

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00500

丝素蛋白对聚左旋乳酸-共- ϵ -己内酯电纺丝支架体内降解及生物相容性的作用

程自申¹, 杨成伟¹, 刘 莉², 杨 洋¹, 邓国英¹, 叶晓健^{1*}

1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003
2. 河北省保定市第一中心医院妇产科, 保定 071000

[摘要] **目的** 探讨丝素蛋白(SF)对聚左旋乳酸-共- ϵ -己内酯[P(LLA-CL)]电纺丝支架的体内降解及生物相容性的作用。**方法** 运用静电纺丝技术分别制备[P(LLA-CL), ($w/w=1:1$)及混有含25% SF的P(LLA-CL)[SF/P(LLA-CL)]纳米纤维支架,将两种支架分别植入至45只6个月龄大鼠皮下6个月,以观察评估SF对P(LLA-CL)降解及生物相容性的影响。**结果** 病理切片显示,支架植入3个月时,P(LLA-CL)支架明显肿胀,并开始分层,6个月时支架已支离破碎;而SF/P(LLA-CL)支架植入6个月时仍能保持相对完整的结构。免疫组化切片显示,在支架植入1个月时P(LLA-CL)支架表面及内部有大量的巨噬细胞,3个月时仍有大量的巨噬细胞,同时伴有异物巨细胞生成;而SF/P(LLA-CL)支架组巨噬细胞及异物巨细胞在各个时间点表达均不明显。炎症基因相对表达结果显示,在支架植入1周时P(LLA-CL)支架组TNF- α 及IL-10相对表达高于SF/P(LLA-CL)支架组($P<0.05$),1个月时P(LLA-CL)支架组TNF- α 、IL-1 β 及IL-10相对表达高于SF/P(LLA-CL)支架组($P<0.05$),2个月时P(LLA-CL)支架组TNF- α 及IL-10相对表达高于SF/P(LLA-CL)支架组($P<0.05$),3个月时P(LLA-CL)支架组TGF- β 相对表达高于SF/P(LLA-CL)支架组($P<0.05$),6个月时P(LLA-CL)支架组IL-1 β 及TGF- β 相对表达高于SF/P(LLA-CL)支架组($P<0.05$)。**结论** SF能延缓P(LLA-CL)降解,减轻炎症反应,改善生物相容性。

[关键词] 丝素蛋白;聚左旋乳酸-共- ϵ -己内酯;降解;炎症反应;巨噬细胞;异物巨细胞;生物相容性

[中图分类号] R 318.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)05-0500-07

Effect of silk fibroin on degradation and *in vivo* biocompatibility of poly (L-lactic-co- ϵ -caprolactone) electrospun nanofibrous scaffolds

CHENG Zi-shen¹, YANG Cheng-wei¹, LIU Li², YANG Yang¹, DENG Guo-ying¹, YE Xiao-jian^{1*}

1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Obstetrics and Gynecology, First Central Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of silk fibroin (SF) on degradation and biocompatibility of poly (L-lactic acid-co- ϵ -caprolactone)(P[LLA-CL]) *in vivo*. **Methods** The scaffolds of P(LLA-CL) ($w/w=1:1$) blended with 25% of SF (SF/P[LLA-CL]) and P(LLA-CL) were prepared by electrospinning. Both kinds of scaffolds were subcutaneously implanted in 45 6-month-old rats for up to 6 months to evaluate their degradation and biocompatibility characteristics. **Results** Pathological sections showed P(LLA-CL) scaffold become swollen and began to separate into different layers after 3 months, and then become broken after 6 months; while SF/P (LLA-CL) scaffold largely maintained its structure after 6 months. Immunohistochemical staining showed a large number of macrophages on the surface and in P(LLA-CL) scaffolds 1 month after implantation, and they could still be found 3 months after implantation, accompanied by foreign body giant cells; while no obvious macrophages or foreign body giant cells were found in SF/P(LLA-CL) scaffolds at different time points. Examination of inflammatory gene expression showed that TNF- α and IL-10 expression in P(LLA-CL) scaffolds was significantly higher than that in SF/P(LLA-CL) scaffolds 1 week after implantation ($P<0.05$), the same was also true for TNF- α , IL-1 β and IL-10 expression 1 month after implantation ($P<0.05$), for TNF- α and IL-10 expression 2 months after implantation ($P<0.05$).

[收稿日期] 2014-11-08 **[接受日期]** 2015-01-19

[基金项目] 国家自然科学基金(81472071). Supported by National Natural Science Foundation of China (81472071).

