

江苏产菲律宾蛤仔提取物的抗疲劳作用

程颖¹, 王欣之^{1,2}, 吴皓^{*1,2}, 刘睿^{1,2}, 王令充^{1,2}, 邱韵萦^{1,2},
杨小林^{1,2}, 陈丽叶¹, 冯子芳¹

(1. 南京中医药大学, 江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023)

摘要: 研究了江苏产菲律宾蛤仔提取物(RE)对运动小鼠抗疲劳能力的影响。将小鼠随机分为6组, 正常组、模型组、阳性组以及低、中、高3个剂量组。小鼠灌胃15 d后, 采用小鼠游泳疲劳模型, 观察各组小鼠负重游泳时间、不负重游泳后血清乳酸(LA)、尿素氮(BUN)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)指标的差异。结果: 高、中剂量组小鼠负重游泳时间明显长于模型组和低剂量组; 与模型组相比, 3个剂量组小鼠血清乳酸($p < 0.01$)含量显著降低, 且呈剂量依赖性; 肌酸激酶($p < 0.01$)、乳酸脱氢酶($p < 0.01$)活力均下降, 超氧化物歧化酶($p < 0.05$)活力升高, 尿素氮含量仅高剂量有显著性差异。结论: 菲律宾蛤仔提取物能提高小鼠运动耐力, 加速疲劳的消除。

关键词: 菲律宾蛤仔; 抗疲劳; 游泳; 小鼠

中图分类号: S 968 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)01-0051-05

Anti-Fatigue Effect of the Extract from *Ruditapes philippinarum* Cultivated in Jiangsu Province

CHENG Ying¹, WANG Xinzhi^{1,2}, WU Hao^{*1,2}, LIU Rui^{1,2}, WANG Lingchong^{1,2},
QIU Yunying^{1,2}, YANG Xiaolin^{1,2}, CHEN Liye¹, FENG Zifang¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource Pharmaceutics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: The study aimed to investigate the in vivo anti-fatigue effect of an extract from *Ruditapes philippinarum*. Mice were randomly divided into six groups (normal, mode, positive, three dose groups) and after oral administration for 15 days, the forced swimming models of mice were established. The swimming time with weight loading was recorded and contents of lactic acid (LA) and blood urea nitrogen (BUN) and activities of lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and superoxide dismutase (SOD) in mice serum were analyzed. Results showed that the swimming time of high and medium doses of groups with weight loading was longer than that of the mode

收稿日期: 2015-04-02

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项基金(201305007, 201405017)。

* 通信作者: 吴皓(1957—), 女, 江苏徐州人, 教授, 从事海洋药物研究开发和中药炮制机理及饮片标准化研究。

E-mail: hbxgey90@163.com

引用本文: 程颖, 王欣之, 吴皓, 等. 江苏产菲律宾蛤仔提取物的抗疲劳作用[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(01): 51-55.

group, three dose groups after exercise had an obviously reduced content of LA ($p < 0.01$), a lower content of BUN, a higher activity of SOD ($p < 0.05$), and lower activities of LDH ($p < 0.01$) and CK ($p < 0.01$). Thus, the extract from *Ruditapes philippinarum* could be effective in accelerating the decomposition of metabolites to delay fatigue.

Keywords: *Ruditapes philippinarum*, antifatigue, swim, mouse

菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*), 俗称花蛤、蛤仔、蛤蜊、蚬子等, 其味甘、咸, 性冷, 有润五脏、止消渴、软坚之功^[1-3]。作者前期研究发现, 菲律宾蛤仔软体中含有大量的多糖、水溶性蛋白质以及牛磺酸类等营养成分。据文献报道, 牛磺酸^[4]、多糖^[5-6]以及水溶性蛋白质^[7]均具有显著的抗疲劳作用。且菲律宾蛤仔在江苏沿海资源量十分丰富, 南通、连云港、盐城等沿海滩涂地区均有大规模的养殖。因此, 选用江苏产菲律宾蛤仔软体为原料, 研究其水提物的抗疲劳作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

菲律宾蛤仔软体, 采自江苏省南通市吕四港 (批号: 20130711), 由江苏省海洋水产研究所提供, 经江苏省海洋水产研究所万夕和研究员鉴定为帘蛤科动物菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)。

灵芝西洋参口服液: 购自先声再康大药房; BCA 试剂盒、血清乳酸试剂盒 (LA)、尿素氮试剂盒 (BUN) 以及 LDH、CK、SOD 试剂盒: 均购自南京建成生物工程研究所。

