

# 黑果枸杞子对过度训练大鼠骨骼肌 MAPK 信号通道蛋白表达及抗氧化应激损伤能力的影响

崔笑梅<sup>1</sup>, 曹建民<sup>2</sup>, 周海涛<sup>3\*</sup>, 王灿<sup>2</sup>, 万子一<sup>3</sup>

(1. 兰州理工大学, 兰州 730050; 2. 北京体育大学, 北京 100084;  
3. 北京联合大学 生物化学工程学院, 北京 100023)

**[摘要]** 目的:研究黑果枸杞子对过度训练大鼠骨骼肌 MAPK 信号通道蛋白表达及抗氧化应激损伤能力的影响。方法:以等量负荷有氧运动训练和大强度耐力训练大鼠为模型,50只 SPF 级 Wistar 49 d 龄雄性大鼠为对象,随机分为4组,分别为正常组、有氧训练组、过度训练组、过度训练+黑果枸杞子组,每组12只(剔除不符合实验要求的大鼠)。每天灌胃(ig)给药1次,黑果枸杞子干预组剂量为 $4.48 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,ig 体积为 $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,其他组 ig 等体积生理盐水。42 d 负荷游泳训练后,测试各组大鼠骨骼肌丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号系统蛋白表达及氧化应激损伤相关指标,分光光度法检测骨骼肌超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量;蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测 MAPK 信号通道蛋白表达;酶联免疫吸附测试法(ELISA)检测 3-硝基酪氨酸(3-NT),8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量;乙酰半胱氨酸法检测血清肌酸激酶(CK)活性;苯肼显色法检测乳酸脱氢酶(LDH)活性。结果:力竭游泳时间,有氧训练组较正常组有所延长,黑果枸杞子干预组较过度训练组显著增加( $P < 0.01$ )。骨骼肌 SOD 活性,有氧训练组略高于正常组;过度训练组较正常组和有氧训练组明显下降( $P < 0.05$ ),黑果枸杞子干预组较过度训练组明显升高( $P < 0.05$ )。骨骼肌 MDA 含量,有氧训练组略低于正常组;过度训练组较正常组和有氧训练组显著升高( $P < 0.01$ ),黑果枸杞子干预组较过度训练组显著降低( $P < 0.01$ )。骨骼肌 3-NT,8-OHdG,有氧训练组略高于正常组;过度训练组较正常组和有氧训练组显著升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组明显降低( $P < 0.05$ )。血清 LDH 活性,有氧训练组略高于正常组;过度训练组较正常组和有氧训练组均显著升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组明显升高( $P < 0.05$ )。血清 CK 活性,有氧训练组略高于正常组;过度训练组较正常组和有氧训练组显著升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著降低( $P < 0.01$ )。p38 MAPK,细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)信号通路蛋白表达,有氧训练组高于正常组( $P < 0.05$ ),低于过度训练组( $P < 0.05$ );过度训练组高于安静组( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组高于正常组( $P < 0.05$ ),低于过度训练组( $P < 0.05$ )。结论:补充黑果枸杞子可以有效缓解过度训练导致的机体内环境失衡,抑制 MAPK 信号通路蛋白的过度表达,激活过度训练大鼠骨骼肌 MAPK 信号转导系统诱导抗氧化酶基因表达,提高机体尤其是骨骼肌的氧自由基清除能力,调节机体的抗氧化应激损伤能力,预防和延缓氧化应激损伤及运动疲劳的发生与发展。

**[关键词]** 黑果枸杞子; 过度训练; 丝裂素活化蛋白激酶信号通路; 蛋白表达; 抗氧化应激损伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0122-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030122

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161118.1312.008.html>

**[网络出版时间]** 2016-11-18 13:12

## Effect of *Lycium ruthenicum* Fructus on Skeletal Muscle Mitogen Activated Protein Kinase Signaling Pathways Protein Expression and Antioxidative Stress Damage Capacity in Over-trained Rats

