

DOI:10.13475/j.fzxb.20201008606

丝素蛋白/磷酸八钙复合材料生物界面的 蛋白质吸附和细胞响应

杨 亚^{1,2}, 闫凤祎², 王 卉², 张克勤²

(1. 常熟理工学院 纺织服装与设计学院, 江苏 常熟 215500;

2. 苏州大学 纺织与服装工程学院, 江苏 苏州 215000)

摘要 为进一步了解仿生材料结构与功能的关系,为体内骨整合设计一个有利的种植微环境,通过电化学沉积技术调控电解液中丝素蛋白(SF)的质量浓度,制备了具有纳微米多级结构的丝素蛋白/磷酸八钙(SF/OCP)复合涂层。研究了丝素蛋白质量浓度对SF/OCP复合涂层的表面形貌、力学性能、蛋白质吸附以及细胞增殖行为的影响。结果表明:随电解液中丝素蛋白质量浓度的增加,涂层表面孔洞直径由 $(19.96 \pm 6.96) \mu\text{m}$ 减小至 $(1.56 \pm 0.22) \mu\text{m}$, OCP晶体宽度减小至纳米级别($26.84 \pm 8.2 \text{ nm}$);与纯OCP涂层相比,SF/OCP复合涂层(SF质量浓度为 1.0 mg/mL)的弹性模量和硬度分别增加了约1.5和4.3倍;SF/OCP复合涂层选择性地增强了纤连蛋白(Fn)的吸附,经7 d的细胞培养后,SF/OCP复合涂层(SF质量浓度为 1.0 mg/mL)表面的细胞活力是纯OCP涂层上的1.28倍。

关键词 丝素蛋白;磷酸八钙;蛋白质吸附;细胞培养;仿生材料

中图分类号:TS 101.4 文献标志码:A

Protein adsorption and cell response on bio-interfaces of silk fibroin/octacalcium phosphate composites

YANG Ya^{1,2}, YAN Fengyi², WANG Hui², ZHANG Keqin²

(1. School of Textile Garment and Design, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500, China;

2. College of Textile and Clothing Engineering, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract To further understand the structure-function relationships for biomimetic materials for the purpose of designing a favorable implant microenvironment for osseointegration in vivo, the nano/micro hierarchical structure of silk fibroin (SF)/octacalcium phosphate (OCP) composite coating was constructed by controlling simply the SF concentration of the electrolyte during the electrochemical deposition process. The influence of SF concentration on surface morphology, mechanical property, protein adsorption and cell proliferation were studied. The results show that the pore diameter of the coating surface decreases from $(19.96 \pm 6.96) \mu\text{m}$ to $(1.56 \pm 0.22) \mu\text{m}$ and the crystal width decreases to the nano-scale with SF concentration increasing in electrolyte. Comparing the pure OCP coating, the elastic modulus and hardness of the SF/OCP composite coating (1.0 mg/mL SF) increase approximately 1.5 times and 4.3 times, respectively. The SF/OCP composite coating selectively enhances fibronectin (Fn) adsorption, and the cell viability on the SF/OCP composite coating (1.0 mg/mL SF) is 1.28 times that on the pure OCP coating after culturing for 7 days.

Keywords silk fibroin; octacalcium phosphate; protein adsorption; cell culture; biomimetic material

在人体内,骨组织展现出了优异的力学性能,其主要由硬而脆的纳米级钙磷盐和柔软坚韧的有机蛋

白质复合而成。从自然界中得到启发,构筑具有不同化学组分的纳微米多级结构是组织工程应用中先

收稿日期:2020-10-30 修回日期:2020-11-13

基金项目:江苏省基础研究计划面上研究项目(BK20161253)

