

文章编号: 1008-9357(2025)02-0157-10

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20241127001

# 基于氯化钙-甲酸溶剂体系的 Silk I 结构丝素蛋白支架材料的制备与性能

翁敏仪<sup>1,2</sup>, 王志伟<sup>1,2</sup>, 宁晚娥<sup>1,2</sup>, 王倩<sup>1,2</sup>, 黄继伟<sup>1,2</sup>

(广西科技大学 1. 生物与化学工程学院; 2. 天虹现代纺织产业学院, 广西柳州 545006)

**摘要:** 首先以氯化钙-甲酸为溶剂溶解脱胶蚕丝, 然后采用自制的加湿处理装置对溶解液进行加湿处理, 接着将其置于稀碱溶液中进行透析得到丝素蛋白水溶液, 最后针对所得丝素蛋白水溶液进行冷冻诱导和冷冻干燥, 制备出了具有 Silk I 结构的丝素蛋白支架材料。采用扫描电子显微镜(SEM)、X射线衍射(XRD)、傅里叶变换红外光谱(FT-IR)、差示扫描量热(DSC)、热重分析(TGA)和力学分析等对所得丝素蛋白支架材料的形貌、结构、热稳定性、孔隙率、力学性能和酶降解性能等进行了表征和测试。结果表明, 所制备的丝素蛋白支架材料具有稳定的 Silk I 结构、可调控的孔隙率、酶降解性和力学性能。

**关键词:** 丝素蛋白; 支架材料; Silk I 结构; 氯化钙-甲酸溶剂体系; 冷冻干燥法

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

## Preparation and Properties of Silk I Structured Fibroin Scaffolds via Calcium Chloride-Formic Acid Solvent System

WENG Minyi<sup>1,2</sup>, WANG Zhiwei<sup>1,2</sup>, NING Wan'e<sup>1,2</sup>, WANG Qian<sup>1,2</sup>, HUANG Jiwei<sup>1,2</sup>

(1. College of Biological and Chemical Engineering; 2. Rainbow Modern Textile Industry College, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou 545006, Guangxi, China)

**Abstract:** The process of creating a silk fibroin scaffold material with a silk I structure begins with dissolving degummed silk in a calcium chloride-formic acid solvent. Following this, a custom-made humidification device is employed to treat the solution. Subsequently, the solution is dialyzed in a dilute alkaline solution to obtain an aqueous silk fibroin solution. This solution is then subjected to freeze induction and freeze-drying, resulting in the formation of the desired silk fibroin scaffold material. The morphology, structure, thermal stability, porosity, mechanical properties, and enzymatic degradation of the resulting scaffold are thoroughly characterized and tested using various analytical techniques, including scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), and mechanical analysis. The results indicate that the prepared silk fibroin scaffold material exhibits a stable silk I structure, with properties such as porosity, enzymatic degradability, and

收稿日期: 2024-11-27

基金项目: 国家自然科学基金(51763001); 广西自然科学基金(2024 GXNSFAA010390); 广西研究生教育创新计划项目(YCSW2023476)

作者简介: 翁敏仪(1999—), 女, 硕士生, 研究方向为蚕丝工程及丝蛋白基新材料。E-mail: 2975269385@qq.com

通信联系人: 黄继伟, E-mail: huangjiwei@gxust.edu.cn

引用格式: 翁敏仪, 王志伟, 宁晚娥, 王倩, 黄继伟. 基于氯化钙-甲酸溶剂体系的 Silk I 结构丝素蛋白支架材料的制备与性能 [J]. 功能高分子学报, 2025, 38(2): 157-166.

**Citation:** WENG Minyi, WANG Zhiwei, NING Wan'e, WANG Qian, HUANG Jiwei. Preparation and Properties of Silk I Structured Fibroin Scaffolds via Calcium Chloride-Formic Acid Solvent System [J]. Journal of Functional Polymers, 2025, 38(2): 157-166.

mechanical strength that can be adjusted.

**Key words:** silk fibroin; scaffold material; silk I structure; calcium chloride-formic acid solvent system; freeze-drying method

丝素蛋白是一种来源于蚕丝的天然高分子,具有独特的氨基酸组成和多层级结构,并以其无毒性、良好的生物相容性、可控的生物降解性与低致炎性等特性,在生物医学工程领域有着广泛运用<sup>[1]</sup>。作为一种应用价值广泛的原材料,丝素蛋白的结构特征及其转变机制一直是相关应用领域的重要研究内容,并已被广泛报道<sup>[2,3]</sup>。其中,关于丝素蛋白结构的调控和表征,更是赋予材料功能或优化材料性能的常用手段<sup>[4,5]</sup>。

通过脱胶处理从天然蚕丝中获得的丝素蛋白属于半结晶物,结晶度约为 56%,其结晶区主要由  $\beta$ -折叠构象(约 38%)和扭曲  $\beta$ -转角构象(约 18%)组成;而非结晶区则属于酪氨酸(Tyr)富集区,由扭曲  $\beta$ -转角构象(约 22%)和扭曲折叠构象(约 22%)组成<sup>[6]</sup>。丝素蛋白存在 Silk I 和 Silk II 两种不同的结晶形式<sup>[7]</sup>。通常认为, Silk II 结构是家蚕吐丝后形成的天然蚕丝的主要结构,其基本特征是反平行  $\beta$ -折叠构象,由  $\beta$ -折叠片分子间的氢键相互作用形成稳定态。Silk I 结构则被认为是一种亚稳态结构,最早发现于风干的家蚕丝腺内容物,并被认为是以  $\alpha$ -螺旋构象为主导的结构,但随着研究的深入,更倾向认为 Silk I 的分子构象为“重复的  $\beta$ -转角 II 型结构”,分子链呈曲轴形状,与无规卷曲和  $\alpha$ -螺旋构象有明显的不同<sup>[8-10]</sup>。作为生物医学材料, Silk II 结构的丝素蛋白材料的吸湿性和柔韧性较差,不利于生物降解和吸收,而 Silk I 结构丝素蛋白材料可以有效改善 Silk II 结构丝素蛋白材料的不足,为制备不溶但可快速酶解的丝素蛋白材料提供了可能性,这种具有快速生物降解性的 Silk I 结构的丝素蛋白材料有望用作组织工程支架、组织诱导材料、细胞培养材料和可控药物载体等<sup>[11]</sup>。