CUI Xiao-mei<sup>1</sup>, CAO Jian-min<sup>2</sup>, ZHOU Hai-tao<sup>3\*</sup>, WANG Can<sup>2</sup>, WAN Zi-yi<sup>3</sup>

(1. Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China; 2. Beijing Sports University, Beijing 100084, China; 3. Biochemical Engineering College, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

**[收稿日期]** 20160603(010)

**[基金项目]** 北京市朝阳区协同创新项目(CYXC1508);北京市高等学校高水平人才交叉培养—实培计划项目

**[第一作者]** 崔笑梅, 硕士, 副教授, 从事体育教学与训练研究, Tel: 18793100528, E-mail: 51258485@qq.com

**[通讯作者]** \*周海涛, 硕士, 副教授, 从事运动性疲劳与恢复研究, Tel: 13611383040, E-mail: zsettle@sina.com

**[ Abstract ] Objective:** To study the effect of *Lycium ruthenicum* fructus on the expression of MAPK signal channel protein and antioxidative stress damage capacity in skeletal muscle of rats with excessive training. **Method:** Equivalent load aerobic training and high intensity endurance training rat model was established. A total of 50 49-day old male SPF Wistar rats were randomly divided into 4 groups, with 12 in each group (the rats that did not meet the requirements were removed): control group (C Group), aerobic training group (M group), overtraining group (OM group), overtraining and *Lycium ruthenicum* fructus group (LM group). The dose of LM group was  $4.48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , with *ig* volume of  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ . The other groups were given equal volume of saline. After 42 days' exhaustive swimming training, mitogen activated protein kinase (MAPK) signal channel protein expression and antioxidative stress damage indicators in skeletal muscle of rats were examined. Spectrophotometry was adopted to detect activity of superoxide dismutase (SOD) and content of malondialdehyde (MDA). Western blot was used to detect MAPK signal channel protein expression. ELISA was applied in detecting content of 3-nitrotyrosine (3-NT) and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG). Acetylcysteine method was adopted to detect activity of creatine kinase (CK). Phenylhydrazine chromogenic method was used to detect activity of lactate dehydrogenase (LDH). **Result:** The exhaustive swimming time of M group was longer than C group, and that of LM group was significantly longer than OM group ( $P < 0.01$ ). The SOD activity in M group was higher than that in C group, that in OM group was significantly lower than C group and M group ( $P < 0.05$ ), and that in LM group was significantly higher than OM group ( $P < 0.05$ ). 3-NT and 8-OHdG content in M group was higher than that in C group, that in OM group was significantly higher than C group and M group ( $P < 0.01$ ), and that in LM group was significantly lower than OM group ( $P < 0.01$ ). The LDH and CK activities of serum in M group was slightly higher than C group, that in OM group was significantly higher than C group and M group ( $P < 0.01$ ), and that in LM group was significantly higher than OM group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The expression of p38 MAPK and ERK signal channel protein in M group was higher than that in C group ( $P < 0.05$ ), and that in M group was lower than the OM group ( $P < 0.05$ ); that in OM group was higher than C group ( $P < 0.01$ ); that in LM group was higher than that in C group ( $P < 0.05$ ), and that in LM group was lower than OM group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The supplementation of *Lycium ruthenicum* fructus can effectively alleviate the imbalance of the inner environment caused by overtraining, inhibit the excessive expression of MAPK signal channel protein, activate antioxidant enzyme gene expression induced by skeletal muscle MAPK signal transduction system of overtraining rats, improve the capacity of scavenging oxygen free radicals in body, especially skeletal muscle, regulate the antioxidative stress damage capacity of body, and prevent and delay the oxidative stress injury and the occurrence and development of the sports fatigue.

