

海蒿子岩藻聚糖结构特征及其抗流感病毒活性

薛卫, 李玲翠, 祁明星, 吴文惠, 迟连利, 王培培

Structural characteristic of fucoidans from *Sargassum pallidum* and their anti-influenza virus activities

XUE Wei, LI Lingcui, QI Mingxing, WU Wenhui, CHI Lianli, WANG Peipei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20211103619>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

裸藻多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性

Isolation, purification, monosaccharide composition and antioxidant activity analysis of *Euglena gracilis* polysaccharides
上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 564 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200302957>

海马多糖提取工艺优化与抗氧化活性研究

Optimization of extraction of *Hippocampus mohnikei* polysaccharides and study on antioxidant activity
上海海洋大学学报. 2022, 31(5): 1295 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503448>

响应面优化南极磷虾粉肽制备工艺及 α -葡萄糖苷酶抑制活性分析

Optimization of preparation technology of Antarctic krill powder peptide by response surface methodology and analysis of its inhibitory activity on α -glucosidase
上海海洋大学学报. 2022, (2): 564 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210203295>

微藻异养/兼养生产多不饱和脂肪酸以及向卤虫的传递

Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for PUFA production and delivery to *Artemia* sp.
上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1373 <https://doi.org/10.12024/jsou.20210503451>

团头鲂肠道菌株MA35产纤维素酶分离纯化及性质分析

Isolation, purification and characterization of cellulase produced from *Aspergillus niveus* MA35 in the gut of the *Megalobrama amblycephala*
上海海洋大学学报. 2020, 29(2): 313 <https://doi.org/10.12024/jsou.20190302564>

文章编号: 1674-5566(2023)01-0227-07

DOI:10.12024/jsou.20211103619

海蒿子岩藻聚糖结构特征及其抗流感病毒活性

薛 卫¹, 李玲翠¹, 祁明星¹, 吴文惠¹, 迟连利², 王培培^{1,2}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 山东大学 山东省糖化学生物学重点实验室, 山东 青岛 266200)

摘要: 采用热水提取法从海蒿子中提取粗多糖, 再用 Q-Sepharose Fast Flow 和 Sepharose 4B Fast Flow 纯化得到一种硫酸化岩藻聚糖, 命名为 SF0。通过逐步部分酸水解, 该岩藻聚糖 SF0 被进一步分为 3 种次级多糖 SF1、SF2 和 SF3, 硫酸基团的含量和相对分子质量依次降低。通过单糖组成、傅里叶红外光谱 (FT-IR) 和 ¹³C-NMR 谱分析了 4 种多糖的结构特征, 并探究了其抗甲型流感 (H1N1) 病毒的活性。结果表明, SF0 主要由甘露糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖和岩藻糖组成, 摩尔比为 10.8:8.3:3.0:21.1:21.2:35.6, 相对分子质量为 628.1 ku, 由 α -D-1,2-Manp 和 β -D-1,4-GlcAp 双糖重复单元构成核心骨架。抗甲型流感 (H1N1) 病毒检测表明, 4 种多糖都可以抑制 MDCK 细胞中的 H1N1 病毒复制。低分子量组分 SF3 比未降解岩藻聚糖抗病毒活性更好。初步认为该岩藻聚糖的抗 H1N1 病毒活性与其精细结构和分子量有关。

关键词: 岩藻聚糖; 结构; 抗 H1N1 病毒; 海蒿子

中图分类号: R 284; R 285 **文献标志码:** A

海蒿子 (*Sargassum pallidum*) 是一种褐藻, 属于马尾藻属 (*Sargassum*), 广泛分布于中国黄海和东海, 是一种传统海洋中药, 具有化痰止咳、消肿利尿和抗癌等功效^[1]。海蒿子中主要包含多糖、蛋白质、甘露醇、藻胶酸和脂肪酸等成分。最近研究发现岩藻聚糖 (Fucoidan) 具有多种生物活性, 例如抗凝剂和抗血栓形成^[2-4]、抗肿瘤^[5-7]、抗病毒^[8-10]和抗氧化活性^[11-13], 其在海蒿子中也是一类具有高度异质性的天然硫酸化多糖。据报道, 岩藻聚糖的生物活性和其硫酸化程度、分子量、单糖组成和连接方式密切相关^[14]。岩藻聚糖的结构因褐藻种类、采集时间和提取方法不同而呈现差异性。其中, 较经典结构模型主要由岩藻糖 (Fuc) 和硫酸基团组成, 岩藻糖连接方式和硫酸根取代位置及取代度具有多样性。其他岩藻聚糖具有更复杂的结构, 单糖组成通常包括岩藻糖、甘露糖 (Man)、半乳糖 (Gal)、木糖 (Xyl) 和糖

