

文章编号: 1671-7104(2021)03-0301-04

# 丝素蛋白的制备方法及其在生物医用材料领域的应用

**【作者】** 王苗苗<sup>1,2</sup>, 韩倩倩<sup>2</sup>

1 烟台大学, 烟台市, 264005

2 中国食品药品检定研究院, 北京市, 102629

**【摘要】** 丝素蛋白具有良好的生物相容性、力学性能、降解性能及易塑形性等特点, 使得丝素蛋白成为了生物医用材料制备和研究的重点, 得到了广泛关注。综述了丝素蛋白从脱胶、溶解及再生加工的现有技术方法。对丝素蛋白材料在生物医用材料领域的具体应用方面进行了综述, 并对丝素蛋白在生物医用材料领域的应用前景进行了展望。**【关键词】** 丝素蛋白; 生物; 医用材料**【中图分类号】** R318.08**【文献标志码】** A

doi:10.3969/j.issn.1671-7104.2021.03.015

## Preparation Method of Silk Fibroin and Its Application in Field of Biomedical Materials

**【Writers】** WANG Miaomiao<sup>1,2</sup>, HAN Qianqian<sup>2</sup>

1 Yantai University, Yantai, 264005

2 China Institute for Food and Drug Control, Beijing, 102629

**【Abstract】** Silk fibroin has the characteristics of good biocompatibility, mechanical properties, degradation performance and easy shaping, which makes silk fibroin become the focus of biomedical material preparation and research, and has received extensive attention. This article reviews the prior art methods of silk fibroin degumming, dissolution and regeneration processing. The specific applications of silk fibroin materials in the field of biomedical materials are reviewed, and the application prospects of silk fibroin in the field of biomedical materials are prospected.**【Key words】** silk fibroin, biology, medical materials

### 0 引言

蚕丝是一种主要由内层的丝素蛋白和外层的丝胶蛋白组成的天然丝, 是熟蚕结茧时所分泌丝液凝固而成的连续长纤维, 也是一种天然纤维。丝素蛋白作为一种不溶于水的天然大分子材料, 约占蚕丝总质量的75%。作为蚕丝的主体组成部分, 丝素蛋白不仅含有人体必需氨基酸, 对机体没有毒性、致敏性、刺激作用, 而且大部分可被生物体所降解<sup>[1]</sup>。在生物医用领域, 它不但与人体具有良好的亲和性, 而且最重要的是, 丝素蛋白在可控条件下可以实现水

**收稿日期:** 2020-07-17**基金项目:** 科技部十三五重点研发计划(2016YFC1103202); 中国科学院“器官重建与制造”战略性先导专项(XDA16040602)**作者简介:** 王苗苗, E-mail: 18740631878@163.com**通信作者:** 韩倩倩, E-mail: hanqianqian2005@163.com

溶性与非水溶性的双向转化的特点, 使得其可根据所需进行后期加工。丝素蛋白来源广泛, 制备方法简单, 根据不同的应用场合, 再生和加工成薄膜、海绵、水凝胶、微球等不同的形态<sup>[2]</sup>。随着加工技术的不断改进与完善, 丝素蛋白将具有更加广阔的应用前景。

### 1 再生丝素蛋白溶液的制备

#### 1.1 蚕丝的脱胶工艺

有文章表明, 当丝胶蛋白单独使用时, 不会诱导免疫反应, 而当丝素蛋白和丝胶蛋白混合使用时, 会引起蚕丝蛋白的免疫原性<sup>[3]</sup>。因此, 蚕丝的脱胶是丝素蛋白在生物医用材料领域应用的关键部分。由于丝素也是一种蛋白质, 在对蚕丝进行脱胶过程中, 往往会导致丝素的力学强度和丝素蛋白分子量的下降。因此, 在蚕丝脱胶工艺

中, 如何选择合适的脱胶剂以及脱胶条件尤为重要。脱胶的好坏, 对丝的质量和原料的制成率都有极大的影响<sup>[4]</sup>。譬如, 丝素蛋白在生物医用材料方面的应用中, 未脱胶或者脱胶不彻底, 可能会引起人体的一些炎症反应, 往往以巨噬细胞的增多为主要表现<sup>[5]</sup>。但是如果脱胶过度, 则会影响丝素的蛋白质结构。因此, 选择合适的脱胶方法对脱胶效果的好坏至关重要。

