中国科学 C 辑: 生命科学
2007 年 第 37 卷 第 5 期: 508~515
http://www.scichina.com

《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

香港海藻网胨藻中抗病毒活性多糖的分离与纯化

王 辉[①] 黄荣春[②] 伍泽赓[②*]

(① 暨南大学医学院, 广州 510632; ② 香港中文大学生物系, 香港 999077)

摘要 采用生物活性追踪的方法从香港海藻网胨藻(*Hydroclathrus clathratus*)中分离具有抗病毒活性的多糖, 其中 H3-a1 和 H3-b1 纯度较高, 它们表现出很强的抗单纯疱疹病毒Ⅱ型活性, 且细胞毒性很小. 通过高压液相色谱(HPLC)、紫外扫描、气相色谱、红外分光光谱和元素分析等方法对这 2 种多糖进行鉴定, 发现它们是 2 种由不同单糖成分组成的高分子量硫酸多糖, 分别含有一定量的蛋白质和糖醛酸. 同时, 从网胨藻水提物中分离到的多糖显示较低的抗凝血活性. 在分离纯化过程中, 多糖的抗病毒活性随着硫酸基含量的变化而变化.

关键词 香港海藻 网胨藻 抗病毒多糖 多糖鉴定

多糖是海藻细胞壁的主要成分, 所有藻类都至少含有 1 种类型的硫酸多糖[1]. 由于其分子量、分子结构及生理特征的多样性, 海藻多糖显示出多种生物活性, 比如抗病毒[2~4]、抗肿瘤、抗凝血、抗氧化、抗炎和补体抗性等活性[5~8].

在前期的筛选实验中发现, 采自香港海域的褐藻网胨藻(*Hydroclathrus clathratus*)的水提物有很好的抗单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)活性, 但对 Vero 和 HEp-2 细胞的毒性很低. 本研究集中于网胨藻中抗病毒活性多糖的分离、纯化和鉴 定, 对各分离组分的抗凝血活性也作了初步检测.

1 材料和方法

1.1 海藻、病毒、细胞和阳性对照药物

网胨藻 2003 年 3 月采自香港吉澳、乌排, 使用前于–20℃保存.

Vero 细胞(ATCC CCL-81)和 HEp-2 细胞(ATCC CCL-23)在生长液(growth medium)中于 37℃, 95%湿度和 5% CO_2 的条件下培养. 生长液是含有 10%热灭活胎牛血清(FBS, Gibco)、HEPES 20 mmol/L、谷氨酸盐 2 mmol/L 和庆大霉素 50 μg/mL 的 Eagle's 基础培养基(Eagle's minimum essential medium, MEM, Gibco). 分析液(Assay medium)是含有 1%血清的 MEM, 其他成分与生长液相同. 单纯疱疹病毒Ⅱ型(Herpes simplex virus-Ⅱ, HSV-Ⅱ)8702 标准株蒙加拿大哈利法克斯 Dalhousie 大学 Spence HS. Lee 博士惠赠, 在 Vero 细胞中增殖、保存.

实验中, 抗病毒药物阿昔洛韦(acyclovir, ACV, Wellcome Foundation Ltd., 英国)和一种分离自海藻且具有很好抗病毒活性的硫酸葡聚糖(dextran sulfate, DS, 分子量为 10 000, Sigma)作为阳性对照药物.

1.2 生物活性追踪分离网胨藻多糖

网胨藻经沸水提取后, 残渣分别用稀酸和碱液提取(图 1), 所得到的组分同时用苯酚硫酸法[9]和 Lowry-Folin法[10]检测. 分别收集苯酚硫酸反应阳性的部分进行抗HSV-Ⅱ活性筛选, 选择活性最好的组分经离子交换柱层析(DEAE-纤维素, Sigma)和凝胶过滤(Sepharose CL-4B, Sigma)进一步纯化. 所有组分均做体外抗病毒活性测试.

收稿日期: 2007-01-22; 接受日期: 2007-07-17
香港特别行政区研究资助局(批准号: CUHK4367/01M)和香港中文大学科研经费资助项目
* 联系人, E-mail: put-ang@cuhk.edu.hk

1.3　细胞毒性检测

海藻多糖对 Vero 和 HEp-2 的细胞毒性用乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)释放法测定, 按检测试剂盒的操作程序(Roche Diagnostics GmbH, 德国)进行. 简单来说, 在生长于 96 孔板(Iwaki, 日本)的细胞中加入新鲜的分析液(100 μL/孔)和系列 2 倍梯度稀释的样品溶液(100 μL/孔), 继续培养 24 h 后, 于各孔中吸出 100 μL 上清液并分别与等体积新鲜配制的反应液混合, 25℃避光培育 30 min 后加入停止液(50 μL/孔), 在 490 nm/620 nm 处测定 *A* 值. 细胞毒性以 CC_{50}(50% cytotoxic concentration)表示, 即促使半数细胞发生毒性死亡的样品浓度.

