·研究论文·

脱细胞肝基质复合丝素蛋白水凝胶支架的制备及表征

雷敏 张苗 尹诗韵 孙中涛 刘心雨 付开秀 牛晓 陈国宝*

(重庆理工大学药学与生物工程学院，重庆 400054)

摘要：近年来，脱细胞基质在组织工程中展现出巨大应用潜力，但如何改善其力学性能仍然是一个问题。为了探究引入丝素蛋白(silk fibroin, SF)改善脱细胞肝基质(decellularized liver matrix, DLM)力学性能的复合水凝胶支架用于肝组织工程的潜能，对大鼠肝脏进行脱细胞处理后，与SF溶液按等浓度不同体积比例混合交联，制成4组SF/DLM复合支架，SF与DLM溶液的比例分别为100:0、75:25、50:50、25:75，并对支架的形态结构、体外降解性、亲水性、力学性能和细胞相容性等进行了表征。研究结果表明SF能够改善复合支架的力学性能，SF比例的增加使支架的孔隙率和抗压强度提高，支架的降解性能和亲水性能得到提升，结合DLM的促细胞生成功能，该复合支架有望应用于肝修复组织工程。

关键词：支架材料；脱细胞基质；丝素蛋白；肝组织工程

Preparation and Characterization of Decellularized Liver Matrix Composite Silk Fibroin Hydrogel Scaffold

LEI Min, ZHANG Miao, YIN Shi-yun, SUN Zhong-tao, LIU Xin-yu, FU Kai-xiu, NIU Xiao, CHEN Guo-bao*

(*School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China*)

Abstract: In recent years, decellularized matrix has shown great potential in tissue engineering, but how to improve its mechanical properties is still a problem. In order to explore the potential of using a composite hydrogel scaffold with silk fibroin (SF) to improve the mechanical properties of decellularized liver matrix (DLM) for liver tissue engineering, four groups of SF/DLM composite scaffolds were prepared by cross-linking the rat liver with SF solution at the same concentration and different volume proportions. The proportions of SF to DLM solution were 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, respectively. The morphological structure, *in vitro* degradability, hydrophilicity, mechanical properties and cell compatibility of the scaffolds were characterized. The results showed that SF could improve the mechanical properties of the composite scaffold, the porosity, pressure resistance, degradability and hydrophilicity of the scaffold were all improved. Combined with the cell promoting function of DLM, the composite scaffold is expected to be applied in liver repair tissue engineering.

Keywords: Scaffold material; Decellularized matrix; Silk fibroin; Liver tissue engineering

引用：雷敏，张苗，尹诗韵，孙中涛，刘心雨，付开秀，牛晓，陈国宝. 脱细胞肝基质复合丝素蛋白水凝胶支架的制备及表征. 高分子通报, **2024**, 37(12), 1791–1800

Citation: Lei, M.; Zhang, M.; Yin, S. Y.; Sun, Z. T.; Liu X. Y.; Fu, K. X.; Niu, X.; Chen, G. B. Preparation and characterization of decellularized liver matrix composite silk fibroin hydrogel scaffold. *Polym. Bull.* (in Chinese), **2024**, 37(12), 1791–1800

2024-06-15 收稿，2024-08-17 录用，2024-09-12 网络出版

基金项目：重庆市教委科学技术研究项目(项目号 KJQN202301136)，大学生创新创业训练计划项目(重庆市级)

* 通信联系人：陈国宝，E-mail: gbchen@cqut.edu.cn

doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2024.24.179

肝脏是人体内脏最大的器官，也是人体消化系统最大的消化腺，有着营养代谢、合成各种凝血因子、解毒、分泌胆汁等重要功能。相关研究表明，肝病每年造成200万人死亡，占所有死亡人数的4%[1]。其死亡主要原因之一是肝硬化，世界范围内肝硬化最常见的原因与病毒性肝炎、酒精性和非酒精性脂肪性肝病有关，且伴有多种并发症，死亡率高。当肝硬化发展到晚期时，目前最好的治疗方法仅限于肝移植。但器官移植存在免疫排斥以及疾病传播的问题，而随着对脱细胞基质的研究越来越多，从组织工程上修复肝脏组织甚至诱导再生完整的肝脏器官用于肝移植指日可待[2~5]。

脱细胞基质具有低免疫原性、仿生内环境、类组织器官的理化性质和功能化潜力，在组织工程中得到了广泛的应用[6~8]。相关研究[9~11]表明，脱细胞基质可用于修复受损组织和细胞再生。但由于脱细胞基质的力学性能较差，降解速率过快，单独使用不易成型，限制了其在组织工程中的应用[12,13]。因此，通过将脱细胞基质与其他材料结合可能有助于增强脱细胞基质的物理性能，保留其生物学功能，从而提高其修复效果[14,15]。例如，脱细胞肝基质(DLM)和凝血酶负载的脱酰基甲壳素氧化纤维素纳米纤维(plant-derived oxidized cellulose nanofiber, TOCN)和壳聚糖(chitosan, CS)复合材料CN/CS/EM-Th对大鼠受损肝组织具有快速止血以及促进肝伤口再生效果[14]。这可能是DLM与其他材料的协同作用，使得复合支架更有利于肝脏修复。

丝素蛋白(silk fibroin, SF)作为一种独特的天然蛋白具有优异的力学性能、生物相容性以及抗菌性能，已被美国食品和药物管理局批准用于临床。研究发现，纯SF支架虽然力学性能好，但促细胞生成能力较弱，复合天然组织脱细胞基质的SF支架，不仅能改善脱细胞基质的力学性能，有利于细胞的粘附，还能提供促进细胞生长的有效成分。最新的研究证明，SF的添加能够提高支架的力学性能，而DLM能为细胞提供营养成分。与未掺入DLM微状颗粒的SF支架相比，DLM/SF复合支架上细胞的粘附性更强，增殖活性更大[16]。SF明胶脱细胞肝基质(silk gelatine decellularized liver matrix, SG-DLM)支架能促进肝细胞增殖并使肝细胞标志物表达上调，为提高肝细胞的分化和功能提供有利的微环境[17]。因此，将SF与脱细胞基质结合，不管是从生物功能上还是力学性能上，都可以达到更好的组织修复效果。

