

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所 266003)

赵晓燕 王长云:

## 海洋多糖分子修饰方法研究概况

### THE RESEARCH STATUS OF MOLECULAR MODIFICATION METHODS ON MARINE POLYSACCHARIDES

分子修饰是通过化学、物理学及生物学等手段对化合物分子进行结构改造,以获得众多结构类型衍生物的方法。海洋多糖经分子修饰可改变其结构,从而提高其生物活性或降低其毒副作用。因此,海洋多糖的分子修饰研究引起了高度重视。近些年,海洋多糖分子修饰方法研究已取得很大进展,降解、硫酸酯化、脱硫酸根、乙酰化、羧甲基化、磷酸酯化、硬脂酰化等方法也已被广泛应用<sup>[9,10]</sup>。本文着重对近年来海洋多糖分子修饰方法的研究作一综述,以期对该领域的研究有所启示。

#### 1 降解

海洋多糖分子量很大,几十

万到几百万不等。海洋多糖的分子量对其生物活性起着重要作用。一般地,把较高分子量的多糖,降解成较低的分子量,能显著提高其活性。有报道,硫酸葡聚糖的抗 HIV 病毒活性随着分子量的增加而增加,分子量 10 000 时达到最大,10 000 ~ 500 000 之间保持最大活性。将卡拉胶、甲壳质等海洋多糖降解,同样能显著提高其活性。鉴于此,选择合适的降解方法,将多糖降解到适宜的分子量,至关重要。目前海洋多糖降解的方法主要有酸降解、酶降解和超声波降解等。

##### 1.1 酸降解

酸降解的依据是,酸性溶液能引起多糖中糖苷键的断裂,使多糖降解为低分子片段。控制酸浓度、

温度及时间可获得不同分子量大小的降解产物。David 等<sup>[5]</sup>通过控制不同的温度和 pH 值,用酸水解  $\kappa$  卡拉胶, GPS-LS 协助分析,制备了不同分子量的  $\kappa$  卡拉胶。最近, Torgeir 等<sup>[10]</sup>在稀酸中分别加入诱导物 LiCl 或 LiI 进行降解,得到了部分降解的  $\kappa$  卡拉胶,用凝胶色谱分析发现此方法降解的多糖分子量分布较均一。张虎等<sup>[3]</sup>在几丁质的降解中,用浓硫酸进行水解,得到了聚合物度较高的几丁寡糖。酸降解还有过碘酸法、醋酸或醋酸酐降解法等。相对而言,酸降

收稿日期:2000-01-17;

修回日期:2000-04-21

解条件不易控制,且易引起多糖结构破坏。

## 1.2 酶降解

酶降解因其高度的专一性和高效性在多糖降解中已引起重视。用水解多糖,可迅速得到分子量比较均一的降解产物,而且由于特定的酶能降解特定的糖苷键,可以得到理想的分子量片段。酶降解包括专一性酶降解和非专一性酶降解。从 *Bacillus* sp. NO.7-M 获得的壳聚糖酶只切断 GLCNGLCN 糖苷键,从 *Bacillus pumilus* BN262 获得的壳聚糖酶只切断 GLC-NAG-GLCN 及 GLCNGLCN 糖苷键,均属专一性酶解。纤维素酶、蛋白酶和脂肪酶等都可以降解壳聚糖,且降解速度快,属非专一性酶解<sup>[3]</sup>。有报道大部分的 *Cytophagas* 都能产生胞外酶,这些酶能降解多糖类物质如甲壳质、琼胶和纤维素等。

## 1.3 超声波降解

有报道用超声波降解海洋多糖可取得理想结果。如将脱乙酰的甲壳素用 CFS-1 A 超声波发生器,于 60 °C 恒温下,在乙酸溶液中,进行超声波降解,15 h 后特性粘度降低了 80%。最近, Kulicke 等<sup>[6]</sup> 将从海藻中提取的具 (1→3)-β-D-glucans 结构的葡聚糖用超声波降解,通过控制降解时间,获得了不同分子量的低分子量产物。实验证明,超声波降解只引起糖苷键断裂,不改变葡聚糖的化学结构。因此,此方法已引起关注。

