

摘要

骨骼肌在严重损伤时其修复和再生能力会受到很大的影响甚至丧失，骨骼肌组织工程技术是促进骨骼肌再生的一种很有前途的策略。为解决日益增长的人口与对动物蛋白需求量增加之间的矛盾，体外细胞培养肉日渐发展，也主要采用骨骼肌组织工程技术。天然多糖水凝胶作为组织工程支架具有支持细胞生长的巨大优势，然而其存在机械强度较低、稳定性较差的缺点。基于此，本论文以碳酸钙（ CaCO_3 ）作为海藻酸钠（SA）的交联钙源，制备了壳聚糖（CS）与 SA 交联为主的物理交联双网络 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶，旨在通过优化材料的组合，制备出理想的骨骼肌组织工程细胞培养支架。

（1）制备不同 CS/SA/ Ca^{2+} 摩尔比的 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架，并研究 CS/SA/ Ca^{2+} 摩尔比对水凝胶支架的凝胶均匀性、内部微观结构和机械强度等理化性能的影响。扫描电子显微镜（SEM）结果表明 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架具有良好的三维形貌和多孔结构，能量色散光谱仪（EDS）结果显示 CS、SA 和 CaCO_3 材料在水凝胶中均匀分布、高效凝胶。在 CS/SA/ Ca^{2+} 摩尔比为 1:1.2:0.24（H-1.2 组）时，CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架的孔径为 $104.06 \pm 2.64 \mu\text{m}$ ，有利于细胞黏附、迁移；压缩模量为 $40.00 \pm 2.52 \text{ kPa}$ ，接近天然骨骼肌。各组 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架提取液中培养的细胞的存活率均在 90%以上，水凝胶支架具有良好的生物相容性。

（2）进行 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架的体外细胞培养评价。SEM 和共聚焦激光扫描显微镜（CLSM）的结果表明在 H-1.2 组 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架上的 C2C12 成肌细胞活力最高、生长速度最快。H-1.2 组 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶作为商业化猪肌肉干细胞（PMuSCs）的培养支架可提供有利于干细胞黏附、生长及增殖的空间。进一步从仔猪背最长肌组织中提取原代肌肉干细胞（MuSCs），先通过表面标记蛋白 $\text{CD}31^-/\text{CD}45^-$ 和 $\text{CD}56^+/\text{CD}29^+$ 分选出纯度较高的 MuSCs；再通过细胞免疫荧光技术检测到所获细胞表面的抗原标志物 Pax7 和 MyoD 均呈阳性表达，表明分离提取到纯度高并且活力强的 MuSCs。提取的 MuSCs 经过成肌诱导分化后，肌球蛋白重链 MyHC 免疫荧光结果为阳性，表明该 MuSCs 具有成肌分化的能力。将成功提取的 MuSCs 接种到 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架上进行培养，其中 H-1.2 组 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架上的 MuSCs 具有更好的黏附、生长和增殖效果，说明调节 CS/SA/ Ca^{2+} 摩尔比可以改善细胞在 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架上的黏附和生长环境。

本研究成功制备了物理交联双网络 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶，该水凝胶具有良好的可打印性，具有一定 CS/SA/ Ca^{2+} 摩尔比的 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶有望成为骨骼肌组织工程的干细胞培养支架之一。

关键词：多糖水凝胶；物理交联；肌肉干细胞；双网络；骨骼肌组织工程

Abstract

The ability of skeletal muscle to repair and regenerate is greatly affected or even lost when skeletal muscle is severely damaged. Skeletal muscle tissue engineering technology is a promising strategy for promoting skeletal muscle regeneration. In order to solve the contradiction between the growing population and the increasing demand for animal protein, *in vitro* cell culture meat is increasingly developed, which was the main use of skeletal muscle tissue engineering technology. Natural as a scaffold for tissue engineering, they have great advantages in supporting cell growth. However, natural polymer hydrogels have the disadvantages of low mechanical strength and poor stability. Based on this, in this paper, CaCO_3 was used as the cross-linked calcium source of sodium alginate (SA) to prepare a physical cross-linked double network CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffold with chitosan (CS) and SA crosslinking network as the main network, aiming to prepare an ideal cell culture scaffold for skeletal muscle tissue engineering by optimizing the combination of materials.

