

# 丝素蛋白-丹参多功能生物敷料的制备及其组织相容性研究

祁俊<sup>1</sup>, 张逸<sup>1\*</sup>, 胡克苏<sup>1\*</sup>, 李明忠<sup>2</sup>, 卢神州<sup>2</sup>, 张云<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南通大学附属医院烧伤整形科, 江苏 南通 226001; <sup>2</sup>苏州大学现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215123)

**[摘要]** 目的:以丝素蛋白、丹参为主要原料研制一种新型的创伤敷料,评价其作为医用生物材料的安全性。方法:制备丝素蛋白三维材料,载入丹参,制得丝素蛋白-丹参多功能生物敷料,进行组织相容性试验,包括细胞毒性试验、刺激性试验、过敏性试验和遗传毒性试验。结果:制备的丝素蛋白-丹参多功能生物敷料的细胞毒性试验、刺激性试验、过敏性试验和遗传毒性试验结果呈阴性。结论:丝素蛋白-丹参多功能生物敷料具有良好的生物相容性,无不良反应,是可以安全使用的医用生物材料。

**[关键词]** 丝素蛋白;丹参;组织相容性

**[中图分类号]** R318.08

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2013)07-1024-03

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130736

烧伤后引起的各种损害,如新陈代谢加剧、体温下降、水分和蛋白质的过度散失及内分泌和免疫系统的失调,均与皮肤屏障作用的丧失有关。从治疗原则来看,使用合适的创伤敷料将创面覆盖,使其在临时性形成体表屏障的基础上,提供促进创面愈合的微环境。在可用于敷料的高分子材料中,与合成材料相比,更有发展前景的是来自非脊椎动物的可降解性天然高分子材料,例如蚕丝丝素蛋白材料。丝素蛋白作为纯天然生物高分子材料在生物医学领域被广泛应用于人工皮肤、血管、神经、骨骼、韧带、肌腱和角膜等<sup>[1]</sup>。丹参为唇形科鼠尾草属植物,主要有效成分为脂溶性的丹参酮类和水溶性的酚酸类。丹参酮 A 是丹参中含量最高的有效活性成分,经修饰可转变成丹参酮 B,具有 L-钙通道阻滞作用;丹参酮 B 可以提高超氧化物歧化酶活性,增加清除自由基能力。

本课题组研究一种新型的丝素蛋白-丹参多功能生物敷料,按照现行的生物材料医疗器械生物学评价国家标准(GB/T 16886 系列标准),对丝素蛋白-丹参多功能生物敷料进行无菌试验、细胞毒性试验、致敏试验、皮内反应试验和遗传毒性试验,较系统地评价了其生物相容性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

蚕茧(苏州大学现代丝绸国家工程实验室物中心),RPMI1640 培养液及小牛血清(美国 Gibco 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司)。仪器主要有-80℃冰箱(日本 SANYO 公司 MDF-U71V 型),低温离心机(德国 Hettich 公司),酶标仪(ELX800 通用型,美国 Biotek 公司),NU-4750E 型 CO<sub>2</sub> 培养箱、恒温水浴箱(上海跃进医疗器械厂),石蜡切片机(CN61MLS-2055 型),Olympus 生物显微镜 BX51 及其成像系统(日本 Olympus 公司)。实验动物新西兰白兔与豚鼠由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供[实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2007-2008]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 丝素蛋白-丹参多功能生物敷料的制备

称量一定量的蚕茧片,放入沸腾的 5 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液中煮沸脱胶 30 min,茧片与水溶液的质量浴比为 1:50,重复脱胶 2~3 次。脱胶完毕后,自然干燥获得纤维状丝素蛋白。经透析提纯后获得可溶性丝素蛋白,置于器皿中保存备用。用 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化溶液中的丝素蛋白,边搅拌边将丹参水溶液按照预定比例滴加于丝素蛋白溶液中,用 20%1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)交联,37℃培养 60 min,随后于-40~-80℃快速预冻 6 h 以上,再经冷冻干燥 48 h 后制得丝素-丹参三维多孔材,用作敷料的下层。这一冻结结晶法是制备

**[基金项目]** 江苏省高校重点实验室开放课题(KJS 1216);南通苏州大学纺织研究院开放课题(NS1210)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:198zy@163.com,gcsh@163.com

丝素蛋白-丹参复合三维材料的新方法,制得的丝素蛋白三维材料的结晶度高,短期内难以被生物降解;内部是多孔结构但表面孔径很小,吸水、保湿能力强但新生组织难以进入;采用培养-自组装技术,在丝素蛋白三维材料中载入丹参,通过丹参的缓释,赋予丝素蛋白三维材料抗菌和诱导创面修复的生物功能。用丝素蛋白微纤维增强、流延法干燥成型制备强韧丝素蛋白膜。最后,用等离子处理法分别将丝素蛋白三维材料和强韧丝素蛋白膜活化,用高黏度的丝素蛋白黏合、组装,再经切割、包装、灭菌后,制得丝素蛋白-丹参多功能生物敷料。