第一作者:杨亚(1990—),女,讲师,博士。主要研究方向为丝素蛋白生物医用材料、纳米材料和3D打印的研究。

通信作者:张克勤(1972—),男,教授,博士。主要研究方向为功能纤维与生物材料的研究。E-mail:kqzhang@suda.edu.cn。

进生物材料合成的关键因素。磷酸八钙(OCP)和丝素蛋白(SF)由于各自具有优异的理化性质和生物性能,被认为是合适的骨组织替代材料^[1-3]。

近年来,关于材料表面拓扑结构对蛋白质吸附和细胞行为影响的研究吸引了众多关注,相关研究表明,生物材料表面纳米尺度和微米尺度的结构在一定程度上可直接和间接影响细胞的生长行为^[4-5]。一般来说,如果植入物被植入活体中,蛋白质包括许多生物活性物质会立即与这些植入物相互作用并吸附在其表面,这种蛋白质吸附过程的研究对于预测生物进程中细胞对基底的响应是至关重要的^[6-7]。众多研究者指出,生物材料表面微观结构只有在细胞粘附蛋白存在的前提下才能促进细胞的粘附,表明蛋白质在调控移植生物材料表面一系列细胞行为方面起到了重要的作用^[8-9]。相关研究表明,纳米材料的特异性可促进组织替代材料生物性能和力学性能的提高^[10-12]。

本文利用电化学沉积技术精确调控纳微米多级结构,探索材料表面理化特征与其力学性能和生物性能的相互关系。在电化学沉积过程中,通过调节SF的质量浓度,精确调控SF/OCP复合涂层的孔隙尺寸和晶带宽度;讨论纳米多级结构表面形貌的变化对牛血清白蛋白(BSA)和纤连蛋白(Fn)吸附以及细胞活力的影响。

1 实验部分

1.1 实验材料与设备

材料:四水硝酸钙(分析纯)、磷酸二氢铵(分析纯)、二甲基亚砜(DMSO),国药集团化学试剂有限公司;蚕茧,市售;钛片(Ti),西格玛奥德里奇贸易有限公司;微量二喹啉甲酸(μ BCA)蛋白定量分析试剂盒,安诺伦北京生物科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA),卡迈舒上海生物科技有限公司;纤连蛋白(Fn),美国R&D Systems公司;噻唑蓝(MTT),西格玛奥德里奇贸易有限公司。

设备:CHI600E型电化学工作站(上海辰华仪器有限公司);S-4800型高分辨场发射扫描电镜(SEM,日本Hitachi公司);Synergy 4型酶标仪(美国Bio-Tek公司);G200型纳米压痕仪(美国KLA公司)。

1.2 试样制备方法

1.2.1 丝素蛋白溶液的制备

将蚕茧剪成合适大小的茧片,称取一定量放入到质量分数为0.5%的 Na_2CO_3 溶液中,煮沸45 min后,用去离子水冲洗脱胶丝4~5次,然后自然晾干。

将干燥后的丝素撕扯至蓬松状态,放入到浓度为 9.3 mol/L 的溴化锂(LiBr)溶液中,在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下溶解1 h,用4层纱布过滤溶液中的杂质,用透析袋(截留分子量6 000~8 000)对溶液进行透析处理,透析时间为3 d,按常规操作进行换水处理,去除溶液中的溴化锂,最后将透析好的丝素蛋白溶液存放在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2.2 涂层材料制备

采用超纯水配制电解液,配制好的电解液中含 0.045 mol/L 的四水硝酸钙和 0.027 mol/L 的磷酸二氢铵,用于制备纯OCP涂层。在上述电解液中缓慢添加一定质量浓度的SF(0.0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.5、2.0 mg/mL),并混合均匀,用于制备SF/OCP复合涂层。采用CHI600E电化学工作站,钛片作为工作电极(阴极),铂电极作为对电极(阳极),饱和甘汞电极作为参比电极,采用恒电流模式进行电化学沉积。控制电流密度为 $0.2 \sim 1.5 \text{ mA/cm}^2$,沉积时间为15 min,沉积温度为 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 。在钛基底上沉积纯OCP涂层和SF/OCP复合涂层。电化学沉积结束后,用超纯水对样品进行冲洗,然后晾干备用。

