

壳聚糖的磺化产物对大鼠血栓和凝血时间的影响^{*}

邢荣娥¹ 刘 松¹ 于华华¹ 李智恩² 李鹏程²

(¹中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(²中国科学院研究生院, 北京 100039)

甲壳质及壳聚糖的硫酸酯化反应是其化学修饰中最吸引人的研究内容之一。由于它们与肝素有相似骨架, 经硫酸酯化, 引入 $-\text{NH}\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{H}$, $-\text{OSO}_3\text{H}$, COOH , $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 基团后得到甲壳质 (壳聚糖) 类肝素药物, 显示出抗栓、抗凝血性能 (李鹏程等, 1998; 曾宪放等, 1992; Proeyanat *et al.*, 2002); 如 Muzzarelli (1985) 早已预见并证实其抗凝血活性; 莫斯科血液研究中心病理药理系止血组的研究人员也证明了壳聚糖硫酸酯具有抗凝血活性, 他们将肝素与壳聚糖硫酸酯以 1:1 的比例给家兔静脉注射各 0.5 mg/kg 与单纯用肝素 1 mg/kg 对照组比较, 其抗凝血效应基本接近, 但对照组有出血副作用, 而试验组无副作用, 可以证明壳聚糖硫酸酯具有既抗凝血又止血的双重调节作用; Tokura 等 (1994) 证实分子质量大小和脱乙酰度不同对磺化产物的抗凝血活力有影响, 样品分子质量 26 000 Da 的活性最高, 脱乙酰度 70% 比 45% 的抗凝血活性更强, 脱乙酰度为 95% 的壳聚糖磺化后抗凝血活性最弱。在中国这方面的研究相对较少, 特别是分子中含硫的多寡对生物活性的影响还未见报道。本文作者就壳聚糖的磺化产物对大鼠抗栓、抗凝血进行了研究, 表明壳聚糖硫酸酯具有一定的抗栓、抗凝血效果, 且具有一定的量效关系, 这对今后该方面的进一步研究提供了科学理论依据。

一、材料及方法

1. 材料、试剂、仪器

作者实验所用材料壳聚糖是青岛百成海洋生物资源有限公司产品, 色泽乳白色, 颗粒度 100 目, 脱乙酰度为 91%; 试剂 DMF (N, N-二甲基甲酰胺)、氯磺酸、甲酰胺、甲

^{*} 此课题为中国科学院知识创新工程方向性课题和青岛市科技项目联合资助;

通讯作者: 李鹏程, 责任研究员, 博士生导师, E-mail: pcl@ms.qdio.ac.cn 第一作者: 邢荣娥 (1975), 博士;

收稿日期: 2004 年 11 月 26 日。

酸、乙醇均属国产商品试剂 AR 级; 透析袋为 8 000 ~ 12 000D; NicoletNexus 470 FT-IR 型傅立叶变换红外光谱仪; JEOL JNM-ECP 600 核磁共振仪。

2. 方法

(1) 红外光谱分析

NicoletNexus 470 FT-IR 型傅立叶变换红外光谱仪, 采用 KBr 压片法进行测定。

(2) 核磁 (^{13}C NMR) 谱分析

JEOL JNM-ECP 600 核磁共振仪, D_2O 作为溶剂, 用 150 MHz 频率照射, 在 20°C 下记录图谱。

(3) 硫含量测定

用 BaCl₂ 明胶法进行硫含量测定。

(4) 试验动物

实验动物: Wistar 大鼠, 体重 18 ~ 22 g 雌雄各半, 由山东省新药药理研究中心实验动物室提供, 合格证号: 970102

饲养条件: 室温 $18 \sim 22^\circ\text{C}$, 小鼠每笼 5 只, 自由饮水摄食, 饲料为颗粒鼠料, 由山东省新药药理研究中心实验动物室提供。

试验方法: 预试验表明, 本品毒性较低, 难以测出 LD_{50} , 故进行其小鼠一日内最大耐受量测定。

(5) 壳聚糖的磺化反应

将 10 mL HClSO_3 搅拌下缓慢滴加到适量的试剂 DMF 中, 上述反应温度控制在 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 。滴加完毕, 反应混合物搅拌至室温直到变成澄清溶液为止 (待用)。将一定量的壳聚糖溶于适量的甲酰胺与甲酸的混合溶液中, 然后将上述混合物加入, 在一定温度下搅拌反应一定的时间。将反应液倒入 3 倍体积的乙醇中, 搅匀后沉化 30 min 抽滤, 所得滤饼用水溶解, 2 mol/L NaOH 中和, 蒸馏水透析, 冷冻干燥得产品。时间、温度等条件决定硫在壳聚糖上的取代度。

