

羊栖菜多糖对小鼠抗疲劳作用的研究

吴越¹, 曲敏², 佟长青², 李伟^{1,2}, 于涛^{1,*}

(1.东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040;
2.辽宁省水产品加工及综合利用重点开放实验室, 大连海洋大学食品科学与工程学院, 辽宁大连 116023)

摘要: 研究羊栖菜多糖对小鼠的抗疲劳作用, 对于开发利用羊栖菜资源具有重要意义。通过对小鼠灌胃不同剂量的羊栖菜多糖(50、150mg/mL·d), 经15d后测定小鼠体重、负重游泳力竭时间、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肝糖原、肌乳酸及血清尿素的含量, 研究羊栖菜多糖抗疲劳作用机理。结果表明, 羊栖菜多糖对小鼠体重增长无明显影响($p>0.05$), 但能明显延长小鼠负重游泳时间($p<0.01$), 增强小鼠血清SOD活性($p<0.01$), 提高肝糖原含量($p<0.01$), 降低血清MDA($p<0.05$)、肌乳酸($p<0.01, 0.05$)及血清尿素($p<0.01$)的含量。说明羊栖菜多糖具有抗疲劳的作用。

关键词: 羊栖菜, 多糖, 抗疲劳, 小鼠

Study on the effect of polysaccharide from *Hizikia fusiformis* of anti-fatigue of mice

WU Yue¹, QU Min², TONG Chang-qing², LI Wei^{1,2}, YU Tao^{1,*}

(1.Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration in Oil Field, Ministry of Education; Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;
2.College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Abstract: The aim of this study was to develop whether the polysaccharides extracted from *H. fusiformis* have the anti-fatigue effect on mice. It was important for the further development of *H. fusiformis*. The weight, loading swimming time, the activities of blood SOD, the content of blood MDA, liver glycogen, muscle lactic acid, the content of blood urea nitrogen were measured after 15 days through being given different doses (50、150mg/mL·d) of the polysaccharides to mice. The result showed there was no significant difference on the body weights between control and polysaccharides fed mice ($p>0.05$). However, the loading swim time ($p<0.01$), the activity of SOD ($p<0.01$) and the concentration of liver glycogen ($p<0.01$) were enhanced, while the concentration of MDA ($p<0.01$), muscle lactic acid ($p<0.01, 0.05$), and urea in blood ($p<0.01$) were decreased. In conclusion, the polysaccharides extracted from *H. fusiformis* do had anti-fatigue effect on mice.

Key words: *Hizikia fusiformis*; polysaccharide; anti-fatigue; mouse

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0350-03

羊栖菜(*Hizikia fusiformis*)是浙江省洞头县所特有的重要经济藻类。羊栖菜中含有大量的生物活性物质,如多糖、多酚类、甾醇类物质^[1-2],其中对于羊栖菜多糖的研究比较系统深入。蒋定文等^[3]报道了采用水煮醇沉法、酸煮醇沉法及乙醇脱脂后,水煮醇沉法提取羊栖菜多糖及分子筛法纯化羊栖菜多糖。梅雪樵等^[4]研究了羊栖菜多糖提取过程中的氯化钙分级、乙醇分级过程。唐志红等^[5]研究了采用微波方法提取羊栖菜多糖的工艺。对羊栖菜多糖生物活性的研究表明,羊栖菜多糖具有多种生物活性。季宇彬等^[6]对羊栖菜多糖抑制小鼠肿瘤细胞p53基因蛋白表达进

行了研究,发现了羊栖菜多糖可以显著诱导小鼠肿瘤细胞野生型p53蛋白的积累。岑颖洲等^[7]发现了羊栖菜多糖对单纯疱疹病毒I型(HSV-1)和柯萨奇病毒(CVB₃)的抑制作用。张胜帮等^[8]报道了羊栖菜多糖对羟自由基的清除活性。严全能等^[9]观察了羊栖菜多糖提高小鼠胸腺指数、小鼠NK细胞杀伤活性及腹腔巨噬细胞的吞噬活性的作用。综上所述,对于羊栖菜多糖抗肿瘤、抗病毒、抗氧化及调节免疫的活性都有较深入的研究,但迄今为止,还没有关于羊栖菜多糖抗疲劳作用的报道。本文利用小鼠进行羊栖菜多糖抗疲劳实验,发现羊栖菜多糖具有抗疲劳作用,可以作为保健食品来进行开发。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

