

# 基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS和网络药理学 探究地龙抗疲劳作用机制

孟璇<sup>1\*</sup>, 王梦娇<sup>1</sup>, 赵天旸<sup>1</sup>, 张国忠<sup>1</sup>, 赵德龙<sup>1</sup>, 何希宏<sup>1</sup>, 赵化冰<sup>1</sup>, 贾立明<sup>2</sup>, 贾京华<sup>2</sup>, 张黎明<sup>1\*</sup>  
(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457) (2. 天津民生生物工程股份有限公司, 天津 301500)

**摘要:** 基于超高效液相色谱四级杆-飞行时间串联质谱技术 (Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 分析与网络药理学探究地龙活性成分的抗疲劳作用机制。通过 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 获得地龙化学成分信息, 收集成分作用靶点、疲劳和抗疲劳的基因靶点取交集, 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。利用 KEGG Mapper 初步阐明抗疲劳机制, 设计动物实验验证地龙抗疲劳功效。网络分析表明地龙抗疲劳主要集中在磷酸化的正向调节、核因子- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 信号通路、5-羟色胺能突触、JAK-STAT 通路和精氨酸和脯氨酸代谢通路等。动物实验结果表明, 与空白组相比, 地龙提取物中剂量组小鼠负重游泳实验时间由 9.78 min 延长至 34.07 min ( $P < 0.001$ ), 肝糖原含量显著升高, 高剂量组为 2 591.21 mg/g ( $P < 0.001$ ), 高剂量组小鼠尿素氮和血乳酸含量分别降低至 3.65 nmol/L 和 182.21 nmol/L ( $P < 0.01$ )。综上, 地龙通过多成分、多靶点、多途径的协同效应发挥抗疲劳作用, 为后续的抗疲劳机制研究提供新的思路与方法。

**关键词:** 地龙; 飞行时间串联质谱; 网络药理学; 抗疲劳

文章编号: 1673-9078(2025)03-21-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0001

## Clarification of Mechanism of Anti-fatigue Active Components Derived from Earthworms Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and Network Pharmacology

MENG Xuan<sup>1\*</sup>, WANG Mengjiao<sup>1</sup>, ZHAO Tianyang<sup>1</sup>, ZHANG Guozhong<sup>1</sup>, ZHAO Delong<sup>1</sup>, HE Xihong<sup>1</sup>,  
ZHAO Huabing<sup>1</sup>, JIA Liming<sup>2</sup>, JIA Jinghua<sup>2</sup>, ZHANG Liming<sup>1\*</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

(2. Tianjin Minsheng Bioengineering Co. Ltd., Tianjin 301500, China)

**Abstract:** The anti-fatigue mechanism of the active constituents of earthworm was clarified using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry/mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology. UHPLC-Q-TOF-MS/MS was used to identify chemical constituents of earthworm extract. The

引文格式:

孟璇,王梦娇,赵天旸,等.基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS和网络药理学探究地龙抗疲劳作用机制[J].现代食品科技,2025,41(3):21-33.

MENG Xuan, WANG Mengjiao, ZHAO Tianyang, et al. Clarification of mechanism of anti-fatigue active components derived from earthworms based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS and network pharmacology [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 21-33.

收稿日期: 2024-01-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22105145)

作者简介: 孟璇 (1991-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 天然产物的分离纯化及功效分析, E-mail: mengxuan@tust.edu.cn

共同通讯作者: 张黎明 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物研究与开发, E-mail: zhlm@tust.edu.cn

targets of these constituents and fatigue and anti-fatigue associated genes were collected to identify the common targets. Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed. KEGG Mapper was utilized to preliminarily elucidate the anti-fatigue mechanism, and animal experiments were performed to verify the anti-fatigue efficacy of earthworm extract. Network analysis showed that the anti-fatigue effects of earthworm extract mainly function via positive regulation of phosphorylation, NF- $\kappa$ B signaling pathway, serotonergic synapse signaling, JAK-STAT pathway, and arginine and proline metabolic pathways. As shown in the results of animal experiments, the time of weight-bearing swimming in mice in the middle-dose earthworm extract group was 34.07 min, significantly longer than that (9.78 min) of the CK group ( $P < 0.001$ ). Hepatic glycogen content in the high-dose earthworm extract group was 2 591.21 mg/g, which was significantly higher than that in the CK group ( $P < 0.001$ ). Urea nitrogen and blood lactic acid contents in the high-dose earthworm extract group were 3.65 nmol/L and 182.21 nmol/L, respectively, which was significantly lower than those of the CK group ( $P < 0.01$ ). In conclusion, the anti-fatigue effect of earthworm extract was exerted through synergistic effects of multiple constituents, targets, and pathways, providing valuable insights and methods for further research into anti-fatigue mechanisms.

**Key words:** Earthworm; TOF-MS/MS; network pharmacology; anti-fatigue

随着生活节奏的加快, 饮食不合理、缺乏运动和心理压力大等问题使得越来越多的人处于一种亚健康状态, 疲劳是其中较为常见的表现之一<sup>[1,2]</sup>。疲劳是一种复杂的生理现象, 由机体的中枢和周围神经介导, 具有不确定性、复杂性和持续性的特点<sup>[3,4]</sup>。长期处于疲劳状态会导致身体运动能力下降、出现焦虑、抑郁和睡眠障碍等问题, 还可能导致与免疫系统相关的疾病<sup>[5]</sup>。此外, 癌症、心血管病、风湿性关节炎、糖尿病患者也常常感觉疲劳<sup>[6]</sup>。疲劳可以通过适当的休息、摄入营养补充剂和药物得到缓解<sup>[7]</sup>。许多临床药物含有类似兴奋剂类的成分, 例如咖啡因、麻黄碱、苯丙胺等, 这些药物存在起效慢、副作用大, 具有成瘾性等问题, 不适合长期服用<sup>[8]</sup>。天然产物具有种类繁多、资源丰富、毒性和副作用小等优点, 因此, 开发天然产物作为抗疲劳药物是一个很好的策略<sup>[9]</sup>。

地龙 (Earthworm) 作为我国传统的动物药, 体内含有大量的营养物质, 如氨基酸、脂类、核苷酸和微量元素等<sup>[10]</sup>。研究发现, 地龙的天然免疫功能使其具有很高的药用价值。许多其他形式的替代药物受到动物试验的伦理和经济问题的限制, 但使用地龙在很大程度上避免这些限制<sup>[11]</sup>。现代药理学研究证实, 地龙具有溶栓、降压、抗癫痫、抗肿瘤和止咳平喘等多种药理作用<sup>[12,13]</sup>。深入研究发现, 地龙对疲劳也有显著影响, 地龙蛋白-牛磺酸胶囊能显著延长小鼠负重游泳时间<sup>[14]</sup>。近年来针对地龙的研究多集中在抗凝血、抗栓和抗菌等方面, 对其潜在抗疲劳特性的研究还不够充分, 其抗疲劳作用机制尚不清楚。因此, 本研究拟利用超高效液相

色谱四级杆-飞行时间串联质谱技术 (Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, UHPLC-Q-TOF-MS/MS) 阐明地龙的化学成分、网络药理学和小鼠水平实验来探究地龙抗疲劳的作用机制, 以论证地龙抗疲劳的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 KM 雄鼠 (18~22 g), 斯贝福 (北京) 生物科技有限公司, 许可证号码为 SYXK (津) 2018-0001。控制湿度 (50%~70%) 和温度 (20~24 °C) 下, 光/暗循环 12 h, 实验动物设施和实验方案经天津科技大学动物伦理委员会批准, 动物实验伦理许可证号: TUST.No20230415。

### 1.2 药物与试剂

地龙提取物 (含 20 000 IU/mg 蚓激酶), 天津民生生物工程股份有限公司; 尿素氮、血乳酸试剂盒 (批号: 20220915、20220923), 均购自南京建成生物工程研究所; 硫脲 (批号: C14181597)、葱酮 (批号: C13859691), 均购自麦克林; 乙腈 (色谱级, 批号: 1499230-935), 购自 Merck 公司; 乙酸铵 (色谱级, 批号: 73594), 购自 Sigma 公司; 甲醇、氨水 (色谱级, 批号: A456-4、A470-500), 均购自 Fisher 公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 仪器与设备

