



水溶性低分子量壳聚糖致鼠脱毛的毒理性研究

刘安军, 詹伟, 朱振元
(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 通过对水溶性低分子量壳聚糖致鼠脱毛的毒理性研究, 评价低分子量壳聚糖的潜在毒性. 实验包括致小鼠脱毛观察、生理指标检测、组织切片等. 结果表明, 水溶性低分子量壳聚糖致鼠脱毛与肾毒性相关.

关键词: 低分子量壳聚糖; 肾毒性; 氨基糖苷类抗生素; 安全性

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-6510 (2007) 04-0020-04

Study on Toxicology of Oligochitosan on Hair Removal in Mouse Model

LIU An-jun, ZHAN Wei, ZHU Zhen-yuan

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The result of hair removal after subcutaneous injection of oligochitosan in mice and rats was studied in this paper, using the observation of hair removal and tissue slices and the detection of hematological parameters. It is shown from the determination results that oligochitosan has renal toxicity.

Keywords: oligochitosan; renal toxicity; aminoglycoside antibiotics; safety

壳聚糖 (Chitosan), 由甲壳素脱乙酰化所得, 具有很好的生物相容性和许多生理功能, 如抗肿瘤、提高免疫力、降血脂、抗菌、抑菌等^[1,2]. 就其安全性, 国内外也有相关报道. 例如: 吴晴斋等^[3]以甲壳素为原料, 石玲等^[4]以壳聚糖为原料采用小鼠最大药量灌胃, 李华等^[5]采用最大可灌浓度腹腔注射, 结果显示大分子量壳聚糖几乎无毒. 而国外也将其作为可吸收的缝线, 药物的载体, 伤口愈合成分等^[6]. 但这些结论与应用均以大分子量壳聚糖为研究对象, 至于水溶性低分子量壳聚糖的毒性问题, 尚未见权威性报道. 国外只是严谨地报道其具有抗菌、抑菌、抗肿瘤等功效, 而国内则多沿用大分子量壳聚糖的研究结果, 认为其安全无毒. 但通过本实验室相关试验, 认为不应完全沿用以前的观点, 并希望能引起广泛关注, 深入研究.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

昆明种小鼠、SD 大鼠, 中国人民解放军军事医

学科学院实验动物中心; 硅胶板, 青岛海洋化工厂.

中等分子量壳聚糖, Sigma 公司(分子量约 600 ku, 记为 K_{SIG}); 水溶性低分子量壳聚糖(分子量 < 5 ku、分子量 < 2 ku, 分别记为 K_5 、 K_2), 济南海德贝生物工程有限公司; 氨基葡萄糖, Sigma 公司; 其他试剂均为国产化学纯.

1.2 主要仪器

VECTOR22 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国布鲁克仪器公司; KD-BM II 电脑生物组织包埋机, 浙江金华市科迪仪器设备有限公司; WZZ-2 型旋光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 光学显微镜, 上海复日科技有限公司; Labsystems wellscan MK3 酶标仪.

1.3 方法

1.3.1 旋光度测定

分别配制 K_5 、 K_2 、 K_{SIG} 溶液 10 mg/mL, 于旋光仪中, 连续测量 4 次, 取平均值.

1.3.2 红外检测

精确称取 K_5 、 K_2 、 K_{SIG} 1 mg 与干燥 KBr 压片, 傅里叶变换红外光谱仪扫描检测.

收稿日期: 2007-04-04; 修回日期: 2007-08-31

基金项目: 人事部中国博士后基金资助项目 (20060400709); 天津科技大学人才引进基金资助项目 (2006403)

作者简介: 刘安军 (1963—), 男, 河北人, 教授, 博士.

