

壳寡糖对高脂血症小鼠降血脂及肝脏保护的作用

申 杰,叶希韵,沈 菊,金百胜,王耀发

(华东师范大学 生命科学学院,上海 200062)

[摘 要] 通过建立高脂血症小鼠模型来研究壳寡糖对小鼠降血脂及肝脏保护的作用。将昆明种小鼠分为正常组、高脂血症模型组、壳寡糖组和脂必妥对照组,喂养 7 周后,测定血清中总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)的含量,丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)活性以及肝脏中丙二醛(MDA)、总巯基(T-SH)、非蛋白结合巯基(NP-SH)和蛋白结合巯基(PB-SH)的含量。结果表明,壳寡糖使高脂血症小鼠血清中 TC 含量、ALT 和 AST 活性显著降低,HDL-C/TC 显著升高,显著提高了肝脏中 T-SH 的含量,降低了肝脏中的 MDA 含量。说明壳寡糖具有明显降血脂和保护肝脏的作用。

[关键词] 壳寡糖;高脂血症;降血脂作用;护肝作用;小鼠

[中图分类号] R965;S865.1⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)09-0035-04

Studies on the effect of chito oligosaccharide on reducing lipid and protecting liver of chito oligosaccharide in hyperlipidemia mice

SHEN Jie, YE Xi-yun, SHEN Ju, JIN Bai-sheng, WANG Yao-fa

(School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: To investigate the prevention effect of chito oligosaccharide on hyperlipidemia in mice and protective effect on liver of chito oligosaccharide in mice, 40 Kunming mice are divided into four groups randomly: controlled group (N), high lipid group (L), chito oligosaccharide group (C) and positive drug group (zhibituo) (P). The levels of TC, HDL-C, ALT and AST in serum and the contents of T-SH, NP-SH and PB-SH, MDA in livers are determined in all groups after 7 weeks. Compared with group L, there are declines of TC, ALT, AST in serum and MDA in livers. There are increases of the ratio of HDL-C to TC in serum and T-SH in livers. The results show that chito oligosaccharide decrease the level of lipid in serum and have a protective effect on liver in mice.

Key words: chito oligosaccharide; hyperlipidemia; reducing lipid; protecting liver; mice

高脂血症是由于脂肪代谢异常导致血浆中脂质水平高于正常的一种病症,近几年来其发病率呈现出逐年增高及年轻化的趋势。高脂血症是导致动脉粥样硬化的主要因素,可引起严重的心脑血管疾病。因此,进行中医药防治高脂血症的试验性研究,开发安全高效降脂药物成为当前的迫切需要。

甲壳质(Chitin)是自然界含量仅次于纤维素的第二大生物大分子多糖,广泛存在于昆虫、甲壳类动物外壳,真菌细胞壁及一些藻类当中,是由 N-乙酰基葡萄糖聚合而成。甲壳质经脱乙酰化处理得到壳聚糖(Chitosan)。近几十年来,国内外广泛开展了甲壳质、壳聚糖的研究,证明其具有多种生理活

†收稿日期] 2006-12-11

[基金项目] 农业部“948”项目(2006-G28)

[作者简介] 申 杰(1981-),男,山东青岛人,在读硕士,主要从事肝脏保护研究。

[通讯作者] 叶希韵(1964-),女,上海人,副教授,主要从事心血管细胞的损伤与修复研究。E-mail:xyye@bio.ecnu.edu.cn。

性。目前壳聚糖已被用作免疫促进剂、抗肿瘤制剂、止血剂和伤口敷料等^[1-4],但是由于其不溶于水及其他许多无机溶剂,所以在开发应用上受到很大限制。而用甲壳质、壳聚糖降解制备的壳寡糖,是对甲壳质、壳聚糖更有效的利用。壳寡糖是由 2~10 个氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖。通过一系列试验发现,其不仅水溶性好,易被人体吸收,与壳聚糖具有相同的作用,如抑菌、抗肿瘤、调节免疫力等^[5],而且应用领域大大拓宽,广泛应用于医药、食品、饮料、化妆品和化工等多种领域中。

目前,国内外对壳聚糖的降血脂作用及机理的研究比较多,而对壳寡糖降血脂作用的报道则较少^[6-7]。此外,国内尚未见有关利用壳寡糖作为干预物质,作用于高脂血症模型小鼠肝保护的试验研究报道。本试验初步研究了壳寡糖对高脂血症小鼠降血脂及肝脏保护的作用,旨在为壳寡糖保健品的开发研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 雄性昆明种小鼠(质量 25 g 左右)及基础饲料均购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.1.2 试剂与仪器