本研究将DLM与SF按不同体积比例混合交联形成SF/DLM凝胶支架，并对支架的降解性能、亲水性能、力学性能和细胞相容性等特征进行了初步表征及评价，为以后利用天然组织来源脱细胞基质进行肝组织修复提供一种可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 细胞

本实验采用的为大鼠肝星状细胞(HSC-T6)，购自武汉普诺赛生命科技有限公司，该细胞为4~6代细胞。

1.1.2 动物

雌性Sprague-Dawley (SD)大鼠(200±20) g购于中国重庆莱皮特生物科技有限公司(许可证号为：SCXK (湘)2019-0004)。本实验所有动物程序均严格按照重庆医科大学动物保护委员会批准的程序进行。

1.1.3 主要试剂

中等级蚕茧购自重庆市纤维检验所。杜尔贝科改良培养基(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、胎牛血清、青霉素、链霉素、胰蛋白酶均购自美国Gibco公司。4%多聚甲醛组织固定液购自美国Biosharp生物科技有限公司。胃蛋白酶、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、Masson染色试剂盒荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)均购自北京索莱宝生物技术有限公司。水合氯醛、离心柱基因组DNA小体积提取试剂盒、苏木素-伊红(hematoxylin Eosin, HE)染色试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司等。

1.1.4 主要仪器

真空冷冻干燥机(FD-1B-50，比朗仪器制造公司，中国)、微机控制生物力学试验机(DNS20型，长春机械科学研究院，中国)、傅里叶变换红外光谱仪(Perkin Elmer公司，美国)、倒置生物显微镜(IX71，Olympus公司，日本)等。

1.2 方法

1.2.1 肝脏的脱细胞处理

选取健康大鼠，使用7%的水合氯醛对其进行

过量麻醉处死，取出肝脏。将肝脏切成0.5 cm^3左右的小块，放入PBS中，在–80 ℃下冷冻6 h以上，后置于37 ℃水浴锅中解冻30 min，为一次冻融循环，共进行3次。冻融完成后，将组织置于0.5%氨水+1%的TritonX-100中，慢速搅拌处理48 h，直至组织变成白色。将脱细胞后的组织置于100 U/mL的DNase溶液中，在温度为37 ℃，摇速为120 rmp的摇床中反应6 h，以除去多余的DNA。最后用PBS彻底冲洗24 h，直至液体中没有泡沫。

1.2.2　肝脏的脱细胞表征

(1) H-E染色和Masson染色

将脱细胞前后的肝脏组织在4 wt%多聚甲醛中固定48 h。将样本在分级乙醇中脱水，并用新鲜二甲苯透明化。将已经透明完成的待测组织包埋在石蜡中并切片，再将载玻片放置于60 ℃电热鼓风干燥箱中烘烤。将烤好的切片放入二甲苯中脱蜡再水化。使用H-E和Masson试剂盒对组织切片进行染色，然后脱水、透明化并封片。在显微镜下对组织切片进行观察并拍照。

(2) DNA含量检测

使用离心柱基因组DNA小体积提取试剂盒对脱细胞前后的肝组织进行DNA定量。根据制造商的说明手册，在脱细胞化前后，对所取肝组织称重10 mg (n=3)，提取总DNA含量。使用紫外分光光度计在260 nm处测量DNA浓度，并归一化至初始组织干重。

1.2.3　DLM溶液的制备

脱细胞流程完成后，将组织置于PBS中，然后冻干，得到脱细胞肝基质粉。使用0.5 mol/L的稀醋酸溶液配置10 mg/mL的胃蛋白酶溶液，调整溶液pH至1.5~2。然后加入剪碎后的脱细胞肝基质，使用磁力搅拌器搅拌48~72 h至完全溶解。溶解后以1000 r/min离心5 min去除掉多余杂质，得到10 mg/mL的DLM溶液，放入4 ℃冰箱中储存待用。

1.2.4　SF溶液的制备

选取干净的中等级蚕茧，然后将蚕茧剪开，去除中间蚕蛹，再剪碎、洗净和烘干。称取完全烘干后的蚕茧，按照1 g:25 mL的比例加入0.4 wt%的Na_2CO_3溶液，100 ℃沸煮2.5 h，然后再捞出、冲洗、拧干，再将SF样品完全烘干。配制$CaCl_2$/C_2H_5OH/H_2O的混合盐液，将脱完胶的蚕茧溶于该溶液，在80 ℃下水浴加热30~60 min，至SF全部溶解。取出SF溶液，冷却至室温后，再离心、抽滤，得到无沉淀、澄清的SF溶液。用去离子水将SF溶液透析3天。透析完成后，离心取上清液。最后使用旋转蒸发仪浓缩SF溶液，得到高浓度的SF溶液，将SF溶液稀释至10%。

1.2.5　SF/DLM凝胶支架的制备

将SF与DLM溶液分别以100:0、75:25、50:50、25:75四个比例(等浓度不同体积)混合搅拌1 h，然后调节溶液pH至7左右后，快速倒入孔板，放置于37 ℃环境下孵育1 h。溶液自热凝胶后，放入–20 ℃冰箱中2 h，再放–80 ℃冰箱中8 h，然后冻干2天，通过EDC/NHS反应实现SF/DLM支架的交联。交联完成后，使用PBS清洗支架，然后冻干，得到支架。

1.2.6　傅里叶红外光谱检测

将SF、DLM、SF/DLM凝胶支架交联前后的材料经过冷冻干燥后，研磨成粉末状，另外将EDC、NHS与上述材料一起放置于六孔板，在4 ℃冰箱保存待用。打开傅里叶红外光谱分析仪相关软件，设置相关参数，如扫描速度32次/分钟、分辨率为4 cm^{-1}、扫描范围为4000~500 cm^{-1}等。在设定好扫描参数后，保持样品仓内无样品，扫描背景。再依次添加待测样品粉末于检测样品仓处，开始扫描后，调整压力至50 N左右，测试波长4000~500 cm^{-1}，等待扫描完成。将Excel格式数据保存，关闭软件及机器，运用数据处理软件对得到的数据进行处理分析。

