

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.12.006

龙定沛, 杜胤, 杨镇霖, 等. 人工合成重组蜘蛛丝蛋白在生物医学领域的应用研究进展 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(12): 52-69.

人工合成重组蜘蛛丝蛋白在 生物医学领域的应用研究进展

龙定沛^{1,2}, 杜胤^{1,2}, 杨镇霖¹, 易科^{1,2},
汪林¹, 林先蕊², 林治豪², 向仲怀¹, 代方银^{1,2}

- 西南大学 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室/农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715;
- 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 重庆 400715

摘要: 蜘蛛丝是一种天然的蛋白质纤维, 具有良好的生物降解性、生物相容性、抗菌性和优异的机械性能。然而, 由于人工高密度饲养蜘蛛极为困难, 且天然蛛丝蛋白的产量极低, 目前只能通过化学模拟合成和基因工程技术人工合成重组蜘蛛丝蛋白以满足其在研究、开发和应用中的需求。重组蜘蛛丝蛋白具有高度的形态可塑性、良好的生物相容性、可降解性和可修饰性, 这些特性使其在生物医学、生物材料和军事等领域具有广泛的应用前景。概述了蜘蛛丝蛋白的结构和功能, 阐述了人工合成重组蜘蛛丝蛋白的原理和方法, 并对其在生物医学领域的研究进展和未来发展趋势进行了总结和探讨, 旨在为解析蛛丝蛋白的结构、功能和促进蛛丝蛋白的人工合成研发与应用提供参考。

关键词: 重组蜘蛛丝蛋白; 人工合成; 生物医学; 结构与功能;
生物材料

中图分类号: TS149; R318.08

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2025)12-0052-18

Advances in the Application of Artificially Synthesized Recombinant Spidroin in Biomedicine

LONG Dingpei^{1,2}, DU Yin^{1,2}, YANG Zhenlin¹,
YI Ke^{1,2}, WANG Lin¹, LIN Xianrui²,
LIN Zhihao², XIANG Zhonghuai¹, DAI Fangyin^{1,2}

收稿日期: 2024-07-02

基金项目: 重庆英才·青年拔尖人才项目(CSTC2022YCJH-BGZXM0019); 重庆市留学人员回国创业创新支持计划项目(cx2024003);
重庆市自然科学基金项目(CSTB2023NSCQ-MSX0506, cstc2021jcyj-xtt0005); 重庆市在渝院士牵头科技创新引导专项
(CSTB2023YSZX-JCX0003)。

作者简介: 龙定沛, 博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事家蚕(丝)分子遗传改良及应用研究。

通信作者: 代方银, 博士, 教授, 博士研究生导师。

1. State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University/Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 400715, China;
2. College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Spider silk is a natural protein fiber known for its excellent biodegradability, biocompatibility, antimicrobial properties and superior mechanical performance. However, due to the significant challenges associated with high-density artificial breeding of spiders, the production of natural spidroin is extremely limited. Currently, recombinant spidroin is synthesized through chemical simulation synthesis and genetic engineering techniques to meet the demands of research, development, and application. The recombinant spidroin exhibits high morphological plasticity, good biocompatibility, degradability and modifiability, making it widely applicable in the fields of biomedicine, biomaterials and military. This paper aims to outline the structure and functions of spidroin, elucidate the principles and methods of synthetic recombinant spidroin, and summarize and explore the research progress and potential future developments in the field of biomedicine. The goal is to provide a reference for further analysis of the structural functions of spidroin and to promote the synthesis, research, and application of spidroin.

Key words: recombinant spidroin; artificial synthesis; biomedical applications; structure and function; biomaterials

截至 2024 年 6 月,自然界中已知的蜘蛛种类超过 52 000 种^[1]。这些蜘蛛可以根据其生活方式大致分为 3 类:游猎蜘蛛、洞穴蜘蛛和结网蜘蛛。游猎蜘蛛通过四处游走或伪装捕食猎物,不结网。洞穴蜘蛛喜欢藏身于沙堆或洞穴中。结网蜘蛛的主要特征是其结网行为,首先使用丝腺合成并加工蛛丝蛋白,蛛丝蛋白被吐出后会在空气中凝结成细小的蛛丝,结网蜘蛛再用这些蛛丝结成具有高黏性的蛛网,用于捕食猎物。蜘蛛共有 9 种丝腺体,但并非一种蜘蛛同时拥有这 9 种丝腺体,如十字园蛛(*Araneus diadematus*)体内含有包括大囊状腺、小囊状腺、鞭毛状腺、葡萄串状腺等在内的 7 种丝腺体,可分泌包括蜘蛛网中呈放射状的横丝、捕食过程中缠绕食物的包裹丝以及用于制作卵囊保护后代的卵囊丝等共计 7 种具有不同特性和生物学功能的蛛丝^[2]。

天然蛛丝大多具有卓越的机械性能,如达尔文树皮蜘蛛(*Caerostris darwini*)分泌的大囊状腺体丝的断裂强度可达(380±62) MPa,与高强度钢相当^[3]。除了优良的机械性能外,天然蛛丝良好的抗菌性、生物相容性和可降解性,使其具有成为手术缝合线、药物缓释载体等生物医用材料的潜力。然而,由于蜘蛛的独居性和肉食性,以及它们相互残杀的习性,很难进行大规模、高密度饲养,因此天然蛛丝的产量非常低,难以满足生产的需求。

随着生物技术的发展,人们对蛛丝蛋白的结构和性能有了更深入的了解,科研人员开始利用基因工程技术合成重组蜘蛛丝蛋白。1995 年,Prince 等^[4]利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达了分子量为 14.7~41.3 kDa 的蜘蛛丝蛋白,这是采用基因工程方法生产重组蜘蛛丝蛋白的最早报道。此后,研究人员陆续利用包括真菌^[5-6]、植物^[7-8]、哺乳动物^[9-11]和家蚕细胞^[12-13]或个体^[14-15]等多种宿主成功表达重组蜘蛛丝蛋白。这些人工合成的蜘蛛丝蛋白不仅保留了天然蛛丝蛋白的优良特性^[16],还具有更强的可塑性和可修饰性^[17]。近年来,重组蜘蛛丝蛋白已经被加工成膜、微纳米球和支架等多种形态^[18],在生物医学领域的应用日益广泛。本文概述了不同种类蛛丝蛋白的结构与功能,详细阐述了人工合成重组蜘蛛丝蛋白的原理和方法,并讨论其在生物医学领域的应用进展及潜在的发展前景。

1 天然蛛丝蛋白的结构和功能

不同种类的蜘蛛可以分泌多种不同类型的天然蛛丝,这些蛛丝又由多种不同的丝蛋白构成。2017 年,

Babb 等^[19]经全基因组测序发现, 络新妇蛛 (*Nephila clavipes*) 的基因组中包含编码 28 种不同蛛丝蛋白的基因, 其中 8 种是首次发现的新蛛丝蛋白。蛛丝蛋白属于高分子量蛋白 (通常为 250~400 kDa), 其氨基酸序列根据蛛丝类型和蜘蛛种类的不同而存在差异。蛛丝蛋白通常由高度重复的序列段构成, 两侧分别是非重复的氨基末端结构域 (即 N 端结构域, NTD) 和羧基末端结构域 (即 C 端结构域, CTD)^[20-21], 其一级结构在不同类型的蛛丝和不同种类的蜘蛛中独一无二。进一步的序列研究表明, 蛛丝蛋白的氨基酸序列和二级结构, 如 β -折叠、无规卷曲等, 其数量、排列顺序和比例共同决定了天然蛛丝的机械性能^[21]。

1.1 蜘蛛大囊状腺体丝蛋白的结构及功能

蜘蛛大囊状腺体分泌的大囊状腺体丝 (Major Ampullate Gland Silk), 也称为拖牵丝或牵引丝 (Dragline Silk)。1990 年, Xu 等^[22]从络新妇蛛大囊状腺体的 cDNA 库中成功筛选出 1 个长度为 2.4 kb 的大囊状蛛丝蛋白 1 (MaSp1)。随后, Hinman 等^[23]鉴定获得了 1 个富含脯氨酸的 MaSp2, 并推测天然蜘蛛拖牵丝主要由 MaSp1 和 MaSp2 这 2 种蛋白组成。进一步研究表明, 这 2 种蛋白在不同蜘蛛拖牵丝中的比例有所不同, 如金丝蜘蛛 (*Trichonephila clavipes*) 拖牵丝由 81% 的 MaSp1 和 19% 的 MaSp2 组成, 而橙色金蛛 (*Argiope aurantia*) 拖牵丝中 MaSp1 和 MaSp2 的比例分别为 59% 和 41%^[24]。拖牵丝蛋白的氨基酸基序具有高度重复的特点, 其重复序列主要由富含甘氨酸和丙氨酸的基序构成, 如图 1。MaSp1 和 MaSp2 由非重复的 CTD 和 NTD 以及中间的重复结构域构成, 其中重复结构域通常包含约 20~100 个串联的重复结构单元^[25]。MaSp1 的重复结构域富含 polyA (A_n)、polyGA ($(GA)_n$) 和 GGX ($X=Q, Y, L$ 或 R) 基序; MaSp2 的重复结构域含有脯氨酸基序, 主要为 GPGQQ 和 GPGGX, 同时也富含 A_n 基序。拖牵丝蛋白氨基酸基序组成的二级结构的数量及分布, 决定了拖牵丝的力学特性。例如 $(GA)_n/A_n$ 基序参与形成的疏水性 β -折叠纳米晶体结构域, 起到了增强拖牵丝纤维抗拉伸强度的效果; GGX 基序参与形成的亲水性 3_{10} 螺旋结构域, 以及 GPGQQ 或 GPGGX 基序形成的 β -螺旋或 β -转角结构, 则赋予了拖牵丝良好的弹性^[25-28]。

