

岩藻低聚糖的酶法制备及其降尿酸效果

高鑫¹, 肖爱璇¹, 程凤至¹, 王立平¹, 朱昱兴¹, 王莹^{1,2*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109) (2. 青岛特种食品研究院, 山东青岛 266109)

摘要: 该文研究了岩藻低聚糖的最佳酶解条件及对高尿酸血症小鼠的降尿酸效果。采用岩藻多糖酶(专利授权号 ZL20121055581.6) 降解岩藻多糖获得岩藻低聚糖, 以黄嘌呤氧化酶抑制率为指标探究其最佳酶解条件, 并用高尿酸血症小鼠模型探究其降尿酸效果。研究表明, 最佳酶解温度为 30 °C, 最佳酶解时间为 1.5 h, 最佳酶添加量为 2 000 U/g, 最佳多糖质量浓度为 10 mg/mL; 酶解后, 重均分子量由 7.873×10^5 u 降至 8.508×10^3 u; 酶解产物用超滤膜进行分级后, 小于 5 ku 的岩藻低聚糖对黄嘌呤氧化酶的抑制作用最强, 抑制率为 88.65%, 硫酸根含量为 30.93%, 岩藻糖含量为 33.16%, 葡萄糖醛酸含量为 9.29%; 与模型组相比, 小于 5 ku 的岩藻低聚糖能够增加小鼠体重, 缓解建模药物对肝脏、肾脏和脾脏的损伤, 显著降低小鼠血清肌酐、尿素氮的含量, 150 mg/kg、300 mg/kg 样品组小鼠血清尿酸值分别降低 42.10% 和 25.63%, 小鼠黄嘌呤氧化酶活性分别降低 10.04% 和 8.57%, 小鼠腺苷脱氨酶活性分别降低 2.83% 和 5.25%。小于 5 ku 的岩藻低聚糖对高尿酸血症小鼠具有显著的降尿酸效果。该研究为岩藻低聚糖的开发利用奠定了理论基础。

关键词: 岩藻低聚糖; 降尿酸; 高尿酸血症; 黄嘌呤氧化酶

文章编号: 1673-9078(2024)02-221-230

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.2.0086

Enzymatic Preparation and Uric Acid-lowering Effect of Fucoidan Oligosaccharides

GAO Xin¹, XIAO Aixuan¹, CHENG Fengzhi¹, WANG Liping¹, ZHU Yuxing¹, WANG Ying^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2. Qingdao Special Food Research Institute, Qingdao 266109, China)

Abstract: In this study, the optimal conditions for enzymatic hydrolysis of fucoidan oligosaccharides and their uric acid-lowering effect in mice with hyperuricemia were investigated. Fucoidanase (Patent Grant No. ZL20121055581.6) was used to break down fucoidan to obtain fucoidan oligosaccharides, and the optimal enzymatic hydrolysis conditions were explored by taking the inhibition rate of xanthine oxidase as the index. The uric acid-lowering effect was examined by using a hyperuricemia mouse model. The results showed that the optimum enzymatic hydrolysis temperature was 30 °C, the optimum enzymatic digestion time was 1.5 h, the optimum enzyme dosage was 2 000 U/g, and the optimum polysaccharide mass concentration was 10 mg/mL. After the enzymatic hydrolysis, the average molecular weight decreased from 7.873×10^5 u to 8.508×10^3 u; After the enzymatic hydrolysate was fractionated with an ultrafiltration membrane, the fucoidan oligosaccharides less than 5 ku had the strongest inhibitory effect against xanthine oxidase, with the inhibition rate as 88.65%, sulfate content as 30.93%, fucose

引文格式:

高鑫,肖爱璇,程凤至,等.岩藻低聚糖的酶法制备及其降尿酸效果[J].现代食品科技,2024,40(2):221-230.

GAO Xin, XIAO Aixuan, CHENG Fengzhi, et al. Enzymatic preparation and uric acid-lowering effect of fucoidan oligosaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(2): 221-230.

收稿日期: 2023-01-13

基金项目: 山东省青年科学基金资助项目(662/2321613); 横向技术开发项目(20223702030327)

作者简介: 高鑫(1999-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 海藻活性物质的开发, E-mail: gaixin990728@163.com

通讯作者: 王莹(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 海藻活性物质的开发, E-mail: wangying@qau.edu.cn

content as 33.16%, and glucuronic acid content as 9.29%; Compared with the model group, fucoidan oligosaccharides less than 5 ku could increase the body weights of mice and alleviate the damage to the liver, kidney, and spleen caused by the model drug, and significantly reduce the serum creatinine and urea nitrogen levels of mice. In mice, the treatment with 150 mg/kg and 300 mg/kg fucoidan oligosaccharides decreased the serum uric acid value by 42.10% and 25.63%, respectively, the xanthine oxidase activity by 10.04% and 8.57%, respectively, and the adenosine deaminase activity by 2.83% and 5.25%, respectively. The fucoidan oligosaccharides less than 5 ku had a significant uric acid-lowering effect in mice with hyperuricemia. This study has laid a theoretical foundation for the development and utilization of fucoidan oligosaccharides.

Key words: fucoidan oligosaccharides; lowering uric acid; hyperuricemia; xanthine oxidase

高尿酸血症是由于体内尿酸生成增加或排泄减少导致的代谢性疾病^[1], 不仅是引起痛风的重要生化指标, 还与冠心病、糖尿病、慢性肾病、高血压等疾病的发生紧密相关^[2-4]。最近的资料表明^[5], 全国的高尿酸血症患病率高达 13.3%, 患病人数高达 1.77 亿, 患病率呈现逐年增加和年轻化趋势。目前, 治疗高尿酸血症的药物主要有三类, 分别是抑制尿酸生成药物、促进尿酸排泄药物和促进尿酸分解药物, 其中应用最广泛的治疗方式是通过抑制黄嘌呤氧化酶活性, 进而抑制尿酸生成, 其代表药物有别嘌呤醇、非布索坦, 但这些药物普遍存在过敏反应^[6]、肝肾损害^[7]等副作用。因此, 找到一种绿色天然、安全有效的降尿酸成分具有重大意义。

