DOI:10.12441/spyswjs.20240113007 [文章编号] 1673-1689(2024)12-0092-09

虾夷扇贝裙边多糖的结构及生物活性

白光辉[1] 李海漫[1] 董新玉[1] 黄万成[2] 赵前程[1,3] 李 莹[1*]

(1. 大连海洋大学食品科学与工程学院,辽宁 大连 116023; 2. 獐子岛集团股份有限公司,辽宁 大连 116001; 3. 辽宁省海洋健康食品工程研究中心,辽宁 大连 116023)

摘要:【目的】探究虾夷扇贝裙边二次酶解醇沉多糖的结构特征及其生物活性。**【方法】**采用高效液相色谱、紫外光谱和傅里叶变换红外光谱分析虾夷扇贝裙边多糖结构,测定虾夷扇贝裙边多糖的抗氧化活性和细胞免疫活性,并通过动物试验研究虾夷扇贝裙边多糖对小鼠肠道菌群和结肠组织免疫球蛋白的影响。**【结果】**虾夷扇贝裙边多糖由5种单糖组成,相对分子质量为2.538×10^5,具有以α-型糖苷键为主、不含糖醛酸的D型吡喃环结构。虾夷扇贝裙边多糖的抗氧化活性较弱,其1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)和羟基自由基清除率分别仅为VC(阳性对照)的19.7%和20.1%;虾夷扇贝裙边多糖能够促进巨噬细胞分泌细胞因子和NO,当虾夷扇贝裙边多糖质量浓度为200 μg/mL时,肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)质量浓度和NO浓度分别提高了75.7%、22.8%、46.6%;虾夷扇贝裙边多糖能够改善小鼠肠道菌群组成,显著增加双歧杆菌和拟杆菌等益生菌的数量,灌胃高剂量虾夷扇贝裙边多糖的小鼠结肠组织中免疫球蛋白A(IgA)、免疫球蛋白G(IgG)和免疫球蛋白M(IgM)质量浓度分别提高了13.6%、68.7%、23.9%。**【结论】**虾夷扇贝裙边多糖具有促进益生菌增殖和调节免疫的功能,该研究为虾夷扇贝裙边多糖的进一步开发和利用提供了理论依据。

关键词:虾夷扇贝裙边;多糖;生物活性;结构

Structure and Biological Activity of Polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* Skirt

BAI Guanghui[1] *LI Haiman*[1] *DONG Xinyu*[1] *HUANG Wancheng*[2] *ZHAO Qiancheng*[1,3] *LI Ying*[1*]

(1. College of Food Science and Engineering, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Zoneco Group Co., Ltd., Dalian 116001, China; 3. Liaoning Provincial Marine Healthy Food Engineering Research Centre, Dalian 116023, China)

Abstract: [**Objective**] Polysaccharides were extracted from *Patinopecten yessoensis* skirt by twice enzymatic hydrolysis and alcohol precipitation. [**Method**] High performance liquid chromatography, ultraviolet spectroscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy were employed to characterize the polysaccharide structure, and the antioxidant activity and immunomodulatory activity of the extracted polysaccharides were determined. Furthermore, animal experiments were carried out to examine the effects of the extracted polysaccharides on gut microbiota and colonic immunoglobin in mice. [**Result**] The polysaccharides were composed of five monosaccharides, with an average molecular weight of 2.538×10^5. The polysaccharides had a D type pyran ring structure with α-glycosidic bond and no uronic acid. The extracted polysaccharides showed weak antioxidant activity, with the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl free radical scavenging rates only 19.7% and 20.1% those of vitamin C

基金项目:2023年中央财政对辽宁渔业补助项目(20230015-22);辽宁省科技厅自然科学基金面上项目(2023-MS-283);辽宁省教育厅项目(JYTMS20230484,LJKZZ20220090)。

通信作者:李莹(1986—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事海洋多糖构效关系研究。E-mail:liying@dlou.edu.cn

收稿日期:2024-01-13 **修回日期:**2024-04-15

(positive control), respectively. The extracted polysaccharides promoted macrophages to secrete cytokines and nitric oxide (NO). At the mass concentration of 200 μg/mL, the extracted polysaccharides increased the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), and NO by 75.7%, 22.8%, and 46.6%, respectively. In addition, the polysaccharides improved the gut microbiota structure in mice by significantly increasing the relative abundance of probiotic genera (*Bifidobacterium* and *Bacteroides*). The mass concentrations of immunoglobin A, immunoglobin G, and immunoglobin M in the colon tissue of mice fed with a high dose of polysaccharides increased by 13.6%, 68.7%, and 23.9%, respectively. [**Conclusion**] The polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt promoted the proliferation of probiotics and regulated the immunity. The findings provide a theoretical basis for the further development and utilization of polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt.

Keywords: *Patinopecten yessoensis* skirt; polysaccharides; biological activity; structure

海洋中蕴藏着丰富的生物资源，由于特殊的生存环境，海洋生物体内多糖的合成过程与陆地生物不同，因此产生了许多结构新颖、功能独特的活性物质[1]。海洋多糖是存在于海洋生物体内的一种生物活性物质，具有抗衰老、抗肿瘤、抗凝血以及降低血糖、血脂、血压等多种生物学活性，有较高的药用和保健价值[2-5]。虾夷扇贝自20世纪80年代从日本引进后，已经成为我国北方地区主要的养殖品种之一，是一种重要的海洋经济贝类[6]。

