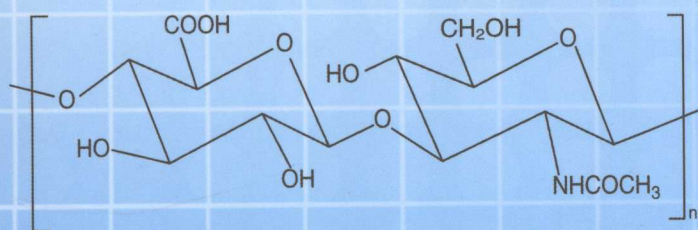


# HYALURONAN



## 玻璃酸 研究与应用

主编 凌沛学    主审 张天民



# 玻璃酸 研究与应用

作者 张晓明 王明 张晓明

人民卫生出版社

*HYALURONAN*

# 玻尿酸 研究与应用

人民卫生出版社

## 图书在版编目 (CIP) 数据

玻璃酸研究与应用/凌沛学主编. —北京: 人民卫生出版社, 2010. 3

ISBN 978 - 7 - 117 - 12526 - 0

I. ①玻… II. ①凌… III. ①粘多糖 - 基本知识  
IV. ①Q538

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 234965 号

|                                                       |                       |
|-------------------------------------------------------|-----------------------|
| 门户网: <a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a>   | 出版物查询、网上书店            |
| 卫人网: <a href="http://www.ipmph.com">www.ipmph.com</a> | 护士、医师、药师、中医师、卫生资格考试培训 |

版权所有, 侵权必究!

## 玻璃酸研究与应用

主 编: 凌沛学

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010 - 59780011)

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010 - 67605754 010 - 65264830

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 27 插页: 2

字 数: 668 千字

版 次: 2010 年 3 月第 1 版 2010 年 3 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978 - 7 - 117 - 12526 - 0/R · 12527

定 价: 58.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: [WQ@pmph.com](mailto:WQ@pmph.com)

(凡属印装质量问题请与本社销售中心联系退换)



## 主编简介



**凌沛学**,我国生化制药专家,生于1963年11月,博士,研究员。现任山东省药学科学院院长和山东福瑞达医药集团公司总裁,兼任山东大学教授、博士生导师,北京化工大学、西安交通大学兼职教授,国家糖工程技术研究中心副理事长,国家海洋药物工程技术中心副主任,中国药学会生化与生物技术药物专业委员会副主任委员,中国生物化学与分子生物学学会工业分会副理事长、《中国生化药物杂志》副主编以及《中国药学杂志》、《药物生物技术》、《中国药学年鉴》、《中华临床医药杂志》、《药学实践杂志》编委、《生物医学工程研究》副主编、《食品与药品》主编等职务。

凌沛学研究员致力于生化药物的研究和相关产品的开发20余年,在糖胺聚糖类药物特别是玻璃酸(又称透明质酸)及其药物制剂的研发方面有较深的造诣,进行了大量富有开创性的研究。国内率先开发成功生物提取法工业制备玻璃酸并首创微生物发酵法工业生产玻璃酸;国际首创将玻璃酸作为给药系统的媒介用于滴眼液;国内率先研制成功眼科手术用玻璃酸钠注射液和关节腔内注射用玻璃酸钠注射液;国内首创用于外科术后防粘连和烧伤治疗等。获国家科技进步二等奖2项、国家科技进步三等奖1项、国家“九五”攻关优秀成果奖1项。获得授权发明专利40余项。为我国生化药物特别是玻璃酸系列药物的研究、开发和应用作出了突出贡献。

凌沛学研究员传承了其恩师、我国著名的生化药学专家张天民教授的学术思想,善于将生化药物研究的理论和实践成果进行推广,已发表论文150余篇,其中SCI、EI和中文核心期刊共70余篇,主编出版学术著作和教材16部。

凌沛学研究员1992年起享受国务院特殊津贴、1995年获吴阶平-保罗·杨森医药研究奖、1997年获国家有突出贡献中青年专家称号、2001年被评为全国优秀科技工作者、2004年获中国青年科技奖、2005年被授予中国专利山东优秀发明家、2006年被评为全国杰出专业技术人才和中国十大创新英才,并被山东省政府授予“泰山学者”特聘专家、2007年获何梁何利科学与技术创新奖和山东省科学技术最高奖。



## 前言

玻璃酸(hyaluronic acid),又称透明质酸,是由葡糖醛酸和乙酰氨基葡糖双糖重复单位组成的糖胺聚糖。1934年美国Meyer等首先从牛眼玻璃体中分离出该物质,现已被广泛用作眼科手术辅助剂、眼科药物传递系统的媒介、化妆品的天然保湿剂、保健食品的功能性成分以及术后粘连、干眼症、关节疾病和烧伤等的预防和治疗。玻璃酸在人们的生活中正扮演着越来越重要的角色。

为了交流玻璃酸的研究成果,促进我国玻璃酸的研究和应用,凌沛学教授已主编出版有关玻璃酸著作4部。2000年出版了国内第一部关于玻璃酸的专著《透明质酸》。2003年出版了《玻璃酸钠及其在外科中的应用》。1997年和2004年先后出版了《生化药物研究》和《生物药物研究进展》,两部著作中均重点选编了有关玻璃酸的论文。在此基础上,我们又选编了自《生物药物研究进展》出版以来山东省药学院、山东福瑞达医药集团公司和山东大学生化与生物技术药物研究所发表的近百篇有关玻璃酸的论文,以《玻璃酸研究与应用》一书出版。

本书按照综述、玻璃酸的理化性质、生产工艺、分析检验、药理作用和生理功能及其在多个领域中的应用等顺序进行编排,着重突出了玻璃酸研究与应用的新理论、新技术与新方法,编写的内容代表了国内乃至世界玻璃酸研究和应用的较高水平,并结合研究、开发与生产的实践,对实际工作具有指导意义和实用价值。本书适合从事玻璃酸生产、质检和研究的专业人员使用,也可供从事药品、保健食品研发和生产单位与个人参考,同时,对于生物药物等相关专业的教学也有一定的帮助。