支架材料是一种具有相互连通的三维网络结构,可支持接种细胞的增殖、分化以及黏附生长的组织工程材料<sup>[12]</sup>。理想的支架材料除了具有相互连通的三维网络结构,还应当具备优异的生物相容性、可调控的生物降解速率、适当的可塑性和可调控的力学性能<sup>[13,14]</sup>。丝素蛋白满足了制备组织工程支架材料要求,已被广泛应用于皮肤、血管、韧带、软骨、骨骼和神经等多种组织再生及临床研究领域<sup>[15]</sup>。为了满足不同组织细胞的增殖、分化以及黏附生长要求,具有不同结构特征的丝素蛋白组织工程支架材料已被广泛研究<sup>[16-19]</sup>。其中,武汉纺织大学 Li 等<sup>[16,17]</sup>和范群梅<sup>[18]</sup>采用低温退火处理诱导形成 Silk I 结构的支架材料;苏州大学 Zhang 等<sup>[19]</sup>采用缓慢浓缩过程诱导形成 Silk I 结构的支架材料;苏州大学张萌<sup>[6]</sup>采用单向纳米孔脱水诱导形成 Silk I 结构的支架材料。这些支架材料的制备过程以 LiBr 溶液或  $\text{CaCl}_2\text{-EtOH-H}_2\text{O}$  溶液为溶剂体系溶解脱胶蚕丝,然后,再经透析和冷冻干燥后制备支架材料。

$\text{CaCl}_2$ -甲酸溶液是一种优良的脱胶蚕丝溶剂,具有溶解速率快、含盐量低等特点<sup>[20-22]</sup>,但由于甲酸对丝素蛋白具有高度的促结晶作用<sup>[23]</sup>,以其为溶剂所制备的丝素蛋白材料往往具有高度 Silk II 结构。目前,有关以  $\text{CaCl}_2$ -甲酸溶液为溶剂制备 Silk I 结构丝素蛋白支架材料的研究尚鲜见报道。本文设计了一套溶解和材料处理程序,首先以  $\text{CaCl}_2$ -甲酸溶液为溶剂溶解脱胶蚕丝获得  $\text{CaCl}_2$ -甲酸-丝素蛋白溶解液,然后采用自制的加湿处理装置,对  $\text{CaCl}_2$ -甲酸-丝素蛋白溶解液进行加湿处理,在此过程中,稀释  $\text{CaCl}_2$ -甲酸-丝素蛋白溶解液中甲酸的浓度,再通过稀碱透析制得丝素蛋白水溶液,最后通过简单的冷冻诱导和冷冻干燥制备出了具有 Silk I 结构的丝素蛋白支架材料。结果表明,通过调控丝素蛋白溶液的浓度,可实现对所制备的 Silk I 结构丝素蛋白支架材料孔隙率、力学性能和酶降解速率的调控,满足组织工程支架材料的使用要求。

## 1 实验部分

### 1.1 原料

桑蚕生丝:柳州市昌海茧丝有限责任公司;无水碳酸钠:西陇科学股份有限公司;无水氯化钙、甲酸、氢氧化钠、无水乙醇、蛋白酶 XIV:上海麦克林生化科技股份有限公司;10×PBS 缓冲液:北京索莱宝科技有限公司。上述化学试剂均为分析纯。

### 1.2 实验仪器

电子天平(奥豪斯 AR224 CN 型);电热鼓风干燥箱(余姚市正泰 XMA-600 型);磁力搅拌水浴锅(金坛市

城西富威 FJS-6 型);电子万能试验机(东莞宝大 PT-1198 型);磁力搅拌器(广东睿声 RS-201 型);冷冻干燥机(上海田枫 TF-FD-1 型);场发射扫描电镜(德国蔡司 Sigma 300 型);Jupiter 同步热分析仪(德国耐驰 STA 449 F5 型);傅里叶变换红外光谱仪(莱飒光学 FOLI10-R 型);全自动 X-射线衍射仪(荷兰 PANalytical 公司 X'Pert Pro 型)。

### 1.3 丝素蛋白支架材料的制备

取适量桑蚕生丝放入  $w=0.5\%$  的碳酸钠溶液(桑蚕生丝的  $\rho$  为  $0.005\text{ g/L}$ )中,煮沸 30 min,煮完用清水清洗,此过程重复 3 次,再把脱胶后的蚕丝晾干备用。

取定量脱胶蚕丝放在氯化钙-甲酸( $w(\text{CaCl}_2)=3\%$ )溶剂中,用磁力搅拌器搅拌至蚕丝完全溶解,得到丝素蛋白- $\text{CaCl}_2$ -甲酸混合溶解液,其中,丝素蛋白的质量分数( $w(\text{SF})$ )为  $10\%$ 。

将完全溶解的丝素蛋白- $\text{CaCl}_2$ -甲酸混合液置于敞口容器中,并将其放置于自制的加湿处理装置进行加湿处理 6 h。将经过湿气处理的混合液装进透析袋中,再将其放入 NaOH 溶液中透析,调节至合适的 pH,然后将水溶液置于去离子水中透析 1 d 后离心,取上清液,获得丝素蛋白水溶液。将装有丝素蛋白水溶液的透析袋放入聚乙二醇溶液中浓缩,将浓缩后的水溶液稀释至  $w(\text{SF})$  分别为  $3\%$ 、 $5\%$ 、 $7\%$  和  $10\%$ ,再将其倒入 24 孔板中,在  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰柜中冷冻,之后转移到  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  冷冻干燥机中,得到丝素蛋白支架材料。将冷冻干燥后得到的样品分别浸泡在乙醇溶液(体积分数为  $75\%$ )中 2 h,待乙醇挥发完全后再进行冷冻干燥。

### 1.4 测试与表征

1.4.1 扫描电镜(SEM) 用刀片从丝素蛋白支架材料圆柱的中部截取厚度约 3 mm 的扁平层,用导电胶将其黏贴于样品台,并进行喷金处理,喷金时间为 60 s,之后用发射扫描电镜进行观察,测试电压为 10 kV。

1.4.2 傅里叶变换红外光谱(FT-IR) 使用傅里叶变换红外光谱仪对丝素蛋白支架进行 FT-IR 测试,测试范围  $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ ,分辨率  $4\text{ cm}^{-1}$ 。

1.4.3 X 射线衍射(XRD) 把丝素蛋白支架材料样品剪成粉末状,在 40 kV、40 mA 下,用 X 射线衍射仪进行测试,X 射线光源为  $\text{Cu-K}\alpha$  射线,扫描速率为  $10(^\circ)/\text{min}$ ,扫描范围为  $5^\circ\sim 50^\circ$ 。

1.4.4 热学性能 将丝素蛋白支架材料剪成粉末状,使用同步热分析仪对所得粉末进行热力学性能测试(差示扫描量热(DSC)、热重分析(TGA)、微商热重法(DTG)),升温速率为  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ ,温度从室温到  $800\text{ }^\circ\text{C}$ ,测试环境为氮气,流速为  $20\text{ mL}/\text{min}$ 。

