

# 丝素支架应用于骨组织工程的研究进展

于潇<sup>1,2,3</sup> 马勇<sup>1,2,3△</sup> 郭杨<sup>2,3</sup> 潘娅岚<sup>2,3</sup> 涂鹏程<sup>2,3</sup> 过俊杰<sup>2,3</sup>

[关键词] 丝素蛋白;组织工程支架;骨组织工程;免疫微环境

[中图分类号] R318.08;R68 [文献标志码] A [文章编号] 1005-0205(2021)05-0084-05

骨组织工程将材料工程与生物学相结合,制作三维支架,以模拟天然骨组织的结构和功能,从而达到修补替换天然组织的目的。其三大基本要素包括种子细胞、生长因子和支架。支架作为组织工程中的核心部分,其材料的选择及制备工艺一直备受关注。

研究者引入了多种天然或合成聚合物材料以及不同的加工方法用于支架的开发研究,以重建天然骨基质,填补骨缺损。丝素蛋白作为一种天然高分子纤维蛋白,凭借其来源广泛、易水解且水解速率易于调控、良好的生物相容性与低免疫性、易于多种生物活性分子及矿物共混等优点,在组织工程领域获得广泛应用。

本文对近年来丝素支架应用于骨组织工程的研究进展进行综述,多角度介绍丝素支架性能,重点阐述多种形态丝素支架在骨组织工程中的应用。随着研究的深入,越来越多的研究者关注于支架植入后宿主反应,包括局部免疫微环境的改变及炎症反应。因此,对近来提出的支架的免疫微环境调控策略加以概括。最后,对目前研究中仍存在的问题提出作者的看法并指出未来的研究方向。

## 1 丝素支架性能

支架在种子细胞迁移、增殖、分化的过程中,为其提供生物力学支持,因此支架需要提供与天然骨组织接近的力学性能、孔径、孔隙方向、孔隙率和表面化学性质,以促进种子细胞的迁移、增殖以及分化。

### 1.1 机械强度

常用于组织工程的脱丝胶丝素具有 300 ~

740 MPa 的拉伸强度、10~17 GPa 的拉伸弹性模量、4%~26% 的断裂应变<sup>[1]</sup>。然而,在蚕丝溶解过程中使用的溶剂往往容易导致分子间氢键的不可逆断裂,导致人工制造的丝素蛋白无法达到天然蚕丝的强度。通过改变丝素蛋白纤维的构象,将丝素由不稳定  $\alpha$ -helix 结构转变为更为稳定的  $\beta$ -sheet 结构,可以调节丝素的机械强度。例如,提高共混溶液中丝素的含量<sup>[2]</sup>、在处理丝素溶液的过程中掺入金属离子(如  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等)<sup>[3]</sup>、使用激素类物质<sup>[4]</sup>等措施,均可以改变丝素蛋白纤维的构象,诱导  $\beta$ -sheet 结构的产生。此外,纳米级 HAP 等矿物的矿化作用也是提高丝素蛋白机械性能的有效途径。

### 1.2 可降解性与生物相容性

理想支架的降解速率应与骨再生速度相协调。过快的降解速率,使得支架不能提供适当的微环境来保护细胞增殖和分化。过低的降解速率可能导致支架残留物变成异物残留,引起炎症反应,从而阻碍骨缺损部位的修复。作为一种蛋白质,丝素易被蛋白酶 XIV、 $\alpha$ -糜蛋白酶和胶原酶 IA 等多种酶降解<sup>[5]</sup>。其降解速率与丝素 II (即  $\beta$ -sheet) 的比例负相关<sup>[6]</sup>。在处理蚕丝的过程中使用不同的溶剂可以通过控制  $\beta$ -sheet 的数量和二级结构,将生物降解率控制在几周到 12 个月<sup>[7]</sup>。有机溶剂处理的支架在体内降解需要 12 个月甚至更长时间,而水处理的支架在体内降解时间则不超过 6 个月<sup>[8]</sup>。同时,支架的降解产物不对人体组织产生不利影响。丝素在降解过程中释放的多肽有助于控制炎症和成骨细胞产生胶原,此外,丙氨酸和甘氨酸作为组成丝素的主要氨基酸,同时也是丝素降解的副产物,均可以被用于合成新的蛋白,从而避免了副产物在局部的蓄积<sup>[9-10]</sup>。在体内外的条件下,丝素生物材料所引起的免疫反应程度与现下正广泛使用的医用植入物并无不同,现已广泛应用于外科缝线及敷料中<sup>[11]</sup>。

