

海马酶法提取物的抗疲劳作用

彭汶铎¹ 陈启亮²

(1. 中山大学药学院,广东 广州 510275;2. 汕尾市金海宝有限公司,广东 汕尾 516600)

摘要:为了解海马酶法提取物的抗疲劳作用,制备一次性运动疲劳模型小鼠和递增运动量疲劳模型小鼠,(后者的制备方法是:小鼠给予体重3%的负荷进行游泳,每天定时1次连续4d,第1天游泳时间30min,然后每天递增10min)。测定上述2种疲劳小鼠的血乳酸、血清尿素氮和后肢骨骼肌脂质过氧化程度。结果表明,海马酶解提取物(Enzymatic extracts of hippocampus, EEH)即可减少运动时乳酸、尿素氮和过氧化物的产生,又能促进运动后3者的清除;EEH的作用与机体的运动状态有关,随着运动量的增加和疲劳程度的加重,EEH的作用也增强。此外,对于正常小鼠,EEH可延长其在缺氧、寒冷以及缺氧合并寒冷条件下的生存时间,延长游泳时间。EEH的上述作用均呈明显的量效关系。在本试验条件下EEH具有明显的抗疲劳作用。

关键词:海马;组织提取物;疲劳;运动性;乳酸;血尿素氮;脂质过氧化作用;抗疲劳

Anti-fatigue effect of enzymatic extract of hippocampus

PENG Wen-duo, CHEN Qi-liang

(School of Drug Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangdong Guangzhou 510275, China)

Abstract: Hippocampus has long been used as an ingredient in Chinese traditional medical prescriptions. To explore the health protection effect of hippocampus, four groups of NIH mice were given enzymatic extract of hippocampus (EEH) 0, 50, 100, 200 mg/kg BW respectively by gavage daily for 14 days. On the 14th day, 1 hour after the last dose was given, the animals' capacity to tolerate fatigue was tested by physical exercise (swimming) of various intensity. The level of blood lactic acid, serum urea nitrogen and lipid-peroxidation of skeletal muscle of hind leg were used as indexes of the capacity of tolerance. The results showed that the rise of these indexes was significantly lower and their clearance was faster after swimming in animals received EEH than those in the animals of the control group. It was also observed that the anti-fatigue action of EEH was dose-dependent, the larger the dose the stronger the action. Furthermore, EEH's effect was also related to the physical condition of the animal. The anti-fatigue effect enhanced with the increase of the intensity of physical exercise. In an additional test, EEH was found to have the effect of withstanding hypoxia and coldness.

Key word: Hippocampus; Tissue Extracts; Fatigue, Physical; Lactic Acid; Blood Urea Nitrogen; Lipid Peroxidation; Anti fatigue

评分特征相差较明显,等级差也较远,最大限度地减少了对象个体因素对实验的影响。同时,非常注意评分员的选择,要求评分员对《评价表》须有详细的了解,且有一线监督工作的经验,并能严格按照要求独立完成评分,不相互对比或比较,从而尽可能减少评分员差异的影响。严格控制2个因素后,实验结果

比较理想。

参考文献

[1] 方积乾. 医学统计学与电脑实验[M]. 上海:上海科学技术出版社,1997,243.

[收稿日期:2005-06-09]

中图分类号:R15;TS972.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)05-0401-04

基金项目:广东省自然科学基金(No. 940631)
作者简介:彭汶铎 男 博士 副教授

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, China. (No. 940631)

海马为传统高档滋补食品。据《本草拾遗》记载,海马性甘温,功能补肾壮阳、调气活血。文献曾报道日本海马、三斑海马全体粉碎灌胃对小鼠有抗疲劳作用^[1,2]。运动性疲劳既与体内内源性物质的消耗有关,也与神经、内分泌及免疫系统的平衡调节有关^[3]。本研究制备2种疲劳动物模型,研究海马酶解提取物(Enzymatic extracts of hippocampus, EEH)的抗疲劳作用,以及对动物抗应激反应能力和血象的影响。

