



SF/GO 纳米纤维复合支架的制备及体外生物活性

郑洁^a, 刘涛^{a,b}, 丁新波^a, 王吉楠^a, 王寅^a

(浙江理工大学, a. 纺织科学与工程学院(国际丝绸学院); b. 科技与艺术学院, 杭州 310018)

摘要: 为了获得良好生物相容性和导电性能的复合支架, 以丝素蛋白(SF)为基材, 自制氧化石墨烯(GO)为添加剂, 利用静电纺丝技术制备 SF/GO 纳米纤维复合支架; 采用扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、数字万用表对复合支架的微观形貌、分子结构、导电性能以及体外生物活性进行了表征, 结果表明: 当 GO 与 SF 质量比为 1.5/100 时, 纳米纤维复合支架材料的导电性最佳达到 1.3 kΩ; 模拟体液处理后, 样品表面沉积呈现出球状羟基磷灰石, 体现出良好的生物相容性。

关键词: 复合支架; 丝素蛋白; 氧化石墨烯; 静电纺丝; 体外生物活性

中图分类号: TS195.644

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2022) 03-0147-06

Preparation and in vitro biological activity of SF/GO nanofiber composite scaffold

ZHENG Jie^a, LIU Tao^{a,b}, DING Xinbo^a, WANG Jinan^a, WANG Yin^a

(a. College of Textile Science and Engineering (International Institute of Silk);

b. Keyi College, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In order to obtain a composite scaffold with good biocompatibility and electrical conductivity, by taking silk fibroin (SF) as the substrate and self-made graphene oxide (GO) as the additive, the author prepared a SF/GO nanofiber composite scaffold by using electrospinning technology. The microscopic morphology, molecular structure, electrical conductivity and in vitro biological activity of this composite scaffold were characterized by scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and digital multimeter. The results showed that when the mass ratio of GO to SF was 1.5/100, the electrical conductivity of the nanofiber composite scaffold was the best and reached 1.3 kΩ. After being treated by simulated body fluid, spherical hydroxyapatite was deposited on the surface of sample, which showed good biocompatibility.

Key words: composite scaffold; silk fibroin; graphene oxide; electrospinning; in vitro biological activity

0 引言

变形或受损的组织 and 器官可以通过组织工程的方式来修复, 随着医学技术水平不断地发展, 安全且“智能”的修复组织支架材料成为了研究热点^[1-2]。目前, 常规静电纺丝制备的丝素蛋白纤维支架具备

良好的生物相容性, 但不导电、不具有信号传导的能力, 无法有效的调控细胞分化和组织再生^[3-4]。

桑蚕丝是天然的聚合物, 由丝素蛋白(SF)和丝胶蛋白组成, 其中丝素蛋白已被制成各种材料, 如凝胶、纤维、粉末、海绵和膜等^[5-6]。由于丝素蛋白具有良好的生物相容性和降解性, 并能模拟细胞外基质,

在支架制备中受到广泛的关注^[7-8]。单一材料的丝素蛋白支架韧性较差,应用受到一定的限制,是目前研究需要突破的关键问题之一。共混纳米粒子是目前比较常见的改善高聚物性能不足的方式^[9-10],如:Cai 等^[11]制备了丝素蛋白/壳聚糖复合支架,提高了支架材料的机械性能;Guang 等^[12]利用氢键技术在纯丝素支架上涂层壳聚糖,制备了皮肤修复材料;Shi 等^[13]利用丝素和明胶混溶液,通过 3D 打印制备出良好降解性能和机械性能的复合支架。

氧化石墨烯(GO)是石墨烯的衍生物之一,表面有丰富的活性基团和出色的物理化学性能,如高力学性能、高热稳定性和大比表面积,在水中具有良好的分散性,常被作为改进聚合物性能的功能添加剂之一^[14]。本文为改善纯丝素支架机械性能将 GO 掺入 SF,利用浸渍还原法将纳米纤维复合支架表面的 GO 还原制备 SF/GO 纳米纤维复合支架,并对 SF/GO 复合支架的微观形貌、分子结构、导电性能及体外生物活性进行分析。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