岩藻多糖^[8], 也称褐藻多糖硫酸酯或岩藻多糖硫酸酯, 主要来源于海带、墨角藻等藻类植物, 研究表明, 岩藻多糖具有多种生物活性, 如抗氧化、抗凝血、抗炎、降血糖、降血脂等^[9-11]。近年来, 报道发现岩藻多糖还具有降尿酸的效果。张育等^[12]研究发现, 褐藻多糖硫酸酯可以抑制尿酸诱导的细胞炎症。同时, 褐藻多糖硫酸酯能够下调 *URAT1*, 上调 *OATI*、*OCT2* 的表达, 抑制黄嘌呤氧化酶的活性以降低血清尿酸水平^[13-15]。但是岩藻多糖存在分子量大、吸收性差、难以通过血脑屏障等缺点, 其应用受到了一定限制^[16]。Zhao 等^[17]在体外实验中发现, 低分子量岩藻多糖具有更好的清除超氧自由基和羟自由基的能力。Xue 等^[18]研究显示, 低分子量的岩藻多糖对低密度脂蛋白的氧化能力比粗岩藻多糖更强。任立士等^[19]发现, 岩藻低聚糖对自由基有更好的清除作用。因此, 降低岩藻多糖的分子量, 可以更好的发挥其生物利用率和生物活性。

前期研究发现, 本团队自提的岩藻多糖酶能够降解岩藻多糖。本文以黄嘌呤氧化酶抑制率为指标,

探究了岩藻低聚糖的最佳酶解条件, 并通过建立高尿酸血症小鼠模型, 研究岩藻低聚糖的降尿酸效果, 为岩藻低聚糖的开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

岩藻多糖购自青岛明月海藻集团有限公司; 昆明 SPF 级雄性小鼠 (体质量 25~27 g), 实验动物使用许可证号: SYXK(鲁)2018-0027, 购自青岛大任富城畜牧有限公司; 黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、酵母膏、氧嗪酸钾、别嘌呤醇购自北京索莱宝生物科技有限公司; 尿酸测定试剂盒、肌酐测定试剂盒、尿素氮测定试剂盒、黄嘌呤氧化酶试剂盒、腺苷脱氨酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠购自国药集团化学试剂有限公司; 岩藻多糖酶由青岛农业大学中韩食品生物技术研究中心自提。

1.2 仪器与设备

TECAN 型多功能酶标仪, 帝肯奥地利有限责任公司; WFZUV-2000 型紫外可见分光光度计, 美国贝克曼公司; PHS-3C 型酸碱指示计, 奥豪斯国际贸易有限公司; 超滤膜分离系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; LYOQUEST-55 型冷冻式干燥机, 西班牙泰事达公司; HH-4 型恒温水浴锅, 常州国华电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 岩藻低聚糖的制备

用磷酸盐缓冲液 (pH 值 8) 配置质量浓度为 10 mg/mL 的岩藻多糖溶液, 向其加入岩藻多糖酶 2 000 U/g, 放于 30 °C、120 r/min 的培养箱中酶解

1.5 h, 结束后 100 °C 灭酶 10 min。恢复至室温后 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液冷冻干燥, 得岩藻低聚糖。

岩藻低聚糖依次用 50、30、10 和 5 ku 超滤膜进行分级处理, 得到大于 50、30~50、10~30、5~10 ku 和小于 5 ku 分子量段的岩藻低聚糖, 依次命名为 FF-1、FF-2、FF-3、FF-4、FF-5, 冷冻干燥, 将其配制质量浓度为 10 mg/mL, 并用 1.3.2 中的方法测定其黄嘌呤氧化酶抑制率。

1.3.2 抑制黄嘌呤氧化酶活性的测定

用磷酸盐缓冲液 (pH 值 8) 配制黄嘌呤氧化酶、岩藻低聚糖和黄嘌呤。按照表 1 加入相应反应液, 混匀, 在 37 °C 水浴中保温 30 min, 再加入黄嘌呤反应 30 min, 加入 0.05 mL 1 mol/L HCl 结束反应, 在 295 nm 处测吸光值^[20]。按以下公式计算黄嘌呤氧化酶抑制率:

$$D = \frac{(A_1 - A_2) - (B_1 - B_2)}{A_1 - A_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D——黄嘌呤氧化酶抑制率, %;

A₁——空白组的吸光值;

A₂——空白对照组的吸光值;

B₁——样品组的吸光值;

B₂——样品对照组的吸光值。

表 1 反应液组成

反应组	黄嘌呤氧化酶	岩藻低聚糖	磷酸盐缓冲液	黄嘌呤
A ₁	50	0	250	500
A ₂	0	0	300	500
B ₁	50	50	200	500
B ₂	0	50	250	500

1.3.3 岩藻低聚糖制备工艺优化

1.3.3.1 单因素试验

以黄嘌呤氧化酶抑制率为指标, 以 1.3.1 为基础实验操作, 分别考察不同酶解温度 (20、25、30、35、40 °C)、酶解时间 (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h)、酶添加量 (1 000、1 500、2 000、2 500、3 000 U/g)、多糖质量浓度 (5、10、15、20、25 mg/mL) 下酶解产物对黄嘌呤氧化酶抑制作用的影响。

1.3.3.2 正交试验

根据单因素试验结果, 按照表 2 设计四因素三水平正交试验, 以确定最佳酶解条件。

表 2 正交试验因素水平表

水平	A 酶解 温度/°C	B 酶解 时间/h	C 酶添 加量/(U/g)	D 多糖质量 浓度/(mg/mL)
1	25	1.0	1 500	5
2	30	1.5	2 000	10
3	35	2.0	2 500	15

1.3.4 分子量的测定

将岩藻低聚糖配置质量浓度为 10 mg/mL, 利用十八角度激光散射仪测定分子量。测定条件设置如下: 色谱仪: Ultimate 3000, 分析柱: TSKgel 2500PW (XL) (8 μm, 8.0 mm×300 mm), 流动相: H₂O, 流速: 0.5 mL/min, 柱温: 30 °C, 进样量: 50 μL, 示差检测器检测。

1.3.5 硫酸根含量的测定

标准品由不同质量浓度的无水硫酸钠组成, 硫酸根的质量浓度设定为 5~50 μg/mL。测定条件设置如下: 色谱柱: Ionpac AS11-HC (4.0 mm×250 mm), 流动相: 30 mmol/L KOH 溶液, 流速: 0.5 mL/min, 以无水硫酸钠的 SO₄²⁻ 含量做标准曲线, 计算硫酸根含量^[21]。

1.3.6 单糖组成的测定

混合标准品由岩藻糖、半乳糖、甘露糖、葡萄糖、葡萄糖醛酸、木糖、鼠李糖 7 种单糖混合组成。测定条件设置如下: 色谱柱: Agilent EC-C18 (5 μm, 4.6 mm×250 mm), 紫外检测波长: 254 nm, 流动相: 磷酸盐缓冲液: 乙腈 (82:18), 流速: 1 mL/min, 进样量: 20 μL, 根据峰面积计算每种单糖含量^[22]。