## 2 硫酸酯化

硫酸酯化可给多糖链上引入  $\text{SO}_3^-$ ,使之具抗病毒、抗凝血等活性。硫酸多糖能有效地抑制 HIV 的感染和复制及 HIV 诱导的合胞体

的形成,对其他具囊膜病毒也有明显的抑制作用<sup>[4]</sup>。在对裸藻淀粉研究中发现,裸藻淀粉无抑制病毒作用,但经硫酸酯化后,硫酸取代率为 12.6% 的硫酸裸藻淀粉即能有效地抑制 HIV1 和 HIV2 感染 MF4 细胞和 PBMC。卡拉胶对 HIV 等病毒有显著的抑制作用,但脱去硫酸根后活性消失。最近, Nshimural 等<sup>[8]</sup> 定位合成了 O2 和/或 O3 位硫酸酯化的新型硫酸甲壳质,进行结构及活性研究后发现其具有强的抗 HIV 活性,而抗凝血活性极小。硫酸基对多糖抗病毒活性具有极其重要的作用,多糖硫酸化修饰因此近年引起高度重视。

### 2.1 中性多糖的硫酸酯化

中性多糖一般能溶于有机溶剂,可直接对其进行硫酸酯化。Inoue 等用氯磺酸和吡啶对 MG (D-Mannose D-Glucan) 进行硫酸酯化,制得硫酸化多糖。改变温度、时间及氯磺酸和吡啶的比例,可得到不同硫酸化度的多糖。用上述方法对褐藻胶进行硫酸酯化,成功制备了硫酸褐藻多糖,并发现具有良好的抗凝血、降血脂等活性。

对于组成单糖为呋喃糖的多糖,常采用 Nagasawa 方法,即将多糖溶于二甲亚砜,加入 N 吡啶-磺酸来制备硫酸酯化的呋喃型多糖。Hatanaka 等用此法合成了硫酸酯化 (1→5)-α-D 呋喃糖,通过控制不同温度和时间获得含硫量从 4.85%~16.53% 的样品,这些硫酸化多糖具有抗病毒和抗凝血活性。

### 2.2 硫酸多糖的硫酸酯化

硫酸多糖难溶于有机溶剂,因此,在对其进行硫酸酯化前,需先用酸性树脂对其进行转型,然后用吡啶中和,即将硫酸多糖转为可溶

于有机物的形式,方能取得较好的硫酸酯化效果。最近, Takano 等<sup>[9]</sup> 将卡拉胶进行上述处理,然后以二环己基碳二亚胺为缩合剂用浓硫酸对其进行了硫酸酯化。此法不易引起糖苷键断裂,特别对卡拉胶来说,不易破坏 κ 卡拉胶中 3,6-内醚-半乳糖的结构。结合甲基化和 <sup>13</sup>C NMR 进行结构分析,发现 D 半乳糖的 C<sub>6</sub> 位上最易引入  $\text{SO}_3^-$ ,而其他糖羟基的硫酸酯化几率相对低得多。

## 3 脱硫酸基

硫酸根具有抗凝血作用,因而,部分脱硫,可降低多糖的抗凝活性,从某种意义上降低了毒性。脱硫的研究还有助于探讨硫酸根对海洋多糖的构效关系的影响。此外,在海洋多糖的结构测定中定位脱硫非常重要。

### 3.1 酸、碱脱硫

多糖脱硫方法在 20 世纪 40 至 50 年代就有研究。最初人们主要用浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$  和无水乙酸进行脱硫。这种方法反应条件剧烈,容易引起多糖构象的改变。此后,人们对此法进行了改进,用甲醇分解法在比较温和的条件下进行脱硫。将硫酸软骨素置于无水甲醇 HCl 溶液 (0.065 mol/L) 中反应,控制反应时间,可得到脱硫酸根程度不等的硫酸软骨素。有报道,在用此方法对卡拉胶进行脱硫时,可除去 κ 卡拉胶和 λ-卡拉胶中 95% 的硫酸根。

碱脱硫也有应用,如用碱处理 λ-卡拉胶和 μ-卡拉胶可使其脱去 C<sub>6</sub> 上的硫酸基,半乳糖由 C<sub>1</sub> 椅式构象转变为 1C 椅式构象,得到 θ 卡拉胶和 κ 卡拉胶。

### 3.2 有机溶剂脱硫

酸脱硫易引起糖苷键的断裂,

因此,有人提出了有机溶剂脱硫法。此方法不易引起多糖中糖苷键的断裂,也不易引起多糖分子结构改变。这对多糖化学结构分析测定的研究具有重大意义。Miller等<sup>[7]</sup>将无水L-卡拉胶置于无水二甲亚砜溶液中,加入吡啶,1,2,4,5-苯四酸和一种能与硫酸根结合的化合物,如三氧二锡或氟化钠等,进行反应,可脱去硫酸多糖的硫酸根。如选择三氧二锡进行反应,可获得全脱硫的产物;选择氟化钠反应,可获得4-脱硫的产物。

