

文章编号: 1004-7220(2023)01-0142-07

不同基质刚度三维丝素支架制备及其性能研究

尹诗韵, 邓雅心, 陈国宝

(重庆理工大学 药学与生物工程学院, 重庆 400054)

摘要:目的 使不同浓度丝素蛋白(silk fibroin, SF)与胶原蛋白(collagen, COL)发生氢键结合,通过联合凝胶体系,制备出一种刚度可调的复合支架,并对其理化性质进行表征。方法 分别将不同质量SF加入海藻酸钠溶液中溶解,然后分别加入不同浓度COL溶液和一定质量碳酸钙(CaCO_3)粉末。取出混合溶液,加入一定质量葡萄糖酸内酯(gluconic acid lactone, GDL)粉末,成形后得到SC1、SC2、SC3组水凝胶,冷冻干燥后得到不同SF支架。结果 成功制备刚度可调的SF支架,SC1、SC2、SC3组压缩模量分别为(17.31±2.73)、(24.12±1.81)、(32.54±1.81)kPa。观察其内部结构,发现SC1~SC3组材料孔隙越来越小,数量越来越少,材料亲水性能越来越好。结论 通过改变SF与COL溶液浓度可以制备具有不同基质刚度三维多孔支架,且SF和COL的浓度与SF支架材料的压缩模量、吸水率、保水率、溶胀率成正比,与孔隙率成反比。研究结果有望为构建可用于诱导间充质干细胞成骨分化的适宜基质刚度骨支架提供理论指导。

关键词: 丝素蛋白; 海藻酸钠; 胶原蛋白; 基质刚度; 骨组织工程

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.01.021

Preparation and Performance of Three-Dimensional Silk Fibroin Scaffolds with Different Matrix Stiffness

YIN Shiyun, DENG Yaxin, CHEN Guobao

(School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

Abstract: **Objective** After hydrogen bonding between collagen (COL) and silk fibroin (SF) at different concentrations, a composite scaffold with adjustable stiffness was prepared by combining with gel system, and its physical and chemical properties were characterized. **Methods** SF with different qualities was dissolved in sodium alginate (SA) solution, then COL solution at different concentration and calcium carbonate (CaCO_3) powder were added. The hydrogels of SC1, SC2, and SC3 groups were obtained by taking out the mixed solution and adding some gluconic acid lactone (GDL) powder, and different SF scaffolds were obtained after freeze drying. **Results** The SF scaffolds with adjustable stiffness were successfully prepared. The compression moduli of SC1, SC2, and SC3 groups were (17.31±2.73), (24.12±1.81), (32.54±1.81) kPa, respectively. The inner structure of the scaffolds was observed. From SC1 group to SC3 group, pores of the scaffolds were smaller and fewer, and hydrophilicity of the materials become better and better. **Conclusions** Three-dimensional (3D) porous scaffolds with different matrix stiffness can be prepared by changing the concentration of SF and COL solution. The concentration of SF and COL is proportional to the compression modulus, water absorption, water retention and swelling rate of SF scaffolds, while inversely proportional to porosity. The findings of this study are expected to provide theoretical guidance for construction of scaffolds with appropriate matrix stiffness for inducing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.

Key words: silk fibroin (SF); sodium alginate (SA); collagen (COL); matrix stiffness; bone tissue engineering

收稿日期: 2022-01-18; 修回日期: 2022-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(11702044), 重庆市自然科学基金项目(cstc2020jcyj-msxmX0350)

通信作者: 陈国宝, 副教授, E-mail: gbchen@cqut.edu.cn

骨作为人体内保护内脏的坚硬器官,是重要的力学支柱,不仅承担着各种载荷,还为肌肉提供可靠的动力联系与附着点^[1]。然而,骨损伤是全世界常见的损伤之一,车祸、肿瘤和高负荷运动等都会造成骨缺损的发生,需要大量的骨移植物来进行修复^[2]。目前市面上主要有自体移植物、异体移植物和组织工程支架三类骨移植物。自体移植物虽是移植物中的“金标准”,但其来源有限,而且易造成供体的二次损伤;异体移植物来源广泛,但存在病原交叉感染的风险。组织工程为骨修复提供了一种新策略,由天然或高分子材料复合而成的骨组织工程支架不仅可提供细胞黏附位点,而且其力学性能还被证明可影响骨修复过程中种子细胞的生物学行为以及免疫微环境等,最终影响骨修复与重建的效率^[3-4]。

