

低分子质量 κ -卡拉胶钾的酶法制备及其对原发性高血压大鼠降血压作用的研究

陈 梦, 韩振莲, 付晓丹, 朱常亮, 牟海津

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 为了探究低分子质量 κ -卡拉胶钾对原发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)血压的影响, 以 κ -卡拉胶粉为原料, 酶解法和醇沉法相结合制备分子质量为 3.5 kDa 的低分子质量 κ -卡拉胶寡糖(low-molecular-weight κ -carrageenan, LC)。将 LC 与 KCl 溶液混合, 经醇沉操作除去游离的钾离子, 以此获得高结合率的低分子质量 κ -卡拉胶钾(low-molecular-weight potassium κ -carrageenan, LCP), 使得 LC 中结合型钾元素的含量由原先的 6.5% 上升至 8.7%。各组灌胃剂量: 实验组 600 mg/kg LCP, 空白组灌胃蒸馏水, 阳性对照组 10 mg/kg 卡托普利。结果显示, LCP 对 SHR 有稳定且持续的降压作用, 与空白组相比, 显著降压 18 mmHg。LCP 显著降低了 RAS 系统中肾素($P < 0.05$)和血管紧张素 II(Ang II)($P < 0.01$)的水平, 推测 LCP 的降压机理可能是降低了 RAS 系统的活化程度; 此外, LCP 显著降低了血液中脂多糖(LPS)的水平($P < 0.05$), 并显著改善了肠道上皮结构的完整性。

关键词: 酶解法; 低分子质量; 卡拉胶钾; 降血压

中图分类号: S986.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)08-0036-07

DOI: 10.11759/hyxx 20190320003

高血压是导致脑溢血、动脉粥样硬化和肾功能衰竭最重要的一个危险因素, 且具有一定的家族遗传趋势^[1]。有研究表明, 非西班牙裔白人长期服用某些光敏性降压药物(氢氯噻嗪、硝苯地平)可增加患唇癌的风险^[2], 服用 10 年或以上钙离子通道阻滞剂的女性患乳腺癌的机率成倍增加^[3]。因此, 从天然产物中获取降血压功效成分成为新药研发和功能食品开发的突破口。

近年来, 海洋生物活性物质引起了人们极大的关注, 尤其在中国科学院上海药物研究所等机构联合研发的治疗阿尔茨海默症的新药“甘露寡糖二酸(GV-971)”顺利完成临床 3 期试验后, 海洋寡糖的功效活性更受关注。卡拉胶是从红藻中提取的硫酸酯化多糖, 其中 κ -卡拉胶由硫酸基化的或非硫酸基化的半乳糖和 3,6-脱水半乳糖, 通过 α -1,3 糖苷键和 β -1,4 键交替连接而成。由于分子质量较大的卡拉胶粘性大、扩散困难, 难以被机体所吸收, 对于其生物活性的报道较少。有报道称卡拉胶寡糖具有多种生物活性, 如抗肿瘤^[4]、抗病毒^[5]、调节免疫^[6]等。然而, 因受限于学术界关于卡拉胶促炎的观点, 关于卡拉胶寡糖的研究多数停留在体外试验, 其降血压活性也鲜有报道。

有研究指出^[7], κ -卡拉胶寡糖具有抗凝血作用; 而改善高血压病人的凝血和血液流变学功能异常与紊乱不仅有助于控制原发性高血压病人的病情, 还可降低其发生血栓栓塞性心脑血管事件的风险^[8], 这预示着 κ -卡拉胶寡糖可能具有潜在降压作用。补钾排钠是临床上控制高血压的常用手段, Iimura 等^[9]发现高钾饮食可显著降低实验组的平均动脉压, 且增加尿钠的排泄量; Suzuki 等^[10]用氯化钾作用于两肾一夹型高血压模型鼠, 发现钾负荷后减缓了高血压的发展, 并且减轻了肾血管性高血压的临床症状。本研究首次将 LC 与钾离子结合, 旨在研究 LCP 对 SHR 血压的影响以填补 LCP 在心脑血管疾病领域数据的空白。

收稿日期: 2019-03-20; 修回日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872893); 山东省科技攻关计划项目(2017YYSP003); 山东省自然科学基金项目(ZR2017MD006)

[Foundation: National Natural Science Foundation, No.31872893; Scientific and Technological Research Project of Shandong Province, No.2017YYSP003; Natural Science Foundation of Shandong Province, No.ZR2017MD006]

