

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520061152676

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

翡翠贻贝粘附蛋白生物相容性及其对生物  
材料表面改性的研究

Research on the biocompatibility and changing the  
biomaterial surface bioactive in *Perna viridis* adhesive  
protein

杨丙晔

指导教师姓名: 张其清 教授/博导

孙亚楠 金利华 讲师

专 业 名 称: 生物医学工程

论文提交日期: 2009 年 5 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2009 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
<b>第一章 绪论 .....</b>	<b>1</b>
1.1 贻贝足丝的蛋白结构及其功能 .....	1
1.2 贻贝粘附蛋白的粘附机制 .....	6
1.3 蛋白在生物材料改性方面的应用 .....	9
1.4 细胞周期研究 .....	12
1.5 流式细胞术 .....	12
1.6 细胞贴壁机理 .....	13
1.7 立题意义 .....	14
参考文献 .....	16
<b>第二章 翡翠贻贝粘附蛋白粘附性和细胞相容性研究 .....</b>	<b>21</b>
2.1 引言 .....	21
2.2 材料与方法 .....	21
2.3 结果与讨论 .....	33
2.4 本章小结 .....	47
参考文献 .....	48
<b>第三章 翡翠贻贝粘附蛋白对钛表面的生物改性研究 .....</b>	<b>51</b>
3.1 引言 .....	51
3.2 材料和方法 .....	52
3.3 结果与讨论 .....	56
3.4 本章小结 .....	63
参考文献 .....	64
<b>第四章 全文总结 .....</b>	<b>67</b>
<b>硕士期间发表论文 .....</b>	<b>68</b>

致 谢.....69

厦门大学博硕士论文摘要库

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Reviews</b> .....	<b>1</b>
1.1 Structure and function of mussel foot protein.....	1
1.2 Adhesive mechanism of mussel adhesive protein.....	6
1.3 The application of protein on biomaterials.....	9
1.4 Study on cell cycle .....	12
1.5 Flow cytometry .....	12
1.6 The mechanism of cell attachment .....	13
1.7 Main focus of this dissertation .....	14
References.....	16
<b>Chapter 2 Research on the adhesion and cell compatibility in <i>Perna viridis</i> adhesive protein</b> .....	<b>21</b>
2.1 Introduction .....	21
2.2 Materials and methods.....	22
2.3 Results and discussion.....	33
2.4 Summary .....	47
References.....	48
<b>Chapter 3 Research on biological modification of titanium surface with <i>Perna viridis</i> adhesive protein</b> .....	<b>51</b>
3.1 Introduction .....	51
3.2 Materials and methods.....	52
3.3 Results and discussion.....	556
3.4 Summary .....	64
References.....	64
<b>Chapter 4 Conclusions</b> .....	<b>67</b>

**Publications ..... 68**

**Acknowledgement ..... 69**

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘要

海洋贻贝粘附蛋白具有极强的粘接力、湿粘接特性和耐水性，因此可被用于制作水下密封胶和粘合剂，在国防和海洋工程领域有着广泛的应用前景，而且贻贝足腺细胞所分泌的粘液蛋白对细胞没有毒害作用，也不引起细胞炎症反应，因此，在生物材料的表面生物活性改善方面有着极大的应用前景。

翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 和紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 是福建省分布广泛，养殖产量最高的两种贻贝。已经有学者对紫贻贝的粘附蛋白进行了大量研究，而且美国公司已经从紫贻贝中提取研制出了细胞和组织粘合剂Cell-Tak™。而对于翡翠贻贝粘附蛋白 (*Perna viridis* foot protein, Pvfp) 的研究还很少有文献报道。本研究选用翡翠贻贝为研究对象，对Pvfp的生物相容性及其对钛片支架材料表面生物活性的改善方面进行初步的研究，研究结果如下：