SPF 级 ICR 雄性小鼠: 体重 18~22 g, 许可证号: SCXK (沪) 2012-0002, 上海 SLAC 公司提供。

1.2 实验仪器

UNIQUE-s15 超纯水机: 厦门锐思捷科学仪器有限公司产品; Buchi R210 落地式旋转蒸发仪: 瑞士步琦有限公司产品; 全波长酶标仪 1510: 美国 Thermo 公司产品; 冷冻干燥机: 美国 LABCONCO 公司产品; KQ-200KDE 高功率数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司产品; 微量移液器: 美国 Thermo 公司产品。

1.3 实验药物的制备及主要成分的分析

1.3.1 菲律宾蛤仔提取物 (RE) 的制备 软体洗净沥干, 绞碎, 加 3 倍量水, 加热煎煮 40 min, 取滤液, 肉渣加 3 倍量水重复煎煮 1 次, 合并 2 次滤液, 旋

转蒸发仪 60 °C 下浓缩, 得初膏。初膏在冷冻干燥器中干燥, 研磨得到菲律宾蛤仔干燥提取物, 批号为: 20141230。

1.3.2 RE 中主要成分的测定 据文献报道, 菲律宾蛤仔软体中主要成分为多糖、蛋白质、牛磺酸, 因此分别采用 BCA 法^[8]测定 RE 中蛋白质的含量, 蒽酮-硫酸法^[9]测定 RE 中多糖的含量, 邻苯二甲醛柱前衍生化-HPLC 法^[10]测定 RE 中牛磺酸的含量。

1.4 实验方法及过程

1.4.1 动物分组与给药剂量 SPF 级 ICR 雄性小鼠, 体重 18~22 g, 在屏障环境中适应性喂养一周后, 按体重将小鼠随机分为正常对照组 (简称正常组)、模型组、阳性对照组 (简称阳性组) 和菲律宾蛤仔提取物低、中、高剂量组 (简称低、中、高剂量组)。低、中、高剂量组分别灌胃给予小鼠 RE 0.15、1.5、3.0 mL/kg, 正常组、模型组灌胃等体积蒸馏水, 阳性组按推荐剂量 (3 mL/kg) 给予小鼠相同体积的灵芝西洋参口服液。各组小鼠灌胃 15 d。

1.4.2 负重游泳时间的测定 各组小鼠 (除正常组外) 分别取 10 只, 于末次给药 30 min 后, 于鼠尾根部负其体质量 5% 的铅丝, 在水深不低于 30 cm, 水温为 (25±1) °C 的游泳桶中进行负重游泳实验, 记录小鼠自游泳开始至死亡的时间, 即小鼠负重游泳时间^[11]。

1.4.3 血清乳酸 (LA)、尿素氮 (BUN) 含量测定 正常组小鼠于末次灌胃 90 min 后眼眶取血, 其余各组小鼠于末次灌胃 30 min 后, 在 (25±1) °C 的游泳桶中游泳 60 min 后, 眼眶取血, 血液 3 500 r/min 离心 10 min, 取血清, 分别测定血清中 LA、BUN 含量^[12-13]。

1.4.4 血清乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK) 以及 SOD 活力测定 采用 1.4.3 中得到的血清, 按试剂盒说明书测定血清中 LDH、CK、SOD 活力^[14]。

1.5 实验数据统计分析

实验数据采用 SPSS16.0 软件中的 Descriptives 进行统计, 实验结果采用 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示; 与正常组、模型组比较采用软件中的 t -检验进行统计分析。

2 结果及分析

2.1 RE 中功效性成分分析

经检测,RE 中含有丰富的牛磺酸、多糖及蛋白质等功效性成分,高剂量组(3.0 g/kg)相当于给予小鼠牛磺酸 97.73 mg/kg、多糖 853.44 mg/kg、蛋白质 612.93 mg/kg,说明 RE 具有良好的抗疲劳物质基础。

表 1 RE 中牛磺酸、多糖、蛋白质质量分数

Table 1 Contents of taurine, polysaccharides, proteins in RE

组别	质量分数/(mg/g)		
	牛磺酸	多糖	水溶性蛋白质
RE	32.38±0.94	284.87±1.45	204.37±0.52

2.2 RE 对小鼠负重游泳时间的影响

从表 2 和图 1 中可知,在水温为(25±1) °C,30 cm 深的水中,各剂量组与模型组相比,游泳时间均有延长。中剂量、高剂量组以及阳性药组小鼠的负重游泳时间相对于模型组小鼠分别延长了 17.34%、21.67%、24.26%,阳性药效果最明显,高剂量次之,低剂量组时间延长不明显,结果表明不同剂量 RE 可加强小鼠的运动耐力。

