

· 综 述 ·

## 褐藻寡糖的制备方法及生物活性研究进展

阿拉腾珠拉, 胡永飞

中国农业大学 动物科学技术学院 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193

阿拉腾珠拉, 胡永飞. 褐藻寡糖的制备方法及生物活性研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(1): 104-118.

A La Teng Zhu La, HU YF. Advances in the preparation of alginate oligosaccharides and its biological functions. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 104-118.

**摘 要:** 褐藻胶是一类多糖聚合物, 由于其独特的理化性质和有益健康的作用, 已被广泛应用于制药和食品工业。然而, 由于褐藻胶的水溶性低、黏度大, 进而限制了褐藻胶的开发和应用。褐藻寡糖 (alginate oligosaccharide, AOS) 是褐藻胶的降解产物, 由于其分子量低、水溶性高、安全无毒等特点, 近年来受到广泛关注。AOS 独特的生物活性与其结构的多样性密切相关, 可通过不同的制备方法获得具有特定结构和不同生物活性的 AOS。文中对褐藻胶制备 AOS 的方法以及 AOS 的抗肿瘤、免疫调节功能、抗炎、抗氧化、益生元和抗糖尿病等生物活性进行了综述, 并对 AOS 的结构与生物活性之间的关系进行了阐述, 以期为 AOS 的深入研究与应用提供理论基础。

**关键词:** 褐藻胶; 褐藻寡糖; 生物活性; 褐藻胶裂解酶

## Advances in the preparation of alginate oligosaccharides and its biological functions

A La Teng Zhu La, HU Yongfei

State Key Laboratory of Animal Nutrition, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

**Abstract:** Alginate is a group of polyuronic saccharides that are widely used in pharmaceutical and food industry due to its unique physicochemical properties and beneficial health effects. However, the low water solubility and high viscosity of alginate hampered its application. Alginate oligosaccharide (AOS) is a decomposition product of alginate and has received increasing attention due to its low

**Received:** May 21, 2021; **Accepted:** July 29, 2021; **Published online:** August 24, 2021

**Supported by:** The 2115 Talent Development Program of China Agricultural University

**Corresponding author:** HU Yongfei. Tel: +86-10-62732225; E-mail: huyongfei@cau.edu.cn

**基金项目:** 中国农业大学 2115 人才工程

molecular weight, high water solubility, safety, and non-toxicity. The wide-ranging biological functions of AOS are closely related to its structural diversity. AOS with distinct structures and biological functions can be obtained by different methods of preparation. This review summarized the biological functions of AOS reported to date, including anti-tumor, immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant, prebiotic, and anti-diabetes. The preparation of AOS, as well as the relationship between the structure and biological functions of AOS were discussed, with the aim to provide a reference for further development and application of AOS.

**Keywords:** alginate; alginate oligosaccharides; biological functions; alginate lyase

褐藻胶 (alginate) 又称海藻酸盐, 是一种从褐藻细胞壁中提取的天然多糖醛酸, 是唯一一种在单体分子中含有羧基的多糖, 其分子式为  $(C_6H_7NaO_6)_n$ 。褐藻胶通过 1,4-糖苷键将  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸 ( $\alpha$ -L-guluronic acid, G) 和  $\beta$ -D-甘露糖醛酸 ( $\beta$ -D-mannuronic acid, M) 连接成聚合长链, 因此褐藻胶的组合方式主要有 3 种: 只由 M 组成的多聚  $\beta$ -D-甘露糖醛酸片段 (polymannuronate, PM); 只由 G 组成的多聚  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸片段 (polyguluronate, PG); 由 G 和 M 组成的共聚物 (heteropolymer, PolyMG)<sup>[1]</sup>。组成褐藻胶的 M 和 G 在结构上互为差向异构体, 主要在 C5 位上羧基位置的不同 (图 1)<sup>[2]</sup>, 且 M 和 G 的比率与其生物活性密切相关。

随着海藻多糖类天然产物研究的不断深入, 褐藻胶被认为是一种具有重要的免疫刺激、

抗凝血、抗病毒和抗癌活性的大分子化合物, 然而褐藻胶分子量大、黏性大、难以跨越细胞膜和多重生物屏障, 进而限制了褐藻胶的开发和应用<sup>[3]</sup>。近年来, 通过糖苷键水解或生物/有机合成获得的低分子量的褐藻寡糖 (alginate oligosaccharides, AOS) 受到了广泛关注, 其不仅分子量较低、黏性小、易于吸收, 而且表现出较强的生物活性<sup>[4]</sup>。因此, AOS 受到了广泛的关注, 特别在最近十年, 相关研究明显增多, 文章发表数量逐年上升 (图 2A)。Web of Science 的统计分析表明, AOS 及其应用的基础研究主要集中在生物化学与分子生物学、化学、生物技术与应用微生物学、食品科学技术、微生物学、药理学与药学以及农学等相关领域 (图 2B)。

AOS 具有多种生物活性, 包括免疫调节<sup>[5]</sup>、益生元<sup>[6]</sup>、抗炎<sup>[7]</sup>、抗细胞凋亡<sup>[8]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>甚

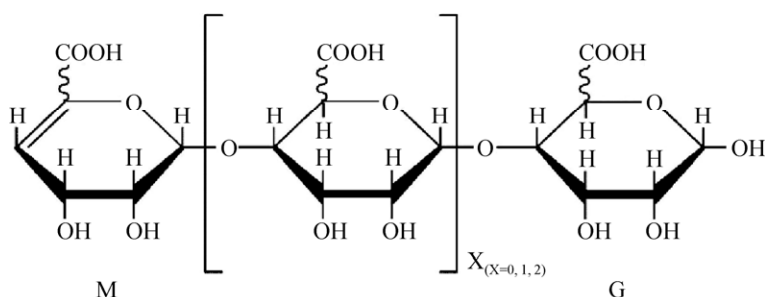


图 1 褐藻胶的分子结构 M:  $\beta$ -D-甘露糖醛酸; G:  $\alpha$ -L-古罗糖醛酸<sup>[2]</sup>

Figure 1 Molecular structure of alginate. M:  $\beta$ -D-mannuronate; G:  $\alpha$ -L-guluronate<sup>[2]</sup>.

