

巴西海参 *Ludwigothurea grisea* 的体壁多糖类型、性质及活性研究*

罗 兰¹, 赵金华², 向静颖³, 李 姿², 吴明一², 王盛民^{1△}

(1. 西南交通大学, 四川成都 610031; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650201;

3. 云南中医学院, 云南昆明 650500)

摘要: 目的 研究巴西海参 *Ludwigothurea grisea* 所含多糖种类、理化性质及其活性。方法 提取分离海参多糖, 研究其理化性质、波谱特征和抗凝活性。结果 *L. grisea* 体壁中得到3种多糖, 化学结构及理化性质存在显著性差异, LG-1 为硫酸酯取代的岩藻聚糖; LG-2 由 α -葡萄糖组成, 为中性葡聚糖; LG-3 由岩藻糖、葡萄糖醛酸和乙酰氨基半乳糖组成, 为岩藻糖化糖胺聚糖。LG-3 抗凝活性强于 LG-1, LG-2 无抗凝活性。结论 此海参中至少含有3种不同类型的多糖, 中性葡聚糖首次在海参中发现。它们的抗凝活性可能与单糖组成及硫酸酯基含量相关。

关键词: 海参; 多糖; 理化性质; 抗凝活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)02-0014-06

海参不仅是珍贵的食材, 也是名贵的药材。《本草纲目拾遗》中记载: 海参, 味甘咸, 补肾, 益精髓, 摄小便, 壮阳疗痿, 其性温补。国内外研究表明, 棘皮动物门海参纲动物体壁含有化学结构特殊的酸性多糖, 如岩藻糖化糖胺聚糖 (fucosylated glycosaminoglycan, FGAG)^[1-2]、硫酸化岩藻聚糖 (fucan sulfate, FS)^[3-4]。这些酸性多糖具有广泛而强效的药理学活性。FGAG 具有抗凝血、抗肿瘤、抗 HIV 活性^[1,5-6], FS 除具有抗肿瘤活性^[7], 还可抑制破骨细胞形成^[8]。本实验室^[1]对南海产梅花参所含 FGAG 进行了系统研究, 发现解聚的 FGAG 具良好的抗凝及抗 HIV 活性, 并且发现抗凝活性与硫酸根含量有关, 特别是岩藻糖侧链 2,4-二硫酸取代对抗凝活性影响较大。本文对巴西产海参 *Ludwigothurea grisea* 进行提取分离纯化, 得到3种海参多糖, 并对其理化性质及其抗凝活性进行研究, 以期对海参多糖结构鉴定和构效关系研究提供参考。此外, 海参多糖结构复杂, 研究困难, 本文研究海参多糖的理化性质还可以为海参多糖质量标准的研究奠定基础。

1 实验材料

1.1 材料

Ludwigothurea grisea 由巴西里约热内卢联邦大学 Mourão S. G. Pavao 教授研究组惠赠。

1.2 试剂

岩藻糖标准品 (Fuc, Sigma), 乙酰氨基半乳糖标准品 (GalNAc, TCI), 葡萄糖醛酸标准品 (GlcA, Alfa Aesar), 葡萄糖标准品 (Glc, Alfa Aesar)、半乳糖标准品 (Gal, Alfa Aesar); 右旋糖酐 (中国药品生物制品检定所); Heparin (Sigma); 木瓜蛋白酶 (EC 3.4.22.2, 北京鼎国生物技术有限责任公司); Sephadex G-100 (2×100 cm, GE Healthcare), DEAE-Sephadex Fast Flow (3×7 cm, Amersham Biosciences), Dowex (r) 50WX8 50-100 氢型阳离子交换柱 (1×13 cm, Alfa Aesar); 1-苯基-3-甲基-5-吡啶酮 (PMP, 99%, ACROS organics); 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器设备

Agilent 1200 型高效液相色谱仪; Shodex OH-pak SB-804 HQ 柱 (8 mm×300 mm); 示差折光检测器 (RID, G1362A); 二极管阵列检测器 (DAD, G1315D) (美国安捷伦科技有限公司); FD-5 冷冻干燥机 (北京博医康实验仪器有限公司); TECO MC-

* 基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (NO: 81102372); 云南省高端人才引进项目 (NO: 2010CI116)
云南省应用基础研究计划—应用基础研究面上项目 (NO: 2012FB177)

