球参多糖的分离纯化及体外抗凝血活性研究

刘静雯[1,2,3], 吴　宁[1,3], 耿丽华[1,3], 王　晶[1,3], 岳　洋[1,3], 张全斌[1,3]

(1. 中国科学院海洋研究所 实验海洋生物学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 球参(*Phyllophorus proteus*)是一种产于印度尼西亚等热带海域, 具有较大开发利用潜力的低价值海参。本研究利用酶解碱解联用与离子交换柱层析相结合的方法, 从球参中分离到 2 种硫酸化多糖, 经理化性质分析, 确定 2 种多糖分别为岩藻聚糖硫酸酯(FS)与岩藻糖化糖胺聚糖(FG)。分别采用 Sephadex G-100 凝胶柱层析对 2 种多糖进行纯化, 获得了 2 种多糖纯化组分, 之后采用稀酸水解 FS 得到 dFS, 采用 β-消除降解 FG 获得 dFG。体外抗凝血活性实验结果显示 FG 能够显著延长活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB)时间, 表明其具有非常显著的抗凝血活性。dFG 能够显著延长 APTT 和 FIB 的凝血时间, 但对 PT 没有明显影响, 即 dFG 可以影响内源性凝血途径, 但不能影响外源性凝血途径, 因此调节 FG 的分子量可以加强对特定凝血途径的选择性作用, 从而在保持较好的抗凝血活性的同时降低出血风险, 以上结果提示 FG 及 dFG 均具有开发成为抗凝血剂的潜力。

关键词: 球参; 岩藻聚糖硫酸酯; 岩藻糖化糖胺聚糖; 抗凝血

中图分类号: R284.2　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3096(2024)9-0034-10

DOI: 10.11759/hykx20240229003

海参属于棘皮动物门、海参纲。自古以来, 海参就是一种传统的滋补佳品, 其在日常保健与药用方面均有巨大的应用潜能[1], 海参体壁含有海参多糖、海参皂苷等活性成分[2], 其中海参多糖主要包括岩藻聚糖硫酸酯(FS)与岩藻糖化糖胺聚糖(FG)[3]两种类型。这 2 种多糖具有广泛的生物活性, 如抗凝血[4-6]、抗氧化[7-9]、抗肿瘤[10]、降血脂[11]、抗病毒[12]、抗糖尿病[13-15]与免疫调节[16-18] 作用。因此, 针对海参多糖的开发利用一直是研究热点[19]。

海参多糖的结构相对规则, 但不同海参来源的多糖在连接方式、硫酸基取代位点等方面仍然存在着相当大的差异, 表现出明显的结构多样性[20]。FS 是一种由岩藻糖构成的硫酸化多糖。1994 年, Mulloy 等[21]对 *Ludwigothurea grisea* 来源的 FS 的研究发现, 该 FS 具有 4 个不同硫酸化的岩藻糖通过 α-1, 3 糖苷键连接组成重复结构单元。大量的研究表明, 多数海参来源的 FS 均由 α-1, 3 连接的硫酸化岩藻糖构成主链, 硫酸基常位于岩藻糖的 C-2、C-4 或 C-2, 4 位, 部分 FS 存在岩藻糖构成的侧链。虽然不同海参来源的 FS 组成与结构相似, 但是其在分子量大小、硫酸基浓度以及连接方式上均有较大的差异[22-25]。

FG 主要由硫酸软骨素构成主链骨架, 即葡萄糖醛酸与乙酰氨基半乳糖以 β-1, 3 与 β-1, 4 糖苷键交替连接构成主链[26], 其与哺乳动物来源的硫酸软骨素主要区别在于 FG 主链的葡萄糖醛酸的 3 位存在着 α-1, 3 糖苷键连接的岩藻糖侧链, 但是不同海参来源的 FG 侧链岩藻糖的硫酸基取代位点及比例各不相同[27-29]。正是由于 FG 的结构差异性, 使得这些多糖有着许多不同的生物活性。FG 能够通过由抗凝血酶 III(ATIII)介导的凝血酶(FIIa)和因子 Xa(FXa)抑制而表现出抗凝血作用, 并且已经证明分子量和硫酸化程度极大地影响其抗凝血和抗血栓形成活性[30], 此外, FG 能够发挥抗凝血作用与其硫酸化岩藻糖支链的存在密切相关[31], 但其构效关系尚未明确。

球参(*Phyllophorus proteus*)是一种来自印度尼西亚等热带海域的海参。与刺参相比, 球参的产量较大, 但极少被食用, 因此属于具有较大开发利用潜力的低值海参[7]。但目前对球参中硫酸化多糖的研究还非常少见。本研究从球参中分离纯化得到了 2 种海参

收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-04-17

基金项目: 福建省 STS 计划配套项目(2023T3057)

[Foundation: Fujian Province STS Program Supporting Projects, No. 2023T3057]

作者简介: 刘静雯(1999—), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事海洋生物学研究, E-mail: ljw_990304@163.com; 张全斌(1971—), 通信作者, 男, 山东章丘人, 研究员, 博士生导师, 研究方向为海藻化学与海洋药物, E-mail: qbzhang@qdio.ac.cn

多糖 FG 与 FS, 根据其结构特点采取不同的降解策略, 获得了 2 种多糖的降解产物, 并对其抗凝血活性进行了评价, 以期为球参的高值化应用与开发提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

球参产自印度尼西亚海域, 购自京东商城, Sepharose DEAE- Fast Flow 凝胶、Sephadex G100 凝胶购自美国 GE 公司, D-甘露糖(Man)、D-葡萄糖醛酸(GlcA)、氨基葡萄糖盐酸盐(GlcN)、氨基半乳糖盐酸盐(GalN)、N-乙酰基-D 氨基半乳糖(GalNAc)、D-葡萄糖(Glc)、D-半乳糖(Gal)、L-岩藻糖(Fuc)、D-核糖(Rib)均购自美国 Sigma 公司, 其他化学药品与试剂均为分析纯。

1.2 球参多糖的制备与分离纯化

使用酶解碱解联用的方法提取球参多糖, 将干燥球参用去离子水泡发过夜, 去内脏, 匀浆, 加入 1%的木瓜蛋白酶于 60 ℃水浴锅中搅拌酶解 6 h, 随即加入 NaOH 溶液至终浓度为 0.25 mol/L, 60 ℃搅拌碱解 2 h, 加入 HCl 溶液中和并加热灭酶, 4 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 加入 95%乙醇至体积分数为 60%, 4 ℃静置过夜, 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 沉淀溶解后经透析(截留分子量为 3.5 kDa)、减压浓缩、冻干后得球参粗多糖。

