

白藜芦醇可调控运动性疲劳大鼠的糖异生

阮蓉¹, 娄旭佳², 金其贯¹, 章立冰¹, 徐尚¹, 胡玉龙¹<https://doi.org/10.12307/2023.960>

投稿日期: 2022-10-17

采用日期: 2022-12-29

修回日期: 2023-03-09

在线日期: 2023-04-01

中图分类号:

R459.9; R318; G804.2

文章编号:

2095-4344(2024)08-01229-06

文献标识码: B

文章快速阅读: 白藜芦醇对运动性疲劳大鼠糖异生的影响

雄性
SD大鼠

空白对照组

白藜芦醇组

运动组

白藜芦醇+运动组

指标检测:

(1) 血浆尿素氮、肌酸激酶水平;
(2) 血糖、肝糖原含量;
(3) 肝脏组织乳酸、丙酮酸含量;
(4) 糖异生关键限速酶活性;
(5) 糖异生调控通路相关基因的表达。

结论:

白藜芦醇能缓解长时间中高强度运动导致的运动性疲劳, 其机制可能与调控 SIRT1/CREB/PGC-1 α 通路, 提高 PEPCK 活性、促进肝脏糖异生、升高血糖和肝糖原水平有关。

文题释义:

运动性疲劳: 是指运动持续一段时间后, 机体不能将功能维持在某一特定水平或者不能维持某一预定的运动强度。

白藜芦醇: 是一种天然存在于葡萄、花生和虎杖等植物中的二苯乙烯类酚类化合物, 具有抗氧化、抗炎、免疫调节、神经保护等多种生物学功能。

糖异生: 非糖物质(如乳酸、丙酮酸、甘油、生糖氨基酸等)合成葡萄糖或糖原的过程, 是体内合成葡萄糖的一种特殊方式。

摘要

背景: 白藜芦醇是从植物中提取而来的天然抗氧化剂, 其改善运动性疲劳的机制主要集中在氧化应激和炎症反应的保护作用上, 此次研究主要从糖异生角度探讨其对运动性疲劳的保护机制。

目的: 探讨白藜芦醇对运动性疲劳大鼠糖异生的影响。

方法: SD雄性大鼠适应性训练1周后随机分为4组, 即空白对照组、白藜芦醇组、运动组、白藜芦醇+运动组, 每组12只。空白对照组和白藜芦醇组正常饲养, 不进行游泳训练; 白藜芦醇+运动组和运动组采用负重游泳训练模拟长时间中高强度运动, 每天负重5%游泳1 h后, 分别灌胃50 mg/kg的白藜芦醇溶液或等体积的二甲基亚砜溶剂, 每周6 d, 共6周。末次运动后24 h取材, 试剂盒检测尿素氮、肌酸激酶、血糖、肝糖原以及肝脏组织中乳酸、丙酮酸水平; 微量法检测磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性, 酶联免疫吸附法检测葡萄糖-6-磷酸酶活性; RT-PCR检测SIRT1、CREB和PGC-1 α 的基因表达水平。

结果与结论: ①运动组大鼠血浆尿素氮和肌酸激酶水平明显升高(均 $P < 0.05$), 肝脏乳酸、丙酮酸水平和乳酸/丙酮酸比值明显升高(均 $P < 0.01$), 血糖和肝糖原水平明显降低(均 $P < 0.01$); 补充白藜芦醇可有效改善以上情况; ②运动使大鼠肝脏组织糖异生关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和葡萄糖-6-磷酸酶的活性明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), 补充白藜芦醇可明显提高磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶活性($P < 0.01$); ③运动组肝脏组织SIRT1、CREB和PGC-1 α 的mRNA表达水平明显降低(均 $P < 0.01$), 补充白藜芦醇可使该通路基因表达水平明显升高; ④提示白藜芦醇能缓解长时间中高强度运动导致的运动性疲劳, 其机制可能与上调糖异生调控通路、提高限速酶活性、促进肝脏糖异生、升高血糖和肝糖原水平有关。

关键词: 运动性疲劳; 白藜芦醇; 糖异生; 限速酶; 大鼠

缩略语: 沉默信息调节因子1: silent information regulator 1, SIRT1; 过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子1 α : peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α ; 环磷酸腺苷反应元件蛋白: cAMP-response element binding protein, CREB; 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶: phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, PEPCK; 葡萄糖-6-磷酸酶: glucose-6-phosphatase, G6Pase

Effect of resveratrol on gluconeogenesis in exercise-induced fatigue rats

Ruan Rong¹, Lou Xujia², Jin Qiguan¹, Zhang Libing¹, Xu Shang¹, Hu Yulong¹¹School of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225021, Jiangsu Province, China; ²Zhengzhou Sports Vocational College, Dengfeng 452470, Henan Province, China

Ruan Rong, Master candidate, School of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225021, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Hu Yulong, MD, Associate professor, School of Physical Education, Yangzhou University, Yangzhou 225021, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Resveratrol is a natural antioxidant extracted from plants. Its mechanism of improving exercise-induced fatigue mainly focuses on the protective¹扬州大学体育学院, 江苏省扬州市 225021; ²郑州体育职业学院, 河南省登封市 452470

第一作者: 阮蓉, 女, 1998年生, 江苏省淮安市人, 扬州大学在读硕士, 主要从事运动营养与健康方面的研究。

通讯作者: 胡玉龙, 博士, 副教授, 扬州大学体育学院, 江苏省扬州市 225021

<https://orcid.org/0000-0003-0458-101X>(阮蓉)

基金资助: 2016年度国家重点研发计划(2016YFD0400603-02), 项目负责人: 金其贯

引用本文: 阮蓉, 娄旭佳, 金其贯, 章立冰, 徐尚, 胡玉龙. 白藜芦醇可调控运动性疲劳大鼠的糖异生[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(8):1229-1234.



effect against oxidative stress and inflammation. In this study, the protective mechanism of resveratrol on exercise-induced fatigue was mainly discussed from the perspective of gluconeogenesis.

