

甲壳质/壳聚糖硫酸酯研究进展*

ADVANCE IN THE STUDY OF CHITIN/CHITOSAN SULFATE

严共鸿 李鹏程

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

人们希望能够找到或合成能够代替肝素的物质,以解决肝素资源有限问题,在众多的衍生物当中,甲壳质、壳聚糖磺化修饰成为最诱人的领域,由于壳聚糖具有独特的分子结构,比其他多糖更适合于制备肝素类物质,因此科学家对甲壳质、壳聚糖选择性磺化,对它们的构效关系,生物活性与应用开发进行了大量研究,以期在海洋药物领域获得突破。

1 甲壳质/壳聚糖硫酸酯的理化性质

甲壳质是一种天然高分子多糖,存在于各种节肢动物(虾、蟹、昆虫等)的甲壳中,在褐煤中曾找到约 250×10^4 a 前各种甲虫翅膀的残余,可见甲壳质对细菌作用十分稳定。这类天然高分子所具有的特性赋予其无限的可能性,经过磺化,引入 SO_3^- 基团,伴随着大分子降解而降低分子量,使母体分子增加水溶性,降低脂溶性,保持高度溶剂化区域,对动物排泄物类,甾族类终产物极为重要,磺化衍生物随着 SO_3^- 取代度增加和分子量降低而增强水溶性。经过磺化后,分子大小趋同性增加而变得较均一。甲壳质、壳聚糖磺化后,可封闭糖基单元活泼的氨基,伯醇基化学性质相对稳定,磺化产物粘度变小,纯度提高,由原来的酸溶性变为在较宽 pH 值范围可溶,这种聚二性电解质结构变得较为紧密,比重增大,同时颜色由原来的白色变为淡黄色或黄色^[1]。

2 甲壳质/壳聚糖硫酸酯化合物的制备

甲壳质是由 β -1,4 糖苷键连结的 2-乙酰氨基-D 葡聚糖,糖基分子 C_3, C_6 位上的 OH 和 2 位上的 NH_2 比较活泼,可进行化学修饰,其伯醇基易于磺化,氨基易于保护或活化,从而可选择在这三个位点磺化。磺化反应是杂环化合物的特征反应,在合成染料、药物等工业生产中常常遇到,磺化后增加染料和药物的溶解性。甲壳质、壳聚糖水不溶性限制了其广泛的应用,经磺化引入功能基团,导致化合物理化性质和其

他性质显著变化,授予化合物重要生理功能。通常磺化试剂有:浓硫酸, $\text{SO}_3/\text{Pyridine}$, SO_3/SO_2 , SO_3/DMF , $\text{HClO}_3\text{S}/\text{Pyridine}$, 其中氯磺酸是最常用的磺化试剂。俄罗斯从 70 年代至今对多糖磺化进行了较多研究工作,他们常用磺化方法有: H_2SO_4 -iso-PrOH 法, $\text{HClO}_3\text{S}/\text{Pyridine}$, HClO_3S -DMF 法, HClO_3S -DMSO 法。

由于工业化生产的甲壳质、壳聚糖不可避免含有一些未除尽的氨基酸残基、脂质和色素等杂质,这不仅影响磺化修饰,而且影响衍生物质量,因此磺化反应之前应纯化,然后选用磺化条件和基团保护,在糖基单元上 C_3, C_6 位 OH, 2 位 NH_2 进行选择性的磺化。磺化条件的确定主要以其有机“S”含量为准,其他指标如粘度、旋光、毒性和收率亦是重要依据。

3 甲壳质/壳聚糖硫酸酯的生物活性与其构效关系

多糖的研究要比蛋白质、核酸大分子的研究难度大,核酸分子内遵循碱基互补原则,组成的三联密码与蛋白质的氨基酸单元相对应,按照遗传信息流动的中心法则,保证信息传递质的稳定性,其代谢有规律可循,而多糖大分子结构复杂,其代谢具有很大的随机性,如甲壳质、壳聚糖在体内如何降解,降解到多大片段发挥功效以及如何发挥功效等问题,目前人们对此认识还很肤浅。通过近 20 a 的研究,选择性制备甲壳质、壳聚糖磺化衍生物,并进行一系列体内外活性实验,逐渐积累经验,确定了一些构效关系。

3.1 抗凝血

Muzzarelli 等人在五六十年代就已充分认识到壳聚糖硫酸酯化学结构类似肝素,预见到其作为新抗凝血活性物质的可能性,并在 80 年代初证实壳聚糖 2 位 NH_2 羧甲基化(简称为 CM,下同)后,再将 6-位磺