1.4　抗病毒活性检测

样品的抗病毒活性用细胞病变(cytopathic effect, CPE)减少法 [11]和空斑减少法(plaque reduction assay, PRA)[12]进行测定. 检测时, HSV-Ⅱ感染Vero细胞, 感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10^3 $TCID_{50}$/mL 或 80 单位/孔(plaque formation unit (PFU)/well), 继续培育 3 天后检测 CPE 或空斑减少的情况. 样品的抗病毒活性以半数有效浓度(50% effective concentration, EC_{50})表示, 即与病毒对照相比, 使 50%CPE 或空斑减少的样品浓度.

1.5　抗凝血活性分析

采用凝血酶时间(thrombin time, TT)检测 [13]: 0.2 mL人血浆(购自香港红十字会)和 0.1 mL多糖样品(浓度为 0.98~500 μg/mL)在小试管中混匀, 并于 37℃温育 1 min后加入 0.1 mL含有 3~4 单位/mL的凝血酶(Sigma)溶液, 37℃条件下记录凝血时间(s). 肝磷脂(heparin, Sigma)溶液、硫酸葡聚糖溶液作为阳性对照, PBS的TT为基线值.

1.6　活性多糖的化学特性研究

(1) HPLC 测定多糖 H3-a1 和 H3-b1 的相对分子量

采用惠普 1100HPLC 系统配置 TSK-GEL G5000PW 柱(7.5 mm×30.0 cm, 粒径: 17 μm) (Toshohaas Co., 日本)进行检测. 样品用 0.5 mol/L NaCl 溶液溶解并洗脱, 洗脱组分用折光率检测器(HP 1047A RI 检测器)监测. 分子量为 25, 80, 270 和 670 kD 的葡聚糖(Dextran, Fluka)标准品作为标准推测所检测多糖的相对分子量.

(2) 紫外扫描

样品溶于 0.1 mol/L NaCl 溶液(浓度约为 1 mg/mL), 用 Milton Roy Sptronic 3000 (Milton Ray, USA)检测仪在 200~800 nm 波长下扫描并记录紫外吸收情况.

(3) 气相色谱(GC)检测单糖组分

首先, 多糖经过酸水解, 水解产物用来制备中性单糖的醛醇酸盐 [14], 再用GC检测. 检测系统为 HP6890 GC系统, 配备Alltech DB-225 色谱柱(15 m×0.25 mm×0.25 μm, Alltech Associates, Inc., Deerfield). 升温程序: 初始温度 180℃, 以 4℃/min升至 220℃保持 30 min, 氦气作为载体. 注射样品量为 2 μL.

(4) 糖醛酸成分检测

采用 Official Methods of Analysis (AOAC, 1996) 检测方法. 实验中, 2 mol/L 硫酸作为空白对照, D-半乳糖醛酸溶液(6.25~400 μg/mL)作标准曲线, 样品中糖醛酸含量以重量百分比表示.

(5) 硫酸基含量检测

$BaCl_2$ 比浊法 [15]检测多糖样品中的硫酸基含量(稍有改进): 准确称量 20 mg样品, 在氮气存在的条件下于密封的玻璃管中用 0.5 mL 2 mol/L盐酸于 100℃水解 2 h, 冷却之后的水解液用容量瓶定容至 10 mL. 活性碳除色之后, 取 1 mL无色溶液、0.5 mL 6 mol/L HCl, 2.5 mL 70% 山梨醇和 0.5 g $BaCl_2{\cdot}H_2O$依次加入到试管中混匀, 放置 15~20 min之后于 470 nm 波长处检测吸光值. 硫酸基含量根据硫酸钾标准曲线计算.

(6) 红外扫描: 采用溴化钾打饼法 [16], 用 Magna-IR 560 检测系统进行检测, 测得 400~4500 cm^{-1} 范围的红外吸收光谱.

(7) 元素分析: 由英国 MEDAC 公司对多糖的碳、氢、氮和硫 4 种元素进行测定.

