维普资讯 http://www.cqvip.com

综 述 文章编号:0253-3626(2007)08-0894-03

糖树状大分子在生物医学方面的应用研究进展

赵俊义,王 驰

(重庆医科大学药学院药剂教研室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R94 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-01-30

复合糖(糖蛋白、糖脂等)是由脂类或蛋白质与糖类物质共价结合而形成的一类生物大分子。它们覆盖在细胞表面,形成了细胞与外界相互作用的第一条通道,通过与细胞、病毒、细菌、细菌毒素上的糖蛋白(凝集素)相互识别而起作用,调节一些重要的生理过程:受精、控制 B 细胞的激活;病理过程:病原体侵入、引发炎症应答、癌症转移等。一般单价糖配体与糖蛋白受体的结合力很弱,而复合糖上含多个糖配体,与糖蛋白受体产生很强的相互作用,具有明显的生物效应,又称"多价效应"。人们模拟生物体内这种多价作用模式把多个糖配体连接在树状大分子的表面形成多价复合糖,又称糖树状大分子(Glycodendrimers,GD),以此提高每个糖配体与蛋白受体的亲合力。

GD 具有单分散度、可控的结构、表面可糖基化修饰等特殊的物化性质,利用这些性质可设计出不同水溶性,多种生物功能的 GD。近年来,其研究主要是:研究分子水平上的糖-蛋白相互作用机理;药物靶向递送载体;造影剂、生物传感器等方面。本文综述了 GD 在生物医学方面的应用。

1 糖树状大分子的结构及鉴定

GD[1]是一种球形、纳米大小、结构可控的单分散高分子化合物,它是在树状大分子(Dendrimer)的表面糖基化修饰而形成的,包括两个部分:树状大分子和表面糖配体。树状大分子由三个不同的区域组成:(1)核中心,由单个原子或原子团组成;(2)从核中心散发出的树枝结构,重复单元呈几何式递增,形成多层放射状同心环,每环称为一代;(3)分布在树状大分子的表面功能基团,可连接大量的糖配体。表面糖配体量可根据需要,通过调节 GD 的代数进行控制。

鉴定 GD 结构的方法有:核磁共振(NMR)、质谱(MS)、小角度中子散射(SANS)、基质辅助的激光解吸/电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF)等。虽然电喷射离子化傅利叶变换离子回旋加速共振质谱法(Fouier transform ion cyclotron resonance mass spertrometer FT-ICR-MS)鉴定 GD 结果精确,但是 Eric 等[2]研究表明 MALDI-TOF 是鉴定大分子 GD 最简单、实用、准确的方法。

2 设计与合成

合成 GD[3]的方法主要有两种:发散法和收敛法。在发散法中,GD 从核向外生长,发散法是工业生产主要的方法,但是单个分子的反应次数多,副产物多、分离困难。收敛法包括 3 步:(1)合成树枝状楔形物,在其表面连接糖配体;(2)连接楔形物在分枝状组件上,形成树状支链;(3)连接树状支链到核中心。收敛法避免了发散法的缺陷,使产物容易分离。利用不同的支链和糖配体可设计出表面和内部水溶性不同的 GD。Sakamoto J 等[4]设计了一种以聚亚苯基为内核表面结合糖配体的全新 GD,该疏水内核可装载疏水性药物,但整个 GD 因表面糖基存在而具有很好的亲水性。另外,需要根据受体靶点的结构设计出不同糖配体密度的 GD,使之能与受体选择性的结合。

3 多价效应

研究发现,生物体内蛋白质与糖类物质的结合强度通常是多个糖与蛋白质协同作用的结果,此谓"多价效应"[5](Multivalent effect)或"簇集效应"(Cluster effect)。多价效应最早由 Lee(1994 年)定义:在相同糖配体浓度下,多价糖配体与蛋白受体亲和力强于单价糖配体与蛋白受体亲和力。多价效应可能存在两种不同的分子机制:(1)统计效应—多价糖配体大大提高了受体结合位点的配体浓度;(2)螯合效应—多价糖配体交叉连接到邻近受体复合体或多价受体上,多价糖配体与多价受体的结合力比多价糖配体与单价受体的结合力强。但 W. Bruce[6]等研究发现并不是糖配体越多,结合力越大。因此需要更进一步理解:(1)小簇 GD 模型多价结合的能量过程;(2)小簇 GD 在形成稳定的糖—蛋白复合物过程中的作用;(3)糖—蛋白结合过程中的空间位阻效应。目前,多价效应明确的分子机制还不是很清楚,只有充分理解"多价效应",才能设计出与蛋白质亲和力更强的 GD,使 GD

