

再生丝素/明胶-聚己内酯皮芯结构纳米纤维膜的制备及生物性能研究

刘欣^a, 熊杰^b

(浙江理工大学, a. 材料与纺织学院; b. 先进纺织材料与制备技术教育部重点实验室, 杭州 310018)

摘要: 利用同轴静电纺丝技术,制备以丝素(SF)/明胶(GE)共混物为皮层,聚己内酯(PCL)为芯层的复合纳米纤维膜。研究不同芯层浓度对复合纳米纤维膜形貌、孔径、力学性能和生物相容性的影响。结果表明:所制备的SF/GE-PCL复合纳米纤维表面光滑且有明显的皮芯结构,随着芯层浓度由4%增大到10%,复合纳米纤维的平均直径从256 nm增大到941 nm,纤维膜的平均孔径从0.576 μm 增大到1.018 μm ,纤维膜的断裂强度和断裂应变增大,人皮肤成纤维细胞能在皮芯结构纳米纤维膜上黏附、生长和增殖。

关键词: 丝素; 明胶; 聚己内酯; 同轴静电纺丝; 皮芯结构; 生物相容性

中图分类号: TS102.1 **文献标志码:** A

0 引言

丝素(SF)是一种天然蛋白质,具有良好的生物相容性,来源广泛,价格低廉,广泛应用于组织工程支架领域^[1-2];明胶(GE)是胶原的水解产物,可以从动物组织如皮肤、软骨和骨等组织中获得,具有良好的生物相容性和生物可降解性,也是一种优异的生物材料。丝素、明胶共混所得的纳米纤维膜具有较好的生物相容性,可用于细胞的体外培养及创面的修复,具有很高的医用价值^[3]。聚己内酯(PCL)是一种合成的生物材料,其力学性能好,但细胞的亲和性较差。Zhang等^[4]研究发现向PCL中加入GE后,一定程度上提高了细胞在PCL膜上的黏附增殖能力。采用共混静电纺丝的方法,可以集合各组分材料的优势,但是共混组分中的合成材料不利于细胞的黏附和增殖,而同轴静电纺丝方法可以有效地解决这一问题。因为同轴静电纺丝可以制备天然-合成皮芯结构的纳米纤维,天然材料作为皮层直接与细胞接触,有利于细胞的识别和生长,合成材料

作为芯层能起到更好的支撑作用。

本文采用同轴静电纺丝方法,制备SF/GE-PCL皮芯结构复合纳米纤维膜,探讨了不同芯层浓度对复合纳米纤维膜形貌、孔径、力学性能和生物相容性的影响。

1 实验部分

1.1 原材料和仪器

材料:再生丝素蛋白(SF,实验室自制);明胶(GE,胶强度250 g,阿拉丁试剂有限公司);聚己内酯(PCL,数均相对分子质量为8 000,深圳市光华伟业实业有限公司);六氟异丙醇(HFIP,盐城冬阳生物制品有限公司);高糖培养基(杭州四季青生物工程材料有限公司);人皮肤正常成纤维细胞株(百奥迈科生物技术有限公司);青霉素钠100 U/mL(杭州四季青生物工程材料有限公司);硫酸链霉素(杭州四季青生物工程材料有限公司)。仪器:DXT-800酶标仪(美国BECKMAN公司);FC60P2高压电源(0~60 kV,美国Glassman公司);KDS220型微量注射泵(美国KDS Scientific Inc);FreeZone® 2.5 Liter Freeze

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(11272289);浙江省重点科技创新团队计划资助(2011R50003)

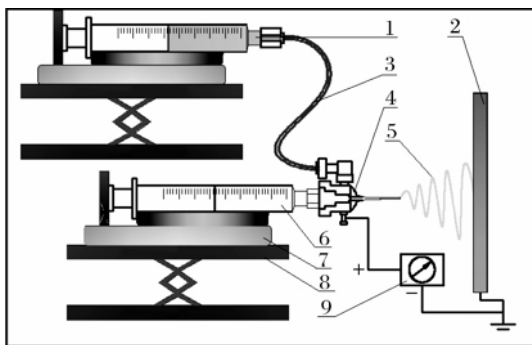
作者简介: 刘欣(1988-),女,河南泌阳人,硕士研究生。主要从事新纤维材料及功能性纤维材料的研究。