(1) By preparing CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffolds with different CS/SA/ Ca^{2+} molar ratios, the effects of CS/SA/ Ca^{2+} molar ratios on the physical and chemical properties of hydrogels such as gel uniformity, internal microstructure, and mechanical strength were studied. Scanning electron microscopy (SEM) results showed that CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffolds had good three-dimensional morphology and porous structure. Energy dispersive spectrometer (EDS) results showed that CS, SA, and CaCO_3 materials were uniformly distributed and efficiently gelled in the hydrogel. When the molar ratio of CS/SA/ Ca^{2+} was 1:1.2:0.24 (H-1.2 group), the pore size of the CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffold was $104.06 \pm 2.64 \mu\text{m}$, which was conducive to cell adhesion and migration. The compression modulus is $40.00 \pm 2.52 \text{ kPa}$, which is close to the natural skeletal muscle. The viability of cells cultured in the extracts of CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffolds in each group was more than 90%, indicating that CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffold had good biocompatibility.

(2) *In vitro* cell culture evaluation of CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel scaffolds were performed. SEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM) showed that the activity and growth rate of C2C12 myoblasts on CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel in the H-1.2 group were the highest. The H-1.2 group CS/SA/ Ca^{2+} hydrogel as a scaffold for the culture of commercial porcine muscle stem cells (PMuSCs) could provide a space conducive to the adhesion, growth, and proliferation of stem cells. Further, primary muscle stem cells (MuSCs) were further isolated and extracted from the longissimus dorsi tissue of piglets, and MuSCs with high purity were separated by surface labeled proteins $\text{CD31}^-/\text{CD45}^-$ and $\text{CD56}^+/\text{CD29}^+$. Surface antigen

markers Pax7 and MyoD were detected by cell immunofluorescence technology, and both of them were positively expressed in the cells obtained, indicating that MuSCs with high purity and strong activity were isolated and extracted. The results of myosin heavy chain MyHC immunofluorescence were positive after induction differentiation of the extracted MuSCs, indicating that the MuSCs had myogenic differentiation ability. The successfully extracted MuSCs were inoculated on CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds for in vitro cell culture experiments. MuSCs also showed better adhesion, growth, and proliferation effects on CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds in the H-1.2 group, indicating that adjusting the CS/SA/Ca²⁺ molar ratio could improve the adhesion and growth environment of cells on CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds.

In this study, the physically cross-linked dual-network CS/SA/Ca²⁺ hydrogel was successfully prepared. The hydrogel has good printability, and the CS/SA/Ca²⁺ hydrogel with a certain CS/SA/Ca²⁺ molar ratio is expected to become one of the stem cell culture scaffolds for skeletal muscle tissue engineering.

Keywords: polysaccharide hydrogel; physical crosslinked; muscle stem cell; double network; skeletal muscle tissue engineering

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 组织工程.....	1
1.1.1 组织工程简介.....	1
1.1.2 骨骼肌组织工程.....	1
1.2 水凝胶.....	3
1.2.1 水凝胶的概述.....	3
1.2.2 双网络水凝胶.....	4
1.2.3 天然多糖水凝胶材料.....	5
1.3 骨骼肌再生相关因素.....	10
1.3.1 肌肉干细胞.....	11
1.3.2 生肌调节因子.....	11
1.3.3 肌球蛋白重链.....	12
1.4 本文研究意义及内容.....	12
1.4.1 研究意义.....	12
1.4.2 研究内容.....	13
第二章 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架的制备及表征.....	14
2.1 引言.....	14
2.2 实验材料.....	15
2.2.1 材料和试剂.....	15
2.2.2 仪器与设备.....	15
2.2.3 细胞株.....	16
2.3 实验方法.....	16
2.3.1 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架的制备方法.....	16
2.3.2 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架的理化性能及生物相容性的表征.....	17
2.4 结果与讨论.....	20
2.4.1 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架的制备.....	20
2.4.2 交联分析.....	21
2.4.3 扫描电子显微镜测试分析.....	22
2.4.4 孔隙率测试分析.....	23
2.4.5 机械性能测试分析.....	24
2.4.6 流变测试与可打印性分析.....	25
2.4.7 平衡溶胀测试分析.....	26
2.4.8 降解测试分析.....	27
2.4.9 亲水性分析.....	28

