·综　述·

肝素前体 heparosan 的制备及药学应用研究进展

冯昭龙，刘纯慧*(山东大学药学院与国家糖工程技术研究中心，济南 250012)

摘要: 目的　综述肝素前体 heparosan 的制备技术及其在药学领域应用的最新研究进展，为其进一步研究和开发提供参考。**方法**　查阅国内外关于 heparosan 的制备方法及药学应用的文献，对其分析、概括和总结。**结果**　现有 heparosan 的制备方法主要包括微生物发酵提取法、代谢工程改造菌生产法、体外重组酶合成法；heparosan 不仅可作为起始原料用于非动物源肝素的生物合成和非抗凝肝素衍生物的制备，还可作为药物载体。**结论**　发酵工程、代谢工程及酶工程等技术的成功应用推动 heparosan 的制备规模显著提高，但尚难以定制合成分子量可控的 heparosan 及衍生物；目前 heparosan 在药学领域的应用发展迅速，新的制备与结构改造策略将进一步拓宽其在药物发现与研究中的应用。

关键词: heparosan; 肝素; 多糖; 制备方法; 药学应用
中图分类号：R943　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1007-7693(2019)01-0114-06
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.01.024
引用本文：冯昭龙, 刘纯慧. 肝素前体 heparosan 的制备及药学应用研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1): 114-119.

Research Progress of the Preparation and Pharmaceutical Applications of Heparosan

FENG Zhaolong, LIU Chunhui*(*School of Pharmaceutical Sciences & National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To systematically review the latest research achievement in the preparation and the pharmaceutical applications of heparosan to provide a reference for its further research and development. **METHODS**　The literatures at home and abroad were collected, summarized and analyzed on preparation methods of heparosan and its pharmaceutical application. **RESULTS**　The present methods for the preparation of heparosan mainly included extraction from bacterial fermentation liquid, production by metabolic engineering bacteria and *in vitro* synthesis using recombinant enzymes. Heparosan could be used for the biosynthesis of non-animal derived heparin and preparation of non-anticoagulant heparin analogs as starting materials, as well as for drug delivery. **CONCLUSION**　Heparosan has been produced at a large scale due to the successful application of fermentation engineering, metabolic engineering, and enzyme engineering, nevertheless, which still can't allow for tailored synthesis of heparosan with controllable molecular weight and its derivatives. To date, heparosan has been rapidly applied in the pharmaceutical field, and new strategies for the production and structure modifications will further expand its application in drug discovery and research.

KEYWORDS: heparosan; heparin; polysaccharide; preparation methods; pharmaceutical application

肝素前体heparosan是Vann等[1]最早从引起泌尿道感染的大肠杆菌 K5(*Escherichia coli* 010 : K5 : H4)的荚膜中分离得到的，经鉴定为 *β-D*-葡萄糖醛酸和 *N*-乙酰-*α-D*-葡萄糖胺二糖重复单元[-GlcA-*β*(1,4)-GlcNAc-α (1,4)-]$_n$组成的糖胺聚糖。此后，又先后从 D 型多杀性巴氏杆菌[2](*Pasteurella multocida* Type D)、副鸡禽杆菌[3](*Avibacterium paragallinarum*)等分离得到二糖重复单元相同、相对分子质量(M_r)不同的荚膜多糖。从结构上分析，heparosan 可看作非硫酸化、非异构化的肝素前体，经适当修饰能够得到非动物源的肝素或其类似物，因此受到越来越多的关注和重视[4-5]。此外，作为致病细菌逃避宿主免疫反应的重要机制分子，heparosan 具有免疫原性低、生物相容性好等优点，适合开发成为一种安全、可靠的药物载体[6-7]。本文对 heparosan 的制备及其在药学领域的应用进展进行综述。

1　Heparosan 的制备

Heparosan 作为一种微生物多糖，传统的制备方法主要通过微生物发酵提取。近年来，代谢工

基金项目：国家自然科学基金(21372146)；山东省科技重大专项(2015ZDJS04002)
作者简介：冯昭龙，男，硕士生　Tel: 18353122021　E-mail: 923688019@qq.com　***通信作者**：刘纯慧，男，博士，教授　Tel: (0531)88380288　E-mail: liuchunhui@sdu.edu.cn

