

# 硫酸软骨素 - 姜黄素两亲性聚合物抗炎活性研究

高继往, 霍志伟, 徐亚楠, 赵修华\*

东北林业大学化学化工与资源利用学院, 森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨

收稿日期: 2025年5月31日; 录用日期: 2025年7月10日; 发布日期: 2025年7月24日

## 摘要

利用姜黄素中的羟基(-OH)与硫酸软骨素中的羧基(-COOH)发生酯化反应, 制备硫酸软骨素-姜黄素(CSC)两亲性聚合物。通过细胞摄取、细胞活性氧(ROS)清除能力、细胞炎症模型测定了CSC的体外活性; 测定了CSC对骨关节炎大鼠血清中的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 与PG-E2炎症因子的抑制效果以及体内抗氧化活性。体外活性实验结果表明: CSC在CT-26细胞中的摄取效果、活性氧(ROS)清除能力的清除能力以及对脂多糖诱导RAW264.7细胞验证模型中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 与PG-E2的抑制效果优于硫酸软骨素、姜黄素以及物理混合物。体内活性实验结果表明: CSC对骨关节炎大鼠血清中的IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 与PG-E2炎症因子的抑制效果显著优于硫酸软骨素、姜黄素与物理混合物, 稍弱于阳性药地塞米松; CSC对GSH和SOD的促进效果均显著优于硫酸软骨素、姜黄素以及物理混合物, 稍弱于阳性药双醋瑞因。CSC同时提高了硫酸软骨素与姜黄素的抗炎、抗氧化活性, 为解决硫酸软骨素与姜黄素的应用难题提供了良好的解决思路与实验基础, 开发前景广阔。

## 关键词

硫酸软骨素, 姜黄素, 两亲性聚合物, 抗炎活性, 抗氧化活性

## Study on the Anti-Inflammatory Activity of Chondroitin Sulfate-Curcumin Amphiphilic Polymers

Jiawang Gao, Zhiwei Huo, Yanan Xu, Xiuhua Zhao\*

School of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilisation, Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang

Received: May 31<sup>st</sup>, 2025; accepted: Jul. 10<sup>th</sup>, 2025; published: Jul. 24<sup>th</sup>, 2025

\*通讯作者。

文章引用: 高继往, 霍志伟, 徐亚楠, 赵修华. 硫酸软骨素-姜黄素两亲性聚合物抗炎活性研究[J]. 生物医学, 2025, 15(4): 744-762. DOI: 10.12677/hjbm.2025.154081

## Abstract

Chondroitin sulfate-curcumin (CSC) amphiphilic polymer was prepared by the esterification reaction of the hydroxyl group (-OH) in curcumin and the carboxyl group (-COOH) in chondroitin sulfate. The *in vitro* activity of CSC was determined through cell uptake, cellular reactive oxygen species (ROS) clearance ability and anti-inflammatory activity ability. The inhibitory effect of CSC on inflammatory factors IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PG-E2 in the serum of rats with osteoarthritis and its antioxidant activity *in vivo* were determined. The results of the *in vitro* activity experiment show that: The uptake effect of CSC in CT-26 cells, the scavenging ability of reactive oxygen species (ROS), and the inhibitory effect on IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PG-E2 in the validation model of lipopolysaccharide induced RAW264.7 cells are superior to those of chondroitin sulfate, curcumin and physical mixtures. The results of *in vivo* activity experiments indicated that the inhibitory effect of CSC on the inflammatory factors IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and PG-E2 in the serum of rats with osteoarthritis was significantly better than that of chondroitin sulfate, curcumin and physical mixtures, and slightly weaker than that of the positive drug dexamethasone. The promoting effect of CSC on GSH and SOD were significantly better than those of chondroitin sulfate, curcumin and the physical mixture, and slightly weaker than the positive drug diacetoin. CSC simultaneously enhances the anti-inflammatory and antioxidant activities of chondroitin sulfate and curcumin, providing a good solution idea and experimental basis for solving the application problems of chondroitin sulfate and curcumin, and has broad development prospects.

## Keywords

Chondroitin Sulfate, Curcumin, Amphiphilic Polymer, Anti-Inflammatory Activity, Antioxidant Activity

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

硫酸软骨素是存在于生物组织中的天然多糖，是软骨细胞外基质的主要成分[1] [2]。它是由 n-乙酰-d-半乳糖胺(GalNAc)和 d-葡萄糖醛酸(GlcA)由  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3)和  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4)糖苷键交替连接的重复双糖单元组成的磺化糖胺聚糖(GAG)。硫酸软骨素具有广泛的生物学功能，如抗炎、抗氧化、降血糖、增强免疫力、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等[3]-[8]。近年来，硫酸软骨素在北美、东南亚和澳大利亚等地具有良好的发展前景。硫酸软骨素通过与粘膜受体 CD44 和 ICAM1 结合，促进 IL-1 受体相关激酶-m (IRAK-m) IRAK 抑制剂或 MKP-1 的释放，使 MAKP 去磷酸化，减少 NF- $\kappa$ B 的核易位，从而减少炎症的发生[9]。硫酸软骨素电荷密度高，脂溶性差，在体内不能完全吸收。因此，硫酸软骨素在生物制剂分类体系中属于 III 类药物，具有溶解度高、膜透性差、口服生物利用度低等特点[10]-[12]。为了有效提高硫酸软骨素的生物利用度，研究人员采用了降低硫酸软骨素分子量使其血药浓度提高 1.22 倍[13]，使用  $\alpha$ -亚麻酸修饰硫酸软骨素使其生物利用度提高 3.12 倍[14]。虽然现有研究在一定程度上提高了硫酸软骨素的血药浓度，但是还有待进一步提高， $\alpha$ -亚麻酸的价格较高，生产成本较高。

姜黄素是一种天然类黄酮，主要存在于姜黄根中(约 3%~6%) [15]。研究表明，姜黄素具有优异的抗炎、抗氧化、抗肿瘤、神经保护、肝保护和免疫调节活性[16]-[20]。姜黄素因其药理作用广泛、毒性低、

不良反应少、价格低廉等优点,在亚洲、非洲和欧洲被广泛用作食品添加剂[21][22]。此外,最近的研究表明,姜黄素在治疗骨关节炎方面具有很大的潜力。姜黄素通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,有效降低白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6)和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )的水平。此外,姜黄素通过抑制 i- $\kappa$ B $\alpha$ ,降低核因子  $\kappa$ B 信号通路的激活,从而显示出与骨关节炎软骨降解相关的基质金属蛋白酶的显著抑制作用[23]。但姜黄素水溶性差,生物利用度低,极大地限制了其应用[24]。近年来,研究人员通过脂质体、合成姜黄素衍生物、纳米颗粒包封、纳米晶给药等方法来提高姜黄素的口服生物利用度[25]-[29]。最新研究还利用植物蛋白、动物蛋白和动物多糖等天然生物聚合物作为载体,有效增强了姜黄素的稳定性和生物活性[30]。然而,这种方法的准备步骤很繁琐。

胶束是一种具有亲水性和亲脂性的两亲性纳米结构[31]。胶束因其体积小、能穿透细胞膜、与软骨靶向配体功能化、延长体内停留时间而被广泛应用于关节炎的治疗[32]。用 II 型胶原结合肽修饰 MMP-13 获得的胶束可以显著延长胶束在体内的停留时间[33]。目前已有文献表明,硫酸软骨素联合姜黄素可显著降低 p65 的表达,对软骨修复有明显作用,增加 II 型胶原含量,此外,硫酸软骨素联合姜黄素不仅能减轻大鼠软骨损伤,还能减轻骨关节炎的炎症反应,使受伤的膝关节在短时间内有效恢复关节屈曲[34]。然而,硫酸软骨素和姜黄素的生物利用度均较低,极大地限制了它们的应用。因此,本课题将脂溶性的姜黄素与亲水性的硫酸软骨素通过酯化反应偶联形成具有两亲性聚合物(CSC),用于提高硫酸软骨素与姜黄素的生物活性。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验材料

#### 2.1.1. 主要细胞

小鼠结肠直肠癌(CT-26)细胞、小鼠单核巨噬细胞白血病(RAW264.7)细胞、小鼠胚胎成骨(MC3T3-E1)细胞均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

#### 2.1.2. 主要试剂

硫酸软骨素(98%)、甲酰胺、碳二亚胺盐酸(EDC·HCl)购自麦克林化学试剂有限公司;姜黄素(98%)购自上海源叶生物技术有限公司;DMAP (4-氨基吡啶)、DAPI 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水乙醇、二甲基亚砜购自天津市富宇精细化工有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶购自江苏泽源生物科技有限公司;小鼠白介素细胞 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )酶联免疫试剂盒、小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )酶联免疫试剂盒、小鼠前列腺素 E2 (PG-E2)酶联免疫试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司。

#### 2.1.3. 主要仪器

电子分析天平(204F1)购自德国 NETZSCH 公司;真空冷冻干燥机(Scientz-10N)购自宁波新芝生物技术有限公司;荧光分光光度计(F-7000)购自日立高新技术公司;多功能酶标仪(AVANCEIIIHD)购自美国布鲁克科学仪器有限公司;恒温培养箱(Pert-Pro)购自荷兰 Philip 公司。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. CSC 两亲性聚合物制备

硫酸软骨素为一种具有亲水性的天然多糖,脂溶性较差,姜黄素则是一种具有亲脂性的天然多酚,其水溶性较差。为此,本研究设计合成一种具有两亲性的聚合物胶束。以硫酸软骨素作为亲水端,姜黄素作为疏水端,以 EDC·HCl 和 DMAP 为催化剂,利用硫酸软骨素结构上的羧基与姜黄素结构上的羟基进行化学偶联,从而实现硫酸软骨素与姜黄素的化学连接。特定的合成方法如下:将 1 mmol 硫酸软骨素、