1.2.7　孔隙率测定

采用液体置换法测量支架的孔隙率，这是一种常用于表征支架孔隙率的方法[18~20]。选取冻干后不同比例的SF/DLM凝胶支架每组3个，放置于分别盛有相同V_0体积的乙醇中浸泡5 min。5 min后，测定各组单个样品乙醇和支架材料的总的体积，记录为V_1；将支架取出，测定此时乙醇体积为V_2。样品孔隙率P如下式所示：

$$P=\frac{V_0-V_2}{V_1-V_2}\times 100\% \quad (1)$$

式中：P (%)为样品孔隙率；V_0为已知的乙醇体积；V_1为样品浸入乙醇后的总体积；V_2为取出支架后剩余的乙醇体积。为减少误差，每组结果取算术平均值。

1.2.8　扫描电子显微镜(scanning electron microscopy, SEM)观察

将冷冻干燥后的SF/DLM支架材料用液氮脆

断后进行喷金处理，在真空条件下使用SEM进行不同倍数的观察，主要观察经冻干处理后，支架材料内部不同区域的形貌、孔径大小及孔隙分布。

1.2.9 力学性能测定

取不同比例的SF/DLM凝胶支架每组3个，确保每一个支架已充分吸满PBS溶液，用直尺精确测量并记录样品直径。打开力传感器相关软件Test Expert，设置测试方法为：压缩、棒材、压缩弹性模量及抗压强度；设置复查曲线：Y为压力(kPa)，X为压缩率(%)，设置试验速率为5 mm/min，并在压缩率为60%的条件下终止压缩。将待测样品置于测试台上，调节控制器匀速下降，当其刚好接触待测样品时停止下降，使用直尺测定样品标距。将所测样品的直径、标距输入软件，即可开始测定，并将输出量保存。

1.2.10 体外降解实验

取冻干后不同比例的SF/DLM凝胶支架每组3个，确保每一个支架已充分吸满PBS溶液，称量每组初始质量M_0。将支架材料分别放置于盛有PBS溶液的干净离心管中(注意PBS溶液需浸没支架材料，可过量)。将离心管放置于设定参数为37 ℃，50 r/min的摇床中振荡。每隔24 h将支架材料取出，用滤纸吸取多余水分，使用电子天平精密称重记录质量为M_t，其中，t为检测的时间天数。使用此方法可得到材料在设定时间内的质量变化率。样品剩余率(%)如下式所示：

$$\text{Residual rate}\ (\%)=\frac{M_t}{M_0} \tag{2}$$

式中，Residual rate (%)为样品剩余率；M_0为样品的初始质量；M_t为样品降解后每天的质量。为减少误差，每组结果取算术平均值。

1.2.11 亲水性能测试

选取冻干后不同比例的SF/DLM凝胶支架每组3个，精准称取各样品初始重量记为M_0；再使用PBS缓冲液浸泡各组样品，待其充分吸水3 min后取出；取出后用滤纸将表面多余的水分除去，再使用电子天平精密称重，质量记为M_1。样品吸水率W_s如下式所示：

$$W_s=\frac{M_1-M_0}{M_0} \tag{3}$$

式中，W_s (g/g)为样品吸水率；M_1为样品吸水3 min后的质量。为减少误差，每组结果取算术平均值。

选取冻干后不同比例的SF/DLM凝胶支架每组3个，精准称取各样品初始重量记为M_0，再浸泡于PBS缓冲液中3 min使其充分吸水，捞出，使用滤纸吸除表面多余水分，再使用高速台式冷冻离心机以500 r/min离心3 min，使用电子天平精密称重，质量记为M_2。样品保水率W_R如下式所示：

$$W_R=\frac{M_2-M_0}{M_0} \tag{4}$$

式中，W_R (g/g)为样品保水率；M_2为样品充分吸水、高速离心后的质量。为减少误差，每组结果取算术平均值。

选取冻干后不同比例的SF/DLM凝胶支架每组3个，使用电子天平精密称重，质量记为M_0；将样品浸泡于PBS溶液中，并在第2、4、6、8、10、20、30和60 min的时间点取出，用滤纸吸除表面多余水分，再使用电子天平精密称重，质量记为M_t，其中，t为每个取出时间点。样品溶胀率S如下式所示：

$$S=\frac{M_t-M_0}{M_0} \tag{5}$$

式中，S (g/g)为样品溶胀率。为减少误差，每组结果取算术平均值。

1.2.12 细胞活力

通过Live/Dead染色来评估凝胶表面的细胞活力。在冻干的支架中加入浓度为1×10^7个细胞/mL的50 μL细胞悬液。孵育2 h，直到细胞粘附，然后加入完全的培养基。在不同时间点(1、3和7天)用FDA和PI染色。在荧光显微镜下对细胞进行观察并拍照。

1.2.13 统计学方法

每组实验至少进行3次，结果以平均±标准差表示。两组的比较采用ANOVA进行分析。$^*P<0.05$表示有显著性差异，$^{**}P<0.01$表示有非常显著性差异，$^{***}P<0.001$表示有极其显著性差异，ns表示无显著性差异。所有计算使用Origin 2018软件和Graphpad Prism 9进行。

