Hans Journal of Biomedicine 生物医学, 2024, 14(4), 555-562
Published Online October 2024 in Hans. https://www.hanspub.org/journal/hjbm
https://doi.org/10.12677/hjbm.2024.144059

Hans汉斯

蚕丝纬编针织网的细胞相容性及体外降解性实验研究

唐　靓[1*]，李跃中[2]，张文元[1#]

[1]杭州医学院检验医学院、生物工程学院，浙江　杭州
[2]杭州医学院药学院、食品科学与工程学院，浙江　杭州

收稿日期：2024年7月22日；录用日期：2024年9月30日；发布日期：2024年10月10日

摘　要

目的：蚕丝纬编针织网支架结合骨髓间充质干细胞(BMSCs)细胞片制成组织工程支架，并对其进行细胞相容性观察，以及蚕丝纬编针织网支架的体外降解性。方法：通过密度梯度离心法结合贴壁培养法提取兔BMSCs，通过维生素C培养法制备BMSCs细胞片。采用纬编针织法制备蚕丝网状支架，将BMSCs细胞片覆盖于该支架上体外培养2周，观察细胞在支架上的生长情况。并进行蚕丝纬编针织网支架为期1年的体外降解性的力学性能及质量变化测试。结果：提取的BMSCs生长旺盛。支架-BMSCs细胞片培养2周的扫描电镜观察显示：BMSCs黏附于支架呈立体生长，增殖良好。通过体外1年降解实验，蚕丝纬编针织网状支架降解速率非常缓慢，力学性能及质量变化很小。结论：蚕丝纬编针织网-BMSCs细胞片具有良好的细胞相容性，蚕丝纬编针织网体外降解速率非常缓慢，可以尝试作为组织工程韧带/肌腱的支架材料。

关键词

蚕丝纬编针织网，骨髓间充质干细胞，细胞片，细胞相容性，体外降解性，力学性能

Experimental Study on Cytocompatibility and *in Vitro* Degradability of Silk Weft Knitted Mesh

Liang Tang[1*], Yuezhong Li[2], Wenyuan Zhang[1#]

[1]School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang
[2]School of Pharmacy and Food Science and Engineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou Zhejiang

Received: Jul. 22nd, 2024; accepted: Sep. 30th, 2024; published: Oct. 10th, 2024

[*]第一作者。
[#]通讯作者。

文章引用: 唐靓, 李跃中, 张文元. 蚕丝纬编针织网的细胞相容性及体外降解性实验研究[J]. 生物医学, 2024, 14(4): 555-562. DOI: 10.12677/hjbm.2024.144059

Abstract

Objective: Silk weft knitted mesh scaffolds were combined with bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) to form tissue engineering scaffolds, and the cytocompatibility and degradability of silk weft knitted mesh scaffolds were observed. Methods: BMSCs were extracted by density gradient centrifugation combined with adherent culture, and BMSCs cell sheets were prepared by vitamin C culture. A silk mesh scaffold was prepared by weft knitting method. BMSCs cell sheets were covered on the scaffold and cultured for 2 weeks *in vitro* to observe the growth of cells on the scaffold. The mechanical properties and quality changes of silk weft knitted mesh scaffolds were tested for 1 year. Results: The extracted BMSCs grew strongly. Scanning electron microscopy (SEM) observation of BMSCs cells cultured on scaffolds for 2 weeks showed that BMSCs adhered to scaffolds in stereoscopic growth and proliferation. After 1 year *in vitro* degradation experiment, the degradation rate of silk weft knitted mesh scaffold is very slow, and the mechanical properties and quality changes are very small. Conclusion: BMSCs cell sheet with silk weft knitted mesh has good cytocompatibility, and the degradation rate of silk weft knitted mesh is slow *in vitro*, which can be used as scaffolds for tissue engineering ligaments/tendons.

