

铁皮石斛对运动疲劳小鼠能量代谢和 CNTF mRNA 表达的影响

唐汉庆¹, 陈桦^{2*}, 韦祎³, 卢兰⁴

(1. 右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2. 惠州卫生职业技术学院, 广东 惠州 516025;
3. 海南医学院, 海口 571199; 4. 惠州市第四人民医院, 广东 惠州 516055)

[摘要] 目的: 观察铁皮石斛对运动疲劳小鼠能量代谢和睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF) mRNA 表达的影响。方法: 清洁级雄性昆明种小鼠 60 只随机分为正常对照组(简称对照组)、铁皮石斛低、中、高剂量组共 4 组。每组 15 只。对铁皮石斛低、中、高剂量组按 0.75, 1.5, 4.5 g·kg⁻¹ 分别给予铁皮石斛灌胃, 对照组灌胃相同体积的生理盐水。每天 1 次, 连续 30 d。然后通过负重游泳实验, 观察小鼠负重游泳时间, 检测血清尿素、肌糖原、肝糖原及乳酸含量和 CNTF mRNA 表达。结果: 与对照组负重游泳时间比较, 铁皮石斛低、中、高剂量组均显著延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组血清尿素、乳酸含量比较, 铁皮石斛低、中、高剂量组均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组肝糖原、肌糖原含量比较, 铁皮石斛中、高剂量组均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组 CNTF mRNA 表达量比较, 铁皮石斛低、中、高剂量组均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 铁皮石斛通过提高机体糖原储备、减少血清尿素含量、减轻乳酸堆积, 同时提高 CNTF mRNA 表达, 从调节能量代谢和营养肌肉两方面发挥功效可能是其抗疲劳的机制之一。

[关键词] 铁皮石斛; 能量代谢; 睫状神经营养因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0164-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150164

Effects of *Dendrobium officinale* on Energy Metabolism and Expression of CNTF mRNA in Athletic Fatigue Mice

TANG Han-qing¹, CHEN Hua^{2*}, WEI Yi³, LU Lan⁴

(1. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China;
2. Huizhou Health Vocational Technical Institute, Huizhou 516025, China;
3. Hainan Medical University, Haikou 571199, China;
4. The Fourth People's Hospital of Huizhou City, Huizhou 516055, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of *Dendrobium officinale* on energy metabolism and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) mRNA in athletic fatigue mice. **Method:** Sixty male Kunming mice were divided randomly into control group, *D. officinale* low-dose group, middle-dose group, high-dose group. The low-dose group, middle-dose group and high-dose group were intragastrically (ig) administrated with *D. officinale* respectively according to 0.75, 1.5, 4.5 g·kg⁻¹ while control group was ig given same volume normal saline, once a day for 30 days. The weight carrying swimming test were used to observe exhaustive weight carrying swimming time and to examine levels of serum urea, muscle glycogen, hepatic glycogen, lactic acid and the expression of CNTF mRNA. **Result:** Compared to control group, exhaustive weight carrying swimming time in low-dose group increased ($P < 0.05$), and in both middle-dose group and high-dose group increased significantly

[收稿日期] 20140322(004)

[基金项目] 广西教育厅科研立项(2011106LX443)

[第一作者] 唐汉庆, 博士, 副教授, 从事中西医结合基础研究工作, E-mail: phdtanghanqing@163.com

[通讯作者] * 陈桦, 主治医师, 从事中西医结合临床研究工作, E-mail: chenhua809@126.com

($P < 0.01$). Compared to control group, the levels of serum urea and lactic acid in both low-dose group and middle-dose group decreased ($P < 0.05$), and in high-dose group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared to control group, the levels of muscle glycogen and hepatic glycogen in middle-dose group increased ($P < 0.05$) and in high-dose group increased significantly ($P < 0.01$). Compared to control group, the expression of CNTF mRNA in low-dose group increased ($P < 0.05$), and in middle-dose group and high-dose group increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** *D. officinale* could increase glycogen store, decrease the level of serum urea and lactic acid accumulation, meantime, could up-regulate the expression of CNTF mRNA, which may be one of mechanisms that *D. officinale* alleviate athletic fatigue by regulating energy metabolism and nourishing muscle.