作者简介: 陈梦(1994-), 女, 安徽淮南人, 硕士研究生, 主要从事海洋寡糖活性研究, 电话: 17853252838, E-mail: meng18356975575@163.com; 牟海津, 通信作者, 博士, 教授, 主要从事水产品加工及贮藏工程的研究, E-mail: mousun@ouc.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 动物

选取 SPF 级的雄性 SHR 18 只, 9 周龄, 220~260 g, 收缩压>165 mmHg, 供货商北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号为 SCXK(京)2016-0011。

1.1.2 原料及试剂

κ -卡拉胶 80 目精粉购自青岛德慧海洋生物科技有限公司; 所用酶为实验室前期构建的能够高效酶解 κ -卡拉胶的重组 *cgkZAPst* 菌株所产; 卡托普利购自深圳海王药业有限公司; 体积分数 95% 的乙醇为工业乙醇; 其他试剂皆为国产分析纯。

1.2 仪器与amp;设备

大小鼠智能无创血压计 BP-2010A, 租自北京软隆科技有限公司; 火焰原子吸收分光光度仪, 购自岛津企业管理有限公司; AKTA 蛋白质层析系统, 购自通用电气医疗集团生命科学部; OLYMPUS BX41 显微镜, 购自南京贝登医疗股份有限公司; 傅立叶变换红外光谱仪, 购自赛默飞世尔科技有限公司; 高效液相色谱仪等购自安捷伦科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 低分子质量 κ -卡拉胶寡糖(LC)制备

平板上挑取单菌落至 YPD 种子液中, 转速 200 r/min、28℃ 发酵 24 h, 按 1% 发酵液体积的量接种至 BMGY 发酵液中, 转速 200 r/min、22℃ 发酵 36 h, 加入 1% 发酵液体积的甲醇, 此后每隔 24 h 加 1 次甲醇, 共加 4 次, 发酵结束后, 离心得上清发酵液。按 1% 加酶量、1% 底物(κ -卡拉胶)浓度, 40℃ 不停搅拌酶解 8 h, 酶解液浓缩 1 倍后加入 1 倍体积预冷乙醇, 4℃ 静置醇沉 1 h, 离心, 弃去沉淀, 上清浓缩到初始酶解液体积的 1/5, 加入 3 倍浓缩液体积的预冷乙醇, 4℃ 静置醇沉 1 h, 离心, 沉淀用水复溶, 旋转蒸发冻干, 得 LC。

1.3.2 分子质量的测定

色谱柱: TSK G4000_{PWXL}(7.5 mm×600 mm×17 μ m); 流动相: 10 mmol/L NaH₂PO₄ 和 200 mmol/L NaNO₃; 柱温: 25℃; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μ L; 检测器: 示差折光检测器 RID。

1.3.3 低分子质量 κ -卡拉胶钾(LCP)制备

60 g/L 的 LC 与 1 g/L 的 KCl 等体积混合, 转速 130 r/min、25℃ 反应 4 h 以上, 浓缩 1 倍后加入 3 倍

浓缩液体积的预冷乙醇, 4℃ 静置醇沉 1 h, 离心, 沉淀用水复溶, 蒸发至原浓缩液体积, 加入 3 倍体积预冷乙醇, 4℃ 静置醇沉 1 h, 离心, 沉淀用水复溶, 旋转蒸发, 冻干, 得 LCP。

1.3.4 Sephadex G-10 葡聚糖凝胶柱脱盐

选取内径 1 cm, 柱长 80 cm 的层析柱, 垂直固定并检漏, 手动灌制 Sephadex G-10 葡聚糖凝胶填料, 以超纯水为流动相, 连接 AKTA 蛋白纯化系统, 开启紫外和电导率检测。将 1 次、2 次、3 次醇沉后得到的 LCP 以超纯水为溶剂配制成 5 g/L 的浓度, 进样 5 mL, 以电导率为观测对象, 辅助评价不同醇沉次数后残留的游离钾离子的含量。

1.3.5 火焰原子吸收分光光度法测定钾元素

整个实验过程所需溶剂皆为超纯水。将实验所需玻璃制品浸泡在 3%~5% 的硝酸中超声过夜, 超纯水冲洗 2~3 次, 低温烘干。称取 10 mg 样品, 加混酸 (*V*(硝酸): *V*(高氯酸)= 4: 1) 高温消解 4~7 h, 用超纯水转移至 10 mL 容量瓶中, 充分混匀, 稀释到合适浓度进行上样测定吸光值, 对应标准曲线计算钾元素的质量分数。

