

# 褪黑素在有氧运动改善自发性高血压大鼠血压和肠系膜动脉功能中的作用

邱方, 熊开宇, 石丽君

(北京体育大学运动生理教研室, 北京市 100084)

[关键词] 有氧运动; 褪黑素; 自发性高血压大鼠; 血压; 肠系膜动脉

[摘要] **目的** 探讨褪黑素在有氧运动改善自发性高血压大鼠(SHR)血压和肠系膜动脉功能中的作用。**方法** 选用12周龄雄性SHR 54只和Wistar-Kyoto(WKY)大鼠(WKY组,即正常血压对照组)18只。SHR随机分为5个组,即安静空白对照组(SHR-SED组,  $n=18$ )、安静生理盐水注射组(SHR-SED+NS组,  $n=6$ )、安静褪黑素受体阻断剂2-苯基-N-乙酰色胺(Luz)[1 mg/(kg·d)]注射组(SHR-SED+Luz组,  $n=6$ )、有氧运动组(SHR-EX组,  $n=18$ )、有氧运动Luz注射组(SHR-EX+Luz组,  $n=6$ )。运动组进行8周有氧训练:坡度0°, 18~20 m/min, 每天60 min, 每周5天。8周有氧运动后,采用尾动脉无创法测量大鼠血压与心率;WKY组、SHR-SED组、SHR-EX组采用ELISA竞争法测定血清褪黑素水平;离体微血管环实验测定二、三级肠系膜动脉的舒缩特性。**结果** (1)8周有氧运动后,SHR-EX组的收缩压、舒张压、平均动脉压和心率与SHR-SED组相比显著降低。SHR-EX+Luz组的收缩压、心率明显高于SHR-EX组,却低于SHR-SED+Luz组;而SHR-SED组与SHR-SED+NS组、SHR-SED+Luz组比较无差异。(2)WKY组和SHR-SED组血清褪黑素浓度在21:00~22:00时最高,明显高于12:00~13:00和8:00~9:00;但SHR-EX组在8:00~9:00最高。在3个时间段内,WKY组血清褪黑素浓度始终显著高于SHR-SED组;但在8:00~9:00时间段,SHR-EX组明显高于WKY组、SHR-SED组。(3)微血管环在去甲肾上腺素( $10^{-5}$  mol/L)预收缩后,对褪黑素( $10^{-6}$ ~ $10^{-3}$  mol/L)呈浓度依赖性舒张反应, $pIC_{50}$ 值:WKY组>SHR-EX组>SHR-SED组,且各组无N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯的内皮完整血管舒张幅度大于有N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯( $10^{-4}$  mol/L)的内皮不完整血管;Luz( $2 \times 10^{-6}$  mol/L)预孵育微血管环20 min,可部分阻断褪黑素的舒张作用。**结论** 有氧运动可降低SHR的收缩压和心率,增强肠系膜动脉舒张作用,其中褪黑素发挥了重要作用。

[中图分类号] R331.3<sup>+</sup>2

[文献标识码] A

## The Role of Melatonin in the Improvement of Blood Pressure and Mesenteric Artery Function Induced by Aerobic Exercise in Spontaneously Hypertensive Rats

QIU Fang, XIONG Kai-Yu, and SHI Li-Jun

(Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] Aerobic Exercise; Melatonin; Spontaneously Hypertensive Rat; Blood Pressure; Mesenteric Artery

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of melatonin in the improvement of blood pressure and mesenteric arterial function induced by aerobic exercise in spontaneously hypertensive rat (SHR). **Methods** A total of 72 twelve-week-old male rats were used in the experiments. A group of normotensive WKY rats ( $n=18$ ) was used as normal blood pressure control group (WKY group). 54 SHRs were separated into five groups: SHR sedentary control group (SHR-SED,  $n=18$ ), SHR sedentary with normal saline injection group (SHR-SED+NS,  $n=6$ ), SHR sedentary with melatonin receptor blocker luzindole (Luz) injection group (SHR-SED+Luz,  $n=6$ ), SHR aerobic exercise group (SHR-EX,  $n=18$ ), and SHR aerobic exercise with Luz injection group (SHR-EX+Luz,  $n=6$ ). Luz was injected 1 mg/(kg·d) in-

[收稿日期] 2015-01-04

[修回日期] 2015-02-08

[基金项目] 国家自然科学基金(31371201);北京市自然科学基金(5132017);新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0850)

[作者简介] 邱方,硕士研究生,研究方向为运动与心血管生理学,E-mail为870325194@qq.com。熊开宇,教授,博士研究生导师,研究方向为运动过程生物电变化规律。通讯作者石丽君,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事运动与心脑血管功能调控相关研究,E-mail为L\_j\_shi72@163.com。

traperitoneally. Rats in the aerobic exercise groups were subjected with 8 weeks-treadmill exercise: 0° slope, 18 ~ 20 m/min, 60 min each day, 5 days each week. Blood pressure and heart rate (HR) of awake animals were measured by using tail-cuff method before the beginning of the exercise training protocol and at the end of the protocol. Serum melatonin level was examined by ELISA with commercially available kits. The mechanical properties of small mesenteric arteries were studied with vascular ring experiment in vitro.

