

基于氧化应激研究刺五加多糖的抗运动性疲劳作用

古鹏鑫¹, 贾奇侠¹, 王海峰^{2*}

(1. 重庆交通大学体育部, 重庆 400074) (2. 西北农林科技大学体育部, 陕西杨凌 712100)

摘要: 该文研究了 ASP (刺五加多糖) 的抗运动性疲劳与抑制氧化应激作用。将小鼠随机分为对照组及刺五加多糖低、中、高剂量组 (50、100、200 mg/kg), 连续干预 28 d。结果发现, 与对照组比较, 刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠负重游泳时间延长了 13.79%、33.68% 和 48.89%, 肌糖原、肝糖原含量增加, BUN (血尿素氮)、乳酸、血糖及血氨含量降低; 与对照组比较, 刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠骨骼肌 GSH-Px (谷胱甘肽过氧化物酶) 活性增加了 29.82%、53.03% 和 59.32%, SOD (超氧化物歧化酶) 活性增加了 9.64%、15.23% 和 50.05%, MDA (丙二醛) 含量降低了 16.45%、36.76% 和 45.82%; 与对照组比较, 刺五加多糖中、高剂量组小鼠骨骼肌 NOX2 及低、中、高剂量组 NOX4、Keap1 基因表达下降, 而刺五加多糖各剂量组 Nrf2 及 HO-1 基因表达增加, 同时相关蛋白的表达水平具有一致的趋势。结果表明, 刺五加多糖具有抗小鼠运动性疲劳作用, 该作用与抑制 NOX2、NOX4 表达及调节 Nrf2/ARE 信号通路, 进而抑制氧化应激作用有关。

关键词: 刺五加多糖; 运动性疲劳; 氧化应激; NADPH 氧化酶; Nrf2/ARE 信号通路

文章编号: 1673-9078(2023)04-55-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.4.0617

Anti-exercise-fatigue Effect of *Acanthopanax senticosus* Polysaccharide Based on Oxidative Stress

GU Pengxin¹, JIA Qixia¹, WANG Haifeng^{2*}

(1. Department of Physical Education, Chongqing Jiaotong University, Chongqing 400074, China)

(2. Department of Physical Education, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The anti-exercise-fatigue and oxidative stress inhibitory effects of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASP) was investigated. Mice were randomly divided into the control group and the low-, medium- and high dose ASP groups (50, 100 and 200 mg/kg), and the intervention lasted for 28 days. The results showed that compared with the control group, the weight-bearing swimming times of mice for the low-, medium- and high dose ASP groups were prolonged by 13.79%, 33.68% and 48.89%, respectively, the contents of muscle glycogen and liver glycogen increased, and the contents of BUN, lactic acid, blood glucose and blood ammonia decreased; Compared with the control group, the activity of GSH-Px in the skeletal muscle for the low-, medium- and high dose ASP mice increased by 29.82%, 53.03% and 59.32%, respectively, their SOD activities increased by 9.64%, 15.23% and 50.05%, respectively, and their MDA contents decreased by 16.45%, 36.76% and 45.82%, respectively; Compared with the control group, NOX2 gene expression in the skeletal muscle of the medium- and high dose ASP groups and the NOX4 and Keap1 gene expressions of the low-, medium- and high dose ASP groups decreased, whilst Nrf2 and HO-1 gene expressions of all the ASP groups increased, and the expression levels of related proteins showed a consistent trend. The results showed that ASP has an anti-exercise-fatigue effect in mice, which is related to the inhibition of NOX2 and NOX4 expressions and the regulation of Nrf2/ARE signaling pathway, thereby inhibiting oxidative stress.

Key words: *Acanthopanax senticosus* polysaccharide; exercise fatigue; oxidative stress; NADPH oxidase; Nrf2/ARE signaling pathway

引文格式:

古鹏鑫, 贾奇侠, 王海峰. 基于氧化应激研究刺五加多糖的抗运动性疲劳作用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 55-61.

GU Pengxin, JIA Qixia, WANG Haifeng. Anti-exercise-fatigue effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide based on oxidative stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(4): 55-61.

