

岩藻多糖及其降解物在小鼠肠道中的代谢 及对肠道代谢产物的影响

张玉姣¹, 孙晓娜¹, 田伟功¹, 王松涛², 沈才洪², 艾春青¹, 宋爽^{1*}

(1. 大连工业大学食品学院, 辽宁大连 116034)

(2. 泸州品创科技有限公司国家固态酿造工程技术研究中心, 四川泸州 646000)

摘要: 该研究比较了岩藻多糖(FUC)及其弱酸降解产物(AFUC)与氧化降解产物(OFUC)在BALB/c小鼠肠道内代谢情况及其对肠道代谢物的影响。通过高效液相色谱-二级质谱(HPLC-MS/MS)检测FUC、AFUC和OFUC随粪便排出体外的排出率分别为48.85%、40.78%和40.99%,发现岩藻多糖相对分子质量对排出率影响不显著,个体间差异较大。进一步对肠道细菌与FUC、AFUC和OFUC的在肠道内的代谢率做多元线性回归分析发现, Muribaculaceae 菌科微生物是AFUC在肠道中代谢的主要参与菌, FUC和OFUC在肠道中代谢主要与毛螺菌科(Lachnospiraceae)、Muribaculaceae 菌科和拟杆菌科(Bacteroidaceae)等相关。FUC、AFUC和OFUC在宿主体内通过影响肠道菌群代谢,共同影响了D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢(D-Glutamine and D-Glutamate Metabolism)途径,降解产物OFUC和AFUC均显著影响生物素代谢(Biotin Metabolism)的代谢途径,说明岩藻多糖及其降解产物对肠道菌群相互作用的效果存在差异。本研究揭示了岩藻多糖通过肠道菌群发挥功效的机制,为岩藻多糖及其降解产物在食品领域的进一步应用提供数据支持。

关键词: 岩藻多糖; 降解产物; 肠道菌群; 代谢组学

文章编号: 1673-9078(2022)12-26-33

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.12.0588

Metabolism of Fucoidan and Its Degradation Products in the Murine Gut and Their Effects on Gut Metabolites

ZHANG Yujiao¹, SUN Xiaona¹, TIAN Weigong¹, WANG Songtao², SHEN Caihong², AI Chunqing¹, SONG Shuang^{1*}

(1.School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, China) (2.Luzhou Pinchuang Technology Company Limited and National Engineering Research Center of Solid-State Brewing, Luzhou 646000, China)

Abstract: The degrees to which the polysaccharide fucoidan (FUC) and its acid (AFUC) and oxidative degradation products (OFUC) are metabolized in the gut of BALB/c mice were investigated, and their effects on the gut metabolites were compared. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement revealed the proportions of FUC, AFUC, and OFUC excreted in the mouse feces to be 48.85%, 40.78%, and 40.99%, respectively. Although the relative molecular mass of FUC did not have a significant effect on its excretion rate, there were large inter-individual differences. Furthermore, multiple linear regression analysis of the rates of FUC, AFUC, and OFUC metabolism in the gut revealed that AFUC was metabolized mainly by the *Muribaculaceae*, whereas FUC and OFUC were mainly utilized by the *Lachnospiraceae*, *Muribaculaceae*, and *Bacteroidaceae*. FUC, AFUC, and OFUC affected the metabolic activities of the gut microflora and jointly affected the D-glutamine and D-glutamate metabolic pathways in the host. OFUC and AFUC both significantly affected the pathway for biotin metabolism, indicating significant differences in gut microbiota interactions between FUC and its degradation products. This study

引文格式:

张玉姣,孙晓娜,田伟功,等.岩藻多糖及其降解物在小鼠肠道中的代谢及对肠道代谢产物的影响[J].现代食品科技,2022,38(12):26-33

ZHANG Yujiao, SUN Xiaona, TIAN Weigong, et al. Metabolism of fucoidan and its degradation products in the murine gut and their effects on gut metabolites [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(12): 26-33

收稿日期: 2022-05-10

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2019YFD0902005)

作者简介: 张玉姣(1997-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学与工程, E-mail: 437377739@qq.com

通讯作者: 宋爽(1981-),女,博士,教授,研究方向:食品科学与工程, E-mail: songs1008@163.com

reveals the mechanism by which FUC carries out its effects through the gut microbiota and provides data supporting further application of this polysaccharide and its degradation products in the food industry.

Key words: fucoidan; degradation products; gut microbiota; metabolomics

岩藻多糖是一种含有大量岩藻糖和硫酸基团的硫酸多糖,主要来自于褐藻^[1]。岩藻多糖具有多种生物活性如抗凝血^[2]、抗病毒^[3]、抗氧化^[4]、抗肿瘤和免疫活性^[5]等。然而,岩藻多糖作为一种天然的高分子化合物,通常无法被人体的消化系统降解^[6],仅少量可被吸收入血^[7],绝大部分是以原型到达宿主肠腔内影响肠道微生物及其代谢产物^[8],这可能是岩藻多糖发挥健康功效的最重要途径^[9]。但是岩藻多糖在体内被肠道菌群代谢情况及其对肠道代谢物的影响仍不清楚,这阻碍了对岩藻多糖功效机制的了解。

