


壳聚糖及其衍生物在生物工程领域中的应用研究*

THE STUDY OF THE APPLICATION OF CHITOSAN AND ITS DERIVATIVES ON BIOENGINEERING

郎刚华 陈西广 刘成圣 刘万顺

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

 壳聚糖是甲壳质部分和全部脱乙酰基的产物,由于其分子中含有-OH和-NH₂,所以可酰基化、磺化、羧甲基化、羟甲基化、酯化、醚化、交联、螯合等,获得溶解性和生物活性不同的衍生物,从而拓宽了壳聚糖的应用领域。本文对壳聚糖及其衍生物在生物工程领域中的应用研究进行评述。

1 在细胞工程领域中的应用研究

利用动物细胞大规模培养技术,可以制备出稀有的生化药物和细胞活性因子等医疗产品。微载体是直径在60~250 μm能够适于贴壁细胞在其上附着生长的微珠,研究表明,壳聚糖是一种新型的细胞大规模培养用优质材料。

Scholz M.等1990年用胶原和壳聚糖制成漂浮床状或多孔纤维状细胞载体,利用一个特制的细胞反应

器,进行了重组人细胞-293生产C蛋白的研究。陈西广等^[1,2]以壳聚糖为主要原料,通过戊二醛交联和分散,研制出了一系列微载体,研究证明,壳聚糖微载体耐高温高压,可方便地用湿热法进行除菌;其密度稍大于1,在轻微搅拌条件下可悬浮,当停止搅拌时,微载体即下沉,从而便于将它与培养基分离。通过对BHK21, Vero, BB等细胞的培养实验,证明来源于不同物种的细胞株均能在其表面进行高密度生长。而且此微载体可反复使用多次。

2 在组织工程领域中的应用研究

组织工程是利用组织或细胞以及有关的生长因

* 国家自然科学基金资助项目 39970212号。

收稿日期:2000-04-14;修回日期:2000-04-30

子和做为载体的生物材料,培养出相应的组织或器官,用于替代或修复损伤、病变或老化的组织与器官。组织工程所使用的载体材料主要有聚羟基乙酸、明胶、胶原、聚乳酸或它们的复合物等。壳聚糖及其衍生物具有良好的组织相容性和抑菌活性,可被生物组织降解,能够加速组织的修复,易于进行分子改造、改性及加工成型。人们利用壳聚糖及其衍生物已开发出了人造皮肤、手术缝合线、人造肾膜、止血海绵、烧伤膏等生物医用材料。目前,壳聚糖及其衍生物已被用在培养皮肤、肝、肾、软骨、神经等器官或组织的骨架材料中。

2.1 在皮肤修复及组织工程中的应用研究

我国是最早将壳聚糖及其衍生物应用于生物医学领域中的国家之一,1986年楼宝城等研制成功壳聚糖人工皮肤,并应用于临床,1987年该技术获国家发明专利;1987年7月,美国 High Technology 杂志报道了伊利诺斯大学 Viedre 等用蟹壳、人发等材料制成人造皮肤。动物实验及大量临床病例证明壳聚糖人工皮肤不致敏、无刺激、无吸收中毒及占位排斥现象,透气性好、可促进皮肤生长,且有止血和抑制斑痕生长效果。

包括糖胺多糖在内的细胞外基质在细胞的贴附、生长分化和形态发生中起重要作用,壳聚糖具有类似糖胺多糖的结构,而且拥有上述有利于皮肤修复的特性,所以在皮肤组织工程中是理想的骨架材料之一。1990年法国 Shahabeddin L. 等用壳聚糖将 I 型胶原、II型胶原及糖胺聚糖交联后制成了一种多孔的支架,然后将人皮肤成纤维细胞接种在此支架上,从而得到了适合于上皮细胞生长的类真皮层。培养的角质层细胞可迅速贴附于这种类真皮层上,经过有丝分裂后,形成一层连续的上皮层。培养 2 周后,进行组织切片,可以看到一层附着于类真皮层上的柱状基底层细胞和几层包括生长旺盛的生发层在内的细胞。此皮肤从形态上与人正常皮肤相当,所以可以作为体外毒性检验的实验工具和治疗皮肤深度烧伤的医用材料。Da mour O. 等 1994 年将胶原-黏多糖-壳聚糖类真皮应用于临床,他们将这种类真皮移植于皮肤切除后的区域,然后在其上移植剪碎的或经培养的自体皮块,此类真皮通过与下部组织粘附而代替切除的真皮。15 d 后,类真皮可上皮化,而且用类真皮与经培养的自体上皮结合所得到的修复效果比用类真皮与剪碎的自体皮肤相结合的效果好。虽然此种类真皮仍不能取代高质量的自体供皮,但它方便易得,便于保存,而且可免于微生物的污染,所以仍是一种较理想的真皮代用材料。Augustin C. 等^[5]将人成纤维细胞接种于由壳