表 2 RE 对小鼠负重游泳时间的影响

Table 2 Effect of RE on the swimming time of mice with weight loading

组别	剂量/(g/kg)	游泳时间/s	时间延长率(相对于模型组)/%
模型组	-	154.40±15.98	-
阳性对照组	-	191.86±22.54	24.26
低剂量组	0.15	158.17±15.83	2.44
中剂量组	1.5	181.17±24.49	17.34
高剂量组	3.0	187.86±17.89	21.67

2.3 RE 对小鼠血清乳酸(LA)、尿素氮(BUN)浓度的影响

由表 3 和图 2、图 5 可知,灌胃给药 15 d 后游泳,模型组小鼠血清中乳酸相对于正常组增幅可达到 40.76%,低剂量组乳酸含量较模型组低,中、高剂量组、阳性组乳酸浓度与模型组相比,有极显著性下降($p<0.01$)。阳性组和 3 个剂量组血清中尿素氮浓度与模型组相比,均有所下降但清除速率较低,且呈现一定剂量依赖性。由此可见菲律宾蛤仔提取物可显著减少乳酸、尿素氮在体内的积累量,减缓疲劳的产生。

表 3 RE 对小鼠血清乳酸(LA)、尿素氮(BUN)浓度的影响

Table 3 Effect of RE on the contents of serum lactic acid and urea nitrogen in mice

组别	剂量/(g/kg)	乳酸浓度/(mmol/L)	尿素氮浓度/(mmol/L)
正常对照组	-	9.79±1.53	4.22±0.35
模型组	-	13.78±1.74 [#]	6.28±0.69
阳性对照组	-	9.21±1.49 ^{**}	5.96±0.58
低剂量组	0.15	9.17±2.31	5.94±0.87
中剂量组	1.5	8.79±1.50 ^{**}	5.83±0.77
高剂量组	3.0	7.58±0.98 ^{**}	5.81±0.37 [*]

注:与模型组对比,“*”表示 $p<0.05$,“**”表示 $p<0.01$ 与正常组对比,“#”表示 $p<0.05$,“##”表示 $p<0.01$

2.4 RE 对小鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

从表 3 和图 2、图 5 可以看到,中、高剂量组和阳性组与模型组相比,可以显著降低小鼠血清 LDH 活力,低剂量组与模型组相比,LDH 活力有降低的趋势,但无明显差异。阳性组与 3 个剂量组可以显著降低 CK 活力,且剂量越大,CK 活力增加幅度越小。3 个不同剂量组小鼠血清中 SOD 活力升高不明显,但随着给药组剂量的增加其活力不断提高,说明菲律宾蛤仔能在一定程度上清除氧自由基,减少机体的氧化应激反应,保护细胞不受损伤。

表 4 RE 对小鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响

Table 4 Effect of RE on the levels of serum LDH, CK and SOD in mice

组别	剂量/(g/kg)	LDH 活力/(U/L)	CK 活力/(U/L)	SOD 活力/(U/L)
正常对照组	-	302.67±94.33	339.33±101.95	148.73±8.82
模型组	-	557.29±88.23 ^{##}	686.40±110.29 ^{##}	131.51±6.95 [#]
阳性对照组	-	412.43±69.34 [*]	371.60±105.70 [*]	153.30±11.97 ^{**}
低剂量组	0.15	458.71±89.33	472.17±77.51 ^{**}	147.15±13.89
中剂量组	1.5	304.86±70.79 ^{**}	433.00±43.01 ^{**}	147.48±13.20 [*]
高剂量组	3.0	271.88±55.12 ^{**}	412.43±140.29 ^{**}	150.85±13.85 [*]