SECURA613-1CN 分析天平, 德国 Sartorius

公司; LG20-W 离心机, 北京京立离心机有限公司; Sunrise™ 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; AB Triple TOF 6600 质谱仪, 美国 Thermo 公司; Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; LGJ-10 真空冷冻干燥机, 河南信陵仪器设备有限公司; SHHF-48LD 多样品组织研磨仪, 上海贺帆仪器有限公司; G3KT18273 型旋涡混合器, 赛默飞世尔科技公司; Milli-Q IQ 7005 超纯水制备仪, Millipore 公司; QL-103 计时器, 和顺达电子科技有限公司; 水温计, 衡水市酷鑫科技有限公司。

## 1.4 地龙的UHPLC-Q-TOF-MS/MS检测

### 1.4.1 样品前处理

取地龙提取物 10 g, 加适量的去离子水溶解后, 100 u 透析袋透析 48 h 后, 将真空冷冻干燥机设置温度为 -60 °C, 真空度 1 Pa, 对样品进行冻干。取适量冻干后的样品加入预冷甲醇/乙腈/超纯水溶液 (2:2:1, V/V), 超声混匀, 上清液真空冷冻干燥。加入乙腈水溶液 (乙腈:超纯水=1:1, V/V) 溶解, 混匀后离心, 取上清液进样分析。

### 1.4.2 色谱条件

ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流动相为 A: 1 000 mL 超纯水 +25 mmol/L 乙酸铵 +25 mmol/L 氨水, B: 乙腈; 梯度洗脱程序如下: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~7 min, 95%~65% B; 7~8 min, 65%~40% B; 8~9 min, B 维持在 40%; 9~9.1 min, 40%~95% B; 9.1~12 min, B 维持在 95%。

### 1.4.3 质谱条件

雾化器电压 (Gas1) 为  $8.7 \times 10^3$  Pa, 辅助加热器电压 2 (Gas2) 为  $8.7 \times 10^3$  Pa, 气帘气 (CUR) 为  $4.35 \times 10^3$  Pa, 离子源温度为 600 °C。正负两种模式下将喷雾电压和去簇电压分别设定为  $\pm 5\ 500$  V 和  $\pm 60$  V, 碰撞能量设定为  $35 \pm 15$  V。

### 1.4.4 定性分析

利用 XCMS 软件对地龙提取物进行全离子流分析, 获得其总离子流图谱, 并将其相对分子质量、二级碎片等信息与已有的文献<sup>[15-20]</sup>进行比对, 确定其结构, 为地龙的成分研究提供理论依据。

## 1.5 网络药理学分析

### 1.5.1 活性成分的筛选与靶点预测

使用 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 Swiss ADME 数据库 ([www.swissadme.ch](http://www.swissadme.ch)) 筛

选 (Lipinski, Ghose, Veber, Egan and Muegge) 这五个类药性大于等于 2 个为 “Yes”, “Bioavailability Score” 大于等于 0.55 的为地龙活性成分。Swiss Target Prediction 数据库 ([swisstargetprediction.ch](http://swisstargetprediction.ch)) 预测化合物靶点。Uniport 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 进行数据校正, 剔除非人源基因, 校正后的靶点为地龙潜在靶点。

### 1.5.2 疲劳疾病靶点的筛选

以 “Fatigue” 和 “anti-fatigue” 为关键词, 采用 TTD ([db.idrblab.net](http://db.idrblab.net)); DisGeNET (<https://www.disgenet.org>) 和 GeneCards (<http://www.genecards.org>) 数据库查询靶点, 去重整理后即疲劳的潜在靶点。使用 Venny 2.1.0 获得地龙活性成分靶点和疾病靶点的交集靶点。

### 1.5.3 PPI蛋白互作网络分析和GO、KEGG富集分析

将 79 个交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>) 中, 以 “Homo sapiens” (combined score > 0.4) 为评价指标, 构建地龙-疲劳靶蛋白互作网络。将交集靶点导入 Cytoscape 3.9.1 中, 利用 NetworkAnalyzer 进行拓扑分析。使用 Metascape 平台对地龙抗疲劳相关靶点进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。

### 1.5.4 构建“中药-成分-疾病靶点-通路”网络图

在 Cytoscape 3.9.1 中导入地龙、地龙成分、疾病、交集靶点及代谢通路, 并对其拓扑结构进行分析。

## 1.6 通路图绘制

在 KEGG 数据库中, 通过 KEGG mapper 软件对 79 个地龙抗疲劳靶点的 Uniprot ID 输入, 以人类为对象, 获得地龙抗疲劳的通路图, 并对其中所含靶点最多的前 10 条抗疲劳通路进行整合分析, 得到地龙抗疲劳的通路图。

## 1.7 小鼠抗疲劳实验

### 1.7.1 小鼠分组及给药

48 只昆明小鼠随机分成 4 组 ( $n=12$ )。设置四个实验组, 即空白对照组、地龙提取物低、中、高剂量组。给药剂量参考杨美玲等<sup>[14]</sup>的方法略有改动,

地龙提取物低、中、高剂量组给药剂量分别为 0.25、0.50、1.00 g/kg，灌胃 (*i.g.*) 给药 30 d。

### 1.7.2 小鼠体质量和脏器指数

实验期间记录小鼠体质量，30 d 后小鼠脱臼处理后收集心、肝、脾、肺和肾组织。按照下式计算脏器指数：

$$A = \frac{m_1}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

$A$ ——脏器指数，%；

$m_1$ ——脏器质量，g；

$m_0$ ——小鼠体质量，g。

### 1.7.3 力竭游泳实验

灌胃 30 d，完成最后一次给药 30 min 后，在小鼠尾根部绑上铅皮，约为小鼠体质量的 5%，在（大小约 50 cm×50 cm×40 cm）的游泳箱中游泳。水深不低于 30 cm，并且严格控制水温在 23~25 °C 范围内。记录小鼠力竭时间<sup>[14]</sup>。

### 1.7.4 血清组织生化指标的检测

血清组织生化指标的检测在杨美玲等<sup>[14]</sup>的研究基础上略有修改。

尿素氮含量测定：灌胃 30 d 最后一次给药 30 min 后，在无负荷条件下游泳 90 min，1 h 间歇期眼球取血，2 000 r/min 离心 15 min，取血清进行检测。

肝糖原含量测定：灌胃 30 d 最后一次给药 30 min 后脱臼处死，称取肝脏加入到三氯醋酸置于组织研磨仪中研磨，3 000 r/min 离心 15 min。在上清液中加入  $\varphi=95\%$  的乙醇，混匀过夜，离心后收集沉淀，采用蒽酮法测肝糖原含量。

乳酸含量测定：灌胃 30 d 最后一次给药 30 min 后，小鼠内眦取血，在血浆中快速加入蛋白沉淀剂混匀后，3 500 r/min 离心 10 min 取上清液待测定，然后使其游泳 10 min。分别于游泳后 0 min 和 20 min 小鼠内眦取血，加入蛋白沉淀剂混匀，离心收集上清液进行后续测定，检测方法见试剂盒说明书。血乳酸曲线下面积计算方法：

$$S = 5 \times (A_0 + 3 \times A_1 + 2 \times A_2) \quad (2)$$

式中：

$S$ ——血乳酸曲线下面积，mmol/L；

$A_0$ ——游泳前血乳酸值，mmol/L；

$A_1$ ——游泳后 0 min 的血乳酸值，mmol/L；

$A_2$ ——游泳后休息 20 min 的血乳酸值，mmol/L。

## 1.8 数据处理

采用 SPSS 25.0 进行数据处理， $t$ -检验进行显著性分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示， $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 地龙有效成分分析

通过 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 检测出地龙提取物成分，正负离子模式分别检测出 384 和 333 种化合物，共计 717 种化合物。结果如图 1、2 所示。

