

γ 射线降解丝素蛋白的生物相容性研究

金洵宇^{1,2} 董朝飞³ 刘星¹ 刘雨^{2,3} 王大朋¹ 宗春燕¹ 张鹤美¹

赵华¹ 刘建¹ 冯晓青¹ 银华^{2,3} 安艳^{1,2}

¹ (苏州大学医学部公共卫生学院 苏州 215123)

² (苏州大学现代丝绸国家工程实验室 苏州 215123)

³ (苏州大学纺织与服装工程学院 苏州 215006)

摘要 丝素蛋白膜,经不同剂量(25、50、100和200 kGy) γ 射线照射后植入SD大鼠皮下,植入后第7、14、28、56和84天剖杀取材,进行生化检测。对植入丝素蛋白部位的皮下组织进行病理检查,通过ELISA法检测丝素蛋白植入后的大鼠血清中IL-6和TNF- α 含量,取出植入后的丝素蛋白称重,计算质量减少率并绘制质量减少曲线。病理观察及IL-6、TNF- α 含量检测结果均提示,丝素蛋白的植入并未引起明显的炎症反应。随着植入时间延长,高剂量组辐照的丝素蛋白质量明显减少。推测 γ 射线辐照不显著改变丝素蛋白良好生物相容性,可促进丝素蛋白在大鼠体内的降解。

关键词 γ 射线,丝素蛋白,生物相容性,生物降解

中图分类号 R114, R33, TQ316

丝素蛋白由于其良好的生物相容性和优良的物理化学性质,长期以来作为医用生物材料备受人们的青睐。然而由于丝素蛋白在植入体内60 d后,大部分的机械性能未丧失,美国药典将其归为不可降解的生物材料^[1]。丝素蛋白作为医用生物材料,应用需求对其降解性要求不同,植入体内作为支架,需要具有较好的生物降解性。生物降解材料的应用也在一定程度上缓解植入对象对植入物的紧张情绪。然而,对改善丝素蛋白生物降解性的研究至今少有报道,使其应用受到限制。研究表明,200 kGy以内 γ 射线照射对丝素蛋白的分子结构无明显影响^[2],并且 γ 射线辐照可改善材料生物降解性能^[3]。照射后的丝素蛋白二级结构不发生改变的同时,体外试验的生物相容性也表现良好^[4]。因此本研究拟通过动物实验,进一步研究 γ 射线照射对丝素蛋白生物相容性及生物降解性的影响。

1 实验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 将生丝用Na₂CO₃脱胶后,溶解于CaCl₂:C₂H₆O:H₂O=1:2:8的三原溶液,装入纤维素膜的透析袋中,置于去离子水中透析4 d,过滤后延

流法于60℃成膜。制得的丝素蛋白膜置于85%的酒精中2 h,使其成为不溶性的丝素蛋白膜^[5]。制成直径1 cm²的受试品,并予以25–200 kGy剂量的 γ 射线照射,在苏州大学辐照中心实施。

1.1.2 实验动物 SD大鼠75只,雄性,体重200 g以上,适应性喂养7 d,饲养条件为清洁级。实验期间在清洁级环境下,正常饮水、饮食和昼夜节律继续饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 丝素蛋白皮下植入 将75只雄性SD大鼠随机分为空白对照组(假手术组)、25、50、100及200 kGy照射组。每剂量组及处理时间点取3只实验动物。使用10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,沿动物背部脊柱中线两侧选取3点,各相距3 cm,切开皮肤,做3个切口,至浅筋膜,用钝器解剖法在皮肤切口部位制备皮下囊,囊底部与皮肤切口相距10 mm,每个囊内植入一个受试物,受试物之间不相互接触^[6,7]。植入后缝合。观察术后实验动物恢复情况,并及时给伤口消毒。于术后7、14、28、56和84 d采集动物植入部位皮肤,用以制作病理切片,观察丝素蛋白在皮下的降解情况,并取静脉血,3000 r/min离心5 min,分离血清,于-80℃保存,