[作者简介] 程自申, 博士, 主治医师. E-mail: ganlanshu1012@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885624, E-mail: yespine@163.com

for $TGF-\beta$ expression 3 months after implantation ($P < 0.05$), and for $IL-1\beta$ and $TGF-\beta$ expression 6 months after implantation ($P < 0.05$). **Conclusion** SF incorporation can delay degradation, reduce inflammation, and improve the biocompatibility of P(LLA-CL) scaffolds, which may provide reference for scaffold design in tissue engineering.

[Key words] silk fibroin; poly(L-lactic-co- ϵ -caprolactone); degradation; inflammation; macrophage; foreign body giant cells; biocompatibility

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(5): 500-506]

组织工程再生组织或器官是近年来一个研究热点,而组织工程的一个核心问题是组织工程支架的模拟^[1]。目前有很多技术可实现组织工程支架的制备,其中静电纺丝技术是简单、易于控制且经济的方法^[2]。在组织工程支架制备的过程中要考虑到材料本身的降解及生物相容性问题,最为理想的材料应具备生物相容性好、降解速度与组织再生速度相吻合、降解产物对机体无不良影响等特点。近年来聚左旋乳酸(PLLA)、 ϵ -聚己内酯(PCL)两种物质引人关注,两者都可降解,按适当比例组合可克服机械力学性能的不足,但 PLLA 的酸性降解产物可使周围 pH 值降低,导致局部炎症反应及潜在的组织恶化^[3-4]。由丝素蛋白(SF)制备的纳米纤维毡拥有较好的生物相容性^[5],体外研究已证实可通过复合 SF 来提高周围环境的 pH 值^[6]。本研究探讨 SF 对聚左旋乳酸-共- ϵ -己内酯 P(LLA-CL)的降解及生物相容性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 家蚕蚕茧购于上海步克医药科技有限公司, P(LLA-CL) (50 : 50) ($M_w = 34.5 \times 10^4$ g/mol)由日本奈良医科大学提供,六氟异丙醇(HFIP)购于日本大金工业公司。磷酸盐缓冲液(PBS)购于美国 Sigma 公司。

1.2 脱胶 SF 的制备 蚕茧在 100℃ 0.5% (w/w) Na_2CO_3 溶液中脱胶 30 min, 共 4 次, 然后用蒸馏水冲洗。脱胶的 SF 溶解于 70℃ 的 $CaCl_2/H_2O/EtOH$ 溶液 (摩尔比 1 : 8 : 2) 1 h。置于纤维素管膜(250-7 u, Sigma 公司)室温下蒸馏水中渗析 3 d, SF 溶液过滤并冻干得到脱胶 SF。

1.3 支架制备 SF/P(LLA-CL) ($w : w = 25 : 75$) 及 P(LLA-CL) ($w : w = 50 : 50$) 分别溶解在 HFIP 溶剂内, 在室温下磁力棒持续搅拌 8 h。10 mL 带有钝性针头的注射器装入上述溶液并分别安装在注射器泵上(789100C, Cole-Pamer, 美国)。用直径为

6 cm 的转筒作为接受器, 针尖至转筒的距离为 20 cm。针尖与转筒加一 12 kV 的直流电压(BGG6-358, BMEICO Ltd., 中国), 溶液流速为 1.2 mL/h, 转筒转速为 8.3 m/s(表面速度), 纳米纤维被包裹在转筒的铝箔收集。整个过程保持相对湿度为 30%。真空干燥炉烘干后纳米纤维支架从铝箔分离开。为使 SF 的构象从无规则卷曲或 α 螺旋到 β 折叠转换, SF/P(LLA-CL) 纳米纤维支架用乙醇熏蒸 24 h, 然后再次放入真空干燥炉 24 h 去除残留溶剂。

1.4 支架形貌观察 支架在真空中喷金后, 用高分辨率电场发射扫描电子显微镜(FESEM, HITACHI S-4800, 日本)观察其形貌特征, 加速电压为 10 kV。纤维直径用图像分析软件(ImageJ, National Institutes of Health, 美国)分析, 在 FESEM 纤维照片上随机选取 100 根纤维计算其平均值。

