

褐藻寡糖对小鼠热应激及甲状腺的影响

李丽妍^a, 兰 翀^b, 毛 阳^b, 郝红英^a

(黄河科技学院 a. 医学院; b. 纳米功能材料研究所, 郑州 450003)

摘 要:为探讨褐藻寡糖对小鼠抗热应激能力和热应激小鼠甲状腺的影响,将小鼠随机分成四组,分别用生理盐水和不同剂量的褐藻寡糖($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)连续灌胃四周.之后各组分别在 $45 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下进行热应激实验,考察应激前后体重的变化、存活时间;待小鼠死亡后,分别取出甲状腺称重,计算其指数.常规石蜡切片,HE染色,观察甲状腺形态学改变.结果显示热应激小鼠体重下降,但差异不显著($P > 0.05$).中等剂量褐藻寡糖组($600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)抗热应激能力较对照组高,差异显著($P < 0.05$),甲状腺指数随褐藻寡糖浓度的升高而增加,且与抗热应激的存活时间存在显著相关.甲状腺的形态学也随之发生改变.结果表明,褐藻寡糖能够提高小鼠的抗热应激能力,中等剂量为最佳;甲状腺参与了热应激反应.

关键词:褐藻寡糖;小鼠;热应激;甲状腺

中图分类号:R96

文献标志码:A

褐藻寡糖(alginate oligosaccharides, AOS)为褐藻胶的寡聚物,是主要的海洋性功能寡糖之一.褐藻寡糖分子量低,水溶性强,稳定性好,安全无毒.近年来的研究发现,低聚合度的褐藻寡糖及其衍生物具有抗氧化、抗肿瘤、抗凝血和免疫调节等多种生物活性^[1-4].

应激是动物体受到体内外非特异有害因子的刺激所表现的机能障碍和防御反应,是机体对外界或内部的各种非常刺激所产生的非特异性反应的总和^[5-6].应激性刺激对动物的生长、行为和生理功能都产生不同程度的影响,应激过强易使机体产生许多异常反应^[7].有研究表明,寡糖在增强动物免疫能力及抗应激等方面有明显增强作用^[8-10],但褐藻寡糖对热应激小鼠甲状腺的影响尚未见报道.本实验旨在探讨褐藻寡糖对小鼠抗热应激能力的影响以及对热应激小鼠甲状腺的影响,为开发抗应激药物以及褐藻寡糖在医药领域的更广泛应用提供理论支撑.

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验小鼠为昆明种系,50只,4周龄,雌雄不限,由郑州大学动物实验中心提供.

1.2 实验药品与试剂

褐藻胶(粘度 $0.5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 级别)购置于青岛明月海藻集团有限公司.褐藻胶裂解酶冻干粉由中国海洋大学食品科学与工程学院提供.

1.3 实验方法

1.3.1 褐藻寡糖的制备

称取褐藻胶 5 g,溶解于 500 mL $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0)中,加入 200 U 褐藻胶裂解酶,充分混匀,置于 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中反应 2 h,加热终止酶解反应.待反应液冷却,减压蒸馏浓缩后,用 3 倍体积预冷无水乙醇沉淀寡糖过夜,收集沉淀,冻干保存.

收稿日期:2016-06-24;修回日期:2016-08-01.

基金项目:河南省教育厅高等学校重点科研项目(15A350008)

第1作者简介(通信作者):李丽妍(1974-),女,辽宁沈阳人,黄河科技学院讲师,博士,主要从事天然产物活性筛选和相
关机理研究,E-mail: liyanli0921@163.com.

1.3.2 动物实验

1.3.2.1 热应激实验

将小鼠随机分成空白组、对照组(生理盐水)和褐藻寡糖给药组(用生理盐水溶解褐藻寡糖,灌胃剂量分别为 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $1200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组 10 只.连续灌胃给药 4 周后,取对照组和实验组小鼠分别编号,放入 $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的环境中,观察并记录应激前后体重的变化和存活时间.

1.3.2.2 甲状腺指数计算

待热应激小鼠死亡后,常规手术取出甲状腺(空白组和对照组小鼠麻醉后取出甲状腺),称质量并计算其指数.空白组为正常小鼠,作甲状腺指数和形态学对照.指数 = (脏器质量/体质量) $\times 1000$.

1.3.2.3 甲状腺的形态学观察

将上步骤的甲状腺进行常规石蜡切片,切片厚度 $6 \sim 8 \mu\text{m}$,HE 染色,Moticam 1300 数码显微摄影系统拍照.