1.3.3 壳聚糖水解及薄层检测

精确称取 K_5 、 K_2 、 K_{SIG} 25 mg, 溶于 1.0 mL 三氟乙酸 (2 mol/L) 充氮封管, 100 °C 水浴, 水解 15 h, 40 °C 氮吹至干, 甲醇复溶, 再氮吹至干, 如此反复 3 次. 采用硅胶板薄层检测, 展开剂: 正丁醇/乙酸/水 (60/25/25), 显色剂: 苯胺-二苯胺-磷酸^[7].

1.3.4 小鼠腹腔注射致脱毛试验

40 只小鼠雌雄各半, 体重 (22 ± 2) g, 随机分成 5 组, 依次为空白组 (注射生理盐水)、 K_{SIG} 组 (注射 Sigma 提供的中等分子量壳聚糖)、 K_5 组 (注射分子量 < 5 ku 壳聚糖)、 K_2 组 (注射分子量 < 2 ku 壳聚糖)、氨基葡萄糖组 (注射分子质量为 215.64 u 的氨基葡萄糖). 采用腹腔注射, 每日一次, 给药量为每只 10 mg/d, 每日注射前称重, 记录观察现象.

1.3.5 大鼠尾静脉注射致脱毛试验

方法与 1.3.4 类似, 40 只雌雄各半, 体重 (150 ± 10) g, 只是给药方式改为大鼠尾静脉注射, 注射量为每只 25 mg/d.

1.3.6 小鼠间断性重复腹腔注射致脱毛试验

方法与 1.3.4 类似, 只是小鼠脱毛后, 停止给药, 待其体毛恢复与空白组无明显差异时, 继续给药, 药量不变.

1.3.7 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 的测定

实验鼠眼球取血, 脱臼处死, 取新鲜肝、肾组织, 按试剂盒说明书测定组织 SOD、MDA.

1.3.8 组织切片观察

实验鼠眼球取血, 脱臼处死, 取新鲜组织, 10% 甲醛固定, 做石蜡切片, HE 染色观察.

2 结果

2.1 旋光度

K_5 、 K_2 、 K_{SIG} 三种物质的比旋光度分别为 -9.0 、 -9.5 、 -9.0 . 它们的比旋光度在误差范围内可视为相同.

2.2 红外检测

图 1 为 K_2 、 K_5 、 K_{SIG} 的红外光谱图. 三者的红外光谱图大体相似, 如壳聚糖的主要吸收峰有 3422 cm^{-1} 氨基伸缩振动, 2878 cm^{-1} 亚甲基的伸缩振动, 1653 cm^{-1} 羰基伸缩振动, 1319 cm^{-1} 碳氮伸缩振动. 且壳寡糖的 $-N-H$ 剪式振动峰和 $-N-H$ 伸缩振动峰较壳聚糖更明显. 由此说明, 不同分子质量的壳寡

糖单元基本骨架结构没有明显区别, 只是糖苷键断裂, 分子质量降低, 氢键作用减弱导致的一些吸收峰改变.

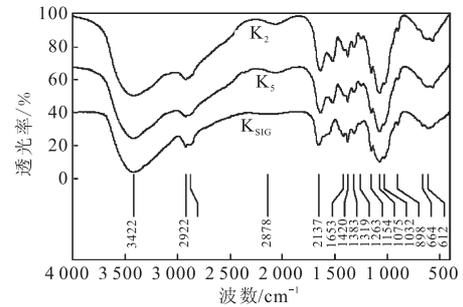
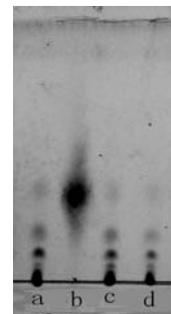


图 1 K_5 、 K_2 、 K_{SIG} 的红外光谱图

Fig. 1 Infrared spectra of K_5 , K_2 , K_{SIG}

2.3 薄层层析 (TLC)

图 2 为三氟乙酸水解 K_{SIG} (a)、 K_2 (c)、 K_5 (d) 后, 硅胶板薄层层析的结果. 三种壳聚糖水解后的 TLC 结果相同, 存在相同的点对应, 且均有斑点与标准氨基葡萄糖 (b) 处于同一水平线, 可见它们在单糖组成上不存在实质性的区别, 只是存在浓度大小的差别.



