

The Cytocompatibility of Silk Fibroin/Poly(ϵ -caprolactone) Electrospun Fibers*

Weichao Yang¹, Zhenran Xia^{1,2}, Caili Ma¹, Xiufang Li¹, Mingzhong Li^{1#}

¹School of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou

²School of Mechanical Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu

Email: #mzli@suda.edu.cn

Received: Nov. 1st, 2013; revised: Nov. 14th, 2013; accepted: Nov. 19th, 2013

Copyright © 2013 Weichao Yang et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: In order to develop a new degradable biomaterial with both good biocompatibility and mechanical properties, blended fibers composed of silk fibroin (SF) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL) were fabricated by electrospinning technique in this study. Confocal laser scanning microscope, scanning electron microscopy, cell adhesion rate and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) assay were used to analyse the cytocompatibility of SF/PCL electrospun fibers, and to study the influence of the SF/PCL blend ratio on L-929 cell adhere and proliferate. The results showed that cells on the SF/PCL electrospun fibers surface can adhere and proliferate, and the cell number increased with the prolongation of the culturing time. The rate of cell adhesion and proliferation cultured on the SF/PCL electrospun fibers with the ratio of 70/30 and 50/50 was higher than other SF/PCL blend ratio electrospun fibers.

Keywords: Electrospinning; Silk Fibroin; Poly(ϵ -caprolactone); Cytocompatibility

丝素/聚己内酯静电纺纤维的细胞相容性*

杨伟超¹, 夏震然^{1,2}, 麻彩丽¹, 李秀芳¹, 李明忠^{1#}

¹苏州大学纺织与服装工程学院, 苏州

²常熟理工学院机械工程学院, 常熟

Email: #mzli@suda.edu.cn

收稿日期: 2013年11月1日; 修回日期: 2013年11月14日; 录用日期: 2013年11月19日

摘要: 用蚕丝丝素(SF)和聚己内酯(PCL)共混进行静电纺丝, 可以制备一种新的既具有良好生物相容性又具有良好力学性能的可降解性生物材料。用激光共聚焦显微镜、扫描电镜、细胞粘附率和四甲基偶氮唑盐比色法对SF/PCL共混纤维的细胞相容性进行检测和分析, 研究了SF/PCL共混比例对L-929细胞粘附和生长的影响。结果表明, 细胞在SF/PCL静电纺丝网表面能够正常粘附和增殖且形态正常, 随着培养时间的延长细胞数量逐渐增多, 当SF/PCL共混比例为70/30和50/50时, 细胞粘附率和增殖率明显高于其他比例的静电纺丝网。

关键词: 静电纺丝; 蚕丝丝素; 聚己内酯; 细胞相容性

1. 引言

蚕丝丝素(SF)是一种天然的蛋白质, 无毒性,

*感谢国家自然科学基金项目(批准号: 31370968), 江苏省基础研究计划(编号: BK20131177)和江苏省高校自然科学基金项目(批准号: 12KJA430003)的资助。

#通讯作者。

具有良好的生物相容性和可控的生物降解性^[1-3]。以丝素为原料采用静电纺丝法制得的纤维有利于细胞的粘附、分化和增殖, 但其在力学性能方面往往存在韧性不足、断裂伸长率较小的缺点。聚己内酯(PCL)是一种人工合成的高聚物, 在体内可被降解, 无毒副作

用, 断裂伸长率较大, 柔韧性较好, 但其亲水性不足, 对细胞的亲和性有待提高^[4,5]。为了研制既具备良好生物相容性又具备良好力学性能的可降解纤维材料, 用于组织工程支架等生物医学领域, 本文采用静电纺丝法制备 SF/PCL 共混纤维, 研究共混比例对细胞粘附和增殖的影响。

2. 实验部分

2.1. 主要原料与试剂

家蚕生丝: 购自浙江省; 六氟异丙醇(HFIP): 购于美国杜邦公司; 聚己内酯(PCL): 购自上海 Sigma 公司; 小鼠胚胎成纤维细胞(L-929): 由苏州大学医学院提供; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、硫酸链霉素(Streptomycin)、氨苄青霉素(Ampicillin)、CM-DiI 荧光蛋白、MTT 粉末: 均购自上海西巴斯生物技术有限公司。

