



细菌纤维素-明胶/丝素蛋白双层 支架的制备及其性能

孙卫华¹,陈驰昊²,李 喆²,吕向国³,王秀华¹

(1. 浙江理工大学材料科学与工程学院,杭州 310018;2. 嘉兴学院材料与纺织工程学院,浙江嘉兴 314001;
3. 上海交通大学医学院附属仁济医院泌尿科,上海 200127)

摘要: 为了获得能够模拟尿道组织多尺度结构的细菌纤维素复合明胶/丝素蛋白双层支架,以明胶(Gelatin, Gel)/丝素蛋白(Silk fibroin, SF)为原料,通过冷冻干燥法制备 Gel/SF 管状多孔支架,并以 Gel/SF 为模板,采用原位发酵法将细菌纤维素(Bacterial cellulose, BC)与 Gel/SF 支架复合,获得细菌纤维素-明胶/丝素蛋白(Gel/SF/BC)双层支架,并对 Gel/SF/BC 双层支架的结构及性能进行测试表征。结果表明:Gel/SF/BC 双层支架具有尿道组织的宏观形貌,形成了内致密外疏松的多孔双层结构,外层以 Gel/SF 多孔支架为骨架,内层由单纯 BC 膜构成,BC 纳米纤维分布在多孔孔壁表面;Gel/SF/BC 双层支架具有良好的力学性能、吸水性能及生物相容性。通过该方法制备的双层支架能够高度模拟尿道组织的多尺度结构,有望应用于尿道组织的再生修复。

关键词: 双层支架;明胶;丝素蛋白;原位发酵法;细菌纤维素

中图分类号: Q811.8

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2024)01-0030-09

引文格式:孙卫华,陈驰昊,李喆,等. 细菌纤维素-明胶/丝素蛋白双层支架的制备及其性能[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2024,51(1):30-38.

Reference Format: SUN Weihua, CHEN Chihao, LI Zhe, et al. Preparation and properties of a bacterial cellulose gelatin/silk fibroin bilayer scaffold[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University,2024,51(1):30-38.

Preparation and properties of a bacterial cellulose gelatin/silk fibroin bilayer scaffold

SUN Weihua¹, CHEN Chihao², LI Zhe², LÜ Xiangguo³, WANG Xiuhua¹

(1. School of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. College of Materials and Textile Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; 3. Urology, Renji Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China)

Abstract: To obtain a bacterial cellulose composite gelatin/silk fibroin bilayer scaffold that can simulate the multi-scale structure of urethral tissue, gelatin(Gel)/silk fibroin (SF) was used as the raw material to prepare Gel/SF tubular porous scaffold by freeze-drying method. Gel/SF was used as the template and bacterial cellulose (BC) was compounded with the Gel/SF scaffold by in situ fermentation, bacterial cellulose-gelatin/silk fibroin (Gel/SF/BC) bilayer scaffold was obtained, and the structure and performance of the Gel/SF/BC bilayer scaffold were tested and characterized. The results show that the Gel/SF/BC bilayer scaffold has a macroscopic morphology of urethral tissue, forming a porous bilayer structure with dense inner and loose outer layers. The outer layer takes the Gel/SF porous scaffold as the skeleton, and the inner layer is composed of a simple BC membrane. BC nanofibers are distributed on the surface of the porous pore wall. The Gel/SF/BC double-layer scaffold has good mechanical properties,

收稿日期:2022-03-14 网络出版日期:2023-07-03

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(LGG21E030010);国家自然科学基金项目(51703078)

作者简介:孙卫华(1996—),河南鹤壁人,硕士研究生,主要从事生物医用材料方面的研究。

通信作者:李 喆,E-mail:lizhe830817@163.com

water absorption performance, and biocompatibility. The double-layer scaffold prepared by this method can highly simulate the multi-scale structure of urethral tissue, and is expected to be applied to the regeneration and repair of urethral tissue.

Key words: double layer scaffold; gelatin; silk fibroin; in situ fermentation; bacterial cellulose

0 引言

长段尿道狭窄是泌尿外科一种常见的疾病,组织工程技术有望成为治愈该疾病的有效方法。支架材料可以为细胞生长提供空间结构与力学支撑,并通过模拟体内微环境促进组织重建与再生,因此在组织工程研究中具有重要作用^[1-3]。研究表明,高度模拟细胞外基质(Extracellularmatrix, ECM)的纳米三维网络结构会影响细胞行为,进而提高细胞黏附、增殖及蛋白表达,促进组织重建^[4-7]。

天然可降解的生物材料已广泛用于制备尿道组织工程支架。明胶(Gelatin, Gel)和丝素蛋白(Silk fibroin, SF)是尿道组织工程中常用的两种天然生物材料。Gel具有良好的生物相容性及可降解性,且降解产物毒性较低;SF具有良好的力学强度及可塑性。以明胶和丝素蛋白为原料制备的疏松多孔支架,兼具两者的优良性能。BC具有良好的持水性能、机械性能及生物相容性,且其三维纳米网络结构能够完美模拟天然ECM^[8-10]。因此,BC三维纳米网络结构与Gel/SF多孔支架进行结合,有望应用于尿道组织修复。

本文将Gel与SF水溶液进行混合,通过冷冻干燥法制备Gel/SF管状多孔支架,探究了不同冷冻温度对支架多孔结构的影响,选择与尿道组织多孔结构相近的Gel/SF支架,并以其为模板,采用原位发酵法使BC与Gel/SF支架复合,最终得到具有多尺度结构的双层支架Gel/SF/BC。对Gel/SF/BC双层支架的结构及性能进行测试表征,分析其微观形貌、化学结构、力学性能及生物相容性。本文的研究结果可为尿道、血管、皮肤等组织工程支架的设计与构筑提供新的思路与方法。

1 实验部分

1.1 实验材料与仪器

主要材料:木葡糖酸醋杆菌 1.1812,购自中国科学院微生物研究所;酵母膏、鱼粉蛋白胨和戊二醛(生物试剂),购自国药集团化学试剂有限公司;葡萄糖、磷酸氢二钠、柠檬酸、磷酸二氢钾、无水乙醇和明胶(分析纯),购自国药集团化学试剂有限公司;曲拉

