

中华跌打丸调节钙通道及 ATP 代谢改善外周疲劳作用研究

张明哲^{1a}, 戴明珠², 梁云飞³, 郝二伟^{1b}, 侯小涛^{1b}, 邓家刚^{1b}, 叶祖光⁴, 吕林艳³, 刘洋^{3*}, 杜正彩^{1a*}

[1.广西中医药大学, a.广西中医药科学实验中心, b.广西中药药效研究重点实验室, 南宁 530200; 2.杭州环特生物科技股份有限公司, 杭州 310051; 3.广西梧州制药(集团)股份有限公司, 广西 梧州 543000; 4.中国中医科学院中药研究所, 北京 100000]

摘要: 目的 建立缺氧-疲劳斑马鱼模型, 研究中华跌打丸抗外周疲劳作用及其机制。方法 利用亚硫酸钠诱导建立缺氧-疲劳模型, 分别从运动能力、乳酸含量、ATP 生成、镇痛、自由基清除和钙离子代谢 6 个方面考察中华跌打丸的抗疲劳作用。结果 中华跌打丸(250, 500, 1 000 和 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)可明显改善疲劳斑马鱼的运动能力, 促进乳酸代谢, 降低机体乳酸含量, 同时具有镇痛作用; 中华跌打丸 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可明显促进疲劳斑马鱼 ATP 能量合成; 中华跌打丸 500, 1 000 和 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可明显提高超氧化物歧化酶 1(SOD1)基因相对表达量; 中华跌打丸 1 000, 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 可明显提高钙离子通道(CACNA1D)基因相对表达量。结论 中华跌打丸具有明显的抗外周疲劳和镇痛作用, 其机制可能与促进乳酸代谢、促进 ATP 生成、提高 SOD1 和 CACNA1D 基因相对表达量有关。

关键词: 斑马鱼; 中华跌打丸; 抗疲劳; 乳酸; ATP; 超氧化物歧化酶 1; 钙离子通道

中图分类号: B285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)24-3234-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.24.007

引用本文: 张明哲, 戴明珠, 梁云飞, 等. 中华跌打丸调节钙通道及 ATP 代谢改善外周疲劳作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(24): 3234-3239.

Study on Anti-peripheral Fatigue Effect of Zhonghua Dieda Pills by Regulating Calcium Channel and ATP Metabolism

ZHANG Mingzhe^{1a}, DAI Mingzhu², LIANG Yunfei³, HAO Erwei^{1b}, HOU Xiaotao^{1b}, DENG Jiagang^{1b}, YE Zuguang⁴, LYU Linyan³, LIU Yang^{3*}, DU Zhengcai^{1a*} (1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, a. Guangxi Scientific Experimental Center of Traditional Chinese Medicine, b. Guangxi Key Laboratory of Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Nanning 530200, China; 2. Hunter Biotechnology Group Co., Ltd., Hangzhou 310051, China; 3. Guangxi Wuzhou Pharmaceutical Group Co., Ltd., Wuzhou 543000, China; 4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the zebrafish hypoxia-fatigue model, and to study the anti-peripheral fatigue effect of Zhonghua Dieda pills and its mechanism. **METHODS** The hypoxia-fatigue model of zebrafish was established by sodium sulfite. The anti-fatigue effects of Zhonghua Dieda pills were observed from six aspects: exercise, content of lactic acid, ATP production, degree of pain, free radical scavenging and calcium ion metabolism. **RESULTS** Zhonghua Dieda pills(250, 500, 1 000 and 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) could significantly improve the exercise ability of fatigued zebrafish, promote lactic acid metabolism, and reduce the content of lactic acid. Zhonghua Dieda pills 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly promote ATP energy synthesis of fatigued zebrafish, while having an analgesic effect. Zhonghua Dieda pills 500, 1 000 and 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly increase the relative expression of SOD1 gene. Zhonghua Dieda pills 1 000, 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly increase the relative expression of CACNA1D gene. **CONCLUSION** Zhonghua Dieda pills has obvious anti-peripheral fatigue and analgesic effect, the mechanism maybe related to promoting lactate metabolism, promoting ATP production, increasing the relative expression of SOD1 gene and increasing the relative expression of CACNA1D gene.