桑蚕茧(桐乡市蚕茧经营有限责任公司);无水乙醇(分析纯,杭州双林化工试剂有限公司);无水氯化钙(CaCl_2)和截留分子量 8000~14000 透析袋(上海麦克林生化科技有限公司);浓硫酸、浓磷酸、高锰酸钾和过氧化氢均购于杭州市米克化工有限公司;去离子水实验室自制。

冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(杭州惠创仪器设备有限公司);HH-4 型数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司);TGL-16G 型台式高速离心机(湖南兴科科学仪器有限公司);FE20 型 pH 计(上海梅特勒-托利多仪器公司);Nicolet5700 型傅里叶红外光谱仪(FTIR,美国 ThermoElectron 公司);Ultra55 型场发射扫描电子显微镜(FESEM,德国 CarlZeiss 公司);Pyris-1 热重分析仪(TG,美国 Pyekin-Elmer 公司)和 34461 A 数字万用表(美国 Keysight 公司)

1.2 丝素蛋白的制备

将桑蚕茧剥开,去除蚕蛹,在质量分数 0.5%的 Na_2CO_3 中煮沸 1 h,重复两到三次,脱胶完成后用去离子水清洗干净,以除去丝胶蛋白和杂质。然后将得到的脱胶丝溶解在 75 °C 的 $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 物质的量 1:8:2 的三元溶剂中 3 h,待冷却后,将过滤后的丝素蛋白溶液转移至分子截留量为

8000~14000 的透析袋中透析 72 h,每天更换去离子水。最后,将溶液以 3000 r/min 在离心机中离心 20 min,共两次,在冷冻干燥机中干燥备用。

1.3 氧化石墨烯的制备

氧化石墨烯(GO)采用的改进的方法制备,具体参考文献[15]。具体操作步骤如下:在 200 mL 烧杯中配置浓硫酸和浓磷酸的混合酸溶液(质量比 9:1),称 0.38 g 石墨粉置于干净的 200 mL 烧杯中;将上述混合酸溶液慢慢倒入盛有石墨粉的烧杯中,混合均匀后置于预先加热到 50 °C 的磁力搅拌水浴锅中,将 2.25 g 高锰酸钾少量多次的加入上述反应体系当中,增加磁力搅拌速率,水浴温度控制在 (50 ± 1) °C,保持反应 6 h;加入双氧水,直至溶液由黑色变为亮黄色,无气泡产生;反应体系加热搅拌 3 h,冷却备用。

1.4 SF/GO 纳米纤维复合支架的制备

称量 1.00 g 冷冻干燥后的 SF 溶于 9.00 g 甲酸溶液,配置成质量分数 10%的 SF,按照 GO 与 SF 质量比 0.5/100、1.0/100、1.5/100 进行混合。根据 GO 与 SF 的质量比,将得到的纺丝液命名为 SF/GO-0.5%、SF/GO-1.0%、SF/GO-1.5%;将纺丝液置于 10 mL 的注射器当中,在相对湿度 35%±5%,温度 20 °C ±5 °C,电压为 20 kV,喷丝头尖端距接收器距离为 13 cm,注射泵的流速在 1.5 mL/h,连续纺丝 8 h,将其从铝箔上剥落,置于干燥箱中干燥,保存。

1.5 测试与表征

1.5.1 形貌与结构分析

采用场发射扫描电子显微镜对 SF/GO 复合支架的表面形貌进行观察。测试时,工作电压为 3 kV。

1.5.2 化学结构分析(FTIR)

