

对不同剂量 γ 射线处理后丝素蛋白生物相容性的研究

金洵宇^{1,2} 董朝飞³ 刘星¹ 刘雨^{2,3} 王大朋¹

刘建¹ 姜秉成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 为探讨 γ 射线对丝素蛋白生物相容性的影响, 用不同剂量 (0、25、50、100 和 200 kGy) γ 射线对丝素蛋白进行辐照, 通过检测丝素蛋白结构变化、细胞增殖活力、细胞毒性以及溶血性检验, 探索不同剂量 γ 射线处理对丝素蛋白生物相容性的影响。结果表明: 在本实验所设定的剂量范围内, γ 射线辐照对丝素蛋白结构影响不明显, 照射后丝素蛋白对细胞增殖活力的影响较小, 浸提液对细胞无明显毒性, 丝素蛋白材料及其浸提液的血液相容性良好。结论是, 在 0—200 kGy 剂量范围内, γ 射线辐照对丝素蛋白结构及其生物相容性影响均不明显。

关键词 丝素蛋白, γ 射线, 结构改变, 生物相容性

中图分类号 R114, R33, TQ316

丝素蛋白因其良好的物理化学性质, 较强的机械性能以及良好的生物相容性, 长期以来都用于外科手术缝合, 然而, 其功用已不再局限于此。近年来, 还出现了以丝素为原料的组织工程材料, 如骨修复材料、人工血管、微胶囊、人工皮肤、尿道缺损的修复材料、创面敷料以及人工肌腱韧带等^[1,2]。丝素蛋白尽管应用广泛, 但仍然存在不足之处, 在一些敏感人群中, 丝素蛋白的使用会引起一些过敏症状。因此, 改善丝素蛋白的生物相容性, 已成为近年来研究热点之一。本研究使用 0—200 kGy 剂量范围内的 γ 射线对材料进行辐照处理, 考察不同剂量 γ 辐照对丝素蛋白生物相容性的影响。

1 实验材料和方法

1.1 材料

SD 乳鼠 5 只 (出生 1—3 d), DMEM/F12 培养基 (Wisent 公司); 胎牛血清 (Wisent 公司); 0.25% 胰酶 (Sigma 公司); 培养皿, 培养瓶, 24 孔板和 96 孔板 (Corning 公司); CCK-8 试剂盒 (碧云天公司)。丝素蛋白膜制备, 家蚕生丝经 Na_2CO_3 脱胶后, 用 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_6\text{O} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 2 : 8$ 三原溶液溶解, 装入纤维素膜袋中, 用去离子水透析 4 d, 滤去杂质后, 使用延流法在聚苯乙烯板于室温下干燥成膜。制得

的丝素蛋白膜放入 85% 的酒精中 2 h, 使其成为不溶性的丝素蛋白膜^[3]。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠真皮细胞原代培养及传代 SD 乳鼠颈椎脱臼处死后, 于 75% 酒精中消毒 5 min, 将乳鼠移入玻璃平皿中, 剪下背部皮肤, 剔除皮下组织 (血管、脂肪等), 使用无菌 PBS 清洗 3 遍后, 剪成 3 mm×5 mm 的皮片, 放入无菌离心管中, 加入相对其体积 5—6 倍的 0.25% 的胰酶, 置于 4℃ 冷消化过夜, 取出皮片, 以无菌 PBS 清洗, 置于无菌平皿中, 用镊子分离表皮和真皮, 弃去表皮组织, 将真皮组织进一步剪碎至约 1 mm³, 加入胰酶和 PBS 的 1 : 1 混合液, 约为组织体积的 5 倍。置于 37℃ 水浴中消化至形成悬浊液, 终止消化, 将悬浊液移入离心管中, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加入适量培养基重悬细胞, 将细胞悬液吸出加入培养瓶中, 加入适量培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。待多数贴壁后, 弃去原培养基, 加入新鲜培养基培养。培养扩增至一定数量, 部分冻存。其余部分继续培养、传代用于实验^[4]。

1.2.2 实验分组 本实验分组为无膜对照组、0、25、50、100 和 200 kGy 组。将丝素蛋白膜剪成与 24 孔板孔径大小一致的圆片, 铺于 24 孔板底, 密封后辐