作者介绍:赵俊义(1981-),男,硕士,
主要研究方向:靶向药物制剂。

维普资讯 http://www.cqvip.com

在生物医学方面有更广阔的应用。

4 生物医学应用

4.1 糖-蛋白质的相互作用

GD 在研究糖和蛋白质相互作用方面有许多优点。它的大小介于小糖簇和大糖复合物之间,空间位阻较小;分散度比大糖复合物低,结构均一;提高了多价糖配体与蛋白受体亲和力。现在广泛应用的测量 GD 与蛋白受体亲和力的四种技术[6]为:血细胞凝集抑制分析(HIA)、酶联凝集素测定法(ELLA)、等温滴定微量量热法(ITC)、表面等离子体激光共振(SPR)。Eric 等[2,7]通过血细胞凝集分析一系列表面甘露糖修饰的 Dendrimers,第六代 PAMAM dendrimers(含 170 个甘露糖残基),每个甘露糖残基与伴刀豆蛋白 A(ConA)的亲和力大约为第四代 GD(含 55 个糖配体)的 2 倍。另外,第四代 GD 每个甘露糖残基与伴刀豆蛋白 A(ConA)的亲和力为每个甘露糖单体的 2 个数量级。含 32 个 T 抗原残基(与癌有关抗原)的 PAMAM dendrimers,浊度分析、酶联凝集素分析(ELLA)、酶联免疫吸附分析(ELISA)都显示 GD 上每个 T 抗原残基与花生凝集素或鼠单克隆抗体的亲和力为 T 抗原单体的 20 倍[8]。固相法显示表面连接 8 个乳糖配体的 GD 与半乳凝素 -1 亲和力强;而血细胞凝集分析显示该 GD 高度选择性的与半乳凝素 -3 结合。含 4 个乳糖配体 GD,每个乳糖配体与半乳凝素 -1 的亲和力为单个乳糖分子与半乳凝素 -1 亲和力的 3 个数量级[9]。Arce E 等[10]合成了 BH30sucMan,它为表面含 32 个甘露糖配体的以 Boltorn (2,2- 二羟甲基丙酸)为支链的 GD,在生理介质中显示了高度溶解性和低毒性。用饱和转移差异核磁共振(Saturation Transfer Difference NMR, STD-NMR) 实验和定量沉淀试验研究了其与甘露糖结合凝集素(LCA)的结合性能,结果表明,该甘露糖 GD 与凝集素之间存在着明显的相互作用。

4.2 抗病毒作用

GD 通过两种方法抑制病毒与细胞的结合,达到抗病毒作用:(1)GD 结合到病毒表面,干扰病毒与细胞的相互作用,抑制感染过程。这是一种主要的抗病毒方式。Richard D 等[11]合成了以 3- 硫酸半乳糖神经酰胺(SGalCer)为糖配体的第五代 GD(psGal64mer)。SGalCer 是一种脑硫脂,经酶联免疫分析法证明为 HIV-1 病毒膜糖蛋白(rgp-120)的最好配体。rgp-120 作用是介导 HIV-1 进入感染细胞。psGal64mer 抑制 HIV-1 感染细胞的能力与 HIV-1 结合抑制物硫酸右旋糖酐(DxS)相同。然而,许多病毒,如甲型流感病毒、HIV 等不同种系之间表面糖蛋白不尽相同,因此 GD 抑制不同病毒感染细胞的效果也不同。Landers 等[12]在体内实验中发现,表面含有唾液酸的 GD 抑制病毒的感染依赖于病毒表面血细胞凝集素类型;(2)GD 与细胞表面受体结合,干扰了病毒与细胞结合,阻止了病毒进入细胞。树突状细胞表面特异粘附性分子(Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin,DC-SIGN)为一种结合凝集素,主要表达于树突状细胞(DC),在病原体的识别过程中起重要作用。Fatima Lasala[13]以 DC-SIGN 为靶点,接上依波拉病毒膜糖蛋白(EBOV-GP)的缺陷性逆转录病毒颗粒作为 EBOV 感染模型,用 BH30sucMan 抑制 EBOV 感染细胞,结果显示 BH30sucMan 在纳摩尔级上(IC_{50}=337nmol/l)抑制通过 DC-SIGN 调节的病毒进入细胞过程。

