

仙茅酒对小鼠抗疲劳作用的影响

潘明^a, 陈欲云^b, 刘春丽^a, 邬亚平^b, 代联伶^b, 陈利娟^b

(四川理工学院 a. 生物工程学院; b. 化学与制药工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要:评价仙茅酒对小鼠抗疲劳作用的影响。方法:50 只 SPF 级 ICR 小鼠随机分成 5 组, 每天灌胃 1 次, 连续 14 天。各组小鼠末次给药 30 min 后, 称重, 小鼠负重游泳 3 min, 休息 5 min 后摘眼球取血, 测定各组小鼠血清 SOD、LDH、全血 LD、肝糖原和肌糖原。结果:与空白对照组比较, 仙茅酒高、中剂量组血清 SOD 含量显著性升高 ($P < 0.05$), 仙茅酒高剂量组小鼠全血 LD 含量显著性降低 ($P < 0.05$), 仙茅酒高、中剂量组小鼠肌糖原含量明显增高 ($P < 0.05$), 仙茅酒高剂量组小鼠肝糖原也显著性增高 ($P < 0.05$); 与小曲酒组比较, 仙茅酒高、中剂量组血清 SOD 含量也显著性升高 ($P < 0.05$), 仙茅酒高剂量组小鼠全血 LD 含量显著性降低 ($P < 0.05$), 肌糖原含量显著性升高 ($P < 0.05$)。结论:仙茅酒可以增加小鼠运动耐力, 减轻小鼠运动性疲劳。

关键词:仙茅酒; 抗疲劳; 小鼠

中图分类号:Q814

文献标志码:A

引言

仙茅 (*Curculigo orchioides* Gaertn.), 又名地棕、独茅、仙茅参等, 为仙茅属药用植物; 具有补肾助阳、益精血、强筋骨和行血消肿的作用。文献[1]报道仙茅、大叶仙茅和三叶鬼针草已被传统医学用于治疗各种疾病, 如阳痿、腰膝无力、胃肠道和心脏疾病。董国明^[2]研究表明, 仙茅提取物对阳虚型 SD 大鼠血清 SOD、血清 Zn/Cu 比值、血浆 cAMP/cGMP 水平的恢复可能是仙茅壮阳作用的机制。Wu Xiuying^[3]的研究表明仙茅苷可以降低老年大鼠脑 AchE 的活性, 并下调 BACE1 的表达而改善老年大鼠记忆缺失的症状。

运动性疲劳亦称体力性疲劳, 在中医学属于“劳”、“虚劳”的范畴, 即劳动或运动可导致机体阳气不足而引发肢软乏力、神疲倦怠等气虚症候, 形成体力性疲劳^[4]。运动过程中, 可因出汗津液损耗导致阴虚之症; 另一方面运动可致气虚血瘀之症; 故人体能否迅速补充由于运

动所消耗的精气, 排出运动过程中产生的代谢产物, 恢复机体阴阳平衡是机体抗运动性疲劳的关键。

中国民间仙茅浸泡于酒中, 制成仙茅酒用于治疗阳痿滑精, 腰膝冷痛, 男子精寒, 女子宫冷不孕, 老年遗尿, 小便余沥等疾病。但尚未见仙茅酒抗疲劳作用的文献报道, 本研究对仙茅酒影响小鼠抗运动性疲劳作用机制做初步探讨。

1 材料与仪器

1.1 材料

超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒, 批号: 20131206; 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒, 批号: 20140317; 肌糖原及肝糖原测定试剂盒, 批号: 20140121; 全血乳酸 (LD) 试剂盒, 批号: 20140305; 均购于南京建成生物工程研究所。仙茅, 批号: 20131208, 购于四川省中药饮片有限公司。

1.2 实验动物

SPF 级 ICR 小鼠 50 只, 雄性, 购于中国医学研究院

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目 (NJ2014-11)

作者简介: 潘明 (1966-), 女, 湖北麻城人, 教授, 博士, 主要从事食品生物技术与应用微生物方面的研究, (E-mail) panming106@163.com

