

丝胶蛋白的细胞相容性和抗菌性能研究

陈忠敏, 罗 琴, 张瑶琴, 刘 琼

(重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054)

摘要: 研究了从茧壳、茧衣中提取丝胶蛋白(S1、S2)及茧壳丝胶进行酶解制备的小分子丝胶蛋白肽(S3)的细胞相容性, 以及对革兰氏阴性菌、阳性菌的抗菌作用。结果表明: 三种丝胶蛋白均“对细胞无毒性”, 并随丝胶浓度的增大对细胞生长有促进作用。采用细菌生长抑制试验定量测试了各梯度浓度下丝胶的抑菌率, 结果显示丝胶具有显著的抑菌作用, 对金黄色葡萄球菌和的大肠杆菌抑制率由大到小依次为S3、S1、S2和S2、S3、S1, 丝胶浓度对抑菌性有一定影响。研究结果表明丝胶是一种具有良好抑菌性能的生物相容性材料。

关键词: 丝胶蛋白; 细胞相容性; 抗菌性

中图分类号: TS146; R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-7003(2012)11-0001-05

Cytocompatibility and antibacterial properties of sericin proteins

CHEN Zhong-min, LUO Qin, ZHANG Yao-qin, LIU Qiong

(College of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

Abstract: This paper studies the cytocompatibility of sericin proteins (S1, S2) extracted from cocoon shell and cocoon outer floss respectively and small molecule sericin protein peptide (S3) prepared by enzymolysis of cocoon shell sericin, and studies the antibacterial properties against Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria. Results show that: all these three kinds of sericin protein have not toxicity to cells, and show the function of promoting cell growth with the increase of sericin concentration. Have a quantitative test of bacterial inhibition rate of sericin under each concentration gradient by using bacterial growth inhibition test, and results show that sericin has significant antibacterial properties, and inhibition rates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in descending order are S3, S1, S2 and S2, S3, S1 respectively, and sericin concentration has effects on their antibacterial properties. The results suggest that sericin is a kind of biocompatible material with good antibacterial properties.

Key Words: Sericin proteins; Cytocompatibility; Antibacterial properties

近年来, 丝胶作为生物材料的应用研究日趋活跃, 阎隆飞、陈华等^[1-2]的研究指出丝胶的降解性、凝胶-溶胶转化特性等优于丝素蛋白, 可作为一些特定范围内的生物材料加以应用。丝胶蛋白作为一种球状蛋白质, 具有复杂的结构、独特的生物活性和环境易变性^[3], 所以在关于丝胶应用的研究报告中一般均注明了所用丝胶的制备条件。张瑶琴等^[4]研究了丝胶蛋白结构与制备条件的相关性, 指出不同制备方法获得丝胶

蛋白的氨基酸组成、相对分子质量、分子构象、溶解性等均存在差异。而研究人员更多的兴趣在于不同形状的丝胶蛋白是否具有免疫原性而影响细胞、组织, 丝胶基础分子形态构象变化、相对分子质量大小变化和细胞相容性具有怎样的相关性等方面的问题^[5-6]。

本研究在张瑶琴等^[4]研究的基础上, 按照文献^[4]采用的水煮脱胶法分别从茧壳、茧衣中提取丝胶蛋白(S1、S2), 将部分茧壳丝胶酶解得到小分子丝胶蛋白肽(S3)。样本采用MTT法细胞毒性检测对比了各组丝胶样本对L-929小鼠成纤维细胞的相对增殖率(RGR, %), 观察细胞形态学变化, 评价细胞毒性。同时进行了体外抑菌定量试验, 以获取丝胶抗菌性能, 进一步探明其作为生物材料的应用可行性。

收稿日期: 2012-06-07; 修回日期: 2012-07-18

基金项目: 重庆市高等学校优秀人才培养计划项目(2011CQ04);
重庆理工大学研究生创新基金项目(YCX2011310)

作者简介: 陈忠敏(1968—), 女, 教授, 主要从事生物材料、功能高分子材料研究。

1 材料与方法

1.1 材料

茧壳、茧衣(重庆市纤维制品检验所), 中性蛋白酶(南宁庞博生物有限公司), 金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(重庆理工大学药学与生物实验室), L-929细胞(重庆第三军医大学)。

