

# 乙醇诱导的柞蚕丝素蛋白多孔材料的研究

王心如<sup>1a,b</sup>, 邹盛之<sup>1a,b</sup>, 冯文庆<sup>1a,b</sup>, 张耀鹏<sup>1a,b</sup>, 张佳明<sup>2</sup>, 邵惠丽<sup>1a,b</sup>

(1. 东华大学 a. 纤维材料改性国家重点实验室; b. 材料科学与工程学院 上海 201620; 2. 复旦大学附属华山医院 老年科 上海 200040)

**摘要:** 文章采用乙醇诱导再生柞蚕丝素蛋白 (ASF) 水溶液形成凝胶, 并对该凝胶冷冻干燥制备出不溶于水的 ASF 多孔材料, 利用傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 和扫描电子显微镜 (SEM) 研究乙醇水溶液浓度、ASF 初始浓度对 ASF 凝胶及其冻干后样品结构的影响, 并采用激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 对 ASF 多孔材料的生物相容性进行评价。FTIR 结果表明, 乙醇诱导 ASF 水溶液成胶伴随着大量  $\beta$ -折叠构象的形成。SEM 结果显示, 冻干后的 ASF 多孔材料孔径在 14.2 ~ 30.4  $\mu\text{m}$ 。LSCM 结果表明, 该材料在生物医学领域具有潜在的应用价值。

**关键词:** 柞蚕丝素蛋白; 冷冻干燥; FTIR;  $\beta$ -折叠构象; 凝胶

中图分类号: TS102.33 文献标志码: A 文章编号: 1001-7003(2018)10-0001-08 引用页码: 101101

## Studies on Antheraea pernyi silk fibroin porous materials induced by ethanol

WANG Xinru<sup>1a,b</sup>, ZOU Shengzhi<sup>1a,b</sup>, FENG Wenqing<sup>1a,b</sup>, ZHANG Yaopeng<sup>1a,b</sup>, ZHANG Jiamin<sup>2</sup>, SHAO Huili<sup>1a,b</sup>

(1a. State Key Laboratory for Modification of Chemical Fibers and Polymer Materials; 1b. College of Materials Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China; 2. Department of Geriatric Cardiology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** Antheraeapernyi silk fibroin (ASF) gels were prepared from regenerated ASF aqueous solutions induced by ethanol, and freeze-dried to form insoluble ASF porous materials. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscope (SEM) were used to investigate the effects of ethanol concentration and original ASF concentration on the structure of ASF gel and its freeze-dried samples. Moreover, laser scanning confocal microscope (LSCM) was used to further evaluate the biocompatibility of the obtained ASF porous materials. FTIR results showed that the gelation process of regenerated ASF aqueous solution induced by ethanol was accompanied by the formation of substantial  $\beta$ -sheet conformation. SEM results indicated that the pore size of the obtained ASF freeze-dried samples ranged from 14.2 to 30.4  $\mu\text{m}$ . LSCM results further showed that the ASF materials had great potential for biomedical application.

**Key words:** Antheraea pernyi silk fibroin; freeze-drying; FTIR;  $\beta$ -sheet conformation; gel

生物医用材料是一类与生命系统相作用,用以诊断、治疗、修复和替代人体病变或损伤的组织、器官,或增进其功能的材料<sup>[1]</sup>。目前,正在研究及已得到应用的生物医用材料很多,例如硅橡胶、胶原蛋

白、甲壳胺、尼龙、聚酯等,它们各有其特点,但有些合成材料的生物相容性不足,有些天然材料则提纯比较困难,成本较高<sup>[1-2]</sup>。

相比之下,天然蚕丝是一种容易获得且价格相对便宜的生物材料,由于其具有优良的柔韧性、吸湿性、透气性和优雅的光泽而被人们熟知。蚕丝中含有生物相容性良好的丝素蛋白,而丝素蛋白自身及降解产物对细胞和机体无毒,不会或较少引起炎症和免疫排斥反应,从而使得蚕丝在生物医学领域的研究得到迅速发展。蚕丝可分为家蚕丝与野蚕丝两大类,家蚕丝主要指桑蚕丝,野蚕丝则包括柞蚕丝、

收稿日期: 2017-11-23; 修回日期: 2018-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(21674018); 上海市曙光人才计划项目(15SG30); 国家重点研发计划(2018YFC1105800, 2018YFC1106002)

作者简介: 王心如(1993—),女,硕士研究生,研究方向为生物材料成型与加工。通信作者: 张耀鹏,教授, zyp@dhu.edu.cn。

天蚕丝、蓖麻蚕丝等,其中柞蚕丝在我国资源丰富、分布广阔。目前,中国柞蚕茧每年产量占世界总产量的90%左右<sup>[3]</sup>。近年来,人们对蚕丝丝素蛋白的研究逐渐转向分子水平。通过研究发现,柞蚕丝中的丝素蛋白(ASF)具备一般蚕丝丝素蛋白所不具备的优点,即ASF中含有大量的精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)三肽序列,经证明该序列对细胞的黏附有利<sup>[4]</sup>,因此,利用ASF制备的生物组织工程支架在医学领域中有较大的应用前景。

