

文章编号:1000-582X(2002)07-0075-04

丝素在生物医学领域中的应用

李 苹¹, 刘利萍², 吴泽志¹, 蔡绍哲¹

(1. 重庆大学 生物工程学院教育部生物力学与组织工程重点实验室, 重庆 400044; 2. 重庆大学 化学化工学院, 重庆 400044)

摘 要:讨论了丝素(silk fibroin, SF)与生物医学领域应用相关的基本性质,以及在生物分析及药物缓释载体、人工器官及组织工程支撑体材料中的应用现状。结论认为:丝素具有固化结晶方式的多样化,易于保持高度生物亲和性以及形成特殊的多孔性网状结构。丝素还具有优良的成膜特性,并且通过与其它一些天然高分子材料的复合与化学改性,可以进一步改善其物理性能,从而适宜于构建新型药物载体与人工器官。同时,针对丝素蛋白在体的生物相容性、在体降解特性方面存在的问题,认为其在体变化机制不仅取决于与之接触体液的化学构成,也与温度、力学环境等生物物理因素有关,因此其在体变化机制是生物力学与生物流变学的因素与生物化学因素协同控制的。

关键词:丝素蛋白;生物分析;药物缓释载体;组织工程支撑体材料

中图分类号:Q66

文献标识码:A

近年来,国内外一个引人注目的研究热点是具有良好生物相容性以及生物降解吸收功能的生物医学高分子材料。尤其是胶原等蛋白质与壳聚糖、淀粉、纤维素等一些天然高分子材料,以其资源再生性强、生物相容性高,具备真正意义上的生物降解吸收功能等众多优势而倍受关注。目前已大量应用于合成生物医学材料的表面复合改性,并相继研制出淀粉-聚乙烯膜、壳聚糖骨钉等工业化的产品^[1]。但淀粉和纤维素类的成纤成膜性较差,胶原与血红蛋白来源日趋紧张,壳聚糖生产的工业化普及程度尚有待提高,均较大地制约了这些天然高分子的应用。丝素(silk fibroin, SF)是一种源于蚕丝的天然高分子材料,随着对其独特氨基酸组成及结晶结构等理化特性研究的深入,尤其是近年来蚕丝多用途开发向高新技术的渗透,国内外对丝素的应用正从传统的纺织领域积极向化妆品、食品等领域扩展,在生物医学领域的探索,如利用丝素蛋白来制造药物缓释剂、生物传感器、隐形眼镜及皮肤、血管等人工器官等,更是受到广泛关注,已取得了一系列的基础研究成果,显示了巨大的应用潜力。文中将对丝素蛋白在生物医学领域应用研究的热点及一些急待解决的问题进行探讨。

1 丝素蛋白基本性质的研究

蚕丝是由 20% ~ 30% 的丝胶蛋白和 70% ~ 80% 的丝素蛋白以及极少量的色素、碳水化合物等构成。其中,丝胶蛋白是一种高分子量的球蛋白,其分子结构的支链上亲水基含量较高,链排列不紧密,故易溶于水、稀酸和稀碱,并能被蛋白酶等水解,还具有与明胶类似的凝胶、粘着等特性。丝素蛋白由分子量为 5 万左右的小肽链和分子量为 30 万左右的大肽链组成。其蛋白质的氨基酸组成以甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸为主,与人的皮肤和头发的角朊极为接近,这成为一些研究中,将丝素用于人造皮肤制造的原因之一。丝素蛋白的结晶部分为较为紧密的 β -折叠结构,在水中仅发生膨胀而不能溶解,亦不溶于乙醇等有机溶剂,但可在一些特殊的中性盐溶液中发生无限膨胀形成粘稠的液体,透析除盐即可得到丝素的纯溶液。然后通过喷丝、喷雾或延展、干燥等处理,可得到再生丝、凝胶、薄膜或微孔材料等产品。

