

• 研究论文 •

海藻硫酸多糖抑制草酸钙结石形成的化学模拟

邓穗平^a 欧阳健明^{*,a,b} 吴秀梅^a 王凤新^a 岑颖洲^b

(^a暨南大学生物矿化与结石病防治研究所 广州 510632)

(^b暨南大学化学系 广州 510632)

摘要 用体外模拟方法研究了从海藻异枝麒麟菜中提取的硫酸多糖(ESPS)对尿结石患者尿液中草酸钙晶体生长的影响。ESPS不但诱导与尿路细胞膜粘附力较弱的二水草酸钙晶体形成,而且抑制一水草酸钙的生长和聚集,归因于一水草酸钙的富钙($\bar{1}01$)晶面与聚阴离子ESPS之间的静电相互作用。上述结果表明,ESPS是一种抑制草酸钙结石的潜在绿色药物。

关键词 草酸钙; 海藻多糖; 尿结石

Chemical Simulation on Inhibition of Calcium Oxalate Stones by *Eucheuma striatum* Polysaccharide

DENG, Sui-Ping^a OUYANG, Jian-Ming^{*,a,b} WU, Xiu-Mei^a

WANG, Feng-Xin^a CEN, Ying-Zhou^b

(^a Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

(^b Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632)

Abstract The influence of sulfated polysaccharide (ESPS) isolated from marine algae *Eucheuma striatum* on crystallization of calcium oxalate crystals was investigated in urine of lithogenic patient *in vitro*. SPS could inhibit the growth and aggregation of calcium oxalate monohydrate (COM) and induce the formation of calcium oxalate dihydrate crystals due to the strong electrostatic interactions between the Ca^{2+} -rich ($\bar{1}01$) crystal faces of COM and the polyanionic polysaccharide. This result indicated that SPS may be a potential inhibitor to calcium oxalate urinary stones.

Keywords calcium oxalate; algal polysaccharide; urinary stone

海藻多糖的生物活性诸如抗病毒、抗肿瘤、抗辐射、抗突变、抗氧化和增强免疫力等在很大程度上取决于其硫酸基的含量^[1,2]。具有生物活性的多糖,在脱去硫酸基以后,活性也随之减弱或消失^[3,4],此外,硫酸基的取代位置不同也会影响其性质,如卡拉胶中硫酸根的数目和位置对其抗病毒、抗凝血活性具有显著的影响。

异枝麒麟菜是多年生红藻,资源丰富,在我国湛江、海南岛等地均有大规模养殖^[5]。异枝麒麟菜多糖(ESPS)是一种以 1,3- β -D-半乳吡喃糖和 1,4- α -D-半乳吡

喃糖作为基本骨架的直链硫酸酯多糖(图式 1),在医疗领域中有广泛的应用前景^[5],但尚没有将 ESPS 用于预防和治疗泌尿系结石方面的报道。

泌尿系结石的无机成分主要是草酸钙(CaOxa),尿液中存在的大分子物质主要是葡氨聚糖。在结石病人和正常人的尿中,葡氨聚糖的质和量都存在明显的差异,结石病人尿液中葡氨聚糖含量(男性: 2.97 ± 0.43 mg/L; 女性: 2.32 ± 0.24 mg/L)明显低于正常人的含量(男性: 8.22 ± 0.60 mg/L; 女性: 7.97 ± 0.43 mg/L),这表明,葡

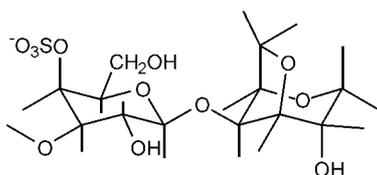
* E-mail: toyjm@jnu.edu.cn; Tel. & Fax: 020-85223353.

Received July 1, 2005; revised October 24, 2005; accepted December 2, 2005.

国家自然科学基金(No. 20471024)、广东省科技攻关(No. 2005B30701003)和教育部留学基金(No. 教外司[2005]55号)资助项目。

氨聚糖的含量与 CaOxa 结石形成有着密切的关系^[6,7].

由于 ESPS 的分子结构和性质均与葡氨聚糖相似,特别是经降解后的小分子量硫酸多糖,无需经过酶(这种酶广泛存在于动物脊椎组织中)的降解作用可以直接排泄在尿液中,且其高硫酸基含量使得 ESPS 与 Ca^{2+} 有很强的亲和力(结合常数 $3000\sim 15000\text{ mol/L}$)^[8],因此,ESPS 极有可能成为一种潜在的外源性绿色防石药物.