2.2. 丝素蛋白固体的制备

将家蚕生丝于沸腾的 0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液中煮 30 min, 然后用蒸馏水冲洗, 重复 3 次, 脱去家蚕生丝中的丝胶, 在 60°C 烘箱中干燥后得到丝素蛋白纤维。将丝素蛋白纤维于 65°C 溶解于 9.3 mol/L 的 LiBr 溶液中 1 h, 然后透析 3 d 得到丝素蛋白溶液。丝素蛋白溶液经流延法成膜, 室温干燥后得到丝素蛋白固体。

2.3. SF/PCL 共混纤维的制备

将丝素蛋白固体与 PCL 以不同 SF/PCL 比例 (100/0、70/30、50/50、30/70、0/100) 于 HFIP 溶液中恒温 (26°C) 振荡水浴溶解 3 天, 制得浓度为 6% 的 SF/PCL 纺丝液。将纺丝液填充到注射器中, 在浓度为 6%, 电压为 12 kV, 接收距离为 10 cm, 推注速度为 1.0 ml/h 的条件下进行静电纺丝, 得到不同比例的 SF/PCL 共混静电纺丝网。静电纺丝网用 80% 乙醇处理 30 分钟, 诱导 β -折叠构象转变, 使其不溶于水。静电纺丝网浸渍于去离子水中 1 d 以除去其中的乙醇。

2.4. SF/PCL 共混纤维的细胞相容性

在 37°C、5% CO_2 条件下, 用 DMEM 培养基(含

10% 小牛血清, 1% 的双抗) 培养小鼠胚胎成纤维细胞 (L-929)。静电纺丝网剪成 24 孔板大小的圆片状, 置于 24 孔细胞培养板中, 浸泡在 75% 乙醇中灭菌 2 小时, 再浸泡在三蒸水中 7 天除去乙醇。静电纺丝网用无菌 PBS 洗涤 3 次, 并转移到 24 孔细胞培养板。细胞接种到静电纺丝网之前, 静电纺丝网 37°C 条件下浸在 1 ml 的细胞培养基中过夜, 提高细胞粘附能力。将细胞浓度为 5×10^4 cell/ml 的细胞接种于静电纺丝网表面, 待细胞贴壁后添加 1 ml 培养基继续培养。

细胞形态的观察: 用活细胞示踪剂 CM-DiI 标记的 L-929 细胞接种于静电纺丝网和空白细胞培养板, 在 37°C、5% CO_2 条件下培养箱中孵化 4 h, 待细胞贴壁后添加 1 ml 培养基继续培养, 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 下观察细胞的生长状态以及细胞与材料的结合情况。4°C 条件下用浓度为 2.5% 的戊二醛将静电纺丝网上的细胞固定, PBS 洗涤两遍。之后冷冻干燥机干燥 36 h, 得到干燥的样品, 喷金后用日本 S-4800 扫描电子显微镜 (SEM) 观察细胞的生长情况。用细胞计数板测定悬浮的细胞数表征细胞粘附率。用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 表征细胞的活性。用酶标仪测定溶液的吸光度 (OD), 选定波长为 490 nm。用 SPSS16.0 软件进行统计学分析。P < 0.05 为有显著性差异。

3. 结果与讨论

3.1. 激光共聚焦显微镜

从图 1 中可以看出, L-929 细胞在 SF/PCL 共混纤维表面进行培养, 第一天时, 细胞均匀地分散在材料表面, 细胞形态多呈圆形; 到第三天时, 不同比例 SF/PCL 共混纤维上的细胞数量增多, 细胞呈梭形。培养至第五天及第七天时的激光共聚焦显微镜结果 (图片略) 显示, 材料上的细胞数量明显增多, 远多于第一天及第三天在材料上所看到的细胞数, 且大部分细胞都为梭形。其中 SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的细胞增殖数量明显高于其他的静电纺丝网。以上说明各种比例的 SF/PCL 材料都能够较好地支持 L-929 细胞的生长和增殖, 具有良好的细胞相容性, 且 SF/PCL 共混纤维与 SF 纤维或 PCL 纤维相比更有利于 L-929 细胞的生长。随着培养天数的延长, 各比例的 SF/PCL 静电纺丝网上的细胞数量逐