2.4.10 细胞毒性测试分析.....	29
2.5 本章小结.....	29
第三章 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架的体外细胞培养评价.....	31
3.1 引言.....	31
3.2 实验试剂与材料.....	31
3.2.1 材料和试剂.....	31
3.2.2 仪器与设备.....	32
3.2.3 实验动物.....	33
3.2.4 细胞株.....	33
3.3 实验方法.....	33
3.3.1 商业化 MuSCs 和 C2C12 成肌细胞的培养.....	33
3.3.2 原代 MuSCs 的分离提取和培养.....	34
3.3.3 提取的 MuSCs 的生物学特性表征.....	35
3.3.4 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架上 C2C12 成肌细胞和 MuSCs 的培 养评价.....	36
3.4 结果与讨论.....	37
3.4.1 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架上 C2C12 成肌细胞的培养评价.....	37
3.4.2 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架上商业化 MuSCs 的培养评价.....	39
3.4.3 CS/SA/Ca ²⁺ 水凝胶支架上提取的 MuSCs 的培养评价.....	39
3.5 本章小结.....	45
主要结论与展望.....	46
主要结论.....	46
展望.....	46
参考文献.....	47

缩略符号说明

缩略语	英文全称	中文全称
SA	sodium alginate	海藻酸钠
CS	chitosan	壳聚糖
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
HS	horse serum	马血清
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
PBS	phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲溶液
MTT	methyl thiazolyl tetrazolium	噻唑蓝
DAPI	4-6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
XPS	x-ray photoelectron spectroscopy	x 射线光电子能谱
SEM	scanning electron microscopy	扫描电子显微镜
EDS	energy dispersive spectrometer	能量色散光谱仪
CLSM	confocal laser scanning microscopy	共聚焦激光扫描显微镜
FTIR	fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
Pax7	paired box transcription factor 7	配对盒转录因子 7
Myf5	myogenic factor 5	生肌决定因子 5
Myf4	myogenic factor 4	生肌决定因子 4
MyoD	myogenic differentiation factor	成肌分化因子
MyoG	myogenin	肌细胞生成素
MyHC	myosin heavy chain	肌球蛋白重链
FACS	fluorescence-activaed cell sorting	流式细胞术
3T3	mouse embryo fibroblast	小鼠胚胎成纤维细胞
HFF-1	human skin fibroblast	人皮肤成纤维细胞
C2C12	mouse skeletal muscle myoblasts	小鼠骨骼肌成肌细胞
MuSCs	muscle stem cells	肌肉干细胞
PMuSCs	porcine muscle satellite cells	猪肌肉干细胞

第一章 绪论

1.1 组织工程

1.1.1 组织工程简介

在当今社会，随着科技的发展，交通事故及其它事故所造成的人体组织或器官受损的比例在逐年上升，受损的器官和组织的自愈过程需要很长的一段时间且经常达不到预期的愈合效果，由于先天性疾病或者后天患病所造成的组织或器官损害也经常面临无法修复而需要切除的窘境。与此同时，器官和组织移植也面临着自体移植数量紧缺、异体移植互斥反应的难题。组织或器官受损而无法修复一方面会给伤患者的正常生活带来不便，另一方面也会给他们及其家人带来巨大的心理痛苦。人们一直在试图用其他可促进组织自然修复的方法来改善受损组织的修复和再生效果。因此，基于修复或再生组织和器官的需要，融合了细胞学、生物学、基础医学、材料学等多门学科的交叉学科应运而生，这一交叉学科被称为组织工程或组织工程技术^[1]。组织工程技术的研究内容可以分为三大块：细胞、生物支架和生长因子，其中的关键点在于生物支架的构建^[2]。

细胞在生物体内生长需要特定的环境，这个环境被称为细胞外基质环境（ECM）。在组织工程技术中生物支架材料的设计就是为了更贴合这个细胞所需的生长环境，从而对生物材料的细胞相容性具有很高的要求。研究者们利用天然或合成的高分子聚合物来制备具有类似细胞外基质性质的生物支架材料或者仿生支架材料，将细胞培养在支架材料上，通过支架材料的支撑作用使其上的细胞生长、增殖和分化，最后形成组织结构，从而达到促进受损组织的修复和再生的目的^[3]。在生物材料被大量应用于组织工程领域的同时，水凝胶因具有类似细胞外基质的性质也随之被进行广泛的研究。