蜘蛛拖牵丝中除了 MaSp1 和 MaSp2 这 2 种主要蛋白外, 还含有其他含量较低的蛛丝蛋白 (表 1)。1996 年, Guerette 等^[29]利用络新妇属 *Spidroin1* 和 *Spidroin2* 的基因 cDNA 部分序列作为探针, 从园蛛属丝腺 cDNA 库中筛选获得了 4 个阳性克隆序列, 分别命名为 ADF1~ADF4。研究发现, ADF3 和 ADF4 蛋白的氨基酸序列与 MaSp1 和 MaSp2 相似, 尽管这 2 种蛋白的脯氨酸含量较低, 仅占整个氨基酸序列的 13%, 但无论是由 ADF3/ADF4 蛋白组合还是由 MaSp1/MaSp2 蛋白组合组成的拖牵丝, 比较二者的力学性能并无显著差异。进一步研究表明, 脯氨酸主要决定了蜘蛛丝的超收缩特性及湿丝的机械性能^[30]。此外, 研究显示超收缩性与蛋白的亲水性和疏水性有关, 其中 MaSp1 和 ADF4 蛋白的疏水性较好, 而 MaSp2 和 ADF3 蛋白则更为亲水^[31]。

2019 年, Kono 等^[32]利用基因组学、转录组学和蛋白质组学方法, 首次从大腹园蛛 (*Araneus ventricosus*) 的蛛丝蛋白序列中鉴定获得了 MaSp3, 并将其命名为 MaSp3A。2021 年, 同一研究团队又从络新妇蛛的拖牵丝中鉴定获得了 MaSp3B 序列^[33]。2019 年, Garb 等^[34]对达尔文树皮蜘蛛 (*Caerostris darwini*) 进行等位基因测序, 获得了 MaSp4 和 MaSp5。进一步研究发现, MaSp4 中 GPGQQ 序列占重

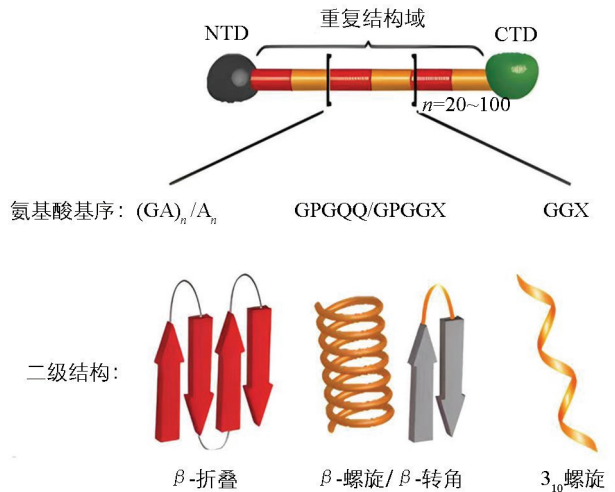


图 1 蜘蛛拖牵丝中 MaSp1 和 MaSp2 的蛋白结构示意图

复序列的 44%~52%，其重复序列含有 31.4%~32.0%的脯氨酸，这种特殊的重复序列与蜘蛛丝优良的弹性有关，而 MaSp5 主要由 GGX 序列组成。目前，MaSp4 和 MaSp5 这 2 种蛋白仅在达尔文树皮蜘蛛中发现^[35]。

表 1 主要蛛丝蛋白及其功能

蜘蛛丝种类	蛛丝蛋白种类	功能应用	参考文献
大囊状腺体丝	MaSp1、MaSp2、ADF3、ADF4、MaSp3A、MaSp3B、MaSp4、MaSp5	悬吊蜘蛛的拖牵丝、蜘蛛网框架丝和放射状丝	[22-23, 32-35]
鞭毛状腺体丝	Flag、Flag-A、Flag-B、Flag-E	捕获丝的核心纤维、毒素分泌	[36-37]
小囊状腺体丝	ADF1、MiSp1、MiSp2	增强蜘蛛网的力学性能；拖牵丝的附着丝、增强丝或蜘蛛网起始旋节	[21, 38]
聚集状腺体丝	ASG1、ASG2	捕获丝的黏附丝蛋白，具有较强的黏合作用	[39-40]
葡萄串状腺体丝	AcSp1、AcSp2	包裹猎物级蜘蛛网内层丝纤维	[27, 41]
管状腺体丝	TuSp1、ECP-1、ECP-2	蜘蛛卵壳外层，用于保护蜘蛛幼卵	[42-44]
梨状腺体丝	PySp1、PySp2	黏附和连接纤维	[45-46]

1.2 鞭毛状腺体丝蛋白的结构及功能

1998 年，Hayashi 等^[47]对络新妇蛛进行了 cDNA 序列的克隆，首次筛选出鞭毛状腺体丝蛋白(Flagelliform Gland Spidroin, Flag)基因(表 1)。随后，Lubec 团队通过蛋白质组学确定了络新妇蛛 Flag 的完整序列^[48]。与 MaSp1 和 MaSp2 类似，Flag 也拥有 NTD、CTD 以及由 11 个重复单元组成的重复结构域。这些重复单元由 GPGGX、GGX(X=S、Y 或 A)和疏水间隔序列构成，其中 GPGGX 序列和 GGX 序列可形成₃₁₀螺旋和 β -螺旋，对鞭毛状腺体丝的可伸展性、韧性和强度做出了贡献^[37, 49]。

2020 年，Tian 等^[37]对大腹园蛛的 Flag 进行了鉴定，发现其富含甘氨酸和脯氨酸的特性，赋予了鞭毛状腺体丝极高的弹性，这是构成捕获丝核心部分的关键，但这种富含甘氨酸和脯氨酸的特性也导致 Flag 难以被外源表达。2022 年，Jorge 等^[50]通过蛋白质组学分析蜘蛛鞭毛状腺体中蛋白质的表达，结果表明 Flag 只在鞭毛状腺体中表达，且其分子量大于 250 kDa^[48]。目前，由于缺乏在天然状态下 Flag 的真实蛋白结构数据，因此其完整结构模型尚待进一步确定^[51]。

2022 年，Babb 等^[36]在达尔文树皮蜘蛛中鉴定获得了 3 种新的 Flag 同源蛋白——Flag-A、Flag-B、Flag-E(表 1)。进一步研究发现，这 3 种蛋白能在雄性蜘蛛的鞭毛状腺体、毒腺、头胸部和螯肢等部位表达，而仅在雌性蜘蛛的鞭毛状腺体中表达。这与之前发现的 Flag 只在络新妇蛛和大腹园蛛的鞭毛状腺体中表达有所不同。此外，该研究还表明这 3 种 Flag 还与达尔文树皮蜘蛛的毒素分泌有关。

1.3 其他主要蛛丝蛋白的结构及功能

除了上述研究较为广泛与深入的大囊状腺体丝蛋白和鞭毛状腺体丝蛋白外，其余报道的主要蛛丝蛋白还包括小囊状腺体丝(Minor Ampullate Gland Silk)、聚集状腺体丝(Aggregate Gland Silk)、葡萄串状腺体丝(Aciniform Gland Silk)、管状腺体丝(Tubuliform Gland Silk)和梨状腺体丝(Pyriiform Gland Silk)(表 1)。

小囊状腺体丝在蜘蛛的生理过程中主要起支撑和固定作用^[52]。1998 年，Colgin 等^[53]克隆获得了来自小囊状腺体丝的 2 种小囊状蛛丝蛋白 1 和 2(Minor Ampullate Spidroin 1 和 Minor Ampullate Spidroin 2, MiSp1 和 MiSp2)的基因序列，其编码蛋白分子量分别为 9.5 kDa 和 7.5 kDa。此外，小囊状腺体还会分泌 ADF1，ADF1 自身不具有弹性，但其能够提高蜘蛛丝的力学性能，并有助于蜘蛛丝网状结构的形成^[54]。

聚集状腺体丝蛋白(Aggregate Spidroin, ASG)含有高黏性糖蛋白和高吸湿性多肽^[39]。ASG1 和 ASG2

分别在络新妇蛛和黑寡妇蛛(*Latrodectus hesperus*)中被鉴定获得^[40]。进一步研究发现, ASG1 是一种广泛存在于节肢动物的围膜基质蛋白, ASG2 具有拖牵丝蛋白相似的序列和典型结构(包含 NTD、重复序列和 CTD), 具有较强的黏附作用, 是捕获丝的黏附蛋白。

葡萄串状腺体丝主要由葡萄串状蛛丝蛋白(Aciniform Spidroin, AcSp)组成, 用于捕获和包裹猎物。蜘蛛葡萄串状蛛丝蛋白可以根据其含有的不同重复区域分为 2 种类型(AcSp1 和 AcSp2)^[41]。AcSp 由 14 个高度重复的同源单元组成, 每个单元约含有 200 个氨基酸, 相对于其他类型的蛛丝蛋白, AcSp 中的甘氨酸和丙氨酸含量较低^[27]。

管状腺体丝(Tubuliform Gland Silk)又称圆柱形腺体丝(Cylindrical Gland Silk), 主要用于构建蜘蛛卵壳的外层, 与内层的葡萄串状腺体丝共同构成抵御外界威胁的保护屏障^[42]。Tian 等^[55]经克隆测序, 筛选出构成管状腺体丝的主要成分蛋白 TuSp1, 其重复序列包含 A_n 、 S_n 、 $(SA)_n$ 、 $(SQ)_n$ 和 $GX(X=Q, N, I, L, A, V, Y, F \text{ 或 } D)$ 。此外, 组成管状腺体丝芯纤维的主要蛋白还包括 2 种卵壳蛋白 ECP-1 和 ECP-2, 其分子量大小均约为 100 kDa^[56]。

梨状腺体丝与蜘蛛网的附着、连接及食物包覆密切相关。研究人员对蜘蛛梨状腺体丝蛋白(Pyri-form Spidroin, PySp)的研究相对较少, 目前仅报道鉴定获得来自黑寡妇蜘蛛的 PySp1^[45]和来自络新妇蛛的 PySp2^[46]。

2 人工合成重组蜘蛛丝蛋白的原理和方法

目前, 人工合成重组蜘蛛丝蛋白的方法主要包括化学模拟合成(Chemical Mimic Synthesis)和基因工程(Genetic Engineering)两种。化学模拟合成法是以动物丝氨基酸序列结构相似的片段为目标, 通过诱导变形的的方法合成重组蜘蛛丝蛋白^[57]。基因工程法则是通过转基因技术将蛛丝蛋白基因导入大肠杆菌、酵母等微生物, 或烟草、马铃薯、家蚕、仓鼠细胞等植物和动物个体或细胞等宿主体内, 以实现重组蜘蛛丝蛋白的高量表达^[16](表 2)。