蚕丝的脱胶原理是基于: 丝胶是一种具有水溶性特点的蛋白, 而丝素不溶于水, 在一定外界条件下, 丝胶进行溶解并从丝素上脱除下来, 从而达到脱胶的目的<sup>[6]</sup>。脱胶工艺经过多年的不断发展, 碱法脱胶是目前使用最多的脱胶工艺之一, 和其它脱胶工艺相比, 具有效果明显、成本低、时间短等优势, 不同的碱性试剂对蚕丝脱胶的效果以及脱胶后丝素蛋白分子量和丝素纤维的力学性能、表面形貌的影响差异均比较大<sup>[7]</sup>, 常选用的碱性试剂有碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、尿素等; 除此之外, 酸法脱胶、酶法脱胶及高温高压法等工艺也被广泛应用。柠檬酸、酒石酸等有机酸常作为酸性脱胶剂被使用, 但这种方法不但成本比较高, 而且操作过程中也不易控制<sup>[8]</sup>; 酶法脱胶虽是一种简单易操作的蚕丝脱胶方法, 但使用成本较高, 不适用于大规模使用; 高温高压法是一种高效率、低污染、低成本、无需多次脱胶的工艺, 但该方法在操作过程中往往会破坏丝素的水解, 导致丝素纤维的力学强度和丝素蛋白的分子量明显降低。

## 1.2 蚕丝的溶解工艺

丝素蛋白难以溶解, 只有用强酸、强碱或高浓度盐才能溶解。由于强酸和强碱溶解丝素蛋白会破坏其分子链, 使丝素分子量大大降低。因此, 选择合适的溶解方法至关重要<sup>[9]</sup>。

### 1.2.1 离子液体溶解体系

离子液体是指全部由离子组成的、没有电中性分子的环保试剂。具有优异的溶解性、热稳定性、强极性、不挥发、难氧化和可设计性等优点, 具有“需求特定”和“量体裁衣”

等称号。近年来, 离子液体在溶解高聚物方面备受关注<sup>[10]</sup>。任厚朋等<sup>[11]</sup>组合了十种离子液体, 其中离子液体1-丁基-3-甲基咪唑乙酸盐([Bmin]AC)在75℃下, 840 min内对丝素蛋白的最大溶解能力可达到15%, 为丝素蛋白的溶解和应用提供参考; 王宗乾等<sup>[12]</sup>采用1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐([Amim]Cl)离子液体共溶法制备丝素蛋白/聚乙烯醇(SF/PVA)复合膜, 随着复合膜中丝素蛋白含量的增加, 复合膜的亲水性能提升。采用[Amim]Cl离子液体共溶提高了丝素蛋白与聚乙醇组分的相容性, 且使用后的[Amim]Cl离子液体可经过旋蒸回收, 实现重复使用, 具有环保效益。

### 1.2.2 中性盐溶解体系

丝素在水中只能有限膨润, 但在部分高浓度中性无机盐溶液中却能无限膨润, 最终完全溶解<sup>[9]</sup>。肖露等<sup>[13]</sup>选用中性溶剂高浓度盐、盐与有机液体的多元溶剂, 分别对桑蚕丝和柞蚕丝进行溶解, 在CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH溶解体系下, 桑蚕丝素的溶解最佳, 而Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-4H<sub>2</sub>O体系下则更有利于柞蚕丝素的溶解。在不同溶解体系下制备的丝素溶液不但分子量分布与稳定性不同, 而且氨基酸含量也有所差异; 甘润生等<sup>[14]</sup>采用两种不同的溶解体系对脱胶后的蚕丝蛋白纤维进行溶解, 制备了丝素蛋白纳米颗粒。其中CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH-FA溶解体系有助于形成球状丝素蛋白纳米颗粒, 且制备出的丝素蛋白纳米颗粒粒径均一、分布均匀。

