

水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠抗疲劳功能研究

张丽婧¹, 刘臻¹, 刘冬英¹, 胡志航¹, 陈建国¹, 曲雪峰¹, 梅松¹, 骆华星¹,
楼敏涵¹, 胡文力¹, 周敏², 杨宗鑫², 王茵^{1*}

(1. 杭州医学院, 杭州 310013; 2. 杭州鑫伟低碳技术研发有限公司, 杭州 310000)

摘要: **目的** 研究水溶性雨生红球藻虾青素粉对正常小鼠抗疲劳功能的影响。**方法** 取 SPF 级 ICR 雄性小鼠 160 只随机分为 4 组, 每组 40 只, 水溶性雨生红球藻虾青素粉设低、中、高 3 个剂量组分别为 25、50、150 mg/kg bw, 另设溶剂对照组。小鼠连续给受试样品 30 d 后进行负重游泳试验并测定血清尿素氮、肝糖原、血清乳酸含量。**结果** 水溶性雨生红球藻虾青素粉各剂量组小鼠增重与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 高剂量组负重游泳时间显著延长($P < 0.05$); 高剂量组与对照组比较血清尿素氮显著性降低($P < 0.05$), 血清乳酸显著性降低($P < 0.05$), 肝糖原显著性增高($P < 0.05$)。**结论** 水溶性雨生红球藻虾青素粉具有缓解体力疲劳功能, 本研究为虾青素的开发利用提供一定的科学依据。

关键词: 虾青素; 抗疲劳; 负重游泳; 血尿素氮; 乳酸; 肝糖原

Study on the anti-fatigue function of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* in mice

ZHANG Li-Jing¹, LIU Zhen¹, LIU Dong-Ying¹, HU Zhi-Hang¹, CHEN Jian-Guo¹, QU Xue-Feng¹,
MEI Song¹, LUO Hua-Xing¹, LOU Min-Han¹, HU Wen-Li¹, ZHOU Min²,
YANG Zong-Xin², WANG Yin^{1*}

(1. Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China; 2. Hangzhou Xinwei Low Carbon Technology R & D Co., Ltd, Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: Objective To observe the anti-fatigue effect of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* on mice. **Methods** 160 male ICR mice of SPF were randomly divided into four groups with 40 mice in each group. The dosage of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* was 25, 50 and 150 mg/kg bw respectively, and another solvent control group was set up. After 30 days of continuous administration of the test sample, the mice were tested by weight-bearing swimming test and the contents of serum urea nitrogen (BUN), liver glycogen and serum lactate were determined. **Results** There was no significant difference in weight

基金项目: 浙江省科技计划项目(2017F30001)、浙江省医学支撑学科营养学(11-zc03)、浙江省重点研发计划(2019C02028)、浙江省中医药科技计划(2019ZZ005)

Fund: Supported by the Zhejiang Science and Technology Plan Project (2017F30001), Nutrition of Zhejiang Medical Supporting Subject (11-zc03), Key R & D Plan of Zhejiang Province (2019C02028), and Zhejiang Traditional Chinese Medicine Science and Technology Program (2019ZZ005)

***通讯作者:** 王茵, 研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生学。E-mail: wy3333@163.com

***Corresponding author:** WANG Yin, Professor, Hangzhou Medical College, No.182, Tianmushan Road, Xihu District, Hangzhou, Zhejiang 310013, China. E-mail: wy3333@163.com

gain between each dose group and the control group ($P > 0.05$), The swimming time in high dose group was significantly prolonged ($P < 0.05$). Compared with the control group, the serum urea nitrogen in the high dose group decreased significantly ($P < 0.05$), the serum lactate significantly decreased ($P < 0.05$), and glycogen in liver significantly increase ($P < 0.05$). **Conclusion** Water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* has the function of alleviating physical fatigue. This study provides a scientific basis for the development and utilization of astaxanthin.

