

[文章编号] 1000-1182(2008)02-0211-04

丝素蛋白/纳米羟磷灰石支架的实验研究

赵 勇¹, 李 罡², 陈 静¹, 陈治清¹

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041; 2.昆明医学院口腔医院 修复科, 云南 昆明 650031)

[摘要] 目的 设计和构建三维丝素蛋白/羟磷灰石骨组织工程支架材料。方法 联合运用丝素蛋白非编织方法和仿生矿化技术, 制备并表征三维多孔丝素蛋白/纳米羟磷灰石的有机/无机组织工程支架。结果 仿生矿化在非编织支架上形成的针状羟磷灰石晶体, 直径20~60 nm, 长100~300 nm。复合支架孔隙度为70%~78%, 孔径为 $(163.4 \pm 42.6) \mu\text{m}$ 。结论 采用非编织丝素蛋白和仿生矿化的方法可制备孔隙度和孔径可控的组织工程支架。

[关键词] 丝素蛋白; 仿生矿化; 羟磷灰石

[中图分类号] R783.1 **[文献标识码]** A

Preparation and characteristics of non-woven silk fibroin/nano-hydroxyapatite scaffolds ZHAO Yong¹, LI Gang², CHEN Jing¹, CHEN Zhi-qing¹. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Prosthodontics, Stomatological Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] Objective The aim of the present study was to design and fabricate a three dimensional(3D) porous structure of silk fibroin/apatite used as a potential scaffold in bone tissue engineering. Methods With the combining use of non-woven silk fibroin net and biomimetic method, porous non-woven silk fibroin/nano-hydroxyapatite net (NSF/nHAP) was prepared and characterized with X-ray diffraction(XRD), scanning electron microscope(SEM) and fourier transform infrared spectroscopy(FTIR). The porosity and swelling ratio of the 3D scaffold were also measured. Besides, the osteoblasts from the cranium of new born SD rat were cultured on the pre-fabricated scaffold to evaluate the biological reaction of the scaffold. Results The nano-sized hydroxyapatite crystals were needle-like with the length of 100-300 nm and the diameter of 20-60 nm. The scaffold fabricated in the present study exhibited the porous microstructure with open porosity around 70%-78%. Its average pore size was about $(163.4 \pm 42.6) \mu\text{m}$. The swelling ratio and water uptaking were 4.56% and 81.93%, respectively, which revealed that the 3D porous scaffold had an excellent hydrophilicity. The rod-shaped apatite crystals could rapidly form on the surface of fibroin fibers throughout the network by immersing the net into calcium and phosphate solutions alternatively. Conclusion A 3D porous NSF/nHAP scaffold can be fabricated by biomimetic mineralization and non-woven silk fibroin method. The novel NSF/nHAP scaffold has an excellent cytocompatibility for the growth of osteoblasts. Porous NSF/nHAP scaffold may be a hopeful biomaterial used in bone tissue engineering.

[Key words] fibroin; biomineralization; hydroxyapatite

理想支架材料的研究和运用是骨组织工程的重要内容。在骨组织工程中, 支架材料为新生骨组织提供生长所需的三维空间和力学支持。蚕丝丝素蛋白属于一种天然的纤维蛋白, 具有优良的生物相容性和力学性能, 可以缓慢降解, 在医药和生物技术等方面已有广泛应用^[1-2]。现阶段将蚕丝蛋白应用于骨组织工程的相关研究主要停留在丝素蛋白的生物

相容性方面, 合成复合材料方面的研究还十分有限^[3-4], 所合成材料的结构特性还不能满足骨组织工程支架材料或骨替代材料的要求。本实验旨在探讨丝素蛋白的矿化行为, 并通过仿生矿化来制备三维多孔非编织丝素蛋白纤维网/纳米羟磷灰石(non-woven silk fibroin/nano-hydroxyapatite net, NSF/nHAP)支架, 以期为其应用于骨组织工程奠定实验基础。

[收稿日期] 2007-11-05; [修回日期] 2008-02-25

[基金项目] 国家“863”计划资助项目(2002AA326080)

[作者简介] 赵 勇(1966-), 男, 四川人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 陈治清, Tel: 028-85502407