对丝素蛋白的研究发现,与明胶、清蛋白等普通蛋白相比,其固化结晶方式具有多样化的特点:既可沿用一般天然蛋白的传统固化工艺,采用戊二醛做交联剂;也可以通过一些独特的处理方式来达到目的,如冷冻、

• 收稿日期:2002-03-31

基金项目:国家自然科学基金支持项目(39970198),教育部骨干教师项目,重庆市科委应用基础研究项目共同资助

作者简介:李苹(1967-),女,广西桂林人,重庆大学讲师,博士研究生。主要从事天然高分子材料与肿瘤细胞应力生长关系的研究。

热蒸、拉伸及低毒性有机溶剂浸泡等^[1]。特别是采用冷冻干燥,短时高温与乙醇浸泡的协同处理方式,可以很好地保持天然蛋白的高度生物亲和性,并适应药物载体应用中,一些对高温或某种固化剂敏感的负载药物的特殊要求,在应用方面体现出更大的灵活性。

在丝素蛋白的特性研究中,其良好的成膜性是最受人们关注的热点之一^[1]。与传统应用较多的天然高分子材料——壳聚糖与胶原等相比,丝素蛋白膜成膜方便性更好,还可以保持高达98%以上的透明性,在高湿状态下的柔韧性与形态保持性能也较为突出^[1],有利于制造一些在临床或实验中要求透明性,以便观测提取生物信息或体内高湿环境使用的生物医学产品。另外,在成膜条件适当的情况下,丝素膜可以表现出优良的透氧透气性能,如1 mm厚的丝素膜,其透氧率每平方米可高达33 mL/h^[1],不亚于甚至超过目前一般认为在这方面性能卓越的合成材料,如聚-L-亮氨酸膜或聚羧乙基丙烯酸膜。

但单纯的丝素蛋白膜也存在一些缺陷。因为纯丝素膜的稳定性和强度主要取决于膜中的 β 结构和分子间氢键,但纯丝素膜中这两者含量并不多,使丝膜的结晶区相对较少,使其在某些应用中受到限制。例如纯丝素膜在含水量极低时易于破碎,在低湿环境应用时强度不够;结晶区偏少也会导致丝素膜在溶液中的溶失率较高。对此,目前除了筛选合适的固化工艺来提高膜的结晶区比例外,研究中的一个新热点是希望通过复合材料性能互补的原理,来多方位的改善丝素膜的物理性能。目前用来与丝素构建复合材料的主要有:海藻酸钠、壳聚糖、聚谷氨酸钠、间规聚乙烯醇等^[1-4]。其中,海藻酸钠分子量为5万~20万,按适当比例与丝素复合后,在红外光谱中可见膜中的 β 结构吸收峰增高,有效地增加了丝素膜的总结晶度。而且海藻酸钠具有优良的吸水性,与丝素复合后,使复合膜在断裂强度、热稳定性与吸湿性方面均比纯丝素膜得到了比较显著的改善^[2]。

2 生物分析及药物缓释载体方面的应用

在固定化酶及免疫测定方面的应用研究已较为深入,取得了不少有应用价值的成果。如日本利用丝素固定特定的单克隆抗体,开发成功癌症自动诊断仪,其敏感度达到7 min内能测定1 μ g/L肿瘤标识体AFP浓度,受到广泛注目^[1,5]。基于丝素能将酶固定,又具有良好的基质透过性,能使酶保持足够的自由度的原理,将治疗苯丙酮尿症的药物苯丙氨酸酶负载在丝素上,可以在酶解效应与游离态酶相当的情况下,防止该酶

与肠内的胰蛋白酶等作用失活,从而延长其在体内的半衰期3~4倍,起到比直接口服更好的治疗效果。同样根据此原理,日本研制出葡萄糖氧化酶丝素固定膜,作为测定葡萄糖浓度的生物传感器的响应部件,获得了非常令人满意的测定结果,测定稳定性亦较好^[6,7]。