[**Key words**] *Dendrobium officinale*; energy metabolism; ciliary neurotrophic factor

铁皮石斛为兰科石斛属多年生附生草本植物,位居“中华九大仙草”之首,近年来展开了对其药用和保健功效的研究及产品开发。传统上用于抗疲劳、提高免疫力和滋补养生等方面,研究表明铁皮石斛具有广泛的药理作用,具有抗疲劳、提高免疫力、抗氧化、降血压、抗肿瘤、防辐射性损伤等功效^[1-3]。其中,抗运动性疲劳是铁皮石斛的重要功效之一。近来的研究已表明睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)对肌肉有营养作用,能维持正常骨骼肌的形态和功能^[4],对肌肉萎缩、运动性肌肉酸痛和损伤等有防治作用,因此,本实验工作通过建立小鼠运动疲劳模型,给予铁皮石斛干预,从肌肉能量代谢和肌肉营养因子表达变化这一较新的角度探讨铁皮石斛抗疲劳、强身健体之功效,为进一步利用铁皮石斛并开发新型运动营养剂提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性昆明种小鼠 60 只,体质量(19.9 ± 1.9)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 SCXK(京)2013-0005。实验期间,小鼠以基础饲料常规饲养,自由饮水,全部小鼠照明、通风、湿度、温度等饲养环境相同。实验中对动物的处理遵循相关动物使用伦理学原则。

1.2 试剂与仪器 3% 戊巴比妥钠(批号 20130126,北京化学试剂公司),肌糖原(批号 20132256)、肝糖原(批号 20130236)及乳酸(批号 20130483)测定试剂盒(均购于南京建成生物工程研究所),Trizol(Gibcobl 公司,批号 1098462),M-MLV(Piomegan 公司),Tag 酶、DNA mark(北京博奥公司,批号 BK501),CNTF 基因引物(Invitrogen 公司)。RT-9000 型半自动生化分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司),Z360K 型台式高速低温离心机(德国 Hermle 公司),AE160 型电子天平(瑞士

Mettler 公司),722 型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),DY-89 型电动玻璃匀浆机(宁波新芝公司),MK3 型酶标仪(Thermo Labssystem 公司),7900HT 型 PCR 仪(ABI 公司)。

1.3 药品制备 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 鲜品由广西浙商投资有限公司馈赠并经右江民族医学院附属医院副主任药师陆高翔鉴定。准确称取铁皮石斛鲜品 50 g,加入 3 倍水量,浸泡 1 h,再加入 2 倍水量,采用热水回流加纤维素酶浸提法提取,将滤液水浴加热浓缩至含生药量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,杀菌,贮存于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内备用。根据 2010 年版《中国药典》成人推荐剂量 $6 \sim 12 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,按成人平均推荐量 $9 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 标准及体重 60 kg ^[5],折合为 $0.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。实验设铁皮石斛低、中、高剂量组,分别为人体推荐量的 5, 10, 30 倍,即 $0.75, 1.5, 4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 动物分组 小鼠适应性饲养 1 周后,按随机数字表法分为 4 组:正常对照组(简称对照组)、铁皮石斛低、中、高剂量组。每组 15 只。

2.2 负重游泳实验 铁皮石斛低、中、高剂量组分别以 $0.75, 1.5, 4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 铁皮石斛药液灌胃(ig),对照组 ig 相同体积的生理盐水。每天 1 次,连续 30 d。第 31 天起,采用 $100 \text{ cm} \times 50 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ 的玻璃游泳箱,水深 50 cm。为防止小鼠漂浮水面静止不动,加水泵制造成循环水。控制水温(25 ± 1.0) $^\circ\text{C}$,小鼠鼠尾系以 5% 体重的铅条,置于泳箱内,记录游泳开始直至游泳力竭的时间。游泳力竭的评定:小鼠沉入水下 10 s 无力游动浮出水面,立刻捞出并记录游泳时间,作为负重游泳力竭时间^[6]。

2.3 血生化指标检测^[7] 血清尿素含量用生化分析仪检测。肌糖原、肝糖原及乳酸根据试剂盒说明

进行操作检测。

2.4 CNTF mRNA 表达检测 RT-PCR 法检测。取 100 μ L 肌肉匀浆,用 Trizol 试剂提取总 RNA,氯仿和异丙醇抽提。紫外分光光度仪和琼脂糖电泳鉴定 RNA 的浓度和纯度,取 10 μ L 根据逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA, -70 $^{\circ}$ C 冻存储备用。取 5 μ L 逆转录产物进行 PCR 扩增反应,并以 β -actin 为内参对照。CNTF 基因引物由 Invitrogen 公司设计合成。PCR 反应条件:60 $^{\circ}$ C 3 min \rightarrow 90 $^{\circ}$ C 6 min \rightarrow (95 $^{\circ}$ C 10 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 3 min)共 40 个循环。 β -actin 反应条件:90 $^{\circ}$ C 30 s 变性,60 $^{\circ}$ C 30 s 退火,72 $^{\circ}$ C 3 min 延伸。具体序列及扩增长度,见表 1。

