

壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠的降脂功能比较研究

王斌^{1,2}, 苏谦俊¹, 张思聪¹, 杨硕¹, 夏文水^{1*}¹食品学院 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 无锡 214122; ²江苏海隆国际贸易有限公司, 淮安 223005

摘要: 本文比较研究了壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠降脂作用的影响。选取雄性 C57BL/6 小鼠, 随机分成 4 组: 即 Control 组(正常日粮)、Model 组(高脂日粮)、COS 组(高脂 + 5% 壳寡糖组)和 CS 组(高脂 + 5% 壳聚糖组)。饲喂 17 周, 每周记录摄食量、称量小鼠体重。17 周后进行小鼠血清、肝脏生化指标和 RT-PCR 分析。结果表明: 壳寡糖和壳聚糖的添加可降低高脂膳食小鼠体重、血脂和肝脂水平, 提高肝脂酶活性, 缓解肝脏脂质过氧化水平, 调节肝脏脂肪代谢基因, 缓解脂质代谢紊乱。壳寡糖的降脂作用效果好于壳聚糖。

关键词: 壳寡糖; 壳聚糖; 高脂膳食; 降脂

中图分类号: R151.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.6.021

Comparison of Hypolipidemic Effect of Chitosan Oligosaccharide and Chitosan in Mice Fed High-fat Diet

WANG Bin^{1,2}, SU Qian-jun¹, ZHANG Si-cong¹, YANG Shuo¹, XIA Wen-shui^{1*}¹School of Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; ²Jiangsu Hilong International Trading Co., Ltd, Huai'an 223005, China

Abstract: The hypolipidemic effect of chitosan oligosaccharide (COS) and chitosan (CS) was compared in mice fed high-fat diet. Male C57BL/6 mice were randomly assigned to four groups. Control group consumed a normal diet (Control). Model group was fed with a high-fat diet (Model). The COS mice were fed with high-fat diet supplement with 5% COS (COS). The CS mice were fed with high-fat diet supplement with 5% CS (CS). The diet intake and weight data were collected weekly, the biochemical indicators of serum and liver, the RT-PCR analysis in liver were determined at the end of the 17 week. The results indicated that supplementation of chitosan oligosaccharide and chitosan can reduce body weight, decrease the levels of serum lipid, liver lipid and increase the hepatic lipase capacity of HF mice. It can alleviate the liver lipid peroxidation, regulate the genes of liver fat metabolism and thus exert the hypolipidemic effect. In addition, chitosan oligosaccharide showed better hypolipidemic effect than chitosan.

Key words: chitosan oligosaccharide; chitosan; high-fat diet; hypolipidemic effect

高脂血症已成为全球性的健康问题, 现代的高脂饮食伴随着能量摄入增加, 诱导机体肥胖, 脂肪组织甘油三酯积累, 伴随而来的脂肪分解减少, 游离脂肪酸增加, 脂肪细胞数量增加, 脂肪酸储存在肌肉、胰腺以及肝脏等非脂肪组织中, 诱导机体高脂血症。高脂膳食饲喂 C57BL/6 小鼠, 诱导肥胖和以高血糖、高脂血症为特征的代谢综合症, 该动物模型常被

用于研究脂代谢紊乱的病理过程以及治疗途径。本实验室近年来研究也发现, 高脂膳食肥胖小鼠血脂升高^[1,2]。壳聚糖(chitosan, CS)是从虾蟹壳中提取出的带正电荷的碱性多糖, 广泛应用于抗心肌缺血和心率失常、降血压、减肥、抗凝和免疫调节等方面, 本课题组前期研究结果表明, 5% 壳聚糖的添加能够减少高脂膳食大鼠膳食脂肪和胆固醇的吸收^[3]。壳寡糖(chitosan oligosaccharide, COS)是壳聚糖的降解产物, 是由 2-10 个 N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的低聚糖, 其分子量小, 易溶于水, 可被人体、动物及植物机体吸收, 其在神经保护、抗肿瘤、抑菌、抗炎、减肥和抗糖尿病等方面具有独特的生物活性且无毒副作用^[4-6]。然而, 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠血脂的调节作用比较研究目前尚