收稿日期: 2022-05-16

基金项目: 陕西省哲学社会科学重大理论与现实问题研究项目 (2021ND03823)

作者简介: 古鹏鑫 (1995-), 男, 硕士, 助教, 研究方向: 运动营养学与体育教育训练学, E-mail: gupengfei2050@163.com

通讯作者: 王海峰 (1977-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 运动营养学与体育教育训练学, E-mail: 827658214@qq.com

运动性疲劳在运动训练中较常见,主要是指由运动引起的肌肉最大输出功率或最大收缩暂时性下降的一种生理现象^[1]。高强度长时间运动会使机体产生大量的活性氧、自由基等有害代谢产物,不仅会引起机体的某些功能障碍,还可以使线粒体合成能力减弱,加快机体疲劳速度及程度,从而导致运动能力下降^[2]。传统抗运动性疲劳物质多以营养强化生物制剂为主,虽其在延缓疲劳及提高运动能力等方面的作用已被证实,但兴奋剂类成分及不可避免的副作用常给机体带来一定的损害,限制了其应用范围的扩大^[3]。因此,长久以来从天然植物中寻找和探索更加安全有效的抗运动性疲劳活性物质,一直是运动保健领域的研究热点^[4,5]。

刺五加为五加科植物刺五加 [*Acanthopanax senticosus* (Rupr.et Maxim.) Harms] 的干燥根或根茎,为药食两用植物^[6]。刺五加的主要化学成分为皂苷类、多糖类、木脂素类、香豆素类及黄酮类,具有抗肿瘤、保护心脑血管系统及抗炎、抗氧化等药理作用^[7,8]。近年来,刺五加皂苷类成分的抗疲劳作用多见报道。研究发现,采用递增强度跑台训练法建立大鼠运动疲劳模型并给予刺五加苷 B 干预,可以有效提高肌糖原、肝糖原含量,降低血尿素氮 (Blood Urea Nitrogen, BUN) 及乳酸脱氢酶等指标,表明刺五加苷 B 有利于能量物质的积累和储存,能使清除疲劳代谢物质的速度加快,具有加快疲劳恢复及延缓疲劳发生的作用^[9]。昆明小鼠灌胃 100、200、400 mg/kg 的刺五加总皂苷 4 周后进行强迫游泳试验,发现与灌胃蒸馏水组比较,各剂量刺五加总皂苷均能延长小鼠游泳力竭时间,增加组织糖原含量,降低血乳酸和 BUN 含量,提高运动耐受性^[10]。多糖作为刺五加的主要功效成分之一,具有改善抑郁、降血糖及提高免疫力等作用,但是关于刺五加多糖 (*Acanthopanax senticosus* Polysaccharide, ASP) 是否具有抗运动性疲劳作用鲜见报道^[11-13]。因此,本研究拟在明确刺五加多糖具有抗运动性疲劳作用的基础上,进一步探讨其与氧化应激的关系,并深入分析潜在的分子机制,旨在为把刺五加多糖用于缓解运动性疲劳提供依据。

1 材料与方法

1.1 原料与实验动物

刺五加多糖 (含量 $\geq 85.00\%$), 单糖组成为木糖 (11.60%)、鼠李糖 (13.60%)、半乳糖醛酸 (14.90%)、阿拉伯糖 (15.40%)、葡萄糖 (17.10%) 和半乳糖 (24.20%), 购于陕西斯诺特生物科技有限公司 (批号 2021031501)。无特定病原体 (Specific Pathogen Free,

SPF) 级昆明种雄性小鼠, 48 只, 体质量 18~22 g, 购于北京维通利华实验动物公司, 合格证号: SCXK (京) 2019-0009。动物实验方案经重庆交通大学伦理委员会审批, 并遵循 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂

肌/肝糖原含量检测试剂盒, 购于合肥莱尔生物科技有限公司 (批号 YX-C-B603); 谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活性及丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂盒, 购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司 (批号 E-BC-K096-M、E-BC-K022-M、E-EL-0060c); 逆转录 (Reverse Transcription, RT) 试剂盒和定量聚合酶链式反应 (Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR) 试剂盒, 购于北京艾德莱生物科技有限公司 (批号 PC44、PC61-2); qPCR 引物, 由上海生工合成; NADPH 氧化酶 2 (NADPH Oxidase 2, NOX2)、NOX4、Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (Kelch-like ECH Associated Protein 1, Keap1)、核因子红细胞系 2 相关因子 2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor, Nrf2)、血红素氧合酶 1 (Heme Oxygenase 1, HO-1)、内参蛋白 β -actin 多克隆抗体及相应二抗, 均购于北京索莱宝科技有限公司 (批号 K004982P、K002187P、K108661P、K107506P、K009542P、K101527P、SE134)。