### 1.3 孔径与孔隙率

在诸多支架性能中,孔径与孔隙率一直被视作设

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81673995)

江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX17\_1308)

2018 年地方高校国家级大学生创新训练计划项目  
(201810315008)

<sup>1</sup> 南京中医药大学附属医院骨伤科(南京,210023)

<sup>2</sup> 南京中医药大学骨伤研究所

<sup>3</sup> 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室

$\Delta$  通信作者 E-mail: mayong@njucm.edu.cn

计支架的重要数据,对于细胞成分、新生血管的形成以及支架本身的降解率都有重要影响。但是,最适的孔径仍存在争议,Karageorgiou 等则推荐孔径在 300~400  $\mu\text{m}$ ,这也是能观察到毛细血管长成的临界数值<sup>[12]</sup>;也有研究者提出孔径在 150~300  $\mu\text{m}$  之间的支架,和更小孔径的支架相比有着更好的细胞黏附<sup>[13]</sup>。不同孔径大小的支架对细胞分布的影响大于对细胞数量影响。细胞在较小的孔(200~500  $\mu\text{m}$ )上均匀填充,而在较大的孔(1 000~1 500  $\mu\text{m}$ )的孔壁上密集生长,导致沿孔壁的细胞与细胞之间的相互作用更紧密,正是这些更紧密的细胞相互作用增强了成骨反应<sup>[14]</sup>。较大的孔径引发成骨,而较小的孔径则导致血管形成受限和缺氧。局部的缺氧会增强局部炎症反应,最终导致肉芽组织的形成,并包绕植入体,阻止了进一步骨化的发生。其潜在机制可能与巨噬细胞的极化相关,孔径的增大导致了 M2 表型表达的上调和 M1 表型表达的下调<sup>[15-16]</sup>,其中 M1 表型巨噬细胞启动血管生成,而 M2 巨噬细胞促进血管成熟<sup>[17]</sup>。

## 2 多种制备工艺生产丝素支架在骨组织工程中的应用

细胞外基质(ECM)是组织细胞合成及分泌的结构蛋白、多糖、酶等分子构建的局部微环境,组织细胞与 ECM 的双向交互作用决定了组织细胞的生长分化。原生 ECM 在诱导良好的免疫环境,特别是巨噬细胞极化的同时诱导组织重塑<sup>[18]</sup>。原生的 ECM 和基于原生 ECM 的支架可以降低异物反应并在支架植入后调节免疫细胞抗炎表型<sup>[19]</sup>。因此,良好的支架需要在体内提供与 ECM 相类似的三维结构以及免疫微环境。为了尽可能的复制原生 ECM 的结构,研究人员从支架材料、形态以及制作工艺等方面进行了多种尝试。

### 2.1 三维多孔支架

三维多孔支架独特的结构有利于细胞附着、增殖和迁移,并可促进营养和代谢废物的运输。常用的制备方法有粒子沥滤法、冷冻干燥法以及 3D 打印法等。

粒子沥滤法将一定的成孔剂溶解于丝素溶液中,随后的溶剂蒸发导致在丝素基体中嵌入盐颗粒。丝素基体在去离子水中浸泡后,支架上的盐颗粒浸出,形成多孔结构。成孔剂的选择决定了支架孔径与孔隙。Zhang 等<sup>[20]</sup>以  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  为成孔剂,用丝素蛋白与羧甲基壳聚糖、锆取代羟基磷灰石、纤维素纳米晶制得 3 种复合支架,成孔率分别为  $90.09\% \pm 0.19\%$ 、 $84.28\% \pm 2.05\%$ 、 $82.03\% \pm 1.45\%$ ,其中 Sr-Hap/CNCs/SF/CMCs 支架表现出最高的 OPN 和 BSP 表达。纳米级矿化物的加入,提高了支架的机械性能及表面粗糙度,但是会造成孔径、孔隙率及溶胀率的下降。Correia 等<sup>[21]</sup>使用不同大小颗粒 NaCl 作为成孔