表 1 引物序列及扩增长度

引物	引物序列(5'-3')	扩增长度 /bp
CNTF	AACTAGACTACGAAGGAGATCGAGC	148
	TTAGACGAACAAGCCACTGTCAGATA	
β -actin	AGCTAGAGTCTACACGCCGTCAGCGC	126
	GCGAGTTCATTGACAGCACAGATCGC	

PCR 扩增反应产物经 2% 琼脂糖电泳,溴化乙啶染色,通过凝胶电泳分析系统读取目的基因灰度

值,将目的基因灰度值与 β -actin 基因灰度值的比值作为目的基因 mRNA 的表达量,目的基因 mRNA 表达量 = 目的基因灰度值/ β -actin 基因灰度值。

2.5 统计学分析 数据统计采用 SPSS 13.0 软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

与对照组比较,铁皮石斛低剂量组负重游泳力竭时间延长($P < 0.05$),血清尿素、乳酸含量均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),CNTF mRNA 表达量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);中剂量组负重游泳力竭时间显著延长($P < 0.01$),血清尿素、乳酸含量均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),而肝糖原、肌糖原含量均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),CNTF mRNA 表达量显著升高($P < 0.01$);高剂量组负重游泳力竭时间显著延长($P < 0.01$),血清尿素、乳酸含量均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$),而肝糖原、肌糖原含量均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),CNTF mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 铁皮石斛对运动疲劳小鼠能量代谢和睫状神经营养因子 CNTF mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	负重游泳力竭 时间/s	血清尿素 / $mmol \cdot L^{-1}$	肝糖原 / $mg \cdot g^{-1}$	肌糖原 / $mg \cdot g^{-1}$	乳酸 / $mmol \cdot L^{-1}$	CNTF mRNA / β -actin
对照	-	219 \pm 52	18.02 \pm 2.32	38.22 \pm 4.56	3.65 \pm 0.96	10.12 \pm 2.18	0.32 \pm 0.03
铁皮石斛	0.75	350 \pm 83 ¹⁾	13.35 \pm 2.11 ¹⁾	46.38 \pm 6.21	4.35 \pm 1.23	7.81 \pm 1.88 ¹⁾	0.46 \pm 0.05 ¹⁾
	1.5	592 \pm 103 ²⁾	11.71 \pm 1.98 ¹⁾	52.33 \pm 6.86 ¹⁾	5.11 \pm 1.59 ¹⁾	7.34 \pm 1.58 ¹⁾	0.58 \pm 0.06 ²⁾
	4.5	646 \pm 163 ²⁾	9.87 \pm 1.52 ²⁾	60.48 \pm 7.55 ²⁾	5.87 \pm 1.64 ²⁾	7.11 \pm 1.22 ²⁾	0.81 \pm 0.09 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

植物多糖是普遍存在于植物中的天然大分子物质,植物多糖具有抗疲劳、抗肿瘤、降血糖、降血脂、调节免疫、抗病毒、抗炎和抗衰老等活性^[8],《神农本草经》认为铁皮石斛“主伤中,除痹,下气,补五脏虚劳羸瘦,强阴,久服厚肠胃”,具有滋阴补虚的功效,现代药理学认为铁皮石斛多糖成分含量较高,铁皮石斛多糖属于植物多糖的一种,是铁皮石斛发挥功效的重要物质基础^[9]。

研究^[10]表明运动性疲劳的发生与能量物质的消耗、代谢产物的堆积及刺激作用、内部理化环境的改变等因素有关,例如,糖原大量消耗、乳酸局部堆积刺激均可引起运动性疲劳。就本实验工作而言,

糖原消耗程度,乳酸含量,负重游泳力竭时间能较好反映动物运动疲劳的程度^[11],在本实验工作中观察到,与对照组负重游泳力竭时间比较,低剂量组延长,中剂量组和高剂量组显著延长,表明补充铁皮石斛能够延缓运动疲劳发生,且与剂量有关,表现为随剂量增加而时间延长,同时,与对照组肝糖原、肌糖原含量比较,中剂量组均升高,而高剂量组均显著升高,表明铁皮石斛能够促进机体的糖代谢,增加糖原的储备,避免因剧烈运动使血糖大量消耗引起运动性疲劳,推测这种作用可能是由于铁皮石斛多糖成分可以直接补充糖原消耗或在体内通过糖代谢途径合成糖原。

