

D-核糖对疲劳小鼠骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢的影响*

丁 岩¹, 吴 丹², 贾占红¹, 李丹丹¹, 魏 芸¹, 阮金新¹,
张硕峰^{1**}, 孙毅坤^{1**}

(1. 北京中医药大学中药学院 北京 100102; 2. 诚志生命科技有限公司 北京 100084)

摘 要:目的:研究 D-核糖对疲劳小鼠骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢的影响。方法:通过小鼠负重游泳的方法造疲劳模型,将疲劳小鼠用对位分组法分为模型组、核糖组、咖啡因组以及核糖咖啡因组,灌胃给药 3 次/日,并继续游泳 3 天,记录游泳时间,游泳结束后,除即刻取材的小鼠外,其他小鼠继续给药,继续给药 3 天后取材。分别取小鼠腓肠肌,高效液相测腓肠肌内的 ATP、ADP、AMP、IMP 含量。结果:与模型组相比,核糖组、核咖组小鼠游泳时间明显延长,恢复 3 天后核糖组小鼠腓肠肌内 ATP、AMP、IMP 的含量显著增加,核咖组小鼠腓肠肌内 ATP、AMP、ADP 的含量显著增加,咖啡因组小鼠无明显差异。结论:D-核糖进入机体参与骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢,可促进疲劳小鼠腓肠肌中 ATP 含量的恢复,延长疲劳小鼠游泳时间,具有一定的抗疲劳作用。

关键词: D-核糖 三磷酸腺苷 腺苷二磷酸 腺苷酸 次黄嘌呤核苷酸

doi: 10.11842/wst.2013.09.010 中图分类号:591.8 文献标识码:A

疲劳是指机体在运动时体内能量降低且肌肉力量也随之降低的一种亚健康状态,机体的耐力可以通过测定机体维持运动到力竭的时间来表现^[1]。机体运动时骨骼肌利用能量做功,运动的强度越大,能量消耗则越大,如若能量供应不足,将会出现疲劳现象^[2];此外,机体运动时糖酵解产生乳酸,乳酸进入血液中释放 H⁺,也是产生疲劳的部分原因。重复的大强度运动,会造成骨骼肌的损伤,研究表明,恢复机体的能量代谢水平,特别是骨骼肌高能磷酸物质代谢的水平,对于修复骨骼肌的损伤具有积极的作用^[3]。研究普遍认为,含咖啡因的物质对于运动能力具有增强作用,尤其是对于快速运动等项目^[4],可以提高长时间高强度运动时人体的耐力。但当咖啡因使用剂量过大时,则不利于保持神经肌肉

的稳定性,反而会出现疲乏,无力等症状^[5],甚至会出现心律失常等毒性反应。因此如何保持咖啡因的抗疲劳作用,同时减少咖啡因的用量是当前研究的重要课题。

D-核糖(D-ribose)作为生物体内存在于所有细胞中能量代谢中的成份,与腺苷酸的形成和 ATP 的再生密切相关,可用于防治腺苷酸脱氢酶缺陷造成的肌肉僵硬,以及骨骼肌细胞内磷酸化酶缺乏所造成的肌肉疼痛。D-核糖能加速肌肉组织中腺嘌呤核苷酸的代谢,加快高强度运动后骨骼肌中嘌呤核苷酸的恢复,加速嘌呤核苷酸转化为三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP),所以 D-核糖可以及时补充运动过程中消耗的 ATP,延缓疲劳的产生^[6]。由此可见对于 D-核糖的研究具有重要的病理生理学意义和广阔的应用前景。

本研究观察了 D-核糖单独使用和与咖啡因配

收稿日期:2013-10-25

修回日期:2013-11-27

* 北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXTD-12):中药复方药物动力学研究创新团队 负责人:石任兵。

** 通讯作者:张硕峰,副教授,主要研究方向:中药防治新血管研究;孙毅坤,教授,主要研究方向:中药分析。

伍使用对疲劳小鼠负重游泳时间的影响,并通过高效液相测定负重游泳即刻及恢复后腓肠肌内 ATP、AMP、ADP、IMP 的含量,探讨了 D-核糖对骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢的影响,为开发利用 D-核糖的抗疲劳作用,减少咖啡因的用量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验动物

