

杨舒, 黄徐英, 屠寒, 等. 桑葚花色苷对小鼠的抗疲劳作用 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(16): 377–385. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090071

YANG Shu, HUANG Xuying, TU Han, et al. Anti-fatigue Effects of Mulberry Anthocyanins in Mice[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(16): 377–385. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090071

· 营养与保健 ·

桑葚花色苷对小鼠的抗疲劳作用

杨 舒, 黄徐英, 屠 寒, 刘 忠, 柳 鑫*
(武汉市第四医院药剂科, 湖北武汉 430034)

摘 要:目的: 研究桑葚花色苷对小鼠的抗疲劳作用, 并探讨其抗疲劳机制。方法: 经制备、分析后, 评价桑葚花色苷样品抗氧化活性; 将小鼠随机分为安静组、有氧运动组、模型组、低、中、高剂量组 (桑葚花色苷剂量分别为 100、200、400 mg/kg), 进行负重游泳。连续灌胃 4 周后, 检测小鼠的血乳酸 (Lac)、血尿素氮 (BUN)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 等疲劳相关生化指标和氧化应激指标, 评价桑葚花色苷的抗疲劳作用; 并通过测定核因子 E2 相关因子 (Nrf2) 和血红素加氧酶 1 (HO-1) mRNA 相对表达水平, 初步探讨桑葚花色苷抗疲劳机制。结果: 经过纯化、富集后, 桑葚花色苷中活性成分含量升高, 并显示出与维生素 C 相当的抗氧化能力。与模型组比较, 低、中、高剂量桑葚花色苷可显著延长运动时间 ($P<0.05$), 提升运动耐力; 中、高剂量桑葚花色苷显著降低小鼠血液中 Lac 和 BUN 含量、CK 和 LDH 活性 ($P<0.05$), 提高了骨骼肌中 SOD 和 GSH-Px 活性, 降低了 ROS、MDA、8-OHdG 含量 ($P<0.05$), 同时, Nrf2/HO-1 mRNA 的表达显著 ($P<0.05$) 增加。结论: 桑葚花色苷可通过调控 Nrf2/HO-1 信号途径, 提高机体的抗氧化能力, 以发挥抗疲劳作用。

关键词: 桑葚, 花色苷, 抗疲劳, 抗氧化, 氧化应激

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)16-0377-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022090071

本文网刊:



Anti-fatigue Effects of Mulberry Anthocyanins in Mice

YANG Shu, HUANG Xuying, TU Han, LIU Zhong, LIU Xin*

(Pharmaceutical Preparation Section, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan 430034, China)

Abstract: Objective: To study the anti-fatigue effects of mulberry anthocyanins (AM) and discuss the mechanism in mice. Methods: After preparation and analysis, the antioxidant activity AM was evaluated. The mice were randomly divided into the quiet group, the aerobic exercise group, the model group, the low, medium and high dose groups (the AM dosage were 100, 200 and 400 mg/kg/d, respectively), and exhaustive swimming test were performed. After mice were orally administered for 4 weeks, the fatigue-related biochemical indicators were measured to evaluate the anti-fatigue effect of AM, such as the levels of blood lactic acid (Lac), blood urea nitrogen (BUN) and malondialdehyde (MDA) the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px). Meanwhile, the anti-fatigue mechanism was explained by the relative expression levels of Nrf2 and HO-1 mRNA. Result: After enrichment and purification, the contents of active components in AM were increased, and showed the antioxidant capacity that equivalent to vitamin C. Compared with the model group, the low, medium and high dose groups were significantly prolonged exhaustive swimming time ($P<0.05$), as well as the exercise capacity was increased. The medium and high dose of AM significantly decreased the levels of Lac and BUN ($P<0.05$), the activities of LDH and CK ($P<0.05$) in rat blood, improved the activity of SOD and GSH-Px, as well as low-regulate the level of MDA, 8-OHdG and ROS ($P<0.05$) in muscle. Furthermore, AM significantly increased the expression levels of Nrf2/HO-1 mRNA in muscle ($P<0.05$). Conclusion: AM could improve the ability of the antioxidant capacity to exert anti fatigue effect through regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: mulberry; anthocyanins; anti-fatigue; antioxidant; oxidative stress

收稿日期: 2022-09-08

基金项目: 武汉市卫生健康委临床医学科研项目 (中医药及中西医结合类) (WZ19Q15)。

作者简介: 杨舒 (1990-), 女, 本科, 主管药师, 研究方向: 中药药理学, E-mail: 895061192@qq.com。

* 通信作者: 柳鑫 (1988-) 男, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药资源开发与利用, E-mail: liuxin420462554@163.com。

随着经济水平的快速提升,社会竞争愈趋激烈,超长时间、高强度、大负荷的工作节奏使疲劳逐渐成为普遍的社会健康问题。疲劳是亚健康的主要表现之一,常伴随身体乏力、肌肉酸痛、内分泌紊乱、免疫力下降等症状,严重影响人们的工作效率和生活质量。诸多研究表明,疲劳的产生与体内积累过量的自由基,导致氧化和抗氧化系统失衡密切相关^[1-2]。因此,诸多学者开发了多糖、多酚、黄酮等抗氧化成分,以清除体内自由基,减少机体氧化损伤,改善机体的生理机能,缓解机体疲劳^[3]。从药食两用的桑葚资源挖掘开发安全性高、资源丰富、抗疲劳功效显著的产品,已逐渐成为当前国内学者的研究热点,如桑葚多糖^[4]、桑椹果醋^[5]、襄荷桑葚复合饮料^[6]等。