粗多糖经 Sepharose DEAE Fast Flow 阴离子交换色谱柱(2.6×100 cm)层析分级, 采用 0~2 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 共收集到 4 个组分, 分别对应洗脱浓度为 0.4 mol/L、1.1 mol/L、1.4 mol/L、2.0 mol/L NaCl。将洗脱液分别进行透析(截留分子量为 3.5 kDa)、浓缩和冻干共得到 4 个分级组分, 主要多糖组分经 Sephadex G-100 凝胶柱层析进一步纯化。

1.3 分子量与化学组成分析

总糖质量分数采用苯酚-硫酸法[32]进行测定, 以 L-岩藻糖作为标准品; 岩藻糖质量分数采用半胱氨酸盐酸盐[33]的方法进行测定; 糖醛酸质量分数采用咔唑比色法[25]进行测定; 多糖中的蛋白浓度使用 BCA 试剂盒测定; 硫酸基质量分数通过明胶氯化钡比色法测定[34]; 多糖分子量采用高效液相色谱法测定[4]; 单糖组成采用 PMP-柱前衍生法测定[35]。

1.4 多糖降解

岩藻糖化糖胺聚糖组分 FG 采用 β-消除方法进行降解, 取 800 mg FG, 溶于 12 mL 水中, 缓慢滴加苄索氯铵溶液至终浓度为 62.5 mg/mL, 4 ℃静置过夜, 4 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 沉淀用去离子水清洗, 每次 4 ℃静置 4 h, 重复 3 次, 沉淀在真空干燥箱中 40 ℃烘干得 FG-季铵盐沉淀, 用 10 mL DMF 将其溶解(200 mg/mL), 加入氯化苄 0.43 mL, 溶液颜色变为淡黄色, 35 ℃油浴锅搅拌反应 25 h, 反应完成后降温至 25 ℃, 加入乙醇钠-乙醇溶液至终浓度 0.02 mol/L, 继续搅拌反应 30 min, 反应完成后加入等体积饱和 NaCl 溶液及无水乙醇至体积分数 80%, 静置 6 h, 4 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 重复醇沉 3 次, 沉淀加 120 mL 水溶解, 加 4 mol/L NaOH 溶液至终浓度 0.05 mol/L, 反应 30 min, 加入 $NaBH_4$ 至终浓度为 0.1 mol/L, 继续反应 30 min, 反应结束后用 HCl 溶液将 pH 调至中性。使用 Sephadex G10 凝胶柱脱盐, 再经浓缩、冻干即得 β-消除产物 dFG。

岩藻聚糖硫酸酯组分 FS 使用 10 mmol/L 三氟乙酸(TFA)进行降解, 取 200 mg FS, 加入 20 mL 10 mmol/L TFA 溶解, 100 ℃回流反应, 期间每隔 1 h 取 30 μL 反应液, 加 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至中性, 使用 HPLC 监测其分子量, 至分子量降至 2.0 kDa, 用 4 mol/L NaOH 溶液调 pH 至中性, 使用 Sephadex G10 凝胶柱脱盐, 再经浓缩、冻干即得降解产物 dFS。

1.5 IR 光谱分析

分别取 10 mg FG 与 FS, 采用溴化钾压片, 使用傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS 10)在 4 000~500 cm^{-1} 波数范围内进行分析。

1.6 体外抗凝血活性

分别使用浓度为 5 μg/mL、10 μg/mL 与 50 μg/mL 的 FG、FS 及 dFG、dFS 进行复钙实验, 在 96 孔板中分别加入 10 μL 各浓度球参多糖样品及 40 μL 血浆, 振荡 20 s, 置于 37 ℃烘箱中恒温孵育 10 min, 然后快速加入浓度为 50 μmol/L 的 $CaCl_2$ 溶液 50 μL, 每隔 30 s 测定波长在 650 nm 处的吸光度, 持续测定 30 min。

分别使用 APTT、PT、TT 与 FIB 试剂盒对复钙实验结果较好的 FG 与 dFG 组分进行抗凝血活性测定。在凝血杯中加入 10 μL 不同浓度的各球参多糖样品, 随后加入体积比为 1∶1 的血浆与 APTT/PT/TT/ FIB 试剂, 终体积为 100 μL, 摇匀, 置于凝血仪中测定凝血时间, 以水为空白对照, 以低分子量肝素(LMWH)为阳性对照。使用的羊血浆购自源叶生物公司, APTT、PT、TT 试剂盒来自雷根生物公司, FIB 试剂盒来自上海太阳生物公司。

1.7 统计分析

所有数据均为平均值±标准差(SD), 使用 t 检验的方法确定各平均值之间的个体差异, 当 $P<0.05$ 时, 认为有统计学显著差异。

2 结果与讨论

2.1 理化性质分析

球参多糖经酶解碱解联用的方法进行提取, 粗多糖的得率为 2.86%。取 1 g 粗多糖经 Sepharose DEAE Fast Flow 柱层析进行梯度洗脱, 使用 0~100%的 2 mol/L NaCl 溶液洗脱, 根据洗脱曲线(图 1)获得对应洗脱浓度分别为 0.4 mol/L、1.1 mol/L、1.4 mol/L、2.0 mol/L NaCl 四个分级组分。各组分总糖质量分数、岩藻糖质量分数、硫酸基质量分数、糖醛酸浓度及蛋白质量分数如表 1 所示, 其中 1.1 mol/L NaCl 洗脱组分总糖质量分数为 46.63%, 岩藻糖质量分数为 13.77%, 硫酸基质量分数为 24.36%, 糖醛酸及蛋白质量分数分别为 8.07%、3.41%; 2.0 mol/L NaCl 洗脱组分总糖质量分数为 62.37%, 岩藻糖质量分数为 25.32%, 硫酸基质量分数为 14.47%, 糖醛酸及蛋白质量分数分别为 2.90%、2.20%。

