

透明质酸的结构、性能、改性和应用研究进展

张 堃¹, 简 军¹, 张政朴^{1,2*}

(1. 生物可降解新材料北京市工程实验室, 北京 100022;

2. 南开大学 高分子化学研究所, 天津 300071)

摘要:透明质酸是天然存在的一种具有高黏弹性、高保湿性的大分子糖胺聚糖, 被广泛用作各种生物医用材料, 如眼科手术助剂、手术后防粘连剂、皮肤填充剂、药物载体、组织工程支架等。为赋予透明质酸更为优良的机械强度、流变学特性及抗酶解能力, 扩大其在生物医学领域的应用范围, 越来越多的改性透明质酸衍生物被设计开发。本文对透明质酸的结构、性能、改性、应用进行了综述。

关键词:透明质酸; 化学改性; 生物医学

引言

透明质酸, 又叫玻尿酸(hyaluronan, hyaluronic acid, HA)是一种天然存在于生物体内的糖胺聚糖, 最早由美国哥伦比亚大学的 Karl Meyer 和 John Palmer 在 1934 年从牛眼玻璃体中被分离出来。他们将之命名为“透明质酸(Hyaluronic acid)”, 该名称来源于“玻璃状的(hyaloid)”和“糖醛酸(uronic acid)”两个单词^[1]。后来, Endre Balazs 于 1986 年创造了术语“hyaluronan”来命名透明质酸以符合多糖的国际命名法, 用以涵盖各种分子形式(包括酸和盐形式)^[2]。透明质酸是细胞基质和多种组织的重要组成成分, 具有多种重要的生理学功能, 例如: 调节细胞增殖、迁移和分化; 天然的保湿作用; 润滑关节保护软骨; 调节蛋白质合成; 调节炎症反应; 调节免疫功能; 促进伤口愈合等。透明质酸独特的黏弹性、生物相容性和可降解性使其在生物医学领域有广泛的应用, 包括作为眼科手术助剂、外科手术后防粘连剂、皮肤创伤愈合再生助剂、药物载体、组织工程支架等。本文介绍了透明质酸的结构、性能和化学改性方法, 并对其在生物医学领域的应用现状进行了论述。透明质酸特殊的结构特点和优良的性能决定了其在生物医学领域具有极高的应用前景。本综述的目的在于通过对透明质酸的全面报道来提高研究者们对它的兴趣, 为设计新型透明质酸生物医学材料提供一定的指导帮助。

1 透明质酸的结构、性质及其生理学功能

1.1 透明质酸的化学结构

透明质酸是糖胺聚糖(也称为粘多糖)家族中的一员。与其他糖胺聚糖相同, 透明质酸也是由氨基己糖和己糖醛酸构成的双糖单元重复连接而成的一种高分子量的线性多糖, 不过它是唯一一种非硫酸化的糖胺聚糖, 也是唯一一种不与核蛋白共价链接形成蛋白聚糖的糖胺聚糖。与大多数的糖胺聚糖不同, 透明质酸是在细胞膜上通过膜蛋白合成的, 而非通过细胞高尔基体合成^[3]。天然透明质酸的双糖单元由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-葡萄糖胺构成, D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰-D-葡萄糖胺之间通过 β -1,3 糖苷键相连, 而双糖单元通过 β -1,4 糖苷键连接, 即 $[(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GlcNAc}-(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcUA}]$ (见图 1), 分子量可达 10^7Da ^[4]。两种糖均采用 β 构象, 其羟基、羧基、乙酰氨基、羟甲基都处在 e 键位上, 使透明质酸在能

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.09.016

收稿: 2015-06-09; 修回: 2015-06-30;

基金项目: 生物可降解新材料北京市工程实验室开放基金;

作者简介: 张堃(1983-), 男, 天津人, 博士, E-mail: zhangkun@emeonline.com.cn;

* 通讯联系人: 张政朴(1947-), 男, 江苏常熟人, 教授, 博士生导师, E-mail: zhangzp@nankai.edu.cn.

量上非常稳定。

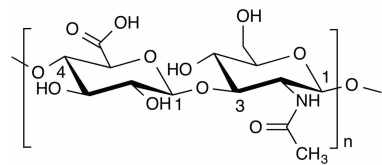


图 1 透明质酸的分子结构

Figure 1 Molecular structure of hyaluronic acid

1.2 透明质酸的性质

透明质酸是白色无定型固体,无味,有很强的吸湿性,溶于水,但不溶于有机溶剂。透明质酸分子结构中亲水基团均处于糖环的平行位,而疏水的氢原子则在轴向上形成憎水区,由于分子链单糖间氢键的作用,使透明质酸分子链在空间上形成刚性的柱型螺旋结构。在水溶液中,透明质酸分子链呈膨胀的无规线团结构。这些透明质酸链在较低的浓度下也会彼此发生缠结,形成连续的三维网络结构,具有独特的流变学特性。水分子通过氢键被固定在透明质酸分子形成的网络中,不易流失。研究表明,透明质酸能够吸附约为其本身重量 1000 倍的水分,是目前自然界中发现的保水性最好的天然物质。1% 的溶液即可形成凝胶,但在压力作用下其容易流动,并可通过注射针狭窄的通道,属于假塑性材料。透明质酸溶液非凡的流变性能使其成为理想的润滑剂,能够分离大多数组织的表面,使其沿着彼此滑动。

