

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21620141152585

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

鳄鱼硫酸软骨素的制备及其生物

活性的研究

Studies on the Preparation and Biological Activities of
Chondroitin Sulfate from Crocodile

郑雅惠

指导教师姓名: 陈清西 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2017年4月18日

论文答辩时间: 2017年5月13日

学位授予日期: 2017年 月 日

答辩委员会主席: 颜江华 教授

评阅人: _____

2017年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

论文主要缩略词表	1
摘要.....	2
ABSTRACT.....	1
1 前言	3
1.1 鳄鱼的研究状况.....	3
1.2 硫酸软骨素的概述.....	4
1.2.1 硫酸软骨素的结构.....	5
1.2.2 硫酸软骨素的物理性质.....	5
1.2.3 硫酸软骨素的化学性质.....	5
1.3 硫酸软骨素的提取方法.....	6
1.3.1 碱法.....	6
1.3.2 酶降解法.....	6
1.3.3 中性盐法.....	6
1.3.4 碱盐法.....	6
1.3.5 酸法.....	7
1.3.6 超声波辅助法.....	7
1.3.7 发酵法.....	7
1.4 硫酸软骨素的纯化方法.....	7
1.4.1 溶剂法.....	7
1.4.2 超滤膜法.....	8
1.4.3 季铵盐沉淀法.....	8
1.4.4 离子色谱法.....	8
1.4.5 层析法.....	8
1.4.6 电泳法.....	8
1.5 硫酸软骨素结构的分析方法.....	9
1.5.1 色谱-质谱联用分析	9

1.5.2 红外光谱分析.....	9
1.5.3 核磁共振分析.....	9
1.5.4 其他方法.....	9
1.6 硫酸软骨素的生物活性.....	10
1.6.1 抗凝血作用.....	10
1.6.2 抗氧化作用.....	10
1.6.3 降血脂及抗动脉粥样硬化作用.....	10
1.6.4 免疫调节作用.....	10
1.6.5 防治关节炎作用.....	11
1.6.6 保护和修复神经元作用.....	11
1.6.7 抗肿瘤作用.....	11
1.7 硫酸软骨素的应用现状.....	11
1.7.1 临床医学上的应用.....	12
1.7.2 食品上的应用.....	12
1.7.3 化妆品上的应用.....	12
1.8 本研究的内容与意义.....	12
2 材料与试剂.....	14
2.1 主要材料来源.....	14
2.2 主要药品和试剂.....	14
2.3 主要仪器.....	16
2.4 培养基及常用溶液的配制.....	17
2.4.1 细胞培养基的配制.....	17
2.4.2 常用溶剂的配制.....	17
3 实验方法.....	18
3.1 响应曲面法优化硫酸软骨素提取条件.....	18
3.1.1 硫酸软骨素的制备流程.....	18
3.1.2 硫酸软骨素含量的测定.....	18
3.1.3 单因素条件实验设计.....	19

3.1.4 响应曲面法.....	20
3.2 硫酸软骨素的分离纯化.....	21
3.2.1 Q-Sepharose-F-F 离子交换树脂柱层析分离硫酸软骨素.....	21
3.2.2 Sephadex G-150 柱层析分离纯化硫酸软骨素.....	21
3.3 硫酸软骨素理化性质及结构分析.....	22
3.3.1 糖醛酸含量测定.....	22
3.3.2 氨基己糖含量测定.....	22
3.3.3 硫酸基含量测定.....	23
3.3.4 紫外光谱分析.....	24
3.3.5 高效液相色谱法分析.....	25
3.3.6 红外光谱分析.....	25
3.3.7 核磁共振图谱分析.....	25
3.4 硫酸软骨素功能研究.....	25
3.4.1 硫酸软骨素对 LO2 细胞毒性作用的研究.....	25
3.4.2 鳄鱼硫酸软骨素对淋巴细胞的影响.....	26
3.4.3 鳄鱼硫酸软骨素抗氧化能力的测定.....	26
3.4.4 小鼠的慢性毒性实验.....	27
3.4.5 硫酸软骨素缓解体力疲劳功能的研究.....	28
3.5 统计学分析.....	28
4 结果与分析.....	29
4.1 单因素条件优化.....	29
4.1.1 NaOH 浓度的优化.....	30
4.1.2 固液比的优化.....	30
4.1.3 提取温度的优化.....	30
4.1.4 提取时间的优化.....	31
4.2 响应曲面法优化.....	31
4.3 鳄鱼硫酸软骨素的分离纯化.....	35
4.3.1 Q-Sepharose-F-F 离子交换树脂柱层析分离鳄鱼硫酸软骨素.....	35
4.3.2 Sephadex G-150 柱层析分离纯化鳄鱼硫酸软骨素.....	36

