

多糖抗病毒作用研究进展 · 多糖抗病毒作用

王长云 管华诗

(青岛海洋大学海洋药物与食品研究所 青岛 266003)

摘要 近年来,多糖的抗病毒作用已引起极大关注。本文综述了多糖的抗病毒作用,概述了多糖构效关系、抗病毒机理、分子修饰及其与其他抗病毒药物的协同作用。多糖抗病毒药物研究前景广阔。

关键词 多糖 抗病毒活性 综述

多糖的抗病毒作用已引起医药界的高度重视,尤其是硫酸多糖(sulfated polysaccharides,或称硫酸酯化多糖、硫酸化多糖)的强抗病毒活性,显示了广阔的药用前景。卡拉胶是一种红藻硫酸多糖,其突出的抗病毒活性为多糖药物研究所关注。作者从多糖、硫酸多糖和卡拉胶三个层次,分别阐述其抗病毒作用、抗病毒机理及其构效关系,以期对多糖抗病毒药物研究有所启示。

1 多糖抗病毒活性及构效关系研究

多糖的抗病毒活性早被人们所认识。大量研究表明,许多天然多糖和化学合成的多糖对各种病毒有抑制作用,如艾滋病毒(human immunodeficiency virus, HIV-1),单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV-1, HSV-2),巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV),流感病毒(influenza A virus),囊状胃炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV),劳斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus),鸟肉瘤病毒(avian sarcoma virus),等等^[1-7]。各种天然多糖还有抗逆转录病毒活性^[5,6]。目前,对于多糖及其衍生物的抗病毒活性的研究,主要有硫酸多糖、中性多糖及糖复合物(脂多糖、糖蛋白及糖肽)^[8],而硫酸多糖的研究已成为当今多糖研究中的一个热点^[9]。各种天然及合成硫酸多糖抗病毒作用研究进展较快,如硫酸葡聚糖,硫酸戊聚糖,硫酸香菇多糖,硫酸半乳聚糖,岩藻依聚糖,卡拉胶等。有关硫酸多糖的抗病毒活性在“· 硫酸多糖抗病毒作用”中详述。

多糖(及寡糖)的构效关系研究至今尚不多,且相当不完善,这可能与多糖结构复杂和临床研究太少有关^[10]。目前所知,多糖的活性与其初级和高级结构特别是三维空间构象密切相关,而高级结构对其活性影响更大。有证据表明,多糖的高级结构比

一级结构在活性方面起更大作用。有些多糖一级结构相同,但活性不同,其原因是二级结构及三级结构不同。多糖分子链内外氢键是多糖高级结构的决定因素。一般地,凡具 α -螺旋型立体结构的多糖其活性较高。目前多糖立体结构研究方法一般是依靠2D-NMR及X-衍射^[11]。

多糖活性还和分子量、溶解度、粘度等物理化学性质有关^[10]。如分子量为90,000左右的右旋糖具有一定活性,其活性随着大于或小于此分子量而迅速降低。一般,中等分子量多糖的活性大于高分子量及低分子量的多糖。溶解度对活性的影响有时也很显著,如具 α -(1 \rightarrow 3)-D-葡聚糖的Curdlan,不溶于水,部分羧甲基化后,水溶性提高,同时显著提高了活性^[10]。目前为止,除了对肝素碎片寡糖的构效关系研究得较详细外,其他寡糖的构效关系研究还极少,是一个有待加强的研究领域。当然这需要化学和生物学等的密切配合。

2 多糖分子修饰研究

为提高多糖的活性,多糖分子修饰(结构改造)研究已有很大进展。将多糖或寡糖进行衍生化,如降解、硫酸化、磺酰化、乙酰化、烷基化等,有可能大大提高多糖的生物活性。其他修饰方法,如磷酸酯化、硬脂酰化、棕榈酰化、二乙基氨基乙基化、羧甲基化、羧乙基化、碘化、氨化等,在多糖分子修饰中也有运用。

2.1 降解

2.1.1 化学降解 多糖常因分子量大、粘度高、溶解度低等,影响其临床应用。多糖降解是解决这一问题的有效途径之一。多糖降解多用酸、过碘酸氧化水解等化学方法。有报道化学降解肝素和硫酸氨基多糖两种低分子量化合物的抗HIV-1活性^[29]。