#### 4 其他

海洋多糖的分子修饰方法还很多,如乙酰化和脱乙酰化也是海洋多糖分子修饰中常用的方法。甲壳质通过浓碱高温处理可脱去乙酰基,形成壳聚糖,其溶解性大为改善,能溶于酸和酸性水溶液。壳聚糖在有机相中,其分子中的氨基(-NH<sub>2</sub>)可与酸酐进行乙酰化反应,可得到溶于甲酸等有机溶剂的酰基化产物。这些产物可用于皮肤烧伤、创伤治疗和药物包被材料等。具乙酰基的烷基寡糖在含NaOMe的甲醇中反应,也可脱去乙酰基。在二甲亚砜中对溶胀的甲壳质可进行羟基化,其产物可用于制造人造细胞。甲壳胺在三乙胺或在NaOH/N-甲基-2-吡咯烷酮中与ICH<sub>3</sub>作用可生成季胺盐N-三甲基甲壳胺碘化物,可用作抗菌素。Inoue等报道了DMG-1的磷酸酯化和硬脂酰化。DMG-1是一种降解的

甘露古罗聚糖(Mannoglucan),于甲酰胺、三丁胺和磷酸中进行磷酸酯化,可获得磷酸酯化产物DMG-1-PH。DMG-1进行硬脂酰化时,先将其溶于二甲基甲酰胺,然后加入吡啶和硬脂酰氯(Stearoyl chloride)反应,可得到硬脂酰化DMG(DMG-1-STL)。

甲壳胺有与肝素类似的氨基糖结构,直接在甲壳胺分子上引入-SO<sub>3</sub>H或使之与带有-SO<sub>3</sub>H或-CH<sub>2</sub>COOH的聚阴离子多糖相互作用,所形成的聚电解质复合物具有类似肝素的结构,可获得抗凝血物质。有报道用卡拉胶和甲壳胺制备了具显著抗凝血活性的多糖-多糖复合物。微量元素与海洋多糖络合的报道也很多。壳聚糖6-O-硫酸酯分子的2位NH<sub>2</sub>与C<sub>5</sub>-OH配价结合Fe<sup>3+</sup>,增强胃肠道吸收能力,用于治疗铁缺乏症<sup>[2]</sup>。最近,陈小川等<sup>[1]</sup>研究发现4-碘代硫酸多糖(Se-Carrageenan)作为一种免疫调节剂,可间接对抗化疗所致的白细胞减少,对化疗所致骨髓毒性有明显的保护作用。

海洋多糖种类繁多,且结构具有复杂性和多样性,对其进行分子修饰可获得各种结构类型和各种生物活性的多糖衍生物,为多糖构效关系分析奠定了基础,为多糖类药物的设计、研究和开发提供了理论支持。分子修饰在海洋多糖研究中将发挥更大的作用。对海洋多糖分子修饰的研究将出现更多新的修饰方法和思路,例如糖肽、糖脂

等复合物的研究,将为活性筛选及构效关系分析提供更多的多糖衍生物。可以预见,随着海洋多糖分子修饰方法的完善和技术水平的提高,将为其构效关系研究带来更多方便,运用分子修饰手段将开发出更多高效低毒的新型多糖类药物。

#### 主要参考文献

- 1 陈小川,林志彬.北京医科大学学报,1998,30(4):317
- 2 严共鸿,李鹏程.海洋科学,1999,4:24
- 3 张虎,杜昱光.中国生化药物杂志,1999,20(2):99
- 4 周靓,蒙义文.应用与环境生物学报,1997,3(1):82
- 5 David M.E., Stancioff, Dimitri et al.. Carbohydr. Polym., 1996, 31(1/2):83
- 6 Kulicke W.M., Lettan A.I., Thielking H. et al.. Carbohydrate Research, 1997, 297:135
- 7 Miller I., Blunt J.. Carbohydrate Research, 1998, 309:39
- 8 Nshimura S.I., Kai H., Shibada K. et al.. Carbohydrate Research, 1998, 306:427
- 9 Takano R., Yoshikawa S. et al.. J. Carbohydrate Chem., 1996, 15(4):449
- 10 Torgeir H., Clav S., Bjorn T.S., et al.. Macromolecules, 1998, 31:1842

(本文编辑:张培新)