



丝素/海藻酸钠载药复合支架的 药物缓释行为及其活性

任旭^{1a}, 刘涛^{1b}, 朱莹^{1a}, 陈晓怡², 丁新波^{1a}

(1.浙江理工大学, a.纺织科学与工程学院, 杭州 310018; b.科技与艺术学院, 杭州 310018;

2.浙江省人民医院临床研究所, 杭州 310014)

摘要: 以丝素和海藻酸钠为原材料, 盐酸万古霉素为负载药物, 利用冷冻干燥法制备负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架, 通过扫描电子显微镜和红外光谱仪等仪器对其形貌和结构进行表征, 探究丝素/海藻酸钠复合支架对盐酸万古霉素的控释能力, 并通过模拟体液浸泡法来探究其样品的生物活性。结果表明: 丝素/海藻酸钠复合支架均呈现出三维孔状结构, 孔隙率在 98% 以上。在不同质量比的复合支架中, 随着海藻酸钠添加比例增加, 其药物缓释速率和累积释放量也有所增长; 样品通过体外模拟体液浸泡后, 可以观察到复合支架表面沉积了一层球状晶体的羟基磷灰石, 表明样品有较好的生物活性。

关键词: 丝素; 海藻酸钠; 复合支架; 药物缓释; 生物活性

中图分类号: TQ341.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2020)03-0209-07

Drug sustained release properties and bioactivity of silk fibroin/sodium alginate drug-loaded composite scaffold

REN Xu^{1a}, LIU Tao^{1b}, ZHU Ying^{1a}, CHEN Xiaoyi², DING Xinbo^{1a}

(1a.School of Textile Science and Engineering; 1b.Keiyi College, Zhejiang Sci-Tech University,

Hangzhou 310018c China; 2. Clinical Research Institution of Zhejiang Provincial People's

Hospital, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The silk fibroin and sodium alginate were used as the raw materials and vancomycin hydrochloride was applied as the load drug to prepare silk fibroin/sodium alginate composite scaffolds loaded with vancomycin hydrochloride with the freeze-drying method. The morphology and structure of the composite scaffolds were characterized by FESEM and FTIR, and the release controlling behavior of silk fibroin/sodium alginate composite scaffold was discussed. The bioactivity of the samples was evaluated by the immersion in simulated body fluid (SBF). The results showed that the silk fibroin/sodium alginate composite scaffolds exhibited a three-dimensional pore structure and the porosity of sample was over 98%. In the composite scaffolds with different quality ratios, the release rate and accumulative release amount of drug increased with the rise of sodium alginate. After immersing the sample in SBF, it was observed that a layer of globular crystal hydroxyapatite was deposited on the surface of composite scaffold. Thus, the composite scaffold is considered to have a good bioactivity.

Key words: silk fibroin; sodium alginate; composite scaffold; drug sustained release; bioactivity

收稿日期: 2019-09-10 网络出版日期: 2019-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31900964); 浙江省自然科学基金项目(LY17H180010); 科技与艺术学院科研项目(KY2019002)

作者简介: 任旭(1993-), 女, 河北石家庄, 硕士研究生, 主要从事生物医用纺织新产品的开发研究。

通信作者: 刘涛, E-mail: maggie_liu310@163.com

0 引言

骨组织在生物体中起着重要作用,目前骨组织工程用于骨缺损临床治疗已成为研究热点^[1]。生物材料、缓释系统和骨组织工程的结合利用为骨缺损临床治疗提供了新的发展方向^[2]。因三维多孔支架生物材料可提供与天然细胞外基质相类似的环境^[3],该环境使其能够为细胞提供结构支撑和附着场所及引导组织再生和控制组织结构。据报道目前有多种方法制备三维多孔支架,如冷冻干燥法、气体发泡法、相分离法、静电纺和3D打印等技术^[4-8]。由于冷冻干燥法能保持支架材料的完整性,提高药物的利用率,因此多采用冷冻干燥法制备三维多孔支架。

