

葛根黄酮对大强度运动大鼠骨骼肌氧化应激损伤的保护作用及其机制研究

朱晓东

(郑州大学 体育学院, 河南 郑州 450044)

摘要: 通过检测血清肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)水平及骨骼肌超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)水平,同时采用 Western blot 法检测骨骼肌中 p38MAPK、ERK 蛋白表达的方法,研究葛根黄酮对大强度运动大鼠骨骼肌氧化损伤的保护作用及其可能的机制。结果表明:与安静对照组相比,运动对照组大鼠力竭运动时间显著降低,SOD、GSH-Px 活性显著下降,CK、LDH 活性及 MDA 含量显著上升($P < 0.01$),同时 p38MAPK、ERK 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);运动前给予葛根黄酮灌胃处理后,与运动对照组相比,给药低、中、高大鼠力竭运动时间有所上升,SOD、GSH-Px 活性显著升高,CK、LDH 活性及 MDA 含量显著下降($P < 0.05$),p38MAPK、ERK 蛋白表达显著下降($P < 0.05$)。说明葛根黄酮的补充能改善运动疲劳大鼠氧化应激水平、缓解运动对骨骼肌造成的损伤、提高大鼠运动潜能,同时还可下调 p38MAPK、ERK 蛋白,抑制 p38 MAPK、ERK 信号通路的过度激活,对运动性疲劳起到一定的缓解作用。

关键词: 葛根黄酮;大强度运动;骨骼肌损伤;氧化应激;机制

中图分类号: TS 972.165

文献标志码: A

文章编号: 2095-8730(2020)03-0078-05

运动性疲劳是源于肌肉疲劳和能量衰竭而引发的机体在特定水平上不能持续维持预定运动强度的一种自然生理现象。^[1] 引发运动性疲劳的机制较为复杂,有研究显示,运动过程中尤其是急性运动、大强度运动均会引发内源性自由基生成增加,造成机体内被清除的自由基不断积累,引起细胞出现毒性反应和不可逆损伤。^[2] 为预防和缓解以上现象的发生,运动科学领域常通过合理的营养膳食、中医药保健来提高体内抗氧化系统能力,清除过度积累的氧自由基,减少运动损伤和运动性疲劳的发生。^[3-4]

葛根黄酮具有广泛的生物学作用,如保护心脑血管、抗衰老、增强机体免疫力、抗氧化等功能。在运动保健领域,近年来,相关文献主要聚焦于葛根黄酮改善血糖和抗氧化应激等方面,陈江林等^[5]通过检测运动训练大鼠血液生化指标和抗氧化能力发现,200 mg/kg 的葛根异黄酮能显著升高大鼠血清超氧化物歧化酶活性及血糖、血红蛋白含量,降低丙二醛含量和谷草转氨酶活性。

龚志刚等^[6]发现葛根黄酮可提高游泳运动大鼠的总抗氧化能力(T-AOC),改善机体红细胞的变形能力,降低血液黏度,继而加速其他有害代谢产物的清除,从而发挥抗运动性疲劳的作用。尽管葛根黄酮在体育运动中的应用已经比较广泛,但其微观作用机制目前尚不十分清楚,为此,本研究以过度跑台训练建立运动疲劳大鼠模型,观察补充葛根黄酮对大强度运动大鼠骨骼肌氧化应激损伤的保护,并通过研究大鼠骨骼肌形态变化及 p38 MAPK、ERK 蛋白的表达来探讨葛根黄酮发挥抗运动疲劳的具体微观作用机制,为进一步的探讨葛根黄酮的保健功能提供科学依据。

1.1 材料与方法

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性健康大鼠 50 只,体质量(140 ± 20)g,由郑州大学医学院实验动物中心提供(生产许可证 SCXK(豫)2012-0001)。大鼠置于温度为(23 ± 1)℃,湿度 40% ~ 60% 的环境下

收稿日期:2020-04-07

基金项目:河南省软科学资助项目(142400410773)

