

葛根素对运动疲劳大鼠海马 NO-cGMP 信号系统的影响

郭雅¹, 习雪峰²

(1.西北工业大学体育部, 陕西 西安 710072; 2.河南大学体育学院, 河南 开封 475001)

摘要:目的: 研究葛根素对运动疲劳大鼠认知能力和海马组织 NO-cGMP 信号系统的影响。方法: 选取成年雄性 SD 大鼠 30 只。将大鼠随机分为 3 组: 安静对照组、运动对照组、运动加药组, 每组 10 只大鼠。对大鼠进行为期 10d 递增负荷游泳, 测试大鼠认知能力和海马 iNOS mRNA、nNOS mRNA 表达和 cGMP、NO 含量。结果: 运动对照组大鼠中心区停留时间百分比、通过原平台位置次数和 nNOS mRNA 含量较安静对照组显著下降, 大鼠海马 NO 含量、cGMP 含量、iNOS mRNA 表达显著增加; 运动加药组大鼠中心区停留时间百分比、通过原平台位置次数和 nNOS mRNA 表达较运动对照组显著增加。大鼠海马组织 NO 含量、iNOS mRNA 表达、cGMP 含量较运动对照组显著降低。结论: 葛根素能显著降低运动疲劳大鼠海马组织的 NO 含量, 其结果可能与 iNOS mRNA 表达的降低有关, 并可能通过降低海马组织 NO 含量, 使运动疲劳大鼠海马 cGMP 含量趋于稳定以实现运动疲劳大鼠的神经保护功能。

关键词: 葛根素; 海马; 运动疲劳; NO-cGMP 信号系统

Influence of Puerarin Administration on Hippocampal NO-cGMP Signaling System in Rats with Exercise-Induced Fatigue

GUO Ya¹, XI Xue-feng²

(1. Physical Education Department, Northwest Polytechnical University, Xi'an 710072, China;

2. College of Physical Education, Henan University, Kaifeng 475001, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of puerarin on cognitive ability and hippocampal tissue NO-cGMP signaling in rats with exercise induced fatigue. Methods: A total of 30 adult male SD rats were randomly assigned to 3 groups (10 rats in each group): no exercise control, exercise and exercise plus puerarin groups. The rats in both exercise groups were subjected to increasing weight-loading swimming training for 10 d. The cognitive ability of rats was evaluated by morris water maze test, and the hippocampal iNOS mRNA and nNOS mRNA expression levels and cGMP and NO contents were measured. Results: The exercise control group showed a significant decrease in percent residence time in the central area, the number of original platform passes, and hippocampal nNOS mRNA expression level but a significant increase in hippocampal cGMP and NO contents and iNOS mRNA expression level as compared to the no exercise control. The percent residence time in the central area, the number of original platform passes and nNOS mRNA expression level of the exercise plus puerarin group were significantly higher than those of the exercise control group, whereas the hippocampal cGMP and NO contents and iNOS mRNA expression level of the exercise plus puerarin group were significantly lower than those of the exercise control group. Conclusion: Puerarin administration can result in a marked decrease in hippocampal NO content in rats with exercise induced fatigue, which may be related to the decreased expression of iNOS mRNA. Moreover, puerarin has some neuroprotective effect on rats with exercise induced fatigue by inhibiting hippocampal NO and stabilizing cGMP production.

Key words: puerarin; hippocampus; exercise induced fatigue; NO-cGMP signaling system

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)13-0276-04

收稿日期: 2011-07-20

作者简介: 郭雅(1975—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为运动人体科学和体育训练学。E-mail: 596003001@qq.com

葛根素是从中药葛根中提取的主要有效成分之一,是一种异黄酮类化合物,以往的实验研究发现葛根素具有减轻炎症^[1]、抗氧化损伤^[2]、减少兴奋性氨基酸释放^[3]、抑制神经细胞凋亡^[4]的作用。而目前关于葛根素对运动疲劳导致学习记忆等认知能力的影响尚未见报道。根据葛根素的药理作用及前人的研究成果,通过实验研究探讨其对运动疲劳大鼠认知能力和海马组织 NO-cGMP 信号系统的影响,为葛根素作为抗中枢运动疲劳药品或运动保健饮料的开发研制提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

1.1.1 动物

SD(Sprague-Dawley)雄性健康大鼠 30 只,体质量 160~180g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。国家标准啮齿类动物干燥饲料喂养,自由饮食,动物室温度(23±5)℃,相对湿度 40%~70%,分笼饲养备用。

