

研究报告

## 牛肺肝素寡糖的制备

于广利<sup>1\*</sup> 王群<sup>2</sup> 管华诗<sup>1</sup> 徐家敏<sup>1</sup> Robert J. Linhardt<sup>2</sup>

(1 青岛海洋大学海洋药物与食品研究所, 青岛, 266003)

(2 美国爱荷华大学药物与天然产物化学系, 美国, IA 52242)

**摘要** 利用肝素酶 (Heparinase I, EC 4.2.2.7) 对牛肺肝素进行控制酶解, 混合寡糖经超滤、凝胶渗透色谱和高压液相色谱技术分离制备后, 得到聚合度为 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 和 20 的寡糖纯品。各寡糖纯度采用毛细管电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检验, 寡糖结构采用核磁共振氢谱证实。

**关键词** 牛肺; 肝素寡糖; 制备

**中图分类号** R284

**文章编号** 1001-1862(2002)02-231-05

牛肺肝素 (Bovine Lung Heparin, BLH) 和其它动物器官提取的肝素相比, 也是由糖醛酸和葡糖胺以 1→4 糖苷键连接的重复二糖单位组成的, 即由 2-O-硫酸- $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸 (IdoA<sub>2</sub>S) 及 6-O-硫酸-2-N-硫酸- $\alpha$ -D-葡糖胺 (Glc6S<sub>2</sub>N) 组成的三硫酸二糖是其重复单位 (75%~90%), 其它的单糖残基如  $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸, 6-O-硫酸-2-N-乙酰- $\alpha$ -D-葡糖胺,  $\beta$ -D-葡糖醛酸及 3,6-二-O-硫酸-2-N-硫酸- $\alpha$ -D-葡糖胺等以较低频率 (10%~25%) 出现。BLH 酶解后得到的寡糖结构比从猪肠黏膜得到的寡糖结构简单, 高硫酸化寡糖含量较高。随着肝素寡糖构效关系研究的不断深入, 发现了肝素的许多新用途, 不同聚合度 (dp) 肝素寡糖能和不同蛋白因子作用而呈现不同的生物学作用。如抗血管平滑肌细胞 (VSMC) 增生的活性, 抗炎症活性, 抗血管生成活性; 抗肿瘤活性, 抗病毒活性等, 而这些均和特定肝素寡糖片段结构有关<sup>[1-6]</sup>。采用肝素酶 I (Heparinase I, EC 4.2.2.7) 对 BLH 进行控制降解, 通过几种色谱分离技术得到 8 种肝素寡糖纯品并确定了结构。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验材料与设备** 牛肺肝素钠 (日本千叶大学 Toshihiko Toida 教授实验室提供); 肝素酶 (Heparinase I, EC 4.2.2.7, 来源于 *Flavobacterium heparinum*, 美国 IOWA 大学药物与天然产物化学系 Linhardt 教授实验室提供); Bio-Gel P-2, Bio-Gel P-6 柱色谱填料 (BioRad 公司); 低压玻璃柱 (2.5cm×100cm; 2.5cm×80cm, BioRad 公司); 高压液相色谱柱 (美国 Waters 公司); 其它试剂均为分析纯。高压液相色谱仪 (Shimadzu 公司); 电泳仪 (BioRad 公司);

\* 本文于 Robert J. Linhardt 教授实验室完成, 得到 NIH (GM38060) 课题资助  
收稿日期: 2000-12-18; 修订日期: 2001-03-29  
于广利, 男, 1964 年 12 月出生, 副教授。

紫外可见分光光度仪(JASCO公司);核磁共振仪(Varian 500MHz,瓦里安公司)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 强阴离子交换液相色谱分析和分离<sup>[7]</sup> 混合寡糖以及纯度检验在 Spherisorb SAX, 5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm 分析柱上进行,条件为 0~2mol/L NaCl, pH3.5, 120min, 流速 1.0mLmin<sup>-1</sup>;样品的制备在半制备柱 Spherisorb SAX, 5 $\mu$ m, 20 $\times$ 250mm 上进行,条件为 0~2mol/L NaCl, pH3.5, 150min., 流速 4.0mL/min。

