

本文引用:井宏颖,吕克宁,宋晓晨,周妍妍.地黄饮子对运动性疲劳小鼠运动能力的影响[J].湖南中医药大学学报,2021,41(1):34-38.

地黄饮子对运动性疲劳小鼠运动能力的影响

井宏颖^{1,2},吕克宁²,宋晓晨¹,周妍妍^{1*}

(1.黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040;2.哈尔滨体育学院,黑龙江 哈尔滨 150008)

[摘要] 目的 探讨地黄饮子对运动性疲劳小鼠运动能力的影响。方法 将昆明小鼠30只随机分为安静对照组(安静组)、疲劳模型组(模型组)和地黄饮子组,每组10只。采用游泳训练方式建立小鼠疲劳模型。常规饲料喂养外,地黄饮子组给予地黄饮子水煎液灌胃,安静组和模型组给予蒸馏水灌胃,连续给药28 d。ELISA法检测血尿素氮、睾酮、皮质醇含量和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性、丙二醛(MDA)含量;Western blot法检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)和过氧化物酶增殖活化受体辅激活因子1α(PGC-1α)蛋白表达量。结果 与安静组比较,模型组小鼠体质量明显升高($P<0.05$);血睾酮含量明显降低($P<0.05$);皮质醇、尿素氮含量显著升高($P<0.05$);肝组织GSH-Px、SOD活性显著降低($P<0.05$),MDA含量明显升高($P<0.05$);AMPK和PGC-1α的蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组比较,地黄饮子组小鼠体质量增加明显($P<0.05$);力竭游泳时间明显延长($P<0.05$);血睾酮含量明显升高($P<0.05$);皮质醇、尿素氮含量显著降低($P<0.05$);肝组织GSH-Px、SOD活性显著增强($P<0.05$),MDA含量明显降低($P<0.05$);AMPK和PGC-1α的蛋白表达升高($P<0.05$)。结论 地黄饮子能够在一定程度上起到缓解运动性疲劳的作用,其可能机制是通过降低运动性疲劳模型小鼠血皮质醇、尿素氮、MDA含量,提高肝组织GSH-Px、SOD活性及AMPK/PGC-1α信号通路对能量代谢的调节能力,从而提升小鼠运动能力。

[关键词] 运动性疲劳;地黄饮子;运动能力;腺苷酸活化蛋白激酶;过氧化物酶增殖活化受体辅激活因子1α

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.01.007

Effect of Radix Rehmanniae Decoction on Exercise Ability in Exercise-Induced Fatigue Mice

JING Hongying^{1,2}, LV Kening², SONG Xiaocheng¹, ZHOU Yanyan^{1*}

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150040, China;

2. Harbin Sport University, Harbin, Heilongjiang 150008, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of Radix Rehmanniae Decoction on exercise ability of mice with exercise fatigue. **Methods** 30 Kunming mice were randomly divided into quiet control group (quiet group), fatigue model group (model group) and Radix Rehmanniae Decoction group, and 10 mice in each group. The fatigue model of mice was established by swimming training. In addition to conventional feed feeding, the Radix Rehmanniae Decoction group was given a gavage of Radix Rehmanniae Decoction, and the quiet group and the model group were given gavage of distilled water for 28 consecutive days. The levels of blood urea nitrogen (BUN), testosterone and cortisol, the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected by ELISA; the protein expression of adenylate activated protein kinase (AMPK) and peroxisome proliferating activated receptor coactivator-1α (PGC-1α) were detected by Western blot. **Results** Compared with the quiet group, the body mass of the model group was significantly increased ($P<0.05$); the content of serum testosterone decreased significantly ($P<0.05$); the contents of cortisol and BUN were significantly increased ($P<0.05$); the activity of GSH-PX and SOD in liver tissues was significantly decreased ($P<0.05$), and the content of MDA was significantly increased ($P<0.05$); the expression of AMPK and PGC-1α was increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the body mass of mice in the Radix Rehmanniae