为了制备ASF多孔组织工程支架材料,冷冻干燥技术是一种环境友好、经济高效的成型方法。但研究发现,经冷冻干燥法直接得到的ASF材料是溶于水的,尚无法有效应用于生物医学领域。人们在对家蚕丝素蛋白(BSF)的研究中发现,采用某些方法可使丝素蛋白构象转变,从而使制备的材料不溶于水。其中,用乙醇处理是最简单和可靠的方法。目前,有些研究小组已报道了乙醇影响BSF构象的研究结果<sup>[5-7]</sup>。然而,国内外尚未见报道在溶液中直接加入乙醇诱导ASF成胶、再冷冻干燥制备ASF多孔材料。

为此,本研究以柞蚕丝为原料,采用乙醇促使ASF溶液快速凝胶并进一步冷冻干燥的方法制备ASF多孔材料,然后通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、扫描电子显微镜(SEM)探讨了乙醇水溶液浓度及ASF初始浓度对ASF样品结构的影响。采用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)对ASF多孔材料的生物相容性进行初探,本研究有望对制备性能优良的ASF组织工程支架材料提供一定的理论指导。

## 1 实验

### 1.1 材料

柞蚕丝,购自辽宁丹东(市售)。无水碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司),硫氰酸锂(LiSCN) (分析纯,西格玛奥德里奇有限公司),纤维素透析袋(截留相对分子质量为 $14\,000 \pm 2\,000$ ) (上海源聚生物科技有限公司),无水乙醇(分析纯,江苏常熟市鸿盛精细化工有限公司),雪旺细胞(SCs细胞株) (中国科学院生物化学与细胞生物学研究所),鬼笔环肽(Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 phalloidin) (英杰生命科技有限公司),4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) (北京索莱宝科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

MDF-192型超低温冰柜(日本SANYO公司),

FD-1A-50型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),Nicolet 8700型傅里叶变换红外光谱(美国热电公司),JSM-5600LV型扫描电子显微镜(SEM) (日本电子株式会社),TCS SP5 II型激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡公司)。

### 1.3 再生柞蚕丝素蛋白水溶液的制备

将柞蚕丝放入质量分数0.5%的 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 水溶液中,浴比1:50,在 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 下脱胶30 min,重复该过程3次,用去离子水充分洗涤,然后干燥获得脱胶丝。将脱胶丝以1:10的浴比在 $50\text{ }^\circ\text{C}$ 下溶解于 $9.0\text{ mol/L}$ 的LiSCN水溶液中,经离心过滤后将滤液装入纤维素透析袋,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下用去离子水透析后进一步浓缩形成初始质量分数分别为4%、6%、8%和10%的再生ASF水溶液,并将它们分别等体积置于不同的烧杯中待用。

### 1.4 再生柞蚕丝素蛋白多孔材料的制备

向上述各种质量分数的再生ASF水溶液中以1:1的体积比分别加入70%、80%、90%和100%的乙醇水溶液或纯乙醇,将混合溶液于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下静置使其形成凝胶后,采用MDF-192型超低温冰柜在 $-50\text{ }^\circ\text{C}$ 下对其进一步冷冻24 h,然后采用FD-1A-50型冷冻干燥机进行减压干燥,得到再生ASF多孔材料(简称ASF冻干样品)。

### 1.5 再生柞蚕丝素蛋白样品结构与性能表征

采用Nicolet 8700型傅里叶变换红外光谱(FT-IR)仪,通过ATR法对再生ASF凝胶及其冷冻干燥后样品的二级结构进行表征。测定波数范围为 $4\,000 \sim 525\text{ cm}^{-1}$ ,分辨率为 $4\text{ cm}^{-1}$ ,扫描次数为32次。

上述样品的FTIR谱图的酰胺I区( $1\,600 \sim 1\,700\text{ cm}^{-1}$ )中,各子峰与丝素蛋白二级结构的对应关系如下<sup>[8-10]</sup>: $1\,600 \sim 1\,640\text{ cm}^{-1}$ 为 $\beta$ -折叠构象, $1\,640 \sim 1\,660\text{ cm}^{-1}$ 为 $\alpha$ -螺旋或无规线团构象, $1\,660 \sim 1\,690\text{ cm}^{-1}$ 为 $\beta$ -转角构象。按文献[11]所述方法用Peakfit软件采用高斯函数对样品谱图进行曲线拟合,根据归一化后各子峰的积分面积计算ASF样品中对应的二级结构相对百分含量。

采用JSM-5600LV型扫描电子显微镜(SEM)在10 kV电压下对表面经喷金处理的ASF冻干样品的形态进行观察及拍照,并用图像处理软件(Nano Measurer)分析电镜照片中100个孔的尺寸,由此得到样品的平均孔径及孔径分布。

参考文献[12]方法,在再生ASF多孔材料(ASF

水溶液初始质量分数为 6% ,乙醇诱导采用纯乙醇)上接种雪旺细胞( SCs) ,培养第 4 天后用鬼笔环肽和 4' ,6-二脒基-2-苯基吲哚( DAPI) 染色 ,使用激光扫描共聚焦显微镜观察接种在多孔材料上的细胞形貌。

