

人参多糖对一次性力竭游泳大鼠红细胞功能恢复的影响

杨俊杰, 赵大庆, 张婉迎, 白雪媛, 王思明*

长春中医药大学, 吉林 长春 130117

摘要: **目的** 探讨人参多糖对一次性力竭游泳模型大鼠红细胞功能恢复的作用。**方法** 采用大鼠力竭游泳模型, 分为对照组、模型组、力竭后自恢复(自恢复)组及人参多糖低、中、高剂量组, 采用 ELISA 方法对大鼠红细胞氧化损伤程度、大鼠血清中 ATP、ATPase、唾液酸(SA)含量以及大鼠红细胞 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力进行检测, 采用 Western blotting 方法检测红细胞膜 Band 3 蛋白的水平, 并测定由 Band 3 蛋白变化引起的糖酵解关键酶活性的变化。**结果** 力竭游泳后大鼠红细胞受到氧化应激损伤, 红细胞抗氧化能力较对照组有明显下降, 人参多糖能促进红细胞抗氧化能力恢复, 且呈剂量依赖性; 力竭游泳后大鼠血清中 ATP、ATPase、SA 含量较对照组相比下降, 随着人参多糖剂量的增加, ATP、ATPase、SA 含量逐渐回升; 力竭游泳后红细胞 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力均有所下降, 人参多糖可使 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力得到恢复, 且呈剂量依赖性; 力竭游泳后 Band 3 蛋白含量较对照组有明显下降, 人参多糖可恢复红细胞膜 Band 3 蛋白含量及其调节糖酵解关键酶丙酮酸激酶(PK)、己糖激酶(HK)、果糖-6-磷酸激酶(PFK)的活力, 且呈剂量依赖性。**结论** 人参多糖对力竭运动造成的大鼠红细胞功能损伤有较好的恢复作用。

关键词: 一次性力竭; 红细胞功能; 氧化应激; 人参多糖; 糖酵解

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)23-5778-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.019

Study on recovery of erythrocyte function in one-time exhaustive swimming rats by ginseng polysaccharide

YANG Jun-jie, ZHAO Da-qing, ZHANG Wan-ying, BAI Xue-yuan, WANG Si-ming

Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of ginseng polysaccharide on the recovery of erythrocyte function in rats with one-time exhaustive swimming. **Methods** Rat exhaustion swimming model was divided into control group, exhaustion group, self-recovery group after exhaustion, and low, middle and high dose groups of ginseng polysaccharide. The degree of oxidative damage of erythrocyte, ATP, ATPase, SA content in rat serum were detected by ELISA, and the activity of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase in rat red blood cells were detected. The level of Band 3 protein in erythrocyte membrane was detected by Western blot and changes in the activities of key enzymes of glycolysis caused by Band 3 protein were determined. **Results** After exhaustive swimming, the red blood cells of rats were damaged by oxidative stress. The anti-oxidant capacity of red blood cells was significantly lower than that of the control group. The ginseng polysaccharide could promote the recovery of anti-oxidant capacity of red blood cells in a dose-dependent manner. The content of ATPase and SA were decreased compared with the control group. With the increase of ginseng polysaccharide concentration, the content of ATP, ATPase and SA were increased gradually. The activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase were decreased after exhaustive swimming. The ginseng polysaccharide can restore the function of sodium potassium pump and calcium magnesium pump in a dose-dependent manner. The content of Band 3 protein after exhaustive swimming was significantly lower than that of the blank control group. The ginseng polysaccharide can restore the content of erythrocyte membrane Band 3 protein. The activities of the key enzymes of glycolysis, PK, HK and PFK, were adjusted in a dose-dependent manner. **Conclusion** Ginseng polysaccharide has a good recovery effect on rat erythrocyte function damage caused by exhaustive exercise.

Key words: One-time exhaustion; erythrocyte function; oxidative stress; ginseng polysaccharide; glycolysis

收稿日期: 2019-05-22

基金项目: “十三五”国家重点研发计划: 人参关键技术研究及大健康产品开发(2017YFC1702100); “十三五”国家重点研发计划: 高效高压差低温连续式提取分离浓缩技术装备集成与推广示范(2017YFC1703101)

作者简介: 杨俊杰(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药生物技术。Tel: 13086865282 E-mail: abc_592940227@qq.com

