

# 硫酸软骨素降血脂功能的研究

摆倩文<sup>1,2</sup>, 张邵博<sup>1,2</sup>, 赫欣睿<sup>1,2</sup>, 诺如·以扎·诺丁<sup>3</sup>, 丁功涛<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西北民族大学 生物医学研究中心中国-马来西亚国家联合实验室; <sup>2</sup>西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030; <sup>3</sup>马来西亚标准与工业科学研究所工业生物技术研究中心, 莎亚南 40700

**摘要:** 本试验为探究硫酸软骨素(CS)饲喂对小鼠降血脂的作用,以高血脂症小鼠为模型,研究了低剂量(0.1g/d)、中剂量(0.5g/d)和高剂量(2.5g/d)CS给药的对小鼠体重(W)、血液中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)浓度的影响。结果表明:低剂量和中剂量CS对高脂血症小鼠体重的无显著影响( $P > 0.05$ ),高剂量CS对降低高脂血症小鼠体重有显著影响( $P < 0.05$ );低剂量CS对小鼠血液中TC、TG和LDL水平无显著影响( $P > 0.05$ ),而高剂量CS会显著降低小鼠血液的TC、TG和LDL水平( $P < 0.05$ ),同时低、中、高剂量CS会显著提高HDL水平( $P < 0.05$ )。本实验结果表明CS对高脂血症小鼠具有良好的降血脂功能。

**关键词:** 硫酸软骨素;总胆固醇;甘油三酯;低密度脂蛋白;高密度脂蛋白;降血脂

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0079-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.012

## Study on the function of chondroitin sulfate in lowering blood lipid

BAI Qian-wen<sup>1,2</sup>, ZHANG Shao-bo<sup>1,2</sup>, HE Xin-rui<sup>1,2</sup>, Nurul Izza Nordin<sup>3</sup>, DING Gong-tao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>China-Malaysia National Joint Laboratory, <sup>2</sup>Biomedical Research Center, College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030

<sup>3</sup>Standard and Industrial Research Institute of Malaysia (SIRIM), 40700 Shah Alam, Selangor, Malaysia

**Abstract:** This research is aimed to investigate the effect of chondroitin sulphate (CS) feeding on mice hypolipidemic performance. The hyperlipidemia model mice were fed with CS of the low dose (0.1 g/d), the medium dose (0.5 g/d) and the high dose (2.5 g/d) respectively to study the variation of mice body weight (W), the concentration of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) and high density lipoprotein (HDL) in the mice blood. The result shows that low dose CS and medium dose CS feeding exhibit no significant effects on the variation of the hyperlipidemia model mice body weight ( $P > 0.05$ ), while high dose CS exhibit the significant effect on the decreasing of the mice body weight ( $P < 0.05$ ). Low doses CS had no significant effect on the concentration of TC, TG and LDL in the mice blood ( $P > 0.05$ ), while high doses could significantly decrease the concentration of TC, TG and LDL in the mice blood ( $P < 0.05$ ), but low doses, medium and high doses significantly increase the HDL concentration ( $P < 0.05$ ). To summarise, CS has a positive hypolipidemic function in hyperlipidemic mice.

**Key words:** chondroitin sulfate; total cholesterol; triglycerides; low density lipoprotein; high density lipoprotein; Conquer the blood grease

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS),是存在于大多数动物软骨组织的一种纯天然的酸性粘多糖,

是无臭、略带咸味的白色或淡黄色粉末<sup>[1]</sup>,因吸水性强而易形成粘稠溶液。难溶于有机溶剂,如乙醇和氯仿等,其水溶液在高温时不稳定,酸性条件下易水解<sup>[2]</sup>。CS分子中含有能使其呈酸性的羧基和硫酸基,与钠、钾等离子结合能生成盐类聚合物,耐热性强,80℃下结构不易改变<sup>[3]</sup>。CS中含有半缩醛基,碱性环境下能与酒石酸铜溶液中Cu<sup>2+</sup>反应生成氧化亚铜<sup>[4]</sup>。其结构主要是D-葡萄糖醛酸、N-乙

收稿日期:2019-04-03 接受日期:2019-06-27

基金项目:中国-马来西亚在清真食品生物技术、检测及标准体系的合作研究;甘肃省国际科技合作项目(17YF1WA166);中国-马来西亚清真食品国家联合实验室;科技部对发展中国家科技援助项目(KY201501005)