**[ Key words ]** *Lycium ruthenicum* fructus; overtraining; mitogen activated protein kinase signaling pathway; protein expression; antioxidative stress damage

竞技体育中,运动员常需要通过长时间、大负荷的运动训练刺激机体以提高运动能力和运动成绩。正常状态下,体内自由基代谢保持着相对的动态平衡,不会对机体造成伤害。但长时间、大负荷的运动训练过程中,组织耗氧量大幅增加,自由基的产生呈几何量级增长,机体对抗氧化剂及合成抗氧化酶的微量元素的需求和消耗明显增加。同时,体内 pH, 血浆渗透压等内环境及激素水平发生显著变化,期间如未能及时、有效地进行补偿,机体抗氧化及清除自由基能力将明显减弱,进而打破体内自由基代谢的动态平衡。过量堆积的自由基将加速脂质过氧化反应的发生与发展,造成对组织细胞和线粒体等细

胞器的损伤甚至坏死进而影响其功能<sup>[1]</sup>,极易导致短期过度训练的发生。同时由于恢复时间短,过度疲劳后无法及时恢复,进而发展为过度训练综合征,又称过度训练。短期过度训练经过 1~2 周可自行恢复,运动能力得以恢复甚至可超越原来水平。而过度训练综合征则表现为易感染及持续的运动能力、免疫力下降。骨骼肌是最直接参与运动的器官之一。同时也是运动时最大的耗能与耗氧器官,更是最易受氧攻击受损的主要器官<sup>[2]</sup>。长期过度训练可导致骨骼肌的不可逆损伤。有效地预防和延缓运动性氧化应激反应的发生与发展,在提高运动能力和运动成绩的同时合理、有效地保护运动员的身体健康

已成为当前国内外运动医学领域的重点和热点。

黑果枸杞子富含蛋白质、枸杞多糖、氨基酸、维生素、矿物质、微量元素等多种营养成分。《晶珠本草》记载,黑果枸杞子可用于治疗心热病、心脏病、月经不调、停经等。《维吾尔药志》记载,黑果枸杞子对尿道结石、癣疥、齿龈出血等疾病,其果实及根皮治疗效果显著。民间多用其作滋补强壮、明目降压。已有研究表明,黑果枸杞子可滋补肝肾,益精明目,适用于腰膝酸软、头晕目眩、两眼昏花等症状<sup>[3]</sup>。同时黑果枸杞子还可以降低胆固醇,兴奋大脑神经,增强免疫功能,防治癌症,抗衰老和美容,对人体健康起极其有益的作用<sup>[4]</sup>。研究表明,丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号系统在机体对环境应激的适应中及维持机体内氧化-抗氧化的动态平衡状态发挥着重要的作用。本文以等量负荷有氧运动训练和大强度耐力训练大鼠为模型,采用剂量为  $4.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的黑果枸杞子进行营养干预,分光光度法测定骨骼超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量,蛋白质免疫印迹(Western blot)法测定 MAPK 信号通道蛋白表达含量。探讨补充黑果枸杞子通过激活过度训练大鼠骨骼肌 MAPK 信号转导系统诱导抗氧化酶基因表达,调节机体的抗氧化能力,预防和延缓氧化应激损伤及运动疲劳的发生与发展的机制,旨在为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物**<sup>[4]</sup> 50 只清洁级 Wistar 大鼠,雄性,49 d,体重( $249.6 \pm 14.1$ ) g,北京大学医学部实验动物科学部,合格证号 SCXK(京)2006-0008。实验过程中,实验室内温度保持在( $22 \pm 2$ ) °C,相对湿度控制在 55%~75%,自然光照。所有实验大鼠均以北京大学医学部实验动物科学部提供的基础饲料和蒸馏水常规饲养,自由饮食。实验时间为 49 d,其中正式训练时间为 42 d。所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

