

· 论著 ·

公石松水提液对小鼠运动能力与血清乳酸、尿素氮及肝糖原的影响

石鹤坤, 陈开杰, 林小凤, 陈锦珊 (解放军 175 医院/厦门大学附属东南医院药学科, 福建 漳州 363000)

[摘要] 目的 探讨公石松水提液对抗小鼠运动性疲劳的作用及其机制。方法 雄性小鼠随机分为 5 组: 公石松水提液低、中、高剂量组[分别用公石松 1.22、2.44、4.88 g/(kg·d)], 阳性对照组[红景天水提物 2.34 g/(kg·d)]和空白对照组(等量蒸馏水), 连续灌胃 7 d 后, 测定小鼠负重游泳时间及游泳 90 min 后血乳酸、血尿素氮及肝糖原指标。结果 公石松水提液各组均可显著降低小鼠血尿素氮水平($P < 0.05$), 增加肝糖原含量($P < 0.05$), 呈量效关系; 公石松水提液高剂量组可降低血乳酸, 延长小鼠负重游泳时间($P < 0.05$)。其作用与阳性对照红景天水提物相当。结论 公石松水提液具有抗小鼠运动性疲劳的作用, 其作用机制可能通过提高肝糖原储备、增加葡萄糖的有氧分解、减少葡萄糖的无氧酵解及减少蛋白质的分解有关。

[关键词] 公石松水提液; 运动性疲劳; 肝糖原; 血乳酸; 血尿素氮

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2016)05-0399-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.005

Effects of *Ludisia discolor* aqueous extract on exercise capacity, serum lactic acid, urea nitrogen and hepatic glycogen in mice

SHI Hekun, CHEN Kaijie, LIN Xiaofeng, CHEN Jinsan (Department of Pharmacy, No.175 Hospital of PLA/Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, 363000 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect against exercise-induced fatigue in mice by aqueous extract of *Ludisia discolor* and its mechanism. **Methods** Male mice were randomly divided into five groups including low, middle, high dose groups [aqueous extract of *Ludisia discolor* at dose of 1.22, 2.44, 4.88 g/(kg·d) respectively], positive control group [aqueous extract of *Rhodiola*, at dose of 2.34 g/(kg·d)] and control group (distilled water). After intragastric administration for seven days, mice were measured for loading swimming time, and were tested 90 minutes after loading swimming for blood urea nitrogen, blood lactic acid and hepatic glycogen levels. **Results** The blood urea nitrogen was significantly decreased ($P < 0.05$) in aqueous extract of *Ludisia discolor* groups, and hepatic glycogen was significantly increased ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. The blood lactic acid was significantly decreased in high dose group, and weight loading swimming time was prolonged ($P < 0.05$). The effects of *Ludisia discolor* is similar compared to *Rhodiola*. **Conclusion** The aqueous extract of *Ludisia discolor* has anti-fatigue action in mice. The mechanism might be related with the increased glycogen reserves, increased glucose aerobic decomposition, as well as reduced anaerobic glycolysis and reduced protein breakdown.

[Key words] aqueous extract of *Ludisia discolor*; exercise-induced fatigue; hepatic glycogen; blood lactic acid; blood urea nitrogen

运动性疲劳是指机体生理过程不能持续其机能, 在某一特定水平上和/或不能维持预定的运动强度, 目前主要从能量耗竭、代谢产物堆积、内环境稳定性失调、自由基损害等方面进行研究^[1]。对于部队官兵及运动员, 过度疲劳不仅损害机体的肌肉、心血管和内分泌等多个系统, 导致肌肉软弱、食欲下降、精

神萎靡等症状, 而且还会降低机体免疫力, 引发或加重多种疾病和训练伤, 从而影响训练质量, 甚至影响部队的战斗力。目前, 抗疲劳药物如苯丙胺、莫达非尼、咖啡因等尽管在延缓疲劳发生和消除疲劳方面有较好的效果, 但可能存在发生心血管事件、干扰睡眠、精神紊乱、成瘾性等不良反应的明显缺陷。《内经·素问·举痛论》言:“劳则气耗”, 即过度地运动可导致机体阳气不足而引发肢软乏力、神疲倦怠等气虚症候, 形成体力性疲劳。公石松是闽南民间的特色草药, 兰科血叶兰属植物血叶兰(*Ludisia discolor*)的全草, 此名称未见于其他本草著作记载, 但