1.3 测试方法

1.3.1 涂层表面孔洞直径和晶带宽度测试

通过场发射扫描电子显微镜观察涂层表面的形貌特征,打开Image J软件的长度测量工具,测试电镜图像上的孔洞直径和晶带宽度并记录。每种样品分别测试10组,计算其平均值和标准偏差。

1.3.2 涂层的力学性能测试

使用纳米压痕仪对纯OCP涂层和SF/OCP复合涂层(1.0 mg/mL)的力学性能进行测试,分析2种涂层的弹性模量和硬度差异。每种样品测试4组,计算其平均值和标准偏差。

1.3.3 涂层表面蛋白质吸附性能测试

使用微量二喹啉甲酸(μ BCA)蛋白质试剂盒检测样品上蛋白质吸附的数量。测试步骤为:将制备好的样品分别放置在24孔培养板中,每孔分别加入配制好的 5 mg/mL BSA/PBS(磷酸盐缓冲溶液)蛋白质溶液1 mL。然后将培养板放置在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵化箱中孵化4 h,取出样品用PBS清洗3次。将清洗过的样品放置在新的24孔培养板中,每孔加入 0.5 mL 体积分数为5%的十二烷基硫酸钠(SDS)溶液,然后将培养板放置在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温振荡器中,振荡20 min以释放样品表面吸附的BSA蛋白质,最后将溶液收集到新的24孔培养板中,使用 μ BCA试剂盒测试样品表面BSA蛋白质的吸附量。涂层表面Fn吸附量的测试步骤同上,每孔添加 $30 \text{ } \mu\text{g/mL}$ Fn/PBS蛋白

质溶液 1 mL 进行测试。

1.3.4 涂层表面细胞活力测试

使用人脐血间充质干细胞 HUMSCs 进行体外细胞培养实验,接种密度为 1×10^5 个/ cm^2 ,培养时间为 1、3 和 7 d。涂层表面细胞活力测试采用 MTT 比色实验进行,依检测原理,在一定波长下通过测定其吸光度值可间接反映活细胞数量。MTT 溶液配制过程为:称取 250 mg MTT 粉末放入烧杯中,加入 50 mL PBS(0.01 mol/L, pH 值为 7.4)溶液,在磁力搅拌机上避光搅拌 30 min,配制好的溶液用微孔滤膜除菌处理,放置在 4 °C 冰箱保存。将待测样品放入到 24 孔培养板中,每孔加入 200 μL MTT 溶液,然后放置在培养箱中孵化 4 h,将孵化后的样品转移到新的 24 孔板中,每个样品中加入 400 μL DMSO,摇晃一下放置 10 min。最后将每个样品孔的溶液分装

到 96 孔板中,每孔 100 μL 溶液,每个样品分装 3 个孔,用酶标仪进行测试。

2 结果与分析

2.1 涂层表面形貌分析

图 1 为纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层电镜(SEM)照片,图 2 为其放大的电镜照片。可以看出,在电化学沉积过程中,由于阴极表面氢气泡的产生,在所有制备的涂层表面都形成了均一的三维多孔结构,当一定量的丝素蛋白溶液加入到电解液中时,钛(Ti)基底表面就会形成具有纳微米多级结构的涂层,随着电解液中丝素蛋白质量浓度的增加,涂层表面孔洞直径和 OCP 晶体宽度逐渐减小,当丝素蛋白质量浓度高于 1.0 mg/mL 时趋于稳定。