程的兴起，使代谢工程改造菌生产特定分子量分布、来源安全的 heparosan 成为可能。而体外重组酶法合成 heparosan 则为肝素和硫酸乙酰肝素寡糖的体外合成提供原料。以上 3 种方法各有优点和弊端，应根据研究需要进行选择。

1.1 微生物发酵提取

已经鉴定的能产生 heparosan 的微生物之中，以大肠杆菌 K5 菌株发酵生产 heparosan 的研究最早、亦较为深入。Vann 等[1]以酪蛋白氨基酸、酵母提取物、葡萄糖为培养基，培养大肠杆菌 K5 至对数生长期后期，发酵液中的菌体细胞和多糖用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)沉淀，后经解离、醇沉、苯酚提取等步骤得到 heparosan，分子排阻色谱法测得其 M_r 约为 20 000。尽管核酸、蛋白质杂质含量较低，但从荚膜提取的 heparosan 产量仅为 40~50 mg·L^{-1}。若将培养基的酵母提取物替换为酵母自溶物，菌种用发酵罐培养 15 h，发酵滤液经超滤浓缩、酶法除蛋白、醇沉得到胞外多糖，其组成和结构与荚膜 heparosan 相同，最大产量则提高约 7 倍。在此基础上，经 DEAE Sephacel 阴离子交换柱纯化可得到 M_r 分别为 16 000 与 1 500 的 2 种组分，二者的比值取决于胞外 K5 裂解酶的水平。而改变培养类型和配方可调控裂解酶的活性，从而得到比例确定的 2 种多糖组分[8]。

为提高 heparosan 的发酵生产水平，Wang 等[9]比较了大肠杆菌 K5 在 LB 培养基以及合成培养基(M9 培养基、甘油合成培养基、葡萄糖合成培养基)中合成 heparosan 的能力。在相同的摇瓶培养条件下，细菌在不同培养基中产生的胞外多糖的产量差别可达到 7 倍，且 M_r 差别较大；其中采用合成培养基时合成的多糖纯度(>95%)明显高于 LB 培养基(约 85%)。以葡萄糖为碳源、在氧气充足的情况下，指数补料策略可为大肠杆菌 K5 在发酵罐中快速生长提供充足的营养成分、避免过量葡萄糖积累产生有害物质，从而使 heparosan 的最大产量达到 15 g·L^{-1}，完全可满足工业生产要求，为 heparosan 的研究应用奠定基础。

1.2 代谢工程改造菌生产

Heparosan 的生物合成在细菌细胞质膜的内表面上进行，是一个在糖链的非还原端交替添加 GlcNAc 或 GlcA 的过程。大肠杆菌 K5 的荚膜基因簇功能区 2(Region 2)包含 4 个基因，编码 kfiA、kfiB、kfiC 和 kfiD 4 种蛋白质，是 K5 多糖合成所需的，heparosan 在大肠杆菌 K5 的代谢合成途径见图 1。其中，kfiA 具有葡萄糖胺转移活性；kfiC 具有葡萄糖醛酸转移活性；而 kfiB 不具糖基转移酶活性，但能够与 kfiA 和 kfiC 形成稳定的复合物，这是糖链延长必不可少的；kfiD 不参与糖链催化形成过程，但具有 UDP-葡萄糖(UDP-Glc)脱氢酶活性，能够把 UDP-Glc 转化成 heparosan 合成的原料 UDP-葡萄糖醛酸(UDP-GlcA)[10]。