**Results** (1) After exercise training for 8 weeks, systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure, mean arterial pressure and HR were significantly lower in SHR-EX group than those in SHR-SED group. SBP and HR in SHR-EX + Luz group were greater compared to SHR-EX group. However, there were no significant differences of SBP and HR between SHR-SED group and SHR-SED + NS group, SHR-SED + Luz group. (2) The serum melatonin levels in WKY group and SHR-SED group reached peak level at 21:00 ~ 22:00, and were significantly higher than those at 12:00 ~ 13:00 and 8:00 ~ 9:00. However, it reached the peak level at 8:00 ~ 9:00 in SHR-EX group. In these three time periods of day, serum melatonin concentration in WKY group was always significantly higher than that in SHR-SED group; But it was significantly higher at 8:00 ~ 9:00 in SHR-EX group than those in WKY group and SHR-SED group. (3) Melatonin ( $10^{-6} \sim 10^{-3}$  mol/L) caused a concentration-dependent relaxation in small mesenteric arterial beds precontracted by norepinephrine ( $10^{-5}$  mol/L), with pIC<sub>50</sub> value: WKY group > SHR-EX group > SHR-SED group. In the presence of L-nitro-arginine-methyl ester (L-NAME) (eNOS inhibitor), the pIC<sub>50</sub> of the concentration-response curve for melatonin-induced relaxation was lower than that in the absence of L-NAME in both SHR and WKY rats. The relaxation of melatonin was partly blocked by Luz ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L).

**Conclusion** Aerobic exercise can reduce SBP and HR of SHR, and enhance mesenteric artery vasodilation, in which melatonin plays an important role.

近年来,心血管疾病的发病率和死亡率呈现明显的上升趋势,高血压是最常见的心血管疾病之一,它既可以造成心、脑、肾等重要脏器的严重损害,又是动脉粥样硬化的危险因素,其病因尚未十分明确。高血压时由于血压长期异常升高,可使血管壁因受到压力作用而改变,血管发生一系列适应性的结构和功能的改变,称为血管重塑(vascular remodeling, VR)。VR既是高血压病重要的早期病理变化,又是高血压维持、恶化的结构基础。高血压 VR 包括动脉形态结构和功能特性的改变<sup>[1]</sup>。高血压时血管结构的改变主要表现为血管平滑肌细胞增殖、肥大及结缔组织含量增加等,造成血管壁增厚,特别是中层肥厚,血管壁与腔之间的比例明显加大,血流阻力和血管反应性增加。血管功能也发生变化,主要表现在大动脉的顺应性降低,扩张性减退,引起收缩压增加,后负荷增大和心室肥厚,血管反应性增强,体现在增加内皮收缩因子释放,增强血管对神经激素的收缩反应以及减弱血管对缺血、代谢产物的舒张反应<sup>[2]</sup>。目前,高血压伴发的血管结构及功能的改变是心血管及其他相关领域研究的热点。

许多研究表明,适当运动可以改善心血管功能,诱导心血管形态结构与功能的重塑,调节血压,从而降低心血管事件的发生<sup>[3]</sup>。研究发现,运动时的剪切力可以激活内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS),增加内皮一氧化氮(nitric oxide, NO)生成,从而增强血管内皮依赖性舒张功能<sup>[4]</sup>。除了内皮依赖的机制,Shi 等<sup>[5]</sup>研究表明,血管平滑肌细胞的钾离子通道在运动增强血管舒

张中起到作用。褪黑素(melatonin, MT)可影响心血管系统,具有抗高血压、调节血脂代谢、抗心肌细胞损伤及保护血管内皮的作用<sup>[6]</sup>。MT 在心血管稳态中的作用是通过调节血管直径,从而影响动脉血压和局部器官和组织的血流量。此外,循环的 MT 水平的改变与多种心血管疾病有关,包括高血压、局部缺血性心脏疾病、心肌梗死和心脏衰竭<sup>[7]</sup>。因此,本研究以正常 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠与自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)为实验对象,采用无创尾动脉血压监控,结合酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和离体微血管环实验,探讨有氧运动对整体心血管反应性的影响及有氧运动对肠系膜动脉反应性的影响,并探寻 MT 在其中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

12 周龄雄性 SHR 54 只, Wistar-Kyoto(WKY)鼠 18 只(正常血压对照组, WKY 组),由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。将 SHR 随机分为 5 个组:安静(sedentary, SED)空白对照组(SHR-SED 组,  $n = 18$ )、安静生理盐水(normal saline, NS)注射组(SHR-SED + NS 组,  $n = 6$ )、安静褪黑素受体阻断剂 2-苯基-N-乙酰色胺(luzindole, Luz) [1 mg/(kg · d)]注射组(SHR-SED + Luz 组,  $n = 6$ )、有氧运动(exercise)组(SHR-EX 组,  $n = 18$ )、有氧运动 Luz 注射组(SHR-EX + Luz 组,  $n = 6$ )。Luz 注射剂

量的选择主要依据 Rezzani 等<sup>[8]</sup>的研究结果。用国家标准啮齿类动物饲料,分笼饲养,自由饮食,温度维持在 22~24℃,相对湿度 40%~60%,昼夜节律人工控制光照(光照时间为 6:00~18:00)<sup>[9]</sup>。

## 1.2 运动方案

大鼠先进行 1 周适应性训练,之后,SHR-EX 组和 SHR-EX + Luz 组再进行 8 周跑台运动训练;运动方案:跑台坡度 0°,18~20 m/min,55%~65% VO<sub>2</sub>max[VO<sub>2</sub>max:最大摄氧量(maximal oxygen uptake)],每天 60 min,每周 5 天。SHR 各安静组和 WKY 组不进行运动干预。

