

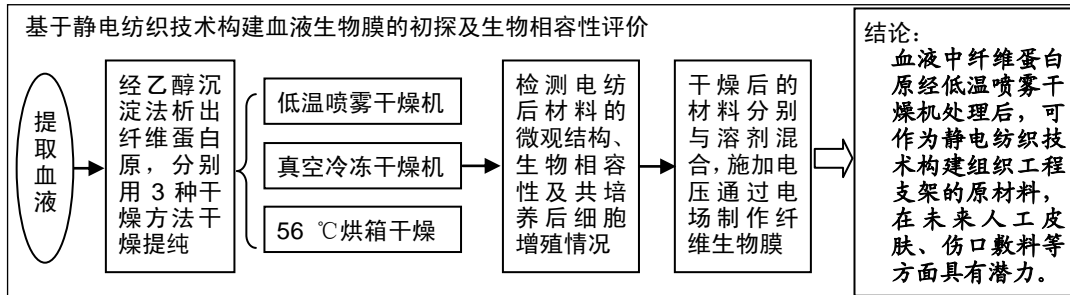
# 基于静电纺织技术构建血液生物膜的初探及生物相容性评价

孙宇<sup>1,2,3</sup>, 邹强<sup>1,2,3</sup>, 李轩泽<sup>1,2,3</sup>, 吴展羽<sup>1,2</sup>, 杨龙<sup>2</sup>, 王建吉<sup>2</sup>, 刘琴<sup>4</sup>, 马敏先<sup>4</sup>, 叶川<sup>1,2,3</sup> (1贵州医科大学, 贵州省贵阳市 550004; 2贵州医科大学附属医院骨科, 贵州省贵阳市 550004; 3贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心, 贵州省贵阳市 550004; 4贵州医科大学附属医院口腔科修复科, 贵州省贵阳市 550004)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1579

ORCID: 0000-0002-5247-6858(孙宇)

文章快速阅读:



孙宇, 女, 1991年生, 黑龙江省鹤岗市人, 汉族, 贵州医科大学在读硕士, 医师, 主要从事组织工程生物材料的研发工作。

通讯作者: 叶川, 主任医师, 贵州医科大学附属医院骨科, 贵州省贵阳市 550004

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-13



文题释义:

**静电纺织技术:** 是一种特殊的纤维制造工艺, 将聚合物溶液或熔体在强电场中进行喷射纺丝; 在电场作用下, 针头处的液滴会由球形变为圆锥形(即“泰勒锥”), 并从圆锥尖端延展得到纤维细丝, 这种方式可生产出纳米级纤维结构的支架材料。

**纤维蛋白原:** 是一种具有凝血功能的蛋白质, 在组织工程领域可作为支架材料, 该材料可促进细胞的黏附、增殖, 指导细胞行为, 具有良好的生物相容性。

**低温喷雾干燥技术:** 是物料干燥的方法之一, 可直接使溶液、乳浊液干燥成粉状, 优点为: 干燥过程非常迅速, 可直接干燥成粉末, 低温不影响生物材料的活性。

摘要

**背景:** 已有研究表明纤维蛋白原可作为组织工程支架材料, 若将血液中的纤维蛋白原提纯再利用, 可制作出无免疫原性、生物相容性良好的支架材料。

**目的:** 探索静电纺丝技术制备血液生物膜的方法, 评价支架的生物相容性。

**方法:** 将新鲜猪血液经分离、离心、纯化等步骤提纯出纤维蛋白原, 分别经真空冷冻干燥机(A组)、低温喷雾干燥机(B组)、56℃烘箱干燥(C组)处理, 采用静电纺织技术制作成纤维薄膜支架材料, 检测3组支架材料的接触角, 采用扫描电镜观察支架材料的三维结构。将3组电纺支架材料分别与骨髓间充质干细胞共培养, 培养7 d后, 扫描电镜观察细胞生长情况; 培养1-4 d, Alamar Blue试剂盒检测B组支架材料表面细胞增殖。