1.3 透明质酸的降解

透明质酸在体内的降解可被看做是糖苷键断裂形成的解聚过程,主要通过酶解作用和自由基降解作用两种机制来完成。透明质酸在体内的酶解作用主要是通过透明质酸酶家族作用完成的,该酶家族中有 6 个成员,分别为 HYAL-1、HYAL-2、HYAL-3、HYAL-4、HYAL-P1 和 PH-20^[5]。其中,最具活性的两种酶为 HYAL-1 和 HYAL-2。HYAL-2(位于细胞膜上)将高分子量的 HA(>1MDa)裂解为 20kDa 的碎片。HYAL-1(位于溶酶体中)随后将这些碎片裂解为四糖,这些四糖进一步在其它酶(如 β -葡萄糖醛酸酶, β -N-乙酰葡萄糖胺酶)的作用下转化为单糖。由于这些降解产物都是存在于人体中的天然物质,因此它们可参与人体本身的清除过程。另一方面,组织炎症等产生的自由基也通过切断糖苷键来对透明质酸产生氧化降解作用。透明质酸的降解代谢发生在原位(如在细胞外基质)、细胞内和淋巴结内。长链透明质酸在酶和自由基的作用下原位降解产生较小的透明质酸寡糖,这些寡糖随后在细胞内和淋巴结内进一步发生降解代谢,最终进入循环系统,由肝脏和肾脏将它们消除^[6]。

1.4 透明质酸的生理学功能

透明质酸是细胞外基质的重要组成成分。在过去,透明质酸被认为只是一个简单的空间填充物质,后来人们才逐渐认识到其重要性。由于透明质酸的高度吸水性,其在人体中的首要作用是结构支持和保湿作用,其为细胞和其它细胞外基质成分(包括胶原蛋白和弹性蛋白)提供了润滑和减震的作用,同时调节组织的水平衡,为细胞的迁移和增值提供便利的环境。透明质酸骨架上还有大量的带负电的羧基基团,起到离子交换的作用,能够调节细胞周围阳离子浓度。除此之外,透明质酸还作为信号传导分子,通过与细胞外基质及细胞膜上的多种蛋白受体结合来参与细胞信号传导、调控细胞的各种活动,包括细胞的增值、迁移、分化、贴附等,从而起到调节机体生理学功能的作用,如透明质酸通过与 CD44 受体的结合能够促使白细胞在炎症部位的聚集,从而促进机体的免疫抗炎作用^[7]。透明质酸的这种信号调控作用与其分子量有关,不同分子量的透明质酸触发不同的信号通路。高分子量的透明质酸表现出抗血管生成、抑制瘢痕生成和抗炎作用,而低分子量的透明质酸(<100kDa)则相反,表现出促炎症、免疫刺激性、促进瘢痕形成和促血管生成的作用^[8]。这一差异的成因目前尚无定论,其中一种假说认为高分子量的透明质酸具有聚集细胞膜上的受体蛋白的作用,而低分子量的透明质酸不具该作用^[9],从而引起受体活性的差异造成不同的生理学功能。

透明质酸是一种智能的保湿因子,可根据周围环境的相对湿度调节自身的吸水量,调节细胞及组织的水平衡。在皮肤中,这些高保湿的透明质酸与胶原蛋白、弹性蛋白等形成含有大量水分的胞外胶质基质,赋予皮肤韧性和弹性。同时,透明质酸也具有清除自由基的作用,前面提到自由基能够氧化降解透明质酸,而透明质酸正是利用了这一降解反应通过自身的快速代谢来清除体内的自由基。

透明质酸同时也是关节滑液的主要成分,其高黏弹性对保护关节起到至关重要的作用。在行走等低撞击频率下呈黏性液体,可减少组织间的摩擦;在跑步等高撞击频率下呈弹性液体,可缓冲应力的冲撞;在负重时呈凝胶状弹性体,起到缓冲垫的作用,减轻关节承受的压力^[10]。

透明质酸在促进组织创伤愈合的过程中也发挥着作用,是该过程中的一个公认的主要化合物,其在免疫应答的激活和调节、促进血管生成以及细胞增殖和迁移上有着重要的作用。在炎症期,高分子量的透明质酸增加,吸水膨胀产生多孔支架适于细胞迁移,抑制中性粒细胞的迁移,减轻炎症反应。在增值期,透明质酸寡糖促进血管生成,促进成纤维细胞迁移至创伤组织,构建新的细胞外基质。在重建期,透明质酸调控瘢痕的形成^[11]。

2 透明质酸的工业化生产

透明质酸广泛存在于动物体内各种组织的细胞基质和润滑液中,包括人的脐带、关节滑液、皮肤、胸淋巴液、玻璃体、鸡冠等。鸡冠是目前发现的透明质酸含量最高的动物组织(见表 1)^[4]。透明质酸的提取工艺一般是将这些新鲜采集的富含透明质酸的组织经匀浆、提取、沉淀、除杂等一套完整的工艺而最终获得纯度较高的透明质酸。提取法虽然工艺流程简单,但受到原料来源有限、效率低、成本高等条件的制约,已经逐渐被发酵法所取代。

