

丝素蛋白材料在组织工程中的新进展*☆

谢敏凯, 徐月敏

文章亮点: 总结丝素蛋白作为支架在生物材料和组织工程领域的应用和发展: 以丝素蛋白支架为载体, 通过多种方式添加各种生物制剂, 比如各种生长因子和细胞因子, 进一步扩大丝素蛋白在组织工程中的应用范围。

关键词: 丝素蛋白; 组织工程; 生物材料; 支架材料; 综述文献

摘要

背景: 丝素蛋白支架已被建议运用在组织工程骨和软骨重建、肌腱重建、血管重建、神经重建以及膀胱重建等各方面。

目的: 总结丝素蛋白作为支架在生物材料和组织工程领域的应用与发展。

方法: 由第一作者应用计算机检索 PubMed 数据库及中国期刊数据库 2000 年 1 月至 2011 年 11 月有关丝素蛋白支架制备工艺, 丝素蛋白支架修饰方法及丝素蛋白在组织工程中的应用等方面的文献。

结果与结论: 丝素蛋白具有机械强度高、生物降解性慢、生物相容性良好、制备工艺多样等特点, 支持多种细胞黏附、分化和生长, 可应用于人工韧带、血管、骨、神经组织等方面。近期以丝素蛋白支架为载体, 通过多种方式添加各种生物制剂, 比如各种生长因子和细胞因子, 进一步扩大丝素蛋白在组织工程中的应用范围。

A new development of silk fibroin scaffolds in tissue engineering

Xie Min-kai, Xu Yue-min

Abstract

BACKGROUND: Silk fibroin scaffolds have been recommended to use in tissue-engineered bone and cartilage, tendon, vessel, nerve, and bladder.

OBJECTIVE: To summarize the application and current development of silk fibroin scaffolds in the fields of biomaterials and tissue engineering.

METHODS: An online search was conducted by the first author in PubMed database and CNKI database to identify the articles related to silk fibroin scaffold preparation technique, modification of silk fibroin and silk fibroin tissue engineering published from January 2000 to November 2011.

RESULTS AND CONCLUSION: Silk fibroin scaffolds has excellent mechanical strength, slow biodegradability, superior biocompatibility and processability. And they can support various cells to attach, differentiate and grow. The scaffolds have been applied in tissue engineering studies, such as artificial ligament, blood vessels, bone, nerve tissue and so on. To date, diverse biologicals, such as growth factors or cytokines, were incorporated therein silk fibroin scaffolds, to further expand the application range in tissue engineering.

Xie MK, Xu YM. A new development of silk fibroin scaffolds in tissue engineering. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(43): 8105-8110.

0 引言

组织工程是目前富有前景的生理性修复技术, 主要包涵了生物支架材料、种子细胞、生物活化因子及 3 者的有机组合, 其中生物支架材料的主要作用是为种子细胞附着、生

长、增殖和新陈代谢提供适宜的微环境, 自身会逐步降解吸收, 最终被新生组织所替代。生物支架材料的结构可以引导组织工程器官的构建, 提供机械支持来对抗体内张力, 使器官按照预定的结构生长。此外, 还可以通过各种方式加载各种药物, 比如各种生长因子以及细胞因子等, 进一步拓宽其应用范

上海交通大学附属第六人民医院泌尿外科, 上海市 200233

谢敏凯☆, 男, 1985 年生, 浙江省永嘉市人, 汉族, 上海交通大学在读博士, 主要从事泌尿系统组织工程方面的研究。
xieminkai@hotmail.com

通讯作者: 徐月敏, 博士, 主任医师, 主任, 博士生导师, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院泌尿外科, 上海市 200233
xuyuemin@263.net

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)43-08105-06

收稿日期: 2012-01-07
修回日期: 2012-02-16
(20111108021/GW·W)

Department of Urology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China

Xie Min-kai☆, Studying for doctorate, Department of Urology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
xieminkai@hotmail.com

Corresponding author: Xu Yue-min, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Urology, Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China
xuyuemin@263.net

