

两种马尾藻岩藻多糖的理化性质、结构表征及其增强免疫和降血糖活性

陈舒桐^{1,2}, 周庆玲¹, 杨睿宇¹, 王潇潇¹, 丁睿³, 李瑞^{1,4,*}, 罗连响³, 钟赛意^{1,4}

(1.广东海洋大学食品科技学院, 广东省水产品加工与安全重点实验室, 广东省海洋生物制品工程实验室, 广东省海洋食品工程技术研究中心, 广东省亚热带果蔬加工科技创新中心, 广东湛江 524088; 2.汕头大学理学院生物系, 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东汕头 515063; 3.广东医科大学海洋医药研究院, 广东湛江海洋医药研究院, 广东湛江 524023; 4.大连工业大学, 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心, 辽宁大连 116034)

摘要: 分析和比较张氏马尾藻岩藻多糖 (*Sargassum zhangii* fucoidan, SZ-Fuc) 和半叶马尾藻岩藻多糖 (*Sargassum hemiphyllum* fucoidan, SH-Fuc) 的化学成分及结构、增强免疫和降血糖活性。结果表明, SZ-Fuc硫酸基质量分数为 (29.74±0.01)%, 分子质量为111.28 kDa, 表面结构较疏松, 主链存在(→1)连接的岩藻糖、木糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖, (1→3)-和(1→4)-连接的木糖, (1→2)-连接的甘露糖, (1→3)-、(1→4)-和(1→6)-连接的半乳糖, (1→4)-和(1→6)-连接的葡萄糖。而SH-Fuc分子质量相对较大, 为1 166.48 kDa; 硫酸基质量分数较高, 为 (44.11±0.01)%; 表面结构较紧实; 主链包含(→1)、(1→3)-和(1→4)-连接的岩藻糖, (→1)、(1→4)-和(1→6)-连接的葡萄糖, (→1)和(1→2)-连接的甘露糖, (1→4)-连接的半乳糖。二者均具有多糖分支结构, 均可显著增加RAW264.7细胞NO的释放量, 并提高一氧化氮合酶和诱导型环氧化酶的蛋白表达情况, 具有良好的增强免疫活性, 其中SZ-Fuc增强免疫活性优于SH-Fuc, 而后者抑制 α -葡萄糖苷酶的效果较好, 表明其具有较好的降血糖潜力。本研究可为两种马尾藻多糖在免疫调节和降血糖相关功能食品和营养食品方面的开发提供理论依据。

关键词: 马尾藻; 岩藻多糖; 理化性质; 结构表征; 免疫调节; 降血糖

Physicochemical Properties, Structural Characterization, Immunoenhancing and Hypoglycemic Activities of Fucoidan Extracts from Two *Sargassums* Species

CHEN Shutong^{1,2}, ZHOU Qingling¹, YANG Ruiyu¹, WANG Xiaoxiao¹, DING Rui³, LI Rui^{1,4,*}, LUO Lianxiang³, ZHONG Saiyi^{1,4}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety, Guangdong Province Engineering Laboratory for Marine Biological Products, Guangdong Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Food, Guangdong Sub-tropical Fruit and Vegetable Processing Technology Innovation Center, College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Department of Biology, College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China; 3. Zhanjiang Institute of Marine Medicine, Guangdong Province, Institute of Marine Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 4. Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China)

Abstract: In this study, the chemical compositions, structures, immunomodulatory and hypoglycemic activities of fucoidans from *Sargassum zhangii* (SZ-Fuc) and *Sargassum hemiphylla* (SH-Fuc) were analyzed and compared. The results showed that the sulfate group content and molecular mass of SZ-Fuc were (29.74 ± 0.01)% and 111.28 kDa, respectively, and SZ-Fuc had a relatively loose surface structure. The main chain of SZ-Fuc was composed of (→1) linked fucose, xylose, glucose, mannose and galactose, (1→3)- and (1→4)- linked xylose, (1→2)-linked mannose, (1→3)-, (1→4)- and (1→6)-linked

收稿日期: 2023-02-02

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目 (2021A1515010868); 广东省普通高校特色创新人才类项目 (2020KTSCX051); 广东省高等学校科技创新团队项目 (2021KCXTD021); 广东海洋大学大学生创新训练计划项目 (S202210566016); 广东海洋大学科研启动费资助项目 (R20078)

第一作者简介: 陈舒桐 (2000—) (ORCID: 0000-0001-9406-6454), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物活性物质开发。
E-mail: cst2313@163.com

*通信作者简介: 李瑞 (1981—) (ORCID: 0000-0001-5953-2341), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为食品功能因子及海洋生物活性物质研究与开发。E-mail: lirui@gdou.edu.cn

galactose, and (1→4)- and (1→6)-linked glucose. Meanwhile, the sulfate group content and molecular mass of SH-Fuc were $(44.11 \pm 0.01)\%$ and 1 166.48 kDa, respectively, SH-Fuc had a compact surface structure, and its main chain contained (→1), (1→3)- and (1→4)-linked fucose, (→1), (1→4)- and (1→6)-linked glucose, (→1) and (1→2)-linked mannose, and (1→4)-linked galactose. Besides, both SZ-Fuc and SH-Fuc had branched structures. They significantly increased NO release from RAW264.7 cells and improved the protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), indicating good immunomodulatory activity. The immunomodulatory activity of SZ-Fuc was better than that of SH-Fuc, while the inhibitory effect of SH-Fuc on α -glucosidase was better than that of SZ-Fuc, suggesting that SH-Fuc had better hypoglycemic potential. This study can provide a theoretical basis for polysaccharides from *S. zhangii* and *S. hemiphylla* in the development of functional and nutritional foods with immunomodulatory and blood glucose-reducing activity.