Engler 等^[5]研究表明,在不同刚度聚丙烯酰胺 (poly acrylamide, PA) 水凝胶二维基底上,间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 在 0.1~1.0 kPa 基底可被诱导分化为神经细胞;在 8~17 kPa 基底可分化为肌细胞;在 25~40 kPa 基底可分化为成骨细胞。该研究结果证实了单纯的基质刚度可以调控 MSCs 的谱系分化。除了在二维条件下研究基质力学对 MSCs 生物学行为的影响外,Chen 等^[6-7]通过将不同比例的胶原蛋白 (collagen, COL) 与羟基磷灰石 (hydroxyapatite, HA) 混合物表衬在三维 (three-dimensional, 3D) 脱细胞骨支架表面,形成具有不同 3D 基质刚度的骨支架。结果发现,这种高基质刚度 [(37.7±19.6) kPa] 支架在体外可以诱导大鼠 MSCs 的成骨分化,植入兔的大块骨缺损模型 3 个月后观察到最佳的骨形成。Hu 等^[8]研究表明,通过控制脱细胞骨脱钙时间可以形成具有不同基质刚度的 3D 支架,(0.67±0.14) MPa 支架刚度下能更好促进 MSCs 的体外成骨分化以及体内骨修复与重建。因此,构建具有不同基质刚度的 3D 支架,对于研究基质力学调控干细胞成骨分化,促进骨修复具有重要的意义。

丝素蛋白 (silk fibroin, SF) 作为一种高分子纤维蛋白,具有良好的生物相容性、独特的生物机械性能、可调节的生物降解性和较低的炎症反应^[9-10]。然而,在实际应用中,SF 支架在力学性能和成型性能上的不足导致其受到很大的限制^[11]。而且,SF

缺乏精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (Arg-Gly-Asp, RGD) 序列,限制了细胞的迁移和生长^[12]。因此,本文综合 SF 和 COL 的结构特征,使两者氢键结合,采用海藻酸钠 (sodium alginate, SA)、碳酸钙 (CaCO₃)、葡萄糖酸内酯 (gluconic acid lactone, GDL) 建立的复合离子交联体系为凝胶基底^[13],最终制备出成型好、形状均匀、刚度可调的复合支架。研究结果为构建可用于诱导 MSCs 成骨分化的适宜基质刚度骨支架提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

中等级蚕茧 (重庆纤检所)、SA (成都市科隆化学用品有限公司)、鼠尾 I 型 COL (天津市赛宁生物工程有限公司)、CaCO₃ (成都市科龙化工试剂厂)、GDL (上海麦克林生化科技有限公司)、冷冻干燥机 (上海比朗仪器有限公司)、旋涡混合器 (上海驰唐电子有限公司)、微机控制生物力学试验机 (长春机械科学研究院有限公司)、Thermo 傅里叶红外光谱仪分析仪 (PerkinElmer 公司,美国)。

1.2 蚕茧中 SF 提取

SF 提取过程如下:将蚕茧去蛹、剪碎,洗 2~3 次并烘干。然后将蚕茧与 0.4% Na₂CO₃ 溶液中以 1 g:25 mL 比例煮沸两次,每次 2 h,以除去丝胶。再将样品在 80 °C 条件下水浴 30 min,使其溶解于混合溶液 (CaCl₂:C₂H₅OH:H₂O,摩尔比为 1:2:8),得到 SF 溶液。将该溶液离心,收集上清液。将溶液灌入透析袋 (分子量为 8~14 kDa),用去离子水透析 3 d,每 12 h 更换 1 次去离子水。最后将液体再次离心,收集上清液,冷冻干燥得到粉末,置于 -20 °C 下保存待用^[14]。

1.3 不同浓度 COL 溶液配置

将 COL 加入稀醋酸中搅拌溶解,得到 5 mg/mL COL 溶液。溶液加入离心管中,并加入一定量的去离子水稀释,在旋涡混合器上振荡均匀,得到 2、3、3.5 mg/mL 不同浓度的 COL 溶液。由于 COL 在碱性条件下易变性^[15],故用移液枪加入微量 0.1 mol/L 的 NaOH,使各组达到接近中性的 pH 值即可,放入 -4 °C 中保存待用。

