

κ-卡拉胶寡糖硫酸基含量与其抗疱疹病毒活性关系研究

栾晖¹ 牟海津¹ 罗兵² 江晓路¹

(1.中国海洋大学 食品科学与工程学院 山东 青岛 266003 ;

2.青岛大学医学院 山东 青岛 266003)

摘要：利用酶解法降解 κ-卡拉胶，得到 κ-卡拉胶寡糖 (KOS)。利用甲酰胺-氯磺酸和二甲基亚砷-甲醇-吡啶方法，分别得到 κ-卡拉胶寡糖磺化衍生物 (SKO) 和 κ-卡拉胶寡糖脱硫酸基衍生物 (DSK)。利用单纯疱疹病毒 HSV-1 研究了 κ-卡拉胶寡糖硫酸基含量与抗病毒活性之间的关系，同时从对病毒的直接作用、阻止病毒对细胞的吸附、影响病毒复制和释放三个途径初步探讨了 κ-卡拉胶寡糖抗疱疹病毒的机理。结果表明，KOS 及 SKO 对 Vero 细胞毒性极低，对单纯疱疹病毒 HSV-1 无直接灭活作用，也不影响病毒的复制和释放，但是能够阻止病毒对细胞的吸附。相同浓度下，SKO 对病毒吸附的抑制率要明显高于 KOS，DSK 对病毒则无明显作用。实验说明 κ-卡拉胶寡糖硫酸基含量与其抗疱疹病毒活性二者呈正相关，而且 κ-卡拉胶寡糖及其磺化衍生物的抗病毒活性主要是通过阻止病毒对细胞的吸附而实现。

关键词：κ-卡拉胶寡糖；酶解；磺化；脱硫酸基；单纯疱疹病毒

中图分类号：R373; R978.7

Study on the relationship between the content of sulfate group and antiherpesviral activities of oligosaccharide from kappa-carrageenan

LUAN Hui¹ MOU Hai-jin¹ LUO Bing² JIANG Xiao-lu¹

(¹ College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Medical College of Qingdao University, 266003)

ABSTRACT κ-Carrageenan oligosaccharide (KOS) was prepared through enzymatic hydrolysis. After chemical modification of the produced oligosaccharide *via* use of formamide-chlorosulfonic acid or DMSO-methanol-pyridine, sulfated derivatives (SKO) and desulfated (DSK) derivatives of κ-carrageenan oligosaccharides were obtained respectively. Herpes simplex virus (HSV-1) was used to study the relationship between the content of sulfate group and antiherpesviral activities of the oligosaccharide and its derivatives. The antiherpesviral mechanism of κ-carrageenan oligosaccharide was also studied, by the ways of directly inactivating virus, inhibiting virus absorption, and influencing virus replication and release. The results showed that KOS and SKO had little cytotoxic effect on Vero cells, and could not directly inactivate HSV-1 or influence its replication and release, but absorption of HSV-1 on the surface of cells was inhibited. SKO had stronger effects on HSV-1 absorption than KOS with the same concentration, while DSK had no effect on HSV-1. So it could be concluded that there was a positive relationship between the content of the sulfate group of κ-carrageenan oligosaccharide and its antiherpesviral activity, which was achieved mainly *via* inhibiting HSV-1 absorption on the host cells.

KEY WORDS κ-Carrageenan oligosaccharide Enzymatic hydrolysis Sulfating Desulfating HSV-1

基金项目：国家自然科学基金项目(40506027, 30771646)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(2005BS02015)共同资助

作者简介：栾 晖(1983-)，女，硕士研究生，研究方向为应用微生物。Tel: 13969781597, Email: xljamy@163.com

通讯作者：牟海津，副教授。Tel: 0532-82032290, Email: mousun@ouc.edu.cn.

