

## 丝素蛋白自组装纳米粒的制备、理化表征及细胞相容性研究

闫羽<sup>1,2</sup>, 程佳玲<sup>2</sup>, 刘子晗<sup>2</sup>, 王洪亮<sup>2</sup>, 杨艳芳<sup>2</sup>, 叶军<sup>2</sup>, 蒋伟哲<sup>1\*</sup>, 刘玉玲<sup>2\*</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 本研究旨在制备丝素蛋白纳米粒 (SF-NPs), 并对制备得到的纳米粒的理化性质及细胞相容性进行评价。采用优化简易的去溶剂化法制备 SF-NPs。通过单因素的处方筛选, 如丝素蛋白 (SF) 溶液的浓度、SF 溶液和有机溶剂的比例、超声功率及时间、不同有机相的种类, 优化了制剂处方, 并对最优处方的粒径分布、多分散性指数 (PDI)、zeta 电位、形态及稳定性进行了表征。通过 CCK-8 及细胞活/死染色 Calcein-AM/PI 评估了 SF-NPs 的体外细胞相容性。实验结果表明, 当 SF 浓度为  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、水相和丙酮的体积比为 1:6、超声功率为 80 W、超声时间为 3 min 时, 制备得到的 SF-NPs 最优。本研究制备得到的 SF-NPs 为类球形, 粒径分布狭窄, 平均粒径为 144.8 nm, PDI 为 0.174, zeta 电位为  $-27.35 \text{ mV}$ 。细胞相容性实验结果表明, SF-NPs 具有优异的细胞相容性, 可促进细胞的增殖。综上所述, 通过去溶剂法制备得到 SF-NPs 具有均一的粒径及良好的生物相容性, 在药物递送领域具有较大的应用前景。

**关键词:** 丝素蛋白; 纳米粒; 去溶剂法; 处方筛选; 细胞相容性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2023)12-3715-07

## Preparation, physicochemical characterization and cytocompatibility study of self-assembled silk fibroin nanoparticles

YAN Yu<sup>1,2</sup>, CHENG Jia-ling<sup>2</sup>, LIU Zi-han<sup>2</sup>, WANG Hong-liang<sup>2</sup>, YANG Yan-fang<sup>2</sup>, YE Jun<sup>2</sup>,  
JIANG Wei-zhe<sup>1\*</sup>, LIU Yu-ling<sup>2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Beijing Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This study aimed to prepare silk fibroin nanoparticles (SF-NPs) and assess the physicochemical properties and biocompatibility of the formulation. An optimized and simplified solvent displacement method was employed to obtain SF-NPs. Single-factor prescription screening, such as silk fibroin (SF) solution concentration, the ratio of SF solution to organic solvent, ultrasonication power and time, and different types of organic phases, was used to optimize the formulation. The characterization of the optimal formulation included particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, morphology, and stability. The *in vitro* cell compatibility of the nanoparticles was evaluated using CCK-8 and Calcein-AM/PI cell viability staining. The results showed that when SF concentration was  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , volume ratio of aqueous phase to acetone was 1:6, ultrasonic power was 80 W and ultrasonic time was 3 min, the best SF-NPs was obtained. The nanoparticles prepared in this study exhibit a near-spherical shape, with a uniform size distribution, having an average size of 144.8 nm, a PDI of 0.174, and a

收稿日期: 2023-11-10; 修回日期: 2023-11-17.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304393); 北京市科技新星计划 (Z211100002121127, 20220484219); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2021-I2M-1-026).

\*通讯作者 Tel: 13607713097, E-mail: jiangweizhe6812@163.com;

Tel: 86-10-89285191, E-mail: ylliu@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1273

zeta potential of  $-27.35$  mV. Results from *in vitro* cell experiments demonstrate excellent cell compatibility of SF-NPs, showing the ability to promote cell proliferation. The SF-NPs which were successfully prepared in this study exhibit uniform particle size and excellent biocompatibility.

**Key words:** silk fibroin; nanoparticles; solvent displacement method; prescription screening; cell compatibility

丝素蛋白 (silk fibroin, SF) 是从天然蚕丝中提取出来的一种结构性蛋白质, 由 18 种氨基酸组成<sup>[1]</sup>。它在生物医学和材料科学领域中备受瞩目, 已经成为美国食品和药品监督管理局 (FDA) 批准用于药物递送系统的载体材料<sup>[2]</sup>。SF 作为一种天然的高分子材料, 具有优异的生物相容性、可生物降解性和刺激响应性<sup>[3-5]</sup>, 这些特性也使其成为药物递送领域的研究热点。