2.1 化学模拟合成重组蜘蛛丝蛋白

蛛丝蛋白的化学模拟合成主要采用 N-羧基环内酸酐(N-carboxyanhydride, NCA)合成法和液相多肽合成法。NCA 合成法在 20 世纪被广泛用于制备高分子量聚氨基酸, 其是利用 α -氨基酸环化生成 NCA, 再通过亲核试剂或碱催化的开环聚合方法。曾有研究利用丙氨酸-NCA 开环聚合模拟蛛丝蛋白, 虽然此法操作简单、反应快、产物分子量大, 但所得到的重组蜘蛛丝蛋白结构与天然蛛丝蛋白相差较大^[58]。Fukushima 等^[59]利用五氯本酯活化酯的液相多肽合成法, 模拟合成了分子量在 23~48 kDa 的重组蜘蛛丝蛋白, 其含有多个连续重复的 $GGX(X=Ala, Tyr, Gln \text{ 或 } Leu)$ 氨基酸序列, 通过甲酸溶解检测其二级结构, 发现这些重复序列蛋白形成了 β -折叠结构。然而, 由于液相多肽合成法步骤繁琐, 聚合物分子量较小, 因此该方法目前主要用于研究模拟蛛丝蛋白与天然蛛丝蛋白结构及性能之间的关系, 并未广泛应用于实际开发。

近年来, 研究人员还致力于利用化学合成法创制具有优异力学性能的人造蜘蛛丝。2019 年, Dou 等^[60]基于天然蛛丝的壳-芯结构, 使用乙烯基三乙氧基硅烷、丙烯酸及去离子水合成了聚丙烯酸水凝胶, 再通过水蒸发自组装方式, 利用该水凝胶进一步获得了机械性能可与天然蛛丝相媲美的人造蜘蛛丝纤维。上述方法为人造蜘蛛丝纤维的合成开辟了一条新途径, 但通过自组装获得具有更为优异力学性能的人造蜘蛛丝仍具挑战。2024 年, He 等^[61]通过施加外部应力来诱导自组装过程, 优化了蛋白分子链的柔韧性, 成功利用超细纳米原纤维制备更坚固的人造蜘蛛丝, 其具有 1.83 GPa 的断裂强度以及高达 238 MJ/m³ 的韧性。

2.2 微生物合成重组蜘蛛丝蛋白

1995 年, Prince 等^[4]首次使用大肠杆菌表达了分子量在 14.7~41.3 kDa 的蜘蛛丝蛋白。1996 年,

Lewis 等^[62]利用大肠杆菌表达了分子量超过 100 kDa 的蜘蛛丝蛋白,其质量分数在分泌总蛋白中达到 10 mg/g。1997 年, Fahnestock 等^[63]分别以大肠杆菌和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)作为宿主合成了重组蜘蛛丝蛋白 DP-1B,结果发现大肠杆菌只能有效合成并分泌小于 1 000 个氨基酸的蜘蛛丝蛋白,而毕赤酵母能够合成并分泌含有 3 000 个及以上氨基酸的蜘蛛丝蛋白,但其表达效率随氨基酸数量增加而降低。2010 年, Xia 等^[64]利用大肠杆菌表达了分子量为 284.9 kDa 的重组 MaSp1,通过将重组 MaSp1 溶解在常用的纺丝溶剂六氟异丙醇中,随后以溶解后浓度为 20% 的重组 MaSp1 溶液为原料,经电纺织成重组蜘蛛丝纤维,检测其力学性能可达到蜘蛛天然拖牵丝相当的水平。2016 年, Jansson 等^[6]利用毕赤酵母生产了重组蜘蛛丝融合蛋白 Z-4RepCT,通过蛋白质自组装可变成丝纤维。值得注意的是,由于蛛丝蛋白富含甘氨酸和丙氨酸且具有复杂的二级结构,利用大肠杆菌和酵母等微生物表达重组蜘蛛丝蛋白时,常会出现遗传不稳定的现象,导致重组蜘蛛丝蛋白表达效率降低^[65]。

近年来,研究人员还尝试利用其他微生物合成重组蜘蛛丝蛋白。2020 年, Foong 等^[65]利用海洋光合紫色细菌(*Rhodovulum sulfidophilum*)成功表达了源自络新妇蛛的重组 MaSp1,与大肠杆菌相似,海洋光合紫色细菌也会面临因遗传不稳定而导致重组蜘蛛丝蛋白表达效率低的问题。2022 年, Jin 等^[66]利用谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)成功合成并分泌了 2 种源自络新妇蛛的重组 MaSp1,其分子量大小分别为 43 kDa 和 168 kDa,遗憾的是通过微流体纺纱装置获得蛛丝纤维的力学性能未能达到天然蛛丝的水平。

2.3 植物和哺乳动物合成重组蜘蛛丝蛋白

除了在微生物中表达重组蜘蛛丝蛋白外,研究人员还曾利用多种植物作为宿主表达重组蜘蛛丝蛋白。2001 年, Scheller 等^[7]合成了源自络新妇蛛包含有 420~3 600 个核苷酸的 MaSp1 的 cDNA,该基因序列与天然蛛丝蛋白基因序列具有高度相似性,随后利用烟草和马铃薯作为宿主表达该融合基因,但重组蜘蛛丝蛋白仅占有蛋白含量的 2%^[7]。2013 年, Hauptmann 等^[67]利用基于内含肽介导的翻译后蛋白融合技术(Intein-Based Posttranslational Protein Fusion Technology)在烟草叶片细胞的内质网中添加了络新妇蛛的 Flag 基因序列,并成功获得了分子量超过 250 kDa 的 Flag。2016 年, Peng 等^[8]也利用该技术在烟草中成功表达了分子量为 73~136 kDa 的重组 MaSp1 和 MaSp2。2008 年, Brooks 等^[68]在拟南芥的叶片和种子及大豆胚中成功表达了源自络新妇蛛的重组 MaSp2。与微生物相比,植物表达重组蜘蛛丝蛋白的优势在于其可以利用初始原材料自主合成氨基酸,且重组率更高、遗传稳定性更强,但还存在以下问题:通过植物生产蜘蛛丝蛋白需要全面且昂贵的临床研究,植物和植物细胞的生产效率低,纯化重组蜘蛛丝蛋白成本高等,因此还需要进一步完善技术以便实际应用^[67, 69]。

2002 年,加拿大 Nexia 生物技术有限公司与美国陆军 Natick 研究中心共同完成了利用哺乳动物来表达重组蜘蛛丝蛋白的研究^[9]。他们首先合成了源自络新妇蛛牵引丝的 MaSp1 和 ADF3 的 cDNA,将其分别在牛乳腺上皮泡状细胞和仓鼠肾细胞中进行表达,并将纯化后的蛛丝蛋白纺丝得到了世界上首例通过哺乳动物合成的高弹性、高强度的人造蜘蛛丝纤维,称为“生物钢”。2007 年, Xu 等^[70]将人工合成的络新妇蛛的 MaSp1 和 MaSp2 蛋白基因插入羊的 β 酪蛋白启动子序列下游,注射进小鼠受精卵的细胞核中,最终在小鼠的乳汁中成功表达了重组蜘蛛丝蛋白。此后,也有研究尝试利用山羊、猪等动物表达蛛丝蛋白^[16]。与微生物或植物的表达系统不同,重组蜘蛛丝蛋白在动物体内的表达并不是独立存在,而是与动物本身的酪蛋白或乳清蛋白均匀混合,因此如何进行有效的分离和回收是动物表达重组蜘蛛丝蛋白的关键。2021 年, Li 等^[71]成功制备了自身基因组中整合有重组蜘蛛丝蛋白基因的转基因羊胚胎。与通过乳腺分泌重组蛋白不同,该研究旨在利用转基因羊丰富的毛发和毛囊生产重组蜘蛛丝蛋白,然而,尽管进行了胚胎移植并观察到妊娠,但并未产生后代,因此,通过毛发生产重组蜘蛛丝蛋白的可行

性尚未得到验证^[71]。

2.4 遗传改良家蚕“纺”蜘蛛丝

相较于同类相食的蜘蛛, 家蚕可以进行大规模的人工饲养, 能合成大量蛋白质并纺丝结茧。家蚕的丝腺与蜘蛛的丝腺形态十分相似^[72], 且它们的理化环境表现出极高的相似性^[14]。蜘蛛与家蚕的丝蛋白均由富含甘氨酸和丙氨酸的串联重复序列组成, 两者的基因序列和结构也高度相似^[72-73]。经过人类数千年的驯化, 家蚕已能高效合成丝蛋白, 因此借助于转基因或基因组编辑等手段创制遗传改良家蚕, 进而实现在遗传改良茧丝中高效合成重组蜘蛛丝蛋白的方法具有其他物种不可比拟的优势。