结果显示,这些低分子量化合物具有高抗 HIV-1 活性,是有前途的 HIV-1 感染化疗的候选化合物。从 *Auricularia judace* 得到的多糖,若经控制性过碘酸盐氧化,其产物的活性大大高于母体。

2.1.2 酶降解 由于酸等化学降解的反应程度难以控制,且易发生副反应,随着酶技术发展,用酶降解多糖的研究在近年逐渐受到重视。酶降解具有专一性,降解条件和过程易于控制,无副反应等优点,在多糖降解中运用日益增多。

海藻多糖,如褐藻胶、岩藻依聚糖、卡拉胶和琼胶,具有抗肿瘤、抗病毒、增强免疫等多种生理功能,但因其粘度高和溶解性低,影响了其在医药中的应用^[12]。近些年报道,这些多糖,如褐藻胶可经酶水解而降解,从而降低其粘度。

英国江蓠 *Gracilaria verrucosa* 水溶性多糖级分 GWS 和条斑紫菜 *Porphyra yezoensis* 多糖 PASF (平均分子量为 400 KDa),都具有类于硫酸半乳聚糖(galactan sulfate, GS)的结构,可用 α -琼胶酶(α -agarase, 分离自 *Pseudomonas atlantica*)降解。GWS 用从 *Pseudomonas sp.* O-148 中获得的降解酶水解,其产物 GWS-E,粘度降低,溶解性增加^[12]。该酶水解作用类于 α -琼胶酶的方式,并适于工业制备^[13]。PASF 经 α -琼胶酶(含 α , β 型)降解,起初快速降解阶段是在未取代序列处降解,后来的慢速阶段是在部分取代序列处降解。PASF 经 α -琼胶酶降解后,粘度降低,可溶性增加,并对分子无任何破坏作用,而且显示出比未降解时更高的活性^[14]。

从海洋细菌中提取、分离各种卡拉胶酶已有报道,尤其是从 *Pseudomonas carrageenovora* 中分离的 α -卡拉胶酶^[15]和 β -卡拉胶酶^[16],以及从一种未鉴定的革兰氏阴性菌(一种需氧杆菌)中获得的 α -卡拉胶酶^[17]。也有报道用有黄/棕色素的海洋细菌降解卡拉胶。从 Dsij 和 *P. carrageenovora* 中获得的 α -卡拉胶酶都水解 α -卡拉胶中 α -(1 \rightarrow 4)键。 α -卡拉胶完全酶解产生的各种寡糖比率与酶的细菌来源有关。Dsij 来源的 α -卡拉胶酶,其主要终产物是硫酸 α -新卡拉四糖(α -neocarratetraose sulfate)和硫酸 α -新卡拉六糖(α -neocarrahexaose sulfate)。纯酶再不能水解这两种寡糖。从 *P. carrageenovora* 中获得的 α -卡拉胶酶其产物为较多的硫酸 α -新卡拉二糖(α -neocarrabiose sulfate)^[18]。有报道从红藻 *Delesseria sanguinea* 中分离出可降解各种硫酸半乳聚糖(卡拉胶和琼胶)的菌株(Cytophaga-样细菌),经在 α -卡拉胶培养基中培养,可分离获得 α -卡拉胶酶。该酶分子量为 40 KDa,对 α -卡拉胶最适 pH 值在 Tris 缓冲

液中为 7.2,在 Mops 缓冲液中为 7.0;酶降解 α -卡拉胶至硫酸 α -新卡拉四糖(α -neocarratetraose sulfate)的程度。该酶可用于制备大量卡拉胶寡糖,即硫酸 α -新卡拉四糖(α -neocarratetraose sulfate)和硫酸 α -新卡拉六糖(α -neocarrahexaose sulfate)^[18]。

2.1.3 超声降解 超声辐照(ultrasonic irradiation)也可引起多糖解聚。超声辐照的结果是,无论辐照时间长短,解聚分子量有个低限;而且,解聚物具有相当窄的分子量分布,即使原有多糖具有较宽的分子量分布^[19]。

有报道用超声辐照法部分降解 Schizophyllan (提取自 *Schizophyllum commune*,为水溶性 α -D-葡萄糖聚糖)成低分子多糖“超声降解 Schizophyllan”^[19]。该多糖降解前后具有相似的结构特征,但在分子量和特性粘度等物理性质方面具有显著差异。放射性同位素标记法分析终端基团表明,超声降解主要存在于 Schizophyllan 主链上糖苷键的裂解^[19]。裂褶多糖经控制性超声波处理,部分解聚,使分子量降低,同时粘度下降,但基本重复结构不变,而且保持了原有活性。超声降解在多糖抗病毒研究中值得借鉴。

