DOI:10.12441/spyswjs.20230801002 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0133-10

硫酸酯化扇贝多糖结构表征与生物活性研究

胡美辰[1] 周宇轩[1] 段珺婕[1] 王海波[1,2,3] 赵前程[1,2,3] 李智博[1,2,3*]

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院,辽宁 大连 116023; 2. 辽宁省水产品分析检验及加工技术科技服务中心,辽宁 大连 116023; 3. 辽宁省水产品加工及综合利用重点试验室,辽宁 大连 116023)

摘要:【目的】为了改善扇贝多糖的生物活性,明确海洋贝类多糖的构效关系。**【方法】**以扇贝多糖为原料,采用氯磺酸-吡啶法制备不同取代度的硫酸酯化多糖,对其基本成分、结构、抗氧化活性、免疫活性等指标进行对比。**【结果】**硫酸酯化扇贝多糖SSP1、SSP2的硫酸根质量分数分别为22%、32%,且主要由葡萄糖组成,是一种不具有三螺旋结构的α-吡喃环酸性多糖。体外抗氧化活性结果表明,SSP1、SSP2具有较好的DPPH自由基清除能力,对ABTS和羟基自由基清除能力较弱。免疫调节活性结果表明,经硫酸酯化修饰后多糖的免疫活性较弱。**【结论】**经硫酸酯化修饰后扇贝多糖结构发生改变,提高了对DPPH自由基的清除能力,且随硫酸根质量分数的增加,清除能力增强并降低了原有多糖的免疫活性,但对细胞无毒副作用。该研究为硫酸酯化改善扇贝多糖的生物活性提供了参考。

关键词:硫酸酯化扇贝多糖;结构表征;抗氧化活性;免疫活性

Study on Structural Characterization and Bioactivity of Sulfated Scallop Polysaccharides

HU Meichen[1] *ZHOU Yuxuan*[1] *DUAN Junjie*[1] *WANG Haibo*[1,2,3] *ZHAO Qiancheng*[1,2,3] *LI Zhibo*[1,2,3*]

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Liaoning Aquatic Product Analysis, Inspection and Processing Technology Service Center, Dalian 116023, China; 3. Liaoning Provincial Key Laboratory of Aquatic Products Processing and Comprehensive Utilization, Dalian 116023, China)

Abstract: [**Objective**] In order to improve the bioactivities of scallop polysaccharides and clarify the structure-activity relationship of polysaccharides derived from marine mollusk. [**Method**] Sulfated polysaccharides with different degrees of substitution were prepared from scallop polysaccharides by the chlorosulfonic acid-pyridine method. The basic components, structure, antioxidant activity, and immune activity were compared between the polysaccharides with and without sulfation. [**Result**] The mass fractions of sulfate groups in SSP1 and SSP2 were 22% and 32%, respectively. SSP1 and SSP2 were mainly composed of glucose, and they were acidic polysaccharides with α-pyranose rings and no triple helical structure. SSP1 and SSP2 had strong scavenging abilities against DPPH free radicals but weak scavenging abilities for ABTS and hydroxyl free radicals *in vitro*. The immune activity of the polysaccharides was weakened after sulfation. [**Conclusion**] Sulfation changed the structures of scallop polysaccharides, enhancing the scavenging ability against DPPH free radicals. Moreover, the scavenging ability increased with the increase in sulfate group content. In addition, sulfation weakened the immune activity of the polysaccharides, which, however, had no toxic or side effects on cells. This study provides a reference for improving the bioactivities of scallop polysaccharides through sulfation.

Keywords: sulfated scallop polysaccharides; structural characterization; antioxidant activity; immune activity

---

基金项目:2023中央财政对辽宁渔业补助项目。

通信作者:李智博(1979—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品生物技术研究。E-mail: zhibo9800@163.com

收稿日期:2023-08-01 **修回日期:**2023-10-12

海湾扇贝（*Argopectenirradias*）富含多糖、蛋白质、氨基酸、牛磺酸、EPA、DHA 等生理活性物质[1]，深受大众喜爱。扇贝多糖是由 10 个及以上单糖结合而成的极性大分子物质，具备多种生物活性[2]，如增强免疫活性[3]、抗氧化[4]、抗肿瘤[5]等。在多糖的构效研究中发现，受结构直接或间接的影响，部分天然多糖本身不具备或具备较弱的生物活性[6]。因此，对多糖进行分子修饰改变空间结构对提高其生物活性具有重要意义。

多糖的修饰包括化学修饰、物理修饰和生物修饰 3 种方法[7]，其中化学修饰最为常见。研究表明，硫酸基团是多糖的活性中心[8]，因此选择硫酸酯化对贝类多糖进行分子修饰。硫酸酯化多糖是一类糖残基中含有硫酸酯基团的化合物[9]。谢建华[10]研究发现，修饰后的硫酸多糖结构发生改变，从而提高了多糖的抗氧化活性。经硫酸根修饰后，多糖的立体构象发生变化是硫酸酯化多糖生物活性改变的主要原因。

为了考察官能团对扇贝多糖结构及生物活性的影响，作者采用化学方法对扇贝多糖进行硫酸酯化修饰，以期为开发新型扇贝多糖提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

扇贝多糖：参考刘志昌[11]的方法制备，纯度 87.3%；RAW264.7 细胞：中国科学院上海细胞库；Dextran Blue2000、Dextran T-10、Dextran T-70、Dextran T-500、中性红：Solarbio 公司；单糖标准品：美国 Sigma 公司；刚果红：天津市大茂化学试剂厂；NO 试剂盒：上海碧云天生物技术有限公司。