2　结果

2.1　活性追踪法分离多糖

基于溶解性的不同, 从网胨藻中分离多糖的过程如图 1 所示, 各级分离组分中选取抗 HSV-2 活性最好的部分进行纯化. 因此, 对水提物中分离得到的组分 HⅠ-3 做 DEAE-纤维素柱层析, 先后用水和 0~1.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱, 收集苯酚硫酸反应阳性的

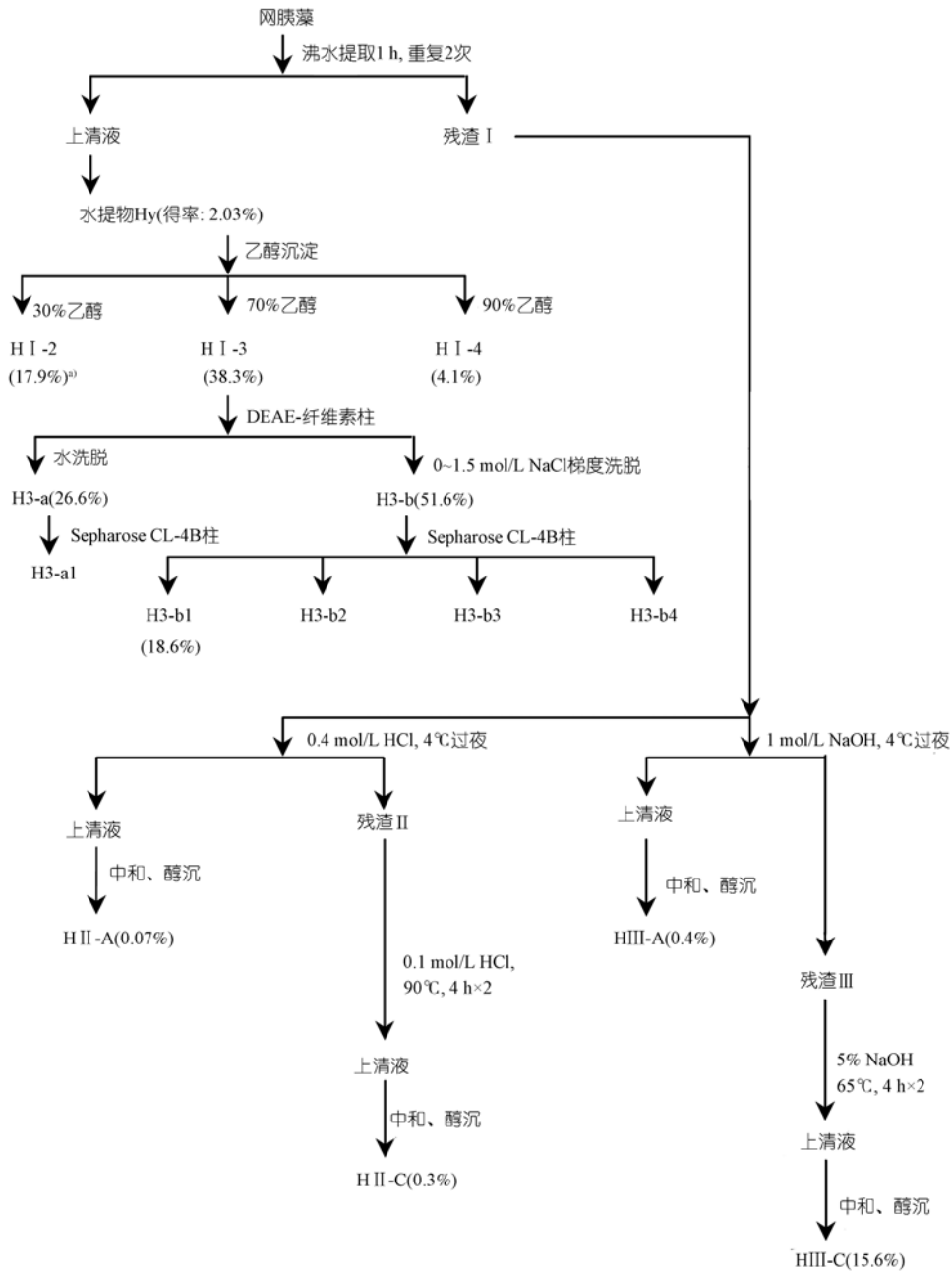

图 1 从网胰藻中提取、纯化多糖的流程

a) 各得率均基于上一级的产物算出

部分, 得到组分 H3-a 和 H3-b(图 2). 这 2 个组分分别用 Sepharose CL-4B 凝胶柱层析进一步纯化. 从 H3-a 中仅得到一个组分, 命名为 H3-a1(图 3(a)), 从 H3-b 中分离到 4 个片段, 分别为 H3-b1, H3-b2, H3-b3 和 H3-b4(图 3(b)).

CPE 减少法检测各组分抗 HSV-2 活性的结果如表 1 所示. 加热条件下, 稀酸和碱液的提取物 HⅡ-C 和 HⅢ-C 基本不显示抗 HSV-2 活性, 其他部分尤其是水提物及其纯化产物都能抑制病毒诱导产生 CPE. 从 3 种粗提物来看, 水提物 Hy 比稀酸和碱液提取物 HⅡ-A 和 HⅢ-A 的抗病毒活性高. Hy 的主要成分 HⅠ-3 显示出比 Hy 更好的抗 HSV-2 效果, 其 EC_{50} 为 6.25 μg/mL. HⅠ-3 经 DEAE-纤维素柱层析之后, 得到的组分 H3-a 和 H3-b 抗 HSV-2 活性稍有降低. 进一

步经凝胶柱层析纯化之后, 2 个相对较纯的组分 H3-a1 和 H3-b1 的抗性活性又有所升高. 从 H3-b 中分离到的另外 2 个组分 H3-b3 和 H3-b4 的抗病毒活性很弱或没有活性.