收稿日期: 2016-10-09 接受日期: 2017-04-01

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金(BK20160170); 中国博士后科学基金(2015M581726); 江苏省博士后科研资助计划(1501099C); 江南大学自主科研计划青年基金(JUSRP11551); 2014 年泰山学者蓝色产业领军人才团队支撑计划; “江苏省食品安全与质量控制协同创新中心”项目

* 通信作者 Tel: 86-510-8532 9057; E-mail: xiaws@jiangnan.edu.cn

不清楚。

本实验以高脂日粮长期饲喂小鼠,比较、研究壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠降脂作用的影响。探讨壳寡糖和壳聚糖抗氧化活性与降脂调节功能之间的关系,为进一步阐明壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠降脂调节作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

壳寡糖(相对分子量 1299 Da)、壳聚糖(相对分子量 48000 Da):购自浙江金壳生物化学有限公司。过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及高、低密度脂蛋白胆固醇(HDL-C、LDL-C)试剂盒、总脂酶(脂蛋白脂酶 LPL、肝脂酶 HL)测定试剂盒,购自南京建成生物工程研究所。Trizol 裂解液(美国 Biomiga 公司)。M-MLV 逆转录酶、5 × 逆转录缓冲液、RNase Inhibitor、dNTPs、TaqDNA 聚合酶,(Invetrogen 公司)。荧光染料 SYBR Green(Bioneer 公司)。基因引物(上海桑尼生物科技有限公司, β -actin: F, GGGTCAGAAG-GACTCCTATG; R, GTAACAATGCCATGTTCAAT。Cpt1a: F, TATGCGCTACTCGCTGAAGG; R, CGAC-CCGAGAAGACCTTGAC。ApoE: F, GAACTGACG-GCACTGATGGA; R, GTCGGTTGCGTAGATCCTCC)。其余试剂均为分析纯。UV-1800 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司。Multiskan Mk3 酶标仪,美国 Thermo 公司。One-drop spectrophotometer(上海采邑生物科技有限公司)。7900HT Fast Real-time PCR(美国应用系统公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计

选用 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 40 只(上海斯莱克实验动物有限公司),一周预饲后,按体重随机分成 4 组:即 Control 组小鼠 10 只(正常饲料, D12450B, 20% 蛋白质, 70% 碳水化合物, 10% 脂肪), Model 组小鼠 10 只(高脂饲料, D12451, 20% 蛋白质, 35% 碳水化合物, 45% 脂肪), COS 组小鼠 10 只^[7,8](HF + 5% COS, COS 相对分子量 1299 Da), CS 组小鼠 10 只^[9](HF + 5% CS, CS 相对分子量 48000 Da)。饲喂 17 周,壳寡糖和壳聚糖混合于饲料中,小鼠自由采食。每周称重 1 次,记录摄食量。饲养结束后,各组小鼠隔夜禁食 12 h,乙醚麻醉小鼠后,摘眼球取血,4000 rpm 离心 15 min,取上层血清,

用于血脂检测。断颈椎处死小鼠,一部分肝脏研磨制成 10% 组织匀浆,4000 rpm 离心 15 min,取上清液用于总脂酶、抗氧化酶活性和 MDA 含量检测。一部分肝脏置于 Trizol 中用于总 RNA 提取和 RT-PCR 分析。

1.2.2 血脂含量检测

血清和肝脏甘油三酯、总胆固醇,血清低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇;肝脏总脂酶测定试剂盒按南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。

1.2.3 肝脏抗氧化酶活性及丙二醛含量检测

肝脏抗氧化酶活性和丙二醛含量按南京建成生物工程研究所试剂盒进行测定。

1.2.4 实时荧光相对定量 PCR 分析

提取肝脏总 RNA,逆转录合成 cDNA,以 β -actin 为内参,对目的基因进行 PCR 扩增,检测模板 Ct 值进行相对定量,基因表达相对定量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.3 数据处理与统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件中的 one-way ANOVA 方法对实验数据进行多重比较、差异显著性检验分析。