酶标仪：PT-9602 型，芬兰 LabSystems 公司；恒温离心机：GL-21M 型，湖南湘仪公司；傅里叶变换红外光谱仪：F950 型，北京北分瑞利分析仪器有限责任公司；紫外-可见分光光度计：TU-1080 型，上海奥析科学仪器有限公司；高效液相色谱仪：Agilent1260 型，美国 Agilent 公司；二氧化碳培养箱：MCO-18AIC 型，松下健康医疗器械有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 硫酸酯化扇贝多糖的制备

参考 Chen 等[12]的方法。将 50 mL 无水吡啶在加冰块的磁力搅拌器中迅速搅拌降温，按照无水吡啶与氯磺酸的体积比为 5∶1，在 40 min 内缓慢逐滴加入 10 mL 氯磺酸，得到酯化试剂。将 40 mL 溶有 2 g 扇贝多糖的 N，N-二甲基甲酰胺倒入酯化试剂中，60 ℃搅拌 3 h。样品冷却后加入 100 mL 冰水，用 20 g/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.0，加入溶液 3 倍体积的乙醇（体积分数 95%）静置 24 h，9 000 r/min 离心 5 min 后收集沉淀加水复溶，透析并干燥后得到硫酸酯化扇贝多糖 SSP2。将酯化试剂中无水吡啶与氯磺酸的体积比调整为 8∶1，得到硫酸酯化扇贝多糖 SSP1。

1.2.2 理化性质测定

参考韦志等[13]的方法，采用苯酚-硫酸法测定。以 0.2 mg/mL 葡萄糖溶液为标准品，分别加入 0.5 mL 的 6 g/L 苯酚和 2.5 mL 硫酸后静置 10 min，于 490 nm 下测定吸光度，绘制标准曲线。配制合适浓度的样品溶液，取 1 mL 按照上述方法加入试剂，于 490 nm 下测定吸光度。

采用氯化钡比浊法测定硫酸酯化多糖的取代度[14]。以 0.1 mg/mL 的 K_2SO_4 溶液为标准品，用 1 mol/L HCl 补至 0.2 mL，将 3.8 mL 的 3 g/L 三氯乙酸溶液和 1 mL 的 1 g/L $BaCl_2$ 溶液混匀，25 ℃静置 20 min。在 360 nm 处测定吸光度，以 0.5 g/L 明胶溶液代替 $BaCl_2$ 溶液测定吸光度，绘制标准曲线。

将 10 mL 的 1 mol/L HCl 溶液加入含有 70 mg 样品的水解管中，100 ℃水浴 3 h，冷却后用盐酸补至 50 mL，过滤后得到样品溶液，每组做 3 个平行。测定样品吸光度，带入标准曲线计算硫酸根质量分数及取代度，见式（1）~（2）。

$$\omega = (W_2/4W_1) \times 100\% \quad (1)$$

$$Q = 162 \times \omega/98/(100 - 96 \times \omega/98) \quad (2)$$

式中：

ω——硫酸根质量分数，%；

W_1——样品质量，mg；

W_2——硫酸根质量，μg；

Q——硫酸根取代度。

1.2.3 结构表征

1）单糖组成分析：参考关媛等[15]的方法并稍

加修改。利用1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）进行样品衍生化，加入100 μL的0.3 mol/L HCl中和，加入1 mL氯仿重复萃取3次，收集顶部水相用高效液相色谱仪分析。

2）相对分子质量测定：参考关媛等[15]的方法并稍加修改。取葡萄糖标准品配制2 g/L的标准溶液，12 000 r/min离心10 min，取上清液过0.22 μm滤膜后用高效液相色谱仪分析。以相对分子质量的对数值为纵坐标、保留时间为横坐标，绘制标准曲线。

3）红外光谱测定：将105 ℃下烘干至质量恒定的200 mg KBr粉末与2 mg烘干样品置于研钵中，研磨均匀后制备透明薄片。在波数范围为4 000~400 cm^{-1}时测定样品的红外光谱。

4）刚果红试验：将2 mL的0.5 mg/mL多糖样品与2 mL的0.1 mol/L刚果红试剂混匀后分别加入不同浓度的NaOH溶液，在波长400~600 nm下测定样品吸光度。

5）扫描电镜分析：取适量多糖样品，通过导电粉黏附于扫描电镜样品台上，镀导电金，在扫描电镜下观察样品外貌形态。

1.2.4 体外抗氧化活性测定

配制质量浓度为2、4、6、8、10 mg/mL的样品溶液，选取VC为阳性对照。

1）DPPH自由基清除能力测定：参考王思婷等[16]的方法。分别将1 mL不同质量浓度的样品溶液与1 mL 0.1 mmol/L DPPH溶液混匀，25 ℃避光反应30 min，在517 nm处测定吸光度。DPPH自由基清除能力的计算见式（3）。

$$H=\frac{A_2-(A_1-A_0)}{A_2}\times 100\% \quad (3)$$

式中：

H——DPPH自由基清除能力，%；

A_1——样品的吸光度；

A_2——蒸馏水代替样品所测吸光度；

A_0——无水乙醇代替样品所测吸光度。

2）ABTS自由基清除能力测定：参考曹雪原等[17]的方法。将0.8 mL ABTS工作液与0.2 mL样品溶液混匀，25 ℃避光反应6 min，在734 nm处测定吸光度。ABTS自由基清除能力的计算见式（4）。

$$B=(1-A_4/A_3)\times 100\% \quad (4)$$

式中：

B——ABTS自由基清除能力，%；

A_4——样品的吸光度；

A_3——无水乙醇代替样品所测吸光度。

3）羟基自由基清除能力测定：参考曹雪原等[17]的方法。首先将0.5 mL样品溶液与0.5 mL 9 mmol/L $FeSO_4$和0.5 mL 9 mmol/L水杨酸-乙醇溶液混匀，再加入0.5 mL 8.8 mmol/L过氧化氢充分混匀，25 ℃反应30 min，在510 nm处测定吸光度。羟基自由基清除能力的计算见式（5）。

