

生物高分子材料蚕丝蛋白研究与应用

庄愉 孙宁苓 陆良英 吴梅霞
(鑫缘茧丝绸集团股份有限公司江苏南通 226600)

摘要: 蚕丝蛋白是一类具有优良性能的天然高分子材料,除了应用于丝绸面料、纤维服饰等传统领域外,蚕丝蛋白作为生物资源高分子材料的开发研究已日益引人瞩目,不仅拓展了桑蚕黄丝的应用领域,延伸了蚕丝产业及桑蚕茧丝综合加工利用途径,提升了蚕丝蛋白的应用价值和市场竞争力,而且对提高蚕丝行业经济效益,推动蚕丝业循环经济建设发展等具有重要意义。

关键词: 蚕丝蛋白; 丝素; 丝胶; 生物高分子材料

桑蚕丝蛋白质含量高达 98%,由 70-80%的丝素蛋白和 20-30%覆盖在外面的丝胶蛋白组成,丝蛋白富含 18 种氨基酸,其中赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸等 8 种是人体必须氨基酸。除碳、氢和氮元素外,丝蛋白还含不超过 0.7%的钾、钙、硅、锶、磷、铁和铜等多种无机元素,这与丝蛋白的性能及蚕吐丝的机理等有直接关系。随着科技发展,特别是材料科学、生物化学和分子生物学在蚕丝学领域的广泛应用,素有“纤维皇后”美誉的蚕丝已不仅仅是一种纺织原料,其生物新功能在医学、材料科学、日化、食品和环保等众多领域都得到了广泛地应用。

1 丝素

1.1 丝素基高吸水材料

高吸水材料是一种具有较高吸水性能和保水性能的新型高分子材料^[1]。高吸水材料经适度交联形成一定的三维网络结构,含有强亲水基团,可通过水合作用迅速地吸收自重几百倍乃至上千倍的水而成凝胶状聚合物^[2]。与传统的吸水材料不同,高吸水材料具有吸水倍率大,吸水速率快,保水能力强,有效持续性强且无毒无味等优点^[3]。

研究以具有良好生物分解性能的丝素蛋白(SF)为原料,将其与丙烯酸(AA)和丙烯酰胺(AM)共聚合成一种新型的丝素蛋白/丙烯酸/丙烯酰胺吸水材料(SF/AA/AM),用红外吸收光谱 FTIR 扫描电镜(SEM)差示扫描量热仪(DSC)对其结构与性能进行了分析,并对材料的吸水 and 保水性能进行了测定。结果表明:SF/AA/AM 吸水材料在去离子水、自来水和 0.9%NaCl 溶液中的吸水倍率分别为 220~308g/g, 135~210g/g, 24.3~34.8g/g。丝素蛋白与内烯酸和丙烯酰胺聚合良好,丝素蛋白引入后,使材料的热分解温度升高,材料具有较高的熔融温度,吸水比表面增加^[4-5]。

1.2 新型丝素支架材料的体内降解

丝素材料因其良好的生物相容性、可降解吸收性和能制备成多种形态的材料等性能,在组织工程支架材料方面的应用被人们广泛关注。目前在支架材料制备及材料与各种哺乳动物细胞的相容性研究等方面已经取得诸多成果。随着对丝素支架材料研究向组织构建和修复应用方面的深入,调控丝素支架材料在体内的降解吸收过程显得十分重要。

将冷冻干燥法制备的新型丝素支架材料植入兔耳皮下进行体内降解试验。肉眼外观观察发现植入丝素支架材料部位的皮肤无明显红肿,经过 28 周左右皮下材料植入部位的突起逐渐消失;组织切片观察发现丝素支架材料引起的组织反应较弱;扫描电镜在 28 周时只观察到将近消失的丝素支架材料种植腔,表明材料已基本降解。相比之下 28 周时丝素膜仍完好,无明显降解。研究结果表明,冷冻致孔新型丝素支架材料有望开发成为一种生物相容性优良的可降解吸收性组织工程支架材料^[6-7]。