试剂壳寡糖(聚合度 6~8,平均分子量 2 500,脱乙酰度 $\geq 90\%$),上海伟康生物制品有限公司生产;地奥脂必妥片,成都地奥九泓制药厂生产;胆固醇粉剂,上海蓝季生化有限公司生产;总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒,上海科欣生物技术研究生产。仪器包括 HITACHI 850 荧光分光光度计(Hitachi High Technologies Corporation)、722 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)和 Olympus 普通光学、荧光显微镜(奥林巴斯株式会社)。

1.2 高脂血症小鼠模型的建立

雄性昆明种小鼠 10 只,饲喂实验室自行配制的高脂饲料(高脂饲料配方:由 840 g/kg 基础饲料、100 g/kg 市售猪油、10 g/kg 胆固醇、50 g/kg 鸡蛋黄加适量的自来水充分搅拌均匀,制成颗粒状)。7 周后在形态学上和血清中分别检测,结果与正常组小鼠相比,高脂血症模型组小鼠质量及血清中总胆固醇含量均明显升高,肝脏颜色呈淡黄色,说明按该方法建模成功。

1.3 试验设计

将雄性昆明种小鼠随机分为 4 组,分别为 正常组(N):小鼠喂以基础饲料,并灌胃 9 g/L NaCl 溶液; 高脂血症模型组(L):小鼠喂以自行配制的高脂饲料,并灌胃 9 g/L NaCl 溶液; 脂必妥对照组(P):小鼠喂以高脂饲料,并灌胃 15 g/L 脂必妥水剂; 壳寡糖组(C):小鼠喂以高脂饲料,并灌胃 37.5 g/L 壳寡糖水剂。

每组 10 只小鼠,各组小鼠均自由进食,水剂及 NaCl 溶液灌胃量均为 0.4 mL/(d·只),持续饲养 7 周。

1.4 测定指标及方法

1.4.1 血清生化指标的测定 各组小鼠饲养 7 周末禁食 12 h 后,眼球取血,分离出血清,测定各组小鼠血清中总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、由 TC 与 HDL-C 值的差得出极低密度与低密度脂蛋白胆固醇之和(VLDL-C + LDL-C)^[8]。

1.4.2 肝脏丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量的测定 参考文献[9]的方法进行。

1.4.3 肝脏巯基含量的测定 肝脏中总巯基(T-SH)、非蛋白结合巯基(NP-SH)和蛋白结合巯基(PB-SH)含量测定参考文献[10]的方法进行。

1.5 数据处理

数据处理采用 SPSS12.0 统计软件进行单因子方差分析,数据以($\bar{X} \pm SD$)表示。

2 结果与分析

2.1 壳寡糖对高脂血症小鼠肝脏外观的影响

对刚取出的各组肝脏观察发现,正常组肝脏体积较小,颜色较深,呈红褐色,表面光滑,并具有一定的组织弹性;而高脂血症模型组小鼠肝脏呈棕黄色,切面呈淡黄色且稍隆起,包膜紧张外翻,边缘较钝,质地略软,触之有油腻感,且组织易碎、肿大;脂必妥对照组与壳寡糖组小鼠的肝脏在形态上接近正常组。表明脂必妥和壳寡糖均有较明显的肝脏保护作用。

2.2 壳寡糖对高脂血症小鼠血脂水平的影响

表 1 表明,与正常组小鼠相比,高脂血症模型组小鼠的 TC 含量显著增高,HDL-C/TC 显著降低,VLDL-C + LDL-C 含量显著升高($P < 0.05$),表明按本试验方法给小鼠喂养高脂饲料,可成功建立高脂血症小鼠模型。与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组、脂必妥对照组小鼠 TC 含量和 VLDL-C + LDL-

C 含量均显著降低;此外,壳寡糖组小鼠的 HDL-C/TC 显著增加。表明壳寡糖、脂必妥均能降低血清中 TC 与 VLDL-C + LDL-C 含量,壳寡糖还能显著提高 HDL-C/ TC,有明显的降血脂效果。

表 1 壳寡糖对高脂血症小鼠血脂水平的影响 (n = 10)

组别 Group	TC/ (mmol · L ⁻¹)	HDL-C/ (mmol · L ⁻¹)	(HDL-C/ TC)/ %	(VLDL-C + LDL-C)/ (mmol · L ⁻¹)
正常组 N	3.14 ±0.23	2.07 ±0.13	66.39 ±3.70	1.07 ±0.35
高脂血症模型组 L	5.47 ±0.08	2.31 ±0.16	42.28 ±1.54	3.16 ±0.25
壳寡糖组 C	4.83 ±0.10 *	2.57 ±0.16	53.11 ±2.74 *	2.26 ±0.26 *
脂必妥对照组 P	4.96 ±0.10 *	2.42 ±0.14	49.78 ±2.6	2.52 ±0.29 *

注:标 者表示与正常组相比,差异达显著水平 (P < 0.05);标 * 者表示与高脂血症模型组相比差异达显著水平 (P < 0.05)。下同。
Notes:“ ”means significant difference (P < 0.05) compared with controlled group;“ * ” means significant difference (P < 0.05) compared with high lipid group. The following tables as same.