丝素的结晶结构主要由 α -螺旋结构和 β -折叠结构组成,以无规线团形式存在,由于无规线团结构不稳定,所以在外界环境的影响下,无规线团容易向 β -折叠的构象变化^[9]。例如旋涡超声震动、pH值、温度改变等都会导致丝素蛋白聚集形态的变化^[10-11]。海藻酸钠是由 β -D-甘露糖醛酸(M单元)和 α -L-古洛糖醛酸(G单元)组成的线性聚合物^[12]。G单元上的 Na^+ 易与二价阳离子(Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 等)发生离子交换反应,形成具有“egg-box”结构的海藻酸钠凝胶;该凝胶也是较为理想的细胞材料。Wang等^[13]将丝素蛋白和海藻酸钠混合通过自然风干成型工艺,制备得复合薄膜。Ghalei等^[14]通过静电纺丝法制备海藻酸盐和丝素蛋白创伤敷料具有将促进细胞反应和伤口愈合的物质输送到伤口部位的能力。Hassani等^[15]将血管内皮生长因子加载到丝素蛋白纳米颗粒上,然后包裹在含有万古霉素的丝素蛋白支架中以形成双药物释放系统。丝素蛋白和海藻酸钠具有良好的生物相容性,对人体均无毒副作用,传统的共混过程中往往通过添加其他交联剂以达到复合效果。通过超声法诱导的丝素/海藻酸钠凝胶,在凝胶过程中不会引入其他交联剂及发生抗原性反应。当前关于丝素与海藻酸钠复合材料方面的研究较多,但是选用这两种材料复合制备三维多孔支架材料的研究较少。

在丝素所占比例较多的情况下,为了使丝素材料在缓释中得到更好的性能,本实验选用具有吸湿性较好的材料海藻酸钠为辅料。因盐酸万古霉素性质相当稳定,不被各种水解酶如胰酶或蛋白酶等所破坏,因此选用盐酸万古霉素作为负载药物。本文通过超声法制备负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸

钠三维多孔复合支架,将盐酸万古霉素包覆在复合支架中来实现对药物的负载;并通过对丝素/海藻酸钠复合支架体外活性研究来进一步探究其生物活性。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

蚕茧购于浙江湖州、海藻酸钠(分析纯,国药化工集团有限公司)、无水乙醇(EtOH ,分析纯,杭州双林化工试剂有限公司);盐酸万古霉素(USP,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);氯化钙(分析纯,杭州高晶精细化工有限公司)、透析袋(截留分子量8000~14000,上海麦克林生化科技有限公司)、去离子水(DI Water,实验室自制)。

DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(杭州惠创仪器设备有限公司)、FD-1A-50型冷冻干燥机(上海比朗仪器制造有限公司)、FE20型pH计(上海梅特勒-托利多仪器公司)、UV-2600型紫外分光光度计(日本Shimadzu公司)、Ultra55型场发射扫描电子显微镜(FESEM,德国Carl Zeiss公司)、Nicolet5700型傅立叶红外光谱仪(FTIR,美国Thermo Electron公司)。

1.2 丝素/海藻酸钠复合支架的制备

图1所示为负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架流程图。首先,蚕茧脱胶处理后得到丝素蛋白;其次,在 $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 的三元溶剂中将丝素蛋白溶解;再次,通过在去离子水中透析后,得到的丝素蛋白溶液,在高速离心机中离心以除去微小的聚集体;最后,得到质量分数为5.0%的丝素溶液。

将海藻酸钠粉末均匀的溶解在去离子水中,得到质量分数为0.5%的海藻酸钠溶液。经预试验所得,当丝素和海藻酸钠质量比为80/20和60/40时,其后续形貌、孔隙率及缓释性能更具代表性。因此将丝素和海藻酸钠分别按质量比为80/20和60/40的比例混合均匀。将40 mg/mL的万古霉素溶液按照质量比为1:20的比例加入到丝素/海藻酸钠溶液中。通过超声处理凝胶化后,将上述负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合水凝胶冷冻干燥得到负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架。