Keywords: *Sargassum*; fucoidan; physicochemical properties; structural characterization; immunomodulatory; hypoglycemic

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230202-015

中图分类号: TS254

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0015-08

引文格式:

陈舒桐, 周庆玲, 杨睿宇, 等. 两种马尾藻岩藻多糖的理化性质、结构表征及其增强免疫和降血糖活性[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 15-22. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230202-015. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Shutong, ZHOU Qingling, YANG Ruiyu, et al. Physicochemical properties, structural characterization, immunoenhancing and hypoglycemic activities of fucoidan extracts from two *Sargassums* species[J]. Food Science, 2024, 45(1): 15-22. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230202-015. <http://www.spkx.net.cn>

马尾藻 (*Sargassum*) 属褐藻门、墨角藻目、马尾藻科、马尾藻属, 是一种暖温带海洋褐藻, 广泛分布于广东和广西沿海, 尤其是海南岛和湛江硇洲岛居多^[1-2]。马尾藻富含多酚、蛋白质、硫酸化多糖及其衍生物等多种营养成分, 其中岩藻多糖是马尾藻中的主要活性物质^[3-4]。岩藻多糖是一种水溶性的多聚阴离子同型杂多糖, 富含硫酸基团^[5]。岩藻多糖的单糖组成除了L-岩藻糖外, 还包括木糖、葡萄糖、半乳糖等, 各单糖间主要通过 α -1,2、 α -1,3或 α -1,4糖苷键连接^[6-7]。大量研究表明, 岩藻多糖具有降血脂^[8]、降血糖^[9]、抗氧化^[10]、抗癌^[11]、调节免疫^[12]等生物活性, 并且其生物活性与多糖的分子质量大小、硫酸基质量分数及化学结构有密切关系^[13]。

目前, 学者们不断发现不同植物来源多糖的免疫调节功能。免疫是人体的一种生理功能, 人体可以利用这种功能识别“自己”和“非己”成分, 从而清除进入人体的抗原物质或人体自身产生的损坏细胞或肿瘤细胞, 进而维持身体健康。巨噬细胞是免疫细胞的一种, 通过激活巨噬细胞, 可以吞噬或杀死病原体, 其分泌的NO、前列腺素、肿瘤坏死因子等也可以间接杀死病原体, 因此活化巨噬细胞对免疫调节有很大的帮助^[14]。诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和诱导型环氧化酶-2 (inducible cyclooxygenase-2, COX-2) 是催化巨噬细胞分泌合成NO和前列腺素的关键酶, 通过检测多糖样品干预后RAW264.7细胞NO的释放量以及采用Western blot技术研究多糖干预后RAW264.7细胞中iNOS和COX-2

这两种酶在蛋白水平的表达情况, 可以反映多糖的免疫调节活性。任琪^[15]通过提取、分离纯化得到银杏叶多糖后, 将其加入细胞培养基中发现银杏叶多糖可以显著促进细胞COX-2和iNOS在蛋白水平上的表达。陈怡帆等^[14]研究了甘孜松茸多糖的免疫调节活性, 发现多糖可以提高RAW264.7细胞的增殖能力, 且促进细胞释放NO和多种细胞因子, 进而显著提升RAW264.7细胞的免疫调节能力。

2型糖尿病, 又称非胰岛素依赖性糖尿病, 作为一种慢性、不可阻挡的疾病, 其发病机制尚不清楚。而目前用于治疗2型糖尿病的临床药物, 包括双胍类、磺脲类以及糖苷酶抑制剂类等, 这类药物大多副作用较多, 容易引起肠胃功能紊乱、低血糖等症状^[16]。已有研究表明, 岩藻多糖可抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 从而阻止餐后血糖水平的升高。Shan Xindi等^[17]研究发现, 从褐藻中提取的岩藻多糖可有效抑制 α -葡萄糖苷酶的活性, 从而降低体内血糖水平以降低糖尿病发病率, 其半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 显著低于糖苷酶抑制剂阿卡波糖。

然而, 据笔者所知, 目前关于马尾藻岩藻多糖免疫调节及降血糖活性的报道较少。本实验以超声波辅助热水浸提法提取张氏马尾藻 (*Sargassum zhangii*) 和半叶马尾藻 (*Sargassum hemiphyllum*) 中的岩藻多糖为研究对象, 对其理化性质和结构进行分析, 明确其化学组成和结构, 并探究其免疫调节和降血糖作用, 以期为进一步开发马尾藻岩藻多糖调节免疫及降血糖相关的功能食品或药物提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

张氏马尾藻于2020年10月采摘于广东省湛江市雷州地区附近海域,半叶马尾藻于2021年4月采摘于广东省湛江市硇洲岛地区附近海域。采摘后的马尾藻经清洗、晾晒、烘干、粉碎后过100目筛,放入-20℃冰箱保存。商业化纯多糖:泡叶藻岩藻多糖、海带岩藻多糖市购。

标准品:L-岩藻糖、牛血清白蛋白、没食子酸、福林-酚、再生纤维素透析袋(1.5 kDa) 上海源叶生物科技有限公司;RAW264.7细胞 中国科学院干细胞库;一氧化氮检测试剂盒 碧云天生物技术公司;DMEM培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、青霉素、链霉素和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 美国生命技术公司;生化试剂:糖苷酶、淀粉酶、对硝基苯酚葡萄糖苷(4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, pNPG)、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS) 美国Sigma公司;其他试剂购自西陇科学股份有限公司,均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FD8508冷冻干燥机 韩国Ilshin公司;全自动酶标仪、ICS5000离子色谱仪 美国ThermoFisher公司;纳米粒度电位仪 上海马尔文帕纳科公司;LC-10A高效液相色谱仪(配有RI-10A示差检测器)、GCMS-QP2010气相色谱-质谱(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)联用仪 日本Shimadzu公司;色谱柱BRT105-104-102串联凝胶柱(8 mm×300 mm) 博睿糖生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 岩藻多糖的提取

