

蚕丝蛋白/明胶多孔肝组织支架的 制备及性能研究

郝星¹, 贺健康¹, 高琨², 李涤尘¹, 刘亚雄¹

(1. 西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安;

2. 西安交通大学生命科学与技术学院, 710049, 西安)

摘要: 采用冷冻干燥法制备了蚕丝蛋白/明胶多孔支架,并分别在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻,以观察支架的微孔结构,测量支架的孔隙率、溶胀吸水性及力学性能,研究 HepG2 细胞在支架中的生长增殖情况.结果表明:随预冻温度降低,支架的孔径减小且微孔分布更加均匀,孔隙率及力学性能均得到提高.细胞培养结果显示:随预冻温度降低,支架的细胞贴壁率减小, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架中的细胞数量稳步增加,而 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架中的细胞在培养前期生长良好,在培养后期增殖受到限制.此项研究证明,采用冷冻干燥法可以成功制备蚕丝蛋白/明胶多孔支架,通过改变预冻温度可以控制支架的孔隙结构及性能.

关键词: 蚕丝蛋白/明胶多孔支架;冷冻干燥法;预冻温度;肝组织工程

中图分类号: R318.08;Q813 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2011)11-0121-06

Preparation and Properties of Silk Fibroin/Gelatin Porous Scaffolds for Liver Tissue Engineering

HAO Xing¹, HE Jiankang¹, GAO Kun², LI Dichen¹, LIU Yaxiong¹

(1. State Key Laboratory for Manufacturing Systems Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

2. School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: The silk fibroin/gelatin porous scaffold was prepared by the freeze-drying method. The temperature was set as $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The micro-porous morphology was observed by SEM and the porosities were measured. The swelling performance and mechanical property were also investigated. HepG2 cells were cultured in the two kinds of scaffolds to evaluate their biocompatibility. The results show that with decrease of the freezing temperature, the pore size becomes smaller and the porous morphology gets more homogeneous. Reducing freezing temperature results in higher porosity and much stronger mechanical performance. The cell culture results demonstrate that with the decrease of freezing temperature, fewer cells adhere to the scaffold. Cells in scaffolds with higher freezing temperature proliferate gradually. Cells in scaffolds at lower freezing temperature proliferate very well at first, while the proliferation is limited later. It is concluded that the silk fibroin/gelatin porous scaffold can be successfully prepared by the freeze-drying method, and the porous structure and properties of the scaffold can be controlled by adjusting the freezing temperature.

Keywords: silk fibroin/gelatin porous scaffold; freeze-drying method; freezing temperature; liver tissue engineering

组织工程包括3个主要要素——种子细胞、三维支架和适宜的培养条件,其中三维支架作为细胞贴附生长的构架,在组织工程中发挥着重要的作用。天然可降解生物材料因来源于生物体本身而具有良好的生物相容性,因而近年来成为组织工程支架材料的研究重点^[1-3]。其中,蚕丝蛋白在力学性能、降解性、材料来源等方面具有明显优势,因而在骨组织工程^[4]、角膜组织工程^[5]、软骨组织工程^[6]、韧带组织工程^[7]以及肝组织工程^[2]等领域得到了应用;明胶是胶原的一种部分变性物,具有良好的生物相容性。由此可以预见,蚕丝蛋白/明胶复合材料在组织工程领域具有较大的应用潜力。目前已有一些关于蚕丝蛋白/明胶复合支架材料的研究^[8-9],但是关于其在肝组织工程中的应用则近乎空白。有研究表明,明胶比胶原更有利于肝细胞的贴附^[3]。因此,有必要就蚕丝蛋白/明胶复合支架材料在肝组织工程领域的应用潜力进行探索。