OBJECTIVE: To investigate the effect of resveratrol on gluconeogenesis in exercise-induced fatigue rats.

METHODS: After 1 week of adaptive training, male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups with 12 rats in each group: blank control group, resveratrol group, exercise group, resveratrol + exercise group. Weight-bearing swimming training was used to simulate long-term medium-high intensity exercise. After swimming with a weight of 5% for 1 hour every day, 50 mg/kg resveratrol solution or the same volume of dimethyl sulfoxide solvent were given orally, 6 days a week, for a total of 6 weeks. Samples were collected 24 hours after the last exercise, and the levels of urea nitrogen, creatine kinase, blood glucose, liver glycogen and lactic acid and pyruvate in liver tissue were detected by the kit. The activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase was detected by microassay, and the activity of glucose-6-phosphatase was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the gene expression of silent information regulator 1, cAMP-response element binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α .

RESULTS AND CONCLUSION: In the exercise group, plasma urea nitrogen and creatine kinase levels of rats were significantly increased (both $P < 0.05$), liver lactate and pyruvate levels and lactate/pyruvate ratio were significantly increased (all $P < 0.01$), and blood glucose and liver glycogen contents were significantly decreased (both $P < 0.01$). Resveratrol supplementation could effectively improve the above conditions. Exercise significantly decreased the activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and resveratrol supplementation significantly increased the activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver tissue ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of silent information regulator 1, cAMP-response element binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α in liver tissue of the exercise group were significantly decreased (all $P < 0.01$), while resveratrol supplementation could significantly increase the gene expression levels of this pathway. To conclude, resveratrol can relieve exercise-induced fatigue caused by long-term medium-high intensity exercise, and its mechanism may be related to up-regulating the gluconeogenesis regulatory pathway, improving rate-limiting enzyme activity, promoting liver gluconeogenesis, and increasing blood glucose and liver glycogen levels.

Key words: exercise-induced fatigue; resveratrol; gluconeogenesis; rate-limiting enzyme; rat

Funding: 2016 National Key Research and Development Program of China, No. 2016YFD0400603-02 (to JQG)

How to cite this article: RUAN R, LOU XJ, JIN QG, ZHANG LB, XU S, HU YL. Effect of resveratrol on gluconeogenesis in exercise-induced fatigue rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(8):1229-1234.

0 引言 Introduction

关于疲劳的研究始于 19 世纪 Mosso 发现持续的电刺激使屈指肌无法提起重物, 并提出了“疲劳”一词^[1]。在 1983 年第五届国际生化会议给出了运动性疲劳的定义, 它是指运动持续一段时间后, 机体不能将功能维持在某一特定水平或者不能维持某一预定的运动强度^[2]。运动性疲劳是一种普遍且复杂的生理现象, 运动时间与运动强度都是引起运动性疲劳的原因。长时间的运动会引起能源物质供应不足, 有研究表明未经训练的个体在 80% 最大摄氧量下进行 118 min 的运动后, 肝糖原的消耗超过 70%, 导致无法维持血糖稳态和/或过早疲劳^[3]。因此, 改善和延缓运动性疲劳是提高运动能力的关键。

糖是机体运动时最重要的能源物质, 当机体缺糖时, 糖异生活动加强。糖异生是指非糖物质(如乳酸、丙酮酸、甘油、生糖氨基酸等)合成葡萄糖或糖原的过程, 是体内合成葡萄糖的一种特殊方式。肝脏是葡萄糖合成与代谢的关键部位, 也是进行糖异生的主要器官。随着运动的持续进行, 糖异生的活动加强对运动中肌肉组织葡萄糖的供应有一定代偿作用, 起到维持血糖稳定的作用, 并使机体清除酸性代谢产物的速度增加, 延缓疲劳感的发生^[4]。因此, 增强糖异生作用, 增加内源性葡萄糖的生成是改善运动性疲劳的重要环节。

沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1) 是一种去乙酰化酶, 它使下游因子去乙酰化从而发挥调节糖代谢的作用^[5]。过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是环磷酸腺苷反应元件蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB) 的靶基因, 通过诱导 PGC-1 α 的活化, 激活关键糖异生酶促进肝脏糖异生, 从而促进肝脏葡萄糖的生成^[6]。