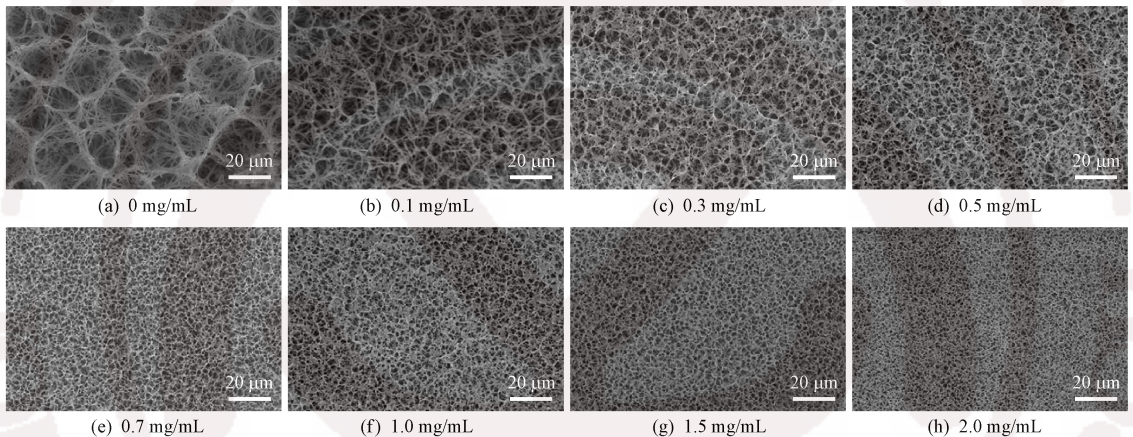


图 1 纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层电镜照片

Fig.1 SEM images of pure OCP coating and SF/OCP composite coatings

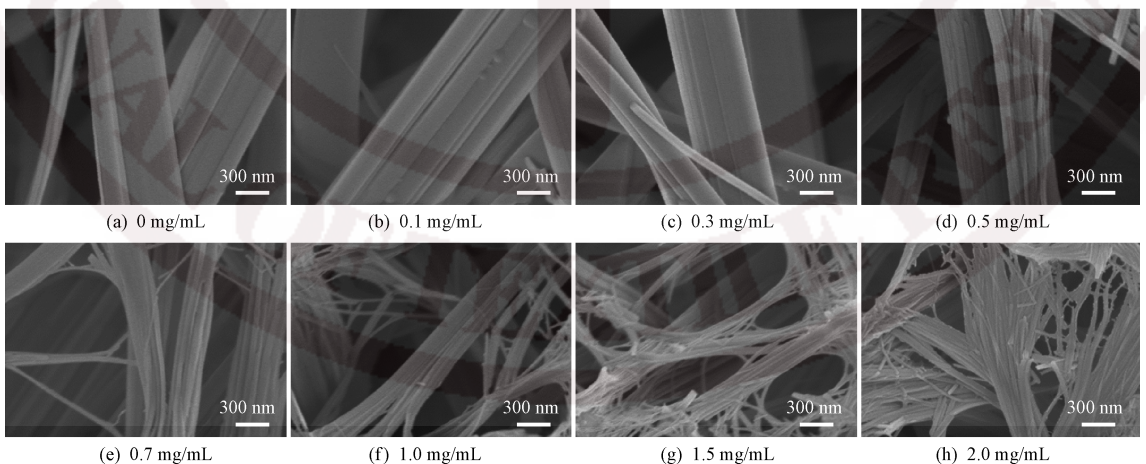


图 2 放大的纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层电镜照片

Fig.2 Enlarged SEM images of pure OCP coating and SF/OCP composite coatings

图 3 示出涂层孔洞直径和 OCP 晶带宽度随丝素蛋白添加量的变化。可以看出:纯 OCP 涂层的孔洞直径为 $(19.96 \pm 6.96) \mu\text{m}$,晶带宽度为 $(554.33 \pm$

$108.55) \text{ nm}$;随着电解液中丝素蛋白的加入,孔洞直径减小到 $(1.56 \pm 0.22) \mu\text{m}$,OCP 晶带宽度减小到纳米 $(26.84 \pm 8.2) \text{ nm}$ 级别。