1.3 羟基磷灰石/丝素复合支架

骨形态发生蛋白 2 (BMP-2) 是转录生长因子 β (TGF- β) 家族成员之一,具有促进成骨细胞分化、诱导骨组织再生的能力,目前已广泛应用于骨组织工程研究之中。羟基磷灰石 (HA) 是天然骨组织的主要无机成分,具有骨诱导性,能够诱导新生骨的血管化,促进新骨的形成,且植入体内后不会引起炎症反应,常用作骨修复材料。丝素蛋白 (SF) 因其良好的生物相容性、降解性及独特的力学性能等,广泛用于生物医学领域。张艳红等在大肠杆菌原核表达系统进行重组人的骨形态发生蛋白 2 (rhBMP-2) 的表达并通过体外复性获得了 rhBMP-2 重组蛋白。利用该重组蛋白与 HA/SF 支架复合,制备了新型复合支架材料。通过体内外实验表明,该材料的生物相容性良好,是一种潜在的骨修复材料^[8-9]。

1.4 丝腺丝素支架材料

相比于从茧壳里采取一些化学试剂溶解的方法提取丝素,直接从丝腺里提取丝素更加环保。采用直接从丝腺里提取的丝素制备了支架材料。丝素取自五龄第 7d 的家蚕的中部丝腺。用冷冻干燥的方法制备了多孔支架。SDS-PAGE 分析表明丝素分子量多在 200 kDa 以上。SEM (扫描电镜) 分析显示支架孔径均一日孔径大小随着丝素溶液浓度的增大而减小。通过力学万能测试机测试,支架的压缩模量达 6.9 ± 0.4 MPa。另外通过细胞增殖实验表明,丝素支架具有较高的细胞粘附能力和增殖能力,同时也显示出较高的碱性磷酸酶活性。丝腺丝素支架良好的抗压能力和生物相容性使其有望应用于骨组织工程^[10]。

1.5 丝素/壳聚糖复合支架

以丝素和壳聚糖为原料,采用冷冻干燥法制备丝素壳聚糖支架,通过预矿化使羟基磷灰石 (HA) 沉积,形成多孔羟基磷灰石-丝素蛋白/壳聚糖复合支架。对复合支架进行红外吸收光谱 (FT-IR)、X 射线衍射 (XRD)、扫描电子显微镜 (SEM) 热重分析 (TGA) 力学性能和空隙率表征;采用 WST-1 方法检测 MG-63 骨肉瘤细胞在复合支架上的增殖情况,评价其细胞相容性。结果显示,沉积的 HA 结构属于弱结晶态范畴,主要位于孔壁上,且随着预矿化循环次数的增加沉积量增多,使预矿化复合支架的弹性模量得到极显著地提高,其孔隙率保持在 90% 左右的较高水平;WST-1 检测表明,含有 HA 的预矿化复合支架对细胞增殖有明显的促进作用,具有良好的细胞相容性^[11]。

1.6 海绵状丝素敷料

因丝素蛋白良好的生物相容性,早在 2500 年前,丝素就被作为手术缝合线应用于生物医用材料方面。采用纳米银颗粒和 1.25~5.0% (v/v) 缩水甘油醚混合,再与丝素溶液共混冷冻干燥后得到海绵状的丝素敷料。对敷料的力学性能,透气性和吸湿性能进行表征,发现材料具有良好的拉伸强度和弹性,敷于伤口上发现材料透气性和吸湿性能均不错。吸湿率能每小时达到 101 g/m^2 ,在干态和湿态下的吸湿倍率分别达到 595.2% 和 251.9%。敷料中的纳米银在 PBS 缓冲液中处于相对稳定状态,抗菌性能良好。用新西兰象做实验,将敷料敷于其背部创伤皮肤,发现 17.7 ± 2.4 d 后创伤完全愈合,明显快于作对照的猪皮敷料。以上实验结果表明,海绵状丝素敷料有巨大潜力应用于人体皮肤创伤方面。