多糖的结构是多糖发挥生物活性的基础，多糖的单糖组成及比例、相对分子质量、糖苷键类型等对其生物活性具有一定影响，对多糖结构的研究有助于理解多糖的构效关系[7-8]。抗氧化活性和免疫活性是多糖生物活性的两个重要指标。多糖可以通过清除DPPH自由基和羟基自由基发挥抗氧化作用[9]。巨噬细胞是机体的重要免疫防线，激活后能够分泌多种细胞因子，从而调控机体的免疫应答反应。TNF-α和IL-1β均是由巨噬细胞产生的细胞因子。另外，NO的释放量也是巨噬细胞被激活参与免疫应答的一个重要指标[9]。肠道微生物能够为肠道黏膜细胞提供营养物质，激活肠道免疫系统，释放免疫球蛋白，从而维持肠道的免疫屏障功能[10]。

虾夷扇贝裙边多糖的结构及生物活性研究鲜有报道，作者探究了虾夷扇贝裙边多糖的结构、抗氧化活性及细胞免疫活性，为其构效研究及高值化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

虾夷扇贝裙边：獐子岛集团股份有限公司；小鼠腹腔巨噬细胞系RAW264.7：中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库；雄性SPF级C57BL/6小鼠：北京维通利华实验动物技术有限公司。所有试验均按照GB/T 35892—2018进行，并经北京维通利华实验动物技术有限公司实验动物护理与使用委员会批准，批准号为：P2020046。

TNF-α试剂盒、IL-1β试剂盒、硝酸还原酶法试剂盒、链霉蛋白酶（分子级）：北京索莱宝科技有限公司；IgA的ELISA检测试剂盒、IgG的ELISA检测试剂盒、IgM的ELISA检测试剂盒：上海岚派生物科技有限公司；碱性蛋白酶（食品级）：诺维信生物技术有限公司；EMB培养基、MRS培养基、BBL培养基、GAM培养基：青岛海博生物技术有限公司；Dextran系列标准品：中国食品药品检定研究院；DPPH自由基：美国Sigma公司；三氟乙酸、环磷酰胺、水杨酸、硫酸亚铁、过氧化氢：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪：Aglient 1260型，美国安捷伦科技有限公司；傅里叶变换红外光谱仪：FTIR-300 型，山东淄瑞仪器设备有限公司；紫外光谱仪：UV-1600PC型，上海析谱仪器有限公司；全波长扫描酶标仪：354-00771型，山东竞道光电科技有限公司；差式扫描量热仪：Q20型，北京恒久有限公司；冷冻干燥机：SICIENTZ-18N/A型，宁波新芝生物科技股份有限公司；冷冻离心机：TDL-5M型，上海医疗器械（集团）有限公司；恒温水浴锅：CS-R12型，上海力辰科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 虾夷扇贝裙边多糖的制备

虾夷扇贝裙边洗净，冷冻干燥并粉碎。采用碱性蛋白酶一次酶解，酶添加质量为虾夷扇贝裙

边冻干粉质量的15%，pH 8.5，温度65 ℃，酶解时间4 h。酶解液经过灭酶处理，于4 ℃、8 000 r/min离心15 min后取上清液，采用截留相对分子质量为1×10^4的超滤膜过滤，浓缩液经冷冻干燥，即得虾夷扇贝裙边粗多糖。粗多糖经过链霉蛋白酶二次酶解，酶添加质量为虾夷扇贝裙边冻干粉质量的2.5%，pH 8.0，温度60 ℃，酶解时间6 h。酶解液经截留相对分子质量为7×10^3的透析袋透析并反复冻融离心（4 ℃、8 000 r/min、15 min）后，向上清液中加入3倍体积的乙醇，于4 ℃静置过夜后在4 ℃、8 000 r/min离心15 min，取沉淀冷冻干燥，即得虾夷扇贝裙边多糖。参照艾雨晴[11]的方法测定虾夷扇贝裙边多糖水分、灰分、蛋白质、总糖和还原糖的质量分数。

1.3.2 虾夷扇贝裙边多糖的结构分析

1）相对分子质量测定：采用高效凝胶排阻色谱测定多糖的相对分子质量。色谱仪为Aglient 1260 Infinity II液相色谱系统，色谱柱为TSK-gel G5000PWxl（30.0 cm×7.8 mm），检测器为示差检测器，流动相为0.2 mol/L的氯化钠溶液，流量为0.5 mL/min，柱温为40 ℃，标准品为Dextran系列标准品[12]。以保留时间为横坐标，以−lg M_r（M_r为相对分子质量）为纵坐标，绘制标准曲线。

2）单糖组成测定：参照文献[13]中的方法，稍加修改。采用PMP柱前衍生HPLC的方法，首先称取2.0 mg样品于10 mL安瓿瓶中，垂直加入1 mL的2 mol/L三氟乙酸溶液，待样品完全溶解后，充氮气2 min进行封管，在110 ℃恒温条件下水解8 h，取出冷却至室温，于50 ℃水浴锅中使用氮气将三氟乙酸吹干，用0.3 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性，并定容至1 mL。取其中400 μL水解液于5 mL离心管中，加入450 μL的PMP衍生试剂和450 μL的0.3 mol/L氢氧化钠溶液，充分振荡后于70 ℃水浴30 min进行PMP衍生化。结束后，取出冷却至室温。用450 μL的0.3 mol/L盐酸溶液中和，加入1 mL氯仿萃取，充分振荡，小心吸弃下层溶液，重复3次。将上层溶液过滤至1.5 mL离心管中，待进样检测。

