

The Structure and Properties of Electrospun Silk Fibroin-Poly (Butylene Succinate) Tubular Scaffold

Bin-wei Wu^{1,2}, Shi-zhuang Xue^{1,2}, Hai-lin Zhu^{1,3}, Xin-xing Feng^{1,2}, Jian-yong Chen^{1,2}

(Zhejiang Sci-Tech University¹, The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology of Ministry of Education, Hangzhou, 310018, China; 2. Zhejiang Sci-Tech University, College of Materials and Textiles, Hangzhou, 310018, China; 3. Zhejiang Sci-Tech University, College of Science, Hangzhou, 310018, China)
Email: Wubinwei1@163.com

Abstract: To develop a small-diameter tissue engineering blood vessel, the silk fibroin (SF)/poly (butylene succinate) (PBS) tubular scaffolds were fabricated via electrospinning. In the electrospinning process, the electrospun SF/PBS composite tubular scaffolds were collected on a 3D collector instead of traditional 2D collector. The effects of 3D collector and process parameters of electrospinning on the morphologies of the tubular scaffolds were investigated. FTIR was used to study the secondary structure of SF. The mechanical properties and the porosities of the tubular fiber materials were characterized. The results showed that SF/PBS composite tubular materials with different sizes and shapes could be prepared by changing the voltage, TCD and the structure of 3D collectors. The porosity, the tensile stress, the elongation at break and the burst pressure of the composite tubular scaffold were 84.6%, 4.31 MPa, 46.21% and 358 kPa, respectively.

Keywords: electrospun; tubular materials; silk fibroin; poly (butylene succinate)

静电纺丝素/聚丁二酸丁二醇酯血管材料结构与性能的研究

吴斌伟^{1,2}, 薛士壮^{1,2}, 朱海霖^{1,3}, 冯新星^{1,2}, 陈建勇^{1,2*}

(1. 浙江理工大学 “先进纺织材料与制备技术”教育部重点实验室, 杭州 浙江 310018; 2. 浙江理工大学 材料纺织学院, 杭州 浙江 310018; 3. 浙江理工大学 理学院, 杭州 浙江 310018)

Email: Wubinwei1@163.com

摘要:为制备组织工程血管支架,以丝素蛋白(SF)和聚丁二酸丁二醇酯(PBS)为原料,通过静电纺丝法,以具有三维结构的收集模板取代传统的二维平板作为电纺丝收集基板,构建了丝素/PBS血管支架材料。研究了纺丝条件和三维收集模板对管状支架形貌的影响,采用FT-IR对丝素蛋白二级结构进行了表征,测试了血管支架材料的孔隙率和力学性能。结果表明:通过改变电压、纺丝间距以及三维收集模板的宏观结构,可制备出具有不同直径和长度的血管支架材料。此支架材料的孔隙率达84.6%,拉伸应力为4.31MPa,断裂伸长率为46.21%,爆破压力为358kPa。

关键词: 静电纺丝; 血管支架材料; 丝素蛋白; 聚丁二酸丁二醇酯

1 引言

随着心血管疾病发病率的上升以及机械外伤的频发,临床急需各种直径的血管替代物修复损伤血管。自体血管、异体血管和人工血管是目前临床应用的主

要血管移植植物^[1]。由于自体血管的来源不足,异体血管多因排斥反应、内皮细胞脱落等原因在应用中受到限制。为扩大血管移植物的来源,目前的研究主要集中在组织工程血管支架材料及血管支架构建方法。静电纺丝技术能够形成纳米到微米级纤维,模仿细胞外基质的组成和结构,为细胞提供良好的生长环境,并且可以形成所需口径的管状结构,因此受到人们的高

资助信息: 国家自然科学基金(编号 50903073, 50973096); 浙江省自然科学基金(编号 Y407295)

度重视^[2]。

丝素蛋白是将蚕丝脱胶后得到的天然蛋白质,具有良好的生物相容性和细胞粘附能力。目前可通过静电纺丝法制备丝素蛋白纳米纤维^[3],但制备的丝素纤维材料力学性能不够理想,断裂强度较低,可拉伸性非常小^[4],限制了其在组织工程领域的应用。聚丁二酸丁二醇酯(PBS)是一种合成聚合物,由于其良好的力学性能和生物可降解性^[5, 6],因此可用作组织工程支架材料。但PBS的缺点是生物活性较低,细胞粘附较困难。

