

生物特异性功能高分子*

郭圣荣 封麟先 俞小杰 杨士林

(浙江大学高分子系, 杭州, 310027)

提要 模仿天然生物活性高分子关键作用点的化学组成, 在聚合物链上接上各种官能团或化学残基, 制备具有与该天然高分子相似生物活性的高分子, 即生物特异性功能高分子。本文主要介绍似肝素高分子和似粘连蛋白高分子两种生物特异性功能高分子。

关键词 似肝素高分子, 似粘连蛋白高分子, 生物特异性

1 引言

模仿天然生物活性物质人工合成或制备具有与该天然物质相似生物活性的高分子材料(即生物特异性功能高分子材料)是很有意义的。一方面用人工合成材料替代天然材料可以解决天然材料短缺、成本昂贵等问题, 另一方面可以反过来探讨天然材料生物活性机制的化学基础, 探索生命的奥秘。国外, 生物特异性功能高分子的研究已成为生物医用高分子领域的热点。国内, 很少有这方面的报道, 浙江大学高分子系正从事这方面的研究。本文旨在对这一领域的部分成果作一综述, 确切地说是介绍两种生物特异性功能高分子——似肝素高分子和似粘连蛋白高分子。

在介绍它们之前, 有必要先简要介绍高分子材料与生命体系间的相互作用。当高分子材料与生物环境(如血液)相接触时, 通常会发生诸如凝血和补体体系活化等各种不良反应, 从而给生命体系带来严重影响。这些反应往往是由于血液蛋白质和细胞与高分子材料发生非特异性作用所致。比如血液蛋白质与高分子材料的相互作用^[1]。如图1所示, 由于蛋白质分子本身具有各种不同的作用部位(如带电荷基团、疏水基团以及可形成氢键的基团等), 高分子材料表面亦是很复杂的。蛋白质在材料表面的吸

附就是由蛋白质分子的不同作用部位与材料表面的相应作用部位通过各种作用力(如静电力、氢键、范德华力等)相互作用的结果, 这种复杂的作用就是非特异性作用, 它必然导致蛋白质分子吸附的不可逆性、不可重复性, 从而导致吸附蛋白质的变性。而当生物活性物质与血液接触时, 它与血液蛋白质的反应具有高度特异性, 生物活性物质的这种特异性体现在如下两个方面: (1) 在血液蛋白质的竞争吸附中, 它优先吸附某种蛋白质; (2) 它对这种蛋白质的吸附具有高度的特异性, 即它是通过其特有的作用部位(生物活性作用点)与该蛋白质的相应部位发生作用的。有学者把这种特异性作用比喻为钥匙和锁的关系, 用“一把钥匙开一把锁”来形容这种特异性。一些学者把生物活性物质负载于高分子材料表面制备负载生物活性物质的高分子材料。这类材料当然亦应具有生物活性, 但它不是生物特异性功能高分子材料, 它具有如下缺陷: 第一, 它仍需要提供生物活性物质; 第



郭圣荣 男 30岁, 湖北潜江人, 1987~1989年在浙江大学化学系攻读表面与胶体化学硕士学位, 获理学硕士及浙江省优秀论文二等奖。1992年至今在浙江大学高分子系攻读博士学位, 从师于杨士林、封麟先二位教授, 研究方向为

生物活性高分子的合成、表面和本体表征及其生物活性的测定。

* 863 及国家自然科学基金资助项目。

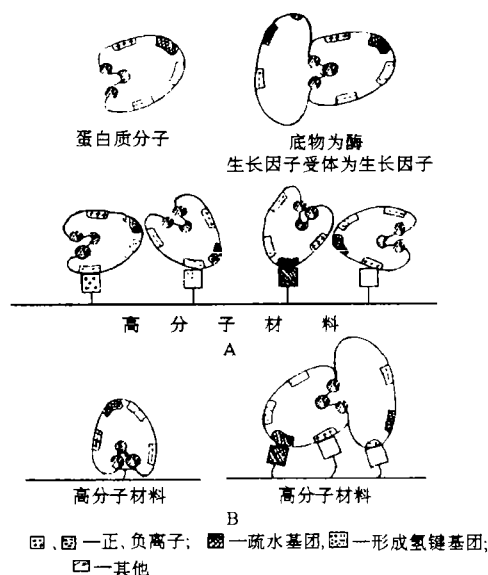


图 1 高分子材料与蛋白质的相互作用示意图

A—非特异性相互作用; B—特异性相互作用

二,在将生物活性物质通过物理吸附、共价键或离子键负载于材料表面时易发生变性而失活。生物特异性功能高分子是模仿生物活性物质的化学组成来设计和制备的,更确切地说,是模仿生物活性物质的关键作用点的化学组成。