醛酸 (Uronic acid)^[15-16]。它们中的一些具有由 β -D-1,2-Man 和 α -D-1,4-GlcA 二糖单元组成的骨架^[15]。揭示岩藻聚糖的精细结构对于深入研究其构效关系具有重要意义^[17-19]。此前, 我们通过温和酸水解获得系列海蒿子寡糖片段, 结合电喷雾碰撞诱导解离质谱 (ES-CID-MS/MS) 分析了其结构序列, 发现所得寡糖主要由 α -1,3-Fuc、 β -1,4-Xyl 和 β -1,6-Gal 组成, 并具有不同位点的硫酸化取代^[20]。一些研究表明, 硫酸化多糖可以阻断病原体表面受体与宿主细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖 (HSPGs) 结合, 从而干扰病毒的侵入过程, 显示出有多种抗病毒活性^[21-23], 被认为是潜在有效的抗病毒药物的物质基础。然而, 海蒿子岩藻聚糖的精细结构和抗流感病毒活性研究鲜有报道。本文从海蒿子中分离出岩藻聚糖, 通过逐级水解, 获得其核心结构, 对所得分级多糖结构特征及抗 H1N1 病毒活性进行探究。

收稿日期: 2021-11-16 修回日期: 2021-11-21

基金项目: 山东大学山东省糖化与生物学重点实验室开放课题 (2021CCG03); 上海市自然科学基金 (21ZR1427300); 上海市创新行动计划 (19440741200); 国家自然科学基金 (82173731)

作者简介: 薛 卫 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为多糖结构解析与活性评价。E-mail: m190300732@st.shou.edu.cn

通信作者: 王培培, E-mail: ppwang@shou.edu.cn

版权所有 © 《上海海洋大学学报》编辑部 (CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

1 材料与amp;方法

1.1 材料和仪器

海蒿子 (*S. pallidum*) 采集于浙江省洞头 (2020 年 5 月)。单糖标准品 (甘露糖、葡萄糖、半乳糖、木糖、岩藻糖、葡萄糖醛酸)、利巴韦林和 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 购自 Sigma 公司 (中国上海)。葡聚糖标准品 (788、404、112、47.3、11.8 和 5.9 ku) 购自 Shodex 公司 (日本东京)。Q-Sepharose Fast Flow 和 Sepharose 4B Fast Flow 购自 GE Healthcare (瑞典乌普萨拉)。PL aquagel-OH 柱 (8 μm , 300 \times 8 mm) 购自 Perkin Elmer 公司 (美国马萨诸塞州)。ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱 (5 μm , 4.6 \times 150 mm) 购自安捷伦公司 (中国北京)。所有其他试剂均为分析纯。狗肾细胞传代细胞株 (MDCK) 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所; 甲型流感病毒鼠肺适应株 H1N1 (A/PR8/34) 由中国科学院武汉病毒研究所提供。

BSZ-100 自动部分收集器和 HL-2 恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂), Fevik-TS8606 型冷冻干燥器 (德国 Fevik 公司), 日立 20PR-52D 型高速离心机 (日本 Hitachi 公司), 安捷伦 1260 Series 高效液相系统 (美国 Agilent 公司), Novostar 全波长双板多功能仪/酶标仪 (美国 BMG Labtech 公司)。

1.2 岩藻聚糖的提取、纯化和部分酸水解

参考 WANG 等^[19]的方法从海蒿子中提取岩藻聚糖, 并稍做修改。干燥的海蒿子粉碎, 过 100 目筛, 得到海蒿子粉。将 1 kg 海蒿子粉用 20 L 体积分数为 95% 的乙醇溶液在 85 $^{\circ}\text{C}$ 下回流 3 次, 每次 4 h, 以去除脂质并将残留物干燥。残渣用 20 L 80 $^{\circ}\text{C}$ 热水提取 3 次, 每次 3 h。收集所有上清液, 浓缩, 加 CaCl_2 至浓度为 3 mol/L, 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理过夜, 离心。将上清液透析、浓缩和冻干, 得到粗海蒿子岩藻聚糖 1.8 g。粗岩藻聚糖过 Q-Sepharose Fast Flow 离子柱分离, 依次用去离子水和不同浓度 NaCl 溶液 (0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L) 以 3 mL/min 的流速梯度洗脱。硫酸-苯酚法跟踪检测糖含量。收集 1.5 mol/L NaCl 洗脱得到的主要成分, 用 Sepharose 4B Fast Flow 柱进一步纯化得到海蒿子岩藻聚糖 532 mg, 命名为 SF0。

