

# 丝素蛋白生物硅化材料在骨组织工程学中的应用



郑直, 宁美英 综述 李东 审校

国家卫生计生委科学技术研究所 药物与医用材料研究中心 (北京 100081)

**【摘要】** 制备可生物降解并具有骨再生功能的支架材料是骨组织工程当前研究的重点领域。丝素蛋白具备可用作骨组织工程支架材料的许多要素,其中通过仿生方式生物矿化制备的丝素蛋白/无机复合材料与单纯丝素相比,由于具有较好的生物相容性、生物力学性能、可生物降解性以及骨诱导和传导特性,展现出更好的应用前景。本文综述了近年丝素蛋白生物硅化制备新型骨组织工程材料的研究进展,并展望了丝素蛋白生物硅化今后的发展方向。

**【关键词】** 丝素蛋白; 生物硅化; 骨组织工程; 二氧化硅

## Silicification of silk fibroin and their application in bone tissue engineering

ZHENG Zhi, NING Meiyong, LI Dong

Drug and Medical Materials Research Center, National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, P.R.China

Corresponding author: LI Dong, Email: cvsskin@hotmail.com

**【Abstract】** In bone tissue engineering, fabrication of scaffold materials that are biodegradable with regenerative functions is one of the most important research fields. Silk fibroin exhibits many favorable characteristics used as scaffold materials. Among them, hybrid silk fibroin/inorganic composites prepared by biomimetic mineralization have better biocompatibility, biomechanical properties, and biodegradability. At the same time, the hybrid silk fibroin/inorganic materials have much better osteoinduction and conduction properties than silk fibroin. Here, the recent advances in the preparation of silk fibroin/silica hybrid materials by combination or biomimetic silicification are reviewed, and the future research prospects of silicification of silk fibroin are discussed.

**【Key words】** silk fibroin; silicification; bone tissue engineering; silica

## 引言

随着生物医学的快速发展,可生物降解并具有再生功能的生物医用材料成为下一代骨组织工程研究的重要方向和热点领域。通过骨支架材料、生物活性因子、细胞以及血管等不同因素的有效整合,实现骨组织的工程化,最终达到修复缺陷骨组织和骨再生的目的。骨支架材料不但要具有良好的生物相容性和组织诱导性,还需要优异的生物力学性能,这是骨组织工程研究的核心和难点之一。可生物降解的有机/无机复合材料由于具有良好的生物相容性和力学性能,已成为近年国内外的研究

热点。丝素蛋白由于具备优异的生物相容性、可降解性能和力学特性,成为骨组织工程研究领域的重要分支之一。但由于其机械性能不足,将丝素蛋白与无机材料进行复合成为近些年骨组织工程的重要研究方向。本文将对国内外生物硅化丝素蛋白复合材料制备及其在骨组织工程中的应用研究进行综述和展望。

## 1 丝素蛋白的结构和生物学特性

蚕丝主要由丝素蛋白和丝胶蛋白组成。丝胶蛋白约占蚕丝的 25%,被认为是引起机体免疫反应的主要成分,因此其医学应用受到一定限制。

DOI: 10.7507/1001-5515.201705029

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1000900); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015NRIPF10006)

通信作者: 李东, Email: cvsskin@hotmail.com

丝素蛋白占 70% ~ 80%，主要含有 18 种氨基酸，其中 Gly、Ala 和 Ser 含量最多，约占 87%，在体内可被多种蛋白酶和胶原酶降解并能被完全吸收<sup>[1]</sup>，免疫原性低，生物相容性好<sup>[2]</sup>。丝素蛋白由一条重链 (325 ku) 和一条轻链 (25 ku) 通过二硫键连接。其结构包含结晶区和非结晶区：结晶区的丝素蛋白链间形成较为致密的  $\beta$ -折叠，使其具备了较高的韧性和抗拉伸能力；非结晶区排列无序，肽链间作用力弱而且极性基团较多，使丝素蛋白延展性和弹性大大增强。丝素蛋白的生物力学性能甚至优于很多高性能合成纤维<sup>[3]</sup>。此外，丝素蛋白易于加工，可根据需求制备成膜、微球、凝胶、纳米纤维或者三维结构的支架<sup>[4-5]</sup>。因此，丝素蛋白在医用材料方面得到了很大的发展，作为手术缝合线已有近百年的使用历史，近年来也被广泛应用于人工皮肤、软骨、骨、人造血管和韧带等<sup>[2, 4, 6-7]</sup>。

