

红景天苷改善马拉松业余选手氧化应激损伤 引起的代谢通路改变的研究

贾 怡¹, 刘相玉¹, 田俊生², 向 欢¹, 秦雪梅², 陈安平¹, 韩雨梅^{1*}

¹山西大学体育学院; ²山西大学中医药现代研究中心, 太原 030006

摘要:为了探讨红景天苷对马拉松业余选手定量负荷后机体氧化应激损伤的影响,采集8名受试者服用红景天苷一个月前后安静时和定量负荷后的尿液与血液,测定血清抗氧化水平和心肌酶系活性,尿液进行代谢组学分析。发现定量负荷后较安静时受试者血清抗氧化能力失衡,心肌微损伤,尿液中筛选出缬氨酸等15种潜在生物标志物;补充红景天苷后完成相同负荷时,血清抗氧化酶活性提高,心肌损伤减轻,部分生物标志物显著回调。因此,红景天苷可能通过促进相关氨基酸和脂质代谢,增加脂肪利用,节约蛋白质,进而改善马拉松业余选手的氧化应激和心肌损伤。

关键词:马拉松;红景天苷;代谢组学;心肌酶系;氧化应激

中图分类号:G804.49

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)5-0837-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.5.016

Research on the effect of salidroside on improving the metabolic pathway changes caused by oxidative stress injury in amateur marathon runners

JIA Yi¹, LIU Xiang-yu¹, TIAN Jun-sheng², XIANG Huan¹, QIN Xue-mei², CHEN An-ping¹, HAN Yu-mei^{1*}

¹Physical Education College of Shanxi University;

²Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: In order to explore the effect of salidroside on the oxidative stress damage of amateur marathon runners after a quantitative load, the urine and blood of 8 subjects were collected at rest and after a quantitative load before and after taking salidroside for one month. The serum antioxidant level and myocardial enzyme activity were determined, and the urine was analyzed by metabolomics. Compared with the quiet state, serum antioxidant capacity of the subjects was unbalanced and myocardial microdamage was detected after quantitative loading. Fifteen potential biomarkers, including valine, were screened out from the urine. When the same load was completed after salidroside supplementation, serum antioxidant enzyme activity was increased, myocardial injury was alleviated, and some biomarkers were significantly adjusted. Thus, salidroside may improve oxidative stress and myocardial damage in marathon amateurs by promoting the metabolism of related amino acids and lipids, increasing the use of fat and saving protein.

Key words: marathon; salidroside; metabolomics; myocardial enzyme system; oxidative stress

近年来全民健身热潮日益高涨,国内马拉松赛事举办和参赛人数均呈井喷态势,2019年在全国范围内共举办规模赛事1 828场,较2018年同比增长15.62%;累计参赛人次712.56万,较2018年同比增长22.22%。马拉松已经发展成为中国最受欢

迎,最具影响力的品牌赛事之一^[1]。作为经典的有氧耐力运动,长期马拉松锻炼能够降低人体心血管患病风险和死亡率。然而,由于长期大负荷运动,马拉松运动员也可能会伴随心脏和肾脏等损伤^[2],其中氧化应激可能是导致其损伤的机制之一。

机体在剧烈运动过程中,体内可产生和蓄积大量的活性自由基,当超出机体抗氧化防御系统的清除能力时,即可造成运动氧化应激损伤。中药红景天乃景天科红景天属多年生草本或亚灌木,《神农本

草经》和《月王药诊》中记载景天性平,有轻身、扶正固本、理气养血、润肺补肾、健脑益智、滋补强身之功效;红景天的有效成分为红景天苷,其具有抗缺氧、抗自由基、抑制细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,调节神经内分泌免疫网络,加速机体有氧代谢供能,增强心肺功能,改善运动疲劳的积极作用^[3],但其在马拉松项目中的应用研究却未见报道。因此,研究红景天苷对马拉松业余选手运动过程中机体代谢能力的影响及作用机制,对提高其身体机能,降低运动损伤,改善运动疲劳具有重要的现实意义。

代谢组学技术是运动人体科学研究的新兴工具,已经逐步应用到运动训练实践和运动与健康促进的机制研究中^[4],该技术通过研究机体受到外界刺激时所引起的内源性代谢物在体内的动态变化,结合精确的现代分析方法,借助多元统计分析可辩

识和解析研究对象的生理、病理状态及其环境等因素与代谢物变化之间的关系,在表型,毒理学,疾病相关生物标志物和分子机制的研究中被广泛使用,在对中药的多组分、多靶点整体药效评价以及机制研究方面具有明显优势^[5]。

本研究旨在明确补充红景天苷对马拉松业余选手定量负荷运动过程中机体氧化应激和心肌损伤的影响,并利用代谢组学技术阐释其可能的作用机制。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

选取参加5次以上国际马拉松赛全程组别的男性业余选手共8名,受试者身体健康,无任何不良的饮食偏好。个人马拉松平均成绩4~5 h,月跑量200~300 km,所有受试者均自愿参加并签署知情同意书。基本情况如表1所示。

表1 受试者基本情况($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Basic situation of the subjects($\bar{x} \pm s, n = 8$)

性别 Gender	人数 Number	年龄 Age (year)	身高 Height (cm)	体重 Weight (kg)
男 Male	8	42.50 ± 2.24	170.20 ± 5.20	62.15 ± 7.74

1.2 研究方法

1.2.1 实验分组及运动方案

根据受试者不同阶段进行分组,分为安静组(C组)、定量负荷组(CE组)、服药后安静组(MC组)与服药后定量负荷组(ME组)。受试者统一进行20 km的定量负荷运动,场地为标准的400 m跑道,共50圈。通过专业运动手环记录跑步距离,全程平均时间在1.5~2 h,心率150~170次/min,运动中只允许补充纯净水。