称取马尾藻粉20.0 g于1 L烧杯,按料液比1:30(g/mL)加入蒸馏水,搅拌均匀后在80℃恒温磁力搅拌锅中热水浸提3.5 h。浸提完成后,用350 W超声辅助提取50 min,浸提液在4 000 r/min离心10 min,弃去沉淀。上清液用旋转蒸发仪浓缩至原体积的1/3后,加入无水乙醇至其体积分数30%,再在4 000 r/min离心10 min后取上清液。上清液继续加入无水乙醇至其体积分数80%,同样条件下离心后取沉淀。沉淀用无水乙醇和丙酮各洗2次后,加入水溶解,再加入Sevag试剂除蛋白(多糖溶液:Sevag试剂=6:1, V/V),旋涡仪振荡20 min后,静置分层,取上清液于15 000 Da规格的透析袋,在4℃冰箱中透析24 h,期间更换2~3次蒸馏水。透析后,多糖溶液进行冷冻干燥,即得岩藻多糖(张氏马尾藻岩藻多糖(*Sargassum zhangii* fucoidan, SZ-Fuc)和半叶马尾藻岩

藻多糖(*Sargassum hemiphyllum* fucoidan, SH-Fuc)。岩藻多糖得率计算公式如下:

$$\text{岩藻多糖得率/\%} = \frac{\text{粗提取物质量}}{\text{马尾藻粉质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.2 岩藻多糖多糖、蛋白质和硫酸基质量分数测定

多糖质量分数:采用苯酚-硫酸法,以L-岩藻糖为标准品^[18];硫酸基质量分数:采用氯化钡比浊法,以硫酸钾为标准品^[19];蛋白质量分数:采用考马斯亮蓝法,以牛血清白蛋白为标准品^[18]。

1.3.3 岩藻多糖分子质量测定

色谱柱:BRT105-104-102串联凝胶柱(8 mm×300 mm);流动相:0.05 mol/L NaCl溶液;流速:0.6 mL/min,柱温:40℃;进样量:20 μL;检测器:RI-10A示差检测器。

1.3.4 扫描电子显微镜观察

取适量岩藻多糖样品置于样品台,用导电胶固定后进行镀金,在5 kV电场下对多糖的表面形态进行观察并拍照。

1.3.5 粒径和电位测定

将两种岩藻多糖分别溶于蒸馏水中,配成5 mg/mL的溶液,再采用马尔文纳米粒度电位仪进行测定,每个样品扫描3次。

聚合物分散性指数(polymer dispersity index, PDI)计算公式如下:

$$\text{PDI} = \frac{\text{重均分子质量}}{\text{数均分子质量}} \quad (2)$$

1.3.6 甲基化糖残基测定

样品经甲基化、水解、乙酰化后,经GC-MS测定并与标准质谱图库进行比对。GC-MS条件:RXI-5 SIL MS色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);程序升温条件:起始温度120℃,以3℃/min升温至250℃/min,保持5 min;进样口温度为250℃,检测器温度为250℃,载气为氦气,流速为1 mL/min。

1.3.7 Griess试剂法检测RAW264.7细胞NO的释放量

RAW264.7细胞在含有10% FBS、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/mL)的DMEM的培养基中,于37℃,含5% CO₂恒温培养箱中培养。将RAW264.7细胞悬液(1×10⁴个/mL)接种至96孔板(100 μL/孔),并将其放置含5% CO₂培养箱中培养24 h。培养过后,使用0.1 mol/L的PBS(pH 7.2)洗涤96孔板2次,以除去非贴壁细胞。向96孔板加入质量浓度为25、50、100 μg/mL的两种多糖溶液(用新鲜的完全DMEM培养基溶解),孵育24 h后收集96孔板上每个孔中的上清液进行NO含量的测定。NO含量使用一氧化氮检测试剂盒进行检测,

在540 nm波长处测定其吸光度。该实验用不含多糖的DMEM培养基作空白对照,根据NaNO₂的校准曲线计算NO的含量,即为释放量^[19]。

1.3.8 Western blot技术检测RAW264.7细胞iNOS和COX-2蛋白表达

将RAW264.7细胞悬液(1×10⁴个/mL)接种于铺有盖玻片的6孔板中(2 mL/孔),设置空白组、SZ-Fuc实验组(25、50 μg/mL和100 μg/mL)和SH-Fuc实验组(25、50 μg/mL和100 μg/mL),每个质量浓度做5个平行,培养24 h至贴壁。弃去细胞培养液后,对照组加入2 mL细胞培养液,实验组加入2 mL对应质量浓度的多糖溶液,接着在细胞培养箱中培养24 h。用PBS清洗3次,在每孔中加入细胞裂解液150 μL,置于冰上裂解30 min。接着在4 ℃、12 000 r/min离心15 min,取上清液。然后将对照组和实验组依次加入倒好胶的电泳槽中。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质样品(10~20 μL)并转移到聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。然后将PVDF膜与5%牛血清白蛋白在室温下孵育2 h,并用Tris含吐温-20缓冲盐溶液(tris buffered saline with Tween-20, TBST)洗涤3次,每次洗涤时间为10 min,一抗加入后在4 ℃孵育24 h。最后,用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育2 h后,用TBST洗去多余的二抗。加入显色液进行曝光拍照,利用ImageJ软件进行定量分析。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参,每个样品最后测得的目标蛋白含量与本样品GAPDH含量的比值即为每个样品目标蛋白的相对含量^[19]。

