

电纺丝技术制备组织工程食管仿生支架

於学婵, 沈秋霞, 卢珍珍, 张陈, 邓玲, 胡品, 竺亚斌(宁波大学医学院, 浙江省宁波市 315211)

文章亮点:

- 1 运用组织工程技术, 体外模拟构建具有功能的食管替代物是一个非常具有前途的治疗方法, 有望减轻患者的痛苦, 提高生活质量, 甚至延长生命。
- 2 根据食管特殊的组织学结构, 实验创新以两种结构的纤维排布为目标, 以具有良好生物相容性的可降解聚己内酯和廉价易得的蛋白质为基材, 在探索纺丝液性质和系统参数对电纺丝纤维结构影响的基础上, 运用自行研发的电纺丝系统制备无规和有序的纳米级多孔纤维。

关键词:

生物材料; 纳米材料; 电纺丝; 聚己内酯; 纳米纤维; 取向; 食管组织工程; 仿生支架; 国家自然科学基金

主题词:

纳米纤维; 明胶; 丝素蛋白

基金资助:

国家自然科学基金(81171476); 宁波市创新团队项目(2011B82014); 宁波市社发项目(2013C50031)

摘要

背景: 前期实验中曾发现纤维的取向可以引导平滑肌细胞的取向生长, 因此, 设想通过制备取向排列的电纺丝纤维支架, 以引导食管平滑肌细胞的有序生长, 从而有利于维持肌细胞的形貌及生物功能。

目的: 以可降解聚己内酯、明胶、丝素蛋白为基材, 采用自制的电纺丝系统制备无规和有序的纳米级多孔纤维。

方法: 将聚己内酯与丝素蛋白以 4:1 质量比混合, 通过调整溶液浓度、电压、喷射速度等参数, 采用自制的电纺丝系统制备聚己内酯/丝素蛋白电纺丝纤维。将聚己内酯与明胶分别以 2:1、1:1、1:2 质量比混合, 在金属平板接收器下, 通过调整溶液浓度、电压、喷射速度等参数, 采用自制的电纺丝系统制备聚己内酯/明胶无规电纺丝纤维; 同时改用滚轴接收装置, 通过调整滚轴转速、电压、喷射速度等参数, 制备聚己内酯/明胶有序电纺丝纤维。

结果与结论: 在溶液质量浓度为 0.08 g/mL、纺丝液流速 1.6 mL/h 和电压 22.5 kV 的条件下, 制得了均匀、无串珠、纤维直径为(535.9±126.7) nm 的聚己内酯/丝素蛋白多孔纳米纤维膜。在溶液质量浓度为 0.10 g/mL、纺丝液流速 0.8 mL/h 和电压 22.5 kV 的条件下, 制得了无明显串珠、纤维直径为(257.9±117.8) nm 的聚己内酯/明胶多孔纳米纤维膜; 并且在 1:2 质量比时更易成纤维, 纤维尺寸更均匀。在滚轴转速 3 000 r/min、溶液流速 0.8 mL/h、电压 15 kV 的条件下, 制得的聚己内酯/明胶有序电纺丝纤维排序更理想, 纤维也更均匀。

於学婵, 沈秋霞, 卢珍珍, 张陈, 邓玲, 胡品, 竺亚斌. 电纺丝技术制备组织工程食管仿生支架[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(30):4771-4776.

Preparation of tissue-engineered esophageal scaffolds using electrospinning technology

Yu Xue-chan, Shen Qiu-xia, Lu Zhen-zhen, Zhang Chen, Deng Ling, Hu Pin, Zhu Ya-bin (Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: We have found that oriented fibers can guide the alignment of smooth muscle cells in our previous experiments. Thus, we designed the experiment to prepare well aligned polymeric fibers using electrospinning technology, aiming at guiding the growth of esophageal smooth muscle cells to maintain cell morphology and biological function.

OBJECTIVE: Using electrospinning technology, to fabricate isotropic and directed nano-fibrous scaffolds made of polycaprolactone, gelatin and silk fibroin.

METHODS: Polycaprolactone/silk fibroin fibers at a ratio of 4:1 were prepared with proper parameters, including solution concentration, voltage and injection speed, under the self-made spinning system. The polycaprolactone/gelatin sheets with mass ratio of 2:1, 1:1 and 1:2, respectively, were also fabricated under suitable process parameters. Using the roller collector instead of the metal plate, polycaprolactone/gelatin nano-fibrous scaffold with good alignment of fibers was manufactured.

