

肝素原应用研究进展

陈祥娥

(济宁医学院生物科学学院, 山东日照 276826)



陈祥娥,女,汉族,1984年7月出生于山东五莲。2012年12月毕业于山东大学微生物与生化药学专业,获医学博士学位。2012年12月起在山东省药学科学院生化与生物技术中心从事新药研发工作,2014年8月到济宁医学院生物科学学院工作。研究领域为生物药物,主要从事多糖类药物的研究与开发。论文主要发表在 Carbohydrate Polymers, 目前以第一作者发表 SCI 论文 2 篇。

摘要 肝素原(heparosan)是某些细菌荚膜中多糖骨架的二糖重复单位,同时也是肝素和硫酸乙酰肝素的生物合成前体。以发酵获得的肝素原为前体骨架多糖,采用化学或生物修饰生产肝素及其类似物是目前非动物来源肝素生产的研究热点。近来发现,肝素原还可作为良好的药物载体,具有调节肠道菌群等作用。本文对其应用研究作一综述。

关键词 肝素前体;肝素;药物载体;肠道菌群

中图分类号: Q533 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9760(2015)06-153-04

Progress on the application of heparosan

CHEN Xiang'e

(School of Biological Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Heparosan is a polysaccharide found in the capsule of certain bacteria, as well as the biosynthesis precursor of heparin and heparan sulfate of animals. Now researches mainly focus on the non-animal origin production of heparin which employs chemical or biological modifications and takes the heparosan from fermentation as precursor. It has been recently found that heparosan can serve as a good drug carrier and regulate the intestinal flora and so on. This article reviews the latest progress of its application.

Keywords: Heparosan; Heparin; Drug carrier; Intestinal flora

肝素原(heparosan, 又称 N-acetylheparosan), $(-4-\beta-D-GlcA-1,4-\alpha-D-GlcNAc-1)_n$ (其中 GlcA 代表葡萄糖醛酸; GlcNAc 代表乙酰氨基葡萄糖)^[1], 是某些细菌荚膜中多糖骨架的二糖重复单位, 同时也是肝素和硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)的生物合成前体。细菌荚膜肝素原的发现, 引起了广泛关注。因为它使通过细菌合成, 化学或生物修饰生产肝素、HS 成为可能。肝素原二糖骨架结构与脊椎动物中的肝素类似, 但未硫酸化, 也没有将 GlcA 异构化为艾杜糖醛酸(IdoA)^[2]。

已发现的可以生产肝素原的细菌有大肠杆菌

K5 (Escherichia coli K5), 多杀性巴氏杆菌 D 型 (Pasteurella multocida type D) 以及副鸡禽杆菌基因型 II (Avibacterium paragallinarum genotype II) 3 种^[3-5]。肝素原可以通过微生物发酵提取或重组酶体外合成^[6]。目前, 文献报道的肝素原发酵生产多采用 E. coli K5。Wang 等^[7]采用优化培养基, 富氧给予并指数补加葡萄糖, 在 7 L 发酵罐中培养 E. coli K5 菌株制备肝素原, 产量可达 15 g/L, 相对分子质量为 5.8×10^4 , 重均分子质量为 8.4×10^4 。

目前, 肝素原的研究热点集中于以其作为前体

骨架修饰合成肝素、HS 及其类似物^[8]。近来研究发现,肝素原还可作为良好的药物载体,具有调节肠道菌群等作用^[9-10]。

1 肝素类生物合成前体

肝素被发现已近一百年,作为抗凝血和抗血栓药物广为应用。2008年,曾因杂质过量引起严重的过敏反应甚至死亡。动物源性肝素的质量成为广泛关注的焦点,同时也引发了对非动物来源肝素大规模生产的需求^[11]。脊椎动物合成肝素或 HS 的过程是先催化合成肝素原作为前体聚合物,然后在一系列酶的作用下进行硫酸化及异构化修饰,生成的高度 N-,O-硫酸化,IdoA 含量较高的多糖链为肝素,而部分修饰后生成的 O-硫酸化程度较低,GlcnAc、GlcA 含量较高的多糖链为 HS^[12]。目前,商品化肝素主要从猪肠黏膜或牛肺中提取,以细菌发酵获得的肝素原为前体,经化学或生物修饰生产肝素是一种较有希望的替代方法^[13-15]。