所用试剂均为市售分析纯。MTT(Scientific Research Specialic)、胰蛋白酶(Sigma进口分装)、小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、RPMI-1640培养基(HyClone, 赛默飞世尔生物化学制品有限公司)、滤头(Millipore, Ireland)、96孔板(Costar, USA)、塑料培养瓶(Corning, USA)、血球计数板。

1.2 试验

1.2.1 三种丝胶样品的制备

按照文献[4]的方法, 分别从茧壳和茧衣中提取丝胶蛋白(S1, S2): 用蒸馏水将茧壳或茧衣清洗晾干, 用适量的乙醚浸泡48 h(24 h换一次乙醚)除蜡质物, 洗净、摊晾干燥; 将干燥的茧壳和茧衣用无水乙醇在室温下浸泡24 h除去部分有机物和杂质, 蒸馏水洗净后室温下摊晾干燥后, 分别将茧壳和茧衣放入蒸馏水中煮沸脱胶, 取小样用苦味酸胭脂红检测, 至茧丝变黄即丝胶脱净。将所得丝胶溶液, 经浓缩、冷冻干燥后得丝胶蛋白粉末备用。

按照文献[7]的方法, 将经上述方法从茧壳中提取的丝胶, 用中性蛋白酶酶解制备小相对分子质量丝胶蛋白肽(S3)。

通过SDS-PAGE法分别测定从茧壳、茧衣中提取丝胶蛋白的相对分子质量, 采用Tricine-SDS-PAGE法测定酶解茧壳丝胶的蛋白肽相对分子质量。

1.2.2 L-929细胞相容性试验

用含小牛血清10%的RPMI-1640培养基将丝胶S1、S2、S3分别配成0.5、0.1、0.02 mg/mL三种质量浓度, 用于培养L-929小鼠成纤维细胞。将细胞浓度为 2×10^4 个/mL的L-929细胞悬液加入96孔板中, 每孔加入100 μ L。待细胞贴壁后, 将96孔板孔内液体吸走, 然后每孔加入200 μ L上述准备好的含各试验组丝胶的培养基, 并以只加培养基的孔为空白对照组, 每试验组设5个复孔, 在37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂细胞培养箱中培养。采用5块96孔板分别培养24, 48, 72, 96, 120 h。

待培养到相应的时间点时, 从培养箱中取出培养板, 采用倒置显微镜(XDS-1B, 重庆光电仪器总公司)

观察细胞的生长形态, 并采用MTT法处理试样: 每孔加入5 g/L MTT 20 μ L, 继续培养4 h, 弃上清液, 加入二甲基亚砷(DMSO)150 μ L, 震荡10 min, 用TECAN酶标仪 SUNRISE(A-5082, Austria)在490 nm处测定吸光度值, 绘制细胞生长曲线, 并计算细胞的相对增殖率(RGR)^[8]。

$$RGR/\% = \frac{\text{试验组吸光值}}{\text{对照组吸光值}} \times 100 \quad (1)$$

细胞毒性分级标准如下: RGR \geq 100, 0级; 75 \leq RGR<100, 1级; 50 \leq RGR<75, 2级; 25 \leq RGR<50, 3级; 1<RGR<25, 4级; RGR=0, 5级。

1.2.3 抑菌性能测试

配置肉膏蛋白胨培养基, 置121 $^{\circ}$ C高压灭菌锅中灭菌30 min, 待培养基冷却至50 $^{\circ}$ C, 倒平板, 制成固体培养基待用。将S1、S2、S3分别配成50, 10, 2 mg/mL三种质量浓度梯度样品备用。

准确吸取经活化的大肠杆菌及金黄色葡萄球菌菌液, 分别稀释到 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 取各浓度的菌液50 μ L在平板上均匀涂布。放入恒温培养箱中倒置培养, 至菌落长出来后进行计数。则样品的菌数/mL=同一稀释度4次重复的菌落平均数 \times 稀释倍数 \times 20, 找到最适合的菌液浓度, 平板上菌落数在50~120 cfu为宜。本次试验以稀释到 10^{-5} 计数最宜。

