

## 硫酸苦豆子多糖构象及抗凝血活性

陈冠<sup>1,2</sup>, 程琳<sup>1</sup>, 张岩<sup>1</sup>, 王文彤<sup>1</sup>, 任荣<sup>3</sup>, 陶遵威<sup>1\*</sup>

(1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2. 天津中医药大学, 天津 300193;  
3. 天津医科大学总医院, 天津 300052)

**[摘要]** **目的:**研究硫酸化苦豆子多糖(SAPS)溶液的构象特征以及在不同因素影响下的溶液行为,并考察其体外抗凝血活性。**方法:**采用刚果红法研究 SAPS 构象特征;通过圆二色谱(CD)研究 SAPS 在不同浓度、温度和添加钙离子等条件下构象的变化;并测定 SAPS 体外抗凝血活性。**结果:**刚果红试验中 SAPS 络合物的最大吸收波长会发生红移;浓度、温度变化以及添加钙离子使 SAPS 构象发生变化。不同取代度的 SAPS 表现出不同程度的抗凝血活性。**结论:**SAPS 具有多股螺旋结构。浓度、温度和金属离子因素均对其构象均有不同程度的影响。随着硫酸根的取代度增加,SAPS 的抗凝血作用增强。

**[关键词]** 硫酸化; 苦豆子; 多糖; 溶液构象; 圆二色谱; 抗凝血

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0032-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170032

**Conformation and Anticoagulant Activity of *Sophora alopecuroides* Polysaccharide** CHEN Guan<sup>1,2</sup>, CHENG Lin<sup>1</sup>, ZHANG Yan<sup>1</sup>, WANG Wen-tong<sup>1</sup>, REN Rong<sup>3</sup>, TAO Zun-wei<sup>1\*</sup> (1. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 3. General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the conformation characteristics of *Sophora alopecuroides* (SAPS), its solutions under different conditions and its *in vitro* anticoagulant activity. **Method:** The Congo red analysis was used to study the conformation characteristics of SAPS. The changes in SAPS conformations were analyzed by circular dichroism (CD) under different conditions, such as concentration, temperature and adding calcium ions. Finally, the anticoagulant activities of SAPS *in vitro* was determined. **Result:** The Congo red analysis showed red shift in the maximum absorption wavelength of SAPS complex. The conformations of SAPS were affected by the changes in the concentration, temperature and metal ions. SAPS with different substitution degrees showed varying degrees of anticoagulant activities. **Conclusion:** SAPS is a triple helical polysaccharide. Its conformation in solution can be affected by the changes in the concentration, temperature and metal ions. The anticoagulant activities strengthen with the increase in the substitution degree of sulfate radicals.

**[Key words]** sulfate; *Sophora alopecuroides*; polysaccharide; solution conformation; circular dichroism; anticoagulation

苦豆子多糖主要成分为半乳甘露聚糖,具有降血糖和促进益生菌生长等生理活性<sup>[1-2]</sup>,还可作为增稠剂、稳定剂和生物材料广泛应用于食品、医药和造纸等行业<sup>[3-5]</sup>。目前,以苦豆子多糖为原料进行结构修饰已经得到硫酸苦豆子多糖(SAPS),磷酸苦豆子多糖(SAPP)和羧甲基苦豆子多糖(CM-

SAP)等一系列多糖衍生物,并报道了抗氧化活性<sup>[6-9]</sup>。但未见硫酸苦豆子多糖的溶液构象和抗凝血活性的报道。在多糖加工过程中,会涉及到多糖浓度、温度以及金属离子等外源性因素,因此本文在已有的基础上探讨外源性因素对 SAPS 构象的影响,有助于了解多糖的优势构象与活性的关系,并进

**[收稿日期]** 20141010(013)

**[基金项目]** 天津市卫生局科技基金项目(2012KY30)

**[第一作者]** 陈冠,助理研究员,从事天然产物研究与开发工作,Tel:13672009387,E-mail:guanchenren@yahoo.com

**[通讯作者]** \*陶遵威,研究员,从事化学药物的合成工作,Tel:022-27236182,E-mail:taozunwei@126.com

一步研究不同取代度的 SAPS 的抗凝血活性,最后归纳出 SAPS 抗凝血活性的构效关系,为其进一步开发成新药奠定理论基础。

### 1 材料

Specord 210 PLUS 型紫外-可见分光光度计[德国耶拿(Jena)公司],J-715 型圆二色谱仪(日本Jasco公司),CA-1500 型全自动血凝分析仪(日本Sysmex公司)。

