

文章编号: 1008-9357(2026)02-0117-11

DOI: 10.14133/j.cnki.1008-9357.20260203002

原位成胶型丝素蛋白基脊髓仿生水凝胶的构筑

耿敬敬, 赵伟焜, 牛欠欠, 姚响, 张耀鹏

(东华大学材料科学与工程学院, 先进纤维材料全国重点实验室, 上海 201620)

摘要: 为获得原位凝胶时间适中、模量低且生物相容性佳的脊髓修复用水凝胶支架, 以辣根过氧化物酶温和介导交联的丝素蛋白(SF)基水凝胶为基体, 进一步利用酪胺(Tyr)接枝改性后的透明质酸(HA-Tyr)对SF基复合水凝胶进行改性和调控。综合考察了HA-Tyr含量对SF基复合水凝胶的凝胶时间、压缩模量及细胞相容性的影响。结果表明: HA-Tyr含量升高会缩短复合水凝胶的凝胶时间, 提升水凝胶的压缩模量。当SF与HA-Tyr在水凝胶反应体系中体积比为8:2时(生成的水凝胶标记为S8H2)为最优配方, 凝胶时间满足手术植入窗口时间需求, 且水凝胶模量特征亦可达到较好的脊髓组织仿生需求。在水凝胶表面培养的小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3)的增殖能力随着水凝胶中HA-Tyr含量的提升大体呈现出先增加后减少的趋势, S8H2水凝胶表面培养细胞的活力最高。综合凝胶时间、压缩模量、细胞相容性等特征, S8H2水凝胶展现出更优的综合性能, 在脊髓损伤修复中应用潜力较大。

关键词: 丝素蛋白基水凝胶; 原位成胶; 模量仿生; 细胞增殖; 脊髓修复

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

Fabrication of *In situ*-Gelling Silk Fibroin-Based Biomimetic Hydrogel for Spinal Cord Repair

GENG Jingjing, ZHAO Weikun, NIU Qianqian, YAO Xiang, ZHANG Yaopeng

(State Key Laboratory of Advanced Fiber Materials, College of Materials Science and Engineering,
Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: To develop a hydrogel scaffold for spinal cord repair with appropriate *in situ* gelation time, low modulus, and good biocompatibility, a horseradish peroxidase (HRP)-mediated, mildly crosslinked silk fibroin (SF)-based hydrogel was used as the matrix material. This SF-based composite hydrogel was further modified and tuned by incorporating tyramine (Tyr)-grafted hyaluronic acid (HA-Tyr). The effects of different HA-Tyr contents on the gelation time, compressive modulus, and cytocompatibility of SF-based composite hydrogels were investigated. Results indicated that higher HA-Tyr content led to shorter gelation time and higher compressive modulus of the composite hydrogels. The S8H2 hydrogel (volume ratio of SF to HA-Tyr is 8:2) exhibited a gelation time highly consistent with the surgical implantation window, and its modulus also met

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2232024 D-01); 国家自然科学基金面上项目(52273125); 东华大学学科创新领域培育项目(xkcx-202414)

作者简介: 耿敬敬(2000—), 女, 安徽淮北人, 硕士生, 主要研究方向为丝素蛋白生物医用水凝胶。E-mail: 2230543@mail.dhu.edu.cn

通信联系人: 姚响, E-mail: yaoxiang@dhu.edu.cn; 张耀鹏, E-mail: zyp@dhu.edu.cn

引用格式: 耿敬敬, 赵伟焜, 牛欠欠, 姚响, 张耀鹏. 原位成胶型丝素蛋白基脊髓仿生水凝胶的构筑[J]. 功能高分子学报, 2026, 39(2): 117-127.

Citation: GENG Jingjing, ZHAO Weikun, NIU Qianqian, YAO Xiang, ZHANG Yaopeng. Fabrication of *In situ*-Gelling Silk Fibroin-Based Biomimetic Hydrogel for Spinal Cord Repair [J]. Journal of Functional Polymers, 2026, 39(2): 117-127.

the biomimetic requirements for spinal cord tissue. The proliferation capacity of mouse embryonic fibroblasts (NIH3T3) cultured on the hydrogel surfaces generally displayed an initial increase followed by a decrease with rising HA-Tyr content, with cells on the S8H2 hydrogel showing the highest viability. Considering the gelation time, compressive modulus, and cytocompatibility collectively, the S8H2 hydrogel demonstrated superior overall performance, showing promising potential for effective application in spinal cord injury repair.

Key words: silk fibroin-based hydrogel; *in situ* gelation; modulus biomimicry; cell proliferation; spinal cord repair

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是一类严重损害中枢神经系统的创伤性病症,该损伤造成患者损伤平面以下出现永久性运动、感觉和自主神经障碍。目前临床诊疗中对其依旧缺乏安全有效的治疗手段^[1]。近年来,随着生物材料和组织工程技术不断进步,脊髓损伤修复领域迎来新型治疗方案^[2,3]。神经组织工程支架能够为受损脊髓组织提供力学支撑,引导神经细胞生长和缺损修复,防止瘢痕组织侵袭,改善损伤处微环境,但仍面临复杂的生物学和工程学挑战,如脊髓组织模量较低且其损伤形状大都不规则,传统支架难以同时实现低模量仿生和不规则缺损形状的匹配填充。体温温敏性原位成胶型水凝胶可在液态下通过注射器精确注入损伤区域,在体温环境下快速凝胶化,进而实现与复杂形状损伤部位的紧密贴合和匹配填充,相比传统支架极大提高了支架与损伤组织的适配性^[4]。

原位成胶型水凝胶的凝胶时间与模量需与实际应用场景相匹配,实现两者的合理平衡,确保材料植入目标部位后可快速固化成型,并与周围组织具备良好的力学适配性。在脊髓损伤修复领域,脊髓横断后缺血缺氧会在10 min内启动神经元不可逆损伤,手术过程中通常将减压、缺损处理的核心操作控制在5~15 min内,以最大程度缩短脊髓缺血暴露时间、降低损伤风险^[5,6]。如Zweckberger等^[7]在脊髓损伤修复研究中提出建立高效、微创的操作流程,并将核心操作时长控制在约13 min。此外,天然脊髓组织的模量仅0.1~3 kPa^[8],在不同种属之间略有差异。因此构筑凝胶窗口时间符合实际手术操作窗口(5~15 min)需求的低模量原位成胶型水凝胶具有重要应用前景。近年来,研究者在脊髓修复用原位成胶型水凝胶领域开展了许多尝试。李方园课题组^[9]开发了基于壳聚糖的温敏水凝胶,结合纳米酶清除活性氧及间充质干细胞移植,在生物体内取得较好的修复效果。该水凝胶具有较低的模量((3.8 ± 0.5) kPa),但其不足之处在于凝胶时间仅能在1~5 min内微调,难以适配复杂的SCI手术场景。门可课题组^[10]提出可注射和光固化的脂质纳米粒-明胶水凝胶用于脊髓损伤的治疗,该支架可促进神经元轴突再生和髓鞘再生。由于其交联需外部光源,而光照穿透深度(通常小于5 mm)有限,因此在深层脊髓损伤灶中成胶受到一些限制。综上,制备兼具适宜的凝胶窗口时间、适配的力学性能与脊髓组织、良好的生物相容性的原位成胶型水凝胶非常必要。

丝素蛋白(Silk Fibroin, SF)是从蚕丝中提取的天然蛋白,具有优异可调的力学性能、良好的生物相容性、生物可降解性等优势^[11-13],相比于明胶、海藻酸钠、壳聚糖等生物材料,丝素蛋白的免疫原性更低^[14],降解产物氨基酸安全无毒,在组织修复^[15]、药物控释^[16]、神经接口^[17]、类器官构建及细胞培养^[18,19]方面均具有较为广阔的应用前景。