图式 1 从海藻异枝麒麟菜中提取的硫酸多糖主要成分的结构式

Scheme 1 The molecular structure of the representative composition of sulfated polysaccharide extracted from algae *Eucheuma striatum*

1 实验部分

1.1 试剂

异枝麒麟菜采自海南琼海麒麟菜养殖场,采用直接水提法提取硫酸多糖^[5],直接水提法可使硫酸基得以保护,从而保持了硫酸多糖良好的生物活性.然后,将提取的初产品在 $\text{pH}=3.0$ 的 HCl 溶液中, $80\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水解 24 h,再用 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 为 7.0 , $70\text{ }^\circ\text{C}$ 减压浓缩至浸膏状.这样得到的异枝麒麟菜硫酸多糖(ESPS)中硫酸基含量为 18.3% .红外光谱和 ^{13}C NMR 谱证明异枝麒麟菜多糖主要为 β -(1 \rightarrow 3)-*D*-半乳糖-4-硫酸基和 α -(1 \rightarrow 4)-3,6-内醚-*D*-半乳糖(图式 1).

草酸钠(Na_2Oxa)、二水氯化钙和氯化钠均为分析纯. Tris-HCl 试剂由三羟甲基甲胺 [$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_3\text{OH})_3$] 和分析纯盐酸配制而成,原始 $\text{pH}=2.04$,实验时用 NaOH 调节 $\text{pH}=7.3$.实验用水均为从石英亚沸蒸馏器制得的二次蒸馏水.

尿液取自一男性患者(20岁,右肾,中盏,草酸钙结石),尿液 $\text{pH}=6.2$,使用前往尿液中加入 0.02% 的防腐剂 NaN_3 ,摇匀后离心 15 min ,取上层清液备用.

1.2 仪器

XL-30 型环境扫描电子显微镜(ESEM) (Philips 公司),测量电压 15 kV . XD-2 粉末 X 射线衍射仪(XRD) (北京大学研制); Equinox55 型傅里叶变换红外吸收光谱仪(德国 Bruker 公司); PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂).

1.3 草酸钙晶体的生长

在 50 mL 容量瓶中,加入 1.5 mL 10 mmol/L CaCl_2 , 1 mL 0.50 mol/L NaCl ,一定量的 ESPS,加 Tris 试剂 2.0 mL ,加二次水至 46 mL 左右,然后加入 1.5 mL 10 mmol/L Na_2Oxa ,最后用二次水稀释至刻度,摇匀后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,这样得到的溶液中 $c(\text{Ca}^{2+})=c(\text{Oxa}^{2-})=0.30\text{ mmol/L}$, $c(\text{NaCl})=10\text{ mmol/L}$.实验中的 $c(\text{ESPS})$ 分别为 $0, 0.01, 0.03, 0.10, 0.30$ 和 0.50 mg/mL .

将上述 CaOxa 亚稳溶液倒入 50 mL 烧杯中进行结晶,预先在烧杯底部放入处理好的基片.为防止由于溶剂水的挥发而造成体系过饱和驱动晶体形成,晶体生长在密闭环境中进行.晶体生长 3 d 后,取出基片,置于干燥器中干燥,然后对基片上 CaOxa 晶体进行 XRD 测试和 SEM 观察,对烧杯底部晶体进行 FT-IR 检测.

2 结果与讨论

2.1 ESPS 抑制草酸钙晶体聚集

图 1 为添加和不添加 ESPS 时尿石患者尿液中形成的 CaOxa 晶体的 SEM 形貌图.在没有 ESPS 存在时,尿液中形成的 CaOxa 为三维的拉长六边形晶体及其聚集体(图 1a),XRD(图 2)表明其为一水草酸钙(COM)晶体.加入 ESPS 后,不但 COM 晶体的棱角变得圆钝(图 1b),而且 COM 聚集体显著减少.ESPS 减小 COM 晶体聚集的原因归因于其可以吸附在 CaOxa 晶体表面,使晶体表面电负性增加, Zeta 电位变负,导致晶体颗粒之间的斥力加大,从而抑制 CaOxa 晶体的聚集^[9,10].