1.2.2 药物干预

红景天胶囊(四川省佳汇泰生物科技开发有限公司,国食健字G20120266),按照说明书每日1次,每次2粒服用(0.3 g/粒,每100 g含红景天苷1.26 g),连续服用一个月。干预期间没有服用其他药物,受试者日常训练及三餐摄入均不进行干预。

1.2.3 样品收集与处理

C组与MC组均采集晨尿和安静时空腹血液,CE组与ME组血液在定量负荷运动后即刻采集,尿液在运动后半小时收集。血液取肘静脉血5 mL,3 500 rpm离心15 min取血清;尿液用10 mL离心管分装,离心取上清液。分离的体液于-80 °C保存待测。采样前一天要求受试者不能摄入高脂肪、高蛋

白食物。

1.2.4 血清心肌酶系与自由基指标的检测

使用南京建成生物工程研究所相关试剂盒,通过酶标仪(Tecan公司200 Pro的多功能酶标仪,瑞士公司)对血清心肌酶系指标肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和谷草转氨酶(AST)以及自由基指标超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和总抗氧化能力(T-AOC)进行测定,测试均严格按说明书的步骤进行。

1.2.5 核磁信号采集及数据收集

1.2.5.1 尿样预处理

尿样解冻后取500 μL转至EP管中,加入200 μL D₂O(美国诺德,兰迪斯维尔,美国)配制的PBS磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L Na₂HPO₄/0.2 mol/L NaH₂PO₄,81:19,V/V,pH=7.40),并加入适量0.15% TSP(三甲基叔丁基酸钠盐,美国剑桥同位素实验室公司)作为化学位移零点的定标,4 °C,离心20 min(13 000 rpm),最后移取上清液600 μL,置于内径5 mm的核磁管中待测。

1.2.5.2 NMR(布鲁克600 MHz的AVANCE III核磁共振检测仪,德国布鲁克公司)检测条件

采用 NOESY 脉冲序列进行样本测定,参数设置为谱宽 8 kHz,混合时间 0.15 s,弛豫延迟 320 ms,采样点数 64 k,累加次数 64。在弛豫延迟期间采用预饱和方式抑制水峰,谱仪偏置设置在水峰位置,自由感应衰减信号经过傅里叶变换转换为¹H NMR 图谱。

1.2.5.3 NMR 图谱处理

尿液¹H NMR 图谱均使用 MestReNova (Version8.0.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, SPain) 进行基线、相位调整。以 TSP 的化学位移 (δ 0.0) 为标准,对 NMR 图谱进行化学位移校正。以 δ 0.01 为基本单位,对图谱中 δ 0.5~9.0 的区域进行分段积分,可以得到与化学位移值段相对应的积分值。为消除水峰、尿素峰对分析结果的影响,将 δ 4.6~6.2 区间的谱峰强度设置为零。然后采用归一化法,消除样品浓度差异的影响,使数据集中在 0~1 范围内,数据归一化处理后进行多元变量统计分析。

1.2.6 统计分析

所有数据用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异比较采用 *t* 检验和 ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异。使用 SIMCA-P (Ver.

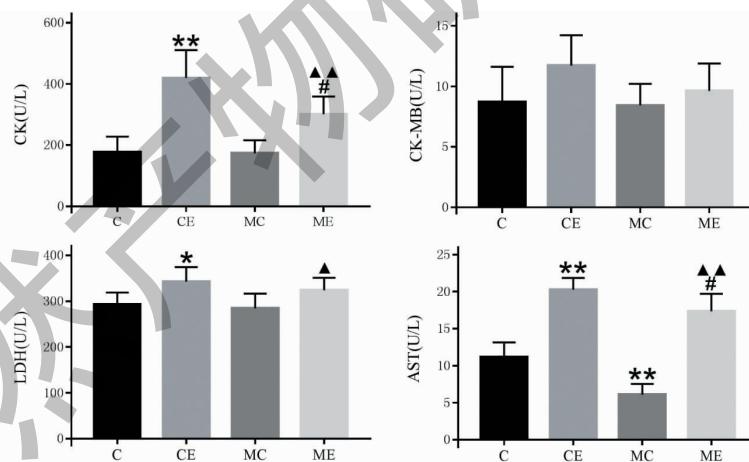


图 1 补充红景天昔对马拉松业余选手定量负荷后心肌酶系的影响 ($n = 8$)

Fig. 1 Effect of Salidroside supplementation on myocardial enzymes after amount-loading of marathon amateurs ($n = 8$)

注:与 C 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与 CE 组相比, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; 与 MC 组相比, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$ 。Note: Compared with C, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Compared with CE, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; Compared with MC, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$ 。

2.2 补充红景天昔对马拉松业余选手定量负荷后血清自由基指标的影响

如图 2 所示,与 C 组相比,CE 组血清 MDA 含量、SOD 活性均明显升高 ($P < 0.05$),MC 组 MDA, SOD、T-AOC 与 GSH-PX 活性均无统计学差异;与

14.0, Umetrics, Umea, Sweden) 统计软件对积分数据进行 PCA 和 PLS-DA 分析。PCA 分析作为一种无监督的分析方法,可以显示出样本的原始分类状态,是样本内部固有差异性和相似性的反映。但在实际操作中,许多因素会影响实验结果的准确性,例如环境或某些系统错误。有监督的分析方法 PLS-DA 用于分析 NMR 数据与分组变量之间的关系,可获得更准确的分组并尽可能排除这些外部因素的影响。PLS-DA 模型通过置换测试的响应值进行验证,其中随机设置 200 次。

