

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.07.018

# 超微粉碎辅助酶解法制备海参冻干粉的生物活性分析

金丹莉<sup>1,2</sup>, 程逸潮<sup>1,2</sup>, 洪杏德<sup>3</sup>, 董秀萍<sup>4,5</sup>, 陈跃文<sup>1,4,5\*</sup>

(1. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018; 2. 浙江工商大学 东海食品台州研究院, 浙江 台州 318000; 3. 青岛纽萃生生物健康科技有限公司, 山东 青岛 266071; 4. 大连工业大学 食品学院, 辽宁 大连 116034; 5. 国家海洋食品工程技术研究中心, 辽宁 大连 116034)

**摘要:** 以超微粉碎辅助酶解法制备的海参(*Cucumaria frondosa*)冻干粉为研究对象, 通过 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和还原力、HeLa 细胞增殖抑制率、小鼠转棒实验及血乳酸(lactic acid, LA)含量和环磷酰胺(cyclophosphamide, CY)诱导的免疫缺陷小鼠实验及免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)含量, 分别研究海参冻干粉的抗氧化能力、抗肿瘤、抗疲劳和提高免疫力的能力。结果表明, DPPH 自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 为 12.46 mg/mL, 羟基自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 为 15.22 mg/mL, 还原力为 0.35, 表明海参冻干粉具有抗氧化能力。海参冻干粉对 HeLa 细胞增殖抑制率的 IC<sub>50</sub> 为 556.2 μg/mL, 表现出抗肿瘤能力。通过灌胃海参冻干粉, 小鼠转棒运动时间随着剂量升高而延长, 运动后高剂量组的 LA 含量(19.15 mmol/L)较低, 说明小鼠运动耐力提高, 且 CY 诱导的免疫缺陷小鼠降低了体质量的下降速率, 高剂量组 IgG 含量恢复到 11.98 mg/mL。综上, 海参冻干粉具有抗氧化、抗肿瘤抗疲劳和提高免疫力的多功能活性潜力。

**关键词:** 海参冻干粉; 超微粉碎; 复合酶解; 抗氧化; 抗肿瘤; 抗疲劳; 增强免疫力

## Bioactivity of Sea Cucumber Freeze-Dried Powder Prepared by Vibration-Assisted Milling Combined with Enzymatic Hydrolysis

JIN Danli<sup>1,2</sup>, CHENG Yichao<sup>1,2</sup>, HONG Xingde<sup>3</sup>, DONG Xiuping<sup>4,5</sup>, CHEN Yuewen<sup>1,4,5\*</sup>

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China; 2. Donghai Food Research Institute (Taizhou), Zhejiang Gongshang University, Taizhou 318000, Zhejiang, China; 3. Qingdao Niucuisheng Biotechnology Co., Ltd., Qingdao 266071, Shandong, China; 4. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 5. National Engineering Research Center of Seafood, Dalian 116034, Liaoning, China)

**Abstract:** Sea cucumber freeze-dried powder was prepared by vibration-assisted milling combined with enzymatic hydrolysis. The antioxidant activity of the sea cucumber freeze-dried powder was evaluated based on the DPPH and hydroxyl radical scavenging rates and reducing power. The anti-tumor activity was examined based on the proliferation inhibition rate of HeLa cells. The rotarod test of mice and the blood lactic acid (LA) content were employed to measure the anti-fatigue activity. The mouse model of cyclophosphamide (CY)-induced immune deficiency and the immunoglobulin G (IgG) content were employed to assess the immunity-enhancing activity of the powder. The prepared sea cucumber freeze-dried powder showed the IC<sub>50</sub> of 12.46 mg/mL and 15.22 mg/mL for scavenging DPPH and hydroxyl free radicals, respectively, and the reducing power of 0.35, which indicated that the sea cucumber freeze-dried powder possessed antioxidant activity. The sea cucumber freeze-dried powder showed the IC<sub>50</sub> of 556.2 μg/mL on the proliferation of HeLa cells, demonstrating anti-tumor activity. The administration of sea cucumber freeze-dried powder prolonged the duration of rotarod exercise of mice in a dose-dependent manner, and the LA content (19.15 mmol/L) in the high-dose group piled up less after exercise, which suggested that the powder improved the exercise endurance of mice. Furthermore, the sea cucumber freeze-dried powder slowed down the body weight loss in the mouse model of CY-induced im-

作者简介: 金丹莉(1999—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品加工技术与理论。

\*通信作者: 陈跃文(1985—), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 食品加工技术与理论。

mune deficiency in a dose-dependent manner, and the IgG content in the high-dose group was restored to 11.98 mg/mL. In conclusion, sea cucumber freeze-dried powder has antioxidant, anti-tumor, anti-fatigue, and immunity-enhancing activities.

**Key words:** sea cucumber freeze-dried powder; vibration-assisted milling; compound enzymatic hydrolysis; antioxidant; anti-tumor; anti-fatigue; immunity enhancement

引文格式:

金丹莉,程逸潮,洪杏德,等.超微粉碎辅助酶解法制备海参冻干粉的生物活性分析[J].食品研究与开发,2024,45(7):125-132.

JIN Danli, CHENG Yichao, HONG Xingde, et al. Bioactivity of Sea Cucumber Freeze-Dried Powder Prepared by Vibration-Assisted Milling Combined with Enzymatic Hydrolysis[J]. Food Research and Development, 2024, 45(7): 125-132.