1.3 岩藻聚糖部分酸水解

SF0 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下用 0.1 mol/L TFA 处理 3 h。

用超滤管 ($M_w = 5 \text{ ku}$) 离心超滤除去低分子量的寡糖, 浓缩液中的多糖被命名为 SF1。SF1 用 0.2 mol/L TFA 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下进一步水解 1.5 h, 并用同类型的管子进行超滤, 浓缩液中的多糖被命名为 SF2。最后, SF2 用 0.5 mol/L TFA 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 1 h 并超滤, 浓缩液中的多糖被命名为 SF3。

1.4 化学组分测定

总糖含量通过苯酚-硫酸法测定^[24]。蛋白质含量通过 BCA 法测定^[24]。硫酸根含量通过 Dodgson 和 Price 方法估计^[25]。糖醛酸含量通过吡唑-硫酸法测定^[24]。

1.5 纯度和相对分子质量的测定

用高效凝胶渗透色谱法 (HPGPC) 测定多糖的纯度和相对分子质量 (M_w)。色谱柱选用 PL aquagel-OH 柱, 用 0.2 mol/L Na_2SO_4 等度洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 检测器: Agilent 1260 示差折光检测器。

1.6 单糖组成分析

岩藻聚糖经过三氟乙酸 (TFA) 水解, 用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 衍生^[26]后, 通过高效液相色谱分析。色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱, 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液 (18:82, pH = 6.7), 流速为 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。紫外检测波长为 254 nm。

1.7 红外光谱分析

取多糖样品 1 ~ 3 mg, 溴化钾压片后, 用 Nicolet Nexus 470 Thermo 仪器进行红外光谱分析。

1.8 ^{13}C NMR 核磁分析

取多糖样品约 20 mg 溶解在 D_2O 中, 用 JNM-ECP 600 光谱仪测定 ^{13}C NMR 图谱, 测定温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 丙酮- d_6 用作内标^[27]。

1.9 抗甲型流感病毒活性测定

通过细胞病变效应试验评估了岩藻聚糖对甲型流感病毒 (H1N1) 的抗病毒活性^[21]。待 96 孔板中的 MDCK 细胞长成单层后, 与流感病毒 H1N1 (A/PR8/34) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。去除病毒稀释液后, 将细胞培养在含有不同浓度岩藻聚糖的感染培养基 (RPMI-1640, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰蛋白酶) 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 48 h 后, 将细胞用 100 μL 4% 甲醛在室温下固定 20 min。去除甲醛后, 细胞用 0.1% 结晶紫染色 30 min。洗涤板干燥, 并在 570 nm 处测量每个孔的结晶紫染色强度。50% 抑制

浓度(IC_{50})表示将流感病毒产量抑制为 50% 时所需的测试样品浓度。利巴韦林作为阳性对照进行平行评估。抗病毒抑制率 R 的计算公式:

$$R = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{virus}}}{A_{\text{blank}} - A_{\text{virus}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: R 为抗病毒抑制率,%; A_{sample} 为感染 H1N1 病毒的细胞,用多糖或利巴韦林处理; A_{blank} 为正常细胞,未添加 H1N1 稀释液以及多糖或利巴韦林; A_{virus} 为感染 H1N1 病毒的细胞,未用多糖或利巴韦林处理。

2 结果与讨论

2.1 海蒿子多糖的分离、水解和化学组成

根据图 1 所示的提取方法,将干燥的海蒿子

粉用乙醇脱脂,然后用热水提取。通过 $CaCl_2$ 沉淀去除褐藻胶后,得到粗岩藻聚糖。为了进一步表征它们的精细结构,通过阴离子交换色谱和凝胶色谱获得均一多糖 SF0(图 2),相对分子质量为 628.1 ku。SF0 的化学成分如表 1 所示,其硫酸基团含量和糖醛酸含量分别为 15.8% 和 10.5%。单糖组成分析表明,SF0 是一种复杂的岩藻聚糖,主要由 Man、GlcA、Glc、Gal、Xyl 和 Fuc 组成,摩尔占比分别为 10.8%、8.3%、3.0%、21.1%、21.2% 和 35.6%。这些结果表明,这种来自海蒿子的天然岩藻聚糖不是典型的主要由岩藻糖和硫酸根基团组成的岩藻聚糖,结构更加复杂。

