

吕珊珊——未来三年研究计划

一、主要研究方向和思路：

从单分子水平自下而上的设计模仿天然肌肉的生物材料。运动或疾病常常会导致各种各样的如肌肉拉伤、断裂等组织功能障碍甚至功能丧失。这些问题往往会影响到人类的日常活动，某些严重的损伤，如心脏衰竭等甚至还会威胁到人类生命。以心脏病为例：全球每年心脏病晚期患者有 30 万，预计未来三年大约有 60 万人需要更换心脏瓣膜。但是心脏修复和移植的替代物来源却非常有限，供体器官远远不能满足器官总需求。在美国，每年有 5 万多人需要作心脏移植手术，但是可用的心脏才 2000 多个，这意味着每年有近 5 万人因为没有可供移植的心脏而死去。我国也有大量的心脏病病人都因缺乏心脏移植来源的问题，面临着死亡。随着老龄化进程的发展，这种情况也进一步加剧。由于修复和移植替代物的来源短缺，关于可用于肌肉组织修复和替换的材料的研究有着很大的市场与科研需求。[2015-2020 中国生物材料行业市场前瞻与投资战略规划分析报告]

科学家们已经进行了几十年的研究与探索，尝试通过人工合成能够模仿天然肌肉的生物材料来解决来源短缺的问题。这类人工合成的材料能够模仿肌肉必须具备两个重要条件。一是这类材料必须具有类似肌肉的机械性能，这其中包括主动弹性性能和被动弹性性能两部分。二是这类材料既能储存大量能量又能保持自身活性，在数千次收缩或伸长时仍具有良好的性能。[Schenk, D.J., *Mechanics of Muscle*. 1992, New York and London: New York University Press.]现在已有多种材料被报道用于人造肌肉的研究，这些材料包括塑料、类似橡胶的聚合物、凝胶以及金属等[Shahinpoor, M., *Smart Mater. Struct.*, 1992: 91-94.] [H LL, P JM, *Science*. 2002. (5557): 1014-1017.] [Ramaratnam, A., *Journal of Intelligent Material Systems and Structures*, 2006. 17(3): 199-208.] [Zang, J., et al., *Nat Mater*, 2013. 12(4): 321-325.]。

考虑到天然肌肉组织是一种由约 80% 组分的水溶液和 20% 左右的蛋白质构成的弹性材料，研究者们将聚合物凝胶材料作为这类材料的研究重点。目前，仿肌肉聚合物凝胶材料的研究，主要通过环境的刺激来诱导聚合物的构象发生变化，导致高分子聚合物凝胶的宏观形状与体积发生变化，从而产生力的效果，以达到模仿肌肉相关性能的目的。Kuhn, Hargittai 和 Katchalsky 最先发现了一些溶胀聚

合物可以通过化学作用像肌肉一样收缩[Kuhn, W., et al., *Nature*, 1950: 165.]。自从他们的开创性发现之后,多种聚合物凝胶都已经被合成出来用于模仿肌肉。特别是一些能够模拟响应物理或化学刺激(包括溶液浓度、溶剂、pH 值、电场和磁场的改变等)导致肌肉收缩这一特性的聚合物凝胶更是备受关注。[Osada, Y., *Advances in Polymer Science*, 1987. 82(1).][De Rossi., et al., *Polymer Gels Fundamentals and Biomedical Applications*. 1991, New York: Plenum Press.]

溶剂敏感的凝胶,是一种能够响应溶剂变化的凝胶。在 Caldwell 等人的关于聚丙烯腈/聚乙烯醇人造肌肉的合成的研究中,他们先将凝胶纤维平行排列组成条状纤维束并放置在一个容器内,让容器中丙酮溶液和氯化钠盐溶液交替循环流动,从而使得纤维束交替膨胀和收缩。纤维束产生的力及其收缩速度可以通过调节纤维束的厚度来控制与优化,以达到接近天然肌肉的效果。[Caldwell, D.G., N. Tsagarakis, and G.A. Medrano-Cerda, *Mechatronics*, 2000. 10: 499-530.] 在此基础上, Brock 等人研制了 pH 敏感的聚丙烯腈凝胶纤维。[Brock, D., et al., *Journal of Intelligent Materials and Structures*, 1994. 5(6): 764-771.] Shahinpoor 等人则进一步研究了聚丙烯腈纤维的可逆伸缩。他们利用 pH 值变化引起的凝胶表面亲水疏水性的变化,通过提高碱浓度纤维伸长,提高酸浓度纤维则缩短来实现纤维的可逆收缩。他们还发现即使重复 30 次以上的应激实验后,材料仍具有良好的应激性能。[H. Brett Schreyer, N.G., Kwang J. Kim, and Mohsen Shahinpoor, *Biomacromolecules*, 2000. 1: 642-647.]