1.3 测试与表征

1.3.1 丝素/海藻酸钠复合支架的释放性能测试

将盐酸万古霉素配制成一定浓度水溶液,在200~800 nm波长范围内使用紫外分光光度计进行

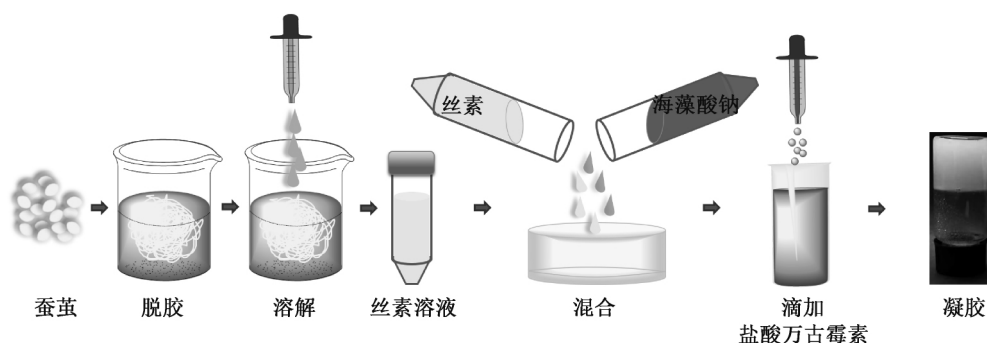


图1 负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架流程图

扫描,将 280 nm 处的最大吸收波长作为测定波长。使用 PBS(pH 值 7.4)溶解盐酸万古霉素配置成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液,用 PBS 溶液分别稀释至 90、80、60、50、20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以 PBS 为空白对照样,利用紫外分光光度计在波长 λ 为 280 nm 下测定各种浓度的万古霉素标准溶液,绘制标准曲线。

将丝素/海藻酸钠复合支架在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下完全浸入 20 mL 的 PBS(pH 值 7.4)中。在不同时间取出 5 mL 样品溶液,并立即用相同量的新 PBS 培养基替换提取的体积。通过紫外分光光度法^[16]在 280 nm 下测量盐酸万古霉素的量。

1.3.2 形貌及结构分析

采用场发射扫描电子显微镜对负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠支架的表面形貌进行观察。

通过傅立叶红外光谱仪对负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠样品化学结构进行分析。

1.3.3 孔隙率测试

孔隙率测试:采用液体替代法^[17]测试支架孔隙率。样品支架的重量(W_s),将样品支架浸入已知质量(W_1)的乙醇中。测得乙醇和样品支架的重量为 W_2 。通过反复抽真空,排气和抽真空,循环几次,直到没有气泡出现,以确保乙醇完全进入样品支架空间。取出支架后,称取剩余的乙醇质量计算为 W_3 。最后,样品支架的孔隙率(ϵ)通过以下公式(1)获得:

$$\epsilon/\% = \frac{(W_2 - W_3 - W_s)\rho}{(W_1 - W_3)/\rho} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 载药率测试

载药率测试:称取一定质量的干燥样品向其中加入 PBS 缓冲溶液(pH 7.4)超声,随后在 8000 r/min 的转速下离心 10 min,吸取上层清液。为了保证样品中负载的药物能够收集完全,多次重复该过程。将累积的上层清液用紫外分光光度计下在

280 nm 波长处测量其吸光度的数值,根据标准曲线,计算样品中盐酸万古霉素的浓度。载药率(LC)^[18]的计算如式(2)所示:

$$LC/\% = \frac{M_1}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

其中: M_1 为载体中包覆的药物量,mg; M_0 为载体的总重量,mg。

1.3.5 体外活性研究

样品生物活性可通过生物体液浸泡法来进行研究^[19]。将样品置于 Kokubo 法^[20]制备 SBF 溶液中(样品质量与 SBF 溶液体积比为 1.5 mg/mL)并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下培养 7 d,每 24 h 更换一次溶液。浸泡结束后,将样品从 SBF 溶液中取出,用去离子水洗涤并对样品进行冷冻干燥后进行下一步表征。

2 结果与讨论

2.1 负载盐酸万古霉素复合支架形貌及结构分析

2.1.1 负载盐酸万古霉素复合支架的电镜观察

图 2 为负载盐酸万古霉素丝素/海藻酸钠复合支架 FESEM 图。从图 2 中可以看出,不同质量比的丝素/海藻酸钠复合支架均呈现出三维不规则孔状结构,孔隙之间相互连通。良好的孔状结构为药物的组装和存储提供了表面空间,在药物释放过程中有利于对药物的控释。

2.1.2 负载盐酸万古霉素复合支架的 FTIR 图谱

图 3(a)为丝素、海藻酸钠和盐酸万古霉素的 FTIR 图谱。从图 3(a)中可以看出,丝素收峰的特征是 1631 cm^{-1} (酰胺 I),1521 cm^{-1} (酰胺 II)和 1236 cm^{-1} (酰胺 III)。这些峰代表在超声处理过程中诱导的 β -折叠结构^[21]。同时,在图 3(a)的 FTIR 光谱中纯海藻酸钠在波长为 1616、1417 cm^{-1} 和 1031 cm^{-1} 出现的吸收特征峰,分别归因于 $-\text{COO}-$ (不对称)、 $-\text{COO}-$ (对称)和 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 。图 3(b)为负载盐酸万古霉素不同配比的丝素/海藻