当机体发生运动性疲劳时, 外源性补充一些营养物质可以改善疲劳程度、促进疲劳恢复。白藜芦醇是应用较多的一

种抗氧化剂, 它的来源涉及了多种植物和中草药, 具有丰富的医疗保健作用^[7]。白藜芦醇在抗炎、抗氧化、保护心血管、调节免疫功能等方面具有重要的生物学作用, 在抗疲劳方面也有比较突出的功效^[8]。目前关于白藜芦醇对运动性疲劳的保护效应, 主要集中在抗氧化、改善炎症反应等方面, 也有研究发现白藜芦醇参与糖代谢^[9], 但对糖异生途径的研究较少。因而, 此次研究构建了长时间中高强度运动大鼠模型, 探讨白藜芦醇对运动性疲劳发生时糖异生途径的影响及调控通路, 为白藜芦醇改善运动性疲劳的机制寻找新的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 组间采用两两比较的 t 检验。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 10 月至 2022 年 6 月在扬州大学完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 6-8 周龄雄性 SD 大鼠购于杭州医学院, 体质量 (234.5 \pm 14.5) g, 动物实验设施合格证编号: SCXK(浙)2019-0002。实验方案经扬州大学动物实验伦理委员会批准, 批准号: 202012010。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 药品与试剂 白藜芦醇, 上海麦克林公司; 二甲基亚砜溶剂, 碧云天生物技术有限公司; 尿素氮检测试剂盒, 肌酸激酶检测试剂盒, 乳酸、丙酮酸检测试剂盒, 血糖检测试剂盒, 肝糖原检测试剂盒, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxylase kinase, PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 引物, 南京锐真生物技术有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 雄性 SD 大鼠 48 只, 根据完全随机分组法随机分为空白对照组、白藜芦醇组、运动组、白藜芦醇 +

运动组，每组 12 只。大鼠在环境温度 (22±2) °C、相对湿度 40%–60% 的条件下适应 1 周后进行运动和药物干预。

1.4.2 运动方案 参照 TUNG 等^[10]、HUANG 等^[11]和 XIE 等^[12]的研究并结合课题组前期研究^[13]，采用 5% 负重游泳模拟长时间中高强度运动，负重物固定于尾部，具体方案如下：空白对照组和白藜芦醇组正常饲养，不进行游泳训练；运动组和白藜芦醇 + 运动组适应性训练 1 周后每天进行 5% 的负重游泳训练，每次 60 min，每周进行 6 次运动干预，共 6 周。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题：

| | |
|-----------|---|
| 造模目的 | 探讨白藜芦醇对运动性疲劳大鼠糖异生的影响 |
| 动物来源及品系 | 6–8 周龄雄性 SD 大鼠购于杭州医学院，动物实验设施合格证编号：SCXK(浙)2019-0002 |
| 动物数量及分组方法 | SD 大鼠 48 只，随机分为空白对照组、白藜芦醇组、运动组、白藜芦醇 + 运动组，每组 12 只 |
| 造模技术描述 | 适应性游泳 1 周后，尾部负重 5% 游泳 1 h，每周 6 次，共 6 周 |
| 造模后实验观察指标 | ①血浆尿素氮和肌酸激酶活性；②血糖、肝糖原、肝脏乳酸和丙酮酸水平；③肝脏组织中磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和葡萄糖-6-磷酸酶活性；④肝脏组织中沉默信息调节因子 1、环磷酸腺苷反应元件蛋白和过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子的基因表达 |
| 造模后动物处理 | 取材后动物尸体送往扬州大学实验动物无害化处理中心 |
| 伦理委员会批准 | 此次研究获得扬州大学实验动物福利伦理委员会审核和批准，批准号：202012010 |

1.4.3 给药方案 药物剂量参考李方等^[14]的研究，并结合大鼠与人药品计量换算方法，确定药物剂量为 50 mg/kg。用二甲基亚砷溶解白藜芦醇 (纯度 ≥ 99%) 并用无菌去离子水将其稀释至二甲基亚砷为 2%，使白藜芦醇质量浓度为 25 mg/mL。训练结束后 1 h 进行药物灌胃，白藜芦醇组和白藜芦醇 + 运动组按 50 mg/kg 灌胃白藜芦醇溶液，空白对照组和运动组灌胃等体积 2% 二甲基亚砷溶液，1 次/d，每周 6 d，共 6 周。周日称体质量后根据体质量变化更换负重物和药物体积。

1.4.4 动物标本采集及处理 运动干预结束 24 h 后，按 50 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠进行麻醉，腹主动脉取血，随后迅速取出肝脏，生理盐水洗净，修剪多余结缔组织，滤纸吸干水分称取整肝质量，之后 -80 °C 分装冻存，用于相关指标的测定。

1.5 主要观察指标

1.5.1 疲劳指标的检测 腹主动脉取血，收集全血至肝素抗凝管后，上下颠倒使其充分抗凝，静置半小时后，4 °C，2 500 r/min，离心 10 min，离心后上层黄色液体为血浆，严格按照试剂盒说明书测定血浆尿素氮和肌酸激酶水平。

1.5.2 糖异生水平的检测 从分装的冻存管中取出肝脏组织，生理盐水洗净，滤纸吸干水分，准确称取肝脏组织质量，按质量 (g) : 体积 (mL) = 1 : 9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水或试剂盒指定的组织提取液，4 °C 冰浴条件下，60 Hz，90 s 机械匀浆，之后转移到新的离心管中 4 °C，2 500 r/min，离心 10 min，取上清液进行测定。分别按照试剂盒说明书检测