1.3.7 高尿酸血症小鼠模型的建立

小鼠在试验环境下适应 7 d 后, 随机分为空白组、模型组、阳性组、低浓度样品组和高浓度样品组, 每组 12 只, 分别用质量浓度为 5 mg/mL 的苦味酸标记头、背、尾。

用酵母膏和氧嗪酸钾进行高尿酸血症小鼠模型的建立, 空白组每隔 24 h 灌胃 0.2 mL 蒸馏水和腹腔注射 0.2 mL 生理盐水, 模型组、阳性组、样品组

每隔 24 h 灌胃 0.2 mL 酵母膏和腹腔注射 0.2 mL 氧嗪酸钾, 共建模 14 d。

建模 14 d 后, 在每天建模的基础上给药。空白组、模型组在建模 1 h 后灌胃 0.2 mL 蒸馏水, 阳性组在建模 1 h 后灌胃 0.2 mL 10 mg/kg 别嘌呤醇, 低浓度样品组和高浓度样品组在建模 1 h 后灌胃 0.2 mL 150 mg/kg 和 300 mg/kg 样品, 共给药 15 d^[23]。

1.3.8 小鼠体重和脏器系数的测定

给药后, 每隔 5 d, 测定一次小鼠体质量。

给药 15 d 结束后, 测定小鼠肝脏、脾脏、肾脏的质量。按以下公式计算各脏器系数:

$$F_1 = \frac{W_1}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

$$F_2 = \frac{W_2}{W_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$F_3 = \frac{W_3}{W_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

F_1 —肝脏系数, %;

F_2 —脾脏系数, %;

F_3 —肾脏系数, %;

W_0 —小鼠体质量, g;

W_1 —小鼠肝脏质量, g;

W_2 —小鼠脾脏质量, g;

W_3 —小鼠肾脏质量, g。

1.3.9 相关指数的测定

取 0.5 mL 小鼠眼眶静脉血, 低温处理 1 h 后, 3 500 r/min、4 °C 下离心 10 min 分离血清; 准确称取 0.2 g 小鼠肝脏, 向其加入 1.8 mL 生理盐水, 得到质量浓度为 100 mg/mL 肝脏匀浆, 12 000 r/min、4 °C 下离心 10 min, 取上清液备用。

按照试剂盒说明书要求, 测定各组小鼠尿酸、肌酐、尿素氮含量及黄嘌呤氧化酶、腺苷脱氨酶活性。

1.3.10 数据分析

所有实验均重复 3 次, 实验数据采用 Graphpad Prism 9 绘图软件制图, 采用 SPSS 26 分析软件进行数据显著性分析, 结果 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

一般来说, 温度越高, 反应速度越快, 分子

的平均动能越大, 单位时间内撞击的次数也就越多^[24]。如图 1a 所示, 随着酶解温度的升高, 酶解产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用逐渐增强, 当酶解温度为 30 °C 时, 酶解产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用最强, 抑制率为 60.38%。因此, 适当提高酶解温度有利于增强酶解产物抑制黄嘌呤氧化酶活性, 选择 30 °C 为最佳酶解温度。如图 1b 所示, 随着酶解时间的延长, 酶解产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用逐渐增强, 抑制率从 53.34% 增大至 64.14%, 因此, 最佳酶解时间为 1.5 h。如图 1c 所示, 随着酶添加量的增多, 酶解产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用逐渐增强, 抑制率从 48.15% 增大至 59.54%, 因此, 最佳酶添加量为 2 000 U/g。如图 1d 所示, 随着多糖质量浓度的升高, 酶解产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用逐渐增强, 当多糖质量浓度为 10 mg/mL 时, 酶解产物对黄嘌呤氧化酶的抑制作用最强, 抑制率为 60.28%, 因此, 最佳多糖质量浓度为 10 mg/mL。

2.2 正交试验结果

通过单因素试验, 确定四因素三水平正交试验, 具体为酶解温度 (25、30、35 °C)、酶解时间 (1.0、1.5、2.0 h)、酶添加量 (1 500、2 000、2 500 U/g)、多糖质量浓度 (5、10、15 mg/mL), 试验结果如表 3。从表 3 中可以看出, 各因素对抑制黄嘌呤氧化酶活性的影响程度依次为: 酶解温度 > 酶解时间 > 酶添加量 > 多糖质量浓度, $A_2B_2C_2D_2$ 为最佳酶解条件, 即酶解温度为 30 °C, 酶解时间为 1.5 h, 酶添加量为 2 000 U/g, 多糖质量浓度为 10 mg/mL。随后进行了最佳酶解条件验证试验, 所得岩藻低聚糖的黄嘌呤氧化酶抑制率为 60.64%, 高于正交试验中的最高值, 证明正交试验结果有效。

2.3 岩藻低聚糖的分子量分布

用十八角度激光散射仪测定岩藻多糖及酶解后岩藻低聚糖的重均分子量, 分子量与出峰时间有关, 分子量越小, 出峰时间越晚^[25]。岩藻多糖及酶解后岩藻低聚糖的重均分子量如图 2 所示。从图中可以看出, 岩藻低聚糖的出峰时间明显晚于岩藻多糖, 且岩藻多糖的重均分子量为 7.873×10^5 u, 岩藻低聚糖的重均分子量为 8.508×10^3 u, 表明酶解能够有效降低岩藻多糖的分子量。