收稿日期: 2013-03-13 修回日期: 2013-03-31

作者简介: 罗兰 (1988~), 女, 云南建水人, 硕士研究生在读, 主要从事中药质量控制研究工作。

△通信作者: 王盛民, E-Mail: wangshengmin@sohu.com

4000 凝血计(德国美创);BRUKER Tensor 27 傅立叶变换中红外光谱仪(Bruker);Jasco P-1020 全自动数字旋光仪(日本 Jasco);Advance III 500MHz 超导核磁共振仪(Bruker);MS-H-S 标准型磁力搅拌器(大龙医疗设备有限公司);FE20 实验室 pH 计(梅特勒-托利多);DDSJ-308A 雷磁电导率仪(上海精科);KDC-2046 低速冷冻离心机(安徽中佳科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 *L. grisea* 多糖的提取分离

按文献[8]改进方法提取分离,主要包括以下步骤:称取干燥海参适量,12 倍水浸泡并均质,0.5mol/L NaOH,60℃搅拌 3h;6mol/L HCl 调至 pH 6~7。1% (w/w)木瓜蛋白酶,50℃搅拌 6 h;煮沸灭酶,离心取上清液。加乙醇至终浓度 60%(v/v),4℃静置过夜,离心取沉淀。沉淀用 20 倍水溶,6mol/L HCl 调 pH 值至 2.5,静置(4℃×4 h),离心取上清液。6mol/L NaOH 调至 pH 10,50℃下加 3 % H₂O₂ 搅拌 3h;6 mol/L HCl 调中性,离心去沉淀。加乙醇至终浓度 60%(v/v),得粗糖。2mol/L 醋酸钾盐析后得到 LG-3, Sephadex G-100 得到 LG-1 和 LG-2 的混合多糖,离子交换树脂 DEAE-Sephrose FF 纯化得到 LG-1 和 LG-2(分别是在 1.5mol/L 和 0.5mol/L 氯化钠条件下得到),透析,冻干纯品。

高效凝胶色谱法监测样品纯度,色谱条件:Shodex Ohpak SB-804HQ(8×300mm)凝胶色谱柱;以 0.1mol/L 氯化钠为流动相;流速为 0.5mL/min;RID 检测器和 DAD 检测器;进样量 50μL。理论板数按右旋糖酐 D2(M_w 4600)计算不低于 1000。

2.2 单糖组成及硫酸酯基含量测定

2.2.1 柱前衍生化法分析单糖组成

取供试品 LG-1、LG-2 和 LG-3 各 5mg,加 2mol/L 三氟乙酸 1mL,封管,100℃中水解 8h,蒸干后,甲醇洗涤并蒸干,1mL 水溶后作为供试品溶液;另取单糖标准品(GalNAc、GlcA、Glc、Gal、Fuc)适量,加 1mL 水溶解,作为对照溶液。采用文献多糖的单糖分析改进方法^[9],分别取上述两种溶液 50μL 与 50μL 0.6mol/L 的 NaOH 溶液充分混合;再加 50μL 0.5mol/L 的 PMP 甲醇溶液,混匀后于 70℃下反应 30min;静置冷却至室温后加 50μL 0.3mol/L 的 HCl 中和;加水至 1mL,再加等体积的氯仿,振摇,静置,弃去氯仿相,重复萃取 3 次,将水相用 0.45μm 微孔

膜过滤后供高效液相色谱(HPLC)法分析。

HPLC 色谱条件:Agilent Eclipse XDB C18(4.6×150 mm)色谱柱;以 0.1 mol/L 醋酸盐(pH 5.5)缓冲液-乙腈(78:22)为流动相;流速为 1 mL/min;检测波长为 250 nm;进样量 10 μL。

2.2.2 硫酸基/羧酸基比值测定

按照文献[8]方法测定 3 种海参中多糖硫酸基/羧酸基比值。取样品溶液置氢型阳离子交换柱交换为氢型样品,再用 0.02mol/L 氢氧化钠滴定液滴定,并计算硫酸基/羧酸基摩尔比。

2.3 分子量及分散系数测定

按照高效凝胶色谱(HPGPC)法^[8]对多糖分子量及分散系数进行测定。色谱条件同上。精密称取样品、标准品右旋糖酐 5mg,加流动相 0.1mol/L 氯化钠溶液 1mL 溶解后进样,进样量为 10μL,记录色谱图。已知分子量的梅花参 FGAG(M_w 65 820)作为宽标的校正溶液分析 LG-1、LG-3 分子量,以 Dextran (M_w 100000)作为宽标的校正溶液分析 LG-2 分子量,GPC 专用软件分析数据。

