

党参提取物抗运动性疲劳机制研究^①

尚 尧, 李靖文

西南大学 体育学院, 重庆 400715

摘要: 目的: 研究中药党参提取物抗运动性疲劳的效应及机制. 方法: 随机将昆明小鼠分为空白对照组、党参提取物低剂量组(100 mg/(kg·d))、中剂量组(300 mg/(kg·d))、高剂量组(600 mg/(kg·d)). 喂养 20 d 后, 检测其负重重力竭游泳时间、肝糖原含量、运动后血乳酸、血清尿素氮含量以及腓肠肌 PGC-1 α 蛋白的表达. 测量结果: 党参提取物能够显著增加昆明小鼠负重重力竭游泳时间, 并显著降低血乳酸含量($p < 0.05$); 此外高剂量组中血清尿素氮含量降低了 28.64% ($p < 0.01$), 肝糖原含量升高了 30.30% ($p < 0.01$); Western Blot 检测结果显示, 高、中、低剂量组 PGC-1 α 表达较空白组均有显著提高($p < 0.05$). 结论: 说明党参提取物很可能是通过提高 PGC-1 α 蛋白的表达来减少代谢产物的堆积, 增加糖原含量, 从而达到抗运动性疲劳的作用.

关键词: 党参; 运动性疲劳; PGC-1 α

中图分类号: Q949.783.2; R285

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)06-0009-06

运动性疲劳是指机体生理过程不能持续其机能在一特定水平上或不能维持预定的运动强度^[1]. 以前劳动疲劳是其最常见叫法, 直到 1982 年, 在美国波士顿召开的第 5 届国际运动生物化学学术会议上, 才正式将运动性疲劳作为专题进行讨论, 该会议专门将运动、劳动、疲劳、力竭的概念作了区分与解释, 从而正式对运动性疲劳这一概念做出了上述定义.

随着抗疲劳药物需求的增多, 中药补气类药物凭借其效果显著、天然且副作用低的优势引起了国内外学者的大量关注, 红景天、人参、黄芪这些我国的地道中药都已被证实具有明显的抗运动性疲劳作用^[3]. 如于亮等^[4]连续灌喂昆明小鼠 28 d 红景天苷(Salidroside, SAL)后, 昆明小鼠运动耐力比灌药前明显增加了 75%. 还有徐云凤等^[5]发现人参蛋白能显著增加小鼠负重重力竭游泳时间, 降低血乳酸含量, 增加肝糖原含量, 对运动耐力有显著提高. 有研究发现抗疲劳药物通过调节 PGC-1 α (α subunit of peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1)的表达起到抗疲劳的作用, 赵婷婷^[6]的研究得出了耐力运动能通过 Akt-NRF-1-mtTFA 途径、Akt-NOS 途径、p38MAPK-PGC1- α -NRF1-mtTFA 途径诱发线粒体的生物产生, 保持线粒体功能, 而黄芪丹参复合物亦是经过这些途径. 还有熊斌等^[7]通过设计昆明鼠运动耐力实验得出紫色甘薯醇提物能通过提升 PGC-1 α 蛋白表达以此加快昆明鼠体内能量代谢, 产生抗疲劳的效果.

党参是我国传统名贵的补益类药材, 其功效接近人参, 包含植物党参以及中药材党参. 2010 版《中国药典》规定, 党参为桔梗科植物党参[*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.]、素华党参[*Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf) L. T. Shen]或川党参[*Codonopsis tangshen* Oliv.]的干燥根^[2]. 党参与红景

① 收稿日期: 2017-11-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360254); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金项目(20130182110023); 重庆高校优秀成果转化资助项目(KJZH14203); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(SWU1609025).

作者简介: 尚 尧(1993-), 男, 硕士研究生, 主要从事体育教育训练学的研究.

通信作者: 李靖文, 副教授, 硕士研究生导师.

天、人参、黄芪等同属补气类药物,有特殊香气,带有少许甜味,能够补气、健脾、益肺,但关于其抗疲劳方面的研究却鲜有报道.

