

特约专栏

蚕丝丝素材料的生物降解性能

李明忠¹, 张 剑², 邱玉华³, 卢神州¹

(1. 苏州大学现代丝绸国家工程实验室, 江苏 苏州 215021)

(2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科, 上海 200025)

(3. 苏州大学医学部免疫学系, 江苏 苏州 215021)

摘要: 蚕丝丝素材料植入体内后的降解可直接造成其形态和结构变化、力学性能和质量下降。降解产物与组织反应或全身反应的程度密切相关。用于组织工程和再生医学的丝素支架材料的生物降解速率应与组织再生速率相匹配; 用于药物控制释放系统的丝素载体的生物降解速率应与生物活性物质的释放需要相适应。概述了近年来对丝素材料生物降解问题的研究现状, 介绍了通过体外、体内实验所观察到的丝素材料生物降解行为, 包括天然丝素纤维、再生丝素纤维、多孔支架及薄膜等, 总结了未来需要进一步研究的问题。指出蚕丝丝素作为一种蛋白质可被多种蛋白酶催化水解; 天然丝素纤维比再生丝素材料的生物降解速率慢; 丝素的分子构象、结晶度、交联程度、材料的形态等对丝素的降解速率有明显影响; 建立预测丝素材料生物降解程度与其功能变化以及与其机体应答关系的研究模型和技术, 有效调控其生物降解速率, 将是未来的研究方向。

关键词: 蚕丝; 丝素; 生物降解; 蛋白酶; 丝素多孔材料

中图分类号: TS149 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2015)07-0565-06

Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Materials

LI Mingzhong¹, ZHANG Jian², QIU Yuhua³, LU Shenzhou¹

(1. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou 215021, China)

(2. Department of Burn Surgery, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

(3. Department of Immunology, Medical College, Soochow University, Suzhou 215021, China)

Abstract: Degradation behavior of silk fibroin materials after *in vivo* implantation affects the morphological, structural and mechanical properties and gives rise to the mass loss of materials, and degradation products are closely related to the host tissue and body responses. The degradation rate of silk fibroin scaffolds and drug carriers should mirror the rate of tissue regeneration or be adequate for the controlled release of bioactive molecules. Here, this paper summarizes the degradation behaviors of silk-based materials over the last few years through introducing *in vitro* and *in vivo* degradation properties of natural silk fibroin fibers and regenerated silk fibroin materials including regenerated silk fibroin fibers, films and porous scaffolds, discussing the influences of morphological and structural features on degradation rate of silk fibroin materials, and further highlights the potential issues. The results obtained from current state researches indicate that silk fibroin can be hydrolyzed by various proteases *in vitro* and *in vivo*. The regenerated silk fibroin materials show a rapid degradation rate compared to natural silk fibroin fibers. Furthermore, the molecular conformation, crystallinity, crosslinking degree and morphological features significantly influence the degradation rate of regenerated silk fibroin materials. It will be the aim of future research to develop the models and technology that can predict the biodegradation degree and functional alteration of biomaterials as well as the host body responses to the biomaterials, effectively controlling the degradation rate of biomaterials.

Key words: silkworm silk; silk fibroin; degradation; proteases; porous silk fibroin

1 前言

蚕丝包括家蚕(桑蚕)丝和野蚕(柞蚕、天蚕)丝两类。野蚕丝的产量低, 仅占蚕丝总产量的不足5%。通常所称“蚕丝”是指家蚕丝。蚕进入五龄期后, 凝胶状的丝素和丝胶蛋白分别储存于其绢丝腺后部和中部管腔

收稿日期: 2014-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370968); 江苏省基础研究计划(BK20131177)

第一作者: 李明忠, 男, 1963年生, 教授, 博士生导师, Email: mzli@suda.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2015.07.11

内。蚕吐丝时, 绢丝腺后部管腔内的丝素蛋白依靠蚕体的收缩作用向前推进, 经过绢丝腺中部、前部以及吐丝部的作用, 完成丝素蛋白从无规卷曲向反平行 β -折叠结构的构象转变和纤维化过程, 形成直径约 $10 \sim 20 \mu\text{m}$ 的蚕丝。每根蚕丝由两根直径约 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ 的丝素单丝组成, 它们的外围都由丝胶蛋白包覆。丝素和丝胶分别约占蚕丝的 75% 和 25%。丝素是纤维状结构蛋白, 天然丝素纤维不溶于水; 丝胶是球蛋白, 可溶于水。蚕丝的拉伸强度、断裂伸长率及弹性模量分别为 500 MPa, 19% 及 $5 \sim 12 \text{ GPa}$ [1]。其拉伸强度与普通不锈钢丝相当, 力学性能优异。