## 1.3 主要药物及溶液配制

褪黑素试剂盒购自德国 IBL 公司,戊巴比妥钠、MT、Luz、去甲肾上腺素(norepinephrine,NE)、N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯(L-nitro-arginine-methyl ester,L-NAME)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(hydroxyethyl piperazine ethanesulfonic acid,HEPES)、乙酰胆碱(acetylcholine,ACh)均购自美国 Sigma 公司,NaCl、KCl、MgCl<sub>2</sub>、葡萄糖、NaHCO<sub>3</sub>等购自北京化学试剂公司。Na-HEPES 缓冲液成分(mmol/L):121.1 NaCl、10 HEPES、5.16 KCl、2.4 MgSO<sub>4</sub>、11.08 葡萄糖、2 CaCl<sub>2</sub>,持续充氧(95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>),pH 7.4。

## 1.4 大鼠基础血压和心率测定

WKY 组、SHR-SED 组、SHR-SED + NS 组、SHR-SED + Luz 组、SHR-EX 组、SHR-EX + Luz 组各选取 6 只大鼠,在安静、清醒状态下,在上午 10:00~12:00 点时间段内,使用智能无创血压计(鼠仪 BP-2010A)通过检测大鼠尾动脉的血流,测定大鼠的基础血压:收缩压(systolic blood pressure,SBP)、舒张压(diastolic blood pressure,DBP)及平均动脉压(mean arterial pressure,MAP),及心率(heart rate,HR)。具体步骤:连接仪器,将大鼠放入鼠袋固定后,把加压传感器置于尾根处,大鼠稳定 5 min 后,开始测量,每只大鼠测定 3~5 次,取平均值。

## 1.5 大鼠血清内源性褪黑素水平测定

WKY 组、SHR-SED 组、SHR-EX 组各选取 18 只大鼠,使用 ELISA 法测定血清内源性 MT 水平。大鼠腹腔麻醉(50 mg/kg 戊巴比妥钠)后,迅速打开腹腔,刺破大鼠肝门静脉、肠系膜静脉取血,离心,取血清样品,-20℃保存。用褪黑素试剂盒测定血清内源性 MT 水平。具体步骤:先使用试剂盒提供的提取柱提取样品、标准品和质控品,将其加入到微孔中,每一微孔再依次加入 50  $\mu$ L 褪黑素生物素、50  $\mu$ L 褪黑素抗血清,2~8℃下温育 14~20 h,洗板 3 次,然后加入 150  $\mu$ L 临时配置好的酶联物,室温(18~25℃)下轨

道振荡器上(500 r/min)温育 120 min,洗板,用 8 道移液器加入 200  $\mu$ L PNPP(对硝基酚磷酸盐)底物液,温育 20~40 min,再加入 50  $\mu$ L PNPP 终止液,轻轻震板以使溶液混合均匀。在 1 h 内使用 Tecan Sunrise 酶标仪在 405 nm 处读取 OD 值(参考波长:600~650 nm),血清 MT 水平结果使用 ng/L 表示。

## 1.6 离体血管环制备及张力测定

WKY 组、SHR-SED 组、SHR-EX 组各选取 6 只大鼠,进行二、三级肠系膜动脉血管环张力测定。大鼠腹腔麻醉后断头处死,迅速打开腹腔取肠系膜动脉,置于含有 4℃ Krebs 缓冲液的平皿中,用大针头固定动脉主干和肠管,在体视显微镜下找到二、三级动脉,剔去血管周围的脂肪组织,剪取多段约 2 mm 的血管环。血管环用两根直径 40  $\mu$ m 的钨丝固定在 DMT(Danish Myo Technology 公司,丹麦)浴槽中,一端固定在微调标尺上,以调节微血管静息张力,另一端与张力换能器相连,浴槽内为 pH 值 7.4、37℃的 Na-HEPES 缓冲液 5 mL,并向浴液内持续通以 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>,平衡 10 min,使血管基础张力维持在 1 mN 左右。

血管环的张力变化通过 DMT 换能系统采集,并用 LabChart 7.3.7 生物信号采集分析软件记录。检测微动脉血管环在离体状态下对血管活性物质的反应性:在正式实验开始之前,血管张力稳定后,以 60 mmol/L KCl 刺激血管收缩,若净收缩幅度超过 1 mN,认为该血管环活性良好,可开始正式实验;肠系膜动脉管环加药方式:在内皮完整和内皮不完整血管环,先加入 NE(10<sup>-5</sup> mol/L)预收缩,达到平台稳定后,再加入 MT(10<sup>-6</sup>~10<sup>-3</sup> mol/L)或 ACh(10<sup>-6</sup> mol/L);观察 MT1/MT2 选择性受体阻断剂 Luz 对 MT 血管反应性的影响:在 NE 预收缩前,提前加入 Luz(2 $\times$ 10<sup>-6</sup> mol/L)孵育 20 min,再加入 MT(10<sup>-6</sup>~10<sup>-3</sup> mol/L);微血管环通过提前加入一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME(10<sup>-4</sup> mol/L)孵育 20 min 破坏内皮功能。观察各组血管张力及反应性的变化。