2.4 旋光度测定

精确称取 LG-1、LG-2、LG-3 适量,水溶后按照中国药典(2010 版)二部附录 VI E 旋光度测定法,于 20℃进行旋光度测定。

2.5 红外光谱

参照中国药典(2010 版)二部附录 IV C 红外分光光度法测定,KBr 压片法,Bruker Tensor 27 型红外光谱仪扫描样品在 4000~400cm⁻¹ 的红外光谱。

2.6 核磁共振谱(¹H NMR)分析

取样品适量经 3 次 D₂O 交换和冷冻干燥后,以 trimethylsilyl-propionic acid-d₄ (TSP-D₄, Norell 公司,美国)为内标,温度均为 45℃,用 Bruker Advance III 500 测定 ¹H NMR 谱图。

2.7 抗凝活性检测

依据文献[13]方法将样品用 Tris-HCl 缓冲液溶解配制成系列浓度,按照活化部分凝血活酶时间(Activated Partial Thromboplastin Time, APTT),前凝血酶时间(Prothrombin Time, PT)和凝血酶原时间(Thrombin Time, TT)的试剂盒说明书中提供的方法进行体外抗凝血活性测定。

3 实验结果

3.1 海参多糖的提取分离

本文采用文献[8]方法从 *L. grisea* 分离得到总

多糖,凝胶色谱法分析多糖中应该含有多个组分(见图 1),进一步醇沉、盐析后得到 LG-3,经过 Sephadex G-100 和离子交换树脂 DEAE-Sephrose FF 纯化得到 LG-1 和 LG-2。样品呈现单一色谱峰,且紫外检测器显示样品峰仅在 209 nm 左右处有末端吸收,未见 260 nm 或者 280 nm 等其他特征吸收峰,说明没有蛋白质和小分子杂质峰干扰,面积归一化法算出样品纯度大于 99 %。文献^[4,10]报道同品种海参用丙酮脱脂后,用木瓜蛋白酶酶解,再用凝胶柱和阴离子柱分离纯化多糖,得到两种多糖;本实验中采用碱解—酶解联用法分离得到 3 种多糖: LG-1、LG-2、LG-3。

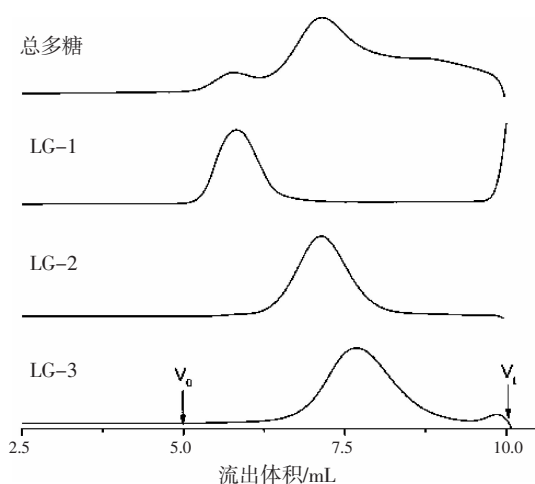


图 1 海参 *L. grisea* 总多糖及其纯化组分 LG-1、LG-2、LG-3 的 HPLC 图谱

3.2 海参多糖理化性质比较

3.2.1 柱前衍生化 HPLC 分析

从图 2 中可见, LG-1、LG-2 和 LG-3 的单糖组成显著不同。多糖 LG-1 中只含有岩藻糖,表明其为岩藻聚糖; LG-2 中只含有葡萄糖,表明其为葡聚糖; LG-3 中含有乙酰氨基半乳糖、葡萄糖醛酸和岩藻糖,其单糖组成与已发现于多种海参来源的岩藻糖化糖胺聚糖相同^[10]。