1 mmol EDC·HCl 和 1 mmol DMAP (摩尔比: 硫酸软骨素二糖单元: EDC·HCl: DMAP = 1:1:1) 加入到甲酰胺(15 mL)中, 避光搅拌 2 h 在来活化硫酸软骨素上的羧基。将 1 mmol 姜黄素溶解在 5 mL 甲酰胺中(摩尔比: 硫酸软骨素二糖单元: EDC·HCl: DMAP: 姜黄素 = 1:1:1:1), 并逐滴加入上述含有硫酸软骨素的甲酰胺溶液中。将样品溶液置于恒温磁力搅拌器中, 在 55°C 下避光搅拌反应 48 h。在反应结束后, 将样品溶液以 12,000 r/min 下离心 15 min。取上清液逐滴加入到无水乙醇中(样品溶液的体积比: 无水乙醇 = 1:5), 并连续搅拌 30 分钟, 进行反溶剂沉淀, 然后在 12,000 r/min 下离心 15 min, 弃去上清液, 将沉淀物用无水乙醇洗涤至少 3 次后, 将沉淀物分别用无水乙醇和超纯水透析 2 天和 3 天。最后, 将透析的样品溶液在 12,000 r/min 下离心 15 分钟, 上清液用冷冻干燥机进行冻干, 以获得 CSC 两性相聚合物。

### 2.2.2. 红外光谱(FT-IR)检测

称取 5 份适量的 KBr 进行干燥, 干燥后 1 份为空白背景, 其他 4 份分别与适量的硫酸软骨素、姜黄素、物理混合物和 CSC 的冻干粉末样品混合均匀, 研磨后压制成薄片。压制后的薄片通过傅立叶变换红外光谱仪(FT-IR, Fourier transform infrared spectrometer)检测, 扫描范围为 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 2.2.3. CSC 中姜黄素含量测定

采用高效液相色谱法检测 CSC 中姜黄素的含量。取一定质量的姜黄素标准品, 溶于流动相, 固定到一定体积, 制备浓度为 0.39~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的姜黄素标准品溶液。CSC 采用碱性法水解, 将 5 mg CSC 溶解在 5 mL 的 1.0 M 氢氧化钠水溶液中, 在 60°C 黑暗中加热搅拌 72 h, 冷却至室温, 用 1.0 M HCl 调节 pH 至中性。采用 HPLC 法测定水解产物中姜黄素的含量。紫外检测器在 430 nm 波长下进行检测, 流动相为乙腈: 4%冰醋酸 = 48:52 (V:V), 进样体积为 20  $\mu\text{L}$ , 流速为 1.0 mL/min。采用标准曲线法计算 CSC 中姜黄素的含量。

### 2.2.4. 细胞摄取实验

为了验证 CSC 聚合物胶束能否增加药物跨膜运输, 采用小鼠结直肠腺癌(CT-26)细胞作为模型, 由于姜黄素本身具有荧光特性, 因此以 CSC 中的姜黄素作为标记物, 检测 CT-26 细胞对 CSC 的体外摄取情况。将 CT-26 细胞复苏后接种于含 10%胎牛血清(FBS)和 1%青霉素-链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37°C、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养。将处于对数生长期的 CT-26 细胞用胰蛋白酶消化后, 计数并调整细胞密度至合适浓度( $1 \times 10^5$  个/孔), 将细胞接种到 6 孔板中, 放入细胞培养箱中培养, 待细胞贴壁生长良好, 达到 80%融合后, 用于细胞摄取实验。显微镜下观察细胞贴壁情况良好后吸走孔内培养基, 姜黄素的给药浓度分别为 10、20 和 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 分别将 2 mL 不同浓度的姜黄素和 CSC 胶束的 PBS 分散液加入板孔中, 在 37°C 下孵育 4 h, 每组设置 3 个平行。孵育结束后, 用 PBS 溶液轻轻冲洗细胞 3 次, 每次冲洗时间约 2 min, 以去除未被细胞摄取的姜黄素。用 2 mL 4%的多聚甲醛溶液对细胞进行固定 30 min, 固定结束后吸弃固定液, 再用 PBS 溶液轻轻冲洗细胞 3 次。用 DAPI 染色液对细胞核进行染色 15 min, 染色结束后吸弃 DAPI, 再用 PBS 溶液轻轻冲洗细胞 3 次。通过荧光显微镜观察 CT-26 细胞内的荧光分布情况, 进而说明 CT-26 细胞对 CSC 的摄取情况。

### 2.2.5. 活性氧(ROS)清除能力检测

小鼠单核巨噬细胞白血病(RAW264.7)细胞在受到脂多糖(LPS)刺激后, 细胞内的信号转导通路被激活, 特别是 Toll 样受体 4 (TLR4)信号通路。这会引发一系列的炎症反应, 其中包括激活 NADPH 氧化酶等酶系统, 促使细胞内 ROS 生成大量增加。ROS 的过量积累会导致细胞氧化应激, 进而影响细胞的正常功能。研究了 CSC 是否具有清除 LPS 诱导 RAW264.7 细胞产生的 ROS 的能力, 进而进一步验证 CSC 的体外抗氧化效果。将 RAW264.7 细胞接种于含 10%FBS 与 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中, 置于

37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养，待细胞生长至对数期后，用胰蛋白酶消化，制成细胞悬液，调整浓度并放置于 6 孔板中，在细胞培养箱中培养。待细胞贴壁达到 80%后，向 6 孔板中加入含有浓度为 1 μg/mL LPS 的 DMEM 培养基，空白组加入未含有 LPS 的 DMEM 培养基，在细胞培养箱中培养 12 h 以诱导炎症。诱导结束后，弃去培养基，分别加入含有硫酸软骨素、姜黄素、物理混合物、CSC (相当于硫酸软骨素 80 μg/mL，姜黄素 20 μg/mL)与地塞米松(100 μg/mL)的 DMEM 培养基，继续孵育 12 h。孵育结束后，弃去细胞培养液，用无血清培养基洗涤细胞 3 次，加入适量含有 DCFH-DA 探针(10 μmol/L)的无血清培养基，37℃孵育 30 min，使探针进入细胞并被细胞内的酯酶水解为 DCFH。孵育结束后，再次用无血清培养基冲洗细胞，去除未进入细胞的探针。之后加入新鲜培养基，在荧光显微镜下测定 DCFH 的荧光强度。

### 2.2.6. 体外抗炎活性能力检测

以 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞为模型，RAW264.7 细胞的处理同 3.3.5 项下操作。研究 CSC 分别对白介素细胞 1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)与前列腺素 E2 (PG-E2)等炎症因子水平的影响。

#### 1) IL-1β 水平

将纯化后的抗体用于包被微孔板，以此制成固相载体。在已包被抗 IL-1β 抗体的微孔中，按照顺序依次加入标本或者标准品、生物素化的抗 IL-1β 抗体以及 HRP 标记的亲合素。完成添加步骤后，进行充分洗涤，随后使用底物 TMB 进行显色反应。在过氧化物酶的催化作用下，TMB 会转变为蓝色，之后在酸性环境中进一步转化为最终的黄色。最终，颜色的深浅程度与样本中的 IL-1β 含量呈现正相关关系。按照武汉华美生物工程有限公司的小鼠白介素细胞 1β (IL-1β)酶联免疫试剂盒使用说明书操作，借助酶标仪，在 450 nm 波长条件下对吸光度(OD 值)进行测定，计算出样本中 IL-1β 的浓度。RAW264.7 细胞培养、脂多糖诱导方法以及硫酸软骨素、姜黄素、物理混合物、CSC 和地塞米松的给药浓度同 2.2.5 项下方法。

#### 2) TNF-α 水平

将纯化的抗体用于包被微孔板，由此制作出固相载体。在已包被抗 TNF-α 抗体的微孔中，依照顺序逐次加入标本或者标准品、经生物素化处理的抗 TNF-α 抗体以及 HRP 标记的亲合素。待添加完毕后，进行彻底的洗涤，之后采用底物 TMB 开展显色流程。在过氧化物酶发挥催化效能时，TMB 会逐渐转变为蓝色，而在酸性环境的作用下，蓝色又会进一步转化为最终的黄色。颜色的深浅程度与样本里的 TNF-α 含量之间呈现出正相关联系。按照武汉华美生物工程有限公司的小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF-α)酶联免疫试剂盒使用说明书操作，利用酶标仪在 450 nm 波长的条件下对 OD 值予以测定计算出样本中 TNF-α 的浓度。

#### 3) PG-E2 水平

采用酶联免疫竞争法对 PG-E2 进行检测。先将纯化的抗原用于包被微孔板，从而制成固相载体。随后在包被了抗原的微孔内加入标本或者标准品，以及生物素化的 PG-E2 抗体。在此过程中，预先包被在微孔板上的 PG-E2 会和样本里的 PG-E2 竞争结合生物素化抗体。向微孔中添加 HRP 标记的亲合素。进行充分且彻底的洗涤后，使用底物 TMB 进行显色反应。在过氧化物酶的催化作用下，TMB 会转变为蓝色，而在酸性环境影响下，蓝色会进一步转化为最终的黄色。颜色的深浅程度与样本中的 PG-E2 含量呈负相关关系。按照武汉华美生物工程有限公司的小鼠前列腺素 E2 (PG-E2)酶联免疫试剂盒使用说明书操作，使用酶标仪在 450 nm 波长条件下测定 OD 值，计算出样本中 PG-E2 的浓度。

### 2.2.7. 大鼠体内生物活性评价

#### 1) 大鼠体内生物活性评价

在木瓜蛋白酶与 L-半胱氨酸诱导的骨关节炎大鼠模型中对 CSC 的体内生物活性进行进一步研究。用无菌生理盐水分别配制浓度为 2%的木瓜蛋白酶溶液与 0.03 mol/L 的 L-半胱氨酸溶液，并将二者的溶液