通信作者: 熊杰, E-mail: jxiong@zstu.edu.cn

Dry Systems 冷冻干燥机(LABCONCO 公司)。

1.2 纳米纤维膜的制备

称取质量比 3:1 的 SF 和 GE 溶于 HFIP 中配成质量分数为 4% 的 SF/GE 混合溶液, 常温磁力搅拌 12 h, 用作皮层纺丝液; 称取一定量的 PCL 溶于 HFIP 中配成质量分数分别为 4%, 6%, 8% 和 10% 的 PCL 溶液, 用作芯层纺丝液; 然后利用实验室自制的同轴静电纺丝装置(如图 1 所示), 在纺丝电压 15 kV, 纺丝距离 13 cm, 皮层流率 0.6 mL/h, 芯层流率 0.3 mL/h 的条件下制备不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜(文中皮芯纳米纤维膜采用以下标记 SF/GE-PCL(4%/4%、4%/6%、4%/8%、4%/10%))。



1. 皮层纺丝液, 2. 接收板, 3. 软管, 4. 同轴针头, 5. 纤维,
6. 芯层纺丝液, 7. 注射泵, 8. 升降台, 9. 高压电源

图1 同轴静电纺丝装置示意

1.3 纤维形貌观察及直径计算

利用日立 S4800 场发射扫描电镜(FE-SEM)对样品的形貌进行分析, 并用 Image-Pro® Plus 软件测量纤维的直径(50 根纤维), 计算纤维直径及其分布; 采用 JEM-2100 透射电镜观察纤维的皮芯结构。

1.4 纤维膜的孔径分析

将纤维膜裁成直径为 2 cm 的圆片, 采用南京高谦功能材料科技有限公司的 PSDA-20 孔径分析仪分析纤维膜的孔径。孔径计算公式: $d = 4 \times \gamma \times \cos\theta / \Delta P$, 其中 d 为孔道直径, m; γ 为润湿液表面张力, 10^{-3} N/m; θ 为润湿液与待测材料间的接触角, ΔP 为待测样品两侧气体压差, Pa。

1.5 纤维膜的力学性能表征

将纤维膜裁成 50 mm × 5 mm 的长方形样条, 采用 KES-G1 型多功能拉伸仪测试样品的力学性能。在恒温恒湿条件下进行拉伸, 夹持长度为 40 mm, 拉伸速率为 0.2 mm/s, 每组试样测试 5 次。

1.6 细胞相容性实验

将试样固定在 96 孔板内, 经 75% 的酒精浸泡

消毒 24h 后, 再经紫外灯照射灭菌后, 将处于对数期生长的人皮肤成纤维细胞(HSF), 用 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 制成单细胞悬液, 以 1×10^5 个细胞/孔接种到纤维膜上, 以细胞直接接种到孔板(TCP)上为对照组, 加入含 10% 牛血清和 1% 双抗的培养基 2 mL, 置于 37℃, 5% CO₂ 的恒温培养箱内, 每隔 2 d 换 1 次培养基。分别于 1、4、7 d 取样进行 MTT 检测, 用酶标仪在 570 nm 波长下测 OD 值。细胞培养至 7 d 时, 取芯层浓度为 6% 的纤维支架, 用 PBS 洗掉未黏附的细胞, 并用浓度为 2.5% 的戊二醛固定 2 h, 经一系列梯度(15%~100%)酒精脱水, 室温干燥, 表面喷金处理后, 用 SEM 观察 HSF 细胞在纤维膜上的形态。

2 结果与讨论

2.1 不同芯层浓度对 SF/GE-PCL 皮芯结构纳米纤维形貌和直径的影响

图 2 给出了不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构纳米纤维的 SEM 图。从图 2 可以看出, 通过选择合适的静电纺丝条件可以得到光滑均匀的纤维。采用 Image-Pro® Plus 软件分析纤维的直径, 其结果如表 1 所示。表 1 可见, 随着芯层浓度的增大, 纤维的平均直径从 (256 ± 90) nm 增大到 (941 ± 87) nm, 这主要是因为随着芯层 PCL 浓度的增大, 纺丝液的黏度也随之增大, 分子链之间相互穿插交叠, 相互之间的缠结作用较强, 缠结的分子链在射流过程中需要更大的电场力来克服分子间的作用力^[5], 因此随着芯层 PCL 浓度增大, 纳米纤维的平均直径也随之增大。

