

# Fabrication and Characterization of Silk Fibroin/CaSiO<sub>3</sub> Composite Scaffolds

#### Hai-lin Zhu, Bin-wei Wu, Xin-xing Feng, Jian-yong Chen

(The Key Laboratory of Advanced Textile Materials and Manufacturing Technology, College of Materials and Textiles; Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018)

Email: cjy@zist.edu.cn

Abstract: Silk fibroin/CaSiO<sub>3</sub> composite scaffolds were prepared by solvent casting-particulate leaching method. The as-prepared composite scaffolds showed high porosity and interconnected pores of about 150-300 µm in diameter. XRD analysis suggested that the SF was in Silk II structure. The compressive modulus and compressive strength of composite scaffolds decreased along with the increase of the content of porogen, but the porosity showed opposite trend. XRD, field emission scanning electron microscopy (FESEM) and energy-dispersive spectrometer (EDS) analysis showed that the composite scaffold was completely covered by hydroxycarbonate apatite layers after soaking in SBF for 7 days. All these results indicated that the silk fibroin/CaSiO<sub>3</sub> composite scaffold may be potential candidates as bioactive scaffold for tissue repair and tissue engineering application.

**Keywords:** silk fibroin; CaSiO<sub>3</sub>; composite scaffold; Structure

## 丝素蛋白/硅酸钙复合多孔材料的制备及性能研究

朱海霖,吴斌伟,冯新星,陈建勇\*

(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,材料与纺织学院,杭州 310018) Email: cjy@zist.edu.cn

摘 要:采用溶剂浇注-粒子析出法制备了丝素蛋白/硅酸钙复合多孔材料,该多孔材料孔径尺寸约为 150~300μm,具有较高的孔隙率和较好的孔连通性。X 射线衍射(XRD)分析表明复合多孔材料中丝素的结构主要以 Silk II 为主。研究表明,复合多孔材料的力学强度随致孔剂含量的增加而降低,而孔隙率则相反。应用模拟体液浸泡实验研究了复合多孔材料的体外生物活性,并用 XRD、场发射扫描电镜(FESEM)和能谱分析对试样表面进行了表征,结果显示,复合多孔材料经模拟体液浸泡 7 天后,表面全部被类骨羟基磷灰石(HA)层覆盖。研究结果显示丝素蛋白/硅酸钙复合多孔材料有望作为生物活性较好的组织修复材料。

关键词: 丝素蛋白; 硅酸钙; 复合多孔材料; 结构

### 1 引言

丝素蛋白是蚕丝的主要组成部分,约占总重量的75%,是一种天然的蛋白质。由于丝素蛋白具有良好的生物相容性和优异的物理、化学性质,近年来有关丝素在生物医学领域的开发和应用研究很活跃,如可作为组织工程材料<sup>[1]</sup>、药物控制释放材料<sup>[2]</sup>和人工皮肤<sup>[3]</sup>等。但纯丝素多孔材料力学性能较差,缺乏生物活性,阻碍了其在生物骨组织工程材料方面的研究与应用。

近年来一些研究表明硅酸钙(CaSiO3, CS)粉体或

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)

陶瓷在体外具有很好的生物活性和诱导沉积类骨羟基磷灰石层的能力<sup>[4,5]</sup>。羟基磷灰石层的形成有利于促进材料的骨传导和骨再生,并促进同软/硬组织形成化学键合作用<sup>[6]</sup>。另有报道硅酸钙/聚乳酸<sup>[7]</sup>、硅酸钙/羟基丁酸和羟基戊酸共聚酯 (PHBV) <sup>[8]</sup>等复合材料不仅表现出非常高的生物活性,而且也呈现出较好的机械性能。这表明硅酸钙是一种潜在的、具有广阔应用前景的医用生物活性材料。

本文以丝素蛋白为基质,采用溶剂浇注-粒子析出 法制备丝素蛋白/硅酸钙复合多孔材料,探讨致孔剂的 含量对材料孔结构及力学性能的影响,并研究了样品 的体外生物活性。



## 2 实验部分

#### 2.1 再生丝素蛋白和硅酸钙粉体的制备

家蚕丝在0.5%中性皂溶液中,经过2次脱胶( $98^{\circ}$ C)得到精练丝素。脱胶后的丝素在 $CaCl_2-C_2H_5OH-H_2O$ 混合溶剂中溶解2h并在去离子水中透析3天。将透析后的丝素溶液置于 $-80^{\circ}$ C冰箱冷冻6h并冷冻干燥,即得到再生丝素蛋白(SF)。采用化学沉淀法制备硅酸钙水合物,再在 $800^{\circ}$ C煅烧2h制得硅酸钙(CS)粉体 $^{[7]}$ 。

