

金雀异黄素通过AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路缓解免疫抑制大鼠的疲劳作用

董佳萍¹, 谢琳琳¹, 王鹤霖¹, 迟晓星^{1,2,*}, 张东杰^{1,2,*}

(1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319;

2.黑龙江八一农垦大学杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:目的: 探讨金雀异黄素 (genistein, GEN) 缓解免疫抑制大鼠的疲劳作用及其作用机制。方法: 96 只雄性SD大鼠随机分为6组(每组16只), 分别为空白对照组、免疫抑制模型组与金雀异黄素低、中、高剂量组以及阳性对照组。除空白对照组外, 其余组腹腔注射环磷酰胺40 mg/kg m_b , 连续3 d, 建立免疫抑制大鼠模型。金雀异黄素低、中、高剂量组分别灌胃10、20、40 mg/kg m_b 金雀异黄素, 阳性对照组灌胃贞芪扶正颗粒3.125 g/kg m_b , 空白对照组灌胃等量花生油。实验结束后, 记录大鼠力竭游泳时间; 采用比色法检测大鼠血清中肌酸激酶 (creatinase kinase, CK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活力; 酶联免疫吸附测定法检测大鼠血清中免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 质量浓度; 采用实时荧光定量技术检测大鼠骨骼肌中腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1)、过氧化物酶增殖活化受体 γ 辅激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) mRNA表达水平; 采用蛋白免疫印迹法检测大鼠骨骼肌中p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ 的蛋白表达水平。结果: 与免疫抑制模型组相比, 补充GEN后极显著延长了大鼠力竭游泳时间 ($P < 0.01$); 与免疫抑制模型组相比, 高剂量GEN能够显著降低血清中CK活力 ($P < 0.05$) 和LDH活力 ($P < 0.01$), 极显著提高大鼠血清中IgG、TNF- α 质量浓度 ($P < 0.01$), 同时显著提高大鼠骨骼肌中p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ 基因及蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。结论: GEN具有缓解免疫低下大鼠疲劳的作用, 其机制可能与激活骨骼肌AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路及改善大鼠运动耐力、能量产生及免疫调节能力有关。

关键词: 金雀异黄素; 疲劳; 免疫抑制; AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

Genistein Alleviates Fatigue in Immunosuppressed Rats through the AMPK/SIRT1/PGC-1 α Signaling Pathway

DONG Jiaping¹, XIE Linlin¹, WANG Helin¹, CHI Xiaoxing^{1,2,*}, ZHANG Dongjie^{1,2,*}

(1. College of Food, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 2. Miscellaneous Grains Engineering Technology Research Centre, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: Objective: To explore the effect of genistein (GEN) on relieving fatigue in immunosuppressed rats and the underlying mechanism. Methods: A total of 96 male SD rats were randomly divided into six groups with 16 rats in each group, including blank control (CG), immunosuppression model (MG), low-dose GEN (LG), medium-dose GEN (MG), high-dose GEN (HG) and positive control (PG). All rats except those in the blank control group were injected intraperitoneally with cyclophosphamide at a dose of 40 mg/kg m_b for three days to establish an immunosuppressed rat model. The rats in the LG, MG and HG groups were gavaged with GEN at doses of 10, 20, and 40 mg/kg m_b , respectively.

收稿日期: 2022-05-07

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2021H055); 黑龙江省自然科学基金研究团队项目 (TD2020C003); “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2018YFE0206300)

第一作者简介: 董佳萍 (1996—) (ORCID: 0000-0003-1192-1043), 女, 硕士, 研究方向为食品营养与质量安全。

E-mail: 949656063@qq.com

*通信作者简介: 迟晓星 (1976—) (ORCID: 0000-0003-1771-5638), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与安全。