1.4 数据处理

实验数据用 SPSS16.0 统计软件包进行统计处理,各组之间的差异性采用单因素方差分析(One Way ANOVA)和 Tukey's 多重比较,文中数据以平均值 \pm 标准误差表示(mean \pm SE), $P < 0.05$ 即认为差异显著.

2 结果

2.1 褐藻寡糖对小鼠抗热应激的影响

褐藻寡糖对小鼠抗热应激的影响如图 1 所示.由图可知,中剂量褐藻寡糖能够显著提高小鼠的抗热应激能力,存活时间延长($P < 0.05$).其他各组未表现出明显的抗热应激能力,且高剂量褐藻寡糖使小鼠抗热应激能力下降.应激后各组小鼠体重均低于应激前,但各组间没有显著性差异($P > 0.05$).应激前给予褐藻寡糖,小鼠体重均有增加,说明褐藻寡糖能够促进小鼠生长发育,提高小鼠体重.应激后各组小鼠体重均低于应激前,如图 2 所示.

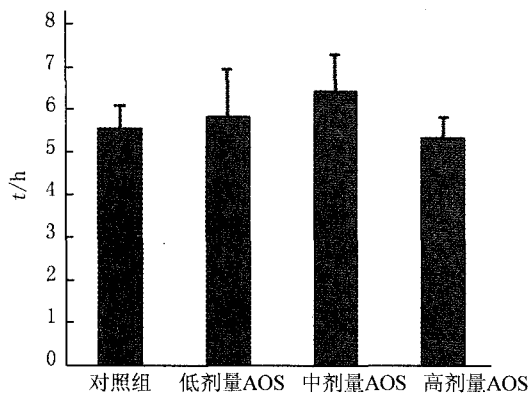


图1 褐藻寡糖对小鼠抗热应激能力的影响

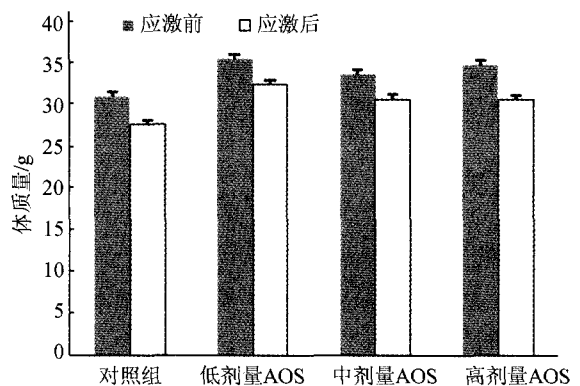


图2 褐藻寡糖对小鼠热应激前后体重的影响

2.2 褐藻寡糖对小鼠甲状腺指数的影响

褐藻寡糖对热应激小鼠甲状腺的影响见图 3.由图可知,褐藻寡糖能够提高小鼠甲状腺指数.随着褐藻寡糖浓度的升高,热应激小鼠甲状腺指数增加,均与对照组具有显著差异($P < 0.05$),且呈明显剂量关系.我们将热应激小鼠的甲状腺指数和抗热应激的存活时间进行相关性分析,发现二者在一定范围内存在多项式相关(图 4),且相关显著($P < 0.05$).

2.3 褐藻寡糖对热应激小鼠甲状腺形态学的影响

褐藻寡糖对应激后小鼠甲状腺组织学的影响见图 5.由图 5 可以看出,正常甲状腺由不规则的球形或卵圆形、大小不一的滤泡构成.滤泡上皮细胞排列规整,胞核圆形,核仁清楚,滤泡腔内有胶状物质(图 5(a), (A)).

应激后小鼠的甲状腺滤泡在低倍镜下观察略有减小,高倍镜下可见多数滤泡细胞变形,滤泡间界限变得不清晰,囊内胶状物质减少,形成大的空泡;滤泡间细胞密度稀疏(图 5(b),(B)).