作者简介:朱晓东,男,郑州大学体育学院讲师,从事武术与民族传统体育学研究。

饲养,每笼5只。

1.2 药物、试剂与仪器

葛根黄酮(纯度98%):西安西海生物科技有限公司;Trizol试剂、PVDF膜:Invitrogen公司;逆转录试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒:北京百奥莱博科技有限公司;一抗及HRP标记的IgG二抗:Abcam公司;CK活性、LDH活性、SOD活性、GSH-Px活性和MDA含量测定试剂盒:南京建成生物工程有限公司;BCA蛋白定量试剂盒:上海碧云天生物技术有限公司。

ZH-PT型动物跑台:淮北正华生物仪器设备有限公司;BSA124S型电子天平:德国赛多利斯公司;T100型PCR仪:美国Bio-Rad公司;5430R型离心机:Eppendorf中国有限公司;UV-1600PC型紫外分光光度计:上海析谱仪器有限公司;PowerPac型电泳仪、GelDoc EZ凝胶成像分析系统:美国Bio-Rad公司。

1.3 动物分组及给药

采用基础饲料适应性饲喂3d后,将大鼠随机分为5组:安静对照组、运动对照组、运动葛根黄酮(低、中、高剂量)组,每组10只。分别对运动葛根黄酮低、中、高剂量大鼠灌胃100、200、400 mg/kg的葛根黄酮,每日1次,安静对照组及运动模型组大鼠灌胃等量的生理盐水,各组大鼠灌胃时间均为运动前1h,共灌胃3周。

1.4 动物运动模型建立

大鼠递增负荷力竭运动方案参考朱洪竹等^[7]方法进行,除安静对照组外,其余大鼠进行为期3周的递增负荷跑台运动,具体方案如表1所示,大鼠每日训练1次,训练期间采用棍棒驱赶运动缓慢或者不跑的大鼠,同时观察并记录大鼠所有情况。第3周末对各组大鼠进行一次力竭运动,力竭判定标准为大鼠呼吸急促、四肢无力、目光呆滞,采用声光电刺激无反抗行为,并记录大鼠力竭运动时间。

1.5 动物取材及相关生化检测

在3周末力竭运动结束后,用2%戊巴比妥钠麻醉,腹腔取血,3000 r/min离心10 min后分离血清,检测CK、LDH活性,其中CK、LDH活性分别采用乙酰半胱氨酸法和苯肼显色法进行检测。选择下肢运动中较易损伤的肌肉群腓肠肌组织,在冰浴上进行分离,分离好后生理盐水漂洗拭干,剪碎,加生理盐水匀浆,3000 r/min离心

10 min,取上清液测定SOD、GSH活性和MDA含量,SOD、GSH及MDA水平检测采用紫外分光光度法、二硫代苯甲酸比色法,紫外分光光度法进行,检测步骤均严格参照试剂盒说明书进行。

表1 大鼠运动训练方案 $m \cdot \min^{-1} \times \min \cdot d^{-1}$

周次	周一	周二	周三	周四	周五	周六	周日
第1周	15 × 15	15 × 15	18 × 20	18 × 20	20 × 25	20 × 25	20 × 25
第2周	22 × 25	22 × 25	25 × 30	25 × 30	28 × 30	28 × 30	30 × 35
第3周	30 × 35	35 × 35	35 × 35	35 × 40	35 × 40	38 × 42	38 × 42

1.6 骨骼肌形态学观察

大鼠腓肠肌组织,采用10%的中性福尔马林中固定24h,梯度乙醇脱水1min,二甲苯透明1min,石蜡包埋,冷却凝固后切片,切片厚度控制在5~8 μm左右,后经脱蜡,至水,苏木精伊红染色,于倒置显微镜下观察。

