

·实验研究·

牡蛎肉提取物对小鼠抗疲劳和耐缺氧能力的影响

蔡亚伟¹, 王海燕², 孟辰¹, 牟翔宇¹, 邹国庆³, 刘爱青⁴, 薛玲⁵, 郭英慧¹

(1.山东中医药大学中医学院, 山东 济南 250355; 2.农业部规划设计研究院, 北京 100062;
3.北京盛美诺生物技术有限公司, 北京 100062; 4.海南盛美诺生物技术有限公司, 海南 文昌 571339;
5.山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355;)

[摘要] 目的:探讨牡蛎肉提取物对小鼠抗疲劳和耐缺氧能力的影响。方法:分别以高、中、低剂量的牡蛎肉提取物给小鼠连续灌胃,不同剂量的干预时间均有2周和4周两种方案,干预后通过负重游泳实验观察小鼠负重游泳时间和免疫器官指数,常压耐缺氧实验观察小鼠耐缺氧能力,强迫游泳实验观察小鼠运动后肝糖原和血乳酸含量变化。结果:与对照组相比,牡蛎肉提取物干预组小鼠负重游泳时间和缺氧死亡时间显著延长($P < 0.05$),肝糖原含量增加($P < 0.05$),血清血乳酸含量降低($P < 0.05$),免疫器官指数提高($P < 0.05$),并且小鼠抗疲劳能力随着干预时间的延长和干预浓度的增加而逐渐提高,以4周干预时间效果较好。结论:牡蛎肉提取物可以提高小鼠的抗疲劳能力和耐缺氧能力,增强小鼠的免疫能力。

[关键词] 牡蛎肉提取物;抗疲劳;耐缺氧;免疫力;小鼠;负重游泳实验;常压耐缺氧实验;强迫游泳实验

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 1007-659X(2019)05-0503-05

DOI:10.16294/j.cnki.1007-659x.2019.05.018

Effects of Oyster Meat Extract on Anti-fatigue Ability and Hypoxia Tolerance in Mice

CAI Yawei¹, WANG Haiyan², MENG Chen¹, MU Xiangyu¹, ZOU Guoqing³, LIU Aiqing⁴, XUE Ling⁵, GUO Yinghui¹

(1.College of Traditional Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2.Planning and Design Institute of the Ministry of Agriculture, Beijing 100062, China; 3.Beijing Shengmeino Biotechnology Co., LTD., Beijing 100062, China; 4.Hainan Shengmeino Biotechnology Co., LTD., Wenchang 571339, China; 5.College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract Objective: To explore the effects of oyster meat extract on the anti-fatigue ability and hypoxia tolerance of mice. **Methods:** Mice were continuously intragastrically administrated with high, medium and low

doses of oyster meat extract. The intervention time of different doses was 2 weeks and 4 weeks. After the intervention, the weight-bearing swimming time and immune organ index was observed by weight-bearing swimming test. The ability of hypoxia tolerance was observed by hypoxia test under ordinary pressure. The changes of liver glycogen and blood lactate content after exercise were ob-

[收稿日期] 2018-12-19

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(编号:81202616); 海口市“十三五”海洋经济创新发展示范市立项项目(编号:HHCL201804)

[作者简介] 蔡亚伟(1992-),男,河南周口人,2017年硕士研究生,研究方向:中医肝藏象生物学基础和情志病发病及药物干预机制研究。邮箱:841765917@qq.com;电话:15550481914。

[通信作者] 郭英慧(1976-),女,山东泰安人,医学博士,副教授,主要从事中医肝藏象生物学基础及中药药理机制研究。邮箱:yhguo76@126.com。

served by forced swimming test. **Results:** Compared with the control group, the weight-bearing swimming time and hypoxia death time of the oyster meat extract intervention groups were significantly prolonged ($P < 0.05$), the liver glycogen content increased ($P < 0.05$), the serum blood lactate content decreased ($P < 0.05$), the immune organ index increased ($P < 0.05$), and the mice's anti-fatigue ability improved with the extension of the intervention time and the increase of the intervention concentration. When the intervention time was four weeks, the effect was the best. **Conclusions:** Oyster meat extract can improve the anti-fatigue ability and hypoxia tolerance of mice, and enhance the immunity of mice.

