

超声后 RADA16-I 短肽纳米纤维支架重组及成胶的研究*

罗涵琳,张航与,郑青,赵晓军

(四川大学纳米生物医学技术与膜生物学研究所,成都 610041)

摘要 RADA16-I 自组装短肽水溶液中形成纳米纤维并在盐离子作用下触发成水凝胶。RADA16-I 纤维被大功率超声打断为小的原纤维片段。用 AFM、CD 和流变仪研究超声后纤维的重组及其成胶性质。实验发现,超声未破坏纳米纤维二级结构,纤维仍保持 β -sheet 构型,超声 4h 后,小片段重组为 500nm 的纤维,纤维虽未恢复到原长度,但仍未丧失其触发成胶的能力,只是在相同触发时间内达不到超声前的储能模量 G' 。还研究了超声对纳米纤维和成胶性能的影响,并提出相应的分子模型,这有助于短肽生物材料的应用,并对淀粉样蛋白变异的机理有一定的启示作用。

关键词 生物材料 纳米纤维 自组装短肽 重组 凝胶

中图分类号:R318.08

文献标识码:A

Research on the Reassembly and Hydrogel-forming Property of Peptide RADA16-I Nanofiber Scaffold under Ultrasound

LUO Hanlin, ZHANG Hangyu, ZHENG Qing, ZHAO Xiaojun

(Institute for Nanobiomedical Technology and Membrane Biology, Sichuan University, Chengdu 610041)

Abstract Self-assembly peptide RADA16-I can form nanofibers spontaneously in aqueous solution and undergo gelation in the presence of salt. In this study, RADA16-I nanofibers are sonicated into small fragments, the reassembly of which is followed by AFM, circular dichroism and rheology. The typical β -sheet spectra are observed before and after sonication, indicating the integrity of the second structure is unchanged. After 4 hours sonication, the fragments reassemble to nanofibers (~500nm). Although nanofibers fail to grow to original length after sonication, they still possess hydrogel-forming ability. Admittedly, the storage modulus (G') of hydrogel after sonication is smaller than that before, when peptides are triggered by salt for 30min. The molecular model of reassembly and gelation for RADA16-I is also proposed. The research concerning the effect of ultrasound on RADA16-I nanofibers and hydrogel, to a certain extent, is not only conducive to the application of peptide scaffold but to further comprehend the possible assembly and reassembly mechanism of amyloid fibrils.

Key words biomaterials, nanofiber, self-assembly peptide, reassembly, hydrogel

0 引言

许多短肽和蛋白质通过分子间的非共价键作用自发组装形成构象稳定的分子聚集体或超分子材料,在生物医学领域有潜在应用^[1]。RADA16-I 是短肽材料的典型代表,可应用于细胞培养、组织工程、药物缓释等^[2,3]。RADA16-I(RA-DARADARADARADA)有 2 个截然不同的面,间隔的 A 形成疏水面,R 和 D 形成亲水面。它在水溶液中能自组装成纳米纤维,在盐作用下能触发形成凝胶,但其组装及成胶机理还不清楚。

成胶性能是短肽材料实际应用的重要前提。在细胞培养、止血或药物载体时,为将短肽水凝胶中的生物分子混合均匀,实验中常引入超声来实现。超声一般伴随机械作用、热效应和空化效应,产生出高热高压的环境,对高分子解聚

和重新聚合有重要影响^[4]。因此,超声可能影响 RADA16-I 的成胶性能,进而影响到短肽材料的应用。此外,自组装短肽类似于淀粉样蛋白疾病中常见的蛋白纤维,后者在生理环境中可能经历自组装和重组的过程^[5]。因此,研究超声对 RADA16-I 纳米纤维的影响有助于对蛋白变构疾病机制的理解和治疗手段的选择。有资料^[6]表明,保存在 ep 管内的 RADA16-I 在小功率超声清洗机中超声后 2h 内基本恢复原状,但 ep 管的强屏蔽作用使超声严重衰减,超声对短肽影响较小。本文即研究大功率超声探头直接作用自组装短肽后对其结构及成胶的影响,并提出可能的分子模型。