1.1.2 动物分组

将 30 只大鼠随机分为 3 组:安静对照组 10 只、运动对照组 10 只、运动加药组 10 只。各组小鼠自由摄入水和基础饲料,运动加药组每天采用灌胃法给药,用药剂量为 400mg/kg,安静对照组和运动对照组每天按 0.1mL/10g 灌胃给蒸馏水一次。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立

动物完成 15min/d、3d 适应性游泳运动后开始建模,参照本实验室建立的 10d 递增负荷游泳运动方式^[5]。训练时间为 10d,训练在直径为 120cm 的塑钢圆桶中进行,静水深 90cm,水温(30±1)℃。第 1~2 天动物游泳训练时间为 30min,第 3~5 天每天递增 30min,第 6~7 天每天进行一次力竭性游泳训练,第 8~10 天每天进行 2 次力竭性游泳训练,次间间隔 6h。游泳训练期间对动物运动能力及活动状态进行观察。对照组相同条件饲养,不参加游泳训练。

1.2.2 3 组大鼠 Morris 水迷宫测试

在取材当天开始进行 Morris 水迷宫测试^[6]。Morris 水迷宫操作系统,包括直径 150cm 的圆形水池,直径 10cm、高 15cm 的平台,平台表面低于水面 2cm,水迷宫记录分析系统。训练 4d,在第 6 天撤去平台,进行空间搜索实验;去除平台并观察 2min 内大鼠在中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数,测试记忆能力^[7]。

1.2.3 动物取材和指标测试

第 11 天,3 组大鼠在安静状态下称质量,各组用 200mg/L 乌拉坦(0.5mL/kg)腹腔麻醉后迅速取脑组织剥离单侧海马,用生理盐水冲洗干净后立即置于液氮中保存备用。

海马组织 NO 含量测试采用硝酸还原酶法;海马 cGMP 含量的检测采用放免法;海马 iNOSmRNA 和 nNOS mRNA 采用逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)分析:采用 TRIzol(Invitrogen 公司)试剂一步抽提安静对照组、运动对照组、运动加药组大鼠脑皮质总 RNA,再逆转录成 cDNA。以适量 cDNA 为模板,在 TaqDNA 聚合酶催化下行 PCR,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列如下:iNOS 引物序列:正义:5'-CGCCAAGAACGTGTTCACCA-3',反义:5'-AGCAGGCACACGCAATGA TG-3',扩增产物的长度为 548bp, β -actin 内参照引物序列:正义:5'-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3',反义:5'-TCGGGGCATCGGAACCGCTCA--3',扩增产物的长度为 384bp;nNOS 引物序列:正义:5'-GGGGCTCAAATGGTATGG-3'。扩增产物的长度为 592bp。PCR 扩增反应:按照美国 Promega 公司提供的 PCR 扩增反应体系以及步骤进行。PCR 反应体系:诱导型一氧化氮合酶的 PCR 扩增条件为:94℃变性 30s,60℃复性 30s,72℃延伸 60s,反应 35 个循环,72℃延伸 10min; β -actin 的 PCR 扩增条件为:94℃变性 30s,56℃复性 30s,72℃延伸 60s,反应 35 个循环,72℃延伸 10min。PCR 产物在经 2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μ g/mL 溴乙锭),再用 UVP 凝胶图像成像系统进行分析,以待检测指标与 β -actin 吸光度的比值来表示其相对含量(目的基因相对表达量 = 目的基因条带吸光度 / β -actin 基因条带吸光度)。

1.3 统计学处理

数据经正态分布和方差齐性检验后以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析并进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果与分析

2.1 3 组大鼠 Morris 水迷宫测试结果

表 1 3 组大鼠 Morris 水迷宫测试结果($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Morris water maze test results for rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	中心区停留时间百分比/%	通过原平台位置次数
安静对照组	29.15 ± 5.05	5.13 ± 0.98
运动对照组	15.01 ± 4.60 $\Delta\Delta$	2.27 ± 0.57 Δ
运动加药组	21.49 ± 6.25 Δ	3.81 ± 0.93 Δ

注: Δ .与安静对照组比较,差异显著($P < 0.05$); $\Delta\Delta$.与安静对照组比较,差异极显著($P < 0.01$); Δ .与运动对照组比较,差异显著($P < 0.05$)。下同。