1.3 主要仪器

BSA124S 型电子天平, 德国赛多利斯公司; NR-B17CC 型超低温冰箱, 日本松下电器公司; 5417R 型高速低温离心机, 德国艾本德公司; 小鼠游泳箱 (规格: 100 cm \times 50 cm \times 70 cm), 北京智鼠多宝生物科技有限公司; UV1600PC 型紫外分光光度计, 上海析谱仪器公司; 7060 型全自动生化分析仪, 日本日立公司; MultiSkan-3 型酶标仪, 芬兰雷勃公司; 7500 型 qPCR 仪, 美国 ABI 公司; XCell SureLock 型蛋白电泳及转移系统, 美国赛默飞世尔公司; GIS-500 型凝胶成像仪, 杭州米欧仪器公司。

1.4 方法

1.4.1 分组、干预及负重游泳实验

小鼠饲养于湿度为 50% \pm 10%、温度为 (22 \pm 2) $^{\circ}$ C 条件下, 日光灯明暗间隔 12 h, 自由饮水及饮食。适应环境 1 周后, 随机分为对照组及刺五加多糖低、中、高剂量组, 每组 12 只。对照组小鼠灌胃蒸馏水, 刺五加多糖低、中、高剂量组分别灌胃 50、100 及 200 mg/kg

的刺五加多糖, 每天1次, 连续干预28 d。记录干预前及末次干预后各组小鼠体质量。末次干预结束后, 禁食不禁水2 h, 开始小鼠负重游泳实验。在小鼠尾部绑一重物, 其质量为小鼠体质量的5%, 随后将小鼠置于游泳箱中。游泳箱水深30 cm, 水温(25±1) °C, 游泳至力竭(小鼠鼻孔沉于水面下10 s不能上浮)为止, 该时间即为负重游泳时间。

1.4.2 肌糖原及肝糖原含量检测

负重游泳实验结束后, 取出小鼠, 用 $m=1\%$ 戊巴比妥钠麻醉, 摘眼球取血, 离心(3 000 r/min, 15 min), 分离血清, -80 °C 冰箱中保存备用。颈椎脱臼法处死小鼠, 剖取后腿肌肉和肝脏组织, 用生理盐水冲洗残留血液, 滤纸拭干。分别称取0.1 g 标本, 加入0.9 mL 预冷的生理盐水, 在冷冻研磨机中进行匀浆操作, 离心(3 000 r/min, 15 min), 取上清液。按照试剂盒说明书中的操作, 利用蒽酮试剂通过分光光度法检测肌糖原及肝糖原含量。

1.4.3 血清生化指标检测

取冻存的血清, 用日立全自动生化分析仪(7060型)分别检测各组小鼠 BUN、乳酸、血糖及血氨含量。

1.4.4 骨骼肌氧化应激指标检测

根据“1.4.2”项下方法制备骨骼肌匀浆液。按照试剂盒说明书中的操作, 通过酶联免疫吸附(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)法分别检测各组小鼠 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量。

1.4.5 骨骼肌 NOX2、NOX4、Keap1、Nrf2 及 HO-1 基因表达检测

采用 RT-qPCR 法检测各组小鼠骨骼肌 NOX2、NOX4、Keap1、Nrf2 及 HO-1 基因表达。TRIzol 试剂提取骨骼肌总 RNA, 逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA 后, 进行 qPCR 反应, 具体反应体系参考试剂盒说明书, 并通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因表达量。引物序列如表1所示, qPCR 反应程序为 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 共40个循环。

表1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 The primer sequences of RT-qPCR

基因名称	引物序列	产物长度/bp
NOX2	正向: 5'-TAGCACTTCACACGGCCATT-3'	86
	反向: 5'-ATATGGGTCCGAAGTCCCGA-3'	
NOX4	正向: 5'-ACAGGATCAGCTTGTTTGGCT-3'	117
	反向: 5'-CACAATCCTAGGCCCAACATC-3'	
Keap1	正向: 5'-GAGATATGAGCCAGATCGAGACG-3'	183
	反向: GGTGTAATCATCCGCCACTCAT-3'	
Nrf2	正向: 5'-GACATCCTTTGGAGGCAAGACAT-3'	168
	反向: 5'-TGGAATGTGGGCAACCTG-3'	
HO-1	正向: 5'-GAGCGAAACAAGCAGAACCC-3'	191
	反向: 5'-ACCTCGTGGAGACGCTTTAC-3'	
β -actin	正向: 5'-CGTTGACATCCGTAAGACCTC-3'	110
	反向: 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3'	