4.3 防止疤痕组织的形成

在各种致伤因素作用下使人体皮肤损伤,成纤维细胞和毛细血管网增殖形成新的肉芽组织,使纤维细胞逐渐停止分裂,出现胶原纤维及降解失衡,神经末梢长入,创伤边沿的上皮组织向中心生长,覆盖了肉芽组织,最终形成疤痕。疤痕组织可以发生恶变成为疤痕癌。抑制成纤维细胞的生长是防止疤痕组织形成的关键。Sunil Shaunak[14]等研究显示 3.5 代阳离子聚氨基胺 PAMAM GD 复合物(表面接上氨基葡萄糖或 6- 硫酸氨基葡萄糖)分别具有免疫调节和抗血管生成的性质。氨基葡萄糖 GD 抑制脂多糖诱导的化学增活素(MIP-1α、MIP-1β、IL-8)和细胞活素(INF-α、IL-1β、IL-6)等的合成。这两类色素产生于树突状细胞(DC)和巨噬细胞,上调共刺激分子(CD25、CD80、CD83、CD86)。6- 硫酸氨基葡萄糖抑制成纤维细胞生长因子调节的内皮细胞增生和血管生成。当氨基葡萄糖 GD 和 6- 硫酸氨基葡萄糖 GD 同时作用于青光眼滤过手术老鼠模型时,抑制疤痕组织形成的成功率从 30%提高到 80%。因此,他们认为这两种 GD 同时作用能防止疤痕组织形成。

4.4 作为药物载体

GD 作为纳米粒药物递送系统,显著的优点是能增加治疗剂的选择性和稳定性。其内层空腔和内核分别可以包裹或共价结合药物分子,在它表面进行糖基化修饰后可选择性与糖蛋白受体结合。例如半乳糖能与肝癌细胞表面无唾液酸糖蛋白受体特异性结合,当半乳糖与抗癌药物或载体连接后,该复合物易于聚集于肝癌细胞,提高了抗癌药物的选择性。Jean-Louis[15]等制备了 GD 和抗癌药物秋水仙碱的复合物。GD 由肽单元组成,表面连接的多价糖苷为载体导向物,秋水仙碱共价结合到 GD 的内核上。用 Hela 肿瘤细胞和老鼠胚胎成纤维细胞(MEFS)(代表正常细胞)评价该 GD 复合物的生物活性,结果显示,GD 复合物抑制 Hela 细胞的增殖效果是抑制 MEFS 的 20 ~ 100 倍。Benito JM[16]用多价甘露糖配体树状 β - 环糊精(CD)衍生物包被紫杉醇药物分子,结果显示该复合物极大改善了紫杉醇的水溶性,提高了生物利用度。这种包裹药物分子的 GD-βCD 复合物不但能提高疏水性药物的生物利用度,而且能实现药物的靶向递送。

4.5 作为生物传感器

生物传感器是一类特殊形式的传感器,由生物分子识别元件(酶、蛋白质、DNA、抗体、抗原、生物膜等)与各类物理、化学换能器(如树状大分子)组成,用于各种生命物质和

维普资讯 http://www.cqvip.com

化学物质的分析和检测。它的基本原理:待测物质经扩散作用进入生物活性材料,通过分子识别,发生生物学反应,产生的信息继而被相应的物理或化学换能器转变成可定量和可处理的电信号,再经二次仪表放大并输出,可检测到待测物浓度。生物传感器的特点:(1)采用固定化生物活性物质作催化剂,价值昂贵的试剂可以重复多次使用,克服了过去酶法分析试剂费用高和化学分析繁琐复杂的缺点;(2)专一性强,只对特定的底物起反应,而且不受颜色、浊度的干扰;(3)分析速度快,可以在 1min 得到结果;(4)操作系统比较简单,容易实现自动分析。生物传感器的研究涉及生物学、化学、物理学、信息科学及相关技术,已经发展成为一门新兴的交叉学科。Snejdarkova M 等[17]用电流分析法和石英晶体监控(QCM)技术研究了不同代数葡萄糖 GD(G0、G1、G4)生物传感器的特性。结果显示传感器的灵敏度随着 GD 代数的增加而增加,这是由于随着 GD 体积的增加,葡萄糖氧化酶(GOX)的结合位点增多。QCM 实验显示,GD 表面固定多层 GOX。虽然酶交换量比通过卵白素 - 维生素技术在脂质胶片上固定 GOX 低,但是 GD 生物传感器比脂质胶片传感器稳定,能在冰箱中储存 15 天,而不失敏感性。