由表 1 可知, 与安静对照组比较, 运动对照组大鼠中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数显著下降($P < 0.05$)。与运动对照组大鼠相比, 运动加药组大鼠中心区停留时间百分比和通过原平台位置次数显著增加($P < 0.05$); 运动加药组大鼠停留时间百分比和通过原平台位置次数与安静对照组无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 葛根素对运动疲劳大鼠海马 NO、cGMP 含量和 NOS mRNA 表达的影响

表 2 葛根素对运动疲劳大鼠海马 NO、cGMP 含量和 NOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of puerarin on cGMP and NO contents and nNOS mRNA expression in the hippocampus of rats with exercise induced fatigue ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	NO 含量/ ($\mu\text{mol/L}$)	iNOS mRNA/ β -actin	nNOS mRNA/ β -actin	cGMP 含量/ (nmol/L)
安静对照组	1.49 ± 0.32	0.64 ± 0.09	0.77 ± 0.06	0.42 ± 0.06
运动对照组	$2.81 \pm 0.60^{\Delta\Delta}$	$1.52 \pm 0.14^{\Delta\Delta}$	$0.27 \pm 0.05^{\Delta\Delta}$	$2.17 \pm 0.77^{\Delta}$
运动加药组	$1.94 \pm 0.55^{\Delta}$	$1.08 \pm 0.10^{\Delta}$	$0.54 \pm 0.06^{\Delta\Delta}$	$1.35 \pm 0.21^{\Delta}$

由表 2 可知, 运动对照组大鼠海马 cGMP 含量显著高于安静对照组($P < 0.05$), NO 含量和 iNOS mRNA 表达均极显著高于安静对照组($P < 0.01$), nNOS mRNA 表达极显著低于安静对照组($P < 0.01$); 运动加药组大鼠海马 NO 含量、cGMP 含量和 iNOS mRNA 表达均显著低于运动对照组($P < 0.05$), nNOS mRNA 表达显著高于运动对照组($P < 0.05$), 同时显著低于安静对照组($P < 0.05$)。

3 讨 论

NO 是一个具有广泛生物学作用的生物活性因子, 以 L-精氨酸为底物, 在 NOS 催化作用下生成, 参与介导神经传递、血管调节、免疫反应等过程, 当 NO 异常表达时表现为明显的神经毒性作用^[8]。NOS 是体内合成 NO 的关键酶, 有 3 种亚型, 即内皮细胞型(eNOS)、神经元型(nNOS)和诱导型。iNOS 的活性需要诱导因素的存在, 它主要存在于巨噬细胞、平滑肌、肾小管上皮、血管内皮细胞, 在病理情况下, 当受到内毒素、 γ -干扰素、白介素-1 等细胞因子刺激时生成大量 NO。nNOS 主要分布于神经元中, 在突触可塑性、神经再生、神经传导与神经元发育、神经内分泌调节与行为调控方面起着非常重要的作用^[9]。在神经细胞损伤时, nNOS 表达上调, 产生大量 NO, 进而产生大量自由基, 损伤线粒体及 DNA, 诱导细胞凋亡, 产生神经毒性作用。nNOS 及 NO 在神经组织的作用越来越受到关注^[10]。海马富含各种信使受体, 是应激激素作用的一个靶区, 具有可塑性并极易受损。应激可导致海马兴奋性毒性损伤及行为的改变^[11]。海马中的 NO 作为神

经递质参与其他神经递质的功能活动, 如乙酰胆碱(Ach)、去甲肾上腺素(NE)、 γ -氨基丁酸(GABA)的释放, 参与热应激所致海马 CA1 区神经元损伤^[12]。海马结构中 NOS 神经元参与了中枢性疲劳应激的形成, 其机理可能与海马结构对应激反应的心理行为调节、神经内分泌调节以及 NO 的神经毒性有关^[13]。

