

丝素蛋白含量对纳米羟基磷灰石仿生矿化和体外细胞相容性的影响

朱云荣¹, 陈玉云², 许国华¹, 叶晓健¹, 钟健², 何丹农²

(1. 长征医院, 上海 200003; 2. 纳米技术及应用国家工程研究中心, 上海 200241)

摘要: 通过制备含有不同丝素蛋白(SF)含量的丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料, 着重研究丝素蛋白含量对纳米羟基磷灰石(n-HA)仿生矿化过程中晶体成核与生长及体外细胞相容性的影响。结果表明: SF 的加入对 n-HA 晶体的成核和生长具有明显的调控作用; 丝素含量的大小对 n-HA 晶体成核和生长没有明显的区别, 但对晶粒在有机大分子中的聚集状态有明显的影响: 当 SF 含量不超过 20wt%时, n-HA 晶粒呈现放射状团簇, 当 SF 含量超过 20wt%时, n-HA 晶粒无序团聚。体外细胞相容性结果显示, SF 的加入可以促进材料与细胞的界面亲和性, 但 SF 含量对这种亲和性的影响不明显, 20wt%和 30wt%的 SF 含量对增殖能力具有较强的促进作用。

关键词: 羟基磷灰石; 丝素蛋白含量; 纳米晶; 仿生矿化; 细胞相容性

中图分类号: TB321

文献标识码: A

Effect of Silk Fibroin Content on the Bionic Mineralization and *In Vitro* Cellular Compatibility of Silk Fibroin/Hydroxyapatite Nanocomposites

ZHU Yun-Rong¹, CHEN Yu-Yun², XU Guo-Hua¹, YE Xiao-Jian¹, ZHONG Jian², HE Dan-Nong²

(1. Changzheng Hospital, Shanghai 200003, China; 2. National Engineering Research Center for Nanotechnology, Shanghai 200241, China)

Abstract: Silk fibroin and hydroxyapatite nanocomposites (SF/HA) with various SF content were prepared. Effect of Silk fibroin content on the bionic mineralization and cellular compatibility *in vitro* of HA nanocrystals (n-HA) was investigated. The results show that SF content has an obvious effect on the nucleation and growth of n-HA. However, though SF content does not show obvious difference on the nucleation and growth of n-HA, it has obvious effect on the n-HA aggregation. When SF content is less than 20wt%, n-HA orderly disperses in SF matrix. While the SF content is more than 20wt%, the n-HA aggregation becomes disordered. The *in vitro* cellular compatibility experiments demonstrate that the SF/HA composites exhibit better cell affinity than pure n-HA. However, SF content has no obvious effect on the cell affinity of n-SF/HA 20wt% SF/HA and 30wt% SF/HA show better osteoblast proliferation.

Key words: hydroxyapatite; silk fibroin content; nanocrystals; bionic mineralization; cytocompatibility

蚕丝丝素蛋白(silk fibroin, SF), 作为一种天然提取蛋白, 以其良好的生物相容性、生物可降解性、力学性能优良、对细胞的粘附、扩增、分化作用良好等特点, 逐渐应用于生物替代材料和组织工程材料, 丝素蛋白/羟基磷灰石复合材料也被探索用来作

为骨组织修复材料^[1-2]。当前对纳米丝素蛋白/羟基磷灰石(n-SF/HA)复合材料的制备与性能的研究集中于制备工艺对 HA 结晶行为以及 SF 与 HA 结合方式的影响^[3-5]、制备方法改进^[6-7]、以及 SF/HA 纳米晶^[8-10]、在 SF 纤维上沉积 HA^[11-12]和在 SF 薄膜上

收稿日期: 2011-08-25; 收到修改稿日期: 2011-11-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2009CB930000); 上海市自然科学基金(0852nm03100)

973 Program (2009CB930000); Natural Science Research Foundation of Shanghai (0852nm03100)

作者简介: 朱云荣(1984-), 男, 博士研究生. E-mail: zyr13579@hotmail.com

通讯作者: 叶晓健, 教授. E-mail: yexj1964@hotmail.com; 陈玉云, 硕士. E-mail: jeccica_1982@hotmail.com

