

蓝指海星新型糖胺聚糖分离纯化、结构解析与靶向内源性凝血途径的抗凝活性研究

符洁雯^{1,2}, 时响^{1,2}, 吕旭升^{1,2}, 侯小涛⁴, 刘永宏^{1,2}, 袁清霞^{1,2,3*}, 赵龙岩^{1,2,3*}

1. 广西中医药大学海洋药物研究院, 广西海洋药物重点实验室, 广西 南宁 530200

2. 海洋中药资源高效利用广西高校工程研究中心, 广西 南宁 530200

3. 中药壮瑶药创新药物教育部工程研究中心, 广西 南宁 530200

4. 中药资源循环利用广西高校工程研究中心, 广西 南宁 530200

摘要:目的 从蓝指海星 *Linckia laevigata* 中挖掘新型糖胺聚糖, 解析其精细结构, 并评估其作为内源性凝血途径抑制剂的抗凝潜力。方法 采用酶解-碱解协同提取蓝指海星总多糖, 强阴离子交换色谱纯化获得糖胺聚糖; 经脱酰-脱氨基解聚制备寡糖, 采用“bottom up”策略联合高效凝胶渗透色谱 (high-performance gel permeation chromatography, HPGPC)、1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮衍生化高效液相色谱 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization high-performance liquid chromatography, PMP-HPLC)、红外光谱 (infrared spectroscopy, IR) 及一维/二维核磁共振 (one-dimensional/two-dimensional nuclear magnetic resonance, 1D/2D NMR) 进行结构表征; 以活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 评价体外抗凝活性, 生色底物法测定内源性因子 X 酶 (intrinsic factor Xase, iFXase) 抑制活性。结果 制备得到结构均一的硫酸化糖胺聚糖 LLGAG ($M_w \approx 38\,000$), 其单糖组成为艾杜糖醛酸 (iduronic acid, IdoA): 乙酰氨基半乳糖 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc): 半乳糖 (galactose, Gal) $\approx 34.4:59.7:5.9$ 。该聚糖核心由 *L*-IdoA_{2S3S}- α -1,3-*D*-GalNAc_{4S6S} (2S3S4S6S) 基序的二糖单元构成, 兼含 3S4S6S 及 2S3S6S 等基序, 为自然界中罕见的新型硫酸皮肤素样糖胺聚糖。体外实验中, LLGAG 显著延长 APTT 与 TT, 活性与临床抗凝金标准依诺肝素钠相当; 抑制 iFXase 的半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC₅₀) 为 (17.75 $\pm$ 1.12) ng/mL, 较依诺肝素钠强约 2.8 倍。结论 发现了 1 种结构新颖独特的蓝指海星来源糖胺聚糖, 推断出其确切结构, 发现其具有强效 iFXase 抑制活性, 为开发海洋生物来源的肝素替代物提供理论依据与候选分子。

关键词: 蓝指海星; 多糖; 糖胺聚糖; 结构表征; 抗凝血活性; 内源性因子 X 酶

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)14-5416-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.14.005

Isolation, purification, structural characterization, and anticoagulant activity of a novel glycosaminoglycan from *Linckia laevigata* targeting intrinsic coagulation pathway

FU Jiewen^{1,2}, SHI Xiang^{1,2}, LYU Xusheng^{1,2}, HOU Xiaotao⁴, LIU Yonghong^{1,2}, YUAN Qingxia^{1,2,3}, ZHAO Longyan^{1,2,3}

1. Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs, Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. University Engineering Research Center of High-efficient Utilization of Marine Traditional Chinese Medicine Resources, Nanning 530200, China

3. Engineering Research Center of Innovative Drug of Traditional Chinese and Zhuang Yao Medicine, Ministry of Education, Nanning 530200, China

4. University Engineering Research Center of Reutilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Nanning 530200, China

收稿日期: 2026-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82404503); 国家自然科学基金资助项目 (32160220); 国家自然科学基金资助项目 (82373788); 广西杰出青年科学基金 (2020GXNSFFA297005); 中药壮瑶药创新药物教育部工程研究中心 (ZYZY2025034)

作者简介: 符洁雯 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋中药糖类新药研发。E-mail: weiwei1999777@163.com

*通信作者: 袁清霞 (1987—), 女, 研究员, 硕士生导师, 博士, 研究方向为中药糖类新药研发。E-mail: qingxiayuan@163.com

赵龙岩 (1983—), 男, 研究员, 硕士生导师, 博士, 研究方向为海洋中药糖类新药研发。E-mail: longyanzhao@gmail.com

Abstract: Objective To identify novel glycosaminoglycans from *Linckia laevigata*, elucidate their fine structures, and evaluate their anticoagulant potential as inhibitors of the intrinsic coagulation pathway. **Methods** Total polysaccharides were extracted from the starfish *L. laevigata* using a combination of enzymatic and alkaline hydrolysis, and then purified by strong anion-exchange chromatography. Oligosaccharides were prepared through deacetylation-deamination depolymerization. A “bottom-up” strategy integrating high-performance gel permeation chromatography (HPGPC), 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization high-performance liquid chromatography (PMP-HPLC), infrared spectroscopy (IR), and one-dimensional/two-dimensional nuclear magnetic resonance (1D/2D NMR) was employed for structural characterization. *In vitro* anticoagulant activity was assessed by activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and prothrombin time (PT) assays, while inhibition of intrinsic factor Xase (iFXase) was measured via a chromogenic substrate assay. **Results** A homogeneous sulfated glycosaminoglycan, designated LLGAG (molecular weight, $M_w \approx 38\ 000$), was obtained with a monosaccharide composition of iduronic acid (IdoA):N-acetylgalactosamine (GalNAc):galactose (Gal) $\approx 34.4 : 59.7 : 5.9$. The polymer core comprised disaccharide units featuring the *L*-IdoA_{2S3S}- α -1,3-*D*-GalNAc_{4S6S} (2S3S4S6S) motif, together with 3S4S6S and 2S3S6S motifs, representing a rare and novel dermatan sulfate-like glycosaminoglycan. *In vitro*, LLGAG significantly prolonged APTT and TT, showing activity comparable to that of the clinical gold-standard enoxaparin sodium. Its half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) for iFXase inhibition was (17.75 ± 1.12) ng/mL, approximately 2.8-fold more potent than that of enoxaparin sodium. **Conclusion** This study identified a structurally unique glycosaminoglycan from *L. laevigata*, elucidated its precise structure, and demonstrated its potent iFXase inhibitory activity, thus providing both a theoretical foundation and a candidate molecule for the development of marine-derived heparin alternatives.

Key words: *Linckia laevigata* (Linnaeus); polysaccharide; glycosaminoglycan; structural characterization; anticoagulant activity; intrinsic factor Xase

抗凝药物是血栓性疾病防治的核心手段，但现有临床用药普遍存在严重出血倾向、过敏反应等毒副作用^[1]。肝素（heparin，HP）类抗凝药作为临床金标准，除显著出血风险外，还面临血小板减少症、朊病毒及非洲猪瘟病毒等动物源性污染隐患^[2-3]。我国辽阔的海疆蕴藏着丰富的海洋生物资源，为海洋药物研发提供了得天独厚的物质基础^[4-5]。近年来，从海洋生物中发掘新型糖胺聚糖（glycosaminoglycan，GAG）作为 HP 替代物已成为抗凝药物研究的前沿热点。其中，棘皮动物富含结构多样、抗凝活性强效的硫酸化 GAG，海参来源的岩藻糖化糖胺聚糖（fucosylated glycosaminoglycan，FG）衍生物 LFG-53 已于 2021 年获 FDA 临床批件并完成 I 期试验^[6-8]。然而，海参资源有限，因此从资源丰沛、成本低廉的棘皮动物（如海星）中开发 HP 替代物具有重要的研究价值与现实意义。