海参(*Cucumaria frondosa*)是加拿大东海岸数量最多、分布最广的物种之一,至2017年,捕捞量已达9万t以上,价值在1830万美金以上,常以冷冻、腌制和干品等形式出口到世界市场<sup>[1]</sup>。但是相较于刺参(*Stichopus japonicus*),海参仍然属于低产值品种,有待更多地商业开发。然而,传统的热加工方式容易导致海参形态不完整、破坏整体口感等,而且在贮藏过程中,容易变硬、变黏和降低食用品质等,不适合长途运输和远距离销售<sup>[2]</sup>。将食品原料加工成粉末主要是为了保持其稳定性,便于长途运输和食用,还能将其用作调味品、色素和功能成分,因此此加工方式广泛应用于食品领域<sup>[3]</sup>。超微粉碎是一种能够改变物料粒径的新兴机械技术,常应用于面粉、奶粉、水果和蔬菜等,但在水产品领域中应用较少。Wu等<sup>[4]</sup>利用超微粉碎生产的鲤鱼骨粉,其溶解性和蛋白溶解性等均得到了提高。此外,超微粉碎技术能够提高物料的酶解速率<sup>[5]</sup>。目前,关于超微粉碎辅助酶解法制备产品的生物活性研究相对较少。冷冻干燥是一种改善蛋白质水解物的稳定性、延长保质期和提高品质的技术手段<sup>[6]</sup>。例如,Dadi等<sup>[7]</sup>研究表明冻干微胶囊的总酚含量、总黄酮含量、抗氧化活性和消化率均明显高于喷雾干燥微胶囊;Xie等<sup>[8]</sup>研究表明水稻蛋白水解物冻干法比喷雾干燥法具有更高的羟基自由基和DPPH自由基清除活性。研究表明,海参含有20种酚类化合物,有利于提高产品附加价值<sup>[9]</sup>。Senadheera等<sup>[10]</sup>研究发现海参具有完整的必需氨基酸组成,因此海参蛋白酶解物可作为功能食品成分。然而,针对超微粉碎辅助酶解法制备的海参冻干粉的生物活性研究较少。

本文对超微粉碎辅助酶解法制备的海参冻干粉进行抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳和增强免疫力的生物活性研究,以期对海参的精深加工形式提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

海参[体质量(100±10)g,体长(10±2.5)cm]:青岛

纽萃生生物健康科技有限公司;食品级中性蛋白酶(23 000 U/g)、食品级木瓜蛋白酶(102 000 U/g):浙江一诺医药有限公司;水杨酸:上海麦克林生化科技有限公司;1,1-二苯基-2-三硝基苯胍(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH):上海阿拉丁生化科技股份有限公司;硫酸亚铁七水合物、铁氰化钾:上海源叶生物科技有限公司;无水三氯化铁、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO):国药集团化学试剂有限公司;HeLa细胞:通派(上海)生物科技有限公司;青霉素-链霉素溶液:上海碧云天生物技术股份有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI-1640:武汉普诺赛生命科技有限公司;C57BL/6雄性小鼠:杭州派思奥生物科技有限公司;无特定病原体(specific pathogen free, SPF)小鼠维持饲料:沈阳茂华生物科技有限公司;注射用环磷酰胺(cyclophosphamide, CY):江苏盛迪医药有限公司;细胞计数-8(cell counting kit-8, CCK-8)检测试剂盒、免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)测试盒、乳酸(lactic acid, LA)测试盒:南京建成生物工程研究所;以上化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

斩拌机(CM-14):无锡市哈克逊工贸有限公司;振动式细胞级超微粉碎机(XDW-6J):济南达微机械有限公司;冷冻干燥机(SCIENTZ-100FG/A):宁波新芝冻干设备股份有限公司;二氧化碳细胞培养箱(BPN-150CRH):上海一恒科学仪器有限公司;小鼠转棒式疲劳仪(KW-6C):南京卡尔文生物科技有限公司;电子天平(XPR106DUH/AC):梅特勒-托利多科技(中国)有限公司;全波长酶标仪(Multiskan SkyHigh):赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 超微粉碎制备海参冻干粉

海参用流水解冻后浸泡脱盐4h。随后,利用斩拌机和振动式细胞级超微粉碎机物理粉碎海参体壁。加入物料质量1.5%的活性酶(木瓜蛋白酶与中性蛋白酶

质量比1:2)酶解,酶解温度45℃,酶解时间3.5 h。酶解结束后,沸水浴灭酶10 min,将酶解液冷冻干燥48 h,得到海参冻干粉。

### 1.3.2 海参冻干粉抗氧化活性的测定

#### 1.3.2.1 DPPH 自由基清除能力的测定

参考 Wu 等<sup>[11]</sup>的 DPPH 自由基清除能力的测定方法,并作适当修改。配制浓度为0、5、10、15、20 mg/mL 的海参冻干粉溶液,吸取1 mL 样品,加入4 mL 以无水乙醇配制的0.2 mmol/L DPPH 溶液,避光反应30 min后,8 000 r/min 离心5 min。取200 μL 反应后溶液于96 孔板,于517 nm 下用全波长酶标仪测定吸光度 $A_1$ ,同时测定1 mL 样品溶液与4 mL 无水乙醇溶液混合后的吸光度 $A_2$ ,以及1 mL 去离子水与4 mL 的 DPPH 自由基溶液混合后的吸光度 $A_3$ 。平行3次取平均值。按照以下公式计算样品对 DPPH 自由基清除率( $X, \%$ )。