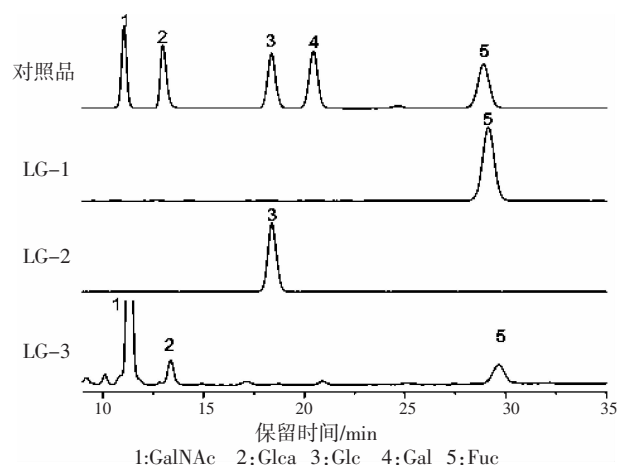


图 2 海参多糖与对照品柱前衍生化 HPLC 图谱

3.2.2 LG-1、LG-2、LG-3 理化性质比较

L. grisea 来源的多糖 LG-1、LG-2 和 LG-3 的理化性质存在显著差异,所含硫酸酯基、羧基的含量(质量百分比)、分子量分布和比旋度等理化检测结果见表 1。

表 1 LG-1、LG-2 和 LG-3 理化性质比较

	分子量分布			比旋光度	质量百分比 /%	
	Mn /KDa	Mw /KDa	Mw/Mn		SO ₃ ⁻	COO ⁻
LG-1	421.2	554.4	1.32	-177.5 °	24.3	-
LG-2	147.0	177.5	1.21	+ 170.7 °	-	-
LG-3	49.1	58.9	1.20	-38.7 °	34.0	9.7
Dex*	n.d*	100.0	n.d	+ 182.5 °	n.d	n.d
Hep*	20.2	26.3	1.30	+ 48.2 °	n.d	n.d

注: Dex: 葡聚糖 Hep: 肝素 n.d: 未检测

分子量检测结果显示, LG-1、LG-2 和 LG-3 中, LG-1 分子量最大(Mw 约 554 KDa), 高于 3 倍 LG-2 的分子量, 而 LG-3 分子量最低, 其约为 LG-2 的 1/3。3 种多糖的多分散系数(Mw/Mn)分别为约 1.32、1.21 和 1.20, 表明 3 种多糖均为均一性多糖。

比旋度检测结果显示, LG-1 比旋度为 -177.5 °,

表明其为 L-岩藻糖的聚合物。肝素因不含有 L-岩藻糖, 比旋度为 48.2 °。与之相比, LG-3 为 -38.7 °, 近似于文献报道的 FGAG 类化合物(-30°)^[11], 并且提示其所含岩藻糖基也是 L-构型。LG-1 的比旋度约为 LG-3 的 4.6 倍, 其与单糖组成检测结果相符。LG-2 比旋度为 + 170.7 °, 与右旋糖酐(Dex)比旋度

接近(+182.5°)。

电导法 NaOH 滴定结果显示, LG-1 中存在取代的硫酸酯基, 其 $-\text{SO}_3^- / \text{Fuc}$ 摩尔比约为 0.65; LG-2 不含硫酸酯基, 为中性糖; LG-3 和肝素所含的硫酸酯基、羧基摩尔比($-\text{SO}_3^- / \text{COO}^-$)分别为约 2.5 和 2.04。

3.3 LG-1、LG-2 和 LG-3 波谱分析

3.3.1 IR 分析

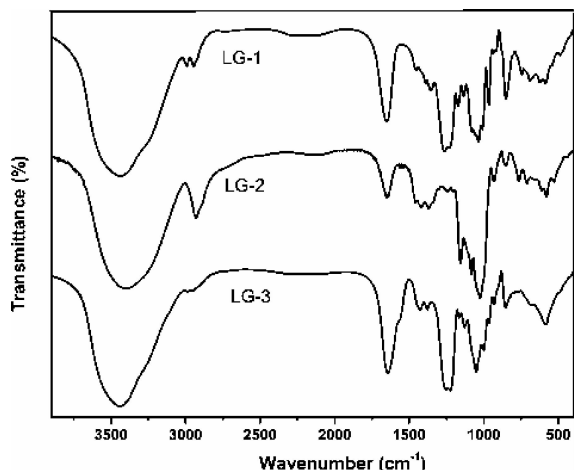


图3 海参 *L. grisea* 硫酸化岩藻聚糖、中性葡聚糖、岩藻糖化糖胺聚糖的 FT-IR 图谱

从图3和表2中可见, LG-1 和 LG-3 的 IR 谱图中存在约 1200 cm^{-1} 的硫酸酯基 S=O 不对称伸缩振动, 以及约 820、850 cm^{-1} 的硫酸酯基轴向配位伸缩振动特征吸收峰; LG-2 850 cm^{-1} 特征吸收显示了 α -葡聚糖的组成特征; LG-3 具有岩藻糖化糖胺聚

