



# SF/SA/HBG 纤维支架材料的构建 及体外生物矿化

訾园兴<sup>a</sup>, 刘涛<sup>b</sup>, 陈颖睿<sup>a</sup>, 任旭<sup>a</sup>, 丁新波<sup>a</sup>

(浙江理工大学, a.材料与纺织学院、丝绸学院, b.科技与艺术学院, 杭州 310018)

**摘要:** 由静电纺丝技术纺制的纤维支架材料能够提供大的比表面积及较高的孔隙率。以甲酸为溶剂, 丝素蛋白(Silk fibroin, SF)和海藻酸钠(Sodium alginate, SA)为基体材料, 并加入中空生物活性玻璃(Hollow bioactive glass, HBG), 复合成体外生物活性较好的生物支架材料; 通过体外生物矿化可以加速羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAp)的沉积及生长。经过一系列测试分析, 结果显示: 通过静电纺丝制备出 SF/SA/HBG 纤维复合膜, 其平均直径分布在 200~300 nm; 经过乙醇处理后, 纤维表面发生溶胀, 直径变粗, 平均直径分布在 230~380 nm; 进行体外生物矿化后, 在纤维表面形成 HAp, SF/SA/HBG 纤维复合支架材料具有良好的生物活性。

**关键词:** 静电纺丝; 生物支架材料; 体外生物矿化; 生物活性

中图分类号: TQ127.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2019)07-0427-06

## Construction of SF/SA/HBG fiber scaffold materials and in-vitro biomineralization

ZI Yuanxing<sup>a</sup>, LIU Tao<sup>b</sup>, CHEN Yingrui<sup>a</sup>, REN Xu<sup>a</sup>, DING Xinbo<sup>a</sup>

(a. Silk Institute, College of Materials and Textiles;

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

**Abstract:** The fiber scaffold material spun by electrospinning technology can provide large specific surface area and high porosity. In this paper, the biological scaffold material with good in-vitro biological activity was synthesized by using formic acid as the solvent, using silk fibroin (SF) and sodium alginate (SA) as matrix materials, and adding hollow bioactive glass (HBG). The deposition and growth of hydroxyapatite (HAp) could be accelerated through in-vitro biomineralization. After a series of tests and analysis, the results showed that the average diameter of the SF/SA/HBG fiber composite membrane prepared by electrospinning was between 200 nm and 300 nm. After ethanol treatment, the surface of the fiber swelled and the diameter became thick and the average diameter was distributed within is 230 ~ 380 nm. After in vitro biomineralization, hydroxyapatite was formed on the fiber surface, indicating that the SF/SA/HBG fiber composite scaffold material has good biological activity.

**Key words:** electrospinning; biological scaffold material; in-vitro biomineralization; biological activity

收稿日期: 2018-09-27 网络出版日期: 2018-12-01

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY16E020012); 浙江理工大学科研启动基金项目(15012081-Y); 浙江理工大学研究生创新基金项目(11110131201716); 浙江理工大学科技与艺术学院面上项目(KY2017010)

作者简介: 訾园兴(1992- ), 男, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事现代纺织技术及新产品开发方面的研究。

通信作者: 丁新波, E-mail: dxblt@zstu.edu.cn

## 0 引言

目前纳米纤维的制备方法备受广泛关注,主要包括模板合成<sup>[1]</sup>、超声波技术<sup>[2]</sup>、自组装技术<sup>[3]</sup>和静电纺丝技术<sup>[4]</sup>,其中静电纺丝技术是一种能够连续生产简单有效的生产工艺,能生产出直径为亚微米级或纳米级纤维,常作为一种生物支架材料可应用于支持细胞生长<sup>[5]</sup>、伤口敷料<sup>[6]</sup>和组织工程<sup>[7]</sup>等领域。静电纺丝技术生产出的纳米纤维膜结构材料的广泛应用,受益于大的比表面和较高的孔隙率<sup>[8]</sup>。

