

• 研究论文 •

## 桑蚕丝素蛋白初始结构对其矿化作用的影响

姚菊明<sup>\*,a</sup> 魏克民<sup>b</sup> 励 丽<sup>a</sup> 孔祥东<sup>c</sup> 祝永强<sup>b</sup> 林 凤<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> 浙江理工大学材料与纺织学院 教育部先进纺织材料与制备技术重点实验室 杭州 310018)

(<sup>b</sup> 浙江省中医药研究院 杭州 310007)

(<sup>c</sup> 浙江理工大学生命科学学院 杭州 310018)

**摘要** 以碱金属离子诱导桑蚕丝素蛋白溶液发生构象转变,研究了蛋白质初始结构对其矿化作用的影响. FT-IR, XRD 和 SEM 等测试结果显示,未经任何处理的桑蚕丝素蛋白溶液矿化后形成片状复合物,其无机相以二水磷酸氢钙(DCPD)为主;而经过 $K^+$ 和 $Na^+$ 金属离子处理后,桑蚕丝素溶液的结构由无规线团/螺旋构象向 $\beta$ -折叠发生转变,矿化后成纤维状,并相互结合呈现纳米级的三维多孔结构,其无机相以热力学稳定的羟基磷灰石(HA)为主. 可以认为,丝素蛋白结构转化为较伸展的 $\beta$ -折叠后,使得更多的亲水基团暴露在外面,在丝素蛋白分子不断凝聚成纤过程中,HA 结晶快速生长并附着在这些微纤上,最终形成纤维状的丝素蛋白/HA 复合物. 该结果为阐明蛋白质的生物矿化过程及其调控机理提供了理论依据,同时可以从矿化复合物的形成来反映这些微量元素可能对骨组织形成的影响,为临床骨组织的修复提供一定的参考.

**关键词** 桑蚕丝素; 碱金属离子; 磷酸钙; 羟基磷灰石; 生物矿化; 蛋白质结构

## Effect of Initial *Bombyx mori* Silk Fibroin Structure on the Protein Biomineralization

YAO, Ju-Ming<sup>\*,a</sup> WEI, Ke-Min<sup>b</sup> LI, Li<sup>a</sup> KONG, Xiang-Dong<sup>c</sup>

ZHU, Yong-Qiang<sup>b</sup> LIN, Feng<sup>a</sup>

(<sup>a</sup> The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology of Ministry of Education, College of Materials and Textile, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

(<sup>b</sup> Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007)

(<sup>c</sup> College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

**Abstract** In this study, we studied the effect of initial *Bombyx mori* silk fibroin structure on the protein biomineralization, where the structural transition was induced by the alkali metal ion treatment. The results from XRD, FTIR and SEM showed that the as-prepared composites formed from the silk fibroin without metal ion treatment had the sheet-like morphology, where the predominant inorganic phase was dicalcium phosphate dehydrate (DCPD). In contrast, the structural transition occurred in the silk fibroin, from random coil/helical structure to  $\beta$ -sheet, after the treatment of  $K^+$  and  $Na^+$  metal ions. The as-prepared composites had the fiber/rod-like morphology with the predominant inorganic phase of hydroxyapatite (HA), where the fibers/rods bundled together to form the nano-size, 3D porous network structure. It is thought that there were more hydrophilic groups with outside exposure on the extended  $\beta$ -sheet molecular chains, where HA crystals grew with the aggregation of silk fibroin, and further accreted onto the silk fibroin fibrils through the interaction with the hydrophilic groups. These results may provide some information on the protein biominerali-

\* E-mail: yaoj@zstu.edu.cn; Tel.: 0571-86843618; Fax: 0571-86843619.

Received November 16, 2006; revised January 4, 2007; accepted February 2, 2007.

国家自然科学基金(Nos. 20404011, 10672145)、浙江省自然科学基金(Nos. R404066, Y205468)、人事部留学回国人员择优资助项目以及教育部留学回国人员科研启动基金资助项目.

zation and its bio-molecular control. Moreover, the results may reflect the role of these trace elements to the bone formation, which are somewhat important for the bone repairing on clinical practice.

