

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.11.014

不同酸降解对海带多糖结构特征与生物活性的影响

洪成志, 查学强, 李雪影

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为了降低海带多糖 LJP61A 的分子量,扩大其利用范围,文章分别采用三氟乙酸(TFA)和盐酸(HCl)降解 LJP61A,并得到 2 种酸降解产物 DLJP-1 和 DLJP-2,在此基础上,测定了多糖降解前后的分子量、溶解度、化学组成和三螺旋结构变化;以氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)诱导巨噬细胞泡沫化为实验模型,在细胞水平上分析了不同降解处理对 LJP61A 抑制巨噬细胞泡沫化活性的影响。结果显示:低浓度的 TFA 和 HCl 均可有效地降解 LJP61A,降低 LJP61A 的分子量,改善其溶解性;2 种降解均未改变 LJP61A 的主要官能团结构和单糖组成;TFA 降解未破坏 LJP61A 的三螺旋结构,而 HCl 水解产物中未检测到三螺旋结构。细胞学实验证明:LJP61A 酸降解产物对巨噬细胞均无毒性,经过 TFA 降解后,LJP61A 抑制巨噬细胞泡沫化活性显著增强;HCl 降解明显降低了 LJP61A 的活性。研究结果可为海带多糖 LJP61A 的性能优化和活性改善提供方向,为天然活性多糖的降解开发提供理论基础。

关键词:海带多糖;降解;结构;巨噬细胞泡沫化

中图分类号:Q71

文献标志码:A

文章编号:1003-5060(2025)11-1526-08

Effects of different acid hydrolysis on structural features and bioactivities of *Laminaria japonica* polysaccharides

HONG Chengzhi, ZHA Xueqiang, LI Xueying

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: The present work aims to decrease the molecular weight and expand the utilization of a *Laminaria japonica* polysaccharide LJP61A. The trifluoroacetic acid(TFA) and hydrochloric acid(HCl) were employed to degrade LJP61A, and two degradation products, DLJP-1 and DLJP-2, were generated. Based on this, the changes of the molecular weight, solubility, chemical composition, and triple-helix structure of LJP61A after degradation were determined. Additionally, the oxidized low density lipoprotein(Ox-LDL)-induced macrophage foam cell formation was used as the experimental model, and the inhibitory effects of the degradation products on macrophage foam cell formation were clarified at the cellular level. The results revealed that both TFA and HCl at low concentrations could degrade LJP61A effectively with lower molecular weights and higher solubilities. Meanwhile, neither degradation altered the primary functional groups and monosaccharide composition of LJP61A. Moreover, the triple-helix structure of LJP61A remained unaffected by TFA hydrolysis, whereas no triple-helix structure was detected in HCl hydrolysates. At the cellular level, it was demonstrated that the degradation products were nontoxic to RAW264.7 cells, and the inhibitory effects of LJP61A on macrophage foam cell formation increased significantly after TFA hydrolysis. However, the HCl hydrolysis decreased the activity of LJP61A. In conclusion, this research offers a strategy for the performance optimization and activity improvement of LJP61A and provides a theoretical basis for the degradation and development of natural bioactive polysaccharides.

收稿日期:2023-05-22;修回日期:2023-06-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(32072176);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(JZ2022HGQA0232; JZ2022HGTA0316)

作者简介:洪成志(1998—),男,安徽太湖人,合肥工业大学硕士生;

查学强(1979—),男,安徽怀宁人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者,E-mail:zhaxueqiang@hfut.edu.cn.

Key words: *Laminaria japonica* polysaccharides; degradation; structure; macrophage foam cell formation

海带(*Laminaria japonica*)是一种常见的海洋蔬菜,富含多糖、膳食纤维、蛋白质和矿物质等成分,具有排痰、润肤、减肥和促进钙吸收等功能,是一种理想的天然食品。多糖是海带中的主要活性成分,近年来,从海带中提取的多糖被证实具有抗病毒^[1]、降血脂^[2]、调节胃肠道^[3]、抗氧化^[4]等多种功能。近期研究发现,从海带中可分离出一种均一的多糖组分 LJP61A,其具有抑制巨噬细胞泡沫化的能力^[5]。然而,结构分析结果表明,LJP61A 分子量高达 1.96×10^6 Da,有研究显示,多糖分子量越大,其分子体积越大,故难以通过细胞膜进入细胞内发挥活性,这可能会限制 LJP61A 在机体内发挥活性,影响其生物利用度^[6]。因此,降低 LJP61A 的分子量能进一步提高其活性和生物利用度。

对多糖进行降解是降低其分子量的主要手段。多糖的降解方法包括物理降解、生物酶解和化学酸解^[7]。其中:物理降解包括超声降解、微波降解等,其操作简单,但是效率较低,通常用以辅助其他降解方法;生物酶解通过选用特异性的糖苷键水解酶,定向切割多糖中特定糖苷键,但成本较高,实现广泛应用较困难;酸降解因其效率高,操作便捷,降解效果显著,一直是多糖降解领域的研究热点^[8]。目前,基于价格低廉、无氧化副产物、对健康影响小等优点,三氟乙酸(TFA)和盐酸(HCl)常被选作多糖酸降解研究的主要材料。此外,有学者发现较低浓度的酸降解不会破坏多糖的活性基团和基本结构^[9-10]。因此,本研究分别采用低浓度的 TFA 和 HCl 降解 LJP61A,分析多糖降解前、后理化性质及结构特征的变化。同时,采用氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)诱导的巨噬细胞作为活性评价模型,分析对比 LJP61A 降解前、后抑制巨噬细胞泡沫化的活性变化,以期为海带多糖的进一步研究与开发提供理论支持。