2 似肝素高分子

肝素是一种天然线性多阴离子聚糖衍生物,其化学名称为氨基葡聚糖,分子量分布范围为 3000~40000 daltons^①,平均分子量为 15000 daltons^②。商用肝素是从牛和猪的肺、肠粘膜分离提取的。其化学结构如图 2 所示,主要由两个重复的二糖单元组成,*D*-葡糖胺-*L*-艾杜糖醛酸和 *D*-葡糖胺-*L*-葡糖醛酸,在其多糖大分子链上连有大量的 *N*-和 *O*-硫酸基和羧基,肝素的抗凝血活性主要与这些化学基团以及它们在大分子链上的分布和构象有关。有证据表明肝素与抗凝血因子(AT III)发生特异性作用的活性作用点是一个四糖单元序列,这个四糖单元序列是由两个不含硫酸基的糖醛酸

单元和两个含有 *N*-和 *O*-硫酸基的葡糖胺单元构成,肝素分子就是通过这一活性作用点与 AT III 发生特异性作用而具有抗凝血活性的^[3,4]。肝素除具有抗凝血活性外,还具有其他

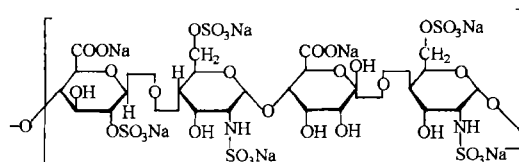
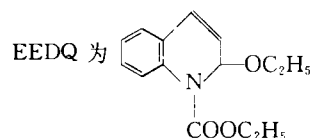
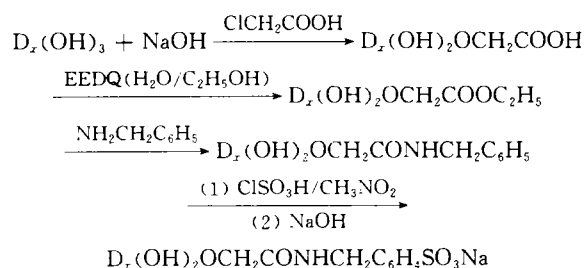


图 2 肝素钠的结构

生物活性,如抑制补体体系活化、抑制或促进细胞生长和繁殖、对酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF 和 bFGF)具有保护、稳定和强化的生物活性^[5~7]。根据肝素分子上具有许多 *O*-和 *N*-硫酸基和羧基的化学结构特点,Jozefonvicz 等^[1,8]模仿肝素分子在交联聚苯乙烯(PSt)和葡聚糖分子上接上羧基和苄酰胺磺酸盐等制备了一系列 PSt 衍生物和葡聚糖衍生物,并对其生物活性进行研究。

2.1 葡聚糖衍生物的制备

葡聚糖常用作血浆体积膨胀剂,其化学成分为聚 α -1,6-葡萄糖。葡聚糖衍生物的制备分为以下几个步骤:首先是羧甲基化,其次羧基苄酰胺化,然后在苯环上磺酸化^[9,10]。见下式:



2.2 葡聚糖衍生物似肝素活性

2.2.1 抗凝血性 由图 3 可知葡聚糖衍生物的主链上随机分布着 4 种葡糖单元:未取代葡糖单元(D),及分别含有羧甲基、苄酰胺基、苄

①1 dalton (道尔登)=1.66057×10⁻²⁷kg。

酰胺磺酸基的葡糖单元(CM、B、S)。仅含有CM、B的衍生物没有抗凝血性,含有S的衍生物才具有抗凝血性^[9~11]。当S含量一定时,衍

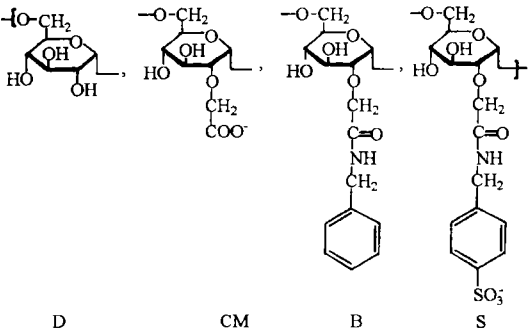


图 3 葡聚糖衍生物的结构

生物的抗凝血性强烈依赖于CM的含量,只有CM含量>40%的衍生物才具有明显的抗凝血性,在CM含量为40%~50%范围内,随着CM含量的增大,衍生物的抗凝血性迅速增强。当CM含量一定时,衍生物抗凝血性也强烈依赖于S的含量(如图4所示),当S和CM的含量

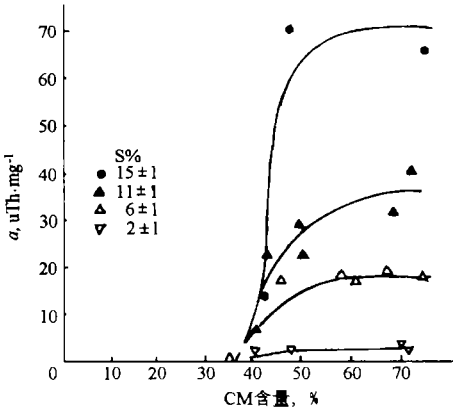


图 4 葡聚糖衍生物抗凝血活性 α 与其结构的关系

达到某一定值时,衍生物将具有最大的抗凝血性。有趣的是肝素分子中活性作用点四糖单元序列中的羧基的含量为50%,这个值与具有最大抗凝血活性的衍生物的羧基含量相接近。衍生物的分子量对其生物活性亦有影响,在取代

基含量一定(CM 50%和S 19.5%)时,分子量为40000daltons的衍生物抗凝血活性为245.1 uTh/mg,而分子量为10500daltons的衍生物的抗凝血活性为80.9uTh/mg^①,分子量较大的衍生物抗凝血活性较大。在分子量为14500~40000daltons的范围内,衍生物的抗凝血活性随其分子量的增大而迅速增强,最后趋于平稳^[11]。肝素分子亦具有如上分子量依赖性^[12]。另外,只有在ATⅢ存在下,葡聚糖衍生物才具有抗凝血活性,这说明葡聚糖衍生物的抗凝血机理与肝素相似,必须有ATⅢ的存在^[13]。

2.2.2 抗补体系活化 仅具有CM、B的葡聚糖衍生物抗补体系活化活性不大,只有含有S的衍生物才具有较强的活性。CM、S的含量对葡聚糖衍生物抗补体系活化活性的影响与其对抗凝血活性的影响相似^[11]。衍生物的抗补体系活化和抗凝血性的比较见表1^[14]。

表 1 葡聚糖衍生物抗凝血性与抗补体系活化活性的比较

组 成 (糖单元含量, %)			抗补体系活化活性 ($\mu\text{g}/10^7\text{EAC4b, 3b, Bb, p}$)	抗凝血活性, uTh/mg
CM	B	S		
0	0	0	400	0
68.5	0	0	120	0
51.0	14	0	120	0
40.0	12	3.0	60.0	3
45.0	0	4.0	13.0	15
61.0	0	4.0	11.0	16
37.0	15	4.5	60.0	1
47.5	0	5.0	9.0	25
60.0	14	5.0	10.0	18
37.0	11	9.0	45.0	1
43.0	4	11.0	7.5	23
68.0	0	12.0	4.0	31
71.5	0	9.5	3.0	40

* 在 10^7 个EAC4b, 3b, Bb, p活性部位中有50%被抑制失活所需的聚合物的量(μg)。

从表1可知,虽然含有CM、S的衍生物既具有抗补体系活化活性也具有抗凝血性,然而只有当S含量较大时,衍生物才具有明显的抗凝血性,而在S含量不大时,只要CM含量足够大,衍生物 also 具有很好的抗补体系活化活性。