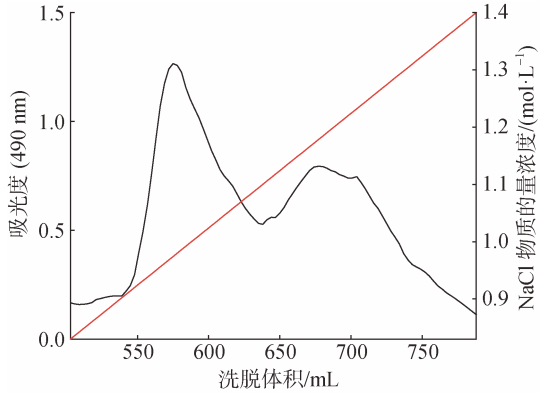


图 1 Sepharose DEAE-Fast Flow 梯度洗脱洗脱曲线

Fig. 1 Curve of Sepharose DEAE Fast Flow gradient elution

表 1 Sepharose DEAE-Fast Flow 洗脱组分化学组成

Tab. 1 Chemical composition of elution fractions of Sepharose DEAE Fast Flow distribution

洗脱浓度 / 分析指标	0.4 mol/L	1.1 mol/L	1.4 mol/L	2.0 mol/L
总糖浓度/%	25.37	46.63	62.68	62.37
岩藻糖浓度/%	0.25	13.77	23.01	25.32
糖醛酸浓度/%	1.45	8.07	5.58	2.90
硫酸基浓度/%	0.00	24.36	19.27	14.47
蛋白浓度/%	30.61	3.41	1.93	2.20

分子量测定结果(图 2)显示, 1.1 mol/L NaCl 洗脱组分重均分子量(Mw)为 67.1 kDa, 2.0 mol/L NaCl 洗脱组分重均分子量(Mw)为 137.8 kDa。

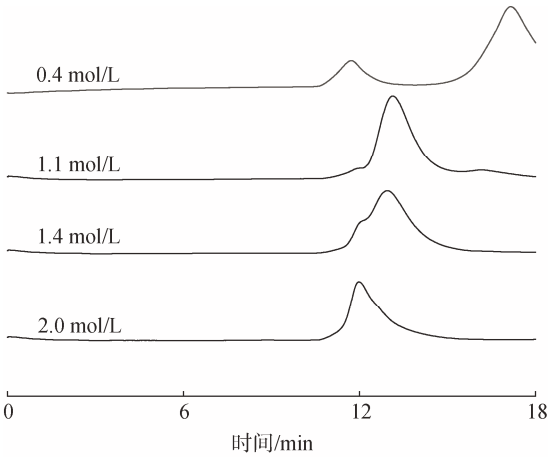


图 2 Sepharose DEAE-Fast Flow 洗脱组分高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC results of elution fractions of Sepharose DEAE Fast Flow distribution

对得到的 4 个组分进行了单糖组成测定, 结果显示(图 3), 1.1 mol/L NaCl 洗脱组分主要单糖组成为

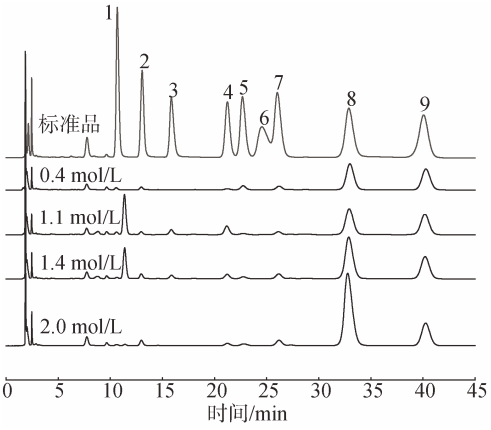


图 3 DEAE-Fast Flow 分布洗脱组分单糖组成

Fig. 3 Monosaccharide composition of elution fractions of Sepharose DEAE Fast Flow distribution

注: 1. Man; 2. GlcN; 3. GlcA; 4. GalN; 5. Glc; 6. GalNAc; 7. Gal; 8. Fuc; 9. Rib

GalNAc、GlcA、Fuc, 2.0 mol/L NaCl 洗脱组分主要单糖组成为 Fuc。

对 1.1 mol/L 和 2.0 mol/L 洗脱组分进行红外光谱分析。1.1 mol/L NaCl 洗脱组分红外光谱结果(图 4a)显示, 3 366、1 024 cm^{-1} 分别为糖环醇羟基 O—H 和糖环内 C—O—C 的伸缩振动, 2 940 cm^{-1} 为岩藻糖甲基 C—H 的伸缩振动, 1 218、850、583 cm^{-1} 吸收峰显示存在硫酸基的 S═O 非对称伸缩振动, C—O—S 的弯曲振动以及硫酸基 S—O 的伸缩振动, 1 640 cm^{-1} 为乙酰氨基半乳糖的与葡萄糖醛酸上 C═O 双键的伸缩振动, 1 426 cm^{-1} 为葡萄糖醛酸羧基上 C—O 单键的伸缩振动。

2.0 mol/L NaCl 洗脱组分红外光谱结果(图 4b)显示, 3 385、1 025 cm^{-1} 分别为糖环醇羟基 O—H 和糖环内 C—O—C 的伸缩振动, 2 943 cm^{-1} 为岩藻糖甲基 C—H 的伸缩振动, 1 212、840、572 cm^{-1} 吸收峰显示存在硫酸基的 S═O 非对称伸缩振动, C—O—S 的弯曲振动以及硫酸基 S—O 的伸缩振动。

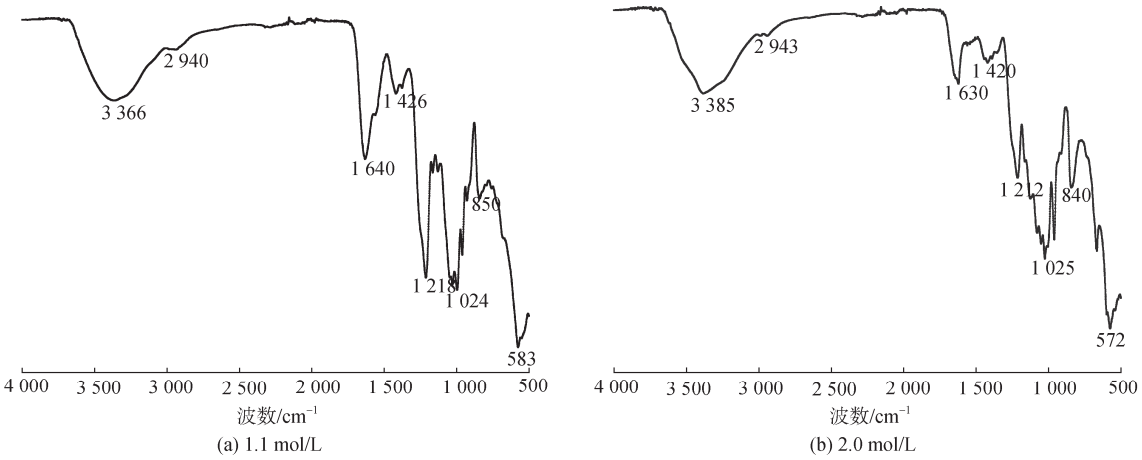


图 4　Sepharose DEAE-Fast Flow 分布洗脱组分红外光谱

Fig. 4　Infrared spectra of elution fractions of Sepharose DEAE Fast Flow distribution

