

ICS 11.030.30

CCS 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

组织工程医疗器械 丝素蛋白

Tissue engineering medical device - Silk Fibroin

(征求意见稿)

2022-07-06

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

建议本标准发布 12 个月 after 开始实施

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

| | |
|-------------------------------------|-----|
| 前言 | II |
| 引言 | III |
| 1 范围 | 1 |
| 2 规范性引用文件 | 1 |
| 3 术语和定义 | 1 |
| 4 分类 | 2 |
| 5 动物源性材料要求 | 2 |
| 6 性能要求 | 2 |
| 7 试验方法 | 4 |
| 8 稳定性 | 6 |
| 9 包装、运输和贮存 | 6 |
| 附录 A (资料性) 丝素蛋白在生物医用领域研究进展 | 7 |
| 附录 B (规范性) 再生丝素蛋白分子量测定——流变学方法 | 10 |
| 参考文献 | 16 |

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时可能涉及到附录B流变学方法测定分子量的方法和数据拟合计算相关专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，附录B已经公开给出了方法操作说明，专利持有人愿意同任何标准使用人在合理且无歧视的条款和条件下共享该方法的应用。该专利持有人的声明已经在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得。

专利持有人姓名：复旦大学

地址：上海市邯郸路220号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国外科植入物和矫形器械标准化技术委员会组织工程医疗器械产品分技术委员会（SAC/TC110/SC3）归口。

本文件起草单位：浙江大学，中国食品药品检定研究院，复旦大学，浙江星月生物科技股份有限公司，复向丝泰医疗科技(苏州)有限公司，江西丝科生物科技有限公司。

本文件主要起草人：---

本文件是首次发布。

引 言

从组织工程材料的发展趋势看来,具备良好的生物相容性及体内可吸收性的天然生物材料将受到青睐。天然生物材料在结构、力学、和生物降解性能可控的情况下,在临床应用中具备巨大潜力。其中,来源于天然桑蚕丝的丝素蛋白不仅具有良好的生物相容性,同时还具有较高的力学强度与较慢的降解速率,植入体内免疫原性低,原料来源广泛,易于加工制造,可被制成多种形态的支架用于不同组织的修复(详见附录A),现已受到越来越多的重视,不断有研究将其用于组织再生并进行产品开发。丝素蛋白作为一种优秀的生物医用材料具有巨大的市场前景。

在2008年,美国FDA已批准丝素蛋白手术补片用于乳房修补、软组织损伤修复。近年来,国家对丝素蛋白材料的研究给予巨大的支持,国内从事丝素蛋白医疗产品的研发的医疗器械公司逐渐增多,基于丝素蛋白的医疗产品不断涌现。其中,丝素蛋白膜状敷料产品和丝蛋白创面敷料产品均已获得产品注册证,分别为第III类医疗器械产品和第II类医疗器械产品,用于皮肤修复;同时,丝素蛋白疝补片产品已完成临床试验,进入注册报批;丝素蛋白骨钉产品已进行委托检验;丝素蛋白人工韧带等系列产品在研发中。

随着丝素蛋白医疗器械产品的增加,对这一材料的生产制备、质量控制等提出了要求。相对于产业的迅速发展,丝素蛋白相关标准在国际国内仍处于空白。由于标准的缺乏,各丝素蛋白企业在企业标准制定过程中无统一的标准参考依据,限制了丝素蛋白医疗产业的高质量发展。为了提高丝素蛋白材料的质量与安全性,为监管提供支撑,特制定本文件。

组织工程医疗器械 丝素蛋白

1 范围

本文件规定了用于组织工程医疗器械产品的丝素蛋白的性能要求，试验方法，以及标志、包装、运输和贮存等要求。

本文件适用于制备组织工程医疗器械产品的丝素蛋白。

注1：本文件所指的丝素蛋白，是以天然桑蚕的茧层或生丝为原料，经过脱丝胶处理或脱胶后溶解再生等工艺处理后得到的产物。不包括经基因工程或转基因获得的丝素蛋白。

注2：其他外科植入物或敷料类产品所用的丝素蛋白可参考本标准。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 191 包装储运图示标志
- GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验
- GB/T 16886.7 医疗器械生物学评价 第7部分：环氧乙烷灭菌残留量
- GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照样品种
- GB/T 16886.20 医疗器械生物学评价 第20部分：医疗器械免疫毒理学试验原则和方法
- GB 18278.1 医疗保健产品灭菌 湿热 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求
- GB 18279.1 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制的要求
- GB 18280.1 医疗保健产品灭菌 辐射 第1部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求
- GB/T 26380 纺织品 丝绸术语
- GB/T 32016 蚕丝 氨基酸的测定
- YY/T 0313 医用高分子制品包装、标志、运输和贮存
- YY 0466.1 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分：通用要求
- YY/T 0771.1 动物源医疗器械第1部分：风险管理应用
- YY/T 0771.2 动物源医疗器械第2部分：来源、收集与处置的控制
- YY/T 0771.3 动物源医疗器械第3部分：病毒和传播性海绵状脑病（TSE）因子去除与灭活的确认
- YY/T 1465 医疗器械免疫原性评价方法（系列标准的所有部分）
- YY/T 1571 组织工程医疗器械产品 透明质酸钠
- YY/T 1699 组织工程医疗器械产品 壳聚糖
- SB/T 10407 丝素与丝胶
- SN/T 2843 生丝含胶率的测定方法
- FZ/T 40006-2018 蚕丝含油率试验方法
- 《中华人民共和国药典》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

丝素蛋白 silk fibroin

丝素蛋白是由桑蚕后部丝腺分泌的纤维状蚕丝蛋白。桑蚕丝纤维中的核心蛋白质由理论分子量约为391 kDa的重链(H-chain)、25 kDa的轻链(L-chain)和30 kDa或27 kDa纤维六聚体/P25组成, H链蛋白、L链蛋白和P25蛋白的物质的量比是6:6:1。重链和轻链通过单个二硫键连接, P25为含有ASN寡糖链的糖蛋白, P25与二硫键连接的重链和轻链通过非共价的疏水相互作用连接。

3.2

再生丝素蛋白 regenerated silk fibroin, RSF

别名: 再生丝蛋白, 是蚕丝核心纤维(丝素蛋白纤维)溶解除盐后的蛋白质混合物, 其基本的氨基酸基序(motif)与丝素蛋白相同。再生丝蛋白在脱胶和溶解过程导致其分子链无序降解, 分子量下降至不低于10 kDa分子量, 且分子链的构效关系与丝素蛋白纤维中的构效关系存在较大差别, 通常以微黄色半透明的水溶液的形式存在。按成型和干燥方法的不同, 也可制成水溶性(聚集态结构主要为Silk I)和水不溶性(聚集态结构主要为Silk II)的白色粉末。