**1.2 药物及试剂** 黑果枸杞子产自青海(青海雪谊德宝生物科技有限公司,批号 20150814)。黑果枸杞子由北京联合大学生物化学工程学院生物医药系霍清教授鉴定为茄科植物黑果枸杞子 *Lycium ruthenicum* 的干燥果实。将干燥的黑果枸杞子以浸渍法制备成质量浓度  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,4 °C 冰箱避光冷藏待用<sup>[3]</sup>。p38 MAPK 抗体(天德悦生物科技有限公司,批号 20150907),细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)抗体(赛信通生物试剂有限公司,批号 20150909);MDA,SOD,肌酸激酶(CK),乳酸脱氢酶

(LDH)测试试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20150915, 20150903, 20151021, 20151230);3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)测试试剂盒,8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)测试试剂盒(上海迪奥生物科技有限公司,批号均为 20160225)。

**1.3 仪器** 佳宝 AP1500 型水泵(广东振华电器有限公司),5417R 型低温超速离心机(德国艾本德股份公司),MultiSkan3 型酶标仪(芬兰雷勃公司),PowerPac 系列电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),RT2200C 型全自动生化分析仪(美国雷杜公司),721 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),NR-B17CC 型超低温冰箱(日本松下电器产业株式会社),ISO9001 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 实验大鼠在适应性饲养后,经筛选淘汰,将剩余大鼠随机分为 4 组,分别为正常组、有氧训练组、过度训练组、过度训练+黑果枸杞子组(黑果枸杞子干预组),每组 12 只。训练期间,大鼠自由摄食、饮水。各组大鼠每天灌胃(ig)1 次。其中黑果枸杞子干预组根据预实验及参考相关文献<sup>[4]</sup>设置 ig 剂量及体积为  $4.48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。其他组 ig 等体积的生理盐水。

**2.2 训练及测试方案** 有氧训练组,每天无负重游泳 60 min;黑果枸杞子干预组进行递增负荷游泳运动以建立过度训练模型。具体训练方案为 1~3 周大鼠无负重运动,通过递增运动时间以递增运动负荷(第 1 周 5~30 min,第 2 周 30~60 min,第 3 周 60~120 min);4~6 周在固定运动 120 min 的基础上增加负重[第 4 周负重(1~2)%体重,第 5 周(2~4)%体重,第 6 周(4~6)%体重]。玻璃泳槽水深 50 cm,水温( $31 \pm 2$ ) °C。训练周期 42 d,每周 6 d,休息 1 d。

**2.3 指标测定** 采用 2% 的戊巴比妥钠溶液在末次游泳训练后即刻对大鼠进行麻醉,首先在大鼠腹主动脉处取全血 5 mL(柠檬酸钠溶液抗凝),37 °C 水浴 30 min 后,4 °C  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,以分离制备血清(5417R 低温超速离心机)。稍后分离出大鼠两侧完整的腓肠肌,以 4 °C 的生理盐水进行漂洗,快速去除血液及其他结缔组织并吸干水分后,切取腓肠肌 300 mg,均匀地分为 3 份,以锡纸包裹标记后装入密封袋中,并立即投入液氮中冻存。所取样品均放入 -80 °C 超低温冰箱中保存,待测 SOD

活性,MDA,3-NT,8-OHdG 含量和 MAPK 信号通道蛋白表达的含量。骨骼肌 SOD 活性及 MDA 含量采用紫外分光光度法测定,MAPK 信号通道蛋白表达含量采用 Western blot 法测定,3-NT,8-OHdG 含量采用酶联免疫吸附测试法(ELISA)测定,CK 活性采用乙酰半胱氨酸法测定,LDH 活性采用苯胍显色法测定。

**2.4 蛋白抽提** 预冷放射免疫沉淀试验裂解液(RIPA)后适量加入蛋白酶抑制剂。蛋白抽提前加入  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  苯甲基磺酰氟(PMSF)母液,PMSF 终浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,并置于冰上以保持低温。称取腓肠肌 100 mg,以质量-裂解液体积 1:9 的比例加入裂解液后  $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  进行匀浆(KIMBLE 电子匀浆器),每次 10 s,共进行 3 次(每次间隔 10 s)。匀浆过程中离心管需要浸入冰水混合物中进行降温。匀浆完成后冰上孵育 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , $13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min。离心完成后取上清,分装保存,待测。