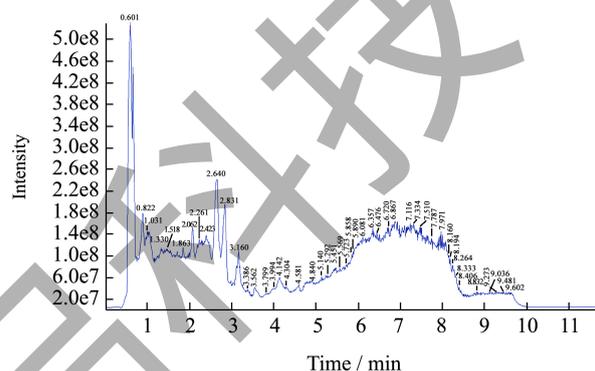


图 1 正离子模式 QC 样本总离子流图重叠谱图

Fig.1 Overlaid spectrum of the total ion flow map of the QC sample in positive ion mode

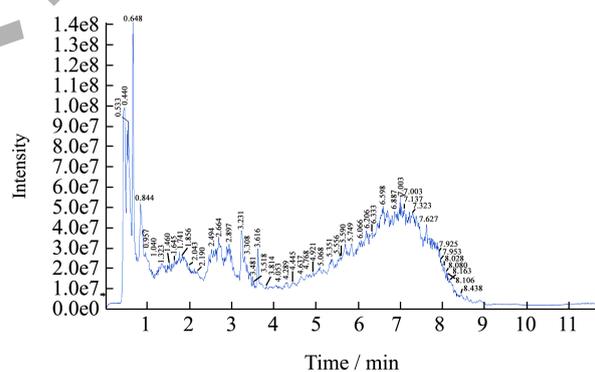


图 2 负离子模式 QC 样本总离子流图重叠谱图

Fig.2 Overlaid spectra of total ion flow map of QC samples in negative ion mode

将 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 正负离子模式下检测出的地龙提取物与 Pubmed、Web of science 和中国知网数据库查询得到的地龙成分对比，除去非地龙成分，将筛选后的地龙提取物成分导入 Swiss ADME 筛选地龙提取物活性成分，推断地龙提取物中共含有 50 种活性成分，结果如表 1 所示。包括氨基酸和二肽 16 种，核苷类 11 种，有机酸类 9 种，其他类化合物 14 种。

表 1 地龙提取物成分鉴定

Table 1 Identification of the constituents of the extract of earthworm

编号	化合物名称	分子式	CAS 号	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	偏差/‰
1	L-谷氨酸	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	56-86-0	147.053 2	148.059 0 [M+H] <sup>+</sup> 146.044 8 [M-H] <sup>-</sup>	6.84
2	D/L-苯丙氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	150-30-1	165.079 0	166.084 9 [M+H] <sup>+</sup>	6.09
3	L-酪氨酸	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	60-18-4	181.073 9	182.091 9 [M+H] <sup>+</sup>	5.62
4	L-组氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	71-00-1	155.069 5	156.076 0 [M+H] <sup>+</sup>	6.49
5	L-精氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	74-79-3	174.111 7	175.118 6 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 173.103 3 [M-H+NH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	5.78 5.79
6	L-异亮氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	73-32-5	131.094 6	130.085 9 [M-H] <sup>-</sup>	7.69
7	L-焦谷氨酸	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	98-79-3	129.042 6	128.034 4 [M-H] <sup>-</sup>	7.81
8	L-缬氨酸	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	72-18-4	117.079 0	116.071 4 [M-2H] <sup>-</sup>	8.61
9	L-亮氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	61-90-5	131.094 6	130.086 6 [M-H+NH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	7.69
10	甘氨酸-L-亮氨酸	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	869-19-2	188.116 1	189.121 8 [M+H] <sup>+</sup>	5.35
11	D-丙氨酰-D-丙氨酸	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	923-16-0	160.085 0	159.075 9 [M-H] <sup>-</sup>	6.30
12	亮氨酰亮氨酸	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2883-36-5	244.179 0	245.185 4 [M+Na] <sup>+</sup>	4.12
13	N-乙酰-L-组氨酸	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	2497-02-1	197.080 0	196.070 3 [M-H] <sup>-</sup>	5.12
14	Nε-乙酰基-L-赖氨酸	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	692-04-6	188.116 1	187.108 2 [M-H] <sup>-</sup>	5.36
15	S-甲基-L-半胱氨酸	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	1187-84-4	135.035 4	136.038 3 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	7.43
16	不对称二甲基精氨酸	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	30315-93-6	202.143 0	203.138 4 [M+H] <sup>+</sup>	4.92
17	腺苷	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	58-61-7	267.096 8	268.102 8 [M+H] <sup>+</sup>	3.77
18	鸟嘌呤	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	73-40-5	151.049 4	152.056 3 [M+H] <sup>+</sup>	6.67
19	胞嘧啶	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	71-30-7	111.043 3	112.049 4 [M+K] <sup>+</sup>	9.06
20	腺嘌呤	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	73-24-5	135.054 5	136.06 [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	7.45
21	胞嘧啶核苷	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	65-46-3	243.085 5	244.078 2 [M+Na] <sup>+</sup>	4.08
22	胸腺嘧啶	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	65-71-4	126.042 9	125.034 7 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup>	8.00
23	2'-脱氧尿苷	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	951-78-0	228.074 6	227.064 8 [M-H+NH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	4.43
24	7-甲基腺嘌呤	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	935-69-3	149.070 1	150.076 8 [M+H] <sup>+</sup>	6.75
25	9-(B-D-呋喃核糖)嘌呤	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	550-33-4	252.086 0	253.116 4 [M+H] <sup>+</sup>	4.09
26	甲氧苄氨嘧啶	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	738-70-5	290.137 9	291.141 4 [M+Na] <sup>+</sup>	3.46
27	β-胸苷	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	50-89-5	242.090 3	241.081 3 [M-H] <sup>-</sup>	4.17
28	壬二酸	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	123-99-9	188.104 9	187.095 5 [M-H] <sup>-</sup>	5.37
29	棕榈烯酸	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	373-49-9	254.224 6	253.215 0 [M-H] <sup>-</sup>	3.97
30	十四酸	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	544-63-8	228.208 9	227.199 8 [M-H] <sup>-</sup>	4.42
31	棕榈酸	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	57-10-3	256.240 2	255.232 4 [M-H] <sup>-</sup>	3.93
32	月桂酸	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	143-07-7	200.177 6	199.168 6 [M-H] <sup>-</sup>	5.04
33	氢化琥珀酸酯	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	2203-97-6	462.225 4	463.214 8 [M+H] <sup>+</sup>	2.14
34	N-(4-氨基丁基)乙酰胺	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O	5699-41-2	130.111 0	131.117 1 [M+H] <sup>+</sup>	7.73
35	2-氨基-6-三甲基氨基己酸酯	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19253-88-4	188.152 0	189.1587 7 [M+H] <sup>+</sup>	5.35
36	泛硫醇	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	496-65-1	278.130 0	277.119 7 [M-H] <sup>-</sup>	3.63
37	17-α-羟基表孕甾烷醇酮	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	570-52-5	334.250 8	335.280 0 [M+H] <sup>+</sup>	3.08
38	5-α-胆甾烷-3-酮	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	566-88-1	386.354 9	387.371 1 [M+Na] <sup>+</sup>	2.63

续表1

编号	化合物名称	分子式	CAS 号	理论值 ( $m/z$ )	实测值 ( $m/z$ )	偏差/ $\%$
39	胆甾-5-烯-3,7 二醇	$C_{27}H_{46}O_2$	566-26-7	402.3498	403.3655 $[M+Na]^+$	2.52
40	$\gamma$ -胍丁酸	$C_5H_{11}N_3O_2$	463-00-3	145.0850	146.0916 $[M+CH_3COO+2H]^+$	6.94
41	1,4-二胍基丁烷	$C_6H_{16}N_6$	544-05-8	172.1436	173.1391 $[M+NH_4]^+$	5.78
42	5-羟基色胺	$C_{10}H_{12}N_2O$	50-67-9	176.0950	177.1012 $[M+K]^+$	5.71
43	酪胺	$C_8H_{11}NO$	51-67-2	137.0841	138.0908 $[M+NH_4]^+$	7.34
44	硬脂酸酰胺	$C_{18}H_{37}NO$	124-26-5	283.2880	284.2936 $[M+H]^+$	3.55
45	二乙醇胺	$C_4H_{11}NO_2$	111-42-2	105.0790	106.0854 $[M+K]^+$	9.58
46	油酸酰胺	$C_{18}H_{35}NO$	301-02-0	281.2719	282.2781 $[M+H]^+$	3.58
47	N,N-二甲基-D-赤型鞘氨醇	$C_{20}H_{41}NO_2$	119567-63-4	327.3137	328.3185 $[M+Na]^+$	3.07
48	7,8-二甲基咯嗪	$C_{12}H_{10}N_4O_2$	1086-80-2	242.0800	243.0868 $[M+Na]^+$	4.16
9	维生素 D2	$C_{28}H_{44}O$	50-14-6	396.3392	397.3443 $[M+H]^+$	2.54
50	D-泛酸	$C_9H_{17}NO_5$	79-83-4	219.1107	218.1016 $[M-H]^-$	4.61