注: 制法为天然蚕(茧)丝纤维脱除丝胶蛋白后, 在高浓度盐, 如: 溴化锂、硫氰酸钠、尿素、硝酸钠或氯化钙-乙醇等)的水溶液中充分溶解, 再以透析等方式除盐, 制成各种不同性状的材料, 用于生物、医药、光电和纺织等领域。

3.3

丝胶 sericin

由蚕中部丝腺分泌的球状蛋白质混合物, 蚕吐丝结茧时, 被覆于由丝素蛋白形成的核心纤维表面, 主要起黏结作用以利于核心纤维成茧。其分子量在250 kDa~400 kDa之间, 具有水溶性, 可以在脱胶过程中完全除去。

3.4

生丝 raw silk

以桑蚕茧为原料, 按一定的制丝工艺和质量要求, 用机械方式将若干根茧丝抱合胶着缫制而成的长丝。

[来源: GB/t 26380-2011, 2.2.5]

3.5

茧层 cocoon layer

蚕吐丝形成的蚕茧, 主要由蚕丝纤维核心蛋白质(70%~80%)和丝胶蛋白(20%~30%)组成, 俗称茧壳。

4 分类

根据制备工艺, 分为脱胶处理的天然丝素蛋白纤维和脱胶后再行溶解(或从后丝腺中直接提取纯化)的再生丝素蛋白。

5 动物源性材料要求

用于制作丝素蛋白的桑蚕生丝或桑蚕茧层应按照YY/T 0771.1、YY/T 0771.2、YY/T 0771.3及《动物源性医疗器械产品注册申报资料指导原则》的要求进行管理和控制。

注: 丝素蛋白为昆虫分泌物, 非动物组织来源的蛋白, 理论上不含有细胞成分。

6 性能要求

6.1 性状

脱丝胶处理的天然丝素蛋白纤维为白色或淡黄色固体。再生丝素蛋白可形成白色或淡黄色或无色固体(纤维、粉末, 或海绵、膜、块材等)、溶液或水凝胶等, 无异味。

6.2 分子量

再生丝素蛋白分子量分布通常在10 kDa~400 kDa之间, 企业应提供分子量的下限信息。

6.3 结构表征

6.3.1 总氨基及特征氨基酸分析

总氨基酸含量应大于95 % (质量/质量, 干重), 其中特征氨基酸甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸总含量应不小于76 % (质量/质量)。

6.3.2 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)

丝素蛋白的FT-IR实测谱带应在 $1700\text{ cm}^{-1}\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, $1590\text{ cm}^{-1}\sim 1460\text{ cm}^{-1}$, 以及 $1280\text{ cm}^{-1}\sim 1190\text{ cm}^{-1}$ 处存在特征峰, 分别对应丝素蛋白的酰胺I带、酰胺II带以及酰胺III带。

6.3.3 高级结构

丝素蛋白的聚集态结构有结晶态和无定形态两类。结晶态有两种空间构型, 分别称为 α 型和 β 型, 又称silk I和silk II。silk I呈曲柄形分子链, 由无规卷曲和螺旋构象组成; silk II呈反平行 β -片层结构。在丝素蛋白水溶液与空气界面处存在一种称为silk III的有序形态, 呈三角形结构(三螺旋链构造)。通过改变温度、溶剂极性(如甲醇、乙醇、甲酸、二甲基甲酰胺等)、溶液pH和应力作用, 可使丝素蛋白从silk I向silk II转变。

必要时应进行相应表征。

6.4 蛋白质含量

应 $\geq 96\%$ (质量/质量, 干重)。

6.5 丝胶残留

脱胶后蚕丝纤维的丝胶残留应 $\leq 2\%$ (质量/质量, 干重)。

注: 本项指标仅针对脱胶处理后丝素蛋白纤维。若为再生丝素蛋白需在脱胶工艺中进行控制。

6.6 脂类物质残留量

丝素蛋白中的脂类物质主要为蜡质和其他油脂类物质, 其残留量应 $\leq 0.5\%$ (质量/质量, 干重)。

6.7 pH值

应为5.0~8.0。

6.8 重金属含量

重金属总含量(以Pb计)应 $\leq 10\text{ }\mu\text{g/g}$ (质量分数)。

砷含量 $\leq 1\text{ }\mu\text{g/g}$ (质量分数); 铬、镉、铜、铁、汞、镍、铅、钼总量应 $\leq 50\text{ }\mu\text{g/g}$ (质量分数)。

6.9 干燥失重

应 $\leq 11\%$ (质量/质量, 干重)。

注: 本项目仅针对固态丝素蛋白。

6.10 炽灼残渣

应 $\leq 1.5\%$ (质量/质量, 干重)。

6.11 试剂残留

6.11.1 概述

应对工艺中使用的试剂(如溴化锂、尿素、硼砂、硼酸、氯化钙等)进行残留量检测, 并根据其潜在风险进行限量控制。

6.11.2 溴化锂残留量

若使用溴化锂溶解丝素蛋白纤维, 制备再生丝素蛋白, 则干重下单位质量溴离子含量应 $\leq 80\text{ mg/g}$, 锂离子含量应 $\leq 2\text{ mg/g}$ 。

注: 人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)于2014年12月发布Q3D Step 4版《元素杂质指导原则》, 提供的元素大致PDE标准(每日允许暴露量)列表中, 锂元素口服制剂的每日允许暴露量为 $550\text{ }\mu\text{g}$, 注射剂的每日允许

暴露量为220 μg。

6.11.3 环氧乙烷 (E0) 残留

若采用环氧乙烷灭菌，应按照GB/T 16886.7中的规定，对灭菌后产品中环氧乙烷残留进行检测，残留量应≤10 μg/g。

6.12 细菌内毒素含量

应≤0.05 EU/mg(干重)。

6.13 无菌试验

应无菌。

注：如果丝素蛋白以无菌方式提供，需进行该项目的检测，并按照GB 18278.1、GB 18279.1、GB 18280.1进行灭菌工艺确认。

6.14 微生物限度

每克 (g) 供试品中需氧菌总数应<100 cfu，霉菌和酵母菌菌落数应<20 cfu，不得检出金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌。

注：如果丝素蛋白以非无菌的方式提供，则进行该项目的检测。

6.15 生物学评价

6.15.1 作为制备医疗器械产品的原(材)料，应按照GB/T 16886.1的要求对丝素蛋白进行相应的生物学评价。

6.15.2 丝素蛋白是人体中不存在的蛋白质，宜根据其预期的使用目的(适用时)，对其可能的免疫原性和对人体的潜在免疫毒理学风险进行充分评价。

7 试验方法

7.1 性状

肉眼直接观测，应符合6.1规定。

7.2 分子量

7.2.1 流变学法

按照附录B，采用流变学方法测试供试品的平均分子量，应符合6.2规定。

7.2.2 电泳法

固体样品需用纯化水或9.3 mol/L溴化锂溶液溶解，制成1 mg/mL溶液，液体样品使用纯化水稀释至1 mg/mL作为供试液，按《中华人民共和国药典》(2020年版)四部，通则0541 电泳法，第五法 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法的规定进行检验，给出最低分子量，并应符合6.2规定。