$$Q=\frac{A_5-(A_6-A_7)}{A_5}\times 100\% \quad (5)$$

式中：

Q——羟基自由基清除能力，%；

A_6——样品的吸光度；

A_5——蒸馏水代替样品所测吸光度；

A_7——蒸馏水代替过氧化氢所测吸光度。

1.2.5 免疫活性分析

用PBS配制不同质量浓度的多糖样品，以1 μg/mL脂多糖作为阳性对照。

巨噬细胞培养在37 ℃、CO_2体积分数5%的细胞培养箱中。

1）巨噬细胞的细胞活力测定：采用MTT比色法[18]进行检测。用PBS配制不同质量浓度（2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/mL）的多糖样品，并分别命名为G1、G2、G3、G4、G5。将巨噬细胞培养在37 ℃、CO_2体积分数5%的细胞培养箱中。取180 μL RAW264.7细胞（1×10^5个/mL）接种在96孔板中，24 h后加入20 μL样品溶液，另设空白对照组和阳性对照组。24 h后每孔加入20 μL 2.5 mg/mL的MTT试剂，培养4 h后弃上清液，每孔加150 μL DMSO溶液，室温慢速振荡5 min。于490 nm处检测各孔吸光度，每孔3组平行。细胞活力的计算见式（6）。

$$I=A_9/A_8\times 100\% \quad (6)$$

式中：

I——细胞活力，%；

A_9——样品的吸光度；

A_8——PBS代替样品所测吸光度。

2）巨噬细胞吞噬能力的测定：用 PBS 配制不同质量浓度（2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/mL）的多糖样品，并分别命名为 G1、G2、G3、G4、G5。将巨噬细胞培养在 37 ℃、CO_2 体积分数 5% 的细胞培养箱中。取 180 μL RAW264.7 细胞（1×10^5 个/mL）接种在 96 孔板中，培养 24 h 后，加入 20 μL 样品溶液再次培养 24 h，弃上清液，每孔加 100 μL 0.001 g/L 的中性红溶液，1 h 后弃上清液，加入 100 μL 细胞裂解液，振荡 5 min，2 h 后于 550 nm 处测定各孔吸光度。吞噬能力的计算见式（7）。

$$S=A_{11}/A_{10}\times100\% \quad (7)$$

式中：

S——吞噬能力，%；

A_{11}——样品的吸光度；

A_{10}——PBS 代替样品所测吸光度。

3）巨噬细胞产生 NO 能力的测定：用 PBS 配制不同质量浓度（2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0、800.0 μg/mL）的多糖样品，并分别命名为 G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7、G8、G9。将巨噬细胞培养在 37 ℃、CO_2 体积分数 5% 的细胞培养箱中。取 180 μL RAW264.7 细胞（1×10^5 个/mL）接种在 96 孔板中，培养 24 h 后加入 20 μL 样品溶液，按 NO 试剂盒检测步骤进行测定。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行 ANOVA 方差分析，并比较组间差异性。

2 结果与讨论

2.1 多糖纯度、硫酸根质量分数及取代度检测结果

样品检测结果如表 1 所示，SSP2 的纯度达 30.0%，硫酸根质量分数为 32%，取代度 0.818；SSP1 的纯度达 46.0%，硫酸根质量分数为 22%，取代度 0.485。与 SP 相比，经硫酸酯化修饰后的扇贝多糖纯度均有所降低，可能是硫酸根基团的引入降低了组成中的多糖占比，以及添加化学试剂后导致杂质质量分数增加。

表 1 样品的多糖纯度、硫酸根质量分数及取代度

Table 1 Polysaccharide purity, sulphate mass fraction and degree of substitution of the samples

样品	多糖纯度/%	硫酸根质量分数/%	取代度
SP	87.3	0	—
SSP1	46.0	22	0.485
SSP2	30.0	32	0.818

注：“—”表示未检测到。

2.2 单糖组成

由表 2 可知，SP、SSP1、SSP2 主要由葡萄糖组成，质量分数达到 98% 以上。经硫酸酯化修饰后，阿拉伯糖和半乳糖醛酸质量分数均有所增加，这主要是由于在硫酸酯化过程中，甘露糖存在脱落现象，这与红枣多糖[19]和柑橘囊衣果胶多糖[20]硫酸酯化修饰后的结果相似。

表 2 SP、SSP1、SSP2 的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of SP、SSP1、SSP2

样品	单糖质量分数/%								
	甘露糖	氨基葡萄糖	半乳糖醛酸	葡萄糖醛酸	氨基半乳糖	葡萄糖	半乳糖	阿拉伯糖	岩藻糖
SP	0.42	—	—	—	—	98.29	—	1.29	—
SSP1	—	—	0.22	—	—	98.46	—	1.32	—
SSP2	—	—	0.33	—	—	98.30	—	1.37	—

注：“—”表示未检测到。

2.3 相对分子质量测定结果

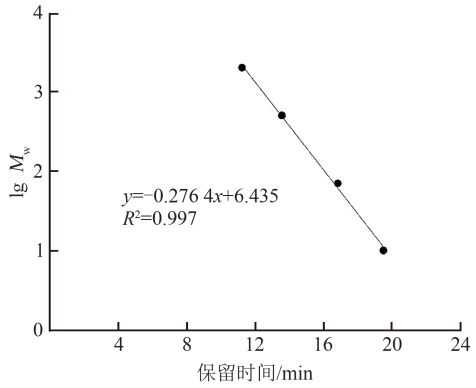
如图 1 所示，基于标准曲线得到的方程为 $y=-0.276\ 4x+6.435$，$R^2=0.997$，可以计算出 SP、SSP1 和 SSP2 的相对分子质量分别集中在 2.0×10^6、1.7×10^6 和 1.0×10^4 附近。由图 2 可以看出，经硫酸酯化修饰后，出峰时间发生右移，表明相对分子质量有所减小，且取代度越大相对分子质量越低。这种相对分子质量减小的情况可能是由于氯磺酸的酸化作用导致多糖发生一定程度的降解[21]，且根据结果可知硫酸根质量分数越高，降解越彻底。