Keywords

Silk Weft Knitted Mesh, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Cell Sheet, Cytocompatibility, *In Vitro* Degradability, Mechanical Properties

1. 引言

蚕丝丝素蛋白(SF)是一种具有优异力学性能、生物相容性和生物可吸收性的天然蛋白质，在组织工程应用中备受关注[1]。随着人口老龄化的加剧，肌肉骨骼组织的修复已成为组织工程研究的重点。在组织工程测试的各种材料中，蚕丝丝素蛋白(SF)越来越被认为是一种有前途的材料。SF 是一种具有优异理化特性的天然蛋白聚合物，在肌肉骨骼组织工程领域已建立了良好的声誉[2]。蚕丝适合作为组织工程韧带与肌腱的支架材料[3] [4]。蚕丝纬编针织网状支架具有充足的力学性能，有较大的空隙结构，可提供足够的内部空间供韧带/肌腱组织、细胞生长[5]。然而目前的细胞接种技术，是将细胞直接接种于支架上，存在易流失、利用率低等缺点，而细胞凝胶复合材料粘附支架强度有限，不能将大量的细胞整合到密集的移植物中等问题[6]。细胞片技术可以有效地解决细胞流失等问题，且费用较低，已成为组织工程领域的研究热点。本实验通过维生素 C 培养法制备骨髓间充质干细胞(BMSCs)细胞片，并覆盖于蚕丝纬编针织网状支架上体外培养，观察细胞在支架上的生长情况。体外降解实验是最直观且方便的途径，具有针对性和科学性。本实验将纬编针织蚕丝纤维网状支架通过为期 1 年的体外降解，考察该支架的降解性及力学性能变化。

2. 材料与方法

2.1. 材料和主要器材

桑蚕丝(*Bombyx Mori* silk)购于杭州丝绸市场。I 型鼠尾胶原(5 mg/ml，欣友生物技术有限公司)。扫描

电镜(XL30-ESEM, Philips-FEI)，拉力试验机(QX-W300，上海企想检测仪器有限公司)，冷冻干燥机(LL3000, Heto PowerDry)。新西兰白兔，生产许可证号：SCXK(浙) 2022-0008，杭州余杭科联兔业专业合作社提供。

2.2. 兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)提取及 BMSCs 细胞片制备

按照文献[7]，通过密度梯度离心结合贴壁培养法从 3 月龄新西兰白兔髂骨提取、纯化 BMSCs。并按照文献[8]，制备 BMSCs 细胞片。

2.3. 蚕丝丝素纤维网状支架的制备

参照文献[9]，蚕丝通过 0.5% Na_2CO_3 溶液煮沸两次，每次 30 min，脱去丝胶，得到蚕丝丝素纤维细丝。按下列顺序编织：将蚕丝丝素纤维单丝 200 根，逆时针扭合(2 捻)成 1 小束(含蚕丝丝素纤维单丝 400 根)。按图 1 将纤维小束通过纬编针织成长条网状支架(长 25 mm × 宽 5 mm)。分别经 0.1 mol/L 稀盐酸、蒸馏水、0.1 mol/L NaOH、蒸馏水超声清洗机洗涤，晾干。进行如下细胞相容性实验，以及体外降解实验。