2 实验结果

2.1 补充红景天昔对马拉松业余选手定量负荷后血清心肌酶系的影响

如图 1 所示,与 C 组相比,CE 组血清 CK、LDH 与 AST 活性显著升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), CK-MB 活性未见统计学差异,MC 组仅有 AST 活性显著降低 ($P < 0.01$);与 CE 组相比,ME 组 CK、AST 活性明显降低 ($P < 0.05$), LDH 和 CK-MB 均无显著性差异;与 MC 组相比,ME 组 CK、LDH 和 AST 活性均显著性升高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), CK-MB 活性无统计学差异。

CE 组相比,ME 组中 MDA 含量明显降低 ($P < 0.05$), SOD、T-AOC 与 GSH-PX 活性无明显变化;与 MC 组相比,ME 组中 SOD、T-AOC 与 GSH-PX 活性显著上升 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), MDA 含量有上升趋势但无统计学意义。

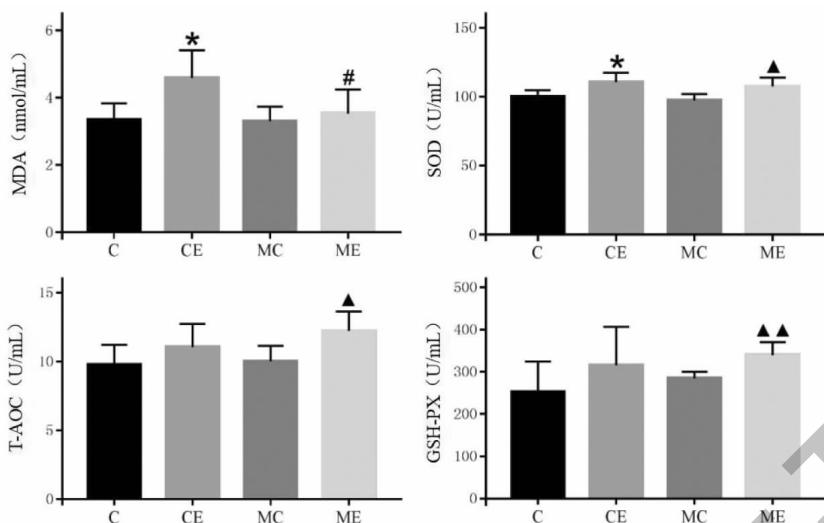


图 2 补充红景天苷对马拉松业余选手定量负荷后血液自由基指标的影响($n=8$)

Fig. 2 Effect of Salidroside supplementation on blood free radicals index of amateur athletes after marathon ($n=8$)

注:与 C 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;与 CE 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与 MC 组相比, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$ 。Note: Compared with C, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Compared with CE, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with MC, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$.

2.3 补充红景天苷对马拉松业余选手定量负荷后尿液代谢物的影响

2.3.1 图谱指认与分析

马拉松业余选手尿液 ^1H NMR 典型图谱见图 3。图谱处理后,通过分析每个化合物对应的化学位移、偶合常数及峰形等信息,结合文献报道并使用 Chenomx NMR Suite 软件(Version 7.5, Chenomx Inc Inc,

Edmonton, AB, Canada) 以及 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 数据库对图谱中的主要化学成分进行指认,得到马拉松业余选手定量负荷前后 δ 1.0 ~ 8.5 的 ^1H NMR 尿液代谢图谱,共指认出 28 种内源性代谢物,主要涉及氨基酸代谢和脂质代谢,其化学位移及谱峰归属见表 2。

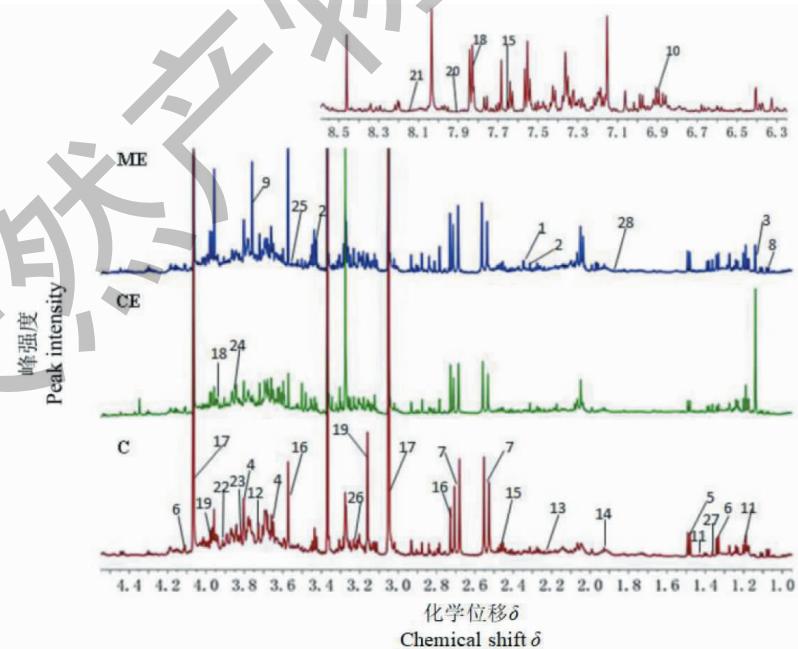


图 3 马拉松业余选手尿液 ^1H NMR 图谱($n=8$)

Fig. 3 Marathon amateur urine ^1H NMR map ($n=8$)

表 2 马拉松业余选手尿液¹H NMR 图谱中主要代谢物指认结果(*n* = 8)Table 2 Identification results of major metabolites in urine ¹H NMR map of marathon amateurs (*n* = 8)