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81170641*

Received: 2012-01-07
Accepted: 2012-02-16

围以及提升效果。丝素蛋白生物相容性好, 生物分解时间长, 赋有卓越的机械性质, 其加工工艺多样化, 形态多样化。以上多种独特性质使丝素蛋白成为组织工程支架材料的选择之一, 其还被证明可以运载和保持蛋白的活性。新的制备技术, 比如丝素蛋白水溶液工艺等扩大了其应用范围。丝素蛋白支架已经被建议运用在组织工程骨和软骨重建、肌腱重建、血管重建, 神经重建以及膀胱重建等各方面。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者应用计算机检索 PubMed 2000 年 1 月至 2011 年 11 月相关文章, 检索词为 “tissue engineering, biomaterials, silk, silk fibroin, scaffolds”, 并限定语言种类为 “English”; 同时检索中国期刊数据库 2000 年 1 月至 2011 年 11 月的相关文章, 检索词为 “组织工程, 支架材料, 丝素蛋白, 组织重建”, 并限定文章语言种类为中文。

1.2 入选标准

纳入标准: 选择文章内容与丝素蛋白组织工程支架相关, 同一领域文献则选择近期发表或发表在权威杂志文章。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取 计算机初检得到 78 篇文献, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究 28 篇, 共保留其中的 50 篇归纳总结。

1.4 质量评价 符合纳入标准的 50 篇文献中, 文献[1-30]探讨了丝素蛋白的理化性质, 文献[31-34]探讨了丝素蛋白支架的消毒灭菌方法, 文献[35-50] 探讨有关丝素蛋白支架的制备工艺, 对丝素蛋白支架的修饰方法。

2 结果

丝素蛋白可来源于多种昆虫和蜘蛛。典型的丝素蛋白来源于家蚕, 一条重链(-325 kda), 一条轻链(-25 kda), 通过 S-S 键结合组成。丝胶蛋白包裹于丝素蛋白表面,

丝胶能引起免疫反应, 但是, 丝胶蛋白水溶性好的多, 可被碱性溶液轻易去除^[1]。丝素蛋白的重链包含交替的亲水区和疏水区, 疏水区包含高度保守的 GAGAGS 序列和相对低保守的 GAGAGX, 两者一起构建丝素蛋白的 β 折叠结构, 亲水部分序列较短且没有重复^[2]。丝素蛋白由氨基酸构成, 为化学修饰提供可能。比如, 来自天冬氨酸和谷氨酸通过羧基侧链可与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽(RGD)以及骨形成蛋白 2 的氨基共价结合^[3-4], 有学者尝试利用生物素和亲和素之间特有的高度亲和性, 将所需的药物或者是蛋白质复合在丝素蛋白支架上, 他们先将亲和素与丝素蛋白上的羧基共价结合, 再将需要的添加物生物素化^[5]。这进一步扩大了可与丝素蛋白共价或者非共价结合的药物或蛋白质种类, 拓展了丝素蛋白功能范围。

2.1 丝素蛋白的物理特性

相对分子质量: 聚合物的相对分子质量对其机械特性和生物降解性有很大影响, 一般来讲, 相对分子质量大, 其机械性能较强, 生物降解较慢。天然丝素蛋白相对分子质量较大, 相对分子质量小些的可以通过对丝素蛋白的处理获得, 比如, 延长蚕茧在 Na_2CO_3 溶液煮沸的时间, 能使丝素蛋白不同程度水解, 获得较小相对分子质量的丝素蛋白, 可是这种方式难以监测, 可控性较差, 而且引起较大的相对分子质量分布。要得到各种相对分子质量丝素蛋白还可以通过在不同温度的丝素蛋白水溶液中添加 NaOH 或者酶进行水解^[6-7], 但是, 作为支架材料, 一般需要强化其机械强度, 故很少通过改变相对分子质量调节支架物理属性。

丝素蛋白晶体化及其水溶性: 丝素蛋白的结晶区由丝素蛋白 β 折叠结构组成。通过不同处理方式, 使可溶于水的无规卷曲和不稳定的 I 型结构转变为含较多 β 折叠结构的 II 型结构, 这样的结构稳定, 不溶于水。增加 β 折叠结构的常见方法为醇处理, 其他方法包括高温处理^[8], 使溶液 pH 值接近丝素蛋白的等电位点(≈ 4), 各种盐的使用及剪切力施用等^[9-10], 但是, 敏感的添加物, 比如生长因子等, 要与丝素蛋白结合就需要比较温和的条

件, 在水蒸汽中暴露的湿处理方法可能是这样的选择之一^[11], 另一种方式可能是进行缓慢的冰冻($>-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), 也可增加基于 β 结构的丝素蛋白晶体化^[12]。