1 实验材料

1.1 材料与试剂

新鲜海带购于合肥市大润发超市,经超纯水清洗、浸泡除盐后烘干打粉,过 60 目筛,密封储存备用;小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 购于北京协和医学院细胞资源中心;Sephacryl S-500 丙烯葡聚糖凝胶购于美国 GE 公司;Ox-LDL 购于广州

奕源生物科技有限公司;DEAE-52 纤维素树脂、细胞总胆固醇(total cholesterol, TC)质量试剂盒、细胞游离胆固醇(free cholesterol, FC)质量试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司;氯化钠、氢氧化钠、HCl、TFA、乙醇、硫酸、苯酚、刚果红等均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

本实验所用仪器与设备有:高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)(安捷伦科技有限公司);紫外分光光度计(北京谱析通用仪器公司);傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)(美国铂金埃尔默公司);CO₂ 细胞培养箱(日本 SANYO 公司);全波长酶标仪(Thermo Fisher Scientific);光学相差显微镜(重庆光电仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 海带多糖 LJP61A 的提取

称取 80 g 新鲜海带粉末,加入 4 L 超纯水,90 °C 水浴加热,搅拌萃取 3 h;萃取完成后使用纱布挤压过滤取滤液,调节 pH 值至 1.0,离心除去海藻酸盐沉淀,调节上清液 pH 值至 7.0 后,减压蒸发浓缩并加入 4 倍体积无水乙醇,静置 24 h,待多糖完全析出后,抽滤取沉淀并复溶于超纯水中,使用三氟乙酸与正丁醇混合溶剂萃取法去除蛋白后,经过 4 000 Da 规格透析袋透析 48 h 除盐,浓缩冻干得到粗多糖。将粗多糖配置成 10 mg/mL 的溶液,加入压制完成的 DEAE-52 纤维素柱,使用流速为 2 mL/min 的超纯水洗脱,收集洗脱液并进一步通过 Sephacryl S-500 丙烯葡聚糖凝胶柱分离获得海带多糖均一组分 LJP61A。根据前期研究,LJP61A 的分子量为 1.96×10^6 Da,由葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)和半乳糖(Gal)以 1.85 : 1.00 : 2.92 的摩尔比组成,其结构的重复单元由 $\rightarrow 3, 6)-\alpha\text{-D}\text{-Manp}\text{-}(1 \rightarrow, \rightarrow 4)-\alpha\text{-D}\text{-Manp}\text{-}(1 \rightarrow, \rightarrow 4)\text{-}2\text{-O}\text{-acetyl}\text{-}\beta\text{-D}\text{-Glc}\text{-p}\text{-}(1 \rightarrow, \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D}\text{-Glc}\text{-p}\text{-}(1 \rightarrow, \rightarrow 6)\text{-}4\text{-O}\text{-SO}_3\text{-}\beta\text{-D}\text{-Gal}\text{-p}\text{-}(1 \rightarrow, \rightarrow 6)\text{-}\beta\text{-D}\text{-Gal}\text{-p}\text{-}(1 \rightarrow, \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D}\text{-Gal}\text{-p}\text{-}(1 \rightarrow$ 和末端糖残基 $\alpha\text{-D}\text{-Glc}\text{-p}\text{-}(1 \rightarrow$ 组成。

2.2 LJP61A 酸解产物的制备

分别使用 TFA 和 HCl 对分离纯化得到的均一多糖 LJP61A 进行酸降解。参考文献^[11-12]的酸降解方法,TFA 降解的具体条件为:配制

1 mg/mL 的 LJP61A 溶液 10 mL, 加入终浓度为 0.5 mol/L 的 TFA 溶液, 在 90 °C 水浴条件下密封降解。HCl 降解的具体条件为: 配制 1 mg/mL 的 LJP61A 溶液 10 mL, 加入终浓度为 0.4 mol/L 的 HCl 溶液, 在 95 °C 水浴条件下密封降解。降解完成后调节 pH 值至中性, 并使用 4 000 Da 截留分子量的透析袋透析 24 h 除盐, 浓缩冻干后得到降解后的 LJP61A 组分。期间, 分别取降解时间为 0、30、60、90 min 的样品通过 HPLC 检测降解程度, 取完全降解的产物进行下一步实验, 其中, TFA 降解产物和 HCl 降解产物分别命名为 DLJP-1 和 DLJP-2。

2.3 LJP61A 酸降解产物理化性质测定

2.3.1 相对分子量的测定

采用 HPLC 检测 DLJP-1 和 DLJP-2 的分子量。配制 1 mg/mL 的样品溶液, 经过 0.22 μm 水相滤膜过滤后, 取 20 μL 滤液注入 HPLC, 色谱柱型号为 TSK G5000 PWxl, 流动相为超纯水, 流速为 0.5 mL/min, 采用 Dextran 系列标准葡萄糖的分子量对数与其保留时间绘制标准曲线, 根据标准曲线计算样品的分子量^[13]。