[收稿日期]2020-08-25

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81774197);黑龙江省教育厅基本科研业务费项目(2018KYYWF-FC04)。

[作者简介]井宏颖,女,在读博士研究生,副主任医师,研究方向:中医治则治法及中医药防治老年病研究。

[通讯作者]*周妍妍,女,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:13339319259@163.com。

Decoction group increased significantly ($P<0.05$); the exhausted swimming time was significantly prolonged ($P<0.05$); the blood testosterone content was significantly increased ($P<0.05$); the contents of cortisol and BUN was significantly reduced ($P<0.05$); GSH-Px and SOD activities in liver tissue were significantly increased ($P<0.05$), and MDA content was significantly reduced ($P<0.05$); the expression of AMPK and PGC-1 α was increased ($P<0.05$). **Conclusion** Radix Rehmanniæ Decoction can play a role in alleviating sports fatigue to a certain extent, the mechanism may be by reducing the content of cortisol, BUN and MDA in sports fatigue model mice, increasing the activity of GSH-Px and SOD, and enhancing the regulation of AMPK / PGC-1 α signaling pathway on energy metabolism, which can enhance exercise capacity of mice.

[Keywords] exercise fatigue; Radix Rehmanniæ Decoction; exercise ability; adenylate activated protein kinase; peroxisome proliferator activated receptor coactivator 1 α

运动性疲劳的研究从19世纪初开始,至今一直是运动医学研究的热点。运动性疲劳是指运动后导致机体生理过程不能持续其功能在特定水平上和(或)各器官不能维持预定的运动强度的现象^[1]。运动性疲劳产生后会降低机体的运动能力,也会使机体产生相应的生理生化以及病理的改变。减弱或缓解运动性疲劳产生的运动能力下降问题,一直是体育和医学相关学科共同研究的课题。中医药在抗疲劳方面和提高运动能力方面的研究中获得了大量的经验,且有良好的效果。

通过临床病例观察中发现,地黄饮子具有改善患者疲劳状态的功效,实验研究结果显示地黄饮子可以增加双转基因痴呆小鼠超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量,降低丙二醛(MDA)的含量^[2];能通过保护线粒体结构功能,改善细胞能量代谢^[3];可降低脑组织中脂褐素含量,提高大鼠抗氧化能力^[4]。本文在此基础上研究地黄饮子对运动性疲劳小鼠运动能力的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药物

选用清洁级雄性昆明小鼠30只,由黑龙江中医药大学动物实验中心提供,动物生产许可证号为SCXK(黑)2019-001,体质量为(28 ± 2)g,8周龄。饲养于自然光照条件下,20~25℃,自由进食。地黄饮子水煎液由黑龙江中医药大学中医基础理论实验室提供,地黄饮子组成:熟地黄、石斛、山茱萸、肉苁蓉、巴戟天、五味子、麦冬、肉桂、远志、石菖蒲、茯苓各15g,炮附子、薄荷、生姜各5g,大枣1枚。加10倍水浸泡1h,砂锅煎煮1h后倒出药液,按照上述步骤将药物再煎煮1次;将2次滤出的药液混合并浓缩成1.85g/mL的生药浓度,高压灭菌后放入

4℃冰箱备用。

1.2 动物分组及给药方法

适应性喂养3d后,随机分为安静对照组(安静组)、疲劳模型组(模型组)和地黄饮子组,每组10只小鼠。常规饲料喂养外,地黄饮子组每天给予24.05g/kg的地黄饮子水煎液灌胃,安静组和模型组给予等剂量的蒸馏水灌胃,共灌胃4周。

1.3 主要仪器

ELITE 300PLUS 基础电泳仪电源、Yrdimes SW 07D0567 蛋白印迹仪、Dolphin 系列凝胶成像系统均购自威泰克有限公司;5415C 高速冷冻离心机(德国 eppendorf公司);UV-2540 分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);THZ-312 台式恒温振荡器(上海精宏实验设备有限公司);BL310/BL21S 分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.4 主要实验试剂