研究发现, 虽然结构晶体化是丝素蛋白稳定的基础, 但是过快的结晶化会减少材料的弹性, 使材料过脆。在水中退火或水蒸气湿处理的丝素蛋白较甲醇处理的有较好弹性^[13]。对两者的构象分析显示, 经水蒸气湿处理过的丝素蛋白材料 II 型结构的比例为 30%–47%, 经甲醇处理过的 II 型结构为 74%^[11], 最近报道一种处理时间相关性 β 结构增加的方法: 可将丝素蛋白置于饱和 NaCl 溶液中 1, 4, 15 h 分别得到 β 结构为 34%, 51%, 67%的丝素蛋白, 而丝素蛋白颗粒甲醇处理 30 min 得到的丝素蛋白材料 β 结构占 58%^[14]。

溶解性: 通常用高浓度的溴化锂、硫氰酸锂、硫氰酸钙、氯化钙溶液溶解丝素蛋白, 以上的电解质溶液能够维持破坏 β 结构的氢键^[15]。丝素蛋白在上面提及的电解质溶液溶解后在水或是缓冲液中进行透析, 去除电解质。得到的丝素蛋白水溶液经冻干, 冻干后干燥的丝素蛋白可溶解于六氟异丙醇^[16]。但六氟异丙醇是一种昂贵且对细胞有毒害作用的溶剂, 丝素蛋白全水溶液的制备方式提供一个相对温和的条件, 水溶液有几点好处: 溶解蛋白质等添加物, 制孔剂; 水溶液的丝素蛋白可过滤消毒; 以及没有有机溶剂残留^[17]。但是丝素蛋白水溶液也有问题存在, 因为分子间的作用, 丝素蛋白相互聚集, 丝素蛋白会以富含 β 结构的 2 型丝素蛋白沉淀下来, 未行处理的丝素蛋白水溶液一般在 1 个月内凝胶化。最近发现, 通过重氮偶联反应使 4-磺胺酸修饰丝素蛋白上的酪氨酸残基, 可以在 1 年内有效预防丝素蛋白聚集沉淀, 而且磺酸化丝素蛋白经甲醇处理后仍然能够形成 β 折叠结构^[18]。

稳定性: 未经后处理的丝素蛋白基质 β 折叠结构含量较少, 仍旧吸水, 对湿度敏感。研究已经证实在水蒸汽中进行湿处理可以增加丝素蛋白中的 β 折叠结构^[11], 丝素蛋白表现出异乎寻常的热稳定性, 当温度达到 $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 实质上结构并没有受到影响。蛋白质玻璃相变温度通常被考虑为蛋白质性质改变的上限温度, 来自家蚕的丝素蛋白膜玻璃转化相温度为 $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右^[17], 低温玻璃相转变温度在 $-34\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间^[19]。

机械特性: 源自高分子聚合物的支架材料, 包括 PLGA、壳聚糖作为支架材料缺乏足够的机械强度^[20]。各种组织重建中都需要支架材料承当一定的机械力,

特别是在骨软骨修复运用中。胶原的机械强度相当有限, 除非交联, 但是交联作用可能对临近组织有不良影响^[21], 比如说炎症反应和细胞毒性作用^[22], 与此相反, 晶体化丝素蛋白呈现卓越的机械特性, 且并不需要交联。在骨相关组织工程重建研究中, 与多孔降解高分子聚合物(壳聚糖、胶原、透明质酸)比较, 丝素蛋白水溶液制备的支架材料有想好的机械性能^[23]。研究证明: 伴随着丝素蛋白溶液浓度增加, 孔隙大小减小, 孔隙分布均匀, 丝素支架的抗压缩力以及杨氏系数进一步改善^[23]。当然丝素蛋白支架的机械强度与制备工艺有很大关系, 比如气体泡沫法丝素蛋白支架比盐溶沥法的压缩强度及杨氏模型要强^[19]。

生物降解性: 材料的生物降解性必须与生物体内的重建和修复过程相协调。之前使用的高分子聚合物一般降解较快, 况且某些聚合物的水解产物, 比如广泛使用的 PLGA, 产生酸性成分, 降低局部的 pH 值, 会引起植入部分及其临近部分组织炎症反应^[24]。研究证明水蒸气处理过的丝素蛋白支架在体外的无蛋白水解酶参与情况下 7 周内质量仅减少 4%^[25]。作为蛋白质, 丝素蛋白的水解产物没有毒性。

