

甲壳素/壳聚糖及其衍生物抗菌、抗肿瘤活性研究进展

何乃普, 宋鹏飞, 王荣民^{*}, 张 慧, 王云普

(西北师范大学甘肃省高分子材料重点实验室, 兰州 730070)

摘要: 主要从甲壳素/壳聚糖及其衍生物在抗菌、抗肿瘤活性两方面的研究进展进行了综述。

关键词: 甲壳素/壳聚糖; 抗菌活性; 抗肿瘤活性; 进展

甲壳素又名甲壳质、几丁质、壳多糖, 化学名称为聚-*N*-乙酰-*D*-葡萄糖胺, 属于氨基多糖, 是一种天然高分子聚合物。甲壳素脱除乙酰基后其产物是壳聚糖, 又名甲壳胺或可溶性甲壳质, 其化学名称为(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -*D*-葡聚糖(见图1)。壳聚糖是一种天然聚阳离子多糖衍生物, 具有优良的生物亲和性, 其分子链上丰富的羟基和氨基使其易于进行化学修饰而赋予多种功能。

甲壳素/壳聚糖在医药的应用一直是科学家们研究的热点, 其主要表现在以下几个方面^[1~3]: (1) 自身有一定的药理活性, 如抗菌活性、抗肿瘤活性、抗胆固醇升高、抗凝血、抗感染等特性; (2) 有优良的生物相容性, 即血液相容性、组织相容性、生物相粘性、无细胞毒性和良好的机体免疫性; (3) 作为多糖, 是所有生命有机体的重要组分, 在控制细胞分裂和分化、调节细胞生长和衰老以及维持生命有机体的正常代谢等方面有重要作用; (4) 良好的保湿性能, 使其应用于化妆品^[4,5]和促进伤口愈合^[6,7]取得了

良好的效果; (5) 链上丰富的羟基和氨基使其易于进行化学修饰, 可作为小分子药物或一些大分子药物的载体; (6) 作为天然聚阳离子多糖衍生物, 其阳离子性质使其对 DNA 或细胞表面具有较强的静电作用, 从而作为基因载体有潜在的优势。本文主要从其在抗菌、抗肿瘤活性方面的研究进展进行了综述。

1 抗菌活性(Antibacterial or Antimicrobial)

夏文水^[8]用低聚壳聚糖通过对大肠杆菌的抗菌活性实验证明, 低聚壳聚糖的抗菌活性随着其分子量的降低而逐渐增强, 尤以均分子量为 1500 左右的低聚壳聚糖的抗菌效果最好, 而且通过实验比较, 证明了游离氨基的存在是壳聚糖抗菌抑菌作用的基础。已知的壳聚糖的抗菌活性可能来源于下面两个方面^[9]: 细菌表面通常带有负电荷, 在酸性条件下, 壳聚糖具有阳离子性质, 它能与细

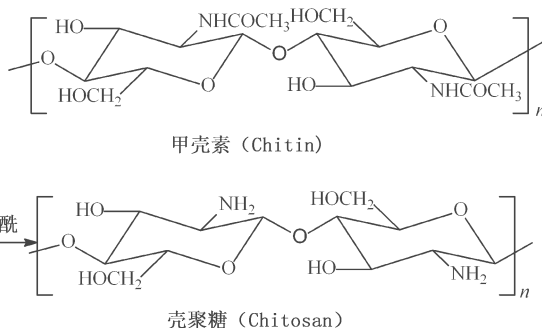


图1 甲壳素和壳聚糖结构

Figure 1 The chemical structures of chitin and chitosan

基金项目: 国家自然科学基金(20274034)

作者简介: 何乃普(1974—), 男, 硕士研究生, 毕业于西北师范大学高分子研究所, 从事天然高分子生物活性研究。现在兰州交通大学化学与生物工程学院任教。

^{*} 通讯联系人, Email: wangnm@nwnu.edu.cn

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌细胞的表面带有负电荷的大分子基团结合,从而附着于细菌细胞表面,破坏细胞壁,使细菌的呼吸功能受到抑制而致死;低聚壳聚糖能穿透细胞壁,进入细胞的内部,抑制细胞中 RNA 和蛋白质的合成,从而抑制细胞的生长。