RESULTS AND CONCLUSION: The isotropic polycaprolactone/silk fibroin scaffold with fiber diameter of (535.9±126.7) nm was prepared under conditions of solution concentration (0.08 g/mL), injection speed (1.6 mL/h) and voltage (22.5 kV), and these fibers were uniform with no beads. The isotropic polycaprolactone/gelatin scaffold

於学婵, 女, 1993 年生, 安徽省六安市寿县人, 汉族, 宁波大学医学院本科在读。

通讯作者: 竺亚斌, 教授, 宁波大学医学院, 浙江省宁波市 315211

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.30.003
<http://www.crter.org>

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)30-04771-06

稿件接受: 2014-06-14

Yu Xue-chan, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China

Corresponding author: Zhu Ya-bin, Professor, Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China

Accepted: 2014-06-14

with fiber diameter of (257.9±117.8) nm was prepared under conditions of solution concentration (0.10 g/mL), injection speed (0.8 mL/h) and voltage (22.5 kV). Using the roller collector instead of the previous metal plate, polycaprolacton/gelatin (w:w, 1:2) nano-fibrous scaffold with good alignment of fibers was manufactured. The process parameters were 3 000 r/min of rolling speed, 0.8 mL/h of injection speed and 15 kV of voltage.

Subject headings: nanofibers; gelatin; silk

Funding: the National Natural Science Foundation of China, 81171476; the Innovative Team Program of Ningbo City, No. 2011B82014; the Social Development Project of Ningbo City, No. 2013C50031

Yu XC, Shen QX, Lu ZZ, Zhang C, Deng L, Hu P, Zhu YB. Preparation of tissue-engineered esophageal scaffolds using electrospinning technology. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(30):4771-4776.

0 引言 Introduction

食管疾病引起食管梗阻而不能进食, 严重威胁人类生命健康。中国是食管癌高发地区, 在消化道肿瘤中每年因食管癌死亡的人数仅次于胃癌, 而且食管癌的发病率呈逐年上升趋势。临床常用的治疗方法主要有3种: ①手术切除、胃-颈段食管直接吻合。②对于长段食管病变, 手术切除后必须进行重建替代, 常以自身的胃、空肠、结肠等替代^[1-3], 但对较大面积的食管缺损存在供体不足的问题。③人工合成组织替代品。手术切除重建是目前临床上治疗食管缺损最主要的方法, 但此法以创伤修复创伤, 并且治疗效果也不理想, 据Badylak报告指出以胃替代病变食管患者的死亡率达7%~20%, 术后综合征患病率高达50%以上^[4]。对于人工替代物, 主要是一类非生物降解的材料, 如金属合金、橡胶、塑料、玻璃等, 这些非降解、非生物相容替代物的缺点也是显而易见的, 发生排异、感染等异物反应的概率高, 功能达不到要求。谢远财等^[5]应用钛镍合金制成人工食管, 植入普通家猪体内替代7 cm的胸段食管, 2周后由于组织增生而发生食管狭窄。

组织工程与再生医学的发展为食管修复重建带来了希望。运用组织工程技术, 体外模拟、构建具有功能的食管替代物是一个非常具有前途的治疗方法, 有望减轻患者的痛苦, 提高生活质量, 甚至延长生命。Takimoto等^[6]应用胶原海绵垫片包覆内层硅胶支架制备人工食管, 行犬颈段食管替代实验中发现, 新生食管管体中有复层鳞状上皮、黏膜下环形和纵形排列横纹肌层及腺体的存在, 提出只要提供一种合适的三维细胞外结构支持, 即使在成年更高等的哺乳动物, 食管的高级组织也是能够再生的。故而, 对于组织工程食管的研究主要围绕三维可降解支架、活性细胞(种子细胞)及二者的有效复合, 具有良好生物和组织相容性的支架材料是其中很重要的研究内容之一。用于支架构建的材料目前主要有两大类, 一类是天然生物材料(胶原、壳聚糖、明胶)、脱细胞的细胞外基质(猪小肠黏膜下层、去除上皮细胞和肌层后的膀胱黏膜^[7-11], 来自于人体或动物去细胞后的主动脉、胃壁、食管、皮肤等组织的细胞外基质)^[12-15]。随着聚合物科学的发展, 另一类对人体低毒的、可被动物体降解和/或吸收的合成聚合物因具有来源广泛、成本低、易造型等特点, 被广泛用于食管支架的研究和开发^[16-19]。