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, Email: dranyan@126.com

收稿日期: 初稿 2012-05-29, 修回 2012-07-02

照。0 Gy 组以酒精消毒,用时以无菌 PBS 冲洗。 γ 射线照射工作由苏州大学辐照中心完成。

1.2.3 丝素蛋白辐照后结构改变的测定 将经 γ 射线照射后的丝素蛋白膜,制成粉末,使用 KBr 压片,经 Nicolet 5700 FTIR 型傅立叶变换红外光谱仪(美国, Nicolet 公司)检测。

1.2.4 增殖活力测定 将原代培养的真皮细胞以每孔 1×10^5 细胞,接种于铺有辐照丝素蛋白膜的 24 孔板中培养,于 1、3、5 和 7 d 各取 6 孔,使用 CCK-8 法检测细胞增殖活力,酶标仪于 450 nm 波长处,测得 OD 值^[5]。

1.2.5 丝素蛋白浸提液细胞毒性试验 丝素蛋白浸提液制备,使用含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基,按照国家标准,在 37℃ 下浸提 24 h 制得。再将原代真皮细胞以每孔 5 000 个,接种于 3 块 96 孔板中,待细胞贴壁后移去普通培养基,加入丝素蛋白膜浸提液,100 μ L/孔,培养 1、3 和 6 d,每个时间点各取一板,加入 CCK-8 溶液反应,使用酶标仪测得各孔 OD 值。细胞相对增殖率(Relative growth rate, RGR)=实验组吸光度值/对照组吸光度值 $\times 100\%$ ^[6]。按照国家标准进行毒性分级,如表 1 所示。

Table 1 Standard of toxicity grading

RGR	Toxicity grading	Judgement
$\geq 100\%$	0 grade	Qualified
75%-99%	1 grade	Qualified
50%-74%	2 grade	Need more analysis
25%-49%	3 grade	Disqualification
1%-24%	4 grade	Disqualification
0	5 grade	Disqualification

1.2.6 溶血试验 使用真空抗凝采血管,取志愿者全血,与生理盐水以 4:5 比例制成稀释血。将辐照好的丝素蛋白膜置于无菌生理盐水中,37℃ 下浸提 24 h。实验前,将含 10 mL 生理盐水、双蒸水、浸提液及含丝素蛋白膜的生理盐水的玻璃试管,置于 37℃ 水浴 30 min 后,每管加入 0.2 mL 稀释血,37℃ 水浴 60 min。反应后的溶液以 1 000 r/min 离心 5 min,取上清液移入 96 孔板中,使用酶标仪于 545 nm 波长处测定吸光度^[7,8]。

溶血率(%)= $\frac{D_t-D_{nc}}{D_{pc}-D_{nc}}\times 100\%$

式中, D_t 为试验样品; D_{nc} 为阴性对照; D_{pc} 为阳性对照。

1.2.7 数据处理 所有数据均使用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计算各组数据的算术均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)。对各组数据进行单因素方差分析,以 $p<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果和分析

2.1 γ 射线辐射对丝素蛋白结构的影响

对于家蚕丝素蛋白,通常其 silk I 结构的特征吸收峰出现在 1655 cm^{-1} (酰胺 I), 1525—1540 cm^{-1} (酰胺 II), 1266 cm^{-1} (酰胺 III), 669 cm^{-1} (酰胺 V) 附近; silk II 结构的特征吸收峰在 1620—1635 cm^{-1} (酰胺 I), 1530 cm^{-1} (酰胺 II), 1230—1235 cm^{-1} (酰胺 III), 700 cm^{-1} (酰胺 V) 附近。无规则卷曲结构的特征吸收峰则是在 1655—1660 cm^{-1} 、1535—1545 cm^{-1} 、1235 cm^{-1} 和 660 cm^{-1} 附近^[9,10]。本实验用 85%乙醇处理家蚕丝素蛋白,使其不溶,通过红外光谱测试,可以看出家蚕丝素蛋白交联后(见图 1(a))。主要在 1628 cm^{-1} 、1526 cm^{-1} 等处出现特征吸收峰,说明乙醇处理后的家蚕丝素蛋白主要以 silk II 结构为主。进行 γ 射线照射后,红外光谱仪检测(见图 1(a) — 图 1(e))发现, γ 射线照射后的丝素蛋白吸收峰并未发生明显移动,说明 γ 射线对丝素蛋白的二级结构影响不明显。