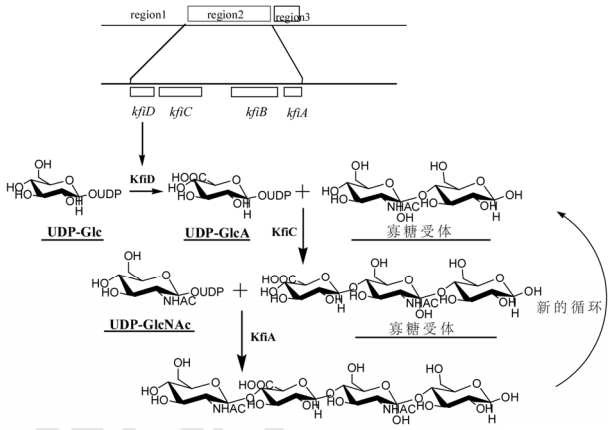

图 1 Heparosan 在大肠杆菌 K5 的代谢合成途径

Fig. 1 The synthesis of heparosan in *Escherichia coli* K5

基于对大肠杆菌 K5 菌株合成 heparosan 途径的研究，Zhang 等[11]运用代谢工程技术成功将上述 4 个基因单独或共同导入非致病的大肠杆菌 BL21，得到 6 个重组子。结果表明：以 LB 为培养基，只表达 kfiA 或 kfiC 的工程菌摇瓶培养 24 h 后不能产生 heparosan；共表达 *kfiA* 和 *kfiC* 的工程菌(sAC)则具有合成多糖的能力，但产量仅为 63 mg·L^{-1}；对于共表达 *kfiABC*、*kfiABD* 或 *kfiABCD* 的工程菌(sABC、sACD、sABCD)，heparosan 的产量可提高约 1 倍，表明 kfiB、kfiD 对多糖的产生是有利的；而采用甘油为单一碳源的培养基，sABCD 工程菌的多糖产量提高 3 倍以上，表明甘油是合成多糖的偏好碳源。采用发酵罐补料分批发酵，多糖产量最高达到 1.88 g·L^{-1}。除 sAC 外，sABCD 等来源的 heparosan 的 M_r 显著高于大肠杆菌 K5，多分散指数(PDI=1.01~1.10)明显低于大肠杆菌 K5(PDI=1.19)，有利于建立标准化的下游工艺。此外，在构建 heparosan 合成途径的同时，将裂解酶基因 *elmA* 共同转入大肠杆菌 K12，工程菌能够直接产生聚合度(DP)为 2~10 的寡糖，为在微生物体内生产肝素寡糖奠定了基础[12]。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus. subtilis*)属于公认安全

的菌种，将 *kfiA*、*kfiC* 整合到枯草芽孢杆菌基因组中构建 heparosan 的生物合成途径，工程菌在摇瓶中发酵能够产生 1.71 g·L^{-1}的 heparosan。由于内源基因 *tuaD* 编码的 UDP-葡萄糖脱氢酶是 UDP-GlcA 生物合成中的限速酶，因此，以核糖体结合位点(RBS)序列为翻译起始信号构建 *tuaD* 基因重组质粒，过表达 *tuaD* 的工程菌的多糖产量提高约 55%，而在补料分批发酵条件下，与大肠杆菌 BL21 工程菌相比，枯草芽孢杆菌工程菌的最大产量提升 3 倍，达 5.82 g·L^{-1}。枯草芽孢杆菌工程菌产生的 heparosan 的 M_r 约为 58 250、PDI 为 1.91±0.09，与大肠杆菌 K5 较为接近[13]。

与大肠杆菌 K5 不同，多杀性巴氏杆菌体内合成 heparosan 仅依赖一种双功能糖基转移酶 PmHS1(或 PmHS2)，该酶能够交替转移 GlcNAc 和 GlcA 到糖链非还原端[14]。PmHS1 独特之处在于其虽为一条多肽链，但具有转移 2 种不同单糖的能力，功能分析显示其可能为进化中 kfiA 和 kfiC 融合表达的产物[15]。因此，将 PmHS1 的糖基转移模块 *dcbF* 整合至枯草芽孢杆菌 168 的基因组，同时把糖基供体合成酶重组质粒转化入枯草芽孢杆菌，工程菌亦能够产生 heparosan[16]。