KEYWORDS: zebrafish; Zhonghua Dieda pills; anti-fatigue; lactic acid; ATP; SOD1; CACNA1D

“老药新用”是发现新药的一种方式, 美国 FDA 批准的新药中 70%~80% 是已批准药物的新主治病症和新剂型。利用经典中成药进行二次开发研究, 增加其新的临床适应证, 具有安全性高, 研发速度快、成本低等许多优点, 得到国家大力

支持。中华跌打丸为临床常用治疗跌打损伤的中成药, 该方来源于“急性子散”^[1], 始产于 1961 年梧州市中药厂^[2], 已有 60 年的历史, 并已经连续被 2005 年、2010 年、2015 年和 2020 年版中国药典一部收录。

基金项目: 广西科技重大专项(桂科 AA17202040-2); 广西中药药效研究重点实验室项目(17-259-20)

作者简介: 张明哲, 男, 硕士 E-mail: 642872261@qq.com

*通信作者: 杜正彩, 男, 研究员 E-mail: duzhengcai8@163.com

刘洋, 男, 高级工程师 E-mail: liuyang@wz-zh.com

中华跌打丸具有活血化瘀、消肿止痛之功效,临床用于跌打损伤之瘀血与肿痛、挫伤筋骨、创伤出血、风湿瘀痛等^[3-4]。早期有研究表明中华跌打丸还具有抗疲劳、抗氧化等功能^[5-6],但研究尚浅,且未对其机制进行深入探讨。本实验采用斑马鱼模型系统,研究中华跌打丸抗疲劳作用及其机制,为中华跌打丸增加新的临床适应证及其二次开发提供研究基础。

斑马鱼是一种公认的新型模式生物,其优势是胚胎发育的透明性,基于高通量的检测体系,以及短时-高效-低费筛选。随着“3R 原则”的推行与实施,斑马鱼在药物的靶点鉴别、疾病的模型开发和毒性评价中应用越来越广泛^[7-10]。本研究利用斑马鱼模型,对中华跌打丸的安全性进行评价,并分别从运动能力、乳酸含量、ATP 生成、镇痛、自由基清除和钙离子代谢 6 个方面对中华跌打丸的抗疲劳作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 药物

中华跌打丸来自广西梧州制药(集团)股份有限公司,批号:180201;规格:每盒 6 g×10 丸,阴凉柜储存。中华跌打丸精密称重,用研钵碾碎后加入养鱼用水(固定水质:每升反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐,电导率为 450~550 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$;pH 为 6.5~8.5;硬度为 50~100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3)配制成 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 水溶液,摇匀后直接使用,现配现用。

1.2 动物

野生型 AB 品系斑马鱼来自杭州环特生物科技股份有限公司,以自然成对的交配方式进行胚胎繁殖,在 28 °C 条件下用养鱼用水孵育斑马鱼胚胎。动物生产许可证号:SCXK(浙)2022-0003;动物使用许可证号:SYXK(浙)2012-0171;并通过国际 AAALAC 认证(001458)^[8-9]。实验结束后,使用 0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 三卡因甲基磺酸盐对所有斑马鱼进行麻醉安乐死,符合美国兽医协会对斑马鱼麻醉安乐死的要求^[11]。

1.3 试剂

无水亚硫酸钠(Sigma-Aldrich,批号:11428128);ATP 检测试剂(Promega,批号:0000342036);蛋白浓度检测试剂(Quick Start™ Bradford 1×Dye Reagent,批号:500-0205)、iTaq Universal SYBR Green Supermix(批号:1725121)均来自 Bio-rad;乳酸测定试剂盒(南京建成生物工