海星属棘皮动物门海星纲，是传统中药材，《中国药用动物志》《中华海洋本草》《中药大辞典》等典籍均载有其药用价值。其味咸、性温，归心、胃、大肠经，具解毒散结、制酸止痛、镇惊安神之效，在抗血栓形成以及抗心律失常等方面具有药用价值^[9]。蓝指海星 *Linckia laevigata* (Linnaeus) 为印度-太平洋珊瑚礁海域广布种，虽未见上述典籍明确记载该物种的药用价值，但海星属多种生物作为海洋

中药具有悠久应用历史^[10-11]，提示该物种具有潜在开发价值，是研究海星来源 GAG 的优质资源。海星来源的硫酸化 GAG 具有强效抗凝活性，这可能是海星在中医里能够“散结”的物质基础。中医“散结”与西医“抗血栓”在改善局部瘀滞方面，理论上是相通的。但 GAG 的结构呈现显著的种属特异性，即同属不同种的 GAG 结构差异明显。例如，俄罗斯学者从 *Lysastrosoma anthosticta* 和 *Lethasterias fusca* 中分离出类硫酸皮肤素（dermatan sulfate，DS）与类 HP 多糖^[12]；本课题组前期在光滑花海星中亦获得硫酸软骨素（chondroitin sulfate，CS）-DS 杂合链^[13]。然而，除上述少数物种外，多数海星 GAG 的精细结构尚不明确。李军等^[14]对三亚海域未知种海星的研究提示，其 GAG 由己糖醛酸、氨基己糖与岩藻糖（物质的量比为 1 : 1 : 1）构成，可能含新颖结构，但未见确切解析。

内源性凝血途径抑制剂兼具强效抗凝与低出血风险优势，其中内源性因子 X 酶（intrinsic factor Xase，iFXase）是关键的限速酶^[15]。除海参 FG 外，针对 iFXase 的海洋 GAG 抑制剂研究相对有限^[7-8]。蓝指海星资源丰富，但其多糖成分未见报道，存在发掘新型 HP 类物质的潜力。基于此，本研究拟从蓝指海星制备高纯度均一硫酸化 GAG，综合运用色谱、光谱及核磁共振等技术解析其化学结构与硫酸

化特征,并系统评价其体外抗凝活性及对 iFXase 的抑制效力,旨在为开发海洋生物来源的新型 HP 替代物及高值化应用提供理论依据与物质储备。

1 材料

1.1 药品与试剂

蓝指海星干燥体由广西中医药大学海洋药物研究院刘昕明博士提供并鉴定为 *Linckia laevigata* (Linnaeus); 单糖标准品甘露糖 (mannose, Man, 批号 F1815046)、乙酰氨基葡萄糖 (*N*-acetylglucosamine, GlcNAc, 批号 E2308212)、半乳糖醛酸 (galacturonic acid, GalA, 批号 BCBK3704V)、葡萄糖醛酸 (glucuronic acid, GlcA, 批号 SLCR0286V)、乙酰氨基半乳糖 (*N*-acetylgalactosamine, GalNAc, 批号 BCCD6801)、葡萄糖 (glucose, Glc, 批号 071M0145V)、半乳糖 (galactose, Gal, 批号 SLBK9175V)、1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP, 批号 BCBP1308V)、明胶 (批号 WXBD4397V)、阿利新蓝 8GX (批号 3540111001)、CS (批号 C17550308)、氧化氘 (deuterium oxide, D₂O, 批号 E2417179) 等购自 Sigma-Aldrich 公司; 右旋糖酐 (批号 140637-646-201203) 购自中国食品药品检定研究院; 艾杜糖醛酸 (*L*-iduronic acid, IdoA, 批号 ZG-31380) 购自上海甄准生物科技有限公司; 岩藻糖 (*L*-fucose, Fuc, 批号 F1924062)、三氟乙酸 (TFA, 批号 L2425434)、DS (批号 E2305580)、乙酸钡 (批号 20181022) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 木瓜蛋白酶 (批号 IS236057) 购自上海源叶生物科技有限公司; 质控血浆 (批号 093B-P108A) 购自德国 TECO GmbH; 氯化钙 (批号 220606)、活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 试剂盒 (批号 231220)、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 试剂盒 (批号 240823)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 试剂盒 (批号 240823) 均购自北京美创新跃医疗器械有限公司; Tris-HCl 缓冲液 (批号 C12696867) 购自 Amresco 公司; FVIII:C 试剂盒 (批号 FD0262HZ) 购自法国 HYPHEN BioMed; 乙腈 (批号 0134241003D)、甲醇 (批号 0234251203D) 购自上海星可高纯溶剂有限公司; 溴化钾 (批号 C18033381)、HP、依诺肝素钠 (low molecular weight heparin, LMWH, 批号 C16140040) 购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 仪器

LC 2030C 3D Plus 高效液相色谱仪 (株式会社岛津制作所); EvoLution 350 型紫外可见分光光度计 (美国赛默飞公司); L1600400 Spectrum TWO 型傅里叶变换红外光谱仪 (PerkinElmer); EYELAN-1300-WB 小型旋转蒸发仪 (上海爱朗仪器有限公司); YDF-20L 型防爆双层玻璃反应釜 (上海予华仪器设备有限公司); RCT Basic 恒温数显磁力搅拌器 (广州 IKA 设备有限公司); 5810R 型大容量冷冻离心机 (Eppendorf 中国有限公司); LyoQuest-85 plus 冷冻干燥机 (泰事达科技公司); FiveEasy Plus PH 计 (梅特勒-托利多仪器有限公司); Advance III 600MHz 超导核磁共振波谱仪 (瑞士布鲁克公司); Milli-Q®IQ7000 型系统超纯水仪 (默克密理博公司); VICTOR Nivo 多功能酶标仪 (上海珀金埃尔默仪器有限公司); MC-4000 型血液凝固分析仪 (德国 TICO GmbH 公司)。

2 方法

2.1 LLGAG 的制备及理化分析

2.1.1 多糖的制备 参照文献方法^[16]改进, 取 3.8 kg 干燥蓝指海星体壁粉粉碎, 加 19 L 水及 24 g 木瓜蛋白酶 (0.1%) 于 55 °C 酶解 16 h, 随后用 0.5 mol/L NaOH 在 60 °C 碱解 2 h。离心 (4 700 r/min、15 min) 取上清, 调 pH 至 3 于 4 °C 静置 6 h 沉淀蛋白, 再次离心后回调 pH 至中性, 以终浓度为 75% 的乙醇沉淀。沉淀经 3% H₂O₂ (pH 10, 50 °C) 脱色 2 h 后重复醇沉, 水复溶并冻干得粗多糖。粗多糖溶液上 Amberlite FPA98 (Cl⁻) 阴离子交换柱, 依次用水及 0.5、1、2 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱 (苯酚-硫酸法监测), 收集 2 mol/L 洗脱组分, 中和、醇沉、透析、冻干后获均一性 LLGAG。

2.1.2 相对分子质量测定 LLGAG (2.0 mg) 以 1 mL 超纯水溶解配成 2.0 mg/mL 溶液, 0.22 μm 滤膜滤过后取 20 μL 进样, 采用高效凝胶渗透色谱 (high-performance gel permeation chromatography, HPGPC) 测定相对分子质量^[16]。以 $5.9 \times 10^3 \sim 1.07 \times 10^5$ 右旋糖酐标准品绘制保留时间- $\lg M_w$ 标准曲线, 根据样品峰保留时间计算相对分子质量。色谱条件: 岛津 LC-2030C 3D HPLC 配 RID 检测器, Shodex OHpak SB-804 HQ 柱 (300 mm × 8 mm), 流动相 0.1 mol/L NaCl, 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 35 °C。

2.1.3 硫酸基含量测定 采用氯化钡-明胶法测定硫酸基含量^[17]。取 0.3 mg/mL K₂SO₄ 标准溶液 0、

0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别补水至 1.0 mL, 加入 700 μ L 8%三氯乙酸和 500 μ L 0.5%氯化钡-明胶溶液, 混匀静置 15 min 后于 360 nm 测定吸光度 (A), 绘制浓度-吸光度标准曲线。取 2 mg LLGAG 溶于 1 mL 1 mol/L HCl, 100 $^{\circ}$ C 水解 6 h, 冷却、减压浓缩至干后用 1 mL 水溶解。取 200 μ L 水解液 2 份, 均补至 1.0 mL, 分别加入氯化钡-明胶溶液 (测 A_1) 和 0.5%明胶溶液 (测 A_2) 以扣除紫外干扰, 其余操作同标准曲线法。将 ($A_1 - A_2$) 代入标准曲线计算 LLGAG 中硫酸基含量。