1.3.6 SHR 饲养及尾动脉收缩压测定方法

18 只 SHR 于 SPF 级屏障环境动物房适应性喂养 1 周, 温度: 20~25℃; 湿度: 50%~70%; 饲养密度: 3 只/笼; 照明时间: 12 h。根据体质量和血压随机分为 3 组, 每组 6 只。空白对照组灌胃蒸馏水, 实验组灌胃 LCP(600 mg/kg), 阳性对照组灌胃卡托普利(10 mg/kg)。实验周期 4 周, 每周固定时间测量收缩压(SBP)和心率 1 次, 称重 2 次。SBP 测量部位为尾动脉, 将老鼠固定入套, 保持体温在 37~39℃ 之间且安静的情况下将传感器固定在尾动脉处, 连续测定 5 次 SBP 和心率, 取平均值。

1.3.7 肾素、血管紧张素 II、脂多糖的测定

双抗体酶联免疫吸附试验(ELISA), 具体步骤及细节问题见试剂盒说明书。

1.3.8 结肠组织病理切片制作及观察

小鼠处死后, 取远端结肠 1 cm, 固定、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(厚度 5 μ m), 进行 HE 染色, 组织病理切片的 HE 染色由武汉塞维尔生物科技有限公司制作。通过 OLYMPUS BX41 显微镜进行观察拍片。

1.4 统计学分析

试验结果表示方式为“平均数±标准偏差”, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 组间数据采用单因素

方差分析(one-way ANOVA)的方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 LC 制备及其分子质量测定

借助于高效液相色谱仪和 TSK G4000_{PWXL}, 以 1、5、12、21、80 kDa 标准品的保留时间为横坐标, 分子质量的对数形式为纵坐标绘制标准曲线(图 1)。用流动相配制 5 g/L 的 LC 溶液, 上样 10 μ L, 保留时间为 35.820 min(图 2)。代入标准曲线得出: LC 分子质量约为 3.5 kDa。

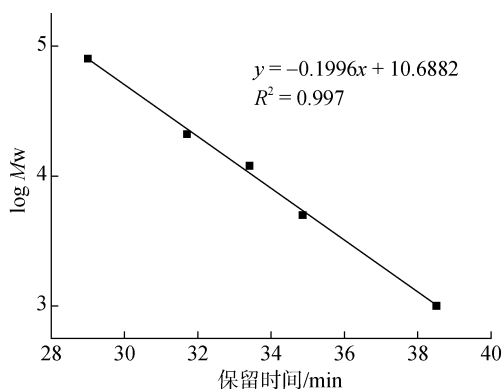


图 1 TSK G4000_{PWXL} 标准曲线
Fig. 1 Standard curve of TSK G4000_{PWXL}

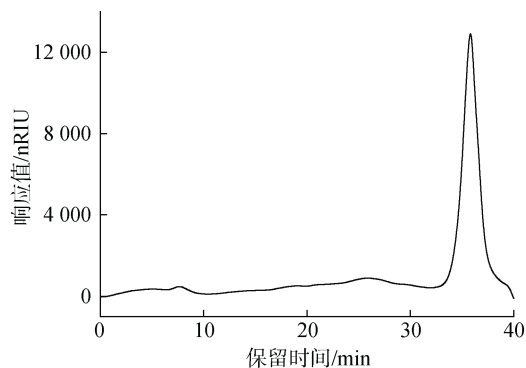


图 2 LC 的保留时间(色谱柱: TSK G4000_{PWXL})
Fig. 2 Retention time of LC (Column: TSK G4000_{PWXL})

2.2 LCP 制备工艺的确定

根据 κ -卡拉胶的结构计算可得, 若结构中的硫酸基全部与钾结合, 则钾元素的饱和质量分数接近 9.18%。考虑到 LC 的溶解状态, 以 60 g/L 的 LC 与不同质量分数的 KCl 结合, 一次醇沉后测定钾元素含量(表 1)。由表 1 可知, 由于饱和结合率的限制, 不同质量分数的 KCl 与 60 g/L 的 LC 结合后其钾元素含量基本趋近于饱和值。由于 KCl 浓度越高, 后续醇沉除去游离钾离子的难度越大, 故选择 60 g/L 的 LC 与 1 g/L 的 KCl 进行反应。

