

壳寡糖医药保健功能的研究进展

乔莹^{1,2}, 白雪芳¹, 杜昱光¹

(1. 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 此文对壳寡糖的免疫调节作用、抗肿瘤活性、抑制糖尿病、降血脂、促进钙的吸收、调节肠道健康等医药保健方面的研究进展进行综述。

关键词: 壳寡糖; 抗肿瘤; 钙的吸收; 肠道健康; 抑制糖尿病

中图分类号: R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2008)03-0210-04

Research advances of Chitosan oligosaccharides on keeping healthy

QIAO Ying^{1,2}, BAI Xue-fang¹, DU Yu-guang¹

(1. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

壳寡糖(又称寡聚氨基葡糖, Chitosan oligosaccharide, Chitooligosaccharide, COS)是由甲壳素(又称几丁质, Chitin)脱乙酰的产物壳聚糖(Chitosan)降解获得, 由 2~10 个氨基葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖^[1], 目前认为相对分子质量(M_r) < 5 000 的都可以称为 COS(图 1)。对于它的安全性研究表明, 给小鼠一次性灌服最大剂量超过 10 g/kg 的 COS^[2], 或日灌服 2 g/kg 的 COS^[3], 均未见任何不良反应。COS 是天然糖中唯一大量存在的碱性氨基寡糖, 具有水溶性好, 安全无毒、易被动物体吸收等优点, 因此, 其生物学活性备受关注, 在保健品、营养剂、食品添加剂等方面都具有良好的应用价值。本文将近些年国内外学者对壳寡糖的医药保健方面的研究作一综述。

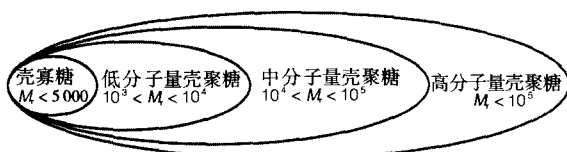


图 1 壳寡糖及壳聚糖相对分子质量范围

Fig 1 M_r of Chitooligosaccharide and Chitosan

1 COS 的免疫调节作用

30 年前, Suzuki 等报道 COS 具有免疫调节作用。此后, 对其在免疫调节方面的研究成为一个热门领域, 不断有新的研究成果涌现。目前对机体的免疫调节能力较强的主要为聚合度(DP)2~10 的 COS。可能是通过调节机体的体液和细胞免疫作用来实现免疫增强效应。

1.1 增强体液免疫和细胞免疫作用

窦江丽等^[4]的研究发现将 120 mg/kg 的 COS 作用于小鼠能明显提高溶血空斑数、血清溶血素水平, 增强伴刀豆球蛋白(Con A)诱导的 T 淋巴细胞增殖、迟发型变态反应。B 淋巴细胞受抗原刺激后分化成浆细胞并产生抗体, 当再次接受同一抗原刺激时溶血产生肉眼可见的空斑, 溶血空斑数大体上可以反映抗体形成细胞数。COS 能使小鼠的溶血空斑数及血清抗体数明显增加, 表明 COS 能增强小鼠的体液免疫功能。ConA 诱导的 T 淋巴细胞增殖实验以及迟发型变态反应结果显示 COS 能增强小鼠的细胞免疫功能。Wu 等^[5]的研究发现 DP 为 1~6 的 COS 能显著增加血清中 IgG 和 IgM 含量。

1.2 对免疫细胞的作用

1.2.1 对巨噬细胞的作用 一般认为, 几丁质和 COS 都可以通过激活巨噬细胞从而调解机体免疫。Okamoto 等^[6]发现 DP 1~6 的 COS 可以显著的提高小鼠腹腔巨噬细胞的迁移活性和吞噬能力, 但对淋巴细胞的增殖没有促进作用。COS 可结合并激活巨噬细胞可能是经由巨噬细胞表面的甘露糖受体介导的, 并且 Ca^{2+} 相关的信号转导途径可能参与这一过程。

