

文章编号:0253-9721(2008)03-0001-05

静电纺再生丝素/明胶纳米纤维的结构与性能

鲍犇犇¹, 王曙东¹, 张幼珠¹, 尹桂波¹, 吴佳林¹, 施德兵², 董智慧², 符伟国²

(1. 苏州大学 材料工程学院, 江苏 苏州 215021; 2. 复旦大学 附属中山医院, 上海 200032)

摘要 以质量分数为98%的甲酸为溶剂,将再生丝素与明胶以质量比70:30进行共混静电纺丝。研究纺丝液质量分数及乙醇处理对纤维膜的结构及力学、溶解性能等的影响;测定不同纺丝液质量分数及不同厚度下纤维膜的孔隙率及孔径;在纤维膜上进行小鼠成纤维细胞(L929)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养实验。结果表明:随着纺丝液质量分数的提高或经乙醇处理后,丝素 β 化程度提高,纤维结晶度增大,溶失率减小,拉伸强度增大;随着纺丝液质量分数的提高,纤维膜的孔隙率减小,孔径增大,厚度增加时,纤维膜的孔隙率及孔径均减小;L929及HUVECs均能够在纳米纤维膜上黏附、生长和增殖。

关键词 再生丝素;明胶;静电纺丝;结构;力学性能;孔隙率;细胞培养

中图分类号:TS 102.512 文献标识码:A

Microstructure and property of electrospun regenerated silk fibroin/gelatin nanofibers

BAO Weiwei¹, WANG Shudong¹, ZHANG Youzhu¹, YIN Guibo¹, WU Jialin¹,
SHI Debing², DONG Zhihui², FU Weiguo²

(1. School of Material Engineering, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215021, China;

2. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The electrospinning of regenerated silk fibroin (SF) and gelatin blended with the composition ratio 70:30 was performed with 98% formic acid as spinning solvent. The influence of mass concentration and ethanol treatment on the microstructure, mechanical properties and solubility of electrospun SF/gelatin nanofibers was investigated. The pore diameter and porosity of SF/gelatin fiber membrane with different mass concentrations and different thickness were measured. The mouse fibroblasts and human umbilic vein endothelium cells were seed on SF/gelatin nanofibers scaffold. The results showed that: along with the mass concentrations of spinning solution increasing and ethanol treating, the content of β -sheet of SF in electrospun SF/gelatin nanofibers was increased, crystallinity increased, water-dissolved rate declined, and tensile strength enhanced of electrospun SF/gelatin nanofibers; as the mass concentration of spinning solution increased, the pore diameter of electrospun SF/gelatin nanofibers was decreased and the porosity was increased; both the pore diameter and porosity were decreased with the increase of the thickness of electrospun SF/gelatin nanofibers. The SF/gelatin nanofibers scaffold may be a good candidate for both L929 and HUVECs spreading and proliferating.

Key words regenerated silk fibroin; gelatin; electrospinning; microstructure; mechanical property; porosity; cell seeding

采用静电纺丝法制备的纳米纤维膜具有比表面
积高和孔隙率高等特点,在生物材料领域有广泛的

应用前景。丝素和明胶具有良好的生物相容性,可
作为生物医用材料。明胶具有优异的生物可降解性

收稿日期:2007-04-18 修回日期:2007-07-09

基金项目:江苏省高校重点实验室开放研究课题(S8115033)

作者简介:鲍犇犇(1984—),男,硕士生。主要研究方向为纳米纤维及功能纤维制品的研究。张幼珠,通讯作者,E-mail:
zhangyouzhu@suda.edu.cn。

及促进细胞黏附和生长的性能^[1-2]。文献[3]研究了静电纺丝工艺条件对丝素/明胶共混纳米纤维形貌及直径的影响。

本文将再生丝素和明胶以 70:30 的质量比溶解于 98% 的甲酸中制得纺丝液, 然后进行静电纺丝, 制备再生丝素/明胶共混纳米纤维。通过红外光谱(IR)和热分析(DTA)法研究纺丝液质量分数及乙醇处理对纳米纤维结构的影响; 研究纳米纤维膜的溶解、力学性能及孔隙率、孔径; 对纳米纤维膜进行小鼠成纤维细胞(L929)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)培养试验, 为使其作为组织工程支架材料提供试验基础资料。