剂,水溶液和六氟异丙醇(HFIP)作为溶剂,分别制得四种支架,其中 400~600  $\mu\text{m}$  的 HFIP-SF 支架表现出最优的成骨能力。但是,有机溶剂的使用不可避免的增加了免疫反应风险,降低了支架的生物相容性。

冷冻干燥法通过冰晶的升华作用在三维支架内形成孔隙,可以避免有机溶剂的使用。Wang 等<sup>[22]</sup>通过冷冻干燥法制得氧化石墨烯-羟基磷灰石-丝素复合支架,该支架外层致密含有 5~15  $\mu\text{m}$  的微孔,中间层疏松伴有 15~30  $\mu\text{m}$  的带状孔隙,内层呈海绵状孔隙大小为 30~65  $\mu\text{m}$ 。和单纯 HAP-SF 支架相比,具有更高的机械强度和蛋白吸附能力。层状结构和球状结构相比,更贴近于板层骨结构,有利于种子细胞向板层骨分化,带来更高的机械强度。高温梯度梯度的快速冻结有利于纳米纤维和定向结构的形成。在 -80  $^{\circ}\text{C}$  下冻结的 SF 支架具有由随机短通道/孔/纳米纤维组成的混合结构,但短通道和孔不相互连接。相比之下,在 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻结的 SF 支架中只观察到没有很好地连接成网络的随机气孔<sup>[23]</sup>。Gokila 等在 -80  $^{\circ}\text{C}$  下制得具有典型的网状结构纳米壳聚糖/丝素蛋白/透明质酸支架,有着良好的增殖速率和细胞定植,同时保留了纳米壳聚糖的抑菌效应<sup>[24]</sup>。抗菌效应的保留对丝素支架可以一定程度上避免植入后的感染。

3D 打印法通过计算机预设支架内部结构,可以极大程度上克服粒子沥滤法及冷冻干燥法所制支架内部结构上的随机性。近年来,新兴的生物打印技术通过 CAD 技术来规划种子细胞的精确位置,然后逐层打印,可以实现活体细胞的 3D 打印。Suntivich 等<sup>[25]</sup>将丝素聚合物逐层组装成具有典型的“巢”状结构的支架,细胞在没有损害其完整性的情况下被成功地种植到这些“丝巢”中。使用数字光处理辅助 3D 生物打印技术可以解决喷墨和挤压打印的部分缺点,例如对被包封的细胞施加较大的机械应力或由于打印时间长而致细胞活力的降低<sup>[26]</sup>。使用甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)将 SF 溶液甲基丙烯酸化可以提高 SF 基生物油墨的机械性能及流变性能,同时可以实现不同细胞的多层印刷<sup>[27]</sup>。这使得具有多种细胞类型的生物组织可以被复制,特别是涉及软骨面的骨缺损。

### 2.2 静电纺丝支架

在静电纺丝中,高压产生的电势差使丝素溶液自喷射板中喷出,并在喷射过程中迅速蒸发,形成固体纤维。多种营销因素决定了电纺丝素纤维的性能。电纺丝素纤维的直径随溶液浓度的增加而增大,当丝素浓度低于 20% 无法成功纺丝,而高于 30% 则无法形成圆形截面纤维<sup>[28]</sup>。温度及相对湿度的升高是造成纤维不均及不良纺丝的重要因素。在 30  $^{\circ}\text{C}$  和 25% 相对湿度的条件下,可以制造出最高的抗渗透性和整体上最