1.2.2 对中性粒细胞的作用 Dou 等^[7]研究 COS 对静息的中性粒细胞和用豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)刺激过活的中性粒细胞作对比, 发现 COS 可提高静息状态下中性粒细胞的活性, 使之产生一系列下游的信号因子用以激发免疫应答反应。而对于 PMA 刺激过活的中性粒细胞, COS 则起到负调控的作用, 减少因释放过多细胞因子所引发的细胞损伤。

2 COS 的抗癌(抗肿瘤)活性

20 世纪 80 年代, 一些科学家发现利用几丁质或 COS 可作为抗肿瘤制剂或者是肿瘤转移抑制剂, 后来经过研究, 普遍认为 DP 为 6 的 COS 有较好的抑瘤效果。并且随着 COS 浓度的升高, 抑瘤率提高。目前研究表明, COS 抗肿瘤的机制主要有以下 3 个方面。

收稿日期: 2007-10-22

作者简介: 乔莹(1984-), 女, 河南长垣人, 生物化工专业硕博连读研究生; 杜昱光, 通信作者, E-mail: duyg@dicp.ac.cn。

2.1 COS 可抑制肿瘤生长

COS 对很多肿瘤细胞,例如 S180 肉瘤细胞^[8]、Lewis 肺癌细胞、Hela 宫颈癌细胞系、人白血病 K562 细胞株、结肠癌 Lo-Vo 细胞株^[9]等癌细胞具有抑制效果。官杰等^[10]以荷瘤小鼠做动物模型进行体内实验,其中浓度为 1.5% 的 COS 明显抑制实体瘤的生长,抑制率达 47.17%,而 COS 对肺癌细胞的抑制效果更加明显,体外抑瘤率平均达 76%。COS 抑制肿瘤生长的机理有两种说法:① COS 可诱导肿瘤细胞坏死。Huang 等^[11]研究表明 COS 的抗肿瘤活性与其所带的电荷有关。高电荷的 COS 衍生物,不论所带的为正电荷还是负电荷,都可显著降低肿瘤细胞活性。而这种抗肿瘤的活性是通过诱导肿瘤细胞坏死来实现的;② COS 可诱导肿瘤细胞凋亡。Xu 等^[12]对肝癌细胞 SMMC-7221 的研究中发现 COS 可显著介导该细胞的凋亡,并且随 COS 浓度升高而效率增大。用 0.8 mg/mL COS 处理 72 h 后,引发的凋亡率可达 38%。官杰等^[13]通过 COS 与双歧杆菌协同抗肿瘤的实验发现,COS 协同双歧杆菌对肿瘤的生长有抑制作用,显微镜观察显示肿瘤组织出现坏死;肿瘤细胞经 COS 作用后,透射电镜显示细胞有凋亡趋势。

2.2 COS 可抑制肿瘤细胞血管生成

肿瘤血管生成是指肿瘤细胞诱导的微血管生长以及肿瘤中血液循环建立的过程。这一过程既受机体神经内分泌因素影响,又受肿瘤细胞和肿瘤基质细胞表达的生长因子调控。

Wang 等^[14]以人脐静脉上皮细胞做体外实验表明 COS 可抑制由血管内皮生长因子引发的血管生成,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 效果最好。并以斑马鱼胚胎做为动物模型进行活体实验表明 COS 可抑制新生血管生成。Prashanth 等^[15]对比 COS 与可溶性壳聚糖抑制由埃利希腹水瘤细胞的生长和肿瘤血管生成时发现,低剂量 COS 比高剂量壳聚糖具有更强的抑制效果。

研究还表明 COS 可抑制一些血管生成因子,如基质金属蛋白酶(MMP)、TNF 等来发挥抗肿瘤作用。MMP 的测定可作为判断肿瘤恶性程度、复发、转移的指标。Van 等^[16]在研究 COS 抑制 MMP-9 在人纤维肉瘤细胞 HT1080 中的表达时发现, M_r 为 1 000 ~ 3 000 的 COS 抑制效果最好,可在基因和蛋白水平同时抑制 MMP-9 的表达。