卡拉胶(Carrageenan)是一种硫酸半乳聚糖,是存在于某些红藻细胞壁中的多糖成分。近年来的研究发现硫酸多糖往往具有独特的生物活性。卡拉胶作为一种结构独特的硫酸多糖,也被证明在抗肿瘤(Sugawara *et al.* 1982; Hoffman *et al.* 1995)、抗病毒(Witvrouw *et al.* 1994)、抗凝血(Opoku *et al.* 2006)、抗氧化(Yuan *et al.* 2006)等方面具有较理想的生物活性。作为一种高分子量化合物,卡拉胶因其相对分子质量过大而使应用受到限制。卡拉胶经降解后,生物利用度和生物活性能够显著提高。

本实验通过酶法降解及化学修饰制备得到了κ-卡拉胶寡糖(KOS)、κ-卡拉胶寡糖磺化衍生物(SKO)和κ-卡拉胶脱硫酸基衍生物(DSK)三种寡糖,并利用单纯疱疹病毒HSV-1研究了κ-卡拉胶寡糖抗病毒的机理及其抗病毒活性与硫酸基含量之间的关系,以期为卡拉胶寡糖药物的开发提供新的依据和方法。

1 材料与方法

1.1 κ-卡拉胶寡糖的制备

κ-卡拉胶:购自烟台海藻公司(源于菲律宾异枝卡帕藻 *Kappaphycus striarum*),经本实验室二次纯化后得到。

κ-卡拉胶降解菌:MCA-2菌株,由本实验室分离并保存(牟海津等 2002)。

将MCA-2接种到κ-卡拉胶液体培养基中,28-32℃培养48h。将发酵液3000r/min离心10min,取上清液以还原糖法测MCA-2活力。将发酵上清液以10%的比例加入装有浓度为0.5%的κ-卡拉胶溶液的三角瓶中,28-32℃振荡反应24h。将反应液通过旋转蒸发进行减压浓缩后,用乙醇沉淀,收集沉淀,冷冻干燥,得到κ-卡拉胶寡糖酶解组分。将κ-卡拉胶寡糖酶解组分经Bio-Gel P-4凝胶过滤纯化,收集组分,冷冻干燥后得到κ-卡拉胶寡糖(KOS)。

1.2 κ-卡拉胶寡糖磺化衍生物的制备

冰盐浴条件下,向干燥的三口烧瓶中加入10ml甲酰胺,不断搅拌,使用恒压漏斗缓慢加入3ml氯磺酸,当反应形成白色乳状试剂时,将反应体系转移至温水浴中,向三口烧瓶中加入1g κ-卡拉胶寡糖,不断搅拌,逐渐升温至68℃左右,反应时间6-8h。反应结束,待冷却,加入适量去离子水冲洗,加乙醇沉淀,收集沉淀,冷冻干燥,得到κ-卡拉胶寡糖磺化衍生物(SKO)。

1.3 κ-卡拉胶脱硫酸基衍生物的制备

向盛有200ml混合溶液(无水二甲亚砜-甲醇-吡啶,89:10:1 v/v/v)的体系中加入500mg卡拉胶寡糖,通风条件下加热至100℃,反应时间4h。反应结束,待冷却,将混合液置于透析袋(截留分子量10000)中,用蒸馏水透析36h,每8h换一次水。透析结束,将透析液进行减压浓缩,浓缩液用乙醇沉淀后,冷冻干燥,得到κ-卡拉胶脱硫酸基衍生物(DSK)。

1.4 硫酸基含量测定

对实验得到的KOS、SKO和DSK进行硫酸基含量的测定。硫酸基含量测定使用明胶-氯化钡法(Kawai *et al.* 1969)。

1.5 分子量测定

使用GPC法测定卡拉胶寡糖的分子量。凝胶柱为TSK-GEL3000，柱温40℃，以超纯水洗脱，流速0.8ml/min，示差检测器检测。以标准分子量葡聚糖苷为标准，分子量分别是180，360，2000，5000，8000和60000。

1.6 细胞株及病毒

细胞株：非洲绿猴肾细胞Vero细胞株由青岛大学医学院提供，于DMEM基础培养液中加入10%的胎牛血清，100U/ml青霉素，100μg/ml链霉素，置5%CO₂孵箱中37℃培养，2~3d传代1次。

病毒：标准单纯疱疹病毒1型(HSV-1)株由青岛大学医学院提供。在Vero细胞中传代，毒种保存于-80℃。

1.7 病毒的增殖与感染性测定

取细胞密度在80%的Vero细胞，将培养液吸出，加入0.5ml HSV-1病毒，置CO₂培养箱37℃吸附60min；用PBS冲洗单层细胞，加入含0.5%胎牛血清的DMEM培养液，置CO₂培养箱中继续培养。每日在倒置显微镜下观察细胞病变(CPE)。当80%以上细胞发生CPE时，将细胞和培养液一起置于-80℃下冻融3次以裂解细胞，离心收集上清，分装至0.5ml冻存管中，-80℃保存备用。

