

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.05.016

黄芪总皂苷对运动性疲劳大鼠海马功能和形态的影响

冯毅¹, 许金叶¹, 赵自明², 刘少斌¹, 荆纯祥¹, 汶希¹, 潘华山^{*}

(1. 广州中医药大学, 广东省广州市番禺区广州大学城外环东路 232 号, 510006; 2. 广东省中医药工程技术研究院)

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2011B031600009)

摘要 **目的** 研究黄芪总皂苷抗运动性疲劳的可能作用机制。 **方法** 将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组和黄芪总皂苷组, 每组 12 只。黄芪总皂苷组灌胃黄芪总皂苷 50mg/kg, 模型组和空白组灌胃等量生理盐水, 每天 1 次。黄芪总皂苷组和模型组大鼠在灌胃 1 h 后进行水平跑台运动, 复制运动性疲劳大鼠模型, 每天 1 次, 连续 14 天。检测各组大鼠海马组织丙二醛 (MDA)、总抗氧化能力 (T-AOC)、乙酰胆碱脂酶 (TchE) 及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 表达; 光镜下观察海马形态学变化。 **结果** 与空白组比较, 模型组大鼠海马组织 MDA 含量升高, T-AOC 与 TchE 活性降低, caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比升高 ($P < 0.01$), 光镜下海马出现病理损伤改变。与模型组比较, 黄芪总皂苷组大鼠海马组织 MDA 含量降低, T-AOC 与 TchE 活性升高, caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比降低 ($P < 0.01$), 光镜下海马形态趋于正常。 **结论** 黄芪总皂苷抗运动性疲劳作用可能与其抑制运动氧化应激所致的自由基增加和改善海马神经元损伤有关。

关键词 黄芪总皂苷; 运动性疲劳; 海马; 神经元

运动性疲劳是一种典型的应激反应, 会造成中枢神经系统的缺血、缺氧性损害。实验证明, 由于力竭运动时大脑处于相对缺血、缺氧状态, 脑细胞自由基产生增加, 出现神经细胞线粒体钙超载, 并发生缺血、缺氧性损伤, 这些都是运动导致脑细胞凋亡的诱发因素^[1], 而海马是中枢神经系统中对应激及缺氧最敏感的组织之一, 因此运动性疲劳时海马极易因缺血缺氧而受损, 海马神经元细胞凋亡的增加必将诱导运动性中枢疲劳的产生^[2]。本研究通过观察黄芪有效成分黄芪总皂苷对运动性疲劳大鼠海马形态与功能的影响, 探讨其抗运动性疲劳的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只, 体重 180 ~ 220 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (粤) 2008 - 0002。

1.2 药品与试剂

黄芪总皂苷提取方法参照文献 [3], 由广东

省中医药工程技术研究院提取。丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: 20111028)、总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒 (批号: 20111030)、乙酰胆碱脂酶 (TchE) 试剂盒 (批号: 20111032)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 免疫组织化学试剂盒 (批号: 20111033) 均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 主要仪器

ZH-PT 动物实验跑台, 淮北正华生物仪器设备有限公司; TDL-5-A 型低速离心机, 上海金鹏分析仪器有限公司; 3K30G 型超速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; 722 分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; HH-6 型数显恒温水浴锅, 金坛市高华仪器有限公司; RM2135 型轮转式切片机、CM1850 冷冻切片机、TP1020 全自动组织脱水机、EG1140 石蜡包埋机、HI1210 摊片机和 HI1220 烘片机, 德国 Leica 公司; 光学显微镜及病理图像采集系统, 日本 Olympus 公司; Image Pro Plus 5.1 病理图像分析系统, 美国 MediaCybernetics 公司。

1.4 分组及模型建立

动物适应性饲养 2 天后, 采用随机数字表法分

* 通讯作者: phs681011@163.com, (020) 39358306

成正常组（等容积生理盐水）、模型组（等容积生理盐水）、黄芪总皂苷组（50 mg/kg），每组 12 只，每天灌胃 1 次，灌胃 1 h 后模型组与黄芪总皂苷组大鼠均进行水平跑台运动，每天 1 次，速度为 15 m/min，坡度 0°，跑台 20 min，间歇 40 min，再跑台 20 min，连续 14 天，复制运动性疲劳大鼠模型^[4]。