1. 依据丙酮沉淀蛋白原理从翡翠贻贝足部直接提取粘附蛋白Pvfp，酸尿素聚丙烯酰胺电泳检测出总蛋白中含有七条蛋白条带。其中四条蛋白多巴含量比较高。利用硝化反应测定吸光度值检测出总蛋白中多巴的含量大约在18%左右。
2. Pvfp对四种材料表面粘附的实验显示，Pvfp具有非常良好的防水性能，在金属材料表面的粘附性比在聚合材料表面的粘附好。扫描电镜观察Pvfp包被表面形态发现，Pvfp和Cell-Tak™具有相似的网格状包被形态。
3. 自然提取的Pvfp对Hela细胞的粘附实验显示，Pvfp对细胞具有很好的粘附效果，为以后翡翠贻贝粘附蛋白在组织粘合剂中的应用提供数据支持。
4. MTT法测细胞毒性和流式细胞仪检测实验显示粘附蛋白具有良好的细胞相容性，可以促进细胞的增值。
5. Pvfp 包被钛片和成骨细胞共培养实验显示，Pvfp 改善了钛片表面生物活性，促进成骨细胞的贴壁和生长。
6. 成骨细胞碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 的活性检测显示，Pvfp 可以提高成骨细胞碱性磷酸酶的活性有利于促进骨骼的生长和修复。
7. 检测巨噬细胞在不同基底培养分泌炎症因子 TNF- $\alpha$  显示，Pvfp 具有良好的血液相容性，可以减少炎症反应的发生。

**关键词：**贻贝粘附蛋白；生物相容性；生物材料



## Abstract

Marine mussel adhesive protein has the properties of extremely adhesion, moist-adhesion and water resistance. Therefore it can be used to make underwater sealants and adhesives, and has a wide range of applications in national defense and marine engineering. Since the mucus protein secreted from foot gland cells not only is biocompatible and nontoxic to cells but has not inflammatory response, the mussel adhesive protein has considerable importance in improving the surface biocompatibility of the scaffold materials.

*Perna viridis* and *Mytilus edulis* are widely distributed and have high yield of aquaculture in Fujian Province. The *Mytilus edulis* foot protein has been much researched, and the American corporation have extracted adhesive protein called Cell-Tak™ from *Mytilus edulis* for cell and tissue adhesion. However the *Perna viridis* foot protein (Pvfp) are rarely reported in the literature. Therefore, our study focused on the biocompatibility of Pvfp and its bioactive effect on the surface of titanium plate scaffold materials. The preliminary study results are as follows:

1. Pvfp was directly extracted from the *Perna viridis* foot according to the principle of acetone precipitation. Seven kinds of CBBR-positive bands were found in the crude extract with the acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis (AU-PAGE) analysis. The quantities of DOPA were high in four of NBT-positive bands. The quantity of dopa in the crude extract protein was 18% measured with the absorbance values after the nitrification.
2. The adhesion experiments on four kinds of materials surface showed that Pvfp has good waterproof, its adhesion on metal materials surface is stronger than that on polymeric materials surface. To determine coating topographies, the coated surfaces were investigated by scanning electron microscopy (SEM). Surfaces coated with Pvfp or Cell-Tak™ showed similar surface patterns and formed grid structures
3. Cell-adhesion experiments showed that Hela can be immobilized on the Pvfp coated surface. That would support the evidence of applying Pvfp in tissue adhesive.
4. Cytotoxicity experiments by MTT and flow cytometry experiments showed that the

Pvfp has favorable cell compatibility and can induce cell proliferation.

5. The osteoblasts culture experiments on surfaces of pristine and functionalized Ti substrates coated with Pvfp showed that Pvfp can improve the biological activity of titanium surface and induce osteoblast adhesion and growth.

6. Alkaline phosphatase (ALP) activity of Osteoblasts was found significantly higher on Pvfp than that on control. That would promote bone growth and repair.

7. Variations in TNF- $\alpha$  released from alveolar macrophages after incubation with pristine and functionalized Ti substrates coated with Pvfp showed that Pvfp have favorable blood compatibility and can reduce inflammation.