肠道微生物群产生的代谢物对宿主的生理状态有重要影响^[10,11],因此阐明岩藻多糖对肠道代谢的影响对揭示岩藻多糖功效机制具有重要意义。非靶向代谢组学采用液相色谱-质谱检测(LC-MS)等技术,无偏向性的检测生物体内受到刺激前后所有小分子代谢物的动态变化,并通过生信分析筛选差异代谢物,对差异代谢物进行通路分析,揭示其变化的生理机制^[12-14]。因此,在本研究中,非靶向代谢组学被应用于检测岩藻多糖及其降解产物对肠道代谢物的调控作用,以探究岩藻多糖及其降解产物的作用机制。

本研究通过分析岩藻多糖(FUC)、岩藻多糖弱酸降解产物(AFUC)和氧化降解产物(OFUC)在小鼠肠道代谢情况、主要参与岩藻多糖及其降解产物在肠道内代谢的肠道微生物以及其对肠道代谢物的影响,揭示岩藻多糖通过肠道菌群发挥功效的机制及结构因素(硫酸基和相对分子质量)对作用效果的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

岩藻多糖(FUC),青岛明月海琳岩藻多糖生物科技有限公司提供,岩藻多糖弱酸降解产物(AFUC)和氧化降解产物(OFUC)由实验室前期制得,FUC、AFUC和OFUC的相对分子质量分别为188.6、7.4、19.6 ku,硫酸基含量分别为28.3%±4.4%、3.1%±0.7%、28.2%±3.1%。1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;氨水(分析纯),天津石英钟厂;乙酸(分析纯),大茂化学试剂有限公司;氯仿(分析纯),武汉化学试剂厂;乙腈(色谱纯),甲醇(色谱纯),Spectrum公司;甲醇(色谱纯);1-Methylnicotinamide-d₃ Iodide(标准品),Acetyl-L

-carnitine-(N-methyl-d₃)(标准品),DL-glutamic acid(标准品),剑桥同位素;12-[(Cyclohexylcarbonyl)amino]dodecanoic acid(标准品),Sigma公司;岩藻糖(标准品),Fluka公司;乳糖(分析纯),天津光复精密化工研究所。AB SCIEX 4000 QTRAP 质谱仪,美国 AB SCIEX;LXQ 液相色谱-线性离子阱质谱仪,赛默飞世尔科技有限公司;CF16RX II 高速冷冻离心机,日本日立公司;XW-80A 漩涡混合器,上海精科有限公司;干燥箱,上海-恒科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物实验

动物实验研究方法:本研究方案和实验均得到动物实验伦理委员会的批准(批准方案ID SYXK2017-0005)。10只BALB/c雄性小鼠(SPF级4周龄),购买于辽宁长生生物技术股份有限公司。小鼠生活环境温度维持在(23±2)℃,相对湿度为55%±5%,明/暗循环12h的条件下,自由进食和饮水。小鼠饲养于洁净的标准实验动物饲养笼适应两周。实验前,称量实验小鼠质量,收集实验小鼠的新鲜粪便记为空白组(BLK),冻存于-80℃冰箱中。对小鼠灌胃200 μL FUC(每天300 mg/kg),并将小鼠放进代谢笼中,收集24 h粪便。一天后,再灌胃200 μL AFUC(每天300 mg/kg),并收集24 h粪便。间隔24 h以后,再次灌胃200 μL OFUC(每天300 mg/kg),收集24 h粪便,将粪便样品置于-80℃冰箱冻存。

1.2.2 岩藻多糖及其降解产物在粪便中的含量测定

1.2.2.1 混合标准工作液的配制

称取岩藻多糖FUC或其降解产物(AFUC,OFUC)10 mg,用水溶解并定容至10 mL,制得岩藻多糖标准储备液。分别移取适量岩藻多糖标准储备液,用水逐级稀释成质量浓度为1000、500、200、100、50、20、10 μg/mL的混合标准工作液,现用现配。

1.2.2.2 标准溶液的水解

量取0.5 mL上述标准工作液于5 mL具螺口和胶垫片的水解管中,再加入0.5 mL的4 mol/L的三氟乙酸溶液,密封,放入恒温干燥箱中,设定温度120℃,水解3 h,取出水解管,室温冷却。氮吹除去溶剂,再加入0.5 mL甲醇,氮吹至完全干燥以除去残余的三氟乙酸。

1.2.2.3 样品前处理与水解

准确称取冻干后的粪便样品 0.1 g, 加入 2 mL 纯净水溶解, 离心 (8 000 r/min, 10 min, 4 °C), 取 1 mL 上清溶液加入 4 mL 乙醇, 在 4 °C 条件下静置 4 h 以上, 离心 (4 000 r/min, 10 min, 4 °C), 得到沉淀样品。

向离心管中加入 0.5 mL 2 mol/L 的三氟乙酸, 旋涡混匀, 再转移至 5 mL 具螺口和胶垫片的水解管中, 该操作重复 2 次, 以保证离心管中沉淀全部转移至水解管中。将水解管密封, 放入恒温干燥箱中, 设定温度 120 °C, 水解 3 h。取出水解管, 室温冷却。氮吹除去溶剂, 再加入 0.5 mL 甲醇, 氮吹至完全干燥以除去残余三氟乙酸。