[基金项目] 解放军 175 医院青年苗圃基金资助项目(13Y017)

[作者简介] 石鹤坤, 硕士, 药师, 研究方向: 中药药理学. E-mail: zzh-phshk@163.com

[通讯作者] 陈锦珊, 本科, 主管药师, 研究方向: 医院药事管理与临床药理学. E-mail: cjs1223@sohu.com

在漳州是家喻户晓的一味草药。在闽南民间医生认为,其味甘、微涩,性凉,具有滋阴润肺、健脾安神、凉血、止血等功效^[2]。由于运动后的气虚无力运血,而致血行不畅,运动性疲劳除存在“气虚血瘀”外,又有湿热内生、口燥咽干、烦热难眠等阴虚内热症。本研究以“健脾润肺,凉血养血”为应用思路,探讨公石松水提液对运动性疲劳指标的影响。

1 材料

1.1 仪器 ADVIA2400全自动生化分析仪(德国西门子公司);UV-2550紫外分光光度计(日本岛津公司);BS223S电子天平(德国赛多利斯集团公司);Pico-17高速离心机(美国赛默飞世尔公司);420-A型恒温水浴箱(姜堰市新康医疗器械有限公司)。

1.2 试剂 公石松草药(干品,漳州山珍金线莲有限公司,批号:20140822);红景天药材粉末(江西江中中药饮片有限公司,批号:100303002);乳酸检测试剂盒(英国朗道实验诊断有限公司,批号:274240);尿素测定试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号:D1407033);肝糖原测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20120319);浓硫酸(福建省三明市三圆化学试剂有限公司,批号:T20110914)。

1.3 实验动物 健康清洁级雄性昆明种小鼠,体重(20±2)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号:SCXK(沪)2012-0002,实验动物环境与设施符合《中华人民共和国实验动物规范》(GB14925-95)。动物实验在厦门大学附属东南医院中心实验室进行,许可证号:SYXK(军)2012-054,实验过程符合中国动物实验的福利伦理准则,并获得厦门大学附属东南医院实验动物伦理委员会批准,按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。实验前适应性饲养3d,自由饮水摄食。

1.4 药物制备与给药剂量 公石松药材加水提取3次,每次加入10倍量水煎煮沸1h,合并3次药液浓缩至1g/ml原药材,红景天药材粉末也按上法进行提取浓缩。公石松民间的临床成人用法用量为3钱/次,3次/d,共9.375g/d,换算为小鼠的临床等效量为1.22g/(kg·d);红景天粉末临床成人用法用量为6g/次,3次/d,共18g/d,换算为小鼠的临床等效量为2.34g/(kg·d)。最终稀释配制成分石松水提液低、中、高剂量组药液(含原药材30.5、61、122mg/ml),阳性对照组药液含红景天原药材58.5mg/ml。

2 方法

2.1 小鼠负重游泳试验 取雄性昆明种小鼠50只,按体重随机分为5组,每组10只,即空白对照组,公石松水提液低、中、高剂量组,红景天阳性对照组。本实验设计,给予小鼠公石松水提液低、中、高剂量,分别为1.22、2.44、4.88g/kg,阳性对照组给药剂量为2.34g/kg。因红景天已有多篇文献报道有良好的抗疲劳效果^[3],所以本试验选用红景天作为抗疲劳阳性对照药。小鼠每10g体重给药0.4ml,每日给药1次,连续给药7d,空白对照组给予蒸馏水。末次给药30min后,小鼠按照体重的5%在尾根部负重铅丝,将小鼠放入水深20cm的游泳箱中游泳,水温(25±1)℃,记录小鼠从游泳开始至死亡的时间(以小鼠沉入水底,10s内不能浮出水面为溺死指标)。