四川省人民医院动物实验中心,动物生产许可证 SCXK(川)2013-15。

1.3 仪器

H-1850R 台式高速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;JJ-1 电动搅拌器,常州国华电器有限公司;756pc 紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司。

2 实验方法

2.1 仙茅酒的制备

将仙茅 200 g 切成 3 cm 小段后浸泡于 1000 mL 小曲酒中,密封 21 天后过滤即得。

2.2 动物分组及给药

SPF 级 ICR 小鼠 50 只,正常饲养 1 周,开始实验。按体质量随机分为空白对照组、小曲酒组、仙茅酒低剂量、中剂量、高剂量 5 组,每组 10 只。给药量参照《药理与中药药理实验》^[5]中推荐的成人服用中药剂量折换成小鼠服用剂量,即空白对照组灌胃等剂量生理盐水 0.1 mL/10gBW,小曲酒组灌胃等剂量小曲酒 0.1 mL/10gBW,仙茅酒低、中、高剂量组分别灌胃剂量为 0.06 mL/10gBW、0.12 mL/10gBW、0.24 mL/10gBW,每天灌胃 1 次,连续 14 d。

2.3 血清 SOD、LDH 测定

各组小鼠连续给药 14 d,参照《保健食品功能学评价程序和方法》^[6]中抗疲劳作用检验方法进行实验。各组小鼠末次给药 30 min 后,称重,在小鼠尾根部负荷一块质量为小鼠体质量 10% 的重物,将小鼠置于水温 25 ℃、水深 25 cm 的水箱中游泳 3 min,然后将小鼠取出,5 min 后摘眼球取血,收集于 2 mL 离心管中,3500 r/min 离心 8 min,取上清即得血清。

血清 SOD 活力测定按照试剂盒说明书操作,血清中总 SOD (T-SOD)活力计算公式:

$$\text{总 SOD 活力(U/mL)} = \frac{A_{\text{对照管}} - A_{\text{测定管}}}{A_{\text{对照管}}} \times$$

反应体系稀释倍数 × 样本测试前稀释倍数 × 2

血清 LDH 活力测定,乳酸脱氢酶催化乳酸生成丙酮酸的同时将烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)还原成 NADH。通过测定 NADH 在 440 nm 处吸光度可求得各样本乳酸脱氢酶的活力。

2.4 全血乳酸(LD)含量测定

依照全血乳酸(LD)试剂盒说明书步骤操作,按 2.3 项小鼠摘眼球取血,留取 50 μL 全血,置于用肝素钠处理过的离心管中,再加入 0.6 mL 蛋白沉淀剂,静置 10 min,3500 r/min 离心 8 min,取上清液 20 μL 加入酶

工作液和显色剂充分混匀,37 ℃ 孵育 10 min,加入终止剂终止反应。于 530 nm 波长处测定其吸光度值。

2.5 肝糖原和肌糖原含量测定

参考文献^[7]浓硫酸可使得糖原脱水生成糖醛衍生物,后者再与蒽酮作用形成蓝色化合物与同法处理的标准葡萄糖溶液比色定量。各组小鼠取血后立即脱颈椎处死,解剖取出肝脏和后肢肌肉,置于冰冻生理盐水中,剔除结缔组织,用滤纸吸干,称重(样本质量 ≤ 100 mg 为宜)。按样本质量(mg):碱液体积(μL) = 1:3 配制浓减溶液,将样本加入浓碱溶液中,沸水水浴 20 min,流水冷却后加入蒸馏水,按照试剂盒说明书操作,于 620 nm 波长处,测各样本 OD 值。糖原含量的计算公式:

$$\text{糖元含量(mg/g 组织)} = \frac{OD_{\text{测定管}}}{OD_{\text{标准管}}} \times \text{标准管含量}$$

(0.01 mg) × 样品测试前稀释倍数 × 10 ÷ 1.11

2.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异用单因素方差分析进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 小鼠一般情况变化

