

龟鹿益神颗粒对慢性疲劳大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 的影响

王晨¹, 金晨曦², 金杰¹

1. 黄河中心医院, 河南 郑州 450000; 2. 南昌大学玛丽女王学院, 江西 南昌 330000

[摘要] 目的: 研究慢性疲劳综合征的基本病机, 建立慢性疲劳大鼠模型, 观察龟鹿益神颗粒对慢性疲劳大鼠行为学指标和骨骼肌中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α) 的影响。方法: 雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 随机分为正常组、正常对照组、模型组、苁蓉益肾颗粒组、龟鹿益神颗粒组, 每组 8 只。除正常组、正常对照组不造模外, 其他 3 组采用慢性束缚、夹尾激怒和力竭游泳方法构建慢性疲劳大鼠模型。正常组和模型组按 10 ml/(kg·d) 给予生理盐水灌胃, 正常对照组和龟鹿益神颗粒组按 1 250 mg/(kg·d) 给予龟鹿益神颗粒混悬液灌胃, 苁蓉益肾颗粒组按 417 mg/(kg·d) 给予苁蓉益肾颗粒混悬液灌胃。每天观察并记录大鼠的体质量、饮水量、进食量、粪便形态及鼠毛色泽等情况, 用 ELISA 法检测大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 的含量。结果: 造模前, 各组大鼠体质量、力竭游泳时间、直立次数、跨格次数无明显差异。造模后, 与正常组比较, 模型组、龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠体质量、力竭游泳时间、直立次数、跨格次数显著减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。给药后, 与正常组比较, 模型组大鼠体质量、力竭游泳时间、直立次数、跨格次数、骨骼肌中 PGC-1 α 含量显著减少, 正常对照组大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 含量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 龟鹿益神颗粒组和苁蓉益肾颗粒组大鼠体质量、力竭游泳时间、跨格次数、直立次数、骨骼肌中 PGC-1 α 含量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与苁蓉益肾颗粒组比较, 龟鹿益神颗粒组大鼠力竭游泳时间、骨骼肌中 PGC-1 α 含量显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 运用慢性复合因素复制慢性疲劳动物模型具有可行性。龟鹿益神颗粒可以改善慢性疲劳大鼠身心疲劳状态, 提高慢性疲劳大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 含量。

[关键词] 慢性疲劳综合征; 龟鹿益神颗粒; 骨骼肌; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (PGC-1 α); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 09-0016-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.09.005

Guilu Yishen Granule Can Improve Content of PGC-1 α in Skeletal Muscle of CFS Model Rats

WANG Chen, JIN Chenxi, JIN Jie

Abstract: **Objective:** To study the basic pathogenesis of chronic fatigue syndrome(CFS), establish CFS models, and to observe effect of Guilu Yishen granule on behavioral indexes and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) in skeletal muscle of CFS rats. **Methods:** Divided 40 SPF male rats into the normal group, normal control group, model group, Congrong Yishen granules group and Guilu Yishen granule group, 8 cases in each group. Except the normal group and the normal control group, the other three groups were all given chronic immobilization, tail pinch and exhaustive swimming so as to establish CFS model rats. The normal group and the model group was given saline of 10 ml/(kg·d) by gavage, while the normal control group and Guilu Yishen granule group was given 1 250 mg/(kg·d) suspension of Guilu Yishen granule by gavage, and Congrong Yishen granules group was given 417 mg/(kg·d) suspension of Congrong Yishen granules by gavage. Recorded body mass, drinking amount, dietary amount, shape of stool and fur color of the rats every day, and detected PGC-1 α content in skeletal muscle with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Results:** There was no significant difference in the body mass, exhaustive swimming time, times of standing up and times squares crossed in the all groups before modeling. After modeling, compared with the normal group, body mass, exhaustive swimming time, times of standing up and times of squares crossed in the model group, Congrong Yishen granules group and Guilu Yishen granule group were decreased significantly, the differences being significant ($P < 0.05$). After medication, compared with the normal group,

[收稿日期] 2017-03-03

[基金项目] 河南省中医管理局普通公关项目 (2013ZY02028); 河南省中医管理局项目 (2013ZY03001)