沉积 HA^[13-15]等不同的应用形式的研究。

由于自然骨中的无机成分约占 70wt%，有机成分约占 30wt%，很多研究没有对该质量配比进行过论证与核实，而直接制备出 30%SF/70%HA 的材料开展后续研究。针对这个问题，本研究以丝素蛋白为生物矿化的模板，采用仿生方法制备不同丝素含量的 n-SF/HA，研究丝素蛋白含量对 n-HA 的晶体成核与生长行为，以及材料/细胞界面相容性的作用和影响，讨论有机大分子 SF 对无机矿物 HA 在分子水平上的精细控制过程和有机无机界面处的相互作用。

1 材料与方法

1.1 实验原料

桑蚕茧由湖州市农业科学研究院提供；骨肉瘤细胞(MG63)购自中科院上海细胞库；胎牛血清和 MEM 培养基购自 Gibco(加拿大)；二甲基亚砜(DMSO)和噻唑蓝(MTT)购自 Sigma(美国)；其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司(上海)，并且均为分析纯。

1.2 材料制备与表征

以终产物 SF 与 HA 的设计质量比率(设计比率分别为 0、10wt%、20wt%、30wt%、40wt%)以及终产物 HA 中 Ca/P 为 1.67 的计量比为原则，采用文献[16]的制备方法，合成了一系列不同质量比率的 n-SF/HA 复合材料。首先将购买的桑蚕茧用 0.5%(w/v)的 Na₂CO₃ 水溶液进行脱胶处理，烘干，得到丝素纤维；然后称取 1.12、2.51、4.3、6.69 g(分别对应设计比率 10wt%、20wt%、30wt%、40wt%)的丝素纤维，置入 75℃的 CaCl₂-CH₃CH₂OH-H₂O 三元溶剂(摩尔比为 1:2:8)至完全溶解，其中三元溶剂中 CaCl₂ 为 11.10 g。然后向该溶解液中逐滴加入 (NH₄)₂HPO₄ 溶液((NH₄)₂HPO₄ 的质量为 7.92 g)，体系中出现白色沉淀，继续在温度 75℃和搅拌条件下反应 24 h，通过加入氨水维持整个体系的 pH 值为 10 左右。最后将白色沉淀反复清洗，烘干，得到不同 SF 含量的 n-SF/HA 粉末样品。将上述 5 组 n-SF/HA 都采用静电雾化沉积设备^[17]沉积于钛合金表面形成涂层样品以备作细胞测试，其中钛合金为 φ12 mm × 1.5 mm 的片状，制备出的涂层厚度约 50 μm。

用透射电镜 TEM(JEM-2100F, Joel, 日本)对 n-SF/HA 的微观形态进行观察。

1.3 材料的体外细胞相容性检测

1.3.1 细胞增殖检测(四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)法)

分别将灭菌处理后的 n-SF/HA 涂层样品置于 24 孔板中。每孔接种细胞悬液 700 μL(浓度为 1 × 10⁴ cells/mL)，在 37℃和 5% CO₂ 环境的培养箱(Thermo, 美国)中孵育，并分别于第 1、4、7 d 吸去孔板中的培养液，每孔加入 70 μL MTT 溶液(5mg/mL，即 0.5% MTT)，继续培养 4 h，产生蓝紫色结晶物。每孔加入 700 μL 二甲基亚砜(DMSO)，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。取 200 μL 溶解液转入 96 孔板中，在酶联免疫检测仪(infinite F50, TECAN, 瑞士)OD490 nm 处测量各孔的吸光值。

根据以下公式计算细胞增长率：

$$\text{增殖率}(\%) = (\text{实验} - \text{本底}) / (\text{对照} - \text{本底}) \times 100\%$$