## 2 丝素蛋白支架在骨组织工程中的应用

在骨组织修复应用中，丝素蛋白虽然表现出了较好的韧性，但再生的丝素蛋白经过溶解和冷冻干燥法重新制备成支架后，其力学性能大幅降低、韧性减小，植入体内后难以承受应力作用。同时，单一丝素蛋白成分植入体内再次水化后很难成形，从而失去支架形状和机械强度。此外，骨细胞在单一丝素制备的支架材料上附着能力不佳，造成诱导成骨的能力有限<sup>[2, 8-9]</sup>。许多学者尝试将丝素蛋白与其他高分子材料例如聚乳酸、聚己内酯等共混后制备成复合材料以增强其支架性能。这些高分子材料具备可降解、容易加工以及生物相容性好的特点，但也存在力学强度不足、代谢产物往往呈酸性、易引起无菌性炎症等缺陷<sup>[10]</sup>。

为满足骨缺损部位对修复材料的力学及功能要求，包括良好的强度和韧性，以及抗压、抗张和抗扭转等力学指标，通过仿生方法，将丝素蛋白与无机材料复合制备支架材料在近年来受到更多关注<sup>[5, 11]</sup>。利用仿生矿化原理和方法制备具有模拟天然骨组织结构和功能的复合材料是骨组织工程领域的研究前沿和热点<sup>[11-12]</sup>。当前，相关研究多集中于丝素蛋白/羟基磷灰石复合材料，包括丝素蛋白与羟基磷灰石的共混材料或通过仿生矿化制备的复合材料。研究发现，与羟基磷灰石复合可显著提升丝素蛋白的生物力学性能，同时其诱导成骨的能力也得到较大提高。但天然丝素蛋白矿化能力有限，通过丝素蛋白与羟基磷灰石共混的材料由于两

者之间难以形成共价键等紧密的结合，生物力学强度难以满足实际应用需求<sup>[9, 13]</sup>。

## 3 硅基材料的生物学特性

在自然界中，参与生物矿化除了以钙作为主要成分的无机相之外，另一大类是以硅为主要成分的无机组分。硅基材料在生物体内是通过各种生物分子的调控矿化，并在温和条件[包括水相、pH 值接近中性和接近室温 (4 ~ 40℃)]下形成。此种条件对于有机/无机复合材料的形成特别重要，例如以蛋白作为有机相模板通常无法忍受严苛的条件<sup>[14]</sup>。硅基材料具有优异的生物相容性、骨传导性和诱导性。植入体内的硅基生物活性玻璃可以和骨整合并且无任何毒性，不会在接触面产生结缔组织或者发生炎症。此外，在硅基玻璃表面可有效地诱导羟基磷灰石类似物形成。但硅基材料本身质地较脆，难以单独使用<sup>[15]</sup>。如将丝素蛋白与硅基材料一起制备成有机/无机复合材料，将综合二者的优点，为新一代骨生物支架材料提供新的研究方向。

## 4 丝素蛋白/硅基复合材料在骨组织工程中的应用

### 4.1 天然丝素蛋白硅化材料

天然丝素蛋白中缺乏与生物硅化相关的特殊序列和基团，因此这方面的研究相对较少。邵正中团队<sup>[16]</sup>通过溶胶凝胶法将丝素蛋白溶液和硅溶胶共沉淀制备出了共混薄膜。由于丝素蛋白含有谷氨酸和天冬氨酸等带羧基的氨基酸，可与硅溶胶发生反应，因此观察到溶胶水解后形成的二氧化硅颗粒 (直径大约 100 nm) 均匀地分布在丝素蛋白连续相之间，但并没有与丝素蛋白紧密结合。Hou 等<sup>[17]</sup>同样采用溶胶凝胶法制备了丝素蛋白/二氧化硅杂化材料，采用正硅酸乙酯 (tetraethyl orthosilicate, TEOS) 作为前体溶液，采用 3-氨丙基三乙氧基硅烷 ((3-aminopropyl) triethoxysilane, APTES) 作为偶联剂，同时加入了 2,4,6-三[(2-3-环氧丙烷-二烷基铵)丙基]-1,3,5-三嗪氯 (2,4,6-tri[(2-epihydrin-3-bimethyl-ammonium) propyl]-1,3,5-triazine chloride, Tri-EBAC) 作为交联剂。丝素蛋白中的氨基与纳米级二氧化硅颗粒表面含有的氨基通过 Tri-EBAC 交联形成共价键，傅里叶变换红外光谱等结果也证实了共价键的形成。

