

多糖的化学修饰对其生物活性影响研究进展

孟思彤¹, 徐艳芝², 王振月^{1*}¹黑龙江中医药大学; ²哈药集团三精制药股份有限公司, 哈尔滨 150040

摘要:多糖是重要的药用活性成分,将其结构进行化学修饰,得到的修饰后多糖有可能具有较修饰前更高的活性或者产生新的活性。本文对这一方面进行研究,阐述了硫酸化、磷酸化、羧甲基化、烷基化、乙酰化等化学修饰方法对多糖生物活性的影响,并对多糖化学修饰应用前景加以展望。

关键词:多糖;化学修饰;生物活性;研究进展

中图分类号: R284.3

文献标识码: A

Research Progress on Chemical Modification of Polysaccharide and Their Biological Activities

MENG Si-tong¹, XU Yan-zhi², WANG Zhen-yue^{1*}¹Heilongjiang University of Chinese Medicine; ²Harbin Pharm. Group Sanjing Pharmaceutical Shareholding CO., LTD, Haerbin 150040, China

Abstract: Polysaccharide are important medicinal active ingredients. They are likely to have a higher activity or generate new activity after chemical modification. This paper will conduct a study in this field, expounding sulfation, phosphorylation, carboxymethylation, alkylation and acylation on polysaccharide and their influence on biological activities, and have an outlook on their application prospect.

Key words: polysaccharide; chemical modification; biological activities; research progress

多糖在自然界蕴藏丰富,种类繁多,具有抗肿瘤、抗氧化和免疫调节等众多生物活性且其副作用低而引起研究者广泛关注并获得很大进展^[1-3],多糖生物活性的发挥与其结构有关,很多研究发现经化学修饰后多糖生物活性明显增强或产生新的活性,在保持健康和预防疾病方面产生了极好的生理特性^[4,5],如天然香菇多糖具有抑制肿瘤的作用,而硫酸化后显示出较高的抗 HIV 的活性,因此多糖的分子修饰和结构改造具有重要意义。本文对多糖化学修饰的常见方法硫酸化、磷酸化、乙酰化、烷基化、羧甲基化等及其对生物活性影响进行阐述。

1 化学修饰方法

1.1 硫酸化

硫酸化修饰是多糖修饰中常见的方法之一,硫酸化的修饰方法主要有氯磺酸-吡啶法、浓硫酸法、三氧化硫-吡啶法等,其修饰结果是将硫酸基团加到

多糖的糖基上,增加其生物活性。研究表明,硫酸的取代度、取代位置、碳水化合物含量等对硫酸酯化多糖活性有一定影响。

1.2 磷酸化

多糖分子经磷酸化修饰后,支链上的羟基被磷酸基团取代,增强原多糖水溶性,改变链构象,磷酸多糖衍生物有减轻心功能不全症状、抗炎、抗氧化、抗菌免疫、抗肿瘤等功能。

1.3 羧甲基化

羧甲基化是向多糖分子引入羧甲基,使部分生物活性受影响。大多数有生物活性的多糖都是水溶的,难溶于水的一部分通常认为没用。提高多糖的水溶性是促进多糖活性的很重要部分。广泛认为羧甲基化可以增加多糖的水溶性。

1.4 乙酰化

乙酰化是将多糖支链上羟基被乙酰基团取代,使多糖结构伸展,让更多的羟基暴露出来,会导致它在水中的溶解度增加,提高其活性,是一种常用的多糖修饰方法。

1.5 烷基化

目前研究较多的是壳聚糖的烷基化,壳聚糖系甲壳素脱乙酰基的产物,这种高分子的生物官能性和相容性、血液相容性、安全性、微生物降解性等优良性能被各行各业广泛关注,烷基化的壳聚糖有极好的水溶性,有强溶菌酶降解和自身降解能力。对于制备水溶性好、可生物降解的壳聚糖衍生物有一定意义^[6]。