将50 μ L的 10^{-5} 菌液和100 μ L的各浓度梯度的样品加入倒好培养基的平板上均匀涂布, 以只涂布菌悬液的平板为空白对照。待液体完全吸收后在37 $^{\circ}$ C的恒温培养箱中倒置培养, 至菌落长出后进行计数。每组进行3次重复试验, 并以抑菌率来评价各丝胶样的抑菌性能。

$$\text{抑菌率}/\% = \frac{\text{对照组细菌菌落数} - \text{试验组细菌菌落数}}{\text{对照组细菌菌落数}} \times 100 \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 丝胶蛋白质制备

通过SDS-PAGE凝胶电泳, 确认了茧壳中提取丝胶S1的相对分子质量分布在66.2~130 kDa, 茧衣中提取丝胶S2的相对分子质量在43~130kDa, Tricine-SDS-PAGE凝胶电泳测得茧壳提取丝胶酶解后相对分子质量在3 kDa以下, 这与张瑶琴等^[4]研究所得结果一致。

2.2 细胞相容性试验

L-929细胞, 即小鼠成纤维细胞, 是国家标准细胞相容性测试时使用细胞。试验中, 在含有各类丝胶的培养基中培养了1, 2, 3, 4, 5 d的细胞形态与对

照组的细胞形态基本相同，呈梭形或三角形，贴壁良好，生长旺盛，如图1所示。

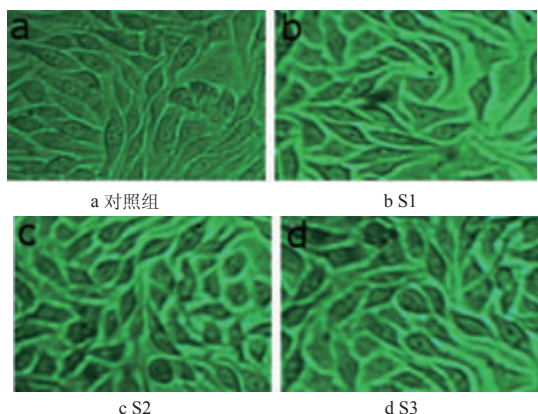


图1 L-929细胞在含有不同丝胶(0.5 mg/mL)的培养基中生长3 d的倒置显微镜照片

Fig.1 Inverted microphotograph of L-929 cells growing on culture medium with different sericin (0.5 mg/mL) for 3d

图2A、B、C分别为L-929细胞在含各种丝胶样本S1、S2、S3培养基的生长曲线。由图2可见：各试验组细胞的生长趋势与对照组基本一致；对蚕壳提取丝胶蛋白，随着S1质量浓度的增大，吸光度值变小，0.5 mg/mL的S1吸光度值低于对照组，对细胞生长有细微影响；而各质量浓度的S2和S3的吸光度值均高于对照组，表现出对细胞有较强促生长作用，且随质量浓度的增大促进作用越明显。

MTT法用来评价各组丝胶的细胞毒性。表1计算了各试验组丝胶对L-929细胞的相对增殖率和毒性评分。由表1可见，5 d内，S1的细胞毒性评分随其质量浓度的增大从0级增至1级，高质量浓度的S1对细胞生长有微小影响，但均在2级以下，未造成细胞毒性；而各质量浓度的S2和S3的RGR均大于100，毒性评分均为0级，有促细胞生长作用，且随质量浓度的增大，促生长作用更好。这说明丝胶蛋白生物相容性良好，具有在生物材料领域开发应用的前景。

2.3 抑菌性能测试

对于生物材料来说，具备抗菌性能将在其应用过程中更为有利。丝胶蛋白质是蚕茧壳的一部分，其生理性功能是保护蚕蛹度过孵化成蛾时期。丝胶蛋白质在一定程度上能够抗拒外界恶劣环境，包括细菌侵入等，由此推定其应具备抗菌性能。图3、图4为不同质量浓度丝胶蛋白质对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌的抗菌试验。

从图3、图4可知，各组丝胶蛋白对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌都有抑菌效果，而且随着质量浓度增