**Keywords** *Bombyx mori* silk fibroin; alkali metal ion; calcium phosphate; hydroxyapatite (HA); biomineralization; protein structure

体内骨组织是受细胞高度调节控制生长而成的生物矿化组织,由两大部分构成——有机质和无机质。成年人的有机质占 30%(主要是骨胶原纤维束),它作为骨的网状支架,赋予骨的弹性和韧性;无机质(主要是碱性磷酸钙结晶,另外还包括钾、钠、镁、锌等矿质元素)占 70%,决定骨骼的硬度及刚性特征。随着组织工程学的发展,国内外利用仿生自组装的概念,通过控制生物矿化过程,设计生物材料并将其用于骨组织的修复取得了较大的进步<sup>[1-5]</sup>。当前,国内外的相关模拟生物矿化及相关骨组织工程材料的研究中,选用的蛋白质大多为 I 型胶原蛋白,这是因为天然骨中 I 型胶原蛋白是含量最多的有机基质<sup>[2,3]</sup>。作为天然骨的成分,胶原蛋白虽然具有一定的优势,但它也有自身劣势。首先,目前骨材料中选用的胶原蛋白的提纯工艺复杂,低纯度胶原则容易引起炎症反应等问题;其次,目前临床应用的胶原蛋白多半从牛筋和牛皮等动物组织中萃取,但随着疯牛病及其人类变种——“克雅氏症”(Creutzfeldt-jakob disease)的出现,人们开始担心牛胶原蛋白及其衍生物可能会受到污染。因此,利用胶原以外的有机基质作为调制生物矿化的模板可能是一条理想的途径。

桑蚕丝素蛋白来源丰富,除了被用于传统的纺织原料外,由于其优越的力学性能和相对良好的生体适应性,易降解且降解产物易被人体吸收而不产生炎症反应等优点,近年来,以其为基材的各种细胞生长支架材料的研究应运而生,成为组织工程学中的一个热门研究领域<sup>[4-6]</sup>。孔祥东等<sup>[5,7]</sup>曾以天然桑蚕丝蛋白为模板研究了其对磷酸钙晶体生长的调控作用,发现丝蛋白在近中性条件下可以促进无定型磷酸钙向稳定的羟基磷灰石 [HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] 晶体转变,结晶附着在丝蛋白分子上形成长短不一的矿化复合纤维,显示了丝蛋白有发生不同层次矿化复合纤维形成的能力。然而,蛋白质生物矿化过程及其调控机理有待进一步研究。本文报道了桑蚕丝素蛋白初始结构对其矿化作用的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

桑蚕茧由湖州市农业科学研究院提供。 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , LiBr, KCl, NaCl,  $\text{CaCl}_2$  及  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  等购自杭州汇普化工

仪器有限公司,均为分析纯。

### 1.2 样品的制备

将桑蚕茧去蛹并剥成片状后,放入含 0.5%  $w(\text{Na}_2\text{CO}_3) : w(\text{H}_2\text{O})$  的沸水中进行脱胶处理,蚕茧与水溶液的质量比约为 1 : 100。30 min 后,将已成纤维状的蚕茧捞出拧干,并用去离子水清洗。重复上述操作 2 次,并在室温下自然晾干后得脱胶桑蚕丝(即丝素蛋白)。在 40 °C 条件下,将上述桑蚕丝溶解于 9 mol/L 的 LiBr 溶液中,离心去除部分不溶性固体状物质后,在去离子水中透析 3 d 以去除溶液中的盐离子,得丝素蛋白溶液(SF),经紫外分光光度计(BECKMAN DU530 DNA/Protein Analyzer)测定,其蛋白质浓度为 1.75%。将装有 10 mL 丝素溶液的透析袋浸没于 100 mL 含 KCl 和 NaCl 的混合去离子水溶液(盐浓度均为 1 mol/L)中,24 h 后取出丝素溶液并盛放于烧杯中,依次缓慢滴加浓度为 0.2 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液和 0.2 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液,并用磁力搅拌器不断搅拌,使  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{PO}_4^{3-}$  的终浓度达到 0.05 和 0.025 mol/L 后,调节 pH 至 7.4。将上述体系静置,待上下分层后离心除去上清,得到的沉淀用去离子水洗涤除去多余的盐分后,放入真空干燥箱中干燥(40~45 °C)得桑蚕丝素蛋白/磷酸钙复合材料。以同样的方法制备未经  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  处理的样品作对照。

