

网络出版时间:2015-10-13 08:46

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.11.004

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20151013.0846.008.html

地鳖虫提取物对大鼠运动能力和骨骼肌 抗氧化酶活性的影响

高颖晖^{a,b},周万红^b,马 贺^a,戚一曼^a,王 敦^a

(西北农林科技大学 a 应用昆虫学重点实验室,b 体育部,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨补充地鳖虫提取物对大鼠运动能力、骨骼肌抗氧化酶表达水平及活性的影响,以明确其作为运动补剂的可能性。【方法】对大负荷游泳训练大鼠按各组平均体质量的 0.5、1.0 和 1.5 g/kg 剂量分别补充地鳖虫提取物,在 8 周大负荷训练结束后测定大鼠力竭游泳时间、骨骼肌抗氧化酶活性及其原因表达水平。【结果】8 周大负荷训练后,与单纯大负荷运动组相比,补充地鳖虫提取物组大鼠运动能力显著提高,其骨骼肌 SOD、CAT、GST 3 种抗氧化酶活性均显著增加,同时 3 种抗氧化酶编码基因的表达水平也显著上调。【结论】补充地鳖虫提取物能够显著提高大鼠运动能力和骨骼肌抗氧化酶活性,其可能的机理是地鳖虫提取物上调了抗氧化酶编码基因的表达水平。

【关键词】 地鳖虫提取物;运动大鼠;运动能力;骨骼肌抗氧化酶;表达水平;酶活性

【中图分类号】 G804.7

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)11-0024-05

Effects of ethanol extract from *Eupolyphaga sinensis* on sports performance and activities of antioxidant enzymes in skeletal muscle of rats

GAO Ying-hui^{a,b}, ZHOU Wan-hong^b, MA He^a, QI Yi-man^a, WANG Dun^a

(a Key Lab of Applied Entomology, b Department of P E, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The effects of ethanol extract from *Eupolyphaga sinensis* (EEES) on sports performance and activities and expression levels of antioxidant enzymes in skeletal muscle of exercised rats were analyzed to investigate the possibility of using it as sports supplement. 【Method】 The EEES was supplemented to exercised rats at three dose levels of 0.5, 1.0 and 1.5 g/kg. The exhaustive swimming time, and activities and encoded genes expression levels of antioxidant enzymes in skeletal muscle were measured after eight weeks training. 【Result】 The exhaustive swimming time of rats supplemented with EEES increased significantly compared to non-supplemented training rats ($\alpha=0.05$). The activities of SOD, CAT and GST of EEES supplemented rats were increased significantly compared to non-supplemented training rats. Meanwhile, the expression levels of encoded genes of the three enzymes were up-regulated as well. 【Conclusion】 The exercise performance and antioxidant enzymes activities in skeletal muscle were improved by EEAC supplementation, which is possibly due to the improvement of encoded gene expression levels by EEAC supplementation *in vivo*.

【收稿日期】 2015-04-24

【基金项目】 国家自然科学基金项目(30500391)

【作者简介】 高颖晖(1973—),女,陕西西安人,讲师,硕士,主要从事运动生理生化研究。E-mail:yinghuigao@aliyun.com

【通信作者】 王 敦(1973—),男,青海西宁人,教授,博士,主要从事生化与分子生物学研究。E-mail:wanghande@nwsuaf.edu.cn

Key words: ethanol extract of *Eupolyphaga sinensis*; exercised rat; exercise performance; antioxidant enzymes in skeletal muscle; expression level; enzyme activity