表 1 不同人和动物组织中的透明质酸含量	
Table 1 Concentration of hyaluronic acid in different human and animal tissues	
组织或体液	透明质酸浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
鸡冠	7500
人脐带	4100
人关节滑液	1400~3600
牛鼻软骨	1200
人眼玻璃体	140~340
人真皮	200~500
人表皮	100
兔脑	65
兔心	27
人胸淋巴液	0.2~50
人尿	0.1~0.3
人血清	0.01~0.1

利用微生物发酵制备透明质酸最早出现在 20 世纪 70 年代,不过直到 1985 年日本资生堂首次报道了用链球菌发酵生产透明质酸的方法后,生物发酵法才得到发展,逐渐替代传统的动物组织提取法,成为现今国际上主流的透明质酸生产方法^[12]。目前商业上生产透明质酸的菌种包括链球菌和枯草芽孢杆菌等。国内生产透明质酸的厂家有山东正大福瑞达、天津诺维信等。

3 透明质酸的化学改性

纯透明质酸在人体中的滞留时间较短,注射入皮肤或关节后,其半衰期不超过 24h^[13]。这大大限制了其在生物医学领域的应用。但是,由于透明质酸拥有多个活性基团,包括羧基、羟基以及通过脱乙酰化暴露出来的氨基,可进一步进行化学改性,赋予其更为优良的机械强度、流变学特性及抗酶解能力等,扩大其在生物医学领域的应用范围。

3.1 羧基改性

3.1.1 酰胺化反应 透明质酸的羧基可先被碳二亚胺、2-氯-4,6-二甲基-1,3,5-三嗪(CDMT)、2-氯-1-甲基碘代吡(CMPI)、1,1'-羰基二咪唑(CDI)等活化^[14~17],再与氨基化合物进行高效反应,形成酰胺键(见图 2)。其中,使用最为广泛的活化剂当属 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)。其反应机理为:首先,EDC 活化羧基形成 *O*-乙酰基异脲中间体,再由氨基进行亲核进攻形成酰胺键。由于 *O*-乙酰基异脲中间体也易与水反应发生快速重排形成稳定的 *N*-乙酰基脲副产物,为避免 *N*-乙酰基脲的形成,活化时加入 *N*-琥珀酰亚胺(NHS)或羟基苯并三唑(HOBt)以形成稳定的抗水解中间体(见图 3)^[18]。另一方面,EDC 活化反应最适宜的 pH 为 3.5~4.5,而氨基具有较高的 pK_a 值,在此 pH 条件下,质子化的氨基亲核性降低,与活化羧基的反应活性也降低,而用低 pK_a 值的酰肼(pK_a≈2~3)来代替氨基能够提高反应活性^[19]。用二酰肼做交联剂制备的透明质酸凝胶具有更强的机械性能。当使用过量的己二酰肼(ADH)与透明质酸反应时,只发生单功能化反应,形成稳定的透明质酸-ADH 衍生物,保留另一个酰肼作为进一步功能化的反应位点(见图 2)。实际上,许多透明质酸-药物前体都是通过透明质酸-酰肼中间体而非透明质酸本身与碳二亚胺活化的药物反应结合而成的,因为如果直接使用透明质酸则主要生成 *N*-乙酰基脲副产物。

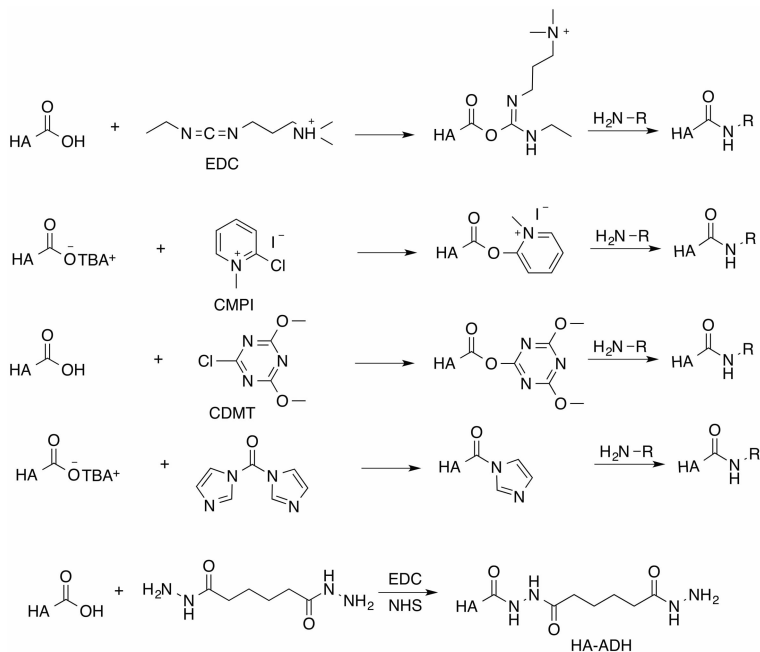


图 2 透明质酸的酰胺化反应

Figure 2 Amidation of hyaluronic acid

3.1.2 酯化反应 透明质酸的羧基除与氨基化合物反应外还可与脂肪醇或芳香醇发生酯化反应。上述活化试剂也可用于催化透明质酸羧基的酯化反应。活化羧基后的透明质酸亦可与自身的羟基进行交联反应,形成自交联凝胶(交联结构中不含交联剂)。除与醇发生酯化反应外,透明质酸还可以与卤代烃及