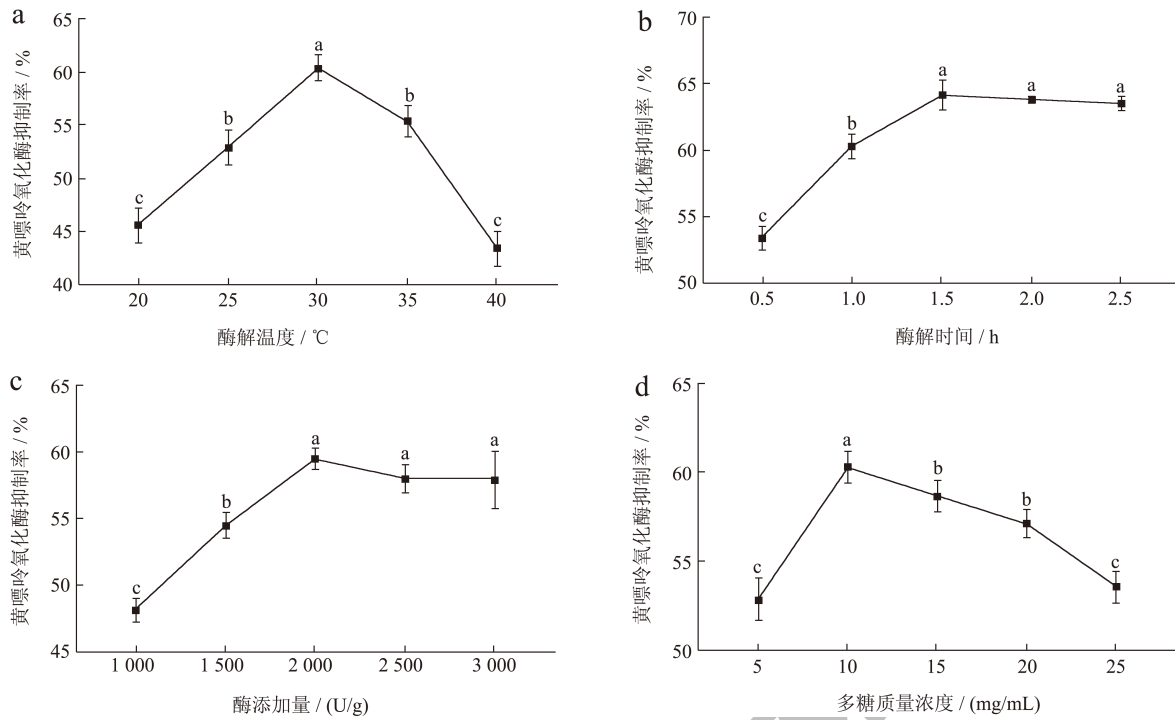


图1 单因素试验结果

Fig.1 Univariate test results

注: 不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表3 正交试验结果表

Table 3 Results of orthogonal test

实验号	酶解温度/°C	酶解时间/h	酶添加量/(U/g)	多糖质量浓度/(mg/mL)	黄嘌呤氧化酶抑制率/%
1	1	1	1	1	35.41
2	1	2	2	2	44.01
3	1	3	3	3	39.83
4	2	1	2	3	46.37
5	2	2	3	1	49.36
6	2	3	1	2	48.03
7	3	1	3	2	37.57
8	3	2	1	3	38.22
9	3	3	2	1	41.47
K1	39.75	39.78	40.55	42.08	
K2	47.92	43.86	43.95	43.20	
K3	39.09	43.11	42.10	41.47	
R	8.83	4.08	3.40	1.50	

注: K1、K2、K3 为各因素水平的黄嘌呤氧化酶抑制率的平均值, R 为极差。

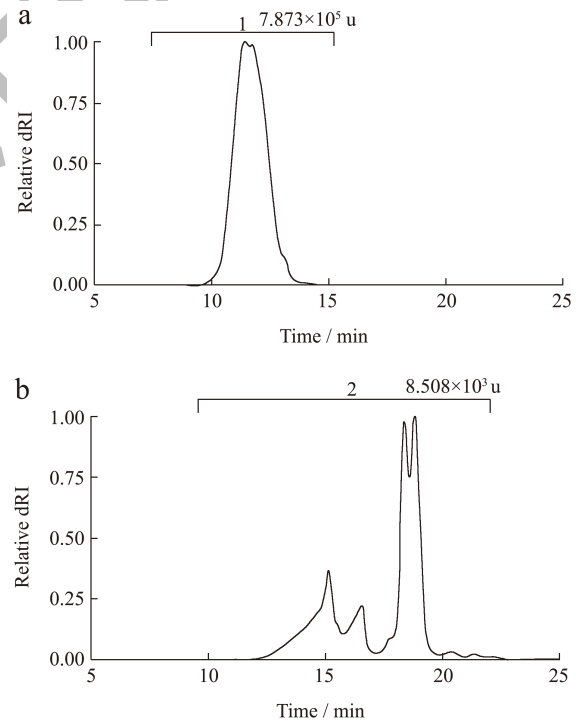


图2 岩藻多糖及酶解后岩藻低聚糖的重均分子量

Fig 2 Average molecular weight of fucoidan polysaccharides and fucoidan oligosaccharides after enzymatic hydrolysis

2.4 不同分子量段岩藻低聚糖对黄嘌呤氧化酶抑制作用的影响

用 50、30、10 和 5 ku 超滤膜将最佳酶解条件下得到的岩藻低聚糖分成大于 50、30~50、10~30、5~10 ku 和小于 5 ku 分子量段，分别命名为 FF-1、FF-2、FF-3、FF-4、FF-5，测定不同分子量段岩藻低聚糖的黄嘌呤氧化酶抑制率，结果如图 3 所示。从图中可以看出，岩藻低聚糖对黄嘌呤氧化酶的抑制作用随分子量的减少而增强，FF-5 的黄嘌呤氧化酶抑制率明显高于其他组分 ($P < 0.05$)，抑制率为 88.65%，说明其对黄嘌呤氧化酶的抑制作用与其分子量大小有关。Wang 等^[26]研究发现，小于 5 ku 的岩藻低聚糖具有较好的抑制酪氨酸酶的活性，酪氨酸酶抑制率为 52.40%，显著高于大于 100 ku 组分（抑制率为 8.20%），证实小于 5 ku 的岩藻低聚糖具有更好的生物活性。因此，选择 FF-5 进行后续试验。

2.5 FF-5的硫酸根含量及单糖组成

岩藻多糖和 FF-5 的硫酸根含量及单糖组成如表 4 所示，从表中可知，FF-5 的硫酸根含量为 30.93%，单糖组成和岩藻多糖基本相同，其中岩藻糖含量由原来的 31.26% 升高至 33.16%，葡萄糖醛酸含量由 10.42% 降低至 9.29%。

表 4 岩藻多糖和FF-5的硫酸根含量及单糖组成

Table 4 Sulfate content and monosaccharide composition of fucoidan and FF-5

样品	硫酸根含量/%	单糖组成/%						
		岩藻糖	半乳糖	甘露糖	葡萄糖醛酸	鼠李糖	葡萄糖	木糖
岩藻多糖	31.25±0.33 ^a	31.26±0.23 ^b	20.25±0.38 ^b	14.24±0.45 ^b	10.42±0.37 ^a	6.21±0.37 ^a	5.89±0.14 ^b	2.38±0.24 ^a
FF-5	30.93±0.88 ^a	33.16±0.32 ^a	21.76±0.65 ^a	15.16±0.22 ^a	9.29±0.46 ^b	5.82±0.68 ^b	6.24±0.27 ^a	1.98±0.19 ^b