1.1 合成途径

以肝素原作为前体多糖,首先采用化学方法或在 N-去乙酰化酶/ N-磺基转移酶(N-deacetylase/ N-sulfatransferase, NDST)的作用下获得 N-去乙酰化/ N-硫酸化的肝素原,在 C5-异构化酶(C-5 epimerase, C5-epi)作用下将大部分 GlcA 异构化为 IdoA 后,经 2-O-磺基转移酶(2-O-sulfotransferase, 2-OST)、6-OST 和 3-OST 的依次作用,在 IdoA 的 C2 位, GlcA 的 C3 和 C6 位进行硫酸化修饰,即可获得具有抗凝血活性的肝素或 HS^[16-20]。部分修饰可生成 N-硫酸化肝素原(NSH)、O-硫酸化肝素原(OSH)、N,O-硫酸化肝素原(NOSH)、差向异构化 N,O-硫酸化肝素原(Epi-NOSH)等一系列衍生物。采用肝素原作为前体还可修饰获得低分子肝素类产品,如 Arixtra^[21]。

Bhaskar 等^[22]研究开发了一锅烩化学酶法合成肝素的制备工艺。构建可表达 C5-epi、2-OST、6-OST-1、6-OST-3、3-OST-1 和芳基磺基转移酶 IV(AST IV)融合蛋白的 E. coli,发酵培养获得重组酶。具体制备工艺是先化学修饰肝素原获得 NSH 作为底物。在缓冲体系中加入 3'-磷酸腺苷 5'-磷酸硫酸(PAPS)作为硫酸基供体,在重组酶的作用下,37℃ 孵育过夜即可获得具有抗凝血活性的全长或寡聚肝素/HS。本工艺主要通过酶与底物比的控制实现酶活性的调节,适于进行肝素结构异质性及其对构效关系影响的高通量筛选研究。

1.2 生物活性

以肝素原为起始物,修饰生成的多种肝素类衍生物表现出多种与肝素类似的生物活性,主要有抗凝血、抗炎、抗癌、抗病毒和诱导干细胞分化等^[23-25]。已报道的由肝素原修饰获得的衍生物的基本结构及活性见表 1。

表 1 肝素原衍生物的基本结构及活性

衍生物	基本结构	活性
Sulfaminoheparosan (SAH, NSH)	-GlcA-GlcNS-	抗凝
Epi-NOSH	-GlcA3S (orH) 6S-GlcNS6S- IdoA2S-GlcNS6S	抗炎 抗病毒
OSH(H)	-GlcA2S3S-GlcNAc3S6S-	抗炎 抗癌 抗病毒
NOSH(L)	-GlcA-GlcNS6S-	抗癌 抗病毒 诱导分化
NOSH(H)	-GlcA2S3S-GlcNS6S-	抗癌 抗病毒
Epi-OSH (L)	-GlcA-GlcNS6S-IdoA2SGlcNS6S	抗病毒
Epi-OSH (H)	-GlcA2S3S-GlcNS6S- IdoA2SGlcNS6S	抗病毒
Neoheparin	-IdoA2S-GlcNS6S-GlcAGlc- NS3S6S-IdoA2SGlcNS3S6S-GI- cA3S-GlcNS6S	抗凝 抗血栓

注:L. 低度硫酸化;H. 高度硫酸化

肝素原硫酸化衍生物的药理作用与肝素类似,部分明显优于肝素,如 OSH、NOSH 的抗病毒活性,且不引发出血等副作用^[23]。随着人们对肝素结构和功能之间关系的不断认识和研究,可以有选择性的对肝素原进行修饰,获得具有特定功能的衍生物,以更好地适用于不同的治疗需求。

2 药物载体

肝素原作为肝素和 HS 的生物合成前体,具有良好的生物相容性,生物可降解性、低毒性和易于化学修饰的特点。研究发现,肝素原具有细胞内化作用,可逃避调理素作用,具有适宜的血浆循环半衰期,不具有免疫原性,可作为良好的药物载体改进药物的药代动力学特性,提高性能^[26-27]。

基于肝素原的纳米载体可以实现药物的胞内传递,细胞摄取实验表明,其内吞途径包括网格蛋白介导的内吞作用和巨胞饮。Chen 等^[28]采用基于肝素原和去氧胆酸共轭作为药物载体制备的新型胶束,可以抵抗血清吸附,表现出良好的稳定性。荧光实验证实,这种胶束能够有效地将模型疏水性

药物阿霉素靶向运送到 HeLa 细胞。此胶束为 pH 敏感型,在 pH5.0 的酸性条件下阿霉素的释放速率远高于生理 pH7.4 时的释放速率,在过表达 β -葡萄糖醛酸酶的肿瘤组织中也可加速释放,增强治疗效果,具有良好的临床应用潜能。作为荷负电的糖胺聚糖家族一员,肝素原有望成为新一代药物载体^[29]。

3 调节肠道菌群

研究表明,肝素和 HS 具有广谱抗感染作用。越来越多不同种类的传染性微生物对宿主的黏附、胞内化或在体内的转移已证实可被肝素或 HS 降低。但肝素静脉注射治疗溃疡性结肠炎的临床试验结果并不理想,部分病人甚至出现了严重的直肠出血反应^[30]。