丝素蛋白的生物降解性与其 β 折叠结构直接相关, 支架中丝素蛋白 β 结构含量越高, 其降解速度越慢^[13]。有学者进一步将丝素蛋白水溶液及丝素蛋白六氟异丙醇溶液制备的三维支架材料种植到小鼠体内, 比较两者的生物降解性, 6 个月后丝素蛋白水溶液来源的丝素蛋白材料完全降解, 六氟异丙醇来源的支架材料仍旧存在^[26]。此外, 提高丝素蛋白溶液浓度延长丝素蛋白降解时间^[26], 有报道称基因工程产物 SELPs 通过改变聚合物的构象和排序可以控制丝素蛋白的水解速度^[27]。

生物相容性: 丝素蛋白已经被证实比大部分现有聚合物材料有更好的生物相容性, 丝素蛋白水溶液及丝素蛋白六氟异丙醇溶液来源的支架植入小鼠 1 年, 宿主免疫反应是轻微和局部的^[28]。这和丝素蛋白膜的研究相一致。

材料孔隙大小及孔隙率: 孔隙率和材料的机械性能及生物降解能力有关, 一般来说, 支架材料孔隙越小, 孔隙大小均匀, 则材料的机械性能越好, 降解越慢^[23], 另一方面, 材料有一定孔隙及孔隙率, 能够模拟细胞生长环境, 利于细胞对营养物质吸收, 代谢物排除。此外, 后处理影响孔隙大小和孔隙率。其中对制备完成后的支架材料进行冻干是常见方法, 此方法比较温和, 并帮助材料形成多孔结构^[29]。有研究报道不同

的冻干温度影响丝素蛋白的空隙大小和孔隙率。高浓度的丝素蛋白溶液则形成较小孔隙^[29]。更好的控制孔隙形成方法是在丝素蛋白溶液中加入石蜡颗粒或者盐晶体等制孔剂, 在制备支架后这些物质可以被某些物质洗脱。比如乙烷可洗脱石蜡, 水可透析出盐晶体。进一步研究显示使用了制孔剂 NaCl 晶体可诱导丝素蛋白从无规蜷曲转变为 β 折叠结构, 避免甲醇处理。但是高浓度盐溶液对生长因子这些敏感生物制剂的完整性及效能有不良作用^[30]。

2.2 丝素蛋白材料的消毒灭菌 由于大部分的聚合物高分子的玻璃相化温度较低, 很少能直接采用高压蒸汽灭菌法, 而是采用灭菌试剂处理。然而晶体化丝素蛋白可以由高压蒸汽灭菌, 而没有明显构象变化^[31-32]。最近的一项研究证实, 在高压蒸汽灭菌后, 诱导凝胶形成的所需时间无明显改变^[33]。当加载了生长因子等敏感添加物时, 高温会引起这些物质的变性, 其生物效能丧失。在这种情况下, 药物必须在支架材料灭菌后通过无菌途径加入。有其他消毒灭菌, 比如 γ 射线灭菌, 但是 γ 射线可能会引起丝素蛋白分子量晶体化下降、弹性力下降, 以及由于分解引起的热稳定性下降^[34]。还有体积分数 70% 乙醇消毒灭菌, 使用乙醇灭菌必须考虑晶体改变、敏感添加物变形失活等因素^[4]。总之, 不同灭菌方式对丝素蛋白的影响仍需要系统的研究。

2.3 制备工艺 丝素蛋白制备工艺多种, 包括有压膜、凝胶化、电纺丝技术等, 可满足多种器官重建需要。丝素蛋白可被制备成多种形式: 膜状、水凝胶、2D/3D 支架等。在制备过程中, 由于工艺原因, 丝素蛋白可能会面临高温、强剪切力等挑战, 这些都会引起丝素蛋白的结构变化比如形成 β 结构。当添加了敏感的生物试剂比如说是生长因子, 如何要避免高温和有机溶剂是另一个重要议题^[35]。

压膜技术: 压膜技术就是将丝素蛋白溶于水溶液或者是六氟异丙醇溶液中, 置入模具中, 压膜干燥后暴露于甲醇或者是水蒸气中诱导 β 结构形成^[18, 36]。丝素蛋白膜透明, 结合其高机械强度, 生物降解慢的特点, 丝素蛋白膜或可应用于角膜重建, 研究证实, 制备的丝素蛋白膜有良好光学特性, 可模拟角膜纤维细胞生存发育条件, 并有细胞外基质沉积生成^[37]。膜状支架进行折叠或者蜷曲可使之成为 3D 结构材料。