按照体积比为 1:1 的比例混合均匀。取 SD 大鼠 42 只, 随机分配为 7 组( $n=6$ ), 其中 6 组分别在第 1 天、第 4 天和第 7 天分别将体积为 50  $\mu\text{L}$  的木瓜蛋白酶与 L-半胱氨酸混合溶液注射在大鼠的双侧膝关节腔中, 剩余的 1 组为空白组, 注射同体积的生理盐水, 造模结束后, 注射木瓜蛋白酶与 L-半胱氨酸混合溶液组的大鼠膝关节出现明显肿大现象。在第 8 天, 将 7 组大鼠分为空白组、模型组、硫酸软骨素(40 mg/kg)组、姜黄素(10 mg/kg)组、物理混合物组、CSC 组与双醋瑞因(8.0 mg/kg)组, 连续口服灌胃给药 28 天, 实验结束时取从大鼠眶静脉采血, 滴入加有 20  $\mu\text{L}$  浓度为 10 mg/mL 的肝素钠溶液试管中并混合均匀。将血液在 5000 r/min 条件下离心 4 min, 分离出血清, 对其进行 Elisa 检测, 测定炎症因子水平与氧化应激因子水平。本研究中所涉及的所有动物实验操作均严格遵循国际通行的《实验动物护理和使用指南》准则, 并且已通过哈尔滨医科大学实验动物伦理委员会的专业审查(审批文号: NEFU-2021018)。

## 2) 大鼠血清中的炎症因子水平

### (1) 大鼠血清中的 IL-1 $\beta$ 因子水平

按照武汉华美生物工程有限公司的小鼠白介素细胞 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )酶联免疫试剂盒使用说明书操作, 借助酶标仪, 在 450 nm 波长条件下对吸光度(OD 值)进行测定, 采用“Curve Expert”软件绘制标准曲线, 进而计算出样本中 IL-1 $\beta$  的浓度。

### (2) 大鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 因子水平

按照武汉华美生物工程有限公司的小鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )酶联免疫试剂盒使用说明书操作, 利用酶标仪在 450 nm 波长的条件下对 OD 值予以测定, 采用“Curve Expert”软件绘制标准曲线, 依据所得数据计算出样本中 TNF- $\alpha$  的浓度。

### (3) 大鼠血清中的 PG-E2 因子水平

按照武汉华美生物工程有限公司的小鼠前列腺素 E2 (PG-E2)酶联免疫试剂盒使用说明书操作, 使用酶标仪在 450 nm 波长条件下测定 OD 值, 采用“Curve Expert”软件绘制标准曲线, 并据此计算出样本中 PG-E2 的浓度。

## 3) 大鼠血清中的氧化应激因子水平

### (1) 大鼠血清中的还原型谷胱甘肽(GSH)测定

采用比色法测定大鼠血清中的 GSH。GSH 分子中含有活性巯基。当 GSH 与 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)相遇时, GSH 的巯基会与 DTNB 发生反应, 使 DTNB 中的二硫键断裂。这个反应会生成一种黄色的阴离子产物——5-硫代-2-硝基苯甲酸(TNB)。按照南京建成生物工程研究所的还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒说明书操作。

### (2) 大鼠血清中的超氧化物歧化酶(SOD)测定

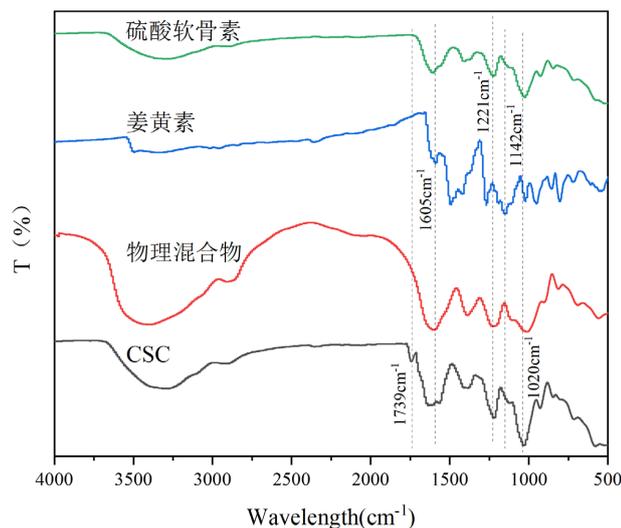
采用黄嘌呤氧化酶法测定大鼠血清中的 SOD。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色, 用可见光分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时, 则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值, 通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。按照南京建成生物工程研究所的超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒说明书操作。

## 3. 结果与讨论

### 3.1. FT-IR 检测结果

CSC, 硫酸软骨素, 姜黄素和物理混合物的 FT-IR 如图 1 所示。在姜黄素的光谱中, 1605  $\text{cm}^{-1}$  处的峰为芳环 C=C 键伸缩振动特征峰, C-O 键伸缩振动的特征峰在 1142  $\text{cm}^{-1}$  处。在 1221  $\text{cm}^{-1}$  处出现硫酸酯

基团的 C-O-SO<sub>3</sub> 键伸展振动特征峰, 1020 cm<sup>-1</sup> 处为硫酸酯基团的 S=O 键伸缩振动特征峰。在物理混合物的光谱中, 特征光谱基本与硫酸软骨素的光谱一致。通过 CSC 谱图观察到-COO-基团在 1739 cm<sup>-1</sup> 处的特征吸收峰。

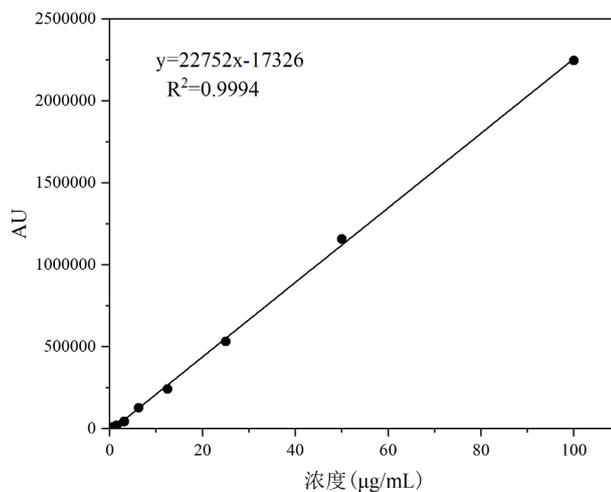


**Figure 1.** FT-IR measurement of chondroitin sulfate, curcumin, physical mixture and CSC

**图 1.** 硫酸软骨素、姜黄素、物理混合物以及 CSC 的红外光谱检测图

### 3.2. CSC 中姜黄素含量测定结果

采用 HPLC 法测定姜黄素。在 430 nm 波长下, 姜黄素的保留时间为 9.59 min, 绘制姜黄素的标准曲线, 如图 2 所示, 回归方程为  $y = 22752x - 17326$ ,  $R^2 = 0.9994$ 。将 CSC 完全水解后, 用 HPLC 法检测 CSC 中姜黄素的含量, 在高效液相色谱中出峰情况如图 3 所示, 100 mg CSC 中姜黄素的含量为  $19.51 \pm 0.28$  mg。



**Figure 2.** Curcumin standard curve

**图 2.** 姜黄素标准曲线

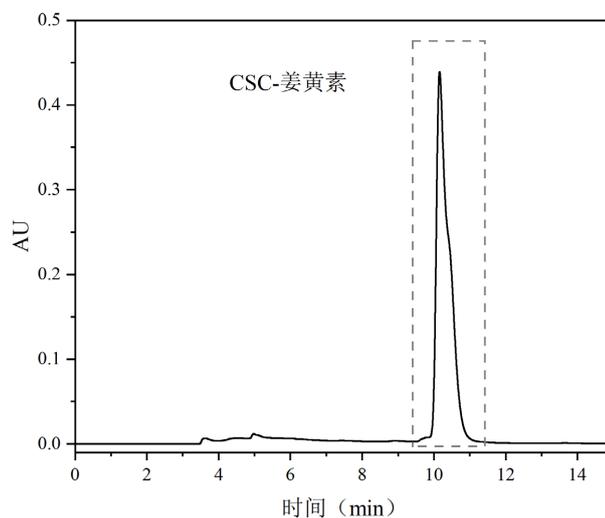


Figure 3. HPLC detection diagram of curcumin in CSC

图 3. CSC 中姜黄素的 HPLC 检测图

### 3.3. 细胞摄取实验结果

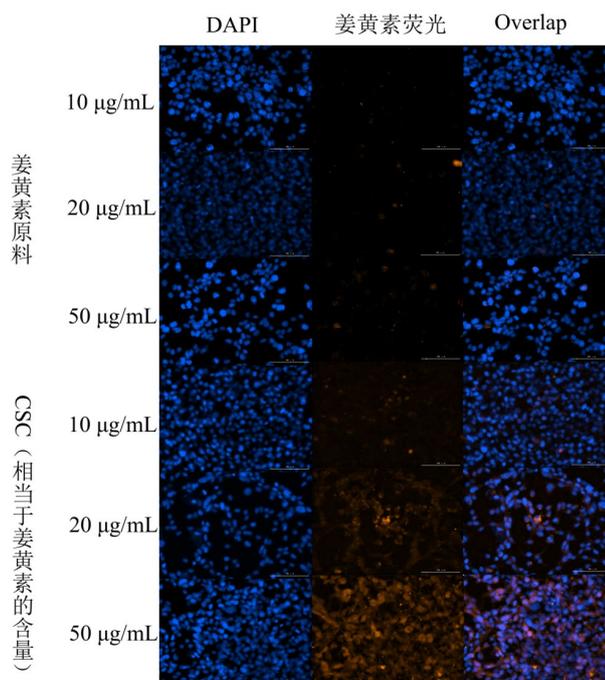


Figure 4. Fluorescence microscopy imaging of free curcumin and CSC polymer micelle uptake in CT-26 cells