E-mail: chixiaoxing@sina.com

张东杰 (1966—) (ORCID: 0000-0003-3536-8422), 男, 教授, 博士, 研究方向为杂粮食品营养与安全追溯。

E-mail: byndzdj@126.com

The positive control group was gavaged with 3.125 g/kg m_b of Zhenqi Fuzheng granule, and the blank control group was gavaged with an equal amount of peanut oil. After the experiment, the exhaustive swimming time of rats was recorded. The activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) in rat serum were detected by colorimetry. The concentrations of immunoglobulin G (IgG) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect adenylate-activated protein kinase (AMPK), silent information regulator 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) and peroxisome proliferators-activated receptor- γ (PPAR γ) mRNA expression levels. The protein expression levels of AMPK, SIRT1, PGC-1 α and PPAR γ in the skeletal muscle of rats were detected by Western blot. Results: Compared with the MG group, GEN supplementation significantly prolonged the exhaustive swimming time of rats ($P < 0.01$), and high-dose GEN significantly decreased CK and LDH activities and increased the concentrations of IgG and TNF- α in the serum ($P < 0.01$), and significantly increased the gene and protein expression levels of AMPK, SIRT1, PGC-1 α and PPAR γ in the skeletal muscle of rats ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). Conclusion: GEN relieves fatigue in immunosuppressed rats, and the underlying mechanism may be related to activating the AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway in the skeletal muscle and improving the exercise endurance, energy production and immunomodulatory capacity of rats.

Keywords: genistein; fatigue; immunosuppression; AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway; peroxisome proliferators-activated receptor γ

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220507-089

中图分类号: R151.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2023) 09-0082-06

引文格式:

董佳萍, 谢琳琳, 王鹤霖, 等. 金雀异黄素通过AMPK/SIRT1/PGC-1 α 信号通路缓解免疫抑制大鼠的疲劳作用[J]. 食品科学, 2023, 44(9): 82-87. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220507-089. <http://www.spkx.net.cn>

DONG Jiaping, XIE Linlin, WANG Helin, et al. Genistein alleviates fatigue in immunosuppressed rats through the AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway[J]. Food Science, 2023, 44(9): 82-87. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220507-089. <http://www.spkx.net.cn>

金雀异黄素 (genistein, GEN) 是大豆异黄酮的主要活性成分^[1], 又称为染料木素或染料木黄酮, 是一种天然植物激素, 具有丰富的药理学活性^[2]。现已证实其具有抗癌活性, 目前在前列腺癌和乳腺癌治疗中效果显著。同时, 它还具有抗氧化、提高机体免疫、抗疲劳和抗骨质疏松等多种活性^[3-9]。蒙兰兰等^[7]研究发现, GEN可提高运动性疲劳大鼠全血中红细胞、白细胞和淋巴细胞数量, 升高血红蛋白水平, 具有提高免疫力作用。丁王辉等^[8]研究发现, GEN可以通过增强大鼠颞舌肌功能及核因子E2相关因子2基因及蛋白表达, 发挥对颞舌肌的保护作用, 提高大鼠颞舌肌的抗疲劳能力。孔凡秀等^[9]在研究人参皂苷Rg1对于免疫抑制小鼠运动性疲劳的作用时发现, 人参皂苷Rg1可显著提高实验小鼠耐力并调节血清及组织中疲劳相关生化指标水平, 对于免疫抑制小鼠具有较好的抗运动性疲劳功效。

有研究指出, 目前大多数人处于亚健康状态, 疲劳是众多亚健康状态中最常见的一种表现形式^[10]。机体的疲劳与免疫能力互相影响, 免疫力低下时常伴随疲劳感, 而长时间疲劳也同样容易引起机体免疫力降低。因此, 如何有效预防运动性疲劳的发生, 以及如何有效恢复运动性疲劳是当前需要重点考虑的问题。

本实验通过对免疫抑制大鼠进行游泳训练, 测定大鼠血清中疲劳及免疫相关指标, 并以腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 为主要研究靶点, 观察GEN干预对大鼠骨骼肌中AMPK、沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1)、过氧化物酶增殖活化受体 γ 辅激活因子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , PPAR γ) 基因及蛋白表达水平的调节作用, 以期阐明GEN缓解疲劳的作用机制, 为GEN缓解机体疲劳提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

选取96只SPF级雄性SD大鼠, 体质量(200±20)g, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001。

GEN(纯度98%) 上海融禾医药科技发展有限公司; 环磷酰胺 上海研生生化试剂有限公司;

贞芪扶正颗粒 吉林修正药业集团股份有限公司；肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 生化试剂盒 南京建成生物工程研究所；免疫球蛋白G (immunoglobulin G, IgG)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 酶联免疫吸附测定试剂盒 上海研瑾生物科技有限公司；总RNA抽提试剂盒 生工生物工程(上海)有限公司；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司；AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、PPAR γ 抗体 英国Abcam公司；辣根过氧化物酶标记兔抗大鼠二抗 美国Proteintech公司。