## 2 结果与分析

### 2.1 乙醇诱导柞蚕丝素蛋白结构转变的二级结构分析

ASF 分子的二级结构主要包括  $\beta$ -折叠构象、 $\alpha$ -螺旋构象和无规线团构象 ,另外还有部分的中间态构象(即  $\beta$ -转角构象)<sup>[13-14]</sup>。图 1 是不同 ASF 样品的 FTIR 图谱。其中 ,图 1( a) 为天然柞蚕丝经脱胶后的样品结果 ,从图中可以发现 ,脱胶柞蚕丝在 1 625  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 I) 、1 520  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 II) 、1 237  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 III) 、962  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 IV) 和 700  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 V) 处的吸收峰均属于丝素蛋白  $\beta$ -折叠构象<sup>[15-16]</sup> ,621  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 V) 处的吸收峰则属于  $\alpha$ -螺旋构象<sup>[17]</sup>。由此可见 ,脱胶柞蚕丝样品的二级结构以  $\beta$ -折叠构象为主。

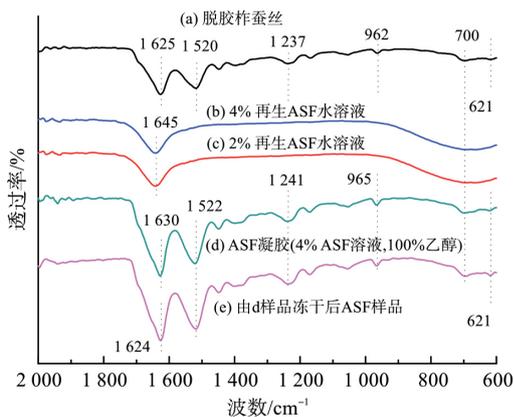


图 1 不同 ASF 样品的 FTIR 图谱

Fig. 1 FTIR spectra of different ASF samples

图 1( b) 反映的是初始质量分数为 4% 的再生 ASF 水溶液的红外结果。考虑到乙醇处理过程是在其中以 1:1 的体积比加入乙醇或乙醇水溶液 ,混合溶液中 ASF 的质量分数会下降至 2% 左右 ,为了便于比较分析 ,图 1( c) 进一步给出了 2% 再生 ASF 水溶液的 FTIR 结果。可以发现 ,图 1( b) 与图 1( c) 具有相同的出峰位置 ,其中 1 645  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 I) 处较尖锐的峰是丝素蛋白无规线团/ $\alpha$ -螺旋构象所致<sup>[18-19]</sup> ,而 700  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 V) 处属于  $\beta$ -折叠构象的峰相对较弱。由此可见 ,与上述脱胶柞蚕丝相比 ,再生 ASF 水溶液中  $\beta$ -折叠构象要少得多。

图 1( d) 是乙醇诱导 ASF 水溶液所形成的凝胶

的 FTIR 图谱 ,较明显看出 ,该谱图的吸收峰位置和脱胶柞蚕丝样品(图 1( a)) 的红外吸收峰位置类似 ,1 630  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 I) 、1 522  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 II) 、1 241  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 III) 、965  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 IV) 和 700  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 V) 处是丝素蛋白  $\beta$ -折叠构象的典型吸收峰 ,621  $\text{cm}^{-1}$  (酰胺 V) 处为丝素蛋白  $\alpha$ -螺旋构象的吸收峰。从红外光谱变化来看 ,乙醇诱导溶液成胶后 ,ASF 凝胶的红外谱图(图 1( d)) 出现了明显的  $\beta$ -折叠构象的吸收带。对图 1( b ~ d) 曲线的酰胺 I 区按文献 [8] 提及方法进行分峰处理 ,可得到各样品中不同二级结构的含量 ,其中 2% 和 4% 再生 ASF 水溶液中的  $\beta$ -折叠构象含量分别仅为 10.9% 和 13.0% ,而添加乙醇后得到的凝胶中  $\beta$ -折叠构象的含量升至 26.5% ,这表明 ASF 溶液在乙醇的诱导作用下形成凝胶后 ,部分 ASF 分子由原来的  $\alpha$ -螺旋/无规线团构象转变成了  $\beta$ -折叠构象。

图 1( e) 是上述 ASF 凝胶冷冻干燥后样品的 FT-IR 图谱。由图 1( e) 可知 ,该样品红外光谱的出峰位置和图 1( d) 基本一致 ,但酰胺 I 区属于  $\beta$ -折叠构象的吸收带略往低波数方向移动至 1 624  $\text{cm}^{-1}$  处。据文献 [20] 报道 ,酰胺 I 区(1 600 ~ 1 700  $\text{cm}^{-1}$ ) 的产生主要由 C—O 伸缩振动贡献 ,且易受到氢键效应的影响。氢键的产生会引起伸缩振动频率向低波数方向偏移 ,由此说明了 ASF 凝胶冷冻干燥得到的 ASF 样品中含有更多的氢键。定量分析结果显示 ,ASF 冻干样品中  $\beta$ -折叠构象含量也更高 ,这可能是因为在 ASF 凝胶冷冻干燥过程中 ,冰晶会对丝素蛋白产生类似剪切的作用而诱导丝素蛋白由  $\alpha$ -螺旋/无规线团构象向  $\beta$ -折叠构象转变<sup>[21-22]</sup> ,使得 ASF 样品中形成更多的分子间氢键。因此 ,与 ASF 凝胶相比 ,ASF 冻干样品在酰胺 I 区的吸收带略往低波数方向移动(更接近于脱胶柞蚕丝)。