### 2.1.1 氨基酸类

对比数据库,推断地龙提物中可能存在9种游离氨基酸,且在裂解过程中容易失去 $NH_3$ 、 $COOH$ 和 $H_2O$ ,以化合物1为例,分子离子峰146  $[M-H]^-$ ,失去 $COOH$ 和 $NH_3$ 形成较稳定的128  $[M-H-H_2O]^-$ 和102  $[M-COOH]^-$ 碎片离子。综上信息,参考文献<sup>[16]</sup>,推断1号化合物为谷氨酸,其二级质谱见图3。此类化合物的裂解规律与化合物1相似。

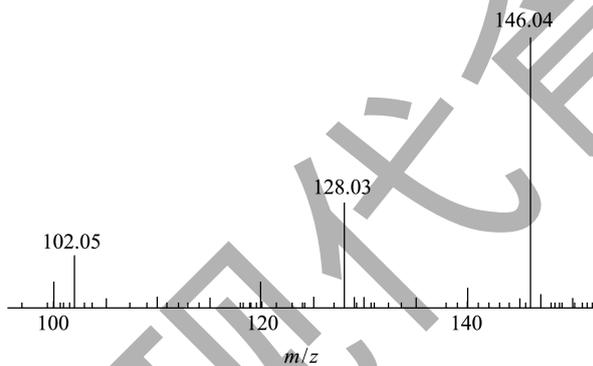


图3 化合物1的二级质谱图

Fig.3 MS/MS spectrum for compound 1

### 2.1.2 核苷类

正负离子模式下共推测出11种核苷类化合物,其中,以化合物17(268  $[M+H]^+$ )为例,容易损失呋喃糖 $C_5H_7O_4$ 与 $NH_3$ 生成更稳定的136  $[M-C_5H_7O_4]$ 和119  $[M-C_5H_7O_4-NH_3]$ ,参考文献<sup>[16]</sup>,推断17号化合物为腺苷,其二级质谱见图4。此类化合物的裂解规律与化合物17相似。

### 2.1.3 有机酸类

正负离子模式下,以化合物29 ( $m/z$  253  $[M-H]^-$ )

为例,易丢失 $H_2O$ 、 $C_2H_4$ 、 $C_3H_6$ 和 $COOH$ 形成较稳定的237  $[M+H-H_2O]$ 、210  $[M+H-COOH]$ 、181  $[M-COOH-C_2H_4]$ 和167  $[M-COOH-C_3H_6]$ ,参考文献<sup>[16]</sup>,故推测化合物29为棕榈烯酸,其二级质谱见图5。此类化合物的裂解规律与化合物29相似。

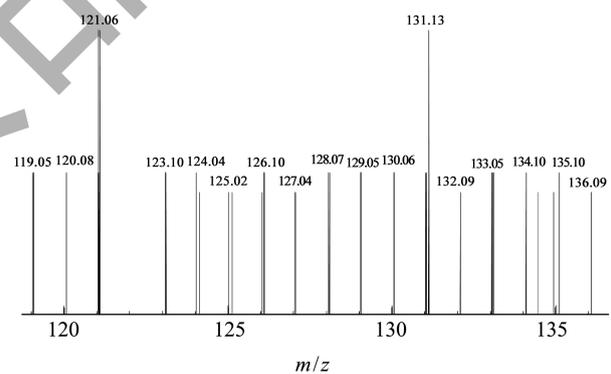


图4 化合物17的二级质谱图

Fig.4 MS/MS spectrum for compound 17

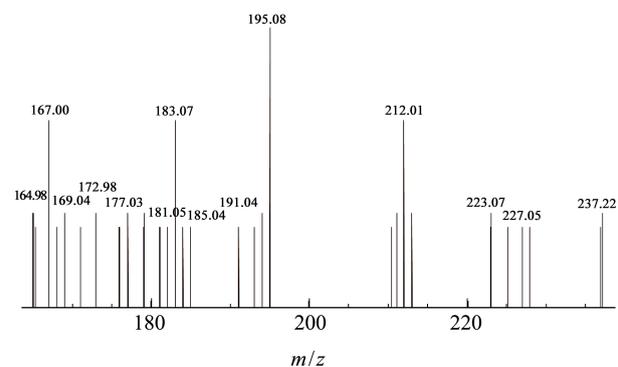


图5 化合物29的二级质谱图

Fig.5 MS/MS spectrum for compound 29

2.1.4 其他类化合物

比对数据库和参考文献，还发现地龙提取物中可能存在甾体类和杂环含氮类等一些其他化合物。

2.2 地龙-疲劳的核心靶点确定

检索抗疲劳靶点 2 897，经过合并去重后共得到 840 个抗疲劳靶点。药物靶点通过 Uniport 数据库进行数据校正，剔除非人源基因，校正后的靶点为地龙潜在靶点，合并去重后共有 594 个。如图 6 所示。将地龙成分预测靶点与疾病靶点交集，整理后确定 79 个地龙抗疲劳的潜在靶点。

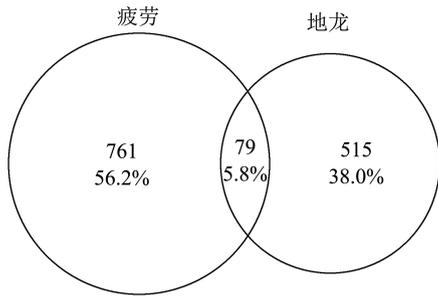


图 6 地龙 - 疲劳交集靶点 Venn 图

Fig.6 Venn diagram of the common target of the earthworm and fatigue

2.3 PPI网络的构建

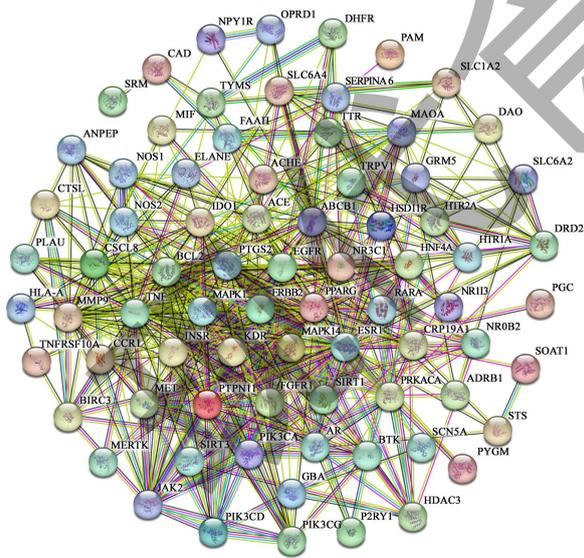


图 7 地龙治疗疲劳的 PPI 网络

Fig.7 PPI network of earthworm for fatigue

将 79 个交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析，如图 7 所示。其中包含 79 个节点和 537 条边，平均节点度为 13.6。随后，将这些数据成功导入 Cytoscape 3.9，用于构建 PPI 网络图，如图 8 所示。依据节点颜色，推测肿瘤坏死因子（Tumor Necrosis

Factor, *TNF*）、表皮生长因子受体（Epidermal Growth Factor Receptor, *EGFR*）、过氧化物增殖因子活性受体（Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma, *PPARG*）等可能为地龙提取物抗疲劳的核心靶点。