桑蚕丝脱胶后形成的丝素蛋白(Silk fibroin, SF)具有良好的生物相容性和取代细胞外基质胶原蛋白的潜力<sup>[9]</sup>,SF在生物材料、临床医学、骨修复材料、组织细胞工程<sup>[10]</sup>和改性材料中的应用前景广阔。海藻酸钠(Sodium alginate, SA)是一种存在于褐藻中的一种天然高分子材料,具有无毒、无害、可以生物降解的一种纯天然绿色生物材料。SA有优异的吸湿保湿、生物相容性及可降解吸收性能,在医用卫生材料<sup>[11]</sup>领域广泛应用。Ming等<sup>[12]</sup>采用SF/SA纤维水凝胶来调节和控制羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAp)晶体的生长制备含有SF和SA多糖的纤维水凝胶,该纤维水凝胶模仿真正的骨骼矿化系统,是一种仿生途径可以控制其形态及结构的生物材料。生物玻璃(Bioactive glass, BG)在骨组织工程和药物载体应用广泛,具有较高的比表面积,较大的孔容结构,可以作为生物活性和降解性优异的骨修复材料<sup>[13]</sup>。Hench等<sup>[14]</sup>认为由于BG表面反应释放的钙、磷、硅和钠离子可以促进BG界面细胞的胞内和胞外反应,从而促进成骨细胞的增殖与分化,与骨组织发生化学键结合。Liu等<sup>[15]</sup>以聚丙烯酸为模板剂,成功地制备出中空生物玻璃(Hollow bioactive glass, HBG),在模拟体液中验证其具有良好的生物活性,可用于骨修复材料。

有机/无机复合支架材料既可以克服无机材料脆性大和不易加工等缺点,同时又可以弥补有机材料力学性能差、生物活性低及与骨结合力差的不足,从而达到骨修复和促进组织再生所需的要求。以SF/SA/HBG的纤维复合支架材料目前还未见系统的报道,本文采用SF/SA为基体材料,添加HBG无机粒子构建纤维支架材料,并改善其生物活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验原料和仪器设备

桑蚕茧购于浙江湖州,海藻酸钠购于国药化工

集团有限公司,无水乙醇、正硅酸乙酯(TEP)、磷酸三乙酯(TEOS)、四水硝酸钙( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、聚丙烯酸(PAA)、氨水、无水氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )、磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )、碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )和透析袋(分子量8000~14000),均购于杭州市米克化工有限公司和去离子水实验室自制备用。

冷冻干燥机采用美国Labconco公司、KDS100型微量注射泵(KDS Scientific, Inc.)、DW-P303-1 ACFO型高压直流电源(东文高压电源有限公司)、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)、FE20型PH计(上海梅特勒-托利多仪器公司)、TGL-15B型号的高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)和SSJ-III型马弗炉(河南洛阳神佳窑业有限公司)。

### 1.2 试样制备

#### 1.2.1 SF样品的制备

将桑蚕丝置于0.05 wt%的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中,在98℃条件下1h,上述步骤重复2次。脱胶后用去离子水清洗数次,以除去丝胶蛋白及杂质。溶解的过程:将脱胶后蚕丝放入 $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 摩尔比为1:8:2的三元溶剂中,在75℃下溶解3h;然后将丝素蛋白溶液冷却后抽滤去除杂质,将溶液转移到分子截留量为8000~14000的透析袋中,在去离子水中透析3d后,在离心机中反复离心2次,而后在冷冻干燥机中冷冻干燥。

#### 1.2.2 HBG样品的制备

取0.4g聚丙烯酸为模板剂( $M_w=3000$ ),分别加入18mL氨水,180mL无水乙醇,搅拌1h后加入3.6g正硅酸乙酯,继续搅拌10h,得到澄清透明溶液。按硅源、磷源、钙源的摩尔比为80:15:5,向上述溶液中依次加入0.4g四水硝酸钙、1.2g磷酸三乙酯,常温下搅拌反应48h,形成乳白色溶液。将反应后的溶液经3次无水乙醇离心水洗,在50℃鼓风烘箱中烘干得到白色粉末。将干燥的白色粉末在650℃马弗炉中煅烧5h去除模板剂,设定升温速率为2min/h,即得中空生物活性玻璃球。