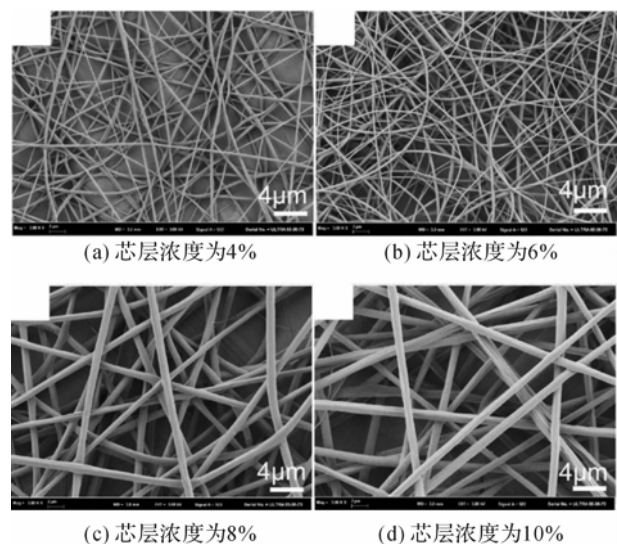


图2 同轴静电纺 SF/GE-PCL 皮芯结构纳米纤维膜的 SEM 图

表 1 不同芯层浓度下纤维直径分布

芯层浓度/%	平均直径/nm	标准方差/nm
4	256	90
6	286	97
8	863	107
10	941	87

2.2 不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维的透射电镜表征

图 3 为不同芯层浓度的皮芯结构复合纳米纤维的透射电镜照片。从图 3 中可以看出,纤维有明显的皮芯界线,且随着芯层浓度的增加,纤维的芯层直径也明显增大。

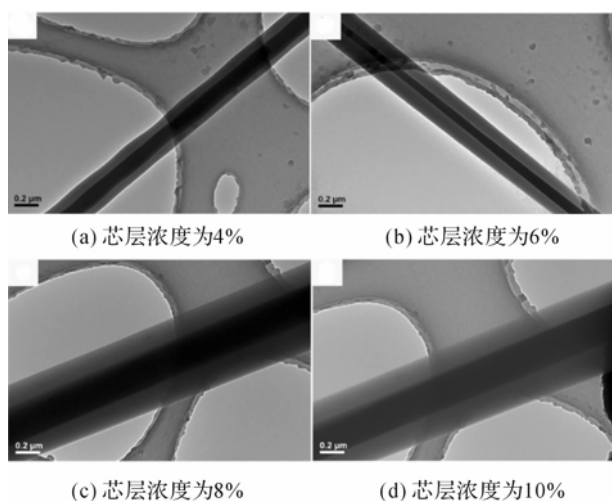


图 3 同轴静电纺 SF/GE-PCL 皮芯结构纳米纤维的 TEM 图

2.3 不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的孔径分析

图 4 是不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的孔径分布图;表 2 是不同芯层浓度下复合纳米纤维膜的平均孔径及最大孔径值。从图 4 可以看出,复合纳米纤维膜的孔径分布比较集中,说明膜的均匀性比较好;从表 2 中可以看出,随着芯层浓度由 4% 提高到 10%,SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的孔径从 0.576 μm 增大到 1.018 μm 。这主要是因为随着芯层 PCL 浓度的增大,复合纳米纤维的平均直径也增大,纤维的堆积相对比较松散,因此形成的孔径增大^[7]。

表 2 不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的最大孔径及平均孔径

芯层浓度	4%	6%	8%	10%
最大孔径/ μm	0.729	0.946	1.085	1.102
平均孔径/ μm	0.576	0.887	0.889	1.018

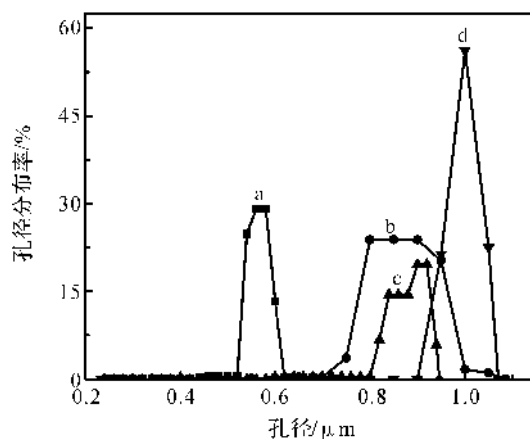
a. 芯层浓度为 4%, b. 芯层浓度为 6%,
c. 芯层浓度为 8%, d. 芯层浓度为 10%