**结果与结论:** ①扫描电镜显示, A组可见纤维结构, 纤维粗细不均并有大量液滴状结构; B组可见排列有序的多层纤维结构, 纤维直径、孔径大小接近一致, 仅见少量液滴状结构; C组未见纤维结构, 为大小不等的液滴状结构; ②A-C组支架材料的接触角分别为(82±3)°、(67±5)°、(80±3)°, 3组材料接触角都< 90°, 表明亲水性良好; ③共培养7 d后, 骨髓间充质干细胞均可黏附于3组支架材料上, 其中B组材料表面的细胞分布较为均匀, 细胞黏附生长于纤维表面, 细胞核形态相对规则; A、C组可见少量细胞黏附生长于支架上, C组细胞量最少, 细胞核形态不规则, 两组均未见明显纤维结构; ④Alamar Blue实验结果显示, 随着培养时间的延长, B组支架材料表面的细胞呈增殖趋势, 生长状态良好; ⑤结果表明, 采用静电纺织技术可制备出血液纤维蛋白原生物膜, 其具有良好的生物相容性。

关键词:

纤维蛋白原; 血液生物膜; 静电纺织; 纤维蛋白原; 细胞增殖趋势; 血液纤维蛋白原生物膜

主题词:

纤维蛋白原; 生物膜; 血液; 组织工程

中图分类号: R459.9; R318.08

基金资助:

国家自然科学基金资助项目(81360232), 项目负责人: 叶川; 贵阳市科技局创新团队资助项目(20175-17), 项目负责人: 叶川

## Construction and biocompatibility of blood biofilms based on electrospinning technology

Sun Yu<sup>1,2,3</sup>, Zou Qiang<sup>1,2,3</sup>, Li Xuanze<sup>1,2,3</sup>, Wu Zhanyu<sup>1,2</sup>, Yang Long<sup>2</sup>, Wang Jianji<sup>2</sup>, Liu Qin<sup>4</sup>, Ma Minxian<sup>4</sup>,Ye Chuan<sup>1,2,3</sup> (1Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; 2Department of

Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China;

3National and Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Guiyang

550004, Guizhou Province, China; 4Department of Prosthodontics, Affiliated Stomatology Hospital of Guizhou

Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China)

Sun Yu, Master candidate, Physician, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; National and Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Corresponding author:

Ye Chuan, Chief physician, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; National and Guizhou Joint Engineering Laboratory for Cell Engineering and Biomedicine Technique, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies have shown that fibrinogen can serve as tissue engineering scaffold material. Therefore, the reuse of fibrinogen in the autologous blood can make the scaffold material which has non-immunogenicity and good biocompatibility.

**OBJECTIVE:** To explore the method of preparing blood biofilm using the electro-spinning technology and to evaluate the biocompatibility of the fibrinogen scaffold.

**METHODS:** Fibrinogen was purified out of the fresh blood after the procedures of separation, centrifugation, and purification, and then subjected to vacuum freeze drying (group A), low temperature spray drying (group B), and oven drying at 56 °C (group C). It was finally made into fiber film using the electrospinning technology. Contact angle of the three sets of scaffold materials was detected, and the three-dimensional structure of the scaffolds was observed under scanning electron microscope. Bone marrow mesenchymal stem cells were co-cultured with the three sets of scaffolds *in vitro*. Cell growth was observed using scanning electron microscope at 7 days of culture, and cell proliferation in the group B was detected using Alamar Blue kit at 1-4 days of culture.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Under the scanning electron microscope, fiber structure with uneven fiber thickness was observed, and a lot of droplet-like structures were also visible in the group A; the ordered multi-layer fiber structure with similar fiber diameter and pore size was observed in the group B, and only a small amount of droplet-like structures were detected; in the group C, there was no fiber structure, but the droplet-like structures of different sizes. (2) The contact angle of the scaffold material was  $(82\pm 3)^\circ$  in the group A,  $(67\pm 5)^\circ$  in the group B, and  $(80\pm 3)^\circ$  in the group C. (3) After 7 days of co-culture, the bone marrow mesenchymal stem cells adhered to the scaffold materials in the three groups. The cells on the surface of group B were evenly distributed, which were adherent to the fiber surface and had relative regular nuclei. Only a small amount of cells grew onto the scaffolds in the groups A and C, especially in the group C, in which the cells had irregular nuclei and no fiber structure was observed. (4) The cells in the group B exhibited an increasing proliferation tendency as shown by the results of Alamar Blue experiment, and the cell growth was in good status. All these findings indicate that it is feasible to prepare the blood fibrinogen biofilm with good biocompatibility using the electrospinning technology.