2.1.4 单糖组成分析 多糖单糖组成采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑酮衍生化高效液相色谱 (1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatization high-performance liquid chromatography, PMP-HPLC) 分析^[18]。称取 LLGAG 及 9 种标准单糖各 2 mg 配成 5 mg/mL 溶液。取 100 μ L 加 100 μ L 4 mol/L TFA, 120 $^{\circ}$ C 水解 2 h, 冷却后用甲醇 200 μ L 于 50 $^{\circ}$ C 反复浓缩除酸 3 次, 100 μ L 水溶解残渣, 依次加入 100 μ L 0.6 mol/L NaOH 和 100 μ L 0.5 mol/L PMP-甲醇溶液, 70 $^{\circ}$ C 反应 100 min, 50 μ L 0.3 mol/L HCl 中和后浓缩至干。加 1 mL 水复溶, 用 1 mL 氯仿萃取 3 次除去过量 PMP, 水相经 0.45 μ m 滤膜滤过后 HPLC 检测。色谱条件: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C; 流动相乙腈-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (17:83, pH 6.7); 体积流量 1.0 mL/min; PDA 检测器, 检测波长 245 nm。

2.1.5 电泳分析 醋酸纤维薄膜电泳分析多糖纯度^[19]。CS、DS、HP 标准品与 LLGAG 样品均配成 5 mg/mL 溶液。薄膜经 50%甲醇浸泡过夜、滤纸吸干后, 于 0.1 mol/L 乙酸钡缓冲液中浸泡 30 min。用超级加样器吸取约 10 μ L 样品, 在距阴极 1.5 cm 处点样约 0.5 μ L (糙面向下、点样处朝负极), 电泳槽稳定 10 min 后于 61 V 恒压电泳 1 h 55 min, 经阿利新蓝染色 15 min、2%醋酸脱色 10 min 后自然风干。

2.1.6 红外光谱 (infrared spectroscopy, IR) 分析 采用溴化钾压片法检测多糖样品的红外吸收光谱。取 2 mg LLGAG 样品与干燥溴化钾粉末研磨混匀后压片, 在 L1600400 Spectrum TWO 傅里叶变换红外光谱仪上扫描, 波数 4 000~400 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。

2.2 基于“bottom up”策略的 LLGAG 结构解析

2.2.1 多糖解聚产物的制备 参照本课题组海参脱乙酰脱氨基解聚方法略作改进^[8,20]。1 g LLGAG

与 250 mg 硫酸胍溶于 25 mL 水合胍, 氮气保护下 90 $^{\circ}$ C 搅拌反应 12 h, 乙醇沉淀后离心, 纯水溶解, 用截留相对分子质量为 500 的透析袋透析, 浓缩干燥得中间产物。中间产物溶于 5 mL 水, 加 2 倍体积 pH 4、5.5 mol/L 亚硝酸溶液, 室温反应 15 min 后调 pH 7 终止, 亚硝酸试纸检测阴性, 反应液经 Sephadex G-25 柱除盐, 浓缩冻干。冻干品溶于 5 mL 纯水, 加 0.25 mol/L 硼氢化钠 50 $^{\circ}$ C 反应 2 h, 冷却后调 pH 3 分解过量硼氢化钠, 再回调至中性, 浓缩后经 Sephadex G-10 柱除盐, 浓缩冻干得脱乙酰脱氨基解聚产物 dLLGAG。

2.2.2 寡糖片段的分离制备 dLLGAG 400 mg 经 Bio-Gel P-10 和 P-6 凝胶柱分离寡糖, 3 mL/管收集, 紫外检测 210 nm 吸收峰并收集馏份, 合并后经 Superdex™ 30 Increase 10/300 GL 分析柱检测, 采用 Bio-Gel P-2 凝胶柱除盐、减压浓缩、冻干。

2.2.3 核磁共振波谱 (NMR) 分析 样品 (10~20 mg) 经 2 次 D₂O 溶解-冻干循环后, 以含 0.05% TSP 内标的 0.5 mL D₂O 复溶。在 298 K、pH 7.0 条件下, 于 Bruker Avance 600/800 MHz 谱仪采集 1D 及 2D NMR 谱 (¹H、¹³C、DEPT-135、COSY、TOCSY、ROESY、HSQC、HMBC、HSQC-TOCSY)。参数设置参照文献报道^[21]: ¹³C 谱数据点 32 k, 弛豫延迟 2 s, 扫描次数 4 096; HMBC 为 1 024 $\times$ 160 复数点, 每增量扫描 64 次。

2.3 抗凝血及 iFXase 抑制活性检测

2.3.1 凝血 3 项检测 采用商品化试剂盒测定标准人血浆的 APTT、PT 和 TT^[22]。空白对照为 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4), 阳性对照为 HP 和 LMWH。多糖样品溶于 Tris-HCl 缓冲液配成 1.28 mg/mL 母液, 稀释得系列浓度。人凝血质控血浆以 1 mL 超纯水复溶, 室温静置 30 min 后使用。

APTT 法: 比色杯中加入 5 μ L 样品或空白对照与 45 μ L 血浆, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 min, 加 50 μ L 预热的 APTT 试剂孵育 3 min, 再加 50 μ L 预热的 0.02 mol/L CaCl₂ 溶液并计时。

PT 法: 5 μ L 样品与 45 μ L 血浆 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 min, 加 100 μ L 预热的 PT 试剂并计时。

TT 法: 10 μ L 样品与 90 μ L 血浆 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 min, 加 50 μ L 预热的 TT 试剂并计时。各浓度平行测定 3 次取平均值, 以空白对照为零浓度, 绘制浓度-效应曲线, 线性拟合计算凝血时间延长 1 倍所需的样品浓度。

2.3.2 iFXase 抑制活性检测 按 FVIII:C 试剂盒检测 iFXase 抑制活性: 96 孔板中加入 30 μ L 系列浓度样品 (Tris-HCl 缓冲液为对照), 依次加入 30 μ L FVIII 溶液 (2 IU/mL)、30 μ L R2 溶液 (60 nmol/L IXa, 含 IIa、 Ca^{2+} 、PC/PS), 酶标仪混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 min; 再加 30 μ L R1 溶液 (50 nmol/L FX, 含 IIa 抑制剂), 混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 min; 最后加入 30 μ L 预热 R3 溶液 (8.4 nmol/L FXa 生色底物 SXa-11), 每 30 s 读取 405 nm 吸光值 (A_{405}), 以每分钟 A_{405} 的变化率表示 iFXase 活性^[16]。

3 结果与分析

3.1 LLGAG 的分离纯化及理化性质

通过酶解-碱解协同处理, 蓝指海星粗多糖的提取得率为 1.40%。粗多糖经 Amberlite FPA 98 Cl⁻ 阴离子交换树脂色谱柱分离纯化, 依照氯化钠洗脱梯度获得 0、0.5、1.0、2.0 mol/L 4 个组分, 其中 2 mol/L 组分经后续处理得到硫酸化多糖 LLGAG, 得率为 31.5% (按粗多糖质量计)。