图 4 同轴静电纺 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的孔径分布

2.4 不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的力学性能表征

同轴静电纺不同芯层浓度的 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维膜的应力-应变曲线如图 5 所示。图 5 可见,随着芯层浓度的增大,纤维膜的断裂强度由 3.12 MPa 增大到 3.84 MPa,断裂伸长率由 60% 增大到 76%。这是因为纤维膜在拉伸过程中主要表现为纤维之间交络点的打开和纤维之间的滑移,当纤维直径较小时,在外力的作用下纤维较易发生滑移^[8],拉伸所需的断裂强度较小,相反当纤维直径增大时需要较大的拉伸力才能使纤维断裂。

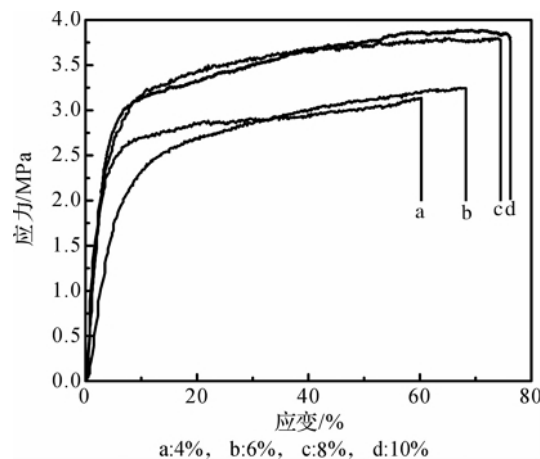


图 5 同轴静电纺不同芯层浓度 SF/GE-PC 皮芯结构纳米纤维膜的应力-应变曲线

2.5 细胞相容性表征

图 6(a)和(b)分别是 HSF 细胞在不同芯层浓度的纳米纤维支架及孔板上的黏附和增殖情况。由图 6(a)可知,在不同的黏附时间 1、3、5 h 下,细胞在支架上的 OD 值均高于孔板,且随着黏附时间的增加,细

胞在支架上的 OD 值逐渐增大。表明这种皮芯结构的支架对细胞无毒性,有利于细胞的生长,相同时间点下不同的芯层浓度对细胞的黏附情况影响不大。图 6(b)可知,随着培养天数的增加,细胞在支架上的

OD 值逐渐增大,说明细胞能在支架上增殖,但细胞在芯层浓度为 8%和 10%支架上的 OD 值略低于 6%的支架,这是因为在细胞培养的过程中,芯层浓度为 8%和 10%的支架略有溶解,从而导致细胞含量有所下降。

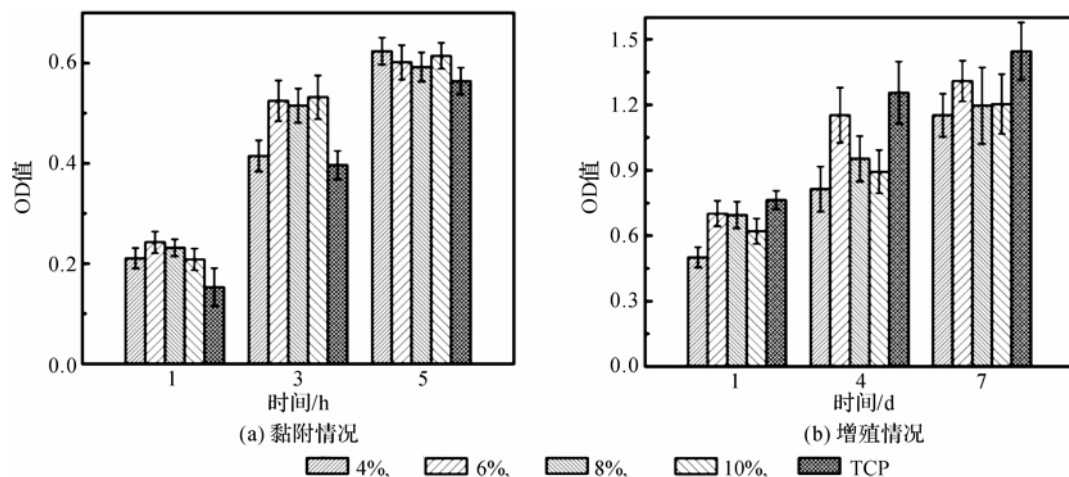


图 6 HSF 细胞在同轴静电纺丝 SF/GE-PCL 皮芯结构纳米纤维支架上的黏附和增殖情况

图 7 是 HSF 在芯层浓度为 6%的支架上培养 7 d 后的 SEM 图。由图 7(a)可以看出,细胞在支架上生长良好,数目较多,有的细胞堆积起来;由局部放大图 7(b)可以看到,细胞在支架表面铺展开,部分细胞长出大量伪足,细胞与细胞之间通过微绒毛相互连接起来。这一结果表明人皮肤成纤维细胞能在皮芯结构支架上黏附、生长和增殖。

