DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251010005
引用格式: 陈聪, 谢雨霏, 李锡锋, 等. 不同分子量大小的硫酸软骨素的吸收效果及其对膝关节软骨健康的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(5): 121–129.
CHEN C, XIE YF, LI XF, *et al*. Effects of absorption of chondroitin sulfate with different molecular weights and its effects on knee cartilage health [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(5): 121–129. (in Chinese with English abstract).

不同分子量大小的硫酸软骨素的吸收效果及其对膝关节软骨健康的影响

陈 聪[1], 谢雨霏[2], 李锡锋[2], 黎春红[1*], 曹立亭[2*]
(1. 四川慧谷康生物科技有限公司, 德阳 618300; 2. 西南大学动物医学院, 重庆 402460)

摘 要: 目的 探究不同分子量大小的硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)在体内的吸收效果及对膝关节软骨健康的影响。**方法** 50 只健康状况良好的清洁级新西兰雄兔, 适应性喂养 3 d 后随机分为空白对照组(CON 组)、大分子正常剂量组(BH 组)、大分子减半剂量组(BL 组)、小分子正常剂量组(SH 组)、小分子减半剂量组(SL 组), CON 组灌胃生理盐水, 正常剂量组和减半剂量组分别按 0.170 g/kg、0.085 g/kg 的剂量连续灌胃 7 d。**结果** 与 CON 组相比, SH 组血清和关节软骨组织中 CS 含量均极显著升高(P<0.01)、II 型胶原蛋白(collagen type-II, COL-II)含量均显著升高(P<0.05), 血清中白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)含量极显著降低(P<0.01); 关节软骨组织中基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)含量极显著降低(P<0.01)。苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色结果表明, 各 CS 组软骨细胞分布均匀, 软骨内无血管和神经, 未见病理改变; 定量实时聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)结果显示, SH 组关节软骨组织中基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, *MMP-1*)、*IL-17* 信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)表达水平均显著降低(P<0.05), *MMP-3* mRNA 表达水平极显著降低(P<0.01), 胶原蛋白 II 型 α1 链[collagen alpha 1 (II) chain, *COL2A1*]、成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor-2, *FGF-2*) mRNA 表达水平均极显著升高(P<0.01), 胶原蛋白 IX 型 α1 链(collagen type IX alpha 1 chain, *COL9A1*) mRNA 表达水平显著升高(P<0.05)。**结论** CS 可通过营养深层软骨细胞, 促进 COL-II含量及相关基因 mRNA 表达, 抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)表达, 降低炎性因子含量, 从而保护兔膝关节软骨, 其中以 SH 组效果最佳。

关键词: 硫酸软骨素; 吸收效果; 膝关节软骨; 保护作用

收稿日期: 2025-10-10
基金项目: 西南大学技术服务项目(F2025338)
第一作者: 陈聪(2000—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物制药研发。E-mail: 826446314@qq.com
***通信作者:** 黎春红(1979—), 女, 研究员, 主要研究方向为生物医药研发。E-mail: lichunhong@schgk.com
曹立亭(1979—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为中兽医学。E-mail: caoliting@swu.edu.cn

Effects of absorption of chondroitin sulfate with different molecular weights and its effects on knee cartilage health

CHEN Cong[1], XIE Yu-Fei[2], LI Xi-Feng[2], LI Chun-Hong[1*], CAO Li-Ting[2*]

(1. *Sichuan Hugcon Biotechnology Co*., *Ltd*., *Deyang* 618300, *China*;
2. *College of Veterinary Medicine*, *Southwest University*, *Chongqing* 402460, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the absorption effects of chondroitin sulfate (CS) with different molecular weights in the body and its effects on the health of knee joint cartilage. **Methods** The 50 healthy, clean-grade New Zealand male rabbits were randomly divided into 5 groups after 3 days of adaptive feeding, namely the control group (CON), the normal-dose macromolecule group (BH), the half-dose macromolecule group (BL), the normal-dose small molecule group (SH) and the half-dose small molecule group (SL). The CON group was gavaged with normal saline and the normal dose group and the halved dose group were given gavage at doses of 0.170 g/kg and 0.085 g/kg for 7 d, respectively. **Results** Compared with the CON group, the SH group exhibited extremely significant increases in serum and articular cartilage tissue levels of CS (P<0.01) and significant increases in collagen type-II (COL-II) content (P<0.05), and interleukin-17 (IL-17) levels in serum was extremely significantly decreased (P<0.01) and matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) levels in articular cartilage tissue were extremely significantly reduced (P<0.01). Hematoxylin-eosin (HE) staining results showed that the chondrocytes in each CS group were evenly distributed, and there were no blood vessels or nerves in the cartilage, and no pathological changes were observed. The results of quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) revealed showed that the messenger RNA (mRNA) expression levels of matrix metalloproteinase-1 (*MMP-1*) and *IL-17* in the SH group were significantly decreased (P<0.05) and *MMP-3* were extremely significant decreased (P<0.01) , the mRNA expression levels of collagen alpha 1 (II) chain (*COL2A1*) and fibroblast growth factor-2 (*FGF-2*) were both significantly increased (P<0.01) and collagen type IX alpha 1 chain (*COL9A1*) was significantly increased (P<0.05). **Conclusion** CS can promote the content of COL-II and the mRNA expression of related genes through trophic deep chondrocytes, inhibit the expression of matrix metalloproteinases (MMPs), and reduce the content of inflammatory factors, thereby protecting the cartilage of the rabbit knee joint. Among them, the SH group has the best effect.