以上结果表明 1.1 mol/L NaCl 洗脱组分即为岩藻糖硫酸软骨素 FG, 2.0 mol/L NaCl 洗脱组分为岩藻聚糖硫酸酯 FS。

2.2　FS 与 FG 的纯化

使用 Sephadex G-100 凝胶柱层析分别对 FG 与 FS 进行纯化得到 FG-G-100 与 FS-G-100, 洗脱曲线如图 5 所示, 结果显示(表 2), 经过 Sephadex G-100 凝胶柱纯化后, FG 的岩藻糖质量分数由 13.77% 上升至 14.48%, 硫酸基质量分数由 24.63%上升至 28.04%; FS 的岩藻糖质量分数由 25.32%上升至 32.56%, 硫酸基质量分数由 14.48%上升至 24.05%。对纯化后得到的组分进行高效液相色谱和单糖组成检测, 结果显示(图 6、图 7), 纯化后的组分色谱图更加对称, 分散程度降低; 单糖组成结果显示, 纯化后的组分杂质更少, FG 与 FS 的主要组成单糖质量分数明显上升。

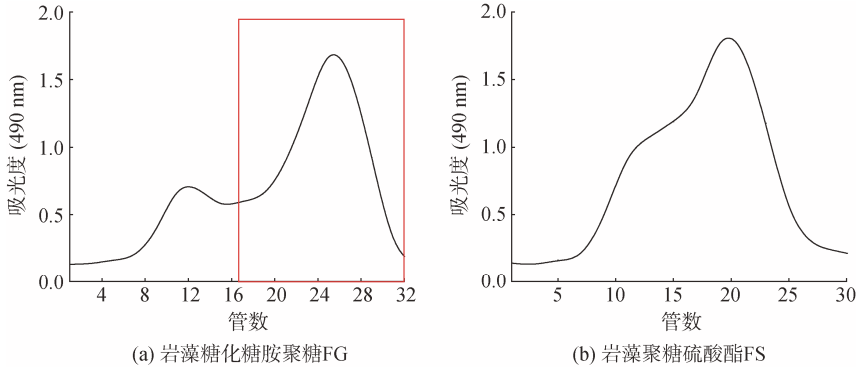
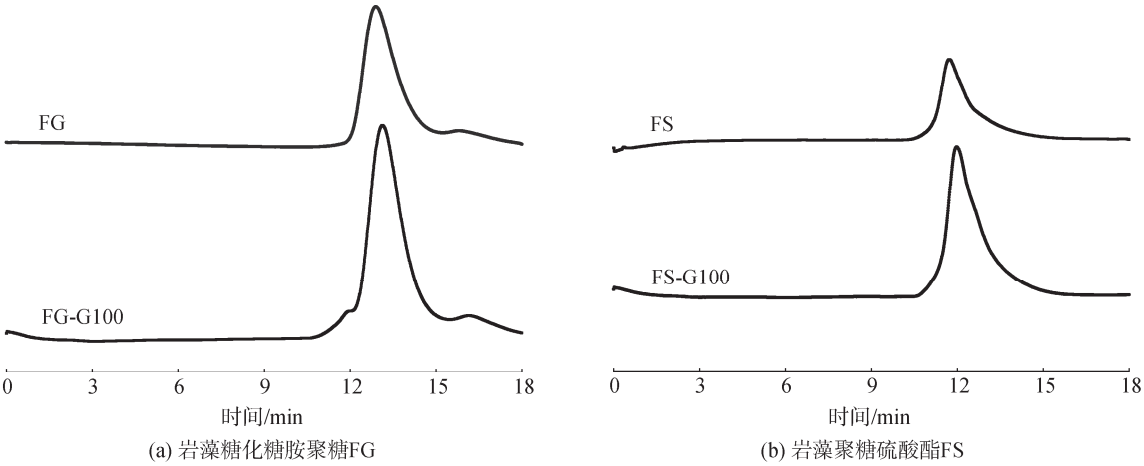


图 5　FG(a)与 FS(b)Sephadex G-100 凝胶柱层析洗脱曲线

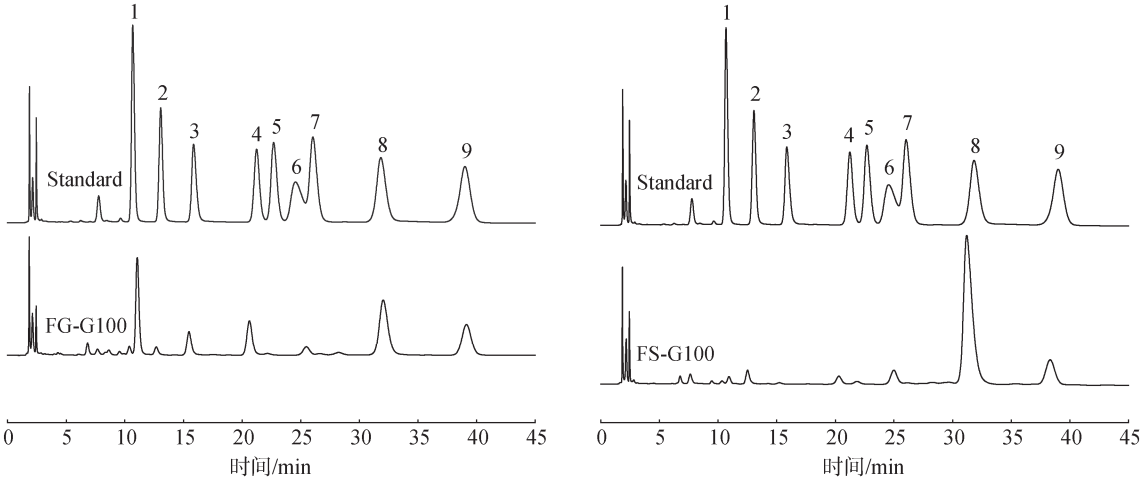
Fig. 5　Elution curves of FG (a) and FS (b) purified through a Sephadex G-100 column