1.2 仪器与设备

MultiskanSky全波长酶标仪 美国Thermo Scientific公司；T6型紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司；StepOne荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 美国ABI公司；垂直电泳仪 美国伯乐公司；AI600化学凝胶成像仪 美国GE公司；FR980凝胶成像系统 上海复日科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及免疫抑制模型的建立

大鼠按体质量随机分为6组，分别为空白对照组 (CG)、免疫抑制模型组 (MG) 与金雀异黄素低 (L)、中 (M)、高剂量组 (H) 以及阳性对照组 (PG)，每组16只。

适应性喂养1周后，CG组大鼠腹腔注射生理盐水，其余组大鼠腹腔注射环磷酰胺40 mg/kg m_b ，每日1次，连续3 d，建立免疫抑制模型^[11]。然后，L、M、H组大鼠分别灌胃10、20、40 mg/kg m_b GEN (GEN溶于花生油，灌胃体积1.0~1.6 mL)，PG组大鼠灌胃3.125 g/kg m_b 贞芪扶正颗粒 (溶于生理盐水，灌胃体积0.78~1.25 mL)，CG、MG组大鼠灌胃等量花生油，周期21 d。相关动物实验经黑龙江八一农垦大学学术规范委员会审查，符合国内外相关伦理规范。

1.3.2 大鼠游泳训练

适应性喂养1周后，在直径50 cm、水深50 cm的塑料圆桶中进行大鼠游泳训练，水温控制在(24 \pm 1) $^{\circ}$ C。剔除不会游泳的大鼠后随机分组，首次游泳训练时间为30 min，灌胃期间每日延长10 min，至80 min时维持此训练时间至灌胃实验结束。训练时使用玻璃棒对漂浮的大鼠进行拨动，确保大鼠一直处于运动状态，且大鼠尾部呈悬空状态不与桶底接触，游泳结束后立即用吹风机将大鼠皮毛迅速干燥。

1.3.3 力竭游泳时间测定

于末次灌胃后1 h，每组随机抽取8只大鼠，在大鼠尾部缚有约为体质量5%的铅皮，然后进行急性力竭负重游泳实验。力竭时间以从游泳实验开始至大鼠头部沉入桶底后10 s不浮出水面计算，比较各组大鼠负重游泳至力竭时间。

1.3.4 疲劳及免疫相关指标检测

末次灌胃后，各组大鼠禁食12 h，不禁水，称体质量后将剩余48只大鼠进行游泳训练，大鼠进行50 min负重游泳训练，休息30 min后乙醚麻醉处死。腹主动脉取血，2 410 \times g离心15 min后取上清液，分别按照相应试剂盒说明书测定血清中CK、LDH、IgG、TNF- α 水平。

1.3.5 实时荧光定量PCR检测骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ mRNA表达情况

按1.3.4节方法，大鼠经负重游泳训练，休息30 min后乙醚麻醉处死。取骨骼肌组织，按照RNA抽提试剂盒说明书提取大鼠骨骼肌中RNA，测定RNA浓度。按照反转录试剂盒说明书将RNA反转录为cDNA，再以cDNA为模板进行荧光定量PCR分析。使用Primer Premier 5.0软件进行引物序列设计，由生工生物工程(上海)有限公司合成，引物序列见表1。以 β -actin为内参，根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

表1 PCR引物信息

Table 1 PCR primers used in this study

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (3'-5')
AMPK	AAACCCACAGAAATCCAAACAC	CCTTCCATTCATAGTCCAACCTG
PGC-1 α	GGGGCACATCTGTCTTCCA	GCTTGACTGGGATGACCGAA
PPAR γ	TCAGGTTGGGCGAATGC	CTTGGTCAGCGGGAAGG
SIRT1	TGATTGGCACCCATCCTCG	CCACAGCGTCATATCATCCAG
β -actin	CTACCTCATGAAGATCCTGACC	CACAGCTTCTCTTGTATGTCAC