SF 是由重链、轻链和 P25 编码的糖蛋白组成, 其中重链是主要的结构支架, 具有多个不同的区段, 这些区段包括亲水嵌段和疏水嵌段, 它们以交替的方式排列<sup>[6,7]</sup>。这一排列形成了 SF 独特的分子结构, 为其性质和功能提供了基础。SF 作为一种载体材料, 可根据需要制备成支架<sup>[8,9]</sup>、薄膜<sup>[10,11]</sup>、纳米粒 (nanoparticles, NPs)、纤维和凝胶<sup>[12]</sup>等各种体系<sup>[13]</sup>, 这种机械性能的可调控性有助于精准控制药物的释放速率和靶向输送。SF 的天然可降解特性和优异的机械性能使其在药物递送载体的设计中具有显著优势, 应用场景十分广泛<sup>[14]</sup>。这些优势包括 SF 的高水溶性、生物可降解性、易于制造和冷冻干燥、较高的药物包封率和载药量、可控的纳米粒大小及缓控释特性<sup>[15-17]</sup>。它可用于小分子药物、蛋白质药物和基因药物的递送。SF 纳米颗粒可以提高药物的吸收和生物利用度, 其降解速率可以通过改变结晶度、分子量或交联度来调节<sup>[18]</sup>。由于 SF 具有活性氨基和酪氨酸残基, 也可对其进行表面功能化修饰<sup>[19]</sup>, 包括电荷反转和特定的靶向配体修饰等<sup>[20]</sup>。SF 纳米粒的制备方法主要包括自上而下法和自下而上法, 前者是将 SF 通过研磨的方法磨碎, 然后喷雾干燥制备而得, 制备方法简单且无须引入有机溶剂, 但制备得到的纳米粒粒径分布宽, 易引入杂质, 载药纳米粒的制备通常不适用于此种方法<sup>[21]</sup>; 后者是利用疏水作用, 促使溶液中的 SF 形成更多反平行  $\beta$ -折叠结构, 从而实现纳米粒的自组装和相分离过程<sup>[7]</sup>。与前者相比, 自下而上的方法应用更为广泛, 制备得到的纳米粒粒径可控且分布狭窄, 药物的包封率高。Sharma 等<sup>[22]</sup>将 SF 加入到丙酮溶液中, 在有机溶剂的诱导下 SF 可迅速自组装成为纳米颗粒。随后, 将制备得到的 SF-NPs 与庆大霉素溶液共混搅拌 12 h, 可获得载庆大霉素的丝素蛋白纳米粒, 制备得到的纳米粒具有良好的抗菌性能。Wu 等<sup>[23]</sup>通过去溶剂法成功制备了载紫杉

醇 (paclitaxel, PTX) 的 SF 纳米粒, 该纳米粒具有较小的粒径, 可降低 PTX 的全身毒性。

基于 SF-NPs 在药物递送领域的应用前景, 本研究采用去溶剂法对 SF-NPs 的制备工艺进行系统考察, 旨在得到一种具有普适性的 SF-NPs 制备方法, 为 SF-NPs 用于药物递送奠定研究基础。作者以平均粒径和分散性指数 (polydispersity index, PDI) 为主要指标, 通过处方工艺筛选, 制备得到了可稳定制备的 SF-NPs, 并对最优处方制备的 SF-NPs 的粒径、PDI、zeta 电位、纳米粒的形态及稳定性进行了表征。为考察 SF-NPs 的细胞相容性, 以 L929 和 4T1 细胞为典型代表, 通过 CCK-8 及细胞活/死染色 Calcein-AM/PI 方法评估了 SF-NPs 对细胞增殖能力的影响, 发现 SF-NPs 具有优异的细胞相容性, 可促进细胞增殖。本研究结果表明, 采用去溶剂制备方法可以制备得到粒径可控且重现性良好的 SF-NPs, 其良好的细胞生物相容性也为其用于药物递送奠定良好的基础。

## 材料与方法

**材料** SF (批号: 22102801) 购自中芯创惟生物科技 (杭州) 有限公司; CCK-8 试剂盒 (批号: 20231114) 购自索莱宝; 小鼠成纤维细胞 L929 和小鼠乳腺癌细胞 4T1 由中国医学科学院药物研究所提供。

**仪器** 激光粒度分析仪 (Zeta Potential/Particle Sizer NICOMP™380ZLS, 美国); 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) (JEM-1400Plus, 日本); 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) (Thermoscientific ApreoS, FEI); 微粒递送系统稳定性分析仪 (Tower, 法国)。

**SF-NPs 的制备** 在去离子水中完全溶解一定浓度的 SF, 然后充分水化, 以获得 SF 溶液 ( $5\sim 40$  mg·mL<sup>-1</sup>)。随后, 在缓慢搅拌的同时, 将 SF 溶液滴入不同体积的丙酮溶液中, 混合后观察到混合物迅速转变为白色乳浊液。将取得的乳液继续涡旋 30 s, 然后置于冰浴中, 以 80 W 的功率进行 3 min 的超声振荡, 随后以 500 r·min<sup>-1</sup> 的速度搅拌 2 h。接下来, 通过在 10 000 r·min<sup>-1</sup> 的转速下离心 10 min, 收集 SF-NPs, 并进行 3 次水洗, 最后冻干保存。