用Reed-Muench法测定病毒感染性(傅传华等，2001)。将HSV-1培养上清液在灭菌离心管内作10倍系列稀释，各取0.1ml分别接种至形成Vero细胞单层的6孔板中，每个稀释度的病毒液接种5个孔，同时设阴性对照。置37℃培养并逐日观察，以出现细胞病变最高稀释倍数的倒数作为TCID₅₀。

倒置显微镜下观察CPE判断标准：75%以上的细胞发生病变为+++，50%~75%的细胞发生病变为++，25%~50%细胞发生病变为+，25%以下细胞发生病变为+/-，没有细胞病变为-。当病毒对照组细胞病变达+++以上时判断结果。

1.8 细胞毒性实验

96孔板中Vero细胞形成单层后，吸出培养液，用0.1ml PBS洗涤2次，加入用DMEM(血清浓度0.5%)配制的不同稀释度的卡拉胶寡糖(3200μg/ml、1600μg/ml、800μg/ml、400μg/ml、200μg/ml、100μg/ml和50μg/ml)，37℃培养，每一浓度3个复孔，同时以不加卡拉胶寡糖作用的细胞作为对照，每日观察CPE。

1.9 卡拉胶寡糖样品对病毒的作用

卡拉胶寡糖样品对病毒的直接作用：取100TCID₅₀/ml的HSV-1悬液与不同浓度卡拉胶寡糖等体积混合，37℃作用1h。然后将混合液离心去除卡拉胶寡糖，沉淀用PBS洗涤后再离心沉淀病毒颗粒。病毒沉淀以DMEM培养液重悬，接种至已形成单层Vero细胞的96孔板中，置5%CO₂培养箱37℃吸附1h。吸弃病毒悬液，用PBS洗涤细胞3次，然后每孔加0.1ml维持液，置5%CO₂培养箱37℃培养，逐日观察CPE。待观察到病毒对照孔CPE呈+++~++++且细胞对照正常时，以MTT法(李海波等，2001)检测卡拉胶寡糖对病毒的抑制情况。每一卡拉胶寡糖浓度均设3个复孔，同时设立病毒对照和正常细胞对照。

卡拉胶寡糖对病毒吸附细胞的抑制作用：在HSV-1感染Vero细胞的同时加入不同浓度的

卡拉胶寡糖，置37℃ 吸附1h，用PBS洗单层细胞，去除未吸附的病毒和卡拉胶寡糖，加入维持液，37℃ 培养，每日观察CPE。待观察到病毒对照孔CPE呈现+++~++++且细胞对照正常时，用MTT法检测卡拉胶寡糖对病毒的抑制情况。每一卡拉胶寡糖浓度均设3个复孔，同时设立病毒对照和正常细胞对照。

卡拉胶寡糖对病毒复制的抑制作用：以100TCID₅₀/ml的HSV-1悬液感染形成单层的Vero细胞，37℃ 孵育2h后弃病毒悬液，用PBS洗单层细胞，将感染细胞在不同的卡拉胶寡糖浓度下（多糖用含0.5%胎牛血清的细胞维持液稀释）37℃ 培养，逐日观察CPE。待观察到病毒对照孔CPE呈现+++~++++且细胞对照正常时，用MTT法检测卡拉胶寡糖对病毒的抑制情况。每一卡拉胶寡糖浓度均设3个复孔，同时设立病毒对照和正常细胞对照。

病毒抑制率计算公式（于红等，2006）：抑制率=（寡糖平均A值-病毒对照平均A值）/（细胞对照平均A值-病毒对照平均A值）

2 结果

2.1 硫含量测定

对实验制得的KOS、SKO、DSK的硫含量进行了测定。结果如表1所示。

结果表明，本研究采用的磺化和脱硫酸基处理方法能够明显改变卡拉胶低聚糖的硫酸基含量，SKO的硫含量由7.5%增至24.2%；而DSK的硫含量则降低到2.05%。三种寡糖的硫含量有较大区别，有利于后续实验研究。

表1 κ-卡拉胶寡糖及其衍生物的硫含量

Table 1 Sulfur content in κ-carrageenan oligosaccharide and its derivatives

名称 Sample	KOS	SKO	DSK
硫含量（%） Sulfur content (%)	7.5	24.2	2.05

2.2 分子量分布情况

以标准分子量葡聚糖苷为标准，以分子量的对数logMW为横坐标，以保留时间RT为纵坐标做图，得到标准回归方程 $y = -2.529x + 15.416$ ， $R^2 = 0.998$ 。KOS、SKO、DSK分子量分布情况如图1、图2、图3所示，保留时间分别为7.894min、7.207min和8.461min，其MW分别为942、1776和562。