[作者简介] 王晨 (1987-), 女, 住院医师, 主要从事脑血管疾病研究。

[通信作者] 金杰, E-mail: j159371@126.com。

body mass, exhaustive swimming time, times of standing up, times of squares crossed and PGC-1 α content in skeletal muscle mitochondria of the model group were decreased significantly; PGC-1 α content in skeletal muscle mitochondria of the normal control group were increased significantly, the differences being significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, body mass, exhaustive swimming time, times of squares crossed, times of standing up and PGC-1 α content in skeletal muscle mitochondria of Congrong Yishen granules group and Guilu Yishen granule group were increased significantly, the differences being significant ($P < 0.05$). Compared with Congrong Yishen granules group, exhaustive swimming time and PGC-1 α content in skeletal muscle mitochondria of Guilu Yishen granule group were increased significantly, the differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** It is feasible to create CFS models by copying chronic multiple factors. Guilu Yishen granule can improve fatigue of CFS model rats and content of PGC-1 α in skeletal muscle.

Keywords: Chronic fatigue syndrome(CFS); Guilu Yishen granule; Skeletal muscle; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ coactivator-1 α (PGC-1); Animal experiment; Rat

慢性疲劳综合征(Chronic fatigue syndrome, CFS)是以极度疲劳持续或反复发作6个月以上,休息后不能缓解,体格检查和实验室检测无明显异常,且未发现能引发疲劳的内科或精神疾患,同时伴有低热或自觉发热、头疼、肌肉和关节疼痛、咽喉痛、颈部和(或)腋窝淋巴结肿大疼痛等流感样症状;注意力无法集中、记忆力下降、理解力较差等认知功能的损害以及睡眠障碍、抑郁等非特异性症状的一组症候群。本实验中,笔者采取束缚、夹尾激怒、力竭游泳复合方法构建慢性疲劳大鼠模型,通过观察大鼠一般情况、行为学指标及大鼠骨骼肌中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (PGC-1 α)含量的变化,并与苁蓉益肾颗粒对照组比较,阐明龟鹿益神颗粒的抗疲劳疗效,为临床推广提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 成年雄性SPF级SD大鼠40只,体质量(200 ± 20)g,由河南省动物实验中心提供,许可证号:SCXK(豫)2010-0002。大鼠自然进食饮水,饲养环境的室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度40%~45%正常光照条件,5只/笼,适应性饲养1周,随机分为正常组、正常对照组、模型组、苁蓉益肾颗粒组、龟鹿益神颗粒组,每组8只。

1.2 实验药物、试剂与仪器 龟鹿益神颗粒为金杰主任医师自拟中药复方,处方:党参颗粒20g,枸杞颗粒、鹿角霜颗粒、醋龟甲颗粒各10g,仙鹤草颗粒15g。中药配方颗粒由江阴天江药业有限公司生产;苁蓉益肾颗粒由内蒙古兰太药业有限责任公司生产,产品批号:12091101,国药准字Z20030099,规格:每袋装2g。电子天平,型号:DS-671,由上海寺冈电子有限公司制造;大鼠过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子1 α (PGC-1 α)ELISA试剂盒,由上海丰寿实业有限公司生产,规格:48 Tests。

1.3 动物模型制备 除正常组、正常对照组不造模外,其余3组单号日期进行力竭游泳,双号日期进行夹尾激怒(每天2次,每次夹尾15min),并每天进行束缚(将大鼠放入自制的束缚筒内,使大鼠头部朝向通气口,抵住大鼠后端,限制大鼠的

活动,每次束缚30min,每天1次),共造模14天。大鼠出现体质量增长缓慢或减轻,饮水、进食量减少,便溏、鼠毛晦暗无光泽等,证实慢性疲劳大鼠模型造模成功。

1.4 给药剂量与方法 造模结束次日起,正常组和模型组按10ml/(kg·d)给予生理盐水灌胃,正常对照组和龟鹿益神颗粒组按1250mg/(kg·d)给予龟鹿益神颗粒混悬液灌胃,苁蓉益肾颗粒组按417mg/(kg·d)给予苁蓉益肾颗粒混悬液灌胃,模型组按10ml/(kg·d)给予生理盐水灌胃。每天1次,共14天。每隔3天测量1次大鼠体质量,以调整灌胃量。