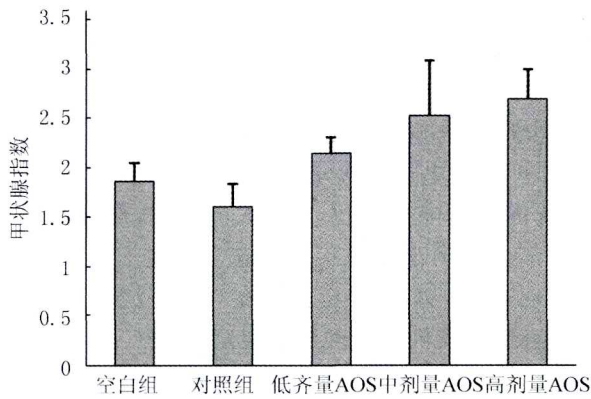


图3 褐藻寡糖对热应激小鼠甲状腺指数的影响

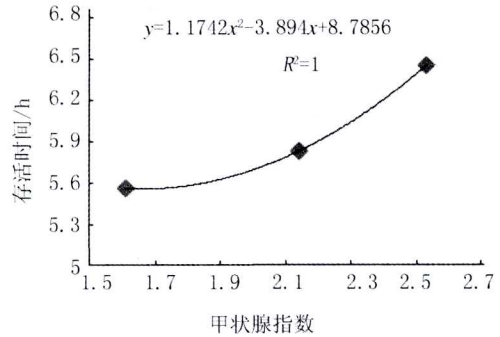
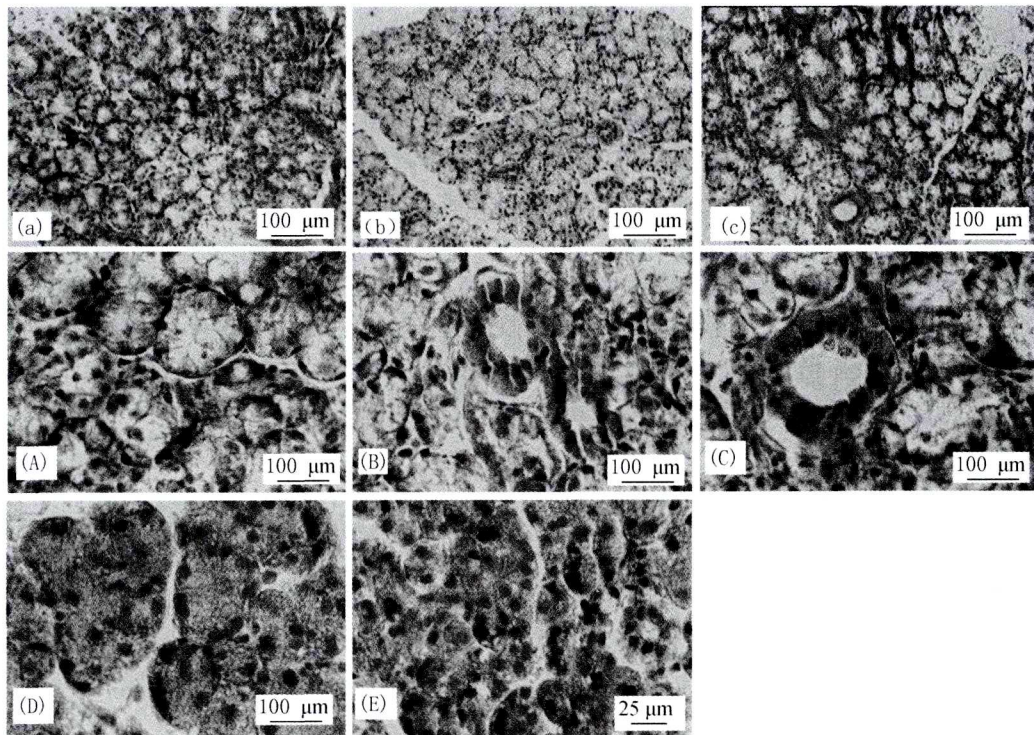


图4 热应激小鼠甲状腺指数和抗热应激相关性

低剂量寡糖组小鼠甲状腺的滤泡明显加大,各滤泡细胞囊壁变宽;上皮细胞密度加大,排列依然规整,核仁变大清晰;囊内胶体稀疏;滤泡间细胞密度减小(图 5(c),(C)).

中剂量寡糖组小鼠甲状腺的滤泡大小与对照组无明显变化,但滤泡形状不规整,核仁明显,上皮细胞密度加大,囊内胶状物质致密度加大,滤泡间细胞密度减小(图 5(D)).

高剂量寡糖组小鼠甲状腺滤泡体积明显变小,形状不规整;上皮细胞体积变小,密度加大,囊内胶体致密.滤泡间细胞密度减小(图 5(E)).



(a),(A) 正常小鼠甲状腺; (b),(B) 热应激小鼠甲状腺;其他,喂饲褐藻寡糖小鼠甲状腺 ((c),(C)300 mg/(kg · d);(D) 600 mg/(kg · d);(E)1200 mg/(kg · d))

图5 褐藻寡糖对热应激小鼠甲状腺的影响

3 讨论

甲状腺是机体非常重要的内分泌器官,在产热调节中发挥重要作用^[11].甲状腺轴、下丘脑-垂体间的集成作用和信号、甲状腺和外周组织的共同作用可调节机体的代谢率,以降低机体暴露于高温环境时的能量利用和热量的产生,维持体内温度的正常化^[12].