a. K_{SIG} ; b. 氨基葡萄糖; c. K_2 ; d. K_5

图 2 水解产物的 TLC 图

Fig. 2 TLC of hydrolysate

2.4 脱毛试验

实验 1.3.4 和 1.3.5 的结果有一定相似性. 均表现为注射 K_{SIG} (分子量约 600 ku) 和壳聚糖单体氨基葡萄糖 (分子量 215.64 u) 对实验鼠无特异性反应, 小鼠的各项指标与空白鼠基本一致, 无明显毒副作用. 这一结果与李华等^[5]得到的结果基本一致. 而注射 K_2 、 K_5 的实验鼠则出现体重明显降低 (见图 3), 体毛脱落 (见图 4), 尿液黏稠、发黄, 肝叶片数增多, 肾组织和一些生理指标异常等现象.

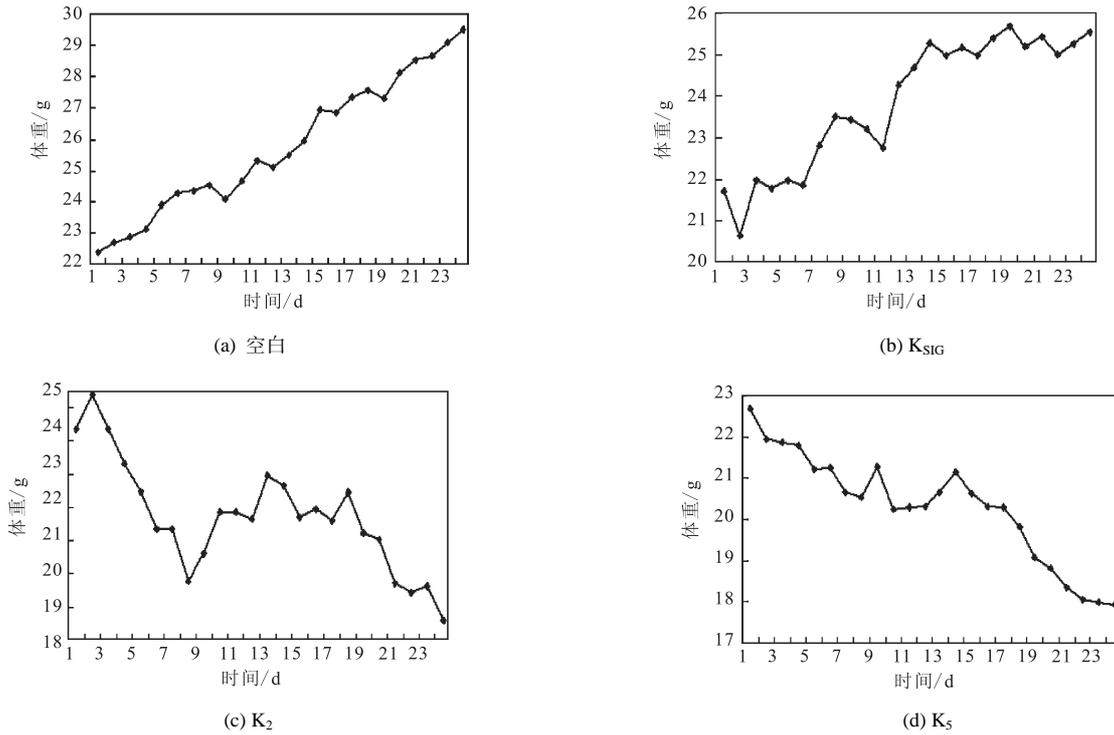


图3 实验小鼠平均体重变化图

Fig. 3 Changes of average weight



图4 K₂、K₅腹腔注射致鼠脱毛的照片

Fig. 4 Photo of paunch injecting oligochitosan result in hair removing in mouse model

2.5 间断性重复腹腔注射致小鼠脱毛试验

在实验 1.3.6 中发现第一次给药停止后,经过一段时间,小鼠的体毛在停药期会恢复性地长起来,体重等指标也开始趋于正常.为证明该现象不是由于实验鼠体内形成抗体而产生的恢复性生长,待其体毛恢复与空白组无明显差异时,第二次给药,药量不变.