血糖、肝糖原、乳酸和丙酮酸水平。

1.5.3 糖异生关键酶的检测 取已制备的肝脏上清液进行测定，微量法测定 PEPCK；酶联免疫吸附法检测肝脏中 G6Pase 的活性，严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.5.4 糖异生相关基因的检测 RT-PCR 测定糖异生相关基因肝组织中 SIRT1、CREB、PGC-1α 的 mRNA 水平。肝脏组织中加入 Trizol 机械研磨后提取总 RNA，反转录为 cDNA，放入 PCR 仪检测，以 GAPDH 为参照，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的表达量。基因序列见表 1。

表 1 | 目的基因引物序列

Table 1 | List of primer sequences of target genes

| 基因名称 | 碱基序列 |
|----------|-------------------------------------|
| SIRT1-f | 5'-ATT TAA TGC TCG CCT TGC TGT G-3' |
| SIRT1-r | 5'-CAG AGC TGC TCA TGA ATG CTG-3' |
| CREB-f | 5'-CTG CTG TAA CAG AAG CTG AAA G-3' |
| CREB-r | 5'-TGA AAT CTG AGT TCC GGA GAA A-3' |
| PGC-1α-f | 5'-TAT TCA TTG TTC GAT GTG TCG C-3' |
| PGC-1α-r | 5'-TGT CTG TAG TGG CAA GAT TCA T-3' |
| GAPDH-f | 5'-TGC CAC TCA GAA GAC TGT GG-3' |
| GAPDH-r | 5'-TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT-3' |

表注：SIRT1 为沉默信息调节因子 1；PGC-1α 为过氧化物酶体增殖物激活受体共激活因子 1α；CREB 为环磷酸腺苷反应元件蛋白

1.6 统计学分析 实验数据使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析，各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间采用两两比较的 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。文章统计学方法已经扬州大学体育学院统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用 SD 大鼠共 48 只，分为 4 组，每组 12 只，实验过程无脱失，全部进入结果分析。

2.2 大鼠基本情况观察 大鼠运动 45–50 min 时频繁出现下沉甚至跳出水面的情况，此时捞出休息 30 s 以免大鼠死亡，运动结束后运动组大鼠出现反应迟钝、双眼无光、皮毛蓬乱、运动能力下降等现象，表明大鼠已达到疲劳状态；白藜芦醇 + 运动组出现下沉甚至跳出水面的情况相对较少。

2.3 白藜芦醇对运动性疲劳相关指标的影响 与空白对照组相比，运动组血浆中尿素氮和肌酸激酶水平均明显升高 (均 $P < 0.05$)，提示长时间中高强度运动造成大鼠疲劳，蛋白质分解加强，伴随肌肉组织损伤。与运动组相比，白藜芦醇 + 运动组血浆中尿素氮和肌酸激酶水平显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)，提示白藜芦醇减缓了大鼠肌肉蛋白质的过度分解，肌肉组织损伤得到改善，对运动性疲劳大鼠产生了保护作用。见表 2。

表 2 | 各组大鼠疲劳指标比较

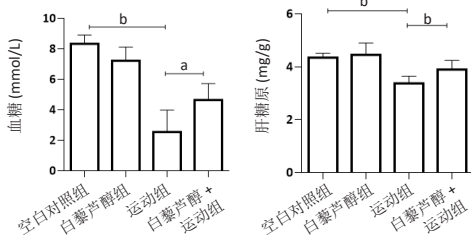
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 2 | Changes in fatigue indexes of rats in each group

| 指标 | 空白对照组 | 白藜芦醇组 | 运动组 | 白藜芦醇 + 运动组 |
|--------------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|
| 尿素氮 (mmol/L) | 5.52±0.50 | 5.67±0.65 | 6.29±0.73 ^a | 5.14±0.17 ^b |
| 肌酸激酶 (U/mL) | 1.31±0.05 | 1.25±0.08 | 1.52±0.07 ^a | 1.32±0.09 ^b |

表注：与空白对照组相比，^a $P < 0.05$ ；与运动组相比，^b $P < 0.01$ ，^c $P < 0.05$

2.4 白藜芦醇对运动性疲劳大鼠糖异生水平的影响 与空白对照组相比, 运动组大鼠血糖和肝糖原水平显著下降 (均 $P < 0.01$)。与运动组相比, 摄入白藜芦醇使白藜芦醇 + 运动组的血糖和肝糖原水平明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1。



图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 1 | 各组大鼠血糖和肝糖原水平比较

Figure 1 | Blood glucose and liver glycogen levels of rats in each group

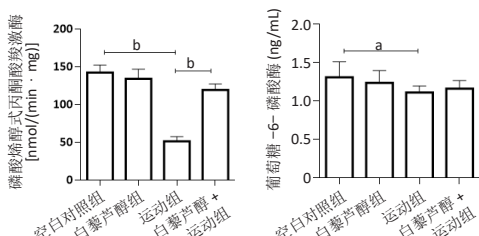
与空白对照组相比, 运动组大鼠肝脏中乳酸、丙酮酸水平和乳酸 / 丙酮酸比值显著升高 (均 $P < 0.01$), 说明长时间中高强度运动使大鼠体内葡萄糖大量分解, 而肝脏糖异生的能力下降, 不足以供应机体糖的消耗, 导致血糖下降、肝糖原水平下降, 肝脏组织中乳酸和丙酮酸堆积。补充白藜芦醇使白藜芦醇 + 运动组大鼠肝脏组织中乳酸、丙酮酸水平和乳酸 / 丙酮酸比值比运动组明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示白藜芦醇可以促进肝脏糖异生活动, 在一定程度上弥补了运动中糖的消耗, 有助于血糖水平保持稳定。见表 3。