人体食管为一20-25 cm的长管状肌性器官, 连接咽喉和胃部, 担负着将食物从咽输送到胃的功能。食管由黏膜、黏膜下层、肌层和外膜构成, 黏膜中的功能细胞—未角化复层鳞状上皮细胞生长在基膜上, 这一基膜包含了上皮细胞所需要的特殊蛋白、生长因子及其他营养物质, 对上皮细胞的增殖、分化、迁移和死亡等具调控作用。经化学和物理方法分析发现, 基膜呈由纳米纤维相互交织而成的网状结构, 纤维直径28-165 nm, 基膜厚度53-151 nm, 其化学成分主要含有胶原、层粘连蛋白、巢蛋白和蛋白聚糖等^[20]。食管中另一功能组织是肌肉层, 肌细胞以内环行和外纵行的方向有序排列形成两层结构, 其运动可为摄取物通过管腔产生蠕动波, 使食物和水在其蠕动下从口腔运送至胃部。

根据食管这一特殊的组织学结构, 作者希望运用电纺丝技术分别构建能促进上皮细胞和肌细胞生长和分化的支架, 以模拟食管的上皮层和肌层, 最终达到制备组织工程化食管的目的。对于上皮层(黏膜层), 以构建支持上皮细胞生长的“拟基膜”为目标; 而对于肌层, 前期实验中发现, 纤维的取向可以引导平滑肌细胞的取向生长^[21]。因此, 可通过制备取向排列的电纺丝纤维支架, 以引导食管平滑肌细胞的有序生长, 有望维持肌细胞的形貌及其生物功能。实验以这两种结构的纤维排布为目标, 以具有良好生物相容性的可降解聚己内酯和廉价易得的蛋白质(如明胶和丝素蛋白)为基材, 在探索纺丝液性质和系统参数对电纺丝纤维结构影响的基础上, 运用自行研发的电纺丝系统(发明专利 ZL 200810062323.8)制备无规和有序的纳米级多孔纤维, 为食管组织工程研究提供构建黏膜组织和肌组织的支架。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 样本观察实验。

时间及地点: 于2013-04-01/2014-04-01在宁波大学完成。

材料: 聚己内酯($M_n=80\ 000$)从SIGMA公司购买; 明胶由国药集团化学试剂有限公司提供; 三氟乙醇(沸点77-80 °C)和六氟异丙醇购自上海达瑞精细化学品有限公司; N, N-二甲基甲酰胺、聚乙二醇(相对分子质量20 000)购自国药集团化学试剂有限公司; 透析袋购自上海源叶生物科技有限公司, 截留相对分子质量为8 000-14 000。蚕

丝由江东吉达有限公司提供。电纺丝系统为实验室自行研制, 发明专利ZL 200810062323.8。

实验方法:

丝素蛋白的提取: 将蚕丝或蚕茧剪碎后, 用去离子水清洗干净, 置于0.5% NaHCO₃水溶液煮沸1 h, 去离子水冲洗, 真空烘箱烘干, 得干丝。将此干丝投于Ca(NO₃)₂·4H₂O中80 °C水浴中加热1 h, 干丝与Ca(NO₃)₂·4H₂O的质量比为1:20^[22]。待干丝完全融化后, 将其溶液装入透析袋中进行透析, 6 h换水1次, 透析3 d, 即得丝素蛋白液, 将此溶液以聚乙二醇浓缩, 然后在冷冻干燥机中冻干, 得到海绵状丝素蛋白固体, 冰箱中保存备用。

制备聚己内酯/丝素复合纤维: 用三氟乙醇和甲酸分别溶解聚己内酯和丝素蛋白, 得到聚己内酯溶液和丝素蛋白溶液, 将两者以4:1的质量比混合, 以六氟异丙醇调节至所需纺丝溶液的浓度。通过调节系统电压、液体供给速度等因素, 室温下进行电纺丝, 得到聚己内酯/丝素蛋白复合电纺丝纤维。所用纺丝液喷射针头为医用7号金属针(外径0.7 mm), 平头。喷射头与平板接收板之间的距离为20 cm。所用电纺丝系统为本实验室自行研制, 接收器为平板和滚轴, 定位和移行由中央控制系统编程控制。采用同样的方法, 以三氟乙醇为溶剂溶解聚己内酯得聚己内酯纺丝液, 制备聚己内酯电纺丝纤维, 实验中用于对比。

制备聚己内酯/明胶无规纤维: 以三氟乙醇为溶剂, 将聚己内酯与明胶以一定浓度和比例溶于三氟乙醇中, 80 °C水浴加热以促进溶解。以金属平板为接收器, 喷射头与平板接收板之间的距离为20 cm, 室温下进行电纺丝。实验中探索了聚己内酯:明胶为1:1质量比时的电纺丝操作参数。