色谱条件：色谱柱为La Chorm C18色谱柱（4.6 mm×250 mm×5 μm）；流量为1.0 mL/min；流动相A为体积分数15%乙腈+0.05 mol/L磷酸盐缓冲液（磷酸二氢钾，使用氢氧化钠调节pH至6.80），流动相B为体积分数40%乙腈+0.05 mol/L磷酸盐缓冲液（磷酸二氢钾，使用氢氧化钠调节pH至6.80）。梯度洗脱程序：0~15 min时，流动相B洗脱体积分数0~75%；15~23 min时，流动相B洗脱体积分数75%~85%；23~27 min时，流动相B洗脱体积分数85%~75%；27~45 min时，流动相B洗脱体积分数75%~100%；进样量为20 μL。

3）紫外光谱分析：将样品配制成0.5 mg/mL的溶液，以蒸馏水作为对照，在200~400 nm波长进行紫外光谱扫描，扫描间距为1 nm[14]。

4）傅里叶变换红外光谱分析：将待测样品于105 ℃烘干3 h至质量恒定，与溴化钾按照2 mg∶200 mg的比例混合研磨后，均匀地平铺在压片模具中，在不超过20 MPa的压力下保持5 min，制成澄清透明薄片。全过程保持干燥，将薄片样品轻置于傅里叶变换红外光谱仪中，以溴化钾为背景，选择波数4 000~400 cm^{-1}进行扫描[15]。

1.3.3 抗氧化活性测定

1）DPPH自由基清除率的测定：分别吸取2 mL不同质量浓度的虾夷扇贝裙边多糖溶液，加入2 mL避光保存的0.1 mmol/mL的DPPH溶液，充分混合均匀，于25 ℃水浴条件下避光反应30 min，在517 nm波长下测定OD值，以VC作为阳性对照[16]，按照公式（1）计算DPPH自由基清除率。

$$R_{DPPH}=[D_a-(D_b-D_c)]/D_a\times100\% \quad (1)$$

式中：

R_{DPPH}——DPPH自由基清除率，%；

D_a——在517 nm波长下，2 mL蒸馏水与2 mL 0.1 mmol/mL的DPPH溶液反应后的OD值；

D_b——在517 nm波长下，2 mL样品与2 mL 0.1 mmol/mL的DPPH溶液反应后的OD值；

D_c——在517 nm波长下，2 mL样品与2 mL体积分数95%的乙醇溶液反应后的OD值。

2）羟基自由基清除率的测定：分别吸取1 mL不同质量浓度的虾夷扇贝裙边多糖溶液，依次加入3 mL的2 mmol/L硫酸亚铁溶液、3 mL的6 mmol/L水杨酸溶液和3 mL的1 mmol/L过氧化氢溶液，充分混匀后，于37 ℃水浴条件下反应30 min，在510 nm

波长下测定OD值，以VC作为阳性对照[16]，按照公式（2）计算羟基自由基清除率。

$$R_0=[D_d-(D_e-D_f)]/D_d\times100\% \quad (2)$$

式中：

R_0——羟基自由基清除率，%；

D_d——在510 nm波长下，以蒸馏水为空白对照的OD值；

D_e——在510 nm波长下，样品的OD值；

D_f——在510 nm波长下，以蒸馏水代替过氧化氢溶液的OD值。

1.3.4 巨噬细胞免疫活性测定

小鼠腹腔巨噬细胞培养参照文献[17]中的方法，并稍加修改。在96孔板中加入180 μL活化培养的巨噬细胞悬液和20 μL不同质量浓度的虾夷扇贝裙边多糖溶液（虾夷扇贝裙边多糖组），以RPMI1640培养液作为空白对照（空白对照组），以10 μg/mL脂多糖（LPS）溶液作为阳性对照（阳性对照组），巨噬细胞经过24 h培养后，分别根据TNF-α试剂盒、IL-1β试剂盒及硝酸还原酶法试剂盒说明书测定TNF-α和IL-1β质量浓度以及NO浓度。

1.3.5 动物试验设计及指标检测

1）动物的分组：动物饲养条件参考文献[18]中的方法，并稍加修改。4周龄雄性SPF级C57BL/6小鼠，在（25±1）℃下饲养，明/暗循环12 h/12 h，可随意进食和饮水。27只小鼠经过7 d的适应期后随机分为3组，每组9只。空白对照组灌胃蒸馏水，低剂量组灌胃50 mg/kg虾夷扇贝裙边多糖溶液，高剂量组灌胃100 mg/kg虾夷扇贝裙边多糖溶液，灌胃体积为0.35 mL，喂养期为14 d，每天测定小鼠体质量。各组于喂养第14天注射100 mg/kg环磷酰胺，注射后断水断食8 h，并处死小鼠。

2）肠道微生物的选择培养与计数：收集第14天小鼠粪便，取0.1 g小鼠粪便经过适当稀释，分别涂布在EMB培养基（选择性培养肠杆菌、有氧、37 ℃、24 h）、BBL培养基（选择性培养双歧杆菌、无氧、37 ℃、48 h）和GAM培养基（选择性培养拟杆菌、无氧、37 ℃、48 h）上，待长出单菌落后，采用平板菌落计数法进行计数。厌氧培养采用2.5 L厌氧培养袋，内部放入厌氧产气包和氧气指示剂[19]。

3）小鼠结肠组织IgA、IgM和IgG的测定：组织样品的处理参考文献[20]中的方法，并稍加修改。取小鼠结肠组织，并用生理盐水洗涤干净。然后，称取0.2 g结肠组织，加入PBS缓冲液，组织匀浆后于4 ℃、3 000 r/min离心15 min取上清液。分别根据IgA的ELISA检测试剂盒、IgG的ELISA检测试剂盒、IgM的ELISA检测试剂盒说明书，测定IgA、IgG和IgM质量浓度。