1 试验

1.1 肽溶液制备

RADA16-I 肽 ($\text{CH}_3\text{CO-NH-(Arg-Ala-Asp-Ala)}_4\text{-CO-}$

* 四川大学“985”自然科学基金(0083604127032)

罗涵琳:女,1985年生,硕士生,从事纳米生物材料的研究 E-mail:lhl_scu@sina.com

NH_2 , 1% (10mg/mL), 分子量为 1712.9), 购于上海波泰生物科技有限公司, 纯度为 95%。所有短肽溶液均在 4℃ 冰箱储存。超声时将超声波细胞破碎仪探头伸入短肽溶液液面以下 1cm 左右, 功率 200W, 作用 15min。

1.2 圆二色谱(CD)

AVIV400 型光谱仪(AVIV Associates, Lakewood, NJ) 在 25℃ 下进行采集, 使用 1mm 的石英杯。测量的波长范围为 190~260nm, 1nm/s。测试肽溶液浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, CD 信号转换为摩尔椭圆率进行比较。

1.3 原子力显微镜(AFM)

AFM 扫描在室温下采用 SPA-400 SPM Unit (Seiko Instruments Inc., Chiba, Japan) 以敲击模式进行。全部图像采用针尖曲率半径为 10nm、弹性系数 12.00N/m、共振频率 127.00kHz 的 Olympus Si-DF20 悬臂。扫描图像前, 取 1 μL 肽溶液置于新揭开的云母片上, 静置 30s 使样品黏附于云母表面, 然后用 100 μL 纯水冲洗 2 次。

1.4 流变学性质(Rheology)

流变学实验采用 TA Instruments 公司的旋转流变仪 AR2000EX。试验使用直径 20mm、锥度为 0°59'42" 的不锈钢锥板夹具, 锥板尖与 Peltier 间间隙为 25 μm 。测试温度设定为 25℃, 应变率设为 0.1%。测试用 RADA16-I 为 0.1%

(10mg/mL), 每次用量 80 μL 。

2 实验结果

2.1 超声前后 RADA16-I 纳米纤维的形态学变化

如图 1(a)所示, 超声前 RADA16-I 在水溶液中为细长纤维(高为 $1.224 \pm 0.08\text{nm}$, 宽为 $17.78 \pm 1.44\text{nm}$, 长度为 $1108 \pm 184\text{nm}$)。10mg/mL 的质量浓度下, RADA16-I 用 PBS (pH=7.2) 触发可形成透明水凝胶, 如图 1(b)所示。图 1(b) 中两平底玻璃试管均倒置, 左侧玻璃管为 RADA16-I 触发后形成的透明凝胶, 凝胶在重力作用下不会掉下来; 右侧玻璃管为同等体积的水, 管口用封口膜封闭。

大功率超声作用后不同时间点的 RADA16-I 形貌如图 1(c)~(f)所示((c)5min、(d)30min、(e)1h、(f)4h、(g)8h、(h)12h)。超声作用后 5min, 原来紧密交织的纤维被打碎为不规则聚集体和细小的原纤维片段; 30min 后, 纤维片段增长, 长度小于 400nm; 1h 后, 纤维开始密集, 出现大小不一的短纤维, 长度为 50~500nm; 4h 后, 纤维未显著增长, 但长度变均一; 8h 和 12h 后的纤维长度仍在 500nm 左右, 出现相互交叠和聚集的现象。实验表明, 超声作用后纤维约恢复到超声前 50% 的长度; 短纤维没有超声前长纤维舒展, 而有团聚的趋势。