**Key words:** Mussel adhesive protein; Biocompatibility; Biomaterials

## 第一章 绪论

海洋贻贝属软体动物门 (Mollusca)、瓣鳃纲 (Lamellibranchia)、翼形亚 (Pterimorphia)、贻贝目 (Mytioida)、贻贝科 (Mytilidae)，是一种常见的海洋双壳贝类，可以分泌一种非常特殊的蛋白质，具有超强的粘着性能，称作贻贝粘附蛋白 (mussel adhesive protein, MAP)。由于贻贝粘附蛋白的特殊组成和结构，使贻贝具有及其特殊的粘着能力，能够与礁石、船体等很多的固体表面形成牢固连接，并可经受海浪的反复冲刷而不脱落，如图1.1所示，贻贝通过分泌的足丝将自身牢固粘附到很光滑的玻璃表面上。贻贝足丝蛋白的粘接力及防水性能极强且无毒性，是现有任何粘合剂均无法比拟的，因此在医药、造船、涂料等行业具有广泛的应用前景。

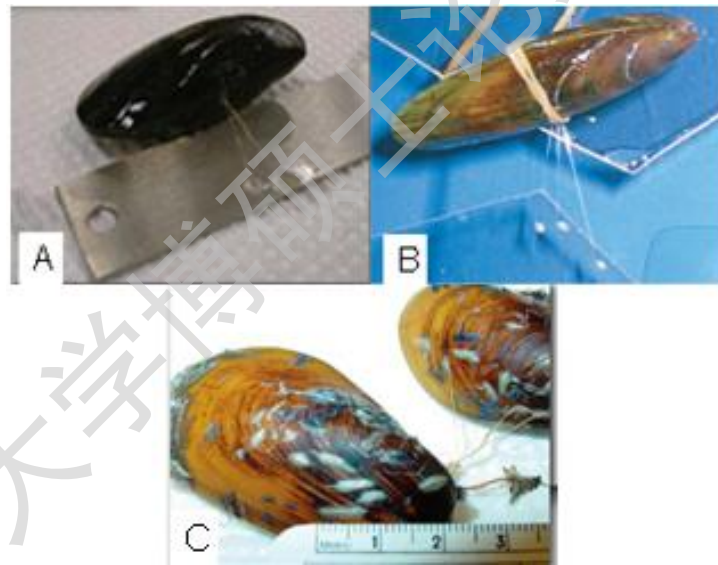


图1.1 贻贝分泌足丝蛋白对基底材料的粘附

(A) 足丝粘附在钛片上；(B) 足丝粘附在云母片上；(C) 足丝粘附在贻贝壳上；

**Fig 1.1 Mussel secretion foot protein for attached to a substrate**

(A) Mussel byssal Plaque attachment to Titanium; B Mussel byssal Plaque attachment to mica;

(C) Mussel byssal Plaque attachment to the conch of Mussel;

### 1.1 贻贝足丝的蛋白结构及其功能

贻贝足丝中富含蛋白质成分，从外形上足丝可以分为两部分，足丝纤维

(Byssus) 和足丝盘(Plaque)<sup>[1]</sup>见图1.2。其中，位于贻贝足丝盘的粘附蛋白可在水下与固体表面形成交联，用以粘附并固定在外界的各种固体表面<sup>[2, 3]</sup>。

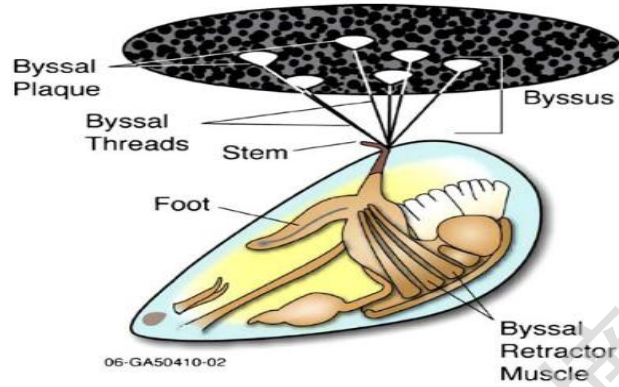


图1.2 贻贝足丝结构

Fig 1.2 The structure of mussel foot byssal



图1.3 三种代表性贻贝

Fig 1.3 three representative mussel species

MAP研究最多的是紫贻贝(图1.3)中的粘附蛋白，这类贻贝通过足部分泌大量的足丝附着在水中物体表面。目前已从贻贝足丝中鉴定了至少8种贻贝足丝蛋白(mussel foot proteins, mfp)，分别为mfp-1~mfp-6、preColD和preColNG(图1.4)。

