蚕丝蛋白和明胶复合组织工程材料与肝细胞相容性的实验研究 *

徐丽莎[1] 刘文晶[2] 申少波[3] 杨 照[1] 陈蕊蕊[1] 韩 英[1] 尹 芳[1] 时永全[1] 周新民[1△]

(1 第四军医大学西京消化病医院 陕西 西安 710032；2 第四军医大学训练部医学教育教研室 陕西 西安 710032；
3 第四军医大学军事预防医学系卫生勤务教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的：研究蚕丝蛋白 - 明胶三维材料支架对人永生化肝细胞系 QZG 贴附及增殖的影响。**方法：**采用四氮唑盐比色法(MTT)、细胞计数法检测 QZG 细胞在纯蚕丝生物材料上与在蚕丝蛋白 - 明胶复合材料上的增殖情况，用扫描电镜观察 QZG 细胞在两种三维生物材料上的贴附与增殖情况。**结果：**QZG 细胞可以在蚕丝蛋白生物材料贴附及增殖，在引入明胶的蚕丝蛋白材料上细胞贴附更紧密，增殖更明显。**结论：**蚕丝蛋白与明胶复合材料支架具有良好的细胞贴附性能，通过改进在肝组织工程应用方面将具有一定应用前景。

关键词：MTT 比色法；蚕丝蛋白；明胶；肝组织工程；细胞相容性。

中图分类号：R322.47 R318.14 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2011)08-1432-04

Experimental Study on Silk Protein - Three-dimensional Gelatin Scaffold and Compatibility of Liver Cells*

XU Li-sha[1], LIU Wen-jing[2], SHEN Shao-bo[3], YANG Zhao[1], CHEN Rui-rui[1], HAN Ying[1], YIN Fang[1], SHI Yong-quan[1], ZHOU Xin-min[△]

(1.State Key Laboratory of Cancer Biology & Institute of Gastroenterology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi province, 710032, P.R. China;

2. Faculty of Training Administration, Department of Medical Education, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi province, 710032, P.R. China;

3. Department of Health Service, Faculty of Preventive Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi province, 710032, P.R. China)

ABSTRACT Objective: To study the silk fibroin material's effect on proliferation of human normal hepatic cell line QZG, and to testify the cytocompatibility when blending of silk fibroin and gelatin into 3D scaffold. Methods: The activity of cell proliferation and relative growth rate (RGR) were assessed by MTT colorimetric assay and viable cell counting, The effect of silk protein materials on growth of cells was observed by scanning electron microscopy (SEM). Results: Human normal hepatic cell line QZG were cultivated in vitro directly on pure silk protein materials and silk fibroin/ gelatin materials. Cells solidly adhered to the materials. The activity of cell proliferation on silk fibroin/ gelatin materials was significantly more than that in the group of pure silk fibroin materials. The result of viable cell counting was compatible to MTT colorimetric assay. Conclusion: The silk fibroin materials together with gelatin has a good cytocompatibility with human normal hepatic cell line QZG. It will be useful in liver tissue engineering.

Key Words: MTT; Silk protein; Gelatin; Liver tissue engineering

Chinese Library Classification(CLC): R322.47 R318.14 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)08-1432-04

理想的肝组织工程可作为有效的生物人工肝替代支持系统，为急性肝功能衰竭及终末期肝病患者提供有效的替代治疗，为患者自身肝脏的再生及等待肝源争取宝贵时间。近年来肝组织工程在组织工程发展的大背景下获得了巨大的成效，载体材料和种子细胞是肝组织工程的两大关键，而这两者的相容性是构建理想肝组织工程的关键环节。蚕丝蛋白是一种生物相容性较好的材料，其具有较高强度和韧性[1]，被广泛应用于骨组织工程和皮肤组织工程。胶原是软骨组织中的主要结构蛋白，使软骨组织具有其独特的力学性质。而且胶原蛋白也有利于细胞的黏附、增殖和分化，可降解并为新生组织提供足够的空间[2]。近年来，研究者尝试将蚕丝蛋白与胶原复合支架应用于肝组织工程，借以充分发挥二者的特性[3]。本文拟研究蚕丝蛋白 / 明胶复合材料及纯蚕丝材料与体外建系的肝脏细胞相容性，为选择更好的载体材料奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