#### 2.2 SF/CS复合多孔材料的制备

将0.8gSF溶于5ml六氟异丙醇中,再称取0.2gCS 粉体加入SF的六氟异丙醇溶液中,搅拌4h后再超声分散30min使CS均匀分散在SF溶液中,然后向SF/CS混合溶液中分别加入5g,10g和15gNaCl(200±50μm)做致孔剂。将浆料浇注在聚四氟乙烯容器中,室温下干燥24h,使六氟异丙醇完全挥发,再将复合物浸入乙醇进行丝素不溶化处理,然后用水将致孔剂NaCl完全除去。之后将复合材料取出放入真空干燥箱,40°C真空干燥24h,得到复合多孔材料。本文以CS含量为20%时制备的复合多孔材料为研究对象。

#### 2.3 性能及结构表征

依据阿基米德排水法测试多孔材料的孔隙率。采用多功能材料实验机测试试样的抗压强度和抗压模量(Shimadza AG-5kN, Japan)。采用日本JEOL公司的JSM-5610LV电子扫描电镜观察孔的结构。采用ARL-X′TRA型X-射线衍射仪,在CuKa射线(1.54 nm)下进行实验。

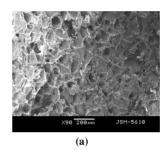
### 2.4 复合多孔材料体外生物活性评价

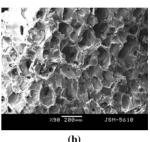
采用模拟体液浸泡法评价复合多孔材料体外诱导羟基磷灰石沉积的能力<sup>[9]</sup>。首先按照Kokub的方法配制模拟体液(Simulated Body Fluid, SBF)<sup>[10]</sup>。将复合多孔材料浸泡在装有30mL模拟体液的聚乙烯塑料瓶中。将塑料瓶放入37°C恒温水浴中静置浸泡1、3、7和14天后将材料取出,用去离子水反复冲洗,60°C真空干燥后待用。采用XRD和Hitachi S-4800场发射扫描电镜(FESEM)测定复合多孔材料在SBF中沉积后的表面结构变化,并采用扫描电子能谱仪(EDS)对断面Ca、Si和P元素分布作能谱线扫描。用等离子体原子发射光谱(ICP-AES,Varian Co., USA)分析浸泡前后SBF中Ca、Si和P的离子浓度。

### 3 结果与讨论

### 3.1 SF/CS 复合多孔材料的 SEM 表征

图1显示了SF/CS复合多孔材料的结构。当致孔剂NaCl与SF/CS复合材料的质量比为5:1时,材料内部能形成大小形状不一的三维孔洞,部分孔道连通;当质量比达到10:1时,孔与孔内部相互贯通,孔隙分布较均匀,孔径尺寸约为150-300μm;当致孔剂与复合材料的质量比达到15:1时,多孔材料仍能保持均匀分布的开孔结构。图2是致孔剂添加量对样品孔隙率的影响。可以看出,SF/CS复合多孔材料的孔隙率随着致孔剂添加量的增加而增大,但当致孔剂与样品的质量





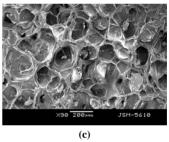


Figure 1. SEM of SF/CS composite porous materials
(a) NaCl:SF/CS=5:1; (b) NaCl:SF/CS=10:1; (c) NaCl:SF/CS=15:1
图 1. SF/CS复合多孔材料的扫描电镜照片

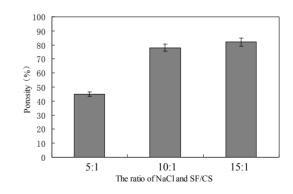


Figure 2. Porosity of the composite porous materials as a function of the content of porogen (n=3)

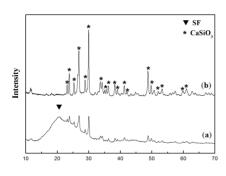
图 2. 复合多孔材料的孔隙率与致孔剂添加量的关系(n=3)



比超过 10:1 后,增幅明显变小。在骨组织工程研究中,多孔支架材料作为种植细胞的载体,为了便于高密度的细胞长入以及血管的形成,通常要求具有高的孔隙率、合适的孔径和较高连通度的孔结构特征。有文献 [11-12]报道,当支架的孔隙率大于 50%和孔径大于150μm 时,细胞可以进入支架空隙与体液进行交换,促进细胞的繁殖和扩散。因此本文制备的 SF/CS 复合多孔材料能满足骨组织工程的需要。