1.4 数据处理

所有试验进行3次平行测定，数据采用$\bar{x}\pm s$表示，组间差异的显著性采用t检验评估，$P<0.05$认为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 虾夷扇贝裙边多糖基本成分分析

对虾夷扇贝裙边多糖的基本成分进行测定，虾夷扇贝裙边多糖的水分、灰分、蛋白质、总糖和还原糖质量分数分别为（11.12±0.87）%、（5.08±0.05）%、（19.48±2.04）%、（61.32±1.30）%和（0.89±0.03）%，说明在虾夷扇贝裙边多糖中，仍含有少量蛋白质。

2.2 虾夷扇贝裙边多糖结构分析

2.2.1 相对分子质量分析

如图1所示，虾夷扇贝裙边多糖的保留时间为15.363 1 min，代入标准曲线$y=0.365\ 7x-11.023\ 1$，计算得到虾夷扇贝裙边多糖的相对分子质量为2.538×10^5。

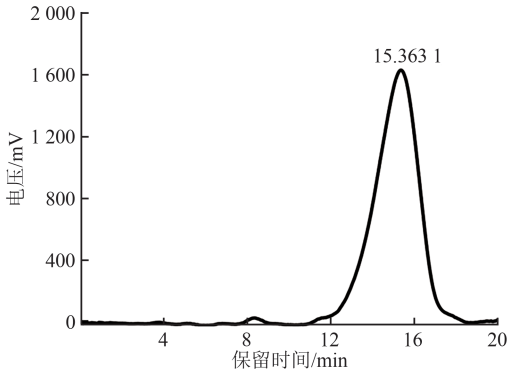


图1 虾夷扇贝裙边多糖的高效凝胶排阻色谱

Fig. 1 High performance gel exclusion chromatography of polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt

2.2.2 单糖组成分析

虾夷扇贝裙边多糖的单糖测定结果表明，虾夷扇贝裙边多糖由甘露糖、氨基葡萄糖、氨基半乳糖、葡萄糖和半乳糖组成，其质量分数依次为

3.36%、39.44%、9.72%、20.85% 和 26.63%，说明虾夷扇贝裙边多糖为氨基多糖。

2.2.3 紫外光谱分析

如图 2 所示，在 200~400 nm 波长时，样品在 200 nm 波长处的吸收峰是多糖类物质的特征吸收峰；在 260 nm 处没有吸收峰，说明样品中不含核酸；在 280 nm 处有弱吸收峰，说明样品中仍含有少量与多糖紧密结合的蛋白质，这与虾夷扇贝裙边多糖的基本成分分析结果相符。

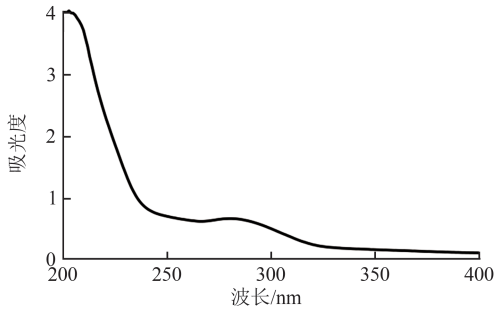


图 2 虾夷扇贝裙边多糖的紫外吸收光谱

Fig. 2 UV absorption spectrum of polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt

2.2.4 傅里叶变换红外光谱分析

如图 3 所示，3 400~3 300 cm^{-1} 处出现了宽而强的吸收峰。糖类皆存在—OH，而氨基多糖含有—NH[21]，由于分子内氢键的作用，使—OH 伸缩振动吸收峰与—NH 伸缩振动吸收峰重叠，从而形成增宽的多重吸收峰；2 931 cm^{-1} 和 2 872 cm^{-1} 处为甲基（$—CH_3$）和亚甲基（$—CH_2—$）的 C—H 伸缩振动吸收峰[22-23]；1 598 cm^{-1} 处为—NH 变形振动吸收峰[21]；1 390 cm^{-1} 和 1 450 cm^{-1} 处为 C—H 变角振动吸收峰；1 242 cm^{-1} 处为 C—N 伸缩振动吸收峰；

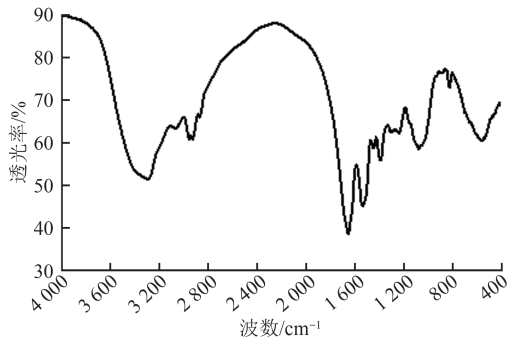


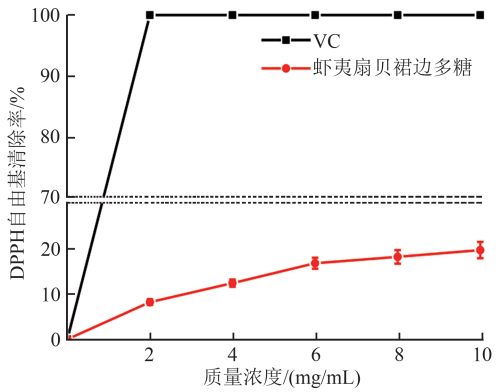
图 3 虾夷扇贝裙边多糖的傅里叶变换红外光谱

Fig. 3 Fourier transform infrared spectrum of polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt

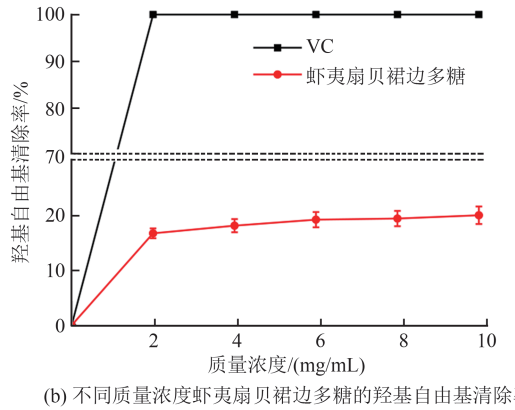
1 077 cm^{-1} 处为 C—O—C 糖环的伸缩振动吸收峰，说明存在 *D* 型吡喃糖[24]；829 cm^{-1} 是 *α* 异头端基的特征吸收峰；在 1 740 cm^{-1} 处没有检测到糖醛酸的特征吸收峰，说明虾夷扇贝裙边多糖不含糖醛酸[25]。

2.3 虾夷扇贝裙边多糖抗氧化活性分析

DPPH 自由基和羟基自由基清除能力是衡量多糖抗氧化能力的重要指标，不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖对 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力的影响如图 4 所示。阳性对照 VC 具有较强的抗氧化活性，在质量浓度为 2 mg/mL 时，DPPH 自由基和羟基自由基清除率即达到最大值。虾夷扇贝裙边多糖的 DPPH 自由基和羟基自由基清除能力相对较弱，在质量浓度为 10 mg/mL 时，多糖的自由基清除率远远不及 VC（$P<0.05$），分别为 VC 自由基清除率的 19.7% 和 20.1%，且羟基自由基清除能力存在剂量饱和效应，即羟基自由基的清除率不随多糖质量浓度增加而增加。



(a) 不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖的DPPH自由基清除率



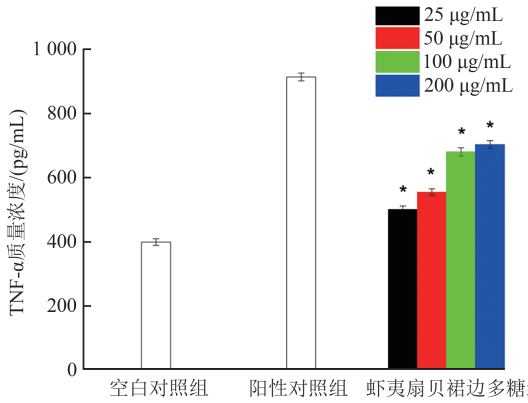
(b) 不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖的羟基自由基清除率

图 4 不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖的 DPPH 自由基和羟基自由基清除率

Fig. 4 DPPH and hydroxyl free radical scavenging rates of different mass concentrations of polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt

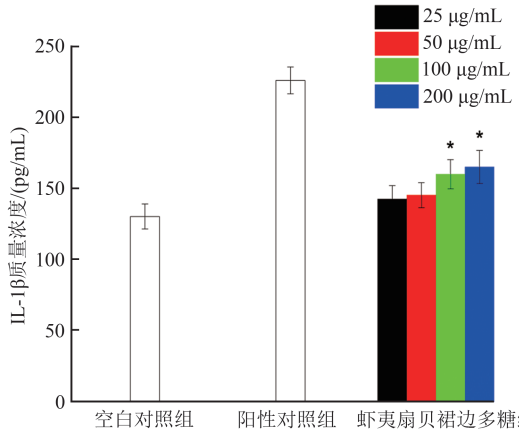
2.4　虾夷扇贝裙边多糖细胞免疫活性分析

如图5所示，虾夷扇贝裙边多糖质量浓度在25~200 μg/mL时，均能不同程度地促进TNF-α、IL-1β和NO的合成与释放，且呈明显的剂量效应。



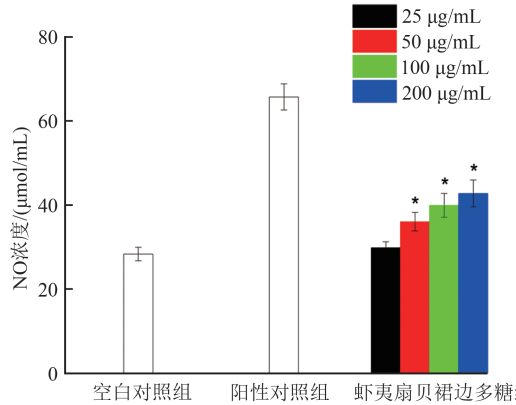
*—与空白对照组相比差异显著(P<0.05)。

(a) 不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖对巨噬细胞产生TNF-α的影响



*—与空白对照组相比差异显著(P<0.05)。

(b) 不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖对巨噬细胞产生IL-1β的影响



*—与空白对照组相比差异显著(P<0.05)。

(c) 不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖对巨噬细胞产生NO的影响

图5　不同质量浓度虾夷扇贝裙边多糖对巨噬细胞产生TNF-α、IL-1β和NO的影响

Fig. 5　Effects of different mass concentrations of polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* skirt on TNF-α, IL-1β, and NO production in macrophages

在质量浓度为25 μg/mL时，虾夷扇贝裙边多糖能显著增强TNF-α的分泌；在质量浓度为200 μg/mL时，TNF-α的分泌量较空白对照组提高了75.7%。在质量浓度为100 μg/mL时，虾夷扇贝裙边多糖能显著增强IL-1β的分泌；在质量浓度为200 μg/mL时，IL-1β的分泌量较空白对照组提高了22.8%。在质量浓度为50 μg/mL时，虾夷扇贝裙边多糖能显著促进NO的释放；在质量浓度为200 μg/mL时，NO的浓度较空白对照组增加了46.6%。

