纳米纤维家蚕丝蛋白软支架制备及性能*

宁洪艳[1**] 韩宏岩[1] 吕 强[2] 许维岸[1***]

（1. 苏州大学基础医学与生物科学学院，苏州 215123；2. 现代丝绸国家工程实验室/苏州大学，苏州 215123）

摘 要 **【目的】** 通过调控蚕丝蛋白溶液的状态，可实现对蚕丝蛋白支架的力学及结构性能的调控，获得适宜于内皮细胞生长的支架材料，解决复杂组织修复中由于不利于组织长入和血管生长而导致组织功能无法修复的问题。**【方法】** 向新鲜蚕丝蛋白溶液中添加蚕丝蛋白纳米纤维增加冻干支架的成孔性，基于丝蛋白自组装原理对丝素蛋白溶液进行浓缩处理增加分子间亲水作用力，获得不同状态的丝蛋白溶液，最后冷冻干燥，制备支架，观察蚕丝蛋白状态变化对支架性能的影响。**【结果】** 实验结果表明，蚕丝蛋白溶液经浓缩处理可以降低支架 Silk II 的形成，获得较柔软支架。**【结论】** 添加蚕丝蛋白纳米纤维并浓缩处理可以获得模量适宜内皮细胞生长的支架材料，为不同软组织的修复提供了良好的基质材料。

关键词 蚕丝素蛋白，软组织，力学性能，冷冻干燥，二级结构

Preparation and properties of nano-fiber, soft *Bombyx mori* silk protein scaffolds

NING Hong-Yan[1**] HAN Hong-Yan[1] LÜ Qiang[2] XU Wei-An[1***]

(1. School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. National Engineering Laboratory for Modern Silk, College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract **[Objectives]** Regulating the nature of silk protein solution allows the control of the mechanical and structural properties of silk protein scaffolds suitable for the growth of endothelial cells, and solves the problem of engineering thick complex organs and tissues that require functional vasculature. **[Methods]** To study the effect of different silk protein scaffold properties nanofiber-assisted lyophilization was used to restrain separate lamella formation in silk scaffolds. In addition, the structure of silk was controlled by adjusting silk-water interactions, thereby obtaining different silk protein solutions, and through preparing scaffolds by lyophilization. **[Results]** Increasing silk-water interactions resulted in reduced silk II (β-sheet crystal) formation, which resulted in a decrease in scaffold formation. **[Conclusion]** Scaffolds with a suitable stiffness and porous structure for the growth of endothelial cells were obtained by increasing the solution concentration. These also provided a promising matrix for different soft tissue engineering and regenerative medicine.

Key words silk fibroin; soft tissue, stiffness, lyophilization, secondary structure

组织工程旨在恢复重建受损组织或器官的结构和功能完整性，而现今还不能解决复杂组织器官的修复。大组织、复杂器官不像简单的薄层组织可以通过小分子扩散获得营养物质和氧气，它们需要通过庞大的血管系统才能获得营养物质和氧气。修复损伤的大组织和复杂器官的生物材料必须具有促血管形成的能力才能使大组织和复杂器官具有生物功能。

生物材料的力学性能对细胞与材料的相互作用具有重要的影响。细胞通过感知材料的力学信号，将其转换为生物学信号，进而影响细胞的生物学行为。相关研究表明，干细胞能够对材料

* 资助项目 Supported projects：国家自然科学基金（No. 81071306）

**第一作者 First author，E-mail：ninghongyan1016@163.com

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：xuweian@suda.edu.cn

收稿日期 Received：2015-03-20，接受日期 Accepted：2015-05-14

的力学性能做出响应，从而转变成同力学性能匹配的功能细胞，实现定向分化。Engler 等（2006）证实了基质的弹性对人的骨髓间充质干细胞的分化具有诱导作用。研究证明，基质模量为 0.1~1 kPa 时，骨髓间充质干细胞最易分化为神经细胞。当基质模量为 1~7 kPa 时，骨髓间充质干细胞最易分化为内皮细胞。基质模量为 8~17 kPa 时，骨髓间充质干细胞易向成肌细胞方向分化，而基质模量为 34 kPa 时，骨髓间充质干细胞易向成骨细胞方向分化（Mathur *et al.*，2001；Pek *et al.*，2010）。因此，调控支架的力学性能是组织工程研究中必须解决的问题。