2 结果与讨论

为了进一步探究该支架的具体性能，对新鲜及脱细胞的肝组织进行了H-E染色、DNA含量检测，并对各组支架进行形貌及结构观察、傅里叶

红外光谱分析、力学性能测试、降解能力测定。

2.1　肝脏的脱细胞效果表征结果

对肝脏组织进行循环冻融、化学试剂脱细胞处理，结果如图1(a)右边部分所示，呈透明白色状态。脱细胞前后的肝基质的组织形态学结果如图1(b)所示，可以看出，新鲜大鼠肝脏组织经H-E染色液染色后，在显微镜下可以观察到明显的蓝紫色颗粒及大片粉红色，说明新鲜的肝脏组织样本存在细胞核及细胞质。脱细胞过后的肝脏组织样本经过染色液染色后没有发现明显的蓝紫色颗粒，只有粉红色的细胞质，说明脱细胞后的肝脏组织样本已没有细胞核存在。H-E染色结果表明脱细胞成功，肝脏组织样本的细胞核被去除，且保留了完整的细胞质基质。通过Masson染色可以看出，未进行脱细胞处理的肝组织含有大量被染色呈红色的肌纤维；而脱细胞处理的肝脏组织只存在被染色呈蓝色的板块状排布的胶原纤维。以上染色结果表明成功进行脱细胞处理，并保留了细胞外基质和胶原的成分。

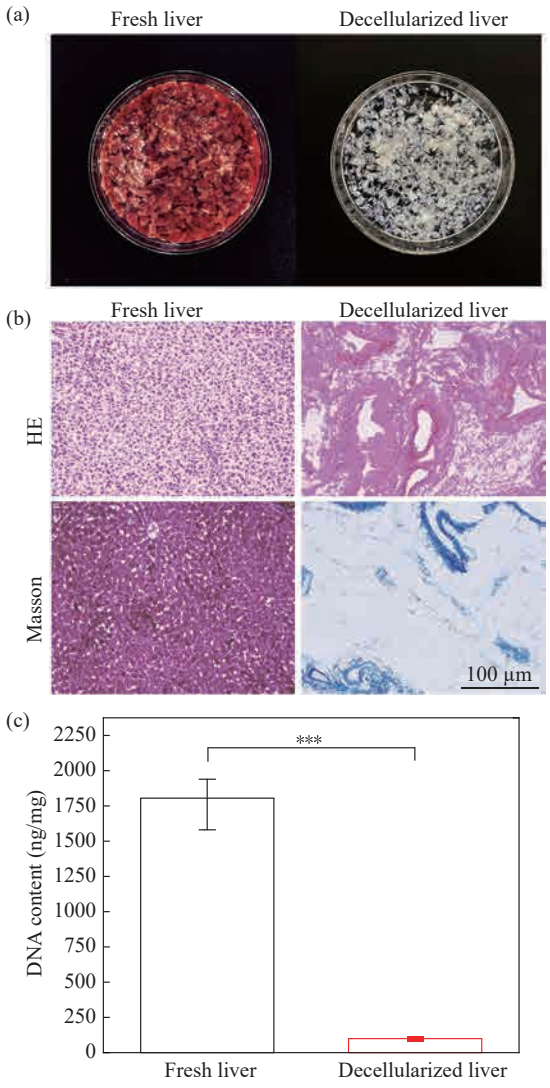

图 1　脱细胞前后肝脏的表征。(a) 脱细胞前后肝脏组织的大体观测；(b) 脱细胞前后肝脏组织的 H-E 染色和 Masson 染色结果；(c) 肝脏脱细胞前后的 DNA 含量统计结果 (n=3, $^{*}P$<0.05, $^{***}P$<0.001)

Figure 1　Characterization of the liver before and after decellularization. (a) Gross observation of liver tissues before and after decellularization; (b) Morphological observation of liver tissues before and after decellularization; (c) Statistics of DNA content in liver before and after decellularization (n=3, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01, $^{***}P$<0.001)

使用基因组DNA小量抽提试剂盒(离心柱式)可对脱细胞前后的肝脏组织的DNA含量进行定量的检测，以判断脱细胞是否成功，得到肝脏组织脱细胞前后DNA的测试结果，如图1(c)所示。脱细胞前肝脏组织的DNA含量为1802.67±188.41 ng/mg，脱细胞后肝脏组织的DNA含量为100.00±12.49 ng/mg，可以看出，新鲜的肝脏组织所含的DNA明显高于脱细胞后组织的DNA。脱细胞前后的肝脏组织之间的显著性差异P值为0.0001，有极其显著的统计学差异(P<0.001)，定量结果证明肝脏脱细胞成功。

2.2　SF/DLM支架的形态学观察

将冷冻干燥后的凝胶支架从孔板中取出，进行观察和测量。如图2(a)所示，各组别样品的外观颜色无明显差异，均为乳白色。不同比例的SF/DLM凝胶支架均为成型较好的表面非光滑的圆柱体，直径为14.00±0.50 mm。由图2(b)的SEM图可看出，各组支架内部均为多孔且相互贯通的结构，表面有一定的粗糙度，说明该支架用于细胞培养时有利于细胞的长入、营养物质的传输和废物的代谢。随着SF比例的增大，支架的孔隙率越大，孔径越小[18,21]。使用液体置换法对各个实验组进行孔隙率测定。结果如图2(c)所示，100:0、75:25、50:50、25:75组的孔隙率分别为(70.71±12.02)%、(69.45±4.81)%、(61.67±12.58)%、(57.41±8.49)%。50:50组和25:75组的孔隙率比100:0组和75:25组略小。

2.3　傅里叶红外光谱测定结果

使用傅里叶红外光谱仪对SF、DLM和不同比例的SF/DLM (25:75，50:50，75:25，100:0)支架材料进行了测定，得到如图3所示的结果。SF的红外光