**Subject headings:** Fibrinogen; Biofilms; Blood; Electrospinning; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81360232 (to YC); the Science and Technology Innovation Team Funded Project of Guiyang Municipal Science and Technology Department, No. 20175-17 (to YC)

## 0 引言 Introduction

生物材料是组织工程研究的核心内容之一,理想的组织工程材料应有合适的生物力学和良好的生物相容性。静电纺丝技术是近年来发展的制备直径毫米至纳米级别纤维的新技术,其制作的纤维结构和空间构象类似于天然细胞外基质,并且具有高比表面积、高孔隙率等性质<sup>[1-2]</sup>,对细胞黏附、生长、增殖有益<sup>[3]</sup>。静电纺丝技术能够制备出微米纤维结构,具有简便快捷、成本低廉、结构可控等优点。纤维蛋白原是天然的可溶性血液蛋白质,主要由肝细胞分泌,它由6条链组成,分别是2条A $\alpha$ 、2条B $\beta$ 和2条 $\gamma$ 链。纤维蛋白原和凝血酶发生反应形成纤维蛋白,所得纤维蛋白可聚合成纤维蛋白纤维网,有助于血液凝固。纤维蛋白原在止血、伤口愈合、炎症、血管生成和血小板聚集等方面起着至关重要的作用<sup>[4]</sup>,通常被认为是止血剂或用于伤口敷料<sup>[5-6]</sup>。Balasubramanian等<sup>[7]</sup>探讨了纤维蛋白原支架在心血管、骨、软骨和皮肤组织工程中的应用。

以往研究表明,基于纤维蛋白原的支架材料易于降解<sup>[8]</sup>,有一定的力学性能和生物相容性<sup>[9-10]</sup>。Gugutkov等<sup>[11]</sup>证明纤维蛋白原纳米纤维有指导内皮细胞行为的能力,表明细胞可在该支架材料上黏附和增殖。经静电纺丝技术制备出的纤维蛋白原支架材料含有丰富的生长因子,例如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子等<sup>[12]</sup>。但目前纤维蛋白原的来源普遍是成品物料,无活性保证且价格昂贵,而其他合成高分子材料存在生物相容性和安全性等方面的缺陷。新鲜血液经提纯可得纤维蛋白原,其具有良好的生物相容性,能够为细胞黏附和细胞间相互作用提供必要的生物信号,促进组织再生<sup>[13-14]</sup>。一直以来,热敏性材料的快速干燥问题困扰着很多科研人员。真空冷冻干燥是将物料冻结后形成稳定的骨架结构,去除水分后骨架结构基本维持原状并留下孔隙,此种方法耗时较长。此次研究采用了

低温喷雾干燥技术,该技术是将溶液或乳液雾化,通过遇冷介质冻结成冰颗粒,而后再脱水干燥成粉。该技术可制备出比表面积大、高空隙度、结构均匀稳定的粉体。已有研究证明通过低温喷雾干燥技术处理所得的干燥品优于冷冻干燥<sup>[15]</sup>。低温喷雾干燥技术可直接使溶液、乳液干燥成粉状,干燥过程仅持续几秒钟,干燥温度为35-50 °C,不影响蛋白质等物质的生物活性,可增加雾滴的表面积,广泛适用于酶制剂、生物活性制剂等方面。因此研究选择动物新鲜血液制备纤维蛋白原,经不同干燥方法干燥后,采用静电纺织技术电纺成支架薄膜,通过体外实验评价材料的生物相容性,探讨其作为组织工程支架材料的可行性。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 基于高压静电纺织技术的血液成膜实验。

1.2 时间及地点 实验于2017年5月至2018年1月在贵州医科大学组织工程与干细胞实验室完成。

1.3 材料

**实验动物:** 4周龄SD大鼠,体质量50-60 g,雌雄不拘,许可证号:SYXK(黔)2012-0001,由贵州医科大学动物实验中心提供。

**实验主要试剂及仪器:** 无水乙醇(天津永大化学试剂有限公司);蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich); 1, 1, 1, 3, 3, 3-六氟-2-丙醇溶液(HFP, TCI America Inc.); 10xMEM培养基(Sigma Aldrich, Co.); 激光共聚焦显微镜LSM5 Excitor(Carl Zeiss); 接触角测试仪(DropMaster DMo-501); 扫描电镜(Hitachi, 日本); 多功能酶标仪(SpectraMax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA); 静电纺织机(SS-2534H, Ucalery, 中国北京); 低温喷雾干燥机(JT-6000Y, 杭州聚同); 新鲜猪血(贵州医科大学动物实验中心); DAPI染色剂(北京索莱宝); Alamar Blue测