1.2.2.4 1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (PMP) 衍生化

向样品水解物或标准品水解物中加入 400 μ L 的氨水, 使水解管中的残渣充分溶解, 然后加入 100 μ L 10 μ g/mL 乳糖内标工作液, 再加入 400 μ L 的 PMP 甲醇溶液 (0.5 mol/L), 混匀, 密封后在 70 °C 水浴条件下加热反应 30 min, 氮吹除去溶剂。再加入 0.5 mL 甲醇, 氮吹除去溶剂, 重复 2 次, 以除去氨水。然后加入 1% 的乙酸溶液 1 mL, 再加入 1 mL 三氯甲烷, 充分涡旋混匀, 静置后去除有机相。重复该操作三次, 以保证萃取效果。将萃取后水相溶液过 0.22 μ m 有机系滤膜, 得到待测样品供液相色谱-质谱/质谱检测。衍生后的试样应在 48 h 内完成检测, 否则需冻存 (-18 °C, 6 个月内)。

液相色谱-质谱/质谱检测条件:

色谱柱: Thermo scientific Hyperisil Gold (150 mm \times 2.1 mm, 5 μ m); 进样量: 2 μ L; 柱温: 30 °C; 流动相: 20 mmol/L 乙酸铵-乙腈 (85:15, V/V), 等度洗脱; 流速: 0.5 mL/min。离子化模式: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式; 喷雾电压: 5 500 V; 辅助加热气温度: 600 °C; 扫描模式: 多重反应监测 (MRM) 模式。

1.2.3 小鼠的肠道微生物群分析

16S 扩增子测序采用 SDS 方法提取小鼠粪便菌群基因组的 DNA, 然后通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度。对基因组 DNA 中的 16S rRNA 基因 V3-4 区扩增, 引物选用 806R 和 515F。根据 TruSeq® DNA 无 PCR 样品制备试剂盒 (Illumina, 美国) 的说明生成测序文库, 并在 Qubit® 2.0 荧光计 (Thermo Scientific) 上进行了评估。动物粪便样品测序由诺禾致源生物信息科技有限公司完成。小鼠肠道菌群主成分分析、花瓣图、聚类分析、菌群的相对丰度和热图等可在网站上操作得出 (<https://magic.novogene.com>)。

根据 Caporaso 等^[15]的分析方法, 采用 QIIME V1.7.0 对 Alpha 多样性、Rarefaction 曲线进行分析, 使

用 R 软件 V3.0.3 显示计算得出的样本中的辛普森指数和香农指数等。测序深度指数用 Good's coverage 来展现, 菌群丰富度采用 Chao1 指数和 Ace 来评估确定, 并采用辛普森指数和香农指数来分析菌群多样性^[15]。Venn 图采用 R 软件包 V3.0.3 进行构建, 用来比较分析不同组间肠道菌群里 OTUs 的组成差异^[16]。主坐标分析 PCoA 和 β 多样性使用 QIIME 软件 V1.7.0 进行计算, 使用 R 软件 V2.15.3 中的 Stat、Ggplot2 和 WGCNA 软件包进行展示。在 PCoA 分析基础上进一步做聚类分析, 采用 R 软件 V2.15.3 中的 Ggplot2 和 FactoMineR 程序包来降低原始变量的维度。Wilcoxon 秩和检验用来分析各个组之间在门和属上存在的统计差异。对每个样本中相对丰度前 35 的属, 采用 R 软件包 V2.15.3 制成热图。采用线性判别分析 (LDA) 和 LEfSe (LDA Effect Size) 分析来确定各个组之间存在的统计差异^[16]。

1.2.4 非靶向代谢组学测定

1.2.4.1 样品处理

称取粪便样品 100 mg, 加入 500 μ L 乙腈-甲醇-水 (2:2:1, V/V/V) 溶液, 再加入 10 μ L 内标 (20 ng/mL 12-[(cyclohexylcarbamoyl) amino] dodecanoic acid, 210 ng/mL 1-methylnicotinamide-*d*₃ iodide, 51 ng/mL acetyl-L-carnitine-(N-methyl-*d*₃) 和 3 500 ng/mL DL-glutamic acid (2,4,4-*d*₃, 98%), 放在冰浴中涡旋振荡 30 s 直至形成完全分散的匀浆, 将其放置于 -20 °C 冰箱保持 30 min。在 4 °C 的温度条件下, 12 000 r/min 离心 12 min。取上清液置于干净离心管中, 低温保存。再于 4 °C 的温度条件下, 12 000 r/min 离心 5 min 后留取上清, 并用 0.22 μ m 的有机滤膜进行过滤。取上清液到进样瓶中用于代谢分析。

1.2.4.2 AB TripleTOF 5600 液质测定

(1) 色谱条件

色谱柱: Waters Xselect @HSS T3 (2.5 μ m, 100 \times 2.1 mm); 柱温 30 °C; 流速 0.4 mL/min; 正离子模式下使用的流动相: A 相采用水-乙腈 (95:5, V/V) 并向其中添加体积分数 0.1% 甲酸, B 相采用水-乙腈 (5:95, V/V) 并向其中添加体积分数 0.1% 甲酸; 负离子模式使用的流动相为 C 相: 将 5 mmol 的 CH₃COONH₄ 溶解在 1 L 的纯净水中, 并加入 5% 的乙腈; D 相: 5 mmol 的 CH₃COONH₄ 溶解在 1 L 的 95% 乙腈中。