制备聚己内酯/明胶有序取向纤维: 将聚己内酯与明胶以不同质量比(1:2、1:1、2:1)80 °C下溶解于三氟乙醇, 由上述平板改为滚轴接收器, 喷射头与平板接收板之间的距离为20 cm。在室温下进行电纺丝, 转速为1 000–3 000 r/min, 其他条件同上。

测试: 通过光学显微镜(CKX41SF, Olympus)观察, 以监控电纺丝纤维的形貌, 从而调整系统操作参数。通过扫描电子显微镜(SEM, S-3400, HITACHI, Japan)对电纺丝纤维进行表面形态分析, 测试前将纤维在HITACHI Ion Sputter (E-1010, Japan)上喷金。电纺丝纤维直径从扫描电镜图中估算而得, 每个样品选取不同部位20个数值平均所得, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与讨论 Results and discussion

运用电纺丝技术可以制备纤维直径介于5 nm至5 μm、多种微观结构、高孔隙率的膜片状或管状支架, 并依据目标支架的结构性能要求进行设计和调整, 使这一技术在生物工程领域如制备仿生化和功能化的组织工程支架方面得到了广泛研究和应用^[23-24]。根据食管组织的结构特点, 作

者分别设计了无规和有序排列的纳米级多孔纤维, 为构建食管中的功能成分——黏膜层和肌层提供支架。理论上, 聚合物的溶液性质, 即纺丝液性质、电纺丝系统中所采用的电压、喷射速度或流量、喷射口与收集板距离, 以及接收滚轴转速等都会对最后制备的纤维膜结构产生影响。在前期工作的基础上, 选用具有良好生物相容性并已被美国FDA论证可用于体内的聚己内酯, 以及价格低廉、原料易得、性能良好的明胶和丝素蛋白为基材, 运用本实验室自行研制的电纺丝系统和技术, 探索了溶液性质和系统参数对聚合物成纤性能的影响, 以制备符合食管组织工程需要的仿生支架。

2.1 聚己内酯/丝素蛋白复合纤维 浙江省是蚕丝之乡, 蚕丝来源丰富易得。从蚕丝或蚕茧中提取得到的丝素蛋白是一种天然结构性蛋白, 具有高度重复的丙氨酸-甘氨酸-丝氨酸序列, 具有其他高分子材料所不可比拟的优点, 如无毒、无刺激、无污染、独特的机械性能及优良的透气透湿性和生物相容性, 对机体细胞黏附力强, 支持组织细胞的生长与增殖^[25-27], 实验选它作为基材是非常有优势的。根据前期关于聚己内酯与丝素蛋白混合电纺的实验, 认为在两者4:1的比例时制备的电纺丝溶液成纤维性能良好^[28], 因此本实验仍采用此比例探讨系统参数对纺丝液成纤行为的影响, 见表1所示。在溶液质量浓度0.8–0.125 g/mL、供给速率(纺丝液流速)0.6–1.6 mL/h和电压17–30 kV的探索范围内, 得到最佳成纤维条件为: 溶液质量浓度0.08 g/mL、纺丝液流速1.6 mL/h和电压22.5 kV的条件下, 制得了均匀、无串珠、纤维直径为(535.9±126.7) nm的多孔纳米纤维膜(图1)。

2.2 聚己内酯/明胶复合纤维 明胶虽是变性的胶原, 但它仍然维持了胶原蛋白所具有的优良生物和组织相容性, 而且价格更低廉, 原料易得, 已在生物材料领域得到广泛应用。作者曾对明胶促进血管内皮细胞、食管上皮细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞生长的情况进行了研究并得到正向结果, 但它的缺点是成纤维能力较差^[29-31]。另一方面, 聚己内酯是生物可降解的合成聚合物, 其良好的生物相容性使其在组织工程领域中得到了广泛关注和应用, 将明胶和聚己内酯混合明显提高了二者的成纤维能力, 改变了各自都不容易被电纺的事实: 在溶液质量浓度为0.10 g/mL的条件下, 聚己内酯与明胶质量比为2:1质量比时有少量丝形成, 粗细不均; 在1:1、1:2时成丝量多。明胶的加入提高了纺丝液的成纤维能力, 如聚己内酯与明胶质量比为1:1时, 溶液浓度和操作参数对成纤维行为的影响见表2所示。在溶液质量浓度0.06–0.12 g/mL、纺丝液流速0.7–1.0 mL/h、电压17–30 kV的探索范围内, 得到最佳成纤维条件为: 溶液质量浓度为0.10 g/mL、纺丝液流速0.8 mL/h和电压22.5 kV的条件下, 制得了无明显串珠、纤维直径为(257.9±117.8) nm的多孔纳米纤维膜(图2), 其扫描电镜下的形貌见图2C、D所示。而单纯聚己内酯(图2A、B)相对较难成纤维, 图中也显示有少量