1.4.5 孔隙率 用液体置换法<sup>[24]</sup>对所制备的丝素蛋白支架材料的孔隙率进行测量。将冷冻干燥后的支架放入无水乙醇溶液(体积为  $V_0$ )中,当样品被溶液完全浸没时测得总体积为  $V_1$ 。然后取出样品记录此时剩余的无水乙醇溶液体积为  $V_2$ 。根据公式(1)计算孔隙率( $R_E$ )。每组样品测量 3 次并取平均值。

$$R_E = \frac{V_0 - V_2}{V_1 - V_2} \times 100\% \quad (1)$$

1.4.6 力学性能 利用电子万能试验机对试样进行了干湿状态下的压缩试验。在进行力学性能测试前,先用游标卡尺对丝素蛋白支架材料的尺寸进行测量,该圆柱体材料的直径约 15 mm,高为 7~12 mm;然后,将待测的丝素蛋白支架材料置于去离子水中浸泡 10 min;最后置于电子万能试验机上进行湿态压缩测试,其中,水平头下压速率设定为  $3\text{ mm}/\text{min}$ ,当压缩变形达到丝素蛋白支架材料高度的  $60\%$  时停止下压。

1.4.7 水溶性 首先将待测样品冷冻干燥后取出称重记为  $m_0$ ;然后将支架与去离子水以质量比 1:99 浸入 50 mL 试管中;接着将该试管放在  $37\text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴振荡箱中,1 h 后取出;最后在烘箱中干燥并称重,记为  $m_1$ 。每次测量 3 个样品取平均值。根据公式(2)计算水溶失重率( $R_W$ )。

$$R_W = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

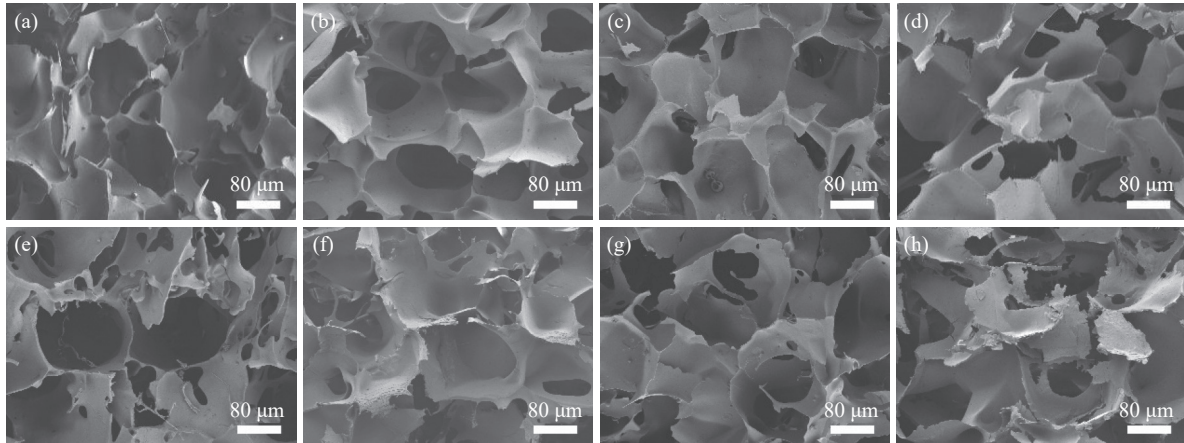
1.4.8 体外降解性 首先称量一定量的丝素蛋白支架材料样品,记为  $m_2$ ;然后将样品放入  $0.01\text{ mol/L}$  PBS 溶液(含  $1.0\text{ U/mL}$  蛋白酶 XIV),样品与 PBS 溶液的质量比为 1:99;接着将装有样品的离心管密封后置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  的恒温水浴振荡箱中,降解期间每 3 天更换一次降解液,降解液现配现用;最后在预定的时间点将剩余样品取出,去离子水浸润洗涤去除降解液中残留物,干燥后称重  $m_3$ ,根据公式(3)计算酶降解率( $R_M$ )。

$$R_M = \frac{m_2 - m_3}{m_2} \times 100\% \quad (3)$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 微观形貌与孔隙率分析

图1所示为丝素蛋白支架材料及其经乙醇浸泡处理2h后所制备支架材料的微观形貌。由图1可见,不同 $w(\text{SF})$ 所制备的支架材料均具有高度的多孔网络结构,孔隙之间相互连通,可满足作为组织工程支架材料使用的要求,乙醇处理对所制备丝素蛋白支架材料微观形貌的影响并不明显。



$w(\text{SF})/\%$ : a, e—3; b, f—5; c, g—7; d, h—10

图1 经乙醇处理(a~d)前(e~h)后所得丝素蛋白支架材料的形貌

Fig. 1 Morphology of silk fibroin scaffold materials (a~d) before and (e~h) after treated with ethanol

丝素蛋白支架材料的孔隙率如图2所示。由图2可知,当 $w(\text{SF})=3\%$ 时,丝素蛋白支架材料的孔隙率为 $(92.11 \pm 1.47)\%$ ;随着 $w(\text{SF})$ 的增加,丝素蛋白支架材料的孔隙率逐渐下降;当 $w(\text{SF})$ 增加至10%时,丝素蛋白支架材料的孔隙率降低至 $(74.40 \pm 1.46)\%$ 。这说明 $w(\text{SF})$ 对所制备支架材料的空隙结构具有重要的影响,考虑到不同种类细胞对支架材料孔隙率的要求不同,通过调控 $w(\text{SF})$ 可实现较宽范围的孔隙率,有利于适用不同种类细胞的培养和组织再生<sup>[25,26]</sup>。进一步地,在相同 $w(\text{SF})$ 条件下,对比乙醇处理前后,丝素蛋白支架材料的孔隙率可知,经乙醇处理后丝素蛋白支架材料的孔隙率略有下降,这可能与乙醇浸泡后丝素蛋白分子构象发生转变,材料发生收缩而变得紧实有关<sup>[16]</sup>。

### 2.2 结构分析

2.2.1 XRD分析 图3所示为所制备支架材料的XRD图谱。不同 $w(\text{SF})$ 所制备支架材料的XRD图谱基本一致,均在 $12.0^\circ$ 、 $19.8^\circ$ 、 $24.3^\circ$ 、 $27.9^\circ$ 和 $36.4^\circ$ 附近出现衍射峰(图3(a)),说明 $w(\text{SF})$ 的变化对所制备支架材料的结构不存在明显影响。同时, $12.0^\circ$ 和 $19.8^\circ$ 处的衍射峰较强,此两处的峰是Silk I结构的标志特征,而 $24.3^\circ$ 、 $27.9^\circ$ 和 $36.4^\circ$ 处的衍射峰较弱,这些衍射峰亦属于Silk I结构,上述特征峰表明所制备的丝素蛋白支架材料具有Silk I结构<sup>[16,17]</sup>。

