

翡翠贻贝足蛋白作为生物黏合剂的提取及应用*

蒋 臻¹ 刘加鹏¹ 金利华¹ 张其清^{1,2Δ}

1 (厦门大学 材料学院 生物材料系; 厦门大学 生物医学工程研究中心, 福建省生物医学工程重点实验室;

厦门市生物医学工程技术研究中心, 厦门 361005)

2 (中国医学科学院 中国协和医科大学 生物医学工程研究所, 天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192)

摘要: 贻贝黏附蛋白作为一种潜在的环保性生物黏合剂, 在医学以及水下应用等方面具有潜在价值。为了研究翡翠贻贝足部黏附蛋白(Pvfp)作为生物黏合剂的黏附特性, 利用酸提取法提取 Pvfp, 并对其在不同材料表面包被能力分析, 以石英晶体微天平(QCM)检测蛋白在金表面的黏附量, 分析该蛋白对细胞及组织的黏附能力以及细胞毒性。对不同材料表面包被能力以及 QCM 分析结果显示, Pvfp 具有与 Cell TakTM 相似甚至更佳的吸附能力; 细胞黏附结果显示, Pvfp 具有比 Cell TakTM 和 PLL(poly-L-lysine)更强的细胞黏附能力; 对 HeLa 细胞和 293T 细胞的毒性分析结果显示, Pvfp 没有细胞毒性; 组织黏附结果显示, Pvfp 可以黏接断裂的小鼠股骨; 黏接聚氯乙烯材料和黏接猪的断裂股骨实验结果表明, Pvfp 具有比医用生物蛋白胶更强的抗张强度。提示, Pvfp 蛋白可能作为有效的细胞和组织黏合剂而广泛应用于生物技术领域, 并在临床应用生物黏合剂中具有潜在应用价值。

关键词: 翡翠贻贝; 生物黏合剂; 生物材料; 足蛋白

中图分类号 Q78; Q819 文献标识码 A 文章编号 1001-5515(2010)06-1266-08

Extraction and Application of *Perna viridis* Foot Protein as Bioadhesive

Jiang Zhen¹ Liu Jiapeng¹ Jin Lihua¹ Zhang Qiqing^{1,2}

1 (Research Center of Biomedical Engineering, Xiamen University, Key Laboratory of Biomedical Engineering of Fujian, Technology Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen, Xiamen 361005, China)

2 (Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Key Laboratory of Biomedical Material of Tianjin, Tianjin 300192, China)

Abstract: Mussel adhesive proteins have attracted increasing interests for their potential use as environmentally friendly bioadhesives in medicine and aqueous conditions. In this study, surface coating analysis, quartz crystal microbalance (QCM), cell and bone tissue adhesion and cytotoxicity assay were used to study the properties of the *Perna viridis* foot proteins (Pvfp) extract as bioadhesive. The results of coating ability on various materials and QCM analysis revealed that Pvfp extract has comparable or superior adsorption ability to that of Cell TakTM (the naturally extracted MAP mixture from *Mytilus edulis*, and has been commercialized), and also, the cell adhesion ability of Pvfp extract was stronger than that of Cell TakTM and poly-L-lysine. No cytotoxicity was detected using human HeLa and 293T cells. Furthermore, broken bones of mouse could be stuck together by use of Pvfp extract. In bulk-scale adhesion tests, Pvfp extract showed much greater tensile strength than did fibrin glue for conglomerating poly(vinyl chloride) sticks and for binding together pig's femur segments. These results suggested that Pvfp extract be an efficient cell and tissue adhesive in biotechnological application and it might be a potential bioadhesive in medical practice.

Key words: *Perna viridis*; Bioadhesive; Biomaterial; Foot proteins(fp)

* 福建省青年科技人才创新项目资助(2004J022) 和国家自然科学基金资助项目(30600147)

Δ 通讯作者。E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

引言

海洋贻贝可以通过其足分泌的足丝使其牢固贴附在水下的基底物质表面。这种足丝的末端结构称为黏附盘,由6种不同的黏附蛋白足蛋白(foot protein 1~6, f₁~f₆)^[1]组成。这些黏附蛋白中的多巴(DOPA, L-3, 4-二羟基苯丙氨酸)含量都很高,而多巴是由酪氨酸残基经羟基化修饰后的产物^[1]。在这6种足蛋白中f₁、f₃和f₅被认为是在黏附性能中起重要作用的蛋白。其中f₁作为足丝的包被蛋白^[2],含有大约80个十肽重复序列;而富含多巴的f₃和f₅则在基底和黏附盘之间的界面处起黏接作用^[2,3];f₂和f₄作为黏附盘内的蛋白成分,而f₆在通过巯基发生的交联反应和由多巴氧化为醌等方面与其他几种足蛋白相似^[2,4]。大量研究结果显示,多巴在足丝黏附性能发挥中起关键的作用^[1,3,5-7]。