家蚕丝素蛋白由 H 链 (350 kDa)、L 链 (25.8 kDa) 及糖蛋白 P25 (23.55 kDa, 另加 3 个寡糖链) 组成, 6 条 H 链、6 条 L 链及 1 条 P25 链组成 1 个丝素蛋白复合体, 总分子量约为 2 286 kDa [2]。H 链和 L 链之间以二硫键相互连接, P25 链以非共价键与 H 链结合。作为家蚕丝素主要成分的 H 链, 其核心区域由 12 个低复杂度的“结晶”区及 11 段几乎相同拷贝的由约 43 个氨基酸残基组成的间隔序列组成 [3]。“结晶”区全部由中性氨基酸组成, 其中 Gly-X 重复序列覆盖了 94% 的序列, X 中丙氨酸占 65%, 丝氨酸占 23%, 酪氨酸占 9%。每个结晶区域是由若干子域组成, 每个子域约含 70 个氨基酸残基。

天然丝素纤维用作手术缝合线已有近百年历史, 其生物安全性久经考验。近 20 年来, 国内外多个研究组以丝素材料应用于组织工程和再生医学为主要目标, 广泛开展了丝素蛋白材料细胞相容性的研究。大量研究表明, 蚕丝素材料有利于成纤维细胞、表皮细胞、血管内皮细胞、成骨细胞、胶质细胞、软骨细胞、肝细胞、肌肉细胞、间充质干细胞、神经干细胞等的黏附和生长 [4-8]。蚕丝素应用于血管、皮肤、骨、韧带、神经、软骨等组织工程支架及药物控释载体的研究非常活跃 [9-15]。

从熟蚕体内绢丝腺后部获得的天然丝素蛋白仅能满足实验室少量制备的需要, 不能满足工业化生产的要求。天然蚕丝纤维因能够制得的材料形态有限、结晶度高、生物降解速度慢等原因, 多数情况下也难以直接用来制备生物材料。所以, 通常需先将蚕丝脱胶, 再用 CaCl_2 , LiBr 或 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 等中性盐浓溶液溶解, 经纯化后获得蚕丝素蛋白水溶液。用该再生丝素蛋白, 借助喷雾干燥、湿法纺丝、静电纺丝、热风干燥、冷冻干燥、盐析等技术, 可以制得颗粒、纤维、薄膜、海绵、凝胶等多种形态的材料, 用作组织工程支架及药物控释载体。

生物材料植入体内后常常发生降解、凝血、补体激活、免疫细胞聚集和粘附等效应。蚕丝素材料的生物降解速率对其力学性能的失效速率、质量损失速率、表

面微观结构变化、本体的形态和结构变化都将产生显著影响。用于组织工程和再生医学的丝素支架材料的生物降解速率应与组织再生速率相匹配; 用于药物控制释放系统的丝素载体的生物降解速率应与生物活性物质的释放需要相适应。

2 蚕丝素材料的体外生物降解性能

丝素蛋白分子量是否降低是衡量其是否被降解的标志。若丝素蛋白的分子量下降是由于生理环境中的蛋白酶或其他生物学作用造成的, 则这样的效应称为丝素蛋白的生物降解。迄今尚没有证据证明未经降解的丝素蛋白材料能够被机体吸收。

丝素作为一种蛋白质可被多种蛋白酶降解。早在 1960 年代, 为了获得丝素的结晶区并研究其结构, 曾用 α -胰凝乳蛋白酶处理家蚕丝素纤维获得高结晶度的丝素蛋白。其后, 用糜蛋白酶、羧化酶等将天然丝素纤维降解后获得的丝素肽应用于食品添加剂和化妆品 [16-17]。对丝素手术缝合线的跟踪检测说明, 其植入体内 1 a 后基本失去强度, 2 a 后找不到其具体位置 [18]。这些对丝素蛋白降解性能的早期研究说明, 丝素可以被生物降解, 其降解机制是蛋白质分解酶催化使其发生水解。