编号 No.	代谢物 Metabolite	化学位移 δ Chemical shift δ
1	琥珀酸 Succinate	2.36(s)
2	乙酰乙酸 Acetoacetate	2.29(s), 3.43(s)
3	3-羟基丁酸 3-Hydroxybutyric acid	1.17(d)
4	甘油 Glycerin	3.65(m), 3.80(m)
5	丙氨酸 Alanine	1.49(d, <i>J</i> = 8.57 Hz)
6	乳酸 Lactate	1.34(d, <i>J</i> = 8.40 Hz), 4.11(q, <i>J</i> = 8.32 Hz)
7	柠檬酸 Citrate	2.54(d), 2.69(d)
8	缬氨酸 Valine	1.05(d, <i>J</i> = 8.46 Hz)
9	谷氨酰胺 Glutamine	3.77(t, <i>J</i> = 7.42 Hz)
10	酪氨酸 Tyrosine	6.90(m, <i>J</i> = 2.6 Hz)
11	异亮氨酸 Isoleucine	1.22(m), 1.44(m)
12	亮氨酸 Leucine	3.72(m)
13	丙酮 Acetone	2.23(s)
14	醋酸 Acetic acid	1.93(s)
15	丙酮酸 Pyruvate	2.46(s), 7.65(s)
16	肌氨酸 Sarcosine	2.73(s), 3.59(s)
17	肌酐 Creatinine	3.05(s), 4.06(s)
18	马尿酸 Hippurate	3.97(d, <i>J</i> = 5.84 Hz), 7.62(t, <i>J</i> = 7.47 Hz)
19	组氨酸 Histidine	3.16(dd), 3.98(dd)
20	黄嘌呤 Xanthine	7.92(s)
21	次黄嘌呤 Hypoxanthine	8.19(s)
22	甜菜碱 Betaine	3.92(s)
23	丝氨酸 Serine	3.82(dd)
24	天冬氨酸 Aspartic acid	3.86(m)
25	甘氨酸 Glycine	3.57(s)
26	牛磺酸 Taurine	3.27(t, <i>J</i> = 6.7 Hz)
27	2-羟基异丁酸 2-Hydroxisobutyric acid	1.36(s)
28	赖氨酸 Lysine	1.89(m)

2.3.2 多元统计分析

采用有监督的 PLS-DA(偏最小二乘法判别分析)对尿样进行¹H NMR 代谢轮廓分析,结果如图 4 所示,C 组与 CE 组、ME 组均沿 t[2] 轴明显分开,CE 组与 ME 组各自聚集且沿 t[1] 轴明显分开(图 a)。进一步对 PLS-DA 进行模型验证(图 b),累积的 R^2 和 Q^2 都低于原始值($R^2 = 0.825$, $Q^2 = 0.578$),且 Q^2 在纵轴上的截距为负值,表明本实验所建立的模型未发生过拟合,PLS-DA 模型验证成立。

2.3.3 补充红景天苷对马拉松业余选手定量负荷后尿液潜在生物标志物的影响

为了明确补充红景天苷对马拉松业余选手定量负荷后尿液潜在生物标志物的影响,分别对 C 组、CE 组和 ME 组尿液¹H NMR 数据进行 PLS-DA 分析(图 5)。对 C 组和 CE 组的代谢物峰面积进行独立样本 *t* 检验,筛选 VIP > 1 且 $P < 0.05$ 的代谢物作为定量负荷前后的潜在生物标志物。结果发现(表 3):与 C 组相比,CE 组共发现缬氨酸、乳酸、2-羟基

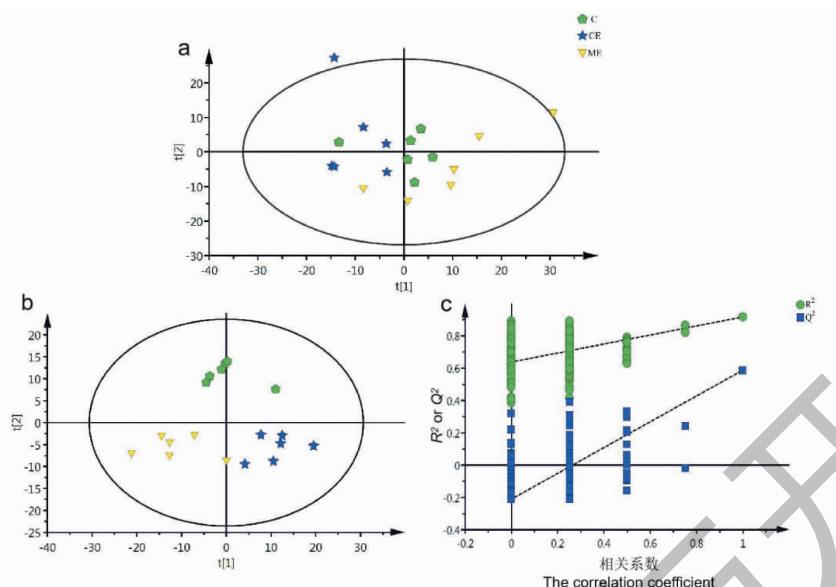


图4 马拉松业余选手C、CE、ME组的PCA散点图(a)、PLS-DA得分图(b)和模型验证图(c)($n=6$)

Fig. 4 PCA score plot (a), PLS-DA scores (b) and model validation (c) of the marathon amateur C, CE, and ME groups ($n=6$)

异丁酸等15个潜在生物标志物,其中缬氨酸、乳酸、2-羟基异丁酸、丙酮酸、3-羟基丁酸、赖氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、丙酮和琥珀酸这10种潜在生物标志物显著增加,甜菜碱、甘油、谷氨酰胺、丝氨酸和肌氨酸这5种潜在生物标志物显著下降。在红景天苷干预一个月后,与CE组相比,ME组尿液中上述15种潜在生物标志物有11种向C组状态显著回调,表明