表 3 | 各组大鼠糖异生水平比较 (均 $\bar{x} \pm s$, $n=12$)
Table 3 | Level of gluconeogenesis in rats

| 指标 | 空白对照组 | 白藜芦醇组 | 运动组 | 白藜芦醇 + 运动组 |
|---------------|--------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| 乳酸 (mmol/g) | 1.183±0.060 | 1.195±0.056 | 1.604±0.053 ^a | 1.278±0.032 ^b |
| 丙酮酸 (μmol/mg) | 0.057±0.006 | 0.058±0.008 | 0.070±0.005 ^a | 0.063±0.004 ^b |
| 乳酸 / 丙酮酸比值 | 20.731±1.487 | 20.760±2.526 | 23.148±1.270 ^a | 20.393±1.043 ^c |

表注: 与空白对照组相比, ^a $P < 0.01$; 与运动组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

2.5 白藜芦醇对运动性疲劳大鼠糖异生限速酶活性的影响 PEPCK 和 G6Pase 是糖异生途径的两个关键限速酶, 是衡量糖异生水平的重要分子标志物。与空白对照组相比, 运动组糖异生限速酶 PEPCK 和 G6Pase 的活性显著降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 提示长时间中高强度运动对 PEPCK 和 G6Pase 的活性有抑制作用, 使肝脏合成葡萄糖的能力下降, 糖原输出减少。与运动组相比, 补充白藜芦醇使白藜芦醇 + 运动组的 PEPCK 活性显著提高 ($P < 0.01$), G6Pase 活性略有升高, 但差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 提示白藜芦醇能提高糖异生限速酶的活性, 促进糖异生活动, 增加糖原输出。见图 2。

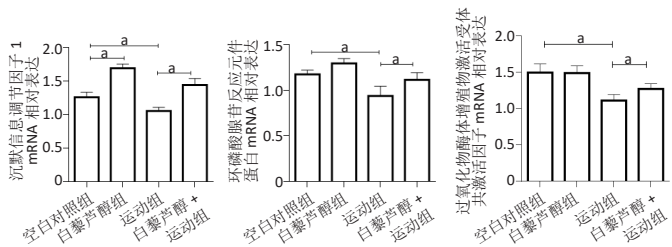


图注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 2 | 各组大鼠糖异生限速酶水平比较

Figure 2 | Levels of rate-limiting enzymes for gluconeogenesis in rats

2.6 白藜芦醇对运动性疲劳大鼠糖异生相关调控因子的影响 与空白对照组相比, 运动组 SIRT1、CREB 和 PGC-1α 的 mRNA 表达显著减少 (均 $P < 0.01$), 白藜芦醇组 SIRT1 的 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$), 说明长时间中高强度运动抑制了糖异生调控通路的活性, 肝脏糖异生能力下降, 补充白藜芦醇可激活 SIRT1 的表达。与运动组相比, 白藜芦醇 + 运动组 SIRT1、CREB 和 PGC-1α 的 mRNA 水平显著升高 (均 $P < 0.01$), 提示白藜芦醇可以激活 SIRT1、CREB 和 PGC-1α 的表达, 促进糖异生活动。见图 3。



图注: ^a $P < 0.01$

图 3 | 各组大鼠糖异生调控因子表达水平

Figure 3 | Expression levels of gluconeogenesis regulatory factors in rats

3 讨论 Discussion

运动性疲劳的发生机制涉及了能源物质耗竭、代谢产物堆积、自由基大量生成、神经系统的保护性抑制等多种因素, 其中能源物质耗竭是最主要的原因之一^[15]。糖的消耗与运动能力密切相关。静息状态下, 90% 以上的内源性葡萄糖在肝脏中合成^[16], 肝脏可以利用多种底物通过糖异生途径合成糖原, 维持机体在空腹或饥饿状态下的血糖稳定。随着运动时间延长, 机体氧化糖原的能力下降, 无法满足自身的能量需求, 血糖水平下降, 产生疲劳感, 不能完成预定的运动强度。

已有大量研究发现, 动植物中存在的活性物质在改善运动性疲劳方面效果显著^[17-18], 其中白藜芦醇被证明具有抗疲劳功能^[19-20]。在此次研究中, 采用 5% 负重游泳模拟长时间中高强度的运动。研究结果显示, 这样的运动强度已造成大鼠运动性疲劳, 血浆尿素氮和肌酸激酶含量升高, 提示蛋白质供能占比增大, 肌肉组织损伤, 而补充白藜芦醇使大鼠的疲劳状态得到缓解。