2 丝胶

2.1 海绵状纯丝胶凝胶支架

丝胶在自然状态下能够形成凝胶,但机械性能较差,不能满足生物材料的要求。通过与其他生物高分子 (如聚乙烯醇等) 复合或用交联剂进行化学修饰,可以明显地提高丝胶凝胶的机械性能。而化学试剂的添加容易降低材料的生物相容性,因此若能少用或不用化学试剂来研制丝胶凝胶材料将是一个重要突破。以沸水法提取的普通茧层丝胶为原料,在不添加化学交联剂的条件下,采用冷冻解冻的方法制备出一种新型的海绵状丝胶凝胶支架材料。通过对不同制备条件 (如丝胶浓度、冷冻时间、冷冻温度和冷冻解冻次数等) 下丝胶凝胶生成率的比较分析,确定了效率最高的丝胶凝胶制备工艺条件。并对不同条件下制备丝胶凝胶的多孔结构、孔径大小和形态结构等进行了研究,为开发实用性凝胶支架材料建立了基础^[12]。

2.2 丝胶/甘油混合膜

一直以来,由于丝胶的力学性能欠佳,限制了其在组织工程等方面的应用。为改善丝胶膜的力学特性,在丝胶溶液中添加适量甘油以期能改变其性能。结果表明,不论在干态还是湿态下,均可以通过调节甘油的量来调节丝胶膜的拉伸性能。ATR-FT-IR(傅里叶红外光谱全反射)和热分析(TGA和DSC)均表明甘油的加入促进了膜的无定形结构的形成。SEM(扫描电镜)结果表明甘油的量在10wt%时,丝胶和甘油混合得比较均一。丝胶膜拉伸性能的改善对其力学性能是一个优化,增加了丝胶基高分子材料在组织工程应用的可能性^[13]。

2.3 丝胶蛋白/羟基磷灰石复合支架材料

复合骨支架是重要的骨组织修复材料。用氢氧化钙和磷酸湿法合成羟基磷灰石,按一定的比例加入到浓缩后的丝胶溶液中,经冷冻干燥制备丝胶蛋白/羟基磷灰石复合骨支架材料。通过SEM、XRD、FTIR、DSC及力学性能等检测方法,探讨了制备工艺条件对丝胶/羟基磷灰石复合支架材料的影响及结构性能。结果表明,丝胶/羟基磷灰石复合支架材料的孔隙分散均匀且孔与孔之间相互贯通,孔隙率为33.0%~62.5%呈弱结晶,与人体骨中晶体态相似分子呈 β 结构,热分解温度提高,热学性能发生变化;弹性模量最大为15.64 MPa。具有较好的力学性能^[14]。

2.4 丝胶蛋白基复合吸水材料

目前广泛使用的聚丙烯酸类高吸水材料生物降解性能差,对生态环境造成危害,同时其原料来源于日益枯竭的石油资源。因此,研究可生物降解吸水材料,对于减少环境污染等具有重要意义。丝胶蛋白是一种天然高分子,一般作为制丝生产的废弃物。丝胶蛋白的氨基酸中含有大量极性基团(如一OHCOOH-NH₂等),具有较好的亲水性、反应活性和生物降解性。如能将丝胶蛋白变废为宝作为生物资源加以利用,研制丝胶蛋白基可生物降解吸水材料,不仅丰富了吸水材料类型,也为丝胶蛋白资源利用提供了一条新途径^[15]。

2.5 丝胶蛋白/羟基磷灰石复合膜

以乙醇处理的家蚕丝胶膜为模板。采用氯化钙和磷酸氢二钠溶液交替浸渍的方法,研究经不同矿化周期处理丝胶膜上的矿化物沉积及对丝胶膜结构的改变情况。通过红外吸收光谱(FT-IR)、X射线衍射(XRD)、扫描电子显微镜(SEM)和X射线能谱(EDX)对表面沉积矿化物的丝胶膜进行微观形貌与结构表征,发现矿化物能快速有效地在丝胶膜表面沉积和生长,随着矿化周期的增加,矿化物的沉积量不断增加,丝胶膜表面的结晶度略有提高,沉积的矿化物呈龟裂、薄板状,主要成分为无定形磷酸钙盐。将矿化第7d的复合膜材料和乙醇预处理丝胶膜与MG-63人成骨瘤细胞进行体外培养,通过细胞形态学观察和XTT比色法检测研究复合材料的生物相容性。结果表明,复合膜材料更能促进MG-63细胞的增殖和生长。