Keywords oyster meat extract; anti-fatigue; hypoxia tolerance; immunity; mouse; weight-bearing swimming test; hypoxia test under ordinary pressure; forced swimming test

在快节奏的现代生活及日益加重的工作压力下, 疲劳已成为常见的一种亚健康表现, 延缓疲劳的发生, 迅速消除疲劳状态, 保持旺盛的精力对现代人而言极为重要^[1-2]。研究开发快速有效、无不良反应的新型抗疲劳保健品, 成为当今医学研究的热点^[3]。牡蛎是常用海洋中药, 其中牡蛎壳是历版中国药典收载的中医临床常用药, 有平肝潜阳、软坚散结、收敛固涩之功, 在中医临床用药中有重要地位^[4-5]。如童远明等^[6]研究含海洋中药的补益方剂配伍规律发现, 在收集的 285 首方中(包含 416 味中药), 牡蛎的用药频次和使用频次均位居首位, 含牡蛎的方剂占方剂总数 50% 以上。代民涛等^[7]指出桂枝加龙骨牡蛎汤可治疗失精所致的阴阳两虚之虚劳。随着现代医学研究的深入, 牡蛎肉也被发现具有多种活性物质, 如某些肽类具有提高机体免疫力、降血脂、降血压、抗肿瘤、保护肝脏等作用^[8-11]。为进一步验证牡蛎肉的现代药理作用, 本研究通过小鼠负重游泳实验、常压耐缺氧实验和强迫游泳耐疲劳实验分别探讨牡蛎肉提取物对小鼠抗疲劳能力以及耐缺氧能力的影响, 旨在明确牡蛎肉保健养生的作用机制, 为提升牡蛎的价值及推广提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Thermo UV550 分光光度计; 小鼠乳酸酶联免疫分析试剂盒(上海安谱实验科技股份有限公司, 生产批号: 201705); 小鼠肝糖原酶联免疫分析试剂盒(上海安谱实验科技股份有限公司, 生产批号: 201705); 高速低温离心机(Thermo Fisher)、分析天平(METTLER TOLEDO)、酶标仪(SUNRISE REMOTE); 牡蛎肉提取物(海南盛美诺生物技术有限公司)。

1.2 动物与实验环境

SPF 级健康成年昆明种雄性小鼠 720 只, 体质

量 18~22 g, 许可证号: SCXK 鲁 20140007, 由山东朋悦实验动物繁育有限公司提供。饲养条件: 每笼 5 只, 自由饲养, 温度控制在 22~25 °C, 通风良好, 湿度 55%~70%。

1.3 实验分组

实验分两批进行(干预时间分别为 2 周和 4 周), 每批 120 只小鼠, 每批小鼠随机分为 3 组(每组 40 只), 分别进行小鼠负重游泳实验、常压耐缺氧实验和强迫游泳实验, 每一个实验(40 只小鼠)随机分为牡蛎肉提取物高剂量组(M1 组, 1 g/kg, 相当于人日口服推荐用量的 20 倍)、牡蛎肉提取物中剂量组(M2 组, 0.5 g/kg, 相当于人日口服推荐用量的 10 倍)、牡蛎肉提取物低剂量组(M3 组, 0.17 g/kg, 相当于人日口服推荐用量的 5 倍)、对照组。牡蛎肉提取物干预的各组小鼠以相应剂量灌胃, 对照组以纯净水灌胃, 每天 1 次, 灌胃液体量为每 10 g 体质量 0.1 mL。每一批实验均重复 3 次。

1.4 实验方法

参照《保健食品检验与评价技术规范》^[12]中缓解体力疲劳实验和提高缺氧耐受力实验方法, 分别进行以下实验。

1.4.1 小鼠负重游泳实验 连续灌胃 2 周和 4 周后, 各组小鼠分别称重, 将尾根部负重 10% 铅条的小鼠置于游泳箱中(水温 30 °C, 水深约 30 cm)游泳, 记录小鼠自游泳开始至死亡的时间。小鼠死亡后立即捞出擦干, 剖取胸腺、脾脏, 去除脏器周围的脂肪和结缔组织, 滤纸吸附血液, 精确称量, 按下式计算免疫器官指数: 免疫器官指数 = 脏器质量(mg)/小鼠体质量(g) × 100%^[13]。