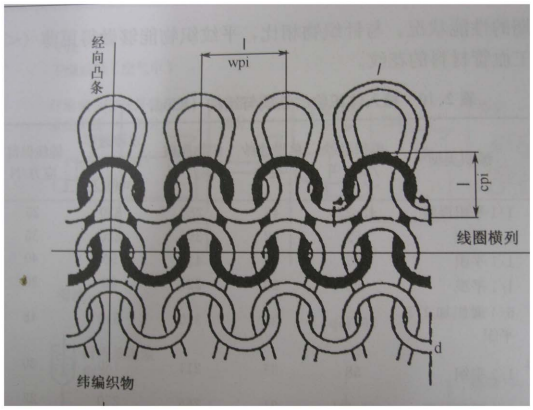


Figure 1. Schematic diagram of weft knitting
图 1. 纬编针织示意图

2.4. 支架-BMSCs 细胞片复合物的体外培养

将 5 mg/ml I 型胶原缓慢滴加充填于“2.3 项”制备的蚕丝网中，−80℃冰箱过夜，冷干机冻干。环氧乙烷消毒。

将“2.2 项”制备的 BMSCs 细胞片覆盖缠绕于上述 I 型胶原修饰的蚕丝网支架上，以丝线稍作固定。37℃、5% CO_2 培养 2 天后，去除丝线，继续培养，共培养 2 周。取支架-BMSCs 细胞片复合物，戊二醛固定，锇酸固定，梯度乙醇脱水，临界点干燥，喷金，扫描电镜观察。

2.5. 体外降解实验

1) 体外模拟降解实验：以模拟体液(simulated body fluid, SBF)作为降解液，按照文献[10]配制。将“2.3 项”制备的蚕丝长条网状试样，每条试样称重，记为 M_0。环氧乙烷灭菌。并将其浸入装有 10 ml SBF 的试管中，硅胶塞盖紧，每个试管静态放置 1 条试样。37℃，每周换液 1 次，共 40 根。分别于 0 (降解前)、3、6、12 个月各取出 10 个试样，洗净后进行以下实验。

2) 材料的力学性能测试：每个时间点取出的 10 个试样，在湿润条件下进行力学性能测试。试样两端用纱布紧密包裹，固定于拉力试验机上，经适当预拉后，拉力至 2 N 时测其横截面积及夹具间距长度，再以 50 mm/min 进行拉伸试验，记录最大负荷、拉伸强度、弹性模量。

3) 质量损耗率检测：收集上述“2)项”力学检测后的试样材料，真空干燥，称重，记为 M_t。并计算质量损耗率：质量损耗率 $= (M_0 - M_t)/M_0 \times 100\%$。

3. 结果

3.1. BMSCs 培养及传代

骨髓经密度梯度离心及贴壁培养后获得 BMSCs。提取的 BMSCs 生长迅速，原代培养呈现集落生长。第三代 BMSCs 传代培养 2 d 后 BMSCs 细胞呈长梭形生长(图 2)。随着时间增加，细胞呈旋涡生长，生长迅速旺盛。

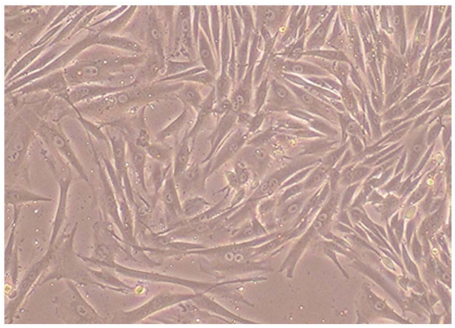
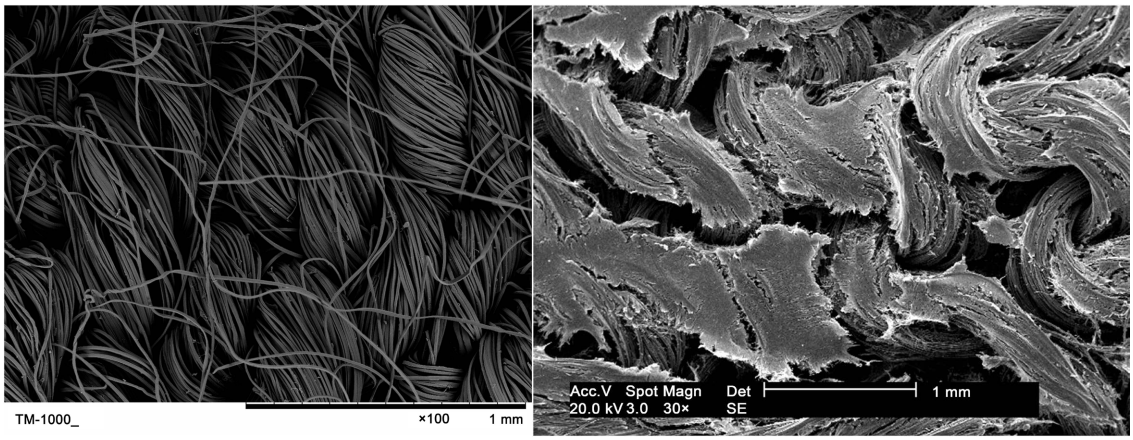