特殊的多孔性网状膜结构使丝素膜本身具有优良的吸附及缓释功能,若经过丙烯酰接枝反应后其最大吸水率可达300倍左右^[8],能大大提高凝胶态的水及乳化油的稳定性,从而抑制挥发性成分的蒸发,延缓经过皮肤吸收的药物释放速度,成为很好的药物缓释剂。另外,目前一些比较昂贵或全身性副作用比较大的药物如抗癌药物直接口服则效果低、成本高,因此将药物负载在一些天然蛋白质如明胶、血清蛋白中,并添加磁粉制成磁微粒,然后通过磁控制从血液输送到靶位,可以显著地提高靶位药物浓度,降低全身副作用,是一种极有应用价值的药物治疗方式。但明胶、血清蛋白往往有较明显的抗原或在固定化时需要高温,而这类药物中有许多在高温下都易降解,容易影响负载率。丝素抗原性不明显^[6],还可以选择一些非高温方式固化。因此,很有可能成为制造这种靶向药物载体的一种新材料。

总的来讲,目前利用丝素负载药物或酶时,一般采用2种方式:简单包埋法与共价交联法。前者主要是被负载物与丝素溶液简单混合后固化成产品,具有简单方便,一般不采用过多化学试剂的特点,可以较好地保存丝素的天然性。但由于负载方式是吸附式,所以负载的牢固程度欠佳;而且对酶来讲,由于被包在丝素蛋白内部,使大分子底物不容易透过,从而限制了使用性能。而共价交联法是根据丝素蛋白分子中含有大量侧链羟基和一定量的氨基的特点,采用包括戊二醛在内的多种化学试剂处理使被负载物与丝素间产生共价键,使之较为稳定地固定在丝素蛋白上。这种方式加工工艺比较复杂,对不同的被负载物来讲往往不具备广泛适用性。一些固定剂有可能影响丝素的生物亲和性。但由于负载稳定,不容易引起所谓的暴释现象,而且可以将酶固定在膜的表面。因此,在体外使用的生物分析中,显然比简单包埋法要好。但在体使用时,应该注意到一些高毒化学试剂对丝素亲和性的破坏,在缓释时间能够保证的情况下,简单包埋法仍然不失为一种快捷简便的方法。

3 人工器官及组织工程支撑体材料方面的应用

目前应用丝素制造人工器官的热点主要集中在人造皮肤上,已有暂时性皮肤替代物应用于烧伤的临床

治疗上^[6,7,9],被认为比目前常用的猪皮或创可贴拥有更良好的应用性能:其透明性使观察创面的情况较为容易;创面的痛感较弱,丝膜与创口贴合紧密,但又不易融化,可以防止感染,同时又保持良好的透气性,再加上丝素本身对皮肤细胞的生长促进功能,使其愈创效果更显突出。而且丝素膜在消毒、剪裁与保存方面也比猪皮方便^[6]。在人工血管和角膜方面探索相对而言比较少,亦大多停留在短期替代物的研制或应用基础研究上,离具有完整功能的组织构建还有相当距离。但从已有的一些研究(如隐型眼镜的制造使用)至少显示,丝素材料在这些器官中应用时生物亲和性能良好,已经具备了进一步开发的潜力。

另外,组织工程的一项重要内容是研究用于组织修复的生物替代物。其中,具有良好生物相容性、生物可降解吸收的支撑体材料的开发尤其受到国内外的广泛重视^[1,7,9]。目前,具备上述功能的较有代表性的合成高分子材料有聚乳酸、聚酸酐和聚羟基乙酸等,天然高分子材料有壳聚糖、胶原纤维等。由于丝素蛋白与人体皮膜组织的氨基酸构成相近,生物相容性好,而且来源丰富,易于得到高纯度的材料,成型加工方便,特别是可利用蚕丝生产中的大量副产物——下脚茧与废丝作为原料,故成本较低。而且,根据国内外的研究^[7,9]及我们目前的实验结果表明,丝素蛋白的降解产物本身不仅对组织无毒副作用,还对如皮肤、牙周组织有营养与修复的能力,对肝脏功能的恢复亦颇有特色。另外,经过适当处理的丝素膜能承受在常规高温灭菌消毒和细胞培养液的浸泡而形状不会产生明显变化,在吸水的情况下, α 型丝素膜的多孔网状凝胶结构能够适应细胞的附着、铺展,对增殖极为有利。因此,丝素有望成为有发展潜力的新型组织工程三维支撑体材料,用于制造真正意义上的永久性人工器官。