### 3.2 SF/CS复合多孔材料的XRD分析

图 3 是复合多孔材料的 XRD 图谱。由图可知,本文制备的硅酸钙经 800°C 煅烧后得到的是β-CaSiO<sub>3</sub> 物相<sup>[13]</sup>。在复合多孔材料中除了 β-CS 的强衍射峰外,还在 20.6°附近出现了一个宽峰。一般认为丝素的二级结构有三种: 无规线团、Silk I 和 Silk II 结构。其中Silk I 的主要衍射峰为 12.2°和 28.2°左右,而 Silk II 的主要衍射峰为 20.7°和 24.0°左右<sup>[14]</sup>。20.6°附近的宽峰可归属为丝素 Silk II 结构的衍射峰,因此在复合多孔材料中丝素的结构以 Silk II 为主,含部分无规线团。



2θ° Figure 3. The XRD of the SF/CS composite porous materials (a) composite scaffold (NaCl:SF/CS=10:1); (b) pure CS powder. 图 3. SF/CS 复合多孔材料的 XRD 图

(a) 复合多孔材料 (NaCI:SF/CS=10:1); (b) 纯硅酸钙粉体.

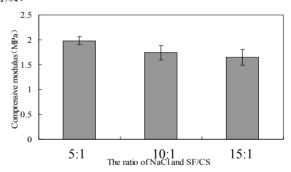
### 3.3 SF/CS复合多孔材料的力学性能测试

图4是致孔剂添加量对样品抗压强度和抗压模量的影响。可以看出,随着NaCl添加量的增加,复合材料的抗压强度和模量明显下降。当NaCl与复合材料的质量比从5:1增加到10:1时,抗压模量从1.98MPa下降到1.74MPa,抗压强度从0.31MPa下降到0.20MPa。而当NaCl与复合材料的质量比超过10:1之后,下降幅度较小。这可能是与复合材料的孔隙率有关。根据Ryskewitch方程<sup>[15]</sup>:  $\sigma$ = $\sigma$ <sub>0</sub>exp(-cp),式中 $\sigma$ 为多孔材料的强度, $\sigma$ <sub>0</sub>为致密材料的强度, $\sigma$ <sub>0</sub>为对密材料的强度, $\sigma$ <sub>0</sub>为对密材料的强度, $\sigma$ <sub>0</sub>为对不

c为常数。由方程可知多孔材料的力学性能主要受孔隙率的影响,随着孔隙率的提高,力学强度显著降低。 因此在本实验中,多孔材料的孔隙率随致孔剂添加量的增加而增大,从而导致多孔材料的力学强度相应降低。

### 3.4 SF/CS复合多孔材料体外生物活性的研究

在SBF中材料表面类骨羟基磷灰石(HA)的结晶结构和沉积速度可以作为评价生物材料体外活性的一个重要方法<sup>[16]</sup>。图5为试样在SBF中浸泡1、3、7和14天后的XRD图谱。由图可见,样品经SBF浸泡3天后,对应的(002)和(211)晶面的25.9°和31.8°(20)处的HA的主峰开始出现,随着浸泡时间的延长,HA的衍射峰强度逐渐增强。浸泡7天后,CS的衍射峰几乎消失,只有HA的衍射峰存在,说明沉积的HA层较厚,也说明该复合材料具有很强的生物活性。图6是样品在SBF中浸泡前和浸泡7天后的FESEM照片。从图中可以发现复合多孔材料在SBF中浸泡7天后即可在样品表面形成一层致密的沉积层,同时在致密沉积层的上方又有新的球状团聚颗粒层生成。高倍显微结构图(图6c)显示形成的HA沉积层是由约400nm的花瓣状晶体构成。



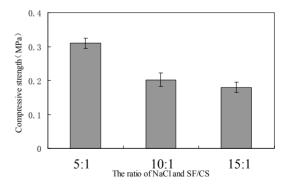


Figure 4. Effect of the content of porogen on the compressive modulus and compressive strength of SF/CS composite porous materials (n=3).

图 4. 致孔剂用量对复合多孔材料的抗压模量和抗压强度的影响 (n=3)



图7是SF/CS复合多孔材料在SBF中浸泡0、1、3、7和14天后的溶液中的Ca(II)、P(V)和Si(IV)离子的浓度和pH值。随着浸泡时间的延长,P(V)的浓度急剧降低;相反Ca(II)和Si(IV)离子的浓度随着浸泡时间的延长而增大。这是由于CS在SBF中的溶解导致Ca(II)、Si(IV)离子浓度的增加,而类骨羟基磷灰石沉积层的形成则导致磷酸根浓度的降低。尽管沉积羟基磷灰石需要消耗Ca(II)离子,但是从复合多孔材料上溶解释放的Ca(II)离子浓度大于沉积羟基磷灰石所消耗的Ca(II)离子浓度,所以SBF中的Ca(II)离子浓度呈现增加的趋势。SF/CS复合多孔材料在SBF中沉积类骨羟基磷灰石的机理同生物玻璃表面沉积羟基磷灰石的机