KEY WORDS: chondroitin sulfate; absorption effect; knee cartilage; protective effect

0 引 言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种以关节退行性病变引起的关节软骨破坏、滑膜炎症和滑膜关节运动功能丧失的慢性关节退行性疾病, 特点是关节疼痛和功能障碍, 晚期症状为关节挛缩、肌肉萎缩和肢体畸形[1]。关节软骨包括软骨细胞和细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 活化的成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast like synoviocytes, FLS)能够诱导基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)分泌, 降解 ECM 成分, 激活炎症信号通路, 促进炎症细胞因子和趋化因子表达, 导致破骨细胞分化[2]。这些过程进一步增强了 FLS 迁移、免疫细胞浸润和血管翳形成, 加剧软骨组织退化[3]。软骨组织结构复杂, 机械负荷要求高, 再生能力不足, 限制了修复的有效性[4]。目前的非手术治疗方法主要是给予糖皮质激素或非甾体抗炎药缓解肿痛, 无法逆转修复损伤的软骨细胞和预防 OA 的发生[5]。因此, 预防关节软骨损伤, 对维持机体健康至关重要。

硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)是一类由葡萄糖醛酸与 N-乙酰半乳糖胺通过 β-1-3 糖苷键连接而成的酸性黏多糖, 广泛分布于如牛气管、猪鼻中隔、鱿鱼喉软骨等动物软骨、角膜及血管壁中, 工业化生产多通过酶解或碱提法从动物软骨中分离纯化, 制成膳食补充剂或食品添加剂[6], 可通过改善食品质地、提升产品稳定性和强化食品营养价值等, 广泛应用于各类食品的工艺改良与营养强化[7]。此外, CS 还具有明显的亲软骨性, 可靶向进入软骨组织, 直接或间接地影响细胞内的信号传递过程, 发挥抗氧化、保护关节软骨、抗肿瘤、促进骨形成等多样性的生理功能[8]。研究表明, CS 通过抑制弹性酶, N-乙酰氨基葡糖苷酶等软骨基质降解酶的生成, 减少其对软骨基质和关节滑液成分的破坏, 促进关节滑膜生成透明质酸、蛋白聚糖和胶原, 延缓软骨面的退变, 在骨关节炎的防治中发挥重要作用[9−10], 并促进新的软骨组织形成, 口服 1~3 年可

明显改善关节软骨结构[11]。此外, CS 可通过抑制白细胞介素-1β (interleukin-1beta, IL-1β)诱导的反应酶发挥抗炎作用, 将水分吸入蛋白多糖分子内使软骨变厚, 增加关节内滑液量, 增强关节减震能力, 缓解运动中的冲击和摩擦[12]。目前临床中已广泛应用于医药领域和保健食品领域, 2015 年中国药典收录有硫酸软骨素钠(chondroitin sulfate sodium salt, CS-Na)、CS-Na 片及 CS-Na 胶囊, 类别为降血脂及骨关节疾病治疗药。

CS 口服给药后经肠道微生物和软骨素酶分解为低聚糖和单糖, 通过小肠上皮细胞寡肽转运体与被动扩散吸收, 分解的 CS 片段被关节内软骨细胞吸收, 合成功能性大分子聚合物、营养软骨基质[13]。研究表明, CS 的分子量直接影响其体内吸收和生物利用度[14]。高分子 CS 在体内难以被吸收利用, 仅有少量CS可以通过小肠被吸收, 生物利用度不超过 13%, 因其与细胞外基质的高亲和性更容易在局部滞留发挥作用; 反之, 小分子 CS 能有效穿过肠道黏膜, 展现出更广泛的生物学活性[15]。兔膝关节大体解剖结构与人类相似性较高, 且兔相比鼠类的体型大, 操作更为方便, 经济方面也更能接受, 故兔是目前研究膝关节组织损伤常用的模型动物[16]。目前针对不同来源 CS 的比较研究较为广泛, 但不同分子量 CS 的体内吸收和对软骨的保护作用的比较研究鲜见报道。因此, 本研究通过探究不同分子量 CS 在兔体内的吸收特性及其对膝关节软骨的影响, 旨在为不同分子量硫酸软骨素的应用研究提供理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验动物

本研究所用清洁级新西兰白兔均购自成都达硕实验动物有限公司, 经西南大学实验动物伦理审查委员会批准(批准文号: IACUC-20190901-03)。

1.2　试剂与仪器

小分子硫酸软骨素(分子量 1000~5000 Da)、大分子硫酸软骨素(分子量>20000 Da)(含量 95%, 四川慧谷康生物科技有限公司); 生理盐水(山东齐都药业有限公司); 液氮(沙坪坝区双流液氮经营部); CS、II 型胶原蛋白(collagen type-II, COL-II)、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17)、基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)酶联接免疫吸附剂测定(enzyme-linked immunosorbnent assay, ELISA)试剂盒(上海朗顿生物科技有限公司); 氯仿、异丙醇、无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水(北京索莱宝科技有限公司); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)、TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、总 RNA 提取剂(total RNA extraction reagent, RNAiso Plus)[宝日医生物技术(北京)有限公司]; 乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, EDTA 2Na)(纯度≥99%, 合肥博美生物科技有限责任公司); 4%多聚甲醛、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(广州赛国生物科技有限责任公司); 苏木素染液[西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich)公司]; 伊红染液(合肥博美生物科技有限责任公司); Trizol(美国赛默飞世尔科技公司)。

2-16R 高速冷冻离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司); SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司); MIX-1500 微孔板振荡器(杭州米欧仪器有限公司); Infinite® 200 PRO 全自动酶标仪(帝肯奥地利有限责任公司); NanoPhotometer N60 超微量分光光度计[因普恩(北京)国际贸易有限公司]; C1000 Touch 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪(伯乐生命医学产品有限公司); QS3 96W 实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司); 徕卡-2016 转轮式切片机(德国徕卡公司); JT-12S 自动脱水机(武汉俊杰电子有限公司); BMJ-A 组织包埋机(常州郊区中威电子仪器厂); PHY-III病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); Primo Star 生物显微镜(德国 Carl Zeiss AG 公司)。

1.3　试验方法

1.3.1　试验分组和处理

50 只体质量相近的 3 月龄健康新西兰雄兔, 适应性喂养 3 d 后随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为空白对照组(CON 组)、大分子正常剂量组(BH 组)、大分子减半剂量口服组(BL 组)、小分子正常剂量组(SH 组)、小分子减半剂量组(SL 组)。CON 组灌胃生理盐水, 其余各试验组分别灌胃 0.170 g/kg、0.085 g/kg 的大分子 CS 和 0.170 g/kg、0.085 g/kg 的小分子 CS, 正式试验期 7 d。整个试验期间确保饲养环境安静, 自由饮食饮水。