4.4 鳄鱼硫酸软骨素理化性质及结构分析结果	37
4.4.1 鳄鱼硫酸软骨素化学组成分析.....	37
4.4.2 紫外光谱检测分析.....	38
4.4.3 高效液相色谱法.....	40
4.4.4 红外光谱检测分析.....	41
4.4.5 核磁共振图谱检测分析.....	42
4.5 鳄鱼硫酸软骨素功能研究	43
4.5.1 鳄鱼硫酸软骨素对 LO2 细胞毒理性作用评估	43
4.5.2 鳄鱼硫酸软骨素的体外免疫调节作用.....	44
4.5.3 鳄鱼硫酸软骨素抗氧化能力.....	46
4.5.4 小鼠的慢性毒性实验.....	49
4.5.5 鳄鱼硫酸软骨素缓解体力疲劳功能的测定.....	54
5 讨论	55
6 结论	57
7 展望	59
参考文献	60
在学期间发表论文	67
致 谢	68

Content

The main abbreviations.....	1
Chinese abstract.....	2
English abstract.....	1
1 Forward	3
1.1 Survey of Research on Crocodile.....	3
1.2 Introduction of chondroitin sulfate	4
1.2.1 Structure of chondroitin sulfate	5
1.2.2 Physical property of chondroitin sulfate	5
1.2.3 Chemical property of chondroitin sulfate	5
1.3 Extraction of chondroitin sulfate.....	6
1.3.1 Soda solution.....	6
1.3.2 Enzymolysis.....	6
1.3.3 Neutral salt solution	6
1.3.4 Alkali salt law	6
1.3.5 Organic acid solution	7
1.3.6 Ultrasonic auxiliary.....	7
1.3.7 microorganism fermentation	7
1.4 Purification of chondroitin sulfate	7
1.4.1 Organic solvent	7
1.4.2 Ultrafiltration membrane	8
1.4.3 Quaternary ammonium salt.....	8
1.4.4 Ion chromatography	8
1.4.5 Chromatography	8
1.4.6 Eletrophoresis	8
1.5 Structure analysis of chondroitin sulfate.....	9
1.5.1 Analysis of GC-MS.....	9
1.5.2 Analysis of infraed spectroscopic	9
1.5.3 Analysis of NMR	9
1.5.4 Other methods.....	9
1.6 Biological activity of chondroitin sulfate	10

1.6.1 Anticoagulation	10
1.6.2 Antioxidation.....	10
1.6.3 Reducing blood fat and anti-atherosclerosis	10
1.6.4 Immunomodulatory.....	10
1.6.5 Prevent arthritis	11
1.6.6 Protection and restoration of neurons	11
1.6.7 Anti-tumor.....	11
1.7 Application status of chondroitin sulfate	11
1.7.1 Application of chondroitin sulfate on clinical medicine	12
1.7.2 Application of chondroitin sulfate on the food	12
1.7.3 Application of chondroitin sulfate on the cosmetics.....	12
1.8 The sinificance and contents of this research	12
2 Material and Reagents	14
2.1 Source of major materials	14
2.2 Major medicines and reagents	14
2.3 Major instruments	16
2.4 Culture medium and frequently-used solution.....	17
2.4.1 Culture medium of cell	17
2.4.2 Frequently-used solution.....	17
3 Experimental methods.....	18
3.1 Optimization of the crocodile chondroitin sulfate by response surface analysis.....	18
3.1.1 Technology of production of chondroitin sulfate.....	18
3.1.2 Assay of chondroitin sulfate.....	18
3.1.3 Experiment design of the conditions of single factors.....	19
3.1.4 Response surface methodology.....	20
3.2 Purification of the crocodile chondroitin sulfate.....	21
3.2.1 Separation on Q-Sepharose-F-F column.....	21
3.2.2 Separation on Sephadex G-150.....	21
3.3 Analysis of the physical and chemical properties and structure	22
3.3.1 Determination of uronic sugar	22
3.3.2 Determination of amino sugar	22