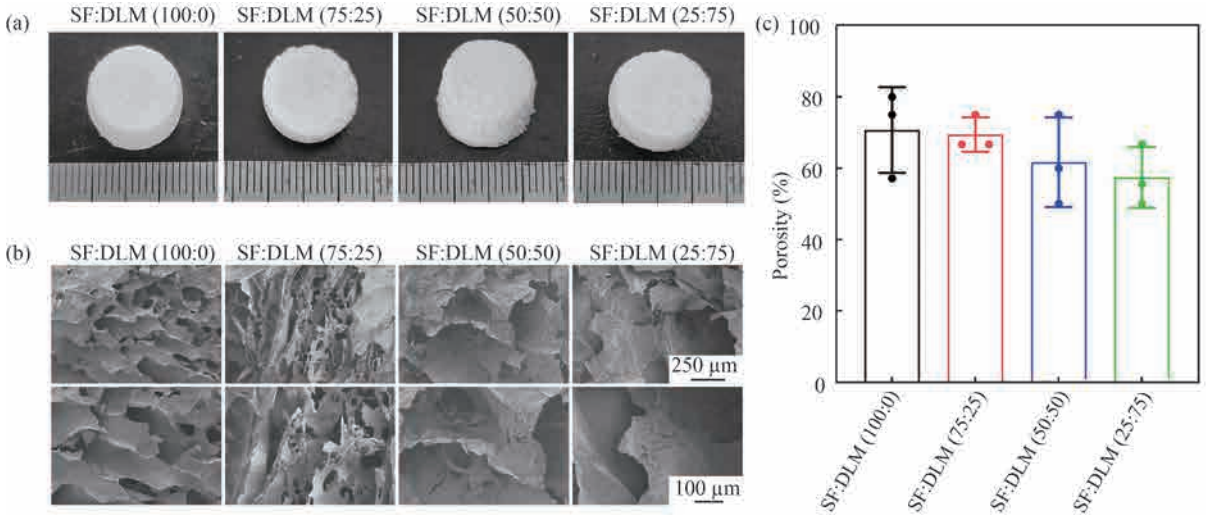

图 2 SF/DLM 支架的表面结构与孔隙率结果：(a)不同比例的 SF/DLM 支架的大体观察图；(b)不同比例的 SF/DLM 支架的 SEM 图；(c)不同比例的 SF/DLM 支架的孔隙率统计结果图

Figure 2 Morphological observation of SF/DLM scaffolds. (a) Gross observation of SF/DLM scaffolds with different scales; (b) SEM images of the scaffolds; (c) Porosity statistics of the scaffolds

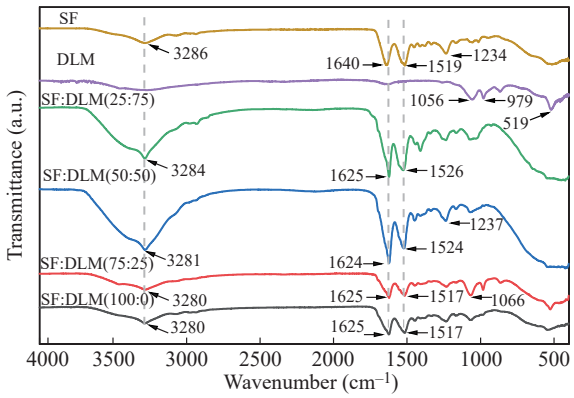

图 3 SF、DLM 和不同比例的 SF/DLM 支架的红外光谱分析图

Figure 3 Infrared spectral analysis of SF, DLM and different ratios of SF/DLM

谱分析为：υ_{N-H}= 3286 cm^{-1} (宽峰)，$\upsilon_{C=O}$= 1640 cm^{-1} (尖峰)，与 δ_{N-H}= 1519 cm^{-1} 共振形成峰，共轭效应导致 $\upsilon_{C=O}$ 波数明显小于正常值。δ_{N-H}= 1234 cm^{-1} 与 δ_{C-H}= 1234 cm^{-1} 共振成峰。DLM 的红外光谱分析为：υ_{C-O}= 1056 cm^{-1} (尖峰)，但羰基峰强度很低，几乎不出峰。SF/DLM 的红外光谱分析为：υ_{N-H}= 3284 cm^{-1}；$\upsilon_{C=O}$= 1625 cm^{-1} (尖峰)；υ_{C-N}= 1526 cm^{-1} (尖峰)；δ_{N-H}= 1237 cm^{-1} (尖峰)。SF/DLM 复合支架的红外光谱显示，C＝O 伸缩振动(酰胺 I 带)和 N－H 弯曲振动(酰胺 II 带)发生了位移，并且强度也有所增加，特别是 SF:DLM(50:50) 组强度最大，这种变化是由于 SF 中的羧基和 DLM 中的氨基反应形成肽键，导致 C＝O 和 N－H 吸收峰位置和强度的变化，在 1524 cm^{-1} 附近的峰是由 C－N 拉伸振动引起的。红外谱图的结果表明，SF 和 DLM 交联形成肽键。

2.4 支架的降解性能评价结果

使用 PBS 缓冲液模拟人体环境，对四组支架材料进行 10 天降解试验，支架材料的剩余率折线图如图 4 所示。可以看出，支架材料的剩余率随着时间增加逐渐降低，降解速率随时间增加呈减小趋势，且在第 4 天后，支架的总体降解速率逐渐趋向平缓。同时，我们观察到 100:0 组最后剩余率远高于另外三组，剩余产物最多，可知，100:0 组

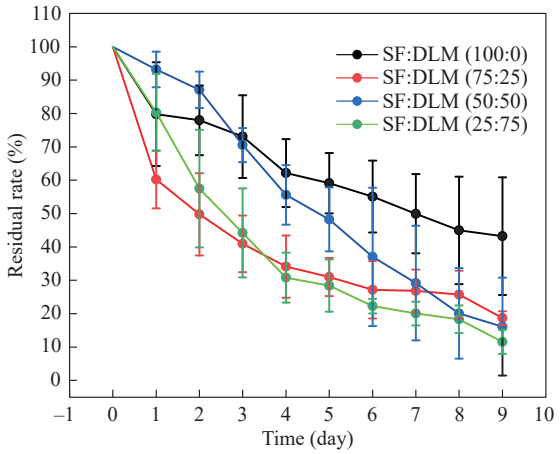

图 4 四组 SF/DLM 支架的剩余率折线图

Figure 4 Residual rate fold plots for four groups of SF/DLM scaffolds

的降解能力最弱；25:75组剩余率的总体下降速度相对于另外三组明显更快，说明25:75组的降解能力越强；75:25组和50:50组最后的剩余率十分接近，但在7天前，75:25组的剩余率下降速度明显快于50:50组的剩余率，这是由于SF/DLM支架中所含SF易溶于水，75:25组和50:50组总体降解能力比较相似。通过模拟人体环境对材料进行降解实验，可以看出，四组材料均能很好地进行降解，且降解速率总体较平缓，说明四组支架作为体内修复材料，均具有一定的稳定性。