通过傅里叶红外光谱仪对纯 SF 支架和 SF/GO 复合支架的化学结构进行分析。测试时,采用 ATR 方法,其中波数范围为 4000~500 cm^{-1} 。

1.5.3 电化学性能分析

将纺丝膜浸渍 GO 后经过 5 g/L 的保险粉 95 °C 还原处理,水洗后烘干,用双探针数字万用表测试不同 GO 含量复合支架表面的电阻。试样测量间距 1 cm,测试 15 次取其平均值,并求标准偏差。

1.5.4 体外活性研究

制备好的纤维复合支架材料可以利用生物体液浸泡法来分析体外活性。将纤维复合支架材料浸泡在制备好的体积分数 75%的乙醇水溶液中 30 min,取出用去离子水清洗干净;再将样品置于利用 Kokubo 法^[16]制备的 SBF 溶液中,在恒温 37 °C 的条件下培养 7 d,期间每隔 24 h 更换一次溶液。培

养结束后将样品从 SBF 溶液中取出,并用去离子水洗净后干燥。

1.5.5 体外生物降解性能

将样品浸泡在 PBS 溶液或 1 U/mL 蛋白酶的 PBS 溶液中,在恒温 37 ℃ 的条件下反应并在 1、3、7、14 d 和 21 d 时取出样品用去离子水洗涤后干燥,并记录样品干燥后重量。

2 结果与讨论

2.1 微观结构分析

图 1 所示为 SF、SF/GO-0.5%、SF/GO-1.0%、SF/GO-1.5% 的微观形貌照片。由图 1 可知,复合支架的表面呈现出较为光滑的微观形貌,无明显的团聚现象;静电纺丝溶液电导率的改善和静电纺丝液黏度的增加,静电力对纤维的拉伸作用力增大,纤维直径减小;制备的 SF、SF/GO-0.5%、SF/GO-1.0%、SF/GO-1.5% 纤维的平均直径为 379、173、178 nm 和 138 nm,随着 GO 含量的增加纤维直径分布变窄。

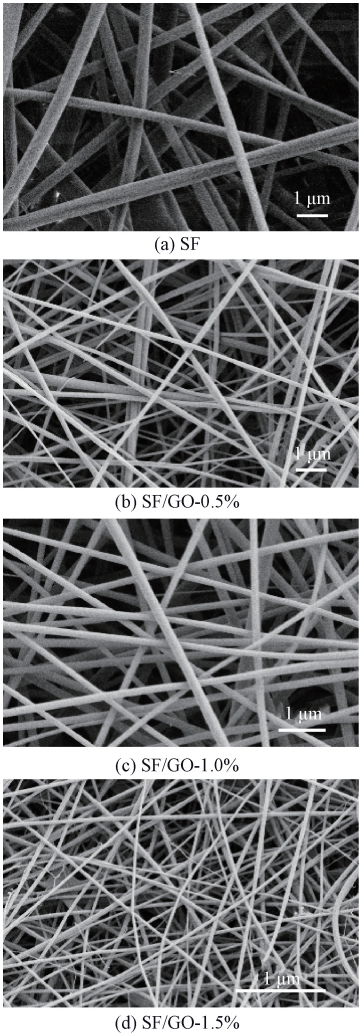


图 1 丝素/氧化石墨烯复合支架的扫描电镜图

2.2 FTIR 分析

不同氧化石墨烯含量的 FTIR 结果如图 2 所示。由图 2 可知,纯 GO 薄膜在 3730 cm^{-1} 区域出现一个吸收峰是由于羟基的拉伸振动产生的,在 1650 cm^{-1} 和 1540 cm^{-1} 处的两个尖锐的吸收峰与羧基 C=O 拉伸振动峰和未被氧化的杂化峰有关^[17];与纯 GO 相比,SF/GO 复合支架材料中拉伸振动产生的峰从 3722 cm^{-1} 偏移到 3730 cm^{-1} ;纯 SF 薄膜在 1650、1540 cm^{-1} 和 1248 cm^{-1} 分别出现酰胺 I,酰胺 II 和酰胺 III 的吸收峰,在 1700 cm^{-1} 出现 β 转角特征峰^[18],随着 SF/GO 复合支架中 GO 含量的增加,1650 cm^{-1} 的峰宽在变大,表明随着 GO 含量的增加,导致了纤维中 β 折叠含量的减小。