桑葚(Mulberry),是桑科桑树(*Morus alba* Linn.)的聚花果,又名乌葚、桑果等;因口味酸甜可口,色泽鲜亮,有“民间圣果”的美誉,备受消费者的信赖与喜爱。桑葚中含丰富的花色苷、维生素、氨基酸、多糖等活性成分,具有极高的食用价值和营养价值^[7-8]。作为中药资源入药历史悠久,桑葚收录于《唐本草》、《本草纲目》等中药典籍,具有滋阴补血、生津润燥的功效^[9]。花色苷是桑葚中一类重要的多酚成分,常作为天然色素、营养成分、活性成分等功能因子,用于食品、化妆品和药品等,如矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷和飞燕草素-3-O-葡萄糖苷等^[7]。因吡喃环存在未配对电子,花色苷具有超强的抗氧化活性^[10]。同时,桑葚花色苷还可抗脂质氧化、抗衰老等,预防视疲劳、糖尿病、肥胖等^[11-12]。因此,桑葚花色苷富有营养保健价值,极具抗疲劳的潜力。然而,桑葚极易腐败,易造成较大的资源浪费。在桑葚抗疲劳的报道中,关于桑葚花色苷抗疲劳作用的研究较少,其资源价值未被充分利用。本研究采用AB-8大孔树脂、HPLC分别制备、分析桑葚花色苷提取物,并通过研究桑葚花色苷体内外的抗氧化活性,以探讨桑葚花色苷抗疲劳的作用机制,为进一步开发桑葚资源及其营养保健价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑葚鲜果(Mulberry) 2019年5月购自湖北省武汉市江岸区水果批发市场,清洁级C57BL/6J雄性小鼠 60只,7周,体重(20.8±1.03)g,北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008;小鼠分笼饲养,自由摄食和饮水,饲养温度22~24℃,相对湿度为40%~60%;乳酸(Lac)、尿素氮(BUN)、活性氧(ROS)试剂盒 南京建成生物工程有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)试剂盒 上海臻科生物科技有限公司;TRIzol试剂 北京百奥莱博科技有限公司;引物、实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒 杭州联科美讯生物医药技术

有限公司;矢车菊素-3-O-葡萄糖(C3G,纯度≥98%)、天竺葵素-3-O-葡萄糖苷(P3G,纯度≥98%)、飞燕草素-3-O-葡萄糖苷(D3G,纯度≥98%) 上海源叶生物科技有限公司;甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯) 北京市通广精细化工公司;磷酸缓冲盐溶液、蒸馏水 自制。

多功能酶标仪(Spectramax i3x)、高速冷冻离心机(Sorvall ST16R)、流式细胞仪(Attune NxT) 赛默飞世尔科技有限公司;高效液相色谱仪(Agilent 1260) 安捷伦科技有限公司;电子精密天平(New Classic ME) 瑞士梅特勒-托利多集团;电泳槽(Mini-PROTEAN® Tetra) 伯乐生命医学产品有限公司;实验室超纯水机(Direct-Q3) 美国默克集团;超净台(SW-CJ-2FD) 上海涵今仪器仪表有限公司;实验室超低温冰箱(DW-HL340) 中科美菱低温科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 桑葚花色苷馏分制备 将桑葚鲜果清洗除杂后,加入4倍体积的60%乙醇溶液(含0.05%醋酸)提取,碾碎成浆液,过滤,得滤液;滤液7000 r/min离心10 min,取上清液,冻干,作桑葚粗提物(冻干粉)备用;取冻干粉加水溶解,配制成100 mg/mL水溶液,作桑葚溶液(MY)冷藏备用。将AB-8大孔树脂(2.6 cm×60 cm)活化,垂直装柱,径高比为1:15,备用;桑葚溶液(MY)上样,静置30 min;随后依次用3倍柱体积水、40%、60%、80%乙醇依次洗脱,流速3 BV/h,每瓶20 mL收集洗脱液,备用^[7,13]。

分别精密称取适量的C3G、P3G、D3G标准品,配制成混合标品溶液,各成分浓度为1.0 mg/mL;精密吸取不同体积的混合标品溶液,梯度稀释,制备不同浓度混合标品溶液(0.05、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL)进行HPLC分析,绘制C3G、P3G、D3G浓度与吸收峰面积的标准曲线回归方程。

HPLC测定桑葚花色苷色谱条件^[14]:Kromasil 100-5C₁₈色谱柱(5 μm, 250×4.6 mm);流动相为0.1%甲酸水溶液(A)和甲醇(B);梯度洗脱程序为0~5 min 93%→90% A, 5~10 min 90%→80% A, 10~15 min 80%→75% A, 15~20 min 75%→65% A, 20~25 min 65%→60% A, 25~30 min 65%→60% A, 30~32 min 60%→92% A, 32~35 min 92%→92% A;流速、柱温、进样量分别设置为1.0 mL/min、25℃、525 nm和10 μL。

通过上述HPLC色谱条件,分析桑葚洗脱液中花色苷(C3G、P3G、D3G)含量,合并馏分,浓缩、冷冻干燥,获得桑葚花色苷提取物,用于小鼠实验。

1.2.2 抗氧化活性测定 采用DPPH自由基清除率法^[15],取1.2.1项下纯化前后的桑葚花色苷提取物,配制成水溶液,维生素C作为阳性药物组,浓度设置为10 μg/mL,分析各提取物抗氧化活性。

1.2.3 实验动物分组、给药与饲养 小鼠(60只)经

适应性饲养后,随机分为安静组、有氧运动组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,共 6 组,每组 10 只。低、中、高剂量组小鼠用桑葚花色苷馏分灌胃给药,根据课题组前期预实验结果,剂量分别设置为 100、200、400 mg/kg,其它组小鼠灌胃等体积的生理盐水。

安静组小鼠正常饲养;有氧运动组小鼠每天游泳 10 min,随即吸干皮肤水分正常饲养;模型组和低、中、高剂量组小鼠每天进行负重游泳运动力竭实验,饲养周期 4 周。本实验通过湖北中医药大学伦理委员会审批(批号: HUCMS202111089),实验操作符合国家制定的实验动物管理和使用指南。

1.2.4 负重游泳力竭实验 在给药 30 min 后,模型组和低、中、高剂量组小鼠尾部系上 5% 体质量的铅丝,依次放入游泳箱(水深 30 cm、水温 24±2 ℃)中进行负重游泳实验。当小鼠头部浸入水 10 s,无法浮出水面,即为小鼠力竭时间。每间隔 1 周,记录小鼠负重游泳力竭时间^[16]。

1.2.5 小鼠血清及组织样本收集 在末次训练结束 30 min 后,采用 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠,摘眼球取血,置于抗凝管中 7000 r/min 离心 10 min,得上清液,储藏备用。

颈椎脱臼处死小鼠,取小鼠腿部骨骼肌,用 4 ℃ 生理盐水漂洗,吸水纸吸干表面水分,置于-80 ℃ 冰箱中冻存,储藏备用。

1.2.6 血清生化指标测定 取上述血清,参照各试剂盒说明书,测定血清中 Lac、BUN 的含量,LDH、CK 的酶活力。

1.2.7 小鼠骨骼肌氧化应激指标测定 取上述骨骼肌,参照各试剂盒说明书,测定骨骼肌中 ROS 和 MDA、8-OHdG 含量、SOD 和 GSH-Px 的酶活力。