1.4.6 骨骼肌 NOX2、NOX4、Keap1、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达检测

采用 Western blot 法检测各组小鼠骨骼肌 NOX2、NOX4、Keap1、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达, 其中 NOX2、NOX4、Keap1 及 HO-1 蛋白检测提取总蛋白后进行, Nrf2 蛋白检测提取核蛋白后进行。取 20 μ g 变性后的蛋白进行 $m=10\%$ SDS-PAGE 电泳, 半干法转至聚偏二氟乙烯膜上, 剪去一角做标记后在室温下用含 5% 牛血清白蛋白的 TBST 封闭 2 h。洗膜后, 分别加入 NOX2、NOX4、Keap1、Nrf2 及 HO-1 一抗, 在 4 °C 条件下孵育过夜; 继续洗膜, 加入相应的二抗, 在室温下继续孵育 1 h。再次洗膜, ECL 显色后, 用 Image J 软件分析灰度值。

1.4.7 数据分析

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 组间差异性比价采用 t 检验及单因素方差分析, $P < 0.05$ 为显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 刺五加多糖对各组小鼠体质量的影响

分别于灌胃刺五加多糖前和末次干预后称重各组小鼠体质量, 并计算体质量增长情况, 结果见表2。与对照组比较, 刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠干预前、末次干预后体质量及干预期间体质量增长等指标均无明显变化, 结果说明灌胃刺五加多糖无明显毒副作用。

表2 刺五加多糖对各组小鼠体质量的影响

Table 2 Effects of ASP on body mass of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	体质量/g		体质量增长/g
		干预前	末次干预后	
对照组	0	19.88±2.24	28.29±3.38	8.41±0.73
刺五加多糖低剂量组	50	20.24±1.83	29.06±2.51	8.82±1.05
刺五加多糖中剂量组	100	20.30±1.52	28.67±2.29	8.37±0.96
刺五加多糖高剂量组	200	19.92±2.15	28.75±2.77	8.83±0.60

表4 刺五加多糖对各组小鼠肌糖原及肝糖原含量的影响

Table 4 Effects of ASP on muscle and hepatic glycogen contents of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	肌糖原/(mg/g)	肝糖原/(mg/g)
对照组	0	1.21±0.15	11.65±0.96
刺五加多糖低剂量组	50	1.37±0.12*	15.39±1.38**
刺五加多糖中剂量组	100	1.68±0.15**	17.73±1.64**
刺五加多糖高剂量组	200	1.93±0.20**	18.02±2.13**

注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。下表同。

2.2 刺五加多糖对各组小鼠负重游泳时间的影响

表3 刺五加多糖对各组小鼠负重游泳时间的影响

Table 3 Effects of ASP on weight-bearing swimming time of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	负重游泳时间/s
对照组	0	76.82±5.57
刺五加多糖低剂量组	50	87.41±6.40**
刺五加多糖中剂量组	100	102.69±8.24**
刺五加多糖高剂量组	200	114.37±7.83**

当发生运动性疲劳时，机体会出现复杂的生化生理反应，负重游泳时间可以较好的反映运动性疲劳的程度及水平。由表3，通过负重游泳实验发现，与对照组比较，刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠负重游泳时间明显延长，其分别延长了13.79%、33.68%和48.89%，表明刺五加多糖具有抗运动性疲劳作用。刺五加多糖对各组小鼠负重游泳时间的影响。

2.3 刺五加多糖对各组小鼠肌糖原及肝糖原含量的影响

糖原是机体中主要的能量来源，在如游泳、长跑等高强度长时间有氧运动下，可耗竭体内糖原储备^[14]。肌糖原是肌肉中葡萄糖的储存形式，运动时肌糖原先分解生成乳酸，再由血液运送至肝脏组织，转化为肝糖原并分解成葡萄糖后供给能量；肝糖原是肝脏中葡萄糖的储存形式，当机体需要能量时，可直接分解为

葡萄糖后供给能量。刺五加多糖对各组小鼠肌糖原及肝糖原含量的影响，如表4所示。与对照组比较，刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠肌糖原及肝糖原含量均呈剂量依赖性增加，其中肌糖原含量分别增加了13.22%、38.84%和59.50%，肝糖原含量增加了31.10%、52.19%和54.68%，提示刺五加多糖可以增加肌肉和肝脏中的糖原储备。