虽然低聚壳聚糖具有较好的抗菌活性,但是最近 Jeon 等的研究表明^[10],高聚壳聚糖较低聚壳聚糖对细菌的生长具有更高的抑制作用,研究中提到,壳聚糖和其低聚物的抗菌活性主要受其分子量的影响。但这些研究所采用的壳聚糖和其低聚物在分子量分布上不太具有规律,不便于完全说明壳聚糖分子量对其抗菌抑菌活性的影响。为了进一步研究壳聚糖的分子量对其抗菌抑菌活性的影响, No 等^[11]用六种不同分子量的壳聚糖(CS: $M_w = 1671\text{kDa}$, 1106kDa , 746kDa , 470kDa , 224kDa 和 28kDa ;注:Da 为分子量单位 Dalton)和六种不同分子量的壳聚糖低聚物(COS: $M_w = 22\text{kDa}$, 10kDa , 7kDa , 4kDa , 2kDa 和 1kDa)分别对四种带负电和七种带正电的细菌进行了抗菌抑菌活性实验。研究表明,CS 的抗菌抑菌活性明显强于 COS,CS 对大部分细菌具有抑制作用,并且 CS 和 COS 分子量的不同和细菌种类的不同将影响到对细菌的抑制活性。在 CS 浓度为 0.1% 时,其对带正电细菌的杀死效果强于带负电的,由于 CS 的分子量的不同和细菌种类的不同,其最小抑制浓度(MIC; minimum growth inhibitory concentration)在 $0.05\% \sim 0.1\%$ 之间。溶剂和溶液 pH 值的不同对 CS 抗菌抑菌活性也有重要的影响,其中在 $\text{pH} = 4.5 \sim 5.9$ 之间可观察到 CS 的抗菌抑菌活性,且在较低 pH 时,其抗菌抑菌活性则更高。

除了不同分子量的壳聚糖具有抗菌抑菌活性外,一些改性壳聚糖也具有抗菌抑菌活性,文献^[12,13]研究了三种不同分子量的低聚壳聚糖及其被不同氨基酸改性后的抗菌抑菌活性,发现低聚壳聚糖及其衍生物对 *Escherichia coli* 细菌的生长具有较好的抑制作用。姚康德等^[14]用 γ -辐射法制备了不同分子量($M_w = 5.11 \times 10^4 \sim 1.08 \times 10^6$)、不同脱乙酰度($\text{DDA} = 74.0\% \sim 89.9\%$)的低聚壳聚糖和其羧甲基化衍生物,并研究了这些化合物对 *Escherichia coli* 细菌生长的抑制作用。这些化合物对 *Escherichia coli* 细菌都表现出不同的抑制作用,对低聚壳聚糖而言,随着其分子量从 5000 升高到 9.16×10^4 ,其抗菌活性也在升高,而当其分子量从 9.16×10^4 升高到 1.08×10^6 ,其抗菌活性反而降低;随着低聚壳聚糖 DDA 和在溶液中浓度的升高,其抗菌活性也在升高;在溶液 $\text{pH} = 6.3$ 时,其抗菌活性最强,在溶液 pH 大于 7 时,没有发现抗菌活性,这可能是在这种环境中水溶性降低的原因;壳聚糖及其羧甲基化衍生物的抗菌活性依次为: *O*-羧甲基壳聚糖(*O*-CM-Chitosan) > 壳聚糖(chitosan) > *N*, *O*-羧甲基壳聚糖(*N*, *O*-CM-Chitosan)。他们认为壳聚糖及其羧甲基化衍生物的抗菌活性主要受聚合物中 NH_2 含量的影响,即在溶液中受 $-\text{NH}_3^+$ 浓度的影响,并用 FITC (fluorescein isothiocyanate) 示踪法研究了分子量为 8000 和 5000 两种壳聚糖在细菌内的分布,提出了可能的机理,认为具有较好渗透性的低聚壳聚糖可能阻碍了 DNA 的转录从而干扰 RNA 和蛋白质的合成。

Jia 等^[15]报道了季铵化的壳聚糖的抗菌活性,结果显示其对 *E. coli* 细菌抑制作用主要受其分子量的影响,且在乙酸中的抑制作用强于在水中的,其抗菌活性随着乙酸浓度的增大而增大。同时还发现壳聚糖季铵化后抗菌活性明显强于未进行改性的。另有报道^[16]将壳聚糖进行季铵化后对其抗菌性能进行了测定并予以比较,在乙酸缓冲液中, 100×10^{-6} 的浓度的抗菌剂,经比较其抗菌活性的顺序为:壳聚糖 < *N*, *N*-二丁基壳聚糖 < *N*, *N*-二丁基-*N*-甲基壳聚糖 < *N*-辛基-*N*, *N*-二甲基壳聚糖 < *N*-十二基-*N*, *N*-二甲基壳聚糖。可见季铵化壳聚糖的抗菌活性比壳聚糖强,而且随着烷基链长度的增加,其抗菌活性也增加,表明烷基链的长度和正电荷取代基强烈地影响着壳聚糖衍生物的抗菌活性。