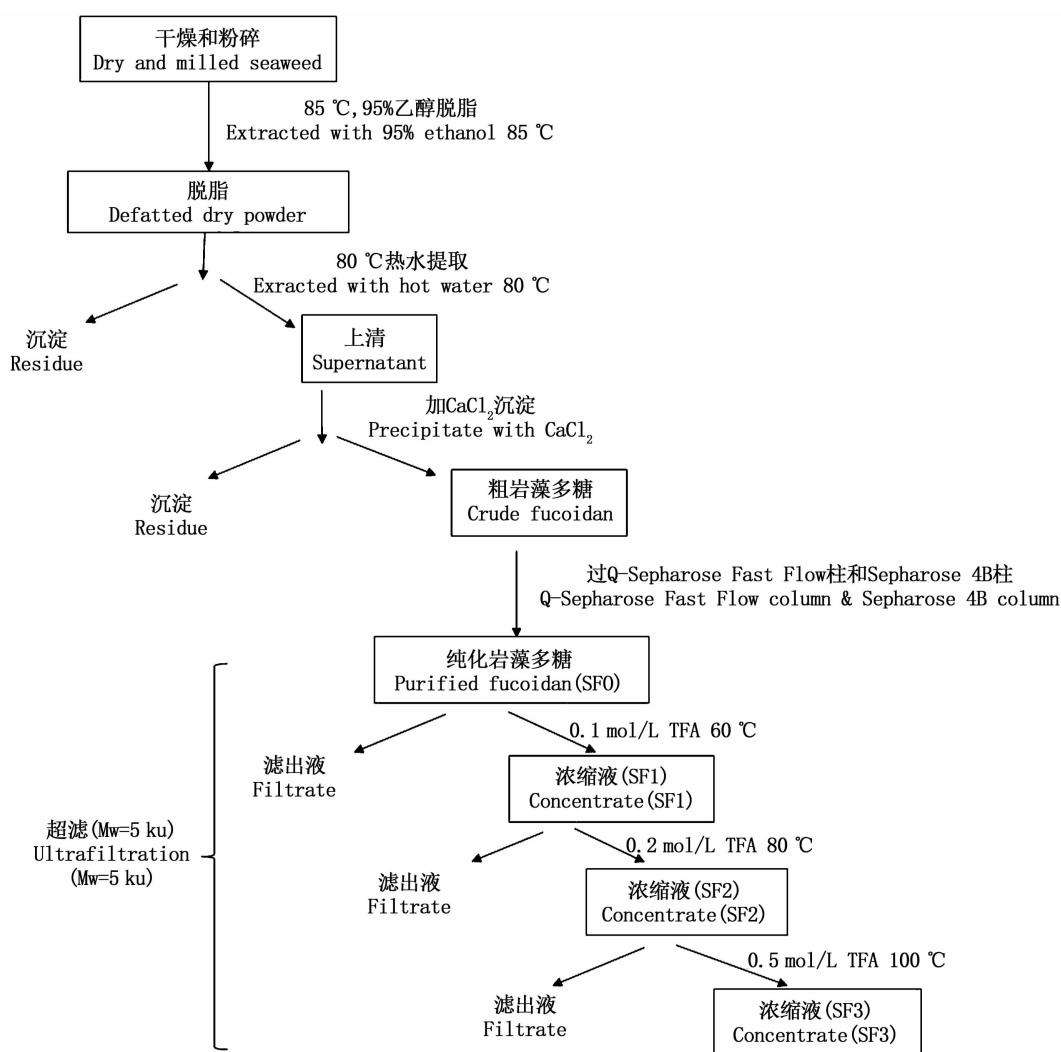


图 1 海蒿子中岩藻聚糖的提取分离方案

Fig. 1 Extraction and isolation scheme of fucoidans from *S. pallidum*

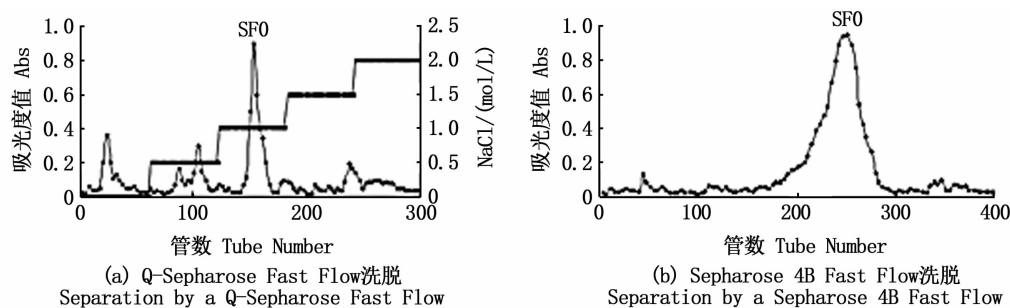


图2 SF0 分离纯化图
Fig.2 Purification of SF0

为此,采用图1所示的逐步部分酸水解法对其结构进行深入分析。检测了不同TFA浓度水解所得多糖的化学组成(表1)。通过比较发现,SF0到SF3分子量从628.1 ku降低到10.7 ku。单糖分析结果表明,从SF0到SF3,Fuc、Xyl、Glc和Gal的含量显著降低。相反,Man和GlcA的百分比从10.7%和8.3%显著增加到50.1%和44.9%。第3次水解后,SF3主要由Man和GlcA