酸钠复合支架的 FTIR 曲线图,与图 3(a)相比,图 3(b)中载药丝素和海藻酸钠复合支架中的分子伸缩振动与组成的单体基本一致,发生轻微偏移,丝素的酰胺 I 峰从 1631 cm^{-1} 偏移到 1627 cm^{-1} ,酰胺 II 峰从 1521 cm^{-1} 偏移到 1517 cm^{-1} ,海藻酸钠特征峰从 1417 cm^{-1} 偏移至 1409 cm^{-1} 。随着负载盐酸万古

霉素的丝素/海藻酸钠复合支架中海藻酸钠的质量比增加,丝素/海藻酸钠复合支架红外曲线中海藻酸钠的峰值逐渐出现。在图 3(b)曲线中 1062 cm^{-1} 和 1027 cm^{-1} 处出现新的振动峰,这些与盐酸万古霉素特征振动峰相吻合,说明药物盐酸万古霉素成功负载在丝素/海藻酸钠复合支架上。

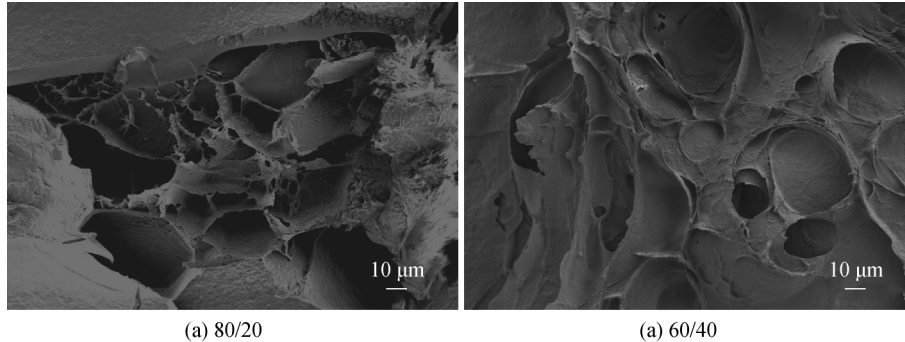


图2 负载盐酸万古霉素不同质量比的丝素/海藻酸钠复合支架 FESEM 图

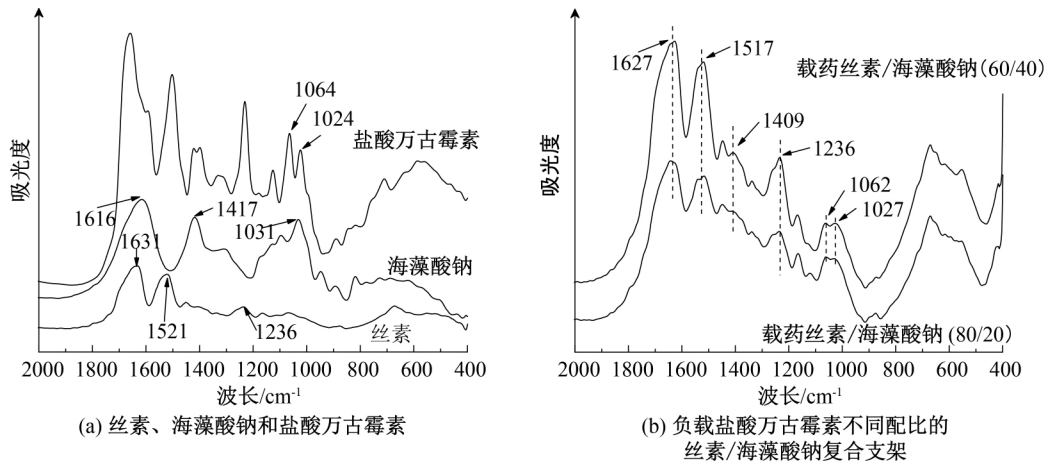


图3 不同样品的 FTIR 图

2.1.3 负载盐酸万古霉素复合支架的孔隙率和载药率

负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架孔隙率和载药率结果见表1。采用液体替代法测试的负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架孔隙率为: $98.50\% \pm 0.14\%$ (80/20); $98.80\% \pm 0.05\%$ (60/40)。两种质量比的复合支架孔隙率均在 98.00% 以上,且海藻酸钠比例高的孔隙率大。良好的孔隙率有助于细胞进入支架,为细胞迁移,增殖和物质代谢提供了机会^[22]。

表1 负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架的孔隙率和载药率

丝素/海藻酸钠(质量比)	$\varepsilon/\%$	LC/ $\%$
80/20	98.50 ± 0.14	6.2 ± 2.3
60/40	98.80 ± 0.05	7.6 ± 1.5

