

自由基氧化法制备海带岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血活性

赵雪¹, 傅海舰^{1,2}, 薛长湖¹, 苗本春³, 付雪艳¹

(1. 中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 日照公路管理局, 山东 日照 276800; 3. 中国海洋大学 海洋药物与食品研究所, 山东 青岛 266003)

摘要:以海带 (*Laminaria japonica*) 为原料, 采用阴离子交换和自由基氧化降解反应制备了不同分子量和硫酸根含量的岩藻聚糖硫酸酯, 然后以血浆复钙时间 (RT)、活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 为指标, 研究海带岩藻聚糖硫酸酯抗凝血活性的构效关系。结果表明, 采用离子交换, 可从海带糖提取物中分离出低硫大分子组分 F-A 和高硫大分子组分 F-B。粗糖经自由基氧化降解, 可得到分子量为 1.5 kD 和 8.0 kD 左右的低分子组分, 实验重复性好, 产物分子量集中, 其中分子量 8.0 kD 左右的低分子组分硫酸根含量最高。抗凝血实验表明, 岩藻聚糖硫酸酯能显著延长 RT、APTT 和 TT, 尤以高硫组分大分子 F-B 抗凝血效果最好, 而对 PT 影响不大, 说明岩藻聚糖硫酸酯对外源凝血系统影响很小, 它的抗凝血活性主要是通过内源性凝血途径来实现的。岩藻聚糖硫酸酯分子量对抗凝血活性的影响要比硫酸根含量的影响更大, 其抗凝血活性随着分子量的降低而显著降低。对于分子量相近的岩藻聚糖硫酸酯, 硫酸根含量越高, 则抗凝血活性越高。总之, 岩藻聚糖硫酸酯分子量和硫酸根含量越高, 其抗凝活性越高。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 1 017–1 022]

关键词:岩藻聚糖硫酸酯; 自由基氧化降解; 抗凝血活性

中图分类号: Q54

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)06–1017–06

岩藻聚糖硫酸酯 (Fucoidan) 是一种含有硫酸酯的水溶性杂聚糖, 是褐藻特有的一种化学组分。研究发现它在医学方面具有抗凝血、抗肿瘤、抗 HIV、抗血栓、提高免疫力、降血脂等独特功效, 具有陆地植物成分所无法比拟的优势^[1–6], 已成为当今天然海洋药物研究的重点之一。目前已经有大量的研究表明, 褐藻中提取制备的岩藻聚糖硫酸酯有很好的抗凝血和抗血栓活性。褐藻的岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血机理与肝素不同, 前者主要与肝素因子 II (HC II) 结合成复合物, 从而提高 HC II 对相关凝血酶的抑制作用^[8–9], 而肝素有一个专一性强的位点, 与抗凝血酶 III 结合, 生成的复合物对凝血酶有很强的抑制作用; 而且岩藻聚糖硫酸酯还能通过增强纤溶系统中的组织型纤溶酶原溶化剂 (t-PA) 来激活纤溶酶原向纤溶酶转化, 从而具有溶栓的作用^[10–11], 因此具有抗血栓形成和溶解血栓的双重作用, 这种功效是其他抗凝剂所没有的。虽然岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血效果没有肝素显著, 但是由于疯牛病的恐慌和穆斯林宗教信仰, 替代动物源肝素的抗血栓药物

的研究迫在眉睫, 因此岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血活性的研究具有重要意义。

目前对于泡叶藻 (*Ascophyllum nodosum*)、墨角藻 (*Fucus vesiculosus*)、昆布 (*Ecklonia kurome*)、钩鹿角藻 (*Chondrus ocellatus*) 制备的岩藻聚糖硫酸酯的抗凝和抗血栓活性的研究表明, 岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血活性与其结构、硫酸根含量和分子量有关, 但是岩藻聚糖硫酸酯的化学组成和结构随海藻的种类和提取方法的不同而不同^[2, 12–13, 15]。目前关于海带 (*Laminaria japonica*) 岩藻聚糖硫酸酯结构及抗凝活性间关系的研究尚未见报道。

在制备低分子量的岩藻聚糖硫酸酯时, 传统的化学降解方法主要有酸水解和自由基氧化降解两种。本实验组在低分子量的海带岩藻聚糖硫酸酯的制备和结构研究方面已作了大量工作, 发现酸水解制备低聚糖产率比较低, 而且脱硫现象比较严重^[14]。Nardella 和 Chevolot 的研究均发现, 通过自由基降解泡叶藻的岩藻聚糖硫酸酯大分子, 可以得到分子量为 4~6 kD 的高硫高岩藻糖组分; 采用自

收稿日期: 2006–12–25; 修订日期: 2007–05–28.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (2003AA625030).