2.4 结构表征结果

2.4.1 红外光谱结果

扇贝多糖硫酸酯化前后的红外光谱图较为

相似，特征峰差异不大。由图3可知，3 500~3 400 cm^{-1}为O—H拉伸振动的吸收峰；3 000~2 900 cm^{-1}为游离碳水化合物C—H的不对称伸缩振动峰；1 700~1 600 cm^{-1}为羰基的C═O不对称伸缩振动峰；1 200~1 000 cm^{-1}为C—O—C的伸缩振动峰；在850 cm^{-1}左右为α-型吡喃糖环特征吸收峰，说明硫酸酯化修饰前后扇贝多糖均为α-型吡喃糖，是*D*-葡聚糖的典型特征[22]。



M_w—相对分子质量。

图1　标准品相对分子质量的标准曲线

Fig. 1　Standard curve of relative molecular weight of standard substance

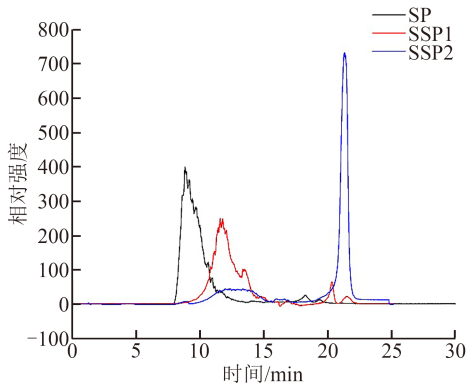


图2　SP、SSP1、SSP2的相对分子质量

Fig. 2　Relative molecular weight of SP、SSP1、SSP2

在1 200~800 cm^{-1}为多糖的指纹区[23]，SSP1和SSP2在1 210 cm^{-1}处出现不同于SP的特征峰是由S═O官能团引起的伸缩振动峰，说明硫酸根成功结合在多糖上，且特征峰的强度随取代度的增加明显增强，表明硫酸酯化取代了—OH，同时图中能明显看出O—H键的伸缩振动峰随取代度的增加而降低，也验证了上述观点[24]。

2.4.2　刚果红试验结果

三螺旋多糖与刚果红形成的复合物会提高最大吸收波长，即发生红移[25]。如图4所示，随着NaOH浓度的升高，SP的最大吸收波长逐渐升高，明显发生红移，表明其具有三螺旋结构。SSP1和SSP2的最大吸收波长则随着NaOH浓度的增加而减小，表明其发生解旋，不具备原有的三螺旋结构。

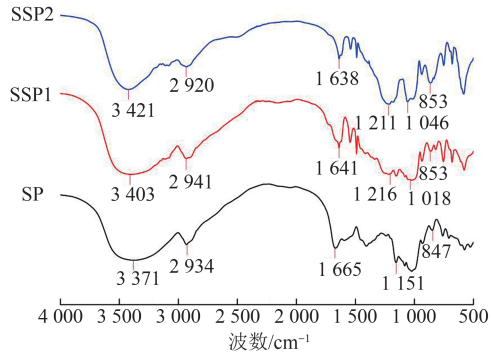


图3　SP、SSP1、SSP2的红外光谱图

Fig. 3　Infrared spectra of SP、SSP1、SSP2

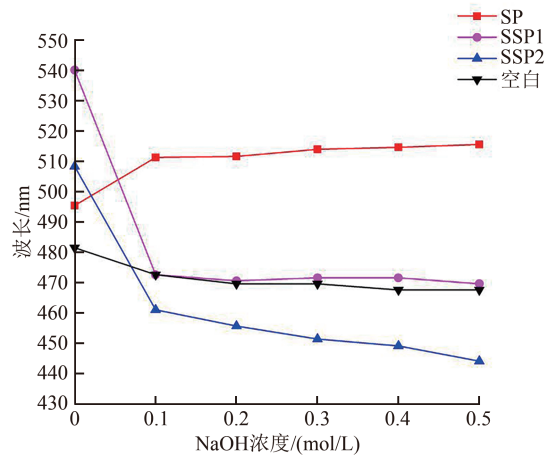


图4　NaOH浓度对SP、SSP1、SSP2吸收波长的影响

Fig. 4　Effects of NaOH concentration on the absorption wavelength of SP、SSP1、SSP2

2.4.3　扫描电镜结果

扫描电镜是观察分子大小、形状和孔隙率最有效的结构形态分析技术[26]。由图5可知，SP呈现片状的疏松结构，无孔洞，多糖边缘粗糙。经硫酸酯化修饰后，多糖表面形态改变，呈光滑片状且存在小孔，通过SSP1和SSP2的扫描电镜图可以看出硫酸根质量分数越高，结构越趋于膜状，可能是由于经过硫酸酯化修饰后，多糖颗粒