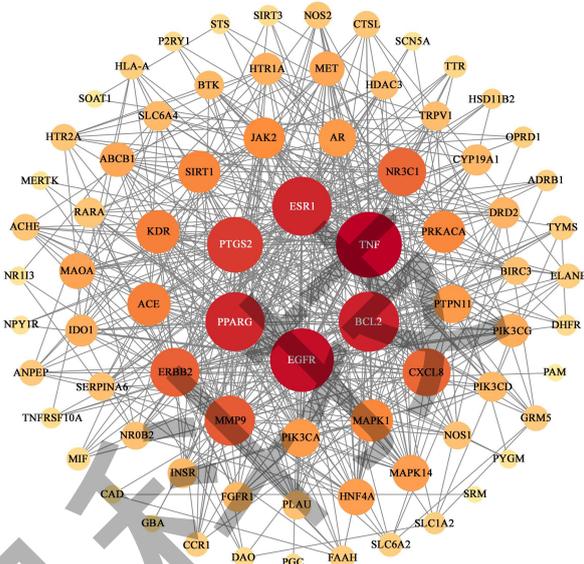


图 8 PPI 网络拓扑分析关键靶点

Fig.8 Key targets of PPI network topology analysis

注：节点大小由红变黄，程度与度值呈正相关，度值越大，节点越大，节点红色越深。

2.4 GO功能富集分析

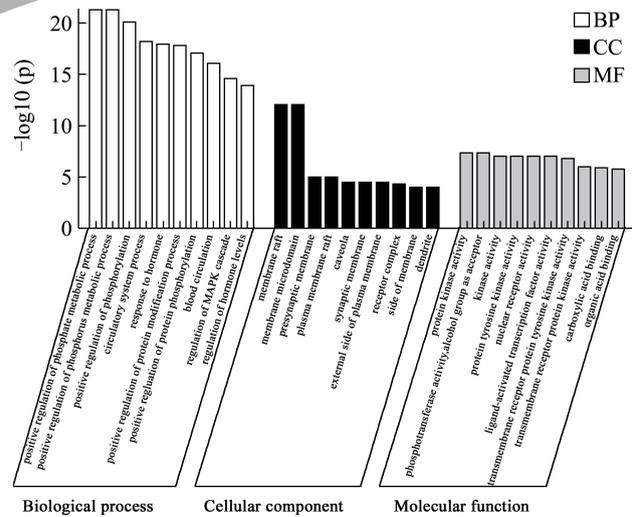


图 9 GO 功能富集分析

Fig.9 GO functions enrichment analysis

使用 Metascape 平台对 79 个交集靶点进行了信号通路分析。如图 9 所示。GO 富集分析结果显示了生物过程（BP）341 项，其中包括磷酸化的正向调节、血液循环以及丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK）的调节等。此外，

细胞组成 (CC) 方面涵盖了 77 项内容, 主要包括细胞质核周区域、突触前膜、膜筏、膜微区和受体复合物等。分子功能 (MF), 涉及了 112 项内容, 其中包括蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性和激酶活性等。筛选 GO 富集分析三个模块中  $q\text{-value} \leq -2.62$  的前 10 条制图。

## 2.5 KEGG通路分析

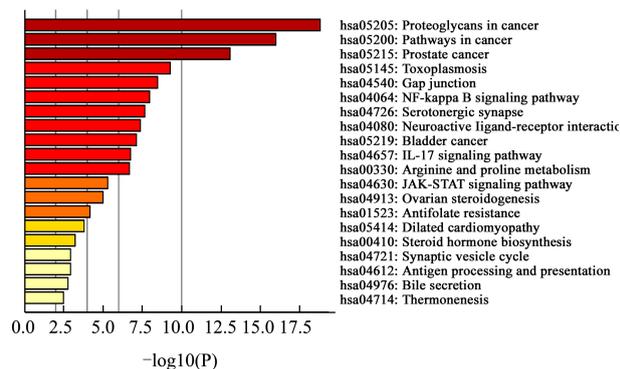


图 10 KEGG 通路富集分析

Fig.10 KEGG pathway enrichment analysis

KEGG 通路分析如图 10 所示。79 个交叉靶蛋白富集于 184 条通路 ( $P < 0.05$ ), 并对富集最好的前 20 个结果进行可视化。富集显著性较高的通路主要包括核因子- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)、5-羟色胺能突触和 JAK-STAT 通路等。GO 和 KEGG 分析表明疲劳涉及生物过程, 物质、能量代谢和激素应答等多种作用。NF- $\kappa$ B 转录因子与炎症、免疫反应、细胞生长和细胞凋亡相关, 可介导促炎基因的表达<sup>[21]</sup>。长期剧烈运动会造成机体损伤, 产生大量 ROS 和炎症因子, 促炎细胞因子可激活 NF- $\kappa$ B, 并产生炎症反应和线粒体功能障碍, 导致肌肉力量下降和疲劳<sup>[22]</sup>。5-HT 是色氨酸 (Tryptophan, TRP) 产生的一种神经传递物质, 能够通过特殊的载体穿越血脑屏障。在长期运动过程中, 血浆和脑内 TRP 的浓度增加, 从而引起脑内 5-HT 的增加<sup>[23]</sup>。研究表明, 高浓度的 5-HT 会导致运动能力受限和中枢疲劳<sup>[24]</sup>。长期剧烈运动可引起脑内氧自由基及一氧化氮 (NO) 释放增多, 大脑长期处于缺血、缺氧的状态会引起脑组织细胞凋亡及神经功能障碍。JAK-STAT 通路调节脑缺血引起的细胞凋亡, 改善脑缺血引起的神经元损伤<sup>[25]</sup>。

## 2.6 构建“地龙-成分-疲劳靶点-通路”网络图

使用 Swiss Target Prediction 数据库查找 50 个成

分所对应的靶点。从 2.3 中的 PPI 网络图中选取度值大于 20 的前 19 个核心靶点, 查找到此 19 个靶点对应的成分, 共 29 个。将 19 个核心靶点输入到 Metascape 数据库, 物种设置为“Homo sapiens”, 设置阈值为“ $P > 0.01$ ”进行 KEGG 通路富集分析, 导出 12 条通路。将 29 个地龙成分, 19 个核心靶点, 12 条通路导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建“地龙-成分-疲劳靶点-通路”网络。如图 11 所示。拓扑分析发现其共有 63 个节点, 233 条边。选择结合度值  $\geq 4$  的成分, 确定腺苷、9-(B-D-呋喃核糖)嘌呤、十四酸、棕榈酸、甘氨酸-L-亮氨酸、亮氨酰亮氨酸、N $\epsilon$ -乙酰基-L-赖氨酸、月桂酸、17- $\alpha$ -羟基孕甾烷醇酮、棕榈烯酸、氢化琥珀酸酯和 N,N-二甲基-D-赤型鞘氨醇这 13 个成分为地龙抗疲劳作用的主要成分。主要潜在靶点分别为 AR、EGFR、MAPK1、PTGS2、PIK3CA 和 PPARG 等。腺苷是自然界中广泛存在的一类核苷, 其主要来源于胞内外腺嘌呤核苷酸的降解。在细胞中, 腺苷是由 ATP 生成的, 并以双向的形式被转运至胞外。咖啡因能通过阻断腺苷 A2 受体, 延缓中枢疲劳<sup>[26]</sup>。在腺苷环境中能够减轻小鼠比目鱼肌的疲劳<sup>[27]</sup>。棕榈酸是人体中最常见的饱和脂肪酸, 可以从脂肪酸、碳水化合物和氨基酸内源性合成。过量的棕榈酸会导致全身炎症反应和代谢失调, 胰岛素抵抗和脂肪沉积和分布失调, 通过运动可以降低棕榈酸的生成, 调节糖代谢进而起到抗疲劳效果<sup>[28]</sup>。陈慧等<sup>[29]</sup>发现补充精氨酸、缬氨酸丝氨酸等多种营养物质可以提高体内酮体的水平, 从而延缓运动过程中的疲劳。地龙提取物中所含的活性成分能充分使其发挥抗疲劳功效。

## 2.7 靶点通路分析

利用 KEGG Mapper 软件对地龙的抗疲劳通路进行分析, 选取其中所含靶点最多的 10 个通路进行整合。结果如图 12 所示。在图中, 箭头代表着促进, T 代表着抑制, 而不同的颜色代表着不同的途径。路径靶标用蓝色标示, 地龙疲劳靶标用粉红色标示。地龙的抗疲劳效应与 MAPK、PI3K/AKT、PI3K/AKT 等信号通路密切相关。

