

[补充信息]

面向组织工程应用的再生丝素/海藻酸钙海绵:制备、表征及体内、体外性能研究

石敏, 陶思洁, 李丹, 王鑫, 徐水, 朱勇✉

西南大学生物技术学院, 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

[Supplementary Information]

Regenerated Silk Fibroin/Calcium Alginate Sponge for Tissue Engineering Applications: Preparation, Characterization and in Vivo and in Vitro Properties

SHI Min, TAO Sijie, LI Dan, WANG Xin, XU Shui, ZHU Yong✉

State key Laboratory of Silkworm Genome Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

实验

蚕茧切成小片, 置入双蒸水配制的 5 g/L 沸腾状态的 Na_2CO_3 溶液, 茧片与溶液浴比为 1:50, 脱胶 30 min。脱胶后, 丝纤维在 60 °C 蒸馏水清洗和干燥。将干丝素溶于沸腾的 40% 的 CaCl₂ 溶液 (双蒸水配制) 中, 以浴比 (丝素与溶液质量比) 1:10 加入适量的丝素, 不断搅拌至完全溶解。完全溶解后, 将再生丝素(RSF)溶液与去离子水在室温下透析 3 天。然后将透析液冷冻干燥, 粉碎得到丝素。

动物体实验过程

SD 大鼠(由第三军医大学提供, 重量:200~250 g)是由腹腔内注射 2% 戊巴比妥钠麻醉(25 毫克/公斤), 通过去除部分背上的毛发暴露皮肤。75% 酒精消毒后, 在取毛处的背部适当位置切开切口, 沿切口通过钝器解剖法沿切口部位向里制备适宜大小的皮下囊, 植入实验材料, 缝合切口。每一种材料都植入两只大鼠, 分别饲养。

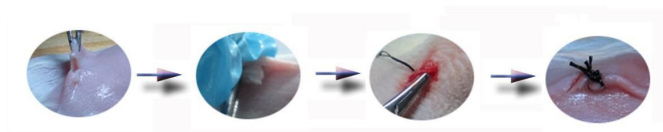


图 S1 包埋手术步骤

Fig.S1 Embedding procedure

术后观察

(1)取材及大体观察

术后每天对动物手术切口、周围形态及术后反应进行观察。并于 1 周、4 周两个时间点对试验鼠麻醉处死, 切下包有材料的皮下组织。取材时观察创面愈合状况、有无明显的炎症反应等。

(2)冰冻切片的制备

速冻组织: 将组织块放于特制小盒 (按材料相同的形式编号), 加适量的 OCT 包埋剂至浸没组织, 随后缓缓平放入液氮小杯中, 盒底接触液氮时开始汽化, 此时保持不动, 大约 10~20 s 后组织速冻完

成。

切片：取出速冻成块的组织及时置入 -80°C 冰箱过夜后，于恒冷切片机中冰冻切片（要求冰冻切片 $4\sim 6\ \mu\text{m}$ ），并附于编号后的载玻片上， -20°C 保存备用。

固定：切片于室温下放置 30 min，用丙酮在 4°C 下固定 20 min。

冲洗：PBS 冲洗 3 次，每次 5 min。

灭活内源性过氧化物酶：用 $3\%\text{H}_2\text{O}_2$ 对切片进行 20 min 避光处理。

冲洗：PBS 洗（5 min \times 3 次）。

(3) HE 染色

染色前处理：用二甲苯脱蜡 5~10 min，换新鲜二甲苯，再处理 5~10 min。然后分别依次置于无水乙醇、90%乙醇、70%乙醇和蒸馏水中 5 min，2 min，2 min，2 min。

苏木精染色：染色 5-10min 后，浸入流动的自来水中约 10min，除去多余的苏木精染色液，蒸馏水洗涤一次，95%乙醇处理 5 s。

伊红染色：染色 1 min 后，70%乙醇清洗 2 次。

脱水、透明及封片：先后用不同瓶装的 95%乙醇各脱水 2 min 后，再用不同瓶装的二甲苯透明两次，每次 5 min，最后用中性树胶封片。

(4) 组织切片观察

通过光学显微镜对不同时间点不同材料有无细胞长入、支架降解情况进行观察分析。