注：若测试条带出现偏离或不在同一直线上，需用蛋白质快速脱盐柱对供试液进行脱盐处理。

7.3 结构表征

7.3.1 特征氨基酸分析

按照GB/T 32016 蚕丝氨基酸的测定中酸水解法对丝素蛋白样品进行预处理，使用氨基酸分析仪进行氨基酸含量的测定，并计算丝氨酸、丙氨酸、甘氨酸的总含量，结果应符合6.3.1规定。

7.3.2 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR)

将丝素蛋白干燥至恒重，按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部，通则0402，红外分光光度法规定的衰减全反射方法测定，应符合6.3.2规定。

7.3.3 高级结构

参考《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0421,拉曼光谱法或《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0451,X射线衍射法对供试品进行检测,结果应符合6.3.3的要求。

7.4 蛋白质含量

按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0731 蛋白质含量测定法中规定的第一法 凯氏定氮方法 测定法(2)测定,结果应符合6.4规定。

注:除另有规定外,换算系数通常按6.25计算。建议企业结合自身原料和产品的氨基酸分析结果,计算换算系数,完成验证,并在检验报告中注明。

7.5 丝胶残留

根据SN/T 2843 生丝含胶率的测定方法中规定的方法测定,结果应符合6.5规定。

7.6 脂类物质含量

按照FZ/T 40006-2018 蚕丝含油率试验方法测试,结果应符合6.6规定。

7.7 pH值

丝素蛋白溶液直接使用pH计检测,固体丝素蛋白样品使用浸提液检测。按照GB/T 16886.12“医疗器械生物学评价 第12部分:样品制备与参照样品”中的规定制备浸提液。取浸提液或丝素蛋白溶液,按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0631:pH值测定法的规定检测,结果应符合6.7规定。

7.8 重金属含量

重金属总含量按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0821,重金属检查法第二法的规定进行检测;铬、镉、铜、铁、镍、铅、钼的含量按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0406,原子吸收分光光度法的规定进行检测;砷、汞的含量按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0405,荧光光度法的规定进行检测。结果应符合6.8规定。

7.9 干燥失重

按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0831:干燥失重测定法规定,结果应符合6.9规定。

7.10 炽灼残渣

取一定质量的样品,按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0832,水分测定法,第二法(烘干法)规定的方法干燥并精密称重。按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0841“炽灼残渣检查法规定进行检测,结果应符合6.10规定。

7.11 试剂残留

7.11.1 按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0513,离子色谱法或《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则0412,电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)的规定检测溴离子和锂离子残留量,结果应符合6.11.2规定。

7.11.2 按照GB/T 16886.7 医疗器械生物学评价 第7部分 环氧乙烷灭菌残留量规定的方法检验环氧乙烷残留量,结果应符合6.11.3规定。

7.12 细菌内毒素含量

按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则1143,细菌内毒素检查法的规定进行检测,结果应符合6.12规定。

7.13 无菌试验

按照《中华人民共和国药典》(2020年版)四部,通则1101,无菌检查法的规定进行检测,结果应符合6.13规定。

7.14 微生物限度

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）四部，通则1105，非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法的规定进行检测，结果应符合6.14规定。

7.15 生物学评价

7.15.1 按照 GB/T 16886 系列标准进行相应的生物学评价。

注：如果产品以非无菌的方式提供，可将样品灭菌后用于生物学评价试验。

7.15.2 按照 GB/T 16886.20 和 YY/T 1465 系列标准（适用部分）进行必要的免疫原性和免疫毒理学评价。

7.15.3 材料的细胞生物学效应评价

建议选择适当的细胞如成纤维细胞，进行材料的细胞生物学效应评价，如细胞在材料上粘附、增殖和/或迁移等。

8 稳定性

在规定贮存条件下进行稳定性研究。如样品采用灭菌工艺，应研究灭菌方法对样品性能和稳定性的影响。

9 包装、运输和贮存

9.1 若生产商作为本单位研发医疗器械产品的初始材料（原材料）时，应按照医疗器械生产中对原材料管理的质量体系进行包装、贮存、运输相关管理。

9.2 若生产商作为医疗器械研发的原材料销售时，建议参照医疗器械产品对包装、贮存、运输的要求，提供必要的信息。应采用适宜的包装，确保丝素蛋白产品的安全性和有效性。

附录 A (资料性)

丝素蛋白在生物医用领域研究进展

A.1 丝素蛋白的基本结构特性

天然丝素蛋白是由桑蚕后部丝腺分泌的纤维状丝素蛋白^[1]。天然桑蚕丝纤维中的核心蛋白质由理论分子量约为391 kDa的重链(H-chain)、25 kDa的轻链(L-chain)和30 kDa或27 kDa纤维六聚体/P25组成, H链蛋白、L链蛋白和P25蛋白的物质的量比是6:6:1。重链和轻链通过单个二硫键连接, P25为含有ASN寡糖链的糖蛋白, P25与二硫键连接的重链和轻链通过非共价的疏水相互作用连接^[2]。

桑蚕丝素蛋白的氨基酸主要由甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸组成。丝素蛋白重链由12个重复序列(domains)组成, 这些重复序列形成了丝素蛋白纤维的结晶区, 这些重复序列与非重复的一级序列相互交错, 从而在纤维中形成较少的有序区域。纤维结晶区为甘氨酸-X重复序列, X为丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸。结晶区平均由381个氨基酸残基组成(第7重复序列含596个氨基酸残基, 第12重复序列含36个氨基酸残基)。每个重复序列都包含六肽或八肽的子重复序列, 包括:GAGAGS、GAGAGAGY或GAGAGA等。这些子重复序列末端与GAAS或GAGS四肽序列连接。非结晶区即晶区的连接部分, 长度为42~44个氨基酸残基。所有的非结晶区都有一个相同的25个氨基酸残基(非重复序列), 它是由结晶区中没有的带电氨基酸组成的。丝素蛋白的一级序列结构具有天然的共嵌段聚合物结构特征^[3-4]。

桑蚕丝素蛋白的分子链构象包括无规卷曲、 β -折叠、 β -转角, 以反向平行 β -折叠为基础。天然桑蚕丝纤维中 β -折叠构象的含量很高, 且 β -折叠的取向是沿着纤维轴高度取向, 这赋予蚕丝纤维优良的力学性能^[5]。另外, 蚕丝纤维中结晶区和非结晶区两部分交替分布, 受应力作用时非结晶区可吸收大部分的能量, 从而使蚕丝具有较好的韧性^[6]。

