

文章编号:1001-6880(2014)3-0403-04

羧甲基茯苓多糖抗疲劳作用研究

符 辉¹, 吴奇辉², 王广兰³, 王 娟³, 刘 莹², 黄 文^{2*}¹华中农业大学体育课部; ²华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070;³武汉体育学院健康科学学院, 武汉 430079

摘要:研究羧甲基茯苓多糖(CMP)对小鼠抗疲劳作用。将雄性小鼠随机分为5组,分别为空白对照组、阳性对照组、CMP低剂量组($35 \text{ mg}/(\text{kg bw} \cdot \text{d})$)、CMP中剂量组($70 \text{ mg}/(\text{kg bw} \cdot \text{d})$)、CMP高剂量组($140 \text{ mg}/(\text{kg bw} \cdot \text{d})$),灌胃给药30 d后,测定小鼠负重的游泳时间、血清尿素氮和血乳酸等指标。结果表明,与空白对照组相比,CMP可以延长小鼠负重游泳时间($P < 0.05$);CMP中、高剂量组可以显著降低血清尿素氮、血乳酸含量并提高肝脏SOD活性($P < 0.05$)。CMP对小鼠具有很好的抗疲劳作用,其机制可能与降低血清尿素氮、血乳酸含量以及提高肝脏SOD活性有关。

关键词:羧甲基茯苓多糖;抗疲劳;血清尿素氮;血乳酸;超氧化物歧化酶

中图分类号:R979.18

文献标识码:A

Anti-fatigue Effect of Carboxymethyl-pachyman

FU Hui¹, WU Qi-hui², WANG Guang-lan³, WANG Juan³, LIU Ying², HUANG Wen^{2*}¹Department of physical education, Huazhong Agricultural University;²College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;³College of Health Science, Wuhan Sports University, Wuhan 430079, China

Abstract: In order to study the anti-fatigue effect of carboxymethyl-pachyman (CMP) on mice, healthy male mice were randomly divided into 5 groups including control group, positive control group, CMP groups at low, medium and high doses ($35, 70, 140 \text{ mg}/(\text{kg bw} \cdot \text{d})$). All the five groups were treated by gavage for 30 consecutive days. The loaded swimming time, the contents of blood urea nitrogen and blood lactic acid were measured. The results showed that CMP could significantly prolong the loaded swimming time of mice ($P < 0.05$); CMP at medium and high doses could reduce the contents of blood urea nitrogen, blood lactic acid and increase the activity of SOD in liver ($P < 0.05$). CMP have an excellent anti-fatigue effect on mice and its mechanism may be related to reducing the contents of blood urea nitrogen, blood lactic acid and increasing the activity of SOD in liver.

Key words:Carboxymethyl-pachyman; anti-fatigue; blood urea nitrogen; blood lactic acid; superoxide dismutase

茯苓为多孔菌科真菌属茯苓(*Poria cocos* (Schw.) Wolf)的干燥菌核,具有利水渗湿、健脾宁心等功效,为中药“四君八珍”之一^[1]。但是,占茯苓菌核干重93%的 β -茯苓聚糖(β -pachymose)不溶于水且生理活性较弱,不利于临床应用。 β -茯苓聚糖在碱性条件下与氯乙酸反应生成一种水溶性多糖,即羧甲基茯苓多糖(Carboxymethyl-pachyman, CMP),具有抗肿瘤、增强免疫力、抗衰老、预防结石等作用,可广泛应用于医疗保健领域^[2,3],但是至今

还没有对其抗疲劳研究的报道。本研究主要探讨羧甲基茯苓多糖的抗运动疲劳作用,挖掘茯苓多糖新的潜在生物功能,为开发新型、健康的抗运动疲劳保健品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

茯苓菌块:购于湖北罗田,由华中农业大学应用真菌研究所鉴定为茯苓(*Poria cocos*)。

红景天(含1%的红景天苷):由湖北欣恺生物科技有限公司提供,并经湖北省产品质量监督检验研究院鉴定。

小白鼠:昆明种健康雄性小鼠(SPF级),体质量

19 ± 4 g, 购于华中科技大学同济医学院。

CMP 由本实验室制备, 化学药品均为国产分析纯; 乳酸测定试剂盒、尿素氮测定试剂盒、超氧化物歧化酶测定试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶测定试剂盒、乳酸脱氢酶测定试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 仪器与设备