1 材料和方法

1.1 主要原料和仪器设备

蚕丝(双宫丝, 成都天友丝绸公司), 碳酸钠、

无水氯化钙、无水乙醇、体积分数为98%甲酸、无水甲醇、碳酸氢钠、三羟甲基胺基甲烷,均为分析纯级(成都科龙有限公司)。X射线衍射仪(荷兰飞利浦公司),傅里叶变换红外光谱仪(Vector22公司,德国)。

1.2 非编织丝素纤维网的制备

NSF的制备参考Armato等方法。蚕丝经脱胶、脱脂处理后,浸入含氯化钙的甲酸溶液。 CaCl_2 在甲酸中的质量浓度为0.01%。蚕丝与溶液之比为1 200。蚕丝振荡分散后,漂洗干净待用。

1.3 非编织丝素纤维网/纳米羟磷灰石复合材料的制备

NSF经新鲜配制的饱和氢氧化钙溶液($\text{pH}=12.4$)预矿化浸泡3 d后,采用交替矿化的方法仿生矿化NSF^[6]。基本步骤为:去离子水清洗后首先把样本浸泡于浓度为0.1 mol/L CaCl_2 Tris缓冲溶液中,37℃恒温水浴12 h,取出后再以去离子水洗涤,然后浸泡于浓度为0.1 mol/L Na_2HPO_4 Tris缓冲溶液,37℃恒温水浴12 h。此过程即为矿化的1个周期。参考交替矿化相关文献,分别于1、3、5、8个交替矿化周期结束后,采取样本,自然干燥,备检测。

1.4 复合材料的表征方法

使用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM),X射线衍射(X-ray diffraction, XRD),傅里叶变换红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)等检测材料的形貌、结构特性,并表征材料的孔隙率、孔径大小、吸水膨胀性。

1.4.1 XRD检测 测试条件为:Cu靶,K α 线,管电压40 kV,管电流40 mA,2 θ 从10°~60°进行扫描(步长为0.02°,设置时间为5 s)。

1.4.2 FTIR的检测 FTIR是鉴定化合物和测定分子结构的最有用方法之一。本实验用该法测试矿化产物类型并了解矿化过程中矿化物与丝素蛋白的相互作用。

1.4.3 孔隙度的检测 孔隙度的检测采用液体置换的方法。文献报道:正己烷很容易渗透到蚕丝蛋白纤维的孔隙中,而且渗透到孔隙的过程中不会引起蚕丝蛋白支架的皱缩或膨胀,因此适合用来测试蚕丝蛋白孔隙度。并用LSD(least significant difference)t检验对数据进行统计分析。

1.4.4 孔径的检测 用图像分析软件(Smile View Ver 2.1)测量NSF及NSF/nHAP的孔径大小。

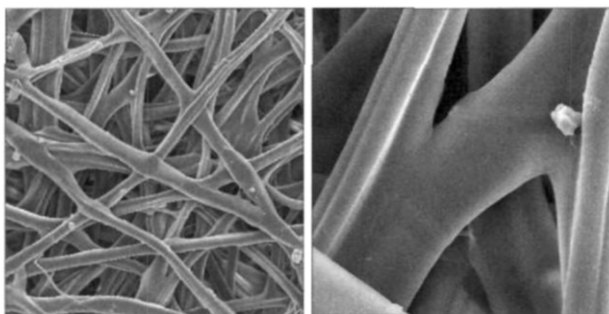
1.4.5 泡胀比和摄水率的检测 泡胀比(swelling ratio, SR)和摄水率(water uptaking, WU)反映了支架材料的吸水性或亲水性^[6]。检测方法:室温下,将NSF浸泡到蒸馏水中24 h,取出后去除多余水分,称

重得到NSF湿重。然后把样本真空干燥(65℃, 12 h),再进行称量得到NSF的干重。

2 结果

2.1 复合材料的形态、结构特征

NSF的多孔形貌见图1。蚕丝在甲酸溶液中分散均匀后,纤维表面在浸泡过程中发生部分溶解,相互交织。溶液蒸发后蚕丝沉积形成三维多孔的非编织网状结构。



左: SEM $\times 200$; 右: SEM $\times 1000$

图1 NSF的多孔形貌

Fig 1 The porous appearance of non-woven silk fibroin

NSF经 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 预矿化处理后,采用交替矿化法沉积磷灰石。矿化第1个周期,钙磷沉积物覆盖于NSF表面,晶体颗粒细小,分布均匀,排列密集。横截面的SEM图像可见:矿化后,沉积的晶体均匀分布在丝素蛋白纤维孔隙的内外表面(图2)。SEM显示,交替矿化法能够在NSF的孔隙外表和孔隙内部的丝素蛋白纤维表面形成并沉积矿化物。随着矿化周期的增加,矿化晶体在原有钙磷沉积物的基础上进一步沉积和生长,晶体颗粒逐渐变得有序和规则,最终形成针状矿化晶体,直径20~60 nm,长100~300 nm。随着进一步矿化,磷灰石晶体覆盖于整个NSF表面并层层堆积,充塞到NSF的孔隙当中。