SF水凝胶的交联策略主要涵盖物理交联法和化学交联法。这两种方法应用广泛,其中物理交联法主要是通过通过对SF溶液施加物理刺激(如温度驱动、pH调节或超声诱导等)缓慢形成分子间氢键,其相关机理不适合在体内进行原位成型,且力学性能相对较弱^[12,20]。在化学交联法中,紫外光交联^[21]与小分子试剂交联等具有一定毒性,不适用于制备细胞包覆与体内植入的水凝胶材料。相较而言,基于辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)介导的温和化学交联的SF基水凝胶与生物体细胞/组织的生物相容性已被充分论证^[19,22,23],其构筑可注射原位成胶型水凝胶基体具有明显优势。然而,单独SF原料基于HRP交联的交联速率较慢、凝胶时间(通常需要40 min以上)过长,需要进一步对其进行改性或引入新的组分,以满足手术操作窗口时间需求。何留民课题组^[24]提出功能自组装多肽与SF协同组装,构建双网络杂化水凝胶用于脊髓损伤修复,其材料模量随相互作用时间动态变化,即5 min形成软凝胶、30 min硬化、60 min刚性化,较难实现精准调控且最终模量显著偏高。张克勤课题组^[25]通过水滑石纳米材料与丝素蛋白经氢键诱导自组装,制备可注射水凝胶用于脊髓损伤修复。然而,其中的水滑石与载体材料SF仅靠弱相互作用—氢键结合,而无化学键锚定,易在生物体内流失,4周内模量衰减约30%。

透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)是一种存在于人体结缔组织、皮肤、关节滑液等部位的天然糖胺聚糖,其

化学修饰便捷,经酪胺(Tyr)修饰的透明质酸(HA-Tyr)在HRP介导下可在不到1 min内实现凝胶化^[26]。因此,在SF中引入同样具有优秀生物相容性的HA-Tyr组分有望解决单独SF原位凝胶时间过长的问题,同时可达到有效调节复合凝胶模量的目的。基于此,本文以SF为基体,引入HA-Tyr,通过调控复合体系中HA-Tyr的含量,以调节复合水凝胶的原位成胶窗口时长,并使其凝胶模量与脊髓组织接近。随后开展细胞培养以验证其细胞相容性。最终制备了凝胶时间符合手术植入窗口时间需求,模量可满足较好的脊髓仿生需求,同时具有优异细胞相容性的原位成胶型SF基水凝胶。相关研究为进一步优化制备原位成胶型脊髓仿生修复支架提供了重要参考。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

生丝:西北桑蚕基地;透明质酸钠($M_w=3.5\times 10^4$)、4-(4,6-二甲氧基三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMTMM):上海源叶生物科技有限公司;氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)、无水碳酸钠(Na_2CO_3):分析纯,国药集团化学试剂有限公司;溴化锂(LiBr):分析纯,上海中锂实业有限公司;2-吗啉乙磺酸(MES)、酪胺盐酸盐:分析纯,上海泰坦科技股份有限公司;过氧化氢溶液(H_2O_2 质量分数30%)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、pH标准缓冲溶液、无水乙醇:上海麦克林生化科技股份有限公司;HRP: Type VI, 295 U/mg, 美国Sigma-Aldrich公司;小鼠胚胎成纤维细胞(NIH3T3):富衡生物科技有限公司;胎牛血清(FBS)、反应缓冲液(Assay Buffer)、钙黄绿素(Calcein-AM)、碘化丙啶(PI):上海翌圣生物科技股份有限公司;胰蛋白酶(EDTA)、低糖培养基(DMEM)、青霉素与链霉素溶液(双抗):美国Gibco公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒:美国MCE公司。

电子天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司MA204型;全数字化核磁共振谱仪:瑞士Bruker公司AVANCE 3HD 600 MHz型;高级旋转流变仪:美国Waters公司ARES-G2型;万能材料试验机:深圳三思纵横科技股份有限公司;稳态/瞬态荧光光谱仪:美国PTI公司QuantaMaster/TimeMaster型;扫描电子显微镜(SEM):日本日立公司FlexSEM1000 II型;接触角仪:瑞典百欧林科技有限公司THETA Auto1型;倒置相差显微镜:日本奥林巴斯株式会社CKX41型;倒置荧光显微镜:德国徕卡显微系统公司DMI8型;超净台、多功能酶标仪:美国Thermo Fisher公司;细胞培养箱:日本松下Panasonic公司Mco-5AC型;恒温水浴锅:比克曼生物WB-2型。

1.2 SF水溶液及其冻干粉的制备

取西北桑蚕丝置于 Na_2CO_3 溶液($w=0.38\%$)中,煮沸30 min,随后使用去离子水反复清洗,重复2次,除去丝胶蛋白和 Na_2CO_3 。将上述脱胶丝放置在60℃恒温烘箱中干燥处理。使用去离子水配制9.3 mol/L的LiBr溶液,取干燥的脱胶丝,以1 g:10 mL的料液比,于40℃水浴中加热溶解。待脱胶丝完全溶解后进行抽滤和透析,得到SF溶液,将该溶液置于4℃环境中,风干浓缩至 $w=5\%$ 后进行冷冻干燥,得到SF冻干粉,于4℃、干燥条件下保存备用。详细步骤可参考文献[22,27,28]。

1.3 HA-Tyr的制备与表征

HA-Tyr的制备流程图及其反应原理图如图1所示。具体而言,先将1.0 g的HA粉末溶解于100 mmol/L的MES缓冲溶液中,完全溶解后用5 mol/L的NaOH溶液调节pH为5.5,然后依次加入1.25 mmol的DMTMM与1.25 mmol的酪胺盐酸盐,保持37℃水浴加热10 h,搅拌速率为10 r/min。接枝反应结束后,加入30 mL饱和NaCl溶液对产物进行富集,随后加入无水乙醇进行沉淀处理,目标产物HA-Tyr以白色絮状沉淀的形态析出。使用体积分数为80%的乙醇溶液洗涤沉淀3次以上,去除沉淀中的杂质,洗涤完毕后将沉淀溶解于去离子水中即得到HA-Tyr溶液,经冷冻干燥后获得HA-Tyr冻干粉,随即转移至4℃干燥条件下妥善保存备用。

参考文献[26],以 D_2O 为测试溶剂,通过核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)表征反应产物HA-Tyr在化学位移6.50~7.50是否出现特征峰,以验证Tyr是否成功接枝至HA分子链,其接枝率(DS)可通过 $^1\text{H-NMR}$ 中相应峰的积分面积计算。

1.4 SF基水凝胶的凝胶时间和模量调控

固定SF基水凝胶前驱液与所需的HRP、 H_2O_2 体积比为1000:25:13,其中水凝胶前驱液中溶质的固含量为3%。通过改变SF基水凝胶前驱液中HA-Tyr的含量(表1),进一步制备了具有不同凝胶时间和模量的SF