体外实验表明,尿液中的大分子物质硫酸软骨素 A(葡氨聚糖的一种^[7])能有效地抑制 CaOxa 晶体的生长和聚集.当硫酸软骨素 A 的浓度为 0.5 mg/mL 时,对 CaOxa 晶体聚集的抑制能力达到最大^[11].本实验表明,当 ESPS 浓度为 0.01 mg/mL 时,已基本上没有 COM 聚集体存在.可见,ESPS 是草酸钙晶体聚集的强有力抑制剂.由于 CaOxa 结石形成的一个重要原因是 COM 晶体在尿路细胞表面的聚集,如果能有效减少 COM 晶体的聚集,则可抑制草酸钙尿石的形成.

2.2 ESPS 诱导二水草酸钙晶体形成

加入 ESPS 后,不但 COM 聚集体显著减少,COM 晶体的棱角更趋圆钝,而且诱导了四方锥形的二水草酸钙(COD)晶体生成.图 2 为加入不同浓度 ESPS 后,生成的 CaOxa 晶体的 XRD 谱.没有加入 ESPS 时(图 2a),CaOxa 的主衍射峰晶面间距 d 值为 $0.593, 0.365$ 和 0.298 nm ,归属于 COM 晶体的 $(\bar{1}01)$, (020) 和 $(\bar{2}02)$ 晶面.加入 0.10 mg/mL ESPS 后,在 d 值为 $0.618, 0.368$ 和 0.309 nm 处出

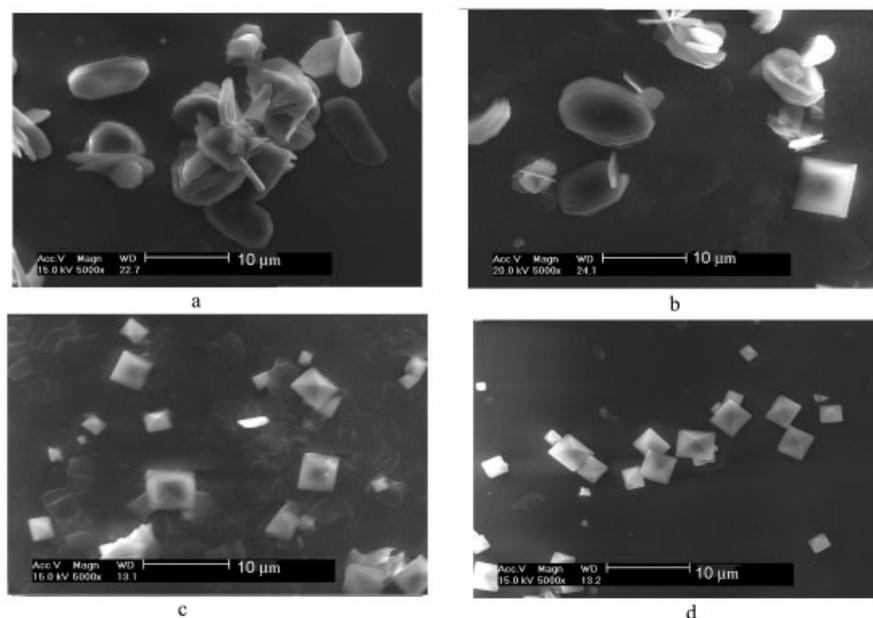


图1 海藻多糖 ESPS 浓度对尿石患者尿液中 CaOxa 晶体生长影响的 SEM 图片

Figure 1 Scanning electron microscopy of calcium oxalate crystals grown in urine of lithogenic patient in the presence of ESPS of 0 (a), 0.01 (b), 0.10 (c) and 0.50 mg/mL (d)

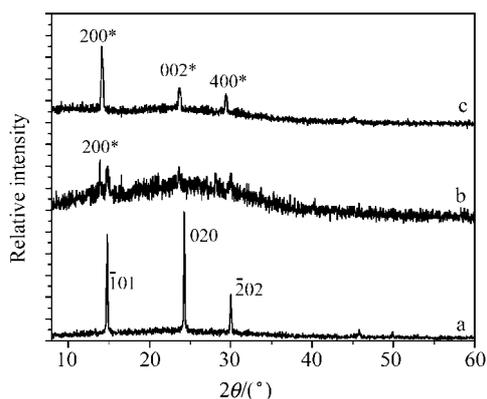


图2 海藻多糖 ESPS 浓度对尿石患者尿液中 CaOxa 晶体生长影响的 XRD 谱

Figure 2 XRD patterns of calcium oxalate crystals grown in urine of lithogenic patient in the presence of ESPS of 0 (a), 0.10 (b) and 0.50 mg/mL (c)