支架的材料构成是决定支架性能的一个重要因素,此外,多孔支架的微观形貌和结构也会对支架的性能及细胞的生长产生很大影响。高孔隙率、高连通度的支架可以在减少支架材料的同时增加支架的细胞贴附面积,更有利于细胞的生长增殖。目前,制备多孔支架的方法主要有盐析法、气体发泡法、冻干法等^[10]。冻干法的基本原理是:首先在低温状态下将溶液冻结为固态,然后在真空条件下使冰晶升华,并用冷凝器捕凝升华的水气,从而得到多孔支架。在冻干法中,无论是致孔剂还是去除致孔剂的过程均清洁无害,这一方法也因此被广泛用于三维多孔支架的制备^[11-13]。从原理可以看出,冻干法中决定支架多孔结构的主要因素是冰晶,而冷冻温度及冷冻速度决定了冰晶的形状及大小^[14-17]。为此,本文探讨了冻干法制备蚕丝蛋白/明胶三维多孔肝组织支架的工艺,并就冻干工艺对支架性能及细胞相容性的影响进行了研究。

1 支架的制备及性能测试方法

1.1 实验材料及设备

实验中使用的主要材料有:生蚕丝(安徽黔县缫丝厂);B型明胶(美国Sigma公司);化学纯试剂,包括 Na_2CO_3 、 CaCl_2 、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 、 CH_3COOH 、戊二醛、甲醇等。

实验中使用的主要设备包括:VFD2000型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);HITA-CHI S-3000N型扫描电子显微镜;CMT6503型万

能试验机(MTS Systems (China) Co., Ltd.)。

1.2 蚕丝蛋白溶液的准备

(1)脱胶:将质量分数为0.5%的 Na_2CO_3 溶液煮沸后,向其中加入75 g生蚕丝,保持微沸状态1 h,取出后用蒸馏水冲洗数次,放入烘箱中过夜烘干得到蚕丝蛋白。

(2)溶解:以 $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 三相溶液(摩尔比为1:2:8)为溶剂,向其中加入蚕丝蛋白,于80℃水浴中放置8 h至蚕丝蛋白完全溶解。

(3)透析:将蚕丝蛋白溶液灌入透析袋(3500D,美国Viskase公司)中,在蒸馏水中透析3 d,得到蚕丝蛋白水溶液,并在50℃水浴中浓缩溶液至质量分数6%。

1.3 支架的制备

称取一定量的明胶粉末溶于蒸馏水中,40℃水浴助溶,配制质量分数为6%的明胶水溶液。将蚕丝蛋白溶液与明胶溶液等质量混合、充分搅拌后,按混合溶液与戊二醛溶液的体积比32:1加入质量分数为0.25%的戊二醛溶液进行交联。将制备好的混合溶液注入硅胶模具,并将模具置于低温下预冻12 h,预冻温度分别选择-20℃和-70℃。目前文献报道中选择的预冻温度常为3个等级:低温(-20℃左右),中低温(-80℃左右),超低温(-196℃)。结合实际实验条件,本文选择-70℃作为中低预冻温度。根据预实验结果,-196℃预冻支架的微孔孔径过小(约5 μm),因此未对其进行进一步研究。预冻结束后,将模具放入冻干机中冻干24 h,将支架脱模后在甲醇中浸泡12 h以对蚕丝蛋白进行交联,然后在真空条件下抽干。2种温度下预冻支架的材料组成相同,蚕丝蛋白、明胶的质量分数均为3%。

1.4 支架性能测试

(1)微观形貌:对支架进行喷金处理后,应用扫描电子显微镜观察支架的微观孔洞结构。

(2)孔隙率:采用乙醇位移法测量支架的孔隙率,方法为先测量支架的干态质量(m_d)和体积(V_d),然后将支架浸入无水乙醇中,抽负压,再取出支架称量质量(m_2)。支架孔隙率的计算公式为 $R_a = (m_2 - m_d)/\rho V_d$,其中 R_a 为支架的孔隙率, $\rho = 0.79 \text{ g/cm}^3$ 为无水乙醇的密度。

(3)吸水率:先测量支架的干态质量(m_d),再将支架浸入蒸馏水中24 h,然后测量支架的湿态质量(m_w),支架的吸水率 $R_w = (m_w - m_d)/m_w$ 。

(4)体积溶胀率:先测量支架的干态体积(V_d),

再将支架浸入蒸馏水中 24 h,然后测量支架的湿态体积(V_w),支架的体积溶胀率 $R_v=(V_w-V_d)/V_d$.