1.3 体外重组酶法合成

动物或微生物来源的糖基转移酶经重组表达，能够以 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcA 为糖基供体，体外合成 heparosan。例如，重组大肠杆菌 K5 糖基转移酶 kfiA、kfiC 与 UDP-GlcNAc 和 UDP-GlcA 共同孵育能够合成不同链长的 heparosan。底物特异性研究发现，kfiA 能够单独催化 GlcNAc 的转移，但 kfiC 必须与 kfiA 共存才具有 GlcA 转移活性[17]，kfiC 对 kfiA 的依赖性导致难以利用这 2 种酶合成长度一定的 heparosan 糖链。有趣的是，双功能糖基转移酶 PmHS1 催化合成过程受初始寡糖模板的调节，当反应体系中含一定量的寡糖模板，控制加入糖基供体的量，PmHS1 将合成 M_r 单分散的 heparosan；若没有寡糖模板，产物的 M_r 分布宽的多[15]，该聚合机制可能与酶和寡糖模板的亲和力高于糖基供体有关。尽管 PmHS2 与 PmHS1 的同源性高达 73%，但其催化特性有所不同，缺乏对寡糖模板的依赖性。在体外反应体系中，PmHS2 与 UDP-GlcNAc 的结合是反应起始的控制步骤，通过控制 UDP-GlcNAc 和寡糖模板的量，并给予过量的 UDP-GlcA，PmHS2 可以合成均一高 M_r 的 heparosan[18]。此外，通过定点突变技术得到 PmHS2 的 2 个单功能的结构域(PmHS2-GlcNAc$^+$和 PmHS2-GlcA$^+$)[19]，催化特性研究表明：重组 PmHS2-GlcA$^+$是 PmHS2 催化活性的限速结构域，而 PmHS2-GlcNAc$^+$在 heparosan 寡糖链延长中起重要作用，交替使用固定化的 PmHS2 两个单功能结构域，添加一定量的糖基供体，即得到特定长度的 heparosan 寡糖，合成过程不依赖寡糖模板[20]。综合分析 heparosan 生物合成中不同酶的催化特性，Liu 等[21]以亚硝酸降解 heparosan 得到的双糖为起始原料，交替利用重组 KfiA 和 PmHS2 催化，并以相应的糖核苷酸为糖基供体，成功合成了结构确定的 heparosan 寡糖，在此基础上，运用多步酶法修饰获得结构确定的硫酸乙酰肝素(HS)寡糖。

2 Heparosan 在药学领域的应用

2.1 合成生物工程肝素

天然肝素结构的不均一性和动物源导致其存在较大的安全风险[22]，因此，以非动物来源的 heparosan 为原料，利用酶法或化学法，对 heparosan 糖链进行不同策略的修饰，可合成多样化的生物工程肝素[23]，其一般的制备流程见图 2。例如，Kuberan 等[24]首先利用重组表达的 *N*-脱乙酰化酶/*N*-硫酸基转移酶(NDST)使 heparosan 糖链的 GlcNAc 转变为 GlcNS，得到的 *N*-硫酸化 heparosan 衍生物(NS-heparosan)经肝素酶Ⅲ降解后，依次经 C_5 异构化酶(C_5-epi)、2-*O*-硫酸基转移酶(2-OST)、6-*O*-硫酸基转移酶(6-OST)及 3-*O*-硫酸基转移酶(3-OST)修饰，纯化得到结构确定的、具有抗凝活性的肝素五糖。与 Kuberan 等不同，Lindahl 等[25]采用化学法 *N*-脱乙酰化/*N*-硫酸化修饰 heparosan 得到 NS-heparosan，然后利用 C_5-epi 使 GlcA 残基异构化为 IdoA，进而采用化学法依次进行 *O*-全硫酸化、选择性 *O*-脱硫酸化，最后利用亚硝酸控制降解制备得到 M_r 为 8 000、纯度>95%的低分子量肝素类似物(命名为新肝素)。新肝素与抗凝血酶(AT)的亲合特性与天然肝素类似，但其结构中含 3-*O*-硫酸化的 GlcA 残基，需要改进 *O*-硫酸化修饰工艺。Linhardt 团队[26]则通过化学法制备了 NS-heparosan，控制 *N*-脱乙酰化/*N*-硫酸化反应条件使 NS-heparosan 乙酰基含量接近肝素(12.3%~16.5%)，然后依次运用重组 C_5-epi/2-OST、6-OST、3-OST 对 NS-heparosan 进行酶法修饰，最

终得到结构与天然肝素类似的、具有良好抗凝活性的生物工程肝素，制备规模达到克级。当然，为获得具有产业化前景的生物工程肝素，尚需要从提高修饰酶的催化活性及稳定性，明确不同修饰酶的底物特异性，优化酶修饰反应工艺等方面开展研究[27-28]。