现了归属于 COD 晶体的(200), (002)和(400)晶面的衍射峰(图 2b); 而添加 0.50 mg/mL 的 ESPS 后, COD 晶体的衍射峰强度进一步增加(图 2c). 参照文献[12]方法用下式对 CaOxa 晶体中的 COM 和 COD 晶体的百分含量进行定量分析.

$$\text{COM}\% = \frac{I_{\text{COM}}}{I_{\text{COM}} + I_{\text{COD}}}$$

式中 I_{COM} 和 I_{COD} 分别为 COM 和 COD 主衍射峰的强度.

结果表明, 在患者尿液中加入浓度为 0.01, 0.10 和 0.50 mg/mL 的 ESPS 后, 可以分别诱导约 6%, 60% 和

90% 的 COD 晶体, 即: 随着 ESPS 浓度增加, COD 晶体含量依次增加.

FT-IR 光谱进一步证明了上述结果, 如图 3 所示, 没有 ESPS 存在时(图 3a), 1621 cm^{-1} 为 COM 的羰基不对称伸缩振动 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$, 1318 cm^{-1} 为 COM 的羰基对称伸缩振动 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$, 780 cm^{-1} 为 COM 的 COO^- 在指纹区的很尖的特征吸收峰^[12], 即晶体为 COM.

加入 0.10 mg/mL 的 ESPS 后(图 3b), 羰基 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 分裂为双峰 $1647(\text{COD}$ 晶体的羰基对称伸缩振动)和 1622 cm^{-1} , 而 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 蓝移至 1324 cm^{-1} , 处于 COM 和 COD 晶体的特征峰之间, 表明生成了 COM 和 COD 的混合物.

当加入 0.50 mg/mL 的 ESPS 后(图 3c), 羰基的 $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ 和 $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ 分别蓝移至 1645 和 1326 cm^{-1} , 表明此时主要生成了 COD 晶体.

由于 COM 与肾上皮细胞膜的粘附力比 COD 强, 即 COD 晶体比 COM 晶体容易随尿液排出体外, 因此, 能够诱导更多 COD 晶体生成的添加剂将有可能被用于草酸钙结石的预防和治疗^[12].

FT-IR 图谱中没有 ESPS 的特征峰, 说明在 ESPS 存在下, CaOxa 晶体并不结合 ESPS, 即多糖没有嵌入 CaOxa 晶体中. ESPS 在体系中可能是通过分子表面的功能基团调控 CaOxa 晶体的晶相和晶面.

2.3 ESPS 抑制草酸钙晶体生长

从图 1 可以看出, 随着 ESPS 浓度增加, COM 和 COD 晶体的尺寸均依次减小, 表明 ESPS 在抑制 CaOxa

晶体聚集的同时, 还抑制了 CaOxa 晶体的生长. 如随着 ESPS 浓度从 0.01 mg/mL 增加到 0.10 和 0.50 mg/mL, COD 晶体的尺寸由 $6.5 \mu\text{m} \times 6.5 \mu\text{m}$ 分别减少至 $2.7 \mu\text{m} \times 2.7 \mu\text{m}$ 和 $1.7 \mu\text{m} \times 1.7 \mu\text{m}$.

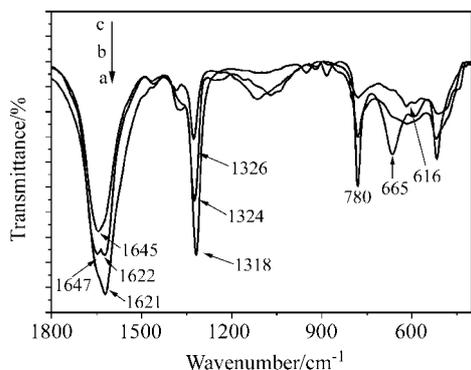


图3 不同浓度 ESPS 对尿石患者尿液中 CaOxa 晶体生长影响的 FT-IR 谱

Figure 3 FT-IR spectra of calcium oxalate crystals grown in urine of lithogenic patient in the presence of ESPS of 0 (a), 0.10 (b) and 0.50 mg/mL (c), respectively