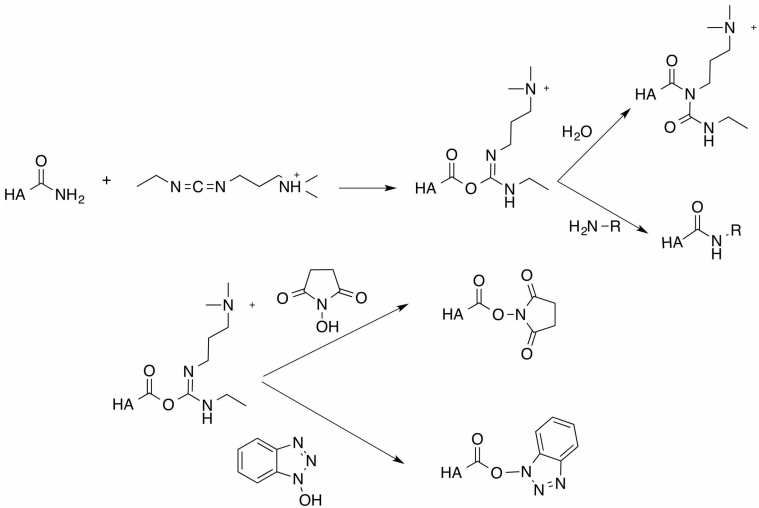


图 3 EDC 活化透明质酸酰胺化的机理

Figure 3 Hyaluronic acid amidation mechanism with EDC

环氧化合物发生反应,形成酯键(见图 4)^[20, 21]。

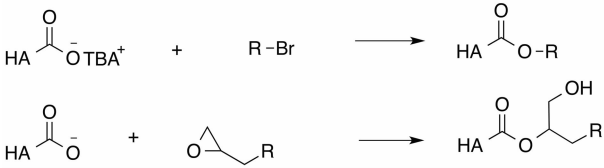


图 4 透明质酸羧基的酯化反应

Figure 4 Esterification of the carboxylic groups of hyaluronic acid

3.2 羟基改性

3.2.1 成醚反应 由于透明质酸酶的存在,天然透明质酸在人体的半衰期较短,因此市面上的各种透明质酸填充剂,一般都采用化学交联的方式来提高其抗酶解能力,以延长其在体内的保持时间。1964 年,Laurent 等^[22]第一次报道了透明质酸的交联反应,他们选用 1,2,3,4-二环氧丁烷作交联剂,在 pH 值为 13-14 的强碱条件下发生反应。目前全球各大厂家使用的交联剂,包括 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)、1,2,7,8-二环氧辛烷(DEO)、二乙烯基砜(DVS)等(见图 5)^[23],都主要通过成醚反应来实现透明质酸的交联改性。成醚反应一般在强碱条件下进行。此时,羟基发生去质子化($pK_a \approx 10$)形成具有强亲核性的氧负离子,其优先于去质子化的羧基发生亲核加成,形成醚键。而在酸性条件($pH\ 2 \sim 4.5$)下,羟基的去质子化程度降低,主要由带负电的羧基进攻环氧基团而形成酯键(见图 5)^[24]。不过,Tomihata 和 Ikada^[25]发现在弱酸性和中性条件($pH=4.7, 6.1, 8.0$)下,产物仍然以醚为主。

3.2.2 酯化反应 透明质酸的羟基也可与活化的羧酸、酸酐以及酰氯等活性基团发生酯化反应。例如 Coradini 等^[26]报道的使用丁酸酐在吡啶或二甲基氨基吡啶存在下与透明质酸的三甲基吡啶盐上的羟基反应生成透明质酸-丁酸前体药物。该透明质酸-丁酸前体药物不但保留了丁酸原有的药理作用,且能够促进丁酸的细胞摄取量,提高丁酸抑制肿瘤细胞生长的效果。实际上,透明质酸-丁酸在 CD44 受体的介导下被完全内吞入 MCF-7 人乳腺癌细胞中,显示出较为明显的肿瘤靶向性。

3.2.3 其它反应 透明质酸的羟基还可发生其它反应,如与戊二醛发生交联反应生成半缩醛。该反应需要在酸性条件下进行,用于活化醛基并催化反应。不过,生成的半缩醛在酸性条件下易发生水解,因此需要在反应结束时进行中和,以稳定交联产物^[27]。另外,透明质酸的羟基还可经溴化氰活化与氨基化合物在水相中反应形成氨基甲酸酯^[28]。