贻贝足丝具有高强度、高韧性、防水性以及强黏附能力,使之在生物技术领域具有潜在应用价值。以往研究表明,由于该类黏附蛋白具有良好的生物相容性,对人体无毒性以及较好的生物可降解性,因而可被用作环境友好的生物医用黏合剂^[8-10]。研究中用于细胞和组织黏附实验的是自然提取的贻贝黏附蛋白(mussel adhesive proteins, MAPs),然而,从紫贻贝中提取得到的、含有多酚蛋白并由串联十肽重复序列组成的Cell-TakTM,是现在唯一商业化应用的MAPs。翡翠贻贝(*perna viridis*)足部含有多种足丝前体蛋白,即称为翡翠贻贝足部黏附蛋白(*Perna viridis* foot protein, Pvfp),其中Pvfp₁含有两种特殊修饰的氨基酸(O-糖基化的Thr和罕见的多巴衍生物L-β-3, 4-二羟基苯基-α-丙氨酸^[11])。虽然其他几种Pvfp的结构特征尚未明确,但由于Pvfp₁的特殊性,我们研究了Pvfp提取物的黏附功能,同时与商业化的MAPs提取物Cell-TakTM对比,以提供从贻贝资源中开发新型生物黏合剂的理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

翡翠贻贝(购自福建厦门第八市场);胃酶抑素A(中国Solarbio),亮肽酶素(美国AMRESCO),PMSF(美国BBI),Cell-TakTM(BD Bioscience),Poly-L-lysine(PLL)(Sigma),天绣医用生物蛋白胶Fibrin Sealant(中外合资广州倍绣生物技术有限公

司)。胰酶、Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)、胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素均来源于美国Hyclone公司。

1.2 仪器

组织匀浆机T18 basic(德国IKA公司),超声波清洗器SK8210HP(上海科导超声仪器有限公司;上海汉克科学仪器有限公司),数显恒温磁力搅拌器HJ-3(常州国华电器有限公司),标准型pH计PB-10(德国赛多立斯),生物显微镜YS100(日本尼康),台式高速冷冻离心机Biofuge fresco(德国SORVALL),电泳仪(BIO-RAD美国),核酸蛋白检测仪DU800(BECKMAN),冷冻干燥机FreeZone(Labconco公司),单人双面净化工作台SW-CJ-1F(苏州净化设备有限公司),荧光倒置显微镜(德国ZEISS),石英晶体微天平(QCM)及石英晶振片(Technobiochip,意大利)。

1.3 Pvfp提取

选取壳长6~10 cm的翡翠贻贝,根据以往文献方法提取Pvfp^[11]。提取过程:从活的翡翠贻贝中切取足部,搜集约20 g,在170 ml 5%乙酸(含有0.1%甲醇、30 μmol/L胃酶抑素A、30 μmol/L亮肽酶素和1 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)中切碎;将切碎的足部用组织匀浆机T18 basic匀浆,4℃,20 000 g,离心60 min。取上清(约160 ml),向上清中缓慢加入60%高氯酸(PCA)至终浓度1%(v/v);搅拌30 min后再次离心,上清(约150 ml)转移至500 ml离心管中;并向管内边搅拌边加入2.52 ml浓硫酸以酸化,然后向混合物中边搅拌边逐滴加入300 ml冰预冷的丙酮;冰浴30 min后离心。一部分沉淀于4℃保存于5%乙酸中,用于后续大量黏附实验分析,另一部分沉淀在5%乙酸中匀浆后,调节蛋白浓度到1.44 mg/ml。

1.4 电泳

根据Ahmed总结的操作方法^[12],对样品进行酸尿素聚丙烯酰胺凝胶电泳(AU-PAGE)。每个样品电泳后分别以NBT(四唑氮蓝, Nitroblue Tetrazolium)^[13]和考马斯亮蓝R-250(CBBR-250)染色法检测。

1.5 材料表面包被

将Pvfp蛋白提取物包被于不同材料(盖玻片、聚苯乙烯片、钛片)表面以检测Pvfp提取物的包被能力。包被方法^[14]:材料表面以洗洁精反复清洗,并以双蒸水润洗,氮气中干燥后,向每种材料表面滴加约10 μl(浓度为1.44 mg/ml)蛋白样品,25℃潮

湿环境中(80%相对湿度) 孵育 12 h; 待蛋白样品干燥后, 各材料表面以 PBS 冲洗 2 h(同时震荡)。通过 CBBR 染色观察材料表面吸附的蛋白。以溶于 5% 乙酸的同浓度牛血清白蛋白 (BSA) 和 CelT Tak™ 分别作阴性对照和阳性对照。

1.6 QCM 检测金表面蛋白吸附量

实验中使用直径 6 mm、共振频率 9 949 MHz 的石英晶振片(带有中心喷金电极的铬片)检测蛋白在金表面的吸附量。将每种蛋白样品(1.44 mg/ml)各滴加约 5 μ l 于金表面上, 样品干燥后, 将石英晶振片连接到 QCM 分析仪上, 检测共振频率的变化, 根据相关公式转换成所吸附蛋白的质量^[14, 15]。

1.7 细胞黏附分析

在 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂ 的培养环境中, 采用含 10% FBS、100IU 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基培养 HeLa 细胞、293T 细胞。