1 试 验

1.1 静电纺共混纳米纤维的制备

将桑蚕废丝置于质量分数为 0.1% 的 Na_2CO_3 水溶液中煮沸并清洗脱除丝胶, 将纯丝素用 $\text{CaCl}_2/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液(物质的量比为 1:2:8)于 $(78 \pm 2)^\circ\text{C}$ 溶解(浴比 1:10), 溶液经透析、过滤后置于 ABS 盘内在室温下干燥成再生丝素膜。将该膜及明胶以 70:30 的质量比溶解于 98% 甲酸中, 配制不同质量分数的纺丝液。将纺丝液倒入纺丝管内(管口径为 0.7 mm), 阳极插入纺丝管内, 阴极与收集网相接, 在电压为 30 kV, 极板间距离为 13 cm 的条件下进行静电纺丝。

1.2 共混纳米纤维的结构与性能测试

1.2.1 微细结构

将制得的纤维膜及经乙醇处理后的纤维膜剪成粉末再与 KBr 混合研磨后压片, 用美国 PE 公司 Nicolet 5700 型红外光谱仪测定其红外光谱, 测量范围为 $4\ 000 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$ 。用美国 PE 公司 Diamond 5700 型热分析仪测定纳米纤维膜的 DTA 图谱, 测试条件及扫描范围: $40 \sim 400^\circ\text{C}$, 升温速度 $10^\circ\text{C}/\text{min}$, 氮气保护, 流量 $120\ \text{mL}/\text{min}$ 。

1.2.2 溶失率

将制得的纤维膜及经乙醇处理后的纤维膜以 1:100 的浴比, 置于 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 恒温水中溶解 1 h, 在 50°C 烘干至恒重, 测其溶解前后的质量 W_0 、 W , 每个试样平行测 3 次, 溶失率按下式计算。

$$\text{溶失率} = [(W_0 - W)/W_0] \times 100\%$$

1.2.3 力学性能

将纤维膜制成 $10\ \text{mm} \times 50\ \text{mm}$ 的拉伸样条, 样品

在恒温恒湿条件 (23°C , 70%) 下平衡 24 h 后, 在 Instron3365 型强伸度测试仪上进行拉伸试验, 其中膜的厚度为 $(0.23 \pm 0.05)\ \text{mm}$, 夹持长度为 30 mm, 拉伸速度为 $20\ \text{mm}/\text{min}$ 。

1.2.4 膜的孔径和孔隙率

测定不同条件下纤维膜的密度 ρ , 丝素/明胶按质量比为 70:30 比例混合的标准密度 ρ_0 为 $1.1\ \text{g}/\text{cm}^3$, 按照公式计算出样品的孔隙率 ϵ 。利用 SEM 照片计算纤维膜的孔隙面积, 再把面积拟合成圆, 求得孔径大小^[4-5]。孔隙率计算公式如下。

$$\epsilon = (1 - \rho/\rho_0) \times 100\%$$

1.2.5 细胞培养试验

小鼠成纤维细胞(L929)和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)用含 10% 小牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI1640 完全培养基培养, 置于 5% CO_2 、饱和湿度、 37°C 培养箱内, 取对数生长期细胞进行消化传代, 连续培养备用。

