

· 实验研究 ·

聚己内酯/丝素蛋白/胶原电纺纤维的制备
及其细胞相容性研究*魏盖杰¹ 李超¹ 张心如¹ 李鸿宾¹

[摘要] 目的:制备聚己内酯/丝素蛋白/胶原电纺纳米纤维支架,检测其对口腔黏膜上皮细胞生长和增殖的影响。**方法:**将再生丝素膜、水溶性胶原蛋白粉末及聚己内酯按质量比1:1:4;1:1:8;1:1:10共同溶于六氟异丙醇中,采用静电纺丝法制备聚己内酯/胶原/丝素蛋白电纺纳米纤维支架。将体外培养的口黏膜上皮细胞接种至材料表面,采用MTT法和扫描电镜研究口腔黏膜上皮细胞在材料表面的生长和增殖情况,评价聚己内酯/丝素蛋白/胶原电纺纳米纤维的细胞相容性。**结果:**MTT结果表明,口腔黏膜上皮细胞在聚己内酯/丝素蛋白/胶原电纺纳米纤维支架生长良好。电镜观察显示所制备的电纺纤维直径均一,呈相互连通的多孔网状结构,口腔黏膜上皮细胞在改性后的材料表面具有良好的生长形态。**结论:**聚己内酯/丝素蛋白/胶原电纺纳米纤维支架,具备合适的孔径和孔隙率,适合口腔黏膜上皮细胞生长,细胞相容性良好,是一种组织工程尿道重建良好的支架载体。

[关键词] 聚己内酯;丝素蛋白;胶原;纳米纤维;细胞相容性

[中图分类号] Q813 [文献标识码] A [文章编号] 1001-1420(2013)10-0778-04

Preparation of polycaprolactone-silk fibroin-collagen electrospun
ultrafine fibers and its biocompatibility

WEI Gaijie LI Chao ZHANG Xinru LI Hongbin

(Department of Urology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200233, China)

Corresponding author: LI Chao, E-mail: chaoli1979@126.com

Abstract Objective: To prepare the polycaprolactone-silk fibroin-collagen electrospun nanofibrous scaffold and evaluate the growing and proliferation of oral keratinocytes on it. **Method:** The regenerated silk fibroin membrane, water-soluble collagen powder and polycaprolactone were dissolved in hexafluoro-isopropanol at the mass ratio of 1:1:4; 1:1:8; 1:1:10. Method of electrostatic spinning was used to prepare porous nanofiber scaffold of polycaprolactone-silk fibroin-collagen. The scaffold was observed by scanning electron microscope. The parameters of scaffold fiber diameter, porosity, water absorption rate, and tensile strength were detected. Oral keratinocytes were seeded on the electrospun scaffold and the cell proliferation was also evaluated by MTT method and scanning electron microscope. **Result:** The MTT results of biocompatibility showed that grafted collagen was obviously suitable for the growth of oral keratinocytes. The scanning electron microscope images showed that the fibers were smooth and uniform with the interwoven and porous morphology, and oral keratinocytes grew well on the scaffold. **Conclusion:** The nanofiber scaffold of polycaprolactone-silk fibroin-collagen prepared by the method of electrostatic spinning is safe, free of toxicity, and suitable for oral keratinocytes growth. It has good cytocompatibility and proper aperture and porosity, which is a potential scaffold carrier for tissue engineered urethra.

Key words polycaprolactone; silk fibroin; collagen; nanofiber; biocompatibility

二十年来,随着组织工程技术的发展,尿道重建进入了一个崭新的阶段。在经历了最初由单纯生物支架进行替代到以种子细胞与支架复合后进行重建,组织工程技术在尿道重建中的运用日趋成熟^[1~3]。口腔黏膜细胞与尿道黏膜细胞同属黏膜

组织来源的细胞,有望最大程度的模拟尿道黏膜的特性,因此是尿道重建理想的种子细胞。天然的细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)框架,其生物相容性较佳,已应用于各种实验研究,但其力学性能较差,无法调控,且难以形成产业化广泛应用于临床。

与常规的组织工程支架相比,静电纺丝纳米纤维支架与细胞外基质在形态结构上具有更高的相似性;其特有的高比表面积有利于细胞的黏附和增

* 基金项目:国家自然科学基金(编号 30901503;81370793)

¹上海交通大学附属第六人民医院东院泌尿外科(上海, 200233)