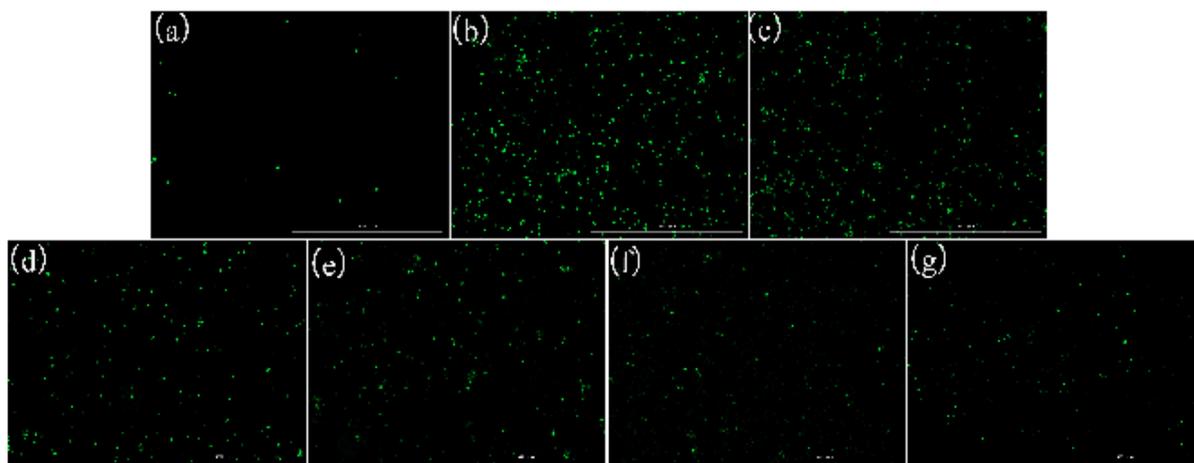
图 4. CT-26 细胞中游离姜黄素与 CSC 聚合物胶束摄取荧光显微镜成像图

通过比较姜黄素原料组与 CSC 组的荧光强度如图 4 所示，姜黄素特有的荧光标记显示了药物的位置，CT-26 的细胞核经 DAPI 染色后呈蓝色荧光。在相同给药浓度及孵育时间的前提下，姜黄素原料组的荧光在 CT-26 细胞的细胞质中强度较弱，但随姜黄素原料给药浓度的增大，荧光强度有所增强，这主要

是由于姜黄素本身由于其疏水性, 通过跨膜进入 CT-26 细胞存在一定的障碍, 摄取效率相对有限。CSC 组的荧光在 CT-26 细胞的细胞质中的强度整体均明显强于姜黄素原料组, 这主要是由于 CSC 有效改善了姜黄素在水中的溶解度, 使其更容易在细胞外液中分散和接近细胞表面, 进而增加了被细胞摄取的效率。同时, 随着给药浓度的增加, CSC 组的细胞质中荧光强度呈浓度依赖性增强。

### 3.4. 活性氧(ROS)清除能力检测结果

RAW264.7 细胞经 LPS 诱导下产生的 ROS 能够将无荧光 DCFH 探针氧化生成带有荧光的 DCF。如图 5 所示, 与空白组相比, LPS 诱导组的荧光强度极其显著增强, 硫酸软骨素给药组的荧光强度相较于 LPS 诱导组发生显著降低, 姜黄素给药组的荧光强度弱于硫酸软骨素给药组, 这主要是由于姜黄素具有较长的共轭双键体系, 这种共轭结构赋予分子较高的电子流动性。共轭双键体系能通过电子转移过程直接与活性氧自由基相互作用, 消耗自由基能量, 使其失去活性。物理混合物组的荧光强度弱于硫酸软骨素组与姜黄素组, CSC 组的荧光强度相较于硫酸软骨素组、姜黄素组与物理混合物组发生极其显著降低, 但相较于地塞米松组的荧光强度有所增强。



**Figure 5.** CSC reactive oxygen scavenging capacity. Blank group (a); LPS induction group (b); Chondroitin sulfate group (c); Curcumin group (d); Physical mixture group (e); CSC group (f); Dexamethasone group (g)

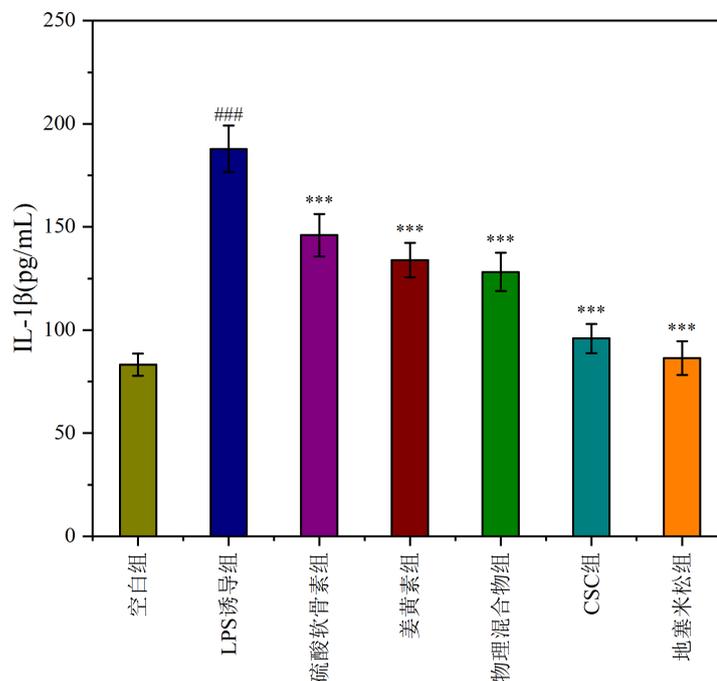
**图 5.** CSC 的活性氧清除能力。空白组(a); LPS 诱导组(b); 硫酸软骨素组(c); 姜黄素组(d); 物理混合物组(e); CSC 组(f); 地塞米松组(g)

### 3.5. 体外抗炎活性检测结果

#### 3.5.1. IL-1 $\beta$ 水平

硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组、地塞米松组、空白组与 LPS 诱导组的 RAW264.7 细胞中 IL-1 $\beta$  水平如图 6 所示。经给药孵育 12 h 后, 空白组的 IL-1 $\beta$  水平为 83.27 pg/mL, 而 LPS 诱导组的 IL-1 $\beta$  水平为 187.88 pg/mL, 这主要是由于 LPS 能够激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 激活下游的核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 诱导激酶(NIK)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路。激活的 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路转位至细胞核, 与 IL-1 $\beta$  基因启动子区域的特定序列结合, 促进 IL-1 $\beta$  基因的转录。转录生成的信使核糖核酸(mRNA)在核糖体上翻译成 IL-1 $\beta$  前体蛋白(pro-IL-1 $\beta$ )。pro-IL-1 $\beta$  在半胱天冬酶-1 (caspase-1) 的作用下被切割成具有生物活性的成熟 IL-1 $\beta$ , 并释放到细胞外, 导致细胞内和细胞培养上清液中的 IL-1 $\beta$  水平显著升高。硫酸软骨素组与姜黄素组的 IL-1 $\beta$  水平分别为 146.03 pg/mL 与 133.93 pg/mL, 这是由于硫酸软骨素可能通过调节细胞表面受体与 LPS 的相互作用, 干扰 LPS 激活的下游炎症信号通

路,从而减少 IL-1 $\beta$  基因的转录和翻译;而姜黄素能直接作用于 NF- $\kappa$ B、MAPK 等关键炎症信号通路,抑制其活性,进而减少 IL-1 $\beta$  等炎性细胞因子的产生。物理混合物组的 IL-1 $\beta$  水平为 128.19 pg/mL, CSC 组的 IL-1 $\beta$  水平为 95.92 pg/mL,地塞米松组的 IL-1 $\beta$  水平为 86.44 pg/mL,表明 CSC 对 IL-1 $\beta$  的抑制作用明显优于硫酸软骨素组与姜黄素组,稍弱于地塞米松组。

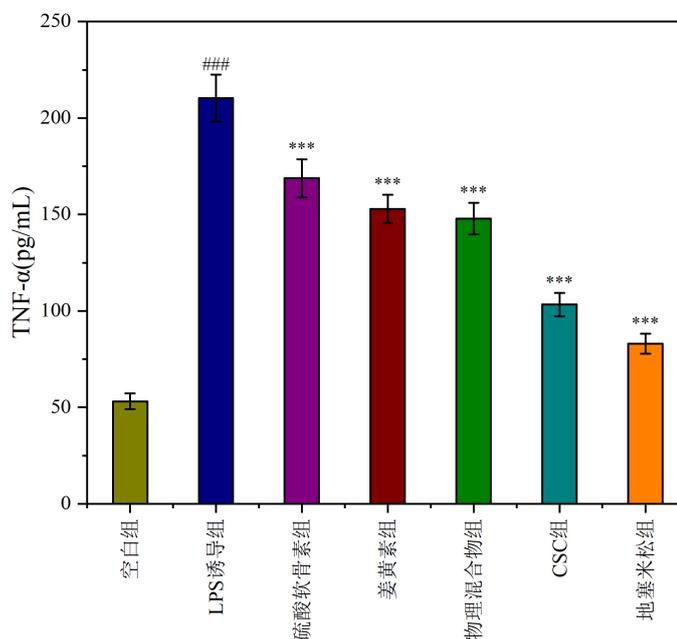


**Figure 6.** Effect of CSC on IL-1 $\beta$  factor levels in LPS-induced RAW264.7 cells (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ### means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \*\*\* means  $P \leq 0.001$  compared with the LPS-induced group,  $n = 6$ )

**图 6.** CSC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 IL-1 $\beta$  因子水平的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示, ###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*表示与 LPS 诱导组相比  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