程研究所,批号:20190514)。FastQuant RT Kit (With gDNase)试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,货号:KR106];TRI reagent(Invitrogen,货号:1382739);4%组织细胞固定液(Solarbio,批号:20190513);异丙醇[分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司];氯仿、无水乙醇均为分析纯,购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.4 仪器

SZX7 体视显微镜(日本 Olympus 公司);VertA1 CCD 相机(上海土森视觉科技有限公司);AZ100 电动聚焦连续变倍荧光显微镜(日本 Nikon 公司);V3.11 行为分析仪(法国 ViewPoint Life Sciences 公司);Mithras LB940 多功能酶标仪(德国 Berthold Technologies);NanoDrop 2 000 紫外-可见分光光度计(美国 Thermo 公司);CP214 精密电子天平(澳大利亚 Ohaus 公司);6 孔板和 96 孔板(上海 Nest Biotech 公司);NIS-Elements D 3.10 高级图像处理软件(日本 Nikon 公司);T 100 普通 PCR 扩增仪、CFX Connect 荧光定量 PCR 仪、HSP9601 低位裙边 96 孔板(透明)、MSB1001 光学黏性封膜 B 均来自美国 Bio-rad 公司;PIC017/21 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

1.5 方法

1.5.1 中华跌打丸安全性评价 随机选取受精后 4 d(4 day post fertilization, 4 dpf)正常野生型 AB 品系斑马鱼于 6 孔板中,每孔(每实验组)均处理 30 尾斑马鱼。分别水溶给予中华跌打丸 125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,同时设置正常对照组(养鱼用水处理的斑马鱼),每孔药液容量为 5 mL。各浓度组置于 28 °C 培养箱中孵育 18 h 后,观察和统计斑马鱼毒性表型与死亡数量,对中华跌打丸的安全性进行评价,并确定中华跌打丸对斑马鱼的最大检测浓度(maximum toxic concentration, MTC)。

1.5.2 中华跌打丸抗疲劳功效性评价 取 4 dpf AB 品系斑马鱼于 6 孔板中,每孔每 5 mL 体系 30 尾,分别水溶给予中华跌打丸 125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,同时设置正常对照组和模型对照组。各浓度组置于 28 °C 培养箱中孵育 18 h 后,除正常对照组外,其余实验组均水溶给予 8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 无水亚硫酸钠诱导建立斑马鱼疲劳模型^[12]。①运动功能检测:中华跌打丸和无水亚硫酸钠共同处理 0.5 h 后,每个实验组随机挑选 10 尾斑马鱼转

移至 96 孔板中, 200 μL 每孔, 每孔 1 尾, 利用行为分析仪检测每尾斑马鱼 1 h 的总运动距离(S); ②乳酸和 ATP 含量测定: 中华跌打丸和无水亚硫酸钠共同处理 1.5 h 后, 按照乳酸测定试剂盒说明书收集斑马鱼样品, 用生理盐水按重量体积为 1:9 制备成组织匀浆液, 离心取上清后, 利用 Mithras LB940 多功能酶标仪测定 530 nm 波长下各实验组吸光度值(OD 值), 计算乳酸含量(C); 同时按照 ATP 检测试剂盒说明书, 将斑马鱼转移至白色不透明 96 孔板中, 每孔每尾 100 μL , 28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后, 利用紫外-可见分光光度计测定每尾活体斑马鱼整体 ATP 相对化学光值(A); ③基因水平: 中华跌打丸和无水亚硫酸钠共同处理 1.5 h 后, 立即收集斑马鱼样本, 采用经典的 Trizol 法提取各浓度组斑马鱼总 RNA, 再通过 q-PCR 法检测目的基因超氧化物歧化酶 1(*SOD1*)、钠钾三磷酸腺苷泵 $\alpha 3$ 亚基(*ATP1A3B*)和钙离子通道(*CACNA1D*)的转录水平, 并以 β -actin 作为基因表达的内参。引物序列如下, β -actin: 上游 5'-TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3'; 下游 5'-CTCGTGGATACCGCAAGATTC-3'。 *SOD1*: 上游 5'-TCCACGTCCATGCTTTTGGT-3'; 下游 5'-CAGGTCTCCGACGTGTCTCA-3'。 *ATP1A3B*: 上游 5'-AAAGGGGGCAAA GGATCTCG-3'; 下游 5'-GTTGTAGGTGGTGGGGTCAG-3'。 *CACNA1D*: 上游 5'-GTCCTCATAGAGTCGCCTGC-3'; 下游 5'-GGTTCTCACGAGAGCAAACAG-3'。计算公式如下:

运动能力改善作用(%)=

$$\frac{S(\text{供试品组}) - S(\text{模型对照组})}{S(\text{正常对照组}) - S(\text{模型对照组})} \times 100\%;$$

乳酸含量($\text{mmol} \cdot \text{g} \cdot \text{prot}^{-1}$)=

$$\frac{\text{OD}(\text{供试品组}) - \text{OD}(\text{空白对照组})}{\text{OD}(\text{标准对照组}) - \text{OD}(\text{空白对照组})} \times$$

标准品浓度($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) ÷ 蛋白浓度($\text{g} \cdot \text{prot} \cdot \text{L}^{-1}$);

乳酸代谢促进作用(%)=

$$\frac{C(\text{模型对照组}) - C(\text{供试品组})}{C(\text{模型对照组}) - C(\text{正常对照组})} \times 100\%;$$

ATP 生产促进作用(%)=

$$\frac{A(\text{供试品组}) - A(\text{模型对照组})}{A(\text{正常对照组}) - A(\text{模型对照组})} \times 100\%;$$

RNA 相对表达量= $2^{-\Delta\Delta C_t}$;

$$\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{模型对照组}} - \Delta C(t)_{\text{供试品组}};$$

$$\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}} \circ$$

1.5.3 中华跌打丸镇痛作用评价 取 4 dpf AB 品系斑马鱼于 6 孔板中, 每孔每 5 mL 体系 30 尾, 分别水溶给予中华跌打丸 125, 250, 500, 1 000, 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度, 同时设置正常对照组和模型对照组。各浓度组置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h 后, 每组随机挑选 10 尾斑马鱼转移至 96 孔板中, 每孔每尾 200 μL , 除正常对照孔外, 其余每孔均水溶给予 0.009% 冰醋酸诱导建立斑马鱼疼痛模型^[13], 利用行为分析仪测定斑马鱼给予诱导剂 0.5 h 内的总翻身次数(N), 以总翻身次数的统计学分析结果评价中华跌打丸镇痛作用。镇痛作用计算公式如下:

镇痛作用(%)=

$$\frac{N(\text{模型对照组}) - N(\text{供试品组})}{N(\text{模型对照组})} \times 100\%。$$

1.5.4 数据分析 采用 GraphPad Prim 5.0 软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间采用方差分析和 Dunnett's T 检验, 2 个独立样本用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 中华跌打丸的 MTC

在实验终点, 中华跌打丸 125, 250, 500, 1 000 和 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度斑马鱼均未见明显异常, 状态与正常斑马鱼相似。设定中华跌打丸对斑马鱼的 MTC 为 2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 对疲劳斑马鱼运动能力改善作用

与正常对照组比, 模型对照组斑马鱼总运动距离明显缩短($P < 0.001$), 提示模型构建成功。中华跌打丸 125~2 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度条件下, 疲劳斑马鱼的运动能力明显改善, 结果见表 1、图 1。

表 1 中华跌打丸对斑马鱼运动能力的作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Effects of Zhonghua Dieda pills on the exercise ability of zebrafish($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	总运动距离/ mm	运动能力改善 作用/%
正常对照组	—	7 570 $\pm$ 542 ²⁾	—
模型对照组	—	3 456 $\pm$ 259	—
中华跌打丸	125	4 902 $\pm$ 354	35
	250	5 721 $\pm$ 557 ¹⁾	55
	500	7 343 $\pm$ 739 ²⁾	94
	1 000	7 876 $\pm$ 547 ²⁾	107
	2 000	6 015 $\pm$ 236 ¹⁾	62

注: 与模型对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$.