1999 年, Altmann 等^[13]首次利用家蚕核型多角体病毒杆状表达系统在家蚕细胞中成功表达了 37 kDa 的重组蜘蛛鞭毛状蛋白, 随后 Zhang 等^[15]也利用此系统在家蚕细胞系(BmN)和幼虫中成功表达了 70 kDa 的 MaSp1-EGFP 荧光融合蛋白。研究报告称, 在幼虫中产生的融合蛋白产量为 6 mg, 占 BmN 细胞总蛋白的 5%。此外, 该研究指出, 重组蜘蛛丝蛋白的低溶解性是产量提升的主要障碍^[15]。近年来, 研究人员开始通过利用 piggyBac 转座载体建立更为可靠的转基因家蚕来表达重组蜘蛛丝蛋白^[74-78]。Wen 等^[75]获得了基因组中含有家蚕丝胶蛋白 1(Sericin 1)基因启动子调控 MaSp1 表达框的转基因家蚕, 并成功在转基因茧丝中检测到了 MaSp1 的表达。然而, 由重组蜘蛛丝蛋白纺成的丝蛋白纤维力学性能不如天然蜘蛛拖牵丝, 这可能是由于 MaSp1 在丝蛋白中占比较低^[75]。2014 年, Kuwana 等^[76]构建了拥有大腹园蛛拖牵丝蛋白基因和家蚕丝素重链基因融合片段的转基因家蚕, 并获得了含有融合蛋白的转基因蚕丝。经检测, 转基因蚕丝的韧性与非转基因蚕丝相比提高了 53%, 随后这种转基因纤维被编织成背心和围巾等衣物。2018 年, You 等^[77]利用 piggyBac 转座载体成功建立了能表达‘黑寡妇’体内大小为 160 kDa 的 MaSp2 转基因纯合性家蚕和杂合性家蚕, 通过对两种家蚕丝纤维的力学性能比较, 纯合性家蚕的丝纤维在最大应力、杨氏模量、韧性等方面均优于杂合性家蚕。2021 年, Tang 等^[78]也利用该转座子系统, 成功获得了 2 种转基因家蚕, 能分别在茧丝中表达金丝蜘蛛 ASG1 和金银蛛(*Argiope argentata*)的 PySp1。该研究还表明, 这 2 种蛋白均能提高转基因蚕丝的力学性能, 其中含 ASG1 的茧丝韧性和断裂拉升强度与天然茧丝相比分别提高了 21.0% 和 34.2%, 含 PySp1 的茧丝韧性和断裂拉升强度分别为 91.5% 和 36.9%。

近年来, 研究人员开始探索利用基于转录激活因子样效应核酸酶(TALEN)或 CRISPR/Cas9 的基因组编辑工具, 将外源重组蜘蛛丝蛋白基因与内源丝蛋白基因进行原位替换, 期望进一步提高重组蜘蛛丝蛋白在遗传改良家蚕茧丝中的含量。2018 年, Xu 等^[79]利用 TALEN 介导的外源基因替换技术, 用络新妇蛛的 MaSp1 蛋白基因取代了家蚕丝素重链基因, 获得的遗传改良茧丝中含有 35.2% 的重组 MaSp1。次年, Zhang 等^[80]利用 CRISPR/Cas9 技术成功将络新妇蛛 MaSp1 和 MiSp1 蛋白基因插入到丝素蛋白重链或轻链中, 得到的蛋白纤维拉伸强度与天然蛛丝相当, 且能保持遗传稳定性。2023 年, Mi 等^[14]也利用 CRISPR/Cas9 技术成功地在转基因家蚕中合成了达尔文树皮蜘蛛完整的聚酰胺蜘蛛丝纤维, 该纤维的拉伸强度达到 1 299 MPa, 韧性达到 319 MJ/m³, 该研究对具有高强度和超韧性的商用纤维生产具有重要参考意义。2024 年, Yu 等^[81]利用 3 种不同转化策略: 转座子介导的转基因重链表达系统(BmFibH-T)、TALEN 介导的丝素蛋白轻链融合系统(BmFibL-F)和丝素蛋白重链替换系统(BmFibH-R), 获得了丝腺能特异表达源自络新妇蛛的 MaSp2 并将其分泌至茧丝的转基因家蚕中。结果显示, 与天然茧丝相比, 利用 BmFibL-F、BmFibH-R 和 BmFibH-T 获得的转基因茧丝的断裂拉伸强度分别提高了 34.86%、73.87% 和 86.18%, 其中由 BmFibH-R 构建的转基因蚕丝中的重组外源 MaSp2 的含量最高(占茧丝总蛋白的 51.02%), 表明利用 BmFibH-R 建立转基因家蚕可能是大量生产重组蜘蛛丝蛋白的有效手段^[81]。

表 2 不同宿主表达的天然蛛丝蛋白基因

宿主种类	宿主	蛋白种类	重组蛋白分子量/ kDa	重组蛋白表达量/ (mg · L ⁻¹)	参考文献	
原核生物	大肠杆菌	MaSp1	1.5~28.5	2.5~150	[82]	
		MaSp2	30~200	—	[83]	
		Flag	36.8	—	[37]	
		AcSp1				
		Flag	14~94	—	[11]	
			TuSp1	33~45	4.8~72	[11]
			PySp2	33~45	4.8~72	[11]
		鼠伤寒沙门氏菌	ADF1	25~106	—	[11]
			ADF4			
		谷氨酸棒状杆菌	MaSp1	43/168	—	[66]
	海洋光合紫色细菌	MaSp1	8.5~38	—	[65]	
真菌	毕赤酵母	MaSp1	65~163	80	[84-85]	
		MaSp2	65~163	—	[85]	
植物	烟草	MaSp1	12.9~99.8		[7]	
		Flag	37.6	—	[86]	
	马铃薯	MaSp1	12.9~99.8		[7]	
	紫花苜蓿	MaSp2	80~110	—	[87]	
哺乳动物	山羊	MaSp1	25~106	—	[88]	
	小鼠	MaSp1	31~66	—	[89]	
		MaSp2	31~66	—	[89]	
昆虫	家蚕	MaSp1	37~83	—	[89]	
		MaSp2	31~160	—	[81]	
		AsG1	44.4	—	[78]	
		PySp1	51.8	—	[78]	

3 重组蜘蛛丝蛋白在生物医学中的应用现状

数千年来,人类利用蜘蛛丝作为各种用途的天然材料。在古代,希腊人和罗马人使用以天然蛛丝蛋白为原料的膏药作为敷料用于战伤止血,这些膏药还被用作止痛药和退烧药^[90]。然而,由于从蜘蛛中直接提取蛛丝极度耗时,再加上蜘蛛的自相残杀特性导致大规模饲养蜘蛛难度极大,因此从自然界中收集蛛丝极不容易,无法提供大量的材料。

近年来,随着生物技术的发展,重组蜘蛛丝蛋白的产量增加且质量更为一致,一些重组生产的蜘蛛丝变种甚至已经商业化^[91]。研究人员通过大量的细胞体外试验发现,溶液状态的重组蜘蛛丝蛋白大多无细胞毒性,且重组蜘蛛丝蛋白生物材料具有良好的生物相容性、生物降解性、低过敏性和可修饰性。此外,重组蜘蛛丝蛋白还具有易加工性,可进一步开发为薄膜(Film)、微纳米球(Micro-nanosphere)、支架(Scaffold)、纤维(Fiber)、凝胶(Hydrogel)、胶囊(Capsule)和网(Net)等结构(图 2),因此其在生物医学领域备受青睐^[92-96]。

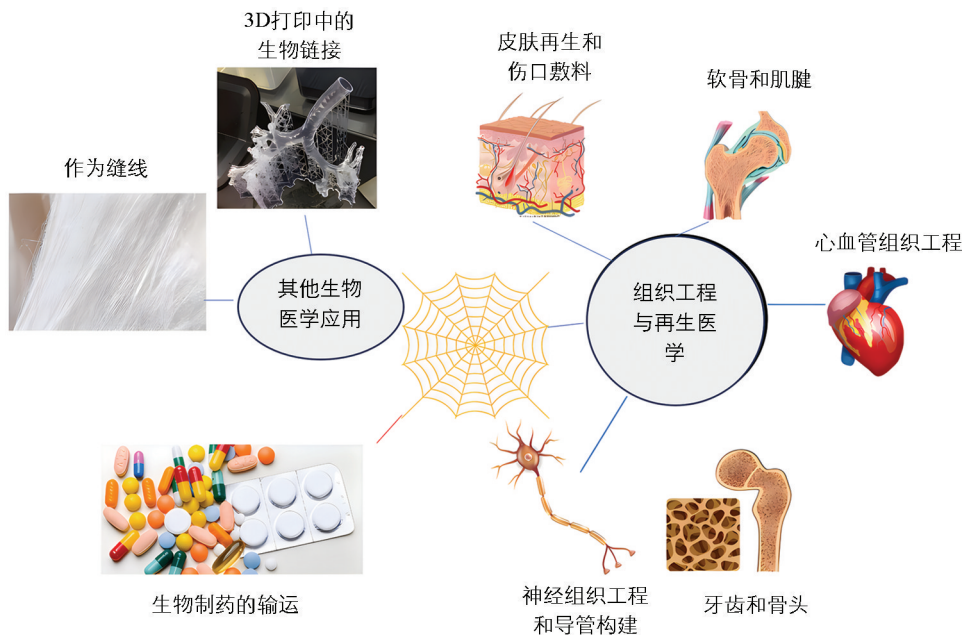


图 2 重组蜘蛛丝蛋白在生物医学中的应用^[91]

3.1 重组蜘蛛丝蛋白膜

为了制备具有多种不同形态结构的重组蜘蛛丝蛋白材料, 研究人员首先利用不同的缓冲液溶解重组蜘蛛丝蛋白, 然后将溶液置于模具中自然风干, 从而获得具有所需形态结构的产物^[97], 利用这种方式制备的重组蜘蛛丝蛋白膜具有优异的机械特性和选择渗透性。与天然蛛丝制成的蛋白膜相比, 重组蜘蛛丝蛋白膜更薄, 更适合用作医学材料^[98]。这种重组蜘蛛丝蛋白膜可用于固定和包裹酶、抗体、抗原以及药物等, 进而制成抗菌材料^[99]以及伤口敷料^[100], 并能在组织再生领域^[101]和药物递送领域^[102]发挥作用。

将蛛丝蛋白与抗菌多肽结合, 可以得到新型的抗菌材料。2011年, Gomes等^[103]将人中性粒细胞防御素-2(HNP-2)以及人中性粒细胞防御素-4(HNP-4)与络新妇蛛的重组 MaSp1 结合得到复合蛋白膜。同年, Currie等^[99]将短银结合肽对应的核苷酸整合到络新妇蛛的基因组中, 再用其表达的重组蜘蛛丝蛋白制成的膜分别去处理大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 结果表明大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的生长均受到抑制。此外, 重组蜘蛛丝蛋白膜作为植入物涂层, 可以有效减少细菌感染, 并能通过改善细胞附着和生长状态来优化植入物的性能以及与人体的整合^[104]。