$$X = [1 - (A_1 - A_2)/A_3] \times 100$$

#### 1.3.2.2 羟基自由基清除能力的测定

参考 Ren 等<sup>[12]</sup>的测定羟基自由基清除能力的方法,并作适当修改。分别取1 mL 海参冻干粉溶液、2 mL 的6 mmol/L 亚硫酸铁溶液、2 mL 的6 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液和2 mL 的6 mmol/L 过氧化氢溶液,混合均匀,37℃ 孵育60 min,8 000 r/min 离心5 min。在510 nm 下测定吸光度 $A_1$ ,去离子水代替过氧化氢溶液测定其吸光度 $A_2$ ,去离子水代替样品溶液平行测定其吸光度 $A_3$ 。按照以下公式计算样品对羟基自由基的清除率( $Y, \%$ )。

$$Y = [1 - (A_1 - A_2)/A_3] \times 100$$

#### 1.3.2.3 还原力的测定

参考 Li 等<sup>[13]</sup>的测定方法,稍作修改。取1 mL 海参冻干粉溶液、2.5 mL 的0.2 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值为6.6)和2.5 mL 的1% 铁氰化钾溶液混合均匀,在50℃ 下恒温孵育20 min。冷却至室温后,加入2.5 mL 的10% 三氯化铁溶液,静置10 min,然后8 000 r/min 离心5 min。取2.5 mL 上清液、2.5 mL 蒸馏水和0.5 mL 0.1% 三氯化铁溶液,反应10 min。待体系颜色由黄色变为蓝色,取200 μL 于96 孔板,在700 nm 处测定吸光度,吸光度越高代表还原能力越强。

### 1.3.3 海参冻干粉对 HeLa 细胞的影响

#### 1.3.3.1 细胞培养

采用含10% FBS 和1% 青霉素-链霉素溶液的 RPMI-1640 培养基,在5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养箱中进行 HeLa 细胞的培养。

待测海参冻干粉溶液:10.0 mg 海参冻干粉用1 mL DMSO 溶解,再用 RPMI-1640 培养基稀释至0、10、100、1 000、2 000、3 000 μg/mL,最终 DMSO 在培养体系中的体积含量需小于0.5%,以避免溶剂毒性。最后,利用微孔滤膜(0.22 μm)除菌,于4℃ 储存备用。

#### 1.3.3.2 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率

在倒置显微镜下观察 HeLa 细胞的生长状态。生长良好的细胞,采用0.25% 胰蛋白酶消化液消化,制备细胞悬液。利用培养基调整细胞密度约为 $5 \times 10^4$  个/mL,接种于96 孔板。除空白组外,加入100 μL 细胞悬液,在37℃、5% 二氧化碳条件下培养24 h,使细胞贴壁生长。第2天弃去旧的培养基,实验组和空白组加入100 μL 海参冻干粉溶液,阴性对照组加入100 μL DMSO 溶液,培养24、48 h 和72 h。培养结束后,加入10 μL 的 CCK-8 溶液,置于细胞培养箱培养1 h 后,在450 nm 测吸光度,按以下公式计算 HeLa 细胞增殖抑制率( $Z, \%$ )<sup>[14]</sup>。

$$Z = [1 - (A_1 - A_2)/(A_3 - A_2)] \times 100$$

式中: $A_1$  为实验组(含有细胞、培养基、CCK-8 和含 DMSO 的待测试样)吸光度; $A_2$  为空白组(只含有培养基、CCK-8 和含 DMSO 的待测试样,无细胞)吸光度; $A_3$  为阴性对照组(含有细胞、培养基、CCK-8 和 DMSO 溶液,无待测样品)吸光度。

参考王丽娇<sup>[15]</sup>的方法,按以下公式计算半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>( $H$ )。

$$H = Y_m - B \times [H - (3 - Z_m - Z_n)/4]$$

式中: $Y_m$  为最大药物剂量,1 g; $B$  为最大药物剂量/相邻剂量; $H$  为细胞增殖抑制率之和, $\%$ ; $Z_m$  为最大细胞增殖抑制率, $\%$ ; $Z_n$  为最小细胞增殖抑制率, $\%$ 。

#### 1.3.4 动物实验

C57BL/6 雄性小鼠,实验动物生产许可证编号 SCXK(沪)2017-0005,6~8 周龄,18~22 g,每组6只,共54只。小鼠饲养条件为 SPF 小鼠维持饲料,室温控制在20~25℃,湿度控制在50%~60%,明暗交替各12 h,自由饮水取食,鼠笼每2 d 换洗1次。基础饲料适应环境性喂养7 d。

#### 1.3.5 模型建立、实验分组及给药

分别进行抗疲劳和增强免疫力实验,具体实验方法如下。

急性疲劳小鼠模型的建立<sup>[16]</sup>:在正式实验前3 d,将灌胃30 min 后的小鼠放于40 r/min 的小鼠转棒式疲劳仪上进行5 min 转棒实验,作为实验前的适应性训练。在连续灌胃14 d 后测定转棒时间。对照组:0.3 mL 生理盐水;低剂量组:0.3 mL 生理盐水+200 mg/kg 海参冻干粉;中剂量组:0.3 mL 生理盐水+400 mg/kg 海参冻干粉;高剂量组:0.3 mL 生理盐水+800 mg/kg 海参冻干粉。实验开始时,小鼠禁水不禁食24 h。所有小鼠常规饲养,每日上午9:00~10:00 按照组别设定连续灌胃14 d,小鼠灌胃深度为3 cm。

免疫缺陷小鼠模型的建立<sup>[17]</sup>:实验开始时,小鼠禁水不禁食24 h。除对照组外,其他各组小鼠给予环磷酰胺免疫抑制剂(40 mg/kg),腹腔注射连续5 d,与对