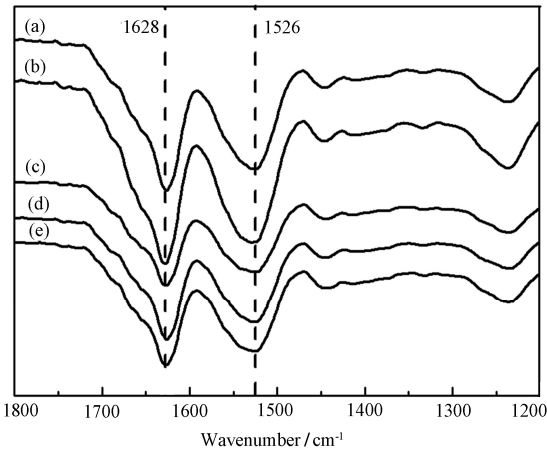


Fig.1 FTIR spectra of silk fibroin irradiated with different absorbed doses: a. 0 kGy; b. 25 kGy; c. 50 kGy; d. 100 kGy; e. 200 kGy

2.2 增殖活力

如图 2 所示,原代真皮细胞在丝素蛋白膜上的增殖活力表现出相同的趋势,对每个时间点各组细胞增殖活力进行单因素方差分析,各组吸光度值均具有方差齐性,且各组细胞增殖活力之间不存在显著性差异。因此,在 0—200 Gy 剂量范围内, γ 射线照射后的丝素蛋白膜支持细胞正常生长,对真皮细胞的增殖并未出现明显抑制或促进作用。

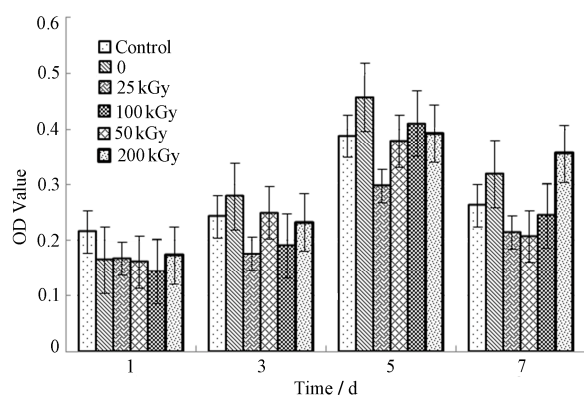


Fig.2 The proliferation activity of dermal cells influenced by silk fibroin films with different absorbed doses of γ -rays ($n=6$)

2.3 浸提液细胞毒性试验

在细胞培养 24、72 和 144 h，分别测定细胞增殖情况，并按照国家标准^[8]，评定不同剂量的 γ 射线照射后，丝素蛋白浸提液的毒性情况如表 2 所示。发现细胞增殖趋势具有一致性，并且其毒性在分级标准的 1 级（RGR:75%—99%）以内，经 SPSS17.0 统计分析，各时间点各组细胞 RGR 差异无统计学意义。因此可认为，0—200 kGy 剂量范围的 γ 射线照射后，丝素蛋白浸提液对细胞生长无明显抑制或促进作用。

Table 2 Toxicity of extracts of silk fibroin films with different absorbed doses of γ -rays

($n=6$)

Time / h	Group	OD value	RGR / %	Toxicity grading
24	Control	1.122±0.050	100	0
	SF extracts	1.131±0.016	100.8	0
	25 kGy SF extracts	1.124±0.042	100.1	0
	50 kGy SF extracts	1.141±0.036	101.7	0
	100 kGy SF extracts	1.087±0.050	96.88	0
	200 kGy SF extracts	1.030±0.052	91.8	0
72	Control	1.315±0.051	100	0
	SF extracts	1.274±0.084	96.88	1
	25 kGy SF extracts	1.289±0.062	98.02	1
	50 kGy SF extracts	1.245±0.015	94.68	1
	100 kGy SF extracts	1.289±0.075	98.02	1
	200 kGy SF extracts	1.292±0.017	98.25	1
144	Control	0.883±0.060	100	0
	SF extracts	0.832±0.049	94.22	1
	25 kGy SF extracts	0.822±0.041	93.09	1
	50 kGy SF extracts	0.815±0.007	92.3	1
	100 kGy SF extracts	0.952±0.021	107.8	0
	200 kGy SF extracts	0.886±0.042	100.3	0