在古代, 天然蛛丝被用来覆盖伤口并帮助伤口愈合, 如今对蛛丝敷料的研究也表明其具有治愈烧伤伤口的潜力^[91], 因此重组蜘蛛丝蛋白膜还可用于伤口敷料。Zhao等^[100]利用 pNSR16/PVA 静电纺丝膜为敷料治疗大鼠皮肤烧伤, 其结果表明重组蜘蛛丝蛋白膜能促进大鼠受损皮肤的愈合。Chouhan等^[105]将涂有和未涂有重组蜘蛛丝蛋白的薄膜, 分别用于兔子糖尿病伤口, 结果表明涂有重组蜘蛛丝蛋白的薄膜能加速兔子伤口的愈合。

重组蜘蛛丝蛋白膜也被广泛应用于促进组织再生的研究中。有报道表明, 重组蜘蛛丝蛋白膜的光滑面能有效将骨缺损部位与非成骨细胞隔离, 而其粗糙面则有助于促进成骨细胞的黏附和增殖^[106]。重组蜘蛛丝蛋白膜对人体血浆蛋白具有渗透性, 并促进人角质细胞的黏附和增殖, 在膜两侧接种的人角质细胞在 3 d 内可形成汇合的单层^[97]。此外, 被重组蜘蛛丝蛋白修饰过的膜蛋白也能促进组织再生。Widhe等^[107]对成纤维细胞、角质形成细胞、内皮细胞和神经胶质细胞的研究显示, 经过 RGD 修饰的重组蜘蛛丝蛋白 4RepCT 在这些细胞中的黏附性更加显著, 更能促进组织再生。随后, Schiller等^[108]研究表明, eADF4(C16)-RGD 膜与 eADF4(C16)膜相比, 含有重组蜘蛛丝蛋白的前者更能促进成

纤维细胞的黏附和分裂。

经生物工程改造的重组蜘蛛丝蛋白薄膜,最近也被开发成药物输送系统^[109]。有研究表明,由于阳离子药物优先与多阴离子的 eADF4(C16)相互作用,可通过调整 eADF4(C16)在薄膜中的比例,来调节重组蜘蛛丝蛋白膜的药物加载量^[110]。该研究还表明这些薄膜可以在几周内有效地调控药物释放,并在弹性蛋白酶和胰蛋白酶存在时加速药物释放,类似于家蚕丝素薄膜的药物释放特性,特别适合递送如氟哌啶醇(Haloperidol)之类的阳离子抗精神病药物。然而,利用重组蜘蛛丝蛋白薄膜构成的药物递送系统并不利于药物的包裹^[91],因此仍需进一步研究。

3.2 重组蜘蛛丝蛋白微纳米球

重组蜘蛛丝蛋白微纳米球的制备方法更具多样性和复杂性,包括乳液法、自组装法、微制备法、离子凝聚法、相分离法等^[111]。封装药物并进行药物递送,是重组蜘蛛丝蛋白微纳米球最为广泛的应用方式^[112]。将重组蜘蛛丝蛋白溶液与药物混合,加入甲醛、六氟异丙醇等,蛋白与药物会发生自组装,形成微米或纳米颗粒,经水或乙醇处理后性质趋于稳定,可用于后续研究^[110, 113]。Jastrzebska 等^[114]将重组蜘蛛丝蛋白微纳米球作为抗癌药物的载体,结果表明这种微纳米球具有肿瘤组织的靶向性,可延长药物的释放时间,从而增强了药物对肿瘤细胞的作用效果并降低了对正常细胞的损害。该研究还表明,重组蜘蛛丝蛋白微纳米球由于其优良的弹性和机械性能,可以确保封装药物的稳定性,而且这种材料可以调控封装药物在病灶部位的精准释放剂量。Gu 等^[115]对重组蜘蛛丝蛋白微纳米球递送疏水和亲水性药物进行了研究,结果发现重组蜘蛛丝蛋白微纳米球能够稳定包裹疏水性药物并能将其准确递送至靶细胞或靶器官,进而发挥药效。此外,由于制备的重组蜘蛛丝蛋白微纳米球带有负电荷,其可与带正电荷的亲水性药物通过静电作用相结合形成稳定的聚合物,进而将其递送至肿瘤组织发挥药效。

重组蜘蛛丝蛋白微纳米球本身还具有促进细胞生长增殖的功效。2022 年,Deptuch 等^[116]将重组蜘蛛丝蛋白微纳米球用于刺激小鼠脾细胞,其结果表明被刺激过的小鼠脾细胞增长速率更快,说明重组蜘蛛丝蛋白微纳米球有促进小鼠细胞生长的功能。2023 年,Ornithopoulou 等^[117]将重组蜘蛛丝蛋白微纳米球接种于人骨髓间充质干细胞,微纳米球能黏附在细胞表面,随后细胞随着微纳米球逐渐融合在一起,其结果表明重组蜘蛛丝蛋白微纳米球能促进人细胞的生长。

3.3 重组蜘蛛丝蛋白支架

生物支架既要能起到支撑作用还需要为细胞的黏附、分化和繁殖提供场所。最常用制备支架的方法是冻融法:将重组蜘蛛丝蛋白溶液浇铸在适当模具中,低温处理一定时间,室温解冻后并用水冲洗即得到支架材料^[118]。2024 年,Branković 等^[119]利用 NIH-3T3 细胞对重组蜘蛛丝蛋白支架进行了体外测试,结果证实 NIH-3T3 细胞可以在重组蜘蛛丝蛋白支架上轻松附着并不阻碍其生长,表明重组蜘蛛丝蛋白支架具有良好的细胞相容性。此外,利用重组蜘蛛丝蛋白制得的 3D 支架可以定制,其可以通过控制营养物质和氧气的运输,实现对细胞迁移、增殖和分化的控制^[106],能在生物体内进一步开发利用。

重组蜘蛛丝蛋白支架具有再生生物学应用的良好特性,可用于组织修复以及伤口敷料等^[120]。利用重组蜘蛛丝蛋白制得的 3D 支架力学性能良好,足以支撑起骨组织,可以用作修复骨组织的材料^[121]。重组蜘蛛丝蛋白支架还能构成人体血管,可用于血管移植^[122]或血管再生^[123]。重组蜘蛛丝蛋白还能被用于构成伤口愈合支架,促进皮肤再生^[124]。在 Chouhan 等^[125]和 Liu 等^[126]的研究中,将来自蚕的丝素蛋白加工成纳米支架,并用重组蜘蛛丝蛋白(FN-4RepCT)修饰,利用该支架覆盖大鼠模型中的三级烧伤伤口,经过 14 d 的治疗后,与利用市售的敷料贴片处理的伤口以及未经治疗的伤口相比,这种功能性支架显示出更好的促伤口愈合的功效。

3.4 其他形态的重组蜘蛛丝蛋白

重组蜘蛛丝蛋白形成的纤维在医学领域最主要的用途是用作手术缝合线^[90]。2013 年, Hennecke 等^[127]将重组蜘蛛丝蛋白纤维制备的手术缝合线与天然蛛丝制得的传统手术缝合线进行比较, 结果证明 2 种手术缝合线的抗拉强度基本相同, 重组蜘蛛丝蛋白制备的手术缝合线在 1 000 个疲劳周期内的强度并不会显著降低。此外, 重组蜘蛛丝蛋白形成的亚微米和纳米纤维也可用于再生医学, 如膜组织^[128]、神经导管^[129]、皮肤移植体和伤口敷料等^[130]。

重组蜘蛛丝蛋白水凝胶的形成过程是在再生丝蛋白溶液中加入水溶性有机物或无机物形成纳米纤维, 然后进一步浇铸成型。水凝胶不同于支架等材料, 它不存在孔径间隙, 其结构中充满了大量水分。重组蜘蛛丝蛋白形成水凝胶能够封存细胞, 随后可以在其 3D 结构中处理细胞, 进行 3D 生物打印^[96, 104]。此外, 将重组蜘蛛丝蛋白与其他生物活性化合物如海藻酸盐结合的水凝胶作为伤口敷料, 已经在促伤口愈合研究方面显示出良好的活性^[119]。

重组蜘蛛丝蛋白在甲苯中可以快速形成微米级的胶囊, 可用作药物的递送载体, 药物通过蛛丝蛋白的水解而释放, 适应于靶向药物运输^[131]。重组蜘蛛丝蛋白微针已作为特殊材料被用于胰岛素的药物递送中^[132]。2019 年, Pawar 等^[51]评估了基于重组蜘蛛丝蛋白的无纺布网应用于神经修复领域的效果, 结果表明该无纺布网的表面结构能为神经再生提供理想的附着位点, 且没有细胞毒性。

4 重组蜘蛛丝蛋白在生物医学领域的应用前景

近年来, 研究人员已经不限于探究利用不同的合成策略来生产重组蜘蛛丝蛋白, 还在努力改良和优化重组蜘蛛丝蛋白序列的方法以及与其他功能性分子联合使用的策略, 目前已经有一系列由不同宿主合成的重组蜘蛛丝蛋白被研究, 其表达得率高, 能满足探索下游材料潜在应用开发的需求。研究人员将注意力转向在重组蜘蛛丝蛋白氨基酸序列中插入一些特殊的结构序列, 从而对蛛丝蛋白分子的构象进行人工调节并赋予其新性能, 以期应用于生物医学领域。具有特异性功能的蛋白或核酸序列, 如可控细胞穿透与细胞膜失活肽(Cell Penetrating and Cell Membrane Destabilizing Peptides, CPPs)、核酸适体(Aptamer)等, 也有望应用于制成蛛丝蛋白新型材料^[133]。此外, 重组蜘蛛丝蛋白与离子化合物、功能性肽等结合后也具有特殊功能, 如增强细胞黏附性、促进细胞生长增殖、特异性识别靶位点和抗菌等^[93, 134]。