1.6 硒化

硒化多糖是由硒和多糖组成,有双重药理作用,然而又不是两种活性的简单相加,硒化多糖会比它们产生更高或更新的活性。大量研究发现硒化多糖免疫增强活性与最佳硒化度的协同作用和碳水化合物含量有关。

2 生物活性影响

2.1 抗病毒活性

Yu Lu 采用 CSA-Pyr 硫酸修饰法,这个方法中氯磺酸与吡啶浓度比、反应时间和反应温度是重要影响因素,将三个因素加以考虑进行正交设计,得到 9 种硫酸化淫羊藿多糖。结果证实硫酸化的淫羊藿多糖对鸡胚成纤维细胞抵抗鸡传染性法氏囊病毒感染的作用显著增强,且其能力与硫酸基取代度和碳水化合物含量有一定的相关性^[7]。较低浓度的硫酸化牛膝多糖与没经化学修饰的牛膝多糖比,硫酸化牛膝多糖(在 MARC-145 细胞上)有显著的抗猪繁殖与呼吸综合症病毒的作用^[8]。Tiehong Yang 等研究了硫酸化当归多糖 APSs 在白血病病毒感染的小鼠体内的活性,病毒复制被抑制,六种不同硫酸化程度的衍生物在浓度 10 ~ 30 mg/kg 时抑制率从 26% 到 30%。当 APS-1 在浓度为 3 ~ 30 mg/kg 时,外周血细胞中 CD⁴⁺ 细胞数量、CD⁴⁺/CD⁸⁺ 比值明显增强,即加强了免疫功能。此外因感染病毒而减少的胸腺体重量指标升高。这个类似患 AIDS 的鼠模型与感染 AIDS 的人类有很多相似的地方,如免疫缺陷、病毒复制、肿瘤发生。因此此实验结果可适用于人类 AIDS 研究上^[9]。用 MTT 法检测两种硫酸化银耳多糖和三种没经过化学修饰的银耳多糖对感染 NDV 病毒细胞的效果,结果显示硫酸化银耳多糖明显提高抗 NDV 病毒能力^[10]。Uryu 等最先将烷基引入到硫酸低聚糖,合成了如硫酸十八烷基麦芽醇己糖苷、硫酸十二烷基布戊糖苷和硫酸十二烷基布寡聚物。发现烷基化修饰后的硫酸低聚糖的抗 HIV 活

性远远高于修饰前的多糖^[11]。大量实验证明了多糖衍生物抗病毒作用增强与化学集团取代度有关,同时聚合度、基团位置、聚合物骨干等结构因素也会影响抗病毒活性,化学集团的引入改变多糖三维构象,从而影响其活性。