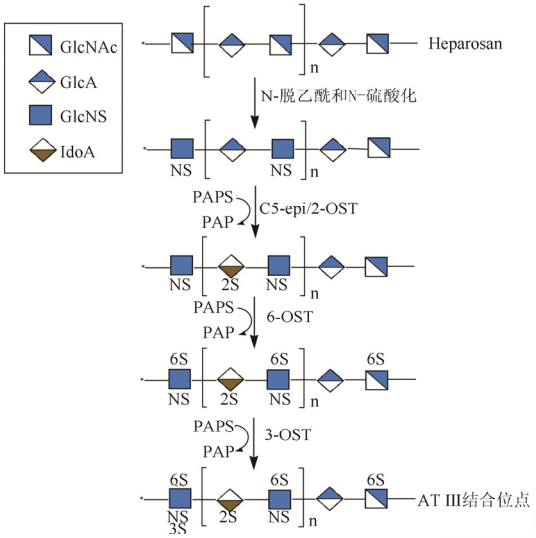

图 2　生物工程肝素的制备流程图

Fig. 2　Schematic diagram for the preparation of bioengineered heparin from heparosan

2.2　制备非抗凝肝素衍生物

前期研究表明，采用化学法对肝素进行不同程度的脱硫酸化、乙酰化等修饰能够得到抗凝活性降低、其他活性保留的衍生物[29-31]。受此启发，肝素前体多糖 heparosan 经不同位点的硫酸化等修饰可以得到结构不同的肝素/硫酸乙酰肝素类似物[32]。例如，Heparosan 经化学法 *O*-硫酸化或(和)*N*-脱乙酰化/*N*-硫酸化修饰得到低硫酸化修饰的 OS-heparosan(K5-OS_1)、高硫酸化修饰的 OS-heparosan(K5-OS_2)、NS-heparosan、NOS-heparosan，其中 K5-OS_2 和 NOS-heparosan 具有抗 FGF2 和阻止新生血管生成的作用[33-34]；而 OS-heparosan 能显著抑制黑色素瘤细胞和人乳腺癌细胞在小鼠体内的转移，抑制乙酰肝素酶的活性以及选择素等黏附分子介导的黑色素瘤细胞与内皮细胞的黏附，是一种抗肿瘤转移的潜在药物[35]。最近研究表明，K5-OS_2 可通过激活鼠巨噬细胞释放肿瘤坏死因子 α(TNF-α)和白细胞介素 1β(IL-1β)调控免疫反应，促进 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞增殖并上调 NK 细胞的细胞毒性，但具体硫酸化位点与活性之间的关系有待于进一步阐明[4]。此外，NOS-heparosan 对干细胞没有明显的毒性而且可促进干细胞向软骨细胞分化，其 *O*-硫酸化修饰主要发生在 GlcNS 残基的 C_6-OH，有利于拓展其在再生医学的应用[5]。而 Fu 等[36]研究表明，在肿瘤组织中高表达的基质细胞衍生因子(SDF-1/CXCL12)可提升内皮祖细胞的活力，促进其迁移。而 NOS-heparosan 能抑制 CXCL12 诱导的内皮祖细胞新生血管生成，故通过抑制肿瘤新生血管的发生，NOS-heparosan 可发挥抗肿瘤作用。因此，基于 heparosan 制备的非抗凝肝素衍生物将为肝素及其衍生物的多样应用研究提供坚实基础。