丝素蛋白可形成具有多种晶型的凝聚态结构, 包括结晶前的腺体状态(silk I)、由 β -折叠二级结构组成的绢丝状态(silk II)和空气/水组装界面丝(silk III, 具有螺旋结构)。其中, silk I结构为水溶性状态, 在丝素蛋白的溶液中, 大分子链间一般以无规线团及少量的螺旋结构为主。其在受热或物理旋转时容易转变为 β -折叠结构为主的silk II结构, 例如通过调节溶液中金属离子与氧化物交联剂的浓度、或改变pH值、温度、电场等条件。 β -折叠结构是不对称的, 一侧被甘氨酸的氢侧链占据, 另一侧被疏水区丙氨酸的甲基侧链占据。 β -折叠有序排列, 使得甲基基团和 β -折叠中的氢键形成晶体中折叠间堆叠, 通过氢键和范德华力产生热稳定结构; 同时, 垂直于 β -折叠方向的氨基酸之间形成链内或链间氢键, 可影响丝素蛋白基材料的力学性能^[7]。

A.2 丝素蛋白材料的制备方法

丝素蛋白可从桑蚕体内后部丝腺中直接提取, 或通过脱胶并溶解和透析等处理从桑蚕丝中提取。常用的提取方法如下:

a) 桑蚕丝腺中直接提取: 蚕到五龄末期丝腺内腔充满液状无规线团的丝物质, 后部丝腺分泌的丝素是非结晶化的 α 型丝素溶胶。在蚕达到五龄后6~8天时(吐丝结茧前)进行解剖, 取出后部丝腺, 浸泡于预冷的注射用水中(约4℃), 摇床处理7~8小时, 过滤去除杂质, 得到丝素蛋白水溶液^[8]。

b) 蚕丝脱胶: 一般可使用碱性试剂脱胶(如碳酸钠、碳酸氢钠、尿素等)、酸性试剂脱胶(酒石酸、柠檬酸等有机酸)、中性皂液脱胶、高温高压水脱胶、酶法脱胶(如木瓜蛋白酶、胰蛋白酶等)。其中使用碳酸钠脱胶是目前最常用的脱胶方法, 其对丝胶的溶解作用强, 脱胶效率高。有机酸脱胶较少使用; 中性皂液脱胶较温和, 丝胶残留较多; 高温高压水脱胶对丝素纤维的力学性能影响较大; 酶法脱胶是利用酶作用与丝胶蛋白主链上的特定氨基酸位点, 催化肽键水解, 从而将蚕丝外围的丝胶蛋白除去, 该方法脱胶效果较碳酸钠脱胶弱, 长时间浸泡在酶溶液中, 丝素蛋白表面会被逐渐腐蚀/降解^[9-11]。总之, 采用不同脱胶程序/试剂, 均能有效地除去丝胶蛋白, 但其对丝纤维的表面形貌、所获丝素蛋白的分子量以及丝素蛋白基材料的力学性能等也有很大的影响。

A.3 不同类型丝素蛋白材料在再生医疗领域中的应用前景

A.3.1 概述

天然丝素蛋白纤维可经编织形成线状、管状、网片等结构，分别用于肌腱、韧带、血管、气管或其他软组织的再生修复。例如Zhang W等^[12]利用丝素蛋白纤维编织成规则网孔结构平片，其具有良好的力学性能如拉伸强度和伸长率，较聚丙烯材质的网片柔软度更高，在大鼠腹壁大面积缺损模型的修复实验中，表现出良好的修复效果，预期可用于腹壁疝的修复治疗。同时，Shen WL等^[13]将丝素蛋白网片用于肩袖损伤的修复，Zou XH等^[14]将丝素蛋白网片用于压力性尿失禁的治疗，丝素蛋白网片均显示出良好的组织修复能力。

天然丝素蛋白纤维通过溴化锂、六氟异丙醇或氯化钙/乙醇溶液等溶解成形成再生丝素蛋白溶液。再生丝素蛋白溶液可进一步衍生加工成薄膜、多孔海绵支架、静电纺丝支架、水凝胶、微球、粉末或3D打印原料等，用于制作各类组织工程支架产品。采用不同溶解和透析试剂、透析程序，对所获再生丝素蛋白溶液的分子量以及力学性能等有很大的影响。Yuan QQ等^[15]采用溴化锂水溶液对定向排列的脱胶桑蚕丝进行可控的表面溶解，再与高浓度的再生丝蛋白水溶液一起浇筑成型，获得一种高性能得蚕丝蛋白复合材料。该复合材料拉伸断裂强度可由原60 MPa上升至77 MPa，断裂伸长率由2.1%上升到21.9%。

A.3.2 再生丝素蛋白膜

Minoura N等^[16-17]研究证明再生丝素蛋白膜和胶原蛋白膜对成纤维细胞、其他哺乳动物细胞以及昆虫细胞均表现出相当的粘附能力。Zhang W等^[18]使用再生丝素蛋白水溶液制备一种透明、致密、湿润环境下柔软的薄膜，这种膜状支架具有良好的水蒸气透过能力和阻菌性，经兔和猪全层皮肤缺损修复实验证明该支架可有效缩短创面愈合时间，且在71例临床试验中也得到相同结论，证明再生丝素蛋白膜是一种良好的皮肤修复支架。

A.3.3 再生丝素蛋白多孔海绵支架

Cao Z等^[19]将再生丝素蛋白与不同的醇溶剂在不同的比例下进行混合与冷冻，发现当再生丝素蛋白溶液与添加的正丁醇体积比为10:1~5:3时，制备的再生丝素蛋白多孔支架具有良好的机械性能，该支架具有较高的孔隙密度、而且具有开孔式、互传网络结构，这有利于细胞的黏附与增殖，同时也有利于体液在支架中的流通。再生丝素蛋白多孔海绵支架可用于骨或软骨组织的修复。Kaplan DL团队研究证明再生丝素蛋白多孔海绵有助于大鼠临界尺寸股骨缺损的修复^[20]；大孔径（900 μm）再生丝素蛋白海绵支架可用作骨组织工程支架，接种人间充质干细胞，并使用成骨诱导液体外培养28天，可观察到类似骨小梁的结构^[21]。再生丝素蛋白海绵支架在体内缓慢降解，在该支架上接种人间充质干细胞并使用成软骨培养基进行培养，与胶原海绵支架比较，再生丝素海绵支架中细胞的II型胶原和糖胺聚糖转录因子的表达上调显著高于胶原海绵支架^[22]。Aoki H等^[23]分别将软骨细胞接种至再生丝素蛋白海绵和胶原蛋白海绵中培养，细胞在丝素蛋白海绵中增殖更快，产生的糖胺聚糖含量高于胶原海绵；Morita Y等^[24-25]在再生丝素蛋白多孔海绵支架中接种软骨细胞，体外培养28天后，支架表面的摩擦系数与天然软骨相似。