检测 Pvfp 提取物对 HeLa 细胞和 293T 细胞的黏附作用^[10], 以 CelT Tak™、PLL 和未经蛋白包被的盖玻片表面为对照。将每种蛋白样品(1.44 mg/ml)各约 5 μ l 滴加于洗净的盖玻片(18 mm \times 18 mm)表面。CelT Tak™ 和 PLL 的样品溶液按说明书制备, Pvfp 提取物样品制备方法与 CelT Tak™ 样品一致。玻片于超净台中干燥, 以磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次; 将包被后的盖玻片浸入含有悬浮 HeLa 细胞或 293T 细胞(1×10^5 cells/ml)的培养皿(60 mm)中, 培养基为 2 ml DMEM(无 FBS)。37 $^{\circ}$ C 培养 1 h 后, PBS 冲洗盖玻片 5 次, 洗去未黏附的细胞; 黏附在盖玻片上的细胞以 0.4% (w/v) 的台盼兰染色以观察细胞黏附情况。

1.8 细胞毒性分析

Pvfp 提取物的细胞毒性以 MTT 比色法检测。按上述包被盖玻片的方法向 96 孔板每孔中滴加 4 μ l(1.44 mg/ml)样品(Pvfp 提取物、CelT Tak™ 和 PLL), 每个样品 4 个重复, 并以未包被孔作为对照。向处理后的 96 孔板中种入 100 μ l HeLa 细胞(5×10^3 cells/ml) 或 293T 细胞(1×10^4 cells/ml), 参照 MTT 试剂盒(ATCC, USA)说明书方法, 每培养 12 h, 检测一次吸光值(490 nm)以反映细胞活性。

1.9 对骨组织和塑料耗材的黏附

根据相关文献方法^[8], 将 4 μ l(1.44 mg/ml)样品滴于细胞培养皿上, 再将塑料枪头置于其上, 检测培养皿与塑料枪头之间的黏附作用。同样, 用 8 μ l(1.44 ng/ml)样品滴于小鼠股骨断裂处, 将断裂的两段股骨固定连在一起; CelT Tak™ 和 BSA 为对

照。将黏合的连接物置于 25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 80% 的潮湿环境中观察黏接效果。

1.10 黏附抗张强度

Pvfp 提取物取用前先以双蒸水清洗、称重并匀浆(蛋白:水=2:1, w/w)^[16]。以医用生物蛋白胶作为对照, 样品制备按说明书操作。取 Pvfp 提取物和医用生物蛋白胶各 15 ml, 分别涂覆于聚氯乙烯(PVC)棒(1 \times 1 \times 5 cm³)的连接处; 然后, 取 Pvfp 提取物和医用生物蛋白胶各 30 mg, 分别涂覆于猪股骨断裂处(面积约为 2 cm²)。用管型测力计(LTZ-10, 最大量程 100 N)测量接合物的抗张强度。

2 结果

2.1 电泳分析

根据 AU-PAGE(见图 1)显示, Pvfp 提取物中共有 12 种蛋白, 其中 10 种可被 NBT 染色, 显示 Pvfp 提取物中大多数蛋白含有多巴或多巴衍生物。

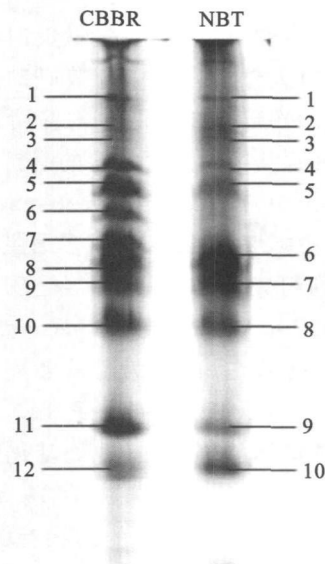


图1 Pvfp 蛋白提取物的 AU PAGE 电泳图

所有蛋白被考马斯亮蓝染色; 含有 DOPA 和 DOPA 衍生物的蛋白被 NBT 染色

Fig 1 AU-PAGE analysis of Pvfp extract

CBBR staining, whole protein; NBT staining, DOPA/DOPA-derivatives containing protein.

2.2 材料表面包被及 QCM 分析

材料表面包被能力以及 QCM 等对 Pvfp 提取物的小量分析结果显示, 几种材料表面包被的 Pvfp 提取物和 CelT Tak™ 经双蒸水冲洗后, CBBR 染色

显示仍然吸附在材料表面; 而材料表面被 BSA 则几乎完全被冲洗掉(见图 2 a)。该结果说明 Pvfp 提取物和 Cell-Tak™ 可以在潮湿环境中包被于材料表面, 具有一定的防水性能。钛片表面 Pvfp 提取物与 Cell-Tak™ 的吸附量相当, 而在盖玻片和聚苯乙烯表面 Pvfp 提取物的吸附量大于 Cell-Tak™ (见图 2 a)。

另外, 用 QCM 检测蛋白样品在金表面吸附量的分析结果显示, 滴加 Pvfp 提取物和 Cell-Tak™ 后, 晶振片的频率变化分别为 6 732 Hz 和 4 966 Hz,

比滴加了 BSA 晶振片的频率变化(1 298 Hz) 大(见图 2b); 同时, Pvfp 提取物吸附的金表面产生的频率变化大于 Cell-Tak™ (见图 2b)。根据频率变化每减少 1 Hz 就表示蛋白量增加 0. 88397 ng^[17] 计算, 金表面吸附的 Cell-Tak™ 的量是 4 39 μg, 吸附的 Pvfp 提取物的量是 5. 951 μg, 吸附的 BSA 的量是 1. 147 μg。该结果表明, Pvfp 提取物和 Cell-Tak™ 在金表面的吸附量多于 BSA, 而 Pvfp 提取物的吸附量多于 Cell-Tak™。