羊栖菜 2010年5月采自浙江省洞头县;羊栖菜

收稿日期:2012-10-10 * 通讯联系人

作者简介:吴越(1988-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:国家自然科学基金(31070322)。

多糖 自制;昆明种小鼠 清洁级,体重16~18g,由大连医科大学动物中心提供,许可证号SCXK(辽)2008-0002;超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(生产批号20120827)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(生产批号20120823)、肝糖原测定试剂盒(生产批号20120828)、尿素氮(BUN)测定试剂盒(生产批号20120809)、乳酸(LD)测定试剂盒(生产批号20120822) 购于南京建成生物研究所。

高效液相色谱 美国Waters公司;MultiskonAscen型酶标仪 德国Thermo公司;ME-1树脂柱 天津瑞欧生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 羊栖菜多糖的制备 在Zvyagintseva等^[10]方法的基础上进行修改后制备:即将羊栖菜粉用乙醇和丙酮脱脂后,用60~70℃热水浸提,所得的浸提液上疏水ME-1树脂柱,水洗,收集水洗液以80%乙醇沉淀,得到羊栖菜多糖。所得的羊栖菜多糖经三氟乙酸酸解,以3-甲基-1-苄基-2-吡啶啉-5-酮(PMP)衍生后用高效液相色谱(HPLC)分析^[11],羊栖菜多糖为由岩藻糖、半乳糖和甘露糖(其摩尔比为8:7:5)组成的水溶性多糖。

1.2.2 实验动物分组及给药 昆明种小鼠27只,按其质量随机将小鼠分为3组:对照组和羊栖菜多糖低、高剂量组,每组9只。在实验条件下适应喂养3d后开始灌胃。每天灌胃羊栖菜多糖溶液1次,连续15d,浓度分别为50、150mg/mL·d,每个剂量组每天按剂量0.1mL/16g体重灌胃,对照组灌服相同体积生理盐水。

1.2.3 小鼠负重游泳实验 小鼠连续灌胃15d,末次灌胃30min后,在小鼠尾部负重其体重5%的铅丝,让其在恒温水槽中进行游泳,水槽深度为30cm,水温(25±2)℃。记录从小鼠开始沉入水面下10s后不能浮出水面的时间,此时间即为游泳力竭时间^[12]。

1.2.4 小鼠血清SOD、MDA、肝糖原含量的测定 小鼠连续灌胃15d,末次灌胃30min后,让小鼠自由游泳5min取出,断头取血。血样于冰箱中静置后,3500r/min离心10min,取上清液,分别按照SOD测定试剂盒MDA测定试剂盒说明书方法测定血清中SOD和MDA含量^[13]。

取出小鼠肝脏,用生理盐水冲洗干净,用滤纸吸干后准确称量0.1g肝脏,加入2mL TCA匀浆,将匀浆在5000r/min条件下离心20min,取上清液,按照肝糖原测定试剂盒说明书方法测定肝糖原含量^[13]。

1.2.5 小鼠肌乳酸、血清尿素含量的计算 取出小鼠后腿肌肉0.1g,用生理盐水匀浆,将匀浆5000r/min离心20min,取上清液,按照LD测定试剂盒说明书方法测定LD。按照BUN测定试剂盒说明书方法测定1.2.4中断头取血所得的血清中BUN含量。

1.2.6 统计分析 用SPSS13.0统计软件进行单因素方差分析处理, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异非常显著,数值以($\bar{x} \pm SD$)表示。

2 结果与讨论

2.1 羊栖菜多糖对小鼠负重游泳时间的影响

由表1可见,各组小鼠灌服羊栖菜多糖15d后,灌服羊栖菜多糖的小鼠体重略有变化,但变化不显著($p > 0.05$)。灌服羊栖菜多糖的各剂量组小鼠负重游泳时间显著高于对照组小鼠,其中低、高剂量组的小鼠游泳时间分别达到185.3、204min,极显著高于对照组的18.5min($p < 0.01$)。类似的游泳时间结果显著性差异较大现象,出现在黑果枸杞多糖对小鼠游泳时间的影响研究中^[14],其中黑果枸杞多糖中剂量组(50mg/kg/d)的小鼠游泳时间为(129.9±37.02)min,而对照组小鼠游泳时间为(61.4±18.22)min。小鼠游泳时间结果显著性差异较大的现象,应该是由个体差异造成的。小鼠灌服羊栖菜多糖后,其游泳时间能够延长,表明羊栖菜多糖具有延缓运动性疲劳出现时间的作用。羊栖菜多糖是否具有抗运动性疲劳的作用,还需由下面的生物化学指标测定来进行印证。