3 展望

随着生物技术的日新月异,研究手段的不断进步,目前国内外对蚕丝蛋白的基础研究和蚕丝蛋白高分子材料的应用研究都越来越深入,并已取得了一些有价值的成果。蚕丝蛋白的诸多优良性能使得蚕丝蛋白高分子材料应用前景广泛,这对拓展蚕丝资源利用新途径,促进蚕丝业循环经济建设发展等方面意义重大。不过由于技术条件等的限制,目前蚕丝蛋白高分子材料的很多应用研究还处在实验室阶段。要让其真正走向市场,还需要突破一些技术限制,任重而道远。

参考文献

- [1] M.J. Zohuriaan-Mehr, A. Pourjavadi, H. Salimi, et al. Protein-and homopoly (amino acid)-based hydrogels with super-swelling properties [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2019, 20(8): 655~671.
- [2] K. Prudnikova, M. Utz. Electromechanical Equilibrium Properties of poly(acrylic acid/acrylamide) hydrogels [J].

Macromolecules.2020.45(2):1041~1045.

[3]P.C.Parvathy,A.N.Jyothi.Synthesis,characterizationand swelling behaviour of superabsorbent polymers fromcassava starch-graft-poly(acrylamide)[J].Starch-Stärke2020.64(3):207~218.

[4]汪琦翀,朱良均,闵思佳等.丝素蛋白/丙烯酸/丙烯酰胺复合吸水材料的吸水性能探讨.蚕业科学2019.35(3):661~665.

[5] QichongWang,LiangjunZhu,SijiaMinetal.Synthesisand characterization of silk fibroin/acrylic acid /acryl amide superabsorbent polymer J.Polymer Materials Sci- ence and Engineering2019.26(9):128~131.

[6]杨磊,陈宇,朱良均等.一种新型丝素支架材料的体内降解实验[J].蚕业科学,2018,37(4):713~718.

[7]张艳红,姚菊明,朱良均.载人骨形态发生蛋白的羟基磷灰石/丝素蛋白复合支架的细胞相容性研究[J].蚕业科学,2018,37(4):700~705.

[8] YanhongZhang,YinsunMa,MingyingYang,et al. Expres-sion, purificationand refolding of a recombinant human bone morphogenetic protein 2 in vitro[J].Protein Expression and Purification2018.75:155~160.

[9]MingyingYang,YajunShuai,WenHeetalPreparationof porous scaffolds from silk fibroin extracted from the silk gland of bombyxmoriJ.International Journal of molecular sciences.2017,11,7762~7775.

[8]施李杨邓连霞张海萍等预矿化丝素/壳聚糖复合支架的性能及细胞相容性[J].高分子材料科学与工程,2013.

[10]SiiiaMin,XinGao,ChunmaoHanetalPreparation of asilk fbroin spongy wound dressing and its therapeutic efficiency in skin defects J. Journal of Biomaterials Sci- ence-Polymer Edition2018,23(1-4):97~110.

[11] HaipingZhang,MingyingYang,Sijia Min, et al.Preparation and characterization of a novel spongy hydrogel from aqueous bombyxmorisericin[J].E-polymers,2008:66.[15]

HaipingZhang,LianxiaDeng,MingyingYang,etal.En-hancing Effect of Glycerol on the Tensile Properties of Bombyxmori Cocoon Sericin Films JInternational Jour nal of Molecular Sciences2019,12:3170~3181

[12]LianxiaDeng,HaipingZhang,Liangjun Zhu, et al.Synthesis and characterization of silk sericin/acrylic acid/ acrylamide superabsorbent polymer[J]. Journal of fiber bioengineering&informatics. 2011,341~345.

[13]LianxiaDeng,LiangjunZhu,MinyingYang,etal.Prepara-tion and Water Absorbency Performance of Silk Sericin/Acrylic Acid/Acrylamide Composite Absorbent Material[J]. Polymer Materials Science and Engineering 2019,12:127~130.

[14]王雪云,张海萍,闵思佳,等,交替浸渍矿化丝胶膜表面沉积的矿化物及对丝胶膜结构的改变.蚕业科学2021.38(4):721~726.