KEY WORDS: astaxanthin; anti-fatigue; weight-bearing swim; serum urea nitrogen; lactic acid; glycogen

1 引言

虾青素(Astaxanthin), 属于酮式类胡萝卜素, 是一种萜烯类不饱和化合物, 化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β - β '-胡萝卜素, 是一种天然抗氧化剂^[1]。虾青素主要通过天然提取或者化工合成的方法获得。藻源虾青素 100% 为左旋, 生物活性最好。其中雨生红球藻是目前所知的自然界中虾青素含量最高的生物, 可达细胞干重的 5% 以上。虾青素是脂溶性的, 难溶于水, 并且对光、温度、氧等因素敏感, 容易发生氧化降解而失去生物活性, 不易保存, 这大大限制了其应用。而通过新型微/纳米囊化技术获得的水溶性虾青素, 一方面提高虾青素的生物利用度, 提高虾青素的稳定性, 更易贮藏保存^[2]。另一方面非水溶性(脂溶性)虾青素产品由于需要动物胶制成的软(硬)胶囊壳包裹, 导致素食者和肝功能不良人群无法选用, 致使产品难以满足多元化应用的需求, 水溶性雨生红球藻虾青素粉则解决了这些问题, 拓宽了适用人群, 增加其应用范围。

虾青素具有卓越的抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用^[3,4]。近年来研究显示, 虾青素具有保护心血管系统^[5,6]、维护中枢神经系统^[7,8]、增强免疫系统功能^[9]、抗肿瘤^[10]、保护肝损伤^[11]等作用, 说明其具有多种生物活性, 发展和应用前景广阔。但目前关于水溶性虾青素的研究较少, 本研究参照《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)缓解体力疲劳功能实验方法, 采用水溶性雨生红球藻虾青素粉经口灌胃 30 d 后, 通过小鼠负重游泳实验以及血清尿素氮、血乳酸、肝糖原等指标水平, 来探讨水溶性雨生红球藻虾青素粉的抗疲劳功能。此研究可以为水溶性虾青素作为保健食品等其他产品的开发利用提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 仪器设备

ST23161204 游泳箱(上海默家电子商务有限公司); FilterMax F5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); CL-2050M 高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); YH-A30002 电子天平(瑞安市英衡电器有限公司)。

2.2 样品及试剂

2.2.1 试剂

A043 糖原测试盒(南京建成生物工程研究所); C013-1 血尿素氮测试盒(南京建成生物工程研究所); A019-1 血乳酸测试盒(南京建成生物工程研究所)。

2.2.2 水溶性雨生红球藻虾青素粉的制备

以雨生红球藻为原料, 采用二氧化碳超临界提取, 得到虾青素含量为 15% 的虾青素油, 得油率为 25%, 将虾青素油与囊材溶液通过均质形成稳定的水包油乳化体系, 将乳化液喷入惰性热气流形成球形, 进一步干燥固化得到虾青素微囊, 最终得到虾青素含量为 4% 的水溶性虾青素粉末。所得粉末载油量 18%, 包埋率 95%, 酸价 0.65 mg/g, 过氧化值 0.05 g/100 g。由杭州鑫伟低碳技术研发有限公司提供。

2.3 实验动物的分组与饲养

实验用 ICR 小鼠由浙江省实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(浙)2019-0002, SPF 级, 雄性, 体重 16~20 g。实验动物使用许可证号为 SYXK(浙)2016-0022。实验环境条件为: 室温 20~25 °C, 相对湿度 40%~70%。实验动物质量合格证号 No.1704200018。参照石丽丽等^[12]的《虾青素的毒理学安全性评价研究》设水溶性雨生红球藻虾青素粉推荐量 5 mg/kg bw, 实验设 3 个剂量组以及阴性对照组(蒸馏水)。受试物低、中、高 3 个剂量分别为 25、50、150 mg/kg bw, 分别取受试物 0.25、0.5、1.5 g 加蒸馏水至 100 mL, 灌胃给予受试物, 灌胃体积为 0.1 mL/10 g bw, 对照组给予等体积的溶剂, 每天灌胃 1 次, 连续 30 d。在实验过程中小鼠享受良好的动物福利, 本实验项目被浙江省医学科学院实验动物福利伦理委员会审查批准, 编号为 2016-027。

2.4 实验方法

2.4.1 负重游泳试验

每组选取小鼠 10 只, 于末次给受试物 30 min 后, 将小鼠放入水箱中游泳, 水深 30 cm, 水温 25 °C, 鼠尾根部负荷 5% 体重的铅条, 记录小鼠自游泳开始至死亡的时间(min)。

2.4.2 血乳酸测定

每组选取小鼠 10 只, 于末次给受试物 30 min 后, 内眦采血, 离心, 取血清, 测血乳酸; 然后在温度为 30 °C 的水中游泳 10 min, 取出, 纱布擦干, 立即眼眶采血, 测血乳酸; 温风吹干, 安静 20 min 后再测 1 次血乳酸。比较动物运动前后及安静 20 min 各时段血乳酸变化。