实验用 ICR 雄性小鼠,体重 18~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号为:SCXK(京):2012-0001。

1.1.2 药品与试剂

D-核糖,由诚志生命科技有限公司提供,批号:20121112。根据文献报道,小鼠受试剂量为 $2.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [3]。

咖啡因,由诚志生活科技有限公司提供。小鼠受试剂量为 $75\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

1.1.3 仪器及测试条件

高效液相色谱仪 Agilent1100,色谱柱采用 Welch C₁₈AQ 耐水柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 100 mmol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(含 12 mmol·L⁻¹ 的磷酸氢二钠和 88 mmol·L⁻¹ 的磷酸二氢钠,pH6.5)-甲醇(99.5:0.5),预实验结果表明温度降低至 5℃时,使用 HPLC 法测定 ATP、ADP、AMP、IMP 含量,拖尾情况消失,四个峰的分离度最高,故柱温选择为 5℃;流速 $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长 254 nm,样品进样量 10 μL。

1.2 实验设计

1.2.1 疲劳模型的制备

将相当于小鼠 7.5%体重的铅丝固定于小鼠尾部,放入 30 cm×25 cm×25 cm 水箱中,水温 30℃,水深 20 cm,2 只/箱,游泳至疲劳(疲劳标准:沉入水中 4 s),休息 20 min 后再进行第二次游泳至疲劳,分别记录两次游泳的时间。每天上、下午负重游泳两次,将两次游泳时间相加作为一天游泳的时间。以前两天游泳时间平均值作为参照,继续每天游泳,直至当天游泳时间低于第一天游泳和第二天游泳均值的 80%,即可认为疲劳。

1.2.2 分组与给药

将已确定为疲劳的小鼠,用对位分组法重新分为 4 组,即模型组(等量饮用水)、核糖 $2.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、咖啡因 $75\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组、核糖咖啡因组($1.25\text{g}\cdot$

kg^{-1} 核+ $40\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 咖),分别灌胃给予相应药物,给药容积 $0.2\text{mL}/10\text{g}$,每日剂量分 3 次给药,在上、下午游泳前 30 min 给药,并在下午游泳结束,待小鼠皮毛干燥后灌胃给药一次。按先前条件连续游泳 3 天,游泳结束后,除即刻取材的小鼠外,其他小鼠继续给药,3 次/日,继续给药 3 天后取材。另设一正常组,小鼠不作任何处置。

1.2.3 取材和处理

小鼠末次游泳后,各组随机抽选 7 只小鼠即刻脱颈椎处死,余下小鼠继续给药 3 天后取材,分别取小鼠双下肢腓肠肌,−80℃冰箱保存,高效液相测腓肠肌内的 ATP、ADP、AMP、IMP 含量。

1.2.4 样品的处理

将肌肉组织样品置于−80℃冰箱冷冻干燥过夜。精确称重后迅速置于预冷的玻璃组织研磨器中,按溶剂体积和组织重量比为 $10\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 的比例加入 4℃遇冷的 $0.4\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的高氯酸溶液,然后于冰浴中迅速研磨成骨骼肌匀浆液,漩涡混匀 2.0 min。再 4℃低温离心(4 000 rpm)15 min,取上清液,用 4℃遇冷的 $1.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液,将上清液的 pH 调至 6.5 之后,再次 4℃低温离心(4 000 rpm)15 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜过滤后制成骨骼肌提取液,即供试品溶液,置于−80℃储存待测。

1.2.5 溶液的处理

ATP、ADP、AMP、IMP 混合对照品溶液的制备:精密称取 ATP 对照品、ADP 对照品、AMP 对照品、IMP 对照品各 0.051 2 g、0.050 8 g、0.050 0 g、0.048 5 g,置 100 mL 容量瓶中,用超纯水溶解并稀释至刻度,作为储备液。取 1 mL 此溶液,置 10mL 容量瓶中,用超纯水溶解并稀释至刻度,即得 ATP 浓度为 $51.2\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、ADP 浓度为 $50.8\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、AMP 浓度为 $50.0\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、IMP 浓度为 $48.5\text{μg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