定试剂盒(DAL1100, Life Technologies)。

#### 1.4 实验方法

**1.4.1 纤维蛋白原的制备** 取200 mL新鲜猪血液,置于4 °C离心机5 000 r/min离心10 min,吸取上层血浆,按10:1加入医用无水乙醇,混合后-20 °C孵育8 min,4 °C 1 800 r/min离心10 min,弃上清,留取沉淀物备用。将沉淀物分别经真空冷冻干燥机(A组)、低温喷雾干燥机(B组)、56 °C烘箱干燥(C组),收集冻干粉,4 °C保存。

**1.4.2 静电纺织** 将3种干燥方法所得的纤维蛋白原分别配成质量浓度为120 g/L,分别溶解于90%的1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇溶液和10%的10×MEM培养基中,混匀器混匀<sup>[16]</sup>。取5 mL混合溶液于5 mL的一次性注射器中,将注射器置于注射泵上,以3.5 mL/h的速度推注。正极连接在固定在注射器的6号注射器头上,施加20 kV电压;负极连接转动轴并施加2 kV电压,产生取向纤维支架。电纺结束后,将薄膜材料取下放置在通风橱内30 min进行脱气处理,清除残留的1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇溶液。将制备的支架放入医用无水乙醇中浸泡10 min,用无菌D-Hanks缓冲液冲洗3次,每次5 min,紫外灯下照射30 min。为了调节纤维蛋白原支架的降解速度,在含体积分数10%胎牛血清的完全培养基中加入1 000 kU/mL蛋白酶抑制剂<sup>[17]</sup>,4 °C备用。

**1.4.3 接触角测试** 在20 °C下通过DropMaster DMO-501光学接触角测量仪测量3组支架的接触角,每组随机测量支架表面5个点,对双蒸水的接触角。

**1.4.4 扫描电镜观察** 取3组支架材料,表面喷金,使用扫描电镜在20 kV的加速电压下观察样品。

**1.4.5 体外骨髓间充质干细胞与材料混合培养** 根据NIH指南(NIH Publication No.85-23 Rev.1985),动物手术按照文献<sup>[18]</sup>描述进行。脱颈处死SD大鼠,无菌条件下取股骨及胫骨,骨头分离后将一侧骨垢剪断,用5 mL注射器吸取一定量的无菌PBS,将骨髓冲洗至无菌培养品中,反复吹打形成细胞悬浊液,将细胞悬液以1 500 r/min离心5 min,去上清,用DMEM完全培养基重悬细胞,放置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养扩增。通过细胞流式实验检测细胞表面CD45、CD106因子的表达来鉴定干细胞。取经过消毒后的3组纤维蛋白原支架材料,用无菌D-Hanks缓冲液洗涤2次,将培养至第3代的骨髓间充质干细胞以 $2.06 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的细胞浓度接种在支架表面。

#### 1.4.6 生物相容性检测

**DAPI检测:** 细胞与支架共培养第7天时,用DAPI染色剂处理,使用激光共聚焦显微镜观察。

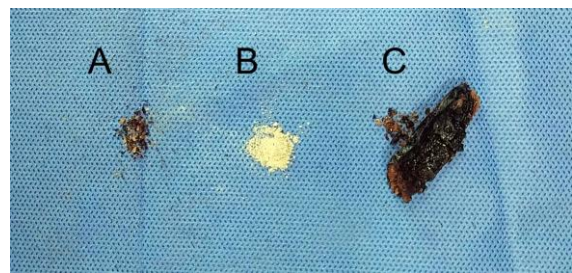
**细胞增殖检测:** 取Alamar Blue测定试剂盒,根据试剂盒说明书测量B组支架与细胞共培养1,4,7 d的细胞增殖。将测定溶液与细胞培养基以1:10的体积比混合后,将其加入到每个测试孔中,并在37 °C孵育5 h。温育后,取每个样品的测定溶液100 μL放入96孔板中,使用多功能酶标仪在544 nm/590 nm的激发/发射下测量荧光强度。除去所有测定溶液并用PBS洗涤样品2次后,将样品加入培养基继续培养。