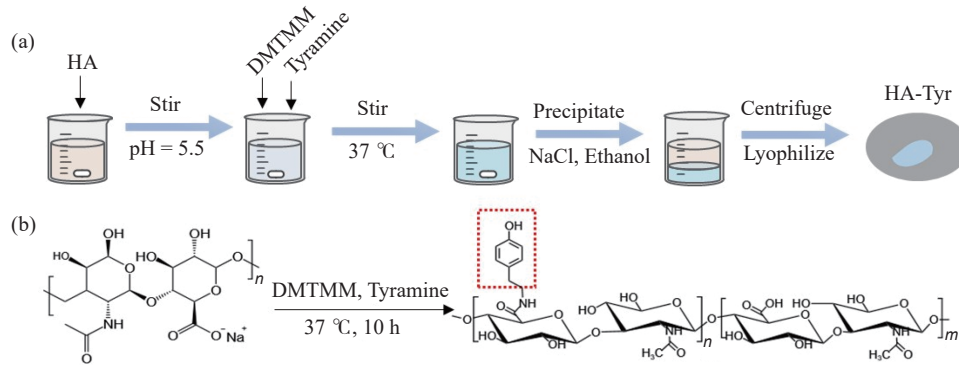


图 1 HA-Tyr 的(a)制备流程图及(b)原理图

Fig. 1 (a) Flow chart and (b) schematic illustration of the preparation of HA-Tyr

基复合水凝胶(SF/HA-Tyr)。详细制备流程如下:首先以去离子水为溶剂,分别配制 SF 溶液($w=3\%$)、HA-Tyr 溶液($w=3\%$)、HRP 溶液(1000 U/mL)及 H_2O_2 溶液(0.49 mol/L);随后按照表 1 所列配方,将各组分溶液充分混合并搅拌至体系均一;最后将混合液转移至 37 °C 恒温环境中反应,即可制备得到目标凝胶。

1.4.1 凝胶时间 凝胶时间为水凝胶从液体到固体转变所需要的时间,本研究参考磁珠旋转实验方法^[29-31],从宏观角度大体测定了不同配方 SF 基水凝胶的凝胶时间。具体步骤如下:将 1 mL SF/HA-Tyr 溶液分别加入透明玻璃瓶中,置于 37 °C 磁力搅拌水浴中预热 5 min,使溶液体系升温到 37 °C 左右;然后加入 25 μ L 的 HRP 溶液,以 100 r/min 的转速磁力搅拌 2.5 min;接下来加入 13 μ L 的 H_2O_2 溶液,同时以 100 r/min 的转速进行磁力搅拌并开始计时,当磁子无法顺利转动时停止计时。记录 SF 基水凝胶制备过程中从加入最后组分 H_2O_2 溶液开始至磁子停止转动所需要的时间,单位为 min。

1.4.2 流变学测试 使用直径 40 mm 的平板,测试温度 37 °C,平板间隙 0.65 mm。将水凝胶前驱液搅拌 3 s,然后立即转移至旋转流变仪底板。在 1 Hz 的频率和 10% 的应变下测试水凝胶成胶过程中的储能模量(G')与损耗模量(G'')。

1.4.3 压缩力学性能 使用万能材料试验机进行测试,其中力传感器的满量程为 100 N。设定仪器压缩速率和最大应变分别为 8 mm/min、30%。依据文献[22],选取 5%~15% 应变区间内的有效数据,进行线性拟合,得到的直线斜率即为压缩模量。待测样品为标准圆柱体,直径 16 mm,高度 10 mm。

1.4.4 稳态荧光光谱 稳态荧光光谱法作为检测二酪氨酸键含量的常规方法之一,可用于检测 SF 基水凝胶中的相对交联密度。相关研究^[19,32,33]证实 SF 基水凝胶在 410 nm 处的荧光发射强度与内部二酪氨酸键的含量呈正相关关系,即与本研究 SF/HA-Tyr 复合水凝胶的交联密度正相关。将样品置于 315 nm 激发波长下,检测其在 410 nm 处的荧光发射强度,待测水凝胶样品直径为 14 mm、高为 5 mm。

1.4.5 表面微观形貌 将各组样品进行冷冻干燥处理,并固定在样台上。使用洗耳球清除样品表面杂质,经 10 mA 电流下溅射喷金 60 s 后,于 1 kV 电压下,通过扫描电子显微镜观察水凝胶样品的表面形貌。

1.4.6 表面接触角 通过接触角仪测试各组水凝胶样品的表面接触角,以表征样品的亲疏水性,测试过程中所用水滴的体积为 3 μ L。

1.5 典型 SF/HA-Tyr 复合水凝胶的细胞相容性

1.5.1 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3 的培养与传代 根据文献[22,27,28],细胞培养基配方为 DMEM、FBS、双抗按照 100:10:1 的体积比混匀。将新购买的 NIH3T3 细胞传代至 T75 培养瓶,置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO_2 细胞培养箱内培养,细胞培养基 3 d 更换一次。为获得足够数量的细胞用于后续接种实验,待瓶底贴

表 1 不同 HA-Tyr 含量的 SF 基水凝胶的前驱液配方

Table 1 Formulation of precursor solution for SF-based hydrogels with different HA-Tyr contents

Sample	V/ μ L			
	SF	HA-Tyr	HRP	H_2O_2
S10H0	1000	0	25	13
S9H1	900	100	25	13
S8H2	800	200	25	13
S7H3	700	300	25	13
S6H4	600	400	25	13

壁细胞汇合度达到约 80% 时,继续传代于 3 个 T75 培养瓶中进行扩增。

1.5.2 NIH3T3 细胞在 SF 基水凝胶表面的接种与培养 以低糖 DMEM 培养基为溶剂配制 SF、HA-Tyr 溶液,用去离子水配制 HRP 和 H_2O_2 溶液并经孔径为 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜无菌过滤;参照表 1 中 S10H0、S8H2、S7H3 这 3 种水凝胶的配比将各组分混匀,快速将 $500\ \mu\text{L}$ 前体溶液分装至 24 孔板各孔,并置于细胞培养箱直至各孔板完全成胶。为去除凝胶中残留的小分子,使用 DMEM 清洗孔板样品 3 次,最后一次弃去孔板中培养基,每孔接种 $500\ \mu\text{L}$ 细胞悬液(细胞密度为 2×10^4 个/孔),置于细胞培养箱中培养,培养基每 3 d 更换一次。

1.5.3 NIH3T3 细胞在 SF 基水凝胶表面的黏附情况观察 采用倒置相差显微镜,于第 1、3、5 d 记录样品表面细胞的黏附情况。

1.5.4 NIH3T3 细胞在 SF 基水凝胶表面的增殖情况检测 采用 CCK-8 试剂盒,分别检测样品表面细胞培养至第 1、3、5 d 的光密度(OD)值分别标记为 OD_{1d} 、 OD_{3d} 、 OD_{5d} ,评估其增殖情况。首先,吸除各时间点样品孔板中的旧培养基,加入含体积分数 10% CCK-8 的新鲜培养基,孵育 2 h 后,将反应后的培养基转移至 96 孔板中,并采用酶标仪检测其在 $450\ \text{nm}$ 波长下的 OD 值,该检测全程避光。

1.5.5 NIH3T3 细胞在 SF 基水凝胶表面的活/死染色检测 采用倒置荧光显微镜观察细胞培养第 1、5 d 的活/死情况。首先,将 $10\times$ Assay Buffer 用去离子水稀释为 $1\times$ Assay Buffer,按体积比 1:3:1 000 将 Calcein-AM($2\ \text{mmol/L}$)、PI($1.5\ \text{mmol/L}$)与 $1\times$ Assay Buffer 混合制备染色工作液。样品染色前需吸除孔板内的培养液,并加入 $1\times$ Assay Buffer 润洗 2 次,每次 10 min;润洗完毕后每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 染色工作液,于培养箱中避光孵育 1 h。孵育结束后弃去工作液,再次使用 $1\times$ Assay Buffer 润洗 2 次,每次 10 min。最后,分别在 $488\ \text{nm}$ 和 $561\ \text{nm}$ 激发波长下观察细胞的荧光染色照片以评估细胞相容性。