1.2.8 小鼠骨骼肌 mRNA 相对表达水平测定 取适量骨骼肌组织匀浆碾碎后,采用 TRIZOL 法提取骨骼肌组织总 RNA^[17]。通过紫外-分光光度测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值(1.8~2.0),确定总 RNA 浓度。随后按照反转录试剂盒说明书进行逆转录,以其 cDNA 产物测定 Nrf2 和 HO-1 mRNA 转录表达水平(表 1)。选取 β -actin 作为内参,以 Nrf2 和 HO-1 mRNA 与 β -actin 表达含量比值作为该因子相对表达水平。

表 1 Nrf2、HO-1 和 β -actin 的引物序列
Table 1 Primer sequence of Nrf2, HO-1 and β -actin

基因	引物序列(5'-3')	方向	长度(bp)	Tm(℃)
β -actin	GATGAGATTGGCATGGCTTT	Forward	20	53
	CACCTTCACCGTTCCAGTTT	Reverse	20	55
Nrf2	ACATGGAGCAAGTTTGGCAG	Forward	20	55
	TGGAGAGGATGCTGCTGAAA	Reverse	20	55
HO-1	GAAATCATCCCTTGCACGCC	Forward	20	57
	CCTGAGAGGTACCCAGGTA	Reverse	20	60

1.3 数据处理

每组实验重复 3 次,结果用($\bar{x}\pm s$)表示,采用

SPSS 19.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,比较组间差异,并使用 Origin 9.0 绘图。 $P<0.05$ 认为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 桑葚花色苷的制备与分析

C3G、P3G、D3G 是桑葚主要的抗氧化活性成分,极具抗疲劳潜力^[2,7,17]。对纯化前后桑葚提取物中 C3G、P3G、D3G 的含量及其抗氧化活性进行了分析,C3G、P3G、D3G 的标准曲线如表 2 所示,其 HPLC 图谱如图 1 所示。经大孔树脂分离纯化后,桑葚花色苷中杂质峰明显较少或降低,其 C3G、P3G、D3G 含量分别为 9.1%、20.9%、7.6%。与桑葚粗提取物比较,纯化后桑葚花色苷中 C3G、P3G、D3G 的含量分别增加了 193.5%、190.3%、171.4%。DPPH 自由基清除实验表明,桑葚粗提取物、纯化后桑葚花色苷、维生素 C 的 DPPH 自由基清除率分别为 46.1%、88.4%、90.6%。桑葚花色苷具有良好的抗氧化活性,远优于桑葚粗提物的抗氧化活性。可能原因是,在花色苷提取过程中,大量的蛋白质、氨基酸、多糖等杂质成分亦被提取,降低了桑葚粗提取物中花色苷的含量,从而影响了花色苷的抗氧化活性^[18]。因此,通过高效的精制方式处理桑葚粗提取物以减少杂质,提升花色苷的含量,以增强其抗氧化活性,是挖掘桑葚花色苷抗疲劳潜力的必要步骤。

表 2 C3G、P3G、D3G 含量测定的标准曲线方程与含量
Table 2 Standard curve equation and the content of C3G, P3G, D3G

化合物	线性回归 曲线方程	决定系数 (R ²)	线性范围 (mg/mL)	含量(%)	
				纯化前	纯化后
矢车菊素-3-葡萄糖苷	Y=402936x-15567	0.9993	0.05~0.8	3.1	9.1
飞燕草素-3-葡萄糖苷	Y=307431x-10819	0.9996	0.05~0.8	7.2	20.9
天竺葵素-3-葡萄糖苷	Y=292114x-10861	0.9985	0.05~0.8	2.8	7.6

注: x、Y 分别为目标成分浓度(mg/mL)、峰面积。

2.2 桑葚花色苷对小鼠负重游泳时间的影响

过量运动后,机体能量供应和代谢能力不足,出现身体乏力、肌肉酸痛等疲劳症状,使得机体运动能力、耐力下降等。负重游泳实验常用于评价食品药品的抗疲劳作用,力竭运动时间的长短客观、直接的反映了运动能力^[19-20]。由表 3 可知,模型组小鼠的游泳力竭时间呈现先增加后逐渐降低的趋势。第 1 周小鼠适量的运动,增强了机体运动能力与忍耐力,从而延长了游泳力竭时间。然而,第 2 周开始,小鼠游泳的运动量倍增,超过了身体负荷,从而产生疲劳导致力竭时间降低。在末次给药后,低、中、高剂量组小鼠的游泳力竭时间分别为 13.85±1.23、15.91±1.15、19.48±1.04 min。与模型组比较,低、中、高剂量组小鼠的游泳力竭时间分别延长了 94.5%、125.6%、

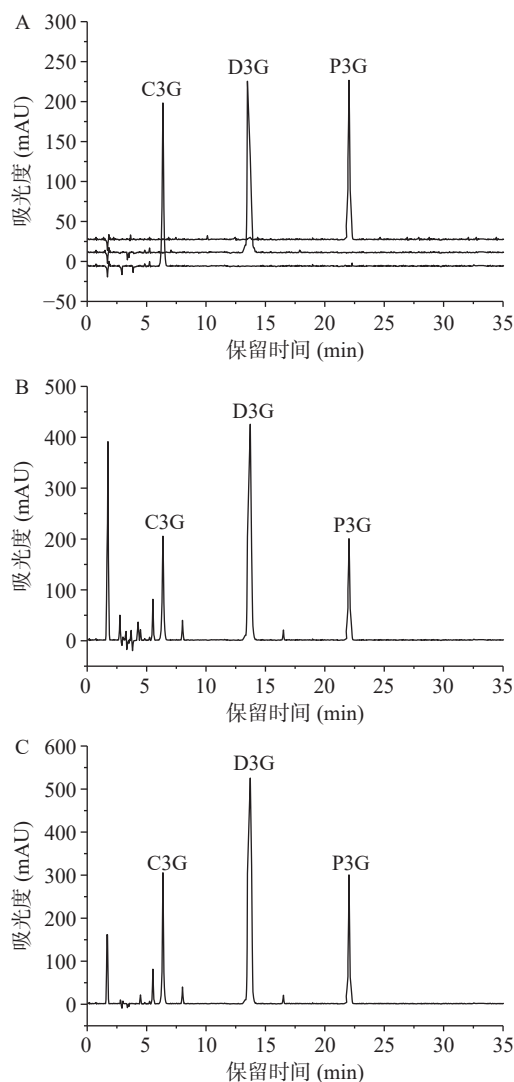


图1 桑葚花色苷提取物色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mulberry anthocyanin extract