经乙醇处理后,所得丝素蛋白支架材料的XRD图谱中,部分峰位发生了微弱的偏移( $24.3^\circ$ 峰偏移至 $24.5^\circ$ ,  $27.9^\circ$ 峰偏移至 $28.0^\circ$ ,  $36.4^\circ$ 峰偏移至 $37.0^\circ$ ),这些微弱的峰位偏移说明所制备的丝素蛋白支架材料经乙

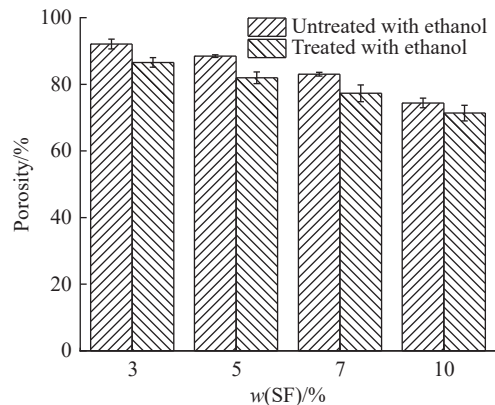


图2 丝素蛋白支架材料的孔隙率

Fig. 2 Porosity of silk fibroin scaffold materials

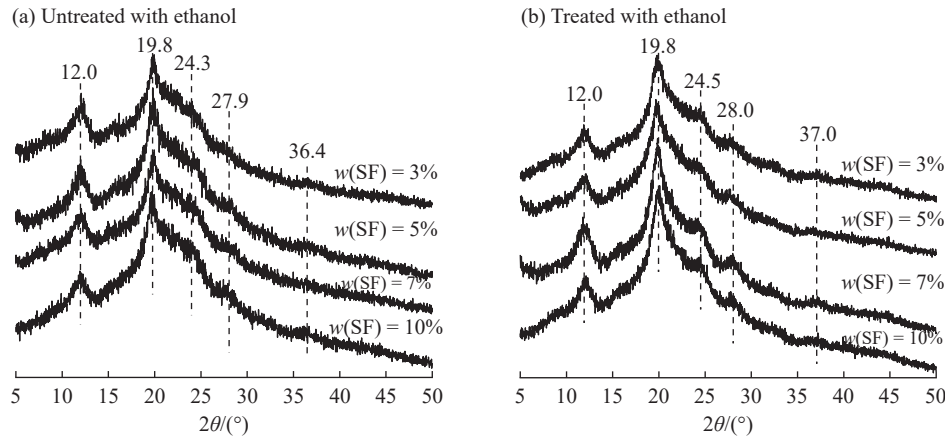


图 3 丝素蛋白支架材料的 XRD 图谱

Fig. 3 XRD spectra of silk fibroin scaffold materials

醇处理后存在结构变化,但考虑到峰强较大的  $12.0^\circ$ 和  $19.8^\circ$ 峰未发生变化,而仅是峰强较弱的峰发生了微弱偏移,可以确定所制备的丝素蛋白支架材料经乙醇处理后仍具有 Silk I 结构。

**2.2.2 FT-IR 分析** 丝素蛋白支架材料的 FT-IR 图谱如图 4(a)所示。 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  对应丝素蛋白的酰胺 I 区,  $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$  对应丝素蛋白的酰胺 II 区,  $1350\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  对应丝素蛋白的酰胺 III 区,这些 FT-IR 区域被广泛应用于丝素蛋白材料的结构分析。由图 4(a)可知,不同  $w(\text{SF})$  所制备支架材料的 FT-IR 图谱基本一致,酰胺 I 区的  $1643\text{ cm}^{-1}$  处存在尖峰,主要源于 C=O 和 C-N 的伸缩振动, N-H 平面中弯曲亦产生一定影响;酰胺 II 区的  $1513\text{ cm}^{-1}$  处存在尖峰,主要是 N-H 平面中弯曲且伴有 C-N 伸缩振动;酰胺 III 区的  $1236\text{ cm}^{-1}$  处存在尖峰,主要由 C-N 伸缩振动与 N-H 平面中弯曲所致<sup>[27]</sup>。

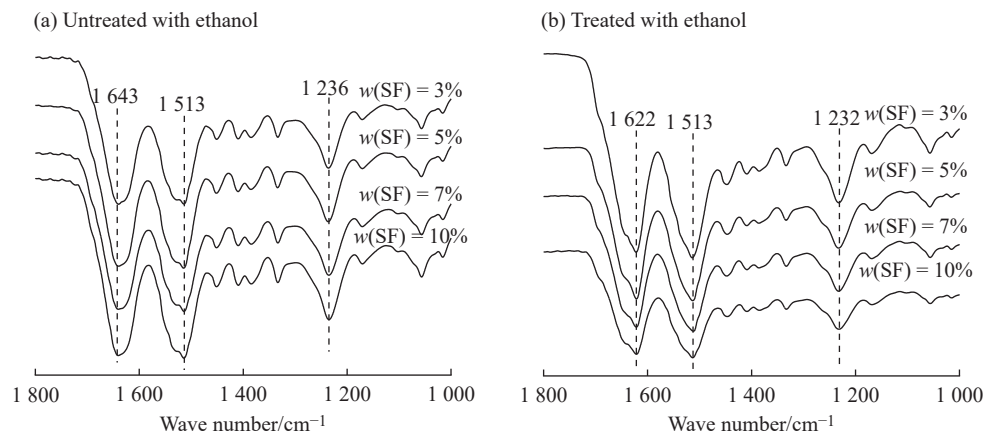


图 4 丝素蛋白支架材料的 FT-IR 图谱

Fig. 4 FT-IR spectra of silk fibroin scaffold materials

经乙醇处理的丝素蛋白支架材料的 FT-IR 图谱如图 4(b)所示。由图 4(b)可知,酰胺 I 区的峰位由  $1643\text{ cm}^{-1}$  处偏至  $1622\text{ cm}^{-1}$  处,酰胺 III 区的峰位由  $1236\text{ cm}^{-1}$  处偏至  $1232\text{ cm}^{-1}$  处,这说明经乙醇处理后,所制备丝素蛋白支架材料的二级结构发生了变化。