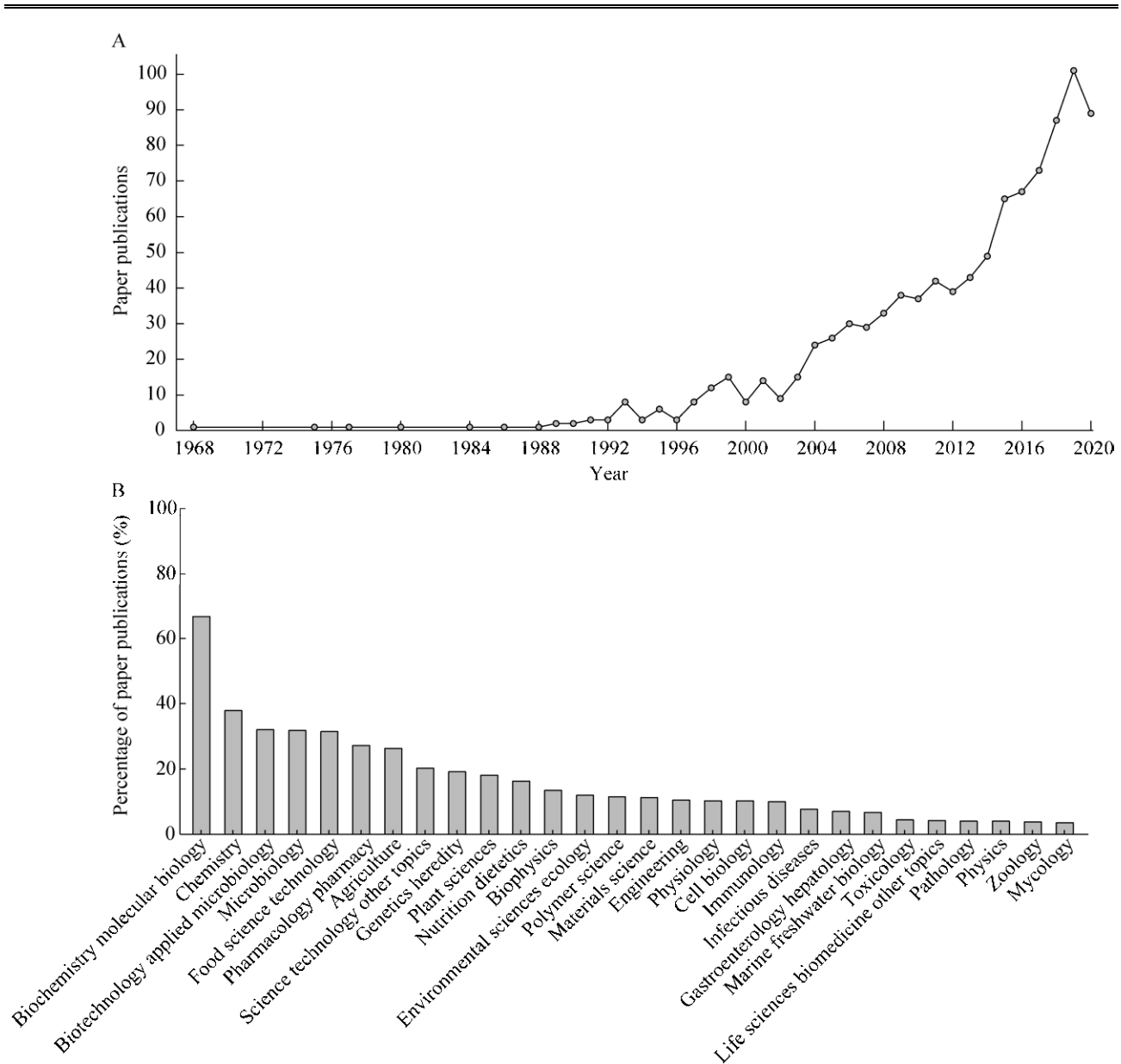


图2 统计分析近50年来发表AOS相关文章 A: 1968–2020年发表AOS相关文章数量; B: 发表AOS相关文章的研究领域

Figure 2 An overview of AOS related articles published in the past 50 years. (A) The number of annual publication of AOS during 1968–2020. (B) Distribution of research areas associated with AOS-related publications.

至抗肿瘤<sup>[9]</sup>等。AOS的生物活性取决于分子结构，因此制备结构新颖、聚合度明确的AOS，对于发现AOS新的生物活性与作用方式具有重要意义。本文重点综述了AOS的制备方法以及生物活性的研究进展，以期在未来AOS在药

物研制、功能食品以及农业等领域的应用提供参考。

## 1 褐藻寡糖的制备方法

AOS发挥生理功能的过程中，寡糖的聚合

度、构象、取代基等与其活性密切相关。目前制备 AOS 的方法有化学降解法、物理降解法、生物降解法、有机合成法和生物合成法等。物理降解法有反应迅速和无环境污染等特点,化学降解制备得到的是饱和褐藻寡糖 (saturated alginate oligosaccharides, SAOS), 而生物降解制备得到的是不饱和褐藻寡糖 (unsaturated alginate oligosaccharides, UAOS)。有机合成法是将 1,6- $\alpha$ -B-L-甲吡喃吡喃物作为底物, 使 -GGGG- 和 -MMMM- 的寡糖链从非还原端 (还原端) 组装到还原端 (非还原端); 此外, MG 连接成的二糖也用相同的糖基受体合成, 进而制备 -MGMG- 片段的 AOS, 该方法的优点为精准合成, 但产量较低<sup>[10]</sup>。生物合成法主要利用微生物产生的合成酶制备 AOS, 该方法可精确地控制产物的区域选择性以及形成立体化学键, 但成本较高、产率低、产物品种单一<sup>[11]</sup>。以下将重点介绍化学降解法、物理降解法和生物降解法。

### 1.1 化学降解法

化学降解法已被广泛用于 AOS 的制备, 主要包括酸水解、碱水解和氧化降解法, 其中酸水解法是制备 AOS 的传统方法。酸水解法通常用到盐酸、草酸、甲酸和硫酸等<sup>[12]</sup>。在酸水解反应过程中, 反应条件以及褐藻胶的来源和组成对 AOS 的聚合度有较大的影响。在 100 °C 下, 使用 1 mol/L 草酸制备 AOS, 大约 30% 的褐藻胶发生水解反应 (degrees of polymerizations, DP 10–30)<sup>[13]</sup>。然而褐藻胶具有耐酸性, 不能被无机酸完全降解<sup>[14]</sup>。Chandía 等<sup>[15]</sup>用 90% 的甲酸水解 6 h (100 °C), 再用 1.5 mol/L 甲酸水解 2 h (100 °C), 褐藻胶能完全水解。酸水解褐藻胶的具体反应步骤如下: 糖苷氧给予共轭酸质子; 共轭酸形成的非还原端基末端和碳-正氧鎓离子断裂; 后向碳-氧离子快速加水, 形成还原端

基<sup>[3]</sup>。碱水解也是制备 AOS 常用的方法。然而, 在碱性条件下, 利用  $\beta$ -消除反应, 使褐藻胶糖苷键断裂, 会导致褐藻胶的结构发生变化, 所以一般不用此方法。酸和碱水解法具有成本低、操作方便, 可获得褐藻胶大分子固有结构特征的 AOS, 且在一次降解中可获得不同聚合度的寡糖 (DP 2–6)<sup>[16]</sup>, 但易产生有毒的降解产物, 腐蚀仪器, 造成环境污染。氧化降解 ( $H_2O_2$ ) 法是一种绿色制备 AOS 的方法, 可直接醇沉淀制备 AOS, 且制备的 AOS 中没有双键, 副产物是  $H_2O$ , 具有较高的回收率和纯度, 同时避免了其他杂质对环境的污染<sup>[17]</sup>。目前,  $H_2O_2$  降解褐藻胶的确切机制尚不清楚, 可能是  $H_2O_2$  的羟基自由基首先从 M 或 G 残基中提取 C-1 质子, 诱导褐藻胶糖苷键的结构重排和降解<sup>[18]</sup>。

### 1.2 物理降解法

制备褐藻寡糖的物理方法有很多, 常用的包括超声波、紫外照射和辐照法 ( $\gamma$  射线和微波), 此外还有离子体处理、水热处理和亚临界水解法等。在能源效率方面,  $\gamma$  射线辐照被认为是目前最有效的物理降解方法之一<sup>[19]</sup>, 且不受温度、环境或添加剂的影响; 微波辐射是一种方便、快速和环保的降解褐藻胶的方法, 可避免脱盐<sup>[20]</sup>; 二氧化钛存在条件下, 紫外照射褐藻酸钠水溶液 3 h 以上, 其降解产生的 AOS 的相对分子质量较低, G/M 比率与酸降解法产物相似<sup>[21]</sup>。亚临界水通常是在沸点 (100 °C) 和临界温度 (374 °C) 之间的压力下的液态水。在高温 (150–374 °C) 时, 水发生自电离, 产生酸性水合氢离子和碱性氢氧根离子<sup>[22]</sup>。亚临界水解法 (180–250 °C) 可选择性地降解褐藻胶中 M-M、M-G、G-M 和 G-G 之间的糖苷键, 进而制备 AOS<sup>[23]</sup>。物理法具有反应迅速和无环境污染等优点, 但该方法成本较高、降解效率较低、反应机理不明确, 仍需进一步研究。

### 1.3 生物降解法

生物降解法利用微生物或者具有特异性的褐藻胶裂解酶对底物进行酶解<sup>[24]</sup>。褐藻胶裂解酶是多糖裂解酶家族 (PL 家族, 包括 PL5、6、7、14、15、17 和 18) 的成员, 可通过  $\beta$ -消除作用于褐藻胶的  $\beta$ -1,4-糖苷键, 并在糖苷键所在的 C4 和 C5 之间形成双键, 进而制备出一系列不同分子量的 AOS 混合物<sup>[24]</sup>。褐藻胶裂解酶通过  $\beta$ -消除降解褐藻胶的具体反应步骤如下 (图 3): (1) 中和褐藻胶的羧基负电荷并降低 H-5 质子的 pKa; (2) 碱催化 C-5 上的质子, 并形成羧酸根二价阴离子的中间体; (3) 在 C-4 和 C-5 之间双键的形成中提供质子, 导致 4-O-糖苷键的消去反应<sup>[21]</sup>。在自然界中, 褐藻胶裂解酶分布广泛, 主要来源于海洋微生物、海洋动物、真菌和病毒等<sup>[25]</sup>。根据底物的特异性, 可将其分为三类: G 区域特异性裂解酶 (PG 裂解酶, EC4.2.2.11)、M 区域特异性裂解酶 (PM 裂解酶, EC4.2.2.3) 和双功能裂解酶<sup>[21]</sup>。按褐藻胶裂解酶作用方式可分为内切酶和外切酶, 其中