组成,比例约为1:1。此外,随着TFA浓度的增加,硫酸根基团含量随之降低,总糖醛酸含量增加。这些结果表明SF0的核心由Man和GlcA组成,这与我们之前的研究一致,即通过ES-CID-MS/MS确定这些TFA部分水解后的低聚糖主要由Fuc、Xyl、Gal和硫酸根组成^[20]。这些结果表明Fuc、Xyl、Gal主要存在于SF0结构的分支中,并且对TFA敏感而被降解。

表1 海蒿子岩藻聚糖的化学组成
Tab.1 Chemical composition of fucoidans from *S. pallidum*

样品 Sample	总糖 Total sugar/%	蛋白 Protein/%	硫酸根 Sulfate/ %	糖醛酸 Uronic acid/%	相对分子 质量 Mw/ku	单糖组成 Ratio and composition of monosaccharides /%					
						Man	GlcA	Glc	Gal	Xyl	Fuc
SF0	70.5	3.2	15.8	10.5	628.1	10.7	8.4	3.0	21.1	21.2	35.6
SF1	70.0	2.5	12.9	14.6	441.2	16.0	12.7	4.1	28.3	18.4	20.5
SF2	68.1	-	10.5	21.4	51.3	44.3	33.9	1.1	19.8	0.9	-
SF3	61.4	-	9.9	28.7	10.7	50.1	44.9	-	5.0	-	-

2.2 红外光谱

这4种岩藻聚糖的FT-IR光谱如图3所示。3453.6 cm^{-1} 、2953.9 cm^{-1} 和1036.4 cm^{-1} 处的典型多糖特征峰对应于羟基的O-H、吡喃糖的C-H和糖苷的C-O-C。1258.0 cm^{-1} 、813.6 cm^{-1} 处的强吸收带对应硫酸盐的O=S=O和C-O-S的弯曲振动峰,这证实多糖中存在硫酸根基团^[28]。1258.0 cm^{-1} 处吸收带的强度变化,反映了这4种岩藻聚糖中硫酸盐的相对含量变化趋势。

2.3 NMR 光谱

为了进一步阐明SF0的精细结构,图4给出了这4种岩藻聚糖的¹³C-NMR谱。在SF0的异头碳区域,信号峰重叠严重难以识别。在 δ 174.2和 δ 15.6处的2个明显信号可以分别归属于葡萄糖醛酸的-COOH和岩藻糖的-CH₃。经过部分酸水解后得到SF3的¹³C-NMR谱,信号减少,图谱相对比较清晰。比较SF0和SF3的¹³C-NMR

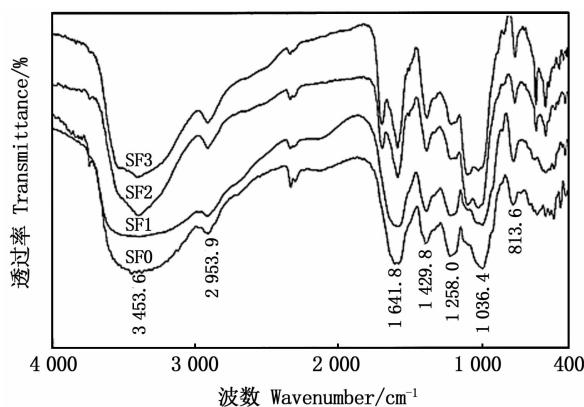


图3 海蒿子岩藻聚糖的FT-IR谱
Fig.3 FT-IR spectra of
fucoidans from *S. pallidum*

光谱发现,SF3的¹³C-NMR光谱 δ 15.6处没有峰,说明SF3中不存在岩藻糖。根据之前的文献, δ 103.8和 δ 102.1的信号属于 β -1,3,4-GlcA和