2.3 COS 可能通过调节机体免疫来抑制肿瘤细胞的增殖

现代肿瘤免疫学研究发现巨噬细胞、T 淋巴细胞和 NK 细胞在抗肿瘤的免疫效应中发挥着主要作用。许多学者证实一些具有免疫活性的细胞表面存在 *N*-乙酰-*D*-糖胺或 *D*-糖胺残基和受体的结合可能与抗肿瘤密切相关。吴海明等^[17]研究 COS 对巨噬细胞相关细胞因子的影响,显示 COS 能促进巨噬细胞分泌细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-18。而这些细胞因子又可以反馈激活巨噬细胞和 NK 细胞,形成网络状的反馈调节关系,从而极大地增强机体的免疫功能和抗肿瘤能力。

Maeda 等^[18]在以小鼠为动物模型的体内试验中,低 M_r 壳聚糖和 COS 都有抑制 S180 瘤的作用。并且其作用机理可能是由于 COS 可以提高肠上皮内的淋巴细胞的自然杀伤活

性。这表明 COS 有可能是通过对肠道免疫功能的调节来抑制肿瘤的生长。

3 COS 的抑制糖尿病活性

3.1 抗氧化活性

很多学者认为自由基代谢异常、机体抗氧化机能低下与糖尿病的发生发展有密切的关系。黄春林等研究发现壳寡糖、壳聚糖以及 COS 对清除糖尿病模型大鼠体内氧自由基,抑制脂质过氧化,对抗自由基对胰岛 β -细胞的损害,并且发现壳寡糖的效果最明显。

刘冰等^[19]的研究发现以链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠为模型,不同剂量的 COS 和 *N*-乙酰氨基单糖均能不同程度地调节糖尿病大鼠血脂和提高其机体抗氧化能力,改善糖尿病大鼠的体重减轻、多饮、多食等症状。随后研究发现以 M_r 为 1 200 的 COS 对于原代培养的大鼠胰岛细胞和胰岛 β 细胞体外增殖具有明显的促进作用,并可以显著促进该细胞胰岛素的分泌。

3.2 降血糖活性

曹朝晖等^[20]的研究发现,以 250 mg/(kg·d) 剂量 COS 灌服实验性糖尿病大鼠,有明显降血糖作用,体外的酶学实验显示 COS 对 α -葡萄糖苷酶活力有较强的抑制作用,抑制率呈一定的剂量效应关系,且抑制效果优于阿卡波糖,提示 COS 可能具有类似阿卡波糖样的降糖机制。Lee 等^[21]对大鼠所做的实验同样证明了这一点,COS 可以使实验大鼠的空腹血糖水平下降 19%,还可以显著提高葡萄糖的耐受性。甘油三酯与对照糖尿病大鼠组相比下降了 49%。Kondo 等报道低 M_r 壳聚糖(壳聚糖乳酸盐, M_r 20 000)可以预防低剂量链脲菌素诱导产生的小鼠慢性进行性糖尿病,减缓血糖上升的时间。相反,氨基葡萄糖和壳聚糖均不能抑制糖尿病的发生。他们进一步对遗传性肥胖糖尿病大鼠的研究表明,对高血糖症、高胰岛素血症和高甘油三酯血症低 M_r 壳聚糖都有一定疗效。结果证明低 M_r 壳聚糖可以有效的降低血糖水平。

4 COS 的降血脂活性

1988 年就有人发现 COS 有清除血液中胆固醇的作用。有文献报道按 240 mg/kg 的剂量给小鼠口服壳三糖可使小鼠血脂降低 66% 左右。Enomoto 等^[22]发现每次喂食低 M_r 壳聚糖(M_r 2 000 ~ 20 000,平均 M_r 8 000),与对照组相比(饲喂 M_r 为 220 000 的壳聚糖),大鼠的血清中胆固醇水平降低 25% 左右(从 133 mg/dl 降低到 100 mg/dl)。Kim 等在利用高血脂胆固醇的大鼠实验中,发现高胆固醇饲喂的大鼠喂食 2% COS 4 周后,血清中总胆固醇、低密度脂蛋白(LDL)和甘油三酸酯含量都显著降低,而高密度脂蛋白(HDL)含量增加。HDL 将外周组织的胆固醇运向肝脏,进而排出体外,故 HDL 含量升高,有利于胆固醇清除,降低血胆固醇含量。肝脏中 SOD 和 H_2O_2 酶活性也都显著提高。