注：小写字母表示不同样品同种成分之间具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 5 FF-5对高尿酸血症小鼠体质量的影响

Table 5 Effect of FF-5 on body weight in mice with hyperuricemia

组别	初始体质量	给药第 0 天	给药第 5 天	给药第 10 天	给药第 15 天
空白组	36.23±0.52 ^a	40.71±0.61 ^a	42.22±0.12 ^a	44.92±0.61 ^a	46.41±0.32 ^a
模型组	36.30±0.42 ^a	38.31±0.43 ^b	39.92±0.21 ^b	41.93±0.32 ^d	43.51±0.42 ^d
阳性组	36.41±0.22 ^a	38.23±0.42 ^b	39.91±0.33 ^b	41.91±0.37 ^d	43.53±0.27 ^d
低浓度样品组	36.35±0.31 ^a	38.21±0.29 ^b	41.93±0.37 ^a	44.12±0.27 ^b	45.31±0.55 ^b
高浓度样品组	36.27±0.61 ^a	38.04±0.22 ^b	41.92±0.26 ^a	43.22±0.16 ^c	44.35±0.15 ^c

注：小写字母表示同一天各组小鼠之间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.6 FF-5对高尿酸血症小鼠体质量的影响

体质量的改变可以反映机体功能^[27]。表 4 显示了空白组、模型组、阳性组、低浓度样品组、高浓度样品组的小鼠建模前初始体质量及建模 14 d 后给药 0、5、10、15 d 的体质量变化。由表 5 可得，给药第 0 天，空白组小鼠的体质量显著高于其他组，表明建模药物会影响小鼠体质量的持续增加；给药第 5~15 天，样品组小鼠的体质量与模型组存在显著性差异 ($P < 0.05$)，表明 150 mg/kg FF-5 和 300 mg/kg FF-5 可以有效增加小鼠的体质量，其中 150 mg/kg FF-5 对小鼠体质量的增加更明显。

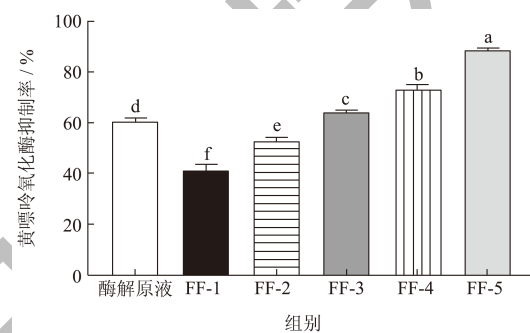


图 3 不同分子量段岩藻低聚糖对黄嘌呤氧化酶抑制作用的影响

Fig 3 Effect of fucoidan oligosaccharides of different molecular weights on the inhibition of xanthine oxidase

注：不同小写字母表示有显著性差异 ($P < 0.05$)。下同。

2.7 FF-5对高尿酸血症小鼠脏器系数的影响

肝脏系数、脾脏系数、肾脏系数可以反应出样品对肝脏、脾脏及肾脏的损伤程度^[28], FF-5对高尿酸血症小鼠脏器系数的影响见图4。如图所示, 模型组和阳性组小鼠的肝脏系数、脾脏系数、肾脏系数均显著高于空白组 ($P<0.05$), 说明建模药物能够对小鼠肝脏、脾脏、肾脏产生不良影响。样品组与空白组相比没有显著性差异 ($P<0.05$), 这表明150 mg/kg FF-5和300 mg/kg FF-5可以有效缓解建模药物对肝脏、脾脏、肾脏的损伤, 能对高尿酸血症小鼠的肝脏、脾脏、肾脏起到保护作用。

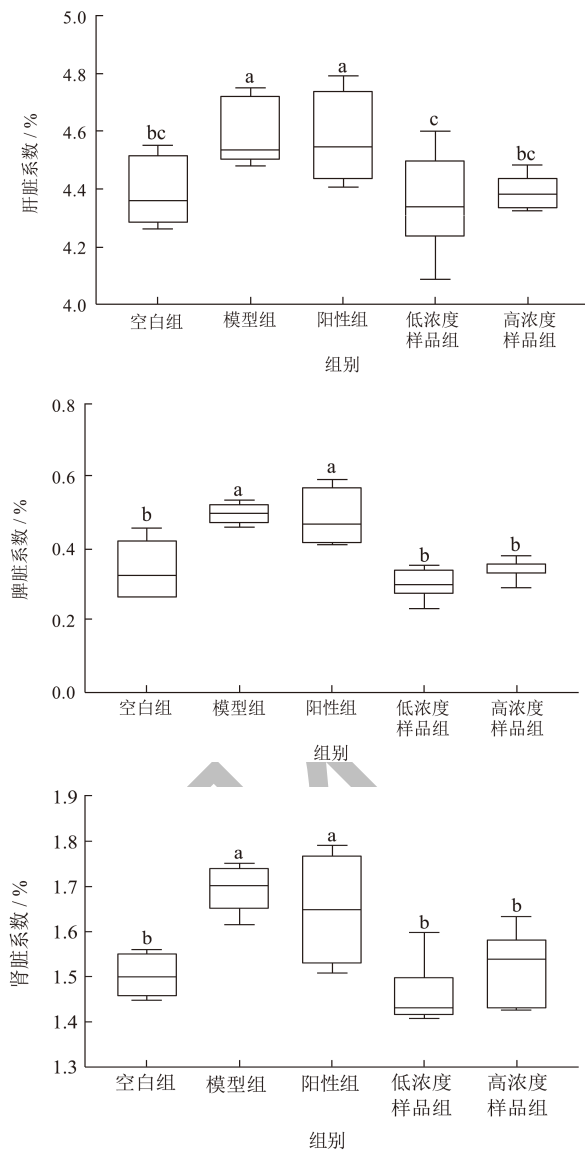


图4 FF-5对高尿酸血症小鼠脏器系数的影响

Fig.4 Effect of FF-5 on organ coefficients in mice with hyperuricemia

2.8 FF-5对高尿酸血症小鼠血清尿酸的影响

高尿酸血症可以通过血清尿酸含量来判断^[29]。

图5表示给药15d后各组小鼠的血清尿酸含量。由图可知, 与空白组相比, 模型组小鼠的血清尿酸含量明显升高, 升高率为56.47%, 说明高尿酸血症小鼠建模成功; 与模型组相比, 阳性组和样品组的血清尿酸含量分别降低31.71%、42.10%、25.63%, 说明10 mg/kg别嘌呤醇、150 mg/kg FF-5和300 mg/kg FF-5均有显著的降尿酸效果, 其中150 mg/kg FF-5降尿酸效果更显著。