每组样品 6 个平行样本，取平均值，T-test 法计算标准偏差， $p < 0.05$ 具有统计学意义。

1.3.2 细胞形态观察

分别将灭菌处理后的 n-SF/HA 涂层样品置于 24 孔板中。每孔接种 700 μL 细胞悬液(1 × 10⁴ cells/mL)，在 37℃和 5% CO₂ 环境中培养，并分别于第 1、4、7 d 弃去培养液并加入 5%戊二醛溶液，4℃固定 24 h，梯度乙醇脱水干燥，并喷金后在扫描电镜 SEM(s-4800, Hitachi, 日本)下观察细胞形态。

2 结果与讨论

2.1 n-SF/HA 的透射电镜分析(TEM)

图 1 是 5 组 n-SF/HA 颗粒的 TEM 照片。由图 1(a)、(b)所见，n-HA 晶粒形状为棒状，晶粒尺寸的长度范围为 20~100 nm，宽度为(35 ± 4) nm，晶粒分布呈明显的随机性。由图 1(c)、(d)所见，10%SF/HA 晶粒形状为针状，统计分析得出晶粒尺寸长度为(140 ± 10) nm，宽度为(15 ± 4) nm，n-HA 晶粒的形态发生明显变化，晶粒密集交错团簇并呈现放射状的聚集形态。图 1(e)、(f)中 20%SF/HA 晶粒形状为针状，统计分析得出长度为(148 ± 18) nm，宽度为(12 ± 2) nm，n-HA 晶粒团簇成团并呈现放射状聚集形态。图 1(g)、(h)中 30% SF/HA 晶粒形状为针状，统计分析得出长度为(143 ± 14) nm，宽度为(10 ± 2) nm，晶粒开始团聚。图 1(i)、(j)中 40%SF/HA 晶粒形状为针状，统计分析得出长度为(136 ± 10) nm，宽度为(10 ±

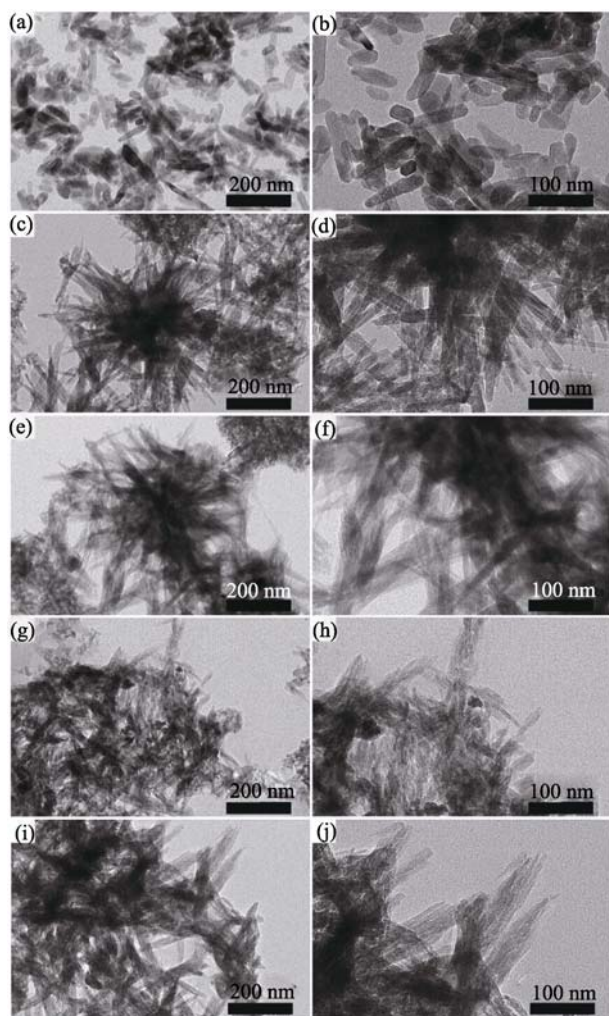


图 1 n-SF/HA (0~40wt%)的 TEM 照片

Fig. 1 TEM images of five groups of n-SF/HA (0~40wt%) samples

(a), (b) HA; (c), (d) 10wt%SF/HA; (e), (f) 20wt%SF/HA; (g), (h) 30wt%SF/HA; (i), (j) 40wt%SF/HA