1.3.2　给药方法及给药剂量的选择

基于美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)公布的文件, 按照每平方米体表面积(body surface area, BSA, 单位 m^2)的体重(kg), 即转换因子 Km 的单位是 kg/m^2 进行转换。动物体重采用“参考体重”时, 动物的剂量(mg/kg 体重)=人的剂量(mg/kg 体重)×人的 Km/动物的 Km。根据人用剂量(3.6 g/d)及兔体表面积换算确定, CS 兔用正常剂量和减半剂量分别为 0.170 g/kg、0.085 g/kg, 每日给药前称重, 蒸馏水溶解 CS 后灌胃给药。

1.3.3　样品采集

分别于首日灌胃给药后 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 h, 各给药组兔耳缘静脉采血并分离血清, 以备检测吸收效果; 连续灌胃给药 7 d 后次日清晨耳缘静脉采血并分离血清, 取后肢膝关节置于 4%多聚甲醛中固定, 迅速剥离后肢膝关节软骨组织, 置于液氮中速冻, –80 ℃保存。

1.3.4　血清及软骨组织相关指标测定

取兔耳缘静脉血液, 4 ℃、3500 r/min 离心 10 min 后

分离血清，将试剂盒室温平衡 30 min 后，于微孔板中依次加入：标准品孔加入 50 μL 不同浓度梯度标准品；空白对照孔加入 50 μL 标准品/样品稀释液；样品孔加入 50 μL 待测样品。随后各孔均加入 50 μL 生物素化抗原工作液，混匀后覆以封板膜，37 ℃孵育 30 min。洗板后，每孔加入 50 μL 亲和素-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)工作液，再次于 37 ℃孵育 30 min 并洗板。依次向每孔加入显色剂 A 和显色剂 B 各 50 μL，37 ℃避光反应 10 min。最后每孔加入 50 μL 终止液，450 nm 波长、10 min 内测定吸光度值(以空白孔调零)。根据标准品浓度与对应 OD 值绘制标准曲线，计算血清中 CS、COL-II、IL-17、MMP-3 的含量。

称取适量关节软骨组织组织，按 1:9 (*V*:*V*)比例加入 1×PBS 制成组织匀浆液，4 ℃、3000 r/min 离心 10 min，取上清液，按照上述测定方法检测关节软骨组织中 CS、COL-II、IL-17、MMP-3 含量。

1.3.5 膝关节软骨苏木精-伊红染色

取 4%多聚甲醛固定后的膝关节组织，10%乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)脱钙液脱钙后制作石蜡切片，并进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色，观察软骨组织形态结构。

1.3.6 定量实时聚合酶链式反应检测

称取 50 mg 软骨组织放入研钵中，缓慢多次加入液氮进行冷冻研磨，将软骨组织粉末混悬于 1 mL RNAiso Plus 试剂中，采用总核糖核酸提取法提取软骨组织样品总 RNA，超微量分光光度计评估 RNA 的纯度和浓度。按照 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书合成互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)模板。定量实时聚合酶链式反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qPCR)反应体系为 TB Green® Premix Ex Taq™ II (2×) 5 μL，上、下游引物各 0.4 μL，ROX Reference Dye (50×) 0.2 μL，ddH_2O 3 μL，cDNA 模板 1 μL。反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 5 s；60 ℃ 30 s，40 次循环；60 ℃ 1 min。以 *β*-肌动蛋白(beta-actin, *β*-actin)为内参，引物序列如表 1 所示，基因信使核糖核酸(messenger RNA, mRNA)相对表达量计算公式见(1)~(3)：

$$\Delta Ct(样本)=Ct(目标基因)-Ct(内参基因) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta Ct=\Delta Ct(实验组)-\Delta Ct(对照组) \quad (2)$$

$$目标基因相对表达量=2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

式中：Ct 为扩增循环数(cycle threshold)。

1.4 数据处理

所有试验至少重复 3 次，使用 ELISAcalc 进行计算，拟合模型选用 logistic 曲线(四参数)；使用 SPSS 26.0 进行独立样本 *t* 检验分析，采用 GraphPad Prism 9.5 统计软件进行绘图，以 $P<0.05$ 表示差异显著，$P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 CS 灌胃给药后在兔体内的吸收情况

通过测定给药后不同时间点血清中 CS 的水平，可以比较不同分子量和不同剂量给药后 CS 吸收入血的情况。如图 1 所示，CS 灌胃给药后，各剂量组 CS 均在给药后约 2 h 达到最大质量浓度，随后逐渐下降，并在 8 h 之后逐渐代谢吸收，其血药浓度-时间曲线符合药动学模型，表明 CS 能够经胃肠道吸收入血，具有吸收较快、在体内可被有效代谢的药代动力学性质。

表 1 qPCR 引物

Table 1 qPCR primers

基因名称	引物序列(5′-3′)	产物长度/bp
β-actin	F: CAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAG R: TAGGTTTCGTCGAGAGAGGGTGTC	117
COL2A1	F: CCACCGTGCCCAAGAAGAACTG R: GAAGCCGCCGTTGATGGTCTC	86
COL9A1	F: AAGGGTGAAGAGGGTGACCAAGG R: GTCTCCAACTACGCCAGTGATGC	99
MMP-1	F: TGGCTCAGTTCGTCCTCACTCC R: CACATCTGCCCTTGACAGGTCTG	101
MMP-3	F: CCCAGTCTACAACGCCTTCACAG R: AGGGACAGGTTCCATAGGCACTC	133
TIMP-1	F: CGGAACGGGCTCTTGCACATC R: GCAGCGTAGGTCTTGGTGAAGC	98
TIMP-3	F: CATGCTCTCCAACTTCGGCTACC R: GGCGTTGATGGTCGTCTTGTCC	124
FGF-2	F: AGGACCCCAAGCGGCTGTAC R: TGATGTGTGGGTCGCTCTTCTCC	102
IL-17	F: GGGCTGTGTCAATGCTGAAGGG R: TGCGTAGGACCAGGATCTCTTGC	80