### 1.2.2 无菌试验

样品测试接种均按无菌操作法(在 100 级净化工作台内)进行。无菌打开包装,用灭菌剪刀、镊子将丝素蛋白-丹参敷料转移至 SCDB 培养基中,置于 28~32℃ 培养箱中培养 14 d,观察有无细菌生长。

### 1.2.3 细胞毒性试验

浸出液制备:将丝素蛋白-丹参敷料剪成 2.0 cm × 0.5 cm,放入试剂瓶中,按样品的表面积与生理盐水的体积比为 3:1 的比例,加入无菌无热源的浸提介质生理盐水 120 ml。在 37℃ 浸取 90 h,作为受试材料浸提液待用。

细胞株接种、培养:将 L-929 细胞用 RPMI1640 培养液(内含 10% 小牛血清,100 U/ml 的青霉素和链霉素,200 mmol/L 的谷氨酰胺)制备成浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液,加入 96 孔培养板,每孔 0.1 ml,培养 24 h 以使细胞贴壁。24 h 后舍弃原培养液,在受试材料组、空白和阳性对照组分别加入 25% 的受试材料浸提液、培养液和含 0.64% 的苯酚培养液各 0.1 ml。每组设 6 个平行孔。

细胞观察和 MTT 测定:于培养后 2、4、7 d 各取 1 块培养板,在倒置显微镜下观察活细胞形态并照相,吸去培养液,用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入 5 mg/ml MTT 溶液 10  $\mu$ l 继续培养 6 h,置于倒置显微镜下观察结晶物密度并照相。然后每孔加入含 10% SDS 的 10 ml HCl,室温下振荡器振荡 15 min,使结晶物充分溶解,用酶联免疫检测仪测定 570 nm 处吸光度值。以空白对照的吸光度均值为 100% 细胞增殖率,各实验组吸光度均值/空白对照组吸光度均值 × 100% 为该材料组的细胞增殖百分率。

### 1.2.4 刺激试验

取皮肤健康无损的新西兰白兔 9 只,体重(3.0 ± 0.5)kg,试验前 1 d 将动物背部脊柱两侧被毛除去约 10 cm × 15 cm 的区域,作为试验材料接触和观察

部位。将丝素蛋白-丹参敷料浸提液滴到 25 mm × 25 mm 的 4 层纱布上,使其完全浸透,并敷贴于动物背部两侧上方,用同样的方法把阴性对照生理盐水敷贴于动物背部两侧下方,用半封闭性包扎带固定敷料 6 h。在除去敷贴物后 1、24、48 和 72 h 分别观察皮肤反应情况。

### 1.2.5 致敏试验

选豚鼠 60 只,体重(400 ± 50)g,分成 3 组,其中受试材料组 30 只,阴性对照生理盐水组 15 只,阳性对照 5% 甲醛组 15 只。试验前 1 d 除去豚鼠背部或腹部皮毛,约 3 cm × 4 cm 的区域,作为试验材料接触和观察的部位。

皮内诱导试验:选用最大剂量法。在皮内诱导阶段用 75% 乙醇清洁豚鼠背部去毛区,在每只豚鼠去毛区作 6 点对称的皮内注射 0.1 ml,从上至下分别是 2 点弗氏完全佐剂,2 点浸提液或阴、阳性对照和 2 点浸提液或阴、阳对照与弗氏完全佐剂的乳化液。

局部诱导试验:在皮内注射后第 7 天,将 20 mm × 40 mm 滤纸浸透于浸提液或阴、阳性对照液后,局部贴敷于各试验组豚鼠的诱导注射点,用封闭式包扎带固定,并于 48 h 后除去包扎带和滤纸片。

激发试验:局部诱导后第 14 天,用浸透的滤纸片局部贴敷于各试验组豚鼠的单侧腹部,封闭包扎固定 24 h 后,除去包扎带和滤纸片,于 0、24、48、72 h 观察各组动物激发部位的皮肤反应情况。

### 1.2.6 遗传毒性试验

辐照灭菌后将已形成单层的鼠胚真皮层成纤维细胞消化后,调整至  $1 \times 10^5$  个/ml 的细胞浓度,以 1 ml/孔接种于上述 24 孔板中,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 培养箱中培养 3 d。制片:将培养板中细胞用 0.25% 胰酶消化,无钙镁 PBS 洗,制成浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液,滴片,晾干,固定。微核检测:用 Giemsa 染色 10 min,晾干,镜检。油镜下记数 2 000 个完整的细胞,记录微核数,计算微核率。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,率的比较采用卡方检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

经无菌试验检测,丝素蛋白-丹参敷料在 SCDB 培养基中无细菌生长。说明丝素蛋白-丹参敷料为无菌产品。

细胞毒性试验显示受试材料组细胞形态良好,细胞折光性强,与空白对照组相似,为长梭形和多角

形,并可见圆形分裂细胞,表明细胞生长旺盛。阳性对照组细胞数量明显少,细胞缩小。受试材料和空白对照组 MTT 结晶物密度均比阳性对照组高。实验结果表明丝素蛋白-丹参敷料的体外细胞毒性分级为 0 级,属无细胞毒性(表 1)。

