

专 论

蛋白质的天然构象与高分子生物材料
的生物相容性^{*}

林思聪

(南京大学高分子科学与工程系生物材料分子工程
及控制释放分子工程室, 南京, 210093)

提要 在论述天然构象是蛋白质生物功能之根本、肽链-侧基协同作用是蛋白质构建天然构象和完成生物功能的动力所在, 以及高分子生物材料吸附对蛋白质天然构象影响等的基础上, 进一步阐述生物材料生物相容性与蛋白质构象的关系。结论是, 设计与建立能够维持蛋白质等天然构象的表面分子结构是提高高分子生物材料生物相容性的一个基本方向。

关键词 蛋白质构象, 生物材料, 生物相容性, 蛋白质吸附, 抗凝血性

80年代以来, 一类以高分子生物材料及其制品(Catheters、Devices、Prosthetics 及控释药物等)为基础的新高科技产业正在发达国家中兴起^[1~3]。高分子生物材料是高分子科学与生命科学相互渗透和发展的必然产物, 也是人类健全和完善自身机体和机能的又一有力武器, 前景无限。所谓高分子生物材料是指在生理环境中使用的高分子材料^[1,4,5]。在生理环境中, 材料所接触的除了水、无机盐外, 更有蛋白质、细胞器、细胞、组织和器官等生命有机体, 因此材料对所有这些生命有机体的作用和影响就变得至为重要。生物相容性主要是指这种作用和影响的程度。生物相容性是影响生物材料发展和应用的症结所在。如何改善生物材料的生物相容性不仅是过去和现在, 而且也是将来生物材料研究和发展的主要内容之一^[2~4,6]。

直到现在, 对生物相容性的评估主要是通过细胞学和组织学的方法。这些方法检测的都只是生物材料对生命有机体作用和影响的最后综合结果, 加上目前还缺乏检测材料真正表面组成和结构的手段, 因此, 研究材料表面分子结构与生物相容性关系的困难很大, 进展也较慢。所幸, 近40年来, 分子生物学已取得了很大的发展^[7~11], 数以百计的蛋白质分子的天然构象

已经得到阐明, 蛋白质构象与生物功能之间的关系也有了一定的了解; 再则, 高分子生物材料的蛋白质吸附已有了较深入的研究, 对蛋白质吸附与生物相容性的关系以及蛋白质分子在高分子生物材料表面吸附过程中天然构象是否发生变化等也都有所认识, 这些都为在分子水平上探讨材料表面分子结构与生物相容性的关系提供有利条件。本文正是在这些基础上, 对有关文献进行搜集和综述, 目的在于阐述生物材料对蛋白质等生命有机体的作用和影响, 归根结底就是对其天然构象的影响。因此, 要改善生物材料的生物相容性, 关键在于设计和建立一个能维护蛋白质等生物大分子天然构象的表面分子结构。

1 天然构象是蛋白质生物功能之本

蛋白质的生物功能极其丰富多彩, 目前已经认识的就有催化、免疫、识别、运载、储存、收缩、毒性、激素以及结构等功能。近40年来, 随着蛋白质天然构象的阐明, 蛋白质构象与这些生物功能关系的研究已有了长足的进展。不过, 无论在广度和深度上, 这方面的研究还只能说

^{*} 国家自然科学基金资助项目。

是刚刚开始。下面仅以目前研究比较多的酶、抗体、受体和血红蛋白等为代表^[7~15],从生物功能的构象要求及构象变化对生物活性的影响等两个方面来阐明,天然构象是蛋白质生物功能的基础和根本。

1.1 酶的催化功能

人类对酶的研究已有一百多年的历史,也早已认识到酶的催化具有很高专一性(Specificity)和活性(Activity)的特点。近20年来,通过对溶菌酶(Lysozyme)、胰蛋白酶(Trypsin)、胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin)、弹性酶(Elastase)、羧肽酶A(Carboxypeptidase A)及L-乳酸脱氢酶(L-lactate dehydrogenase)等的三级结构和催化机理的研究,对酶的催化特性有了进一步的了解,认为酶的催化特性来自其特征的天然构象。例如,胰蛋白酶、弹性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶催化的专一性系来自其天然构象中紧靠活性中心的部位有一个袋状空隙,能容纳底物中相关氨基酸残基的侧基,而它们三者之间对底物选择性的不同,则来自其袋状微隙在尺寸和电性质上的差别。羧肽酶A的催化专一性也与其天然构象中有一个能容纳底物C-端氨基酸侧基的微隙有关;对于溶菌酶来说,其专一性也归咎于在其天然构象的表面有一个与底物糖链相匹配的狭缝。至于酶的高活性则一般都认为存在着许多由极性基团组成的活性中心,这些活性中心在空间上能与反应过渡状态的构象相匹配。在上述一些酶中,它们活性中心的氨基酸残基分别是胰凝乳蛋白酶、His⁵⁷、Asp¹⁰²、Ser¹⁹⁵;羧肽酶A、Arg¹⁴⁵、Try²⁴⁸、Glu²⁷⁰;溶菌酶、Glu³⁵、Asp⁵²。可以看出,这些活性中心的残基在肽链的一级结构中是彼此远离的,而在三级结构中,它们不但彼此汇集在一起,而且在反应过程中还相互构成与反应过渡状态相匹配的构象。也就是说,酶的催化特性来自其独特的天然构象。