2.3 壳寡糖对高脂血症小鼠血清 AL T 和 AST 活性的影响

表 2 表明,与正常组小鼠相比,高脂血症模型组小鼠血清中 AL T 和 AST 活性均显著升高,表明本研究的建模方法可使试验小鼠肝功能下降;与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组、脂必妥对照组小鼠血清中 AL T 和 AST 活性均显著降低,表明壳寡糖和脂必妥均能明显抑制因高血脂造成的肝功能下降。

表 2 壳寡糖对高脂血症小鼠血清 AL T 和

AST 活性的影响 (n = 10) U/L

Table 2 Effect of chito oligosaccharide on activities of AL T and AST of hyperlipidemia mice inserum

组别 Group	AL T	AST
正常组 N	29.55 ±1.56	68.97 ±1.66
高脂血症模型组 L	50.19 ±4.00	123.47 ±10.37
壳寡糖组 C	27.65 ±1.56 *	82.72 ±3.22 *
脂必妥对照组 P	25.78 ±1.61 *	106.64 ±5.39 *

2.4 壳寡糖对高脂血症小鼠肝脏丙二醛含量的影响

表 3 表明,与正常组小鼠相比,高脂血症模型组小鼠肝脏的 MDA 含量显著升高,表明本研究的建模方法可使试验小鼠肝脏脂质过氧化程度升高。与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组和脂必妥对照组小鼠肝脏的 MDA 含量均显著降低,表明壳寡糖和脂比妥均能显著抑制因高血脂造成的脂质过氧化

物大量堆积对肝脏的氧化损伤。

表 3 壳寡糖对高脂血症小鼠对肝脏丙

二醛含量的影响 (n = 10)

Table 3 Effect of chito oligosaccharide on contents of MDA in hyperlipidemia mice liver nmol/ mg

组别 Group	MDA
正常组 N	0.95 ±0.08
高脂血症模型组 L	1.52 ±0.08
壳寡糖组 C	1.03 ±0.03 *
脂必妥对照组 P	1.07 ±0.13 *

2.5 壳寡糖对高脂血症小鼠肝脏巯基含量的影响

表 4 表明,与正常组小鼠相比,高脂血症模型组小鼠肝脏的 T-SH、NP-SH 和 PB-SH 的含量均显著降低,表明本研究的建模方法可使肝脏的 T-SH 含量和 NP-SH 含量降低,从而使肝脏抗氧化水平降低。

表 4 还表明,与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组小鼠肝脏的 T-SH 和 PB-SH 含量均显著升高,但 NP-SH 含量降低,表明壳寡糖能显著提高 T-SH 和 PB-SH 含量,但不能显著提高 NP-SH 含量。与高脂血症模型组小鼠相比,脂必妥对照组小鼠肝脏的 NP-SH 含量显著升高,T-SH 和 PB-SH 含量均升高,但差异均不显著。表明脂比妥能够显著提高 NP-SH 的含量,而对提高 T-SH 和 PB-SH 含量没有显著效果。

表 4 壳寡糖对高脂血症小鼠肝脏 T-SH 和 NP-SH 含量的影响 (n = 10)

Table 4 Effect of chito oligosaccharide on concents of T-SH and NP-SH in hyperlipidemia mice liver nmol/ mg

组别 Group	T-SH	NP-SH	PB-SH
正常组 N	31.27 ±1.98	4.99 ±0.18	26.82 ±1.95
高脂血症模型组 L	22.18 ±1.61	3.64 ±0.25	18.54 ±0.70
壳寡糖组 C	27.21 ±1.87 *	3.53 ±0.13	23.68 ±1.76 *
脂必妥对照组 P	24.92 ±1.54	4.44 ±0.33 *	20.57 ±1.47