(6) 壳聚糖硫酸酯 (CSA、CSB) 急性毒性试验

取样品 CSA、CSB 分别配制溶液浓度为 12.5 g/100 mL 给药量 0.2 mL/10g 取健康 Wistar 大鼠 20 只, 雌雄各半, 试验前 12 h 禁食不禁水, 第 2 d 按 0.2 mL/10g 体重 i.p 混悬液, 于 8:00 am i.p 一次, 药后立即观察动物反应情况, 并记录动物行为活动、呼吸、精神状态、大小便性状及颜色、被毛、鼻、眼、口腔分泌物和死亡情况, 连续观察 7 d

(7) 对大鼠血栓形成和凝血时间的影响

取健康 Wistar 大鼠 60 只, 雌雄各半, 按体重随机分为 6 组, 空白对照组, 阳性对照 (阿斯匹林) 组 (100 mg/kg), CSA 高 (600 mg/kg)、低 (200 mg/kg) 剂量组和 CSB 高 (600 mg/kg)、低 (200 mg/kg) 剂量组, 每组 10 只, CSA、CSB 各剂量组连续 i.p 给药 7 d 空白组给予等量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 阳性对照组于测试前连续给药 3 d 于最后一次 i.p 药后 1 h 将动物麻醉, 剪尾取血测凝血时间。腹部正中切开, 充分暴露腹主动脉, 用细针将 4 cm 长手术线 (折成双线) 穿入腹主动脉, 将针取出后, 使线完全留在血管内, 血

管压迫止血，手术后 45 min 称量丝线增加的重量，与对照组进行比较。

二、结果与讨论

1. 壳聚糖磺化结果

作者所制壳聚糖磺化产物 CSA、CSB 经 BaCl₂-明胶法检测硫酸根含量分别为 21.23%和 42.21%，通过 IR 和 NMR 进一步证实了本制备方法已成功地将硫酸酯基引入到壳聚糖上(如图 1~图 3)。由图 1、图 2 比较可以看出，在图 2 中 1253.17 cm⁻¹处出现了 S=O 的非对称伸缩振动，在 813.71 cm⁻¹处出现了 S-O-C 的对称伸缩振动，初步证明了分子中硫酸酯基(-OSO₃⁻)的存在。由图 3 可以看出，在壳聚糖的 C₆、C₃、C₂ 位引入硫酸酯基(-OSO₃⁻)后，由于硫酸酯基的去屏蔽作用使 C₆的化学位移由 62.85 ppm 明显向低场漂移至 69.3 ppm，同上所述，C₃的化学位移由 75.3 ppm 明显向低场漂移至 78.1 ppm，C₂的化学位移由 56.7 ppm 明显向低场漂移至 58.2 ppm，表明此反应已成功地将硫酸酯基引入到壳聚糖上。