(a) 岩藻糖化糖胺聚糖FG　　(b) 岩藻聚糖硫酸酯FS

图 6　Sephadex G100 纯化前后 FG(a)与 FS(b)高效液相色谱图

Fig. 6　HPLC results of FG (a) and FS (b) purified through a Sephadex G100 column



(a) 岩藻糖化糖胺聚糖FG　　(b) 岩藻聚糖硫酸酯FS

图 7　FG-G100(a)与 FS-G100(b)单糖组成

Fig. 7　Monosaccharide composition of FG (a) and FS (b) purified through a Sephadex G100 column

注: 1. Man; 2. GlcN; 3. GlcA; 4. GalN; 5. Glc; 6. GalNAc; 7. Gal; 8. Fuc; 9. Rib

表 2　岩藻糖化糖胺聚糖(FG)与岩藻聚糖硫酸酯(FS)纯化前后化学组成

Tab. 2　Chemical composition of FG and FS before and after purification

分析指标	FG	FG-G100	FS	FS-G100
岩藻糖/%	13.77	14.48	25.32	32.56
硫酸基/%	24.63	28.04	14.48	24.05

2.3　抗凝血活性

为了探究球参多糖的抗凝血活性, 取各样品以 10 μg/mL 进行复钙实验, 在去钙离子的抗凝血浆中, 重新加入适量的钙离子后, 血浆就发生凝固, 若血浆中加入具有抗凝活性的药物, 血浆凝固的速度就会变慢, 使凝血曲线的斜率降低; 凝固所需的时间会增加, 使凝血曲线达到平台期的时间延长。结果显示(图 8)FG 与 dFG 均能够延迟血浆的凝固时间, 降低血浆凝固的速度, 具有明显的抗凝血活性, 而 FS 与 dFS 对血浆的凝固没有明显的影响。

对于复钙实验抗凝血效果较好的 FG 与 dFG 两个组分进行下一步的量效关系研究, 结果显示(图 9), FG 在 5 μg/mL 时没有明显的抗凝血活性, 浓度 50 μg/mL 时在记录时间内一直使血浆保持未凝固状态, 表现出十分显著的抗凝血活性; dFG 在 5 μg/mL 与 10 μg/mL 时均表现出抗凝血活性, 且随着浓度的升高活性增强。

APTT 是衡量内源性凝血途径疗效的性能指标, PT 评估外源性凝血途径, TT 代表常见的凝血途径。使用 APTT、PT、TT 和 FIB 试剂盒评估 FG 及 dFG

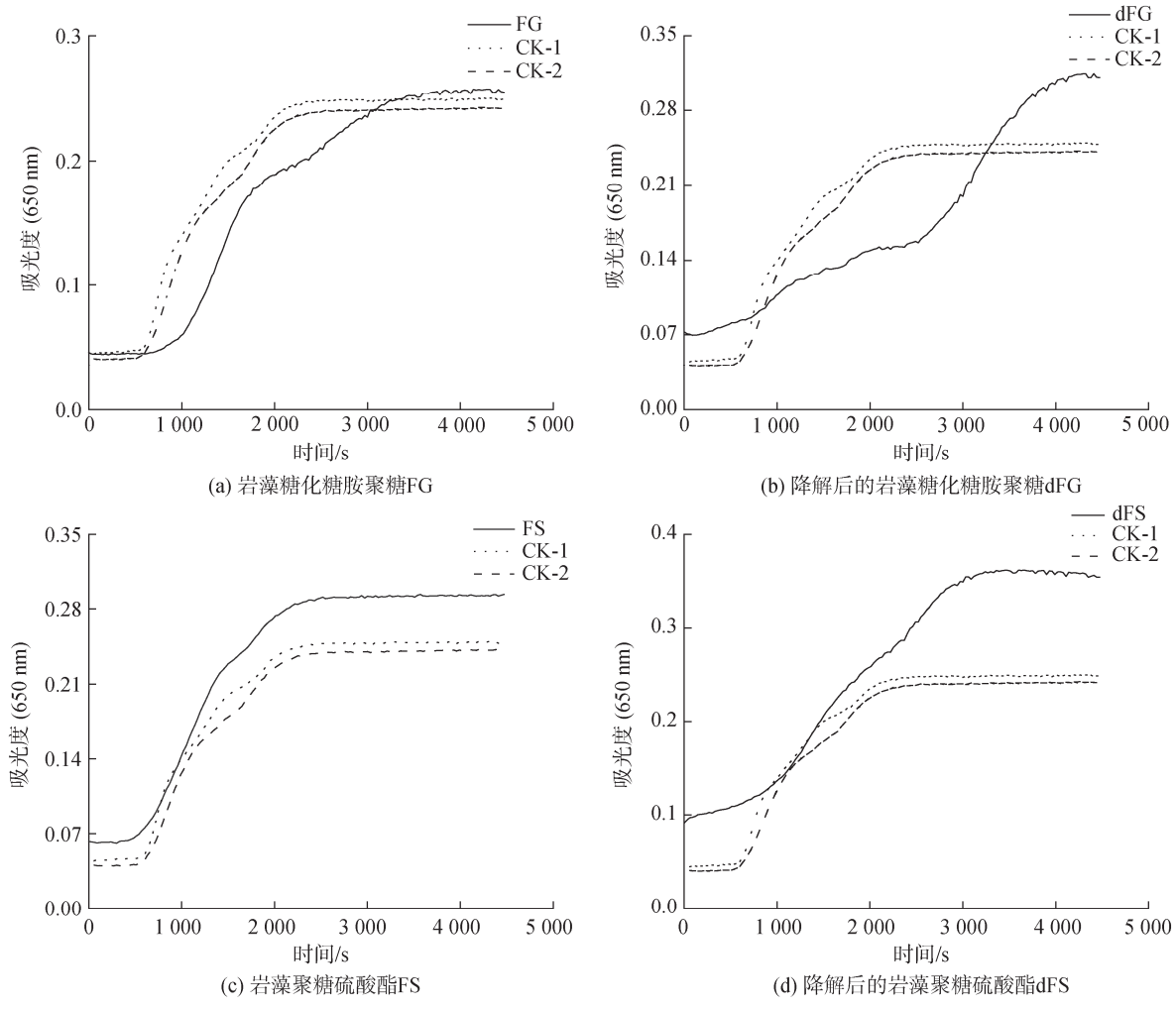


图 8　的 FG(a)、dFG(b)、FS(c)及 dFS(d)复钙实验结果

Fig. 8　Recalcification experiments of FG (a), dFG (b), FS (c), and dFS (d)