通信作者:李超, E-mail: chaoli1979@126.com

殖;高的孔隙率为细胞的生长提供更多的空间;良好的孔隙通透性有利于支架与环境间的物质交换;纤维间的结合力相对较弱,这方便细胞运动进而提高细胞在支架中的渗透力。聚己内酯具有良好的生物降解性、力学性能和生物相容性,已获得美国 FDA 批准,并已被广泛应用于组织工程,控制释放等生物医用领域;胶原是细胞外基质的主要结构成分,拟生性好;丝素蛋白是从蚕丝中提取出的天然高分子蛋白,作为缝合材料已有很长的临床历史,它能够为细胞提供丰富的粘附位点,促进细胞增殖,并可增强纳米纤维的强度和柔性。为了结合天然聚合物优良的生物相容性与人工聚合物良好的力学性质,我们拟将聚己内酯,胶原与丝素蛋白进行混纺制备出性能优良的纳米纤维支架,与口腔黏膜细胞复合培养,评价其细胞相容性,为纳米组织工程尿道重建的进一步研究和临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水溶性胶原蛋白,分子量 6 000,AR 级(四川铭让生物科技有限公司);无水碳酸钠,AR 级(北京康普汇维科技有限公司);无水氯化钙,AR 级(宜兴市凯利达化学有限公司);甲酸,质量分数 99%,AR 级(东莞市乔科液晶金属技术有限公司);桑蚕废丝。聚己内酯(相对分子质量 8×10^4 , Sigma-Aldrich 公司,美国);透析袋(3 500 Da, Pierce 公司,美国);溴化锂(LiBr),六氟异丙醇(Hexafluoroisopropanol, HFIP)(Dupont 公司,美国);新西兰大耳白兔,雄性,体重 0.3~0.5 kg;KSMF 培养液(Gibco invitro gene 公司);0.05%胰酶+0.53 mmol·L⁻¹ EDTA(Gibco invitro gene 公司);Dispase II 酶(Dispase,德国 Roche 公司);0.25%氯霉素溶液,Triton X-100,氢氧化氨(中国医药集团上海试剂公司);胎牛血清(Gibco invitro gene 公司);DMEM 培养液(Gibco invitro gene 公司)。

1.2 纳米支架的制备

桑蚕废丝于 0.1%(质量分数)Na₂CO₃ 水溶液中煮沸 30 min 并重复 3 次,以去除丝胶。将丝素用 CaCl₂/H₂O/C₂H₅OH 三元溶液(摩尔比 1:8:2)在(78±2)°C 下溶解(浴比 1:10),溶液经透析过滤后置于 ABS 盘内室温干燥成再生丝素膜。将再生丝素膜、水溶性胶原蛋白粉末及聚己内酯按质量比 1:1:4;1:1:8;1:1:10 共同溶于 HFIP 中,聚己内酯终浓度 2%,作为实验组;将单纯 2%聚己内酯溶于六氟异丙醇中作为对照组。

将上述制备好的溶液装入 12 号平头不锈钢针头的注射器中。针头与实验室自制的开放式滚筒接收装置(直径 12 cm)之间的距离为 12 cm。电纺

条件为:流速 3.2 ml/h,电压 12 kV,滚筒转速 300 r/min。将制好的纳米纤维薄膜放入通风橱中干燥过夜备用。

1.3 口腔黏膜细胞的分离与培养

取十周龄雄性幼兔,体重约 0.3~0.5 kg,在 0.25%戊巴比妥静脉麻醉下,剪取 1.0 cm×1.0 cm 的口腔黏膜组织,取下的黏膜置入 4°C 的 0.25%氯霉素溶液漂洗 3 次后,修剪黏膜组织,制成 1.0 cm×0.2 cm 大小,置入 Dispase II 酶中 4°C 过夜消化,剥离真皮层和黏膜上皮层。黏膜上皮置入 0.05%胰酶+0.02%EDTA 在 37°C 下消化 15 min,加入含 10%胎牛血清的 DMEM,终止胰酶作用。采用 150 目金属不锈钢过滤网,滤出细胞悬液。使用 1 500 转/分离心机离心 5 min,去除上清液,加 PBS 6 ml,摇匀,再离心 1 次,去上清液。接种培养皿底部,加入 KSMF 培养液 7~10 ml。放入 37°C、5%CO₂、饱和湿度细胞培养箱。第 4 天换培养液,以后每 3 天换 1 次液。口腔黏膜细胞增殖到 85%~90%融合时传代。传代的细胞均以 1:3 接种于有新的培养皿内。