1.4.2 常压耐缺氧实验 连续灌胃 2 周和 4 周后, 将小鼠分别放入盛有 5 g 钠石灰的 250 mL 磨口瓶内(每瓶 1 只), 用瓶塞和凡士林密封瓶口, 记录小鼠

死亡时间^[14]。

1.4.3 强迫游泳实验^[15-16] 连续灌胃2周和4周后,令小鼠在温度30℃的游泳箱(70 cm×50 cm×60 cm)中不负重游泳90 min后,捞出擦干,立即取眼球血,分离血清,用试剂盒测定血清血乳酸含量^[17]。眼球取血后,小鼠立即颈椎脱臼处死,剖取肝脏,精确称取质量,加入三氯乙酸,匀浆、离心,取上清液用试剂盒测定肝糖原含量^[18]。

1.5 统计学分析

采用Graph Pad Prism 6软件分析处理数据,组间比较采用*t*检验,取 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 牡蛎肉提取物对小鼠负重游泳时间和免疫器官指数的影响

负重游泳实验显示,灌胃2周后,与对照组相

比,各干预组小鼠负重游泳时间均有延长趋势,但差异无统计学意义;灌胃4周后,其负重游泳时间显著长于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$)。见图1A。

从胸腺指数看,灌胃2周后,与对照组相比,M1组小鼠胸腺指数显著升高,差异有统计学意义($P<0.001$);与M1组比较,M2、M3组小鼠胸腺指数差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见图1B。灌胃4周后,与对照组相比,M1、M2和M3组小鼠胸腺指数显著升高,差异均有统计学意义($P<0.001$ 或 $P<0.01$),见图1C。

从脾脏指数看,灌胃2周后,与对照组相比,各组小鼠脾脏指数差异均无统计学意义;干预4周后,与对照组相比,M1、M2和M3组脾脏指数显著升高,差异有统计学意义($P<0.001$ 或 $P<0.01$),见图1D。