1.7 Western Blot法检测p38 MAPK、ERK蛋白表达水平

腓肠肌组织采用RIPA裂解液常规裂解后,匀浆并离心,BCA法测定总蛋白含量,进行SDS-PAGE凝胶电泳,将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上,4%脱脂奶粉封闭2h,加入一抗(p38 MAPK稀释比例10:2000,ERK稀释比例10:10000)置于4℃冰箱摇床孵育过夜,取出后以0.1% Tween-PBS漂洗3次,每次5min,再室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000),孵育1h,经0.1% Tween-PBS洗3次,每次5min,最后加入ECL反应3~5min,胶片曝光显影,用凝胶成像系统拍照,采用Quantity One软件分析条带灰度值并计算分析蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

实验数据采用SPSS 20.0软件统计,计量采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,数据进行单因素方差分析,组间比较采用多重比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 各组大鼠力竭运动时间变化

力竭时间是评价机体抗运动疲劳能力的直接指标。^[8]研究结果如表2所示,过度大强度可造成大鼠运动能力降低,运动对照组大鼠力竭运动时

间显著低于安静对照组($P < 0.01$)。给予葛根黄酮干预后,给药各剂量组大鼠运动能力较运动对照组有显著提高($P < 0.01$),这表明葛根黄酮可以改善大鼠运动性疲劳,提高运动训练时间。

表2 各组大鼠力竭运动时间变化

组别	数量/只	力竭运动时间/min
安静对照组	10	55.53 ± 4.62
运动对照组	10	48.26 ± 5.68**
低剂量组	10	75.81 ± 6.64##
中剂量组	10	104.62 ± 6.63##
高剂量组	10	113.88 ± 7.44##

注:与安静对照组比较,**表示 $P < 0.01$;与运动模型组比较,##表示 $P < 0.01$ 。

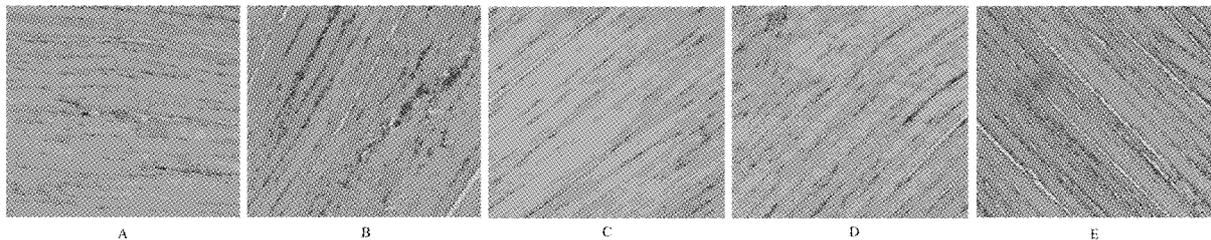


图1 各组大鼠骨骼肌组织形态结构变化情况

注:图A为安静对照组;图B为运动对照组;图C为葛根黄酮低剂量组;图D为葛根黄酮中剂量组;图E为葛根黄酮高剂量组。

2.3 各组大鼠骨骼肌 SOD、GSH - Px 活性及 MDA 含量和血清中 CK、LDH 活性变化

血清 CK 和 LDH 的活性是肌纤维损伤的显著性标志物。^[9] 本研究结果显示,与安静对照组比较,运动对照组 CK、LDH 活性显著增加($P < 0.01$);与模型对照组比较,给药低、中、高剂量组 CK、LDH 活性显著降低($P < 0.01$),整体趋势呈现一定的剂量依耐性。在氧化应激方面,大强度运动造成骨骼肌内自由基-抗氧化性酶类动态失衡,具体表现在运动对照组大鼠 SOD、GSH 活性显著低于安静对照组($P < 0.01$),脂质过氧化产物 MDA 含量显著高于安静对照组($P < 0.01$),但在运动前给予一定剂量的葛根黄酮,大鼠 SOD、GSH 活性较运动对照组显著升高,MDA 含量较运动对照组显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),详见表3。