注：胶原蛋白 II 型 *α*1 链[collagen alpha 1 (II) chain, *COL2A1*]；胶原蛋白 IX 型 *α*1 链(collagen type IX alpha 1 chain, *COL9A1*)；基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, *MMP-1*)；组织金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, *TIMP-1*)；组织金属蛋白酶抑制因子-3 (tissue inhibitor of metalloproteinases-3, *TIMP-3*)；成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor-2, *FGF-2*)。

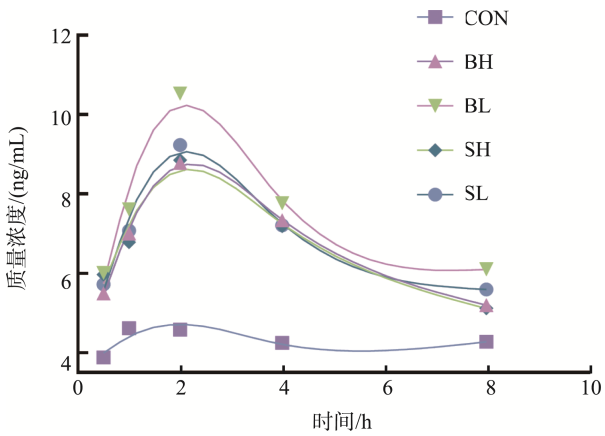
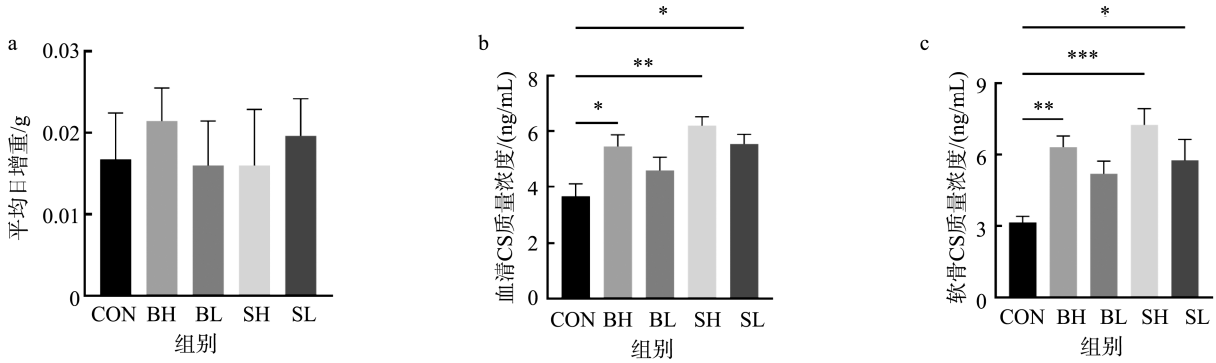


图 1　CS 灌胃给药后在兔血清中的浓度-时间曲线

Fig.1　Concentration-time curve of CS in rabbit serum after oral administration

2.2　连续给药 7 d 后对兔平均日增重、血清和关节软骨组织 CS 含量的影响分析

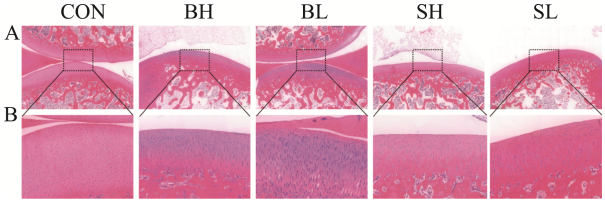
平均日增重是评估动物生长情况的重要指标，由图 2a 可知，与 CON 组相比，各组平均日增重均无明显差异，表明不同分子量 CS 对兔均无负面作用。此外，各组血清 CS 含量(图 2b)与关节软骨组织 CS 含量(图 2c)均升高，且同一分子量之间均正常剂量组 CS 含量较高。与 CON 组相比，SH 组血清 CS 含量极显著升高(P<0.01)，BH 组和 SL 组血清 CS 含量显著升高(P<0.05)；BH 组、SH 组关节软骨组织 CS 含量极显著升高(P<0.01)，SL 组关节软骨组织 CS 含量显著升高(P<0.05)，且 SH 组均比 BH 组升高更多。结果表明，小分子 CS 能有效增加机体血清及关节软骨中的 CS 含量，发挥关节软骨保护作用。



注：*表示差异显著(P<0.05)；**表示差异极显著(P<0.01)；***表示差异强极显著(P<0.001)，图 4~6。

图 2　CS 连续给药 7 d 后对兔平均日增重(a)、血清 CS 含量(b)和关节软骨组织 CS 含量(c)的影响

Fig.2　Effects of continuous administration of CS for 7 d on average daily weight gain (a), serum CS content (b) and articular cartilage tissue CS content (c) in rabbits



注：A. ×20；B. ×100。

图 3　兔膝关节软骨组织 HE 染色切片图

Fig.3　HE stained section of rabbit knee cartilage tissue

2.3　不同分子量 CS 对兔膝关节软骨组织形态结构的影响分析

CS 是蛋白聚糖的重要组成部分，补充外源性硫酸软骨素可为软骨细胞提供合成新蛋白聚糖所需的“原材料”，促进软骨基质的合成与修复。深层软骨细胞分泌蛋白聚糖，合成软骨基质，对软骨的承重能力及骨基质的合成/分解稳态起重要作用[17]。由图 3 可知，各组膝关节软骨结构完整，表面被覆薄层透明软骨，关节面光滑，其中 CON 组软骨全层细胞细胞体较小，呈单个分布；BH 组、BL 组、SH 组和 SL 组浅层细胞较小，单个分布，深层细胞较大，排列成行，与表面垂直，软骨陷窝可见软骨细胞或同源细胞群，细胞结构较为清晰，软骨细胞分布均匀，软骨内无血管和神经，未见明显软骨缺损，软骨细胞坏死及纤维增生等病理改变，其可能与 CS 诱导深层软骨细胞合成蛋白聚糖、II 型胶原等软骨基质的代谢活动增强等作用机制相关。