热应激属于外环境因素造成的躯体应激,对神经内分泌系统和甲状腺功能有明显影响.持续高热属过度应激.高温应激状态下,机体为使代谢率和产热量降低而抑制了甲状腺的分泌活动.从我们的实验结果来看,热应激下的对照组上皮细胞呈现扁平状,少数立方,滤泡胶质排空明显,形成大的空泡,部分滤泡塌陷,形状不规整.这与肖桃元等人对应激大鼠及张乐萃等人对热应激肉鸡的甲状腺形态学描述一致^[13-14].热应激情况下血浆中甲状腺素 T₃, T₄ 含量显著降低^[15],抑制体内代谢功能,维持机体在高温环境下的产热与散热平衡.随着应激时间的延长,机体代偿反应不足以克服应对,造成机体严重损害甚至死亡.

糖类物质作为大分子物质在提高机体抗热应激能力方面已有报道,如苜蓿多糖可促进热应激兔子的生长和抗氧化能力的增加,三七多糖可提高秀丽隐杆线虫的抗热应激能力等^[16-17].而褐藻寡糖为海洋性功能寡糖,研究表明其具有增强机体免疫活性能力^[9, 18].非应激状态下灌胃褐藻寡糖,小鼠体重与对照组相比均有增加,说明褐藻寡糖可促进小鼠生长发育,可能与其促进甲状腺功能,使甲状腺素进一步促进蛋白质合成而增加体重有关.热应激后,褐藻寡糖组小鼠存活时间高于对照组,且其甲状腺的重量和系数明显高于对照组,说明褐藻寡糖可在一定程度上提高小鼠的抗热应激能力,且褐藻寡糖对热应激小鼠抗应激能力的提高与甲状腺系数的增加存在显著相关.随着褐藻寡糖浓度的增加,热应激小鼠的抗应激能力和甲状腺系数同步增加.

从形态学结果来看,甲状腺形态学的改变与其指数变化相对应.对照组热应激后甲状腺皮质呈现部分滤泡细胞变形,甚至塌陷,上皮扁平,少数立方,囊内胶状物质减少,形成大的空泡;滤泡间细胞密度稀疏等,这与刘凤华等人在鸡上的研究结果相似^[19].热应激使甲状腺体积变小,甲状腺分泌减少, T₃, T₄ 减少,从而降低体内的代谢,减少体热的产生,以增加机体对炎热环境的适应.给予低剂量寡糖的小鼠甲状腺滤泡明显加大,但囊内胶状物质稀疏;给予中和高剂量寡糖的小鼠甲状腺的滤泡大小与对照组无明显变化,但囊内胶状物质致密度加大,滤泡胶质排空或塌陷现象明显得到改善.随着寡糖浓度升高,甲状腺皮质细胞核仁清晰,滤泡上皮细胞密度增大,细胞增殖.这与王钰等^[20]研究的补铬使热应激鸡甲状腺组织结构呈功能旺盛状态的结果相似.

甲状腺形态学的变化进一步表明,褐藻寡糖通过甲状腺参与了小鼠的热应激,提高了抗热应激能力.可能是高温刺激小鼠大脑皮层抑制促甲状腺激素(TSH)的分泌,而降低 T₃, T₄ 的释放水平,进而使甲状腺指数增大,滤泡囊腔内胶状物质增加^[5, 19],从而降低体内的基础代谢以维持产热和散热的平衡.同时,缓解了热应激造成的损伤,维持了内环境的稳定.这与金灵等^[5]的研究结果相一致.

4 结论

本研究通过考察褐藻寡糖干预的小鼠在热应激条件下的存活时间和甲状腺形态学特征,研究褐藻寡糖对小鼠热应激及热应激小鼠甲状腺的影响.研究表明,褐藻寡糖可增强小鼠的抗热应激能力,以中等剂量(600 mg · kg⁻¹ · d⁻¹)效果最佳,甲状腺也参与了热应激反应.