本书由我国富有理论和实践经验的专家凌沛学教授、郭学平研究员、刘爱华主任药师、贺艳丽研究员、王凤山教授等选编,并经我国著名的生化药学家张天民教授主审完成。本书的出版得到了山东福瑞达医药集团公司等有关单位的大力支持和帮助,在此深表谢意。

本书内容均为原始论文,由于论文发表的时间和刊物不同,为了体现论文的原貌,本书未对体例和格式进行过大的改动,只对原文中个别文字和印刷错误进行了修正。因部分内容受当时研究条件和认识水平以及选编水平所限,加之时间紧迫,不当之处在所难免,敬请读者批评指正。

|                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>第1章 综述</b> .....                                                                                                                                                                                                                                     | 1   |
| 1. 玻璃酸研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                                        | 1   |
| 2. 玻璃酸的研究与应用新进展 .....                                                                                                                                                                                                                                   | 7   |
| 3. 透明质酸衍生物研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                                    | 10  |
| 4. 透明质酸与组织工程 .....                                                                                                                                                                                                                                      | 14  |
| 5. 交联玻璃酸的制备及其在医药中的应用 .....                                                                                                                                                                                                                              | 24  |
| 6. 透明质酸近两年的应用研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                                 | 29  |
| 7. 不同相对分子质量透明质酸钠的应用 .....                                                                                                                                                                                                                               | 34  |
| 8. 透明质酸寡糖研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                                     | 37  |
| 9. 玻璃酸钠及其在外科应用的研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                               | 41  |
| <b>第2章 玻璃酸的理化性质</b> .....                                                                                                                                                                                                                               | 48  |
| 1. 透明质酸钠的光谱学性质研究 .....                                                                                                                                                                                                                                  | 48  |
| 2. 透明质酸钠的核磁共振波谱研究 .....                                                                                                                                                                                                                                 | 51  |
| 3. 透明质酸的热降解研究 .....                                                                                                                                                                                                                                     | 54  |
| 4. 透明质酸钠热稳定性的研究 .....                                                                                                                                                                                                                                   | 56  |
| <b>第3章 玻璃酸的生产工艺</b> .....                                                                                                                                                                                                                               | 63  |
| 1. Use of Induction Promoters to Regulate Hyaluronan Synthase and UDP-Glucose-6-Dehydrogenase of <i>Streptococcus zooepidemicus</i> Expression in <i>Lactococcus lactis</i> : A Case Study of the Regulation Mechanism of Hyaluronic Acid Polymer ..... | 63  |
| 2. Expression of a Novel Hyaluronidase from <i>Streptococcus zooepidemicus</i> in <i>Escherichia coli</i> and Its Application for the Preparation of HA Oligosaccharides .....                                                                          | 74  |
| 3. 透明质酸酶催化透明质酸水解的最适反应条件 .....                                                                                                                                                                                                                           | 85  |
| 4. 产透明质酸菌的育种概况 .....                                                                                                                                                                                                                                    | 88  |
| 5. Research Survey of Hyaluronan Production by Fermentation .....                                                                                                                                                                                       | 91  |
| 6. 透明质酸合酶的研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                                    | 95  |
| 7. 透明质酸生物合成的研究进展 .....                                                                                                                                                                                                                                  | 100 |
| 8. 过氧化氢氧化降解法制备低分子玻璃酸 .....                                                                                                                                                                                                                              | 105 |
| 9. 超声对生物大分子的作用及其在透明质酸降解中的应用 .....                                                                                                                                                                                                                       | 108 |
| 10. 低相对分子质量透明质酸的制备及其促血管生成作用 .....                                                                                                                                                                                                                       | 111 |
| 11. Preparation of Low Molecular Weight Hyaluronan by Hydrogen Peroxide and                                                                                                                                                                             |     |