注: 标准品(A)、桑葚粗提取物(B)与纯化后桑葚花色苷(C)。

表3 桑葚花色苷对小鼠负重游泳时间的影响

Table 3 Effect of mulberry anthocyanin on the loading swimming time of mice

组别	负重游泳时间(min)				
	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
安静组	—	—	—	—	—
有氧运动组	—	—	—	—	—
模型组	8.61±0.41	9.43±0.57	7.22±0.82	7.19±0.94	7.05±1.36
低剂量组	8.59±0.38	10.56±0.41	12.27±0.77	12.8±0.91	13.85±1.23 [#]
中剂量组	8.62±0.36	11.88±0.59	13.85±0.84	15.1±0.94	15.91±1.15 [#]
高剂量组	8.51±0.42	13.22±0.78	16.1±0.97	18.85±1.02	19.48±1.04 [#]

注: 与模型组比较, #代表差异显著, $P<0.05$ 。

176.3% ($P<0.05$), 且与桑葚花色苷存在剂量依赖关系。同桑葚多糖抗疲劳研究的结果一致^[4], 上述研究结果表明了桑葚花色苷作为桑葚的重要活性成分, 可有效提高小鼠的运动耐力, 延长小鼠运动时间, 具有显著的抗疲劳作用。

2.3 桑葚花色苷对能量代谢的影响

Lac、BUN 分别是糖、蛋白质代谢的产物, 其水

平的高低反应机体糖类、蛋白质的消耗程度, 客观体现疲劳累积程度^[21]。由图2可知, 与安静组比较, 有氧运动组小鼠血清中 Lac、BUN 含量无显著性差异 ($P>0.05$)。与有氧运动组比较, 模型组小鼠血清中 Lac、BUN 含量分别显著升高了 102.3%、64.6% ($P<0.05$)。在正常的情况下, 机体内的 Lac、BUN 均处于动态平衡的状态。有氧运动过程中, 肌肉组织的糖原、蛋白质等物质代谢加快, 以补充机体能量的消耗。Lac、BUN 的生成速率小于其分解或排出的速率。因此, 有氧运动组小鼠体内的 Lac、BUN 水平较低, 未产生相关的疲劳症状。然而, 当运动过度时, 体内糖和蛋白质分解迅速加快。同时, 机体处于缺氧状态, 大量的 Lac、BUN 无法分解, 堆积于体内, 破坏体内酸碱平衡, 从而使得模型组小鼠体内 Lac、BUN 浓度迅速升高, 产生疲劳症状^[22]。

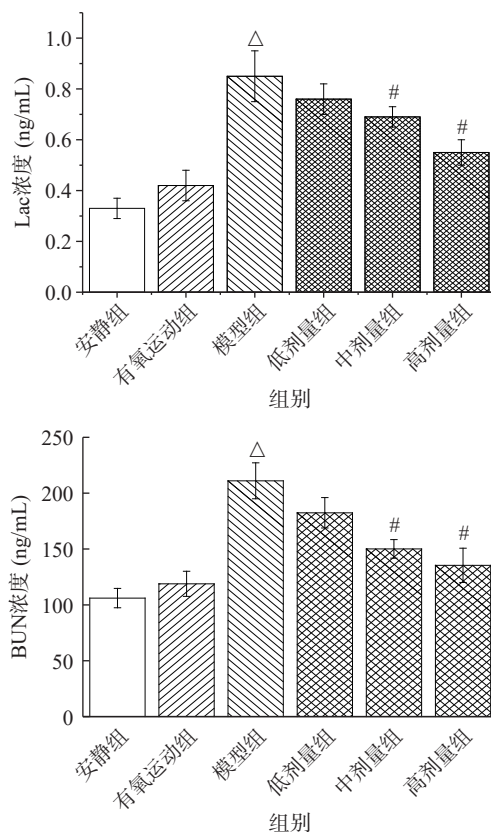


图2 桑葚花色苷对小鼠血清中 Lac、BUN 浓度的影响

Fig.2 Effect of mulberry anthocyanin on the concentration of Lac、BUN in serum of mice

注: 与安静组比较, *代表差异显著 $P<0.05$; 与有氧运动组比较, Δ代表差异显著 $P<0.05$; 与模型组比较, #代表差异显著 $P<0.05$; 图3~图6同。

低、中、高剂量组小鼠的清中 Lac、BUN 浓度依次降低, 与桑葚花色苷存在剂量依赖关系。与模型组比较, 低剂量组 Lac 和 BUN 浓度无显著性差异 ($P>0.05$); 中、高剂量组 Lac 浓度分别显著降低了 18.8%、35.3% ($P<0.05$), BUN 浓度分别显著降低了 28.9%、36.4% ($P<0.05$)。高剂量组 BUN 浓度与有氧运动组无显著性差异 ($P>0.05$)。上述研究与百香果、胡萝卜花色苷抗疲劳的研究结果一致^[23-24], 可能

由于低剂量的桑葚花色苷总量太低,而花色苷结构不稳定,导致机体吸收的桑葚花色苷较少,无法发挥显著的功效^[25]。随着剂量的增加,桑葚花色苷逐渐被吸收,减少了运动中糖类和蛋白质分解,使得 Lac、BUN 浓度降低。因此,桑葚花色苷可改善体内糖类、蛋白质和氨基酸的分解代谢,减少代谢产物的堆积,发挥抗疲劳作用。

2.4 桑葚花色苷对运动损伤的影响

LDH 是糖酵解的关键酶,催化乳酸氧化成丙酮酸。CK 是促进能量代谢的酶,与细胞内能量运转密切相关。LDH、CK 常存在于肌肉组织中,其活性作为运动损伤程度的指标,反映机体对运动负荷的适应能力^[23]。由图 3 可知,与安静对照组比较,有氧运动组小鼠血清中 CK 和 LDH 活性无显著性差异($P>0.05$)。与有氧运动组比较,模型组小鼠血清中 CK 和 LDH 活性显著升高了 26.9%、42.2%($P<0.05$)。有氧运动的强度较低,机体的负荷较小,不易造成运动损伤。当过度运动时,对骨骼肌造成了损伤,使得细胞膜通透性增强,LDH 和 CK 易渗透至血液中,并大量的积累。因此,有氧运动组小鼠血清中 LDH 和 CK 活力较低,模型组小鼠血清中 CK 和 LDH 活性则快速升高^[25]。