2.4　连续给药 7 d 后对兔血清 COL-II、IL-17、MMP-3 含量的影响分析

胶原蛋白是由多个原胶原组装形成的纤维状蛋白质，其基本单位是原胶原，原胶原由 3 条肽链 α-链相互缠绕的三螺旋结构组成，每条链都具备重复的模式胶原三肽(ollagen tripeptide, CTP)[18]，增强了胶原蛋白在各组织中的强度，有助于维持结构的完整性、弹性和抗压性[19]。研究发现，COL-II能促进干细胞向软骨细胞分化和软骨细胞增殖[20]。IL-17 是一种主要的炎症驱动细胞因子，通过诱导和维持炎性细胞因子、趋化因子和 MMPs 的产生来发挥其功能[21]。由图 4 可知，与 CON 组相比，各 CS 组均能显著提高血清中 COL-II含量(图 4a，P<0.05)，且 SH 组升高最多；极显著降低 BL 组、SH 组、SL 组血清 IL-17 含量(P<0.01)，显著降低 BH 组血清 IL-17 含量(P<0.05，图 4b)；显著降低 BL 组、SL 组 MMP-3 的表达(图 4c，P<0.05)。CS 有效提高

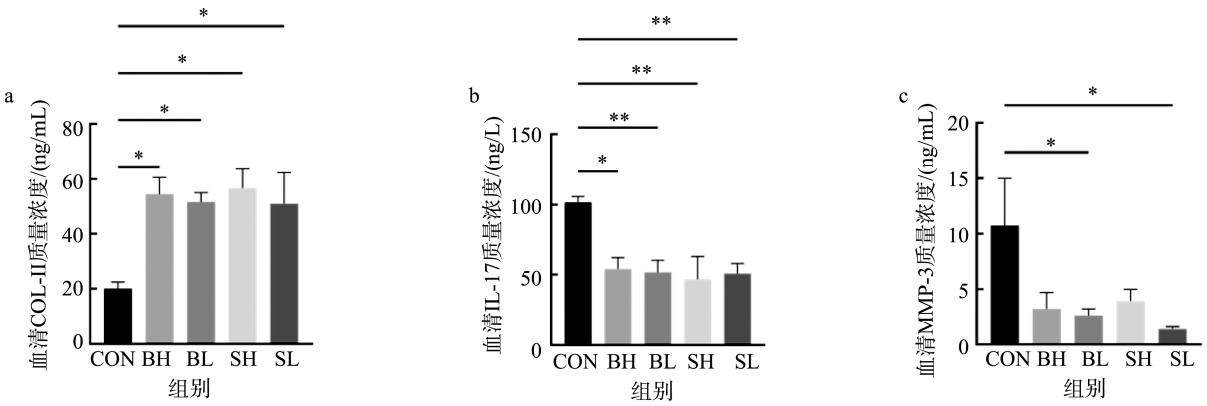


图 4 连续给药 7 d 后对兔血清 COL-II (a)、IL-17 (b)、MMP-3 (c)含量的影响

Fig.4 Effects of continuous administration for 7 d on the content of COL-II (a), IL-17 (b), MMP-3 (c) in rabbits serum

血清 COL-II含量, 降低 IL-17、MMP-3 含量, 表明其能够正向调节软骨的合成与分解代谢, 其作用机制与促进 II 型胶原生成、抑制炎性因子介导的基质破坏有关。

2.5 连续给药 7 d 硫酸软骨素后对兔关节软骨组织 COL-II、IL-17、MMP-3 含量的影响分析

COL-II是软骨组织透明基质中的主要固体成分, 主要分布于软骨、肌腱软骨区、玻璃体和椎间盘, 可通过限制带负电荷的蛋白聚糖的膨胀压力来保持软骨的整体形态和排列, 人关节软骨中 II 型胶原蛋白的降解和代谢紊乱可能导致骨关节炎的发生和发展[22]。MMPs 驱动 ECM 结构分子蛋白进行不可逆水解, 按其特定底物划分, MMP-1 可降解 I、II 和 III 型间质胶原蛋白, MMP-3 可降解几乎所有的软骨基质, 其水平与软骨破坏程度成正比[23], 阻断 IL-17 通路能抑制 MMP-3 的表达, 并有效保护软骨细胞, 防止软骨降解[24]。由图 5 可知, 与 CON 组相比, 各 CS 组均能促进关节软骨组织中 COL-II(图 5a)含量, 且 SH 组呈显著上升(P<0.05); BH 组、BL 组关节软骨组织 IL-17 含量(图 5b)极显著降低(P<0.01), SL 组显著降低(P<0.05); BH 组、BL 组、SH 组关节软骨组织 MMP-3 含量(P<0.01)极显著降低, SL 组 MMP-3 含量(P<0.05, 图 5c)显著降低。结果表明, CS 可以有效增加软骨组织 COL-II含量, 降低 IL-17、MMP-3 含量, 从而发挥对膝关节软骨的保护作用。

2.6 不同分子量 CS 对兔膝关节软骨组织相关基因 mRNA 表达水平的影响分析

炎症性关节疾病可诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)和炎症细胞因子分泌, 刺激软骨细胞分泌过量的 MMPs, 导致软骨组织损伤[25]。II 型胶原作为关节软骨细胞外基质中含量最高(90%)的胶原蛋白, 有利于软骨细胞维持透明软骨表型, 实现猪、大鼠和兔模型的透明软骨再生[26]。FGF-2 可通过成纤维细胞生长因子受体 1/2 (fibroblast growth factor receptor 1/2, FGFR1/2)激活丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MAPK/ERK)通路和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling, PI3K/Akt)通路, 刺激间充质干细胞增殖, 增强软骨转录因子 Sox 9 的早期表达[27]。由图 6 可知, 与 CON 组相比, SH 组 *MMP-1*(图 6a)、*IL-17*(图 6g) mRNA 表达水平均显著降低(P<0.05), *MMP-3*(图 6b) mRNA 表达水平极显著降低(P<0.01), *COL2A1*(图 6e)、*FGF-2*(图 6h) mRNA 表达水平均极显著升高(P<0.01), *COL9A1*(图 6f) mRNA 表达水平显著升高(P<0.05), *TIMP-1*(图 6c)与各组 *TIMP-3*(图 6d)