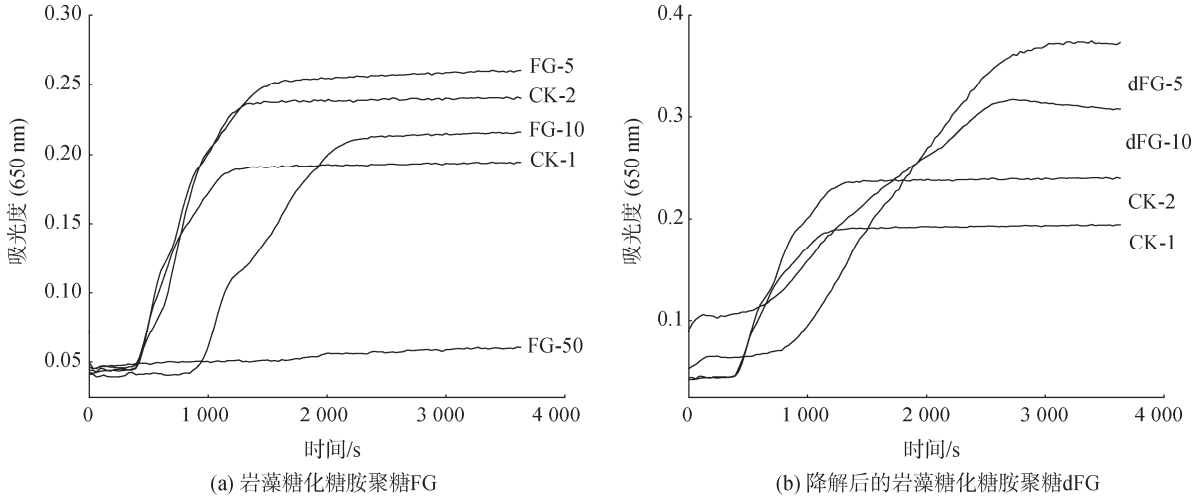
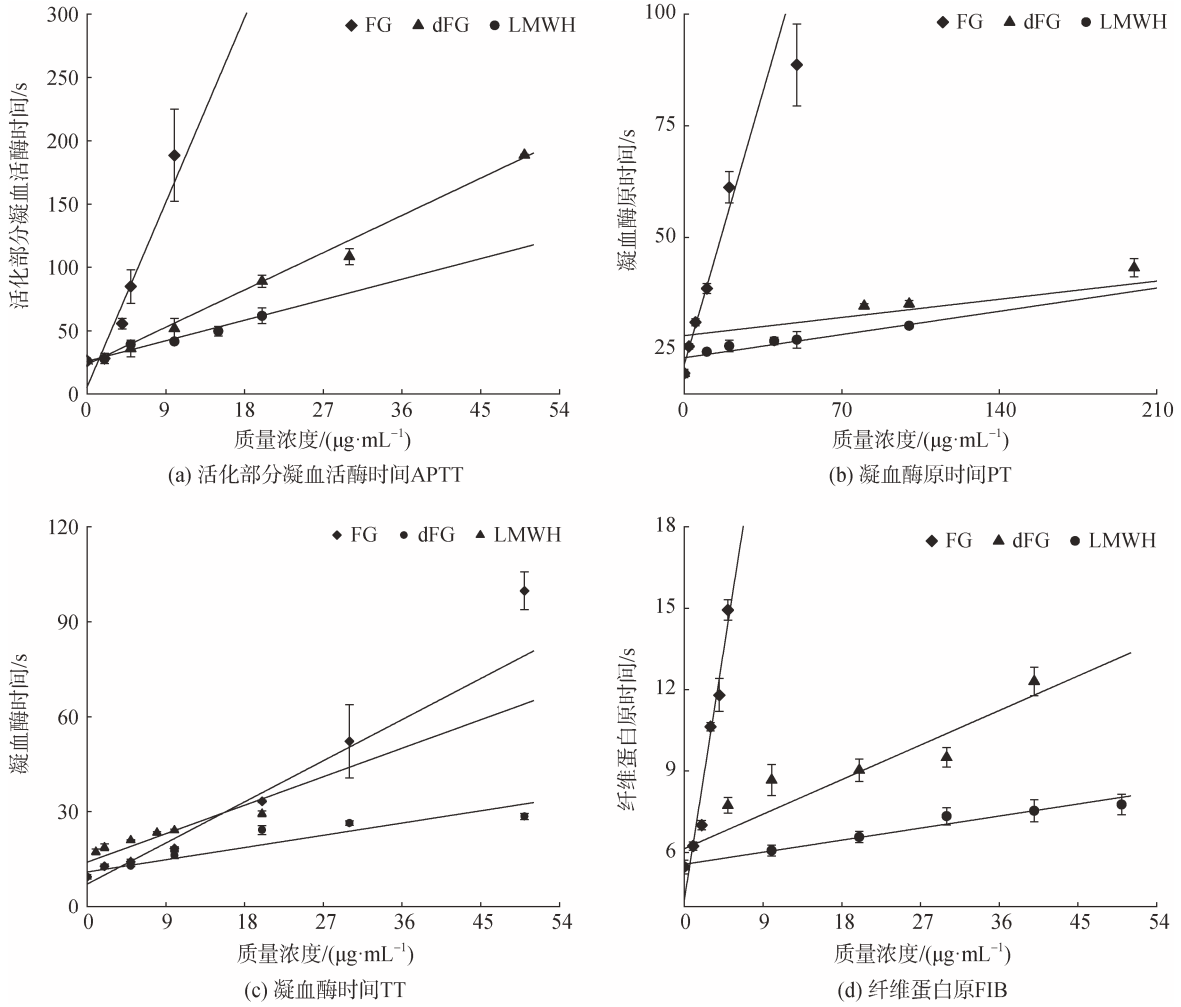


图 9　FG(a)与 dFG(b)复钙实验量效关系

Fig. 9　Quantitative-effect relationship of FG (a) and dFG (b)

的抗凝活性, 并与 LMWH 进行比较。结果(图 10, 表 3)显示, FG 具有非常显著的抗凝血活性, 可显著延长 APTT、PT、TT 和 FIB 的凝血时间, 使 APTT、PTTT 和 FIB 翻倍所需的质量浓度分别为 2.77、10.85、8.03 和 3.36 μg/mL。FG 使 APTT、PT、TT 和 FIB 持续时间增加 1 倍所需的浓度低于低分子肝素, 表明其具有非常明显的抗凝血活性。而使 APTT、PT、TT 和 FIB 时间翻倍所需的 dFG 质量浓度分别为 9.54、192.88、17.40 和 33.45 μg/mL, dFG 显著延长了 APTT、TT 和 FIB 的凝血时间, 但对 PT 的凝血时间没有显著影响。这些结果表明, dFG 可以影响内源性凝血途径和常见凝血途径, 但不能影响外源性凝血途径, 类似于先前报道的 *Holothuria nobilis* 来源的 dFG[36]。