地鳖虫(*Eupolyphaga sinensis*),又名土元、蟪虫、土鳖等,是常用的昆虫源中药材,其生药为蜚蠊目鳖蠊科昆虫地鳖虫的雌虫干燥虫体。目前该虫已完全实现了人工养殖。地鳖虫的药用记载最早见《神农本草经》,描述其具有“主心腹寒热洗洗,血积癥瘕,破坚,下血闭”等作用^[1]。在《本草纲目》中也有“行产后血积、折伤瘀血、小儿腹痛夜啼”等医效记载^[2]。现代医学研究发现,地鳖虫具有促进动物骨骼再生、抗凝、调节血脂、抗脂质过氧化等作用;临床研究也有类似发现;特别是其能够提高人体含硒谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性^[3-5]。除药用外,地鳖虫还被开发为功能性食品,例如肴“油煎银鳖”、地鳖虫氨基酸口服液等^[6],说明地鳖虫具有开发为功能食品或补剂的潜力。本研究在分析地鳖虫浸膏的动物抗氧化作用基础上,探索该浸膏抗氧化酶编码基因表达水平的体外调控机理,旨在明确其作为运动补剂的可能性,为深入利用药用昆虫资源提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 试验动物为雄性 SD 大鼠共 50 只,平均体质量 240 g/只,购自西安交通大学医学院医学试验动物中心。大鼠被随机分为 5 组进行室内饲养:通风、自然光照、22~24 ℃,自由饮水进食、大鼠标准混合饲料喂养。

1.1.2 昆虫材料及其浸膏制备 地鳖虫(*Eupolyphaga sinensis*),购自西安中药材公司。将购回的地鳖虫放于 60 ℃干燥箱中干燥 8 h,充分干燥后粉碎、过 20 目筛(孔径 900 μm),均匀混和后密封保存。上述粉碎的地鳖虫材料用常温常压冷浸法^[7-8]提取,萃取液旋蒸获得浸膏(以下简称为 EE-ES)。浸膏溶解于分析纯乙醇溶液中,配制成质量浓度为 1.0 g/mL 的溶液,2 ℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 训练方法 5 组大鼠适应性喂养 1 周,剔除生长不良和体质量偏差较大的个体,重新随机分为 4 组(每组 10 只),按照任启俊等^[7]的运动方案进行训练。对照组(CK)灌服 5%乙醇水溶液 10 mL,其他试验组在每次训练后按各组平均体质量 0.5、1.0 和 1.5 g/kg 分别灌服地鳖虫提取物。于第 8 周训

练最后一天,各组小鼠进行力竭游泳,力竭运动开始试验时按大鼠体质量的 8%为负重负荷,以大鼠沉入水中 10 s 不能浮出水面为力竭标准。

1.2.2 样品处理 大鼠最后一次运动训练结束后颈椎脱臼处死,立即切取其大腿部位骨骼肌,用冰浴预冷的生理盐水冲洗 1 次,滤纸吸除骨骼肌表面水分,加入液氮、冰浴研磨,每组肌肉样品取 3 g 用于 RNA 制备(每个处理 3 个重复、每个重复 1 g 样品),其余样品用生理盐水制成 100 g/L 匀浆液,4 000 r/min、4 ℃离心 10 min 后将上清液转移入灭菌离心管中,置于-80 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 酶活性的测定 过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽转移酶(GST)活性测定均采用试剂盒(南京建成生物工程研究所)完成。

1.2.4 RT-PCR 分析 取 1.2.2 节制备的各组肌肉样品,分别用 Trizol 提取总 RNA 后,立即采用试剂盒 RT reagent Kit Perfect Real Time (TaKaRa)进行反转录获得 cDNA,cDNA 用于后续检测。3 种抗氧化酶的 RT-PCR 检测采用 20 μL 体系:其中 SYBR Premix Ex Taq II 反应液 10 μL,引物各 0.8 μL,模板 DNA 2.0 μL,双蒸水 6.4 μL。RT-PCR 反应条件:阶段 I 为 95 ℃ 30 s,1 个循环;阶段 II 为 95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,共 40 个循环;阶段 III 为 65 ℃ 15 s。检测仪器为 iCycler iQ5 RT-PCR 仪(Bio-Rad)。3 个基因检测引物序列如下。