高效凝胶渗透色谱分析显示, LLGAG 色谱峰形单一对称, 相对分子质量分布均一, 约为 38 000

(图 1-A); 醋酸纤维素薄膜电泳进一步证实其为电荷与相对分子质量均一的单一条带, 其迁移位置介于 DS 和 HP 之间 (图 1-B)。氯化钡明胶法中硫酸钾标准曲线回归方程为 $Y=5.871\ 1\ X+0.030\ 2$ ($R^2=0.996\ 8$), 测得 LLGAG 的硫酸基含量为 $(42.56\pm 0.17)\%$, 高于其他海星物种如 *Anthenoides laevigatus* 来源的硫酸化多糖 (38.53%)^[13]。单糖组成分析表明 (图 1-C), LLGAG 主要由 IdoA、GalNAc 和很少量的 Gal 构成, 物质的量比为 34.4:59.7:5.9。IR 结果显示 (图 1-D), LLGAG 在 $3\ 494\ \text{cm}^{-1}$ 处呈现强而宽的 O-H 与 N-H 伸缩振动峰, $2\ 969\ \text{cm}^{-1}$ 处为 C-H 伸缩振动峰, $1\ 648\ \text{cm}^{-1}$ 与 $1\ 425\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别对应羧酸根的不对称与对称伸缩振动, $1\ 249\ \text{cm}^{-1}$ 处的特征峰提示硫酸酯基 S=O 伸缩振动, $1\ 000\ \text{cm}^{-1}$ 处的系列吸收峰归属于糖环 C-O-C 和 C-OH 伸缩振动, $808\ \text{cm}^{-1}$ 和 $588\ \text{cm}^{-1}$ 处的吸收分别对应 C-O-S 伸缩振动和 S-O 的弯曲振动, 以上特征均符合硫酸化 GAG 的典型结构。

3.2 “bottom up” 策略解析 LLGAG 的结构

3.2.1 寡糖片段的分离纯化 本研究采用 “bottom-

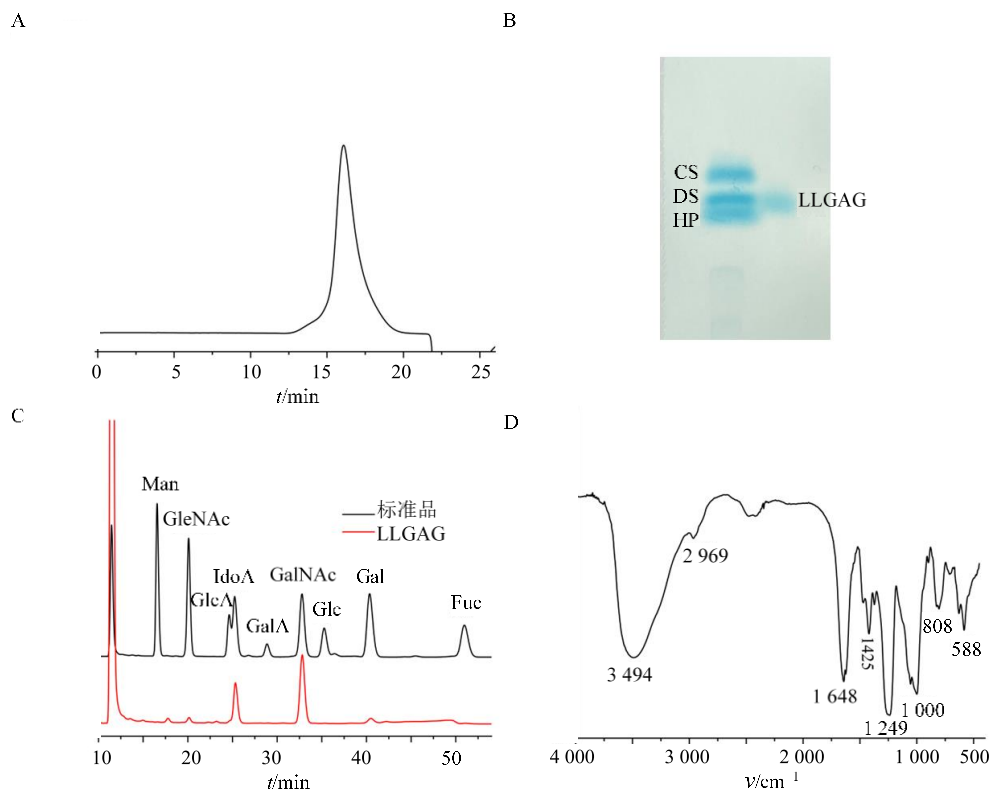


图 1 LLGAG 的 HPGPC 色谱图 (A)、醋酸纤维素薄膜电泳图 (B)、单糖组成分析色谱图 (C) 及红外光谱图 (D)
Fig. 1 HPGPC chromatogram (A), cellulose acetate film electrophoresis (B), monosaccharide composition chromatogram (C), and infrared spectrum (D) of LLGAG

up”策略,即通过酶解或化学解聚等解聚方法将高分子化合物降解为低相对分子质量片段并分别解析其结构以推断原始高分子组成,该策略常用于蛋白质结构解析^[23]。具体而言,利用课题组前期建立的糖苷键选择性脱酰脱氨基解聚技术,将 1 g 高分子量 LLGAG 降解,获得 870 mg 低相对分子质量解聚产物 dLLGAG,得率 71.3%。经 Bio-Gel P10 柱层析分离 dLLGAG 得到 5 个寡糖及多糖组分,命名为 dLL-1~5。Superdex™ 30 Increase 10/300 GL 柱分析结果显示(图 2-A),dLLGAG 包含不同相对分子质量或聚合度的寡糖片段,表明脱酰脱氨基解聚选择性地断裂了乙酰氨基糖或氨基糖位点的糖苷键,生

成了由 GAG 二糖结构单元组成的寡糖片段(如二、四、六、八糖等);该色谱柱对多肽排阻限为 7 000,对低聚合度寡糖具有更高分辨率,故 dLL-1 和 dLL-2 呈现 3 个明显寡糖片段色谱峰,而 dLL-3~5 因高分子寡糖片段分辨率不足均显示单一色谱峰。寡糖片段单糖组成分析色谱图见图 2-B, dLL-2~5 的单糖组成与 LLGAG 基本一致,主要由 IdoA、GalNAc 和很少量的 Gal 组成。dLL-1 单糖组成分析仅检测到 IdoA,这是由于 GalNAc 在脱乙酰-脱氨基解聚反应过程中转化为 2,5-脱水-塔罗糖醇(anTal-ol),而该衍生物在常规单糖组成分析方法中未能被有效检出。据此推测, dLL-1 是由 IdoA 和 anTal-ol 组成的二糖结构。

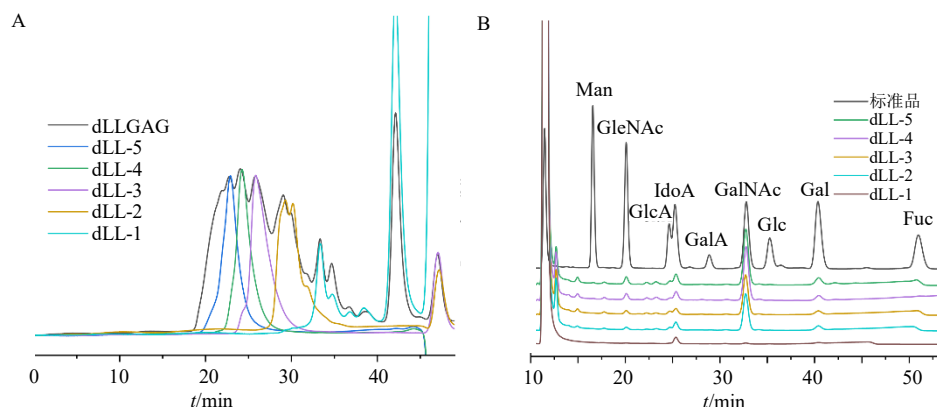


图 2 dLLGAG 及其寡糖片段的 HPGPC 色谱图 (A) 及单糖组成分析色谱图 (B)

Fig. 2 HPGPC chromatograms (A) and monosaccharide composition analysis chromatograms (B) of dLLGAG and its oligosaccharide fragments