内切酶是从褐藻胶的内部降解, 制备出以二糖、三糖和四糖为主要产物的 UAOS, 而外切酶是从褐藻胶的末端切除单体或二聚体<sup>[26]</sup>。表 1 总结了不同来源的褐藻胶和褐藻胶裂解酶以及降解产物的相关信息。褐藻胶裂解酶具有较高的底物特异性, 是制备具有特殊结构低聚糖的理想选择。然而, 目前关于褐藻胶裂解酶具有高度底物特异性的研究报道较少。

此外, 还可以利用微生物直接降解褐藻胶, 比酶促降解更加简单, 不需要进行酶的分离纯化等, 且微生物法生产条件可控、可规模化生产、产品品质可控、生产周期较短。研究发现, 可利用微生物混合菌降解北方海带 *Laminaria hyperborea* 叶柄中的褐藻胶<sup>[27]</sup>。从人类肠道微生物中分离得到拟杆菌门 (Bacteroidetes) 成员中的单形拟杆菌 (*Bacteroides uniformis*) L8 和卵形拟杆菌 *B. ovatus* G19 可通过分泌酶产生 AOS<sup>[21,28]</sup>。此外, 降解褐藻胶的细菌还包括糖球菌属 (*Gracilibacillus* A7)<sup>[29]</sup>、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) KCTC11782BP<sup>[30]</sup>、海滨芽孢杆菌

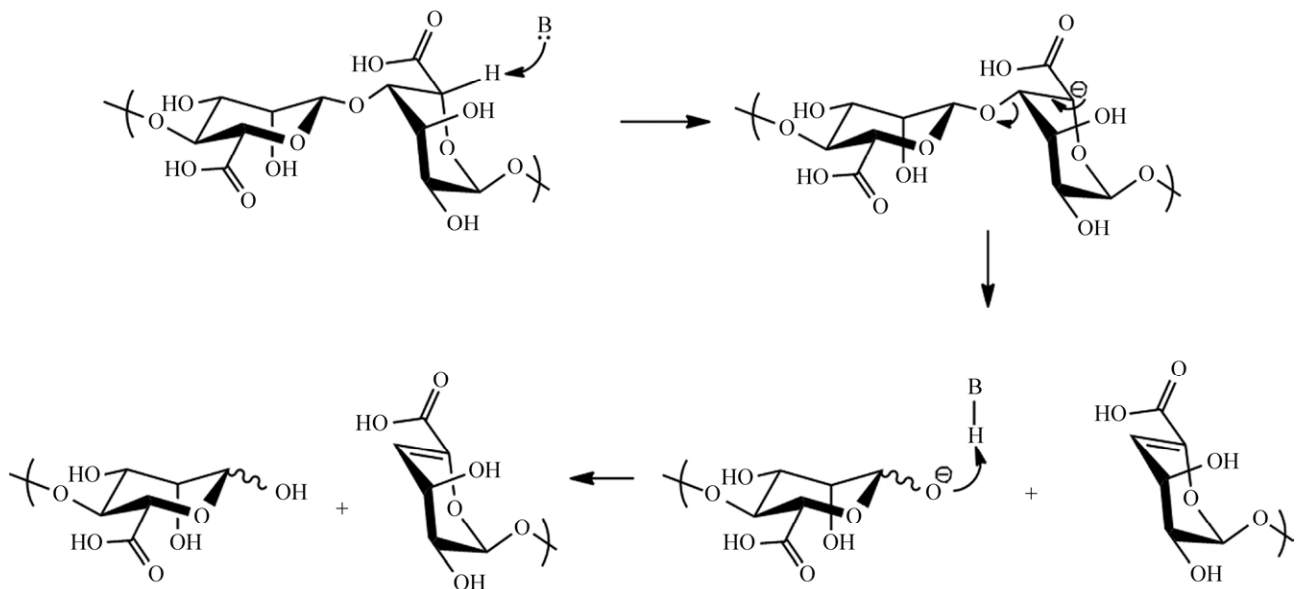


图 3 褐藻胶的酶降解机理<sup>[3]</sup>

Figure 3 Mechanisms for enzymatic degradation of alginates<sup>[3]</sup>.

表 1 不同来源褐藻胶裂解酶和降解产物

Table 1 Different sources of alginate lyases and the corresponding AOS products

Alginate sources	Enzyme sources	AOS products	References
<i>Laminaria japonica</i> (M/G=2.28 MW=300 kDa)	<i>Vibrio</i> sp. 510	$\Delta$ GG, $\Delta$ MM, $\Delta$ MG, $\Delta$ GGG, $\Delta$ MMG, $\Delta$ MGM, $\Delta$ MGG, $\Delta$ GMG, and $\Delta$ MMM	[34]
<i>Laminaria japonica</i> (M/G=1.86)	<i>Pseudomonas</i> sp. HZJ216	Average MW=1.2 kDa, DP 2-6 M/G=1/2.6	[35]
Alginate	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	DP 2-6	[36]
Alginate	<i>Gracilibacillus</i> A7	Average DP 3.3	[37]
Alginate	<i>Vibrio</i> sp. 510	2 202 and 2 324 Da	[38]
Sodium alginate	<i>Microbulbifer</i> sp. ALW1	DP 2 and 3	[39]
Sodium alginate ( <i>Macrocystis pyrifera</i> , M/G=77/23)	<i>Cellulophaga</i> sp. NJ-1	DP 2-6	[40]
Sodium alginate	<i>Flavobacterium</i> sp. LXA	DP 6	[8]
Sodium alginate (M/G=2.28)	<i>Pseudomonas</i> sp. HZJ 216	DP 2-3	[41]
Sodium alginate	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. strain No. 272	DP 2-4	[42]
Sodium alginate	<i>Alteromonas</i> sp. No. 1786	DP 2-9	[43]
Sodium alginate (M/G=60/4)	<i>Sphingobacterium</i>	DP 2-4	[4]
Sodium alginate	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i> IAM 14594	DP 4 and 5 (12.6%), DP 6 (35.2%), DP 7 (51.0%), DP>8 (1.2%)	[44]
Sodium alginate	<i>Vibrio</i> sp. QY102	DP 3 (77.8%), DP 4 (16.5%), DP 5 (3.6%), and DP 6 (2.1%)	[6]
Sodium alginate	<i>Isoptericola halotolerans</i> CGMCC 5336	DP 2-4	[45]
Sodium alginate, polyM/polyG	<i>Vibrio weizhoudaoensis</i> M0101	DP 2-9	[46]
Sodium alginate, polyM (99%)	<i>Serratia marcescens</i> NJ-07	DP 1-5	[47]
Sodium alginate ( <i>Macrocystis pyrifera</i> , M/G=77/23), polyM/polyG (99%)	<i>Vibrio</i> sp. NJU-03	DP 2-4	[48]
Sodium alginate, polyM/polyG	<i>Wenyingzhuangia fucanilytica</i>	DP 2-6 (sodium alginate) DP 2-4 (polyM/polyG)	[49]
Sodium alginate ( <i>Macrocystis pyrifera</i> , M/G=77/23), polyM and polyG (95%; M/G=97/3, 3/97; DP 39; MW=7 200 Da)	<i>Flammeovirga</i> sp. NJ-04	DP 2-4	[50]
Sodium alginate, polyM	<i>Bacillus</i> sp. Alg07	DP 2-4 (sodium alginate) DP 2-3 (polyM)	[51]
PolyG containing 79% L-guluronic acid prepared from sodium alginate (M/G=0.2)	<i>Flavobacterium multivolum</i>	DP 2-7	[14]
PM, PG	<i>Marinimicrobium</i> sp. H1	DP 2-4	[52]
PM, PG	<i>Cellulophaga algicola</i>	$\Delta$ GG, $\Delta$ GGG, and $\Delta$ GGGG	[53]