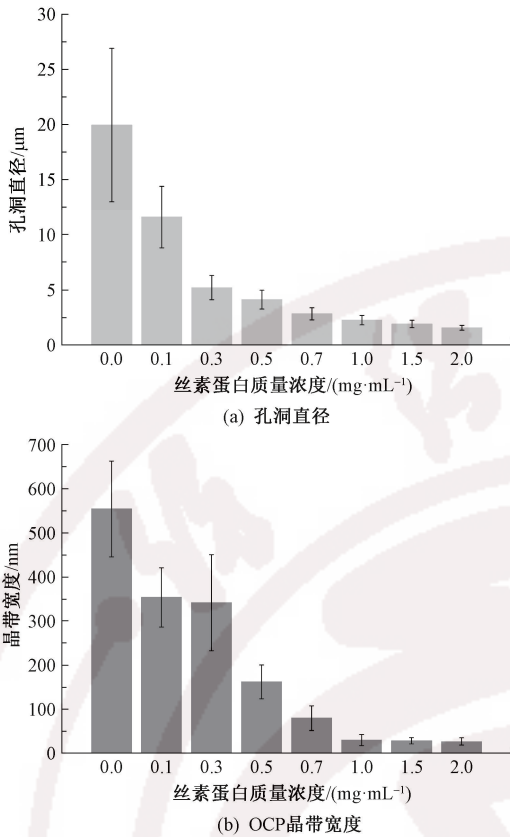


图 3 孔洞直径和 OCP 晶带宽度随丝素蛋白质量浓度的变化

Fig.3 Change of pore size (a) and OCP crystals width (b) in prepared coatings with SF concentration

图 4 示出 SF/OCP 复合涂层电化学沉积机制示意图。在电化学沉积过程中,当丝素蛋白加入到电解液中时,在阴极/溶液界面的 pH 值高于电解液 pH 值的情况下,SF 和 OCP 共沉积在阴极表面形成纳微米多级结构。通过调控初始电解液中丝素蛋白溶液的质量浓度,可以非常容易地控制 SF/OCP 复合涂层的微观形貌。在这个过程中,丝素蛋白不仅在微米级孔状结构的形成方面起到了重要作用,而且在纳米级纤维状 OCP 微晶的形成上也起到了关键作用。当电流通过电极时,由于水解电化学反应,在阴极表面产生大量动态的氢气气泡,如果 OCP 晶体生长速率与电极表面氢气气泡的形成-离开速率相匹配,OCP 晶体可围绕氢气气泡生长,并沉积在气泡周围。这个过程中,氢气气泡扮演着形成孔状结构的软模板。当电解液中加入丝素蛋白后,SF 很可能吸附在暴露于溶液中的(100)晶面上,从而抑制 OCP 晶体的生长。

2.2 涂层的力学性能分析

表 1 示出 OCP 和 SF/OCP 涂层的弹性模量和硬度。为测量含有丝素蛋白和不含丝素蛋白 2 种涂层的力学性能差异,选取了丝素蛋白质量浓度为

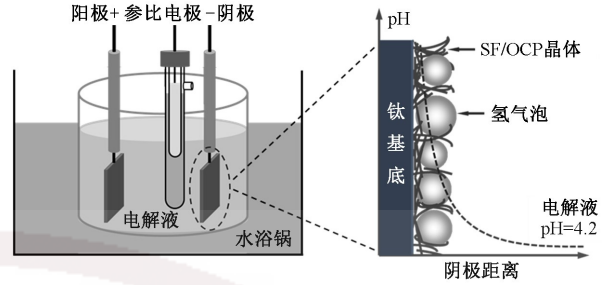


图 4 SF/OCP 复合涂层电化学沉积机制

Fig.4 Schematic illustration of formation of SF/OCP composite coatings on Ti substrates by ECD technique

1.0 mg/mL 制备得到的 SF/OCP 复合涂层和纯 OCP 涂层进行比较。由表 1 可知,与纯 OCP 涂层相比,SF/OCP 复合涂层(1.0 mg/mL)的弹性模量是其 1.5 倍,硬度是其 4.3 倍,表明 SF/OCP 复合涂层具有更好的力学性能。这可能是由于其结构上的改变,当电解液中添加丝素蛋白时,在涂层表面会形成纳微米二级结构,孔洞直径和 OCP 晶带宽度的减少能有效地促进 SF/OCP 复合涂层表面形成更加致密的多孔结构。此外,丝素蛋白和 OCP 之间的相互交联也有助于复合涂层力学性能的提升。