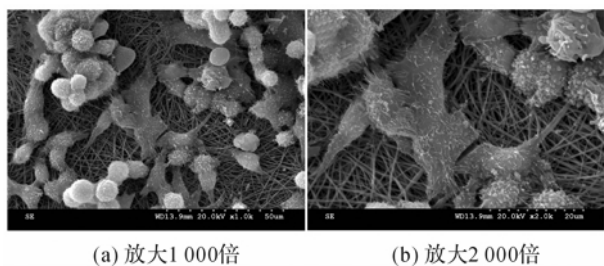


图 7 培养 7 d 后 HSF 细胞在芯层浓度为 6%的支架上的 SEM 图

3 结 论

通过同轴静电纺丝,成功制备了 SF/GE-PCL 皮芯结构复合纳米纤维。随着芯层 PCL 浓度的增大,纤维的平均直径增大,纤维膜的平均孔径也逐渐增大,纤维膜的断裂强度也有一定的提高。细胞实验表明该支架具有良好的生物相容性,能支持细胞的黏附、生长和增殖,有望成为理想的皮肤组织工程支架材料。

参考文献:

- [1] Kasoju N, Bhonde R R, Bora U. Fabrication of a novel micro-nano fibrous nonwoven scaffold with Antheraea assama silk fibroin for use in tissue engineering[J]. Materials Letters, 2009, 63(28): 2466-2469.
- [2] Schnierder A, Wang X Y, Kaplan D L, et al. Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing[J]. Acta Biomaterials, 2009, 5(7): 2570-2578.
- [3] Yin B G, Zhang Y Z, Bao W W, et al. Study on the properties of the electrospun silk fibroin/gelatin blend nanofibers for scaffolds[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2009, 111(3): 1471-1477.
- [4] Zhang Y Z, Ouyang H, Lim C T, et al. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005, 72(1): 156-165.
- [5] 丁 彬, 俞建勇. 静电纺丝与纳米纤维[M]. 北京: 中国纺织出版社, 2011: 83-85.
- [6] Sun Z C, Zussman E, Yarin A L, et al. Compound core-shell polymer nanofibers by co-electrospinning[J]. Advanced Materials, 2003, 15(22): 1929-1932.
- [7] 王曙东, 尹桂波, 吴佳林, 等. 静电纺再生丝素/明胶纳米纤维的结构与性能[J]. 纺织学报, 2008, 29(3): 1-8.
- [8] 徐安长, 赵静娜, 潘志娟, 等. 静电纺聚乳酸纤维毡的微观结构及力学行为[J]. 纺织学报, 2007, 28(7): 4-7.

Study on Preparation and Biological Properties of Nanofiber Membrane with Regenerated Silk Fibroin/Gelatin-Polycaprolactone Skin-core Structure

LIU Xin, XIONG Jie

(a. School of Materials and Textiles; b. Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology, Ministry of Education, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: This study prepares composite nanofiber membrane with silk fibroin (SF)/gelatin (GE) blend as skin layer and polycaprolactone (PCL) as core layer through coaxial electro-spinning technology and studies the influence of different core layer concentrations on the morphology, bore diameter, mechanical properties and biological compatibility of composite nanofiber membrane. The result shows that the SF-GE-PCL composite nanofiber prepared has a smooth surface and obvious skin-core structure; as core layer concentration increases from 4% to 10%, the average diameter of composite nanofiber increases from 256nm to 941nm, the average bore diameter of fiber membrane increases from 0.576 μm to 1.018 μm and the breaking strength and breaking strain of fiber membrane increase; fibroblast of human skin can adhere to and grow and proliferate on nanofiber membrane with skin-core structure.

Key words: silk fibroin; gelatin; polycaprolactone; coaxial electro-spinning; skin-core structure; bio-compatibility

(责任编辑: 张祖尧)