|                                                                                                                                |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Hyaluronidase .....                                                                                                            | 115        |
| 12. 玻璃酸钠衍生物的制备方法和应用 .....                                                                                                      | 119        |
| 13. 透明质酸锌的制备方法和用途 .....                                                                                                        | 122        |
| <b>第4章 玻璃酸的分析检验 .....</b>                                                                                                      | <b>126</b> |
| 1. 多角度激光光散射仪与尺寸排阻色谱法联用测定透明质酸相对分子质量及其分布 .....                                                                                   | 126        |
| 2. 凝胶色谱法测定透明质酸钠的含量 .....                                                                                                       | 129        |
| 3. 透明质酸钠特性黏度的一点法测定 .....                                                                                                       | 133        |
| 4. 测定低分子量透明质酸相对分子质量的3种方法比较 .....                                                                                               | 134        |
| 5. 唑啉法同时测定玻璃酸钠和硫酸软骨素的含量 .....                                                                                                  | 137        |
| 6. 露点法测定透明质酸钠凝胶渗透压 .....                                                                                                       | 140        |
| 7. 玻璃酸钠特性黏度测定方法的研究 .....                                                                                                       | 141        |
| 8. 透明质酸钠沙门菌检查方法的验证 .....                                                                                                       | 144        |
| 9. 血清中微量透明质酸的放射免疫测定 .....                                                                                                      | 145        |
| 10. pH值对透明质酸钠溶液溶血性测定的影响 .....                                                                                                  | 148        |
| <b>第5章 玻璃酸的药理作用和生理功能 .....</b>                                                                                                 | <b>151</b> |
| 1. 口服透明质酸在动物体内的分布 .....                                                                                                        | 151        |
| 2. 口服透明质酸在大鼠体内吸收机制的研究 .....                                                                                                    | 156        |
| 3. Progress in Oral Administration of Hyaluronic Acid .....                                                                    | 159        |
| 4. Study on Distribution of Hyaluronic Acid in Serum and Skin after Multiple-dose Oral Administration .....                    | 165        |
| 5. Oral Absorption of Hyaluronic Acid and Phospholipids Complexes in Rats .....                                                | 170        |
| 6. 透明质酸在肿瘤治疗中的应用 .....                                                                                                         | 176        |
| 7. 透明质酸与恶性肿瘤的关系研究进展 .....                                                                                                      | 181        |
| 8. 透明质酸复合物靶向治疗恶性肿瘤研究进展 .....                                                                                                   | 184        |
| 9. 透明质酸铋的抗幽门螺杆菌及促溃疡愈合活性研究 .....                                                                                                | 188        |
| 10. Preparation, Characterization and Anti- <i>Helicobacter pylori</i> Activity of Bi <sup>3+</sup> -hyaluronate Complex ..... | 192        |
| 11. 透明质酸钙毒理学研究 .....                                                                                                           | 202        |
| 12. 透明质酸钠毒性实验 .....                                                                                                            | 206        |
| 13. 交联透明质酸体外耐酶试验方法的研究 .....                                                                                                    | 208        |
| <b>第6章 玻璃酸在化妆品和保健品中的应用 .....</b>                                                                                               | <b>214</b> |
| 1. 海藻糖和透明质酸对膜脂双层的保护及其作用机制 .....                                                                                                | 214        |
| 2. 海藻糖和透明质酸对长双歧杆菌的保护作用 .....                                                                                                   | 222        |
| 3. Trehalose and Hyaluronic Acid Coordinately Stabilized Freeze-dried Pancreatic Kininogenase .....                            | 227        |
| 4. 新资源食品——透明质酸 .....                                                                                                           | 237        |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>第7章 玻璃酸在给药体系中的应用</b>                                                                                                    | 243 |
| 1. 眼科药物传递系统的研究进展                                                                                                           | 243 |
| 2. 玻璃酸作为药物媒介的研究进展                                                                                                          | 247 |
| 3. 玻璃酸钠降低滴眼剂中防腐剂不良反应的作用                                                                                                    | 250 |
| 4. 交联透明质酸膜的特性与生物相容性的初步研究                                                                                                   | 253 |
| 5. 交联透明质酸衍生物制备的水凝胶膜体外药物释放研究                                                                                                | 257 |
| 6. 交联透明质酸凝胶膜的制备及其生物相容性的研究                                                                                                  | 263 |
| 7. 酰肼交联透明质酸衍生物的生物相容性研究                                                                                                     | 266 |
| 8. 不同相对分子质量的玻璃酸钠对药物释放影响的研究                                                                                                 | 270 |
| 9. Influence of Sodium Hyaluronate as Vehicle on Ibuprofen Release and Transdermal Absorption <i>in vitro</i>              | 273 |
| <b>第8章 玻璃酸在眼科中的应用</b>                                                                                                      | 279 |
| 1. 玻璃酸在眼科药物中的应用与研究进展                                                                                                       | 279 |
| 2. 玻璃酸及卡波姆有效降低滴眼剂中防腐剂不良反应的作用                                                                                               | 283 |
| 3. The Pharmacokinetics and Bioavailability of Levofloxacin Hydrochloride Vehicled by Sodium Hyaluronan in Ocular Delivery | 288 |
| 4. The Pharmacokinetics and Bioavailability of Timolol Maleate Acid Vehicled by Hyaluronan in Ocular Delivery              | 291 |
| 5. 玻璃酸钠对氯霉素溶液在眼部吸收进入血液循环的影响                                                                                                | 294 |
| 6. 玻璃酸钠在氯霉素滴眼液中的作用                                                                                                         | 297 |
| 7. 以玻璃酸钠为媒介对氯霉素在滴眼液中释放的影响                                                                                                  | 298 |
| 8. 含玻璃酸钠海藻糖滴眼液的研究                                                                                                          | 301 |
| 9. 眼干燥症药物治疗的研究进展                                                                                                           | 305 |
| 10. 眼干燥症的药物治疗研究进展                                                                                                          | 309 |
| 11. 玻璃酸钠在眼用溶液中的作用                                                                                                          | 313 |
| <b>第9章 玻璃酸在关节疾病中的应用</b>                                                                                                    | 318 |
| 1. 透明质酸对骨关节炎的治疗作用                                                                                                          | 318 |
| 2. 关节腔注射玻璃酸钠治疗兔膝关节炎的研究                                                                                                     | 321 |
| 3. 硫酸软骨素和玻璃酸钠联合应用治疗木瓜酶致兔膝关节炎                                                                                               | 326 |
| 4. Effects of Sodium Hyaluronate Preparation Containing Phosphatidylcholine on Osteoarthritis in Rabbit                    | 330 |
| <b>第10章 玻璃酸预防术后粘连和对组织的修复作用</b>                                                                                             | 336 |
| 1. 透明质酸及其衍生物防粘连的研究与应用                                                                                                      | 336 |
| 2. Application of Sodium Hyaluronate in Surgery                                                                            | 341 |
| 3. 透明质酸钠散剂的制备及其质量控制                                                                                                        | 344 |
| 4. Prevention Effect of Sodium Hyaluronate Powder on Post-operative Dura Adhesion                                          | 346 |