WG2003 型电热鼓风干燥箱: 天津市泰斯特仪器有限公司; SHZ-C 型循环水式真空泵: 巩义市予华仪器有限公司; 722 紫外可见分光光度计: 上海光谱仪器有限公司; HH-S2 型数显恒温水浴锅: 金坛市医疗仪器厂; Avanti J-E 型冷冻离心机 美国 BECKMAN 公司。

1.3 方法

1.3.1 羟甲基茯苓多糖(CMP)的制备

将茯苓菌块用粉碎机粉碎, 过 100 目, 称取 10 g 茯苓粉置于三口烧瓶中。然后加入 50 mL 85% 乙醇于 55 ℃ 下搅拌溶胀 30 min。之后加入 3.4 g 氢氧化钠, 碱化 1 h。一小时之后再加入 9.25 g 氯乙酸及 3.36 g 氢氧化钠反应 4 h。接着再加入 3.36 g 氢氧化钠反应 3 h。取出, 用乙酸中和至 pH 为 6, 用 80% 乙醇洗脱 4 次, 与 40 ℃ 下干燥 5 h, 得干燥小块状茯苓多糖, 再将其用粉碎机粉碎, 过 100 目, 得干燥改性茯苓粉。然后, 通过苯酚-硫酸法测得改性茯苓粉中羟甲基茯苓多糖(CMP)的含量为 87.1%。

1.3.2 动物分组及给药

将 50 只雄性小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为空白对照组(蒸馏水)、红景天阳性对照组(1 g/kg)、羟甲基茯苓多糖低剂量组(35 mg/kg)、羟甲基茯苓多糖中剂量组(70 mg/kg)、羟甲基茯苓多糖高剂量组(140 mg/kg), 每组 10 只。各组均以 10 mL/

表 1 茯苓多糖对小鼠体质量的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 1 The effect of CMP on body weight of mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	对照组 Control	红景天组 Rhodiola	低剂量组 CMP-L	中剂量组 CMP-M	高剂量组 CMP-H
体质量增量(g) Body weight (g)	9.22 ± 1.99	9.44 ± 2.11	9.54 ± 2.25	9.87 ± 1.84	9.77 ± 1.85

由表 1 可知, 与空白对照组相比, CMP 高剂量组、中剂量组、低剂量组和红景天组小鼠的体质量增量没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 CMP 对小鼠力竭游泳时间的影响

各组小鼠负重游泳致死, 记录并统计其负重力竭游泳时间。与空白对照组相比, 红景天组和 3

(kg/d) 的剂量, 1 次/d, 连续灌胃 30 d^[4]。饲养温度: 18 ~ 22 ℃, 湿度: 50% ~ 60%。饲喂常规饲料, 自由取食。

1.3.3 小鼠体质量的测定

首次灌胃前称量并记录各组小鼠体质量, 末次灌胃之后游泳前称量并记录各组小鼠体质量, 计算各组小鼠体质量的增加量。

1.3.4 小鼠负重游泳实验

末次灌胃后 30 min, 于尾部负重 5% 体质量的铅皮, 在水深 30 cm、水温 25 ℃ 的游泳箱中游泳, 用秒表记录小鼠自游泳开始至力竭的时间。当小鼠头部沉入水面 10 s 不能浮出, 认为达到力竭^[5]。

1.3.5 小鼠血清尿素氮(BUN)和血乳酸(BLA)的测定

小鼠负重游泳至力竭, 休息 15 min 之后, 摘眼球取血, 用南京建成试剂盒测定小鼠血清尿素氮(BUN)和血乳酸(BLA)的含量。

1.3.6 小鼠肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)的测定

小鼠采血后立即取肝脏, 用生理盐水洗去残留液, 滤纸拭干, 准确称取 0.5 g 肝组织, 加 9 倍生理盐水制成 10% 的组织匀浆。用南京建成试剂盒测定肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性。

1.3.7 数据处理

采用 SPSS11.5 软件进行统计学分析, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 CMP 对小鼠体重的影响

记录第一次灌胃之前和最后一次灌胃 30 min 之后, 各组小鼠负重游泳前的体质量, 统计灌胃期间各组小鼠体质量增量。结果见表 1。

由表 1 可知, 与空白对照组相比, CMP 高剂量组、中剂量组、低剂量组和红景天组小鼠的体质量增量没有显著性差异($P > 0.05$)。结果见表 2。

由表 2 可知, 不同剂量组的 CMP 对小鼠负重力竭游泳时间具有不同程度的影响。低剂量组小鼠负重力竭游泳时间比空白对照组延长了 51.01% ($P < 0.05$), 中剂量组小鼠负重力竭游泳时间比空白对