2 结果与讨论

2.1 HA-Tyr 的表征

对用 Tyr 修饰 HA 后的产物进行 $^1\text{H-NMR}$ 表征以验证是否顺利将 Tyr 接枝在 HA 上,对照组为未进行接枝处理的 HA,结果如图 2 所示。未改性 HA 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图在化学位移 $6.50\sim 7.50$ 区间无明显信号,而 HA-Tyr 在 6.85 、 6.86 、 7.17 、 7.19 、 7.36 及 7.38 处出现了与 Tyr 苯环接近的特征二重峰^[26]。这有别于游离 Tyr 的苯环质子峰(6.75 、 7.10 左右),这是由于共价接枝会改变 Tyr 与 HA 的电子环境,使 Tyr 苯环中质子的化学位移发生偏移。此结果也在一定程度上证明 Tyr 并非通过物理吸附结合于 HA 中,而是通过共价键实现接枝。综上,可以确认 Tyr 已成功接枝到 HA 分子链中生成目标产物 HA-Tyr,依据特征峰计算其接枝率为 9%,这与文献^[26,34]报道的接枝率相当。

2.2 不同 HA-Tyr 含量对 SF 基复合水凝胶的凝胶时间的影响

在体温 ($37\ ^\circ\text{C}$) 条件下, SF 与 HA-Tyr 均可在 HRP/ H_2O_2 引发体系的作用下发生交联反应。文献^[19,35,36]指出, SF 和 HA-Tyr 链上的酚羟基均可在酶催化下形成苯氧自由基,经分子间偶联形成二酪氨酸键,构建三维凝胶网络。上述机理为本研究中两组分的相互交联提供了机理支撑(图 3),其交联反应的核心是酚自由基形成后相互偶联生成二酪氨

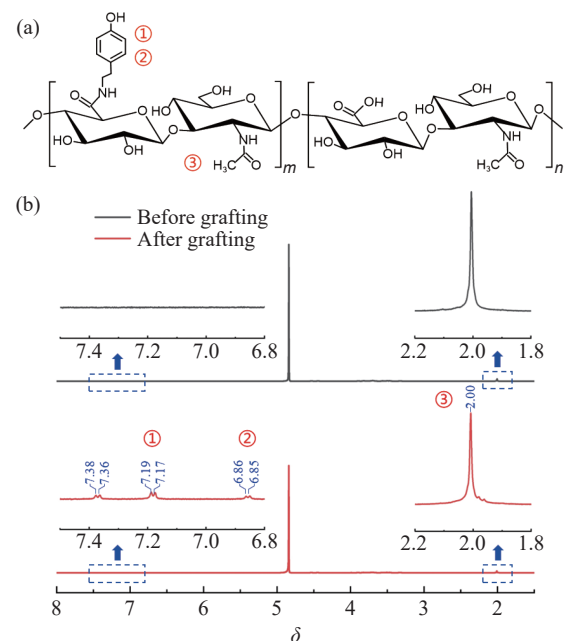


图 2 (a)目标产物 HA-Tyr 中的不同氢化学环境(①为苯环羟基邻位氢,②为苯环羟基间位氢,③为乙酰氨基上的甲基氢);(b)HA 接枝 Tyr 前后的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

Fig. 2 (a) Different hydrogen chemical environments of the target product HA-Tyr (①refers to the ortho-hydrogens of the hydroxyl group on the benzene ring, ②refers to the meta-hydrogens of the hydroxyl group on the benzene ring, ③refers to the methyl hydrogens of the acetamido group); (b) $^1\text{H-NMR}$ spectra of HA before and after grafting with Tyr

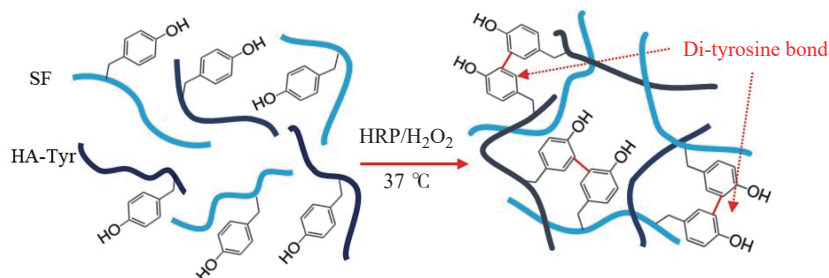


图 3 利用 HRP 引发体系形成 SF/HA-Tyr 复合水凝胶的交联机理示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the crosslinking mechanism of SF/HA-Tyr composite hydrogels formed by HRP-initiated system

酸键, 而反应速率与体系中酚基的初始浓度高度正相关。

为考查各组分水凝胶的凝胶时间是否满足手术植入窗口时间需求, 表征了所有组分的凝胶时间, 结果如图 4(a)所示。结果显示, S10H0 水凝胶的凝胶时间最长, S6H4 水凝胶的凝胶时间最短。随后在 37 °C 下对 S10H0、S8H2、S7H3 这 3 组典型水凝胶进行动态时间扫描流变测试, 监测水凝胶交联过程中 G' 与 G'' 的变化情况, 以两者交点判定体系凝胶点。如图 4(b)所示, S10H0、S8H2 与 S7H3 水凝胶出现凝胶点的时间分别为 5.2、3.2、1.3 min, 其中, S8H2 和 S7H3 水凝胶的 G' 在出现凝胶点后迅速增加, 而 S10H0 水凝胶的 G' 约在 17 min 后才出现明显增加。总体而言, 这与磁珠旋转法测得的凝胶时间趋势一致, 即体系中 HA-Tyr 含量越高, 越有利于凝胶的快速原位成型。这很可能是由于 SF 分子中含有的酚基数量较 HA-Tyr 明显变少, 导致其作为交联位点的酚基浓度更低, 自由基生成少且碰撞概率低, 交联缓慢。HA-Tyr 的分子链上接枝了较多的 Tyr, 这些基团均含酚基结构, 引入后会大幅提升体系整体酚基浓度。在 SF 与 HA-Tyr 的复合体系中, HA-Tyr 含量越高的水凝胶, 酚基的数量也越多, 因而体现出更短的成胶时间。郭北辰课题组^[37]将 Tyr 接枝到 SF 分子链, 同样证实酚类基团含量越高, 其凝胶化达到平衡所需时间越短。结合手术植入窗口时间为 5~15 min 的要求, 本研究筛选获得 S8H2、S7H3、S6H4 这 3 组样品的凝胶时间满足需求。该时长既能满足术中材料注射、缺损病灶贴合等操作需求, 又可避免因凝胶过慢导致的预凝胶体系流失和定型效果不佳等问题。

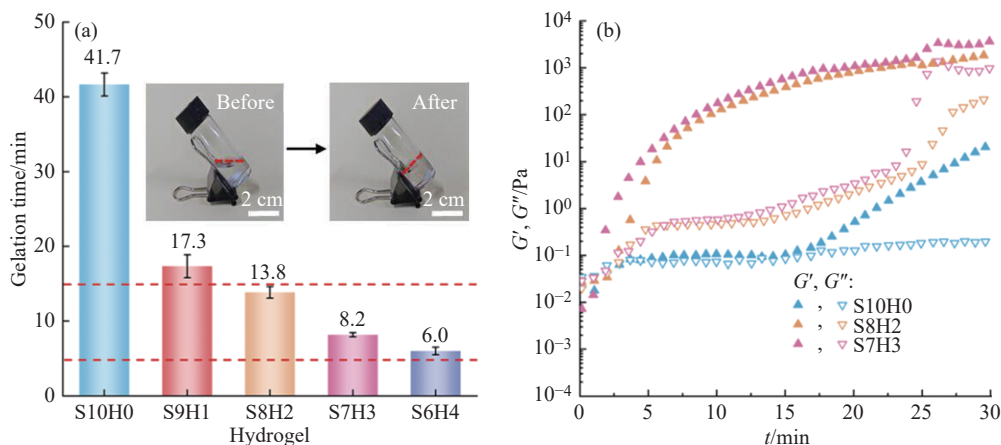


图 4 (a)不同 HA-Tyr 含量 SF 基水凝胶的凝胶时间及交联前后的宏观照片; (b)典型 SF 基水凝胶在动态时间扫描流变测试中的 G' 与 G''