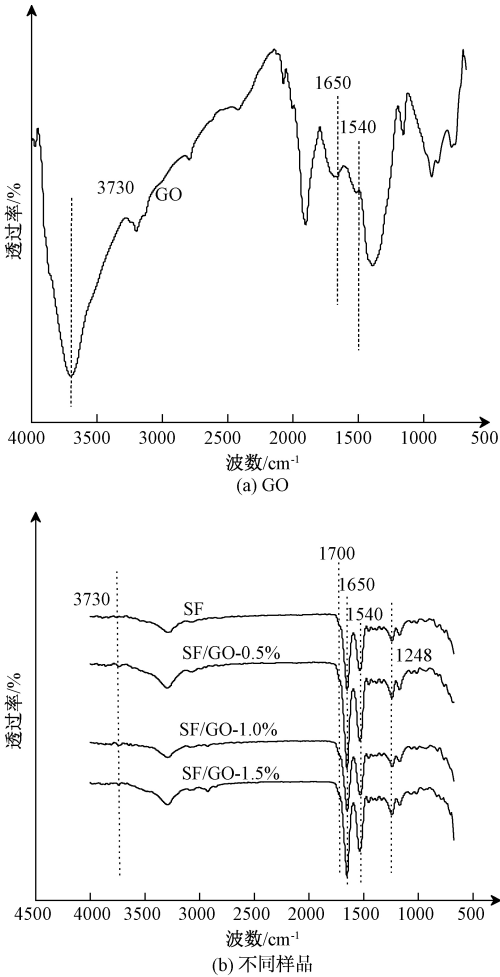


图 2 不同氧化石墨烯含量的 FTIR 图

2.3 电化学性能分析

通过浸渍还原法将 GO 上的 $\pi\pi$ 共轭双键部分恢复可改善 GO 本身导电性较差的问题^[19-20]。采用四探针测试仪对复合支架的电学性能进行测试,结果如图 3 所示。图 3 表明,随着 GO 含量的提高,浸渍还原纳米纤维支架表面的电阻逐渐降低,当 SF/GO

质量比为 1.5/100 时,电阻减小到 1.3 kΩ,说明在复合支架表面已经形成有效的导电网络。

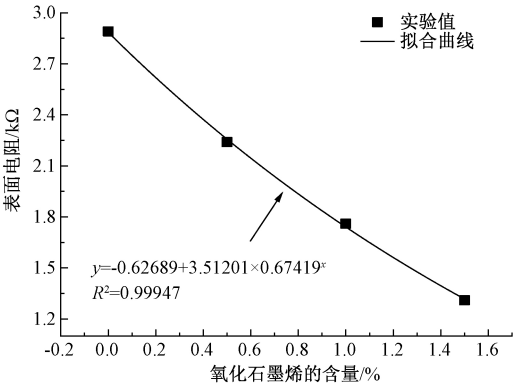


图3 丝素/氧化石墨烯纳米纤维复合支架的表面电阻随氧化石墨烯含量变化的曲线

2.4 体外生物活性

2.4.1 丝素/氧化石墨烯复合支架体外活性的电镜表征

体外羟基磷灰石的活性与试样材料表面结构性质有关,如比表面积和孔结构^[21],图4为SF/GO复合支架浸泡模拟体液之后的体外生物活性结果。浸泡于SBF中的纤维表面有大量“球状”的HA晶体生成,氧化石墨烯的加入,使得复合支架材料出现不同微纳级别的形貌,引起比表面积减小,GO含量为1.5%时羟基磷灰石的形成活性却低于GO含量为1.0%(见图4),表明SF/GO复合支架材料具有较高的生物活性。