血乳酸曲线下面积=5×(游泳前血乳酸值+3×游泳后 0 min 血乳酸值+2×游泳后休息 20 min 血乳酸值)

2.4.3 尿素测定

每组选取小鼠 10 只, 于末次给受试物 30 min 后, 将小鼠放入 30 °C 水箱中游泳 90 min, 取出, 热风烘干, 休息 60 min 后, 摘除眼球采血, 离心, 取血清, 用二乙酰肼法测血尿素氮。

2.4.4 肝糖原测定

每组选取小鼠 10 只, 于末次给受试物 30 min 后, 取肝脏制成匀浆, 按蒽酮法测肝糖原。

肝糖原含量(mg/g 肝组织)=测定管 OD 值/标准管 OD 值×标准管含量(0.01 mg)×样品测试前稀释倍数×10÷1.11

2.5 统计学分析

数据为计量资料, 采用方差分析, 但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验, 方差齐, 计算 F 值; F 值 $< F_{0.05}$, 结论: 各组均数间差异无显著性; F 值 $> F_{0.05}$, $P < 0.05$, 用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计; 对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换, 待满足

正态或方差齐要求后, 用转换后的数据进行统计; 若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的, 改用秩和检验进行统计。

3 结果与分析

3.1 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠负重游泳时间及小鼠增重的影响

不同剂量的水溶性雨生红球藻虾青素粉灌胃 30 d, 与对照组比较, 各剂量组小鼠增重差异无统计学意义($P > 0.05$), 高剂量组游泳时间明显延长, 具有统计学差异($P < 0.05$), 见表 1。判断抗疲劳功能加强最直接的表现是运动耐力的提高, 运动时间延长可以直接反映抗疲劳功能的改善。实验结果表明该样品在高剂量下可以延长负重游泳时间, 推迟疲劳出现。

3.2 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠血清尿素及小鼠增重的影响

与对照组比较, 水溶性雨生红球藻虾青素粉高剂量组血尿素氮降低差异具有统计学意义($P < 0.05$), 各剂量组小鼠增重差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。剧烈运动会引起蛋白质分解加剧, 尿素作为蛋白质分解代谢的产物, 可以反映机体蛋白质分解代谢平衡状态, 血尿素水平升高引发机体产生疲劳^[13]。实验结果显示高剂量受试物可以显著降低血清尿素氮水平, 进而缓解体力疲劳。

表 1 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠负重游泳时间及小鼠增重的影响($n=40$)

Table 1 Effects of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* on weight-bearing swimming time and weight gain in mice($n=40$)

组别	动物数/只	体重/g			游泳时间/min
		实验初	实验末	增重	
对照组	10	19.2±1.3	38.5±4.2	19.3±2.9	6.9±1.9
低剂量组	10	19.0±1.1	36.3±3.1	17.3±1.9	7.3±2.8
中剂量组	10	19.2±1.0	38.6±2.2	19.3±1.2	8.5±2.2
高剂量组	10	19.3±1.1	37.6±4.8	18.4±3.7	11.4±2.6*

注: *与对照组相较具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠血清尿素及小鼠增重的影响($n=40$)

Table 2 Effects of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* on serum urea and weight gain in mice($n=40$)

组别	动物数/只	体重/g			尿素/(mmol/L)
		实验初	实验末	增重	
对照组	10	19.1±0.8	39.5±4.7	20.4±3.9	11.19±1.08
低剂量组	10	19.1±1.0	37.7±3.7	18.6±2.7	10.96±1.39
中剂量组	10	19.0±0.9	36.7±2.5	17.8±1.7	10.76±1.50
高剂量组	10	18.8±1.1	38.4±2.7	19.6±1.6	9.64±0.85*

注: *与对照组相较具有统计学意义($P < 0.05$)。

3.3 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠肝糖原含量及小鼠增重的影响

与对照组比较, 水溶性雨生红球藻虾青素粉中、高剂量组肝糖原含量升高具有统计学意义($P < 0.05$), 各剂量组小鼠增重差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 3。剧烈运动时, 机体内糖原耗尽会引起身体疲劳。实验结果表明, 实验剂量下水溶性虾青素有效的保护肝糖原使其较慢消耗, 提升抗疲劳功能。