表 1 60 g/L LC 与不同质量分数 KCl 结合后钾元素含量

Tab. 1 Potassium element content of 60 g/L LC combined with different concentrations of KCl

KCl 质量浓度(g/L)	1	5	10	20	30
钾元素含量/%	9.262	9.472	10.072	9.767	10.176
	9.236	9.336	9.969	10.618	10.498
	8.761	9.073	9.371	9.746	10.112
平均含量/%	9.086	9.294	9.804	10.044	10.262

为了尽可能地排除游离钾离子对后续降血压实验的干扰, 方便评价结合型的 LCP 对 SHR 血压的影响, 在低浓度 KCl 环境下对反应混合液进行醇沉以脱除游离钾离子。以 10 mL 60 g/L LC 与 10 mL 1 g/L KCl 反应为例, 分别对反应后的 LCP 进行 1 次、2 次、3 次的 3 倍体积乙醇醇沉操作。以超纯水为流动相, 用 Sephadex G-10 葡聚糖凝胶柱检测游离的钾离子, 评价不同醇沉次数对游离钾离子的脱除情况(图 3); 计算不同醇沉次数的得率, 3 次实验取平均值(表 2); 同时火焰原子吸收法测定不同醇沉次数后钾元素的含量, 3 次实验取平均值(表 3)。

对应图 3 中 1 次醇沉的图谱, 根据体积排阻色谱

的原理可知, LCP 与游离盐离子(基本为钾离子)两种组分分离效果良好。比较 2 次和 3 次醇沉的图谱可知, 2 次醇沉后游离盐峰显著减小, 游离钾离子基本脱除殆尽; 而 3 次醇沉后基本无游离盐峰。结合 2 次醇沉后的 LCP 得率为 42.4%, 3 次醇沉后的 LCP 得率为 27.0%, 综合考虑确定 LCP 的制备工艺为二次醇沉。此外, 根据火焰原子吸收的结果, LCP 中钠元素的含量基本稳定在 0.5%, 可以忽略不计。因此, LC 经过与 KCl 溶液结合以及 2 次 3 倍体积乙醇醇沉操作后, 其中结合的钾元素的质量分数为 8.7%, 基本接近理论饱和结合率 9.18%, 与 LC 中 6.5% 左右的钾含量相比, 钾元素含量增加了 2.2%。

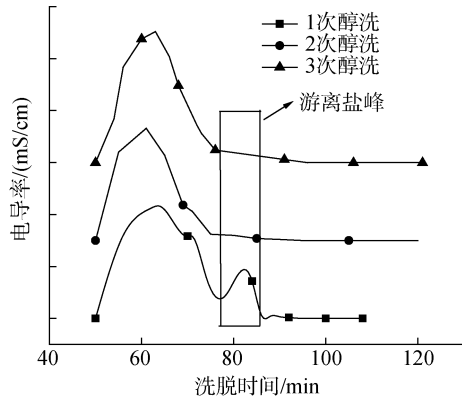


图3 不同醇沉次数后 LCP 电导率的变化

Fig. 3 Change in conductivity of LCP after different times of alcohol precipitation

表2 不同醇沉次数后 LCP 的得率
Tab. 2 Yield of different times of alcohol precipitation

醇沉次数	1	2	3
冻干后质量/g	0.362	0.255	0.170
	0.350	0.252	0.155
	0.358	0.256	0.161
平均质量/g	0.357	0.254	0.162
得率/%	59.5%	42.4%	27.0%

表3 不同醇沉次数后钾元素的含量
Tab. 3 Potassium content after different times of alcohol precipitation

样品	LC	醇沉次数		
		1	2	3
钾元素含量 /%	7.003	9.765	8.412	7.916
	6.427	10.902	8.751	8.542
	6.217	9.547	9.004	7.646
平均含量/%	6.549	10.071	8.722	8.035