由于单一的丝素和PBS作为组织工程支架材料均存在一定的不足,因此,我们将丝素与PBS共混,通过静电纺丝技术制备一种具有良好力学性能和生物相容性的复合纤维管状材料,用于组织工程血管支架材料的研究。到目前为止,将丝素与PBS结合构建组织工程血管支架方面的研究还未见报道。

本文将丝素与PBS共混,通过改变电压、纺丝间距以及三维收集模板的宏观结构,制备出具有不同直径和长度的丝素/PBS复合管状支架材料,研究管状支架材料的孔隙率和力学性能,为其成为一种良好的组织工程血管支架提供实验参考。

2 实验

2.1 SF/PBS 三维血管支架材料的构建

将桑蚕丝置于质量分数为0.05%的 Na_2CO_3 水溶液中煮沸并清洗脱除丝胶,将脱胶后的丝素用 $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 三元溶液(物质的量比为1:2:8)于 $(75\pm 2)^\circ\text{C}$ 溶解,溶液经透析、过滤制得丝素溶液,经冷冻干燥制得再生丝素膜。将该膜及PBS以50:50的质量比溶解于六氟异丙醇(HFIP)中,配制不同质量分数的纺丝液(6 wt%、8 wt%、10 wt%、12 wt%)。以具有三维结构的收集模板取代传统的二维平板作为静电纺丝收集基板^[7],如图1。在一定的电压、极距、流速等工艺条件下制备SF/PBS血管支架。将制得的SF/PBS血管支架用乙醇进行不溶化处理30min,真空干燥24h除去乙醇。以纯丝素支架材料为对照。

2.2 血管支架材料的形貌结构测试

采用场发射扫描电镜(ZEISS SUPRA40/VP)和数码相机(佳能80is)对三维血管支架材料进行形貌分析。采用Auto Pore IV9500压汞仪,测试孔隙率。采用美国Nicolet 5700傅立叶变换红外分析仪测试结构变化,扫描次数64次,测试光谱范围:4000~400 cm^{-1} 。

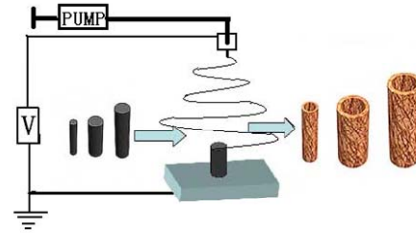


Figure 1. Schematic illustration of fabrication of electrospun tubular scaffolds using 3D columnar collectors

图1 利用三维模板收集电纺丝管状支架材料的示意图

2.3 血管支架材料的力学性能测试

2.3.1 拉伸性能测试

采用日本(KES-G1)强伸度测试仪测定SF/PBS血管支架材料的拉伸性能。将血管支架材料用乙醇处理30min后剪成长40mm,宽5mm,厚度为0.8mm的细条,安放在测试仪上,夹持长度为20mm,以10mm/min的速度拉伸,得到测试样品的应力、应变及杨氏模量。每组平行测试5个样品。

2.3.2 压力爆破测试

将注满生理盐水的压力枪与血管支架材料一端连接,另一端在纺丝时制备成封闭结构(支架厚度为0.4~0.5 mm),慢慢旋转调压阀使水压升高直至支架材料爆破,记录此时读数,每组平行测试5个样品。

3 结果与讨论

3.1 复合纤维微观形态分析

将丝素和PBS以50:50共混,根据不同质量分数的纺丝液制备得到的纳米纤维如图2所示。随着纺丝液质量分数的提高,纤维直径逐渐增大,纤维变得不规整,分布也变得不均匀。这一方面是因为纺丝液质量分数的提高使溶液的黏度增大,导致纤维直径增大;另一方面质量分数高的纺丝液切变速率大,黏度不稳定,导致在纺丝过程中纤维直径分布不均匀,离散程度大,尤其是质量分数为10%和12%的纺丝液。而质量分数为6%和8%的纺丝液所得的纳米纤维形貌规整,直径分布较为均匀,离散度小。由表1可知,随着纺丝液质量分数升高,丝素/PBS纳米纤维膜的孔隙率不断减小;这是因为随着纺丝液质量分数的升高,所得的SF/PBS复合纤维变粗,纤维膜的密度不断增大,孔隙率减小。故本实验选择的纺丝液质量分数为8%。