β -1,4-GlcA^[17-20, 29]。而 δ 100.8 和 δ 99.2 的峰分别归属于 α -1,2,3-Man 和 α -1,2-Man。

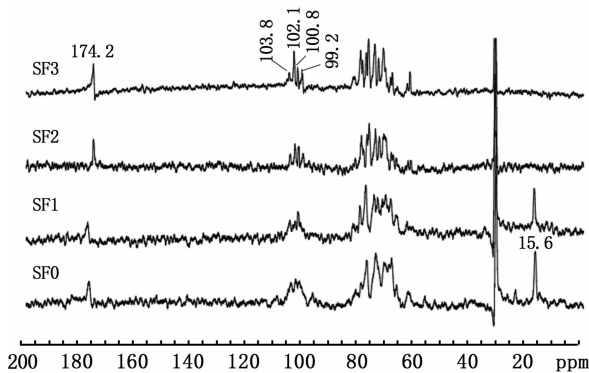


图4 海蒿子岩藻聚糖的¹³C-NMR谱
Fig. 4 ¹³C-NMR spectra of fucoidans from *S. pallidum*

结合化学成分数据结果表明,来自海蒿子的岩藻聚糖具有由重复的 α -1,2-Manp 和 β -1,4-GlcAp 组成的核心结构,分支位于 Man 的 C3 和 GlcA 的 C3 处。褐藻中羊栖菜和海蕴中之前也发现了这种岩藻聚糖结构^[17-18]。有趣的是,来自岩藻聚糖的-[GlcA-Man]-重复二糖的骨架结构与透明质酸-[GlcA-GlcNAc]-重复二糖的骨架结构相似。

2.4 抗甲型流感病毒活性

研究^[30-31]表明,不同来源的岩藻聚糖在体内和体外均具有广泛的抗病毒活性,且细胞毒性较低。岩藻聚糖的抗病毒活性机制是抑制病毒吸附以抑制病毒诱导的合胞体形成或直接抑制病毒复制并刺激先天性和适应性免疫防御。

众所周知,病毒进入细胞是病毒感染扩展的关键阶段。大多数包膜病毒只有在病毒包膜蛋白与细胞表面的主要受体发生非特异性相互作用后才能进入细胞。硫酸乙酰肝素是细胞膜上的一种高度硫酸化多糖,参与许多病毒(单纯疱疹病毒、丙型肝炎病毒、人巨细胞病毒、人乳头瘤病毒、HIV-1、鼠白血病病毒)的初级细胞结合^[32]。岩藻聚糖具有硫酸基团和糖醛酸基团,具有类似于硫酸乙酰肝素的电荷。这些强负电荷官能团可以与病毒表面蛋白结合,干扰病毒包膜蛋白与细胞表面主要受体的相互作用,从而阻断其吸附。此外,相对分子质量对多糖生理活性同样有很大影响,分子量过大影响多糖跨膜运输效率,过小难以形成活性结构^[33]。也有研究发现当

葡萄糖醛酸羧基被还原时,来自奥氏海藻的硫酸化岩藻聚糖的抗病毒活性消失^[34]。综上所述,岩藻聚糖的硫酸基团、相对分子量、糖醛酸含量等都会影响其抗病毒活性。

4种海蒿子来源的岩藻聚糖的抗 H1N1 病毒活性见表2,比较它们的抗病毒活性发现,在 250 μ g/mL 的浓度下,随着平均分子量的减小,岩藻聚糖的抗病毒活性增强。其中,平均分子量为 10.7 ku 的 SF3 在 250 μ g/mL 的浓度下抑制效果最好,IC₅₀为 266.2 μ g/mL。尽管其活性低于利巴韦林,但由于其低细胞毒性,这种岩藻聚糖仍具有潜在的抗病毒价值。结果表明,平均分子量对海蒿子岩藻聚糖的抗 H1N1 病毒活性有很大影响,因此多糖降解对其抗病毒活性具有重要的意义。

表2 海蒿子岩藻聚糖的抗 H1N1 病毒活性
Tab. 2 Anti-H1N1 virus activity of fucoidans from *S. pallidum*

样品 Sample	浓度 Concentration/ (μ g/mL)	抑制率 Inhibition rate/%	50% 抑制浓度 IC ₅₀ / (μ g/mL)
SF0	250	17.3 \pm 0.16	529.4
SF1	250	22.6 \pm 0.13	445.4
SF2	250	33.5 \pm 0.21	311.0
SF3	250	42.3 \pm 0.11	266.2
利巴韦林	250	85.0 \pm 0.08	24.6