A.3.4 再生丝素蛋白静电纺丝支架

Jin HJ等^[26-27]通过静电纺丝的方法制备出直径小于800 nm的再生丝素蛋白纳米纤维支架，人间充质干细胞可在这种再生丝素蛋白电纺材料表面粘附并铺展生长。Ayutsede J等^[28]使用甲酸作为溶剂，通过静电纺丝制作的再生丝素蛋白纤维直径约为100 nm，但其力学性能更高，杨氏模量可达515 MPa，拉伸强度可达7.25 Mpa。Dal Pra I等^[29]使用甲酸和少量氯化钙经电纺制备再生丝素蛋白非织造支架，该支架生物相容性良好，经组织学、mRNA转录水平和免疫组化研究均表明，该支架可促进血管化网状结缔组织形成。

A.3.5 再生丝素蛋白水凝胶

Yan Z等^[30]制备一种再生丝素蛋白双网络水凝胶材料，该水凝胶材料在体外表现出良好的细胞相容性和骨诱导性，且兔前交叉韧带重建（ACLR）模型中，该材料表现出显著的生物力学性能，并在宿主骨隧道中有显著的新骨长入。Fini M等^[31]将再生丝素蛋白水凝胶注射到兔股骨临界尺寸缺损中，与聚（D，L-丙交酯-乙交酯）水凝胶相比，再生丝素蛋白水凝胶可产生的骨小梁体积和厚度更大、矿物质含量更多和骨形成率更高。Lu Y等^[32]将再生丝素蛋白水凝胶用于面神经缺损的修复，在SD大鼠面神经5 mm缺损的修复中，大鼠神经得以成功再生，再生丝素蛋白材料组较壳聚糖材料对照组在长时间点有显著的差异，具有良好的修复效果，预期可用于神经再生。Wang SH等^[33]研究了可注射再生丝素蛋白在药物水凝胶在药物控释中的应用，通过超声法制得了具有两种不同药物释放行为的（RSF/CA4P）-（SBA-15/DOX）可

注射水凝胶，其中CA4P可快速释放，用于破坏肿瘤血管，阻断肿瘤细胞营养输送，而DOX可缓慢释放，用于抑制肿瘤细胞生长，这种药物控释水凝胶在较长时间内对人乳腺肿瘤细胞（MDA-MB-231）的增殖有较强的抑制作用，同时达到了降低DOX的使用剂量但仍能保持高效的抗肿瘤细胞作用的目的。

A.3.6 再生丝素蛋白微球

Wang XQ等^[34-36]研究证明再生丝素蛋白微球可用于药物、生长因子或小分子物质的递送。Shi LB等^[37]使用丝素蛋白微球作为细胞三维培养支架载体，接种脂肪干细胞的微球可用于修复尿道括约肌损伤，从而改善尿失禁症状。

A.3.7 其他

Xuan M等^[38]研究了再生丝素蛋白材料在3D打印中的应用，通过对再生丝素蛋白分子进行化学改性处理，可实现丝素蛋白快速光交联，由此，可利用3D打印技术制作复杂组织和器官支架。Guo等^[39]报道了一种将再生丝素蛋白直接固态模塑成具有可调机械性能的大块“零件”或器件的热处理方法，该方法使蚕丝材料在作为硬组织修复材料方面提供了可能。Liu K等^[40]通过甲醇再结晶方法制备出一种再生丝素蛋白实体材料用于颅骨固定，通过调控再生丝素蛋白分子量及结晶水平可对该材料的力学和降解特性进行调控，该材料在动物体内显示出良好的生物相容性。

附录 B

(规范性)

再生丝素蛋白分子量测定——流变学方法

B.1 原理

本方法通过确定样品的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 与拟合理论数值的偏离量来测定丝素蛋白的数均分子量和重均分子量^[41]。

在丝素蛋白离子液体溶液的稳态流变行为中表现出典型的高分子溶液行为,即:在不同浓度的测试范围内,丝素蛋白浓度越大,溶液黏度越大;并且高浓度再生溶液的黏度值与腺体中天然丝素蛋白溶液的黏度值在数量级上是很接近的。在不同浓度下,溶液黏度的剪切速率依赖性呈现几种不同的趋势,即:

1) 低剪切速率下的剪切变稀行为; 2) 中等剪切速率下的牛顿流体行为; 3) 高剪切速率下的剪切变稀行为。高浓度溶液(浓度>7 wt%)则随着剪切速率的增大,流动曲线直接由低剪切区域的牛顿流体平台紧接着进入高剪切区域的剪切变稀状态,这种剪切变稀行为与传统的高分子溶液非常相似。

在Flory-Huggins高分子溶液理论中, Huggins参数 K_H 能够反映高分子与溶剂混合时相互作用能的变化,一般来说 $K_H < 0.5$ 时,高分子链在稀溶液下能够舒展,可判断该溶剂为高分子的良溶剂。通过计算Huggins参数,可以定量的确定丝素蛋白在离子液体溶液中的状态。在既往的研究中¹,所测得丝素蛋白在离子液体(1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐, AmimCl)溶液的Huggins参数 $K_H < 0.1$,说明该离子液体是丝素蛋白分子的良溶剂,意味着丝素蛋白在该溶剂中呈现单链状态。

高分子浓溶液除了表现出黏性液体的特性,同时也具有弹性固体的特性,这种兼而有之的特性即为高分子溶液的黏弹性。高分子浓溶液中,高分子链伸展并相互贯穿、相互缠结,形成拓扑缠结网。该缠结行为所表现出的性质又能够反映出高分子链的结构、组成等信息。动态力学法是研究高分子黏弹性的方法之一。对于高分子溶液来说,流变学方法中的动态剪切法可以测量高分子溶液的黏弹性。其原理是流变仪的平板对高分子溶液施加交变的应变,同时测定其应力的变化。当达到平衡时,应力和应变二者都按正弦函数形式变化。

在由蚕丝经历脱胶和溶解两步骤获取再生丝素蛋白溶液的过程中,必然会引起再生丝素蛋白分子链的无序降解,从而致使丝素蛋白由天然腺体中的单一明确分子量转变为多分布的分子量。Rouse模型描述了溶液模量与高分子溶质的浓度及分子量的关系,因此通过模型对实验测量的数据进行拟合,就可获得体系中再生丝素蛋白的分子量。

对于高分子分子量多分散体系,溶液的动态模量,不仅与高分子溶质的平均分子尺寸(分子量)有关,还与不同分子尺寸的高分子溶质所占的比例有关。换言之,多分散体系的分子量分布对于低频率下的储存模量有很大影响,导致了与偏离的指数依赖关系。因此,为了更好地拟合以获取较接近于实际的分子量数据,采用修正的模型重新进行拟合,通常以分子量平均值描述。基于对于材料的同一黏弹性行为,低温与高频的影响是等效的,即“时温等效(TTS)原理”,通过测定样品的储能模量(G')和损耗模量(G''),以30℃为参考温度,将低温下数据经平移即可获得高频区数据,以获得主曲线。然后将主曲线与拟合数值进行对比,即可得到样品的重均分子量和数均分子量,以及多分散指数。