表 1 制备涂层的弹性模量和硬度

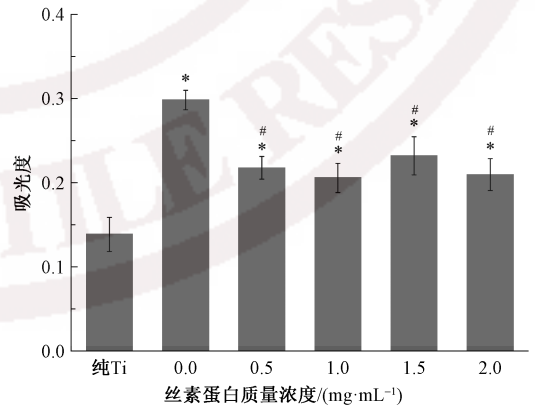
Tab.1 Elastic modulus and hardness values of prepared coatings GPa

样品名称	弹性模量	硬度
OCP 涂层	8.56 ± 0.62	0.011 ± 0.001
SF/OCP 涂层	12.84 ± 1.34	0.047 ± 0.011

注:SF/OCP 涂层中丝素蛋白质量浓度为 1.0 mg/mL。

2.3 涂层表面蛋白质吸附性能分析

图 5、6 示出 BSA 和 Fn 在纯 Ti 基底、纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层上的吸附量。

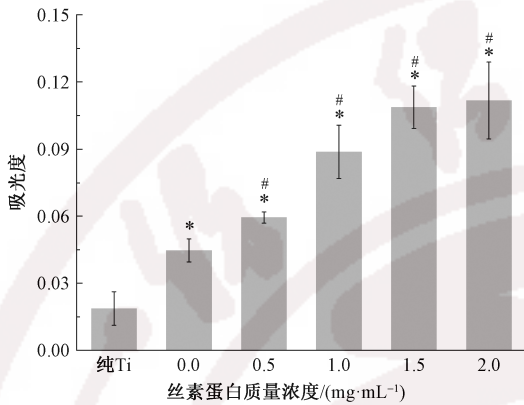


注: * 表示与纯 Ti 基底相比, $p < 0.05$; # 表示与纯 OCP 涂层相比, $p < 0.05$ 。

图 5 BSA 在纯 Ti 基底、纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层上的吸附量

Fig.5 BSA adsorption on pure Ti, pure OCP coating and SF/OCP composite coatings

由图可知,纯 OCP 涂层上的 BSA 蛋白吸附量是空白 Ti 基底上的 2 倍多,但在 SF/OCP 复合涂层上的 BSA 蛋白吸附量保持同一吸附水平,且明显低于纯 OCP 涂层上的蛋白质吸附量。Fn 蛋白在 SF/OCP 复合涂层上的吸附高于纯 OCP 涂层和空白 Ti 基底上的吸附,且随着丝素蛋白浓度的增加,复合涂层表面 Fn 蛋白吸附量增加。