SD 雄性大鼠购于第四军医大学试验动物中心；DMEM

* 基金项目：国家 863 计划(2009AA043801)

作者简介：徐丽莎(1984-)，女，硕士，主要研究方向：生物人工肝；电话：13571883321；
E-mail：xulisha8855@163.com
△通讯作者：周新民，zhouxm128@fmmu.edu.cn，电话：029-84771538

(收稿日期：2011-01-23 接受日期：2011-02-18)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

培养基、胎牛血清购于 Hyclone 公司；MTT 粉购于 Sigma 公司；DMSO 购于 Sigma 公司；蚕丝蛋白 / 明胶材料由西安交通大学机械学院提供；Thermo Steri-Cycle CO_2 培养箱；倒置相差显微镜（CKX-31,Olympus,Japan）；TD5M-WS 赛特湘仪离心机；SW-CJ-1F 水平层流洁净工作台；Thermo 酶标仪。

1.2 蚕丝蛋白 / 明胶复合材料支架的制备与灭菌处理

1.2.1 蚕丝的脱胶

为获得蚕丝蛋白，需要先对蚕丝进行脱胶处理，本研究中采用在 0.5wt%的 Na_2CO_3 溶液中将蚕丝煮沸 1 小时，然后分别用自来水和超纯水将脱掉的丝胶蛋白冲洗干净。

1.2.2 蚕丝蛋白的溶解

本研究中选用 $CaCl_2/C_2H_5OH/H_2O$（摩尔比 1:2:8）三相溶液作为蚕丝蛋白的溶解液，将适量蚕丝蛋白加入三相溶液中在 80℃水浴中放置数小时即可得到蚕丝蛋白溶液。

1.2.3 纯蚕丝蛋白水溶液的制备

溶解后得到的蚕丝蛋白溶液中含有大量的无机盐离子以及乙醇，本研究中选用截留分子量 3500D 的透析袋对溶液进行透析。

1.2.4 混合溶液的制备

研究中选用的是来源于牛皮的 B 型明胶，当温度低于 30℃时，在水溶液环境中，明胶自然地从无规则卷曲结构转变为三螺旋结构进而形成凝胶，当温度升高时，螺旋结构又转变为无规则结构，形成均质的水溶液。在本研究中，利用 40℃水浴帮助明胶充分溶解。然后将 4%蚕丝与 3%明胶溶液充分混合得到混合溶液。

1.2.5 蚕丝蛋白 / 明胶三维多孔支架的制备

本研究中应用冷冻干燥法制备蚕丝蛋白 / 明胶多孔支架。具体工艺是将配制好的混合溶液注入硅胶模具，置于 -20℃预冻 24h，然后将预冻支架冻干 24h 得到三维多孔支架。支架孔径为 250± 30um 之间。孔隙率为 85.4± 2.1%。将所制备的蚕丝蛋白 / 明胶材料送第四军医大学钴 60 辐照中心照射灭菌（25℃,25KGY）。复合材料使用前用无菌 1× PBS 洗三遍。

1.3 体外人永生化肝细胞系 QZG 培养

复苏冻存的人永生化肝细胞系 QZG 至 10cm 培养皿，置 CO_2 孵箱中以 DMEM（高糖）培养液 +20%胎牛血清培养，隔天换液一次。

1.4 体外人永生化肝细胞系 QZG 在支架上接种与培养

分为两组，第一组 4%蚕丝蛋白与 3%明胶复合材料支架与人永生化肝细胞系 QZG 组，第二组纯蚕丝蛋白与人永生化肝细胞系 QZG 组。将支架材料预先铺于 96 孔板中，消化长至 70-80%的人永生化肝细胞系 QZG 细胞成单细胞悬液，以 1× 10^4 个 /ml 的密度以悬滴法分别接种至 100%纯蚕丝及蚕丝蛋白 - 明胶材料支架上，CO_2 孵箱中静置 1 小时后补加 DMEM（高糖）培养液 +20%胎牛血清，CO_2 孵箱中连续培养 7 天，隔天换液一次。