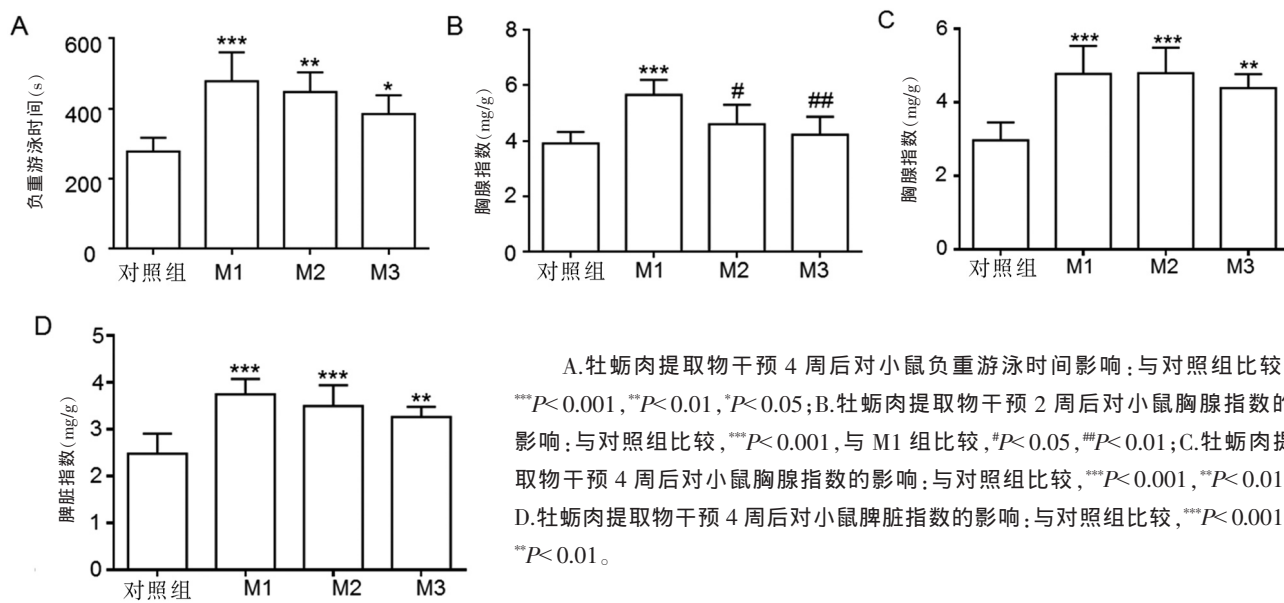


图1 牡蛎肉提取物干预2周、4周后对小鼠负重游泳时间和免疫器官指数的影响

2.2 牡蛎肉提取物对小鼠耐缺氧能力的影响

常耐压缺氧实验结果显示,灌胃2周后,与对照组相比,M1组小鼠缺氧死亡时间显著延长,差异有统计学意义($P<0.05$),其余各组缺氧死亡时间差异均无统计学意义($P>0.05$),见图2A。灌胃4周后,与对照组相比,M1、M2、M3组小鼠缺氧死亡时间显著延长,差异有统计学意义($P<0.001$),见图2B。

2.3 牡蛎肉提取物对小鼠运动后肝糖原和血乳酸含量的影响

强迫游泳实验结果显示,灌胃2周后,与对照组

相比,各干预组小鼠肝糖原含量有升高趋势,但差异无统计学意义;灌胃4周后,与对照组相比,M1、M2、M3组肝糖原含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见图3A。

从血清血乳酸含量看,灌胃2周后,与对照组相比,M1、M2、M3组小鼠血清血乳酸含量均降低,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见图3B。灌胃4周后,与对照组相比,各干预组小鼠血清血乳酸含量亦降低,差异有统计学意义($P<0.001$ 或 $P<0.01$),见图3C。

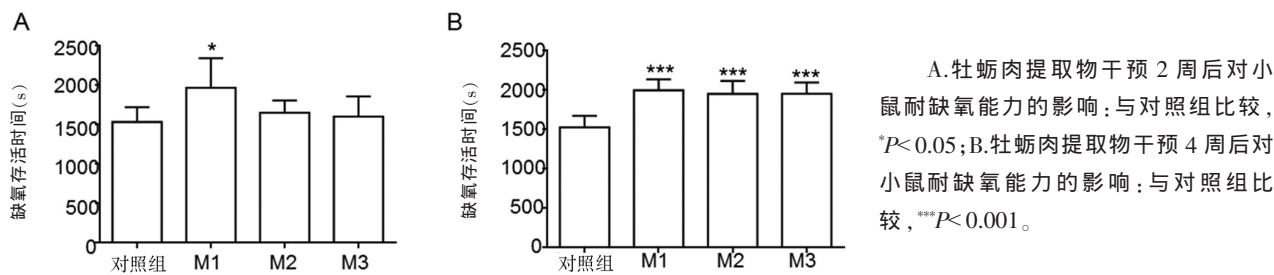
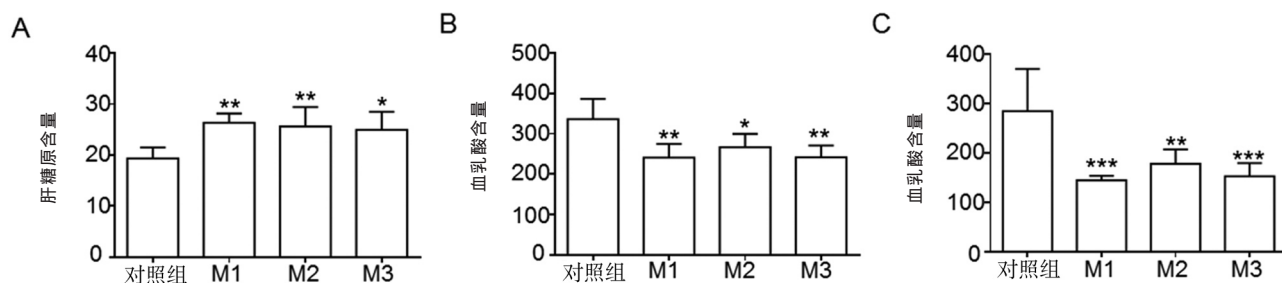