## SF-NPs 影响因素的考察

**SF 浓度的考察** 按照 SF-NPs 的制备方法, 考察

不同浓度的 SF (5、10、15、20、30、40 mg·mL<sup>-1</sup>) 对形成 SF-NPs 粒径及 PDI 的影响, 其中 SF 溶液和丙酮的比例为 1:6。

**水相与有机相比例的考察** 按照 SF-NPs 的制备方法, 考察不同体积的丙酮 (2、4、6、8、10、20 mL) 对形成 SF-NPs 粒径及 PDI 的影响, 其中 SF 的浓度为 20 mg·mL<sup>-1</sup>。

**超声功率及时间考察** 按照 SF-NPs 的制备方法, 保持 SF 浓度为 20 mg·mL<sup>-1</sup>, 水相与丙酮的体积比为 1:6, 考察不同的超声功率 (60、80、120 W) 及超声时间 (3 和 6 min) 对形成 SF-NPs 粒径及 PDI 的影响。

**不同有机相种类考察** 在实验中, SF 溶液与有机溶剂的体积比通常会对 SF-NPs 的形成过程产生影响。因此, 以甲醇、丙酮、无水乙醇、异丙醇为有机溶剂, 探讨不同种类的有机溶剂对 SF-NPs 粒径及 PDI 的影响。

### SF-NPs 制剂的表征

**形态、粒径的考察** 根据 SF-NPs 影响因素的考察筛选出的最佳条件, 取 SF-NPs 适量, 用水稀释后, 采用激光粒度仪测定其粒径、zeta 电位和 PDI; 另外, 将已经稀释好的 SF-NPs 混悬液滴于铜网上, 通过醋酸铀染色, 并用滤纸将多余的染色液吸除, 在室温状态下自然干燥后, 采用 TEM 进行观察; 此外, 取已经冻干好的 SF-NPs 颗粒, 在 15 kV 的二次电子模式下获得图像。将分散体沉积在铜片上, 通过 SEM 观察其表面形貌。

**稳定性考察** 采用法国的微粒递送系统稳定性分析仪测定 SF-NPs 的稳定性; 将样品置于样品瓶中, 4 °C 下测定, 每 30 min 扫描 1 次, 连续测定 5 天; 测定完成后, 观察样品状态, 并恢复温度至 25 °C, 继续扫描并连续测定 5 天, 分析数据。

### SF-NPs 体外细胞实验

**L929 细胞培养** 小鼠成纤维细胞 L929 使用含有 10% 马血清、1% 的链霉素和青霉素的高糖 DMEM 培养基, 置于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 定期换液、传代, 取对数生长期细胞进行实验。

**4T1 细胞培养** 小鼠乳腺癌 4T1 细胞使用含有 10% 胎牛血清、1% 的链霉素和青霉素的高糖 DMEM 培养基, 置于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 定期换液、传代, 取对数生长期细胞进行实验。

**CCK-8 法测定 L929 和 4T1 细胞的增殖能力** 96 孔细胞培养板铺板, 每组设 6 个复孔, 调整 L929 细胞密度为 2×10<sup>3</sup> 个, 调整 4T1 细胞密度为 3×10<sup>3</sup> 个, SF-NPs 混悬液浓度设为 0.1、1、5、10、50、100 μg·mL<sup>-1</sup>, 当 L929 细胞或 4T1 细胞与 SF-NPs 共培养 72 h 后, 通过 CCK-8 法测定并通过细胞活/死染色 Calcein-AM/PI 定性分析 SF-NPs 对两种细胞增殖能力的影响。

## 结果

### 1 SF-NPs 影响因素的考察

SF 在与水互溶的有机溶剂、不同 pH 值和超声等外界条件下能够通过诱导分子间自组装形成稳定的、不溶于水的沉淀<sup>[24]</sup>。本实验中, 通过改变 SF 浓度、有机相种类、水相与有机相的体积比以及超声功率及时间, 来考察对 SF-NPs 理化性质的影响。

**1.1 SF 浓度的考察** 如图 1 所示, 随着 SF 浓度的增大 (5~40 mg·mL<sup>-1</sup>), SF-NPs 粒径有增大的趋势, 但低浓度的 SF 相比较于高浓度的 SF, PDI 更大。考虑原因可能是因为粒子越小, 越容易聚集, 从而导致 PDI 越大。为了确保纳米粒具有合适的粒径与较小的 PDI, 故选择 20 mg·mL<sup>-1</sup> SF 作为 SF-NPs 的制备条件。