2.2 硫酸化

鉴于硫酸基在硫酸多糖抗病毒活性的重要作用,多糖分子的硫酸化衍生物的研究尤为重要。近些年,许多研究者半合成了一系列具有体外抗 HIV 活性的硫酸多糖,如 Pentosan polysulfate, Mannan sulfate, Hoe/Bay946, Curdlan sulfate, Curdlan arabinose sulfate, Curdlan galactose sulfate, GE-3-S 等。这些多糖未硫酸化前或者没有抗 HIV 活性,或者活性较低,硫酸化后在分子中引入硫酸基,从而具有或增强了活性。

纤维素和支链纤维素含有 D-吡喃葡萄糖或 D-吡喃半乳糖侧链,经吡啶 N-磺酸或 SO₃-N, N-二甲基甲酰胺复合物硫酸化,获得的高取代度的硫酸多糖显示出高抗 HIV 活性^[20]。香菇多糖(lentinan)是从香菇 *Lentinus edodes* 中得到的一种 α -(1 \rightarrow 3)连接并带有 α -(1 \rightarrow 6)侧链的聚糖,硫酸化后生成香菇多糖硫酸酯(lentinan sulfate),可抑制人 MT-4 细胞由于感染 HTLV-1 (HIV 的早期名称)产生的细胞病变。目前发现的抗 HIV 活性最强的香菇多糖硫酸酯的结构系分子内含有每葡萄糖单位 1.7 个硫酸根^[21]。

硫酸多糖及多糖硫酸化衍生物的抗病毒作用详见“硫酸多糖抗病毒作用”。

2.3 脱硫

脱去硫酸基主要用于构效关系研究,或因分子

中硫酸基过多而显示某些毒性,脱去部分硫酸基,以获得较高活性和较低毒性。

最近,Carlucci 等人(1997)研究了红藻 *Gigartina skottsbergii* 中卡拉胶及其环化(脱硫)衍生物的抗 HSV-1 和 HSV-2 活性。卡拉胶中 -D-半乳糖 6-硫酸和 2,6-二硫酸单位环化成 3,6-脱水- -D-半乳糖和 3,6-脱水- -D-半乳糖 2-硫酸残基,一般地,所得衍生物相对于天然卡拉胶其抗 HSV 活性降低^[22]。在卡拉胶的环化过程中, -D-半乳糖 2,6-二硫酸单位的环化致使⁴C₁ 构型向¹C₄ 构型的转变,释放出 C-6 硫酸基,并使 C-2 硫酸基由平伏位变成竖立位。 / - , μ / - 卡拉胶环化大大降低了抗病毒活性,而 - 卡拉胶环化其活性仍保持^[22]。 / - 和 μ / - 及 - 卡拉胶初始结构的唯一区别在于 -D-半乳糖残基上硫酸基的位置,前者在 C-4 位,后者在 C-2 位。这些结果表明, - 单位 C-2 硫酸基对环化的 - 卡拉胶的抗病毒活性有一定影响。然而, -D-半乳糖残基硫酸基位置对含 -D-半乳糖 2,6-二硫酸单位的非环化卡拉胶的抗病毒活性来说并非是决定因素。

2.4 乙酰化、碘化、磺酰化、烷基化等

多糖中乙酰基对多糖活性也有影响,因为它能改变多糖分子的定向性和横向次序,从而改变多糖的物理性质。一般来说,乙酰基增加,其在水中溶解度增加,而乙酰基的数量及位置对多糖活性影响很大。同样,多糖的磺化或碘化对多糖的活性也有影响。某些分子量较大的酸性多糖,经氧化降解成较低分子量的多糖,然后用氯磺酸酰化得到 O-磺酰衍生物,则其免疫活性也可提高。

多糖的烷基化对其活性也产生影响。Uryu 等人(1992)合成了对 HIV 有抑制活性的中等分子量化合物硫酸烷基寡糖,如硫酸十八烷麦芽醇己糖苷(sulfated octadecyl maltolhexaoside),硫酸十二烷昆布戊糖苷(sulfated dodecyl laminaripentaoside)和硫酸十二烷昆布寡聚物(sulfated dodecyl laminarioligomer),未烷基化的寡糖显示低抗 HIV 活性,烷基化后活性显著提高(半抑制浓度 EC₅₀ 0.4—0.7 μ g/mL,体外, MT-4 细胞株和 HIV-1_{HTLV-B})^[16]。硫酸烷基寡糖抑制 HIV 的机理推测为对 HIV 向细胞结合的抑制,在某种程度上是烷基部分与病毒脂双分子层反应所致。