1.2.6 数据处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计分析,所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA),LSD 检验比较两组间差异。

2 结果与分析

2.1 D-核糖对负重游泳疲劳小鼠游泳时间的影响与模型组比较,核糖组、核糖咖啡因组疲劳小

鼠在摄取核糖后第二天、第三天游泳时间明显延长 ($P<0.05$, $P<0.01$), 咖啡因组小鼠游泳时间减少, 且第一天、第 3 天减少明显 ($P<0.01$)。其中, 摄入 D-核糖 $1.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 与咖啡因 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的疲劳小鼠给药后三天的游泳时间均明显长于摄入咖啡因 $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的疲劳小鼠游泳时间 ($P<0.01$)。结果见表 1。

2.2 D-核糖对负重游泳疲劳小鼠腓肠肌中 ATP、ADP、AMP、IMP 含量的影响

与正常组相比较, 疲劳后小鼠分别口服给予饮用水、D-核糖、咖啡因或 D-核糖配合咖啡因, 连续 3 天, 并持续负重游泳后即刻模型组小鼠腓

肠肌内 ATP 明显下降、ADP 含量明显升高 ($P<0.05$); 与模型组相比较, 核糖组、核糖咖啡因组小鼠腓肠肌内 ATP、AMP 含量明显升高 ($P<0.05$), 咖啡因组小鼠腓肠肌内 AMP 含量显著升高 ($P<0.01$)。结果见表 2。

与模型组相比, 疲劳小鼠重游泳结束 3 天后, 核糖组小鼠腓肠肌内 ATP、AMP、IMP 含量明显增高 ($P<0.05$), 咖啡因组动物体内 ATP、AMP 含量有不同程度的增加, 但无明显统计学差异。与模型组相比, 核咖组小鼠腓肠肌内 ATP、AMP 含量明显升高 ($P<0.05$), 且 ADP 含量显著降低 ($P<0.01$)。结果见表 3。

表 1 D-核糖对负重游泳疲劳小鼠游泳时间的影响($\bar{x}\pm s$, $n=14$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	第一天/s	第二天/s	第三天/s
模型组	—	8 738.57±2 461.21	5 652.00±2 501.17	7 294.28±1 817.87
核糖组	2 500	8 778.75±3 646.74	9 856.25±2 480.35**	10 215.00±2 428.84**
咖啡因组	75	4 560.0±1 612.04**	4 208.57±1 690.81	4 285.71±1 166.47**
核咖组	1 250 核+40 咖	8 571.43±2 562.79 $\Delta\Delta$	8 481.43±3 952.30* $\Delta\Delta$	10 118.57±2 495.04** $\Delta\Delta$

注: 与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与咖啡因组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

表 2 D-核糖对疲劳小鼠游泳后即刻腓肠肌中 ATP、ADP、AMP、IMP 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	ATP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	ADP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	AMP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IMP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
正常组	—	1.43±0.74*	5.08±1.18*	1.24±0.47	96.66±17.72
模型组	—	0.64±0.41	7.46±2.91	1.00±0.77	96.02±57.44
核糖组	2 500	3.28±2.60**	8.05±3.18	2.18±1.41*	84.25±33.80
咖啡因组	75	2.72±1.77	5.91±3.49	3.35±2.03**	95.63±13.76
核咖组	1 250 核+40 咖	2.11±0.81**	8.66±3.88	3.06±1.03**	108.61±23.09

注: 与模型组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

表 3 D-核糖对疲劳小鼠恢复 3 天腓肠肌中 ATP、ADP、AMP、IMP 含量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	ATP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	ADP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	AMP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	IMP/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
模型组	—	1.11±1.25	10.09±1.12	1.21±0.85	119.55±24.44
核糖组	2 500	3.70±1.58*	8.24±2.93	2.88±1.53*	150.04±11.24*
咖啡因组	75	2.20±0.87	8.87±2.57	2.79±2.04	113.07±29.37
核咖组	1 250 核+40 咖	3.34±1.56*	6.38±2.29**	3.10±1.47*	118.63±25.69