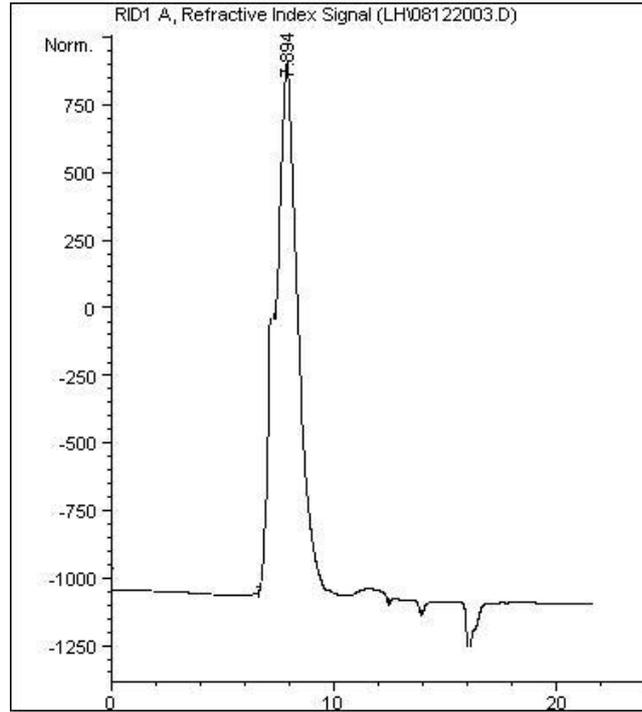


图1 KOS分子量分布情况

Fig. 1 MW distribution of KOS by GPC

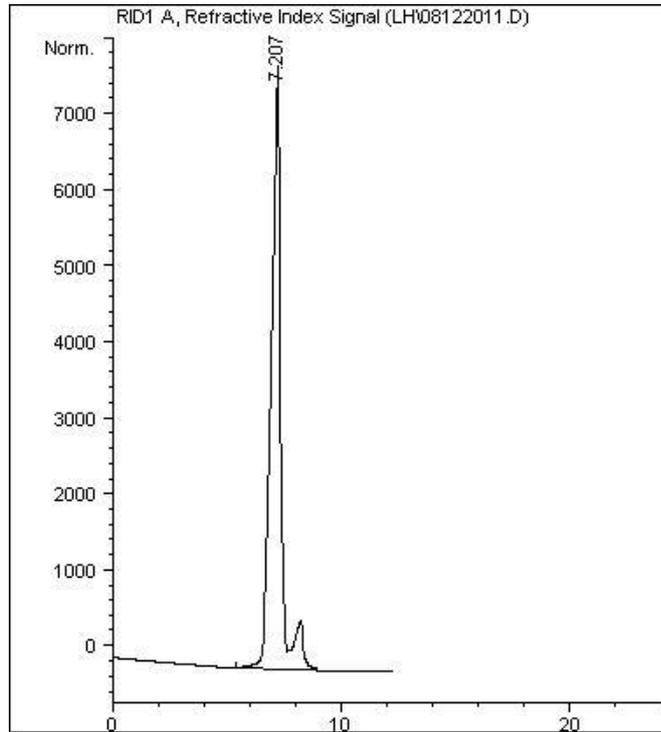


图2 SKO分子量分布情况

Fig. 2 MW distribution of SKO by GPC

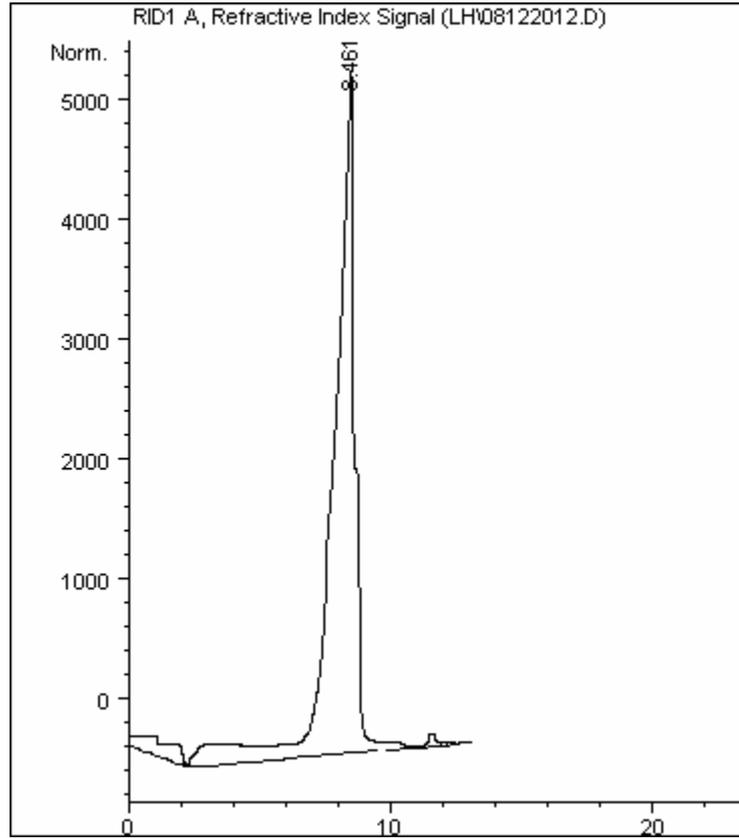


图3 DSK分子量分布情况

Fig. 3 MW distribution of DSK by GPC

2.3 κ-卡拉胶寡糖对细胞的毒性作用

每日观察卡拉胶寡糖对细胞生长的影响。发现培养液中κ-卡拉胶寡糖含量为3200μg/ml时，培养至第3d可观察到Vero细胞绝大多数出现圆缩、脱落；κ-卡拉胶寡糖含量为1600μg/ml时，培养至第3d可观察到约半数的Vero细胞圆缩、脱落。其余各浓度孔均未观察到细胞形态和生长受到影响。由此确定在抗病毒机理实验中采用的卡拉胶寡糖的浓度为200μg/ml、100μg/ml、50μg/ml、25μg/ml、12.5μg/ml、6.25μg/ml和3.12μg/ml共7个浓度。