2.4 葛根黄酮对运动大鼠骨骼肌 p38 MAPK, ERK 蛋白表达的影响

大强度力竭运动引起大鼠骨骼肌 p38 MAPK 和 ERK 蛋白表达水平出现不同程度的差异,运动对照组大鼠骨骼肌 p38 MAPK 及 ERK 蛋白表达显著高于安静对照组($P < 0.01$),在大强度运动

2.2 各组大鼠骨骼肌形态结构的变化

本研究结果显示,安静对照组大鼠骨骼肌肌膜清晰,肌细胞排列规则,肌核呈椭圆形且分布较均匀;运动对照组大鼠力竭运动后,其骨骼肌肌膜较模糊,肌纤维肥大,肌核分布不均,肌细胞形态破坏较严重。葛根黄酮低剂量组大鼠肌纤维排列较规则,但肌核分布不均,局部地区较为密集;中剂量组大鼠骨骼肌肌纤维排列较规则,肌核分布均匀,但局部仍有肌核聚集出现;高剂量组大鼠骨骼肌肌纤维排列较规则,肌核分布均匀,偶见肌核聚集,各组大鼠骨骼肌形态学情况如图1所示。

前给予不同剂量的葛根黄酮,各组大鼠 p38 MAPK 和 ERK 蛋白表达水平随着剂量增加呈现一定下降趋势,给药各剂量组大鼠 p38 MAPK 和 ERK 蛋白表达水平较运动对照组显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),见表4和图2。

表3 各组大鼠骨骼肌 SOD、GSH - Px 活性及 MDA 含量和血清中 CK、LDH 活性变化($\bar{x} \pm SD, n = 10$)

组别	LDH/ U · L ⁻¹	CK/ U · L ⁻¹	SOD/ U · mg ⁻¹	GSH - Px/ U · mg ⁻¹	MDA/ μmol · g ⁻¹
安静 对照组	326.47 ± 36.28	325.73 ± 20.35	184.60 ± 22.19	128.17 ± 11.36	24.41 ± 5.37
运动 对照组	551.13 ± 46.82**	443.23 ± 24.19**	115.81 ± 21.66**	82.45 ± 11.47**	40.68 ± 6.59**
低剂 量组	474.31 ± 42.20##	411.00 ± 21.64##	137.09 ± 21.64#	95.07 ± 9.36#	33.89 ± 6.83#
中剂 量组	408.67 ± 35.07##	361.62 ± 19.74##	152.00 ± 22.83##	105.68 ± 11.70##	31.16 ± 5.36##
高剂 量组	350.00 ± 35.53##	343.79 ± 20.34##	174.04 ± 23.52##	117.16 ± 10.79##	26.74 ± 5.65##

注:与安静对照组比较,**表示 $P < 0.01$;与运动对照组比较,#表示 $P < 0.05$,##表示 $P < 0.01$ 。

表4 各组大鼠骨骼肌 p38 MAPK, ERK 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm SD, n = 10$) ku

组别	p38 MAPK	ERK
安静对照组	48.87 ± 6.44	58.50 ± 5.93
运动对照组	81.38 ± 7.56**	86.37 ± 7.24**
低剂量组	72.93 ± 7.05#	74.45 ± 6.82##
中剂量组	64.15 ± 6.87##	66.77 ± 6.52##
高剂量组	53.18 ± 6.06##	61.23 ± 5.51##