丝素的降解产物是肽或氨基酸。影响丝素材料生物降解速率的因素包括材料的化学结构 (家蚕或野蚕丝素、天然或再生丝素、分子内及分子间交联键的种类和密度、分子构象、表面亲水基团)、微观结构 (孔结构、原纤的排列、表面拓扑结构、分子构象) 和宏观结构 (形状、尺寸、表面粗糙度)。通过模拟体内生理环境进行体外降解实验, 能够方便、有效地观察、检测丝素材料在降解过程中发生的物理变化 (形状、尺寸、表面形貌、内部孔结构、质量、力学性能、结晶度等) 和化学变化 (分子量、分子构象、表面暴露的化学基团等)。同时, 便于检测丝素材料在降解过程中功能的变化和降解产物的细胞毒性。

将蚕丝脱胶、 CaCl_2 的浓溶液溶解, 纯化后的蚕丝素蛋白水溶液, 经冷冻干燥后可制得海绵状丝素多孔材料 [19-20], 其内部丝素蛋白的分子构象以无规卷曲结构为主要特征。分别用浓度为 1.0 U/ml (37°C , $\text{pH } 7.0$) 的 α -胰凝乳蛋白酶、胶原蛋白酶 I A 和蛋白酶 XIV 对丝素多孔材料的体外降解实验表明, 这 3 种蛋白酶都能将丝素多孔材料降解成肽甚至游离氨基酸, 经过 15 d 的浸渍, α -胰凝乳蛋白酶、胶原蛋白酶 I A 和蛋白酶 XIV 溶液中的丝素多孔材料的质量分别减少了 32%, 52% 和 70%, 见图 1。说明以无定形结构为主的再生丝素材料易被生物降解, 蛋白酶的种类对降解速率有显著影响。当天然丝素纤维浸渍于蛋白酶 XIV 溶液后, 不仅

质量和直径减小、强度和韧性下降, 而且经 7 d 浸渍后, 能够观察到丝素单丝分裂产生的细纤维和碎片。凝胶电泳检测结果表明, 丝素纤维内 L 链组分和完整的 H 链组分明显减少^[21], 蛋白酶 XIV 对蚕丝丝素具有很强的降解能力。

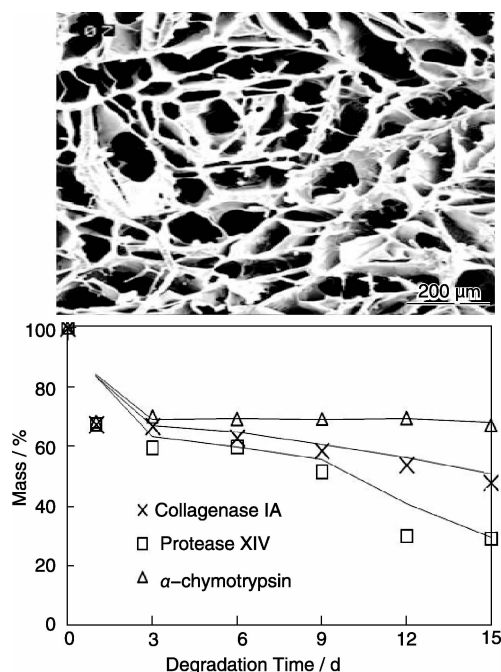


图1 丝素多孔材料质量随蛋白酶降解时间的变化

Fig. 1 Quantitative changes of porous silk fibroin during the enzymatic degradation

将丝素纤维或丝素膜浸渍于胶原酶 F、蛋白酶 K、蛋白酶 XXI 或蛋白酶 XXIII 溶液中后, 材料表面产生了凹沟或裂纹, 分离出细纤维, 强度下降, 质量减小。在蛋白酶 K 溶液中, 丝素膜的质量在 10 d 内损失 80%^[22]。蛋白酶对再生丝素膜的降解速率远大于对天然丝素纤维的降解速度。将天然丝素纤维浸渍于 α -胰凝乳蛋白酶或蛋白酶 XIV 溶液中, 同时外加循环应力作用时, 塑性变形积累、纤维的柔性提高; 而未被施加循环应力作用的丝素纤维的柔软性无明显变化^[23]。在家蚕丝丝素蛋白内, 富含甘氨酸和丙氨酸的区域抵抗蛋白酶降解的能力较强, 富含极性氨基酸的间隔序列、L 链及 P25 链抵抗蛋白酶降解的能力较弱。

野蚕(柞蚕)丝素的重要特征是富含聚丙氨酸序列, 这些序列与含各种其他氨基酸的间隔排列交替排列。柞蚕丝素纤维、薄膜或多孔支架与蛋白酶 XXI、 α -胰凝乳蛋白酶、胶原蛋白酶 I A 或蛋白酶 XIV 接触后, 蛋白酶优先攻击其非聚丙氨酸的序列, 造成材料表面破坏、分子量和材料质量下降, 而聚丙氨酸序列抵抗酶降解的能力强^[24-25]。分别用浓度为 1.0 U/ml (37 °C, pH 7.4) 的