注: 因测量批次不同, 与表1不构成绝对比较, 可进行相对比较

2.3 LCP 对 SHR 收缩压的影响

由表4可知, 实验期间, 空白组(B组)SHR 的血压值随着周龄增大而上升, 第3周稳定在210 mmHg左右。实验组(LCP组)在灌胃第1周基本无降压作用, 从第2周开始便控制血压不再上升, 第3周开始与空白组有了显著差异($P < 0.05$), 这种显著的降压效果持续到了第4周, 且与B组相比, 有18 mmHg左右的血压差, 说明LCP具有一定的降压作用且能够保持稳定持续的降压效果。卡托普利组(P组)控制血压的效果较为明显, 灌胃1周后就出现了显著的降压效果

表4 各组动物不同时间点的收缩压($x \pm SD, n = 6, \text{mmHg}$)
Tab. 4 Systolic blood pressure (SBP) at different time in each group of animals($x \pm SD, n = 6, \text{mmHg}$)

组别	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
B	166±15	185±9	197±10	210±18	211±8
P	167±9	165±14*	161±18**	176±9**	166±14**
LCP	172±12	196±11	198±11	192±5*	193±9*

注: *表示与空白组比较差异显著($P < 0.05$), **表示与空白组比较差异极显著($P < 0.01$),下同

并持续到实验结束。

王金玲等^[11]研究发现, 用分子质量低于3 kDa的降血压肽灌胃SHR, 实验周期为6周, 降压幅度最高达20 mmHg。林峰等^[12]研究发现, 以玉米低聚肽灌胃SHR, 实验周期为8周, 在第4周时, 显著降压20 mmHg, 第8周显著降压38 mmHg。比较可以看出, LCP的降压效果与一些降血压肽的效果旗鼓相当, 关于其更长实验周期的降压效果以及停药后对血压的控制效果都有待进一步研究。

2.4 LCP 对 SHR 肾素-血管紧张素(RAS)系统的影响

RSA系统主要包括肾素、血管紧张素原(Ang)、血管紧张素转换酶(ACE)和血管紧张素II(Ang II), 过度激活的RAS系统是导致高血压形成的重要原因之一。来源于肾脏球旁细胞的肾素可将血液中的Ang转变为无生理活性的Ang I, 紧接着在ACE的作用下生成具有强烈升压作用的物质Ang II。肾素被视为RAS系统活跃的初始和限速因素, 而Ang II则被认为是导致血压升高的直接因素。分析各组血液中的肾素和Ang II水平(图4)可知, 与B组相比, LCP显著降低了肾素($P < 0.05$)和Ang II($P < 0.01$)的水平, 而P组对于两项重要指标的降低程度不如LCP组。虽然宏观上P组的血压降低程度优于LCP组, 但更深层次的体液调节方面却略逊于LCP组, 这也突出显示了天然产物的活性作用以及在降压机理上的优势。因此推测: LCP可能是通过调节RAS系统, 抑制这一通路的表达和活性进而降低SHR的血压。

2.5 LCP 对 SHR 血浆中脂多糖含量的影响

脂多糖(LPS)来源于革兰氏阴性菌, 是其外膜的主要组成成分, 当肠道环境受到外界刺激损伤或者自身系统紊乱等威胁时, 会导致革兰氏阴性菌增多甚至裂解释放出过量的LPS, 进而引起肿瘤坏死

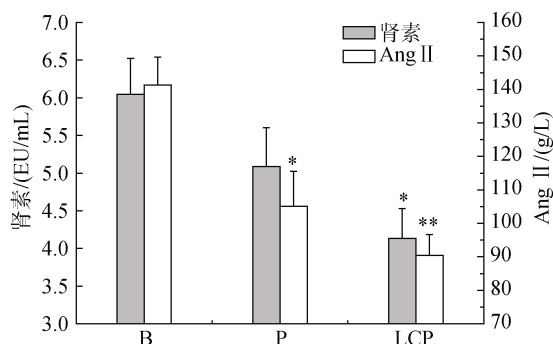


图4 各组血浆中肾素以及 Ang II 的含量

Fig. 4 The content of renin and Ang II in plasma of each group

因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)等促炎因子的过量表达、中性粒细胞的过量堆积等一系列炎症症状,宏观表现为肠黏膜水肿、肠绒毛细胞坏死,致使肠道通透性增加,无法拦截细菌和 LPS 进入血液引发一系列损伤问题。严玉霖^[13]在研究 LPS 对大鼠小肠黏膜免疫指标的影响中发现, LPS 可显著降低肠黏膜杯状细胞的量以及分泌性免疫球蛋白 A 的含量。杯状细胞在增加肠黏膜表面黏液分泌量上贡献巨大,分泌的黏液物质对黏膜上皮有润滑和保护作用,可以阻止病原微生物等各类有害物质的入侵;而免疫球蛋白 A 可增强肠黏膜中和病毒、毒素等异物的能力。总之, LPS 的降低可以在一定程度上表征肠道内环境的改善。