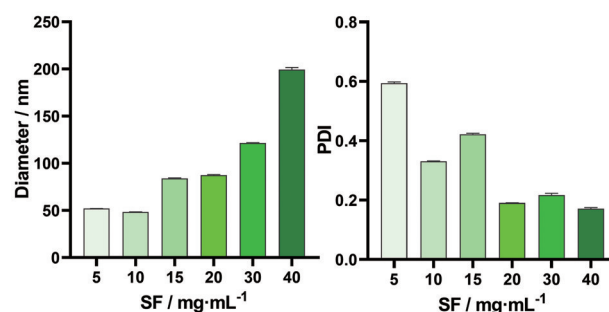


Figure 1 Effects of silk fibroin (SF) solution on the properties of silk fibroin nanoparticles (SF-NPs) ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ ). PDI: Polydispersity index

**1.2 水相与有机相比例的考察** 实验中, SF 与有机溶剂的体积比通常会影响 SF-NPs 的形成过程。为此, 以丙酮为有机溶剂, 探讨了不同体积的丙酮对形成 SF-NPs 的影响。如图 2 所示, 当 SF 与丙酮的体积比较小时 (1:2), 形成的 SF-NPs 粒径较大, PDI 也较大, 考虑原因可能是因为当把 SF 溶液加入到有机溶剂丙酮中, 在有机溶剂的诱导下, SF 可马上分散脱水并自组装形成 SF-NPs。当有机溶剂比例过低时, 不足以将 SF 完全诱导形成纳米粒; 当增大 SF 与丙酮的体积比到 1:4 时, 得到的 SF-NPs 粒径减小, PDI 也有所降低; 当继续增大二者的比例, 发现当 SF 与丙酮的体积比为 1:6 或 1:10 时, 得到的纳米粒粒径与 PDI 均较小, 虽然 1:8 的体积比形成的 SF-NPs 粒径更小, 但 PDI 略大; 为了确保 SF 能被充分地诱导, 且无需引入过多的有机溶剂, 故选择 1:6 的水相与有机相比例作为 SF-NPs 的制备条件。

**1.3 超声功率及时间的考察** 制备方法中超声功率及时间对形成 SF-NPs 的影响, 如图 3 所示, 控制超声时间不变 (3 min), 当超声功率为 80 W 时, 形成的 SF-NPs 粒径和 PDI 相比于低功率 (60 W) 而言, 均有降低

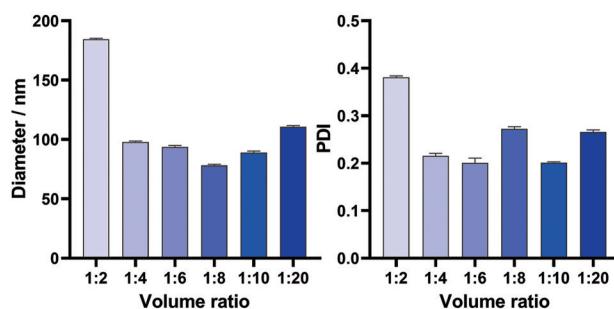


Figure 2 Effects of volume ratio of acetone on the properties of SF-NPs ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

的趋势,当增大超声功率到 120 W 时,对 SF-NPs 的粒径并没有很好的改善作用, PDI 变化也并不显著;当延长超声时间到 6 min 时,随着功率的增大,形成的 SF-NPs 粒径有增大的趋势,而 80 W 制备得到的纳米粒 PDI 更小。为了确保制备得到的纳米粒具有较小的粒径和 PDI,故选择超声功率 80 W 作为 SF-NPs 的制备条件;当延长超声时间时,制备得到的纳米粒 PDI 虽然有降低的趋势,但粒径反而增大。表明当超声诱导 SF 的二级结构从 silk 1 向 silk 2 转变时,不宜使用过高的超声功率和超声时间。因此,选择超声功率 80 W、超声时间 3 min 作为 SF-NPs 的制备条件。

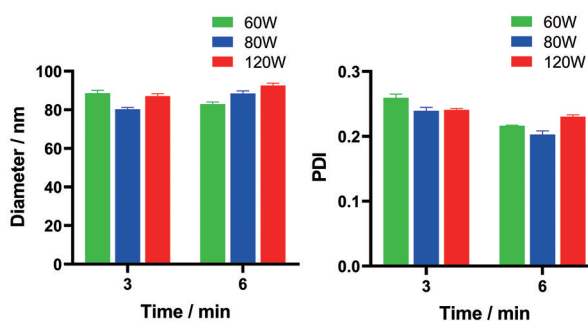


Figure 3 Effects of ultrasonic power and ultrasonic time on the properties of SF-NPs ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

**1.4 有机相种类的考察** SF 在与水互溶的有机溶剂中可自组装形成 SF-NPs,因此探讨了甲醇、丙酮、乙醇、异丙醇对形成 SF-NPs 的影响。当以异丙醇作为有机溶剂时,形成的 SF-NPs 粒径较大;当以甲醇作为有机溶剂时,形成的 SF-NPs PDI 较大,粒子分散性较差;当以丙酮作为有机溶剂时,形成的 SF-NPs 粒径较小,粒子更稳定、不容易聚集(图 4)。因此,选择丙酮作为后续 SF-NPs 的制备条件。