#### 1.2.3 SF/SA/HBG复合纤维膜的制备

取1.0g海绵状的SF溶解到9.0g甲酸中制备出10wt%SF溶液。而后在超声波超声下再加入0.2g的SA和一定比例的HBG(HBG占溶质的百分比),在混合容器中混合搅拌12h后可以得到均匀且不发生团聚的纺丝溶液,纺丝条件:温度(20±

5)  $^{\circ}\text{C}$ , 湿度 50%~60%, 纺丝电压设定为 14 kV, 针头到接收板距离为 14 cm, 注射泵的进料速度设定为 0.5 mL/h。

#### 1.2.4 SF/SA/HBG 复合纤维膜的交联处理

通过将三种含有不同比例的 HBG 的纤维复合膜, 室温下浸泡在无水乙醇中 1 h, 然后取出试样于室温下放置 20 h 去除乙醇分子, 在自然状态下晾干, 以备后续测试分析使用。

#### 1.2.5 SF/SA/HBG 生物矿化产生 HAp 晶体

生物矿化工艺是在 SF/SA/HBG 纤维支架材料上生长 HAp 晶体。将制备好的纤维复合膜用 75%(V/V) 的乙醇水溶液中浸泡 30 min, 取出后在去离子水中浸泡半小时去除多余的有机溶剂; 再将样品按照与溶液 1.5 mg/mL 浸入到 0.1 mol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液, 在室温下 1 h 用去离子水洗涤两次以除去游离的钙离子。将样品置于过饱和的 0.1 mol/L 的  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  中, 在混合反应中, 使得钙和磷原子的摩尔比接近于 1.67。采用氨水将混合溶液 pH 值调节到 10, 并将混合溶液在室温下超声 1 h, 而后在  $37^{\circ}\text{C}$  下矿化 48 h, HAp 的沉积在 SF/SA/HBG 纤维支架材料表面上, 并且将样品用去离子水将多余的离子去除, 样品可以多次反复矿化, 形成层层堆积的 HAp 晶体<sup>[16]</sup>。

### 1.3 表征及性能测试

#### 1.3.1 SEM 和 EDS 分析

用 JFC-1600 离子溅射仪镀铂金 40 s, 来提高样品的导电性能。在加速电压为 3 kV 条件下, 利用日本日立公司 HITACHI S-4800 型热场发射扫描电子显微镜对待测样品的表面形貌特征进行测试。设定样品在加速电压为 10 kV 条件下, 样品放大倍数为 500 倍, 利用电子能谱仪(EDS)对样品进行测试分析元素组成及其含量。

#### 1.3.2 TEM 分析

在 200 kV 加速电压条件下, 通过日本电子公司 JEOL-2100 型透射电子显微镜对经过红外灯干燥后静电纺丝接收在微滤膜上的纤维可以观测到微观结构形貌进行测试分析。

#### 1.3.3 XRD 测试分析

通过德国布鲁克 AXS 有限公司生产的 D8 discover 型 X 射线衍射仪对样品进行检测, 所采用的放射源为 Cu 靶  $\text{K}\alpha$  射线, 扫描步长取  $0.02^{\circ}$ , 在扫描区间为  $2\theta = 10^{\circ} \sim 80^{\circ}$  进行广角物相分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SF/SA/HBG 静电纺丝纤维膜形貌分析

图 1 为 SF/SA/HBG 复合膜纤维的 SEM 形貌。由图 1 可知: 纤维表面呈现圆柱形, 部分纤维表面有轻微粘连和相互交叉现象, 这可能是由于纺丝过程中溶液的进料速率不均匀, 溶剂仍残留在纤维表面, 未能完全挥发<sup>[17]</sup>。为了得到生物活性最佳的复合纤维材料, 通过添加适量的 SA 和不同含量的 HBG, 随着 HBG 含量的增多, 纤维在纺丝的过程中 SF/SA/HBG 复合纤维膜显示出团聚现象比较严重, 结果如图 2 中 TEM 电镜图所示。添加一定量的无机粒子 HBG, 可增加纤维复合膜的生物活性。采用 imageProplus 图像分析软件, 测量纤维的直径分布在 200~300 nm。