CaOxa 晶体在形貌和尺寸上的变化归因于: (1) ESPS 能通过络合 Ca^{2+} 离子减小 CaOxa 的过饱和度, 使晶体明显变小, 并通过络合平衡使 COM 晶体变得圆钝; (2) ESPS 分子是聚阴离子, 可结合到 CaOxa 晶体的含钙位点, 特别是富 Ca^{2+} 离子的 COM 的(101)晶面. ESPS 粘附在晶体表面后, 一方面覆盖于晶体的生长点形成一层保护膜, 阻止游离晶粒的渗入, 从而抑制晶体的生长; 另一方面, 可以改变晶体表面的电荷分布和 Zeta 电位, 使晶体表面带有更多的负电荷, 增加晶体之间的相互斥力, 提高晶体间的能量屏障, 抑制晶体的聚集^[10].

3 结论

ESPS 不仅能通过络合 Ca^{2+} 离子减小溶液中草酸钙的过饱和度, 抑制草酸钙晶体的生长; 通过络合平衡使一水草酸钙晶体变得圆钝; 通过其聚阴离子吸附到一水

草酸钙晶体表面, 降低一水草酸钙表面的 Zeta 电位, 从而抑制其聚集; 而且可以通过诱导二水草酸钙晶体形成, 从而减小草酸钙晶体与尿路细胞膜的粘附. 这些变化均有利于抑制草酸钙晶体生长, 因此, 海藻硫酸多糖 ESPS 是抑制 CaOxa 结石的一种潜在的绿色药物.

References

- Zhou, G.; Sun, Y.; Xin, H.; Zhang, Y.; Li, Z.; Xu, Z. *Pharmacological Res.* **2004**, *50*, 47.
- Kaji, T.; Okabe, M.; Shimada, S.; Yamamoto, C.; Shimada, S.; Lee, J.; Hayashi, T. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2431.
- Mariana, S. P.; Ana-Cristina, E. S. V.-S.; Ana-Paula, V.; Paulo, A. S. M. *Carbohydrate Res.* **2002**, *337*, 2231.
- Kolender, A. A.; Matulewicz, M. C. *Carbohydrate Res.* **2002**, *337*(1), 57.
- Guo, L.; Bao, H.-Y.; Ye, S.-M.; Xin, Y.-Y.; Xu, S.-Y.; Cen, Y.-Z. *J. Jinan University (Nat. Sci. Ed.)*, **2002**, *23*(3), 79. (郭凌, 包惠燕, 叶绍明, 邢莹莹, 许少玉, 岑颖洲, 暨南大学学报(自然科学版) **2002**, *23*(3), 79.)
- Ouyang, J.-M.; Deng, S.-P.; Zhong, J.-P.; Tieke, B.; Yu, S.-H. *J. Cryst. Growth*, **2004**, *270*, 646.
- Ouyang, J.-M.; Zhang, J.-P.; Su, Z.-X.; Kuang, L.; Liang, W.-B. *Chin. J. Urol.* **2003**, *24*(2), 138 (in Chinese). (欧阳健明, 钟玖平, 苏泽轩, 邝荔, 梁蔚波, 中华泌尿外科杂志, **2003**, *24*(2), 138.)
- Tostes, V.; Martinussoa, C. A.; Cardoso, L. R. *Clin. Chim. Acta* **2004**, *341*, 147.
- Cao, L. C.; Boeve, E. R.; Schroder F. H. *J. Urol.* **1992**, *147*, 1643.
- Deng, G.; Zhang, Y.; Geng, M.-Y.; Xin, X.-L.; Li, J.; Guan, H.-S. *Chin. J. Mar. Drugs* **2000**, *19*(5), 16 (in Chinese). (邓岗, 张岩, 耿美玉, 辛现良, 李静, 管华诗, 中国海洋药物, **2000**, *19*(5), 16.)
- Robertson, W.-G.; Peacock, M.; Nordin, B. E. C. *Clin. Chim. Acta* **1973**, *43*(1), 31.
- Ouyang, J.-M.; Duan, L.; He, J.-H. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*(10), 1597 (in Chinese). (欧阳健明, 段荔, 何建华, 化学学报, **2003**, *61*(10), 1597.)

(A0507013 QIN, X. Q.; LING, J.)