1.2 抗体的免疫功能

抗体(Antibody)在化学上是一大类具有免疫功能的球蛋白(Immunoglobulin, Ig),种类多

达 10^6 种,分属IgG、IgA、IgM、IgD及IgE等5大类,其中以IgG为最多,约占全部Ig的75%。有关抗体结构与免疫功能的研究也是从IgG开始的。1962年Porter和Edelman提出IgG具有四链结构(H_2L_2),其中两两相同,长的称H链(Heavy Chain),短的叫L链(Light Chain)。H链有4个结构域(也称功能区) C_H1 、 C_H2 、 C_H3 及 V_H ;L链则仅有两个结构域 C_L 及 V_L (C是Constant的缩写,指其一级结构基本上是恒定的;V是variable的缩写,指其一级结构是可变的)。X射线单晶分析表明,IgG的各功能区中,其二级结构不是 α helix而是 β pleated sheet构象。这些 β pleated sheet构象的肽链段来回折叠而构成上下两层的 β 结构层,其中每层各含有3~4条反向平行的肽段,两层之间有一个二硫键。这种结构的特点是, β 结构层是支架,支架的外表面是氨基酸残基的侧基。特别是在 V_H 及 V_L 结构域中,那些本来在一级结构中相距较远的活性残基可以在结构层的表面按特定的空间排布而汇集在一起,起着和抗原特异结合的功能。抗体之所以能和抗原特异结合的另一结构因素是在 V_H 、 V_L 的 β 折叠层间存在着与抗原决定簇相匹配的空隙。也就是说,一般认为抗体与抗原的特异结合跟酶与底物特异契合的原理是相似的。

在IgG的 C_H2 功能区中含有一些能和补体结合的活性残基。在抗体-抗原结合之前,这些活性残基在空间上被其它功能区所屏蔽,而一旦抗体与抗原结合后,由于肽链构象的特征变化,这些原来隐匿着的活性点才得以暴露并显示出激活补体的活性。抗体跟抗原结合后之所以能出现调理和变态等其它应答反应,也是来自天然构象特征变化的缘故。也就是说,抗体的免疫功能来自它们独特的天然构象及其特征的构象变化。

1.3 血红蛋白的载氧功能

血红蛋白(Hemoglobin)载氧功能的特点在于其氧释放曲线呈S形,而且pH值降低、 CO_2 分压增加以及2,3-二磷酸甘油酸浓度的

增加都使血红蛋白对氧亲和力的下降。这些特点既有利于它在肺部对氧的饱和,也有利于它在代谢组织对氧的释放,也就是说完全是为了满足生理活动的需要。血红蛋白载氧功能的这些特性来自其四级结构。

血红蛋白是由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成的($\alpha\beta$),两者都含有约 75% 的 α 螺旋构象而且每个亚基都有一个血红素辅基。其三级结构的特点是氨基酸残基中的疏水基团潜入分子内部,而亲水基团处于分子表面并在亚基间形成离子键;血红素则通过其卟啉环与疏水侧基的作用以及 Fe^{2+} 与咪唑基团(α 亚基的 His_{87} 或 β 亚基的 His_{92}) 间形成配位键而位于亚基结构的近表面内。氧合前, Fe^{2+} 的配位数为 5, 其中一个配键来自组氨酸残基上咪唑基团中有独对电子的氮原子, 另外 4 个则来自卟啉环上的 4 个氮原子(其中 2 个以共价键, 另外 2 个则以配位键结合)。这时, Fe^{2+} 虽然和卟啉环中 4 个吡咯环上的氮原子成键, 但它们并不共平面, Fe^{2+} 与平面的距离为 0.075nm。氧合后, Fe^{2+} 的配位数变为 6, (d^2sp^3 杂化), 同时位移 0.075nm 而进入卟啉环的平面内。应该强调的是, 正是这 0.075nm 的位移, 牵动了跟它组成配位键的咪唑基团的位移, 而咪唑基团的位移又牵动了它所在肽链及其相关亚基构象的改变, 结果引起各亚基之间离子键的减少。第一个亚基氧合后, 减少了 $\alpha\alpha$ 亚基间的两个离子键; 第二个亚基氧合后, $\alpha\alpha$ 亚基间及 $\beta\beta$ 亚基间的离子键全部消失。亚基间离子键的减少, 意味着氧合作用更易于进行, 也就是说, 各亚基的氧合有相互促进的作用, 这也就是其氧释放曲线之所以能呈 S 形的原因所在。也正是这个原因, 只有一个亚基的肌红蛋白的氧释放曲线就没有这个特点。因此, 蛋白质的天然构象及其特征的构象运动也是血红蛋白载氧功能的基础。