## 1.7 统计学分析

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 19.0、GraphPad Prism 5 进行数据统计分析,采用单因素方差分析(ANOVA)以及独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为有显著性差异,*P*<0.01 为有非常显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 有氧运动和 Luz 对 SHR 血压、心率和体重的影响

有氧运动开始前,SHR 的安静 SBP、DBP、MAP 及

HR 均明显高于 WKY 组 ( $P < 0.05$ ), 体重无明显差异。8 周有氧运动结束后, SHR 的 SBP、DBP、MAP 和 HR 仍显著高于 WKY 组 ( $P < 0.05$ ), 且 SHR-SED 组明显高于 SHR-EX 组、SHR-EX + Luz 组 ( $P < 0.05$ ), SHR-SED 组与 SHR-SED + NS 组、SHR-SED + Luz 组无差异, SHR-EX + Luz 组的 SBP、HR 明显低于 SHR-SED + Luz 组, 却高于 SHR-EX 组 ( $P < 0.05$ ); 有氧运

动后 SHR-EX 组体重明显低于 SHR-SED 组 ( $P < 0.05$ )。与同组 12 周龄比较, WKY 组、SHR-EX + Luz 组 21 周龄的 SBP、DBP、HR、体重均无差异; SHR-SED 组、SHR-SED + NS 组、SHR-SED + Luz 组 21 周龄的 SBP、DBP、HR 均高于 12 周龄 ( $P < 0.05$ ), 体重无差异; 而 SHR-EX 组 21 周龄的 SBP、DBP、HR、体重明显低于 12 周龄 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表 1. 有氧运动和 Luz 对大鼠血压、心率和体重的影响 ( $n = 6$ )

Table 1. Effect of aerobic exercise and luzindole on the rats blood pressure, heart rate and body weight ( $n = 6$ )

分组	大鼠周龄	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)	平均动脉压(mmHg)	心率(次/分)	体重(g)
WKY 组	12 周	142.7 ± 4.3	109.0 ± 2.1	120.3 ± 2.7	314 ± 3	329.3 ± 10.9
	21 周	142.7 ± 3.1	103.2 ± 6.7	116.3 ± 5.2	314 ± 7	330.3 ± 6.5
SHR-SED 组	12 周	215.7 ± 4.9 <sup>a</sup>	152.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	173.7 ± 3.8 <sup>a</sup>	340 ± 8 <sup>a</sup>	331.7 ± 7.7
	21 周	220.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	174.3 ± 4.8 <sup>bf</sup>	189.8 ± 3.3 <sup>bf</sup>	394 ± 8 <sup>bf</sup>	334.7 ± 1.8
SHR-SED + NS 组	12 周	211.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	153.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	168.9 ± 4.1 <sup>a</sup>	393 ± 6 <sup>a</sup>	331.6 ± 1.6
	21 周	221.3 ± 1.5 <sup>bf</sup>	173.8 ± 4.2 <sup>bf</sup>	188.9 ± 3.1 <sup>bf</sup>	391 ± 7 <sup>b</sup>	333.6 ± 1.5
SHR-SED + Luz 组	12 周	211.3 ± 3.1 <sup>a</sup>	147.8 ± 8.6 <sup>a</sup>	168.8 ± 5.4 <sup>a</sup>	327 ± 8	321.3 ± 3.3
	21 周	224.0 ± 2.2 <sup>bf</sup>	172.3 ± 5.9 <sup>bf</sup>	189.5 ± 4.4 <sup>b</sup>	393 ± 4 <sup>bf</sup>	336.2 ± 3.3 <sup>f</sup>
SHR-EX 组	12 周	222.7 ± 9.2 <sup>a</sup>	158.7 ± 9.8 <sup>a</sup>	180.3 ± 3.9 <sup>a</sup>	347 ± 4 <sup>a</sup>	330.0 ± 3.2
	21 周	192.7 ± 1.5 <sup>bcd</sup>	144.8 ± 2.9 <sup>bcd</sup>	160.8 ± 1.8 <sup>bcd</sup>	316 ± 6 <sup>cd</sup>	312.1 ± 3.3 <sup>cf</sup>
SHR-EX + Luz 组	12 周	216.8 ± 11.2 <sup>a</sup>	168.0 ± 2.8 <sup>a</sup>	184.3 ± 5.3 <sup>a</sup>	339 ± 8 <sup>a</sup>	323.0 ± 3.2
	21 周	205.5 ± 1.0 <sup>bcd</sup>	156.0 ± 6.2 <sup>b</sup>	172.5 ± 4.2 <sup>bc</sup>	346 ± 8 <sup>bcd</sup>	318.3 ± 4.7

12 周龄为小鼠有氧运动训练开始前, 21 周龄为有氧运动结束后。a 为  $P < 0.05$ , 与 WKY 组 12 周龄比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 WKY 组 21 周龄比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 SHR-SED 组 21 周龄比较; d 为  $P < 0.05$ , 与 SHR-SED + Luz 组 21 周龄比较; e 为  $P < 0.05$ , 与 SHR-EX 组 21 周龄比较; f 为  $P < 0.05$ , 与同组 12 周龄比较。