血液中 LPS 测定结果如图 5 所示, LCP 与 B 相比出现显著性差异, P 与 B 相比差异极显著, LCP 和 P 都显著降低了 LPS 的效价,但两者之间无显著性差异,即两者降低血浆中 LPS 效价的能力差别不大。数据形式上显示, LCP 和卡托普利对 SHR 的肠道通透性均有一定的改善。

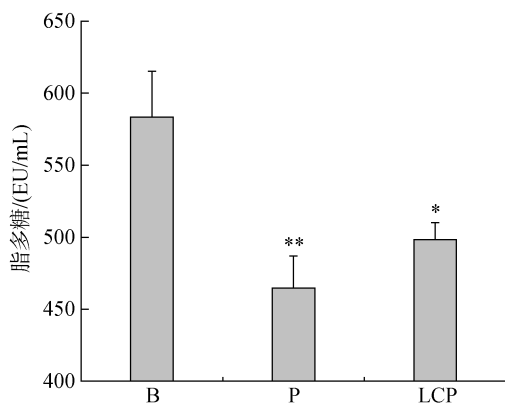


图5 各组血浆中 LPS 的含量

Fig. 5 The content of LPS in plasma of each group

2.6 LCP 对 SHR 结肠形态的影响

学术界一直都有关于卡拉胶是否会导致炎症的争论, Watt 等^[14]研究指出,将酸解的卡拉胶制备成 2% 的饮用液可在短时间内引起豚鼠的结肠性溃疡,而不久后的 Norris 等^[15]利用三种类型的卡拉胶(κ -、 ι -、 λ -)及同样的酸解方法获得的降解产物均未引起豚鼠肠胃溃疡的结果反驳了 Watt 等的研究。值得注意的是上述研究所用到的卡拉胶分子质量基本都在 10 kDa 以上。李苗苗^[16]的研究表明,分子质量为 4.5kDa 的 LC 通过与定殖在无菌小鼠肠道中的一种木糖降解拟杆菌的共同作用引起小鼠肠道炎症,但该木糖降解拟杆菌在结肠癌病人肠道黏膜中呈增长趋势^[17],所以存在该菌通过其他途径引起肠道炎症的可能性。郭娟娟^[6]研究表明四种 κ -卡拉胶寡糖从生理水平及转录水平上分别剂量依赖性地抑制了多种炎症介质的分泌,降低了细胞炎症反应。

此外, Jaworska 等^[18]的研究表明,大鼠的高血压与结肠对三甲胺(肠道细菌代谢物)的通透性增加有关,这一结果伴随着结肠形态学的改变,如杯状细胞减少、黏膜以及上皮细胞浸润等,暗示结肠形态学的改变导致肠道对某些代谢物的通透性增加,而这一结果与大鼠的高血压相关。Santisteban 等^[19]的研究表明,肠道交感神经活动增加,改变肠道病理,导致肠道通透性增加,出现炎症状态以及肠道菌群微生物失调现象,而有研究表明交感神经系统活动增加是动物和人类高血压的标志^[20]。因此 LCP 对于结肠环境的改善或许与其降低 SHR 血压有一定的关系。

本研究对 SHR 的结肠部位进行切片染色,发现 B 组多个个体出现了较明显面积的淋巴细胞及伴中性粒细胞等的浸润现象,绒毛损伤严重,腺体隐窝结构被破坏,杯状细胞丢失。P 组同样也有一定程度的炎症,但与 B 组相比略有缓解。而 LCP 组与 B 组相比,并未表现出更严重的炎症表象,甚至有一定程度的改善,大部分肠上皮结构完整,存在完整的隐窝结构,保留了大量的杯状细胞,炎症细胞浸润也得到了缓解(图 6)。

3 结论

利用酶解法和醇沉法,以 κ -卡拉胶粉为原料制备出分子质量在 3.5 kDa 左右的 LC,将 LC 与 KCl 溶液混合,经过两次醇沉后得到 LCP,将其作用于 SHR,发现其对 SHR 有稳定且持续的降压作用,降压幅度为 18 mmHg。进一步研究发现, LCP 显著降低了