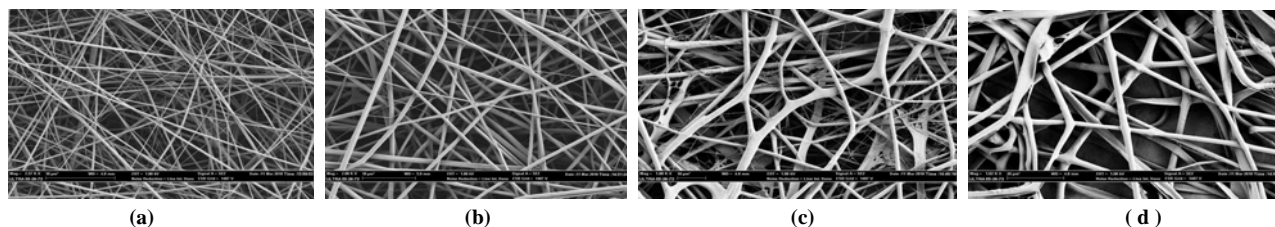


Figure 2. SEM of SF/PBS composite fibers with different concentrations (a) 6 wt% (b) 8 wt% (c) 10 wt% (d) 12 wt%

图 2 不同质量分数 SF/PBS 复合纤维的 SEM 照片

Table 1. Diameters of SF/PBS composite fibers with different concentrations

表 1 不同质量分数 SF/PBS 复合纤维的直径

纺丝液质量分数/%	平均直径/nm	孔隙率 (%)
6	247.8 ± 86.7	86.2 ± 2.1
8	582.6 ± 75.25	84.6 ± 1.9
10	1076.7 ± 460.9	78.0 ± 1.1
12	2654.2 ± 551.97	71.1 ± 2.5

3.2 SF/PBS 三维血管支架的宏观结构

以具有三维结构的收集模板取代传统的二维平板作为电纺丝收集基板,在适当的TCD间距L和电压V下进行静电纺丝可以得到匀管状支架。本实验中SF/PBS电纺的条件为:电压10kV、接收间距10cm、流速0.5ml/h、质量分数8%(SF:PBS=50:50)。从图3可以看出,通过改变三维收集模板的宏观结构,可制备具有不同直径和长度的管状支架材料。

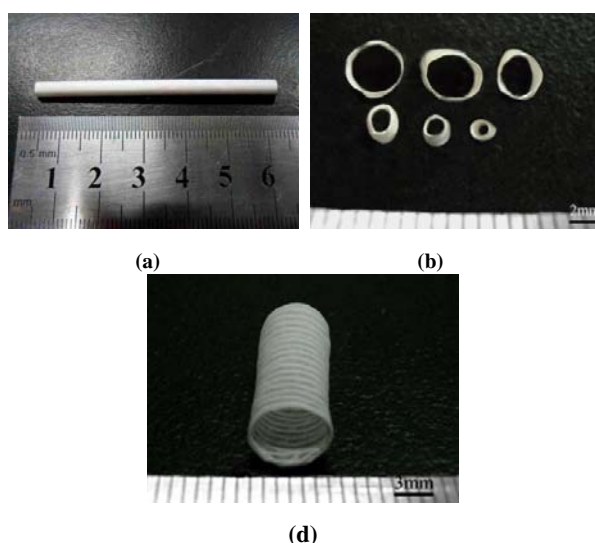


Figure 3. Optical images of electrospun tubular scaffolds (a) electrospun tubular scaffolds, (b) cross section of electrospun tubular scaffolds (c) tubular scaffold with patterned architecture
图 3. 管状支架材料的光学照片

3.3 SF/PBS血管支架的FT-IR分析

红外光谱能够显示蛋白质分子肽键的特征性振动

谱带、主链骨架的振动谱带,以及侧链的振动谱带。由于肽键(酰胺键)是组成蛋白质主链的基本结构,因此,可以利用红外光谱酰胺 I 和酰胺 II 特性谱带表征丝素蛋白的二级结构。