1 材料与方法

1.1 EEH的制备及质量控制 大海马(*H. kelloggi* Jordan et Snyder)由广东省汕尾市水产供销公司提供,经粉碎、酶解、过滤等步骤制备酶解提取物,每克干海马制成EEH约10 ml。

1.2 动物和给样 NIH小白鼠,体重(23.2±1.7)g,购自广东省医用动物中心,雌雄皆有。小鼠随机分组,每个实验设4组:空白组(给予等容量蒸馏水)、EEH 50、100和200 mg/kg组,各组小鼠每天定时灌胃1次,自由饮水和取食,连续14 d,第14天给药1 h后开始测试。给药剂量折算为海马重量表示。

1.3 运动性疲劳模型动物制备及指标测定

1.3.1 一次性疲劳模型^[4] 每鼠给予体重4%的负荷,投入(30±0.5)℃恒温水箱中游泳45 min。游泳后30 min和90 min测定血乳酸(对羟基联苯比色法)和血清尿素氮(酶偶联速率法)。

1.3.2 递增运动量疲劳模型 每鼠给予体重3%的负荷,投入(30±0.5)℃恒温水箱中游泳,每天定时1次连续4 d,第1天游泳时间30 min,然后每天递增10 min,每天游泳后动物单独饲养并自由饮水和取食以利于体力的自然恢复,期间第2天~第4天游泳后约2 h给予EEH,保持饲养笼清洁干燥,保持室温恒定于(25±1)℃。第4天游泳后1 h和25 h取组织标本,测定血乳酸、血清尿素氮和后肢骨骼肌脂质过氧化程度(比色法)。

1.4 耐缺氧、耐寒和耐力实验

1.4.1 缺氧 将小鼠放入装有15 g钠石灰的250 ml广口瓶中,每瓶1只,加盖密封,以呼吸停止为终点记录动物存活时间,实验过程中保持室温恒定于(25±1)℃。

1.4.2 寒冷 将小鼠放入-(20±1)℃冰箱中,以呼吸停止为终点记录动物存活时间。

1.4.3 缺氧+寒冷 先将装有15 g钠石灰的250 ml广口瓶放入-(20±1)℃冰箱中,1 h后将动物放入其中,加盖密封,以呼吸停止为终点记录动物存活

时间。

1.4.4 负荷游泳 每鼠给予体重10%的负荷,投入水箱中(水深40 cm,水温(25±1)℃)游泳,记录此时至其鼻孔沉下水面的时间为游泳时间。

1.5 统计 实验数据用t检验。

2 结果

2.1 降低一次性疲劳动物血乳酸和血清尿素氮含量 小鼠游泳后,测得EEH组的血乳酸和血清尿素氮均显著低于对照组,并且随EEH剂量的提高而逐步下降,呈现明显的量效关系(表1)。EEH 50、100和200 mg/kg组小鼠,游泳后30 min血乳酸含量分别比对照组低7.9%、13.4%和19.9%,血清尿素氮含量分别比对照组低14.0%、15.4%和28.6%;游泳后90 min血乳酸含量分别比对照组低12.9%、18.3%和28.1%,血清尿素氮含量分别比对照组低16.4%、18.7%和33.1%。进一步比较游泳后30~90 min期间血乳酸和血清尿素氮的消除速度,EEH 50、100和200 mg/kg组分别是对照组的1.29、1.23、1.40倍和1.30、1.46、1.55倍。结果表明,EEH既可减少运动时乳酸和尿素氮的产生,又能促进运动后乳酸和尿素氮的清除。

表1 EEH对一次性运动疲劳小鼠 血乳酸和血清尿素氮含量的影响 (n=16, $\bar{x} \pm s$)				
组别	剂量 (mg/(kg·d))	游泳后 30 min	游泳后 90 min	消除速度 (mmol/(L·h))
血乳酸 (mmol/L)				
空白		22.15 ± 1.51	19.51 ± 1.33	2.64 ± 0.18
EEH	50	20.40 ± 1.67 ^a	17.00 ± 1.29 ^b	3.40 ± 0.23 ^c
	100	19.19 ± 1.16 ^b	15.93 ± 1.34 ^c	3.26 ± 0.22 ^c
	200	17.74 ± 1.03 ^c	14.03 ± 0.92 ^c	3.71 ± 0.25 ^c
血清尿素氮 (mmol/L)				
空白		16.92 ± 1.53	16.06 ± 1.47	0.86 ± 0.08
EEH	50	14.55 ± 1.04 ^b	13.43 ± 1.20 ^c	1.12 ± 0.08 ^c
	100	14.32 ± 1.11 ^b	13.06 ± 1.45 ^c	1.26 ± 0.11 ^c
	200	12.08 ± 0.88 ^c	10.75 ± 1.06 ^c	1.33 ± 0.10 ^c