2.4 溶血率

经不同剂量 γ 射线照射的丝素蛋白浸提液及丝素蛋白膜溶血率见表 3。

由表 3 中数据可见，丝素蛋白浸提液及含丝素蛋白的生理盐水，溶血率均小于国家标准所规

定的 5%，使用 SPSS17.0 统计软件结果显示，各组溶血率之间均无统计学差异。因此可以认为，在 0—200 kGy 范围内， γ 射线照射的丝素蛋白膜及其浸提液不具有溶血性，可初步认为照射后的丝素蛋白血液相容性良好。

Table 3 Hemolysis test of silk fibroin films with different absorbed doses of γ -rays

Group		OD value			Mean	Hemolysis rate / %
		1	2	3		
Control	Positive	0.441	0.566	0.539	0.516	—
	Negative	0.065	0.076	0.049	0.064	—
Extracts	0	0.064	0.074	0.062	0.067	0.66%
	25 kGy	0.058	0.060	0.036	0.052	-2.66%
	50 kGy	0.061	0.050	0.042	0.051	-2.73%
	100 kGy	0.060	0.030	0.029	0.040	-5.24%
	200 kGy	0.061	0.038	0.107	0.069	1.18%
Saline with silk fibroin film	0	0.062	0.063	0.060	0.062	0.44%
	25 kGy	0.039	0.082	0.022	0.048	-3.47%
	50 kGy	0.057	0.037	0.054	0.050	-3.10%
	100 kGy	0.033	0.093	0.104	0.077	2.95%
	200 kGy	0.013	0.075	0.011	0.033	-6.71%

3 讨论

丝素蛋白是蚕丝的重要组成部分，约占蚕丝总质量的 70%左右。丝素蛋白作为蚕丝的核心成分，由丝胶蛋白包绕其外，丝胶蛋白约占蚕丝的 25%左右，其余为少量杂质^[9]。由于蚕丝易于取得，并具有良好的生物相容性，长期以来被用作外科手术缝合线。近年来，以丝素蛋白为原材料的生物材料日新月异，在组织工程、药物工程等领域得到了广泛的应用^[1]。

γ 射线常被用作医用生物材料的灭菌，一定剂量下可达到对医用材料灭菌的效果，并可能使材料结构产生一定变化，从而可能影响到材料的生物相容性等。我们对 γ 射线照射后的丝素蛋白进行的结构测试，除添加交联剂具有显著影响外，单纯辐照无显著影响，相关研究实验结果具有一致性^[11]。有研究表明，随 γ 射线吸收剂量增加，丝素蛋白水溶性增强，表明蛋白降解率增加^[12]。

对于材料生物相容性的评价，GBT16886 提到，可选择浸提液试验，直接接触试验及间接接触试验方法进行，主要涉及生物材料对细胞形态，细胞损伤，细胞生长增殖的影响，以及生物材料浸提液对细胞毒性进行评价，以判断生物相容性是否符合标准^[8]。长期以来，利用体外细胞培养及动物血液对生物材料的毒性及溶血性进行评价，已成为行之有效、便捷、可重复性强的标准方法，可在短期内检测出生物材料对生物体的作用^[7]。实验表明，细胞在不同

剂量 γ 射线照射后获得的丝素蛋白对试验细胞的增殖活力没有明显影响。细胞毒性试验结果也表明，丝素蛋白浸提液对细胞生长没有明显的抑制作用，由此可推测丝素蛋白浸提液对生物细胞无明显毒性。溶血试验结果表明，在此实验的剂量范围内，照射后的丝素蛋白膜与血细胞接触不会导致其破裂而发生溶血。从本实验的结果可以看出，丝素蛋白经 0—200 kGy γ 射线照射后，其分子结构并未呈现明显变化，可能成为其生物相容性改变不明显的原因。

丝素蛋白的良好生物相容性，使其在生物材料领域的应用十分广泛。本实验研究结果表明，在设定的辐照剂量范围内， γ 射线对丝素蛋白的生物相容性并未出现明显影响，为丝素蛋白消毒剂量范围的确定提供了理论依据。有关 γ 射线对丝素蛋白的降解作用，将在以后的实验中进一步展示。

参考文献

1

王琳婷, 朱良军, 闵思佳. 丝素蛋白在生物医学领域的应用研究[J]. 北方蚕业, 2009, 30(3): 1-4
WANG Linting, ZHU Liangjun, MIN Sijia. Study and application of silk fibroin in bio-medical field [J]. North Sericulture, 2009, 30(3): 1-4