表 1 电纺溶液浓度和系统参数对聚己内酯/丝素蛋白纺丝液成纤维行为的影响

Table 1 Effects of polymer concentration and operating parameters on the formation of polycaprolacton/silk fibroin fibers

项目	条件	成纤维状态
溶液质量浓度(g/mL)	0.08	出丝量多, 纤维粗细较均匀
	0.09	出丝量多, 但纤维粗细不均
	0.10	丝较粗, 出丝数量少
	0.11	丝粗, 出丝数量极少
	0.125	无法成丝
纺丝液流速(mL/h)	0.6	因溶剂挥发太快, 电纺液堵塞针尖
	0.8	因溶剂挥发太快, 电纺液堵塞针尖
	1.0	因溶剂挥发太快, 电纺液堵塞针尖
	1.2	因溶剂挥发太快, 电纺液堵塞针尖
	1.4	少量电纺液流出针尖, 易堵塞针尖
电压(kV)	1.6	电纺液流出针尖均匀, 匀速滴下
	17.5	出丝量少, 液滴多
	20	出丝量一般, 有少量液滴
	22.5	出丝量多, 无液滴
	25	无液滴, 纤维粗细不均
	30	无液滴, 纤维粗细不均, 少量串珠样丝
	40	丝粗, 串珠样丝多

表注: 聚己内酯与丝素蛋白质量比为 4 : 1。最佳成纤维条件为: 溶液质量浓度为 0.08 g/mL、纺丝液流速 1.6 mL/h 和电压 22.5 kV。

表 3 电纺操作系统参数对聚己内酯/明胶溶液有序纤维形成能力的影响

Table 3 Effects of operating parameters on formation and alignment of polycaprolacton/gelatin

项目	条件	成纤维状态
转速(r/min)	1 000	纤维粗细不均, 弯曲成圈状, 无取向
	1 500	纤维粗细不均, 不连续, 出丝少
	2 000	纤维粗细不均, 弯曲成圈状, 出丝少
	2 400	纤维粗细较均匀, 细而直
	3 000	纤维粗细均匀, 细而直, 排列有序
流速(mL/h) (转速 3 000 r/min)	0.7	纤维排序较好, 有少量圈
	0.8	纤维较细, 有取向趋势
	0.9	纤维细少, 呈卷曲状, 无取向
电压(kV) (转速 3 000 r/min, 流速 0.8 mL/h)	1.0	纤维成束, 较粗, 取向不好
	10	丝细而少, 微卷, 取向
	13	丝细, 微卷, 取向
	15	丝均匀, 取向较好
	17	较乱
	19	圈较多
	20	圈多, 不佳

表注: 聚己内酯与明胶质量比为 1 : 2, 溶液质量浓度为 0.10 g/mL, 喷射头与接收器距离 10 cm。

的融合纤维存在(图中箭头), 致使整个纤维膜的均匀性降低。在相似条件下, 聚己内酯与明胶在 1 : 2 时更易成纤维, 纤维直径为(255.5±90.6) nm, 纤维尺寸更均匀(标准偏差更小)。

2.3 有序聚己内酯/明胶复合纤维 根据上述聚己内酯/明胶成纤维能力及纤维性能的探索结果, 考虑到明胶具有良好的细胞和组织相容性, 以聚己内酯/明胶(1 : 2)的纺丝溶液制备取向的多孔纤维支架。将平板接收器改为滚轴接收器, 研究了系统参数如滚轴转速、流速和电压对纤

表 2 电纺溶液浓度和系统参数对聚己内酯/明胶纺丝液成纤维行为的影响

Table 2 Effects of polymer concentration and operating parameters on the formation of polycaprolacton/gelatin fibers

项目	条件	成纤维状态
溶液浓度(g/mL)	0.06	载玻片上较多溶剂残留, 丝细且少
	0.08	载玻片上较多溶剂残留, 丝细且少
	0.1	无溶剂残留, 成丝好, 均匀
	0.12	丝粗, 串珠
	0.7	出丝量少, 丝细
纺丝液流速(mL/h)	0.8	出丝量较多, 丝细
	0.9	成丝量较多, 丝较粗
	1.0	成丝量多, 丝粗
	17.5	成丝较少, 多余液滴
	20	有少量液滴, 成丝较多
电压(kV)	22.5	成丝好, 稳定、纤维粗细均匀
	25	纤维粗细不均, 纤维不连续
	27.5	纤维断裂, 串珠样纤维增多
	30	大量串珠样纤维