***通信作者** 王思明(1987—), 男, 实验师, 研究方向为中药有效成分及产品开发。Tel: 13844900468 E-mail: 369257449@qq.com

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 系五加科多年生草本植物, 以根入药, 是古今著名的滋补强壮良药, 又有百草之王之称。中医经典名方独参汤, 古代医案记载独参汤主要用于“治诸气虚气脱, 诸虚证垂危者。”近年来, 国内外对人参中的有效成分进行研究, 结果均证实人参具有改善微循环、提高组织抗缺氧能力、抑制血小板聚集、抗疲劳等功效。且诸多文献报道人参多糖是人参的主要有效成分^[1-4]。唐玉等^[5]研究了人参多糖对红细胞变形性的影响; 林松毅等^[6]研究了缺氧条件下人参对红细胞数量和血红蛋白含量的影响; 魏云等^[7]研究了人参多糖对高脂血症动物血液流变性的影响, 然而人参多糖在红细胞功能恢复方面的作用还尚未深入研究。

红细胞因在机体清除自由基^[8-9]、维系氧化还原平衡过程中起重要作用而越来越受到研究者关注。力竭运动可引起红细胞功能发生变化, 使其载氧能力下降, 清除自由基能力减弱, 体液渗透平衡和酸碱平衡失调, 胞内能量代谢受影响。红细胞膜带三蛋白 (Band 3) 在调控红细胞代谢和维持膜结构稳定中起重要作用^[10-11]。由于成熟的红细胞无细胞核和线粒体, 无法进行有氧呼吸, 能量代谢依赖 Band 3 蛋白调节的糖酵解过程^[12]。糖酵解产生的 ATP 是红细胞各功能正常运行的主要能量来源, 糖酵解途径关键酶丙酮酸激酶 (PK)、己糖激酶 (HK)、果糖-6-磷酸激酶 (PFK) 对红细胞能量代谢起重要作用。一次性力竭游泳可引起大鼠机体内自由基增加, 发生严重的氧化应激反应^[13-14]。本研究通过对大鼠红细胞氧化损伤指标的检测来评估人参多糖对红细胞抗氧化能力的影响, 通过红细胞膜蛋白 Band 3 的变化来分析力竭运动后红细胞功能的变化, 初步探讨人参多糖对一次性力竭游泳大鼠红细胞功能恢复的影响。

1 材料

1.1 主要试剂与仪器

人参多糖 (质量分数 80.6%, 批号 201901Z) 由长春中医药大学大健康实验中心提供; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、活性氧 (ROS)、三磷酸腺苷 (ATP) ELISA 试剂盒 (上海朗顿生物科技有限公司); ATP 酶 (ATPase)、唾液酸 (SA) ELISA 试剂盒 (上海源叶生物技术公司); Band 3 ELISA 试剂盒 (江苏酶免实业有限公司); PK、HK、PFK (苏州科铭生物技术有限公司); 超微量 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶、超微量 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATP 酶

检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); PMSF (Solarbio 公司); 兔抗鼠 Band 3 蛋白一抗 (Abcam 公司); 电泳及相关转膜设备耗材 (Bio-rad 公司); Infinite 200 PRO 多功能酶标仪 (Tecan 公司)。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体质量 220~250 g, 购于长春市伊思实验动物技术有限责任公司, 许可证号码 SCXK (吉)-2016-0003; 实验大鼠每笼 8 只, 饲养温度 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 湿度 50%~60%, 自然光照, 自由饮食、饮水, 垫料为消毒木屑 (每周换 2~3 次垫料)。

2 方法

2.1 造模方法

参照文献报道方法^[15-17], 并做改进, 逐渐增加运动量 (游泳 5、10、15、20 min) 直至力竭, 并固定实验动物间歇休息时间 5 min, 使大鼠达到充分力竭状态。水深 60 cm, 水温 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 大鼠负重 10%, 力竭标准为 10 s 后大鼠仍不能返回水面, 并且大鼠取出水面后置于平面不能完成翻正反射。

2.2 给药起效时间的筛选

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分组, 即对照组、模型组及力竭后给药 0.5、1、2、4、8、12、24 h 组, 同时设置力竭后自恢复 0.5、1、2、4、8、12、24 h 组, 按照“2.1”项造模方法造模, 通过对红细胞 ROS 含量、血清 ATP 含量, 对比各时间点指标恢复情况, 确定出药物起效的最佳时间。

2.3 分组及给药

根据药物起效的最佳时间结果确定出给药后的最佳检测时间, 大鼠随机分为对照组、模型组、力竭后自恢复组 (简称自恢复组) 及人参多糖低、中、高剂量 (30、60、100 mg/kg) 组, 每组 10 只。除对照组正常饲养外, 其余各组均采用“2.1”项造模方法进行大鼠游泳力竭模型制备。造模完成后, 对照组不做处理 1 h 后处死并检测各项指标; 模型组立即处死并检测各项指标; 自恢复组自行恢复 1 h 后处死并检测各项指标; 人参多糖组根据各组剂量, 将人参多糖用温水溶解后 ig 给药, 1 h 后检测各项指标。