本实验结果显示, 运动对照组大鼠海马 NO 含量和 iNOS mRNA 表达均极显著高于安静对照组($P < 0.01$), nNOS mRNA 表达极显著低于安静对照组($P < 0.01$), 提示运动疲劳导致海马 NO 含量显著升高, 与长期大强度运动提高 iNOS mRNA 表达有关。与文献[13]结果一致。另外 cGMP 的生成受鸟苷酸环化酶(GC)催化, 与 NO 一起构成细胞信息传递中 NO-cGMP 第二信使转导系统, 通过这一系统进行细胞间和细胞内信息传递和细胞功能调节的信号传导。而 NO 通过对其铁原子的作用, 主要激活 sGC, 使 cGMP 水平增高, NO 的许多生物学效应主要通过增加 cGMP 合成而实现^[14]。本实验结果中运动对照组大鼠海马 cGMP 含量显著高于安静对照组($P < 0.05$), 可能与运动疲劳导致海马 NO 含量的增加, 并通过以上方式增加了 cGMP 的产生, 通过 NO-cGMP 信号通路, 使细胞外 Ca^{2+} 内流, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 影响到细胞内外 Ca^{2+} 的稳态。而 Ca^{2+} 的平衡是学习记忆的重要因素^[15]。从而影响到保护与学习记忆相关的功能细胞和神经通路的传导, 进而可能影响到该组大鼠的认知能力。运动加药组大鼠海马 NO 含量、iNOS mRNA 表达和 cGMP 含量均显著低于运动对照组, 大鼠的认知能力显著高于运动对照组, 说明葛根素的补充能显著降低运动疲劳大鼠海马组织的 NO 含量, 其结果可能与 iNOS mRNA 表达的降低有关。并通过降低海马组织 NO 含量, 使运动疲劳大鼠海马 cGMP 含量趋于稳定来实现运动疲劳大鼠的神经保护功能。但运动疲劳的因素发生机制复杂, 各种因素可能互相促进, 互相影响。葛根素通过何种途径降低运动疲劳大鼠海马 NO 含量, 对 NO 的影响是直接途径还是间接途径, 值得进一步研究。

本实验结果显示葛根素能显著降低运动疲劳大鼠海马组织的 NO 含量, 其结果可能与 iNOS mRNA 表达的降低有关。并可能通过降低海马组织 NO 含量, 使运动疲劳大鼠海马 cGMP 含量趋于稳定来实现运动疲劳大鼠的神经保护功能。

参考文献:

- [1] CHANG Y, HSIEH C Y, PENG Z A, et al. Neuroprotective mechanisms of puerarin in middle cerebral artery occlusion-induced brain infarction in rats[J]. J Biomed Sc, 2009, 16: 9.
- [2] CHUNG M J, SUNG N J, PARK C S, et al. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 578(2/3): 159-170.

- [3] XU Xiaohong, ZHENG Xiaoxiang. Potential involvement of calcium and nitric oxide in protective effects of puerarin on oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(3): 421-426.
- [4] 姜泓, 王玲, 张义和, 等. 葛根素在新生鼠缺氧缺血性脑损伤中的神经保护作用[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(3): 245-247.
- [5] 侯莉娟, 刘晓莉, 乔德才. 大鼠游泳运动疲劳模型建立的研究[J]. *实验动物科学与管理*, 2005, 22(1): 1-3.
- [6] MIMURA M, YANO M. Memory impairment and awareness of memory deficits in early-stage Alzheimer's disease[J]. *Rev Neurosci*, 2006, 17(1/2): 253-266.
- [7] 高原, 肖谦, 赵柯湘, 等. 替米沙坦对糖尿病大鼠认知功能的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(15): 1514-1516.
- [8] MISHRA O P, DELIVORIA-PAPADOPOULOS M. Nitric oxide-mediated Ca^{2+} -influx in neuronal nuclei and cortical synaptosomes of normoxic and hypoxic newborn piglets[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 318(2): 93-97.
- [9] DREW B, LEEUWENBURGH C. Aging and the role of reactive nitrogen species[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 959(1): 66-81.
- [10] 张茹, 成红学, 吴海琴. 葛根素对大鼠局灶性缺血脑组织内海马神经元型一氧化氮合酶表达的影响[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2011, 31(6): 669-672.
- [11] SARKISOVA K Y, KULIKOV M A. Prophylactic actions of the antioxidant agent AEKOL on behavioral (psychoemotional) disturbances induced by chronic stress in rats[J]. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2001, 31(5): 503-508.
- [12] TAKEYA M, HASUO H, AKASU T. Contribution of nitric oxide to the depression of neuronal activity induced by temperature increase in the rat hippocampal CA1 area[J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 344(3): 153-156.
- [13] 药宏亮. 反复力竭游泳应激对大鼠海马结构神经元型一氧化氮合酶表达的影响[J]. *首都体育学院学报*, 2010, 22(6): 93-96.
- [14] 韩炎晶, 李文迅, 贾宝辉, 等. 电针对抑郁模型大鼠海马一氧化氮—环磷酸鸟苷信号转导通路的影响[J]. *针刺研究*, 2009, 34(4): 236-241.
- [15] 汤洋, 罗佛全. 学习记忆的分子生物学机制研究进展[J]. *南昌大学学报: 医学版*, 2010, 50(3): 116-119.