### 2.2 乙醇水溶液浓度对 ASF 凝胶及其冻干样品二级结构的影响

根据本研究中 FTIR 测试结果并结合文献 [23-25] ,一方面 ,在 ASF 水溶液中加入乙醇会使乙醇分子更多地与水分子结合 ,破坏水分子与丝素蛋白分子的结合 ,从而使得丝素蛋白分子之间的相互作用增强 ,导致丝素蛋白分子间形成更多的氢键 ,生成更多  $\beta$ -折叠构象。另一方面 ,ASF 富含聚丙氨酸序列 ,该序列表现出很强的疏水性。而乙醇分子中的乙基与 ASF 中丙氨酸链段的结构较为相似 ,推测能与其相似相溶 ,故在 ASF 水溶液中加入乙醇后 ,丝素蛋白的

疏水基团与乙醇分子的相互作用逐渐增强,削弱了丝素蛋白分子在疏水区域之间的相互作用,促进了这些疏水链段的活动,从而导致丝素蛋白从高能量的无规线团/ $\alpha$ -螺旋构象转变为低能量的 $\beta$ -折叠构象。当 $\beta$ -折叠构象的含量增加到某个临界值时,ASF水溶液中就出现了不溶物,随着不溶物尺寸和数目不断增多,体系的流动性逐渐变差,最终形成凝胶。

研究表明,在正常情况下,ASF凝胶过程十分缓慢,将低质量分数(如4%或2%)的ASF水溶液置于4℃的温度下,经过两周仍无凝胶现象产生。而在与一定量的乙醇作用后,即有部分丝素蛋白变性成白色絮状物,这些白色絮状丝素蛋白就是前述的不溶物。当水溶液中ASF含量一定时,随着乙醇浓度的提高,溶液中出现的白色絮状物增多,凝胶过程也大幅加速。当乙醇浓度仅为70%时,体系完全形成凝胶的时间需20h以上;当乙醇浓度上升至80%及90%时,溶液中出现白色絮状物的速度加快,且凝胶时间分别缩短至7h和5h;而当乙醇浓度达到100%时,溶液中很快出现白色絮状物,凝胶时间仅需3h。

图2反映了乙醇水溶液浓度对ASF凝胶及其冻干样品二级结构的影响。在不同乙醇浓度下,ASF凝胶中 $\beta$ -折叠构象含量均比其进一步冷冻干燥后的样品低,这再次佐证了上一节的相关结论。从图2中a曲线还可以看出,乙醇浓度的增加能使ASF凝胶中 $\beta$ -折叠构象的含量增多。这是因为溶液中乙醇浓度越高,有越多的乙醇分子会与水分子结合,从而破坏水分子与丝素蛋白分子结合,导致丝素蛋白分子之间的相互作用增强,这种情况下形成 $\beta$ -折叠构象的速度更快,凝胶中 $\beta$ -折叠构象的含量相对更多。此外,乙醇浓度越高意味着有更多的乙醇分子会与丝素蛋白的疏水基团发生相互作用,使得疏水链段

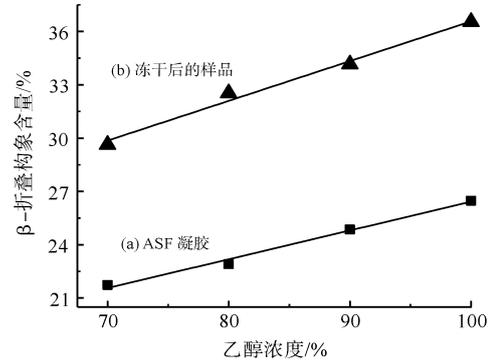
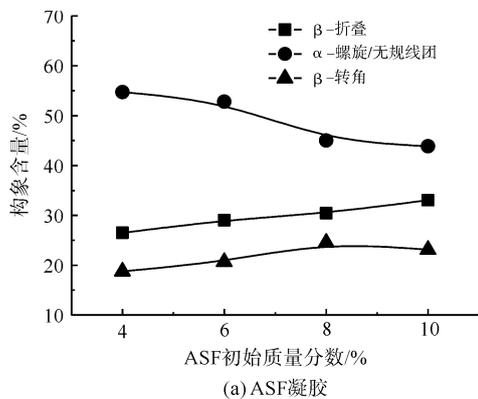


图2 乙醇水溶液浓度对ASF凝胶及其进一步冻干后样品的二级结构的影响

Fig. 2 Effect of ethanol concentration on the secondary structure of ASF gel and freeze-dried ASF samples

的活动能力加快,从而导致更多的无规线团/ $\alpha$ -螺旋构象转变为 $\beta$ -折叠构象。从图2中b曲线进一步可以看出,ASF凝胶冷冻干燥后的样品也有类似的结果,当乙醇水溶液浓度从70%上升至100%时,ASF冻干样品中 $\beta$ -折叠构象的含量从29.6%增加至36.5%。由此可见,提高乙醇诱导过程中采用的乙醇水溶液浓度,将促进冷冻干燥法ASF材料中 $\beta$ -折叠构象的形成。

### 2.3 ASF初始质量分数对ASF凝胶及其冻干样品二级结构的影响

图3反映了ASF初始质量分数对ASF凝胶及其进一步冻干后样品二级结构的影响,可以发现,当ASF初始质量分数从4%上升至10%时,ASF凝胶中的 $\beta$ -折叠构象含量(图3(a))从26.5%提高到33.0%,而 $\alpha$ -螺旋/无规线团构象含量则从54.7%降至43.9%,这说明ASF初始质量分数的增加有利于凝胶中 $\beta$ -折叠构象的形成。ASF初始质量分数越高,越能减少丝素蛋白分子与水分子结合的几率,使得丝素蛋白分子链相互碰撞的机会更大,丝素蛋白分