\* 通信作者 Tel:86-017793140005; E-mail:dinggongtao@outlook.com

酰-D-氨基半乳糖和  $\beta$ -1,3 糖苷键连接形成二糖单位组成;二糖单位之间以  $\beta$ -1,4 糖苷键连接成生物大分子,一般含有 50 ~ 70 个双糖单位,相对分子量 5 000 ~ 50 000D<sup>[5]</sup>。据研究发现,硫酸软骨素具有多种生物活性,如抗凝、降血脂、提高免疫和抗炎等,在临床上可用于动脉粥样硬化、治疗风湿及骨关节炎等<sup>[6,7]</sup>。目前,CS 的提取方法多为碱法、中性盐法、酶法、碱盐法、超声波法、酶催化法、乙酸抽提法、发酵法等。超声波技术是近年来发展起来的一种新型的物理提取方法,利用特殊的强纵向震动、搅拌及加热等物理性能,破坏提取物细胞结构并提高提取率<sup>[8]</sup>。本试验利用碱-盐、超声波提取和酶解提取相结合的方法以制备硫酸软骨素,再通过分离纯化得到 CS 精提物,以高脂血症小鼠模型研究 CS 对其体重的影响和降血脂效果,为开发具有生物活性的 CS 提供理论依据。

## 1 实验过程

### 1.1 实验材料

硫酸软骨素由中国马来西亚国家联合实验室自制提纯(99.23%);普通基础饲料由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供;高脂高糖饲料(基础日粮 + 20% 猪油 + 10% 蔗糖 + 6% 全脂奶粉 + 10% 大豆分离蛋白 + 2% 实验动物预混料 + 2% 磷酸氢钙)购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司;注射用生理盐水购自青州尧王制药有限公司;苦味酸购自成都化夏化学试剂有限公司

### 1.1 试验动物

昆明小鼠,雌雄各半,体重  $23 \pm 2$  g,为洁净级小鼠,饲养于洁净动物房。

### 1.3 主要设备和检测试剂盒

台式高速冷冻离心机 H2050R(长沙湘仪离心机仪器有限公司);全自动生化分析仪 AU5831(Beckman);总胆固醇(TC)测定试剂盒(保定长城临床试剂公司);甘油三酯(TG)测定试剂盒(保定

长城临床试剂公司);高密度脂蛋白(HDL)测定试剂盒(保定长城临床试剂公司);低密度脂蛋白(LDL)测定试剂盒(保定长城临床试剂公司)。

## 2 方法

### 2.1 小鼠造模及其采血

取 50 只昆明小鼠,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄分笼。对小鼠编号并称重,饲喂。设置空白对照组和高脂对照组。低、中、高剂量组在对照组的基础上分别给 CS 低、中、高剂量组每只小鼠每天饲喂高脂高糖饮食 0.1、0.5、2.5 g,高脂对照组用生理盐水喂养。如上述要求饲养并于第 0 天和 35 天分别进行称重,观察小鼠生长发育的变化。

小鼠采血方式为断头采血,血液经 4 000 rpm 离心,15 min,吸取上清,冻存于  $-80$  °C 待检。

### 2.2 CS 降血脂作用探究

通过高脂高糖饲料饲喂小鼠,诱发小鼠高脂血症,再对实验组进行梯度 CS 溶液灌胃,通过测定小鼠血浆中的 TC、TG、HDL、LDL,评价 CS 对高脂血糖小鼠健康的影响。

### 2.3 指标测定

TC 和 TG 测定分别采用 CHO-PAP 法、GPO-PAP 法,HDL 和 LDL 测定采用化学沉淀法<sup>[9]</sup>。测定 TC 和 TG 的试剂盒中有工作液和标准液,而测定 HDL 和 LDL 的试剂盒中有定值血清、工作液(R1)和沉淀剂(R2)三种试液。将空白对照、高脂对照和 CS 高、中、低剂量的样品分别装入试管于 4 000 rpm 离心 10 min,取上清液后使用自动生化分析仪对这四项目标进行测定。