2.3　作为药物载体

利用聚乙二醇(PEG)等聚合物作为药物载体，能够延长药物的体内半衰期、降低药物的不良反应、赋予药物靶向性[37-38]，从而提高药物对疾病的治疗效果。Heparosan 作为一种天然多糖，具有水溶性好、无免疫原性、生物可降解等优点，是一种理想的药物载体材料[39]。例如，Chen 等[7]利用高碘酸钠使 heparosan 自 GlcA 的邻二羟基部分氧化开环，醛基化的 heparosan 与抗肿瘤药多柔比星(DOX)席夫碱结构共价结合形成 pH 敏感的 heparosan-DOX 缀合物(HDC)，两亲性的 HDC 在 pH 7.4 的环境中自组装形成直径为 50 nm 的纳米颗粒。细胞摄取实验证明，heparosan-DOX 纳米粒以网格蛋白介导的胞吞作用和巨胞饮作用被运输到细胞内，显著提升了 DOX 的入胞能力。重要的是，HDC 缀合物在 pH 7.4 的条件下是稳定的，而在 pH 5 左右的肿瘤细胞和吞饮泡内的酸性环境下，席夫碱结构分解，实现 DOX 的加速释放。而 heparosan 以硼酸酯键与脱氧胆酸(DOCA)结合能够形成两亲性药物传递胶束，载体带负电荷性，可有效抵抗血清蛋白的吸附，具有良好的稳定性。装载 DOX 的胶束在 pH 7.4 时呈现缓释的药物释放行为，而在 pH 5 或过表达的 β-葡萄糖醛酸酶的肿瘤细胞中则表现为加速释放行为。装载 DOX 的胶束体外对肿瘤细胞的半数抑制浓度(IC_{50})显著低于正常细胞，呈现显著的选择性杀伤肿瘤细胞作用[6]。最近，Rachel 等[40]用 heparosan 代替 PEG 包裹 DOX 脂质体，解决了 PEG 作为药物载体的免疫原性问题。此外，Wei 等[41]用 heparosan 代替 PEG 与重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)联结，制备了 heparosan 化的 G-CSF(HEP-G-CSF)。小鼠体内实

验表明，单次剂量给药，HEP-G-CSF 提升血液中中性粒细胞的水平高于 PEG-G-CSF；而长时间、重复剂量给药，HEP-G-CSF 并不会造成 heparosan 引起的毒性反应及免疫原性。因此，heparosan 是一种安全的药物载体，能够显著提高药物入胞能力，控制药物靶向释放，值得进一步研究和开发。

2.4 其他

Chen 等[42]研究了 heparosan 体外对鼠李糖乳杆菌、几种致病菌与肠上皮细胞的黏附作用以及生物膜形成的影响。结果显示，heparosan 对所测菌株的生物膜形成没有显著影响，但其可以抑制致病菌与肠上皮细胞及黏液的黏附，而不影响鼠李糖乳杆菌。因此，heparosan 具有潜在的致病菌抑菌剂的价值。

3 展望

采用补料分批发酵大肠杆菌 K5，heparosan 的最高产率已达到工业生产水平，然而大肠杆菌 K5 为致病菌，存在安全隐患；另一个问题是直接发酵策略对 heparosan 分子量大小及分布的调控有限，更不可能引入修饰和模拟的糖残基。体内代谢合成途径研究的发展将在一定程度上解决传统天然菌株发酵存在的弊端。如利用代谢工程技术在非致病的大肠杆菌、食品级的枯草芽孢杆菌中构建 heparosan 的合成途径，不仅很好地消除了致病菌产生的安全隐患，亦能够制备分子量分布更窄的多糖，在此基础上引入降解酶基因则可以由重组工程菌直接产生低分子量产物甚至寡糖，但总体而言尚难以定制合成分子量可控的多糖及衍生物。此外，体外酶法合成 heparosan 以及进一步化学酶法选择性修饰，已经实现了特定聚合度、特定修饰位点的肝素寡糖类化合物的合成[43]，但现有的合成规模仅为毫克级，限制了该技术在制药工业领域的应用[44]。

基于此，笔者认为，可重点围绕以下几方面对 heparosan 开展研究和开发：①与大肠杆菌 K5 相比，代谢工程改造菌的 heparosan 分布较窄但产量偏低，需进一步研究和优化以提高其产量，满足巨大的工业需求；②探索 GlcNAc 和 GlcA 及结构类似物在菌体内聚合规律和调控机制以在体内直接合成单分散 heparosan 及其衍生物，探究体内直接合成肝素前体寡糖；③提高各种重组酶的表达和活性水平、糖基供体与硫酸基供体合成规模，以实现结构确定的 heparosan 寡糖及不同硫酸化修饰的肝素寡糖的规模化酶法制备；④以 heparosan 为原料，运用化学酶法制备多样性的非动物源肝素衍生物，探究其生物活性和构效关系；⑤进一步研究 heparosan 作为药物载体的能力、运载范围及可靠性等。可以预见的是，技术的进步将拓宽 heparosan 在药学领域的应用，从而在未来人们的生活中发挥重要作用。

REFERENCES

[1] VANN W F, SCHMIDT M A, JANN B, et al. The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of Urinary-Tract-Infective *Escherichia coli* 010 : K5 : H4. A polymer similar to desulfo-heparin [J]. Eur J Biochem, 1981, 116 (2): 359-364.