**1.5 主要观察指标** 3组支架材料的接触角、三维结构,以及3组电纺支架材料与骨髓间充质干细胞共培养后的细胞生长及增殖。

**1.6 统计学分析** 数据采用SPSS 17.0软件进行处理,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

## 2 结果 Results

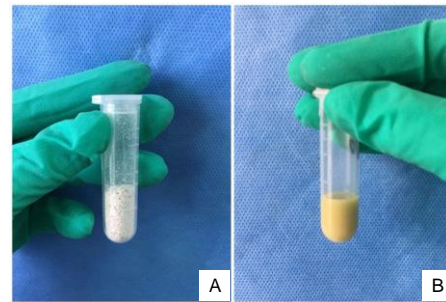
**2.1 不用方法干燥后的粉末大体观** 经真空干燥机干燥后的纤维蛋白原为颗粒状、大小规则不等;经低温喷雾干燥机干燥后的材料为白色、细小粉末状、大小规则较为均一;经56 °C烘箱干燥后的材料为大颗粒状,且互相粘连成大块状,见图1。图2为粉末材料与溶剂充分混合后的混合溶液,颜色微黄,当血色素较多时褐色加深。



图注:图中A为经真空干燥机干燥后的纤维蛋白原,为颗粒状、大小规则不等;B为经低温喷雾干燥机干燥后的纤维蛋白原,为白色、细小粉末状、大小规则较为均一;C为经56 °C烘箱干燥后的纤维蛋白原,为大颗粒状,且互相粘连成大块状。

图1 纤维蛋白原经不同方法干燥后的大体观

Figure 1 The general view of three groups of blood fibrinogen after drying



图注:图中A为干燥后的纤维蛋白原粉末,B为纤维蛋白原-溶剂混合物。

图2 纤维蛋白原制备及静电纺织过程

Figure 2 Preparation of fibrinogen and electrospinning process

**2.2 扫描电镜观察** 通过扫描电镜观察电纺后的支架,见图3,A组可见纤维结构,纤维粗细不均并有大量液滴状结构;B组可见排列有序的多层纤维结构,纤维直径、孔径大小接近一致,仅见少量液滴状结构;C组未见纤维结构,为大小不等的液滴状结构。

**2.3 DAPI荧光染色观察** DAPI荧光染色结果,见图4,共培养7 d后,3组均可见细胞黏附于支架材料上,其中B组细胞分布较为均匀,明显可见细胞黏附生长于纤维表面,细胞核形态相对规则;A、C组可见少量细胞黏附生长于支架上,且C组细胞量最少,细胞核形态不规则,两组均未见明显纤维结构。

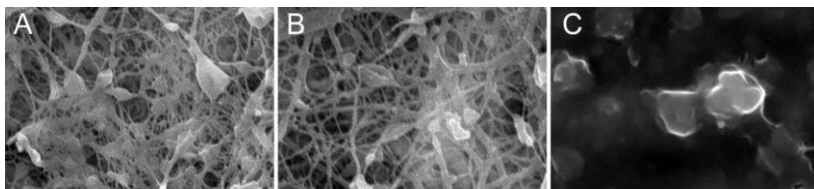


图3 扫描电镜观察纤维蛋白原微观纤维结构 (×8 000)

Figure 3 Scanning electron microscope observation of the micro-fiber structure of blood fibrinogen (× 8 000)

图注: 图中 A 为经真空干燥机干燥制备的纤维蛋白原, 可见纤维结构, 纤维粗细不均并有大量液滴状结构; B 为经低温喷雾干燥机干燥后制备的纤维蛋白原, 可见排列有序的多层纤维结构, 纤维直径、孔径大小接近一致, 仅见少量液滴状结构; C 为经 56 °C 烘箱干燥后制备的纤维蛋白原, 未见纤维结构, 为大小不等的液滴状结构。