**2.5 蛋白浓度测试及调整** 将二辛可宁酸(BCA)工作液按 A 液-B 液 50:1 的比例充分混匀稀释后,分别提取牛血清白蛋白(BSA)对照品。样品以磷酸盐缓冲液(PBS)稀释。样品:BCA 工作液 1:8,混匀后  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 30 min,酶标仪 570 nm 波长读取吸光度 A。以 RIPA 调整蛋白浓度,加入  $5 \times$  还原样品缓冲液后样品终质量浓度为  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (不同样品具体确定)。煮沸变性 5 min。腓肠肌质量浓度调为  $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.6 Western blot 法测定 p38 MAPK,ERK 蛋白表达**

根据目的蛋白的相对分子质量,配制 12% 分离胶,浓缩胶浓度为 5%。电泳条件:浓缩胶恒压 90 V,约 20 min;分离胶恒压 160 V,通过预染蛋白 Marker 以确定电泳停止时间。采用湿转法转膜。转膜条件:300 mA 恒流; $0.45 \mu\text{m}$  孔径硝酸纤维素膜(NC),转膜时间 1 h。转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。3% BSA-TBST 室温封闭 30 min 后,用 3% BSA-TBST 稀释一抗,室温孵育 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜。p38 MAPK 一抗稀释比例为 1:2 000,ERK 一抗稀释比例为 1:1 万。次日, $4 \text{ }^\circ\text{C}$  取出膜,在室温孵育 30 min。TBST 洗膜 5 次,每次 3 min。洗完后进行二抗孵育。用 5% 脱脂奶粉-TBST 稀释二抗,山羊抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG)(H+L)HRP,1:1 万,室温轻摇 40 min。TBST 洗膜 6 次,每次 3 min。ECL 加到膜上后反应 3~5 min,胶片曝光:10 s~5 min(曝光时间随不同光强度而调整),显影 2 min,定影。胶片洗净晾干后,用凝胶成像系统拍照,再用 Quantity One 软件去除背景后,

分析条带灰度值,通过目标蛋白/ $\beta$ -actin,得到目标蛋白的相对含量。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 软件对所有数据进行处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠运动能力及骨骼肌 SOD 活性和 MDA,3NT,8-OHdG 含量的影响** 力竭游泳时间,有氧训练组较正常组明显延长( $P < 0.05$ );过度训练组低于正常组( $P < 0.05$ )和有氧训练组( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著增加( $P < 0.01$ )。骨骼肌 SOD 活性,有氧训练组略高于正常组,但不具有统计意义;过度训练组较正常组和有氧训练组均明显下降( $P < 0.05$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著升高( $P < 0.05$ )。骨骼肌 MDA 含量,有氧训练组略低于正常组,但不具有统计意义;过度训练组较正常组和有氧训练组明显升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著降低( $P < 0.01$ )。骨骼肌 3NT,8-OHdG 含量,有氧训练组略高于正常组,但不具备统计意义;过度训练组较正常组和有氧训练组明显升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.2 对大鼠血清 LDH,CK 活性的影响** 血清 LDH 活性,有氧训练组略高于正常组,但无统计意义;过度训练组较正常组和有氧训练组均明显升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著升高( $P < 0.05$ )。血清 CK 活性,有氧训练组略高于正常组,但无统计意义;过度训练组较正常组和有氧训练组明显升高( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组较过度训练组显著降低( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 对大鼠骨骼肌 p38 MAPK,ERK 蛋白表达的影响** 各组样本均检测出 p38 MAPK,ERK 信号通路蛋白表达。有氧训练组略高于正常组( $P < 0.05$ ),低于过度训练组( $P < 0.05$ );过度训练组高于安静组( $P < 0.01$ );黑果枸杞子干预组低于过度训练组( $P < 0.05$ )。见表 3 及图 1,2。

