

高模量高强度丝素蛋白 GBR 膜的制备及性能评估

廖小毓¹, 方 辉¹, 杨飞宇¹, 邹多宏^{1,2}

摘要 目的 拟制备一种高模量和高强度的可降解丝素蛋白引导骨再生(GBR)膜,以解决骨缺损修复成骨空间维持问题。**方法** 提纯丝素蛋白后利用蒸发-热压法制备膜材,使用拉伸测试、体外模拟、细胞共培养等方法评估其理化性质与生物性能。**结果** 制得丝素蛋白 GBR 膜,体外模拟 12 h 降解率为 35.3%,湿态弹性模量达 45 MPa,拉伸强度达 8.39 MPa,7 d 细胞生存率近 100%。**结论** 所制得可降解 GBR 膜具有高模量和高强度,以及优异的生物相容性,有望为解决骨缺损修复成骨空间维持问题提供材料基础。

关键词 骨缺损修复;成骨空间维持;引导骨再生膜;丝素蛋白;蒸发-热压法;成骨分化;拉伸强度

中图分类号 R 782

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0590-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.005

引导性骨再生(guided bone regeneration, GBR)技术是口腔科常用的骨量提升技术之一,而 GBR 膜作为其关键材料之一,具有避免骨缺损部分被软组织侵占并引导新骨生长的重要作用^[1]。然而,商用 GBR 膜如 Bio-Gide 膜等,存在机械性能不足、降解速度过快等问题,容易导致严重的并发症,如膜穿孔等^[2]。因此,迫切需要开发一种高模量高强度的 GBR 膜。丝素蛋白是一种天然的蛋白质,主要存在于蚕丝的茧中。它具有良好的生物相容性,可在各种医学应用中使用,并不引起免疫反应。丝素蛋白可在体内逐渐降解并被代谢,为新生组织提供支撑,最终被身体自身的组织所替代^[3]。丝素蛋白因其生物相容性、可降解性、机械性能、生物活性以及可

塑性和可功能化的特点,使其在生物医药和组织工程领域具有重要的应用潜力。该研究以丝素蛋白作为原料,采用自蒸发方法使丝素蛋白溶液转变为膜材,并通过保湿、热压的方法进一步改变其蛋白质的二级结构,通过测试其湿态拉伸强度、蛋白质二级结构以及对细胞增殖黏附的影响等,探究其作为新型 GBR 膜的可行性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 蚕茧(南浔练市久恒蚕丝制品经营部);蛋白酶 K、溴化锂(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);碳酸钠(上海国药集团化学试剂有限公司);小鼠胚胎成骨细胞前体细胞(MC3T3-E1)、小鼠成纤维细胞(L929)购自中国科学院细胞库;MWCO 3500 透析袋(湖南翊博生物科技有限公司)。MEM- α 培养基、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)、杜氏磷酸盐缓冲溶液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS)、胎牛血清、0.25% 胰酶细胞消化液、青-链霉素(美国 Gibco 公司),CCK-8 试剂盒、Calcein-AM/PI 活/死细胞双染试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所)。

1.2 主要仪器 场发射扫描电子显微镜(JSM-IT800,日本电子株式会社),傅里叶变换红外光谱仪(Nicolet iS50 FT-IR,美国 Thermo Fisher 公司),自动压片机(ZDZT-30T,天津市睿恒科技发展有限公司),温控仪(ZTRM-1,天津市睿恒科技发展有限公司),酶标仪(Spark,美国 Biotek 仪器有限公司),倒置荧光显微镜(IX71,日本 Olympus 株式会社),细胞培养箱(IMH60-S,美国 Thermo Scientific 公司),冷冻离心机(MultifugeXPro Series,美国 Thermo Scientific 公司),万能力学试验机(5565A,美国 Instron 公司),冷冻干燥机(SCIENTZ-12N/A,宁波新芝士生物科技有限公司),激光扫描共聚焦显微镜(A1 RHD25,日本尼康株式会社)。