β-actin-F:GAAATTGTGCGCGACATCAAGGA;

β-actin-R:GCAATGCCCGGGTACATGGTGGT;

CAT-F:ACAAGGCAATCCAGTCTATT;

CAT-R:AATCGTCCAACAGGTATCAA;

GST-F:GGGCATCTGAAACCTTTTGA;

GST-R:GAGCCACATAGGCAGAGAGC;

SOD-F:GCCTTGACTCTCCTGTAC;

SOD-R:GCTCGTCCTATTATAGAATGTG。

表达量分析采用目的基因与内参基因(*βactin*)表达量的倍数比值表示。

1.3 数据分析

分析用试验数据均为 3 次重复的平均值,采用 SPSS(12.0)软件对试验数据进行单因素 *t* 检验,显著性水平设置为 $\alpha=0.05$ 的显著和 $\alpha=0.01$ 的极显著。采用 EXCEL 制表,采用 GraphPad Prism 5 制图。

2 结果与分析

2.1 地鳖虫提取物对运动训练大鼠运动能力的影响

表 1 显示,与单纯大负荷运动组(CK)力竭运动时间相比,补充地鳖虫提取物均能显著延长大鼠大负荷运动时间,且该时间的增加与提取物添加水平呈正相关。

表 1 地鳖虫提取物对大鼠力竭游泳时间的影响
Table 1 Effects of EEES on exhaustive swimming time of exercised rats

提取物添加水平/(g·kg ⁻¹) Supplemental level of EEES	游泳力竭时间/min Exhaustive swimming time
0(CK)	48.24±4.68 a
0.5	57.15±3.99 b
1.0	60.60±4.31 b
1.5	62.03±7.20 b

注:同列数据后标不同小写字母表示差异显著,标不同大写字母表示差异极显著。下表同。

Note: Different lowercase letters in each column mean significant difference compared to CK ($\alpha=0.05$), and different capital letters mean very significant difference compared to CK ($\alpha=0.01$). The same below.

2.2 地鳖虫提取物对运动训练大鼠肌肉抗氧化酶活性的影响

由表 2 可知,与单纯大负荷运动组(CK)相比,在地鳖虫提取物 0.5 g/kg 的添加水平,大负荷运动补充地鳖虫提取物试验组 SOD、CAT 和 GST 活性

显著升高;当地鳖虫提取物在 1.0 g/kg 的添加水平以上时,SOD、CAT 和 GST 活性均极显著升高。表明大负荷运动大鼠补充地鳖虫提取物后,其肌肉抗氧化酶活性均有显著提高,并存在显著的剂量相关性。

2.3 地鳖虫提取物对运动训练大鼠骨骼肌抗氧化酶基因表达水平的影响

由图 1 可知,与单纯大负荷运动组(CK)相比,地鳖虫提取物 0.5 g/kg 的添加水平时,补充地鳖虫提取物试验组 SOD 表达水平显著升高;当地鳖虫提取物在 1.0 g/kg 的添加水平以上时,SOD 表达水平极显著升高。该结果说明大运动训练的试验动物在补充地鳖虫提取物后,其 SOD 基因表达水平显著提高,且与地鳖虫提取物的添加剂量呈正相关。与单纯大负荷运动组(CK)相比,补充地鳖虫提取物在 0.5 g/kg 添加水平时,CAT 表达水平略微升高,差异不显著;当地鳖虫提取物的补充水平增加至 1.0 g/kg 以上时,CAT 表达水平极显著升高。与单纯大负荷运动组(CK)比较,补充地鳖虫提取物试验组在 0.5 g/kg 添加水平时,GST 表达水平显著升高,并持续到补充剂量达到 1.0 g/kg 时,当地鳖虫提取物的添加水平增加至 1.5 g/kg 时,GST 的表达水平极显著升高。说明地鳖虫对于运动大鼠 GST 表达水平的上调作用与其补充剂量呈正相关。