1.5 一般情况观察 造模期间,每天观察并记录大鼠的体质量、饮水量、进食量、粪便形态及鼠毛色泽等情况。

1.6 旷场实验 将大鼠放入敞箱的中央正中格,观察大鼠在3min内的行为举动。测定的指标包含:①跨格运动的次数(三爪以上跨入方格内方可计数);②直立运动的次数(攀附箱壁或两个前肢离地面1cm以上)。测量时保持室内安静,每次实验结束后将箱内粪便清扫干净。造模前、后和灌胃后分别测定1次,每次时间3min,每次每只动物测定1次。

1.7 力竭游泳实验 单号日期每天下午对大鼠进行力竭游泳实验,大鼠游泳时水深40cm,水温(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。以大鼠沉入水中3s不动为力竭标准,大鼠力竭后,迅速将大鼠捞出,以免溺水或者死亡。各组大鼠在造模前、造模后和灌胃后分别测量,每次每只大鼠测定1次。

1.8 骨骼肌中PGC-1 α 的测定 实验前大鼠禁食12h,给予每只大鼠100g/L的水合氯醛腹腔注射,注射剂量为3ml/kg,大鼠麻醉成功后仰卧于手术台上,在固定板上固定,用手术剪剪开大鼠大腿部位的皮肤,快速取出大鼠左后肢股四头肌,称取1g在生理盐水中漂洗,除去血液,用滤纸拭干,放入密封的玻璃小瓶中,在-20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存,全部大鼠骨骼肌取完后,由专业人员按PGC-1 α ELISA说明书中的步骤检测大鼠骨骼肌中PGC-1 α 的含量。

1.9 统计学方法 采用SPSS19.0统计软件包进行数据的分析和处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异采用单因素方差分析(One Way ANOVA):组间两两比较,如果方差齐,采

用LSD法(最小显著差异法);如果方差不齐,则采用Dunnett's T3法。

2 结果

2.1 一般情况 各组大鼠在造模前,体质量、饮水量、进食量、粪便形态、鼠毛色泽等均没有明显差异。随着造模时间的推移,造模各组大鼠体质量减轻,饮水量、进食量减少,大便稀溏,皮毛晦暗、失去光泽。开始给药后,各给药组大鼠体质量逐渐恢复增长,饮水量、进食量增多,大便稀溏较前好转。

2.2 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后体质量比较 见表1。造模前,各组大鼠体质量无明显差异。造模后,与正常组比较,模型组、龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠体质量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。给药后,与正常组比较,模型组大鼠体质量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠体质量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后体质量比较($\bar{x} \pm s$) g

组别	n	造模前	造模后	给药后
正常组	8	204.82±10.57	255.62±16.55	311.00±13.63
正常对照组	8	203.08±13.12	261.20±10.91	313.98±26.51
模型组	8	208.35±10.22	224.13±25.40 ^①	250.33±27.78 ^①
龟鹿益神颗粒组	8	203.05±12.12	217.70±20.87 ^①	288.93±22.58 ^②
苁蓉益肾颗粒组	8	204.52±13.56	219.68±18.43 ^①	283.93±20.94 ^②

与正常组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.3 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后力竭游泳时间比较 见表2。造模前,各组大鼠力竭游泳时间无明显差异。造模后,与正常组比较,模型组、龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠力竭游泳时间显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。给药后,与正常组比较,模型组大鼠力竭游泳时间显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠力竭游泳时间显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与苁蓉益肾颗粒组比较,龟鹿益神颗粒组大鼠力竭游泳时间显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后力竭游泳时间比较($\bar{x} \pm s$) min

组别	n	造模前	造模后	给药后
正常组	8	62.12±9.86	64.92±5.10	69.45±11.99
正常对照组	8	58.81±8.33	65.63±4.90	75.76±5.01
模型组	8	60.63±5.40	18.95±3.84 ^①	38.02±3.91 ^①
龟鹿益神颗粒组	8	60.25±6.86	18.27±5.87 ^①	77.57±24.40 ^{②③}
苁蓉益肾颗粒组	8	59.86±8.76	21.48±2.50 ^①	56.07±9.96 ^②

与正常组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与苁蓉益肾颗粒组比较,③ $P < 0.05$

2.4 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后直立次数比较 见表3。造模前,各组大鼠直立次数无明显差异。造模后,与正常组比较,模型组、龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠直立次数显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。给药后,与正常组比较,模型组大鼠直立次数显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟鹿益神颗粒组和苁蓉益肾颗粒组大鼠直立次数显著增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后直立次数比较($\bar{x} \pm s$) 次