3.2.2 低相对分子质量寡糖组分的 NMR 图谱解析 NMR 是解析多糖及寡糖精细结构的核心分析手段^[24]。本研究借助 2D NMR 技术(图 3、4)进一步阐明了 dLL-1 和 dLL-2 等的化学结构特征,其化学位移归属见表 1、2。

dLL-1 是主要由 3 种二糖构成的混合物。IdoA 残基(图 3-A~C)的特征性低场位移信号(H-1: δ 5.00~5.27; H-5: δ 4.70~4.78)使其得以明确指认^[25-26]。anTal-ol 单元作为脱乙酰-脱氨基解聚反应生成的还原端产物,其鉴定基于本课题组前期对海参 FG 的研究^[8,16,20]。与文献报道^[12,27]的非硫酸化对照物化学位移数据比较表明,IdoA 糖残基 A 和 B 在 O-2 和 O-3 位的氢、碳信号均呈现显著低场位移,证实其为 2,3-二-O-硫酸化结构;糖残基 C 仅 O-3 位出现明显低场位移,提示为 3-O-硫酸化取代。anTal-ol 糖残基 D 和 F 的 O-4 和 O-6 位发生显著低场位移,表明这些位点存在硫酸酯取代,而残基 E

仅在 O-6 位显示硫酸化特征,与以往报道的其他海参及海星物种相关残基数据相符^[8,13]。糖残基间的连接方式由 ROESY 相关信号进一步确证(图 3-C): A→D 的 O-3 位, B→E 的 O-3 位,以及 C→F 的 O-3 位。综上, dLL-1 主要包含 3 种寡糖,其结构如图 5-a 所示。

dLL-2 的 NMR 谱图较 dLL-1 更为复杂,但信号清晰可辨,易于归属。结果表明其主要包含 4 种 α -L-IdoA (I^a、I^b、I^c、tI)、2 种 β -D-GalNAc (A^a 和 A^b) 及 2 种 anTal-ol (T^a 和 T^b) 残基,共 8 种不同微环境存在的糖单元(表 2)。该复杂性源于糖链内部不同的糖苷键连接方式、硫酸化取代模式及化学环境差异。与 dLL-1 相比, dLL-2 在 HSQC 谱中额外出现了 GalNAc (A^a 和 A^b) 信号,其 C-2 化学位移(δ 54.4)较其他残基处于更高场。 α -L-IdoA 残基主要为 2,3-二-O-硫酸化 (I^a、I^b、tI),同时存在 3-O-单硫酸化形式。 β -D-GalNAc 与 D-anTal-ol 单元几

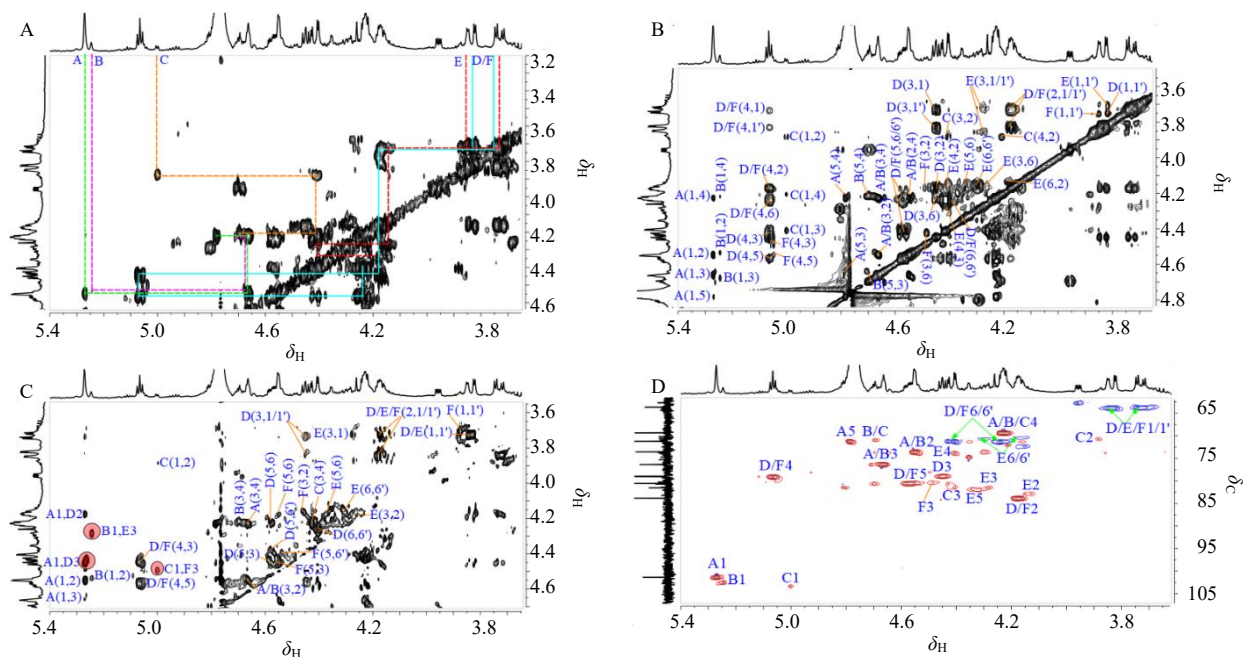
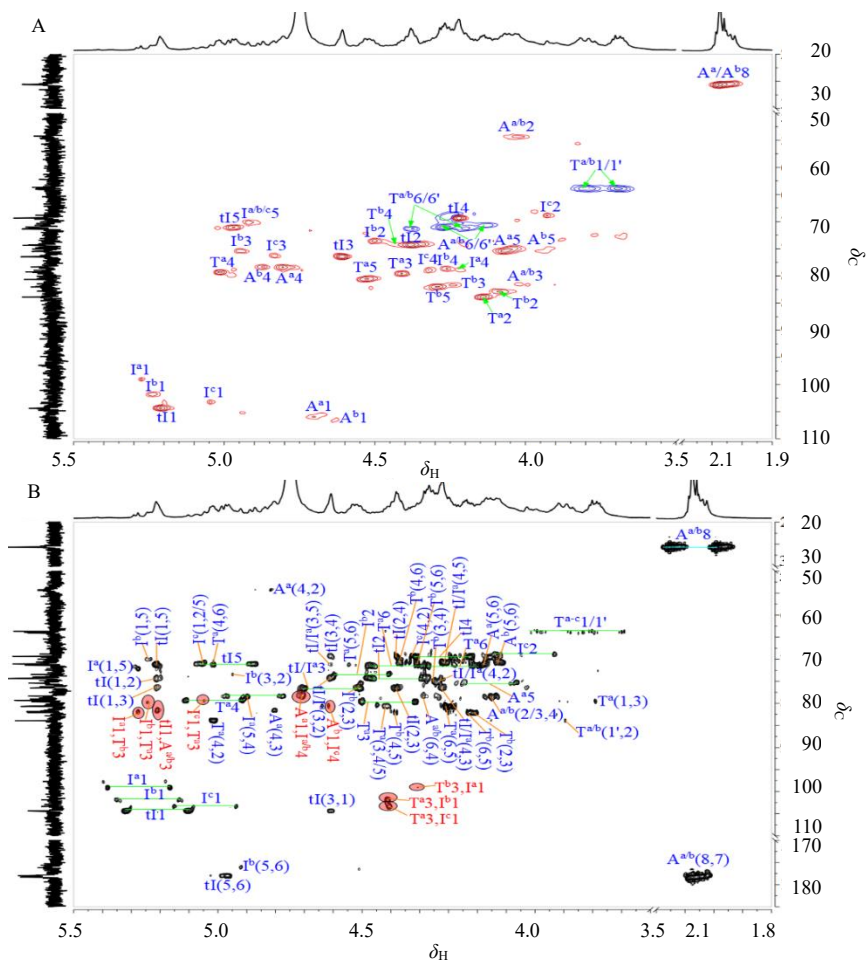
图3 dLL-1的 ^1H - ^1H COSY (A)、TOCSY (B)、ROESY (C) 和 HSQC (D) 谱图Fig. 3 ^1H - ^1H COSY (A), TOCSY (B), ROESY (C), and HSQC (D) spectra of dLL-1图4 dLL-2的 ^1H - ^{13}C HSQC (A) 和 HMBC (B) 谱图Fig. 4 ^1H - ^{13}C HSQC (A) and HMBC (B) spectra of dLL-2

表 1 dLL-1 化学位移归属及糖残基连接关系
Table 1 Chemical shift assignments and glycosyl linkage patterns of dLL-1