1.3.6 Western Blot检测骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ 蛋白表达情况

按1.3.4节方法，大鼠经负重游泳训练，休息30 min后乙醚麻醉处死。取骨骼肌组织，提取总蛋白后用BCA试剂盒测定总蛋白质量浓度，根据实验要求进行稀释。利用垂直电泳仪进行SDS-PAGE，转膜至聚偏氟乙烯膜后，5%脱脂奶粉封闭，摇床孵育1 h。封闭结束后进行免疫反应，分别加入AMPK、p-AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ 一抗，4 $^{\circ}$ C下过夜孵育，然后用TBST (Tris-HCl缓冲液+Tween-20) 洗涤5次，加入相应二抗，室温孵育1 h，最后用TBST洗涤5次，滴加ECL化学发光液显影，采用凝胶成像系统对目的条带灰度进行分析。

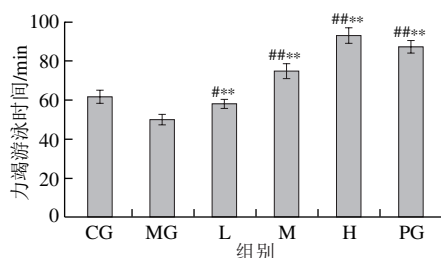
1.4 数据处理与分析

实验结果以平均值 \pm 标准差表示，采用SPSS 20软件进行单因素方差分析，采用最小显著性差异法进行多重比较， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 分别表示差异显著或极显著，利用Origin软件绘制相关图表。

2 结果与分析

2.1 GEN对大鼠力竭游泳时间的影响

由图1可知,与MG组相比,各剂量GEN和PG均可极显著延长免疫抑制大鼠力竭游泳时间($P < 0.01$)。与CG组相比,M、H和PG组大鼠平均力竭游泳时间极显著延长($P < 0.01$),其中H组大鼠力竭游泳时间延长了50.4%。结果表明,GEN可呈剂量依赖性延长免疫抑制大鼠的力竭游泳时间。



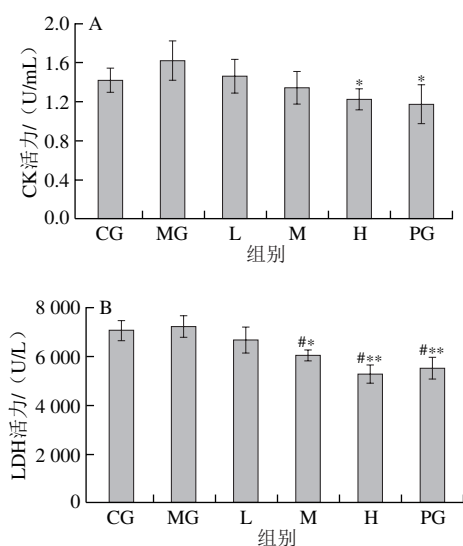
与CG组相比, #.差异显著 ($P < 0.05$), ##.差异极显著 ($P < 0.01$); 与MG组相比, **.差异极显著 ($P < 0.01$)。下同。

图1 GEN对大鼠力竭游泳时间的影响

Fig. 1 Effect of GEN on the exhaustive swimming time of rats

2.2 GEN对大鼠血清中CK、LDH活力的影响

由图2可知,与CG组相比,MG组大鼠运动疲劳后血清中CK、LDH活力有不同程度上升。GEN处理后,与MG组相比,GEN各剂量组血清CK、LDH活力均有所下降,其中H和PG组大鼠血清中CK活力($P < 0.05$)和LDH活力($P < 0.01$)降低较显著,表明高剂量GEN可以有效降低免疫抑制大鼠血清中CK和LDH活力。



与MG组相比, *.差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图2 GEN对大鼠血清中CK (A)、LDH (B) 活力的影响

Fig. 2 Effect of GEN on the activity of CK (A) and LDH (B) in serum of rats

2.3 GEN对大鼠血清中IgG、TNF- α 质量浓度的影响

由图3可知,与CG组相比,MG组大鼠运动疲劳后血清中IgG、TNF- α 质量浓度均极显著降低($P < 0.01$),说明腹腔注射环磷酰胺影响了机体免疫因子分泌,提示免疫抑制模型造模成功。补充GEN后,大鼠血清中IgG、TNF- α 质量浓度均较MG组有不同程度恢复和提高,且呈剂量依赖性。高剂量GEN和PG提高血清中IgG、TNF- α 质量浓度的效果最为显著($P < 0.01$)。