[2] DEANGELIS P L, WHITE C L. Identification and molecular cloning of a heparosan synthase from *Pasteurella multocida* type D [J]. J Biol Chem, 2002, 277(9): 7209-7213.

[3] WU J R, CHEN P Y, SHIEN J H, et al. Analysis of the biosynthesis genes and chemical components of the capsule of *Avibacterium paragallinarum* [J]. Vet Microbiol, 2010, 145(1/2): 90-99.

[4] TENG L, FU H, WANG M, et al. Immunomodulatory activity of heparan sulfate mimetics from *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide *in vitro* [J]. Carbohydr Polym, 2015(115): 643-650.

[5] 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(10): 32-38.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 夏亚穆, 戴晓丽. 肝素和硫酸乙酰肝素前体 Heparosan 的合成研究进展[J]. 化学与生物工程, 2013, 30(9): 1-4.

[9] WANG Z, LY M, ZHANG F, et al. *E. coli* K5 fermentation and the preparation of heparosan, a bioengineered heparin precursor [J]. Biotechnol Bioengin, 2010, 107(6): 964-973.

[10] ZHAO L, YAN Z Q, WANG C, et al. Progress of study on the heparosan production by *E. coli* K5 [J]. Curr Biotechno(生物技术进展), 2011, 01(3): 195-200.

[11] ZHANG C, LIU L, TENG L, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21 for biosynthesis of heparosan, a bioengineered heparin precursor [J]. Metab Eng, 2012, 14(5): 521-527.

[12] BARRETEAU H, RICHARD E, DROUILLARD S, et al. Production of intracellular heparosan and derived oligosaccharides by lyase expression in metabolically engineered *E. coli* K-12 [J]. Carbohydr Res, 2012, 360(19): 19-24.

[13] JIN P, ZHANG L, YUAN P, et al. Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* [J]. Carbohydr Polym, 2016(140): 424-432.

[14] TANG D Y, YU J P, CHEN R, et al. Application of synthetic biology technologies in glycosaminoglycan production [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2015, (5): 376-383.