2.3.2 紫外光谱分析

分别取 2 mg 干燥的 LJP61A、DLJP-1 和 DLJP-2, 溶于 1 mL 蒸馏水中, 使用紫外可见分光光度计于 190~400 nm 波长范围内进行扫描, 观察其在 260、280 nm 处有无特征吸收峰, 验证样品中是否含有核酸和蛋白质残留^[14]。

2.3.3 溶解度测定

参考文献^[15], 称取 10 mg 多糖样品置于已知质量的 EP 管中, 加入 100 μL 超纯水, 在室温下涡旋震荡, 溶解后以 12 000 r/min 离心 5 min, 吸除上清, 于 50 °C 烘干并计算管中沉淀质量。计算 100 g 超纯水中能溶解多糖的最大质量。

2.4 LJP61A 酸降解产物化学组成测定

2.4.1 官能团测定

取 2 mg 干燥的 LJP61A、DLJP-1、DLJP-2, 分别加入溴化钾混合压片, 置于 FTIR 光谱仪上, 在 4 000~500 cm⁻¹ 范围内进行扫描, 观察样品中的特征官能团。

2.4.2 单糖组成测定

采用 PMP 柱前衍生法检测 LJP61A 降解前、后的单糖组成变化。分别制备 10 mg/mL 的 LJP61A 溶液、DLJP-1 溶液、DLJP-2 溶液, 采用浓度为 3 mol/L 的 HCl 溶液完全酸解 1 h, 并使用浓度为 0.3 mol/L 的 NaOH 溶液和 0.5 mol/L

的 PMP-甲醇溶液进行衍生化反应, 衍生化产物经过三氯甲烷反复涡旋清洗后, 取 20 μL 注入配备有紫外检测器的 HPLC 检测 250 nm 下的吸收波长, 与经过相同衍生化处理的单糖标品对比, 得到不同样品的单糖组成信息^[16]。

2.5 LJP61A 酸降解产物三螺旋结构测定

参考文献^[17]的方法, 配制 1 mg/mL 的 LJP61A 溶液、DLJP-1 溶液、DLJP-2 溶液, 分别加入等体积的刚果红溶液(100 μmol/L)混匀, 并加入终浓度为 0~0.5 mol/L 的 NaOH 溶液, 置于紫外分光光度计中扫描, 测定不同溶液于 400~700 nm 范围的最大吸收波长。采用已知具有三螺旋结构的凝胶多糖(Curdlan)作为阳性对照组, 去离子水作为空白对照组。

2.6 抑制巨噬细胞泡沫化活性测定

1) LJP61A 酸降解产物对 RAW264.7 细胞存活的影响。采用噻唑蓝比色法检测 LJP61A 及其酸降解产物对 RAW264.7 细胞存活的影响^[18]。将 RAW264.7 细胞以 5×10⁴ 个/mL 种植于 96 孔板, 每孔 90 μL, 待细胞贴壁后每孔分别加入终质量浓度为 5、10、15、25、50、100、200 μg/mL 的 LJP61A 及其酸水解产物溶液, 空白对照组添加 10 μL 不含血清的空白培养基。培养 24 h 后, 每孔加入 20 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的噻唑蓝溶液, 继续培养 4 h 后除去旧培养基并加入 150 μL 二甲基亚砜, 放置于酶标仪中, 于 570 nm 下测定吸光度并进行统计学分析。

2) LJP61A 及其酸降解产物对巨噬细胞泡沫化的影响。将 RAW264.7 细胞以 1×10⁶ 个/mL 种植于 24 孔板中, 每孔 470 μL, 待细胞贴壁后, 处理组和多糖干预组(实验组)添加终质量浓度为 50 μg/mL 的 Ox-LDL 溶液, 实验组分别添加不同质量浓度的多糖溶液, 于培养箱中继续培养 48 h。培养完成除培养基, 根据油红 O 染色试剂盒说明书步骤操作染色, 染色完成后使用苏木素染液复染 5 min, 洗净后置于显微镜下观察并拍照。拍照完成后使用无水乙醇漂洗并于 500 nm 下测定吸光度进行统计学分析^[19]。

3) LJP61A 及其降解产物对巨噬细胞 TC 和 FC 质量的影响。将 RAW264.7 细胞以 1×10⁶ 个/mL 种植于 24 孔板中, 每孔 470 μL, 待细胞贴壁后, 处理组和实验组添加终质量浓度为 50 μg/mL 的 Ox-LDL 溶液, 实验组分别添加不同质量浓度的多糖溶液, 于培养箱中继续培养 48 h。培养完成后收集细胞, 按照试剂盒说明书测定

TC 质量和 FC 质量^[20]。

2.7 统计分析

所有的实验至少进行 3 次,使用单因素方差分析法确认各组之间的统计学差异。文中数据均以平均值±标准差表示。采用字母标记法表示显著性差异,其中:最大值标记为 a,与其无显著性差异的组别均标记为 a;有显著性差异的组别标记为 b,与 b 组有显著性差异的组别标记为 c;以此类推,标记其他所有组别。