3.4 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠血乳酸值及小鼠增重的影响

与对照组比较, 水溶性雨生红球藻虾青素粉低、高剂量组小鼠血乳酸曲线下面积均有下降差异具有统计学意义($P < 0.05$), 各剂量组小鼠增重差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 4。当机体剧烈运动时, 会引起机体进行无氧糖酵解, 产生大量乳酸引起体力疲劳。当机体抗疲劳能力提升, 血清中的乳酸含量会降低。实验结果表明一定浓度的受试物可以降低血清中乳酸含量, 延缓疲劳的产生。

4 结论与讨论

剧烈运动时大量活性氧自由基被释放, 有氧代谢能力不足, 会引起葡萄糖或者糖原进行无氧糖酵解提供能量。同时机体长时间的剧烈运动也会加剧蛋白质分解。这就会导致糖原快速消耗, 体内产生和积累大量的乳酸和尿素, 产生运动疲劳。有研究显示^[13-15], 在运动期间虾青素可以促进糖异生, 增加葡萄糖利用率, 增加可作为能量来源的脂肪酸的利用, 从而维持血清糖原水平, 降低血清中尿素和乳酸含量, 以缓解机体运动疲劳改善游泳能力。此外, 虾青素具有优秀的抗氧化能力可以清除自由基有效地预防生物膜系统中的脂质过氧化稳定细胞膜, 可以降低运动诱导的小鼠骨骼肌细胞和心肌细胞的损伤^[16,17]。本研究结果显示高剂量组水溶性雨生红球藻虾青素粉可以显著地延长小鼠负重游泳时间, 提高小鼠肝糖原水平, 降低血清中尿素氮、乳酸水平。运动耐力的提高是判断抗疲劳功能加强最直接的表现, 运动时间延长可以直接反映抗疲劳功能的改善。在实验结果的基础上可以进一步探索其抗氧化作用机制以及可能涉及的信号传导通路, 同时为水溶性虾青素的开发利用提供理论依据。

表 3 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠肝糖原含量及小鼠增重的影响($n=40$)

Table 3 Effects of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* on liver glycogen content and weight gain in mice ($n=40$)

组别	动物数/只	体重/g			肝糖原/(mg/g 肝组织)
		实验初	实验末	增重	
对照组	10	18.9±0.9	38.0±3.2	19.2±2.3	34.69±4.57
低剂量组	10	19.1±0.8	37.1±3.1	17.9±2.3	38.24±5.91
中剂量组	10	19.0±0.8	38.3±3.4	19.3±2.6	52.73±13.27*
高剂量组	10	18.9±1.1	37.5±3.5	18.7±2.4	46.93±14.39*

注: *与对照组相较具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 4 水溶性雨生红球藻虾青素粉对小鼠血乳酸曲线下面积及小鼠增重的影响($n=40$)

Table 4 Effects of water soluble astaxanthin powder from *Haematococcus pluvialis* on area under the blood lactate curve and weight gain in mice($n=40$)

组别	动物数/只	体重/g			乳酸曲线下面积/(mmol/L)
		实验初	实验末	增重	
对照组	10	19.1±1.1	38.9±2.4	19.8±1.3	251.2±40.6
低剂量组	10	18.9±1.0	39.7±3.4	20.8±2.4	188.1±55.1*
中剂量组	10	19.0±0.8	38.5±2.2	19.5±1.4	199.4±47.6
高剂量组	10	19.1±1.2	36.5±2.9	17.5±1.8	177.9±66.3*