5 展 望

GD 在生物医学方面的应用已显示了巨大的潜力。各种评价糖与蛋白质相互作用的分析方法的发展,有力促进了对多价效应的理解。随着对多价效应分子机制的进一步理解,可根据需要设计出与蛋白质亲和力更强的 GD,使之在研究糖 - 蛋白质相互作用、抗病毒、药物载体等方面更好的发挥作用。但是有两点须注意:(1)在评价 GD 作为抗病毒药物时,需要选择合适的动物模型;(2)在研究糖 - 蛋白质相互作用时,不同的分析方法可能得出不同的结论,因此需综合考虑几种分析方法。不久的将来,GD 将会在研究糖 - 蛋白质相互作用、形成凝胶、核磁共振成像造影剂、基因和药物的靶向递送等生物医学领域广泛应用。

参 考 文 献

[1] Mary J Cloninger.Biological applications of dendrimers[J]. Current Opinion in Chemical Biology,2002;6:742-748.

[2] Eric K. Woller and Mary J. Cloninger.Mannose Functionalization of a Sixth Generation Dendrimer [J]. Biomacromolecules,2001;2:1052-1054.

[3] W. Bruce Turnbull,J. Fraser Stoddart.Design and synthesis of glycodendrimers[J]. Reviews in Molecular Biotechnology,2002;9:231-255.

[4] Sakamoto J.Sugars within a hydrophobic scaffold:glycodendrimers from polyphenylenes[J]. Org Lett,2004;6(23):4277-4280.

[5] Davis,B.G.Recent developments in glycoconjugates[J]. J. Chem. Soc. Perkin Trans,1999;1:3215-3237.

[6] Joseph J. Lundquist and Eric J. Toone.The Cluster Glycoside Effect[J]. Chem. Rev,2002;102:555-578.

[7] Woller EK,Cloninger MC.The lectin-binding properties of six generations of mannose-functionalized dendrimers[J]. Org Lett,2002;4:7-10.

[8] Baek MG,Rene Roy.Synthesis and Protein Binding Properties of T-Antigen Containing GlycoPAMAM Dendrimers[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry,2002;10:11-17.

[9] Sabine Andre,Roland J. Pieters,Ioannis Vrasidas.Wedgelike Glycodendrimers as Inhibitors of Binding of Mammalian Galectins to Glycoproteins,Lactose Maxiclusters,and Cell Surface Glycoconjugates [J]. Chembiochem,2001;2:822-830.

[10] Arce E,Nieto PM,Diaz V,et al. Glycodendritic structures based on Boltorn hyperbranched polymers and their interactions with Lens culinaris lectin[J]. Bioconjug Chem,2003;14(4):817-823.

[11] Richard D,Kensinger,Bradley J. Catalone,et al. Novel Polysulfated Galactose-Derivatized Dendrimers as Binding Antagonists of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy,2004;48(5):1614-1623.

[12] Jeffrey J. Landers, Zhengyi Cao,Inhan Lee. Prevention of Influenza Pneumonitis by Sialic Acid-Conjugated Dendritic Polymers[J]. The Journal of Infectious Diseases,2002;186:1222-1230.

[13] Fatima Lasala, Eva Arce, Joaquín R. Otero, Javier Rojo. Mannosyl glycodendritic structure inhibits DC-SIGN-mediated Ebola virus infection in cis and in trans[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2003;47(12):3970-3972.

[14] Sunil Shaunak,Sharyn Thomas,Elisabetta Gianasi.Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation [J]. Nature Biotechnology,2004;22:977-984.

[15] David Lagnoux,Tamis Darbre,M. Lienhard Schmitz,et al. Inhibition of Mitosis by Glycopeptide Dendrimer Conjugates of Colchicine[J]. Chem. Eur. J,2005;11:3941-3950.

[16] Benito JM,Gómez-García M,Ortiz Mellet C.Optimizing saccharide-directed molecular delivery to biological receptors:design, synthesis,and biological evaluation of glycodendrimer-cyclodextrin conjugates[J]. Journal Of The American Chemical Society,2004;126(33):10355-10363.

[17] Snejdarkova M,Svobodova L,Gajdos V,et al. Glucose biosensors based on dendrimer monolayers[J]. J Mater Sci MaterMed,2001;12:1079-1082.