1.4 扫描电镜观察

将所制备电纺纤维样品使用导电胶固定在样品台上,旋转蒸镀仪喷金,使用 S-3400 N 型扫描电镜(日本, HITACHI 公司)进行观察,电子加速率为 5 kV。采用图象分析软件 Image-Pro Plus 5.02 (美国, Media Cybernetics 公司)测定电镜照片中的纤维直径,每张电镜照片至少取 10 根纤维的直径计算平均值。聚己内酯/胶原/丝素蛋白电纺纤维接种口腔黏膜细胞,共培养 5 天后,取出细胞支架复合物,以 PBS 轻轻洗涤,3%戊二醛溶液固定 4 h,50%、60%、70%、80%、90%和 100%乙醇梯度脱水各 10 min,真空干燥,喷金后观察口腔黏膜细胞在材料表面的生长形貌。

1.5 MTT 检测

培养 1、3、5、7 天后,向实验各组分别加入 0.25%胰蛋白酶消化 3 min,然后加入含 10%胎牛血清的 DMEM 终止消化。500 g 离心 10 min,每管重新加入 DMEM 培养液 200 μl,接种至 96 孔培养板。每组 4 孔,每孔加入 5 μl/L 的 MTT 溶液 20 μl,37°C 孵育 4 h。酶联免疫检测仪上选择 490 nm 波长测量各孔 A 值。每组 3 个试件,取平均值,采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 扫描电镜

观察聚己内酯/胶原/丝素蛋白电纺纤维的表面微观形貌可以看出,质量比 1:1:8 为电纺纤维表面光滑,直径均一,没有膨大的珠状结构或者粘并现象,纤维呈现相互连通的三维网络状结构(图 1),Image-Pro Plus 测量得到电纺纤维的平均直径

为(310±17) nm。口腔黏膜细胞在电纺纤维材料表面贴附牢固,具有良好的生长形态,伸展充分。细胞与纤维之间、细胞与细胞之间均有较多树枝状的突起相互交连(图 2)。

2.2 MTT 检测

聚己内酯/胶原/丝素蛋白电纺纤维接种口腔黏膜细胞后,共培养 1、3、5 和 7 天后,聚己内酯/胶原/丝素蛋白电纺纤维组与对照组的吸光度 A 值均随共培养时间的增加而增大,各检测时间点间差异有统计学意义($P < 0.05$);在各检测时间点,聚己内酯/胶原/丝素蛋白电纺纤维组与对照组之间的吸光度 A 值比较差异无统计学意义($P > 0.05$) (图 3)。

3 讨论

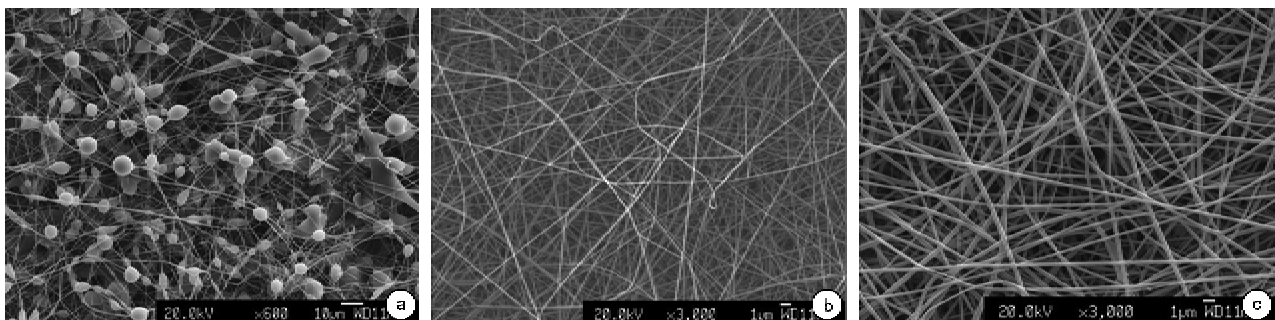
自体组织重建尿道是目前临床上复杂性长段尿道狭窄治疗的主要措施^[4]。常用的自体组织包括阴茎皮瓣、膀胱黏膜、口腔黏膜、结肠黏膜、舌黏膜^[5~10]等。对于复杂的长段尿道狭窄,可单独采用自体结肠黏膜组织,或者将一种或几种其他黏膜组织于体外拼接后联合用于重建尿道,这使复杂性长段尿道狭窄患者获得了重新排尿的机会^[5,6]。但各类自体组织重建尿道手术后,尿道再狭窄率仍高达约 14%~44%^[2],而且自体组织尿道替代是“以牺牲正常组织为代价,以手术创伤修复组织缺损”,这导致手术时间延长,供区并发症增加;再者可供移植的同源性皮片或黏膜瓣来源亦十分有限,限制了其进一步的应用。