1.5 观察指标及方法

大鼠处死后，取大鼠全脑并分离海马，左侧海马置于冻存管中冻存，右侧海马置于中性福尔马林固定。取左侧海马匀浆，制成 0.1 mg/ml 的海马组织匀浆液，2500 r/min 离心 10 min，取上清，检测 MDA、T-AOC 与 TchE 活性，检测方法按照试剂盒说明书进行操作。取右侧海马组织，常规石蜡切片，尼氏体染色观察海马组织神经元形态学变化；TUNEL 免疫组织化学染色，检测 caspase-3 表达，观察 caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比，每张切片随机选取 5 个 400 倍视野，采用 Image Pro Plus 5.1 软件分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析，计量资料以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间均值的比较采用单因素方差分析，若方差齐组间均值两两比较采用 *S-N-K* 法，若方差不齐组间均值两两比较采用 *Dunnett T3* 法。

2 结果

2.1 各组大鼠海马组织 MDA 含量和 T-AOC 活性比较

表 1 示，与正常组比较，模型组海马组织 MDA 含量显著增加，T-AOC 活性显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄芪总皂苷组海马组织 MDA 含量显著降低，T-AOC 活性显著增强 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠海马组织 MDA 含量和 T-AOC 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDA (nmol/mg)	T-AOC (U/mgprot)
正常组	12	18.74 ± 5.61	29.67 ± 2.35
模型组	12	30.44 ± 4.48*	19.48 ± 1.42*
黄芪总皂苷组	12	20.21 ± 4.09 [△]	27.37 ± 2.23 [△]

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠海马组织 TchE 活性比较

表 2 示，与正常组比较，模型组海马组织

TchE 活性显著降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄芪总皂苷组海马组织 TchE 活性显著增强 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠海马组织 TchE 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TchE
正常组	12	14.39 ± 1.43
模型组	12	6.57 ± 1.98*
黄芪总皂苷组	12	11.12 ± 1.79 [△]

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠海马组织 caspase-3 表达比较

表 3 示，与正常组比较，模型组海马组织 caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，黄芪总皂苷组海马组织 caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠海马组织 caspase-3 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性细胞数 (个)	阳性面积比 (%)
正常组	12	0.42 ± 2.36	3.4 ± 1.82
模型组	12	11.48 ± 3.34*	18.02 ± 3.25*
黄芪总皂苷组	12	8.05 ± 1.67 [△]	11.53 ± 2.33 ^{△△}

注：与正常组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠海马组织神经元形态学变化

正常组大鼠海马组织神经细胞排列紧密、整齐，细胞间质均匀、致密，多数细胞核深染，核仁明显可见，细胞内尼氏体较为常见，弥漫于细胞质；模型组大鼠海马组织神经细胞排列松散、紊乱，层次不完整，分布不均匀，细胞周围间隙增宽，胞体肿胀变圆、变大，胞浆染色变浅、染色不清，一些细胞结构消失、核浓缩，核仁不甚明显，部分细胞固缩，形状不规则，大部分神经细胞因失活，尼氏体减少；黄芪总皂苷组病理改变程度较模型组轻，趋于正常组。

3 讨论

运动性疲劳属中医学“虚劳”范畴，虚劳又称虚损，虚劳发病缓慢，病程较长，缠绵难愈，而烦劳过度、损伤五脏是本病的主要病因^[5]。明代医家张景岳认为黄芪“因其味轻，故专于气分而达表，所以能补元阳，充腠理，治劳伤，长肌肉”。而现代研究表明中药黄芪及其有效成分能够对脑缺血缺氧（和缺糖）状态下的海马神经元具有营养保护作用^[6-7]。

海马富含各种信使受体,是应激素作用的一个靶区,具有可塑性并极易受损,海马神经细胞损伤后,导致了海马对机体的运动调节功能下降。运动性疲劳状态下自由基增加,攻击膜脂中的不饱和脂肪酸产生脂质过氧化产物 MDA,通过测定体内 MDA 含量,可间接反映体内自由基对机体的损伤程度^[8]。运动促进机体组织中氧自由基增加,氧自由基的损伤作用是神经细胞凋亡发生的重要机制之一^[9-10]。氧自由基引起的脂质过氧化直接损伤细胞膜与线粒体膜、DNA^[11-12],激活凋亡蛋白酶活化 caspases 蛋白酶^[13-14],从而导致细胞凋亡^[15]。活化后的 caspase-3 可以切割许多蛋白质底物,使胞内部分参与 DNA 修复、DNA 复制、mRNA 剪切的酶(蛋白)失活或下调,从而使细胞丧失修复功能^[16],中枢胆碱能系统是参与和影响学习记忆功能中最重要的神经系统。隔-海马系统胆碱能纤维通路主要参与空间学习记忆过程^[17],这些部位的损伤可导致皮质、海马及大细胞基底核细胞萎缩,胆碱能传导通路受损,从而引起胆碱能缺陷和学习记忆功能障碍^[18]。运动性疲劳时,脑组织缺血缺氧、自由基、钙超载等均可导致胆碱能神经元细胞的损伤,导致 AchE 含量减少或活性抑制^[19]。