4 急待解决的一些问题

4.1 特殊器官中的生物亲和性的研究

根据大量的研究显示,丝素膜在皮肤、口腔及眼睛等部位的生物相容性良好,抗原性不明显,皮下埋植试验表明,无明显炎症或占位现象发生^[6,7,9,10]。但要将丝素膜应用于与血液直接接触的器官如人工血管的建造上,其血液相容性则必须加以详细的研究。尤其是,血液相容性与膜的结晶结构及表面状态密切相关,故丝素膜成膜条件或复合膜的复合物选择,应不仅取决于对膜力学性能的考虑,还应综合考虑其在特殊器官中的生物相容性。丝素的氨基酸排列是以 $-(\text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{Ser} -)_n$ 重叠结构为特征的,其

中,Ser之间的距离,与肝磷脂中的抗血凝结构即硫酸基间的距离十分相近,因此在丝素中的Ser上引入硫酸基进行改性处理,就有可能增加其血液相容性。而且根据初步的研究,改性后的丝素在抗凝血性能方面得到了明显的改善,虽然仍然比肝磷脂略低,但确实显示出积极的结果^[8]。对其抗凝血机理进一步的探索,有可能使丝素成为比较好的人工血管构建材料。

4.2 在体药物负载及降解特性的研究

在生物医学高分子的研究中,最受关注的是生物可降解的高分子。在通常情况下,原始状态下的丝素蛋白,除其中占总体极少部分的非结晶区对稀酸稀碱有一定程度的敏感性,可部分降解外,整体的酶降解性能极差,使得其生物降解性不好^[11]。而经过我们研究表明,通过中性盐溶解法使丝素蛋白分子量适当降低,暴露出部分可酶切部位,可以使丝素蛋白的体外酶解率大大提高,表现为可被胰蛋白酶、木瓜蛋白酶等降解成为分子量几十到几百的小分子肽。而在动物实验中,其消化吸收率可由原来的20%上升到50%以上。

丝素蛋白在成膜以后的生物降解性能则不但取决于丝素的分子量,还与成膜条件有关。目前在用丝素蛋白负载药物或酶时主要是利用普通包埋法,即丝素溶液与被负载的物质混合,然后干燥固化成膜的方式。为了提高被负载物稳定性,往往在后期处理时还采用乙醇等有机溶剂来提高丝素蛋白的交联程度。在成膜过程中固化温度与时间,以及后期固化剂的选择,对丝素膜中结晶区所占的比例,以及结晶区中难以酶解的 β 化构象的比例,起着至关重要的作用^[11]。由于这两个比例对丝素膜的机械性能甚至对药物的缓释速度都有极为重要的影响。因此,要根据具体情况来控制不同应用方向的丝素膜的成膜条件,以便在生物降解速度与膜机械性能的维持或药物缓释速度之间寻求一个比较好的平衡点。

但目前,对于丝素膜的降解主要是研究考察了其分子结构与膜结构与孤立于生物体外,在酸碱酶作用下的降解,少量亦涉及到其分子结构与消化吸收的关系,对其在体内非消化器官中的体液接触下的降解及药物负载与缓释机制则尚不清楚,从而影响了其在人工血管,非口服的药物载体等方面的开发应用。而且对于生物降解高分子,最重要的指标是生物降解速度的控制,对于应用于生物体内的材料来说,这不仅取决于与之接触体液的化学构成,也与温度、力学环境等生物物理因素有关。由于导致丝素蛋白降解的主导因素是酶,而据研究表明,蛋白的构象在流场剪切力的作用下可发生变化,从而影响底物与催化剂的结合,使反应