1.4 不同刚度丝素蛋白支架制备

如图 1 所示,不同质量 SF 与不同浓度 COL 溶

液发生氢键结合,再联合 SA/CaCO₃/GDL 复合凝胶体系,制备出不同刚度的多孔 SF 支架。分别将 294、441、514.5 mg 的 SF 粉末,加入到 21 mL 的 1% SA 溶液中,缓慢搅拌 24 h 至全部溶解。分别加入 3 mL 的 2、3、3.5 mg/mL COL 溶液,使用玻璃棒搅拌均匀后,再加入 120 mg 的 CaCO₃ 粉末继续缓慢搅拌 1~2 d,直至完全溶解。取出交联溶液,分别加入 120 mg 的 GDL 粉末,加入后用玻璃棒搅拌均匀,将溶液缓慢加入到 24 孔板中。放在室温中成形 12 h,得到 SC1、SC2、SC3 组水凝胶,再放入 4 °C 冰箱中,使其析出多余液体。为防止样品冻干后膨出,吸出水凝胶样品周围多余的液体,冷冻干燥得到不同 SF 比例支架。

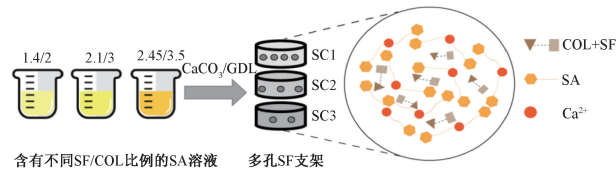


图1 SF 支架制备过程

Fig. 1 Preparation process of the SF scaffolds

注:SA 与 Ca²⁺ 化学交联发生凝胶化,将氢键结合的 COL 与 SF 封装起来。

1.5 力学性能测试

打开微机控制生物力学试验机的配套软件并与机器相联通,在软件中设置好待测的形状(棒状)、测试方式、压缩速度以及横纵坐标等参数。切除样品表面不平滑部分,量取样品的直径,再将样品放置于测试台中央,使用遥控器操控活动横梁向下移动,使传感器压紧样品,再测量样品标距。在软件中输入样品直径和标距,运行测试。每组各取样品至少 3 个。

1.6 傅里叶红外光谱检测

将 Thermo 傅里叶红外光谱仪分析仪初始化,启动 PerkinElmer Spectrum 应用程序,设置参数,如扫描频率、扫描范围等。在设定好扫描参数后,先扫描背景,此时应保证样品仓内无样品放入。在背景扫描完成后,向样品仓内放入样品开始扫描图谱。选取每组 1 个样品、SA、COL、SF 和 GDL 为检测对象。

1.7 扫描电子显微镜观察

将冷冻干燥后的各组支架材料用液氮脆断后

进行喷金处理,在真空条件下使用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 进行不同倍数观察。主要观察经冻干处理后,支架材料内部不同区域的形貌、孔径及孔隙分布。

1.8 孔隙率测定

将 50 mL 烧杯装满去离子水并称重,记为 w_1 。倒掉其中一部分水,选取不同组冻干后的样品,每组至少 3 个,精准称取样品的初始质量,记为 w_0 。将样品放入剩余部分水的烧杯之中,等待液体将整个样品孔隙充满后,再将烧杯加满水,精准称重记为 w_2 ,再将样品从烧杯中取出来并称取剩余的水和烧杯的总重量,记为 w_3 。样品的孔隙率计算公式如下^[16]:

$$P = \frac{w_2 - w_0 - w_3}{w_1 - w_3} \times 100\% \quad (1)$$

式中: P 为孔隙率; w_0 为 SF 支架初始质量; w_1 为装满水的 50 mL 烧杯质量; w_2 为含有 SF 支架的装满水的 50 mL 烧杯质量; w_3 为将含有 SF 支架的装满水的 50 mL 烧杯中 SF 支架取出来后的质量。