糖残基	氢/碳	δ						连接方式
		1	2	3	4	5	6	
A (α -L-IdoA _{2S3S})	H	5.27	4.55	4.66	4.23	4.78		A1-D3
	C	101.4	73.5	76.4	69.3	71.2	178.3	
B (α -L-IdoA _{2S3S})	H	5.25	4.53	4.68	4.22	4.70		B1-E3
	C	102.6	73.5	76.4	69.3	71.2	178.3	
C (α -L-IdoA _{3S})	H	5.00	3.88	4.41	4.22	4.70		C1-F3
	C	103.4	70.8	81.3	69.3	71.2	178.3	
D (Tal-ol _{4S6S})	H	3.73/3.82	4.17	4.44	5.07	4.57	4.23/4.41	
	C	63.7	83.9	78.9	79.1	80.6	71.3	
E (Tal-ol _{6S})	H	3.71/3.80	4.14	4.28	4.40	4.33	4.17/4.30	
	C	63.7	82.1	81.5	74.0	82.0	70.6	
F (Tal-ol _{4S6S})	H	3.75/3.85	4.17	4.49	5.04	4.55	4.20/4.41	
	C	63.7	83.2	80.2	79.7	80.2	70.6	

加粗表示糖苷键连接位点；斜体表示硫酸酯基连接位点。

Bold indicates glycosidic linkage sites; italics indicate sulfate ester substitution sites.

表 2 dLL-2 化学位移归属及糖残基连接关系
Table 2 Chemical shift assignments and glycosyl linkage patterns of dLL-2

糖残基	氢/碳	δ								连接方式
		1	2	3	4	5	6	7	8	
I ^a (α -1,4-IdoA _{2S3S})	H	5.28	4.32	4.61	4.22	4.71				I ^a 1-T ^b 3
	C	99.1	74.1	76.3	78.9	71.7	178.3			
I ^b (α -1,4-IdoA _{2S3S})	H	5.24	4.51	4.96	4.27	4.92				I ^b 1-T ^a 3
	C	101.9	73.7	75.5	78.7	70.0	176.1			
tI (t - α -IdoA _{2S3S})	H	5.21	4.38	4.61	4.22	4.97				tI1-A ^{a/b} 3
	C	104.4	74.4	76.5	69.4	71.2	178.3			
I ^c (α -1,4-IdoA _{3S})	H	5.05	3.93	4.84	4.32	4.92				I ^c 1-T ^a 3
	C	103.4	68.9	76.3	79.0	70.0				
A ^a β -1,3-GalNAc _{4S6S}	H	4.70	4.05	4.02	4.81	4.07	4.15/4.28		2.07	A ^a -I ^{a/b} 4
	C	105.9	54.4	81.5	78.4	75.3	70.9	178.7	25.6	
A ^b β -1,3-GalNAc _{4S6S}	H	4.62	4.03	4.00	4.87	4.03	4.13/4.28		2.04	A ^b -I ^c 4
	C	106.6	54.4	81.5	78.4	75.4	70.6	178.4	25.6	
T ^a (Tal-ol _{4S6S})	H	3.69/3.79	4.14	4.41	5.02	4.53	4.20/4.36			
	C	63.9	83.9	79.6	79.3	80.6	71.3			
T ^b (Tal-ol _{6S})	H	3.71/3.82	4.08	4.25	4.39	4.30	4.17/4.30			
	C	63.9	82.8	81.6	74.2	82.1	70.6			

加粗表示糖苷键连接位点；斜体表示硫酸酯基连接位点。

Bold indicates glycosidic linkage sites; italics indicate sulfate ester substitution sites.

乎均为 4,6-二-*O*-硫酸化取代, 且 anTal-ol 兼有 6-*O*-单硫酸化模式, 此取代特征与 dLL-1 一致。糖基化位点由 I^a、I^b、I^c 的 H-4/C-4 以及 A^a、A^b、T^a、T^b 的 H-3/C-3 低场位移得以确证。HMBC 相关信号 (图 4-B) 揭示: tI 连接于 A^a/A^b 的 *O*-3 位, A^a/A^b 与 I^a/I^b 的 *O*-4 位相连, I^a 与 T^b 的 *O*-3 位连接, I^b/I^c 与 T^a 的 *O*-3 位连接, 由此构建出 dLL-2 所包含的四糖片段

结构 (图 5-b)。

基于 dLL-1 与 dLL-2 组分中寡糖片段的结构特征, 可推导出 LLGAG 的结构组成 (图 5-c)。LLGAG 是一种极其罕见的 DS 样 GAG, 其核心由 *L*-IdoA_{2S3S}- α -1,3-*D*-GalNAc_{4S6S} (2S3S4S6S) 基序的二糖单元构成, 同时含有 3S4S6S 和 2S3S6S 等基序。IdoA_{2S3S} 残基在自然界中较为少见。单糖组

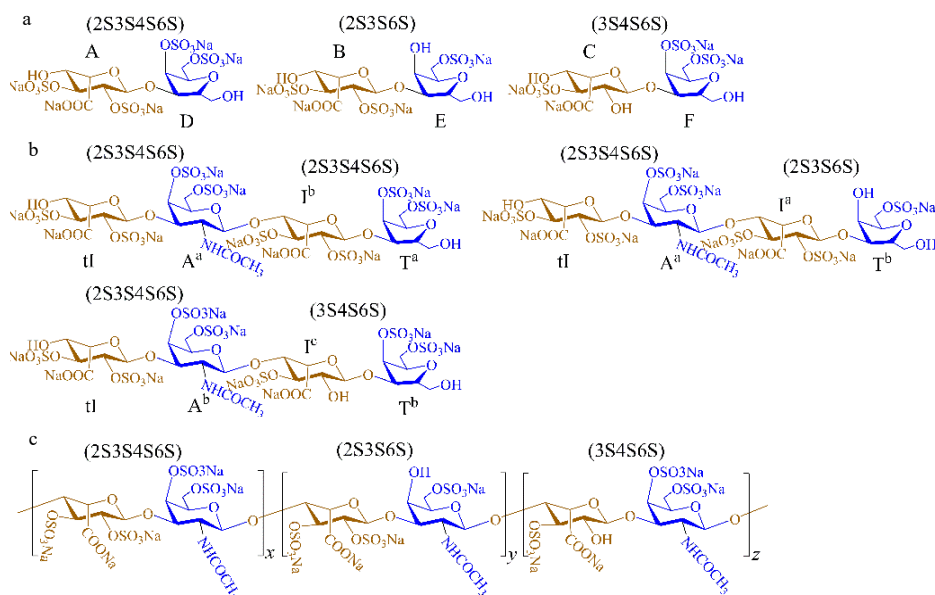


图5 dLL-1 (a)、dLL-2 (b) 及 LLGAG (c) 的化学结构

Fig. 5 Chemical structures of dLL-1 (a), dLL-2 (b), and LLGAG (c)

成分分析显示,LLGAG 还含有微量 GlcNAc 和 Gal, 但含量过低, 未能通过 NMR 图谱确认其位置, 其是否位于糖链与蛋白连接的连接域(类似海参 FG^[27]), 仍有待通过对更长糖片段的精细分离加以阐明。

普通动物源 DS 主要由 *L*-IdoA- α -1,3-*D*-GalNAc_{4S}(4S)基序二糖单元构成,并含有少量 2S4S 及 0S 基序。近年来,Bilan、Ustyuzhanina 等及本课题组从海星、海蛇尾等棘皮动物中分离获得多种结构新颖的 DS 样及 CS-DS 杂合型 GAG^[12-13,28-29]。例如,从 *L. anthosticta* 海星中提取的过硫酸化 DS 由 2S3S4S 和 2S3S 基序的二糖单元构成,而 *L. fusca* 海星来源的 DS 则包含 2S3S4S、2S3S 和 3S4S 等基序。此外, *A. laevigatus* 的 CS-DS 杂合链主要由含 IdoA/GlcA 与 GalNAc 的 2S3S4S 基序二糖单元组成,掌枝蛇尾 *Trichaster palmiferus* 来源的 DS 样聚糖则主要由 2S3S4S、2S3S6S 和 2S4S 基序构成。迄今未见报道含有 2S3S4S6S、3S4S6S 及 2S3S6S 等罕见取代模式的 DS 样结构,这一独特性使 LLGAG 成为该家族中 1 个新颖成员。