1.1.2 骨骼肌组织工程

骨骼肌作为最主要的肌肉组织在机体所有器官中占据了最大的比例，约为30%~40%^[4]。骨骼肌在机体的日常生命活动中发挥着许多重要的功能，例如运动能力需要多个肌群的配合才能完成。人体骨骼肌在轻微损伤时具有自发修复和再生的能力，而在严重损伤或患病时骨骼肌的修复和再生能力会受到很大影响，甚至丧失。受伤或肌肉萎缩疾病导致的肌肉功能丧失影响着全球 5.61 亿人，不仅给人们带来严重的经济及心理压力，也造成了巨大的社会负担^[5]。除此之外，家养动物和野生动物在其日常的活动中也会出现肌肉损伤的情况。受伤的骨骼肌修复如果依靠自身的自愈能力，耗时较长，且容易形成瘢痕组织而导致二次损伤，影响后续的行动和生活^[6]。研究可促进受损肌肉修复和再生的方法，不管是对于人类还是其它动物而言都具有重要的意义。在

骨骼肌严重损伤破坏了肌肉组织结构的完整性时，只依靠单纯的干细胞输送或者生长因子注射的方法不足以支撑肌肉的再生，从而需要将干细胞、生长因子与生物支架相结合的组织工程技术。采用组织工程技术对受损的骨骼肌进行修复、重建，也被称为骨骼肌组织工程技术。即骨骼肌组织工程技术是一种利用干细胞、具有良好生物相容性的支架材料和生物活性因子来修复受损肌肉和治疗体积肌肉损失的有效而复杂的方法^[7]。骨骼肌组织工程技术主要分为两种，一种是开发骨骼肌构建体用以增强骨骼肌的修复或模拟骨骼肌的行为^[8]，另外一种如图 1-1 所示，通过开发生物支架用以充当肌肉干细胞生长、增殖和分化的载体从而促进骨骼肌组织的修复和再生^[9]。

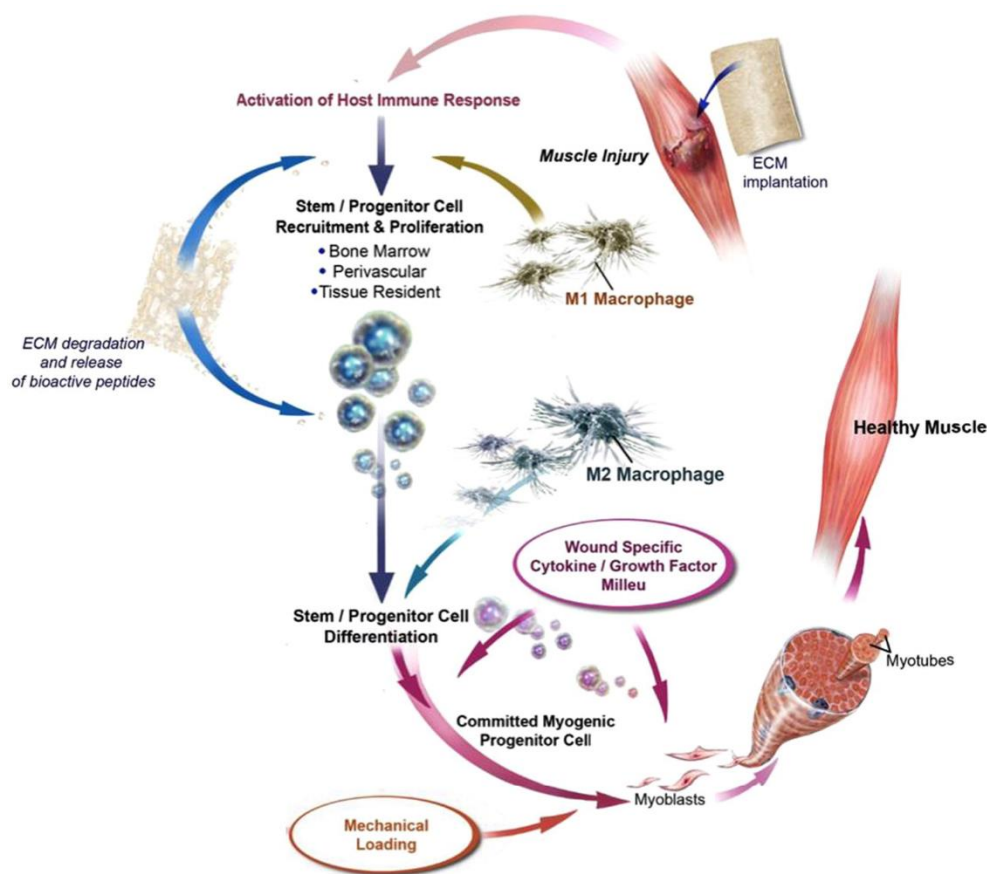


图 1-1 使用 ECM 支架材料的骨骼肌重建示意图^[9]