聚糖与胶原、黏多糖交联成的基质材料上,制备成了一种离体皮肤模型,他们以 MTT 还原反应、乳酸还原酶活性和白细胞介素-6 的释放作为毒性反应鉴定指标,研究了此模型对刺激的反应。通过对氯化镉、硫酸十二醇、氯化苯并蒽这 3 种化工产品刺激的反应,对这种皮肤模型的用途及对预测人皮肤对刺激反应的能力进行了评价。证明此皮肤模型可以代替在体实验进行化妆品、家用化工产品及药物等对皮肤或眼睛的刺激性实验。欧盟关于化妆品性能的测试必须用非动物手段的规定大大推进了这种体外药物毒性实验模型的研究进展。此外,Black A. F. 等^[6]研制了一种在皮肤中血管发生的模型,即将内皮细胞与皮肤细胞共培养于由壳多糖与胶原、糖胺多糖交联而成的基质上,在只含有由成纤维细胞和角质层细胞合成的细胞外基质的条件下,可形成毛细血管样结构,并在体外研究了血管形成过程中管状结构的组织、基底膜的沉积,以及细胞间连接的形成过程。由弹性纤维组成的复杂的网状结构对结缔组织的弹性起重要作用,弹性蛋白网的改变将引起多种器官的病变。Duplan Perrot F. 等^[7]用此皮肤模型研究了角质细胞对弹性蛋白网成熟和组织的影响,他们将成纤维细胞接种于胶原-糖胺多糖支架上构成一种皮肤模型,在平行组中同时接种上角质层细胞。研究发现,培养 15 d 后,通过免疫染色的方法可以检测到纤层蛋白-1 和弹性蛋白的合成,并且通过扫描电子显微镜观察到了弹性蛋白网的典型结构,从而在皮肤模型中检测到了弹性纤维的合成,并证明角质层细胞影响着弹性蛋白网的组织和成熟。

2.2 在神经组织工程中的应用研究

作为神经修复材料,必须有良好的组织相容性、可适时地被组织降解、具多层结构、并可以提供神经生长所需的通道。清华大学生命科学与工程研究院用海洋活性多糖为原料,进行了开发周围神经修复材料的研究,并已证明,经修饰、改构后的壳聚糖及其衍生物对神经细胞有良好的亲和性和组织相容性,能够诱导神经纤维生长^[3]。吴德升等^[4]将 2% 的壳聚糖充入硅胶管再生室中,然后将之套接在 10 mm 间距的大鼠坐骨神经缺损处,对照组以空白硅胶管再生室套接,手术后 16 周时,取再生室进行电镜观察和图象分析,结果显示,壳聚糖可促进再生轴突数目的恢复以及横断面髓鞘面积的增加,而髓鞘横断面积是有髓神经再生成熟程度的标志,且与其功能密切相关。利用壳聚糖作为神经修复导管的高新技术,有望克服移植法的弊端,该材料可粘合或缝合于患者断裂的两段神经之间,用作神经组织生长的“脚手架”。当神经纤维长到

所需长度并开始执行正常功能时,此修复材料则开始降解。Eser Elcin A等¹⁹研究了嗜铬细胞在胶原与壳聚糖组成的基质上的贴附性和活性,发现在此基质上生长的细胞在体外可存活两周,并植入大鼠蛛网膜下也获得了成功。

2.3 在肝组织工程中的研究

当肝脏发生病变或损伤时就必须将其切除,可能时将不得不移植入异体肝,但是,合适的异体肝不易获得,而且即使获得,也可能会因发生排异反应,而使移植失败。所以,如果通过组织工程技术,将病人自身的健康肝细胞经培养后,移植到适当的细胞支架上,制备成有功能的肝组织,然后将其植入病人体内,这将更完善地解决异体移植中所存在的问题。为实现上述设想,大量研究人员以胶原、明胶、褐藻酸钙等聚合物作为细胞支架,进行了培养动物肝细胞的研究,以期培养出具有肝功能的肝组织。而以壳多糖为材料进行肝组织培养是近几年才开展起来的研究。Kawase M.等1996年以戊二醛交联的壳聚糖作为大鼠肝细胞附着的基质,发现这些肝细胞不但保持了与体内一样的球形状态,而且具有肝细胞的许多功能。

Elcin Y. M.等¹⁸将壳聚糖与胶原、明胶或白蛋白等混合后制备成膜,再将胎猪和大鼠的肝细胞接种于其上,确定了细胞的最适接种密度并对细胞的粘附动力学特性进行了分析。在两周的培养过程中,通过每天测定尿素和总蛋白的合成研究了细胞的代谢活性,结果表明,胶原与壳多糖混合组成的膜适于大鼠肝细胞贴附,白蛋白、明胶和壳多糖混合制成的膜非常适于胎猪肝细胞贴附。当用分子量 750 000 D(道尔顿)的壳多糖制成的膜,每平方米接种 30 000 ~ 40 000 个细胞时可获得最适的贴附效率。经细胞形态观察和代谢物分析,证明此材料可为细胞生长和形成拟肝组织提供适当支持。