中华人民共和国卫生部于 2003 年公布的《保健食品功能学评价程序和检验方法》^[8]中规定,凡是达到 1 项及 1 项以上运动实验指标和 2 项以上生化指标呈阳性条件的,就可判断所测药物具有抗疲劳作用. 本研究欲通过测定党参提取物对昆明小鼠负重力竭游泳时间的影响以及血清尿素氮、血乳酸、肝糖原 3 个生化指标的变化,并用 Western Blot 检测 PGC-1 α 蛋白的表达,开展党参抗运动性疲劳研究,为我国地道中药党参的相关研究积累文献资料,增进人们对党参的了解,为开发党参运动食品、饮品等提供帮助,有效利用我国党参丰富的天然资源,提高党参产业的经济效益.

1 材料与方法

1.1 党参提取物

本实验党参来源为重庆市石柱县中药材生产基地,采集时间为 2016 年 10 月,经西南大学药学院李学刚教授鉴定,并确认为川党参. 我们将所采集到的川党参的根部放在烘箱中干燥,温度设置 50 $^{\circ}\text{C}$,然后粉碎,过 40 目筛,将其密封保存于容器中.

取备用党参粉末 30 g 左右放入锥形瓶内,加入 20 mL 的 95% 乙醇,在超声波清洗器中处理 30 min,过滤,并重复上述方式对滤渣进行处理,将滤液合并,在水浴锅上用蒸发皿将提取物浓缩^[8].

1.2 实验动物

4 周龄健康雄性昆明小鼠,体质量范围在 18~22 g,由西南大学药学院提供.

1.3 主要试剂与仪器

乳酸(Lactic Acid LD)测试盒(货号: A019-2 测血清、组织等),血清尿素氮(BUN)测试盒(货号: C013-1 二乙酰肼法),糖原测试盒(货号: A043 测肝脏、肌肉组织等),均购于南京建成生物工程研究所,PGC-1 α 蛋白抗体,购于武汉三鹰生物技术有限公司.

JA2003 -精密电子天平、恒温水浴锅、KQ-700DV 型数控超声清洗器、LD4-2A 离心机、全自动生化分析仪、721 分光光度计、电泳仪、游泳箱(60 cm $\times$ 60 cm $\times$ 50 cm)等.

1.4 实验方法

1.4.1 负重游泳实验

选 40 只昆明种小鼠,适应性喂养 3 d,按体质量随机分组,设空白对照组,党参提取物低剂量组(100 mg/(kg $\cdot$ d)),中剂量组(300 mg/(kg $\cdot$ d)),高剂量组(600 mg/(kg $\cdot$ d))四组,每组 10 只,每隔 2 d 对小白鼠进行称质量,根据体质量的变化来调整喂药的剂量. 空白组喂同低剂量组体积的生理盐水,连续灌喂 20 d. 末次给药 30 min 后,将小鼠放入准备好的游泳箱中进行负重力竭游泳,水温控制在 32 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$,水深 30 cm. 每只实验鼠尾部负重体质量 10% 的铅皮,然后记载小鼠游泳到力竭的时间. 当小鼠头部没入水中时间达到 10 s 且不再向上,放在平面上不能够自主进行翻正动作即可判断其达到力竭.

1.4.2 血乳酸的测量

实验前期操作同 1.4.1,在末次灌喂小鼠 30 min 后,将小鼠放于水温 30 $^{\circ}\text{C}$ 的游泳箱,10 min 后取出,于眼眶中取血,在 3 500 r/min 转速下 10 min,取其上清液,严格按照试剂盒说明书所写步骤进行血乳酸含量的测定.

1.4.3 血清尿素氮的测量

实验分组、灌喂同 1.4.1,在末次给药 30 min 后,小鼠在水温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 的游泳箱中游泳 60 min,于眼眶中取血,分离血清,严格按照试剂盒说明书步骤进行血清尿素氮的测定.

1.4.4 肝糖原的测定

实验条件同 1.4.1,末次给药 30 min 后,解剖,取肝脏,生理盐水洗净,滤纸吸干,精确称取肝脏组织,按标本质量(mg): 碱液体积(μL)=1:3,一起加入试管中,沸水浴煮 20 min,流水冷却,将糖原水解液进一步制备成糖原检测液.