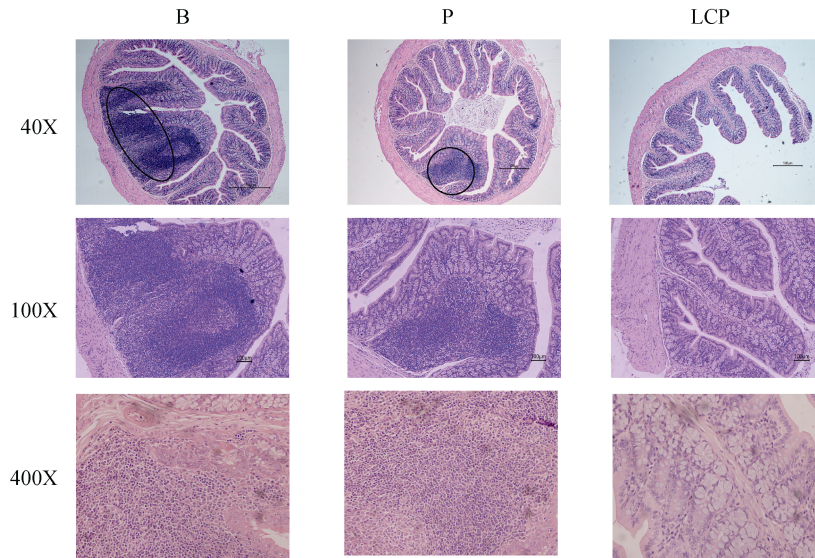


图 6 SHR 结肠组织病理切片

Fig. 6 Colon histopathological section of spontaneously hypertensive rat

注: 40x 显微镜下圈中部分为炎症浸润

RAS 系统中肾素($P < 0.05$)和血管紧张素 II (Ang II) ($P < 0.01$)的水平, 推测 LCP 可能是通过降低 RAS 系统的活化程度发挥降压作用; 此外 LCP 显著降低了血液中脂多糖(LPS)的水平($P < 0.05$), 减轻了肠道通透性程度, 进一步改善了肠道上皮结构的完整性, 众多研究表明肠道结构的完整与高血压密切相关, 所以 LCP 也可能通过改善肠道内环境进而降低了 SHR 的血压。

参考文献:

[1] Boda H, Uchida H, Takaiso N, et al. A PDE3A mutation in familial hypertension and brachydactyly syndrome[J]. *Journal of Human Genetics*, 2016, 61(8): 701-703.

[2] Friedman G D, Asgari M M, Warton E M, et al. Anti-hypertensive drugs and lip cancer in non-Hispanic whites[J]. *Archives of Internal Medicine*, 2012, 172(16): 1246-1251.

[3] 闫睿. 长期应用钙离子拮抗剂或与乳腺癌风险增加相关[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2013, 5(5): 544-544.

Yan Rui. Long-term use of calcium antagonists or associated with increased risk of breast cancer[J]. *Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine*, 2013, 5(5): 544-544.

[4] Zhou G, Sun Y P, Xin H, et al. In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from chondrus ocellatus[J]. *Pharmacological Research*, 2004, 50(1): 47-53.

[5] Wang W, Zhang P, Yu G L, et al. Preparation and anti-

influenza a virus activity of κ -carrageenan oligosaccharide and its sulphated derivatives[J]. *Food Chemistry*, 2012, 133(3): 880-888.

[6] 郭娟娟. κ -卡拉胶寡糖酶法制备及其免疫防御调节机制的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2018.

Guo Juanjuan. Enzymatic hydrolysis preparation of κ -carrageenan oligosaccharides and its mechanism in immunologic defense[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2018.

[7] 吴海歌, 姚子昂. κ -卡拉胶寡糖抗凝血作用的研究. *中国食品添加剂*, 2014, 5: 84-88.

Wu Haige, Yao Ziang. Anti-coagulation effects of κ -carrageenan oligosaccharides[J]. *China Food Additives*, 2014, 5: 84-88.

[8] 黄海云, 蔡召忠. 氯沙坦对高血压患者凝血和纤溶活性指标的影响[J]. *血栓与止血学*, 2017, 23(1): 108-109, 112.

Huang Haiyun, Cai Zhaozhong. Effect of losartan on blood coagulation and fibrinolysis in hypertensive patients[J]. *Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis*, 2017, 23(1): 108-109, 112.