2.4 溶血率测定

各组大鼠给药后 1 h, 以 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 腹主动脉取血, 4°C 、2 500 r/min 离心 10 min, 取下层积压红细胞, 配成 2% 细胞悬液。参照文献测

定方法^[18]，以生理盐水加红细胞为阴性组，以纯水加红细胞为阳性组，采用比色法于 542 nm 下分别测定阳性组的吸光度 ($A_{\text{阳性}}$) 和阴性组的吸光度 ($A_{\text{阴性}}$)，计算溶血率 (溶血率 = $A_{\text{阴性}}/A_{\text{阳性}}$)。

2.5 红细胞氧化损伤指标 ROS、SOD、MDA、CAT 检测

各组大鼠给药后 1 h，10%水合氯醛 ip 麻醉，腹主动脉取血，4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min，取上层血清备用，取下层血细胞 PBS 清洗 3 遍，即得积压红细胞。用 PBS (pH 7.4) 稀释细胞悬液，使细胞浓度约 1.0×10^6 个/mL。通过反复冻融，以使细胞破坏并释放出细胞内成分。4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min，收集上清液 (保存过程中如有沉淀产生，重复离心)，并按各指标试剂盒操作方法检测。

2.6 血清 ATP、ATPase、SA 水平检测

各组大鼠给药后 1 h，以 10%水合氯醛 ip 麻醉，腹主动脉取血，4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min，收集上清液 (保存过程中如有沉淀产生，重复离心)，按试剂盒操作方法检测。

2.7 红细胞 Na^+ 、 K^+ -ATPase、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 活力检测

各组大鼠 10%水合氯醛 ip 麻醉后，腹主动脉取血，4 ℃静置 20 min 后，4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min，上层血清取出备用，下层血细胞等渗缓冲液清洗 3 遍。取 50 μL 的积压红细胞加入 2 450 μL 双蒸水，混匀，使红细胞充分溶血 (对光观察至溶液透亮)。按照试剂盒操作测定。

2.8 红细胞膜制备及 Band 3 蛋白含量检测

根据文献报道方法^[19]，取 1 mL 洗涤后积压红细胞置于 4 ℃低渗磷酸缓冲液 (pH 7.4，7.5 mmol/L 磷酸缓冲液) 60 mL 中，加入 20 $\mu\text{mol/L}$ PMSF，混合均匀后 4 ℃条件下破溶 1.5 h，然后 4 ℃、9 800 r/min 离心 20 min，洗涤 4~5 次后得到乳白色的红细胞膜。

根据样品数量，按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液，充分混匀。将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μL 加到 96 孔板的标准品孔中，加标准品稀释液补足到 20 μL 。将适量的红细胞膜蛋白样品加入到 96 孔板样品孔中，加 PBS 补足 20 μL 。各孔加入 200 μL BCA 工作液，37 ℃放置 20~30 min。将 96 孔板置酶标仪中，测定 562 nm 波长处的 A 值，绘制标准曲线，根据标准曲线计算并调整红细胞膜蛋白

浓度。

调整过的红细胞膜蛋白样品按照 Band 3 蛋白 ELISA 试剂盒检测方法进行含量检测。

2.9 Western blotting 方法检测 Band 3 蛋白表达水平

按照“2.8”项红细胞膜制备方法，制备红细胞膜蛋白样品。电泳采用 4%~20%梯度胶，还原性电泳样品经含 β -巯基乙醇的上样缓冲液充分还原后上样，上样量为 20 μL ，Hepes 缓冲电泳液，150 V，45 min。电泳结束后，15 V 条件下湿转 30 min，5%奶粉封闭 1 h，1 $\times$ PBST 清洗 3 遍，加封闭液稀释的兔抗大鼠 Band 3 一抗 (稀释比例 1:1 000)，4 ℃孵育过夜。1 $\times$ PBST 洗去一抗，1%奶粉稀释过的二抗，室温摇床孵育 1 h，1 $\times$ PBST 洗去二抗后，显色处理。使用 iBright FL1000 凝胶成像系统扫描，并用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.10 红细胞 PK、HK、PFK 活力检测