(*B. litoralis*) M3<sup>[31]</sup>、黄杆菌(*Flavobacterium* sp.) LXA<sup>[32]</sup>、食琼脂假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas agarovorans*) CHO-12<sup>[33]</sup>等。

## 2 褐藻寡糖的主要生物活性

### 2.1 抗肿瘤活性

AOS 可通过抑制肿瘤细胞增殖和迁移, 以

及调节免疫防御反应等发挥抗肿瘤活性。已有研究证明, AOS 可通过抑制 Hippo/YAP/c-Jun 信号通路来减弱人前列腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[9]</sup>。由交替假单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. 褐藻胶裂解酶制备的古罗糖醛酸寡糖 ( $\alpha$ -L-guluronic acid AOS, GAOS) 和甘露糖醛酸寡糖 ( $\beta$ -D-mannuronic acid AOS, MAOS) 通过

上调人单核细胞合成细胞毒性细胞因子, 增强人白血病细胞 U937 的防御机制, 这些作用被肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 的抗体所抑制<sup>[54]</sup>。50 mg/kg GAOS 能有效抑制肿瘤细胞对细胞外基质的粘附, 抑制肿瘤细胞在植入组织中的浸润, 减少荷瘤小鼠体内免疫抑制细胞和炎症细胞的积累<sup>[55]</sup>。因此, AOS 的抗肿瘤作用和免疫调节作用是密不可分的。噬琼胶菌 (*Agarivorans* sp.) L11 褐藻胶裂解酶制备的 AOS (DP 2-5) 可抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的生长<sup>[56]</sup>; 多元醇化的 MAOS 在肿瘤组织中选择性地诱导 TNF-细胞毒因子, 进而对小鼠 MH134 肝癌有局部治疗作用<sup>[57]</sup>。此外, 连续 2 年每日口服 10 mg AOS 可提高骨肉瘤患者抗氧和抗炎功能, 并减少肿瘤平均体积, 降低局部复发率<sup>[56]</sup>。因此, AOS 提高机体的抗氧化和抗炎能力可能是 AOS 抗肿瘤的另一种重要作用。

## 2.2 免疫调节功能

天然多糖和寡糖具有作为免疫调节剂的潜力。AOS 在免疫调节中关键功能之一是诱导细胞因子的活性<sup>[58]</sup>。在动物试验中发现, AOS 可提高断奶仔猪血清中白介素 (interleukin, IL)-6、IL-10、免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 和 IgA 的浓度, 并提高了小肠中分泌型免疫球蛋白 A 的含量<sup>[59]</sup>, 进而表明 AOS 可提高免疫球蛋白和细胞因子, 增强断奶仔猪的免疫功能。在 RAW264.7 巨噬细胞中, 具有较高分子量和 M/G 比值的褐藻胶可诱导 TNF- $\alpha$  的分泌, 而由 *Pseudoalteromonas* sp. No. 272 褐藻胶裂解酶制备的 AOS 比未降解的褐藻胶更能增强 TNF- $\alpha$  的诱导活性<sup>[60]</sup>。不同方法制备的 AOS 与诱导细胞因子分泌的结构与功能之间有密切的相关性。目前, 越来越多的研究关注于 AOS 不饱和末端结构与其活性之间的关系。*Pseudoalteromonas* sp. 褐藻胶裂解酶制备的 AOS 不饱和结构在

RAW264.7 巨噬细胞中诱导 TNF- $\alpha$  的分泌中起了关键作用, 且 GAOS(G8) 和 MAOS(M7) 对 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的诱导作用最强。这可能是由于 MAOS 呈“带”状相对较直的聚合物, 而 GAOS 呈“脊柱”状。因此, G8 和 M7 在整个构象上的这种差异可能导致最有效的 GAOS 比 MAOS 多一个残基, 然而酸降解法制备的 SAOS 显示出较低的活性。因而, 酶降解法制备的 AOS 中存在不饱和末端结构是激活巨噬细胞的必要条件<sup>[61]</sup>。此外, Xu 等<sup>[5]</sup>也证明了 GOS 可提高 RAW264.7 巨噬细胞中诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达, 促进一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的生成, 并刺激活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和 TNF- $\alpha$  的产生。但 Yamamoto 等<sup>[62-63]</sup>研究发现 MAOS(M3-M6) 刺激 RAW264.7 巨噬细胞产生细胞因子的活性均高于 GAOS(G3-G6)。其中, M3 与 G3 之间的差异最明显。然而, 目前尚不清楚 MOS 和 GOS 对 RAW264.7 巨噬细胞上的识别位点和具体机制上的区别。上述研究结果可证明, AOS 的分子构象和分子量的大小可能是影响其诱导细胞因子活性的重要因素, 并证明了 AOS 可通过激活巨噬细胞并诱导多种具有免疫活性的细胞因子, 进而增强宿主免疫系统的能力。

巨噬细胞通过识别入侵机体的各类病原微生物及其产物, 并以吞噬的方式将其消化和清除, 进而保护机体免受病原微生物的感染<sup>[58]</sup>。激活巨噬细胞可产生 ROS 和各种细胞因子, 还可通过分泌 iNOS 催化 L-精氨酸产生 NO。酶降解法制备的 AOS(DP 2-5) 通过促进 RAW264.7 巨噬细胞中 iNOS 的表达来诱导 NO 的生成, 因此 NO 可作为炎症介质和特异性免疫调节剂<sup>[64]</sup>。方伟珊等<sup>[58]</sup>在体外和体内试验中证明: *Pseudoalteromonas* sp. strain 272 褐藻胶裂解酶

制备的 GAOS(DP 2-8) 介导 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节功能可分为以下几个步骤 (图 4): (1) 表面 Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 识别 CAOS; (2) TLR4 激活磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) 并诱导蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt or PKB) 磷酸化; (3) 磷酸化的 Akt 促进核转录因子  $\kappa$ B 抑制蛋白 (inhibitory protein, I $\kappa$ B) 磷酸化; (4) 进而释放核转录因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 并转位进入细胞核内; (5) 同时被激活的 Akt 还能通过磷酸化下游的雷帕霉素靶体蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 及核糖体 S6 蛋白激酶 (70 S6K); (6) 激活下游的转录因子, 促进 iNOS 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的

转录, 从而增加 NO 及 TNF- $\alpha$  的产生。促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 位于 TLR4 下游信号通路, 在机体固有和适应性免疫系统中起着重要的调节作用<sup>[58]</sup>。

GAOS 可激活 RAW264.7 巨噬细胞中 MAPK 信号通路中 p38、c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和细胞外信号调节的蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK), GAOS 通过识别 TLR4 介导 MAPK/JNK 磷酸化水平, 进而激活下游的转录因子 (AP-1) 调节相关基因的转录, 此外 GAOS 所激活的 p38 和 ERK 的磷酸化也参与了免疫介质的产生。然而这种激活方式不一定要通过 TLR4 所介导的