2.5　小鼠肠道菌群变化分析

由表1可知，与空白对照组相比，低剂量组小鼠粪便中拟杆菌的数量显著增加，双歧杆菌和肠杆菌的数量无显著变化；高剂量组小鼠粪便中双歧杆菌和拟杆菌的数量显著增加，肠杆菌的数量无显著变化。结果说明，虾夷扇贝裙边多糖能够改善小鼠肠道菌群组成，增加双歧杆菌和拟杆菌等益生菌的数量。

表1　各组小鼠粪便中主要菌群的数量

Table 1　Number of main bacteria in feces of mice in each group

组别	菌群数量/(CFU/g)		
	双歧杆菌	肠杆菌	拟杆菌
空白对照组	610±150^{a}	719±51^{a}	708±74^{a}
低剂量组	1 019±69^{ab}	617±97^{a}	1 067±189^{b}
高剂量组	1 474±368^{b}	719±51^{a}	1 150±225^{b}

注：不同字母表示组间存在显著性差异(P<0.05)。

2.6　小鼠肠道免疫指标分析

连续14 d灌胃虾夷扇贝裙边多糖后，小鼠生长状态良好，体质量与空白对照组相比无显著差异，解剖观察各器官无病变。由表2可知，与空白对照组相比，低剂量组能显著提高小鼠结肠中IgA和IgG的质量浓度，分别提高了13.6%和47.6%，

表2　各组小鼠的体质量和结肠中免疫球蛋白质量浓度

Table 2　Body weights and immunoglobulin mass concentrations in the colon tissue of mice in each group

组别	体质量/g	IgA质量浓度/(g/L)	IgG质量浓度/(g/L)	IgM质量浓度/(g/L)
空白对照组	20.71±0.32^{a}	0.22±0.02^{a}	8.38±1.28^{a}	2.18±0.21^{a}
低剂量组	20.71±0.96^{a}	0.25±0.02^{b}	12.37±1.23^{b}	2.24±0.23^{a}
高剂量组	21.16±1.41^{a}	0.25±0.02^{b}	14.14±1.16^{c}	2.70±0.30^{b}

注：不同字母表示组间存在显著性差异(P<0.05)。

IgM质量浓度无显著变化；高剂量组能显著提高小鼠结肠中IgA、IgG和IgM的质量浓度，分别提高了13.6%、68.7%和23.9%。与低剂量组相比，高剂量组小鼠结肠中IgG质量浓度提高了14.3%。

2.7 讨论

多糖的生物活性与其结构密切相关，对其结构的分析是研究其构效关系的基础。分析表明，虾夷扇贝裙边多糖由5种单糖组成，其中氨基糖约占总多糖质量的50%，未检测到糖醛酸。李广靖[26]采用CTAB法提取虾夷扇贝下脚料糖胺聚糖，其硫酸根、糖醛酸和氨基糖质量分数分别为5.75%、25.86%和1.03%，具有良好的抗氧化活性。多糖化学组成的差异可能是由提取方法不同所致，CTAB法主要提取酸性多糖。众多研究证实，多糖的抗氧化活性与其结构密切相关，糖醛酸和硫酸根被认为是反映多糖抗氧化活性的重要指标，含有糖醛酸或硫酸根的酸性多糖通常具有良好的抗氧化活性[27-30]。由单糖组成和傅里叶变换红外光谱结果可知，虾夷扇贝裙边多糖不含糖醛酸和硫酸根，这可能是虾夷扇贝裙边多糖抗氧化活性较弱的原因。

动物源多糖通常与蛋白质或脂质紧密结合，形成多糖复合物，这种结构特征对其分离纯化造成极大困难。虾夷扇贝裙边经过碱性蛋白酶一次酶解，所得粗多糖中仍含有大量蛋白质，经过链霉蛋白酶二次酶解后，蛋白质质量分数显著降低，但紫外光谱分析结果表明，仍然有少量蛋白质残留。一般情况下，傅里叶变换红外光谱同时在3 600~3 200 cm^{-1}出现—OH伸缩振动吸收峰，在2 900~2 800 cm^{-1}出现C—H伸缩振动吸收峰，在1 400 cm^{-1}附近存在C—H变角振动吸收峰，即可判断待测样品为多糖[31]。傅里叶变换红外光谱结果说明，虾夷扇贝裙边多糖符合糖类的基本结构特征，并且是一种含有α-型糖苷键的*D*型吡喃糖，与单糖组成和紫外光谱结果一致。

虽然虾夷扇贝裙边多糖抗氧化活性较弱，但具有良好的细胞免疫和黏膜免疫活性。体外细胞免疫试验结果表明，虾夷扇贝裙边多糖能够促进巨噬细胞分泌NO和细胞因子。细胞因子参与免疫应答过程中细胞间相互作用的信号传递。TNF-α能够加强免疫反应并诱导其他细胞因子的分泌；IL-1β可进一步激活巨噬细胞，促进抗体的生成；NO的生成量也是巨噬细胞被激活参与免疫应答的一个重要指标[32]。动物试验结果表明，虾夷扇贝裙边多糖能够改善小鼠肠道菌群组成，增加双歧杆菌和拟杆菌等益生菌的数量，同时能够增加小鼠结肠中IgA、IgG和IgM的质量浓度。大分子的多糖不能被人体直接消化吸收，但是可以被肠道微生物降解转化为短链脂肪酸，短链脂肪酸既可诱导分子参与信号传递，又能为肠上皮细胞提供能量，改善肠道功能[33]。拟杆菌通过分泌多种糖苷酶将大分子多糖降解为可吸收的小分子多糖，从而获取所需营养；同时，其持续产生的诱导分子可促进宿主机体健康，最终形成多糖代谢与菌群互相作用的良性循环[34]。同时，多糖也可以作为益生元对肠道微生物的组成产生一定影响[35-36]。肠道益生菌对机体肠道黏膜免疫具有重要作用，双歧杆菌可以激活肠道黏膜免疫，诱导肠道黏膜系统分泌免疫球蛋白IgA，从而抑制由细菌引起的肠道黏膜淋巴组织的免疫反应。此外，双歧杆菌对T淋巴细胞及NK细胞均有激活作用[37-38]。