表 2 地鳖虫提取物对大鼠抗氧化酶活性的影响
Table 2 Effects of EEES on antioxidant enzyme activities of exercised rats

提取物添加水平/(g·kg ⁻¹) Supplemental level of EEES	SOD	CAT	GST
0(CK)	93.2±5.5 aA	7.7±0.4 aA	39.5±2.8 aA
0.5	151.2±9.6 bA	9.9±1.1 bA	46.1±3.2 bA
1.0	196.1±12.3 bB	11.7±0.8 bB	56.6±3.9 bB
1.5	221.3±17.9 bB	15.2±1.5 bB	68.6±6.3 bB

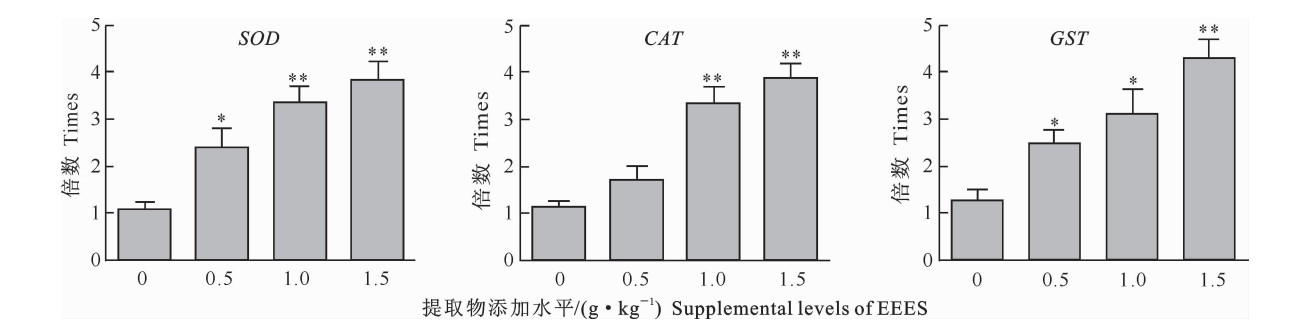


图 1 地鳖虫提取物对大鼠骨骼肌 3 种抗氧化酶基因表达水平的影响
* 表示差异显著($\alpha=0.05$), ** 表示差异极显著($\alpha=0.01$)
Fig. 1 Effects of EEES on expression levels of genes of three antioxidant enzymes in muscle of exercised rats
* means significant difference ($\alpha=0.05$) and ** means very significant difference ($\alpha=0.01$)

3 讨 论

关于地鳖虫的药理作用研究发现,地鳖虫提取物的抗凝作用与其纤溶活性蛋白组分相关^[9],而这类纤溶活性蛋白被证明具有一定的抗癌活性^[10-12]。另外,也有研究报道地鳖虫粗提物具有显著的抗氧化作用^[13]。本研究进一步采用动物试验证明了地鳖虫的抗氧化作用,并且其抗氧化作用与其对试验动物抗氧化酶编码基因的上调存在相关性。同时,本研究还发现补充地鳖虫提取物能够显著提高运动大鼠的运动能力,推测这种促进作用可能与抗氧化酶对大负荷运动产生过氧化物的清除作用有关。动物在剧烈运动的情况下引起体内自由基大幅增加,从而能够引起肌细胞伤害并影响运动能力^[14]。因此,国内外许多研究都采用天然自由基拮抗物质作为抗氧化功能增进剂或运动恢复补剂^[15-19]。本研究发现地鳖虫提取物不仅能够明显延长大鼠游泳力竭时间、提高抗氧化酶活性,而且能够提高 3 种抗氧化酶编码基因的表达水平。因此推测其可能的机理之一是,地鳖虫提取物上调了运动大鼠肌肉中抗氧化酶编码基因的表达水平,从而显著提高试验动物骨骼肌 SOD、CAT、GST 的活性,达到有效对抗肌肉细胞内的过氧化反应和延缓运动疲劳发生的作用。