红景天苷对马拉松业余选手定量负荷后的尿液潜在生物标志物有显著的干预调节作用。采用热图分析可以更加直观地展示红景天苷干预作用下的11种尿液潜在生物标志物在各组中的变化趋势(图6),颜色越深表明在尿液中含量越高,相反,则含量越低。

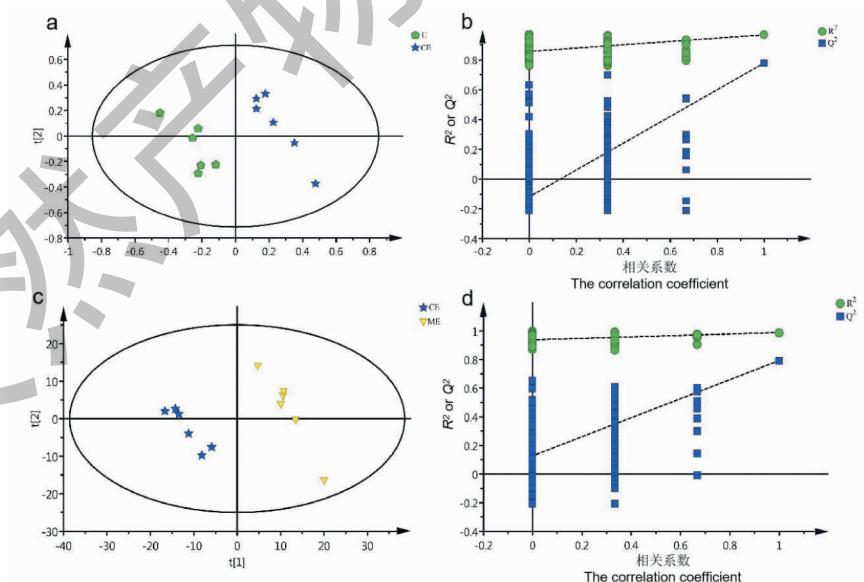


图5 马拉松业余选手尿液PLS-DA得分图和模型验证图($n=6$)

Fig. 5 Marathon amateur urine PLS-DA score map and model validation map ($n=6$)

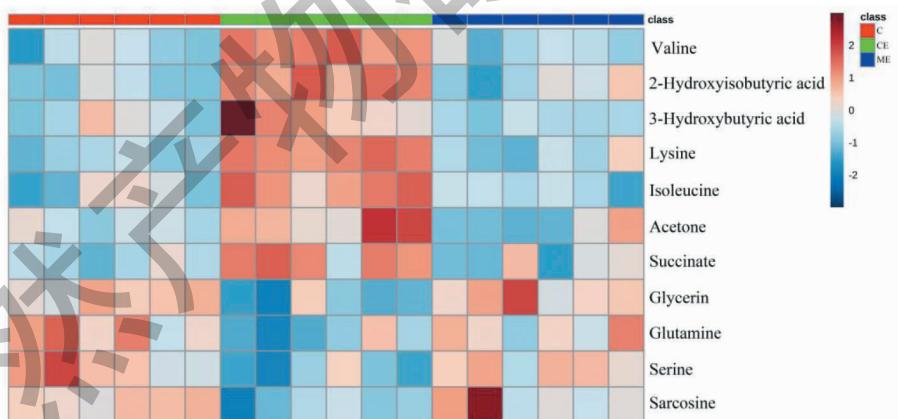
注:a图和b图;C vs CE;c图和d图:CE vs ME。Note:Fig. a and b:C vs CE;Fig. c and d:CE vs ME.

表3 尿液¹H NMR图谱中代谢物的相对峰面积(*n*=6)Table 3 Relative peak area of differential metabolites in urine ¹H NMR spectra (*n*=6)

代谢物 Metabolite	相对峰面积 Relative peak area ($\times 1000$)		
	C	CE	ME
缬氨酸 Valine	0.22 ± 0.09	0.45 ± 0.05 **	0.11 ± 0.05 #
乳酸 Lactate	1.38 ± 0.34	1.96 ± 0.22 **	2.04 ± 0.38
2-羟基异丁酸 2-hydroxyisobutyric acid	0.58 ± 0.24	1.24 ± 0.16 **	0.59 ± 0.27 #
丙酮酸 Pyruvate	0.91 ± 0.07	1.17 ± 0.13 **	1.01 ± 0.13
甜菜碱 Betaine	4.20 ± 0.58	3.40 ± 0.42 *	3.60 ± 0.39
甘油 Glycerin	6.31 ± 0.38	5.30 ± 0.49 **	6.34 ± 0.45 #
谷氨酰胺 Glutamine	8.26 ± 0.88	6.45 ± 0.98 **	7.78 ± 0.86 #
3-羟基丁酸 3-hydroxybutyric acid	0.98 ± 0.25	1.58 ± 0.20 **	0.97 ± 0.14 #
赖氨酸 Lysine	0.30 ± 0.12	1.12 ± 0.09 **	0.36 ± 0.23 #
丙氨酸 Alanine	1.02 ± 0.36	1.73 ± 0.48 *	1.16 ± 0.55
丝氨酸 Serine	4.78 ± 0.26	3.40 ± 0.37 **	5.05 ± 0.31 #
异亮氨酸 Isoleucine	0.98 ± 0.21	1.58 ± 0.41 **	0.98 ± 0.13 #
丙酮 Acetone	1.17 ± 0.07	1.50 ± 0.10 *	1.10 ± 0.19 #
琥珀酸 Succinate	0.97 ± 0.07	1.26 ± 0.12 **	0.96 ± 0.14 #
肌氨酸 Sarcosine	3.16 ± 0.42	2.41 ± 0.27 **	3.06 ± 0.54 #

注:与C组相比, * *P*<0.05; ** *P*<0.01;与CE组相比, # *P*<0.05; ## *P*<0.01。

Note: Compared with C, * *P*<0.05; ** *P*<0.01; Compared with CE, # *P*<0.05; ## *P*<0.01.