2.2 小鼠肝糖原、乳酸(LA)、尿素氮(BUN)含量测定试验 取雄性昆明种小鼠50只,分组与给药同“2.1”项。末次给药后30min,将小鼠置于水深约20cm的游泳箱中游泳,水温(25±1)℃,不负重游泳90min^[4]。游泳结束后,立即摘除各组小鼠眼球进行采血,将所采得的血置于离心机中以3000r/min的转速离心10min,分离血清,测定LA与BUN。将小鼠颈椎脱臼处死,取出小鼠肝脏,经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,精确称取肝脏(85±15)mg,严格按试剂盒说明书操作测定肝糖原含量。

2.3 统计分析 实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用t检验进行比较,用SPSS 13.0统计软件进行分析。

3 结果

由表1可知,与空白组比较,各给药组小鼠的负重游泳时间均有增加的趋势。其中,以公石松水提液高剂量组和阳性对照组最为明显($P < 0.05$),其余各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 公石松水提液对小鼠负重游泳时间的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量 (g/kg)	负重游泳时间 (t/min)
空白对照组	0	54.45±14.15
红景天组	2.34	70.66±16.17*
低剂量组	1.22	62.97±14.80
中剂量组	2.44	65.03±11.36
高剂量组	4.88	69.67±17.40*

* $P < 0.05$,与空白对照组比较

由表 2 可知,小鼠经过 90 min 的游泳运动,与空白组比较,各给药组的肝糖原消耗有明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。运动后各给药组小鼠血清中 LA 的产生与空白对照组比较均有下降的趋势,以公石松水提液高剂量组最为明显($P < 0.01$),其余各组差异无统计学意义($P > 0.05$);血清中 BUN 含量各给药组均有显著减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 公石松水提液对运动后小鼠血清肝糖原、LA、BUN 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	给药剂量 (g/kg)	肝糖原 (mg/g)	LA (mmol/L)	BUN (mmol/L)
空白对照组	0	2.35±0.39	4.66±0.21	13.43±2.54
红景天组	2.34	3.67±1.63*	4.61±0.30	8.57±1.88**
低剂量组	1.22	2.80±0.44*	4.59±0.14	9.57±1.02**
中剂量组	2.44	2.86±0.34*	4.43±1.17	9.08±1.04**
高剂量组	4.88	3.09±0.72*	3.53±1.11*	8.94±1.12**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与空白对照组比较

由表 3 可知,试验过程中各组小鼠体质量均有不同程度的增加,经过 7 d 灌胃给药后,与空白组比较,各给药组小鼠的体质量均有增加的趋势,中剂量组给药第 4、第 7 天,高剂量组给药第 4 天与空白对照组比较有显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 公石松水提液对试验过程小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10, g$)

组别	试验第 1 天	试验第 4 天	试验第 7 天
空白对照组	22.52±1.38	25.13±2.00	26.94±2.52
红景天组	22.6 ±1.07	26.51±2.13	28.22±3.24
低剂量组	22.4 ±2.31	26.67±2.09	27.7 ±2.57
中剂量组	21.58±0.95	27.15±1.73*	29.15±1.37*
高剂量组	22.01±1.14	26.98±1.51*	28.78±1.99

* $P < 0.05$,与空白对照组比较

4 讨论

糖原是运动过程中提供能量的重要来源,运动时骨骼肌对血糖的需求增大,肝糖原在运动过程中通过不断分解葡萄糖入血补充不断消耗的血糖,维持体内血糖稳定,从而为机体提供更多能量,达到抗疲劳的目的^[5,6]。本实验观察到,各给药组肝糖原明显高于空白对照组,以红景天组的肝糖原储备量最高为(3.67±1.63) mg/g,各组与空白对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),这表明公石松