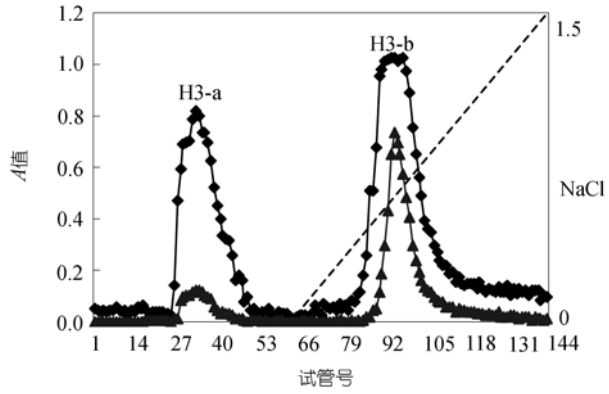

图 2　HⅠ-3 的离子交换柱层析(DEAE-纤维素)图

HⅠ-3 溶解于水, 层析柱先后用水和 0~1.5 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱(30 mL/h, 6 mL/管). 采用苯酚硫酸法和 Lowry-Folin 法检测碳水化合物和蛋白质, 检测波长分别为 490 nm (◆)和 750 nm (▲)

采用空斑减少法进一步确定 H3-a1 和 H3-b1 的抗 HSV-2 活性时发现, 这 2 个多糖都显示出与浓度相关的抗病毒效果(图 4), 它们对 HSV-2 的 EC_{50} 值分别为 1.7 和 1.67 μg/mL. 由于这 2 种多糖对 Vero 和 HEp-2 细胞几乎无毒, 因此它们有很高的选择性系数(SI)(表 2). 由此可见, H3-a1 和 H3-b1 都是有效的抗 HSV-2 活性物质.

2.2　多糖的抗凝血活性

抗凝血的 TT 检测中, 如果血浆在加入凝血酶 5 min 后都不发生凝固, 则认为凝血被完全抑制, 此时凝血时间记为>300 s. 在本实验中, 网胨藻的各多糖组分同肝磷脂及硫酸葡聚糖一样, 都能延长血浆的凝固时间, 且抗凝血活性与浓度成正相关. 但是, 血浆凝固被完全抑制所需要的网胨藻多糖的浓度至少为 125 μg/mL, 而肝磷脂及硫酸葡聚糖的完全凝血浓度分别为 1.95 和 31.25 μg/mL. 在 TT 检测中, PBS 的凝血酶时间(21.3 s)为基线值, 为了使凝结时间延长至基线值的 2 倍, H3-a1 和 H3-b1 所需浓度约为 35 μg/mL, 比所需肝磷脂(约 1.1 μg/mL)高 32 倍, 比硫酸葡聚糖(约 13.2 μg/mL)高 2.7 倍, 因此, H3-a1 和 H3-b1 的抗凝血活性是相对较低的.

2.3　H3-a1 和 H3-b1 的特性

(1) 纯度和相对分子量检测

经 HPLC 检测发现 H3-b1 仅有一个对称峰, 而 H3-a1 在主峰旁边还有一个小峰, 表明 H3-b1 纯度较高. 以葡聚糖标准品为对照, H3-a1 和 H3-b1 都是大分子量物质, 测得它们的相对分子量分别是 0.34×10^6~4.7×10^6 和 3.9×10^6.

(2) H3-a1 和 H3-b1 的化学特点

为了分析其化学特点, 本实验检测了 H3-a1 和 H3-b1 的总碳、蛋白质、硫酸基和糖醛酸含量. 紫外扫描的结果显示, H3-b1 和 H3-a1 在 200 nm 左右有很强的吸收值, H3-a1 在 275 nm 处有一个小的吸收峰, 而 H3-b1 在此波长处仅有微弱吸收, 因此 H3-a1 的蛋白含量可能比 H3-b1 高. SDS-PAGE 电泳后染色发现, H3-a1 和 H3-b1 只在经 Schiff 试剂染色的凝胶上出现紫红色的多糖带, 而经考马斯亮蓝染色后没有蛋白

