

丝素/明胶组织工程支架的生物相容性初探

彭 鹏 余占海

摘 要 **目的** 初步研究丝素/明胶(silk fibroin/gelatin, SFG)支架的生物相容性。**方法** 利用冷冻干燥法制备 SF/G 支架, 将 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的第 3 代人牙周膜干细胞(human periodontal ligament stem cells, hPDLSCs)接种于 SF/G 支架上, 设置对照组(人牙周膜干细胞悬液), 通过 MTT 试验测试两组人牙周膜干细胞第 1、3、5、7 天的吸光度值, 利用细胞扫描电镜观察第 5 天和第 7 天两组细胞的生长增殖状况。**结果** MTT 显示接种于 SF/G 支架上的 hPDLSCs 的吸光度值在第 1、3、5、7 天分别为 0.053、0.113、0.197、0.399, 对照组分别为 0.069、0.105、0.176、0.283。细胞扫描电镜显示第 5、7 天的 hPDLSCs 在 SF/G 支架上相互融合, 分泌大量细胞外基质, 细胞触须几乎铺满整个支架表面, 并且有朝向支架空隙内部生长的趋势。**结论** 冷冻干燥法制备的 SF/G 支架能够促使细胞在其上增殖生长, 具有一定的生物相容性, 在牙周组织工程领域具有一定的应用潜力。

关键词 生物相容性 丝素 组织工程

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.023

Biocompatibility Preliminary Investigation of Silk Fibroin/Gelatin Tissue Engineering Scaffolds. Peng Peng, Yu Zhanhai. Department of Stomatology, Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang 310002, China

Abstract **Objective** To examine the biocompatibility of silk fibroin(SF)/Gelatin, (G) scaffolds. **Methods** SF/G scaffolds were made by freezing - dry method. Passages 3 human periodontal ligament stem cells at a density of $1 \times 10^5/\text{ml}$ were seeded on the scaffolds to evaluate its cellular biocompatibility by MTT assay and observed by scanning electron microscope. **Results** The MTT results showed that the human periodontal ligament stem cells seeded on the silk fibroin/Gelatin scaffolds had higher A values compared with blank control group, and the 5th and 7th days cell scanning electron microscopy figures also showed the human periodontal ligament stem cells grew well on the scaffolds. **Conclusion** SF/G scaffolds has good biocompatibility and application potential in periodontal tissue engineering.

Key words Biocompatibility; Silk fibroin; Tissue engineering

牙周炎、肿瘤、根尖周病变、颌面部外伤等常可导致牙周组织缺损, 骨质吸收, 进而引起牙齿松动, 严重者影响全身健康, 对人体造成严重伤害^[1]。目前牙周引导组织再生技术(GTR)应用广泛, 但并不能从根本上解决牙周组织再生^[2]。组织工程技术通过将细胞和生物支架材料整合, 经过体外生长, 植入人体组织器官缺损部位, 进而引导缺损组织再生。为牙周组织再生重建提供了新的探索途径^[3~7]。生物支架材料是组织工程三要素之一, 其扮演着临时细胞外基质(extracellular matrix components, ECM)的角色, 为细胞提供一个适宜的生长环境, 促使细胞黏附、生长、增殖、分化, 最后形成新组织。因此, 支架材料需要具备

良好的生物相容性^[8,9]。丝素蛋白(silk fibroin, SF)是一种天然纤维蛋白, 具有低免疫原性, 同时有良好的机械性能, 生物相容性、降解性、容易加工等优点^[10~13]。明胶(Gelatin, G), 胶原的一种变性衍生物, 具有良好的生物相容性、低抗原性, 优良的弹性而广泛用于临床和制药领域^[14~16]。人牙周膜干细胞(hPDLSCs)是促使牙周组织再生的基础细胞, 具有多项分化潜能^[17]。本研究采用冷冻干燥法制作丝素/明胶支架, 将 hPDLSCs 接种于支架上, 通过测定和观察细胞的增殖及生长状况, 初步测试丝素/明胶复合支架的生物相容性, 探讨其在牙周组织工程支架领域的应用潜力。

材料与方法

1. 材料: 蚕茧(陕西安康), 明胶(相对分子质量 240~270, 上海化学试剂厂), 人牙周膜干细胞(课题细胞组培养提供), 溴化锂(上海恒信化学试剂有限公司), 无水 Na_2CO_3 (分析纯, 上海化学试剂厂), 戊二醛(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 透析袋