|                                                                                                       |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5. Effect and Mechanism of Sodium Hyaluronate Powder in Promoting the Healing of Scalds in Rats ..... | 349        |
| 6. 注射用交联透明质酸钠凝胶的制备及其体外抗酶降解性的研究 .....                                                                  | 356        |
| 7. 低相对分子质量透明质酸的促血管生成作用 .....                                                                          | 359        |
| 8. 玻璃酸钠治疗烧烫伤疗效与安全性分析 .....                                                                            | 363        |
| 9. 玻璃酸钠在输卵管治疗中的作用 .....                                                                               | 364        |
| <b>第11章 其他 .....</b>                                                                                  | <b>367</b> |
| 1. 生化药物研制的思路与方法 .....                                                                                 | 367        |
| 2. 2003 年我国生化药物研究进展 .....                                                                             | 371        |
| 3. 2004 年我国生化药物研究进展 .....                                                                             | 378        |
| 4. 2005 年我国生化药物研究进展 .....                                                                             | 385        |
| 5. 2006 年我国生化药物研究进展 .....                                                                             | 392        |
| 6. 2007 年我国生化药物研究进展 .....                                                                             | 398        |
| 7. 2008 年我国生化药物研究进展 .....                                                                             | 404        |
| 8. 2008 年我国生化药物临床应用进展 .....                                                                           | 411        |
| 9. 半定量 RT-PCR 法测定链球菌透明质酸合酶 mRNA 的水平 .....                                                             | 416        |
| 10. 透明质酸与磷脂复合物概述 .....                                                                                | 419        |
| 11. 含玻璃酸钠的复方硫酸软骨素滴眼液中硫酸软骨素的含量测定 .....                                                                 | 421        |

## 1. 玻璃酸研究进展

凌沛学

1934年, Meyer等人自牛眼玻璃体中提取分离得到一种大分子多糖, 即玻璃酸(hyaluronic acid, HA)。HA是一种广泛存在于机体各组织中的黏多糖, 具有特殊的理化性质和独特的生理功能, 被广泛应用于骨科、眼科、化妆品、保健食品等多个领域。

### 1 HA的分布和性质

HA是胞外基质(extracellular matrix, ECM)的重要组成成分。近来研究表明, HA不仅存在于ECM中, 还存在于细胞内, 主要集中于新生细胞的胞浆和细胞核中<sup>[1,2]</sup>。

HA是线性大分子, 在溶液中缠绕成网状结构, 赋予其溶液独特的流变学特性(如假塑性、黏弹性等)和依数性。这些性质使HA表现出独特的生理功能, 并在各个领域得以广泛的应用。

### 2 HA的生产

已有报道的HA的生产方法有3种: 提取法、发酵法<sup>[3]</sup>和人工合成法<sup>[4]</sup>。提取法是从人和动物的组织中提取HA; 发酵法是经过筛选的菌种进行发酵培养, 从发酵液分离纯化得HA; 人工合成法, 首先使用生物高分子合成“玻璃酸氧氮杂环戊烯衍生物”, 然后添加水和降解酶(羊或牛的精巢玻璃酸酶), 制备出衍生物和酶的复合体, 最后清除其中的酶, 就合成了HA。现在可以进行工业生产的只有前两种, 人工合成法还处于实验室研究阶段, 而发酵法由于具有产量不受动物原料资源限制、成本较低、分离纯化工艺简捷、易于规模化生产等优点而成为近年来应用最广泛的工业生产方法。

发酵法生产中, 菌种是非常重要的环节。对HA合成及降解的分子机制的研究发现, HA合成操纵子由3种基因组成, 分别是*hasA*、*hasB*和*hasC*。*hasA*编码HA合酶, *hasB*编码UDP-葡萄糖脱氢酶, *hasC*编码UDP-葡萄糖焦磷酸化酶。克隆HA合酶基因, 转化到宿主中, 从而表达HA合酶, 并进一步生产HA。*hasA*是从*Streptococcus pyogenes*的基因文库中克隆的, 这个转化子可使*E. coli*和产荚膜链球菌产生HA。Heldermon等在*E. coli*中表达HA合酶spHAS(sp表示*S. pyogenes*)和seHAS(se表示*S. equisimilis*)。这两种重组链球菌HA合酶提供了一种研究和控制HA生物合成的理想系统。研究表明, 这两种酶控制HA合成速率和

HA 分子的大小。使用工程菌发酵 HA 不仅可以大大提高产量、降低成本,还可生产具有特定  $M_r$  和纯度的 HA<sup>[5]</sup>。

### 3 HA 衍生物

#### 3.1 HA 的结构修饰

天然的 HA 为线性多糖,分子中有四个部位可被修饰:羧基、羟基、乙酰氨基及还原末端。

对羧基的修饰:HA-四丁基铵盐与烷基醇在二甲基甲酰胺(DMF)溶液中发生酯化反应;羧基与碳二亚胺(carbodiimide)通过共价键方式结合,生成 *N*-酰基脲结合物;在大量己二酸二酰肼(ADH)存在下,被碳二亚胺活化的 HA 可与之有效结合,生成稳定的酰肼功能化的 HA(HA-ADH)。

对羟基的修饰:三硫吡啶和 HA 在 DMF 中反应,可得到不同程度的硫酸化 HA;丁酸酐和低分子 HA 的对称可力丁盐在含二甲基氨基吡啶的 DMF 溶液中反应,可得 HA 丁酸酯;在溴化氢的催化下,一种异脲中间体活化寡聚糖产生亲和基,再通过氨基甲酸乙酯键与蒽环类抗生素相连;用高碘酸盐对 HA 分子中相邻的两个仲醇进行氧化,然后伯胺进行还原性的连接,可得 HA 与多肽或固定化材料的连接产物。

对乙酰氨基和还原末端的修饰率很低,一般不对这两个基团进行修饰。

#### 3.2 HA 的交联

HA 交联的方法有:双环氧化物和二乙烯基砜交联、内酯化作用、光交联、戊二醛交联、金属离子介导交联、碳二亚胺交联、酰肼交联、残余蛋白质交联、多组分反应、表面修饰等。