2.5　支架的吸水性能评价结果

使用PBS缓冲液模拟人体环境，得到支架材料的亲水性能如图5所示。从图5(a)可以看出，100:0、75:25、50:50、25:75组的吸水率分别为(11.60±3.74)、(10.78±0.85)、(6.47±0.27)、(5.03±0.41) g/g。100:0组与50:50组(P=0.047)、100:0组与25:75组(P=0.014)、75:25组与25:75组(P=0.027)之间吸水率差异有显著统计学意义(P<0.050)；100:0组与75:25组(P=0.953)、75:25组与50:50组(P=0.097)、50:50组与25:75组(P=0.798)之间吸水率差异无统计学意义(P>0.050)。如图5(b)结果显示，100:0、75:25、50:50、25:75组的保水率分别为(8.22±0.46)、(7.94±0.51)、(6.09±1.275)、(5.17±0.21) g/g。100:0组与50:50组(P=0.030)之间保水率差异有显著统计学意义(P<0.050)；100:0组与25:75组(P=0.004)、75:25组与25:75组(P=0.006)之间保水率差异有显著统计学意义(P<0.010)；100:0组与75:25组(P=0.963)、75:25组与50:50组(P=0.058)、50:50组与25:75组(P=0.412)之间保水率差异无统计学意义(P>0.050)。支架材料的溶胀率如图5(c)所示。从整体来看，每组都在溶胀前2 min内溶胀率增加速率最大；在溶胀2 min后，材料溶胀率逐渐减慢，由于SF在具有极强吸水性的同时也极易溶于水中，各组溶胀的速度开始出现不规律性。从100:0组到75:25组到50:50组再到25:75组，溶胀率随时间增加越来越稳定，在最终60 min的时间点时，75:25组溶胀率((6.98±2.63) g/g)明显比100:0 ((4.58±0.89) g/g)、50:50 ((3.33±0.76) g/g)、25:75 ((3.76±0.45) g/g)组的溶胀率大。

2.6　支架的力学性能检测结果

将各组支架进行力学压缩，测得其应变和应力之间的关系。测量样品的直径与标距，计算每

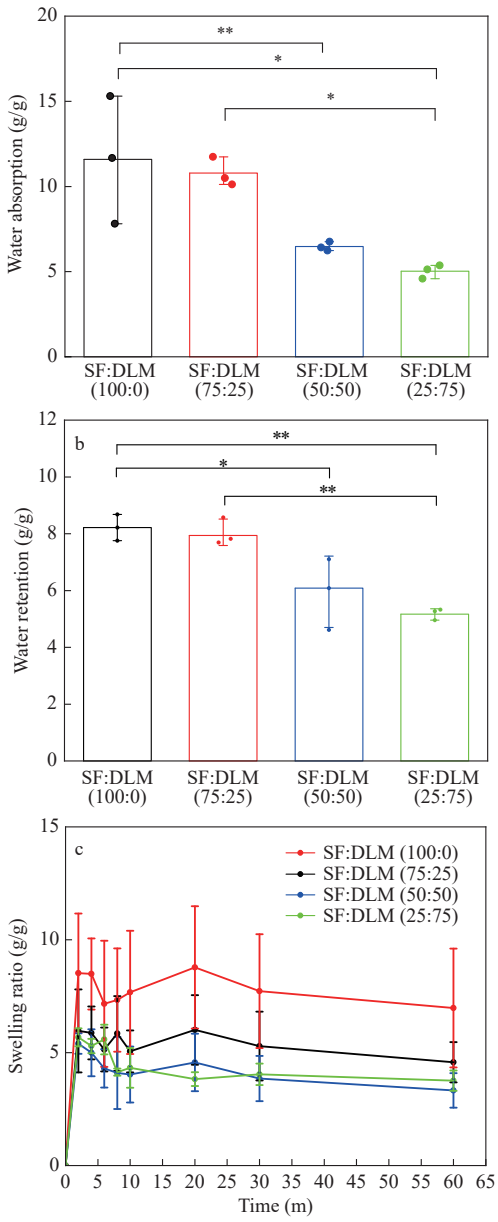

图5　四组SF/DLM支架的亲水性能检测结果：(a)吸水率；(b)保水率；(c)溶胀率 (n=3, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01)

Figure 5　Hydrophilic properties of four groups of SF/DLM scaffolds: (a) water absorption; (b) water retention; (c) swelling (n=3, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01)

组在应变为30%时的压缩模量。如图6(a)所示，4条曲线都是从0开始，未达到完全光滑，呈上升走势。100:0组的曲线比75:25、50:50、25:75组更加陡峭，且50:50、25:75组前期增长比较缓慢，四组均是在35%~60%应变时应力出现大幅增长。如图6(b)所示，100:0、75:25、50:50、25:75组杨氏模量分别为(1043.05±492.96)、(609.49±384.42)、(402.63±113.41)、(193.81±78.19) kPa。100:0组与50:50组之间杨氏模量有显著性差异(P=0.011)；