睾酮、皮质醇检测试剂盒(20190107),MDA、SOD、GSH-Px 检测试剂盒(20190320),检测试剂盒(20190312)均购于中国南京建成生物工程研究所。全蛋白抽提试剂盒(KGP2100)、Western 及 IP 细胞裂解液(KGP701)、SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒(KGP113)、BCA 蛋白含量检测试剂盒(KGP903)购于南京凯基生物科技发展有限公司;Invent 总蛋白提取试剂盒(Invent SD001/SN002)购于英文特生物技术股份有限公司;ECL 检测试剂盒(Millipore WBKLS0100)购于德国默克公司。

1.5 动物模型制备

除安静组外,另两组每天进行游泳训练,在直径为100cm、深度为60cm的圆形游泳池内进行,水温为(30 ± 2)℃,每周游泳训练6d,休息1d,训练时间为每天60min,训练4周。

1.6 取材

在力竭游泳后即刻取材,各组小鼠采用眼眶取

血,采血后立刻断颈、解剖,取肝和股直肌,生理盐水洗净,-80℃冰箱保存备用。血液样本离心后取上清液,-80℃冰箱保存待测。

1.7 指标检测

1.7.1 体质量称量 开始游泳训练前每组小鼠称体质量,开始训练后,于每周的造模休息日称体质量,最后一周取材前称体质量。

1.7.2 力竭游泳时间 记录模型组和地黄饮子组小鼠从开始游泳至四肢出现不协调,头部全部沉入水中5 s不能自主浮出水面,取出水后不能自由抬起头的时间,即为力竭游泳时间。

1.7.3 血清血睾酮、皮质醇、尿素氮含量测定 离心后的血清,严格按照睾酮、皮质醇、尿素氮的检测试剂盒的说明书进行操作,测定各指标的数值,记录并分析。

1.7.4 肝组织抗氧化酶活性测定 取肝组织天平称重后,置于冷生理盐水中,制成10%的匀浆,离心后取上清液,用BCA法蛋白定量后,按照试剂盒说明书的操作步骤来检测各组小鼠肝组织SOD、GSH-Px活性和MDA含量。

1.7.5 Western blot法检测股直肌中AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平 用Invent试剂盒提取股直肌组织蛋白,低温操作;采用BCA法检测股直肌组织蛋白浓度,各管试剂充分混匀,37℃放置30 min,记录吸光值;配制SDS-PAGE的分离胶后,将SDS-PAGE的浓缩胶注入分离胶的上端,插入与玻璃板厚度相适应的样品梳子,避免产生气泡,开始电泳;电压开始设置为60 V,当蛋白样品进入分离胶后,电压提高到90 V,参照预染Marker的位置,待目的条带进入凝胶的2/3时,停止电泳;预先将转膜液4℃预冷,转印夹层依次形成“纤维垫—滤纸—凝胶—NC/PVDF膜—滤纸—纤维垫”层次,关闭转印夹,放入转移槽中;稳流200 mA,90 min,转膜结束后,取出NC/PVDF膜并作好标记;封闭,蛋白上样量40 μg,AMPK和PGC-1 α (1:500)、Actin(1:1 000)一抗4℃孵育过夜;羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗(1:5 000)常温孵育2 h,免疫印迹完成;用ECL化学发光试剂配置的工作液滴在NC/PVDF膜上,凝胶成像仪成

像;用Gel-Pro Analyzer 4软件对结果进行灰度分析。

1.8 统计学方法

使用SPSS 16.0统计软件对本次研究中的数据进行处理,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间采用单因素方差分析进行比较,差异显著性水平定义为 $P<0.05$,若3组之间差异具有显著性,则进行多重比较,由于每组样本量相同,故采用Tukey Test进行多重比较。两组之间进行比较,则采用t检验。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量变化比较