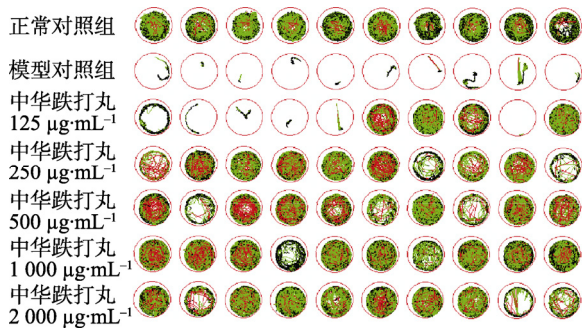


图1 各实验组处理后斑马鱼运动行为轨迹图
黑线表示慢速运动轨迹, 绿线表示中速运动轨迹, 红线表示快速运动轨迹。

Fig. 1 Trajectories of zebrafish after treatment in each experimental group

The black line represented the slow motion track, the green line represented the medium speed motion track, and the red line represented the fast motion track.

2.3 对疲劳斑马鱼乳酸代谢促进作用

中华跌打丸组较模型对照组的乳酸含量均降低, 且差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 提示中华跌打丸对乳酸代谢具有明显的促进作用。结果见表2。

表2 中华跌打丸对乳酸代谢促进作用($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Promoting effect of Zhonghua Dieda pills on lactate metabolism($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	乳酸含量/ $\text{mmol} \cdot \text{g} \cdot \text{prot}^{-1}$	乳酸代谢促 进作用/%
正常对照组	—	$0.362 \pm 0.007^{(3)}$	—
模型对照组	—	0.695 ± 0.030	—
中华跌打丸	125	$0.590 \pm 0.019^{(2)}$	32
	250	$0.516 \pm 0.019^{(3)}$	54
	500	$0.537 \pm 0.010^{(3)}$	48
	1 000	$0.577 \pm 0.020^{(2)}$	36
	2 000	$0.613 \pm 0.012^{(1)}$	25

注: 与模型对照组比较, $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$ 。

Note: Compared with the model control group, $^{(1)}P<0.05$, $^{(2)}P<0.01$, $^{(3)}P<0.001$.

2.4 对疲劳斑马鱼 ATP 生成促进作用

中华跌打丸 $1\,000\,\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 较模型对照组的 ATP 化学光值低, 且差异具有统计学意义($P<0.01$), 提示中华跌打丸可促进疲劳斑马鱼 ATP 能量合成。结果见表3。

2.5 对疲劳斑马鱼自由基清除的影响

供试品处理结束后, 提取斑马鱼 *SOD1* 基因检测总 RNA, 用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度(A_{260}/A_{280} 比值), 结果表明 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.1, 表明提取得到斑马鱼 *SOD1* 基因检测总 RNA 质量较好, 可用于后续 q-PCR 试验, 结果见表4。

表3 中华跌打丸对疲劳斑马鱼的 ATP 生成促进作用($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 3 Promoting effect of Zhonghua Dieda pills on ATP production in tired zebrafish($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	ATP 化学光值/ $\bar{x} \pm s$	ATP 生成促进 作用/%
正常对照组	—	$198\,200 \pm 5\,792^{(1)}$	—
模型对照组	—	$175\,840 \pm 4\,324$	—
中华跌打丸	125	$177\,681 \pm 4\,139$	1
	250	$181\,352 \pm 4\,690$	3
	500	$190\,988 \pm 4\,755$	9
	1 000	$198\,468 \pm 5\,643^{(1)}$	13
	2 000	$184\,186 \pm 5\,048$	5

注: 与模型对照组比较, $^{(1)}P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, $^{(1)}P<0.01$.