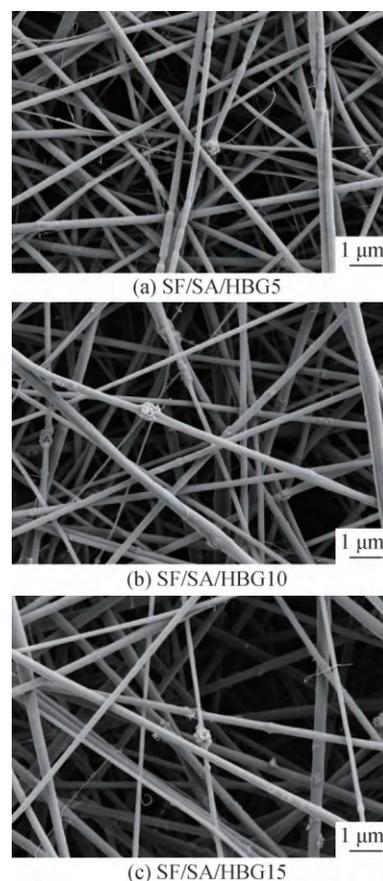


图 1 SF/SA/HBG 静电纺丝纤维复合膜的扫描电镜图

图 2 为纤维复合膜内部 TEM 形貌, 由图 2 可知, 添加直径分布在 40~60 nm 的 HBG, 当含量为 5 wt% 的 HBG 在纺丝过程中, 纤维表面比较平整光滑, 分布较为均匀, 不发生团聚, 随着 HBG 含量的增加, HBG 在纤维内部容易发生团聚现象并且

在纤维表面较为粗糙。由于 HBG 是纳米级别的颗粒主要嵌入在纤维内部,当含量增多时,纳米颗粒分布不匀,容易发生团聚被附着或固定在表面上。

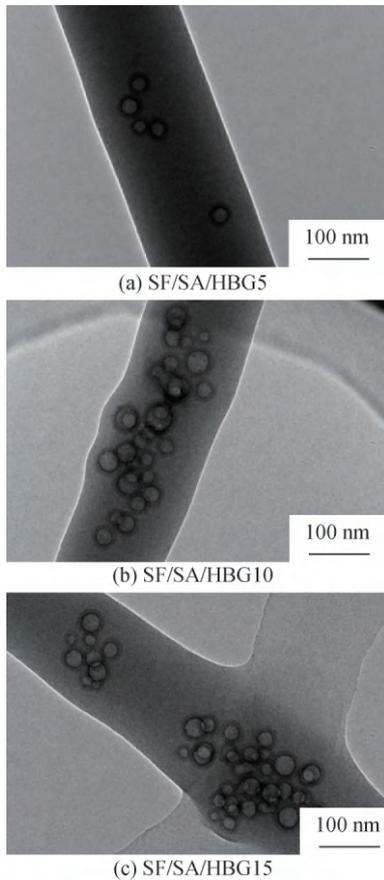


图2 SF/SA/HBG 静电纺丝纤维复合膜的透射电镜图

## 2.2 交联后 SF/SA/HBG 静电纺丝纤维膜形态变化

为了使得纤维复合膜在组织工程中具有良好的应用,必须对其结构与性能进行控制,采用无水乙醇交联。交联是对丝素蛋白分子结构诱导处理,使得丝素蛋白肽链间的氢键重新组合,形成了结构较为紧密的 $\beta$ -折叠构象<sup>[18]</sup>。交联后纤维分子结构稳定,由于乙醇会与蛋白质分子链中的基团形成氢键作用,出现丝素蛋白分子链的 $\beta$ -折叠构象,由于 $\beta$ 折叠区的氨基酸排列,促使丝素蛋白分子内部二级结构转变,形成稳定形态的酰胺键<sup>[19]</sup>。图3为SF/SA/HBG静电纺丝纤维复合膜交联后的SEM表面形貌,结果表明SF/SA/HBG复合纤维膜表面随着HBG含量的增多,纤维表面有微幅度突起,故而增加了纤维表面的粗糙度,有利于后续细胞的黏附与增殖。