使用 KEGG Mapper 工具获取地龙抗疲劳的通路, 筛选所含靶点最多的前 10 条通路整合绘制。结果如图 12 所示。图中箭头表示促进作用, T-箭头表示抑制作用, 通路靶点为蓝色, 地龙抗疲劳靶点为粉色。地龙抗疲劳作用主要涉及了 MAPK、PI3K/AKT、TP53、TNF 和 NF- $\kappa$ B 等信号通路, 位于这

几条通路中发挥作用的靶点为 PI3K、Akt、TP53 和 NF-κB 等。

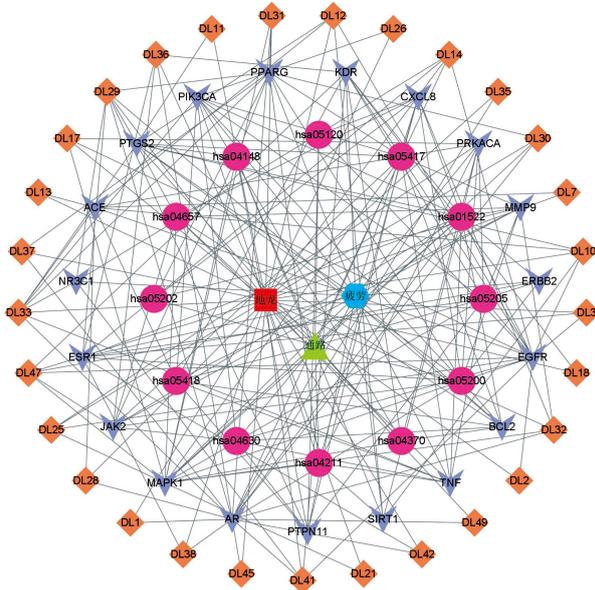


图 11 地龙 - 活性成分 - 疲劳靶点 - 通路网络图

Fig.11 Earthworm-Active ingredient-Fatigue target-Pathway network diagram

注：三角形为地龙，正方形为疲劳，圆形为靶点，V 型为通路，菱形为成分。

MAPK 信号通路在细胞增殖、分化、迁移等方面起着重要的调控作用<sup>[30]</sup>。细胞外调节蛋白激酶 (Extracellular Regulated Protein Kinases, ERK)

是 MAPK 家族的成员。磷酸化激活的 ERK 分子，进一步磷酸化下游激酶以调节转录因子活性，在细胞增殖，分化和保护神经元凋亡等方面发挥重要作用<sup>[31]</sup>。PI3K/AKT 信号通路调控肝脏糖脂代谢、糖异生及脂质合成。糖原合成酶激酶 3β (Glycogen Synthase Kinase 3β, GSK3β) 是 Akt 信号途径中的关键底物，可通过活化糖原合成酶，提高糖原合成<sup>[32]</sup>。在功能上 TP53 诱导的糖酵解和凋亡调节因子在维持细胞能量代谢的稳态中起重要作用<sup>[33-35]</sup>。TP53 缺失会导致线粒体呼吸强度降低，从而影响能量的产生。这意味着，如果机体长时间暴露于高强度的运动，会导致耐疲劳能力下降<sup>[36]</sup>。

### 2.8 地龙提取物对小鼠体质量及脏器指数的影响

脏器系数是一种能直接反映药物对机体器官毒性效应的重要指标<sup>[37]</sup>。小鼠脏器指数结果如表 2 所示。地龙给药组与空白组相比，在统计学上未观察到显著性差异 ( $P > 0.05$ )。体质量变化能反映出机体能量代谢的平衡状况，即机体从食物中获取的能量与各种生命活动所需的能量的整体平衡<sup>[38]</sup>。如图 13 所示。给药 30 d 后，小鼠体质量呈上升趋势。与空白组相比，地龙给药组的最终体质量均有不同程度的降低，其中高剂量下降最明显，表明小鼠运动加剧，随着地龙提取物浓度的增高，小鼠运动量逐渐增加。

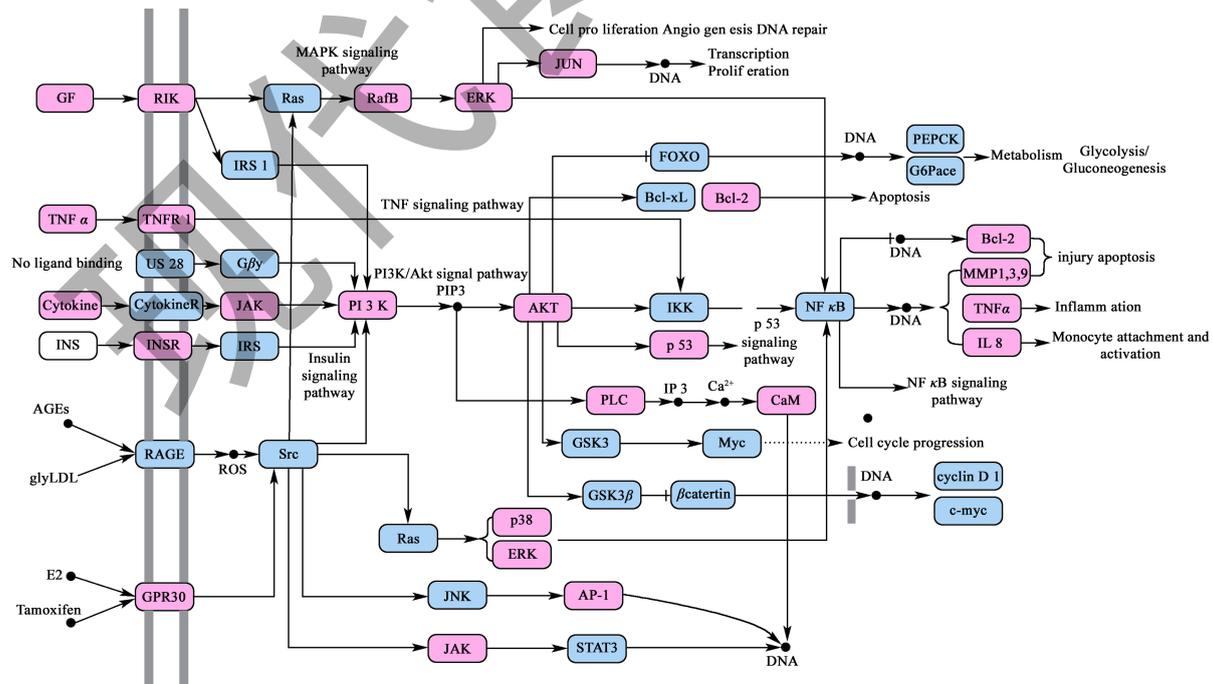


图 12 地龙抗疲劳通路

Fig.12 Anti-fatigue pathway of earthworm

注：蓝色代表通路中靶点，粉色代表地龙抗疲劳作用靶点。

表 2 小鼠脏器指数

Table 2 Organ indices in mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

组别	脏器系数比/%				
	心	肝	脾	肺	肾
空白组	0.62 ± 0.10	5.36 ± 0.40	0.46 ± 0.15	0.63 ± 0.05	1.46 ± 0.14
地龙提取物低剂量组	0.57 ± 0.08	5.31 ± 0.73	0.36 ± 0.08	0.66 ± 0.13	1.56 ± 0.16
地龙提取物中剂量组	0.56 ± 0.13	5.21 ± 0.08	0.38 ± 0.05	0.59 ± 0.06	1.33 ± 0.17
地龙提取物高剂量组	0.54 ± 0.05	5.46 ± 0.29	0.45 ± 0.16	0.59 ± 0.06	1.56 ± 0.25

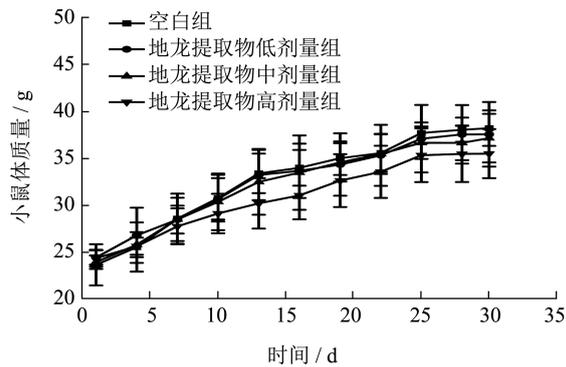


图 13 小鼠体质量变化图

Fig.13 Plot of changes in body mass of mice ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=12$ )