注:与模型组对比,“*”表示 $p<0.05$,“**”表示 $p<0.01$ 与正常组对比,“#”表示 $p<0.05$,“##”表示 $p<0.01$

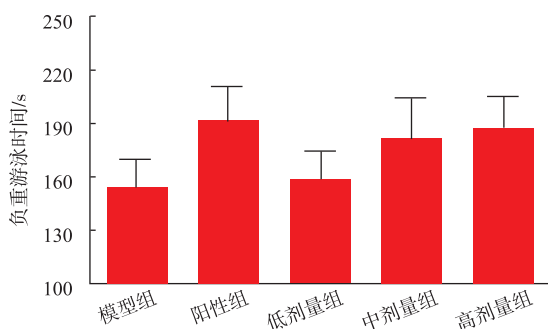


图 1 不同组别小鼠负重游泳时间比较

Fig. 1 Swimming time of different groups with weight loading

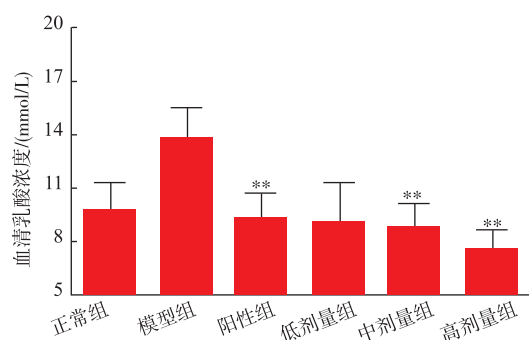


图 2 不同组别小鼠血清乳酸含量比较

Fig. 2 Lactic acid contents of different groups

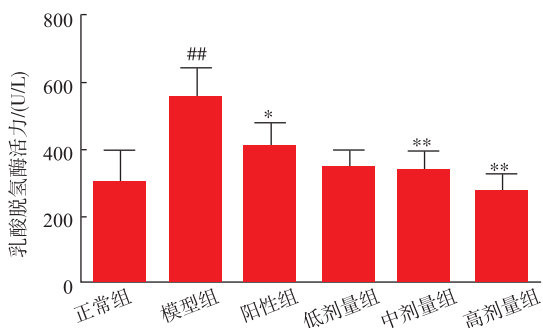


图 3 不同组别小鼠乳酸脱氢酶活力比较

Fig. 3 LDH activities of different groups

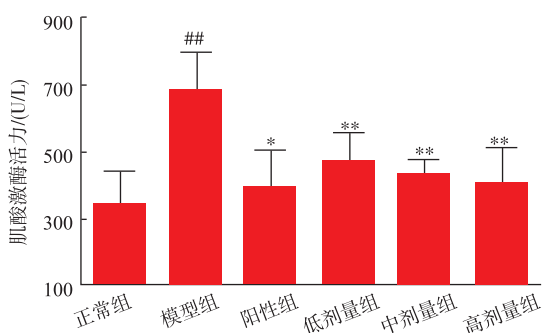


图 4 不同组别小鼠肌酸激酶活力比较

Fig. 4 CK activities of different groups

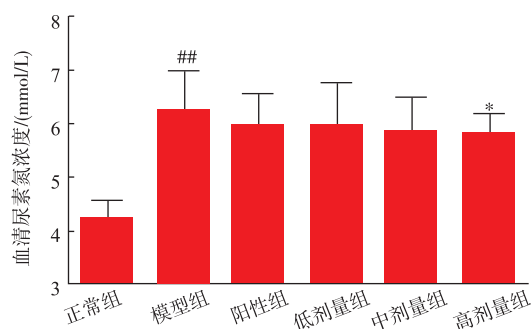


图 5 不同组别小鼠血清尿素氮含量比较

Fig. 5 BUN contents of different groups

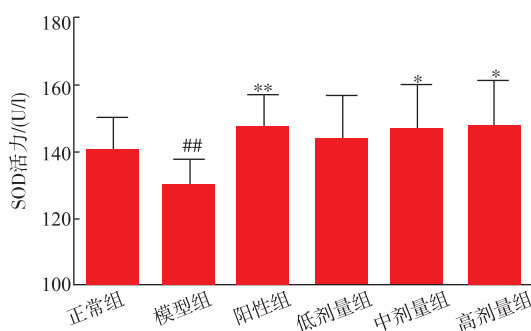


图 6 不同组别小鼠 SOD 活力比较

Fig. 6 SOD activities of different groups

3 结语

经过长时间剧烈运动,机体相对缺氧,糖酵解加速,蛋白质及氨基酸的分解代谢加强,并造成组织细胞一定程度的损伤,导致乳酸、尿素氮含量升高,LDH、CK 这类存在于机体组织细胞中的、不能直接进入循环系统的大分子蛋白质逸出,通过淋巴系统进入到血液中,因此可以将 LDH、CK 作为肌肉损伤标志酶来衡量细胞的受损程度。而 SOD 可以通过清除自由基,阻止脂质过氧化,有效地保护机体细胞结构与功能免受损伤^[15]。

菲律宾蛤仔软体中含有丰富的多糖、蛋白质、牛磺酸及多种微量元素^[16-17],经菲律宾蛤仔软体得到的提取物或酶解物等具有抗肿瘤、抗氧化、增强免疫力,抑制酪氨酸酶活性等作用^[18-21]。此次实验参考《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)及相关文献,首次对菲律宾蛤仔提取物的抗疲劳作用进行了研究。实验结果表明,RE 可以显著增加小鼠的运动耐力,降低血清乳酸、尿素氮含量,降低 LDH、CK 活力,提高 SOD 活力,说明 RE 有抗疲劳的作用,且呈剂量依赖关系。这可能与 RE 能为机体提供能量,加速机体代谢产物的清除,清除氧自由基,保