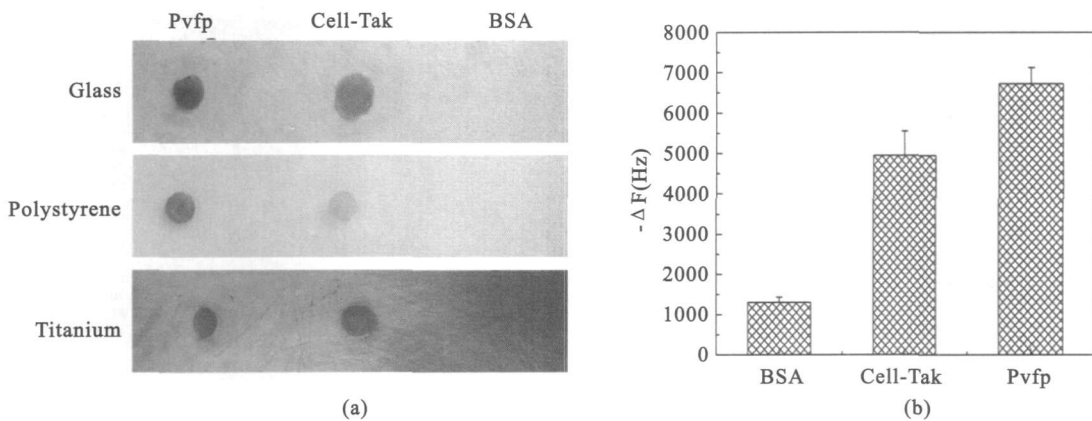


图 2 Pvfp 提取物的吸附能力分析

(a) 不同材料表面包被 Pvfp 提取物, 10 μl, 1. 44 mg/ml 的蛋白样品被用于包被, 包被后以考马斯亮蓝 R 250 染色; (b) QCM 分析金表面包被的蛋白。5 μl, 1. 44 mg/ml 的蛋白样品被用于此分析。

Fig 2 Adsorption ability of Pvfp extract

(a) Pvfp extract Coating on various material surfaces. A 10 μl drop of each 1. 44 mg/ml protein sample was used in the coating, and the coated proteins were stained with coomassie blue R 250; (b) QCM analysis for adsorption of Pvfp extract on a gold surface. A 5 μl drop of each 1. 44 mg/ml protein sample was used. Each value and error bar represents the mean of triplicate independent experiments and its standard deviation.

2. 3 细胞黏附分析

蛋白样品包被的盖玻片表面经 PBS 冲洗并经 CBBR 染色结果显示, 大部分 Pvfp 提取物和 Cell-Tak™ 仍然吸附在盖玻片表面, 而 PLL 则被冲洗掉。细胞在经处理后的盖玻片表面培养 1 h 后, 观察到在 Pvfp 提取物、Cell-Tak™ 以及 PLL 包被区域有大量细胞附着, 而在未包被蛋白区域仅有少量细胞附着。然后, 以 PBS 轻轻冲洗盖玻片表面 5 次后再观察发现, 原来附着于 Pvfp 提取物和 Cell-Tak™ 包被区域的大量细胞仍然附着于相应区域, 而原来附着于 PLL 包被表面的细胞则连同 PLL 一起几乎完全被冲洗掉, 残留在玻片表面的细胞数量仅与未包被区域相当(见图 3)。

用显微镜(100×)观察各蛋白样品包被盖玻片的相同区域(见图 3d, 图 3e 和图 3f), 并计算这些区域中的细胞数量(见图 3g), 发现 Pvfp 提取物包被

区域黏附的 HeLa 细胞约有 262 个, Cell-Tak™ 包被区域约黏附 177 个细胞, 而在 PLL 被冲洗后的相应区域仅有 20 个细胞黏附。293T 细胞的分析结果与此相似。统计分析结果显示, Pvfp 提取物包被区黏附的细胞数量明显多于 Cell-Tak™ 包被区与 PLL 包被区, 差异显著($P < 0.01$), 说明 Pvfp 提取物具有较好的细胞黏附活性。对附着于玻片上细胞的台盼兰染色结果显示, 黏附细胞具有高细胞活性, 表明 Pvfp 提取物并不会影响细胞存活率; 另外, 对 Pvfp 包被表面细胞 5 d 后的活性检测显示, 细胞活性仍然良好, 说明 Pvfp 具有较好的生物相容性。

2. 4 细胞毒性分析

MTT 比色法分析结果显示, 490 nm 处吸光值与黏附的 HeLa 细胞和 293T 细胞的活性细胞数量呈线性相关; 在分别培养了 12 h 和 24 h 后, Pvfp 提取物包被孔中的细胞与其他对照组相比, 活性更佳,