(2) 质谱条件

AB TripleTOF 5600 质谱仪使用离子源气体 1 (GS1): 55 arb; 离子源气体 2 (GS2): 55 arb; 幕气 (CUR): 35 arb; 温度 (TEM): 550 °C; 离子喷雾电压浮动 (ISVF): 5 500 V 为正离子模式, -4 500 V 为负离子模式。为了确保系统的准确性, 所有样品各取 10 μ L

混合在一起得到 QC，每 8 个检测样品之间增加一个 QC 样品，通过 QC 样品对系统一致性进行验证。

1.2.4.3 非靶向代谢组学数据分析

将采集出来的原始数据转换成“abf”格式，转换的文件导入到 MSDIAL 中进行原始峰的提取，去卷积，峰对齐，峰识别，再将数据导出，然后用 SIMCA 14.1 软件来进行主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘-判别分析（OPLS-DA），再利用 MSDIAL 中的资料库来鉴别 VIP 值大于 1 的代谢产物。

1.3 统计学分析

多元线性回归分析用于研究岩藻多糖及其降解产物的利用率与细菌 OTUs 之间的关系。至少一个样本中丰度大于 1% 的细菌 OUTs 才会被纳入到回归模型中。采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析，GraphPad Prism 8.3 进行作图。所有数据均表示为平均值±标准误差。两组或两个样本间的比较使用 Student's t-test 检验。检验三组之间的差异使用单因素方差分析（ANOVA）中 Duncan's range 检验。 $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 肠道菌群对岩藻多糖及其降解物的利用作用分析

岩藻多糖（FUC）主要由硫酸化的(1-3)- α -L-岩藻糖为重复单元构成，结构如图 1 所示。氧化降解通常不会破坏硫酸基团^[17]，所以氧化降解产物（OFUC）与 FUC 重复结构单元相同，只是分子量降低。而酸降解会使硫酸基团严重脱落，生成脱硫酸化的降解产物^[18]

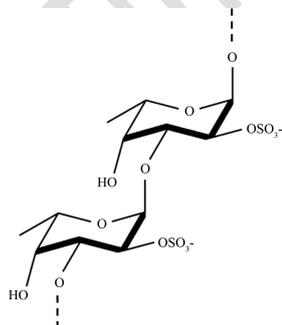


图 1 岩藻多糖结构^[19]

Fig.1 Structure of fucoidan

对实验小鼠定量灌胃 FUC、AFUC 和 OFUC，收集 0~24 h 内粪便，通过 HPLC-MS/MS 定量分析 FUC、AFUC 和 OFUC 的排出率。结果表明 FUC 的排出率为 48.85%±23.43%，OFUC 的排出率为 40.99%±13.86%，AFUC 的排出率为 40.78%±19.66%，但是 AFUC、OFUC

与 FUC 的排出率没有显著差异，这可能是由于小鼠个体之间存在较大的代谢差异。该结果说明相对分子量对 FUC、AFUC 和 OFUC 在肠道内代谢情况无显著影响。

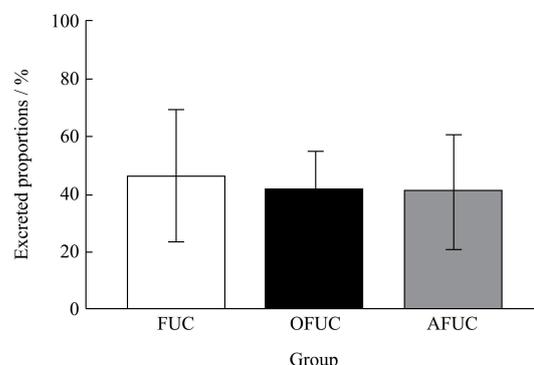


图 2 FUC、AFUC 和 OFUC 24 h 内随粪便排出率

Fig.2 The excreted proportions of FUC, AFUC and OFUC through feces within 24 h

2.2 利用岩藻多糖及其降解物的关键肠道微生物分析

为了分析利用岩藻多糖及其降解物的关键肠道微生物，采用 16S rRNA 菌群测序分析小鼠肠道菌群，并分析 FUC、AFUC 和 OFUC 的利用率与肠道菌群之间的关系。首先分析了肠道菌群在门水平上的相对丰度，可以看出不同小鼠的肠道菌群组成存在着很大差异。如图 3 拟杆菌门和厚壁菌门占总体细菌的 80% 以上，是最具优势的肠道菌门。

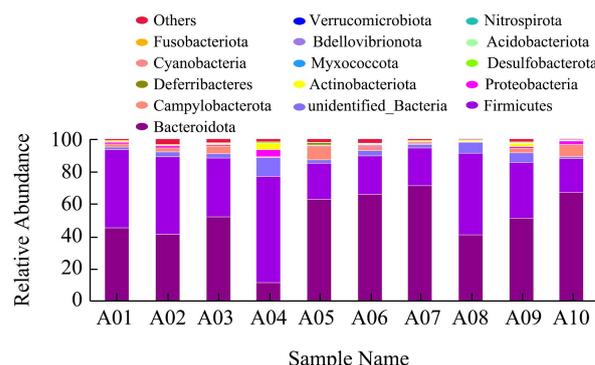


图 3 不同大鼠的肠道菌群在在门水平的相对丰度图

Fig.3 The intestinal flora of different mice at the relative abundance at the phylum level