表 1 MTT 法检测丝素蛋白-丹参敷料浸提液对 L-929 细胞的增殖率 (%)

分组	2 d	4 d	7 d
受试材料组	368.29	325.64	295.63
阳性对照组	71.65	51.66	28.89

刺激试验显示,在除去敷贴物后 1、24、48 和 72 h 均未发现受试材料接触部位和阴性对照部位有红斑、水肿或坏死现象,表明丝素蛋白-丹参敷料浸提液对皮肤没有刺激性。

致敏试验显示,受试材料组和阴性对照组豚鼠在各观察时点均未见皮肤出现红斑、水肿等皮肤刺激反应,阳性对照组有 3 只豚鼠在 6 h 出现红斑和水肿现象,72 h 后基本消失。结果表明丝素蛋白-丹参敷料浸提液对皮肤无致敏性。

遗传毒性试验显示,丝素蛋白-丹参敷料与阴性对照比较微核率无显著差异( $P > 0.05$ ,表 2),表明丝素蛋白-丹参敷料对细胞形成微核的影响较小,对鼠胚真皮层成纤维细胞无明显的遗传毒性。

表 2 微核数及微核率的比较

组别	观察细胞数(个)	微核细胞数(个)	微核率(%)
受试材料组	2 000	12	0.61
阴性对照组	2 000	8	0.42

### 3 讨论

近些年来,组织工程的兴起为组织损伤修复提供了一条新的解决途径<sup>[2]</sup>。组织工程支架的合理设计与构建及其生物相容性是组织工程修复成败的关键。丝素蛋白作为一种生物相容性良好、力学性能优异、可生物完全降解的天然高分子材料,又可以通过简单的再生加工和化学修饰来制备与改进丝素蛋白的形态、结构与性能,从而更有利于丝素蛋白作为生物医用材料应用于再生医学领域<sup>[3]</sup>。研究表明,未经任何处理的天然蚕丝纤维与神经组织有良好的生物相容性,并支持雪旺细胞的黏附与生长<sup>[4]</sup>。丝素蛋白材料不会引起明显的免疫反应,有利于多种哺乳动物细胞和人类成体细胞的黏附和生长,包括内皮

细胞、成纤维细胞、成骨细胞系、软骨细胞、胶质细胞等<sup>[5]</sup>。作为生物医用材料,丝素蛋白不仅具有上述优良特性,而且具有比胶原蛋白更可靠的生物安全性,提纯成本也比胶原蛋白低得多。

研究表明,丹参用于烧伤创面的治疗有如下作用:①抗氧自由基损伤、保护内皮细胞;②改善微循环、促进组织修复和再生;③抗金黄色葡萄球菌感染;④调节细胞因子;⑤抑制瘢痕增生;⑥改善严重烧伤后重要脏器微循环、抗感染及促进创面愈合的临床疗效。

本课题研究的丝素蛋白-丹参生物敷料采用自组装技术,创造性地在丝素蛋白三维材料中载入丹参。冷冻干燥制成丝素蛋白丹参敷料的目的在于:①可以使丹参固定在创面位置发挥作用;②在丝素蛋白的包裹下,丹参可以随着伤口渗液中的酶降解而逐步释放,从而取得更好地促进伤口愈合作用和治疗效果。由于蚕丝丝素蛋白具有良好的组织亲和性,能迅速而牢固地与创面黏附;较好的屏障功能,其丝素蛋白膜能阻止细菌入侵,减少热量、蛋白质和离子的流失;良好的生物安全性及顺应性,具有很好的柔韧性,可随体形覆盖创面,不因缝合、牵拉而撕裂;适当的通透性,故用蚕丝丝素蛋白作为医用敷料在烧伤领域具有巨大的开发和应用潜力。

本文经过对丝素蛋白-丹参多功能生物敷料的试验表明,该材料不引起急性不良反应,无刺激性、致敏性和溶血性,说明丝素蛋白-丹参多功能生物敷料具有良好的生物相容性,无不良反应,是可以安全使用的生物材料。

#### [参考文献]

- [1] 侯春春,徐水. 蚕丝蛋白生物医学材料的研究现状[J]. 丝绸,2010,7(1):18-22
- [2] 张逸,王磊,潘立群. 丹参促进烧伤创面修复的研究进展[J]. 南通大学学报:医学版,2007,27(1):75-76
- [3] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering [J]. Nat Mater,2005,4(7):518-524
- [4] Omenetto FG,Kaplan DL. New opportunities for an ancient material[J]. Science,2010,329(5991):528-531
- [5] Yang YM,Chen XM,Ding F, et al. Biocompatibility evaluation of silk fibrin with peripheral nerve tissues and cells in vitro[J]. Biomaterials,2007,28(9):1643-1653

[收稿日期] 2013-01-18