作者简介: 赵雪 (1976–), 女, 博士, 讲师, 主要从事海洋生物活性物质的研究. Tel: 0532–82031662; E-mail: zhaoxue@ouc.edu.cn

通讯作者: 薛长湖. Tel: 0532–82032468; E-mail: xuech@ouc.edu.cn

由基降解方法得到的低分子量糖的产率高,重复率好,可以减少脱盐等纯化步骤^[13,15]。本研究采用离子交换和自由基氧化降解制备不同分子量和硫酸根含量的岩藻聚糖硫酸酯,以血浆复钙时间(RT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)为凝血指标,研究了海带岩藻聚糖硫酸酯抗凝血活性的构效关系,旨在为开发抗血栓的海带岩藻聚糖硫酸酯奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本 新鲜海带采自山东荣成,冰箱冷冻保藏。新西兰纯种兔(体质量 2.5 kg 左右)由青岛市药物检验检疫所提供。

1.1.2 仪器与试剂 PABER-I 型血小板聚集及血凝测试仪(购自北京电帝公司)。1100 型高效液相色谱仪(购自 Agilent 公司)。硫酸葡聚糖、肝素和 Chelex100 螯合树脂为 Sigma 公司产品。截留分子量 6 kD 和 15 kD 的超滤膜分别购自杭州水处理中心和中国科学院原子核研究所。Q-Sepharose FF 离子交换色谱柱为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。APTT 试剂盒(批号:BT009)、PT 试剂盒(批号:N46)、TT 试剂盒(批号:TT25006)均购于上海太阳生物技术公司。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 岩藻聚糖硫酸酯的提取纯化 按参考文献^[16-17]的方法,将海带热水提取、过滤、分级醇沉,可得到岩藻聚糖硫酸酯粗糖。将粗糖配成 3% 水溶液,加入 Q-Sepharose FF 阴离子交换树脂色谱柱(1.6 mm × 50 cm),分别用 H₂O、1.0 mol/L 和 2.0 mol/L 的 NaCl 溶液进行分步洗脱,用硫酸-苯酚法检测洗脱的糖的含量,直到糖完全洗脱完毕。弃去 H₂O 洗脱部分,合并洗脱液得到低硫组分 F-A 和高硫组分 F-B,透析后冷冻干燥。硫酸根含量的测定采用 BaCl₂-明胶法^[18]。

1.2.2 岩藻聚糖硫酸酯的氧化降解 参考文献^[13]的方法,取 1.0 g 岩藻聚糖硫酸酯粗糖与 0.08 g Cu(AC)₂·H₂O 一起溶于 15 mL 蒸馏水中,用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.5 左右。用蠕动泵以 12 mL/h 的速度加入不同浓度的 H₂O₂ 溶液,用水浴保持反应温度 60 ℃ 恒定,反应中不断加入 NaOH 保持反应液 pH 值为 7.5,5 h 后停止加入 H₂O₂。氧化降解后用 NaOH 调溶液 pH 至中性,加入 Chelex 100 螯合树

脂除去残留的 Cu²⁺。反应液分别用 6 kD 和 15 kD 的超滤膜进行超滤,分别得分子量 6~15 kD 组分 Fb 和分子量小于 6 kD 组分 Fa。小于 6 kD 的组分用截留分子量为 100 kD 的透析袋在水中透析脱盐,然后浓缩冻干。

1.2.3 岩藻聚糖硫酸酯分子量的测定 采用高效体积排阻色谱(HPSEC)的方法测定。高分子组分 F-A 和 F-B 采用 TSK G4000PWXL 色谱柱(日本 TOSOH)分析,分子量低于 15 kD 的低分子量组分采用 TSK G3000PWXL 色谱柱(日本 TOSOH)分析,用 0.5 mol/L NaCl 以流速 0.5 mL/min 洗脱,采用示差检测器检测。色谱柱用标准的硫酸葡聚糖校准。峰值分子量(M_p)和分子量分布系数($I = \overline{M}_w / \overline{M}_n$)使用 Agilent ChemStation 计算。