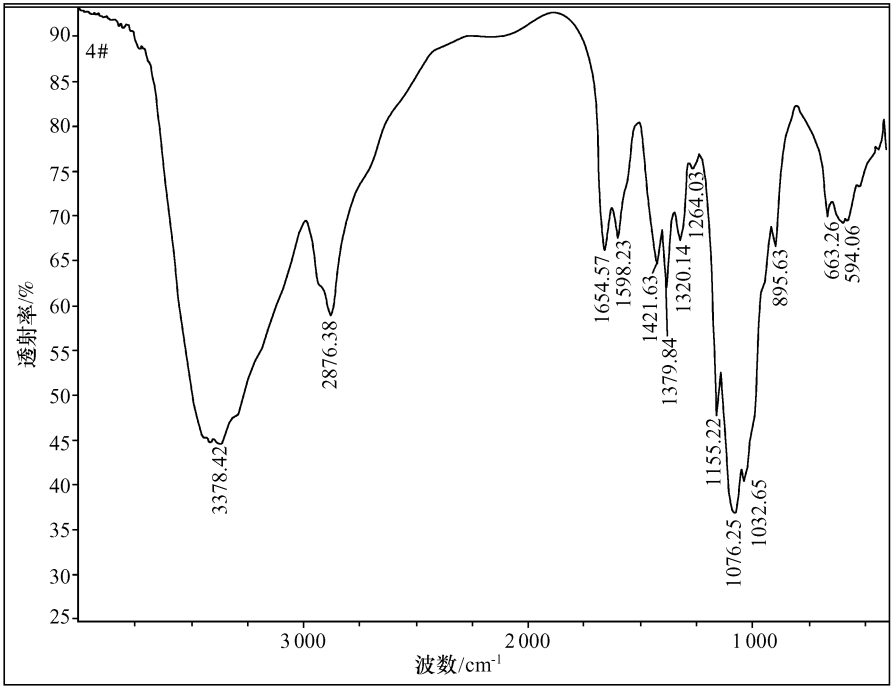


图 1 原料壳聚糖的红外光谱图

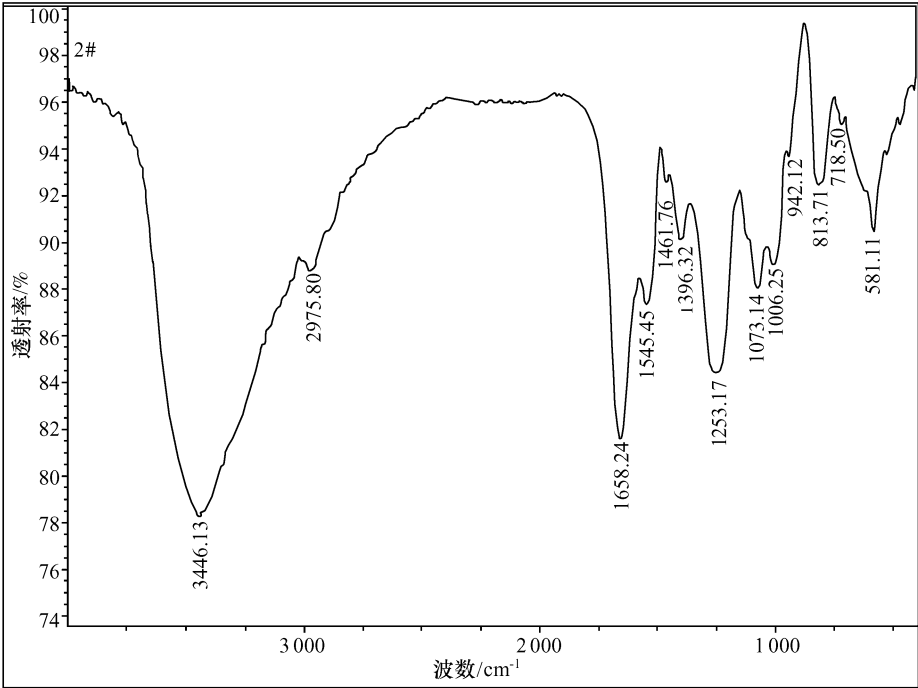


图 2 壳聚糖硫酸酯的红外光谱图

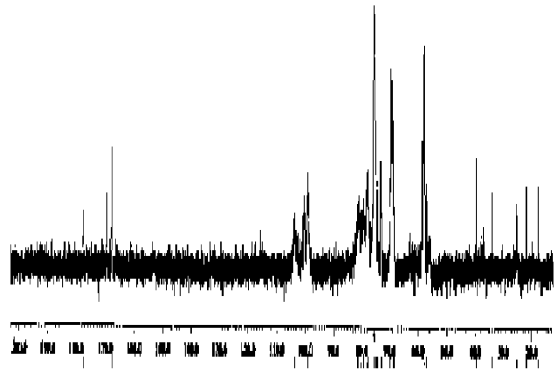


图 3 壳聚糖硫酸酯的¹³C NMR图谱

2. 毒性试验结果

CSA i.p. CSB i.p 给药后小鼠活动立即增加，10 min 后动物逐渐出现扭体，活动减少，1 h 后扭体症状消失，动物开始出现俯卧，闭目不动，直至用药后 8 h 仍少动，药后第 2 d 动物恢复正常。连续观察 7 d 未见明显变化，第 7 d 处死并剖检部分小鼠，肉眼观察心、肝、脾、肺、肾等主要脏器均无肉眼可见异常。表明 CSB 小鼠 i.p 给药的一日最大耐受量大于 2.5 g/kg 本品一次用药无明显毒性作用。

该样品的原料壳聚糖天然无毒，具有生物相容性并可在体内降解，经磺化引入 SO_4^{2-} ，结构类似肝素，与其他含 SO_4^{2-} 的天然多糖一样，其毒副作用小。经过作者的实验证明 CSA、CSB毒副作用小，可见 CSA、CSB作为新药开发是可行的。

3. 对大鼠血栓形成和凝血时间的影响及结果 (表 1)