家蚕是重要的经济昆虫，人们对它的研究一直在进行（Ruan *et al.*，2005），家蚕丝具有优良的机械性能，其作为组织工程用材料具有天然的优势。家蚕丝素材料具有良好的生物相容性、可控的生物降解性等优点，便于组织工程材料的设计调控。本研究通过添加蚕丝蛋白纳米纤维和缓慢浓缩调整生物材料的力学性，以期可以制作出能使干细胞向内皮细胞分化，适合于血管内皮细胞生长的支架材料。

1 材料与方法

1.1 材料

家蚕生丝（广西贵盛茧丝工贸有限公司）、无水碳酸钠（AR 上海国药集团化学试剂有限公司）、溴化锂（CP 南通科洁化工有限公司）、透析袋（截流分子量～3 500 美国光谱医学）等。

1.2 仪器

S4800 型扫描电子显微镜（SEM，日本，Hitachi）；Allegra-64R 高速离心机（美国，Beckman Coulter）；Nicolet 5700 FTIR 型傅立叶变换红外光谱仪（FTIR，美国，Nicolet 公司）；NanoZS90 粒径分析仪（英国，Malvern）；DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱（中国，上海精宏实验设备有限公司）；HF Super PW 系列超纯水系统（香港，Heal Force）；FD-1A-50 型冷冻干燥机；HF Super PW 系列超纯水系统（香港，Heal Force）；蓝盖瓶、磁力搅拌转子、分样筛、烧杯、塑料称量皿、玻璃棒等。

1.3 实验方法

1.3.1 丝素溶液的制备 将 2 L 去离子水烧热至沸腾，加入 4.24 g 碳酸钠，5 g 家蚕生丝。煮沸 30 min 去离子水清洗干净、烘干后，用 9.3 mol/L LiBr 溶液溶解。丝素完全溶解后将溶液装入透析袋，去离子水透析 72 h 后，9 000 r/min 离心 20 min，重复两次。测定丝素溶液的质量分数。

1.3.2 单纯丝蛋白溶液浓缩处理及纳米线水溶液的制备 取丝素溶液置于烧杯中，置于 60℃恒温箱内快速浓缩至原体积的一半时，再转入培养皿中通风橱内缓慢浓缩至质量分数 25%左右，这种浓缩方法得到的溶液记为缓慢浓缩液（SS）。另取部分溶液置于烧杯中，60℃恒温箱内快速浓缩至质量分数 25%左右，记为快速浓缩液（FS）。

缓慢浓缩液放入 4℃冰箱储存，2 d 后将浓缩液稀释到 0.5%，充分均匀搅拌后放入恒温箱内孵育直至形成半透明凝胶状的纳米纤维水溶液，丝蛋白纳米纤维的长度 1 μm 左右，直径 10~20 nm，富含 β-sheet 结构，与丝蛋白溶液混合有助于冻干支架成孔性提高（白树猛，2013；Bai *et al.*，2014）。

1.3.3 支架的制备 将单纯丝素蛋白溶液与丝蛋白纳米纤维溶液以丝素蛋白干重比 15∶1 混合稀释形成 2 wt %混合液，充分均匀搅拌后，加入模具中，置于 －20℃冷冻 12 h。再用真空干燥机干燥 48 h。即可得到丝素多孔支架。由丝蛋白纳米纤维溶液与新鲜丝素溶液、快速浓缩溶液、缓慢浓缩溶液所制得的支架分别记为 Ff-S, FSf-S, SSf-S。

1.3.4 溶液及支架性能表征

1.3.4.1 粒径 样品粒径通过 Zetasizer 粒径仪进行测试。1.5 mL 样品溶液加入到比色皿中，在室温条件下进行动态光散射扫描（Dynamic light scattering，DLS）测试。

1.3.4.2 傅立叶转换红外线光谱（FTIR） 将每种样品用刀片除去表层后切片，取 1~2 mm 厚的切片进行压片后用 Nicolet 5700 FI-IR 型傅立叶变换红外光谱仪的表面全反射模式测试，波数范