2.2 抗肿瘤活性

Wei 等合成了四种硫酸取代度不同的红芪多糖,硫酸基团主要修饰 C-2 和 C-6 位置。与红芪多糖较低的效果相比,硫酸化的红芪多糖在体外实验中对 A549 细胞和 BGC-823 细胞有更高的抑制率,表明硫酸化的红芪多糖有更好的抗肿瘤活性。流式细胞术表明硫酸化红芪多糖调节 A549 和 BGC-823 细胞在 G1 阶段细胞周期阻滞,抑制细胞增长及诱发细胞凋亡。且与常见治疗癌症的药物不同,红芪多糖和硫酸化的硫酸化多糖对非癌症细胞 HEK293 均没有细胞毒性作用^[12]。将有独特结构 - [3GlcA β 1-4 (GalNAc α 1-3)-Fuc α 1]_n 的乌贼墨多糖硫酸化,结构变为 - [3GlcA β 1-4 (4, 6-SO₄-GalNAc α 1-3)-Fuc α 1]_n - 在体外肝癌细胞 HepG2 上产生剂量依赖的抑制细胞入侵和转移作用。而且在鸡胚尿囊膜模型中,明显抑制血管新生^[13]。硫酸化的脱脂米糠多糖在体外有明显抑制 B16 细胞和 HepG2 细胞增长的作用。当硫酸取代程度在 0.81 到 1.29 范围内、碳水化合物含量在 41.41% 到 78.56% 之间时,其抗肿瘤作用相对较强^[14]。磷酸化的茯苓(1 \rightarrow 3)- β -D-葡聚糖在溶液中存在一个相对延伸柔性链。体外实验中有抗肿瘤活性,在体内对 S₁₈₀ 细胞有较强的抑制率,而茯苓葡聚糖则没有这个生物活性。或许是磷酸基团、较高的分子质量、相对扩展的构象增加与免疫细胞受体结合的机会,从而增强抗肿瘤活性^[15]。将茯苓中 β -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖 (PCS3-II) 羧甲基硫酸化后 (CS-PCS3-II),在溶液中有一条扩展的柔性链。CS-PCS3-II 在老鼠体内对 S₁₈₀ 肿瘤细胞抑制率比 PCS3-II 有显著提高,显微镜观察肿瘤细胞有坏死和凋亡的迹象。免疫增强是因为硫酸和羧甲基基团通过结合氧、静电吸引与免疫细胞受体接触增多,达到一个更强大的免疫反应,从而抑制肿瘤细胞扩散。此外,噬菌细胞、胸腺指标、脾脏指标都有显著增多。溶血活性、脾脏抗体产生、迟发型超敏反应表明在老鼠体内 CS-PCS3-II 能显著增强免疫保护功能^[16]。多糖的抗肿瘤活性与结构有关,大量实验证明了许多多糖衍生物抗肿瘤作用增强,主要机制为抑制肿瘤细胞增长、诱发其凋

亡、抑制其转移和入侵等作用。

2.3 免疫作用

Junmin Wang 等将宁夏枸杞多糖硫酸化配合 ND 免疫雏鸡,在一免后 28 d 内能显著促进淋巴细胞增殖、增强血清抗体效价、加强免疫力^[17]。硫酸化香菇多糖减少 NDV 雏鸡的发病率和死亡率,高剂量可增强抗体效价,低剂量促进淋巴细胞增殖效果更好,比香菇多糖效果明显。硫酸化香菇多糖可增加香菇多糖的佐剂性,提高 NV 疫苗的免疫效力^[18]。将三种硫酸取代度不同,其中碳水化合物含量、分子质量、氯磺酸与吡啶浓度比均不同的硫酸化柿子多糖进行体外脾淋巴细胞增殖实验,结果表明硫酸化多糖能促进细胞因子的产生及 NO 释放,使脾淋巴细胞激活性显著提高^[19]。硫酸化多糖衍生物产生增强抗体效价、促进淋巴细胞增殖、提高淋巴细胞激活性等作用,使其免疫作用明显增强。在注射新城疫病毒疫苗的雏鸡体内,硒化当归多糖与没经化学修饰的当归多糖相比可以明显促进周围淋巴细胞增殖、增加血清抗体效价、IFN- γ 、1L-6 含量。根据三个因素(Na₂SeO₃ 量、反应温度、反应时间)正交得到 9 种硒化衍生物 sCAPs,其中 sCAP2 效力最强,可能与最佳的硒化程度和碳水化合物含量有关^[20]。

2.4 抗氧化

硫酸化的柿子多糖有呈剂量依赖的还原反应, DPPH 清除、超氧阴离子清除、羟基清除。三种柿子多糖衍生物(硫酸化取代度分别为 0.8、1.7、2.5)中,硫酸化程度高的效果最好。硫酸根基团使端基碳的氢原子活泼、增加多糖聚合电解质和亲核性、增加与金属铁的接触,从而增强清除力。多糖的清除能力取决于其结构参数,如分子质量、水溶性、取代基团、取代位置、取代程度、糖种类、糖苷分支。对这些条件进行优化也是增强多糖抗氧化力的途径^[21]。硫酸化白沙蒿多糖抗氧化提高,其机制可能是由于其强供氢能力、与金属螯合能力、除超氧自由基效力。高硫酸取代度和适当的分子质量能加强其抗氧化性^[22]。黑木耳作为药物食物有 1000 多年,有很多生物活性。黑木耳粗多糖水溶性差,很难纯化及进一步研究。但羧甲基化的黑木耳多糖水溶性增强,其氧化性与黑木耳粗多糖相比增强,如羟基消除、DPPH 自由基消除和 ABTS + 自由基消除,特别是后两个实验,氧化性几乎为没经化学修饰的黑木耳多糖的两倍^[23]。灵芝多糖羧甲基化增加了其水