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81102712); 甘肃省自然科学基金资助项目(1208RJZA148)

作者单位: 310002 杭州市第一人民医院口腔科(彭鹏); 730030 兰州大学口腔医学院(余占海)

通讯作者: 余占海, 博士生导师, 教授, 电子邮箱: yuzhanhai@lzu.edu.cn

(分子截留量 8000 ~ 14400, 科昊生物工程有限责任公司);

2. 实验设备: 细胞扫描电镜(日立 s4800), 冷冻干燥机(GT2-B 上海实维实验仪器技术有限公司)。

3. 实验方法: (1) 丝素/明胶支架的制作: 蚕茧脱胶: 质量分数 0.5% 的 Na_2CO_3 水溶液反复煮洗 3 次; 烘干: 置于恒温箱 (50°C , 12h); 丝素水溶液: 9mol/L 的 LiBr 溶液溶解丝素; 透析: 去除水溶液杂质, 制得纯丝素水溶液。冻干: -80°C 冰箱 24h, 真空干燥: 真空冷冻干燥机 48h; 丝素明胶水溶液: 质量分数 7:3, 恒温水浴 60°C ; 冻干: -80°C 冰箱 24h; 真空干燥: 真空冷冻干燥机 48h; 交联: 25% 戊二醛, 48h。 (2) 微观形貌扫描: 制样, 喷金, 扫描电镜观察支架微观形貌。 (3) 接种细胞: 紫外线消毒支架, 分装于 24 孔板, 接种 hPDLSCs, 接种密度 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养, 每 2 天更换培养液, 设置 hPDLSCs 悬液为对照组。 (4) MTT 实验: 测定接种于 SF/G 支架上的 hPDLSCs 数目及增殖情况。分别于第 1、3、5、7 天在支架上滴加 MTT (0.5mg/ml) 200 μl , 4h 后滴加 SDS200 μl (37°C , 5% CO_2) 24h 后震荡 30min, 移液枪吸取 100 μl 上清液于 96 孔板, 酶标仪测定支架吸光度值 (490nm 波长), 取 3 次平均值。 (5) 细胞扫描电镜: 观察第 5、7 天支架上 hPDLSCs 的形态及黏附增殖情况。PBS 清洗支架, 支架固定 (0.25% 戊二醛, 24h) (1% 锇酸, 2h); 梯度脱水 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇; 叔丁醇浸泡, 24h; 制样, 喷金 1min, 电镜观察。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析, 两组实验数据均数比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

丝素/明胶支架外观见图 1, 为冷冻干燥法制备的支架。色白, 质地坚韧细腻。



图 1 丝素/明胶复合支架外观

支架微观形态结构见图 2, 扫描电镜下可见支架为三维多孔结果, 孔径大小较一致, 孔隙相互连通。

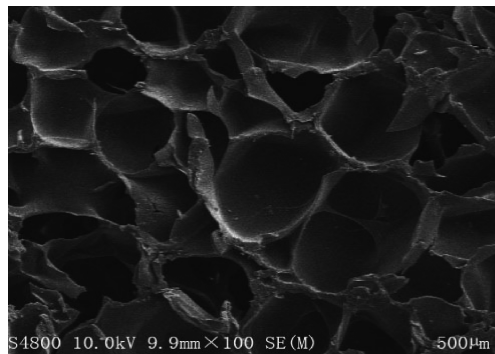


图 2 丝素/明胶支架微观形态

细胞活性和增殖 (MTT) 见图 3, MTT 结果显示第 1 天生长于 SF/G 支架上的 hPDLSCs 吸光度值 (A 值) 相较于对照组稍低, 第 3、5、7 天均高于对照组, 并在第 7 天明显高于对照组 ($P < 0.05$)。说明 SF/G 支架对细胞无毒性并可促进其增殖。