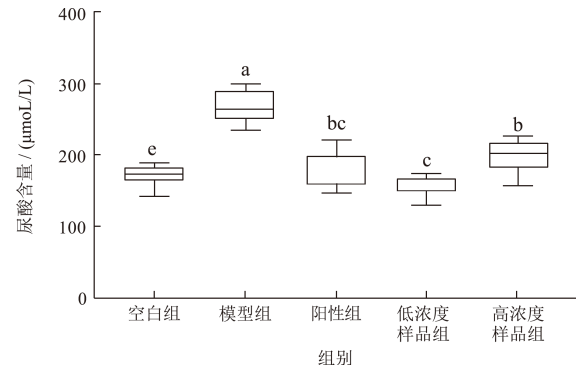


图5 FF-5对高尿酸血症小鼠血清尿酸的影响

Fig.5 Effect of FF-5 on serum uric acid in mice with hyperuricemia

2.9 FF-5对高尿酸血症小鼠血清肌酐和尿素氮的影响

血清肌酐、尿素氮含量对肾脏功能影响较大, 含量高可能会导致肾脏损伤^[30]。图6和图7表示给药15d后各组小鼠的血清肌酐和尿素氮含量。由图可知, 与空白组相比, 模型组小鼠的血清肌酐、尿素氮含量明显增加, 说明高尿酸血症小鼠的肾脏受到损伤; 与模型组相比, 10 mg/kg别嘌呤醇阳性组的血清肌酐、尿素氮含量无显著差异, 说明别嘌呤醇不能改善肾脏损伤; 150 mg/kg FF-5和300 mg/kg FF-5样品组血清肌酐、尿素氮含量与模型组相比显著减少 ($P<0.05$), 说明FF-5对肾脏具有较好的保护作用。

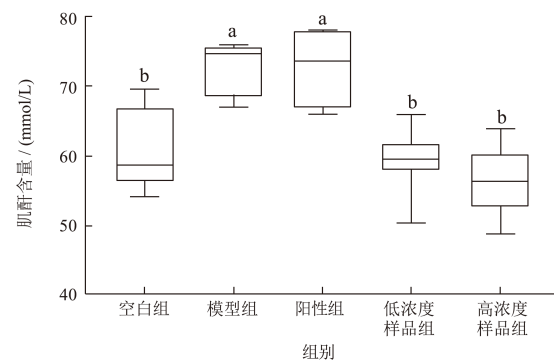


图6 FF-5对高尿酸血症小鼠血清肌酐的影响

Fig.6 Effect of FF-5 on serum creatinine in mice with hyperuricemia

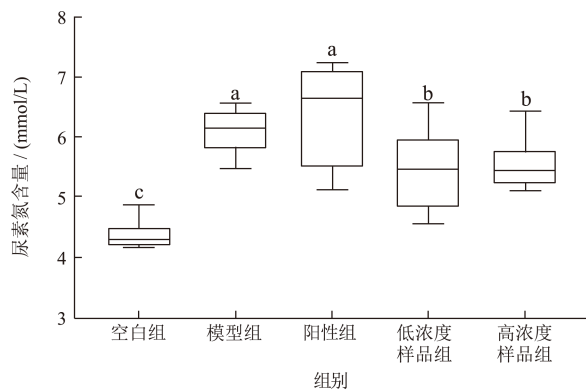


图7 FF-5对高尿酸血症小鼠尿素氮的影响

Fig.7 Effect of FF-5 on urea nitrogen in mice with

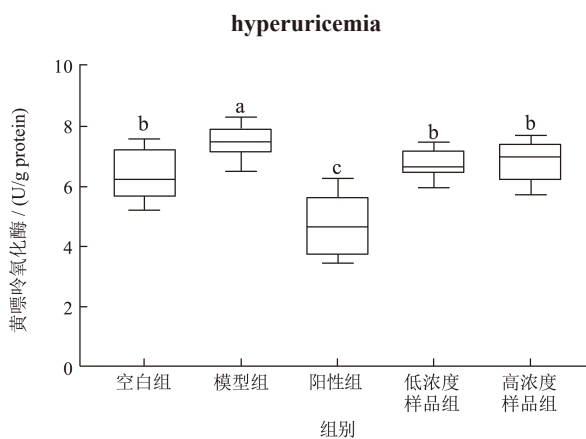


图8 FF-5对高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶的影响

Fig.8 Effect of FF-5 on xanthine oxidase in hyperuricemia mice

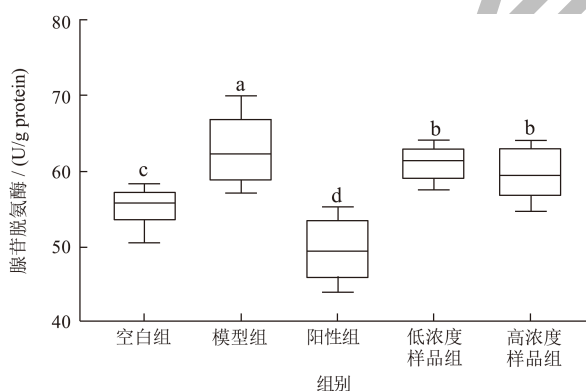


图9 FF-5对高尿酸血症小鼠腺苷脱氨酶的影响

Fig.9 Effect of FF-5 on adenosine deaminase in mice with

hyperuricemia

2.10 FF-5对高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶的影响

在嘌呤代谢过程中,黄嘌呤氧化酶可以将黄嘌呤和次黄嘌呤氧化为尿酸,是尿酸形成过程中的关键酶^[31];抑制腺苷脱氨酶的活性,不仅肌苷、次黄嘌呤的合成减少,还能增强机体的抗炎能力^[32]。图8和图9表示给药15 d后各组小鼠的黄

嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性。由图可知,与空白组相比,模型组小鼠的黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性明显升高,升高率分别为17.27%、13.8% ($P<0.05$);与模型组相比,150 mg/kg FF-5样品组小鼠的黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性均降低,分别降低了10.04%、2.83%,300 mg/kg FF-5样品组小鼠的黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性均降低,分别降低了8.57%、5.25% ($P<0.05$)。

综上所述,FF-5能够抑制与尿酸生成有关的黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶的活性,减少体内尿酸的生成,具有显著的降尿酸效果。