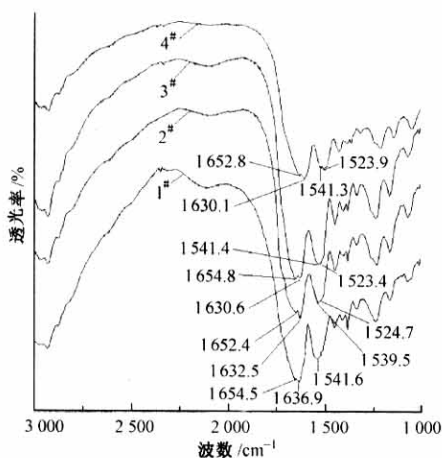
将纤维膜裁剪成直径为 15 mm 的圆片, 经 γ 射线照射灭菌, 转移到 24 孔培养板中, 用 5×10^3 个细胞/mL DMEM 悬浮液接种纤维膜上。培养 24 h 后, 用显微镜(Olympus CKX31, 日本)观察并拍照。培养 5 d 后, 用 PBS 冲洗纤维膜除去没有黏附的细胞, 然后在 4°C 下用 3% 的戊二醛固定, 并经梯度酒精系列脱水, 乙腈置换, 真空干燥, 表面喷金后进行 SEM(日立 S-570, 日本)观察。

2 结果与讨论

2.1 丝素/明胶纳米纤维的微细结构

利用红外光谱酰胺 I 和酰胺 II 特征谱带表征丝素蛋白的二级结构。丝素蛋白特定构象时酰胺 I 和酰胺 II 在红外光谱中的经验值^[6]: 无规构象丝素的酰胺 I 峰($\nu_{\text{C=O}}$)、酰胺 II 峰($\delta_{\text{N-H}}$) 分别在 $1\ 660 \sim 1\ 650$ 、 $1\ 545 \sim 1\ 535\ \text{cm}^{-1}$ 附近; β 折叠在 $1\ 640 \sim 1\ 625$ 、 $1\ 525 \sim 1\ 515\ \text{cm}^{-1}$ 附近。图 1 为不同质量分数及经乙醇处理的丝素/明胶纳米纤维的红外光谱图。文献[7]指出, $290 \sim 300^\circ\text{C}$ 是无定形丝素的热分解吸热温度。图 2 为不同质量分数及经乙醇处理的丝素/明胶纳米纤维的 DTA 谱图。

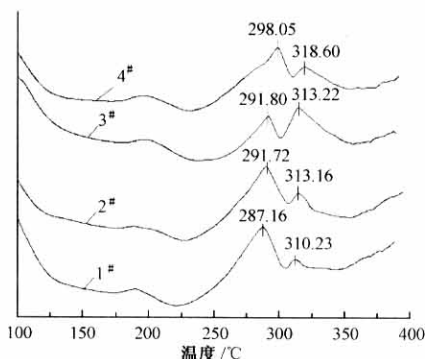
由图 1 可见, 1# 试样的酰胺 I 峰为双峰, 是 $1\ 654.5\ \text{cm}^{-1}$ 处无规构象和 $1\ 636.9\ \text{cm}^{-1}$ 处 β 折叠特征吸收峰; 酰胺 II 峰为 $1\ 541.6\ \text{cm}^{-1}$ 处无规构象特征



注:1#—11%;2#—13%;3#—15%;
4#—2#经乙醇处理60 min。

图1 丝素/明胶纳米纤维的红外图谱

Fig.1 IR of SF/gelatin nanofibers



注:1#—11%;2#—13%;3#—15%;
4#—2#经乙醇处理60 min。

图2 丝素/明胶纳米纤维的DTA图谱

Fig.2 DTA of SF/gelatin nanofibers

吸收峰。2#试样的酰胺Ⅰ峰转变为 1652.4 cm^{-1} 处和强度较大的 1632.5 cm^{-1} 处 β 折叠特征吸收峰;酰胺Ⅱ峰转变为 1539.5 cm^{-1} 处和强度较小的 1524.7 cm^{-1} 处 β 折叠特征吸收峰。3#试样的酰胺Ⅰ峰为强度相当的 1654.8 cm^{-1} 处无规构象和 1630.6 cm^{-1} 处 β 折叠特征吸收峰;酰胺Ⅱ峰为强度较大的 1523.4 cm^{-1} 处 β 折叠特征吸收峰。4#试样的酰胺Ⅰ峰转变为强度较大的 1630.1 cm^{-1} 处吸收峰;酰胺Ⅱ峰为强度较大的 1523.9 cm^{-1} 处 β 折叠特征吸收峰。