注：A01~A10 代表不同小鼠个体。

为了更进一步分析肠道菌群与岩藻多糖及其降解产物的相互作用关系，找出能够利用岩藻多糖及其降解产物的关键细菌，我们对肠道细菌与 FUC、AFUC 和 OFUC 的肠道代谢率做多元线性回归分析，得到与 FUC、AFUC 和 OFUC 的在肠道内的代谢率呈正向相

相关的肠道细菌如表 1 所示。FUC 在肠道中的代谢与 *Bacteroides* 菌属, *Muribaculaceae* 菌科的未知菌属以及 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 菌属呈正向相关; AFUC 在肠道中的代谢与 *Muribaculaceae* 菌科呈正向相关; OFUC 在肠道中的代谢与 *Muribaculaceae* 菌科、*Lachnospiraceae* 菌科和 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 菌属呈正向相关。其中, FUC、AFUC 和 OFUC 在肠道中的代谢均与 *Muribaculaceae* 菌科呈正向相关。据报道 *Muribaculaceae* 菌科确实存在与糖类降解有关的酶, 分析结果进一步证实了 *Muribaculaceae* 菌科在糖类消化吸收方面的重要作用^[20,21]。然而, FUC 和 OFUC 在肠道中的代谢均与 *Lachnospiraceae*

NK4A136_group 菌属呈正向相关。 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 菌属虽然没有降解多糖的报道, 但是有研究表明给高脂模型小鼠灌胃硫酸化多糖以后, 会增加 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 菌属的丰度^[22], 因此推测 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* 菌属同样参与 FUC 和 OFUC 在肠道内的消化降解过程。从 FUC、AFUC 和 OFUC 的结构差异来看, 硫酸基团含量高的复杂多糖在肠道内的代谢需要更复杂的菌群合作代谢, 且 *Muribaculaceae* 菌科, *Lachnospiraceae* 菌科和 *Bacteroidaceae* 拟杆菌科等是对 FUC、AFUC 和 OFUC 在肠道内代谢的关键菌群。

表 1 与 FUC、AFUC 和 OFUC 在肠道内利用存在相关性的肠道细菌

Table 1 Gut microbiota correlated with FUC, AFUC and OFUC utilization <i>in vivo</i>			
	Variable	Nonstandard coefficient	Family/Genus
FUC	OTU_67	83.691	<i>Bacteroides</i>
	OTU_23	6.104	<i>Muribaculaceae</i>
	OTU_51	3.593	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>
AFUC	OTU_23	19.753	<i>Muribaculaceae</i>
OFUC	OTU_181	38.671	<i>Muribaculaceae</i>
	OTU_41	13.525	<i>Lachnospiraceae</i>
	OTU_793	1.534	<i>Lachnospiraceae_NK4A136_group</i>

2.3 岩藻多糖及其降解物对肠道代谢产物的影响

为了研究 AFUC、OFUC 和 FUC 对肠道代谢产生的影响, 对小鼠粪便进行了基于 LC-MS 的非靶向代谢组学分析。从图 4 中可以看出, 与空白组 (BLK) 相比, AFUC、OFUC 和 FUC 均对肠道代谢产生了显著的影响, 而且三者之间没有明显分离, 但有一定的差异性。

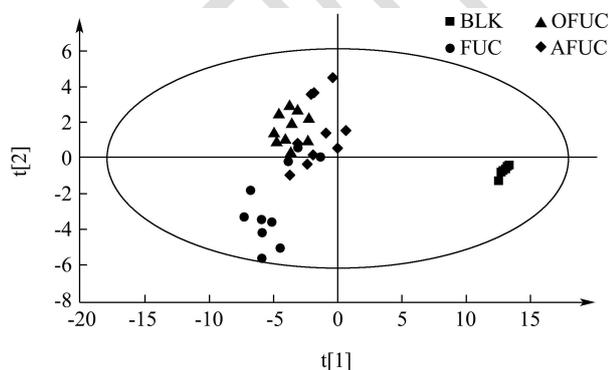


图 4 粪便中代谢物的 PLS-DA

Fig.4 PCA analysis of the feces metabolites

根据 OPLS-DA 模型的 VIP (Variable Importance in the Projection) 值对变量进行筛选, 通过比较 VIP 的值, 来确定不同离子模式下 FUC 组与空白组之间 VIP 大于 1 的差异代谢物, 并通过 t-test 检验筛选出 $p < 0.05$ 的