为了进一步明确乙醇处理对所制备丝素蛋白支架材料二级结构的影响,基于 Hu 等<sup>[28]</sup>所总结的方法,对丝素蛋白多孔支架材料 FT-IR 图谱的酰胺 I 区进行分峰拟合处理,二级结构含量分析见表 1。由表 1 可知,经乙醇处理后的支架材料,其  $\beta$ -折叠含量由约 29% 增加至约 33%,而无规卷曲含量明显下降,由约 32% 降至约 25%, $\alpha$ -螺旋含量和  $\beta$ -转角含量未发生明显变化,分别约为 11% 和 16%。这些二级结构含量变化说明乙醇处理可使丝素蛋白的二级结构发生转变,尤其是由无规卷曲含量向  $\beta$ -折叠构象转变。对此,已有大量研究结果表明,乙醇可使丝素蛋白材料中  $\beta$ -折叠含量增加<sup>[29-31]</sup>,而就 Silk I 结构丝素蛋白材料而言,醇类分子(如甲醇或乙醇)可以促进丝素蛋白由无规卷曲构象向  $\beta$ -折叠构象的转变,但不会引起 Silk I 的变化, Silk I

表 1 丝素蛋白支架材料的二级结构含量分析

Table 1 Secondary structure content of silk fibroin scaffold materials

w(SF)/%	Post-processing	Content/%			
		$\beta$ -Sheet	Random coil	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Turn
3	Untreated with ethanol	29.06	32.57	11.41	16.71
5		29.18	32.15	11.38	16.61
7		29.36	31.69	11.13	17.19
10		29.19	32.27	11.24	15.79
3	Treated with ethanol	32.24	25.01	10.26	17.55
5		34.14	25.49	10.07	16.06
7		33.53	25.82	10.05	16.95
10		32.44	25.41	9.66	17.68

结构在甲醇和乙醇溶液中能稳定存在<sup>[11]</sup>。

### 2.3 热学性能分析

丝素蛋白支架材料的热分析曲线(图 5)呈现出相似的变化趋势。其中,对于未经乙醇处理的丝素蛋白支架材料,材料中的水分散失至 126 °C 基本完成,262 °C 开始材料表现出热分解(图 5(a));而对于经乙醇处理的丝素蛋白支架材料,材料中的水分散失至 116 °C 基本完成,269 °C 开始材料表现出热分解(图 5(b))。丝素蛋白支架材料的最速热分解出现在 294 °C 附近,经乙醇处理后的最速热分解温度存在 1 °C 的差异(图 5(c, d))。丝素蛋白支架材料在 286 °C 附近出现吸热峰(图 5(e)),而经乙醇处理后吸热峰出现在 290 °C(图 5(f))。丝素蛋白材料的热分解与其结构有关,结晶区分子排列紧密且作用力强,热稳定性优于非结晶区,而乙醇处理

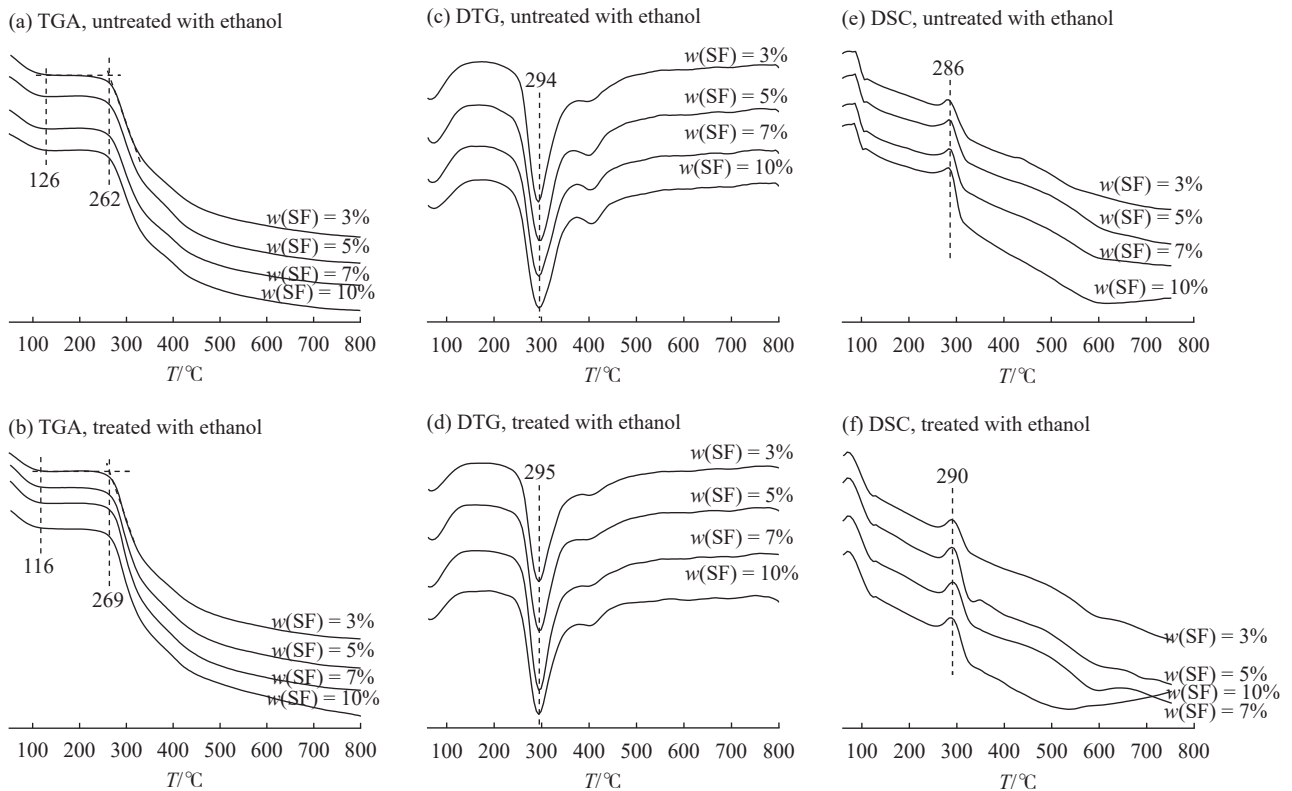


图 5 丝素蛋白支架材料的热分析

Fig. 5 Thermal analysis of silk fibroin scaffold materials

可使丝素蛋白材料中  $\beta$ -折叠含量增加, 进而使得丝素蛋白支架材料的热分解温度提高<sup>[32]</sup>。

#### 2.4 力学性能分析

丝素蛋白支架材料及其经乙醇浸泡处理 2 h 后的干态和湿态压缩应力-应变曲线如图 6 所示。由图 6 可知, 丝素蛋白支架材料的压缩应力-应变曲线主要由 3 个区域组成: 其中, 第 1 个区域为弹性区, 反映支架材料的弹性, 压缩模量可根据该区域中曲线的斜率计算而得; 第 2 个区域为屈服区, 曲线斜率变得平缓; 第 3 个区域为硬化区, 曲线斜率急剧上升<sup>[25]</sup>。相对于干态压缩应力-应变曲线, 丝素蛋白支架材料的湿态压缩应力-应变曲线的弹性区与屈服区之间的转变点不清晰, 说明其压缩模量急剧下降。