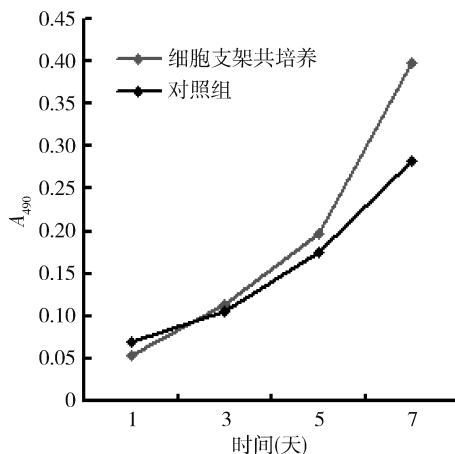


图 3 MTT 实验

细胞扫描电镜见图 4, 显示第 5、7 天 hPDLSCs 在支架上大量迁移增殖, 细胞触角延伸至支架孔隙内部, 分泌大量细胞外基质, 覆盖整个支架表面。

讨 论

三维多孔的结构以及高孔隙率是组织工程支架的必备条件之一^[18]。冷冻干燥法是制备组织工程支架的一种成熟技术, 原理是通过真空冷冻干燥使样品中的水升华, 从而使材料形成高孔隙结构。本实验利用冷冻干燥法制备的丝素/明胶支架在扫描电镜下可见孔隙相互连通的高孔隙率结构, 孔径较均匀, 形态易加工, 对于植入人体内, 引导不同部位, 不同形态的组织再生具有可操作性。

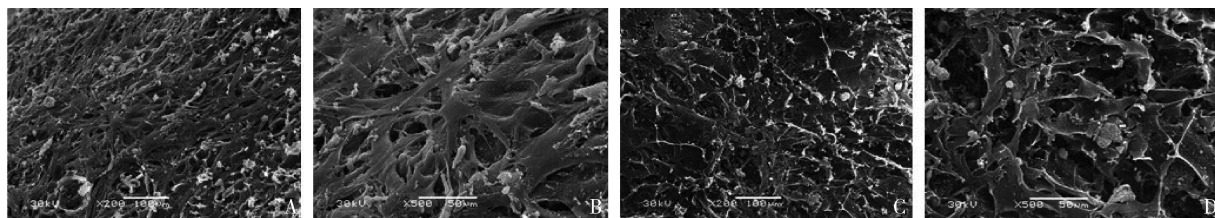


图4 人牙周膜干细胞于丝素/明胶支架上的生长状况

单纯丝素制成的支架缺乏足够的力学强度,容易形成片层状的微观结构,加入一定比例的明胶,可改变这一缺陷,容易加工形成具有一定力学强度,并且孔隙大小均匀的三维多孔的结构,增大了支架的表面积,为细胞提供了更多生长空间,有利于营养物质充分浸润扩散,被细胞吸收,因此更加有益于细胞在支架上的增殖生长^[19-21]。

MTT 实验显示第 1 天的 hPDLSCs 吸光度值低于对照组主要考虑细胞对新的生长环境有一定适应过程,同时可能由于支架孔隙里部分区域消毒不充分,对细胞产生一定毒性作用,造成部分细胞死亡,细胞数目下降。但第 3 天开始接种于 SF/G 支架上的细胞数目开始高于对照组,第 7 天明显高于对照组 ($P < 0.05$)。考虑细胞已适应新的生长环境,并且得益于支架的高孔隙率结构以及拥有更大的表面积,促进了其大量迁移增殖;另外明胶具有的精氨酸-丙氨酸-天冬氨酸(RGD)序列亦能够促使细胞增殖分化。证实了 SF/G 支架本身无毒性作用,具有一定的生物相容性^[14-16]。

第 5、7 天的细胞扫描电镜更加直观的证实了人牙周膜干细胞铺展生长覆盖于整个 SF/G 支架表面,相互融合,呈星网状分布,同时朝支架孔径内部生长,并且分泌大量细胞外基质,进一步证实 SF/G 支架具有较好生物相容性,适宜细胞生存增殖,在牙周组织工程支架领域有一定应用潜力。