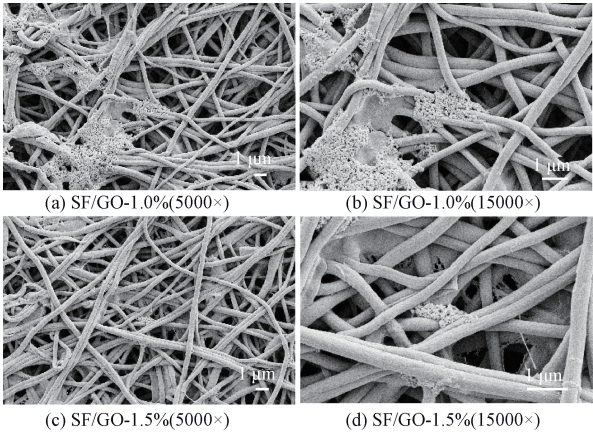


图4 浸泡模拟体液后不同配比的丝素/氧化石墨烯复合支架的FESEM照片

2.4.2 丝素/氧化石墨烯复合支架体外活性的EDS分析

为进一步确定SF/GO复合支架表面的结构,对其表面颗粒层进行元素分析,结果如图5所示。由图5可知,浸泡模拟体液后的丝素/GO表面颗粒层主要由钙、磷原子组成,具有P元素(2.08 keV)和Ca元素

(3.71 keV)明显的特征峰,表明浸泡模拟体液后的复合支架表面生成羟基磷灰石;进一步增加GO的含量,复合支架仍然表现出良好的生物相容性。

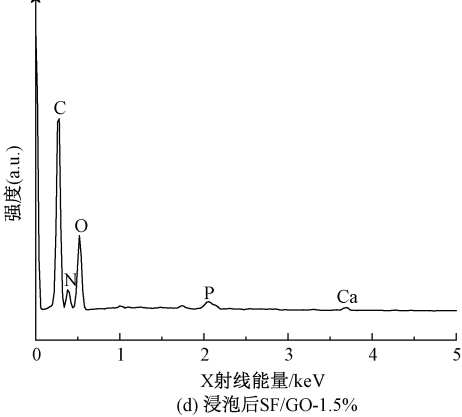
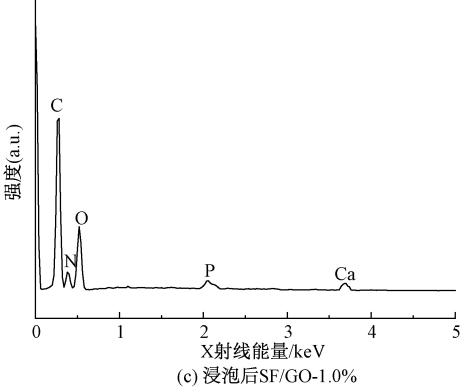
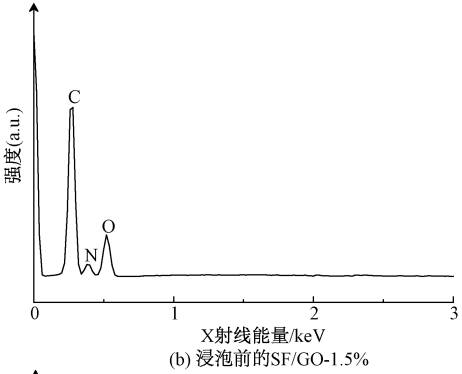
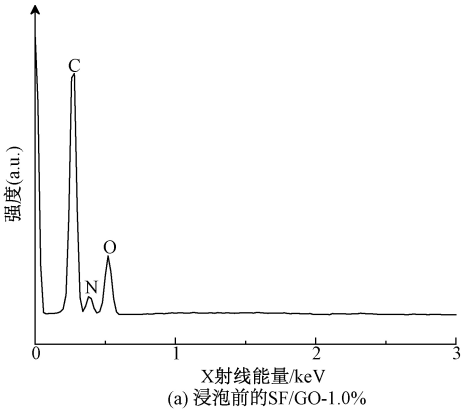