3 结果与分析

3.1 LJP61A 酸降解结果分析

LJP61A 是一种均一的海带多糖,分子量为 1.96×10^6 Da^[6]。为了观察 LJP61A 的降解程度,分别取降解第 0、30、60、90 分钟的产物,经过 NaOH 调节 pH 值至中性终止反应,使用 500 Da 截留量透析袋经过蒸馏水透析 24 h 后,注入高效液相色谱仪进行检测,测得 LJP61A 的酸解动态如图 1 所示。

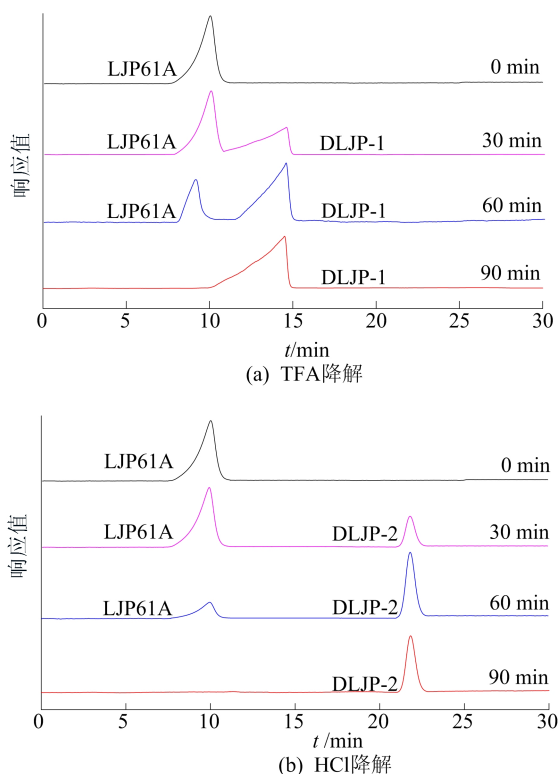


图 1 LJP61A 酸降解动态结果

从图 1 可以看出:LJP61A 经过 2 种酸降解后,谱图中 9.8 min 处对应的 LJP61A 的色谱峰面积随着降解时间的延长而逐渐减少,对应酸降解产物 DLJP-1、DLJP-2 的色谱峰面积逐渐升高;降解时间为 90 min 时,2 种酸降解产物的 HPLC

谱图中均仅有单一的酸降解产物峰并趋于稳定,随着降解时间的延长,色谱图没有发生变化。因此,取降解 90 min 的产物进行后续实验。

3.2 LJP61A 酸降解产物的理化性质分析

3.2.1 分子量分析

LJP61A 及其酸降解产物的分子量分析结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,LJP61A 分别经过 TFA 和 HCl 降解后,分子量明显降低,并且均表现为均一产物。根据 Dextran 系列标准葡萄糖的分子量对数与其保留时间所得的标准曲线计算得到,DLJP-1 的分子量为 3.58×10^5 Da,DLJP-2 的分子量为 2.36×10^4 Da。

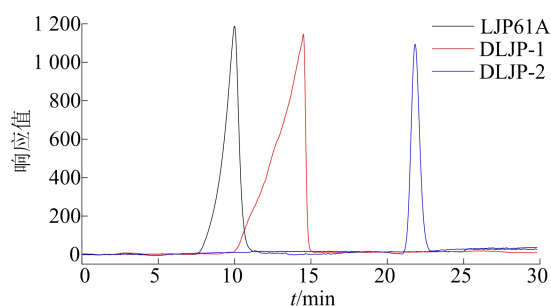


图 2 LJP61A 及其酸降解产物的分子量分析

3.2.2 紫外光谱分析

LJP61A 及其酸降解产物的紫外光谱分析如图 3 所示。从图 3 可以看出,LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 在 190~400 nm 处的紫外谱图均为连续光滑的曲线,于 260 nm 和 280 nm 处均无吸收峰,表明多糖提取、分离纯化、降解过程中无核酸和蛋白残留。

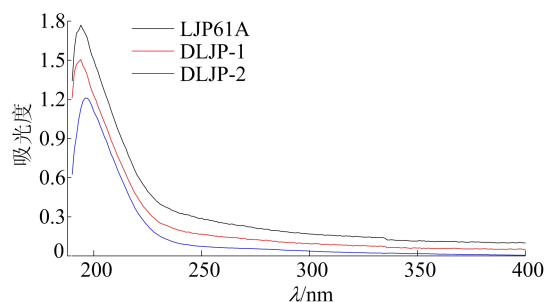


图 3 LJP61A 及其酸降解产物的紫外光谱分析

3.2.3 溶解度分析

分子量是影响多糖溶解度的主要因素之一,分子量大的多糖通常具有较低的溶解度,会导致其在生物体内较低的释放速度和利用率。LJP61A 及其酸降解产物的溶解度见表 1 所列。