### 4.2 丝素蛋白与硅基共混材料

许多学者也尝试将丝素蛋白与二氧化硅等硅基材料共混制备复合材料。朱勇团队<sup>[18]</sup>将二氧化

硅颗粒与丝素蛋白共混,同时加入了硅烷偶联剂 KH-550,红外结果显示丝素蛋白与纳米二氧化硅之间产生了一定的共价结合。陈建勇团队<sup>[19-20]</sup>分别采用冷冻干燥法和静电纺丝法制备了丝素蛋白与硅酸钙纳米颗粒复合材料。此复合材料可在模拟体液中有效地诱导羟基磷灰石进行矿化,体外细胞培养也表明其具有较好的生物相容性。将丝素蛋白、硅酸钙纳米粒子以及交联剂共混后制备的纳米薄膜相对于丝素蛋白自身,共混材料的生物力学性能得到较大提高,但硅酸钙只是分散在丝素蛋白形成的空隙内,通过机械或者超声的混合方式也无法将硅酸钙纳米粒子分散均匀。随着共混材料中硅酸钙含量的进一步提高,其力学性能不升反降<sup>[21]</sup>。丝素蛋白与硅酸钙混合制备的复合材料也可在模拟体液中有效诱导磷灰石沉积,使其亲水性和生物活性增强<sup>[20]</sup>。将不同粒径大小的二氧化硅颗粒(24 nm ~ 2 μm)与丝素蛋白溶液混合干燥,可制备出生物相容性优良的复合材料。体外干细胞培养表明,丝素蛋白/二氧化硅复合材料可有效地诱导干细胞向成骨方向分化,并形成矿化位点。由于采用了纳米级别的颗粒,其生物降解性较好,为骨组织工程提供了一种新选择<sup>[22]</sup>。将丝素蛋白与另外一种生物相容性较好的三元无机材料(CaO-MgO-SiO<sub>2</sub>)-透辉石纳米颗粒混合后,力学性能增强,润湿度增加<sup>[23]</sup>。丝素蛋白与锂皂石(Na<sup>+</sup><sub>0.7</sub>[Si<sub>8</sub>Mg<sub>5.5</sub>Li<sub>0.3</sub>]O<sub>20</sub>(OH)<sub>4</sub>]<sup>-0.7</sup>)纳米片混合可制备出生物活性较好的水凝胶,有效地促进成骨细胞增殖,并增强成骨方向的分化<sup>[24]</sup>。

### 4.3 基因工程化丝素蛋白生物硅化材料

为了提高丝素蛋白或者与其序列和结构非常相似的蛛丝蛋白生物硅化的能力,可将蛛丝蛋白工程化并在温和条件下进行生物硅化,这一方法在2006年被首次报道<sup>[25]</sup>。将蛛丝蛋白末端融合一段与二氧化硅生物矿化相关的片段 R5 后,其生物硅化能力大大增强。对比实验表明,R5 序列本身诱导大的二氧化硅颗粒(直径 0.5 ~ 10 μm)形成,融合蛋白诱导形成纳米级别的二氧化硅颗粒(直径 0.5 ~ 2 μm)。但不含 R5 序列的蛋白,无法诱导二氧化硅颗粒在其膜表面沉积。此外,只有 R5 在其 C 端融合才会诱导二氧化硅沉积<sup>[25]</sup>。R5 与分子量更大的蛛丝蛋白片段融合也同样证明了它在任何一端都不会影响蛋白的润湿性以及表面能,但在 C 端可更好地诱导生物硅化,这表明蛋白的不同折叠方式可能影响了蛋白表面电荷暴露的程度<sup>[26]</sup>。和生物硅化相关的另外一个 Pep1 片段也具有类似作用,可诱导约 100 nm 大小的二氧化硅颗粒形成。通过将