图4为纯丝素支架与丝素/PBS复合管状支架的红外光谱图。由图4a和4b可知,未经乙醇处理的纯丝素和丝素/PBS复合管状支架在 1650cm^{-1} 、 1538cm^{-1} 和 1520cm^{-1} 的吸收峰分别归属于酰胺I的 $\gamma\text{C=O}$ (无规线团和Silk I)、酰胺II的 $\delta\text{N-H}$ (无规线团和Silk I)和酰胺II的 $\delta\text{N-H}$ (Silk II),且 1538cm^{-1} 吸收峰的强度大于 1520cm^{-1} ,说明丝素以无规线团和Silk I 构象为主,含少量的Silk II (β -折叠)结构^[8]。而复合管状支架经乙醇处理后,酰胺I峰移动至 1629cm^{-1} ,酰胺II峰移动至 1520cm^{-1} ,说明经乙醇处理丝素蛋白肽链间氢键先被破坏后又重新形成,使丝素蛋白的二级结构由无规线团或Silk I 转变为Silk II,从而结晶度提高,在水中仅膨胀而不溶解。另外复合管状支架的红外图谱中 1720cm^{-1} 和 1161cm^{-1} 吸收峰分别归属于PBS酯基中 C=O 伸缩振动和 C-O 的伸缩振动^[9]。

3.4 SF/PBS血管支架的力学性能分析

人工血管作为体内血管的代用品,首先应保持持久的强度、良好的抗机械疲劳能力,这是人工血管在移植后能耐受长期血流冲击不发生变形破裂的关键,也是组织工程血管目前研究的热点与难点,而拉力测试能较好地反应这方面的性能。图5和表2显示了纯丝素和丝素/PBS复合管状支架的拉伸性能。纯丝素的拉伸应力很低,只有 $(0.79 \pm 0.09)\text{MPa}$,经乙醇处理后其拉伸应力增大至 $(1.23 \pm 0.11)\text{MPa}$,但断裂伸长率缩小至 $(5.05 \pm 0.62)\%$ 。说明经乙醇处理后丝素结构从Silk I转变为Silk II (β 折叠),结晶度提高,脆性增大。而对于复合纤维支架来说,由于PBS本身良好的力学性能,因此其拉伸强度和断裂伸长率达到了 3.73MPa 和 61.54% ,这表明复合管状支架的力学性能与纯丝素支架相比有了明显的改善。经乙醇处理后由

于复合纤维中的丝素蛋白 β -折叠化,其拉伸应力增大到4.31MPa,但断裂伸长率有所下降。拉力测试结果表明PBS的加入增强了丝素纤维的力学性能,增大了血管支架的应力和粘弹性。

爆破强度是考核血管支架力学性能另一重要指标。由于人体内血液正常的收缩压为12.0-18.7 kPa,舒张压为8.0-12.0 kPa,作为血管支架必须能承受足够

的压力而不至破裂。由于未经乙醇处理的纯丝素支架含较多无规线团和Silk I结构,在水中的溶失率较大,因此本实验只测试了复合管状支架和不溶化处理后的丝素支架的压力爆破数据(见表2)。从表中可以看出丝素/PBS复合管状支架的爆破压力大于纯丝素支架,表明PBS的加入可增强血管支架的耐受性、使得支架的抗压性增大。

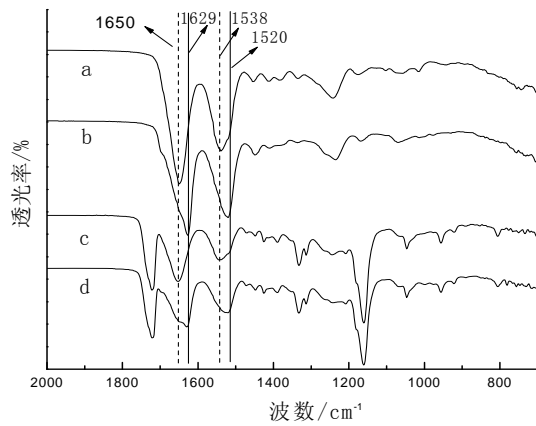


Figure 4. FT-IR of SF/PBS composite tubular scaffolds
(a) pure SF tubular scaffold, (b) pure SF tubular scaffold (ethanol treatment 30 min), (c) SF/PBS composite tubular scaffold, (d) SF/PBS composite tubular scaffold (ethanol treatment 30 min)
图 4 .SF/PBS复合管状支架的红外光谱