注: * 表示与纯 Ti 基底相比, $p < 0.05$;
表示与纯 OCP 涂层相比, $p < 0.05$ 。

图 6 Fn 在纯 Ti 基底、纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层上的吸附量

Fig.6 Fn adsorption on pure Ti, pure OCP coating and SF/OCP composite coatings

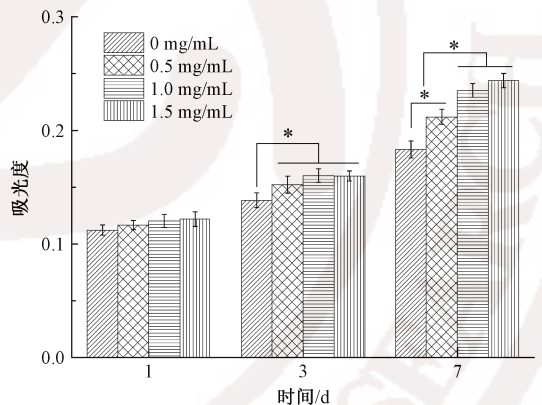
众所周知,在体内移植中 BSA 和 Fn 是最重要的 2 种蛋白质,存在于复杂的生物体液和组织中。BSA 是一种存在于血浆中的小型球状血清蛋白,有助于调节渗透压和低水溶性营养物质的运输。BSA 的分子量较低,为 66 kDa,导致其在体液中扩散速度更快。一般来说,在生物学研究中,BSA 被用来屏蔽细胞的非特异性粘附位点^[6-7,13]。一些研究团队报道了片状 HAp 粒子因其具有很大部分的 b-c 晶面而更容易吸附 BSA 分子^[14]。OCP 的晶体结构与 HAp 有着很多相似之处,在 OCP 磷灰石层中的 4 个钙原子和 4 个磷原子位置与 HAp 晶体中相应原子几乎完全匹配。BSA 蛋白更快的扩散速度和其在优先晶面上更高的吸引力,使其在纯 OCP 涂层上有更高的吸附量。与纯 OCP 涂层晶带在(100)晶面上的生长相比,随着丝素蛋白的加入,复合涂层上 OCP 晶带在这个方向上的生长受到抑制,晶带宽度明显减少。由于 BSA 分子快速的扩散速度,与 SF/OCP 复合涂层相比,纯 OCP 涂层表面具有更大的孔洞尺寸,可以吸附更多的 BSA 蛋白。

Fn 蛋白不仅是最重要的细胞黏附蛋白,可促进生物材料上细胞黏附和迁移,且在早期的成骨分化中也起到了重要的作用。一些研究表明,生物材料表面微观形貌能影响相对大的蛋白质的吸附。Fn

蛋白的相对分子质量较高,为 250 kDa^[15-17]。随着电解液中丝素蛋白质量浓度的增加,SF/OCP 复合涂层具有更高的有序结构和更大的表面积。由于表面积的增加,使得其有更多的非特异性 Fn 蛋白吸附。

2.4 涂层表面细胞活力分析

图 7 示出 HUMSCs 细胞在纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层上培养 1、3 和 7 d 时的细胞增殖状况。可知,经过 1 d 的培养后,所有样品之间没有显著性的差异,但经过 3、7 d 培养后,SF/OCP 复合涂层表面的细胞活力明显高于纯 OCP 涂层,而且具有显著性差异。随着复合涂层中丝素蛋白质量浓度的增加,涂层表面细胞活力明显增加,这种增加趋势随着培养时间的增加越来越明显。尤其在培养第 7 d 时,SF/OCP 复合涂层(1.0 mg/mL)表面的细胞活力是纯 OCP 涂层上的 1.28 倍。经统计分析,在整个细胞培养过程中,SF/OCP 复合涂层(1.0 mg/mL)和 SF/OCP 复合涂层(1.5 mg/mL)上的细胞活力没有显著性差异,这可能是由于这 2 种涂层之间具有极其相似的纳微米多级结构。



注: * 表示涂层表面细胞活力的显著性差异, $p < 0.05$ 。

图 7 HUMSCs 在纯 OCP 涂层和 SF/OCP 复合涂层上培养 1、3 和 7 d 时的细胞活力

Fig.7 HUMSCs cell viability on pure OCP coating and SF/OCP composite coatings for 1, 3 and 7 d

在所有复合涂层中,具有更小微米级孔洞尺寸,更细的纳米级晶体纤维和更好的 Fn 蛋白吸附的 SF/OCP 复合涂层(1.0 mg/mL)和 SF/OCP 复合涂层(1.5 mg/mL)显示出更好的细胞活力。细胞实验表明,与具有单一尺度特性的样品相比,纳微米多级尺度的样品能够有效增强细胞活力。