### 4 讨论

实验表明有氧训练组大鼠通过长期的有氧训练,机体对相同的物理负荷刺激的适应反应能力及抗运动氧化应激能力明显得到提高,进而在一定程度上提高抗运动疲劳能力。其可能机制为①有氧运动有效地提高了机体有氧供能能力,增加三羧酸循环中的酶的活性。②有氧运动有效地阻断脂质过氧化链式反应,避免和延缓了脂质过氧化损伤的发生

表 1 运动及黑果枸杞子对大鼠运动能力及骨骼肌 SOD 活性,MDA,3NT,8-OHdG 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effect of exercise and *Lycium ruthenicum* fructus on rats' exercise capacity, SOD activity and content MDA, 3NT and 8-OHdG in skeletal muscle ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	力竭游泳时间/min	骨骼肌 SOD /U·mg <sup>-1</sup>	骨骼肌 MDA /μmol·g <sup>-1</sup>	骨骼肌 3NT /μmol·g <sup>-1</sup>	骨骼肌 8-OHdG /ng·L <sup>-1</sup>
安静对照	-	85.5 ± 13.2	374.651 ± 58.281	24.365 ± 7.402	47.745 ± 20.681	12.164 ± 13.681
有氧训练	-	105.3 ± 14.5 <sup>1,4)</sup>	379.673 ± 46.249 <sup>3)</sup>	23.227 ± 7.452 <sup>4)</sup>	51.425 ± 22.426 <sup>4)</sup>	15.742 ± 11.784 <sup>4)</sup>
过度训练	-	73.9 ± 12.4 <sup>1)</sup>	293.635 ± 37.328 <sup>1)</sup>	38.391 ± 10.174 <sup>2)</sup>	85.123 ± 21.316 <sup>2)</sup>	40.647 ± 9.328 <sup>2)</sup>
黑果枸杞子干预	4.48	114.6 ± 20.3 <sup>4)</sup>	344.725 ± 40.246 <sup>3)</sup>	29.234 ± 9.613 <sup>4)</sup>	61.263 ± 20.416 <sup>3)</sup>	18.105 ± 10.551 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01;与过度训练组比较<sup>3)</sup>P < 0.05,<sup>4)</sup>P < 0.01(表 2,3 同)。

表 2 运动及黑果枸杞子对大鼠血清 LDH,CK 酶活的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effect of exercise and *Lycium ruthenicum* fructus on LDH and CK activity in rats' serum ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	LDH	CK
安静对照	-	313.61 ± 18.21	324.35 ± 17.02
有氧训练	-	339.67 ± 16.24 <sup>4)</sup>	342.27 ± 14.52 <sup>4)</sup>
过度训练	-	453.35 ± 20.32 <sup>2)</sup>	448.39 ± 20.17 <sup>2)</sup>
黑果枸杞子干预	4.48	344.72 ± 19.24 <sup>3)</sup>	359.23 ± 16.13 <sup>4)</sup>

表 3 运动及黑果枸杞子对大鼠骨骼肌 p38 MAPK,ERK 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effect of exercise and *Lycium ruthenicum* fructus on expression of p38 MAPK and ERK protein in rats' skeletal muscle ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p38 MAPK	ERK
安静对照	-	48.52 ± 6.02	60.85 ± 5.09
有氧训练	-	64.85 ± 7.14 <sup>1)</sup>	69.24 ± 6.84 <sup>1)</sup>
过度训练	-	80.35 ± 7.46 <sup>2)</sup>	82.12 ± 8.61 <sup>2)</sup>
黑果枸杞子干预	4.48	64.51 ± 7.03 <sup>1,3)</sup>	68.74 ± 7.45 <sup>1,3)</sup>