照组对比,小鼠的体质量和免疫球蛋白 IgG 含量出现显著差异,即造模成功。此后,所有小鼠常规饲养。每日上午 9:00~10:00 按照组别设定连续灌胃 20 d。对照组:0.3 mL 生理盐水;模型组:40 mg/kg 环磷酰胺免疫抑制剂+0.3 mL 生理盐水;低剂量组:40 mg/kg 环磷酰胺免疫抑制剂+0.3 mL 生理盐水+200 mg/kg 海参冻干粉;中剂量组:40 mg/kg 环磷酰胺免疫抑制剂+0.3 mL 生理盐水+400 mg/kg 海参冻干粉;高剂量组:40 mg/kg 环磷酰胺免疫抑制剂+0.3 mL 生理盐水+800 mg/kg 海参冻干粉。

### 1.3.6 抗疲劳实验相关指标测定

#### 1.3.6.1 小鼠体质量的测定

记录小鼠初始体质量,每 7 d 及处死前,称重。

#### 1.3.6.2 小鼠转棒时间的测定

根据文献[18]的方法,稍作修改。在 14 d 结束时,末次灌胃 30 min 后,将小鼠置于 30 r/min 小鼠转棒式疲劳仪进行运动耐力测试。记录各组小鼠在小鼠转棒式疲劳仪上运动直至因疲劳而从转棒上跌倒的时段,该时段即为小鼠的运动耐力时间。如果小鼠抓住杆子并随着翻转,则认为跌倒。

#### 1.3.6.3 血乳酸含量的测定

根据 Xian 等<sup>[19]</sup>的测定方法,稍作修改。于转棒实验前 30 min 时对各组小鼠禁食,在小鼠运动前 30 min 及运动后立即取血。采血后,将血液于 4 °C 冰箱静置 1 h,以 3 000 r/min 离心 30 min,得到血清。采集的血清严格按照 LA 测试盒说明书操作。

### 1.3.7 增强免疫力实验相关指标测定

#### 1.3.7.1 小鼠体质量的测量

记录小鼠初始体质量,每 5 d 及处死前,称重。

#### 1.3.7.2 IgG 含量的测定

在末次灌胃后,对小鼠进行采血,3 000 r/min 离心 30 min,得到血清。采集的血清严格按照 IgG 测试盒操作。

### 1.4 数据处理与分析

采用 Excel 2019 软件分析整理数据,数据以平均值±标准差表示,利用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析、OriginPro 2023b 进行作图。 $P<0.05$  被认为有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 海参冻干粉的抗氧化活性分析

DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和还原力被用于评估海参冻干粉的抗氧化活性潜力,结果如图 1 所示。

如图 1 所示,随着海参冻干粉浓度增加,其对 DPPH 自由基清除能力逐步增强,呈现出浓度依赖性,且  $IC_{50}$  为 12.46 mg/mL。羟基自由基是活跃的自由基之一,它

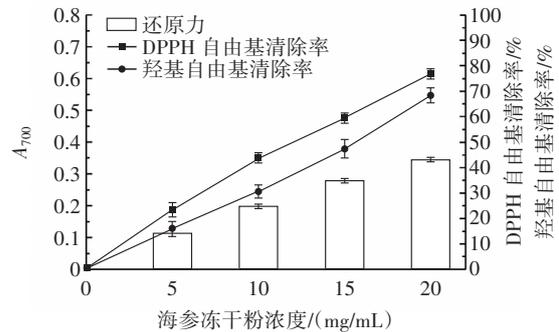


图 1 海参冻干粉的 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和还原力

Fig.1 DPPH and hydroxyl radical scavenging activities and reducing power of sea cucumber freeze-dried powder

对周围的生物分子会造成严重损害,容易引起癌症、衰老等不良影响<sup>[20]</sup>。随着海参冻干粉浓度增加,其对羟基自由基清除能力逐步增强,呈现出浓度依赖性, $IC_{50}$  为 15.22 mg/mL。抗氧化能力和还原力一般存在正相关关系,抗氧化剂通过自身的还原作用给出电子,自由基接受电子形成稳定的产物,从而阻断氧化过程的链式反应<sup>[21]</sup>。海参冻干粉给出电子,将体系中的  $Fe^{3+}$  还原成  $Fe^{2+}$ ,给出的电子越多,产生的  $Fe^{2+}$  越多,在 700 nm 处吸光度越大。吸光度随着海参冻干粉溶液的浓度增加而增加,当浓度为 20 mg/mL 时,还原力为 0.35,表明海参冻干粉具备抗氧化能力,且具有量效关系。海参冻干粉中含有大量氨基酸,而甘氨酸被认为是具有抗氧化功能的氨基酸残基,是有效的质子供体,对抗氧化活性有重要影响<sup>[22]</sup>。Mamelona 等<sup>[23]</sup>的研究结果表明海参的抗氧化能力与总酚、类黄酮含量存在显著相关性,表现出了抗氧化潜力。