1.3.9 岩藻多糖对α-葡萄糖苷酶活性抑制率的测定

将样品配制成0.1、0.5、0.75、1.0、1.5 mg/mL质量浓度梯度的溶液(样品包括岩藻多糖和阿卡波糖)。实验在96孔板上进行,具体步骤参照表1,96孔板于405 nm波长处测量吸光度^[20]。按照下式计算酶活性抑制率:

$$\text{酶活性抑制率}/\% = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \times 100 \quad (3)$$

表1 α-葡萄糖苷酶活性测定实验步骤

试剂	对照组	对照空白组	样品组	样品空白组
PBS体积/μL	120	120	120	120
酶液(0.2 U/mL)体积/μL	20	20	20	20
底物pNPG(25 mmol/L)体积/μL	20	20	—	—
不同质量浓度多糖溶液体积/μL	—	—	20	—
反应条件	37 ℃恒温15 min			
终止液Na ₂ CO ₃ (0.1 mol/L)体积/μL	40	40	40	40

注:—,不加,表2同。

1.3.10 岩藻多糖对α-淀粉酶活性的抑制率测定

将样品配制成0、0.5、0.75、1.0 mg/mL质量浓度梯度的溶液(样品包括岩藻多糖和阿卡波糖)。实验在96孔板上进行,具体步骤参照表2,于540 nm处测量吸光度^[20]。按照下式计算酶活性抑制率:

$$\text{酶活性抑制率}/\% = \frac{(A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}) - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}} \times 100 \quad (4)$$

表2 α-淀粉酶活性测定实验步骤

试剂	对照组	对照空白组	样品组	样品空白组
PBS体积/μL	20	40	—	20
酶液(4 U/mL)体积/μL	20	—	20	—
可溶性淀粉(0.5%)体积/μL	40	40	40	40
不同质量浓度多糖溶液体积/μL	—	—	20	20
反应条件	37 ℃恒温10 min			
终止液DNS体积/μL	80	80	80	80

1.4 数据处理

实验结果平行测定3组,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 25.0软件处理数据,并采用ANOVA和Duncan多重比较进行显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 岩藻多糖的得率及化学成分分析

采用超声波辅助热水浸提法分别提取两种马尾藻中的岩藻多糖,岩藻多糖得率和化学成分含量如表3所示。SZ-Fuc和SH-Fuc得率分别为(2.85±0.35)%和(2.72±0.18)%。Lakshmanasenthil等^[21]采用热水浸提法从喇叭藻中提取岩藻多糖,得率为(1.8±0.16)%。与本研究结果对比说明,采用超声波辅助热水浸提法提高了多糖的得率,原因是超声空化时所产生的高压和高条件会导致细胞壁的破裂,增加溶剂渗透,从而有利于多糖的析出^[22]。表3表明,SH-Fuc硫酸基质量分数高于SZ-Fuc。SH-Fuc和SZ-Fuc蛋白质质量分数分别为(2.66±0.67)%和(1.92±0.38)%,含量较少,说明Sevag法除蛋白效果较好。

表3 两种马尾藻岩藻多糖的得率及化学成分

样品	得率	多糖质量分数	硫酸基质量分数	蛋白质质量分数
SZ-Fuc	2.85±0.35	82.77±0.40	29.74±0.01	1.92±0.38
SH-Fuc	2.72±0.18	75.35±1.46	44.11±0.01	2.66±0.67

2.2 岩藻多糖的分子质量和纯度分析

如图1所示,在25~50 min之间,观察两种岩藻多糖的峰(4号峰为流动相),表明两种多糖均是异质多糖。

其中SH-Fuc出峰数比SZ-Fuc多两个,说明SZ-Fuc纯度更高。两种岩藻多糖的重均分子质量(m_w)存在明显差别,SH-Fuc的 m_w 为1 166.48 kDa,占比为44.06%;SZ-Fuc的 m_w 较小,为111.28 kDa,占比达90.27%(表4),说明SZ-Fuc纯度较高。有研究报道,岩藻多糖的 m_w 分布在400~1 400 kDa之间,且 m_w 的差异主要取决于原料种类与提取方法^[23]。因此推测本研究所得两种岩藻多糖的 m_w 不同与原料种类有关。

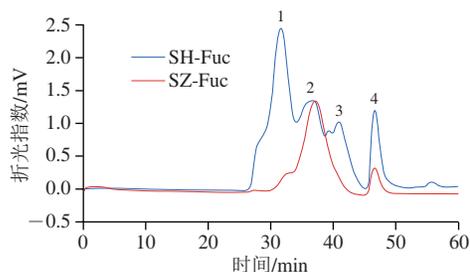


图1 两种马尾藻岩藻多糖的高效凝胶色谱图

Fig. 1 High performance gel chromatograms of fucoidan extracts from two *Sargassum* species

表4 两种马尾藻岩藻多糖分子质量

样品	m_w /kDa	峰面积占比/%
SZ-Fuc	111.28	90.27
SH-Fuc	1 166.48	44.06

2.3 岩藻多糖的甲基化分析

经过衍生化得到了部分甲基化的乙酸酯衍生物,利用GC-MS分析其连接方式,SZ-Fuc和SH-Fuc的质谱解析结果分别见表5、6。表5显示:SZ-Fuc主链包含(→1)-连接的甲基吡喃岩藻糖、木糖、葡萄糖、甘露糖和半乳糖乙酸酯,(1→3)-和(1→4)-连接的甲基吡喃木糖乙酸酯,(1→2)-连接的甲基吡喃甘露糖乙酸酯,(1→3)-、(1→4)-和(1→6)-连接的甲基吡喃半乳糖乙酸酯,(1→4)-和(1→6)-连接的甲基吡喃葡萄糖乙酸酯;同时存在(1→3,6)-和(1→4,6)-连接的甲基吡喃半乳糖乙酸酯,(1→3,4)-和(1→4,6)-连接的甲基吡喃葡萄糖乙酸酯,表明SZ-Fuc存在支链结构。表6显示:SH-Fuc主链包含(→1)、(1→3)-和(1→4)-连接的甲基吡喃岩藻糖乙酸酯,(→1)、(1→4)-和(1→6)-连接的甲基吡喃葡萄糖乙酸酯,(→1)和(1→2)-连接的甲基吡喃甘露糖乙酸酯,(1→4)-连接的甲基吡喃半乳糖乙酸酯,SH-Fuc中同时存在(1→2,4)-连接的甲基吡喃岩藻糖乙酸酯、(1→3,4)-和(1→4,6)-连接的甲基葡萄糖乙酸酯、(1→3,6)-和(1→4,6)-连接的甲基半乳糖乙酸酯、(1→4,6)-连接的甲基甘露糖乙酸酯,表明SH-Fuc同样存在分支结构。