血糖是大脑的重要能量来源, 运动中血糖水平的稳定可以避免中枢神经系统疲劳, 保持运动能力。此外, 肝糖原水平也与运动表现密切相关。有研究发现, 与禁食和运动的小鼠相比, 肝脏特异靶向糖原蛋白过度表达的小鼠 (PTGOE 小鼠) 表现出更好的运动能力, 并且运动后血糖下降较慢, 即使在禁食条件下运动也保持着较高的肝糖原水平^[21], 说明肝糖原是维持小鼠耐力的关键因素。由于体内糖原储备有限, 当运动耗竭糖原时, 骨骼肌需要从细胞外获取能量, 从而引发血糖下降, 不能保持较好的运动状态。此次研究结果显示, 运动组血糖水平和肝糖原水平显著低于空白对照组, 补充白藜芦醇使白藜芦醇 + 运动组血糖和肝糖原水平显著高于运动组, 提示长时间中高强度的运动导致大鼠糖原耗竭, 而白藜芦醇可以提高糖原水平, 保证血糖稳定, 这与 BALTACI 等^[22] 的研

究结果一致。该研究发现白藜芦醇对血浆瘦素水平没有影响,但可以防止急性游泳运动引起的大鼠肝糖原减少。熊正英等^[23]在大强度耐力跑台训练中发现白藜芦醇提高了大鼠运动后血糖、肝糖原和肌糖原的含量,这可能与白藜芦醇保护肝脏、肌肉组织的正常结构及功能有关。

乳酸是代谢性应激反应的生物标志物,也是糖无氧酵解的终产物。丙酮酸是糖从有氧代谢进入无氧代谢的中间产物,在能量代谢中起到枢纽的作用。长时间运动时机体对能量的需求增大,能源物质特别是糖大量分解,乳酸和丙酮酸大量生成。乳酸和丙酮酸也是糖异生的主要原料,机体通过糖异生作用,将运动中产生的大量乳酸转变成葡萄糖,促进肌糖原的更新,补充血糖和肝糖原水平,防止乳酸中毒的发生^[24]。肝脏乳酸/丙酮酸的比值是评估肝脏糖异生的重要指标^[25],此次研究中运动组大鼠肝脏乳酸、丙酮酸水平以及乳酸/丙酮酸比值显著升高,补充白藜芦醇使得这些指标都有明显下降,说明长时间中高强度的负重游泳使大鼠糖原分解特别是无氧酵解加强,代谢产物堆积,白藜芦醇加强了肝脏对乳酸和丙酮酸的转化和利用。

PEPCK 和 G6Pase 是糖异生过程的主要限速酶,这两种酶的活性可以影响糖异生的速度和内源性葡萄糖的输出^[26]。PEPCK 主要存在于胞质中,催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸,是肝脏糖异生过程中最先发生且最为重要的反应环节。G6Pase 是内质网膜上一个多组分的酶复合体,催化葡萄糖-6-磷酸转化为葡萄糖,是葡萄糖生成的最后一步限速酶,对糖异生和机体葡萄糖稳态起着重要作用^[27]。陈娟娟^[28]的研究中采用轮式疲劳仪对 C57BL/6J 小鼠进行一次性力竭运动后发现,小鼠血糖、肝糖原、PEPCK 和 G6Pase 水平明显下降。此次研究结果显示,长时间中高强度运动使大鼠肝脏组织中 PEPCK 和 G6Pase 活性显著降低,补充白藜芦醇使 PEPCK 活性显著升高,说明白藜芦醇可以促进 PEPCK 活性,进而促进糖异生水平。然而,目前关于运动、营养补剂与运动的联合使用对糖异生酶影响的研究还没有一致的结果。HUANG 等^[29]研究了运动前 1 h 单次补充黑姜对一次性力竭运动小鼠糖原代谢相关基因表达的影响,运动和高剂量黑姜显著提高了肝脏 PEPCK 的基因表达,运动也显著增加了肝脏 G6Pase 的基因表达,他们推测黑姜可能与运动相互作用共同增强肝脏糖异生和三羧酸循环的能力,使运动中产生的乳酸更有效地转化为葡萄糖或糖原;另有研究发现,添加牛磺酸组与未添加牛磺酸组在 120 min 节点时动态血糖浓度差异最明显,但是对糖原分解和糖异生没有影响,肝脏中 G6Pase 活性和生糖氨基酸浓度两组间也无差异,运动期间血糖稳态的维持可能通过脂肪分解、激活甘油在糖异生的作用来实现^[30]。因此运动中糖异生酶活性的变化还需要在以后的研究中进一步探讨。

大量文献研究证明,糖异生的水平受到 SIRT/CREB/PGC1- α 信号通路的调控^[31-32]。Sirtuins 家族在哺乳动物中普遍存在,由 7 个不同亚型的 275 个氨基酸组成。其中 SIRT1 主要存在于细胞质中,参与调节肝脏、肌肉组织对糖的摄取