蛋白酶 XIV 体外降解柞蚕丝素多孔材料和天然柞蚕丝素纤维的研究表明, 经 18 d 后, 蛋白酶能够将柞蚕丝素多孔材料完全降解成肽或游离氨基酸, 但只能将天然柞蚕丝素纤维降解 5.6%。说明丝素的分子构象和结晶结构是决定材料降解速率的关键, 以无规卷曲和 α -螺旋结构为主的柞蚕丝素多孔材料呈现出易被生物降解的特征, 而含有大量 β -折叠结构的天然柞蚕丝素纤维则显示出能长期抵抗酶降解的能力。

脱胶是制备再生丝素材料的必经步骤, 目前使用的脱胶剂有碱性溶液和蛋白酶溶液 2 类。这 2 类脱胶方式在去除丝胶的同时, 都会对丝素蛋白产生一定程度的破坏, 造成丝素蛋白的分子量降低, 用碱性溶液脱胶造成的丝素水解程度往往比用蛋白酶溶液大。由于丝素水解、分子量降低, 导致制得的再生丝素材料的力学性能和抵抗生物降解的能力比天然丝素纤维差。

用冷冻干燥法制备家蚕丝素蛋白多孔材料。通过调节冷冻温度和采用不同的后处理方法, 制得 β -折叠结构含量不同的家蚕丝素多孔材料。将不同二级结构的家蚕丝素多孔材料放入胶原酶 IA 的缓冲溶液 (pH 7.4, 37 °C) 进行体外降解实验, 如图 2 所示, 丝素多孔材料中 β -折叠结构的含量与材料的生物降解速率有显著的相关性, 随着 β -折叠结构含量的增多, 材料的降解速率显著减慢。在酶降解过程中, 丝素蛋白中规整性较差的非结晶区域首先被破坏而溶解, 降解残留物的结晶度较大。

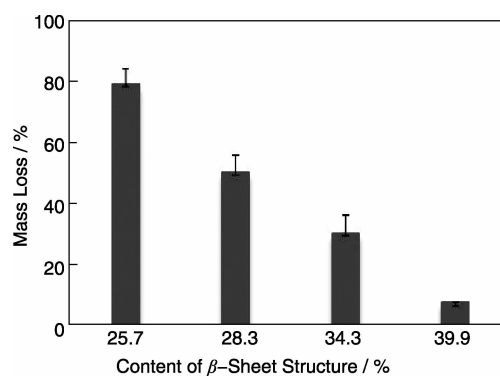


图2 柞蚕丝素多孔材料中 β -折叠结构含量对其在胶原酶 IA 溶液中的质量损失率的影响

Fig. 2 Effect of the β -sheet content in *Antheraea pernyi* silk fibroin on the mass loss rate of 3D materials in Collagenase IA solution

在丝素水溶液中添加粒径为 300 ~ 500 μ m 的 NaCl 颗粒后, 丝素蛋白因盐析作用析出, 分子构象转变, 经水洗, 溶出析出的丝素内 NaCl 颗粒, 再经冷冻干燥后可得到丝素多孔材料^[26]。将丝素水溶液冷冻干燥后得到的丝素固体, 用六氟异丙醇溶解, 向溶液内

添加粒径为 300 ~ 500 μm 蔗糖颗粒后, 通过与甲醇溶液混合使丝素析出, 水洗, 溶出析出物内的蔗糖颗粒, 再经冷冻干燥后也可得到丝素多孔材料。虽然用这 2 种方法制得的丝素多孔材料内丝素的分子构象都以 β -折叠结构为主要特征, 但盐析法制得的材料内孔壁粗糙、脆而硬, 降解速度快; 六氟异丙醇/蔗糖法制得的材料内孔壁薄、光滑、柔软, 降解速度慢。将兔耳软骨细胞接种于材料内培养 4 ~ 8 周后的观察结果说明, 柔软、降解速度慢的六氟异丙醇/蔗糖法制得的丝素多孔材料比较有利于软骨基质的沉积, 形成的软骨组织形态较正常。这一方面说明丝素材料的生物降解速率除与分子构象有关外, 还与纳米/微米尺度的组装方式有关; 另一方面说明作为组织工程支架的丝素三维材料的生物降解速率对新组织能否顺利形成有较大影响。