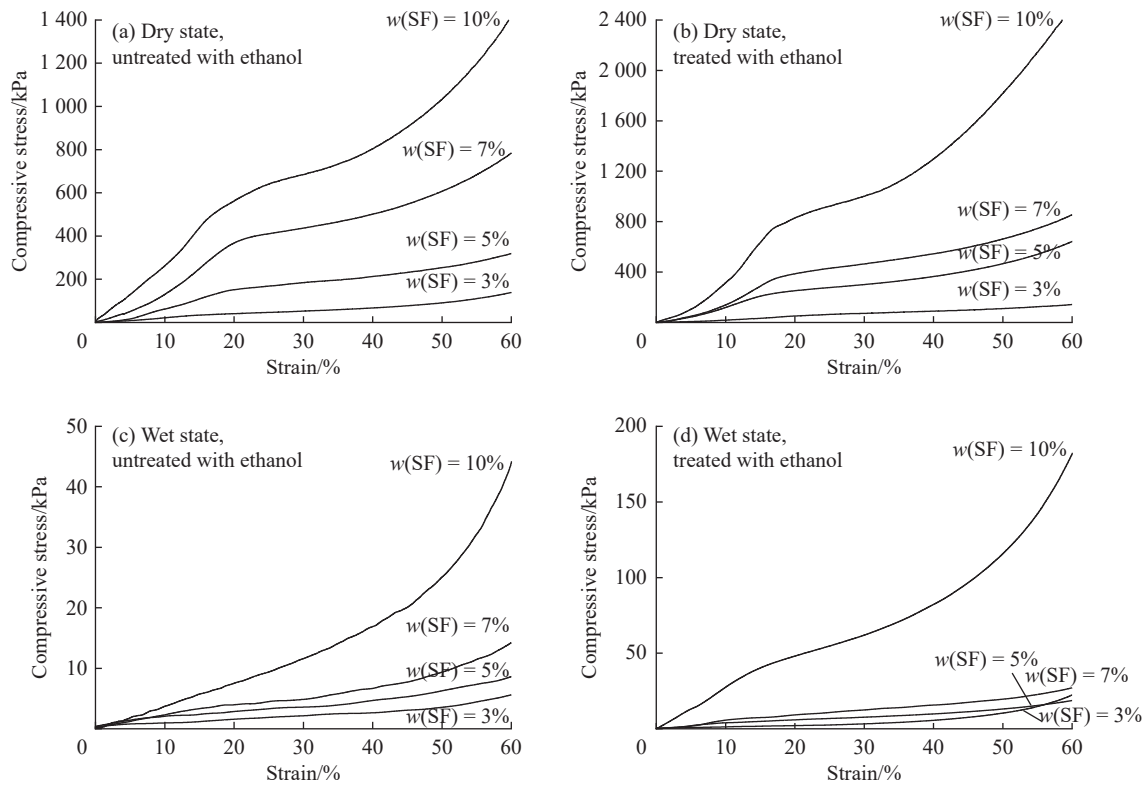


图 6 丝素蛋白支架材料的压缩应力-应变曲线

Fig. 6 Compression stress-strain curves of silk fibroin scaffold materials

为了进一步量化分析, 对所制备支架材料及其经乙醇浸泡处理 2 h 后的干态和湿态压缩模量进行统计分析, 结果如图 7 所示。由图 7 可知, 随着  $w(\text{SF})$  的增大, 丝素蛋白支架材料的压缩模量均逐渐增大。在干态下, 丝素蛋白支架材料的压缩模量从  $(245.91 \pm 17.83)$  kPa 增大到  $(2963.16 \pm 519.81)$  kPa; 在湿态下, 丝素蛋白支架材料的压缩模量从  $(5.84 \pm 0.28)$  kPa 增大到  $(35.36 \pm 2.8)$  kPa。在相同  $w(\text{SF})$  条件下, 经乙醇处理的丝素蛋白支架材料的压缩模量略高于未经乙醇处理的支架材料。经乙醇处理支架材料压缩模量的增加可能与其  $\beta$ -折叠含量提高有关, 已有研究表明, 丝素蛋白支架材料中  $\beta$ -折叠含量越高, 其压缩模量越大<sup>[25]</sup>。

#### 2.5 水溶性与酶降解性能分析

不同浓度丝素蛋白溶液所制备支架材料的水溶失重率和酶降解曲线如图 8 所示。实验中观察到所制备支架材料在水中浸泡后均能保持住原有形貌, 具有好的水稳定性。不同  $w(\text{SF})$  所制备支架材料的平均水溶失重率变化不大(图 8(a)), 这说明  $w(\text{SF})$  对丝素蛋白支架材料的水溶性无显著影响。不同  $w(\text{SF})$  所制备的支架材料在蛋白酶 XIV 溶液中降解存在明显的差异,  $w(\text{SF})$  越大, 所制备的支架材料的质量残余率越高, 这说明其降解越少。丝素蛋白支架材料的酶降解与其孔隙率有关, 孔隙率越高, 其比表面积越大, 蛋白酶 XIV 分子所接触的丝素蛋白材料孔壁面积越大, 导致其降解速率提高<sup>[26]</sup>。同时, 在相同  $w(\text{SF})$  下, 经乙醇处理的材料降解速率更缓慢, 这与乙醇处理导致的支架材料  $\beta$ -折叠含量增加有关,  $\beta$ -折叠含量越高, 丝素蛋白支架材料的降解速率越慢, 这是由于蛋白酶 XIV 更易攻击丝素蛋白支架材料的无规则卷曲区域<sup>[33]</sup>。