对小鼠一般情况观察(表 1),用药两周后与空白对照组比较,仙茅低、中剂量组小鼠毛色、食欲正常,精神状态好,体质量无显著性差异($P > 0.05$);仙茅酒高剂量组小鼠体质量显著性增加($P < 0.05$),这可能是由于仙茅酒高剂量增加了小鼠食欲使得体质量显著性增加。

表 1 各组小鼠体质量

组别	给药前	药后 14 d
空白对照组	19.57 ± 1.48	28.23 ± 1.77
小曲酒组	20.12 ± 1.51	28.92 ± 1.69
仙茅酒低剂量组	20.55 ± 1.30	29.65 ± 1.64
仙茅酒中剂量组	19.33 ± 1.42	30.30 ± 1.91
仙茅酒高剂量组	20.58 ± 1.56	34.31 ± 2.02 *

注: * 表示与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3.2 血清 SOD 的含量

小鼠血清中 SOD 的含量见表 2,与空白对照组比较,仙茅酒高、中剂量组血清 SOD 含量显著升高($P < 0.05$),仙茅酒低剂量组有增加趋势,但无统计学意义;与小曲酒组比较,仙茅酒高、中剂量组血清 SOD 含量也显著性升高($P < 0.05$)。

在劳累性运动中,SOD 被认为是抑制活性氧产生的抗氧化酶系中最先起作用的酶系之一^[8]。另有研究报道^[9],血清中的 SOD 活性增加与运动性疲劳所致的氧化应激反应加强有关系;SOD 能够增强机体内代谢废物的清除能力,从

而消除疲劳。连续给药 14 d 后,仙茅酒中的活性成分显著性地增加小鼠血清 SOD 含量,说明仙茅酒能增加小鼠体内阴离子自由基的清除从而增加小鼠抗疲劳能力。

表 2 仙茅酒对小鼠血清 SOD 含量的影响

组别	SOD/(U/mL)
空白对照组	36.07 ± 6.50
小曲酒组	36.74 ± 9.88
仙茅酒低剂组	50.33 ± 8.40
仙茅酒中剂组	51.64 ± 15.95 * #
仙茅酒高剂组	52.37 ± 13.11 * #

注: * 表示与空白对照组比较, * $p < 0.05$, # 表示与小曲酒组比较, # $p < 0.05$ 。

3.3 血清 LDH 的活力

检测小鼠血清中 LDH 含量,结果见表 3。与空白对照组相比,仙茅酒组 LDH 活力均有提高,但没有统计学意义。

表 3 仙茅酒对小鼠血清 LDH 活力的影响

组别	LDH/(U/mL)
空白对照组	0.87 ± 0.58
小曲酒组	0.99 ± 0.56
仙茅酒低剂组	0.89 ± 0.62
仙茅酒中剂组	0.91 ± 0.56
仙茅酒高剂组	1.15 ± 0.80

LDH 是一个能够准确反应肌肉损伤程度的指标,LDH 可以催化乳酸转化为丙酮酸,与乳酸的清除代谢相关,可减少乳酸的堆积^[10]。由此可见,血清 LDH 活力是反映乳酸清除速度的指标。连续给药 14 d 后,负重游泳 3 min,各组小鼠血清中 LDH 含量均有增高的趋势,但无统计学意义。可能延长仙茅酒干预时间,可以显著性地提高小鼠血清 LDH 而加快乳酸清除速度。

3.4 全血 LD 的含量

小鼠全血 LD 含量检测结果见表 4,与空白对照组比较,仙茅酒高剂量组 ($P < 0.05$) 小鼠全血 LD 含量显著性降低,小曲酒组、仙茅酒低、中剂量组小鼠全血 LD 含量有降低趋势,但无显著性差异 ($P > 0.05$);与小曲酒组比较,仙茅酒高剂组小鼠全血 LD 含量显著性降低 ($P < 0.05$),提示仙茅酒中的活性成分增加了小曲酒的抗疲劳作用。