通 X-100(化学纯),购自上海源叶生物科技有限公司;最低限量基本培养基(MEM, AH29917357),购自上海桥星贸易有限公司;L-929 细胞(购自中科院上海细胞库);胎牛血清(FBS, NYN0769),购自上海桥星贸易有限公司;二苯基四氮唑溴盐(MTT, J17GS15117),购自上海源叶生物科技有限公司;青霉素链霉素(J210042),购自上海桥星贸易有限公司;高糖液体培养基(DMEM, PM150210),购自武汉普诺赛生命科技有限公司;苯酚和溴化锂(分析纯),购自上海麦克林生化科技有限公司;2,4-二硝基氯苯(分析纯),购自上海博飞美科化学科技有限公司;十二烷基硫酸钠(色谱纯),购自上海麦克林生化科技有限公司;高密度聚乙烯薄膜(海门市扬子医疗器械有限公司);雄性豚鼠(普通级),购自邳州市东方养殖有限公司;道康宁硅胶及其固化剂(DC184),购自北京瑞德佑业科技有限公司;蚕茧(浙江嘉欣丝绸股份有限公司)。

主要仪器:超声诊断仪(东芝 Aplio 500),购自日本东芝医疗系统株式会社;冷冻干燥机(SCIENTZ-18 N),购自上海双旭电子有限公司;3D 打印机(Creater Pro),购自浙江闪铸三维科技有限公司;电热恒温培养箱(DHP-9082),购自济源千司生物技术有限公司;立式高压蒸汽灭菌锅(申安 LDZX-50KBS),购自上海习仁科学仪器有限公司;扫描电镜(Apreo S),购自美国赛默飞公司;傅里叶变换红外光谱仪(VERTEX 70),购自德国布鲁克公司;X 射线薄膜衍射仪(D8 ADVANCE 型),购自德国布鲁克公司;万能试验机(Instron 5982),购自美国英斯特朗公司。

1.2 Gel/SF 管状多孔支架的制备

图 1 为 Gel/SF 管状多孔支架的制备流程图。通过超声扫描获取尿道组织二维断层图片(图 1(a)),对二维断层图片做数据识别处理,利用 imaris 软件对处理后的系列二维断层图片进行三维重建及拟合(图 1(b)),再经 3DMax 软件平滑处理后得到尿道三维数字模型(图 1(c)),3D 打印得到 ABS 材质的尿道节段性三维实体模型(图 1(d))。硅胶和固化剂按照质量比 100:5 进行混合,将 3D 打印模型放入方形透明塑料器皿中并注入上述混合试剂,固

化后的硅胶进行倒模处理,得到具有尿道组织宏观形貌的硅胶模具(图 1(e))。将 Gel/SF 混合倒入硅

胶模具,冷冻干燥后得到 Gel/SF 管状多孔支架(图 1(f))。

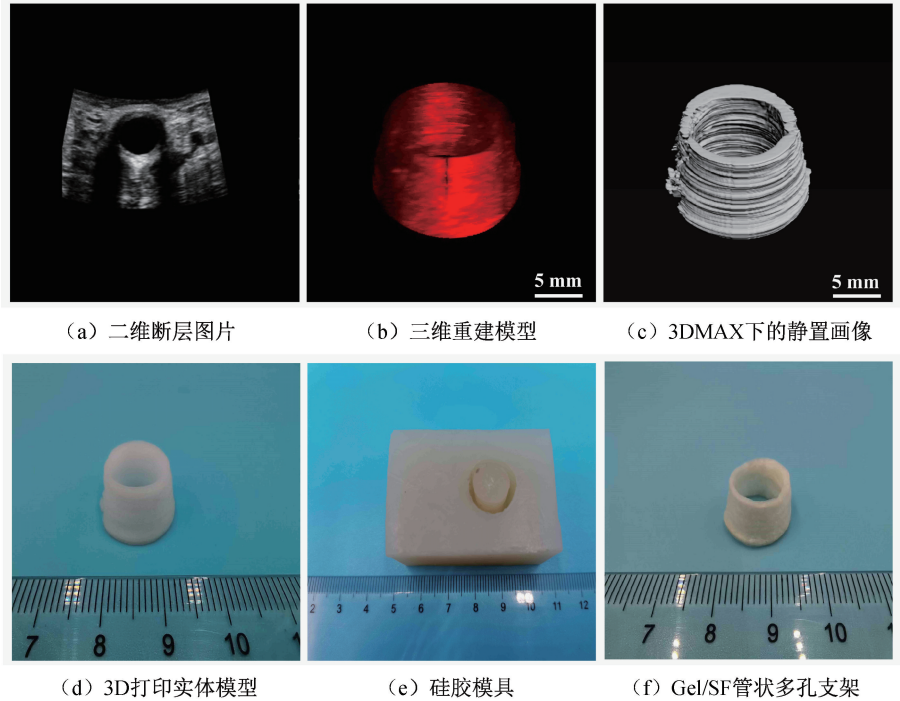


图 1 Gel/SF 管状多孔支架的制备流程图

将 10 g 脱胶处理后的蚕茧在质量分数 60% 的溴化锂溶液中 60 °C 条件下溶解 5 h, 多层纱布过滤, 然后用去离子水透析 3 d, 每隔 12 h 换水; 透析完成后的 SF 溶液冷冻干燥, 制得纯 SF。取纯 SF 溶于去离子水中, 配制质量分数 5% 的 SF 水溶液, 将 Gel 溶于 45 °C 去离子水中, 配制质量分数 5% 的明胶溶液, 将两种溶液等体积混合后注入硅胶模具中, 分别在 -20、-80 °C 以及液氮 (-196 °C) 中冷冻 12 h, 然后进行冷冻干燥, 得到 Gel/SF 管状多孔支架。