1.9 亲水性能测定

1.9.1 吸水率测定 选取不同组冻干后的样品,每组至少 3 个。精准称取各样品初始重量记为 m_0 ,再浸泡于 PBS 缓冲液中 3 min 使其充分吸水,捞出,使用滤纸吸除表面多余水分 30 s,再精密称重质量记为 m_1 。样品吸水率的计算公式如下^[17]:

$$W_s = \frac{m_1 - m_0}{m_0} \quad (2)$$

式中: W_s 为吸水率; m_0 为 SF 支架初始质量; m_1 为 SF 支架充分吸水后质量。

1.9.2 保水率测定 选取不同组冻干后的样品,每组至少 3 个。精准称取各样品初始重量记为 m_0 ,再浸泡于 PBS 缓冲液中 3 min 使其充分吸水,捞出,使用滤纸吸除表面多余水分,以 500 r/min 离心 3 min,精密称重质量记为 m_2 。样品保水率的计算公式如下^[18]:

$$W_r = \frac{m_2 - m_0}{m_0} \quad (3)$$

式中: W_r 为保水率; m_0 为 SF 支架初始质量; m_2 为 SF 支架充分吸水、离心后质量。

1.9.3 溶胀率测定 选取不同组冻干后的样品,每

组至少 3 个。精准称取各样品初始重量记为 m_0 , 再浸泡于 PBS 缓冲液中, 并在 2、4、6、8、10、20、30、60 min 的时间点取出样品, 用滤纸吸除表面多余水分再精准称重并记录为 m_t 。样品各时间点溶胀率的计算公式如下^[18]:

$$S = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (4)$$

式中: S 为溶胀率; m_0 为 SF 支架初始质量; m_t 为 SF 支架各时间点吸水后质量。

1.10 数据分析

每个实验至少进行 3 次, 实验结果以均值 \pm 标准差表示。两组比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行分析, $P < 0.05$ 表示有显著统计学差异, $P \leq 0.01$ 表示有极其显著统计学差异。所有计算都使用 Origin 2018 软件进行。

2 实验结果

将各组支架冷冻干燥后分别从模具中脱出, 进行大体观察, 发现不同组支架的形状为圆柱体, 表面光滑, 拥有疏松的多孔结构。为了进一步探究该支架的具体性能, 对各组支架的力学性能、官能团、微观结构、孔隙率和亲水性能等理化性质进行测定。

2.1 支架的力学性能

将各组支架进行力学压缩, 以测得其应变和应力之间的关系。测量样品的直径与标距, 计算每组在应变为 30% 时的压缩模量。

如图 2(a) 所示, 3 条曲线都是从 0 开始, 未达到完全光滑, 呈先上升再下降的走势。SC3 组比 SC1、SC2 组的曲线更加陡峭, 且 SC2、SC1 组都是在 40% ~ 45% 应变时应力开始下降, 而 SC3 组在 35% ~ 40% 应变时应力就出现了下降。

如图 2(b) 所示, SC1、SC2、SC3 组压缩模量分别为 (17.31 ± 2.73) 、 (24.12 ± 1.81) 、 (32.54 ± 1.81) kPa。SC1 组与 SC2 组之间压缩模量有显著统计学差异 ($P = 0.02$); SC1 组与 SC3 之间压缩模量有极其显著统计学差异 ($P = 0.0003$); SC2 组与 SC3 组之间压缩模量有极其显著统计学差异 ($P = 0.007$)。

2.2 傅里叶红外光谱分析

图 3 所示为 SF 支架 (SA/GDL/CaCO₃/COL/SF)、GDL、SF、COL、SA 的红外光谱分析图。GDL 的

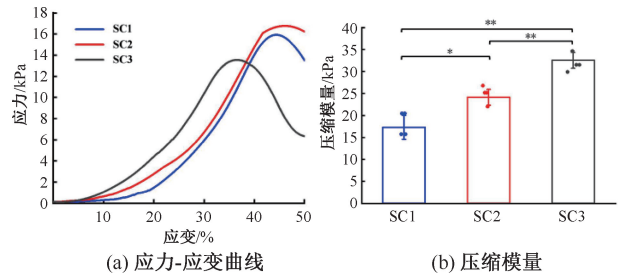


图 2 不同 SF 支架力学特征 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 2 Mechanical characteristics of different SF scaffolds