① uTh/mg 为每毫克衍生物抑制凝血因子的量。

当 S 含量 > 10% 时, 衍生物的抗凝血性和抗补体系活化活性都很好。通过调节衍生物中各取代基的含量, 可以制备具有很高抗补体系活化活性同时抗凝血性很低的高分子材料, 这种性质的材料可用作非甾类消炎药。分子量对衍生物抗补体系活化活性的影响与其对抗凝血性的影响相似^[11]。

2.2.3 抑制平滑肌细胞增殖活性 含有 S 的衍生物具有抑制平滑肌细胞增殖活性, 其活性与肝素的差不多, 荧光探针实验证明葡聚糖衍生物和肝素都内化于平滑肌细胞中, 两者具有相似的抑制细胞增殖机理^[15]。

葡聚糖衍生物还有其他似肝素生物活性, 如保护、稳定、强化 aFGF 和 bFGF 的活性^[16~18]。

2.3 聚苯乙烯衍生物的准备

聚苯乙烯 (PSt) 常用作经典的组织培养基材。磺酸化 PSt 通过氯磺化 PSt 的水解得到; 氨基酸磺酰胺 PSt 由氯磺化 PSt 与氨基酸反应制备; 氯磺化 PSt 是由 PSt 与氯磺酸反应得到的^[19~29]。

2.4 聚苯乙烯衍生物的抗凝血性及抗凝血机理

含有磺酸基和/或氨基酸磺酰基的 PSt 具有明显的抗凝血性。谷氨酸磺酰胺 PSt 在血浆中的抗凝血活性大约为磺酸化 PSt 的 3 倍^[19,21]。磺酸化 PSt 的抗凝血活性与材料表面的磺酸基的浓度呈线性关系, 这说明一方面材料表面上孤立的磺酸基团便足以作为活性作用点, 另一方面材料表面上吸附蛋白质的浓度很低。当羧基直接键合或蛋氨酸以酰胺键结合到 PSt 上时, 该衍生物不具有生物活性^[19]。然而氨基酸磺酰胺 PSt 却具有比磺酸化 PSt 更高的抗凝血性, 其中天冬氨酸磺酰胺 PSt 抗凝血性最好^[20]。

凝血酶和抗凝血酶在磺酸化 PSt 或谷氨酸磺酰胺 PSt 材料表面的吸附是可逆的, 它们与材料表面的负电荷发生强烈的相互作用, 其对材料的亲合性分别为 $K_t \approx 10^7 (\text{mol/L})^{-1}$ 和 K_{at}

$\approx 10^5 (\text{mol/L})^{-1}$, $K_t > K_{at}$; 在血浆中它们与其他蛋白质(如白蛋白 alb)发生竞争吸附, 亲合性大小顺序为 $K_{alb} < K_{at} < K_t$ 。白蛋白可与抗凝血酶发生竞争吸附, 但不足以与凝血酶发生竞争吸附。该 PSt 衍生物还能催化凝血酶与抗凝血酶之间形成络合物, 这种络合物对材料的亲合性大于抗凝血酶, 小于凝血酶^[22,23,25]。肝素的抗凝血活性是由于它能催化凝血酶与抗凝血酶之间形成络合物, 从而使凝血酶失活, 从这点看, PSt 衍生物和肝素具有相似的抗凝血机理。另外, PSt 衍生物表面吸附的抗凝血酶亦使血小板在其表面的粘附量减少^[21]。

3 似粘连蛋白高分子

细胞粘连蛋白在细胞间以及细胞与细胞外间质间的粘着方面具有重要作用。许多细胞粘连蛋白(如 fibronectin、vitronectin、fibrinogen 等)已被证明都含有 RGD(R 为精氨酸, G 为甘氨酸, D 为天冬氨酸)三肽序列, RGD 三肽序列是细胞粘连蛋白的关键活性作用点之一^[30~32]。把含有 RGD 序列的短链肽接到高分子材料上, 并研究这种材料的似细胞粘连蛋白活性, 这方面的工作已有一些报道, 并逐渐成为研究热点。因为把生物活性物质的关键活性作用点(如短链肽序列)固定在高分子材料上比固定整个生物活性物质具有较多的优点: (1) 短链肽能高密度地固定在材料表面^[33]; (2) 表面上分布