电场敏感的凝胶,由于其形状变化快速平稳并且可控,也已被用作作为介电弹性体的人造肌肉。[Pelrine, R., et al., *Materials Science and Engineering C*, 2000. 11: 89-100.] Kaneko 等人通过利用电场中聚合凝胶表面活性分子的可逆的络合作用合成了这类凝胶。他们的研究发现,电场的开闭会使得表面活性分子可逆地与凝胶结合,从而引起各向异性的收缩与舒张,这在人造肌肉方面拥有着潜在的应用价值。[Kaneko, D., J.P. Gong, and Y. Osada, *Journal of Materials Chemistry*, 2002. 12(8): 2169-2177.]

磁场敏感的凝胶,有时也被称为铁磁凝胶,也是一种可用于制造人造肌肉系统的材料。[W. Haas, M.Z., H. -G. Kilian and B. Heise, *Colloid and Polymer Science* 1993. 271(11): 1024-1034.] Szabo 等人通过混合聚合物溶液和磁性纳米溶胶并再

将其交联制得了一类凝胶。他们发现，在附加磁场的情况下，这种凝胶中的凝胶纤维会发生变形，依靠凝胶内部的弹力和磁力相互作用从而达到一种平衡态形状，当撤去磁场后又恢复成原形态。这种材料表现出很不俗的人造肌肉潜质。

[Szabo, M.Z.a.D., *International Journal of Modern Physics B*, 2001. 15:

557-563.] Miklos 等人则研究了聚乙烯醇与 Fe₃O₄ 合成的磁感凝胶随磁场的变形行为。他们发现这种凝胶响应磁的速度比以往的智能凝胶要快得多，而且体积变化连续，有着很好的应用前景。[Miklos Zrmnyi, D.S., Hanns-Georg Kilian, *Polymer Gels and Networks*, 1998. 6: 441-454.]

此外，Pierre-Gilles 等人采用液晶凝胶将形态舒张时间控制在实际肌肉控制时间之内，从而克服了传统的凝胶材料在应用于人造肌肉时存在力学反应速度慢、局部压力过大以致损坏材料等问题的限制。[De Gennes, P.-G., M. Hebert, and R. Kant, *Macromolecular Symposia*, 1997. 113(1): 39-49.] Giuseppone 的研究小组通过合成超分子键结合的长聚合物链，也成功设计出了能模仿天然肌肉运动的材料。这种材料中的每条聚合物链可以生产大约 1nm 的线性伸缩运动，成千上万条聚合物链同步运动，使整个聚合物链上的收缩或延伸效果超过了 10 μ m，非常好地模仿了肌肉收缩和伸展的特性。[Du, G., et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012.

124(50): 12672-12676.]

前文提到的研究模仿肌肉的聚合物凝胶例子，基本上达到了模拟天然肌肉的应变能力和弹性模量等特性的目的。虽然这些凝胶材料均不同程度上地与肌肉的收缩或拉伸性能相似，但大多数和天然肌肉还是有一定差距的。究其原因，是这些材料只通过材料表面的力学性质和功能加以模仿，而不是参考功能机制达到分子水平上模仿，较难取得成效，这导致了到目前为止很少有能够模拟天然肌肉的所有复杂机械性能的生物材料的相关报道。

申请人的课题组拟通过了解肌肉的构造，分析肌肉收缩和延伸原理即肌肉生物力学的微观序列的信息，尝试从单分子层面出发，研究设计出能同时模仿肌肉的主动收缩和被动延伸的生物材料。