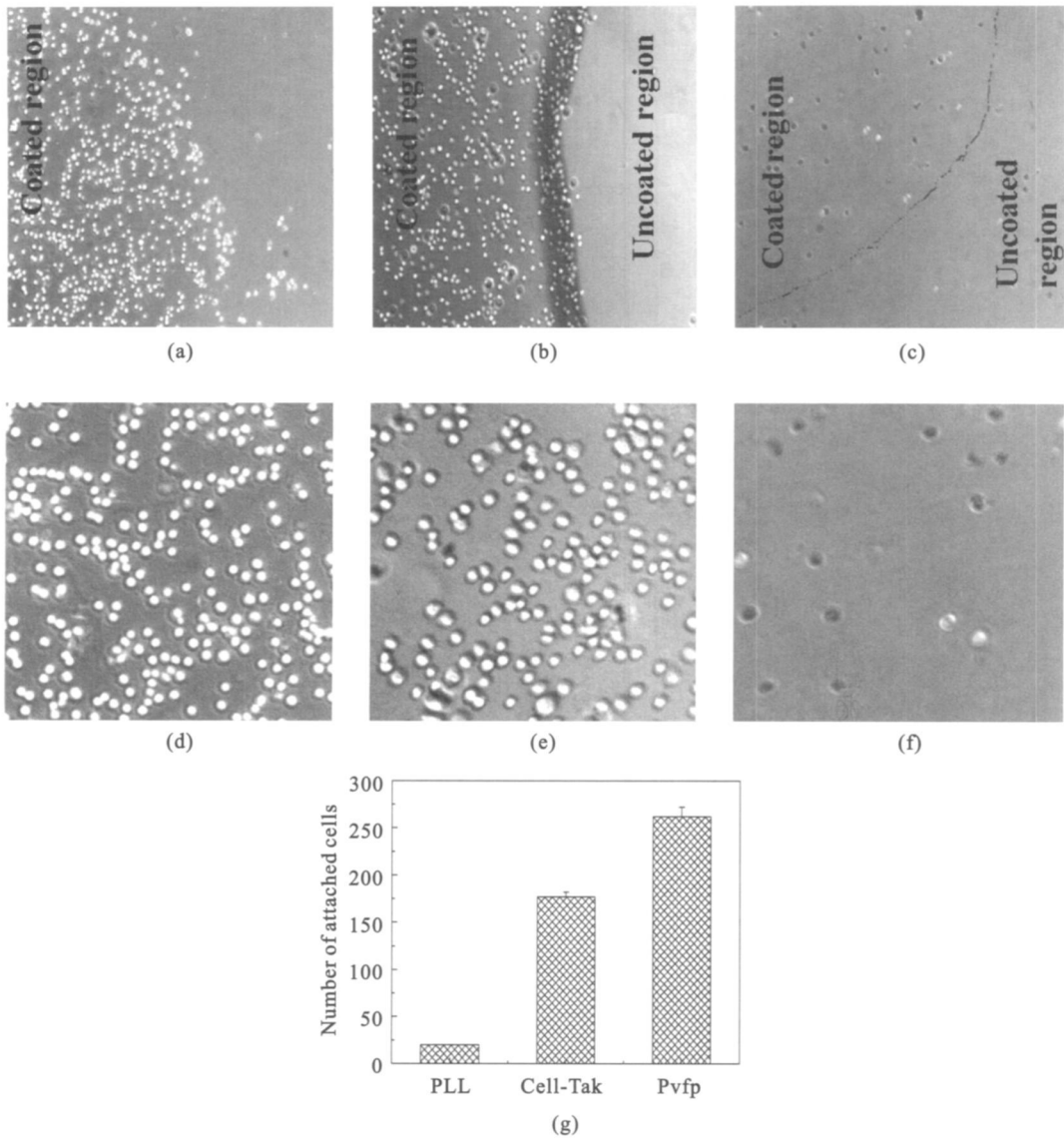


图3 细胞黏附分析

(a)、(d) Pvpf 提取物包被区域; (b)、(e) Cell-TakTM包被区域; (c)、(f) PLL 包被区域; (g) 包被区域中一定区域吸附的细胞数((d)、(e)、(f) 分别选自(a)、(b)、(c)中的包被区域)。以台盼蓝染色观察吸附细胞的活性和吸附位置。

Fig 3 Cell adhesion analysis of human HeLa cells

(a), (d) Pvpf extract coated region; (b), (e) Cell-TakTM coated region; (c), (f) PLL coated region; (g) The number of attached cells on a selected region from the coated region; (d), (e), (f) are selected from the coated region of (a), (b), (c), respectively). The viability and locations of the attached cells were visualized by staining with trypan blue.

差异显著($P < 0.01$); 36 h 和 48 h 后, Pvpf 提取物包被孔中的细胞活性与 Cell-TakTM 包被以及 PLL 包被的对照组相比, 差异不显著($P > 0.05$), 说明活性相当, 且没有细胞毒性(见图 4)。

2.5 对骨组织和塑料耗材的黏附

利用聚苯乙烯细胞培养皿与白色塑料枪头检测 Pvpf 的黏接性能的结果显示, Pvpf 提取物在潮湿环

境中较成功的将塑料枪头黏附于聚苯乙烯细胞培养皿表面, 而 BSA 对照组则不能将两者黏接。Pvpf 提取物在黏接 3 h 后, 可将两者黏连, 而需要 12 h 完成交联(见图 5a)。对断裂小鼠股骨的黏接实验结果表明, 交联作用完成需 14 h(见图 5b), Cell-TakTM 对照组也显示出相似的黏接效果。