本研究通过跑台运动复制运动性疲劳模型大鼠,检测发现模型大鼠 MDA 含量升高, T-AOC 与 TchE 活性降低, caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比升高,光镜下海马出现病理损伤改变。而黄芪总皂苷组大鼠海马 MDA 含量降低, T-AOC 与 TchE 活性升高, caspase-3 阳性细胞数和阳性面积比降低,光镜下海马形态趋于正常。提示黄芪总皂苷抗运动性疲劳的作用可能与其抑制运动氧化应激所致的自由基增加和诱发海马神经元损伤有关。

参考文献

- [1] 王来栓,邵肖梅. 线粒体与缺氧缺血性脑细胞凋亡 [J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2003, 11(1): 65-67.
- [2] 张梅. 运动疲劳训练对大鼠海马 NOS 活性的影响及中药的干预作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(3): 188-190.
- [3] 李伟东,贾晓斌,蔡宝昌. 黄芪总皂苷提取工艺研究 I [J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(2): 43-45.
- [4] 汶希,潘华山,冯毅翀. 大鼠运动性疲劳模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(5): 368.
- [5] 田德禄. 中医内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 346-347.
- [6] 王畅,张艳军,冯英,等. 黄芪甲苷对短暂性前脑缺血模型大鼠海马神经再生的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 754-758.
- [7] 叶冬青,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 JNK3 的表达 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 77-82.
- [8] Halliwell BL, Gutteridge JM. Free Radicals in Biology and Medicine [M]. Oxford: Clarendon Press, 1995, 2032-2046.
- [9] Qureshi A, Suri MF, Ostrow PT, et al. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage [J]. Neurosurgery, 2003, 52(5): 1041-1047.
- [10] 张尉华,饶明俐,吴江,等. 实验性脑出血后的细胞凋亡和凋亡相关基因转录、表达水平 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2005, 22(1): 10-12.
- [11] Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(2): 153-159.
- [12] Werner C, Hanhoun M, Widmann T, et al. Effects of Physical Exercise on Myocardial Telomere-Regulating Proteins, survival Pathways, and Apoptosis [J]. J Am Cardiol, 2008, 52(6): 470-482.
- [13] 方敏,王晓东. 细胞凋亡的线粒体通路 [J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(1): 1-10.
- [14] Osborne NN. Mitochondria: Their role in ganglion cell death and survival in primary open angle glaucoma [J]. Exp Eye Res, 2010, 90(6): 750-757.
- [15] 杨杨,尚方剑,刘鑫琪,等. 海马细胞凋亡的钙通路与创伤后应激障碍发生机制的相关性 [J]. 中国医药指南, 2011, 9(21): 212-214.
- [16] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis [J]. Mol Cell, 2002, 9(3): 459-470.
- [17] 郑金瓯,孙圣刚,莫雪安,等. 脑内注射乙酰胆碱受体抗体 IgG 对大鼠隔-海马胆碱能系统的损害 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(4): 13-16.
- [18] 吴江,张淑琴,饶明俐,等. 无名质区破坏的 Wistar 大鼠脑内胆碱乙酰转移酶和生长抑素活性的变化及相互关系 [J]. 中风与神经疾病杂志, 1995, 12(3): 130-132.
- [19] 张瑞萍,张波,刘宏骞,等. 疲劳与睡眠剥夺对晕船和乙酰胆碱酯酶的影响 [J]. 解放军预防医学杂志, 2008, 26(5): 325-327.

Effect of Astragalus Total Saponin on Hippocampal Function and Morphology in Sports Fatigue Rats

FENG Yichong¹, XU Jinye¹, ZHAO Ziming², LIU Shaobin¹, JING Chunxiang¹, WEN Xi¹, PAN Huashan¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Province 510006; 2. Guangdong Institute of Chinese Medical Engineering and Technology)

ABSTRACT Objective To research the possible anti-sports fatigue mechanism of Astragalus Saponin. **Methods**

Totally 36 male SD rats were randomized into the blank group, model group and Astragalus Saponin group, with 12 in each. The Astragalus Saponin group was gavaged with 50 mg/kg Astragalus Saponin. The model group and blank group were gavaged with the same volume of normal saline once daily. The sports fatigue rat models were copied in the Astragalus Saponin group and model group by horizontal treadmill exercise one hour after intragastric administration once daily for 14 consecutive days. The malondialdehyde (MDA) in hippocampal tissue, total antioxidant capacity (T-AOC), acetylcholinesterase (TchE) and caspase 3 (caspase-3) expressions were detected and the changes of hippocampal morphology were observed under light microscope. **Results** Comparing with the blank group, the MDA content was significantly increased, the activity of T-AOC and TchE was significantly decreased and the positive cells and positive area ratio of caspase-3 were significantly increased ($P < 0.01$) and the pathologic changes were appeared in hippocampal tissue under light microscope in the model group. Comparing with the model group, the MDA content was significantly decreased, the activity of T-AOC and TchE was significantly increased and the positive cells and positive area ratio of caspase-3 were significantly decreased ($P < 0.01$) and the hippocampal morphology became normal under light microscope in the Astragalus Saponin group. **Conclusion** The anti-sports fatigue effect of Astragalus Saponin may be relevant to inhibiting free radical increment caused by sports oxidative stress and relieving the hippocampal neuronal damage.