3 讨 论

3.1 壳寡糖对高脂血症小鼠的降血脂作用

本试验结果表明,壳寡糖和脂必妥均可显著降

低高脂血症小鼠的 TC 含量及 VLDL-C + LDL-C 含量,壳寡糖还可以显著提高 HDL-C/ TC,表明壳寡糖和脂必妥均具有明显的降血脂效果,其中壳寡糖的效果更加明显。有报道指出,壳寡糖可以抑制

HMG-CoA 还原酶活性,是一种天然的 HMG-CoA 还原酶抑制剂^[11]。因此,壳寡糖可以抑制内源胆固醇的合成,但是本试验建立的小鼠高脂血症模型,主要是由于食物中高胆固醇引起小鼠血液中胆固醇含量升高,而壳寡糖组小鼠血液中总胆固醇含量显著降低,因此壳寡糖可能对小鼠吸收食物中的胆固醇也有抑制作用。在本试验中,各组的 HDL-C 含量没有显著差异,与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组小鼠的 HDL-C/TC 显著提高,一种机制可能是因为壳寡糖降低了肝脏中 VLDL 和 LDL 的合成速率或提高了 VLDL 和 LDL 的降解速度;另外一种机制可能是 VLDL 和 LDL 转化成 HDL-C 的速度加快,或者两种机制兼而有之,这还有待于进一步研究。

3.2 壳寡糖对高脂血症小鼠的肝脏保护作用

本研究中,与高脂模型组小鼠相比,壳寡糖组和脂必妥组小鼠的肝脏均明显接近于正常组小鼠,直观地说明了壳寡糖对小鼠肝脏具一定的保护作用。

转氨酶作为反映肝功能损伤的灵敏指标,在正常条件下,这些酶存在于细胞质当中,当细胞膜受到损伤的时候就会释放出来。血清中 ALT 和 AST 活性升高能够反映肝细胞膜结构的损伤程度。本试验中,与正常组小鼠相比,高脂血症模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 的活性均显著升高;与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著降低,表明壳寡糖能显著抑制因高血脂引起的血清转氨酶水平升高,对肝功能和肝细胞膜结构有一定的保护作用。

MDA 是一种脂质过氧化物,其含量的高低可以间接反映机体内脂质的过氧化程度。另外,脂质过氧化物能对细胞膜的结构和功能造成不可逆转的损伤^[12]。从本试验结果可以看出,高脂血症模型组小鼠肝脏中 MDA 的含量,较正常组小鼠显著升高,与血脂水平呈正相关,表明高血脂使高脂血症模型组小鼠肝脏内脂质过氧化程度提高;与高脂血症模型组小鼠相比,壳寡糖组小鼠肝脏中 MDA 的含量显著降低,表明壳寡糖能显著降低 MDA 的含量,抑制了脂质过氧化,有一定的抗氧化作用,能够保护肝细胞膜的结构和功能,从而对肝脏有一定的保护作用。

巯基是维持机体正常生理功能活性基团,通常分为两类,一类是非蛋白结合巯基(NP-SH),90%以上存在于谷胱甘肽(GSH)中,是由细胞合成的抗氧化剂和解毒剂;另一类为蛋白结合巯基(PB-SH),

是多种酶的活性中心^[13]。肝脏是机体的重要解毒器官,含有丰富的 GSH。GSH 不仅具有解毒功能,而且还是一种低分子清除剂,能防止细胞因氧化而受到的损伤,因此又具有抗氧化功能。本研究中,与高脂血症模型组小鼠相比,脂必妥对照组小鼠肝脏 NP-SH 含量显著提高,说明脂必妥可以提高高脂血症小鼠体内抗氧化水平和解毒功能,而壳寡糖在这方面的效果不明显;高脂血症模型组小鼠肝脏 PB-SH 含量均低于其他 3 组,这可能是由于高脂血症小鼠体内脂质过氧化程度提高,使细胞膜发生脂质过氧化,导致膜蛋白质聚集和交联所致。本研究中,壳寡糖可以显著提高 PB-SH 含量,可能是壳寡糖直接抑制了脂质对细胞膜的氧化损伤,降低了脂质过氧化水平,并且保护了许多酶的活性不受抑制。由此可知,壳寡糖和脂必妥均能起到抗氧化和解毒的效果,但其起作用的机制可能不同。

3.3 壳寡糖的应用前景

本研究中,无论是从保护肝脏组织形态完整性和抑制脂质堆积方面看,还是从降血脂、对肝脏功能的保护和抗氧化水平综合来看,脂必妥和壳寡糖均具有显著效果,而壳寡糖的效果要更好一些。脂必妥属于复方药,其降血脂和对肝脏的保护作用,已经在前期实验研究和临床上均已得到验证。而壳寡糖是在成分比较单一的情况下达到了更好的疗效,因此以后应该在壳寡糖与其他降血脂的有效成分复合来提高治疗效果方面作进一步研究,此外壳寡糖是由天然提取物甲壳素加工而成,来源广泛,因此具有更好的应用前景。