溶性,而且还发现了它有很高的氧化性,特别是清除羟基自由基、过氧化氢,一定程度上清除超氧阴离子团。而灵芝多糖的这些活性表现的很微弱^[24]。乙酰化南瓜多糖在 DPPH 自由基清除实验、超氧阴离子自由基活性测定实验、还原能力测定实验中都显示出比南瓜多糖更高的氧化性,且其氧化能力和取代度有很大关系,可能结构参数取代度、分子量不同而导致不同的抗氧化性,该实验加入吡啶催化剂可以增加取代度,而酸酐量几乎没有影响。南瓜多糖及其乙酰化衍生物都可抑制过氧化氢诱导小鼠胸腺淋巴细胞的细胞凋亡和细胞死亡,乙酰化南瓜多糖表现出更好的防护作用。在体内和体外的实验都说明了乙酰化南瓜多糖有较强的抗氧化性^[25]。然而 Shao 从裂片石莼中分离的四种硫酸多糖抗氧化性差异表现和很多实验结果不同,两种硫酸含量低的多糖氧化性高于另两种硫酸含量高的多糖。也许是裂片石莼多糖抗氧化活性不是一个因素决定的,而是由几个因素共同决定:如分子质量、糖醛酸含量、蛋白质含量^[26]。分析实验不同结果可见,多糖抗氧化力并不是一个因素决定的,而是由多因素共同决定。研究不同多糖抗氧化作用机制,优化硫酸化反应实验条件,找到合适的硫酸化衍生物,对研究其性能优势至关重要。

2.5 抗凝血作用

肝素是迄今为止使用时间最长的硫酸多糖。通常,硫酸化多糖有抗凝血作用是因为和肝素有相似的结构和抗凝血机制一致。尽管肝素已经广泛用于抗凝血治疗 60 多年,但它在临床应用上有很多问题,比如对抗凝血酶不足病人无效,生物利用度低,出血的风险以及在一些肝素接受者身上引起的血小板减少症^[27-30]。近年来根据肝素抗凝血机理制备的低副作用硫酸化多糖受到广泛关注。Lihong Fan 首次采用三碘化十二胺作为硫酸化试剂在水溶液中制备苹果果胶硫酸盐。果胶硫酸盐能通过抑制抗凝血酶延长部分凝血活酶时间和凝血酶时间^[31]。硫酸多糖衍生物的制备与探寻为寻找新的副作用更小的抗凝血药物有很大意义。

2.6 抗炎

硫酸黄芪多糖剂量依赖的上调紧密蛋白如闭合蛋白、ZO-1 的 mRNA 表达,下调促炎因素如 TNF- α 、1L-1 β 、1L-8 的 mRNA 表达,保护了 LPS 感染的 Ca-co2 细胞。体外研究表明硫酸化的黄芪多糖抗炎效果优于黄芪多糖^[32]。

2.7 降血脂作用

硫酸化孔石莼多糖与孔石莼多糖相比,前者使小鼠体内的甘油三酸酯、低密度脂蛋白浓度明显下降[28.1% ($P < 0.05$)和28.4% ($P < 0.01$)]。结果显示硫酸化孔石莼多糖有更高的抗高血脂效果且降血脂活性没有浓度依赖。作用机制尚不明确,前期研究表明硫酸化孔石莼多糖比石莼多糖有更高的抗氧化性,其降血脂活性可能与抗氧化活性有关^[33]。