结果给 K₅、K₂ 组小鼠又重复性继续脱毛.

2.6 相关生理指标测定

2.6.1 SOD 酶活测定

实验鼠肝、肾组织酶活力的测定结果见表 1.与空白组相比较,K₅组、K₂组明显降低组织细胞的SOD酶活力,抑制了SOD酶的有效表达,降低了组织细胞清除自由基的能力,对细胞造成氧化损伤,加速了细胞的衰老进程.而K_{SIG}组则变化不大.

2.6.2 MDA 测定

组织 MDA 测定的结果见表 2.与空白组相比较,K₅组、K₂组使细胞的脂质过氧化产物增加,降低了组织细胞的抗氧化能力,对细胞造成了显著的氧化损伤,具有细胞毒性.K_{SIG}组则变化不大.

表1 组织 SOD 酶活

Tab. 1 Tissue SOD enzymatic active

U/mg

组织	空白组	K _{SIG} 组	K ₅ 组	K ₂ 组
肝组织	65.38 ± 2.4	64.98 ± 3.1	59.97 ± 15.3*	55.68 ± 12.5**
肾组织	60.12 ± 4.8	60.01 ± 5.1	56.26 ± 18.2**	53.19 ± 17.8**

注:*P<0.05, **P<0.01.

表2 组织 MDA 测定

Tab. 2 Mensurate of tissue MDA

nmol/mg

组织	空白组	K _{SIG} 组	K ₅ 组	K ₂ 组
肝组织	5.38 ± 0.1	5.40 ± 0.2	5.88 ± 0.78**	6.22 ± 0.8**
肾组织	5.41 ± 0.08	5.45 ± 0.13	5.98 ± 0.80**	6.51 ± 0.59**

注:**P<0.01.

2.7 肾组织结构变化

石蜡切片是组织学常规制片技术中广泛应用的方法. 图5为各实验组肾组织切片图.

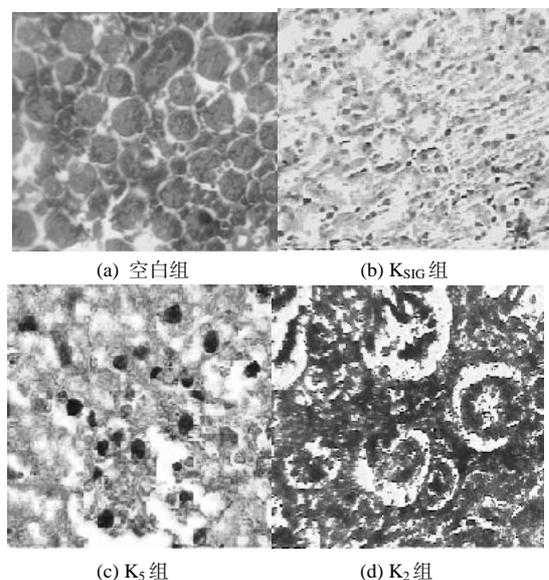


图5 肾组织切片图

Fig. 5 Slice of the kidney tissues

由图5可以看出, K_5 组、 K_2 组肾组织受损严重, 肾小管上皮组织细胞变性广泛, 除变性外还伴有大片坏死, 间质增加, 而 K_{SIG} 组则影响不是很大.

3 讨论

从2.1、2.2、2.3的实验结果可以推断, 由Sigma公司提供的壳聚糖和济南海德贝生物工程有限公司提供的水溶性低分子量壳聚糖实质上属同一类物质. 三种壳聚糖的单糖结构不存在实质性的区别, 它们只存在分子量、聚合度和脱乙酰度的差别.