2 实验结果

2.1 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠体重和摄食量的影响

整个饲喂过程中,各组小鼠摄食量没有显著性差异(图 1, $P > 0.05$)。高脂饲喂 16 周后,模型组小鼠体重显著升高($P < 0.05$),说明高脂饲料脂肪含量的增加引起高脂小鼠体重增加。壳寡糖组小鼠体重较模型组显著降低($P < 0.05$),与正常组差异不显著,壳聚糖组小鼠体重与模型组差异不显著($P > 0.05$),因此,壳寡糖在减少体重方面的作用好于壳聚糖。

2.2 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠血脂水平的影响

由图 2 可见,各组小鼠 TG 含量无显著性差异($P > 0.05$),与正常组相比,模型组小鼠血清 TC、LDL-C、HDL-C 含量显著增高($P < 0.05$),TC/HDL-C 增高,但差异不显著($P > 0.05$)。壳寡糖组小鼠血清 TC、LDL-C、HDL-C 含量和 TC/HDL-C 较模型组显著降低($P < 0.05$),且 TC 含量和 TC/HDL-C 与正常组相比差异不显著。壳聚糖组小鼠血清 LDL-C 和 HDL-C 含量较模型组显著降低($P < 0.05$),其 TC 含量与模型组差异不显著。与体重数据类似,壳寡糖的降血脂效果好于壳聚糖。

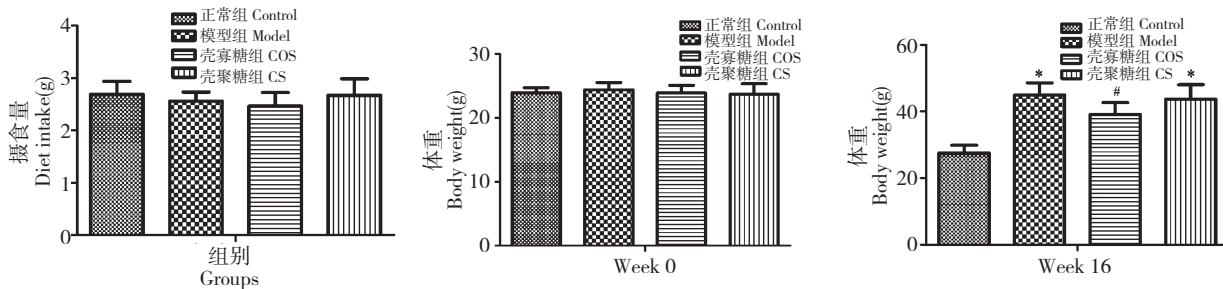


图 1 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠体重和摄食量的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of COS and CS on the body weight and diet intake of high-fat diet fed mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

注: * $P < 0.05$, 与正常组比较, # $P < 0.05$, 与模型组比较, 下同

Note: * $P < 0.05$ vs Control mice; # $P < 0.05$ vs Model mice. Same as below

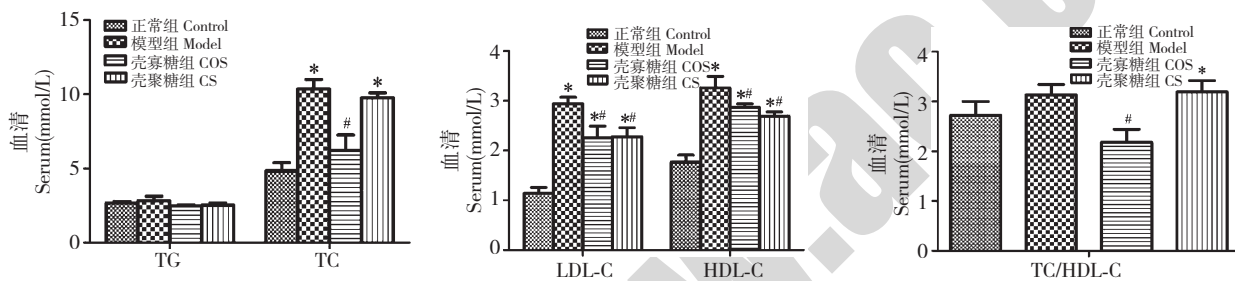


图 2 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠血脂的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of COS and CS on the serum lipid of high-fat diet fed mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