4 结 论

大负荷运动训练大鼠补充一定量地鳖虫提取物后,其运动能力显著提高,骨骼肌中 3 种抗氧化酶活性均显著升高,同时 3 种抗氧化酶的编码基因表达水平也有显著升高。说明地鳖虫提取物对运动大鼠运动能力的提高与其抗氧化功能相关,这种促进作用可能的机理之一是,地鳖虫提取物上调了这些抗氧化酶编码基因的表达水平。

[参考文献]

- [1] 宋永刚. 神农本草经讲读 [M]. 北京: 中国中医出版社, 2012.
Song Y G. An introduction for the divine farmer's materia medica [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2012. (in Chinese)
- [2] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
Li S Z. Compendium of materia medica [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1979. (in Chinese)
- [3] 田军鹏, 黄 文, 雷朝亮. 地鳖虫药理作用研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 418-419.
Tian J P, Huang W, Lei C L. Progress of the pharmacological actions of *Eupolyphaga sinensis* Walker [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 17(3): 418-419. (in

- Chinese)
- [4] 唐庆峰, 吴振廷, 王学林, 等. 地鳖虫人工饲养和食用、药用研究进展 [J]. 经济动物学报, 2005, 9(1): 57-62.
Tang Q F, Wu Z T, Wang X L, et al. Advances on rearing method and nutritive, medicine value of *Eupolyphaga seuesteleophaga* [J]. Journal of Economic Animal, 2005, 9(1): 57-62. (in Chinese)
- [5] 彭利伟, 杨海新. 中药土鳖虫对兔下颌骨牵张成骨作用的研究 [J]. 中华整形外科杂志, 2013, 29(2): 125-130.
Peng L W, Yang H X. Effect of *Eupolyphaga sinensis* Walker on mandibular distraction osteogenesis in rabbits [J]. Chinese Journal of Plastic Surgery, 2013, 29(2): 125-130. (in Chinese)
- [6] 李岗生, 同芝芬, 郭延军, 等. 地鳖虫 [M]. 北京: 中国中医出版社, 2000.
Li G S, Yan Z F, Guo Y J, et al. *Eupolyphaga sinensis* [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2000. (in Chinese)
- [7] 任启俊, 刘保康, 窦 鹏, 等. 九香虫醇提物对大鼠运动能力及骨骼肌抗氧化酶系的影响 [J]. 西北农业学报, 2013, 22(12): 170-173.
Ren Q J, Liu B K, Dou P, et al. The effects of ethanol extract *Aspongopus chinensis* on antioxidant enzymes in skeletal muscle and exercise performance of rats [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2013, 22(12): 170-173. (in Chinese)
- [8] 王俊儒. 天然产物提取分离与鉴定技术 [M]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2004.
Wang J R. Isolation and identification of natural product extraction technology [M]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University Press, 2004. (in Chinese)
- [9] 李兴暖, 韩雅莉. 地鳖虫纤溶活性蛋白组分抑制血管的生成 [J]. 动物学报, 2007, 53(1): 135-142.
Li X N, Han Y L. Antiangiogenesis of fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis* Walker [J]. Acta Zoologica Sinica, 2007, 53(1): 135-142. (in Chinese)
- [10] 李兴暖, 牛 力, 赵 勇. 地鳖虫纤溶活性蛋白组分抑制肿瘤作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1149-1151.
Li X N, Niu L, Zhao Y. Anti-tumor effects of fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis* Walker [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2011, 22(5): 1149-1151. (in Chinese)
- [11] 余 磊, 韩雅莉. 地鳖虫纤溶酶的三维结构模拟与序列分析 [J]. 湖北农业科学, 2014, 53(5): 1185-1188.
Yu L, Han Y L. The simulation of 3D-structure and sequence analysis of fibrinolysin from *Eupolyphaga sinensis* Walker [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(5): 1185-1188. (in Chinese)
- [12] 刘 浩, 韩雅莉, 丁 鸿, 等. 地鳖纤溶蛋白对荷 S180 和 H22 小鼠的抑瘤作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2140-2142.
Liu H, Han Y L, Ding H, et al. The antitumour effect of *Eupolyphaga fibrinolytic* protein on S180 and H22 *in vivo* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21