均匀的纯丝蛋白纤维<sup>[29]</sup>。Kim 等<sup>[30]</sup>通过电纺丝制备了一种经干扰素处理的纳米丝素支架,不仅使植入其上的 hMSCs 有着良好的增殖与迁移,还提高免疫调节功能性细胞因子,IDO 和 COX2 的表达。Gao 等<sup>[31]</sup>通过电纺丝制得具有分层结构的矿化纳米丝素支架,在保持良好孔径与孔隙率的同时将压缩模量和应力分别是提高了 32.8 和 3.0 倍,分层结构则显著增加了细胞粘附和增殖与间充质干细胞向成骨细胞的分化。通过电纺丝生产的丝纳米纤维通常具有  $\alpha$ -helix 结构或低稳定性的无规卷曲构象。这些纳米纤维需要浸入有机溶剂(例如甲醇)中,以诱导在纳米纤维中形成更稳定的反平行  $\beta$ -sheet 结构。但是,使用有机溶剂和腐蚀性溶剂可能会破坏生物分子的结构和生物活性。因此,最好在静电纺丝前使用更温和的手段避免使用有机溶剂以最大限度地减少残留溶剂的毒性作用。红外光谱证明,在静电纺丝前使用简单的超声波处理溶液可以一定程度上调节溶液的黏度,在电纺基质中诱导水稳定性。流变性能测试表明,超声处理显著提高了溶液的黏度,进一步提高了电纺纤维的质量,改善了干、湿条件下的力学性能<sup>[32]</sup>。

### 3 丝素支架的免疫调节手段

骨生物材料的植入后的免疫反应对随后的成骨和骨整合有着重要影响。丝胶作为蚕丝中含量第二的蛋白质,通常被认为是引发免疫应答的关键因素。可能与丝胶上调的肿瘤坏死因子- $\alpha$  的表达有关<sup>[33]</sup>,而掺入 4-己基间苯二酚(4HR)则可以抑制这一过程,增强成骨<sup>[34]</sup>。但是,也有研究员制得掺有不同浓度丝胶的丝素支架,各组之间促炎性标志物 TNF- $\alpha$ 、CXCL10 和 CD197 的基因表达与无丝胶组相比并无明显差异<sup>[35]</sup>。亦有部分研究同样支持丝素丝胶共混,丝胶蛋白引发的类骨羟基磷灰石结晶形成,或有利于骨形成<sup>[36-37]</sup>。对于各研究者得出的不同结果,可能与处理蚕丝的过程中脱丝胶过程及丝胶的制备工艺有关,因此,丝胶对免疫反应的影响尚需进一步研究。

植入物诱导多核巨噬细胞的浸润导致肉芽肿形成是移植失败的主要原因。巨噬细胞是宿主对生物材料反应的第一反应者,并且已被证明是下游组织重塑事件的预测因子。同时,具有高度可塑性的巨噬细胞使得通过改变支架成分及结构来调节免疫成为可能。近年来,多种措施被应用于调节免疫微环境,包括:1)通过支架表面修饰以改变拓扑结构及粗糙度,调节免疫细胞与支架材料之间的相互作用<sup>[38]</sup>。支架的表面是第一个与生理环境和细胞相互作用的场所,表面粗糙度的增加促进了细胞与蛋白质宿主位点的相互作用,对细胞附着和密度有着深远的影响。有研究员提出理想的骨种植体,表面粗糙度应在  $1\sim 2\ \mu\text{m}$ <sup>[39-40]</sup>。未经