重组蜘蛛丝蛋白还被探索用于开发各种新型绿色能源转换设备及潜力巨大的生物医用材料, 如植入式器官监护仪^[16]。研究显示, 通过在重组蜘蛛丝蛋白中添加特定的信号传导和黏附基序, 可以促进干细胞的分化, 或者通过调控其生物降解性来构建人造骨等永久性植入物, 以及生产安全的唇部用药和烧伤愈合产品^[95]。由于重组蜘蛛丝蛋白具有优良的生物相容性, 它可用于开发药物递送研究和毒素测试中的器官芯片^[135], 或制造人工假体、韧带和皮肤等人造材料^[115]。结合其低免疫反应, 这些材料在细胞培养和药物递送应用领域的研究进展顺利^[136]。

重组蜘蛛丝蛋白的这些优良特性和潜在的应用价值都需要在未来进行广泛研究, 以提供合适且安全的蜘蛛丝基生物材料, 用于药物递送和再生医学等领域。然而, 重组蜘蛛丝蛋白的利用仍面临制备工艺优化和材料应用安全性能等方面的挑战, 需要更多研究来保持重组蜘蛛丝蛋白材料的稳定性和安全性^[95]。

5 结语

现有研究表明, 蛛丝蛋白种类丰富且具有优良的力学性能, 为其在医学领域的多功能应用奠定了基础, 但由于天然蛛丝蛋白无法量产, 通过人工手段合成重组蜘蛛丝蛋白成为推动其在医学领域实现大规模

应用研究的关键环节。重组蜘蛛丝蛋白可以通过化学合成和基因工程技术获得,并通过各种加工技术开发成适用于不同医学领域的材料,在伤口敷料、组织再生、药物递送等方面发挥着重要作用,且其应用范围还在不断拓展,但重组蜘蛛丝蛋白的研究仍面临工艺优化和材料应用安全性等问题,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Natural History Museum Bern [EB/OL]. World Spider Catalog Version 25.0. [2024-06-24]. <http://wsc.nmbe.ch>.
- [2] VOLLRATH F. Strength and Structure of Spiders' Silks [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 74(2): 67-83.
- [3] HTUT K Z, ALICEA-SERRANO A M, SINGLA S, et al. Correlation between Protein Secondary Structure and Mechanical Performance for the Ultra-Tough Dragline Silk of Darwin's Bark Spider [J]. *Journal of the Royal Society Interface*, 2021, 18(179): 20210320.
- [4] PRINCE J T, MCGRATH K P, DIGIROLAMO C M, et al. Construction, Cloning, and Expression of Synthetic Genes Encoding Spider Dragline Silk [J]. *Biochemistry*, 1995, 34(34): 10879-10885.
- [5] FAHNESTOCK S R, BEDZYK L A. Production of Synthetic Spider Dragline Silk Protein in *Pichia Pastoris* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47(1): 33-39.
- [6] JANSSON R, LAU C H, ISHIDA T, et al. Functionalized Silk Assembled from a Recombinant Spider Silk Fusion Protein (Z-4RepCT) Produced in the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris* [J]. *Biotechnology Journal*, 2016, 11(5): 687-699.
- [7] SCHELLER J, GÜHRS K H, GROSSE F, et al. Production of Spider Silk Proteins in Tobacco and Potato [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(6): 573-577.
- [8] PENG C A, RUSSO J, GRAVGAARD C, et al. Spider Silk-Like Proteins Derived from Transgenic *Nicotiana Tabacum* [J]. *Transgenic Research*, 2016, 25(4): 517-526.
- [9] LAZARIS A, ARCIDIACONO S, HUANG Y, et al. Spider Silk Fibers Spun from Soluble Recombinant Silk Produced in Mammalian Cells [J]. *Science*, 2002, 295(5554): 472-476.
- [10] WILLIAMS D. Sows' Ears, Silk Purses and Goats' Milk: New Production Methods and Medical Applications for Silk [J]. *Medical Device Technology*, 2003, 14(5): 9-11.
- [11] HEIDEBRECHT A, SCHEIBEL T. Recombinant Production of Spider Silk Proteins [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2013, 82: 115-153.
- [12] MIAO Y G, ZHANG Y S, NAKAGAKI K, et al. Expression of Spider Flagelliform Silk Protein in *Bombyx Mori* Cell Line by a Novel Bac-to-Bac/BmNPV Baculovirus Expression System [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(2): 192-199.
- [13] ALTMANN F, STAUDACHER E, WILSON I B H, et al. Insect Cells as Hosts for the Expression of Recombinant Glycoproteins [J]. *Glycoconjugate Journal*, 1999, 16(2): 109-123.
- [14] MI J P, ZHOU Y Z, MA S Y, et al. High-Strength and Ultra-Tough Whole Spider Silk Fibers Spun from Transgenic Silkworms [J]. *Matter*, 2023, 6(10): 3661-3683.
- [15] ZHANG Y S, HU J H, MIAO Y G, et al. Expression of EGFP-Spider Dragline Silk Fusion Protein in BmN Cells and Larvae of Silkworm Showed the Solubility is Primary Limit for Dragline Proteins Yield [J]. *Molecular Biology Reports*, 2008, 35(3): 329-335.
- [16] DE C BITTEN COURT D M, OLIVEIRA P, MICHALCZECHEN-LACERDA V A, et al. Bioengineering of Spider Silks for the Production of Biomedical Materials [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022(10): 958486.
- [17] MI J P, LI X, NIU S W, et al. High-Strength and Ultra-Tough Supramolecular Polyamide Spider Silk Fibers Assembled via Specific Covalent and Reversible Hydrogen Bonds [J]. *Acta Biomaterialia*, 2024, 176: 190-200.
- [18] SCHACHT K, SCHEIBEL T. Processing of Recombinant Spider Silk Proteins into Tailor-Made Materials for Biomaterials Applications [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 29: 62-69.

- [19] BABB P L, LAHENS N F, CORREA-GARHWAL S M, et al. The *Nephila Clavipes* Genome Highlights the Diversity of Spider Silk Genes and Their Complex Expression [J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(6): 895-903.
- [20] RISING A, JOHANSSON J. Toward Spinning Artificial Spider Silk [J]. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(5): 309-315.
- [21] HAYASHI C Y, SHIPLEY N H, LEWIS R V. Hypotheses that Correlate the Sequence, Structure, and Mechanical Properties of Spider Silk Proteins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1999, 24(2-3): 271-275.
- [22] XU M, LEWIS R V. Structure of a Protein Superfiber: Spider Dragline Silk [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, 87(18): 7120-7124.
- [23] HINMAN M B, LEWIS R V. Isolation of a Clone Encoding a Second Dragline Silk Fibroin. *Nephila Clavipes* Dragline Silk is a Two-Protein Fiber [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(27): 19320-19324.
- [24] BROOKS A E, STEINKRAUS H B, NELSON S R, et al. An Investigation of the Divergence of Major Ampullate Silk Fibers from *Nephila Clavipes* and *Argiope Aurantia* [J]. *Biomacromolecules*, 2005, 6(6): 3095-3099.
- [25] DOBLHOFER E, HEIDEBRECHT A, SCHEIBEL T. To Spin or Not to Spin: Spider Silk Fibers and More [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(22): 9361-9380.
- [26] LI J T, LI S T, HUANG J Y, et al. Spider Silk-Inspired Artificial Fibers [J]. *Advanced Science*, 2022, 9(5): 2103965.
- [27] HAYASHI C Y, BLACKLEDGE T A, LEWIS R V. Molecular and Mechanical Characterization of Aciniform Silk: Uniformity of Iterated Sequence Modules in a Novel Member of the Spider Silk Fibroin Gene Family [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 21(10): 1950-1959.
- [28] SPONNER A, VATER W, ROMMERSKIRCH W, et al. The Conserved C-Termini Contribute to the Properties of Spider Silk Fibroins [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(2): 897-902.
- [29] GUERETTE P A, GINZINGER D G, WEBER B H F, et al. Silk Properties Determined by Gland-Specific Expression of a Spider Fibroin Gene Family [J]. *Science*, 1996, 272(5258): 112-115.
- [30] SAVAGE K N, GOSLINE J M. The Effect of Proline on the Network Structure of Major Ampullate Silks as Inferred from Their Mechanical and Optical Properties [J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(12): 1937-1947.
- [31] EISOLDT L, SMITH A, SCHEIBEL T. Decoding the Secrets of Spider Silk [J]. *Materials Today*, 2011, 14(3): 80-86.
- [32] KONO N, NAKAMURA H, OHTOSHI R, et al. Orb-Weaving Spider *Araneus Ventricosus* Genome Elucidates the Spidroin Gene Catalogue [J]. *Scientific Reports*, 2019(9): 8380.
- [33] KONO N, NAKAMURA H, MORI M, et al. Multicomponent Nature Underlies the Extraordinary Mechanical Properties of Spider Dragline Silk [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(31): 1-10.
- [34] GARB J E, HANEY R A, SCHWAGER E E, et al. The Transcriptome of Darwin's Bark Spider Silk Glands Predicts Proteins Contributing to Dragline Silk Toughness [J]. *Communications Biology*, 2019(2): 275.
- [35] MALAY A D, CRAIG H C, CHEN J M, et al. Complexity of Spider Dragline Silk [J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(5): 1827-1840.
- [36] BABB P L, GREGORIC M, LAHENS N F, et al. Characterization of the Genome and Silk-Gland Transcriptomes of Darwin's Bark Spider (*Caerostris darwini*) [J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0268660.
- [37] TIAN L Y, MENG Q, LIN Y. Expression and Characterization of Chimeric Spidroins from Flagelliform-Aciniform Repetitive Modules [J]. *Biopolymers*, 2020, 111(12): e23404.
- [38] LI J X, YANG G Z, LI X, et al. Nanoassembly of Spider Silk Protein Mediated by Intrinsically Disordered Regions [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 271: 132438.
- [39] STELLWAGEN S D, BURNS M. Repeat Variation Resolves a Complete Aggregate Silk Sequence of *Bolas* Spider *Mastophora Phrynosoma* [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2021, 61(4): 1450-1458.