近年来随着组织工程技术的发展,尿道重建进入了一个崭新的阶段。在经历了最初由单纯生物支架进行替代到以种子细胞与支架复合后进行重建,组织工程技术在尿道重建中的运用日趋成熟。口腔黏膜作为重建尿道较为理想的替代物在近几年已为广大泌尿外科学者所接受,是目前尿道重建最佳的材料。而且口腔黏膜细胞与尿道黏膜细胞同属黏膜组织来源的细胞,有望最大程度的模拟尿道黏膜的特性,因此是尿道重建理想的种子细胞。

在前期研究中,我们尝试单纯选用口腔黏膜细胞作为种子细胞接种于膀胱黏膜下脱细胞基质(BAMG),构建简单的组织工程口腔黏膜用于尿道黏膜重建^[2,3]。短期内观察,所形成的黏膜面光滑平整,修复效果良好。但在此研究中,我们亦发现 BAMG 虽然为天然的细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)框架,其生物相容性较佳,但力学性能较差,无法调控,且难以形成产业化广泛应用于临床。

组织工程支架材料能够起到支撑种子细胞生长、引导组织再生和控制组织形态结构的功能,是决定组织再生与修复效果的关键因素之一。理想的组织工程支架应具有以下特点:在结构和功能上与天然的细胞外基质相似,具有很好的生物相容性,对周围组织环境没有不良影响;加工制作方便、高效,便于应用,而且便于调节材料的各种性能;结构稳定,有一定力学强度以支持新生组织的生长^[11,12]。静电纺丝技术所获得的纤维,具有纤维细度小、比表面积高、孔隙率高的特点,能够很好地模拟天然细胞外基质的结构^[13,14]。此外,静电纺丝技术工艺简单,能够通过调节纺丝液的种类及浓度、粘度、电压、距离等纺丝参数来控制纤维产品的各种性能,满足不同研究类型的需要。因此,静电纺丝技术在组织工程支架材料领域具有相当好的应用前景。目前,大约近百种天然及合成高分子材料都能够通过静电纺丝技术顺利获得纳米级纤维。

聚己内酯具有良好的生物降解性、力学性能和生物相容性,已获得美国 FDA 批准,并已被广泛应用于组织工程,控制释放等生物医用领域;胶原是细胞外基质的主要结构成分,拟生性好;丝素蛋白是从蚕丝中提取出的天然高分子蛋白,作为缝合材料已有很长的临床历史,它能够为细胞提供丰富的粘附位点,促进细胞增殖,并可增强纳米纤维的强度和柔性。我们将口腔黏膜细胞种植在聚己内酯-丝素蛋白-胶原纳米三维多孔支架上的结果表明,聚己内酯-丝素蛋白-胶原纳米三维多孔支架上细



a,丝素蛋白:胶原:聚己内酯为 1:1:4,电纺纤维有明显膨大的珠状结构或者粘并现象;b,丝素蛋白:胶原:聚己内酯为 1:1:10,电纺纤维没有膨大的珠状结构或者粘并现象,但直径不均一;c,丝素蛋白:胶原:聚己内酯为 1:1:8,电纺纤维表面光滑,直径均一,没有膨大的珠状结构或者粘并现象,纤维呈现相互连通的三维网络状结构

图 1 扫描电镜观察结果

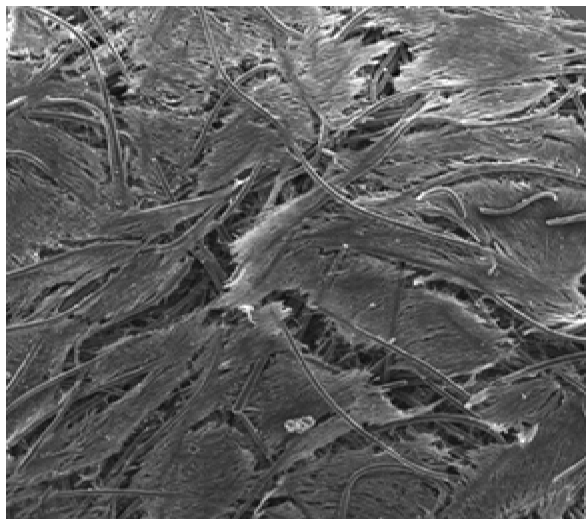


图 2 口腔黏膜细胞在电纺纤维材料表面贴附牢固, 具有良好的生长形态, 伸展充分(电镜, 5 000×)