(5)力学性能:使用微机控制的 CMT6503 型万能试验机测试支架的力学性能,测试之前将支架在 PBS 缓冲液中浸泡 12 h,加载速度为 1 mm/min,每种支架测试 3 个样品,绘出应力-应变曲线,得到平均弹性模量和压缩强度.弹性模量定义为应力-应变曲线初始线性部分的斜率,即应变为 5%~30%的部分,压缩强度定义为 30%应变处的应力^[18].

1.5 细胞相容性的测试方法

1.5.1 细胞贴壁率 将经过 Co60 照射灭菌的支架置于 24 孔板中,每孔加入 1 mL DMEM 培养液(含体积分数 10%的胎牛血清和 0.2%的青霉素与链霉素),置于 37 ℃培养箱中孵育 6 h.去除培养液,每孔接种 20 000 个 HepG2 细胞,置于 37 ℃培养箱中孵育贴壁 6 h,并将支架转移至新的培养板中,每孔补加 1 mL 培养液,采用 CCK-8 试剂测量细胞贴壁率.具体操作如下:除了在支架上接种外,还在空的 24 孔板中接种等量的细胞悬液,待贴壁 6 h 后,将支架移入新的培养板,加入等量培养液,每孔加入 100 μ L 的 CCK-8 溶液,振荡 10 min 后置于培养箱中孵育 3 h;从每孔中吸取上清液 100 μ L,转入 96 孔板.在 450 nm 波长下测定吸光度,并计算细胞贴壁率.细胞贴壁率 $S=A_i/A_0$,其中 A_i 为支架中细胞的吸光度, A_0 为空孔中细胞的吸光度.

1.5.2 细胞增殖 每 2 d 更换 1 次培养液,于培养 1、3、5、7 d 后使用 CCK-8 试剂测定细胞增殖.另外,将支架在质量分数为 2.5%的戊二醛溶液中固定 24 h,经体积分数为 30%、50%、70%、90%和 100%的酒精梯度脱水后冻干,表面镀金后,通过扫描电子显微镜观察细胞在支架中的生长状态.

1.6 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析.数据以均值±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为有统计学意义.

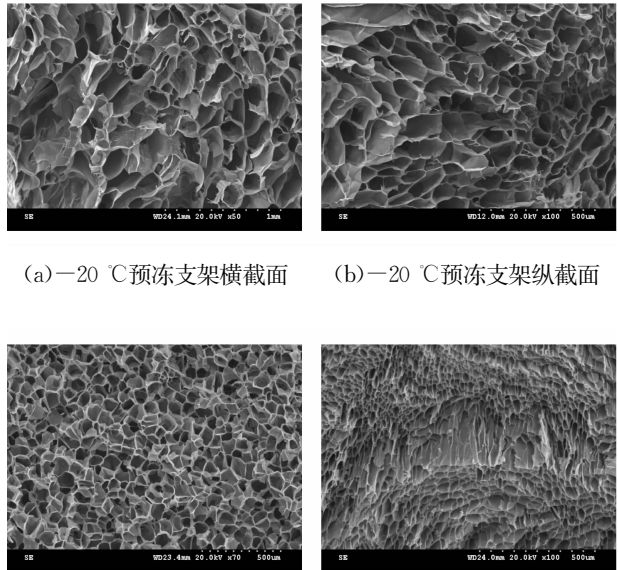
2 支架性能及细胞相容性测试结果

2.1 支架的性能

扫描电镜观察结果如图 1 所示,从中可以看出:−20 ℃预冻支架的微孔孔径较大,为(150.32±25.41) μ m,孔的分布不均匀,微孔的形态为不规则多边形,横截面微孔形貌与纵截面微孔形貌相似;当预冻温度为−70 ℃时,支架的微孔孔径明显变小,为(50.62±10.56) μ m,孔的分布较为均匀,横截面

微孔形貌为多边形,而纵截面微孔形貌为类线形.