Liao 等^[23]通过 60 名志愿者 8 周的实验观察发现在水溶性壳聚糖组(M_r 为 30 000 ~ 50 000)总胆固醇下降了 7.5%,在水不溶性壳聚糖组(M_r 为 100 000 ~ 150 000)总胆固醇下降了 8.9%。血清中 LDL 分别下降了 10% 和 6%。

5 促进钙的吸收和骨骼健康

Jung 等^[24]的研究证实 COS 在体外实验中可抑制钙质形成不溶性的钙盐,并且以切除卵巢的骨质疏松大鼠为模型,发现服用 COS 的大鼠与未服的对照组相比,对钙质的排泄明显减少,增大了机体对钙的保持力。实验鼠股骨的总钙含量,骨质密度和力度都有显著增加。另外,磷酸化的 COS 也有加速钙质吸收的作用。这种作用与 COS 的 M_r 相关。 M_r 在 1 000 以下的磷酸化 COS 具有较强的抑制磷酸钙沉淀的作用,其抑制磷酸钙沉淀的作用与酪蛋白磷酸肽(CPP)相近。因此,认为在钙强化奶中广泛使用加入磷酸化 COS 的方法,可抑制钙质形成沉淀,以达到增加钙吸收率的目的。

Ohara 等^[25]发现 COS 可以显著提高成骨细胞中碱性磷酸酶的活性。通过对其基因表达的进一步研究发现, COS 可以诱导 CD56 抗原和组织型血纤维蛋白溶酶原催化剂表达量增加。而这两类物质的基因又与细胞的增殖和细胞分化有关。这就表明 COS 在 mRNA 水平上有调节造骨细胞的功能。随后发现低 M_r 壳聚糖也具有抑制破骨样多核细胞形成的作用。给切除卵巢的大鼠口服低 M_r 壳聚糖可有效预防腰椎骨密度的降低。作用机理可能是低 M_r 壳聚糖通过抑制了破骨细胞的再吸收功能来防止骨密度的降低。

沈若武等^[26]在对新西兰模型兔的体内试验中证实 COS 可以加速骨折愈合,作用机理可能是通过促进胶原质的形成并且增加了在骨折愈合过程中转化生长因子 β -1(TGF- β -1)的表达,骨和血小板中 TGF- β 1 的含量最为丰富,在骨折修复过程中以自分泌和旁分泌的方式调节骨折愈合不同阶段的细胞的功能,从而促进骨折的愈合。COS 可能通过促进 TGF- β 1 的合成与分泌来促进骨折的愈合。

6 促进肠道健康

6.1 促进肠绒毛生长

小肠的绒毛长度、黏膜厚度、绒毛表面积都是衡量小肠消化吸收功能的重要指标。绒毛长度、黏膜厚度增加可使小肠吸收面积扩大,有利于营养物质的吸收。王秀武等^[27]的研究表明, COS 可增加大鼠小肠绒毛长度和黏膜厚度从而增强了小肠对营养物质的吸收功能。并且 COS 可抑制肉仔鸡肠道菌,促进微绒毛生长发育,提高免疫能力和生产性能。

6.2 调节肠内菌群分布

Han 等^[28]的研究表明, COS 可明显降低致病菌——大肠杆菌和肠球菌的数量,但对有益菌-双歧杆菌和乳酸杆菌却有增殖作用,且改善效果随着剂量的增加而增加。最近又有实验证明, COS 有抑制致肠病的病原菌对大肠细胞的粘连作用。Rhoades 等发现 DP 为 4 的 COS 可抑制 3 种有害的大肠杆菌菌株对肠癌细胞 HT-29 的黏附,抑制率为 12% ~ 29%。

7 展望

综上所述,很多研究表明 COS 具有多元化保健功能,在保健品的开发中有很高的应用价值。但目前的研究并没有很好的解释 COS 多样生物活性的分子生物学机制,而只是观察到很多实验现象。实际上,人体的免疫系统很复杂,想要很好的解释作用机理比较困难。所以,目前很多学者的研究