2.3 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠肝脏脂肪含量和脂肪酶的影响

进一步研究壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠肝脏的影响,发现二者均能显著降低高脂膳食小鼠 TG 和 TC 含量(图 3, $P < 0.05$),从而进一步说明,壳寡糖和壳聚糖通过降低血脂和肝脂来减少脂肪堆积。脂蛋白脂肪酶(LPL)和肝脂酶(HL)是调节脂类代谢的关键酶,HL 催化中间密度脂蛋白及高密度脂蛋白中甘油三酯的水解,而 LPL 催化极低密度脂蛋白中 TG 的水解。LPL 和 HL 活性降低可使脂质清除能力下降,导致 TG 的升高及代谢紊乱。本研究中,模

型组小鼠肝脏 LPL 和 HL 活性降低,进而诱导肝脏 TG 水平升高。壳寡糖和壳聚糖添加后,较模型组显著提高肝脏 LPL 和 HL 活性($P < 0.05$)。

2.4 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠脂肪组织抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响

如图 4 可知,高脂膳食小鼠脂肪组织 SOD 活性和 T-AOC 显著降低,MDA 含量显著增加,壳寡糖和壳聚糖添加后显著增加脂肪组织 SOD 活性和 T-AOC,降低肝脏 MDA 含量($P < 0.05$),壳寡糖对于脂肪组织的抗氧化作用好于壳聚糖。

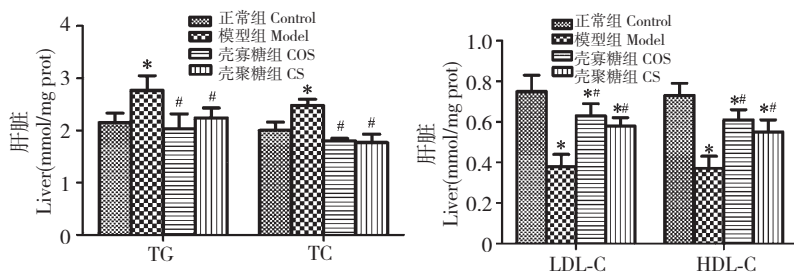


图 3 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠肝脏脂肪含量和脂肪酶的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effects of COS and CS on the liver lipid and lipase of high-fat diet fed mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

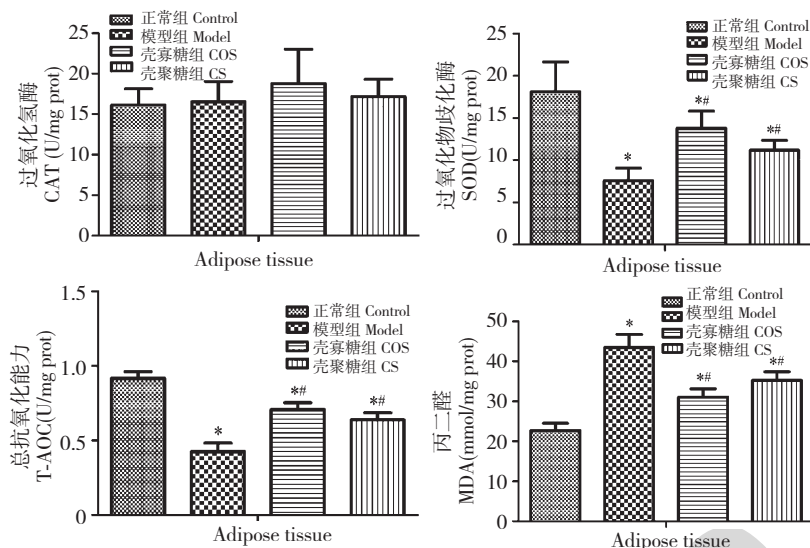


图4 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠脂肪组织抗氧化酶活性及MDA含量的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Effects of COS and CS on antioxidant enzyme activity and the content of MDA in the adipose tissue of high-fat diet fed mice ($n=8, \bar{x} \pm s$)