苏州大学现代丝绸国家工程实验室开放课题(SS115801)、江苏省放射医学与防护重点实验室开放课题(KJS0927)资助

第一作者:金洵宇,女,1988年4月出生,2010年毕业于南通大学预防医学专业,现为苏州大学卫生毒理学硕士研究生

通讯作者:安艳, E-mail: dranyan@126.com

收稿日期:初稿2012-07-17,修回2012-09-08

用于后续试验。

1.2.2 病理切片观察丝素蛋白植入部位组织情况 将取得的组织用多聚甲醛固定 24 h 后,进行石蜡包埋切片,HE 染色后,镜下观察组织情况。

1.2.3 IL-6 及 TNF- α 在体内的分泌情况 将试剂在室温下平衡 30 min,同时解冻血清样品,配制标准曲线,在包被有 IL-6 和 TNF- α 单抗的微孔板中,严格按照说明书要求加样,加样后,于 37℃ 水浴中温浴 30 min,用稀释后的洗涤液漂洗微孔板,弃去液体并甩干,重复 5 次,拍干,加入酶标试剂(空白孔不加),37℃ 温浴 30 min。弃去液体后洗涤过程如前。先后加入显色剂 A、B,避光显色 15 min 后终止。于酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度值。

1.2.4 丝素蛋白膜质量减少测定 处死动物后剪开背部皮肤,取出植入物,分离组织与植入物之间的粘连,清洗植入物,并烘干,用分析天平称量,与植入前质量比较,计算丝素蛋白膜的质量减少率,具体见下式^[8,9]。

$$\text{质量减少率} = \frac{\text{植入前质量} - \text{植入后质量}}{\text{植入前质量}} \times 100\%$$

1.2.5 数据分析 数据均使用 SPSS17.0 进行分析,IL-6 及 TNF- α 测定值以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,使用单因素方差分析,方差不齐的经对数转换后进行分析。

2 结果及分析

2.1 动物一般情况

手术后,实验动物精神恢复良好,活动力及饮

食、饮水均正常,体重增加符合规律。术后伤口未见明显红肿,愈合良好,试验期间未出现动物死亡。

2.2 病理检查

丝素蛋白膜植入 7 d 后,植入部位出现巨噬细胞及少量的淋巴细胞和中性粒细胞浸润,有少量的炎性渗出,丝素蛋白膜与组织之间尚未形成粘连,可轻易地剥离。植入后 14 d,丝素蛋白膜与组织之间粘连增加,淋巴细胞与中性粒细胞浸润减少,主要以巨噬细胞浸润,部分标本有炎性渗出表现。丝素蛋白膜表面尚光整,未见明显破裂。植入后 28 d,丝素蛋白膜与组织之间有明显粘连,并且经 100 kGy 及 200 kGy γ 射线照射的丝素蛋白,已被组织穿透或包绕,组织未见炎性渗出,以巨噬细胞浸润为主,仅有少量的中性粒细胞和淋巴细胞。植入 56 d 后,炎症消退,无中性粒细胞和淋巴细胞浸润,巨噬细胞数量也较少。随受照剂量增加,丝素蛋白膜的断裂程度也随之增加。植入后 84 d,无炎症反应,病理切片与假手术组的状况基本一致,100 kGy 和 200 kGy 照射组,材料裂痕明显,成断裂碎片,并被组织包绕。

2.3 IL-6 及 TNF- α 分泌情况

各丝素蛋白膜受照剂量组之间,IL-6 和 TNF- α 分泌没有显著性差异(见表 1 和表 2),说明不同剂量组的受照丝素蛋白引起的急性期炎症反应情况基本一致,与假手术组(Blank)比较,可以发现丝素蛋白并未引起明显炎症反应($p > 0.05$)。

Table 1 IL-6 secretion in different periods of SD rats after implanted silk fibroin films irradiated by γ -rays with different doses ($n=3$), $p > 0.05$

Time / d	Dose / Gy				
	Blank	25	50	100	200
7	53.35±9.18	40.93±3.43	54.19±0.54	41.95±14.12	50.78±2.74
14	48.05±8.52	47.54±11.70	43.26±4.06	41.75±4.18	47.51±1.63
28	46.19±4.61	41.78±5.82	49.62±6.16	57.29±12.53	45.51±0.98
56	53.81±3.29	50.72±5.13	41.44±14.15	40.13±0.32	50.59±7.90
84	59.07±1.7	56.19±12.03	48.18±3.46	50.13±5.05	39.41±7.95

Table 2 TNF- α secretion in different periods of SD rats after implanted silk fibroin films irradiated by γ -rays with different doses ($n=3$), $p > 0.05$

Time / d	Dose / Gy				
	Blank	25	50	100	200
7	143.00±21.10	130.63±20.58	122.03±5.55	130.63±15.63	147.04±0.86
14	128.15±10.24	124.63±12.50	133.23±12.76	148.08±23.18	111.08±15.98
28	127.50±21.97	122.29±14.93	159.16±2.34	148.08±11.29	163.45±2.60
56	127.50±20.58	147.56±16.32	126.98±12.33	129.84±7.12	129.45±19.88
84	156.55±22.06	137.14±18.75	149.65±13.89	142.48±7.20	146.58±15.93