1.3 Gel/SF/BC 双层支架的制备

配制发酵培养液 (5 g/L 酵母膏、5 g/L 鱼粉蛋白胨、50 g/L 葡萄糖、2 g/L 磷酸氢二钠、1 g/L 柠檬酸、1 g/L 磷酸二氢钾), 待上述物质充分溶解后, 放入立式高压蒸汽灭菌锅中进行灭菌, 并在 121 °C、0.1 MPa 下灭菌 30 min。

采用质量分数 0.5% 的戊二醛无水乙醇溶液交联 Gel/SF 管状多孔支架 10 min, 用发酵培养液清洗 3 次, 置换出多余的戊二醛溶液。将处理后的 Gel/SF 管状多孔支架重新放置于硅胶模具中, 配制菌种密度为 10^7 个/mL 的木葡糖酸醋杆菌发酵培养液, 并将其注入模具内。待发酵培养液充分浸润 Gel/SF 管状多孔支架后, 放入恒温培养箱中, 35 °C 发酵培养 7 d, 获得 Gel/SF/BC 双层支架。将双层支架浸入医用酒精消毒处理 24 h, 用质量分数 1%

的曲拉通 X-100 浸泡处理 24 h, 并用超纯水清洗 3 次, 除去多余的试剂。

1.4 样品表征

1.4.1 形貌及结构分析

采用扫描电镜对管状样品内表面及横截面结构进行观察, 采用 Image J 软件进行测量, 并用 Origin 软件统计进行分析 ($n=200$, n 为统计数量), 利用傅里叶变换红外光谱仪及 X 射线薄膜衍射仪对双层支架进行化学结构测试。

1.4.2 孔隙率测试

采用乙醇置换法测量支架孔隙率。取冻干后的支架称重为 m_1 , 将其完全浸没在无水乙醇中, 用滤纸轻蘸去表面多余液体后称重为 m_2 ; 将多孔支架放入 20 mL 量筒中, 缓慢倒入乙醇至 10 mL, 添加乙醇的体积为 V ; 计算样品的孔隙率, 每组支架测试 3 个样品。孔隙率 P 用式(1)计算:

$$P/\% = \frac{(m_2 - m_1)/\rho_c}{(10 - V)} \times 100 \quad (1)$$

其中: m_1 为支架冻干后的质量, g; m_2 为浸泡无水乙醇 2 h 后的质量, g; V 为添加的乙醇的体积, mL; ρ_c 为无水乙醇密度, g/mL。

1.4.3 吸水量测试

将支架置于去离子水中浸泡 24 h, 支架取出后用滤纸将支架表面多余的水分擦拭干净, 用电

子天平称重得到湿态质量 W_s , 然后将支架进行冷冻干燥, 称重得到干态质量 W_d 。计算出支架的吸水量, 每组支架测试 3 个样品。吸水量通过式(2)计算:

$$S_r = \frac{W_s - W_d}{W_d} \quad (2)$$

其中: S_r 为吸水量; W_s 为支架在去离子水中浸泡 24 h 后的质量, g; W_d 为冷冻干燥后干态质量, g。

1.4.4 力学性能测试

采用万能试验机对材料进行力学性能测试。将样品统一裁剪为 $25 \times 4 \times 2 \text{ mm}^3$ 的样条进行拉伸力学性能的测试, 拉伸速率为 5 mm/min 。

循环压缩力学性能测试: 湿态下的 Gel/SF 多孔支架以及 Gel/SF/BC 双层支架进行压缩循环测试。将样品采用相同的工艺条件, 统一制备为直径 15 mm, 高 16 mm 的圆柱状样品, 压缩至样品发生 60% 形变, 然后恢复至 0%, 压缩速率为 10 mm/min , 重复 10 次循环。

1.4.5 细胞毒性试验

体外细胞毒性试验按照《医疗器械生物学评价 第 5 部分: 体外细胞毒性试验》(GB/T 16886.5—2017)进行测试。将 L-929 细胞在含 10% 胎牛血清和抗生素(青霉素 $100 \mu\text{g/mL}$, 链霉素 $100 \mu\text{g/mL}$) 的 MEM 培养液进行培养后, 分别加入 $100 \mu\text{L}$ Gel/SF/BC 试验样品浸提液(100%)、阳性对照(含 0.5% 苯酚的 DMEM 培养液)和阴性对照液(高密度聚乙烯薄膜的浸提液), 37°C 、5% CO_2 培养 24 h, 每组做 6 个平行; 培养 24 h 后, 做细胞形态学观察及吸光度的测定。

1.4.6 皮肤致敏和皮肤刺激试验

皮肤致敏试验和皮肤刺激试验按照《医疗器械生物学评价 第 10 部分: 刺激与皮肤致敏试验》(GB/T 16886.10—2017)进行测试。

皮肤致敏试验过程: 选取 15 只雄性豚鼠将其分为 2 组: 其中阴性对照组为 5 只动物/组, 试验组为 10 只动物/组。试验前 24 h 将实验动物背部左侧去毛, 去毛范围约为 $4 \sim 6 \text{ cm}^2$ 。无菌条件下制备 Gel/SF/BC 样品与阴性对照组, 样品规格为 $2.5 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$, 将试验组(Gel/SF/BC)及对照组(医用纱布)样品在动物背部去毛区域进行贴敷并诱导激发致敏反应。在 24 h 与 48 h 后观察动物激发部位皮肤反应, 并按照 Magnusson and Kligman 分级表评分。

皮肤刺激试验过程: 在给药前 24 h 内, 将动物

背部两侧去毛, 去毛面积约为 $10 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ 。将试验组(Gel/SF/BC)及对照组(医用纱布)样品在两侧去毛区域进行贴敷并做包扎处理, 贴敷持续 4 h 后, 移除样品。移除样品后分别于 1、24、48 h 和 72 h 观察动物皮肤红斑和水肿反应并按照皮肤反应记分表进行记分。