经测定,负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架载药率分别为: $6.2\% \pm 2.3\%$ (80/20),

$7.6\% \pm 1.5\%$ (60/40)。可以看出复合支架中海藻酸钠比例越大载药率越高。实验中由于载药复合支架本身加入的药物量少,导致载药量低,因此可通过增加盐酸万古霉素加入丝素/海藻酸钠共混溶液中的药物量来提高其载药率。

2.2 负载盐酸万古霉素复合支架形貌及结构分析

图4为通过 pH 值 7.4 的 PBS 磷酸盐缓冲溶液配置的盐酸万古霉素在 280 nm 处的吸光度对其标准浓度进行线性拟合得到万古霉素的标准曲线图。

图5所示的是不同质量比的载药丝素/海藻酸钠复合支架药物累积释放曲线。由图5可以看出不同质量比的载药丝素/海藻酸钠复合支架药物释放的趋势大致相同,在 0~10 h,出现爆释,其累积释放速率均超过 70.00% ;在 24 h 后,虽盐酸万古霉素的释放逐渐趋于平缓,但是载药丝素/海藻酸钠质量配比为 60/40 的释放速率相对于 80/20 的释放速率略微较快。例如,在 24 h 时,80/20 的载药丝素/海藻酸钠的

释放速率为 $83.61\% \pm 0.16\%$, 60/40 的载药丝素/海藻酸钠的释放速率为 $87.76\% \pm 0.14\%$; 而在 36 h 时, 80/20 的载药丝素/海藻酸钠的释放速率为 $87.09\% \pm 0.21\%$, 60/40 的载药丝素/海藻酸钠的释放速率为 $89.91\% \pm 0.04\%$, 在 60/40 的载药丝素/海藻酸钠中盐酸万古霉素的累积释放速率和累积释放量均比 80/20 的载药丝素/海藻酸钠要高, 这是由于 60/40 的载药丝素/海藻酸钠的孔隙率较高, 与溶液接触的表面积较大, 更有利于药物与溶液接触溶解。

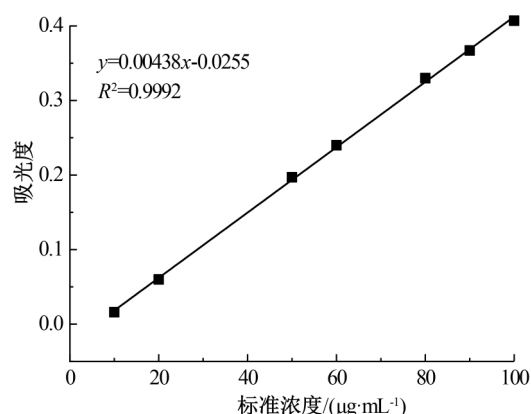


图4 盐酸万古霉素的标准曲线图

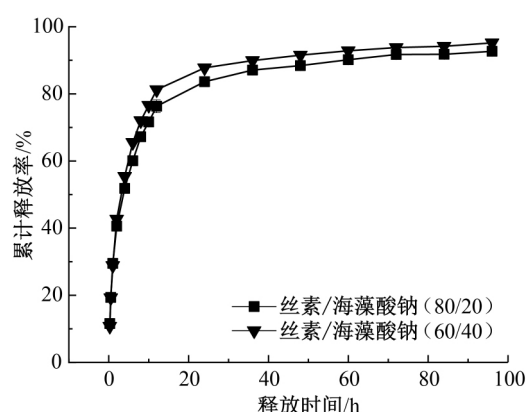


图5 不同质量比的载药丝素/海藻酸钠复合支架的累计释放曲线

2.3 丝素/海藻酸钠复合支架体外活性研究

2.3.1 丝素/海藻酸钠复合支架体外活性的电镜表征

图6是丝素/海藻酸钠复合支架浸泡模拟体液后的FESEM图。通过观察模拟体液浸泡后生成的羟基磷灰石来评估复合支架的生物活性。图6与图2比对可以看出, 在模拟体液中浸泡的复合支架表面覆盖了大量球状晶体。