苦豆子多糖(SAP),不同取代度的硫酸苦豆子多糖(SAPS1,SAPS2,SAPS3;硫酸根取代度分别为1.29,1.35,1.41;自制);刚果红,氢氧化钠,氯化钙,均为分析纯,均购自天津试剂开发公司。肝素(天津试剂开发公司),活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)试剂盒均为上海太阳生物技术有限公司产品。新西兰种系大白兔,体重(3±0.1)kg由北京隆安实验动物养殖中心提供,合格证号SCXK(京)2014-003。

### 2 方法与结果

**2.1 硫酸苦豆子多糖(SAPS)的制备** 由本实验室自制,制备方法及其结构表征见文献[7]。

**2.2 刚果红试验<sup>[10]</sup>** SAPS 溶液质量浓度为 1 g·L<sup>-1</sup>,刚果红溶液浓度为 80 μmol·L<sup>-1</sup>,NaOH 依次配成不同浓度(0.05~1.0 mol·L<sup>-1</sup>用邻苯二甲酸氢钾标定),将 SAPS 溶液,刚果红溶液,NaOH 溶液以体积比 1:1:2 混合并摇匀,25℃下静置 10 min,紫外分光光度计 400~600 nm 扫描依次测定混合液在不同 NaOH 浓度下最大吸收波长的变化。见图 1。实验结果表明,在实验的 NaOH 浓度范围内,SAPS 刚果红形成的复合物在可见光区域的最大吸收波长在低碱浓度区域随 NaOH 浓度的增加而向长波方向移动,当 NaOH 浓度为 0.15 mol·L<sup>-1</sup>时达到最大值,在 0.15~0.3 mol·L<sup>-1</sup>为亚稳区,表明多糖分子存在多股螺旋构象,刚果红与 SAPS 的络合物在弱碱性环境中能保持多稳定。当 NaOH 浓度高于 0.3 mol·L<sup>-1</sup>后,最大吸收波长开始急剧下降,到大于 0.35 mol·L<sup>-1</sup>时,最大吸收波长基本在 483 nm 附近,这是由于随着 NaOH 浓度的继续升高,多糖的螺旋结构开始解离,部分转变为自由弯曲结构,使得刚果红复合物最大吸收波长开始下降,直到 NaOH 浓度 0.35 mol·L<sup>-1</sup>时,多糖的螺旋结构基本完全解离为自由弯曲构象,刚果红与 SAPS 的络合物被完全破坏,最大吸收值趋于稳定。

### 2.3 SAPS 的圆二色性分析<sup>[11]</sup>

**2.3.1 SAPS 与 SAP 圆二色谱的分析** 分别将 SAP

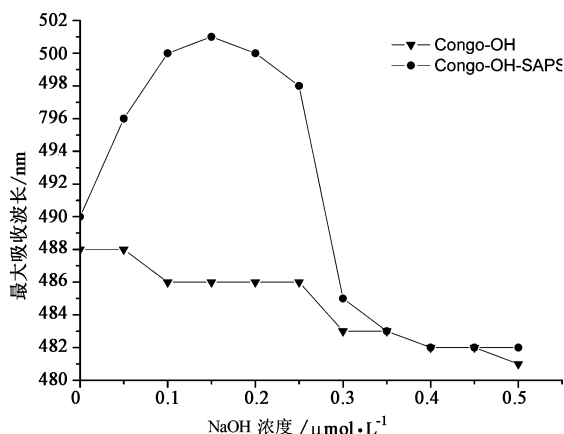
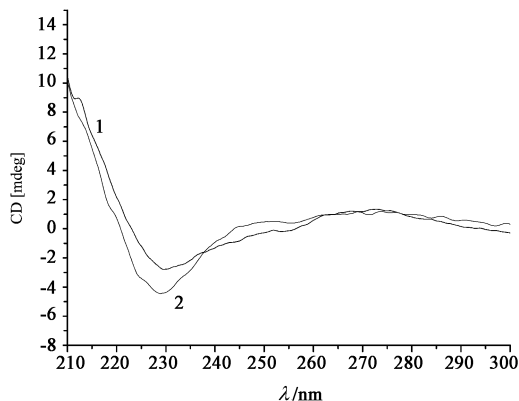


图 1 SAPS-刚果红络合物的最大吸收波长变化

Fig.1 Maximum absorption wavelength ( $\lambda_{max}$ ) of Congo red in presence of SAPS at various concentrations of sodium hydroxide solution