注:与空白组比较, a: P>0.05, b: P<0.05, c: P<0.01。

2.2 降低递增运动量疲劳动物血乳酸和血清尿素氮含量以及骨骼肌脂质过氧化程度 与一次性游泳比较,连续4 d递增运动量游泳使小鼠血乳酸和血清尿素氮含量大幅度上升,EEH可对抗这种变化(表2)。EEH 50、100和200 mg/kg组小鼠,游泳后1 h血乳酸含量分别比对照组低12.3%、21.8%和27.8%,血清尿素氮含量分别比对照组低14.8%、19.1%和34.9%;游泳后25 h血乳酸含量分别比对照组低33.8%、42.0%和54.8%,血清尿素氮含量分

别比对照组低 24.6 %、31.6 %和 52.4 %。进一步比较游泳后 24 h 的血乳酸和血清尿素氮清除速度,EEH 50、100 和 200 mg/kg 组分别是对照组的 1.18、1.40、1.65 倍和 1.40、1.50、1.63 倍。此外,EEH 减轻运动造成的骨骼肌脂质过氧化程度,100 和 200 mg/kg 组小鼠过氧化产物的量在游泳后 1 h 分别比对照组减少 22.3 %和 43.8 %,游泳后 25 h 分别比对照组减少 30.5 %和 56.7 %,过氧化物的清除速度分别是对照组的 1.41 和 1.55 倍。

与对一次性运动疲劳动物的作用比较,EEH 对递增运动量疲劳动物的作用更大。结果表明,EEH 的作用与机体的运动状态有关,随着运动量的增加和疲劳程度的加重,EEH 的作用也增强。

表 2 EEH 对递增运动量疲劳小鼠血乳酸和血清尿素氮含量以及后肢骨骼肌脂质过氧化程度的影响

(n = 18, $\bar{x} \pm s$)				
组别	剂量 (mg/(kg d))	末次游泳后 1 h	末次游泳后 25 h	消除速度 (mmol/(L·24 h))
血乳酸 (mmol/L)				
空白		39.26 $\pm$ 2.47	29.60 $\pm$ 3.36	9.66 $\pm$ 1.15
EEH	50	34.42 $\pm$ 2.50 ^c	23.00 $\pm$ 2.93 ^c	11.42 $\pm$ 1.31 ^b
	100	30.71 $\pm$ 2.72 ^c	17.16 $\pm$ 2.45 ^c	13.55 $\pm$ 1.60 ^c
	200	28.34 $\pm$ 2.68 ^c	13.38 $\pm$ 1.99 ^c	15.96 $\pm$ 1.82 ^c
血清尿素氮 (mmol/L)				
空白		28.34 $\pm$ 2.23	24.05 $\pm$ 3.10	4.29 $\pm$ 0.58
EEH	50	24.15 $\pm$ 2.40 ^b	18.14 $\pm$ 2.67 ^b	6.01 $\pm$ 0.77 ^c
	100	22.92 $\pm$ 2.11 ^b	16.46 $\pm$ 2.35 ^c	6.46 $\pm$ 0.66 ^c
	200	18.45 $\pm$ 1.69 ^c	11.45 $\pm$ 1.50 ^c	7.00 $\pm$ 0.87 ^c
脂质过氧化 (A)				
空白		0.363 $\pm$ 0.045	0.321 $\pm$ 0.052	0.042 $\pm$ 0.006
EEH	50	0.350 $\pm$ 0.052 ^a	0.302 $\pm$ 0.047 ^a	0.048 $\pm$ 0.006 ^a
	100	0.282 $\pm$ 0.036 ^c	0.223 $\pm$ 0.028 ^b	0.059 $\pm$ 0.008 ^c
	200	0.204 $\pm$ 0.035 ^c	0.139 $\pm$ 0.020 ^c	0.065 $\pm$ 0.010 ^c