3 结论

二次酶解醇沉提取的虾夷扇贝裙边多糖由甘露糖、氨基葡萄糖、氨基半乳糖、葡萄糖和半乳糖组成，相对分子质量为2.538×10^5，具有以α-型糖苷键为主、不含糖醛酸的*D*型吡喃环结构。虾夷扇贝裙边多糖抗氧化活性较弱，但是能够促进巨噬细胞分泌TNF-α、IL-1β和NO，增加肠道微生物中双歧杆菌和拟杆菌等益生菌的数量，提高结肠组织中IgA、IgG和IgM的质量浓度。综上表明，虾夷扇贝裙边多糖具有增强机体的免疫应答和改善肠道健康的能力。未来可进一步探索其多糖结构修饰与生物活性优化的可能性，例如通过化学修饰或酶法改造提高其多种生物活性。同时，深入解析其免疫调节和益生作用的具体分子机制，将为其在功能性食品、药物及保健品中的应用奠定基础。

参考文献

[1] 刘志昌，王海波，洪滨，等. 海洋贝类多糖的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2017，8(11)：4231-4238.

LIU Z C，WANG H B，HONG B，et al. Progress of polysaccharides isolated from marine shellfish[J]. Journal of Food Safety and Quality，2017，8(11)：4231-4238.(in Chinese)

[2] CHEONG K L，XIA L X，LIU Y. Isolation and characterization of polysaccharides from oysters (*Crassostrea gigas*) with anti-tumor activities using an aqueous two-phase system[J]. Marine Drugs，2017，15(11)：338.

[3] LIU B X，JIA Z，LI C C，et al. Hypolipidemic and anti-atherogenic activities of crude polysaccharides from abalone viscera[J]. Food Science & Nutrition，2020，8(5)：2524-2534.

[4] SONG S，WANG L L，WANG L L，et al. Structural characterization and anticoagulant activity of two polysaccharides from *Patinopecten yessoensis* viscera[J]. International Journal of Biological Macromolecules，2019，136：579-585.

[5] LI L，LI H，QIAN J Y，et al. Structural and immunological activity characterization of a polysaccharide isolated from *Meretrix meretrix* Linnaeus[J]. Marine Drugs，2015，14(1)：6.

[6] JIANG W W，LIN F，DU M R，et al. Simulation of Yesso scallop，*Patinopecten yessoensis*，growth with a dynamic energy budget (DEB) model in the mariculture area of Zhangzidao Island[J]. Aquaculture International，2020，28：59-71.

[7] DONGRE R S. Marine polysaccharides in medicine[M]. Rejika：Intechopen，2017：181-206.

[8] SHI F L，LIU Z C，LIU Y，et al. Comparison of physicochemical characteristics and macrophage immunostimulatory activities of polysaccharides from *Chlamys farreri*[J]. Marine Drugs，2020，18(8)：429.

[9] ZHONG Q W，WEI B，WANG S J，et al. The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms：an overview[J]. Marine Drugs，2019，17(12)：674.

[10] TANG C，DING R X，SUN J，et al. The impacts of natural polysaccharides on intestinal microbiota and immune responses：a review[J]. Food & Function，2019，10(5)：2290-2312.

[11] 艾雨晴. 纳豆芽孢杆菌发酵刺参中多糖的结构表征及消化特性研究[D]. 大连：大连海洋大学，2022.

[12] 秦娟. 海参蒸煮液多糖的理化性质、消化特性及活性研究[D]. 大连：大连海洋大学，2023.

[13] DVOŘÁČKOVÁ E，SNÓBLOVÁ M，HRDLIČKA P. Carbohydrate analysis：from sample preparation to HPLC on different stationary phases coupled with evaporative light-scattering detection[J]. Journal of Separation Science，2014，37(4)：323-337.

[14] 李菀，胡月，李光霞，等. 纤维素酶和果胶酶提取对甘草渣多糖抗氧化和抗肿瘤性能的影响[J]. 食品工业科技，2020，41(9)：309-313.
LI W，HU Y，LI G X，et al. Effects of cellulase and pectinase extraction on the antioxidant and antitumor activities of licorice residue polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry，2020，41(9)：309-313.(in Chinese)

[15] YUAN X，ZENG Y，NIE K，et al. Extraction optimization，characterization and bioactivities of a major polysaccharide from *Sargassum thunbergii*[J]. PLoS One，2015，10(12)：e0144773.

[16] 范亦菲，郭琳，靳文会，等. 枸杞酸奶体外抗氧化活性和保肝功能研究[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(4)：25-30.
FAN Y F，GUO L，JIN W H，et al. Study on antioxidant activity *in vitro* and hepatoprotective function of *Lycium barbarum* yogurt[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(4)：25-30.(in Chinese)

[17] ZHENG L，WANG M Y，PENG Y，et al. Physicochemical characterization of polysaccharides with macrophage immunomodulatory activities isolated from red ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer)[J]. Journal of Chemistry，2017，2017：3276430.