1.4 受体的偶联应答功能

在细胞通讯中, 受体蛋白起着十分重要的角色, 它一方面特异地识别激素、抗体、生长因子及神经递质等信息分子, 另一方面又把它们

的信息转传到细胞或细胞器内的指定部位并引发它们做出相应的回应。受体蛋白之所以能具有这个偶联应答功能, 关键在于它们含有相当于鉴别器、转传器和效应器等 3 种功能的结构, 这种功能结构可以来自一个三级结构中的不同结构域, 但更多的是来自一个四级结构中的不同亚基。10 多年来, 对胰岛素受体、 β 肾上腺素受体及 G 蛋白等的研究结果进一步表明, 受体的特异(专一)识别与结合功能来自膜外表面的糖蛋白在构象上与信息分子的楔合匹配, 而与信息分子结合后所产生的构象上的特征变化以及这种变化对相关生物大分子天然构象的影响则是其效应功能产生的基础。也就是说, 受体蛋白的生物功能也是来自其独特的天然构象及其特征的构象变化。

实际上, 近来的研究进一步发现, 在胰岛素抗性的糖尿病家族中, 其胰岛素受体功能的异常仅由于 α 亚基的 Leu_{233} 被 Pro 取代而引起构象的改变所致。这种由于一级结构中个别氨基酸残基的改变而引起蛋白质功能的异常也是镰形红细胞分子病的结构原因(β 链的 Glu_6 为 Val 所取代)。另一方面, 一级结构变化而引起生物功能的改变, 又可以成为完善与丰富蛋白质功能的一个途径。例如, 酶原的激活及同工酶和共价调节酶的调控作用等就是如此。从构象与生物功能关系的角度看, 这种由于一级结构上微小的变化而导致天然构象、从而生物功能的重要改变, 正从另一个方面反映出生物功能对天然构象的严格而敏感的依赖关系。不仅一级结构的变化是这样, 所有能引起天然构象改变的物理因素也同样是这样。这些因素包括温度、压力、pH 值、离子强度、表面活性剂乃至流动、振动及表面吸附等。这些因素对蛋白质天然构象的影响都存在一定的限度, 超过天然构象对其所能承受的限度, 就会引起天然构象的变性(Denaturation)和生物功能的丧失。也就是说, 蛋白质的天然构象是其生物功能之本。天然构象一旦变性, 生物功能将荡然无存。另一方面, 天然构象一旦变性, 变了性的蛋白质就可能

诱发一系列相关的生物学反应并成为机体免疫系统的清除对象。

2 肽链-侧基协同作用是蛋白质生物功能之源

如上所述,蛋白质的各种生物功能都有很高的专一性,而在酶的催化和受体、抗体等的识别中还分别具有很高的催化活性和应答活性。天然构象是生物功能之本。但是,为什么来自天然构象的功能会有这些重要的特性呢?其更本质的原因是什么呢?对于蛋白质生物功能的这些特性,文献上都已有所解释。例如,对酶催化的专一性,早在 1894 年 Fisher 就曾提出过锁与钥匙(Lock and Key)的比喻,后来又有 Koshland 提出的酶与底物的诱导匹配(Induced Fit)学说(1953)。诱导匹配与前面提到的特异楔合一样,都仅要求蛋白质与作用物之间的结合在空间大小上的匹配,只是诱导匹配学说更强调这种匹配是在动态的诱导过程中形成^[12]。对于结构域间或亚基间的功能协调作用以及抑制剂对酶活性的影响则多从构象的运动变化来解释;对酶的高催化活性又提出底物与酶活性中心的“靠近”和“定向”、底物中敏感键在张力下的变形、在构象上与反应的过渡状态相匹配以及酶分子内部的低介电微环境等各种学说^[14]。

尽管如此,作者认为蛋白质分子二级结构、三级结构及四级结构的建立及其以后生物功能的显示,都蕴涵着一个基本的建构原理,那就是肽链-侧基协同作用(Synergistic Effect of Peptide Chain and Lateral Group)。所谓肽链-侧基协同作用是指它们两者相互协同配合而在热力学上($\Delta G = \Delta H - T \Delta S < 0$)及动力学上(低活化能)有利于其天然构象及其相关的蛋白质-作用物特定构象的形成。肽链-侧基协同作用是蛋白质一级结构设计的一个重要依据,同时也为我们进一步认识蛋白质天然构象及其生物功能提供新的理论基础。

2.1 协同作用的意义

肽链-侧基协同作用的结果是降低体系的自由能和变化的活化能,其意义主要有两个方面。其一,对蛋白质分子的构象来说,肽链-侧基协同作用是蛋白质从一级结构构建热力学上稳定的不同层次天然构象的基础。其二,对于蛋白质的生物功能来说,无论是酶的催化还是抗体、受体的特异识别和偶联应答,起决定性作用的是酶-底物过渡状态及抗体-抗原和受体-配体复合物等关键性构象的形成。因此,肽链-侧基协同作用的重要性就在于使蛋白质与其作用物从开始接触到关键性构象的形成所经历的各个构象演变不仅 $\Delta G < 0$ 而且活化能低,从而保证生物功能的顺利完成。所以,如果说天然构象是蛋白质生物功能之本的话,那么,肽链-侧基协同作用就是蛋白质天然构象构建及其生物功能完成的动力之源。