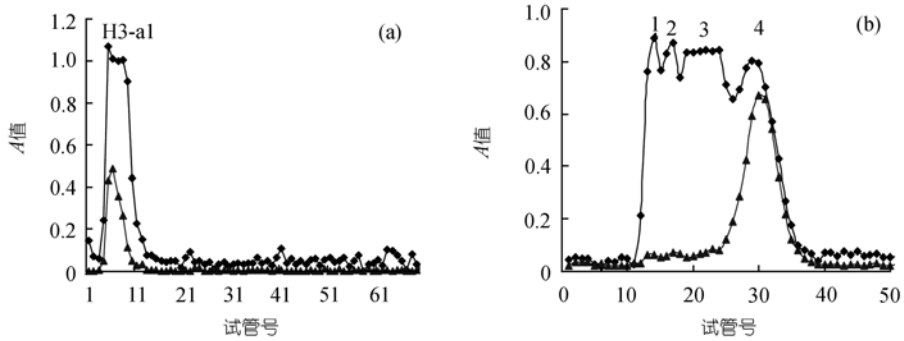

图 3　H3-a(a)和 H3-b(b)分子筛层析(Sepharose CL-4B)图

2 个样品分别用水和 0.1 mol/L NaCl 溶液洗脱(30 mL/h, 2 mL/管), 洗脱液用苯酚硫酸法(490 nm, ◆)和 Lowry-Folin 法(750 nm, ▲)检测. 图(b)中的 4 个峰代表从 H3-b 中分离到的 4 个组分, 称为 H3-b1, H3-b2, H3-b3 和 H3-b4

表 1 网胨藻多糖抗 HSV-2 活性情况 a)

多糖组分	EC_{50} b)/μg·mL^{-1} HSV-2 8702 标准株
Hy (水提物)	12.5
HⅡ-A	25
HⅡ-C	— c)
HⅢ-A	18
HⅢ-C	—
HⅠ-2	12.5
HⅠ-3	6.25
HⅠ-4	12.5
H3-a	6.25
H3-b	6.25
H3-a1	3.13
H3-b1	2.3
H3-b2	12.5
H3-b3	>25
H3-b4	—
DS_{10k}	2.3
Acyclovir	2.0

a) 生长于 96 孔板的 Vero 单层细胞中加入病毒悬液(10^3 $TCID_{50}$·mL^{-1})和等体积的系列 2 倍稀释的样品溶液, 继续培养 3 天后观察 CPE. b) EC_{50}, 50%抗病毒效果的样品浓度; c) —, 在 50 μg·mL^{-1} 浓度下无抗病毒活性

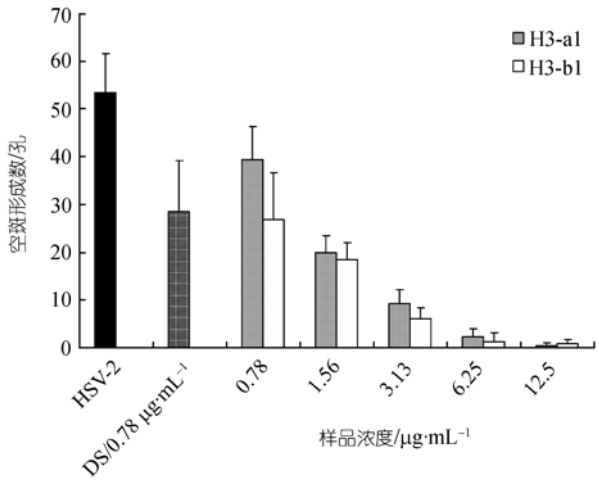

图 4 PRA 法测定 H3-a1 和 H3-b1 的抗 HSV-2 活性

生长于 12 孔板的 Vero 细胞在系列稀释样品存在或不存在(病毒对照)的条件下感染 HSV-2 标准株(80 PFU/孔), 37℃培育 1 h 后用 PBS 洗去未吸附的病毒粒子, 然后各孔加入相应浓度的样品并在同样条件下继续培养 72 h 后固定、染色, 计算空斑数. 阳性对照硫酸葡聚糖以相同方法处理

质条带出现(数据未列出), 表明这 2 种多糖中蛋白质含量都较低, 或者蛋白质可能与多糖联结而不能用这种方式检测到. 用苯酚硫酸法和 Lowry-Folin 法检测, H3-b1 含有较高比例的碳水化合物(42.7%)和很少的蛋白质(0.69%), 而在 H3-a1 中碳水化合物和蛋白质含量分别是 27.8%和 8.6%.

H3-b1 除含有少量海藻糖(fucose, 6.2%)外, 主要 H3-a1 只含有 0.27%海藻糖, 主要的单糖成分为半乳糖(26.0%)、葡萄糖、甘露糖、葡萄糖胺、鼠李糖、由鼠李糖(44.7%)、葡萄糖、甘露糖、半乳糖、核糖、半乳糖胺和微量的木糖组成(表 3). 与 H3-b1 不同,阿拉伯糖以及微量核糖.