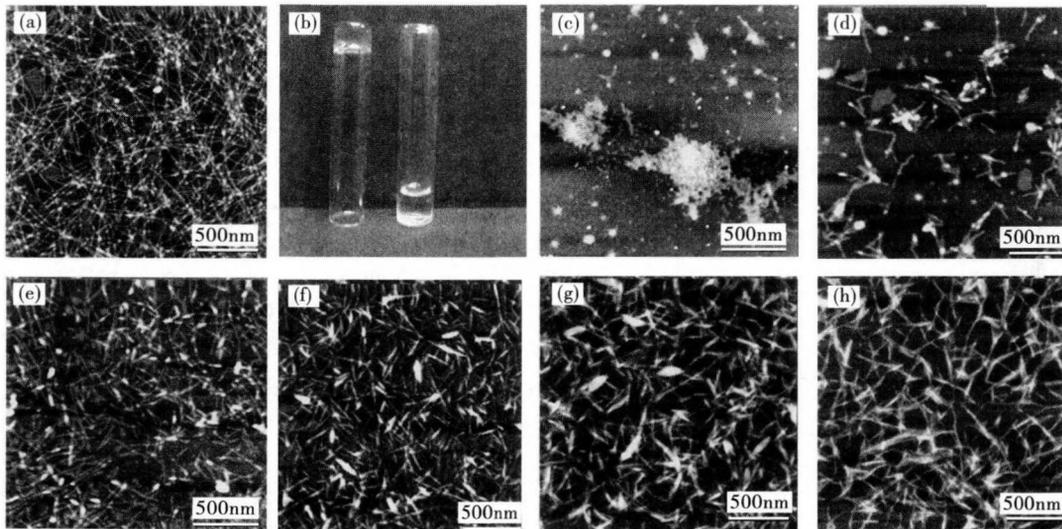


图 1 超声前后 RADA16-I 纳米纤维的形态学变化

Fig. 1 The morphological changes of RADA16-I nanofibers under ultrasound

2.2 超声前后 RADA16-I 二级结构的变化

RADA16-I 在水溶液中形成稳定的 β -sheet, 具有 CD 谱典型的正峰(195nm)和负峰(216nm)。CD 测量的是肽链骨架的形态, 故不能推导纳米纤维自组装的机制。存在 β -sheet 是纤维自组装的前提, CD 能够测量超声是否破坏了短肽分子的二级结构。本实验中, CD 检测了短肽在超声后不同时间(超声前、5min、30min、1h、4h、8h、12h)的二级结构(如图 2 所示)。结果表明, 各个时间点均存在典型的 β -sheet 特征峰, 这表明短肽的二级结构和完整性未受到超声影响。短肽分子间仍保持 β -sheet 结构, 未被打断为单个分子。在小功率超声下, 超声后短肽正峰峰值大于超声前, 负峰峰值基本

不变。而在大功率试验中, RADA16-I 的正负峰值在 12h 内出现缓慢增长, 且未恢复到超声前的峰值。这可能是由于重组装导致了不同的 β -sheet 聚集方式。

2.3 超声前后 RADA16-I 流变性能及其对成胶能力的影响

超声对 RADA16-I 水溶液流变性的影响如图 3(a)(超声前、5min、1h、4h、8h、12h)所示。RADA16-I 水溶液的储能模量 G' (表示材料的弹性响应)始终大于耗散模量 G'' (表示材料的粘性响应)。 G' 较低, 且 G'' 并不稳定。随着时间的延长, RADA16-I 的 G' 逐渐增大, 在 4h 时略微下降, 8h 后达到 8Pa 左右, 12h 时 G' 基本与 8h 时的保持稳定, 而此值远小于超声