和利用,维持血糖的稳定^[33]。肝脏特异性 SIRT1 敲除小鼠显示全身胰岛素敏感性增加,肝脏葡萄糖生成减少^[34]。众所周知,白藜芦醇是 SIRT1 的激活剂。PARK 等^[35]研究了 SIRT1 调控肝脏糖异生的分子机制,发现白藜芦醇增加了被胰岛素抑制的肝细胞中 PEPCK 和 G6Pase 的基因表达水平,转染 SIRT1siRNA 到肝细胞中导致 PEPCK 和 G6Pase 基因表达水平降低,这表明白藜芦醇可能通过 SIRT1 上调糖异生糖基因的表达。WEI 等^[36]的研究观察到 SIRT1siRNA 对急性心肌梗死大鼠和 H9C2 细胞 FGF21/CREB/PGC-1 α 通路的激活有抑制作用,而活化的 SIRT1 可增强 PGC-1 α 的表达,增强梗死后的供血,进一步缩小梗死面积。CREB 可受多种细胞外信号激活,是调节糖异生的关键转录因子。然而 CREB 本身不足以转录激活靶基因,主要是细胞外的信号通过多种蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶促使 CREB 在 Ser133 处磷酸化,与组蛋白乙酰转移酶 CREB 结合蛋白以及 p300 形成复合物,随后转录激活,对 PEPCK 及 G6Pase 两种关键酶进行激活,开启糖异生反应^[37]。研究证明白藜芦醇通过 CRE 刺激转录能上调 CREB 的转录激活电位,白藜芦醇的很多功能是通过 CREB 激活和 CREB 控制基因的转录来解释的^[38]。吴遵桃^[39]的研究证实了在生命早期铅暴露模型中,白藜芦醇可以通过激活 SIRT1/CREB/BDNF 信号通路来上调突触前和突触后蛋白的表达从而改善铅暴露导致的学习记忆损伤。PGC-1 α 能促进糖异生基因表达并抑制糖酵解相关基因的表达,其活性及表达受 NAD⁺ 水平调节^[40]。HERZIG 等^[41]研究证明了在 HepG2 肝癌细胞的瞬时检测中,PGC-1 α 确实是 CREB 的直接靶点,通过环磷酸腺苷激动剂诱导 PGC-1 α 启动子。活化的 PGC-1 α 与肝细胞核因子 4 α 结合形成复合物,使之活化,从而启动 G6ase 和 PEPCK 编码基因转录^[42]。娄旭佳^[43]的研究发现白藜芦醇可以促进 PGC-1 α 过表达,激活 SIRT1/PGC-1 α /NRF1 通路促进线粒体生物合成,改善线粒体能量代谢,促进中高强度训练后疲劳状态的恢复。有研究发现全身 PGC-1 α 敲除小鼠急性运动后血糖和肝糖原含量均低于野生型小鼠^[44]。此次研究中,补充白藜芦醇使大鼠肝脏组织中 SIRT1/CREB/PGC-1 α 的 mRNA 水平显著升高,说明白藜芦醇对该通路具有激活作用,从而激活肝脏糖异生反应,增加肝糖原输出,改善运动性疲劳大鼠的糖原供应。

结论: 白藜芦醇能缓解长时间中高强度运动导致的运动性疲劳,其机制可能与调控 SIRT1/CREB/PGC-1 α 通路、提高 PEPCK 活性、促进肝脏糖异生、升高血糖和肝糖原水平有关。