Fig. 4 (a) Gelation time of SF-based hydrogels with different HA-Tyr contents and macroscopic photographs before and after crosslinking; (b) G' and G'' of SF-based hydrogels in dynamic time sweep test

2.3 HA-Tyr 含量对 SF 基复合水凝胶力学性能与交联密度的影响

HA-Tyr 含量会影响 SF 基水凝胶的交联密度, 进而影响其压缩力学性能。随着 HA-Tyr 的含量增加, 水凝胶的压缩应力在相同应变条件下呈上升趋势(图 5(a)), 水凝胶的压缩模量逐渐增大(图 5(b))。这可能是 HA-Tyr 的引入构建了更稳定的复合交联网络, 且该网络的力学承载能力随 HA-Tyr 含量增加而逐步增强。

研究报道表明, 脊髓组织的弹性模量并非固定值, 会随年龄、脊髓区域(灰质/白质)及是否损伤等因素显著变化^[38,39]。新生大鼠脊髓弹性模量约 200 Pa, 随生长发育至幼年阶段逐步提升, 成年大鼠脊髓弹性模量可达 1.25 kPa。对比水凝胶的压缩模量(图 5(b)), S6H4 水凝胶的模量较正常脊髓组织明显偏高, 而 S10H0、

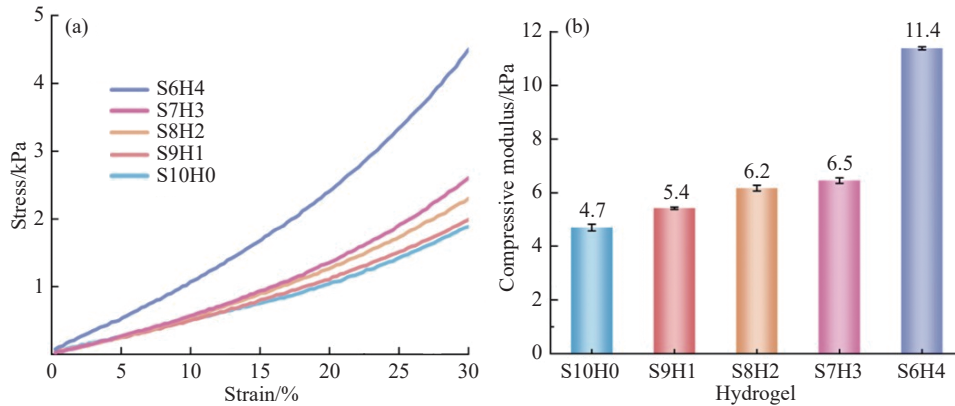


图 5 不同 HA-Tyr 含量的 SF 基水凝胶的压缩性能: (a) 应力-应变曲线; (b) 模量

Fig. 5 Compressive characteristics of hydrogels based on SF with different HA-Tyr contents: (a) Stress-strain curves; (b) Compressive modulus

S9H1、S8H2、S7H3 水凝胶与大鼠脊髓组织模量较为接近, 可达到更好的模量仿生效果。

酶促交联体系合成的 SF/HA-Tyr 复合水凝胶, 其 SF、HA-Tyr 分子链都含有酪氨酸, 相互连接形成二酪氨酸键, 构建三维交联网络(图 3)。据此, 通过测定二酪氨酸键的荧光强度可得到 SF 基水凝胶的相对交联密度^[40]。SF 基水凝胶的荧光发射光谱表征结果如图 6(a) 所示, 依据图 6(a) 中 410 nm 处的相对荧光发射强度进行的统计结果如图 6(b) 所示。5 组复合水凝胶的相对交联密度从左往右依次增加, 即 HA-Tyr 含量越多, 水凝胶的相对交联密度越高, 该趋势与压缩模量变化趋势类似。复合体系内可参与酶促交联的酚基位点随 HA-Tyr 含量的增加而同步增多。在 HRP/H₂O₂ 催化作用下, 这些酚基位点快速转化为酚自由基并偶联形成二酪氨酸共价交联键, 使得交联密度提升, 这也导致材料的压缩力学性能增加。因此, S6H4 和 S10H0 分别具有最高和最低模量。

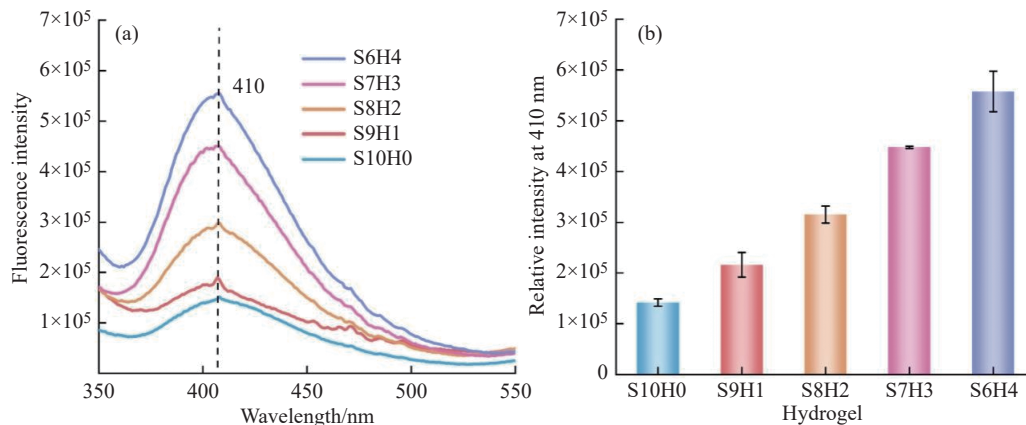


图 6 不同 HA-Tyr 含量的 SF 基水凝胶的交联密度: (a) 荧光发射光谱; (b) 在 410 nm 处的相对荧光发射强度

Fig. 6 Fluorescence emission intensities of SF-based hydrogels with different HA-Tyr contents: (a) Fluorescence emission spectra; (b) Relative fluorescence emission intensity at 410 nm

基于 2.2 和 2.3 节结果, S8H2 和 S7H3 水凝胶的凝胶时间更符合手术植入窗口时间需求, 同时还可达到较好的脊髓组织模量仿生需求, 后续将进一步深入考察并对比其界面特征及细胞相容性。

2.4 典型 SF/HA-Tyr 复合水凝胶的表面形貌与亲疏水性能

S8H2、S7H3 水凝胶与纯 SF 水凝胶(S10H0)的表面形貌和亲疏水性如图 7 所示。电镜照片显示, 3 组水凝胶表面均呈现出不规则的网状凸起结构(图 7(a))。S7H3 水凝胶表面相对平整, S10H0 水凝胶表面形貌介于中间, 而 S8H2 水凝胶表面的网状凸起结构最为明显。接触角测试结果(图 7(b))表明: S10H0 的接触角为 $55.1^\circ \pm 1.6^\circ$, 呈弱亲水性; S8H2 水凝胶的接触角降至 $48.6^\circ \pm 0.3^\circ$, 亲水性显著提升; S7H3 的接触角进一步降至 $43.9^\circ \pm 0.1^\circ$, 亲水性相对最强。HA-Tyr 分子链富含羟基、乙酰氨基等亲水基团^[41], 其含量增加可提升复合