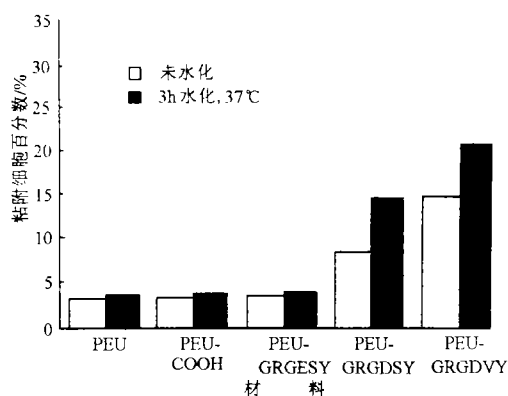


图 5 材料的水化处理对人体内皮细胞在其上粘附活性的影响

的活性作用点不易相互覆盖;(3)短链肽结构简单,对pH和温度具有足够的稳定性,可在正常条件下长期贮存;(4)易于制备合适的保护基团,在短链肽固定于高分子基材上时避免负反应发生等。Horng-Ban Lin等^[34~36]把3种短链肽(GRGESY、GRGDSY、GRGDVY;E为谷氨酸,S为丝氨酸,Y为酪氨酸,V为缬氨酸)

接枝到聚氨酯(PEU)表面,并对其生物活性进行表征。从图5可知经水处理和未经水处理的材料对人体内皮细胞的粘附活性大小顺序为PEU-GRGDVY>PEU-GRGDSY>PEU-GRGESY≈PEU-COOH≈PEU。未经水处理时,在PEU、PEU-COOH、PEU-GRGESY材料上的细胞粘附百分含量仅为3%~4%,在

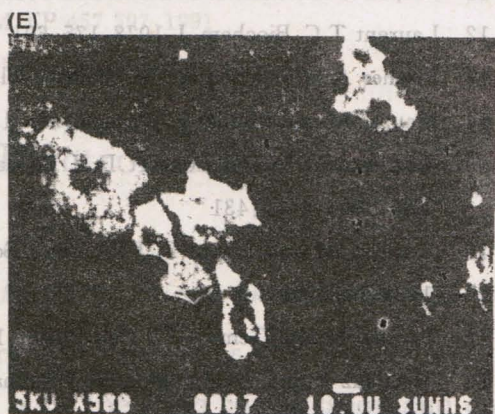
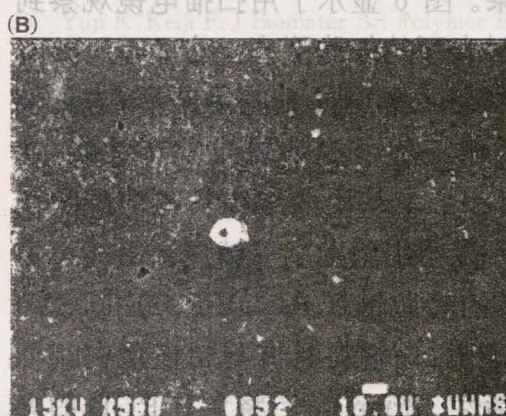


