

桑叶总黄酮抗运动疲劳作用及相关机制研究

马向前^{1*}, 胡颖²

(1. 燕山大学体育学院, 河北 秦皇岛 066004; 2. 燕山大学教务处, 河北 秦皇岛 066004)

[摘要] 目的: 研究桑叶总黄酮抗疲劳作用并探讨其作用机制。方法: 将小鼠分为桑叶总黄酮高、低剂量组(桑叶总黄酮 1, 0.4 g·kg⁻¹)、肌酸给药组(肌酸 3 g·kg⁻¹)、阴性对照组和正常对照组(0.9% 生理盐水), 给药 14 d 后小鼠进行负重游泳实验(除正常对照组外), 采血分离血清, 测定与疲劳有关的生化指标, 应用体外自由基清除实验及小鼠肝组织脂质自氧化法测定桑叶总黄酮抗氧化及清除自由基能力。结果: 与阴性对照组比较, 小鼠给药桑叶总黄酮后负重游泳时间明显延长($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清肌酐和尿素氮浓度降低, 丙二醛的生成受到抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 桑叶总黄酮具有抗疲劳、清除自由基、抑制小鼠肝脏组织脂质自氧化的活性。其抗疲劳能力与其较强的自由基的清除作用相关。

[关键词] 桑叶黄酮; 抗疲劳; 自由基; 清除能力

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0216-04

[doi] 10.11653/syfy2013110216

Anti-fatigue Effect and Mechanism of Flavonoids from Mori Folium

MA Xiang-qian^{1*}, HU Ying²

(1. Physical Education Institute, Qinhuangdao 066004, China;

2. Educational Administration Office, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-fatigue effect of flavonoids from Mori Folium and discuss its mechanism. **Method:** Male Kunming mice were randomly divided into groups of flavonoids group (0.4, 1g·kg⁻¹

[收稿日期] 20121104(003)

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(10457222)

[通讯作者] * 马向前, 硕士, 副教授, 从事体育教育训练学研究, Tel:13013269061, E-mail: xiangqian58@126.com

作用,减轻氧化损伤,进而保护胰岛 β 细胞,并进一步上调抗凋亡基因 Bcl-2 水平,下调促凋亡基因 Bax 表达,保持胰岛 β 细胞及结构完整,降低凋亡的发生,阻止并发症的发生,改善糖尿病症状。

总之,桑叶总黄酮能改善 T2DM 大鼠胰岛素抵抗,增强机体的抗氧化能力,减轻氧化应激,上调 Bcl-2/Bax,缓解胰岛 β 细胞凋亡,预防、延缓 T2DM 的发生。

[参考文献]

- [1] Evans J L, Goldfine I D, Maddux B A, et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction[J]. Diabetes, 2003, 52(1): 1.
- [2] 俞灵莺,李向荣. 植物黄酮类抗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. 国外医学:卫生学分册, 2000, 27(6): 331.
- [3] 孙志,韩海荣,马丽,等. 针对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞

凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(6): 966.

- [4] 丁海燕,赵瑞景,尹小妹,等. 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯减轻 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞氧化损伤[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(1): 36.
- [5] 郑楚,唐金良,杨冬业,等. 罗汉果总黄酮对实验性糖尿病大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22): 194.
- [6] 安丽萍,王英平,王春梅,等. 五味子油对 2 型糖尿病大鼠胰岛 β 细胞凋亡的影响[J]. 吉林大学学报:医学版, 2012, 38(1): 84.
- [7] 李明聪,杨丹,郭英,等. 桑叶中黄酮类化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(2): 377.
- [8] 原爱红,马骏,蒋晓峰,等. 桑叶中糖苷酶抑制活性组分的筛选[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(3): 223.

[责任编辑 聂淑琴]

mulberry leaves flavonoids, respectively), creatine group (creatine $3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), control and normal group (stomach irritation with saline only). The exhaustive swimming experiment was performed 14 days later. The time of exhaustive swimming of mice was recorded and chemistry parameters correlated with fatigue was determined. The effects of flavones of Mori Folium on scavenging free radicals and anti-oxidation were investigated *in vitro*. **Result:** The time of exhaustive swimming of flavonoids groups and creatine group was longer than that of control group ($P < 0.05$). The content of the creatinine and urea nitrogen level of serum decreased significantly the MDA production in liver tissues of mice in flavonoids group is lower than that of control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Flavonoids from Mori Folium can improve the anti-fatigue capacity obviously and has a significant effect on scavenging free-radicals. The anti-fatigue effect of total flavonoids from Mori Folium may have correction with its radicals scavenging effects.