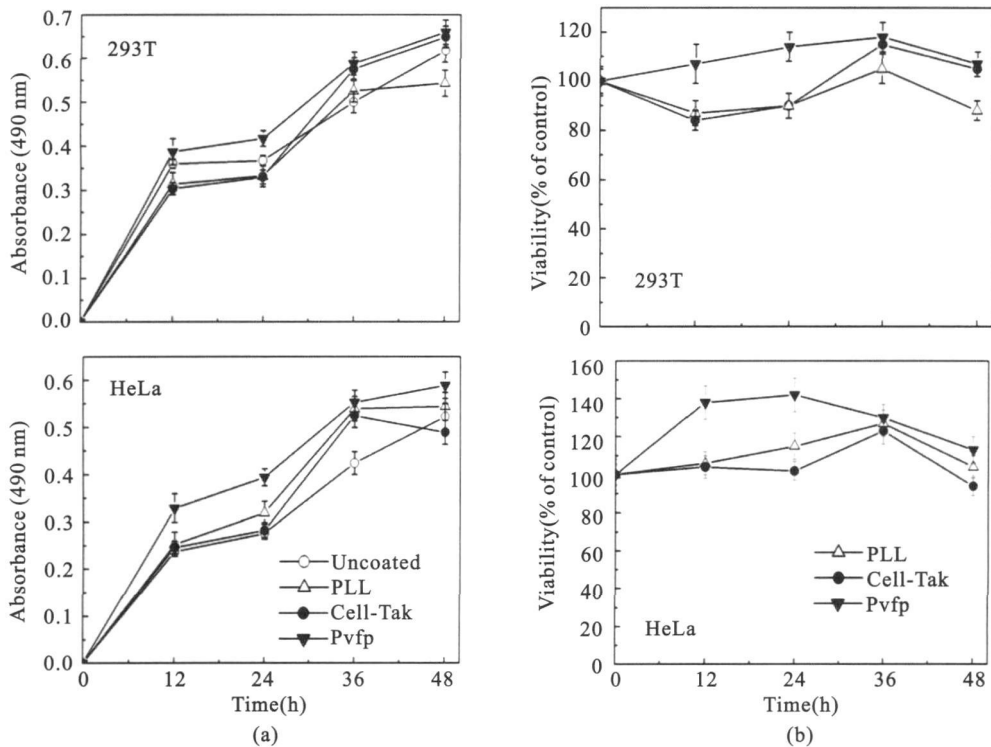


图 4 MTT 分析 Pvfp 提取物对 293T 细胞和 HeLa 细胞的细胞毒性, 以 PLL 和 Cell Tak™ 为对照。

(a) 样品在 490 nm 处的吸光值; (b) 包被与未包被区域的细胞活性对比。将 100 μ l 293T 细胞 (1×10^4 cells/ml) 或 HeLa 细胞 (5×10^3 cells/ml) 接种入 96 孔板中, 每 12 h 进行一次 MTT 分析。

Fig. 4 Cytotoxicity assay of Pvfp extract compared with PLL and Cell Tak™ using human 293T and HeLa cells by MTT assay.

(a) Absorbance at 490 nm of the samples; (b) comparison of cell viability between coated and uncoated regions. 100 μ l of 293T cells (1×10^4 cells/ml) or HeLa cells (5×10^3 cells/ml) were seeded into each well of 96 well cell plates, and MTT assay was performed every 12 h.

2.6 黏附抗张强度

将 Pvfp 提取物分别涂覆到 PVC 棒的接口处和断裂的猪股骨接口处, 检测 Pvfp 抗张强度。在对 PVC 棒的黏连中, 医用生物蛋白胶的抗张强度为 0.06 MPa (见图 5e), 而 Pvfp 提取物抗张强度为 0.12 MPa (见图 5e), 比医用生物蛋白胶具有将近两倍的抗张强度。在对断裂的猪股骨黏连过程中, 医用生物蛋白胶几乎不能将其黏合, 而 Pvfp 提取物则显示出一定的抗张强度, 为 0.135 MPa (见图 5e)。

3 讨论

由于翡翠贻贝大量存在于东南沿海的潮间带, 因此, 本实验选用翡翠贻贝为原材料。另外, Pvfp 1 的多巴含量与其他贻贝类的 fP1 蛋白不同, 我们希望从该翡翠贻贝中提取出该特殊的蛋白黏合剂。由于所有已鉴定的贻贝足蛋白均呈碱性, 我们根据之前文献报道的酸提取法^[11]提取蛋白。在材料表面包被和 QCM 分析中, Pvfp 提取物具有比商业化 CellTak™ 更好的吸附能力, 显示 Pvfp 提取物作为

黏合剂应用具有潜在能力。QCM 分析中, Pvfp 提取物在金表面的残留量少于初始时滴加在金表面的蛋白量, 可能是由于不含多巴及多巴衍生物的蛋白成分在冲洗过程中被洗去, 或是测定蛋白浓度的 Bradford 分析法与 QCM 分析法之间存在差异。

由于含血清的培养基中含有利于细胞黏附的因子(如纤粘连蛋白、层粘连蛋白), 因此, 在研究蛋白对细胞黏附作用的过程中, 用无血清培养基培养细胞。细胞黏附能力分析结果与包被能力分析结果相一致, Pvfp 包被区域黏附的细胞数多于 CellTak™ 包被区域; 台盼兰染色和 MTT 分析则显示黏附细胞具有正常的细胞活性。这些结果说明 Pvfp 提取物作为生物黏合剂应用于细胞黏附的适用性。Pvfp 的材料表面包被能力和对细胞的黏附能力均比 CellTak™ 强, 可能是因为 Pvfp 提取物与源于紫贻贝的 CellTak™ 蛋白结构不同^[11]; 也可能是由于紫贻贝的最佳生存环境温度是 13 $^{\circ}$ C ~ 24 $^{\circ}$ C, 而翡翠贻贝的最佳生存温度是 20 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C。另外研究显示^[11], 翡翠贻贝对温度的耐受范围较宽 (7 $^{\circ}$ C ~