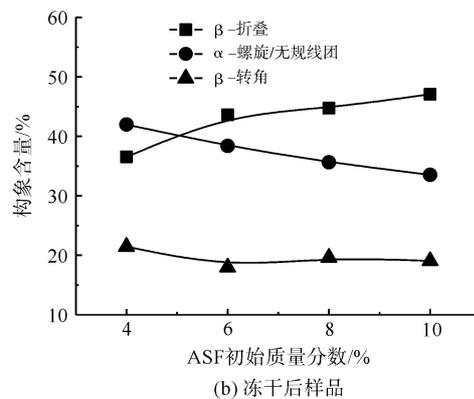


图3 ASF初始质量分数对ASF凝胶及其进一步冻干后样品二级结构的影响

Fig. 3 Effect of original ASF concentration on the secondary structure of ASF gel and freeze-dried ASF samples

子之间的相互作用也更强。随着丝素蛋白分子间相互作用的增强,ASF 水溶液成胶的过程中形成  $\beta$ -折叠构象的速度将变快,从而导致  $\beta$ -折叠构象的含量更多。ASF 初始质量分数对 ASF 凝胶进一步冻干后样品二级结构的影响也有类似的结果(图3(b)),当 ASF 初始质量分数从 4% 上升至 10% 时,ASF 冻干样品中  $\beta$ -折叠构象的含量随之从 36.5% 提高至 46.1%,而  $\alpha$ -螺旋/无规线团构象的含量则从 42.0% 降至 33.5%。由此可见,ASF 水溶液质量分数的适

当提高,有利于冷冻干燥法 ASF 材料中丝素蛋白构象向  $\beta$ -折叠构象转变。

#### 2.4 ASF 初始质量分数与乙醇水溶液浓度对 ASF 冻干样品微观结构的影响

由前述可知,ASF 凝胶中  $\beta$ -折叠构象含量已明显高于 ASF 水溶液,但仍不占主导地位,这导致凝胶结构不是非常稳定。因此,在对 ASF 样品进行形态结构分析时,主要采用由凝胶进一步冷冻干燥处理后的样品。图 4 为由不同初始质量分数的 ASF 水溶

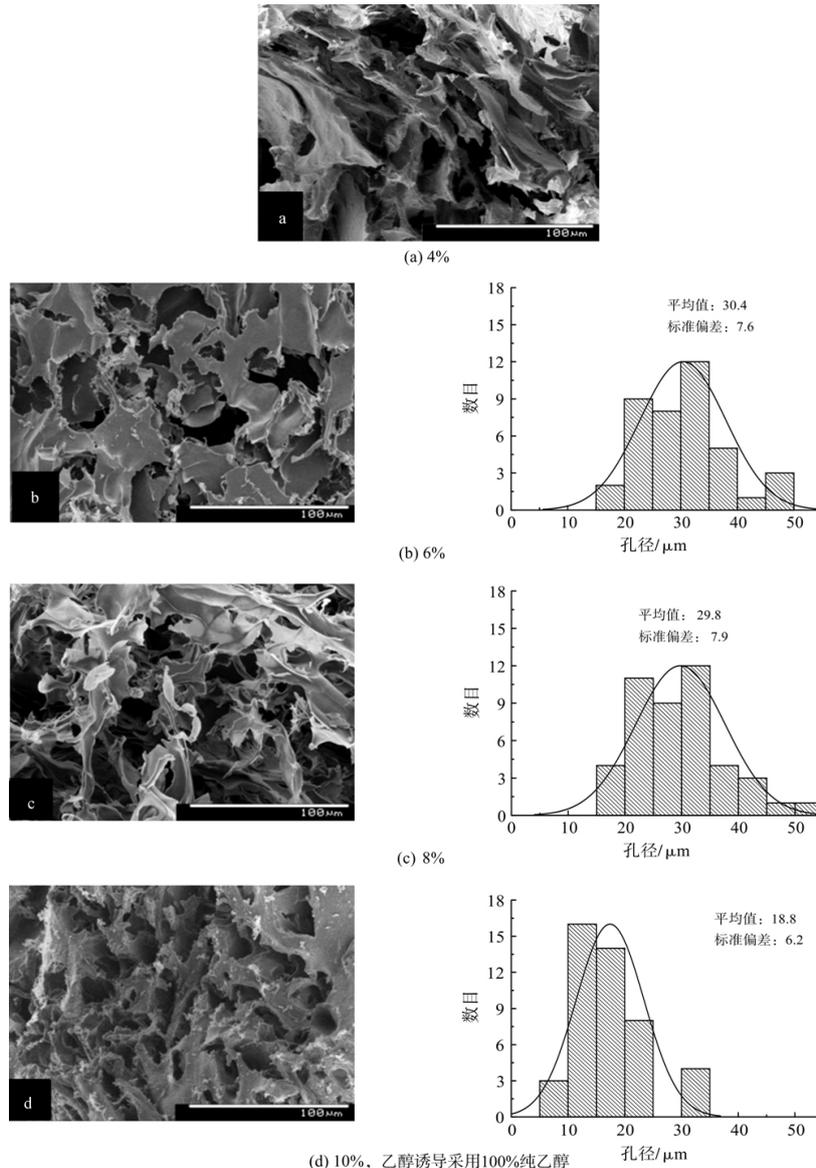


图 4 由不同质量分数的 ASF 水溶液制得的 ASF 冻干样品横截面的 SEM 照片及对应的孔径分布  
Fig. 4 SEM images and pore size distribution histograms of freeze-dried ASF samples prepared from ASF aqueous solution with different concentrations