## 2 蚕丝的再生加工

丝素蛋白材料虽然具有良好的生物相容性和可降解性, 在生物医用领域的应用前景甚广, 但是纯丝素蛋白材料在生物医用领域的应用方面, 其力学性能等尚未达到实用性的要求, 而丝素蛋白的改性研究是一种良好的解决途径。

### 2.1 物理改性

采用物理改性方法, 不但可以改善蚕丝的光泽, 提高蚕丝纤维的力学性能, 而且还可以使蚕丝获得更好的热稳定性、阻燃性、抗皱、抗菌

以及色牢度等性能。常用的物理的改性方法有有机溶剂诱导改性、辐照改性、热处理改性、等离子体技术等<sup>[15]</sup>。王心如等<sup>[16]</sup>以柞蚕丝为原料,采用乙醇诱导再生柞蚕丝素蛋白 (ASF) 溶液快速凝胶,从而进一步制备ASF多孔材料。随着乙醇水溶液浓度的升高,不仅可以使凝胶中 $\beta$ -折叠含量上升,而且有利于获得孔径较大的ASF多孔材料。在该材料上接种血旺细胞后的结果表明,ASF多孔材料在生物医用领域具有一定的应用价值;冯美林等<sup>[17]</sup>将制备的纳米羟基磷灰石溶液通过空气等离子体处理,成功制备出丝素纤维/纳米羟基磷灰石复合材料。该处理不仅增加了丝素纤维的表面粗糙度,而且改变了丝素纤维表面的亲疏水性及结晶度。其制备的丝素纤维/纳米羟基磷灰石复合材料有望用于骨组织修复替代材料,为骨缺损修复提供了一定的解决依据。

## 2.2 化学改性

丝素蛋白分子具有相当数量的丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、酪氨酸等氨基酸残基,可以通过常规的化学方法进行修饰和交联改性,目前常见的交联剂主要有环氧树脂、戊二醛、京尼平和碳化二亚胺等。汪巍巍等<sup>[18]</sup>使用碳化二亚胺 (EDC) 为激活剂,介导柞蚕丝素蛋白侧链上的羧基与低分子量聚乙烯亚胺 (PEI) 上的氨基反应,使得柞蚕丝素蛋白表面的电荷由负电荷转为正电荷,从而获得阳离子改性后的柞蚕丝素蛋白。低分子量的PEI改性的柞蚕丝素蛋白有可能是一种新基因传递载体。

## 2.3 共混改性

共混改性,即将丝素蛋白溶液直接加入天然或合成的高分子溶液均匀搅拌后共混成膜。高分子材料可以与丝素蛋白通过羧基和其他极性基团形成氢键,诱导丝素蛋白分子链结构发生改变,从而提高丝素蛋白材料的力学性能,改善其吸水性<sup>[19]</sup>。YANG等<sup>[20]</sup>研究了明胶 (G) 对丝素蛋白 (SF) 膜进行改性,探讨其作为细胞生长生物材料是否能提高丝素表面的生物相容性。研究结果表明,共混处理后的丝素蛋白膜细胞相容性显

著增强,且无细胞毒性。SF/G共混膜在组织工程和生物医学工程中具有潜在的应用潜力,在组织工程和生物医学工程中,在物理和生物工程领域,SF/G共混膜都体现出其良好的应用前景;王一川等<sup>[21]</sup>采用静电纺丝技术制备了具有一定取向的丝素蛋白-聚乙烯醇共混纳米纤维材料,改善了纳米纤维材料的力学性能,提高了该材料应用于组织工程支架材料时,细胞的生长及增殖等性能。

## 3 丝素蛋白在生物医用材料领域的应用形式

### 3.1 丝素蛋白膜

丝素蛋白具有良好的成膜性能,因此,在生物医用领域再生丝素膜是一种常见的应用形式之一。全君杰等<sup>[22]</sup>运用丝素蛋白、壳聚糖和羟基磷灰石为原料,制备出具有良好生物相容性及一定骨诱导性的复合生物膜,该复合生物膜有望成为一种新型的生物膜材料;赵彬等<sup>[23]</sup>在此前的研究基础上,将氧化石墨烯/丝素蛋白 (GO/SF) 生物材料以屏障膜的形式用于引导性骨再生领域。采用冷冻干燥技术制备负载辛伐他汀 (SIM) 的GO/SF复合屏障膜,经过释药性能检测及体内外实验后发现,该复合屏障膜具有缓释效果和最优的骨缺损修复效果。