2.4 在骨组织工程中的应用研究

寻找一种生物亲和性好、可被降解和吸收的高分子材料,作为骨骼替代材料或骨骼细胞的支架,一直是临床上治疗开放性骨折、关节软骨损伤等骨损伤时所面临的课题。Mizzarelli等1994年研究发现与咪唑基共价交联的壳聚糖可以促进羊股骨的损伤修复。Klokkevold P. R.等1996年研究了壳聚糖在体外对成骨细胞分化和骨形成的作用,结果表明,壳聚糖能促进骨源细胞的分化,并且促进骨骼的形成。倪斌等1995年用壳聚糖制成1 mm厚的膜,然后将之环形包裹在兔桡骨骨干8 mm缺损处,以另一侧桡骨骨干8 mm缺损作为对照,对愈合情况采用X射线及组织学检查。实验组在最初3周无任何骨痂生长及钙化征

象,第4,5周时,在壳聚糖的近端及远端有骨膜反应,同时有稀疏、不连续、密度增高影在两骨断端处形成。第6周时,特殊的、薄形的、连续性较好的外骨痂在壳多糖表面形成,成为较为清晰的外骨桥,两骨断端有少量骨痂生长。空白组无外骨痂形成,在最初4周,X线片上可见密度稍高影在骨断端出现;第5,6周,骨端变得圆钝,并形成硬化骨组织,断端间无骨痂连接,导致愈合失败,呈典型骨不连接表现。因此证明,壳聚糖对骨组织修复有传导成骨作用。大量临床病例也已证明,壳聚糖对促进人骨折的愈合有一定的作用。Sechniost V. F.¹¹³等将硫酸软骨素与甲壳胺结合后制成了一种支持软骨生长的材料,他们将原代培养的牛关节软骨细胞接种于此材料制成的薄层上,发现它们保持了分化软骨的许多表型特征,从而证明这种材料非常适合作为自体软骨细胞移植或骨骼代用品的材料。

3 在酶工程领域中的应用研究

据Dumitriu S.等1996年报道,固定化酶是被结合到特定支持物上并能发挥作用的一类酶,甲壳质/壳聚糖是一种很有前途的固定化载体。可将其制备成凝胶,对酶或微生物进行直接包埋。又据Bendikiene V.等1996年报道,因其分子中存在有氨基,所以可用多功能试剂使酶与其共价结合,也可直接用物理吸附法对某些酶进行固定化。另外,据Krajewska等1991年研究报道,因壳聚糖能络合重金属离子,从而可保护酶的活性。

1990年Krajewska等报道了以壳聚糖为载体制备出固定化的青霉素酰化酶的研究。Xu等1990年将1.4%的壳聚糖溶液用12.5%的戊二醛交联,然后分别用1.5%,pH 5.5和1.5%,pH 8.5的多磷酸使之发生离子转变而凝胶化,并使此介质有良好的机械性能和通透性。再用0.5%的戊二醛和甲苯磺酰氯使之双活化,最后使青霉素酰化酶与之交联。同其他青霉素酰化酶固定化载体相比,壳多糖亲水性强,酶活半衰期时间长。在生物医学领域,Bowers 1986年报道了用壳聚糖固定化尿素酶在体外循环装置中清除尿素的研究。Tang等1989年将短刀豆脲酶和杆菌脲酶分别用0.1%的戊二醛一步交联法固定在壳聚糖上,结果表明,固定化杆菌脲酶比固定化短刀豆脲酶的最适pH、最适温度和活性均高,而米氏常数低。但固定化短刀豆脲酶较固定化杆菌脲酶稳定性高。将固定化脲酶装入小柱中进行血脲降解实验,发现此固定化酶性能稳定,并可重复使用。在食品工业上,壳聚糖已被用于固定化葡萄糖异构酶;陈盛等1996年以甲壳素为

原料进行了纤维素酶的固定化研究。姜涌明等以高分子壳聚糖为载体,以戊二醛为交联剂,对木瓜蛋白酶、AS.1.398 中性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶进行了固定化,其活力回收率分别达 47%, 74%, 50% 以上, 55%。4 种酶对热、酸、碱、乙醇、8 mol/L 尿素的稳定性明显提高,前 3 种酶的操作半衰期分别达 30, 88, 40 d 以上。实验表明,壳聚糖固定化木瓜蛋白酶能使啤酒澄清;壳聚糖固定化 AS.1.398 中性蛋白酶能有效地水解猪血清蛋白质和大豆蛋白质,这将有助于猪血和大豆的综合利用。