1.2.2 寡糖聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析<sup>[8]</sup> 纯化的寡糖样品用超纯水配成 10mg/mL 浓度。分离胶浓度用 22%,浓缩胶的浓度为 5%,电压 200V,电泳时间为 2h,上样量为 3~5 $\mu$ g,染色液为 1%阿利辛蓝。脱色用 1%HAC。梯度电泳采用 12%~22%浓度,温度 5 $^{\circ}$ C,于 400V 电泳 5h,其它步骤同上。

1.2.3 寡糖毛细管电泳分析<sup>[9]</sup> 采用弹性石英毛细管(id 75 $\mu$ m, od 375 $\mu$ m, 780mm),反向电压 18kV,磷酸盐缓冲液(20mmol/L, pH3.5),进样量 5~10ng,分析时间为 25min。

1.2.4 寡糖的核磁共振波谱分析<sup>[10]</sup> 将寡糖样品(0.1~0.5mmol/L)溶于 99.6%D<sub>2</sub>O 1mL 中,0.22 $\mu$ m 膜过滤,冻干,再重复 2 次,然后溶于 99.96% D<sub>2</sub>O 0.7mL 中。实验在 Varian VXR-500 光谱仪上进行,操作温度为 298K,HOD 信号在前 3s 预饱和和进行抑制。

## 2 结果与讨论

2.1 肝素酶解条件的选择 酶解条件是在小规模实验基础上确定的,即在 15mL 聚乙烯试管中加入肝素 100mg,用磷酸盐缓冲液 10mL(50mmol/L, pH7.0,内含 2mg/mL BSA)溶解,然后向此液中加入肝素酶 80mU,于 30 $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温酶解。每间隔一定时间取样分析(取 10 $\mu$ L,加 30mmol/L 盐酸 990 $\mu$ L,混合后于 232nm 测定吸收值),24h 后再补加一定的肝素酶。当吸收度稳定不在上升后,100 $^{\circ}$ C 加热 3min 终止酶解反应。混合液用 PAGE 和 HPLC 分析,进一步确定水解程度。从小试结果看,酶解进行到 63h,吸收度达到 0.3,此时水解度为 30%左右。据梯度 PAGE 分析结果知,水解度为 30%时,可以得到较高含量的高聚寡糖(dp10~14)。如果完全降解,产物 60%~70%为 2 糖,其余为 4 和 6 糖,8 糖含量很少。由于本实验以获得高聚寡糖为目的,所以进行扩大实验时,采用 30%水解度,即在 500mL 灭菌聚乙烯瓶中加入牛肺肝素 3.0g,用上述磷酸盐缓冲液 300mL 溶解,加入 2.4U 肝素酶,24h 后再补加一定量的肝素酶,当吸收度稳定到一定数值后将酶解液升温到 100 $^{\circ}$ C 终止酶解反应。经冷却、旋转蒸发浓缩后,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。实验结果显示,扩大实验结果和小试结果相近,这体现了酶解反应的易控性。

2.2 寡糖的分离纯化和纯度分析 酶解液首先采用超滤方法将其分成两个组分,大于 10kD 的组分含有 BSA 以及高分子量肝素,小于 10kD 的组分含有寡糖,利用低压柱色谱分离,Linhardt 实验室曾经研究了不同填料(Sephadex G-50, Bio-Gel P-30, Bio-Gel P-10, Bio-Gel P-6, Bio-Gel P-4)对肝素寡糖的分离效果,发现 Bio-Gel P-6 和 Bio-Gel P-10 分离效果较好。本文采用 Bio-Gel P-6 填料进行分离(0.2mol/L 氯化钠洗脱,流速 0.3mL/min,232nm 测定吸收值)。根据洗脱体积合并分子量均匀的寡糖。酶解 63h 的 HPLC 分析结果见图 1,其低压柱色谱的分离结果见图 2。从图 1 知, HPLC 可以分离聚合度 2~20 的寡糖,从图 2 可知, Bio-Gel P-6 从 2~12 糖具有较好的分离度,但 14 糖以上分离度较差,必须结合高压液相色谱进行分离。