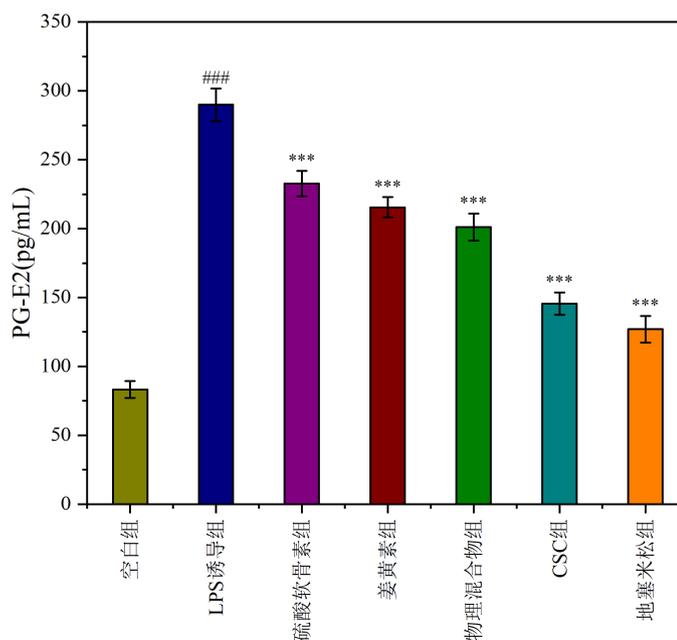
### 3.5.2. TNF- $\alpha$ 水平

硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组、地塞米松组、空白组与 LPS 诱导组的 RAW264.7 细胞中 TNF- $\alpha$  水平如图 7 所示。经给药孵育 12 h 后,与空白组的 TNF- $\alpha$  水平相比,LPS 诱导组的 TNF- $\alpha$  水平极显著升高为 210.26 pg/mL,这主要是由于 LPS 能够激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6),TRAF6 激活下游的转化生长因子- $\beta$  激活激酶 1 (TAK1)及其结合蛋白 TAB1 和 TAB2。TAK1 进而激活核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)诱导激酶(NIK),最终激活 NF- $\kappa$ B 信号通路。同时,TAK1 也能激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)信号通路。激活的 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路的相关蛋白转位进入细胞核,与 TNF- $\alpha$  基因启动子区域的特定顺式作用元件结合,启动 TNF- $\alpha$  基因的转录。转录生成的 mRNA 从细胞核转运到细胞质,在核糖体上翻译成 TNF- $\alpha$  前体蛋白。前体蛋白在蛋白酶的作用下被切割成具有生物活性的成熟 TNF- $\alpha$ ,然后分泌到细胞外,导致细胞培养上清液中的 TNF- $\alpha$  水平显著升高。物理混合物组的 TNF- $\alpha$  水平为 147.86 pg/mL,CSC 组的 TNF- $\alpha$  水平为 103.27 pg/mL,地塞米松组的 TNF- $\alpha$  水平为 82.97 pg/mL,CSC 对 TNF- $\alpha$  的抑制作用明显优于硫酸软骨素组 168.76 pg/mL 与姜黄素组 152.92 pg/mL,但与地塞米松组相比稍弱。



**Figure 7.** Effect of CSC on TNF- $\alpha$  factor levels in LPS-induced RAW264.7 cells (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ###means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \*\*\*means  $P \leq 0.001$  compared with the LPS-induced group,  $n = 6$ )

**图 7.** CSC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 TNF- $\alpha$  因子水平的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示, ###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*表示与 LPS 诱导组相比  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )



**Figure 8.** Effect of CSC on PG-E2 factor levels in LPS-induced RAW264.7 cells (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ###means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \*\*\*means  $P \leq 0.001$  compared with the LPS-induced group,  $n = 6$ )

**图 8.** CSC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 PG-E2 因子水平的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示, ###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*\*\*表示与 LPS 诱导组相比  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

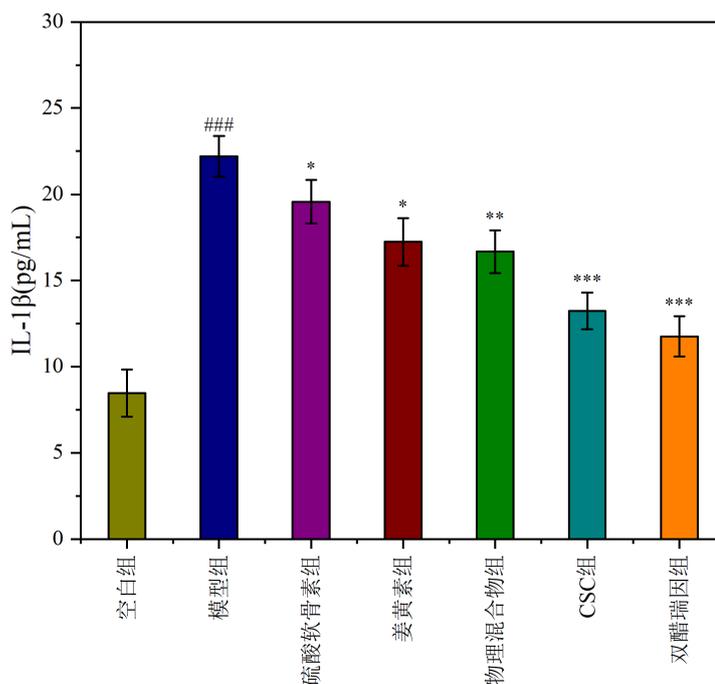
### 3.5.3. PG-E2 水平

硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组、地塞米松组、空白组与 LPS 诱导组的 RAW264.7 细胞中 PG-E2 水平如图 8 所示。经给药孵育 12 h 后,与空白组的 PG-E2 水平相比,LPS 诱导组的 PG-E2 水平极显著升高为 289.65 pg/mL,这是由于在 RAW264.7 细胞中,LPS 刺激使得环氧合酶-2 (COX-2)的 mRNA 水平显著增加,随后翻译成 COX-2 蛋白。COX-2 是催化花生四烯酸转化为前列腺素的关键酶。细胞在受到 LPS 刺激后,磷脂酶 A2 (PLA2)被激活,它作用于细胞膜磷脂,释放出花生四烯酸。新合成的 COX-2 将花生四烯酸逐步转化为前列腺素 H<sub>2</sub> (PG-H<sub>2</sub>),随后在前列腺素 E 合成酶(PG-ES)的作用下,PGH<sub>2</sub> 进一步转化为 PG-E<sub>2</sub>。PGE<sub>2</sub> 合成后释放到细胞外,导致细胞培养上清液中的 PG-E<sub>2</sub> 水平升高。物理混合物组的 PG-E<sub>2</sub> 水平为 201.23 pg/mL,CSC 组的 PG-E<sub>2</sub> 水平为 145.55 pg/mL,地塞米松组的 PG-E<sub>2</sub> 水平为 127.07 pg/mL,CSC 对 PG-E<sub>2</sub> 的抑制作用明显优于硫酸软骨素组 232.64 pg/mL 与姜黄素组 215.46 pg/mL,稍弱于地塞米松组。

## 3.6. 大鼠体内生物活性评价结果

### 3.6.1. 大鼠血清中的炎症因子水平

#### (1) 大鼠血清中的 IL-1 $\beta$ 因子水平



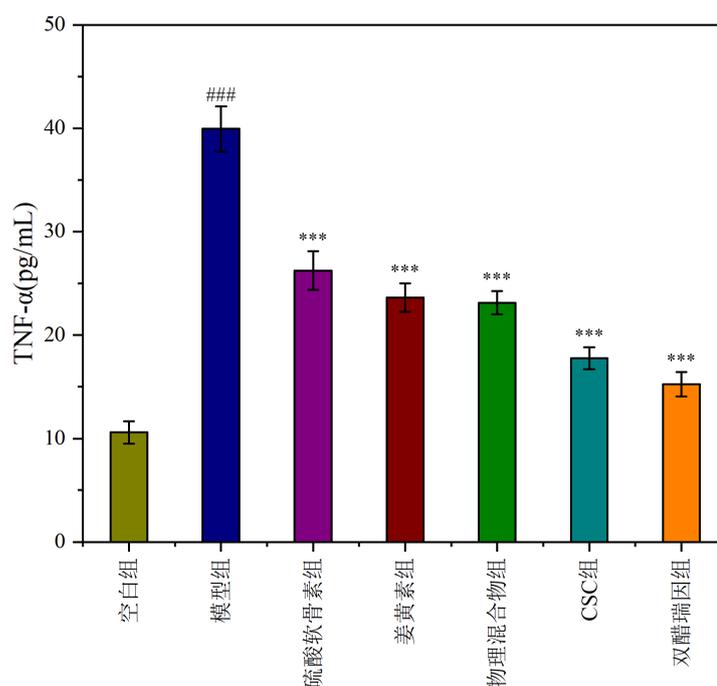
**Figure 9.** Effect of CSC on IL-1 $\beta$  factor level in the blood of rats with osteoarthritis (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ###means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \*means  $P \leq 0.05$  compared with the model group, \*\*means  $P \leq 0.01$ , and \*\*\*means  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

**图 9.** CSC 对骨关节炎大鼠血液中的 IL-1 $\beta$  因子水平的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示,###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*表示与模型组相比  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P \leq 0.01$ , \*\*\*表示  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

IL-1 $\beta$  是一种强大的促炎细胞因子。在炎症发生时,血清中的 IL-1 $\beta$  水平会迅速升高。它可以趋化中性粒细胞、单核细胞等炎症细胞到炎症部位,增强炎症反应。空白组、模型组、硫酸软骨素组、姜黄素