1.3 方法

1.3.1 提取丝素蛋白溶液 将去蛹的桑蚕茧剪成片状,称取 4.24 g 无水碳酸钠,溶于 2 L 去离子水,煮沸后加入 5 g 蚕茧片,保持沸腾 30 min。取出蚕

2024-02-21 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:32171347);上海交通大学医学院生物材料与再生医学研究院联合攻关项目(编号:2022LHA04);上海交通大学医学院附属第九人民医院临床研究助推计划(编号:JYLJ202102)

作者单位:¹ 安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

² 上海交通大学医学院附属第九人民医院,上海交通大学口腔医学院,上海市口腔医学重点实验室,上海 200011

作者简介:廖小毓,女,硕士研究生;

邹多宏,男,教授,研究员,博士生导师,责任作者,E-mail: zdhyy@ahmu.edu.cn

丝,去离子水洗冲洗、浸泡、拧干,重复5遍,直至彻底洗去丝胶和碳酸钠;洗净的蚕丝,放入60℃烘箱过夜烘干,得到脱胶蚕丝。配制浓度为9.3 mol/L的溴化锂溶液,置于60℃油浴中加热。向溶液中加入5 g脱胶蚕丝,低速搅拌反应4 h。完成反应后,将所得溶液装入事先准备好的MWCO 3500透析袋中,去离子水透析48 h,以去除溶液中的溴化锂。透析完毕后,将溶液转移至离心管中,并在4℃、9 000 r/min离心2次,每次离心20 min^[4]。留取上清液作为最终使用的丝素蛋白溶液。

1.3.2 制备丝素蛋白膜 将丝素蛋白溶液均匀地倒入方形培养皿中,然后将培养皿放置在30℃的加热台上蒸发24 h,直至完全干燥,形成薄膜。将膜放置于60℃、100%相对湿度的恒温恒湿箱中高温高湿处理20 min,然后将膜放置于在两块镜面钢之间,使用热压机在15 MPa、170℃的条件下进行热压处理,即可获得丝素蛋白膜。所得的丝素蛋白膜应进行真空干燥保存,以备后续使用。

1.3.3 微观表征 将丝素蛋白膜裁剪成规则大小,于液氮中脆断得到样品。选择断面整齐样品,采用导电胶将其固定于样品台正面及侧面,于低真空度的蒸金室中蒸金60 s,通过扫描电镜在2.5 kV加速电压下观察其表面及截面结构特征。取丝素蛋白膜采用傅里叶变换红外光谱仪分析其二级结构。

1.3.4 力学性能测试 将丝素蛋白膜裁剪成长条形样品并浸泡于DPBS中,待其充分溶胀后使用游标卡尺测量厚度、宽度与长度,样品置于恒温水浴中通过万能力学试验机以100 mm/min的拉伸速度匀速拉伸直至样品断裂,以测量其湿态拉伸性能。

1.3.5 细胞相容性检测 根据ISO/EN10993-12国际标准组织的规定,提取丝素蛋白膜浸提液,并将经过高温高压灭菌处理的样品浸泡在含有10%胎牛血清和1%青-链霉素溶液的培养基中,浸泡时间为24 h。接种MC3T3-E1细胞,每个时间点每组3个复孔,每孔接种 1×10^3 个细胞。接种24 h后更换培养基,对照组使用普通培养基,丝素蛋白组使用浸提液培养,每3 d换液1次。在1、4、7 d分别弃去培养基,PBS清洗,每孔加入CCK-8溶液,37℃孵育1 h后使用酶标仪读取450 nm处吸光度值。

1.3.6 细胞活力实验 通过活/死荧光染色评估细胞活力:使用打孔器将丝素蛋白膜制备成直径6 mm的圆形样品,高压蒸汽灭菌,分别置于3个96孔板中,每个样品上接种 3×10^3 个L929细胞,每个时间点设3个复孔。分别培养4、7 d后按照活死细胞染