[15] 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.
[16] CHEN X, CHEN R, YU X, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for biosynthesis of heparosan using heparosan synthase from *Pasteurella multocida*, PmHS1 [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2017, 40(5): 675-681.
[17] SUGIURA N, BABA Y, KAWAGUCHI Y, et al. Glucuronyltransferase activity of KfiC from *Escherichia coli* strain K5 requires association of KfiA: KfiC and KfiA are essential enzymes for production of K5 polysaccharide, *N*-acetylheparosan [J]. J Biol Chem, 2010, 285(3): 1597-1606.
[18] CHAVAROCHE A A , JAN S, FLOOR K, et al. *In vitro* synthesis of heparosan using recombinant *Pasteurella multocida* heparosan synthase PmHS2 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(6): 1881-1891.
[19] CHAVAROCHE A A, VAN DEN BROEK L A, SPRINGER J, et al. Analysis of the polymerization initiation and activity of *Pasteurella multocida* heparosan synthase PmHS2, an enzyme with glycosyltransferase and UDP-sugar hydrolase activity [J]. J Biol Chem, 2011, 286(3): 1777-1785.
[20] CHAVAROCHE A A, VAN DEN BROEK L A, BOERIU C, et al. Synthesis of heparosan oligosaccharides by *Pasteurella multocida* PmHS2 single-action transferases [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(5): 1199-1210.
[21] LIU R, XU Y, CHEN M, et al. Chemoenzymatic design of heparan sulfate oligosaccharides [J]. J Biol Chem, 2010, 285(44): 34240-34249.
[22] LIU H, ZHANG Z, LINHARDT R J. Lessons learned from the contamination of heparin [J]. Nat Prod Rep, 2009, 26(3): 313-321.
[23] FU L, SUFLITA M, LINHARDT R J. Bioengineered heparins and heparan sulfates [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016(97): 237-249.
[24] KUBERAN B, LECH M Z, BEELER D L, et al. Enzymatic synthesis of antithrombin III-binding heparan sulfate pentasaccharide [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(11): 1343-1346.
[25] LINDAHL U, LI J P, KUSCHEGULLBERG M, et al. Generation of “Neoheparin” from *E. coli* K5 capsular polysaccharide [J]. J Med Chem, 2005, 48(2): 349-352.
[26] WANG Z, YANG B, ZHANG Z, et al. Control of the heparosan N-deacetylation leads to an improved bioengineered heparin [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91(1): 91-99.
[27] LI Y, YU H, THON V, et al. Donor substrate promiscuity of the N-acetylglucosaminyltransferase activities of *Pasteurella multocida* heparosan synthase 2 (PmHS2) and *Escherichia coli* K5 KfiA [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(3): 1127-1134.
[28] ZHOU X, CHANDARAJOTI K, PHAM T Q, et al. Expression of heparan sulfate sulfotransferases in Kluyveromyces lactis and preparation of PAPS [J]. Glycobiology, 2011, 21(6): 771-780.
[29] CASSINELLI G, NAGGI A. Old and new applications of non-anticoagulant heparin [J]. International Journal of Cardiology, 2016, 212: 14-21.
[30] ACHOUR O, POUPARD N, BRIDIAU N, et al. Anti-heparanase activity of ultra-low-molecular-weight heparin produced by physicochemical depolymerization [J]. Carbohydr Polym, 2016(135): 316-323.
[31] VERALDI N, HUGHES A J, RUDD T R, et al. Heparin derivatives for the targeting of multiple activities in the inflammatory response [J]. Carbohydr Polym, 2015(117): 400-407.
[32] LI P, SHENG J, LIU Y, et al. Heparosan-derived heparan sulfate/heparin-like compounds: one kind of potential therapeutic agents [J]. Med Res Rev, 2013, 33(3): 665-692.
[33] CHIODELLI P, BUGATTI A, URBINATI C, et al. Heparin/heparan sulfate proteoglycans glycomic interactome in angiogenesis: biological implications and therapeutical use [J]. Molecules, 2015, 20(4): 6342-6388.
[34] REZZOLA S, MONTE M D, BELLERI M, et al. Therapeutic potential of anti-angiogenic multi-target N, O-Sulfated *E. coli* K5 polysaccharide in diabetic retinopathy [J]. Diabetes, 2015, 64(7): 2581-2592.
[35] BORGENSTRÖM M, WÄRRI A, HIILESVUO K, et al. O-sulfated bacterial polysaccharides with low anticoagulant activity inhibit metastasis [J]. Semin Thromb Hemost, 2007, 33(5): 547-556.
[36] FU H, DENG C, TENG L, et al. Effect of heparan sulfate mimetics from *Escherichia coli* K5 polysaccharide on SDF-1/CXCL12-induced endothelial progenitor cells *in vitro* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 107(Pt B): 2492-2500.
[37] WANG J L, FENG Z W, ZHAO X. Synthesis and preliminary pharmacological efficacy study of PEG-dasatinib conjugates [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(12):1717-1720.
[38] PASUT G, VERONESE F M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research [J]. J Control Release, 2012, 161(2): 461-472.
[39] 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.
[40] LANE R S, HALLER F M, CHAVAROCHE A A E, et al. Heparosan-coated liposomes for drug delivery [J]. Glycobiology, 2017, 27(11): 1062-1074.
[41] JING W, ROBERTS J W, GREEN D E, et al. Synthesis and characterization of heparosan-granulocyte-colony stimulating factor conjugates: a natural sugar-based drug delivery system to treat neutropenia [J]. Glycobiology, 2017, 27(11): 1052-1061.
[42] CHEN X E, 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.
[43] CHEN J, AVCI F Y, MUNOZ E M, et al. Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate [J]. J Biol Chem, 2005, 280(52): 42817-42825.
[44] MOCHIZUKI H, YAMAGISHI K, SUZUKI K, et al. Heparosan-glucuronate 5-epimerase: Molecular cloning and characterization of a novel enzyme [J]. Glycobiology, 2015, 25(7): 735-744.

收稿日期：2018-05-01
(本文责编：曹粤锋)