混匀后置沸水中煮 5 min，冷却后于波长 620 nm，光径 1 cm，空白管调零，测各管 OD 值。

1.4.5 PGC-1 α 蛋白表达的测定

同实验 1.4.3，取其腓肠肌，提取 PGC-1 α 蛋白，用 Western Blot 测定^[9]PGC-1 α 表达，将昆明小鼠腓肠肌组织碾碎，PBS 缓冲液漂洗 3 次，加入组织裂解液，用匀浆器对组织进行匀浆，BCA 法定量卵白，SDS-PAGE，半干转膜仪转膜，PVDF 膜封闭 2h，PGC-1 α 一抗(1：1 000 浓度稀释)4℃过夜，加入 HRP 标记的二抗放在 37℃实验室 1h，用 Luminate crescendo Western HRP Substrate 显影液对膜进行预染，Bio-Rad 显影，最后利用 Image Lab 3.0 软件分析。

1.4.6 数据分析

运用 SPSS 13.0 对所得的数据进行单因素方差分析，实验结果用 $M\pm SE$ 来表示，并使用 origin v8.0 软件作图。

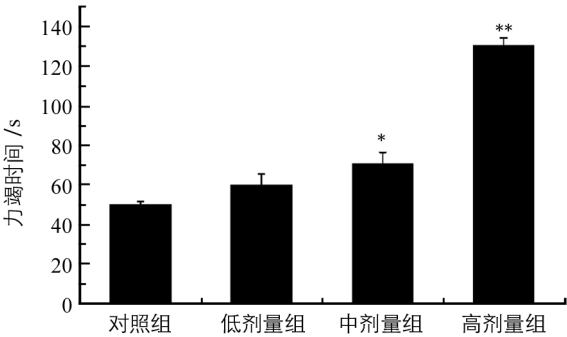
2 结 果

2.1 对力竭游泳时间的影响

图 1 给出了末次给药 30 min 后昆明小鼠的力竭游泳时间，我们可以看出低剂量组较空白对照组没有显著差异，但其负重游泳时间有增加的趋势，中剂量组小鼠较空白对照组有明显差异($p<0.05$)，高剂量组更加显著($p<0.01$)。低剂量组力竭时间提高了 19%，中剂量组提高了 41%，高剂量组提高了 161.5%。

2.2 血乳酸含量

由表 1 可以看出低剂量能显著降低血乳酸含量($p<0.05$)，中、高剂量组降低更加明显($p<0.01$)。低、中、高剂量组血乳酸含量分别降低 11.33%，18.82%，34.78%。



* 表示与对照组比较. * $p<0.05$; * * $p<0.01$.

图 1 党参提取物对小鼠游泳时长影响

表 1 党参提取物对昆明小鼠血乳酸的影响($M\pm SE$ ， $N=10$)

实验分组	动物数	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血乳酸/(mmol·L ⁻¹)
空白对照组	10	0	14.03±0.51
低剂量组	10	100	12.44±0.25*
中剂量组	10	300	11.39±0.53**
高剂量组	10	600	9.15±0.52**

注：* 表示与对照组比较. * $p<0.05$; * * $p<0.01$.

2.3 血清尿素氮含量

由表 2 可以看出，低剂量组对血清尿素氮含量并没有显著降低，但有下降趋势，中剂量组有显著降低($p<0.05$)，高剂量组效果更加明显($p<0.01$)，其中低剂量组血清尿素氮含量降低 6%，中剂量组降低 18.34%，高剂量组降低 28.64%。

表 2 党参提取物对昆明小鼠血清尿素氮的影响($M\pm SE$ ， $N=10$)

实验分组	动物数	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血清尿素氮/(mmol·L ⁻¹)
空白对照组	10	0	8.98±0.21
低剂量组	10	100	8.38±0.34
中剂量组	10	300	7.30±0.53*
高剂量组	10	600	6.38±0.43**

注：* 表示与对照组比较. * $p<0.05$; * * $p<0.01$.

2.4 肝糖原含量

由表 3 可以看出低剂量组对肝糖原含量没明显增加,但有增加趋势,中剂量组对肝糖原含量增加明显($p<0.05$),高剂量组效果更加明显($p<0.01$),其中低剂量组增加 4.83%,中、高组分别增加 14.16%,30.30%.