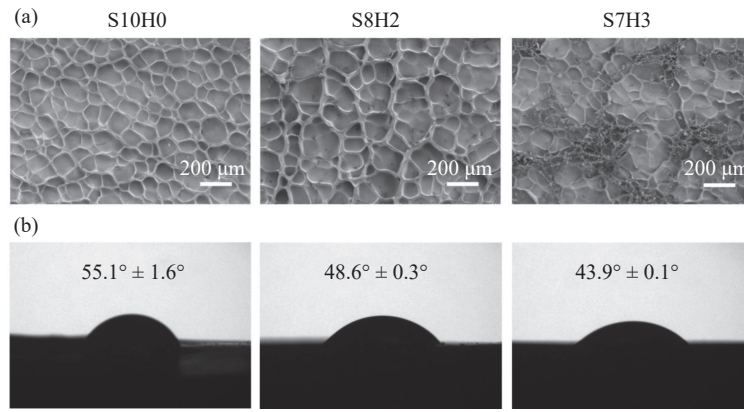


图 7 典型 SF/HA-Tyr 复合水凝胶的表面形貌与亲疏水性: (a)SEM 图; (b)表面接触角

Fig. 7 Surface morphology and hydrophilicity of the typical SF/HA-Tyr composite hydrogels: (a) SEM images; (b) Surface contact angle

水凝胶表面的亲水基团密度。这可能是复合水凝胶表面的接触角随 HA-Tyr 含量提升而下降的主要原因。

2.5 典型 SF/HA-Tyr 复合水凝胶的细胞相容性

采用 CCK-8 试剂盒,检测细胞在 S10H0、S8H2、S7H3 水凝胶表面第 1、3、5 d 的 OD 值变化情况,结果如图 8(a)所示。细胞在 3 种水凝胶表面培养第 1 d 的 OD 值暂未表现出显著性差异;培养至 3 d 时,S8H2 水凝胶表面的细胞增殖速率最快,另外 2 组增殖速率略低(图 8(b))。培养至 5 d 时,3 组 SF 基水凝胶表面的细胞总活力进一步提升,由 OD_{5d}/OD_{3d} 进一步表明,S8H2 水凝胶表面的细胞增殖速率最快,另外 2 组增殖速率相对更低。此外,细胞在 1、3、5 d 的相差显微照片(图 8(c))中的细胞密度变化情况也进一步佐证了 S8H2 水凝胶表面更利于细胞增殖的规律。通过活/死细胞荧光染色图像(图 8(d))可以看到,细胞培养 1 d 时,3 组水凝胶表面几乎无明显细胞死亡(红色),且活细胞总量相当(绿色);培养第 5 d 时,死亡细胞均较少,但 S8H2 水凝胶表面的活细胞数量明显更多,这与前述细胞增殖趋势高度一致。

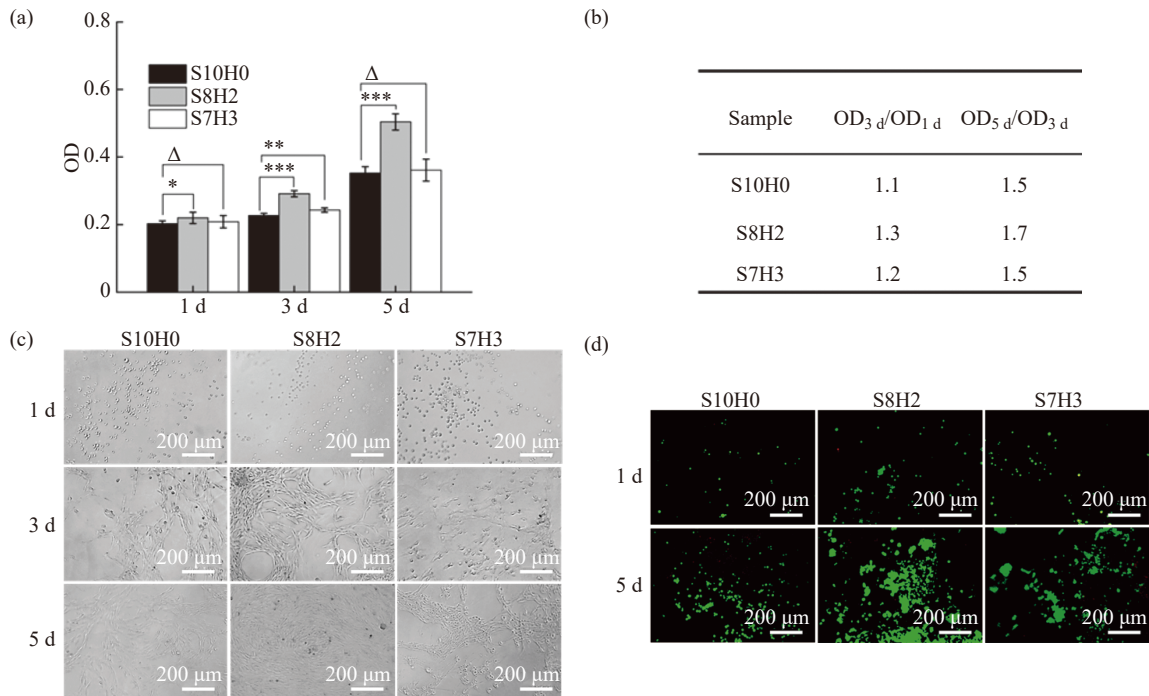


图 8 NIH3T3 细胞在典型 SF/HA-Tyr 复合水凝胶表面的增殖与黏附情况: (a)细胞在 1、3、5 d 的 OD 值(***: $p < 0.001$, **: $0.001 < p < 0.01$, *: $0.01 < p < 0.05$, Δ : $p > 0.05$); (b)图 8(a)对应的 OD 值之比; (c)细胞在 1、3、5 d 的相差显微照片; (d)细胞在 1、5 d 的活/死荧光染色图像

Fig. 8 Adhesion and proliferation of NIH3T3 cells on the surface of the typical SF/HA-Tyr composite hydrogels: (a) OD values of cells at 1, 3, 5 d, (***: $p < 0.001$, **: $0.001 < p < 0.01$, *: $0.01 < p < 0.05$, Δ : $p > 0.05$); (b) Corresponding OD value ratio of Fig. 8(a); (c) Phase contrast micrographics of the cell adhesion at 1, 3, 5 d; (d) Live/dead fluorescence images of cells at 1 d and 5 d

相关研究表明,贴壁细胞更倾向于在高模量基材的表面进行黏附和增殖^[42],粗糙基材表面比光滑基材表面更利于细胞生长^[43]。适当的表面亲水性能也有利于细胞的黏附和增殖,而过高的亲水或疏水性能可能会降低细胞的相关行为^[44,45]。本文 S8H2 水凝胶的模量与 S7H3 水凝胶较为接近,均明显高于 S10H0 水凝胶(图 5(a)); S8H2 水凝胶表面的网状凸起结构在 3 种水凝胶中最为明显,而 S7H3 水凝胶的表面则相对最为光滑(图 7(a))。此外, S8H2 水凝胶表面的亲疏水性能介于 S10H0 和 S7H3 水凝胶之间。上述 3 种因素综合导致 S8H2 水凝胶的细胞增殖最快,明显高于 HA-Tyr 含量更高的 S7H3 水凝胶,也显著高于纯 SF 水凝胶。综上, S8H2 水凝胶的细胞相容性明显优于 S7H3 水凝胶,有望在神经缺损修复中体现出更大的潜力。