2.4 丝素蛋白膜质量减少情况

丝素蛋白膜辐照不同剂量样品植入前后质量差异如图 1 所示。丝素蛋白膜的质量随植入时间增加而不断减少, 并表现出随丝素蛋白受照剂量增加, 不同时间点高剂量组的质量减少量明显高于较低剂量组 ($p<0.05$)。

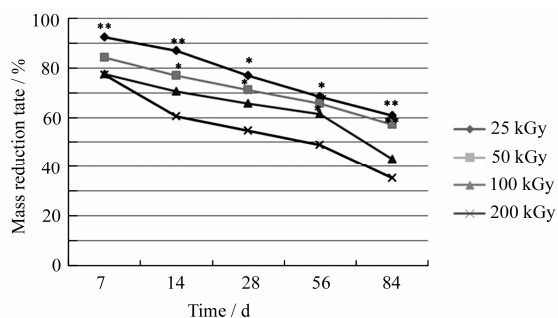


Fig.1 Mass reduction of silk fibroin irradiated by γ -rays with different doses after subcutaneous implantation ($n=6$).

**, compared with 100 kGy and 200 kGy, $p<0.05$; *, compared with 200 kGy, $p<0.05$

3 讨论

皮下植入实验是评价生物材料体内生物相容性和降解性的一种常用方法, 可以从动物整体上反映生物材料的相容性及降解情况。通过病理切片, 可直接观察植入部位组织以及材料在生物体内的变化。近年来, 利用细胞因子评价生物材料的生物相容性被认为是可信度较高, 准确性较好的方法。各类研究报道选择的细胞因子种类不一, 但 IL-6 和 TNF- α 已成为最常用并且被确认可以准确评价生物材料相容性的细胞因子^[9]。

本研究在各辐照组丝素蛋白膜植入后的各个时间点取样, 病理结果显示, 随着植入时间的延长, 动物植入部位的炎症表现减弱, 植入物周围并未出现明显的肉芽肿及纤维化组织, 各组恢复情况未出现明显差异, 这与 Pra 等^[10]和 Panilaitis 等^[11]的研究结果相似。细胞因子在评价生物相容性方面比病理结果更加客观、敏感。本实验中, 各组各时间点 IL-6 和 TNF- α 的改变没有显著性差异, 说明丝素蛋白引起的炎症反应并不明显。但是本实验结果标准差偏大, 可能是由于每组动物数量较少。因此, 细胞因子的变化需在今后实验中进一步确认。

γ 射线作为一种消毒灭菌方式, 利用其对材料化学键的破坏, 加速材料降解^[12,13]。实验中, 经 γ 射线照射的丝素蛋白膜, 其降解率随吸收剂量的增大有所提高, 这可能是由于辐照后丝素蛋白内部化学键受到破坏, 从而使其机械能和抗拉伸能力受到

影响^[14], 加速其在体内的断裂, 使得其植入体内后更容易被吸收, 从而减少了生物降解的时间。

本研究结果表明丝素蛋白经过小于 200 kGy γ 射线照射后, 病理观察植入部位组织未引起明显的炎症反应。随受照剂量的增加, 丝素蛋白膜在体内生物降解速度呈现加快趋势。因此, γ 射线在不改变丝素蛋白良好生物相容性的同时, 可促进其在体内的生物降解作用。