致脱毛实验结果表明, 大分子量壳聚糖和壳聚糖的单体氨基葡萄糖在动物实验中无明显毒副作用, 而分子量 <5 ku、分子量 <2 ku的低分子量壳聚糖则在动物实验中表现出明显的毒副作用, 如体重明显持续降低, 体毛脱落, 尿液黏稠、发黄, 肝叶片数增多, 肾组织和一些生理指标异常等. 而且静脉注射比腹腔注射对鼠的毒性作用更大, K_2 比 K_5 的作用效果更明显.

实验2.5表明, K_2 和 K_5 对鼠的毒副作用具有可逆性, 即停药后即可减轻或恢复. 实验2.6结果表明: K_5 、 K_2 降低肾SOD的活性, 增加肾MDA的生成量; 氨基葡萄糖、 K_{SIG} 的作用结果则与空白组相差不大. 由空白组、 K_{SIG} 组、 K_5 组、 K_2 组肾组织的切片对比可明显发现, K_5 组、 K_2 组肾组织的切片图中, 肾组

织受损严重, 肾小管上皮组织细胞变性广泛, 除变性外还伴有大片坏死, 间质增加, 而 K_{SIG} 组则影响不大.

综合以上分析可知, 分子量 <2 ku和分子量 <5 ku的水溶性低分子量壳聚糖对实验鼠存在明显毒性, 其毒性主要作用在肾组织, 查阅相关文献发现, 这与氨基糖苷类抗生素(AGs)即由氨基糖和氨基环醇得到的氨基糖苷类抗生素作用于人体的副作用具有一定的相似性. 其相似性主要表现在: ①结构上有一定的相似性. 均含氨基糖, 由糖苷键连接的链式结构. 分子量范围相似, 如AGs中硫酸妥布霉素分子量: 1425.45 u; 奈替米星分子量: 1441.54 u. ②都是口服(罐胃)很少吸收, 但注射体内后迅速被吸收, 出现副作用. ③都是水溶性好, 且有一定抗菌杀菌能力, 且均为结构中的氨基对抗菌活性起着重要作用, 氨基含量越多抗菌能力越强, 同时伴随着毒性加大^[8]. ④毒性上都表现出肾毒性, 症状有尿液异常, 变黄, 变浓稠. ⑤毒性作用均表现出可逆性, 即停药后即可减轻或恢复, 且出现异常症状的时间大致相当. 在此推测水溶性低分子量壳聚糖的潜在毒性虽与AGs存在差别, 但有一定可比性.

参 考 文 献:

- [1] Muzzarelli RAA, Tarsi R, Filippini O, et al. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, 34: 2019—2023.
- [2] Kim CH, Choi JW, Chun HJ, et al. Synthesis of chitosan and derivatives and quaternary ammonium salt and their antibacterial activity [J]. *Polymer Bulletin*, 1997, 38: 387—393.
- [3] 吴晴斋, 邵茹辛, 屈步华, 等. 甲壳素的毒理学研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 1995, 16 (3): 120—122.
- [4] 石 玲, 胡利平. 壳聚糖的安全性研究 [J]. *中国海洋药物杂志*, 2000, 19 (1): 25—28.
- [5] 李 华, 蒯正根, 邝荔香. 药用辅料壳聚糖的急性毒性实验 [J]. *临床肺科杂志*, 2004, 9 (3): 236.
- [6] Ueno H, Yamada H, Tanaka I, et al. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs [J]. *Biomaterials*, 1999, 20 (15): 1407—1414.
- [7] 杨景芝, 孙衍华, 张杰道, 等. 蜂蜜中糖的薄层展开剂的研究与应用 [J]. *色谱*, 2003, 21 (4): 427—429.
- [8] Mingot-leclercq M P, Tulkens P M. Aminoglycosides: Nephrotoxicity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43 (5): 1003—1012.