色试剂盒使用说明书染色,使用荧光倒置显微镜观察并拍摄样品。

1.3.7 细胞黏附实验 将MC3T3-E1细胞接种于丝素蛋白膜,4 d后取出,PBS溶液洗涤3次,用4%多聚甲醛固定40 min后再次使用PBS洗涤,每次5 min。使用不同浓度的乙醇溶液进行梯度脱水(乙醇溶液的浓度依次为50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%和100%),每个梯度脱水10 min。脱水完后用叔丁醇清洗薄膜3次,置换出乙醇后使用冷冻干燥机将薄膜样品冻干,用于扫描电镜观察。

1.3.8 细胞成骨分化的检测 将消毒后的丝素蛋白膜浸泡于成骨诱导培养基内24 h,获得浸提液。将MC3T3-E1接种于12孔板内,24 h后更换为相应浸提液培养基,每3 d换液1次,7 d后按照碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色剂说明书进行染色以检测ALP活性。

1.3.9 溶胀及降解性能测试 溶胀测试:将丝素蛋白膜裁剪成5 mm×15 mm的条形样品,60℃烘干后称量原始质量,然后将样品完全浸没于DPBS中,分别于0.25、0.5、1、1.5、6、12、24、48、72 h后取出,用滤纸吸去样品表面的液体后称重,定量变化表示为相对于初始干重溶胀后重量的百分比。

降解性能测试:将丝素蛋白膜制成规则的条形样品,烘干后用分析天平测量样品干重,丝素蛋白膜(每组 $n=3$)浸没在含或不含0.1 U/L蛋白酶K的DPBS溶液中,在37℃摇床中温育0.5、1、3、6、12 h,每个时间段更换新鲜降解液,将降解的产物收集后在去离子水中漂洗并真空抽滤,60℃下干燥后称量干重。定量变化表示为相对于初始干重残留的重量的百分比。

1.4 统计学处理 采用GraphPad Prism和SPSS 20.0进行绘图和统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行差异比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丝素蛋白膜的结构表征及成分分析 扫描电镜可见丝素蛋白膜表面平整(图1A),截面可见其结构致密,厚度约为90 μm(图1B)。如图2C所示,未保湿、热压的丝素蛋白膜的红外吸收峰在 $1\ 637\text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 514\text{ cm}^{-1}$ 处,分别表示随机卷曲、α-螺旋中氨基酸残基的C=O键振动和β-折叠结构中氨基酸残基的N-H及C-N键振动。对膜样品进行

高温高湿、热压处理后,新的红外吸收峰出现在 $1\ 699\ \text{cm}^{-1}$ 处,表明膜样品中出现了新的 C = O 键振动。同时,原先位于 $1\ 637\ \text{cm}^{-1}$ 的 C = O 键振动峰移动至 $1\ 618\ \text{cm}^{-1}$ 处,并且峰形更加尖锐。以上结果表明高温高湿和热压处理促进了 β -折叠构象的形成。

2.2 湿态条件下自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜与甲醇交联的丝素蛋白膜拉伸强度的比较 图2显示,在湿态条件下,自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜与甲醇交联的丝素蛋白膜在拉伸弹性模量、拉伸强度方面存在显著差异。首先,自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜的拉伸弹性模量为 $(45 \pm 8.19)\ \text{MPa}$,而甲醇交联的丝素蛋白膜的拉伸弹性模量为 $(3.27 \pm 0.47)\ \text{MPa}$ 。表明自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜具有更高的弹性模量,即在受力后能够更好地恢复到原始形状。自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜的拉伸强度为 $(8.39 \pm 0.63)\ \text{MPa}$,而甲醇交联的丝素蛋白膜的拉伸强度为 $(1.48 \pm 0.151)\ \text{MPa}$ 。表明自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜具有更高的抗拉强度,