围为 400~4 000 cm^{-1}，以此检测各样品的二级结构。为进一步确定不同二级结构的含量，我们采用 PeakFit 软件对丝素蛋白酰胺 I 1 600~1 700 cm^{-1} 处的红外吸收值进行分析，并选用 Gausse 函数对谱图进行拟合，相应结果见表 1 所示（Nehrer *et al.*，1997）。

1.3.4.3　扫描电子显微镜（SEM）　每种支架切取 3 mm×2 mm 大小的方形薄片，用导电胶粘在圆台上。20 mA 喷金 90 s。用 S-4800 型扫描电镜测试，工作电压 3 kV。

1.3.4.4　机械性能　支架样品高度 9 mm，直径 14 mm。重力传感器为 100 N 的拉力强度试验机来测试，水平头速度设定为 2 mm/min。压缩位移 - 6 mm。每种支架做 3 个重复样。

2　结果与分析

2.1　丝素溶液丝素蛋白分子大小状态的变化

我们通过 Zetasizer 粒径仪检测丝蛋白分子组成颗粒的直径大小平均值（d）称为等效粒径或粒度分布。单纯丝素蛋白溶液浓缩处理后丝素蛋白分子的粒径图像如图 1(左图)，d(F)＜d(FS)＜d(SS)，经浓缩处理后溶液中丝蛋白颗粒的粒径增大，说明丝蛋白纳米小球之间发生团聚，形成更大的纳米颗粒。对溶液进行缓慢浓缩处理时，丝素蛋白有足够的时间进行组装，形成比快速浓缩处理更大的微球结构。当丝素溶液中加入纳米纤维后浓缩，结果如图 1(右图)，d(Ff)＜d(FSf)＜d(SSf)，3 种溶液纳米球的粒径由于加入纳米纤维明显增大，且粒径增大的趋势，与不加纳米纤维时各溶液一样。

2.2　混合溶液制备的多孔支架水溶解前后二级结构的变化

由傅立叶变换红外光谱仪测定的结果可知，新鲜丝素和纳米纤维混合溶液的冻干支架 Ff-S、快速浓缩液和纳米纤维混合溶液的冻干支架 FSf-S、缓慢浓缩液和纳米纤维混合溶液的冻干支架、SSf-S 支架均在 1 645 cm^{-1} 左右有酰胺 I 带的吸收峰，对应无规结构。而水溶解 24 h 后，在 1 634 cm^{-1} 处出现了 Silk II 结构特征吸收峰。使用 PeakFit 软件对红外曲线进行分峰处理结果（表 1），Ff-S 支架的 Silk II 结构的含量是 42.3%，FSf-S 与 SSf-S 支架中 Silk II 含量分别为 31.4% 和 35.2%，浓缩处理加入纳米纤维混合溶液制得的支架中 Silk II 结构的含量比新鲜溶液加入纳