速度受到影响^[12]。因而在心血管系统的器官中,复杂的体液流场因素对材料降解的影响尤为重大^[13-15]。

为此,笔者已着手在综合运用生物化学与生物流变学的观点,通过设计体液流场、温度等物理环境模拟系统,对血管与骨膜两类丝素膜较有潜力发展人工替代物的器官环境下,膜结构、体液成分、体液温度、体液流场变化等因素与丝素蛋白降解的关系进行研究,以期全方位的深入了解丝素在体降解的机制,为拓展丝素在生物医学领域中的应用提供进一步的理论基础。

参考文献:

- [1] 许才定,杨建康,陈寿菊,等. 蚕丝蛋白的开发利用[J]. 国外丝绸, 1996, (6): 8-33.
- [2] 唐人定. 用海藻酸钠改善丝素膜的物理性能[J]. 国外丝绸, 1990, (5): 21-23.
- [3] KAZUO Y. 丝素蛋白/间规乙烯醇混合物的性能[J]. 国外丝绸, 1992, (4): 25-33.
- [4] NAKAMURA T, TERAMOTO A, HACHIMORI A, et al. Preparation of Silk Fibroin-Chitosan Membranes and the Macrophage[J]. SEN'I GAKKAISHI, 1999, 55(8): 369-375.
- [5] 徐新颜,徐静斐,吉鑫松,等. 丝素蛋白膜作为葡萄糖氧化酶载体的研究[J]. 蚕业科学, 1997, 23(3): 153-156.
- [6] 黄伯高,朱德安,吴徽宇,等. 一种新的创面覆盖物——丝素膜[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 1998, 7(14): 270-274.
- [7] 木船尔. 人造皮肤[J]. 纤维学会志, 1991, 47(3): 110-146.
- [8] 常春枝. 以蚕丝为原料的抗凝血物质的开发[J]. 国外丝绸, 1997, (4): 34-35.
- [9] 黑柳能光. 细胞组型人工皮肤[J]. 热伤, 1997, 23(1): 9-14.
- [10] 武继民,叶萍,孙伟健,等. 胶原海绵及其止血性能的研究[J]. 生物医学工程, 1998, 15(1): 63-65.
- [11] 黄晨,徐新颜,盛家铺. 丝素膜的结构测定和分析[J]. 蚕业科学, 1996, 22(3): 183-186.
- [12] 滕绍平. 温度和湿度对丝素膜的溶解性和降解性的影响[J]. 国外丝绸, 1998, (6): 21-30.
- [13] 吴云鹏. 生物流变学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993.
- [14] 蔡绍哲,王远亮,吴云鹏. 开辟流变学新领域——药物流变学[J]. 大自然探索, 1995, 14(3): 25-29.
- [15] 吴云鹏,杨瑞芳. 体液的流变特性[M]. 北京: 科学出版社, 1991.

Application of Silk Fibroin in Biomedical Field

LI Ping¹, LIU Li-ping², WU Ze-zhi¹, CAI Shao-xi¹

(1. College of Bioengineering, Key Lab for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

Abstract: The relative character of silk fibroin in biomedical application is discussed, which focuses on the problems about biocompatibility and degradation mechanism while silk fiber is used in vitro. As the result, it is easier to keep the biocompatibility of silk fibroin by the character of multiple styles of crystallizes and construct the net structure. The modification of membrane structure of other natural material is also discussed, as well as the chemical way in the main application statue in drug-loading material, artificial organ or tissue scaffold. The degrading of silk fibroin in vitro is also controlled by the temperature and mechanical environment as well as the chemical component, and it is should be more comprehensive with the factors of biomechanic and biorheology as well as that of biochemical taken into considered in the investigation of transformation mechanism of silk in vitro.

Key words: silk fibroin; bioanalysis; drug-loading; material tissue scaffold

(责任编辑 李胜春)