[18] WANG J H，LIU S W，WANG H，et al. *Xanthophyllomyces dendrorhous*-derived astaxanthin regulates lipid metabolism and gut microbiota in obese mice induced by a high-fat diet[J]. Marine Drugs，2019，17(6)：337.

[19] 张浩琪，魏华琳，刘宾，等. 大蒜多糖对小鼠肠道微生态的益生元功能研究[J]. 中国微生态学杂志，2012，24(2)：134-138.
ZHANG H Q，WEI H L，LIU B，et al. Evaluating the prebiotic effects of garlic polysaccharides on microecological environment of intestinal tract[J]. Chinese Journal of Microecology，2012，24(2)：134-138.(in Chinese)

[20] 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)

[21] 夏朝红，戴奇，房韦，等. 几种多糖的红外光谱研究[J]. 武汉理工大学学报，2007，29(1)：45-47.
XIA C H，DAI Q，FANG W，et al. Research on the IR spectrscopy of kinds of polysaccharide[J]. Journal of Wuhan University of Technology，2007，29(1)：45-47.(in

Chinese）

[22] 高阳杨，闫晓慧，朱畅，等．葛氏鲈塘鳢鱼头多糖的制备、结构鉴定及体外生物活性分析[J]．食品科学，2020，41(18)：64-70．
GAO Y Y，YAN X H，ZHU C，et al．Preparation，structure identification and *in vitro* biological activity of polysaccharide from *Perccottus glenii* head[J]．Food Science，2020，41(18)：64-70．(in Chinese)

[23] 杨东达．海参内脏多糖的分离、结构鉴定、免疫活性及其应用研究[D]．泉州：华侨大学，2020．

[24] WU L R，SUN H Q，HAO Y L，et al．Chemical structure and inhibition on α-glucosidase of the polysaccharides from *Cordyceps militaris* with different developmental tages[J]．International Journal of Biological Macromolecules，2020，148：722-736．

[25] 陈杨扬，李娇，王向红，等．滑子菇多糖的结构及体外生物活性探究[J]．中国食品学报，2019，19(6)：68-73．
CHEN Y Y，LI J，WANG X H，et al．Structural characterization and bioactivities of polysaccharides from *Pholiota nameko in vitro*[J]．Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2019，19(6)：68-73．(in Chinese)

[26] 李广靖．虾夷扇贝下脚料糖胺聚糖的分离纯化及生物活性研究[D]．天津：天津科技大学，2013．

[27] CHEN H X，QU Z S，FU L L，et al．Physicochemical properties and antioxidant capacity of 3 polysaccharides from green tea，oolong tea，and black tea[J]．Journal of Food Science，2009，74(6)：469-474．

[28] SHEN S A，CHENG H R，LI X，et al．Effects of extraction methods on antioxidant activities of polysaccharides from camellia seed cake[J]．European Food Research and Technology，2014，238：1015-1021．

[29] WU H，MIN T，LI X F，et al．Physicochemical properties and antioxidant activities of acidic polysaccharides from wampee seeds[J]．International Journal of Biological Macromolecules，2013，59：90-95．

[30] AL-SHERAJI S H，ISMAIL A，MANAP M Y，et al．Purification，characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from the fibrous pulp of *Mangifera pajang* fruits[J]．LWT-Food Science and Technology，2012，48(2)：291-296．

[31] TRANG L T，GIANG T H，TRANG V T．Studies on the method for determination of some polysaccharide food additives by Fourier transform infrared spectrum (FTIR)[J]．Vietnamese Journal of Food Control，2020，3(1)：46-53．

[32] 张圣方，赵龙玉，赵凤春，等．泰山蛹虫草多糖对免疫抑制小鼠肠道菌群及分泌型免疫球蛋白A的影响[J]．食品科学，2015，36(5)：148-152．
ZHANG S F，ZHAO L Y，ZHAO F C，et al．Effect of *Cordyceps taishanensis* polysaccharide on intestinal microflora and secretory immunoglobulin A in immunosuppressive mice[J]．Food Science，2015，36(5)：148-152．(in Chinese)

[33] 刘荣瑜，王昊，张子依，等．多糖与肠道菌群相互作用的研究进展[J]．食品科学，2022，43(5)：363-373．
LIU R Y，WANG H，ZHANG Z Y，et al．Progress in understanding interaction of polysaccharides with intestinal flora[J]．Food Science，2022，43(5)：363-373．(in Chinese)

[34] ARBOLEYA S，WATKINS C，STANTON C，et al．Gut *Bifidobacteria* populations in human health and aging[J]．Frontiers in Microbiology，2016，7：1204．

[35] FLINT H J，SCOTT K P，DUNCAN S H，et al．Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut[J]．Gut Microbes，2012，3(4)：289-306．

[36] 王轶帆，邓媛元，张雁，等．龙眼多糖与燕麦多糖的结构特征及其益生活性比较[J]．中国食品学报，2020，20(12)：62-71．
WANG Y F，DENG Y Y，ZHANG Y，et al．Comparison of structure characteristics and probiotic activity of longan polysaccharides and oat polysaccharides[J]．Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology，2020，20(12)：62-71．(in Chinese)

[37] VINDEROLA G，MATAR C，PALACIOS J，et al．Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389[J]．International Journal of Food Microbiology，2007，115(2)：180-186．

[38] RUIZ L，DELGADO S，RUAS-MADIEDO P，et al．*Bifidobacteria* and their molecular communication with the immune system[J]．Frontiers in Microbiology，2017，8：2345．

（责任编辑：许艳超）