酮 IIA、槲皮素	人参、丹参、当归
ESR1	脱氢丹参酮 IIA、2-异丙基-8-甲基菲-3,4-二酮、4-亚甲基米尔顿、2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-5-(3-羟丙基)-7-甲氧基-3-苯并呋甲醛、沙维酮、丹参新醌 D、丹参螺缩酮内酯、去羟新隐丹参酮、氢丹参内酯、表丹参螺缩酮内酯、异隐丹参酮、异隐丹参酮 II、丹参环庚三烯酚酮、新隐丹参酮 II、紫草酸、(2R)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-[(Z)-3-(1,4-二羟基苯)丙烯酰基]氧基丙酸、丹参酮 VI、木瓣树胺、黄藤素	丹参、金果榄

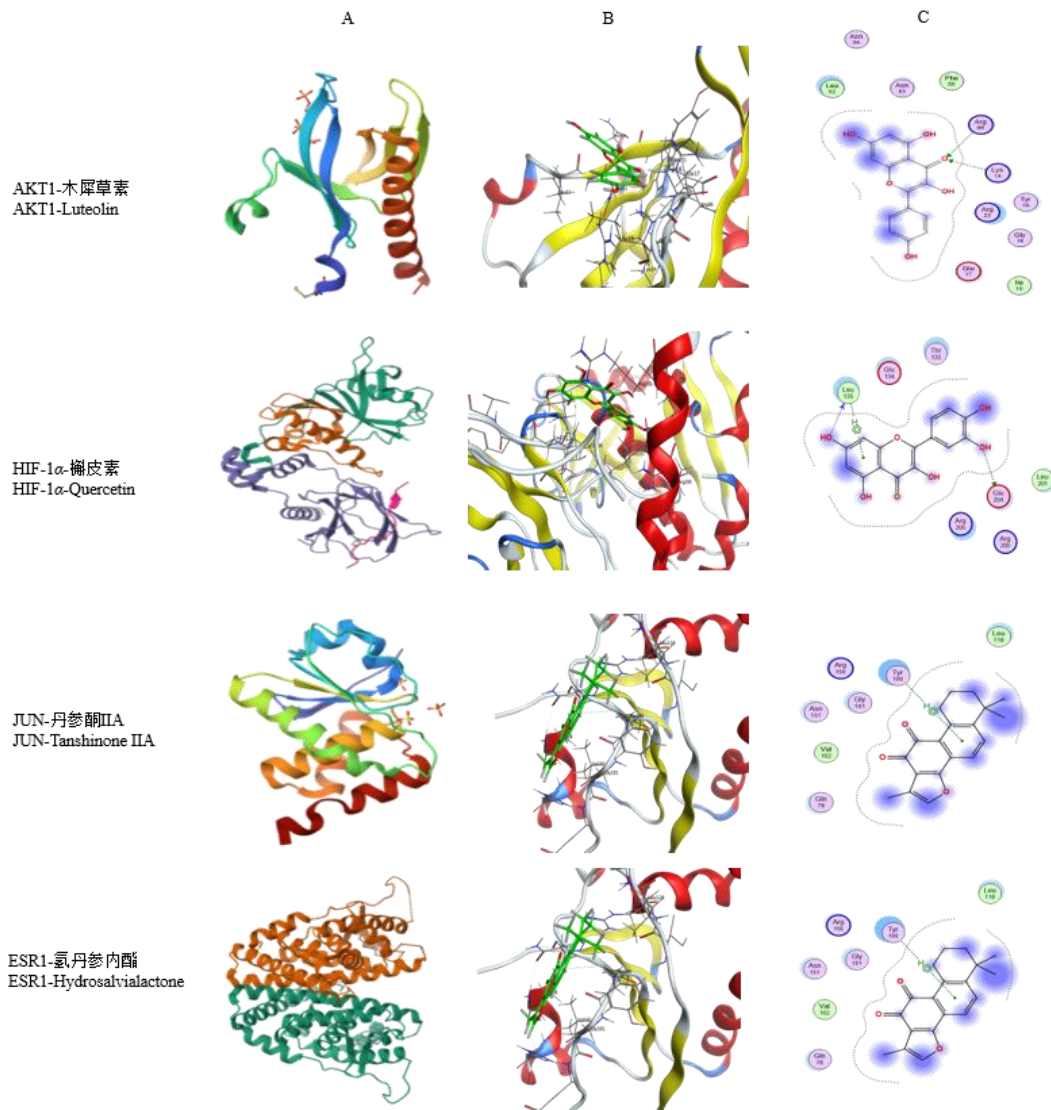


图 13 分子对接模式图

Fig.13 Molecular docking pattern diagram

注：（A）靶点蛋白晶体结构；（B）活性成分与靶点蛋白间的最佳对接构象；（C）对接相互作用 2D 平面展示。

Note: (A) Crystal structure of the target protein; (B) Optimal docking conformation between the active ingredient and the target protein; (C) 2D planar display of docking interaction.

### 2.5.5 复方人参对密闭缺氧实验小鼠脑组织中 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF mRNA 表达的影响

结果见图 14，在密闭缺氧实验中，与空白对照组相比，模型组小鼠脑组织中的 