液制得的 ASF 冻干样品横截面的 SEM 照及对应的孔径分布结果,从中可以看出,ASF 水溶液初始质量分数为 4% 时,样品截面中空隙形态大体呈无规则(故无法分析其孔径分布,图 4(a)中无对应的孔径分布图)这可能是由于 ASF 质量分数较低使得材料强度不高,导致制样及测试中材料形态易被破坏。而当溶液中 ASF 含量逐渐增大时,样品截面的形态也变得更有规则,逐渐呈现孔状结构。从图 4(b ~

d) 右侧所对应的各样品孔径分析结果可以进一步发现,ASF 水溶液的初始质量分数从 6% 上升至 10% 时,样品的平均孔径从 30.4  $\mu\text{m}$  减小至 18.8  $\mu\text{m}$ 。这可能是因为溶液中 ASF 含量较高时,冷冻过程中 ASF 分子对水分子运动的阻力较大,不利于形成大的冰晶,故所制得的 ASF 多孔材料的孔径相对较小。

图 5 进一步给出了采用不同浓度的乙醇水溶液诱导制得的 ASF 冻干样品横截面的 SEM 照片。由图

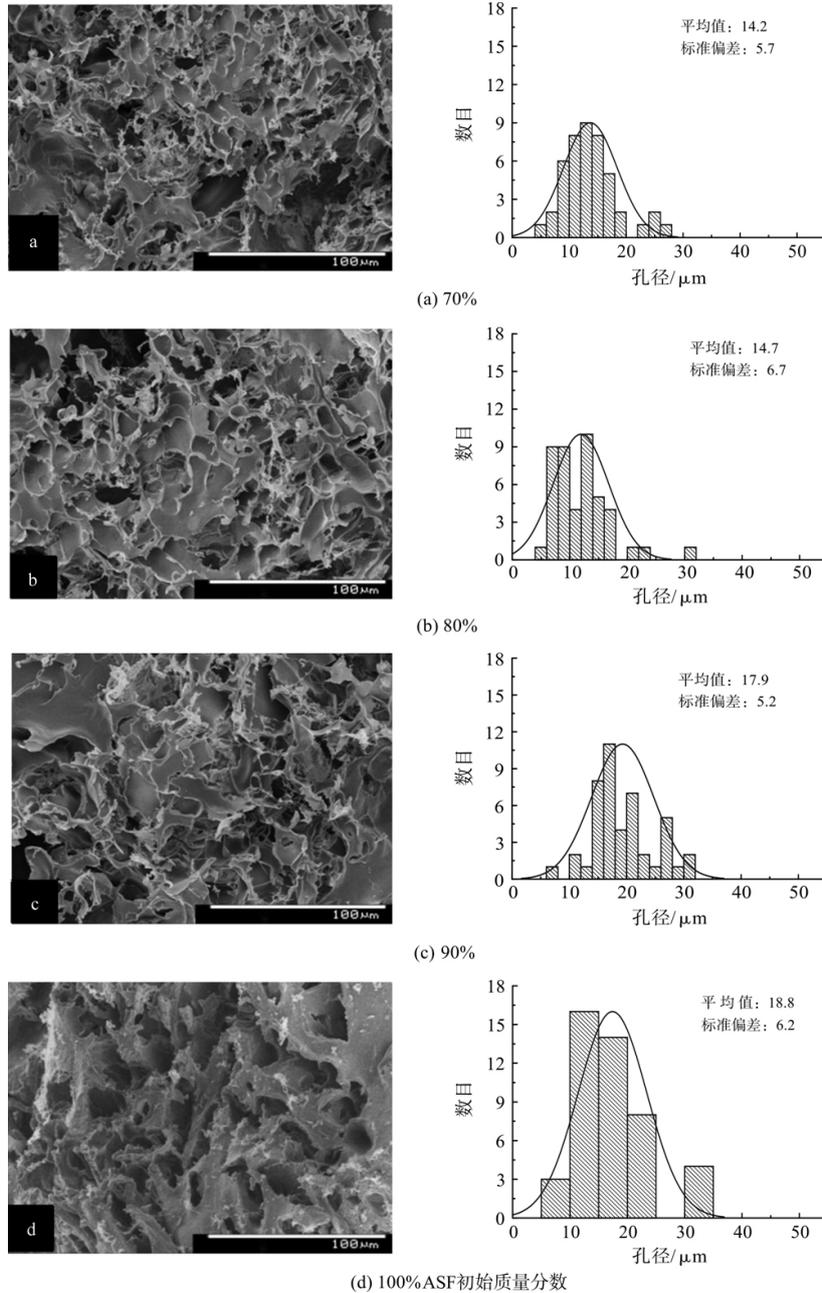
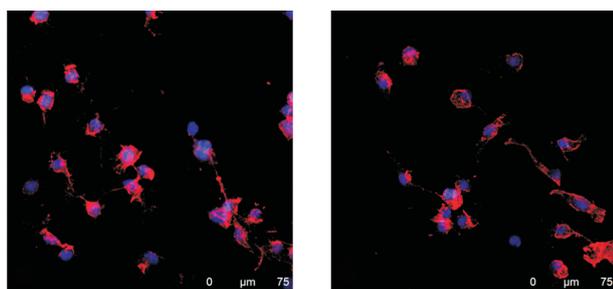