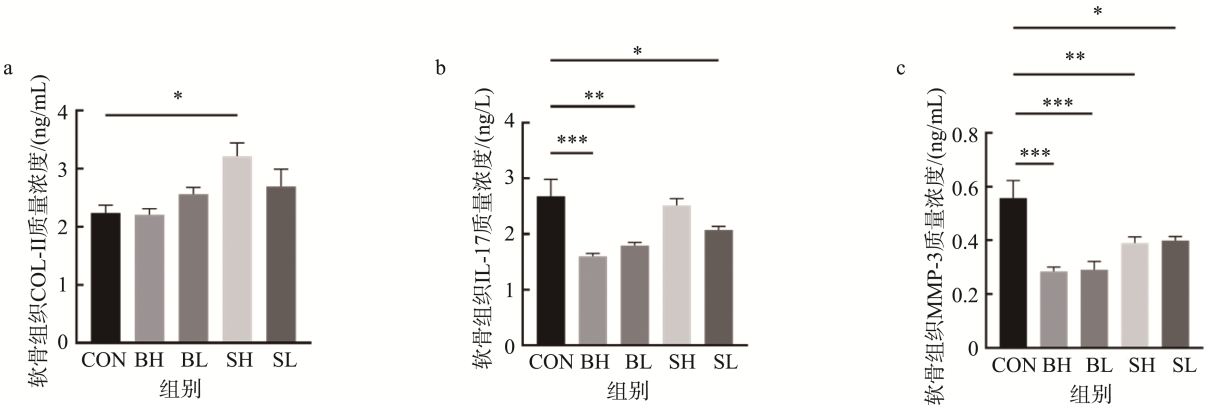


图 5 连续给药 7 d 后对兔关节软骨组织 COL-II (a)、IL-17 (b)、MMP-3 (c)含量的影响

Fig.5 Effects of continuous administration for 7 d on the content of COL-II (a), IL-17 (b), MMP-3 (c) in rabbit articular cartilage tissue

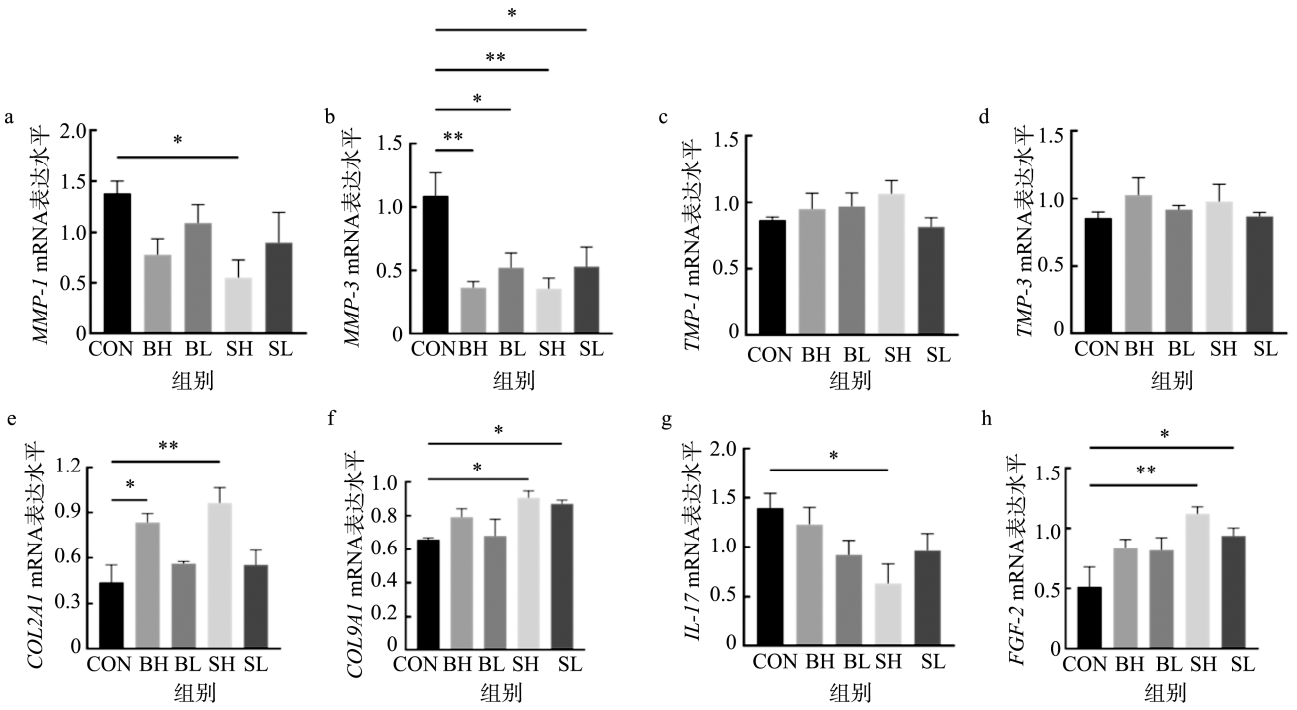


图 6　连续给药 7 d 后对兔关节软骨组织相关基因 mRNA 表达水平的影响

Fig.6　Effects of continuous administration for 7 d on the mRNA expression levels of genes related to rabbit articular cartilage tissue

mRNA 表达水平均均呈现升高趋势, 但差异不具有统计学意义(P>0.05)。结果表明, CS 可通过抑制炎症因子表达, 激活 MAPK/ERK 和 PI3K/Ak 等信号通路, 促进软骨基质生成。