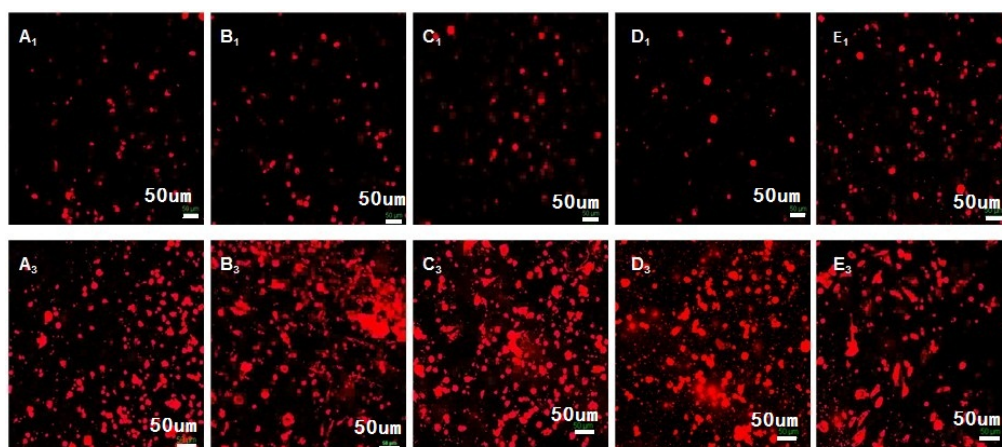


Figure 1. The CLSM images of L-929 cells cultured on the SF/PCL electrospun fibers surface; (A) SF; (B) SF/PCL = 70/30; (C) SF/PCL = 50/50; (D) SF/PCL = 30/70; (E) PCL. 1—cell culture 1 d; 3—cell culture 3 d
 图 1. L-929 细胞在 SF/PCL 静电纺丝网表面培养的激光共聚焦显微镜图片; (A) SF; (B) SF/PCL = 70/30; (C) SF/PCL = 50/50; (D) SF/PCL = 30/70; (E) PCL. 1—细胞培养 1 d; 3—细胞培养 3 d

渐增多,其中 SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的细胞形态优于其他比例的材料,细胞增殖速度也高于其他材料。研究表明,采用不同聚合物共混的方法制备的支架材料,可以改善单纯使用一种材料的适应性^[6]。SF 和 PCL 混合纺出的静电纺丝网,既具有亲水性质又具有疏水性质,满足了细胞粘附对材料亲疏水性的要求,从而使得细胞能够更快的粘附与增殖;且 SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 时,纺丝过程中纤维平均直径较细,能够产生更多的纳米级纤维,有效促进了细胞的粘附与增殖。

3.2. 扫描电子显微镜

从图 2 中可以看出,随着培养时间的延长,各静电纺丝网表面的细胞数量都逐渐增多且细胞分泌的细胞外基质也逐渐在纺丝网上沉积。培养一天后,L-929 细胞在各比例 SF/PCL 静电纺丝网表面粘附并开始生长;培养三天后,SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的细胞增殖数量明显增多,而且表面细胞外基质的沉积面积比较大。培养至第五天时(图片略),各组静电纺丝网表面的细胞大量增殖,静电纺丝网表面完全被细胞分泌的细胞外基质所覆盖。说明 L-929 细胞在五中不同比例 SF/PCL 的静电纺丝网表面都可以粘附和生长,且 L-929 细胞在比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的细胞增殖速度较快,SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网对细胞的增殖明显高于其他比例下的静电纺丝网。静电纺丝网