能够承受更大的拉伸力。以上结果表明自蒸发-热压处理的丝素蛋白膜具有更高的弹性模量、拉伸强度。

2.3 细胞增殖及细胞活力实验 根据 CCK-8 法检测结果显示,培养 1、4、7 d 后,空白组和丝素蛋白组之间的吸光度无明显差异(图 3A)。通过倒置荧光显微镜观察活死细胞染色,结果如图 3B 所示,活细胞呈现绿色荧光(活),死细胞呈现红色荧光(死)。在共培养 4、7 d 后,空白组和丝素蛋白组表面的活死细胞比例无明显差异。这些结果表明丝素蛋白组对细胞的毒性无明显影响。

2.4 细胞黏附能力 MC3T3-E1 接种在丝素蛋白膜表面 4 d 后,扫描电镜结果表明细胞可以较好的黏附在丝素蛋白膜表面(图 3C),且伸出伪足。使用激光扫描共聚焦显微镜观察丝素蛋白膜表面 MC3T3-E1 细胞,图 3D 为细胞核染色图、细胞骨架染色图以及二者的融合图像,可见大量细胞伸展黏附于丝素蛋白膜表面。以上结果表明 MC3T3-E1 细胞对丝素蛋白膜具有良好的黏附性。

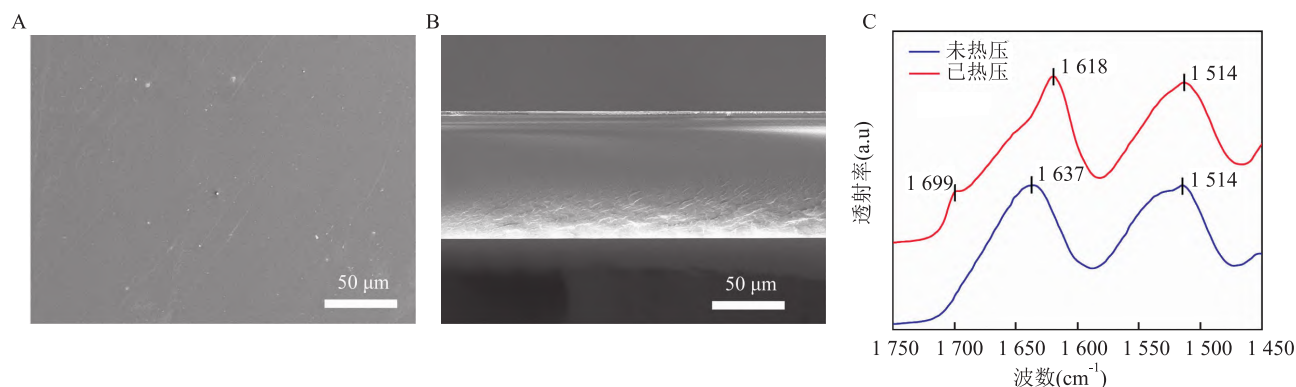


图1 丝素蛋白膜的微观形貌和二级结构成分分析

A:扫描电镜下丝素蛋白膜表面;B:扫描电镜下丝素蛋白膜横截面;C:傅里叶红外光谱分析未热压和已热压处理的丝素蛋白膜的二级结构

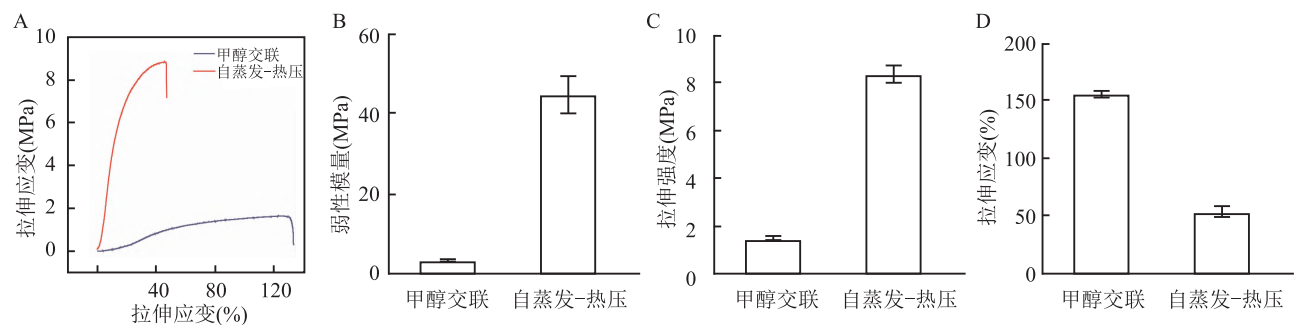


图2 丝素蛋白膜的拉伸机械性能测试

A:甲醇交联及自蒸发-热压的丝素蛋白膜的拉伸应力应变特征曲线;B-D:甲醇交联及自蒸发-热压的丝素蛋白膜的弹性模量、拉伸强度与拉伸应变统计图

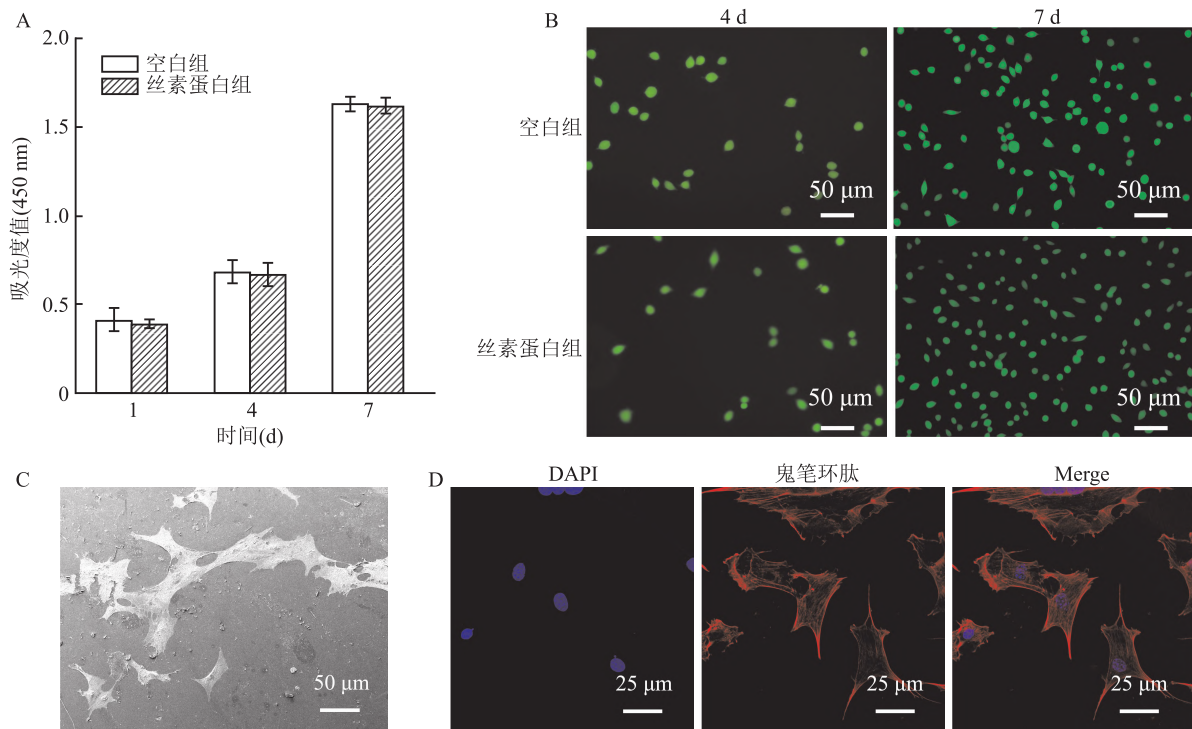


图3 丝素蛋白膜的生物相容性及细胞黏附能力

A: CCK-8 结果; B: 接种细胞 4 d 和 7 d 后活死细胞染色结果 $\times 100$; C: 扫描电镜下接种细胞 4 d 后膜表面细胞黏附结果; D: 激光扫描共聚焦显微镜下接种细胞 4 d 后膜表面细胞黏附结果