凝胶化: 由于丝素蛋白凝胶化过程自发构象变化, β 结构成分增加, 后处理过程中不用再与各种溶剂(水, 甲醇等)接触以诱导构象变化。丝素蛋白的等电

位点为 4.2^[38], 使用柠檬酸将丝素蛋白溶液的 pH 值降至 4 诱导其凝胶化^[39]。这一酸碱度对某些药物来说可以接受, 但对某些药物则有有害作用。将聚乙烯和泊咯沙姆混合丝素蛋白, 丝素蛋白溶液可在 pH 值 7 的环境下通过干燥促成凝胶化, 并促进 β 结构生成, 此工艺结合对某些对酸碱度敏感的药物有益^[39-40]。另一些办法制备水凝胶, Ca^{2+} 可减少丝素蛋白分子间的排斥, 亦可促成 β 结构形成^[38]。最近, 使用超声粉碎法可促进丝素蛋白水凝胶快速形成^[33]。通过不同的制备条件实现凝胶化丝素蛋白孔隙大小的可控化, 进而影响支架的生物机械力, 比如: 增加凝胶化温度和丝素蛋白浓度降低钙离子浓度, 可形成较小的孔隙丝素蛋白支架, 可增加水凝胶生物力学强度^[38]。丝素蛋白水凝胶被证实是软骨重建的良好支架^[41]。

电纺技术: 电纺过程中在接受板和喷头之间存在一个强电压, 丝素蛋白从喷头以一定速度喷出。从毛细管喷头的液滴存在电荷, 当电压到一个临界值, 电荷就克服液滴的表面张力, 喷射成丝; 溶剂蒸发后, 干燥电纺纤维沉积在接受板上, 经过后处理, 比如水蒸气湿处理或者暴露于甲醇中等, 就形成无纺布^[42]。这种技术在组织工程中日益应用广泛, 其形成的纳米级别纤维可以模拟细胞外基质。除了给细胞提供生长微环境外, 生理性细胞外基质可作为生长因子的局部存储部位, 在需要时释放, 并防止蛋白酶水解, 还可加强与细胞位点的结合^[43]。通过调节溶液浓度和电纺参数, 比如电压、喷射距离、黏度、添加物和给料速度等, 可制备不同纤维直径和孔隙大小, 孔隙率的支架材料^[42]。电纺对溶液黏度有要求, 丝素蛋白水溶液可与聚环氧乙烷混合以增加溶液黏度, 从而获得适合的表面张力从而产生稳定持续的电纺过程^[44]。但聚环氧乙烷的存在抑制人类间叶干细胞于电纺毡结合。亦有研究证实可通过控制溶液 pH 值, 浓缩丝素蛋白得到较高黏度, 这种浓缩丝素蛋白溶液短时间不会沉淀聚集^[45]。研究表明, 电纺丝素蛋白支架与骨形成蛋白 2 共价结合复合骨髓间质干细胞可进行骨重建^[16], 除丝素蛋白材料作为支架材料提供机械支撑同时, 其存在可以形成一个保护环境, 回植体内的过程中时, 使脆弱的生长因子保持活性, 并以有效浓度缓慢释放。有学者将包含生长因子的 PLGA 纳米微囊植入电纺制备成的多孔丝素蛋白支架, 可保证生长因子活性及缓慢可控释放^[25]。

凝胶纺丝技术: 在凝胶纺丝过程中将丝素蛋白溶液置于注射泵中通过精细的注射针孔喷出, 纤维在一个

可以自转且可以前后运动的滚轴上被收集起来, 利用剪切力促进其构象变化, 可再行甲醇处理, 气体干燥, 冻干后处理, 改变孔隙率、孔隙大小^[48]。可通过调控丝素蛋白溶液浓度、转轴自转速度、前后移动速度、转轴角度等参数制备所需要的支架材料。凝胶纺丝小直径管状物可应用于血管重建^[48]。Mauney 等^[49]将凝胶纺丝技术应用于小鼠膀胱重建中, 实验表明, 膀胱尿路上皮细胞及平滑肌细胞能够在丝素替代部分爬行生存良好。