足丝纤维中主要含有胶原蛋白mfp-1、preColD和preColNG,其中胶原蛋白preColD和preColNG位于足丝纤维的核心骨架部分(fibrous core)并延足丝纤维伸展到足丝盘<sup>[4,5]</sup>;贻贝足丝蛋白mfp-1则构成足丝纤维的弹性蛋白涂层,覆盖在整个足丝表面而起保护足丝的作用,以防止海水的溶解及微生物的降解<sup>[4-7]</sup>。足丝盘至少含有三种类型的足丝蛋白,即mfp-2、mfp-4和mfp-6。这三种蛋白是贻贝足丝用以和外界固体表面形成粘附的主要蛋白成分<sup>[5-12]</sup>(图1.4)。以上八种足丝蛋白的分子量相差比较大,从5 kDa(mfp-3)~240 kDa(preCol-D)不等。但具有两个比较明显的理化特征,一个是不溶于水,等电点均大于9,属于碱性蛋白。另一个是都含有酪氨酸翻译后修饰的羟基化合物,即3,4-二羟基苯丙氨酸(3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine,DOPA)<sup>[4-6]</sup>。

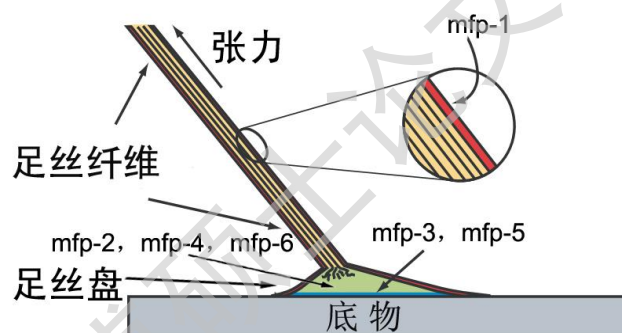


图1.4 贻贝足丝蛋白在足丝中的分布

**Fig 1.4 The MAP schematic picture of a mussel foot byssal attached to a substrate**

粘附蛋白mfp-1已经在很多贻贝种类中进行了研究<sup>[13-18]</sup>,不同的贻贝种类含有不同的十肽重复序列和氨基酸残基。mfp-1是贻贝足丝外被中的主要成分,其一级结构由75~80个多肽重复片段构成,其序列中通常含有2种修饰性氨基酸,分别为DOPA和羟基脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp)<sup>[19, 20]</sup>。此外, mfp-1的糖基化和羟基化程度均非常高,肽链交联紧密,所以结构异常复杂<sup>[18, 21]</sup>。从贻贝足丝中最早鉴定出来是紫贻贝足丝纤维中的第一种亚类蛋白(*Mytilus edulis* foot protein, Mefp-1)<sup>[22, 23]</sup>, Mefp-1最初定位于足丝纤维的外部,通过多酚氧化酶的作用交联形成比较坚硬的外鞘结构,包围内部柔韧的胶原蛋白核心结构而起保护作用。后来在紫贻贝的足丝盘也发现了Mefp-1蛋白,含量为5%左右。Mefp-1是

个含有897个氨基酸的大分子蛋白，很少形成二级结构，通过质谱分析得到其分子量为115<sup>[24]</sup>，Waite等研究表明，Mefp-1的序列由80个高度亲碱和亲水性的重复片段组成，根据片段的氨基酸序列和数目将Mefp-1分为A、B、B'、C、D、E等6种类型。其中肽段B、C、D与E为十肽片段，肽段A、B为六肽片段<sup>[22]</sup>。而Zhao等人对新西兰绿壳贻贝 (*Perna canaliculus*) (图1.3)的mfp-1的研究发现，该贻贝mfp-1分子量为52kDa，其序列由75个串联重复片段构成，其重复片段为四肽<sup>[19]</sup>，这表明不同贻贝种类的mfp-1在一级结构上存在较大差异。