3 小结

多糖的生物活性大多与其结构密切相关,多糖主链各糖单元组成、糖苷键类型均直接决定了多糖的活性,多糖支链的类型、聚合度、支链在多糖链上的分布及其取代度决定了多糖的活性大小,同时多糖生物活性很大程度取决于其分子质量,多糖分子的高级结构如链的柔韧性和空间构象与多糖活性紧密相关,为提高多糖的生物活性,多糖的分子修饰和结构改造具有重要意义。利用化学修饰法向多糖中引入新的基团从而增加或增强多糖的生物活性,且多糖类化合物大多没有毒性,使多糖及其衍生物在功能食品、药品、药妆领域等方面有更大的开发潜力。随着多糖结构修饰方法的完善、科学技术水平不断提高以及生命学科等领域的发展,多糖以及多糖衍生物的研究将会不断深入,科研工作者将会开发出更多更好的多糖类化合物,从而使糖化学研究运用到人类生活中。

参考文献

- Cui FJ, Tao WY, Xu ZH, *et al.* Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Biores Technol*, 2007, 98: 395-401.
- Cooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem*, 2000, 7:715-729.
- Zhao Z, Li J, Wu X, *et al.* Structures and immunological activities of two pectic polysaccharides from the fruits of *Ziziphus jujuba* Mill. cv. jinsixiaozao Hort. *Food Res Int*, 2006, 39:917-923.
- Baba M, Snoeck R, Pauwels R, *et al.* Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Ch*, 1988, 32:1742-1745.
- Veena CK, Josephine A, Preetha SP, *et al.* Beneficial role of sulfated polysaccharides from edible seaweed *Fucus vesiculosus* in experimental hyperoxaluria. *Food Chem*, 2007, 100: 1552-1559.
- Ma G, Yang D, Zhou Y, *et al.* Preparation and characterization of water-soluble N-alkylated chitosan. *Carbohydr Polym*, 2008, 74:121-126.
- Lu Y, Wang D, Hu Y, *et al.* Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. *Carbohydr Polym*, 2008, 71:180-186.
- Liu C, Chen H, Chen K, *et al.* Sulfated modification can enhance antiviral activities of *Achyranthes bidentata* polysaccharide against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) *in vitro*. *Int J Biol Macromol*, 2013, 52:21-24.
- Yang T, Jia M, Zhou S, *et al.* Antivirus and immune enhancement activities of sulfated polysaccharide from *Angelica sinensis*. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50:768-772.
- Zhao X, Hu Y, Wang D, *et al.* Optimization of sulfated modification conditions of tremella polysaccharide and effects of modifiers on cellular infectivity of NDV. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49:44-49.
- Uryu T, Ikushima N, Katsuraya K, *et al.* Sulfated alkyloligosaccharides with potent inhibitory effects on human immunodeficiency virus infection. *Biochem Pharmacol*, 1992, 43: 2385-2392.
- Wei D, Wei Y, Cheng W, *et al.* Sulfated modification, characterization and antitumor activities of *Radix hedysari* polysaccharide. *Int J Biol Macromol*, 2012, 51:471-476.
- Chen S, Wang J, Xue C, *et al.* Sulfation of a squid ink polysaccharide and its inhibitory effect on tumor cell metastasis. *Carbohydr Polym*, 2010, 81:560-566.
- Wang L, Li X, Chen Z. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. *Int J Biol Macromol*, 2009, 44:211-214.
- Chen X, Xu X, Zhang L, *et al.* Chain conformation and antitumor activities of phosphorylated (1→3)- β -D-glucan from *Poria cocos*. *Carbohydr Polym*, 2009, 78:581-587.
- Chen X, Zhang L, Cheung PCK. Immunopotential and antitumor activity of carboxymethylated-sulfated β -(1→3)-d-glucan from *Poria cocos*. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 398-405.
- Wang J, Hu Y, Wang D, *et al.* Sulfated modification can enhance the immune-enhancing activity of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Cell Immunol*, 2010, 263:219-223.
- Guo Z, Hu Y, Wang D, *et al.* Sulfated modification can enhance the adjuvanticity of lentinan and improve the immune