1.5 大鼠体内支架的植入 将支架用组织镊子切成直径为 8 mm 的圆形结构, 通风柜干燥,⁶⁰Co 消毒包装备用。实验动物为 6 个月龄体质量在 180 ~ 200 g 的雄性 SD 大鼠[由第二军医大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(沪)2012-0003], 共 45 只, 随机分为 5 组($n=9$)。所有操作经第二军医大学伦理委员会同意, 遵照《实验动物照顾与利用指导》。将 SD 大鼠用 3% 戊巴比妥钠(1 mL/100 g)注射麻醉, 背部剃毛, 无菌操作, 椎旁 1 cm 对称切开一长为 1 cm 的纵行切口, 钝性分离皮下组织形成“皮袋”, 每只大鼠制作 4 个“皮袋”。4 个支架包括 2 个 SF/P(LLA-CL) 和 2 个 P(LLA-CL) 随机植入每只大鼠不同部位, 然后将皮肤用 1-0 无创缝线闭合, 术后 7 d 拆除缝合线。45 只大鼠共植入 180 个支架。

1.6 标本回收与处理 分别在支架植入 1 周、4 周、2 个月、3 个月和 6 个月, 用戊巴比妥过量麻醉的方式处死大鼠。将植入支架连带周围部分组织取出, 进行病理观察及免疫组化和 PCR 测试。观察支

架横断面情况时,先将标本放入液氮 15 min,然后用两把无齿镊“脆断”,再用 FESEM 观测。

1.7 病理和免疫组化染色 将不同时间点收集的标本用 4% 甲醛固定,不同梯度乙醇逐级脱水,石蜡包埋,切成厚度为 4 μ m 的切片,H-E 染色后进行病理评估。石蜡切片中巨噬细胞用 CD68 染色鉴定,异物巨细胞用抗酒石酸磷酸酶 (TRAP) 染色鉴定。CD68 染色时,切片脱蜡后放入柠檬酸缓冲液 (pH 6.0),于微波炉中进行抗原修复。首先,切片加热从低火到中火再到沸点维持 10 min,然后自然冷却并用 PBS 溶液 (0.1 mol/L, pH 7.4) 冲洗 3 次,每次 5 min。切片用 3% H_2O_2 使内源性过氧化物酶失活,室温避光下孵育 25 min,PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次。再放入 5% 牛血清白蛋白 (1 : 500, Sigma) 预孵育过夜, PBS (0.1 mol/L) 冲洗;加入大鼠抗小鼠 CD68 (1 : 200, AbDSerotec 公司) 孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗;室温下用二抗山羊抗鼠 IgG (1 : 1 DAKO, Denmark) 孵育 50 min, PBS 冲洗,用二氨基联苯胺

(DAKO) 染色。染色后切片复染 3 min,蒸馏水冲洗,脱水并用中性树脂盖片。TRAP 染色时,切片用 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 7 min,蒸馏水冲洗。配制含 0.1 mol/L 醋酸盐缓冲液 18 mL、六偶氮副品红 1 mL、萘酚 AS-BI 磷酸酯 20 mg、N-二甲基甲酰胺 1 mL、酒石酸钾钠 0.282 g 的混合溶液,调 pH 值为 5.0。切片在上述溶液 37 $^{\circ}$ C 孵育 50 min。双蒸水清洗 1 次,用苏木精复染细胞核,甘油明胶封片,显微镜下观察。

1.8 炎症因子基因表达的检测 参照文献[7],利用 TRIzol Reagent (Qiagen, Netherlands) RNA 从含有支架的组织提取 RNA。对照组取自植入部位较远的皮下组织,进行定量 PCR 测定。评估 *IL-1 β* 、*TGF- β* 、*TNF- α* 及 *IL-10* 基因表达情况,并以看家基因 *β actin* 作参照^[8],RT-PCR 引物由 Primer Premier 5.5 软件设计,各引物序列见表 1。每个标本的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。Ct 值定义为每个反应管内的荧光信号达设定的阈值时所经历的循环数。每个标本重复测量 3 次进行分析。

表 1 不同基因 PCR 引物序列

Tab 1 PCR primer sequences of different genes

Name	5'-3'	3'-5'
<i>TNF-α</i>	ACTCCAGAAAAGCAAGCAA	CGAGCAGGAATGAGAAGAGG
<i>IL-1β</i>	CTGTGACTCGTGGGATGATG	GGGATTTTGTCTGTTGCTTGT
<i>TGF-β</i>	ATACGCCTGAGTGGCTGTCT	TGGGACTGATCCATTGATT
<i>IL-10</i>	AATAACTGCACCCACTTCCC	CAACCCAAGTAAACCCTTAAAGTC
<i>βactin</i>	TTCAACACCCCAGCCATGT	TGTGGTACGACCAGAGGCATAC