间的聚合程度提高。研究表明，茶多糖经硫酸酯化修饰后结构密集，趋于片状[27]，与本研究结果相似。

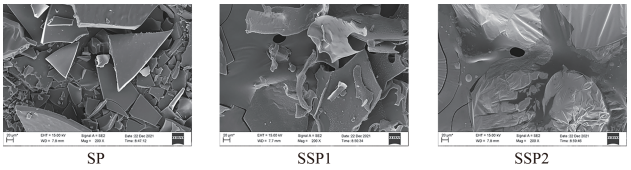


图 5　SP、SSP1、SSP2 的扫描电镜图

Fig. 5　Scanning electron micrographs of SP、SSP1、SSP2

2.5　体外抗氧化活性分析

2.5.1　DPPH 自由基清除能力

如图 6 所示，VC 质量浓度为 2 mg/mL 时，DPPH 自由基清除率达到 98.9%，随后趋于稳定。硫酸酯化修饰前后，扇贝多糖的 DPPH 自由基清除能力呈现出剂量依赖性，硫酸酯化修饰后扇贝多糖的 DPPH 自由基清除能力增强且随硫酸根质量分数的增加而提高。10 mg/mL 时清除作用最强，SSP2、SSP1、SP 的 DPPH 自由基清除率分别为 54.8%、42.7%、34.8%。SSP2 的 DPPH 自由基清除率超过 VC 的一半，说明其具有较好的抗氧化活性，且取代度越高抗氧化活性越强。推测经硫酸酯化修饰后，SSP1 和 SSP2 结合了更多的氢离子，与 DPPH 自由基上孤对电子结合的能力增强，从而提高了抗氧化能力[28]。

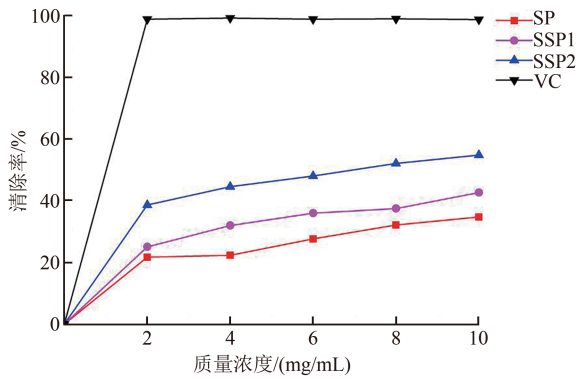


图 6　SP、SSP1、SSP2 的 DPPH 自由基清除能力

Fig. 6　DPPH radical scavenging capacity of SP、SSP1、SSP2

2.5.2　ABTS 自由基清除能力

一般来说，硫酸基团对超氧阴离子具有较好的清除效果，而取代度增加会减弱清除效果[29]。如图 7 所示，在 0~10 mg/mL 时，SP 对 ABTS 自由基的清除率远高于 SSP1、SSP2，经硫酸酯化修饰后并不能增强其清除 ABTS 自由基的活性，甚至大幅度降低，这与黑木耳多糖硫酸酯化后的研究结果基本一致[30]。可能因为经硫酸酯化修饰后碳原子的电子密度增大，导致极性增强，使电子易丢失，因而不能有效清除阳离子自由基。

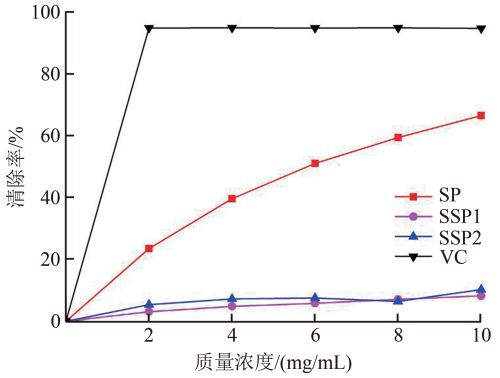


图 7　SP、SSP1、SSP2 的 ABTS 自由基清除能力

Fig. 7　ABTS radical scavenging ability of SP、SSP1、SSP2

2.5.3　羟基自由基清除能力

羟基为一种强活性自由基，通过破坏细胞中的核酸、蛋白质和脂质使细胞功能丧失，因此对羟基的清除作用是评价抗氧化能力的关键指标[31]。如图 8 所示，硫酸酯化修饰前后的扇贝多糖都具备清除羟基自由基的能力，在 0~10 mg/mL 呈现出剂量依赖性。经硫酸酯化修饰后的 SSP1 和 SSP2 虽具备羟基自由基清除能力，但相较于 SP 的活性没有提高。SP 和 SSP2 在 10 mg/mL 时清除率最高，分别为 79.3% 和 54.9%。可能是由于硫酸酯化修饰后多糖上氢原子的结合能力增强，碳原子转变为碳自由基的能力降低，导致羟基形成减少，从而降低了羟基自由基的清除能力[32]。

2.6　免疫活性分析

2.6.1　硫酸酯化扇贝多糖对巨噬细胞的细胞活力影响

巨噬细胞为单核吞噬系统主要成分，通过参与细胞免疫反应转化为活化的巨噬细胞，从而增强机体的免疫防御能力[33]。如图 9 所示，在 G1~G5 组中，SP、SSP1、SSP2 对 RAW264.7 细胞

均无毒性作用且能促进细胞增殖。在相同质量浓度下，多糖对细胞活力的影响为SP>SSP1>SSP2，说明扇贝多糖经硫酸酯化修饰后细胞活力减弱。推测是SSP1、SSP2中的硫酸基团改变了空间位阻和静电排斥作用力，因而改变了多糖原有的结构[34]，多糖三螺旋结构消失使多糖链的伸展程度增加，水溶性增强，且随着取代度的增加抑制作用增强。