(a) Stress-strain curve, (b) Compression modulus

红外光谱分析为: 在 1725 cm^{-1} 左右谱带区域产生尖峰, 这是 C=O 伸缩振动吸收峰。SF 的红外光谱分析为: 在 3286 cm^{-1} 左右谱带区域产生明显的宽单峰, 这是 N-H 伸缩振动吸收峰; 在 1634 cm^{-1} 左右谱带区域产生尖而窄的明显单峰, 这是 C=O 伸缩振动吸收峰; 在 1530 cm^{-1} 左右谱带区域产生同样尖而窄的明显单峰, 这是 N-H 变形振动和 C-N (具有双键特性)^[19] 伸缩振动共同形成的吸收峰; 在 1231 cm^{-1} 左右谱带区域产生明显单峰, 这是 N-H 变角振动 C-H 伸缩振动共同作用形成的吸收峰。COL 的红外光谱分析为: 与 SF 相同, 在 1534 cm^{-1} 左右谱带区域产生同样尖而窄的明显单峰, 为 N-H 变形振动和 C-N 伸缩振动共同形成的吸收峰; 在 1634 cm^{-1} 左右谱带区域产生尖而窄的明显单峰, 为 C=O 伸缩振动吸收峰。SA 的红外光谱分析为: 在 1019 cm^{-1} 左右谱带区域产生宽的尖峰, 这是 C-OH 伸缩振动吸收峰; 在 1407 、 1593 cm^{-1} 左右的谱带区域产生的宽峰, 分别为 -COOH 的对称和不对称伸缩振动吸收峰。

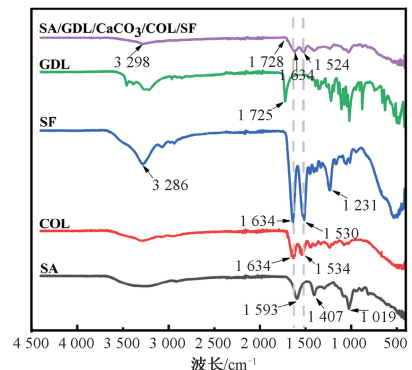


图 3 SF 支架、GDL、SF、COL 和 SA 红外光谱分析图

Fig. 3 IR spectra of SF scaffold, GDL, SF, COL and SA

2.3 支架的结构

图4所示为各组SF支架放大100、200倍后的SEM结果。由于冻干后的支架具有易碎性,故在使用液氮对材料进行脆断后,材料割裂面出现了许多大大小小的碎片,使扫描结果无法被完好显示出

来。由于材料的不均匀性,支架表面结构的孔隙大小不一。在放大100倍结果中,SC1组与SC2组孔隙结构相似,但SC3组明显比SC1组和SC2组孔隙要小许多;在放大200倍结果中,SC1~SC3组支架的孔隙越来越小,也越来越少。