## 2.2 有氧运动对 SHR 血清内源性褪黑素水平的影响

WKY 组血清 MT 浓度在 21:00 ~ 22:00 时最高, 中午 12:00 ~ 13:00 明显高于早上 8:00 ~ 9:00 ( $P < 0.05$ ); SHR-SED 组晚上、中午明显高于早上 ( $P < 0.05$ ); SHR-EX 组在 8:00 ~ 9:00 时最高, 明显

高于 12:00 ~ 13:00 和 21:00 ~ 22:00 ( $P < 0.05$ ; 图 1)。在 3 个时间段内, SHR-SED 组血清 MT 浓度始终显著低于 WKY 组 ( $P < 0.05$ ); 在早上 8:00 ~ 9:00 时间内, SHR-EX 组明显高于 WKY 组、SHR-SED 组, 而在中午、晚上与 SHR-SED 组无显著差异, 但显著低于 WKY 组 ( $P < 0.05$ ; 图 1)。

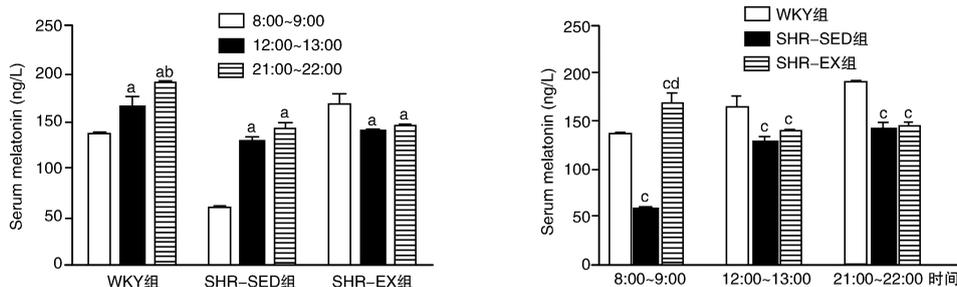


图 1. 大鼠血清内源性褪黑素水平 ( $n = 6$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与 8:00 ~ 9:00 比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 12:00 ~ 13:00 比较; c 为  $P < 0.05$ , 与 WKY 组比较; d 为  $P < 0.05$ , 与 SHR-SED 组比较。

Figure 1. Serum endogenous melatonin levels in rats ( $n = 6$ )

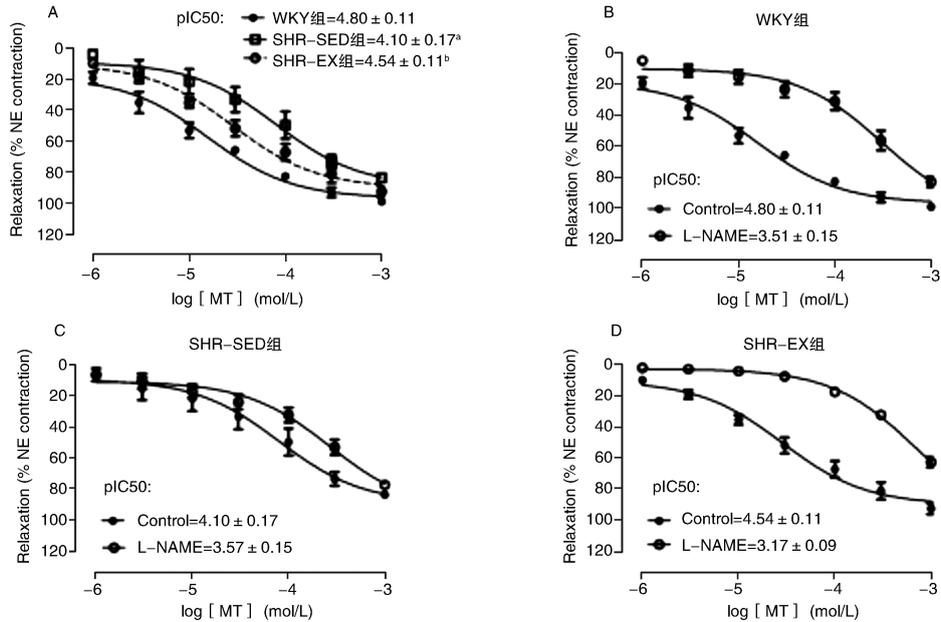
## 2.3 有氧运动对 SHR 肠系膜动脉血管反应性的影响

2.3.1 有氧运动对 MT 诱导的肠系膜动脉舒张反应的影响 在  $10^{-5}$  mol/L NE 引起血管收缩达到

最大后, MT ( $10^{-6} \sim 10^{-3}$  mol/L) 可以诱导血管呈浓度依赖性舒张。与 WKY 组 ( $pIC_{50}$  为  $4.80 \pm 0.11$ ) 相比, SHR-SED 组 ( $pIC_{50}$  为  $4.10 \pm 0.17$ ) 血管舒张反应明显降低, 即对药物敏感性明显减弱 ( $P <$

0.05),但在运动后血管对 MT 的敏感性增加 (SHR-EX 组  $pIC_{50}$  为  $4.54 \pm 0.11$ ) (图 2A)。MT 诱导的各组肠系膜动脉舒张反应:与无 L-NAME 的内皮完整血管 (Control) 相比,有 L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L) 的