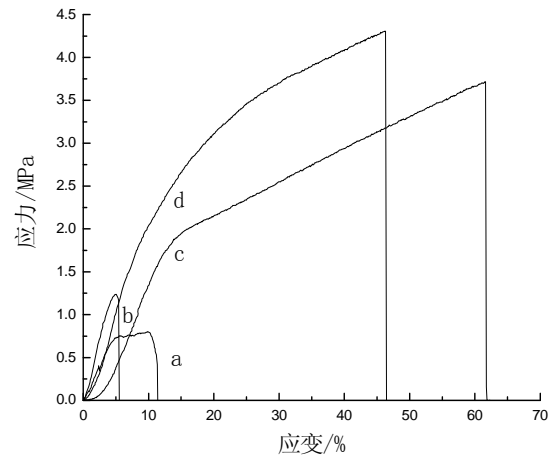


Fig.5 Tensile properties of SF/PBS composite tubular scaffolds
(a) pure SF tubular scaffold, (b) pure SF tubular scaffold (ethanol treatment 30 min), (c) SF/PBS composite tubular scaffold, (d) SF/PBS composite tubular scaffold (ethanol treatment 30 min).
图 5 .SF/PBS复合管状支架的拉伸性能

Table 2. Tensile properties of SF/PBS composite tubular scaffolds (n=5)
表 2 SF/PBS复合管状支架的拉伸性能 (n=5)

样品	拉伸强度(MPa)	断裂伸长率 (%)	杨氏模量 (MPa)	爆破强度 (kPa)
纯丝素支架	0.79 ± 0.09	10.15 ± 0.70	9.43 ± 0.22	—
纯丝素支架 (乙醇处理 30min)	1.23 ± 0.11	5.05 ± 0.62	26.43 ± 0.15	102 ± 15
SF/PBS 复合管状支架	3.73 ± 0.10	61.54 ± 1.72	18.01 ± 0.14	286 ± 21
SF/PBS复合管状支架 (乙醇处理30min)	4.31 ± 0.25	46.21 ± 2.05	24.65 ± 0.33	358 ± 27

4 结论

通过静电纺丝法,以具有三维结构的收集模板取代传统的二维平板作为电纺丝收集基板,通过对纺丝电压和接收间距(TCD)的调节以及改变三维收集模板的宏观结构,制备出具有不同直径和长度的管状纤维材料。由FT-IR分析可知,乙醇处理后SF/PBS复合纤维中,丝素由无规构象转变为 β -折叠结构,结晶度提高。SF/PBS复合管状支架具有较高的拉伸强度和较

好的弹性,其断裂强度和断裂伸长率分别为(4.31 ± 0.25) MPa和(46.21 ± 2.05)%,爆破强度为(358 ± 27 kPa),孔隙率为84.6%,可用于组织工程血管支架材料。

References (参考文献)

- [1] Sell S A, Mcclure M J, Barnes C P, Knapp D C, et al. Electrospun polydioxanone-elastin blends: potential for bioresorbable vascular grafts [J]. Biomedical materials, 2006, 1(2): 72-80.
- [2] Lee SJ, Yoo JJ, Lim GJ, et al. In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application [J]. Journal of

- Biomedical Materials Research Part A, 2007, 83: 999–1008.
- [3] Alessandrino A, Marella B, et al. Electrospun silk fibroin mats for tissue engineering [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2008, 8: 219–225.
- [4] Kim SH, Nam YS, Lee T S. Silk fibroin nanofiber electrospinning properties and structure [J]. *Polymer*, 2003, 35(2): 185–190.
- [5] Liu LF, Yu JY, Cheng LD, Yang XJ. Biodegradability of poly (butylene succinate) (PBS) composite reinforced with jute fibre [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2009, 94: 90 – 94.
- [6] YUTAKA T, BUENAVENTURADA P C. Biodegradability and Biodegradation of Polyesters [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2007, 15: 259–267.
- [7] Zhang DM, Chang J. Electrospinning of three-dimensional nanofibrous tubes with controllable Architectures [J]. *Nano letters*, 2008, 8(10): 3283–3287.
- [8] Brus L E. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state [J]. *Chemical. Physics*, 1984, 80: 4403–4409.
- [9] Zhang Changhui, Zhang Min, Zhao Xia. Synthesis of high relative molecular mass biodegradable Poly (Butylene Succinate) [J]. *Petrochemical technology*, 2009, 38: 185–188.
- 张昌辉, 张敏, 赵霞. 高相对分子质量可生物降解聚丁二酸丁二醇酯的合成 [J]. *石油化工*, 2009, 38: 185–188.