2.2 羊栖菜多糖对小鼠血清SOD、MDA、肝糖原的影响

从表2的数据可知,低、高剂量组小鼠血清中SOD活力分别比对照组升高17.8%、30.09%,其中低、高剂量组有极显著差异($p < 0.01$)。低、高剂量组小鼠血清中MDA含量分别比对照组降低19.04%、15.11%,为19.07U/mL和19.72U/mL。低、高剂量组小鼠肝糖原分别比对照组升高50.63%、62.50%。

运动可以引起脂质过氧化反应从而产生自由

表1 羊栖菜多糖对小鼠负重游泳时间的影响

Table 1 Effect of polysaccharide from *H. fusiformis* on loaded swimming time of mice

组别	剂量(mg/kg)	小鼠(n)	初始体重(g)	终体重(g)	游泳时间(min)
对照组	0	9	17.04±0.57	24.09±1.53	18.50±8.74
低剂量组	50	9	17.03±0.59	24.20±1.51	185.33±65.62*
高剂量组	150	9	17.13±0.45	22.55±2.1	204.00±86.81*

注:*,与对照组相比,差异显著($p < 0.05$);**,与对照组相比,差异极显著($p < 0.01$);表2、表3同。

表2 羊栖菜多糖对小鼠血清SOD、MDA、肝糖原的影响

Table 2 Effect of polysaccharide from *H. fusiformis* on SOD, MDA and liver glycan of mice

组别	剂量(mg/kg)	小鼠(n)	血清SOD(U/mL)	血清MDA(U/mL)	肝糖原(mg/g)
对照组	0	9	113.68±9.04	22.70±1.52	29.17±4.16
低剂量组	50	9	134.49±6.88*	19.07±0.75**	43.94±2.87*
高剂量组	150	9	147.89±6.93*	19.72±3.46**	47.40±3.74*

基, 自由基对肌肉细胞造成损害, 从而产生疲劳^[13]。SOD可以清除体内的自由基, 从而降低疲劳的程度。灌服羊栖菜多糖的小鼠血清中SOD含量显著增加, 因此有助于减少自由基的堆积, 延缓疲劳。MDA是脂质自由基氧化产物之一^[14]。灌服羊栖菜多糖的小鼠血清中MDA含量的减少, 也表明羊栖菜多糖有助于降低自由基氧化过程, 抵抗机体的疲劳。肝糖原储备是机体抵抗疲劳的重要物质基础。运动需要分解糖原来为机体提供能量。因此, 肝糖原储备越多, 机体抗疲劳能力越强。灌服羊栖菜多糖的小鼠肝脏中, 糖原显著高于对照组。因此, 灌服羊栖菜多糖的小鼠延缓了疲劳的出现。

2.3 羊栖菜多糖对小鼠肌乳酸含量及血清尿素的影响

从表3的数据可知, 低、高剂量组小鼠肌乳酸含量分别比对照组降低20.9%、32.2%, 低剂量组有显著差异($p < 0.05$), 高剂量组有极显著差异($p < 0.01$)。低、高剂量组小鼠血清尿素含量分别比对照组降低40.9%、62.0%, 低、高剂量组与对照组存在极显著差异($p < 0.01$)。

动物剧烈运动后, 无氧糖酵解过程产生的乳酸堆积, 是产生疲劳的一个重要原因^[16]。灌服羊栖菜多糖的低、高剂量组肌乳酸明显堆积程度小于对照组, 提示羊栖菜多糖具有加速乳酸清除代谢的作用。血清中尿素含量随着运动负荷的增加而增加, 机体对负荷适应能力越强, 血清中尿素含量就越少^[17]。实验结果表明, 灌服羊栖菜多糖的低、高剂量组血清中尿素含量显著低于对照组, 提示羊栖菜多糖可以提高小鼠运动负荷能力, 抵抗疲劳。

表3 羊栖菜多糖对小鼠肌乳酸含量及血清尿素的影响

Table 3 Effect of polysaccharide from *H. fusiformis* on blood lactic acid and serum urea nitrogen of mice