另一方面也应该说明的是,这种来自肽链-侧基协同作用而产生的自由能降低,其数值一般不大。例如对于一个 150 残基的球蛋白来说,天然构象与变性构象之间自由能之差仅相当于 5 个氢键^[16]。正是这个缘故,蛋白质的天然构象一般是很“娇嫩”的,容易发生变性。

2.2 协同作用中肽链的作用

在肽链-侧基协同作用中,除了跟侧基一起通过彼此在 ΔH 及 ΔS 上的协同而保障 $\Delta G < 0$ 外,肽链更是有关侧基组织起来的骨架及产生协同作用的基础,也正是这样,蛋白质等生物大分子的高层次结构是小分子及其缔合物永远无法存在的,其相应的生物功能也是小分子及其缔合物无法比拟的。另外,由于有了肽链的柔顺性,不仅可以把有关的侧基组织排布在确定的空间位置上(尽管它们在一级结构中可能距离很远)构成天然构象,而且在执行生物功能的过程中,还可以把局部构象的变化通过肽链构象的运动而传递到多级结构的其它指定部位并对整体的构象进行调整。酶的催化作用、别构作用、酶原的激活以及抗体、受体的应答等都有赖于肽链对局部构象变化信息的传递。

2.3 协同作用与专一性

酶、抗体和受体等与其作用物从接触到其关键性构象的形成,往往要经历许多特征的构象演变,其中每一变化都必须 $\Delta G < 0$, 而且活化能低。这正是蛋白质生物功能之所以有很高专一性的根本原因。也就是说,蛋白质生物功能的专一性绝不是如前面所说的那样,仅仅来自它们与作用物在空间大小上或构象上的匹配。这种通过自由能上的多次筛选而产生的高度专一性,只有在天然构象中肽链-侧基的高度协同下才能做到。应该说明的是,在这个协同作用中,体系包括的不仅是直接涉及的少数活性基团(如酶和底物的活性部位),而且是它们的全部。因此,其 ΔG 也包含着两者其它部位相互作用和构象调整而产生的贡献和补偿。

2.4 协同作用与催化活性

如上所述,在酶和底物的作用过程中,由于肽链-侧基的协同作用,从底物与酶的接触到过渡状态构象的形成,其所经历的构象演变不仅 $\Delta G < 0$ 而且活化能低,这也是酶催化之所以有很高活性的内在原因。由此可以看到,对于酶来说,其高催化活性和高专一性是一致的和统一的,而且也是相互联系而不是彼此孤立的。高催化活性必然是高专一性,它们都是肽链-侧基高度协同作用的结果,有着共同的内在基础。

综上所述,蛋白质的生物功能及其特性来自蛋白质分子与作用物接触后能自动而迅速地形成相应的关键性构象。从分子工程的角度看,这是一个极其复杂的过程,因为它至少涉及了蛋白质的天然构象、蛋白质-作用物的关键性构象、从蛋白质与作用物开始接触到关键性构象形成的一系列特征性构象演变以及如何通过肽链-侧基的协同作用而使这些构象的构建及其演变能快速而准确无误地进行;最后,所有这些条件还都必须通过氨基酸残基的组成和顺序而蕴涵在其一级结构的设计中。令人无比惊异的是,如此复杂的难题竟早已在种类如此庞大($10^{10} \sim 10^{12}$)的蛋白质中得到解决和应用。

显然,主链-侧基协同作用也是其它生物大

分子天然构象和生物功能存在的动力之源。当然,对主链-侧基协同作用的揭示和认识刚刚开始。但是,毋庸置疑,这种协同作用是客观存在的。因此,如果说目前谈论生物大分子分子工程研究尚为时过早的话,那么,以生物大分子为模型深入研究包括主链-侧基协同作用在内的上述各种复杂的关系,则将不仅会给分子生物学带来一个新的飞跃,而且也是仿生高分子的根本发展方向。

3 高分子生物材料的蛋白质吸附

早在 60 年代就已经发现,生物材料植入体内后,最先发生的是蛋白质分子等在材料表面的吸附(几秒钟内),生成蛋白质吸附层(厚度 $10 \sim 20 \text{ nm}$),尔后再在蛋白质吸附层上进一步诱发血液的凝固^[17~23]。也就是说,生物材料的抗凝血性是通过其表面对血浆蛋白的吸附而表现出来的。因此,从那以后,高分子材料表面的组成与结构跟蛋白质吸附层的关系以及蛋白质吸附层的组成与结构跟材料抗凝血性之间的关系就一直是生物材料研究的一个重要内容。

血浆蛋白在高分子生物材料表面上的吸附虽然与蛋白质的浓度有关,但更取决于蛋白质的种类和材料表面的组成与结构。例如,在血液中尽管清蛋白含量最高,γ球蛋白次之,纤维蛋白原最少,但在一般高分子生物材料的血浆蛋白吸附层中,其主要成分却都是纤维蛋白原。又如,聚四氟乙烯蛋白质吸附层的主要成分是纤维蛋白原,而聚四氟乙烯表面用 *N*-乙烯基吡咯烷酮接枝后,纤维蛋白原及 α 球蛋白的吸附量就相对下降,而清蛋白的吸附量明显提高。值得注意的是,虽然纤维蛋白原是大部分高分子生物材料表面蛋白质吸附层中的主要成分,但对于 Biomer 及 Avcothane 等抗凝血性较好的生物材料来说,其所吸附的血浆蛋白却主要是清蛋白。不仅蛋白质吸附层的组成与材料的种类有关,而且蛋白质的吸附量也是如此。聚甲基丙烯酸-β-羟乙酯及 Ioplex 等亲水性高分子的蛋白质吸附量最低,有机硅橡胶、聚乙烯、聚四氟