3 结 论

(1)通过在 SF 水凝胶中引入不同含量的 HA-Tyr,可实现对 SF 基复合水凝胶凝胶时间和压缩模量的有效调控。随着 HA-Tyr 含量的增加, SF 基复合水凝胶的凝胶时间逐渐缩短,压缩模量逐渐增加。

(2)原位成胶型 SF 基脊髓仿生水凝胶 S8H2 具有最优的综合性能,其凝胶时间(约 13 min)符合手术植入窗口时间需求,压缩模量(约 6 kPa)可满足较好的脊髓仿生需求,同时还具有优异的细胞相容性,有望应用于脊髓损伤修复。

参考文献:

- [1] ANJUM A, YAZID M D, DAUD M F, IDRIS J, NG A M H, NAICKER A S, ISMAIL O H R, KUMAR R K A, LOKANATHAN Y. Spinal cord injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(20): 7533.
- [2] 孙秀敏, 庞卯, 冯丰, 刘斌, 戎利民, 何留民. 功能高分子材料促进脊髓损伤后再生修复的研究进展 [J]. *功能高分子学报*, 2021, 34(4): 301-319.
SUN X M, PANG M, FENG F, LIU B, RONG L M, HE L M. Research progress of functional polymer for spinal cord regeneration [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2021, 34(4): 301-319.
- [3] CHEN S, LIU S, ZHANG L, HAN Q, LIU H, SHEN J, LI G, ZHANG L, YANG Y. Construction of injectable silk fibroin/polydopamine hydrogel for treatment of spinal cord injury [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 399: 125795.
- [4] ALBASHARI A A, HE Y, LUO Y, DUAN X X, ALI J, LI M C, FU D H, XIANG Y F, PENG Y J, LI S, LUO L H, ZAN X J, KUMERIA T, YE Q S. Local spinal cord injury treatment using a dental pulp stem cell encapsulated H₂S releasing multifunctional injectable hydrogel [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2024, 13(9): 2302286.
- [5] YANG J, YANG K Y, MAN W T, ZHENG J, CAO Z, YANG C Y, KIM K, YANG S H, HOU Z H, WANG G H, WANG X M. 3D bio-printed living nerve-like fibers refine the ecological niche for long-distance spinal cord injury regeneration [J]. *Bioactive Materials*, 2023, 25: 160-175.
- [6] ZHU Y J, HUANG R Q, YU L Q, LIU Z, LIU Y C, FAN W Y, LIN G F, WANG Z J, HE X L, XU X, MA B, CHEN Y W, BAI Y X, LI J, CHEN B R, CHENG L M, ZHU R R. Engineered thoracic spinal cord organoids for transplantation after spinal cord injury [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41551-025-01549-8>.
- [7] ZWECKBERGER K, YANG L, JIAN W, FORGIONE N G, FEHLINGS M. Injecting self-assembling peptides and neural precursor cells for spinal cord repair in a rat model [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2025: e23876.
- [8] YANG B, LIANG C, CHEN D, CHENG F, ZHANG Y, WANG S, SHU J, HUANG X, WANG J, XIA K, YING L, SHI K, WANG C, WANG X, LI F, ZHAO Q, CHEN Q. A conductive supramolecular hydrogel creates ideal endogenous niches to promote spinal cord injury repair [J]. *Bioactive Materials*, 2022, 15: 103-119.
- [9] XU L L, MU J F, MA Z Y, LIN P H, XIA F, HU X, WU J H, CAO J, LIU S B, HUANG T C, LING D S, GAO J Q, LI F Y. Nanozyme-integrated thermoresponsive *in situ* forming hydrogel enhances mesenchymal stem cell viability and paracrine effect for efficient spinal cord repair [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(31): 37193-37204.
- [10] GAO Y, WANG K Y, WU S, WU J P, ZHANG J, LI J M, LEI S B, DUAN X M, MEN K. Injectable and photocurable gene scaffold facilitates efficient repair of spinal cord injury [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2024, 16(4): 4375-4394.
- [11] 耿亚楠, 赵梦露, 姚响, 张耀鹏. 强韧支架用丝素蛋白基生物墨水及其 3D 打印支架模拟软件的开发 [J]. *功能高分子学报*, 2023, 36(2): 107-116.

- GENG Y N, ZHAO M L, YAO X, ZHANG Y P. Development of silk fibroin based bio-ink for tough scaffold and related simulation software for 3D printing scaffold [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2023, 36(2): 107-116.
- [12] YAO X, ZOU S Z, FAN S N, NIU Q Q, ZHANG Y P. Bioinspired silk fibroin materials: From silk building blocks extraction and reconstruction to advanced biomedical applications [J]. *Materials Today Bio*, 2022, 16: 100381.
- [13] ZHU T H, CAI G L, ZHAO W K, YAO X, ZHANG Y P. Effects of silk fibroin hydrogel degradation on the proliferation and chondrogenesis of encapsulated stem cells [J]. *Biomacromolecules*, 2025, 26(2): 1305-1319.
- [14] TIAN Z Q, CHEN H, ZHAO P. Compliant immune response of silk-based biomaterials broadens application in wound treatment [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2025, 16: 1548837.
- [15] GENG Y N, LIU T X, ZHAO M L, WEI H F, YAO X, ZHANG Y P. Silk fibroin/polyacrylamide-based tough 3D printing scaffold with strain sensing ability and chondrogenic activity [J]. *Composites Part B: Engineering*, 2024, 271: 111173.
- [16] LIU X J, SHI X N, ZHANG D X, ZHAO S, HU J J, OUYANG Q J, YIN J, YAO X, ZHANG Y P, YAN L. Silk fibroin electrospun scaffolds with sustained dual release of growth factors enhance acute liver failure treatment [J]. *Composites Part B: Engineering*, 2025, 296: 112260.
- [17] HU Z A, LIANG Y Q, FAN S N, NIU Q Q, GENG J J, HUANG Q M, HSIAO B S, CHEN H, YAO X, ZHANG Y P. Flexible neural interface from non-transient silk fibroin with outstanding conformality, biocompatibility, and bioelectric conductivity [J]. *Advanced Materials*, 2024, 36(46): 2410007.
- [18] ZHAO W K, CAI G L, QIAN J Y, GENG J J, YAO X, ZHANG Y P. Protein conformational transition microenvironment in silk fibroin hydrogels: Proliferation and chondrogenesis of encapsulated stem cells [J]. *Regenerative Biomaterials*, 2025, 12: rbaf102.
- [19] CAI G L, ZHAO W K, ZHU T H, OLIVEIRA A L, YAO X, ZHANG Y P. Effects of protein conformational transition accompanied with crosslinking density cues in silk fibroin hydrogels on the proliferation and chondrogenesis of encapsulated stem cells [J]. *Regenerative Biomaterials*, 2025, 12: rbaf019.
- [20] ZOU S, YAO X, SHAO H, REIS R L, KUNDU S C, ZHANG Y. Nonmulberry silk fibroin-based biomaterials: Impact on cell behavior regulation and tissue regeneration [J]. *Acta Biomaterialia*, 2022, 153: 68-84.
- [21] ZHOU L, WANG Z, CHEN D, LIN J, LI W, GUO S, WU R, ZHAO X, LIN T, CHEN G, LIU W. An injectable and photocurable methacrylate-silk fibroin hydrogel loaded with bFGF for spinal cord regeneration [J]. *Materials & Design*, 2022, 217: 110670.
- [22] 蔡国龙, 赵伟焜, 祝天浩, 姚响, 张耀鹏. 丝素蛋白水凝胶中的蛋白构象转变速率对其表面黏附细胞增殖的影响 [J]. *功能高分子学报*, 2024, 37(4): 312-321.
- CAI G L, ZHAO W K, ZHU T H, YAO X, ZHANG Y P. Effect of protein conformational transition rate in silk fibroin hydrogel on proliferation of cells adhering to its surface [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2024, 37(4): 312-321.
- [23] 赵伟焜, 蔡国龙, 姚婉情, 姚响, 张耀鹏. 具有等效初始特征、不同蛋白构象转变快慢丝素蛋白水凝胶的构筑研究 [J]. *东华大学学报 (自然科学版)*, 2025, 51(5): 81-87.
- ZHAO W K, CAI G L, YAO W Q, YAO X, ZHANG Y P. Construction of silk fibroin hydrogels with equivalent initial properties and different protein conformational transition rates [J]. *Journal of Donghua University*, 2025, 51(5): 81-87.
- [24] FENG F, SONG X, TAN Z, TU Y, XIAO L, XIE P, MA Y, SUN X, MA J, RONG L, HE L M. Cooperative assembly of a designer peptide and silk fibroin into hybrid nanofiber gels for neural regeneration after spinal cord injury [J]. *Science Advances*, 2023, 9(25): eadg0234.
- [25] CUI X, WANG L, GAO X, WU J, HU T, ZHANG J, ZHOU X, ZHANG K Q, CHENG L. Self-assembled silk fibroin injectable hydrogels based on layered double hydroxides for spinal cord injury repair [J]. *Matter*, 2024, 7(2): 620-639.
- [26] LOEBEL C, D'ESTE M, ALINI M, ZENOBI-WONG M, EGLIN D. Precise tailoring of tyramine-based hyaluronan hydrogel properties using DMTMM conjugation [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 115: 325-333.
- [27] GU M J, FAN S N, ZHOU G D, MA K, YAO X, ZHANG Y P. Effects of dynamic mechanical stimulations on the regeneration of *in vitro* and *in vivo* cartilage tissue based on silk fibroin scaffold [J]. *Composites Part B: Engineering*, 2022, 235: 109764.
- [28] 祝天浩, 蔡国龙, 黄亮, 胥学谦, 姚响, 张耀鹏. 丝素蛋白水凝胶的降解速率对其表面黏附细胞增殖的影响 [J]. *功能高分子学报*, 2024, 37(3): 215-222.
- ZHU T H, CAI G L, HUANG L, XU X Q, YAO X, ZHANG Y P. Effects of degradation rate of silk fibroin hydrogel on proliferation of cells adhering to its surface [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2024, 37(3): 215-222.
- [29] BAE J W, KIM B Y, LIH E, CHOI J H, LEE Y, PARK K D. *In situ* formation of enzyme-free hydrogels via ferromagnetic microbead-assisted enzymatic cross-linking [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(89): 13710-13713.
- [30] ARORA A, MAHAJAN A, KATTI D S. TGF- β 1 presenting enzymatically cross-linked injectable hydrogels for improved chondrogenesis [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2017, 159: 838-848.