安静组与模型组比较,体质量具有显著性差异($P<0.05$);地黄饮子组与模型组比较,体质量具有显著性差异($P<0.05$)。见表1。

2.2 各组小鼠力竭时间比较

地黄饮子组与模型组比较,力竭游泳时间明显延长($P<0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠体质量及力竭游泳时间比较($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	体质量/g	力竭游泳时间/min
安静组	42.35±1.21	-
模型组	38.75±2.49 [#]	71±14
地黄饮子组	41.42±2.05 [*]	83±12 [*]

注:与安静组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$

2.3 各组小鼠血睾酮、皮质醇、尿素氮水平比较

模型组与安静组比较,血睾酮含量明显降低($P<0.05$);皮质醇、尿素氮含量显著升高($P<0.05$)。地黄饮子组与模型组比较,血睾酮含量明显升高($P<0.05$),皮质醇、尿素氮含量显著降低($P<0.05$)。见表2。

表2 各组小鼠血睾酮、皮质醇、尿素氮比较($\bar{x}\pm s$,n=10)

组别	睾酮/(nmol·L ⁻¹)	皮质醇/(nmol·L ⁻¹)	尿素氮/(mmol·L ⁻¹)
安静组	23.72±1.34	76.48±5.32	8.46±2.17
模型组	14.65±0.73 [#]	115.20±4.43 [#]	12.62±2.18 [#]
地黄饮子组	17.28±0.81 ^{**}	97.82±3.65 ^{**}	9.67±1.79 ^{**}

注:与安静组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{**} $P<0.05$

2.4 各组小鼠肝组织SOD、MDA、GSH-Px水平比较

与安静组比较,模型组肝组织SOD、GSH-Px

含量明显降低($P<0.05$)，MDA 含量显著升高($P<0.05$)；与模型组比较，地黄饮子组 SOD、GSH-Px 含量明显升高($P<0.05$)，MDA 含量显著降低($P<0.05$)。见表3。

表 3 各组小鼠 SOD、MDA、GSH-Px 比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)
安静组	117.18±11.81	13.12±0.44	12.52±2.17 [#]
模型组	92.40±16.50 [#]	16.59±1.09 [#]	8.65±2.19 [#]
地黄饮子组	109.57±13.56 ^{##}	15.31±0.79 ^{##}	11.43±1.78 ^{##}

注：与安静组比较,[#] $P<0.05$ ；与模型组比较,^{##} $P<0.05$

2.5 各组小鼠股直肌中 AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平比较

与安静组比较,模型组股直肌中 AMPK、PGC-1 α 的表达是明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,地黄饮子组的 AMPK、PGC-1 α 表达量明显升高($P<0.05$)。见表 4、图 1。

表 4 各组小鼠股直肌中 AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	AMPK	PGC-1 α
安静组	0.21±0.03	0.16±0.04
模型组	0.27±0.04 [#]	0.23±0.03 [#]
地黄饮子组	0.36±0.03 ^{##}	0.34±0.03 ^{##}

注：与安静组比较,[#] $P<0.05$ ；与模型组比较,^{##} $P<0.05$

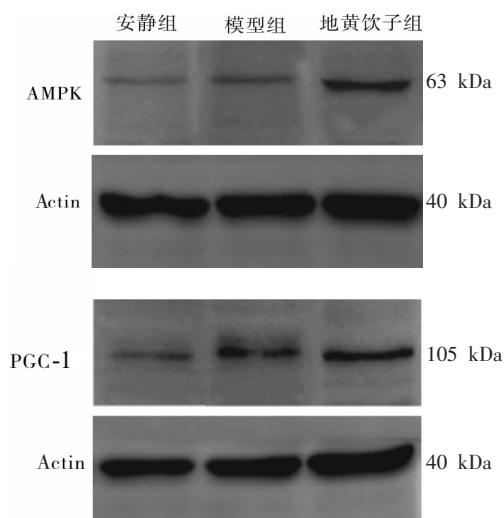


图 1 各组小鼠股直肌中 AMPK、PGC-1 α 蛋白电泳图

3 讨论

地黄饮子出自金代刘完素的《黄帝素问宣明论方》，由 15 味中药组成，功效为滋肾阴、补肾阳、开窍化痰，是阴阳双补的代表方之一。现代研究表明地

黄饮子药物血清可能通过抑制 RAGE/ROS 氧化应激通路激活，减少 ROS 的产生，发挥抗氧化作用^[5]。周妍妍等^[6]研究证实地黄饮子含药脑脊液可以显著抑制 A β 导致的大鼠神经元及 PC12 细胞中 SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶(CAT)活性下降，降低 MDA 水平，提高细胞抗氧化能力。