乙醇处理后的纤维复合膜材料会因 $\beta$ -折叠晶体的形成而发生溶胀,使得纤维直径变粗,其平均直径分布230~380 nm,使得纤维间的孔隙较明显减少。乙醇交联能使纤维膜中水溶性分子结构稳定而不会很快被溶解;乙醇处理后的纤维膜结构使得纤维之间的孔径变大;而且增大纤维膜的韧性,能承受较大的冲击;同时在后续细胞黏附、生长和增殖,提供优异的生物支架材料。

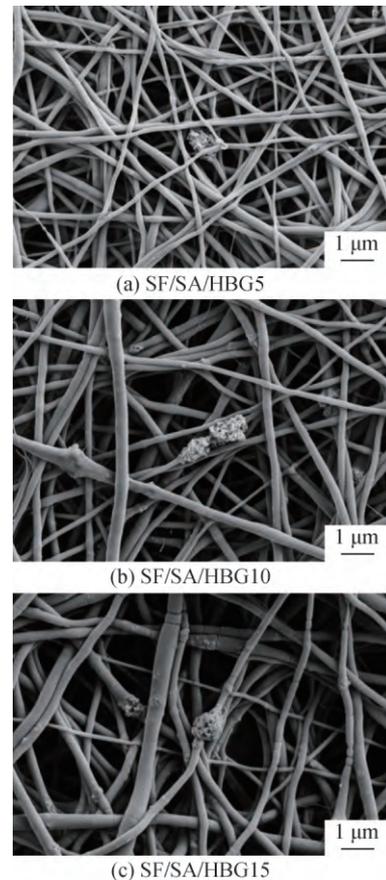


图3 SF/SA/HBG 静电纺丝纤维复合膜交联后的SEM形貌

## 2.3 体外生物矿化评估

骨组织修复材料在进行构建之前,一般会对材料在体外模拟体液环境进行诱导骨细胞的生长,能否诱导羟基磷灰石沉积是判断是否具有生物活性的依据之一<sup>[20-21]</sup>。为了研究SF/SA/HBG纤维复合膜对HAp晶体的沉积能力,使用SEM观察矿化48h后HAp晶体的形貌特征,图4为SF/SA/HBG纤维复合膜仿生矿化的SEM形貌图,图4显示:纤维复合膜的表面为针状形态结构,当添加含量为10 wt%HBG时HAp的沉积量最多。

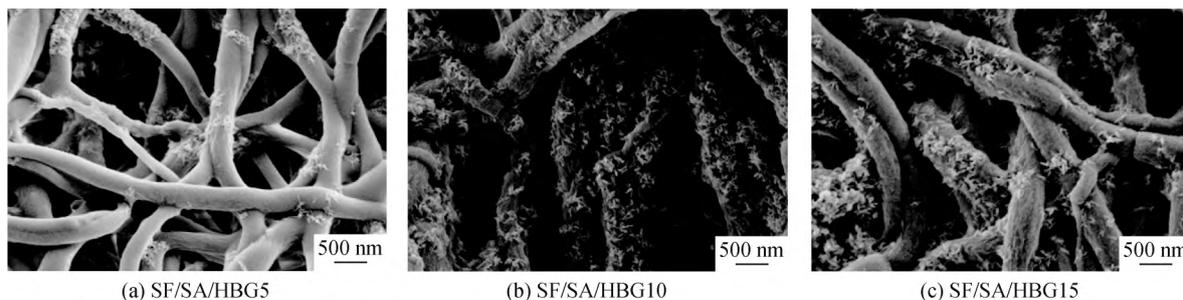


图 4 SF/SA/HBG 纤维复合膜生物矿化的 SEM 形貌图

图 5 为纤维复合膜生物矿化的 EDS 图,采用 EDS 表征矿化前表面元素主要 C、O、Si 和少量的 Ca 元素,图 5 表明:矿化后纤维表面沉积的颗粒物主要为 Ca、P 元素,且 10 wt% HBG 纤维的沉积量较多。