## 2 SF-NPs 制剂的表征

**2.1 形态、粒径的考察** SF 的分子结构具有高度有序性,它由重链(390 kDa)、轻链(25 kDa)和一个由 P25 基因编码的糖蛋白(27 kDa)所组成。其重链由非重复

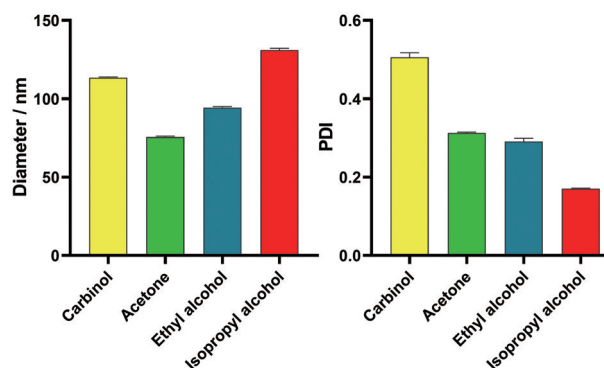


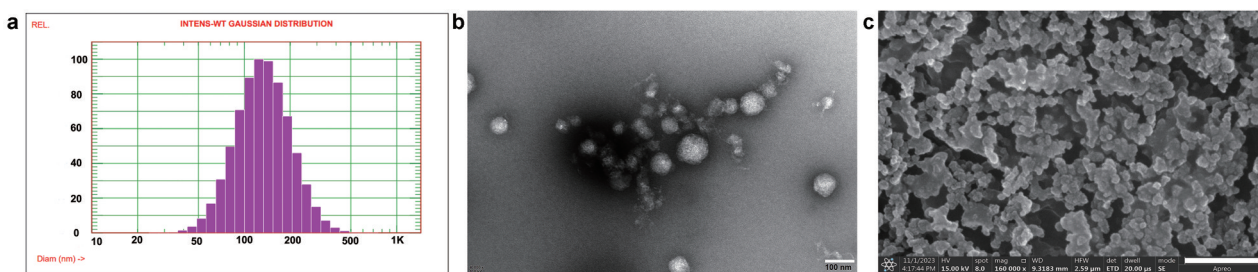
Figure 4 Effects of organic facies species on the properties of SF-NPs ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

序列组成,包括亲水嵌段和具有六肽单元(GAGAGS、GAGAGY)的疏水嵌段,它们交替排列,决定了 SF 的性质。在本研究中,以 SF 为载体材料,通过温和的去溶剂法以自组装的方式制备了 SF-NPs。结果显示,制备得到的 SF-NPs 呈乳白色混悬液,表现为单分散状态,并且没有明显可见的沉淀产生。DLS 结果表明(图 5a),制备得到的 SF-NPs 分布均一,平均粒径为 144.8 nm, PDI 为 0.174, zeta 电位为 -27.35 mV。此外应用透射电镜和扫描电镜来观察 SF-NPs 的形貌(图 5b、c), SF-NPs 明显显示出了粒径小于 100 nm 的类球形状态。通过动态光散射(dynamic light scattering, DLS)和 TEM/SEM 测量得到的 SF-NPs 粒径有明显差别,这是因为纳米粒子在水中会遇水膨胀,所以通过 DLS 测量得到的粒径会偏大,而在 TEM/SEM 制样过程中纳米粒会失水收缩,所以测量得到的粒径会变小。