糖特征吸收峰, 即羧基和乙酰氨基的 C=O 键的伸缩振动峰叠合以及硫酸酯基特征吸收峰。

3.3.2 NMR 分析

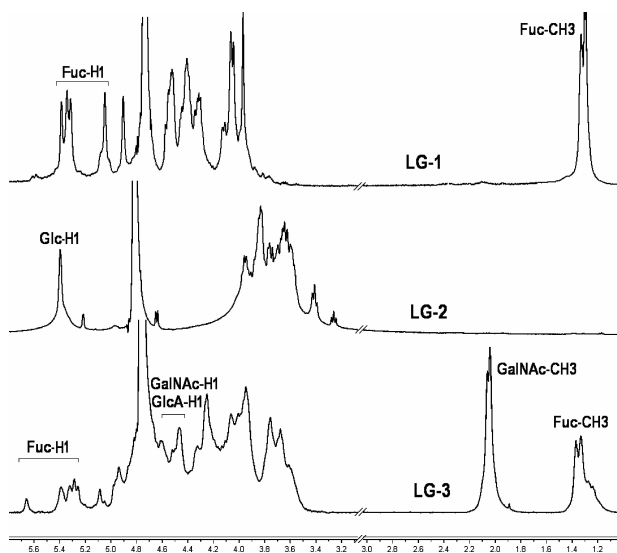


图4 海参 *L. grisea* 硫酸化岩藻聚糖、中性葡聚糖、岩藻糖化糖胺聚糖的 NMR 图谱

由图4中可见, *L. grisea* 来源的3种多糖 LG-1, LG-2 和 LG-3 的结构存在显著差异。

LG-1 的 ^1H NMR 谱图中 $\delta=1.20\sim 1.30$ 为岩藻糖甲基质子峰, $\delta=5.0\sim 5.6$ 呈现4组较强的信号峰 ($\delta=5.12, \delta=5.40, \delta=5.42, \delta=5.47$), 此为硫酸酯化类型不同的 α -岩藻糖端基氢信号, 硫酸酯基取代位的糖环氢出现在约 $\delta=4.6\sim 5.0$, 而约 $\delta=3.6\sim 4.6$ 信号则为非硫酸酯基取代位的糖环氢的叠加, 与文献[4]中

表2 海參中3种多糖红外光谱比较

比较	吸收[cm^{-1}]	强度	归属
LG-1, -2, -3 的相同点	3400	s	糖环醇羟基 O-H 伸缩振动($\nu_{\text{O-H}}$)
	2900	m	岩藻糖或者葡萄糖亚甲基 C-H 伸缩振动($\nu_{\text{C-H}}$)
	2800	m	糖环 C-H 伸缩振动($\nu_{\text{C-H}}$)
	1130~1170	m	糖环内 C-O-C 伸缩振动($\nu_{\text{C-O-C}}$)
	1000	m	糖环骨架振动($\nu_{\text{C-C}}$)
	850	m	糖环端基氢 ($\alpha_{\text{C-H}}$) 弯曲振动($\delta_{\text{C-H}}$)
LG-1, -3 的共同点	1200	s	糖环硫酸酯基 S=O 不对称伸缩振动($\nu_{\text{S=O}}$)
	850	m	硫酸酯基 (轴向配位) 伸缩振动($\nu_{\text{C-O-S}}$)
	820	m	硫酸酯基 (赤道配位) 伸缩振动($\nu_{\text{C-O-S}}$)
LG-3	1641	s	比 LG-1 和 LG-2 的峰强, 为葡萄糖醛酸羧基和乙酰氨基半乳糖的乙酰基 C=O 伸缩振动($\nu_{\text{C=O}}$)和结晶水的重叠峰
	1570	m	乙酰氨基半乳糖仲氨 N-H 弯曲振动与 C-N 伸展振动重叠($\delta_{\text{N-H}}, \nu_{\text{C-N}}$)
	1427	m	葡萄糖醛酸羧基 C-O 伸缩振动($\nu_{\text{C-O}}$)

报道的硫酸化岩藻聚糖 NMR 图谱相符, 结构为不同类型硫酸酯取代的岩藻糖通过 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 糖苷键连接岩藻聚糖(具有四糖重复结构单元)。