乙烯等疏水性高分子材料次之,而 Biomer、Av-cothane 等抗凝血性较好的材料,其蛋白质吸附量最高。因此,从现象看,抗凝血性较好的高分子生物材料,似有血浆蛋白吸附量较大而且吸附层中清蛋白含量较高的特点。

为了研究蛋白质吸附层组成对抗凝性的影响, Lyman、Brash 和 Baier 等先把高分子生物材料分别在清蛋白、 γ 球蛋白及纤维蛋白原等溶液中进行单独吸附,然后研究它们的抗凝血性。结果预先吸附清蛋白的高分子材料其血小板的吸附量最少,而且表现出较好的抗凝血性,而预先吸附纤维蛋白原或 γ 球蛋白的则恰恰相反,它们都粘附大量的血小板而表现出较差的抗凝血性。

高分子生物材料对单一蛋白质溶液的吸附研究,除了有助于阐明蛋白质吸附层组成与抗凝血性的关系外,还揭示了血浆蛋白在高分子生物材料表面吸附的许多特点。这些特点包括:在一般情况下,吸附是单分子层的;被吸附的蛋白质中有一部分可以发生解吸作用,解吸的难易与高分子材料的种类有关,吸附在亲水性高分子表面的蛋白质较在疏水性表面的容易解吸;纤维蛋白原、 γ 球蛋白及清蛋白等 3 种血浆蛋白在一般高分子生物材料上的吸附量,以纤维蛋白原为最高, γ 球蛋白次之,清蛋白最低;Biomer 等抗凝血性较好的高分子生物材料则不仅对蛋白质的吸附量大,而且吸附速度也较快,其中对清蛋白的吸附更为突出。这些都与上述在血液中吸附的结果相一致。

研究生物材料在单一蛋白质溶液中的吸附作用,固然有利于阐明各种蛋白质在材料表面吸附的规律以及不同蛋白质吸附层对抗凝血性的影响,但却无法了解在吸附过程中各种蛋白质之间的相互影响和竞争,而且也与生物材料在血液中对血浆蛋白吸附的实际情况相去甚远。因此, Brash、Kim、Lee、Falb、Kochwa 和 Cooper 等就利用放射性同位素标记的方法研究了高分子生物材料在清蛋白、 γ 球蛋白和纤维蛋白原等混合溶液中的竞争性吸附作用。结

果发现,在竞争性吸附中,各蛋白质的吸附量最后也趋于平稳,但其值均相应较单一蛋白质溶液中的低;材料表面吸附的一种蛋白质可以被溶液中的另一种蛋白质所交换,而且交换程度与材料的性质有关,亲水性高分子表面吸附的蛋白质容易发生交换作用,而疏水性高分子材料表面的则基本上不发生。由于交换作用的缘故,通过材料表面预先吸附清蛋白来提高抗凝血性的,其抗凝血性在和血液接触过程中会逐渐下降。

在生物材料的蛋白质吸附研究中,一个十分重要而且曾经有过争论的问题是,蛋白质分子在材料表面吸附后,其分子的天然构象是否发生了变化。研究初期(60 年代),一些研究者根据蛋白质分子吸附前后的 MAIR (Multiple Attenuated Internal Reflection) 谱基本上没有变化,同时被吸附的蛋白质仍然显示抗体-抗原反应,故认为蛋白质在高分子生物材料表面吸附后,其构象基本上不发生变化^[24~26]。Nyilas Walton、McMillin、Vroman、Morrissey、Baier、Andrade 和 Brash 等,根据微量热法 (microcalorimetry)、CD 谱、透射荧光法 (Transmission fluorescence) 及 TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) 等研究的结果则认为,蛋白质在高分子生物材料表面吸附后,其构象发生了不同程度的变化;在疏水性材料上的变化较在亲水性材料上的大;而且,有的吸附还可能是多分子层的,其中各层分子的构象变化也不相同,与材料表面接触的蛋白质分子其构象变化最大,尔后随着吸附层的增多而逐渐减弱^[27~43]。不仅一般蛋白质如此,Sevastianov 等的研究还表明^[34],有机硅橡胶及 Pellethane 等对补体的吸附也会使其构象变化与活化。最近,Anderson 等的研究更进一步表明^[35,37],聚乙烯、聚二甲基硅氧烷、Dacron、微泡聚四氟乙烯以及 Biomer 等不管其表面是否吸附清蛋白、纤维蛋白原、 γ 球蛋白、fibrinectin 或 Hb,均可活化 monocyte-macrophage 而产生 Interleukin 1 及一种能促进 fibroblast 增殖及 collagen 合成