多孔海绵状支架的制备: 对丝素溶液进行盐溶沥作用、气体泡沫作用或者冻干作用都可形成 3 维结构的多孔丝素蛋白支架^[19]。其中溶剂可以是水或者是 HFIP 等有机物。使用有机溶剂时可以使用盐或者是糖作为制孔剂。而丝素海绵孔隙孔径即由制孔剂的大小调节。丝素水溶液可以盐晶体或者石蜡颗粒作为制孔剂, 制成的海绵体孔隙率在 490–940 μm , 和丝素蛋白有机溶剂溶液比较, 以水作为溶剂的海绵体表面形态更为粗糙, 这使得细胞黏附生长更为容易, 同时, 研究证实以水为溶剂的海绵体其机械强度, 包括硬度、压缩强度及杨氏系数都有优势。而其降解速度较有机溶剂海绵体快^[23]。组织工程丝素海绵体已经被用于修复小鼠的股骨缺损。将软骨细胞种植与丝素海绵体支架上, 在软骨培养基中孵育可形成软骨, 并且 II 型胶原和糖胺多糖的产生多于胶原海绵体支架^[50]。

3 讨论

丝素蛋白支架是一种生物相容性好, 机械强度高, 可缓慢生物降解, 且降解产物不会对细胞机体有不利影响的生物材料。伴随着对丝素蛋白各种特性, 制备工艺, 后处理的进一步理解, 人们能够制备符合各种组织器官重建实际需要的支架。此外, 将各种药物, 特别是各种生长因子或者是细胞因子, 与丝素蛋白支架材料有机结合, 可调节局部微环境, 促进细胞生长发育。而丝素蛋白水溶液工艺的出现, 以及湿处理等温和制备条件的探索为蛋白质复合提供了一种可能。

4 参考文献

- [1] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401-16.
- [2] Bini E, Knight DP, Kaplan DL. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *J Mol Biol*. 2004;335(1):27-40.
- [3] Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, et al. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(2): 559-570.
- [4] Li C, Vepari C, Jin HJ, et al. Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27(16): 3115-3124.
- [5] Wang X, Kaplan DL. Functionalization of silk fibroin with NeutrAvidin and biotin. *Macromol Biosci*. 2011;11(1):100-110.
- [6] Cai K, Yao K, Lin S, et al. Poly(D, L-lactic acid) surfaces modified by silk fibroin: effects on the culture of osteoblast in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(4):1153-1160.
- [7] Horan RL, Antle K, Collette AL, et al. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*. 2005;26(17):3385-3393.
- [8] Kesenci K, Motta A, Fambri L, et al. Poly(epsilon-caprolactone-co-D, L-lactide) /silk fibroin composite materials: preparation and characterization. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;12(3): 337-351.
- [9] Dicko C, Kenney JM, Knight D, et al. Transition to a beta-sheet-rich structure in spidroin in vitro: the effects of pH and cations. *Biochemistry*. 2004;43(44):14080-14087.
- [10] Xie F, Zhang H, Shao H, et al. Effect of shearing on formation of silk fibers from regenerated Bombyx mori silk fibroin aqueous solution. *Int J Biol Macromol*. 2006;38(3-5):284-288.
- [11] Min BM, Jeong L, Lee KY, et al. Regenerated silk fibroin nanofibers: water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells. *Macromol Biosci*. 2006;6(4):285-292.
- [12] Nam J, Park YH. Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight. *J Appl Polym Sci*. 2001;81(12):3008-3021.
- [13] Jin HJ, Park J, Karageorgiou V, et al. Water-Stable Silk Films with Reduced β -Sheet Content. *Advanced Funct Mater*. 2005; 15(8):1241-1247.
- [14] Wang X, Wenk E, Matsumoto A, et al. Silk microspheres for encapsulation and controlled release. *J Control Release*. 2007;117(3):360-370.
- [15] Phillips DM, Drummy LF, Conrady DG, et al. Dissolution and regeneration of Bombyx mori silk fibroin using ionic liquids. *J Am Chem Soc*. 2004;126(44):14350-14351.
- [16] Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, et al. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects. *Bone*. 2007;41(2):247-255.
- [17] Wenk E, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. *J Control Release*. 2011;150(2):bulk viscosity128-141.
- [18] Murphy AR, St John P, Kaplan DL. Modification of silk fibroin using diazonium coupling chemistry and the effects on hMSC proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2008;29(19): 2829-2838.
- [19] Nazarov R, Jin HJ, Kaplan DL. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*. 2004;5(3): 718-726.
- [20] Holland TA, Mikos AG. Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2006;102: 161-185.
- [21] Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(4-5):339-359.