B.2 仪器、试剂与材料

B.2.1 仪器

主要仪器如下:

a) 流变仪: 选用可用于低黏度流变学测试的流变仪(如安东帕公司的Physica MCR301应力控制流变仪等);

- b) 冷冻干燥机;
- c) 油浴锅;
- d) 油泵减压蒸馏装置;
- e) 干燥箱。

B.2.2 试剂与材料

主要试剂与材料如下:

- a) 1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐 (1-allyl-3-methylimidazolium chloride, AmimCl);
- b) 液氮;
- c) 低黏度硅油 (黏度约为10 mPa·s)。

B.3 样品制备

B.3.1 样品溶解

将供试品用适当方法干燥后 (含水量<5 wt%), 按10%~15%的浓度将丝素蛋白粉末溶于1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐离子液体中, 使其充分溶解, 溶解时间一般为1.5 h。

注: 不同分子量的丝素蛋白样品在1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐 (AmimCl) 中的溶解能力有所不同。

B.3.2 冷冻干燥除水

将B.3.1制备的样品放入烧杯置于液氮中冷冻0.5 h, 使离子液体充分固化; 再置于冷冻干燥机中充分抽湿3天后取出, 即刻密封, 室温条件下解冻。

B.3.3 减压溶解

将步骤 (B.3.2) 的丝素蛋白离子液体混合物在搅拌状态下, 油浴加热 (温度不高于120 °C), 并用油泵减压蒸馏 (真空度范围: -0.06 MPa~-0.1 MPa), 以除去混合物中可能残余的微量水分并消除气泡, 加热至丝素蛋白完全溶解即可。停止加热和搅拌, 降温后得到均匀透明溶液。

所得丝素蛋白离子液体溶液在密封干燥的环境下室温保存, 备用。

B.4 测试步骤

B.4.1 黏度测试

选择合适直径 (使数据不超过流变仪的测试范围, 且能获得稳定信号), 如25 mm的平行板 (Parallel plate, PP25)。测试过程中通过控温罩 (H-PTD200 hood with peltier heating/cooling) 的氮气吹扫对测试进行保护; 此外, 在样品与平行板边缘滴加很薄的一层低黏度硅油 (黏度约为10 mPa·s), 以防止测试过程中样品对水汽的吸收。

采取稳态测试模式: 实验温度为30 °C, 剪切速率由低到高进行扫描, 剪切速率范围为: 10^{-3} s^{-1} ~ 10^3 s^{-1} 。记录平台曲线的黏度数值。

B.4.2 储能模量及损耗模量测试

样品放置和测试准备同B.4.1

采用线性动态弹性测试模式, 即震荡模式的应变振幅控制在10%以下, 以确保在频率扫描范围 ($1 \times 10^2 \text{ rad/s}$ ~ $6.81 \times 10^2 \text{ rad/s}$) 内存储模量 (G') 和损耗模量 (G'') 为线性。测试在30%~40%的相对湿度下进行。

在几个不同温度下（0℃、10℃、20℃和30℃）进行频率扫描，得到不同温度下样品的储能模量和损耗模量曲线，每次测试时间保证在1.5 h以内。

B.5 计算

B.5.1 体系成立的确认

采用AmimCl溶剂体系时，文献^[1]验证实验研究表明体系的Huggins参数 K_H 约为0.1，可判断该溶剂为丝素蛋白的良溶剂。具体按式（1）～（3）计算。

- a) 通过测量同一温度下溶液和溶剂在不同浓度下的黏度，按式（1）计算比黏度。

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_s}{\eta_s} \dots\dots\dots(1)$$

式中，

η_{sp} ——比黏度，Pa·s；
 η ——溶液的黏度，Pa·s；
 η_s ——溶剂的黏度，Pa·s；

- b) 根据浓度逼近时的极限值，按式（2）计算特性黏数的值。

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \dots\dots\dots(2)$$

式中，

$[\eta]$ ——特性黏数，mL/g；
 η_{sp} ——比黏度，Pa·s；
 C ——溶液的质量浓度，g/mL。

- c) 由溶液的黏度按式(3)计算Huggins参数：

$$\eta_{sp} = C[\eta] + K_H(C[\eta])^2 + A(C[\eta])^n \dots\dots\dots(3)$$

式中，

η_{sp} ——比黏度，Pa·s；
 C ——溶液的质量浓度，g/mL；
 $[\eta]$ ——特性黏数，dL/g；
 A ——溶剂的黏度，Pa·s；
 K_H ——Huggins参数。

注1：本文件验证实验证实采用 AmimCl 溶剂体系的 Huggins 参数 K_H 约为0.1，符合要求，可不做验证；

注2：若采用其他溶剂体系，则需要验证。

B.5.2 分子量拟合计算

将所测得流变学数据以及黏度数据等导入Favorsun SmartMolFit“复向智算”生物大分子分子量计算商用软件，计算数均分子量和重均分子量。或者按式（4）～（10）计算。

- a) 储能模量和损耗模量：仪器参数设置中，应变 $\varepsilon = \varepsilon_0 \sin \omega t$ ，应力 $\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)$ ， ω 为角频率， δ 为应力超前相角。将应力展开为 $\sigma = \sigma_0 \sin \omega t \cos \delta + \sigma_0 \cos \omega t \sin \delta$ 。应力—应变关系可以进一步用一个和应变同相位的储能模量（ G' ）和一个与应变相位差为 $\pi/2$ 耗能模量（ G'' ）表示，如式（4）～式（6）：

$$\sigma = \varepsilon_0 G' \sin \omega t + \varepsilon_0 G'' \cos \omega t \dots\dots\dots(4)$$

$$G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos\delta \dots \dots \dots (5)$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin\delta \dots \dots \dots (6)$$

其中，储能模量 G' ，反映施加应变后在样品中储存的能量；损耗模量 G'' ，反映响应过程中能量的损耗。在动态剪切法中，流变仪可以给出储能模量与损耗模量随交变剪切频率 ω 的关系。储能模量和损耗模量可以从仪器测试结果中直接获得。