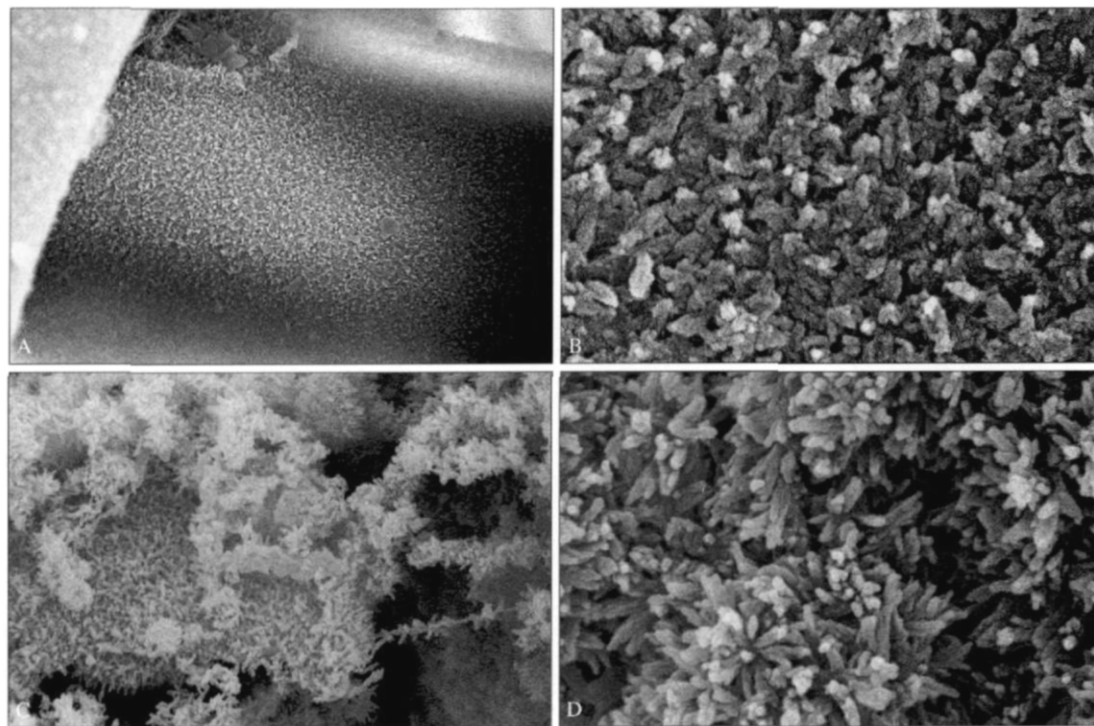
2.2 复合材料的XRD分析

随着矿化周期的增加,NSF羟磷灰石的特征峰逐渐加强。至矿化的第3个循环周期,2 $\theta=25^\circ$ 、2 $\theta=30^\circ$ ~35°等处,均可见磷灰石典型的[002]和[211]等衍射峰。经Rietveld法精修后^[7],可以观测到在交替矿化第3个周期以后,样本上沉积的磷灰石晶体数值即与其理论计算结果相吻合。

随着矿化周期的增加,晶胞参数在矿化过程中发生了一定的变化。形成的磷灰石晶胞参数值从 $a=(0.847\ 156 \pm 0.020\ 652)$ nm增加到 $(0.944\ 443 \pm 0.029\ 105)$ nm;从 $c=(0.624\ 015 \pm 0.019\ 046)$ nm增加到 $(0.688\ 871 \pm 0.042\ 617)$ nm;微晶尺度随着矿化周期的增加而显著增大: $a=(7.000\ 811 \pm 1.079\ 884)$ nm增加到 $(14.791\ 731 \pm 1.136\ 465)$ nm, $c=(15.444\ 452 \pm$