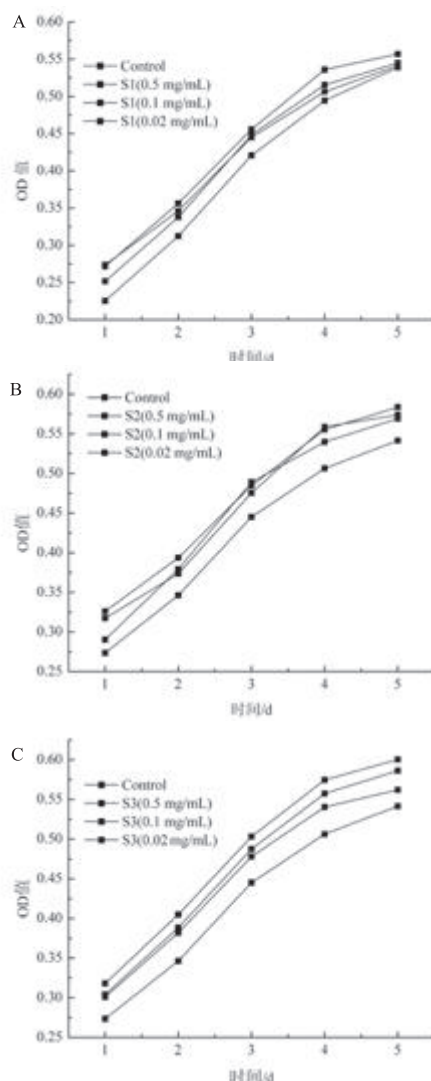


图2 L-929细胞在含不同质量浓度的各丝胶样培养基中的生长曲线

Fig.2 Growth curves of L-929 cells cultured in the medium containing different concentrations of sericin

大，抑菌率呈现先增大后降低趋势，说明丝胶具备抗菌性，而其抗菌效果与质量浓度具有一定的相关性，但暂未发现其具统计学意义。这是因为丝胶蛋白质是球状蛋白质，三级结构中分子构象复杂，质量浓度相同时其构象的变化也将影响其各方面性能。从图3、图4还可看出，不同环境中制得的丝胶蛋白对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的生长呈现不同程度的抑制作用，比较试验中丝胶为10 mg/mL时的抗菌性，对金黄色葡萄球菌的抑制作用由强到弱顺序依次为S3、S1、S2，对大肠杆菌抑制作用由强到弱顺序依次为：S2、S3、S1。从这些数据可以看出，制备条件不同的丝胶，其分子构象不同将导致抗菌性能的差异。

从整体效果看，丝胶对大肠杆菌的抑菌性能优于金黄色葡萄球菌。分析原因，可能是丝胶蛋白的溶解

表1 相对增殖率RGR及毒性评分结果
Tab.1 Relative growth rate (RGR) and toxicity score results

丝胶质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	1 d		2 d		3 d		4 d		5 d		
	RGR	评分	RGR	评分	RGR	评分	RGR	评分	RGR	评分	
S1	0.5	82.4	1	90.2	1	94.5	1	97.6	1	99.6	1
	0.1	92.0	1	97.5	1	100.8	0	101.8	0	100.7	0
	0.02	99.3	1	102.9	0	102.4	0	105.9	0	102.9	0
S2	0.5	119.1	0	113.7	0	108.9	0	109.7	0	107.8	0
	0.1	116.0	0	107.9	0	106.8	0	110.3	0	106.0	0
	0.02	106.1	0	109.4	0	109.9	0	106.6	0	105.1	0
S3	0.5	116.2	0	116.9	0	113.0	0	113.4	0	110.9	0
	0.1	111.1	0	112.1	0	109.6	0	110.1	0	108.3	0
	0.02	110.0	0	110.3	0	107.4	0	106.7	0	103.8	0
对照组	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0	100.0	0	

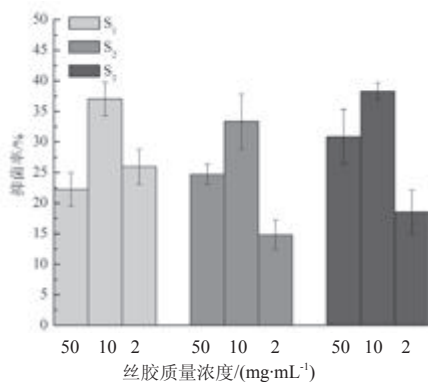


图3 丝胶对金黄色葡萄球菌的抑菌效果
Fig.3 Antibacterial effects of sericin to staphylococcus aureus