2.5 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠肝脏 Cpt1a 及 ApoE 表达的影响

肉碱棕榈酰转移酶(carnitine palmitoyltransferase Ia, Cpt1a)能与长链脂酰辅酶A合成脂酰肉碱,并将其转运至线粒体而被氧化分解。模型组小鼠肝脏脂肪分解代谢相关的基因 Cpt1a 表达较正常组显著降低(图5, $P < 0.05$),提示高脂膳食诱导肝脏脂肪代谢紊乱,脂肪酸转运入线粒体效率减慢和脂肪 β -氧化分解减慢,使肝细胞内的脂肪酸及脂酰辅酶A大量沉积,促成脂肪在肝脏积累。壳寡糖和壳聚糖的添加能够显著增加肝脏 Cpt1a 表达($P < 0.05$),从而促进肝脏脂肪分解。载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)是血浆脂蛋白的重要组成部分,可运载内源性和外源性的胆固醇,在机体脂质尤其是总胆固醇代谢中发挥极其重要的作用,且能调控血浆中脂蛋白的脂解和消除,调控极低密度脂蛋白(VLDL)和TG产量。模型组小鼠肝脏 ApoE 表达显著升高($P < 0.05$),从而诱导肝脏 LDL 水平升高,增加胆固醇浓度。壳寡糖和壳聚糖添加后能够显著降低小鼠肝脏 ApoE 表达($P < 0.05$),进而缓解脂质代谢紊乱。

3 讨论与结论

壳聚糖是甲壳素脱乙酰化后的产物,其分子中含有活泼的羟基和氨基,但因其分子中仍含有较多的氢键,使其仅可溶于稀酸溶液。壳寡糖是壳聚糖

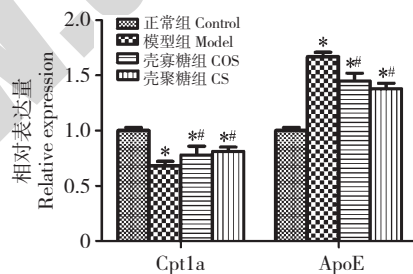


图5 壳寡糖和壳聚糖对高脂膳食小鼠肝脏 Cpt1a 和 ApoE 的影响

Fig. 5 Effects of COS and CS on the expressions of Cpt1a and ApoE in liver of mice with high fat diet

经化学或酶降解后的产物,具有良好的水溶性和低粘度等理化活性,且有抗肿瘤、降血压和抗炎等多种生物活性。

高脂饮食是导致人类和啮齿类动物高血脂的重要因素。本研究中,模型组小鼠体重显著升高,而摄食量较正常组没有显著差异,说明高脂饲料脂肪含量的提高导致模型组小鼠体重增加。壳寡糖添加后能够显著降低高脂膳食小鼠体重,从而进一步验证壳寡糖的减肥作用。有研究表明壳聚糖主要通过包裹吸附、延迟胃排空等机制实现减肥作用^[10]。本研究中,壳聚糖组小鼠体重较模型组有所降低,但差异不显著。

有研究表明,TG 会影响 HDL-C 的代谢,TG 的升高常伴有 HDL-C 水平的降低^[11]。这可能是本研

究中模型组血浆 TG 水平较正常组无显著性差异, HDL-C 水平显著升高的原因。HDL-C 可以介导胆固醇的逆向转运,抑制 LDL-C 氧化修饰。然而有研究表明,高脂饲喂小鼠 3 周至 40 周血浆 HDL-C 水平升高^[12-14],同时,结合作者前期周期实验中 13 周高脂组 HDL-C 水平有所升高,26 周后显著降低的结果^[11]分析,本研究中模型组小鼠血浆 HDL-C 水平升高,TC/HDL-C 和 TG 水平无显著差异,而肝脏 TG 水平显著升高的原因可能是本研究处于高脂饲喂早期阶段。随着高脂饲喂周期的延长,小鼠血浆 TG 和 HDL-C 水平的变化规律值得进一步研究。动物实验证明壳寡糖的添加能够降低四氧嘧啶诱导糖尿病鼠 TC、TG 和 VLDL 水平,提高 HDL-C 水平^[15];通过降低血脂,增加 TG 和 TC 的排泄来降低动脉粥样硬化指数^[16]。在体外实验中,壳寡糖能抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的脂质堆积,降低细胞内 TC 和 TG 的含量^[17]。壳聚糖的体内降脂作用主要从降低脂肪消化、吸收和沉积,降低血液中的 TC 含量两方面研究。同时,壳聚糖对 TC 的吸附能力与其脱乙酰度呈正相关,吸附量还与分子量和形态有关。本研究利用高脂膳食诱导高脂血症,研究、比较壳寡糖和壳聚糖的降脂作用。实验结果表明,壳寡糖和壳聚糖添加后能够显著降低高脂小鼠血脂和肝脂含量,并且其肝脂含量与正常组没有显著差异。壳寡糖和壳聚糖添加后,肝脂酶和脂蛋白脂酶活性较模型组显著提高,说明其可以通过调节总脂酶活性来调节内源性脂质的代谢,降低血清和肝脏 TC 和 TG 含量。