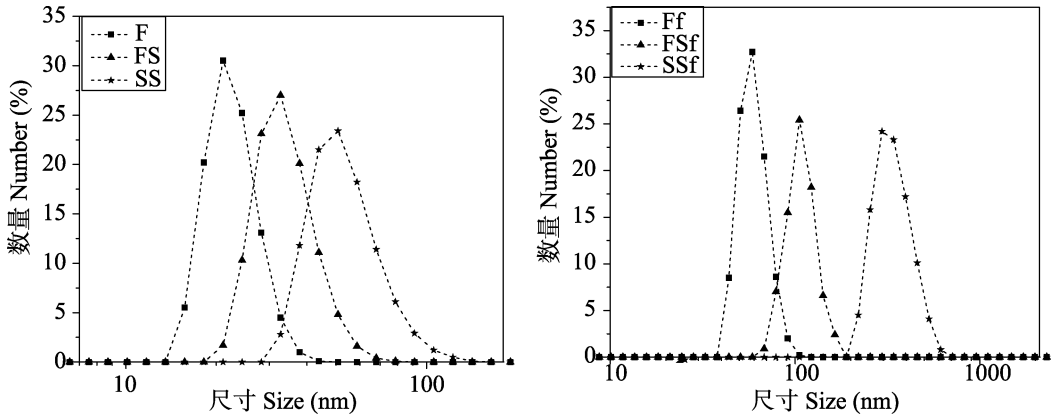

图 1　浓缩处理后丝素溶液的粒径图像

Fig. 1　Fibroin particle size image of concentrated silk fibroin solution

左边：丝蛋白溶液。F. 新鲜丝素溶液；FS. 快速浓缩溶液；SS. 缓慢浓缩溶液。右边：丝蛋白溶液与纳米纤维混合溶液。Ff. 新鲜丝素溶液和纳米纤维混合液；FSf. 快速浓缩丝素溶液和纳米纤维混合液；SSf. 缓慢浓缩丝素溶液和纳米纤维混合液。

The left: Silk solutions. F. Fresh silk solution; FS. Fast concentrated silk solution; SS. Slow concentrated silk solution. The right: Fibroin solution and nano-fiber mixed solution. Ff. Fesh silk solution and nano-fiber mixed solution; FSf. Fast concentrated silk solution and nano-fiber mixed solution; SSf. Slow concentrated silk solution and nano-fiber mixed solution.

表 1 丝素蛋白支架材料中各二级结构的含量

Table 1 FTIR determination of secondary structures of different silk scaffolds through fourier self-deconvolution (FSD) of the amide I region

	β-折叠 β-sheet (%)	无规卷曲 Random coil (%)	α-螺旋 α-helix (%)	β-转角 β-turn (%)
FS	42.3±1.3	30.2±1.5	9.1±0.3	21.8±2.2
FSf-S	31.4±1.9	34.8±1.1	11.8±1.7	23.0±0.8
SSf-S	35.2±2.3	33.2±1.3	10.1±1.9	22.6±1.1

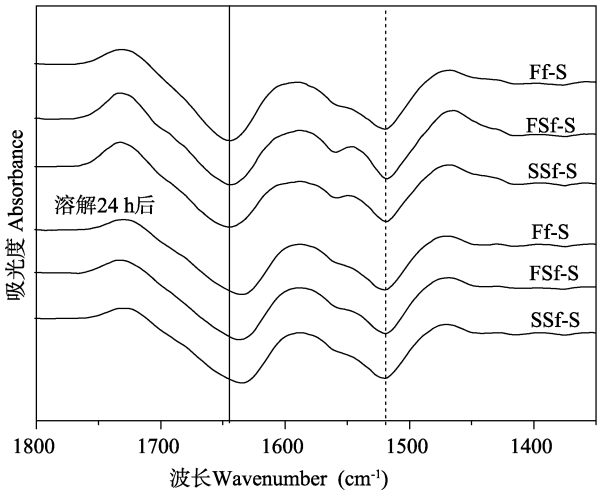

图 2 不同处理支架的 FTIR 曲线

Fig. 2 FTIR characterization of silk scaffolds prepared through different processes

Ff-S. 新鲜丝素溶液和纳米纤维混合液的冻干支架；FSf-S. 快速浓缩溶液和纳米纤维混合液的冻干支架；SSf-S. 缓慢浓缩溶液和纳米纤维混合液的冻干支架。

Ff-S. Silk scaffolds derived from silk solution with 6.7% silk nanofiber; FSf-S. Silk scaffolds derived from fast concentrated silk solution with 6.7% silk nanofiber; SSf-S. Silk scaffolds derived from slow concentrated silk solution with 6.7% silk nanofiber.

米纤维混合溶液制得的支架中 Silk II 结构的含量显著降低。由于纳米纤维的加入使得两种浓缩溶液获得的支架中 Silk II 结构的含量无显著性差异。结果说明：通过调节亲水作用可以抑制丝素蛋白支架的 Silk II 结构的形成。

2.3 水溶解后多孔支架的外观形貌

由支架水溶解 24 h 后的 SEM 图像可知，3 种支架孔壁上都具有纳米线结构，水溶解后，各支架的孔结构保持，纳米纤维的加入提高了支架的孔隙率，溶液浓缩处理可提高支架的不溶性，提高稳定性。