表5 SZ-Fuc甲基化分析结果

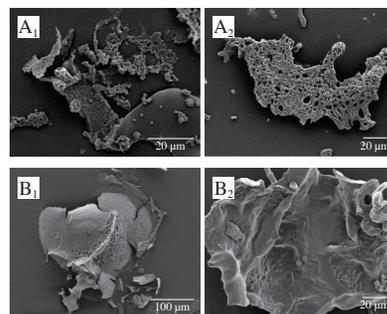
峰编号	甲基化糖残基	物质的量占比	糖苷键类型
1	2,3,4-甲基吡喃岩藻糖乙酸酯	0.097	Fucp-(1→
2	2,3,5-甲基吡喃木糖乙酸酯	0.026	Xylp-(1→
3	2,4-甲基吡喃木糖乙酸酯	0.058	→3)-Xylp-(1→
4	2,3-甲基吡喃木糖乙酸酯	0.019	→4)-Xylp-(1→
5	2,3,4,6-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.045	Glcp-(1→
6	2,3,4,6-甲基吡喃甘露糖乙酸酯	0.062	Manp-(1→
7	2,3,4,6-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.071	Galp-(1→
8	3,4,6-甲基吡喃甘露糖乙酸酯	0.057	→2)-Manp-(1→
9	2,3,6-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.240	→4)-Galp-(1→
10	2,3,6-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.144	→4)-Glcp-(1→
11	2,4,6-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.017	→3)-Galp-(1→
12	2,3,4-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.021	→6)-Glcp-(1→
13	2,3,4-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.032	→6)-Galp-(1→
14	2,6-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.022	→3,4)-Glcp-(1→
15	2,3-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.023	→4,6)-Glcp-(1→
16	2,3-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.043	→4,6)-Galp-(1→
17	2,4-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.024	→3,6)-Galp-(1→

表6 SH-Fuc甲基化分析结果

峰编号	甲基化糖残基	物质的量占比	糖苷键类型
1	2,3,4-甲基吡喃岩藻糖乙酸酯	0.028	Fucp-(1→
2	2,4-甲基吡喃岩藻糖乙酸酯	0.019	→3)-Fucp-(1→
3	2,3-甲基吡喃岩藻糖乙酸酯	0.015	→4)-Fucp-(1→
4	2,3,4,6-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.044	Glcp-(1→
5	2,3,4,6-甲基吡喃甘露糖乙酸酯	0.038	Manp-(1→
6	3-甲基吡喃岩藻糖乙酸酯	0.035	→2,4)-Fucp-(1→
7	3,4,6-甲基吡喃甘露糖乙酸酯	0.257	→2)-Manp-(1→
8	2,3,6-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.105	→4)-Galp-(1→
9	2,3,6-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.231	→4)-Glcp-(1→
10	2,3,4-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.018	→6)-Glcp-(1→
11	2,6-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.041	→3,4)-Glcp-(1→
12	2,3-甲基吡喃甘露糖乙酸酯	0.032	→4,6)-Manp-(1→
13	2,3-甲基吡喃葡萄糖乙酸酯	0.036	→4,6)-Glcp-(1→
14	2,3-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.019	→4,6)-Galp-(1→
15	2,4-甲基吡喃半乳糖乙酸酯	0.081	→3,6)-Galp-(1→

2.4 岩藻多糖的微观形态

如图2所示,SZ-Fuc表面较为粗糙,结构较松散,多糖表面含有较多、较密集的孔洞。而SH-Fuc表面相对光滑,样品大致呈现片状结构,有屑状堆积的特征,在高放大倍数下表面也相对光滑。两种马尾藻岩藻多糖微观形态存在明显差异,推测可能与其种类、化学组成以及分子质量大小等因素有关^[24]。



A. SZ-Fuc; B. SH-Fuc。下标1、2分别为放大400、2 000倍。

图2 两种岩藻多糖扫描电子显微镜图

Fig. 2 Scanning electron micrographs of two fucoidans

2.5 岩藻多糖的粒径和电位

多糖粒径的大小与其在生物体内的利用和代谢程度有很大关系,而电位则反映多糖溶液的稳定性,研究多糖的粒径和电位有利于功能性食品或药物的开发^[25]。PDI用来描述多糖分子质量的分布情况。PDI值越小,多糖分子质量分布越均匀,反之亦然^[26]。如表7所示,SZ-Fuc的PDI值小于SH-Fuc,说明SZ-Fuc的分子质量分布更均匀,这与分子质量分析结果一致。

Zeta电位是带电粒子在水动力剪切平面上的电势。由于多糖结构中存在羧基和硫酸基,所以大部分多糖是以带负电荷的聚电解质的形式存在^[27]。Zeta电位反映溶液体系的稳定性,电位绝对值接近或大于30 mV时,表明溶液较稳定^[28]。如表7所示,SH-Fuc的平均电位绝对值更接近于30 mV,表明SH-Fuc溶液体系较为稳定。2.1节分析结果表明SH-Fuc的硫酸基质量分数较高,而SZ-Fuc硫酸基质量分数低,二者硫酸基质量分数的不同可能是造成两种溶液Zeta电位差异的主要原因^[29]。