处理的丝素蛋白表面粗糙度平均为 40 nm,经乙烯基磷酸(VPA)浸泡、乙烯基磺酸(VSA)浸泡、臭氧中紫外线照射(UV/O<sub>3</sub>)处理后,均可使丝素蛋白的表面粗糙度提升,而碳酸氢钠(NaOH)浸泡、丙烯酸(AAC)浸泡的处理则能减低丝素蛋白的表面粗糙度<sup>[41]</sup>。有机化合物的使用在提高丝素表面粗糙度的同时不可避免的提高了免疫原性,因此需要更温和的手段实现表面粗糙度的提升。2)通过控释方式掺入生物活性元素来调控免疫反应<sup>[42-44]</sup>。掺有镁离子的材料可上调巨噬细胞促炎细胞因子,包括 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达,而与骨修复相关的 TGF- $\beta$ 1 细胞因子<sup>[45]</sup>。Wang 等<sup>[46]</sup>证实掺入 Sr 的 SrHA/SF 纳米球比 HA/SF 纳米球有着更高的成骨分化潜能。掺入的金属离子的支架需严格控制支架的降解及离子的控释,以免造成异物沉积。3)掺入生物活性因子如巨噬细胞诱导剂或炎性细胞因子。Spiller 等<sup>[47]</sup>设计了吸附有干扰素- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )及白介素 4(IL4)的骨再生支架,以短时释放 IFN $\gamma$  促进巨噬细胞 M1 表型,然后持续性释放 IL4 促进 M2 表型,利用宿主巨噬细胞的血管生成行为来实现支架血管化。4)与免疫调节药物联用。与硫酸软骨素共联后的丝素支架降低了 IL1- $\beta$  介导的炎症反应<sup>[48]</sup>,这与文献中证明的硫酸软骨素的免疫调节及骨整合作用相一致<sup>[49]</sup>。联用免疫调节药物时,控制药物的初始突释至关重要。通过改变丝素纤维的直径和厚度,可调节药物的释放动力学。

### 4 展望

骨组织工程致力于开发一种与骨组织微环境相似的骨植入物,旨在通过结合骨祖细胞和生长因子募集细胞进入由各种生物材料制成的支架中来促进骨修复和再生。这些生物材料提供必要的机械支持,有足够的血管化能力,以允许获得营养物质支持,并尽可能的引起免疫反应。有研究员提出了骨免疫调节能力(Osteoimmunomodulation, OIM)的概念,即诱导良好免疫反应的能力,并将其作为生物材料筛选的标准<sup>[50]</sup>。但是,关于丝素支架不同特征引起的不同免疫反应的内在机制尚缺乏研究。同时,对于不同的免疫细胞和干细胞的相互作用和分子机制的研究目前大多集中于巨噬细胞,包括 B 细胞和 T 细胞在内的多种免疫细胞仍需在体内外进一步深入研究,为通过支架在体内更好地调节这些细胞提供理论依据。另一方面,在丝素支架制备过程中使用的有机溶剂及各种改性剂会显著提高支架的免疫原性。开发新型可以完全蒸发或洗掉的改性剂,抑或开发新型纯丝素蛋白纤维支架是解决该问题的不错选择。此外,外源生物活性成分的应用,导致了一些尚未解决的关键问题,如无法控制的再生和潜在的癌症风险,限制了丝素支架的应用。