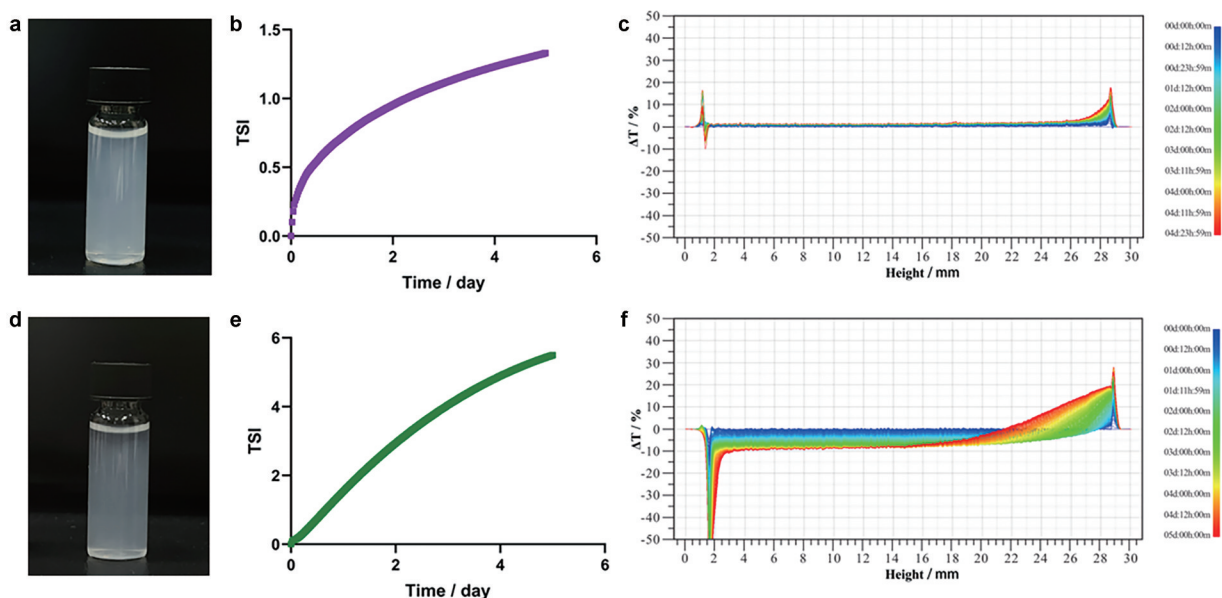
**2.2 稳定性考察** 采用法国的微粒递送系统稳定性分析仪测定 SF-NPs 的稳定性,结果如图 6 所示,测定前观察样品状态(图 6a),纳米混悬液呈单分散状态,无明显沉淀产生;在 4 °C 条件下连续测定 5 天的稳定性(图 6b、c),动力学不稳定指数(Turbiscan stability index, TSI)较低,表明 SF-NPs 较为稳定,测定结束后取出样品观察(图 6d),未观察到明显的沉淀沉积现象。此外,升高温度,继续测定了 SF-NPs 在 25 °C 下的稳定性(图 6e、f),TSI 有缓慢升高的趋势,表明 SF-NPs 的稳定性逐渐减弱,低温更适合 SF-NPs 的保存。

## 3 SF-NPs 体外细胞实验

使用 CCK-8 试剂盒测定了 SF-NPs 对 L929 和 4T1 细胞活力的作用效果,各组加入纳米粒的浓度分别为 0.1、1、5、10、50、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,在与细胞作用 72 h 后,检测该浓度范围内 SF-NPs 对细胞存活的影响。L929 细胞结果如图 7a 所示,在 SF-NPs 与 L929 细胞共培养 72 h 后,所有实验组的细胞存活率均在 90% 以上,且表



**Figure 5** Study on morphology and particle size of SF-NPs. a: Particle size diagram of SF-NPs; b: Transmission electron microscope characterization of SF-NPs (bar: 100 nm); c: Scanning electron microscope characterization of SF-NPs (bar: 500 nm)



**Figure 6** Stability investigation of SF-NPs. a: State of SF-NPs at 4 °C; b: Time variation trend of TSI of SF-NPs at 4 °C; c: Transmission light reference spectrum of SF-NPs at 4 °C; d: The status of SF-NPs after the determination; e: Time variation trend of TSI of SF-NPs at 25 °C; f: Transmission light reference spectrum of SF-NPs at 25 °C. TSI: Turbiscan stability index

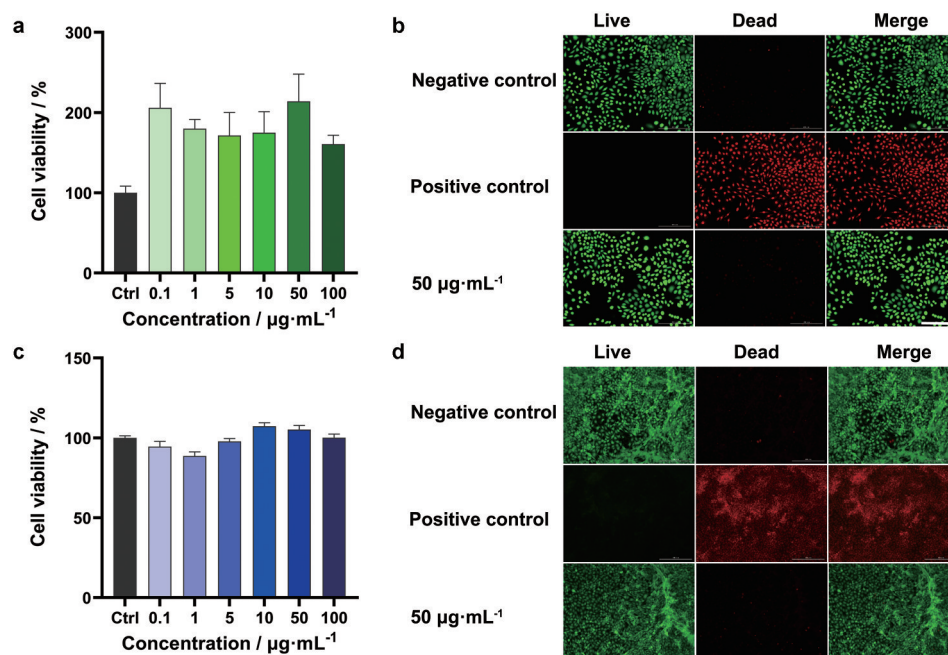
现出一定程度的促增殖作用。此外, 还通过细胞活/死染色 Calcein-AM/PI 试剂盒定性观察了在  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  下, SF-NPs 对细胞增殖的影响, 在该浓度下, L929 细胞生长状态较好, 细胞增殖没有受到抑制 (图 7b); 4T1 细胞结果如图 7c 所示, 当 SF-NPs 与 4T1 细胞共培养 72 h 后, 各实验组的细胞生长状态较好, 尤其是高浓度的 SF-NPs 更能促进 4T1 细胞的增殖。通过细胞活/死染色 Calcein-AM/PI 试剂盒定性观察了 SF-NPs 对细胞增殖的影响 (图 7d), 在  $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度下, SF-NPs 对 4T1 细胞起到促增殖作用, 细胞增殖没有受到抑制。总体而言, SF 在生物相容性方面表现出优越的特性, 使其成为潜在的药物递送载体。