### 1.3 材料的分析测定

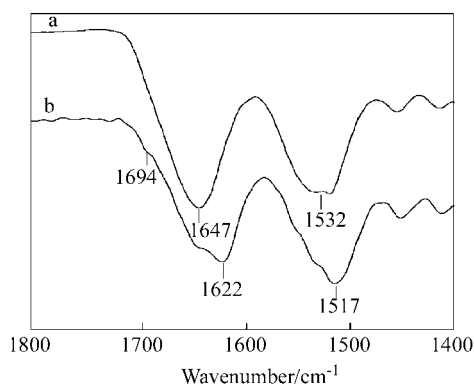
将干燥后的不同样品研磨成粉末,FTIR 采用美国热高公司的 Nicolet5700 型傅立叶红外光谱仪,样品与 KBr 的质量比控制为 1 : 20,扫描次数 32 次,分辨率  $2 \text{ cm}^{-1}$ ,扫描范围为  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。XRD 分析采用日本理学电机株式会社的 Rigaku D/max 2550PC 型阳极 X 射线衍射仪,管电压为 40 kV,管电流为 200 mA,靶材为 Cu ( $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ),衍射角范围为  $3^\circ \sim 70^\circ$ ,并采用美国 MDI 公司的 JADE 6.5 分析软件对图谱进行分析计算。SEM 采用日本日立公司的 Hitachi cold-field emission SEM S-4700-II 型,电压为 10 kV,放大倍数为 100 k,分辨率为 1.5 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{K}^+$ 和 $\text{Na}^+$ 金属离子处理前后的丝素蛋白 FTIR 光谱

图 1 为经  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  金属离子处理前后丝素蛋白膜

的红外光谱. 在未经  $K^+$  和  $Na^+$  处理的丝素蛋白膜中(谱图 a), 其酰胺 I 区是一个以  $1647\text{ cm}^{-1}$  为中心的对称峰, 与丝素蛋白成纤前的谱图相一致, 对应于无规线团/螺旋构象<sup>[8,9]</sup>. 但丝素蛋白溶液在碱金属盐溶液的诱导下, 其红外光谱发生了明显的变化.  $1647\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰向  $1622\text{ cm}^{-1}$  移动, 并且在  $1694\text{ cm}^{-1}$  处出现了新的吸收峰(谱图 b). 根据文献[8~10]所述, 在  $1622\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰归属于  $\beta$ -折叠构象, 而  $1694\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰可以归属于和  $\beta$ -折叠构象相关的转角结构. 同样的结果可以从酰胺 II 区得到, 经  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理后,  $1532\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰明显减小, 而  $1517\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰得到增强, 显示了丝素蛋白结构从无规线团/螺旋构象向  $\beta$ -折叠的转变<sup>[11,12]</sup>. 因此, 通过对丝素蛋白溶液进行碱金属离子的处理, 可以引起其结构发生转变.

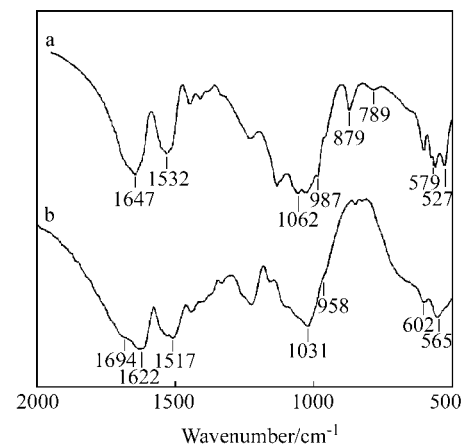


**图 1**  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理前后丝素蛋白的 FTIR 光谱图  
**Figure 1** FTIR spectra of *B.mori* silk fibroin with/without  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment  
 (a) without  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment; (b) with  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment

## 2.2 经不同处理丝素蛋白矿化后的 FTIR 光谱

图 2 是经过不同处理后丝素蛋白矿化后的 FTIR 光谱图. 谱图 a 显示, 纯丝素蛋白矿化后的无机相以二水磷酸氢钙(DCPD,  $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ )为主, DCPD 是天然骨骼组织中一种 HA 的前驱体. 其中,  $1062\text{ cm}^{-1}$  处的峰可归属于  $PO_3$  的对称伸缩振动, 而  $987\text{ cm}^{-1}$  处的峰归属于 P—OH 的伸缩振动, 两者均来自于 DCPD 中的  $HPO_4^{2-}$  基团. 通过与纯 HA 的谱图进行比较后发现<sup>[13]</sup>, 无机相中同样含有 HA. 其中,  $1031$  和  $958\text{ cm}^{-1}$  处的峰归属于 P—O 的伸缩振动, 而  $602$  和  $565\text{ cm}^{-1}$  对应于 O—P—O 的弯曲振动, 可以认为, 两者均来自于 HA 的  $PO_4^{3-}$  基团<sup>[13,14]</sup>. 谱图中,  $879\text{ cm}^{-1}$  处的峰归属于  $CO_3^{2-}$  基团上的 C—O 伸缩振动, 这主要是由于在样品制备过程中, 不断搅拌使得空气中有部分  $CO_2$  溶解于体系所造成的. 另外,  $527$ ,  $579$  和  $789\text{ cm}^{-1}$  三个峰的归属, 还未见文献报

道, 但我们认为, 可以归属于  $HPO_4^{2-}$  基团中的某些振动, 因为它们并不在 HA 的谱图中出现. 然而, 丝素蛋白经  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理并矿化后的 FTIR 光谱(谱图 b)显示,  $1031$ ,  $602$  和  $565\text{ cm}^{-1}$  等处的吸收峰明显增强, 而  $1062$  和  $987\text{ cm}^{-1}$  等处的峰减弱甚至消失, 说明其无机相以 HA 为主.



**图 2** 经不同处理丝素蛋白矿化后的 FTIR 光谱图  
**Figure 2** FTIR spectra of biom mineralized *B.mori* silk fibroin with different treatments  
 (a) without  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment; (b) with  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment

另一方面, 从 FTIR 光谱中酰胺 I 区和 II 区各吸收峰的位置变化可以看出, 纯丝素矿化后的丝素蛋白仍然处于无规线团/螺旋构象, 而经  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理并矿化后的丝素蛋白以  $\beta$ -折叠的形式存在. 同样的结果可以从酰胺 III 区和 V 区得到.  $1230$  和  $664\text{ cm}^{-1}$  通常是丝素蛋白处于无规线团/螺旋构象的特征吸收,  $1239$  和  $702\text{ cm}^{-1}$  则是其形成  $\beta$ -折叠后的特征吸收.

## 2.3 经不同处理丝素蛋白矿化后的 XRD 衍射图

图 3 为纯丝素和经  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理丝素蛋白矿化后的 XRD 谱. 根据各衍射峰位置与 ICDD 标准卡片对照后可知, (020), (121) 和 (112) 等均为 DCPD 的特征衍射峰(标准卡片号: JCPDS 72-1240), 而 (002), (211) 和 (004) 为 HA 的特征衍射峰(标准卡片号: JCPDS 09-0432). 在纯丝素矿化后, 其主要晶相为 DCPD, 同时有少量的 HA 晶体, 这与 FTIR 结果相符. 但  $K^+$  和  $Na^+$  处理的丝素矿化后, XRD 谱图上显示的磷酸钙盐只有 HA, 而且其峰形尖锐, 说明有晶体结构较完善的 HA 生成. 可以认为, 这与其矿化前蛋白质的结构有关, 经过  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理后的丝素结构由无规线团/螺旋构象转化为较伸展的  $\beta$ -折叠, 使更多的亲水基团暴露在外面, 并与磷酸钙盐(主要是 DCPD)相结合, 加速了 DCPD 向 HA 的转化, 并形成了稳定的丝素蛋白/HA 复合物. 在表 1