壳聚糖抗菌活性应用主要集中在医药和食品行业^[17] 1992 年日本首先报道了壳聚糖改性粘胶

纤维的开发情况,并于 1996 年将这种抗菌纤维和棉混纺成布料,制成了商品化的婴儿内衣。天津大学制备了壳聚糖-粘胶纤维共混再生纤维,具有较好的防臭、杀菌效果,有望投入市场使用^[18,19]。在真丝织物的抗菌防皱整理中,柠檬酸与壳聚糖有良好的协同作用;在合适的处理条件下,对于提高真丝织物的抗菌防皱性,保持真丝原有的优良服用性能具有实际意义^[20]。杜予民等^[21,22]研究了壳聚糖水杨酸盐-明胶共混膜和纤维素/羧甲基壳聚糖共混膜抗菌性能,结果表明这类壳聚糖共混膜具有显著的抗菌活性,将具有广阔应用前景。

综上所述,甲壳素/壳聚糖及其衍生物的抗菌活性受壳聚糖的分子量、脱乙酰度、改性剂和其改性程度、溶液的 pH 值以及不同的作用细胞等因素影响。

2 抗癌活性(Anticancer or Antitumor activity)

壳聚糖有直接抑制肿瘤细胞生长的作用,在 1×10^5 个癌细胞的溶液中加入 0.5 mg/mL 的壳聚糖,24h 后癌细胞全部死亡。同样的试验甲壳素无此直接作用,但在动物体内试验中甲壳素则具有明显的抗肿瘤活性。壳聚糖在体外显示凝聚白血病肿瘤细胞,生成紧密的凝块抑制细胞生长,壳聚糖对 DNA 有极强的亲和力,可以抑制宿主细胞对病原体的反应^[23]。何学斌等^[24,25]采用荷瘤小鼠研究了壳聚糖在体内、外抗肿瘤活性。壳聚糖对荷瘤小鼠有较强的抗肿瘤作用,它能提高荷瘤小鼠免疫功能,还可以降低化疗药物的毒副作用。

1986 年 Suzuki 等^[26]首先研究了甲壳六糖(*N*-hexaacetylchitoexaose)和壳六糖(chitoexaose)在老鼠体内的抗癌活性,结果证明,虽然药剂量较大,但具有较高的抗癌活性,也无毒性,在体液中很快便被清除,并且发现两种低聚物并不是直接杀死癌细胞,而是对机体间接的免疫性的达到抑制肿瘤细胞生长的目的,随后他们对这类低聚物的抗癌活性进行了进一步的研究^[27],发现这两种低聚物对 Meth-A 肿瘤也具有抑制作用。同时研究还发现结构单元为 3 和 4 及其不同分子量的壳聚糖^[28,29]对老鼠体内的肉瘤(Sarcoma)180 细胞具有抑制作用。文镜等^[30]用低聚壳聚糖(6~9 个单糖分子)研究了对实体瘤和腹水瘤的抑制作用,结果显示低聚壳聚糖能够抑制体外培养的肿瘤细胞 DNA 的合成,具有一定的抑制肿瘤作用。

最近研究了分子量为 $17.7 \times 10^3 \sim 1.57 \times 10^3$ 的壳聚糖对 Sarcoma180 细胞的抑制作用,通过注射壳聚糖低聚物和其 *N*-乙酰衍生物于老鼠体内,发现这些低聚物对 Sarcoma180 细胞均有抑制作用,最高抑制率可达到 64%,具有较高分子量的壳聚糖其抗肿瘤活性则最高,且高于甲壳六糖和壳六糖。通过口服低聚壳聚糖及其 *N*-乙酰衍生物于老鼠体内,对肿瘤细胞的生长也具有抑制效果,最高抑制率可达到 33.7%^[31]。刘艳如^[32]研究了相对分子质量为 1900 的水溶性壳聚糖对小鼠非特异性免疫和体液免疫功能的影响,并对荷 S180 肿瘤的小鼠进行了抗肿瘤活性的初步观察,结果表明对小鼠 S180 肿瘤有明显的抑制作用,抑瘤率为 53.3%~63.3%。同时分子质量为 1000~1400 水溶性壳聚糖亦能显著提高荷瘤小鼠的免疫功能^[33]。壳聚糖的降解产物对 Ehrlich acites 肿瘤细胞亦有抑制作用^[34]。