3 结论

本研究中,我们从海蒿子中分离出一种分子量为 628.1 ku 的硫酸化岩藻聚糖,命名为 SF0,并通过单糖分析、部分酸水解、FT-IR 和 NMR 对其结构特征进行表征。SF0 具有由 α -D-1,2-Manp 和 β -D-1,4-GlcAp 双糖重复单元组成的骨架,在 Man 的 C3 和 GlcA 的 C3 处有分支。为了评估其抗甲型流感(H1N1)病毒活性,该岩藻聚糖通过逐步部分酸水解进一步分为 3 个组分 SF1、SF2 和 SF3。结果显示,所有这些多糖都抑制了 MDCK 细胞中的 H1N1 病毒复制。其中,低分子量级的 SF3 比原始岩藻聚糖具有更好的活性。这初步表明岩藻聚糖的抗 H1N1 病毒活性与其精细结构和分子量有关。

参考文献:

- [1] 孔丽,朱月霞,周冰雪,等. 海蒿子多糖提取、纯化及其药理活性研究进展[J]. 大连海洋大学学报,2022,37

- (5):894-902.
- KONG L, ZHU Y X, ZHOU B X, et al. Extraction, purification and pharmacological activity of Polysaccharides from *Sargassum pallidum* [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2022, 37(5):894-902.
- [2] CHEVOLOT L, FOUCAULT A, CHAUBET F, et al. Further data on the structure of brown seaweed fucans; relationships with anticoagulant activity [J]. Carbohydrate Research, 1999, 319(1/4): 154-165.
- [3] MOURAO P A S. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: Future perspectives [J]. Current Pharmaceutical Design, 2004, 10(9): 967-981.
- [4] KIM E S, LEE J S, LEE H G. Improvement of antithrombotic activity of red ginseng extract by nanoencapsulation using chitosan and antithrombotic cross-linkers: polyglutamic acid and fucoidan [J]. Journal of Ginseng Research, 2021, 45(2): 236-245.
- [5] SENTHILKUMAR K, MANIVASAGAN P, VENKATESAN J, et al. Brown seaweed fucoidan: Biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 366-374.
- [6] MENSHOVA R V, ANASTYUK S D, ERMAKOVA S P, et al. Structure and anticancer activity *in vitro* of sulfated galactofucan from brown alga *Alaria angusta* [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 132: 118-125.
- [7] HSU W J, LIN M H, KUO T C, et al. Fucoidan from *Laminaria japonica* exerts antitumor effects on angiogenesis and micrometastasis in triple-negative breast cancer cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 600-608.
- [8] LEE J B, TAKESHITA A, HAYASHI K, et al. Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum* [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 86(2): 995-999.
- [9] WOZNIAK M, BELL T, DÉNES Á, et al. Anti-HSV1 activity of brown algal polysaccharides and possible relevance to the treatment of Alzheimer's disease [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 74: 530-540.
- [10] ALBOOFETILEH M, REZAEI M, TABARSA M, et al. Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddiniana zanardinii* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 124: 131-137.
- [11] KIM E A, LEE S H, KO C I, et al. Protective effect of fucoidan against AAPH-induced oxidative stress in zebrafish model [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102: 185-191.
- [12] KOH H S A, LU J, ZHOU W B. Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 212: 178-185.
- [13] LIU J, WU S Y, CHEN L, et al. Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 155: 1385-1392.
- [14] ZVYAGINTSEVA T N, USOLTSEVA R V, SHEVCHENKO N M, et al. Structural diversity of fucoidans and their radioprotective effect [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 273: 118551.
- [15] LI B, LU F, WEI X J, et al. Fucoidan: Structure and bioactivity [J]. Molecules, 2008, 13(8): 1671-1695.
- [16] ZHANG Z Q, TILL S, JIANG C, et al. Structure-activity relationship of the pro- and anticoagulant effects of *Fucus vesiculosus* fucoidan [J]. Thrombosis and Haemostasis, 2014, 111(3): 429-437.
- [17] LI B, WEI X J, SUN J L, et al. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme* [J]. Carbohydrate Research, 2006, 341(9): 1135-1146.
- [18] WANG P P, ZHAO X L, LV Y J, et al. Analysis of structural heterogeneity of fucoidan from *Hizikia fusiforme* by ES-CID-MS/MS [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(1): 602-607.
- [19] WANG W C, CHEN H J, ZHANG L, et al. A fucoidan from *Nemacystus decipiens* disrupts angiogenesis through targeting bone morphogenetic protein 4 [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 144: 305-314.
- [20] 王培培, 吕友晶, 曹欢, 等. 杂合褐藻糖胶寡糖的制备及结构分析 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(8): 1722-1726.
- WANG P P, LYU Y J, CAO H, et al. Preparation of hybrid fucoidan-derived oligosaccharides and their structural analysis by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2012, 33(8): 1722-1726.
- [21] WANG W, ZHANG P, HAO C, et al. In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus [J]. Antiviral Research, 2011, 92(2): 237-246.
- [22] HAYASHI K, LEE J B, NAKANO T, et al. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity [J]. Microbes and Infection, 2013, 15(4): 302-309.
- [23] LU W J, YANG Z F, CHEN J, et al. Recent advances in antiviral activities and potential mechanisms of sulfated polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 272: 118526.
- [24] ZHOU R M, CUI M X, WANG Y, et al. Isolation, structure identification and anti-inflammatory activity of a polysaccharide from *Phragmites rhizoma* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161: 810-817.
- [25] DODGSON K S, PRICE R G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides [J]. Biochemical Journal, 1962, 84(1): 106-110.