#### 3.3 HA 与其他药物形成复合物

HA 与 DPPC(二棕榈酰磷脂酰胆碱)混合可得到一种超大分子的脂质体,其结构在体外可通过染色和旋转阴影电镜(rotary shadowing electronmicroscopy)观察到,而这种超大分子物质在体内主要存在于滑膜液中,具有重要的生理作用<sup>[6]</sup>。

HA 还可与胶原、壳聚糖、聚乳酸等复合,形成的复合物细胞毒性极低,降解速率减缓,延长 HA 在组织中的作用时间<sup>[7]</sup>。

#### 3.4 HA 的盐

HA 的盐一般指其钠盐,通过离子交换等方法,可以得到 HA 的其他盐,如玻璃酸钾、玻璃酸钙、玻璃酸锌、玻璃酸银、玻璃酸金、玻璃酸钨、玻璃酸铈等。HA 的这些盐既保持了 HA 的大分子特性,又具有了金属离子特有的性质,如锌离子可促伤口愈合、银离子和金离子有抑菌作用。而局部氧化的玻璃酸锌与普通的玻璃酸锌相比,对大肠杆菌和金葡萄菌有更强的抗菌作用。

### 4 应用

#### 4.1 HA 在骨科的应用

HA 是构成关节软骨和滑液的主要成分,20 世纪 60 年代 Balazs 等首先提出关节腔内补充外源性 HA 治疗关节疾病。自 1974 年首次应用 HA 治疗骨关节炎(OA)至今,已有大量报道证明 HA 可有效治疗 OA、类风湿关节炎(RA)以及其他感染性和非感染性关节疾病。

4.1.1 治疗机制<sup>[8]</sup> OA 和 RA 病变过程中存在一恶性循环:滑液黏弹性降低→屏障和保护作用降低→软骨进一步破坏→释放的酶和炎症因子进一步使滑液黏弹性降低。补充

外源性 HA,能将病理状态中的滑液恢复至正常状态,打断恶性循环。HA 治疗关节疾病的机制为:①HA 为关节滑液的主要成分,赋予滑液良好的黏弹性。行走时,滑液呈黏性溶液,可减少组织间的摩擦;跑步时,滑液呈弹性溶液,可缓冲应力对关节的撞击;负重时,滑液中的低分子溶质及水分自滑液压至软骨基质中,滑液转变为一个凝胶状弹性体,充当缓冲垫,减轻关节承受的压力。②HA 还可稳定细胞膜,屏蔽膜感受器,钝化其对刺激的敏感性,从而具有减轻和缓解疼痛等作用。③清除自由基、抗炎作用。④HA 可抑制糖胺聚糖的释放,阻止软骨发生退行性变,对已造成病变的关节有促进修复的作用。

#### 4.1.2 临床应用

4.1.2.1 治疗 OA 梁茂华等<sup>[9]</sup>对近 10 年来关于 HA 治疗 OA 的临床研究进行了综合分析,发现关节腔内注射 HA 治疗 OA 的临床研究主要集中在 HA 改善患者症状与关节功能及其副作用方面。多数研究认为关节内注射 HA 治疗 OA,对于减缓疼痛和改善关节功能有效,疗效可持续 6 个月以上。HA 与非甾体消炎镇痛药配合使用,效果明显优于单独使用非甾体消炎镇痛药。这些研究都进行了远期疗效的观察,时间为 26 周至 1 年。同时对 HA 的副作用进行了研究,与其他治疗方法相比,HA 是一种安全的治疗手段,仅有少数患者出现关节肿胀及一过性疼痛加重。

4.1.2.2 治疗 RA Goto 等<sup>[10]</sup>对 25 例 RA 患者进行关节腔注射 HA,每周 1 次,连续 5 周。对关节疼痛、炎症、活动时的疼痛情况、抽吸出的滑液体积或滑液中几种化学物质的水平等临床症状和参数进行跟踪测定。结果表明各项指标均有显著改善,患者病情好转。程秀峰等<sup>[11]</sup>对拒绝采用全身治疗的 31 例老年 RA 患者进行了类似的研究,并随访 3 年。记录关节腔内注射 HA 治疗前后关节静息痛、活动痛、被动活动痛、肿胀、浮髌试验、局部皮温、步行距离痛和晨僵时间,结果同样表明各项指标均有显著改善,认为对全身治疗抵抗的老年 RA 患者关节腔注射 HA 有效。

4.1.2.3 治疗其他骨科疾病 在骸骨骨折患者术中、术后使用 HA,使患者术后反应轻,关节活动好,对 72 例随访半年以上未见创伤性骨关节炎发生,因此认为 HA 关节腔注射能够减轻术后疼痛,促进软骨修复,在一定程度上减轻粘连,改善关节功能,防止创伤性 OA 的发生<sup>[12]</sup>。用 HA 辅助治疗踝关节粉碎骨折和 I、II 型骨折,也取得了良好的临床效果<sup>[13,14]</sup>。

有报道 HA 可治疗颞下颌关节紊乱症(temporomandibular joint disorder, TMD)、颞颌关节内紊乱症(temporomandibular joint internal derangement, TMJID),疗效确切,可替代激素类药物。查年宝<sup>[15]</sup>观察 HA 上腔注射治疗 TMD 的疗效,对各种 TMD 治疗的总有效率可达 84.8%。彭国光等<sup>[16]</sup>用 HA 治疗 TMJID,并用强的松龙作对照。术后 1 周 HA 组有效率为 97.5% (39/40),强的松龙组为 82.5% (33/40);术后 4 周 HA 组为 97.5% (39/40),强的松龙组为 77.5% (31/40)。术后 HA 组无疼痛加剧病例,强的松龙组有 70% (24/40)的患者术后 1~3 天内出现疼痛加重。李晓东等<sup>[17]</sup>认为上下腔注射 HA 比单纯上腔注射 HA 治疗 TMD 的疗效更好。