内皮不完整血管 (L-NAME) 的舒张反应明显下降,且 SHR-SED 组的下降幅度明显低于 WKY 组和 SHR-EX 组 (图 2B、C、D)。

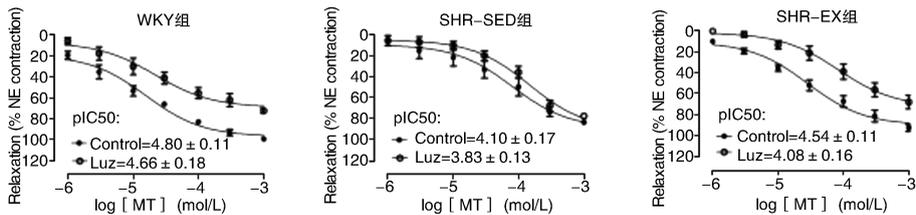


**图 2. MT 诱发的肠系膜动脉舒张的剂量-反应曲线 ( $n=6$ )** A 为内皮完整的微血管环对 MT ( $10^{-6} \sim 10^{-3}$  mol/L) 的舒张反应; B、C、D 分别为 WKY 组、SHR-SED 组、SHR-EX 组肠系膜动脉环之无 L-NAME 的内皮完整血管 (Control) 和有 L-NAME ( $10^{-4}$  mol/L) 的内皮不完整血管 (L-NAME) 对 MT 的舒张反应。pIC<sub>50</sub> 为药物达到 50% 抑制效果时的平均有效浓度的负对数, 主要反映血管对药物的敏感性。% NE 收缩 (% NE contraction) 表示以  $10^{-5}$  mol/L NE 引起的血管预收缩作为 100% 的最大反应。a 为  $P < 0.05$ , 与 WKY 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 SHR-SED 组比较。

**Figure 2. The dose-response curve of MT-induced mesenteric arterial relaxation ( $n=6$ )**

2.3.2 有氧运动对 Luz 抑制 MT 诱导的血管舒张反应的影响 MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> 非选择性拮抗剂 Luz ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) 可部分抑制 MT 所诱导的肠系膜动脉的舒张反应。在  $10^{-5}$  mol/L NE 预收缩前, 先加入 Luz ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) 预孵育血管 20 min, 再加入 MT ( $10^{-6} \sim 10^{-3}$  mol/L) 诱导血管舒张。与 Control 对

比, 提前孵育 Luz 的 MT 诱导的各组肠系膜动脉舒张反应均出现降低, 即对药物敏感性降低, 且 SHR-SED 组的下降幅度明显低于 WKY 组和 SHR-EX 组 (图 3)。此结果提示, 有氧运动后, MT 舒张血管作用的贡献率增加。



**图 3. Luz 对 MT 诱导的血管舒张反应的影响 ( $n=6$ )**

**Figure 3. Effect of luzindole on the MT-induced mesenteric arterial relaxation ( $n=6$ )**

2.3.3 Luz 和 MT 对 ACh 诱导的血管舒张反应的影响 先加入  $10^{-4}$  mol/L MT 孵育 20 min, 再加入 NE 预收缩, 当达到最大收缩稳定时, 加入  $10^{-6}$  mol/L ACh 诱发血管的舒张反应。与 WKY 组相比, SHR-

SED 组血管舒张反应显著降低 ( $P < 0.05$ ), 但在运动后 SHR-EX 组血管对 ACh 舒张反应明显增加。ACh 诱导的各组肠系膜动脉舒张反应, 与 Control 对比, MT 预孵育后, SHR-SED 组出现明显增加 ( $P < 0.05$ ),

但 WKY 组和 SHR-EX 组无明显变化。MT ( $10^{-4}$  mol/L) 孵育 20 min 前, 先加入  $2 \times 10^{-6}$  mol/L Luz 预孵育血管 20 min, 观察 Luz 对 MT 加强血管对 ACh 舒张反应的影响。与 MT 对比, Luz 预孵育后, ACh 诱导各组肠系膜动脉的舒张反应均减弱, SHR-SED 组和 SHR-EX 组下降较明显, 而 WKY 组无明显变化(图 4)。

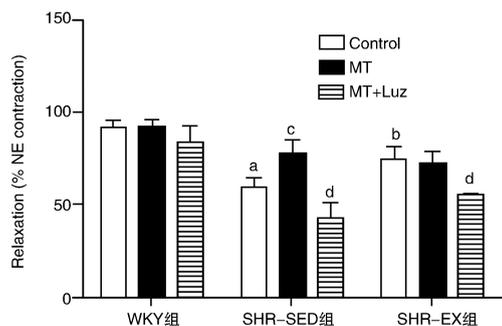


图 4. Luz 对 MT 加强 ACh 诱导的血管舒张反应的影响 ( $n=6$ )  
a 为  $P<0.05$ , 与 WKY 组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 SHR-SED 组比较; c 为  $P<0.05$ , 与同组 Control 比较; d 为  $P<0.05$ , 与同组 MT 比较。

Figure 4. Effect of luzindole on melatonin-induced enhancement of ACh-stimulated relaxation ( $n=6$ )

### 3 讨论

本研究首先采用大鼠尾动脉无创血压监控手段, 从整体水平观察了 8 周规律性有氧运动对大鼠心血管反应的影响; 继而采用 ELISA 竞争法和离体二、三级肠系膜动脉血管环, 从组织器官和分子水平观察了有氧运动对内源性血清 MT 水平及肠系膜动脉功能的影响, 并选用 MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> 非选择性拮抗剂 Luz, 探讨了 MT 在其中的作用。