2.679 909) nm增加到(18.889 171 \pm 2.827 946) nm。微观应力从矿化初期的0.295 82%变化为0.012 67%。磷灰石结构随矿化过程逐渐趋向完善,微晶尺寸增加,微观应力减小。拟合结果数值判断的加权谱图

R指标(R-weighted pattern)在不同矿化时段均在理想值10%左右,说明矿化形成磷灰石,Rietveld结构的精修结果准确。



A: SEM \times 5 000; B: SEM \times 30 000; C: SEM \times 5 000; D: SEM \times 30 000

图2 NSF交替矿化第3个周期(A、B)以及第8个周期(C、D)形貌

Fig 2 The appearance after 3 cycles(A, B) and 8 cycles(C, D) of NSF mineralization

2.3 复合材料的FTIR分析

FTIR分析结果显示,交替矿化后,丝素蛋白的C-N键 $1\,065\text{ cm}^{-1}$ 处出现 PO_4^{3-} 的吸收峰,说明磷灰石的磷酸根与C-N基团结合,形成 PO_4^{3-} 基。处理次数增加,该处的 PO_4^{3-} 的吸收峰也随之显著增强。同时,在 603 cm^{-1} 和 564 cm^{-1} 区段呈现出显著而锐利的磷酸根特异性吸收双峰,表明磷灰石在仿生矿化的过程中与丝素蛋白结合,形成矿化沉积的晶体。FTIR结果说明磷灰石在仿生矿化的过程中与丝素蛋白相互作用,矿化沉积的晶体以磷酸根和C-N结合位点所形成的晶核为核心生长。

2.4 复合材料的孔隙度

交替矿化的过程中,孔隙度的变化趋势与矿化周期呈反变关系。未矿化时的孔隙度为77.88%,矿化的第3、5、8个周期,各组孔隙度检测的平均值依次为77.36%、74.59%、70.14%。经组间两两比较,各组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 复合材料的孔径

NSF矿化第3和第8周期的孔径测量结果见表1。统计分析表明,交替矿化第3和第8周期孔径减小,矿化后孔径的平均值与未矿化组之间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表1 NSF矿化第3和第8周期的孔径测量结果(μm)

Tab 1 The porosity result of NSF after 3 and 8 cycles of mineralization(μm)

项目	NSF的孔径		
	未矿化组	矿化第3周	矿化第8周
最大值	265.0	240.0	208.4
最小值	104.0	96.7	43.5
平均值	177.9	163.4	112.7
标准差	40.0	42.6	41.7

2.6 复合材料的泡胀比和吸水率

NSF矿化后,泡胀比和吸水率最后计算的平均值分别为4.56%和81.93%。

3 讨论

目前制备组织工程支架材料的方法虽然较多,但各种方法制备的支架在理化及生物学性能上都存在着一定的局限,利用丝素纤维设计制备组织工程支架,构建性能更好的骨组织工程多孔支架,仍然是未来的研究课题之一^[8-9]。

有关丝蛋白纤维的矿化,学者们曾尝试了不同的矿化方法。由于丝蛋白纤维的种类不同,矿化的方法不同,所得的结果也各有差别。

Takeuchi等^[3]采用1.5倍模拟体液(simulated body fluid, SBF),对未经脱胶处理的蚕丝生丝、经脱胶处理的蚕丝以及丝胶蛋白膜3种基质材料进行仿生矿化的对比。结果发现,未经脱胶处理的蚕丝生丝经CaCl₂溶液预矿化后,在1.5倍SBF中浸泡7 d,即可在生丝的表面沉积磷灰石。磷灰石沉积的量与预矿化液的钙离子浓度有关,沉积量随着预矿化时使用的CaCl₂溶液浓度的增高而增多。丝胶蛋白膜也能沉积磷灰石。而蚕丝经脱胶后的丝素蛋白基质,即使在仿生矿化前使用浓度为5 mol/L的CaCl₂预矿化,在1.5×SBF溶液中浸泡1周也未见磷灰石的形成。因此认为:丝胶蛋白能促进仿生矿化过程中磷灰石的沉积;预矿化处理有利于提高磷灰石的沉积量;在1.5倍SBF条件下,不能实现对丝素蛋白的仿生矿化。究其原因是酸性氨基酸的含量差异所致。丝胶中含有丰富的酸性氨基酸(天门冬氨酸和谷氨酸)。酸性氨基酸中的羧基易于与钙离子结合,因而有利于在基质表面异相成核,促进磷灰石的沉积。