从图 1、2 知,2 糖的得率较高(60%以上),经 Bio-Gel P-2 二次分离后,可以得到纯度 95% 以上的 2 糖产品。对于 4 糖(含有 1 种高硫酸化和 3 种不同结构的低硫酸化产物)以上的寡糖,由于电荷分布高度不均,相同的糖环含有硫酸基的数量不同,因此需要用制备柱进行多次分离纯化才能得到 95% 以上纯品。从 Bio-Gel P-6 柱分离得到的 4, 6, 8, 10, 12, 14 和 20 寡糖混合物,经半制备柱进行多次分离后,合并相同峰,浓缩后用 Bio-Gel P-2 柱(2.5cm×80cm, 纯水洗脱)脱盐,冻干。最终得到了聚合度为 2(HPLC 图谱略)、4(见图 3)、6(HPLC 图谱略)、8、10、12、14 和 20 的纯品寡糖(见图 4)。

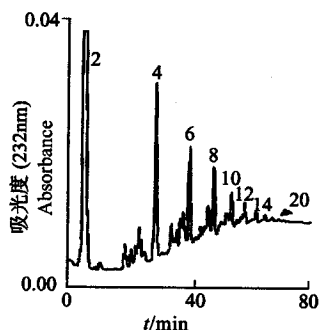


图 1 BLH 寡糖的 HPLC 分析图  
Fig. 1 Separation graph of BLH oligos on HPLC

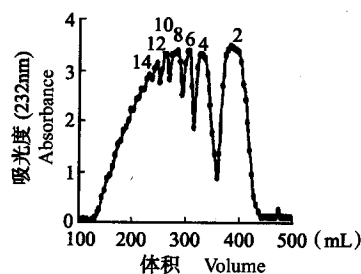


图 2 BLH 寡糖在 Bio-Gel-P6 柱上的分离图

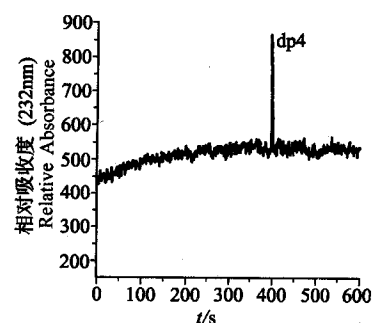


图 3 纯品 4 糖的毛细管电泳图  
Fig. 3 Capillary electrophoresis graph of pure tetrasaccharide

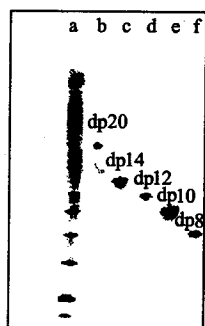


图 4 纯品 8, 10, 12, 14 和 20 糖的梯度电泳图  
Fig. 4 Gradient PAGE graph of pure 8, 10, 12, 14 and 20 oligosaccharide

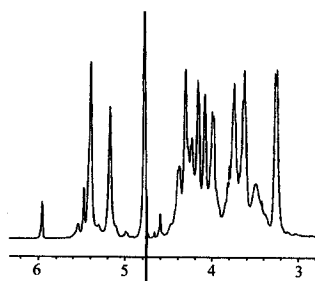


图 5 肝素 20 糖的核磁共振氢谱  
Fig. 5 The  $^1\text{H-NMR}$  spectra of eicosaccharide of BLH

