

海带多糖对心理应激大鼠血管舒张功能的保护作用

黎 静¹, 高金洪², 莫振华², 魏茜敏², 刘家存², 陈 锋², 谢 露¹

1. 广西医科大学 生理教研室, 广西 南宁 530021

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 探讨海带多糖对心理应激大鼠血管舒张功能的保护作用及相关机制。方法 采用愤怒心理应激的方法制备血管内皮损伤大鼠模型, 实验分为对照组、模型组、海带多糖低和高剂量组及低分子肝素组。造模后取血, 采用 ELISA 法检测血浆肾上腺素 (Adr) 水平、血管性血友病因子 (vWF) 水平, 采用放射免疫化学法检测血浆皮质醇、6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 的水平, 采用化学法检测血浆 NO 水平。取血后, 制备大鼠血管环, 观察各组大鼠血管环对累计浓度乙酰胆碱 (Ach) 的内皮依赖性舒张反应。结果 与对照组比较, 模型组、海带多糖组和低分子肝素组血浆皮质醇和 Adr 水平明显升高 ($P < 0.05$); 海带多糖高剂量组血浆 vWF 水平与模型组比较明显降低 ($P < 0.05$); 海带多糖高剂量组血浆 NO 水平与模型组比较显著升高 ($P < 0.05$); 海带多糖组血浆 6-keto-PGF_{1α} 水平与模型组比较显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 海带多糖高剂量组血管舒张反应明显增强 ($P < 0.05$)。结论 海带多糖对心理应激大鼠血管舒张功能具有一定的保护作用。

关键词: 海带多糖; 心理应激; 血管舒张功能; 血管性血友病因子; 一氧化氮; 6-酮-前列腺素 F_{1α}

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2012)04 - 0748 - 04

Protection of laminaria polysaccharide on vasodilation function of rats induced by psychological stress

LI Jing¹, GAO Jin-hong², MO Zhen-hua², WEI Xi-min², LIU Jia-cun², CHEN Feng², XIE Lu¹

1. Department of Physiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To explore the protection of laminaria polysaccharide (LP) on vasodilation function of rats induced by psychological stress and its relative mechanism. **Methods** Normal adult rats were randomly divided into control, model, LP-L, LP-H, and low molecular heparin groups. The rat model with endothelial damage was built up by anger psychological stress method. After psychological stress, the levels of adrenaline (Adr) and von Willebrand factor (vWF) in plasma of rats were tested by ELISA, cortisol and 6-keto-PGF_{1α} were tested by radioimmunoassay, and the level of nitric oxide (NO) in plasma of rats was tested by chemical colorimetry. After taking blood, the aortic rings were prepared and put into organ bath. The tension of endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (Ach) was recorded. **Results** Compared with the control group, the level of cortisol and Adr in plasma increased significantly in the model, LP-H, LP-L, and low molecular heparin groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, the level of vWF in plasma decreased significantly in LP-H group ($P < 0.05$), and the level of NO in plasma of rats in LP-H group was higher than that in the model group significantly ($P < 0.05$). The level of 6-keto-PGF_{1α} in plasma of rats increased significantly in LP-H and LP-L groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, endothelium-dependent relaxation of isolated thoracic aorta in rats induced by Ach significantly increased in LP-H group ($P < 0.05$). **Conclusion** LP could protect the vasodilation function of rats induced by psychological stress.