表注: 聚己内酯与明胶的质量比为 1 : 1。最佳成纤维条件为: 溶液质量浓度为 0.10 g/mL、纺丝液流速 0.8 mL/h 和电压 22.5 kV。

维有序性的影响, 列于表 3。此时喷射头与接收板距离由原来的 20 cm 改为 10 cm, 缩短纤维从喷射头行至接收板的距离其目的是为了减少纤维发生卷曲的概率, 使纤维的取向能力提高。

从表 3 中的参数可见, 滚轴转速越高纤维的取向性更好, 这是合理的, 因为旋转的接收器对喷射头中射出的纤维产生一种惯性拉力, 转速越高拉力越大, 随着滚轴以合适的步进前移, 纤维在滚轴表面可以一条接一条有序的排列。相对于平板接收, 滚轴接收所要求的电场压力较低, 这也是由于旋转给予了纤维移动的动力, 只需要较低的压力即可使射流从喷射头到达接收器。图 3 显示了纤维的形貌, 在相同的操作参数下, 聚己内酯 : 明胶(1 : 2)(图 3B)比聚己内酯 : 明胶(1 : 1)的纤维排序更理想, 纤维也更均匀。在前期实验中发现纤维可以引导平滑肌细胞沿着纤维生长(图 3C)^[21], 因此, 本实验所得的有序纤维膜也有望使食管平滑肌细胞沿着取向的纤维有序生长, 这将对维持平滑肌的功能是非常有利的。

3 结论与展望 Conclusion and prospect

根据食管中上皮层和肌层组织的微观构造, 运用实验室自行研制的电纺丝系统, 对聚己内酯、丝素蛋白和明胶的复合纤维的制备条件进行了探索, 获得了均匀无规和有序取向的电纺丝纤维膜, 纤维直径介于 250–550 nm 之间。实验结果认为明胶和丝素蛋白的加入明显提高了聚合物聚己内酯的成纤维能力。由于明胶和丝素蛋白均为具有良好生物相容性的生物大分子, 这已在前期实验中得到多次证实^[32-33], 由明胶和丝素蛋白与聚

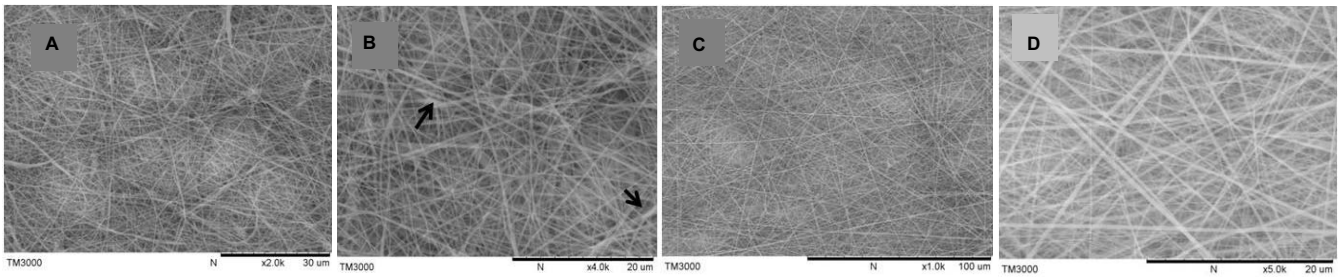


图2 聚己内酯电纺纤维和聚己内酯/明胶电纺复合纤维的扫描电镜图

Figure 2 Morphologies of polycaprolactone and polycaprolactone/gelatin fibers observed under scanning electron microscope

图注: 图中 A、B 为聚己内酯纤维, C、D 为聚己内酯/明胶复合纤维, 复合纤维中聚己内酯与明胶的质量比为 1:1。单纯聚己内酯相对较难成纤维, 直径(251.2 ± 111.2) nm, 图中也显示有少量的融合纤维存在(图中箭头), 致使整个纤维膜的均匀性降低; 聚己内酯/明胶复合纤维无明显串珠, 纤维均匀, 直径(257.9 ± 117.8) nm。