Pep1 和丝素蛋白片段制备的融合蛋白与 Pep1 和丝素蛋白化学偶联对比研究发现,即便一个丝素蛋白可以化学偶联更多的 Pep1 片段,但融合蛋白仍可诱导更大粒径的二氧化硅颗粒形成。这可能是由于化学偶联的分子是以单体形式存在,但融合蛋白是几个或者多个分子聚集的结果<sup>[27]</sup>。以上研究也都证明了,这些与生物硅化相关的片段蛋白并没有起到加速和催化二氧化硅沉积的作用,只是形成了特异的矿化位点并起到模板的作用<sup>[25, 27]</sup>。二氧化硅形成的机制可能是通过静电相互作用,在 R5 等具有正电荷的蛋白表面沉积。将不同的二氧化硅结合多肽(silica-binding peptide, SiBPs) A1、A3 和 R5 与蛛丝来源的骨架片段融合后,分别比较了它们在液相-液相以及液相-固相界面上沉积二氧化硅能力的差异。含有 A3 片段的融合蛋白在液相-液相界面沉积效率最高,但在液相-固相界面最低。随着融合蛋白 β 折叠结构的增加,其生物矿化能力反而下降。分子量较大的融合蛋白矿化形成的二氧化硅颗粒较大,说明蛋白分子量变化与二氧化硅颗粒大小密切相关<sup>[28]</sup>。通过在丝素蛋白或者蛛丝蛋白片段末端融合与生物硅化相关的不同片段以及调整矿化前体溶液的 pH 值,可起到调节和优化蛋白表面电荷密度和疏水区的作用,从而对矿化二氧化硅形貌、大小以及分布起到控制作用<sup>[29]</sup>。此外,通过加入甘油,可以控制二氧化硅纳米颗粒在融合蛋白内的分布程度。由于通过生物矿化所获得的二氧化硅颗粒孔隙率大,表面富含羟基基团,可有效地进一步诱导羟基磷灰石的沉积。这些生物硅化后的融合蛋白具备良好的生物相容性和骨诱导、骨传导能力,可促进干细胞向成骨方向的分化<sup>[26, 30]</sup>。

## 5 总结与展望

在临床骨组织修复和骨组织工程应用中,骨生物材料需要具备优异的生物相容性,包括无细胞毒性、较低的炎症反应和免疫原性并能提供细胞附着、增殖和分化的微环境。材料还需要具有良好的骨传导性和骨诱导性,有利于细胞的迁移、增殖、分化和组织再生并与自体骨形成紧密的骨性愈合材料。同时还必须具备一定的机械强度、韧性和弹性,其力学性能必须与天然骨接近或者相匹配,可生物降解并与修复部位适应,其降解产物无毒副作用,最终能被逐步吸收。为了满足产业化的需要,原材料最好相对容易获得、加工简便且价格低廉。丝素蛋白具有优异的生物力学性能、良好的可降解性和生物相容性、易于加工以及取材方便、价格低

廉等特性,无疑是骨组织工程最佳候选者之一。通过将丝素蛋白与硅基材料复合,不但力学性能大大加强,而且骨诱导和骨传导能力也得到大幅提高。

通过生物矿化得到的丝素蛋白/硅基复合材料不但表面富含可提高生物活性的羟基,而且孔隙率大,可通过掺入其他活性分子例如骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、药物或者生物活性载体等进一步提高复合材料的生物活性。生物矿化的方式不同于化学方法,一般不会引入对细胞有毒性的其他物质,同时由于是在温和条件下进行,蛋白等有机成分得到有效保护,不易发生变性。

与此同时,我们也应当认识到,生物体内有机/无机复合物的形成是一个多重的复杂过程,包括:细胞外基质的组装;选择性地转运无机离子到特定部分;随后矿物进行成核和矿化,使有机、无机相之间形成密切的结合。最终形成的矿化材料具有精妙的组装方式和复杂的多级结构,从而表现出优异的生物力学性能和其他特性,目前通过人工方法是难以企及的。通过基因工程的方法,将丝素蛋白片段与具备矿化能力的多肽融合,可大大增强材料本身的生物矿化能力,但同时也存在诸多缺陷。由于融合蛋白中只有末端的相关片段具有矿化能力,最终形成的复合材料难以均一,与天然骨组织中胶原纤维的全区域矿化相比差异较大。当前丝素/矿化相关片段融合蛋白通过生物硅化所形成的二氧化硅大多还是以纳米颗粒的形式存在,所形成复合材料的有机和无机相之间结合并不紧密,其力学性能也有待进一步验证。最后,由于是通过基因工程方法制备融合蛋白,当前高昂的成本也将成为其产业化的巨大制约因素。

丝素蛋白由氨基酸所组成,可进一步探索通过化学修饰某些氨基酸或者偶联其他分子提高其生物硅化能力,或者通过化学手段控制硅基材料在其表面的共价交联和沉积,都可能提高复合材料的力学性能并优化其生物学特性。由于丝素蛋白可组装成为不同形貌的纳米级材料,在不同组装方式下通过生物硅化所形成的复合材料的生物力学性能也需要进一步评估和优化。随着骨组织工程技术的飞速发展,除了物理和化学手段控制下的不同组装,通过三维打印方法将纳米级别的丝素蛋白/二氧化硅复合材料作为最小单元制备骨修复材料,可能成为一个新的研究方向。

#### 参考文献

1 袁凯. 丝素蛋白在组织工程中的应用和降解性研究. 医学研究杂志, 2011, 40(10): 153-155.