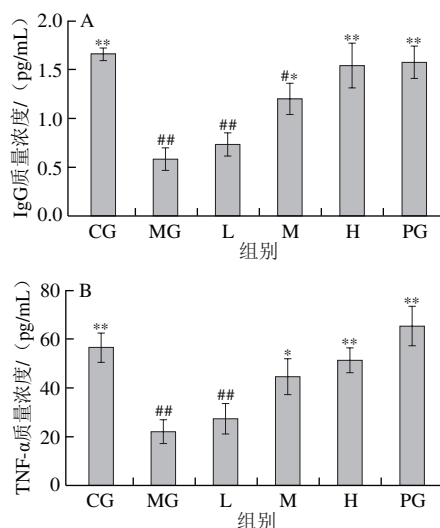
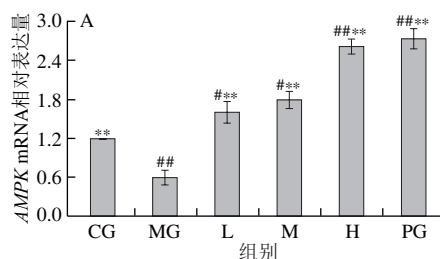


图3 GEN对大鼠血清中IgG (A)、TNF- α (B) 质量浓度的影响

Fig. 3 Effect of GEN on the concentration of IgG (A) and TNF- α (B) in serum of rats

2.4 GEN对大鼠骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ mRNA表达水平的影响

由图4可知,与CG组相比,MG组大鼠骨骼肌AMPK、PGC-1 α 、PPAR γ 和SIRT1 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。H、PG组大鼠骨骼肌中AMPK mRNA表达水平均较CG和MG极显著提高($P < 0.01$),H组SIRT1 mRNA表达量较MG组显著提高($P < 0.05$)。H、PG组大鼠骨骼肌中PGC-1 α mRNA表达量较MG组极显著提高($P < 0.01$)。H组中PPAR γ mRNA表达量较CG和MG均极显著提高($P < 0.01$)。以上结果表明,高剂量GEN可以有效上调免疫抑制大鼠骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ mRNA表达水平。



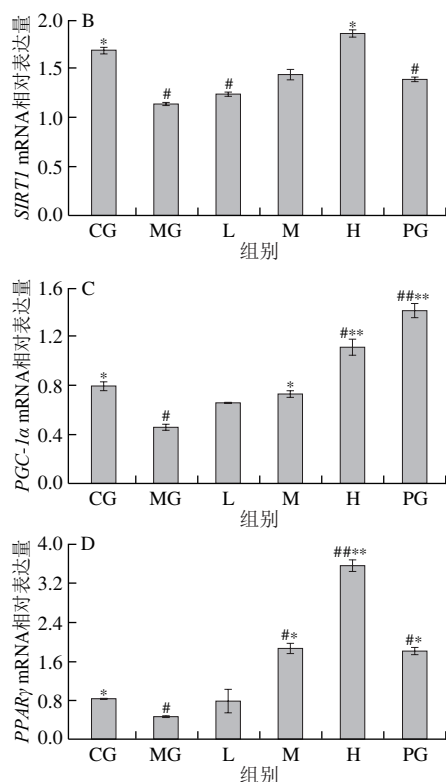
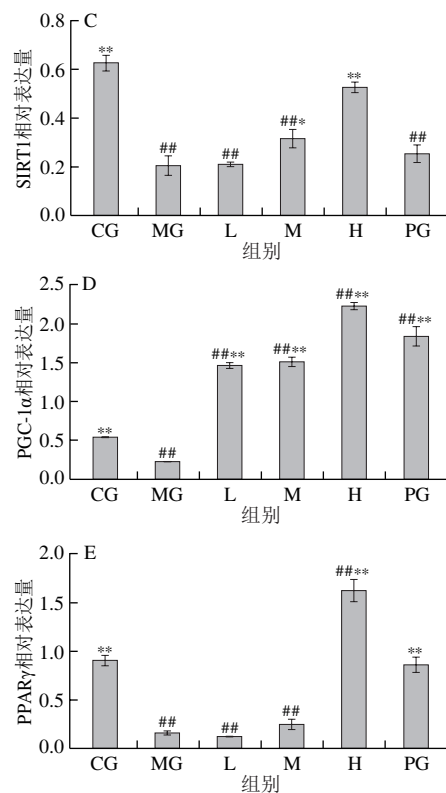
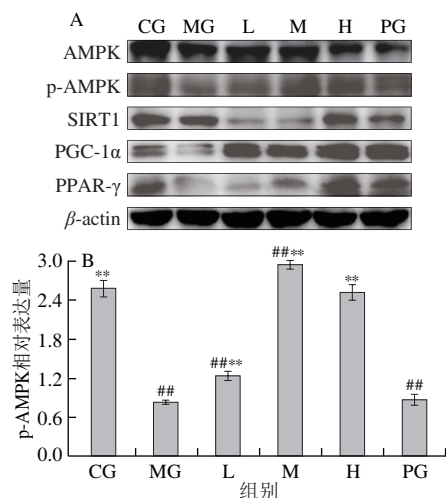