Wu 等[37]研究显示来自海参 *Pearsonothuria graeffei* 的 FG 以及降解得到的低分子量寡糖片段均表现出抗凝活性, 能够明显延长 APTT 与 TT, 但是降解后的低分子量片段具有较短的 APTT 和 TT 时间, 表明抗凝活性降低。因此, 相对于具有更高抗凝活性的天然 FG, 降解后的低分子量片段可能具有更低的出血风险。Li[11]等研究显示, *Isostichopus badionotus* 来源的 FG 分子量的降低导致活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶时间(TT)显著降低, 抗凝血酶 III(ATIII)和肝素辅因子 II(HCII)对凝血酶(FIIa)的抑制作用降低, 以及对因子 X 活性的抑制作用轻微降低, 结果显示低分子量片段能够在具有较好的抗凝血活性的同时减出血的副作用。本文研究结果表明, dFG 显著延长了 APTT、TT 和 FIB 的凝血时间, 但对 PT 没有显著影响, 即 dFG 可以影响内源性凝血途径和共同凝血途径, 但不能影响外源性凝血途径, 这些结果显示调节 FG 的分子量可以加强对特定凝血途径的选择性作用, 从而在保持较好的抗凝血活性的同时降低出血风险, 但分子量与抗凝血活性之间的具体关系尚不明确, 需要进行更加深入的研究。



(a) 活化部分凝血活酶时间APTT
(b) 凝血酶原时间PT
(c) 凝血酶时间TT
(d) 纤维蛋白原FIB

图 10 APTT(a)、PT(b)、TT(c)and FIB(d)实验结果
Fig. 10 APTT (a), PT (b), TT (c), and FIB (d) of FG and dFG

表 3　APTT, PT, TT 与 FIB 延长一倍时间所需 FG 与 dFG 浓度
Tab. 3　Concentrations of FG and dFG required for doubling APTT, PT, TT, and FIB

样品名称	APTT/(μg·mL^{-1})	PT/(μg·mL^{-1})	TT/(μg·mL^{-1})	FIB/(μg·mL^{-1})
FG	2.77	10.85	8.03	3.36
dFG	9.54	>128	17.40	33.45
LMWH	15.21	>128	4.63	112.18

注: APTT: 活化部分凝血活酶时间、PT: 凝血酶原时间、TT: 凝血酶时间、FIB: 纤维蛋白原、LMWH: 低分子量肝素

3　结论

本研究利用酶解碱解联用与 Sepharose DEAE-Fast Flow 柱层析分离, 并经 Sephadex G-100 凝胶柱纯化的方法, 从球参中提取到 2 种多糖, 岩藻聚糖硫酸酯 FS 与岩藻糖化糖胺聚糖 FG, 理化性质分析结果显示, FG 为岩藻糖化糖胺聚糖, 由 Fuc、GalNAc 与 GlcA 构成, 硫酸基质量分数为 28.04%。FS 为岩藻聚糖硫酸酯, 仅由 Fuc 构成, 硫酸基质量分数为 24.05%。体外抗凝血活性实验结果显示 FG 具有显著的抗凝血活性, 能够显著延长 APTT、PT、TT 和 FIB 时间。dFG 能够显著延长 APTT 和 FIB 的凝血时间, 但对 PT 没有明显影响, 即 dFG 可以影响内源性凝血途径, 但不能影响外源性凝血途径, 表明调节 FG 的分子量可以加强对特定凝血途径的选择性作用, 从而在保持较好的抗凝血活性的同时降低出血风险。

参考文献:

[1] GU X, BAI G, LIU L, et al. Research progress on structural characterization of sea cucumber polysaccharide[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2023, 42(1): 66-75.

[2] KANG J, JIA X, WANG N, et al. Insights into the structure-bioactivity relationships of marine sulfated polysaccharides: A review[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 123: 107049.

[3] MARTINS A, ALVES C, SILVA J, et al. Sulfated polysaccharides from macroalgae—a simple roadmap for chemical characterization[J]. Polymers, 2023, 15(2): 399-419.

[4] MA Y, GAO N, ZUO Z, et al. Five distinct fucan sulfates from sea cucumber *Pattalus mollis*: purification, structural characterization and anticoagulant activities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 186: 535-543.

[5] USTYUZHANINA N E, BILAN M I, ANISIMOVA N Y, et al. Depolymerization of a fucosylated chondroitin sulfate from *Cucumaria japonica*: structure and activity of the product[J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 281: 119072.

[6] USTYUZHANINA N E, BILAN M I, DMITRENOK A S, et al. Fucose-rich sulfated polysaccharides from two vietnamese sea cucumbers *Bohadschia argus* and *Holothuria* (theelothuria) spinifera: structures and anticoagulant activity[J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 379-392.

[7] QIN Y, YUAN Q, ZHANG Y, et al. Enzyme-assisted extraction optimization, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from sea cucumber *Phyllophorus proteus*[J]. Molecules, 2018, 23(3): 590-609.

[8] LI R, YU H, YUE Y, et al. Sulfated polysaccharides with antioxidant and anticoagulant activity from the sea cucumber *Holothuria fuscogliva*[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2016, 35(4): 763-769.

[9] XUE Z, ZHAO L, WANG D, et al. Structural characterization of a polysaccharide from Radix Hedysari and its protective effects against H_2O_2-induced injury in human gastric epithelium cells[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 189: 503-515.

[10] SONG Y, JIN S, CUI L, et al. Immunomodulatory effect of *stichopus japonicus* acid mucopolysaccharide on experimental hepatocellular ccarcinoma in rats[J]. Molecules, 2013, 18(6): 7179-7193.

[11] LI S, LI J, ZHI Z, et al. Macromolecular properties and hypolipidemic effects of four sulfated polysaccharides from sea cucumbers[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 173: 330-337.

[12] LU W, YANG Z, CHEN J, et al. Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 272: 118526.

[13] GONG P, LI Q, WU Y, et al. Structural elucidation and antidiabetic activity of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Stichopus japonicas*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 262: 117969.