因此,在应用于人体之前,尚需要开发更为安全的生长因子。总之,对于骨组织工程支架的设计应考虑成骨能力、免疫调节能力及安全性等多方面因素,以实现良好的组织修复。

## 参考文献

- [1] KOH L D, CHENG Y, TENG C P, et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials[J]. *Prog Polym Sci*, 2015, 46(7): 86-110.
- [2] LI J, ZHOU Y, CHEN W, et al. A novel 3D in vitro tumor model based on silk fibroin/chitosan scaffolds to mimic the tumor microenvironment[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(43): 36641-36651.
- [3] WANG X, LI Y, LIU Q, et al. In vivo effects of metal ions on conformation and mechanical performance of silkworm silks[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(3): 567-576.
- [4] GUO K, DONG Z, ZHANG Y, et al. Improved strength of silk fibers in *Bombyx mori* trimolters induced by an anti-juvenile hormone compound[J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018, 1862(5): 1148-1156.
- [5] KUNDU B, RAJIKHOWA R, KUNDU S C, et al. Silk fibroin biomaterials for tissue erations[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(4): 457-470.
- [6] DEBARI M K, ABBOTT R D. Microscopic considerations for optimizing silk biomaterials[J]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2019, 11(2): e1534.
- [7] LU Q, ZHANG B, LI M, et al. Degradation mechanism and control of silk fibroin[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(4): 1080-1086.
- [8] WANG Y, RUDYMD D D, WALSH A, et al. In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(24/25): 3415-3428.
- [9] ZHANG W, CHEN L, CHEN J, et al. Silk fibroin biomaterial shows safe and effective wound healing in animal models and a randomized controlled clinical trial[J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(10). DOI: 10. 1002/adhm. 201700121.
- [10] ASAKURA T, MATSUDA H, NAITO A. Acetylation of *Bombyx mori* silk fibroin and their characterization in the dry and hydrated states using <sup>13</sup>C solid-state NMR[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 155: 1410-1419.
- [11] JO Y Y, KWEON H, KIM D W, et al. Accelerated biodegradation of silk sutures through matrix metalloproteinase activation by incorporating 4-hexylresorcinol[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42441.
- [12] KARAGEORGIOU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(27): 5474-5491.
- [13] ZHANG Y, XIAO Y. The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of BMP7-expressing mesenchymal stem cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2010, 6(8): 3021-3028.
- [14] HURI P Y, OZILGEN B A, HUTTON D L, et al. Scaffold pore size modulates in vitro osteogenesis of human adipose-derived stem/stromal cells [J]. *Biomed Mater*, 2014, 9(4): 045003.
- [15] KLINGE U, KLOSTERHALFEN B, BIRKENHAUER V, et al. Impact of polymer pore size on the interface scar formation in a rat model[J]. *J Surg Res*, 2002, 103(2): 208-214.
- [16] GARG K, PULLEN N A, OSKERITZIAN C A, et al. Macrophage functional polarization (M1/M2) in response to varying fiber and pore dimensions of electrospun scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(18): 4439-4451.
- [17] MADDEN L R, MORTISEN D J, SUSSMAN E M, et al. Proangiogenic scaffolds as functional templates for cardiac tissue engineering[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(34): 15211-15216.
- [18] TANG J, GU Y, ZHANG H, et al. Outer-inner dual reinforced micro/nano hierarchical scaffolds for promoting osteogenesis[J]. *Nanoscale*, 2019, 11(34): 15794-15803.
- [19] DZIKI J L, WANG D S, PINEDA C, et al. Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2017, 105(1): 138-147.
- [20] ZHANG X Y, CHEN Y P, HAN J, et al. Biocompatible silk fibroin/carboxymethyl chitosan/strontium substituted hydroxyapatite/cellulose nanocrystal composite scaffolds for bone tissue engineering[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 136: 1247-1257.
- [21] CORREIA C, BHUMIRATANA S, YAN L P, et al. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8(7): 2483-3492.
- [22] WANG Q, CHU Y, HE J, et al. A graded graphene oxide-hydroxyapatite/silk fibroin biomimetic scaffold for bone tissue engineering[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 80: 232-242.
- [23] FAN L, LI J L, CAI Z, et al. Creating biomimetic anisotropic architectures with Co-Aligned nanofibers and macrochannels by manipulating ice crystallization [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(6): 5780-5790.
- [24] GOKILA S, GOMATHI T, VIJAYALAKSHMI K, et al. Development of 3D scaffolds using nanochitosan/silk-fibroin/hyaluronic acid biomaterials for tissue engineering applications[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120(Part A): 876-885.
- [25] SUNTIVICH R, DRACHUK I, CALABRESE R, et al. Inkjet printing of silk nest arrays for cell hosting[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(4): 1428-1435.
- [26] HONG H, SEO Y B, KIM D Y, et al. Digital light pro-