#### 2.3.1 TC、TG 测定

取空白对照组,高脂对照组,CS 低、中、高剂量所得的血清分别进行测定,设定全自动生化分析仪的各项指标。如表 2 所示后,放  $37$  °C 水浴 10 min,测定两指标。

表 1 TC、TG 测定所加试剂

Table 1 Reagent added for determination of TC and TG

加入物 Add content	空白管 Blank tube	标准管 Standard pipe	样品管 Sample tube
蒸馏水 Distilled water( $\mu$ L)	10	-	-
标准液 Standard( $\mu$ L)	-	10	-
样品 Sample( $\mu$ L)	-	-	10
工作液 Working liquid(mL)	1	1	1

### 2.3.2 HDL、LDL 测定

该两项指标分别用磷钨酸-镁和聚乙烯硫酸沉淀后,取空白对照组,高脂对照组,CS 低、中、高剂量

所得的血清上清分别进行测定,设定全自动生化分析仪的各项指标。如表 3 所示后置于 37 °C 水浴 10 min,进行测定。

表 2 HDL、LDL 测定所加试剂量

Table 2 Reagent added for determination of HDL and LDL

加入物 Add content	空白管 Blank tube	标准管 Standard pipe	样品管 Sample tube
定值血清 Constant value of serum (μL)	-	20	-
样品上清 Sample on clear (μL)	-	-	20
R1 (mL)	1	1	1

### 2.4 数据处理与统计

用 *t* 检验 (*t*-test) 将记录的各组数据进行统计分析, ( $P < 0.05$ , 差异显著;  $P < 0.01$  差异极显著;  $P < 0.001$ , 差异极显著。)

## 3 结果分析

### 3.1 CS 对小鼠生长发育的影响

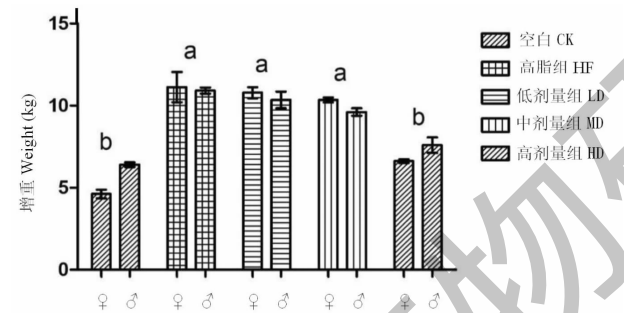


图 1 实验过程中小鼠生长发育的变化

Fig. 1 Changes of mouse growth and development during the experiment

注:ab 表示各剂量组相对于对照组差异显著性。Note: ab represented the significant difference between each dose group and the control group.

由图 1 可知,为各组小鼠饲喂高脂高糖饮食后的体重增长量,但各组组内雌雄小鼠之间体重水平均无显著差异。高脂对照组小鼠的体重增长要明显高出正常对照组的小鼠,说明高脂血症小鼠建模成功;低、中剂量组相对于空白对照组体重增长较显著 ( $P < 0.05$ ),较高脂对照组不明显,而高剂量组相对于空白组增重不显著,但明显低于高脂组,说明对于高脂高糖饮食,CS 低、中剂量无明显降脂作用,而高剂量可以明显使小鼠体重减轻,缓解小鼠的高血脂症,说明一定量的 CS 可以降低血脂,对高脂血症小鼠的生长发育具有良好作用。

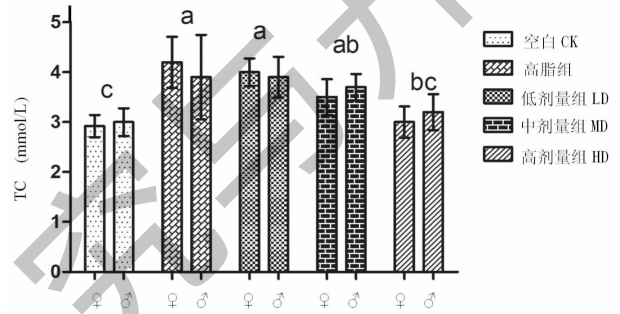


图 2 不同剂量 CS 对小鼠血清 TC 水平的影响

Fig. 2 Effects of different doses of CS on serum total cholesterol in mice

### 3.2 CS 对小鼠 TC 水平的影响

由图 2 可知,空白对照组和高脂对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ),说明试验的阴阳对照成立,但各组组内雌雄小鼠之间 TC 水平均无显著差异。CS 低、中剂量组相对于高脂对照组对小鼠高血脂症的 TC 水平差异不显著,而高剂量差异显著 ( $P < 0.05$ ),说明随着 CS 量的升高,可有效降低 TC 水平;空白对照组和高剂量组差异不显著,说明高剂量对调节小鼠 TC 水平有明显效果,对高血脂症小鼠的症状起缓解作用。