实验得到Vero中HSV-1 病毒TCID₅₀为 10^{-5.5}。

正常Vero细胞、加入卡拉胶寡糖的Vero细胞及加入病毒的Vero细胞在显微镜下的照片如图4所示。

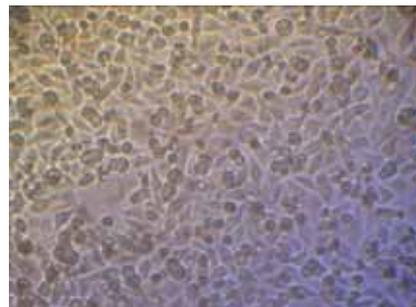


图 4a 正常Vero细胞

Fig. 4a Normal Vero cells

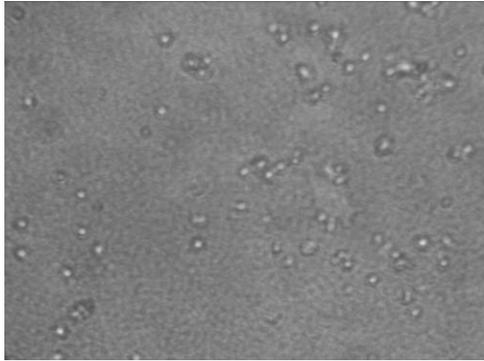


图 4c HSV-1病毒作用3d的Vero细胞

Fig. 4c Vero cells infected by HSV-1 for 3 days

图 4b 1600μg/ml卡拉胶寡糖作用3d的Vero细胞

Fig. 4b Vero cells affected by 1,600 μg/ml κ-carrageenan oligosaccharide for 3 days

2.4 抗病毒机理研究

KOS、SKO、DSK对HSV-1的直接作用结果如图5所示，对HSV-1病毒复制的抑制作用结果如图6所示。结果表明，κ-卡拉胶寡糖及其衍生物对HSV-1均无直接作用，对HSV-1的复制也无明显作用。