工作都在为解释 COS 众多活性的详细分子机制做出努力。

参考文献:

- [1] 胡志鹏.壳寡糖的研究进展[J].中国生化药物杂志,2003,24(4),210-212.
- [2] Qin Caiqin, Gao Junan, Wang Liansheng, et al, Safety evaluation of short-term exposure to chitooligomers from enzymic preparation. [J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(6): 855-861.
- [3] Kim S K, Park P J, Yang, H P, et al, Subacute toxicity of chitosan oligosaccharide in Sprague-Dawley rats [J]. Arzneimittelforschung, 2001, 51(9): 769-774.
- [4] 窦江丽,白雪芳,杜显光,等.壳寡糖对小鼠免疫系统的调节作用[J].中国海洋药物杂志,2005,24:33-35.
- [5] Wu G J, Tsai G J. Cellulase degradation of shrimp chitosan for the preparation of a water-soluble hydrolysate with immunoactivity[J]. Fisheries Sci, 2004, 70: 1113-1120.
- [6] Okamoto Y, Inoue A, Miyatake K, et al. Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of macrophages [J]. Macromolecular Biosci, 2003, 3(10): 587-590.
- [7] Dou Jiangli, Tan Chengyu, Du Yuguang, et al. Effects of chitooligosaccharides on rabbit neutrophils *in vitro* [J]. Carbohydr Polym, 2007, 69, 209-213.
- [8] 王海生,范廷英,任青华,等.壳寡糖对小鼠微循环及移植性肿瘤的影响[J].中国生化药物杂志,2005,26(5):301-302.
- [9] 窦江丽,谭成玉,白雪芳,等.寡糖对免疫系统作用的研究进展[J].中国生化药物杂志,2005,26(6),377-379.
- [10] 官杰,罗晓庆,王琪,等.壳寡糖抑制肿瘤作用的实验研究[J].中国免疫学杂志,2007,23(5):421-425.
- [11] Huang Ronghua, Mendis E, Rajapakse N, et al. Strong electronic charge as an important factor for anticancer activity of chitooligosaccharides (COS) [J]. Life Sci, 2006, 78: 2399-2408.
- [12] Xu Qingsong, Dou Jiangli, Wei Peng, et al. Chitooligosaccharides induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via up-regulation of Bax [J]. Carbohydr Polym, 2007, 71(4): 509-514.
- [13] 官杰,罗晓庆,钱丽丽,等.壳寡糖与双歧杆菌对肿瘤协同抑制的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(6): 1155-1158.
- [14] Wang Zheng, Zheng Lanhong, Yang Shaoli, et al. N-Acetyl chitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357: 26-31.
- [15] Prashanth K V H, Dharmesh S M, Rao K S J, et al. Free radical-induced chitosan depolymerized products protect calf thymus DNA from oxidative damage [J]. Carbohydr Res, 2007, 342: 190-195.
- [16] Van T Q, Kim M M, Kim S K. Inhibitory effect of chitooligosaccharides on matrix metalloproteinase-9 in human fibrosarcoma cells (HT1080) [J]. Mar Biotechnol, 2006, 8(6): 593-599.
- [17] 吴海明,华晓阳,何登全.壳寡糖抗肿瘤作用及免疫调节机理的研究 [J]. 中华医学研究杂志, 2005, 5(8): 729-731.
- [18] Maeda Y, Kimura Y. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice [J]. Nutr Cancer, 2004, 134: 945-950.
- [19] 刘冰,刘万顺,韩宝芹,等.壳寡糖及其衍生物对实验性糖尿病大鼠调节血脂和抗氧化作用[J].山东大学学报(理学版),2006,