表 2 CMP 对小鼠负重力竭游泳时间的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)
Table 2 The effect of CMP on weight loaded-swimming time of mice ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	对照组 Control	红景天组 Rhodiola	低剂量组 CMP-L	中剂量组 CMP-M	高剂量组 CMP-H
游泳时间 (s) Swimming time (s)	945.5 ± 136.6	$1584.3 \pm 115.41^*$	$1427.8 \pm 218.6^*$	$1586.5 \pm 203.1^*$	$1830.8 \pm 117.7^*$
延长率 (%) Increase (%)	-	67.56	51.01	67.79	93.63

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

表 3 CMP 对小鼠运动后血清尿素氮的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 3 The effect of CMP on the levels of blood urea nitrogen of mice after exercise ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	对照组 Control	红景天组 Rhodiola	低剂量组 CMP-L	中剂量组 CMP-M	高剂量组 CMP-H
血清尿素氮含量 (mg/L) Blood urea nitrogen (mg/L)	85.76 ± 3.62	$73.14 \pm 3.19^*$	83.06 ± 2.15	$65.82 \pm 2.55^*$	$61.92 \pm 3.17^*$
清除率 Clearance (%)	-	14.72	3.15	23.25	27.80

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

照组延长了 67.79% ($P < 0.05$) ; 高剂量组小鼠负重力竭游泳时间比空白对照组延长了 93.63% ($P < 0.05$) , 具有明显的剂量效应关系。

2.3 CMP 对小鼠运动后血清尿素的影响

各组小鼠负重游泳致竭, 休息 15 min 后摘眼球取血, 测定并统计各组小鼠运动后血清中尿素氮的含量。结果见表 3。

由表 3 可知, 与空白对照组相比, 红景天组和 CMP 中剂量组、高剂量组的小鼠血清尿素氮含量明

显降低 ($P < 0.05$) 。相对于空白对照组, CMP 中剂量组的血清尿素氮清除率为 23.25% ($P < 0.05$) , CMP 高剂量组的血清尿素氮清除率为 27.80% ($P < 0.05$) , 具有一定的剂量效应关系。

2.4 CMP 对小鼠运动后血乳酸的影响

各组小鼠负重游泳致竭, 休息 15 min 后摘眼球取血, 测定并统计各组小鼠运动后血清中乳酸的含量。结果见表 4。

表 4 CMP 对小鼠运动后血乳酸的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 4 The effect of CMP on the levels of blood lactic acid of mice after exercise ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	对照组 Control	红景天组 Rhodiola	低剂量组 CMP-L	中剂量组 CMP-M	高剂量组 CMP-H
血乳酸含量 (mmol/L) blood lactic acid (mmol/L)	26.05 ± 2.08	$22.44 \pm 2.24^*$	23.68 ± 2.66	$18.69 \pm 1.21^*$	$16.10 \pm 1.50^*$
清除率 Clearance (%)	-	13.86	9.10	28.25	38.20

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

由表 4 可知, 与空白对照组相比, 红景天组和 CMP 中剂量组、高剂量组的小鼠血乳酸含量明显降低 ($P < 0.05$) 。相对于空白对照组, CMP 中剂量组

的血乳酸清除率为 28.25% ($P < 0.05$) , CMP 高剂量组的血乳酸清除率为 38.20% ($P < 0.05$) , 具有明显的剂量效应关系。

表 5 CMP 对小鼠运动后肝组织中 SOD 的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 5 The effect of CMP on the levels of SOD in liver of mice after exercise ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	对照组 Control	红景天组 Rhodiola	低剂量组 CMP-L	中剂量组 CMP-M	高剂量组 CMP-H
SOD (u/mgpro)	202.66 ± 13.08	$281.76 \pm 12.24^*$	244.26 ± 15.66	$311.63 \pm 11.21^*$	$353.73 \pm 14.50^*$
提高率 Increase (%)	-	39.03	19.54	53.77	74.56

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, * $P < 0.05$.