图2 牡蛎肉提取物干预2周、4周后对小鼠耐缺氧能力的影响



A.牡蛎肉提取物干预4周后对小鼠运动后肝糖原含量的影响:与对照组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;B.牡蛎肉提取物干预2周后对小鼠运动后血乳酸含量的影响:与对照组比较,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$;C.牡蛎肉提取物干预4周后对小鼠运动后血乳酸含量的影响:与对照组比较,*** $P < 0.001$,** $P < 0.01$ 。

图3 牡蛎肉提取物干预2周、4周后对小鼠运动后肝糖原和血乳酸含量的影响

3 讨论

历代医书中都有对牡蛎功能和主治的详细记载。牡蛎首载于《神农本草经》，书中将其列为上品，记：“牡蛎，味咸平，主伤寒寒热，温疟洒洒，惊恚怒气，除拘缓鼠痿，女子带下赤白，久服，强骨节，杀邪气，延年。”至汉代，张仲景《伤寒杂病论》就已经广泛使用牡蛎组方^[19-20]。《神农本草经疏》言牡蛎“气薄味厚，阴也降也。入足少阴、厥阴、少阳经”。《名医别录》曰：“除留热在关节荣卫，虚热来去不定，烦满，止汗，心痛气结，止渴，除老血，涩大小肠，止大小便，疗泄精，喉痹，咳嗽，心胁下痞满。”古籍众多记载都不同程度地体现了牡蛎在中医临床上的重要地位，为进一步深入研究和拓宽其现代临床应用奠定了重要基础，提供了坚实的科学依据^[5]。

近代研究进一步表明：牡蛎作为我国第一批被列为药食同源的食物，不仅牡蛎壳有多种药理作用，牡蛎肉亦含多种氨基酸、肝糖元、B族维生素、牛磺酸和钙、磷、铁、锌等营养成分^[21-23]，某些肽类具有抗氧化、降血压、抗菌等生物活性功能，且易于消化吸收，常吃可以提高机体免疫力，是促进儿童智力发展和中老年人防病抗衰老的营养保健补品^[24]。我国牡蛎资源丰富，长期以来如何提高其利用价值和效

益，一直是研究热点^[25-26]。近年来，人们对牡蛎肉提取物作为抗疲劳保健补品的开发进行了探索性研究，先后从牡蛎肉营养成分分离、生物活性、提取工艺、功效及作用机制方面展开大量研究^[27-28]，至此，对牡蛎的药理和临床研究已经突破了其在古籍记载中的基本功效。本实验通过作用剂量和作用时间梯度研究发现，牡蛎肉提取物在提高小鼠抗疲劳和耐缺氧方面功效显著。牡蛎肉提取物可显著延长小鼠负重游泳时间和缺氧死亡时间，增加小鼠肝糖原含量，降低小鼠血清血乳酸含量，提高小鼠免疫器官指数，并且随着干预时间延长和干预浓度增加，小鼠抗疲劳能力逐渐提升，以4周干预时间效果较佳。以上结果与张部昌、易传祝等^[29-30]研究牡蛎口服液、牡蛎软胶囊抗疲劳作用的结果基本一致，进一步为抗疲劳食品开发提供了科学依据。

目前我国对牡蛎的应用已开展了多项研究工作^[31]，牡蛎的产品开发涉及到材料、食品、保健品等领域，但与国外发达国家相比尚存在较大差距。牡蛎肉和牡蛎壳都有其各自的价值，牡蛎肉提取物具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、降血糖等现代药理作用，今后的研究中，可以考虑对其主要成分的分离、提纯、鉴定工艺进一步优化，针对老、幼、病、男、

女等不同人群开发满足不同需求的牡蛎产品。如添加中草药、微量元素等进行复配^[32],使产品具有个体化、功效互补、快速有效等优势,发挥牡蛎在保健补品方面所起到的陆源食品不能代替的独特作用。

[参考文献]