注: 与模型组相比, * $P<0.05$ 。

3 讨论与结论

疲劳小鼠负重游泳时间实验结果表明,单独摄入 D-核糖与摄入 D-核糖和咖啡因的疲劳小鼠在给药后第二天、第三天的游泳时间明显延长。提示 D-核糖具有一定的抗疲劳作用。而疲劳小鼠大剂量摄取咖啡因其游泳时间则明显减少,与文献报道相符^[4]。

骨骼肌运动需要 ATP 提供能量,嘌呤核苷酸循环是骨骼肌嘌呤核苷酸代谢的重要途径,它在骨骼肌的能量产生中具有重要地位。在高强度运动中,骨骼肌剧烈收缩导致细胞内的 ATP 水平下降,ADP、AMP 的浓度升高,AMP 在腺苷酸脱氢酶的催化下,通过嘌呤核苷酸循环,脱氨生成次黄嘌呤核苷酸(Hypoxanthine Nucleotide, IMP)和氨,一部分 IMP 进一步分解为次黄嘌呤核苷,次黄嘌呤核苷再分解为次黄嘌呤,最终在黄嘌呤氧化酶的作用下生成尿酸排出体外,使骨骼肌嘌呤核苷酸总量减少,影响骨骼肌的能量代谢。研究表明当机体补充 D-核糖时, D-核糖与葡萄糖六磷酸(Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, G-6-PDH)结合生成 5-磷酸核糖,进而生成磷酸核糖焦磷酸(Phosphoribosylpyrophosphate, PRPP), 5-磷酸核糖是 PRPP 的主要来源,而 PRPP 是嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸合成的重要前体物质。与此同时, PRPP 还是嘌呤核苷酸补救合成途径的重要前提物质。因此,补充外源性核糖可以消除磷酸戊糖途径中 G-6-PDH 的限速步骤,直接提高 PRPP 水平,从而加快心肌、骨骼肌合成嘌呤核苷酸的速度及机体 ATP 库的恢复。PRPP 一旦形成,就会直接转化成 IMP, IMP 再进一步转化成 AMP, AMP 再转化为 ADP, 进而补充 ATP 的不足,起到抗疲劳作用^[7-12](如图 1)。本研究结果表明,疲劳小鼠单独补充大剂量咖啡因后,腓肠肌内的 ATP、AMP、IMP 含量变化不明显,提示咖啡因对改善骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢的作用不明显,其减少疲乏感和维持持久工作的作用与其兴奋中枢神经系统腺苷受体,抑制骨骼肌环核苷酸磷酸二酯酶的活性有关^[13-15]。而补充了 D-核糖后,无论单独使用还是与咖啡因配伍使用,在停止运动即刻和恢复 3 天后,小鼠腓肠肌内 ATP、AMP、IMP 含量均有不同程度增加,说明核糖参与了骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢途径,使 PRPP 合成增加,起到了补