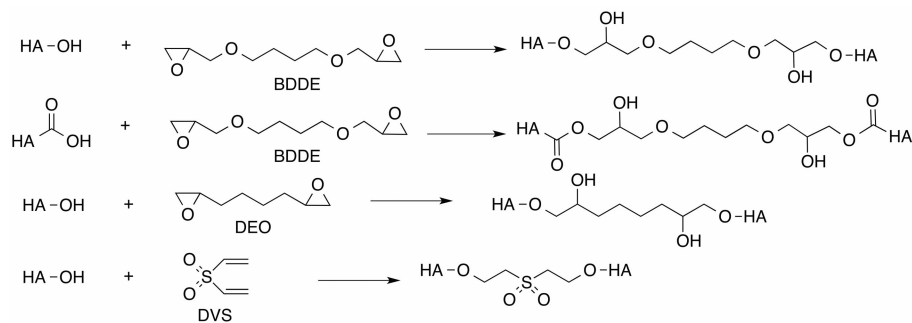


图 5 透明质酸的交联成醚反应

Figure 5 Ether formation of hyaluronic acid by crosslinking

3.3 脱乙酰化的氨基改性

透明质酸上的乙酰氨基经脱乙酰化处理后形成的游离氨基亦可作为改性反应的活性位点,与活化的羧酸反应生成酰胺化合物,甚至与自身的羧基发生自交联反应形成凝胶。不过脱乙酰化处理,即使是在温和的条件下都会引起透明质酸的降解^[29],因此透明质酸的改性一般不采用该方法进行。

3.4 复合改性

透明质酸也可以和其它材料复合使用,以发扬各自优点,弥补缺陷。例如,透明质酸和壳聚糖通过静电作用复合形成纳米粒子可用于负载木瓜蛋白酶及形成新的表面活性剂^[30];透明质酸与明胶通过乳化-凝固法复合使用后,可根据不同的后处理方法获得光滑、褶皱及多孔的微球^[31];透明质酸与羟丙基甲基纤维素等复合提高凝胶抗酶解能力^[32,33];透明质酸与胶原蛋白复合将赋予其更为优良的机械性能。

3.5 金属配合物

透明质酸中富含 O 原子和 N 原子,可与多种金属离子形成配位键,如 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 等。通过配位,改变了透明质酸在溶液中的结构,赋予了其更多的生物学功能^[34]。例如,Gedeon Richter 公司的 Curiosin 凝胶即为透明质酸和 Zn^{2+} 的配合物,通过配位使透明质酸无规线团的结构转变为球型结构,结合的水分子层厚度减小,结合更为牢固。临床实验表明该凝胶能够有效的促进伤口愈合,并防止伤口感染。

4 透明质酸及其衍生物在生物医学中的应用

透明质酸独特的性质使其在生物医学领域中具有广泛的应用。Balazs^[35]将透明质酸及其衍生物的临床应用分为 5 大类。

- (1) 粘性手术(viscosurgery): 保护脆弱组织及为手术操作提供空间,如眼科手术;
- (2) 粘性填充(viscoaugmentation): 填补扩大组织空间,如皮肤、括约肌、声带和咽部组织;
- (3) 粘性分离(viscoseparation): 分离因手术或创伤造成的受损结缔组织表面,以防止粘连和过度瘢痕的形成;
- (4) 粘性补充(viscosupplementation): 替换或补充组织液,如替换关节炎中的润滑液,减轻疼痛;
- (5) 粘性保护(viscoprotection): 保护健康的或受损的组织表面,避免干燥或有害环境对其造成的影响,并促进组织表面愈合。

4.1 眼科

透明质酸是眼玻璃体的主要组成成分,在眼科手术中被主要用于补充如白内障手术或人工晶体植入术等眼科手术造成的玻璃体液缺失。另一方面,透明质酸也被用作眼科手术的黏弹性保护剂,在眼科手术中保护角膜上皮,缓冲机械冲击,维持眼前房适宜的深度和形状,保护眼内组织,防止玻璃体脱出,为手术操作提供便利^[36]。透明质酸同时也是治疗干眼症的滴眼液的主要成分,能够有效延长泪膜的破裂时

间,减少干眼症患者眨眼的次数,缓解干、涩、痒、痛的症状^[37]。

4.2 皮肤填充剂

透明质酸是天然的保湿剂,广泛存在于皮肤组织中,其浓度可到达 2.5g/L。随着年龄的增长,皮肤中的透明质酸含量逐渐减少,导致真皮脱水,皱纹加深,失去弹性。透明质酸由于其具有高黏弹性、可塑性、可生物降解性、良好的生物相容性、无种属性等优点,使其作为皮肤填充剂来填充组织塌陷治疗面部老龄化而得到广泛的应用。据国际美容整形外科协会(ISAPS)的统计,透明质酸填充剂的使用病例数在微创美容治疗中仅次于肉毒素,位列第二。不过天然透明质酸在人体中的维持周期极短,不能保证填充修饰的长期效果,因此一般采用物理或化学交联保护的方法来增加透明质酸抗酶解的能力,延长其在体内的保持时间。

4.3 防粘连和创伤修复

术后组织粘连是困扰外科手术的一大难题,其有可能导致严重的长期临床并发症,影响外科手术的效果,给患者造成痛苦和不便。大量研究表明,透明质酸在预防粘连和促进伤口愈合上有着重要的作用。透明质酸防组织粘连的作用机理主要包括:(1)通过物理屏蔽作用将组织分隔,并能够屏蔽炎症介质和细菌,起到保护作用;(2)可促进血纤蛋白的溶解,同时通过刺激 CD44 受体表达,促进间皮细胞的增生;(3)增强巨噬细胞的功能和活性,调节胶原合成,减少血纤蛋白的沉积,促进伤口愈合并减少瘢痕的形成;(4)在组织表面形成保护膜,减少机械损伤并起到润滑和保湿的作用;(5)吸收膨胀压迫出血点,抑制出血^[38]。