从表 1 可以看出:LJP61A 经过酸降解后分子量降低的同时,溶解度明显上升;相比 TFA 降解,HCl 降解处理对溶解度的提升更为明显。

表 1 LJP61A 及其酸降解产物的溶解度

多糖	LJP61A	DLJP-1	DLJP-2
溶解度/g	(5.41±0.02) ^c	(6.73±0.06) ^b	(8.07±0.06) ^a

3.3 LJP61A 及其酸降解产物化学组成分析

3.3.1 官能团分析

LJP61A 及其酸降解产物的 FTIR 谱图如图 4 所示。从图 4 可以看出,LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 均表现为相似的多糖特征峰,表明 TFA 和 HCl 降解均未改变 LJP61A 中的特征官能团。具体而言,3 335 cm^{-1} 处的吸收峰对应—OH 的伸缩振动,2 937 cm^{-1} 处的吸收峰对应 C—H 的伸缩振动,1 641 cm^{-1} 处的吸收峰为 C=O 的伸缩振动峰,1 417 cm^{-1} 处的吸收峰为 C—H 的变角振动峰,1 225 cm^{-1} 处的吸收峰表明多糖中含有乙酰基,1 027 cm^{-1} 处的振动峰对应 C—O—C 中的 C—O 伸缩振动峰,在 824、845 cm^{-1} 处的吸收峰表明多糖样品中含有硫酸根基团。

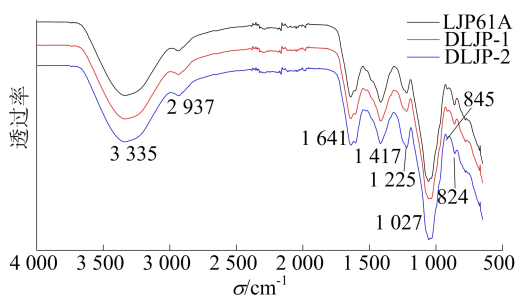


图 4 LJP61A 及其酸降解产物的 FTIR 谱图

3.3.2 单糖组成分析

LJP61A 酸降解产物的单糖组成分析如图 5 所示。从图 5 可以看出,通过与单糖标品的出峰时间和色谱峰面积对比,LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 均由葡萄糖、甘露糖、半乳糖组成。其中:LJP61A 中三者的摩尔比为 1.85 : 1.00 : 2.92,这与本课题组的研究结果一致;DLJP-1 和 DLJP-2 中三者的摩尔比分别为 1.87 : 1.00 : 2.88 和 1.79 : 1.00 : 2.87,这可能是由于降解过程中部分单糖发生了解离,但是其整体变化并不显著,说明 TFA 降解和 HCl 降解均改变了 LJP61A 的单糖组成。

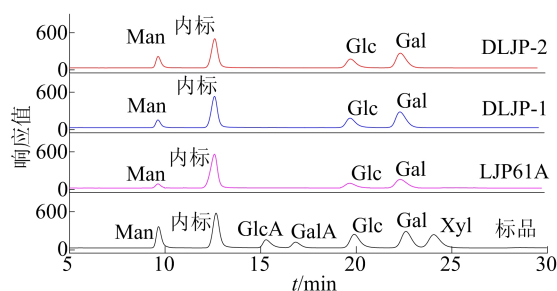


图 5 LJP61A 及其酸降解产物的单糖组成分析

3.4 LJP61A 及其酸降解产物三螺旋结构分析

多糖的高级结构以初级结构为基础,分子中的重复单元之间通过共价键彼此连接,形成更复杂的高级结构。多数观点认为,三螺旋结构具有更大的表面积和更强的稳定性,因此,三螺旋多糖相对其他构型的多糖通常表现出相对较好的生物学活性^[21]。刚果红能够与三螺旋多糖发生络合反应,相比未添加多糖的刚果红溶液,络合物的最大紫外吸收波长会向长波偏移。而 NaOH 会破坏多糖的三螺旋结构,降低混合溶液的最大吸收波长。通过改变多糖刚果红混合溶液中的 NaOH 浓度,探究其最大吸收波长变化情况,可以判断多糖中是否含有三螺旋结构。

LJP61A 及其酸降解产物的三螺旋结构分析如图 6 所示。

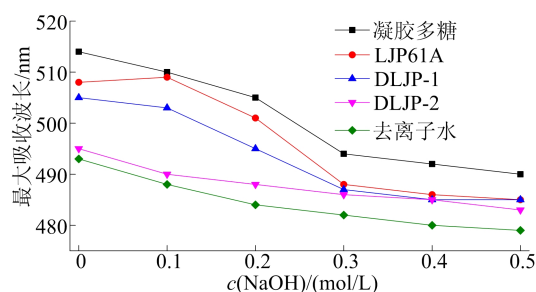


图 6 LJP61A 酸降解产物的三螺旋结构分析

从图 6 可以看出:与空白组相比,LJP61A 和 DLJP-1 的最大吸收波长明显增大,且随着 NaOH 浓度的增加,其最大吸收波长明显降低;而 DLJP-2 的最大吸收波长未发生偏移,其最大吸收波长随 NaOH 浓度的增加而轻微降低,这是由于碱性环境破坏了多糖中的氢键。结果表明 LJP61A 是三螺旋多糖,并且 TFA 能够在不破坏 LJP61A 三螺旋结构的前提下降低 LJP61A 的分子量,而 HCl 降解在降低 LJP61A 分子量的同时,还破坏了其三螺旋结构。