2.4 支架的机械性能

如图 4 所示，Ff-S 的湿态模量为（9.62±1.65）kPa，快速浓缩处理后，FSf-S 模量降为（6.50±0.66）kPa，而缓慢浓缩处理后的 SSf-S 支架模量下降为（7.63±1.85）kPa，FSf-S 与 SSf-S 支架模量两者无显著性差异。实验结果表明，浓缩溶液比新鲜溶液制作的支架模量低，浓缩处理确实降低了 β-sheet 含量，降低了支架模量。通过调节溶液的亲水作用，可以实现对丝素蛋白支架力学性能的调控。

3 讨论

在新鲜蚕丝素溶液中，丝素蛋白以纳米小球的形式稳定存在。对丝素溶液进行浓缩处理时，随着水分的蒸发，溶液的体积减小，丝素纳米小球之间的间距被迫压缩，静电力等与距离有关的力产生变化，丝素分子原有的力平衡遭到破坏，丝素蛋白重新自组装。在有足够能量的条件下（如 60℃）纳米小球彼此融合，团聚成更大的纳米小球，直至达到新的平衡，重新形成稳定结构，这是一个丝素蛋白自组装的过程（Lu *et al.*，2012）。对溶液进行缓慢浓缩处理时，丝素蛋白有足够的时间进行组装，最终所形成的微球的结构更为规整，亲水性更强。而快速浓缩时，由于缺少足够的时间进行组装，丝素微球的结构不够规整，最终的亲水性也较差。

用于组织工程的三维多孔材料必须具有较高的孔隙率，具有相互连通的三维结构，以便于细胞的增殖、迁移，为细胞的生长提供足够的营养物质。加入纳米纤维后，提高了支架的成孔性（Bai *et al.*，2013；Han *et al.*，2014），支架孔壁上具有纳米纤维结构，大大增加了支架的比表

面积。

研究表明，培养基质的模量影响干细胞的生长、增殖与分化方向（Pek *et al.*，2010）。普通的甲醇、盐析支架中 Silk II 含量较高，导致支架硬度大，脆性高，机械性能不易调控（Her *et al.*，2013；Han *et al.*，2014）。通过增加亲水相互作