各组大鼠 10%水合氯醛 ip 麻醉后，腹主动脉取血，4 ℃静置 20 min 后，4 ℃、2 500 r/min 离心 10 min，上层血清取出备用，下层血细胞等渗缓冲液清洗 3 遍。取积压红细胞用提取液 1 000:1 的比例，超声波破碎 (冰浴，功率 20%，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次)；8 000 $\times g$ 、4 ℃离心 10 min，取上清，严格按照试剂盒说明进行 PK、HK、PFK 活力检测。

2.11 统计学分析

实验数据采用 SPSS 12.0 软件分析，所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 最佳起效时间的确定

大鼠力竭游泳后，通过对比各时间点给药组和自恢复组的红细胞内 ROS 含量和血清中 ATP 含量的变化 (以给药组与自恢复组同一时间点指标的差值来表示)，来确定给药后指标检测的最佳时间。结果 (图 1) 显示，给药后 1 h 指标的变化最显著，后续实验指标的检测均在给药后 1 h 时间点检测。

3.2 人参多糖对大鼠力竭运动后溶血率的影响

对照组溶血率为 5.81%，模型组溶血率为 7.32%，自恢复组溶血率稍有下降。随着人参多糖剂量的增加，溶血率逐渐下降至正常水平。结果见图 2。

3.3 人参多糖对大鼠力竭运动后红细胞抗氧化能力的影响

与对照组比较，模型组大鼠红细胞中 ROS 明显

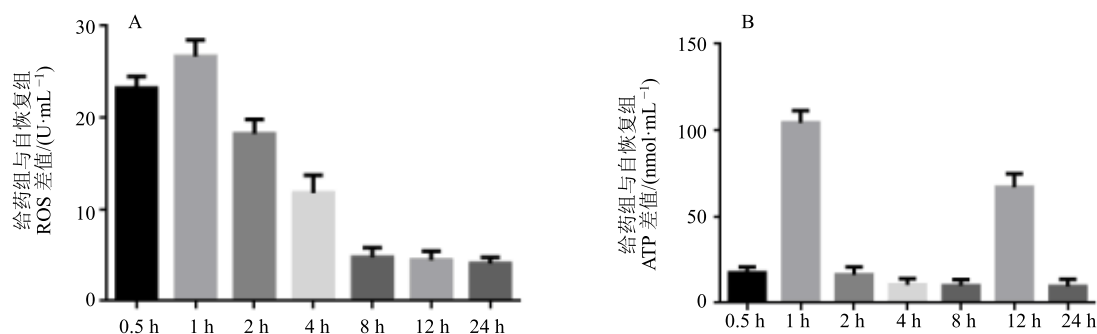
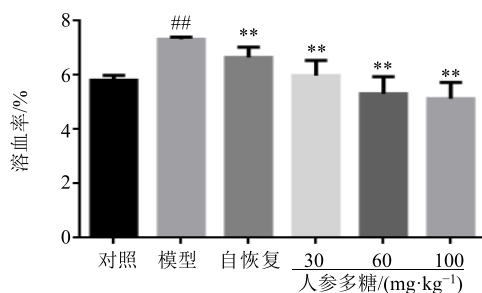


图 1 人参多糖给药后不同时间点大鼠红细胞 ROS (A) 和血清 ATP (B) 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of ginseng polysaccharide on ROS (A) and ATP (B) at different time of administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group

图 2 人参多糖对力竭大鼠溶血率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of ginseng polysaccharide on hemolysis rate of rats with one-time exhaustion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

升高 ($P < 0.01$), SOD、CAT 水平明显下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), MDA 水平有升高趋势; 自恢复组各项指标稍有恢复, 但均未恢复到正常水平; 人参多糖给药后各项指标明显趋于正常, 且人参多糖高剂量组恢复效果更显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

3.4 人参多糖对大鼠力竭运动后血清中 ATP、ATPase、SA 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 ATP、ATPase、SA 水平明显下降 ($P < 0.01$); 自恢复组大鼠各指标稍有恢复; 人参多糖给药后各项指标明显趋于正常, 且人参多糖高剂量组恢复效果最显著 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