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF mRNA 的表达量显著上调 ( $P<0.01$ )；与模型组相比，复方人参中、高剂量组小鼠脑组织中的 HIF-1 $\alpha$ 表达量明显上调 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )（见图 14A），VEGF 表达量显著下调 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )（见图 14B）；这表明复方人参抗缺氧能力可能与增加 HIF-1 $\alpha$ 聚积，从而恢复 VEGF 水平有关。



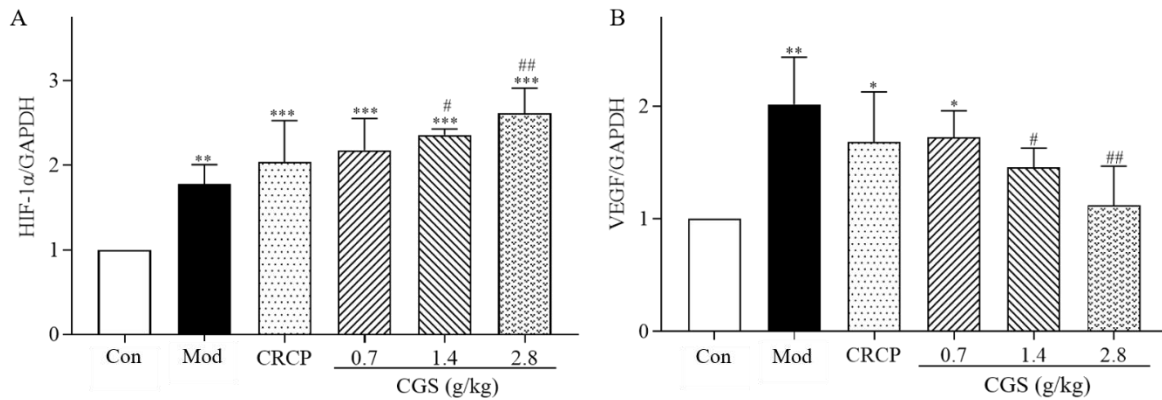


图 14 复方人参对密闭缺氧实验后小鼠脑组织中 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig.14 Effect of CGS on HIF-1 $\alpha$  and VEGF mRNA expression in brain tissue of mice after atmospheric pressure hypoxia tolerance experiment. ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, \* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ ；Compared with Mod, # $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