1.9 统计学处理 采用 SPSS 21.0 (IBM Corp, USA) 统计软件进行方差分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 支架特征及表面形貌变化 如图 1 所示,两种支架降解前的形貌均显示为均匀一致的纤维 (图 1A、1D), P(LLA-CL) 支架直径为 (443 \pm 32) nm, SF/P(LLA-CL) 支架直径为 (386 \pm 54) nm。植入皮下 1 个月及 3 个月后,两种支架轻微肿胀,并有大量纤维组织长入 (图 1B、1C、1E、1F)。

2.2 支架植入后标本大体观察 标本植入后隔天碘伏消毒,伤口表面无溃烂、红肿。分别于植入后 1 周、1 个月、3 个月及 6 个月时取出标本进行组织反应评估。由图 2 可见,两种支架都能大体保持其结

构,无明显感染迹象。

2.3 支架植入皮下标本病理观察 两种支架皮下植入 1 个月、3 个月和 6 个月后的 H-E 染色结果显示,在支架界面可看到大量的多核细胞 (图 3)。植入 3 个月后, P(LLA-CL) 支架明显肿胀 (图 3B), 而 SF/P(LLA-CL) 只轻微肿胀 (图 3E)。植入 6 个月, P(LLA-CL) 支架已支离破碎 (图 3C), 而 SF/P(LLA-CL) 支架大体保持其结构 (图 3F)。

2.4 支架植入后宿主组织反应 两种支架在植入 1 个月 (图 4A、4D) 及 3 个月 (图 4B、4E) 后,在同一时间点 P(LLA-CL) 支架的 CD68 阳性表达多于 SF/P(LLA-CL) 支架。图 4C、4F 显示 TRAP 阳性表达情况,可以看出在支架植入 3 个月后, P(LLA-CL) 支架有较多的阳性表达。

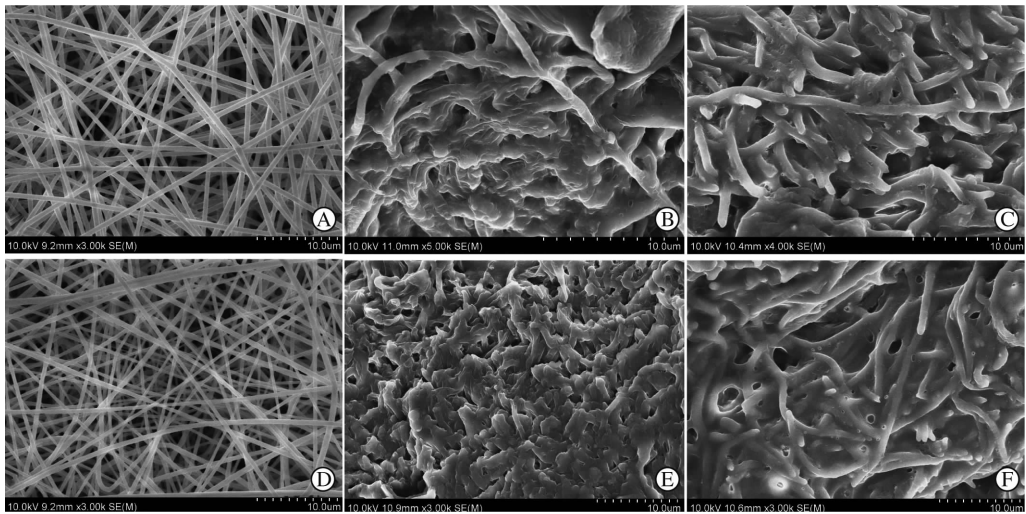


图1 支架植入前后平面或断面扫描电镜图

Fig 1 Scanning electron microscopy (SEM) surface and cross-sectional images of scaffolds before and after implantation

A-C; P(LLA-CL); D-F; SF/P(LLA-CL); A, D: Horizontal sections of scaffolds before implantation; B, E: Cross section of scaffolds 1 month after implantation; C, F: Cross section of scaffolds 3 months after implantation. P(LLA-CL); Poly(L-lactic-co-ε-caprolactone); SF/P(LLA-CL); Silk fibroin/poly(L-lactic-co-ε-caprolactone). Scale bars: 10.0 μm