Figure 1-1 Schematic overview of skeletal muscle reconstruction using an ECM scaffold material

从结构上讲，肉是肌肉骨骼系统失血和脱水的产物，它可以由多种组织形成，包括骨骼肌、骨骼、结缔组织、血管和神经等。它主要是由骨骼肌组成，通过肌腱与骨骼结合，并由组成不同但主要由胶原蛋白组成的结缔组织网络相互连接^[10]。所以骨骼肌组织工程技术也已应用于体外细胞培养肉的生产（图 1-2），目前这是一种可持续的动物蛋白质替代品，用以满足日益增长的人口对动物蛋白消费增加的需求^[11]。联合国粮食及农业组织（FAO）预测，全球人口到 2050 年将超过 90 亿，需要增加 70% 的粮食来满足不断增长的人口需求，且消费者普遍不愿意减少肉类的消费量，这将是一个对有限资源和耕地面积的巨大挑战。与传统生产的肉类相比，细胞培养肉最高可以减

少 45% 的能源消耗, 96% 的温室气体排放量, 99% 的土地使用量和 96% 的用水量^[12], 细胞培养肉给环保意识提高但又不想改变饮食习惯的消费者提供了一种选择。想要将细胞培养肉大规模安全量产变为现实, 研究的重点就要放在原始干细胞的获取与来源、细胞的增殖分化、肌肉组织结构的搭建和口感及质地的优化上。其中肌肉组织结构的搭建是细胞培养肉工艺中最为关键的一步, 即为干细胞搭建专用的培养支架, 该技术属于骨骼肌组织工程技术的范畴。

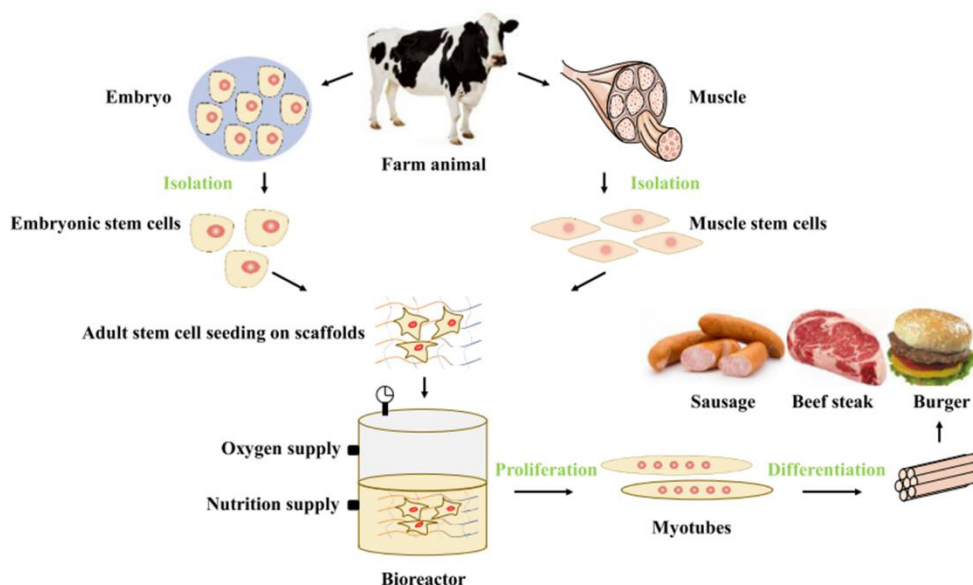


图 1-2 细胞培养肉的生产过程^[13]

Figure 1-2 Process of cell cultured meat

1.2 水凝胶

1.2.1 水凝胶的概述

水凝胶具有由亲水性聚合物链组成的三维 (3D) 网状分子结构, 它能吸收超过自身重量十几甚至上百倍的水分而不溶解于其中, 可以用来模拟与细胞外基质相类似的环境, 从而使得接种在其上的细胞增殖分化, 被广泛用作组织工程的细胞培养支架。将水凝胶支架、细胞和生长因子相结合的方式也被认为是一种有效促进骨骼肌再生的有潜力的方案^[14]。水凝胶的形态介于固态与液态之间, 可通过静电相互作用、共价键等离子相互作用的物理或化学的方式相互交联, 形成单一网络或者多个互穿和半互穿的网络^[15]。