2 结果与讨论

2.1 Gel/SF 管状多孔支架在不同预冻温度下的多孔结构

图 2 为不同预冻温度下制备的 Gel/SF 管状多孔支架截面 SEM 图像及孔径分布。图 2 显示: 预冻温度为 -20°C 的 Gel/SF 管状多孔支架为大孔结构, 孔洞之间连通性较好, 孔径为 $(141 \pm 78) \mu\text{m}$ (图 2(a)); 随着预冻温度降低至 -80°C , Gel/SF 多孔结构的孔径变小, 且孔洞周围分布有闭合的凹陷结构, 孔洞之间的连通性较差, 孔径为 $(23 \pm 18) \mu\text{m}$ (图 2(b)); 在 -20°C 和 -80°C 下, Gel/SF 管状多孔支架孔径大小以及结构变化, 发现在恒定温度场下, 冰晶颗粒生长至最终定型时的尺寸随着温度降低而变小, 冷冻干燥升华从而形成具有不同孔径的多孔结构; -196°C 的 Gel/SF 支架的多孔结构类似于一种取向结构, 孔径为 $(88 \pm 23) \mu\text{m}$ (图 2(c))。研究发现, -196°C 下的多孔结构孔径并没有随着温度的下降而减小。这是因为硅胶模具自身的低导热性, 在冷冻时一维方向上存在温度场(即 -196°C 到室温 35°C), 冰晶沿着一维方向的温度场而生长, 导致冷冻干燥所形成的多孔结构会存在取向结构, 且不同位置处截面的多孔结构及孔径大小存在差异^[10-11]。由于人尿道脱细胞基质海绵体层孔径大小为 $100 \sim 300 \mu\text{m}$, 因此, 在 -20°C 的冷冻条件制备的 Gel/SF 管状多孔支架更适合作为尿道组织修复支架。

2.2 Gel/SF/BC 双层支架微观形貌分析

图 3 为 -20°C 预冻温度下所制备的 Gel/SF/BC 双层支架 SEM 图像。Gel/SF/BC 内侧是单纯 BC 形成的致密层, 外侧是以 Gel/SF 管状多孔支架为骨架复合 BC 纳米纤维的多孔疏松层, 多孔疏松层是由微米级的多孔结构组成, 孔与孔之间相互连通, 孔径的大小为 $(143 \pm 40) \mu\text{m}$ (图 3(a)), 与同条件下制备的 Gel/SF 管状多孔支架孔径一致。

进一步对多孔结构内壁同一位置进行分级观察, 在微米级多孔结构内壁存在 BC 三维纳米网络纤维, 纳米级纤维直径为 $(78 \pm 24) \text{ nm}$ (图 3(b))。

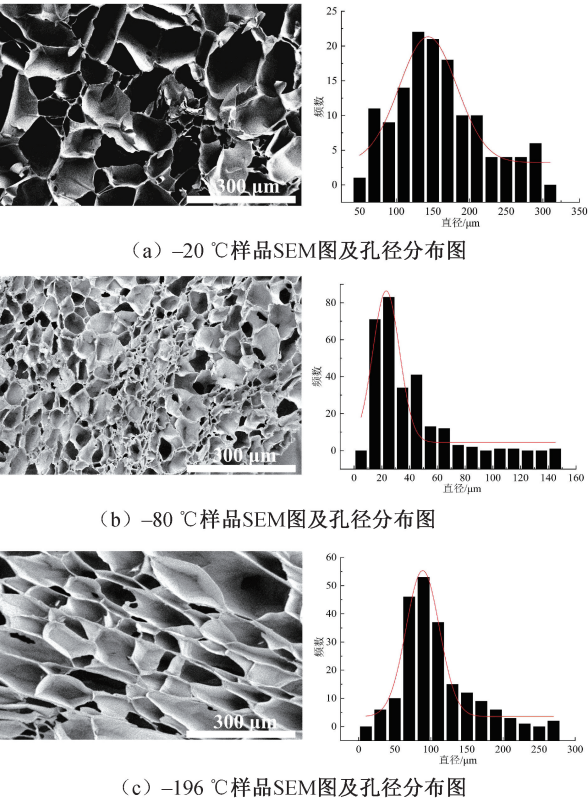


图 2 不同温度下 Gel/SF 支架的 SEM 图及孔径分布图

观察 Gel/SF/BC 双层支架的致密层,其内表面拥有致密的细菌纤维素层,厚度为 $(29\pm4)\mu\text{m}$,纳米纤维相互交错形成的蛛网结构,构成蛛网结构的纳米纤维直径在 $(44\pm8)\text{nm}$ (见图 3(c))。纳米纤维的分布呈现蛛网结构,是由于 Gel/SF 管状多孔支架与木醋杆菌在培养液中的静电作用力,改变了木醋杆菌的聚集状态,进而影响到纳米纤维的自组装过程,最后呈现出不同形貌结构的纳米纤维网络^[12]。静态培养的细菌纤维素为三维无序纳米纤维网络结构,而通过静电作用力的控制可得到特殊的蛛网结构或树枝状结构^[13]。在双层支架的多尺度结构中,纳米级纤维占比为 87.5%,亚微米级纤维占比 12.5%。因此,BC 的纳米纤维贯穿于 Gel/SF 管状多孔支架的内壁及其内表面。

对比原位发酵法所制备的 Gel/SF/BC 双层支架与人尿道脱细胞基质的多尺度结构,结果如表 1 所示。由表 1 可知,Gel/SF/BC 双层支架与尿道脱细胞基质的厚度近乎一致,双层支架的疏松多孔层平均孔径 $(143\pm40)\mu\text{m}$,其内壁纳米纤维直径为 $(78\pm24)\text{nm}$,致密层纳米纤维直径 $(44\pm8)\text{nm}$ 。而