前的 G' , 22Pa。

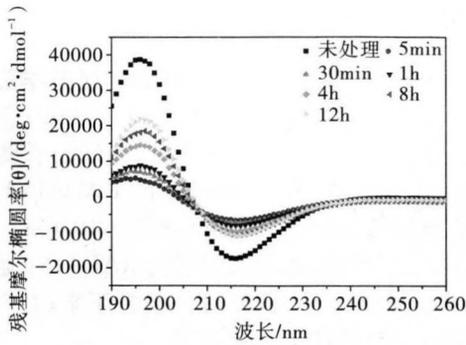


图2 CD测试短肽超声后不同时间的二级结构

Fig. 2 CD spectra of RADA16-I at different time point

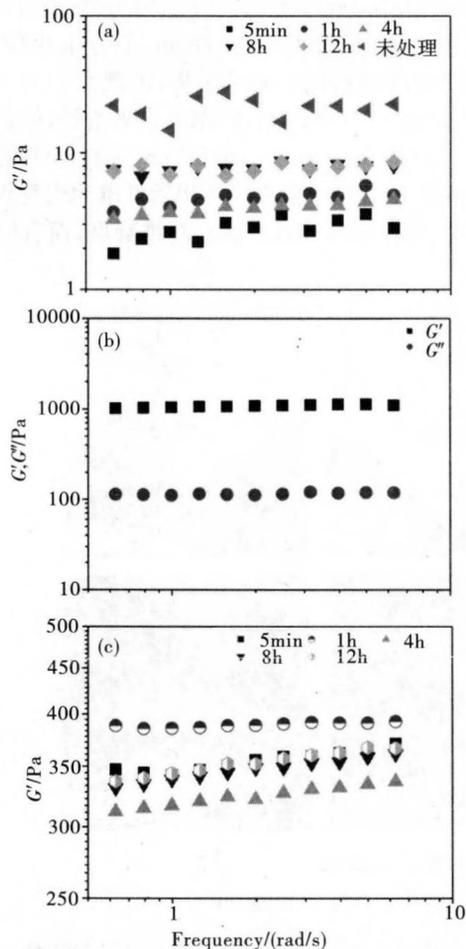


图3 超声对短肽 RADA16-I 水溶液及触发成胶后 RADA16-I 凝胶流变性能的影响

Fig. 3 The influence of ultrasound on the rheological properties of RADA16-I peptide solution and RADA16-I nanofiber hydrogel triggered by PBS

本试验采用 PBS(pH=7.2, 10mmol/L) 触发 RADA16-I 形成凝胶, 用以模拟 RADA16-I 在生理条件下的成胶情况。胶体的 G' 和 G'' 随频率变化而基本稳定, G' 远远大于 0。超声前 RADA16-I 触发 30min 后进行测试, 如图 3(b) 所示。 $G' \approx 1100\text{Pa}$, $G'' \approx 115\text{Pa}$, 均在频率范围 0.628~6.28rad/s 内保

持稳定, 证明短肽发生了溶胶-凝胶转变并达到平衡。超声后短肽在不同时间点(5min, 1h, 4h, 8h, 12h) 由 PBS 触发 30min 后测试, 如图 3(c) 所示。在测试的时间内, 触发后的 G' 为 300~400Pa, 远远大于触发前的值 ($< 8\text{Pa}$), 但凝胶 $G' < 1100\text{Pa}$ 。超声后各时间点的 G' 在扫描的频率范围内不稳定, 出现增大的趋势, 这说明触发 30min 测试时, RADA16-I 的凝胶化在体系内并未达到平衡。随着时间的延长, 5min, 8h, 12h 的 RADA16-I 的 G' 呈递增态(数据未给出), 表明超声降低了 RADA16-I 水溶液的 G' , 但没有破坏其成胶能力。

3 讨论

超声波在液体中传播时, 其振动能量不断被溶液吸收转变为热能而使溶液温度升高。实验中达到的温度不能直接测得, 但由 AFM 显示, 超声后的 RADA16-I 能形成大小不一的纤维。由 RADA16-I 热稳定性的实验^[7] 可知, RADA16-I 在 60℃ 时解体为不规则聚集体且完全丧失纤维形貌。超声产生的高热环境并未使 RADA16-I 纳米纤维解体, 故超声的热机制不是 RADA16-I 重组变化的主要原因。