3 蚕丝素材料的体内生物降解性能

体内生理环境的物质组成复杂, 且不同部位差异较大。丝素材料在体内的降解往往是多种蛋白酶协同作用的结果; 人体的免疫系统、代谢系统、循环系统以及多种细胞均参与了丝素的降解、吸收、代谢和排泄过程。仅仅通过体外实验研究, 难以全面描述丝素材料植入体内后发生的变化及其对机体的影响。将丝素材料植入体内的特定部位, 观测其结构、性能的变化和机体的反应, 并与体外实验结果进行比较研究, 是应用于植入性医疗器械的丝素材料临床前必须进行的工作。

将蚕丝脱胶、经 CaCl_2 的浓溶液溶解、纯化后的蚕丝素蛋白水溶液经冷冻干燥后可制得海绵状丝素多孔材料。选取 200 g 左右 SD 大鼠, 将尺寸为 3 cm \times 3 cm 的丝素多孔材料埋植于大鼠背部全厚皮下(真皮层与肌层之间), 每只大鼠背部左右两侧各植入 1 块丝素材料, 包扎后常规饲养。其后, 在各个时相点取出 10 片丝素多孔材料, 观察、称量, 持续观测 1 a 时间。由图 3 可见, 丝素多孔材料埋植于大鼠背部全厚皮下后, 体积逐渐缩小、降解明显。由图 4 可见, 丝素多孔材料在植入皮下后的第 2 周内, 由于体内物质的浸润, 质量比植入时大。在第 2 ~ 12 周期间, 其质量以很快的速率递减, 干态材料的残留质量在第 6、8、10、12 周时分别为原质量的 91.2%、33.4%、29.2%、24.4%。而在第 26、39 周时, 干态材料的残留质量分别为原质量的 11.8% 和 2.7%。在第 39 周时, 大部分大鼠的皮下已找不到原植入的丝素多孔材料。在第 52 周时, 所有大鼠的皮下都找不到植入的丝素多孔材料。

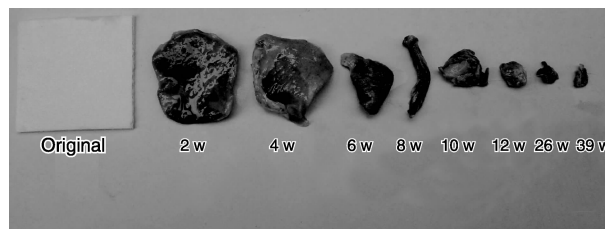


图 3 丝素多孔材料埋植于大鼠全厚皮下不同时间后照片

Fig. 3 Photos of the porous silk fibroin materials after subcutaneous implantation in rats

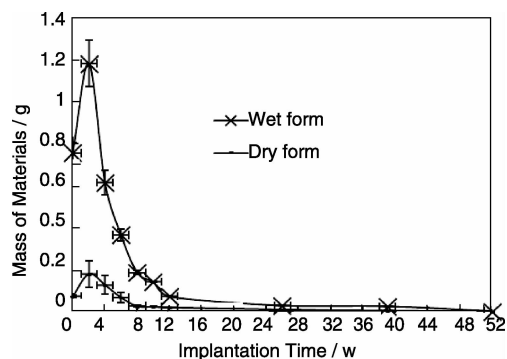


图 4 丝素多孔材料埋植于大鼠全厚皮下后的降解曲线

Fig. 4 Degradation curves of the porous silk fibroin materials after subcutaneous implantation in rats

作为皮肤真皮再生支架的丝素多孔材料, 其周围环境与皮下不同, 多种细胞的侵入为其降解、吸收、代谢和消除提供了比皮下更有利的条件。为了定量检测其作为真皮再生支架时的降解速率, 以 ^{125}I 作为示踪剂, 采用直接碘化法通过亲电取代反应, 将 $^{125}\text{I}^-$ 氧化为 $^{125}\text{I}_2$, 与酪氨酸残基(在丝素蛋白中含量较高)的芳香环上的羟基邻位上的氢原子发生碘取代反应, 将其标记到丝素多孔材料上^[27]。在 5 只 SD 大鼠背部两侧各切除 2 cm \times 2 cm 的全厚皮, 造成全层皮肤缺损创面, 将标记后的尺寸为 1 cm \times 1 cm 丝素多孔材料移植在 SD 大鼠背部两侧的全层皮肤缺损创面, 每侧移植 4 块样品。将取下的全厚皮用鼓式取皮机制备成 0.2 ~ 0.25 mm 厚的皮片, 覆盖于丝素多孔材料外, 缝合固定。在丝素多孔材料作为支架引导真皮再生的过程中, 分别在术后 3 h、3 d、6 d、13 d、20 d、27 d、34 d、41 d、48 d 及 55 d 通过单光子发射计算机断层成像术(SPECT)动态示踪丝素多孔材料, 以 10 μCi 的 ^{125}I 溶液作为标准源, 置于中间, 并通过将移植于大鼠体内的丝素多孔材料的同位素信号强度与标准源信号强度对比, 计算丝素多孔材料同位素信号强度的衰减率, 定量检测丝素多孔材料作为真皮再生支架时的降解率。如图 5 所示, 丝素多孔材料植入后的残留量在前 41 d 以每天约 2.2% 的速率减少。在第 13 d、