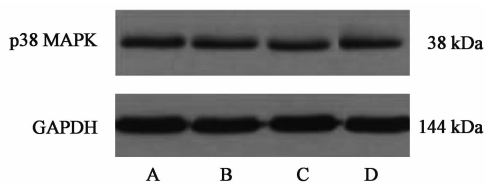


图 1 各组大鼠骨骼肌 p38MAPK 蛋白表达

Fig.1 Expression of p38MAPK protein in skeletal muscle of rats each groups

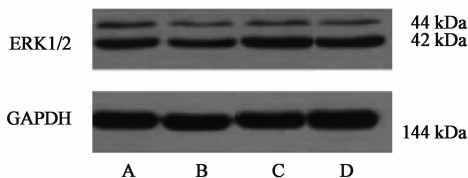


图 2 各组大鼠骨骼肌 ERK 蛋白表达

Fig.2 Expression of ERK protein in skeletal muscle of rats each groups

大、恢复时间短等多重因素的影响,出现过度训练综合征,抗氧化酶活性下降,自由基代谢紊乱,机体氧化-抗氧化系统失衡,氧化应激发生。而黑果枸杞子干预组由于黑果枸杞子中原花青素、多糖、总黄酮等活性成分可以有效地提高骨骼肌组织中超氧化物歧化酶活性,降低运动过程中大量蓄积的自由基对组织造成的脂质过氧化,保证了机体氧化-抗氧化系统的动态平衡,有效地缓解了氧化应激反应的发生与发展,进而提高抗疲劳能力<sup>[4-8]</sup>。

p38 和 ERK 是 MAPKs 家族中较为重要的两条通路。运动及氧化应激均可对其可产生重大的影响。而血清 CK 和 LDH 的活性是肌纤维损伤的显著性标志物<sup>[9]</sup>。3-NT 和 8-OHdG 则是蛋白质和 DNA 氧化应激损伤的标志性产物<sup>[10]</sup>。研究表明机体内自由基代谢在正常情况下处于动态平衡状态。但在运动过程中,尤其是长时间、大强度运动可导致机体氧化-抗氧化系统失衡,氧化应激发生。超量的自由基与生物膜结构中的多不饱和脂肪酸相结合,促进了脂质过氧化反应的发生与发展,破坏了细胞膜稳定性,使得细胞膜流动性改变,通透性增强。肌

细胞中的酶进入血液循环中,蛋白质二、三级结构改变,活性破坏,进而出现细胞死亡和组织损伤<sup>[11]</sup>。同时自由基又可以通过激活 MAPKs 在内的氧化还原敏感型信号通路,调节抗氧化酶基因等氧化还原敏感型基因的表达<sup>[12]</sup>。因此,这种非致死性氧化应激又可以通过激活 MAPK 信号激酶诱导抗氧化酶产生,提高骨骼肌的氧自由基的清除能力,预防细胞遭受进一步损伤。p38 MAPK 信号通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程,并与炎症、应激反应的调控密切相关,在维持细胞的正常功能中起重要作用,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路,特别是运动信号转导中发挥重要作用。运动和肌肉收缩可以激活 p38 MAPK 信号通路,促使骨骼肌中的 p38 的蛋白表达升高,且运动的负荷与 p38 激活程度成正相关。ERK 信号途径是引起细胞分裂、生长和增殖的重要信号转导途径,对于维持骨骼肌肌肉量是不可或缺的<sup>[11]</sup>。研究表明运动可以激活 ERK1/2 通路,并通过激活 ERK 等相关信号通路在骨形成、骨所受到的应力和病理性骨折以及牵引成骨手术治疗等过程中均发挥重要的中心环节作用<sup>[13]</sup>。而活性氧(ROS)可通过两条途径激活 ERK,即激活其上游 c-Raf-1 直接激活 ERK,也可以通过抑制磷酸酯酶间接增加磷酸化细胞外信号调节激酶(P-ERK)的含量。实验结果表明 6 周的有氧训练在一定程度上提高了机体抗运动氧化应激能力,减轻了氧化应激对机体造成的损伤。其机制为虽然运动在刺激机体大量产生代谢产物、氧自由基的同时上调 p38,ERK 活性表达<sup>[12]</sup>。但由于有氧运动对机体的刺激是间歇性的,可以有效地提高抗氧化酶活性的增加,加速机体对代谢产物、氧自由基的清除,适度增强机体抗氧化能力,进而促进细胞产生预适应预防更严重的氧化应激。而过度训练组大鼠机体长期处理应激与应激耐受性之间的失衡状态,氧化-抗氧化系统失衡,组织能量代谢紊乱,抗氧化能力减弱,自由基大量产生并堆积,进而导致 p38,ERK 信号通路过度表达,造成对组织细胞和线粒体等细胞器的损伤。而营养干预组由于黑果枸杞子中原花青素、多糖、总黄酮等活性成分通过有效地提高组织中抗氧化酶活性和自由基清除能力,降低运动过程中大量产生的自由基对组织造成的脂质过氧化,抑制或延缓氧化应激的发生与发展,进而抑制了 p38 和 ERK 信号通路蛋白的过量表达<sup>[4-8]</sup>。