3　讨论与结论

关节软骨损伤是临床中最常见的关节疾患之一, 由于软骨组织高度分化且缺乏神经与血液供应, 其自我修复与再生能力极为有限, 临床上虽可采用手术或保守治疗, 但往往难以实现根本性愈合[28]。因此, 积极预防关节软骨退变与损伤, 对于维持关节功能与机体健康具有重要意义。在这一背景下, 从牛、猪、鸡及鲨鱼等动物软骨中提取的天然酸性黏多糖—CS, 因其广泛的生物活性与临床应用价值日益受到关注。作为一种重要的关节营养与保护剂, CS 被广泛用于骨关节炎、类风湿性关节炎、膝关节损伤、肩关节痛等关节疾患的防治[29]。研究表明, 低分子硫酸软骨素(low molecular weight chondroitin sulfate, LMWCS)在多种炎症模型中表现出较强的抗炎活性, 可通过抑制肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、IL-1β 等炎症因子表达, 减轻关节炎症反应[30]。在小鼠软骨修复研究中也初步证实, LMWCS 能显著减少关节液中炎性因子含量, 显示出其显著的抗炎效果[31]。基于此, 深入探究 CS 的临床实际作用与治疗机制, 不仅能够深化对其“营养软骨”作用的理解, 更为其在关节健康领域的精准高效应用提供理论指导。

本研究以兔为模型系统探讨了 CS 的药代动力学特征及其对膝关节软骨的保护机制。结果显示, 各剂量组 CS 均在给药后 2 h 达到最大质量浓度, 随后逐渐下降, 并在 8 h 之后逐渐代谢吸收。连续给药 7 d 后, SH 组血清及关节软骨中 CS 含量提升最为显著, 其原因可能与小分子 CS 亲水基团少、脂溶性好、体内吸收更为完全、生物利用度高等因素相关[32], 且在此剂量下对动物生长无不良影响。HE 染色结果进一步显示 CS 促进了深层软骨细胞的代谢活性, 表明 CS 可诱导深层软骨细胞合成蛋白聚糖和 COL-II等软骨基质的代谢活动增强, 粗面内质网和高尔基体等细胞器扩张, 导致胞体增大[33]。在分子层面, CS 一方面通过显著上调 COL-II及其相关基因 *COL2A1*、*COL9A1* 和促合成因子 *FGF-2* 的 mRNA 表达, 增强软骨基质生物合成能力; 另一方面, CS 通过显著降低促炎因子 *IL-17* 的含量及其 mRNA 表达, 抑制基质降解酶 *MMP-1*、*MMP-3* 的 mRNA 表达, 上调其抑制剂 *TIMP-1*、*TIMP-3* 的 mRNA 表达, 从而有效抑制炎症反应与基质分解。

综上所述, 小分子 CS 可通过其良好的吸收特性, 有效进入血液和靶向关节组织, 通过促进软骨基质合成、抑制炎性反应与基质降解的多重调节, 发挥关节软骨保护作用。

参考文献

[1] 刘敏, 孟戈, 沈盈盈, 等. 补充硫酸软骨素对健康犬硫酸软骨素代谢、抗氧化及炎症指标的影响[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2025(1): 7–11.

LIU M, MENG G, SHEN YY, *et al*. Effects of chondroitin sulfate

supplementation on chondroitin sulfate metabolism, antioxidant status, and inflammatory markers in healthy dogs [J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2025(1): 7–11.

[2] CHANG CJ, CHANG TM, SUN YS, *et al*. Lutein attenuates rheumatoid arthritis progression by suppressing MAPK/NF-*κ*B signaling and MMP3 and MMP13 expression in fibroblast-like synoviocytes [J]. International Immunopharmacol, 2025, 164: 115360.

[3] HUANG Y, PENG Y, LI H, *et al*. Wilforine inhibits rheumatoid arthritis pathology through the Wnt11/*β*-catenin signaling pathway axis [J]. Arthritis Research and Therapy, 2023, 25(1): 243.

[4] HAQ-SIDDIQI NA, BRITTON D, KIM-MONTCLARE J. Protein-engineered biomaterials for cartilage therapeutics and repair [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2023, 192: 114647.

[5] 叶雨心, 王杰, 刘一乔, 等. 硫酸软骨素寡糖治疗骨关节炎的药效学研究[J]. 药物生物技术, 2025, 32(1): 7–13.
YE YX, WANG J, LIU YQ, *et al.* Pharmacodynamic study on chondroitin sulfate oligosaccharide in the therapy of osteoarthritis [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2025, 32(1): 7–13.

[6] 陈志红, 朱静怡, 姜星丞, 等. 鱿鱼加工副产物中硫酸软骨素的提取工艺优化及其功能特性研究[J]. 保鲜与加工, 2025, 25(12): 96–107.
CHEN ZH, ZHU JY, JIANG XC, *et al*. Optimization of extraction process and functional characteristics of chondroitin sulfate from squid processing by-products [J]. Storage and Process, 2025, 25(12): 96–107.

[7] 安思雨, 张旭, 周秀娟, 等. 高效液相色谱法测定动物软骨提取物中硫酸软骨素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(22): 67–72.
AN SY, ZHANG X, ZHOU XJ, *et al*. Determination of chondroitin sulfate content in animal cartilage extracts by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(22): 67–72.

[8] VIOLA M, BRÜGGEMANN K, KAROUSOU E, *et al*. MDA-MB-231 breast cancer cell viability, motility and matrix adhesion are regulated by a complex interplay of heparan sulfate, chondroitin-/dermatan sulfate and hyaluronan biosynthesis [J]. Glycoconjugate Journal, 2017, 34(3): 411–420.

[9] 陈磊, 凌沛学, 张天民. 硫酸软骨素在骨关节炎防治中的作用[J]. 中国生化药物杂志, 2008(2): 137–139.
CHEN L, LING PX, ZHANG TM. Application of chondroitin sulfate in osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2008(2): 137–139.

[10] ZHU X, SANG L, WU D, *et al*. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2018, 13(1): 170.

[11] BRUYERE O, HONORE A, ETHGEN O, *et al*. Correlation between radiographic severity of knee osteoarthritis and future disease progression. Results from a 3-year prospective, placebo-controlled study evaluating the effect of glucosamine sulfate [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2003, 11(1): 1–5.

[12] 刘茵, 颜耀东, 张娟, 等. 氨基葡萄糖、硫酸软骨素与胶原蛋白治疗骨关节炎的研究进展[J]. 慢性病学杂志, 2013, 14(12): 919–921.
LIU Y, YAN YD, ZHANG J, *et al*. Research progress on the treatment of osteoarthritis with glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen protein [J]. Chronic Pathematology Journal, 2013, 14(12): 919–921.