3 讨论

近年来,由于改变生活方式和饮食结构,高尿酸血症已经成为威胁现代人健康的常见疾病,而尿酸生成增加或排泄减少是影响高尿酸血症发生的主要因素^[33],目前常见的降尿酸药物苯溴马隆、非布司他和别嘌醇等存在一系列副作用^[34]。近年来,有关多糖降尿酸活性的研究越来越多,岩藻多糖也被证实具有降尿酸效果^[35,36],同时Chen等^[37]、Liu等^[38]研究表明低分子量多糖水溶性及生物利用度高,有较高的生物活性,能够有效解决高分子量多糖在应用过程中的问题。

目前,降低岩藻多糖分子量的方法有物理降解法、化学降解法和生物酶解法,其中生物酶解法条件温和且分子量易控制,适合大规模生产。硫酸根含量对岩藻多糖发挥活性起到重要作用^[39],因此,选择方法时应注意保护硫酸根含量。本团队前期研究发现岩藻多糖酶可有效降解岩藻多糖,重均分子量由 7.873×10^5 u降至 8.508×10^3 u,经过超滤膜分级后,FF-5对黄嘌呤氧化酶的抑制作用较强,不会过度破坏硫酸根含量,单糖组成和岩藻多糖基本相同,其中岩藻糖含量升高至33.16%,葡萄糖醛酸含量降低至9.29%,推测其原因可能为酶解过程中发生了脱羧等化学反应,导致化学键断裂,使得单糖含量发生变化。

本文通过高尿酸血症小鼠模型,分析岩藻低聚糖的降尿酸效果,发现FF-5能够增加小鼠体质量,缓解建模药物对肝脏、肾脏和脾脏的损伤,显著降低小鼠血清肌酐、尿素氮的含量,有效降低小鼠血清中尿酸水平。Li等^[40]研究发现海带低分子量硫酸多糖能够显著降低小鼠血清肌酐和尿素氮含量,减轻肾肿胀,改善肾脏形态,降低血清尿酸,与本文研究结果相似。此外,FF-5能够抑制小鼠黄嘌呤氧

化酶和腺苷脱氨酶的活性。据张灏^[41]报道,海参多糖能够抑制高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶的活性,从而减少尿酸生成;张大艳^[42]发现海带岩藻多糖硫酸酯能够显著降低高尿酸血症小鼠的黄嘌呤氧化酶活性,降低小鼠体内的尿酸水平和血清尿素含量,李晶^[43]研究证实,不同质量浓度海带多糖处理的高尿酸血症小鼠的黄嘌呤氧化酶活性比模型组降低了8.73%~17.46%,这与本文研究结果相似。黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶均为尿酸合成过程中的关键酶,当黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性升高时,促进体内核酸分解代谢,进而将黄嘌呤、次黄嘌呤氧化生成尿酸,岩藻低聚糖能抑制黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性,说明岩藻低聚糖对抑制尿酸合成具有一定的积极意义。

综上所述,经过初步研究,酶解后岩藻低聚糖对黄嘌呤氧化酶的抑制作用显著增强,并能降低高尿酸血症小鼠模型黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶活性,从而减少血清尿酸的产生,可作为一种绿色天然,安全高效的黄嘌呤氧化酶抑制剂应用于市场。后期研究将围绕岩藻低聚糖吸收渗透性能和抑制嘌呤形成机制展开。

4 结论

本文以岩藻多糖酶降解得到的岩藻低聚糖为研究对象,对其最佳酶解条件及降尿酸效果进行探究。结果表明,得到最佳酶解条件即酶解温度为30℃,酶解时间为1.5 h,酶添加量为2 000 U/g,多糖质量浓度为10 mg/mL;在此酶解条件下得到的岩藻低聚糖的黄嘌呤氧化酶抑制率为60.64%;酶解后,重均分子量由 7.873×10^5 u降至 8.508×10^3 u,说明岩藻多糖被有效降解;用50、30、10和5 ku超滤膜将酶解后的岩藻低聚糖分为5个组分,测得FF-5的黄嘌呤氧化酶抑制率最高,为88.65%,硫酸根含量为30.93%,岩藻糖含量升高至33.16%,葡萄糖醛酸含量降低至9.19%。用FF-5做后续实验,利用高尿酸血症小鼠模型,研究发现FF-5能够增加小鼠体质量,可以有效缓解建模药物对肝脏、脾脏及肾脏的损伤,降低小鼠血清肌酐及尿素氮的含量;与模型组相比,150 mg/kg、300 mg/kg样品组小鼠血清尿酸值分别降低42.10%和25.63%,小鼠黄嘌呤氧化酶活性分别降低10.04%和8.57%,小鼠腺苷脱氨酶活性分别降低2.83%和5.25%。FF-5通过降低小鼠黄嘌呤氧化酶和腺苷脱氨酶的活性,从而减少小鼠体内血清尿酸含量,对高尿酸血症小鼠具有显著的降尿酸效

果。本文研究结果将为岩藻低聚糖的开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] 吴淑慧,於洪建,於天,等.藤茶提取物的降尿酸作用研究[J].食品工业科技,2021,42(18):350-355.
- [2] 庄振华,石秀杰,孙勇.尿酸与冠心病的关系及研究的进展[J].心血管康复医学杂志,2022,31(5):631-633.
- [3] MAHBUB M H, YAMAGUCHI N, TAKAHASHI H, et al. Association of plasma free amino acids with hyperuricemia in relation to diabetes mellitus, dyslipidemia, hypertension and metabolic syndrome [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 17616.
- [4] SHAVIT E, COHEN A, ZOLLER L, et al. The burden of gout in acne keloidalis nuchae-Insights from a population-based study [J]. Journal of Cosmetic Dermatology, 2023, 22(1): 284-288.
- [5] 李婷婷,王沁,李煜辰,等.瓦尼桑黄提取物及粗多糖降尿酸作用及其机制[J].菌物学报,2023,42(4):997-1008.
- [6] STEFAN W, BRIGITTE L, BERTHOLD R, et al. Cardiovascular risk and mortality in patients with hyperuricemia treated with febuxostat or allopurinol: a retrospective nation-wide cohort study in Austria 2014-2017 [J]. Rheumatol Int, 2022, 42(9): 1597-1603.
- [7] YE X L, WU J, TANG K, et al. Benzbromarone as a possible cause of acute kidney injury in patients with urolithiasis: two case reports [J]. Medicine, 2019, 98(15): e15214.
- [8] 李小松.不同分子量褐藻多糖硫酸酯的制备及其抗EMT活性的研究[D].青岛:中国科学院大学(中国科学院海洋研究所),2020.
- [9] PENG Y, WANG Y, WANG Q, et al. Hypolipidemic effects of sulfated fucoidan from *Kjellmaniella crassifolia* through modulating the cholesterol and aliphatic metabolic pathways [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 51: 8-15.
- [10] WU Q, WU S, CHENG Y, et al. Sargassum fusiforme fucoidan modifies gut microbiota and intestinal metabolites during alleviation of hyperglycemia in type 2 diabetic mice [J]. Food & Function, 2021, 12(8): 3572-3585.
- [11] SHANG Q, SONG G, ZHANG M, et al. Dietary fucoidan improves metabolic syndrome in association with increased Akkermansia population in the gut microbiota of high-fat diet-fed mice [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 28: 138-146.
- [12] 张育.褐藻多糖硫酸酯抑制尿酸介导HK-2细胞NLRP3炎性体活化及机制探讨[D].湛江:广东海洋大学,2021.
- [13] 梁碧容,刘桃丽,伍新林,等.褐藻多糖硫酸酯对尿酸性肾病大鼠相关肾脏转运体的影响[J].中药材,2013,36(11): 1830-1833.
- [14] CHAU Y T, CHEN H Y, LIN P H, et al. Preventive effects of fucoidan and fucoxanthin on hyperuricemic rats induced by potassium oxonate [J]. Mar Drugs, 2019, 17(6): 343.