Keywords Astragalus Saponin; sports fatigue; hippocampus; neuron

(收稿日期: 2013-10-20; 修回日期: 2013-11-30)

[编辑: 洪涛]

中国第八届中医、中西医结合暨非药物治疗防治 心脑血管病、糖尿病、肿瘤高级论坛通知

由世界中医药学会联合会国际合作部、《世界中医药》杂志社联合主办的“中国第八届中医、中西医结合暨非药物治疗防治心脑血管病、糖尿病、肿瘤高级论坛”将于 2014 年 5 月 24 至 27 日在杭州召开。

1. 会议征文与研讨内容: (1) 中医药治疗心脑血管病的理论及临床经验; (2) 中医、中西医结合治疗心脑血管病的新疗法、新进展; (3) 中医药治疗心脑血管病的实验研究; (4) 针灸推拿等非药物治疗防治心脑血管病的体会; (5) 中医、中西医结合治疗糖尿病的理论及临床进展; (6) 糖尿病、肿瘤及心脑血管病的中医诊疗规范; (7) 中医药、中西医结合治疗肿瘤的基础及临床研究; (8) 中医、中西医结合抗肿瘤的理论与临床探讨; (9) 名老中医经验和民间中医方防治心脑血管病、糖尿病、肿瘤经验总结; (10) 抗肿瘤中药的研究与开发; (11) 肿瘤止痛及晚期肿瘤患者生存质量与养生方法研究; (12) 中医非药物治疗的基础研究和理论研究探讨; (13) 中医非药物治疗在临床中的应用研究与总结; (14) 针灸在各科临床的经验总结; (15) 推拿按摩及其他理疗方法在各科临床的运用; (16) 非药物康复治疗经验总结; (17) 中风后遗症的中医特色治疗经验; (18) 老年痴呆症、顽固性失眠、血管性头痛的论治精神及特色疗法; (19) 名老中医临床经验总结; (20) 中医成才经验介绍; (21) 临床应用经方、成方、验方的体会; (22) 中医养生保健、药膳食疗方法介绍及理论研究; (23) 中医药教学经验介绍; (24) 中国医学史研究; (25) 中药、民族药研究及其现代应用; (26) 复方制剂的开发与研究; (27) 民族医经典药方及常用方剂的整理研究; (28) 民族药品种和炮制研究; (29) 民族医特色疗法的研究与应用; (30) 民族医诊脉方法研究。2. 征文要求: (1) 论文要求论点明确、论据充分、结构严密、层次分明、文字精炼,具有科学性、创新性、实用性; (2) 征文请附医院或主管单位介绍信; (3) 征文截止日期为 2014 年 5 月 10 日; (4) 每位作者只限投一篇论文(要求 2 000 字以内); (5) 文稿中的计量单位均须采用法定计量单位; (6) 文题下署作者姓名,作者单位名称、地址、邮政编码、电话请写在文稿末尾,请在投稿信封左下角注明“会议”字样; (9) 征文经专家评审后,录用文章将刊登在《世界中医药》杂志 2014 年增刊(第一、第二作者分别授予国家继续教育学分),并邀请参加会议,入选论文安排在大会交流,参加会议者颁发证书并授予国家 II 类继续教育 10 学分。投稿邮箱: E-mail: 13901318403@139.com。3. 会议日程: 2014 年 5 月 24 日报到; 2014 年 5 月 25 至 5 月 26 日专题演讲、大会交流、分组交流、参观考察; 2014 年 5 月 27 日中午 12 点代表离会。4. 会议地址: 浙江省军区涌金饭店,杭州市上城区劳动路 127 号。5. 注册费用: 每位代表会务费 1280 元(含餐费、场地租用费、专家讲课费、纪念品、资料、会议合影、参观交通费等); 提前 2 个月交费者优惠 10%。住宿标准: 标准间 150 元/床/天。6. 地址与会议回执: 北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 301 室,世界中医药学会联合会国际合作部《世界中医药》杂志社,邮编: 100101,电话: (010) 58239055; 传真: (010) 58239066,手机: 13901318403,联系人: 王炳岐、赵和爱、徐晖。