表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)等现今已被广泛用于皮肤创伤修复,不过这些产品一般为冻干粉形式,使用前需冷藏保存,并且半衰期极短需每日重复施用。Yamamoto 等^[39]报道了一种由高分子量和低分子量的透明质酸形成的双层创伤辅料,其中高分子量的交联透明质酸构成辅料上层,低分子量的透明质酸与精氨酸、维生素 C 衍生物及 EGF 构成辅料下层。实验结果表明该创伤辅料能够保持 EGF 的活性,并促进血管内皮生长因子(VEGF)和肝细胞生长因子(HGF)释放。

4.4 关节炎

透明质酸是关节软骨和关节滑液的主要成分。正常健康的关节几乎可以无摩擦无疼痛的进行运动,不过,当发生骨关节炎或类风湿性关节炎等关节病变时,滑液中的透明质酸浓度明显减少,分子量明显降低,软骨也发生降解和破坏,导致关节运动变得僵硬,并由于发生骨与骨之间的摩擦而造成疼痛。将外源性的高分子量透明质酸注入至关节中,恢复滑液至正常状态,促进软骨逐渐自然修复。同时,注入的透明质酸还可改善关节腔的生物环境,促进自身透明质酸的合成,改善关节的功能。不过,由于透明质酸在体内的半衰期较短,因此在治疗关节病变时,需反复频繁的注射,增加了病人的痛苦。最近,Jordan 等^[40]报道了一种新型的凝胶由透明质酸和壳聚糖混合而成,壳聚糖的加入不但提高了透明质酸的抗降解能力,同时也提高了其治疗效果。这一研究为改进治疗关节病变的透明质酸黏性补充剂提供了一个新的方向。

近年来,对于这种黏弹性补充疗法是否能够有效的治疗关节炎也出现了种种争议。2013 年美国骨科医师协会颁布的第二版《膝骨关节炎治疗循证指南》就明确对于症状性的膝骨关节炎患者不推荐使用透明质酸进行治疗。他们认为尽管诸多研究表明,高分子量的透明质酸治疗骨关节炎的效果上与对照品相比有统计学差异,但这种差异达不到最小临床意义变化值(MCII)标准,因此不具备临床上的显著差异性。

4.5 药物载体

透明质酸良好的生物相容性、高亲水性、高黏弹性、可降解性及与细胞表面受体(如 CD44、RHAMM 等)特异性结合的特性使其具有作为药物载体的潜力。另一方面,从透明质酸的化学结构上看,其具有多个反应位点,包括羧基、羟基及乙酰化氨基,能够使用多种化学改性方法构筑药物前体和载体。目前,透明质酸及其衍生物已被用于构筑多种药物的运输系统,包括抗炎药物、抗肿瘤药物、蛋白质多肽类药物及基因类药物,能够明显延长药物的血液循环保留时间、提高细胞摄取量,提高生物利用度,减小给药量,降

低不良反应^[8, 41]。Zhong 等^[42]报道了一种还原敏感型的可逆交联透明质酸纳米粒子,该纳米粒子由透明质酸-赖氨酸-硫辛酸(HA-Lys-LA)共价结合物构成,在 1,4-二硫代-D,L-苏糖醇(DTT)的催化作用下通过二硫键进行交联提高药物阿霉素(DOX)在生理条件下循环保留时间。该纳米载体通过位于表面的透明质酸与抗 DOX 的 MCF-7 人乳腺癌细胞表面过量表达的 CD44 受体发生特异性结合提高药物的细胞摄入量,再通过肿瘤细胞中过量表达的谷胱甘肽催化二硫键的断裂,使纳米载体膨胀从而释放出药物,可有效抑制肿瘤生长(如图 6 所示)。Park 等^[43]也报道了相类似的药物载体用于 siRNA 的转染。他们设计合成了透明质酸-聚(二甲基氨基乙基甲基丙烯酸酯)(HPD)接枝聚合物作为 siRNA 的运输载体,并通过二硫键发生交联反应。体外实验表明,交联后的 siRNA 复合物(C-siRNA-HPD)具有更高的稳定性,能够更为有效地被过量表达 CD44 的黑色瘤细胞 B16F10 所摄取,从而提高 siRNA 转染效率。体内实验表明,小鼠经全身给药后,C-siRNA-HPD 会选择性地积聚在肿瘤部分,显示出其肿瘤靶向性。