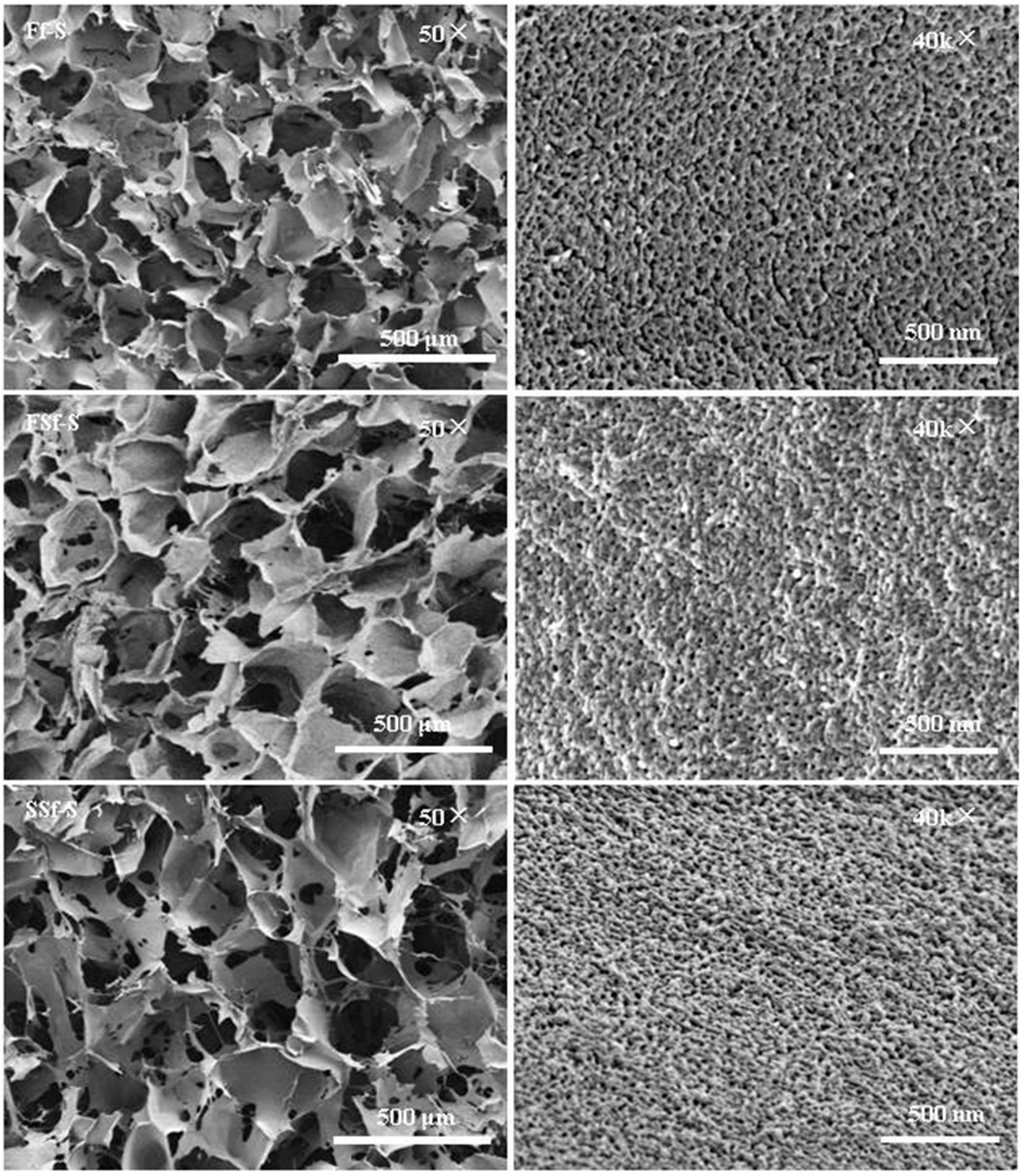

图 3　支架水中溶解 24 h 后的 SEM 图像

Fig. 3　SEM morphologies of different silk scaffolds dissolved in water after 24 hours

Ff-S. 新鲜丝素溶液和纳米纤维混合液的冻干支架低倍镜下形态扫描图；FSf-S. 快速浓缩溶液和纳米纤维混合液的冻干支架低倍镜下形态扫描图；SSf-S. 缓慢浓缩溶液和纳米纤维混合液的冻干支架低倍镜下形态扫描图。右图为左边图的高倍镜下形态扫描图。

Ff-S. Silk scaffolds derived from silk solution with 6.7% silk nanofiber; FSf-S. Silk scaffolds derived from fast concentrated silk solution with 6.7% silk nanofiber; SSf-S. Silk scaffolds derived from slow concentrated silk solution with 6.7% silk nanofiber. The right images show the nanoscaled topography of pore wall with high magnification.

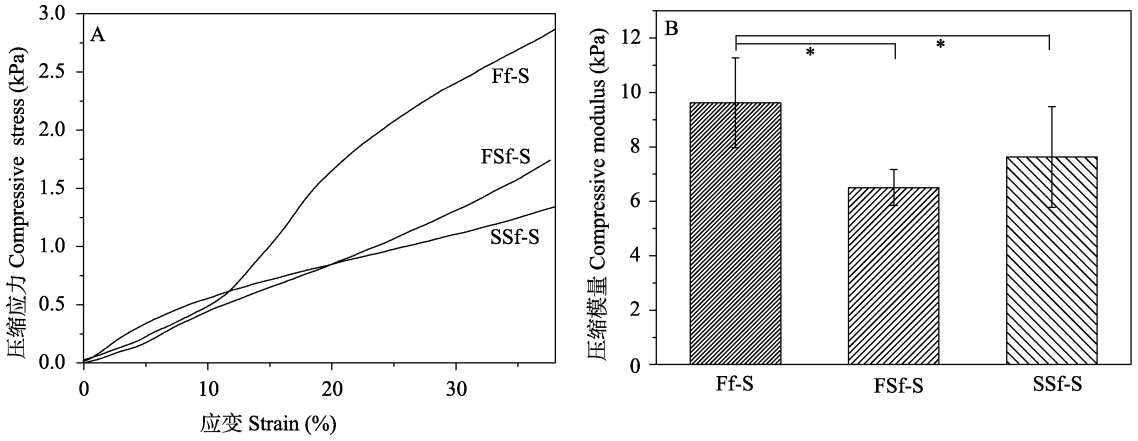

图 4　支架湿态的应力应变特征曲线（**A**）和支架湿态的压缩模量（B）

Fig. 4　Typical stress-strain curves (A) and compressive modulus (B) of the scaffolds were measured in wet conditions