和 SAPS 配制成 1.0 g·L<sup>-1</sup>的溶液,波长范围 200~300 nm,比较经过硫酸化修饰后的圆二色谱(CD),结果见图 2。



1. SAP;2. SAPS

图 2 SAP 及 SAPS 圆二色谱

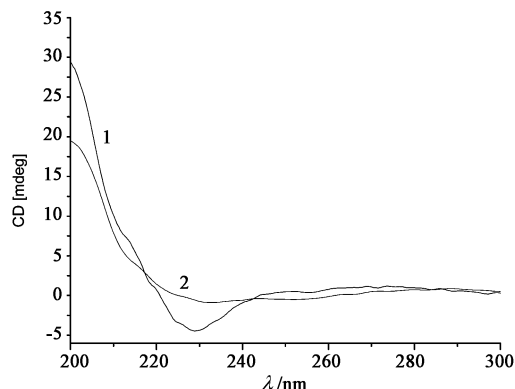
Fig.2 CD spectrum of SAP and SPAS

SAP 在 230,270 nm 有负 Cototn 效应,说明 SAP 具有有序的三股螺旋结构,这个结果与前面刚果红试验结果吻合。与 SAP 相比,SAPS 的负 Cototn 效应增强,证明 SAPS 较 SAP 有更强的手性,即经过硫酸化修饰后,多糖的有序的螺旋结构增强<sup>[12]</sup>。

**2.3.2 不同因素对 SAPS 溶液构象的影响** 将 SAPS 配制成 1.0 g·L<sup>-1</sup>的溶液,在波长范围 200~300 nm,通过改变浓度、温度和添加金属离子(Ca<sup>2+</sup>)等不同因素观察 CD 的变化。

**2.3.2.1 浓度对 SAPS 构象的影响** 分别配置质量浓度为 1.0,0.5 g·L<sup>-1</sup> SAPS 水溶液,测定其 CD,观察 SAPS 在不同浓度下溶液构象的转变,测定结果见图 3。随着浓度降低,200 nm 处的吸收减少,负

Cototn 效应也相应减少,这是由于随着浓度降低,氢键的作用减少,疏水作用增强,SAPS 有序的状态减弱,多糖分子趋于聚解,手性减弱。

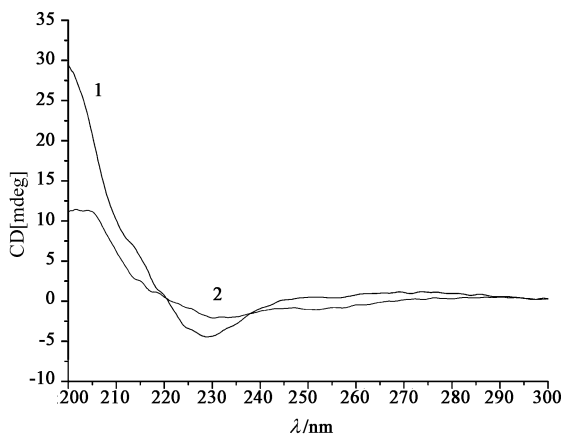


1. 1 g·L<sup>-1</sup>; 2. 0.5 g·L<sup>-1</sup>

图 3 不同浓度的 SAPS 圆二色谱

Fig. 3 Effects of concentration on CD of SPAS

**2.3.2.2 温度对 SAPS 构象的影响** 测定 20, 70 °C 下 SAPS 溶液 CD,观察 SAPS 在不同温度下溶液构象的转变,测定结果见图 4,随着温度升高负 Cototn 效应也相应减弱,提示温度升高到 70 °C 后会破坏 SAPS 的有序性。