[14] WANG Y, WANG J, ZHAO Y, et al. Fucoidan from sea cucumber cucumaria frondosa exhibits anti-hyperglycemic effects in insulin resistant mice via activating the PI3K/PKB pathway and GLUT4[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 121(1): 36-42.

[15] ZHU Q, LIN L, ZHAO M. Sulfated fucan/fucosylated chondroitin sulfate-dominated polysaccharide fraction from low-edible-value sea cucumber ameliorates type 2 diabetes in rats: New prospects for sea cucumber polysaccharide based-hypoglycemic functional food[J].

International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 159: 34-45.

[16] HUANG L, SHEN M, MORRIS G A, et al. Sulfated polysaccharides: immunomodulation and signaling mechanisms[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 92: 1-11.

[17] XIA Y, WANG C, YU D, et al. Methods of simultaneous preparation of various active substances from *Stichopus chloronotus* and functional evaluation of active substances[J]. Food and Agricultural Immunology, 2022, 33(1): 563-574.

[18] YIN J, YANG X, XIA B, et al. The fucoidan from sea cucumber *apostichopus japonicus* attenuates lipopolysaccharide-challenged liver injury in C57BL/6J mice[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 61: 103493.

[19] LI Y, LI M, XU B, et al. The current status and future perspective in combination of the processing technologies of sulfated polysaccharides from sea cucumbers: A comprehensive review[J]. Journal of Functional Foods, 2021, 87: 104744.

[20] MATSUHIRO B, OSORIO-ROMáN I O, TORRES R. Vibrational spectroscopy characterization and anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from sea cucumber *Athyonidium chilensis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 88(3): 959-965.

[21] MOURAO P A S, PEREIRA M S, PAVAO M S G. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm[J]. The Journai of Biological Chemistry, 1996, 271(39): 23973-23984.

[22] CAI Y, YANG W, YIN R, et al. An anticoagulant fucan sulfate with hexasaccharide repeating units from the sea cucumber *Holothuria albiventer*[J]. Carbohydrate Research, 2018, 464: 12-18.

[23] GAO N, CHEN R, MOU R, et al. Purification, structural characterization and anticoagulant activities of four sulfated polysaccharides from sea cucumber *Holothuria fuscopunctata*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 3421-3428.

[24] LI C, NIU Q, LI S, et al. Fucoidan from sea cucumber *Holothuria polii*: Structural elucidation and stimulation of hematopoietic activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1123-1131.

[25] MANSOUR M B, BALTI R, YACOUBI L, et al. Primary structure and anticoagulant activity of fucoidan from the sea cucumber *Holothuria polii*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 121: 1145-1153.

[26] USTYUZHANINA N E, BILAN M I, DMITRENOK A S, et al. The structure of a fucosylated chondroitin sulfate from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 165: 7-12.

[27] USTYUZHANINA N E, BILAN M I, DMITRENOK A S, et al. Two fucosylated chondroitin sulfates from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 164: 8-12.

[28] USTYUZHANINA N E, BILAN M I, DMITRENOK A S, et al. Fucosylated chondroitin sulfates from the sea cucumbers *paracaudina chilensis* and *Holothuria hilla*: structures and anticoagulant activity[J]. Marine Drugs, 2020, 18(11): 540-550.

[29] JIANG S, YIN H, QI X, et al. Immunomodulatory effects of fucosylated chondroitin sulfate from *Stichopus chloronotus* on RAW 264.7 cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 251: 117088.

[30] LIU X, LIU Y, HAO J, et al. In vivo anti-cancer mechanism of low-molecular-weight fucosylated chondroitin sulfate (LFCS) from sea cucumber *Cucumaria frondosa*[J]. Molecules, 2016, 21(5): 625-637.

[31] YANG W, CAI Y, YIN R, et al. Structural analysis and anticoagulant activities of two sulfated polysaccharides from the sea cucumber *Holothuria coluber*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 1055-1062.

[32] WU M, XU L, ZHAO L, et al. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from Sea Cucumber[J]. Marine Drugs, 2015, 13(4): 2063-2084.

[33] ZHANG J, LIU F, ZHANG J, et al. Research progress on preparation, chemical analysis and biological activity of sea cucumber polysaccharide[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(8): 1730-1736.

[34] LUO L, WU M, XU L, et al. Comparison of physicochemical characteristics and anticoagulant activities of polysaccharides from three sea cucumbers[J]. Marine Drugs, 2013, 11(2): 399-417.

[35] TIAN X, SHENG W, ZHAO Y, et al. Simultaneous determination of uronic acids, amino sugars and neutral sugars in polysaccharide from sea cucumber[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(15): 85-94.

[36] LI S, ZHONG W, PAN Y, et al. Structural characterization and anticoagulant analysis of the novel branched fucosylated glycosaminoglycan from sea cucumber *Holothuria nobilis*[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 269: 118290.

[37] WU N, YE X, GUO X, et al. Depolymerization of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber, *Pearsonothuria graeffei*, via 60Co irradiation[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 93(2): 604-614.

Isolation, purification, and anticoagulant analysis of polysaccharides from sea cucumber *Phyllophorus proteus*

LIU Jingwen[1, 2, 3], WU Ning[1, 3], GENG Lihua[1, 3], WANG Jing[1, 3], YUE Yang[1, 3], ZHANG Quanbin[1, 3]

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Feb. 29, 2024
Key words: *Phyllophorus proteus*; fucan sulfate; fucosylated glycosaminogiycan; anticoagulation

Abstract: In this study, two sulfated polysaccharides were isolated from *Phyllophorus proteus* using enzymatic–alkaline coupling and Sepharose DEAE Fast Flow column chromatography, and Sephadex G100 column chromatography was used for further purification. Physicochemical property analysis indicated that the two sea cucumber polysaccharides were fucan sulfate (FS) and fucosylated glycosaminoglycan (FG). Two low molecular weight polysaccharides—dFS and dFG—were obtained through the degradation of FS using 10 mmol/L TFA and degradation of FG via the β-elimination method, respectively. The in vitro anticoagulant assay demonstrated that FG showed good anticoagulant activity and significantly prolonged the clotting times of activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT), and FIB. dFG significantly prolonged the clotting times of APTT, TT, and FIB but showed no significant effect on the clotting time of PT. Therefore, adjusting the molecular weight of FG can enhance the selective effects on specific coagulation pathways, thus reducing the risk of bleeding while maintaining optimal anticoagulant activities. These results indicated that FG and dFG can be developed as anticoagulants.

(本文编辑：杨　悦)