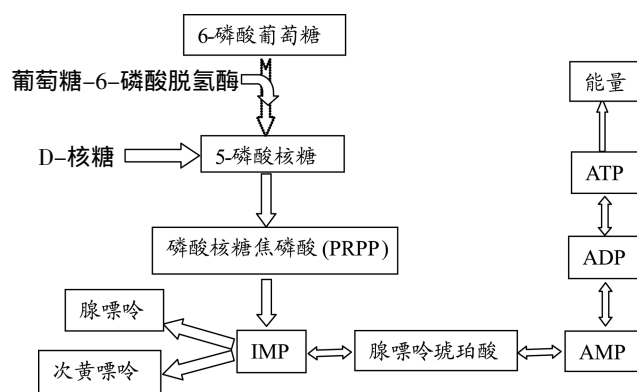


图 1 剧烈运动机体能量代谢

充高能磷酸物质的作用。

综上所述, D-核糖可以延长疲劳小鼠游泳时间,改善骨骼肌组织内高能磷酸物质代谢。D-核糖与咖啡因的抗疲劳作用具有一定的协同作用。

参考文献

- 1 张颖捷,杜万红.国内外抗疲劳研究进展.实用预防医学,2012,19(7):1112~1116.
- 2 李湘奇,张笃超,王毅,怡力康对运动性疲劳大鼠骨骼肌能量代谢的影响.医学研究杂志,2010,39(7):56~58.
- 3 葛新发,董贵俊,王玉站,等.重复大强度运动对骨骼肌蛋白质组变异研究.体育科学,2013,33(5):41~49.
- 4 易超然,卫中庆.咖啡因的药理作用和应用.医学研究生学报,2005,18(3):270~272.
- 5 武桂新.运动员使用咖啡因对运动能力的影响.河南师范大学学报(自然科学版),2011,39(6):164~167.
- 6 王亚坤,孙文敬,刘敬泽.D-核糖对大鼠负载游泳后胰岛素、去甲肾上腺素、肾上腺素的影响及其抗疲劳、抗缺氧能力研究.食品科学,2008,29(11):591~596.
- 7 Dodd S L, Johnson C A, Fernholz K, et al. The role of ribose in human skeletal muscle metabolism. Med Hypotheses, 2004, 62(5): 819~824.
- 8 于文兵,严政,高丽丽.嘌呤核苷酸代谢与核糖(综述).体育与科学,2002,23(2):63~65.
- 9 王勇,袁强,华岩.牡蛎提取液对小鼠运动耐力及骨骼肌自由基、能量代谢酶的影响.现代预防医学,2013,40(1):106~107.
- 10 郭旭霞.耐力运动训练对大鼠骨骼肌线粒体能量代谢的影响.南宁:广西师范大学硕士论文,2011.
- 11 秦海宏,王小平,郭俊生,等.D-核糖对果蝇抗衰老和小鼠耐缺氧时间的影响.中国老年学杂志,2002,1:49~51.
- 12 谈善军,周锋,余震,等.术后疲劳综合征大鼠骨骼肌能量代谢特点及人参皂苷 Rb₁ 的干预研究.中国中药杂志,2011,36(24):3489~3493.
- 13 Davis J M, Zhao Z, Stock H S, et al. Central nervous system effects of caffeine and adenosine on fatigue. Am J Physiol Regul In-

- tegr Comp Physiol*, 2003, 284(2): R399~R404.
- 14 Brice C, Smith A. The effects of caffeine on simulated driving, subjective alertness and sustained attention. *Hum Psychopharmacol*, 2001, 16(7):523~531.
- 15 李淑翠,张敏,陈向明,等.咖啡因抗运动性疲劳作用的实验研究.中国食品添加剂,2012(3):120~124.

Effects of D-ribose on High-energy Phosphate Metabolism of Skeletal Muscle Tissues of Tired Mice

Ding Yan¹, Wu Dan², Jia Zhanhong¹, Li Dandan¹, Wei Yun¹, Ruan Jinxin¹, Zhang Shuofeng¹, Sun Yikun¹

(1. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Chengzhi Life Science Co. Ltd., Beijing 100084, China)

Abstract: This article was aimed to study effect of D-ribose on the high-energy phosphate metabolism of skeletal muscle tissues of tired mice. The model was made by burden swimming. And then, the mice were divided into four groups, which were the model group, D-ribose group, caffeine group, and D-ribose with caffeine group). Intragastric administrations of drugs were given to all mice in four groups, three times per day. And all mice continued to swim for three days. The time of swimming was recorded. Gastrocnemius of mice were removed after swimming or 3 days later to measure the concentration of ATP, ADP, AMP and IMP with the HPLC. The results showed that compared with the control group, the time of burden swimming was significantly prolonged for mice in the D-ribose group and the D-ribose with caffeine group. After three-day recovery, the concentration of ATP, AMP and IMP of gastrocnemius in the D-ribose group and the D-ribose with caffeine group mice was significantly increased. There was no significant difference in the caffeine group mice. It was concluded that D-ribose is involved in the high-energy phosphate metabolism of skeletal muscle tissues of tired mice. D-ribose promotes the recovery of ATP concentration in the gastrocnemius of tired mice, and prolongs the time of burden swimming. Therefore, it has a certain anti-fatigue effect.

Keywords: D-ribose, ATP, ADP, AMP, IMP

(责任编辑 张丰丰 张志华,责任译审 王 晶)