表 4 仙茅酒对小鼠全血乳酸含量的影响

组别	LD/(mmol/L)
空白对照组	9.03 ± 1.30
小曲酒组	8.81 ± 1.21
仙茅酒低剂组	8.82 ± 1.46
仙茅酒中剂组	7.62 ± 0.95
仙茅酒高剂组	7.06 ± 1.30 * #

注: * 表示与空白对照组比较, * $p < 0.05$; # 表示与小曲酒组比较, # $p < 0.05$ 。

Chang Qi^[11] 的研究表明,全血乳酸是一个运动强度指标,电流刺激组的大鼠肌肉乳酸浓度低于运动对照组,提示肌肉乳酸浓度降低促进了运动大鼠有氧代谢过

程中 ATP 的产生。肌乳酸是供能体系的中间产物,长时间剧烈运动会使机体相对缺氧,糖酵解加快,产生大量肌乳酸,这是导致疲劳的重要原因。运动过程中,肌肉产生的乳酸会在 5 ~ 15 min 内渗入血液,使血乳酸含量上升,最终二者达到平衡,所以可以通过测定血乳酸含量反映肌乳酸情况^[12]。本研究中各组小鼠连续给药 14 d,负重游泳 3 min 后,仙茅酒高剂量组可显著性地降低小鼠全血中 LD 含量,从而提高小鼠抗疲劳的能力。

3.5 肝糖原及肌糖原的含量

小鼠肝糖原和肌糖原含量测定结果见表 5,与空白对照组比较,仙茅酒高、中剂量组小鼠肌糖原含量明显增高 ($P < 0.05$),仙茅酒高剂量组小鼠肝糖原含量也显著性增高 ($P < 0.05$);与小曲酒组比较,仙茅酒高剂量组小鼠肌糖原含量显著性升高 ($P < 0.05$)。

表 5 仙茅酒对小鼠肝糖原与肌糖原的影响

组别	肝糖原/(mg/g)	肌糖原/(mg/g)
空白对照组	9.24 ± 1.30	0.56 ± 0.15
小曲酒组	9.84 ± 1.17	0.65 ± 0.18
仙茅酒低剂量组	9.26 ± 1.38	0.70 ± 0.20
仙茅酒中剂量组	10.62 ± 1.82	0.81 ± 0.22 *
仙茅酒高剂量组	11.54 ± 2.09 *	0.89 ± 0.14 * #

注: * 表示与空白对照组比较, * $p < 0.05$, # 表示与小曲酒组比较, # $p < 0.05$ 。

在运动过程中,ATP 的消耗和能源的不足是身体疲劳的关键因素,机体的能量供应主要依赖于糖原发生糖酵解产生的 ATP,所以糖原的储备直接影响运动能力^[13]。在中等运动强度过程中,疲劳主要是由于肌肉中的糖原耗尽^[14]。文献^[15]报道,运动使得肌糖原不断消耗,机体为维持血糖水平,将动用肝糖原而导致肝糖原减少。在本研究中,仙茅酒可以通过增加肝糖原与肌糖原含量从而增加小鼠的运动耐力,减轻疲劳程度。

4 结束语

实验结果显示,仙茅酒高剂量组(0.24 mL/10gBW)和中剂量组(0.12 mL/10gBW)可以提高小鼠的运动耐力,其机制可能与仙茅酒增加小鼠血清 SOD 含量从而加强机体清除运动过程中产生的代谢产物的能力,间接地增强小鼠运动耐力有关;同时降低小鼠全血 LD 含量及升高小鼠肌糖原和肝糖原含量,为小鼠运动抗疲劳提供直接的能源。

参考文献:

- [1] Yan Nie, Dong Xin, He Yongjing. Medicinal plants of genus *Curculigo*: traditional uses and a phytochemical and ethnopharmacological review[J]. *J. Ethnopharmacol*, 2013,