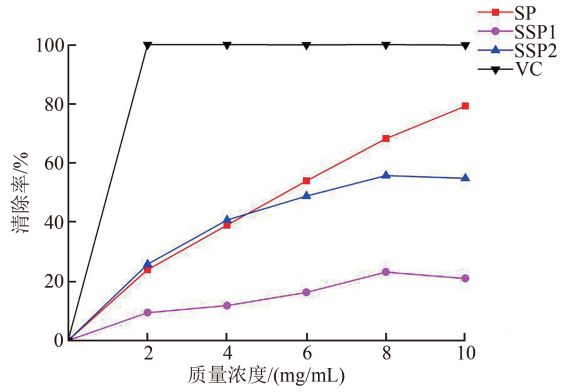
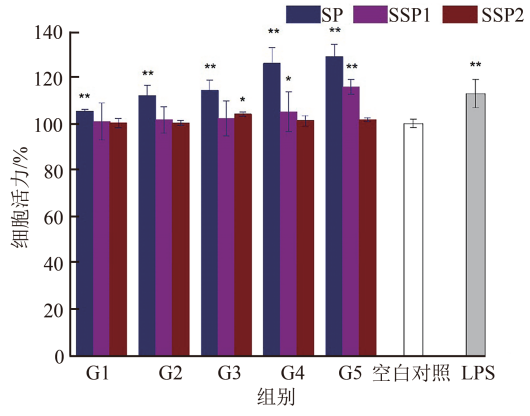


图8　SP、SSP1、SSP2的羟基自由基清除能力

Fig. 8　Hydroxyl radical scavenging ability of SP、SSP1、SSP2



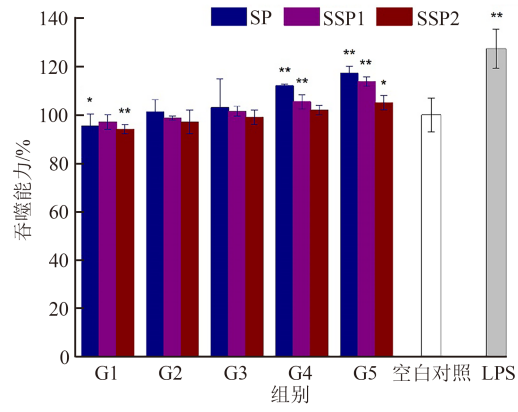
与空白对照组比较，*—P<0.05，**—P<0.01。

图9　SP、SSP1、SSP2对细胞活力的影响

Fig. 9　Effects of SP、SSP1、SSP2 on cell viability

2.6.2　硫酸酯化扇贝多糖对巨噬细胞吞噬能力的影响

巨噬细胞的吞噬能力能够反映其活性，在机体对病原菌的防御和维持体内平衡中发挥着重要作用[35]。如图10所示，扇贝多糖对巨噬细胞吞噬能力的影响呈现出剂量依赖性，3种多糖均使巨噬细胞的吞噬能力高于空白对照组，在相同质量浓度下，按细胞吞噬能力的排序为SP>SSP1>SSP2。50 μg/mL SP和SSP1的条件下，巨噬细胞吞噬能力比空白对照组分别高约17%和14%，低于阳性对照LPS处理组，说明经硫酸酯化修饰后并不能提高巨噬细胞吞噬能力。推测是由于硫酸酯化修饰后细胞活力降低，从而导致巨噬细胞吞噬能力降低。



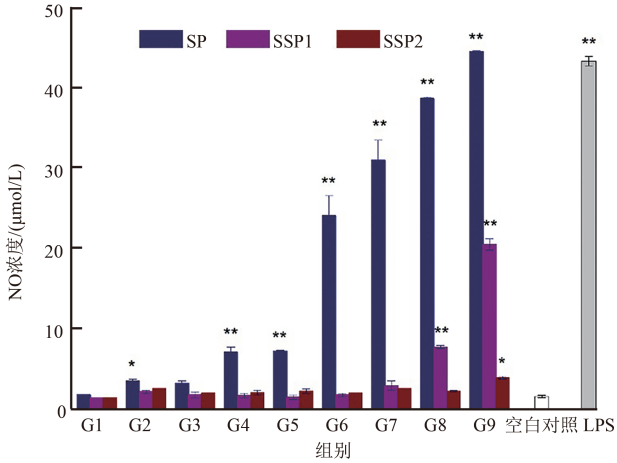
与空白对照组比较，*—P<0.05，**—P<0.01。

图10　SP、SSP1、SSP2对细胞吞噬能力的影响

Fig. 10　Effect of SP、SSP1、SSP2 on cell phagocytic ability

2.6.3　硫酸酯化扇贝多糖对巨噬细胞产生NO能力的影响

NO为巨噬细胞产生的一种信号分子，巨噬细胞相关通路激活后通过分泌NO来参与机体免疫，因此通过测定NO浓度来衡量多糖的免疫活性[36]。如图11所示，SP、SSP1和SSP2均能刺激NO的释放，多糖处于低质量浓度时，产生NO的能力与空白对照组接近，随着质量浓度的增



与空白组比较，*—P<0.05，**—P<0.01。

图11　SP、SSP1、SSP2对NO浓度的影响

Fig. 11　Effect of SP、SSP1、SSP2 on NO concentration

加，上清液中NO浓度也逐渐增加。多糖质量浓度相同时，按照产生NO能力的排序为SP>SSP1>SSP2。且SSP1和SSP2在质量浓度为2.5~200.0 μg/mL时，NO的浓度无明显差异；当多糖质量浓度为400.0、800.0 μg/mL时，2组中NO浓度的差距逐渐增大。SSP1和SSP2组中NO浓度虽高于空白对照组，但相对于SP来说无改善作用，甚至大幅度降低了巨噬细胞产生NO的能力。这可能与硫酸酯化修饰后多糖的空间结构改变、三螺旋结构消失、氢键数量变化等有关，从而导致SSP1和SSP2不能大幅度激活静息状态下的巨噬细胞诱导iNOS的表达，使NO释放量大幅度降低[37]。