体外研究发现,肝素原可显著抑制肠致病性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等常见肠道致病菌对肠道上皮细胞和黏液层的黏附,对鼠李糖乳酸杆菌等益生菌的黏附则无明显影响,可协同增强益生菌的黏附竞争优势,表现出与肝素类似的作用效果^[10]。大鼠体内试验发现,肝素原可调节体内肠道菌群组成,增加和维持 *Lactobacillus taiwanensis* 和 *Lactobacillus gallinarum* 等乳酸杆菌属益生菌的相对数量及优势,有利于维持健康肠道菌群,有效预防外源性致病菌感染,减少肠道疾病的发生,且与肝素之间并无显著性差异^[31]。肝素原具有与肝素类似骨架结构,可发酵生产,有开发为肠道菌群调节剂的潜能,且不引发出血等副作用,在临床应用方面比肝素更有优势。

4 其他

Munoz 等^[32]将生物素酰化的肝素原固定在传感器芯片上,用参与肝素生物合成的酶选择性修饰获得与肝素具有相似结构的多糖,通过表面等离子体共振检测确定这些多糖与抗凝血酶 III 的相互作用,进行肝素-蛋白质相互作用的高通量筛选,并提供参与结合的关键硫酸化基团的结构信息。

5 展望

肝素原作为肝素和 HS 的生物合成前体,具有良好的生物相容性,生物可降解性和易于化学修饰的特点。细菌荚膜肝素原的发现,为我们提供了一条通过发酵工程获得肝素原的途径,使以肝素原为前体,化学或酶法修饰生产肝素成为可能,并获得

了一些具有特殊生物活性的衍生物。肝素原还具有开发为新一代药物载体及肠道菌群调节剂的良好潜能。随着研究的深入和不断开展,肝素原在生化药物开发和功能材料等方面的应用将更为广泛。

参考文献:

- [1] 陈祥娥,凌沛学,张天氏. 关于 heparosan 中文译名的建议[J]. 中国科技词语,2014,16(4):33-34.
- [2] 陈祥娥,凌沛学,张天氏. 细菌肝素前体(heparosan)合酶[J]. 中国生化药物杂志,2008,29(6):422-424.
- [3] Hickey A M, Bhaskar U, Linhardt R J, et al. Effect of eliminase gene (elmA) deletion on heparosan production and shedding in *Escherichia coli* K5[J]. *J Biotechnol*, 2013, 165(3-4):175-177.
- [4] Otto N J, Green D E, Masuko S, et al. Structure/function analysis of *Pasteurella multocida* heparosan synthases: toward defining enzyme specificity and engineering novel catalysts[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10):7203-7212.
- [5] Chen X, Ling P, Jin Y, et al. Heparosan: precursor of bioengineered heparin and heparan sulfate[J]. *Food and Drug*, 2012, 14(4):286-290.
- [6] Chavaroche A A, van den Broek L A, Eggink G. Production methods for heparosan, a precursor of heparin and heparan sulfate[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 93(1):38-47.
- [7] Wang Z Y, Ly M, Zhang F, et al. *E. coli* K5 fermentation and the preparation of heparosan, a bioengineered heparin precursor[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 107(6):964-973.
- [8] Li P, Sheng J, Liu Y, et al. Heparosan-derived heparin sulfate/heparin-like compounds: one kind of potential therapeutic agents[J]. *Med Res Rev*, 2013, 33(3):665-692.
- [9] Chen J X, Liu W, Zhang M, et al. Heparosan based negatively charged nanocarrier for rapid intracellular drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2014, 473(1-2):493-500.
- [10] Chen X, Ling P, Duan R, et al. Effects of heparosan and heparin on the adhesion and biofilm formation of several bacteria in vitro[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 88(4):1288-1292.
- [11] Liu H, Zhang Z, Linhardt R J. Lessons learned from the contamination of heparin[J]. *Nat Prod Rep*, 2009, 26:313-321.
- [12] Lever R, Mulloy B, Page C P. A century of progress [M]. York Springer, 2012:23-42.
- [13] 陈祥娥,凌沛学. 肝素微生物生产展望[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(4):502-504.
- [14] Driguez P A, Potier P, Trouilleux P. Synthetic oligosaccharides as active pharmaceutical ingredients: Lessons learned from the full synthesis of one heparin derivative on a large scale[J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(8):980-989.
- [15] DeAngelis P L, Liu J, Linhardt R J. Chemoenzymatic synthesis of glycosaminoglycans: re-creating, re-modeling and re-designing nature's longest or most complex carbohydrate chains [J]. *Glycobiology*, 2013, 23(7):764-777.