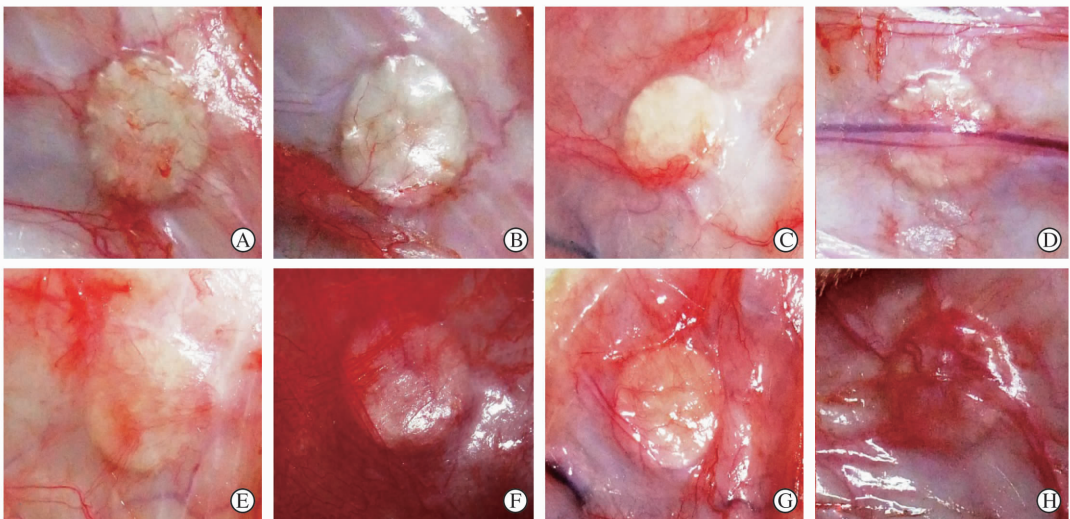


图2 两种支架植入大鼠皮下各时间点标本大体观察

Fig 2 Gross findings of two types of scaffolds after subcutaneous implantation at various time points

A-D; P(LLA-CL); E-H; SF/P(LLA-CL); A, E: 1-week after implantation; B, F: 1 month after implantation; C, G: 3 months after implantation; D, H: 6 months after implantation. P(LLA-CL); Poly(L-lactic-co-ε-caprolactone); SF/P(LLA-CL); Silk fibroin/poly(L-lactic-co-ε-caprolactone)

2.5 炎症因子基因表达 两种不同纳米纤维支架植入大鼠皮下,于植入后1周、1个月、2个月、3个月及6个月连带周围部分软组织取出,测定炎症基因 *IL-1β*、*TNF-α* 和 *IL-10* 的相对表达。由图5可以看出,纳米纤维支架 SF/P(LLA-CL) 有较少的炎症基因表达。在两种支架植入1周时, SF/P(LLA-CL) 支架组 *TNF-α* 及 *IL-10* 相对表达较少

($P < 0.05$); 在植入1个月时, SF/P(LLA-CL) 支架组 *TNF-α*、*IL-1β* 及 *IL-10* 相对表达较少 ($P < 0.05$); 在植入2个月时, SF/P(LLA-CL) 支架组 *TNF-α*、*IL-10* 相对表达较少 ($P < 0.05$); 在植入3个月时, SF/P(LLA-CL) 支架组 *TGF-β* 相对表达较少 ($P < 0.05$); 在植入6个月时, SF/P(LLA-CL) 支架组 *IL-1β* 及 *TGF-β* 相对表达较少 ($P < 0.05$)。

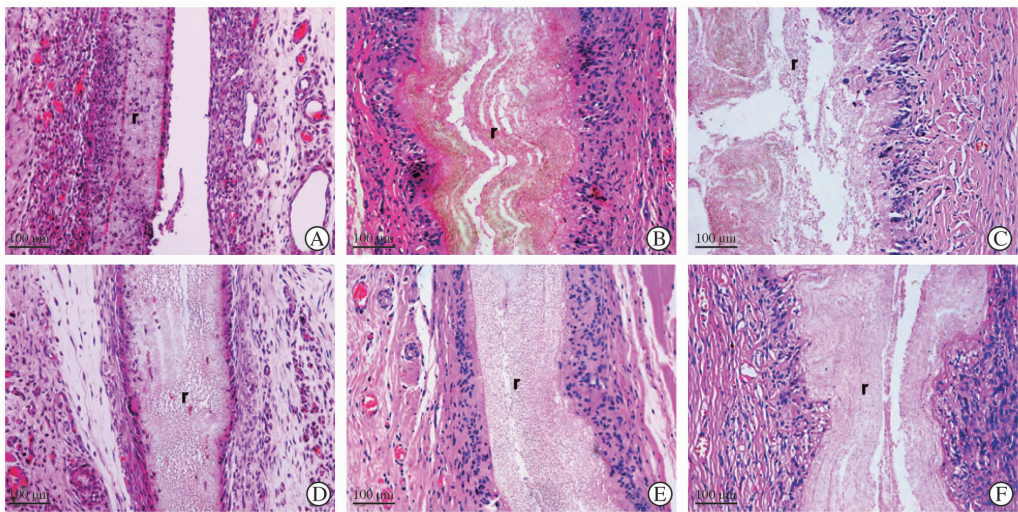


图3 两种支架不同植入时间的降解观察(H-E染色)