27 d、41 d 时的残留量分别约为植入时的 71.6%、25.0% 和 8.5%。到第 55 d 时仅剩约 3.5%，植入的材料已基本降解。表明丝素多孔材料作为真皮再生支架应用于真皮缺损部位时，其降解速率显著快于皮下植入的应用方式。

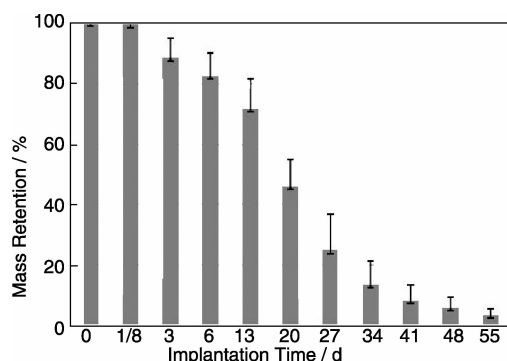


图5 丝素多孔材料移植到 SD 大鼠的全层皮肤缺损创面作为真皮再生支架时残留率随时间的变化

Fig. 5 Remained ratio of porous silk fibroin materials after implantation onto dorsal full-thickness wounds of Sprague Dawley rats as dermal regeneration scaffolds at different time points

将再生丝素膜埋植于大鼠背部皮下后，膜的厚度逐渐减小，到第 19 个月时材料的厚度只剩下原来厚度的 65%^[22]。同样是再生丝素材料的致密薄膜，其体内降解速度明显比多孔材料慢。

再生丝素材料的交联度对其生物降解速率也有显著影响。经京尼平进行不同程度交联的丝素膜，交联度为 68% 和 78% 时，在胶原蛋白酶 I A 中 30 d 的降解率分别为 86.73% 和 63.64%，而 90% 和 94% 高交联度的丝素膜的降解率则仅为 6.95% 和 4.72%，接近于用乙醇处理的丝素膜^[28]。将交联度不同的丝素材料植入 SD 大鼠皮下 28 d 后，如图 6 a 所示，从丝素膜截面观察，低交联度(78%)的再生丝素膜由表面向内部出现明显凹坑、沟槽，部分区域已产生孔洞；交联度为 90% 的丝素膜(图 6b)也有凹坑产生；而高交联度(94%)的丝素膜(图 6c)和经乙醇处理的丝素膜(图 6d)则未见明显腐蚀。交联度为 78%、90%、94% 和经乙醇处理的丝素膜的体内降解率分别为 18%、4%、2.7% 和 2.8%。交联度高的丝素膜的降解速度比交联度低的丝素膜明显慢。

分别以水和六氟异丙醇作为溶解再生丝素固体的溶剂制备纺丝液，用静电纺丝技术纺制再生丝素纤维^[29]。将此纤维分别植入裸鼠和 Lewis 大鼠的皮肤与肌膜之间，以水为溶剂纺制的再生丝素纤维在植入 2~6 个月后全部降解；而以六氟异丙醇为溶剂纺制的再生丝素纤维在植