图5 未浸泡和浸泡模拟体液后的不同质量比的丝素/氧化石墨烯复合支架EDS图

2.5 SF/GO 纳米复合支架的生物降解性能

可降解性能是 SF 基生物材料的重要评价方法^[22]。图 6 为 SF 和不同质量比的 SF/GO 复合支架在酶降解和 PBS 降解中的失重率。从图 6 中可以看出,SF 和不同质量比的 SF/GO 复合支架在蛋白酶溶液中的失重率大于在 PBS 溶液中的失重率,且随着时间增加,其失重率也增加;在蛋白酶溶液中降解 21 d,复合支架的降解速率明显大于纯 SF 支架,且 GO 含量为 1.5%时,失重率达到了 43%。

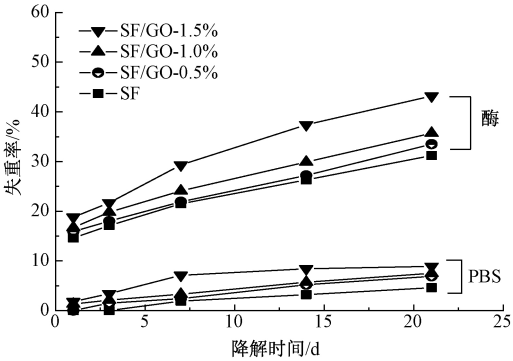


图 6 SF 和不同质量比的丝素/氧化石墨烯复合支架在酶降解和 PBS 降解中的失重率

通过扫描电镜观察到浸泡在酶溶液中的样品形貌变化,结果如图 7 所示。图 7 显示,样品表面出现了小孔和裂缝,其中 SF/GO-1.5%降解的程度最严重,纤维之间碎裂明显,14 d 开始瓶中降解的小碎片增多;而浸泡于 PBS 溶液中的试样形貌变化不明显,纤维表面仅出现细微的粗糙。

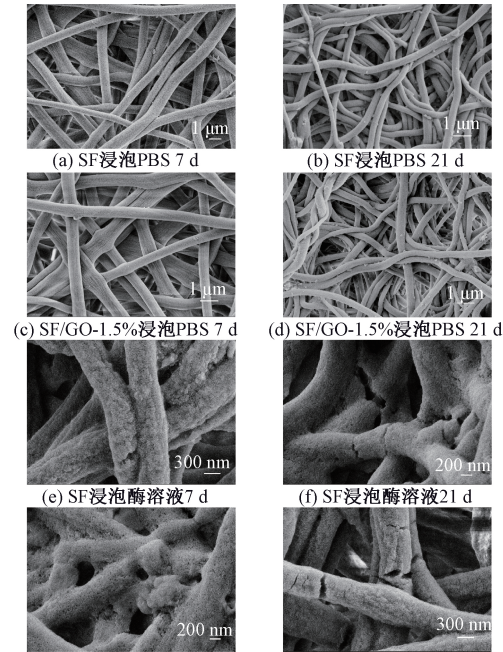


图 7 SF 和 SF/GO-1.5% 复合支架在酶降解和 PBS 降解中的形貌变化

3 结 论

本文利用静电纺丝技术制备了 SF/GO 纳米纤维复合支架,并分析了不同 GO 含量对 SF/GO 纳米纤维复合支架结构、形貌、电化学性能和体外生物活性的影响,主要结论如下:

- a) SF/GO 纤维表面较为光滑,随着 GO 含量的增加,纤维直径先增大后减小,加入的 GO 与 SF 质量比超过 1.5:100 容易发生团聚现象,影响电纺丝纤维的性能。
- b) 经过保险粉还原后,使得 SF/GO 纳米复合纤维支架具有导电性能,并且在 GO 与 SF 质量比为 1.5:100 时,电阻最小,达到 1.3 kΩ。
- c) 丝素/氧化石墨烯复合支架材料在 SBF 中具有诱导羟基磷灰石的能力,浸泡模拟体液之后有明显的颗粒物沉积,具有良好的生物相容性。
- d) 体外降解实验表明试样在 PBS 和酶溶液中的降解能力不同,在酶溶液中的降解能力远大于 PBS 溶解,并且试样中 GO 与 SF 质量比为 1.5:100 时,降解能力最好。

参考文献:

[1] 李勣, 郭保林. 导电高分子生物材料在组织工程中的应用[J]. 科学通报, 2019, 64(23): 2410-2424.

[2] Rajesh, Ahuja T, Kumar D. Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 136(1): 275-286.

[3] 熊莹, 许燕, 周建平, 等. 组织工程研究中的电话性生物材料[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(34): 5523-5530.

[4] Xu J, Wang D X, Yuan Y, et al. Polypyrrole/reduced graphene oxide coated fabric electrodes for supercapacitor application [J]. Organic Electronics, 2015, 24(5): 153-159.

[5] Gui-Bo Y, You-Zhu Z, Shu-Dong W, et al. Study of the electrospun PLA/silk fibroin-gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010, 93(1): 158-163.

[6] Wang S D, Zhang K Q. Electrogelation and rapid prototyping of *Bombyx mori* silk fibroin[J]. Materials Letters, 2016, 169(15): 5-9.

[7] Jalali Monfared M, Nasirinezhad F, Ebrahimi-Barough S, et al. Transplantation of miR-219 overexpressed human endometrial stem cells encapsulated in fibrin

- hydrogel in spinal cord injury[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(10): 18887-18896.
- [8] Farokhi M, Mottaghitlab F, Samani S, et al. Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1): 68-91.
- [9] 张超. 丝素蛋白/石墨烯仿生复合材料的结构设计 with 性能[D]. 上海: 东华大学, 2018: 24-85.
- [10] 赵静, 张红. 氧化石墨烯的可控还原及表征[J]. *化工进展*, 2015, 34(9): 3383-3387.
- [11] Cai Z X, Mo X M, Zhang K H, et al. Fabrication of chitosan/silk fibroin composite nanofibers for wound-dressing applications [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(9): 3529-3539.
- [12] Guang S Y, An Y, Ke F Y, et al. Chitosan/silk fibroin composite scaffolds for wound dressing[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132(35): 42503.
- [13] Shi W L, Sun M Y, Hu X Q, et al. Structurally and functionally optimized silk-fibroin-gelatin scaffold using 3D printing to repair cartilage injury in vitro and in vivo [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(29): 1-7.
- [14] Allen M J, Tung V C, Kaner R B. Honeycomb carbon: A review of graphene[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(1): 132-145.
- [15] Marcano D C, Kosynkin D V, Berlin J M, et al. Improved synthesis of graphene oxide[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4806-4814.
- [16] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(15): 2907-2915.
- [17] Emiru T F, Ayele D W. Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production [J]. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2017, 4(1): 74-79.
- [18] Verma S, Dutta R K. A facile method of synthesizing ammonia modified graphene oxide for efficient removal of uranyl ions from aqueous medium [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(94): 77192-77203.
- [19] Yang Y, Ding X L, Zou T Q, et al. Preparation and characterization of electrospun graphene/silk fibroin conductive fibrous scaffolds[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(13): 7954-7963.
- [20] Vepari C, Kaplan D L. Silk as a biomaterial[J]. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32(8/9): 991-1007.
- [21] Graziani F, Ivanovski S, Cei S, et al. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts [J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2006, 17(2): 212-219.
- [22] 林开利, 常江, 卢建熙, 等. β -磷酸三钙/硅酸钙复合生物陶瓷的制备及性能研究[J]. *无机材料学报*, 2006, 21(6): 1429-1434.

(责任编辑: 廖乾生)