差异性代谢产物, 初步鉴定出 92 个差异性代谢物。对筛选出的差异代谢物进行代谢通路研究 (Pathway Analysis), 以 $-\log_{10}(p)$ 和 *impact* 分别为横坐标和纵坐标, 得到分析结果如图 5 所示。Y 轴基于 p 值 (来自通路富集分析), X 轴基于 *pathway impact value* (来自通路拓扑分析)。FUC 组与空白组相比主要影响了泛酸和辅酶 A 生物合成 (Pantothenate and CoA Biosynthesis)、氨酰-tRNA 合成 (Aminoacyl-tRNA Biosynthesis)、苯丙氨酸代谢 (Phenylalanine Metabolism)、精氨酸生物合成 (Arginine Biosynthesis)、烟酸和烟酰胺代谢 (Nicotinate and Nicotinamide Metabolism)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 (Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan Biosynthesis)、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (D-Glutamine and D-Glutamate Metabolism)、胺基代丙酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 (Alanine, Aspartate and Glutamate Metabolism) 和维生素 B6 代谢 (Vitamin B6 Metabolism) 等 27 个代谢通路。以上代谢通路主要与机体内氨基酸代谢有关, 有研究表明部分氨基酸水平的变化会影响机体的血脂水平^[24], 苯丙氨酸能够被苯丙氨酸羟化酶催化为酪氨酸, 酪氨酸水平的升高进一步对机体的糖脂代谢产生影响^[30], 这可能是岩藻多糖发挥降血脂^[32] 作用的重要原因之一。除此之外, FUC 还显著调节了

泛酸和辅酶 A (CoA) 生物合成途径。CoA 是许多代谢反应中必不可少的辅助因子, 例如脂肪酸的合成和氧化、复杂脂质的合成和柠檬酸循环中丙酮酸的氧化等, CoA 来源于泛酸 (维生素 B5), 泛酸可以从饮食中和肠道细菌中获得^[31]。张彤彤等^[33]研究发现海参多糖可以影响肠道内泛酸和辅酶 A (CoA) 生物合成途径, 增加不饱和脂肪酸排泄从而影响脂质代谢。本研究说明 FUC 可能被肠道细菌代谢产生代谢产物激活氨基酸代谢、以及泛酸和辅酶 A (CoA) 生物合成等多条代谢途径发挥降脂抗肥胖等生理作用。

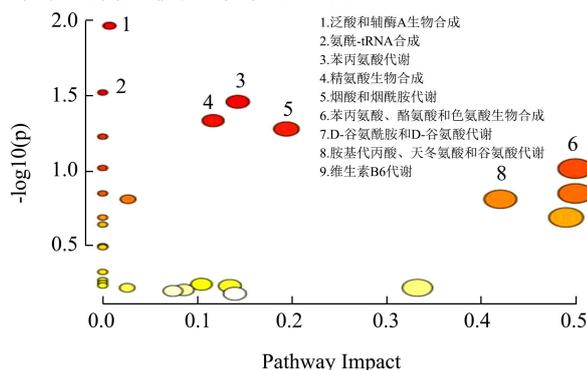


图5 FUC 代谢通路分析图

Fig.5 Pathway analysis of FUC

OFUC 组筛选得到 83 个差异代谢物, 分析代谢通路结果如图 6 所示。OFUC 主要影响了不饱和脂肪酸的生物合成 (Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids)、生物素合成 (Biotin Metabolism)、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸的生物合成 (Phenylalanine, Tyrosine and Tryptophan Biosynthesis)、氨酰-tRNA 合成 (Aminoacyl-tRNA Biosynthesis)、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (D-Glutamine and D-Glutamate Metabolism)、牛磺酸和低牛磺酸代谢 (Taurine and Hypotaurine Metabolism) 等 28 个代谢通路。OFUC 与 FUC 相比, 除了影响氨基酸代谢途径以外还显著影响了不饱和脂肪酸的合成。肠道内不饱和脂肪酸的合成与多种生理功能相关。有研究表明低分子量麦冬寡糖通过调节肠道中不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢、花四烯酸代谢等代谢途径来缓解糖尿病^[34]; 硫酸化修饰的凉粉草多糖通过影响肠道中不饱和脂肪酸的合成、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成等代谢途径来发挥肝保护作用^[35]。本研究发现 OFUC 经体内消化可以调节机体肠道中的脂肪酸代谢和氨基酸代谢等代谢途径, 这为 OFUC 发挥多种生理功能提供了数据支持。

AFUC 组筛选出 76 个差异代谢物, 分析代谢通路结果如图 7 所示。AFUC 主要影响了不饱和脂肪酸的生物合成 (Biosynthesis of Unsaturated Fatty Acids)、谷

胱甘肽代谢 (Glutathione Metabolism)、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (D-Glutamine and D-Glutamate Metabolism)、氮代谢 (Nitrogen Metabolism)、二羧酸代谢 (Glyoxylate and Dicarboxylate Metabolism)、维生素 B6 代谢 (Vitamin B6 Metabolism)、生物素合成 (Biotin Metabolism) 等 24 个代谢通路。结果发现 AFUC 与 FUC 相比, 还显著影响不饱和脂肪酸的合成, 与 OFUC 的作用效果相似, 说明 AFUC 与 OFUC 影响体内区别于 FUC 的多种代谢通路可能与分子量有关, 低分子量的 AFUC 与 OFUC 更容易被肠道微生物代谢产生代谢产物激活多种代谢通路从而发挥益生功效。