1.2.4 血浆的制备 按参考文献^[19]的方法,兔用 1% (W/V) 戊巴比妥麻醉(1 mL/kg),颈总动脉取血,置于含有 1/10 体积 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝液的塑料管中,轻轻颠倒混匀,1 500 r/min 离心 15 min,取上层富血小板血浆(PRP);3 000 r/min 离心 15 min,取上层贫血小板血浆(PPP),-20 ℃ 冻存,使用时 37 ℃ 孵育后双层无菌纱布过滤。

1.2.5 RT 的测定 取 PRP 血浆 100 μL,置于 37 ℃ 下预温 5 min,然后加入 37 ℃ 预温的 0.01 mg/mL 样品溶液 80 μL 及 1% CaCl₂ 溶液 20 μL,立即混匀,于血小板聚集及血凝测试仪测定血浆凝固时间。每个样品平行测 3 次,生理盐水作阴性对照,标准肝素作阳性对照。

1.2.6 APTT、PT 和 TT 的测定 取 PPP 血浆,参照试剂盒的说明操作。

1.2.7 抗凝效价的计算 精确称取肝素标准品,配成 0.722 5、0.850 0、1.000 0 U/mL 3 种浓度;估计样品效价,按上述比例配成合适的 3 个浓度,分别测定 RT、APTT、PT、TT,采用六点法计算样品的效价^[18]。

2 结果与分析

2.1 岩藻聚糖硫酸酯各组分化学性质的比较

将岩藻聚糖硫酸酯粗糖加入 Q-Sepharose FF 阴离子交换柱中,通过分级洗脱可以得到两种不同的高分子岩藻聚糖硫酸酯 F-A 和 F-B(表 1)。通过测定发现 F-B 的硫酸根含量最高,达到 33.5%,是 F-A 组分(16.5%)的 2 倍。经阴离子交换色谱柱分级得到的高分子组分 F-A 和 F-B 分子量分布较宽,分布

系数分别为 2.2 和 2.6, 但仍有比较好的峰形。通过计算确定 F-A 的峰值分子量为 742 kD, 大于高硫组分 F-B 的峰值分子量 (175.9 kD)。

表 1 海带岩藻聚糖硫酸酯高分子组分 F-A 和 F-B 的分子量和硫酸根含量

Tab.1 Peak-molecular weights (Mp) and sulfated ester contents of F-A and F-B from *Laminaria japonica*

组分	硫酸根含量 /%	峰值分子量 /kD	分布系数
Fraction	Sulfate ester content	Mp	I
F-A	16.5±0.7	742	2.2
F-B	33.5±0.3	175.9	2.6

实验发现, 采用 H_2O_2 与 Cu^{2+} 作用产生的羟基自由基可以有效地将大分子量的岩藻聚糖硫酸酯降解。图 1 为采用 9% H_2O_2 降解岩藻聚糖硫酸酯粗糖得到的低分子组分 Fb2 和 Fa2, 在高效体积排阻色谱上的洗脱谱图。Fb2 组分的洗脱峰为窄分布的对称峰, 峰值分子量 8.1 kD, 分布系数为 1.8, 比高分子组分 F-A 和 F-B 分子量更为集中; 而 Fa2 组分有 2 个洗脱峰, 说明由两个组分组成, 但是分子量相对比较集中, 分布系数为 1.2, 峰值分子量为 1.7 kD。而采用 4.5% 和 15% 的 H_2O_2 进行氧化降解

岩藻聚糖硫酸酯粗糖, 制备的低分子量组组分的分子量分布与用 9% H_2O_2 降解的产物非常相似, 分子量均为 1.5 kD 和 8.0 kD 左右。说明采用 H_2O_2 - Cu^{2+} 体系降解岩藻聚糖硫酸酯可以得到分子量相近、均匀的低分子量组分。多次重复实验结果表明, 该方法得到的产物分子量和硫酸根含量相似。