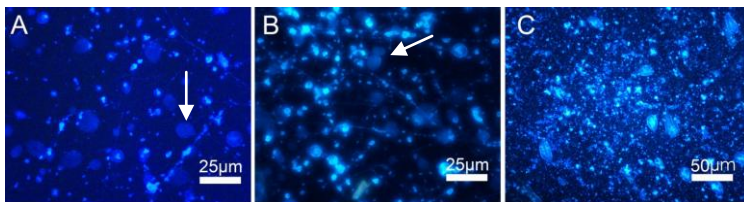


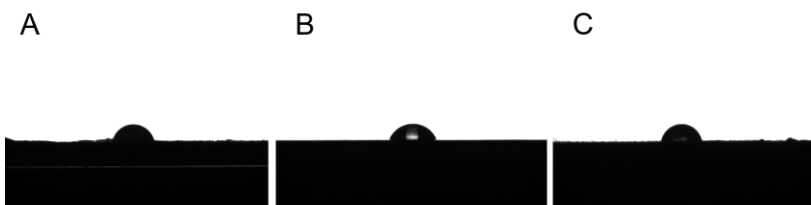
图4 纤维蛋白原电纺薄膜与骨髓间充质干细胞共培养 7 d 后的 DAPI 荧光染色图

Figure 4 DAPI fluorescence staining of bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with fibrinogen electrospun film for 7 days

图注: 图中 A 为经真空干燥机干燥制备的纤维蛋白原电纺薄膜与细胞复合物(×200), 可见少量细胞黏附生长于支架上, 细胞核形态不规则, 无明显纤维结构; B 为经低温喷雾干燥机干燥后制备的纤维蛋白原电纺薄膜与细胞复合物(×200), 细胞分布较为均匀, 明显可见细胞黏附生长于纤维表面, 细胞核形态相对规则; C 为经 56 °C 烘箱干燥后制备的纤维蛋白原电纺薄膜与细胞复合物(×100), 可见少量细胞黏附生长于支架上, 细胞核形态不规则, 无明显纤维结构; 图中白色箭头所指为细胞。

2.4 接触角测试 A组接触角为(82±3)°, B组为(67±5)°, C组为(80±3)°, 3组材料接触角都< 90°, 见图5, 表明亲水性良好, 其中B组接触角最小, 考虑与其纤维排列是否规则有一定关联。

2.5 细胞增殖测定 为了评估电纺后与骨髓间充质干细胞共培养的相容性是否良好, 实验用Alamar Blue法测定细胞增殖, 结果表明随着培养时间的增加, B组中的细胞增殖呈上升趋势, 见图6。



图注: 图中 A 为经真空干燥机干燥制备的纤维蛋白原电纺薄膜, B 为经低温喷雾干燥机干燥后制备的纤维蛋白原电纺薄膜, C 为经 56 °C 烘箱干燥后制备的纤维蛋白原电纺薄膜, 3 组接触角都小于 90°。

图5 纤维蛋白原生物膜的接触角

Figure 5 Contact angle of fibrinogen biofilms

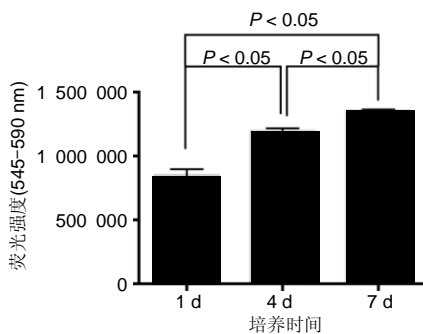


图6 Alamar Blue 法检测纤维蛋白原电纺薄膜-细胞复合物中的细胞增殖情况

Figure 6 Detection of the proliferation of cells in the biofilm-cell complex using Alamar Blue method

### 3 讨论 Discussion

3.1 不同干燥方法对电纺过程的影响 普通的真空干燥和喷雾干燥对材料的生物活性和结构都有较大的破坏。蛋白质一般在70 °C左右开始失活变性, 为避免蛋白质变性, 干燥技术的温度控制在70 °C以下。真空冷冻干燥技术是将传统的热风干燥技术与冷冻相结合, 是干燥成本最高的方法之一, 其技术特点如下: ①物料是在低于水的三相点压力(610.5 Pa)以下干燥, 该状态下相对平衡温度低、处于高度缺氧, 因此可保留新鲜物料中的大部分有效成分; ②物料冻结后形成稳定的骨架结构, 水分去除后骨架结构基