表7 两种岩藻多糖的粒径、电位与PDI

Table 7 Average particle size, zeta potential and polymer dispersity index of two fucoidans

岩藻多糖	平均粒径/nm	PDI	平均电位/mV
SZ-Fuc	262.2±5.2 ^b	0.448±0.038 ^a	-8.84±0.55 ^b
SH-Fuc	330.8±6.9 ^a	0.603±0.039 ^a	-24.30±0.74 ^a

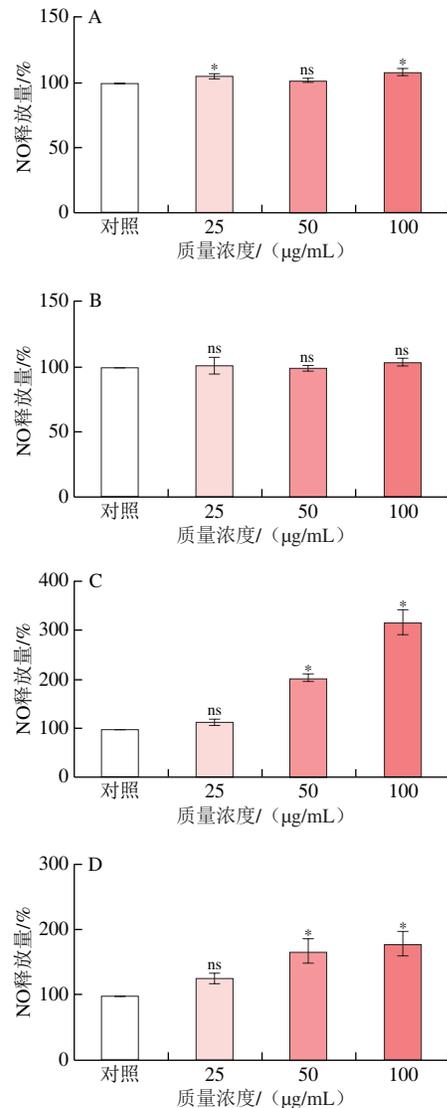
注: 同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.6 岩藻多糖增强免疫活性

2.6.1 岩藻多糖对RAW264.7细胞NO释放量的影响

图3A表明: 泡叶藻岩藻多糖仅在25 $\mu\text{g/mL}$ 和100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下显著增加了NO释放量,但NO释放量低于SZ-Fuc和SH-Fuc,而图3B显示,在海带岩藻多糖的刺激下,RAW264.7细胞释放NO的量与对照组相比均无显著差异,说明两种商业化岩藻多糖增强免疫活性能力较弱。由图3C、D可见,SZ-Fuc和SH-Fuc多糖均可促进RAW264.7细胞释放NO,且呈明显的质量浓度依赖关系,其中在SZ-Fuc刺激下,其质量浓度与NO释放量的剂量关系更明显。具体来讲,当质量浓度达到25 $\mu\text{g/mL}$ 时,SZ-Fuc和SH-Fuc对RAW264.7细胞NO的产生量与对照组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$);当质量浓度在50~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内时,SZ-Fuc和SH-Fuc对RAW264.7细胞NO产生量的影响与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。Bi Decheng等^[30]研究从新西兰裙带菜中提取的岩藻多糖的免疫调节作用发现,低分子质量的岩藻多糖在质量浓度范围为1~50 $\mu\text{g/mL}$ 内对RAW264.7具有显著的增强免疫作用,且能够促进NO的释放,呈现质量浓度依赖性。本研究中,分子质量分析结果表明SZ-Fuc分子质量低于SH-Fuc,且在相同质量浓度下,SZ-Fuc

促进RAW264.7细胞释放NO的量高于SH-Fuc,说明低分子质量的SZ-Fuc具有更好的增强免疫活性作用,与Bi Decheng等^[30]的研究结果一致。



A.泡叶藻岩藻多糖; B.海带岩藻多糖; C. SZ-Fuc; D. SH-Fuc。与对照组比较,*.差异显著 ($P < 0.05$); ns.差异不显著 ($P > 0.05$)。

图3 岩藻多糖质量浓度对RAW264.7细胞NO释放量的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of fucoidans on NO release from RAW264.7 cells

2.6.2 岩藻多糖对RAW264.7细胞中COX-2、iNOS蛋白表达的Western blot结果

iNOS是催化巨噬细胞分泌合成NO的关键酶,而COX-2是合成前列腺素的关键酶,两种酶在免疫调节系统中均发挥重要的作用^[31]。在两种岩藻多糖的刺激后,RAW264.7细胞中COX-2、iNOS在蛋白水平上的表达情况如图4所示。可见,与空白对照组相比,SZ-Fuc和SH-Fuc均可增加COX-2和iNOS蛋白的表达,都具有增强免疫的作用。