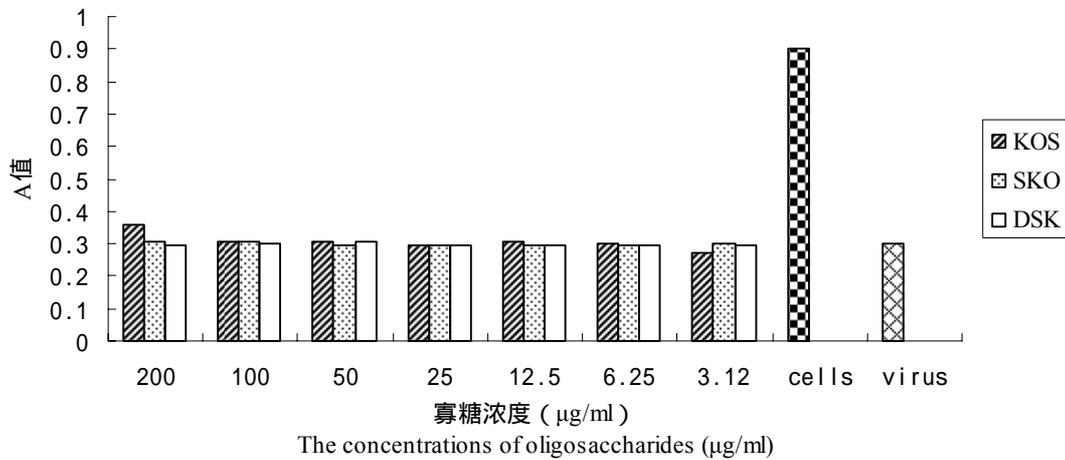


图5 κ-卡拉胶寡糖及其衍生物对HSV-1病毒的直接作用

Fig. 5 Effects of directly inactivating virus by κ-carrageenan oligosaccharide and its derivatives

注：cells：未感染病毒的正常细胞对照组，virus：未添加寡糖的病毒感染对照组，下同。

Note: cells: normal cells not infected by virus; virus: virus-infected cells without addition of oligosaccharide

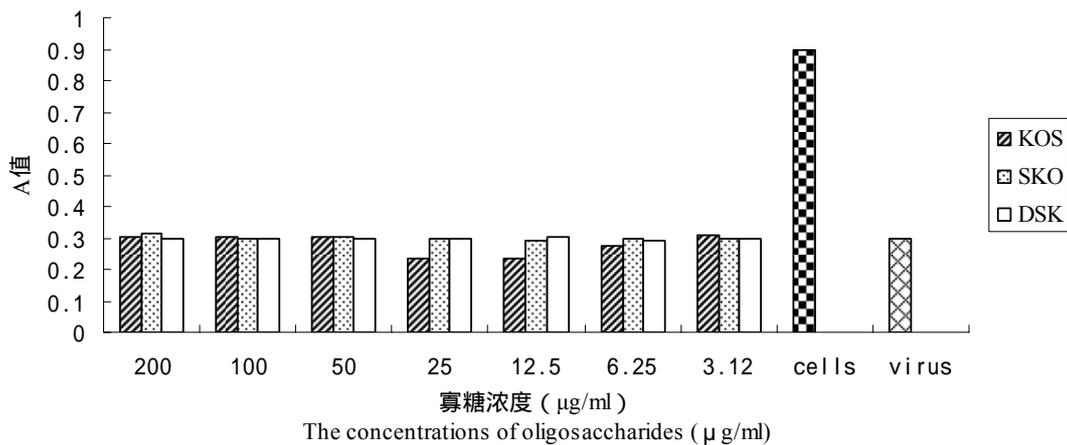


图6 κ-卡拉胶寡糖及其衍生物对HSV-1病毒复制的作用

Fig. 6 Effects of influencing virus replication by κ-carrageenan oligosaccharide and its derivates

KOS、SKO、DSK对HSV-1病毒吸附细胞的抑制作用结果如图7所示。结果表明，各个浓度的KOS、SKO对HSV-1病毒吸附Vero细胞有不同程度的抑制作用。在寡糖浓度为200µg/ml时，KOS的A值为0.53，SKO的A值为0.65，其抑制率分别达到38.3%和58.3%；在寡糖浓度为6.25µg/ml时，SKO的A值为0.48，抑制率仍达到30%，而KOS的A值为0.34，抑制率仅为6.7%。对于KOS和SKO，随着寡糖浓度的增加，对病毒的抑制作用也随之升高，表现出明显的量效关系。比较KOS和SKO对病毒的作用，相同浓度的SKO对病毒的抑制率要明显高于KOS。而DSK对病毒吸附细胞无明显抑制作用。