表 2 为采用不同浓度的 H_2O_2 氧化降解岩藻聚糖硫酸酯所得到的低分子量组分的理化性质的比较。比较发现, H_2O_2 浓度对自由基降解产物的硫酸根含量有影响。采用 4.5% H_2O_2 制备的 8.7 kD 的组分 Fb1 硫酸根含量最高, 达到 38.5%, 但是产率却较低, 仅有 12%; 而采用 9% H_2O_2 降解得到 8.0 kD 组分 Fb2 的硫酸根含量也很高, 达到 36.5%, 且产率高达 35%, 明显高于 4.5% H_2O_2 制备的低聚糖 (结果未列出)。但是 H_2O_2 浓度由 9% 增加至 15%, 得到的低分子量组分的硫酸根含量大大下降。红外谱图分析表明 Fb1 和 Fb2 中含有大量的双硫取代现象 (结果未列出)。Nardella 等^[13]采用自由基氧化降解泡叶藻硫酸多糖, 也得到的分子量为 7.8 kD 和 8.3 kD 的高硫组分, 结果与本研究相似, 说明采用氧化降解可以得到分子量集中的高硫低分子量组分。

表 2 采用不同浓度过氧化氢的自由基体系降解得到的岩藻聚糖硫酸酯组分的理化性质

Tab.2 Physico-chemical characteristics of fucoidans fractions by free radical oxygen degradation with different hydrogen peroxide content

H_2O_2 浓度	组分	峰值分子量 /kD	硫酸根含量 /%	分布系数
H_2O_2 content	Fraction	M_p	Sulfated ester content	I
4.5%	Fa1	1.5	14.6±0.5	1.1
	Fb1	8.7	38.5±0.3	1.8
9%	Fa2	1.7	26.4±0.5	1.2
	Fb2	8.1	36.5±0.2	1.8
15%	Fa3	1.5	4.5±0.6	1.1
	Fb3	8.0	22.5±0.3	1.8

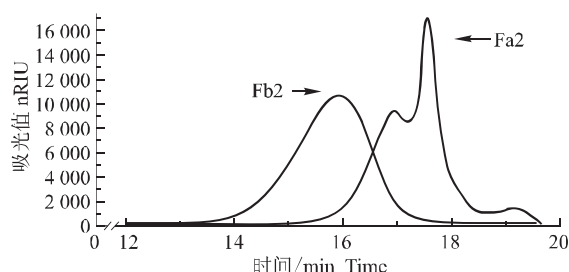


图 1 岩藻聚糖硫酸酯低分子组分 Fb2 和 Fa2 在高效体积排阻色谱上的洗脱谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of low molecular weight fucoidan fractions Fb2 and Fa2

2.2 岩藻聚糖硫酸酯抗凝血活性的比较

表 3 为 F-A、F-B 及其通过自由基降解得到的低分子量组分的理化性质及其抗凝活性的比较。以标准肝素作为抗凝活性的对照, 每个样品的抗凝活性与标准肝素 (150 U/mg) 比较计算出效价 (U/mg)。比较发现, 岩藻聚糖硫酸酯的化学组成对抗凝活性有很大的影响。高分子组分 F-A、F-B 有很好的抗凝活性, 可以显著延长 RT、APTT、和 TT, 但是对 PT 的影响不大。其中尤其以高硫组分 F-B 抗凝活性效果最好, 其分子量为 175.9 kD, RT、APTT、TT 分别达到了肝素的 35.8%、86.64% 和

27.8%，硫酸根含量达到了 33.5%。同样是高分子的 F-A 的硫酸根含量比较低(16.5%)，它的抗凝活性明显低于 F-B。说明硫酸根含量对高分子的岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血活性有一定影响，硫酸根含量越高，其抗凝血活性越高。

高分子的岩藻聚糖硫酸酯经自由基氧化降解以后，得到的分子量为 8.0 kD 左右的组分 Fb1 和 Fb3 仍然有很好的抗凝活性，能够显著延长 RT、APTT 和 TT。尤其是高硫组分 Fb1 对 RT 的效果高于高分子的组分 F-A，达到肝素的 9.7%，但是对 PT 的作用并不明显。Fb1 和 Fb3 分子量非常相近，都在 8.0 kD 左右，但是 Fb1 的硫酸根含量是 Fb3 的 1.6

倍，Fb1 对 RT、APTT 和 TT 的提高活性要高于 Fb3。但是总体来说，组分 Fb1 和 Fb3 的抗凝活性低于高分子的组分，尤其显著低于高硫高分子组分 F-B。比较发现，分子量在 2 kD 左右的组分 Fa1 和 Fa2 的抗凝活性最低，对 RT、APTT、TT、PT 的效价都小于 1。虽然 Fa2 的硫酸根含量达到 26.4%，但是其抗凝血活性显著低于高分子和 8.0 kD 组分。Fa2 的硫酸根含量是 Fa1 的 2 倍，但是 Fa1 的抗凝效果与 Fa2 相似。说明岩藻聚糖硫酸酯的分子量对抗凝血活性影响很大，分子量越高，抗凝血活性越高。而硫酸根含量对低分子量组分的抗凝血活性影响较小。