- [40] COLLIN M A, CLARKE T H, AYOUB N A, et al. Evidence from Multiple Species that Spider Silk Glue Component ASG2 is a Spidroin [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 21589.
- [41] WEN R, WANG K K, YANG D, et al. The Novel Aciniform Silk Protein (AcSp2-V2) Reveals the Unique Repetitive Domain with High Acid and Thermal Stability and Self-Assembly Capability [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 202: 91-101.
- [42] HU X Y, LAWRENCE B, KOHLER K, et al. Araneoid Egg Case Silk: A Fibroin with Novel Ensemble Repeat Units from the Black Widow Spider, *Latrodectus Hesperus* [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(30): 10020-10027.
- [43] SHANAFELT M, LARRACAS C, DYRNESS S, et al. Egg Case Protein 3: A Constituent of Black Widow Spider Tubuliform Silk [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 5088.
- [44] WEN R, WANG K K, MENG Q. Two Novel Tubuliform Silk Gene Sequences from *Araneus ventricosus* Provide Evidence for Multiple Loci in Genome [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 160: 806-813.
- [45] BLASINGAME E, TUTON-BLASINGAME T, LARKIN L, et al. Pyriform Spidroin 1, a Novel Member of the Silk Gene Family that Anchors Dragline Silk Fibers in Attachment Discs of the Black Widow Spider, *Latrodectus hesperus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(42): 29097-29108.
- [46] GEURTS P, ZHAO L, HSIA Y, et al. Synthetic Spider Silk Fibers Spun from Pyriform Spidroin 2, a Glue Silk Protein Discovered in Orb-Weaving Spider Attachment Discs [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(12): 3495-3503.
- [47] HAYASHI C Y, LEWIS R V. Evidence from Flagelliform Silk cDNA for the Structural Basis of Elasticity and Modular Nature of Spider Silks [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1998, 275(5): 773-784.
- [48] DOS SANTOS-PINTO J R A, ARCURI H A, ESTEVES F G, et al. Spider Silk Proteome Provides Insight into the Structural Characterization of *Nephila clavipes* Flagelliform Spidroin [J]. *Scientific Reports*, 2018(8): 14674.
- [49] LI X, QI X M, CAI Y M, et al. Customized Flagelliform Spidroins Form Spider Silk-Like Fibers at pH 8.0 with Outstanding Tensile Strength [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2022, 8(1): 119-127.
- [50] JORGE I, RUIZ V, LAVADO-GARCÍA J, et al. Expression of Spidroin Proteins in the Silk Glands of Golden Orb-Weaver Spiders [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2022, 338(4): 241-253.
- [51] PAWAR K, WELZEL G, HAYNL C, et al. Recombinant Spider Silk and Collagen-Based Nerve Guidance Conduits Support Neuronal Cell Differentiation and Functionality in Vitro [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2019, 2(11): 4872-4880.
- [52] CHEN G F, LIU X Q, ZHANG Y L, et al. Full-Length Minor Ampullate Spidroin Gene Sequence [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52293.
- [53] COLGIN M A, LEWIS R V. SpiderMinor Ampullate Silk Proteins Contain New Repetitive Sequences and Highly Conserved Non-Silk-Like "Spacer Regions" [J]. *Protein Science*, 1998, 7(3): 667-672.
- [54] WIDMAIER D M, TULLMAN-ERCEK D, MIRSKY E A, et al. Engineering the Salmonella Type III Secretion System to Export Spider Silk Monomers [J]. *Molecular Systems Biology*, 2009, 5(1): 309.
- [55] TIAN M Z, LEWIS R V. Molecular Characterization and Evolutionary Study of Spider Tubuliform (Eggcase) Silk Protein [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(22): 8006-8012.
- [56] HU X Y, KOHLER K, FALICK A M, et al. Spider Egg Case Core Fibers: Trimeric Complexes Assembled from TuSp1, ECP-1, and ECP-2 [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(11): 3506-3516.
- [57] BAO R Y, ZHANG H Y, TANG Y F. Biomimetic Synthesis of Natural Products: A Journey to Learn, to Mimic, and to Be Better [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2021, 54(19): 3720-3733.
- [58] EOM K H, BAEK S, KIM I. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Random Copolymerization of N-Carboxyanhydrides of α -Amino Acids [J]. *Polymers*, 2021, 13(21): 3674.
- [59] FUKUSHIMA Y. Secondary Structural Analysis in the Solid State for Analogous Sequential Polypeptides of Glycine-Rich Sequence of Spider Dragline Silk [J]. *Polymer Bulletin*, 2000, 45(3): 237-244.

- [60] DOU Y Y, WANG Z P, HE W Q, et al. Artificial Spider Silk from Ion-Doped and Twisted Core-Sheath Hydrogel Fibres [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5293.
- [61] HE W Q, WANG M L, MEI G K, et al. Establishing Superfine Nanofibrils for Robust Polyelectrolyte Artificial Spider Silk and Powerful Artificial Muscles [J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 3485.
- [62] LEWIS R V, HINMAN M, KOTHAKOTA S, et al. Expression and Purification of a Spider Silk Protein: A New Strategy for Producing Repetitive Proteins [J]. *Protein Expression and Purification*, 1996, 7(4): 400-406.
- [63] FAHNESTOCK S R, IRWIN S L. Synthetic Spider Dragline Silk Proteins and Their Production in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 47(1): 23-32.
- [64] XIA X X, QIAN Z G, KI C S, et al. Native-Sized Recombinant Spider Silk Protein Produced in Metabolically Engineered *Escherichia Coli* Results in a Strong Fiber [J]. *PNAS*, 2010, 107(32): 14059-14063.
- [65] FOONG C P, HIGUCHI-TAKEUCHI M, MALAY A D, et al. A Marine Photosynthetic Microbial Cell Factory as a Platform for Spider Silk Production [J]. *Communications Biology*, 2020(3): 357.
- [66] JIN Q, PAN F, HU C F, et al. Secretory Production of Spider Silk Proteins in Metabolically Engineered *Corynebacterium glutamicum* for Spinning into Tough Fibers [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 70: 102-114.
- [67] HAUPTMANN V, WEICHERT N, MENZEL M, et al. Native-Sized Spider Silk Proteins Synthesized in Planta via Intein-Based Multimerization [J]. *Transgenic Research*, 2013, 22(2): 369-377.
- [68] BROOKS A E, STRICKER S M, JOSHI S B, et al. Properties of Synthetic Spider Silk Fibers Based on *Argiope Aurantia* MaSp2 [J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(6): 1506-1510.
- [69] SCHILLBERG S, RAVEN N, SPIEGEL H, et al. Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019(10): 720.
- [70] XU H T, FAN B L, YU S Y, et al. Construct Synthetic Gene Encoding Artificial Spider Dragline Silk Protein and Its Expression in Milk of Transgenic Mice [J]. *Animal Biotechnology*, 2007, 18(1): 1-12.
- [71] LI H, CHEN S N, PIAO S H, et al. Production of Artificial Synthetic Spidroin Gene 4S-Transgenic Cloned Sheep Embryos Using Somatic Cell Nuclear Transfer [J]. *Animal Biotechnology*, 2021, 32(5): 616-626.
- [72] ANDERSSON M, JOHANSSON J, RISING A. Silk Spinning in Silkworms and Spiders [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8): 1290.
- [73] FU C J, SHAO Z Z, FRITZ V. Animal Silks: Their Structures, Properties and Artificial Production [J]. *Chemical Communications*, 2009(43): 6515-6529.
- [74] ZABELINA V, KLYMENKO V, TAMURA T, et al. Genome Engineering and Parthenocloning in the Silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Journal of Biosciences*, 2015, 40(3): 645-655.
- [75] WEN H X, LAN X Q, ZHANG Y S, et al. Transgenic Silkworms (*Bombyx mori*) Produce Recombinant Spider Dragline Silk in Cocoons [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 1815-1821.
- [76] KUWANA Y, SEZUTSU H, NAKAJIMA K I, et al. High-Toughness Silk Produced by a Transgenic Silkworm Expressing Spider (*Araneus ventricosus*) Dragline Silk Protein [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105325.
- [77] YOU Z Y, YE X G, YE L P, et al. Extraordinary Mechanical Properties of Composite Silk through Hereditary Transgenic Silkworm Expressing Recombinant Major Ampullate Spidroin [J]. *Scientific Reports*, 2018(8): 15956.
- [78] TANG X L, YE X G, WANG X X, et al. High Mechanical Property Silk Produced by Transgenic Silkworms Expressing the Spidroins PySp1 and ASG1 [J]. *Scientific Reports*, 2021(11): 20980.
- [79] XU J, DONG Q L, YU Y, et al. Mass Spider Silk Production through Targeted Gene Replacement in *Bombyx mori* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(35): 8757-8762.
- [80] ZHANG X L, XIA L J, DAY B A, et al. CRISPR/Cas9 Initiated Transgenic Silkworms as a Natural Spinner of Spider Silk [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(6): 2252-2264.
- [81] YU Y, CHEN K, WANG J X, et al. Custom-Designed, Mass Silk Production in Genetically Engineered Silkworms [J]. *PNAS Nexus*, 2024, 3(4): 128.