本维持原状并留下孔隙; ③该技术可除去95%以上的水分, 干燥后的物料可在室温和较高的温度下长期保存。真空冷冻干燥技术应用范围广, 主要应用于生物制药、中药加工、食品加工、生物材料等方面。已有实验将真空冷冻干燥技术成功用于食品加工等领域<sup>[19]</sup>。史宏灿等<sup>[20]</sup>通过真空冷冻干燥术将胶原蛋白-羟基磷灰石海绵作为组织工程材料。但是真空冷冻干燥工作持续时间长, 能效低, 且干燥后的物料成块状, 需要二次粉碎后与溶剂混合, 待充分溶解后方可进行电纺。56 °C恒温干燥技术是较为普遍的一种干燥方法, 通过设定所需的温度且恒温干燥可达到干燥效果。

纤维蛋白原是天然高分子材料。有研究采用静电纺丝技术将其混合在特定比例的六氟异丙醇和DMEM培养基中, 成功制备了纤维蛋白原纳米纤维。实验采用动物新鲜血液中的纤维蛋白原为原材料, 尝试使用不同干燥方法得出不同状态的纤维蛋白原干燥品。其中低温喷雾干燥法的干燥温度保持在45 °C左右, 干燥时长2.0-3.0 s, 为即刻干燥, 并且低温保持蛋白质不失活, 颗粒细致均匀, 易于与溶剂混合, 电纺后的纤维结构相对均匀, 为3种干燥法最优, 可见混合溶剂通过电场形成的明显泰勒锥结构。该方法优点为可即刻将血液一次性电纺成生物纤维薄膜, 用于伤口敷料, 促进伤口愈合, 其生物膜的特点为: 即时可用、无免疫排斥反应、可吸收、生物相容性良好; 真空冷冻干燥法的干燥时长为12-24 h不等, 低温冷冻不影响蛋白质活性, 但其干燥品颗粒大

小不均,可能导致与溶剂混合不均匀,影响电纺后的纤维结构;56℃烘箱干燥法所得干燥品颗粒较大,如需更好地与溶剂混合,需额外再对样品进行处理,与溶剂混合不均匀,影响电纺后的纤维结构,为干燥法中最差选。所以选择低温喷雾干燥技术为该实验的干燥方法。

**3.2 静电纺丝后材料性质初步评定** 经扫描电镜和接触角测试可知,纤维蛋白原支架材料亲水性良好,皆 $< 90^\circ$ ;3组的接触角差异可能与材料表面的微观形态有关。电镜观察可见纤维结构最好的B组,由于纤维较为均匀,液滴较少,表面较为平整,所以其亲水性最优;A组与C组可能由于不同干燥方法所致的材料颗粒与溶剂混合不均所致浓度略有差异,从而影响了其纤维结构。

**3.3 静电纺丝后材料生物相容性初步评定** 实验将材料与骨髓间充质干细胞进行共培养后,采用DAPI荧光染色检测支架材料上的细胞存活情况。结果显示3组材料上均有细胞生长,其中B组细胞黏附于材料纤维爬行生长,状态最优;A组与C组均有少量细胞,纤维结构不明显,可能为纤维结构的存在更利于细胞的黏附生长。Alamar Blue检测观察了B组在1, 4, 7 d的细胞增殖情况,结果表明细胞随着时间的延长细胞增殖明显,说明支架材料利于细胞的黏附和生长,该干燥方法所得材料具有良好的生物相容性。

**3.4 静电纺丝纤维蛋白原临床转化前景展望** 血液中含有丰富的纤维蛋白原,经过特殊的提纯干燥等步骤,通过高压静电纺丝技术制备生物活性薄膜,在伤口敷料、特殊伤口护理、生物活性面膜、高端医疗美容护理等领域都有潜在的临床应用价值和社会前景。血液可来源自体或异体,也可采用临期血液制品或动物血液制备生物薄膜,而后冻存储备用。基于静电纺丝技术的纤维蛋白原生物薄膜材料,制作过程简单,材料易得,制作过程用时较短且可控,该制备流程可形成规模并批量化生产,将弥补生物材料在选材这一方面的空缺;拓宽了纤维蛋白原在组织工程生物材料领域的应用范围。但是该材料仍有生物降解性快等缺点,在后续的实验中将进一步探索。