表 1 人参多糖对力竭大鼠红细胞 ROS、SOD、MDA、CAT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of ginseng polysaccharide on oxidative damage index of RBC in rats with one-time exhaustion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ROS/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)	SOD/(ng·mL ⁻¹)	CAT/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	20.95 ± 2.16	1.18 ± 0.03	1.13 ± 0.14	1.57 ± 0.07
模型	—	56.93 ± 0.93 ^{##}	1.33 ± 0.25	0.44 ± 0.02 [#]	0.33 ± 0.07 ^{##}
自恢复	—	44.35 ± 7.09	1.31 ± 0.07	0.48 ± 0.02	0.53 ± 0.09
人参多糖	30	43.66 ± 4.68	1.06 ± 0.11	0.67 ± 0.01 [*]	0.60 ± 0.12
	60	38.56 ± 1.56 ^{**}	0.90 ± 0.01 ^{**}	0.79 ± 0.11 [*]	0.97 ± 0.31
	100	28.66 ± 3.60 ^{**}	0.87 ± 0.15 [*]	0.84 ± 0.06 ^{**}	1.02 ± 0.11 [*]

与对照组比较: $^{#}P < 0.01$ $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, 下表同

$^{#}P < 0.01$ $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group, same as below

表 2 人参多糖对力竭大鼠血清 ATP、ATPase、SA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of ginseng polysaccharide on ATP, ATPase, and SA in serum of rats with one-time exhaustion ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ATP/(nmol·mL ⁻¹)	ATPase/(nmol·L ⁻¹)	SA/(ng·L ⁻¹)
对照	—	6.54 ± 0.66	636.75 ± 20.79	94.45 ± 8.46
模型	—	3.10 ± 0.12 ^{##}	555.63 ± 29.96 ^{##}	66.13 ± 5.32 ^{##}
自恢复	—	3.88 ± 0.08 [*]	558.00 ± 45.61	78.71 ± 4.59 ^{**}
人参多糖	30	4.87 ± 0.79 ^{**}	567.95 ± 34.75	81.67 ± 5.52 ^{**}
	60	6.61 ± 0.38 ^{**}	635.40 ± 27.71 ^{**}	87.45 ± 7.49 ^{**}
	100	7.66 ± 0.26 ^{**}	705.62 ± 15.06 ^{**}	106.46 ± 4.99 ^{**}

3.5 人参与糖对大鼠力竭运动后红细胞 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力的影响

与对照组比较, 模型组大鼠红细胞 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力明显下降 ($P < 0.01$); 自恢复组各指标稍有恢复; 人参与糖给药后红细胞 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力明显升高, 且人参与糖高剂量组恢复效果最显著 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 3 人参与糖对大鼠红细胞 Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力和红细胞膜 Band 3 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 3 Effect of ginseng polysaccharide on activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase and Band 3 level in RBC of rats with one-time exhaustion ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Na^+ , K^+ -ATPase/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Band3/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	0.37 ± 0.02	9.38 ± 1.51	59.27 ± 1.95
模型	—	0.08 ± 0.00 ^{##}	2.76 ± 0.39 ^{##}	32.81 ± 7.70 ^{##}
自恢复	—	0.11 ± 0.01 ^{**}	3.19 ± 0.91	40.00 ± 2.26
人参与糖	30	0.24 ± 0.02 [*]	4.07 ± 0.82	45.46 ± 5.30 ^{**}
	60	0.31 ± 0.01 ^{**}	5.03 ± 1.14 [*]	49.84 ± 2.15 ^{**}
	100	0.35 ± 0.00 ^{**}	6.20 ± 1.20 ^{**}	57.88 ± 9.55 ^{**}

Western blotting 结果经灰度值分析后显示, 与对照组比较, 模型组大鼠红细胞膜 Band 3 蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.01$), 自恢复组稍有回升, 人参与糖给药后红细胞膜 Band 3 蛋白表达水平明显上调, 且人参与糖高剂量组恢复效果最显著 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

3.7 人参与糖对大鼠力竭运动后红细胞糖酵解关键酶 PK、HK、PFK 活力的影响

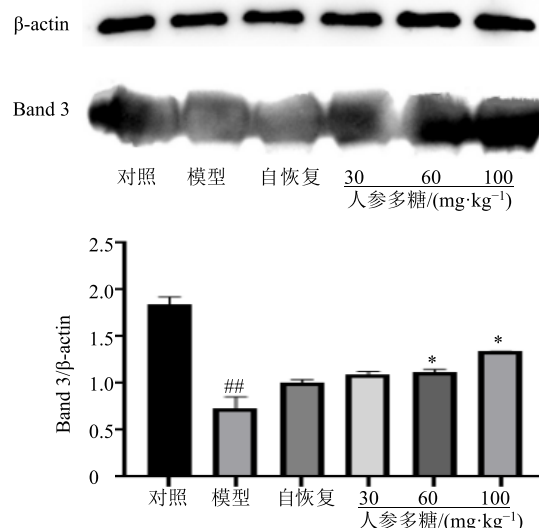
力竭运动后大鼠红细胞糖酵解关键酶 PK、HK 活力与对照组比较明显下降, PFK 活力相较对照组下降不显著, 自恢复组各酶活力稍有恢复但尚不能恢复至正常水平, 人参与糖给药后, 各酶活力均有恢复, 且酶活力随人参与糖剂量呈依赖性增加。结果见图 4。