水凝胶的类型多种多样, 水凝胶的分类方式也有很多种, 根据不同材料来源、交联方式、呈现形状等可以对水凝胶进行不同的分类。根据水凝胶材料的不同来源, 可以将其分为天然高分子水凝胶、合成高分子水凝胶和复合高分子水凝胶。天然高分子水凝胶顾名思义就是利用自然界中天然存在的物质作为原料制备的水凝胶, 这些天然物质包括天然多糖^[16]和天然蛋白^[17]。天然高分子水凝胶具有原料易得、生产成本低、

细胞毒性低、降解性好等优点，缺点是机械强度不高，压缩性能和稳定性能相对较差。相反，合成高分子水凝胶的压缩性能和稳定性能会更好。然而，这些合成水凝胶通常会使用一些有毒的化学试剂，这无疑会使得水凝胶的细胞毒性增加，降低了生物相容性，同时也不具备环境友好性，给其在组织工程等领域的应用带来一定的限制。复合高分子水凝胶则是混合使用了天然、合成两种材料，在一定程度上糅合了它们的优点，使得两者能相互取长补短。

根据水凝胶的不同交联方式，可将其分为物理交联水凝胶和化学交联水凝胶^[18]。物理交联水凝胶是指在不使用任何化学交联剂的情况下，通过氢键、静电作用、疏水作用等分子间作用力使得聚合物链交联形成的水凝胶，一般溶胶-凝胶的这个过程是可逆的。化学交联水凝胶的特点则是一定会使用化学交联剂或者化学引发剂，通过共价交联形成水凝胶，交联过程是不可逆的。但化学交联剂或引发剂大体上都具有或多或少的细胞毒性，因此物理交联水凝胶的细胞毒性和稳定性都低于化学交联水凝胶。

根据水凝胶不同的呈现形状，可以将其分为块状、薄膜状、海绵状、纤维状和微球状水凝胶。根据不同组织再生的需求和目的，可以对水凝胶的形状、孔径大小进行相应地调整，这些调整反过来也会影响到水凝胶的降解性、稳定性和力学性能等^[19]。

水凝胶的含水性能以及独特的网络结构，使其在多个领域均具有广泛的应用市场。例如，用于感知温度、光照、pH 值等外界环境变化的智能水凝胶^[20]；具有良好的溶胀率被用作吸附剂吸附污水中的金属离子^[21]；具有多孔网状结构、触变性和可逆性用于药物递送^[22]；具有强粘附性和生物活性用以促进神经修复和神经肌肉功能恢复^[23]。除此以外，水凝胶在传感材料^[24]、组织工程^[25]和伤口愈合^[26]等领域也发挥着重要的作用。但随着水凝胶应用范围的推广，对其性能的要求也越来越高，一些缺点和不足在实际的应用过程中也逐步显现出来。例如天然水凝胶普遍存在的机械强度不高、稳定性差的问题，在一些共价化学交联水凝胶的应用中也存在。当外界环境发生变化时化学键会被破坏，导致化学交联的结构随之发生变化，水凝胶的网状结构就会被破坏甚至造成水凝胶的坍塌，这些环境因素使得水凝胶的应用受到限制。为了提高水凝胶的机械强度，使得水凝胶在实际应用过程中具有更好的力学性能和稳定性，学者们设计了多种交联方式的水凝胶，比如，双网络水凝胶^[27]、纳米和大分子复合水凝胶^[28, 29]、拓扑水凝胶^[30]、疏水缔合水凝胶^[31]等，从而使得水凝胶能适应各个领域的应用。

1.2.2 双网络水凝胶

双网络水凝胶是指由两个互穿或半互穿的聚合物网络组成的水凝胶，根据交联机理，双网络水凝胶可分为共价交联、复合交联和物理交联^[32]。双网络水凝胶的制备方法主要分为两类，第一类是只使用第一种聚合物作为原料形成第一网络，然后浸没在第二种聚合物溶液中，通过光交联、化学交联、物理交联等方式使得第二种聚合物溶液在第一网络中进行聚合形成第二网络；第二类是直接把两种聚合物进行物理或化学

混合，得到具有一定粘度的混合溶液，然后加入交联剂使其互相交联形成双网络水凝胶。相较于单一的网络来说，双网络交联水凝胶的韧性更强，能承受更大的应力，机械强度更高，稳定性能也更好。