1.5 细胞增殖活力测定（MTT 法）

每天分别于每组培养细胞的材料中取 5 个孔，每孔加入 20ulMTT 液，37℃,CO_2 孵箱中孵育 4 小时。4 小时后取出培养板，小心吸弃上清液，加入 200ulDMSO 后振荡 10min 溶解。溶解后吸出 200ul 溶解液至 96 孔板中，标记后将 96 孔板置于酶标仪中 490nm 检测读数，每组 5 个读数求平均值[4]，另一组操作步骤同上所述。

1.6 细胞收集计数

将支架材料预先铺于 6 孔板中，消化长至 70-80%的人永生化肝细胞系 QZG 细胞成单细胞悬液，以 1× 10^5 个 /ml 的密度以悬滴法接种至 100%纯蚕丝及蚕丝蛋白 - 明胶材料支架上，连续七天，每天分别于每组培养细胞的材料中取 3 个孔，吸弃培养液后加入 1ml0.25%胰酶消化液, 37℃消化 5min，加入 2ml 培养液终止消化。反复吹吸后收集全液至离心管中，1000rmp 离心 5min，弃上清后用 1ml 培养液重悬细胞，对此细胞悬液用细胞计数板进行细胞计数，每组 3 个计数求平均值，另一组操作步骤同上所述。

1.7 扫描电镜观察

将材料分为两组，A 组为 4%的蚕丝蛋白和 3%的明胶复合生物材料组，B 组为纯蚕丝蛋白材料组。消化长至 70-80%的人永生化肝细胞系 QZG 细胞成单细胞悬液，以 1× 10^4 个 /ml 的密度以悬滴法接种至 100%纯蚕丝及蚕丝蛋白 - 明胶三维材料支架上，分别取 1、3、7 天培养细胞的材料，置于 2%戊二醛固定液中固定，送第四军医大学基础部电镜中心进行扫描电镜观察，另一组操作步骤同上所述。

1.8 数据处理

数据采用 SPSS 12.0 for Windows 软件进行分析，组间比较以单因素方差分析进行显著性检验, $P < 0.05$ 差异有显著性意义。

2 实验结果

2.1 细胞增殖活力比较

MTT 比色法测定 490nm 吸光度（OD 值），检测细胞增殖活力。各个时间点两组间比较如（图 1）。连续七天，两组间 MTT 读数间比较($p < 0.05$)，其中 4%蚕丝蛋白与 3%明胶复合材料支架组人永生化肝细胞系 QZG 细胞增殖活力明显优于纯蚕丝蛋白材料支架组。

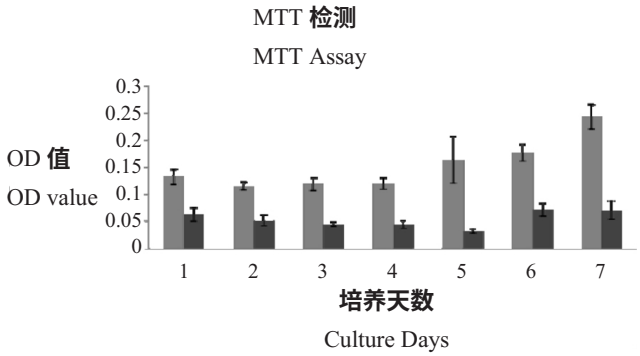

图 1 MTT 检测 QZG 细胞增殖活力（MTT Assay of QZG Cell proliferation）

注：1. 中红色柱状图代表 4%蚕丝蛋白与 3%明胶复合材料支架组人永生化肝细胞系 QZG 细胞增殖活力测定结果；蓝色柱状图代表纯蚕丝蛋白材料支架组人永生化肝细胞系 QZG 细胞增殖活力测定结果。连续七天，两组间 MTT 读数间比较($p<0.05$)

Fig.1 MTT assay of QZG cells cultured for 7 days on silk fibroin s-caffolds（red histograms）and silk fibroin /gelatin blending scaffolds（blue histograms）(n=4, mean± standard deviation, *P<0.05)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 细胞数量比较

两组表面各时间点收获细胞数量比较如（图 2）。连续七天，两组间细胞计数间比较($p < 0.05$)，其中 4%蚕丝蛋白与 3%明胶复合材料支架组人永生化肝细胞系 QZG 细胞计数量明显大于纯蚕丝蛋白材料支架组。