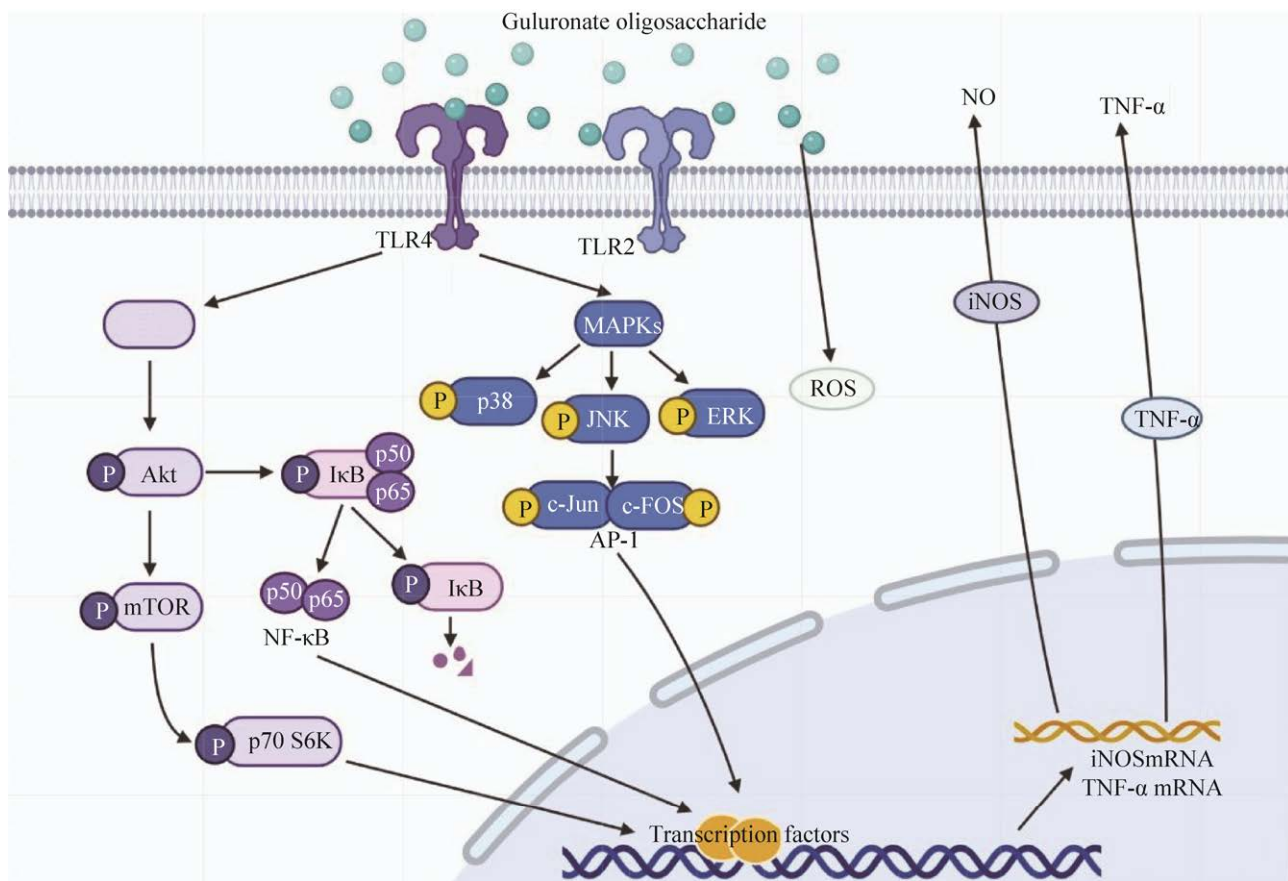


图 4 褐藻寡糖激活巨噬细胞 RAW264.7 发挥免疫调节的信号通路<sup>[58]</sup>

Figure 4 AOS activates the immunomodulatory signaling pathway of RAW264.7 macrophages<sup>[58]</sup>.



信号通路<sup>[58]</sup>, 因此, TLR4 并不是 GAOS 激活巨噬细胞的唯一受体。且已有研究发现, 1 mg/mL GAOS 还可诱导巨噬细胞补体受体的表达, 增加对经 IgG 调理的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的胞内杀菌作用和吞噬能力<sup>[65]</sup>。此外, GAOS 也能诱导巨噬细胞产生 ROS。ROS 是先天免疫系统的自由基效应因子, 可以直接抑制病原体的繁殖<sup>[65]</sup>。GAOS 还能识别 RAW264.7 细胞表面 TLR2 受体<sup>[61]</sup>。除了信号通路的激活外, GAOS 还可调节与抗氧化活性、糖酵解、细胞骨架过程和翻译延伸等相关的通路<sup>[66]</sup>。

### 2.3 抗氧化活性

AOS 具有清除自由基的作用, 可作为抗氧化剂。利用由产微球茎菌 (*Microbulbifer* sp.) ALW1 褐藻胶裂解酶制备的 AOS 由多数二糖和少数三糖组成, 其具有清除自由基 (DPPH、ABTS+和羟基) 和还原能力<sup>[39]</sup>。与壳聚糖和褐藻多糖相比, AOS 具有较强的羟自由基清除能力, 但对  $\text{Fe}^{2+}$  的清除能力和脂质过氧化的抑制能力较差<sup>[67]</sup>。由鞘氨醇杆菌 (*Sphingobacterium*) 褐藻胶裂解酶制备的 AOS (DP 2-4) 能完全抑制铁诱导的乳化亚油酸氧化过程中 TBARS 的形成, 且优于抗坏血酸。这可能是由于 AOS 的共轭烯酸结构有助于清除自由基的活性<sup>[4]</sup>。

AOS 的抗氧化活性与 AOS 中 G 和 M 的相对含量无关<sup>[68]</sup>。C5 羧基的方向是 G 和 M 之间唯一的结构差异, 它们的空间排列不会影响 AOS 的抗氧化活性, 但其制备方法、浓度和分子量可影响 AOS 的抗氧化活性。研究发现, 低分子量 (小于 10 kDa) 的 GAOS 和 MAOS 能够发挥更高的抗氧化活性<sup>[69]</sup>。通过酸水解法制备的 SAOS 的抗氧化活性和作用机理与未降解的褐藻胶相似, 然而通过酶降解法制备的 AOS 因具有共轭烯酸结构, 进而具有较好的抗氧化活性。因此, 通过酶降解法制备的 AOS 抗氧化活性高于褐藻胶和酸水解法制备的单糖或寡糖<sup>[4]</sup>。

AOS 的抗氧化机理可能是从氢键中提取氢, 氢与自由基加成结合到共轭烯酸结构中, 产生共振稳定的加成产物, 进而清除自由基<sup>[70]</sup>。在动物机体内, AOS 具有抵抗氧化应激和防止氧化损伤的作用。酶降解法制备的 AOS 可阻断由  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的氧化应激中内质网和线粒体产生的半胱天冬酶级联反应<sup>[8]</sup>。AOS 可通过抑制 GP91(phox) 和 4-羟基壬烯醛的表达, 进而减轻心脏氧化应激, 从而增加阿霉素损伤小鼠的存活率<sup>[35]</sup>。与高脂组相比, UAOS 可显著降低小鼠肝脏过氧化氢和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的水平, 减轻高脂诱导的 ROS 的形成<sup>[71]</sup>, 然而 SAOS 对抗氧化能力没有影响。AOS 可提高断奶仔猪血清中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶活性和总抗氧化 (total antioxidation capability, T-AOC) 能力以及肠道组织中 T-AOC 能力, 并降低血清和肠道组织中 MDA 的含量<sup>[59,72]</sup>。此外, 在肉鸡日粮中添加 MAOS 也可提高血清和胸肌中的谷胱甘肽过氧化物酶的浓度, 并降低肝脏和胸肌中 MDA 的含量, 进而提高肉鸡抗氧化能力<sup>[73]</sup>。因此, AOS 可通过酶促和非酶促抗氧化系统来提高动物的机体抗氧化防御能力, 并防止动物机体组织的脂质过氧化。

### 2.4 抗炎活性

炎症是机体抵御病原体入侵的重要防御机制, 可激活机体固有的免疫细胞。然而, 慢性或过度炎症可出现在慢性疾病过程中, 如炎症性肠病、风湿性多肌痛、关节炎、糖尿病、心血管疾病和神经退行性疾病<sup>[74]</sup>。AOS 可通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 和 NOD1/NF- $\kappa$ B 信号通路, 进而提高断奶仔猪的肠道抗炎功能<sup>[72]</sup>。通过不同的降解方法制备的 AOS 的抗炎效果明显不同。氧化降解法制备的 AOS 与使用其他方法制备的 AOS 相比, 具有更强的炎症抑制作用。通过氧化降解法制备的 AOS 可抑制脂多糖/ $\beta$ -淀粉样蛋白 (lipopolysaccharide, LPS/ $\beta$ -amyloid, A $\beta$ ) 刺激的