2.5 促成骨分化能力 成骨诱导 7 d 后, ALP 染色实验结果如图 4, 与空白组相比, 在丝素蛋白组中 MC3T3-E1 细胞表面显示碱性磷酸酶阳性结果更明显。这表明丝素蛋白的存在确实有一定促成骨作用。

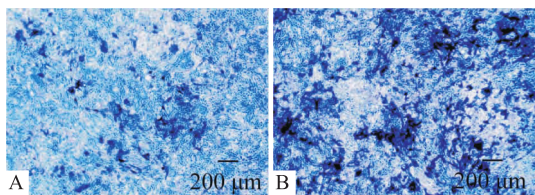


图4 丝素蛋白膜的促成骨分化能力检测

A: 空白组 ALP 染色结果; B: 丝素蛋白组 ALP 染色结果

2.6 溶胀性和可降解性 溶胀测试结果如图 5, 丝素蛋白膜在溶胀初始阶段(1 h 内)溶胀较快, 6 h 左右达到溶胀平衡。降解实验表明, 在 0.1 U/L 蛋白酶 K 的存在条件下, 12 h 时丝素蛋白膜降解率达 35.3% 左右。表明丝素蛋白膜具有一定的溶胀性和可降解性。

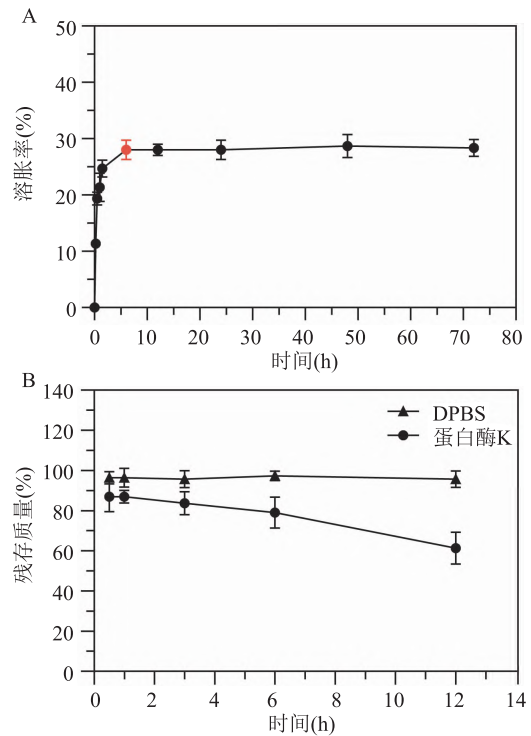


图5 丝素蛋白膜的溶胀及体外降解性能

A: 溶胀实验结果; B: 降解性测试结果

3 讨论

GBR 技术是一种使用屏障膜的外科技术, 广泛

应用于牙周组织再生领域, 它的原理是使用屏障膜来防止软组织长入骨缺损区域, 并帮助形成新生

骨^[5]。GBR 膜通常可分为可吸收性膜和不可吸收性膜,临床上常用的可降解 GBR 膜通常基于聚酯或胶原蛋白。聚酯基膜具有可控的降解速率和足够的机械强度,有利于骨缺损区域成骨空间维持,然而,其降解产物可能引发局部炎症反应,不利于骨组织的形成。而胶原基天然膜虽然具有优异的生物相容性,但降解较快,且力学性能较差,可能会导致膜塌陷,影响成骨效果^[6]。丝素蛋白是一种常见的天然高分子聚合物,因其免疫原性低、生物相容性优异、降解性能可控,广泛应用于生物医用材料领域^[7]。