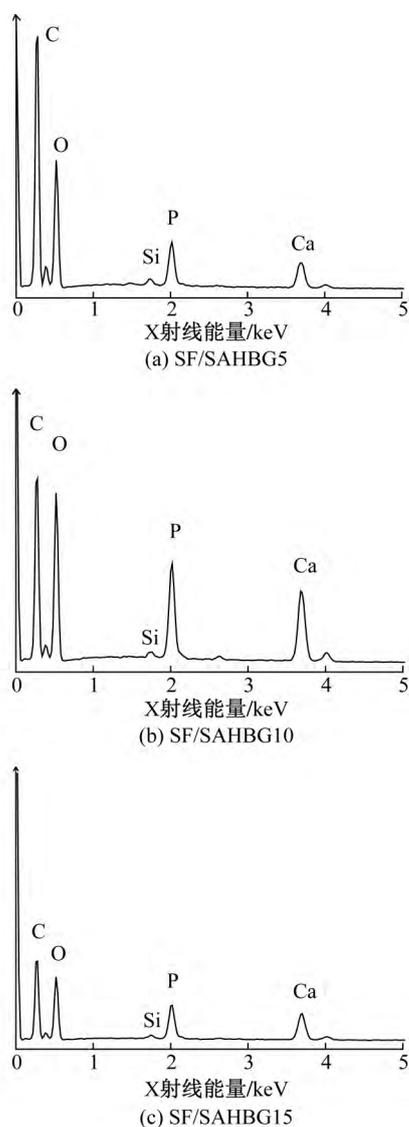


图 5 SF/SA/HBG 纤维复合膜生物矿化的 EDS 图

图 6 为 SF/SA/HBG 不同比例的纤维复合膜的 XRD 图谱,由图 6 可知,HA<sub>p</sub> 晶体 XRD 特征峰在  $2\theta=27.2^\circ$ (002)晶面、 $2\theta=31.9^\circ$ 处(211)晶面、 $2\theta=45.7^\circ$ 处(113)晶面附近有三处结晶峰比较符合羟基磷灰石的结晶峰(JCPDS # 090432)<sup>[22]</sup>,且衍射峰较为细长有良好的结晶性能。在一定的范围内,随着 HBG 含量的增多,HA<sub>p</sub> 沉积的量越多,生物活性越好,其中 10 wt% HBG 时 XRD 中 HA<sub>p</sub> 的衍射峰宽较明显,经过以上测试分析结果表明 SF/SA/HBG 纤维复合材料中含量为 10 wt% 的生物活性最佳。

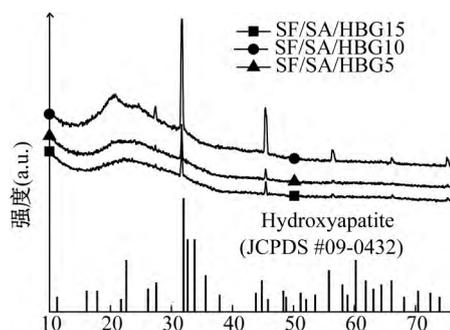


图 6 SF/SA/HBG 纤维复合膜仿生矿化后的 XRD 图

### 3 结 论

本文采用甲酸为溶剂,以 SF/SA 为基体材料,添加具有较好生物活性的中空生物玻璃,通过静电纺丝获得 SF/SA/HBG 纤维复合支架材料,并经过体外仿生矿化制备出具有较好生物活性的支架材料,主要结果如下:

a)通过静电纺丝制备出最佳的纺丝浓度为丝素蛋白 10 wt%,海藻酸钠与丝素蛋白的质量比为 5:1 的基体支架材料,添加中空生物玻璃的量为 10 wt%,制备出 SF/SA/HBG 复合纤维平均直径分布在 200~300 nm。

b)采用无水乙醇处理后,SF/SA/HBG 纤维复

合膜的分子结构稳定,水溶性较好;经过交联处理后纤维表面发生溶胀,使得纤维的直径变粗,平均直径分布在 230~380 nm;。

c) SF/SA/HBG 纤维复合膜材料在温度为 37 °C, pH 值为 10 的条件下,经过矿化 48 h 后,在纤维表面沉积羟基磷灰石基质,纤维复合膜具有良好的生物活性。