2.5 CMP 对小鼠运动后肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)影响

各组小鼠负重游泳致力竭,休息 15 min 后脱臼处死,取其肝脏,测定并统计各组小鼠运动后肝组织中 SOD 的活性。结果见表 5。

由表 5 可知,与空白对照组相比,红景天组和 CMP 中剂量组、高剂量组的小鼠肝脏组织中 SOD 活性明显升高($P < 0.05$)。相对于空白对照组,CMP 中剂量组的 SOD 活性提高率为 53.77% ($P < 0.05$), CMP 高剂量组的 SOD 活性提高率为 74.56% ($P < 0.05$), 具有明显的剂量效应关系。

3 讨论

疲劳是机体一系列复杂的生理生化变化过程,是机体在一定环境条件下,由于长时间或过于繁重紧张的体力或脑力劳动而引起的工作效率暂时降低的一种生理心理现象,一般的检测指标是运动耐力和生化指标^[6]。

疲劳最直接、最客观的表现是运动耐力的下降,游泳是全身消耗性运动,剧烈的运动消耗大量的能量,所以力竭游泳时间是反映运动耐力的重要指标,常用于评价体力疲劳。本研究通过小鼠负重游泳实验可知,与空白对照组相比,CMP 低、中、高剂量组都可以显著提高小鼠的运动耐力($P < 0.05$),提示 CMP 具有一定的抗疲劳作用。

评价体力疲劳的生化指标中,血清尿氮素和血乳酸指标的改变具有代表性,试验结果比较准确,是检测体力疲劳常用的生化指标^[7]。血清尿氮素含量的变化可以说明体内含氮物质的分解代谢情况,是评价机体在特殊条件下体力劳动负荷承受能力的一个较灵敏的指标。机体对负荷的适应力越差,则血液中产生的尿素氮就越多;反之,则产生的尿素氮就越少。

本研究结果表明,与空白对照组相比,CMP 中、高剂量组的小鼠血清尿氮含量明显降低($P < 0.05$),提示 CMP 可以减慢小鼠体内含氮物质分解速度,有效改善机体对运动负荷的压力。长时间的运动会导致机体相对缺氧、糖酵解加快,进而产生大量的乳酸,使肌肉组织内的 pH 值下降,最终导致疲劳,因此血乳酸水平也是反映机体疲劳程度的重要

指标^[8]。乳酸在肌肉中堆积越多,疲劳的程度越严重。本研究结果表明,与空白对照组相比,CMP 中、高剂量组的小鼠血乳酸含量明显降低($P < 0.05$),提示 CMP 可以抑制运动后乳酸的积累和生产,有利于减缓血乳酸的积累,从而减缓机体疲劳的发生,降低机体疲劳的程度。当长时间运动训练时,体内氧化作用会大大加强,产生大量自由基,导致肌肉和肝脏中脂质过氧化物增多,引起细胞或组织损伤,也是机体疲劳的原因^[9]。本研究结果表明,与空白对照组相比,CMP 中、高剂量组的小鼠肝脏组织 SOD 活性明显提高($P < 0.05$),提示 CMP 具有抗自由基氧化的功能,阻止脂质过氧化,进而提高小鼠的运动能力。

参考文献

- Li YL(李燕凌), Zhang ZX(张志旭), Hu L(胡令). Antioxidant of polysaccharides from *Poria cocos*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2012, 24: 1126-1128.
- Yan H, Xiao JZ, Yong L, et al. Novel biodegradable hydrogels based on pachymann and its derivatives for drug delivery. *Int J Pharm*, 2009, 37: 89-98.
- Lin Y, et al. Molecular mass and antitumor activities of sulfated derivatives of alpha-glucan from *Poria cocos* mycelia. *Int J Biol Macromol*, 2004, 34: 289-294.
- Ma L, et al. Anti-fatigue effects of salidroside in mice. *J Med Col PLA*, 2008, 23(2): 88-93.
- Jin FD, et al. Study on effect of jellyfish collagen hydrolysate on anti-fatigue and anti-oxidation. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25: 1350-1353.
- Huang LZ, et al. Bioactivity-guided fractionation for anti-fatigue property of *Acanthopanax senticosus*. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133: 213-219.
- You LJ, et al. In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Food Chemistry*, 2011, 124: 188-194.
- Wang J, et al. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130: 421-423.
- Tan W, et al. Anti-fatigue activity of polysaccharides extract from *Radix Rehmanniae Preparata*. *Int J Biol Macromolecules*, 2012, 50: 59-62.