参考文献

- 1 卢神州. 丝素蛋白材料的生物学性能[J]. 丝绸, 2007, 12: 58-62
LU Shenzhou. Biological properties of fibroin material [J]. Silk Monthly, 2007, 12: 58-62
- 2 JIN Huanyu, YIN hua, LIU Yu, *et al.* The effect of γ -rays on the mechanical and molecular structure changes of silk fibroin [J]. Advanced Materials Research, 2012, 502: 269-272
- 3 金洄宇, 银华, 安艳. 辐射技术在医用生物材料领域中的应用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2011, 29(5): 260-264
JIN Huanyu, YIN hua, AN Yan. The application of radiation technology in the field of medical biomaterials [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2011, 29(5): 260-264
- 4 金洄宇, 董朝飞, 刘星. 对不同剂量 γ 射线处理后的丝素蛋白生物相容性的研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2012, 30(6): 365-369
JIN Huanyu, DONG Chaofei, LIU Xing. Study on the biocompatibility of silk fibroin irradiated with different absorbed doses of γ -rays [J]. J Radiat Res Radiat Process, 2012, 30(6): 365-369
- 5 ZHENG Zhonghou, WEI Yanqiong, YAN Shuqin, *et al.* Preparation of regenerated antheraea yamamai silk fibroin film and controlled-molecular conformation changes by aqueous ethanol treatment [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 116(1): 461-467
- 6 陈敏, 廖隆理, 但卫华. 3D-SC 人工皮肤材料体内降解实验研究[J]. 生物医学工程与临床, 2005, 9(1): 1-3
CHEN Min, LIAO Longli, DAN Weihua. Research on degradation of 3D-SC artificial skin material in vivo [J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2005, 9(1): 1-3
- 7 LIN Teng, LU Chuanhua, ZHU Ligen, *et al.* The Biodegradation of Zein in vitro and in vivo and its application in implants [J]. American Association of Pharmaceutical Scientists, 2011, 12(1): 172-176

- 8 刘勇, 王臻, 林开利. α -硅酸钙和 β -硅酸钙的体外体内降解性研究[J]. 科学技术与工程, 2009, **9**(10): 2569-2573
LIU Yong, WANG Zhen, LIN Kaili. Comparative study the degradation of α -CaSiO₃ and β -CaSiO₃ bioactive bio-ceramics in vivo and in vitro [J]. Science Technology and Engineering, 2009, **9**(10): 2569-2573
- 9 薛兰芬, 赵天然. 联合检测白细胞介素 IL-8、肿瘤坏死因子 TNF- α 评价透析膜生物相容性[J]. 临床荟萃, 2007, **22**(6): 411-413
XUE Lanfen, ZHAO Tianran. Joint detection of IL-8 and TNF- α to evaluate biocompatibility of dialyze film [J]. Clinical Focus, 2007, **22**(6): 411-413
- 10 Pra I D, Freddi G, Minic J, *et al.* De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin non-woven materials [J]. Biomaterials, 2005, **26**(14): 1987-1999
- 11 Panilaitis B, Altman G H, Chen Jingsong, *et al.* Macrophage responses to silk [J]. Biomaterials, 2003, **24**(18): 3079-3085
- 12 Simmons A, Hyvarinen J, Poole-Warren L, *et al.* The effect of sterilisation on a poly (dimethylsiloxane) /poly (hexamethylene oxide) mixed macrodiol-based polyurethane elastomer [J]. Biomaterials, 2006, **27**(25): 4484-4497
- 13 Kojthung A, Meesilpa P, Sudatis B, *et al.* Effects of gamma radiation on biodegradation of Bombyx mori silk fibroin [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, **62**(4): 487-490
- 14 秦廷武, 杨志明, 张姝江. 不同灭菌法对组织工程支架降解性和力学特性的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, **24**(12): 747-749
QIN Tingwu, YANG Zhiming, ZHANG Shujian. Effect of different sterilization techniques on degradation and mechanical properties of tissue engineering scaffolds [J]. China Physical Medicine and Rehabilitation, 2002, **24**(12): 747-749

Study on biocompatibility and biodegradation of silk fibroin degraded by γ -rays *in vivo*

JIN Huanyu^{1,2} DONG Chaofei³ LIU Xing¹ LIU Yu^{2,3} WANG Dapeng¹ ZONG Chunyan¹
ZHANG Hemei¹ ZHAO Hua¹ LIU Jian¹ FENG Xiaoqing¹ YIN Hua^{2,3} AN Yan^{1,2}

¹(School of Public Health, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

²(National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou 215123, China)

³(College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou 215006, China)

ABSTRACT Silk fibroin films irradiated by γ -rays with different doses (25, 50, 100, and 200 kGy) were implanted subcutaneously into SD rats. On the different dates (7th, 14th, 28th, 56th, and 84th day) after surgery, the rats were given euthanasia and the serum and tissue where the silk fibroin implanted were taken for further pathology tests and the concentration of IL-6 and TNF- α in the serum was also measured. The pathology results and the secretion of IL-6 & TNF- α showed that the silk fibroin did not induce significant immune reactions. The biodegradation rate increased more significantly with the increment of the absorbed doses and implantation time. In conclusion, γ -rays irradiation could increase the biodegradation rate of silk fibroin and almost could not change its biocompatibility.

KEYWORDS γ -rays, Silk fibroin, Biocompatibility, Biodegradation

CLC R114, R33, TQ316