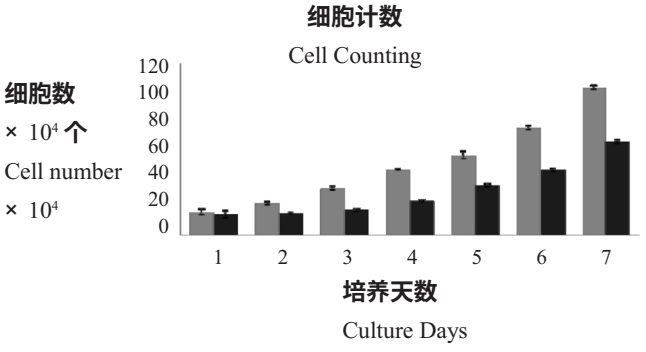

图 2 细胞计数（Cell Counting）

注：2. 中红色柱状图代表 4%蚕丝蛋白与 3%明胶复合材料支架组人永生化肝细胞系 QZG 细胞计数结果；蓝色柱状图代表纯蚕丝蛋白材料支架组人永生化肝细胞系 QZG 细胞计数结果。连续七天，两组间计数间比较($p < 0.05$)

Fig.2 QZG cells counting for 7 days on silk fibroin scaffolds (red histograms) and silk fibroin /gelatin blending scaffolds (blue histograms) (n=4, mean± standard deviation, *P<0.05)

2.3 扫描电镜观察

两组间扫描电镜观察细胞生长情况：细胞均与支架材料完全贴附，细胞间连接紧密，细胞在材料的微孔中成聚集态，第 3 天与第 7 天，4%蚕丝与 3%明胶复合材料支架组上细胞成团片状生长，状态明显优于纯蚕丝蛋白材料支架组。

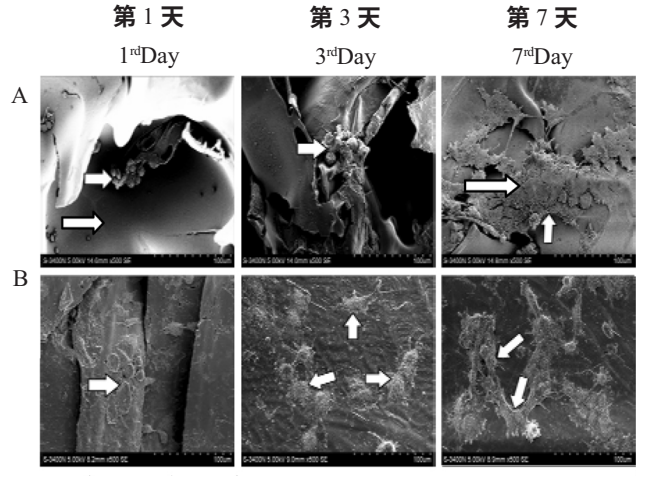

图 3.扫描电镜观察（Scanning Electron Micrographs Observation）

注：3. 中 A、B 两组分别为：4%蚕丝蛋白与 3%明胶复合材料支架组和纯蚕丝蛋白材料组。图中白色箭头所指为在蚕丝蛋白 / 明胶复合生物材料表面贴附和增殖的人永生化肝细胞系 QZG 细胞。

Fig.3. Scanning electron micrographs representing sequential steps of cell attachment and growth on silk fibroin scaffolds (grey histograms) and silk fibroin /gelatin blending scaffolds (black histograms): (A) silk fibroin /gelatin blending scaffolds; (B) silk fibroin scaffolds; White arrows=QZG cells.

3 讨论

近年来，人们特别关注到了组织工程在肝脏方面的应用研究，尤其是应用何种细胞和细胞外基质以及创造什么样的环境来构建组织工程肝脏[5]。肝组织工程材料种类甚多，评价生物材料的方法有多种，其主要关注点还是其与受体的相容性及种子细胞的相容性。体内埋植试验是检测生物材料生物相容性必不可少的方法之一。通过体内埋植试验可以直接观察动物机体对材料中的同种或异种抗原或材料中的化学物质产生的免疫应答[6,7]。