### 3.2 丝素蛋白支架

在组织工程研究中,丝素蛋白支架不但可以为新生组织提供相应的力学支持,而且因其植入机体内具有良好的生物相容性、可降解性及低免疫原性等优势,使得丝素蛋白支架在生物医用领域方面受到人们的广泛关注和应用。陈飞扬等<sup>[24]</sup>研究通过静电纺丝技术对丝素 (SF) 和壳聚糖 (CS) 进行混纺,制备的SF/CS复合纳米纤维膜支架具有良好的生物相容性,CS很好地促进骨髓间充质干细胞成骨分化,使得SF/CS复合支架在骨组织再生方面成为可能;陈琦等<sup>[25]</sup>在浓缩生长因子 (CGF) -丝素蛋白/羟基磷灰石类骨质复合生物支架进行兔颌骨缺损修复中,发现该复合支架具有良好的骨诱导性,在生物医用材料领域有望成为新型的骨缺损修复材料。

### 3.3 丝素蛋白水凝胶

丝素蛋白因其特殊的大分子结构,使得能通过加工制备成丝素蛋白水凝胶,是再生丝素的一种重要表现形式,其具有高含水量和高度交联的空间网络结构,独特的理化性质和对细胞和小分子优异的透过性和扩散性<sup>[26]</sup>。制备的丝素蛋白水凝胶已在生物医用领域得到了广泛的应用。CHEN等<sup>[27]</sup>提出了一种新型的具有三维(3D)各向异性和定向的凝胶骨架/网络形态的丝素蛋白/枯草菌脂肽钠水凝胶,由于其定向的凝胶骨架/网络结构和显著增强的机械性能,剪切诱导的丝蛋白/表面活性素凝胶可能适合作为3D定向组织再生的生物材料,包括用于神经、骨细胞的培养以及修复缺损等研究中;ZHOU等<sup>[28]</sup>合成了具有乙烯基的马来酰化壳聚糖(MCS)和甲基丙烯酸化丝素蛋白(MSF)微/纳米颗粒。通过研究得出,其具有作为组织工程支架修复软骨的潜力。

### 3.4 丝素蛋白微球

丝素微球因具有生物相容性好、可生物降解、比表面积大、分散性好等优点,是药物运输系统的理想材料<sup>[29]</sup>。丝素微球的制备方法主要有乳化法、喷雾干燥法、层流射流技术及自主装法等。叶漫文等<sup>[30]</sup>试图用不同浓度京尼平交联不同丝素蛋白(SF)与壳聚糖(CS)比例,制备SF/CS复合微球并包载牛血清蛋白(BSA)。SF/CS复合微球的缓释效能优于单纯的壳聚糖微球,使得该复合微球在药物转运方面成为可能;徐帮会等<sup>[31]</sup>运用星点设计法,以丝素蛋白溶液为水相,以液体石蜡为油相,以戊二醛为交联剂,以Span80为乳化剂,应用乳化-化学交联法制备丝素蛋白微球圆整,为丝素蛋白微球在药物载体方面的研究提供一定的理论依据。

## 4 总结与展望

丝素蛋白作为一种天然的高分子蛋白质,与其他合成材料相比,具有良好的生物相容性、可生物降解及可塑性等众多优势,使得丝素蛋白材料在生物医学材料领域受到了广泛的关注和重

视。目前,丝素蛋白已成功应用于骨组织支架、血管组织再生、皮肤修复等过程中。然而面对复杂的医学应用要求,丝素蛋白材料从提取、加工及在生物医用领域依然存在许多问题亟需解决。譬如,如何选择合适的脱胶剂和脱胶条件,用以解决脱胶过程中对丝素力学性能和蛋白质分子量降低的影响;如何调控丝素蛋白的降解速率,使得丝素蛋白材料的功效发挥到极致。解决这些问题,还需要国内外学者的不懈努力。总体来讲,丝素蛋白材料在生物医用材料领域还具有较大的探索提升空间,相信经过国内外学者的不懈努力,一定可以使得丝素蛋白材料在生物医用材料领域发挥更大的作用。