#### 4.2 HA 在眼科的应用

1971 年, Balazs 等提出高纯度、非致炎的 HA 组分可作为眼科手术黏弹性辅助剂。1976 年,眼科手术黏弹剂 HA 上市和应用,随之在眼科界形成了黏性手术这一新领域。1992 年以后,HA 又作为眼科制剂的媒介,添加到含抗炎药、抗过敏药、扩瞳药及抗生素等的眼科制剂中,用于提高药物的生物利用度。

4.2.1 在眼科手术中的应用<sup>[18]</sup> 进行眼前节手术时,需要黏弹剂发挥填充和保护作用,否则手术会失败或不够理想。1%~3%的HA溶液具有高度的黏弹性,本身无色透明,是理想的眼科手术黏弹剂。目前,已上市的HA黏弹剂有10余种,成功应用于白内障摘除术、角膜移植术、青光眼小梁切除术、外伤性眼手术等20余种眼科手术。

HA溶液用于眼科手术具有以下特点:①涂布于角膜内皮,形成保护膜,可保护角膜内皮免受手术过程中的器械损伤。②维持眼前房适宜的深度和形状,便于手术操作。③在前房内提供一黏弹性空间,利于晶体、角膜植片等植入物的着位和调整;减缓手术器械及晶体的运动速度,减少可能造成的组织损伤。④涂布于晶体的表面,可避免晶体植入时其表面对眼内组织的摩擦所致的创伤;作为聚阴离子,可中和晶体表面的正电荷,降低炎症反应。⑤清除晶体可能产生的会造成细胞损伤的自由基。⑥黏附于较小的出血点可起到止血作用。⑦为手术者提供了清晰的手术视野。常见的不良反应为术后暂时性眼压升高和炎症反应。

近来有报道<sup>[19,20]</sup>对开角型青光眼进行非穿透小梁切除术时,术中植入HA凝胶,避免了穿透手术可能出现的并发症,能很好地控制眼压,使视力快速恢复。临床应用效果良好,术后眼压均能得到控制,但它适应证窄,仅适用于开角型青光眼,手术机制也在进一步研究中。

4.2.2 在眼科制剂中的应用 HA具有典型的非牛顿力学特性和良好的生物相容性,其作为辅料加入到滴眼液中可以延长药物在眼内的作用时间,提高生物利用度。HA提高生物利用度的作用是通过物理增黏、膜亲和以及药物的结合作用协同产生的。国内有一系列以HA作为眼部给药传递系统媒介的眼用制剂,取得了良好的社会效益和经济效益。国外也有类似研究,Mahe等<sup>[21]</sup>将HA与布比卡因(bupivacaine)配伍,用于角膜长时间麻醉,具有良好的效果和安全性。

4.2.3 对角膜的保护<sup>[22]</sup> 近年研究发现,HA可促进角膜内皮细胞(corneal endothelial cells, CEC)的有丝分裂过程,对CEC生长、移行、增生、分化等过程均有重要的调节作用。通过对CEC形态学、细胞活性、超微结构等检测,发现HA对CEC有明显的保护作用,可提高保存角膜的质量,延长保存时间。将HA加入角膜中期保存液中,依靠HA溶液的黏弹性,聚集在细胞表面形成保护膜,减少氧自由基对细胞的损害;HA通过与CEC的CD44结合,加厚了组织表面的保护膜,可稳定内环境,维持角膜相对透明,减轻角膜水肿等。

### 4.3 HA防粘连的作用

粘连是术后常见的并且危害严重的并发症,形成的原因有:①手术创伤;②局部出血;③异物存留;④出血和暴露伤口表面;⑤细菌感染。HA及其衍生物可通过调节粘连形成的生物系统防止粘连的形成。高相对分子质量( $M_r$ )和高黏弹性的HA溶液和凝胶可显著影响细胞的运动和迁移;其网状结构对血纤蛋白原构成有效的屏障;HA可阻止多形核白细胞的激活,从而抑制了与炎症反应有关的多种物质的释放或分泌,防止粘连的形成。

HA在临床上用于防治腹部外科手术后腹腔内粘连、腱缝合后屈腱肌粘连<sup>[23]</sup>、甲状腺手术后切口粘连<sup>[24]</sup>、椎管内手术后硬膜外粘连<sup>[25]</sup>等,都取得了良好效果,有效率可达80%以上,并极少有不良反应发生。有报道<sup>[26]</sup>,进行腹腔镜肌瘤切除后使用交联HA凝胶,尤其是在进行浆膜下缝合后使用,可避免妊娠率的降低。

### 4.4 HA对软组织的修复作用

研究表明HA在创伤愈合过程中对组织修复和瘢痕形成进行全方位的调控,可以促进

创伤愈合,减少瘢痕形成,尤其在烧伤的治疗中可发挥重要作用。其作用机制为:①与血纤蛋白组成的凝块在伤口愈合过程中发挥构造功能;②通过促进粒细胞的吞噬活性调节炎症反应;③局部降解产生的低  $M_r$  HA 促进血管生成;④调控胶原的合成。

宋国栋等<sup>[27]</sup>局部应用 HA 人工皮肤粉剂治疗各种烧伤(浅Ⅱ度创面、深Ⅱ度创面、肉芽溃疡创面、供皮区、植皮区间隙)共 30 例,采用自身对照,创面愈合的总有效率为 86.7%。

高黏弹性、不可溶的 HA 衍生物可以作为软组织修复材料,其在皮内、皮下和肌内具有很高的生物相容性,且抗降解、抗迁移、不被吸收。基于以上原因,HA 衍生物凝胶在皮肤和胸部的修复和矫正中成为一种安全有效的替代填充剂。