表 3 党参提取物对昆明小鼠肝糖原的影响($M\pm SE$, $N=10$)

实验分组	动物数	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	肝糖原/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
空白对照组	10	0	9.11 ± 0.26
低剂量组	10	100	9.55 ± 0.23
中剂量组	10	300	$10.40\pm0.39^*$
高剂量组	10	600	$11.87\pm0.40^{**}$

注: * 表示与对照组比较. $*p<0.05$; $**p<0.01$.

2.5 对 PGC-1 α 蛋白表达的影响

图 2 为 Western Blot 检测党参提取物对昆明小鼠 PGC-1 α 蛋白表达的结果图,条带清晰有效.从图 2(b)可以看出党参提取物低、中、高剂量组对昆明小鼠 PGC-1 α 蛋白表达分别提高了 4.36%,29.23%,41.24%.

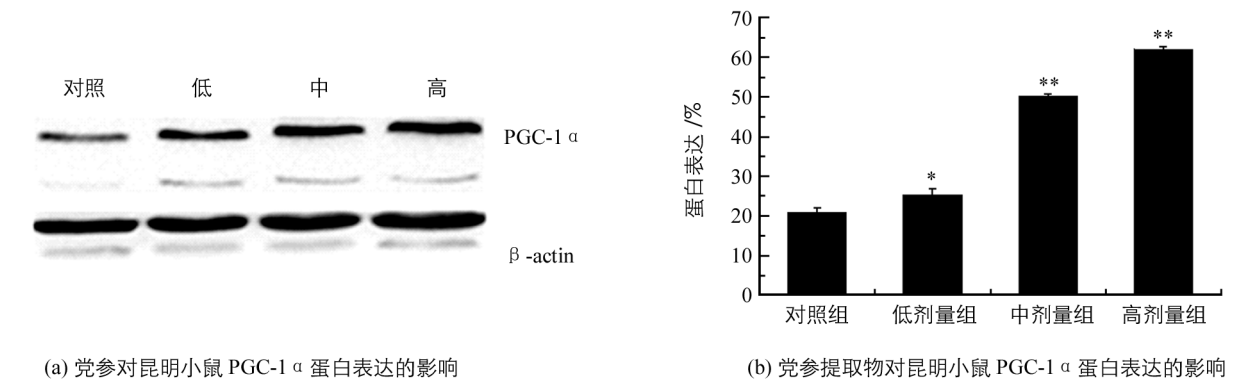


图 2 Western Blot 检测党参提取物对昆明小鼠 PGC-1 α 蛋白表达的结果图

3 讨 论

当机体持续在一定的运动强度下运动时,会导致其体力和运动耐力下降,使其不能维持预期的运动负荷,造成工作能力和效率的降低,产生这一复杂的生理过程的主要原因是由于体内能量的消耗和乳酸等代谢产物的累积导致^[10].运动时间延长正是抗运动性疲劳的直观外表体现,因此用力竭游泳时间的长短来作为本实验的一个指标.糖原是糖类的一种主要储藏形式,当剧烈运动时,机体中大量葡萄糖被消耗用以补充能量,这个时候糖原就成了补充葡萄糖来源的主要途径,因此糖原储备的多少直接影响到机体的运动时间的长短^[11].乳酸是机体供能体系中的产物之一,为体内糖无氧产能时的副产物,当机体剧烈运动时,有氧供能会变为无氧供能,从而产生乳酸,如果机体内产生过量的乳酸,会使肌肉中 H^+ 浓度升高, pH 值降低,进一步引发一系列生化变化,进而导致疲劳的发生^[12].蛋白质为人体生命活动提供能量,血清尿素氮作为人体蛋白质代谢的主要产物,其含量比可表明体内含氮物质的分解状态,随着运动增强,机体内蛋白质和氨基酸的分解增强,经代谢转化生成尿素进入血液中,使血尿素增加,因此随着运动负荷的加大,血尿素氮的产生也随及增加,致使身体难以适应相应的负荷强度,最终导致疲劳的发生^[13].实验测得党参提取物可明显延长昆明小鼠力竭游泳时间,使血乳酸以及血尿素氮含量下降,增加肝糖原储备,具备 1 项运动试验指标和 3 项生化指标呈阳性的条件,说明党参提取物有抗疲劳作用,在我们设计的力竭运动实验中,党参提取物明显延长了昆明小鼠在一定强度下持续运动的时间,进而得出结论:党参提取物能够抗运动性疲劳.