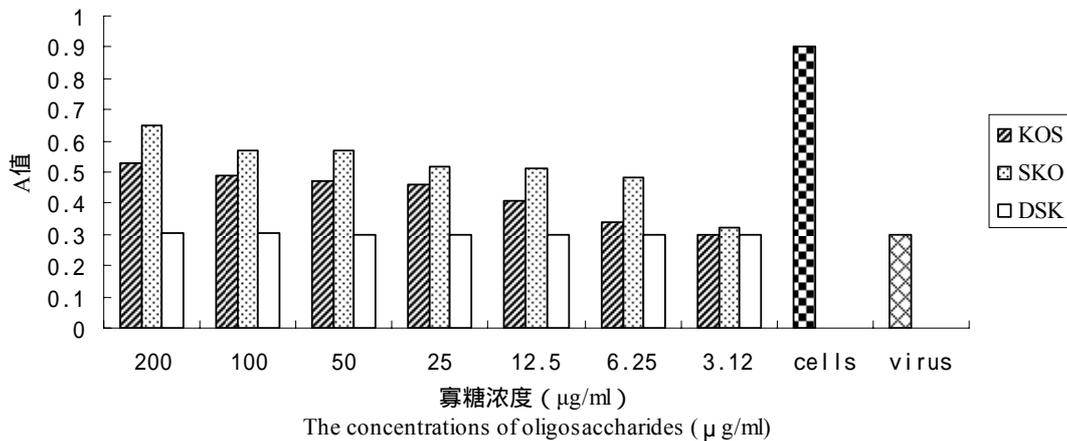


图7 κ-卡拉胶寡糖及其衍生物对HSV-1病毒吸附的抑制作用

Fig. 7 Effects of inhibiting virus absorption by κ-carrageenan oligosaccharide and its derivates

3 讨论

天然卡拉胶多糖因分子量大、粘度高、溶解度低等特点而影响其临床应用价值。若静脉注射未降解的卡拉胶，会与纤维蛋白形成不溶性复合物而难以被机体吸收利用。而经降解

后得到的低分子量卡拉胶经静脉注射后可与血纤维蛋白生成可溶性复合物,则利于机体吸收,同时毒性也大大降低(Anderson *et al.* 1965)。相对于其他降解卡拉胶的方式,酶降解具有专一性、高效性、降解条件和过程易于控制、无副反应等优点。由于特定的降解酶只作用于特定的糖苷键,不但可以得到分子量比较均一的降解产物,并且对糖的主体结构也不会产生影响。除分子量的影响外,卡拉胶寡糖中的硫酸根数目也是影响其生物活性的重要因素。若去掉卡拉胶多糖上的硫酸根,则卡拉胶同时失去抑制 HSV 病毒的作用。有研究发现(Carlucci *et al.* 1997),卡拉胶的抗 HSV 病毒活性与硫酸基团的含量直接相关,只有硫酸基团含量和分子量在合适范围的卡拉胶才能表现出强的抗病毒活性,卡拉胶的抗 HSV 活性会随其 α -D-半乳糖 6-硫酸和 2,6-二硫酸单位环化成 3,6-内醚- α -D-半乳糖和 3,6-内醚--半乳糖 2-硫酸残基而降低。本研究利用酶降解方法制得了 κ -卡拉胶寡糖,进一步通过化学方法得到 κ -卡拉胶寡糖磺化衍生物和 κ -卡拉胶寡糖脱硫酸基衍生物。从对病毒的直接作用、阻止病毒对细胞的吸附、影响病毒复制和释放三个途径进行了抗疱疹病毒实验。比较相同浓度寡糖对病毒吸附的抑制率, κ -卡拉胶寡糖明显低于 κ -卡拉胶寡糖磺化衍生物。