4 讨论

古籍《素问·举痛论》: “劳则气耗, 外内皆越, 故气耗矣”, 《难经本义》: “气中有血, 血中有气, 气与血不可须臾分离, 乃阴阳互根, 自然之理也”。气血之间的关系可以概括为: “气为血之帅, 血为气之母, 血能生气, 气存血中。” 人参具有大补元气, 复脉固脱的功效。力竭状态下的大鼠处于垂危状态, 极度虚弱, 并且力竭运动引起的氧化应激反应会破坏机体氧化-还原平衡, 产生溶血和使红细胞功能受损。人参可以作为拯危救脱之要药^[20], 本研究首次

3.6 人参与糖对大鼠力竭运动后红细胞膜 Band 3 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠红细胞膜中 Band 3 水平明显下降 ($P < 0.01$); 自恢复组大鼠红细胞膜中 Band 3 水平稍有恢复趋势; 人参与糖给药后红细胞膜中 Band 3 蛋白水平明显升高, 且人参与糖高剂量组恢复效果最显著 ($P < 0.01$)。结果见表 3。



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

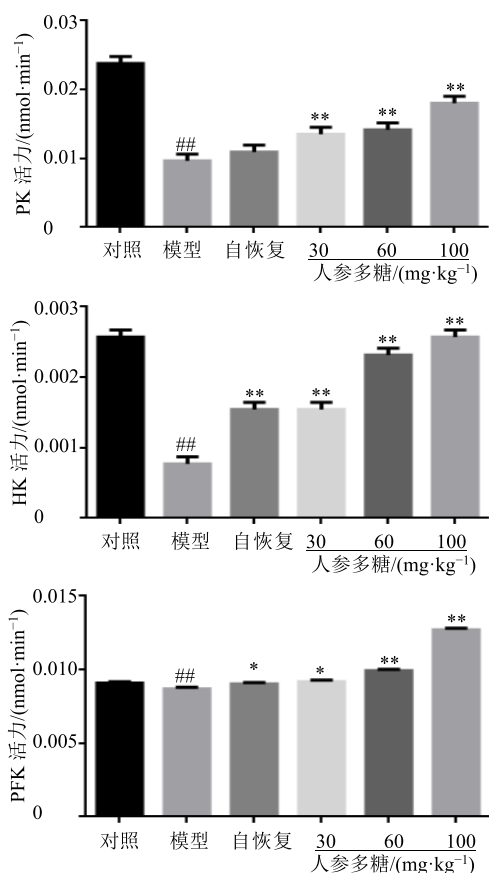
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

图 3 人参与糖对力竭后红细胞膜 Band 3 表达的影响

Fig. 3 Effect of ginseng polysaccharide on expression of erythrocyte membrane Band 3 after exhaustion

从人参与糖对红细胞功能恢复的角度来阐述人参与糖大补元气功效。

力竭运动会产生大量的 ROS, 组织生成的 ROS 后会迅速释放至血浆^[21]。尽管红细胞有相对完善的抗氧化机制, 能够迅速清除机体产生的 ROS, 但



与对照组相比: ## $P < 0.01$; 与模型组相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 4 人参多糖对红细胞糖酵解关键酶 PK、HK、PFK 影响
Fig. 4 Effect of ginseng polysaccharide on PK, HK, and PFK of red blood cell glycolysis

当力竭运动诱导机体产生剧烈的氧化应激反应^[22],大量的 ROS 打破了体内氧化-还原平衡。红细胞作为循环系统主要组分,在维系机体内环境酸碱平衡、渗透压平衡和氧化还原平衡的过程中起着至关重要的作用。本研究从力竭运动后,红细胞功能变化角度着手研究人参多糖对处于氧化应激过程中红细胞功能的恢复作用。通过前期起效时间的筛选,选出人参多糖对力竭运动后大鼠红细胞功能恢复作用的最佳检测时间,为之后的各指标检测提供依据。

本实验中,力竭运动后大鼠红细胞内 ROS、MDA 含量显著升高,红细胞自身清除能力已不足以继续维持氧化-还原平衡^[23]。SOD、CAT 受力竭运动影响,活性明显下降。给药 1 h 后,与模型组相比,各给药组氧化损伤指标均有所恢复。机体内氧化还原失衡,导致溶血的增加和细胞膜的进一步受损。给药 1 h 后,与模型组相比,各给药组溶血