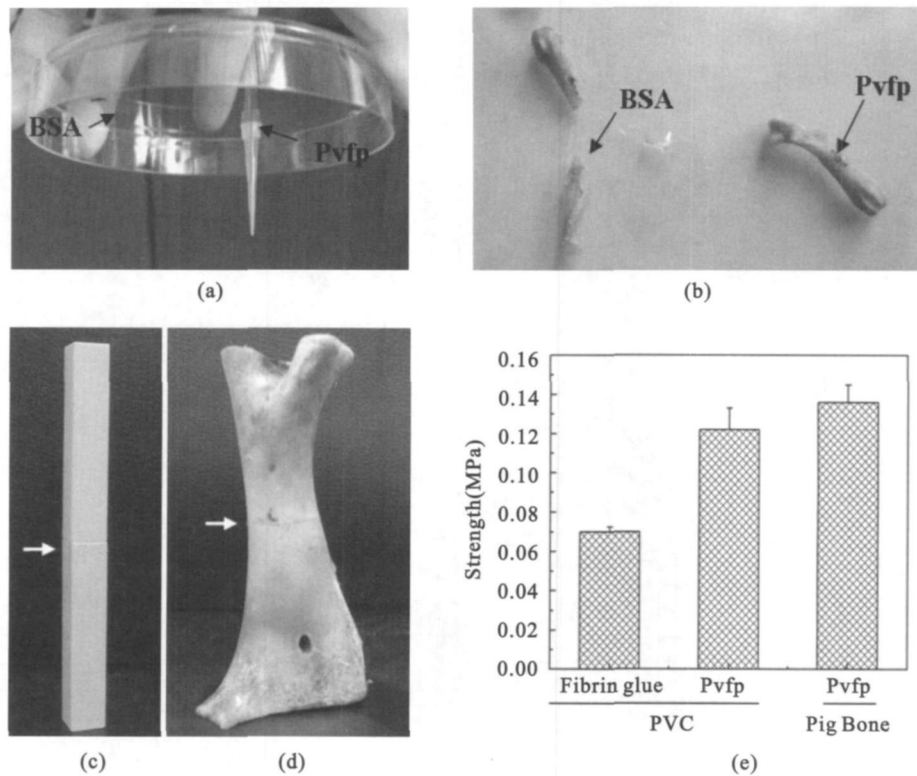


图 5 Pvfp 提取物的黏附能力和抗张强度分析

(a) Pvfp 提取物 4 μ l (1.44 mg/ml) 对实验用塑料耗材的黏接性能检测; (b) Pvfp 提取物 8 μ l (1.44 mg/ml) 对断裂小鼠股骨的黏接; (c) Pvfp 提取物 15 mg, 医用生物蛋白胶 100 μ l, 对 PVC 的黏接; (d) Pvfp 提取物 30 mg, 医用生物蛋白胶 200 μ l, 对猪股骨的黏接; (e) Pvfp 提取物和医用生物蛋白胶在黏接 PVC 棒和断裂猪股骨时的抗张强度分析。黏接物于潮湿环境中 25 $^{\circ}$ C 孵育 12 h。

Fig 5 Adhesion ability and tensile strength of Pvfp extract

(a) Conglutination test of Pvfp extract on laboratory plastic consumables; (b) conglutination test of broken mouse femurs; (c) conglutination on PVC sticks; (d) pig femur segments, for measurement of tensile strength; (e) the tensile strength of Pvfp extract and fibrin glue in end to end joints of PVC sticks and pig femur segments. The joints daubed with protein samples were pointed with arrows. The quantity of protein applied to each joint was 4 μ l (1.44 mg/ml) in (a), 8 μ l (1.44 mg/ml) in (b), 15 mg of Pvfp extract and 100 μ l of fibrin glue in (c), and 30 mg of Pvfp extract and 200 μ l of fibrin glue in (d). The fixtures were incubated at 25 $^{\circ}$ C for 12 h in a humid environment. Each value and error bar represents the mean of triplicate independent experiments and its standard deviation.

37.5 $^{\circ}$ C); 此外, 翡翠贻贝对环境含盐量的耐受范围较宽, 这些都使得源于翡翠贻贝的黏附蛋白在较为宽泛的环境条件下可以被分泌, 并发挥黏附作用。因此, 由于黏附条件的宽泛, 使得其在一定程度上黏附效果优于源于紫贻贝的 CellTakTM。另外, 源于紫贻贝的 CellTakTM 是从紫贻贝中提取得到的, 其蛋白成分中含有一定量的胶原蛋白^[18], 而胶原蛋白则有利于细胞的黏附。本研究中应用的酸提取法是专门针对含多巴蛋白的提取方法, 提取物中不含胶原蛋白。因此, 在同样条件下, 得到 Pvfp 提取物对细胞的黏附能力优于 CellTakTM, 更好的说明了 Pvfp 提取物的强黏附性能。以往研究显示, 重组的 MAPs 比常用的细胞黏附材料 PLL 具有更好的细胞黏附能力^[9]; 本研究中的 Pvfp 提取物也同样具有