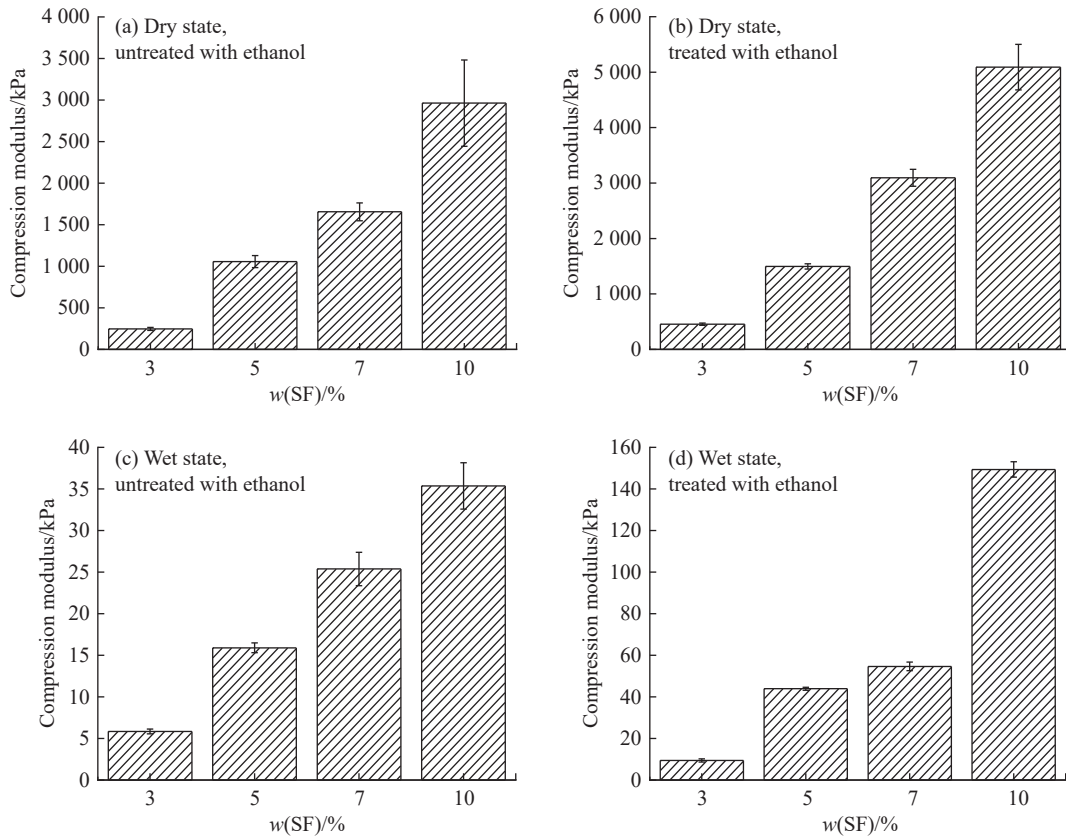


图 7 丝素蛋白支架材料的压缩模量

Fig. 7 Compressive modulus of silk fibroin scaffold materials

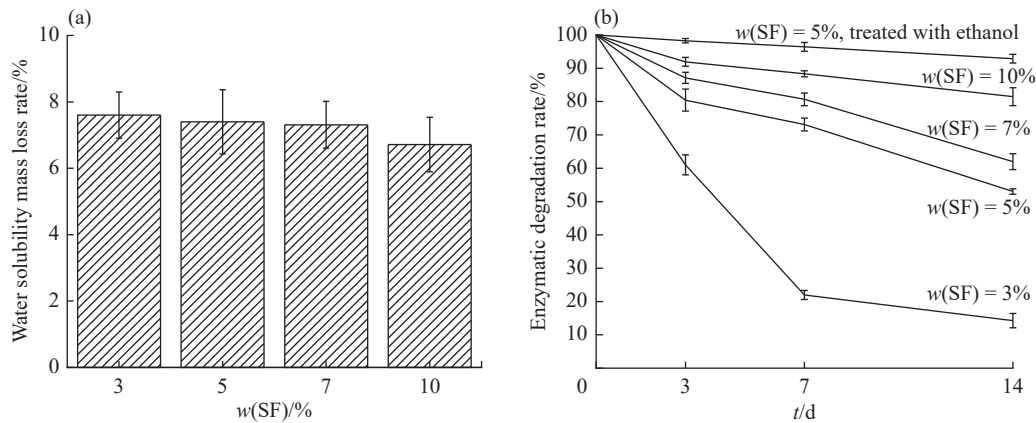


图 8 丝素蛋白多孔支架材料的(a)水溶失重率和(b)酶降解曲线

Fig. 8 (a) Water solubility mass loss rate and (b) enzymatic degradation profile of silk fibroin porous scaffold materials

### 3 结 论

(1) 以氯化钙-甲酸为溶剂, 结合加湿处理、冷冻诱导和冷冻干燥, 可制备出具有 Silk I 结构的丝素蛋白支架材料, 对其进行乙醇处理后, Silk I 结构未发生变化。

(2) 所制备的丝素蛋白支架材料的压缩模量随着制备材料时所采用的丝素蛋白溶液浓度的增大而增加, 而其孔隙率和酶降解速率则随着丝素蛋白溶液浓度的增大而减小。

(3) 当  $w(\text{SF})$  由 3% 增加至 10% 时, 在干态下, 丝素蛋白支架材料的压缩模量由  $(245.91 \pm 17.83)$  kPa 增加至  $(2963.16 \pm 519.81)$  kPa; 在湿态下, 丝素蛋白支架材料的压缩模量为  $(5.84 \pm 0.28)$  kPa 增加至  $(35.36 \pm 2.8)$  kPa; 孔隙率由  $(92.11 \pm 1.47)\%$  减小至  $(74.40 \pm 1.46)\%$ 。