- [1] HOLMES G P, KAPLAN J E, GANTZ N M, et al. Chronic fatigue syndrome: a working case definition[J]. *Ann Intern Med*, 1988, 108(3): 387-389.
- [2] FUKUDA K, STRANS S E, HICKIE I, et al. The chronic fatigue syndrome: a comprehensive approach to its definition and study[J]. *Ann Intern Med*, 1994, 121(12): 953-959.
- [3] MIZUMA H, TANAKA M, NOZAKI S, et al. Daily oral administration of crocetin attenuates physical fatigue in human subjects[J]. *Nutr Res*, 2009, 29(3): 145-150.
- [4] 代春美, 廖晓宇, 叶祖光. 海洋中药牡蛎的化学成分、药理活性及开发应用[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(3): 437, 471-474, .
- [5] 许茜, 秦骥, 丛一博. 海洋中药牡蛎肉在现代临床实验研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(32): 6398-6400.
- [6] 董远明. 含海洋中药补益方剂的配伍规律研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018: 25-28.
- [7] 代民涛, 柴可夫, 李秀月. 《金匱要略》虚劳病八方探略[J]. *中医学报*, 2014, 29(2): 200-202.
- [8] PATARCA R. Cytokines and chronic fatigue syndrome[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001(933): 185-200.
- [9] 徐静, 于红霞. 牡蛎提取物的生物活性研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(11): 1395-1397.
- [10] 冯丽, 赵文静, 常惟智. 牡蛎的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中医药信息*, 2011, 28(1): 114-116.
- [11] 胡雪琼, 吴红棉, 刘芷筠, 等. 近江牡蛎糖胺聚糖的酶解提取及其抗肿瘤活性研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(7): 3-6.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2003: 756-762.
- [13] 王璟, 秦雪, 全令印, 等. 黄酒对小鼠抗疲劳能力和衰老小鼠免疫器官的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(21): 224-228.
- [14] 许锦珍, 刘文君, 付玉梅, 等. 参灵草口服液对小鼠耐缺氧实验研究[J]. *江西中医药*, 2017, 48(412): 59-60.
- [15] 李云宁, 程仁丽, 程静. 疲消乐口服液对小鼠抗疲劳和耐缺氧作用的实验研究[J]. *中医药导报*, 2012, 18(11): 82-84.
- [16] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997: 290, 451.
- [17] 马晓瑜. 血乳酸在运动训练中的应用分析[J]. *文体用品与科技*, 2017, 40(4): 170-171.
- [18] 李凯歌, 孙志芳, 王洋, 等. 逆灸关元、命门穴对力竭运动大鼠糖原、乳酸的影响[J]. *长春中医药大学学报*, 2016, 32(4): 681-683.
- [19] 中国药典委员会. 中国药典: 第一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 120.
- [20] 秦佳佳. 桂枝加龙骨牡蛎汤合二至丸治疗围绝经期综合征临床观察[J]. *新中医*, 2006, 38(7): 27-28.
- [21] 腾瑜, 王彩理. 牡蛎的营养和降糖作用研究[J]. *海洋水产研究*, 2005, 26(6): 39-44.
- [22] JUNG K S, MIN J L, HYE J G, et al. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*[J]. *Mol Immunol*, 2013, 53(1-2): 88-98.
- [23] LIU Z Y, ZENG M Y, DONG S Y, et al. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on harvested strawberries[J]. *Postharvest Biol Technol*, 2007, 46(1): 95-98.
- [24] WANG J P, HU J N, CUI J Z, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. *Food Chem*, 2008, 111(2): 302-308.
- [25] QIAN Z J, JUNG W K, BYUN H G, et al. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(9): 3365-3371.
- [26] 冯丽, 赵文静, 常惟智. 牡蛎的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中医药信息*, 2011, 28(1): 114-116.
- [27] 袁林, 查锋超, 姚焯, 等. 牡蛎酶解产物与还原糖美拉德反应工艺优化及挥发性风味物质分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(16): 1-9.
- [28] 邱娟, 沈建东, 翁凌, 等. 利用牡蛎制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. *食品科学*, 2015, 36(24): 165-172.
- [29] 张部昌, 商桂春, 李宝芳, 等. 牡蛎口服液抗疲劳作用的研究[J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 1999, 23(1): 103-106.
- [30] 易传祝, 周月婵, 刘上, 等. 牡蛎提取物软胶囊缓解体力疲劳功能研究[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(4): 493-495.
- [31] 高加龙, 章超桦, 邱伟佳, 等. 南海不同产地近江牡蛎中牛磺酸含量检测[J]. *食品科学*, 2013, 34(10): 164-168.
- [32] LEO F D, PANARESE S, GALLERANI R, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides: production and implementation of functional food[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(31): 3622-3643.