Key words: laminaria polysaccharide (LP); psychological stress; vasodilation function; von Willebrand factor (vWF); nitric oxide (NO); 6-keto-PGF_{1α}

海带属于褐藻门褐子纲海带目海带科的海带属, 具有多种药理作用, 且大部分生物活性与其中的多糖
中医入药时叫昆布。海带中含有多种生物活性成分, 成分密切相关。海带多糖 (laminaria polysaccharide,

收稿日期: 2011-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960467, 81000148); 广西教育厅博士研究生创新课题资助项目 (2010105981001D37)

作者简介: 黎 静 (1979—), 女, 广西柳州人, 在读博士, 讲师, 研究方向为海洋药物与心血管病理生理学。

Tel: (0771)5358282 E-mail: lijing2580@yahoo.com.cn

*通讯作者 谢 露 Tel: (0771)5358282 E-mail: xielu8282@sina.com

LP)具有多方面复杂的生物活性,在调血脂、降血糖、调节免疫、抗血栓、抗肿瘤、抗辐射、抗氧化和耐缺氧等方面具有独特的功能^[1-3]。本课题组前期研究发现海带多糖具有抗凝血、抑制血小板聚集、抗血栓形成功能及拮抗外源性肾上腺素增多对血管内皮细胞的损伤作用^[4-5]。本研究通过建立心理应激模型大鼠,进一步探讨海带多糖对内源性肾上腺素增多引起的血管内皮舒张功能的损伤是否有保护作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

海带多糖为本实验室自行提取,海带干粉经加水调浆后,纤维素酶和中性蛋白酶水解、盐酸浸泡、乙醇沉淀及DEAE-纤维素柱分离得到海带多糖,其含糖>71.0%。伊诺肝素(低分子肝素)注射液(批号H20064066),赛诺菲安万特制药有限公司产品;肾上腺素(adrenaline, Adr)、血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)试剂盒购自武汉华美公司;NO试剂盒购自Cayman Chemical Company;皮质醇、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)试剂盒购自北方放射免疫生物技术公司。苯肾上腺素(PE),上海禾丰制药有限公司;乙酰胆碱(acetylcholine, Ach),上海三爱思试剂有限公司;其余试剂为市售分析纯。

1.2 仪器

i MARK型全自动酶标仪(美国Bio-rad公司); γ 放射免疫计数器(合肥众成机电技术开发有限公司);血管环张力换能器及Powerlab/4sp生物信号采集处理系统(埃德仪器国际贸易有限公司)。

1.3 动物

雄性SD大鼠(200~250 g),购自广西医科大学实验动物中心,SPF级,合格证号:SCXKG(桂)2009-0002。

2 方法

2.1 心理应激大鼠模型的建立

将大鼠随机分为对照组、模型组、海带多糖低和高剂量组、低分子肝素组,每组8只。对照组大鼠群居饲养,不给予情绪应激,其余各组建立愤怒心理应激模型^[6]:制造昼夜颠倒环境,每晚24:00时开灯,中午12:00时关灯,连续10 d。第11天13:30~15:30进行实验,在每只造模大鼠笼内放进1只入侵鼠(入侵大鼠群居饲养,于实验前1 d禁食,不禁水),给予情绪应激。药物组分别ip海带多糖(1、5 mg/kg)或低分子肝素(1 U/kg),对照组和

模型组同法ip等量生理盐水,每日2次,连续10 d。

2.2 大鼠血浆皮质醇、Adr、vWF、NO、6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 水平检测

造模后第11天,大鼠麻醉后经颈动脉取血,抗凝后离心,取血浆-80℃存放。严格按照试剂盒说明书检测血浆中皮质醇、Adr、vWF、NO、6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的水平。

2.3 胸主动脉环的制备及血管环舒张实验

各组大鼠取血后迅速取其胸主动脉,置于预先氧饱和的4℃K-H液(37℃恒温,并持续通入95%O₂和5%CO₂的混合气体)中,尽量去除周围结缔组织,剪成约3 mm宽的血管环,避免过度牵拉,以防人为操作损伤内皮。将血管环放入含K-H液的浴槽内,每1个血管环用两个L型不锈钢小钩小心贯穿入血管环管腔,一端固定与浴槽底部,另一端通过丝线连接于张力换能器,张力的变化被传输并记录在Powerlab/4 sp生物信号采集处理系统中。血管环在0.5 g张力下稳定30 min后给予1.5 g张力平衡90 min开始实验,期间每15 min换K-H液1次。平衡后予以 1×10^{-6} mol/L PE预收缩至最大收缩张力并稳定后,加入累计浓度Ach(1×10^{-8} ~ 1×10^{-4} mol/L),记录血管张力,观察不同浓度Ach对血管环的舒张反应。血管舒张率= $(A-a)/(A-A_0)$,A为PE刺激后诱发的最大收缩张力,a为某浓度Ach诱发血管的舒张张力,A₀为加PE刺激前的初始张力^[7]。