4 在发酵工程领域中的应用研究

壳聚糖已被广泛应用于工业废水的净化和食品加工废水中蛋白质的沉降及发酵液中菌体的絮凝。Weir 等 1993 年成功地将难以与发酵液分离的酵母用壳聚糖进行了絮凝。刘万顺等用壳聚糖作为絮凝剂,用于谷氨酸发酵液菌体絮凝技术的研究。结果表明,发酵液中菌体的去除率达 98% 以上,工艺路线简便,降低了成本,缩短了工时,提高了谷氨酸的回收率和产品质量,还回收了大量蛋白酵母饲料,而且减轻了废液对环境的污染。目前,此项技术已获得国家发明专利。陈盛等利用固定化细胞技术,用壳聚糖将厌氧菌群进行了固定化,通过 UASB(上流式厌氧污泥床)生化反应器,研究了固定化前后,及不同 pH 值条件下其处理味精生产后废水的能力。

5 在基因工程领域中的应用研究

壳聚糖这种天然阳离子多糖,还是一种潜在的转基因非病毒性载体。Erbacher 等^[10]通过扫描电镜观察、沉淀实验、动态光散射及荧光素酶报告基因转染实验,证明质粒 DNA 可与壳聚糖形成均匀而稳定的复合物,其直径约 50~100 nm,并用其有效地转化了 Hela 细胞。McLaughlin 等^[12]研究了血清、盐溶液及 pH 敏感性肽对壳多糖基因转移系统的影响,发现虽然在特定组织中报告基因表达有所增强,但表达水平较低,并认为这种复合物的吸收和降解是这一基因被细胞吸收的限速步骤。Leong 等^[11]以盐诱导法制备了 cDNA 与壳聚糖凝聚而成的小球,其直径在 200~750 nm 范围内,并可用以转化各种细胞系。虽然对于培养的细胞,其转化效率比脂质体转化法和磷酸钙共沉淀转化法低,但它在 BALB/c 小鼠肌肉细胞中表达 β 半乳糖苷酶的能力比裸 DNA 或脂质体系统转染的表达能力强且持久。研究表明,壳聚糖转基因系统有以下诱人的特点:(1)目的 DNA 可结合到用来刺激受

体介导的内吞作用的壳多糖微球上。(2)溶酶体组分可参与降低 DNA 在胞内体或溶酶体中的降解。(3)一些生物活性成分或多个质粒可被共包裹。(4)因此微球可以保护 DNA 免受血清核酸酶的降解,所以改善了 DNA 的生物活性。(5)此微球可以在液态保存条件下保护 DNA 生物活性。

6 结语

随着科学的发展和人们对生命现象认识的不断深入,糖生物学的研究成了生命科学研究领域的新前沿,而壳聚糖及其衍生物的研究是该研究领域中最为活跃的分支之一。生物工程是生物学与工程技术结合的产物,是 21 世纪技术革命的主角。作为自然界唯一大量存在的碱性氨基多糖——壳聚糖及其衍生物具有不同于其他多糖的独特作用,壳聚糖及其衍生物的应用研究已渗入到生物工程的各个分支中,并已显示出其独到的应用价值。因此,壳多糖及其衍生物与生物工程的密切结合必将极大地造福于人类。

参考文献

- 1 陈西广,刘万顺,郎刚华等.细胞生物学杂志,1997,增刊:30~32
- 2 陈西广,刘万顺,郎刚华等.青岛海洋大学学报,1997,27(1):51~54
- 3 范晓,张士瑾等.海洋生物技术新进展.北京:海洋出版社,1999.301~302
- 4 吴德升,赵定麟等.中国矫形外科杂志,1997,4(1):46~47
- 5 Augustin C., Frei V. et al.. *Skin Pharmacol.*, 1997, 10(2):63~70
- 6 Black A.F., Hudon V. et al.. *Cell Biol. Toxicol.*, 1999, 15(2):81~90
- 7 Duplan Perrat F., Da mour O. et al.. *J. Invest. Dermatol.*, 2000, 114(2):365~370
- 8 Elcin Y. M., Dixit V. et al.. *Artif. Organs.*, 1998, 22(10):837~846
- 9 Eser Elcin A., Elcin Y. M. et al.. *Neuml. Res.*, 1998, 20(7):648~654
- 10 Erbacher P., Zou S. et al.. *Pharm. Res.*, 1998, 15(9):1332~1339
- 11 Leong K. W., Mao H. Q. et al.. *J. Controled Release*, 1998, 53(1-3):183~193
- 12 McLaughlin F. C., Miper R. J. et al.. *J. Controled Release*, 1998, 56(1-3):259~272
- 13 Sechniest V. F., Mao Y. J. et al.. *J. Biomed Mater Res.*, 2000, 49(4):534~541 (本文编辑:刘珊珊)