多糖的分子修饰越来越多地用于构效关系研究中。如 Yoshizawa 等人(1995)通过对 PASF 的进一步硫酸化,脱硫酸化,分级分离和酶降解探讨了其构效关系。而分子修饰仍为多糖抗病毒药物研究的主要途径^[28]。

3 多糖抗病毒药物研究

多糖作为药物始于 1943 年。此后,多糖在药物上应用已越来越多。其中最重要的应用是将多糖作为广谱免疫促进剂。多糖是强抗病毒物质,但其抗病毒效果却难达到。曾一度认为,原因大概有二:其一,多糖是高分子化合物,需通过机体不同的屏障,甚至细胞膜;其二,其抗病毒机理为只阻断病毒吸附,是一种“无益的抗病毒化学疗法”。鉴于此,研究者在寻找低分子寡糖或设法改造分子结构以获得较满意的抗病毒效果方面做了大量工作。

目前,对多糖及其衍生物的抗病毒研究已有了相当的发展,有的多糖制剂已用于临床,为治疗病毒病提供了广阔的前景^[8,30]。随着对多糖结构与功能的不断认识,给艾滋病等疾病的治疗带来了新的希望。九十年代初,国际上已有 4 种以上多糖,如 PSK, Lentinan, Schizophyran 和 Hoe/Bay946 在临床上应用,有的单独应用于癌症或艾滋病的治疗上,更多的则作为佐剂^[11]。

许多研究结果发现,多糖与其他药物具有协同作用。将多糖及其衍生物与现有药物联合作用可能有 3 种益处:(1)防止或推迟抗性株的出现;(2)可能提高抗病毒活性,扩大单个药物的抗病毒范围;(3)减少用药量以减少毒性的可能性^[7,23]。而理想的结合治疗至少应满足以下两个条件:(1)用不同的机制抑制病毒复制,如阻止病毒附着,抑制反转录酶;(2)在较多细胞类型中影响病毒复制,而无毒性。这种结合治疗对于治疗 AIDS 这样的疑难病症提供了一个很好的方法。研究表明,相对无毒的硫酸聚阴离子与具毒性的细胞外抗病毒药物结合使用,可降低后者的用量。

Ueno 等^[24]报道了硫酸葡聚糖(dextran sulfate)和叠氮胸苷 AZT 的协同作用。体外实验已证明,硫酸右旋糖酐与 AZT 有协同抗 HIV-1 作用。如果硫酸右旋糖酐与 AZT 合用治疗,可减少用药量和降低副作用,提高患者的耐受性^[21]。1991 年, Schols 报道了吡啶类似物 AZT, 双脱氧胞苷(Dideoxycytidine, DDC)和硫酸环糊精的协同作用^[25]。有趣的是,香菇多糖本身没有抗 HIV 活性,但与 AZT 合用可显著提高 AZT 体外抗 HIV 活性^[21]。Beutler 等人(1993)报道,岩藻依聚糖(fuciodan)与 AZT 也具有协同作用^[26]。

AIDS 是目前世界范围内最严重的病毒疾病,而临床治疗基本上仍停留在缓和病情上^[23,27]。近来认识到, HIV 对绝大多数药物的耐药性可能是更

大的障碍。而且,免疫发病机理资料显示,尽管病毒从感染的个体排除,病人的免疫系统也不能回复到正常功能^[23]。面对这一障碍,对发病和治疗机理作深入研究十分必要。此外,临床用药中长期预防和紧急治疗引起的耐药病毒株、适宜给药途径、最佳剂量水平等也为抗病毒药物研究所关注。这在多糖抗病毒药物研究中同样重要。