### 2.2 海参冻干粉对 HeLa 细胞增殖抑制分析

海参冻干粉对 HeLa 细胞的影响如图 2 和图 3 所示。

由图 2 可知,HeLa 细胞本身呈现上皮样细胞形态,形态饱满,呈现梭形或为多角形,彼此细胞连接紧密。海参冻干粉组,从细胞连接来看,处理后细胞呈现疏松排布的状态;从形态方面来看,多数细胞膜边缘皱缩,失去原本上皮样细胞形态,整体变圆,细胞膜附近出现膜囊的“小泡”。高剂量组中这种现象更为明显,一部分细胞还出现了内容物外溢。由图 3 可知,海参冻干粉的浓度越高,对 HeLa 细胞增殖抑制率越高,呈现出明显的剂量-效应关系。浓度增至 1 000  $\mu$ g/mL 时,细胞抑制率可达 80%,后趋于平缓。海参冻干粉对 HeLa 细胞干预 24、48 h 和 72 h 后的半数抑制浓度  $IC_{50}$  分别为 556.2、536.60  $\mu$ g/mL 和 611.9  $\mu$ g/mL,没有体现出明显的时间-效应关系。因此,海参冻干粉可以有效抑制 HeLa 细胞的生长,表明海参冻干粉具备良好的抗肿瘤作用潜力。王婷等<sup>[24]</sup>的研究结果显示,通过纯化后的

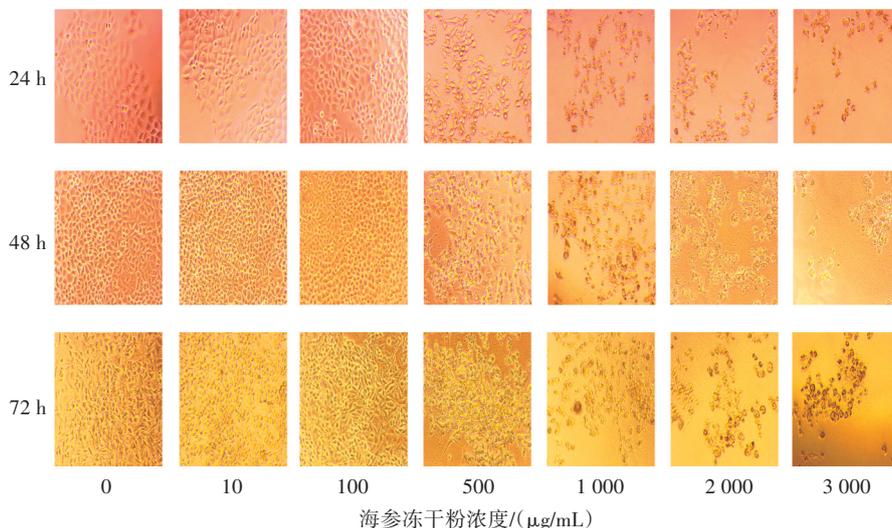


图2 HeLa 细胞形态

Fig.2 Morphology of HeLa cells

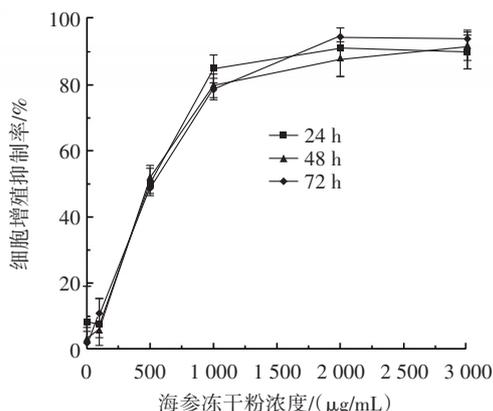


图3 不同时间对 HeLa 细胞增殖抑制率的影响

Fig.3 Effect of different treatment time of sea cucumber freeze-dried powder on the proliferation inhibition rate of HeLa cells

海参精多糖组分 2 对 HeLa 细胞和 HepG2 细胞均有良好的抑制效果,当 10 mg/mL 时,抑制率分别为 80.28% 和 83.11%。李超峰<sup>[25]</sup>利用正丁醇提取的刺参加工废弃液对 HeLa 细胞抑制率为 12.29%,而海参冻干粉能够达到 80% 左右。

### 2.3 海参冻干粉的抗疲劳生物活性分析

#### 2.3.1 海参冻干粉对小鼠体质量的影响

海参冻干粉对小鼠体质量的影响如图 4 所示。

由图 4 可知,在连续 14 d 的实验中,小鼠的饮食、饮水、毛发、大小便等均没有异常。小鼠体质量总体为增长趋势,但增长情况与对照组相比差异不明显。

#### 2.3.2 海参冻干粉对小鼠运动耐力的影响

转棒实验反映小鼠耐力,转棒时间的长短反映动物抗阻力运动时的疲劳程度。海参冻干粉对小鼠转棒时间的影响见表 1。

如表 1 所示,低、中、高剂量组与对照组相比,在单

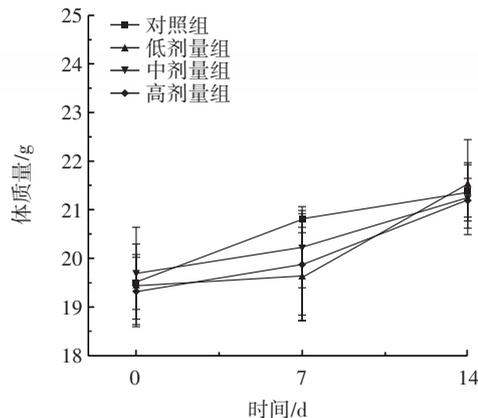


图4 海参冻干粉对小鼠体质量的影响

Fig.4 Effect of sea cucumber freeze-dried powder on the body weights of mice

表 1 海参冻干粉对小鼠转棒时间的影响

Table 1 Effect of sea cucumber freeze-dried powder on the rotarod exercise duration of mice