除了甲壳素/壳聚糖自身具有抗癌抗肿瘤活性外,它的一些衍生物也具有一定的抗癌抗肿瘤活性。郭振楚^[35]研究了对壳聚糖羧甲基化后的抗肿瘤活性,结果发现改性后的壳聚糖对治疗腹水型肿瘤的治愈率达 80%,而未改性的壳聚糖的治愈率仅为 61%。1998 年在一份欧洲专利^[36]中报道了壳聚糖的衍生物用于杀死 malignant 肿瘤。日本科学家分别制备了羧甲基甲壳素及其磺化衍生物,并研究了这些化合物对 B16-BL6 黑色素瘤细胞的体外抑制试验^[37~41],研究结果发现 6-*O*-羧甲基甲壳素(CM-chitin) 6-*O*-硫酸羧甲基壳聚糖(SCM-chitosan)和 6-*O*-硫酸壳聚糖(S-chitosan)对肿瘤细胞

无抑制作用,而 6-*O*-硫酸甲壳素(S-chitin)和 6-*O*-硫酸羧甲基甲壳素(SCM-chitin)对肿瘤细胞有较明显的抑制作用,且硫酸化程度越高,其抗肿瘤活性越强,并提出了可能的作用机理。甲壳素及其衍生物并不能直接杀死肿瘤细胞,而是其氨基具有明显的免疫特性。目前认为硫酸化甲壳素的抗癌机理为:抑制肿瘤细胞在血管内皮下基质的粘附,可刺激产生白介素 I 及增强体内巨噬细胞的生成,显著抑制朝向肿瘤实体的血管生成。最近, Lee 等^[42]对壳聚糖季铵化后研究了它们的抗肿瘤活性及其构效关系,得出了较好的结果。

由于甲壳素/壳聚糖及其衍生物具有一定的抗癌活性,所以将其与其他一些抗癌药物混合使用以提高药物的药理活性^[43~47]。另外在激光免疫治疗癌症(Laser immunotherapy)^[48,49]、中子捕获治疗癌症(Neutron-capture therapy)^[50~52]和辐射免疫治疗癌症(Radiation immunotherapy)^[53]等方法中用作免疫调节剂(immunoadjuvant),如专利文献报道了^[54] ^{166}Ho , ^{153}Sm , ^{165}Dy , ^{169}Er 的壳聚糖配合物和大分子的聚集体的制备,这些具有放射性的复合物用于治疗风湿性关节炎、肝癌、脑癌和乳腺癌等癌症有良好的疗效。

总之,甲壳素、壳聚糖及其衍生物由于具有特殊的性能而得到关注,相信将受到深入研究。

参考文献:

- [1] Muzzarelli R A A. CMLS·Cell Mol Life Sci, 1997, 53, 131~140.
- [2] Dumitriu S, Chornet E. Adv Drug Deliver Rev, 1998, 31, 223~246.
- [3] Majeti N V, Ravi K. React Funct Polym, 2000, 46, 1~27.
- [4] 张文清, 柴平海, 金鑫荣, 应东飞. 高分子通报, 1999, 2, 73~76.
- [5] 谭天伟. 牙膏工业, 1999, 2, 31~32.
- [6] Ueno H, Mori T, Fujinaga T. Adv Drug Deliver Rev, 2001, 52, 105~115.
- [7] Cho Y W, Cho Y N, Chung S H, et al. Biomaterials, 1999, 20, 2139~2145.
- [8] 夏文水, 吴焱楠. 无锡轻工业大学学报, 1996, 15(4), 297~302.
- [9] 鲁从华, 罗传秋, 曹维孝. 高分子通报, 2001, 12, 46~53.
- [10] Jeon Y J, Park P J, Kim S K. Carbohydr Polym, 2001, 44, 71~76.
- [11] No H K, Park N Y, Lee S H, et al. Inten J Food Microbiol, 2002, 74, 65~72.
- [12] Cuero R G. EXS 1999, 87(chitin and chitinases), 315~333; CA, 132, 61305U.
- [13] Jeon Y J, Kim S K. Adv Chitin Sci, 1998, 3, 328~333.
- [14] 杨冬芝, 刘晓非, 管云林, 李志, 姚康德. J Appl Polym Sci, 2001, 79, 1324~1335.
- [15] Jia Z S, Shen D F, Xu W L. Carbohydr Res, 2001, 333, 1~6.
- [16] 沈东风, 孔祥东, 贾之慎. 海洋科学, 2000, 24(7), 28~30.
- [17] Shahidi F, Arachchi J K V, Jeon Y J. Trends Food Sci Tech, 1999, 10, 37~51.
- [18] 杨冬芝, 刘晓非, 管云林. 牙膏工业, 1999, 2, 26~28.
- [19] 庄旭品, 李治, 刘晓非, 李松晔, 管云林. 化工进展, 2002, 21(5), 310~313.
- [20] 黄立新, 谢林明, 崔毅华. 丝绸, 2003, 4, 36~37.
- [21] 赵铁, 杜子民, 唐汝培. 分析科学学报, 2002, 18(2), 100~104.
- [22] 郑化, 杜子民. 高分子材料科学与工程, 2002, 18(4), 124~128.
- [23] 严瑞麟主编. 水溶性高分子, 北京: 化学工业出版社, 1998, 547.
- [24] 何学斌, 薛存宽, 杜子民, 肖玲. 中成药, 2003, 25(7), 564~567.
- [25] 何学斌, 薛存宽, 沈凯, 蒋鹏, 等. 医学导报, 2003, 22(4), 228~231.
- [26] Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, et al. Carbohydr Res, 1986, 151, 403~408.
- [27] Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, et al. Chem Pharm Bull, 1988, 36, 784~790.
- [28] Mizuno T, Kawagishi H, Mizuno K. 静冈大学农学部研究报告, 1986, 36, 85~91.