- [15] ZHANG D, LIU H, LUO P, et al. Production inhibition and excretion promotion of urate by fucoidan from *Laminaria japonica* in adenine-induced hyperuricemic mice [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(12): 472.
- [16] 丛瑶. 厚叶海带Fucoidan结构及其寡糖抗肿瘤活性研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
- [17] ZHAO X, XUE C H, LI Z J, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of low molecular weight sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2004, 16(2): 111-115.
- [18] XUE C H, FANG Y, LIN H, et al. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2001, 13(1): 67-70.
- [19] 任立世, 焦思明, 刘洪涛, 等. 岩藻寡糖的制备及抗氧化活性测定[C]//2015中国微生物学会酶工程专业委员会会议论文集. 北京: 中国微生物学会, 2015: 223.
- [20] 刘盼红. 葵花盘活性物质的制备及其降尿酸作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [21] ZHAO X, GUO F J, HU J, et al. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica* [J]. *Thrombosis Research*, 2016, 144: 46-52.
- [22] 周彦强, 吴光斌, 陈发河. PMP柱前衍生化HPLC法测定黄秋葵多糖的单糖组成[J]. *食品科学*, 2019, 40(4): 266-271.
- [23] 赵冉. 黑茶缓解痛风症状效果及其机理的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [24] YUE W, YAO P J, WEI Y N, et al. An innovative method for preparation of acid-free-water-soluble low-molecular-weight chitosan (AFWSLMWC) [J]. *Food Chemistry*, 2008, 8(3): 1082-1087.
- [25] CHEONG K L, WU D T, ZHAO J, et al. A rapid and accurate method for the quantitative estimation of natural polysaccharides and their fractions using high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detector [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1400: 98-106.
- [26] WANG Y, NIU D, QUE F, et al. Low molecular weight fucoidan prepared by fucoidanase degradation-A promising browning inhibitor [J]. *Lwt*, 2021, 148: 111739.
- [27] VAN VENROOIJ L M, DE VOS R, BORGMEIJER-HOELEN M M, et al. Preoperative unintended weight loss and low body mass index in relation to complications and length of stay after cardiac surgery [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008, 87(6): 1656-1661.
- [28] 段筱杉, 张朝辉, 应锐, 等. 海芦笋黄酮的抗氧化作用及对CCl₄致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *水产学报*, 2017, 41(12): 1946-1955.
- [29] MEHMOOD A, ZHAO L, ISHAQ M, et al. Anti-hyperuricemic potential of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) residue extract in hyperuricemic mice [J]. *Food & Function*, 2020, 11(7): 6387-6406.
- [30] ZHU C, XU Y, LIU Z H, et al. The anti-hyperuricemic effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on hyperuricemic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 168-173.
- [31] ZHANG Z C, SU G H, LUO C L, et al. Effects of anthocyanins from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L. *cultivar* Eshu No.8) on the serum uric acid level and xanthine oxidase activity in hyperuricemic mice [J]. *Food & Function*, 2015, 6(9): 3045-3055.
- [32] KAMINSKY Y, KOSENKO E. AMP deaminase and adenosine deaminase activities in liver and brain regions in acute ammonia intoxication and subacute toxic hepatitis [J]. *Brain Research*, 2010, 1311: 175-181.
- [33] 孙冠媛. 高尿酸血症的发病机制与药物治疗研究进展[J]. *继续医学教育*, 2020, 34(12): 86-88.
- [34] 洪岩, 张越. 非布司他、苯溴马隆、别嘌醇治疗高尿酸血症的安全性和有效性比较[J]. *四川解剖学杂志*, 2020, 28(1): 96-98.
- [35] 张大艳, 肖为, 陶叶杏, 等. 海带褐藻多糖硫酸酯对腺嘌呤诱导的小鼠高尿酸血症的拮抗作用[J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(3): 433-437.
- [36] 谭晓慧. 褐藻多糖硫酸酯抑制尿酸介导URAT1、GLUT9表达的机制研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2021.
- [37] CHEN B J, SHI M J, CUI S, et al. Improved antioxidant and anti-tyrosinase activity of polysaccharide from *Sargassum fusiforme* by degradation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 715-722.
- [38] LIU X, DU P, LIU X, et al. Anticoagulant properties of a green algal rhamnan-type sulfated polysaccharide and its low-molecular-weight fragments prepared by mild acid degradation [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16: 445.
- [39] 阙斐, 陶文靖, 冯文婕. 低分子量褐藻多糖的制备及其活性分析[J]. *食品工业科技*, 2021, 2: 226-232.
- [40] LI X, WANG J, ZHANG H, et al. Renoprotective effect of low-molecular-weight sulfated polysaccharide from the seaweed *Laminaria japonica* on glycerol-induced acute kidney injury in rats [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 132-137.
- [41] 张灏. 海参及其活性成分改善小鼠高尿酸血症的作用及机制[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [42] 张大艳. 海带褐藻多糖硫酸酯降尿酸作用机制的初步研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2017.
- [43] 李晶. 鼠尾藻和海带多糖与多酚对黄嘌呤氧化酶抑制作用及对高尿酸血症小鼠降尿酸效果研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.