低、中、高剂量组小鼠的清中 CK 和 LDH 活性均依次降低,与桑葚花色苷存在剂量依赖关系。与模型组比较,中、高剂量组 LDH 活性分别显著降低了 21.2%、28.9%,CK 活性分别显著降低了 22.9%、28.2% ($P<0.05$)。高剂量组 LDH、CK 活性与有氧运动组无显著性差异($P>0.05$)。机体疲劳、运动损伤等与氧化应激密切相关,通过抗氧化、抗炎、抗凋亡等方式可改善氧化应激,减轻氧化损伤,预防疲劳^[26]。桑葚花色苷具有良好的体内外抗氧化活性,有助于改善机体氧化应激能力,预防心血管疾病、保护视网膜、保护神经细胞等^[27]。因此,剂量组肌肉组织损伤减

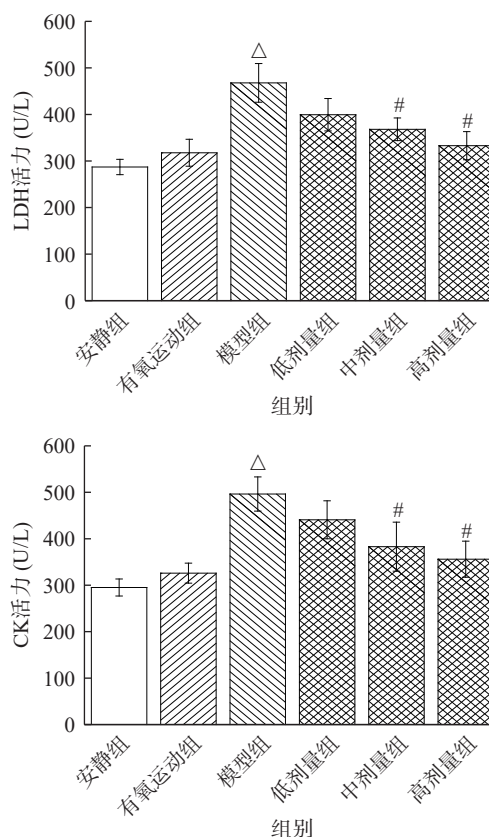


图 3 桑葚花色苷对小鼠血清中 LDH 和 CK 活力的影响
Fig.3 Effect of mulberry anthocyanin on the activity of LDH and CK in serum of mice

轻,细胞膜通透性降低,渗透至血液中 LDH 和 CK 的活性降低。综合上述结果表明,桑葚花色苷可能是通过改善机体氧化应激能力,从而预防运动损伤,发挥抗疲劳的作用。

2.5 桑葚花色苷对氧化因子的影响

ROS 是一类有超强氧化性的自由基,易攻击细胞膜、脂质、蛋白质和 DNA 等,导致氧化应激损伤。因此,通过抑制 ROS 的产生或积累,可改善氧

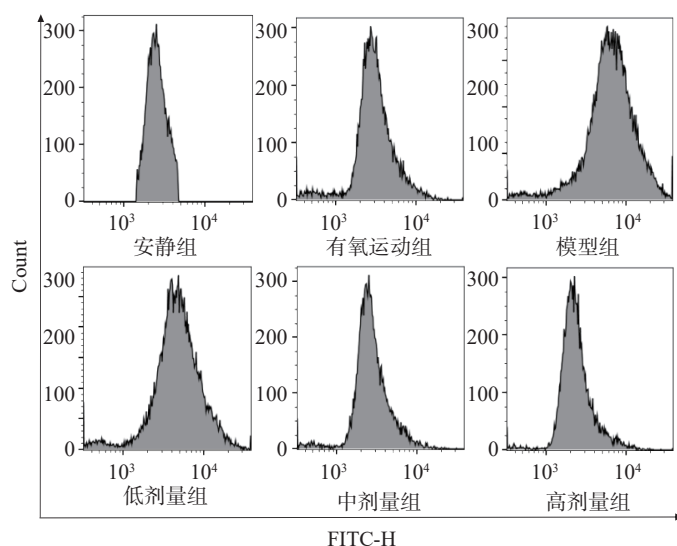
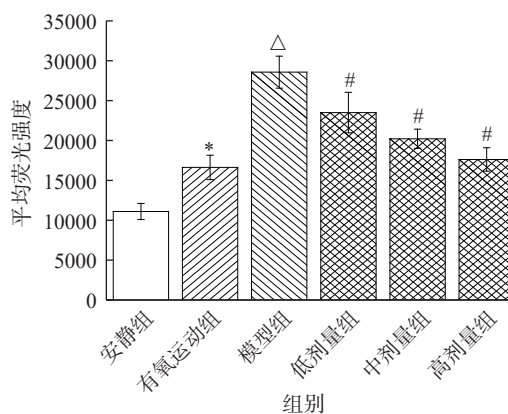


图 4 桑葚花色苷对小鼠骨骼肌中 ROS 含量的影响

Fig.4 Effect of mulberry anthocyanin on the content of ROS in skeletal muscle of mice



化应激损伤,有利于缓解疲劳^[16]。由图 4 可知,与安静组比较,有氧运动组、模型组小鼠骨骼肌 ROS 含量显著升高($P<0.05$)。在运动过程中,肌肉组织的血流量增加,以满足机体的氧气消耗,会伴随大量自由基的产生与清除。然而,当过度运动时,机体抗氧化和氧化系统失衡,从而使得模型组小鼠体内 ROS 大量堆积而显著升高($P<0.05$),导致肌肉组织稳态紊乱,造成氧化应激损伤和疲劳^[16]。

低、中、高剂量组小鼠的骨骼肌 ROS 含量依次降低,与桑葚花色苷存在剂量依赖关系。与模型组比较,低、中、高剂量组 ROS 含量分别降低了 20.6%、43.3%、54.4%,且存在显著性差异($P<0.05$)。高剂量组 ROS 含量与有氧运动组无显著性差异($P>0.05$)。诸多桑葚花色苷抗氧化活性研究结果表明,桑葚花色苷可清除自由基,具有良好的抗氧化效果^[9,28]。综合上述结果表明,桑葚花色苷作为抗氧化剂,可抑制体内 ROS 氧化因子的产生或积累,改善氧化应激,发挥抗疲劳的作用。