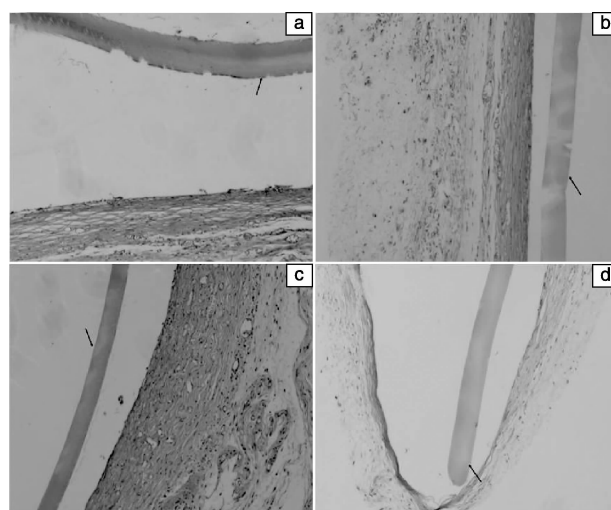


图6 交联度不同的丝素膜植入大鼠皮下 28 d 后的 HE 染色照片：(a) 78%，(b) 90%，(c) 94% 和 (d) 经乙醇处理的丝素膜

Fig. 6 HE stains photos of the silk fibroin films with different crosslinking degree after subcutaneous implantation in rats for 28 d: (a) 78%, (b) 90%, (c) 94% and (d) 75% ethanol treated films

入 1 a 后仍未全部降解。说明该纤维内部丝素的微/纳米尺寸结构对其生物降解速率有显著的影响。

天然蚕丝丝素材料的体内降解速率比再生丝素材料慢得多。天然蚕丝丝素纤维植入大鼠皮下 6 周后，其拉伸强度和弹性模量分别降低到原来的 55% 和 16%^[30]。蚕丝手术缝合线用于缝合大鼠腹部伤口时，经 10 d、30 d、70 d 后，其拉伸强度分别降低至 29%、73%、83%^[31]，2 a 后才完全被降解^[18]。

4 结 语

蚕丝丝素作为一种蛋白质可被多种蛋白酶催化水解。大量的体外及体内实验结果证明，天然蚕丝丝素纤维的生物降解速度明显比再生丝素材料慢；丝素的分子构象、结晶度、交联程度等对丝素的降解速率有显著的影响。如何调控用作组织工程、再生医学支架或药物控制释放载体的丝素材料的生物降解速率，使其与组织再生速率相匹配或满足生物活性物质控制释放的要求，仍然是重要的研究课题。需要从热力学角度深入研究丝素生物降解过程中遵循的规律和降解机理；从动力学角度定量描述不同结构的丝素材料在不同生理环境中的生物降解速率与时间的关系；建立预测生物降解程度和材料功能变化的模型和技术。另一方面，机体免疫系统在丝素材料体内降解过程中发挥的作用也有待深入研究；丝素在体内的吸收、代谢和排泄过程有待进一步跟踪。