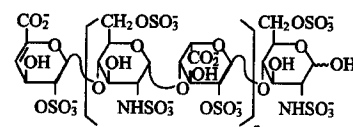


图 6 BLH 寡糖结构  
( $n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9$ )  
Fig. 6 The structure of BLH oligosaccharides

**2.3 BLH 寡糖氢谱分析和结构确定** 经过低压柱色谱和高压液相色谱分离后得到的各种纯品寡糖,经重水交换后,以三甲硅烷基丙酸钠(TSP)为内标,298K 下测定各寡糖的氢谱,聚合度为 2~14 的寡糖氢谱图及其有关数据因篇幅所限从略。20 糖的氢谱如图 5 所示。虽然各寡糖的氢谱化学位移差别不大,但随着糖环数量的增加,氨基葡萄糖和艾杜糖醛酸中异头碳质子信号积分面积逐渐增加,通过氢谱中质子信号积分值可推算寡糖的数目。例如图 5 中异头碳质子(非还原端  $\Delta\text{UAp}2\text{S}$  的 H-4 质子在  $5.96 \times 10^{-6}$  处的积分值和所有糖环 H-1 质子 [ $\Delta\text{UAp}2\text{S}$ ; H-1\*1 ( $5.48 \times 10^{-6}$ ); Glc6SNS, H-1\*10, ( $5.40 \times 10^{-6}$ ); IdoA<sub>p</sub>2S, H-1\*9, ( $5.18 \times 10^{-6}$ )] 的总积分值之比为 1:20,结合其它数据可以确定其聚合度为 20,同样方法可以确定其它寡糖的

聚合度。所得肝素寡糖的结构如图6所示。由于本文采用酶法降解,所有寡糖的非还原端在4,5位碳含有一个不饱和双键的2-O-硫酸- $\alpha$ -L-艾杜糖醛酸( $\Delta$ UA<sub>p</sub>2S),中间重复二糖单位是Glc6SNS和IdoA<sub>p</sub>2S,还原端为Glc6SNS。

### 3 结 论

通过采用肝素酶对从牛肺来源的肝素进行控制酶解,采用低压柱层析和高压液相色谱分离技术得到了各种寡糖,利用HPLC、CE和PAGE等技术对寡糖的纯度进行检验,最终得到了8种高纯度寡糖。这些特定片段的寡糖具有多种用途,如肝素二糖可以作为不同寡糖(软骨素,皮肤素,透明质酸,乙酰肝素等)之间拼接合成的基本合成单位,4糖以上的寡糖可以用于寡糖构效关系研究等<sup>[11]</sup>。研究表明,2糖及4糖没有抗血管平滑肌细胞增生活性,具有和ATⅢ专一性结合的5糖有很低的抗VSMC增生活性,6糖或6糖以上的肝素寡糖具有抗VSMC增生的活性。在大鼠上肝素寡糖(dp8~10)片段能有效地抑制由碱性成纤维细胞介导的血管生成,并且也能抑制由盐水介导的轻度的血管生成,但是该片段对血管内皮生长因子(VEGF)介导的血管生成的抑制效果不明显,而一种5kD的肝素寡糖(dp14~16)片段能系统性地抑制VEGF165介导的血管生成。S<sub>Lex</sub>(唾液酸路易斯X)是一种唾液酸化和岩藻糖化的4糖,存在于多种细胞表达的糖蛋白和糖脂的糖链末端,体外试验表明,肝素酶解产生的4糖混合物是一种比S<sub>Lex</sub>4糖更有效的选择素功能的竞争性抑制剂。在细胞粘附试验中,肝素4糖能抑制中性粒细胞同表达选择素的COS细胞结合,在急性炎症动物模型中,静脉注射肝素4糖降低了中性粒细胞流入小鼠腹腔。肝素与可的松和氢化可的松配伍使用时具有抑制血管生成作用,并且这种混合物在老鼠身上具有抗肿瘤活性<sup>[12-14]</sup>。由于肝素寡糖广泛的生物学活性,使得寻找可行的用于大量制备寡糖的技术,变得越来越重要。本文提供了这种有效方法,通过控制酶解条件,结合使用色谱分离技术,可以得到不同聚合度肝素寡糖并用于肝素寡糖的构效关系研究中。