2.6 桑葚花色苷对氧化应激的影响

SOD 和 GSH-Px 是机体内重要的酶系抗氧化剂和自由基清除剂,可催化自由基转化为过氧化氢,阻断自由基引发的组织损伤,从而发挥抗氧化功能^[29]。MDA、8-OHdG 作为体内氧化能力的标志物,是脂质、DNA 分别与自由基反应的产物^[29]。由图 5 可知,与安静组小鼠相比,有氧运动组小鼠骨骼肌 SOD 和 GSH-Px 活性、MDA 和 8-OHdG 含量无显著性差异($P>0.05$)。与有氧运动组比较,模型组小鼠骨骼肌 SOD、GSH-Px 活性显著降低($P<0.05$),MDA 和 8-OHdG 含量显著升高($P<0.05$)。在运动过程中,机体内产生并堆积了大量的自由基,同时调节体内抗氧化体系活性,以改善机体的氧化应激能力,保护细胞组织^[30]。因此,有氧运动组小鼠 SOD、GSH-Px 活性显著升高,MDA、8-OHdG 含量基本不变。然而,过度运动破坏了模型组小鼠体内氧化平衡体系,消耗大量的 SOD、GSH-Px 抗氧化剂,使其活性降低。另外,大量自由基在体内堆积,使得脂质、DNA 过氧化反应增加,对机体造成氧化应激损伤,模型组小鼠 MDA、8-OHdG 含量升高^[30]。

低、中、高剂量组小鼠的骨骼肌 SOD、GSH-Px 活性依次升高,MDA 和 8-OHdG 含量依次降低,且与桑葚花色苷存在剂量依赖关系。与模型组比较,高剂量组小鼠 SOD、GSH-Px 活性显著升高了 27.8%、51.4%($P<0.05$);中、高剂量组 MDA 含量分别显著降低了 26.3%、40.1%,8-OHdG 含量分别显著降低了 23.6%、52.5%($P<0.05$)。高剂量组 MDA 和 8-OHdG 含量与有氧运动组无显著性差异($P>0.05$)。上述研究结果与百香果、胡萝卜花色苷抗疲劳的研究结果一致^[23-24],桑葚花色苷作为良好的抗氧化剂,有助于清除体内自由基,阻止 MDA 和 8-OHdG 的生成,减小细胞氧化损伤程度,发挥抗疲劳作用^[25]。同

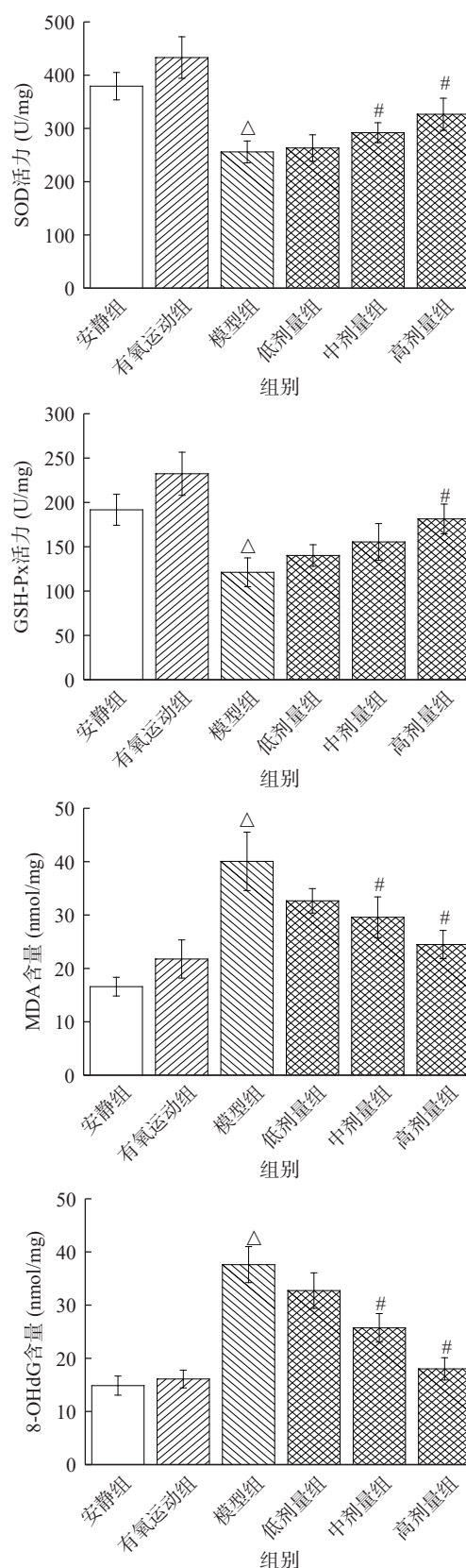


图5 桑葚花色苷对小鼠骨骼肌中 SOD 和 GSH-Px 活性、MDA 和 8-OHdG 含量的影响

Fig.5 Effect of mulberry anthocyanin on the activity of SOD and GSH-Px, the content of MDA and 8-OHdG in skeletal muscle of mice

时,随着桑葚花色苷剂量的增加,SOD 和 GSH-Px 的消耗减少,维护了机体的稳态平衡。因此,桑葚花色

苷可通过清除自由基,减少脂质过氧化和 DNA 损伤,提高骨骼肌 SOD、GSH-Px 抗氧化活性,改善机体氧化应激损伤,发挥抗疲劳的作用。

2.7 桑葚花色苷对小鼠骨骼肌 Nrf2 和 HO-1 相对表达水平的影响

核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)可激活下游多个抗氧化因子和 GSH 氧化还原系统,是增强细胞抗氧化应激作用的调节因子,参与细胞物质与能量代谢、细胞氧化应激等,有助于缓解机体疲劳^[30]。血红素氧合酶 1(HO-1)是抗炎、抗氧化、具有神经保护作用的诱导酶,作为抗氧化因子,在抗氧化损伤中具有重要的作用^[31]。因此,Nrf2、HO-1 是重要的抗疲劳分子靶点。由图 6 可知,与安静组比较,有氧运动组小鼠骨骼肌 Nrf2 和 HO-1 mRNA 相对表达水平无显著性差异($P>0.05$)。与有氧运动组比较,模型组小鼠骨骼肌 Nrf2 和 HO-1 mRNA 相对表达水平显著降低($P<0.05$)。在非运动状态下,Nrf2 常与其负调节因子 Keap1 形成二聚体,从而抑制 Nrf2 的表达。然而,在运动过程中,机体产生了大量的 ROS,使得 Keap1 结构加速解偶联,从而刺激 Nrf2 的转移和表达,激活下游 HO-1 相关的抗氧化应答过程,以清除

ROS。Nrf2 和 HO-1 表达的调节作用存在一定剂量效应,过度运动使机体抗氧化和氧化体系失衡;过量的 ROS 加剧了细胞损伤或凋亡,一定程度抑制了 Nrf2 和 HO-1 mRNA 的表达^[32]。因此,模型组小鼠 Nrf2、HO-1 mRNA 相对表达水平降低。