研究实现了将新鲜血液经过提纯干燥处理,通过高压静电纺织技术电纺成具有高比表面积、高孔隙率、生物相容性良好、无免疫排斥反应纳米生物膜的实验初探。研究探讨了不同干燥方法所得纤维蛋白原电纺后的薄膜材料相关性质,将血液加以适当处理,可即刻成膜,用于伤口愈合。相信随着研究的进一步的优化和深入,该技术可被广泛用于伤口敷料,避免使用异体材料可能出现的免疫排斥反应和伤口不愈合等风险。

**作者贡献:** 孙宇、邹强进行实验设计,实验实施为孙宇、李轩泽、吴展羽、杨龙,实验评估为叶川、马敏先,资料收集为王建吉、刘琴,孙宇成文,叶川审核,孙宇、叶川对文章负责。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(81360232)”、“贵阳市科技局创新团队资助项目(20175-17)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,不存在利益冲突。

**伦理问题:** 实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物麻醉下进行所有的手术,并尽一

切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE指南)。

**文章查重:** 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

**生物统计学声明:** 该文统计学方法已经贵州医科大学生物统计学专家审核。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

## 4 参考文献 References

- [1] Neal RA, McClugage SG, Link MC, et al. Laminin nanofiber meshes that mimic morphological properties and bioactivity of basement membranes. *Tissue Eng*. 2009;15(1):11-21.
- [2] 赵敏丽,隋刚,杨小平,等.电纺丝PLLA/HA复合纤维支架的制备及体外降解性能研究[J].中国生物医学工程学报,2006,25(4):476-480.
- [3] Wang S, Zhang Y, Wang H, et al. Fabrication and properties of the electrospun polylactide/silk fibroin-gelatin composite tubular scaffold. *Biomacromolecules*.2009;10(8):2240-2244.
- [4] Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, et al. Fibrinogen Int J Biochem Cell Biol. 1999;31(7):741-746.
- [5] Ayres CE, Jha BS, Sell SA, et al. Nanotechnology in the design of soft tissue scaffolds: innovations in structure and function. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(1):20-34.
- [6] Spotnitz WD. Commercial fibrin sealants in surgical care. *Am J Surg*. 2001;182(2):8S-14S.
- [7] Balasubramanian P, Prabhakaran MP, Kai D. Human cardiomyocyte interaction with electrospun fibrinogen/gelatin nanofibers for myocardial regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013;24(14):1660-1675.
- [8] Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28(35):5298-5306.
- [9] McManus MC, Boland ED, Simpson DG, et al. Electrospun fibrinogen: feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(2):299-309.
- [10] McManus M, Boland E, Sell S, et al. Electrospun nanofibre fibrinogen for urinary tract tissue reconstruction. *Biomed Mater*. 2007;2(4):257-262.
- [11] Gugutkov D, Gustavsson J, Cantini M, et al. Electrospun fibrinogen-PLA nanofibres for vascular tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;11(10):2774-2784.
- [12] Sell SA, McClure MJ, Garg K, et al. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(12):1007-1019.
- [13] Ye Q, Zünd G, Benedikt P, et al. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000;17(5):587-591.
- [14] Sell SA, McClure MJ, Garg K, et al. Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(12):1007-1019.
- [15] Kondo M, Niwa T, Okamoto H, et al. Particle characterization of poorly water-soluble drugs using a spray freeze drying technique. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2009;57(7):657-662.
- [16] Carlisle CR, Coulais C, Namboothiry M, et al. The mechanical properties of individual, electrospun fibrinogen fibers. *Biomaterials*. 2009;30(6):1205-1213.
- [17] McManus MC, Boland ED, Simpson DG, et al. Electrospun fibrinogen: feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model. *J Biomed Mater Res A*. 2007;81(2):299-309.
- [18] Zhang Y, Ye C, Wang G, et al. Kidney-targeted transplantation of mesenchymal stem cells by ultrasound-targeted microbubble destruction promotes kidney repair in diabetic nephropathy rats. *Biomed Res Int*. 2013;2013:526367.
- [19] 张丽文,罗瑞明,李亚蕾,等.食品真空冷冻联合干燥技术研究进展[J].中国调味品,2017,42(3):152-156.
- [20] 史宏旭,徐志飞,秦雄,等.生物材料人工气管的设计与动物实验研究[J].第二军医大学学报,2002,6(10):1142-1145.