3 结论

SSP1、SSP2主要由葡萄糖构成，是一种具有α-吡喃环、不含三螺旋结构的片状酸性多糖。体外抗氧化分析结果表明，扇贝多糖经硫酸酯化修饰后具备较好的DPPH自由基清除能力；免疫活性分析表明，硫酸酯化修饰后的扇贝多糖对巨噬细胞有抑制作用，吞噬能力、产生NO能力均有所降低，说明硫酸酯化修饰并没有提高扇贝多糖的免疫活性，后续可以从多糖硫酸酯化的结合位点、取代度等角度进一步分析硫酸酯化扇贝多糖的生物活性变化规律，为阐明硫酸酯化贝类多糖的构效关系提供参考。

参考文献

[1] 郭宇，文诗雨，倪策，等. 扇贝加工副产物中蛋白质提取及其酶解物抗氧化活性分析[J]. 食品与机械，2022，38(11)：176-183.
GUO Y，WEN S Y，NI C，et al. Analysis of protein extraction and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from scallop processing by-products [J]. Food & Machinery，2022，38(11)：176-183.(in Chinese)

[2] HUANG L X，SHEN M Y，MORRIS G A，et al. Sulfated polysaccharides：immunomodulation and signaling mechanisms[J]. Trends in Food Science & Technology，2019，92：1-11.

[3] 宋荪阳，孙黎明，朱蓓薇，等. 扇贝性腺多糖提取物的抗氧化及免疫调节活性[J]. 食品科学，2012，33(5)：248-251.
SONG S Y，SUN L M，ZHU B W，et al. Antioxidant and immunomodulating activities of polysaccharide from scallop gonad[J]. Food Science，2012，33(5)：248-251.(in Chinese)

[4] 冯丁丁，李楠，高雨，等. 虾夷扇贝裙边多糖提取物细胞抗氧化活性的研究[J]. 食品科技，2017，42(4)：188-193.
FENG D D，LI N，GAO Y，et al. Cellular antioxidant activity of polysaccharide from the skirt of *Patinopecten yessoensis* [J]. Food Science and Technology，2017，42(4)：188-193.(in Chinese)

[5] 李雪梅，李丽梅，陈辉，等. 海湾扇贝多糖的纯化、分离及抗肿瘤活性研究[J]. 中国食品学报，2016，16(7)：121-127.
LI X M，LI L M，CHEN H，et al. Purification，separation and antitumor activity evaluation of polysaccharides from bay scallop [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2016，16(7)：121-127.(in Chinese)

[6] 宋虹，张尊琴，李一雪，等. 化学修饰多糖的合成、结构表征及构效关系的研究进展[J]. 渤海大学学报(自然科学版)，2022，43(3)：209-216.
SONG H，ZHANG Z Q，LI Y X，et al. Research progress on synthesis，structural characterization and structure-activity relationship of chemically modified polysaccharides [J]. Journal of Bohai University (Natural Science Edition)，2022，43(3)：209-216.(in Chinese)

[7] 张子木，罗凯，黄秀芳. 植物多糖改性研究进展[J]. 山东化工，2021，50(9)：77-79，101.
ZHANG Z M，LUO K，HUANG X F. Research progress on modification of plant polysaccharides[J]. Shandong Chemical Industry，2021，50(9)：77-79，101.(in Chinese)

[8] WANG J L，YANG W，YANG T，et al. Catalytic synthesis of sulfated polysaccharides I：characterization of chemical structure [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2015，74：61-67.

[9] WANG Z J，XIE J H，SHEN M Y，et al. Sulfated modification of polysaccharides：synthesis，characterization and bioactivities [J]. Trends in Food Science & Technology，2018，74：147-157.

[10] 谢建华. 硫酸化修饰青钱柳多糖及其对细胞氧化应激的保护作用[D]. 南昌：南昌大学，2018.

[11] 刘志昌. 扇贝多糖的提取、分离及其理化性质研究[D]. 大连：大连海洋大学，2018.

[12] CHEN L，HUANG G L. Antioxidant activities of sulfated pumpkin polysaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，126：743-746.

[13] 韦志，阮心眉，戴涛涛，等. 碱提砂仁多糖的结构表征及

其抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技，2021，42(24)：87-93.
WEI Z，RUAN X M，DAI T T，et al. Structure characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Amomum villosum* extracted with alkaline solution[J]. Science and Technology of Food Industry，2021，42(24)：87-93.(in Chinese)

[14] 姚秋萍，何可群，黎璐，等. 鱼腥草多糖硫酸酯化修饰及清除自由基活性[J]. 食品工业，2019，40(8)：36-39.
YAO Q P，HE K Q，LI L，et al. Sulfated modification and scavenging effect on free radicals of *Houttuynia cordata* polysaccharides[J]. The Food Industry，2019，40(8)：36-39.(in Chinese)

[15] 关媛，严淑昕，钱少林，等. 桂郁金多糖结构表征及其体外抗氧化活性研究[J]. 中成药，2023，45(12)：4166-4170.
GUAN Y，YAN S X，QIAN S L，et al. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Curcuma aromatica in vitro*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine，2023，45(12)：4166-4170.(in Chinese)

[16] 王思婷，薛蕊，李欣怡，等. 干贝多糖的蛋白质脱除方式对抗氧化活性的影响[J]. 食品与生物技术学报，2021，40(8)：62-69.
WANG S T，XUE R，LI X Y，et al. Effect of deproteinization methods of polysaccharide from dried adductor muscle on antioxidant activities[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2021，40(8)：62-69.(in Chinese)

[17] 曹雪原，唐雅楠，姜秀梅，等. 铁皮石斛不同部位多糖含量及其抗氧化活性研究[J]. 食品与药品，2018，20(3)：227-230.
CAO X Y，TANG Y N，JIANG X M，et al. Study on contents and antioxidant activity of polysaccharides in different parts of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo[J]. Food and Drug，2018，20(3)：227-230.(in Chinese)