注:与安静对照组比较, **表示 $P < 0.01$; 与运动对照组比较, #表示 $P < 0.05$, ##表示 $P < 0.01$ 。

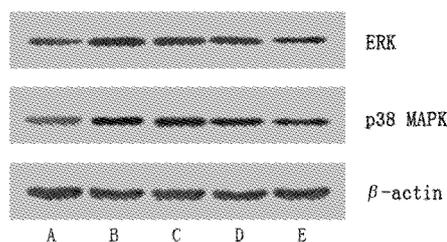


图2 各组大鼠骨骼肌 p38 MAPK 和 ERK 蛋白表达情况

注:图中 A 为安静对照组;图中 B 为运动对照组;图中 C 为药物低剂量组;图中 D 为药物中剂量组;图中 E 为药物高剂量组。

3 讨论

机体内自由基与抗氧化系统,经长期过度的运动和不当的训练方式会打破原本的平衡状态。运动过程中产生大量的自由基可不断攻击生物膜中的多聚不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化反应,破坏细胞膜的流动性和通透性,使细胞正常结构遭到破坏,导致运动性疲劳和肌肉损伤的发生。研究表明,过度训练大鼠极易出现过度训练综合征,其外在最直观的表现则反映在大鼠末次运动力竭时间显著下降。^[10]同时在运动引起的氧化应激过程中,机体内抗氧化酶如 SOD、GSH - Px 因可清除氧自由基,二者活性亦标志改善氧化应激程度的强弱。^[11]本研究结果显示,葛根黄酮结构中含有多个酚羟基,这种结构极大地提高了葛根黄酮的抗氧化作用,通过有效促进骨骼肌组织中 SOD、GSH - Px 活性,缓解运动过程产生大量的自由基对组织造成的脂质过氧化,使其终产物丙二醛(MDA)含量显著降低,保护了骨骼肌细胞的损伤,降低了 CK 和 LDH 的活性,通过控制机体内自由基-抗氧化酶的动态平衡,有效改善了机体氧运动疲劳的发生。

p38 MAPK 和 ERK 是 MAPK 家族中最重要的两个成员,研究发现,运动中产生的过量活性氧可以激活 p38 MAPK、ERK 蛋白激酶,从而活化 MAPK 系统,使其整条 MAPK 信号通路发生级联反应,进而影响细胞的正常功能。LUDLOW 等^[12]发现大鼠运动 8 周后,其骨骼肌 ERK1/2 蛋白表达是安静时的 2 倍,且随着运动时间和运动负荷的不断增加,p38 MAPK、ERK1/2 的表达不断升高。此外,大量研究也表明肌肉收缩过程中,机体内活性氧(ROS)可通过激活 MAPK 在内的氧化还原敏感型信号通路,调节抗氧化酶基因等氧化还原敏感型基因的表达,使细胞产生预适应,以此保护细胞避免更严重的氧化应激。^[13]佟强等^[14]认为 ROS 是个很好的 p38 和 ERK 激酶的激活者,直接补充氧化剂和运动产生的 ROS 都能激活 MAPK 信号通路。运动过程中对大鼠给予补充葛根黄酮,在一定程度上可以使以上两个蛋白表达下调,提示 MAPK 信号通路中 p38 MAPK、ERK 蛋白在大强度运动损伤中有一定的作用,葛根黄酮可通过降低 p38 MAPK、ERK 蛋白的表达,抑制 MAPK 信号通路继续活化,避免骨骼肌细胞的过度损伤。

综上所述,葛根黄酮对于大强度力竭运动造成的骨骼肌损伤具有一定的保护作用,具体表现在可提高骨骼肌 SOD、GSH - Px 活性,降低骨骼肌 MDA 含量和血清 LDH、CK 活性,同时通过研究大鼠在大强度运动中的分子机制变化,我们发现大强度运动可激活 MAPK 信号通路,上调 p38 MAPK、ERK 蛋白表达,而运动前补充一定剂量的葛根黄酮,可下调 p38 MAPK、ERK 蛋白表达,继而抑制 p38、ERK 信号通路的活化,可起到保护骨骼肌免受损伤的作用。

参考文献:

- [1] SHIN I S, KIM D H, JANG E Y, et al. Anti - fatigue properties of cultivated wild ginseng distilled extract and its active component panaxydol in rats [J]. Journal of Pharmacopuncture, 2019, 22(2): 68 - 74.
- [2] LIN T C, WANG S H, HUANG C C, et al. Anti - fatigue, antioxidation, and anti - inflammatory effects of eucalyptus oil aromatherapy in swimming - exercised rats [J]. Chin J Physiol, 2018, 61(5): 257 - 265.
- [3] 刘亭宇,施洪飞. 药膳首先是美食 [J]. 美食研究, 2018, 35(4): 41 - 44.