本实验结合自蒸发技术和热压技术,成功制备了具有优异力学性能的可降解丝素蛋白基 GBR 膜。首先,利用自蒸发技术将丝素蛋白溶液制成平整光滑的膜材,并形成部分结晶。同时引入结合水来维持丝素蛋白的稳定性,水分子与丝素蛋白中的氨基酸残基通过氢键和静电作用相互作用,有利于后续 β -折叠的形成^[8]。这种结合水的引入可以调节丝素蛋白的功能,使其具有一定的弹性和可伸缩性,从而有效提高其力学性能。其次,热压处理可以通过热能的输入和压力的作用,使丝素蛋白中的亮氨酸和甘氨酸残基之间的氢键重新组合,从而促进 β -折叠的形成^[9]。同时,热压处理还可以改变丝素蛋白的分子排列和结晶度^[10]。通过热压处理,丝素蛋白分子可以更加紧密地排列,形成更稳定的结晶态,有利于生成 β -折叠结构。这为制备高模量和高强度的可降解丝素蛋白 GBR 膜提供了理论依据。

既往研究^[11-12]表明,丝素蛋白可以促进骨细胞的增殖和分化。它通过调节细胞外基质的合成和分泌,以及激活细胞内信号通路来促进骨细胞的增殖和分化,从而促进新骨的形成^[13]。体外生物相容性实验结果显示,实验组与空白对照组结果无明显差异,丝素蛋白基 GBR 膜在体外环境中不引起明显的细胞毒性或不良反应,显示出良好的生物相容性。丝素蛋白基 GBR 膜具有表面光滑且致密的结构,这种致密的结构为膜提供了优良的力学性能。力学拉伸实验结果表明,在湿态下,丝素蛋白基 GBR 膜的抗拉强度可达 8.39 MPa,显著高于市售 Bio-Gide 胶原膜的 1.16 MPa^[14]。以上实验结果表明,丝素蛋白基 GBR 膜具有优异的生物安全性,并且本研究所述蒸发-热压法,所得 GBR 膜的机械性能具有显著优势。

综上所述,本研究利用自蒸发技术和热压技术成功构建了丝素蛋白基 GBR 膜,并对其微观结构、湿态下的力学性能、溶胀性能、降解性能、细胞相容

性及细胞黏附能力等进行了探究。相关实验结果显示,所制备的丝素蛋白基 GBR 膜有望作为新型的 GBR 膜在临床中应用。而未来的研究需要进一步的体内实验证据和长期的生物相容性评估,从而深入探究丝素蛋白基 GBR 膜在骨组织工程中的应用潜力,并进行更全面、系统的生物性能评价。

参考文献

- [1] Aprile P, Letourneur D, Simon-Yarza T, et al. Membranes for guided bone regeneration: A road from bench to bedside[J]. *Adv Healthc Mater*, 2020, 9(19):e2000707.
- [2] 赵正宜,肖剑虹,刘重远,等. 聚乙烯醇-细菌纤维素复合可吸收生物屏障膜的制备及理化性能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2022,57(10): 1513-7.
- [3] Kundu B, Rajkhowa R, Kundu S C, et al. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(4): 457-70.
- [4] Guo C, Li C, Vu H V, et al. Thermoplastic moulding of regenerated silk[J]. *Nat Mater*, 2020, 19(1):102-8.
- [5] Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2010, 21(6): 567-76.
- [6] Elgali I, Omar O, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited[J]. *Eur J Oral Sci*, 2017, 125(5): 315-37.
- [7] Gomes S, Numata K, Leonor I B, et al. AFM study of morphology and mechanical properties of a chimeric spider silk and bone sialoprotein protein for bone regeneration[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1675-85.
- [8] Hu X, Shmelev K, Sun L, et al. Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing[J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(5): 1686-96.
- [9] Wang X, Zhang Y, Choukroun J, et al. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma[J]. *Platelets*, 2018, 29(1): 48-55.
- [10] Numata K, Cebe P, Kaplan D L, et al. Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(10): 2926-33.
- [11] Kim U J, Park J, Kim H J, et al. Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(15): 2775-85.
- [12] 陈文泽,邹多宏. 负载褐藻多酚的丝素蛋白 GBR 生物膜制备及其性能的体外实验研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(6): 885-90.
- [13] Jung S R, Song N J, Yang D K, et al. Silk proteins stimulate osteoblast differentiation by suppressing the Notch signaling pathway in mesenchymal stem cells[J]. *Nutr Res*, 2013, 33(2): 162-70.
- [14] Zhang K, Gao H, Pan X, et al. Multifunctional bilayer nanocomposite guided bone regeneration membrane[J]. *Matter*, 2019, 1(3): 770-81.