小胶质神经炎症, 进而促进 A $\beta$  小胶质细胞的吞噬能力<sup>[7]</sup>。氧化降解法制备的 AOS 通过阻断 NF- $\kappa$ B 和 MAPKs 信号通路的激活来抑制 LPS 活化的 RAW264.7 巨噬细胞的炎症反应, 而通过 *Pseudoalteromonas* sp. strain No. 272 褐藻胶裂解酶法和酸降解法制备的 AOS 没有抗炎活性<sup>[75]</sup>。AOS 通过提高小肠各类细胞簇的比例和数量, 增强小肠细胞的功能和发育, 进而缓解白消安诱导的小肠黏膜炎的细胞损伤, 并在 IPEC-J2 细胞中进一步研究发现 AOS 可通过甘露糖受体信号通路发挥作用<sup>[76]</sup>。此外, GAOS 和 MAOS 同样具有较好的抗炎活性, 可作为有效的抗炎药物。研究表明, 30 mg/kg GAOS 在佐剂诱导的关节炎、实验性自身免疫性脑脊髓炎、肾病综合征和肾小球肾炎等多种试验模型中具有免疫抑制作用<sup>[77]</sup>, GAOS 和 MAOS 的抗炎活性与炎症过程中 TLR4 信号通路的调节有关<sup>[78-80]</sup>。

## 2.5 益生元功效及抑菌活性

益生元是一些不被宿主消化吸收但可选择性地促进体内如双歧杆菌 *Bifidobacterium* 和乳酸菌 *Lactobacillus* 等有益菌的代谢和增殖, 并产生生物活性代谢物, 从而改善宿主健康的有机物质。通过体外培养试验发现, AOS 可刺激 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 的生长<sup>[6]</sup>。在小鼠日粮中添加 2.5% AOS 时, 其可选择地增加小鼠粪便中 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 的数量, 并降低肠杆菌科(Enterobacteriaceae)和肠球菌(Enterococci)的数量<sup>[6]</sup>。当 AOS 浓度为 0.625 g/L-1.25 g/L 时, 可以明显地缩短 *Bifidobacterium* 生长的适应期, 使其大量生长<sup>[81]</sup>。AOS 可提高断奶仔猪回肠中 *Bifidobacterium* 和 *Lactobacillus* 的数量, 降低盲肠和结肠中的大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 的数量<sup>[59]</sup>, 并提高了盲肠食糜中乙酸、丙酸和丁酸的浓度以及结肠中丁酸的浓度。因此, AOS 是一种有效

的 *Bifidobacterium* 的增殖因子, 为其开发为益生元提供了一定的科学依据。

AOS 可抑制革兰氏阴性和阳性细菌的生长, 表现出广谱抗菌活性, 具有潜在应用价值。其抑菌的作用可能是 AOS 先与细菌表面结合, 调节细菌表面电荷, 诱导微生物聚集, 进而抑制细胞的运动性, 破坏生物膜并增强抗生素的作用<sup>[82]</sup>。氧化降解法制备的 AOS 可抑制金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、*E. coli* 及藤黄微球菌 *Micrococcus luteus* 的生长, 但对真菌没有抑制作用<sup>[83]</sup>。Han 等<sup>[84]</sup>采用厌氧发酵系统, 研究了 AOS 对猪粪便微生物的发酵能力及影响。发酵 24 h 后, AOS 显著增加了 *Dysgonomonas* 的相对丰度, 并显著降低了埃希菌属 *Escherichia*、志贺氏菌属 *Shigella* 和嗜脲菌属 *Peptoniphilus* 的相对丰度, 同时提高了丁酸和戊酸的浓度。AOS 可减轻肠炎沙门氏菌对肉鸡生产性能的负面影响, 通过促进 *Lactobacillus* 生长、调节黏膜细胞因子表达和抗体产生, 并抑制沙门氏菌在盲肠的定殖<sup>[85]</sup>。此外, Zhu 等<sup>[73]</sup>也证明了 MAOS 可降低肉鸡盲肠中 *E. coli* 的数量, 并提高乙酸的浓度。

## 2.6 抗糖尿病活性

糖尿病是常见的代谢性疾病, 发达国家和发展中国家糖尿病的发病率都在不断上升。近年来, 人们对多种多糖和寡糖进行了研究, 并证实了其抗糖尿病活性。其中, AOS 和硫酸酸化 AOS 具有强大的降糖作用<sup>[86]</sup>。AOS 和甘露酸盐-铬复合物可用于辅助治疗 II 型糖尿病, 其可增强胰岛素敏感性, 毒性比常用的二甲双胍低<sup>[77]</sup>。Yang 等<sup>[87]</sup>研究发现, AOS 在体外和体内对 HepG2 细胞均有较强的抗糖尿病活性, 其通过调节 JNK-IRS1/PI3K 信号通路抑制葡萄糖水平的升高, 防止体重增加, 同时刺激胰岛素的分泌, 提高葡萄糖耐量。

## 2.7 其他活性

除了上述生物学活性外, AOS 还具有降血压、抗哮喘、抗肥胖和神经保护活性。此外, AOS 还可调节细胞生长及胆固醇代谢, 防护射线辐射等<sup>[21]</sup>。

## 3 总结与展望

AOS 是一种有开发前途的天然添加剂, 阐明 AOS 的结构与生物活性之间的关系有助于靶向制备具有特定组成和结构特征的 AOS<sup>[88]</sup>, 从而应用于食品、药品和饲料添加剂等领域。AOS 的生物活性由制备方法、M/G 比例、分子量、空间构象及其衍生物等多种因素决定。与物理降解法、化学降解法和有机合成法相比, 酶降解法具有明显的优势。首先, 酶促反应是安全的, 因为反应过程中几乎不需要化学试剂, 并在温和的条件下制备 AOS, 可避免辐射、消耗较少的能源并有较高的收率<sup>[4]</sup>。其次, 酶降解法制备的 AOS 是不饱和褐藻寡糖, 可调节机体免疫和抗氧化功能。氧化降解法制备的 AOS 由于末端存在羧基具有较好的抗炎功能; 酸水解制备通过非选择性地断裂分子间的糖苷键<sup>[77]</sup>, 所得 AOS 保留了褐藻胶的大分子结构, 形成饱和和寡糖产物, 生物活性较低。此外, AOS 通过硫酸化、醇化等不同化学结构的修饰也可调节机体的生物活性<sup>[38]</sup>。但是, 目前对 AOS 的结构与生物活性之间关系的研究还不够深入, 大部分研究集中在 AOS 混合物的生物活性上, 并多以体外模型研究为主, 从而限制了 AOS 的进一步开发和利用。

## REFERENCES

- [1] Draget KI and Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll*, 2011, 25(2): 251-256.
- [2] Liu M, Liu L, Zhang H-F, et al. Alginate oligosaccharides preparation, biological activities and their application in livestock and poultry. *J Integ Agr*, 2021, 20: 24-34.
- [3] Siddhesh NP and Kevin JE. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 2012, 33(11): 3279-3305.
- [4] Falkeborg M, Cheong LZ, Gianfico C, et al. Alginate oligosaccharides: enzymatic preparation and antioxidant property evaluation. *Food Chem*, 2014, 164: 185-194.
- [5] Xu X, Wu X, Wang Q, et al. Immunomodulatory effects of alginate oligosaccharides on murine macrophage RAW264.7 cells and their structure-activity relationships. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(14): 3168-3176.
- [6] Wang Y, Han F, Hu B, et al. *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutr Res*, 2006, 26(11): 597-603.
- [7] Zhou R, Shi XY, Bi DC, et al. Alginate-derived oligosaccharide inhibits neuroinflammation and promotes microglial phagocytosis of  $\beta$ -amyloid. *Mar Drugs*, 2015, 13(9): 5828-5846.
- [8] Tusi SK, Khalaj L, Ashabi G, et al. Alginate oligosaccharide protects against endoplasmic reticulum- and mitochondrial-mediated apoptotic cell death and oxidative stress. *Biomaterials*, 2011, 32(23): 5438-5458.
- [9] Han Y, Zhang L, Yu X, et al. Alginate oligosaccharide attenuates  $\alpha$ 2,6-sialylation modification to inhibit prostate cancer cell growth via the Hippo/YAP pathway. *Cell Death Dis*, 2019, 10(5): 374.
- [10] Chi FC, Kulkarni SS, Zulueta MM, et al. Synthesis of alginate oligosaccharides containing L-guluronic acids. *Chem Asian J*, 2009, 4(3): 386-390.
- [11] Guo W, Feng J, Geng W, et al. Augmented production of alginate oligosaccharides by the *Pseudomonas mendocina* NK-01 mutant. *Carbohydr Res*, 2012, 352: 109-116.
- [12] Hu BY, Nie Y, Sun L, et al. Antioxidant evaluation of alginate oligosaccharides prepared by acid hydrolysis with different conditions. *Sci Tech Food Ind*, 2016, 37(10): 136-140.
- [13] Larsen B and Haug A. Chemical composition of the brown alga *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol.: presence of reducing compounds in *Ascophyllum nodosum*. *Nature*, 1958, 181(4617): 1224-1224.
- [14] Shimokawa T, Yoshida S, Takeuchi T, et al. Preparation