Figure 2. The third-generation BMSCs showed a long spindle-shaped vortex growth after 2 days of subculture, with rapid and vigorous growth (200×)
图 2. 第三代 BMSCs 传代培养 2 天后呈长梭形旋涡生长，生长迅速旺盛(200×)

3.2. 蚕丝纬编针织网的 SEM 观察

蚕丝纤维纬编针织网有较大的孔隙，伸缩性良好(图 3(a))。于蚕丝纤维针织网上滴加的胶原冻干后可附着于网上(图 3(b))。



(a) (b)

Figure 3. SEM observation of silk fiber weft knitted net. (a): Silk fiber weft knitted net (100×); (b): The collagen dripped on the knitted net is freeze-dried and attached to the net (30×)
图 3. 蚕丝纤维纬编针织网 SEM 观察。(a)：蚕丝纤维纬编针织网(100×)；(b)：在针织网上滴加的胶原冻干后附着于网上(30×)

3.3. BMSCs 细胞片在支架上生长的 SEM 观察情况

BMSCs 细胞片附于充填胶原海绵的蚕丝网支架复合培养 2 周，通过扫描电镜观察，BMSCs 细胞附于支架上生长良好，呈立体状，有伪足生长，增殖旺盛(图 4)。

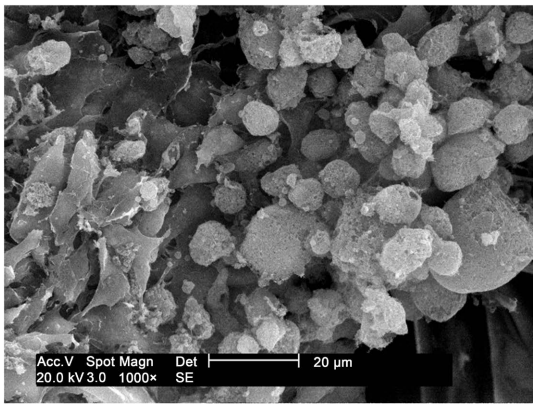


Figure 4. Scanning electron microscope observation of BMSCs cells attached to scaffold (1000×)
图 4. BMSCs 细胞附于支架上的扫描电镜观察(1000×)

3.4. 体外降解实验结果

3.4.1. 蚕丝网形貌变化大体观察

蚕丝网经过 1 年体外降解，在形貌变化上均未见实质性的降解现象。

3.4.2. 蚕丝网的机械性能测定

蚕丝网支架经过 1 年在体外模拟体液中降解，其最大载荷、拉伸强度、弹性模量下降非常缓慢，不同时间点的力学性能均未见实质性下降(表 1)，$p > 0.05$。

Table 1. Mechanical properties change of silk mesh scaffolds degraded *in vitro* for 1 year ($\bar{x} \pm s$, n = 10)
表 1. 蚕丝网支架体外降解 1 年的力学性能变化($\bar{x} \pm s$, n = 10)

降解时间/月	最大载荷/N	拉伸强度/MPa	弹性模量/MPa
0	113.25 ± 13.64	40.91 ± 4.76	194.26 ± 22.40
3	111.20 ± 12.79	40.32 ± 4.45	189.84 ± 22.62
6	109.97 ± 12.82	40.16 ± 4.54	187.93 ± 23.01
12	106.33 ± 13.08	39.78 ± 5.16	185.08 ± 22.93