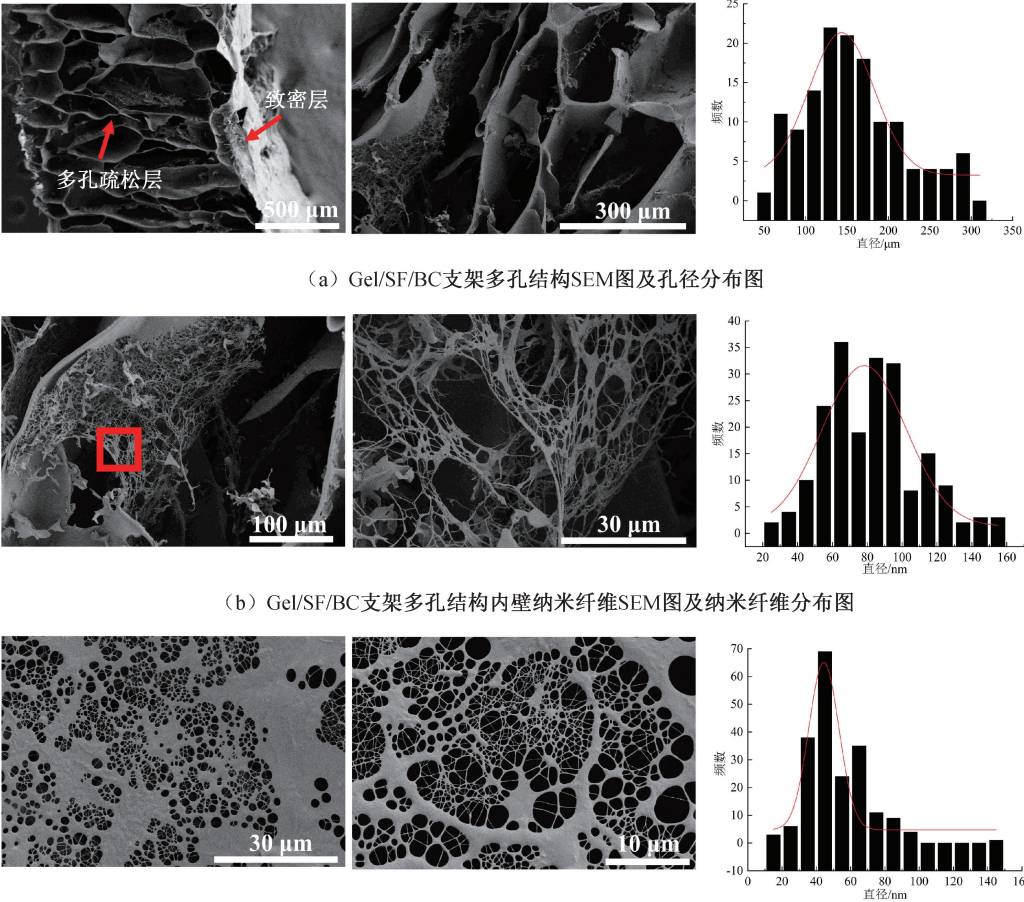


图 3 Gel/SF/BC 双层支架多级结构 SEM 图及孔径、纳米纤维分布图

人尿道的脱细胞基质海绵体层孔径(146 ± 39) μm , (25 \pm 5)nm。因此,Gel/SF/BC 双层支架的多尺度
纳米纤维直径(30 ± 7)nm,致密层纳米纤维直径 结构接近于人体尿道脱细胞基质。

表 1 Gel/SF/BC 双层支架和尿道脱细胞基质的多级结构

项目	微孔直径/ μm	疏松多孔层纳米纤维/nm	致密层纳米纤维/nm	孔隙率/%
尿道脱细胞基质	146 ± 39	30 ± 7	25 ± 5	85.1 ± 4.6
Gel/SF/BC 双层支架	143 ± 40	78 ± 24	44 ± 8	81.3 ± 1.8

2.3 Gel/SF/BC 双层支架化学结构分析

通过 FT-IR 和 XRD 对 BC、Gel/SF 以及 Gel/SF/BC 进行化学结构分析,结果如图 4 所示。图 4 (a)显示:BC 具有典型的细菌纤维素的特征峰,其中在 3356 cm^{-1} 处的吸收峰归属于 O—H 的伸缩振动, 2894 cm^{-1} 附近为 CH_2 的振动吸收, 1652 cm^{-1} 为 O—H 的面内变形振动吸收峰, 1323 、 1162 cm^{-1} 和 1060 cm^{-1} 为 C—H、C—O—C、C—O 的伸缩振动峰;Gel/SF 在 1632 、 1531 cm^{-1} 均有明显的吸收峰,对应于酰胺 I、酰胺 II,在 1239 cm^{-1} 的吸收峰对应于酰胺 III^[14-15];Gel/SF/BC 双层支架具有 BC 和 Gel/SF 的特征峰,与 Gel/SF 酰胺 I (1632

cm^{-1})、酰胺 II (1531 cm^{-1})吸收峰对比,Gel/SF/BC 的酰胺 I(1625 cm^{-1})、酰胺 II (1513 cm^{-1})向低波数方向移动,说明细菌纤维素与明胶/丝素蛋白复合支架之间产生了少量的氢键。图 4(b)显示:BC 特征峰位于 14.4° 、 20.4° 和 22.6° ,分别对应着 ($1\bar{1}0$)、(110)以及 (200)晶面,属于典型的纤维素 I 晶型^[16];Gel/SF 多孔支架并没有出现很强的衍射峰,而是在 20° 左右出现了较宽的散射峰,表明 Gel 和 SF 主要是以无定形结构而存在的;Gel/SF/BC 双层支架观察到除了 Gel/SF 较宽的散射峰,在 20° 、 23° 也存在 BC 微弱的特征峰^[17]。结合 FT-IR 与 XRD 分析,说明 Gel/SF 多孔支架存在少量的 BC。