组、物理混合物组、CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  水平如图 9 所示。与空白组相比, 模型组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  水平为 22.20 pg/mL 发生极显著升高, 这是由于炎症部位的免疫细胞被激活, 大量分泌 IL-1 $\beta$ , 释放入血。持续高水平的 IL-1 $\beta$  会加重炎症反应, 导致组织损伤和功能障碍。硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组的大鼠血清中 IL-1 $\beta$  水平分别为 19.56 pg/mL、17.23 pg/mL 与 16.67 pg/mL, 与模型组相比较均发生一定的降低, 姜黄素组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  水平低于硫酸软骨素组, CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 IL-1 $\beta$  水平分别为 13.23 pg/mL 与 11.75 pg/mL, 与模型组相比较发生极显著降低, 这主要是由于 CSC 中的姜黄素能够抑制 I $\kappa$ B 激酶(IKK)的活性, 阻止 I $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B 抑制蛋白)的磷酸化和降解, 从而使 NF- $\kappa$ B 不能进入细胞核启动 IL-1 $\beta$  等炎性基因的转录。CSC 中的硫酸软骨素具有一定的抗炎特性, 可能协同姜黄素调节 NF- $\kappa$ B 信号通路, 减少 IL-1 $\beta$  的合成。CSC 组的 IL-1 $\beta$  水平显著低于硫酸软骨素组、姜黄素组与物理混合物组, 但稍高于双醋瑞因组。

## (2) 大鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 因子水平



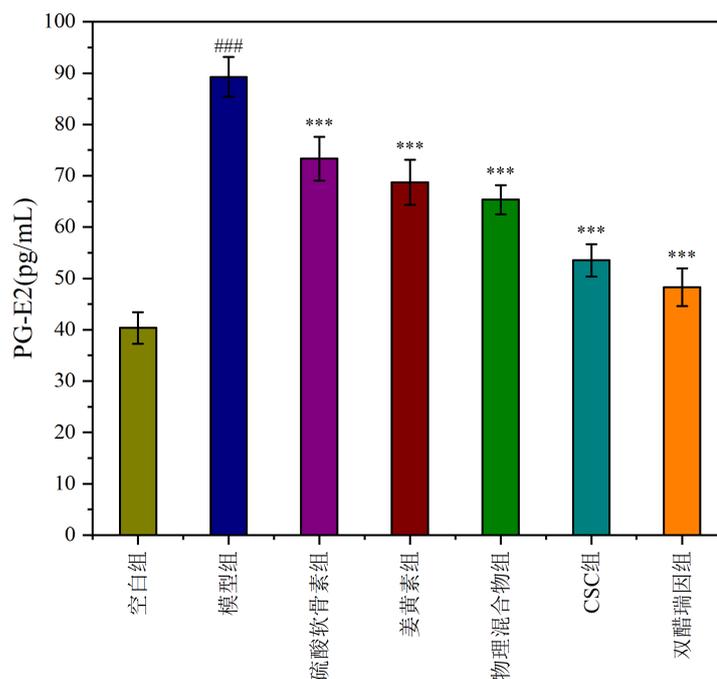
**Figure 10.** Effect of CSC on TNF- $\alpha$  factor level in the blood of rats with osteoarthritis (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ### means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \* means  $P \leq 0.05$  compared with the model group, \*\* means  $P \leq 0.01$ , and \*\*\* means  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

**图 10.** CSC 对骨关节炎大鼠血液中的 TNF- $\alpha$  因子水平的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示, ###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*表示与模型组相比  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P \leq 0.01$ , \*\*\*表示  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

作为一种重要的促炎细胞因子, TNF- $\alpha$  在炎症反应中发挥核心作用。当大鼠组织受到损伤或感染时, 局部细胞释放的 TNF- $\alpha$  会吸引中性粒细胞、单核细胞等炎症细胞向炎症部位迁移, 增强炎症细胞的黏附能力和吞噬活性, 促进炎症反应的发生和发展。TNF- $\alpha$  还能诱导血管内皮细胞表达黏附分子, 增加血管通透性, 使血浆蛋白和炎症细胞更容易渗出到组织间隙, 进一步加剧炎症反应。空白组、模型组、硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  水平如图 10 所示。与空白组相比, 模型组大鼠血清中 TNF- $\alpha$  水平为 39.94 pg/mL 发生极显著升高, 这是由于在骨关节炎关节局

部炎症环境下,趋化因子等物质会吸引外周血中的免疫细胞,如单核细胞、淋巴细胞等向关节部位募集。这些免疫细胞到达关节后,会被局部的炎症信号进一步活化。活化的免疫细胞会分泌大量的  $\text{TNF-}\alpha$ ,除了在局部发挥作用外,多余的  $\text{TNF-}\alpha$  会进入血液,使得血清中的  $\text{TNF-}\alpha$  含量明显增多。硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组的大鼠血清中  $\text{TNF-}\alpha$  水平分别为  $26.24 \text{ pg/mL}$ 、 $23.63 \text{ pg/mL}$  与  $23.13 \text{ pg/mL}$ ,与模型组相比较均发生一定程度的降低,姜黄素组大鼠血清中  $\text{IL-1}\beta$  水平低于硫酸软骨素组,CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中  $\text{TNF-}\alpha$  水平分别为  $17.76 \text{ pg/mL}$  与  $15.24 \text{ pg/mL}$ ,与模型组相比较发生显著降低,这主要是由于 CSC 中的姜黄素的抗氧化和抗炎特性可减少细胞内活性氧(ROS)的积累,降低氧化应激对软骨细胞的损害,维持软骨细胞的正常代谢功能。而 CSC 中的硫酸软骨素作为软骨细胞合成细胞外基质(ECM)的组成部分,有助于维持软骨细胞的微环境稳定,促进 ECM 合成,增强软骨的结构完整性,同时,CSC 中的姜黄素部分能够抑制 MAPK 信号通路中关键激酶的磷酸化,从而减少因软骨细胞受损而引发的  $\text{TNF-}\alpha$  释放。CSC 组的  $\text{TNF-}\alpha$  水平显著低于硫酸软骨素组、姜黄素组与物理混合物组,但稍高于双醋瑞因组。

### (3) 大鼠血清中的 PG-E2 因子水平



**Figure 11.** Effect of CSC on PG-E2 factor level in the blood of rats with osteoarthritis (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ###means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \*means  $P \leq 0.05$  compared with the model group, \*\*means  $P \leq 0.01$ , and \*\*\*means  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

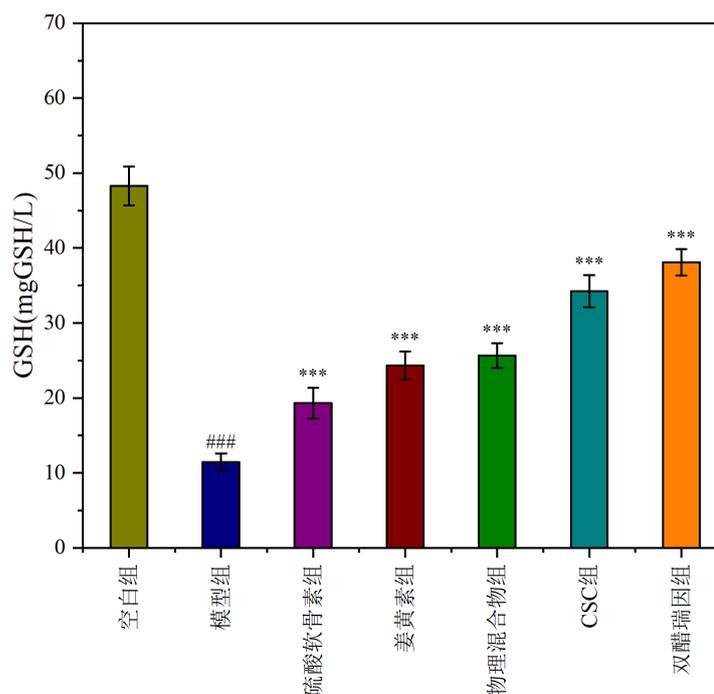
**图 11.** CSC 对骨关节炎大鼠血液中的 PG-E2 因子水平的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示, ###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*表示与模型组相比  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P \leq 0.01$ , \*\*\*表示  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

PG-E2 在炎症早期是一种重要的促炎介质。PG-E2 可以扩张血管,增加血管通透性,导致局部充血、水肿,促进炎症细胞如中性粒细胞、单核细胞等向炎症部位募集,增强炎症反应。在骨关节炎中,关节局部炎症细胞大量分泌 PG-E2,不仅加重关节的炎症和疼痛,还会促进破骨细胞的活性,导致骨质破坏。空白组、模型组、硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 PG-E2 水

平如图 11 所示。与空白组相比,模型组大鼠血清中 PG-E2 水平为 89.25 pg/mL 发生极显著升高,这是因为关节局部存在慢性炎症,而巨噬细胞作为免疫反应的关键参与者,会被关节内的损伤相关分子模式(DAMPs)、病原体相关分子模式(PAMPs)激活。激活后的巨噬细胞中,磷脂酶 A2(PLA2)活性增强,它能水解细胞膜磷脂释放花生四烯酸。花生四烯酸在环氧化酶(COX)尤其是诱导型环氧化酶 COX-2 的作用下,转化为前列腺素 H2 (PG-H2),随后在前列腺素 E 合酶(PG-ES)的催化下大量生成 PG-E2,并释放到细胞外进入血液循环,导致血清 PG-E2 升高。硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组的大鼠血清中 PG-E2 水平分别为 73.32 pg/mL、68.74 pg/mL 与 65.35 pg/mL,与模型组相比较均发生一定程度的降低,姜黄素组大鼠血清中 PG-E2 水平低于硫酸软骨素组,CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 PG-E2 水平分别为 53.53 pg/mL 与 48.26 pg/mL,与模型组相比较发生显著降低,CSC 中的硫酸软骨素部分能通过调节滑膜细胞内的信号通路,抑制滑膜细胞的活化和 PG-E2 的分泌,而 CSC 中的姜黄素部分能够进入细胞内与 COX-2 的活性位点结合,或改变 COX-2 的空间构象,从而抑制其催化花生四烯酸转化为 PG-E2 的能力。CSC 组的 PG-E2 水平显著低于硫酸软骨素组、姜黄素组与物理混合物组,但稍高于双醋瑞因组。