3 结 论

1) 本文通过调控电解液中丝素蛋白(SF)质量

浓度,采用电化学沉积方法制备出具有有序多孔结构的磷酸八钙(OCP)涂层和具有纳微米多级结构的SF/OCP复合涂层。经研究表明:随SF质量浓度的增加,涂层表面孔洞直径由 $(19.96 \pm 6.96) \mu\text{m}$ 减小到 $(1.56 \pm 0.22) \mu\text{m}$, OCP晶体宽度减小到 $(26.84 \pm 8.2) \text{nm}$;SF/OCP复合涂层(1.0 mg/mL)的弹性模量和硬度分别比纯OCP涂层增加了大约1.5和4.3倍。

2)SF/OCP复合涂层可选择性地增强Fn的吸附,经7 d细胞培养,SF/OCP复合涂层(1.0 mg/mL)表面的细胞活力是纯OCP涂层上的1.28倍。

FZXB

参考文献:

- [1] SAI Y K, SHIWAKU Y K, ANADA T K, et al. Capacity of octacalcium phosphate to promote osteoblastic differentiation toward osteocytes in vitro [J]. *Acta Biomaterialia*, 2018, 69:362-371.
- [2] WANG H, LIU X Y, CHUAH Y J, et al. Design and engineering of silk fibroin scaffolds with biomimetic hierarchical structures [J]. *Chemical Communications*, 2013, 49(14):1431-1433.
- [3] SHAO Z, VOLLRATH F. Materials: surprising strength of silkworm silk [J]. *Nature*, 2002, 418(6899):741.
- [4] RICHERT L, VARIOLA F, ROSEI F, et al. Adsorption of proteins on nanoporous Ti surfaces [J]. *Surface Science*, 2010, 604(17):1445-1451.
- [5] SUN M, DENG J, TANG Z, et al. A correlation study of protein adsorption and cell behaviors on substrates with different densities of PEG chains [J]. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 122(18):134-142.
- [6] CARTER D C, HE X M, MUNSON S H, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin [J]. *Science*, 1989, 244(4909):1195-1198.
- [7] DOCKAL M, CARTER D C, RUKER F. The three recombinant domains of human serum albumin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 29303 - 29310.
- [8] WILSON C J, CLEGG R E, LEAVESLEY D I, et al. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review [J]. *Tissue Engineering*, 2005, 11(2): 1-18.
- [9] ASURI P, BALE S S, KARAJANAGI S S, et al. The protein-nanomaterial interface [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(6):562-568.
- [10] MURUGAN R, RAMAKRISHNA S. Development of nanocomposites for bone grafting [J]. *Composites Science & Technology*, 2005, 65(15):2385-2406.
- [11] WEBSTER T J, ERGUN C, DOREMUS R H, et al. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics [J]. *Biomaterials*, 2000, 21(17):1803-1810.
- [12] LIU H, WEBSTER T J. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(2):354-369.
- [13] FELGUEIRAS H P, MURTHY N S, SOMMERFELD S D, et al. Competitive adsorption of plasma proteins using a quartz crystal microbalance [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(21):13207-13217.
- [14] KANDORI K, HAMAZAKI H, MATSUZAWA M, et al. Selective adsorption of acidic protein of bovine serum albumin onto sheet-like calcium hydroxyapatite particles produced by microreactor [J]. *Advanced Powder Technology*, 2014, 25(1):354-359.
- [15] SELA M N, BADIHI L, ROSEN G, et al. Adsorption of human plasma proteins to modified titanium surfaces [J]. *Clinical Oral Implants Research*, 2010, 18(5):630-638.
- [16] GONZÁLEZ-GARCÍA C, SOUSA S R, MORATAL D, et al. Effect of nanoscale topography on fibronectin adsorption, focal adhesion size and matrix organization [J]. *Colloids & Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 77(2): 181-190.
- [17] KHANG D, KIM S Y, LIU-SNYDER P, et al. Enhanced fibronectin adsorption on carbon nanotube/poly(carbonate) urethane: independent role of surface nano-roughness and associated surface energy [J]. *Biomaterials*, 2007, 28(32):4756-4768.