Johnson 等[8,9]认为，在区别生物材料的毒性及对细胞影响方面，体外实验较体内植入更敏感。近年来研究者将目光转移至机械和生物性能均良好的蚕丝蛋白材料，拟将其应用于肝组织工程。蚕丝不溶于绝大多数的溶剂，包括水、稀酸和稀碱。丝素蛋白间的构造特征使纤维内产生 β - 折叠晶体，甚至在很小的结晶区域内也存在液晶态及多态现象[10-12]。这些纳米级特征，小范围因素，定向晶体和大量 β - 折叠晶体，晶体和微小结晶区域间的模糊界面，为蚕丝纤维新机械性能的开发利用提供了基础[13]。另外，与天然蛋白相比，交联可以从本质上改变胶原的性质[14,15]。

明胶提取自天然胶原蛋白，其组织相容性好，适合细胞贴附。明胶被广泛地应用于医疗领域，例如多孔生物材料制造、药物缓释系统、组织工程修复等[16-21]。特别将明胶与其他生物材料混合交联后，能够产生既能满足生物材料支架多孔的要求，又能保证混合材料一定的生物力学性能以及合适生物降解程度的混合生物材料支架，从而为确立组织工程合适的细胞外基质提供了良好的选择。

本实验经过细胞相容性验证，证明引入明胶后的蚕丝蛋白材料能明显促进细胞贴附与增殖。我们下步将在蚕丝蛋白与明胶的复合材料上进行进一步加工修饰，从而优化该材料载体，以求获得能适合于肝组织工程的细胞载体。

参考文献（References）

[1] JIN H J,KAPLAN David.Mechanism of silk processing in insects and spide [J] .Nature,2003,424(6952):1057- 1061

[2] 秦胜男，陈鸿辉.胶原在软骨组织工程中的应用[J].中国矫形外科杂志, 2009, 13(17):998-1000
Qin Sheng-nan, Chen Hong-hui. The application of collagen in cartilage tissue engineering [J]. Orthopedic Journal of China, 2009, 13 (17):998-1000(In Chinese)

[3] Cirillo B, Morra M, Catapano G. Adhesion and function of rat liver cells adherent to silk fibroin/collagen blend films [J]. Int J Artif Organs, 2004 ,27(1):60-68

[4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版公司,1996：169-179
Si Tu-ZhengQiang, Wu Jun-Zheng. Cell culture[M]. Beijing: WORLD PUBLISHING CORPORATION, 1996：169-179(In Chinese)

[5] Naoya Kobayashi. Life support of artificial liver: development of a bioartificial liver to treat liver failure. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2009;16(2):113-117

[6] 国家医药管理局医用高分子产品质量检测中心. GB/T16886.6-1997, 医疗器械生物学评价——第 6 部分: 植入后局部反应试验[S].北京:中国标准出版社, 1997: 92-98

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

State Pharmaceutical Administration of Quality Inspection Center for Medical Polymers. GB/T16886.6-1997,Biological evaluation——Part 6: Local response test in vivo[S]. Beijing: China Standard Press, 1997: 92-98(In Chinese)

[7] 国家医药管理局医用高分子产品质量检测中心. GB/T16886. 11-1997 医疗器械生物学评价——第 11 部分:全身毒性试验[S].北京:中国标准出版社, 1997: 177-183
State Pharmaceutical Administration of Quality Inspection Center for Medical Polymers. GB/T16886.6-1997, ?Biological evaluation——Part 11: Systemic toxicity test [S]. Beijing: China Standard Press, 1997: 92-98(In Chinese)

[8] Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, et al. Biocompatibility test p rocedures formaterials evaluation in vitro. Ⅰ. Comparative test system sensitivity [J]. J BiomedMater Res, 1983, 17 (4) : 571 - 586

[9] 金鸿莱,黄哲玮,陆华,束蓉.多西环素纳米脂质体缓释凝胶生物相容性及细胞毒性 [J]. 上海交通大学学报(医学版), 2007, 27 (6):649-651
Jin Hong-Lai, Huang Zhe-Wei, Lu Hua, Shu Rong. The biocompatibility of self-prepared doxycycline nano-liposom esustained-release gel and its cytotoxicity [J]. Journal of Shanghai Jiao tong University (Medical Science) , 2007, 27 (6):649-651(In Chinese)