率随给药剂量增加而降低。力竭运动会消耗大量能量,血清中的 ATP 和 ATPase 含量下降。给药 1 h 后,各给药组能量指标有明显恢复趋势。SA 为 *N*-乙酰神经胺酸或任何其酯或其醇羟基的衍生物,位于细胞膜糖蛋白侧链末端,是细胞膜表面受体的重要组成部分,力竭运动后,SA 含量减少,红细胞膜结构受影响。给药人参多糖后,SA 含量回升至正常水平。Band 3 蛋白作为红细胞骨架蛋白连接枢纽,维持着红细胞膜结构的稳定。并且 Band 3 蛋白作为红细胞内唯一的阴离子通道,对红细胞离子转运和携氧功能有重要调控作用^[24]。此外,Band 3 蛋白与糖酵解酶类相互作用,调控糖代谢速率和途径。力竭运动后,受红细胞膜功能受损影响,红细胞膜中 Band 3 蛋白含量明显下降^[25]。与模型组相比,各给药组有明显恢复趋势,且呈剂量依赖性。由 Western blotting 结果可知,与模型组相比,各给药组的红细胞膜中 Band 3 含量明显随给药剂量增加而恢复。钠泵^[26]以 Na^+ , K^+ -ATPase 为主要成分,是细胞膜最重要的钠钾转运系统,维持着生物细胞离子环境的稳定。 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 是维持细胞内钙、镁平衡的重要物质, Mg^{2+} 是许多重要酶的辅助因子^[27],在糖脂代谢中发挥重要作用,力竭运动会引起 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力下降,导致红细胞内 Ca^{2+} 增多,从而激活 Ca^{2+} 依赖性降解酶磷脂酶,磷脂酶可使膜磷脂水解,增加花生四烯酸释放,同时又产生大量自由基使膜通透性增加,导致蛋白交联加剧破坏红细胞膜结构。本实验结果显示给药人参多糖后, Na^+ , K^+ -ATPase、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活力明显高于模型组,说明人参多糖能促进红细胞内外离子浓度平衡,有利于恢复相关代谢酶活性,进而保护红细胞膜。由于成熟红细胞无细胞核的结构特殊性,其能量代谢只能依赖糖酵解过程。Band 3 蛋白参与调节糖酵解途径,因而糖酵解的能力受 Band 3 蛋白影响。力竭运动过后,红细胞功能受损,能量代谢受影响。红细胞糖酵解关键酶 PK、HK、PFK 活力均下降,给药人参多糖后,与模型组相比,PK、HK、PFK 活力明显恢复。本研究从力竭运动导致大鼠红细胞功能受损引起红细胞膜 Band 3 蛋白变化,进而调节糖酵解关键酶的活力进行初步探究,红细胞糖酵解的调控机制还有待更深入研究。

力竭运动过程中机体产生大量自由基,造成机体产生运动性氧化应激损伤。红细胞是循环系统的重要成分,有完善的清除体内自由基的能力,但产

生氧化应激损伤后产生的超负荷自由基, 就会损伤红细胞功能。给药人参多糖后, 红细胞功能明显恢复, 各指标趋于正常。从人参多糖对一次性力竭大鼠红细胞功能恢复入手, 来为人参大补元气功效提供理论依据。