从 AFM 图发现, 纤维经历了从短到长的重新组装过程。纤维被打断可能是因为超声中的非热机制, 即机械作用和空化效应。在超声作用下, 溶液中较小的溶剂分子运动较快, 而较大的短肽纤维运动较慢, 水分子和短肽纤维的摩擦力增大, 从而导致短肽纤维断裂。此外, 短肽纤维上可能存在某一段的振动滞滞后于其他段, 应力集中后形成断裂点而使其断裂为小的原纤维片段。实验测得超声前后溶液的 pH 均为 3~4, 故短肽的亲水面带正电。按照双电层理论, 短肽靠拢时由扩散层重叠而产生斥力, 因此原纤维片段需要克服斥力并在疏水相互作用下重组。超声过程中, 短肽纤维的打断和重新组装同时发生。当被打断后的片段重组至一定长度后, 可被超声重新打断成小的片段。

实验发现, 大功率下 RADA16-I 的纤维长度停留在 500nm 左右, 不能恢复到原长度。小功率超声作用时, 由于超声的衰减幅度大, 使纤维被打断后的片段可能比大功率下得到的片段更长(且长度更不均匀), 在溶液内的分布也没有大功率超声作用后均匀, 因此片段更容易接近和延伸。此外, Lormakin^[8,9] 提出杂质可以作为纤维的生长核心。大功率超声下会引入更多的杂质(如空化作用下超声钛探头的氧化物和短肽合成时残留的杂质氧化), 并将其打散后均匀分散, 故大功率超声作用下有更多的纤维延伸中心, 单位生长核心得到的原纤维片段变少, 组装后的纤维变短。当纤维延伸至一定长度后, 纤维间形成的空间位阻会阻碍原纤维片段扩散, 从而抑制纤维的进一步延伸。从 4h, 8h, 12h 的 AFM 可以看出, 500nm 的 RADA16-I 重组纤维并不稳定, 伴有纤维自身和纤维间重叠团聚的趋势。RADA16-I 纤维是纳米级, 具有极高的比表面。纤维亲水面带正电, 其扩散层重叠时产生静电斥力使其舒展。但纤维变短后, 静电斥力可能小于疏水相互作用的吸引力, 此外短纤维在溶液中的扭转也可能使斥力变小, 因此短纤维团聚并降低比表面。可以推测, 当团聚程度变大后, RADA16-I 可能丧失纤维的形态, 形成不

规则或点状聚集体。重组后的 RADA16-I 短纤维比长纤维更易受疏水相互作用的影响,因而在包裹疏水性药物时可能更有优势。

RADA16-I 重组及成胶的分子模型图如图 4 所示。RADA16-I 短肽水溶液中形成纳米纤维,具有亲水面和疏水面。超声后,纤维断裂为小的原纤维片断,4h 后恢复为约 500nm(超声前约 1100nm)。PBS 触发短肽成胶。根据 DLVO 理论^[10],向 RADA16-I 水溶液引入盐后,负离子屏蔽掉部分 RADA16-I 亲水面的正电荷使纤维间斥力减小;当纤维间吸引力占主导时,纤维间距变小而易于接近。短肽疏水面相互吸引(仅以 2 根纤维为例)将亲水面暴露形成纤维束,纤维束相互交联形成纳米纤维凝胶。超声后纤维变短,在盐触发相同时间后,纤维间相互交织的程度小于长纤维。因此,短纤维形成的凝胶(Hydrogel B)储能模量小于超声前形成的凝胶(Hydrogel A)。随着触发时间的延长,RADA16-I 的 G' 能够继续增大甚至达到超声前的大小。