双网络水凝胶因其优异的韧性和多种优异特性的结合，已经被广泛研究和应用于伤口愈合^[33]、血管组织工程^[34]和生物医学^[35]等领域。Azadeh 等人^[36]合成了物理交联双网络的高韧性海藻酸盐基弹性凝胶，该凝胶具有与天然血管组织相似的物理、化学和生物学特性。如图 1-3 所示，物理交联的双离子网络，包括一个由硫酸盐和氨基的软软对组成的坚韧网络，以及一个由羧酸盐和氨基的硬软对通过氨酯键形成的较弱网络，其机械性能接近天然血管组织。以天然多糖为主要原料的双网络水凝胶也已经被开发用于肌肉修复和再生。例如，以石墨烯、壳聚糖和结冷胶为主要原料制备的定向纤维水凝胶膜可以引导培养的 C2C12 成肌细胞的初始定位和肌管的形成^[37]；基于海藻酸钠的纳米杂化水凝胶与导电还原的氧化石墨烯纳米片相结合，可以显著促进 C2C12 成肌细胞的黏附和分化^[38]；基于纤维素、海藻酸钠和纤维蛋白原的交联水凝胶在体外显示出促进骨骼肌分化的强大潜力^[39]。然而这些双网络水凝胶通常会使用到一些具有细胞毒性的化学试剂或交联剂，在提高水凝胶的机械强度使其在实际应用过程中具有更好的力学性能和稳定性的同时，也牺牲了一些生物相容性。

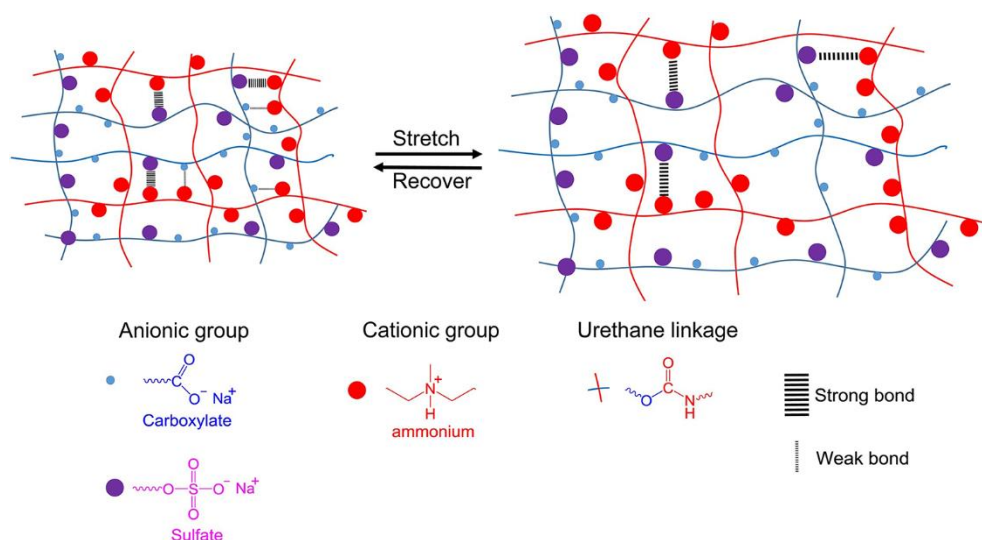


图 1-3 由不同强度的离子网络组成的物理双交联型超分子弹性凝胶的示意图^[36]

Figure 1-3 Schematic presentations of physical double crosslinked supramolecular elastomers composed of ionic networks with different strengths

1.2.3 天然多糖水凝胶材料

天然多糖是一类高分子聚合物，其主要结构由单糖以糖苷键相互缠绕连接的方式形成，这些组成多糖分子链的单糖包括酮糖和醛糖。由于单糖之间的连接方式多种多样，故而天然多糖的形状和分子量的大小是随机的^[40]。天然多糖是生物体内不可缺少的重要物质之一，它作为机体能量的来源，在胞内信息传递、蛋白质合成、蛋白质结

构和功能修饰等方面有着无可取代的地位。天然多糖可以从植物中提取，可以从微生物中提取，也可以从动物身上提取，所以它在自然界中的储量充沛。常见的代表性天然多糖种类有：从植物中提取的多糖，例如海藻酸钠；从微生物中提取的多糖，例如黄原胶；从动物身上提取的多糖，例如壳聚糖。除了这些代表性的天然多糖以外，还包括纤维素、透明质酸、琼脂糖、硫酸软骨素、淀粉、果胶、明胶、葡聚糖等^[41]。