### 3 讨论与结论

缺氧作为一种病理过程，与心血管疾病、代谢综合症和癌症等的发生发展密切相关，严重时致机体组织、细胞的代谢、功能及形态发生病变，从而引起心或脑等重要器官因缺氧产生疾病或死亡。本文利用密闭缺氧实验、亚硝酸钠中毒存活实验、急性脑缺血实验以及心肌缺血缺氧实验评价复方人参的抗缺氧作用，结果显示，复方人参可以显著延长小鼠的存活时间、喘气时间和喘气次数。因此，复方人参是具有抗缺氧作用的。在缺氧状态下，机体内不完全氧化产物不断积累，导致小鼠组织氧化损伤<sup>[11]</sup>。缺氧造成 ROS 在线粒体呼吸链复合物 I、III 上大量产生<sup>[12,13]</sup>，攻击机体内的 DNA、脂质和蛋白质，引起氧化与抗氧化系统失衡，对心血管系统和神经系统造成损伤，这也是缺氧损伤引起生理或病理性反应的重要原因<sup>[14,15]</sup>。本实验结果显示，复方人参能显著降低小鼠血清中 MDA 水平，升高 SOD 活性和 GSH-Px 活力，表明复方人参能增强机体的抗氧化活性，从而减轻缺氧引起的氧化损伤对机体的损伤程度。在心肌缺血缺氧过程中，心肌中的 LDH 和 CK 等心肌酶因细胞膜完整性遭到破坏、通透性增强，从细胞内外漏至血清中，导致血清中的 LDH 和 CK 活性升高<sup>[16]</sup>。细胞膜的完整性和心肌受损程度通过 LDH 和 CK 的活性来表现<sup>[17]</sup>。本研究结果显示，复方人参能减少 LDH 和 CK 的释放，对心肌缺血缺氧有保护作用。

近年来，网络药理学的应用越来越广泛。网络药理学的出现否定了单一药物仅有单一靶点的模式，而是向着“多个靶点，多种成分”的模式发展。本研究采用网络药理学和分子对接预测复方人参对缺氧疾病的作用机制，筛选出复方人参与缺氧疾病的交集靶点。通路分析发现，HIF-1 信号通路、癌症信号通路、JAK-STAT 信号通路、cAMP 信号通路、细胞衰老信号通路等都参与缺氧的调节，这也说明了复方人参抗缺氧作用与缺氧疾病相关途径与代谢、炎症因子等有着密切联系。

HIF-1 $\alpha$ 是低氧信号通路中最关键的转录因子之一，在细胞感知、适应低氧过程中起至关重要的作用<sup>[18]</sup>，HIF-1 $\alpha$ 是氧稳态的主要调节器，控制氧的传递和利用，HIF-1 $\alpha$ 成为缺血缺氧状态下研究的热门课题，HIF-1 $\alpha$ 的非氧气依赖性调控途径十分复杂，与生长因子、活性氧自由基和金属离子及各种蛋白信号通路有关。常氧情况下，VEGF在较低水平维持血管密度和通透性；缺氧时表达增加，血管通透性也增加，结果表明复方人参抗缺氧能力可能与增加HIF-1 $\alpha$ 聚积，从而恢复VEGF水平有关，而HIF-1内源性保护机制具有多样性，其具体机制还需在体内体外实验中进行深入研究。

综上所述，本研究表明，复方人参可以显著性延长密闭缺氧实验和亚硝酸钠中毒实验小鼠的存活时间、急性脑缺血实验的喘气时间以及全心缺血缺氧实验小鼠的存活时间，这表明了复方人参具有耐缺氧作用。这些结果也证实了复方人参在缺氧导致的相关疾病中潜在的临床价值，为进一步的研究提供了基础。然而，本研究预设的缺氧条件单一，复方人参的抗缺氧作用还有需从多方面进行考查，复方人参应用于缺氧损伤的预防和治疗作用还需大量的临床研究来进一步证实。