- [29] Shiratori Y, Nagtsuyu H, Umishio K, et al. 日本东京公开专利, JP 63183352 (88,185~352.).
- [30] 文镜, 吕菁菁, 戎卫华, 金宗濂. 食品科学, 202, 23(8); 249~251.
- [31] Qin C Q, Du Y M, Xiao L, et al. Intern J Biol Macromol, 2002, 31; 111~117.
- [32] 刘艳如, 余萍. 福建师范大学学报(自然科学版), 1999, 15(4); 66~70.
- [33] 王芳宇, 何淑雅, 李邦良, 费树荣. 中国生化药物杂志, 2001, 22(1); 21~22.
- [34] Maria G, Jan I, Elzbieta W. Polym J Pharm, 1996, 48(5); 495~501.
- [35] 郭振楚, 韩永生, 封惠侠. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(1); 25~27.
- [36] Claus T, PCT Int Appl WO 9,811,903, 1998, 3, 26.
- [37] Murata J, Saki I, Nishi N, et al. Cancer Res, 1989, 80(9); 866~872.
- [38] Murata J, Saki I, Matsumo K, et al. Cancer Res, 1990, 81(5); 506~513.
- [39] Saki I, Murata J, Nakajima M, et al. Cancer Res, 1990, 50(12); 3631~3637.
- [40] Murata J, Saki I, Makabe T, et al. Cancer Res, 1991, 51(1); 22~26.
- [41] Tokura S, Tamura H, Azuma I. EXS, 1999, 87(Chitin and chitinases); 179~299.
- [42] Lee J K, Lim H S, Kim J H. Bioorg Med Chem Lett, 2002, 12; 2949~2951.
- [43] Kimura Yoshiyuki, Okuda Hiromichi, Jpn J Cancer Res, 1999, 90(7); 765~774.
- [44] Kimura Yoshiyuki, Okuda Hiromichi. 甲壳素, 壳聚糖研究, 1999, 5(2); 122~123.
- [45] Pavis H, Wilcock A, Edgecombe J, et al. J Pain Symp Manag, 2002, 24(6); 598~602.
- [46] Nsereko S, Amiji M. Biomaterials, 2002, 23; 2723~2731.
- [47] Son Y J, Jang J S, Cho Y W, et al. J Control Release, 2003, 91; 135~145.
- [48] Chen W R, Liu H, Nordquist J A, Nordquist R E. Laser Med Sci, 2000, 15; 43~48.
- [49] Chen W R, Adams R L, Carubelli R, Nordquist R E. Cancer Lett, 1997, 115; 25~30.
- [50] Tokumitsu H, Hiratsuka J, Sakurai Y, et al. Cancer Lett, 2000, 150(2); 177~182.
- [51] Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y. Pharm Res, 1999, 16(12); 1830~1835.
- [52] Futoshi Shikata, Hiroyuki Tokumitsu, Hideki Ichikawa, Yoshinobu Fukumori. Eur J Pharm Biopharm, 2002, 53; 57~63.
- [53] Shim B C, Park K B, Jang B S, et al. Nucl Med Biol, 2001, 28; 719~725.
- [54] Kim J R, Kim Y M, Park K B. EP 0,730,871, 1996, 9, 11.

The Development of Study on Antibacterial and Antitumor Activity of Chitin/Chitosan and Their Derivatives

HE Nai-pu, SONG Peng-fei, WANG Rong-min^{*}, ZHANG Hui, WANG Yun-pu

(Institute of Polymer, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In this review, it is focus on the development of study on antibacterial and antitumor activities of chitin/chitosan and their derivatives.

Key words: Chitin/chitosan; Antibacterial activity; Antitumor activity; Development