肌肉主动弹性中所涉及的肌肉收缩被普遍认为通过钙离子诱导的。肌肉收缩过程中的主要细胞事件是游离钙离子浓度的上升。例如，平滑肌的收缩和舒张是由细胞内游离钙离子浓度变化引起的。在尿平滑肌中，钙离子可以影响肌球蛋白

白轻链激酶的活性(磷酸化肌球蛋白轻链)。[Somlyo, A. and A. Somlyo, *Physiol Rev*, 2003. 83: 1325-1358.]钙离子浓度的增加引发肌球蛋白轻链磷酸化，[Horowitz, A., et al., *Physiol Rev*, 1996. 76: 967-1003.]导致肌球蛋白结合肌动蛋白，并在肌动蛋白纤维上滑动，产生力量，即肌肉收缩。肌肉收缩对钙离子具有响应性，敏感性，特异性，所产生力的大小也取决于钙离子的浓度。而且肌肉收缩的过程是可逆的。[Somlyo, A. and A. Somlyo, *Physiol Rev*, 2003. 83: 1325-1358.]

这些研究结果表明，钙离子诱导的蛋白构象变化在肌肉收缩的整个过程中是非常重要的。这些结果启发我们提出一种设想，如果我们能够设计出可以在结合钙离子之后尺寸减小的蛋白质，然后将这些蛋白质组装在一起合成一种材料，那么这种材料将在结合钙离子之后，变成更小的尺寸。换句话说，这种材料将表现出钙离子诱导的体积变化，并产生力，即模仿肌肉收缩的过程。我们拟通过这种自下而上的设计方法研究能够模仿肌肉主动收缩的材料。

尽管预期所设计出的材料能够模仿肌肉主动收缩，但这仍局限在宏观水平上的研究。只有为材料宏观水平上性能的来源提供分子水平上的依据，才能真正地从根本上解决现有材料无法模拟天然肌肉的所有复杂机械性能的问题。蛋白在分子水平上的力学性能如何转化成材料在宏观水平上的力学性能，如何在单分子水平上了解并评价蛋白的机械性能对钙离子的应激收缩变化及形变恢复弛豫也是亟待解决的科学技术难题。申请人考虑用单分子原子力显微镜力谱等方法来表征结合钙离子后蛋白构象和稳定性的变化，并结合钙离子滴定的方法，来研究材料产生力的速度、响应时间和最大主动力等性能。只有通过这些分子水平上的研究与测试，才能确定该材料能否做到分子水平的模仿肌肉，是否是真正意义上的仿肌肉材料，从而争取为解决肌肉修复、替换材料来源短缺的问题做出贡献。

二、研究内容、拟采取的研究方案及可行性分析：

受天然肌肉的启发，我们提出采用从分子水平上“自下而上”的仿生设计方法研究能够同时模仿天然肌肉主动收缩和被动延伸的生物材料。基于天然肌肉生物力学，在分子水平上起重要作用的蛋白质，主要包括肌动蛋白(actin)，肌球蛋白(myosin)和肌联蛋白(titin)。肌肉主动弹性中所涉及的肌肉收缩主要是通过钙离子诱导的蛋白构象变化引起的。在肌肉的被动弹性中，肌联蛋白起主要作用。肌联蛋白的结构，包括一系列折叠免疫球蛋白(Ig)和一系列独特的而且基本上非结构

化的氨基酸序列(PEVK)。

在模仿肌肉被动弹性性能方面,我们已经成功地通过基本的分子生物学技术,构建 GB1 和 resilin 的重组蛋白。并使用 Ru(II)调控的光化学交联方法将所得蛋白交联成水凝胶生物材料。所得材料表现出模仿天然肌肉被动弹性的性质。[Lv, S., et al., *Nature*, 2010. 465(7294): 69-73]

在模仿肌肉钙离子应激收缩方面,我们需要一种随着钙离子浓度增加尺寸变小的蛋白质。前人研究表明,有一种名为 Beta Roll domain 的蛋白,在结合钙离子之后,尺寸变小。[Szilvay, G., et al., *Biochemistry*, 2009. 48: 11273-11282.]该蛋白源自一个名为 repeats in toxins (RTX)的蛋白域。[Welch, R., *Mol. Microbiol.*, 1991. 5: 521-528.]RTX 包含串联重复的氨基酸序列—壬肽(GGXGDXUX, 其中 X 可以是任何氨基酸的, U 可以是任何疏水性氨基酸, D 代表天冬氨酸,负责钙离子的结合)。[Angkawidjaja, C., et al., *FEBS Lett.*, 2005. 579: 4707.]在无钙或在一个钙离子浓度相对较低的 (nM 的范围)环境中, RTX 是无序的(非结构化的)。