3.5 酸降解对巨噬细胞泡沫化的影响

3.5.1 对巨噬细胞存活的影响

LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 对 RAW264.7 细

胞存活的影响如图 7 所示。

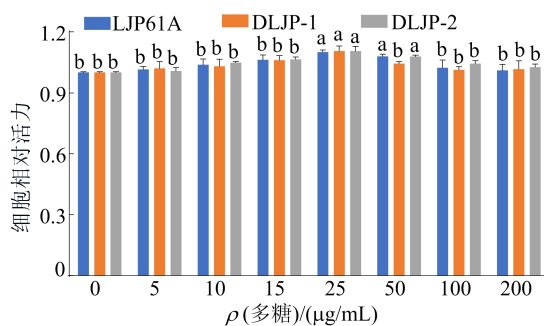


图 7 LJP61A 及其酸降解产物对 RAW264.7 细胞存活的影响

由图 7 可知,多糖质量浓度在 0~200 µg/mL 范围内, LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 均能有效促进

巨噬细胞的增殖,在质量浓度为 25 µg/mL 时, LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 对巨噬细胞的增殖效果最明显。结果表明,在此质量浓度范围内, LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 对巨噬细胞均没有毒性。为了对比不同剂量多糖对实验效果的影响,在后续实验中,选取 5、25 µg/mL 的多糖质量浓度进行进一步研究。

3.5.2 对 RAW264.7 细胞脂质沉积的影响

通过油红 O 染色分析 LJP61A 及其酸降解产物对 RAW264.7 细胞脂质沉积的影响,如图 8 所示。从图 8 可以看出,经过油红 O 染液和苏木素染液的处理,细胞中的脂质呈红色,细胞核呈蓝色。

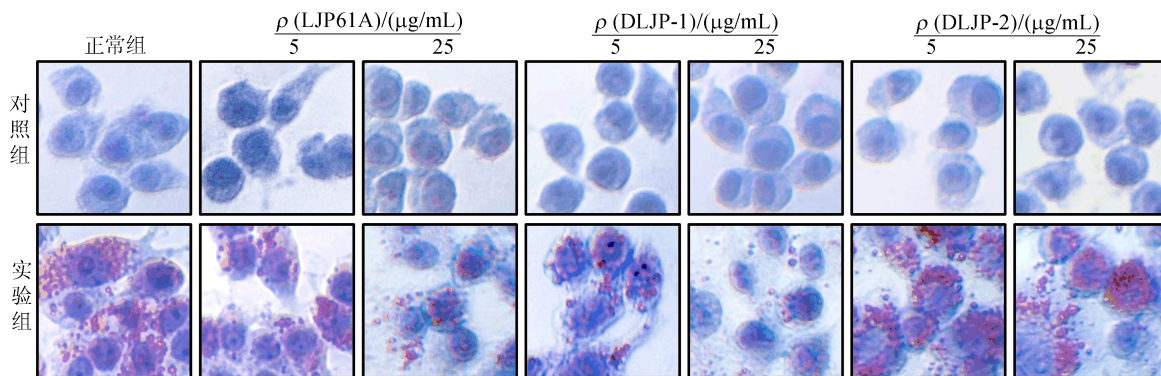


图 8 油红 O 染色分析 LJP61A、DLJP-1、DLJP-2 对 RAW264.7 细胞脂质聚集的抑制作用

在正常对照组和仅添加多糖的正常实验组中几乎观察不到脂质的聚集,而在仅添加 Ox-LDL 的实验组中能够观察到大量的红色颗粒,表明细胞中出现了明显的脂质沉积。正常实验组经过 LJP61A 或 DLJP-1 处理后,红色颗粒明显减少,并且随着质量浓度的升高,对脂质聚集的抑制效果越明显。多糖质量浓度为 5、25 µg/mL 时, DLJP-1 的抑制效果均明显强于 LJP61A。然而,在同等质量浓度下,尽管 DLJP-2 的处理同样能够明显减轻细胞中的脂质沉积,但是其效果明显弱于 LJP61A 和 DLJP-1,并且经过 25 µg/mL DLJP-2 处理后,细胞中仍然能观察到大量的脂质聚集。

结合染色图片和统计学分析结果可知,经过 TFA 的降解, LJP61A 抑制巨噬细胞泡沫化的活性得到了有效的提升;此外,虽然 HCl 降解效果更加显著,但是反而降低了 LJP61A 对巨噬细胞脂质沉积的抑制效果。

3.5.3 对 RAW264.7 细胞 TC、FC 质量的影响

细胞中 TC 质量减去 FC 质量即为胆固醇酯

(cholesteryl ester, CE) 质量, CE 与 TC 的质量比是判断巨噬细胞向泡沫化细胞转变的重要指标,当 $m(CE)/m(TC)$ 大于 0.5 时,表示巨噬细胞转化为泡沫化细胞^[22]。LJP61A 及其酸降解产物处理的细胞的 TC 和 FC 质量见表 2 所列,对应的 $m(CE)/m(TC)$ 分析结果如图 9 所示。

从表 2 可以看出:在单独添加多糖处理的细胞中, TC 质量和 FC 质量均未发生明显变化;经过 Ox-LDL 处理后, TC 和 FC 质量明显升高。

从图 9 可以看出,此时对应的 CE 与 TC 质量比也明显升高,巨噬细胞转化为泡沫化细胞。LJP61A 或 DLJP-1 处理后, CE 与 TC 质量比明显降低,并且在相同质量浓度下, DLJP-1 效果明显强于 LJP61A。然而, DLJP-2 的处理虽然明显降低了细胞中的胆固醇含量,但是效果明显弱于 LJP61A 和 DLJP-1。