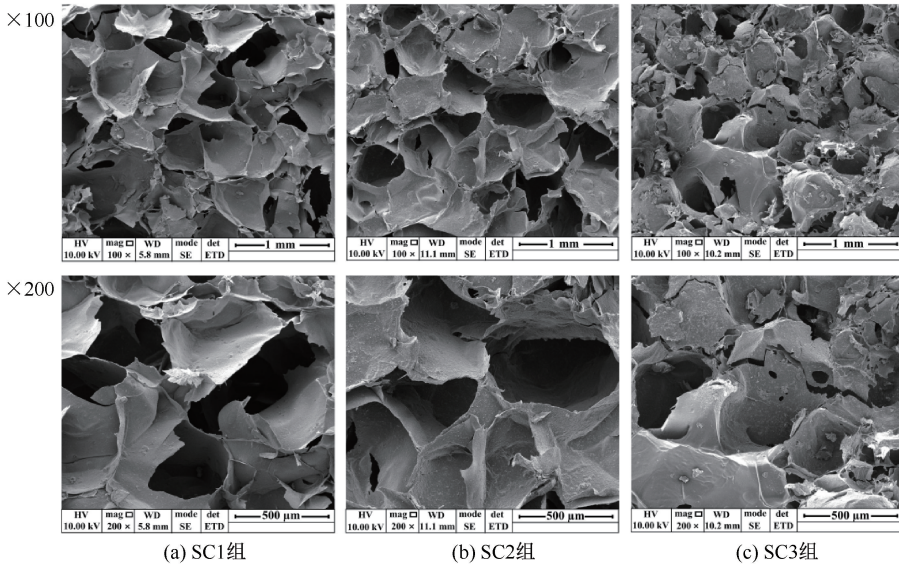


图4 不同SF支架SEM图

Fig. 4 SEM of different SF scaffolds (a) SC1 group, (b) SC2 group, (c) SC3 group

2.4 支架孔隙率

使用称重法对各个实验组进行孔隙率测定。结果显示,SC1、SC2、SC3组孔隙率分别为 $(80 \pm 6.08)\%$ 、 $(71.41 \pm 8.49)\%$ 、 $(53 \pm 6.65)\%$ 。SC1组孔隙率比SC2组略小,但SC3组孔隙率明显比SC1、SC2组都要小很多。SC1组与SC2组($P=0.69$)、SC1组与SC3组($P=0.08$)、SC2组与SC3组($P=0.24$)之间孔隙率差异无统计学意义($P>0.05$)。

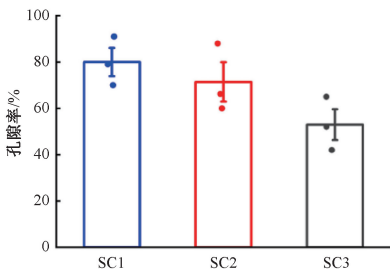


图5 不同SF支架孔隙率

Fig. 5 Porosity of different SF scaffolds

2.5 支架亲水性能

如图6(a)所示,SC1、SC2、SC3组吸水率分别为 (4.94 ± 0.244) 、 (12.39 ± 1.02) 、 (15.75 ± 0.22)

g/g。SC1组与SC2组($P=0.00001$)、SC1组与SC3组($P=0.000002$)、SC2组与SC3($P=0.001$)之间孔隙率差异有极其显著统计学意义($P<0.01$)。

如图6(b)所示,SC1、SC2、SC3组保水率分别为 (4.56 ± 0.14) 、 (11.32 ± 1.13) 、 (13.54 ± 0.30) g/g。与吸水率相比,虽然每组的保水率都出现了略微下降,但保水率结果与吸水率结果类似。SC1组与SC2组($P=0.00004$)、SC1组与SC3组($P=0.000007$)之间保水率差异有极其显著统计学意义($P<0.01$);SC2组与SC3组($P=0.014$)之间保水率差异有显著统计学意义($P<0.05$)。

如图6(c)所示,从整体来看,每组都在溶胀前2 min内溶胀率增加速率最大;在第2 min时,SC1、SC2、SC3组溶胀率分别达到了 (7.76 ± 1.85) 、 (12.94 ± 1.66) 、 (14.41 ± 1.32) g/g;在溶胀2~8 min时,材料的溶胀率增加速率逐渐减慢;溶胀8 min以后,由于SF在拥有极强吸水性的同时也极易溶于水中,各组溶胀的速度开始出现不规律性。从SC1组到SC2组再到SC3组,溶胀率在相同时间点越来越大。在最终60 min时间点时,

SC1、SC2、SC3 组溶胀率分别为 (13.37 ± 1.97) 、 (16.45 ± 1.19) 、 (17.64 ± 1.71) g/g。SC1 组溶胀

率明显比 SC2、SC3 组小, SC3 组溶胀率比 SC2 组略大一点。

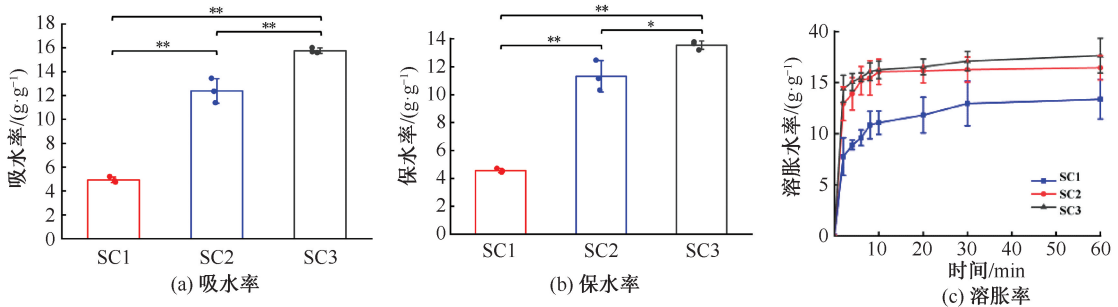


图6 不同SF支架亲水性能(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 6 Hydrophilicity of different SF scaffolds (a) Water absorption, (b) Water retention, (c) Swelling rate