- of two series of oligo-guluronic acids from sodium alginate by acid hydrolysis and enzymatic degradation. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(9): 1532-1534.
- [15] Chandía NP, Matsuhira B, and Vásquez AE. Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydr Polym*, 2001, 46: 81-87.
- [16] 张洪荣, 王长云, 刘斌, 等. 一种饱和褐藻胶寡糖的制备方法. *中国海洋药物*, 2006, 25(03): 1-6.  
Zhang HR, Wang CY, Liu B, et al. A method for preparation of saturated oligosaccharides from alginate. *Chin J Mar Drugs*, 2006(3): 1-6 (in Chinese).
- [17] Mao S, Zhang T, Sun W, et al. The depolymerization of sodium alginate by oxidative degradation. *Pharm Dev Technol*, 2012, 17(6): 763-769.
- [18] Yang Z, Li J-P, and Guan H-S. Preparation and characterization of oligomannuronates from alginate degraded by hydrogen peroxide. *Carbohydr Polym*, 2004, 58(2): 115-121.
- [19] El-Mohdy HLA. Radiation-induced degradation of sodium alginate and its plant growth promotion effect. *Arab J Chem*, 2017, 10: S431-S438.
- [20] Zhu B, Ni F, Xiong Q, et al. Marine oligosaccharides originated from seaweeds: source, preparation, structure, physiological activity and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020: 1-15.
- [21] Liu J, Yang S, Li X, et al. Alginate oligosaccharides: production, biological activities, and potential applications. *Compr Rev Food Sci F*, 2019, 18(6): 1859-1881.
- [22] Mrudulakumari Vasudevan U, Lee OK, and Lee EY. Alginate derived functional oligosaccharides: recent developments, barriers, and future outlooks. *Carbohydr Polym*, 2021, 267: 1-18.
- [23] Aida TM, Yamagata T, Watanabe M, et al. Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions. *Carbohydr Polym*, 2010, 80(1): 296-302.
- [24] 刘海超, 张健, 王共明, 等. 褐藻胶的降解方法及其产物生物活性研究进展. *食品工业科技*, 2020, 41(13): 350-357, 363.  
Liu HC, Zhang J, Wang GM. Advances in degradation methods of alginate and bioactivity of its degradation products. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(13): 350-357, 363 (in Chinese).
- [25] Ertesvåg H. Alginate-modifying enzymes: biological roles and biotechnological uses. *Front Microbiol*, 2015, 6: 523.
- [26] Yamasaki M, Moriwaki S, Miyake O, et al. Structure and function of a hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* protein PA1167 classified into family PL-7: a novel alginate lyase with a beta-sandwich fold. *J Biol Chem*, 2004, 279(30): 31863-31872.
- [27] Moen E, Horn S, and Østgaard K. Alginate degradation during anaerobic digestion of *Laminaria hyperborea* stipes. *J Appl Phycol*, 1997, 9(2): 157-166.
- [28] Li M, Shang Q, Li G, et al. Degradation of marine algae-derived carbohydrates by bacteroidetes isolated from human gut microbiota. *Mar Drugs*, 2017, 15(4): 92.
- [29] Tang JC, Taniguchi H, Chu H, et al. Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 48(1): 38-43.
- [30] Yang JH, Bang MA, Jang CH, et al. Alginate oligosaccharide enhances LDL uptake via regulation of LDLR and PCSK9 expression. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(11): 1393-1400.
- [31] Wang M, Chen L, Liu Z, et al. Isolation of a novel alginate lyase-producing *Bacillus litoralis* strain and its potential to ferment *Sargassum horneri* for biofertilizer. *Microbiologyopen*, 2016, 5(6): 1038-1049.
- [32] An QD, Zhang GL, Wu HT, et al. Properties of an alginate-degrading *Flavobacterium* sp. strain LXA isolated from rotting algae from coastal China. *Can J Microbiol*, 2008, 54(4): 314-320.
- [33] Choi D, Piao YL, Shin WS, et al. Production of oligosaccharide from alginate using *Pseudoalteromonas agarovorans*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(2): 438-452.
- [34] He X, Hwang HM, Aker WG, et al. Synergistic combination of marine oligosaccharides and azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*, 2014, 169(9-10): 759-767.
- [35] Guo JJ, Ma LL, Shi HT, et al. Alginate oligosaccharide prevents acute doxorubicin cardiotoxicity by suppressing oxidative stress and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis. *Mar Drugs*, 2016, 14: 231.
- [36] Liu H, Zhang YH, Yin H, et al. Alginate

- oligosaccharides enhanced *Triticum aestivum* L. tolerance to drought stress. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 62: 33-40.
- [37] Tang J, Zhou Q, Chu H, et al. Characterization of alginase and elicitor-active oligosaccharides from *Gracilibacillus* A7 in alleviating salt stress for *Brassica campestris* L. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7896-7901.
- [38] Hu XK, Jiang XL, Hwang HM, et al. Antitumour activities of alginate-derived oligosaccharides and their sulphated substitution derivatives. *Eur J Phycol*, 2004, 39: 67-71.
- [39] Zhu YB, Wu LY, Chen YH, et al. Characterization of an extracellular bifunctional alginate lyase from marine *Microbulbifer* sp. ALW1 and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Microbiol Res*, 2016, 182: 49-58.
- [40] Zhu B, Chen M, Yin H, et al. Enzymatic hydrolysis of alginate to produce oligosaccharides by a new purified endo-type alginate lyase. *Mar Drugs*, 2016, 14(6): 2-11.
- [41] Li L, Jiang X, Guan H, et al. Preparation, purification and characterization of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Pseudomonas* sp. HZJ 216. *Carbohydr Res*, 2011, 346(6): 794-800.
- [42] Yamasaki Y, Yokose T, Nishikawa T, et al. Effects of alginate oligosaccharide mixtures on the growth and fatty acid composition of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biosci Bioeng*, 2012, 113(1): 112-116.
- [43] Chaki T, Kajimoto N, Ogawa H, et al. Metabolism and calcium antagonism of sodium alginate oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(8): 1819-1825.
- [44] Maitena U, Katayama S, Sato R, et al. Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fisheries Sci*, 2004, 70: 896-902.
- [45] Chen Y, Dou W, Li H, et al. The alginate lyase from *Isoptericola halotolerans* CGMCC 5336 as a new tool for the production of alginate oligosaccharides with guluronic acid as reducing end. *Carbohydr Res*, 2018, 470: 36-41.
- [46] Huang G, Wang Q, Lu M, et al. AlgM4: a new salt-activated alginate lyase of the PL7 family with endolytic activity. *Mar Drugs*, 2018, 16(4): 120.
- [47] Zhu B, Hu F, Yuan H, et al. Biochemical characterization and degradation pattern of a unique pH-stable PolyM-specific alginate lyase from newly isolated *Serratia Marcescens* NJ-07. *Mar Drugs*, 2018, 16(4): 129.
- [48] Zhu B, Sun Y, Ni F, et al. Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. NJU-03. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108: 1140-1147.
- [49] Pei X, Chang Y, and Shen J. Cloning, expression and characterization of an endo-acting bifunctional alginate lyase of marine bacterium *Wenyingshuangia fucanilytica*. *Protein Expr Purif*, 2019, 154: 44-51.
- [50] Zhu B, Ni F, Sun Y, et al. Elucidation of degrading pattern and substrate recognition of a novel bifunctional alginate lyase from *Flammeovirga* sp. NJ-04 and its use for preparation alginate oligosaccharides. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 13.
- [51] Chen P, Zhu Y, Men Y, et al. Purification and characterization of a novel alginate lyase from the marine bacterium *Bacillus* sp. Alg07. *Mar Drugs*, 2018, 16(3): 86.
- [52] Yan J, Chen P, Zeng Y, et al. The characterization and modification of a novel bifunctional and robust alginate lyase derived from *Marinimicrobium* sp. H1. *Mar Drugs*, 2019, 17(10): 545.
- [53] Fischer A and Wefers D. Chromatographic analysis of alginate degradation by five recombinant alginate lyases from *Cellulophaga algicola* DSM 14237. *Food Chem*, 2019, 299: 1-8.
- [54] Iwamoto Y, Xu X, Tamura T, et al. Enzymatically depolymerized alginate oligomers that cause cytotoxic cytokine production in human mononuclear cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(2): 258-263.
- [55] Gombotz WR and Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliver Rev*, 2012, 64: 194-205.
- [56] Chen JY, Hu Y, Zhang LR, et al. Alginate oligosaccharide DP5 exhibits antitumor effects in osteosarcoma patients following surgery. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 623.
- [57] Takahashi K, Watanuki Y, Yamazaki M, et al. Local induction of a cytotoxic factor in a murine tumour by systemic administration of an antitumour polysaccharide, MGA. *Brit J Cancer*, 1988, 57(2): 170-173.