图 5 由不同浓度的乙醇水溶液诱导制得的 ASF 冻干样品横截面的 SEM 照片及对应的孔径分布  
Fig. 5 SEM images and pore size distribution histograms of freeze-dried ASF samples induced by ethanol aqueous solution with different concentrations

5 可知 随乙醇水溶液浓度的增加 ,ASF 样品的平均孔径呈一定的上升趋势。由文献 [26-27] 可知 ,孔径在 10 ~ 20  $\mu\text{m}$  的微小孔洞能基本满足细胞黏附及生长因子、营养物质通过的要求 ,孔径介于 20 ~ 100  $\mu\text{m}$  的多孔材料在动物表皮细胞培养及载入生长因子方面具有一定的应用前景<sup>[28]</sup> ,而更大孔洞则有利于细胞生长<sup>[29]</sup>。因此 ,为了验证所制备的 ASF 多孔材料能否满足细胞黏附、生长的需求 ,本研究进一步考察了其生物相容性。

### 2.5 再生柞蚕丝素蛋白多孔材料的生物相容性评价

选择 ASF 质量分数为 6%、纯乙醇诱导作为优选条件来制备多孔材料。细胞在材料上的生长数目和形态可直观体现生物相容性。图 6 显示了 SCs 在 ASF 多孔材料和盖玻片材料上接种 4 d 后的激光扫描共聚焦显微镜图(采用鬼笔环肽和 DAPI 分别对细胞的骨架和细胞核进行染色)。从图 6 中可以看出 ,ASF 多孔材料和盖玻片上的细胞生长形态很多是圆形 ,部分细胞出现了伪足。并且 ,相比于盖玻片 ,SCs 在 ASF 多孔材料上生长得更更为密集 ,细胞数目和伪足更多 ,这说明 ASF 多孔材料比盖玻片更能促进细胞的黏附和生长。因此 ,本研究所制备的 ASF 多孔材料可作为组织工程支架应用在生物医疗领域 ,并具有较大的潜在价值。



(a) ASF 多孔材料 (b) 盖玻片

图 6 SCs 接种 4 d 的激光扫描共聚焦显微镜图

Fig. 6 Laser Scanning Confocal Microscope images of SCs seeded for 4 days

## 3 结 论

本研究以柞蚕丝为原料 ,采用乙醇促使 ASF 水溶液快速凝胶并进一步冷冻干燥的方法 ,制备了 ASF 多孔材料 ,得到以下结论:

- 1) 乙醇能诱导 ASF 水溶液形成凝胶 ,且形成凝胶的过程中伴随有大量  $\beta$ -折叠构象的产生。
- 2) 随乙醇水溶液浓度的升高及 ASF 水溶液初始

质量分数的增加 ,凝胶中  $\beta$ -折叠含量也相应上升。

3) 提高乙醇水溶液浓度或适当降低 ASF 水溶液初始质量分数 ,有利于获得孔径较大的冷冻干燥法 ASF 多孔材料。

4) 细胞实验结果表明 ,本研究所制备的 ASF 多孔材料可作为组织工程支架应用在生物医用领域 ,并具有较大的潜在价值。

### 参考文献:

- [1]陶伟. 再生柞蚕丝素多孔材料的制备及其结构 [D]. 苏州: 苏州大学, 2005.  
TAO Wei. Preparation and Structure of Regenerated Antheraea Pernyi Silk Fibroin Porous Materials [D]. Suzhou: Soochow University, 2005.
- [2]李娟. 柞蚕丝素蛋白的自组装及其在药物缓释上的应用 [D]. 上海: 东华大学, 2012.  
LI Juan. Self-Assembly Behavior of Tussah Silk Fibroin and Application in Drug Controlled Release [D]. Shanghai: Donghua University, 2012.
- [3]赵春山, 李喜升. 柞蚕的经济与生态作用的再认识 [J]. 辽宁农业科学, 2004(3): 28-29.  
ZHAO Chunshan, LI Xisheng. Reconsideration of economic and ecological effect for the tussah [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2004(3): 28-29.
- [4]MINOURA N, AIBA S, GOTOH Y, et al. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin [J]. Biochemical Biophysical Research Communications, 1995, 208(2): 511-516.
- [5]莫春丽. 傅立叶变化红外光谱对再生丝蛋白二级结构的表征 [D]. 上海: 复旦大学, 2009.  
MO Chunli. Fourier Infrared Spectroscopy Characterization on the Secondary Structure of Silk Fibroin [D]. Shanghai: Fudan University, 2009.
- [6]YANG Y H, SHAO Z Z, CHEN X. Optical spectroscopy to investigate the structure of regenerated *Bombyx mori* silk fibroin in solution [J]. Biomacromolecules, 2004, 5(3): 773-779.
- [7]成莹栋. 再生家蚕丝素蛋白结构转变的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2008.  
CHEN Yingdong. Research on the Structural Transformation of Regenerated *Bombyx mori* Silk Fibroin [D]. Suzhou: Soochow University, 2008.
- [8]卢雁, 张玮玮, 王公轲. FTIR 用于变性蛋白质二级结构的研究进展 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(1): 88-93.  
LU Yan, ZHANG Weiwei, WANG Gongke. Progress in study of secondary structure of denaturated protein by FTIR [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(1): 88-93.
- [9]WU X, WU X D, SHAO M. Structural changes of *Bombyx*