图4 GEN对大鼠骨骼肌中AMPK (A)、SIRT1 (B)、PGC-1α (C)、PPARγ (D) mRNA表达水平的影响

Fig. 4 Effect of GEN on the mRNA expression of AMPK (A), SIRT1 (B), PGC-1α (C) and PPARγ (D) in skeletal muscle of rats

2.5 GEN对大鼠骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1α和PPARγ蛋白表达水平的影响

如图5所示,与CG组相比, MG组大鼠骨骼肌中p-AMPK、SIRT1、PGC-1α和PPARγ蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$), 补充GEN后, AMPK磷酸化水平显著提高, p-AMPK、SIRT1、PGC-1α和PPARγ蛋白在大鼠骨骼肌中的表达量呈剂量依赖性提高, 其中H组p-AMPK、PGC-1α和PPARγ蛋白表达量较MG组均极显著提高 ($P < 0.01$)。



A. 蛋白免疫印迹图; B~E. p-AMPK、SIRT1、PGC-1α、PPARγ蛋白相对表达水平。

图5 GEN对大鼠骨骼肌中p-AMPK、SIRT1、PGC-1α、PPARγ蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of GEN on the protein expression of p-AMPK, SIRT1, PGC-1α and PPARγ in skeletal muscle of rats

3 讨论

抗疲劳能力主要通过运动耐力表现, 力竭游泳时间的变化可反映耐力的情况^[12-14]。本实验采用力竭游泳实验测试大鼠抗疲劳能力, 结果表明, 给予大鼠不同剂量GEN均可极显著延长大鼠的力竭游泳时间, 说明GEN可以提高大鼠运动耐力, 表现出一定的抗疲劳活性。

CK是参与细胞能量运转和机体产能的重要激酶, 通过催化调节肌细胞中磷酸肌酸产生ATP供机体需要^[15]。LDH是糖酵解过程中一种重要的酶, 它可以将糖酵解反应中生成的丙酮转化并排出体外, 从而降低乳酸含量^[16]。当机体不受外界影响时, 肌细胞状态良好, 细胞膜完整, 具有较好的屏障作用, 可以有效防止CK、LDH细胞外泄。然而当处于疲劳状态时, 肌细胞结构受到破坏, CK和LDH可以透过细胞膜, 渗透至组织间液和血液中, 导致血清CK、LDH活力增加^[17]。因此, 血清CK和LDH活力常被用于评价机体疲劳程度和组织损伤情况。本实验结果表明, 补充GEN后, 免疫抑制大鼠运动疲劳后血清中CK和LDH活力均有效降低, 且呈现剂量

依赖性, H组大鼠血清中CK和LDH活力分别较MG组显著和极显著降低。说明补充GEN能够抑制细胞中CK和LDH的外泄, 对骨骼肌和肝脏有保护作用, 进而延缓机体疲劳的发生。

IgG由动物体内淋巴系统B细胞产生, 其水平可以直接反映动物机体免疫应答能力^[18]。TNF- α 可以促进中性粒细胞的吞噬和溶酶体的消化作用, 抵抗细菌和病毒的侵袭^[19]。本实验结果表明, GEN能显著改善环磷酰胺致免疫低下大鼠运动疲劳后血清中IgG、TNF- α 质量浓度的降低, 其中高剂量GEN的提高效果与MG组相比具有极显著差异。说明GEN可能通过影响免疫因子的分泌而影响其介导的免疫反应, 改善机体的免疫功能, 同时缓解疲劳。