图6 红景天苷干预下尿液中11种潜在生物标志物的热图(*n*=6)Fig. 6 Heat map of 11 differential metabolites in urine under the intervention of salidroside (*n*=6)

2.4 代谢通路分析

为了探寻红景天苷干预马拉松业余选手定量负荷运动后潜在生物标志物所涉及的代谢途径,对红景天苷干预后11个显著回调的潜在生物标志物进行MetPA通路富集分析。将其导入MetPA(MetaboAnalyst 4.0, <https://www.metaboanalyst.ca/>)进行整合,筛选出红景天苷干预下明显改变的代谢途径,结

果如图7所示。其中横坐标Pathway Impact表示其代谢通路的重要性值,纵坐标-logP表示代谢通路富集分析的显著性水平。本次分析中设定代谢通路的阈值为0.1,当代谢通路影响值高于0.1时,该通路可被视为潜在的靶标代谢路径。分析结果表明红景天苷干预下马拉松业余选手体内潜在生物标志物的变化主要与以下代谢通路相关性最高(impact > 0.

1):(1)丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢;(2)甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;(3)氨酰基-tRNA生物合成;(4)甘油脂代谢。

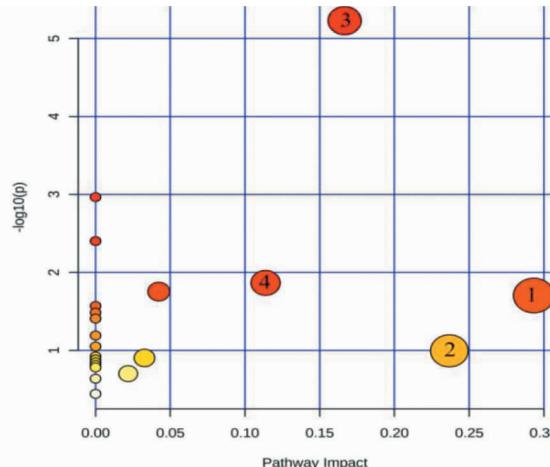


图 7 MetPA 通路分析($n = 6$)

Fig. 7 Summary diagram of Pathway analysis with MetPA ($n = 6$)

注:1:甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢;2:甘油脂代谢;3:氨酰基-tRNA 的生物合成;4:丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢。Note:1:Glycine, serine and threonine metabolism;2:Glycerolipid metabolism;3:Aminoacyl-tRNA biosynthesis;4:Alanine, aspartate and glutamate metabolism.

3 讨论

3.1 红景天昔能够改善马拉松业余选手定量负荷后机体氧化应激和心肌损伤

研究表明,长期的马拉松运动影响机体抗氧化能力,运动导致的肌肉疲劳和延迟性肌肉酸痛(DOMS)等负面效应大多是由于组织细胞过度的氧化应激所致^[6]。而红景天昔作为一味传统中药,具有抗氧化,抗病毒,抗肿瘤等多种药理作用。本研究测定了服用红景天昔前后不同状态下马拉松业余选手血清中抗氧化酶 SOD、T-AOC 和 GSH-PX 活性以及 MDA 含量的变化,其中 MDA 作为细胞膜脂质过氧化的产物,大量积聚会导致细胞裂解和死亡,是机体氧化应激的生物标志物之一^[7]。与 C 组相比,CE 组 MDA 含量显著升高,表明长时间定量负荷运动造成了马拉松业余选手体内脂质过氧化水平升高,SOD 活性显著增加可能是机体自我调节所致。与 CE 组相比,ME 组血清 MDA 含量显著降低,说明红景天昔可以有效改善马拉松业余选手定量负荷后机体氧化应激损伤,而抗氧化酶类活性增加无显著性可能与服药时间长短有关,另一方面也可能与非酶促抗氧化剂的积极作用有关。ME 组相对于 MC 组,血清 MDA 含量无显著改变,而 SOD、T-AOC 和 GSH-PX 活性均显著增加,提示补充红景天昔一段时间后再进行相同定量负荷运动,可以有效提高机体抗氧化酶活性,降低氧化应激水平。

马拉松作为一项长时间大负荷的耐力运动,其能够防治心血管相关疾病的积极作用已被大众广泛认可,然而越来越多的研究表明,长期马拉松运动使心脏负荷过大,易导致心肌纤维撕裂,造成微损伤,加之运动过程中自由基产生增多,机体氧化损伤加剧,抗氧化能力降低,两方面因素结合可能诱发和增加炎症反应从而造成不利的心肌重塑,进而诱发心源性猝死^[8]。红景天昔对缺氧/复氧大鼠原代心肌细胞有保护作用,其机制可能与改善受损心肌细胞线粒体功能障碍、稳定线粒体动力学平衡有关^[9]。本研究选取能够诊断心肌损伤的参考指标心肌酶系,包括 AST、LDH 和 CK-MB 来观察服用红景天昔对马拉松业余选手定量负荷前后心肌损伤的影响。研究发现 CE 组血清 CK、LDH 和 AST 活性较 C 组均显著性升高,提示马拉松业余选手定量负荷后心肌可能出现一定程度的损伤。补充红景天昔一个月后进行相同负荷的定量运动,与 CE 组相比,ME 组 CK、AST 活性显著降低。已知 CK 是参与 ATP-CP 供能系统的关键酶之一,是评估肌肉损伤的敏感指标。AST 活性测定有助于对心脏病变的诊断,正常情况下 AST 存在于组织细胞中,心肌细胞中含量最高,血清中含量极少,心肌梗塞时血清中 AST 活性上升^[10]。ME 组 CK 和 AST 活性显著降低表明红景天昔能够减轻马拉松业余选手定量负荷运动后的肌肉损伤,并具有保护心脏的积极作用。