#### 4.5 在化妆品中的应用

HA 具有良好的保湿作用,被誉为理想的天然保湿因子(natural moisturizing factor, NMF)。HA 应用于化妆品中有以下作用<sup>[3]</sup>:①保湿作用。这是 HA 最主要的生理功能之一,其长的分子链交织成网状,加之与水的氢键结合,从而起到很强的保水作用。HA 的理论保水值达 500 mL/g 以上,最高可达 1 000 mL/g,是目前发现的自然界中保湿性最好的物质。而其不同于其他保湿剂的最显著的特点是“智能保湿”。HA 可根据周围环境的相对湿度调节自身的吸湿量,在低相对湿度(如 33%)下的吸湿量较高,而在高相对湿度(如 75%)下的吸湿量较低。因而 HA 又被称为“智能保湿因子”。②营养作用。HA 是皮肤固有的生物物质,外源性的 HA 是对内源性 HA 的补充,促进皮肤营养的供给和废物的排泄,从而防止皮肤老化,起到美容养颜的作用。③皮肤损伤的修复和预防作用。阳光中的紫外线照射过强可引起光灼伤或日炙,严重的还能引起日光性皮炎等皮肤病。HA 可预防和修复紫外线造成的皮肤损伤,促进表皮细胞的增生和分化,清除氧自由基,保护细胞。在皮肤脂质模型中进行试验表明,在紫外线照射下,HA 和用酶消化的低  $M_r$  HA 介导的保护效应,可对抗细胞损伤,因而表明 HA 具有预防紫外线造成的皮肤损伤的作用。④润滑性和成膜性。含 HA 的护肤品、护发品涂抹时润滑感明显,手感良好。涂抹后,可在皮肤或头发表面形成一层薄膜,使皮肤或头发产生良好的光滑感和湿润感,起到保护作用。⑤增稠性。HA 具有很高的黏度,添加到化妆品中可起到增稠和稳定作用。

目前,国际上添加 HA 的化妆品有膏霜、乳液、化妆水、精华素胶囊、贴膜、沐浴液、洗手液、粉饼、口红、洗发护发剂、摩丝等。含 HA 的化妆品被公认为“仿生化妆品”,备受推崇。添加 HA 的化妆品已成为国际轻工界的主流产品,也必定会给人类延缓皮肤的老化带来深远影响。尤其是添加 HA 的护肤品,亲和肌肤,能迅速渗透至肌肤深层;双向调节,智能保湿;在肌肤表面形成水化膜,有效保持角质层水分。用 HA 和壳聚糖制备的凝胶状化妆品,可以帮助皮肤恢复弹性,延缓由于年龄增长或环境恶变造成的皮肤衰老<sup>[28]</sup>。在美白、祛斑护肤品中使用 HA 具有协同增效作用。HA 的大离子功能可调节细胞膜表面及细胞周围正离子的流动和变化,改变物质在皮肤中的扩散速率,参与水和电解质的输送,维护动脉壁的正常通透性,降解后能提高毛细血管血液循环,使晦暗的皮肤光亮起来。

#### 4.6 在保健食品中的应用

人在胚胎时期体内的 HA 含量最高,出生后逐渐减少。如果把 20 岁人体内的 HA 相对含量定为 100,那么人在 30、50、60 岁时分别下降为 65、45 和 25。早老症患者体内的 HA 含量明显减少,显示衰老的诸多症状,如皮肤弹性下降、皱纹出现等。口服 HA 美容保健食品可补充体内 HA 的不足,从而活化皮肤细胞,达到由内至外的全身美容和保健,并起到预防老化,维持老龄化人群健康的作用<sup>[3]</sup>。

口服 HA 美容和保健的基本理论依据是:HA 通过口服,增加体内 HA 合成的前体,使皮肤和其他组织中的 HA 合成量增加,从而使皮肤的保水性能增加,富有弹性,皱纹减少,预防老化。

#### 4.7 促透皮吸收<sup>[29]</sup>

HA ( $M_r$  为  $2.5 \times 10^5$  和  $4.0 \times 10^5$ ) 在完整皮肤表面的吸收试验是以  $^3\text{H}$  标记的 HA 凝胶涂在无毛小鼠和人前臂完整皮肤,通过放射自显影发现,  $^3\text{H}$  标记的 HA 能通过小鼠和人完整皮肤的所有层;小鼠用药 30 min 内,HA 到达真皮;在表皮的较深层、真皮和淋巴内皮均检测到  $^3\text{H}$  标记的 HA。通过色谱分析小鼠的血、尿、皮肤和肝的提取物,HA 能通过皮肤吸收进一步得到证实。与其他氨基葡糖多聚糖和药理相当的多糖比较,HA 能明显促进双氯芬酸钠和布洛芬在人皮肤中的分布,促进药物在皮肤中的固定。可见,HA 作为经皮给药的媒介,在皮肤中的传递和转运方面具有潜在的优势,可协助预防和治疗皮肤病。

#### 4.8 HA 在肿瘤的诊断和治疗中的作用

检测血清中 HA 水平可用于肝病及一些恶性肿瘤的诊断。肿瘤细胞和瘤周间质内的纤维母细胞能产生和累积 HA,如肺癌、宫颈癌、卵巢癌及神经胶质瘤等都有 HA 过度表达现象。

王爱玲等<sup>[30]</sup>用放免法检测了 107 名健康人、31 例良性肿瘤患者和 276 例恶性肿瘤患者血清中 HA 的含量。结果健康人组 HA 含量为  $(57.4 \pm 28.7) \mu\text{g/L}$ ,良性肿瘤组为  $(71.1 \pm 48.9) \mu\text{g/L}$ ,恶性肿瘤组为  $(197 \pm 68.3) \mu\text{g/L}$ 。恶性肿瘤组与健康人组和良性肿瘤组间的差异有统计学意义,而良性肿瘤组与健康人组间的差异无统计学意义。可见血清中 HA 的检测对肿瘤诊断有一定价值。