### 参 考 文 献

- [1] Linhardt R J, Loganathan D Heparin. Heparinoids and heparin oligosaccharides: Structure and Biological Activities. Biomimetic Polymers. [M] Gebellein G. (ed.), Plenum N Y, 1990:135~175
- [2] Yu Guangli, Laurie Lebrun, Nur Sibel Gunay. Heparinase acts on a synthetic heparin-pentasaccharide corresponding to the antithrombin III binding site. [J] Throm Res, 2000, 100(6):549~556.
- [3] Shuvaev V V, Siest G. Heparin specifically inhibits binding of apolipoprotein E to amyloid beta-peptide. [J] Neurosci Lett, 2000, 280(2): 131~134
- [4] Faham S, Hieman R E, Forman J R, et al. Heparin structure and interaction with basic fibroblast growth factor. [J] Science, 1996, 271: 1116~1120
- [5] Ishan Capila, Victoria A Vandernoot. Interaction of heparin with annexin V. [J] FEBS Lett, 1999, 446: 327~330
- [6] Mikhailov D, Yong H C, Linhardt R J. Heparin dodecasaccharide binding to platelet factor-4 induced thrombocytopenia. [J] J Biol Chem, 1999, 274: 25317~25329
- [7] Linhardt R J, Ampofo S A, Fareed J, et al. Isolation and characterization of a human heparin. [J] Biochemistry, 1992, 31:12441~12445
- [8] Edens R E, AL-Hakim A. Gradient polyacrylamide gel electrophoresis for determination of the molecular weight of heparin and low molecular weight heparin derivatives. [J] J Pharm Sci 1992, 81: 823~827
- [9] Koketsu M, Linhardt R J. Electrophoresis for the acidic oligosaccharides. [J] Analy Biochem, 2000, 283: 136

~145

- [10] Horne A, Gettins P.  $^1\text{H-N. m. r}$  spectral assignments for two series heparin-derived oligosaccharides. [J] Carbohydr Res, 1992, 225:43~57
- [11] Linhardt R J, Rice K G, Merchant Z M. Structure and activity of a unique heparin-derived hexasaccharide. [J] J Biol Chem, 1986, 261:14448~14454
- [12] Merchant Z M, Kim Y S, Linhardt R J. Structure of heparin derived tetrasaccharides. [J] Biochem J, 1985, 229:369~337
- [13] Nelson R M, Cecconi O, Roberts W G. Heparin oligosaccharides bind P- and L-selectin and inhibit acute inflammation. [J] Blood, 1993, 82: 3253~3258
- [14] Folkman J, Langer R, Linhardt R J, et al. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. [J] Science, 1983, 221: 719~725

## Preparation of Bovine Lung Heparin Oligosaccharides

Yu Guangli<sup>1</sup> Wang Qun<sup>2</sup> Guan Huashi<sup>1</sup> Xu Jiamin<sup>1</sup> Robert J. Linhardt<sup>2</sup>

(1 *Institute of Marine Foods and Drugs, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China*)

(2 *Division of Medicinal and Natural Products Chemistry, University of Iowa, IA 52242, USA*)

**Abstract** The method of preparing pure disaccharide, tetrasaccharide, hexasaccharide, octasaccharide, decasaccharide, dodecasaccharide, tetradecasaccharide and eicosaccharide of bovine lung heparin by using heparinase I (EC 4. 2. 2. 7) hydrolysis, ultra filtration, gel permeation chromatography and high performance liquid chromatography techniques was reported in this paper. The purity of each oligos was tested by capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis. The structure of different oligos was conformed by  $^1\text{H-NMR}$  technique.

**Key words** bovine lung; heparin oligosaccharide; preparation