网胨藻多糖的硫酸基含量在纯化过程中有所改变, 从低于 20%(Hy 和 H3-b)到 26%左右(HⅠ-3), 含量最高为 H3-a1(32.8%)和 H3-b1(47.5%)(表 4). 元素分析发现, H3-b1 中 4 种元素的含量分别是碳 23.61%,氢 4.3%, 氮 0.63%和硫 8.28%, 即 H3-b1 中碳、氢、氮和硫的比例大致为 1∶2∶0.023∶0.13, 因此, H3-b1 中平均大约每 1.28 个糖残基就含有一个硫酸根, 是一种高度硫酸化的多糖.

表 2　H3-a1 和 H3-b1 抗 HSV-2 标准株的活性

多糖组分	CC_{50}[a)]/μg·mL^{-1}		EC_{50}[b)]/μg·mL^{-1} (HSV-2)	SI[c]
	Vero 细胞	HEp-2 细胞		
H3-a1	>1000	>1000	1.7	>588
H3-b1	>1000	>1000	1.67	>598

a) CC_{50}, 对半数细胞产生毒性时的样品浓度, 本实验采用 LDH 法检测; b) EC_{50}, 经空斑减少法测得的在 Vero 细胞中使病毒空斑减少 50%时的样品浓度; c) SI, 选择性系数(selective index)= CC_{50}/EC_{50}

表 3　H3-a1 和 H3-b1 中的单糖组成及相对含量

单糖	相对含量/%	
	H3-a1	H3-b1
阿拉伯糖	3.27 ± 0.07	–
海藻糖	0.27 ± 0.01	6.16 ± 0.11
半乳糖胺	–	1.47 ± 0.03
半乳糖	26.01 ± 0.18	9.19 ± 0.02
葡萄糖胺	14.91 ± 0.16	–
葡萄糖	22.23 ± 0.02	15.17 ± 0.18
甘露糖	18.59 ± 1.84	10.45 ± 0.63
鼠李糖	9.61 ± 0.05	44.70 ± 0.32
核糖	0.61 ± 0.04	9.02 ± 0.25
木糖	–	0.90 ± 0.23
其他	4.5	2.94

表 4　网胨藻多糖中硫酸基和糖醛酸含量

多糖组分	含量/%[a)]	
	硫酸基	糖醛酸
Hy	17.05 ± 0.34	–[b)]
HⅠ-3	26.33 ± 0.42	11.75 ± 0.45
H3-b	19.86 ± 2.20	23.05 ± 0.49
H3-a1	32.81 ± 0.21	10.29 ± 0.06
H3-b1	47.50 ± 1.35	0.74 ± 0.03

a) 结果为平均值 ± SD, n=3. b) 未检测

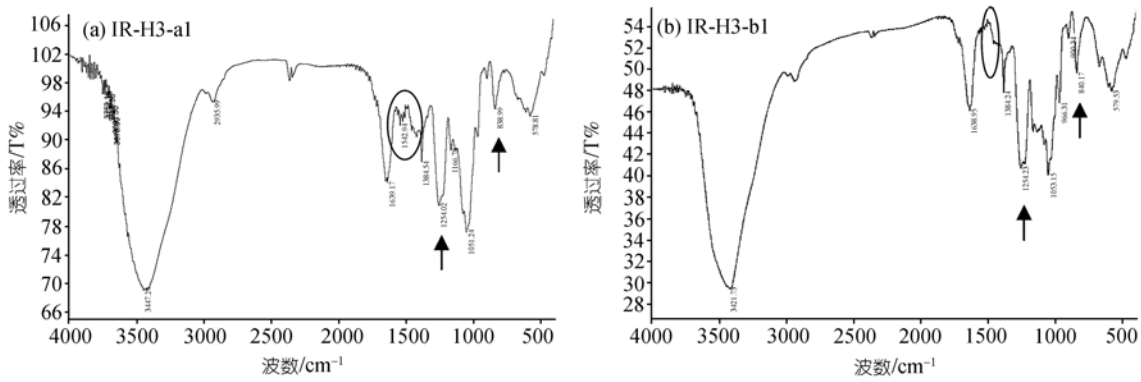

图 5　H3-a1 和 H3-b1 的红外吸收谱

图中箭头所示为 S═O (1254 cm^{-1})和 C–O–S (~ 840 cm^{-1})的吸收峰. 圆圈处为 H3-a1 和 H3-b1 中 NH_2 基团吸收峰位置

H3-b1 和H3-a1 有着相似的红外扫描图谱(图 5): 二者在 3400 cm^{-1} 附近都有一个强的-OH吸收峰; C-H的吸收峰在 2930 cm^{-1}; 在 1640 cm^{-1} 位是由羧基产生的强吸收; 对称的-CH_3 吸收峰在 1380 cm^{-1}; S═O吸收在 1254 cm^{-1} 位. 在低于 900 cm^{-1} 的区域也产生了一些吸收峰, 840 cm^{-1} 附近的吸收峰表明硫酸酯基团连接在第二羧基位. H3-a1 和H3-b1 的不同之处在于: H3-a1 在 1542 cm^{-1} 位有吸收(图 5(a)), 而H3-b1 在此

处没有(图 5(b)). 在 1540 cm^{-1} 附近的吸收峰表明有 NH_2 的存在[16], 这一结果进一步证明H3-a1 含有蛋白质而H3-b1 几乎没有.