水提液可能通过增加小鼠体内肝糖原储备,有利于维持运动时的血糖稳定,从而为机体提供更多能量,减缓疲劳的发生。

BUN 是蛋白质和氨基酸代谢终产物,长时间运动可导致机体能量平衡被破坏,蛋白质和氨基酸的分解代谢加强,尿素生成增多^[7]。其与机体机能、疲劳程度及运动负荷程度呈正相关,是评价运动状态的重要指标之一^[8]。本研究观察到游泳(90 min)后,空白对照组血清中 BUN 含量明显高于各给药组($P < 0.01$),该实验结果说明长时间运动,肌糖原被大量消耗同时,脂肪分解加速,能量需求不均衡。为补充骨骼肌和大脑对糖的需求,蛋白质和氨基酸加快分解代谢,尿素显著增多。而各给药组明显低于空白对照组,这提示公石松水提液可能通过减少蛋白质氧化供能的作用,提高机体对糖类储备和脂肪供能比率,降低蛋白质等含氮化合物的分解代谢供能,从而起到抗疲劳的作用。

肌肉激烈运动时对氧的需求急剧增加,单靠有氧氧化不能满足其能量需求,糖酵解即成为运动过程中重要的供能方式,糖酵解供能可生成大量乳酸,使肌肉中 H^+ 浓度增加,肌细胞 pH 值下降,进而引起一系列生化改变,使肌肉产生疲劳,并有酸痛的感觉^[9]。本研究结果显示,与空白对照组比较,公石松水提液高剂量组显著降低了运动小鼠血乳酸水平($P < 0.05$),其他各组虽有下降的趋势,但差异无统计学意义,提示给予 4.88 g/kg 的公石松水提液具有加速消除运动后小鼠乳酸堆积的作用。

公石松水提液(4.88 g/kg)可明显延长小鼠负重游泳时间,与阳性对照组作用相当。与空白对照组比较,公石松提取液中剂量组在试验的第 4、第 7 天,高剂量组在试验的第 4 天小鼠体质量增加明显,差异有统计学意义。综上所述,给药各组均能有效地提高肝糖原的储备,可为机体提供更多能源物质,延长小鼠负重游泳时间,同时可有效地降低运动后血乳酸和血尿素水平,并显示了一定的量效关系。通过以上分析,提示公石松水提液在提高机体抗疲劳能力、延缓疲劳的产生和加速疲劳的消除方面都有一定的作用。对于公石松水提液在动物机体运动中 ATP 代谢、肌纤维生化反应和体内活性物质水平等方面的影响仍待研究。

【参考文献】

- [1] 石鹤坤,陈锦珊.红景天等单味中药抗疲劳的研究进展[J].中国医药导报,2012,9(4):9-10,13.
- [2] 黄泽豪,沈贤娟.闽南民间药公石松的生药鉴定[J].亚热带植

- 物科学, 2013, 42(4): 288-292.
- [3] 耿欣. 红景天抗疲劳作用研究进展[J]. 中医药学报, 2011, 39(3): 95-97.
- [4] 龚梦鹃, 王立为, 刘新民. 大小鼠游泳实验方法的研究概况[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(5): 311-314.
- [5] 官遵. 运动中能量供应的基本理论[J]. 甘肃科技, 2013, 29(2): 81-83.
- [6] Xu C, Lv J, Lo YM, *et al.* Effects of oat β -glucan on endurance exercise and its anti-fatigue properties in trained rats [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(2): 1159-1165.
- [7] 张宇, 衣雪洁, 王宝明. 优秀单板 U 型场地滑雪运动员不同训练期部分生理生化指标监测分析[J]. 中国运动医学杂志, 2012, 31(1): 62-65.
- [8] Dolny DG, Lemon PW. Effect of ambient temperature on protein breakdown during prolonged exercise [J]. *Physiology*, 1989, 64: 550-555.
- [9] 辛甜, 储智勇, 栾洁, 等. 铁皮石斛胚状体对大鼠抗疲劳能力的影响[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(1): 21-23.
- [收稿日期] 2015-02-27 [修回日期] 2015-12-24
[本文编辑] 顾文华

(上接第 388 页)