PGC-1 α 是过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1(PGC-1)的成员之一^[14],较多分布在心脏、骨骼肌等富含线粒体的组织内,作为一个转录辅助活化因子而存在,对线粒体的合成、骨骼肌纤维类型的转换、调节适应性产热这些过程都有着至关重要的影响,与能量代谢密切相关,能够与多种核受体和非核受体结合,调节基因表达^[15-16],PGC-1 α 亦被称为各种代谢通路的“分子开关”,已有大量的文献证明其在慢肌纤维生成、糖脂代谢调节、线粒体生成以及电子传递链、氧自由基消除等过程中扮演重要角色^[17]。马莉等^[18]实验证实红景天苷能够经过对 PGC-1 α , PPAR α , mtTFA 蛋白产生作用来促进肌细胞的氧化代谢和增进肌肉耐疲劳的程度。Tadaishi M 等^[19]证实转 FL-PGC-1 α -b 基因鼠 GLUT-4 mRNA 表达下调,并且与糖原至丙酮酸代谢相关的酶,特别是包括参与糖原分解的糖原磷酸化酶(PYGM)以及与糖酵解相关的磷酸果糖激酶(PFKM)、丙酮酸激酶(PKM)这些重要调节酶基因转录均下调,且转基因鼠在运动时能够减少对糖原的消耗,节约糖原,在运动过后出现乳酸值低的情形。崔安芳^[20]发现 KLF9 能够作用在 PGC-1 α 基因的启动子,进一步通过染色质免疫沉淀试验验证了 KLF9 能够连接 PGC-1 α 的启动子,从而引发糖异生活动发生,提高原代肝细胞的葡萄糖利用率。另有一项关于全身组织过表达人类 PGC-1 α 的转基因鼠研究,PGC-1 α 的过表达在骨骼肌表现为提高胰岛素的敏感度以及增添糖原储备^[21-22]。

本次实验发现,党参提取物能明显提高 PGC-1 α 蛋白的表达,并伴随着血乳酸、血清尿素氮的减少以及肝糖原储备的增加,并使昆明小鼠耐运动性疲劳能力得到提高。因此我们可以得到,党参提取物很可能是通过提高 PGC-1 α 蛋白的表达来减少代谢产物的堆积,增加糖原含量,从而达到抗运动性疲劳的作用。

参考文献:

- [1] 王瑞元,孙学川,熊开宇,等.运动生理学[M].北京:人民体育出版社,2002:317.
- [2] 孙政华,邵 晶,郭 玫.党参化学成分及药理作用研究进展标[J].安徽农业科学,2015,43(33):174-176.
- [3] 耿 欣.红景天抗疲劳作用研究进展[J].中医药学报,2011,39(3):95-97.
- [4] 于 亮,周 越,陈晓萍.红景天苷对昆明小鼠运动耐力影响的机制研究[C]//中国体育科学学会.2015 第十届全国体育科学大会论文摘要汇编(二).北京:中国体育科学学会,2015.
- [5] 徐云凤,赵 雨,邢楠楠,等.人参蛋白对昆明小鼠抗疲劳作用的研究[J].食品工业科技,2011,32(11):406-407,436.
- [6] 赵婷婷,丁树哲,陈世益.黄芪丹参在 Akt 磷酸化介导的骨骼肌线粒体生物发生中的作用[J].体育科学,2008,28(8):40-44.
- [7] 熊 斌,王杨科,尚书凤,等.紫色甘薯醇提物抗疲劳机制研究[J].中国食品添加剂,2017(1):65-70.
- [8] 杨彦哲,张 红,张 丹,等.赶黄草总黄酮缓解体力疲劳的作用研究[J].中国医院药学杂志,2017,37(5):430-434.
- [9] 王 涛,陈前锋,邹 利,等.党参多糖提取工艺优化及不同购买地党参多糖含量比较[J].西南师范大学学报(自然科学版),2016,41(2):41-45.
- [10] 林 楠,钟琳琳,李 娜,等.人参花提取物抗疲劳作用的研究[J].长春中医药大学学报,2010,26(3):336-337.
- [11] 郭金铭,蒋东升,徐 颖,等.辅酶 Q10 对不同性别昆明小鼠缓解体力疲劳作用的实验研究[J].实用预防医学,2009,16(4):1250-1252.
- [12] 张雅莉,黄晓旭,蔡美琴.枸杞多糖的抗氧化及缓解体力疲劳作用研究进展[J].上海交通大学学报(医学版),2015,35(6):911-914.
- [13] 朱 乐,王 雪,许灵善,等.羊藿五味咀嚼片缓解体力疲劳作用[J].延边大学医学学报,2015,38(2):102-105.
- [14] 付敬敬,李竹琴.PGC-1 α 与能量代谢相关性的研究进展[J].医学研究杂志,2016,45(9):168-171.
- [15] 于 亮,张 鹏,王瑞元,等.PGC-1 α 对骨骼肌肌纤维类型及运动能力的调控作用[J].生理科学进展,2013,44(1):59-62.
- [16] LEE H J, YEON J E, KO E J, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Delta Agonist Ameliorated Inflammation Activation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(45): 12787-12799.
- [17] 吕媛媛,石越丹,张 纓.耐力训练对不同 AMPK α 2 基因状态昆明小鼠骨骼肌细胞核蛋白 PGC-1 α 、ERR α 表达及 PGC-1 α /ERR α 结合量的影响[J].中国运动医学杂志,2014,3(1):27-33.

- [18] 马 莉. 红景天苷抗疲劳作用及其机制的实验研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006.
- [19] TADAISHI M, MIURA S, KAI Y, et al. Skeletal Muscle-Specific Expression of PGC-1Alpha-b, an Exercise-Responsive isoform, Increases Exercise Capacity and Peak Oxygen Up-Take [J]. Plos One, 2011, 6(12): e28290.
- [20] 崔安芳. 饥饿诱导的 KLF9 通过诱导 PGC-1 α 调节肝脏糖异生 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [21] WENDE A R, SEHAEFFER P J, PARKER G J, et al. A Role for the Transcriptional Coactivator pGC-1 α in Mitochondrial Biogenesis [J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36642–36651.
- [22] 许弟群, 王人卫, 曹 芳. 人参皂甙 Rg1 对大负荷运动训练小鼠免疫功能的影响 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2011, 36(5): 192–197.

Research on the Mechanism of Resistance to Exercise-Induced Fatigue of *Codonopsis* Extract

SHANG Yao, LI Jing-wen

School of Physical Education, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective: To study the effect and mechanism of *Codonopsis pilosula* extract against exercise-induced fatigue. Methods: Kunming mice were randomly divided into blank control group, low dose group (100 mg/(kg · d)), medium dose group (300 mg/(kg · d)) and high dose group (600 mg/(kg · d)). After feeding 20 d, their exhaustive swimming time, liver glycogen content, blood lactic acid content, serum urea nitrogen and the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α) protein in the gastrocnastus were measured. The results showed that the extract of *C. pilosula* significantly increased the exhaustive swimming time and significantly decreased the content of blood lactate in Kunming mice ($p < 0.05$). In addition, the content of serum urea nitrogen in the high dose group decreased by 28.64% ($p < 0.01$). The content of PGC-1 α increased by 30.30% ($p < 0.01$). The results of Western Blot showed that the expression of PGC-1 α in the high, medium and low dose groups significantly increased compared with that of the blank group ($p < 0.05$). Conclusion: *C. pilosula* extract may play a role in resistance to exercise-induced fatigue by increasing the expression of PGC-1 α protein, reducing the accumulation of metabolites and increasing the content of glycogen.

Key words: *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.; exercise-induced fatigue; PGC-1 α

责任编辑 汤振金