- [26] 葛智超, 郎蒙, 李燕. 裸藻多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(3): 564-571.
GE Z C, LANG M, LI Y. Isolation, purification, monosaccharide composition and antioxidant activity analysis of *Euglena gracilis* polysaccharides[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(3): 564-571.
- [27] 王思琪, 胡彦波, 翟丽媛, 等. 豆渣可溶性多糖的分离纯化及结构解析[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 52-57.
WANG S Q, HU Y B, ZHAI L Y, et al. Extraction, purification and structure analysis of soluble acidic polysaccharides from soybean dregs [J]. Food Science, 2021, 42(10): 52-57.
- [28] 张忠, 刘艳芳, 唐庆九, 等. 灵芝 β -葡聚糖硫酸化衍生物抑制脂多糖诱导巨噬细胞 RAW264. 7 产生 NO 的活性[J]. 食用菌学报, 2018, 25(2): 105-112.
ZHANG Z, LIU Y F, TANG Q J, et al. Sulfated derivatives of *Ganoderma lucidum* β -glucan inhibits NO production in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 macrophage [J]. Acta Edulis Fungi, 2018, 25(2): 105-112.
- [29] BILAN M I, GRACHEV A A, SHASHKOV A S, et al. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima* [J]. Carbohydrate Research, 2010, 345(14): 2038-2047.
- [30] MANDAL P, MATEU C G, CHATTOPADHYAY K, et al. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica* [J]. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 2007, 18(3): 153-162.
- [31] HAYASHI K, NAKANO T, HASHIMOTO M, et al. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection [J]. International Immunopharmacology, 2008, 8(1): 109-116.
- [32] PROKOFJEVA M M, IMBS T I, SHEVCHENKO N M, et al. Fucoidans as Potential Inhibitors of HIV-1 [J]. Marine Drugs, 2013, 11(8): 3000-3014.
- [33] 杨玉洁, 刘静宜, 谭艳, 等. 多糖降血糖活性构效关系及作用机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(23): 355-363.
YANG Y J, LIU J Y, TAN Y, et al. Research progress on the structure-activity relationship and hypoglycemic mechanism of polysaccharide [J]. Food Science, 2021, 42(23): 355-363.
- [34] HIDARI K I P J, TAKAHASHI N, ARIHARA M, et al. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 376(1): 91-95.

Structural characteristic of fucoidans from *Sargassum pallidum* and their anti-influenza virus activities

XUE Wei¹, LI Lingcui¹, QI Mingxing¹, WU Wenhui¹, CHI Lianli², WANG Peipei^{1,2}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shandong Provincial Key Laboratory of Glycochemical Biology, Shandong University, Qingdao 266200, Shandong, China)

Abstract: A sulfated fucoidan named as SF0, was isolated from *Sargassum pallidum* with hot water extraction and further purified by a strong anion exchange column and a gel filtration column. SF0 was further fractionated into three fractions SF1, SF2 and SF3 by stepwise partial acid hydrolysis. The content of sulfated group and molecular weight were decreased from SF0 to SF3. The structural features and anti-influenza A (H1N1) virus activities of all these fractions were determined. Results showed that SF0 was a homogeneous polysaccharide with a large molecular weight of 628.1 ku. It was mainly composed of mannose, glucuronic acid, glucose, galactose, xylose and fucose, in the molar ratio of 10.8:8.3:3.0:21.1:21.2:35.6, SF0 has a backbone composed of α -D-1,2-Manp and β -D-1,4-GlcAp disaccharide repeat unit. The anti-influenza A (H1N1) virus assay showed that all these fractions inhibited H1N1 virus replication in MDCK cells. Moreover, the fraction SF3 with the low molecular weight had better activity than original fraction. It suggested that the anti-H1N1 virus activity of fucoidan was related to its fine structure and molecular weight.

Key words: fucoidan; structure; anti-H1N1 virus; *Sargassum pallidum*