## 2.9 小鼠负重游泳时间及血清生化指标的检测

天然药物抗疲劳效果最直接的表现即为运动耐力的提高。负重游泳试验是目前公认的最客观、最易于操作、最常用的方法<sup>[1]</sup>。由图 14a 可知，地龙低、中、高剂量组的小鼠负重游泳较空白组分别延长 49.80% ( $P > 0.05$ )、248.36% ( $P < 0.001$ ) 与 183.95% ( $P < 0.001$ )。本研究发现，地龙提取物能够改善小鼠运动耐力。

糖原 (Glycogen, Gn)、血尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 和血乳酸 (Blood Lactic Acid, BLA) 是评价机体疲劳的重要指标。肝脏和肌肉中的糖原是维持糖代谢、氧化磷酸化及正常血糖的关键。在高强度的锻炼中，由于糖原的消耗，使机体的能源供给受到很大的限制，天然抗疲劳药物可提高机体对糖原的储存<sup>[39]</sup>。由图 14b 可知，小鼠肝糖原含量呈剂量依赖性增加，分别增加了 125.58% ( $P < 0.01$ )、131.07% ( $P < 0.01$ )、413.80% ( $P < 0.001$ )。研究表明，被激活的 PPAR $\delta$  活化上游 AMPK，上调丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4)，抑制丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性，减缓葡萄糖氧化，为脂肪酸供能，提高机体糖原合成，缓解疲劳<sup>[40]</sup>。通过与地龙提取物中的肌苷、棕榈酸、亮氨酸和缬氨酸等成分的靶蛋白相结合，活化 PPARG 能够抑制葡萄糖摄取和糖酵解过程，

从而增强小鼠运动能力，减轻疲劳。依据上述内容，推测小鼠游泳耐力的增强可能与肝糖原积累有关。

BUN 是机体蛋白质代谢终产物，人体内的氨基酸在新陈代谢过程中会生成氨气，这会导致机体耐力下降，从而导致疲劳。随着运动强度的增加，BUN 的积累也随之增加<sup>[41]</sup>。由图 14c 可知，地龙中、高剂量组的小鼠尿素氮含量分别降低了 34.60% ( $P < 0.01$ )、35.34% ( $P < 0.01$ )，低剂量组无显著性差异。在运动过程中，由于无氧代谢，葡萄糖在细胞质中生成大量乳酸，造成乳酸堆积<sup>[7]</sup>。由图 14d 可知，地龙中、高剂量组的小鼠血乳酸含量降低 73.92% ( $P < 0.01$ )、149.38% ( $P < 0.01$ )，低剂量组无显著性差异。研究表明，补充酮体能为机体提供能量，增强运动能力<sup>[29]</sup>。而地龙提取物中含有丰富的氨基酸和二肽，在运动过程中能快速的为机体提供能量，减少无氧代谢中代谢物的积累，因此，推测地龙提取物可能通过激活 PPAR $\delta$ 、GSK3 $\beta$  和 PIK3CA 调节糖代谢，提高糖原的储存，减少机体尿素氮和乳酸的生成，来发挥抗疲劳功效。

外周疲劳发病机理的理论主要有三种，包括能量耗竭理论、自由基理论和代谢物积累理论。能量耗竭和代谢物积累理论是高强度运动研究的热点。机体的疲劳主要来源于机体的能量消耗和代谢物积累。高强度运动会导致 BUN 和 BLA 的积累，导致细胞内酸中毒和肌肉疲劳。因此，改善能量供应和消除代谢物的积累已被证明可以提高抗疲劳能力<sup>[41]</sup>。

地龙属于平肝息风药，具有清势止痉、通经活络、平喘利尿等功效。临床上其复方制剂或保健品常用于增强机体免疫、改善代谢等多种症状。地龙提取物活性成分通过 MAPK、PI3K/Akt 和 5-HT 等信号通路与 AR、EGFR、MAPK1、PTGS2、PIK3CA 和 PPARG 结合后，能调控机体糖原合成和增强骨骼肌线粒体运动。动物实验中地龙提取物能延长小鼠负重游泳时间，增加肝糖原储存或减少肝糖原消耗，降低血乳酸和尿素氮含量，进而发挥抗疲劳功效。

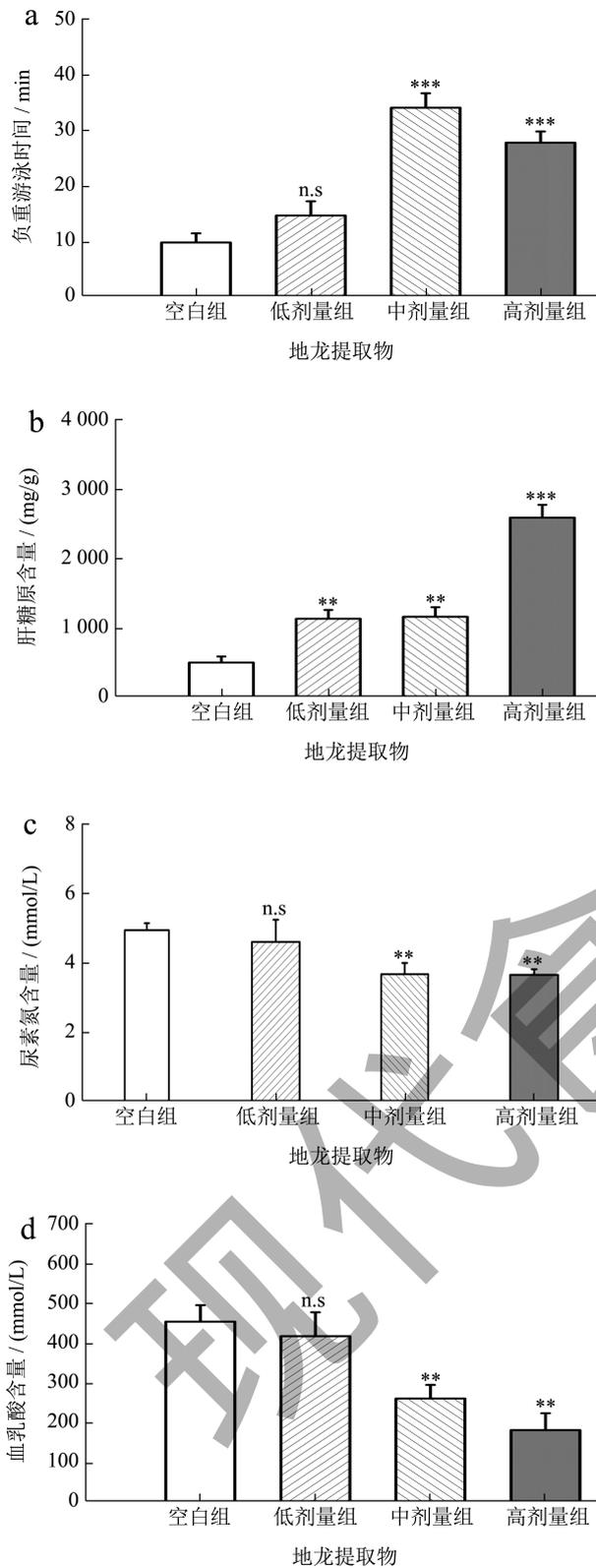


图 14 小鼠抗疲劳生化指标的测定

Fig.14 Determination of anti-fatigue biochemical indexes in mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