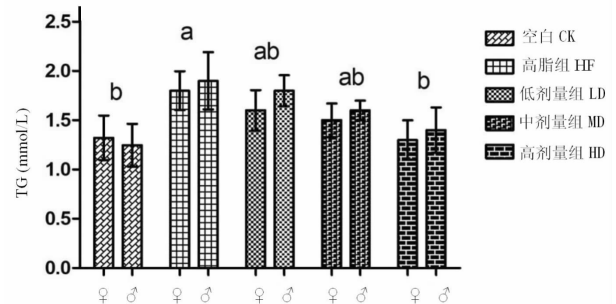


图 3 不同剂量 CS 对小鼠 TG 水平的影响

Fig. 3 Effects of different doses of CS on triglyceride levels in mice

据研究表明,TC 水平增高,可使高血脂的发病率明显升高,降低 TC 水平,能预防高血脂的发生与发展。

### 3.3 CS 对小鼠 TG 水平的影响

由图 3 可知,高脂对照组小鼠血清的 TG 水平与空白对照组的差异显著( $P < 0.05$ ),说明高血脂症小鼠的模型建立成功,但各组组内雌雄小鼠之间 TG 水平均无显著差异。低、中剂量组小鼠血清的 TG 水平较高血脂症对照组不显著,而高剂量组显著低于高脂组( $P < 0.05$ ),说明本实验高剂量 CS 能显著降低小鼠高血脂症的 TG 水平,低、中剂量 CS 对高血脂症小鼠的 TG 水平没有显著影响。

### 3.4 CS 对小鼠 HDL 水平的影响

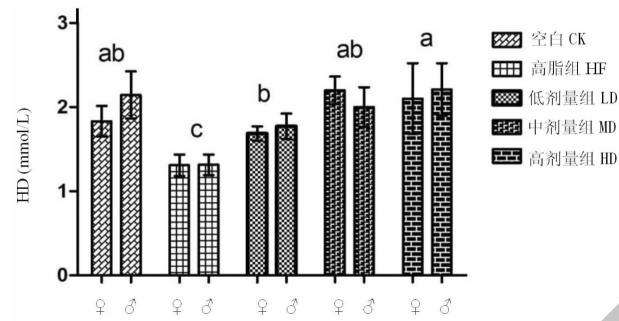


图 4 不同剂量 CS 对小鼠 HDL 水平的影响

Fig. 4 Effects of different doses of CS on high density lipoprotein in mice

由图 4 可以看出,空白对照组和高脂对照组差异显著( $P < 0.05$ ),说明高血脂症小鼠建模成功。随着 CS 剂量的升高,高脂血症小鼠血清中的 HDL 水平明显升高,各组组内雌雄小鼠之间 HDL 水平均无显著差异;低、中剂量组诱导 HDL 水平与高脂对照组相比,差异不显著,高剂量组与高脂对照组差异显著( $P < 0.05$ ),充分说明高剂量 CS 能明显升高高脂血症小鼠的 HDL,低、中剂量对其无明显影响。