## 讨论

随着药物递送系统的迅速发展, 对药物的有效性评价除了考虑其治疗效果之外, 还需要考虑药物带来

的不良反应<sup>[25,26]</sup>。SF 来源于蚕丝, 经过适当的处理后, 通常不含有害物质。因此, 它对细胞和组织具有低毒性, 这也使其成为理想的药物递送系统材料<sup>[27]</sup>。广泛的研究显示, SF 适用于输送小分子、多肽、蛋白质和核酸类药物, 有效提高了药物的包封效率和稳定性、调控药物释放以及降低不良反应。总体而言, 基于 SF 的纳米药物设计在药物递送方面有着广阔的发展前景。

在本项研究中, 以 SF 为载体材料, 通过去溶剂法成功制备了 SF-NPs, 该制备方法快速简单、重现性好。在处方筛选过程中, 发现高浓度的 SF 制备得到的 SF-NPs 粒径较大, 较低浓度的 SF 制备得到的 SF-NPs 虽粒径较小, 但 PDI 较大, 因此选择了  $20 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 SF 作为后续的处方筛选。在比较不同比例的丙酮对 SF-NPs 形成的影响中, 发现 SF 只有在过量丙酮诱导的条件下才能形成纳米沉淀, 但较高体积的丙酮对 SF-NPs 的粒径和 PDI 无明显影响。为了减少有机相的比例,



**Figure 7** Evaluation of cytocompatibility of SF-NPs. a: Effects of different concentrations of SF-NPs on the proliferation capacity of L929 cells ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ); b: The effect of SF-NPs ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) on cell viability was observed by live-dead staining kit of L929 cells (bar: 200  $\mu\text{m}$ ); c: Effects of different concentrations of SF-NPs on the proliferation capacity of 4T1 cells ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ ); d: The effect of SF-NPs ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) on cell viability was observed by live-dead staining kit of 4T1 cells (bar: 200  $\mu\text{m}$ )

故选择 1:6 的比例作为后续的处方筛选。作者还考察了超声功率和超声时间对形成 SF-NPs 的影响, 结果表明超声功率和时间不宜过大, 适中的超声功率和时间可形成粒径较小且更均一的 SF-NPs。此外, 由于 SF 在与水互溶的有机溶剂中可自组装形成 SF-NPs, 也考察了不同有机相的种类对形成 SF-NPs 的影响, 发现以丙酮作为有机溶剂可形成粒径较小且更均一的 SF-NPs。对制备得到 SF-NPs 进行表征, 该纳米粒粒径分布均匀, 平均粒径为 144.8 nm, PDI 为 0.174, zeta 电位为  $-27.35 \text{ mV}$ 。TEM/SEM 结果表明 SF-NPs 形貌呈类球形状, 由于制样过程中纳米粒会失水收缩, 所以测量得到的粒径会变小。稳定性结果表明, 制备得到的 SF-NPs 前期较为稳定, 后期会有少量沉淀蓄积。

经生物安全性评价发现, 本研究制备得到的 SF-NPs 与 L929 和 4T1 细胞具有较好的相容性, 即使是纳米粒子与细胞共培养 72 h 后, 也未表现出明显的细胞毒性, 且具有一定的促增殖作用, 表明了 SF 生物相容性良好, 可作为潜在的药物递送载体。

综上所述, 本研究采用去溶剂制备方法可以制备得到粒径可控且重现性良好的 SF-NPs, 其良好的细胞生物相容性也为其用于药物递送奠定良好的基础。但本研究是从空白 SF-NPs 的角度出发, 未来还需从载药水平深入探讨载药 SF-NPs 的药物递送优势。