* 国家“863”计划资助项目 819-07-02 号。

收稿日期:1999-04-23;修回日期:1999-05-06

化制得 SCM-chitosan 具有血液相容性,与抗凝血酶物质相结合,抑制凝血酶和 Xa 因子活性,当其分子量介于 39 000 至 80 000 D 时具有长效抗凝血活性,不会出现溶血现象和红细胞、淋巴细胞的变化。随后 Shigehiro Hirano 等人进一步的研究加深了对壳聚糖磺化衍生物构效关系的认识:体内外实验表明己糖胺 6-位磺化是影响抗凝生物活性的主要位点,C₃ 位磺化可增强活性,但 C₃ 位和 N 位上磺化取代并非必需;同时,分子量大小对生物活性有影响,有以下活性关系: Mw26 000 > 肝素(21 000) > Mw12 000 > Mw540 000。衍生物抗凝活性据认为是由于高分子某一序列内特异 SO₃⁻ 所致,这与 Lindahl 等人研究肝素的抗凝构效关系一致。同时 Beet, Z. T. 合成一段能特异结合抗凝血酶 AT-III 的序列,这是一段壳聚糖六糖磺化衍生物,其还原端缺少 C₆ 位上的 SO₃⁻,此序列具较强的 α-Xa 活性。80 年代后期有人制备 SCM-chitin,体外检测即使浓度较低亦显示出抑制凝血酶活性,其中 SO₃⁻ 为主要调控因素,与羧甲基协同作用发挥生物活性,当 SO₃⁻ 与 CM 等摩尔比时抑制活性最强。90 年代, Tokura Seiichi 等人^[5]以脱乙酰度 70 % 的壳聚糖经 C₂ 位和 N 位磺化, C₆ 位 CM 化,产物选择性吸附 AT-III 而表现出最高的抑制凝血酶活性,这与 Shigehiro Hirano 认为 C₆ 位磺化是主要活性位点不太一致。而 1998 年 Nishimura 等人^[4]报道的结果与 Shigehiro Hirano 结论相符,都证明 C₃, N 位磺化无抗凝活性,而 C₆-OH 磺化的甲壳质能强烈抗凝。Hiroyuki Komazawa 等人于 1993 年发现 SCM-chitin 虽然结构类似肝素,而无其抗凝活性。迄今,虽然各种意见不一,但大多数人认为甲壳质、壳聚糖磺化制备的类肝素抗凝性密切依赖于 SO₃⁻ 含量。

3.2 抗病毒

1958 年, Gerber 首次报道了多糖硫酸酯具有抗病毒活性,能强烈抑制具有包膜的病毒,多糖硫酸酯衍生物抗艾滋病病毒(HIV-1)的作用也越来越引起药理学家和病毒学家的重视,并取得了一定的临床疗效。许多科学家从不同方面都证实了其抗病毒活性,对壳聚糖硫酸酯抗病毒的研究, Derek Horton 和 Ernst K. Just 研究较早,他们证明-NH₂ 上含有 SO₃⁻ 的壳聚糖衍生物对白血病病毒具有显著抑制作用。Vercellotti, Sharon V. 等人 1992 年发现壳聚糖磺化衍生物能抑制哺乳动物病毒感染,特别是预防治疗人类 HIV 感染,能竞争性抑制 HIV-1 逆转录酶,抑制 HIV-1 复制的 IC₅₀ 为 7 μg/ml,随着浓度的增加而降低 HIV-1 蛋白的合成,同时也能抑制劳舍氏白血病病毒和单纯

疱疹病毒 I 和 II。Ishihara, Chiaki 等人证明甲壳质磺化衍生物对弗兰德鼠白血病病毒、仙台病毒和单纯疱疹病毒有作用,而羧甲基甲壳质无抗病毒活性,可见 SO₃⁻ 是抑病毒活性的功能基团。

对壳聚糖硫酸酯衍生物抗 HIV 的机理, Kornilaeva G. V. 等人^[3]认为是由于抑制病毒复制和病毒诱导的合胞体的形成,具有剂量相关性和低毒性。生物活性依赖于分子结构, Nishimura 等人认为甲壳质硫酸酯特异作用于 AIDS 病毒主要依赖于磺化位点,而不是糖基上 SO₃⁻ 取代度,在 C₃, N 位上选择性磺化比 C₆ 位磺化具更高的抑制 AIDS 病毒感染活性。

Mizumoto 等人比较了几种多糖抑制 HIV 的活性,发现糖链上 SO₃⁻ 起重要作用,但对其构效关系尚不十分明了。一般认为硫酸酯干扰 HIV 早期感染,即吸附病毒粒子到靶淋巴细胞上。