3 讨论

本实验中, 海藻用不同溶剂提取时采用了低温(4℃)或加热处理. 加热可使得率增加, 但是热酸和热碱液的提取物没有抗病毒活性. 事实上, 几乎所有多糖在溶液中都会解聚, 而在酸性条件下解聚更甚[17], 加热会促使解聚加快. 这种得率增加而活性降低可能是由于多糖的一些特性如溶解性、结构、黏度甚至化学成分等发生了改变, 因此, 热水提取是从海藻中分离抗病毒活性多糖的最佳方法.

多数海藻多糖是多聚阴离子化合物[18], 由于离子强度不同, 不同的多糖可通过离子交换层析进行分离纯化. H3-b可与DEAE-纤维素结合并被NaCl溶液洗下说明H3-b带负电荷, 但H3-a不被DEAE-纤维素滞留而被水洗下, 检测发现它是一种中性多糖(pH 7.0). 而且, 从H3-b和H3-a中纯化得到的H3-b1 和H3-a1 也分别是酸性和中性多糖, 但实验显示它们都是硫酸多糖. 据推测, pH7 时, H3-a和H3-a1 中可能存在大量的负电荷, 因此多糖与阴离子交换剂之间的位阻阻碍了它们相互间的结合, 而且使酸性多糖因静电惰性表现出中性特点[19]. 硫酸多糖的中性特点也可能是酯化作用形成了过多的R—O—SO_3^- 基团造成, 这种酯化反应可以在分子内与多糖的自由—OH之间发生, 也可能在纯化过程中与使用的乙醇发生[19].

研究[24]认为硫酸多糖通常都表现出抗凝血活性. 一方面, 海藻多糖有时被作为凝血调节物, 或者代替抗凝血药物肝磷脂使用[21]. 但另一方面, 多糖的抗凝血活性也会成为它作为抗病毒药物使用时的障碍. 分离自网胰藻的多糖都有中等强度的抗凝血效果, 但是, 在抗病毒活性的半数效应浓度(EC_{50} 1.56 ~ 12.5 μg/mL)范围内, 这些多糖并不会显著改变凝血酶时间(TT), 只在 62.5 μg/mL时能延长TT. 因此, 相对于它们的抗病毒活性来讲, 这些多糖的抗凝血活性是很低的, 特别是相对较纯的多糖H3-b1, 如果作为抗病毒药物, 它的抗凝血负作用是非常小的.

研究表明, 植物来源具生物活性的多糖很多是大分子物质, 它们的分子量可在几千至几百万道尔顿范围内变化[22]. 海藻多糖的分子量及其生物活性可能因提取方法、采集时间或采集地点的不同而变化[23]. 而且, 从不同种褐藻中分离到的硫酸多糖通常是独特的, 在其他海藻或陆生植物中不能分离得到. 褐藻多糖主要含有海藻糖、硫酸基, 还有少量糖醛酸、半乳糖、甘露糖和木糖[24]. 然而, 本研究发现, H3-a1 和H3-b1 都含有一些特殊的单糖组分, 海藻糖的含量也很低. H3-b1 中含较高比例的鼠李糖, 与分离自绿藻的硫酸鼠李聚糖相似[4], 这种硫酸鼠李聚糖也显示出很强的抗HSV-1, 人巨细胞病毒HCMV (human cytomegalovirus)和人免疫缺陷病毒HIV-1 的活性. 实际上, 由于其大分子量的特点和纯化过程不同, 海藻多糖有时确实会含有除海藻糖以外的其他单糖残基包括半乳糖、甘露糖、木糖或者还有糖醛酸, 有时还含有蛋白质[21]. 更有甚者, 海藻多糖的组成成分会因海藻种类、提取方法、采集时间和当地气候情况等条件的变化而变化.

抗病毒活性检测表明, HⅠ-3 的抗HSV效果比Hy和H3-b好, 但是略低于H3-a1 和H3-b1, H3-a1 和H3-b1 都能很好地保护细胞免受HSV的感染, 它们的活性变化趋势与其硫酸基的含量变化走向一样, 表现为硫酸基含量越高, 抗病毒活性越好; 同时, 这些多糖的抗凝血活性也随着硫酸含量的增加而增加. 因此, 硫酸根在网胰藻多糖的药学活性中发挥着极重要的作用, 这一结果与其他藻类多糖的研究结果相符[25].