### 3.6.2. 大鼠血清中的氧化应激因子水平

#### (1) 大鼠血清中的还原型谷胱甘肽(GSH)测定



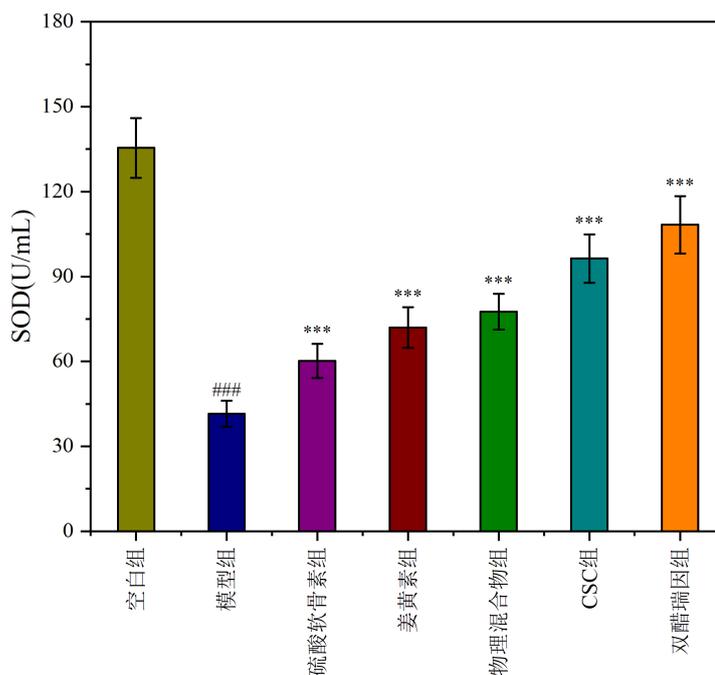
**Figure 12.** Effect of CSC on GSH factor level in the blood of rats with osteoarthritis (The data are expressed as mean  $\pm$  SD, ### means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \* means  $P \leq 0.05$  compared with the model group, \*\* means  $P \leq 0.01$ , and \*\*\* means  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

**图 12.** CSC 对骨关节炎大鼠血液中的 GSH 因子含量的影响(数据以平均值  $\pm$  SD 表示,###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*表示与模型组相比  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P \leq 0.01$ , \*\*\*表示  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

GSH 是一种含  $\gamma$ -谷氨酰基、半胱氨酰基和甘氨酸的三肽,具有强大的还原性,能够保护细胞免受氧化损伤。作为体内重要的抗氧化剂,GSH 能够中和过多的活性氧(ROS)和活性氮(RNS),GSH 在谷胱甘肽

过氧化物酶(GSH-Px)的作用下,将  $H_2O_2$  还原为水,自身被氧化为氧化型谷胱甘肽(GSSG),之后又可在谷胱甘肽还原酶的催化下,利用 NADPH 重新还原为 GSH,继续发挥抗氧化作用。可有效地清除体内的氧化产物,保护细胞免受氧化应激损伤,维持细胞内环境的稳定。空白组、模型组、硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 GSH 含量如图 12 所示。与空白组相比,模型组大鼠血清中 GSH 含量为  $11.43 \text{ mgGSH/L}$  发生极显著降低,这主要是由于骨关节炎引发的慢性炎症会导致关节局部及全身炎症因子水平升高,这些炎症因子可以干扰 GSH 合成相关酶的活性和表达。GSH 的合成需要谷氨酸半胱氨酸连接酶(GCL)和谷胱甘肽合成酶(GS)等多种酶的参与,炎症因子可抑制这些酶的活性,或者减少其基因转录和蛋白表达,从而阻碍 GSH 的正常合成,使得血液中 GSH 的补充不足,含量降低。硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组的大鼠血清中 GSH 含量分别为  $19.29 \text{ mgGSH/L}$ 、 $24.34 \text{ mgGSH/L}$  与  $25.65 \text{ mgGSH/L}$ ,与模型组相比较均发生一定程度的升高,姜黄素组大鼠血清中 GSH 含量升高程度优于硫酸软骨素组,CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 GSH 含量分别为  $34.23 \text{ mgGSH/L}$  与  $38.07 \text{ mgGSH/L}$ ,与模型组相比较发生显著升高,这是由于 CSC 中的姜黄素具有抗氧化特性,能够改善细胞内的氧化还原状态,为 GSH 合成提供有利的环境。它可能激活  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -GCS),该酶是 GSH 合成的限速酶,其活性增强可促进  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸的合成,进而增加 GSH 的生成量。CSC 中的硫酸软骨素可能通过调节细胞内的渗透压、离子浓度等微环境因素,协同姜黄素促进 GSH 合成相关酶的活性,提高 GSH 的合成效率。CSC 组的 GSH 含量显著高于硫酸软骨素组、姜黄素组与物理混合物组,但稍低于双醋瑞因组。

## (2) 大鼠血清中的超氧化物歧化酶(SOD)测定



**Figure 13.** Effect of CSC on SOD factor level in the blood of rats with osteoarthritis (The data are expressed as mean  $\pm$ SD, ###means  $P \leq 0.001$  compared with the blank group; \*means  $P \leq 0.05$  compared with the model group, \*\*means  $P \leq 0.01$ , and \*\*\*means  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

**图 13.** CSC 对骨关节炎大鼠血液中的 SOD 因子活力的影响(数据以平均值  $\pm$ SD 表示,###表示与空白组相比  $P \leq 0.001$ ; \*表示与模型组相比  $P \leq 0.05$ , \*\*表示  $P \leq 0.01$ , \*\*\*表示  $P \leq 0.001$ ,  $n = 6$ )

SOD 广泛存在于生物体内,能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,将其转化为氧气和过氧化氢,保护细胞免受氧化应激的损害。SOD 的存在可以确保细胞内信号分子的正常活性,维持细胞间通讯的准确性,保证细胞的生长、分化和凋亡等生理过程的有序进行。空白组、模型组、硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组、CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 SOD 活力如图 13 所示。与空白组相比,模型组大鼠血清中 SOD 活力为 41.54 U/mL 发生极显著降低,这是由于骨关节炎发生时,关节局部微环境发生显著变化,促使超氧阴离子自由基大量生成,同时会导致体内多种炎症因子大量释放,炎症反应不仅会促使活性氧物质生成增加,还会激活一系列氧化应激相关信号通路,加剧细胞内的氧化损伤。为了应对大量累积的氧离子,SOD 持续发挥催化作用,自身消耗加剧。而此时机体新合成 SOD 的速度跟不上其消耗速度,导致血液中 SOD 活力下降。硫酸软骨素组、姜黄素组、物理混合物组的大鼠血清中 SOD 活力分别为 60.23 U/mL、71.97 U/mL 与 77.57 U/mL 与模型组相比较均发生一定程度的升高,姜黄素组大鼠血清中 SOD 活力升高程度优于硫酸软骨素组,CSC 组与双醋瑞因组大鼠血清中 SOD 活力分别为 96.35 U/mL 与 108.25 U/mL 与模型组相比较发生显著升高,这是因为 CSC 中的姜黄素可修饰 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1)上的半胱氨酸残基,削弱核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)与 Keap1 的结合力,释放 Nrf2 使其进入细胞核与抗氧化反应元件(ARE)结合,促进 SOD 基因转录,增加 SOD 的合成。CSC 中的硫酸软骨素可能通过调节细胞内信号分子,协同姜黄素激活该信号通路,进一步提升 SOD 的表达水平。CSC 组的 SOD 活力显著高于硫酸软骨素组、姜黄素组与物理混合物组,但稍低于双醋瑞因组。

#### 4. 结论

本研究通过化学修饰法,以硫酸软骨素作为亲水端,姜黄素作为疏水端,通过酯化反应合成了 CSC。体外抗炎实验方面,CSC 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的 ROS 清除能力显著强于硫酸软骨素、姜黄素以及物理混合物。并且,CSC 对 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 PG-E2 等炎症因子水平的抑制效果,也明显优于硫酸软骨素、姜黄素以及物理混合物,稍弱于地塞米松。在针对骨关节炎大鼠的研究中,CSC 对血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 PG-E2 等炎症因子的抑制效果,明显优于硫酸软骨素、姜黄素和物理混合物,并且 CSC 对 GSH 和 SOD 具有较好的促进作用,展现出良好的抗炎及抗氧化性能。

#### 基金项目

黑龙江省自然科学基金项目(ZD2022C001)。

#### 参考文献

- [1] Rani, A., Patel, S. and Goyal, A. (2017) Chondroitin Sulfate (CS) Lyases: Structure, Function and Application in Therapeutics. *Current Protein & Peptide Science*, **19**, 22-33. <https://doi.org/10.2174/1389203718666170102112805>
- [2] Shin, J., Kang, E.H., Choi, S., Jeon, E.J., Cho, J.H., Kang, D., et al. (2021) Tissue-Adhesive Chondroitin Sulfate Hydrogel for Cartilage Reconstruction. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **7**, 4230-4243. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01414>
- [3] Melgar-Lesmes, P., Garcia-Polite, F., Del-Rey-Puech, P., Rosas, E., Dreyfuss, J.L., Montell, E., et al. (2016) Treatment with Chondroitin Sulfate to Modulate Inflammation and Atherogenesis in Obesity. *Atherosclerosis*, **245**, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.016>
- [4] Qi, S.S., Shao, M.L., Sun, Z., Chen, S.M., Hu, Y.J., Li, X.S., et al. (2021) Chondroitin Sulfate Alleviates Diabetic Osteoporosis and Repairs Bone Microstructure via Anti-Oxidation, Anti-Inflammation, and Regulating Bone Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, **12**, Article ID: 759843. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.759843>
- [5] Zheng, H.X., Chen, D.J., Zu, Y.X., Wang, E.Z. and Qi, S.S. (2020) Chondroitin Sulfate Prevents STZ Induced Diabetic Osteoporosis through Decreasing Blood Glucose, Antioxidative Stress, Anti-Inflammation and OPG/RANKL Expression Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 5303. <https://doi.org/10.3390/ijms21155303>