3.4.3. 蚕丝网质量损耗率检测

蚕丝网经过 1 年在体外模拟体液中降解，3、6、12 个月的质量损耗率分别为 0.21% ± 0.02%，0.26% ± 0.02%，0.40% ± 0.03%，均未见实质性的质量损耗($p > 0.05$)。

4. 讨论

蚕丝是一种易于加工的生物聚合物，这使得以蚕丝为基础的生物材料被塑造成不同的形式和结构。蚕丝丝素蛋白是一种天然聚合物，具有良好的生物相容性、高机械强度和低降解率等特点，越来越被认

为是肌肉骨骼组织工程应用中首选的支架材料[11]。蚕丝可编织成多种形状，具有优异的承载受力功能，可用于韧带/肌腱组织再生[3] [12]。而且蚕丝可引导羟基磷灰石(骨矿物质基质的主要无机成分)增长的能力，从而改善骨整合[13]。将蚕丝添加到聚二氧环酮和聚乳酸-co-己内酯中，可提高材料的性能和体内外生物相容性；蚕丝在 72 h 内可促进肌腱源性干细胞的附着和增殖。而体内研究表明，植入 6 周后，蚕丝可以降低促炎细胞因子的表达[14]。研究表明蚕丝－胶原蛋白支架具有相当大的临床应用潜力[15]，透明质酸/蚕丝－胶原支架可促进前交叉韧带重建后腱－骨界面的骨整合[16]。

除了支架材料的选择外，支架结构也非常重要，它决定了种子细胞能否在支架上停泊、附着、增殖、分化，以及能否维持一定的力学强度，并最终达到韧带/肌腱修复的要求[17]。蚕丝针织丝网－胶原海绵支架具有特殊的“内部空间保留”特性，可以再生功能性前交叉韧带，并长期预防骨关节炎，提示其作为功能性前交叉韧带重建生物支架的临床应用价值[18]。Tang 等[5]研究了采用海绵状再生丝素/胶原 I 结合蚕丝纬编针织网支架构建组织工程肌腱的可行性，显示支架－骨髓间充质干细胞复合材料具有修复跟腱缺损的潜力。

细胞片技术是再生医学领域近年的研究热点[19] [20]，因其能够提供足量组织结构完整的健康细胞及细胞外基质、治愈难治性疾病并恢复机体受损功能而受到广泛关注[21] [22]。本实验在组织工程构建中使用这两种技术的交集：作为细胞外基质的细胞片结构和作为组织工程要素的支撑支架[23]。解决复杂的组织工程问题需要一个综合的方法，包括三维支架和细胞片[24]。使用细胞片方法，BMSCs 存活时间更长，并可以大量交付[25]。

本实验结果表明，BMSCs 细胞片附于充填胶原的蚕丝纬编针织网支架复合培养 2 周，BMSCs 细胞附于支架上生长旺盛，呈立体状。蚕丝纬编针织网经过体外 1 年降解实验，网状支架降解速率非常缓慢，力学性能及质量变化很小。

蚕丝支架目前只是在实验动物中进行研究，真正应用于临床还有很长的路要走。未来蚕丝组织工程韧带/肌腱的发展方向，一方面可以提高和改善蚕丝性能和蚕丝支架结构，更好地与种子细胞相结合，并可与生长因子或其他材料联合应用，以满足临床中韧带/肌腱修复的更高需求。另一方面，可以改善手术方式，先将蚕丝支架预血管化，模拟关节外炎症刺激，以促进血管和细胞的早期生长。

5. 结论

实验结果显示，BMSCs 黏附于支架呈立体生长，增殖良好。通过体外 1 年降解实验，蚕丝纬编针织网状支架降解速率非常缓慢，力学性能及质量变化很小。结果表明：蚕丝纬编针织网-BMSCs 细胞片具有良好的细胞相容性，蚕丝纬编针织网体外降解速率非常缓慢，可以尝试作为组织工程韧带/肌腱的支架材料。