病毒感染细胞包括吸附、侵入、脱壳、生物合成、装配与释放。能够阻断病毒感染细胞的任何一个过程的药物,都可以成为抗病毒药物。目前关于卡拉胶抗病毒的研究较多,但就其抗病毒机理研究的都不是很透彻。例如,卡拉胶所带的负电荷能够结合 HIV-1 病毒带正电荷的特定区域,从而阻止病毒特定区域与细胞的结合;同时卡拉胶有抑制合胞体形成的作用,所以能够避免感染病毒细胞与未感染病毒细胞的结合。因此,卡拉胶才能够阻止艾滋病毒 HIV-1 病毒对细胞的感染(Baba *et al.* 1990; Meshcheryakova *et al.* 1993)。卡拉胶抑制疱疹病毒的作用主要是通过阻止病毒吸附细胞而完成的,亦有研究发现卡拉胶可能能够抑制病毒的复制(Carlucci *et al.* 1997; Duarte *et al.* 2001)。有报道发现,只有将卡拉胶于病毒侵入细胞的同时加入,卡拉胶才能表现对病毒的抑制作用,卡拉胶抑制病毒复制是在病毒已经侵入细胞,但还未开始病毒蛋白复制的时候(Gonzalez *et al.* 1987)。而本研究则表明,卡拉胶寡糖只具备抑制 HSV 病毒对 Vero 细胞吸附的作用,对病毒本身不具有灭活作用,也不能抑制病毒的复制和生物合成。因此,关于卡拉胶寡糖抗病毒的详细机理有待于进一步研究。

硫酸半乳聚糖能够抑制多种被膜病毒,如艾滋病毒、疱疹病毒、囊膜病毒、沙粒病毒、粘液病毒和棒状病毒等(Witvrouw *et al.* 1994)。作为应用比较广泛的一种硫酸半乳聚糖,卡拉胶寡糖在药物开发方面具有良好的发展前景和使用价值。随着海洋药物和海洋保健生物制品的蓬勃发展,卡拉胶工业也将成为海藻工业发展的方向之一。

参考文献

- 于红,张文卿,赵磊,刘冰. 2006. 钝顶螺旋藻多糖抗病毒作用的实验研究[J]. 中国海洋药物杂志, 25(5):19-24.
- 牟海津,江晓路,蒋萱,管华诗. 2002. 卡拉胶降解菌 M-2 的筛选与产酶性质. 中国水产科学, 9(3):251-254.
- 李海波. 2001. MTT比色法测定Vero毒素-1 的CD₅₀ [J]. 中国卫生检验杂志, 11(5):536-537.
- 傅传华. 2001. 病毒学实用实验技术[M]. 济南:山东科学技术出版社, 61-64.
- Anderson W., Duncan J.. 1965. The anticoagulant activity of carrageenan[J]. J. Pharm. Pharmacol., 17(10):647-654.
- Baba M., Schols D., Pauwels R., Nakashima H., and De Clercq E.. 1990. Sulfated polysaccharides as potent inhibitor of HIV-induced syncytium formation: A new strategy towards AIDS chemotherapy[J]. JAIDS, 3:493-499.
- Carlucci M., Pujol C., Ciancia M., Noseda M., Matulewicz M., Damonte E., Cerezo A.. 1997. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. Int J. Biol. Macromol., 20:97-105.

- Duarte M., Nosedá D., Nosedá M., Tulio S., Puñol C., and Damonte E.. 2001. Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga on herpes simplex virus replication in vitro. *Phytomedicine*, 8(1):53–58.
- González M., Alarcón B., and Carrasco L.. 1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan *Antimicrob. Agents Chemother.* 31(9):1388-1393.
- Hoffman R., Burns W.W., and Paper D.H.. 1995. Selective inhibition of cell proliferation and DNA synthesis by the polysulfated carbohydrate iota-carrageenan. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 36(4):325-334.
- Kawai Y.. 1969. Modified methods to determine sulfate in polysaccharide. *Anal. Chem.*, 32:314-321.
- Meshcheryakova D., Andreev S., Tarasova S., Sidorova M., Vafina M., Kornilaeva G., Karamov E., and Khaitov R.. 1993. CD-4 derives peptide and sulfated polysaccharides have similar mechanisms of anti-HIV activity based on electrostatic interactions with positively charged gp120 fragments[J]. *Mol. Immunol.*, 30(11):993-1001.
- Opoku G., Qiu X., and Doctor V.. 2006. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of kappa carrageenan. *Carbohydr. Polym.*, 65:134–138.
- Sugawara I., Ishizaka S., and Möller G.. 1982. Carrageenans, highly sulfated polysaccharides and macrophage-toxic agents: newly found human T lymphocyte mitogens. *Immunobiology*, 163(5):527-538.
- Witvrouw M., Este J.A., Mateu M.Q., Reymen D., Andrei G., Snoeck R., Ikeda S., Pauwels R., Bianchini N. V., Desmyter J., and De Clercq E.. 1994. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.*, 5(5):297-303.
- Yuan H., Song J., Li X., Li N., and Dai J.. 2006. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett.*, 243:228–234.