参考文献 References

- [1] Pérez-Rigueiro J, Viney C, Llorca J, *et al.* Mechanical Properties of Single-Brin Silkworm Silk [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2000, 75(10): 1 270–1 277.
- [2] Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, *et al.* 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]. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40 517–40 528.
- [3] Zhou C Z, Confalonieri F, Jacquet M, *et al.* Silk Fibroin: Structural Implication of a Remarkable Amino Acid Sequence [J]. *Proteins*, 2001, 44(2): 119–122.
- [4] Unger R E, Peters K, Wolf M, *et al.* Endothelialization of a Nonwoven Silk Fibroin Net for Use in Tissue Engineering: Growth and Gene Regulation of Human Endothelial Cells [J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 5 137–5 146.
- [5] Zhang X, Baughman C B, Kaplan D L. *In Vitro* Evaluation of Electrospun Silk Fibroin Scaffolds for Vascular Cell Growth [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 2 217–2 227.
- [6] Inouye K, Kurokawa M, Nishikawa S, *et al.* Use of *Bombyx mori* Silk Fibroin as a Substratum for Cultivation of Animal Cells [J]. *Biochemical and Biophysical Methods*, 1998, 37: 159–164.
- [7] Minoura N, Aiba S, Higuchi M, *et al.* Attachment and Growth of Fibroblast Cells on Silk Fibroin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 2(208): 511–516.
- [8] Dal Pra I, Freddi G, Chiarini A, *et al.* De Novo Engineering of Reticular Connective Tissue *In Vivo* by Silk Fibroin Nonwoven Materials [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(14): 1 978–1 999.
- [9] Liu H F, Li X M, Zhou G, *et al.* Electrospun Sulfated Silk Fibroin Nanofibrous Scaffolds for Vascular Tissue Engineering [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 3 784–3 793.
- [10] Yan S, Zhang Q, Wang J, *et al.* Silk Fibroin/Chondroitin Sulfate/Hyaluronic Acid Ternary Scaffolds for Dermal Tissue Reconstruction [J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9: 6 771–6 782.
- [11] Kuboyama N, Kiba H, Arai K, *et al.* Silk Fibroin-based Scaffolds for Bone Regeneration [J]. *J Biomed Mater Res B*, 2013, 101(2): 295–302.
- [12] Liu H F, Fan H B, Wang Y, *et al.* The Interaction Between a Combined Knitted Silk Scaffold and Microporous Silk Sponge with Human Mesenchymal Stem Cells for Ligament Tissue Engineering [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 662–674.
- [13] Tang X, Xue C B, Wang Y X, *et al.* Bridging Peripheral Nerve Defects with a Tissue Engineered Nerve Graft Composed of an *in Vitro* Cultured Nerve Equivalent and a Silk Fibroin-Based Scaffold [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 3 860–3 867.
- [14] Foss C, Merzari E, Migliaresi C, *et al.* Silk Fibroin/Hyaluronic Acid 3D Matrices for Cartilage Tissue Engineering [J]. *Biomacromolecules*, 2013, 14(1): 38–47.
- [15] Esther W, Hans P M, Lorenz M. Silk Fibroin as a Vehicle for Drug Delivery Applications [J]. *J Control Release*, 2011, 150: 128–141.
- [16] Chen G, Arai M, Hirabayashi K. Isolation of Tyrosine from Silk Fibroin by Enzyme Hydrolysis [J]. *J Seric Sci Jpn*, 1996, 65: 182–184.
- [17] Chen K, Umeda Y, Hirabayashi K. Enzymatic Hydrolysis of Silk Fibroin [J]. *J Seric Sci Jpn*, 1996, 65: 131–133.
- [18] Altman G H, Diaz F, Jakuba C, *et al.* Silk-Based Biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2003, 24: 401–416.
- [19] Li Mingzhong, Wu Zhengyu, Zhang Chengsheng, *et al.* Study on Porous Silk Fibroin Materials: II. Preparation and Characteristics of Spongy Porous Silk Fibroin Materials [J]. *J Appl Polym Sci*, 2001, 79: 2 192–2 199.
- [20] Li M, Ogiso M, Minoura N. Enzymatic Degradation Behavior of Porous Silk Fibroin Sheets [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(2): 357–365.
- [21] Horan R L, Antle K, Collette A L, *et al.* *In Vitro* Degradation of Silk Fibroin [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 3 385–3 393.
- [22] Lee O J, Lee J M, Kim J H, *et al.* Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Membranes in Repairing Tympanic Membrane Perforations [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, 100A: 2 018–2 026.
- [23] Kluge J A, Thurber A, Leisk G G, *et al.* A Model for the Stretch-Mediated Enzymatic Degradation of Silk Fibers [J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2010, 3: 538–547.
- [24] Taddei P, Arai T, Boschi A, *et al.* *In Vitro* Study of the Proteolytic Degradation of *Antheraea pernyi* Silk Fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7: 259–267.
- [25] Zhao C, Wu X, Zhang Q, *et al.* Enzymatic Degradation of *Antheraea pernyi* Silk Fibroin 3D Scaffolds and Fibers [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 48: 249–255.
- [26] Makaya K, Terada S, Ohgo K, *et al.* Comparative Study of Silk Fibroin Porous Scaffolds Derived from Salt/Water and Sucrose/Hexafluoroisopropanol in Cartilage Formation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108: 68–75.
- [27] Chen Mingxin(陈明心), Zhang Bing(章斌), Chen Changyou(陈昌友), *et al.* 再生多孔丝素膜在创面的降解及对免疫细胞的影响[J]. *Suzhou University Journal of Medical Science* (苏州大学学报(医学版)), 2010, 30(4): 701–704.
- [28] You R, Xu Y, Liu G, *et al.* Regulating the Degradation Rate of Silk Fibroin Films through Changing the Genipin Crosslinking Degree [J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2014, 109: 226–232.
- [29] Wang Y Z, Rudym D D, Walsh A, *et al.* *In Vivo* Degradation of Three-Dimensional Silk Fibroin Scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 3 415–3 428.
- [30] Greenwald D, Shumway S, Albear P, *et al.* Mechanical Comparison of 10 Suture Materials before and after *In Vivo* Incubation [J]. *J Surg Res*, 1994, 56: 372–377.
- [31] Bucknall T E, Teare L, Ellis H. The Choice of a Suture to Close Abdominal Incisions [J]. *Eur Surg Res*, 1983, 15: 59–66.