- [4] 吴海霞. 药食兼用食材的抗氧化性及其比较[J]. 美食研究, 2017, 34(3): 50-54.
- [5] 陈江林, 江丽霞, 曾靖. 葛根异黄酮对运动训练大鼠血液生化指标及抗氧化的影响[J]. 中国当代医药, 2014, 21(1): 6-8.
- [6] 龚志刚, 石向群, 卢普连. 葛根素对运动大鼠血液流变及运动能力的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(7): 639-642.
- [7] 朱洪竹, 朱梅菊, 蔡荣兴, 等. 毛蕊花苷对大鼠递增大强度运动下骨骼肌损伤的保护作用研究[J]. 山东体育学院学报, 2019, 35(1): 53-57.
- [8] 郭爱民, 李亚俊, 曹卉, 等. 姜黄素对过度训练所致大鼠心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(15): 304-310.
- [9] 刘雪梅, 杨铭, 于德伟, 等. 参精运动保健饮料对运动性疲劳大鼠的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(11): 123-126.
- [10] 张景瑞. 红景天苷对大鼠力竭运动性肾损伤的预防和保护作用[J]. 中医临床研究, 2019, 11(2): 110-111.
- [11] HOU C W, CHEN I C, SHU F R, et al. Protective effect of supplementation with Lycium ruthenicum Murray extract from exhaustive exercise-induced cardiac injury in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2019, 132(8): 1005-1006.
- [12] LUDLOW A T, GRATIDAO L, LUDLOW L W, et al. Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle[J]. Exp Physiol, 2017, 102(4): 397-410.
- [13] 李影, 郭标. 姜黄素改善过度训练所致的骨骼肌氧化应激损伤及运动疲劳的研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(22): 2887-2889.
- [14] 佟强, 曹建民, 周海涛. 雨生红球藻对过度训练大鼠骨骼肌 MAPK 信号通道蛋白表达及抗氧化能力的影响[J]. 中国体育科技, 2016, 52(4): 133-138.

Protective effect of pueraria flavonoids on oxidative stress injury of skeletal muscle in high-intensity exercise rats and its mechanism

ZHU Xiaodong

(Physical Education College of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450044, China)

Abstract: By detecting serum creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) levels and skeletal muscle superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA) and using Western blot to detect the expression of p38MAPK and ERK protein in skeletal muscle, the protective effect of pueraria flavonoids on oxidative damage of skeletal muscle in high-intensity exercise rats and possible mechanism were studied. The results showed that compared with the quiet control group, the exercise control group demonstrated significantly ($P < 0.01$) reduced exhaustion time, SOD and GSH-Px activities, and significantly ($P < 0.01$) increased CK, LDH activities and MDA, p38MAPK, and ERK protein levels. After intra-gastric administration of pueraria flavonoids before exercise, the exhausted exercise time of the rats in low, medium and high dosage group was increased, and the activity of SOD and GSH-Px were increased significantly. The activity of CK, LDH and MDA in the low, middle and high dosage groups decreased significantly ($P < 0.05$), while the expression of p38MAPK and ERK decreased significantly ($P < 0.05$). It demonstrated that pueraria flavonoids can improve oxidative stress level of exercise-induced fatigue rats, alleviate the injury of skeletal muscle caused by exercise, and improve the exercise potential of rats, by down-regulating p38 MAPK and ERK proteins to inhibit the over-activation of p38 MAPK and ERK signaling pathways.

Key words: pueraria flavonoids; intensive exercise; skeletal muscle injury; oxidative stress; mechanism

(责任编辑:赵勇)