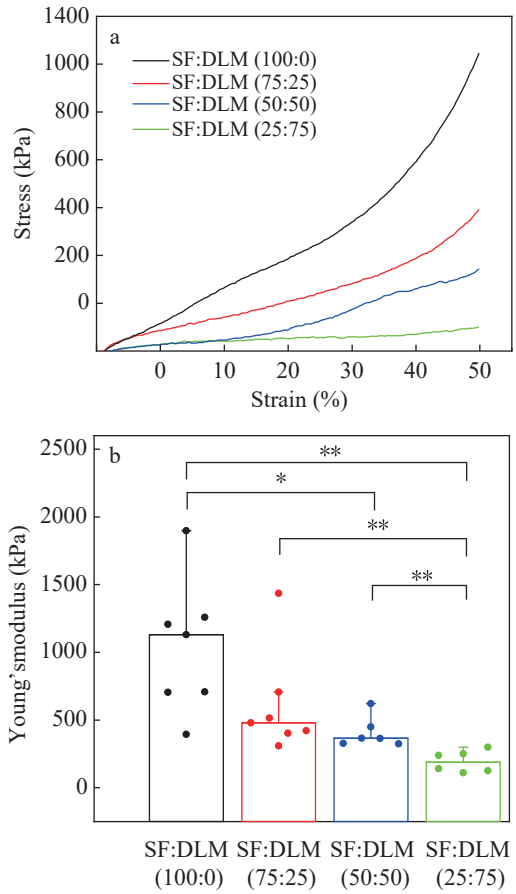

图 6 四组 SF/DLM 支架的力学特征：(a)应力-应变曲线图；(b)杨氏模量 (n=5, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01)

Figure 6 Mechanical characteristics of four groups of SF/DLM scaffolds: (a) stress-strain plot; (b) Young's modulus (n=5, $^{*}P$<0.05, $^{**}P$<0.01)

100:0 组与 25:75 组间杨氏模量有显著性差异 (P=0.002)；75:25 组与 25:75 组间杨氏模量有显著性差异 (P=0.001)；50:50 组与 25:75 组间杨氏模量有显著性差异 (P=0.003)。表明 SF/DLM 复合支架的抗压强度得到明显改善，这可能是 SF 比例的增加使得复合支架孔隙率增大，刚度也相应增加。

2.7 细胞与支架复合后 Live/Dead 染色结果

将肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 分别在三组支架上进行培养，观察培养后 HSCs 的细胞行为和特征的具体情况。图 7 为 HSCs 与四组 SF/DLM 支架复合后的 Live/Dead 染色结果，绿色为 FDA 染料标记的活细胞，红色为 PI 染料标记的死细胞。可以看出由于 HSCs 刚种植到支架上 24 h，还未开始大量的增殖，细胞数量较少，只有 SF:DLM (25:75) 组的细胞相对多一点。当 HSCs 种植到细胞上 3 天和 7 天后，细胞大量地粘附在支架上，几乎没有死细胞。值得注意的是，含有 DLM 的实验组中的活细胞数量明显多于不含有 DLM 的 SF:DLM (100:0) 组，说明 DLM 中的成分可以促进 HSCs 的生长。此外，SF:DLM (100:0) 组的结构较为致密，可能导致 HSCs 种植和长入相对而言更难。总的来说，SF/DLM 支架有利于 HSCs 的黏附、生长和迁移。

3 结论

(1) 通过对大鼠肝脏组织的脱细胞处理得到

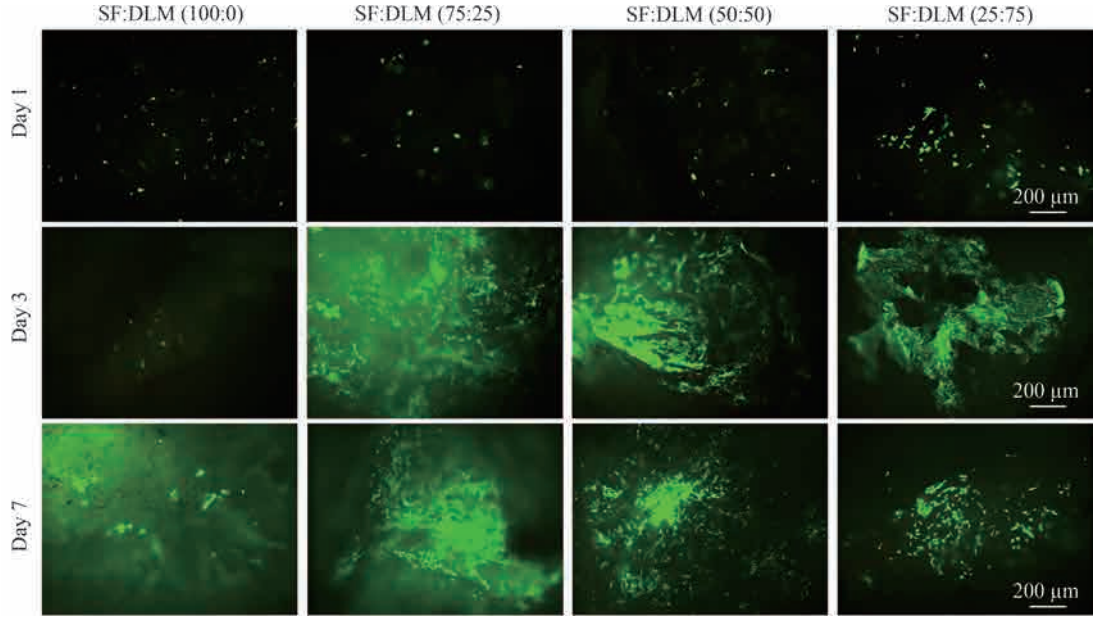

图 7 HSCs 与四组 SF/DLM 支架复合不同天数的 Live/Dead 染色结果

Figure 7 Live/Dead staining plots of four sets of SF/DLM scaffolds

脱细胞肝基质(DLM)，并将其与丝素蛋白(SF)按等浓度不同体积比例混合，经EDC/NHS交联反应制备了丝素蛋白/脱细胞肝基质(SF/DLM)复合水凝胶支架。

(2)从形态结构上看，SF/DLM复合凝胶支架表面粗糙，内部多孔且相互贯通，SF比例的增加使支架的孔隙率增大，孔径减小，有利于细胞的生长和代谢。

(3) SF的添加改善了复合凝胶支架的力学性能。SF比例的增加使复合支架的孔隙率增大，SF与DLM的交联更加紧密，支架的降解时间得以延长，同时也增强了复合支架的抗压强度和稳定性。

(4)细胞与支架复合后Live/Dead染色结果显示，SF/DLM复合支架具有良好生物相容性。细胞种植于支架材料上3天和7天后，细胞大量增殖，几乎没有死细胞，并且复合支架中的DLM成分能够促进细胞生长。

参考文献

1 Vazirzadeh, M.; Azarpira, N.; Davoodi, P.; Vosough, M.; Ghaedi, K. Natural scaffolds used for liver regeneration: a narrative update. *Stem Cell Rev. Rep.*, **2022**, 18(7), 2262–2278.