3.3.3 Determination of sulfate	23
3.3.4 UV-vis Spectra analysis	24
3.3.5 High-performance liquid chromatography	25
3.3.6 Fourier transform infrared spectra analysis	25
3.3.7 Nuclear magnetic resonance	25
3.4 Research of function of the crocodile chondroitin sulfate.....	25
3.4.1 The cytotoxic assessment of the crocodile chondroitin sulfate with LO2	25
3.4.2 Effect of the crocodile chondroitin sulfate on lymphocytes	26
3.4.3 Assay of antioxidant capability	26
3.4.4 Chronic toxicity experiments in rats	27
3.4.5 The antifatigue effect of the crocodile chondroitin sulfate	28
3.5 Statistical analysis	28
4 Result and analysis	29
4.1 Optimization of the conditions of single factors.....	29
4.1.1 Optimization of the concentration NaOH	30
4.1.2 Optimization of the solid to solvent ratio	30
4.1.3 Optimization of extractive temperature	30
4.1.4 Optimization of extractive time	31
4.2 Optimization of response surface methodology	31
4.3 Result of purification of the crocodile chondroitin sulfate.....	35
4.3.1 Result of separation by anion exchange chromatography on Q-Sepharose-F-F column.....	35
4.3.2 Result of separation by chromatography on Sephadex G-150 column...	36
4.4 Result of the physical and chemical properties and structure.....	35
4.4.1 Analysis of chemical composition of the crocodile chondroitin sulfate.	37
4.4.2 Analysis of UV-vis Spectra.....	38
4.4.3 Analysis of high-performance liquid chromatography	40
4.4.4 Analysis of fourier transform infrared spectra	41
4.4.5 Analysis of nuclear magnetic resonance	42
4.5 Research of function of the crocodile chondroitin sulfate.....	43
4.5.1 The cytotoxic assessment of the crocodile chondroitin sulfate with LO2	

.....	43
4.5.2 Effect on immune adjustment in vitro	44
4.5.3 Antioxidant capability of the crocodile chondroitin sulfate.....	46
4.5.4 Chronic toxicity experiments in rats	49
4.5.5 The effect on antifatigue of crocodile chondroitin sulfate	54
5 Discussion	55
6 Conclusions.....	57
7 Prospectives	59
References	60
Publications	67
Acknowledgements	68

论文主要缩略词表

英文简称	英文全称	中文全称
ALB	Albumin	白蛋白
ALT	Alanine Aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
AST	Aspartate Aminotransferase	天门冬氨酸氨基转移酶
BUN	Blood Urea Nitrogen	尿素氮
CHO	Total Cholesterol	总胆固醇
Con A	Concanavalin A	刀豆蛋白 A
CRE	Creatinine	肌酐
CS	Chondroitin Sulfate	硫酸软骨素
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲亚砜
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometer	气相色谱-质谱联用仪
GlcA	Glucuronic Acid	葡萄糖醛酸
GLU	Glucose	葡萄糖
Hb	Hemoglobin	血红蛋白
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	液相色谱-质谱联用仪
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
MTT	Methyl Thiazolyl Tetrazolium	四甲基偶氮唑
OD	Optical Density	光密度
PBS	Phosphate Buffer Solution	磷酸盐缓冲液
PLT	Platelet	血小板
RBC	Red Blood Cell	红细胞
TDA	Trichloroacetic Acid	三氯乙酸
TFA	Trifluoroacetic Acid	三氟乙酸
TP	Total Protein	总蛋白
TRI	Triglyceride	甘油三酯
WBC	White Blood Cell Count	白细胞计数

摘要

动物软骨组织中含有一种以蛋白聚糖形式存在的酸性粘多糖——硫酸软骨素，应用现代生物技术方法适当处理后，能获得优质的硫酸软骨素，同时获得良好的社会价值和经济效益。

本论文主要利用碱提取技术，以加工废弃的鳄鱼软骨为原料，通过选择合适的提取工艺流程，研究开发鳄鱼硫酸软骨素产品。通过研究碱提取过程中影响得率的单因素，并结合响应面分析得到最优提取条件为：NaOH 浓度 5%，固液比 1:14 g/mL，温度 40°C、时间 209.82 min。采用离子交换色谱法对粗提物进一步纯化，根据峰形确定得到单一物质；通过化学组成测定，可知鳄鱼硫酸软骨素中 D-葡萄糖醛酸含量、氨基己糖含量和硫酸基含量分别为 26.05%±0.01、49.93%±0.01 和 26.03%±0.01、；紫外光谱表明纯化后的样品不含蛋白和核酸；采用高效液相色谱分析，纯化后的样品与市面上的硫酸软骨素保留时间相近，近似确定所得的样品即为硫酸软骨素；红外光谱结果表明纯化后的样品中只存在 α -吡喃糖苷键；核磁共振图谱结果表明纯化后的样品含有硫酸软骨素特征性基团。

细胞学毒理实验检测结果表明，鳄鱼硫酸软骨素并未影响 LO2 细胞的生长，甚至能起到促进其生长的效果；体外免疫调节作用结果表明，鳄鱼硫酸软骨素能促进 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖；对其体外抗氧化活性进行检测，结果表明鳄鱼硫酸软骨素具有抗氧化能力；用 ICR 小鼠构建抗疲劳模型，评估其体内抗疲劳功效，同时采用血清学检测手段，对血清进行检测。