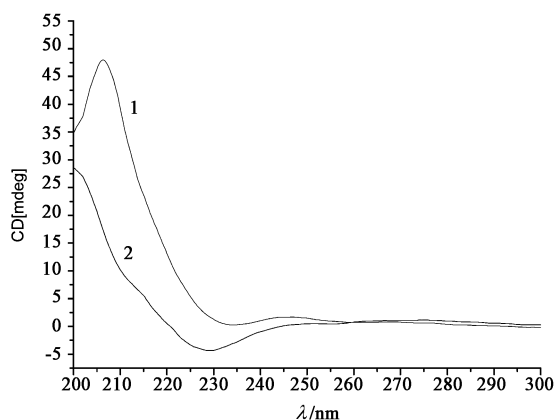


1. 20 °C; 2. 70 °C

图 4 不同温度的 SAPS 圆二色谱

Fig. 4 Effects of temperature on CD of SPAS

**2.3.2.3 钙离子对 SAPS 构象的影响** SAPS 在 Ca<sup>2+</sup> 水溶液中圆二色谱见图 5,吸收峰明显增强并红移,推断 SAPS 分子间与 Ca<sup>2+</sup> 桥接或络合,发生胶化的过程中,形成“蛋箱”结构,导致分子的不对称性增强<sup>[12]</sup>。通过在多糖溶液中添加金属离子,检测其 CD 谱的变化,可以为多糖的结构提供更多信息。添加 Ca<sup>2+</sup> 使 SAPS 分子与 Ca<sup>2+</sup> 能形成“蛋箱”结构,导致分子的不对称性增强。同时也为进一步临床应用奠定理论基础。



1. CaCl<sub>2</sub>-SAPS; 2. SAPS

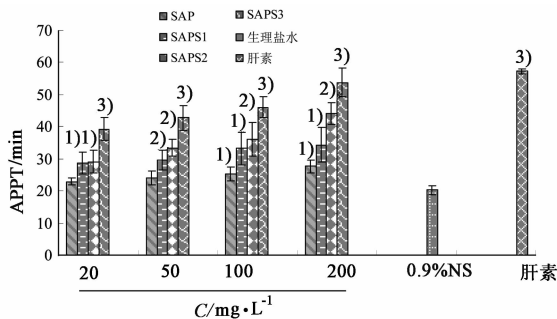
图 5 Ca<sup>2+</sup> 处理的 SAPS 圆二色谱

Fig. 5 Effect Ca<sup>2+</sup> of temperature on CD of SPAS

## 2.4 抗凝血活性的研究<sup>[13]</sup>

**2.4.1 血浆制备** 血浆制备采用心脏穿刺法从大白兔取血,置于含有 1/10 体积 3.8% 枸橼酸钠抗凝液的塑料管中,轻轻颠倒混匀,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集上清液,备用。

**2.4.2 部分活化凝血酶原时间 (APTT) 测定** 待测血浆 0.1 mL 与样品 (SAP, SAPS1, SAPS2, SAPS3) 溶液 (20, 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup>) 0.05 mL 混合均匀,采用 Sysmex CA-1500 全自动血凝分析仪记录时间。以生理盐水 (0.9% NS) 作阴性对照,标准肝素 (2 mg·L<sup>-1</sup>) 作阳性对照,每个样品平行测定 3 次,结果见图 6。



与 0.9% NS 比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01, <sup>3)</sup> P < 0.001 (图 7 同)

图 6 SAP 及不同取代度 SAPS 体外 APTT 活性 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 APTT activities of SAP and SAPS with different DS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**2.4.3 凝血酶原时间 (PT) 测定** 取待测血浆 0.1 mL 与样品 (SAP, SAPS1, SAPS2, SAPS3) 溶液 (20, 50, 100, 200 mg·L<sup>-1</sup>) 各 0.05 mL 混合均匀,采用 Sysmex CA-1500 全自动血凝分析仪记录时间。以生理盐水作阴性对照,标准肝素作阳性对照,每个样品平行测定 3 次,结果见图 7。

经过硫酸化修饰后,SAPS 比 SAP 具有更强的抗凝血活性,SAP 在低浓度时明显抗凝血,在 100, 200 mg·L<sup>-1</sup> 与生理盐水组比较有显著抗凝血活性

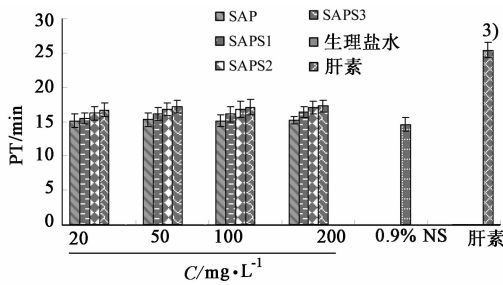


图 7 SAP 及不同取代度 SAPS 体外 PT 活性 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 7 PT activities of SAP and SAPS with different DS ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

( $P < 0.05$ ); 而经过硫酸化修饰的 SAPS1, SAPS2, SAPS3, 表现出相当的量效关系, 随着质量浓度的提高, 其抗凝血活性也呈现增强趋势。并且随着硫酸根取代度的增加, APPT 活性也随之增加明显, 即 SAPS3 > SAPS2 > SAPS1。