[**Key words**] flavonoids from Mori Folium; anti-fatigue; free radicals; scavenging activity

体育竞技训练中,运动员承受的负荷越来越大,产生过度疲劳的机率随之增加。过度疲劳不仅影响运动员竞技成绩的提高,还会引起器官病变,影响运动员的运动寿命。因此,研究疲劳产生的机制,探讨快速消除运动疲劳方法对于提高体育竞技训练水平非常必要。

研究显示,机体在应激或急性剧烈运动时,产生大量活性氧,攻击细胞膜的多不饱和脂肪酸,破坏其完整性和通透性,影响细胞功能,从而使运动能力下降,这是运动性疲劳产生的重要机制之一^[1]。因而,抑制过量自由基的产生并及时进行清除,可以减轻各组织系统损伤,延缓和消除疲劳。研究表明,黄酮类化合物在防护组织细胞免受自由基和活性氧的损伤中具有较好的作用^[2,3],桑叶(Morio Folium)是黄酮类化合物含量最丰富的物种之一^[4],具有利尿、降糖降脂等广泛的药理作用,为国家卫生部颁布的药食两用植物。桑叶黄酮类化合物能够抑制 LDL 受体表达及减少血清低密度脂蛋白的氧化^[5],并具有明显的心肌保护作用^[6]。本文在对桑叶总黄酮类化合物抗疲劳药理作用研究基础上对其清除超氧阴离子、羟基自由基及抗氧化作用进行探讨,为其抗疲劳保健作用应用于竞技领域提供有益实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,购于中国医学科学院实验动物中心,18~22 g,雌雄兼用,许可证号 SCXK(京)-2004-0001。

1.2 药品与试剂 桑叶,购自秦皇岛市安平大药房,经鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶;硫代巴比妥酸(TBA,上海试剂二厂批号 98102)、二苯代苦味肼基(DPPH,美国, Sigma 公司,批号 D9132);溴邻苯三酚红(上海精细化学品有限公司

进口分装,批号 MFCD00148865);丙二醛(MDA)检测试剂盒(购于南京建成生物试剂公司,批号 20070912)。其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 UV-2550 紫外分光光度计(日本,岛津),FW110 型高速粉碎机(天津泰斯特仪器有限公司),RE-F20 旋转蒸发仪(长城亚荣生化仪器厂),AE240 1/10 万电子分析天平(瑞士,梅特勒)。

2 方法

2.1 小鼠力竭性负重游泳实验 桑叶总黄酮的提取按照文献[7]进行。小鼠随机分为桑叶总黄酮高、低剂量组(ig 1,0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、肌酸组(肌酸 $3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)正常对照组(0.9%生理盐水)、阴性对照组,每组 10 只,按上述剂量连续给药 14 d。除正常对照组外,其他各组于末次给药 0.5 h 后开始进行力竭游泳实验。小鼠的负重量为体重的 1/10(约为 2~3 g),水温 28 $^{\circ}\text{C}$,人工驱赶小鼠不停游泳至完全没入水中,8~10 s 不浮出水面定为力竭,立即取出小鼠,记录游泳时间。

2.2 取材及指标测定

2.2.1 血清中肌酐、尿素氮及组织 MDA 含量测定 在进行力竭游泳实验后小鼠正常喂食、喂水,待小鼠恢复正常后摘眼球取血,肝素抗凝,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 收集血清。血清中肌酐采用苦味酸比色法测定,血清尿素氮采用二乙酰一脲比色法测定,肝组织 MDA 按试剂盒说明书进行测定。

2.2.2 体外清除·OH 自由基能力测定 体外清除·OH 自由基采用 Fenton-溴邻苯三酚红体系^[8],在 pH 3.8 HOAc-NaOAc 缓冲体系中依次加入 FeSO_4 溶液、溴邻苯三酚红溶液、1% 过氧化氢溶液,实验组加入桑叶总黄酮,阳性对照组加入等量抗坏血酸。对照组以蒸馏水代替桑叶总黄酮,室温反应 20 min,在 553.50 nm 波长处测定吸光度(A_s),未加桑叶总

黄酮的空白体系 A_0 ; 未加 $\text{FeSO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 及清除剂的体系为 A , 用以下公式计算表观羟自由基清除率 IR:

$$\text{IR} = (A_s - A_0) / (A - A_0) \times 100\%$$

2.2.3 体外清除 DPPH 自由基能力的测定 DPPH 自由基清除能力测定方法依据王锐等^[8]方法进行。将提取物溶于 60% 乙醇溶液中, 配成系列浓度梯度, 取 50 μL 样品液, 加入 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH 甲醇溶液 50 μL , 室温放置 30 min, 用酶标仪测定 517 nm 处 A_s 。以 50 μL 体积分数 60% 乙醇替代提取液测定空白 A_0 , 对 DPPH 的清除率按下述公式进行计算:

$$\text{IR} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%$$

2.2.4 桑叶总黄酮对小鼠肝组织自发性氧化的影响^[10] 小鼠肝脏以冰冷的生理盐水灌注, 滤纸拭干, 称重, 冰浴条件下以 PBS (pH 7.2) 制成 10% 组织匀浆, 取匀浆 0.5 mL, 实验组每管分别加入不同浓度的桑叶总黄酮, 使桑叶总黄酮终浓度分别为 105.36, 52.68, 26.34, 13.17, 6.58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 各组均以生理盐水补充至 1 mL, 于空气浴振荡器 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵

育 1.5 h 后, 应用试剂盒测定 MDA 的生成量, 以 $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 组织为计量单位, 并计算清除率。

2.3 统计学处理 体内试验结果均采用 $\bar{x} \pm s$, 表示, 组间差异显著性采用 t 检验进行判定。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠负重游泳力竭时间及疲劳小鼠血清肌酐、尿素氮的影响 以 0.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的桑叶总黄酮进行灌胃给药 14 d 后, 小鼠力竭时间与阴性对照组相比有所延长, 差异不显著; 以 1 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的桑叶总黄酮灌胃给药 14 d 后, 小鼠力竭时间显著延长, 与阴性对照组相比具有显著差异 ($P < 0.05$); 该组小鼠血清肌酐含量显著降低 ($P < 0.05$); 桑叶总黄酮 2 个剂量组与阴性对照组相比, 血清尿素氮含量均显著降低 ($P < 0.05$); 与阴性对照组比较, 肝组织 MDA 含量明显降低 ($P < 0.01$), 其高剂量优于肌酸对照组, 提示桑叶总黄酮具有抑制脂质过氧化的作用, 并随着药物浓度增加, 抑制作用增强。

表 1 桑叶总黄酮对小鼠血清肌酐、尿素氮及肝组织 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	力竭时间/s	肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	尿素氮/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
正常对照	-	-	29.52 \pm 3.44	12.25 \pm 2.07	1.03 \pm 0.42
阴性对照	-	479 \pm 76	55.25 \pm 6.41 ²⁾	21.25 \pm 2.75 ²⁾	2.96 \pm 1.03 ²⁾
肌酸	3	628 \pm 86 ⁴⁾	40.18 \pm 5.23 ^{2,3)}	13.57 \pm 2.43 ^{1,4)}	1.68 \pm 0.49 ^{2,4)}
桑叶总黄酮	0.4	518 \pm 67	58.99 \pm 6.59 ²⁾	16.28 \pm 2.94 ^{2,3)}	1.77 \pm 0.84 ^{1,4)}
	1	693 \pm 98 ⁴⁾	34.16 \pm 5.75 ^{1,4)}	15.10 \pm 2.88 ^{2,3)}	1.29 \pm 0.73 ^{1,4)}

注: 与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与阴性对照组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 体外清除自由基能力 桑叶总黄酮清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基表观清除率为 46.6%, 而等浓度抗坏血酸为 57.4%。桑叶总黄酮对 DPPH 自由基清除能力随着黄酮浓度增加, 抑制作用增强, 当总黄酮为 160 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 抑制率为 80% (图 1)。

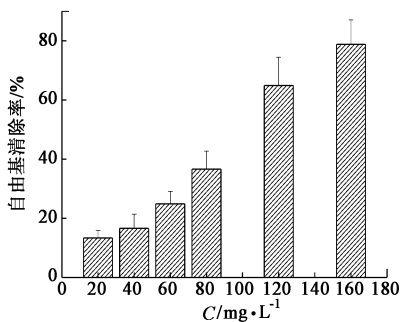


图 1 桑叶总黄酮对 DPPH 自由基清除能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.3 对小鼠肝组织自发性氧化的影响 桑叶总黄酮对小鼠肝组织自发性氧化具有明显抑制作用, 随

着黄酮浓度增加, 抑制作用增强, 根据实验结果获得回归曲线见图 2, $Y = 25.69\text{Ln}(X) - 32.35$, $R = 0.9967$, 经计算半数有效质量浓度 EC_{50} 为 27.74 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