组别	剂量 (mg/kg)	小鼠 (n)	肌乳酸含量 (mmol/L)	血清尿素 (mg/L)
对照组	0	9	12.74±0.44	180.00±7.71
低剂量组	50	9	10.54±0.24**	127.74±11.59**
高剂量组	150	9	9.64±0.71*	111.12±4.64**

3 结论

多糖类物质抗疲劳作用的研究已经有很多报道, 彭梅等^[18]研究了土党参多糖对小鼠抗疲劳作用, 发现了土党参多糖具有增加小鼠游泳耐力、降低血乳酸、血清尿素氮和增加肝糖原的作用; 汪建红等^[14]研究了黑果枸杞果实多糖抗疲劳的机制, 但对于羊栖菜多糖抗疲劳作用未见报道。本文对小鼠灌胃不同剂量的羊栖菜多糖后, 进行了小鼠负重游泳实验, 同时检测其生物化学指标研究羊栖菜多糖抗疲劳作用。研究表明, 羊栖菜多糖具有增加小鼠游泳耐力($p < 0.01$)、小鼠血清中SOD($p < 0.01$)、肝糖原($p < 0.01$)活力, 降低血清中MDA($p < 0.05$)、尿素($p < 0.01$)、肌乳酸($p < 0.01$ 、 0.05)的作用。因此, 羊栖菜多糖可以用于抗疲劳保健食品的开发。

参考文献

- [1] Zhu T, Heo H J, Row K H. Optimization of crude polysaccharides extraction from *Hizikia fusiformis* using response surface methodology [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82: 106-110.
- [2] Kim H-J, Choi J-I, Kim D-J, et al. Effect of ionizing radiation on the physiological activities of ethanol extract from *Hizikia fusiformis* cooking drips [J]. Applied Radiation and Isotopes, 2009, 67: 1509-1512.
- [3] 蒋定文, 沈先荣, 贾福星, 等. 羊栖菜多糖的提取及纯化 [J]. 食品科学, 2007, 28(12): 136-138.
- [4] 梅雪樵, 王璐, 李浩田. 羊栖菜多糖的提取及氯化钙分级、乙醇分级的研究 [J]. 中国药业, 2009, 18(10): 27-28.
- [5] 唐志红, 吕家森, 贾晓晨, 等. 羊栖菜多糖微波提取工艺的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(10): 2240-2242.
- [6] 季宇彬, 高世勇, 孔琪, 等. 羊栖菜多糖对肿瘤细胞P53基因蛋白表达的影响 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2001, 17(2): 1-3.
- [7] 岑颖洲, 王凌云, 马夏军, 等. 羊栖菜多糖体外抗病毒作用研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(5): 765-768.
- [8] 张胜帮, 麻卫锋, 于萍. 羊栖菜多糖提取分离及其清除自由基的活性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(18): 192-195.
- [9] 严全能, 陈均忠, 陈晓文, 等. 羊栖菜多糖的分离纯化及其对小鼠免疫功能的影响 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(12): 2046-2048.
- [10] Zvyagintseva T N, Shevchenko N M, Popivnich I B, et al. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds [J]. Carbohydrate Research, 1999, 322: 32-39.
- [11] Fu D, O'Neill RA. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography [J]. Analytical Biochemistry, 1995, 227: 377-384.
- [12] Shimizu T, Hoshino H, Nishi S, et al. Anti-fatigue effect of dicethiamine hydrochloride is likely associated with excellent absorbability and high transformability in tissues as a vitamin B₁ [J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 635: 117-123.
- [13] Jia R, Cao L, Xu P, et al. In vitro and in vivo hepatoprotective and antioxidant effects of Astragalus polysaccharides against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2012, 38(3): 871-881.
- [14] 杨波, 张钧. 氧自由基脂质过氧化反应致运动性疲劳的机制研究 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(4): 188-190.
- [15] 汪建红, 陈晓琴, 张蔚俊. 黑果枸杞果实多糖抗疲劳生物功效及其机制研究 [J]. 食品科技, 2009, 34(2): 203-207.
- [16] 罗琼, 阎俊, 李瑾伟, 等. 枸杞多糖粗品与纯品抗疲劳作用的比较 [J]. 营养学报, 1999, 21(3): 310-317.
- [17] 缪福俊, 熊智, 吴本行, 等. 驴骨蛋白多肽对小白鼠抗疲劳作用的研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(11): 411-413.
- [18] 彭梅, 张振东, 杨娟. 土党参多糖对小鼠的抗疲劳作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(19): 224-226.