表 3 不同藻聚糖硫酸酯组分的抗凝血活性的比较

Tab.3 Physico-chemical characteristics and anticoagulant activities of fucoidan fractions from *Laminaria japonica*

组分 Fraction	硫酸根 /% Sulfated ester content	峰值分子量 /kD Peak-molecular weight	凝血指标 Coagulant index			
			RT/(U•mg ⁻¹)	APTT/(U•mg ⁻¹)	PT/(U•mg ⁻¹)	TT/(U•mg ⁻¹)
F-A	16.5±0.7	742	13.23	15.32	1.17	27.25
F-B	33.5±0.3	175.9	52.77	129.96	1.08	41.70
Fb3	22.5±0.3	8.0	11.36	7.61	1.23	6.28
Fb1	38.5±0.3	8.7	14.50	9.65	1.04	8.91
Fa1	14.6±0.5	1.5	0.65	0.69	0.16	0.29
Fa2	26.4±0.5	1.7	0.55	0.57	0.27	0.28
肝素			150	150	150	150

APTT: 活化部分凝血活酶时间;PT: 凝血酶原时间;TT: 凝血酶时间;RT: 血浆复钙时间.
APTT: activated partial thromboplastin tim; RT: recalcification time; PT: prothrombin; TT: timethrombin time.

3 讨论

本实验采用 H₂O₂-Cu²⁺ 产生的羟基自由基氧化降解岩藻聚糖硫酸酯，可以得到分子量为 8.0 kD 左右和 1.5 kD 左右的低分子量组分。实验重复性好，得到的组分分子量分布窄，分子量 8.0 kD 左右的组分的硫酸根含量高。Nardella 等^[13]采用醋酸纤维素膜电泳研究发现，泡叶藻岩藻聚糖硫酸酯在 H₂O₂-Cu²⁺ (9%)产生的自由基氧化降解后，低硫高糖醛酸的片段电泳上消失了，而富含岩藻糖和硫酸根的部分的含量变化很少。因此，可以推断在自由基降解岩藻聚糖硫酸酯过程中，低硫富含糖醛酸的部分很容易被自由基降解，而富含岩藻糖和硫酸根的部分不易被降解，可以得到高硫、高岩藻糖含量的低分子量片段。但是 H₂O₂ 的浓度过高时，自由基氧化降解产物的脱硫现象也比较严重，因此认为采用 H₂O₂-Cu²⁺ (9%) 自由基降解是一种很好的制备高

硫低分子量岩藻聚糖硫酸酯片段的方法。

本研究采用了 RT、APTT、PT 和 TT 这 4 个指标来研究不同分子量和不同硫酸根含量的岩藻聚糖硫酸酯的抗凝活性。研究发现，抗凝效果比较好的有 2 种高分子组分 F-A 和 F-B 及分子量在 8.0 kD 左右的 2 种自由基降解产物，4 种组分都对 RT、APTT 和 TT 有显著的提高，而对 PT 影响不大。RT 和 APTT 是常用的反映内源性凝血因子活性的指标。APTT 还可以作为内源途径凝血因子的定量实验，可检测除Ⅶ以外的其他血浆凝血因子，特别是Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ 和前肽释放酶的测定。RT 和 APTT 的延长说明岩藻聚糖硫酸酯对内源凝血系统有抑制作用，而且岩藻聚糖硫酸酯对 APTT 的影响比 RT 更加显著，高硫高分子 F-B 的 APTT 效价可以达到 129.96 U/mg，为肝素的 86.64%。TT 是测定检测样品对凝血酶活性和血浆纤维蛋白原转变为纤维蛋白能力的过筛试验指标。TT 的延长说明岩