3.3 抑制肿瘤

多糖在医药上作为一类免疫调节剂,具有治疗肿瘤、肝炎,调血脂等作用。通过比较壳聚糖硫酸酯和肝素抑制肿瘤作用, Murata, Jun 详细研究了其作用机理。SCM-chitin 介导的抑制肿瘤扩散与肝素的作用显著不同,是由于它干扰癌细胞在微血管的停滞,随即抑制肿瘤细胞导致的能增加癌细胞存活、停滞和侵袭作用的血小板聚集和血液凝聚,而不抑制肿瘤生长。SCM-Chitosan 对 B₁₆-BL₆ 细胞诱发的血管生成具有有效的抑制转移作用,显著减少通向肿块的血管数量,但不直接影响肿瘤与内皮细胞的存活和生长,而 CM-chitin 及肝素无此作用。SCM-chitin 抑制肿瘤诱导的血管生成,切断肿瘤营养源,从而抑制肿瘤转移,对癌扩散抑制率达 80 %~85 %^[6],与肝素不同,它无任何副反应。

Hiroyuki Komazawa 等人在 1993 年合成一种粘附细胞的短肽 RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), 与 SCM-chitin 结合增强了治疗肿瘤扩散的作用。SCM-chitin-RGDS 复合物的抑制活性依赖于甲壳质骨架的取代基团,由 SO₃⁻ 与 CM 协同发挥功效。SCM-chitin 治疗肿瘤转移机理是其特异性结合层粘连蛋白和纤连蛋白,或者是抑制细胞来源的肝素酶和 IV 型胶原酶,从而抑制肿瘤细胞侵袭重建基底膜和肿瘤诱导的血管生成,但对肿瘤细胞和内皮细胞无毒性作用。

3.4 其他

甲壳质、壳聚糖磺化衍生物展现了其他一些用途。壳聚糖 6-O-硫酸酯分子的 2 位 NH₂ 与 C₃-OH 配价结合 Fe²⁺, 增强胃肠道吸收能力,用于治疗铁缺乏症。用甲壳质硫酸酯作为活性成分做成消炎剂,治疗

猫肾衰竭症,4周后猫血尿素氮和血肌酸酐水平达到正常。对猫受到猫科动物免疫缺陷病毒的感染、对猫口腔炎,齿龈炎和狗肺炎均疗效显著。壳聚糖磺化衍生物能吸附脂蛋白^[2],具有调血脂功能。经磺化合成含有 SO_3^- 的兼性衍生物,提高了带阳离子高分子壳聚糖的血液相容性,并显著降低血小板粘着与激活程度,不具有凝血性,适合用作与血液接触的医疗材料^[1]。韩国人 Kim, Kea Yong 等人以壳聚糖及磺化衍生物复合物做成皮肤代用品,满足皮肤要求的基本性能。此外,壳聚糖磺化后在生化、化工上亦有广泛的用途。由于它选择性吸附牛乳铁传递蛋白,可用作亲和层析的吸附材料。Hayashi 等人用壳聚糖磺化衍生物添加到精制纸浆中,可降低精制工艺能耗,提高纸浆强度,并获 1992 年欧洲专利。壳聚糖做成的膜经磺化交联后,具有适合的分子孔径,可用于醇-水蒸发分离。

4 结语

人类创造了现代文明,同时也破坏了自然生态平

衡,人类赖以生存的自然环境日益恶化,极大危害了人类健康。现在我们面对的主要疾病已不再是细菌和寄生虫,而是肿瘤、心脑血管病等慢性病,对这类病,细胞保护与细胞调节的药物比杀伤性药物更有应用前景,甲壳质、壳聚糖磺化衍生物所具有的独特药效,在 21 世纪必将成为人类健康的保护者,造福人类。

主要参考文献

- 1 Amiji, Mansoor M. . *Colloids Surf.* , 1998, **10**(5): 263~271
- 2 Gamzazade, A. I. , Nasibov, S. M. , *et al.* . *Carbohydr. Polym.* , 1997, **34**(4): 381~384
- 3 Kornilaeva, G. V. *et al.* . *Immunologiya* , 1995, **1**: 13~16
- 4 Nishimura, Shin Ichiro; Kai, Hideaki, *et al.* . *Carbohydr. Res.* , 1998, **306**(3): 427~433
- 5 Tokura, seiichi, Itoyama, koki, *et al.* . *J. Macromol. Sci.* , *Pure. Appl. Chem.* , 1994, **31**(11): 1 701~1 718