低、中、高剂量组小鼠骨骼肌 Nrf2 和 HO-1 mRNA 相对表达水平含量依次升高,与桑葚花色苷存在剂量依赖关系。与模型组比较,低、中、高剂量组 Nrf2 mRNA 相对表达水平分别显著升高了 73.3%、84.4%、113.3%($P<0.05$),HO-1 mRNA 分别显著升高了 29.5%、50.1%、61.4%($P<0.05$)。可能原因是,体内 ROS 刺激了 Nrf2 的转移和表达,激活了下游 HO-1 相关的抗氧化应答过程。同时,桑葚花色苷作为良好的抗氧化剂,有助于清除体内自由基,减少细胞的氧化损伤,保护了细胞^[25]。因此,剂量组小鼠 Nrf2、HO-1 mRNA 相对表达水平升高。矢车菊素-3-O-葡萄糖苷可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路保护 ROS 介导的细胞损伤^[33];蓝莓花青素可通过调节 Nrf2/HO-1 信号传导改善视网膜氧化应激和炎症^[34];花青素作为抗氧化剂,通过 PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 途径降低 HT22 细胞中神经毒性而保护神经细胞^[35]。诸多研究表明花色苷可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,增加 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达,增强细胞抗氧化应激的能力,以保护细胞。综合上述研究结果表明,桑葚花色苷可通过促进 Nrf2/HO-1 的表达,增强机体抗氧化作用,改善氧化应激能力,发挥抗疲劳的作用机制。

3 结论

经过大孔树脂纯化后,桑葚花色苷中 C3G、P3G、D3G 含量达到 9.1%、20.9%、7.6%,显示出良好的抗氧化活性。随着给药时间的增加,桑葚花色苷表现出良好的抗疲劳作用。在末次给药后,与模型组比较,低、中、高剂量组小鼠的游泳力竭时间分别延长了 94.5%、125.6%、176.3%($P<0.05$)。血清和骨骼肌生化指标分析显示,桑葚花色苷可改善体内物质和能量代谢,减少 Lac、BUN 等代谢物的堆积,降低 LDH、CK 活性;并通过清除自由基,提高 SOD 和 GSH-Px 的活力,减少脂质过氧化和 DNA 损伤,改善机体氧化应激损伤,提升运动耐力,从而发挥抗疲劳作用。其中,高剂量组 BUN 浓度、LDH 和 CK 活性、MDA 和 8-OHdG 含量,与有氧运动组无显著性差异($P>0.05$)。Nrf2/HO-1 mRNA 表达的增加,表明桑葚花色苷可通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路,改善氧化应激能力,增强机体抗氧化作用,以发挥抗疲劳的作用机制。以上研究初步确定了桑葚花色苷具有良好的抗疲劳作用,与其抗氧化能力、调控 Nrf2/HO-1 信号通路的作用机制密切相关,为进一步深度开发桑葚资源及其应用提供了理论依据。然而,高纯度桑葚花色苷单体的抗疲劳能力、具体的作用蛋白靶点仍需探索。

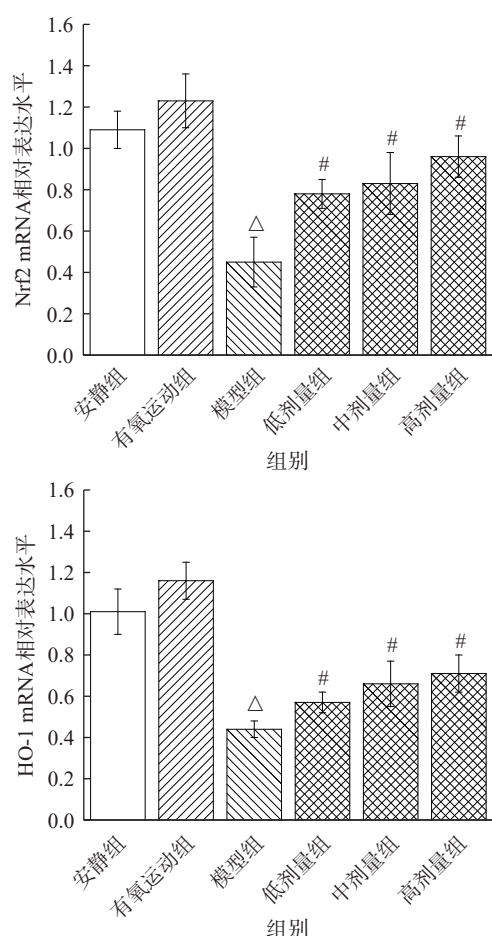


图 6 桑葚花色苷对小鼠骨骼肌 Nrf2 和 HO-1 mRNA 相对表达水平的影响

Fig.6 Effect of mulberry anthocyanin on the relative expression levels of Nrf2 and HO-1 mRNA in skeletal muscle of mice