2.4 数据处理

采用SPSS 13.0软件进行分析,组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 血浆Adr和皮质醇水平变化

与对照组比较,模型组、海带多糖组和低分子肝素组血浆皮质醇和Adr水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,海带多糖和低分子肝素组的血浆皮质醇和Adr水平无显著差异($P > 0.05$)。见表1。

3.2 血浆vWF水平变化

与对照组比较,模型组、海带多糖低剂量组、低分子肝素组血浆vWF水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,海带多糖高剂量组血浆vWF水平明显降低($P < 0.05$),见图1。

3.3 血浆中NO和6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 水平变化

与对照组比较,模型组、海带多糖低剂量组、低分子肝素组血浆NO水平显著降低($P < 0.05$);

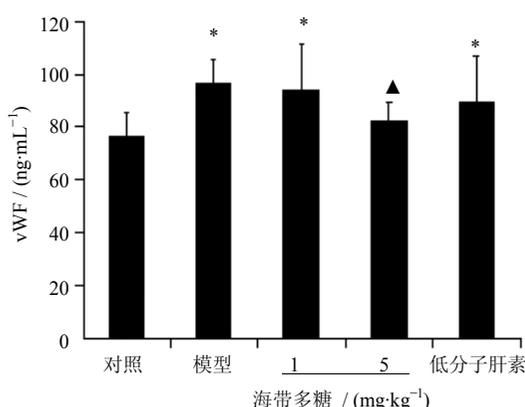
表 1 海带多糖对心理应激大鼠血浆中皮质醇和 Adr 水平的影 响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of LP on cortisol and Adr levels in plasma of psychological stress rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	剂 量	皮质醇 / (ng·mL ⁻¹)	Adr / (pg·mL ⁻¹)
对照	—	14.67 ± 2.98	2.73 ± 1.34
模型	—	19.67 ± 3.84	6.68 ± 2.22*
海带多糖	1 mg·kg ⁻¹	20.15 ± 2.69*	8.35 ± 2.35*
	5 mg·kg ⁻¹	20.49 ± 3.76*	7.42 ± 2.51*
低分子肝素	1 U·kg ⁻¹	20.51 ± 3.32*	6.87 ± 2.80*

与对照组比较: *P<0.05

*P<0.05 vs control group



与对照组比较: *P<0.05; 与模型组比较: ▲P<0.05, 表 2、3 同

*P<0.05 vs control group; ▲P<0.05 vs model group, same as Tables 2 and 3

图 1 海带多糖对心理应激大鼠血浆中 vWF 水平的影 响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of LP on vWF level in plasma of psychological stress rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

与模型组比较, 海带多糖高剂量组血浆 NO 水平显著升高 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组血浆 6-keto-PGF_{1α} 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 海带多糖低、高剂量组血浆 6-keto-PGF_{1α} 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 海带多糖对心理应激大鼠血浆中 NO 和 6-keto-PGF_{1α} 水平的影 响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of LP on NO and 6-keto-PGF_{1α} levels in plasma of psychological stress rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组 别	剂 量	NO / (mmol·mL ⁻¹)	6-keto-PGF _{1α} / (pg·mL ⁻¹)
对照	—	25.00 ± 4.04	95.41 ± 30.38
模型	—	19.42 ± 4.40*	67.88 ± 23.33*
海带多糖	1 mg·kg ⁻¹	19.82 ± 3.86*	111.84 ± 27.19▲
	5 mg·kg ⁻¹	26.89 ± 6.70▲	121.92 ± 33.82▲
低分子肝素	1 U·kg ⁻¹	18.10 ± 4.39*	73.29 ± 23.04*