- cessing 3D printed silk fibroin hydrogel for cartilage tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2020, 232:119679.
- [27] KIM S H, YEON Y K, LEE J M, et al. Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1620.
- [28] HODGKINSON T, CHEN Y, BAYAT A, et al. Rheology and electrospinning of regenerated bombyx mori silk fibroin aqueous solutions[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(4):1288-1298.
- [29] KOPP A, SMEETS R, GOSAU M, et al. Effect of process parameters on additive-free electrospinning of regenerated silk fibroin nonwovens[J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(2):241-252.
- [30] KIM O H, YOON O J, LEE H J. Silk fibroin scaffolds potentiate immunomodulatory function of human mesenchymal stromal cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2):323-329.
- [31] GAO Y, SHAO W, QIAN W, et al. Biom mineralized poly (l-lactic-co-glycolic acid)-tussah silk fibroin nanofiber fabric with hierarchical architecture as a scaffold for bone tissue engineering[J]. *Mater Sci Eng C: Mater Biol Appl*, 2018, 84:195-207.
- [32] SERÓDIO R, SCHICKERT SL, COSTA-PINTO A R, et al. Ultrasound sonication prior to electrospinning tailors silk fibroin/PEO membranes for periodontal regeneration[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 98:969-981.
- [33] JO Y Y, KWEON H, KIM D W, et al. Bone regeneration is associated with the concentration of tumour necrosis factor- $\alpha$  induced by sericin released from a silk mat[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15589.
- [34] SONG J Y, KIM S G, PARK N R, et al. Porcine bone incorporated with 4-Hexylresorcinol increases new bone formation by suppression of the nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway[J]. *J Craniofac Surg*, 2018, 29(7):1983-1990.
- [35] SIAVASHANI A Z, MOHAMMADI J, ROTTMAR M, et al. Silk fibroin/sericin 3D sponges: The effect of sericin on structural and biological properties of fibroin[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 153:317-326.
- [36] RAO J, CHENG Y, LIU Y, et al. A multi-walled silk fibroin/silk sericin nerve conduit coated with poly (lactic-co-glycolic acid) sheath for peripheral nerve regeneration[J]. *Mater Sci Eng C: Mater Biol Appl*, 2017, 73:319-332.
- [37] GHAEI I, DE MORAES M A, BEPPU M M, et al. Phase behaviour and miscibility studies of collagen/silk fibroin macromolecular system in dilute solutions and solid state[J]. *Molecules*, 2017, 22(8):1368-1375.
- [38] CHEN Z, BACHHUKA A, HAN S, et al. Tuning chemistry and topography of nanoengineered surfaces to manipulate immune response for bone regeneration applications [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(5):4494-4506.
- [39] AGARWAL R, GARCÍA A J. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, (94):53-62.
- [40] KANG H, ZENG Y, VARGHEESE S. Functionally graded multilayer scaffolds for in vivo osteochondral tissue engineering[J]. *Acta Biomater*, 2018, 78:365-377.
- [41] RIBEIRO V P, ALMEIDA L R, MARTINS A R, et al. Influence of different surface modification treatments on silk bio-textiles for tissue engineering applications[J]. *J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*, 2016, 104(3):496-507.
- [42] MAO L, XIA L, CHANG J, et al. The synergistic effects of Sr and Si bioactive ions on osteogenesis, osteoclastogenesis and angiogenesis for osteoporotic bone regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2017, 61:217-232.
- [43] LIU W, LI J, CHENG M, et al. Zinc-modified sulfonated polyetheretherketone surface with immunomodulatory function for guiding cell fate and bone regeneration[J]. *Adv Sci*, 2018, 5(10):1800749.
- [44] CHEN B, YOU Y, MA A, et al. Zn-Incorporated TiO<sub>2</sub> nanotube surface improves osteogenesis ability through influencing immunomodulatory function of macrophages[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:2095-2118.
- [45] HU T, XU H, WANG C, et al. Magnesium enhances the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells by inhibiting activated macrophage-induced inflammation[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):3406.
- [46] WANG L, PATHAK J L, LIANG D, et al. Fabrication and characterization of strontium-hydroxyapatite/silk fibroin biocomposite nanospheres for bone-tissue engineering applications[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 142:366-375.
- [47] SPILLER K L, NASSIRI S, WITHEREL C E, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2015, 37:194-207.
- [48] ZHOU F, ZHANG X, CAI D, et al. Silk fibroin-chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair[J]. *Acta Biomater*, 2017, 63:64-75.
- [49] LI Y M, WU J Y, JIANG J, et al. Chondroitin sulfate-polydopamine modified polyethylene terephthalate with extracellular matrix-mimetic immunoregulatory functions for osseointegration[J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(48):7756-7770.
- [50] CHEN Z, KLEIN T, MURRAY R Z, et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials[J]. *Materials Today*, 2016, 16(6):304-321.