3 讨论

体内 MSCs 存在于一个复杂的微环境中, 微环境中的生物物理和生物化学线索在调节它们的行为中发挥重要作用^[20]。MSCs 的成骨分化潜能是机械敏感, 它受细胞所处微环境的力学性质调控, 特别是其基质刚度的影响^[21]。

本文通过添加 GDL 释放 H^+ 与 $CaCO_3$ 反应再释放 Ca^{2+} , Ca^{2+} 与 SA 交联发生凝胶化^[13], 将不同质量 SF 与不同浓度 COL 氢键结合后包封起来, 成功实现了生物支架力学性能调控的目的。该 SF 支架为拥有疏松且多孔结构的圆柱体。SC1、SC2、SC3 组压缩模量呈现递增的趋势, 表明 SF 含量与支架的压缩模量成正比。由红外光谱图对比该支架与原材料之间官能团的异同, 结果发现, SF 和 COL 中 N-H、C-N、C=O 官能团保留, C-OH、-COOH 官能团打断, 由此可以猜测这些官能团是影响 SF 支架材料力学性能发生改变的关键。SF 支架孔隙率和 SEM 观测结果表明, SF 含量与 SF 支架孔隙大小、数量成反比, 孔隙越大, 数量越多, 支架的力学性能越差。该支架制备成功后, 在未来有望用于诱导 MSCs 的成骨分化, 故还要考察其对细胞培养液的保留和吸收能力, 保证其植入体内后细胞更快地生长和更好地分化。为此, 实验中利用 PBS 缓冲液测试支架的亲水性能。结果显示, SF 含量与支架的亲水性能成正比, 这也与 SF 易溶于水的特性有关。

MSCs 的定向分化诱导需要具有一定机械性能

的支架来实现。该支架不仅能模拟细胞外基质刚度, 同时还应具有为细胞提供黏附位点的能力, 促进细胞的黏附、迁移与生长。本文成功制备刚度可调的 SF 多孔支架, 该支架克服 SF 缺乏 RGD 序列的问题, 其中 SC3 组符合 Engler 等^[5] 所研究的诱导 MSCs 成骨分化的最佳基质刚度范围, 即 25 ~ 40 kPa, 这将为利用基质刚度诱导 MSCs 的成骨分化提供新的骨组织工程支架材料。在实验中, SF 含量的变化跨度太小, 无法确定拥有更大 SF 含量的支架的力学性能是否还是呈现增长趋势; COL 与 SF 之间仅存在简单的氢键结合, 使支架的结构(尤其是在液体环境下)不够稳定, 未来需要采用化学交联的方式来对其进行进一步改善。此外, Engler 等^[5] 通过体外构建不同刚度基底发现, MSCs 在 25 ~ 40 kPa 基底可被诱导分化为成骨细胞。而 Huebsch 等^[22] 研究发现, 将 MSCs 包裹在具有不同基质刚度(5、60、110 kPa)水凝胶后移植到裸鼠颅骨缺损模型中, 12 周后检测发现水凝胶弹性模量为 60 kPa 支架具有最佳体内骨再生能力。该研究结果不仅证实支架的刚度可以在体内调控 MSCs 成骨分化, 也发现体内诱导 MSCs 的最佳刚度与体外不同, 这可能与支架植入后降解导致刚度有一定下降有关。因此, 未来研究还应进一步关注支架刚度在体内诱导干细胞分化的最佳刚度以及内在机制, 为构建具有良好骨修复能力的组织工程支架材料提供理论参考。

参考文献:

[1] 韦淑萍, 张西正. lncRNA 在骨重建及骨相关疾病中的作用

- [J]. 医用生物力学, 2018, 33(6): 572-576.
- WEI SP, ZHANG XZ. The role of LncRNA in bone remodeling and skeletal diseases [J]. *J Med Biomech*, 2018, 33(6): 572-576.
- [2] 李家颖. 骨损伤微环境响应性释放 BMP-2 多肽的 MnO₂/GelMA 复合水凝胶促进骨修复[D]. 苏州: 苏州大学, 2016.
- [3] 许明明, 于志峰. 骨骼肌通过力学刺激对骨重建的影响[J]. 医用生物力学, 2020, 35(3): 389-390.
- XU MM, YU ZF. Effects of skeletal muscle on bone remodeling through mechanical stimulation [J]. *J Med Biomech*, 2020, 35(3): 389-390.
- [4] HE J, CHEN G, LIU M, *et al.* Scaffold strategies for modulating immune microenvironment during bone regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, 108: 110411.
- [5] ENGLER AJ, SEN S, SWEENEY HL, *et al.* Matrix elasticity directs stem cell lineage specification [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689.
- [6] CHEN G, DONG C, YANG L, *et al.* 3D scaffolds with different stiffness but the same microstructure for bone tissue engineering [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(29): 15790-15802.
- [7] CHEN G, YANG L, LV Y. Cell-free scaffolds with different stiffness but same microstructure promote bone regeneration in rabbit large bone defect model [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(4): 833-841.
- [8] HU Q, LIU M, CHEN G, *et al.* Demineralized bone scaffolds with tunable matrix stiffness for efficient bone integration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(33): 27669-27680.
- [9] 程威, 张扬, 宋秀钢, 等. 基于丝素/胶原/羟基磷灰石仿生骨材料的多维结构及其性能[J]. 医用生物力学, 2019, 34(6): 623-630.
- CHENG W, ZHANG Y, SONG XG, *et al.* Multidimensional structure and properties of silk fibroin/collagen/hydroxyapatite bionic bone materials [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(6): 623-630.
- [10] BAI S, HAN H, HUANG X, *et al.* Silk scaffolds with tunable mechanical capability for cell differentiation [J]. *Acta Biomater*, 2015, 20(1): 22-31.
- [11] 张飞飞. 丝素蛋白水凝胶的可控制备及其力学性能的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [12] BUITRAGO JO, PATEL KD, EL-FIQLI A, *et al.* Silk fibroin/collagen protein hybrid cell-encapsulating hydrogels with tunable gelation and improved physical and biological properties [J]. *Acta Biomater*, 2018, 69: 218-233.
- [13] 吴国华, 张恒, 纪晓寰, 等. 海藻酸钠/CaCO₃ 医用封闭剂凝胶化时间的调控[J]. 东华大学学报, 2016, 42(1): 67-72.
- [14] FU Q, XIA B, HUANG X, *et al.* Pro-angiogenic decellularized vessel matrix gel modified by silk fibroin for rapid vascularization of tissue engineering scaffold [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2021, 109(9): 1701-1713.
- [15] 王丽娜, 黄素珍. 胶原蛋白的研究进展[J]. 肉类研究, 2010, 24(1): 16-22.
- [16] 许榭楨. 羧甲基壳聚糖/氧化葡甘聚糖/三七复合海绵的制备及评价[D]. 广州: 暨南大学, 2018.
- [17] 耿银雪. 医用壳聚糖基海绵的制备和性能的研究[D]. 南京: 东南大学, 2018.
- [18] HUANG X, FU Q, DENG Y, *et al.* Surface roughness of silk fibroin/alginate microspheres for rapid hemostasis *in vitro* and *in vivo* [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 253: 117256.
- [19] 陈静涛, 赵玉萍, 徐政, 等. 重组胶原蛋白与牛源 I 型胶原蛋白红外光谱研究[N]. 材料导报, 2008, 22(3): 119-121.
- [20] WAN W, CHENG B, ZHANG C, *et al.* Synergistic effect of matrix stiffness and inflammatory factors on osteogenic differentiation of MSC [J]. *Biophys J*, 2019, 117(1): 129-142.
- [21] HSIEH WT, LIU YS, LEE YH, *et al.* Matrix dimensionality and stiffness cooperatively regulate osteogenesis of mesenchymal stromal cells [J]. *Acta Biomater*, 2016, 32: 210-222.
- [22] HUEBSCH N, LIPPENS E, LEE K, *et al.* Matrix elasticity of void-forming hydrogels controls transplanted-stem-cell-mediated bone formation [J]. *Nat Mater*, 2015, 14(12): 1269-1277.