图6 粘附在下列各种材料上的人体内皮细胞的扫描电镜照片

(A)、(B):PEU; (C)、(D):PEU-GRGESY; (E)、(F):PEU-GRGDVY

(A)、(C)、(E)——材料未经水化处理; (B)、(D)、(F)——材料经水化处理

PEU - GRGDSY 和 PEU - GRGDVY 材料上细胞粘附百分含量为 9% 和 16%; 经水处理后, PEU、PEU - COOH 和 PEU - GRGESY 材料的细胞粘附活性无明显变化, PEU - GRGDSY、PEU - GRGDVY 材料的细胞粘附活性变大了, 这可能是经水处理后材料表面上的短肽链的生物活性增大和细胞更易于与其发生作用的结果。图 6 显示了用扫描电镜观察到的粘附在材料表面的细胞形态。在 PEU、PEU - GRGESY 材料上粘附的细胞呈圆形, 未见伸展的伪足, 说明细胞很少铺展或没有铺展; 在 PEU - GRGDVY 上粘附的细胞具有伸展的伪足, 形态扁平, 说明细胞发生了铺展。由此可见将含有 RGD 的短肽链 (GRGDVY、GRGDSY) 接枝到聚氨酯上, 该材料具有与粘连蛋白相似的细胞粘附活性。Brian 等^[37]将含有 RGD 的九肽序列共价接枝到聚丙烯酰胺上, 从而使其具有粘附成纤维细胞的活性。Yuji 等^[38]把含有 RGD 的四肽序列接到聚合物微球上, 该材料对血小板具有粘附活性。Akio 等^[39]把 RGD 三肽接到白蛋白上后, 体外实验表明白蛋白具有和纤维粘连蛋白相似的生物活性, 体内实验表明该白蛋白还具有似纤维粘连蛋白的促进软组织内生于多孔基质中的活性, Yoshiaki 等^[40]将 RGD 以及含有 RGD 的四肽序列固定在乙烯-丙烯酸共聚物上, 研究这些材料对五种细胞的粘附活性, 发现固定在材料上的四肽 (RGDX) 比三肽 (RGD) 具有更大的细胞粘附活性, 氨基酸残基在 RGDX 的细胞粘附活性方面起着重要的作用。

4 小结

根据肝素的化学结构特点, 其大分子链上含有许多 O- 和 N- 硫酸基团和羧基, 在葡聚糖和聚苯乙烯上接上相似的磺酸基和羧基等, 该葡聚糖和聚苯乙烯衍生物便具有似肝素活性; 把细胞粘连蛋白中的关键活性作用点 (RGD) 接枝到高分子材料上, 该材料具有似细胞粘连蛋白的生物活性。这说明模仿天然生物活性物

质的化学组成来设计和制备生物特异性功能高分子的方法是可行的。从葡聚糖和聚苯乙烯衍生物中磺酸基的含量对它们的似肝素活性具有重要影响, 可以反过来说明肝素分子的 O- 和 N- 硫酸基团确实对其生物活性具有重要作用, 含有 RGD 的短肽链接到高分子基质上, 该材料便具有细胞粘附活性, 也反过来可以说明细胞粘连蛋白质分子中的 RGD 三肽序列的确对其细胞粘连活性具有重要意义, 是其关键的生物活性作用点。

生物特异性功能高分子无疑为我们用人工合成材料替代天然生物活性材料提供了一条途径, 同时对我们设计高分子和进行科研工作具有较好的启发作用。

5 参考文献

- 1 Jozefonvicz J and Jozefowicz M. J Biomater Sci Polymer Edn, 1990, 1(3): 147
- 2 Amiji M and Park K. J Biomater Sci Polymer Edn, 1993, 4(3): 217
- 3 Rea W J. Surg Forum, 1971, 22: 188
- 4 Yen S P S. J Biomed Mater Res Symp, 1971, 1: 83
- 5 Maillet F. Mol. Immunol, 1983, 20: 1401
- 6 Wright T C. J Bio Chem, 1989, 264: 1534
- 7 Tardieu M. J Cell Physiol, 1983, 150: 194
- 8 Jozefonvicz J and Jozefowicz M. Pure & Appl Chem, 1992, 64(11): 1783
- 9 Mauzac M and Jozefonvicz J. Biomaterials, 1984, 5: 301
- 10 Mauzac M and Aubert N. Biomaterials, 1982, 3: 22
- 11 Crepon B and Maillet F. Biomaterials, 1987, 8: 242
- 12 Laurent T C. Biochem. J, 1978, 175: 691
- 13 Fischer A M and Mauzac M. Biomaterials, 1985, 6: 198
- 14 Mauzac M and Maillet F. Biomaterials, 1985, 6: 61
- 15 Lettourneur D and Logeart D. J Biomater Sci Polymer Edn, 1993, 4(4): 431
- 16 Tardieu M and Slaoui F. J Biomater Sci Polymer Edn, 1989, 1(1): 63
- 17 Tardieu M and Gemby C. J Cell Physiol, 1992, 150: 194
- 18 Vaudaux P and Avramoglou T. J Biomater Sci Polymer Edn, 1992, 4(2): 89
- 19 Kanmangne F M and Labarre D. Biomaterials, 1985, 6: 297
- 20 Douzon C and Kanmangne F M. Biomaterials, 1987, 8: 190