### 参考文献

- [1] 徐清栋,雷彩虹,朱海霖,等. 丝素/明胶复合材料的比例对小鼠止血性能的影响[J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2018, 39(1): 45-50.
- [2] 李莹莹,王昉,刘其春,等. 丝素蛋白及其复合材料的研究进展[J]. 材料工程, 2018, 46(8): 14-26.
- [3] 杨梅蓉. 基于丝胶蛋白的抗菌材料及dsRNA递送载体的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [4] 钱薇薇,李胜臻,吴晴,等. 苦味酸-胭脂红着色法判别蚕丝的脱胶程度[J]. 天津纺织科技, 2017(1): 34-36.
- [5] 汪斯衡,蒋佳,陈世益. 蚕丝及其衍生材料在运动损伤修复中的应用[J]. 中国运动医学杂志, 2016, 35(7): 682-686.
- [6] 董悦涵. 脱胶条件对盐解丝素蛋白分子量的影响[J]. 现代农业科技, 2019(6): 211-213.
- [7] 黄倩,牛隲星,梁阿辉,等. 蚕丝脱胶方法的分析和比较[J]. 现代丝绸科学与技术, 2019, 34(5): 33-37.
- [8] 李守川. 微波辅助提取丝素蛋白及其水凝胶的研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.
- [9] 王鹏. 不同盐/甲酸溶解丝素及其再生膜和凝胶的制备与表征[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [10] 梁晴晴. 光照对丝素蛋白溶解及成膜性能的探究[D]. 青岛: 青岛科技大学, 2018.
- [11] 任厚朋,孙仕芹,李露. 离子液体对丝素蛋白溶解性能的影响[J]. 应用化工, 2014, 43(7): 1255-1257,1262.
- [12] 王宗乾,杨海伟,汤立洋,等. 丝素蛋白/聚乙烯醇复合膜的制备及其表征[J]. 纺织学报, 2018, 39(11): 14-19, 26.
- [13] 肖露,杨旭超,余卫华,等. 桑/柞蚕丝不同溶解体系再生丝素蛋白性能研究[J]. 纺织科技进展, 2017(11): 13-16, 21.
- [14] 甘润生,张斐超,苏鑫贺,等. 自组装丝素蛋白纳米颗粒的制备[J]. 河南工程学院学报(自然科学版), 2019, 31(3): 1-4.

企业同行在竞争关系中寻求合作等制度优势<sup>[4]</sup>；另一方面，在注册人质量安全责任承担能力、注册人产品全生命周期风险管理能力、知识产权保护与委托生产平衡、跨区域委托生产协同监管等方面有待加强<sup>[5]</sup>。

#### 4.1 “九宫格管理”模式可完善全要素体系，助力形成标准化委托模式

通过识别“注册人制度”及相应指导原则的要求，在“九宫格管理”模式的基础上，完善了全要素体系要求，建立了标准化的委托模式，建立了同时适用于双方的管理体系，形成“注册人制度”管理金字塔。



图5 “注册人”管理金字塔  
Fig.5 “MAH” management pyramid

#### 4.2 “注册人制度”可整合全产业链资源，助力提升区域性集聚效应

2018年至2019年，监管部门先后出台京津冀、长三角、广东省等地的“注册人制度”互通合作的一系列法规。随着“注册人制度”试点扩大至全国范围，形成区域集聚效应，资源优化配置效应也愈加显现。“注册人制度”将有助于医疗器械企业在全国乃至全球业务推广延伸，助力指数型经济增长模式转化。