LG-2 中则无岩藻糖甲基质子峰和乙酰氨基半乳糖乙酰基质子峰, 其与仅含葡萄糖的单糖组成分析结果一致(图 2)。葡萄糖端基主峰位于约 $\delta=5.4$, 表明其连接键主要为 α -糖苷键, 而 $\delta=5.25$ 和 $\delta=4.65$ 表明该多糖结构中还可能存在少量的 β -葡萄糖侧链取代, 而只存在于 $\delta=3.2 \sim 4.4$ 之间的糖环信号峰与其不存在硫酸酯基取代的结构特征一致^[12]。

LG-3 的 ^1H NMR 谱与文献^[10-11]报道以及本研究组^[1,8]报道的其它海参来源的 FGAG 的谱图特征基本一致:除了 $\delta=1.20 \sim 1.30$ 的 Fuc 甲基信号峰外, 在 $\delta=2.0 \sim 2.10$ 处还有 GalNAc 乙酰基的甲基峰;侧链 α -Fuc 端基峰在 $\delta=5.2 \sim 5.7$ 之间, 而 β -GlcA 和 β -GalNAc 的端基峰出现在约 $\delta=4.5 \sim 4.7$ 处;非硫酸酯基取代的糖环氢信号位于约 $\delta=3.6 \sim 4.6$ 处, 其与葡萄糖醛酸存在侧链取代基相符。

3.4 LG-1、LG-2 和 LG-3 的抗凝活性比较

表 3 LG-1、LG-2 和 LG-3 的抗凝活性

样品	APTT [*]		TT [*]		PT [*]	
	$\mu\text{g/mL}$	U/mg	$\mu\text{g/mL}$	U/mg	$\mu\text{g/mL}$	U/mg
LG-1	17.28	13	>128	<1	>128	<1
LG-2	>128	<1	>128	<1	>128	<1
LG-3	3.36	67	14.15	7	>128	<1
Heparin	1.06	212	0.45	212	16-32	212

注:多糖抗凝活性(即延长 APTT、TT、PT 的活性)用倍增 APTT、TT、PT 所需多糖浓度表示;对照品为 Heparin(212 U/mg, USP units/mg)。

岩藻糖化糖胺聚糖 LG-3 抗凝活性为 67U/mg, 硫酸化岩藻聚糖 LG-1 抗凝活性为 7 U/mg。LG-3 抗凝活性显著, 尽管 LG-1 分子量大于 LG-3, 但是 LG-1 抗凝活性很低, 中性葡聚糖 LG-2 则无抗凝活性, 这表明多糖抗凝活性可能和单糖组成以及硫酸酯基含量有关。

4 讨论

本文从巴西产海参 *L. grisea* 干燥体壁中提取纯化了 3 个组分的均一性多糖 LG-1、LG-2 和 LG-3, 通过理化分析及波谱检测可以判断, LG-1 为硫酸化岩藻聚糖, LG-2 为 α -葡聚糖, LG-3 为岩藻糖化糖胺聚糖。

LG-1 为 α -岩藻聚糖, 存在较规则的硫酸酯基取代。由于 ^1H NMR 的四种端基峰信号积分基本相等, 说明其存在基本规则的重复结构单元, 此与文献报道基本一致, 而与海藻来源的岩藻聚糖有明显的区别, 后者的硫酸酯基取代没有明显的规律^[13]。本研究结果显示, LG-1 具有一定的抗凝活性, 结合相关研究资料可见, 其抗凝活性与硫酸酯基的存在相关。

LG-2 为 α -葡聚糖, 硫酸化岩藻聚糖、岩藻糖化糖胺聚糖为海参所含特征性的硫酸化多糖, 已见报道存在于多种海参纲动物, 而中性葡聚糖在海参纲动物中属首次报道。LG-2 无抗凝活性, 鉴于进行硫酸酯化修饰的葡聚糖也具有一定强度的抗凝活性, 说明其缺乏抗凝活性与其不含硫酸酯基相关^[14]。

LG-3 为岩藻糖化糖胺聚糖, 其具有较强的抗凝活性。与肝素抗凝活性相比, 其抗凝活性的特点是对 APTT 影响较大, 对 TT、PT 影响较小, 说明其主要影响内源性凝血, 而对外源性凝血和共同凝血途径影响较小。

本文研究表明, 巴西产海参 *L. grisea* 含有结构类型丰富的多糖类化合物, 这些多糖化学结构相对规则且具有一定的药理学活性, 因此具有一定的理论研究价值和应用研究价值。