注: 与对照组比较 \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , n.s 表示无显著性差异。

### 3 结论

本课题通过小鼠实验发现地龙提取物具有抗疲劳功效, 借助网络药理学分析预测地龙抗疲劳的机制。研究发现地龙提取物中腺苷、9-(B-D-呋喃核糖)嘌呤、十四酸、棕榈酸、甘氨酸-L-亮氨酸、亮氨酸、亮氨酸、N $\epsilon$ -乙酰基-L-赖氨酸、月桂酸、17- $\alpha$ -羟基表孕甾烷醇酮、棕榈烯酸、氢化琥珀酸酯和N,N-二甲基-D-赤型鞘氨醇为抗疲劳关键成分; AR、EGFR、MAPK1、PTGS2、PIK3CA 和 PPARG 为抗疲劳的主要靶点; MAPK、PI3K/Akt 和 5-HT 等信号通路等为抗疲劳关键通路。地龙中 (0.50 g/kg)、高 (1.00 g/kg) 剂量组在小鼠负重游泳、肝糖原含量、尿素氮和血乳酸含量实验中与对照组相比均具有显著性差异。该研究结果表明了地龙抗疲劳作用的机理复杂, 体现了地龙的多成分、多靶点、多途径协同作用的特点。下一步将从代谢组学和蛋白质组学方面更深入地研究地龙抗疲劳的作用机制, 以期为中药材及天然药物的开发利用提供新的思路。

### 参考文献

- [1] LUO C, XU X, WEI X, et al. Natural medicines for the treatment of fatigue: Bioactive components, pharmacology, and mechanisms [J]. Pharmacological Reviews, 2019, 148: 104409.
- [2] LEVEN M V, ZIELHUIS G A, MEER J W, et al. Fatigue and chronic fatigue syndrome-like complaints in the general population [J]. European Journal of Public Health, 2010, 20(3): 251-257.
- [3] ABHIJIT C, Behan O P. Fatigue in neurological disorders [J]. Lancet, 2004, 363(9413): 978-988.
- [4] CHAI X, PAN M, WANG J, et al. Cordycepin exhibits anti-fatigue effect via activating TIGAR/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2022, 637: 127-135.
- [5] LU G Y, LIU Z T, WANG X, et al. Recent advances in *Panax ginseng* C.A. Meyer as a herb for anti-fatigue: an effects and mechanisms review [J]. Foods, 2021, 10(5): 1030.
- [6] FINSTERER J, MAHJOUR S Z. Fatigue in healthy and diseased individuals [J]. The American Journal of Hospice and Palliative Care, 2013, 31(5): 562-575.
- [7] LI Z L, ZHU H K, HUA H Y, et al. Anti-fatigue activity of *Brassica rapa* L. extract and correlation among biochemical changes in forced swimming micer [J]. Food Bioscience, 2022, 47: 101633.

- [8] XIE Q, SUN Y T, CAO L L, et al. Antifatigue and antihypoxia activities of oligosaccharides and polysaccharides from *Codonopsis pilosula* in mice [J]. Food Function, 2020, 11(7): 6352-6362.
- [9] JIANG P, JI X, XIA J, et al. Structure and potential anti-fatigue mechanism of polysaccharides from *Bupleurum chinense* DC [J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 306: 120608.
- [10] 张祎,周飞燕,潘蕾蔓,等.源于地龙蛋白的抗氧化肽鉴定与构效关系[J].现代食品科技,2023,39(3):164-173.
- [11] EDWIN L C, KYLE H, MARIAPPAN B, et al. Dilong: food for thought and medicine [J]. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2012, 2(4): 242-248.
- [12] 王一彤,王海军,马睿鑫,等.地龙研究进展[J].神经药理学报,2022,12(1):48-56.
- [13] 王艳丽,宁宇,丁莹.地龙的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药信息,2022,39(12):86-89.
- [14] 杨美玲,陈瑞仪,张紫虹,等.地龙蛋白和牛磺酸的抗疲劳作用和免疫调节功能的研究[J].中国热带医学,2015, 15(5):552-554.
- [15] CHENG T F, ZHANG Y H, YE J, et al. Investigation of the chemical compounds in *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) using a combination of mass spectral molecular networking and unsupervised substructure annotation topic modeling together with in silico fragmentation prediction [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2020, 184: 113197.
- [16] 张玉,董文婷,霍金海,等.基于UPLC-Q-TOF-MS技术的广地龙化学成分分析[J].中草药,2017,48(2):252-262.
- [17] ZHANG H, WANG Y H, CAO H W, et al. Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities [J]. Pharmaceutical Biology, 2011, 49(3): 269-275.
- [18] 商焯,齐丽娜,金华,等.地龙化学成分及药理活性研究进展[J].药物评价研究,2022,45(5):989-996.
- [19] 李思维,郝二伟,杜正彩,等.广地龙化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J].中草药,2022,53(8):2560-2571.
- [20] 吴娅丽,马韞楠,杜守颖.中药地龙抗血栓活性研究进展[J].中华中医药杂志,2020,35(6):3015-3018.
- [21] MIAO Z R, MIAO Z Y, WANG S C, et al. Exposure to imidacloprid induce oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammation, apoptosis and mitophagy via NF-kappa B/JNK pathway in grass carp hepatocytes [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 120: 674-685.
- [22] LIU L, WU X, ZHANG B, et al. Protective effects of tea polyphenols on exhaustive exercise-induced fatigue, inflammation and tissue damage [J]. Food & Nutrition Research, 2017, 61(1): 1333390.
- [23] ROELAND B, MEEUSEN R. Alterations in central fatigue by pharmacological manipulations of neurotransmitters in normal and high ambient temperature [J]. Sports Medicine, 2010, 40(3): 229-246.
- [24] MEEUSEN R, WATSON P, HASEGAWA H, et al. Central fatigue: the serotonin hypothesis and beyond [J]. Sports Medicine, 2006, 36(10): 881-909.
- [25] HUANG X P, DING H, LU J D, et al. Effects of the combination of the main active components of Astragalus and panax notoginseng on inflammation and apoptosis of nerve cell after cerebral ischemia-reperfusion [J]. American Journal of Chinese Medicine, 2015, 43(7): 1419-1438.
- [26] DAVIS J M, ZHAO Z W, STOCK H S, et al. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue [J]. American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2003, 284(2): R399-404.
- [27] 沈诞,余嘉惠,汪丽娜,等.嘌呤能信号和胞外核苷酸酶在疲劳中的作用及机制研究进展[J].海军军医大学学报, 2022,43(8):929-935.
- [28] CARTA G F, ELISABETTA M, SEBASTIANO B, et al. Palmitic acid: Physiological role, metabolism and nutritional implications [J]. Frontiers in Physiology, 2017, 8: 902.
- [29] 陈慧,马璇,曹丽行,等.运动疲劳机制及食源性抗疲劳活性成分研究进展[J].食品科学,2020,41(11):247-258.
- [30] DAVIDE A, JEREMY R, PIERRE J O, et al. Fatigue in Alzheimer's disease: biological basis and clinical management-a narrative review [J]. Aging Clinical and Experimental Research, 2023, 35(10): 1981-1989.
- [31] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. Physiological Reviews, 2001, 81(2): 807-869.
- [32] FENG C, JIABG Y, WU G, et al. Dietary methionine restriction improves gastrocnemius muscle glucose metabolism through improved insulin secretion and H19/IRS-1/akt pathway in middle-aged mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(14): 5655-5666.
- [33] ERIC C C, ROBERT L L, KAREN H V. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death [J]. Proceedings of the National

- Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(50): 20491-20496.
- [34] YU H P, XIE J M, LI B, et al. TIGAR regulates DNA damage and repair through pentosephosphate pathway and Cdk5-ATM pathway [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9853.
- [35] KARIM B, ATSUSHI T, MARY A S, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis [J]. Cell, 2006, 126(1): 107-120.
- [36] 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.
- [37] 郝敏,李殿龙,徐俊亭,等.黑木耳胞外多糖对小鼠肠道微生态及免疫调节的影响[J].中国食品学报,2021,21(3): 63-70.
- [38] 黄徐根,冯连世,徐建方,等.低氧训练过程中大鼠体重及能量代谢的变化[J].体育科学,2007,10:61-68,96.
- [39] CHEN X, LIANG D, HUANG Z, et al. Anti-fatigue effect of quercetin on enhancing muscle function and antioxidant capacity [J]. Food Biochemistry, 2021, 45(11): e13968.
- [40] FRITZEN A M, LUNDSGAARD A M, JEPPESEN J, et al. 5'-AMP activated protein kinase  $\alpha 2$  controls substrate metabolism during post-exercise recovery via regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 [J]. Journal of Physiology, 2015, 593(21): 4765-4780.
- [41] QI S Y, ZENG T X, SUN T, et al. The effect of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*) extract on fatigue alleviation via improving muscle mass [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2024, 325: 117810.

现代食品科技