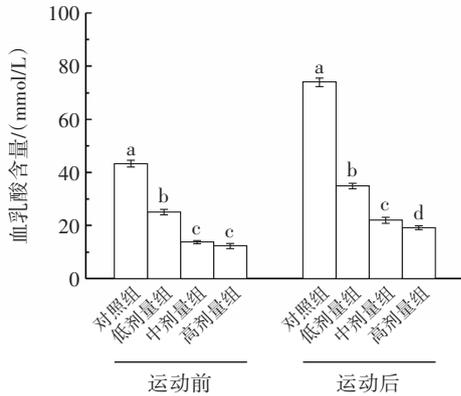
组别	跌落次数	最长运动时间/s	平均运动时间/s
对照组	11±3 <sup>a</sup>	88.53	78.89±13.63 <sup>b</sup>
低剂量组	7±2 <sup>b</sup>	443.55	458.21±131.30 <sup>b</sup>
中剂量组	4±1 <sup>bc</sup>	1 355.61	1 146.28±296.04 <sup>a</sup>
高剂量组	2±1 <sup>c</sup>	1 800.00	1 540.12±367.53 <sup>a</sup>

注:记录单位时间 30 min 内小鼠掉落次数;同列不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

位时间 30 min 内,小鼠掉落次数逐渐从 11 次减少至 2 次,平均运动时间从 78.89 s 延长至 1 540.12 s,最长运动时间由 88.53 s 延长至 1 800.00 s。因此,表明海参冻干粉能够提高小鼠的运动耐力。

## 2.3.3 海参冻干粉对小鼠血清中 LA 含量的影响

在人类或动物中,剧烈或过度的运动可能导致细胞从需氧呼吸转变为厌氧发酵。这种情况下,会产生大量的乳酸,当活性氧水平、内 pH 值和渗透压不平衡时,会出现疲劳状态<sup>[26]</sup>。因此,LA 含量与疲劳程度相关。海参冻干粉对小鼠 LA 含量的影响见图 5。



不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 5 海参冻干粉对小鼠 LA 含量的影响

Fig.5 Effects of sea cucumber freeze-dried powder on the lactic acid (LA) content in mice

如图 5 所示,运动后,对照组 LA 含量明显上升,说明转棒运动能够使小鼠体内的葡萄糖经过无氧酵解产生 LA,导致 LA 不能快速分解而被大量堆积,出现肌肉酸痛状态,使小鼠出现运动疲劳状态<sup>[27]</sup>。在转棒运动前,低、中、高剂量组与对照组(43.23 mmol/L)相比,LA 含量显著减少( $P < 0.05$ ),分别为 25.17、13.74、12.27 mmol/L。而运动后,低、中、高剂量组的 LA 含量比对照组(74.00 mmol/L)差距加大,分别为 34.96、22.02、19.15 mmol/L。因此,海参冻干粉通过提高小鼠体内的有氧代谢能力,增强了小鼠运动负荷的适应能力,发挥了抗疲劳功能活性<sup>[28]</sup>。王敏等<sup>[29]</sup>通过负重游泳实验结果评估得出海参复合物具有较好的缓解疲劳作用。Wang 等<sup>[30]</sup>研究结果表明通过调节 NRF2 和 AMPK 信号通路显著改善了氧化应激蛋白相对水平和线粒体功能,海参酶解产物可提高运动耐力,发挥抗疲劳作用。

## 2.4 海参冻干粉的增强免疫力生物活性分析

## 2.4.1 海参冻干粉对小鼠体质量的作用

研究表明,长期使用 CY 会产生有害副作用,如免疫抑制、骨髓抑制和白细胞减少,因此,CY 常被用于建立小鼠免疫抑制模型<sup>[31]</sup>。海参冻干粉对小鼠体质量的影响如图 6 所示。

由图 6 可知,0~5 d 内,除对照组外,均出现明显的体质量下降现象,说明免疫力低下的小鼠造模成功。经过 20 d 灌胃喂养,小鼠体质量缓慢上升。小鼠体质量增长情况与对照组相比存在明显差异,但是与模型

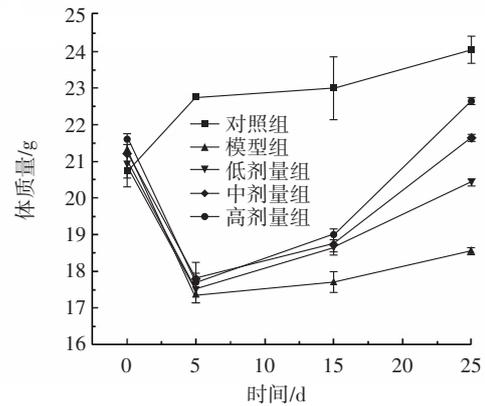


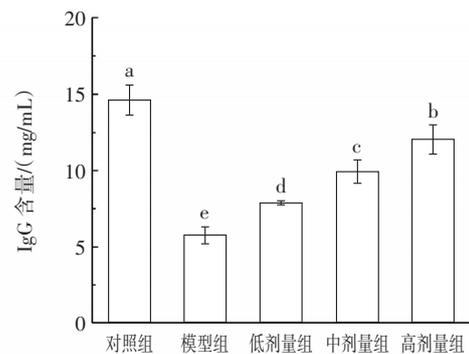
图 6 海参冻干粉对小鼠体质量的影响

Fig.6 Effect of sea cucumber freeze-dried powder on the body weights of mice

组相比差异不明显。综上所述,海参冻干粉可以缓解由 CY 导致的体质量下降。

## 2.4.2 海参冻干粉对小鼠 IgG 含量的影响

免疫球蛋白 IgG 是血清中最丰富和最持久的抗体,它在单核细胞的吞噬作用机制中起至关重要的作用<sup>[32]</sup>,健康成年人 IgG 含量应在 7~18 mg/mL<sup>[33]</sup>。因此,通过测定 IgG 含量可反映小鼠的免疫能力,结果如图 7 所示。