模型组小鼠脂质过氧化增加与血脂水平升高相对应,进一步证实脂质过氧化参与高脂膳食诱发的血脂代谢紊乱的发生、发展。低聚淀粉样蛋白可以诱导原代海马神经元细胞神经毒性,壳寡糖的添加能够减少细胞活性氧自由基的产生,减少脂质过氧化^[18]。本研究中,壳寡糖和壳聚糖添加后能够显著增加脂肪组织抗氧化酶活性,减少高脂膳食引起的脂质过氧化,改善血脂代谢紊乱。

有研究表明,壳寡糖能够剂量依赖性增加肝脏胆固醇 7-羟化酶和低密度脂蛋白受体来降低血脂水平^[19],参与调节脂肪组织中脂肪合成相关基因表达^[20],通过下调脂肪酸连接蛋白和葡萄糖转运子 4 的表达来抑制 3T3-L1 脂肪细胞分化^[21]。壳聚糖能显著上调高脂膳食引起的低密度脂蛋白受体表达,轻微上调卵磷脂胆固醇酰基转移酶和胆固醇 7-羟化酶表达,下调 HMG CoA 还原酶 mRNA 表达,提高

脂肪酸受体 PPAR α 的表达,从而发挥降脂作用^[22,23]。本研究中,壳寡糖和壳聚糖的添加能够显著增加肝脏 Cpt1a 表达,降低 ApoE 表达,从而促进肝脏脂肪分解,缓解脂质代谢紊乱,壳寡糖的降脂作用好于壳聚糖。然而,壳寡糖和壳聚糖的降脂作用机制和量效关系还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Wang B, Sun J, Li LN, *et al.* Regulatory effects of resveratrol on glucose metabolism and T-lymphocyte subsets in the development of high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Food Funct*, 2014, 5: 1452-1463.
- 2 Wang B, Sun J, Ma YH, *et al.* Increased oxidative stress and the apoptosis of regulatory T cells in obese mice but not resistant mice in response to a high-fat diet. *Cell Immunol*, 2014, 288: 39-46.
- 3 Zhang JL, Liu JN, Li L, *et al.* Dietary chitosan can effectively improve hypercholesterolemia in rats fed high-fat diets. *Nutr Res*, 2008, 28: 383-390.
- 4 Fernandes JC, Sereno J, Garrido P, *et al.* Inhibition of bladder tumor growth by chitooligosaccharides in an experimental carcinogenesis model. *Mar Drugs*, 2012, 10: 2661-2675.
- 5 Xia Z, Chen J, Wu S. Hypolipidemic activity of the chitooligosaccharides from *Clanis bilineata* (Lepidoptera), an edible insect. *Int J Biol Macromol*, 2013, 59: 96-98.
- 6 Ju C, Yue W, Yang Z, *et al.* Antidiabetic effect and mechanism of chitooligosaccharides. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33: 1511-1516.
- 7 Miura T, Usami M, Tsuura Y, *et al.* Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18: 1623-1625.
- 8 Hsieh YL, Yao HT, Cheng RS, *et al.* Chitosan reduces plasma adipocytokines and lipid accumulation in liver and adipose tissues and ameliorates insulin resistance in diabetic rats. *J Med Food*, 2012, 15: 453-460.
- 9 Kim YR, Choi YS. Dose-Response of chitooligosaccharide on gut ecology and lipid status in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 2013, 42: 563-569.
- 10 Onishi H, Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 1999, 20: 175-182.
- 11 Assmann G, Schulte H. Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol*, 1992, 70: 733-737.