实验结果与油红 O 染色实验结果一致,证明了 TFA 降解能有效提高 LJP61A 的活性,而 HCl 降解后 LJP61A 活性降低。

表 2 油红 O 染色结果、LJP61A 及其酸降解产物处理的细胞中 TC 和 FC 质量

组别	$\rho(\text{Ox-LDL})/$ ($\mu\text{g/mL}$)	多糖种类	$\rho(\text{多糖})/$ ($\mu\text{g/mL}$)	染色洗液吸光度与 正常组的比值	$m(\text{FC})/\mu\text{g}$	$m(\text{TC})/\mu\text{g}$
正常对照组				(1.016±0.039) ^g	(94.90±3.99) ^c	(139.65±4.23) ^h
对照组 1		LJP61A	5	(1.030±0.037) ^g	(97.53±1.40) ^c	(139.75±5.36) ^h
对照组 2		LJP61A	25	(1.047±0.025) ^g	(98.02±2.74) ^c	(140.37±4.60) ^h
对照组 3	0	DLJP-1	5	(1.020±0.051) ^g	(97.74±2.06) ^c	(142.24±3.15) ^h
对照组 4		DLJP-1	25	(1.030±0.016) ^g	(96.59±1.69) ^c	(139.96±2.16) ^h
对照组 5		DLJP-2	5	(1.043±0.031) ^g	(98.18±2.91) ^c	(141.20±2.06) ^h
对照组 6		DLJP-2	25	(1.033±0.020) ^g	(99.08±1.29) ^c	(141.76±4.05) ^h
正常实验组				(3.987±0.033) ^a	(121.01±4.01) ^a	(320.68±3.78) ^a
实验组 1		LJP61A	5	(3.033±0.042) ^d	(107.47±4.11) ^b	(265.41±3.72) ^d
实验组 2		LJP61A	25	(2.020±0.059) ^e	(103.44±1.75) ^b	(236.77±3.52) ^f
实验组 3	50	DLJP-1	5	(2.890±0.045) ^d	(108.36±2.60) ^b	(253.21±2.62) ^e
实验组 4		DLJP-1	25	(1.657±0.058) ^f	(105.53±1.73) ^b	(221.78±1.00) ^g
实验组 5		DLJP-2	5	(3.703±0.058) ^b	(111.41±2.11) ^b	(307.73±2.10) ^b
实验组 6		DLJP-2	25	(3.243±0.069) ^c	(109.15±0.58) ^b	(287.66±2.92) ^c

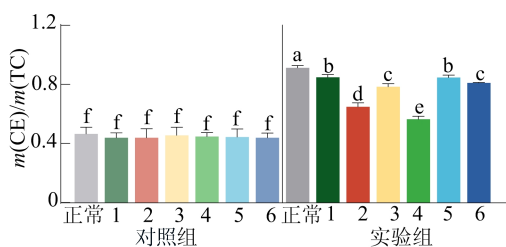


图 9 LJP61A 及其酸降解产物处理的细胞中 CE 与 TC 质量比

4 结 论

本文分别采用低浓度 TFA 和 HCl 降解海带多糖 LJP61A。结果表明,2 种酸降解处理均未破坏 LJP61A 的官能团和化学组成,其中,TFA 能够在不破坏 LJP61A 三螺旋结构的前提下降低其分子量并提高溶解度,并且降解后的多糖对巨噬细胞泡沫化的抑制作用明显提高。此外,尽管 HCl 的处理能更有效地降低 LJP61A 的分子量,但破坏了 LJP61A 的三螺旋结构,LJP61A 的活性也随之降低,表明三螺旋结构可能是 LJP61A 发挥抑制巨噬细胞泡沫化活性的主要因素之一。本文研究结果可以为天然多糖的研究拓宽思路,并提供一定的参考价值。

[参 考 文 献]

- [1] YIM S K, KIM K, CHUN S H, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 virus entry by the crude polysaccharides of seaweeds and abalone viscera *in vitro*[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(4): 219-233.
- [2] LI N, FU X, XIAO M, et al. Enzymatic preparation of a low-molecular-weight polysaccharide rich in uronic acid from the seaweed *Laminaria japonica* and evaluation of its hypolipidemic effect in mice[J]. *Food & Function*, 2020, 11(3): 2395-2405.
- [3] LU X, XU H, FANG F, et al. *In vitro* effects of two polysaccharide fractions from *Laminaria japonica* on gut microbiota and metabolome[J]. *Food & Function*, 2023, 14(7): 3379-3390.
- [4] LI N, LI Q, HE X, et al. Antioxidant and anti-aging activities of *Laminaria japonica* polysaccharide in *Caenorhabditis elegans* based on metabolomic analysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 221: 346-354.
- [5] ZHA X Q, LI X Y, ZHANG H L, et al. Molecular mechanism of a new *Laminaria japonica* polysaccharide on the suppression of macrophage foam cell formation via regulating cellular lipid metabolism and suppressing cellular inflammation[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59(10): 2008-2021.
- [6] WU Q, QIN D, CAO H, et al. Enzymatic hydrolysis of polysaccharide from *Auricularia auricula* and characterization of the degradation product[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 162: 127-135.
- [7] LI K, LI X Q, LI G X, et al. Relationship between the structure and immune activity of components from the active polysaccharides APS-II of *Astragalus Radix* by enzymolysis of endo- α -1, 4-glucanase[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 839635.
- [8] ZHU Z Y, ZHANG J Y, LIU F, et al. Characterization and lymphocyte proliferation activity of an oligosaccharide degraded from *Astragalus* polysaccharide[J]. *RSC Medicinal Chemistry*, 2017, 8(7): 1521-1530.
- [9] 曹慧馨, 吴迪, 王旭升, 等. 黑木耳多糖的降解及其产物抗氧化性[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(10): 15-21.
- [10] 段科, 单虎, 林英庭, 等. 微波辅助盐酸/过氧化氢降解浒苔多糖及其抗氧化活性[J]. *食品科技*, 2015, 40(12): 142-147.