注:与空白组比较,a: P>0.05, b: P<0.05, c: P<0.01。

2.3 延长耐缺氧和耐寒时间 EEH 明显延长小鼠对缺氧和寒冷的耐受时间,并呈良好的量效关系(表 3),50、100 和 200 mg/kg 分别使单独缺氧时的存活时间延长 9.3 %、19.0 %和 22.0 %,使单独寒冷时的存活时间延长 15.1 %、19.9 %和 25.2 %,使缺氧合并寒冷时的存活时间延长 22.8 %、25.7 %和 35.0 %。对上述 3 种条件下动物生存时间进行比较,EEH 的作用强度依次是缺氧+寒冷>寒冷>缺氧。

2.4 提高耐力 EEH 依剂量延长小鼠负荷游泳时间,100 和 200 mg/kg 分别使游泳时间延长 99.1 %和 118.8 %,50 mg/kg 时作用不明显。

表 3 EEH 对小鼠常压缺氧和寒冷条件下生存时间的影响(n = 18~21, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/(kg d))	生存时间 (min)		
		缺氧	寒冷	缺氧+寒冷
空白		34.0 $\pm$ 3.9	29.7 $\pm$ 3.4	20.6 $\pm$ 2.7
EEH	50	37.2 $\pm$ 4.9 ^a	34.2 $\pm$ 3.1 ^b	25.3 $\pm$ 3.2 ^b
	100	40.5 $\pm$ 4.6 ^c	35.6 $\pm$ 3.6 ^c	25.9 $\pm$ 4.0 ^b
	200	41.5 $\pm$ 4.7 ^c	37.2 $\pm$ 4.5 ^c	27.8 $\pm$ 3.4 ^c

注:与空白组比较,a: P>0.05, b: P<0.05, c: P<0.01。

3 讨论

关于保健食品抗疲劳的实验方法和评价指标已有文献^[3]详细报道,即以一次性强制游泳造成动物运动疲劳,然后测定血乳酸、血清尿素氮和糖原等指标。而在运动员运动训练中,负荷量是逐渐增加的,后一阶段的训练量超过前一阶段的负荷量,这种过度负荷原则是现代训练学的重要部分,并认为是对机体适应性的理想刺激^[5]。因此,采用递增运动负荷多次强制游泳的方法来制备一种新的运动疲劳模型,似更能模拟人体运动疲劳的状态。实验表明,与一次性运动疲劳相比,递增运动量疲劳动物的各项测试指标进一步恶化,运动后血乳酸和血清尿素氮的清除速度相对更慢。EEH 对递增运动量疲劳动物的作用大于对一次性运动疲劳动物的作用,提示 EEH 可能更有利于极度疲劳状态的保护。

肌肉剧烈运动时的另一个变化是自由基生成增多,自由基作用于脂质使其产生过氧化反应,可导致骨骼肌损伤^[6,7],同时使机体运动能力和适应力下降。EEH 可抑制骨骼肌的脂质过氧化反应,有利于保护骨骼肌、提高机体运动能力和适应力。

运动后血清尿素氮水平的高低,可间接反映机体的疲劳程度^[7]。EEH 降低小鼠的血清尿素氮含量、加快运动后血清尿素氮的清除,表明 EEH 可减少运动时蛋白质的动员,或者加速运动时和运动后尿素氮的清除,具有提高机体适应力、延缓和消除疲劳的作用。

此外,EEH 能延长小鼠游泳时间、耐寒和耐缺氧时间,说明其具有提高耐力和抗应激能力的效应,而这些效应均有利于保持内环境稳定、保护和增强机体适应性。

参考文献

[1] 张洪,罗顺德,周本宏,等. 日本海马温肾壮阳相关活性的实验研究[J]. 中国海洋药物, 1997, 16 (4): 53-56.
[2] 胡建英,李八方,李志军,等. 八种海洋生药抗疲劳作用的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2000, 19 (2): 56-58.
[3] 王静凤,田树川,胡京滨,等. 海脉冲营养素对运动小鼠抗疲劳作用的实验研究[J]. 中国海洋药物, 2001, 83 (5): 14-17.