中, 通过比较  $K^+$  和  $Na^+$  离子处理丝素并矿化得到矿化复合物中的 HA 与纯 HA 的结晶参数后发现, 尽管两者的晶格参数无明显区别, 但前者的结晶明显大于后者, 而且相对于  $a$  轴方向,  $c$  轴方向的差异更明显. 这说明, 在  $K^+$  和  $Na^+$  处理后的丝素蛋白不仅能够促进 HA 结晶的生长, 而且结晶的生长具有各向异性, 在  $c$  轴方向上具有高度择优性取向的能力.

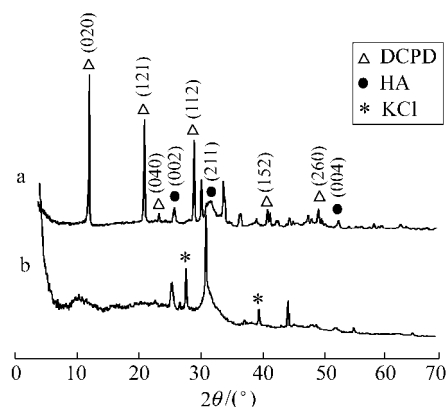


图3 经不同处理丝素蛋白矿化后的 XRD 衍射图

Figure 3 XRD diffraction patterns of biom mineralized *B.mori* silk fibroin with different treatments

(a) without  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment; (b) with  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment

表1 HA 结晶的晶体大小和晶格参数

Table 1 Crystal size and crystallographic parameters of HA crystals

样品	$L_c^a/nm$	$L_a^a/nm$	$L_c/L_a$	$a/\text{Å}$	$c/\text{Å}$
纯 HA <sup>b</sup>	52	38	1.37	9.408	6.876
KNa-HA <sup>c</sup>	202	78	2.59	9.412	6.867

<sup>a</sup>  $L_c$  和  $L_a$  分别表示  $c$  轴和  $a$  轴方向的结晶大小; <sup>b</sup> 数据来自于国际粉晶衍射数据中心(ICDD)标准卡(JCPDS 09-432); <sup>c</sup> KNa-HA 指经  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理丝素蛋白矿化后的 HA.

## 2.4 经不同处理丝素蛋白矿化后的 SEM 分析

图 4 为纯丝素和经  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理丝素蛋白矿化后的 SEM 照片. 纯丝素蛋白矿化(图 4a)后以片状晶体的形态存在. 上述 FTIR 结果显示, 纯丝素蛋白矿化后, 其结构变化较小, 基本上仍以无规线团/螺旋构象为主, 因此, 丝素蛋白没有形成纤维状, 而且分布不均匀. 而经  $K^+$  和  $Na^+$  处理的丝素矿化后呈纤维状(图 4b), 纤维直径约为 20~30 nm, 并且相互结合成三维多孔结构, 分布比较均匀, 形成的空隙大小也为纳米级范围. 这种微观结构对该材料在组织工程中的应用非常重要, 因为在组织培养过程中, 细胞较易进入空隙并均匀分布, 有利于细胞的粘附和增殖<sup>[15]</sup>. 可以认为, 这种结构的形成与丝素蛋白的初始结构密切相关. 在纯丝素蛋白

溶液中, 由于大多数的亲水性基团被包覆在分子内部, 限制了蛋白质与磷酸钙盐的结合, 从而限制了 HA 的形成, 因此, 无机相以 DCPD 为主; 而经过  $K^+$  和  $Na^+$  金属离子处理后, 丝素蛋白结构由无规线团/螺旋构象转化为较伸展的  $\beta$ -折叠, 使更多的亲水基团暴露在外面, 丝素蛋白分子不断自我凝聚成微纤, HA 结晶则通过与这些亲水性基团相结合而附着在微纤上, 并且随着微纤的形成而不断生长, 最终形成纤维状的丝素蛋白/HA 复合物.