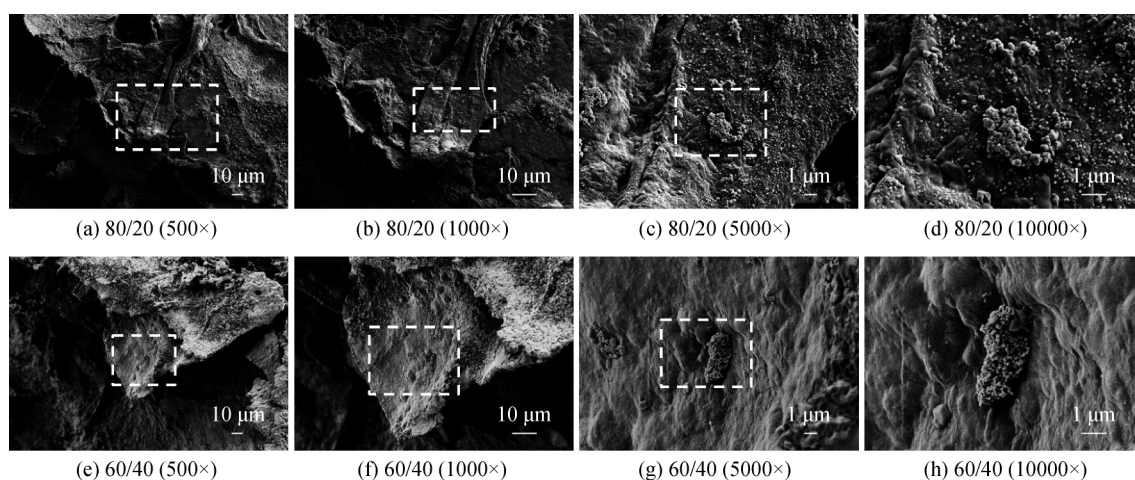


图6 浸泡模拟体液后的不同质量比的丝素/海藻酸钠复合支架 FESEM 图

2.3.2 丝素/海藻酸钠复合支架体外活性的 FTIR 图分析

图7(a)为羟基磷灰石的 FTIR 图, 图7(b)为浸泡模拟体液后丝素/海藻酸钠复合支架。从7(b)的 FTIR 图中可以看出丝素/海藻酸钠复合支架具有酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III。图7(a)中羟基磷灰石在 567 cm^{-1} 和 603 cm^{-1} 处的 P—O 弯曲振动峰, 877 cm^{-1} 处的 CO_3^{2-} 的特征峰, 在 1037 cm^{-1} 处的 P—O 不对称伸缩振动峰^[23], 均在图7(b)中存在, 但在图3(b)中没有出现, 这说明浸泡模拟体液后丝

素/海藻酸钠复合支架仿生矿化表面均有羟基磷灰石的形成。

2.3.3 丝素/海藻酸钠复合支架体外活性的 EDS 分析

为进一步明确丝素/海藻酸钠复合支架表面结构, 对其进行元素分析。图8为丝素/海藻酸钠复合支架未浸泡模拟体液与浸泡模拟体液后的 EDS 图。与图8(a)和图8(b)未浸泡模拟体液相比, 图8(c)和图8(d)中 P 元素(2.02 keV)和 Ca 元素(3.68 keV)有明显的特征衍射峰。这进一步表明丝素/海藻酸