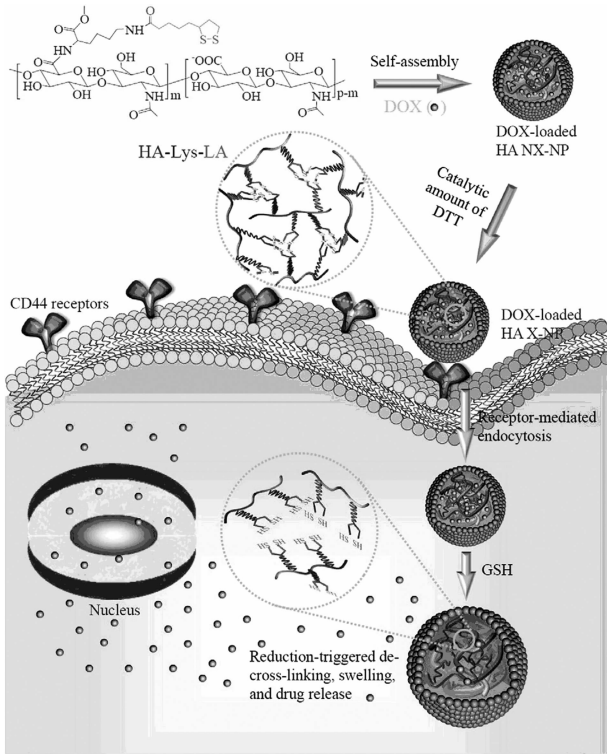


图 6 还原敏感型的可逆交联的 HA-Lys-LA 纳米药物载体^[42]

Figure 6 Reversibly crosslinked HA-Lys-LA nano drug delivery system with reduction-sensitivity^[42]

4.6 组织工程学

组织工程学是 20 世纪 80 年代新兴的一门交叉学科,是近年来组织器官再生医学的研究热点。透明质酸是人体中多种组织的重要组成成分,是细胞外基质的主要组成成分,影响细胞的增值、迁移和分化,促进创伤愈合,因此是一种理想的组织工程学原料。不过,透明质酸凝胶较弱的机械性能、较高的膨胀性能、光滑表面结构及不抗酶解等也制约了其在组织工程学上的应用。因此,为提高其作为组织工程支架的可能性,需进行必要的化学改性来弥补其缺陷,选择其它生物材料与之复合是一种较好的方法,可综合多种材料的优势取长补短,例如用海藻酸钠与透明质酸发生交联反应形成多孔复合凝胶,并通过调节聚合物的浓度、两种多糖的比例来调控复合凝胶的膨胀率、多孔性能及抗酶解能力等,使其能够为细胞的贴附和增殖提供良好的生物学环境^[44]。

4.7 仿生学

药物的高通量筛选一般是通过 2D 体外细胞学评价来完成的,不过这种方法与体内实际结果相差较

大,而采用 3D 支架模拟细胞的微环境则更为贴近实际情况。透明质酸是细胞外基质的重要组成部分,用其构筑 3D 培养基将更适于模仿细胞的体内生长环境。透明质酸本身带有负电荷,会阻碍细胞的贴附,因此需要复合其它生物材料促进细胞的贴附能力。Zhang 等^[45]用透明质酸和壳聚糖构筑 3D 多孔支架材料,用于仿生 U-118MG 人恶性胶质瘤细胞的细胞外基质微环境作为抗肿瘤药物高通量筛选的 3D 培养基。相对于 2D 培养基,透明质酸-壳聚糖支架培养基能够促进肿瘤球体的形成,上调 CD44、巢蛋白、Musashi-1、GFAP 和 HIF-1 α 蛋白的表达。

5 结 论

透明质酸自从 20 世纪 50 年代后期第一次用于人类医学领域已有 60 多年的历史。由于透明质酸特殊的流变学性能和生理学功能,其被广泛用于生物医学领域。迄今为止,新型透明质酸衍生物的设计研究已取得了长足的发展,越来越多的透明质酸产品被开发出来,填补了生物医学应用的空白。本文对透明质酸的结构性能、合成改性及其在生物医学领域的应用进行了综述。不过,关于透明质酸的生理学功能还存在许多未解之谜,目前商业用的透明质酸生物材料还存在一定的缺陷需要进行进一步的改进来促进透明质酸在生物医学领域更为广泛的应用。

参考文献:

- [1] Meyer K, Palmer JW. J Biol Chem, 1934, 107: 629~634.
- [2] Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW. Biochem J, 1986, 235: 903~903.
- [3] Weigel PH, Hascall VC, Tammi M. J Biol Chem, 1997, 272: 13997~14000.
- [4] Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P. Biotechnol Lett, 2007, 29: 17~25.
- [5] Csoka AB, Frost GI, Stern R. Matrix Biol, 2001, 20: 499~508.
- [6] De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez J-X, Paliwal S, Stroumpoulis D. Dermatol Surg, 2013, 39: 1758~1766.
- [7] Termeer C, Sleeman JP, Simon JC. Trends Immunol, 2003, 24: 112~114.
- [8] Schante CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Carbohydr Polym, 2011, 85: 469~489.
- [9] Jiang D, Liang J, Fan J, Yu S, Chen S, Luo Y, Prestwich GD, Mascarenhas MM, Garg HG, Quinn DA, Homer RJ, Goldstein DR, Bucala R, Lee PJ, Medzhitov R, Noble PW. Nat Med, 2005, 11: 1173~1179.
- [10] 凌沛学, 贺艳丽, 张青. 食品与药品, 2005, 7: 1~3.
- [11] 金艳, 李大伟, 祝美华, 陈建英. 食品与药品, 2014, 16: 373~376.
- [12] 崔媛, 段潜, 李艳辉. 长春理工大学学报(自然科学版), 2011, 34: 101~106.
- [13] Brown TJ, Laurent UBG, Fraser JRE. Exp Physiol, 1991, 76: 125~134.
- [14] Danishefsky I, Siskovic E. Carbohydr Res, 1971, 16: 199~205.
- [15] Magnani A, Rappuoli R, Lamponi S, Barbucci R. Polym Adv Technol, 2000, 11: 488~495.
- [16] Bergman K, Elvingson C, Hilborn J, Svensk G, Bowden T. Biomacromolecules, 2007, 8: 2190~2195.
- [17] Bellini D, Topai A. WO2000001733 A1. 2000.
- [18] Bulpitt P, Aeschlimann D. J Biomed Mater Res, 1999, 47: 152~169.
- [19] Pouyani T, Prestwich GD. Bioconjugate Chem, 1994, 5: 339~347.
- [20] Pelletier S, Hubert P, Lapicque F, Payan E, Dellacherie E. Carbohydr Polym, 2000, 43: 343~349.
- [21] Bencherif SA, Srinivasan A, Horkay F, Hollinger JO, Matyjaszewski K, Washburn NR. Biomaterials, 2008, 29: 1739~1749.
- [22] Laurent TC, Hellsing K, Gelotte B. Acta Chemica Scandinavica, 1964, 18: 274~275.
- [23] 简军, 李睿智. CN 102321258 B. 2012.
- [24] De Belder AN, Malson T. US4886787 A. 1985.
- [25] Tomihata K, Ikada Y. Biomaterials, 1997, 18: 189~195.
- [26] Coradini D, Pellizzaro C, Miglierini G, Daidone MG, Perbellini A. Int J Cancer, 1999, 81: 411~416.
- [27] Collins MN, Birkinshaw C. J Appl Polym Sci, 2007, 104: 3183~3191.
- [28] Mlcochova P, Bystricky S, Steiner B, Machova E, Koos M, Velebný V, Kremlar M. Biopolymers, 2006, 82: 74~79.

- [29] Crescenzi V, Francescangeli A, Segre AL, Capitani D, Mannina L, Renier D, Bellini D. *Macromol Biosci*, 2002, 2: 272~279.
- [30] Zhao D, Wei W, Zhu Y, Sun J, Hu Q, Liu X. *Macromol Biosci*, 2015, 15: 558~567.
- [31] Zhou Z, He S, Huang T, Peng C, Zhou H, Liu Q, Zeng W, Liu L, Huang H, Xiang L, Yan H. *Polym Bull*, 2015, 72: 713~723.
- [32] 简军, 李睿智. CN 102492180 B. 2014.
- [33] 简军, 李睿智. CN 102911380 A. 2013.
- [34] 金艳, 凌沛学, 张天民. *中国生化药物杂志*, 2008, 29427~429.
- [35] Garg HG, Hales CA. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, UK: Elsevier, 2004, 415~455.
- [36] 张蕾, 吴迪, 孙巍, 孙军德. *微生物学杂志*, 2006, 26: 100~103.
- [37] 庞素秋, 周金生, 陈秋霞. *海峡药学*, 2003, 15: 252.
- [38] 凌沛学, 管华诗. *中国药学杂志*, 2005, 40: 1527~1530.
- [39] Yamamoto A, Shimizu N, Kuroyanagi Y. *J Artif Organs*, 2013, 16: 489~494.
- [40] Kaderli S, Boulocher C, Pillet E, Watrelot-Virieux D, Rougemont AL, Roger T, Viguier E, Gurny R, Scapozza L, Jordan O. *Int J Pharm*, 2015, 483: 158~168.
- [41] 张伟, 闫翠娥. *化学进展*, 2006, 18: 1684~1690.
- [42] Zhong Y, Zhang J, Cheng R, Deng C, Meng F, Xie F, Zhong Z. *J Controlled Release*, 2015, 205: 144~154.
- [43] Yoon HY, Kim HR, Saravanakumar G, Heo R, Chae SY, Um W, Kim K, Kwon I C, Lee JY, Lee DS, Park JC, Park JH. *J Controlled Release*, 2013, 172: 653~661.
- [44] Chen Y H, Li J, Hao Y B, Qi J X, Dong N G, Wu C L, Wang Q. *J Appl Polym Sci*, 2015, 132: 41898.
- [45] Florczyk SJ, Wang K, Jana S, Wood DL, Sytsma SK, Sham JG, Klevit FM, Zhang M. *Biomaterials*, 2013, 34: 10143~10150.

Review of Hyaluronan: its Structure, Properties, Modifications and Applications

ZHANG Kun¹, JIAN Jun¹, ZHANG Zheng-pu^{1,2*}

(1. *Beijing Engineering Lab of New Biodegradable Materials, Beijing 100022, China;*

2. *Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China*)

Abstract: Hyaluronan is a naturally existing high molecular weight glycosaminoglycan with high viscoelasticity and moisture retention, which has been widely used in numerous medical applications, such as ophthalmologic surgery, anti-adhesion application, dermal filling, and drug delivery system. More and more hyaluronan derivatives have been designed and developed in order to improving its mechanical strength, rheological property, enzyme resistant ability and other properties to extend its biomedical application range. In this review, we summarized the chemical structure, properties, modifications and applications of hyaluronan with the purpose of providing help and guidance for the future research.

Key words: Hyaluronan; Chemical modification; Biomedical applications