(下转第 158 页)

- 趋势分析[J]. 中华泌尿外科杂志, 2012, 33(11): 836-839.
- [2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 330-334.
- [3] 唐志柳, 白洁, 顾丽娜, 等. 2000~2010年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性疾病[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(4): 260-265.
- [4] 叶定伟, 李长岭. 前列腺癌发病趋势的回顾和展望[J]. 中国癌症杂志, 2007, 17(3): 177-180.
- [5] 杨士勇, 江晓春. miRNA与恶性肿瘤关系研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2013, 36(6): 438-441.
- [6] Miron T, Wilchek M, Sharp A, et al. Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells[J]. J Natr Biochem, 2008, 19(8): 524-535.
- [7] Takezaki T, Gao C M, Wu J Z, et al. Dietary protective and risk factors for esophageal and stomach cancers in a low-epidemic area for stomach cancer in jiangsu province, China: comparison with those in a high-epidemic area[J]. Cancer Science, 2001, 92(11): 1157-1165.
- [8] 王国芳, 韩海棠, 聂尚丹. 大蒜水提取物对小鼠腹泻治疗作用的实验研究[J]. 济宁医学院学报, 2009, 32(4): 244-245.
- [9] Tao M, Gao L, Pan J, et al. Study on the inhibitory effect of allicin on human gastric cancer cell line SGC-7901 and its mechanism[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2014, 11(1): 176-179.
- [10] Kim J Y, Kwon O. Garlic intake and cancer risk: an analysis using the Food and Drug Administration's evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 89(1): 257-264.
- [11] Shin H A, Cha Y Y, Park M S, et al. Diallyl sulfide induces growth inhibition and apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells by mitochondrial signaling pathway[J]. Oral Oncol, 2010, 46(4): e15-e18.

(收稿日期 2015-03-22)

(上接第 156 页)

- [16] Wu B, Wei N, Thon V, et al. Facile chemoenzymatic synthesis of biotinylated heparosan hexasaccharide [J]. Org Biomol Chem, 2015, 13(18): 5098-5101.
- [17] Mochizuki H, Yamagishi K, Suzuki K, et al. Heparosan-glucuronate 5-epimerase: molecular cloning and characterization of novel enzyme[J]. Glycobiology, 2015, Epub ahead of print.
- [18] Xiong J, Bhaskar U, Li G, et al. Immobilized enzymes to convert N-sulfo, N-acetyl heparosan to a critical intermediate in the production of bioengineered heparin [J]. J Biotechnol, 2013, 167(3): 241-247.
- [19] Raman K, Kuberan B, Arungundram S. Chemical modification of heparin and heparosan[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1229: 31-36.
- [20] Sheng J, Xu Y, Dulaney S B, et al. Uncovering biphasic catalytic mode of C5-epimerase in heparan sulfate biosynthesis [J]. J Biol Chem, 2012, 287(25): 20996-21002.
- [21] Xu Y, Masuko S, Takeddin M, et al. Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins [J]. Science, 2011, 334(6055): 498-501.
- [22] Bhaskar U, Li G, Fu L, et al. Combinational one-pot chemoenzymatic synthesis of heparin [J]. Carbohydr Polym, 2015, 122: 399-407.
- [23] 陈祥娥, 凌沛学. 大肠杆菌 K5 荚膜多糖硫酸化衍生物的应用 [J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(6): 427-429.
- [24] 陈祥娥. Heparosan 的提取分离及其对肠道菌作用的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [25] Zhao S, Wang Z, Chen J, et al. Preparation of heparan sulfate-like polysaccharide and application in stem cell chondrogenic differentiation[J]. Carbohydr Res, 2015, 401: 32-38.
- [26] Raman K, Mencia C, Desai U R, et al. Sulfation patterns determine cellular internalization of heparin-like polysaccharides [J]. Mol Pharm, 2013, 10(4): 1442-1449.
- [27] DeAngelis P L. HEP tune: a process of conjugating a naturally occurring sugar molecule, heparosan, to a drug for enhanced drug delivery[J]. Drug Dev Deliv, 2013, 13: 34-38.
- [28] Chen J X, Zhang M, Liu W, et al. Construction of serum resistant micelles based on heparosan for targeted cancer therapy[J]. Carbohydr Polym, 2014, 110: 135-141.
- [29] DeAngelis P L. Heparosan, a promising 'naturally good' polymeric conjugating vehicle for delivery of injectable therapeutics[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2015, 12(3): 349-352.
- [30] 段荣帅, 凌沛学, 王凤山, 等. 肝素的抗感染作用[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): II-V.
- [31] Duan R, Chen X, Wang F, et al. Oral administration of heparin or heparosan increases the lactobacillus population in the gut microbiota in mice[J]. Carbohydr Polym, 2013, 94(1): 100-105.
- [32] Munoz E, Xu D, Avci F, et al. Enzymatic synthesis of heparin related polysaccharides on sensor chips: rapid screening of heparin-protein interactions[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 339(2): 597-602.

(收稿日期 2015-05-26)