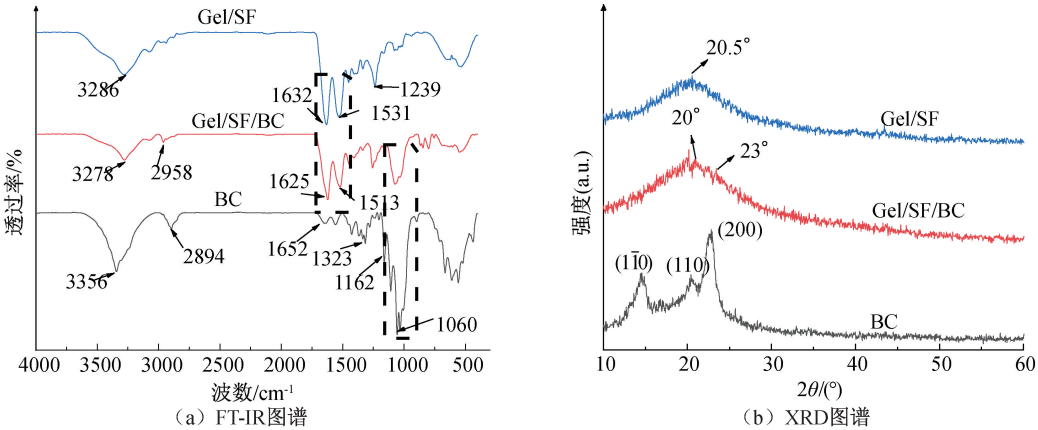


图 4 不同样品的 FT-IR 和 XRD 图谱

2.4 Gel/SF/BC 双层支架孔隙率及吸水量

组织工程支架应具有较高的孔隙率及相互连通的多孔结构,这对细胞的生长、迁移以及新陈代谢等有着重要的影响^[18]。对不同样品孔隙率及吸水量进行对比,结果如图 5 所示。由图 5 可知 Gel/SF 支架和 Gel/SF/BC 双层支架的孔隙率都在 80% 以上,对于尿道组织工程而言已基本满足^[19]。Gel/SF 多孔支架孔隙率为 85.8%,Gel/SF/BC 双层支架的孔隙率为 81.3%,双层支架的孔隙率相对 Gel/SF 较低,是因为 Gel/SF 多孔结构的孔壁上原位生长的 BC 对其孔隙率有一定的影响。Gel/SF/BC 双层支架的吸水量为 16.1,是 Gel/SF 的 1.1 倍,两者由于其多孔结构存在,均具有较强的吸水性能。但 Gel/SF/BC 双层支架的多孔结构里原位生长了纳

米级 BC,并具有更小孔径的三维网络结构,使得该双层支架的吸水性能较 Gel/SF 具有明显的提升。

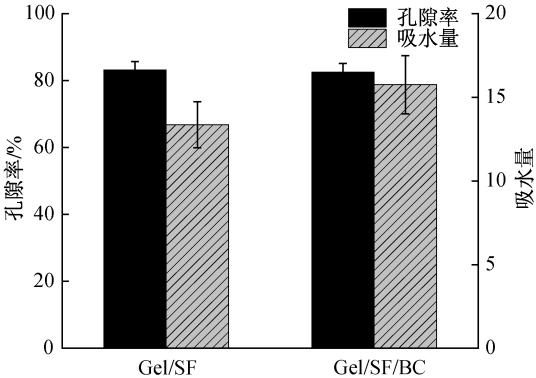


图 5 不同样品孔隙率及吸水量

2.5 Gel/SF/BC 双层支架力学性能分析

天然 BC 本身具有良好的力学性能,其应用于

支架材料的制备可使材料的力学性能得到改善^[20]。对不同样品的拉伸性能进行对比,结果如图 6 所示。Gel/SF/BC 双层支架在 72.5 kPa 处发生材料的断裂(见图 6(a)),其断裂强度与断裂伸长率分别是

Gel/SF 的 1.3 倍和 1.1 倍(见图 6(b)),这表明 Gel/SF/BC 双层支架具有更好的抵抗外力拉伸形变能力,原位发酵生长的 BC 为 Gel/SF 支架带来力学性能上的提升。

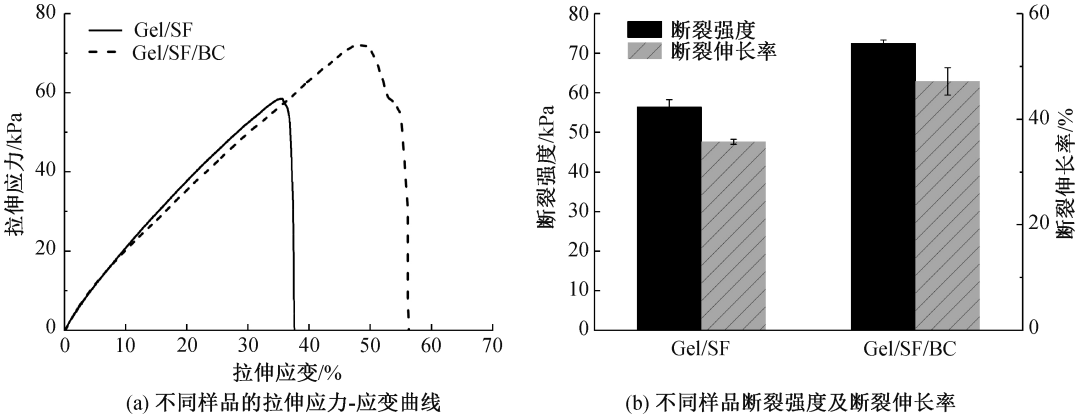


图 6 不同样品的拉伸性能

新生的组织需要适当的压缩力学性能提供支撑,以提供和维护细胞生长所必需的空间环境,并维持一定时间直至新生组织具有一定的自身生物力学特性^[21-22]。对不同样品进行压缩性能的比较,结果如图 7 所示。Gel/SF/BC 双层支架第一次循环压缩的应力-应变曲线所对应的最大应力为 88.2 kPa,杨氏模量为 127.7 kPa,在经过第十次循环压缩后其最大压缩应力降低为 83.1 kPa,杨氏模量降低为

90.9 kPa,其第一次循环压缩对应的最大压缩应力以及杨氏模量分别为 Gel/SF 的 1.4 倍、1.6 倍,经过第十次循环压缩对应的最大压缩应力以及杨氏模量分别为 Gel/SF 的 1.4 倍、1.7 倍(见图 7(c)—(d))。这表明 Gel/SF/BC 双层支架具有更好的耐压缩性能,Gel/SF/BC 双层支架上原位生长的 BC 含有大量羟基,与 Gel/SF 形成氢键,提高了双层支架的力学性能。