大豆异黄酮抗大鼠 T 细胞衰老及抗氧化作用研究

黄 琼 杨杏芬 李文立 李 志 黄俊明 杨国光 黄健康 张 波
(广东省疾病预防控制中心,广东 广州 510300)

摘 要:为研究大豆异黄酮抗大鼠 T 细胞衰老和抗氧化作用,选用老龄 SD 大鼠,观察大豆异黄酮对 T 细胞 CD28 表达水平及肝脏氧化应激水平的影响。实验设立青年对照组、老龄对照组和大豆异黄酮 0.33、0.99 g/kg BW 剂量组,其中剂量组按剂量灌胃给予大豆异黄酮,对照组灌胃给予等量纯净水。4 周后,分别制备肝细胞匀浆和肝单细胞悬液,用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定肝匀浆中丙二醛(MDA)含量,分光光度法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力,用流式细胞仪结合双氢罗丹明 123(Rh123)和双氢-乙酰乙酸二氯荧光黄(H₂DCFDA)染色法分别检测肝细胞线粒体膜电位(MMP)及活性氧(ROS)水平;另取外周血测定 T 淋巴细胞表面 CD8/CD28 表达情况。结果显示:青年对照组及大豆异黄酮剂量组的肝组织 MDA 含量均较老年对照组低,而 SOD 活力及肝细胞 MMP 水平均较老年对照组高($P < 0.05$);大豆异黄酮剂量组肝细胞内的 ROS 水平较老年对照组低($P < 0.01$)。老年对照组大鼠外周血 CD28⁺和 CD28⁺/CD8⁺ T 细胞比例低于青年对照组,而 CD28⁺/CD8⁺ T 细胞比例高于青年对照组,给予大豆异黄酮样品组三者比例均介于两对照组之间。提示衰老大鼠外周血 T 细胞 CD28 表达降低,肝细胞线粒体膜稳定性下降,氧自由基清除能力下降,过氧化脂质分解的终产物增多;大豆异黄酮可提高老龄大鼠 T 细胞 CD28 表达水平,增加肝细胞抗氧化酶活性,稳定线粒体膜电位,减少活性氧产生。
关键词:异黄酮类;抗原,CD8;抗原,CD28;线粒体,肝;活性氧组分;超氧化物歧化酶;丙二醛

Study on anti-senescence and anti-oxidation effects of soybean isoflavones in rats

HUANG Qiong, YANG Xing-fen, LI Wen-li, LI Zhi, HUANG Jun-ming,
YANG Guo-guang, HUANG Jian-kang, ZHANG Bo

(Guangdong Provincial Center for Disease Prevention and Control, Guangdong Guangzhou 510300, China)

Abstract: To explore the anti-senescence and anti-oxidation effects of soybean isoflavones, aged SD rats were given various doses of soybean isoflavone and the change in their CD28 T-cell expression and MDA content in liver were observed. Thirty 12-month-old female rats were divided randomly into 3 groups: aged control and 0.33, 0.99 g/kg BW soybean isoflavones groups. Another ten 2-month-old female rats were used as a young

[4] 何来英,严卫星,楼密密,等. 保健食品抗疲劳作用测试方法研究[J]. 中国食品卫生杂志 1997, 9 (4): 1-8.

[5] 李宁川,金其贯,孙新荣. 力竭性游泳训练对建立过度训练动物模型的作用[J]. 体育与科学, 2000, 21 (1): 53-55.

[6] 杨玉梅,许翠英,刘苏星,等. 增血速口服液的抗疲

劳与耐缺氧作用研究[J]. 中草药, 1998, 29 (9): 616-617.

[7] 黄芳,吴小南,汪家梨,等. 大黑蚂蚁乙醇提取液对健康小鼠抗疲劳作用的影响[J]. 中国公共卫生, 2000, 16 (3): 220-221.

[收稿日期:2005 - 01 - 15]

中图分类号:R15;TS218 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2005)05 - 0404 - 04

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2002087);广东省重点医学科技攻关专项[粤卫[2003]246号]
作者简介:黄琼 女 主管医师 硕士

This work was supported by the Medicine of the Science and Technology research (A2002087) and the Major Medicine of the Science and Technology Program Funds [Yuewei [2003] 246hao] of the Province of Guangdong, China.