- mori fibroin from silk gland to fiber as evidenced by Terahertz spectroscopy and other methods [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 1202-1210.
- [10] VAN de Weert M, HARI S P I, HENNINK W E, et al. Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: Effect of sampling method and stress factors [J]. *Analytical Biochemistry*, 2001, 297(2): 160-169.
- [11] 刘明. FTIR对丝素蛋白构象的研究[D]. 杭州: 浙江大学 2006.  
LIU Ming. Studies on the Conformation of Silk Fibroin by FTIR [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [12] 刘强强. 周围神经修复用搭载双因子静电纺有序丝素蛋白支架的研究[D]. 上海: 东华大学 2016.  
LIU Qiangqiang. Silk Fibroin Scaffolds with Well-Aligned Fibers Loaded with Dual Factors for Peripheral Nerve Repair [D]. Shanghai: Donghua University, 2016.
- [13] 杭怡春. 再生丝素/丝胶蛋白水溶液的经典纺丝和干法纺丝研究[D]. 上海: 东华大学 2012.  
HANG Yichun. Studies on the Electrospinning and Dry Spinning of the Regenerated Silk Fibroin/Sericin Aqueous Solutions [D]. Shanghai: Donghua University, 2012.
- [14] HARDY J G, ROEMER L M, SCHEIBEL T R. Polymeric materials based on silk proteins [J]. *Polymer*, 2008, 49(20): 4309-4327.
- [15] HU X, KAPLAN D, CEBE P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy [J]. *Macromolecules*. 2006, 39: 6161-6170.
- [16] ZHANG C, ZHANG Y P, SHAO H L, et al. Hybrid silk fibers dry-spun from regenerated silk fibroin/graphene oxide aqueous solutions [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(5): 3349-3358.
- [17] PAQUET M F, LEFEVRE T, AUGER M, et al. Evidence by infrared spectroscopy of the presence of two types of beta-sheets in major ampullate spider silk and silkworm silk [J]. *Soft Matter*, 2013, 9(1): 208-215.
- [18] MENG G T, MA C Y. Fourier-transform infrared spectroscopic study of globulin from phaseolus angularis (red bean) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001(29): 287-94.
- [19] CORMIER A R, RUIZ O C, ALAMO R G, et al. Solid State Self-Assembly Mechanism of RADA16-I Designer Peptide [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(6): 1794-1804.
- [20] 刘明, 闵思佳, 朱良均. 冷冻干燥对丝素蛋白凝胶结构的影响[J]. *蚕业科学* 2007, 33(2): 246-249.  
LIU Ming, MIN Sijia, ZHU Liangjun. Effect of freeze-dry on the structure of silk fibroin gel [J]. *Science of Sericulture*, 2007, 33(2): 246-249.
- [21] DONG A, PRESTRELKI S J, ALLISON S D, et al. Infrared spectroscopic studies of lyophilization-and temperature-induced protein aggregation [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1995, 84(4): 415-424.
- [22] LUCIMARA A F, RUBENS B F, LUIZ A C. Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy [J]. *Analytical Biochemistry*, 1998, 259(1): 136-141.
- [23] 金媛. 蚕丝的仿生纺丝研究[D]. 上海: 东华大学, 2013.  
JIN Yuan. Studies on Biomimetic Spinning of Silkworm Silk [D]. Shanghai: Donghua University, 2013.
- [24] 杨宇红. 再生 Bombyx mori 丝素蛋白在水溶液中结构和性质的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2004.  
YANG Yuhong. Investigation on Structures and Properties of Regenerated *Bombyx mori* Silk Fibroin in Aqueous Solution [D]. Shanghai: Fudan University 2004.
- [25] 余晶梅. 荧光探针法和疏水相互作用层析法分析蛋白表面疏水性[D]. 杭州: 浙江大学 2014.  
YU Jingmei. Measurement of Protein Surface Hydrophobicity by Fluorescence Probe Method and Hydrophobic Interaction Chromatography [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [26] 丁珊, 李立华. 新型组织工程支架材料[J]. *生物医学工程学杂志*. 2002, 19(1): 122-126.  
DING Shan, LI Lihua. Novel scaffold materials for tissue engineering [J]. *Journal of Biomedical Engineering*, 2002, 19(1): 122-126.
- [27] 张润, 邓政兴, 李立华, 等. 用超临界 CO<sub>2</sub> 法制备聚乳酸三维多孔支架材料[J]. *材料研究学报* 2003, 17(6): 665-672.  
ZHANG Run, DENG Zhengxing, LI Lihua, et al. Preparation of porous PLA scaffold materials by supercritical CO<sub>2</sub> fluid technique [J]. *Chinese Journal of Materials Research*, 2003, 17(6): 665-672.
- [28] 刘倩倩, 唐川, 杜哲, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 发泡法制备 PLGA 多孔组织工程支架[J]. *高分子学报*, 2013(2): 174-182.  
LIU Qianqian, TANG Chuan, DU Zhe, et al. Fabrication of porous poly (lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds using supercritical carbon dioxide [J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2013(2): 174-182.
- [29] CHANG B S, LEE C K, HONG K S. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(12): 1291-1298.