- [25] Peng CC, Templeton I, Thummel KE, *et al.* Evaluation of 6beta-hydroxycortisol, 6beta-hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 *in vivo* [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89(6): 888-895.
- [26] Marde Arrhen Y, Nylen H, Lovgren-sandblom A, *et al.* A comparison of 4beta-hydroxycholesterol; cholesterol and 6beta-hydroxycortisol; cortisol as markers of CYP3A4 induction [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 75(6): 1536-1540.
- [27] Ohno M, Yamaguchi I, Ito T, *et al.* Circadian variation of the urinary 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratio that would reflect hepatic CYP3A activity [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2000, 55(11-12): 861-865.
- [28] Fleishaker JC, Pearson PG, Wienkers LC, *et al.* Biotransformation of tirilazad in human; 2. Effect of ketoconazole on tirilazad clearance and oral bioavailability [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 277(2): 991-998.
- [29] Shibasaki H, Hosoda K, Goto M, *et al.* Intraindividual and interindividual variabilities in endogenous cortisol 6beta-hydroxylation clearance as an index for *in vivo* CYP3A phenotyping in humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(2): 475-479.
- [30] Luo X, Zheng L, Cai N, *et al.* Evaluation of 6beta-hydroxycortisol and 6beta-hydroxycortisone as biomarkers for cytochrome P450 3A activity: insight into their predictive value for estimating oral immunosuppressant metabolism [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(10): 3578-3586.
- [31] Diczfalusy U, Miura J, Roh HK, *et al.* 4Beta-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker; relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2008, 18(3): 201-208.
- [32] Tremblay-franco M, Zerbinati C, Pacelli A, *et al.* Effect of obesity and metabolic syndrome on plasma oxysterols and fatty acids in human [J]. *Steroids*, 2015, 99(Pt B): 287-292.
- [33] Mannheimer B, Wagner H, Ostenson CG, *et al.* No impact of vitamin D on the CYP3A biomarker 4beta-hydroxycholesterol in patients with abnormal glucose regulation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0121984.
- [34] Woolsey SJ, Beaton MD, Choi YH, *et al.* Relationships between endogenous plasma biomarkers of constitutive CYP3A activity with single time-point oral midazolam microdose phenotype in healthy subjects [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016, 118(4): 284-291.
- [35] Woolsey SJ, Mansell SE, Kim RB, *et al.* CYP3A activity and expression in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 43(10): 1484-1490.
- [36] Suzuki Y, Itoh H, Sato F, *et al.* Significant increase in plasma 4beta-hydroxycholesterol concentration in patients after kidney transplantation [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(9): 2568-2572.
- [37] Suzuki Y, Itoh H, Fujioka T, *et al.* Association of plasma concentration of 4beta-hydroxycholesterol with CYP3A5 polymorphism and plasma concentration of indoxyl sulfate in stable kidney transplant recipients [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(1): 105-110.
- [38] Muro EP, Fillekes Q, Kisanga ER, *et al.* Intrapartum single-dose carbamazepine reduces nevirapine levels faster and may decrease resistance after a single dose of nevirapine for perinatal HIV prevention [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1999), 2012, 59(3): 266-273.
- [39] Baranyai D, Muro E, Godtel-armbrust U, *et al.* Reduction of nevirapine-driven HIV mutations by carbamazepine is modulated by CYP3A activity [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(7): 1933-1937.
- [40] 卜书红, 张健, 陆晓彤, 等. 儿童癫痫患者 CYP 酶活性与血清卡马西平浓度和临床疗效的相关性分析 [J]. 医药导报, 2010, 29(4): 430-432.
- [41] 张健, 唐跃年, 刘海涛, 等. 急性淋巴细胞性白血病患者化疗前后 CYP3A 酶活性研究 [J]. 中国药师, 2007, 10(2): 110-112.
- [42] Rouits E, Charasson V, Petain A, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1239-1245.
- [收稿日期] 2015-12-30 [修回日期] 2016-03-15
[本文编辑] 顾文华