Fig 3 Degradation of two kinds of scaffolds after subcutaneous implantation at various time points(H-E staining)

A-C; P(LLA-CL); D-F; SF/P(LLA-CL); A, D: 1 month after implantation; B, E: 3 months after implantation; C, F: 6 months after implantation. P(LLA-CL): Poly(L-lactic-co-ε-caprolactone); SF/P(LLA-CL): Silk fibroin/poly(L-lactic-co-ε-caprolactone). The remnant scaffold is indicated as “r”

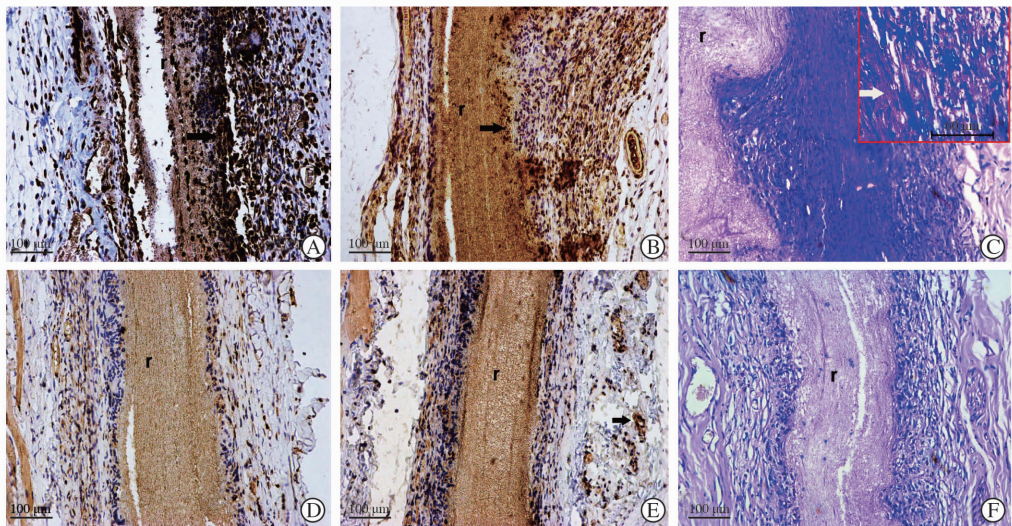


图4 两种支架植入大鼠皮下后不同时间的免疫组化结果

Fig 4 Immunohistochemical findings of two kinds of scaffolds after subcutaneous implantation in rats at various time points

A-C; P(LLA-CL); D-F; SF/P(LLA-CL); A, B, D and E were stained by CD68, and C and F were stained by TRAP. A and D were 1 month after implantation for both types of scaffolds, B, C, E and F are 3 months after implantation. Black arrows indicate CD68 positive cells and white arrow indicates TRAP positive cells. P(LLA-CL): Poly(L-lactic-co-ε-caprolactone); SF/P(LLA-CL): Silk fibroin/poly(L-lactic-co-ε-caprolactone). The remnant scaffold is indicated as “r”

3 讨论

理想的生物材料应具有生物相容性及可降解性,同时能为细胞或组织的生长提供一定的力学支持,利于组织修复^[7]。目前可供选择的高分子材料可分为人工合成及天然材料,人工合成的高

分子材料如聚乳酸等力学性能较好,但缺乏可供细胞识别的位点,且降解产物呈现酸性,不利于组织修复。而天然材料如 SF 一般具有较多的可供细胞识别的位点,但其力学性能较差,两种材料都不适合单独应用。为制备理想的组织工程支架,一般采用人工合成及天然材料组合制备组

织工程支架。本研究结果显示, 支架植入 3 个月时, P(LLA-CL) 支架已分解, 植入 6 个月时已支离破碎, 而 SF/P(LLA-CL) 支架仍保持其大体结