由图2可见,1#试样出现在 $287.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $310.23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 处的吸热峰为热分解峰,后者强度小,此时丝素大部分为无规构象,含有少量 β 折叠结构。2#试样出现了位于 $291.72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $313.16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的热分解

峰,温度较1#试样均有升高,前者强度大,此时丝素大部分为无规构象。3#试样热分解峰温度为 $291.80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $313.22\text{ }^{\circ}\text{C}$,后者强度大,表明此时丝素构象中 β 折叠结构增多。4#试样较2#的热分解峰温度升高,为 $298.05\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $318.60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

综上所述,随着纺丝液质量分数的提高,丝素/明胶纳米纤维中丝素蛋白的构象更趋于 β 化。这是由于随着溶质含量的增加,即丝素和明胶的物质的量增加,两分子肽链之间由 $\text{N-H}\cdots\text{O-H}$ 和 C=O 基形成链间氢键的数量增加,使得丝素大分子结构更稳定,有向相对稳定的 β 折叠构象转变的趋势。经乙醇处理后,丝素蛋白肽链间的氢键先被破坏,后又重新形成,使松散的无规构象转变为排列紧密的 β 折叠构象,因此结晶度提高。

2.2 丝素/明胶纳米纤维膜的性能

2.2.1 溶失率

测定不同质量分数及经乙醇处理的丝素/明胶纳米纤维膜的溶失率,结果如表1所示。

表1 不同质量分数及经乙醇处理的纳米纤维膜的溶失率
Tab.1 Water-dissolved rate of SF/gelatin nanofibers membrane with different concentrations and ethanol treatment

质量分数/%	溶失率/%
10	56.3
13	41.4
13(乙醇处理60 min)	14.5

由表1可知,质量分数为10%的纤维膜较13%的纤维膜溶失率大,这是由于纺丝液质量分数低,所得纳米纤维平均直径小,比表面积大,溶解度大。质量分数为13%的纤维膜经乙醇处理60 min后,溶失率显著下降,这是由于乙醇处理后的纤维膜中丝素构象大部分已转变为 β 折叠构象,结晶度提高,从而降低了丝素/明胶共混膜的溶失率。

2.2.2 力学性能

对不同质量分数及经乙醇处理的丝素/明胶纳米纤维膜进行拉伸试验,结果见表2。

表2 不同质量分数及经乙醇处理的纳米纤维膜的拉伸性能
Tab.2 Tensile strength of SF/gelatin nanofibers membrane with different concentrations and ethanol treatment

质量分数/%	拉伸应力/MPa	断裂伸长率/%
10	1.48 ± 0.25	5.9 ± 0.98
13	1.60 ± 0.54	7.6 ± 1.22
16	2.25 ± 0.87	5.7 ± 0.86
13(乙醇处理60 min)	4.13 ± 1.62	5.5 ± 0.72

由表2可见,随着纺丝液质量分数的提高,纤维膜的最大拉伸应力呈上升趋势。这是因为纳米纤维

平均直径增大,纤维变粗,且丝素蛋白的 β 折叠结构增多,结晶度提高。质量分数为 13% 的纤维膜经乙醇处理 60 min 后拉伸应力显著提高,这是由于乙醇处理后,丝素/明胶纳米纤维 β 折叠构象增多,结晶度提高。质量分数为 13% 的纤维膜其断裂伸长率最大,经乙醇的脱水作用导致膜变脆。

2.3 丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率及孔径

测定不同质量分数下丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率及孔径,结果如表 3 所示。

表 3 不同质量分数丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率及孔径

Tab.3 Pore diameter and porosity of SF/gelatin nanofibers membrane with different concentrations

质量分数/ %	厚度/ mm	平均直径/ nm	密度/ ($g \cdot cm^{-3}$)	孔隙率/ %	孔径/ nm
10	0.30	112	0.12	89	86 ± 8
13	0.29	163	0.14	87	142 ± 10
16	0.30	275	0.16	85	250 ± 19