(9);2140-2142. (in Chinese)

[13] 张 璐,朴美子,王 莹,等. 地鳖虫酶解液体外抗氧化作用的研究 [J]. 食品研究与开发,2010,31(3):159-162,166.
Zhang L,Piao M Z,Wang Y,et al. Study on antioxidation activity of hydrolysates from *Eupoliphaga sinensis* Walker *in vitro* [J]. Food Research and Development,2010,31(3):159-162,166. (in Chinese)

[14] 郭世炳,句海松. 运动与氧自由基损伤 [J]. 中国运动医学杂志,1990,9(3):161-166.
Guo S B,Ju H S. Sports and injury by radical oxygen [J]. Chinese Journal of Sports Medicine,1990,9(3):161-166. (in Chinese)

[15] 张 漓,徐建方,冯连世,等. 补充左旋精氨酸对耐力训练大鼠股外肌抗氧化酶系的影响 [J]. 中国运动医学杂志,2007,26(3):308-312.
Zhang L,Xu J F,Feng L S,et al. Effect of supplementation of exogenous L-Arg on the antioxidant enzymes in vastus lateralis of rats undergoing endurance training [J]. Chinese Journal of

Sports Medicine,2007,26(3):308-312. (in Chinese)

[16] 高颖晖,周万红,曹 军,等. 昆虫壳聚糖对运动训练大鼠肝脏抗氧化酶系与 SOD 基因表达的影响 [J]. 体育科学,2011,35(5):75-78.
Gao Y H,Zhou W H,Cao J,et al. The effects of insect chitosan on antioxidant enzymes and SOD gene expression in liver of exercise rats [J]. China Sport Science,2011,35(5):75-78. (in Chinese)

[17] Elena M,Loana L,Nicoleta B. New approach to prepare willow bark extract-lipid based nanosystems with enhanced antioxidant activity [J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology,2015,15(6):4080-4089.

[18] Sana O B,Nakako K,Yoshihiro K. Water-soluble extracts from defatted sesame seed flour show antioxidant activity *in vitro* [J]. Food Chemistry,2014,175(5):306-314.

[19] Lim S J,Aida W W M,Maskat M Y,et al. Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds [J]. Food Hydrocolloids,2014,42(S1):280-288.

《植物遗传资源学报》征订启事

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物科学研究所和中国农学会主办的学术期刊,为中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(核心期刊)、中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,又被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、中文科技期刊数据库收录。据中信所 2014 年期刊学术影响因子年报统计,《植物遗传资源学报》影响因子为 1.146(综合影响因子 1.396),在全国农艺和园艺类期刊中排名第 5,在全国 1 998 种科技核心期刊中排名第 157 位。

报道内容为大田、园艺作物,观赏、药用植物,林用植物、草类植物及其一切经济植物的有关植物遗传资源基础理论研究、应用研究方面的研究成果、创新性学术论文和高水平综述或评论。诸如,种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新,信息学、管理学等;起源、演化、分类等系统学;基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究。

双月刊,大 16 开本,196 页。定价 20 元,全年 120 元。各地邮局发行。
邮发代号:82-643。国内刊号 CN 11-4996/S,国际统一刊号 ISSN 1672-1810。
本刊编辑部常年办理订阅手续,如需邮挂每期另加 3 元。
地 址:北京市中关村南大街 12 号《植物遗传资源学报》编辑部
邮 编:100081 电 话:010-82105794;010-82105796(兼传真)
网 址:www.zwyczy.cn
E-mail:zwyczyxb2003@163.com;zwyczyxb2003@caas.cn