尽管丝胶蛋白能够促进磷灰石的仿生矿化沉积,有利于合成有机物复合材料,但是由于丝胶存在自身的免疫原性,植入体内后会引发机体的变态反应,所以丝胶不能作为骨的替代材料或骨组织工程材料。与此相反,丝素蛋白却没有这种抗原性,植入体内后不会引发机体的变态反应,同时还具备丝蛋白作为生物材料的一般优点(可降解性,降解终产物为氨基酸,具有较好的机械强度),因此,在骨缺损修复材料的研究中,重新选择一种对丝素蛋白进行仿生矿化的可行方法,是合成新型的丝素蛋白复合材料的重要内容。

本实验所采用的方法能够快速实现丝素蛋白纤维的矿化。在交替矿化的第1个周期(24 h),即可在NSF的表面沉积磷灰石,纳米级的晶体均匀覆盖于SF纤维的表面。笔者在该项研究的初期经实验证实,交替矿化方法在SF膜上仍可实现生物矿化。SEM、XRD、FTIR等检测结果均说明,NSF交替矿化比SF膜的矿化速度更快,矿化循环进行的第3个周期,NSF上即可形成矿化完善的羟磷灰石。虽然FTIR所示的NSF和SF膜在分子结构上差别不大,但两者的宏观结构和表面的微观形貌的差异,可能是导致这一现象的主要原因。

在组织工程中,材料的孔隙度和水的结合性能是评价生物材料特性的两个重要方面。本实验的孔隙测量结果,矿化前三维非编织丝素蛋白孔隙度为77.88%,孔径大小为(177.90±40.0) μm。晶体沉积

的量随矿化周期的增加而增加。孔隙度与矿化周期为反变关系。交替矿化的第3个周期所得的三维多孔复合支架材料,孔隙度约为76%,孔径为(163.4±42.6) μm。NSF浸泡于蒸馏水24 h后,摄水率为81.93%,材料具有良好的亲水性。纳米羟磷灰石的表面结构对于骨组织工程中骨细胞的生物相容性,也是有益的^[10-11]。三维NSF支架材料的基本特性符合骨组织工程的基本要求。有关该三维非均匀多孔的特性对仿生矿化沉积的影响以及这种支架更为详尽的理化性能,尤其是生物学方面的特性,尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials[J]. Biomaterials, 2003, 24(3):401-416.
 - [2] Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL. Porous 3-D scaffolds from re-generated silk fibroin[J]. Biomacromolecules, 2004, 5(3):718-726.
 - [3] Takeuchi A, Ohtsuki C, Miyazaki T, et al. Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 65(2):283-289.
 - [4] Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, et al. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials[J]. Biomaterials, 2006, 27(36):6064-6082.
 - [5] Furuzono T, Taguchi T, Kishida A, et al. Preparation and characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 50(3):344-352.
 - [6] Wilson RM, Elliott JC, Dowker SE, et al. Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite[J]. Biomaterials, 2005, 26(11):1317-1327.
 - [7] Chern JM, Lee WF, Hsieh MY. Preparation and swelling characterization of poly(n-isopropylacrylamide)-based porous hydrogels[J]. J Appl Polym Sci, 2004, 92(6):3651-3658.
 - [8] Kim UJ, Park J, Kim HJ, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin[J]. Biomaterials, 2005, 26(15):2775-2785.
 - [9] Uebersax L, Hagenmuller H, Hofmann S, et al. Effect of scaffold design on bone morphology in vitro[J]. Tissue Eng, 2006, 12(12):3417-3429.
 - [10] Furuzono T, Yasuda S, Kimura T, et al. Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion properties of a three-dimensional scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device[J]. J Artif Organs, 2004, 7(3):137-144.
 - [11] 温波, 陈治清, 蒋引珊, 等. 纳米羟基磷灰石骨细胞相容性的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(6):456-459.
- WEN Bo, CHEN Zhi-qing, JIANG Yin-shan, et al. Cytocompatibility of nanophase hydroxyapatite ceramics[J]. West China J Stomatol, 2004, 22(6):456-459.

(本文编辑 汤亚玲)