钠复合支架仿生矿化表面形成的是羟基磷灰石。与图 8(c)相比图 8(d)中 P 元素和 Ca 元素含量明显增

加,表明随着海藻酸钠含量的增加,其表面羟基磷灰石的含量逐渐增加。

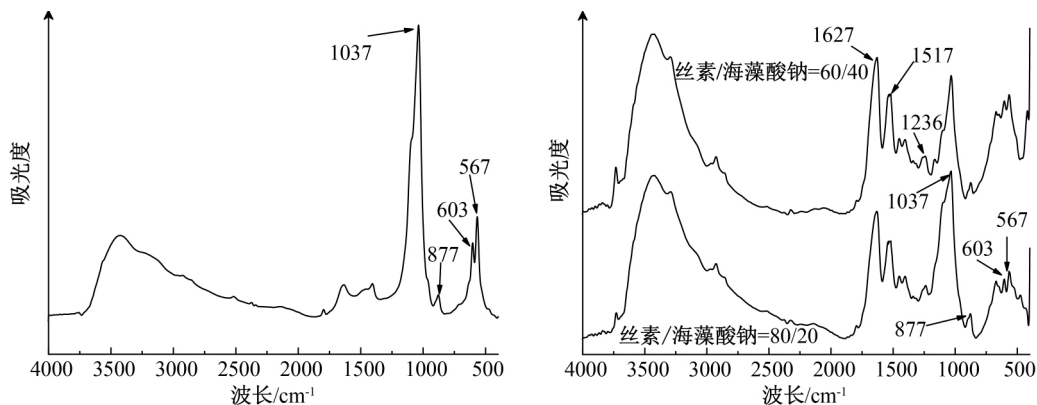


图7 不同样品的 FTIR 图

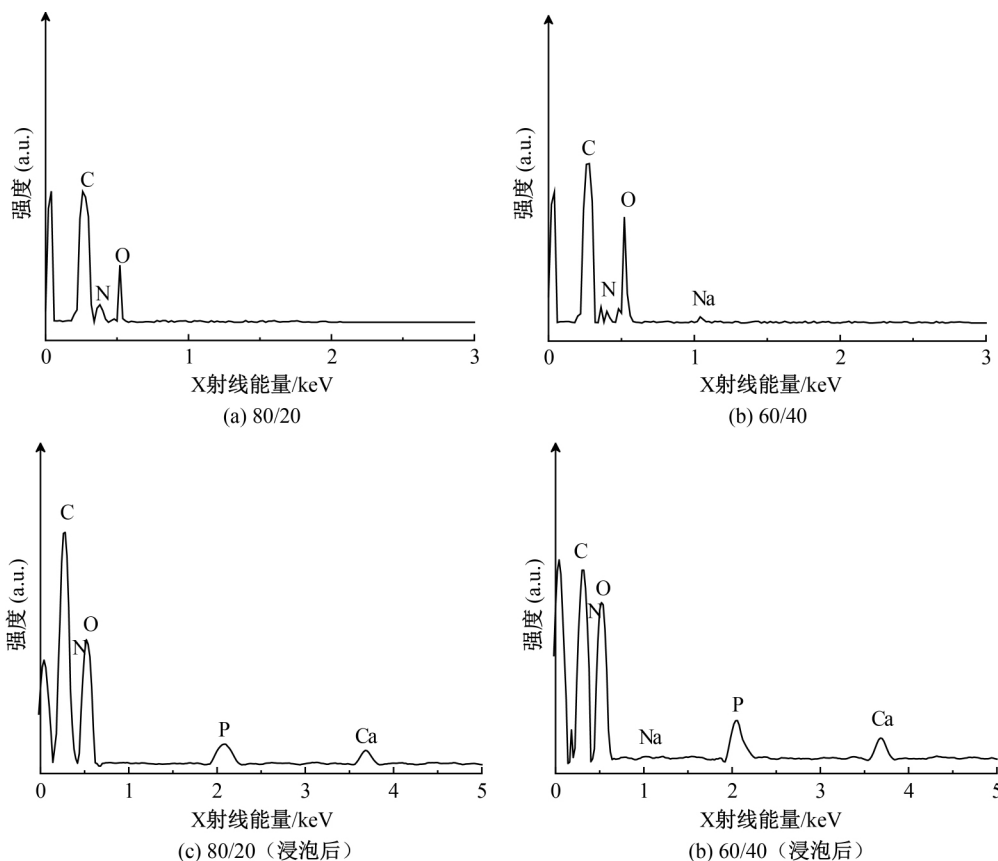


图8 未浸泡和浸泡模拟体液后的不同质量比的丝素/海藻酸钠复合支架 EDS 图

3 结 论

本文通过制备负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架,探究不同比例的丝素/海藻酸钠对盐酸万古霉素的缓释性能,并对复合支架的生物活性进行研究,得到如下结论:

a)采用超声诱导法制备负载盐酸万古霉素的丝素/海藻酸钠复合支架,通过 FESEM、FTIR、EDS 等测试显示,样品呈现三维孔状结构、孔隙率在

98.00%以上。丝素/海藻酸钠载药复合支架的质量比为 80/20 时载药率为 $6.2\% \pm 2.3\%$,丝素/海藻酸钠载药复合支架质量比为 60/40 时载药率为 $7.6\% \pm 1.5\%$ 。

b)不同质量比的载药丝素/海藻酸钠复合支架缓释曲线的趋势大致相同,丝素/海藻酸钠的质量比为 60/40 的载药复合支架累积释放速率和累积释放量大于质量比为 80/20 的载药复合支架。

c)样品在模拟体液中浸泡后,复合支架表面形

成了明显的簇状晶体沉积。通过 FESEM、FTIR、EDS 表征均证明了羟基磷灰石的特征结构,表明样品有较好的生物活性。

参考文献:

- [1] Xin X, Wu J, Zheng A, et al. Delivery vehicle of muscle-derived irisin based on silk/calcium silicate/sodium alginate composite scaffold for bone regeneration [J]. International journal of nanomedicine, 2019, 14: 1451-1467.
- [2] 占华松, 陈跃平, 章晓云. 骨组织工程技术治疗感染性骨缺损: 优势与问题 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23 (30): 4848-4854.
- [3] Kumar A, Nune K C, Misra R D K. Biological functionality of extracellular matrix-ornamented threedimensional printed hydroxyapatite scaffolds [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2016, 104(6): 1343-1351.
- [4] Fereshteh Z, Fathi M, Bagri A, et al. Preparation and characterization of aligned porous PCL/zein scaffolds as drug delivery systems via improved unidirectional freeze-drying method [J]. Materials Science and Engineering: C, 2016, 68: 613-622.
- [5] Song P, Zhou C, Fan H, et al. Novel 3D porous biocomposite scaffolds fabricated by fused deposition modeling and gas foaming combined technology [J]. Composites Part B: Engineering, 2018, 152: 151-159.
- [6] Zhang H, Liu X, Yang M, et al. Silk fibroin/sodium alginate composite nano-fibrous scaffold prepared through thermally induced phase-separation (TIPS) method for biomedical applications [J]. Materials Science and Engineering: C, 2015, 55: 8-13.
- [7] Telemeco T A, Ayres C, Bowlin G L, et al. Regulation of cellular infiltration into tissue engineering scaffolds composed of submicron diameter fibrils produced by electrospinning [J]. Acta Biomaterialia, 2005, 1 (4): 377-385.
- [8] Lai Y, Li Y, Cao H, et al. Osteogenic magnesium incorporated into PLGA/TCP porous scaffold by 3D printing for repairing challenging bone defect [J]. Biomaterials, 2019, 197: 207-219.
- [9] Koh L D, Cheng Y, Teng C P, et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials [J]. Progress in Polymer Science, 2015, 46: 86-110.
- [10] Das S, Pati F, Choi Y J, et al. Bioprintable, cell-laden silk fibroin-gelatin hydrogel supporting multilineage differentiation of stem cells for fabrication of three-dimensional tissue constructs [J]. Acta biomaterialia, 2015, 11: 233-246.
- [11] Han Y, Yu S, Liu L, et al. Silk fibroin-based hydrogels as a protective matrix for stabilization of enzymes against pH denaturation [J]. Molecular Catalysis, 2018, 457: 24-32.
- [12] George M, Abraham T E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan-a review [J]. Journal of controlled release, 2006, 114(1): 1-14.
- [13] Wang Z, Yang H, Zhu Z. Study on the blends of silk fibroin and sodium alginate: Hydrogen bond formation, structure and properties [J]. Polymer, 2019, 163: 144-153.
- [14] Ghalei S, Nourmohammadi J, Solouk A, et al. Enhanced cellular response elicited by addition of amniotic fluid to alginate hydrogel-electrospun silk fibroin fibers for potential wound dressing application [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2018, 172: 82-89.
- [15] Hassani Besheli N, Damoogh S, Zafar B, et al. Preparation of a codelivery system based on vancomycin/silk scaffold containing silk nanoparticle loaded VEGF [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2018, 4(8): 2836-2846.
- [16] 许兴兴, 刘艳芹, 李莉, 等. 紫外分光光度法测定全血胆碱酯酶活性测定试纸中溴化乙酰胆碱含量方法的建立 [J]. 职业卫生与应急救援, 2019, 37(4): 360-363.
- [17] Pati F, Adhikari B, Dhara S. Development of chitosan-tripolyphosphate non-woven fibrous scaffolds for tissue engineering application [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012, 23(4): 1085-1096.
- [18] Sun N, Lei R, Xu J, et al. Fabricated porous silk fibroin particles for pH-responsive drug delivery and targeting of tumor cells [J]. Journal of materials science, 2019, 54(4): 3319-3330.
- [19] Liu T, Li Z, Ding X, et al. Facile synthesis of hollow bioactive glass nanospheres with tunable size [J]. Materials Letters, 2017, 190: 99-102.
- [20] Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? [J]. Biomaterials, 2006, 27(15): 2907-2915.
- [21] Wang X, Kluge J A, Leisk G G, et al. Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation [J]. Biomaterials, 2008, 29(8): 1054-1064.
- [22] 赵忠琪, 王晓坤, 彭慧敏, 等. 提高关节软骨脱细胞支架孔隙率及细胞渗透性方法的研究进展 [J]. 中国生物医学工程学报, 2018, 37(1): 112-118.
- [23] Fical A, Albu M G, Birsan M, et al. Collagen hydrolysate based collagen/hydroxyapatite composite materials [J]. Journal of Molecular Structure, 2013, 1037: 154-159.