- [58] 方伟珊. 褐藻胶寡糖对巨噬细胞信号转导的调节作用研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2016.  
Fang WS. Study of the regulatory effects of alginate oligosaccharide on regulation of signal transduction in macrophages [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2016 (in Chinese).
- [59] Wan J, Jiang F, Xu Q, et al. Alginic acid oligosaccharide accelerates weaned pig growth through regulating antioxidant capacity, immunity and intestinal development. *RSC Adv*, 2016, 6(90): 87026-87035.
- [60] Kurachi M, Nakashima T, Miyajima C, et al. Comparison of the activities of various alginates to induce TNF- $\alpha$  secretion in RAW264.7 cells. *J Infect Chemother*, 2005, 11(4): 199-203.
- [61] Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, et al. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells. *FEBS Lett*, 2005, 579(20): 4423-4429.
- [62] Yamamoto Y, Kurachi M, Yamaguchi K, et al. Induction of multiple cytokine secretion from RAW264.7 cells by alginate oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(1): 238-241.
- [63] Yamamoto Y, Kurachi M, Yamaguchi K, et al. Stimulation of multiple cytokine production in mice by alginate oligosaccharides following intraperitoneal administration. *Carbohydr Res*, 2007, 342(8): 1133-1137.
- [64] Ueno M, Cho K, Nakazono S, et al. Alginate oligomer induces nitric oxide (NO) production in RAW264.7 cells: elucidation of the underlying intracellular signaling mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(11): 1787-1793.
- [65] Xu X, Bi DC, Wu XT, et al. Unsaturated guluronate oligosaccharide enhances the antibacterial activities of macrophages. *FASEB J*, 2014, 28(6): 2645-2654.
- [66] Xu X, Cheng D, Chao B, et al. Morphological and proteomic analyses reveal that unsaturated guluronate oligosaccharide modulates multiple functional pathways in murine macrophage RAW264.7 cells. *Mar Drugs*, 2015, 13(4): 1798-1818.
- [67] Wang P, Jiang X, Jiang Y, et al. *In vitro* antioxidative activities of three marine oligosaccharides. *Nat Prod Res*, 2007, 21(7): 646-654.
- [68] Ueno M, Hiroki T, Takeshita S, et al. Comparative study on antioxidative and macrophage-stimulating activities of polyguluronic acid (PG) and polymannuronic acid (PM) prepared from alginate. *Carbohydr Res*, 2012, 352: 88-93.
- [69] Zhao X, Li B, Xue C, et al. Effect of molecular weight on the antioxidant property of low molecular weight alginate from *Laminaria japonica*. *J Appl Phycol*, 2012, 24(2): 295-300.
- [70] Hernandez-Marin E and Martínez A. Carbohydrates and their free radical scavenging capability: a theoretical study. *J Phys Chem B*, 2012, 116(32): 9668-9675.
- [71] Li S, He N, and Wang L. Efficiently anti-obesity effects of unsaturated alginate oligosaccharides (UAOS) in high-fat diet (HFD)-fed mice. *Mar Drugs*, 2019, 17(9): 540.
- [72] Wan J, Zhang J, Chen D, et al. Alginate oligosaccharide enhances intestinal integrity of weaned pigs through altering intestinal inflammatory responses and antioxidant status. *RSC Adv*, 2018, 8(24): 13482-13492.
- [73] Zhu W, Li D, Wang J, et al. Effects of polymannuronate on performance, antioxidant capacity, immune status, cecal microflora, and volatile fatty acids in broiler chickens. *Poult Sci*, 2015, 94(3): 345-352.
- [74] Saigusa M, Nishizawa M, Shimizu Y, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of digested peptides derived from salmon myofibrillar protein conjugated with a small quantity of alginate oligosaccharide. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(9): 1518-1527.
- [75] Zhou R, Shi XY, Gao Y, et al. Anti-inflammatory activity of guluronate oligosaccharides obtained by oxidative degradation from alginate in lipopolysaccharide-activated murine macrophage RAW 264.7 cells. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(1): 160-168.
- [76] Zhao Y, Feng Y, Liu M, et al. Single-cell RNA sequencing analysis reveals alginate oligosaccharides preventing chemotherapy-induced mucositis. *Mucosal Immunology*, 2020, 13(3): 437-448.
- [77] Xing M, Cao Q, Wang Y, et al. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides. *Mar Drugs* 2020, 18(3): 144.
- [78] Aletaha S, Haddad L, Roozbehkia M, et al. M2000 ( $\beta$ -D-mannuronic acid) as a novel antagonist for blocking the TLR2 and TLR4 downstream signalling pathway. *Scand J Immunol*, 2017, 85(2): 122-129.
- [79] Hajivalili M, Pourgholi F, Majidi J, et al. G2013

- modulates TLR4 signaling pathway in IRAK-1 and TIRAP-6 dependent and miR-146a independent manner. *Cell Mol Biol*, 2016, 62(4): 1-5.
- [80] Mortazavi-Jahromi SS, Farazmand A, Motamed N, et al. Effects of guluronic acid (G2013) on SHIP1, SOCS1 induction and related molecules in TLR4 signaling pathway. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 323-329.
- [81] 李森, 张晓楠, 马莲菊, 等. 褐藻胶寡糖对双歧杆菌体外生长影响的研究. *食品研究与开发*, 2008(11): 16-19.
- Miao L, Zhang XN, Ma LJ, et al. Effects of alginate derived oligosaccharide on the growth of *Bifidobacterium in vitro*. *Food Res Deve*, 2008(11): 16-19 (in Chinese).
- [82] Powell LC, Pritchard MF, Emanuel C, et al. A nanoscale characterization of the interaction of a novel alginate oligomer with the cell surface and motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014, 50(3): 483-492.
- [83] Dou Y and H PH. Preparation of alginate oligosaccharide and studies on antimicrobial activity. *Guangdong Agricul Sci*, 2009(12): 161-163, 179.
- [84] Han Z-L, Yang M, Fu X-D, et al. Evaluation of prebiotic potential of three marine algae oligosaccharides from enzymatic hydrolysis. *Mar Drugs*, 2019, 17(3): 173.
- [85] Yan GL, Guo YM, Yuan JM, et al. Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chickens. *Poultry Sci*, 2011, 90(7): 1441-1448.
- [86] Wang X, Liu F, Gao Y, et al. Transcriptome analysis revealed anti-obesity effects of the sodium alginate in high-fat diet -induced obese mice. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115: 861-870.
- [87] Yang CF, Lai SS, Chen YH, et al. Anti-diabetic effect of oligosaccharides from seaweed *Sargassum confusum* via JNK-IRS1/PI3K signalling pathways and regulation of gut microbiota. *Food Chem Toxicol*, 2019, 131: 110562.
- [88] Aarstad OA, Tøndervik A, Sletta H, et al. Alginate sequencing: an analysis of block distribution in alginates using specific alginate degrading enzymes. *Biomacromolecules*, 2012, 13(1): 106-116.

(本文责编 陈宏宇)