[18] 蒲翔，田兴中，顾春松，等. 黄芪多糖对地塞米松诱导的MC-3T3-E1成骨细胞增殖抑制及Bax、Caspase-3、VDR、CYP24A、CYP27B蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药，2020，31(12)：2850-2853.
PU X，TIAN X Z，GU C S，et al. Effects of *Astragalus* polysaccharide on the proliferation inhibition of MC-3T3-E1 osteoblasts induced by dexamethasone and the expression of Bax，Caspase-3，VDR，CYP24A and CYP27B[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research，2020，31(12)：2850-2853.(in Chinese)

[19] 符玉霞，郭欣，魏亚博，等. 红枣多糖的硫酸酯化修饰及其结构特性的研究[J]. 食品工业，2022，43(8)：33-38.
FU Y X，GUO X，WEI Y B，et al. Study on sulfated modification and structural properties of jujube polysaccharides[J]. The Food Industry，2022，43(8)：33-38.(in Chinese)

[20] 朱凯，刘闪闪，叶兴乾，等. 柑橘囊衣果胶多糖及其降解产物硫酸酯化对抗肿瘤活性的影响[J]. 中国食品学报，2022，22(2)：23-30.
ZHU K，LIU S S，YE X Q，et al. Effects of sulfation of pectin polysaccharides and its degraution products from *Citrus* segment membrane on antitumor activity[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2022，22(2)：23-30.(in Chinese)

[21] 阚金涛，皮正林，杨锴莉，等. 硫酸化修饰对椰子吸器多糖结构和抗氧化活性的影响[J]. 食品工业科技，2024，45(20)：114-123.
KAN J T，PI Z L，YANG K L，et al. Effects of sulfated modification on the structural of characterization and antionxidant activities of coconut (*Cocos nucifera* L.) haustorium polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry，2024，45(20)：114-123.(in Chinese)

[22] 卡地尔亚•库尔班，阿吉然姆•阿布拉，陈卓尔，等. 芜菁酸性多糖结构及对脂多糖诱导肺损伤小鼠的保护作用[J]. 食品科学，2023，44(13)：52-59.
KUERBANA K，ABULA A，CHEN Z E，et al. Structure of an acidic polysaccharide from *Brassica rapa* L. and its protective effect on lipopolysaccharide-induced lung injury in mice[J]. Food Science，2023，44(13)：52-59.(in Chinese)

[23] FIGUEROA F A，ABDALA-DÍAZ R T，PÉREZ C，et al. Sulfated polysaccharide extracted from the green algae *Codium bernabei*：physicochemical characterization and antioxidant，anticoagulant and antitumor activity[J]. Marine Drugs，2022，20(7)：458.

[24] 邱昆成，卢仲禹，张忠德，等. 炮天雄多糖硫酸酯衍生物的制备及生物活性研究[J]. 中药新药与临床药理，2022，33(3)：349-355.
QIU K C，LU Z Y，ZHANG Z D，et al. Preparation and biological activity of sulfated polysaccharide derivatives from PaoTianXiong[J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology，2022，33(3)：349-355.(in Chinese)

[25] 王嘉铭，雷于国，胡国元，等. 香菇多糖纯化前后结构和生物活性的比较[J]. 食品与生物技术学报，2020，39(1)：99-106.
WANG J M，LEI Y G，HU G Y，et al. Comparison of the structural characteristics and biological activity of before

and after purification polysaccharides of *Lentinula edodes* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(1): 99-106. (in Chinese)

[26] PATEL M K, TANNA B, MISHRA A, et al. Physicochemical characterization, antioxidant and anti-proliferative activities of a polysaccharide extracted from *Psyllium* (*P. ovata*) leaves[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118: 976-987.

[27] WANG Y F, PENG Y H, WEI X L, et al. Sulfation of tea polysaccharides: synthesis, characterization and hypoglycemic activity [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(2): 270-274.

[28] 张嫱. 木蹄层孔菌胞外多糖的结构表征、化学修饰及生物活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2022.

[29] CHEN L, HUANG G L. Antioxidant activities of phosphorylated pumpkin polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 125: 256-261.

[30] 张华. 黑木耳中性多糖片段硫酸酯对辐射诱导氧化应激防护作用[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.

[31] ROZI P, ABUDUWAILI A, MUTAILIFU P, et al. Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Fritillaria pallidiflora* Schrenk [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 97-106.

[32] 葛霞. 青钱柳多糖降血脂机制及抗氧化活性的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2011.

[33] YANG D D, LIN F D, HUANG Y Y, et al. Separation, purification, structural analysis and immune-enhancing activity of sulfated polysaccharide isolated from sea cucumber viscera[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 1003-1018.

[34] 邢丽. 松花粉硫酸酯化多糖对小鼠巨噬细胞的免疫调节作用[D]. 济南: 山东师范大学, 2015.

[35] MYRON P, SIDDIQUEE S, AL AZAD S. Fucosylated chondroitin sulfate diversity in sea cucumbers: a review [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 112: 173-178.

[36] 冯潮, 温亚州, 杨宇哲, 等. 新鲜和干制龙眼果肉多糖免疫调节活性的分析[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(6): 52-59.
FENG C, WEN Y Z, YANG Y Z, et al. Analysis of immunomodulatory activity of polysaccharides from fresh and dried longan pulp[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(6): 52-59. (in Chinese)

[37] 卢睿加, 夏友霖, 游宇, 等. 天府花生叶多糖AHL-P结构解析及体外抗肿瘤和免疫活性[J]. 食品科学, 2023, 44(23): 45-54.
LU R J, XIA Y L, YOU Y, et al. Structural identification, *in vitro* immunomodulatory and antitumor activities of polysaccharides AHL-P from *Arachis hypogaea* leaves [J]. Food Science, 2023, 44(23): 45-54. (in Chinese)

（责任编辑：史润东东）