[13] DENG R, ZHAO R, ZHANG Z, *et al*. Chondrocyte membrane-coated nanoparticles promote drug retention and halt cartilage damage in rat and canine osteoarthritis [J]. Science Translational Medicine, 2024, 16(735): eadh9751.

[14] SHANG Q, SHI J, SONG G, *et al*. Structural modulation of gut microbiota by chondroitin sulfate and its oligosaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 489–498.

[15] 王康宇, 王雯芳, 侯成立, 等. 芬顿反应制备低分子量硫酸软骨素及其降解机制[J]. 农业工程学报, 2023, 39(21): 269–278.
WANG KY, WANG WF, HOU CL, *et al*. Preparation of low molecular weight chondroitin sulfate by Fenton method and its degradation mechanism [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2023, 39(21): 269–278.

[16] 黄俊杰, 陈民利, 朱科燕, 等. WHBE 兔膝骨关节炎模型的建立与 PRFr 的干预研究[J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(5): 65–73.
HUANG JJ, CHEN ML, ZHU KY, *et al.* Establishment of a WHBE rabbit knee osteoarthritis model and therapeutic effect of platelet-rich fibrin releasates [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2024, 34(5): 65–73.

[17] 徐小杰. 下颌髁突软骨中 sox^{9+}浅层软骨细胞及 $col10^{+}$深层软骨细胞对异常咬合刺激的生物学响应[D]. 新乡: 新乡医学院, 2021.
XU XJ. Biological responses of sox^{9+} superficial zone cells and $col10^{+}$ deep zone cells in the mandibular condylar cartilage to theabnormal dental occlusions [D]. Xinxiang: Xinxiang Medical University, 2021.

[18] GUILLÉN-CARVAJAL K, VALDEZ-SALAS B, BELTRÁN-PARTIDA E, *et al*. Chitosan, gelatin, and collagen hydrogels for bone regeneration [J]. Polymers (Basel), 2023, 15(13): 2762.

[19] QIN D, WANG N, YOU XG, *et al*. Collagen-based biocomposites inspired by bone hierarchical structures for advanced bone regeneration: Ongoing research and perspectives [J]. Biomaterials Science, 2022, 10(2): 318–353.

[20] TIRUVANNAMALAI-ANNAMALAI R, MERTZ DR, DALEY EL, *et al*. Collagen type II enhances chondrogenic differentiation in agarose-based modular microtissues [J]. Cytotherapy, 2016, 18(2): 263–277.

[21] XU L, MA J, ZHOU C, *et al*. Identification of key hub genes in knee osteoarthritis through integrated bioinformatics analysis [J]. Scientific

Reports, 2024, 14(1): 22437.

[22] WU Z, KORNTNER SH, MULLEN AM, *et al*. Collagen type II: From biosynthesis to advanced biomaterials for cartilage engineering [J]. Biomaterials and Biosystems, 2021, 4: 100030.

[23] 丁强, 尤微, 谭纪锋. 普瑞巴林联合硫酸软骨素治疗膝骨性关节炎疼痛患者的效果分析[J]. 中国医学创新, 2021, 18(10): 122–125.
DING Q, YOU W, TAN JF. Effect analysis of pregabalin combined with chondroitin sulfate in the treatment of patients with knee osteoarthritis pain [J]. Medical Innovation of China, 2021, 18(10): 122–125.

[24] HU G, ZHANG N, LI J, *et al*. Tumor necrosis factor receptor associated factor 3 modulates cartilage degradation through suppression of interleukin 17 signaling [J]. The American Journal of Pathology, 2020, 190(8): 1701–1712.

[25] MACHADO TT, MACHADO ACS, NISHIJIMA CM, *et al*. Protective effects of ozone therapy on cartilage degeneration in temporomandibular joint osteoarthritis [J]. Inflammopharmacology, 2025, 33(9): 5333–5345.

[26] ZHANG Z, HUANG Y, HU X, *et al.* In situ implantation of type II collagen-based double-layer scaffolds for articular osteochondral regeneration comprising hyaline cartilage and vascularized subchondral bones [J]. Bioactive Materials, 2025, 50: 364–381.

[27] STAMNITZ S, KRAWCZENKO A, KLIMCZAK A. Combined TGF-β3 and FGF-2 stimulation enhances chondrogenic potential of ovine bone marrow-derived mscs [J]. Cells, 2025, 14(13): 1013.

[28] DESAI B, ASSID E, JACOBS G, *et al*. Viable cartilage allograft outperforms existing treatments for focal knee cartilage defects [J]. Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy, 2024, 32(3): 636–644.

[29] 赵琳, 云振宇, 吴希, 等. 硫酸软骨素钠的制备及抗骨关节炎活性研究进展[J]. 医药导报, 2024, 43(6): 916–925.
ZHAO L, YUN ZY, WU X, *et al*. Research progress on preparation and anti-osteoarthritis activity of chondroitin sulfate sodium [J]. Herald of Medicine, 2024, 43(6): 916–925.

[30] 张雪莉. 不同分子量硫酸软骨素对骨关节炎的作用[D]. 扬州: 扬州大学, 2025.
ZHANG XL. Effects of chondroitin sulfate with different molecular weights on osteoarthritis [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2025.

[31] JING Y, WANG K, PI T, *et al*. Crucial role of low molecular weight chondroitin sulfate from hybrid sturgeon cartilage in osteoarthritis improvement: Focusing on apoptosis, systemic inflammation, and intestinal flora [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 298: 139850.

[32] 蓝伟, 陈建平. 硫酸软骨素的生物活性及其构效关系研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4924–4932.
LAN W, CHEN JP. Research progress on biological activity and structure-activity relationship of chondroitin sulfate [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(15): 4924–4932.

[33] 魏庆宏. 硫酸软骨素抑制实验性骨关节炎软骨细胞凋亡的体内研究[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(5): 47–50.
WEI QH. Inhibition of chondroitin sulfate on apoptosis of chondrocyte in experimental osteoarthritis *in vivo* [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2016, 36(5): 47–50.

(责任编辑: 安香玉　蔡世佳)