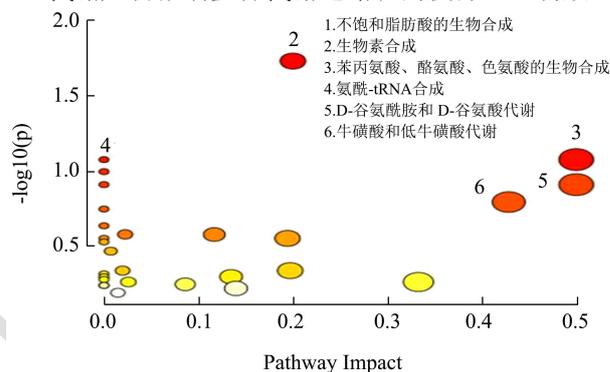


图6 OFUC 代谢通路分析图

Fig.6 Pathway analysis of OFUC

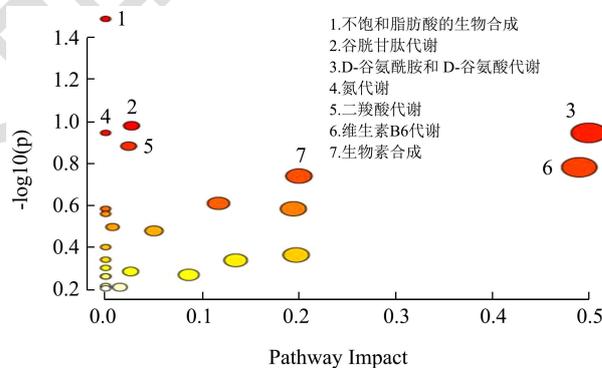


图7 AFUC 代谢通路分析图

Fig.7 Pathway analysis of AFUC

通过比较 FUC 与 AFUC、OFUC 的代谢差异, 发现 FUC、AFUC 和 OFUC 共同影响了 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢 (D-Glutamine and D-Glutamate Metabolism) 途径。谷氨酸代谢在蛋白质和核酸生物合成的调节中起重要作用。谷氨酰胺是一种非必需氨基酸, 作为三羧酸循环的底物参与中枢代谢过程^[23]。Petrus 等^[24]研究发现, 谷氨酰胺可以减少大鼠脂肪组织的炎症, 并与脂肪量成反比。Hu 等^[25]研究发现, 饮食补充植物乳杆菌 FZU3013 发酵海带能影响 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢途径来改善高脂血症大鼠的血脂紊乱。因此, 这可能是 FUC 与 AFUC、OFUC 发挥降血脂的功效的重要代谢途径。降解后的 OFUC、AFUC 与

FUC 相比,显著调控了生物素代谢(Biotin Metabolism)的代谢通路。有研究表明,生物素(维生素H)是一种含硫的酶辅因子^[26],是生命三个领域所必需的微量营养素,它与中枢代谢有关,如羧化、脱羧化和反式羧化反应等^[27],且由大多数细菌合成^[28],在人体内,生物素可以被大肠杆菌以 pimeloyl-ACP 为前体开始合成^[29]。因此我们推测降解后的岩藻多糖更容易被肠道微生物利用,产生的代谢产物参与机体代谢途径从而发挥的益生效果。

3 结论

通过对粪便中 FUC、AFUC 和 OFUC 的定量分析,发现相对分子质量对 AFUC、OFUC 与 FUC 在肠道内的代谢无显著影响。通过分析 FUC、AFUC 和 OFUC 与肠道菌群的相互作用关系发现,AFUC 在肠道内的代谢主要与肠道中的 Muribaculaceae 菌科存在相关性;FUC 和 OFUC 在肠道内的代谢主要与肠道中毛螺菌科(Lachnospiraceae), Muribaculaceae 菌科和拟杆菌科(Bacteroidaceae)等存在相关性。FUC、AFUC 和 OFUC 在宿主体内通过影响肠道菌群代谢,共同影响了 D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢(D-Glutamine and D-Glutamate Metabolism)途径,降解产物 OFUC 和 AFUC 均显著影响生物素代谢(Biotin Metabolism)的代谢途径,说明岩藻多糖及其降解产物对肠道菌群相互作用的效果存在差异。本研究为岩藻多糖在体内吸收研究以及岩藻多糖衍生化产品的开发提供数据支持。