【参考文献】

- [1] 王真,陈西广,郎刚华,等.甲壳质及其衍生物生理活性研究进展[J].海洋科学,2000,24(9):30-32.
- [2] 杜昱光,白雪芳,金宗濂,等.壳寡糖抑制肿瘤作用的研究[J].中国海洋药物,2002,21(2):18-21.
- [3] Govrner J P. Recent advances in topical agents for prehospital haemostasis[J]. Trauma, 2002, 4:203-209.
- [4] 陈煜,龚桂芳,罗运军,等.甲壳素和壳聚糖在伤口敷料中的应用[J].高分子通报,2005(1):94-100.
- [5] 胡志鹏.壳寡糖的研究进展[J].中国生化药物杂志,2003,24(4):210-212.
- [6] 蒋莉,戚晓红,吴翠贞,等.壳聚糖对大鼠实验性脂肪肝的防治作用[J].中国海洋药物,2000(1):28-31.
- [7] Singla A K, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update[J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53(8):1047-1067.

(下转第 44 页)

- [25] Suzuki N, Nishii K, Okazaki T, et al. Human artificial chromosomes constructed using the bottom-up strategy are stably maintained in mitosis and efficiently transmissible to progeny mice[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26615-26623.
- [26] Itzhaki J E, Barnett M A, MacCarthy A B, et al. Targeted breakage of a human chromosome mediated by cloned human telomeric DNA[J]. *Nat Genet*, 1992, 2(4): 283-287.
- [27] Farr C J, Bayne R A, Kipling D, et al. Generation of a human X-derived minichromosome using telomere-associated chromosome fragmentation[J]. *EMBO J*, 1995, 14(21): 5444-5454.
- [28] Heller R, Brown K E, Burgdorf C, et al. Mini-chromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(14): 7125-7130.
- [29] Harrington J J, Van Bokkelen G, Mays R W, et al. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes [J]. *Nat Genet*, 1997, 15(4): 345-355.
- [30] Mejia J E, Willmott A, Levy E, et al. Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(2): 315-326.
- [31] Kawahara M, Inoue T, Ren X, et al. Antigen-mediated growth control of hybridoma cells via a human artificial chromosome [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770(2): 206-212.
- [32] Basu J, Willard H F. Human artificial chromosomes: potential applications and clinical considerations[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2006, 53(5): 843-853.
- [33] Grimes B R, Schindelhauer D, McGill N I, et al. Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome[J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(10): 910-914.
- [34] Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, et al. Double trans-chromosomal mice: maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 722-727.
- [35] Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, et al. Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(10): 1086-1090.
- [36] Shen M H, Yang J, Loupart M L, et al. Human mini-chromosomes in mouse embryonal stem cells[J]. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(8): 1375-1382.
- [37] Co D O, Borowski A H, Leung J D, et al. Generation of transgenic mice and germline transmission of a mammalian artificial chromosome introduced into embryos by pronuclear microinjection[J]. *Chromosome Res*, 2000, 8(3): 183-191.
- [38] Auriche C, Donini P, Ascenzioni F. Molecular and cytological analysis of a 5.5 Mb minichromosome[J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(2): 102-107.
- [39] Ren X, Tahimic C G, Katoh M, et al. Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery [J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(1): 43-50.

(上接第 38 页)

- [8] 程容懿. 甜菜碱预防小鼠高脂血症和脂肪肝的试验研究[J]. *中国药师*, 2004, 7(6): 411-413.
- [9] 杨 李, 唐 瑛, 左 娟, 等. 硫代巴比妥酸法测定血清脂质过氧化物方法的改进[J]. *华南国防医学杂志*, 2004, 18(1): 30-32.
- [10] 周婷婷. 巯基物质对大鼠颅脑外伤后的胃细胞保护作用[J]. *北京医学*, 2004, 26(4): 232-235.
- [11] Chobot V, Kremenak J, Opletal L. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system[J]. *Chitin and Chitosan Ceska Slov Farm*, 1995, 44(4): 190.
- [12] Girotti A W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems[J]. *J Lipid Res*, 1998, 39: 1529-1542.
- [13] 金焕荣, 张 越, 刘 军, 等. 乙二醛对小鼠谷胱甘肽过氧化物酶活力及巯基含量的影响[J]. *工业卫生与职业病*, 2004, 30(1): 25-28.