参考文献

- [1] Wu M Y, Huang R, Zhao J H, et al. Structure and effect of sulfated fucose branches on anticoagulant activity of the fucosylated-chondroitin sulfate from sea cucumber [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87(1): 862-868.
- [2] Yoshida K, Minami Y, Nemoto H, et al. Structure of DHG, a depolymerized glycosaminoglycan from sea cucumber, Stichopus japonicus [J]. Tetrahedron Lett, 1992, 33(34): 4959-4962.
- [3] Kariya Y, Mulloy B, Imai K, et al. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber Stichopus japonicus and their ability to inhibit osteoclastogenesis [J]. Carbohydr Res, 2004, 339: 1339-1346.
- [4] Ribeiro Ana-Cristina, Vieira R P, Mourão P A S, et al. A sulfated α -L-fucan from sea cucumber [J]. Carbohydr Res, 1994, 255: 225-240.
- [5] 周宁娜, 梁晓原, 李其光. 中药多糖的研究近况 [J]. 云南中医学院学报, 1996, 19(3): 19-24.
- [6] Hoshino H. Anti-HIV drug: Europe, EP0410002A1 [P]. 1991-01-30.

- [7] 王静凤,张珣,李辉,等. 海参岩藻聚糖硫酸酯抗肿瘤转移作用研究[J]. 中国海洋药物,2012,31(2):14-18.
- [8] Wu M Y,Xu S M,Zhao J H,et al. Physicochemical characteristics and anticoagulant activities of low molecular weight fractions by free-radical depolymerization of a fucosylated chondroitin sulphate from sea cucumber *Thelenota ananas* [J]. Food Chem,2010,122:716-723.
- [9] 徐继华,刘文英,屠旦来. 吴茱萸多糖的分离和组成研究[J]. 中草药,2009,40(4):573-576.
- [10] Mourão P A S,Pereira M S,Pavão M S,et al. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action[J]. J Biol Chem,1996,271(39):23973-23984.
- [11] Vieira R P,Mourão P A S. Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber[J]. J Biol Chem,1988,263(34):18176-18183.
- [12] Hu C F,Li J H,Yang D Y,et al. A Neuroprotective polysaccharide from *Hyriopsis cumingii* [J]. J Nat Prod,2010,73:1489-1493.
- [13] Pereira M S,Mulloy B,Mourão P A S. Structure and anti-coagulant activity of sulfated fucans:Comparison between the regular,repitive,and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae[J]. J Biol Chem,1999,274:7656-7667.
- [14] 王庆华,李玮,唐松山. 酵母葡聚糖硫酸酯的制备及抗凝血活性[J]. 食品研究与开发,2011,32(7):32-35.

(编辑:迟越)

Polysaccharide Types, Physicochemical Characteristics and Anticoagulant Activities of Polysaccharides from the Sea Cucumber *Ludwigothurea Grisea*

LUO Lan¹, ZHAO Jin-hua², XIANG Jing-ying³, LI Zi², WU Ming-yi², WANG Sheng-min¹

(1. Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan 610031;

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201;

3. Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: **Objective** This work is to study the types of polysaccharides, physicochemical characteristics and biological activities of the sea cucumber *Ludwigothurea grisea*. **Methods** The polysaccharides were isolated from the body wall of sea cucumber *L. grisea*. Their multiple physicochemical properties, spectral characteristics and anticoagulant activities were then examined. **Results** The three types of polysaccharides were found in the sea cucumber *L. grisea*, and their chemical structures and physicochemical properties are significantly different each other. In addition, fraction LG-1 is a fucan with sulfate ester, the polysaccharide fraction LG-2 is a neutral glucan which contains glucose as the only sugar, and fraction LG-3 is composed of glucuronic acid (GlcA), N-acetylgalactosamine (GalNAc) and fucose, named fucosylated glycosaminoglycan (FGAG). The LG-3 has stronger anticoagulant activities than LG-1, and the LG-2 has no activity. **Conclusion** The body wall of the sea cucumber *L. grisea* contains at least three different types of polysaccharides, among which the neutral α -glucan was firstly obtained from sea cucumber. The anticoagulant activities of the different types of polysaccharides may relate to monosaccharide composition and sulfate content.

KEY WORDS: sea cucumber; polysaccharide; physicochemical characteristic; anticoagulant activity