基金项目

浙江省医药卫生科技计划项目(项目编号：2022KY727)。

参考文献

[1] Sun, W., Gregory, D.A., Tomeh, M.A. and Zhao, X. (2021) Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article No. 1499. https://doi.org/10.3390/ijms22031499

[2] Ma, D., Wang, Y. and Dai, W. (2018) Silk Fibroin-Based Biomaterials for Musculoskeletal Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering*: *C*, **89**, 456-469. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.062

[3] Zhang, L., Liu, X., Li, G., Wang, P. and Yang, Y. (2018) Tailoring Degradation Rates of Silk Fibroin Scaffolds for Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **107**, 104-113. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36537

[4] Li, Y., Liu, Z., Tang, Y., Fan, Q., Feng, W., Luo, C., *et al*. (2020) Three-Dimensional Silk Fibroin Scaffolds Enhance the Bone Formation and Angiogenic Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells: A Biocompatibility Analysis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **52**, 590-602. https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa042

[5] Tang, L., Yang, Y., Li, Y., *et al*. (2018) Knitted Silk Mesh-Like Scaffold Incorporated with Sponge-Like Regenerated Silk Fibroin/Collagen I and Seeded with Mesenchymal Stem Cells for Repairing Achilles Tendon in Rabbits. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, **20**, 77-87.

[6] Font Tellado, S., Balmayor, E.R. and Van Griensven, M. (2015) Strategies to Engineer Tendon/Ligament-to-Bone Interface: Biomaterials, Cells and Growth Factors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **94**, 126-140. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.004

[7] Zhang, W., Yang, Y., Zhang, K., Luo, T., Tang, L. and Li, Y. (2017) Silk-Poly(lactic-co-glycolic Acid) Scaffold/Mesenchymal Stem Cell Composites for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in Rabbits. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **7**, 571-581. https://doi.org/10.1166/jbt.2017.1604

[8] 唐靓, 张文元, 李跃中. 天然蚕丝混合再生蚕丝纬编针织网的生物学性能[J]. 中国医学工程, 2022, 30(10): 1-4.

[9] 张科技, 张文元, 杨亚冬, 等. 蚕丝-PLGA网状支架的力学强度检测及其与骨髓间充质干细胞共培养[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(23): 3351-3353.

[10] Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T. and Yamamuro, T. (1990) Solutions Able to Reproduce *in Vivo* Surface-structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W^3. *Journal of Biomedical Materials Research*, **24**, 721-734. https://doi.org/10.1002/jbm.820240607

[11] Zhang, L., Zhang, W., Hu, Y., Fei, Y., Liu, H., Huang, Z., *et al*. (2021) Systematic Review of Silk Scaffolds in Musculoskeletal Tissue Engineering Applications in the Recent Decade. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **7**, 817-840. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01716

[12] Fan, J., Sun, L., Chen, X., Qu, L., Li, H., Liu, X., *et al*. (2017) Implementation of a Stratified Approach and Gene Immobilization to Enhance the Osseointegration of a Silk-Based Ligament Graft. *Journal of Materials Chemistry B*, **5**, 7035-7050. https://doi.org/10.1039/c7tb01579h

[13] Bhattacharjee, P., Kundu, B., Naskar, D., Kim, H., Maiti, T.K., Bhattacharya, D., *et al*. (2017) Silk Scaffolds in Bone Tissue Engineering: An Overview. *Acta Biomaterialia*, **63**, 1-17. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.027

[14] Shiroud Heidari, B., Muiños Lopez, E., Harrington, E., Ruan, R., Chen, P., Davachi, S.M., *et al*. (2023) Novel Hybrid Biocomposites for Tendon Grafts: The Addition of Silk to Polydioxanone and Poly(lactide-Co-Caprolactone) Enhances Material Properties, *in Vitro* and *in Vivo* Biocompatibility. *Bioactive Materials*, **25**, 291-306. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.003