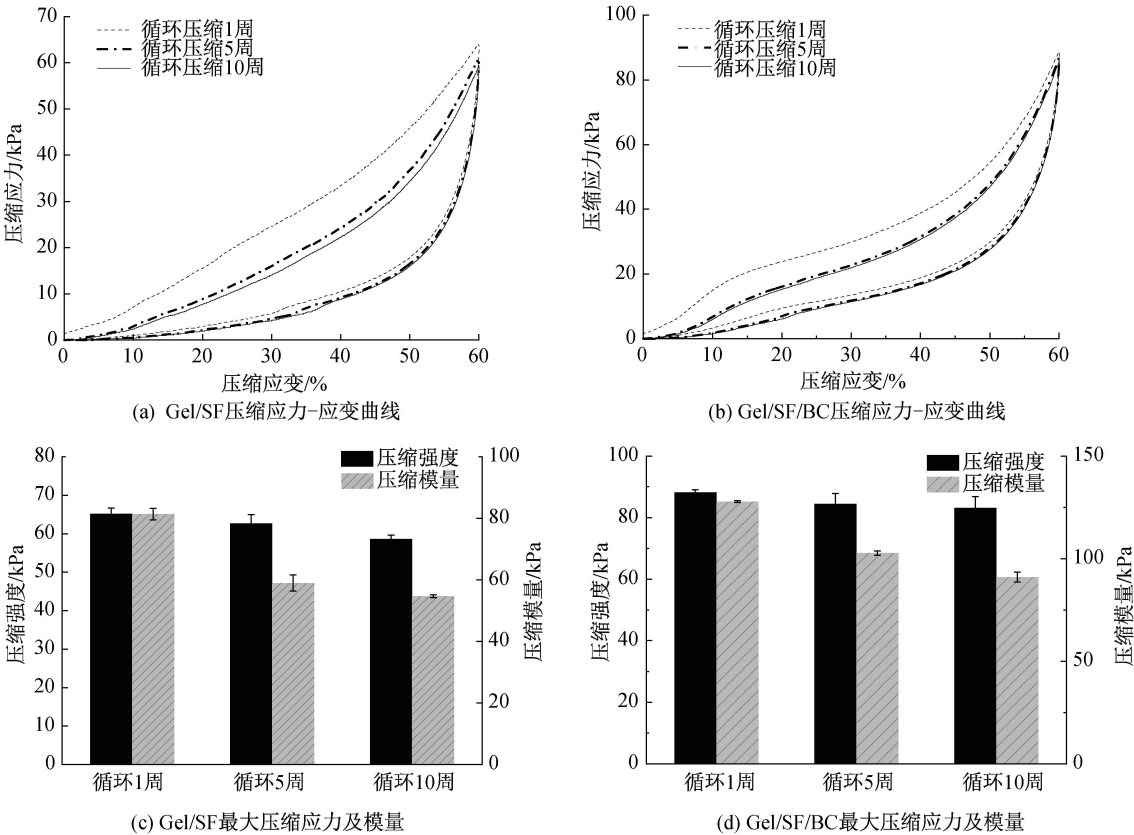


图 7 不同样品的压缩性能

2.6 双层支架细胞毒性测试

采用二苯基四氮唑溴盐(MTT)比色法,用各实验组的浸提液培养 L-929 细胞,并对其增殖情况进行评价。细胞经过 24 h 的培养后,对比不同实验组的吸光度,结果如图 8 所示。阳性对照组对比其他组的吸光度较低,显微镜观察 L-929 细胞几乎没有增长,这表明在含 0.5% 苯酚的 DMEM 培养液中细胞无法正常增殖生长。对比阳性组,空白样品、阴性对照组及 Gel/SF/BC 浸提液(100%),实验组的吸光度相对较强,说明细胞生长状况较好。对比实验组的吸光度(OD 值),发现 Gel/SF/BC 实验组样品浸提液 OD 值(0.218 ± 0.002)稍低于空白对照组(0.324 ± 0.012)。按照标准设定空白对照组对应的存活率为 100%,则实验组 Gel/SF/BC 的存活率为 86.7%。对实验组进行细胞形态学的观察,仅观察到轻微的细胞生长抑制现象,推测 Gel/SF/BC 双层支架在采用曲拉通 X-100 浸泡处理去除内毒素后,存在微量的残留,从而影响了细胞生长。实验样品的细胞存活率为 86.7%,高于标准中细胞存活率应不小于 70%的要求,说明实验样品 Gel/SF/BC 对 L-929 无明显细胞毒性。

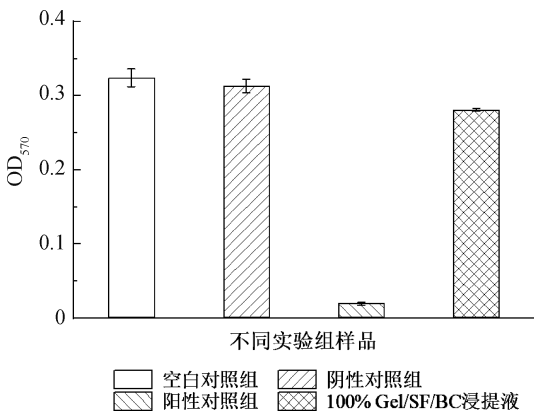


图 8 24 h 后不同样品的吸光度

2.7 双层支架皮肤致敏性与皮肤刺激性测试

皮肤致敏性实验结果:Gel/SF/BC 样品与阴性对照组样品评分均为 0(无明显改变),阳性对照组评分为 2(致敏物为 2,4-二硝基氯苯,中度融合性红斑),说明 Gel/SF/BC 样品无皮肤致敏性。

皮肤刺激性实验结果:Gel/SF/BC 样品实验组与阴性对照组原发性刺激指数均为 0(极轻微刺激性),阳性组(20%十二烷基硫酸钠)原发性刺激指数均为 4.1(中等微刺激性),说明 Gel/SF/BC 样品无皮肤刺激性。