2

田莉, 闵思佳, 朱良均. 丝素蛋白在软组织相容性材料方面的研究进展[J]. 蚕业科学, 2005, 31(2): 187-190
TIAN Li, MIN Sijia, ZHU Liangjun. The research progress of silk fibroin in the soft tissue compatibility of ma-

- terials [J]. *Sericulture*, 2005, **31**(2): 187-190
- 3 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
 - 4 龚爱华, 盛伟华, 缪竞诚. 丝素蛋白材料生物相容性的研究[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2003, **13**(1): 1-3
GONG Aihua, SHENG Weihua, MIAO Jingcheng. Study on biocompatibility of silk fibroin material [J]. *Journal of Jiangsu University (Medicine edition)*, 2003, **13**(1): 1-3
 - 5 余荣峰, 邓江, 黄文良. 丝素蛋白/壳聚糖复合支架材料的细胞相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, **16**(3): 455-458
SHE Rongfeng, DENG Jiang, HUANG Wenliang. Compatibility of silk fibroin /chitosan composite scaffold for cell [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, **16**(3): 455-458
 - 6 赵雄, 曹晓涵, 马玉媛. 纤维蛋白止血敷料的生物相容性研究[J]. *中国输血杂志*, 2010, **23**(4): 247-249
ZHAO Xiong, CAO Xiaohan, MA Yuyuan. Study on biocompatibility of the fibrin hemostatic dressing [J]. *Chinese Journal of Blood Transfusion*, 2010, **23**(4): 247-249
 - 7 孙皎, 宁丽, 顾国珍. 医用丝素蛋白皮肤再生膜的细胞相容性评价[J]. *生物医学工程学杂志*, 2000, **17**(4): 393-395
SUN Jiao, NING Li, GU Guozhen. Cell compatibility evaluation of medical skin regeneration membrane of silk fibroin [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2000, **17**(4): 393-395
 - 8 GB/T16886. 医疗器械生物学评价. 北京: 中国标准出版社, 2003
GB/T16886. Biological evaluation of medical devices. Beijing: Standards Press of China, 2003
 - 9 刘永成, 邵正中, 孙玉宇. 蚕丝蛋白的结构和功能[J]. *高分子通报*, 1998, **3**: 17-23
LIU Yongcheng, SHAO Zhengzhong, SUN Yuyu. Structures and functions of silk fibroin [J]. *Polymer Bulletin*, 1998, **3**: 17-23
 - 10 周文, 陈新, 邵正中. 红外和拉曼光谱用于对丝素蛋白构象的研究[J]. *化学进展*, 2006, **18**(11): 1514-1522
ZHOU Wen, CHEN Xin, SHAO Zhengzhong. Infrared and raman spectroscopy for the study of the conformation of silk fibroin [J]. *Chemistry Progress*, 2006, **18**(11): 1514-1522
 - 11 XIONG Siyong, XU Yamei, JIAO Yuhong, *et al.* Effects of γ -irradiation on the structure and mechanical properties of wild silkworms and bombyx mori silk fibroin films [J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 197-198: 27-31
 - 12 Amornthep Kojthung, Prateep Meesilpa, Boonya Sudatis, *et al.* Effects of γ -radiation on biodegradation of bombyx mori silk fibroin [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2008, **62**(4): 487-490

Study on the biocompatibility of silk fibroin irradiated with different absorbed doses of γ -rays

JIN Huanyu^{1,2} DONG Chao³ LIU Xing¹ LIU Yu^{2,3} WANG Dapeng¹
LIU Jian¹ JIANG Bingcheng¹ 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 To investigate the effects of γ -irradiation on the biocompatibility of silk fibroin, the silk fibroin film was irradiated with different absorbed doses of 0, 25, 50, 100 and 200 kGy, respectively. The dermal cells were used as experimental cell model and cultured on the irradiated films. The molecular structure of silk fibroin was analyzed by FT-IR (Fourier Transform infrared spectroscopy). The graded toxicity and hemolysis had been tested. The results showed that there was no obvious change with the molecular structure of silk fibroin in the range of absorbed dose, meanwhile there was no significant effects on the growth and proliferation activity of dermal cells. And there was also no obvious toxicity to the cells and the silk fibroin film had the good hemo-compatibility. In conclusion, in the range of 0—200 kGy, the γ -irradiation has no significant effects on the structure and biocompatibility of silk fibroin.

KEYWORDS Silk fibroin, γ -irradiation, Molecular structure, Biocompatibility

CLC R114, R33, TQ316