黑果枸杞子可以有效缓解过度训练导致的机体内环境失衡,提高机体尤其是骨骼肌的氧自由基清除能力,抑制 MAPK 信号通路的蛋白表达,预防和延缓运动疲劳的发生与发展。

[参考文献]

- [1] 李琳燕. 过度训练对大鼠骨骼肌自由基代谢和 MAPK 信号通路 p38 蛋白表达的影响[J]. 沈阳体育学院学报, 2011, 30(1): 62-65.
- [2] 苏美华, 陈平, 孙剑. 力竭运动对小鼠骨骼肌氧化应激和 DNA 损伤的影响[J]. 山东体育科技, 2013, 35(2): 88-91.
- [3] 王琴, 王建友, 李勇, 等. 我国黑果枸杞研究进展[J]. 北方园艺, 2016(5): 194-199.
- [4] 张珂, 曹建民, 郭娴, 等. 黑果枸杞对大鼠运动性肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 首都体育学院学报, 2015, 27(1): 85-89.
- [5] 陈晨, 赵晓辉, 文怀秀, 等. 黑果枸杞的抗氧化成分分析及抗氧化能力测定[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(15): 1305-1306.
- [6] ZHENG J, DING C X, WANG L S, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau [J]. Food Chem, 2011, 126(3): 859-865.
- [7] PENG Q, LV X P, XU Q S, et al. Isolation and structural characterization of the polysaccharide LRGPI from *Lycium ruthenicum* [J]. Carbohydr Polymers, 2012, 90(1): 95-101.
- [8] LIU Z, DANG J, WANG Q, et al. Optimization of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* fruit using RSM and its anti-oxidant activity [J]. Int J Biol Macromol, 2013, 61(10): 127-134.
- [9] 吴秀琴, 杨威, 尹玉娇. 茶多酚对一次性力竭运动大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国体育科技, 2016, 52(1): 92-95.
- [10] 李爱春. 富氨水对骨骼肌运动性氧化应激损伤与选择性抗氧化作用机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [11] 王云茹. 红景天苷通过 MAPK 信号通路发挥对急性力竭大鼠心脏保护作用的研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [12] 王小娟, 李建华, 边仁秀. 有氧运动对 2 型糖尿病大鼠腓肠肌氧化应激及 MAPKs 信号通路的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2012, 31(9): 800-805.
- [13] Taylor L W, Wilborn C D, Kreider R B, et al. Effects of resistance exercise intensity on extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase activation in men [J]. J Strength Cond Res, 2012, 26(3): 599-607.

[责任编辑 周冰冰]