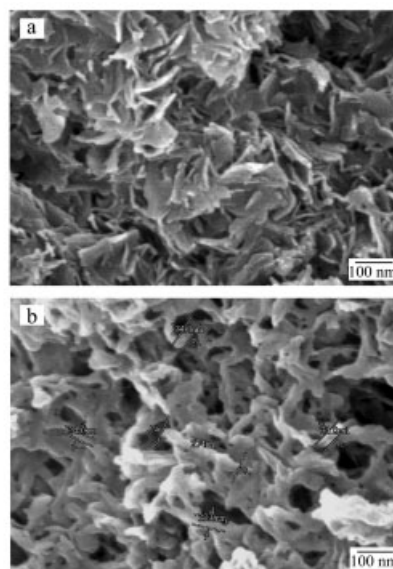


图4 经不同处理丝素蛋白矿化后的 SEM 照片

Figure 4 SEM pictures of biom mineralized *B.mori* silk fibroin with different treatments

(a) without  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment; (b) with  $K^+$  and  $Na^+$  metallic ion treatment

## 3 结论

羟基磷灰石(HA)由于和动物体组织的相容性好, 无生物毒性, 且其与人体骨组织具有相同的钙磷比, 使其具有很好的补钙效果等特点, 因此已经广泛应用于生物硬组织的修复和替换材料. 本文利用 FT-IR 和 XRD 等手段, 对具有不同初始蛋白质结构的桑蚕丝素/磷酸钙复合材料的形成进行了分析后发现, 当丝素蛋白的初始结构为  $\beta$ -折叠时, 有利于促进矿化过程中无机相中钙盐转变为热力学稳定的 HA; SEM 观察发现, 矿化后的丝素纤维形成纳米级的三维多孔结构, 这种结构对其在组织工程中的应用非常重要, 因为在组织培养过程中, 细胞较易进入空隙并均匀分布, 有利于细胞的粘附和增殖.

## References

- 1 Stupp, S. I.; Braun, P. V. *Science* **1997**, *277*, 1242.
- 2 Kikuchi, M.; Itoh, S.; Ichinose, S.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1705.
- 3 Zhang, W.; Liao, S. S.; Cui, F. Z. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3221.
- 4 Sofia, S.; McCarthy, M. B.; Gronowicz, G.; Kaplan, D. L. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54*, 139.
- 5 Kong, X. D.; Cui, F. Z.; Wang, X. M.; Zhang, M.; Zhang, W. *J. Cryst. Growth* **2004**, *270*, 197.
- 6 Yao, J.-M.; Asakura, T. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Eds.: Wnek, G. E.; Bowlin, G. L., New York, Marcel Dekker, Inc., **2004**, pp. 1363~1370.
- 7 Kong, X. D.; Wang, X. M.; Yu, X.; Cui, F. Z. *Key Eng. Mater.* **2005**, 288~289, 191.
- 8 Chen, X.; Shao, Z.-Z.; Knight, D. P.; Vollrath, F. *Acta Chim. Sinica* **2002**, *60*, 2203 (in Chinese).  
(陈新, 邵正中, Knight D. P., Vollrath F., *化学学报*, **2002**, *60*, 2203.)
- 9 Wilson, D.; Valuzzi, R.; Kaplan, D. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 2690.
- 10 Simonetti, M.; Di Bello, C. *Biopolymers* **2001**, *62*, 95.
- 11 Ha, W. S.; Oh, S. K.; Kim, J. H.; Kim, K. Y. *Sen-I Gakkai-shi* **1987**, *43*, 587.
- 12 Zhou, L.; Chen, X.; Shao, Z.-Z.; Huang, Y.-F.; Knight, D. P. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16937.
- 13 Wang, L.; Nemoto, R.; Sna, M. *J. Nanopart. Res.* **2002**, *4*, 535.
- 14 Glimcher, M. J.; Bonar, L. C.; Grynepas, M. D.; Landis, W. J.; Roufosse, A. H. *J. Cryst. Growth* **1981**, *53*, 100.
- 15 Sepulveda, P.; Binner, J. G. P.; Rogero, S. O.; Higa, O. Z.; Bressiani, J. C. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 27.

(A0611166 QIN, X. Q.; LING, J.)