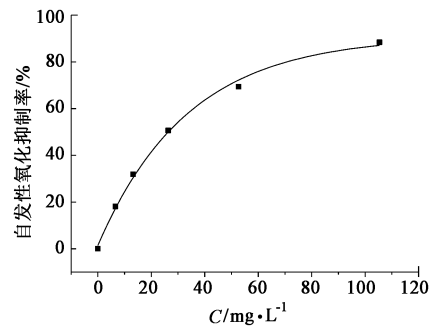


图 2 桑叶总黄酮对小鼠肝组织自发性氧化的影响

4 讨论

本实验采用小鼠力竭游泳模型研究桑叶总黄酮

的抗疲劳机制,此模型既模拟了中医有关疲劳的发病过程,也符合西医所认为的由慢性应激导致疲劳的理论,该模型是目前抗疲劳实验研究通用的实验模型^[10],疲劳的产生与高强度或长时间运动后体内血糖、糖原等大量消耗,肌酐和尿素氮等代谢产物累积及内环境平衡失调有关^[10]。实验结果显示,小鼠在灌胃给药桑叶总黄酮 14 d 后,与阴性对照组相比,小鼠负重游泳力竭时间显著延长,力竭运动所致的血清肌酐、尿素氮累积有所缓解,说明一定剂量的桑叶总黄酮具有改善机体代谢,抗运动性疲劳的功效,能够在一定程度上提高机体对负荷的适应性,增强机体抗应激能力。

随着 1956 年 Harman 教授提出自由基氧化伤害学说^[11],自由基-脂质过氧化疲劳理论一度成为运动性疲劳理论的核心。由于剧烈运动自由基产生过多,可造成肌纤维膜、内质网完整性丧失,妨碍正常的细胞代谢与机能;造成胞浆中 Ca^{2+} 的堆积,影响肌纤维的兴奋-收缩耦联,使肌肉的工作能力下降;同时自由基线粒体呼吸链产生 ATP 的过程受到损害,细胞能量生成受阻,影响肌纤维的收缩功能;自由基使一些重要酶类失活,从而产生一系列病理变化,加重疲劳现象。这些都显示自由基与运动性疲劳有着密切的关系,是导致运动性疲劳的重要原因。活性氧自由基对生物细胞膜上多不饱和脂肪酸攻击产生 MDA,张琳等报道大强度运动可造成大鼠肾脏中 MDA 显著升高^[12],即大强度运动和自由基产生有直接关系。因此,MDA 的含量与自由基产生的量成正相关^[13]。桑叶总黄酮能显著抑制小鼠肝脏中 MDA 的产生,且在体外对 $\cdot\text{OH}$ 自由基具有显著的抑制作用,表明桑叶总黄酮对运动疲劳产生的自由基有较好的清除作用。

本实验结果表明桑叶总黄酮有较好的清除自由基的活性成分,具有较强的抗氧化作用,有利于活性氧的清除,使机体抗脂质过氧化作用增强,减少运动时自由基的生成以减少其对组织的损伤作用。桑叶总黄酮能够有效地抗运动疲劳,与其具有较强的自由基的清除作用相关。桑叶药食兼佳,资源丰富,是一种极有潜力的天然抗氧化剂资源,有望于研制成为高效、低毒、价廉的抗疲劳保健食品或药品。从天

然物质中寻找筛选高效无毒的自由基清除剂应用于竞技训练,有望成为运动医学研究的热点。

[参考文献]

- [1] 邓运龙,田亚平,王成彬. 运动性慢性疲劳的分子机制、评价与营养支持研究[J]. 中华实用医药杂志, 2006, 24(6): 2232.
- [2] Wei W, Zheng L Y, Yu M Y, et al. Anti-fatigue activity of extract from the submerged fermentation of ganoderma lucidum using radix astragali as substrate [J]. J Animal & Plant Sciences, 2010, 6 (3): 677.
- [3] Zhou X, Lin J, Yin Y, et al. Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions [J]. Am J Chin Med, 2007, 35: 559.
- [4] 欧阳臻,陈钧. 桑叶的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 江苏大学学报,2003,24(6): 39.
- [5] Doi K, Kojima T, Fujimoto Y. Mulberry leaf extract inhibits the oxidative modification of rabbit and human low density lipoprotein [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (9):1066.
- [6] 王萍. 桑叶总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17 (19): 185.
- [7] 马金秋,李丹,马向前,等. 桑叶总黄酮的提取纯化工艺研究[J]. 中国药房, 2010, 23:2142.
- [8] 王锐,何媚,袁晓春,等. 木蝴蝶总黄酮的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):102.
- [9] 何桂霞,杜方麓,杨伟丽,等. 藤茶总黄酮清除氧自由基与抗脂质过氧化作用[J]. 中药材, 2003, 26 (5):338.
- [10] 刘晓波,郭美仙,李雯,等. 鸡肉参抗疲劳作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):168.
- [11] Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1067:10.
- [12] 张琳,熊正英,郝选明,等. 白藜芦醇对大强度运动大鼠肾脏功能的保护作用[J]. 天津体育学院学报, 2011, 26(3):208.
- [13] 杨峰,翟元,刘业梅,等. 有氧耐力运动对小鼠肌肉组织自由基损伤的影响[J]. 天津体育学院学报, 2005, 39(6):69.

[责任编辑 聂淑琴]