注: *与对照组相较具有统计学意义($P < 0.05$)。

参考文献

- [1] 邹堂斌, 李华文. 虾青素生物活性及作用机制的研究进展[J]. 广东医学院学报, 2014, 32(6): 873-875.
Zou TB, Li HW. Research progress in bioactivity and mechanism of astaxanthin [J]. J Guangdong Med Coll, 2014, 32(6): 873-875.
- [2] 彭宇, 任晓丽, 陈林, 等. 虾青素制剂技术及其对虾青素稳定性影响的研究进展[J]. 中国油脂, 2019, 44(4): 115-121.
Peng Y, Ren XL, Chen L, *et al.* Advance in preparation technology of astaxanthin and its effects on stability of astaxanthin [J]. Chin Oils Fats, 2019, 44(4): 115-121.
- [3] 董宝莲, 郭玲. 虾青素的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 8: 821-824.
Dong BL, Guo L. Research progress of astaxanthin [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 8: 821-824.
- [4] 刘庆春. 虾青素对 2 型糖尿病大鼠海马抗氧化能力的影响[J]. 中医临床研究, 2017, 22: 31-32.
Liu QC. Efficacy of astaxanthin on the antioxidant capacity of hippocampus in type 2 diabetic rats [J]. Chin J Clin Med, 2017, 22: 31-32.
- [5] 柯晓霞, 许卫攀, 陈志强, 等. 虾青素对缺氧复氧心肌细胞的保护作用及机制研究[J]. 现代中药研究与实践, 2018, 2: 19-22, 26.
Ke XX, Xu WP, Chen ZQ, *et al.* The protective effects and potential mechanisms of astaxanthin on myocardial hypoxia/reoxygenation injury [J]. Chin Med J Res Prac, 2018, 2: 19-22, 26.
- [6] 沈成, 王龙, 王晔. 虾青素在动脉粥样硬化性心血管疾病中的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 3: 417-421.
Shen C, Wang L, Wang X. Research progress of astaxanthin in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. Med Recap, 2018, 3: 417-421.
- [7] 陈昊阳, 王翀. 虾青素对创伤性颅脑损伤保护作用的研究进展[J]. 中华脑科疾病与康复杂志(电子版), 2019, 9(4): 246-250.
Chen HY, Wang C. Research progress on the protective effect of astaxanthin on traumatic brain injury [J]. Chin J Brain Dis Rehabil (Elect Ed), 2019, 9(4): 246-250.
- [8] Esra C, Ufuk C, Cuneyt T, *et al.* Favorable effects of astaxanthin on brain damage due to ischemia-reperfusion injury [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2020.
- [9] 海璇隼, 凌雪萍, 卢英华. 虾青素对正常小鼠与衰老模型大鼠免疫指标的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2013, 5: 703-709.
Hai XJ, Ling XP, Lu YH. Effects of astaxanthin on immune indexes of normal mice and aging model rats [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci), 2013, 5: 703-709.
- [10] 吕亭亭, 葛声. 虾青素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 肿瘤代谢与营养电子杂志, 2015, 4: 58-62.
Lv TT, Ge S. Advanced research on anti-tumor effect of astaxanthin [J]. Electron J Metab Nutr Cancer, 2015, 4: 58-62.
- [11] 王群, 林波. 虾青素在肝脏疾病中作用的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 7: 797-800, 804.
Wang Q, Lin B. Advance in research on role of astaxanthin in liver diseases [J]. Chin J Biologicals, 2018, 7: 797-800, 804.
- [12] 石丽丽, 韩超, 赵金鹏, 等. 虾青素的毒理学安全性评价研究[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(1): 31-35.
Shi LL, Han C, Zhao JP, *et al.* Toxicological safety assessment of astaxanthin [J]. Food Nutr Chin, 2019, 25(1): 31-35.
- [13] 王茵, 刘淑集, 苏永昌, 等. 天然虾青素的抗疲劳及抗氧化作用研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, 9: 42-48.
Wang Y, Liu SJ, Su YC, *et al.* Protective effects of astaxanthin on exercise-induced myocardial injury in rat [J]. J Southwest Univ (Nat Sci), 2015, 9: 42-48.
- [14] Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(10): 2106-2110.
- [15] 孙卓, 王舒, 吴丽君. 虾青素对运动机体的促进作用[J]. 运动, 2018, 10: 151-152.
Sun Z, Wang S, Wu LJ. Promotion effect of astaxanthin on exercise body [J]. Sport, 2018, 10: 151-152.
- [16] 苗小宝, 孟昭琴, 王美乐. 补充天然虾青素和递增游泳对力竭运动大鼠骨骼肌自由基代谢的影响[J]. 当代体育科技, 2016, 35: 25-27.
Miao XB, Meng ZQ, Wang ML. Effects of supplementing natural astaxanthin and increasing swimming on free radical metabolism of skeletal muscle in exhausted exercise rats [J]. Contem Sport Tech, 2016, 35: 25-27.
- [17] 周海涛, 曹建民, 郭娴, 等. 虾青素对大鼠运动性心肌损伤的保护作用[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 7: 1150-1155.
Zhou HT, Cao JM, Guo X, *et al.* Protective effects of astaxanthin on exercise-induced myocardial injury in rat [J]. Nat Prod Res Dev, 2016, 7: 1150-1155.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



张丽婧, 实习研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生学。

E-mail: 754167746@qq.com



王茵, 研究员, 主要研究方向为营养与食品卫生学。

E-mail: wy3333@163.com