- 41(4):158-163.
- [20] 曹朝晖,董晓英,敏方,等.甲壳低聚糖对 α -葡萄糖苷酶活性的影响及降血糖作用[J].中国生化药物杂志,2005,26(6):327-329.
- [21] Lee H W, Park Y S, Choi J W, et al. Antidiabetic effects of chitosan oligosaccharides in neonatal streptozotocin-induced noninsulin-dependent diabetes mellitus in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26: 1100-1103.
- [22] Enomoto M, Hashimoto M, Kuramae T, et al. Low-molecular-weight chitosan as anticholesteremic [P]. Jpn Kokai Tokkyo Koho, 1992: 04108734.
- [23] Liao F H, Shieh M J, Chang N C, et al. Chitosan supplementation lowers serum lipids and maintains normal calcium, magnesium, and iron status in hyperlipidemic patients[J]. Nutr Res, 2007, 27(3): 146-151.
- [24] Jung W K, Moon S H, Kim S K. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats[J]. Life Sci, 2006, 78: 970-976.
- [25] Ohara N, Hayashi Y, Yamada S, et al. Early gene expression analyzed by cDNA microarray and RT-PCR in osteoblasts cultured with water-soluble and low molecular chitooligosaccharide[J]. Biomaterials, 2004, 25(10): 1749-1754.
- [26] 沈若武,王守彪,夏玉军.壳寡糖对新西兰兔骨折愈合的影响[J].解剖学杂志,2005,28(3):340-342.
- [27] 王秀武,杜显光,白雪芳,等.壳寡糖对肉仔鸡肠道主要菌群、小肠微绒毛密度、免疫功能及生产性能的影响[J].动物营养学报,2003,15:32-35.
- [28] Han K N, Kwon I K, Lohakare J D, et al. Chito-oligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility and microbial ecology of the gut in weanling pigs[J]. Asian Aust J Anim Sci, 2007, 20(4): 556-562.

透明质酸与恶性肿瘤的关系研究进展

钱皓^{1,2}, 凌沛学², 王凤山¹, 张天民¹

(1. 山东大学 药学院 生化与生物技术药物研究所, 山东 济南, 250012;

2. 山东省生物药物研究院 博士后科研工作站, 山东 济南, 250108)

摘要: 人类肿瘤的发生、发展中会伴随出现基因、细胞以及机体等方面的不断变化,其中包括肿瘤细胞之间通过细胞外基质而进行的相互作用,而透明质酸作为细胞外基质的重要组成部分在这种相互作用中发挥重要作用。此文主要介绍透明质酸与恶性肿瘤侵袭转移之间的关系。

关键词: 透明质酸; 恶性肿瘤; 细胞外基质

中图分类号: R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-1678(2008)03-0213-03

Research progress in relationship between hyaluronan and malignant tumor

QIAN Hao^{1,2}, LING Pei-xue², WANG Feng-shan¹, ZHANG Tian-min¹

(1. Institute of Biochemical and Biotechnological Drugs, School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Working Station for Postdoctoral Scientific Research, Institute of Biopharmaceuticals of Shandong Province, Jinan 250108, China)

透明质酸(HA)是一种在体内广泛存在的糖胺聚糖。传统中,人们普遍认为HA在润滑关节、连接结缔组织中发挥重要作用。但20世纪后期,人们发现其在维持细胞外基质的结构以及调节细胞内活动中也起着至关重要的作用,尤其在胚胎发育、伤口愈合、炎症反应等方面的作用更是引起人们

的关注。最近的研究也表明HA在肿瘤的发生、侵袭和转移等方面的作用不容忽视^[1-2]。本文就HA与恶性肿瘤的关系介绍如下。

1 HA的分子结构与生物功能

HA的相对分子质量(M_r)分布主要在 $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 之间,是由葡萄糖醛酸与N-乙酰葡萄糖胺组成的双糖单位通过 β -1,4或 β -1,3糖苷键重复连接合成^[3]。HA与其它糖胺聚糖如硫酸软骨素,硫酸角质素等在许多方面都有不同^[1]:HA是在3种透明质酸合酶(hyaluronan synthase, HAS)——HAS1,

收稿日期: 2007-09-21

作者简介: 钱皓(1981-),男,山东济南人,博士研究生,从事多糖与多肽药物研究;凌沛学,男,通信作者,博士,博士生导师,研究员, Tel:0531-88937780-1301, E-mail: peixue.ling@bausch.com。