的形态和结构与天然细胞外基质有一定的相似性,为细胞的粘附和生长提供了较好的微环境。

3.3. 细胞粘附率

由图 3 可见,培养时间为 1、3、5 h 时,细胞在 SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的粘附率明显高于其他 SF/PCL 比例的静电纺丝网,这主要是由于 SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网上纳米级纤维多,有助于细胞的粘附,同时存在微米级纤维,纳米级纤维和微米级纤维交错存在,为细胞的粘附提供了粘附的附着点,更有助于细胞的粘附。2 h 以及 4 h 后,L-929 细胞在不同比例的 SF/PCL 静电纺丝网表面的粘附率均有所增加,SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网的细胞粘附率同样高于其他 SF/PCL 比例的静电纺丝网,有显著差异($P < 0.05$)。

3.4. 细胞活力

从图 4 可以看出,细胞在各组材料上第一天的增殖情况较为相近,未表现出显著的差异。培养至第三天,各种材料的 OD 值均有所增大,细胞活力增大、细胞增殖率提高。SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网上细胞活力均比其他 SF/PCL 比例的纳米纤维上的高,有显著差异($P < 0.05$)。第五天各组材料的 OD 值增加,他们之间仍存在差异,差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。第七天各组材料的 OD 值增加,而

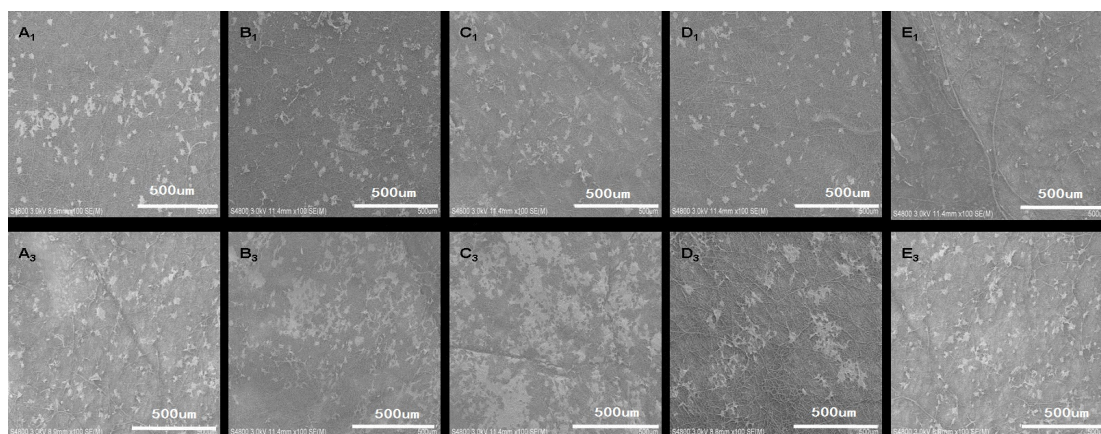


Figure 2. The SEM images of L-929 cells cultured on the SF/PCL electrospun fibers surface; (A) SF; (B) SF/PCL = 70/30; (C) SF/PCL = 50/50; (D) SF/PCL = 30/70; (E) PCL. 1—cell culture 1 d; 3—cell culture 3 d

图 2. L-929 细胞在 SF/PCL 静电纺丝网表面培养的扫描电镜图片; (A) SF; (B) SF/PCL = 70/30; (C) SF/PCL = 50/50; (D) SF/PCL = 30/70; (E) PCL. 1—细胞培养 1 d; 3—细胞培养 3 d

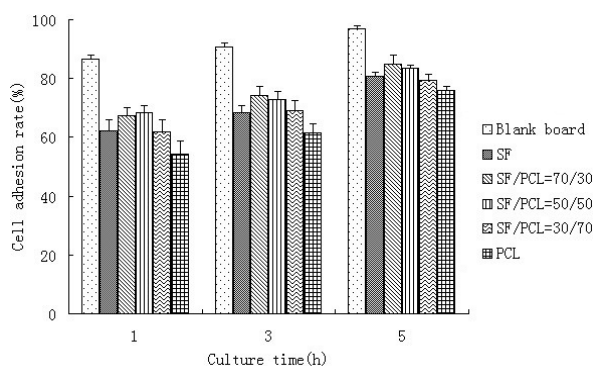


Figure 3. The cell adhesion rate of L-929 cells cultured on the SF/PCL electrospun fibers surface