参 考 文 献

- [1] 周绪霞,徐 璠,丁玉庭.酶解制备褐藻胶寡糖及其产物的抗氧化活性分析[J].食品与发酵工业,2014,40(2):116-120.
- [2] Yoshiko Iwamoto, Xu Xu, Tadashi Tamura, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytosine production in human mononuclear cells[J]. Biosci Biotech Biochem, 2003, 67(2): 258-263.
- [3] Hu Xiao-ke, Jiang Xiao-lu. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their sulphated substitution derivatives[J]. European Journal of Phycology, 2004, 39(1): 67-71.
- [4] Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, et al. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine

- production from RAW264.7 cells[J]. FEBS Letters, 2005, 579: 4423-4429.
- [5] 金灵, 杨琳. 家禽热应激机制研究进展[J]. 饲料研究, 2010(2): 25-27.
- [6] 张学英, 艾洪滨, 孙西寨. 应激性对动物免疫功能影响的研究进展[J]. 生物学通报, 2003, 38(10): 9-10.
- [7] 文效梅, 安立龙, 杜立旺, 等. 中药添加剂降低蛋鸡热应激的机制[J]. 家畜生态, 2003, 24(2): 14-18.
- [8] 凌宝明, 瞿明仁, 卢德勋. 功能性寡糖的免疫学功能及其作用机理[J]. 广东饲料, 2005(1): 29-30.
- [9] 霍圃宇, 潘金露, 韩雨哲. 藻酸寡糖对大菱鲆幼鱼生长性能、血液学指标及非特异性免疫影响[J]. 中国海洋大学学报, 2015, 35(4): 10-15.
- [10] 佟哲, 王雪, 卜宁, 等. 褐藻寡糖对热应激小鼠肝脏和胰腺的影响[J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版), 2007, 4: 487-489.
- [11] Silva J E. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation[J]. Physiological Reviews, 2006, 86: 435-64.
- [12] Baumgard L H, Rhoads R P. Ruminant production and metabolic response to heat stress[J]. J Animal Science, 2012, 90: 1855-65.
- [13] 肖桃元, 可金星, 艾国平, 等. 创伤应激大鼠甲状腺肾上腺皮质形态学研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1130-1132.
- [14] 张乐萃, 王述柏, 单虎, 等. 抗应激添加剂对热应激肉鸡甲状腺和肾上腺组织结构的影响[J]. 饲料研究, 1998(5): 1-2.
- [15] 李舍予, 李佳. 应激对血浆甲状腺激素水平的影响[J]. 四川生理科学杂志 2007, 29(4): 176-178.
- [16] Hua Wei Liu, Xiao Fang Dong, Jian Ming Tong, et al. Alfalfa polysaccharides improve the growth performance and antioxidant status of heat-stressed rabbits[J]. Livestock Science, 2010, 131: 88-99.
- [17] Shiling Feng, Haoran Cheng, Zhou Xu, et al. Thermal stress resistance and aging effects of Panax notoginseng polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 81: 188-194.
- [18] 刘美思, 程立坤, 罗希, 等. 两种海洋寡糖对仿刺参免疫活性的影响[J]. 海洋渔业, 2016, 38(1): 51-56.
- [19] 刘风华, 谢仲权, 孙朝龙, 等. 高温对蛋鸡血液理化指标及生产性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 1997, 33(5): 23-25.
- [20] 王珏, 郑艺梅, 李升和, 等. 补络对热应激蛋鸡甲状腺组织结构的影响[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(6): 29-33.

Effect of Alginate Oligosaccharide on Anti-heat Stress Ability and Thyroid Gland of Mice

LI Liyan^a, LAN Chong^b, MAO Yang^b, HAO Hongying^a

(a. Medical School; b. Institute of Nano-Structured Functional Materials, Huanghe Science & Technology College, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: The effects of alginate oligosaccharides on anti-heat stress ability of mice and thyroid gland of heat stressed mice were investigated in this research. After being divided into one control group and three experiment groups randomly ($n=10$), the mice were administrated by gavage with saline solution and dose of 300, 600 and 1200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ alginate oligosaccharides per day for four weeks, respectively. Later, heat stress experiment was carried out at $45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, and the weight and survival time before and after treated with heat stress were studied. After death, the thyroid glands of the mice were took out and weighted to calculate their index. The thyroid glands were made into paraffin sections and stained by HE methods. The results showed that the body weight of heat stressed mice decreased, but the difference was not significant ($P>0.05$). Survival time of 600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ alginate oligosaccharide group increased significantly than that of control group ($P<0.05$). Thyroid gland coefficient increased following with the increase of alginate oligosaccharide concentration, and which is significantly correlated with anti-heat stress survival time. Characteristics of histology on thyroid also changed. The results suggest that alginate oligosaccharides improved anti-heat stress ability of mice and dose at 600 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ as the optimal concentration. The thyroid gland involved in the heat stress response.

Keywords: alginate oligosaccharide; mouse; heat stress; thyroid gland