关于mfp-1粘附机制方面的研究表明，mfp-1蛋白需要将其中的酪氨酸残基通过酪氨酸酶氧化成DOPA而增强粘附作用，Lin等的研究表明，mfp-1相对于其它几种蛋白亚类来说其粘附能力较弱，其中一个很可能的原因就是mfp-1的分子量较大但其DOPA的含量却相对较少，占12%。又由于其良好的抗海水腐蚀性，降解性和水不溶性以及其在贻贝足丝中的定位研究，Lin等认为，mfp-1在贻贝足丝中主要起对足丝的保护作用，而非与外界的粘附作用<sup>[25]</sup>。

粘附蛋白mfp-2最早是从地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) (图1.3)的足丝中分离到，是含量最高的MAP，有的多达总质量的40%，其分子量为42-47 kDa，序列中同样含有DOPA，但含量较低为2-3%之间，很多学者对不同种类的贻贝粘附蛋白mfp-2进行研究发现，mfp-2的一个重要特征在于其序列中含有大量半胱氨酸。有的mfp-2蛋白序列中还含有11个串联的表皮生长因子(EGF)片段重复单元，这些重复单元夹在高酸性且富含DOPA的链段之间。半胱氨酸残基在生物进化过程中被完整地保存下来，而表皮生长因子的同一性容易进一步扩展到二硫化物之间的配对，所以推断在每个重复单元中有3对起内部稳定作用的二硫化物<sup>[26]</sup>。又由于mfp-2主要定位在足丝盘，因此推测mfp-2蛋白可能在足丝盘粘附蛋白之间的交联中起主要作用<sup>[22]</sup>。

粘附蛋白mfp-3定位于贻贝足丝盘与外界固体表面相接触的部分，mfp-3是贻贝粘附蛋白中最小的蛋白，分子量为5-7 kDa，其序列中含量最丰富的氨基酸依次为DOPA、Gly、Lys和Asn。其中，DOPA的含量高达28%，同时其分子中还含有另一种氨基酸，被修饰后变成4-羟基-L-精氨酸(4-hydroxyarginine)<sup>[9,12]</sup>。4-羟基-L-精氨酸能形成6H-键、p-p键和库伦相互作用，能在金属和矿物表面发生有机金属络合反应而粘接到物体表面。Zhao等人研究发现，mfp-3存在很强的蛋

白多态性现象，例如在加洲贻贝足丝蛋白中检测到mfp-3有20多种，氨基酸残基从42到54个不等，序列相似性较高；此外，不同贻贝来源的mfp-3在其分子量，DOPA含量，序列方面均有较高的相似性，特别是在其序列的C端，均存在一个七肽片段<sup>[12]</sup>。

粘附蛋白mfp-4也是一种定位于足丝盘的蛋白，分子量为93 kDa，DOPA的含量仅为2%左右，但序列中含有大量的His约为22%，此外Aly和Arg的含量也较高，mfp-4的序列中含36个富含组氨酸的十肽重复片段，在其N端和C端还分别含有16个富含Asp的十一肽重复片段。Zhao等人研究认为，由于其特殊的重复片段结构，mfp-4可能负责足丝纤维中的胶原蛋白如preColD等与足丝盘的粘附蛋白之间的交联，同时在足丝盘粘附蛋白之间的连接中也发挥作用<sup>[10]</sup>。

粘附蛋白mfp-5也定位于贻贝足丝盘与外界固体表面相接触的部分，是所有粘附蛋白中DOPA含量最高的<sup>[11,27]</sup>，例如在紫贻贝中Mefp-5的序列(图1.5)每4个氨基酸中含有超过1个的DOPA，DOPA含量达到了30%。mfp-5含有74个氨基酸残基，分子量为8.9 kDa，在加洲贻贝的足丝蛋白中发现有两种mfp-5，两者序列仅一个氨基酸残基的差别(His59/DOPA59)<sup>[11]</sup>；mfp-5分子中含量最丰富的氨基酸依次为：DOPA、Gly、Lys和Ser。