- 147(3):547-63.
- [2] 董国明,张汉明.仙茅提取物与仙茅甙的补肾壮阳作用及其机理研究[J].中国中西医结合杂志,2000(7):123-124.
- [3] Wu Xiuying,Li Jianzhong,Guo Jianzheng,et al.Ameliorative Effects of Curculigoside from Curculigo orchioides Gaertn on Learning and Memory in Aged Rats[J].Molecules,2012,17:10108-10118.
- [4] 肖婷婷,郭倩,田成旺,等.抗运动性疲劳中药及其复方的研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(3):446-451.
- [5] 张大方,金若敏.药理与中药药理实验[M].上海:上海科学技术出版社,2008.
- [6] 卫生部卫生监督司.保健食品功能学评价程序与检测方法[M].北京:化学出版社,1996.
- [7] Vies J V.Methods for the determination of glycogen in liver[J].Biochem,1954,57(4):410.
- [8] Mestre-Alfaro A,Ferrer M D,Sureda A,et al.Phytoestrogens enhance antioxidant enzymes after swimming exercise and modulate sex hormone plasma levels in female swimmers[J].Eur J Appl Physiol,2011,111:2281-2294.
- [9] Feng Z H,Bai L Y,Yan J,et al.Mitochondrial dynamic remodeling in strenuous exercise-induced muscle and mitochondrial dysfunction:regulatory effects of hydroxytyrosol[J].Free Radical Bio Med,2011,50:1437-1446.
- [10] Kim H,Park S,Han D S,et al.Octacosanol supplementation increases running endurance time and improves biochemical parameters after exhaustion in trained rats[J].J Med Food,2003(6):345-351.
- [11] Chang Qi,Miao Xinfang,Ju Xiaowei,et al.Effects of Pulse Current on Endurance Exercise and Its Anti-Fatigue Properties in the Hepatic Tissue of Trained Rats[J].PLoS One,2013,8(10):e75093.
- [12] 张睿,赵玉红,王忠政.鹿茸水提物对小鼠抗疲劳功能的影响[J].食品工业科技,2011(4):365-367.
- [13] Iaia F,Perez-Gomez J,Nordsborg N,et al.Effect of previous exhaustive exercise on metabolism and fatigue development during intense exercise in humans[J].Scand J Med Sci Spor,2010,20:619-629.
- [14] Tan W,Yu K Q,Liu Y Y,et al.Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from Radix Rehmanniae Preparata[J].Int J Biol Macromole,2012,50:59-62.
- [15] Yalcin O,Bor K M,Baskurt O K,et al.Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats[J].J Appl Physiol,2000,88(6):2074-2080.

Anti-fatigue Effects of Curculigo Orchioides Wine on Mice

PAN Ming^a, CHEN Yuyun^b, LIU Chunli^a, WU Yaping^b, DAI Lianling^b, CHEN Lijuan^b

(a. School of Biotechnology Engineering; b. School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

Abstract: Objective: To evaluate the anti-fatigue effect of curculigo orchioides wine on mice. Methods: 50 SPF ICR mice were randomly divided into 5 groups. Mice were given intragastric administration once a day for 14 days. Each of groups of mice, after the last administration for 30 min, were weighed and loaded swimming for 3 min, picked off eyeball and taken blood after 5 min, and then serum SOD, LDH, whole blood LD, liver glycogen and muscle glycogen were measured. Results: compared with the blank control group, for high, middle dosage groups of curculigo orchioides wine, the content of serum SOD was significantly increased ($P < 0.05$) For high dose group of curculigo orchioides wine whole blood LD content was significantly decreased ($P < 0.05$). For high, middle dose groups of curculigo orchioides wine muscle glycogen content increased significantly ($P < 0.05$). For high dose group of curculigo orchioides wine liver glycogen increased significantly ($P < 0.05$); compared with Xiaoqu wine group, for high, middle dose group of curculigo orchioides wine, serum SOD content was significantly increased ($P < 0.05$). For high dose group of curculigo orchioides wine whole blood LD content was significantly decreased ($P < 0.05$), muscle glycogen content was significantly increased ($P < 0.05$). Conclusion: Curculigo orchioides wine can increase exercise endurance in mice, reduce exercise - induced fatigue in mice.

Key words: curculigo orchioides wine; anti-fatigue; mice