在化学特性分析中, 红外扫描也是检测褐藻多糖的常用手段之一[26]. 早前的研究表明, 840 cm^{-1} 处的高吸收是由轴向的C-4 位硫酸基所致[27]. C-2 和C-3 位硫酸基会在 820 cm^{-1} 处形成一个小的吸收增加(shoulder of absorption). 因此根据红外谱图推测, H3-a1 和H3-b1 中大多数硫酸基团可能在C-4 位与单糖残基连接.

虽然海藻多糖的活性与它们的离子强度有关, 但这些活性是否与分子内另一个带电荷成分糖醛酸有关还不清楚, 多糖的分子结构及其构效关系也有待于进一步的研究. 但是, 因为有着非常好的抗 HSV 活性, 从网胰藻中分离到的 2 种硫酸多糖 H3-a1 和 H3-b1 都有发展为抗单纯疱疹病毒感染药物的潜力.

参 考 文 献

1 Witvrouw M, De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. Gen Phamacol, 1997,

29: 497—511
2 Ponce N M A, Pujol C A, Damonte E B, et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies. Carbohydr Res, 2003, 338: 153—165[DOI]
3 Carlucci M J, Scolaro L A, Errea M I, et al. Antiviral activity of natural sulphated galactans on herpes virus multiplication in cell culture. Planta Med, 1997, 63: 429—432[DOI]
4 Lee J B, Hayashi K, Hayashi T, et al. Antiviral activities against HSV-1, HCMV, and HIV-1 of Rhamnan sulfate from *Monostroma latissimum*. Planta Med,1999, 65: 439—441
5 Riou D, Colliec-Jouault S, Du Sel D P, et al. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. Anticancer Res, 1996, 16: 1213—1218
6 Albuquerque I R L, Queiroz K C S, Alves L G, et al. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. J Med Biol Res, 2004, 37: 167—171
7 Zhang Q B, Li N, Liu X G, et al. The structure of a sulfated galactan from *Porphyra haitanensis* and its *in vivo* antioxidant activity. Carbohydr Res, 2004, 339: 105—111[DOI]
8 Blondin C, Fischer E, Boisson-Vidal C, et al. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed. Mol Immunol, 1994, 31: 247—253[DOI]
9 Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956, 28: 350—356
10 Harris E L V, Angal S. Protein purification methods: A practical approach. New York: IRL Press, 1989. 11—12
11 Li Y L, But P P H, Ooi V E C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. Antiviral Res, 2005, 68: 1—9[DOI]
12 Carlucci M J, Scolaro L A, Damonte E B. Herpes simplex virus type 1 variants arising after selection with an antiviral carrageenan: lack of correlation between drug susceptibility and syn phenotype. J Med Virol, 2002, 68: 92—98[DOI]
13 Matsuhiro B, Zúñiga E, Jashes M, et al. Sulfated polysaccharides from *Durvillaea antarctica*. Hydrobiologia, 1996, 321: 77—81[DOI]
14 Blakeney A B, Harris P J, Henry R J, et al. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. Carbohydr Res, 1983, 113: 291—299[DOI]
15 Craigie J S, Wen Z C, Van der Meer J P. Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. Bot Mar, 1984, 27: 55—61
16 Guezennec J G, Pignet R, Raguenes G, et al. Preliminary chemical characterization of unusual eubacterial exopolysaccharides of deep-sea origin. Carbohydr Polymers, 1994, 24: 287—294[DOI]
17 Franz G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. Planta Medica, 1989, 55: 493—497[DOI]
18 Pereira M S, Mulloy B, Mourão P A S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. J Biol Chem, 1999, 274: 7656—7667[DOI]
19 Béress A, Wassermann O, Bruhn T, et al. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. J Nat Prod, 1993, 56: 478—488[DOI]
20 Melo F R, Pereira M S, Fogue D, et al. Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides. J Biol Chem, 2004, 279: 20824—20835[DOI]
21 Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. Glycobiology, 2003, 13: 29R—40R[DOI]
22 Chun H, Shin D H, Hong B S, et al. Purification and biological activity of acidic polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L. Biol Pharm Bull, 2001, 24: 941—946[DOI]
23 Rupérez P, Ahrazem O, Leal J A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. J Agric Food Chem, 2002, 50: 840—845[DOI]
24 Nishino T, Nishioka C, Ura H. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. Carbohydr Res, 1994, 255: 213—224[DOI]
25 Laquerre S, Argnani R, Anderson D B, et al. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. J Virol, 1998, 72: 6119—6130
26 Yim J H, Kim S J, Ahn S H, et al. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. Mar Biotechnol, 2004, 6: 17—25[DOI]
27 Patankar M S, Oehninger S, Barnett T, et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. J Biol Chem, 1993, 268: 21770—21776