## 参考文献:

- [1] BITAR L, ISELLA B, BERTELLA F, VASCONCELOS C B, HARINGS J, KOPP A, MEER Y V, VAUGHAN J T, BORTESI L. Sustainable *Bombyx mori*'s silk fibroin for biomedical applications as a molecular biotechnology challenge: A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 264: 130374.
- [2] QIU W, PATIL A, HU F, LIU X Y. Hierarchical structure of silk materials versus mechanical performance and mesoscopic engineering principles [J]. *Small*, 2019, 15(51): 1903948.
- [3] LIU R, DENG Q, YANG Z, YANG D, HAN M Y, LIU X Y. "Nano-fishnet" structure making silk fibers tougher [J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(30): 5534-5541.
- [4] CHENG Y, KOH L D, LI D, JI B H, HAN M Y. On the strength of beta-sheet crystallites of *Bombyx mori* silk fibroin [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2014, 11(96): 20140305.
- [5] NGUYEN A T, HUANG Q L, YANG Z, LIN N B, XU G Q, LIU X Y. Crystal networks in silk fibrous materials: From hierarchical structure to ultra performance [J]. *Small*, 2015, 11(9-10): 1039-1054.
- [6] 张萌. 单向纳米孔脱水诱导形成一种以II型 $\beta$ -转角结构为主导的超级拉伸和各向异性丝素膜的特性及其应用 [D]. 江苏苏州: 苏州大学, 2022.
- ZHANG M. Unidirectional nanopore dehydration induces to form a super stretching and anisotropic silk fibroin membrane dominated by type II  $\beta$ -turn structure and its application [D]. Suzhou, Jiangsu: Soochow University, 2022.
- [7] CEBE P, PARTLOW B P, KAPLAN D L, WURM A, ZHURAVLEV E. Silk I and silk II studied by fast scanning calorimetry [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 55: 323-332.
- [8] OKUSHITA K, ASANO A, WILLIAMSON M P, ASAKURA T. Local structure and dynamics of serine in the heterogeneous structure of the crystalline domain of *Bombyx mori* silk fibroin in silk II form studied by  $2D^{13}C-^{13}C$  homonuclear correlation NMR and relaxation time observation [J]. *Macromolecules*, 2014, 47(13): 4308-4316.
- [9] SANGAPPA, OKUYAMA K, SOMASHEKAR R. Strain-tensor components, crystallite shape, and their effects on crystalline structure in silk I [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, 91(5): 3045-3053.
- [10] MONTI P, TADDEI P, FREDDI G, ASAKURA T, TSUKADA M. Raman spectroscopic characterization of *Bombyx mori* silk fibroin: Raman spectrum of silk I [J]. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2001, 32(2): 103-107.
- [11] ZHAO M, QI Z, TAO X, NEWKIRK C, HU X, LU S Z. Chemical, thermal, time, and enzymatic stability of silk materials with silk I structure [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4136.
- [12] NAZAROV R, JIN H J, KAPLAN D L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2004, 5(3): 718-726.
- [13] ASADPOUR S, KARGOZAR S, MORADI L, AI A, NOSRATI H, AI J. Natural biomacromolecule based composite scaffolds from silk fibroin, gelatin and chitosan toward tissue engineering applications [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1285-1294.
- [14] GAHARWAR A K, SINGH I, KHADEMOSSEINI A. Engineered biomaterials for *in situ* tissue regeneration [J]. *Nature Reviews Materials*, 2020, 5(9): 686-705.
- [15] ZULUAGA-VÉLEZ A, QUINTERO-MARTINEZ A, OROZCO L M, SEPÚLVEDA-ARIAS J C. Silk fibroin nanocomposites as tissue engineering scaffolds: A systematic review [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 141: 111924.
- [16] LI X, LI N, FAN Q, YAN K, ZHANG Q, WANG D, YOU R C. Silk fibroin scaffolds with stable silk I crystal and tunable properties [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 248: 125910.
- [17] LI X, FAN Q, ZHANG Q, YAN S Q, YOU R C. Freezing-induced silk I crystallization of silk fibroin [J]. *CrystEngComm*, 2020, 22(22): 3884-3890.
- [18] 范群梅. Silk I型丝素蛋白多孔海绵的制备及其作为组织修复支架的研究 [D]. 武汉: 武汉纺织大学, 2022.
- FAN Q M. Preparation of silk I porous sponge and its application as tissue repair scaffold [D]. Wuhan: Wuhan Textile University, 2022.
- [19] ZHANG Z S, DING Z Z, HUANG J W, QIN J Z, SHEN Y X, ZHANG F, ZUO B Q. Green process to prepare water-insoluble silk scaffolds with silk I structure [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 144-151.
- [20] ZHANG F, LU Q, YUE X, ZOU B Q, QIN M D, LI F, KAPLAN D L, ZHANG X G. Regeneration of high-quality silk fibroin fiber by wet spinning from  $CaCl_2$ -formic acid solvent [J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 12: 139-145.
- [21] ZHANG F, YOU X, DOU H, LI J, ZOU B Q, ZHANG X F. Facile fabrication of robust silk nanofibril films via direct dissolution of silk in  $CaCl_2$ -formic acid solution [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(5): 3352-3361.

- [22] ZHANG F, ZUO B, FAN Z, XUE Z G, LU Q, ZHANG X F, KAPLAN D L. Mechanisms and control of silk-based electrospinning [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(3): 798-804.
- [23] 梁苏平, 何秀萍, 牛翔宇, 宁晚娥, 王倩, 黄继伟. 甲酸对丝素蛋白结晶结构转变的影响 [J]. *丝绸*, 2024, 61(3): 44-54.  
LIANG S P, HE X P, NIU X Y, NING W E, WANG Q, HUANG J W. Effect of formic acid on the crystalline structure transformation of silk protein [J]. *Journal of Silk*, 2024, 61(3): 44-54.
- [24] XIAO L, LIU S, YAO D, DING Z Z, FAN Z Y, LU Q, KAPLAN D L. Fabrication of silk scaffolds with nano-microscaled structures and tunable stiffness [J]. *Biomacromolecules*, 2017, 18(7): 2073-2079.
- [25] BAYATTORK M, RAJKHOWA R, ALLARDYCE B J, WANG X G, LI J Q. Tuning the microstructure and mechanical properties of lyophilized silk scaffolds by pre-freezing treatment of silk hydrogel and silk solution [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, 631: 46-55.
- [26] LUO Z W, ZHANG Q, SHI M J, ZHANG Y, TAO W, LI M Z. Effect of pore size on the biodegradation rate of silk fibroin scaffolds [J]. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, 2015(1): 315397.
- [27] 黄继伟. 蚕丝在甲酸溶剂体系中的溶胀收缩与溶解机制研究 [D]. 江苏苏州: 苏州大学, 2022.  
HUANG J W. The swelling contraction and dissolution mechanism of silk fiber in formic acid solvent system [D]. Suzhou, Jiangsu: Soochow University, 2022.
- [28] HU X, KAPLAN D, CEBE P. Determining  $\beta$ -sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy [J]. *Macromolecules*, 2006, 39(18): 6161-6170.
- [29] TERADA D, YOKOYAMA Y, HATTORI S, KOBAYASHI H, TAMADA Y. The outermost surface properties of silk fibroin films reflect ethanol-treatment conditions used in biomaterial preparation [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 58: 119-126.
- [30] WEI W, ZHANG Y, ZHAO Y, SHAO H L, HU X C. Studies on the post-treatment of the dry-spun fibers from regenerated silk fibroin solution: Post-treatment agent and method [J]. *Materials & Design*, 2012, 36: 816-822.
- [31] ZUO B, LIU L, WU Z. Effect on properties of regenerated silk fibroin fiber coagulated with aqueous methanol/ethanol [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2007, 106(1): 53-59.
- [32] 黄继伟, 赵树强, 宁晚娥, 林海涛, 凌新龙, 岳新霞, 蒋芳. 木薯蚕丝纤维的热学性能研究 [J]. *丝绸*, 2018, 55(8): 7-11.  
HUANG J W, ZHAO S Q, NING W E, LIN H T, LING X L, YUE X X, JIANG F. Research on thermal properties of cassava silk fiber [J]. *Journal of Silk*, 2018, 55(8): 7-11.
- [33] HU Y P, ZHANG Q, YOU R C, WANG L S, LI M Z. The relationship between secondary structure and biodegradation behavior of silk fibroin scaffolds [J]. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2012, 2012(1): 185905.

(责任编辑: 王吉晶)