表 1 CSA、CSB 连续给药 7 d 对大鼠血栓形成和凝血时间的影响

组别	剂量 (mg/kg)	血栓重量 mg	凝血时间 /s
Veh(对照组)	/	5.56±1.08	72.0±15.0
阿司匹林	100	4.31±1.28 [*]	87.9±18.4 [*]
CSA	200	5.15±1.13	76.9±14.8
CSA	600	5.02±1.11	79.4±17.5
CSB	200	5.43±1.14	71.8±15.9
CSB	600	4.77±1.26	82.3±16.4

$\bar{x} \pm s$ ^{*} $P \leq 0.05$ vs Veh $N=10$

从表 1 可以看出，阿司匹林组大鼠在连续给药 3 d 后，凝血时间明显延长，所形成血栓重量也明显小于对照组。CSA、CSB 组大鼠在连续给药 7 d 后，小剂量组对凝血时间无明显影响，对抑制血栓形成表现一定的作用趋势，但与对照组比较，差异无统计学意义，大剂量组对凝血时间影响明显，所形成血栓重量也明显小于对照组，表明壳聚糖硫酸酯对血栓及凝血时间的影响有一定的剂量关系。

阿司匹林作为一种血凝抑制剂，具有抗血小板聚集作用，可以明显减少周围动脉内阻塞性血栓的形成。阿司匹林和肝素抗凝血的作用机制相似，可以用于心、脑血管疾病的预防和治疗，但阿司匹林易引起出血或者溃疡，消蚀胃黏膜并损伤肾脏等不良反应。虽然阿司匹林抗凝血的作用强，但副作用大，不是理想的治疗药物，人们希望找到活性强、副作用小的药物。壳聚糖磺化后结构类似于肝素，且毒副作用小，本实验样品脱乙酰度 91%，给药方式是采取灌胃法，与静脉注射相比，吸收不充分，作用慢，其生物利用率低，其抗凝血活性比较低，CSA 和 CSB 在低剂量 200 mg/kg 时对血栓形成和凝血时间几乎没有影响，剂量提高为 600 mg/kg 时则表现出一定的生物效应，但效果仍不显著，呈现出剂量依赖性，随着剂量再加大可能表现出显著的作用。其中磺化度较高，分子量较小的合成产物样品 CSB 比 CSA 更能预防血栓形成并延长凝血时间。可见壳聚糖硫酸酯的磺化程度和分子量大小对防治血栓和抗凝血活性有一定的相关性。

参 考 文 献

李鹏程, 宋金明. 1998. 甲壳质 壳聚糖及其衍生物的应用化学. 海洋科学, 5: 25~29
曾宪放, 李吉高. 1992. 甲壳质和甲壳胺的化学修饰及应用. 中国海洋药物, 4: 29~34
Muzzarelli R A A. 1985. Chitin. The Polysaccharides. Academic Press Inc., 3(3): 428~431
Proeyan at Vongchaia W aranyuth Sajmsang Dumrat Subyen, et al. 2002. Anticoagulant activity of a sulfated chitosan. Carbohydrate Research, 337: 1239~1242
Tokura Shichi, Itoyama Koki, Nishi Norio, et al. 1994. Selective Sulfation of Chitin Derivatives for Biomedical Functions. J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem. A31(11): 1701~1718

Effect of Chitosan Sulfate on Thrombus Formation and Clotting Time in Mice

XING Rong'e¹ LIU Song¹ YU Huahua¹ LI Zhien² LI Pengcheng²

(¹*Institute of Oceanography, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071*)

(²*Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039*)

ABSTRACT

Two sulfated chitosan derivatives were prepared in this paper (CSA and CSB that is low and high replacement) and their medical effect was researched. Aim: to study the effect of chitosan derivatives on thrombus formation and clotting time in mice. Method: sixty mice were divided into six groups and each group was raised with chitosan derivatives (CSA, CSB) 200 and 600 mg/kg, aspirin 10 mg/kg and 0.5% sodium carboxymethyl cellulose 2 ml in ice respectively. The levels of thrombus formation and clotting time were calculated in mice. Conclusion: two kinds of sulfated chitosan of the different sulfur content had been successfully prepared, that is CSA: DD 21.23%; CSB: DD 42.21%. Their yields are all over 90%; CSA, CSB at doses of 200 mg/kg barely influence the rate of thrombus formation and clotting time, however, CSB at doses of 600 mg/kg significantly decreased the weight of thrombus and increased clotting time in mice, decreasing 14.21% thrombus weight and increasing 14.31% clotting time.