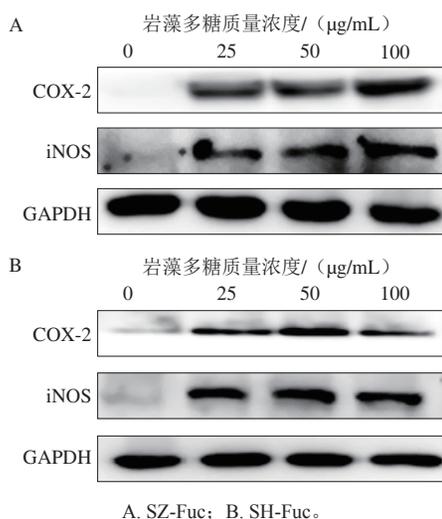


图4 不同质量浓度岩藻多糖刺激下RAW264.7细胞中COX-2、iNOS蛋白的表达

Fig. 4 Expression levels of COX-2 and iNOS in RAW264.7 cells

stimulated by different concentrations of fucoidan extracts from *Sargassum*

2.7 岩藻多糖对 α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶的抑制作用

α -淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶是人体肠道内存在的酶，这两种酶在消化和吸收中充当了重要的角色，它们可以破坏摄取糖类物质的糖苷键，将糖类物质水解为人体易吸收的葡萄糖，而葡萄糖的产生是导致餐后血糖水平升高的原因之一，可引起糖尿病及其并发症等^[32]。本研究中，不同的浓度下，SZ-Fuc和SH-Fuc对 α -淀粉酶（图5A）和 α -葡萄糖苷酶（图5B）均有抑制作用。两种多糖对 α -淀粉酶的抑制作用无剂量关系，由图5A可以看出，当多糖质量浓度在0.5 mg/mL时，SZ-Fuc抑制 α -淀粉酶的效果最好，且效果优于相同浓度下的阿卡波糖。图5B表明，两种多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用呈现浓度依赖关系，随着多糖质量浓度的增加，多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制率逐渐升高。使用GraphPad Prism软件对 α -葡萄糖苷酶抑制数据进行分析得到，SZ-Fuc、SH-Fuc和阿卡波糖的 IC_{50} 值分别为0.033、0.012 mg/mL和0.668 mg/mL，说明SH-Fuc对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果优于SZ-Fuc和阿卡波糖。张梦晴^[33]研究羊栖菜多糖对 α -葡萄糖苷酶的抑制实验结果表明，当多糖质量浓度为1 mg/mL时，羊栖菜多糖对 α -葡萄糖苷酶抑制率可达到62.53%，而相同质量浓度条件下阿卡波糖抑制率只有42.38%，说明羊栖菜多糖有更好的降血糖作用，这与本实验的研究结果相似。Kumar等^[34]从马尾藻（*Sargassum wightii*）中提取岩藻多糖，分析发现岩藻多糖的硫酸根质量分数为（36.00±0.60）%，对 α -葡萄糖苷酶的抑制作用显著（ IC_{50} 值为132.90 μ g/mL），且呈现质量浓度依赖性，比阿卡波糖（ IC_{50} 值为1 mg/mL）更有效。本研究提取的SZ-Fuc、SH-Fuc硫酸基质量分数分别为（29.74±0.01）%和（44.11±0.01）%，相比较下，硫

酸基质量分数较高的SH-Fuc对 α -葡萄糖苷酶的抑制率更高，具有更好的降血糖效果，这说明岩藻多糖的硫酸基质量分数对酶的抑制作用有影响。Shan Xindi等^[17]通过研究11种不同来源的褐藻岩藻多糖对 α -葡萄糖苷酶的影响，发现墨角藻来源的岩藻多糖对 α -葡萄糖苷酶有明显的抑制作用，显著高于其他10种褐藻来源的岩藻多糖，其 IC_{50} 值为0.068 mg/mL。相比较下，本实验提取的马尾藻岩藻多糖降血糖作用更佳。

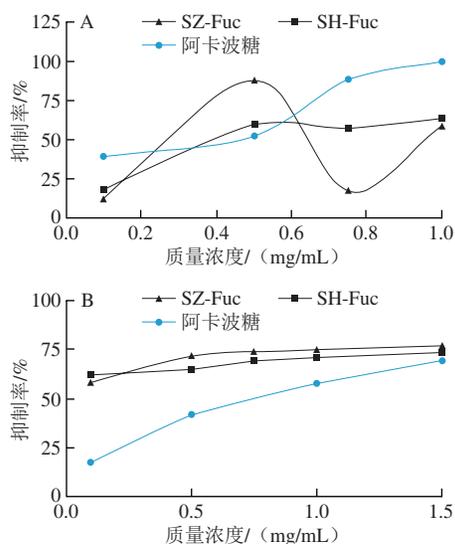


图5 两种马尾藻岩藻多糖对 α -淀粉酶（A）和 α -葡萄糖苷酶（B）的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effects of fucoidan extracts from two *Sargassum* species on α -amylase (A) and α -glucosidase (B)