### Mefp-5(9kDa)

1 SSEEYKGGYYPGNAYHYHSGGSYHG  
26 SGYHGGYKGGKYYGKAKKYYYKVKNS  
51 GKYYLKKARKYHRKGYKYYGGSS

P:trans-4-hydroxyproline  
P:trans-2,3-cis 3,4-dihydroxyproline  
Y:DOPA  
S:O-phosphoserine  
R:4-hydroxyarginine

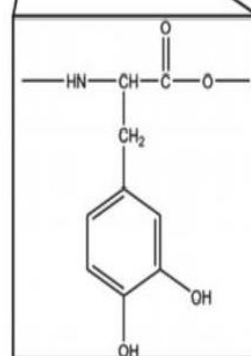


图1.5 紫贻贝中Mefp-5 的氨基酸序列和在Mefp-5 中DOPA 的化学结构

Fig 1.5 The amino acid sequence of Mefp-5 and the chemic structure of DOPA in *Mytilus edulis*

与其它足丝蛋白相比，mfp-3和mfp-5有很多的共同点，例如分子量比较小，都定位于贻贝足丝盘与外界固体表面相接触的部分，还有就是DOPA含量非常高。Waite等研究认为，足丝粘附蛋白的粘附性能与DOPA含量呈正相关，即DOPA含量越高，其粘附能力越强<sup>[28, 29]</sup>；Haeshin等人研究贻贝足丝粘附蛋白的粘附机制时发现，DOPA分子中的酚基的氧化以及由此所介导的DOPA分子与外界固体表面之间形成的非共价键合耦联是贻贝足丝蛋白具有强粘附性的主要原因<sup>[30]</sup>。mfp-3和mfp-5因其低分子量和高DOPA含量以及由此而表现出的强的粘接能力而成为贻贝粘附蛋白研究中最受关注的两个蛋白分子。

mfp-6也是一种定位于足丝盘中的粘附蛋白，分子量11.6kDa，其序列中含量最丰富的氨基酸是Tyr(20.2%)，其次是Gly(14.1%)，Cys的含量也较高(11%)，且约有1/3的Cys保留了自由的巯基，但DOPA的含量不到5%，Zhao等人认为，mfp-6与足丝盘粘附蛋白的固化有很大关系，它能够通过其含自由巯基的Cys介导足丝盘粘附蛋白分子中的DOPA之间形成交联结构。此外，Zhao等人还发现，在加洲贻贝的足丝蛋白中存在5种mfp-6的天然突变体，这表明mfp-6蛋白也存在蛋白多态性现象<sup>[11]</sup>。

## 1.2 贻贝粘附蛋白的粘附机制

### 1.2.1 DOPA在蛋白粘附中的作用

近来研究表明DOPA是贻贝粘附蛋白起胶粘剂特性的主要物质，对海洋生物贻贝附着的粘附力和内粘聚力起着重要的作用，Akemi<sup>[31]</sup>等人通过表面增强拉曼光谱(SERS)分析了人工合成的紫贻贝Mefp-1的十肽重复序列Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-DHP-Hyp-Thr-DOPA-Lys发现，Mefp-1的十肽重复序列是通过多巴的儿茶酚氧和第一位氨基吸附在胶体金表面说明，多巴是蛋白粘附的分子基础。还有研究报道在原子力显微镜(AFM)的顶端安置一个DOPA分子，随后用一个二氧化钛表面接触原子力显微镜的顶端，测量将DOPA拉离二氧化钛表面所需的力。结果显示，完成这一过程需要800皮牛顿的力，可见DOPA分子对二氧化钛表面有着超强的粘附力。Lee<sup>[32]</sup>等人对单分子DOPA粘附的研究发现，DOPA分子对金属氧化物的粘附过程中是可逆的非共价连接，并且在水中被破坏后可以重新进行非共价连接。以上研究证明了贻贝粘附蛋白中的DOPA确实是贻贝粘着



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库