- [82] BOWEN C, DAI B, SARGENT C J, et al. Recombinant Spidroins Fully Replicate Primary Mechanical Properties of Natural Spider Silk [J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(9): 3853-3860.
- [83] BHATTACHARYYA G, OLIVEIRA P, KRISHNAJI S T, et al. Large Scale Production of Synthetic Spider Silk Proteins in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2021, 183: 105839.
- [84] PODDAR H, BREITLING R, TAKANO E. Towards Engineering and Production of Artificial Spider Silk Using Tools of Synthetic Biology [J]. *Engineering Biology*, 2020, 4(1): 1-6.
- [85] WERTEN M W T, EGGINK G, COHEN STUART M A, et al. Production of Protein-Based Polymers in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(5): 642-666.
- [86] WEICHERT N, HAUPTMANN V, HELMOLD C, et al. Seed-Specific Expression of Spider Silk Protein Multimers Causes Long-Term Stability [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7): 6.
- [87] HUGIE M R. Expression Systems for Synthetic Spider Silk Protein Production [D]. Logan: Utah State University, 2019.
- [88] DECKER R E. Production and Biocompatibility of Spider Silk Proteins in Goat Milk [D]. Logan: Utah State University, 2018.
- [89] XU M, JIANG Y K, PRADHAN S, et al. Use of Silk Proteins to Form Organic, Flexible, Degradable Biosensors for Metabolite Monitoring [J]. *Frontiers in Materials*, 2019(6): 331.
- [90] SALEHI S, KOECK K, SCHEIBEL T. Spider Silk for Tissue Engineering Applications [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 737.
- [91] BAKHSHANDEH B, NATEGHI S S, GAZANI M M, et al. A Review on Advances in the Applications of Spider Silk in Biomedical Issues [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, 192: 258-271.
- [92] KUHBIER J W, REIMERS K, KASPER C, et al. First Investigation of Spider Silk as a Braided Microsurgical Suture [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials*, 2011, 97(2): 381-387.
- [93] SPIEB K, WOHLRAB S, SCHEIBEL T. Structural Characterization and Functionalization of Engineered Spider Silk Films [J]. *Soft Matter*, 2010, 6(17): 4168-4174.
- [94] SLOTTA U, RAMMENSEE S, GORB S, et al. An Engineered Spider Silk Protein Forms Microspheres [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(24): 4592-4594.
- [95] LEAL-EGAÑA A, LANG G, MAUERER C, et al. Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein [J]. *Advanced Engineering Materials*, 2012, 14(3): B67-B75.
- [96] AIGNER T B, DESIMONE E, SCHEIBEL T. Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(19): 1704636.
- [97] GUSTAFSSON L, TASIOPOULOS C P, JANSSON R, et al. Recombinant Spider Silk Forms Tough and Elastic Nanomembranes that are Protein-Permeable and Support Cell Attachment and Growth [J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(40): 2002982.
- [98] TASIOPOULOS C P, GUSTAFSSON L, VAN DER WIJNGAART W, et al. Fibrillar Nanomembranes of Recombinant Spider Silk Protein Support Cell Co-Culture in an in Vitro Blood Vessel Wall Model [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2021, 7(7): 3332-3339.
- [99] CURRIE H A, DESCHAUME O, NAIK R R, et al. Genetically Engineered Chimeric Silk-Silver Binding Proteins [J]. *Advanced Functional Materials*, 2011, 21(15): 2889-2895.
- [100] ZHAO L, CHEN D L, YAO Q H, et al. Studies on the Use of Recombinant Spider Silk Protein/Polyvinyl Alcohol Electrospinning Membrane as Wound Dressing [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 8103-8114.
- [101] JONES J A, HARRIS T I, TUCKER C L, et al. More than Just Fibers: An Aqueous Method for the Production of Innovative Recombinant Spider Silk Protein Materials [J]. *Biomacromolecules*, 2015, 16(4): 1418-1425.
- [102] HOLLAND C, NUMATA K, RNJAK-KOVACINA J, et al. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(1): 1800465.
- [103] GOMES S C, LEONOR I B, MANO J F, et al. Antimicrobial Functionalized Genetically Engineered Spider Silk [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(18): 4255-4266.
- [104] TROSSMANN V T, SCHEIBEL T. Design of Recombinant Spider Silk Proteins for Cell Type Specific Binding [J].

- Advanced Healthcare Materials, 2023, 12(9): 2202660.
- [105] CHOUHAN D, DAS P, THATIKONDA N, et al. Silkworm Silk Matrices Coated with Functionalized Spider Silk Accelerate Healing of Diabetic Wounds [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019, 5(7): 3537-3548.
- [106] EL-SHERBINY I M, YACOUB M H. Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: Progress and Challenges [J]. Global Cardiology Science & Practice, 2013, 2013(3): 316-342.
- [107] WIDHE M, JOHANSSON U, HILLERDAHL C O, et al. Recombinant Spider Silk with Cell Binding Motifs for Specific Adherence of Cells [J]. Biomaterials, 2013, 34(33): 8223-8234.
- [108] SCHILLER T, SCHEIBEL T. Bioinspired and Biomimetic Protein-Based Fibers and Their Applications [J]. Communications Materials, 2024(5): 56.
- [109] TUCKER C L, JONES J A, BRINGHURST H N, et al. Mechanical and Physical Properties of Recombinant Spider Silk Films Using Organic and Aqueous Solvents [J]. Biomacromolecules, 2014, 15(8): 3158-3170.
- [110] HARDY J G, LEAL-EGAÑA A, SCHEIBEL T R. Engineered Spider Silk Protein-Based Composites for Drug Delivery [J]. Macromolecular Bioscience, 2013, 13(10): 1431-1437.
- [111] YOSHIMIZU H, ASAKURA T. Preparation and Characterization of Silk Fibroin Powder and Its Application to Enzyme Immobilization [J]. Journal of Applied Polymer Science, 1990, 40(1-2): 127-134.
- [112] HARDY J G, SCHEIBEL T R. Production and Processing of Spider Silk Proteins [J]. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2009, 47(16): 3957-3963.
- [113] LAMMEL A, SCHWAB M, HOFER M, et al. Recombinant Spider Silk Particles as Drug Delivery Vehicles [J]. Biomaterials, 2011, 32(8): 2233-2240.
- [114] JASTRZEBSKA K, KUCHARCZYK K, FLORCZAK A, et al. Silk as an Innovative Biomaterial for Cancer Therapy [J]. Reports of Practical Oncology and Radiotherapy, 2015, 20(2): 87-98.
- [115] GU Y Q, YU L Z, MOU J G, et al. Mechanical Properties and Application Analysis of Spider Silk Bionic Material [J]. e-Polymers, 2020, 20(1): 443-457.
- [116] DEPTUCH T, PENDERECKA K, KACZMAREK M, et al. In Vivo Study of the Immune Response to Bioengineered Spider Silk Spheres [J]. Scientific Reports, 2022, 12: 13480.
- [117] ORNITHOPOULOU E, ÅSTRAND C, GUSTAFSSON L, et al. Self-Assembly of RGD-Functionalized Recombinant Spider Silk Protein into Microspheres in Physiological Buffer and in the Presence of Hyaluronic Acid [J]. ACS Applied Bio Materials, 2023, 6(9): 3696-3705.
- [118] LU H X, HOSHIBA T, KAWAZOE N, et al. Comparison of Decellularization Techniques for Preparation of Extracellular Matrix Scaffolds Derived from Three-Dimensional Cell Culture [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2012, 100(9): 2507-2516.
- [119] BRANKOVIĆ M, ZIVIC F, GRUJOVIC N, et al. Review of Spider Silk Applications in Biomedical and Tissue Engineering [J]. Biomimetics, 2024, 9(3): 169.
- [120] LENTZ S, TROSSMANN V T, SCHEIBEL T. Selective Topography Directed Cell Adhesion on Spider Silk Surfaces [J]. Advanced Materials Interfaces, 2023, 10(5): 2201936.
- [121] AGAPOV I I, PUSTOVALOVA O L, MOISENOVICH M M, et al. Three-Dimensional Scaffold Made from Recombinant Spider Silk Protein for Tissue Engineering [J]. Doklady Biochemistry and Biophysics, 2009, 426(1): 127-130.
- [122] DING Z Z, WANG Y Y, CHEN F F, et al. Biomimetic Vascular Grafts with Circumferentially and Axially Oriented Microporous Structures for Native Blood Vessel Regeneration [J]. Advanced Functional Materials, 2024, 34(1): 2308888.
- [123] SOFFER L, WANG X Y, ZHANG X H, et al. Silk-Based Electrospun Tubular Scaffolds for Tissue-Engineered Vascular Grafts [J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2008, 19(5): 653-664.
- [124] HUMENIK M, PAWAR K, SCHEIBEL T. Nanostructured, Self-Assembled Spider Silk Materials for Biomedical Applications [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1174: 187-221.
- [125] CHOUHAN D, THATIKONDA N, NILEBÄCK L, et al. Recombinant Spider Silk Functionalized Silkworm Silk

- Matrices as Potential Bioactive Wound Dressings and Skin Grafts [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(28): 23560-23572.
- [126] LIU X F, MILLER A L II, PARK S, et al. Two-Dimensional Black Phosphorus and Graphene Oxide Nanosheets Synergistically Enhance Cell Proliferation and Osteogenesis on 3D Printed Scaffolds [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(26): 23558-23572.
- [127] HENNECKE K, REDEKER J, KUHBIER J W, et al. Bundles of Spider Silk, Braided into Sutures, Resist Basic Cyclic Tests: Potential Use for Flexor Tendon Repair [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61100.
- [128] VASITA R, KATTI D S. Nanofibers and Their Applications in Tissue Engineering [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2006, 1(1): 15-30.
- [129] FUKUNISHI T, BEST C A, SUGIURA T, et al. Preclinical Study of Patient-Specific Cell-Free Nanofiber Tissue-Engineered Vascular Grafts Using 3-Dimensional Printing in a Sheep Model [J]. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2017, 153(4): 924-932.
- [130] SEIDLITS S K, LEE J Y, SCHMIDT C E. Nanostructured Scaffolds for Neural Applications [J]. *Nanomedicine*, 2008, 3(2): 183-199.
- [131] HERMANSON K D, HUEMMERICH D, SCHEIBEL T, et al. Engineered Microcapsules Fabricated from Reconstituted Spider Silk [J]. *Advanced Materials*, 2007, 19(14): 1810-1815.
- [132] QI Z Z, TAO X S, TAN G, et al. Electro-Responsive Silk Fibroin Microneedles for Controlled Release of Insulin [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 242: 124684.
- [133] NUMATA K, KAPLAN D L. Silk-Based Gene Carriers with Cell Membrane Destabilizing Peptides [J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(11): 3189-3195.
- [134] WOHLRAB S, MÜLLER S, SCHMIDT A, et al. Cell Adhesion and Proliferation on RGD-Modified Recombinant Spider Silk Proteins [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(28): 6650-6659.
- [135] KONWARH R, GUPTA P, MANDAL B B. Silk-Microfluidics for Advanced Biotechnological Applications; A Progressive Review [J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(5): 845-858.
- [136] HUMENIK M, SMITH A M, SCHEIBEL T. Recombinant Spider Silks—Biopolymers with Potential for Future Applications [J]. *Polymers*, 2011, 3(1): 640-661.

责任编辑 周仁惠