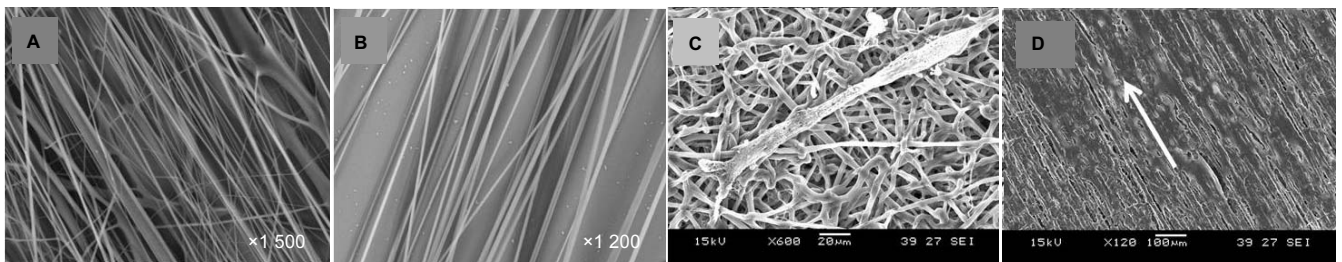


图3 有序聚己内酯/明胶电纺纳米纤维的扫描电镜图

Figure 3 Morphology of directed polycaprolactone/gelatin fibers under scanning electron microscope

图注: 图中 A、B 显示聚己内酯与明胶的质量比分别为 1:1、1:2, 滚轴转速 3 000 r/min, 溶液流速 0.8 mL/h, 电压 15 kV; 图中 C、D 引自文献, 平滑肌细胞可以沿着纤维生长(C), 将纤维有序排列后细胞也沿着纤维方向有序生长(D, 箭头)^[26]。

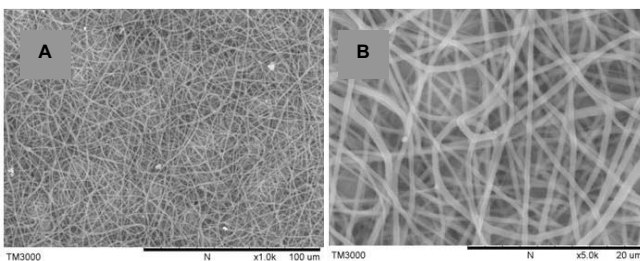


图1 聚己内酯/丝素蛋白多孔电纺纳米纤维膜的扫描电镜图

Figure 1 Morphology of polycaprolactone/silk fibroin fibers observed under scanning electron microscope

图注: 聚己内酯和丝素蛋白的质量比为 4:1。聚己内酯和丝素蛋白复合纤维均匀、无串珠, 纤维直径为(535.9 ± 126.7) nm。

己内酯组成的电纺丝支架也将具有良好的细胞相容性。另一方面, 由于均匀无规和有序取向的纤维结构分别模拟了食管中基膜和肌层组织的构造, 这将为以组织工程技术体外构建人工食管提供支架样品, 接下来将分别在这两种支架上种植食管原代上皮细胞和平滑肌细胞, 以及将二者有机结合, 为将来构建具有形状和功能的组织工程化食管提供支架。

作者贡献: 所有作者均直接参与实验过程及数据整理, 论文撰写为於学婵、竺亚斌, 撰写者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 未涉及伦理冲突的内容。

学术术语: 电纺丝-又称静电纺丝是一种利用聚合物溶液或熔体在强电场作用下形成喷射流进行纺丝加工的工艺。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] D'Journo XB, Martin J, Ferrero P, et al. The esophageal remnant after gastric interposition. *Dis Esophagus*. 2008; 1:377-388.
- [2] Ferahkose Z, Bedirli A, Kerem M, et al. Comparison of free jejunal graft with gastric pull-up reconstruction after resection of hypopharyngeal and cervical esophageal carcinoma. *Dis Esophagus*. 2008; 21:340-345.
- [3] Doki Y, Okada K, Miyata H, et al. Long-term and short-term evaluation of esophageal reconstruction using the colon or the jejunum in esophageal cancer patients after gastrectomy. *Dis Esophagus*. 2008; 21(2):132-138.
- [4] Londono R, Jobe BA, Hoppo T, et al. Esophagus and regenerative medicine. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(47): 6894-6899.
- [5] 谢远财, 张本固, 彭品贤, 等. 应用钛镍合金-硅橡胶组合式人工食管重建食管缺损[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(34):6675-6679.
- [6] Takimoto Y, Nakamura T, Yamamoto Y, et al. The experimental replacement of a cervical esophageal segment with an artificial prosthesis with the use of collagen matrix and a silicone stent. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998; 116:98-106.
- [7] 谭波, 魏人前, 杨志明, 等. 口腔黏膜上皮细胞与猪小肠黏膜下层体外复合培养的实验研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2010, 28(1): 76-80.