构。P(LLA-CL) 为人工合成经典的组织工程支架材料来源, 其降解产物呈酸性^[6], 这可能是 P(LLA-CL) 组织工程支架降解较快的原因。

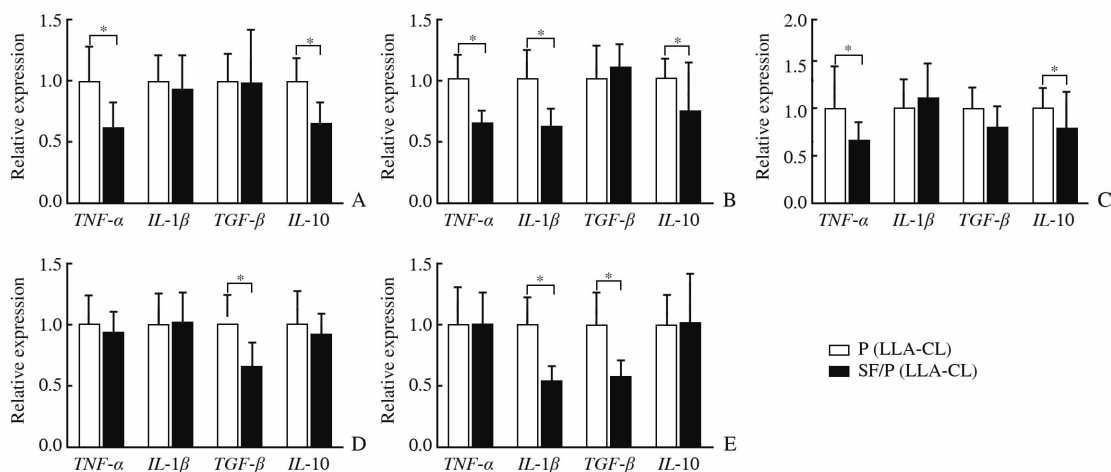


图5 各时间点含有两种支架标本的炎症因子基因的相对表达

Fig 5 Inflammation factor gene expression in two kinds of scaffolds at various time points

Inflammation gene expression of *IL-1 β* , *TGF- β* , *TNF- α* , and *IL-10* were measured 1 week after implantation (A), 1 month after implantation (B), 2 months after implantation (C), 3 months after implantation (D), and 6 months after implantation (E). Data are expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Values were normalized to β -actin. * $P < 0.05$. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

组织工程支架的降解及生物相容性在支架对组织修复过程中起着至关重要的作用。一方面组织工程支架在完成其组织或器官修复功能后逐渐降解; 另一方面组织工程支架应当具有生物相容性, 即生物材料植入体内后行使预期的医学治疗作用, 而不诱发局部或全身毒副作用, 只在特定的情况下产生适当有益的细胞或组织反应^[9]。当组织工程支架植入体内后, 首先巨噬细胞识别支架表面蛋白并特异性地黏附其上, 协调细胞与生物材料支架的相互作用形成无菌炎症反应。若这种反应持续存在, 巨噬细胞与生物材料会融合在一起形成异物巨细胞^[10], 也就是说巨噬细胞及异物巨细胞对生物材料组织工程支架生物相容性起着决定作用。巨噬细胞在分子水平通过一些细胞因子协调与植入组织工程支架的相互作用。TNF- α 为促炎/抗伤口愈合的细胞因子, TGF- β 则是抗炎/促伤口愈合的细胞因子, IL-1 β 能激活炎症细胞(淋巴细胞和单核细胞)并促进伤口愈合, IL-10 通过下调炎症细胞的活力并抑制细胞因子产生从而起到抗炎/抗伤口愈合的作用, 这些蛋白分子都与伤口愈合及炎症反应有关^[11]。

本研究结果显示, 在支架植入 1 个月及 3 个月

时, P(LLA-CL) 支架相比 SF/P(LLA-CL) 支架有较多的 CD68 阳性表达, 证明有较多的巨噬细胞。在巨噬细胞黏附于支架材料及相互作用中, 炎症因子起重要作用, 可以看到 SF/P(LLA-CL) 支架在各时间仅仅有较少的炎症基因表达, 也就是说 SF/P(LLA-CL) 有较好的生物相容性。我们认为这可能与 SF 及其降解产物有关: 一方面 SF 本身具有较好的生物相容性; 另一方面随着 SF/P(LLA-CL) 支架的降解, SF 的降解产物多肽及氨基酸分布于支架的表面及内部, 与 P(LLA-CL) 的降解产物相遇, 对 pH 值下降起中和作用^[6], 从而减缓支架的降解。