组别	n	造模前	造模后	给药后
正常组	8	20.25±3.99	23.75±6.16	24.00±6.55
正常对照组	8	19.75±5.31	23.50±6.28	26.50±4.07
模型组	8	20.38±4.14	12.88±4.42 ^①	12.75±3.88 ^①
龟鹿益神颗粒组	8	19.63±5.76	13.25±6.45 ^①	20.88±6.79 ^②
苁蓉益肾颗粒组	8	22.25±4.92	14.25±4.02 ^①	17.13±2.75 ^②

与正常组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.5 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后跨格次数比较 见表4。造模前,各组大鼠跨格次数无明显差异。造模后,与正常组比较,模型组、龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠跨格次数显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。给药后,与正常组比较,模型组大鼠跨格次数显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟鹿益神颗粒组和苁蓉益肾颗粒组大鼠跨格次数显著增多,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表4 各组大鼠造模前、造模后及给药结束后跨格次数比较($\bar{x} \pm s$) 次

组别	n	造模前	造模后	给药后
正常组	8	41.25±5.65	42.88±7.72	43.38±9.77
正常对照组	8	42.75±8.05	38.75±14.24	50.75±7.59
模型组	8	45.25±8.24	28.00±7.50 ^①	23.38±8.14 ^①
龟鹿益神颗粒组	8	39.75±10.98	23.13±8.46 ^①	44.13±11.01 ^②
苁蓉益肾颗粒组	8	41.13±11.03	25.63±12.44 ^①	31.38±13.75 ^②

与正常组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$

2.6 各组大鼠骨骼肌中PGC-1 α 含量比较 见表5。与正常组比较,正常对照组大鼠骨骼肌中PGC-1 α 含量显著升高,模型组大鼠骨骼肌中PGC-1 α 含量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,龟鹿益神颗粒组和苁蓉益肾颗粒组大鼠骨骼肌中PGC-1 α 含量显著增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与苁蓉益肾颗粒组比较,龟鹿益神颗粒组大鼠骨骼肌中PGC-1 α 含量增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

慢性疲劳综合征的发病是由多种因素刺激所引起的长期持续的躯体和精神上的双重疲劳,因此,在实验中采用了慢性束

表5 各组大鼠骨骼肌 PGC-1 α 含量比较($\bar{x} \pm s$) nmo/L

组别	n	PGC-1 α
正常组	8	223.04 \pm 12.96
正常对照组	8	281.10 \pm 20.79 ^①
模型组	8	157.21 \pm 18.82 ^①
龟鹿益神颗粒组	8	218.27 \pm 16.57 ^{②③}
苁蓉益肾颗粒组	8	199.76 \pm 20.02 ^②

与正常组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与苁蓉益肾颗粒组比较, ③ $P < 0.05$

缚、夹尾激怒和力竭游泳实验复合因素建立慢性疲劳动物模型。造模过程中, 造模各组大鼠逐渐出现便溏、皮毛色泽灰暗稀疏、进食及饮水量减少、体质量减轻、活动度下降、精神不振等症状, 力竭游泳时间缩短, 跨格运动及直立运动次数减少, 说明笔者采取复合因素复制慢性疲劳动物模型是可行的。灌胃后, 龟鹿益神颗粒组、苁蓉益肾颗粒组大鼠体质量均较前增加, 力竭游泳时间较前延长, 跨格、直立运动次数均有所增加, 说明龟鹿益神颗粒、苁蓉益肾颗粒在一定程度上可以缓解大鼠的疲劳状态, 提高疲劳大鼠的耐力。其中龟鹿益神颗粒组各项行为学指标优于苁蓉益肾颗粒组, 说明龟鹿益神颗粒具有更好的抗疲劳作用。