2) nm, 晶粒团聚. 上述现象说明 SF 的加入对 n-HA 的晶体形貌和晶体在有机大分子中的聚集状态起到了调控作用: n-HA 晶粒形状在 SF 的调控下由短棒状变化为针状, 长径比增大, 晶粒尺寸在 SF 的调控下长度增加宽度减少, 晶粒聚集状态由随机分布变化为晶粒密集交错. SF 含量的变化对晶粒尺寸的影响不明显, 但是对晶粒的聚集形态的影响较为明显: SF 含量不超过 20wt%时, 密集交错的晶粒团簇并呈现放射状, SF 含量大于 20wt%时, 晶粒团聚呈无序状态.

丝素在三元体系的溶解过程中 Ca^{2+} 与 SF 中的氨基酸残基以及酰胺基形成静电和共价结合, 大量的 Ca^{2+} 分布于蛋白质表面, 复合时与 PO_4^{3-} 通过静电作用彼此互相靠近促进 n-HA 颗粒的形成, 并且 n-HA 表面的 Ca^{2+} 与蛋白质中的酰胺基、胺基和羧基等的静电或共价作用, 即 Ca^{2+} 在 SF 和 n-HA 颗粒

之间起到了桥架作用^[2, 4, 16], Ca^{2+} 在吸附位上通过静电或者共价作用停留在 SF 长链上, 才能继续完成成核与矿化的过程. 因此, SF 含量对 n-HA 矿化的影响如图 2 所示, 当 SF 含量不超过 20wt%时, SF 提供的吸附位点相对于 Ca^{2+} 不饱和, Ca^{2+} 通过以 SF 长链为模板自组装沿长链方向生长, n-HA 晶体有序放射状分布; 当 SF 含量超过 20wt%时, SF 提供的吸附位点相对于 Ca^{2+} 趋向饱和, Ca^{2+} 可以和不止一个 SF 的位点吸附, 导致 SF 大分子链的牵连缠绕, 因此有序性就有可能降低.

2.2 n-SF/HA 的体外细胞相容性评价

图 3 是通过 MTT 检测 MG63 细胞在 5 组 n-SF/HA 涂层上培养 1、4、7 d 的吸光度值. 第 1 d 和第 4 d 的吸光度值基本没有差异, 第 7 d 的吸光度值有较为明显的提高, 第 7 d 的吸光度值 30%SF/HA 样品的最高, 其次是 20%SF/HA 样品组, 其他组差异不显著($p>0.05$). 计算第 7 d 的细胞增殖率, 以同

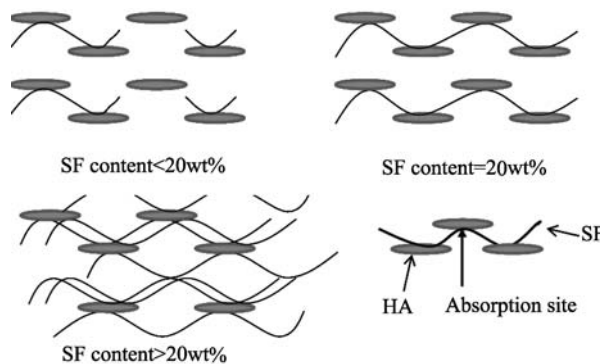


图 2 HA 以 SF 为模板的生物矿化过程示意图

Fig. 2 Schematic models of the biomineralization in the composite of SF/HA

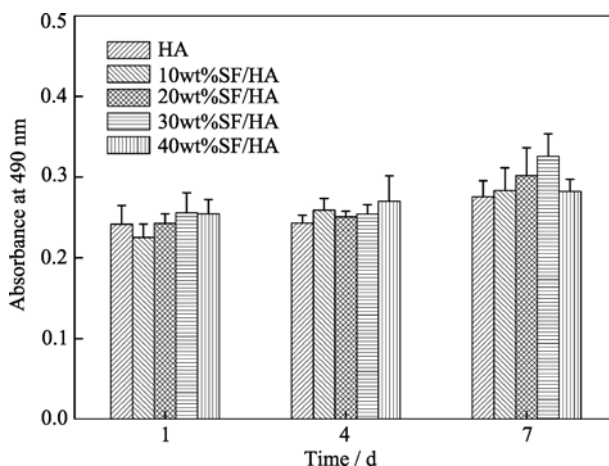


图 3 MG63 细胞在五组 n-SF/HA (0~40wt%)涂层材料上的增殖性能

Fig. 3 Proliferation properties of MG63 on five groups of n-SF/HA (0~40wt%) coating samples