−20 ℃和−70 ℃预冻支架的孔隙度分别为(60.18±4.91)%和(72.82±1.92)%,可见随着预冻温度的降低,支架的孔隙率增大($P<0.05$);2 种支架的吸水率分别为(89.41±1.38)%和(89.85±0.77)%,表明预冻温度对支架的吸水性影响不大;2 种支架的体积溶胀率分别为(13.10±0.65)%和(14.54±1.64)%,虽然−70 ℃预冻支架的体积溶胀率较大,但是数值之间并无统计学意义;2 种支架的弹性模量和压缩强度如表 1 所示,可见预冻温度对支架的力学性能有很大影响,预冻温度的降低能够大大提高支架的弹性模量及压缩强度($P<0.01$).



(a)−20 ℃预冻支架横截面 (b)−20 ℃预冻支架纵截面

(c)−70 ℃预冻支架横截面 (d)−70 ℃预冻支架纵截面

图 1 不同预冻温度下蚕丝蛋白/明胶多孔支架的 SEM 微观形貌

表 1 不同预冻温度支架的弹性模量及压缩强度

预冻温度/℃	弹性模量/kPa	压缩强度/kPa
−20	17.00±0.82	5.97±0.09
−70	42.33±2.05	14.43±0.29

2.2 细胞相容性

2.2.1 细胞贴壁率 −20 ℃和−70 ℃预冻支架的细胞贴壁率分别为 85.15%、78.79%,由此可见,在预冻温度降低的同时,支架的细胞贴附能力也有所下降.

2.2.2 细胞增殖 应用 CCK-8 试剂测试的 2 种预冻温度支架上的细胞增殖结果如图 2 所示,可以看

出:培养 1 d 后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 支架上的细胞数量较多 ($P<0.05$), 这是因为支架的细胞贴壁率较高, 故接种后贴附在支架上的细胞较多; 培养 3 d 后, 2 种支架上的细胞数量均明显增加, 相比之下, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 支架上的细胞数量增幅较大 ($P<0.05$), 这主要是由于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架的孔隙率较高, 孔洞的连通性较好, 有利于营养的传输, 因而细胞生长较好; 培养 5 d 后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 支架上的细胞数量小幅上升, 而 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 支架上的细胞数量明显减少 ($P<0.05$), 培养 7 d 后仍是这种情况。

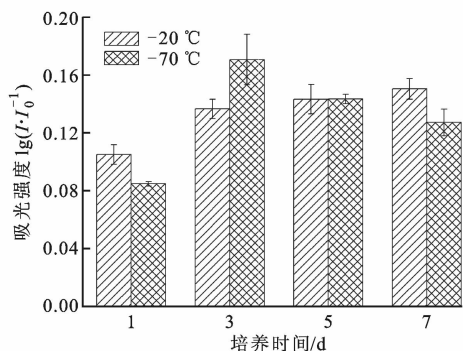
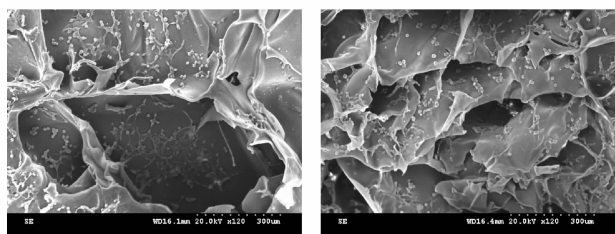


图2 不同预冻温度支架的细胞增殖结果

扫描电镜观察结果也反映出同样的增殖规律: 培养 1 d 后, 2 种支架上的细胞数量均较少, 但是细胞贴附良好 (见图 3); 培养 3 d 后, 支架上的细胞数量明显增加, 且连接成片, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架表面被细胞覆盖 (见图 4); 培养 7 d 后, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架上的细胞数量稍有增加, 而 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 支架上的细胞数量明显减少 (见图 5)。

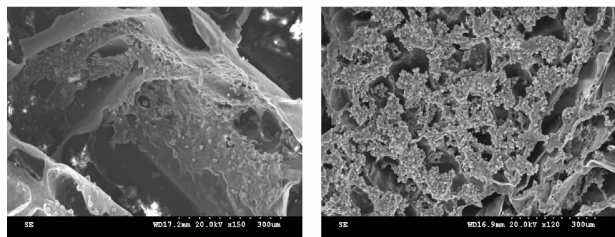


(a) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架 (b) $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架