高血压病是以动脉血压升高为主要表现的一种累及全身系统的慢性疾病, 其血流动力学特征为总外周阻力增加, 病理学改变为血管硬化、弹性减退, 舒缩功能发生改变<sup>[10]</sup>。一般是血管收缩反应增强和/或血管舒张反应减弱。这些改变的核心是 NO 利用率受损继发氧化应激的产生, 从而增加环氧衍生收缩产物<sup>[11]</sup>。以往的研究证实, 经常低强度的运动训练能够防止 SHR 的血压升高<sup>[12]</sup>。Roque 等<sup>[13]</sup>研究表明, 有氧运动可通过减少氧化应激和增加 NO 的生物利用度来改善 SHR 冠状动脉和小肠系膜动脉的内皮功能和血管硬化。

本实验发现, WKY 组和 SHR-SED 组血清 MT 浓度在 21:00 ~ 22:00 时最高, SHR-EX 组在 8:00 ~ 9:00 时最高。WKY 组血清 MT 浓度始终显著高于 SHR-SED 组; 在 8:00 ~ 9:00 时间内, SHR-EX 组明显高于

WKY 组和 SHR-SED 组。目前关于运动后诱导内源性褪黑素升高的机制尚未完全被解释。可能是由于运动改变交感神经系统的活性, 导致昼夜节律变化, 进而影响褪黑素浓度<sup>[14]</sup>。最近研究证实了运动有利于 MT 水平的升高, 而且早上运动后 MT 水平的升高更明显<sup>[14-15]</sup>。Kawashima 等<sup>[16]</sup>研究发现 15 周龄成年 SHR 的血清 MT 浓度明显低于同龄的 WKY 大鼠。还有研究发现 SHR 的内源性血清 MT 浓度在午夜 (23:30 ~ 0:30) 达到最高 ( $202 \pm 31$  ng/L), 明显高于上午 (10:00 ~ 11:00) ( $77 \pm 13$  ng/L) 和下午 (5:30 ~ 6:30) ( $56 \pm 12$  ng/L)<sup>[17]</sup>。这些发现都支持一个假设, MT 分泌紊乱可能导致了高血压发展。

MT 受体拮抗剂 Luz, 可用于判断 MT 的降压作用是否通过 MT 受体所介导的<sup>[8]</sup>。它对 MT<sub>2</sub> 的亲合力是对 MT<sub>1</sub> 亲合力的 15 ~ 26 倍<sup>[8, 18]</sup>。在本实验中, 8 周有氧运动后, SHR-EX 组的 SBP、DBP、MAP 和 HR 与 SHR-SED 组相比显著降低, 且与有氧运动开始前相比, SBP、DBP 和 HR 也显著下降; 这些发现与 Roque<sup>[13]</sup> 等的研究 12 周有氧运动可以降低 SHR 的 SBP 和 HR 相一致。SHR-EX + Luz 组的 SBP 和 HR 明显高于 SHR-EX 组, 而 SHR-SED 组与 SHR-SED + NS 组和 SHR-SED + Luz 组无差异。提示内源性 MT 可能与有氧运动调节血压有关。SHR-SED 组自身内源性 MT 水平低, 作用较弱, 注射 Luz 后血压变化不明显; 而 SHR-EX + Luz 组的 SBP 和 HR 明显高于 SHR-EX 组, 提示可能是由于 SHR-EX 组 MT 水平上升导致血压下降, SHR-EX + Luz 组将 MT 的作用阻断, 故血压高于 SHR-EX 组。这些发现与前人的研究一致。Rezzani 等<sup>[8]</sup> 研究发现, 服用环孢霉素 A 有引起 SBP 升高的副作用, 注射 MT 可降低 SBP, 但 MT 受体被 Luz 阻断后 SBP 将再次升高, 而在对照组, 单独注射 MT 无明显变化, 但单独注射 Luz 后则引起 SBP 升高。

为进一步研究 MT 降压机制, 采用离体血管环实验发现, NE 预收缩后, MT ( $10^{-6}$  ~  $10^{-3}$  mol/L) 诱导肠系膜动脉呈浓度依赖性的舒张反应。WKY 组、SHR-SED 组、SHR-EX 组肠系膜动脉, 加 L-NAME 的内皮不完整血管对 MT 诱导的浓度反应曲线的 pIC<sub>50</sub> 比不加 L-NAME 的内皮完整血管均较低。血管内皮完整时, 舒张反应幅度 WKY 组 > SHR-EX 组 > SHR-SED 组。这提示 MT 舒张反应部分依赖于内皮起作用, 且有氧运动可改善血管舒张反应。内皮被 L-NAME 破坏后 MT 的舒张反应减弱, 说明 MT 可能是加强了内皮依赖性血管舒张反应。MT 可增强 NO 合成酶的活性, 降低氧化应激, 增加 NO 水

平,可刺激 NO 的产生和/或清除自由基,是强的抗氧化剂<sup>[19]</sup>。MT 具有血管内皮依赖性的血管舒张作用和增效 ACh 引起的内皮依赖性的血管舒张<sup>[20]</sup>。内皮去除后,MT 的血管舒张反应将被抑制<sup>[21]</sup>。本实验还发现,SHR-SED 组肠系膜动脉 ACh 的舒张反应明显低于 WKY 组,但 SHR-EX 组的 ACh 舒张反应明显高于 SHR-SED 组;MT 预孵育后,可以增强血管对 ACh 的舒张反应效果。由此可知,MT 改善了血管内皮功能,增加血管舒张反应,从而降低血压,改善心血管功能。