参考文献

- [1] Li B, Lu F, Wei X, et al. Fucoïdan: structure and bioactivity [J]. *Molecules*, 2008, 13(8): 1671-1695
- [2] Ushakova N A, Morozevich G E, Ustyuzhanina N E, et al. Anticoagulant activity of fucoidans from brown algae [J]. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2009, 3(1): 77-83
- [3] Song S, Peng H, Wang Q, et al. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2 [J]. *Food & Function*, 2020, 11(9): 7415-7420
- [4] Rocha De Souza M C, Marques C T, Guerra Dore C M, et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2007, 19(2): 153-160
- [5] Vishchuk O S, Ermakova S P, Zvyagintseva T N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity [J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(17): 2769-2776
- [6] 李芳.不同分子量海带岩藻聚糖硫酸酯消化吸收、免疫及抗病毒活性的比较研究[D].青岛:中国海洋大学,2012
- [7] Pozharitskaya O N, Shikov A N, Faustova N M, et al. Pharmacokinetic and tissue distribution of fucoidan from *Fucus vesiculosus* after oral administration to rats [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16(4): 132
- [8] Wang L, Ai C, Wen C, et al. Fucoidan isolated from *Ascophyllum nodosum* alleviates gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in antibiotic-treated mice [J]. *Food & Function*, 2020, 11(6): 5595-5606
- [9] Li M, Li G, Shang Q, et al. *In vitro* fermentation of alginate and its derivatives by human gut microbiota [J]. *Anaerobe*, 2016, 39: 19-25
- [10] Zeng W, Huang K-E, Luo Y, et al. Nontargeted urine metabolomics analysis of the protective and therapeutic effects of citri reticulatae chachiensis pericarpium on high-fat feed-induced hyperlipidemia in rats [J]. *Biomedical Chromatography*, 2020, 34(4): e4795
- [11] Pang H-H, Jiang M-F, Wang Q-H, et al. Metabolic profile of danshen in rats by HPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 2018, 19(3): 227-244
- [12] Kinross J M, Darzi A W, Nicholson J K. Gut microbiome-host interactions in health and disease [J]. *Genome Medicine*, 2011, 3(3): 14
- [13] Reinke S N, Gallart-Ayala H, Gómez C, et al. Metabolomics analysis identifies different metabolotypes of asthma severity [J]. *European Respiratory Journal*, 2017, 49(3): 1601740
- [14] Chen L, Zhou L, Chan E C Y, et al. Characterization of the human tear metabolome by LC-MS/MS [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(10): 4876-4882
- [15] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [16] Ling Z, Liu X, Jia X, et al. Impacts of infection with different toxigenic *Clostridium difficile* strains on faecal microbiota in children [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4(1): 7485
- [17] Hou Y, Wang J, Jin W, et al. Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87(1): 153-159
- [18] Pieleśz A, Biniś W, Paluch J. Mild acid hydrolysis of fucoidan: characterization by electrophoresis and FT-Raman spectroscopy [J]. *Carbohydrate Research*, 2011, 346(13):

- 1937-1944
- [19] 艾正文,桂敏,于鹏,等.岩藻多糖结构对其功能的影响研究进展[J].食品工业科技,2019,40(9):346-350,356
- [20] Dong J, Liang Q, Niu Y, et al. Effects of *Nigella sativa* seed polysaccharides on type 2 diabetic mice and gut microbiota [J]. International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions, 2020, 159(15): 725-738
- [21] Lagkouvardos I, Lesker T R, Hitch T, et al. Sequence and cultivation study of *Muribaculaceae* reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 1-15
- [22] Shiming, Huang, Daorui, et al. A sulfated polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* regulates cholesterol and bile acid metabolism in high-fat diet mice [J]. Food & Function, 2019, 10(6): 3224-3236
- [23] 王书平,刘俊华.谷氨酰胺体内代谢过程及其调控机制[J].畜牧与饲料科学,2009,4:3
- [24] 张黎,牛世伟,李晓波,等.L-谷氨酰胺治疗大鼠非酒精性脂肪肝[J].基础医学与临床,2015,35(5):642-647
- [25] Zhang Q, Fan X Y, Cao Y J, et al. The beneficial effects of *Lactobacillus brevis* FZU0713-fermented *Laminaria japonica* on lipid metabolism and intestinal microbiota in hyperlipidemic rats fed with a high-fat diet [J]. Food & Function, 2021, 12(16): 7145-7160
- [26] Tang Q, Li X, Zou T, et al. *Mycobacterium smegmatis* BioQ defines a new regulatory network for biotin metabolism [J]. Molecular Microbiology, 2015, 94(5): 1006-1023
- [27] Riveron-Negrete L, Fernandez-Mejia C J M R I M C. Pharmacological effects of biotin in animals [J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2017, 17(6): 529-540
- [28] Hu Z, Cronan J E J P O T N A O S. The primary step of biotin synthesis in mycobacteria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(38): 23794-23801
- [29] Xudong, Hang, Qi, et al. Functional replacement of the BioC and BioH Proteins of *Escherichia coli* biotin precursor biosynthesis by *ehrllichia chaffeensis* novel proteins [J]. Current Microbiology, 2019, 76: 626-636
- [30] 张洁,孙慧娟,严小军,等.藜香对营养性肥胖大鼠降脂的作用及其代谢组学研究[J].世界科学技术-中医药现代化,2019, 21(10):2081-2087
- [31] Lorraine E Dansie, Stacy Reeves, Karen Miller, et al. Physiological roles of the pantothenate kinases [J]. Biochem Soc Trans, 2014; 42(4): 1033-1036
- [32] D Ren, Wang Q, Yang Y, et al. Hypolipidemic effects of fucoidan fractions from *Saccharina sculpera* (Laminariales, Phaeophyceae) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 140: 188-195
- [33] 张彤彤.海参多糖的测定方法优化及其体内代谢研究[D].大连:大连工业大学,2021
- [34] 方佳.基于代谢组学和肠道菌群分析探讨麦冬寡糖抗2型糖尿病的作用机制[D].广州:广州中医药大学,2021
- [35] 洪玉珍.基于肠道菌群及代谢组学探究硫酸化凉粉草多糖对环磷酸胺所致小鼠肝脏损伤的保护作用[D].南昌:南昌大学,2021