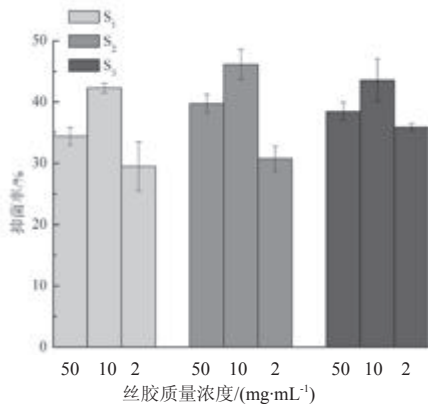


图4 丝胶对大肠杆菌的抑菌效果
Fig. 4 Antibacterial effects of sericin to Escherichia coli

性导致^[4]，其在培养时能够在平板中渗透，具有细菌表面接触和内部侵入的双重作用，对细胞壁较厚的革兰氏阳性细菌金黄色葡萄球菌主要表现为细菌表面接触型，而对细胞壁薄的革兰氏阴性细菌大肠杆菌则主要为表面接触和内部渗透，即溶解渗透性好的丝胶分子上，某些基因先吸附在细菌表面而改变了细菌表面膜的通透性再侵入细菌内部，与细菌体内物质发生吸附，扰乱细菌体内的正常生理活动，从而起到了杀灭细菌的作用。从数据看，茧壳中提取的丝胶抗革兰氏

阳性菌的作用强于茧衣中提取的丝胶，而对革兰氏阴性细菌的顺序则相反，这可能是由于S2的溶解性大于S1^[4]导致。相对分子量小的S3对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果都强于S1，这可能是由于小分子的丝胶本身具有量子效应、小尺寸效应和相对大的比表面积等特性，使得其抗菌接触优于未经酶解处理的S1。

3 结论

1)本研究采用水煮脱胶法分别从家蚕茧壳、茧衣中提取了丝胶蛋白(S1、S2)，用中性蛋白酶酶解部分S1，制备了相对分子量小的茧壳丝胶蛋白肽(S3)。细胞试验结果表明：三种丝胶蛋白对L-929细胞的RGR毒性评分均在2级以下，显示无毒性，且随丝胶质量浓度增大，促细胞生长性能更优。S2和S3的细胞相容性略优于S1。

2)丝胶对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有抑菌作用，对大肠杆菌的抗菌性更为显著。随丝胶质量浓度增大，抑菌率有先逐渐增加后减小的趋势。试验表明，当丝胶质量浓度为10 mg/mL左右时，可发挥较好的抑菌效果。由于不同制备环境下得到的丝胶的溶解性能不同，其抗菌作用强弱有了差异，其对金黄色葡萄球菌的抑制作用强弱顺序为S3、S1、S2，对大肠杆菌抑制作用强弱顺序为S2、S3、S1。丝胶所具有的抗菌性能增大了其在生物材料领域使用的适应性。

参考文献:

- [1]阎隆飞, 孙之荣.蛋白质分子结构[M].北京: 清华大学出版社, 2000: 76-79, 32-42.
YAN Longfei, SUN Zhirong. Protein Structure [M]. Beijing: Qinghua University Press, 2000: 76-79, 32-42.
- [2]陈华, 朱良均, 闵思佳, 等.蚕丝丝胶蛋白的结构、性能及利用[J].功能高分子学报, 2001, 14(3): 344-348.