[10] Winkler S,Kaplan DL. Molecular biology of spider silk [J].Rev Mol Biotech,2000,74:85-93

[11] Heslot H. Atificial fibrous proteins: a review. Biochimie,1998,80:19-31

[12] Kadler K E. Fibril forming collagens. In:Sheterline P,editor.Protein profiles:extracell ular matrix,vol1 [M].L London,UK:A cademic Press,1995

[13] 刘雷艮, 顾伟, 左保齐.蚕丝生物材料[J].丝绸,2006, 2:38-41
Liu Lei-Gen, Gu Wei, Zuo Bao-Qi. Silk Biomaterials[J].Silk,2006, 2:38-41(In Chinese)

[14] Van Luyn MJ, Van Wachem PB, Damink LO, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P. Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens [J].J Biomed Mater Res, 1992, 26:1091 110

[15] Lorenz Meinel, et al. Silk implants for the healing of critical size bone defects [J].Bone, 2005, 37: 688 98

[16] Guidoin R, Marceau D, Rao TJ, King M, Merhi Y, Roy PE, et al. In vitro and in vivo characterization of an impervious polyester arterial prosthesis: the gelseal triaxial graft [J].Biomaterials, 1987, 8: 433-41

[17] Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS. Study on gelatin-containing artificial skin: 1. Preparation and characteristics of novel gelatinealginate sponge [J]. Biomaterials, 1999, 20: 409-17

[18] Tabata Y, Hijikata S, Ikada Y. Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels [J].J Control Release, 1994, 31: 189-99

[19] Kang HW, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering [J].Biomaterials, 1999, 20: 1339 44

[20] Bhattarai SR, Bhattarai N, Yi HK, Hwang PH, Cha DI, Kim HY. Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue ngineering [J].Biomaterials 2004; 25: 2595 2602

[21] Jongman Lee, Giyoong Tae, Young Ha Kim, In Su Park, Sang-Heon Kim, Soo Hyun Kim. The effect of gelatin incorporation into electrospun poly (L-lactide-co-3-caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility [J].Biomaterials, 2008, 29: 1872-79

(上接第 1439 页)

[13] Williamson NR, Fineran P, Gristwood T, et al. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines[J]. Future Microbiol, 2006, 2(6): 1-14

[14] Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, et al. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2008, 19(7): 448-458

[15] Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, et al. Chinese red yeast rice versus lovastatin effects on prostate cancer cells with and without androgen receptor overexpression[J]. J Med Food, 2008, 11(4): 657-666

[16] 周林,朱爽,陈木华,等. 焦化废水中 4 株苯酚高效降解菌的分离及鉴定[J]. 生物技术, 2010, 20(2): 44-46
Zhou Lin, Zhu Shuang, Chen Mu-hua, et al. Isolation and Identification of four highly effective phenol-degrading strains from coking wasterwater[J]. Biotechnol, 2010,20(2): 44-46(In Chinese)

[17] 张垸帼,段开红,牛丹丹,等. 提高红曲菌 9903A 原生质体形成数量和再生率的研究[J].食品研究与开发,2006, 27(8): 54-58
Zhang Yuan-guo, Duan Kai-hong, Niu Dan-dan, et al. Study on formation and regeneration of protoplasts from Monascus purpureus 9903A[J]. Food Res Dev, 2006, 27(8): 54-58(In Chinese)

[18] 任柏林,谢水波,唐东山,等. 单亲灭活柠檬酸杆菌与奇球菌原生质体融合的初步研究[J]. 微生物通报,2010, 37(7): 740-746
Ren Bo-lin, Xie Shui-bo, Tang Dong-shan, et al. Protoplast fusion between single inactivated Citrobacter freundii and Deinococcus radiodurans[J]. Microbiol China, 2010, 37(7): 740-746(In Chinese)

[19] Nedukha O, Kordyum E, Bogatina N, et al. The influence of combined magnetic field on the fusion of plant protoplasts [J]. J Gravit Physiol, 2007, 14(1): 117-118

[20] Strömberg A, Karlsson A, Ryttsén F, et al. Microfluidic device for combinatorial fusion of liposomes and cells[J]. Anal Chem, 2001, 73 (1): 126-130

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net