[Chenal, A., et al., *J. Biol. Chem.*, 2009. 284: 1781-1789.]随着钙浓度的增加(mM 的范围),钙离子结合 RTX 蛋白域,导致其从非结构化的结构变成右旋 β 螺旋。相邻的 XUX 形成 β 链,由通过 GGXGXD 形成的回旋连接形成两个短的平行 β 折叠,即 Beta Roll 的结构。[Meier, R., et al., *J. Biol. Chem.*, 2007. 282:

31477-31483.][Baumann, U., et al., *EMBO J*, 1993. 12: 3357-3364.]钙离子结合在两个相邻的回旋之间的天冬氨酸和羰基上。[Szilvay, G., et al., *Biochemistry*, 2009. 48: 11273-11282.][Welch, R., *Mol. Microbiol.*, 1991. 5: 521-528.][Meier, R., et al., *J. Biol. Chem.*, 2007. 282: 31477-31483.][Baumann, U., et al., *EMBO J*, 1993. 12:

3357-3364.]报道显示,来自 *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin (CyaA) 蛋白的 Beta Roll domain, [Chenal, A., et al., *J. Biol. Chem.*, 2009. 284: 1781-1789.]当钙离子浓度从 0 增加到 10mM 时,端到端的距离从 6.1nm 减小到 4.7nm。[Szilvay, G., et al., *Biochemistry*, 2009. 48: 11273-11282.]该蛋白的水力半径也有报道在结合钙离子之后,由原先的 7.3nm 减小到 3.2nm。[Chenal, A., et al., *Biophysical Journal*, 2010. 99: 3744-3753.]多种 Beta Roll domain 的突变体已经被设计成钙离子响应的水凝胶。[Dooley, K., et al., *Biomacromolecules*, 2012. 13: 1758-1764.]在本研究中,考虑到钙离子结合之后蛋白尺寸的变化,我们将使用 Beta Roll domain

给所设计材料提供能够响应钙离子浓度应激主动收缩的特性。

概括地说，采用 Beta Roll domain 结合钙离子的特性，提供模仿肌肉钙离子应激收缩的特性；利用 GB1 和 resilin 合成仿肌联蛋白的蛋白质，提供模仿肌肉被动延伸的特性；通过将 Beta Roll domain 和 GB, resilin 整合为一体，构建重组蛋白，进而合成水凝胶生物材料，从而达到同时模仿天然肌肉的主动弹性和被动弹性性能的目的。

研究具体分为 5 个阶段：

1.响应钙离子激活和仿肌联蛋白的重组蛋白质的设计和合成

基于前文提到的 GB1, resilin 和 Beta Roll domain 蛋白序列，设计串联重复序列的蛋白。利用分子生物学技术表达提纯目标蛋白。[Lv, S., et al., Nature, 2010. 465(7294): 69-73.] 在不同溶液(含 Ca^{2+} 和含 EDTA)中透析,分别得到结合和不结合 Ca^{2+} 的蛋白。[Dooley, K., et al., Biomacromolecules, 2012. 13: 1758-1764.]

2.仿肌肉水凝胶生物材料的组装

沿用 Ru(II)调控的光化学催化的交联方法将蛋白质分子组装成水凝胶材料。[Lv, S., et al., Nature, 2010. 465(7294): 69-73.]