[15] Bi, F., Shi, Z., Liu, A., Guo, P. and Yan, S. (2015) Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in a Rabbit Model Using Silk-Collagen Scaffold and Comparison with Autograft. *PLOS ONE*, **10**, e0125900. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125900

[16] Bi, F., Chen, Y., Liu, J., Wang, Y., Xu, D. and Tian, K. (2021) Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in a Rabbit Model Using a Silk-Collagen Scaffold Modified by Hydroxyapatite at Both Ends: A Histological and Biomechanical Study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, **16**, Article No. 139. https://doi.org/10.1186/s13018-021-02281-0

[17] Zhang, W., Yang, Y., Zhang, K., Li, Y. and Fang, G. (2014) Weft-Knitted Silk-Poly(lactide-Co-Glycolide) Mesh Scaffold Combined with Collagen Matrix and Seeded with Mesenchymal Stem Cells for Rabbit Achilles Tendon Repair. *Connective Tissue Research*, **56**, 25-34. https://doi.org/10.3109/03008207.2014.976309

[18] Shen, W., Chen, X., Hu, Y., Yin, Z., Zhu, T., Hu, J., *et al*. (2014) Long-Term Effects of Knitted Silk-Collagen Sponge Scaffold on Anterior Cruciate Ligament Reconstruction and Osteoarthritis Prevention. *Biomaterials*, **35**, 8154-8163. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.019

[19] Liu, Q., Yu, Y., Reisdorf, R.L., Qi, J., Lu, C., Berglund, L.J., *et al*. (2019) Engineered Tendon-Fibrocartilage-Bone Composite and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheet Augmentation Promotes Rotator Cuff Healing in a Non-Weight-Bearing Canine Model. *Biomaterials*, **192**, 189-198. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.037

[20] Kaibuchi, N., Iwata, T., Onizuka, S., Yano, K., Yamato, M., Okano, T., *et al*. (2017) Cytological Character of Mini Pig Mesenchymal Stromal Cells from Various Tissues and the Attempt of Cell Sheet Formation. *Regenerative Therapy*, **6**, 83-89. https://doi.org/10.1016/j.reth.2017.02.001

[21] Lai, K., Xi, Y., Du, X., Jiang, Z., Li, Y., Huang, T., *et al*. (2020) Activation of Nell-1 in BMSC Sheet Promotes Implant Osseointegration through Regulating Runx2/Osterix Axis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **8**, Article No. 868. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00868

[22] Wang, Y., Lu, C., He, C., Chen, B., Zheng, Y., Zheng, J., *et al*. (2018) Construction of a Multilayered Mesenchymal Stem Cell Sheet with a 3D Dynamic Culture System. *Journal of Visualized Experiments*, No. 140, Article No. 58624. https://doi.org/10.3791/58624

[23] Maruyama, M., Wei, L., Thio, T., Storaci, H.W., Ueda, Y. and Yao, J. (2020) The Effect of Mesenchymal Stem Cell Sheets on Early Healing of the Achilles Tendon in Rats. *Tissue Engineering Part A*, **26**, 206-213. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2019.0163

[24] Wang, Z., Han, L., Sun, T., Ma, J., Sun, S., Ma, L., *et al*. (2020) Extracellular Matrix Derived from Allogenic Decellularized Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Sheets for the Reconstruction of Osteochondral Defects in Rabbits. *Acta Biomaterialia*, **118**, 54-68. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.022

[25] Wang, X., Chen, Z., Zhou, B., Duan, X., Weng, W., Cheng, K., *et al*. (2018) Cell-Sheet-Derived ECM Coatings and Their Effects on BMSCS Responses. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10**, 11508-11518. https://doi.org/10.1021/acsami.7b19718