的因子。当然,不同的高分子生物材料和不同的蛋白质吸附,其活化程度是不相同的,其中活化程度较轻的是 Biomer 及聚二甲基硅氧烷。这些结果都表明,一般高分子生物材料植入体内后,不仅会很快地吸附蛋白质而且还会使被吸附的蛋白质天然构象发生不同程度的变化,而正是这些构象发生变化的蛋白质进一步诱发血液的凝固和机体免疫系统的反应。因此,作者认为,如果说决定生物材料生物相容性的是它们所吸附的蛋白质在种类和数量上的不同,不如说是由于它们对所吸附的蛋白质在天然构象上改变的差别。实际上,如前所述,蛋白质的天然构象是其生物功能之本,若被吸附的蛋白质天然构象不变,其性质理应与在血液中的一样,又如何能诱发血液的凝固和机体免疫系统的反应呢?那么,为什么蛋白质被一般高分子生物材料表面吸附后,其天然构象就会发生不同程度的变化呢?原因就在于吸附作用破坏了作为天然构象建构之源的肽链-侧基的协同作用。蛋白质在生物材料表面吸附的动力来自吸附后体系自由能的减少。这种自由能减少主要来自吸附过程中原来取向在材料表面水分子的解吸(熵的增加)以及材料表面与蛋白质分子间的引力(焓减少)。因此,可以预料在一般生物材料的表面吸附过程中,不仅蛋白质分子的构象而且高分子表面分子的链节构象都将发生适当的变化,俾使蛋白质分子在材料表面吸附后,材料-蛋白质分子及蛋白质-血液间的界面自由能都趋于最小。因此,在吸附过程中,一些原来位于蛋白质分子内部的基团将转向界面而参与跟材料表面分子间的相互作用以有利体系 ΔG 的降低。正由于这些原来位于蛋白质分子内部的基团转向蛋白质-生物材料的界面,蛋白质中原来肽链-侧基的协同作用(从而蛋白质的天然构象)遭到破坏,结果在蛋白质吸附层-血液的界面上显露出一些原来位于分子内部的活性氨基酸残基或多糖残基,可能正是这些内部残基的显露,诱发了血小板、凝血因子及补体等的活化而导致血液的凝固和免疫系统的反应。

因此,从高分子生物材料分子工程的角度来看,生物材料的蛋白质吸附研究,今后除了进一步阐明高分子表面结构、蛋白质吸附层结构与生物相容性之间的关系外,更重要的应是深入揭示材料的表面组成、结构与被吸附蛋白质天然构象变化的关系。

4 生物材料的生物相容性与蛋白质构象

生物相容性是区别生物材料与其它材料的实质所在。生物材料研究和发展所面临的一个主要难题也是改善材料的生物相容性。生物相容性包括血液相容性(目前强调抗凝血性)和组织相容性,而以前者更为突出。从分子工程的角度看,材料生物相容性的改善首先要有一个正确的理论指导。半个多世纪以来,有关材料结构与抗凝血性的关系已提出过 10 多个不同的假说(见表 1)^[44],其中应该提到的是“维持正常(天然)构象”假说(Maintaining Normal Conformation Hypothesis, 1984),因为这个假说首次把材料表面的分子结构与蛋白质的天然构象直接联系起来而窥及抗凝血性和生物相容性的本质所在。对于生物材料来说,其生物相容性之优劣取决于它对生命系统中包括蛋白质在内的各种生命有机体的作用与影响,而如前所述,仅人体内的抗体蛋白就多达 10^6 种。因此,要使生物材料对种类比这还要庞大的生命有机体都不损害,唯一治本的办法就是维护它们的共同之本,天然构象。另一方面,欲护其本,须先保其源。也就是说,生物材料的表面分子结构必须能避免对其肽链-侧基协同作用的干扰。对于其它生物大分子及其组装体来说,情况也是一样的。

“维持正常构象”假说的内容主要有 3 点^[44]。

(1) 血液由于和生物材料表面接触而引起的一系列生物学反应(包括血液的凝固在内),在分子水平上都是起因于血蛋白/血细胞正常(天然)构象的改变。因此,作为抗凝血生物材料,其表面的分子结构应能维持与其相接触的

表 1 有关抗凝血材料表面性质/结构的假说^[44]

编号	假说名称	提出者(时间)
1	低润湿性(Wettability)	Lampert(1930)
2	低表面自由能 (Surface free energy)	Lyman(1965)
3	低临界表面张力 (Critical surface Tension)	Lyman(1965)
4	最宜临界表面张力 ($2\sim3\times10^{-4}$ N/cm)	Baier(1970)
5	最宜界面张力 ($1\sim3\times10^{-5}$ N/cm)	Ruckenstein (1984)
6	高色散力, 低极性力	Nyilas, Kaelble (1975)
7	色散力/极性力均衡 (Balance)	Ratner, Hoffman (1979)
8	最小界面自由能 (Interfacial free energy)	Andrade(1973)
9	带负电荷	Sawyer(1953)
10	微细粗糙结构	Imai(1972)
11	微相分离结构	Okano(1981)
12	高含水量	Bruck(1971)
13	弥散结构(Diffuse structure)	Ikada(1984)
14	维持正常构象	林思聪(1984)