离体血管环实验还发现,MT 可诱导血管呈浓度依赖性舒张反应,以及增加 ACh 的舒张反应,均可被 Luz 阻断。这证实了在肠系膜动脉中 MT 受体的存在,并且提示 MT 可能是通过结合 MT 受体特异性途径发挥作用。Baykal 等<sup>[22]</sup>研究发现 MT 可引起血管平滑肌舒张,且这种舒张效应是由 MT2 受体的激活所介导。由此我们推测,有氧运动增强血管舒张功能,可能是通过改善 MT 受体和/或内皮功能实现的。而 MT 受体又分为 MT1 和 MT2 两种特异性受体,具体是通过哪一种受体起作用还需进一步研究。目前运动对血管的有益效果主要是通过改善主动脉和大阻力血管的内皮介导的血管舒张、提高肌源性控制、增加小阻力血管的代谢舒张来实现的<sup>[23]</sup>。

在今后的研究中我们将用 Western blot 和免疫组织化学方法进一步讨论有氧运动对肠系膜动脉 MT1 和 MT2 受体的影响,更深入的了解其发生机制。

有氧运动可降低 SHR 的 SBP 和 HR,增强肠系膜动脉舒张作用,其中褪黑素是很重要的机制之一,而其作用可能是通过褪黑素受体或者内皮途径起作用的。

#### 【参考文献】

[1] Kingwell BA, Cameron JD, Dart AM. Large artery stiffness and baroreflex function[J]. *Circulation*, 2002, 105(8): e56.

[2] 关键,陈灿,黄石安. 高血压动脉重构与靶器官功能的关系[J]. *医学综述*, 2007, 13(9): 718-720.

[3] 刘晓东,石丽君,王德刚. 运动对衰老大鼠心血管功能和肠系膜动脉反应性的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2013, 32(4): 316-322.

[4] 石丽君,李珊珊,熊开宇,等. 有氧运动对大鼠心血管和胸主动脉平滑肌的功能重塑作用[J]. *北京体育大学学报*, 2011, 34(11): 47-50.

[5] Shi L, Zhao L, Zeng F, et al. Effect of exercise training volume on arterial contractility and BKCa channel activity in rat thoracic aorta smooth muscle cells[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2012, 112(10): 3667-678.

[6] 王鹏,李海涛,白华. 褪黑素与心血管疾病相关性研究进展

[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2009, 1(2): 115-118.

[7] Tunstall RR, Shukla P, Grazul-Bilska A, et al. MT2 receptors mediate the inhibitory effects of melatonin on nitric oxide-induced relaxation of porcine isolated coronary arteries[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 336(1): 127-133.

[8] Rezzani R, Rodella LF, Bonomini F, et al. Beneficial effects of melatonin in protecting against cyclosporine A-induced cardiotoxicity are receptor mediated[J]. *J Pineal Res*, 2006, 41(3): 288-295.

[9] 张严焱,张寒梦,石丽君,等. 增龄通过下调平滑肌细胞 BKCa 通道  $\alpha$  和  $\beta$ 1 亚基表达改变肠系膜动脉收缩性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(8): 757-762.

[10] Carthy ER. Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review[J]. *Ann Med Surg*, 2014, 3(1): 2-7.

[11] Roque FR, Hernanz R, Salaires M, et al. Exercise training and cardiometabolic diseases: Focus on the vascular system[J]. *Curr Hypertension Rep*, 2013, 15(3): 204-214.

[12] Horta PP, de Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats[J]. *Life Sci*, 2005, 77(26): 3336-343.

[13] Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(3): 686-703.

[14] Marrin K, Drust B, Gregson W, et al. Diurnal variation in the salivary melatonin responses to exercise: relation to exercise-mediated tachycardia[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2011, 111(11): 2707-714.

[15] Germaine E, Guler O, Beatriz BO, et al. Exercise and melatonin in humans: reciprocal benefits[J]. *J Pineal Res*, 2011, 52(1): 1-11.

[16] Kawashima K, Nagakura A, Wurzbarger RJ, et al. Melatonin in serum and the pineal of spontaneously hypertensive rats[J]. *Clin Exp Hypertension A*, 1984, 6(8): 1517-528.

[17] Mayerly N, Yasmir Q, Nosratola V, et al. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 284(3): F447-F454.

[18] Dubocovich ML, Markowska M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals[J]. *Endocrine*, 2005, 27(2): 101-110.

[19] Rodella LF, Favero G, Foglio E, et al. Vascular endothelial cells and dysfunctions: role of melatonin[J]. *Front Biosci*, 2013, 5: 119-129.

[20] Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment[J]. *J Pineal Res*, 2007, 42(4): 319-322.

[21] Satake N, Oe H, Sawada T, et al. The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta[J]. *Gen pharmacol*, 1991, 22(2): 219-221.

[22] Baykal A, Iskit AB, Hamaloglu E, et al. Melatonin modulates mesenteric blood flow and TNF alpha concentrations after lipopolysaccharide challenge[J]. *Eur J Surg*, 2000, 166(9): 722-727.

[23] 米春娟,马珺. 运动改善血管效应及其分子机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(7): 663-667.