- b) 位移因子的计算：利用测试步骤 B.4.1 中的不同温度下样品的黏度曲线来计算位移因子(α_T)，按式(7)计算：

$$\alpha_T = \frac{\eta(T)T_0}{\eta(T_0)T} \dots \dots \dots (7)$$

式中，

α_T ——位移因子；

$\eta(T)$ ——不同温度下样品的黏度，Pa·s；

$\eta(T_0)$ ——30 °C下样品的黏度，Pa·s；

T ——不同测试温度，K；

T_0 ——303 K；

- c) 分子量分布曲线拟合：假定溶液中分子量为10 kDa~40 kDa的丝素蛋白分子的概率密度，代入Rouse模型，按公式(8)~(10)得到拟合曲线：

$$G' = \sum_i \left[f(i) \left(\frac{\rho RT}{M_i} \right) \sum_{p=1}^N \frac{\omega^2 \tau_{ip}^2}{1 + \omega^2 \tau_{ip}^2} \right] \dots \dots \dots (8)$$

$$G'' = \sum_i \left[f(i) \left(\frac{\rho RT}{M_i} \right) \sum_{p=1}^N \frac{\omega \tau_{ip}}{1 + \omega^2 \tau_{ip}^2} \right] \dots \dots \dots (9)$$

$$\tau_p = \frac{6\eta_0 M}{\pi^2 p^2 RT} \dots \dots \dots (10)$$

式中，

G' ——储能模量，Pa；

G'' ——损耗模量，Pa；

ρ ——单位体积溶液中高分子的质量，g/cm³；

R ——气体常数，8.31*10⁶ Pa·cm³/(mol·K)；

T ——测试时的绝对温度，K；

M_i ——丝素蛋白分子的分子量，设定为10 kDa~40 kDa；

$f(i)$ ——分子量为 M_i 的概率密度；

η_0 ——高分子溶液的黏度，Pa·s；

τ_p ——分子量 M 的高分子链的第 p 种松弛模式的松弛时间，s。

- d) 分子量计算：利用式(7)得到的位移因子 α_T ，将测试步骤 B.4.2 的测试结果进行平移，将低温下测试数据经平移获得高频区数据，获得主曲线；将主曲线与步骤 B.5.2 c) 得到的拟合曲线进行对比，不断迭代直至主曲线与拟合曲线达到最优重合，即：在优化过程中引入动态收敛因子，通过自适应权重策略，提高优化算法的全局寻优能力。随着迭代次数的递增，动态收敛因子的数值逐渐减小到0，当前迭代次数达到最大迭代次数时，收敛过程终止，即为“最优重合”。此

假定值即为溶液中分子量为 10 kDa 到 40 kDa 的丝素蛋白的真实概率密度。再由此概率密度进行进一步计算，可得到丝素蛋白的数均分子量、重均分子量以及分子量分布指数，按式 (11)、(12) 计算。

$$M_n = \sum_i f(i) * M_i \quad \dots\dots\dots(11)$$

$$M_w = \frac{\sum_i f(i) * M_i^2}{\sum_i f(i) * M_i} \quad \dots\dots\dots(12)$$

式中，

M_n ——丝素蛋白的数均分子量，kDa；

$f(i)$ ——分子量为 M_i 的概率密度；

M_i ——丝素蛋白分子的初始假定分子量，设定为 10 kDa~40 kDa；

M_w ——丝素蛋白的重均分子量，kDa；

B.6 测试和计算示例

B.6.1 测试样品信息

以下以 0.5 M 碳酸钠溶液沸腾脱胶 45 min 处理的脱胶丝素蛋白为例，给出分子量测试和拟合计算过程示例。

B.6.2 黏度测定

具体测试方法按照 B.4.1，黏度测定结果为 150 Pa·s。

B.6.3 储能模量及损耗模量测试

具体测试方法按照 B.4.2，不同温度下的储能模量及损耗模量测试结果如图所示，随着：

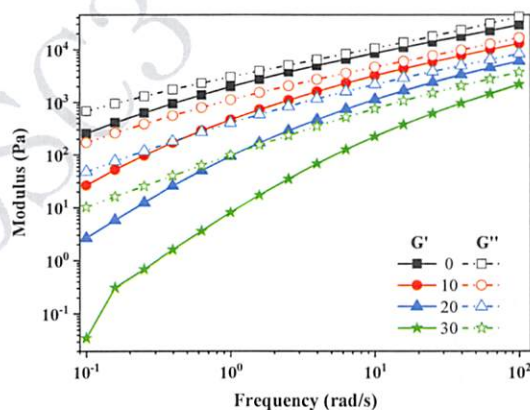


图 B.1 15 wt%脱胶丝素蛋白/AmimCl 溶液在不同温度下的储能模量和损耗模量

B.6.4 分子量拟合计算

B.6.4.1 主曲线的获得

利用 B.5.2 b) 得到的位移因子 α_T ，将 B.6.3 的测试结果（图 B.1）进行平移，将低温下测试数据经平移获得高频区数据，获得主曲线，如图 B.2 所示。