血蛋白/血细胞的正常(天然) 构象。

(2) 生物材料表面能对肽链-侧基协同作用进行干扰, 从而使血蛋白/血细胞正常(天然) 构象发生变化的力不外乎 3 类: (a) 由于材料-血液界面的存在而产生的材料表面对它们的吸附力; (b) 无界面存在时, 材料表面分子与它们之间的分子间作用力, 包括氢键、疏水键、色散力和静电力等; (c) 心脏收缩时, 血液对材料表面冲击而产生的反冲力。所以, 作为抗凝血材料, 其表面的分子结构应能消除或减轻这 3 类力对血蛋白/血细胞正常(天然) 构象的影响。

(3) 为此, 抗凝血生物材料表面的分子结构必须是海藻状的链结构。这种链结构的特点是水溶性的、分子间作用力小以及有足够的链长而能在血液相中漂动。其中, 链的水溶性使材料与血液间的界面消失而消除界面吸附力; 小的分子间作用力既可减弱它与血蛋白/血细胞间的作用力, 又可在相互作用中通过它本身构象

的变化来维持血蛋白/血细胞的正常(天然) 构象。最后, 当由于心脏收缩而迫使血蛋白/血细胞向材料表面冲击时, 足够的链长则可通过其链结构的柔顺性来延长碰撞时间而减少其反冲力。

根据上述这些具体要求, 在目前已知的各类水溶性高分子链结构中, 首选的应属聚乙二醇链结构。除了聚乙二醇链结构外, 带有环状(五元环或六元环) 内盐结构的水溶性海藻状高分子链结构也将是可取的。另外, 还可以进一步让这些水溶性海藻状链结构在血液相中呈球状形态, 亲水的聚乙二醇链或环状内盐结构处于球状结构的表面, 而其内核是低 T_g 的疏水性链结构, 如聚有机硅氧烷或柔性烃链结构等。这类球状形态结构的优点是, 既可以消除界面的存在, 又可以减弱对生命有机体的作用力, 还可以进一步降低它本身的自由能。因此, 在和血蛋白/血细胞接触时将更不易干扰肽链-侧基的协同作用, 从而更有利于它们天然构象的维持。

“维持正常构象”假说为生物材料的分子工程研究提供了新的理论基础。根据假说所提出的海藻状聚乙二醇链结构有利于材料抗凝血性的提高, 已为许多研究结果的证实^[44, 45]。而所提出的其它表面分子链结构, 则不仅为改善生物材料抗凝血性提供新的途径, 而且也将对其本身的正确性进一步进行验证。

如前所述, 血蛋白/血细胞等正常(天然) 构象的改变是机体对生物材料存在所作出的各种生物学反应的总根源。因此, 只要其表面分子链结构能维持它们的正常构象, 那么生物材料就将不仅是抗凝血性材料而且也是血液相容性材料和生物相容性材料。从这个意义上讲, 假说所提出的表面链结构也将是无生命材料与生命系统之间联合与统一的结构基础。

除了特定的链结构要求外, 这种结构在材料表面的浓度也是影响材料生物相容性的一个重要因素。这个因素对于表面组成与结构不均匀的生物材料来说尤为重要。因此, 继“维持正常构象”假说之后, 为了增加预定化学结构在材

料表面的浓度和对材料表面的“屏蔽”,从而进一步提高生物材料的生物相容性和生物功能性,作者等又提出旨在利用高分子链结构来增加预定化学结构表面浓度的所谓“化学放大”(Chemical Amplification)原理^[46],即通过含有预定化学结构的单体的聚合反应、大分子反应或两者的结合来增加它们在材料表面的浓度和空间范围。

综上所述,生物材料对与它相接触的蛋白质等生命有机体的作用和影响,归根结底,是对其肽链-侧基协同作用及由此而构建的天然构象的作用与影响;而大量的蛋白质吸附研究表明,一般高分子生物材料对纤维蛋白原、 γ 球蛋白等蛋白质的吸附都不同程度地引起它们天然构象的改变。因此,在生物材料表面设计与建立能够消除或减轻对蛋白质肽链-侧基协同作用和天然构象影响的表面分子结构,将是提高生物材料生物相容性和生物功能性的一个重要方向。对此,“维持正常构象”假说和“化学放大”原理都将不失其积极的意义。