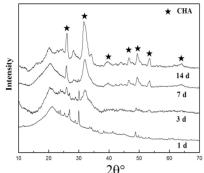


Figure 5. Thin film-XRD of the SF/CS composite porous materials after soaking in SBF

#### 图5. SF/CS复合多孔材料在SBF中浸泡后的XRD图谱

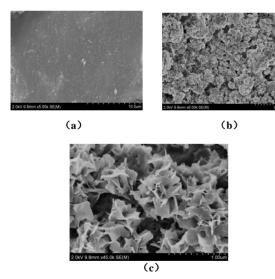


Figure 6. FESEM images of the surface of the SF/CS composite porous materials before and after soaking in SBF for 7 days (a) before soaking in SBF×5000; (b) after soaking in SBF for 7 days ×6000; (c) after soaking in SBF for 7 days ×45000.

图 6.SF/CS复合多孔材料在SBF中浸泡前和浸泡7天后孔壁表面的 FESEM

(a)浸泡前×5000; (b) 浸泡7天×6000; (c) 浸泡7天×45000

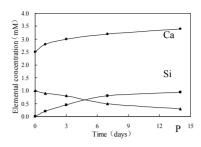


Figure 7. Changes of Ca, Si and P concentrations of the SBF solution after soaking the materials for various periods.

#### 图 7.浸泡复合多孔材料后SBF中Ca、Si和P离子浓度的变化

理相似<sup>[17]</sup>。CS在SBF中溶解后使得复合材料表面形成富硅层,而富硅层的形成为羟基磷灰石提供了有利的成核质点,并进一步吸收周围SBF中的Ca<sup>2+</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和OH<sup>-</sup>离子形成类骨羟基磷灰石层。

## 4 结论

- 1)采用溶剂浇注-粒子析出法制备了丝素蛋白/硅酸钙复合多孔材料,该材料的孔径尺寸约为150~300μm,孔隙率随致孔剂NaCl的添加量的增加而增大,而力学性能则相反。复合多孔材料中丝素的结构主要以β-折叠为主。
- 2) 模拟体液浸泡实验表明,复合多孔材料在 SBF 中浸泡 3 天后,能诱导类骨 CHA 在其表面沉积,当浸泡时间达到 7 天,表面全部被类骨羟基磷灰石层覆盖。
- 3)研究结果显示在丝素蛋白中引入无机硅酸钙可以制备出具有良好力学性能和生物活性的复合多孔材料,有望用于骨组织修复材料。

## References (参考文献)

- Wang Y.Z., Blasioli D. J., Kim H. J., et al. Biomaterials 2006, 27: 4434-4442.
- [2] Wang X. Q., Wenk E., Hu X., et al. Biomaterials 2007, 28: 4161–4169.
- [3] Li M. Z., Wu Z. Y., Zhang C. S. J. Appl. Polym. Sci. 2001, 79: 2185-2199
- [4] Siriphannon P., Kameshima Y., et al. J. Biomed. Mater. Res. 2000, 52: 30-39
- [5] Siriphannon P., Hayashi S., Yasumori A., et al. J. Mater. Res. 1999, 14: 529-536.
- [6] Zhong J. P., Hench L. L. J. Inorg. Mater. 1995, 10(2): 129-138.
- [7] Li H. Y., Chang J. Biomaterials 2004, 25: 5473-5480.
- [8] Li H. Y., Chang J. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2004, 15:1089-1095.
- [9] Lu H. H., Pollack S. R., J. Biomed. Mater. Res. 2000, 51: 80-87.
- [10] Kokubo T. J. Non-Cryst. Solids 1990, 120: 138-157.
- [11] Kong L. J., Gao Y., et al., J. Biomed. Mater. Res. A 2005, 75: 275-286.
- [12] Daculsi G., Passuti N. Biomaterials 1990, 11: 86-87.
- [13] Liu X. Y., Ding C. X., Wang Z. Y. Biomaterials 2001, 22: 2007-2016.
- [14] Miniura N., Aiba S., et al.. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 208: 511-523.
- [15] Rice R. W. J. Mater. Sci. 1993, 28: 2187-2190.
- [16] Koutsopoulos S. J. Biomed. Mater. Res. 2002, 62: 600-612.
- [17] Hench L. L. J. Am. Ceram. Soc. 1991, 74: 1487-1510.