(下转第 1541 页)

- [9] 卢文波,陶振宇. 预裂爆破中炮孔压力变化历程的理论分析[J]. 爆炸与冲击, 1994, 14(2): 140-147.
- [10] 张建华,李世禄,王玉杰,等. 爆炸扩腔数值模拟及分析[J]. 武汉科技大学学报(自然科学版), 2001, 24(2): 174-177.
- [11] MA G W, AN X M. Numerical simulation of blasting-induced rock fractures[J]. International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences, 2008, 45(6): 966-975.
- [12] 毕程程,王志亮,石高扬,等. 初始体积分数法在爆炸模拟中的应用[J]. 工程爆破, 2017, 23(4): 26-33, 38.
- [13] 李洪超. 岩石 RHT 模型理论及主要参数确定方法研究[D]. 北京:中国矿业大学, 2016.
- [14] WANG H, WANG Z, WANG J, et al. Effect of confining pressure on damage accumulation of rock under repeated blast loading[J]. International Journal of Impact Engineering, 2021, 156: 103961.
- [15] 冷振东,卢文波,陈明,等. 岩石钻孔爆破粉碎区计算模型的改进[J]. 爆炸与冲击, 2015, 35(1): 101-107.
- [16] 叶志伟,陈明,李桐,等. 小不耦合系数装药爆破孔壁压力峰值计算方法[J]. 爆炸与冲击, 2021, 41(6): 119-129.
- [17] CHEN M, YE Z, LU W, et al. An improved method for calculating the peak explosion pressure on the borehole wall in decoupling charge blasting[J]. International Journal of Impact Engineering, 2020, 146: 103695.
- [18] 徐颖,孟益平,程玉生. 装药不耦合系数对爆破裂纹控制的试验研究[J]. 岩石力学与工程学报, 2002, 21(12): 1843-1847.
- [19] 胡英国,卢文波,陈明,等. 岩体爆破近区临界损伤质点峰值震动速度的确定[J]. 爆炸与冲击, 2015, 35(4): 547-554.
- [20] BAUER A, CALDER P N. Open pit and blast seminar: 63221[R]. Ontario: Queens University, 1978.

(责任编辑 吴亮)

(上接第 1532 页)

- [11] 李彩金. 基于构效关系的猴头菌大分子量多糖的改性研究[D]. 上海:上海师范大学, 2017.
- [12] 康雨芳. 胶红酵母胞外多糖结构、活性及降解产物的研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2018.
- [13] XIE J H, WANG Z J, SHEN M Y, et al. Sulfated modification, characterization and antioxidant activities of polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 53: 7-15.
- [14] JIANG Y, SHANG Z, LV X, et al. Structure elucidation and antitumor activity of a water soluble polysaccharide from *Hemicentrotus pulcherrimus* [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 292: 119718.
- [15] 尹艳,宋冠华,李周玉,等. 水溶性大豆多糖溶解性的研究[J]. 惠州学院学报(自然科学版), 2009, 29(3): 13-16.
- [16] XIE S Z, YANG G, JIANG X M, et al. *Polygonatum cyrtoneuma* Hua polysaccharide promotes GLP-1 secretion from enteroendocrine L-Cells through sweet taste receptor-mediated cAMP signaling[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(25): 6864-6872.
- [17] CHEN X, ZHANG R, LI Y, et al. Degradation of polysaccharides from *Sargassum fusi forme* using UV/H₂O₂ and its effects on structural characteristics[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 230: 115647.
- [18] LV Y, LIU Z, DUAN X, et al. Immunoenhancement and antioxidative damage effects of *Polygonum cillinerve* polysaccharide on RAW264. 7 cells[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2022, 74(3): 435-445.
- [19] LI X Y, KUANG D D, GUO A J, et al. Inhibition of Ca²⁺-calpain signaling is a new mechanism using *Laminaria japonica* polysaccharide to prevent macrophage foam cell formation and atherosclerosis[J]. Food & Function, 2023, 14(9): 4036-4048.
- [20] LI X Y, WANG Y J, CHEN S, et al. *Laminaria japonica* polysaccharide suppresses atherosclerosis via regulating autophagy-mediated macrophage polarization[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(12): 3633-3643.
- [21] MENG Y, LYU F, XU X, et al. Recent advances in chain conformation and bioactivities of triple-helix polysaccharides[J]. Biomacromolecules, 2020, 21(5): 1653-1677.
- [22] WANG Z, CHEN X, LIU J, et al. Inclisiran inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced foam cell formation in Raw264. 7 macrophages via activating the PPAR γ pathway[J]. Autoimmunity, 2022, 55(4): 223-232.

(责任编辑 闫杏丽)