本文将多种生物学方法相结合，在分子、细胞和个体水平上，从多个方面深入而细致地对鳄鱼硫酸软骨素的生物学活性进行评估，把鳄鱼软骨这种加工业副产品变废为宝，用于功能食品，以改善人们的健康状态提高人们的生活质量奠定了理论基础，还可以减少环境污染，从而提高鳄鱼产品开发的附加值，对鳄鱼资源的充分利用具有一定的意义。

关键词：鳄鱼硫酸软骨素；理化性质；生物学活性

Abstract

Chondroitin sulfate, a kind of acid muco-polysaccharide, distribute in animal cartilage. We can get chondroitin sulfate through it by modern biotechnology, in the meantime we can get a good social value and economic benefits.

The whole research study was aimed at investigating the preparation and bioactivities of chondroitin sulfate from the castoff of Crocodile processing. The appropriate extraction process was selected to produce Chondroitin sulfate. By studying single factor affected the yield in the process of alkali extraction and combining the response surface analysis to get the ideal extraction conditions which was 5% NaOH at 40°C for 209.82 min with the solid to solvent ratio in 1:14. We got a single material by using ion-exchange column chromatography to isolate and purify. According to chemical component analysis, the content of D-glucuronic acid, hexosamine and acidophobe was 26.05%±0.01, 49.93%±0.01 and 26.03%±0.01.

Ultraviolet spectrum showed that the purified sample do not contain protein and nucleic acid. From the result of HPLC analysis further confirmed the purified sample is the chondroitin sulfate for which the retention time similar to the market of chondroitin sulfate. The result of IR analysis, the types of glycosidic bond in the purified sample was α -pyran glucose type. The structure of the purified sample was characterized ^{13}C nuclear magnetic resonance.

Cytology toxicology experiment showed that the crocodile chondroitin sulfate can promote the growth of LO2 cells. To study the effect of immune regulation in vitro, the crocodile chondroitin sulfate can advance the proliferation of B-lymphocytes and T-lymphocytes. The results showed that the crocodile chondroitin sulfate with the antioxidant capacities by determining ABTS⁺, the reducing power and hydroxyl radical methods. The animal model, built by ICR mice, were applied to determine the anti-fatigued activities of Chondroitin sulfate and the serological test was taken to identify the mechanism.

In this paper, different biological study methods were combined to research the antioxidant and anti-fatigued activities of Chondroitin sulfate from Crocodile in different aspects and level (molecular, cellular and individual), which laid the theoretical basement of processing Chondroitin sulfate, a by-product, into some kind of functional food to improve people's health level, reduced the pollution of the environment and had its sense on fully develop crocodile resource by making waste

profitable.

Key words: the crocodile chondroitin sulfate; physicochemical property; biological activity

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前言

1.1 鳄鱼的研究状况

鳄鱼，拉丁学名为 *Crocodylus siamensis*，是迄今发现活着的最早和最原始的爬行动物，它是在三叠纪至白垩纪的中生代(约两亿年以前)由两栖类进化而来；它和恐龙是同时代的动物，鳄鱼属于恐龙家族，大约 1.4 亿年以前就在地球上生存，随着自然环境的变迁，恐龙家族中的其它成员逐渐灭绝，只有鳄鱼顽强地坚持繁衍至今，仍是半水生性凶猛的爬行动物；恐龙的灭绝不管是环境的影响，还是自身的原因，都已是化石，鳄鱼的存在证明了它生命的强有力。

全世界现存 25 种鳄鱼，著名的有：暹罗鳄、扬子鳄等。暹罗鳄(*Crocodylus siamensis*)也叫暹罗淡水鳄、新加坡小型鳄(见图 1)，体长 3-4 米，成体吻部宽，喉部鳞甲横排，幼体金褐色，尾部有黑色条纹，野外分布于越南、老挝、缅甸、泰国等地，栖息于热带及亚热带地区的沼泽地、湖泊等淡水水域，以及咸水水域等，具有体型大、生长快、抗病能力强等特点。鳄鱼全身都是宝，如鳄鱼骨、甲及内脏含有丰富的优良蛋白质和人体必需的氨基酸、不饱和脂肪酸、维生素及各种微量元素，鳄胆具有解毒平热，有去黔生新，促进新陈代谢作用，可用于治疗骨癌、肝癌、膀胱癌、中心视网膜炎和食物中毒，尤其对脂肪肝和肝硬化有显著的疗效^[1]。



图 1 暹罗鳄

Fig.1 *Crocodylus siamensis*

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库