**作者贡献:** 闫羽负责完成空白纳米粒处方筛选及表征; 程佳玲负责完成细胞实验; 刘子晗负责协助完成空白纳米粒的表征; 王洪亮、杨艳芳、叶军参与文章修改; 蒋伟哲和刘玉玲提出研究方案并指导完成实验和文章撰写。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 401-416.
- [2] Melke J, Midha S, Ghosh S, et al. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering [J]. *Acta Biomater*, 2016, 31: 1-16.
- [3] Maitz MF, Sperling C, Wongpinyochit T, et al. Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13: 2633-2642.
- [4] Wongpinyochit T, Johnston BF, Seib FP. Degradation behavior of silk nanoparticles-enzyme responsiveness [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2018, 4: 942-951.
- [5] Gou SQ, Huang Y, Wan Y, et al. Multi-bioresponsive silk fibroin-based nanoparticles with on-demand cytoplasmic drug release capacity for CD44-targeted alleviation of ulcerative colitis [J]. *Biomaterials*, 2019, 212: 39-54.
- [6] Nguyen TP, Nguyen QV, Nguyen VH, et al. Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: a review [J]. *Polymers (Basel)*, 2019, 11: 1933.
- [7] Pham DT, Tiyaboonchai W. Fibroin nanoparticles: a promising

- drug delivery system [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27: 431-448.
- [8] Guo P, Du P, Zhao P, et al. Regulating the mechanics of silk fibroin scaffolds promotes wound vascularization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 574: 78-84.
- [9] Hodgkinson T, Yuan XF, Bayat A. Electrospun silk fibroin fiber diameter influences *in vitro* dermal fibroblast behavior and promotes healing of *ex vivo* wound models [J]. *J Tissue Eng*, 2014, 5: 2041731414551661.
- [10] Gil ES, Panilaitis B, Bellas E, et al. Functionalized silk biomaterials for wound healing [J]. *Adv Healthc Mater*, 2013, 2: 206-217.
- [11] Sugihara A, Sugiura K, Morita H, et al. Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, 225: 58-64.
- [12] He X, Liu XZ, Yang J, et al. Tannic acid-reinforced methacrylated chitosan/methacrylated silk fibroin hydrogels with multifunctionality for accelerating wound healing [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 247: 116689.
- [13] Zhou ZY, Cui J, Wu S, et al. Silk fibroin-based biomaterials for cartilage/osteocondral repair [J]. *Theranostics*, 2022, 12: 5103-5124.
- [14] Totten JD, Wongpinyochit T, Seib FP. Silk nanoparticles: proof of lysosomotropic anticancer drug delivery at single-cell resolution [J]. *J Drug Target*, 2017, 25: 865-872.
- [15] Qu J, Liu Y, Yu YN, et al. Silk fibroin nanoparticles prepared by electrospray as controlled release carriers of cisplatin [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 44: 166-174.
- [16] Pham DT, Saelim N, Tiyaboonchai W. Alpha mangostin loaded crosslinked silk fibroin-based nanoparticles for cancer chemotherapy [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 181: 705-713.
- [17] Li H, Tian J, Wu AQ, et al. Self-assembled silk fibroin nanoparticles loaded with binary drugs in the treatment of breast carcinoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 4373-4380.
- [18] Horan RL, Antle K, Collette AL, et al. *In vitro* degradation of silk fibroin [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 3385-3393.
- [19] Subia B, Chandra S, Talukdar S, et al. Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery [J]. *Integr Biol (Camb)*, 2014, 6: 203-214.
- [20] Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications [J]. *J Control Release*, 2011, 150: 128-141.
- [21] Rajkhowa R, Wang L, Kanwar J, et al. Fabrication of ultrafine powder from eri silk through attritor and jet milling [J]. *Powder Technol*, 2009, 191: 155-163.
- [22] Sharma S, Bano S, Ghosh AS, et al. Silk fibroin nanoparticles support *in vitro* sustained antibiotic release and osteogenesis on titanium surface [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12: 1193-1204.
- [23] Wu PY, Liu Q, Li RT, et al. Facile preparation of paclitaxel loaded silk fibroin nanoparticles for enhanced antitumor efficacy by locoregional drug delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5: 12638-12645.
- [24] Lohcharoenkal W, Wang LY, Chen YC, et al. Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 180549.
- [25] Li C, Wang JC, Wang YG, et al. Recent progress in drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 1145-1162.
- [26] Su HY, Wang Y, Liu S, et al. Emerging transporter-targeted nanoparticulate drug delivery systems [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 49-58.
- [27] Al Saqr A, Wani SUD, Gangadharappa HV, et al. Enhanced cytotoxic activity of docetaxel-loaded silk fibroin nanoparticles against breast cancer cells [J]. *Polymers (Basel)*, 2021, 13: 1416.