SAP 和 SAPS1 对 PT 值均无明显影响, 而 SAPS2 和 SAPS3 随着浓度增加表现出一定的 PT 抗凝血活性。

结合 APTT 和 PT 的结果可以推断, SAPS 的抗凝血作用主要是影响内源性凝血途径, 对外源性凝血途径影响很弱。而 SAP 由于不含硫酸根, 几乎不具有抗凝血活性, 说明 SAPS 其抗凝血机制是通过硫酸根所带的负电荷与抗凝血酶中的正电荷发生中和作用而表现出抗凝血酶的活性。

### 3 讨论

多糖构象受外界因素影响很大, 多糖在体内的构象也是不断变化的, 研究多糖在人体内如何发挥活性的构象变化规律是目前悬而未决的问题, 还有待更多的深入研究探讨。本研究中, 刚果红实验结果表明 SAPS 具有三股螺旋结构, 是潜在的抗肿瘤药物。

通过研究 SAPS 在不同外源性因素下的构象的变化, 为 SAPS 的优势构象和构效关系研究提供理论依据。

将天然多糖进行硫酸酯化修饰是多糖结构修饰的热点, 多糖硫酸化后可以增强原有的生物活性或产生新的功能, 尤其是抗凝血活性。硫酸化多糖抗凝血机制和肝素相似, 近年研究发现, 肝素在某些临床使用中会出现出血、诱导血小板减少血症及血栓形成综合征等副作用。硫酸化多糖虽然活性相对较低, 但使用更安全<sup>[14-15]</sup>。硫酸化多糖与肝素具有相似的硫酸酯结构而普遍具有抗凝血活性, 通过研究 SAPS 抗凝血活性, 归纳出硫酸化多糖的构效关系: 抗凝血活性的高低与多糖的相对分子质量, 硫酸取代度及取代位置有关, 在合适的相对分子质量范围

内, 其抗凝血活性随取代度的增加而增强。

### [参考文献]

[1] 蒋建新, 朱莉伟, 张卫明, 等. 食品级胡芦巴胶及其降血糖功效的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 123-125.

[2] 缪月秋, 吴婷, 张卫明, 等. 胡芦巴多糖酸解和酶解产物对肠道菌群体外生长影响的实验研究[J]. 食品工业技术, 2007, 7(28): 62-64.

[3] 叶文斌, 樊亮, 王都留, 等. 苦豆子多糖与大黄和黄连提取液复合涂膜对鸡蛋常温贮藏的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2014, 49(3): 141-145, 156.

[4] 叶文斌. 胡芦巴胶与中草药绞股蓝可食用复合膜对无花果常温贮藏的影响[J]. 西北农业学报, 2014, 23(8): 160-166.

[5] Flávia C A B, Sidinéa C F, Antônio S E, et al. Effects of tropical fruit pulps and partially hydrolysed galactomannan from *Caesalpinia pulcherrima* seeds on the dietary fibre content, probiotic viability, texture and sensory features of goat dairy beverages [J]. LWT-Food Sci Technol, 2014, 59(1): 196-203.

[6] 张岩, 马丽娜, 王鹏, 等. 苦豆子多糖提取纯化工艺比较[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 85-89.

[7] 赵永安, 郑晓辉, 张岩, 等. 苦豆子多糖硫酸化修饰工艺的研究[J]. 中南药学, 2012, (10)8: 580-583.

[8] 赵永安, 陈冠, 陶遵威. 苦豆子多糖及其衍生物的体外抗氧化活性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 213-216.

[9] 申林卉, 刘丽侠, 陈冠, 等. 苦豆子多糖羧甲基化修饰及其抗氧化活性的研究[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(3): 157-160.

[10] Yang W J, Pei F, Shi Y, et al. Purification, characterization and anti-proliferation activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* [J]. Carbohydr Polym, 2012, 88(2): 474-480.

[11] 简文杰. 魔芋葡甘聚糖螺旋微观构象及性质研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.

[12] 张丽萍, 张翼伸, 孙非, 等. 硫酸化对金顶侧耳多糖构象及生物活性的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 1994, 26(4): 417-421.

[13] Zhang Z S, Zhang Q B, Wang J, et al. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyrha haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities *in vitro* [J]. Carbohydr Polym, 2010, 79(4): 1124-1129.

[14] 高贵珍, 陈雷, 李绪亮. 硫酸化茯苓多糖急性毒性实验研究[J]. 生物学杂志, 2004, 21(1): 36-37.

[15] Li H Y, Mao W J, Qia X H, et al. Structural characterization of an anticoagulant-active sulfated polysaccharide isolated from green alga *Monostroma latissimum* [J]. Carbohydr Polym, 2011, 85(2): 394-400.

[责任编辑 顾雪竹]