参考文献

- [1] ZHOU S S, JIANG J G. Anti-fatigue effects of active ingredients from traditional Chinese medicine: a review[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26(10): 1833–1848.
- [2] PENG X, GAO L, AIBAI S. Antifatigue effects of Anshenyizhi compound in acute excise-treated mouse via modulation of AMPK/PGC-1 α -related energy metabolism and Nrf2/ARE-mediated oxidative stress[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(6): 1897–1906.
- [3] 康鹏, 李国薇, 马宏祥, 等. 运动营养食品及其抗疲劳活性成分研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(23): 9157–9164. [KANG P, LI G W, MA H Y, et al. Research progress of sports nutrition food and its anti-fatigue bioactive components[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(23): 9157–9164.]
- [4] 靳铁柱. 响应面法优化桑葚多糖纯化工艺及不同产物的抗运动疲劳活性比较[J]. *保鲜与加工*, 2022, 22(4): 67–73. [JIN T Z. Optimization of purification process of mulberry polysaccharide by response surface methodology and comparison of anti-exercise fatigue activity of different products[J]. *Storage and Process*, 2022, 22(4): 67–73.]
- [5] 马永昆, 许满青, 陈必祥, 等. 桑椹果醋营养功能功效解读[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 2117–2124. [MA Y K, XU M Q, CHEN B X, et al. Interpretation of the nutritional function of mulberry vinegar[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2021, 12(6): 2117–2124.]
- [6] 马识淳, 韩伟. 裹荷桑葚复合饮料研制及其抗运动疲劳作用研究[J]. *中国食品添加剂*, 2021, 32(8): 67–75. [MA S C, HAN W. Development and anti-fatigue effect of compound beverage of *Zingiber striatum* and mulberry[J]. *China Food Additive*, 2021, 32(8): 67–75.]
- [7] 薛宏坤, 李鹏程, 钟雪, 等. 高速逆流色谱分离纯化桑葚花色苷及其抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2020, 41(15): 96–104. [XUE H K, LI P C, ZHONG X, et al. Separation and purification of anthocyanins from mulberry fruit by high-speed counter-current chromatography and their antioxidant activity[J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 96–104.]
- [8] FANG J L, JIA S S, LIN Y, et al. Extraction, purification, content analysis and hypoglycemic effect of mulberry marc anthocyanin[J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2020, 16: 68–75.
- [9] 赵秀玲, 范道春. 桑葚的生理活性成分、提取检测及药理作用研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(3): 378–385. [ZHAO X L, FAN D C. Review of physiological active components, extraction and detection methods and pharmacological bioactivities of mulberry[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(3): 378–385.]
- [10] 罗晓玲, 徐嘉红, 杨武斌, 等. 蓝莓花色苷抗氧化功能及稳定性研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 312–317. [LUO X L, XU J H, YANG W B, et al. Research progress in antioxidant function and stability of blueberry anthocyanins[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(4): 312–317.]
- [11] YANG S, WAN C, LI X Y, et al. Investigation on the biological activity of anthocyanins and polyphenols in blueberry[J]. *Food Science*, 2021, 86(2): 614–627.
- [12] WU T, YIN J, ZHANG G, et al. Mulberry and cherry anthocyanin consumption prevents oxidative stress and inflammation in diet-induced obese mice[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60: 687–694.
- [13] CHEN Y, DU F, WANG W, et al. Large-scale isolation of high-purity anthocyanin monomers from mulberry fruits by combined chromatographic techniques[J]. *Journal of Separation Science*, 2017, 40(17): 3506–3512.
- [14] ZHOU Y J, SONG J L, XU Q, et al. Optimization and application of HPLC for simultaneous separation of six well-known major anthocyanins in blueberry[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(10): 961–970.
- [15] SURIYAPROM S, KAEWKOD T, PROMPUTTHA I, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of white mulberry (*Morus alba* L.) fruit extracts[J]. *Plants*, 2021, 10(12): 2736.
- [16] 郑传痴, 杨艳, 韦余, 等. 金丝桃苷对小鼠的抗疲劳作用及机制研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(23): 350–355. [ZHENG C C, YAN Y, WEI Y, et al. Study on the effects and mechanism of hyperoside on anti-fatigue in mice[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(23): 350–355.]
- [17] 程美玲, 黄鑫, 安瞳昕, 等. 玫瑰花青素对小鼠抗疲劳及抗氧化研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(6): 956–961. [CHEN M L, HUANG X, AN T X, et al. Study on anti-fatigue and anti-oxidation effects of rose anthocyanin in mice[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2021, 36(6): 956–961.]
- [18] ZHANG L, FAN G, KHAN M A, et al. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues[J]. *Food Chemistry*, 2020, 323: 126714.
- [19] ZHANG S, LIU B, YAN G, et al. Chemical properties and anti-fatigue effect of polysaccharide from *Pholiota nameko* [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2022, 46: e14015.
- [20] MA C, DENG Y, XIAO R, et al. Anti-fatigue effect of phlorizin on exhaustive exercise-induced oxidative injury mediated by Nrf2/ARE signaling pathway in mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 918: 174563.
- [21] LI Y, DENG Y, LI Z, et al. Composition, physicochemical properties, and anti-fatigue activity of water-soluble okra (*Abelmoschus esculentus*) stem pectins[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 165: 2630–2639.
- [22] QIAO Y B, YE Y, CAI T X, et al. Anti-fatigue activity of the polysaccharides isolated from *Ribes stenocarpum* Maxim[J]. *Journal of Functional Foods*, 2022, 89: 104947.
- [23] HU M, DU J, DU L D, et al. Anti-fatigue activity of purified anthocyanins prepared from purple passion fruit (*P. edulis* Sim.) epicarp in mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 65: 103725.
- [24] JIN S H, CAI R R, CHENG F R, et al. Content determination and anti-fatigue effect of the purified anthocyanin from purple *Daucus carota* [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2020, 16(71): 670–674.
- [25] HE W, GUO F, JIANG Y, et al. Enzymatic hydrolysates of soy protein promote the physicochemical stability of mulberry anthocyanin extracts in food processing[J]. *Food Chemistry*, 2022, 386: 132811.
- [26] ZHU H, XU W, WANG N, et al. Anti-fatigue effect of *Lepidium meyenii* Walp. (Maca) on preventing mitochondria-mediated muscle damage and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* [J]. *Food Function*, 2021, 12(7): 3132–3141.
- [27] HAO J, GAO Y, XUE J, et al. Phytochemicals, pharmacological effects and molecular mechanisms of mulberry[J]. *Foods*, 2022, 11(8): 1170.
- [28] CHEN T, SHUANG F F, FU Q Y, et al. Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of mulberry (*Morus*

- alba* L.) fruits from different varieties in China[J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2688.
- [29] ZHU S, YANG W, LIN Y, et al. Antioxidant and anti-fatigue activities of selenium-enriched peptides isolated from *Cardamine violifolia* protein hydrolysate[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 79: 104412.
- [30] ZHANG X, JING S, LIN H, et al. Anti-fatigue effect of anwulignan via the NRF2 and PGC-1 α signaling pathway in mice[J]. *Food Function*, 2019, 10(12): 7755–7766.
- [31] 张馨芸, 林慧娇, 李欣, 等. 五味子酯甲通过调节肝脏 Nrf2/ARE 抗氧化通路改善小鼠疲劳的作用[J]. *食品科学*, 2020, 41(1): 190–195. [ZHANG X Y, LIN H Q, LI X, et al. Schisantherin a improves fatigue in mice by regulating the Nrf2/ARE antioxidant pathway in liver[J]. *Food Science*, 2020, 41(1): 190–195.]
- [32] 蓝瑞高, 梁益军. 人参皂苷 CK 对力竭游泳大鼠抗疲劳作用及骨骼肌氧化应激的影响[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2022, 37(3): 491–496. [LAN R G, LIANG Y J. Effects of ginsenoside CK on anti-fatigue and oxidative stress of skeletal muscle in exhaustive swimming rats[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2022, 37(3): 491–496.]
- [33] BAI X, LIAN Y, HU C, et al. Cyanidin-3-glucoside protects against high glucose-induced injury in human nucleus pulposus cells by regulating the Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2022, 42(7): 1137–1145.
- [34] SONG Y, HUANG L, YU J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2016, 301: 1–6.
- [35] ALI T, KIM T, REHMAN S U, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress, neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(7): 6076–6093.