3.4 各组大鼠血管环的内皮依赖性舒张反应

当 Ach 浓度为 1×10^{-5} mol/L 时, 不同处理组间开始出现显著差异 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组、海带多糖低剂量组和低分子肝素组大鼠血管环对 Ach 诱导的舒张反应显著减弱 ($P < 0.05$), 海带多糖高剂量组无显著差异 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 海带多糖高剂量组血管舒张反应明显增高 ($P < 0.05$), 海带多糖低剂量组和肝素组无显著差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

4 讨论

心理应激已被公认为是引起心血管疾病的一个重要因素。应激过程中, 血液中儿茶酚胺升高、血流的冲击、炎症的发生、血小板的激活等因素均可造成内皮的损伤, 导致血管内皮功能异常、高血压的发生等^[8]。在应激条件下, 交感神经和下丘脑-垂体-肾上腺轴过度激活, 使皮质醇、Adr 水平升高。本实验通过愤怒情绪刺激建立心理应激大鼠模型, 结果显示模型组、海带多糖高和低剂量组及低分子肝素组血浆皮质醇、Adr 水平均显著升高, 说明各组大鼠均产生了情绪应激反应。

当体内 Adr 分泌增多时, 一方面肾上腺素通过收缩血管, 血压升高, 血流加快, 对血管内皮细胞

表 3 海带多糖对心理应激大鼠血管环舒张反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of LP on vasorelaxation reaction of psychological stress rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 别	剂 量	不同浓度 Ach (mol·L ⁻¹) 血管环舒张率 / %				
		1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}
对照	—	3.70 ± 2.47	12.92 ± 5.37	47.45 ± 11.69	100.57 ± 14.70	105.27 ± 13.41
模型	—	1.98 ± 2.48	13.52 ± 5.76	35.70 ± 9.36	73.28 ± 15.53*	83.18 ± 11.30*
海带多糖	1 mg·kg ⁻¹	3.30 ± 3.74	16.01 ± 7.35	31.78 ± 9.23	73.63 ± 18.56*	86.40 ± 16.88*
	5 mg·kg ⁻¹	5.80 ± 3.63	18.58 ± 8.04	44.83 ± 9.98	86.18 ± 17.36▲	94.97 ± 14.35▲
低分子肝素	1 U·kg ⁻¹	2.65 ± 4.84	10.68 ± 7.18	32.70 ± 8.08	80.27 ± 20.66*	89.18 ± 12.01*

造成机械性损伤, 另外一方面, A α r 在 A 型单胺氧化酶作用下, 脱氨生成甲醛、过氧化氢和氨^[9]等毒性产物, 对内皮细胞产生氧化损伤。vWF 是反映内皮细胞损伤敏感的分子标记物, 它由内皮细胞合成后储存于细胞内, 当内皮细胞受损时, vWF 大量释放入血^[10]。本研究中模型组血浆 vWF 水平升高, 提示心理应激后大鼠血浆中 A α r 分泌增多导致了血管内皮细胞的损伤, 使其合成及分泌功能异常。而海带多糖干预后, 血浆中 vWF 水平与模型组比较显著降低, 说明海带多糖对内皮细胞具有一定的保护作用, 从而降低内皮细胞分泌的 vWF 水平。