表4 *SOD1* 基因检测总 RNA 的浓度及纯度($n=3$)

Tab. 4 Total RNA concentration and purity in *SOD1* gene detection($n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	总 RNA 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}
正常对照组	—	$0.819\,8/0.801\,2/0.775\,2$	$1.99/2.01/2.01$
模型对照组	—	$0.904\,0/0.869\,9/0.965\,2$	$1.92/1.90/1.88$
中华跌打丸	500	$0.828\,2/0.796\,2/0.800\,0$	$2.00/2.00/2.00$
	1 000	$0.723\,7/0.712\,9/0.718\,7$	$2.00/1.99/2.00$
	2 000	$0.912\,1/0.859\,0/0.836\,2$	$2.03/2.03/1.99$

中华跌打丸可提高 *SOD1* 基因相对表达量。结果见表5。

表5 中华跌打丸对 *SOD1* 基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 5 Effect of Zhonghua Dieda pills on the expression of *SOD1* gene($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	<i>SOD1</i> 基因相对表达量
正常对照组	—	$1.279 \pm 0.026^{(1)}$
模型对照组	—	1.000 ± 0.012
中华跌打丸	500	$1.576 \pm 0.057^{(1)}$
	1 000	$1.559 \pm 0.030^{(1)}$
	2 000	$2.018 \pm 0.019^{(1)}$

注: 与模型对照组比较, $^{(1)}P<0.001$ 。

Note: Compared with the model control group, $^{(1)}P<0.001$.

2.6 对疲劳斑马鱼钙离子代谢的影响

供试品处理结束后, 提取斑马鱼 *ATPIA3B*、*CACNAIDA* 基因检测总 RNA, 用超微量分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度(A_{260}/A_{280} 比值), 结果表明 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8~2.1, 表明提取得到斑马鱼 *ATPIA3B*、*CACNAIDA* 基因检测总 RNA 质量较好, 可用于后续 q-PCR 试验, 结果见表6。

根据基因相对表达量公式计算, 中华跌打丸在本实验浓度条件下, 对 *ATPIA3B* 基因相对表达

量无明显影响；中华跌打丸可提高 *CACNA1DA* 基因相对表达量。结果见表 7。

表 6 *ATPIA3B* 和 *CACNA1DA* 基因检测总 RNA 的浓度及纯度($n=3$)

Tab. 6 Total RNA concentration and purity in *ATPIA3B* and *CACNA1DA* gene detection($n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	总 RNA 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$	A_{260}/A_{280}
正常对照组	—	1.183 1/1.121 9/1.166 4	2.04/2.04/2.02
模型对照组	—	1.026 9/1.033 4/1.032 2	2.03/2.04/2.03
中华跌打丸	500	0.936 8/0.949 9/0.940 5	2.02/2.05/2.04
	1 000	0.933 3/0.956 3/0.945 6	1.98/1.98/1.99
	2 000	0.853 4/0.842 5/0.852 7	2.01/1.99/2.02

表 7 中华跌打丸对钙离子代谢的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 7 Effect of Zhonghua Dieda pills on calcium metabolism($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>ATPIA3B</i> 基因相 对表达量	<i>CACNA1DA</i> 基因相 对表达量
正常对照组	—	1.458 $\pm$ 0.064 ²⁾	1.219 $\pm$ 0.003 ²⁾
模型对照组	—	1.000 $\pm$ 0.052	1.000 $\pm$ 0.015
中华跌打丸	500	0.948 $\pm$ 0.016	1.143 $\pm$ 0.060
	1 000	1.094 $\pm$ 0.021	1.207 $\pm$ 0.019 ¹⁾
	2 000	0.944 $\pm$ 0.025	1.376 $\pm$ 0.040 ³⁾