网络出版时间:2024-04-12 13:52:17 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1008.006

T 细胞条件性敲除 Spi1 基因小鼠的繁育及鉴定

王卉卉,朱向玲,吴旭铭,张慧茹,周园园,王安琪,刘崇,涂佳杰

摘要 目的 繁育 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因的小鼠并对其鉴定,为进一步探索 Spi1 编码蛋白 PU.1 的作用提供研究基础。方法 将 Lck-Cre 小鼠与 Spi1^{flax/flax} 小鼠进行杂交繁育,通过聚合酶链式反应(PCR)和琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型,筛选出基因型为 Lck-Cre × Spi1^{flax/flax} 的小鼠即为 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因的纯合子小鼠。使用磁珠分选脾脏 T 淋巴细胞,并应用 Western blot、实时荧光定量 PCR (qPCR)及流式细胞术检测 PU.1 在 T 细胞中的敲除效率。结果 Lck-Cre × Spi1^{flax/flax} 小鼠基因稳定遗传。与 Spi1^{flax/flax} 小鼠相比,Lck-Cre × Spi1^{flax/flax} 小鼠脾脏 T 细胞中的 PU.1 表

达水平显著降低。结论 该研究应用 Cre/LoxP 系统和 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 T 细胞条件性敲除 Spi1 基因小鼠,为后续研究 PU.1 在 T 细胞相关疾病中的具体作用提供了可靠的动物模型。

关键词 Spi1; Cre/LoxP 系统; CRISPR/Cas9 技术; T 细胞; PU.1; 条件性敲除

中图分类号 R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0595-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.006

2024-02-02 接收

基金项目:安徽省高校杰出青年科研项目(编号:2022AH020052)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物安徽协同创新中心,合肥 230032

作者简介:王卉卉,女,硕士研究生;

涂佳杰,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:tujiajie@ahmu.edu.cn

PU.1 作为 E26 transformation-specific (ETS) 转录因子家族的成员之一,由 Spi1 基因编码,重要的功能区域包括羧基端高度保守的 DNA 结合区,也就是 ETS 结构域,可以识别拥有 GGA (A/T) 序列的 DNA 结合位点^[1]。PU.1 主要在造血细胞中表达,能够调控多种免疫细胞的分化和功能,从而影响一些自身免疫性疾病的病程,比如类风湿关节炎

Fabrication and performance evaluation of high-modulus and high-strength silk fibroin guided bone regeneration membrane

Liao Xiaoyu¹, Fang Hui¹, Yang Feiyu¹, Zou Duohong^{1,2}

(¹College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032; ²Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University School of Medicine, Shanghai JiaoTong University School of Stomatology, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011)

Abstract Objective To develop a high modulus and high strength biodegradable silk fibroin GBR membrane to address the issue of maintaining the space for bone regeneration in the repair of osseous defects. **Methods** After purifying silk fibroin protein, membrane materials were prepared using evaporation-hot pressing method. The physical and chemical properties and biological performance of the membranes were evaluated using stretching tests, *in vitro* simulations, and cell co-culturing methods. **Results** A silk fibroin GBR membrane was successfully fabricated, resulting in a simulated degradation rate of 35.3% after 12 h *in vitro*. The wet-state elastic modulus reached 45 MPa, while the tensile strength reached 8.39 MPa. Furthermore, the cell survival rate was nearly 100% after 7 days. **Conclusion** The biodegradable GBR membrane produced in this study possesses high modulus and strength, as well as excellent biocompatibility, offering a promise as a foundation for addressing the bone defect repair and bone space maintenance.

Key words bone defect repair; maintaining the space for bone regeneration; guided bone regeneration membrane; silk fibroin; evaporation-heat pressing method; osteogenic differentiation; tensile strength