### 3.5 CS 对小鼠低 LDL 水平的影响

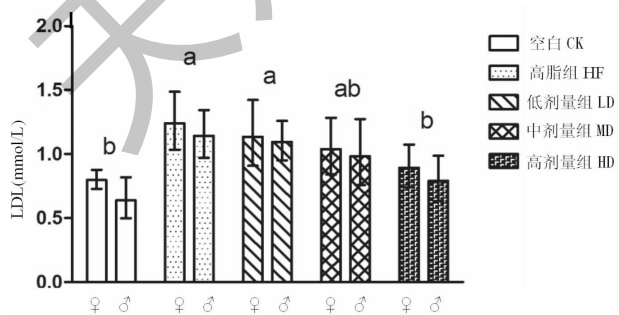


图 5 不同剂量 CS 对小鼠 LDL 水平的影响

Fig. 5 Effects of different doses of CS on low-density lipoprotein in mice

由图 5 可知,空白对照组和高脂对照组差异显著( $P < 0.05$ ),说明高血脂症小鼠建模成功。但各组组内雌雄小鼠之间 LDL 水平均无显著差异,通过显著性差异分析,高脂对照组,CS 低、中、高剂量组比空白对照组 LDL 水平要高,高脂对照组与低、中剂量组无显著性差异,高剂量组的 LDL 水平显著低于高脂对照( $P < 0.05$ ),说明 CS 量越大对 LDL 水平的影响越大,能显著降低高血脂症小鼠的 LDL 水平;而低、中剂量对高血脂症小鼠 LDL 水平影响不显著。

## 4 讨论

随着现代生活饮食营养的增加,成年人脂肪含量相对较高。血脂含量增高,脂肪代谢紊乱,患上动脉硬化和脑血栓等相关疾病的人也会越来越多。研究表明,CS 蛋白多糖能够通过和 LDL 结合以减少体内胆固醇含量,以降低体内血脂含量来预防疾病<sup>[9]</sup>。CS 还具有使小鼠血液中 TC、TG 和 LDL 降低,HDL 含量升高的功效<sup>[10-13]</sup>。Fu 等<sup>[15]</sup>的研究结果表明,高剂量 CS 能显著降低高血脂症小鼠的 TC 水平,低剂量 CS 对小鼠 TC 水平影响不显著;高、中剂量 CS 能显著降低高血脂症小鼠的 TG 水平;高、中剂量 CS 均能显著升高小鼠的 HDL 含量;高剂量 CS 能降低小鼠的 LDL。Sun<sup>[16]</sup>等人的研究中,用添加不同剂量 CS 的饲料对高血脂症小鼠进行灌胃试验,结果表明,CS 的降脂效果与其添加量有关,将 CS 加入高饲料,可降低 TC、TG、LDL 以及升高 HDL;同时,一定量的 CS 能明显减轻小鼠体重。本试验通过对 CS 进行降血脂功能的研究,中、高剂量的 CS 能显著降低高血脂症的 TC 水平( $P < 0.01$ ),中、高剂量 CS 能显著降低高血脂症的 TG 水平( $P < 0.01$ ),中、高剂量 CS 均能显著升高高脂血症的 HDL 水平,高剂量 CS 能显著降低高血脂症的 LDL 水平( $P < 0.05, P < 0.01$ ),即 CS 对高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)均有有利影响,说明 CS 对降低高血脂小鼠血脂有显著作用,对降血脂方面具有良好的功效,且相比于付莹所做的鸡 CS 和孙丰梅等所做的羊 CS 效果较好。

相关研究数据显示,CS 不仅对防止血液中胆固醇的增加有显著效果,而且可清除血液中沉积的脂质和脂蛋白,清除心脏周围血管的胆固醇,而起到调节脂质、降低脂质和抵抗动脉粥样硬化的功效,可使高血脂引起的冠心病和高血压等疾病的发生率显著降低<sup>[12]</sup>。因此充分利于动物软骨资源,对于研究附