2 Uygun, B. E.; Soto-Gutierrez, A.; Yagi, H.; Izamis, M. L.; Guzzardi, M. A.; Shulman, C.; Milwid, J.; Kobayashi, N.; Tilles, A.; Berthiaume, F.; Hertl, M.; Nahmias, Y.; Yarmush, M. L.; Uygun, K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med.*, **2010**, 16(7), 814–820.

3 Mazza, G.; Rombouts, K.; Rennie Hall, A.; Urbani, L.; Vinh Luong, T.; Al-Akkad, W.; Longato, L.; Brown, D.; Maghsoudlou, P.; Dhillon, A. P.; Fuller, B.; Davidson, B.; Moore, K.; Dhar, D.; de Coppi, P.; Malago, M.; Pinzani, M. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci. Rep.*, **2015**, 5, 13079.

4 Agarwal, T.; Narayan, R.; Maji, S.; Ghosh, S. K.; Maiti, T. K. Decellularized caprine liver extracellular matrix as a 2D substrate coating and 3D hydrogel platform for vascularized liver tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2018**, 12(3), e1678–e1690.

5 Lewis, P. L.; Su, J.; Yan, M.; Meng, F. Y.; Glaser, S. S.; Alpini, G. D.; Green, R. M.; Sosa-Pineda, B.; Shah, R. N. Complex bile duct network formation within liver decellularized extracellular matrix hydrogels. *Sci. Rep.*, **2018**, 8(1), 12220.

6 Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int. J. Polym. Sci.*, **2011**, 2011, 290602.

7 Pati, F.; Jang, J.; Ha, D. H.; Kim, S. W.; Rhie, J. W.; Shim, J. H.; Kim, D. H.; Cho, D. W. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 3935.

8 Juhasz, I.; Kiss, B.; Lukacs, L.; Erdei, I.; Peter, Z.; Remenyik, E. Long-term followup of dermal substitution with acellular dermal implant in burns and postburn scar corrections. *Dermatol. Res. Pract.*, **2010**, 2010, 210150.

9 Jiang, W.; Zhang, X.; Yu, S.; Yan, F.; Chen, J.; Liu, J.; Dong, C. Decellularized extracellular matrix in the treatment of spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, **2023**, 368, 114506.

10 Badylak, S. F.; Tullius, R.; Kokini, K.; Shelbourne, K. D.; Klootwyk, T.; Voytik, S. L.; Kraine, M. R.; Simmons, C. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J. Biomed. Mater. Res.*, **1995**, 29(8), 977–985.

11 Ott, H. C.; Matthiesen, T. S.; Goh, S. K.; Black, L. D.; Kren, S. M.; Netoff, T. I.; Taylor, D. A. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat. Med.*, **2008**, 14(2), 213–221.

12 Macchiarini, P.; Jungebluth, P.; Go, T.; Adelaide Asnaghi, M.; Rees, L. E.; Cogan, T. A.; Dodson, A.; Martorell, J.; Bellini, S.; Parnigotto, P. P.; Dickinson, S. C.; Hollander, A. P.; Mantero, S.; Conconi, M. T.; Birchall, M. A. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet*, **2008**, 372(9655), 2023–2030.

13 Basonbul, R. A.; Cohen, M. S. Use of porcine small intestinal submucosa for pediatric endoscopic tympanic membrane repair. *World J. Otorhinol. Head Neck Surg.*, **2017**, 3(3), 142–147.

14 Mahbub, M. S. I.; Bae, S. H.; Gwon, J. G.; Lee, B. T. Decellularized liver extracellular matrix and thrombin loaded biodegradable TOCN/chitosan nanocomposite for hemostasis and wound healing in rat liver hemorrhage model. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2023**, 225: 1529–1542.

15 Chu, T. L.; Tripathi, G.; Bae, S. H.; Lee, B. T. *In-vitro* and *in-vivo* hemostat evaluation of decellularized liver extra cellular matrix loaded chitosan/gelatin spongy scaffolds for liver injury. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, 193, 638–646.

16 Bobrova, M.; Safonova, L.; Efimov, A.; Lyundup, A.; Mozheiko, N.; Agapova, O.; Agapov, I. Scaffolds

based on silk fibroin with decellularized rat liver microparticles: investigation of the structure, biological properties and regenerative potential for skin wound healing. *Pharmaceutics*, **2022**, 14(11), 2313.

17 Sharma, A.; Rawal, P.; Tripathi, D. M.; Alodiya, D.; Sarin, S. K.; Kaur, S.; Ghosh, S. Upgrading hepatic differentiation and functions on 3D printed silk-decellularized liver hybrid scaffolds. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2021**, 7(8), 3861–3873.

18 Fu, Q.; Xia, B.; Huang, X.; Wang, F. P.; Chen, Z. M.; Chen, G. B. Pro-angiogenic decellularized vessel matrix gel modified by silk fibroin for rapid vascularization of tissue engineering scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2021**, 109(9), 1701–1713.

19 Nosar, M. N.; Salehi, M.; Ghorbani, S.; Beiranvand, S. P.; Goodarzi, A.; Azami, M. Characterization of wet-electrospun cellulose acetate based 3-dimensional scaffolds for skin tissue engineering applications: influence of cellulose acetate concentration. *Cellulose*, **2016**, 23(5), 3239–3248.

20 Pezeshki-Modaress, M.; Zandi, M.; Rajabi, S. Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering: an *in vitro* study. *Prog. Biomater.*, **2018**, 7(3), 207–218.

21 Dhasmana, A.; Singh, L.; Roy, P.; Mishra, N. C. Silk fibroin protein modified acellular dermal matrix for tissue repairing and regeneration. *Mater. Sci. Eng. C*, **2019**, 97, 313–324.