- [31] SAGHATI S, KHOSHFETRAT A B, NASRABADI H T, ROSHANGAR L, RAHBARGHAZI R. Fabrication of alginate-based hydrogel cross-linked via horseradish peroxidase for articular cartilage engineering [J]. *BMC Research Notes*, 2021, 14: 384.
- [32] PARTLOW B P, HANNA C W, RNJAK-KOVACINA J, MOREAU J E, APPLGATE M B, BURKE K A, MARELLI B, MITROPOULOS A N, OMENETTO F G, KAPLAN D L. Highly tunable elastomeric silk biomaterials [J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(29): 4615-4624.
- [33] PARTLOW B P, BAGHERI M, HARDEN J L, KAPLAN D L. Tyrosine templating in the self-assembly and crystallization of silk fibroin [J]. *Biomacromolecules*, 2016, 17(11): 3570-3579.
- [34] WYCHOWANIEC J K, BEKTAS E I, VERNENGO A J, MUERNER M, AIROLDI M, TIPAY P S, SAPUDOM J, TEO J, EGLIN D, D'ESTE M. Effect of molecular weight of tyramine-modified hyaluronan on polarization state of THP-1 and peripheral blood mononuclear cells-derived macrophages [J]. *Biomaterials Advances*, 2025, 169: 214166.
- [35] HASTURK O, JORDAN K E, CHOI J, KAPLAN D L. Enzymatically crosslinked silk and silk-gelatin hydrogels with tunable gelation kinetics, mechanical properties and bioactivity for cell culture and encapsulation [J]. *Biomaterials*, 2020, 232: 119720.
- [36] LIU Y, ZHANG X P, WU T L, LIU B, YANG J H, LIU W G. Chinese herb-crosslinked hydrogel bearing rBMSCs-laden polyzwitterion microgels: Self-adaptive manipulation of micromilieu and stemness maintenance for restoring infarcted myocardium [J]. *Nano Today*, 2021, 41: 101306.
- [37] WANG W Z, SUN Z Y, XIAO Y X, WANG M, WANG J Q, GUO C C. Silk acid-tyramine hydrogels with rapid gelation properties for 3D cell culture [J]. *Acta Biomaterialia*, 2024, 187: 138-148.
- [38] ZHENG G, YANG C, YU W, TIAN Y, XU Z, LIU J, HE S T, WANG Y H, YUE Z H, WU X D, ZHOU H Y, HU B, YUAN W E, CHEN H J. Mussel inspired hydrogel promotes axon regeneration via piezo1 modulation and cytoskeleton dynamics in synergy after spinal cord injury [J]. *Advanced Functional Materials*, 2025. DOI:10.1002/adfm.202501844.
- [39] SAXENA T, GILBERT J, STELZNER D, HASENWINDEL J. Mechanical characterization of the injured spinal cord after lateral spinal hemisection injury in the rat [J]. *Journal of Neurotrauma*, 2012, 29(9): 1747-1757.
- [40] MCGILL M, COBURN J M, PARTLOW B P, MU X, KAPLAN D L. Molecular and macro-scale analysis of enzyme-crosslinked silk hydrogels for rational biomaterial design [J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 63: 76-84.
- [41] 朱益锐, 蔡志祥, 郭亚龙, 张洪斌. 基于透明质酸构建的功能材料及其在生物医药领域中的应用 [J]. *功能高分子学报*, 2021, 34(1): 26-48.
- ZHU Y R, CAI Z X, GUO Y L, ZHANG H B. Hyaluronan-based functional materials for their biomedical applications [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2021, 34(1): 26-48.
- [42] YAO X, PENG R, DING J D. Cell-material interactions revealed via material techniques of surface patterning [J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(37): 5257-5286.
- [43] MAZAREI M, ASTROM J, WESTERLUND J, KARTTUNEN M. Effect of substrate heterogeneity and topology on epithelial tissue growth dynamics [J]. *Physical Review E*, 2023, 108: 054405.
- [44] YAO K, HONG G Y, YUAN X M, KONG W C, XIA P, LI Y R, CHEN Y W, LIU N, HE J, SHI J, HU Z, ZHOU Y Y, XIE Z J, HE Y. 3D Printing of tough hydrogel scaffolds with functional surface structures for tissue regeneration [J]. *Nano-Micro Letters*, 2024, 17: 27.
- [45] RAVANBAKSH H, BAO G Y, MONGEAU L. Carbon nanotubes promote cell migration in hydrogels [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 2543.

(责任编辑:王吉晶)