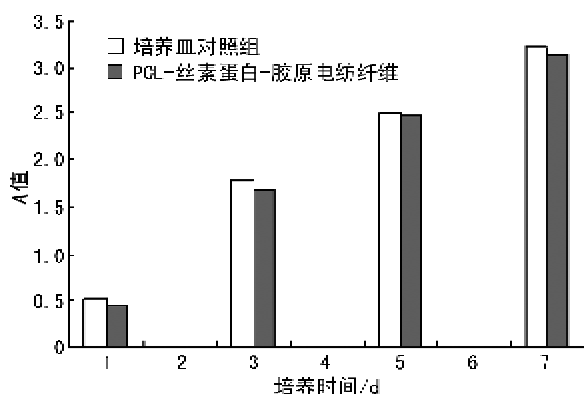


图 3 聚己内酯-丝素蛋白-胶原纳米纤维上细胞增殖情况

胞贴附良好, 生长旺盛, 细胞形态均一, 细胞轴突相互连接, 并且向孔洞内呈立体三维生长, 证实其是口腔黏膜细胞生长增殖的良好载体。

纳米支架应用于尿道组织工程, 必须安全无毒。聚己内酯降解产物对机体无害; 胶原是机体的组成成分; 蚕丝作为静电纺丝材料, 已有细胞在其上生长且安全无毒的报道^[15]。本实验中, 口腔黏膜细胞在聚己内酯-丝素蛋白-胶原纳米三维多孔支架上不断生长增殖, MTT 结果表明其和培养皿对照组比较差异无统计学意义, 提示聚己内酯-丝素蛋白-胶原纳米三维多孔支架具备生物安全性。综上所述, 我们采用静电纺丝技术制备的聚己内酯-丝素蛋白-胶原纳米三维多孔支架适合口腔黏膜细胞生长, 细胞相容性好, 有望成为组织工程尿道重建的良好载体。

[参考文献]

1 Fu Q, Deng C L, Song X F, et al. Long-term study of male rabbit urethral mucosa reconstruction using epide-

rmal cel.[J]. Asian J Androl, 2008, 10(5): 719-722.

- Li C, Xu Y M, Song L J, et al. Preliminary experimental study of tissue-engineered urethral reconstruction using oral keratinocytes seeded on BAMG [J]. Urol Int, 2008, 81(3): 290-295.
- Li C, Xu Y M, Song L J, et al. Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts[J]. J Urol, 2008, 180(4): 1538-1542.
- Waxman S W, Morey A F. Management of urethral strictures[J]. Lancet, 2005, 367(9520): 1379-1380.
- Xu Y M, Qiao Y, Sa Y L, et al. 1-stage urethral reconstruction using colonic mucosa graft for the treatment of a long complex urethral stricture[J]. J Urol, 2004, 171(1): 220-223.
- Xu Y M, Qiao Y, Sa Y L, et al. Substitution urethroplasty of complex and long-segment urethral strictures: a rationale for procedure selection[J]. Eur Urol, 2007, 51(4): 1093-1098.
- Kessler T M, Schreiter F, Kralidis G, et al. Long-term results of surgery for urethral stricture: a statistical analysis[J]. J Urol, 2003, 170(3): 840-844.
- Atala A. Recent applications of regenerative medicine to urologic structures and related tissues[J]. Curr Opin Urol, 2006, 16(4): 305-309.
- Fu Q, Deng C L, Liu W, et al. Urethral replacement using epidermal cell seeded tubular acellular bladder collagen matrix[J]. BJU Int, 2007, 99(5): 1162-1165.
- Xu Y M, Sa Y L, Qiao Y, et al. Histopathological changes of free buccal mucosa and colonic mucosa grafts after translation to dog bladder[J]. Chin Med J, 2005, 118(4): 337-339.
- Ma Z, Kotaki M, Inai R, et al. Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds[J]. Tissue Eng, 2005, 11(1-2): 101-109.
- 孟洁, 孔桦, 朱广瑾, 等. 纳米纤维结构支架的构建及其对再生医学的意义[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(7): 689-693.
- Courtney T, Sacks M S, Stankus J, et al. Design and analysis of tissue engineering scaffolds that mimic soft tissue mechanical anisotropy[J]. Biomaterials, 2006, 27(19): 3631-3638.
- Williamson M R, Black R, Kielty C. PCL-PU composite vascular scaffold production for vascular tissue engineering: attachment, proliferation and bioactivity of human vascular endothelial cells [J]. Biomaterials, 2006, 27(19): 3608-3616.
- Jeong L, Yeo I S, Kim H N, et al. Plasma-treated silk fibroin nanofibers for skin regeneration[J]. Int J Biol Macromol, 2009, 44(3): 222-228.

(收稿日期: 2013-06-03)