5 参考文献

- 1 Szycher M · J Biomaterials Applications, 1988, 2, 372
- 2 Barenberg S A · J Biomed Mater Res, 1988, 22, 1276
- 3 Peppas N A, Langer R · Science, 1994, 263(March), 1715
- 4 Lyman J D · in: Encyclopedia of Polymer Science and engineering · edited by Kroschwitz J I, Mark H F, et al · Vol · 2, 267
- 5 Hoffman A S · in: Polymeric Biomaterials · edited by Piskin E and Hoffman A S · Martinus Nijhoff Publishers, 1986
- 6 Langer R, Cima L G, Tamada J A, Wintermantel E · Biomaterials, 1990, 11, 738
- 7 Mathews C K and Holde K E · Biochemistry · The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, 1990
- 8 Lehninger A L · Principles of Biochemistry · Worth Publishers, Inc, 1984
- 9 Zubay G · Biochemistry · Addison Wesley Publishing Company, 1983
- 10 Eisenberg H · Eur J Biochem, 1990, 187, 7
- 11 Katchalski-Katzir E · Macromol Chem Macromol Symp, 1988, 19, 1
- 12 Foster R I · The Nature of Enzymology · London: Croom Helm, 1980
- 13 Schulz G E and Schirmer R H · Principles of Protein structure · Springer-Vorlag New York Ins, 1979
- 14 沈同, 王镜岩, 赵邦悌 · 生物化学 · 北京: 高等教育出版社, 1990
- 15 刘增楠, 呈历利 · 基础分子生物学 · 北京: 高等教育出版社, 1993
- 16 Pace C N · CRC Crit Rev Biochem, 1975, 3, 1
- 17 Baier R E and Dutton R C · J Biomed Mater Res, 1969, 3, 191
- 18 Brash J L and Lyman D J · J Biomed Mater Res, 1969, 3, 175
- 19 Vroman L, Adam A L and Klings M · Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol, 1969, 30, 1494
- 20 Baier R E, Loeb G I and Wallace G T · Fed Proc, 1971, 30, 1523
- 21 Lyman D J and Kim S W · Fed Proc, 1971, 30, 1658
- 22 Baier R E, Ann N Y · Acad Sci, 1977, 283, 17
- 23 Kim S W and Lee E S · J Polym Sci: Polymer Symp, 1979, 66, 429
- 24 Lyman D J, Brash J L, Chaikin S W, et al · TASAIO, 1968, 14, 250
- 25 Brash J L and Lyman D J · J Biomed Mater Res, 1969, 3, 175
- 26 Morrissey B W and Stromberg R R · J Coll Inter Sci, 1974, 46, 152
- 27 Nyilas E, Chiu T H and Herzlinger G A · TASAIO, 1974, 20, 480
- 28 McMillin C R and Walton A G · J Coll Inter Sci, 1974, 48, 345
- 29 Hoffman A S · J Biomed Mater Res, Symp, 1974, 5, 77
- 30 Soderquist M E and Walton A G · J Coll Inter Sci, 1979, 72, 265
- 31 Walton A G and Maenpa F C · J Coll Inter Sci, 1981, 84, 263
- 32 Chan B M C and Brash J L · J Coll Inter Sci, 1981, 84, 263
- 33 Chuang H Y K and Andrade J D · J Biomrd Mater Res, 1985, 19, 813
- 34 Sevastianov V I and Tseytina E A · Progress in Artificial Organs · 1983, 871
- 35 Bonfied T L, Colton E and Anderson J M · J Biomed Mater Res, 1989, 23, 535
- 36 Miller K M, Huskey R A, Bigby L F and Anderson J M · Biomaterials, 1989, 10, 187
- 37 Miller K M, Rose-Capara V, Anderson J M · J Biomed Mater Res, 1989, 23, 1007

38

Brash J L and Uniyal S·J Polym Sci: Polymer Sympo-
sium, 1979, 66:377

39

Lee R G and Kim S W·J Biomed Mater Res, 1974, 8:251

40

Lee R G, Adamson C and Kim S W·Thrombosis Re-
search, 1974, 4:485

41

Falb R D, Takahashi M T, Grode G A, et al·J Biomed
Mater Res, 1967, 1:239

42

Kochwa S, Litwak R S and Rosenfield R E·Annals·New
York Academy of Science, 1977, 283:37

43

Ihlenfield J V and Cooper S L·J Biomed Mater Res, 1979,
13:577

44

林思聪·高分子生物材料分子工程研究进展, 高分子通
报, 1997, 1:1

45

Amiji M and Paek K·J Biomter Sci, Polym Edn, 1993, 4:
217

46

林思聪, Jooobs H J and Kim S W·J Biomed Mater Res,
1991, 25:791

Proteins’ Natural Conformation and Biomaterials’ Biocompatibility

Li Sicong

(Department of Polymer Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Summary In this review the relation between biocompatibility of biomaterials and confor-
mation of proteins was expounded·The elaboration includes four propositions as follows: 1· The
natural conformation of protein is the basis of its biofunctions, 2· The synergistic effect of peptide
chain-lateral group is the driving source for both the foundation of natural conformation and the
accomplishment of biofunction of proteins, 3· Protein adsorption of biomaterials, 4· Relation be-
tween biocompatibility of biomaterials and conformation of proteins·

It is concluded that one of the best way improving biocompatibility of biomaterials is to main-
tain the natural conformation of proteins and cells contacted, in that both "Maintaining Normal
Conformation" hypothesis and "Chemical Amplification" principle will play a positive role·

Key words Natural conformation, Biomaterials, Nonthrombogenicity, Biocompatibility, Pro-
tein adsorption

(上接第 90 页)

Progress on Solid-phase Synthesis of Oligosaccharides and Research of Mechanism

Qin Fei, Jiang Tingda

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Academia Sinica, Beijing 100085)

Summary The synthesis of oligosaccharides are reviewed·The effect of polymer on the cou-
pling and its mechanism are described·Methods used for protecting hydroxyl group, including sol-
id-phase protection, and the stereospecific control in the coupling are also described·

Key Words Solid-phase synthesis, Oligosaccharide, Coupling