3.2 红景天昔可以调控马拉松业余选手定量负荷后尿液代谢组学特征

本研究采用 PLS-DA 和多元统计分析方法对马拉松业余选手定量负荷前后的尿样进行代谢轮廓分析,发现缬氨酸、乳酸、2-羟基异丁酸等 15 种代谢物可被辨识为 CE 组尿液内源性差异代谢物。补充红景天昔一个月后,ME 组尿液中上述 11 种潜在生物标志物发生明显回调,说明红景天昔补充对马拉松业余选手定量负荷过程中的机体代谢有积极的调节作用。

3.2.1 能量代谢

核磁代谢组学结果揭示了马拉松业余选手在定量负荷运动中三大供能物质(碳水化合物,脂质和蛋白质途径)的代谢变化规律。结果显示,CE 组尿液乳酸水平比 C 组显著上升,表明长时间耐力运动过程中机体糖酵解供能增加,尿液中乳酸代谢物增加是机体消除乳酸的途径之一。研究表明,长时间耐力运动中不仅糖代谢十分活跃,同时氨基酸分解代谢加强,特别是缬氨酸、异亮氨酸等支链氨基酸的氧化加强^[11]。CE 组尿液中缬氨酸、异亮氨酸、丙氨酸,琥珀酸,赖氨酸水平升高提示长时间耐力运动中机体蛋白质水解增加提高能量补充以维持血糖稳定。丙氨酸上调,表明定量负荷运动可能促进了丙氨酸-葡萄糖循环以加速肝脏糖异生^[12]。另外,我们还发现定量负荷运动后马拉松业余选手脂质代谢发生显著改变。CE 组尿液甘油含量显著下降,3-羟基丁酸和丙酮明显增加,表明定量负荷运动过程中甘油糖异生增加,脂代谢加强,酮体合成增加。

3.2.2 氨基酸代谢

肌氨酸,是一种非蛋白氨基酸,可以在肝脏中由甜菜碱代谢生成,研究表明补充甜菜碱可降低肥胖,并增强肌肉耐力和力量^[13]。本研究 CE 组尿液中肌氨酸与甜菜碱水平均显著下降,表明马拉松业余选手在长时间运动后耐力水平下降,机体产生一定程度的疲劳。丝氨酸属于营养非必需氨基酸,对神经酰胺,鞘脂和磷脂酰丝氨酸前体的生物合成至关重要,补充磷脂酰丝氨酸有助于预防肌肉酸痛,在自行车,举重和耐力跑方面均能够提高机体能力^[14]。据报道血浆丝氨酸水平与其他多种氨基酸水平降低是耐力运动的急性反应^[15],本研究 CE 组尿液中的丝氨酸水平明显降低,这可能是机体疲劳的表现之一。谷氨酰胺是骨骼肌和血浆中最丰富的氨基酸,它在调节体内代谢平衡以及增强免疫系统功能方面具有重要意义^[16]。研究表明,血浆谷氨酰胺降低与

过度训练综合征的免疫抑制有关^[17]。本研究 CE 组尿液谷氨酰胺水平的降低可能与长时间耐力运动后机体的免疫功能下降有关。

本研究中补充红景天昔一个月后,相对于 CE 组,ME 组尿液中 11 种潜在生物标志物能够向正常状态显著回调,表明红景天昔能够对马拉松业余选手定量负荷引起的机体代谢变化具有良好的调节作用。基于 Metaboanalyst 在线 MetPA 通路分析显示,上述代谢物主要涉及 4 条代谢通路:丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,氨酰基-tRNA 生物合成和甘油脂代谢。这些代谢通路主要涉及氨基酸代谢和脂代谢。骨骼肌与肝脏之间的丙氨酸—葡萄糖循环是运动时蛋白质参与供能的重要途径,而天冬氨酸和谷氨酸均可参与细胞内三羧酸循环,是连接糖代谢和氨基酸代谢的纽带。甘氨酸为生糖氨基酸,可以转化为乙酰辅酶 A 参与 TCA 循环为机体提供能量。研究证实,甘氨酸可由苏氨酸(苏氨酸脱氢酶途径)、胆碱(肌氨酸合成途径)和丝氨酸(丝氨酸羟甲基转移酶)途径合成。Heidari 等人发现适量补充甘氨酸可减轻线粒体肿胀,减少 ROS 和脂质过氧化作用,说明甘氨酸可抑制活性氧(ROS)生成,减少氧化应激反应的发生^[18]。葡萄糖衍生的丝氨酸可以代谢为甘氨酸参与合成谷胱甘肽(GSH),进而有助于维持氧化还原稳态^[19]。本研究中 ME 组 MDA 含量显著低于 CE 组,提示红景天昔可能通过调节甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路正向调节细胞氧化还原稳态,进而提高了业余马拉松选手运动过程中的抗氧化能力。甘油脂代谢是指甘油三酸酯被分解产生甘油和脂肪酸的过程。甘油可以进一步转化为磷酸二羟丙酮参与糖代谢或糖异生,而脂肪酸通过 β 氧化释放大量能量供人体活动需要。本研究中 CE 组较 C 组甘油含量显著下降,说明业余马拉松选手运动过程中脂肪分解代谢活跃,糖异生作用加强,补充红景天昔后 ME 组尿液甘油含量显著高于 CE 组,说明机体运动过程中脂肪代谢供能比例增加,产能效率显著提高。另外,在氨酰基-tRNA 生物合成代谢通路中,氨酰基-tRNA 合成酶是核编码的酶,该氨酰化反应为蛋白质翻译过程提供了底物,是细胞质与线粒体蛋白翻译的必需物质,在蛋白质合成和转运过程中发挥重要作用^[20]。本研究中,红景天昔干预后 ME 组缬氨酸等多种氨基酸代谢产物均发生回调,提示可能存在蛋白质翻译过程的变化,进而对机体蛋白质代谢产生影响。综上所述,本研究结果提示:红景天昔