3 结 论

本文采用原位发酵法将 BC 与 Gel/SF 管状多孔支架复合,得到具有模拟尿道组织多尺度结构的 Gel/SF/BC 双层支架。Gel/SF/BC 双层支架表现出良好的力学性能、吸水性能及生物相容性,在尿道组织工程材料具有一定的应用前景。主要结论如下:

a)制备的 Gel/SF/BC 双层支架,实现了对尿道组织宏观形貌、微米级多孔、纳米级纤维的结构模拟。Gel/SF/BC 双层支架宏观形貌长度为 9.3 mm,平均孔隙率为 83.1%,其中:内侧致密层由直径为(44 ± 8)nm 的单纯 BC 构成,外侧多孔疏松层以孔径为(143 ± 40) μ m 的 Gel/SF 多孔支架为骨架,直径为(78 ± 24)nm 的 BC 纳米纤维在其孔壁表面分布。

b)Gel/SF/BC 双层支架其力学强度相比于 Gel/SF 多孔支架有所提升,Gel/SF/BC 断裂强度为 72.5 kPa,是 Gel/SF 的 1.3 倍。Gel/SF/BC 经过 10 次循环压缩对应的最大压缩应力以及杨氏模量分别为 Gel/SF 的 1.4 倍、1.7 倍。Gel/SF/BC 双层支架相比于 Gel/SF 多孔支架吸水量有所提升,为 Gel/SF 的 1.1 倍。

c)Gel/SF/BC 双层支架无细胞毒性、无皮肤致敏与皮肤刺激反应,具有较好的生物相容性,能够应用于尿道组织工程。

参考文献:

[1] 李露. 泌尿系统组织工程支架材料的研究进展[J]. 生物化工, 2022, 8(5): 173-175.

[2] 田广超, 范应中, 苑思彤, 等. 尿道下裂 Duckett 术后并发吻合口狭窄的相关因素分析[J]. 临床小儿外科杂志, 2022, 21(5): 445-451.

[3] 傅强. 复杂性尿道狭窄诊疗技术的创新与推广[J]. 上海医学, 2022, 45(7): 461-464.

[4] Nnabugwu I I, Onuh A C, Anyimba S K, et al. Comparing complications of urethral stricture across various ages: a retrospective analysis of findings from retrograde urethrogram and voiding cysto-urethrogram over 10 years[J]. BMC Medical Imaging, 2019, 19(1): 84.

[5] Bakhshandeh B, Zarrintaj P, Oftadeh M O, et al. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials [J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2017, 33 (2): 144-172.

[6] 张逸, 任思聪, 皇甫慧敏, 等. 支架材料对成血管微环境的影响及作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(21): 3391-3397.

[7] Yang, M, Zhang Y, Fang C, et al. Urine-microenvironment-initiated composite hydrogel patch reconfiguration propels scarless memory repair and reinvigoration of the urethra[J]. Advanced Materials, 2022, 34(14): e2109522.

[8] 徐清栋, 雷彩虹, 朱海霖, 等. 丝素/明胶复合材料的比例对小鼠止血性能的影响[J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2018, 39(1): 45-50.

[9] 王莉, 刘涛, 丁新波, 等. 丝素-壳聚糖/聚氧化乙烯双层纳米纤维膜制备及其生物活性[J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2022, 47(4): 474-481.

[10] 江雨, 吴擢彤, 王宝秀, 等. 定向冷冻明胶支架的原位细菌纤维素培养及支架中的细胞行为[J]. 合成技术及应用, 2020, 35(2): 5-8.

[11] 李喆, 吕向国, 王宝秀, 等. 双层细菌纤维素基组织工程尿道支架的设计与初步构建[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2016, 12(5): 276-280.

[12] Wu Z, Jiang Y, Li Z, et al. Bacterial cellulose nanofiber distribution on gelatin and silk fibroin scaffolds and the cell behavior[J]. Cellulose, 2020, 28(1): 91-102.

[13] 李喆. 基于纳米纤维空间结构可控的仿生组织工程支架及制法: 112691234A[P]. 2021-04-23.

[14] Chen Y, Zhou X, Lin Q, et al. Bacterial cellulose/gelatin composites: In situ preparation and glutaraldehyde treatment[J]. Cellulose, 2014, 21(4): 2679-2693.

[15] 王曙东, 马倩, 王可, 等. 丝素蛋白/明胶复合水凝胶的结构与生物相容性[J]. 纺织学报, 2020, 41(11): 41-47.

[16] 万嘉, 吴擢彤, 王宝秀, 等. 细菌纤维素/明胶复合止血海绵的制备与性能研究[J]. 合成技术及应用, 2022, 37(1): 30-36.

[17] 王耀强, 王涛, 李旖曦, 等. 细菌纤维素膜纯化条件的优化及性能表征[J]. 福建师范大学学报(自然科学版), 2023, 39(1): 38-47.

[18] Blume C, Kraus X, Heene S, et al. Vascular implants new aspects for in situ tissue engineering [J]. Engineering in Life Sciences, 2022, 22(3): 344-360.

[19] Huang J W, Lv X G, Li Z, et al. Urethral reconstruction with a 3D porous bacterial cellulose scaffold seeded with lingual keratinocytes in a rabbit model [J]. Biomedical Materials, 2015, 10(5): 055005.

[20] 肖剑虹, 赵正宜, 邹多宏. 壳聚糖-细菌纤维素复合膜的制备及其生物相容性的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(8): 1177-1181.

[21] Wang B, Lv X, Li Z, et al. A simple method for controlling the bacterial cellulose nanofiber density in 3D scaffolds and its effect on the cell behavior[J]. Cellulose 2019, 26(12): 7411-7421.

[22] 杨铭, 张楷乐, 王营, 等. 牛血清白蛋白-羟基磷灰石构建的组织工程支架用于尿道损伤修复的效果[J]. 上海医学, 2022, 45(3): 165-170.

(责任编辑:张会巍)