心理应激时可以造成血管内皮功能异常, 使其释放内皮源性舒缩因子失衡, 如血管收缩因子释放增加和血管舒张因子释放减少, 从而影响血管的内皮依赖性舒缩功能^[11]。由内皮细胞释放的血管舒张因子 NO、PGI₂ 及收缩因子 ET、TXA₂, 正常情况下两者保持平衡与稳定, 当内皮细胞损伤时, NO、PGI₂ 的生成和释放受抑制而 ET、TXA₂ 升高, 导致体内血管收缩呈优势, 舒张功能下降^[12]。由于 PGI₂ 在体内不稳定, 可通过测定其代谢产物 6-keto-PGF_{1 α} 反映机体内 PGI₂ 的水平。本研究发现, 模型组血浆 NO、6-keto-PGF_{1 α} 水平显著降低, 而海带多糖干预后, 血浆 NO、6-keto-PGF_{1 α} 水平与模型组比较显著升高, 说明海带多糖对心理应激大鼠血管舒张功能具有一定的保护作用。

Ach 作用于内皮细胞, 使其合成和释放 NO 增加, 引起血管的内皮依赖性舒张, 本研究显示模型组大鼠对 Ach 诱导的血管舒张反应显著减弱, 说明心理应激导致了大鼠血管内皮细胞的功能损伤, 引起血管的舒张反应异常。通过高剂量海带多糖干预, Ach 诱导的血管舒张反应明显增强, 说明海带多糖对心理应激大鼠血管的内皮依赖性舒张功能具有调节作用。进一步提示海带多糖对内皮细胞功能具有保护作用, 可以通过调节内皮细胞合成和释放血管舒张因子, 从而调节血管的内皮依赖性舒张和收缩功能。

低分子肝素对内皮细胞具有一定的保护作用^[13], 但本研究显示其对内皮细胞的保护作用弱于海带多

糖。综述所述, 海带多糖可通过保护内皮细胞的功能来调节内皮细胞释放血管舒张因子 NO、PGI₂ 来调节心理应激大鼠血管的舒张功能, 对内源性的 A α r 增多引起的血管内皮损伤具有一定的保护作用。

参考文献

- [1] 马明华, 傅喆喆, 余自成, 等. 海带多糖药理活性研究进展 [J]. 中国药师, 2010, 13(8): 1190-1193.
- [2] 张全斌, 于鹏展, 周革非, 等. 海带褐藻多糖硫酸酯的抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 824-826.
- [3] 张洪建, 李劲平, 杨琳. 海带多糖药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(4): 217-219.
- [4] 谢露, 黎静, 刘爱群, 等. 海带多糖 L01 抑制血小板活性与血管内皮细胞保护作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(4): 674-677.
- [5] 刘爱群, 谢露, 龙敬伦. 海带多糖对血管内皮细胞保护作用 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24(3): 334-336.
- [6] 张红梅, 刘晓伟, 曲宏达, 等. 愤怒心理应激动物模型的制作与行为学评估 [J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(2): 189-190.
- [7] 张博男, 储金秀, 韩淑英. 荞麦花叶总黄酮的舒张血管作用及其机制 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(7): 952-956.
- [8] 田英, 傅明德. 心理应激在心血管病发生中的病理生理机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(2): 245-246.
- [9] Yu P H, Lai C T, Zuo D M. Formation of formaldehyde from adrenaline *in vivo*; a potential risk factor for stress-related angiopathy [J]. *Neurochem Res*, 1997, 22(5): 615-620.
- [10] Ferrier K E, Muhlmann M H, Baquet J P, *et al*. Intensive cholesterol reduction lowers blood pressure and large artery stiffness in isolated systolic hypertension [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(6): 1020-1205.
- [11] 易春涛, 陈旭, 马宏伟, 等. 福辛普利对老年高血压患者内皮依赖性血管舒张功能的影响 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8(6): 367-369.
- [12] Lentz S R, Sobey C G, Piegors D J, *et al*. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocysteinemia [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(1): 24.
- [13] 龙健, 曾智. 低分子肝素对血管内皮细胞舒缩功能的影响 [J]. 心脏杂志, 2004, 16(4): 295-300.