- [8] Barnes CA, Brison J, Michel R, et al. The surface molecular functionality of decellularized extracellular matrices. *Biomaterials*. 2011;32(1):137-143.
- [9] Wolf MT, Daly KA, Brennan-Pierce EP, et al. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*. 2012;33(29):7028-7038.
- [10] Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, et al. Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*. 2012;379(9819):943-952.
- [11] Nieponice A, Ciotola F, Nachman F, et al. Patch Esophagoplasty: Esophageal Reconstruction Using Biologic Scaffolds. *Ann Thorac Surg*. 2014;97(1):283-288.
- [12] Urita Y, Komuro H, Chen G. Regeneration of the esophagus using gastric acellular matrix: An experimental study in a rat model. *Pediatr Surg Int*. 2007;23:21-26.
- [13] 谭波, 魏人前, 杨志明, 等. 食管黏膜上皮细胞与SIS复合培养及生物学特性研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(6):742-746.
- [14] Saxena AK, Komann C, Ainoedhofer H, et al. Esophagus tissue engineering: hybrid approach with esophageal epithelium and unidirectional smooth muscle tissue component generation in vitro. *J Gastrointest Surg*. 2009;13:1037-1043.
- [15] 谭波解慧琪. 组织工程在食管修复重建外科中的应用[J]. *生物物理学报*, 2011, 27(6):475-482.
- [16] Lei YN, Zhu YB, Gong CF, et al. Synthesis, characterization and cytocompatibility of a degradable polymer using ferric catalyst for esophageal tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(2):273-282.
- [17] Zhu Y, Leong MF, Ong WF, et al. Esophageal epithelium regeneration on fibronectin grafted poly (L-lactide-co-caprolactone) (PLLC) nanofiber scaffold. *Biomaterials*. 2007;28(5):861-868.
- [18] Gong CF, Hou L, Zhu YB, et al. In vitro constitution of esophageal muscle tissue with endocyclic and exo-longitudinal patterns. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013;5(14):6549-6555.
- [19] Tan JY, Chua CK, Leong KF, et al. Esophageal tissue engineering: an in-depth review on scaffold design. *Biotech Bioeng*. 2011;109:1-15.
- [20] Li YY, Zhu YB, Yu HW, et al. Topographic characterization and protein quantification of esophageal basement membrane for scaffold design reference in tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2012;100B:265-273.
- [21] Zhu YB, Cao Y, Pan J, et al. Macro-alignment of electrospun fibers for vascular tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2010;92B:508-516.
- [22] 陈玲, 竺亚斌, 李媛媛, 等. 丝素蛋白在电纺丝法构建组织工程支架中的应用进展[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(6):831-837.
- [23] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng*. 2006;12:1197-1211.
- [24] Lannuttia J, Reneker D, Mac T, et al. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater Sci Eng C*. 2007;27(3):504-509.
- [25] Shao ZZ, Vollrath F, et al. Materials: Surprising strength of silkworm silk. *Nature*. 2002;418:741.
- [26] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401-416.
- [27] Park SY, Ki CS, Park YH, et al. Electrospun Silk Fibroin Scaffolds with Macropores for Bone Regeneration: An In Vitro and In Vivo Study. *Tissue Eng A*. 2010;16(4):1271-1279.
- [28] 陈玲, 吕静静, 於学婵, 等. 静电纺丝法构建食道上皮组织[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(12): 1796-1807.
- [29] Zhu YB, Gao CY, Shen JC. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials*. 2002;23 (24):4889-4895.
- [30] Zhu YB, Gao CY, He T, et al. Endothelium regeneration on luminal surface of polyurethane vascular scaffold modified with diamine and covalently grafted with gelatin. *Biomaterials*. 2004;25(3):423-430.
- [31] Shen QX, Shi PN, Gao MN, et al. Progress on materials and scaffold fabrications applied to esophageal tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(4):1860-1866.
- [32] Lv J, Chen L, Zhu Y, et al. Promoting Epithelium Regeneration for Esophageal Tissue Engineering through Basement Membrane Reconstitution. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014; 6(7):4954-4964.
- [33] Shen ZS, Kang C, Chen JJ, et al. Surface modification of polyurethane towards promoting the ex vivo cytocompatibility and in vivo biocompatibility for hypopharyngeal tissue engineering. *J Biomater Appl*. 2013;28(4):607-616.