- effect of ND vaccine. *Vaccine*, 2009, 27:660-665.
- 19 Zhang Y, Lu X, Zhang Y, *et al.* Sulfated modification and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharides derived from fresh Chinese persimmon fruit. *Int J Biol Macromol*, 2010, 46:67-71.
- 20 Qin T, Chen J, Wang D, *et al.* Selenylation modification can enhance immune-enhancing activity of Chinese angelica polysaccharide. *Carbohydr Polym*, 2013, 95:183-187.
- 21 Zhang Y, Lu X, Fu Z, *et al.* Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. *Food Chem*, 2011, 127:1084-1090.
- 22 Wang J, Guo H, Zhang J, *et al.* Sulfated modification, characterization and structure-antioxidant relationships of *Artemisia sphaerocephala* polysaccharides. *Carbohydr Polym*, 2010, 81:897-905.
- 23 Yang L, Zhao T, Wei H, *et al.* Carboxymethylation of polysaccharides from *Auricularia auricula* and their antioxidant activities *in vitro*. *Int J Biol Macromol*, 2011, 49:1124-1130.
- 24 Xu J, Liu W, Yao W, *et al.* Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities *in vitro*. *Carbohydr Polym*, 2009, 78:227-234.
- 25 Song Y, Yang Y, Zhang Y, *et al.* Effect of acetylation on antioxidant and cytoprotective activity of polysaccharides isolated from pumpkin (*Cucurbita pepo*, lady godiva). *Carbohydr Polym*, 2013, 98:686-691.
- 26 Shao P, Chen M, Pei Y, *et al.* *In vitro* antioxidant activities of different sulfated polysaccharides from chlorophyten seaweeds *Ulva fasciata*. *Int J BiolMacromol*, 2013, 59:295-300.
- 27 Beijering RJ, ten Cate H, ten Cate JW. Clinical applications of new antithrombotic agents. *Ann Hematol*, 1996, 72:177-183.
- 28 Sun Z, He Y, Liang Z, *et al.* Sulfation of (1→3)- β -D-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. *Carbohydr Polym*, 2009, 77:628-633.
- 29 Martinichen-Herrero JC, Carbonero ER, Gorin PAJ, *et al.* Anticoagulant and antithrombotic activity of a sulfate obtained from a glucan component of the lichen *Parmotrema mantiqueirensis* Hale. *Carbohydr Polym*, 2005, 60:7-13.
- 30 Alban S, Schauerer A, Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides; Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr Polym*, 2002, 47:267-276.
- 31 Fan L, Gao S, Wang L, *et al.* Synthesis and anticoagulant activity of pectin sulfates. *J Appl Polym Sci*, 2011, 124:2171-2178.
- 32 Wang X, Wang S, Li Y, *et al.* Sulfated Astragalus polysaccharide can regulate the inflammatory reaction induced by LPS in Caco2 cells. *Int J Biol Macromol*, 2013, 60:248-252.
- 33 Qi H, Huang L, Liu X, *et al.* Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Carbohydr Polym*, 2012, 87:1637-1640.

(上接第 1900 页)

- 23 Kim S, *et al.* First asymmetric total synthesis of (-)-antofine by using an enantioselective catalytic phase transfer alkylation. *Org Lett*, 2003, 5:2703-2706.
- 24 Zeng W, Chemler SR. Total synthesis of (S)-(+)-tylophorine via enantioselective intramolecular alkene carboamination. *J Org Chem*, 2008, 73:6045-6047.
- 25 Ihara M, *et al.* Asymmetric total synthesis of naturally occurring (R)-(-)-enantiomer of tylophorine via intramolecular double Michael reaction. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1990:2287-2292.
- 26 Comins DL, *et al.* Enantiopure N-acyldihydropyridones as synthetic intermediates: asymmetric synthesis of (-)-septicine and (-)-tylophorine. *J Org Chem*, 1997, 62:7435-7438.