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

2.7 中华跌打丸镇痛作用

中华跌打丸具有明显的镇痛作用，结果见表 8。

表 8 中华跌打丸镇痛作用($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab. 8 Analgesic effect of Zhonghua Dieda pills($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	总翻身次数/次	镇痛作用/%
正常对照组	—	3 672 $\pm$ 367 ¹⁾	—
模型对照组	—	4 635 $\pm$ 267	—
中华跌打丸	125	4 074 $\pm$ 259	12
	250	3 689 $\pm$ 294	20
	500	3 615 $\pm$ 244 ¹⁾	22
	1 000	2 810 $\pm$ 146 ²⁾	39
	2 000	3 573 $\pm$ 397 ¹⁾	23

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

3 讨论

机体一段时间内不能维持原有的运动强度可称之为疲劳，有学者提出疲劳可能发生在 2 个不同的部位，外周疲劳(脊髓运动神经、神经肌肉连接点和骨骼)和中枢疲劳(神经调控减弱导致力量生成或肌张力下降)^[14]。在低氧或缺氧条件下，没

有足够的 O_2 参与细胞氧化磷酸化和能量产生^[15-16]的过程，机体自发活动将会减弱。同时，肌肉贮备糖原无氧酵解生成乳酸，乳酸堆积可使局部 H^+ 浓度升高，过量 H^+ 直接作用于肌原纤维，抑制肌动蛋白和肌球蛋白的结合，导致肌肉收缩能力下降，机体运动能力将会减弱^[17]。中华跌打丸可促进乳酸代谢，降低机体乳酸含量以改善肌肉收缩能力，增强了机体运动能力，同时促进 ATP 生成，产生能量，促进细胞氧化磷酸化过程，增加机体自发活动，从而起到抗外周疲劳作用。

运动过程中会消耗大量的氧气和能量，同时产生大量的活性氧自由基，过量的氧自由基在体内堆积，可引起机体组织细胞氧化或过氧化损伤，导致机体的活动能力下降，从而加剧机体的疲劳^[18-19]。SOD 是体内一种使超氧阴离子自由基发生歧化反应从而清除超氧阴离子自由基的抗氧化酶，该酶由 *SOD1* 基因编码，对保护机体细胞膜和线粒体、清除自由基和抗疲劳有着至关重要的作用^[20-21]。钙离子是有氧运动中的重要调控因子，与骨骼肌的收缩和舒张关系密切。*ATPIA3B* 和 *CACNA1DA* 是体内钙离子代谢相关的 2 个基因。当细胞内钙离子浓度过高，可使肌肉收缩过度，甚至阻滞肌肉兴奋的传导，导致肌肉收缩能力降低；同时，线粒体膜磷脂水解，花生四烯酸释放增多，产生大量自由基。因此，钙离子代谢异常也是导致机体疲劳的重要因素之一^[22]。而中华跌打丸可明显提高 *SOD1*、*CACNA1DA* 基因相对表达量，加速体内氧自由基的清除，调节钙离子代谢，促进骨骼肌兴奋收缩偶联，恢复和维持机体运动功能。

4 结论

中华跌打丸在最高浓度(2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)下并未引起斑马鱼任何异常，其状态与正常斑马鱼相似，说明中华跌打丸安全性高。在此条件下，中华跌打丸可显著改善缺氧疲劳斑马鱼运动能力，降低乳酸含量，促进 ATP 生成，并且具有显著的镇痛作用，同时还显著提高 *SOD1* 和 *CACNA1DA* 基因相对表达量。本研究表明，中华跌打丸抗疲劳和镇痛作用明显，其机制可能为通过促进乳酸代谢、促进 ATP 生成、清除自由基以及调节钙离子代谢而改善机体运动功能，表现出抗外周疲劳作用。本研究可为中华跌打丸增加新的临床适应证和二次开发提供理论依据。