图3 蚕丝蛋白/明胶支架培养 HepG2 细胞 1 d 后的 SEM 观测结果

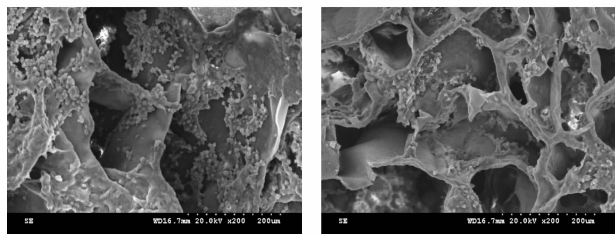
3 分析讨论

冷冻干燥法制备多孔支架的主要原理是使预冻溶液中的冰晶升华, 从而在冰晶位置产生孔洞, 因此多孔支架的微孔特征主要是由冰晶决定的, 而影响冰晶形态的主要因素是预冻温度及速度: 预冻温度越低, 纵向温度梯度就越大, 而晶体容易沿较大温度



(a) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架 (b) $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架

图4 蚕丝蛋白/明胶支架培养 HepG2 细胞 3 d 后的 SEM 观测结果



(a) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架 (b) $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架

图5 蚕丝蛋白/明胶支架培养 HepG2 细胞 7 d 后的 SEM 观测结果

梯度方向生长, 所以支架中的孔隙接近线形; 当预冻温度较高时, 各个方向的温度梯度差异不大, 冰晶向各个方向自由生长, 因而支架中的孔洞多为多边形^[19]. 本文的实验结果也充分验证了这一点: 当预冻温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 支架的横、纵界面微孔形态均为多边形, 而当预冻温度降为 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 支架的横截面微孔为多边形, 而纵截面微孔则接近线形。

Mandal 等^[20]利用冷冻干燥法制备蚕丝蛋白多孔支架, 并通过改变预冻温度来控制支架的微孔特征, 结果发现: 随着预冻温度的降低, 支架的孔隙率升高, 孔径减小, 其中当预冻温度为 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 支架的孔隙率和孔径分别为 74% 和 75~100 μm ; 当预冻温度为 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 支架的孔隙率和孔径分别为 78% 和 50~75 μm . 在本文中, 当预冻温度由 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 降到 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 支架的微孔孔径由 150 μm 降为 50 μm , 孔隙率则由 60.18% 增加到 72.82%, 增加了约 13%. 预冻温度越低, 支架的微孔孔径就越小, 结构就越致密, 因而支架的力学性能也越好. 在 Mandal 等^[20]的研究中, 人纤维原细胞培养结果表明: 2 种支架上的细胞数量均在培养的第 1 周明显减少; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架上的细胞在培养第 2 周的增殖率明显较大, 但是在培养的第 4 周, 细胞数量明显减少, 而 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻支架上的细胞一直平缓增殖. 在本实验中, 细胞增殖也存在着同样的规律: -20

℃预冻支架由于孔隙率较低、孔径较大,细胞数目稳步增加,而-70℃预冻支架由于孔隙率较高、孔洞连通性好,使细胞在培养前期大幅增殖,但由于微孔孔径较小,前期细胞的增殖导致微孔堵塞、孔洞连通性降低,从而限制了细胞的进一步生长。

支架的微孔孔径对细胞的生长也有很大影响。Ranucci 等^[21]曾在 PLA 支架上培养肝细胞,结果发现:随着支架微孔孔径的增大,肝细胞聚集成团块的趋势也在增大。有学者指出,100 μm 的孔径最有利于肝细胞的团聚^[22]。在冷冻干燥法中,预冻温度会影响支架的孔径尺寸,除此之外,支架的材料构成、材料含量等因素也会对支架的孔径产生影响。我们前期的研究发现:当材料总含量一定时,明胶含量越高,支架的孔径就越大;当明胶含量一定时,材料的总含量越低,支架的孔径也越大。对于肝组织工程,100 μm 左右的微孔孔径较为适宜,因此预冻温度不宜过低,但是较低的预冻温度有利于提高支架的孔隙率、微孔连通度以及力学性能,因此,可以通过调节支架的材料构成和材料含量,从而在较低的预冻温度下获得具有适宜微孔孔径的蚕丝蛋白/明胶多孔支架。

参考文献:

- [1] ZAVAN B, BRUN P, VINDIGNI V, et al. Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures; in vitro and in vivo studies [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (34): 7038-7045.
- [2] YOHKO G, SHINGO N, TAKAO H, et al. Preparation of lactose-silk fibroin conjugates and their application as a scaffold for hepatocyte attachment [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (6): 1131-1140.
- [3] LI Keguo, QU Xinjian, WANG Yun, et al. Improved performance of primary rat hepatocytes on blended natural polymers [J]. *Journal of Biomedical Materials Research; Part A*, 2005, 75A (2): 268-274.
- [4] VASSILIS K, LORENZ M, SANDRA H, et al. Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells [J]. *Journal of Biomedical Materials Research; Part A*, 2004, 71A (3): 528-537.
- [5] LAWRENCE B D, MARCHANT J K, PINDRUS M A, et al. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2009, 30 (7): 1299-1308.
- [6] YAMAMOTO K, TOMITA N, FUKUDA Y, et al. Time-dependent changes in adhesive force between chondrocytes and silk fibroin substrate [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (10): 1838-1846.
- [7] LIU Haifeng, FAN Hongbin, WANG Yue, et al. The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2008, 29 (6): 662-674.
- [8] LU Qiang, ZHANG Xiaohui, HU Xiao, et al. Green process to prepare silk fibroin/gelatin biomaterial scaffolds [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2010, 10 (3): 289-298.
- [9] TIYABOONCHAI W, CHOMCHALAO P, PONGCHAROEN S, et al. Preparation and characterization of blended *Bombyx mori* silk fibroin scaffolds [J]. *Fibers and Polymers*, 2011, 12 (3): 324-333.
- [10] NAZAROV R, JIN H J, KAPLAN D L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5 (3): 718-726.
- [11] MANDAL B B, KUNDU S C. Non-bioengineered silk fibroin protein 3D scaffolds for potential biotechnological and tissue engineering applications [J]. *Macromolecules Bioscience*, 2008, 8 (9): 807-818.
- [12] REN Lei, TSURU K, HAYAKAWA S, et al. Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2002, 23 (24): 4765-4773.
- [13] FUKASAWA T, DENG Z Y, ANDO M, et al. Pore structure of porous ceramics synthesized from water-based slurry by freeze-dry process [J]. *Journal of Materials Science*, 2001, 36 (10): 2523-2527.
- [14] DEVILLE S, SAIZ E, NALLA R K, et al. Freezing as a path to build complex composites [J]. *Science*, 2006, 311 (5760): 515-518.
- [15] DEVILLE S, SAIZ E, TOMSIA A P. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2006, 27 (32): 5480-5489.
- [16] ZHANG H, COOPER A I. Aligned porous structures by directional freezing [J]. *Advanced Materials*, 2007, 19 (11): 1529-1533.
- [17] MUKAI S R, NISHIHARA H, TAMON H. Morphology maps of ice-templated silica gels derived from silica hydrogels and hydrosols [J]. *Microporous Mesoporous Materials*, 2008, 116 (1/2/3): 166-170.
- [18] YUNOKI S, IKOMA T, MONKAWA A, et al. Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth [J]. *Materials Letters*, 2006, 60 (8): 999-1002.
- [19] 张洁,徐烈. 冻干支架孔隙形态的影响因素[J]. 低温

工程, 2002(2): 38-43.

ZHANG Jie, XV Lie. Analysis of the influence factors on the scaffold porous configuration based on freeze drying method [J]. Cryogenic Engineering, 2002(2): 38-43.

[20] MANDAL B B, KUNDU S C. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds [J]. Biomaterials, 2009, 30 (15): 2956-2965.

[21] RANUCCI C, KUMAR A, BATRA S, et al. Control

of hepatocyte function on collagen foams: sizing matrix pores toward selective induction of 2-D and 3-D cellular morphogenesis [J]. Biomaterials, 2000, 21(8): 783-793.

[22] RANUCCI C, MOGHE P. Polymer substrate topography actively regulates the multicellular organization and liver-specific functions of cultured hepatocytes [J]. Tissue Engineering, 1999, 5 (5): 407-419.

(编辑 葛赵青)