血清尿素的含量可以反映体内蛋白质或氨基酸

分解代谢的强度,机体在剧烈运动中,蛋白质和氨基酸分解代谢加强,血液中尿素含量相应增高,在本实验工作中,笔者观察到,与对照组血清尿素含量比较,低、中剂量组血清尿素降低,高剂量组则显著降低,说明在负重游泳运动中,给予铁皮石斛可以抑制蛋白质和氨基酸的分解,提示铁皮石斛可能是通过增加主要供能物质糖的供应而不是动员蛋白质或氨基酸分解供能,这一点很有意义,因为蛋白质可以用来合成有利于提高运动能力的肌肉收缩蛋白,因此,铁皮石斛作为运动营养剂,通过糖作为主要供能物质从而减少蛋白质消耗,这样可以将“省下的”蛋白质用于合成肌肉组分从而提高运动能力。

运动会产生大量乳酸,过多乳酸堆积会对肌肉以及机体其他组织和器官功能产生影响,严重者称为乳酸中毒^[12],本实验结果表明,与对照组乳酸含量比较,低、中剂量组乳酸含量降低,高剂量组则显著降低,提示补充铁皮石斛能缓解乳酸堆积程度,减轻乳酸对机体刺激从而起到抗运动疲劳作用,推测可能是通过提高某些对乳酸代谢有调节作用的酶活性而实现的,但可能也有其他途径,具体机制需要进一步实验。

原来对 CNTF 的研究集中于对神经的营养作用,但现在研究发现 CNTF 对肌肉起直接营养作用,在正常及损伤情况下均可增加肌纤维数量、促进肌肉收缩蛋白的合成^[13],是神经和肌肉的双重营养因子,因而在运动疲劳和损伤恢复过程中起着很大作用^[13],在本实验中注意到,与对照组 CNTF mRNA 表达量比较,低剂量组升高,而中剂量组和高剂量组均显著升高,表明铁皮石斛能上调 CNTF mRNA 表达,间接发挥维持正常骨骼肌形态、功能及营养作用,提示铁皮石斛在防止运动疲劳和肌肉病变方面的良好应用前景。

本实验结果显示,铁皮石斛通过提高机体糖原储备、减少血清尿素含量、减轻乳酸堆积,同时提高 CNTF mRNA 表达,从调节能量代谢和营养肌肉两方面发挥抗疲劳、强身健体功效。

[参考文献]

- [1] 吕圭源,颜美秋,陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(4):489.
- [2] 王崇道,强亦忠,崔凤梅. 铁皮枫斗晶对小鼠辐射损伤的防护作用[J]. 辐射防护,2004,24(6):403.
- [3] 秦秋荣,刘庆军,张国庆. 铁皮枫斗颗粒对放射损伤小鼠存活情况及肺病理组织学改变的影响[J]. 中国血液流变学杂志,2008,18(3):332.
- [4] Talon S, Giroux-Metges M A, Pennec J P, et al. Rapid protein kinase C-dependent reduction of rat skeletal muscle voltage-gated sodium channels by ciliary neurotrophic factor[J]. *Physiol*, 2005, 565(3):827.
- [5] 黄娟萍,罗裕,江力,等. 中药药动学研究中给药剂量的现状分析[J]. 中国药理学杂志,2012,47(21):1685.
- [6] Voces J. Effects of administration of the standardized Panax ginseng extract G115 on hepatic antioxidant function after exhaustive exercise[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 1999, 123(2):175.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 2003:87.
- [8] 杨玉红,郝慧敏. 药用植物多糖的生物学功能及应用研究进展[J]. 生物学教学,2013,38(1):6.
- [9] 杨虹,王顺春,王峥涛,等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药理学杂志,2004,39(4):254.
- [10] 池爱平,陈锦屏,熊正英. 木枣多糖抗疲劳组分对力竭游泳小鼠糖代谢的影响[J]. 中国运动医学杂志,2007,26(4):411.
- [11] Zhang P, Li M X, Li L. Influence of zinc on free radical mechanism of liver and brain in rat during exhaustive exercise[J]. *Chin Sport Sci*, 2005, 25(5):63.
- [12] 冯美云. 运动生物化学[M]. 北京:人民体育出版社,2000:60.
- [13] Peroulakis M E, Forger N G. Ciliary neurotrophic factor increases muscle fiber number in the developing levatorani muscle of female rats[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 296:73.

[责任编辑 聂淑琴]