- CHEN Hua, ZHU Liangjun, MIN Sijia, et al. Structure, property and utilization of silk sericin[J]. Journal of Functional Polymer, 2001, 14(3): 344-348.
- [3]张雨青.丝胶蛋白的药理及其在医用材料上的应用[J].纺织学报, 2003, 24(3): 98-100.
ZHANG Yuqing. Pharmacological function and application to medical biomaterials of sericin[J]. Journal of Textile Research, 2003, 24(3): 98-100.
- [4]张瑶琴, 陈忠敏, 张艳冬, 等.丝胶蛋白分子结构及其制备条件[J].中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(3): 468-472.
ZHANG Yaoqin, CHEN Zhongmin, ZHANG Yandong, et al. Structure and extraction conditions of sericin protein[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(3): 468-472.
- [5]KATO N, SATO S, YAMANAKA A, et al. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1998, 62(1): 145-147.
- [6]ZHANG Y Q, MA Y, XIA Y Y, et al. Silk sericin-insulin bioconjugates: Synthesis, characterization and biological activity[J]. Journal of Controlled Release, 2006, 115(3): 307-315.
- [7]陈忠敏, 郝雪菲, 吴大洋, 等.再生蚕丝素蛋白纳米颗粒的制备及抗菌性[J].纺织学报, 2008, 29(7): 17-20.
CHEN Zhongmin, HAO Xuefei, WU Dayang, et al. Preparation of silk fibroin peptide nano-scale particles and its antibacterial activity[J]. Journal of Textile Research, 2008, 29(7): 17-20.
- [8]张富强, 余文, 傅远飞, 等.六种纳米载银无机抗菌剂的体外细胞毒性比较[J].中华口腔医学杂志, 2005, 40(6): 504-507.
ZHANG Fuqiang, SHE Wen, FU Yuanfei, et al. Comparison of the cytotoxicity in vitro among six types of nano-silver base inorganic antibacterial agents[J]. Chinese Journal of Stomatology, 2005, 40(6): 504-507.

参考文献撰写规范

来稿涉及的参考文献需提供中英文对照, 请按GB/T 7714—2005《文后参考文献著录规则》标准著录, 并在正文中标出相应序号, 举例如下:

1) 专著

[序号]主要责任者.题名: 其他题名信息[文献类型标志].其他责任者(任选).版本项.出版地: 出版者, 出版年: 引文页码.

例: [1]霍斯尼 R K.谷物科学与工艺学原理[M].李庆龙译.2版.北京: 中国食品出版社, 1989: 15-20.

HOSNY R K. Grain Science and It's Technology Principle[M]. LI Qinglong Translation. 2 Edition. Beijing: Chinese Food Press, 1989: 15-20.

[2]PIGGOT T M.The cataloguer's way through AACR2; from document receipt to document retrieval[M].London: The Library Association, 1990.

2) 专著中的析出文献

[序号]析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志].析出其他责任者//专著主要责任者.专著题名.出版地: 出版者, 出版年: 析出的页码[引用日期].

例: [1]白书农.植物开花研究[M]//李承森.植物科学进展.北京: 高等教育出版社, 1998: 146-163.

BAI Shunong. Research on Flowering Plants[M]// LI Chengsen. Advances in Plant Science. Beijing: Higher Education Press, 1998: 146-163.

3) 连续出版物(期刊、报纸)中的析出文献

[序号]析出文献主要责任者.析出文献题名[文献类型标志].连续出版物题名: 其他题名信息, 年, 卷(期): 页码.

例: [1]张旭, 张通和, 易钟珍, 等.采用磁过滤MEVVA源制备类金刚石膜的研究[J].北京师范大学学报: 自然科学版, 2002, 38(4): 478-481.

ZHANG Xu, ZHANG Tonghe, YI Zhongzhen, et al. DLC films prepared by filtered MEVVA system[J]. Journal of Beijing Normal University: Natural Science, 2002, 38(4): 478-481.

4) 专利文献

[序号]专利申请者或所有者.专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志].公告日期或公开日期.

例: [1]姜锡洲.一种温热外敷药制备方案: 中国, 88105607, 3[P].1989-07-26.

JIANG Xizhou. A method of warm medicine for external application: China, 88105607[P]. 1989-07-26.

5) 电子文献

[序号]主要责任者.题名: 其他题名信息[文献类型标志/文献载体标志].出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期)[引用日期].获取和访问路径.

例: [1]萧钰.出版业信息化迈入快车道[EB/OL].(2001-12-19) [2002-04-15].http://www.creder.com/news/200112190019.htm.

XIAO Yu. Publishing industry informatization entering into the fast lane[EB/OL].(2001-12-19) [2002-04-15]. http://www.creder.com/news/200112190019.htm.