期培养的 HA 为对照组, 30wt%SF/HA 为 15.35%, 20wt%SF/HA 为 13.56%, 说明 20wt%和 30wt%含量对细胞增殖有促进作用。

实验还研究了 MG63 细胞在涂层上贴壁生长情况, 结果显示 n-SF/HA(0~40wt%)涂层上细胞都可以良好贴壁并完全伸展, 并且细胞数量接近, 说明 SF 含量对细胞与材料的界面亲和性没有明显的影响。本文只列出了 n-HA, 20wt%SF/HA 涂层上细胞生长粘附 1、4、7 d 的 SEM 照片(图 4)。结果显示, 在有无丝素加入的表面上, 细胞都可以在材料表面完全铺展, 并与材料紧密结合。加入丝素与未加入丝素的表面相比, 细胞数量明显增多, 说明 SF 的加入可以提高 MG63 细胞与材料的界面相容性。综合上述 MTT 与 SEM 结果分析可知, 与空白组相比, SF 的加入提高了细胞与材料的粘附能力, 促进了细胞更快速的增殖, 而 20wt%和 30wt% SF 的含量对增殖能力的促进作用略强, 这可能是由于 SF 含量的增高会引起材料表面粗糙度的增大而导致的。

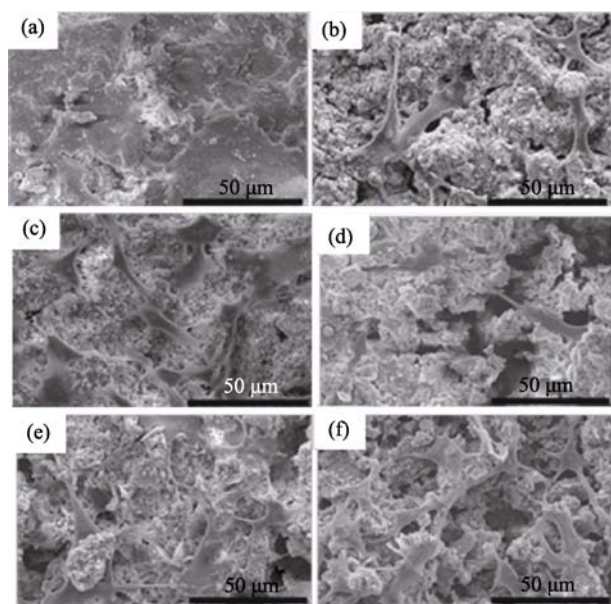


图 4 MG63 细胞在 n-SF/HA (0、20wt%)涂层材料上培养的 SEM 照片

Fig. 4 SEM images of MG63 cultured on n-SF/HA (0, 20wt%) coating samples

(a), (b), (c) n-HA controlled cultured of 1, 4, 7 d; (d), (e), (f) 20wt%SF/HA controlled cultured for 1, 4, 7 d

3 结论

1) SF 的加入对 n-HA 晶体的成核和生长具有明显的调控作用: 促进 n-HA 晶粒沿 *c* 轴高度择优生长, 长径比增大, 形貌由短棒状调控为针状; 丝素含量对 n-HA 晶体成核和生长的影响不明显, 但对晶粒在有机大分子中的聚集状态有明显的调控作用: 当 SF

含量不超过 20wt%时, n-HA 晶粒呈现放射状团簇, 当 SF 含量超过 20wt%时, n-HA 晶粒为无序团聚;

2) SF 的加入可以促进材料与细胞的界面亲和性, 但 SF 含量对这种亲和性的影响不明显, 20wt%和 30wt%的含量对增殖能力的促进作用略为明显。

参考文献:

- [1] Wang Yongzhong, Kim Hyeon-Joo, Gordana Vunjak-Novakovic, *et al.* Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 2006, **27**(36): 6064–6082.
- [2] Kong X D, Cui F Z, Wan X M, *et al.* Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals. *Journal of Crystal Growth*, 2004, **270**(1/2): 197–202.
- [3] 王刚, 姚金波, 周旭光, 等. “一步法”制备纳米丝素蛋白/羟基磷灰石生物复合材料. *复合材料学报*, 2008, **25**(6): 136–139.
- [4] WANG Jiang, ZUO Yi, YANG Wei-Hu, *et al.* Study on preparation of n-HA and silk fibroin bio-mineral material. *Journal of Inorganic Materials*, 2009, **24**(2): 264–268.
- [5] Wang Li Ning, Gui-Ling Senna Mamoru. Microstructure and gelation behavior of hydroxyapatite-based nanocomposite sol containing chemically modified silk fibroin. *Colloids and Surfaces A*, 2005, **254** (1/2/3): 159–164.
- [6] Kong Xiangdong, Sun Xiaodan, Cui Fuzhai, *et al.* Effect of solute concentration on fibroin regulated biomineralization of calcium phosphate. *Materials Science and Engineering C*, 2006, **26**(4): 639–643.
- [7] Sun Xiao-Dan, Zhou Ying-Li, Ren Juan-Yong, *et al.* Effect of pH on the fibroin regulated mineralization of calcium phosphate. *Current Applied Physics*, 2007, **7**(S1): 75–79.
- [8] 王江, 杨维虎, 沈宝珍, 等. 纳米羟基磷灰石/丝素蛋白生物复合材料的制备和表征. *高分子材料科学与工程*, 2008, **24**(11): 165–168.
- [9] 杨辉, 张林, 张宏, 等. 丝素蛋白/羟基磷灰石复合材料的制备及性能表征. *复合材料学报*, 2007, **24**(3): 141–146.
- [10] LI Zhi-Hong, WU Ji-Min, HUANG Shu-Jie *et al.* Effect of pretreatment on fabrication of natural fibroin fiber/apatite composites using alternate soaking method. *Journal of Inorganic Materials*, 2011, **26**(1): 43–48.
- [11] 曹惠, 陈新, 邵正中(CAO Hui, *et al.*). 羟基磷灰石/丝素蛋白复合纤维的制备及其矿化研究. *化学学报(Acta Chim. Sinica)*, 2008, **66**(18): 2059–2064.
- [12] Li Yucheng, Cai Yurong, Kong Xiangdong, *et al.* Anisotropic growth of hydroxyapatite on the silk fibroin films. *Applied Surface Science*, 2008, **255**(5): 1681–1685.
- [13] Du Chunling, Jin Jun, Li Yucheng, *et al.* Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: structure and properties. *Materials Science and Engineering C*, 2009, **29**(1): 62–68.
- [14] 刘琳, 孔祥东, 李玉成, 等(LIU Lin, *et al.*). 预处理对丝素蛋白膜调控羟基磷灰石晶体生长的影响. *高等学校化学学报(Chem. J. Chinese N.)*, 2009, **30**(10): 1987–1991.
- [15] 姚菊明, 魏克民, 励丽, 等(YAO Ju-Ming, *et al.*). 蚕丝素蛋白初始结构对其矿化作用的影响. *化学学报(Acta Chim. Sinica)*, 2007, **65**(7): 635–639.
- [16] Fan Chuanquan, Li Jiashun, Xu Guohua, *et al.* Facile fabrication of nano-hydroxyapatite/silk fibroin composite via a simplified coprecipitation route. *Journal of Material Science*, 2010, **45**(21): 5814–5819.
- [17] Zhu Yunrong, Chen Yuyun, Xu Guohua, *et al.* Micropattern of nano-hydroxyapatite/silk fibroin composite onto Ti alloy surface via template-assisted electrostatic spray deposition. *Materials Science and Engineering C*, 2012, **32**(2): 390–394.