参考文献

- [1] Schols D. , E. De Clercq, J. Balzarini ,et al. ,1990. Antiviral Chem. Chemother. 1 :233 - 240
- [2] Neyts J. ,R. Snoeck ,D. Schols ,et al. ,1992. Virology 189 :48 - 58
- [3] Baba M. ,R. Snoeck ,R. Pauwel ,et al. ,1988. Antimicrob. Agents Chemother. 32 :1742 - 1745
- [4] González M. E. ,B. Alarcon ,and L. Carrasco ,1987. Antimicrobi. Agents Chemother. 31 (9) :1388 - 1393
- [5] Witvrouw M. ,D. Schols ,G. Andrei ,et al. ,1992. Antiviral Chem. Chemother. 3 :351 - 360
- [6] Schols D. ,R. Pauwels J. Desmyter ,et al. ,1990. Virology 175 : 556 - 561
- [7] Witvrouw M. ,Desmyter J. and De Clercq E. ,1995. Antiviral Chem. Chemother. 5 :345
- [8] 周 靛,蒙义文,1997. 应用与环境生物学报,3(1) :82 - 90
- [9] 方积年,1993. 中国药学杂志,28(7) :393 - 396
- [10] 胡文祥,王来曦,恽榴红,1994. 科学(中译本),3:4 - 8
- [11] 方积年,1991. 中国药学杂志,26(9) :533
- [12] Yoshizawa Y. ,J. Tsunehiro, K. Nomura ,et al. ,1996. Biosci. Biotech. Biochem. 60(10) :1667 - 1671
- [13] Nomura K. ,Y. Yoshizawa ,J. Tsunehiro ,et al. ,1994. Nippon Nogeikagaku Kaishi 69 :139
- [14] Yoshizawa Y. ,A. Ametani, J. Tsunehiro ,et al. ,1995. Biosci. Biotech. Biochem. 59(10) :1933 - 1937
- [15] McLean M. W. and F. B. Williamson ,1979. Eur. J. Biochem. 93 :553 - 558
- [16] Uryu T. ,N. Ikushima ,K. Katsuraya ,et al. ,1992. Biochem. Pharmacol. 43(11) :2385 - 2392
- [17] Greer C. W. and W. Yaphe ,1984. Can. J. Microbiol. 30 :1500 - 1506
- [18] Potin P. ,A. Sanseau ,Y. L. Gall ,et al. ,1991. Eur. J. Biochem. 201 :241 - 247
- [19] Tabata K. ,W. Ito ,and T. Kojima ,1981. Carbohydr. Res. 89 : 121 - 135
- [20] Yamamoto I. ,K. Takayama ,K. Honma ,et al. ,1991. Carbohydr. Polymers 14 :53 - 63
- [21] 方唯硕,译(Gao H. ,et al.) ,1993. 国外医药·植物药分册,8 (2) :65 - 69
- [22] Carlucci M. J. ,C. A. Pujol ,M. Cíancia ,et al. ,1997. Int. J. Biol. Macromol. 20 :97 - 105
- [23] Johnston M. I. and D. F. Hoth ,1993. Science 260(28) :1286 - 1292
- [24] Ueno R. ,and S. Kuno ,1987. Lancet 1 :1379
- [25] Schols D. ,E. De Clercq ,M. Witvrouw ,et al. ,1991. Antiviral Chem. Chemother. 2 :45 - 53
- [26] Beutler A. A. ,T. C. McKee ,R. W. Fuller ,et al. ,1993. Antiviral Chem. Chemother. 4(3) :167 - 172
- [27] Baba M. ,D. Schols ,R. Pauwels ,et al. ,1990. J. Acquired Immune Defic. Syndr. 3 :493 - 499
- [28] Witvrouw M. ,D. Schols ,G. Andrei ,et al. ,1991. Antiviral Chem. Chemother. 2 :171 - 179
- [29] Baba M. ,E. De Clercq ,D. Schols ,et al. ,1990. J. Infection Diseases 161 :208 - 213
- [30] Witvrouw M. ,J. A. Este ,M. Q. Mateu ,et al. ,1994. Antiviral Chem. Chemother. 5(5) :297 - 303

Advances of Researches on Antiviral Activities of Polysaccharides

. Antiviral Activities of Polysaccharides

Wang Changyun Guan Huashi

(Marine Drug and Food Institute ,Ocean University of Qingdao ,Qingdao 2669003)

Abstract The close attention has been paid to the antiviral activities of polysaccharides in recent years. This review summarizes the antiviral activities of polysaccharides in the respects of relations between antiviral activities and structures , the mechanisms of antiviral activities , the modification of polysaccharides , and their synergistic effects with other antiviral drugs. The research on antiviral drugs of polysaccharides has boundless prospects in the future.

Key words polysaccharides ,antiviral activities ,review