图 3. L-929 细胞在 SF/PCL 静电纺丝网表面培养的细胞粘附率

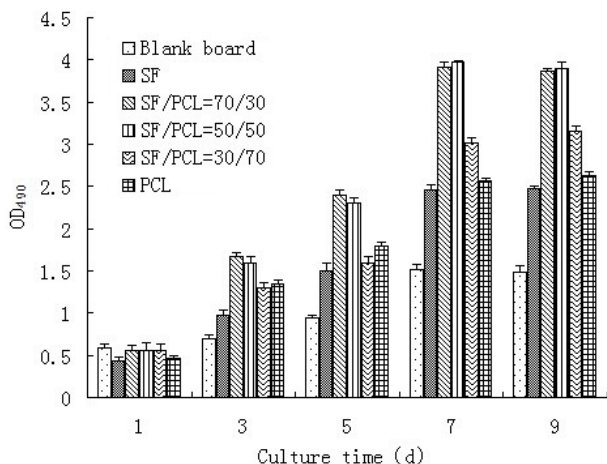


Figure 4. The cell proliferation activity of L-929 cells cultured on the SF/PCL electrospun fibers surface

图 4. SF/PCL 静电纺丝网表面的 L-929 细胞增殖活力

SF/PCL 比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网更充分的显示出其有利于细胞增殖和分化的能力, 与其他各组

材料的差异非常明显, 与纯 SF 及纯 PCL 组之间都具有极显著的差异($P < 0.01$)。到了第九天, 细胞在各组材料表面的增殖趋于平缓, 没有较大的增加, 此时细胞受生长空间的限制, 各组材料之间的差异与第七天类似。用 MTT 法测定得到的 OD 值反映了细胞活力和细胞增殖率, 图 4 的结果表明, 各种比例的 SF/PCL 静电纺丝网都可以支持细胞的生长和增殖, 而各组材料之间的细胞活力、细胞增殖率也有显著差异, 细胞在 SF/PCL 共混比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的增殖率明显高于其他各组材料, 尤其是显著高于纯 SF 及纯 PCL 组材料。

4. 结论

激光共聚焦显微镜和扫描电镜的观察结果表明, L-929 细胞能够在 SF/PCL 比例为 100/0、70/30、50/50、30/70 和 0/100 的静电纺丝网表面充分伸展, 细胞形态正常。随着培养时间的延长, 细胞数量增加, 细胞外基质沉积明显增多。而细胞在 SF/PCL 共混比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网表面的粘附率和增殖率明显高于其他 SF/PCL 比例的纤维网, SF/PCL 共混比例为 70/30 和 50/50 的静电纺丝网具有良好的细胞亲和性。

参考文献 (References)

- [1] Vepari, C. and Kaplan, D.L. (2007) Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, **32**, 991-1007.
- [2] Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., et al. (2003) Silk-based bio-

- materials. *Biomaterials*, **24**, 401-416.
- [3] You, R., Zhang, Y., Liu, Y., Liu, G. and Li, M. (2013) The degradation behavior of silk fibroin derived from different ionic liquid solvents. *Natural Science*, **5**, 10-19.
- [4] Chong, E.J., Phan, T.T., Lim, I.J., *et al.* (2007) Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution. *Acta Biomaterialia*, **3**, 321-330.
- [5] Koh, H.S., Yong, T., Chan, C.K., *et al.* (2008) Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials*, **29**, 3574-3582.
- [6] Ryan, S.V., Calligaro, K.D. and Dougherty, M.J. (2004) Management of hemodialysis access infections. *Seminars in Vascular Surgery*, **17**, 40-44.