3. 材料力学性能及其受钙离子浓度影响的研究

将对所得材料进行一系列力学性能测试，研究其被动弹性(如杨氏模量，断裂强度和应变) [Lv, S., et al., Nature, 2010. 465(7294): 69-73.]和主动弹性，通过钙离子滴定等方法，研究材料产生收缩力的速度，响应时间和最大主动力等力学性能，及其对钙离子浓度的依赖性，敏感性和可逆性。[Arner et al. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1999] 并将测试结果与天然肌肉的性能进行比较；[Scott et al. Am J Physiol Cell Physiol 2008]研究材料的组成和交联反应条件，如蛋白质浓度和 Ru(II)浓度，寻找弹性性能能够与天然肌肉相当的水凝胶制造的最佳条件。

4.蛋白质单分子力谱研究

在过去的十年里，基于原子力显微镜的单分子力谱技术已成功地在单分子层面对蛋白质力学性能进行了全方位的准确描绘。本研究拟利用单分子原子力显微镜表征所设计重组蛋白在单分子水平上的力学性能，及其钙离子结合特性-钙离子结合后的蛋白质构象和稳定性的变化及其与钙离子结合的特异性和可逆性。

[Dooley, K., et al., Biomacromolecules, 2012. 13: 1758-1764.]

5. 借助相关实验技术方法将单分子水平和宏观水平上的研究结果相结合或模拟，确定该材料能否做到分子水平的模仿肌肉，是否是真正意义上的仿肌肉材料。整理研究所得数据结果，撰写并发表论文。

三、研究目标：

- 1.研究一种从分子水平上“自下而上”的仿生设计思路；
- 2.构建得到仿肌肉蛋白的重组蛋白；
- 3.组装重组蛋白合成出能够模仿天然肌肉的生物材料；
- 4.得到所设计材料力学性能受钙离子影响的规律，加深对天然肌肉生物力学微观机理的理解。

四、拟解决关键科学问题

- 1.如何为材料宏观水平性能的来源提供分子水平上的依据，即蛋白质在分子水平上的力学性能如何转化成材料在宏观水平上的力学性能等科学问题；
- 2.如何在单分子水平上了解并评价蛋白质的机械性能，从而借助蛋白质工程技术来设计具有特定机械性能的蛋白质，进而达到使用蛋白质作为功能和结构部件合成面向纳米力学应用的智能材料和纳米机械设备的目的是从单分子水平自下而上的设计合成智能生物材料研究领域需要解决的主要技术问题。

预期研究可合成一种新型的仿肌肉生物材料模仿肌肉的主动弹性和被动弹性，对现有的仿肌肉材料研究领域是一个非常重要的补充和推进；力争让所得的新型仿肌肉材料在解决肌肉修复和移植物来源短缺问题的研究中做出贡献并具有良好的应用前景；提高在生物材料领域的国际影响力，为创新型国家的建设贡献力量。

六、现有基础和需要的支持：

研究计划中的一部分内容已获批国家自然科学基金青年科学基金项目资助（基金号：31400813，项目名称：模仿天然肌肉钙离子应激收缩和被动延伸的生物材料的研究，研究期限：20150101-20171231）。申请人已在北京化工大学建立了实验室。在设计模仿肌肉主动弹性的生物材料这一研究方向上，课题组已从模仿肌肉蛋白钙离子应激变化出发，选用体积会响应钙离子浓度变化的特定蛋白

域，构建表达提纯人工重组蛋白，并利用光化学催化方法将蛋白交联成水凝胶材料。目前对材料的初步测试表明材料在受到钙离子浓度变化的刺激时会收缩，初步达到了模仿天然肌肉主动收缩的目的（结论尚未发表），这让我们相信该材料能在模仿肌肉的复杂机械性能的研究中取得更大的进展。

研究计划中的另一部分内容是：尽管目前基于蛋白质所设计出的材料已经可以在宏观水平上模仿肌肉主动收缩的弹性性能，但是蛋白质在分子水平上的力学性能如何转化成材料在宏观水平上的力学性能等科学问题却尚未得到解决。申请人拟利用单分子原子力显微镜力谱等方法来在单分子水平上了解并评价蛋白质的机械性能，并结合宏观水平上材料产生力的速度、响应时间和最大主动力等性能。通过将单分子水平蛋白质表征方法技术引入到设计合成生物材料的研究中，并以此为切入点，确定该材料能否做到分子水平的模仿肌肉，是否是真正意义上的仿肌肉材料。更进一步地，如何使用蛋白质作为功能和结构部件合成智能材料是从单分子水平自下而上的设计合成智能生物材料研究领域需要解决的主要科学技术问题。申请人希望可以获得学会院士专家在相关研究方向的前瞻性、宏观性、战略性的指导和帮助。