2.4 刺五加多糖对各组小鼠BUN、乳酸、血糖及血氨含量的影响

BUN是蛋白质降解生成的主要代谢产物，其含量可反映机体蛋白质消耗程度^[15]。另外，在长时间或高强度运动期间，骨骼肌需要部分通过无氧代谢方式获取能量，此过程使乳酸大量生成和累积，进而对肌肉收缩产生有害作用^[16]。肌肉收缩和运动均可增加骨骼肌对葡萄糖的利用能力，在运动期间，对葡萄糖的有效利用是维持身体运动能力、延缓疲劳的重要指标。血氨也是高强度运动后的重要代谢物，当三磷酸腺苷的生成速度低于消耗速度时，血氨会维持在较高水平^[17]。刺五加多糖对各组小鼠BUN、乳酸、血糖及血氨含量的影响，如表5所示。与对照组比较，经低、中、高剂量的刺五加多糖干预后，BUN含量分别降低了23.60%、27.25%和35.58%，乳酸含量降低了16.26%、18.44%和36.61%，血糖含量降低了12.76%、18.33%和20.97%，血氨含量降低了10.45%、21.14%和29.20%，进一步提示刺五加多糖具有抗运动性疲劳作用。

表 5 刺五加多糖对各组小鼠 BUN、乳酸、血糖及血氨含量的影响

Table 5 Effects of ASP on BUN, lactic acid, blood glucose and blood ammonia contents of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	BUN/(mg/dL)	乳酸/(mmol/L)	血糖/(mg/dL)	血氨/(μ mol/L)
对照组	0	26.53 \pm 2.16	7.32 \pm 0.61	169.51 \pm 4.18	98.12 \pm 10.17
刺五加多糖低剂量组	50	20.27 \pm 1.87**	6.13 \pm 0.59**	147.88 \pm 12.71*	87.86 \pm 9.42*
刺五加多糖中剂量组	100	19.30 \pm 2.25**	5.97 \pm 0.64**	138.43 \pm 5.60**	77.38 \pm 6.63**
刺五加多糖高剂量组	200	17.09 \pm 1.48**	4.64 \pm 0.48**	133.97 \pm 3.43**	69.47 \pm 8.21**

表 6 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量的影响

Table 6 Effects of ASP on GSH-Px, SOD activities and MDA content in skeletal muscle of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	GSH-Px/(U/mg pro)	SOD/(U/mg pro)	MDA/(nmol/mg pro)
对照组	0	22.10 \pm 1.92	9.65 \pm 0.83	5.74 \pm 0.67
刺五加多糖低剂量组	50	28.69 \pm 2.24**	10.58 \pm 1.27*	4.57 \pm 0.49**
刺五加多糖中剂量组	100	33.82 \pm 3.46**	11.12 \pm 1.08**	3.63 \pm 0.35**
刺五加多糖高剂量组	200	35.21 \pm 3.41**	14.48 \pm 1.53**	3.11 \pm 0.56**

2.5 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 GSH-Px、

SOD 活性及 MDA 含量的影响

机体氧化与抗氧化系统的动态平衡被打破，导致氧化应激水平增加，是引起运动性疲劳发生的重要原因^[18]。抑制氧化应激水平，能有效缓解运动疲劳，并可以提升运动耐力^[19]。GSH-Px 在机体内广泛存在，作为重要的过氧化物分解酶，可以使过氧化物转变为羟基化合物，保护细胞免受过氧化物的损伤；SOD 对于维持机体的氧化与抗氧化动态平衡具有重要意义，是机体内发挥主要作用的抗氧化酶；MDA 是反映自由基所致氧化损伤的指标，其含量随着疲劳累积而升高^[20]。既往的研究^[21]发现，刺五加多糖对刀豆蛋白 A 造成的小鼠免疫性肝损伤模型具有一定的保护作用，该作用与升高 GSH-Px、SOD 活性，降低 MDA 含量有关。在高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠模型中，刺五加多糖可以明显降低 MDA 含量，增加 CAT、SOD 及 GSH-Px 活性，表现出良好的抗氧化应激能力^[22]。本研究结果同样发现，与对照组比较，刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠骨骼肌 GSH-Px 活性分别增加了 29.82%、53.03% 和 59.32%，SOD 活性增加了 9.64%、15.23% 和 50.05%，MDA 含量降低了 16.45%、36.76% 和 45.82%，提示刺五加多糖具有抗氧化应激作用，可以降低骨骼肌氧化应激水平。刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 GSH-Px、SOD 活性及 MDA 含量的影响，见表 6。