- 21 Fougnot C and Lindon J. *Biomaterials*, 1984, 5: 169
- 22 Fougnot C and Jozefowicz M. *Biomaterials*, 1984, 5: 94
- 23 Fougnot C and Jozefowicz M. *Biomaterials*, 1984, 5: 89
- 24 Silver J H and Hart A P. *Biomaterials*, 1992, 13: 339
- 25 Fougnot C and Jozefowicz M. *Biomaterials*, 1983, 4: 294
- 26 Montdargent B and Maillet J. *Biomaterials*, 1993, 14(3): 203
- 27 Montdargent B and Toufic J. *Biomaterials*, 1992, 13(9): 571
- 28 Charef S and Dupillier M P. *Biomaterials*, 1990, 11: 425
- 29 Fougnot C and Dupillier M P. *Biomaterials*, 1983, 4: 101
- 30 Pytela R and Pierschbacher M D. *Science*, 1986, 231: 1559
- 31 Pytela R and Pierschbacher M D. *Cell*, 1986, 44: 517
- 32 Hayman E C and Pierchbacher M D. *J Cell Biol*, 1985, 100: 1948
- 33 Imanishi Y and Ito Y. *J Macromol Sci Chem*, 1988, A25: 555
- 34 Lin Horng - Ban and Lewis K B. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 1993, 4(3): 183
- 35 Lin Horng - Ban and Zhao Zhi - Cheng. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 1992, 3(3): 217
- 36 Lin Horng - Ban and Echeverria C C. *Biomaterials*, 1992, 13(13): 905
- 37 Brian K, Bvandley P L S. *Anal Biochem*, 1988, 172: 270
- 38 Yuji K, Keiji F. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 1993, 4(4): 369
- 39 Akio K, Munehiro T. *Biomaterials*, 1992, 13(13): 924
- 40 Yoshiaki H, Motoya O. *J Biomater Sci Polymer Edn* 1993, 4(3): 235

Biospecific Functional Polymers

Guo Shengrong, Feng Linxian, Yu Xiaojie, Yang Shilin

(*Department of Polymers, Zhejiang University, Hangzhou 310027*)

Summary Biospecific functional polymers are tailored by randomly substituting a polymeric backbone with functional groups or chemical residues which mimic the constituents of the biopolymer active site. This article reviews two kinds of biospecific functional polymers; heparin like functional polymers and adhesive protein like functional polymers.

Key words Biospecific, Heparin - like polymers, Adhesive protein - like polymers

(上接第 173 页)

- 28 Okada I. *JP 04 07 397*, 1992
- 29 Kurihara M. *JP 03 74 494*, 1991
- 30 Ahmed S M, Wilmington D. *USP 4 992 192*, 1991
- 31 Minemura M. *JP 02 142 896*, 1990
- 32 Minemura M. *EP 457 597*, 1991
- 33 Chung K. *USP 4 994 198*, 1991
- 34 Osaki T. *JP 01 266 191*, 1989
- 35 Yoshimura R. *JP 04 25 596*, 1992
- 36 Marakami K. *JP 02 255 798*, 1990
- 37 Shiga T. *JP 04 225 096*, 1992
- 38 Yoshimura R. *JP 04 15 297*, 1992
- 39 Ishino Y. *JP 03 139 598*, 1991
- 40 Katsufumi T. *Polym J*, 1992, 24(9): 995

Polymer Electrorheological Fluid

Wu Shuizhu, Shen Jiarui

(*Department of Polymer Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, 510641*)

Summary In this paper, the history and mechanism of the electrorheological effect are introduced, along with the fluid composition and current researches. The applications of polymer electrorheological fluid and expectation of its further research areas are also reviewed.

Key words Electrorheological fluid, Electroresponsive fluid, Polymer