在某些肿瘤细胞周围同样存在大量的 HA 受体,并且病变部位 HA 受体的表达和浓度与肿瘤的生长情况有密切的联系。根据 HA 与受体的特异性结合,以 HA 为载体,与抗肿瘤药物联合,可将药物带到肿瘤部位,从而达到靶向给药的目的。静脉注射 HA-药物复合物治疗乳腺癌、口服 HA 溶液用于辅助治疗消化道肿瘤都取得了较好的效果。

## 参 考 文 献

- [1] Evanko S P, Park W T, Wight T N. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(12):1525-1535
- [2] Hascall V C, Majors A K, De La Motte C A, *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1673(1-2):3-12
- [3] 凌沛学. 透明质酸. 北京:中国轻工业出版社, 2000:30-39, 123-125, 123-134
- [4] 张可喜. 日完成人工合成透明质酸. [http://japan.people.com.cn/2001/11/25/rinben\\_20011125\\_14005.html](http://japan.people.com.cn/2001/11/25/rinben_20011125_14005.html), 2001-11-25/2005-06-15
- [5] 石艳丽, 王凤山, 郭学平, 等. 药物生物技术, 2004, 11(6):410-412
- [6] Crescenzi V, Taglienti A, Pasquali-Ronchetti I. *Physicochem Eng Aspects*, 2004, 245(1-3):133-135
- [7] 于学丽, 王传栋, 李保陆, 等. 生物医学工程研究, 2005, 24(7):62-66
- [8] 凌沛学, 贺艳丽, 张青. 食品与药品, 2005, 7(1):1-3
- [9] 梁茂华, 张辉, 孙磊, 等. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(7):547-549
- [10] Goto M, Hanyu T, Yoshio T, *et al.* *Clin Exp Rheumatol*, 2001, 19(4):377-383
- [11] 程秀峰, 谭魁麟. 中国临床康复, 2003, 7(17):2476-2477
- [12] 倪卫东, 梁熙, 周爱国. 重庆医科大学学报, 2003, 28(1):80-81
- [13] 王成伟, 高立华, 金晓越, 等. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(1):21-22
- [14] 王成伟, 齐玲, 高立华, 等. 中国骨伤, 2004, 17(4):238-239

- [15] 查年宝. 临床口腔医学杂志, 2003, 19(9): 565
- [16] 彭国光, 李嘉朋, 吴俊伟, 等. 临床口腔医学杂志, 2002, 18(5): 372-373
- [17] 李晓东, 史宗道, 田卫东. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(2): 135-137
- [18] 凌沛学, 王凤山. 生物药物研究进展. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 186-199
- [19] 董仰曾, 种平, 李润埠. 眼科研究, 2002, 20(5): 459-461
- [20] 孟海林, 马锦霞, 张洪亮, 等. 中国实用眼科杂志, 2003, 21(7): 518-520
- [21] Mache I, Mouly S, Jarrin I, et al. Br J Clin Pharmacol, 2005, 59(2): 220-226
- [22] 杨娟, 赵敏, 徐智勇, 等. 重庆医科大学学报, 2004, 29(5): 664-667
- [23] 路青林, 韩建波, 张凯宁. 中国创伤骨科杂志, 2001, 3(1): 31-33
- [24] 李进义, 王华喙, 张红, 等. 暨南大学学报(医学版), 2004, 25(2): 222-223, 226
- [25] 王开化, 贺元茂, 梁晖, 等. 贵州医药, 2003, 27(11): 1017
- [26] Pellicano M, Guida M, Bramante S, et al. Fertil Steril, 2005, 83(2): 498-500
- [27] 宋国栋, 庞晓阳, 张青, 等. 中国生化药物杂志, 2004, 25(4): 243-244
- [28] Petrigni Giuseppe. EP 1407759, 2004-04-14
- [29] Brown T J, Alcorn D, Fraser J R. J Invest Dermatol, 1999, 113(5): 740-746
- [30] 王爱玲, 黄春晓. 中华医学研究杂志, 2003, 3(4): 294

[原文收载于: 中国药学会黏多糖类药物研发及临床应用  
学术研讨会论文集, 哈尔滨, 2005: 1-9]

## 2. 玻璃酸的研究与应用新进展

万秀玉 凌沛学 张天民

玻璃酸(hyaluronic acid, HA)是生物体内普遍存在的酸性黏多糖,具有多种生理功能。其独特的黏弹性、生物相容性及非免疫原性使其广泛应用于眼科、骨科、化妆品和保健食品等多个领域。现对近年来HA在其他领域的研究与应用进行综述。

### 1 在药物传递系统中的研究应用

现已公认,HA是目前眼用制剂中最好的媒介,既可增加药物的生物利用度,又可减轻药物对眼的刺激,促进眼部创伤的愈合,迅速缓解眼部不适症状。在其他领域,HA在药物传递系统中的作用亦得到了广泛的研究与应用。

#### 1.1 作为抗肿瘤药的靶向载体

抗肿瘤药最大缺点是特异性差,攻击肿瘤细胞的同时,也攻击正常组织,所服用的药物中只有很少部分作用于肿瘤细胞,不良反应严重。肿瘤药物靶向治疗可大大减小抗肿瘤药的不良反应。研究发现,某些实体肿瘤和转移淋巴细胞表面存在大量HA受体——CD44,HA与其亲和力很强。HA作为抗肿瘤药物的靶向载体,可将较小的药物分子黏附在HA的网状结构中,与肿瘤细胞表面的受体靶向结合,使更多的药物分子进入肿瘤组织,增加抗肿瘤药在肿瘤和淋巴结中的吸收和滞留时间,从而提高药物的疗效,降低毒副作用。

Brown等<sup>[1]</sup>分别给胸腺癌裸鼠尾静脉注射含HA( $M_r$ 为 $0.825 \times 10^6$ )以及不含HA的氟尿嘧啶(FU)和甲氨蝶呤(MTX),结果与不含HA组相比,含HA的FU和MTX组进入肿瘤