加值较高的产品具有重要意义。

## 参考文献

- Mao L, Chen YJ, Zhu YP, et al. Analysis of inorganic components and structure in shark cartilage[J]. Use Mainten Mod Instrum(现代仪器使用与维修), 1998, 4: 20-21.
- Hassan MS, Mileva MM, Dweck HS, et al. Nitric oxide products degrade chondroitin sulfates[J]. Nitric Oxide-Biol CH, 1998, 2: 360-363.
- Bayraktar H, Akal E, Sarper O, et al. Modeling glycosaminoglycans-hyaluronan, chondroitin, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C and keratin sulfate[J]. J Mol Struct-theochem, 2004, 683: 121-132.
- Yu ZJ. Modern organic analysis[J]. Tianjin Sci Tech(天津科技), 1994: 202-205.
- Xu CT, Guan RZ, Zheng J, et al. Progress research of the determination methods of chondroitin sulfate[J]. J Jimei Univ; Nat Sci(集美大学学报:自科版), 2008, 13(1): 52-56.
- Li X, Yao K, Jia DY, et al. Extraction and purification of chondroitin sulfate[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2004, 16: 597-600.
- Chen S, Zhang XJ, Yan ZY, et al. The extraction technology of chondroitin sulfate from bonito bone[J]. J Anhui Agric Sci(安徽农业科学), 2016, 44: 69-71.
- Yin XP, Dang B. Study on extraction technology of chondroitin sulfate from yak trachea[J]. The Food Ind(食品工业), 2015, 36(9): 88-91.
- Nakano T, Lkawan N, Ozimek L. An economical method to extract chondroitin sulphate-peptide from bovine nasal cartilage[J]. Canadian Agric Engin, 2000, 42: 205-208.
- Kaplan M, Aviram M. Macrophage plasma membrane chondroitin sulfate proteoglycan bin dsoxidized low density lipoprotein[J]. Atherosclerosis, 2000, 149(1): 5-17.
- Yao X Y. Study on lipid-decreasing effect of chondroitin sulfate polysaccharides from monopterus albus bone[J]. China Med Herald, 2011, 8(30): 31-33.
- Ma M, Shi XY, Liu LS, et al. Progress in pharmacological activities of chondroitin sulfate[J]. Food Drug(食品与药品), 2017, 19: 450-455.
- Hu YL, Han FP, Liu Q, et al. The extraction technology of chondroitin sulfate from head of farmed sturgeon by enzymatic[J]. Food Sci Tech(食品科技), 2011, 36: 147-149.
- Xiong SL, Li AL, Wu ZM, et al. Preparation and structural analysis of chondroitin sulfate from chicken sternal cartilage[J]. Food Sci(食品科学), 2008, 25: 271-275.
- Fu Y. Extraction and research of the chondroitin sulfate on the function in blood lipid reduction[D]. Harbin: Harbin University of Commerce(哈尔滨商业大学), 2014.
- Sun FM, Li LH, Li YF, et al. Research of the chondroitin sulfate on its healthy function in blood lipid reduction[J]. J Hebei North Univ; Nat Sci(河北北方学院学报:自科版), 2006, 22(4): 46-51.
- Castro-Webb N, Ruiz-Narvaez EA, Campos H. Cross-sectional study of conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of diabetes[J]. AJCN, 2012, 96: 175-181.
- Ong KW, Hsu A, Tan BKH, et al. Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: A contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes[J]. PLoS ONE, 2012, 7: e32718.
- Liu XX, Sun HL, Ge HN, et al. Improvement of blood lipid and regulation of PPAR gamma in type 2 diabetic rats by radix rostrariae[J]. Modern Food Sci Tech, 2018, 34(9): 12-17.
- Pender C, Goldfine ID, Mancham VP, et al. Regulation of insulin receptor function by a small molecule insulin receptor activator[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 43565-43571.
- Wang ZC, Hu K, Lai WY, et al. Effects of TNF-alpha on glucose uptake of human adipocytes cultured *in vitro*[J]. Clin Med(临床医学), 2007, 27(11): 87-89.
- Yuan F, Liu YH, Tian JW, et al. Adiponectin protects the kidney of diabetic rats and its antioxidant mechanism[J]. J Southern Med Univ(南方医科大学学报), 2010, 3: 426-430.

(上接第 126 页)

- Safran M, Vered Chalifa-Caspi, Orit Shmueli, et al. Human gene-centric databases at the weizmann institute of science; genecards, udb, crowd and horde[J]. NAR, 2003, 31: 142-146.
- Mei SY. In silico enhancing protein interaction networks in string to predict drug-resistance pathways and pharmacological risks[J]. J Proteome Res, 2018, 17: 1749-1760.
- Trott O, Olson AJ. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2009, 31: 455-461.
- Chen GM, Zhong XY, Zhao JL, et al. Target prediction and mechanism of huangqi guizhi wuwu decoction in the treatment of diabetic peripheral neuropathy[J]. Chin J Exp Med(中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 214-222.
- Liu T, Gong ZF, Yin J, et al. Resveratrol improves vascular inflammation in diabetes mellitus and its correlation with rage signal[J]. Chin J Diabetes, (中国糖尿病杂志), 2012, 20: 456-460.