REFERENCES

- [1] 梧州市政协学习文史委员会. 梧州名产溯源[M]. 梧州市文史资料选辑, 2007.
- [2] 钟海森, 陈章美, 赵芳惠, 等. 中华跌打丸研究概况[J]. 广西中医药大学学报, 2018, 21(4): 68-71.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2015: 637.
- [4] DU Z C, YU H P, CHEN Z M. Study on effect of Zhonghua Dieda pill on fracture healing of zebrafish[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(12): 1454-1460.
- [5] GAO H, YU T, CAI T, et al. Study on part pharmacological effect of Chinese Dieda pills[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2008, 28(6): 428-431.
- [6] GAO H, YU T, CAI T. Study on anti-oxidation function of Zhonghua Dieda pills[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2006, 20(8): 466-468.
- [7] LI Z Q, XU Y, ZHAO X, et al. Study on liver diseases with zebrafish as an important tool[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(2): 320-332.
- [8] REN Q Y, ZHANG S S, LIU K C, et al. Study on anti-epileptic activity of Trifolium repens L. extracted by different methods on zebrafish model[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(12): 1215-1222.
- [9] ZHANG L X, ZHANG X Y, GU L L. Application of zebrafish model in the study of Alzheimer's disease[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2020, 37(9): 1145-1152.
- [10] QIAN X W, TAN Z H, ZHU C, et al. Effect of Yiganshu on the anti-alcohol in zebrafish[J]. Pharm Today(今日药理学), 2020, 30(7): 474-477.
- [11] SHEN B, LIU H C, OU W B, et al. Toxicity induced by Basic Violet 14, Direct Red 28 and Acid Red 26 in zebrafish larvae[J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(12): 1473-1480.
- [12] 张成岗, 蒋斌, 任长虹, 等. 利用亚硫酸钠建立低氧和缺氧模型的方法以及一种低氧和缺氧模型: 中国, CN102188444A[P]. 2011-09-21.
- [13] WALKER C I B, OLIVEIRA S M, TONELLO R, et al. Anti-nociceptive effect of stigmasterol in mouse models of acute and chronic pain[J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2017, 390(11): 1163-1172.
- [14] ST CLAIR GIBSON A, LAMBERT M I, NOAKES T D. Neural control of force output during maximal and submaximal exercise[J]. Sports Med, 2001, 31(9): 637-650.
- [15] HAYASHI T, HIRSHMAN M F, FUJII N, et al. Metabolic stress and altered glucose transport: Activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism[J]. Diabetes, 2000, 49(4): 527-531.
- [16] HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: An energy sensor that regulates all aspects of cell function[J]. Genes Dev, 2011, 25(18): 1895-1908.
- [17] YANG T. Preliminary study of the mechanisms of reduced rats' physical performance in acute hypoxia[D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2012.
- [18] WANG Q, RONG R, ZHU J D, et al. Hypobaric hypoxia affects digestion and absorption of carbohydrate in rats[J]. J Med Postgraduates(医学研究生学报), 2009, 22(10): 1028-1031.
- [19] KEHRER J P, KLOTZ L O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: Implications for health[J]. Crit Rev Toxicol, 2015, 45(9): 765-798.
- [20] ZHANG Y W, LUO H L, CHANG Y F, et al. Effects of liquorice extract on the activity and gene expression level of antioxidant enzymes in longissimus dorsi muscle of Tan lamb[J]. Small Rumin Res, 2017(154): 23-28.
- [21] AOKI M, WARITA H, MIZUNO H, et al. Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone, a free radical scavenger[J]. Brain Res, 2011(1382): 321-325.
- [22] ZHANG X, ZHANG J Y, SONG X T. Study on anti-fatigue effects of ginsenoside[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2018, 46(5): 12-14.

收稿日期: 2021-11-05

(本文责编: 沈倩)