- [6] Hatano, S. and Watanabe, H. (2020) Regulation of Macrophage and Dendritic Cell Function by Chondroitin Sulfate in Innate to Antigen-Specific Adaptive Immunity. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article No. 232. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00232>
- [7] Soto, Y., Acosta, E., Delgado, L., Pérez, A., Falcón, V., Bécquer, M.A., *et al.* (2012) Antiatherosclerotic Effect of an Antibody That Binds to Extracellular Matrix Glycosaminoglycans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **32**, 595-604. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.111.238659>
- [8] Pudelko, A., Wisowski, G., Olczyk, K. and Koźma, E.M. (2019) The Dual Role of the Glycosaminoglycan Chondroitin-6-Sulfate in the Development, Progression and Metastasis of Cancer. *The FEBS Journal*, **286**, 1815-1837. <https://doi.org/10.1111/febs.14748>
- [9] Bishnoi, M., Jain, A., Hurkat, P. and Jain, S.K. (2016) Chondroitin Sulphate: A Focus on Osteoarthritis. *Glycoconjugate Journal*, **33**, 693-705. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9665-3>
- [10] Lan, R., Li, Y., Shen, R., Yu, R., Jing, L. and Guo, S. (2020) Preparation of Low-Molecular-Weight Chondroitin Sulfates by Complex Enzyme Hydrolysis and Their Antioxidant Activities. *Carbohydrate Polymers*, **241**, Article ID: 116302. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116302>
- [11] Xiao, Y., Li, P., Cheng, Y., Zhang, Q. and Wang, F. (2016) Effect of A-Linolenic Acid-Modified Low Molecular Weight Chondroitin Sulfate on Atherosclerosis in Apoe-Deficient Mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—General Subjects*, **1860**, 2589-2597. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.032>
- [12] Wang, K., Wang, W., Zhang, R., Liu, Y., Hou, C., Guo, Y., *et al.* (2024) Preparation of Low Molecular Weight Chondroitin Sulfate from Different Sources by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ascorbic Acid Degradation and Its Degradation Mechanism. *Food Chemistry*, **434**, Article ID: 137392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137392>
- [13] Tian, W., You, Y., Sun, X., Wang, L., Wang, L., Wang, S., *et al.* (2023) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> Photocatalytic Degradation of Chondroitin Sulfate and *in Vivo* Absorption and Excretion of Its Product. *Carbohydrate Polymers*, **301**, Article ID: 120295. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120295>
- [14] Xiao, Y., Li, P., Cheng, Y., Zhang, X., Sheng, J., Wang, D., *et al.* (2014) Enhancing the Intestinal Absorption of Low Molecular Weight Chondroitin Sulfate by Conjugation with A-Linolenic Acid and the Transport Mechanism of the Conjugates. *International Journal of Pharmaceutics*, **465**, 143-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.02.009>
- [15] Islam, M.R., Rauf, A., Akash, S., Trisha, S.I., Nasim, A.H., Akter, M., *et al.* (2024) Targeted Therapies of Curcumin Focus on Its Therapeutic Benefits in Cancers and Human Health: Molecular Signaling Pathway-Based Approaches and Future Perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **170**, Article ID: 116034. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.116034>
- [16] Garimella, J.N. and Pradhan, R.C. (2024) Effect of (Multi Pin) Atmospheric Cold Plasma Treatment on Curcumin Extraction and Investigating Phytochemicals, Antioxidants, Physical and Morphological Properties of Turmeric (*Curcuma longa* L.) Powder. *Food Chemistry*, **449**, Article ID: 139233. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139233>
- [17] Guo, Y., Su, J., Jiang, S., Xu, Y., Dou, B., Li, T., *et al.* (2024) Transcriptomics and Metabonomics Study on the Effect of Exercise Combined with Curcumin Supplementation on Breast Cancer in Mice. *Heliyon*, **10**, e28807. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28807>
- [18] Teter, B., Morihara, T., Lim, G.P., Chu, T., Jones, M.R., Zuo, X., *et al.* (2019) Curcumin Restores Innate Immune Alzheimer's Disease Risk Gene Expression to Ameliorate Alzheimer Pathogenesis. *Neurobiology of Disease*, **127**, 432-448. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.02.015>
- [19] Oria, R.S., Anyanwu, G.E., Nto, J.N. and Ikpa, J.O. (2024) Curcumin Abrogates Cobalt-Induced Neuroinflammation by Suppressing Proinflammatory Cytokines Release, Inhibiting Microgliosis and Modulation of ERK/MAPK Signaling Pathway. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **137**, Article ID: 102402. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2024.102402>
- [20] Hua, Y., Wei, Z., Xue, C. and Si, J. (2024) Stability and Programmed Sequential Release of Lactobacillus Plantarum and Curcumin Encapsulated in Bilayer-Stabilized W1/O/W2 Double Emulsion: Effect of Pectin as Protective Shell. *International Journal of Biological Macromolecules*, **265**, Article ID: 130805. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130805>
- [21] Lin, D., Xiao, L., Qin, W., Loy, D.A., Wu, Z., Chen, H., *et al.* (2022) Preparation, Characterization and Antioxidant Properties of Curcumin Encapsulated Chitosan/Lignosulfonate Micelles. *Carbohydrate Polymers*, **281**, Article ID: 119080. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.119080>
- [22] Ryu, V., Chuesiang, P., Corradini, M.G., McLandsborough, L., Jin, T., Ngo, H., *et al.* (2023) Synergistic Photoinactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* by Curcumin and Lauric Arginate Ethyl Ester Micelles. *LWT*, **173**, Article ID: 114317. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114317>
- [23] Swallow, J., Seidler, K. and Barrow, M. (2024) The Mechanistic Role of Curcumin on Matrix Metalloproteinases in Osteoarthritis. *Fitoterapia*, **174**, Article ID: 105870. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2024.105870>
- [24] Ma, L., Gao, H., Cheng, C., Cao, M., Zou, L. and Liu, W. (2023) Fabrication of Emulsions Using High Loaded Curcumin Nanosuspension Stabilizers: Enhancement of Antioxidant Activity and Concentration of Curcumin in Micelles. *Journal*

- of Functional Foods*, **110**, Article ID: 105858. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105858>
- [25] Zhou, Z., Wang, S., Fan, P., Meng, X., Cai, X., Wang, W., *et al.* (2024) Borneol Serves as an Adjuvant Agent to Promote the Cellular Uptake of Curcumin for Enhancing Its Photodynamic Fungicidal Efficacy against *Candida Albicans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **253**, Article ID: 112875. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2024.112875>
- [26] Tian, M., Song, R., Wang, T., Sun, M., Liu, Y. and Chen, X. (2018) Inducing Sustained Release and Improving Oral Bioavailability of Curcumin via Chitosan Derivatives-Coated Liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, **120**, 702-710. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.146>
- [27] Gupta, A., Singh, V.K., Kumar, D., Yadav, P., Kumar, S., Beg, M., *et al.* (2017) Curcumin-3,4-dichloro Phenyl Pyrazole (CDPP) Overcomes Curcumin's Low Bioavailability, Inhibits Adipogenesis and Ameliorates Dyslipidemia by Activating Reverse Cholesterol Transport. *Metabolism*, **73**, 109-124. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.05.005>
- [28] Zhi, K., Wang, R., Wei, J., Shan, Z., Shi, C. and Xia, X. (2021) Self-Assembled Micelles of Dual-Modified Starch via Hydroxypropylation and Subsequent Debranching with Improved Solubility and Stability of Curcumin. *Food Hydrocolloids*, **118**, Article ID: 106809. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106809>
- [29] Yang, D., Wang, L., Zhang, L., Wang, M., Li, D., Liu, N., *et al.* (2024) Construction, Characterization and Bioactivity Evaluation of Curcumin Nanocrystals with Extremely High Solubility and Dispersion Prepared by Ultrasound-Assisted Method. *Ultrasonics Sonochemistry*, **104**, Article ID: 106835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.106835>
- [30] Liu, J., Li, Y., Zhang, H., Liu, S., Yang, M., Cui, M., *et al.* (2022) Fabrication, Characterization and Functional Attributes of Zein-Egg White Derived Peptides (EWDP)-Chitosan Ternary Nanoparticles for Encapsulation of Curcumin: Role of EWDP. *Food Chemistry*, **372**, Article ID: 131266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131266>
- [31] Jin, G. (2020) Current Nanoparticle-Based Technologies for Osteoarthritis Therapy. *Nanomaterials*, **10**, Article No. 2368. <https://doi.org/10.3390/nano10122368>
- [32] Zhou, D., Zhou, F., Sheng, S., Wei, Y., Chen, X. and Su, J. (2023) Intra-Articular Nanodrug Delivery Strategies for Treating Osteoarthritis. *Drug Discovery Today*, **28**, Article ID: 103482. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103482>
- [33] Lan, Q., Lu, R., Chen, H., Pang, Y., Xiong, F., Shen, C., *et al.* (2020) MMP-13 Enzyme and Ph Responsive Theranostic Nanoplatform for Osteoarthritis. *Journal of Nanobiotechnology*, **18**, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00666-7>
- [34] Guan, T., Ding, L., Lu, B., Guo, J., Wu, M., Tan, Z., *et al.* (2022) Combined Administration of Curcumin and Chondroitin Sulfate Alleviates Cartilage Injury and Inflammation via NF- $\kappa$ B Pathway in Knee Osteoarthritis Rats. *Frontiers in Pharmacology*, **13**, Article ID: 882304. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.882304>