由表 3 可见,随着纺丝液质量分数的提高,丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率减小、孔径增大。这是由于所得的纤维直径增大,膜的密度不断增大,孔隙率减小;同时纤维间交错纵横排列越松散,纤维间所形成的孔隙直径越大。

在质量分数为 13% 的条件下,测定不同厚度丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率及孔径,结果见表 4。

表 4 不同厚度丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率及孔径

Tab.4 Pore diameter and porosity of SF/gelatin nanofibers membrane with different thickness

膜厚度/ mm	平均直径/ nm	密度/ ($g \cdot cm^{-3}$)	孔隙率/ %	孔径/ nm
0.10	157	0.10	91	168 ± 12
0.40	179	0.22	80	92 ± 9

由表 4 可见,随着膜厚度的增加,纳米纤维膜的孔隙率减小,孔径减小。这是由于随着膜厚度的增加,纤维层增多,单位面积质量增大,同时纤维间交错纵横排列越缜密,因此,纤维间所形成的孔隙及孔径均减小。

2.4 细胞黏附形态观察

采用质量分数为 13% 的静电纺丝素/明胶纤维膜,再经无水乙醇处理 60 min,并真空干燥 24 h 后,进行细胞培养试验。通过显微镜和扫描电镜观察细胞的生长情况,L929 培养 24 h 后的显微照片见图 3,HUVECs 培养 5 d 后的 SEM 照片见图 4。

由图 3、4 可见,L929 和 HUVECs 细胞与纤维膜黏附良好,细胞的分化、增殖、生长状态良好,密集处细胞连接成片。

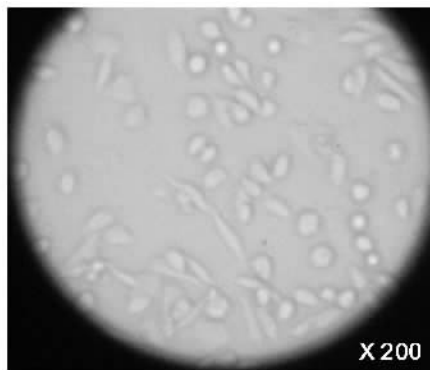


图 3 L929 培养 24 h 后的显微照片

Fig.3 Microscope photo of L929 after 24 h

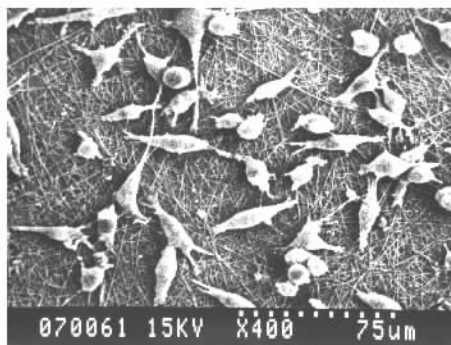


图 4 HUVECs 培养 5 d 后的 SEM 照片

Fig.4 SEM image of HUVECs after 5 d

3 结 论

1) 随着纺丝液质量分数的提高,丝素/明胶纳米纤维中丝素蛋白的构象更趋于 β 化;经乙醇处理后,丝素/明胶纳米纤维 β 折叠构象增多,结晶度提高。

2) 随着纺丝液质量分数的提高,丝素/明胶纳米纤维膜的溶失率下降;经乙醇处理 60 min 后,溶失率显著降低。

3) 随着纺丝液质量分数的提高,丝素/明胶纳米纤维膜的拉伸强度增加;经乙醇处理 60 min 后,纤维膜的拉伸强度增加,但断裂伸长率下降。

4) 随着纺丝液质量分数的提高,丝素/明胶纳米纤维膜的孔隙率减小,孔径增大;随着膜厚度的增加,纤维膜的孔隙率及孔径均减小。

5) 小鼠成纤维细胞和人脐静脉内皮细胞均能够在丝素/明胶纳米纤维膜上黏附、分化及增殖,与纤维膜结合紧密,细胞生长状态良好。

FZXB

(下转第 8 页)