参考文献

- Yang M, Zhang H, Gangolli R. Advances of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and dental tissue in craniofacial tissue engineering [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2014, 9(3):150-161
- Chen FM, Zhang J, Zhang M, *et al* A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(31):7892-7927
- Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, *et al*. Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering [J]. *J Biomechanics*, 2014, 47(9):1933-1940
- Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, *et al*. Tissue engineering in periodontal tissue [J]. *Anat Rec*, 2013, 297(1):16-25
- Magan A, Ripamonti U. Biological aspects of periodontal tissue regeneration: cementogenesis and the induction of Sharpey's fibres [J]. *SADJ: journal of the South African Dental Association*, 2013, 68(7):304-306
- Han J, Menicanin D, Gronthos S, *et al*. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration [J]. *Aust Dent J*, 2014, 59 (Suppl 1):117-130
- Ivanovski S, Vaquette C, Gronthos S, *et al*. Multiphasic scaffolds for periodontal tissue engineering [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(12):1212-1221
- Yang S, Leong K F, Du Z, *et al*. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors [J]. *Tissue Engineering*, 2001, 7(6):679-689
- Pereira TF, Silva MAC, Oliveira MF, *et al*. Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering. This paper analyzes how laser scan spacing and powder layer thickness affect the morphology and mechanical properties of SLS-made scaffolds by using a volume energy density function [J]. *Virt Phys Prototy*, 2012, 7(4):275-285
- Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, *et al*. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(4):457-470
- Kuboyama N, Kiba H, Arai K, *et al*. Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration [J]. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*, 2013, 101(2):295-302
- Zhu B, Li W, Lewis RV, *et al*. E-spun composite fibers of collagen and dragline silk protein: fiber mechanics, biocompatibility, and application in stem cell differentiation [J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(1):202-213
- Jiang J, Hao W, Li Y, *et al*. Hydroxyapatite/regenerated silk fibroin scaffold-enhanced osteoinductivity and osteoconductivity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(4):657-661
- Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications [J]. *Adv Drug Delivery Rev*, 2007, 59(4):207-233
- Tiyaboonchai W, Chomchalao P, Pongcharoen S, *et al*. Preparation and characterization of blended Bombyx mori silk fibroin scaffolds [J]. *Fiber Polym*, 2011, 12(3):324-333

(下转第 102 页)

全身症状,与成人相比更为严重。由于小儿脑血管具备良好的通透性,大大增加患儿脑水肿的概率,导致患儿生命体征波动较大,病情变化多端。在患儿颅骨缺损状态至缺损修补手术期间,相关并发症如颅骨缺损综合征、脑膜膨出、二次损伤、儿童心理障碍、脑塌陷低颅压综合征、硬脑膜钙化、瘢痕粘连、硬膜下积液、头皮感染、癫痫等不利儿童神经系统的发育。同时,影响颅骨缺损修补术后患儿的预后情况。颅骨缺损修补术前相关症状的处理尤为重要。脑积液、脑室贯穿畸形、硬膜下积液均可导致脑组织膨出骨窗边缘,本组资料中2例脑膨出患儿在颅骨修补术前均行脑室腹腔分流术;2例皮下感染、钛网外露患儿均行钛网取出术,进行细菌培养,根据药敏试验结果采用足量足程抗生素治疗,1年后行再次颅骨缺损修补;4例癫痫患儿修补术前均已发生癫痫,修补术后均嘱咐规范抗癫痫药物治疗两年,两年后根据患儿每月癫痫发生频次门诊随访指导抗癫痫药物减量治疗,对于术后预防性使用抗癫痫药物笔者与之意见相反,本组资料中所有患儿均未预防性使用抗癫痫药物。

另外不能忽视正常脑组织的代偿功能的潜力,颅脑损伤患儿的预后优于成年患者,治愈率较高,后遗症较成人少,因为患儿脑组织具备很高的可塑性,侧支循环较为丰富,因而在脑组织损伤后,血供代偿性能较好,避免继发损伤的加重,为患儿脑组织的修复提供有利条件,随着患儿神经系统的不断生长发育,患儿受损伤的脑组织与神经功能缺失会被后续发育脑组织替代,积极早期高压氧治疗和神经功能锻炼无异于会缩短颅骨缺损修补的间隔时间,减少颅骨修补相关并发症的发生率。同时,不能忽视对相关症状的院后康复锻炼的作用。

综上所述,术者应注意患儿术中规范而又精细的操作,尽可能减少两次手术并发症的发生。随着个体化、精准医疗的提倡,对低龄患儿有临床症状的病例可以提前修补,无临床症状的可以适度放宽,以避免