2.6 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 NOX2、

NOX4 基因及蛋白表达的影响

表 7 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 NOX2 及 NOX4 基因表达的影响

Table 7 Effects of ASP on the expressions of NOX2 and NOX4 genes in skeletal muscle of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	NOX2	NOX4
对照组	0	1.00 \pm 0.04	1.00 \pm 0.02
刺五加多糖低剂量组	50	0.82 \pm 0.11	0.77 \pm 0.08*
刺五加多糖中剂量组	100	0.65 \pm 0.05**	0.53 \pm 0.06**
刺五加多糖高剂量组	200	0.60 \pm 0.07**	0.49 \pm 0.05**

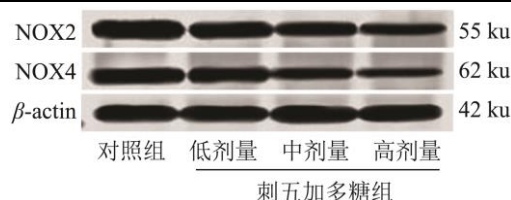


图 1 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 NOX2 及 NOX4 蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of ASP on the expressions of NOX2 and NOX4 proteins in skeletal muscle of mice

NOX 是促使机体产生 ROS 的主要酶类，共包括 7 种亚型，其中 NOX2 和 NOX4 亚型均可以在骨骼肌中表达^[23]。研究发现，在正常生理状态下，骨骼肌 NOX2 和 NOX4 亚型处于低激活状态，而当发生运动性疲劳时，骨骼肌 NOX2 和 NOX4 亚型处于活化状态，进而介导 ROS 的生成，引起脂质过氧化，使机体氧化应激水平增加，反过来也可以进一步加重运动性疲劳程度^[24]。本研究通过 RT-qPCR 及 Western blot 法检测发现，与对照组比较，刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠骨骼肌 NOX2 表达分别下降了 18.00%、35.00% 和 40.00%，NOX4 表达下降了 23.00%、47.00% 和

51.00%，见表 7；进一步通过 Western blot 实验发现，刺五加多糖也可以在一定程度上使骨骼肌 NOX2 及 NOX4 蛋白表达下降，见图 1。以上结果提示刺五加多糖可以同时降低小鼠骨骼肌 NOX2、NOX4 基因及蛋白表达，说明抑制 NOX2、NOX4 表达是其具有抗氧化应激作用的潜在机制。

2.7 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 Keap1、Nrf2、HO-1 基因及蛋白表达的影响

Nrf2/ARE 信号通路与机体的抗氧化应激作用关系密切，其中 Nrf2 对调节机体的氧化应激具有至关重要的作用，通过增加 Nrf2 表达，可以明显降低氧化性损伤，进而发挥抗疲劳作用^[25]。Keap1 参与 Nrf2 的负向调控作用，其可以通过磷酸化、泛素化等机制影响 Nrf2 的表达^[26]。HO-1 为 Nrf2 下游的具有抗氧化作用的蛋白，是 Nrf2 发挥抗氧化作用的重要媒介^[27]。既往

的研究发现，五味子酯甲可以上调 Nrf2、HO-1 蛋白表达，下调 Keap1 蛋白表达，通过调节 Nrf2/ARE 信号通路发挥抗氧化应激作用，进而缓解力竭运动诱导的小鼠运动性疲劳症状^[28]。Nrf2/ARE 信号通路与 NOX 家族蛋白均对机体氧化应激水平有着较大影响，但二者之间是否有相互作用及作用的机制目前并未阐明。本研究结果发现，与对照组比较，刺五加多糖低、中、高剂量组小鼠骨骼肌 Keap1 基因表达分别下降了 26.00%、33.00% 和 52.00%，Nrf2 基因表达增加了 35.00%、53.00% 和 76.00%，HO-1 基因表达增加了 61.00%、82.00% 和 109.00%，见表 8；进一步通过 Western blot 实验发现，刺五加多糖对 Keap1、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达的影响与基因表达具有相同的趋势，见图 2。以上结果证实，刺五加多糖可以同时降低 Keap1 基因及蛋白表达，增加 Nrf2、HO-1 基因及蛋白表达，提示其抗氧化应激作用与调节 Nrf2/ARE 信号通路有关。