作者贡献: 阮蓉负责数据处理和文章写作,娄旭佳负责实验设计,通讯作者负责指导文章,全体作者均参与实验。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 田野. 运动生理学高级教程 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 453-470.
- [2] 张蕴琨, 丁树哲. 运动生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2014: 145.
- [3] GONZALEZ JT, FUCHS CJ, BETTS JA, et al. Liver glycogen metabolism during and after prolonged endurance-type exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311(3):E543-E553.
- [4] MULLER GY, MATOS FO, PEREGO JUNIOR JE, et al. High-intensity interval resistance training (HIIRT) improves liver gluconeogenesis from lactate in Swiss mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2022;47(4):439-446.
- [5] CHOI I, RICKERT E, FERNANDEZ M, et al. SIRT1 in Astrocytes Regulates Glucose Metabolism and Reproductive Function. *Endocrinology.* 2019; 160(6):1547-1560.
- [6] SHE Y, SUN J, HOU P, et al. Time-restricted feeding attenuates gluconeogenic activity through inhibition of PGC-1 α expression and activity. *Physiol Behav.* 2021;231:113313.
- [7] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(14):2568-2578.
- [8] 杨海荣, 李雪斌, 劳贞贤, 等. 白藜芦醇药理作用研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(16):3572-3575.
- [9] 郭瑞. 白藜芦醇抗疲劳作用及其机理研究 [J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(24):174-179.
- [10] TUNG YT, WU MF, LEE MC, et al. Antifatigue Activity and Exercise Performance of Phenolic-Rich Extracts from *Calendula officinalis*, *Ribes nigrum*, and *Vaccinium myrtillus*. *Nutrients.* 2019;11(8):1715.
- [11] HUANG WC, HSU YJ, WEI L, et al. Association of physical performance and biochemical profile of mice with intrinsic endurance swimming. *Int J Med Sci.* 2016;13(12):892-901.
- [12] XIE Y, LI Z, WANG Y, et al. Effects of moderate-versus high-intensity swimming training on inflammatory and CD4(+) T cell subset profiles in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Neuroimmunol.* 2019;328:60-67.
- [13] 贾瑞真, 姜超, 金其贯, 等. 左旋肉碱、泛酸、辅酶 Q₁₀ 联合干预有氧运动疲劳模型小鼠的作用及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(2):165-170.
- [14] 李方, 曹建民, 翟鹏飞, 等. 白藜芦醇调节 NLRP3 炎性小体改善力竭运动大鼠肾组织炎症损伤 [J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(12): 1229-1236.
- [15] 代朋乙, 黄昌林. 运动性疲劳研究进展 [J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41(11):955-964.
- [16] ZHANG X, YANG S, CHEN J, et al. Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;9:802.
- [17] LEE MC, HSU YJ, LIN YQ, et al. Effects of Perch Essence Supplementation on Improving Exercise Performance and Anti-Fatigue in Mice. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(3):1155.
- [18] GIURIATO G, VENTURELLI M, MATIAS A, et al. Capsaicin and Its Effect on Exercise Performance, Fatigue and Inflammation after Exercise. *Nutrients.* 2022;14(2):232.
- [19] 赵静. 运动疲劳机制及食源性抗疲劳活性成分研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(9):3565-3571.
- [20] QIN LL, LU TF, QIN Y, et al. In Vivo Effect of Resveratrol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Relieve Physical Fatigue for Sports Nutrition Supplements. *Molecules.* 2020;25(22):5302.
- [21] LÓPEZ-SOLDADO I, GUINOVAR J, DURAN J. Increased liver glycogen levels enhance exercise capacity in mice. *J Biol Chem.* 2021;297(2): 100976.
- [22] BALTACI AK, DURAN MO, MOGULKOC R, et al. Resveratrol does not affect leptin while it has regulatory effects on liver glycogen levels in exercised and non-exercised rats. *Int J Vitam Nutr Res.* 2019;89(5-6): 303-308.
- [23] 熊正英, 张琳, 武胜奇. 白藜芦醇对大强度耐力训练大鼠部分生化指标的影响 [J]. *武汉体育学院学报*, 2008, 42(8):62-66.
- [24] 浦钧宗, WASSERMAN K, WHIPP BJ, 等. 对常人运动中达无氧阈时动脉血乳酸、丙酮酸等指标变化的探讨 [J]. *中国运动医学杂志*, 1985(1):17-23+63.
- [25] 沈文清, 张强, 张怡, 等. 不同方式急性运动结合二甲双胍改善 2 型糖尿病小鼠血糖稳态及肝脏糖异生的作用 [J]. *首都体育学院学报*, 2019, 31(6):560-569.
- [26] 韩锦铂, 王一国. 肝脏糖异生的调控 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(7):1216-1224.
- [27] RAJAS F, GAUTIER-STEIN A, MITHIEUX G. Glucose-6 Phosphate, A Central Hub for Liver Carbohydrate Metabolism. *Metabolites.* 2019; 9(12):282.
- [28] 陈娟娟. 人参果胶 WGPA 通过促进糖异生途径改善小鼠运动性疲劳的研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2017.
- [29] HUANG JP, TAGAWA T, MA SH, et al. Black Ginger (*Kaempferia parviflora*) Extract Enhances Endurance Capacity by Improving Energy Metabolism and Substrate Utilization in Mice. *Nutrients.* 2022;14(18): 3845.
- [30] KOMINE S, MIYAZAKI T, ISHIKURA K, et al. Taurine supplementation enhances endurance capacity by delaying blood glucose decline during prolonged exercise in rats. *Amino Acids.* 2022;54(2):251-260.
- [31] ZHANG WW, XUE R, MI TY, et al. Propofol ameliorates acute postoperative fatigue and promotes glucagon-regulated hepatic gluconeogenesis by activating CREB/PGC-1 α and accelerating fatty acids beta-oxidation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;586: 121-128.
- [32] RODGERS JT, LERIN C, HAAS W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature.* 2005; 434:113-118.
- [33] WANG T, WANG Y, LIU L, et al. Research progress on sirtuins family members and cell senescence. *Eur J Med Chem.* 2020;193:112207.
- [34] RODGERS JT, PUIGSERVER P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(31):12861-12866.
- [35] PARK JM, KIM TH, BAE JS, et al. Role of resveratrol in FOXO1-mediated gluconeogenic gene expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;403(3-4):329-334.
- [36] WEI YJ, WANG JF, CHENG F, et al. miR-124-3p targeted SIRT1 to regulate cell apoptosis, inflammatory response, and oxidative stress in acute myocardial infarction in rats via modulation of the FGF21/CREB/PGC1 α pathway. *J Physiol Biochem.* 2021;77(4):577-587.
- [37] LI BX, GARDNER R, XUE C, et al. Systemic Inhibition of CREB is Well-tolerated in vivo. *Sci Rep.* 2016;6(1):34513.
- [38] THIEL G, ROSSLER OG. Resveratrol stimulates cyclic AMP response element mediated gene transcription. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(2): 256-265.
- [39] 吴遵桃. 生命早期铅致 SD 大鼠学习记忆损伤及白藜芦醇的保护作用 [D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [40] 乔爱君, 左瑾, 刘晓军, 等. Sirt1 基因的研究进展 [J]. *中国医学科学院学报*, 2009, 31(6):782-785.
- [41] HERZIG S, LONG FX, JHALA US, et al. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature.* 2001;413 (6852):179-183.
- [42] 韩向晖, 季光. 肝脏糖异生的分子机制研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(32):3659-3665.
- [43] 姜旭佳. 白藜芦醇对运动性疲劳大鼠线粒体能量代谢的影响 [D]. 扬州: 扬州大学, 2022.
- [44] HAASE TN, RINGHOLM S, LEICK L, et al. Role of PGC-1 α in exercise and fasting-induced adaptations in mouse liver. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2011;301(5):R1501-R1509.

(责任编辑: GD, ZN, WL, LCH)