改善马拉松业余选手氧化应激损伤并不是单一的靶点,可能与机体内多条生理通路有关。红景天昔在马拉松业余选手定量负荷过程中可能通过促进相关氨基酸和脂质代谢,增加脂肪利用率,节约蛋白质,进而改善氧化应激和心肌损伤。

未来工作中可以进一步采用其他代谢组学方法如质谱、色谱及色谱质谱联用技术展开研究;也可以整合转录组学、蛋白质组学和代谢组学进行深入研究,从而系统全面地阐释中药红景天昔在改善马拉松业余选手氧化应激损伤中的代谢调控机制。

4 结论

补充红景天昔能够增强马拉松业余选手定量负荷运动后机体的抗氧化能力,改善心肌损伤,其机制可能主要是通过促进氨酰基-tRNA 及其他氨基酸的合成和利用而发挥作用。

参考文献

- 1 Chinese Athletics Association releases " 2019 China Marathon Big Data Analysis Report" [EB/OL]. [2020-05-01] <http://www.runchina.org/portal.php?mod=download&id=269>.
- 2 Mansour SG, Verma G, Pata RW, et al. Kidney injury and repair biomarkers in marathon runners [J]. Am J Kidney Dis, 2017, 70:252-261.
- 3 Zhou HT, Cao JM, Lin Q, et al. Effect of rhodiola on testosterone content, substance metabolism and exercise capacity in rats after exercise training [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2012, 24:1808-1812.
- 4 Huang CH, Gui YH, Lin DH. Metabolomics: a new tool for the scientific study of the exercise human body [J]. Chin Sport Sci(体育科学), 2011, 31(9):77-84.
- 5 Tian JS, Zhang X, Liu H, et al. The hematinic effect of Colla Corii Asini (Ejiao) using ^1H NMR metabolomics coupled with correlation analysis in APH-induced anemic rats [J]. RSC Adv, 2017, 7:8952-8962.
- 6 Withee ED, TiPPens KM, Dehen R, et al. Effects of Methylsulfonylmethane (MSM) on exercise-induced oxidative stress, muscle damage, and pain following a half-marathon: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial [J]. J Int Soc Sports Nutr, 2017, 14(1):24.
- 7 Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges [J]. Anal Biochem, 2017, 524:13-30.
- 8 Rao ZJ, Chang Y, Wang SQ, et al. The adverse effects of long-term high-intensity endurance exercise on the heart [J]. Chin Sport Sci(体育科学), 2016, 36(6):46-54.
- 9 Feng Y, Liu XD, Pan T. Effects of rhodiola rosea on mitochondrial function and mitochondrial dynamics of primary myocardial cells in hypoxic/reoxygenated rats [J]. Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2018, 34: 168-172.
- 10 Zhang GY, Zhou J, Yang L, et al. Changes of ecg and myocardial enzymes before and after pulmonary heart disease [J]. Chin J of Nosocomiology (中华医院感染学杂志), 2017, 27:2225-2228.
- 11 Xu M, Kitaura Y, Ishikawa T, et al. Endurance performance and energy metabolism during exercise in mice with a muscle-specific defect in the control of branched-chain amino acid catabolism [J]. PLoS one, 2017, 12(7):e0180989.
- 12 Yan B, Wang G, Lu H, et al. Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training [J]. J Appl Physiol, 2009, 106:531-538.
- 13 Cholewa JM, Guimarãesferreira L, Zanchi NE. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms [J]. Amino Acids, 2014, 46:1785-1793.
- 14 Felder TK, Ring-Dimitriou S, Auer S, et al. Specific circulating phospholipids, acyl carnitines, amino acids and biogenic amines are aerobic exercise markers [J]. J Sci Med Sport, 2017, 20:700-705.
- 15 Lewis GD, Farrell L, Wood MJ, et al. Metabolic signatures of exercise in human plasma [J]. Sci Transl Med, 2010, 2 (33):33ra37.
- 16 Ahmadi AR, Rayyani E, Bahreini M, et al. The effect of glutamine supplementation on athletic performance, body composition, and immune function: a systematic review and a meta-analysis of clinical trials [J]. Clin Nutr, 2019, 38:1076-1091.
- 17 Sawaki K, Takaoka I, Sakuraba K, et al. Effects of distance running and subsequent intake of glutamine rich peptide on biomedical parameters of male Japanese athletes [J]. Nutr Res, 2004, 24(1):59-71.
- 18 Heidari R, Ghanbarinejad V, Mohammadi H, et al. Mitochondria protection as a mechanism underlying the hepatoprotective effects of glycine in cholestatic mice [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:1086-1095.
- 19 Jin N, Bi A, Lan X, et al. Identification of metabolic vulnerabilities of receptor tyrosine kinases-driven cancer [J]. Nat Commun, 2019, 10(1):2701.
- 20 Boczonadi V, Jennings MJ, Horvath R. The role of tRNA synthetases in neurological and neuromuscular disorders [J]. FEBS Lett, 2018, 592:703-717.