- 2 王宏昕, 李敏. 丝素蛋白作为组织工程生物材料的研究进展. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(2): 192-195.
- 3 周婵, 刘彬, 王介平, 等. 家蚕丝素蛋白在组织工程中的应用研究进展. 中国畜牧杂志, 2013, 49(23): 91-94.
- 4 孔令玲, 李延报. 丝素蛋白支架的制备及其在组织工程中的应用. 材料科学与工程学报, 2013, 31(4): 614-620.
- 5 Mottaghitlab F, Hosseinkhani H, Shokrgozar M A, *et al.* Silk as a potential candidate for bone tissue engineering. *J Control Release*, 2015, 215: 112-128.
- 6 谢敏凯, 徐月敏. 丝素蛋白材料在组织工程中的新进展. 中国组织工程研究, 2012, 16(43): 8105-8110.
- 7 陈艳雄, 陈敏, 朱谱新, 等. 丝素蛋白的研究和应用进展. 纺织科技进展, 2007, 2007(2): 13-18.
- 8 施李杨, 杨明英, 朱良均. 丝素蛋白生物材料在骨修复中的应用研究进展. 蚕业科学, 2013, 39(4): 812-819.
- 9 Yao D, Liu H, Fan Y. Silk scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(3): 238-245.
- 10 于同隐, 梅娜, 陈光, 等. 丝素蛋白在组织工程中的应用. 复旦学报: 自然科学版, 2003, 42(6): 828-832.
- 11 Nudelman F, Sommerdijk N A. Biom mineralization as an inspiration for materials chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(27): 6582-6596.
- 12 Sailaja G S, Ramesh P, Vellappally S, *et al.* Biomimetic approaches with smart interfaces for bone regeneration. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1): 77.
- 13 Melke J, Midha S, Ghosh S, *et al.* Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 2016, 31: 1-16.
- 14 王生杰, 蔡庆伟, 杜明轩, 等. 二氧化硅的仿生矿化. 化学进展, 2015, 27(2/3): 229-241.
- 15 Zhou Xianfeng, Zhang Nianli, Mankoci S, *et al.* Silicates in orthopedics and bone tissue engineering materials. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(7): 2090-2102.
- 16 程成, 邵正中, 陈新. 蚕丝蛋白与硅溶胶复合材料的研究. 高分子学报, 2008, 1(10): 974-978.
- 17 Hou A, Chen H. Preparation and characterization of silk/silica hybrid biomaterials by sol-gel crosslinking process. *Materials Science & Engineering B*, 2010, 167(2): 124-128.
- 18 徐水, 张胡静, 李雯静, 等. 丝素/纳米SiO<sub>2</sub>凝胶共混膜的制备及性能测试. 蚕业科学, 2011, 37(1): 82-87.
- 19 朱海霖, 吴斌伟, 冯新星, 等. 丝素蛋白/硅酸钙复合纳米纤维的结构与性能. 纺织学报, 2011, 32(6): 1-6.
- 20 Zhu Hailin, Wu Binwei, Feng Xinxing, *et al.* Preparation and characterization of bioactive mesoporous calcium silicate-silk fibroin composite films. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2011, 98(2): 330-341.
- 21 Kharlampieva E, Kozlovskaya V, Wallet B, *et al.* Co-cross-linking silk matrices with silica nanostructures for robust ultrathin nanocomposites. *ACS Nano*, 2010, 4(12): 7053-7063.
- 22 Mieszawska A J, Fourligas N, Georgakoudi I, *et al.* Osteoinductive silk-silica composite biomaterials for bone regeneration. *Biomaterials*, 2010, 31(34): 8902-8910.
- 23 Ghorbanian L, Emadi R, Razavi S M, *et al.* Fabrication and characterization of novel diopside/silk fibroin nanocomposite scaffolds for potential application in maxillofacial bone regeneration. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 275-280.

(下转第650页; *Continued on Page 650*)