护细胞膜结构完整性有关,具体机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] ZHOU Baokuan. The understanding of fatigue by traditional Chinese medicine [J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese**, 2007, 25(11):2385-2387.(in Chinese)
- [2] JU Baozhao. Antifatigue mechanism of chinese medicine and the screening rules of prescriptions[J]. **Chinese Journal of Clinical Rehabilitation**, 2004, 8(18):3656-3657.(in Chinese)
- [3] 管华诗,王曙光. 中华海洋本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009.
- [4] DING Yuan. Study of anti-anoxia, anti-fatigue effect of γ -aminobutyric acid and taurine in mice[J]. **Neijiang Technology**, 2009, (12):18, 16.(in Chinese)
- [5] WANG J, SUN C, ZHENG Y, et al. The effective mechanism of the polysaccharides from Panax ginseng on chronic fatigue syndrome[J]. **Archives of Pharmacal Research**, 2014, 37(4):530-538.
- [6] LI Qingyu, YANG Ying, JIA Linfei, et al. Purification, structural analysis and antifatigue assay of polysaccharide from castanea mollissima blume[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(7):767-772.(in Chinese)
- [7] ZHANG Chao, GUO Guanxin, ZHANG Hui, et al. Studies on antifatigue of buckwheat protein[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(6):79-82, 87.(in Chinese)
- [8] CAO Yuhua. Content determination of protein in Shenqiling granules by BCA[J]. **China Practical Medicine**, 2009, 4(7):43-44.(in Chinese)
- [9] LIN Li, WANG Yan, WANG Fuxing, et al. Determination of polysaccharides content of Gentiana farreri from different producing areas based on anthrone- sulfuric acid method [J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2014, 39 (14):2774-2776.(in Chinese)
- [10] LI Na, WANG Xinzhi, WU Hao, et al. Study on the dynamic accumulation of taurine in four shellfish flesh of Jiangsu east costal and the appropriate harvest time[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2015, 36(3):54-59.(in Chinese)
- [11] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003版)[S]. 2003-02-14.
- [12] ZHANG Weiye, XU Songde, ZHANG Jianye, et al. A simple method for determination of lactic acid [J]. **Shandong Sports Science & Technology**, 1988(2):6-8.(in Chinese)
- [13] WANG Dongwei, CAO Zhijun, WANG Zhisheng, et al. Comparison of determination methods for milk urea nitrogen [J]. **China Dairy Cattle**, 2010(9):55-57.(in Chinese)
- [14] 李永超. 肉苁蓉有效部位抗疲劳作用机制研究[D]. 北京:中国协和医科大学, 2007.
- [15] WAN Li, BI Man, YANG Lin. Influence of sports nutrition supplement on lactate dehydrogenase and creatine kinase [J]. **Bulletin of Sport Science & Technology**, 2009, 17(2):124-126.(in Chinese)
- [16] WU Yunxia, LIANG Jian, YAN Xiwu, et al. Analysis of the nutritional components of manila clam *Ruditapes philippinarum*[J]. **Acta Nutrimenta Sinica**, 2012, 34(4):409-410, 413.(in Chinese)
- [17] Etelvina Figueira, Rosa Freitas. Consumption of *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*: comparison of element accumulation and health risk[J]. **Environ Sci Pollut Res**, 2013, 20:5682-5691.
- [18] YU Di, YANG Yongfang, WANG Jiabin, et al. Study of glycoprotein extracted and purified from *Ruditapes philippinarum* inhibits the growth of tumor cell in vitro[J]. **Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)**, 2011, 30(4):336-339.(in Chinese)
- [19] YAN Cuiwei, XU Rui, SUN Yan, et al. Study of inhibitory capability of the extract from *Ruditapes philippinarum* against tyrosinase activity[J]. **Periodical of Ocean University of China**, 2009, 39(6):1233-1236.(in Chinese)
- [20] FAN Xiuping, WANG Ruifang, WU Hongmian, et al. Structural characteristics and immunological activity of glycosaminoglycan RG-1 from *Ruditapes Philippinarum*[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2012, 12(2):186-190(in Chinese)
- [21] ZHANG Huien, WANG Jianing, WANG Jiangqiang, et al. Maillard reaction of *Ruditapes philippinarum* hydrolyzate and its antioxidant capacities[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2013, 34(6):140-143.(in Chinese)