既往研究已表明, 脂质过氧化可导致线粒体氧化磷酸化偶联的减少, 线粒体结构损伤和功能降低, 影响能量代谢, 促进细胞凋亡, 从而导致疲劳^[1]。细胞在应激(疲劳)过程中, 线粒体再生是重要的代偿机制, 有学者^[2]发现, 抑制线粒体再生能够明显加重疲劳持续时间和长度, 促进线粒体再生则对疲劳有改善作用。以上研究提示, 慢性疲劳综合征的发生可能与线粒体的再生障碍有关, 促进线粒体再生可以改善骨骼肌疲劳状态。PGC-1 α 在调控细胞线粒体再生中发挥着重要作用^[3], 其表达反应了线粒体再生的强度。有研究表明, 随着疲劳时间的延长, 骨骼肌内 PGC-1 α 水平会逐渐下降^[4]。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)是近年来发现的一个核转录辅激活因子, PGC-1 α 在骨骼肌、棕色脂肪组织、肝脏、心脏、肾脏和大脑组织^[5]等线粒体含量丰富和氧化代谢活跃的组织中高表达, 在机体适应性产热、线粒体的生物合成、肝糖原的异生和脂肪酸氧化等一些能量代谢过程中发挥着作用, 并作为转录共刺激因子参与多方面的代谢, 可因不同的刺激做出应答, 如疲劳、氧化应激、缺氧、营养状态的改变、钙离子的浓度、热量的波动等。本实验主要从线粒体的生物合成角度来探讨 PGC-1 α 与骨骼肌疲劳的关系, 进而说明 PGC-1 α 与慢性疲劳综合征躯体疲劳困倦的关系。

课题组前期研究^[6-9]表明, 慢性疲劳综合征的基本病机主要责之于脾胃肾虚。脾脏功能低下, 表现为困倦、乏力, 四肢肌肉运动和抗疲劳能力下降。肾气亏虚表现为神疲乏力、头晕

耳鸣、腰膝酸痛、健忘失眠等, 与慢性疲劳综合征患者临床表现相似。龟鹿益神颗粒由龟鹿二仙胶加味而成, 龟鹿二仙胶由鹿角胶、龟板、人参和枸杞子四味药物组成, 为阴阳双补的名方, 现代药理研究其具有很好的抗疲劳、抗辐射、抗衰老、增强细胞免疫和体液免疫的功能。龟鹿益神颗粒易原方中人参为党参, 取党参补中益气、健脾和胃养血之功效, 又较原方中加入具有补虚、强壮之功效的仙鹤草, 使本方具有补脾益肾之功效, 用于治疗脾肾两虚所致的四肢困乏、身体消瘦、腰膝酸软、精神倦怠、便溏、面色无华等症状, 与 CFS 的临床症状相符合。在本实验中, 笔者给予正常对照组、龟鹿益神颗粒组模型大鼠龟鹿益神颗粒混悬液灌胃。实验结果显示: 龟鹿益神颗粒对大鼠的直立、跨格运动次数及力竭游泳时间等行为学指标有明显的改善, 且能升高大鼠骨骼肌中 PGC-1 α 的含量, 从而提高骨骼肌的抗疲劳能力, 改善慢性疲劳的四肢无力等状况, 发挥抗疲劳作用。

[参考文献]

- [1] König D, Wagner KH, Elmadfa I, et al. Exercise and oxidative stress: significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress[J]. Exerc Immunol Rev, 2001, 7: 108-133.
- [2] Hussey SE, McGee SL, Garnham A, et al. Exercise increases skeletal muscle GLUT4 gene expression in patients with type 2 diabetes[J]. Diabetes Obes Metab, 2012, 14(8): 768-771.
- [3] Norrbom J, Sällstedt EK, Fischer H, et al. Alternative splice variant PGC-1 α -b is strongly induced by exercise in human skeletal muscle[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011, 301(6): E1092-E1098.
- [4] Li L, Mühlfeld C, Niemann B, et al. Mitochondrial biogenesis and PGC-1 α deacetylation by chronic treadmill exercise: differential response in cardiac and skeletal muscle[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(6): 1221-1234.
- [5] Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 615-622.
- [6] 薛绍芬, 金杰. 从脾论治慢性疲劳综合征[J]. 光明中医, 2010, 25(8): 1361-1362.
- [7] 金杰, 郭智宽. 从肾论治慢性疲劳综合征[J]. 光明中医, 2010, 25(11): 1984-1985.
- [8] 郭智宽, 金杰. 金杰教授治疗慢性疲劳综合征经验[J]. 中医临床研究, 2011, 3(1): 86-88.
- [9] 苗彦勇, 金杰. 升阳益胃汤治疗慢性疲劳综合征 35 例[J]. 中医研究, 2010, 23(11): 52-53.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)