藻聚糖硫酸酯对凝血酶或纤维蛋白的聚合有抑制作用,高硫高分子 F-B 对 TT 的提高最大,效价可以达到 41.7 U/mg。PT 是测定外源凝血系统较理想和常用的实验指标^[19-20]。岩藻聚糖硫酸酯对 PT 的影响并不显著,结果与 Nishino 等^[8]从昆布中提取的岩藻聚糖硫酸酯组分的抗凝活性相一致,说明岩藻聚糖硫酸酯对外源凝血系统影响很小,它的抗凝活性主要是通过内源性凝血途径来实现的。Mauray 等^[9]通过凝血酶生成实验证明,岩藻聚糖硫酸酯的抗凝血活性主要是通过与 HC II 形成复合物,从而增强其抗凝血酶的作用。Nishino 等^[8]研究发现,岩藻聚糖硫酸酯既能与纤维蛋白原结合,又能抑制内源性途径中因子 Xa 和凝血酶原酶的生成从而抑制凝血酶的生成。所以推断岩藻聚糖硫酸酯延长 TT 的可能作用机制是:一方面,岩藻聚糖硫酸酯结合到纤维蛋白原的凝血酶结合位点或其附近的位点上,阻遏凝血酶对纤溶酶原的作用;另一方面,岩藻聚糖硫酸酯能增强抗凝血酶活性,并能抑制凝血酶的生成。

另外,本研究发现,小分子的 Fb1 和 Fb3 对 RT 的作用要强于 APTT。RT 和 APTT 都能反映对内源性凝血系统的影响,所不同的是在 RT 凝血实验中的血浆是富血小板血浆,APTT 实验用的是贫血小板血浆,因此推测低分子量的岩藻聚糖硫酸酯还能与血小板结合,不仅能抑制血小板表面凝血酶的形成,而且还抑制了血小板的聚集与释放^[20]。其具体的机制还有待于进一步的探讨。

本研究选用自由基降解制得的硫酸根含量和分子量不同的岩藻聚糖硫酸酯组分,比较它们的抗凝活性时发现,分子量是影响岩藻聚糖硫酸酯的抗凝活性的重要因素。F-A 和 F-B 的分子量都大于 100 kD,抗凝活性明显高于经过自由基降解得到的 8.0 kD 和 1.5 kD 左右的低分子量组分,说明分子量越高,抗凝效果越好。另外,硫酸根含量对抗凝活性也有影响。相同分子量的岩藻聚糖硫酸酯硫酸根含量越高,抗凝效果越好。比较发现,这种硫酸根含量的不同,尤其对高分子的岩藻聚糖硫酸酯的抗凝活性影响最大,当分子量下降到 1.5 kD,硫酸根含量的影响就非常小了。这一结论在 Haroun-Bouhedja 等^[12]和 Nardella 等^[13]对不同的褐藻岩藻聚糖硫酸酯组分的比较中也得到了证实。说明高分子高硫的岩藻聚糖硫酸酯是开发抗凝血药物的最佳选择。

中国山东省的海带产量最高,从海带或海带综

合利用过程产生的废弃物中分离提取天然的岩藻聚糖硫酸酯,可为开发抗血栓药物提供丰富的资源。虽然岩藻聚糖硫酸酯的活性比肝素要低,但是与动物来源的肝素相比,海带岩藻聚糖硫酸酯具有安全、无污染的优点,可以作为肝素的替代物,因此具有很好的市场潜力。

参考文献:

- [1] 林洪,江洁,薛长湖,等.褐藻岩藻聚糖结构和活性研究进展[J].中国海洋药物,2002,6:42-47.
- [2] Pereira M S, Melo F R, Mourao P A S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? [J]. Glycobio, 2002, 12: 573-580.
- [3] Melo F R, Pereira M S, Foguel D, et al. Antithromb mediated anticoagulant activity of sulfated oligosaccharides[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 20 824-20 835.
- [4] Soeda S, Sakaguchi S, Shimeno H, et al. Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan [J]. Biochem Pharmacol, 1992, 43 (8): 1 853-1 858.
- [5] Doctor V M, Hill C, Jackson G J. Effect of fucoidan during activation of human plasminogen [J]. Thromb Res, 1995, 79 (3): 237-247.
- [6] Koyanagi S, Tanigawa N, Nakagawa H, et al. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65: 173-179.
- [7] Van Osselaer N, Rampart M, Herman A G. Differential inhibition of polymorphonuclear leukocyte recruitment in vivo by dextran sulphate and fucoidan [J]. Mediat Inflamm, 1996, 5: 346-357.
- [8] Nishino T, Fukuda A, Nagumo T, et al. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome* [J]. Thromb Res, 1999, 96 (1): 37-49.
- [9] Mauray S, De Raucourt E, Chaubet F, et al. Comparative anticoagulant activity and influence on thrombin generation of dextran derivatives and of a fucoidan fraction [J]. J Biomater Sci Polym Ed, 1998, 9 (4): 373-387.
- [10] Chabut D, Fischer A M, Collic-Jouault S, et al. Low molecular weight fucoidan and heparin enhance the FGF-2-induced tube formation of endothelial cells through heparan sulfated dependent alpha 6 ver-expression [J]. Mol Pharmacol, 2003, 64: 696-702.
- [11] Nishino T, Yamauchi T, Horie M, et al. Effects of a fucoidan on the activation of plas minogen by u-PA and t-PA [J]. Thromb Res, 2000, 99 (6): 623-634.
- [12] Haroun-Bouhedja F, Ellouali M, Sinquin C, et al. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans [J]. Thromb Res, 2000, 100 (5): 453-459.
- [13] Nardella A, Chaubet F, Vidal C B, et al. Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* [J].