当运动性疲劳发生时，体内会出现比较复杂的生理生化反应，表现出运动能力和耐力的下降及机体供能不足；力竭时间是衡量机体运动能力的重要直接指标^[7]；皮质醇与机体的运动强度和运动时间密切相关；血睾酮含量会因长时间的运动，合成分泌受到抑制，出现运动性低睾酮现象^[8]，从而降低机体的运动能力。有效清除自由基，抑制氧化应激反应是减轻运动性疲劳的方法之一^[9]，SOD 活性的高低能间接反映机体清除自由基的能力^[10]；GSH-Px 能够使谷胱甘肽由还原型转变为氧化型，是衡量机体抗氧化能力的重要因素^[11]；MDA 含量可反映体内氧化应激反应的程度^[12]。血清尿素氮的升高标志着糖原已经消耗殆尽，机体已经依靠蛋白质的分解供能^[13]。

AMPK 是调节能量代谢的关键因子，是敏感的能量变化感应系统^[14]。AMPK 参与机体多种物质能量代谢过程，当细胞处于应激状态(如缺血、缺氧、运动等)时，AMPK 激酶系统将启动，增加葡萄糖转运和脂肪酸氧化等代谢过程，同时阻断糖异生、蛋白质合成以及脂类等代谢过程^[15]。因此，氧化应激和细胞能量代谢的改变可激活 AMPK^[16]。PGC-1 α 在脂肪酸氧化、葡萄糖代谢、线粒体生物合成等方面有重要的调控作用。PGC-1 α 通过激活编码线粒体基因的转录因子表达，提高体内能量代谢酶的活性，从而提高骨骼肌的抗疲劳能力^[17-18]。有实验发现^[17-18]，三仙汤能明显提高肌肉组织的 PGC-1 α 蛋白表达量，提高了机体物质转化能量的速率，使供能物质的合成加速。有研究报道^[18]，小建中汤有缓解运动性疲劳的作用，可能的作用机制是通过提高骨骼肌中 AMPK/PGC-1 α 信号通路的蛋白表达，增强了线粒体的氧化磷酸化过程，减少了代谢产物的堆积，增强了骨骼肌能量合成代谢。有研究证实^[19]，一些代谢疾病中，出现线粒体功能障碍后，AMPK/PGC-1 α 信号通路受到明显抑制。当机体出现运动性疲劳时，AMPK 和 PGC-1 α 表达也受到抑制，能量代谢通路受阻，机体能量供

应不足,代谢产物不能及时清除,因此,提高AMPK和PGC-1 α 的表达能够在一定程度上缓解运动性疲劳。

本实验中,与模型组比较,地黄饮子组小鼠体质量增加明显($P<0.05$),表明模型组小鼠的能量代谢快,体质量增长慢,疲劳程度重;力竭游泳时间明显延长($P<0.05$),表明地黄饮子组小鼠的运动耐力更强;血睾酮含量明显升高($P<0.05$),表明地黄饮子组小鼠的运动能力更强;皮质醇、尿素氮含量显著降低($P<0.05$),表明地黄饮子组小鼠的耐受的运动强度和运动负荷更高;肝组织GSH-Px、SOD活性显著增强($P<0.05$),MDA含量明显降低($P<0.05$),表明地黄饮子组小鼠清除自由基和抑制氧化应激反应的能力更强。AMPK、PGC-1 α 的蛋白表达升高($P<0.05$),表明地黄饮子组小鼠通过AMPK/PGC-1 α 信号通路调控能量代谢的能力更强,能够在一定程度缓解小鼠运动性疲劳的状态。