SF 由家蚕蚕蛹取得, 为高分子聚合物, 由重复的亲水及疏水肽段组成。疏水域重复的 Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser 组成^[12] 有利于分子间及分子内部形成 β 折叠结构^[13]。 β 折叠结构影响着 SF 的溶解性、机械强度和热稳定性。在本研究中, SF/P(LLA-CL) 纳米纤维支架用乙醇蒸汽处理 24 h 以形成 β 折叠结构, 这种结构的转换可能是 SF/P(LLA-CL) 降解缓慢的原因之一。另外, 由于 SF 具有出色的机械力学、较高的氧气及水蒸汽通透性、生物相容性及生物可降解性, 其已成为引起人们注意的生物

材料^[14-16]。目前,基于 SF 的支架材料作为成纤维细胞、软骨细胞以及间充质干细胞等的细胞基质材料已被证实具有优越的性能^[17-18]。

综上所述,本研究结果证实,将 SF 加入 P(LLA-CL)支架中,植入皮下后可延缓支架降解并改善支架的生物相容性。该结果可为组织工程支架材料设计提供参考。

[参考文献]

- [1] Madurantakam P A, Cost C P, Simpson D G, Bowlin G L. Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2009, 4: 193-206.
- [2] Jayaraman K, Kotaki M, Zhang Y, Mo X, Ramakrishna S. Recent advances in polymer nanofibers [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, 4(1-2): 52-65.
- [3] Taylor M S, Daniels A U, Andriano K P, Heller J. Six bioabsorbable polymers; *in vitro* acute toxicity of accumulated degradation products [J]. *J Appl Biomater*, 1994, 5: 151-157.
- [4] Klompmaker J, Jansen H W, Veth R P, de Groot J H, Nijenhuis A J, Pennings A J. Porous polymer implant for repair of meniscal lesions; a preliminary study in dogs [J]. *Biomaterials*, 1991, 12: 810-816.
- [5] Kim J H, Park C H, Lee O J, Lee J M, Kim J W, Park Y H, et al. Preparation and *in vivo* degradation of controlled biodegradability of electrospun silk fibroin nanofiber mats [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100: 3287-3295.
- [6] Zhang K, Yin A, Huang C, Wang C, Mo X, Al-Deyab S S, et al. Degradation of electrospun SF/P(LLA-CL) blended nanofibrous scaffolds *in vitro* [J]. *Polym Degrad Stabil*, 2011, 96: 2266-2275.
- [7] Lamers E, Walboomers X F, Domanski M, te Riet J, van Delft F C, Luttgte R, et al. The influence of nanoscale grooved substrates on osteoblast behavior and extracellular matrix deposition [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 3307-3316.
- [8] Ji W, Yang F, Seyednejad H, Chen Z, Hennink W E, Anderson J M, et al. Biocompatibility and degradation characteristics of PLGA-based electrospun nanofibrous scaffolds with nanoapatite incorporation [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 6604-6614.
- [9] Williams D F. On the mechanisms of biocompatibility [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 2941-2953.
- [10] Prodanov L, te Riet J, Lamers E, Domanski M, Luttgte R, van Loon J J, et al. The interaction between nanoscale surface features and mechanical loading and its effect on osteoblast-like cells behavior [J]. *Biomaterials*, 2010, 31: 7758-7765.
- [11] Yoon S J, Kim S H, Ha H J, Ko Y K, So J W, Kim M S, et al. Reduction of inflammatory reaction of poly (d, l-lactic-co-glycolic acid) using demineralized bone particles [J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14: 539-547.
- [12] Ha S W, Gracz H S, Tonelli A E, Hudson S M. Structural study of irregular amino acid sequences in the heavy chain of *Bombyx mori* silk fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6: 2563-2569.
- [13] Heslot H. Artificial fibrous proteins; a review [J]. *Biochimie*, 1998, 80: 19-31.
- [14] Rockwood D N, Preda R C, Yücel T, Wang X, Lovett M L, Kaplan D L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6: 1612-1631.
- [15] Canabady-Rochelle L L, Belton D J, Deschaume O, Currie H A, Kaplan D L, Perry C C. Bioinspired silicification of silica-binding peptide-silk protein chimeras; comparison of chemically and genetically produced proteins [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 683-690.
- [16] Numata K, Yamazaki S, Naga N. Biocompatible and biodegradable dual-drug release system based on silk hydrogel containing silk nanoparticles [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 1383-1389.
- [17] Acharya C, Ghosh S K, Kundu S C. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19: 2827-2836.
- [18] Mandal B B, Kundu S C. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2009, 30: 2956-2965.

[本文编辑] 魏学丽,尹 茶