#### 参考文献

- [1] 林峰. 我国医疗器械注册人制度试点工作方兴未艾[J]. 张江科技评论, 2020, 1(2): 19-20.
- [2] 徐徕, 林森勇, 胡丽君, 等. 借鉴与创新: 医疗器械注册人制度构建研究[J]. 中国医疗器械杂志, 2019, 43(3): 192-193.
- [3] 朱佳娴, 施绿燕, 颀孙燕, 等. 欧盟, 美国, 日本药品上市许可持有人制度分析及启示[J]. 上海医药, 2020, 41(1): 47-48.
- [4] 陈勇鸣. 中国医疗器械注册人制度改革探析[J]. 张江科技评论, 2020, 1(2): 70-72.
- [5] 黄琬纯, 李新天, 张兴华, 等. 我国医疗器械注册人制度试点实施的风险分析及策略探讨[J]. 中南药学, 2020, 18(2): 318-321.

上接第304页

- [15] 彭若铤, 蔡佳丽, 黄晓冰, 等. 现代丝绸服饰材质的提升技术和方法[J]. 广东蚕业, 2018, 52(12): 8-10.
- [16] 王心如, 邹盛之, 冯文庆, 等. 乙醇诱导的柞蚕丝素蛋白多孔材料的研究[J]. 丝绸, 2018, 55(10): 1-8.
- [17] 冯美林, 张青, 朱良均, 等. 利用等离子体技术调控丝素纤维表面性能诱导其仿生矿化的研究[J]. 蚕业科学, 2017, 43(1): 124-131.
- [18] 汪巍巍, 李明忠. 用低分子量聚乙炔亚胺改性柞蚕丝素蛋白[J]. 现代丝绸科学与技术, 2018, 33(4): 1-4.
- [19] 陈芳芳, 闵思佳, 朱良均. 丝素蛋白材料改性的研究进展[J]. 丝绸, 2005, 42(5): 38-41.
- [20] YANG L, YASEEN M, ZHAO X, et al. Gelatin modified ultrathin silk fibroin films for enhanced proliferation of cells[J]. Biomed Mater, 2015, 10(2): 025003.
- [21] 王一川, 刘延波, 唐兵兵. 丝素蛋白-聚乙炔醇共混改性电纺膜的制备[J]. 合成纤维, 2014, 43(5): 23-28.
- [22] 全君杰, 罗刚, 李志容, 等. 丝素蛋白/壳聚糖/羟基磷灰石膜具有良好的生物相容性及促成骨性能[J]. 分子影像学杂志, 2020, 43(3): 543-547.
- [23] 赵彬, 武峰, 白莹莹, 等. 负载辛伐他汀的氧化石墨烯/丝素蛋白屏障膜的制备及其生物学性能[J]. 新型炭材料, 2018, 33(5): 460-468.
- [24] 陈飞扬, 卜寿山, 庄海, 等. 静电纺SF/CS复合纤维支架对

- hBMSCs体外细胞增殖及成骨分化的影响[J]. 口腔生物医学, 2019, 10(2): 73-77, 82.
- [25] 陈琦, 李石岩, 禹鑫, 等. CGF复合丝素蛋白-羟基磷灰石支架对兔下颌骨缺损的修复作用[J]. 河北医学, 2020, 26(4): 698-702.
- [26] 吴峰. 光固化丝素蛋白水凝胶的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [27] CHEN D, YIN Z, WU F, et al. Orientational behaviors of silk fibroin hydrogels[J]. J Appl Polymer Sci, 2017, 134(32): n/a-n/a.
- [28] ZHOU Y, LIANG K, ZHAO S, et al. Photopolymerized maleilated chitosan/methacrylated silk fibroin micro/nanocomposite hydrogels as potential scaffolds for cartilage tissue engineering[J]. Int J Biol Macromolecules, 2018, 108: 383-390.
- [29] 潘岳林, 杨明英, 张海萍, 等. 丝素微球的制备方法研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2014, 36(4): 8-11.
- [30] 叶漫文, 方炜, 石勇, 等. 京尼平交联丝素蛋白-壳聚糖缓释微球的制备与表征[J]. 广东牙病防治, 2016, 24(2): 79-87.
- [31] 徐帮会, 陈汝玲, 吴静澜. 星点设计-效应面法优化丝素蛋白微球的制备工艺[J]. 贵阳中医学院学报, 2018, 40(5): 12-17.