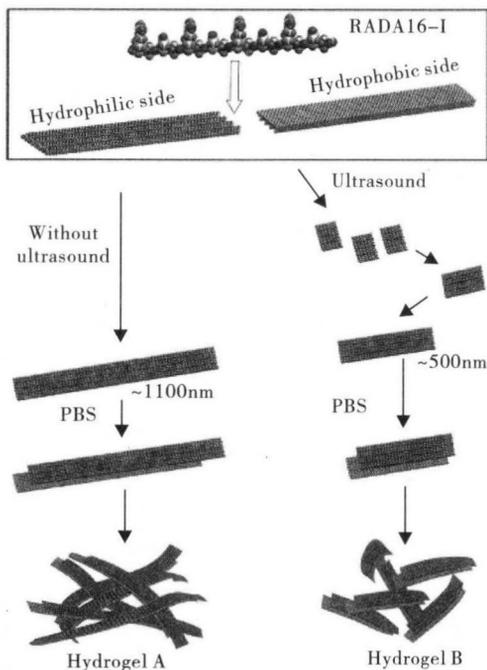


图 4 超声后 RADA16-I 重组及成胶分子模型图

Fig. 4 Molecular model: the reassembly and gelation of RADA16-I

4 结论

在大功率超声作用下,RADA16-I 仍保持 β -sheet 二级结构而未被打断为单体。RADA16-I 重组为约 500nm 的纤维,但不能恢复到超声前长度。超声后 8h 和 12h,短纤维有团聚重叠的趋势,可能意味着短纤维并不稳定。神经性疾病(如阿尔茨海默病、帕金森症)与纤维样蛋白组装产生的神经毒性相关^[11],自组装的蛋白纤维在抵抗药物或其他治疗手段时可能发生重组装^[6],因此了解 RADA16-I 纳米纤维的重组装过程对研究病变纤维的形成机制和治疗手段有重要的指

导意义。

流变试验表明,RADA16-I 超声后不会丧失成胶能力,但在触发 30min 后,其 G' 小于超声前。当短肽应用于细胞培养和止血时,短肽材料需在短时间内触发形成三维纳米纤维凝胶。因此,应用时,超声短肽溶液的时间不宜过长,功率不应过大。而当短肽作为疏水性药物载体时,超声作用后,RADA16-I 短纤维对疏水性药物包裹和缓释可能具有良好的前景。

致谢:感谢四川大学高分子学院钟银屏教授对本实验的建议和指导。

参考文献

- Zhang S. Building from the bottom up[J]. *Materials Today*,2003,6(5):20
- Ellis-Behnke R G, Liang Y X, Tay D K, et al. Nano hemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale[J]. *Nanomedicine*,2006,2(4):207
- Zhang S, Gelain F, Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures[J]. *Seminars in Cancer Biology*,2005,15(5):413
- 冯若,李化茂.声化学及其应用[M].第一版.合肥:安徽科学技术出版社,1992:10
- Krebs M R H, Morozova-Roche L A, Daniel K, et al. Observation of sequence specificity in the seeding of protein amyloid fibrils[J]. *Protein Sci*,2004,13(7):1933
- Yokoi H, Kinoshita T, Zhang S. Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold[J]. *PNAS*,2005,102(24):8414
- Ye Zhaoyang, Zhang Hangyu, Luo Hanlin. Temperature and pH effects on biophysical and morphological properties of self-assembling peptide RADA16-I[J]. *J Peptide Sci*,2008,14(2):152
- Lomakin A, Kirschner D A, Benedek G B. Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein[J]. *Proc Natl Acad Sci*,1997,94(15):7942
- Lomakin A, Chung D S, Benedek G B, et al. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: Detection of nuclei and quantitation of rate constants[J]. *Proc Natl Acad Sci*,1996,93(3):1125
- Caplan M R, Moore P N, Zhang S, et al. Self-assembly of a beta-sheet protein governed by relief of electrostatic repulsion relative to van der Waals attraction[J]. *Biomacromolecules*,2000,1(4):627
- Caughey B, Lansbury P T. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders[J]. *Annu Rev Neurosci*,2003,26(1):267

(责任编辑 云 哲)