[9] Iimura O, Kijima T, Kikuchi K, et al. Studies on the hypotensive effect of high potassium intake in patients with essential hypertension[J]. *Clinical Science*, 1981, 61(Suppl): 77-80.

[10] Suzuki H, Kondo K, Saruta T. Effect of potassium chloride on the blood pressure in two-kidney, one clip Goldblatt hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 1981, 3(5): 566-573.

[11] 王金玲, 何国庆. 酶解法制备带鱼脊骨降血压肽及其降血压效果[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(4): 54-58.

- Wang Jinling, He Guoqing. Study on ACEIP production by enzyme hydrolysis from ribbonfish (*trichiurus haumela*) backbone and its anti-hypertensive activity[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(4): 54-58.
- [12] 林峰, 梁锐, 王军波, 等. 玉米低聚肽降血压作用的实验研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 1-4.
Lin Feng, Liang Rui, Wang Junbo, et al. The experimental study on the antihypertensive effect of corn oligopeptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(8): 1-4.
- [13] 严玉霖, 高洪, 杨进成, 等. 内毒素血症大鼠小肠黏膜免疫相关指标的变化及CA的保护作用[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(7): 1164-1167.
Yan Yulin, Gao Hong, Yang Jincheng, et al. Changes of small intestine mucosa immunity and protection of cation A in endotoxemia rats[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(7): 1164-1167.
- [14] Watt J, Mclean C, Marcus R. Degradation of carrageenan for the experimental production of ulcers in the colon[J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1979, 31(1): 645-646.
- [15] Norris A A, Lewis A J, Zeitlin I J. Inability of degraded carrageenan fractions to induce inflammatory bowel ulceration in the guinea-pig [J]. Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1981, 33(1): 612-613.
- [16] 李苗苗. 人体肠道微生物对琼胶与 κ -卡拉胶及其寡糖的降解和利用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
Li Miaomiao. The degradation and utilization study of agarose, κ -carrageenan and their oligosaccharides by human gut microbiota[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [17] Chen W, Liu F, Ling Z, et al. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer[J]. PloS One, 2012, 7(6): e39743.
- [18] Jaworska K, Huc T, Samborowska E, et al. Hypertension in rats is associated with an increased permeability of the colon to TMA, a gut bacteria metabolite[J]. PloS One, 2017, 12(12): e0189310.
- [19] Santisteban M M, Qi Y, Zubcevic J, et al. Hypertension-linked pathophysiological alterations in the gut[J]. Circulation Research, 2017, 120(2): 312-323.
- [20] Grassi G, Mark A, Esler M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension[J]. Circulation Research, 2015, 116(6): 976-990.

Preparation of low-molecular-weight potassium κ -carrageenan by enzymatic hydrolysis and its antihypertensive effect on SHR

CHEN Meng, HAN Zhen-lian, FU Xiao-dan, ZHU Chang-liang, MOU Hai-jin
(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar. 20, 2019

Key words: enzymatic hydrolysis; low-molecular-weight; potassium κ -carrageenan; antihypertensive effect

Abstract: To investigate the effect of LCP on blood pressure of SHR, LC with a low molecular weight of about 3.5 kDa was prepared by combining enzymatic hydrolysis and alcohol precipitation when taking κ -carrageenan powder as material. Mixed LC with the KCl solution, and the free potassium ion is removed by alcohol precipitation to obtain the LCP with high binding rate. The content of potassium bounded in LC increased from 6.5% to 8.7%. The experimental group was administered with 600 mg/kg of LCP. The negative control group was administered with distilled water. The positive control group was administered with 10 mg/kg of captopril. The results showed that LCP had a stable and sustained antihypertensive effect on SHR, and significantly reduced blood pressure by 18 mmHg compared with the negative group. LCP significantly reduced the levels of renin ($P < 0.05$) and angiotensin II (Ang II) ($P < 0.01$) in the RAS system. It is speculated that the antihypertensive mechanism of LCP may be to reduce the activation degree of RAS system. The level of lipopolysaccharide (LPS) in the blood was reduced ($P < 0.05$) and the integrity of the intestinal epithelial structure was significantly improved. This result will provide a scientific basis for further evaluation of the efficacy of carrageenan oligosaccharides and the development of related products.

(本文编辑: 康亦兼)