3.3 体外抗凝血活性

凝血途径包括内源性、外源性及其共同凝血途径,其中凝血三项是评估血液凝固功能的关键指标。APTT 反映内源性凝血途径功能,PT 评估外源性凝血途径,而 TT 则用于监测共同途径中凝血酶介导的纤维蛋白形成^[7-8]。

如图 6 所示,LLGAG 及其寡糖片段 dLL-2~5 均表现出显著的内源性凝血抑制活性,将人标准血浆 APTT 时间加倍所需的质量浓度为 1.76~34.81 $\mu\text{g/mL}$ 。其中,LLGAG 与 dLL-5 的活性与 LMWH (1.95 $\mu\text{g/mL}$)相当或更强,dLL-2 活性较弱,而 dLL-1 无活性,表明寡糖片段发挥抗凝作用需具备一定链长 ($\text{dp} \geq 4$)。在共同凝血途径方面,LLGAG 对 TT 的延长作用显著(加倍质量浓度 1.65 $\mu\text{g/mL}$),与 LMWH (0.66 $\mu\text{g/mL}$)相近,提示其对该途径影响较强,与以往报道的海参 FG 原型多糖类似^[8,20]。然而,dLL-2~5 对 TT 的影响明显减弱,其加倍质量浓度分别为 >128、77.40、36.99、11.45 $\mu\text{g/mL}$,提示随链长增加抗凝活性呈增强趋势。对外源性凝血途径而言,LLGAG 虽具有一定的 PT 延长作用(加倍质量浓度 28.96 $\mu\text{g/mL}$),但活性远低于 HP (3.11 $\mu\text{g/mL}$);在 128 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度内,dLL-2~5 对 PT 均无显著影响,表明其不干扰外源性凝血途径。

综上所述,与原型多糖 LLGAG 相比,其解聚产生的寡糖片段(尤其是 dLL-2~5)对内源性凝血途径表现出强效且高选择性的抑制作用,对共同途径影响有限,对外源性途径无显著影响。生理学及病理学基础研究表明,外源性凝血途径与共同凝血途径中的凝血因子是生理性止血及维持基本生命功能所必需,而内源性凝血途径并非止血功能所必需^[1,15,30]。因此,靶向抑制内源性凝血途径的药物有

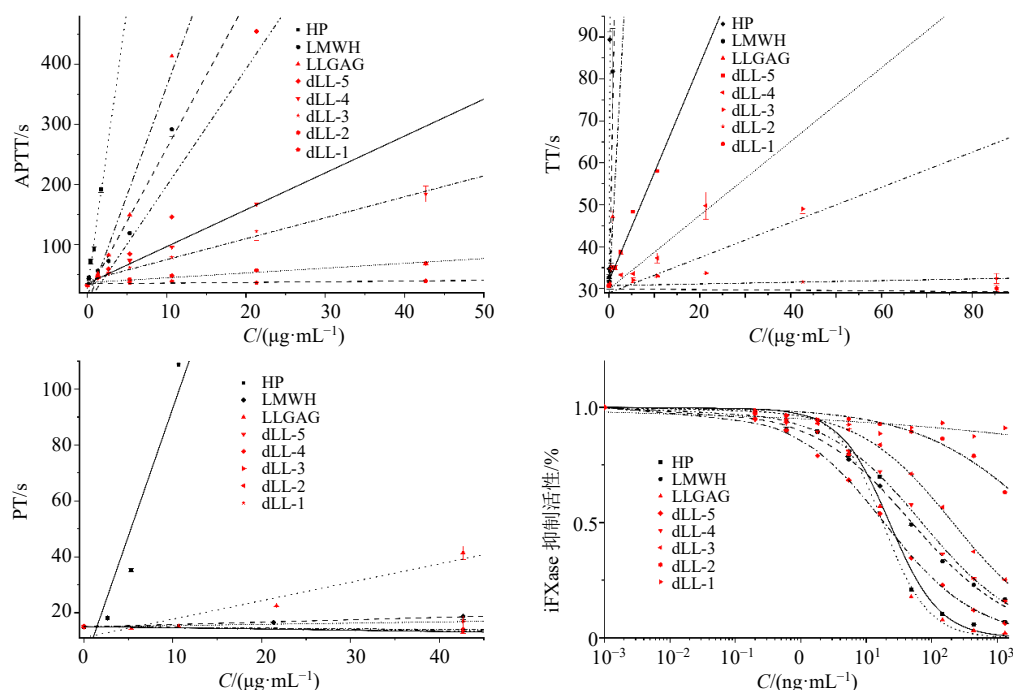


图 6 LLGAG 及其寡糖片段 dLL-1~5 的抗凝血活性及 iFXase 抑制活性

Fig. 6 Anticoagulant activity and iFXase inhibitory activity of LLGAG and its oligosaccharide fragments dLL-1~5

望实现“抗凝防栓”与“干扰正常止血功能”的分离，即在有效预防血栓形成的同时，不损害机体的正常止血能力。基于这一科学理论，前期研发的海参抗凝新药 LFG-53 已于 2021 年和 2022 年分别获得美国 FDA 和中国 NMPA 的临床研究批件（批件号：IND153593，CXSL2200305），并已完成 I 期临床研究^[6-8]。鉴于 LLGAG 来源的寡糖片段对高选择性内源性凝血途径具有强效抑制作用，其作为低出血风险抗凝药物的前体化合物具有良好应用前景。

iFXase (FIXa-FVIIIa 复合物) 是内源性凝血途径末端的限速酶，但其选择性抑制剂除海参 LFG-53 及其寡糖外鲜有报道^[1,15,30]。如图 6-D 所示，LLGAG 与 HP 对 iFXase 的抑制活性相近， IC_{50} 分别为 17.75、22.61 ng/mL，均优于 LMWH (49.57 ng/mL)；寡糖片段 dLL-4 和 dLL-5 亦呈现较强抑制活性 (IC_{50} 分别为 70.91、18.71 ng/mL)，dLL-3 活性较弱 (IC_{50} 为 210.44 ng/mL)，而 dLL-1 与 dLL-2 在 2 000 ng/mL 质量浓度下未检出活性。上述结果表明，LLGAG 发挥 iFXase 抑制活性的基本结构至少需要 3 个二糖单元。

HP 抗凝的最简活性片段为肝素五糖，但其及 LMWH 的主要作用靶点为 ATIII，通过 ATIII 抑制 FIIa 和 FXa；而肝素五糖仅具有显著的 ATIII 依赖性抗 FXa 活性，对 iFXase 无抑制作用^[31]。海参 LFG-

53 为高选择性 iFXase 抑制剂，其最简活性片段为 7~9 糖^[7-8,16]。本研究发现 LLGAG 来源寡糖亦能有效抑制 iFXase 活性。由此可见，结构特征决定其活性机制，强效抑制 iFXase 所需的结构并非局限于肝素及 FG 类化合物，LLGAG 的 iFXase 抑制构效关系有待深入研究。机制方面，HP、LMWH 及海参 FG 类化合物均通过结合 FIXa、阻碍 FIXa 与 FVIIIa 形成 iFXase 而发挥抑制作用^[32]，而 LLGAG 及其解聚产物和寡糖是否具有类似作用机制尚待阐明。后续我们也将进一步开展成药性评价等实验，以全面评估其开发潜力。