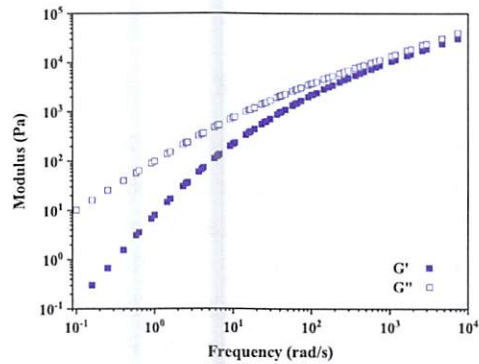


图 B.2 时温叠加后 15 wt%脱胶丝/AmimCl 溶液的储存模量和损耗模量在 30 °C 下的主曲线。

B.6.4.2 主曲线的拟合

将主曲线与步骤 B.5.2 c) 得到的拟合曲线进行对比，不断迭代直至主曲线与拟合曲线达到最优重合，如图 B.4 所示。

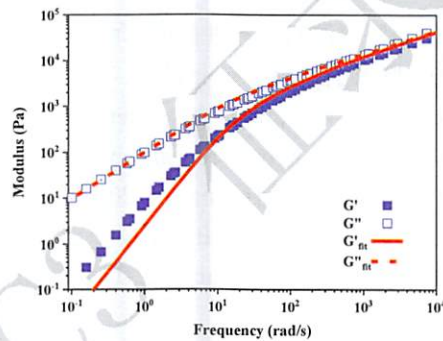


图 B.3 对 15 wt%脱胶丝/AmimCl 溶液的黏弹性数据经 Rouse 拟合得到储能模量和损耗模量

最终得到“最优重合”的丝素蛋白重均分子量为 143 kDa，数均分子量为 67 kDa，分布指数为 2.14。

参 考 文 献

- [1] 黄国瑞主编, 茧丝学, 农业出版社, 1994年5月第1版
- [2] Inoue SS, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S. Silk Fibroin of *Bombyx mori* Is Secreted, Assembling a High Molecular Mass Elementary Unit Consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 Molar Ratio. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 40517-40528
- [3] 邵正中著, 蚕丝、蜘蛛丝及其丝蛋白, 化学工业出版社, 2015年
- [4] Vepari C, Kaplan. Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci.*, 2007, 32(8-9): 991
- [5] Shao ZZ, Vollrath F. Surprising strength of silkworm silk. *Nature*, 2002, 418(6899) : 741
- [6] 周燕, 吴惠英. 再生丝素蛋白水凝胶的性质及应用. *丝绸*, 2016, 53(4) : 29
- [7] Oztoprak Z, Okay O. Reversibility of strain stiffening in silk fibroin gels. *Int J Biol Macromol.*, 2017, 95: 24
- [8] 代时春等, 家蚕后部丝腺丝素蛋白的制备. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(12): 2269
- [9] 黄倩, 牛陇星, 梁阿辉, 骆红, 李明忠: 蚕丝脱胶方法的分析和比较. *现代丝绸科学与技术*, 2019, 34(5): 5
- [10] 周小进, 董雪: 不同脱胶方法对蚕丝性能的影响分析. *针织工业*, 2013
- [11] 张雨清: 蚕丝脱胶方法的比较分析. *蚕业科学*, 2002, 28(1): 75
- [12] Zhang W, Li Y, Jiang DM, Xie SJ, Zeng MF, Chen JL, Chen LK, Ouyang HW, Zou XH. Promotion of Hernia Repair with High-Strength, Flexible, and Bioresorbable Silk Fibroin Mesh in a Large Abdominal Hernia Model. *ACS Biomater Sci Eng.*, 2018, 4(6): 2067-2080
- [13] Shen W, Chen J, Yin Z, Chen X, Liu H, Heng BC, Chen W, Ouyang HW. Allogeneous tendon stemprogenitor cells in silk scaffold for functional shoulder repair. *Cell Transplant*, 2012, 21(5): 943-58
- [14] Zou XH, Zhi YL, Chen X, Jin HM, Wang LL, Jiang YZ, Yin Z, Ouyang HW. Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for urinary incontinence treatment. *Biomaterials*, 2010, 31(18): 4872-9
- [15] Yuan QQ, Yao JR, Chen X, Huang L, Shao ZZ. The preparation of high performance silk fiber/fibroin composite. *Polymer*, 2010, 51(21): 4843-4849
- [16] Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrices. *J Biomed Mater Res.*, 1995, 29(10): 1215-1221
- [17] Minoura N, Aiba S, Higuchi M, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1995, 208(2): 511-516
- [18] Zhang W, Chen LK, Chen JL, Wang LS et al.. Silk Fibroin Biomaterial Shows Safe and Effective Wound Healing in Animal Models and a Randomized Controlled Clinical Trial, *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6: 1700121
- [19] Cao Z, Wen J, Yao J, Chen X, Ni Y, Shao Z. Facile fabrication of the porous three-dimensional regenerated silk fibroin scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33(6): 3522-9
- [20] Meinel L, Fajardo R, Hofmann S, Langer R, Chen J, Snyder B, Vunjak-Novakovic G, Kaplan D. Silk implants for the healing of critical size bone defects. *Bone*, 2005, 37(5): 688-698

- [21] Kim HJ, Kim UJ, Vunjak-Novakovic G, Min BH, Kaplan DL. Influence of macroporous protein scaffolds on bone tissue engineering from bone marrow stem cells. *Biomaterials*, 2005, 26(21): 4442–4452
- [22] Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng.*, 2004, 88(3): 379–391
- [23] Aoki H, Tomita N, Morita Y, Hattori K, Harada Y, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y. Culture of chondrocytes in fibroin-hydrogel sponge. *Biomed Mater Eng* 2003, 13(4): 309–316
- [24] Morita Y, Tomita N, Aoki H, Wakitani S, Tamada Y, Suguro T, Ikeuchi K. Visco-elastic properties of cartilage tissue regenerated with fibroin sponge. *Biomed Mater Eng.*, 2002, 12(3): 291–298
- [25] Morita Y, Tomita N, Aoki H, Sonobe M, Wakitani S, Tamada Y, Suguro T, Ikeuchi K. Frictional properties of regenerated cartilage in vitro. *J Biomech.*, 2006, 39(1): 103–109
- [26] Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*, 2002, 3(6): 1233–1239
- [27] Jin HJ, Chen J, Karageorgiou V, Altman GH, Kaplan DL. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials*, 2004, 25(6): 1039–1047
- [28] Ayutsede J, Gandhi M, Sukigara S, Micklus M, Chen HE, Ko F. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning, Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. *Polymer* 2005, 46(5): 1625–1634
- [29] Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U. De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials. *Biomaterials*, 2005, 26(14): 1987–1999
- [30] Yan Z, Chen WB, Jin WH, Sun YY, Cai JY, Gu K, et al. An interference screw made using a silk fibroin-based bulk material with high content of hydroxyapatite for anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(26): 5352–64
- [31] Fini M, Motta A, Torricelli P, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Tschon M, Giardino R, Migliaresi C. The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel. *Biomaterials*, 2005, 26(17): 3527–3536
- [32] Lu Y, Chi F-l, Zhao X, Shao Z-z, Cao Z-b. Experimental study on facial nerve regeneration by porous silk fibroin conduit. *Zhonghua er bi yan hou tou jing wai ke za zhi* = Chinese journal of otorhinolaryngology head and neck surgery, 2006, 41(8): 603–6
- [33] Wang SH, Sun LN, Cao H, Zhong YM, Shao ZZ. Development of a Dual-drug-loaded Silk Fibroin Hydrogel and Study on Its Drugs Release Behaviors. *Acta Chimica Sinica.*, 2021, 79(8): 1023–9
- [34] Wang XQ, Wenk E, Matsumoto A, Meinel L, Li CM, Kaplan D. Silk microspheres for encapsulation and controlled release. *J Control Release*, 2007, 117: 360–370
- [35] Wang, X. Q., Yucel, T., Lu, Q., Hu, X. & Kaplan, D. L. Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials*, 2010, 31: 1025–1035
- [36] Wang XQ, Wenk E, Zhang XH, Meinel L, VUNJAK-Novakovic G, Kaplan D. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *J. Control Release*, 2009, 34: 81–90

[37] Shi LB, Cai HX, Chen LK, Wu Y, Zhu SA, Gong XN, Xia YX, Ouyang HW, Zou XH. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. *Biomaterials*, 2014, 35(5): 1519-30

[38] Mu X, Sahoo JK, Cebe P, Kaplan D, Photo-Crosslinked Silk Fibroin for 3D Printing, *Polymers*, 2020, 12(12): 2936

[39] Chengchen Guo et al, Thermoplastic moulding of regenerated silk, *Nature Materials*, 2020, 19: 102-108

[40] Liu K, Shi Z, Zhang S, et al., A Silk Cranial Fixation System for Neurosurgery, *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7: 1701359

[41] Qin Wang, Yuhong Yang, Xin Chen, Zhengzhong Shao, Investigation of Rheological Properties and Conformation of Silk Fibroin in the Solution of AmimCl, *Biomacromolecules* 2012, 13: 1875-1881