综上所述,地黄饮子可能是通过降低运动性疲劳模型小鼠血皮质醇、尿素氮、MDA含量,提高GSH-Px、SOD活性和血睾酮的含量,提高AMPK、PGC-1 α 的蛋白表达水平,在一定程度上增强运动性疲劳模型小鼠的运动耐力、运动强度和运动负荷,增加清除自由基和抑制氧化应激反应的能力,提高肌肉组织的物质代谢的能力,从而提升机体运动能力和加速疲劳恢复,起到缓解运动性疲劳的作用。

参考文献

- [1] 王瑞元.运动生理学[M].北京:北京体育大学出版社,2002:305.
- [2] 周妍妍,董春雪,刘艳丽,等.地黄饮子对双转基因痴呆小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响[J].上海中医药杂志,2014,48(2):80-84.
- [3] 黄倩倩,赵永烈,高俊峰,等.地黄饮子对AD大鼠中枢神经线粒体结构及功能的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(21):99-104.
- [4] 陈秀艳,郭蕾,张俊龙,等.地黄饮子对帕金森病肾虚证模型大鼠的干预作用及机制研究[J].云南中医中药杂志,2018,39(3):72-75.
- [5] 朴钟源,魏亚芬,宋琳,等.地黄饮子对A β 1-42诱导的SH-SY5Y细胞中RAGE/ROS/凋亡通路的影响[J].广州中医药大学学报,2017,34(4):543-550.
- [6] 周妍妍,谢宁,姚辛敏,等.地黄饮子对AD细胞模型抗氧能力影响的实验研究[J].中医学报,2010,25(2):249-250.
- [7] 李宝茹,臧洁,吴涛,等.补肾益寿片对小鼠力竭游泳时间及血清生化指标的影响[J].中成药,2013,35(12):2741-2743.
- [8] 李俊豪.基于HPG轴探讨推拿对运动性疲劳大鼠睾酮水平调节机制[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [9] 尹瑞欣,白江涛,张晓红,等.补阳还五汤对运动性疲劳大鼠抗氧化酶活性的影响[J].广东医学,2015,36(10):1487-1489.
- [10] GASTROGIOVANNI P, IMBESI R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise [J]. Italian Journal of Anatomy and Embryology, 2012, 117(2):107-117.
- [11] 刘瑞.针灸疗法治疗运动性疲劳的抗氧化应激机制探索[J].广州中医药大学学报,2019,36(7):1029-1034.
- [12] 张广林,王本瀚,熊家锐,等.绞蓝总皂甙对慢性脑缺血性白质氧化性损伤的保护作用[J].中华神经医学杂志,2012,11(12):1219-1224.
- [13] 郝慧祯.“八珍汤加减”对冬训期间竞走运动员抗疲劳能力的影响[D].呼和浩特:内蒙古师范大学,2020.
- [14] 张喜召,包洁,窦晓兵,等.基于AMPK-PGC-1 α 信号通路探讨“上火”动物模型的发病机制[J].中华中医药杂志,2020,35(4):2002-2006.
- [15] 张洁,傅力.AMPK在机体骨骼肌运动代谢适应方面的研究进展[J].生理科学进展,2016,47(5):391-394.
- [16] 罗琳,张缨.AMPK与氧化应激及其与运动关系的研究进展[J].中国体育科技,2017,53(4):125-130.
- [17] 高天宇.三仙汤对小鼠运动性疲劳影响的实验研究[D].哈尔滨:哈尔滨体育学院,2019.
- [18] 林致辉,周庆莹,王梦妮,等.小建中汤对运动性疲劳小鼠骨骼肌AMPK/PGC1- α 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(13):73-78.
- [19] 王继,杨中亚,张龙,等.AMPK/PGC-1 α 在有氧运动改善2型糖尿病大鼠骨骼肌萎缩中的[J].中国组织工程研究,2020,24(20):3180-3185.

(本文编辑 苏维)