4 讨论

本研究采用酶解-碱解联用技术结合强阴离子交换色谱，首次从蓝指海星中分离获得 1 种结构新颖的 DS 样 GAG (LLGAG)。该多糖主要由 *L*-IdoA 与 GalNAc 构成，并含有微量 Gal 残基。通过脱酰-脱氨基解聚法制备了一系列寡糖片段，并运用一维/二维 NMR 技术对低相对分子质量组分 dLL-1 和 dLL-2 进行了精确结构解析，进而推定 LLGAG 的核心结构单元为罕见的 *L*-IdoA_{2S3S}- α 1,3-*D*-GalNAc_{4S6S}、*L*-IdoA_{2S3S}- α 1,3-*D*-GalNAc_{6S} 及 *L*-IdoA_{3S}- α 1,3-*D*-GalNAc_{4S6S} 等二糖序列。体外抗凝血活性评价显示，LLGAG 及其寡糖片段 dLL-2~5 均具有显著的内源性凝血途径抑制活性，其中

LLGAG 与 dLL-5 的效力与 LMWH 相当甚至更优, 且对共同及外源性凝血途径的影响显著降低。在 iFXase 抑制方面, LLGAG 与 dLL-5 的 IC₅₀ 值均为 17~18 ng/mL, 与 HP 活性相当, 较 LMWH 强约 2.8 倍, 整体抗凝特征与 HP 相似, 但具体作用机制、构效关系及成药性等仍有待深入评价。综上, 本研究首次揭示了蓝指海星来源 GAG 的独特化学结构及其强效 iFXase 抑制活性, 为开发低出血风险、安全可靠的海洋源 HP 替代药物提供了理论依据与候选分子。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mackman N, Bergmeier W, Stouffer G A, *et al.* Therapeutic strategies for thrombosis: New targets and approaches [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(5): 333-352.
- [2] Douaisi M, Paskaleva E E, Fu L, *et al.* Synthesis of bioengineered heparin chemically and biologically similar to porcine-derived products and convertible to low MW heparin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(14): e2315586121.
- [3] Xu Y M, Masuko S, Takieddin M, *et al.* Chemoenzymatic synthesis of homogeneous ultralow molecular weight heparins [J]. *Science*, 2011, 334(6055): 498-501.
- [4] 高玥, 许倩楠, 蔡明刚, 等. 海洋来源药食同源品开发利用研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(17): 5455-5464.
- [5] 李泽宇, 郝二伟, 李卉, 等. 抗肿瘤作用的海洋中药 [J]. *中草药*, 2022, 53(14): 4527-4544.
- [6] 刘梓栋, 符洁雯, 时响, 等. 海洋棘皮动物多糖新药挖掘进展: 分离制备、结构解析及药理活性 [J]. *药学报*, 2025, 60(7): 2106-2121.
- [7] Li H, Yuan Q X, Lv K L, *et al.* Low-molecular-weight fucosylated glycosaminoglycan and its oligosaccharides from sea cucumber as novel anticoagulants: A review [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 251: 117034.
- [8] Zhao L Y, Wu M Y, Xiao C, *et al.* Discovery of an intrinsic tenase complex inhibitor: Pure nonasaccharide from fucosylated glycosaminoglycan [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(27): 8284-8289.
- [9] 徐思嘉, 肖宁, 曾晓起. 中国海域海盘车科(棘皮动物门, 海星纲)种类记述 [J]. *海洋科学*, 2018, 42(10): 53-63.
- [10] Williams S T, Heyworth S M, Kano Y, *et al.* The blue advantage: A novel blue carotenoprotein pigment in the tropical seastar *Linckia Laevigata* is an antioxidant defence against extreme environmental stress [J]. *Mar Biol*, 2025, 172(2): 31.
- [11] 王云达, 李高燕, 郭庆梅, 等. 市售海星类药材的鉴别研究 [J]. *中药材*, 2024, 47(4): 863-868.
- [12] Ustyuzhanina N E, Bilan M I, Dmitrenok A S, *et al.* Oversulfated dermatan sulfate and heparinoid in the starfish *Lysastrosoma Anthosticta*: Structures and anticoagulant activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 261: 117867.
- [13] Shi X, Shi M H, Fu J W, *et al.* Structure-activity relationship of a potent anti-FXase and antithrombotic chondroitin sulfate-dermatan sulfate hybrid bearing 2, 3-O-sulfated motifs from *Anthenoides Laevigatus* [J]. *Carbohydr Polym*, 2026, 375: 124752.
- [14] 李军, 蒋碧蓉, 王海妹, 等. 海星多糖的分离纯化及鉴定 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31(02): 122-124.
- [15] Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis [J]. *Nature*, 2008, 451(7181): 914-918.
- [16] Yuan Q X, Li H, Wang Q, *et al.* Deaminative-cleaved S. monotuberculatus fucosylated glycosaminoglycan: Structural elucidation and anticoagulant activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2022, 298: 120072.
- [17] Dodgson K S, Price R G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides [J]. *Biochem J*, 1962, 84(1): 106-110.
- [18] Yuan Q X, Zhao L Y, Cha Q Q, *et al.* Structural characterization and immunostimulatory activity of a homogeneous polysaccharide from *Sinonovacula constricta* [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(36): 7986-7994.
- [19] Yao Y, Tang H, Ma H Q, *et al.* Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from swim bladder: Isolation, structural analysis, and anticoagulant activity [J]. *Mar Drugs*, 2024, 22(1): 9.
- [20] Zhao L Y, Lai S S, Huang R, *et al.* Structure and anticoagulant activity of fucosylated glycosaminoglycan degraded by deaminative cleavage [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 98(2): 1514-1523.
- [21] Yuan Q X, Liang R Y, Lv K L, *et al.* Structural characterization of a *Chlorella* heteropolysaccharide by analyzing its depolymerized product and finding an inducer of human dendritic cell maturation [J]. *Carbohydr Polym*, 2024, 333: 122000.
- [22] Tang H, Huang J W, Yuan Q X, *et al.* A regular *Chlorella* mannogalactan and its sulfated derivative as a promising anticoagulant: Structural characterization and anticoagulant activity [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, 314: 120956.
- [23] Zhang Y Y, Fonslow B R, Shan B, *et al.* Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics [J]. *Chem Rev*, 2013, 113(4): 2343-2394.

- [24] 赵宁, 韩著, 简颖琳, 等. 中药多糖结构表征及质量评价研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7491-7506.
- [25] Mulloy B, Forster M J, Jones C, *et al.* The effect of variation of substitution on the solution conformation of heparin: A spectroscopic and molecular modelling study [J]. *Carbohydr Res*, 1994, 255: 1-26.
- [26] Sudo M, Sato K, Chaidedgumjorn A, *et al.* ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis for determination of glucuronic and iduronic acids in dermatan sulfate, heparin, and heparan sulfate [J]. *Anal Biochem*, 2001, 297(1): 42-51.
- [27] Pan Y, Sun H F, Gu X, *et al.* Oligosaccharide-assisted resolution of holothurian fucosylated chondroitin sulfate for fine structure and P-selectin inhibition [J]. *Carbohydr Polym*, 2025, 351: 123145.
- [28] Yuan Q X, Liu Z D, Yao Y, *et al.* A novel glycosaminoglycan from the brittlestar *Trichaster Palmiferus*: Structure and low-bleed anticoagulant-antithrombotic action [J]. *Carbohydr Polym*, 2026, 379: 125036.
- [29] Bilan M I, Anisimova N Y, Tokatly A I, *et al.* Glycosaminoglycans from the starfish *Lethasterias Fusca*: Structures and influence on hematopoiesis [J]. *Mar Drugs*, 2023, 21(4): 205.
- [30] Lin L S, Zhao L Y, Gao N, *et al.* From multi-target anticoagulants to DOACs, and intrinsic coagulation factor inhibitors [J]. *Blood Rev*, 2020, 39: 100615.
- [31] Wu M Y, Wen D D, Gao N, *et al.* Anticoagulant and antithrombotic evaluation of native fucosylated chondroitin sulfates and their derivatives as selective inhibitors of intrinsic factor Xase [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 92: 257-269.
- [32] Xiao C, Zhao L Y, Gao N, *et al.* Nonasaccharide inhibits intrinsic factor xase complex by binding to factor IXa and disrupting factor IXa-factor VIIIa interactions [J]. *Thromb Haemost*, 2019, 119(5): 705-715.

[责任编辑 王文倩]