表 8 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 Keap1、Nrf2 及 HO-1 基因表达的影响

Table 8 Effects of ASP on the expressions of Keap1, Nrf2 and HO-1 genes in skeletal muscle of mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

分组	剂量/(mg/kg)	Keap1	Nrf2	HO-1
对照组	0	1.00±0.03	1.00±0.06	1.00±0.05
刺五加多糖低剂量组	50	0.74±0.08**	1.35±0.16*	1.61±0.17**
刺五加多糖中剂量组	100	0.67±0.06**	1.53±0.14**	1.82±0.20**
刺五加多糖高剂量组	200	0.48±0.05**	1.76±0.22**	2.09±0.23**

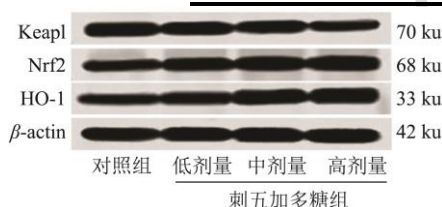


图 2 刺五加多糖对各组小鼠骨骼肌 Keap1、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of ASP on the expressions of Keap1, Nrf2 and HO-1 proteins in skeletal muscle of mice

3 结论

本研究结果发现，经不同剂量的刺五加多糖干预后，小鼠负重游泳时间明显延长，肌肉和肝脏中的糖原储备增加，并且能够使 BUN、乳酸、血糖及血氨含量降低，表明刺五加多糖具有抗运动性疲劳作用。进一步的研究发现，刺五加多糖可以增加小鼠骨骼肌 GSH-Px、SOD 活性，降低 MDA 含量，提示刺五加多糖的抗运动性疲劳作用与抑制氧化应激有关；同时，刺五加多糖也可以在一定程度上降低骨骼肌 NOX2、NOX4、Keap1 基因及蛋白表达，增加 Nrf2、HO-1 基因及蛋白表达，说明刺五加多

糖的抗氧化应激作用与抑制 NOX2、NOX4 表达及调节 Nrf2/ARE 信号通路有关。刺五加多糖抗运动性疲劳作用的可能机制，见图 3。

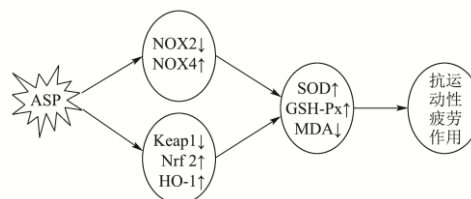


图 3 刺五加多糖抗运动性疲劳作用的机制

Fig.3 Mechanism of ASP on anti-exercise fatigue

综上，本研究证实刺五加多糖具有抗小鼠运动性疲劳作用，该作用与抑制 NOX2、NOX4 表达及调节 Nrf2/ARE 信号通路，进而抑制氧化应激有关，但是否涉及其他的通路与机制还有待于进一步研究。除运动性疲劳外，刺五加多糖对慢性疲劳等是否具有同样的改善作用，将是后续研究的一个方向。

参考文献

[1] Tan A Y, Hamzah S H, Huang C Y, et al. Pre-exercise carbohydrate drink adding protein improves post-exercise fatigue recovery [J]. Front Physiol, 2021, 12: 765473.