不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 7 海参冻干粉对小鼠 IgG 含量的影响

Fig.7 Effect of sea cucumber freeze-dried powder on the IgG content in mice

如图 7 所示,小鼠经过 CY 诱导后 IgG 含量显著降低( $P < 0.05$ ),说明 CY 可导致小鼠免疫力下降。小鼠组间差异显著( $P < 0.05$ ),同时,和模型组(5.66 mg/mL)相比,海参冻干粉灌胃的小鼠 IgG 含量增长明显,特别是高剂量组可达到 11.98 mg/mL,但低于对照组 IgG 含量(14.56 mg/mL)。结果表明海参冻干粉在一定程度上可以增强 CY 诱导免疫缺陷小鼠的免疫力。杨军楠等<sup>[34]</sup>通过 RAW 264.7 巨噬细胞免疫活性实验,发现不同蛋白酶酶解的海参都具有增强免疫调节能力的潜力。乐卿清等<sup>[35]</sup>利用地塞米松诱导免疫低下小鼠,海参肽在 200 mg/kg 和 400 mg/kg 均具有提高免疫力的

作用,且具有量效关系。

### 3 结论

以超微粉碎辅助酶解法制备海参冻干粉为切入点,在抗氧化实验中,DPPH 自由基清除率、羟基自由基和还原力均呈现了浓度依赖性。海参冻干粉对 HeLa 细胞增殖的抑制效果显著,呈现出明显的剂量-效应关系( $P<0.05$ )。通过小鼠转棒及血乳酸含量实验,小鼠的转棒运动时间明显延长,血乳酸含量降低。利用 CY 诱导的免疫缺陷小鼠实验,海参冻干粉可缓解 CY 造成的体质量下降,小鼠 IgG 含量增长明显。综上,海参冻干粉具有抗氧化能力、抗肿瘤、抗疲劳和增强免疫力的多功能活性潜力,且具有量效关系。这为进一步深入研究其生物学活性、药理学特性以及安全性提供了基础。未来,可以聚焦于探索海参冻干粉中活性成分的作用机制,深化对其与其他治疗方法的联合应用的效果以及拓展其在医学和保健领域的应用前景。

### 参考文献:

- [1] HOSSAIN A, DAVE D, SHAHIDI F. Northern sea cucumber (*Cucumaria frondosa*): A potential candidate for functional food, nutraceutical, and pharmaceutical sector[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(5): 274.
- [2] HUANG Y Z, XIE Y S, LI Y X, et al. Quality assessment of variable collagen tissues of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) body wall under different heat treatment durations by label-free proteomics analysis[J]. *Food Research International*, 2023, 165: 112540.
- [3] GAO W J, CHEN F, WANG X, et al. Recent advances in processing food powders by using superfine grinding techniques: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 19(4): 2222-2255.
- [4] WU G C, ZHANG M, WANG Y Q, et al. Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: Suitable production parameters and its properties[J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 109(4): 730-735.
- [5] ZHAO X Y, AO Q, YANG L W, et al. Application of superfine pulverization technology in Biomaterial Industry[J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, 40(3): 337-343.
- [6] DO VALE MORAIS A R, DO NASCIMENTO ALENCAR É, JÚNIOR F H X, et al. Freeze-drying of emulsified systems: A review[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 503(1/2): 102-114.
- [7] DADI D W, EMIRE S A, HAGOS A D, et al. Physical and functional properties, digestibility, and storage stability of spray- and freeze-dried microencapsulated bioactive products from *Moringa stenopetala* leaves extract[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 156: 112891.
- [8] XIE H X, ZHANG L Q, CHEN Q, et al. Combined effects of drying methods and limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and antioxidant properties of rice protein hydrolysates[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102427.
- [9] HOSSAIN A, DAVE D, SHAHIDI F. Effect of high-pressure processing (HPP) on phenolics of North Atlantic Sea cucumber (*Cucumaria frondosa*)[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(11): 3489-3501.
- [10] SENADHEERA T R L, HOSSAIN A, DAVE D, et al. Functional and physicochemical properties of protein isolates from different body parts of North Atlantic Sea cucumber (*Cucumaria frondosa*)[J]. *Food Bioscience*, 2023, 52: 102511.
- [11] WU T Y, LIN L, ZHANG X Y, et al. Covalent modification of soy protein hydrolysates by EGCG: Improves the emulsifying and antioxidant properties[J]. *Food Research International*, 2023, 164: 112317.
- [12] REN L K, FAN J, YANG Y, et al. Identification, *in silico* selection, and mechanism study of novel antioxidant peptides derived from the rice bran protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2023, 408: 135230.
- [13] LI D Z, ZHU L, WU Q M, et al. Effects of enzyme deactivation conditions on the structure, bound phenol content and antioxidant property of phenol modified Tartary buckwheat protein hydrolysate[J]. *Food Bioscience*, 2023, 54: 102794.
- [14] 陈霄汉. 硒与竹叶提取物协同抗油脂氧化及其对 HeLa 细胞抑制研究[D]. 恩施: 湖北民族学院, 2018.  
CHEN Xiaohan. Synergistic effect of selenium and bamboo leaf extracts on anti-lipid oxidation and its inhibition on HeLa cells are studied[D]. Enshi: Hubei University for Nationalities, 2018.
- [15] 王丽娇. 黄芩素-汉黄芩素复合物对 HeLa 细胞凋亡作用及机制的研究[D]. 秦皇岛: 燕山大学, 2019.  
WANG Lijiao. Study on the effects and mechanism of the combination of baicalin and wogonin on the apoptosis of HeLa cells[D]. Qinhuangdao: Yanshan University, 2019.
- [16] 闫曙光, 任杰, 潘亚磊, 等. 黄芩建中汤抗疲劳机制研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(3): 799-803.  
YAN Shuguang, REN Jie, PAN Yalei, et al. Study on anti-fatigue mechanism of Huangqi Jianzhong Decoction[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2020, 22(3): 799-803.
- [17] ZHANG T, LIU H P, MA P C, et al. Immunomodulatory effect of polysaccharides isolated from *Lonicera japonica* Thunb. in cyclophosphamide-treated BALB/c mice[J]. *Heliyon*, 2022, 8(11): e11876.
- [18] JACQUEZ B, CHOI H, BIRD C W, et al. Characterization of motor function in mice developmentally exposed to ethanol using the Catwalk system: Comparison with the triple horizontal bar and rotarod tests[J]. *Behavioural Brain Research*, 2021, 396: 112885.
- [19] XIAN J, CHEN Q L, ZHANG C, et al. *Polygonati rhizoma* polysaccharides relieve exercise-induced fatigue by regulating gut microbiota[J]. *Journal of Functional Foods*, 2023, 107: 105658.
- [20] FAN X K, HAN Y, SUN Y Y, et al. Preparation and characterization of duck liver-derived antioxidant peptides based on LC-MS/MS, molecular docking, and machine learning[J]. *LWT - Food Science and Technology*, 2023, 175: 114479.
- [21] GULCIN İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview[J]. *Archives of Toxicology*, 2020, 94(3): 651-715.
- [22] HOSSAIN A, DAVE D, SHAHIDI F. Antioxidant potential of sea cucumbers and their beneficial effects on human health[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(8): 521.
- [23] MAMELONA J, PELLETIER É, GIRARD-LALANCETTE K, et al. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic Sea cucumber, *Cucumaria frondosa*[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(3): 1040-1047.
- [24] 王婷, 刘京熙, 张健, 等. 海参精多糖提取工艺优化及其体外抗肿瘤活性[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(17): 68-74.  
WANG Ting, LIU Jingxi, ZHANG Jian, et al. Optimization of extraction of sea cucumber sperm polysaccharide and its antitumor activity *in vitro*[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016,