3 结论

本研究中，SZ-Fuc表面结构较疏松、不平整、含有较多孔洞，其硫酸基质量分数较低、分子质量较小，而SH-Fuc表面结构较光滑平整，包含有少许的球形颗粒，其硫酸基质量分数较高、分子质量较大。二者均具有分支结构。SZ-Fuc和SH-Fuc均能促进RAW264.7细胞NO的释放以及iNOS和COX-2蛋白的表达，具有良好的增强免疫活性作用，其中低分子质量的SZ-Fuc增强免疫作用优于SH-Fuc。酶抑制实验中，硫酸基质量分数较高的SH-Fuc抑制 α -葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为0.012 mg/mL，其降血糖作用优于SZ-Fuc（ IC_{50} 值为0.033 mg/mL），且都优于高血糖症治疗药物——阿卡波糖，说明岩藻多糖硫酸基质量分数对降血糖作用具有影响。本实验研究两种不同来源马尾藻岩藻多糖结构、理化性质、降血糖和增强免疫活性，表明两种马尾藻岩藻多糖可用作功能食品或营养食品配料，在免疫调节剂、天然降血糖食物开发等方面有巨大应用潜力。关于岩藻多糖的来源、结构、理化性质等与其生物活性之间的构效关系还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 曾呈奎, 陆保仁. 中国海藻志: 第3卷, 褐藻门第2册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 35.
- [2] 叶红. 马尾藻多糖的分离纯化、生物活性及结构分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [3] 周乾云, 欧阳月红, 李勇, 等. 马尾藻海藻多糖生物活性研究新进展[J]. 现代农业科技, 2019(12): 211-214; 218.
- [4] NARAYANI S S, SARAVANAN S, RAVINDRAN J, et al. *In vitro* anticancer activity of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* against Caco-2 cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 618-628. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.127.
- [5] WU L, SUN J, SU X T, et al. A review about the development of fucoidan in antitumor activity: progress and challenges[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 154: 96-111. DOI:10.1016/j.carbpol.2016.08.005.
- [6] VO TS, KIM S K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 16-27. DOI:10.1016/j.jff.2012.08.007.
- [7] 安子哲, 张朝辉, 刘梦阳, 等. 褐藻来源硫酸岩藻聚糖的化学组成与结构的研究进展[J]. 中国海洋药物, 2022, 40(4): 50-63. DOI:10.13400/j.cnki.cjmd.2021.04.008.
- [8] 廖敏, 谌素华, 王维民, 等. 张氏马尾藻多糖的体外降胆固醇活性[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(3): 80-85. DOI:10.3969/j.issn.1673-9159.2017.03.012.
- [9] 袁鑫, 闫培生. 褐藻降血糖活性物质的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 215-219. DOI:10.12161/j.issn.1005-6521.2021.04.037.
- [10] 徐元庆, 王哲奇, 张静, 等. 岩藻多糖的抗氧化功能研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(10): 1782-1793. DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.10.021.
- [11] 秦益民, 任丹丹, 姜进举, 等. 岩藻多糖的功能特性及其在食品中的应用[J]. 食品科学技术学报, 2021, 39(5): 26-31.
- [12] AMIN M L, MAWAD D, DOKOS S, et al. Immunomodulatory properties of photopolymerizable fucoidan and carrageenans[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 230: 115691. DOI:10.1016/j.carbpol.2019.115691.
- [13] 王亚因, 仇文峰, 杨毅, 等. 分子质量对海参岩藻聚糖硫酸酯在体内吸收的影响[J]. 中国海洋药物, 2020, 39(2): 43-49. DOI:10.13400/j.cnki.cjmd.2020.02.006.
- [14] 陈怡帆, 沈成龙, 曾英杰, 等. 甘孜松茸多糖的分离纯化及免疫调节活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(10): 177-183. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2021.10.028.
- [15] 任琪. 银杏叶多糖的提取、分离纯化及生物活性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018: 59-65.
- [16] 陈雨豪, 王峰, 周嘉威, 等. 螺旋藻肽对四氧嘧啶诱导的糖尿病小鼠作用研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2020, 33(3): 13-18.
- [17] SHAN X D, LIU X, HAO J J, et al. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 82: 249-255. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036.
- [18] 刘海韵. 马尾藻岩藻聚糖硫酸酯对血栓及HUVEC和HMVEC的作用研究[D]. 广州: 广东海洋大学, 2019: 10-11.
- [19] 张帅. 刺参岩藻聚糖硫酸酯对RAW264.7细胞炎症和自噬的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021: 22-23.
- [20] 孟然. 海带提取物的辅助降血糖功能研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2018: 17-18.
- [21] LAKSHMANASENTHIL S, VINOTHKUMAR T, GEETHARAMANI D, et al. Fucoidan: a novel α -amylase inhibitor from *Turbinaria ornata* with relevance to NIDDM therapy[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(3): 66-70. DOI:10.1016/j.bcab.2014.02.003.
- [22] YAN J K, WANG Y Y, MA H L, et al. Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus* mycelia[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 29: 251-257. DOI:10.1016/j.ultsonch.2015.10.005.
- [23] MOHD FAUZIEE N A, CHANG L S, WAN MUSTAOHA W A, et al. Functional polysaccharides of fucoidan, laminaran and alginate from Malaysian brown seaweeds (*Sargassum polycystum*, *Turbinaria ornata* and *Padina boryana*)[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 167: 1135-1145. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.067.
- [24] WANG Y, SHEN X Y, YIN K Y, et al. Structural characteristics and immune-enhancing activity of fractionated polysaccharides from *Athyrium multidentatum* (Doll.) Ching[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 205: 76-89. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.02.037.
- [25] 崔欣. 石花菜多糖的提取纯化、理化性质和生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 39-40.
- [26] 太敏瑞, 蔡泓滢, 李瑞, 等. 不同褐藻来源岩藻多糖理化性质及其免疫调节作用[J]. 广东海洋大学学报, 2022, 42(3): 62-71.
- [27] SUN Y J, GONG G P, GUO Y M, et al. Purification, structural features and immunostimulatory activity of novel polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 108: 314-323. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.016.
- [28] ZHU Z B, WEN Y, YI J H, et al. Comparison of natural and synthetic surfactants at forming and stabilizing nanoemulsions: tea saponin, quillaja saponin, and Tween 80[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2019, 536: 80-87. DOI:10.1016/j.jcis.2018.10.024.
- [29] CARNEIRO-DA-CUNHA M G, CERQUEIRA M A, SOUZA B W S, et al. Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 85(3): 522-528. DOI:10.1016/j.carbpol.2011.03.001.
- [30] BI D C, YU B M, HAN Q G, et al. Immune activation of RAW264.7 macrophages by low molecular weight fucoidan extracted from New Zealand *Undaria pinnatifida*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(41): 10721-10728.
- [31] RASO G M, PACILIO M, DI CARLO G, et al. *In-vivo* and *in-vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002, 54(10): 1379-1383.
- [32] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 355-363. DOI:10.7506/spkx.1002-6630-20200818-244.
- [33] 张梦晴. 羊栖菜 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离纯化及特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2020.000105.
- [34] KUMAR T V, LAKSHMANASENTHIL S, GEETHARAMANI D, et al. Fucoidan-A α -D-glucosidase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to type 2 diabetes mellitus therapy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 1044-1047. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.013.