颅骨生长个体的差异性所带来的不确定性,正常颅骨的生长,取决于完整的硬脑膜和正常的大脑发育,而年幼的患儿更需要尽快恢复颅骨完整的保护功能。

参考文献

- 1 向伟,丁宗一. 儿童意外伤害的预防及措施[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(11):876-879
- 2 中国医师协会神经外科医师分会,中国神经创伤专家委员会. 中国颅脑创伤外科手术指南[J]. 中华神经外科杂志, 2009, 25(2): 301-302
- 3 Chibbaro S, Di Rocco F, Mirone G, *et al.* Decompressive craniectomy and early cranioplasty for the management of severe head injury: a prospective multicenter study on 147 patients [J]. World Neurosurg, 2011, 75(3-4):558-562
- 4 侯海东,张春阳,刘明. 0~6岁小儿颅骨生长特点与同期颅骨缺损修补可行性研究[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(3):286-288
- 5 顾硕,鲍南,徐织. 儿童颅骨缺损早期修补的实践及探讨[J]. 中华神经外科杂志, 2012, 28(10):1001-1004
- 6 Grant GA, Jolley M, Ellenbogen RG, *et al.* Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents [J]. Neurosurg, 2004, 100(2):163-168
- 7 Bowers CA, Riva-Cambrin J, Hertzler DA, *et al.* Risk factors and rates of bone flap resorption in pediatric patients after decompressive craniectomy for traumatic brain injury [J]. Neurosurg Pediatr, 2013, 11(5):526-532
- 8 Springer IN, Acil Y, Kuchenbecker S, *et al.* Bone graft versus BMP-7 in a critical size defect - cranioplasty in a growing infant model [J]. Bone, 2005, 37(4):563-569
- 9 Sakamoto S, Eguchi K, Kiura Y, *et al.* CT perfusion imaging in the syndrome of the sinking skin flap before and after cranioplasty [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2006, 108(3):583-585
- 10 Fodstad H, Love JA, Ekstedt J, *et al.* Effect of cranioplasty on cerebrospinal fluid hydrodynamics in patients with the syndrome of the trephined [J]. Acta Neurochir, 1984, 70(1-2):21-30
- 11 Winkler PA, Stummer W, Linke R, *et al.* Influence of cranioplasty on postural blood flow regulation, cerebrovascular reserve capacity, and cerebral glucose metabolism [J]. Neurosurg, 2000, 93(1):53-61
- 12 杨玲,张宇强,侯俊,等. 小儿颅骨缺损早期修补术26例[J]. 临床小儿外科杂志, 2015, 14(4):341-342
- 13 林友城,严国凤,黄陈铭. 小儿颅骨缺损早期修复治疗的探讨(附32例报告) [J]. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11(3):168-169
- 14 Honeybul S, Ho KM. Long-term complications of decompressive craniectomy for head injury [J]. J Neurotrauma, 2011, 28(9):929-935

(收稿日期:2017-09-17)

(修回日期:2017-10-07)

(上接第98页)

- 16 Rungsiyanont S, Dhanesuan N, Swasdison S, *et al.* Evaluation of biomimetic scaffold of gelatin-hydroxyapatite crosslink as a novel scaffold for tissue engineering: Biocompatibility evaluation with human PDL fibroblasts, human mesenchymal stromal cells, and primary bone cells [J]. J of Biomat Appl, 2012, 27(1):47-54
- 17 潘有条,王一飞,赵润,等. 微环境对牙周膜干细胞分化的抑制和诱导作用 [J]. 国际口腔医学杂志, 2016, 43(2):207-211
- 18 Bian W, Lian Q, Li D, *et al.* Morphological characteristics of cartilage-bone transitional structures in the human knee joint and CAD design of

an osteochondral scaffold [J]. Biomed Eng Online, 2016, 15(1):82

- 19 Lu Q, Zhang XH, Hu X, *et al.* Green process to prepare silk/gelatin biomaterial scaffolds [J]. Macromol Biosci, 2010, 10(3):289-298
 - 20 Lv Q, Feng QL, Hu K, *et al.* Three-dimensional fibroin/collagen scaffolds derived from aqueous solution and the use for HepG2 culture [J]. Polymer, 2005, 46(26):12662-12669
 - 21 Lu Q, Wang XL, Lu SZ, *et al.* Nanofibrous architecture of silk fibroin scaffolds prepared with a mild self-assembly process [J]. Biomaterials, 2011, 32(4):1059-1067 (收稿日期:2018-01-17)
- (修回日期:2018-03-24)