- [2] Zhang J, Zhang C, Liu A, et al. Synthesis of icariin-zinc and its protective effect on exercise fatigue and reproductive system related glands in male rats [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 611722.
- [3] 郑传痴,杨艳,韦余,等.金丝桃苷对小鼠的抗疲劳作用及机制研究[J].食品工业科技,2021,42(23):350-355.
- [4] 李欣.黑灵芝多糖缓解运动性疲劳的效果[J].食品研究与开发,2021,42(4):59-65.
- [5] 杨芳芳.红景天苷对运动疲劳大鼠骨骼肌线粒体自由基代谢及呼吸链功能的影响[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2021,42(5):61-66.
- [6] 杨晓丹,井月娥,卢芳.刺五加的化学成分研究进展[J].中华中医药学刊,2015,33(2):316-318.
- [7] Jia A, Zhang Y, Gao H, et al. A review of *Acanthopanax senticosus* (Rupr and Maxim.) harms: From ethnopharmacological use to modern application [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113586.
- [8] Kawano Y, Tanaka M, Fujishima M, et al. *Acanthopanax senticosus* Harms extract causes G₀/G₁ cell cycle arrest and autophagy via inhibition of Rubicon in human liver cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(3): 1193-1201.
- [9] 吴丽群,叶齐,齐荔红.刺五加苷 B 抗运动性疲劳作用的实验研究[J].西北药学杂志,2013,28(1):50-53.
- [10] Zhang X L, Ren F, Huang W, et al. Anti-fatigue activity of extracts of stem bark from *Acanthopanax senticosus* [J]. *Molecules*, 2010, 16(1): 28-37.
- [11] 丁继红,姜春玉,杨乐,等.刺五加多糖调控 PI3K/Akt/mTOR 通路改善大鼠抑郁行为的作用[J].食品工业科技,2022, 43(11):369-375.
- [12] Fu J, Fu J, Yuan J, et al. Anti-diabetic activities of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide (ASP) in combination with metformin [J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3): 619-23.
- [13] Yang S, Shan C, Ma X, et al. Immunomodulatory effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide on immunosuppressed chickens [J]. *Poult Sci*, 2021, 100(2): 623-630.
- [14] Cui J, Shi C, Xia P, et al. Fermented deer blood ameliorates intense exercise-induced fatigue via modulating small intestine microbiota and metabolites in mice [J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1543.
- [15] Hou Y, Tang Y, Wang X, et al. *Rhodiola crenulata* ameliorates exhaustive exercise-induced fatigue in mice by suppressing mitophagy in skeletal muscle [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4): 3161-3173.
- [16] 万丽娜,王劼,杜玉枝,等.锁阳乙醇提取物对运动小鼠抗疲劳能力的影响[J].甘肃农业大学学报,2019,54(3):23-30.
- [17] Yeh T S, Chuang H L, Huang W C, et al. *Astragalus membranaceus* improves exercise performance and ameliorates exercise-induced fatigue in trained mice [J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 2793-2807.
- [18] Liu S, Meng F, Zhang D, et al. *Lonicera caerulea* berry polyphenols extract alleviates exercise fatigue in mice by reducing oxidative stress, inflammation, skeletal muscle cell apoptosis, and by increasing cell proliferation [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 853225.
- [19] 刘雅娜,包晓玮,王娟,等.沙棘多糖抗运动性疲劳及抗氧化作用的研究[J].食品工业科技,2021,42(10):321-326.
- [20] Chen H, Ma X, Cao L, et al. A Multi-ingredient formula ameliorates exercise-induced fatigue by changing metabolic pathways and increasing antioxidant capacity in mice [J]. *Foods*, 2021, 10(12): 3120.
- [21] 张娜,赵良友,毛迪,等.刺五加多糖调控炎症因子对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2019,44(14):2947-2952.
- [22] 张海燕,熊莉华.刺五加多糖对糖尿病大鼠代谢功能的影响及作用机制[J].北华大学学报(自然科学版),2021, 22(3):333-337.
- [23] Cully T R, Rodney G G. Nox4-RyR1-Nox2: Regulators of micro-domain signaling in skeletal muscle [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101557.
- [24] Osório A J, Matta P L, Cabral C, et al. Strenuous acute exercise induces slow and fast twitch-dependent NADPH oxidase expression in rat skeletal muscle [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(1): 57.
- [25] Ma C, Deng Y, Xiao R, et al. Anti-fatigue effect of phlorizin on exhaustive exercise-induced oxidative injury mediated by Nrf2/ARE signaling pathway in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 918: 174563.
- [26] Cai J, Yang J, Chen X, et al. Melatonin ameliorates trimethyltin chloride-induced cardiotoxicity: The role of nuclear xenobiotic metabolism and Keap1-Nrf2/ARE axis-mediated pyroptosis [J]. *Biofactors*, 2022, 48(2): 481-497.
- [27] Wang T D, Xu S L, Yu Z Y, et al. Arsenic trioxide combining leflunomide activates Nrf2-ARE-HO-1 signaling pathway and protects heart xenografts [J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(10): 760-766.
- [28] 张馨芸,林慧娇,李欣,等.五味子酯甲通过调节肝脏 Nrf2/ARE 抗氧化通路改善小鼠疲劳的作用[J].食品科学,2020,41(1):190-195.