AMPK被称为细胞的“能量感受器”^[20], 其磷酸化可以影响线粒体内相关因子, 促进合成效应^[21-22]。AMPK的众多下游靶分子及其信号分子, 如PGC-1 α 、SIRT1、PPAR γ 等, 主要参与能量代谢和转录后调控。SIRT1能够催化组蛋白和非组蛋白底物的去乙酰化, 参与调节氧化应激和糖脂代谢等, 对维持机体的健康状态具有重要作用^[23]。PGC-1 α 是线粒体合成中最重要的调控因子^[24], 其蛋白的表达水平与线粒体糖脂代谢、氧化代谢呈正相关。AMPK是PGC-1 α 的上游调控因子, 可以直接调节并使其磷酸化。AMPK还可以影响SIRT1的表达, 同时SIRT1也可以促使AMPK磷酸化, 二者都可调控PGC-1 α 的活性, SIRT1通过催化PGC-1 α 脱乙酰使其激活, 其下游PPAR γ 表达水平也随之上升, 从而促进线粒体的合成^[25]。研究表明, 通过刺激AMPK信号通路, 激活其下游SIRT1及PGC-1 α 因子, 可以使骨骼肌由快肌纤维转为慢肌纤维, 从而延缓疲劳的产生^[26]。此外, 也有研究发现, 通过上调骨骼肌中PGC-1 α 、PPAR α mRNA表达可以调节能量代谢因子, 改善机体运动能力, 达到抗疲劳作用^[27-29]。本实验结果表明, 补充GEN后, 骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1 α 、PPAR γ mRNA及其蛋白表达水平均呈剂量依赖性提高。随着大鼠骨骼肌中p-AMPK蛋白表达量提高, 其下游PGC-1 α 、SIRT1蛋白表达量也相应提高, SIRT1活化进一步激活PGC-1 α , 促使PGC-1 α 下游的PPAR γ 蛋白表达水平增加, 进而保护线粒体功能, 改善机体运动能力, 发挥抗疲劳作用。

综上所述, GEN对免疫抑制大鼠体内疲劳和免疫相关指标有很好的调节作用, 提高大鼠血清中免疫因子水平, 提高免疫能力, 改善骨骼肌中AMPK、SIRT1、PGC-1 α 和PPAR γ mRNA及其蛋白表达, 最终达到缓解疲劳的效果。

参考文献:

- [1] 吕思瑶, 朱登兆, 鲍云翔, 等. 大豆分离蛋白与染料木素共价交联对蛋白表征和结构的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(12): 94-100. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210706-051.
- [2] GANAI A A, FAROOQI H. Bioactivity of genistein: a review of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 76: 30-38. DOI:10.1016/j.biopha.2015.10.026.
- [3] ALVES R C, ALMEIDA I M C, CASAL S, et al. Isoflavones in coffee: influence of species, roast degree, and brewing method[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(5): 3002-3007. DOI:10.1021/jf9039205.
- [4] KAUFMAN P B, DUKE J A, BRIELMANN H, et al. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: implications for human nutrition and health[J]. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 1997, 3(1): 7-12. DOI:10.1089/acm.1997.3.7.
- [5] PAVESE J M, FARMER R L, BERGAN R C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein[J]. Cancer and Metastasis Reviews, 2010, 29(3): 465-482. DOI:10.1007/s10555-010-9238-z.
- [6] LAKSHMAN M, XU L, ANANTHANARAYANAN V, et al. Dietary genistein inhibits metastasis of human prostate cancer in mice[J]. Cancer Research, 2008, 68(6): 2024-2032. DOI:10.1158/0008-5472.can-07-1246.
- [7] 蒙兰兰, 吴丽珍, 黄虎龙, 等. 染料木素对运动性疲劳大鼠血细胞的影响[J]. 赣南医学院学报, 2016, 36(6): 854-857; 860. DOI:10.3969/j.issn.1001-5779.2016.06.005.
- [8] 丁王辉, 李文, 陈小燕, 等. 金雀异黄素减弱慢性间歇性低氧大鼠颊舌肌疲劳的实验研究[J]. 中华口腔医学杂志, 2016, 51(1): 46-50. DOI:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2016.01.011.
- [9] 孔凡秀, 董佳萍, 杨琪, 等. 人参皂苷Rg1缓解免疫抑制小鼠运动性疲劳的作用研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(8): 7-11. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.08.002.
- [10] 李红琼, 王天芳, 薛晓琳, 等. 疲劳性亚健康判定标准及中医常见证候的文献研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(6): 768-771. DOI:10.13935/j.cnki.sjzx.190607.
- [11] 薛梅. 鼠李糖杆菌LV108对免疫低下大鼠肠道菌群及代谢的影响研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2016: 25-26.
- [12] 池爱平, 康琛喆, 郭欢欢, 等. 败酱草多糖的组成及抗疲劳与耐缺氧作用[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 212-215. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201421041.
- [13] 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. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181120-230.
- [14] HUANG W C, CHIU W C, CHUANG H L, et al. Effect of curcumin supplementation on physiological fatigue and physical performance in mice[J]. Nutrients, 2015, 7(2): 905-921. DOI:10.3390/nu7020905.
- [15] 谭军. FDP对运动性疲劳大鼠骨骼肌与血中酶活性及自由基代谢影响的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2005: 21-24.
- [16] 张彦荣, 高翔, 毕伟. 氨基胍对大鼠骨骼肌缺血再灌注肺损伤一氧化氮合酶表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(12): 3269-3271. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.12.036.
- [17] 王剑, 李东涛, 阿古拉, 等. 杞菊饮对湿热环境睡眠剥夺大鼠骨骼肌保护及超微结构观察[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(2): 4-8. DOI:10.3969/j.issn.2095-140X.2019.02.002.
- [18] 时佳, 赵新淮. 糖基化酪蛋白消化物对正常小鼠免疫调节作用的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 140-145. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190318-216.
- [19] 曹发昊, 张百胜, 王艳萍, 等. 复方人参皂苷纳米乳对OVA接种小鼠免疫功能的影响[J]. 西北农业学报, 2018, 27(12): 1731-1735. DOI:10.7606/j.issn.1004-1389.2018.12.004.
- [20] 陈慧, 马璇, 曹丽行, 等. 运动疲劳机制及食源性抗疲劳活性成分研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(11): 247-258. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190620-235.
- [21] JÄGER S, HANDSCHIN C, PIERRE J S, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(29): 12017-12022. DOI:10.1073/pnas.0705070104.
- [22] ZHU N, HAN M. Roles of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in the kidney[J]. Chinese Medical Journal, 2022, 135(4): 488-490. DOI:10.1097/CM9.0000000000001831.
- [23] 刘旺, 周琴怡, 莫志勇, 等. SIRT1调控氧化应激的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(2): 239-243. DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2021.02.025.
- [24] FERNANDEZ-MARCOS P J, AUWERX J. Regulation of PGC-1 α , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2011, 93(4): 884S-890S. DOI:10.3945/ajcn.110.001917.
- [25] 许杰, 黄巧婷, 谢敏豪, 等. 不同强度运动对大鼠骨骼肌AMPK/PGC-1 α 信号通路的影响[J]. 成都体育学院学报, 2018, 44(4): 121-126. DOI:10.15942/j.cjcu.2018.04.020.
- [26] XU M, CHEN X, HUANG Z, et al. Grape seed proanthocyanidin extract promotes skeletal muscle fiber type transformation via AMPK signaling pathway[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 84: 108642. DOI:10.1016/j.jnutbio.2020.108642.
- [27] 吕增鹏. 染料木黄酮调节种鸡及其子代脂代谢与免疫的分子机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 34-35.
- [28] 邓红, 徐晓阳, 张卫. 不同运动方式对肥胖大鼠骨骼肌PGC-1 α /FND5/PPAR γ 信号通路的影响[J]. 体育科学, 2019, 39(3): 74-80. DOI:10.16469/j.css.201903009.
- [29] 刘兴龙, 赵迎春, 陈雪艳, 等. 黑多糖抗疲劳作用的分子机制[J]. 食品科学, 2020, 41(5): 173-179. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190311-135.