参考文献

- [1] Chen F, Huang G L. Antioxidant activity of polysaccharides from different sources of ginseng [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.134.
- [2] 高笑一, 鲍建才, 管丽娜, 等. 人参多糖药理活性国内研究新进展 [J]. *人参研究*, 2018, 30(5): 41-44.
- [3] Hoon Kim, Hyo-Won Kim, Kwang-Won Yu, *et al.* Polysaccharides fractionated from enzyme digests of Korean red ginseng water extracts enhance the immunostimulatory activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.127.
- [4] Shen H, Gao X J, Li T, *et al.* Ginseng polysaccharides enhanced ginsenoside Rb1 and microbial metabolites exposure through enhancing intestinal absorption and affecting gut microbial metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, doi: 10.1016/j.jep.2018.01.021.
- [5] 唐 玉, 蔺桂芬. 人参多糖和多抗甲素对动物红细胞变形能力的影响 [J]. *首都医学院学报*, 1995, 16(3): 204-206.
- [6] 林松毅, 殷涌光, 刘静波, 等. 人参等复方中药功能液对小白鼠的抗缺氧作用 [J]. *吉林大学学报: 工学版*, 2005, 35(1): 106-110.
- [7] 魏 云, 刘礼意, 唐映红, 等. 人参多糖对实验性高脂血症动物血脂及血液流变性的影响 [J]. *西北药学杂志*, 1991, 6(3): 3-6.
- [8] Zacheé P, Emonds M P, Lins R, *et al.* Red blood cells, the scavengers for toxic free radicals during haemodialysis [J]. *Nephrol Dialysis Transpl*, 1988, 3(1): 104-105.
- [9] Facorro G, Piehl L, Martinez S M, *et al.* Study of the antioxidant affect of nitroxide free radicals on human red blood cells (HRBC) [J]. *Free Rad Biol Med*, 1998, doi: 10.1016/S0891-5849(98)90084-3.
- [10] Xiong Y, Li Y, Xiong Y, *et al.* Exhaustive running exercise induce tyrosine phosphorylation of Band 3 in rat erythrocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(4): 1060-1071.
- [11] Berzosa C, Gómez-Trullén E M, Piedrafita E, *et al.* Erythrocyte membrane fluidity and indices of plasmatic oxidative damage after acute physical exercise in humans [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2011, 111(6): 1127-1133.
- [12] Ghirmai S, Leif Bülow, Sakai H. *In vivo* evaluation of electron mediators for the reduction of methemoglobin encapsulated in liposomes using electron energies produced by red blood cell glycolysis [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(7): 1364-1372.
- [13] Cristina L D C M, Kussumoto Alcantara B, Antunes Azevedo R, *et al.* Markers of oxidative stress in rats after swimming exhaustive wistar [J]. *Free Rad Biol Med*, 2013, 65: S120.
- [14] Wu M, Han D, Ma C F, *et al.* Effects of polysaccharides from *Radix astragali* on oxidative stress induced by exhaustive swimming exercise in liver and muscle of mice [J]. *Appl Mech Mater*, 2014, 3484(633/634): 558-561.
- [15] 熊延连, 熊艳蕾, 李遥金, 等. 大鼠力竭运动诱导的氧化应激损伤对红细胞变形性的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2014, 30(4): 289-293.
- [16] 赵 勇. 基于小鼠游泳力竭模型探讨红细胞氧化损伤及发生机制 [D]. 重庆: 重庆大学, 2011.
- [17] 臧 洁, 李宝茹, 吴 涛, 等. 淫羊藿苷对小鼠力竭游泳时间及力竭恢复小鼠血清生化指标的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25(9): 1277-1280.
- [18] 黄 娜, 高慧敏, 陈两绵, 等. 金银花与山银花的体外溶血作用分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(12): 6-12.
- [19] 熊延连. 力竭运动诱导的大鼠红细胞氧化应激表现及发生机制的研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2014.
- [20] 郑玉强. 人参二醇组皂苷联合依拉达奉对内毒素休克大鼠心肺损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(6): 682-685.
- [21] Liang Y L, Xu X K, Gao F, *et al.* Effects of moxibustion on central fatigue in rats subjected to different degrees of exhaustive exercise [J]. *Phys Med Rehab Kuror*, 2019, 29(1): 39-44.
- [22] Yan F, Wang B B, Zhang Y. Polysaccharides from *Cordyceps sinensis* mycelium ameliorate exhaustive swimming exercise-induced oxidative stress [J]. *Pharm Biol*, 2014, 52(2): 157-161.
- [23] Benderitter M, Hadj-Saad F, Lhuissier M, *et al.* Effects of exhaustive exercise and vitamin b 6 deficiency on free radical oxidative process in male trained rats [J]. *Free Rad Biol Med*, 1996, 21(4): 541-549.
- [24] Teti D, Crupi M, Busá M, *et al.* Chemical and pathological oxidative influences on Band 3 protein anion-exchanger [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 16(1/3): 77-86.
- [25] Akker E V D, Satchwell T J, Williamson R C, *et al.* Band 3 multiprotein complexes in the red cell membrane; of mice and men [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2010, 45(1): 1-8.
- [26] Lahet J J, Lenfant F, Lecordier J, *et al.* Effects of various osmolarity on human red blood cells in terms of potassium efflux and hemolysis induced by free radicals [J]. *Biomed Pharmacother*, 2008, 62(10): 697-700.
- [27] Rahman M M, Lee S J, Mun A R, *et al.* Relationships between blood Mg^{2+} and energy metabolites/enzymes after acute exhaustive swimming exercise in rats [J]. *Biol Trace Element Res*, 2014, 161(1): 85-90.