- 37(17): 68-74.
- [25] 李超峰. 海参加工工艺评价及其加工废弃液活性物质研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.  
LI Chaofeng. Evaluation of sea cucumber processing technology and study on active substances in its processing waste liquid[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2013.
- [26] ZHANG J X, CHEN L, ZHANG L Y, et al. Effect of *Lactobacillus fermentum* HFY03 on the antifatigue and antioxidation ability of running exhausted mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 8013681.
- [27] 夏春荣, 王晓杰, 姜宇航, 等. D-氨基半乳糖糖基化修饰玉米肽抗疲劳效应的研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(5): 62-67.  
XIA Chunrong, WANG Xiaojie, JIANG Yuhang, et al. Anti-fatigue effect of corn peptide glycosylated by D-galactosylation[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2021, 36(5): 62-67.
- [28] CAI M, XING H Y, TIAN B M, et al. Characteristics and antifatigue activity of graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* separated by cascade membrane technology[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 269: 118329.
- [29] 王敏, 李丽杰, 张曾亮, 等. 海参肽复合物缓解小鼠的体力疲劳[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(2): 32-37.  
WANG Min, LI Lijie, ZHANG Zengliang, et al. Relieving physical fatigue of sea cucumber peptide complex[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(2): 32-37.
- [30] WANG Q Q, SHI J Y, ZHONG H, et al. High-degree hydrolysis sea cucumber peptides improve exercise performance and exert antifatigue effect via activating the NRF2 and AMPK signaling pathways in mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 86: 104677.
- [31] ZHOU Y L, CHEN X Y, YI R K, et al. Immunomodulatory effect of *Tremella* polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice[J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 239.
- [32] YANAKA S, YOGO R, KATO K. Biophysical characterization of dynamic structures of immunoglobulin G[J]. *Biophysical Reviews*, 2020, 12(3): 637-645.
- [33] GUDELJ I, LAUC G, PEZER M. Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases[J]. *Cellular Immunology*, 2018, 333: 65-79.
- [34] 杨军楠, 栾俊家, 崔方超, 等. 不同蛋白酶海参酶解液的制备及其体外免疫调节活性[J]. *食品研究与开发*, 2023, 44(11): 43-52.  
YANG Junnan, LUAN Junjia, CUI Fangchao, et al. Preparation of hydrolysates of sea cucumber with different proteases and the *in vitro* immunomodulatory activities[J]. *Food Research and Development*, 2023, 44(11): 43-52.
- [35] 乐卿清, 廖翼江, 汤桂秋, 等. 海参肽提高免疫力的功效评价[J]. *现代食品*, 2021(10): 111-114.  
LE Qingqing, LIAO Yijiang, TANG Guiqiu, et al. Evaluation of the efficacy of sea cucumber peptides in improving immunity[J]. *Modern Food*, 2021(10): 111-114.

责任编辑:冯娜  
收稿日期:2023-07-17