Ff-S. 新鲜丝素溶液和纳米纤维混合液的冻干支架；FSf-S. 快速浓缩溶液和纳米纤维混合液的冻干支架；SSf-S. 缓慢浓缩溶液和纳米纤维混合液的冻干支架。*表示两者间具有显著性差异（P<0.05）。

Ff-S. Silk scaffolds derived from silk solution with 6.7% silk nanofiber; FSf-S. Silk scaffolds derived from fast concentrated silk solution with 6.7% silk nanofiber; SSf-S. Silk scaffolds derived from slow concentrated silk solution with 6.7% silk nanofiber. * statistically significant at 0.05 level.

用抑制 Silk II 形成，就能得到模量较低的支架材料用于软组织修复。当基质模量为 1~7 kPa 时，骨髓间充质干细胞最易分化为内皮细胞（Mathur *et al.*，2001；Wingate *et al.*，2012）。浓缩处理后支架的模量接近此范围。支架机械性能的不同使其分别适于不同的组织培养。随着研究者对基于特定组织再生的规律对材料进行个性化设计的重视，基质力学性能的灵活调控愈加重要。本实验证明，通过改变丝素溶液的亲水作用可以调控丝素蛋白支架的模量。

参考文献 (Referencers)

Bai S, Liu S, Zhang C, Xu W, Lu Q, Han H, Kaplan DL, Zhu H, 2013. Controllable transition of silk fibroin nanostructures: an insight into in vitro silk self-assembly process. *Acta Biomaterialia*, 9(8): 7806–7813.

Bai S, Zhang X, Lu Q, Sheng W, Liu L, Dong B, Kaplan DL, Zhu H, 2014. Reversible hydrogel−solution system of silk with high beta-sheet content. *Biomacromolecules*, 15: 3044–3051.

Bai SM, 2013. Regulation of silk fibroin nanofibrils and application in tissue repairing biomaterials. Doctoral dissertation. Suzhou: Soochow University. [白树猛, 2013. 家蚕丝素蛋白纳米纤维的调控及其在生物组织修复材料中的应用. 博士学位论文. 苏州: 苏州大学.]

Engler, AJ, Sen, S, Sweeney, HL, Discher, DE, 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4)：677–689.

Han F, Liu S, Liu X, Pei Y, Bai S, Zhao H, Lu Q, Ma F, Kaplan DL, Zhu H, 2014. Woven silk fabric-reinforced silk nanofibrous scaffolds for regenerating load-bearing soft tissues. *Acta Biomaterialia*, 10(2): 921–930.

Her GJ, Wu HC, Chen MH, Chen MY, Chang SC, Wang TW, 2013. Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lieages. *Acta Biomaterialia*, 9(2): 5170–5180.

Lu Q, Zhu HS, Zhang CC, Zhang F, Zhang B, Kaplan DL, 2012. Silk self-assembly mechanisms and control from thermodynamics to kinetics. *Biomacromolecules*, 13: 826–832.

Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus, WE, Truskey, GA, 2001. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *Journal of Biomecanics,* 34(12): 1545–1553.

Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M, 1997. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, 18(11): 769–776.

Pek YS, Wan A CA, Ying JY, 2010. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. *Biomaterials*, 31(3): 385–391.

Ruan LW, Ye XQ, Gui MY, 2005. Advances in the research on silkworm microsatellite DNA. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 42(1): 14–17. [阮灵伟, 叶向群, 桂慕燕, 家蚕微卫星 DNA 的研究进展. 应用昆虫学报, 42(1): 14–17.]

Wingate K, Bonani W, Tan Y, Bryan SJ, Tan W, 2012. Compressive elasticity of three-dimensional nanofiber matrix directs mesenchymal stem cell differentiation to vascular cells with endothelial or smooth muscle cell markers. *Acta biomaterialia*, 8(4): 1440–1449.