#### 参考文献:

- [1] Jin H J, Park J, Valluzzi R, et al. Biomaterial films of bombyx mori silk fibroin with poly (ethylene oxide)[J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 711-717.
- [2] Hofmann S, Foo C T W P, Rossetti F, et al. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2006, 111 (1/2): 219-227.
- [3] Kim U J, Park J, Kim H J, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2775-2785.
- [4] Inouye K, Kurokawa M, Nishikawa S, et al. Use of *Bombyx mori* silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells [J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1998, 37(3): 159-164.
- [5] Yoshimoto H, Shin Y M, Terai H, et al. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(12): 2077-2082.
- [6] Kim H J, Kim U J, Kim H S, et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds[J]. *Bone*, 2008, 42(6): 1226-1234.
- [7] Holzwarth J M, Ma P X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36): 9622-9629.
- [8] Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat S O, et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2010, 21 (2): 77-95.
- [9] Sahoo S, Toh S L, Goh J C H. A bFGF-releasing silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(11): 2990-2998.
- [10] Jin H J, Chen J, Karageorgiou V, et al. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats [J]. *Biomaterials*, 2004, 25 (6): 1039-1047.
- [11] Li W J, Laurencin C T, Cateson E J, et al. Electrospun nanofibrous structure: A novel scaffold for tissue engineering[J]. *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 2002, 60(4): 613-621.
- [12] Ming J, Bie S, Jiang Z, et al. Novel hydroxyapatite nanorods crystal growth in silk fibroin/sodium alginate nanofiber hydrogel[J]. *Materials Letters*, 2014, 126: 169-173.
- [13] Rahaman M N, Day D E, Bal B S, et al. Bioactive glass in tissue engineering [J]. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7(6):2355-2373.
- [14] Hench L L, Splinter R J, Allen W C, et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1971, 5(6): 117-141.
- [15] Liu T, Li Z, Ding X, et al. Facile synthesis of hollow bioactive glass nanospheres with tunable size [J]. *Materials Letters*, 2017, 190(3): 99-102.
- [16] Ming J, Zuo B. A novel electrospun silk fibroin/hydroxyapatite hybrid nanofibers [J]. *Materials Chemistry & Physics*, 2012, 137(1):421-427.
- [17] Ayutsede J, Gandhi M, Sukigara S, et al. Regeneration of *Bombyx mori* silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat [J]. *Polymer*, 2005, 46(5): 1625-1634.
- [18] 吴佳林, 王曙东, 张幼珠, 等. 有机醇处理对 PLA/丝素复合纳米纤维的影响[J]. *丝绸*, 2008, 45(4): 24-26.
- [19] Minoura N, Tsukada M, Nagura M. Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial.[J]. *Biomaterials*, 1990, 11(6):430-434.
- [20] Xu S, Lin K, Wang Z, et al. Reconstruction of calvarial defect of rabbits using porous calcium silicate bioactive ceramics [J]. *Biomaterials*, 2008, 29 (17): 2588-2596.
- [21] Wu C, Zhang Y, Ke X, et al. Bioactive mesopore-glass microspheres with controllable protein-delivery properties by biomimetic surface modification [J]. *Journal of Biomedical Materials Research part A*, 2010, 95 (2):476-485.
- [22] Liu T, Li Z, Ding X, et al. Facile synthesis of hollow bioactive glass nanospheres with tunable size [J]. *Materials Letters*, 2017, 190:99-102.

(责任编辑:廖乾生)