- Carbohydr Res, 1996, 289: 201 – 208.
- [14] Collic S, Fischer A M, Tapon-Berlaudiere J, et al. Anticoagulant properties of a fucoidan Fraction[J]. Thromb Res, 1991, 64 (2): 143 – 154.
- [15] Chevotot L, Foucault A, Chaubet F, et al. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity[J]. Carbohydr Res, 1999, 319: 154 – 165.
- [16] Xue C H, Fang Y, Lin H, et al. Chemical characters and antioxidant properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* [J]. J Appl Phycol, 2000, 13: 1 – 5.
- [17] Nishino T, Yokoyama G, Dobashi K, et al. Isolation, purification of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities [J]. Carbohydr Res, 1989, 186: 119 – 129.
- [18] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术: 第1版 [M]. 浙江: 浙江大学出版社, 1994: 56 – 78.
- [19] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学: 第3版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1 171 – 1 181.
- [20] 姚泰编. 生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 63 – 67.

Anticoagulant activity of fucoidans from *Laminaria japonica* by free radical oxygen degradation

ZHAO Xue¹, FU Hai-jian^{1,2}, XUE Chang-hu¹, MIAO Ben-chun³, FU Xue-yan¹

(1. Ocean University of China Food Chemistry and Technology College, Qingdao 266003, China; 2. China Motorway Industry, Rizhao 276800, China; 3. Institute of Marine Drug & Food of Ocean University of China, Qingdao 26603, China)

Abstract: Fucoidan is a kind of natural active polysaccharides containing sulfate group from brown algae and possesses excellent biological properties, including anticoagulant, anti-thrombosis and anti-tumor, antiviral, and so on. It is a very excellent natural resource for functional food and medicine. In this study, we attempted to determine the relationship between the chemical properties and the anticoagulant activity of fucoidan fractions from *Laminaria japonica*. Fucoidan fractions from *Laminaria japonica* with different molecular weight and sulfated ester content were prepared by ion-exchange chromatography and free radical oxygen degradation and their anticoagulant activities were investigated by classical coagulation assays activated partial thromboplastin time (APTT), recalcification time (RT), prothrombin time (PT) and thrombin time (TT), using heparin as reference compound. By ion-exchange, two different large molecular weight fucoidan fractions, low sulfated F-A and highly sulfated F-B, were obtained from the crude polysaccharides of *Laminaria japonica*. Two fractions with molecular weight of 1.5 kD and 8.0 kD were obtained by free radical oxygen degradation from large molecular weight crude fucoidan. The sulfated ester content of fraction with molecular weight of 8.0 kD was especially higher than that of F-B. This method was used in high yields and good reproducibility. Fucoidan, especially fraction with large molecular weight of 17.5 kD and high sulfated ester content of 33.5%, had significant activity in APTT, TT and RT, but without showing any effect in PT. This result indicates that fucoidan has an inhibition on the intrinsic and/or common system, but no effect on extrinsic part of coagulation system. The composition of fucoidan had influence on anticoagulant activity, especially the molecular weight was found to be a more critical factor than sulfated content. The anticoagulant activity of fucoidan significantly decreased with the decrease of molecular weight. The more highly sulfated fucoidan fractions were found to affect the agulant time to a higher extent when evaluated on a weight basis. In general, the anticoagulant activity of fucoidan clearly increases with the increasing molecular weight and sulfated content. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 1 017 – 1 022]

Key words: fucoidan; anticoagulant activity; free radical oxygen degradation

Corresponding author: XUE Chang-hu. Tel: 0532-82032468; E-mail: xuech@ouc.edu.cn