#### 参考文献

- 1 Dzhaliilova D,Makarova O.Differences in tolerance to hypoxia:Physiological,biochemical,and molecular-biological characteristics[J].J Biomedicines,2020,8:428.
- 2 León-López J,Calderón-Soto C,Pérez-Sánchez M,et al.Oxidative stress in elite athletes training at moderate altitude and at sea level[J].Eur J Sport Sci,2018,18:832-841.
- 3 Wang JY,Ke T,Zhang XN,et al.Effects of acetazolamide on cognitive performance during high-altitude exposure[J].Neurotoxicol Teratol,2013,35:28-33.
- 4 Sarada SKS,Veeramohan,Himadri P,et al.Nifedipine inhibits hypoxia induced transvascular leakage through down regulation of NF $\kappa$ B[J].Respir Physiol Neurobiol,2012,183:26-34.
- 5 Chang KH,Yeh CM,Yeh CY,et al.Neonatal dexamethasone treatment exacerbates hypoxic-ischemic brain injury[J].Mol.Brain,2013,6:11.
- 6 Zhang M,Lin W,Tao XY,et al.Ginsenoside Rb1 inhibits ferroptosis to ameliorate hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J].Int Immunopharmacol,2023,121:16.
- 7 Qin RA,Lin J,Li C,et al.Study of the protective mechanisms of compound danshen tablet(Fufang Danshen Pian) against myocardial ischemia/reperfusion injury via the Akt-eNOS signaling pathway in rats[J].J Ethnopharmacol,2014,156:190-198.
- 8 Tang Y,Hou Y,Zeng Y,et al.Salidroside attenuates CoCl<sub>2</sub>-simulated hypoxia injury in PC12 cells partly by mitochondrial protection[J].Eur J Pharmacol,2021,912:10.
- 9 Zhang L,Liu Q,Lu L,et al.Astragaloside IV stimulates angiogenesis and increases hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

- accumulation via phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway[J].*J Pharmacol Exp Ther*,2011,338:485-491.
- 10 Zhao S,Jia N,Shen Z,et al.Pretreatment with notoginsenoside R1 attenuates high-altitude hypoxia-induced cardiac injury via activation of the ERK1/2-P90RSK-Bad signaling pathway in rats[J].*Phytother Res*,2023,37:4522-4539.
- 11 Yang DS,Lian JH,Wang LY,et al.The anti-fatigue and anti-anoxia effects of *Tremella* extract[J].*Saudi J Biol Sci*,2019,26:2052-2056.
- 12 Semenza GL.Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1[J].*Biochem J*,2007,405:1-9.
- 13 Klimova T,Chandel NS.Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF[J].*Cell Death Differ*,2008,15:660-666.
- 14 Li H,Zhang YF,Li R,et al.Effect of seasonal thermal stress on oxidative status,immune response and stress hormones of lactating dairy cows[J].*Anim Nutr(动物营养学报)*,2021,7:216-223.
- 15 Saleh J,Edeas M, Van Goor H.Antioxidant supplements and oxidative stress:The debate extends to the middle east[J].*Sultan Qaboos Univ Med J*,2019,19:e177-e180.
- 16 Li C,Zhang Y,Wang Q,et al.Dragon's Blood exerts cardio-protection against myocardial injury through PI3K-AKT-mTOR signaling pathway in acute myocardial infarction mice model[J].*J Ethnopharmacol*,2018,227:279-289.
- 17 Ahmed KKM,Rana AC,Dixit VK.Effect of *Calotropis procera* latex on isoproterenol induced myocardial infarction in albino rats[J].*Phytomedicine*,2004,11:327-330.
- 18 Lee CC,Wu CY,Yang HY.Discoveries of how cells sense oxygen win the 2019 nobel prize in physiology or medicine[J].*Biomed J*,2020,43:434-437.

收稿日期：2024-04-25      接受日期：

基金项目：江苏省研究生科研与实践创新计划项目（KYCX23-2908）

†共同第一作者

\*通信作者 E-mail:wh9588@sina.com, shiyongp@sina.com