比 PLL 更佳的细胞黏附性能, 说明这种防水的贻贝黏附蛋白提取物应用于细胞黏附实验具有一定的优势, 而 PLL 则较易被水冲洗掉, 且在人体内易引起组织坏死以及直接或间接引起炎症反应^[19]。

对小鼠骨组织的黏接实验显示, Pvfp 提取物与 CellTakTM 黏接断裂的小鼠股骨的能力相当。该交联过程的完成需要较长时间, 约 14 h; 但以往研究显示, 若交联过程过快, 不利于黏接后对接合处进行位置调整, 而若强行调整则会因为剪应力的产生而破坏交联部位, 导致黏接失败^[20]。Pvfp 提取物在断裂小鼠股骨接口处完成交联的时间约为 14 h, 因此, 有足够的时间来调整结合部位而不会破坏交联过程。同时, 可以通过在交联过程中加入一些氧化剂 (如 Fe(NO₃)₃、高碘酸盐, 或是其他具有较好生物相容

性的交联剂)来适当加速交联过程。Pvfp 提取物具有的这种对断裂部位的交联时间和接合位置可调整的特点,显示该蛋白在外科手术中具有潜在的应用价值。另外,Pvfp 提取物对 PVC 材料以及猪的断裂股骨均显示出比医用生物蛋白胶更好的抗张强度,也很好的说明了该蛋白提取物作为生物黏合剂应用于外科手术中的可行性。

4 结论

Pvfp 提取物在材料表面的包被能力和细胞黏附性能等方面均优于 Cell-TakTM,而且对骨组织具有较好的黏接能力。

致谢:感谢厦门大学固体表面与物理化学国家重点实验室田中群教授在 QCM 仪器使用中提供大力帮助。

参 考 文 献

- [1] SILVERMAN H G, ROBERTO F F. Understanding marine mussel adhesion[J]. *Mar Biotechnol*, 2007, 9(6): 661-681.
- [2] LIN Q, GOURDON D, SUN C, et al. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp1 and mfp3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(10): 3782-3786.
- [3] ZHAO H, WAITE J H. Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26150-26158.
- [4] ZHAO H, WAITE J H. Proteins in load-bearing junctions: the histidine rich metal-binding protein of mussel byssus[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(47): 14223-14231.
- [5] LEE H, SCHERER N F, MESSERSMITH P B. Single molecule mechanics of mussel adhesion[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(35): 12999-13003.
- [4] ZHAO H, WAITE J H. Proteins in load-bearing junctions: the histidine rich metal-binding protein of mussel byssus[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(47): 14223-14231.
- [5] LEE H, SCHERER N F, MESSERSMITH P B. Single molecule mechanics of mussel adhesion[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(35): 12999-13003.
- [6] SUN C J, WAITE J H. Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads [J]. *J. Biol. Chem.*, 2005(47): 280, 39332-39336.
- [7] ZHAO H, ROBERTSON N B, JEWHRUST S A, et al. Probing the adhesive footprints of *Mytilus californianus* byssus [J]. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(16): 11090-11096.
- [8] HWANG D S, GIM Y, YOO H J, et al. Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive for 151 [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(24): 3560-3568.
- [9] HWANG D S, SIM S B, CHA H J. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(28): 4039-4046.
- [10] HWANG D S, GIM Y, KANG D G, et al. Recombinant mussel adhesive protein Mgfpr5 as cell adhesion biomaterial [J]. *J Biotechnol*, 2007, 127(4): 727-735.
- [11] OHKAWA K, NISHIDA A, YAMAMOTO H, et al. A glycosylated byssal precursor protein from the green mussel *perna viridis* with modified DOPA Side chains [J]. *Biofouling*, 2004, 20(2): 101-115.
- [12] AHMED H. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization [M]. Boca Raton: CRC Press, 2005, 107-110.
- [13] WAITE J H. Precursors of quinone tanning: Dopar containing proteins [J]. *Methods Enzymol*, 1995, 258, 1-19.
- [14] HWANG D S, YOO H J, JUN J H, et al. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgfpr5 in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3352-3359.
- [15] HWANG D S, GIM Y, CHA H J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(3): 965-970.
- [16] NINAN L, MONAHAN J, STROSHINE R L, et al. Adhesive strength of marine mussel extracts on porcine skin [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(22): 4091-4099.
- [17] THOMPSON M, KIPLING L A, DUNCAN HEWITT W C, et al. Thickness shear mode acoustic wave sensors in the liquid phase [J]. *Analyst*, 1991, 116(9): 881-890.
- [18] COYNE K J, QIN X X, WAITE J H. Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer [J]. *Science* 1997, 277: 1830-1832.
- [19] STRAND B L, RYAN T L, INTVELDP, et al. Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines [J]. *Cell Transplant*, 2001, 10(3): 263-275.
- [20] PITMAN M I, MENCHED, SONG E K., et al. The use of adhesive in chondrocyte transplantation surgery: *in vivo* studies [J]. *Bull Hospital JT Dis Orthop Inst*, 1989, 49(2): 213-220.

(收稿: 2009-08-20 修回: 2010-02-04)