- [22] Schmidt CE, Baier JM. Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(22):2215-2231.
- [23] Kim UJ, Park J, Kim HJ, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*. 2005;26(15):2775-2785.
- [24] Fu K, Pack DW, Klibanov AM, et al. Visual evidence of acidic environment within degrading poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. *Pharm Res*. 2000;17(1):100-106.
- [25] Wenk E, Meinel AJ, Wildy S, et al. Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(13):2571-2581.
- [26] Wang Y, Rudym DD, Walsh A, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(24-25):341534-28.
- [27] Megeed Z, Cappello J, Ghandehari H. Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(8):1075-1091.
- [28] Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2005;26(2):147-155.
- [29] Mandal BB, Kundu SC. Non-bioengineered silk fibroin protein 3D scaffolds for potential biotechnological and tissue engineering applications. *Macromol Biosci*. 2008;8(9):807-818.
- [30] Uebersax L, Hagenmuller H, Hofmann S, et al. Effect of scaffold design on bone morphology in vitro. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3417-3429.
- [31] Hofmann S, Knecht S, Langer R, et al. Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12(10):2729-2738.
- [32] Hofmann S, Hagenmuller H, Koch AM, et al. Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(6):1152-1162.
- [33] Wang X, Kluge JA, Leisk GG, Kaplan DL. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. *Biomaterials*. 2008;29(8):1054-1064.
- [34] Kojthung A, Meesilpa P, Sudatis B, et al. Effects of gamma radiation on biodegradation of Bombyx mori silk fibroin. *In Biodeter Biodegr*. 2008;62(4):487-490.
- [35] Pace CN, Trevino S, Prabhakaran E, et al. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359(1448):1225-1234; discussion 1234-1235.
- [36] Hofmann S, Foo CT, Rossetti F, et al. Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *J Control Release*. 2006;111(1-2):219-227.
- [37] Gil ES, Park SH, Marchant J, et al. Response of human corneal fibroblasts on silk film surface patterns. *Macromol Biosci*. 2010;10(6):664-673.
- [38] Kim UJ, Park J, Li C, et al. Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*. 2004;5(3):786-792.
- [39] Fang JY, Chen JP, Leu YL, et al. Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2006;54(2):156-162.
- [40] Kang GD, Nahm JH, Park JS, et al. Effects of poloxamer on the gelation of silk fibroin. *Macromol Rapid Comm*. 2000;21(11):788-791.
- [41] Chao PH, Yodmuang S, Wang X, et al. Silk hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;95(1):84-90.
- [42] Sill TJ, von Recum HA. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(13):1989-2006.
- [43] Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2005;23(1):47-55.
- [44] Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, et al. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. 2002;3(6):1233-1239.
- [45] 朱晶心. 仿生制备的再生丝素蛋白水溶液的静电纺丝(II)——pH值的影响[J]. *功能材料*, 2008, 39(2):4.
- [46] Garg K, Ryan JJ, Bowlin GL. Modulation of mast cell adhesion, proliferation, and cytokine secretion on electrospun bioresorbable vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97(4):405-413.
- [47] Shen Y, Qian Y, Zhang H, et al. Guidance of olfactory ensheathing cell growth and migration on electrospun silk fibroin scaffolds. *Cell Transplant*. 2010;19(2):147-157.
- [48] Lovett M, Cannizzaro C, Vunjaknovakovic G, et al. Gel spinning of silk tubes for tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(35):4650-4657.
- [49] Mauney JR, Cannon GM, Lovett ML, et al. Evaluation of gel spun silk-based biomaterials in a murine model of bladder augmentation. *Biomaterials*. 2011;32(3):808-818.
- [50] Wang Y, Blasoli DJ, Kim HJ, et al. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*. 2006;27(25):4434-4442.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 本文获国家自然科学基金资助项目(81170641)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

此问题的已知信息: 基于丝素蛋白卓越的理化性质, 作为一种组织工程支架材料被广泛应用于多种组织器官的重建。

本综述增加的新信息: 深入探讨丝素蛋白的理化性质, 应用过程的消毒灭菌方法及整理介绍丝素蛋白支架材料的各种工艺。

临床应用的意义: 深入了解丝素蛋白的理化性质及丝素蛋白支架的制备工艺, 能够根据特定组织器官的特点, 更有针对性地构建相应的组织工程器官组织。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。