天然多糖因具有来源广泛、成本低、生物相容性好、可生物降解等优点，以其作为主要原料制备的水凝胶已经被广泛应用于食品^[42]、生物医药^[43]及组织工程相关的领域^[44]。不同来源的天然多糖的分子结构、溶解度、亲水性等理化性质也有很大的差异，以下是一些常见的天然多糖水凝胶材料。

1.2.3.1 纤维素

纤维素是自然界中存在范围最广、数量最多的天然多糖，也是主要存在于植物细胞壁和细菌中的由 β -1,4-葡萄糖苷键连接的 D-吡喃葡萄糖（图 1-4），其碳含量在植物界中的占比高达 50% 及以上^[45]。棉花是天然纤维素的主要来源，其纤维素含量最高达 100%。木材是天然纤维素的第二大来源，其纤维素含量可达 40%-50%，具有相似纤维素含量的材料还有竹子、甘蔗渣、稻草等^[46]。天然纤维素具有可再生性，无细胞毒性，良好的降解性、生物相容性及力学性能等优点，使得其作为生物材料在多个领域得到了广泛的应用，并根据不同的应用领域可被加工为不同的尺寸长度。例如，食品领域，基于纤维素的水凝胶薄膜通过与其他材料共混可提升其力学强度，用于食品包装^[47]；在组织工程领域，纤维素以纳米颗粒的形态制备了纳米纤维素水凝胶，可用作组织工程细胞培养支架^[48]；Kruger 等人^[49]通过高压匀浆的方式制备了具有剪切稀化性质、可自愈的纳米纤维素水凝胶，将肝细胞接种在该纳米水凝胶上显示肝细胞具有良好的分化能力。纤维素以纳米尺寸制备水凝胶作为组织工程细胞培养支架较为常见，其他较大尺寸的纤维素水凝胶支架的研究还比较少见^[50]。

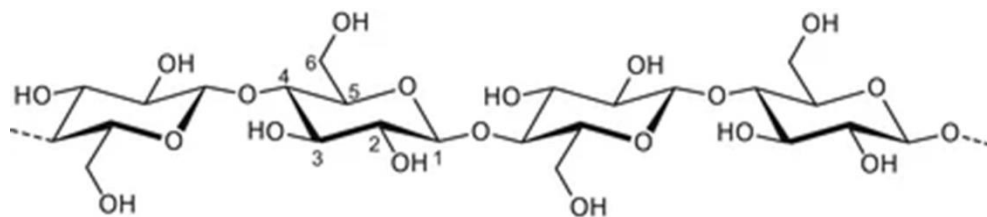


图 1-4 纤维素的结构式^[46]

Figure 1-4 The structural formula of cellulose

1.2.3.2 透明质酸

透明质酸（HA）是一种具有二糖重复单元结构的天然多糖（图 1-5），其二糖单元由 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰基葡萄糖组成^[51]。一般情况下，HA 的主要存在形式为具有弱酸性质的透明质酸钠盐^[52]。HA 作为糖胺聚糖在体内主要存在于细胞外基质中，

大分子 HA 主要起到维持细胞正常形态及其生长环境的作用，小分子 HA 主要起到胞内信息传递的作用。HA 水凝胶及其相关的载药制剂已经应用于组织工程和多种药物释放模型。例如，Kutlusoy 等人^[53]将壳聚糖和 HA 作为原料制备了孔隙率约为 90%-95% 的低温凝胶，通过添加不同浓度的 HA，除了可以提高凝胶的力学性能和生物材料性能，还可以促进 3T3 和 SAOS-2 细胞的黏附和增殖，该低温凝胶可以作为细胞培养支架应用于组织工程领域；以聚己内酯（PCL）和含 L-抗坏血酸（AA）的 HA 为原料，制备了静电纺丝支架，将 L929 成纤维细胞植入其中，与 PCL 支架相比，PCL/HA/AA 支架上 L929 成纤维细胞的生长、增殖和粘附能力增强，证明了纳米纤维支架的包封效率和抗坏血酸的成功释放^[54]。以上的研究表明了 HA 在组织工程和药物递送领域的安全性、可降解性和生物相容性，为 HA 水凝胶的制备与设计提供了一定的参考。然而，HA 依旧存在亟待解决的问题，例如降解率较低、力学性能较差、生物半衰期较短等缺点，使得 HA 水凝胶在组织工程领域的应用受到了限制。针对上述问题，目前的解决方法主要是对 HA 的醛基进行化学修饰得到醛基化 HA，来满足组织工程领域对于支架材料的力学性能和降解性能的要求。

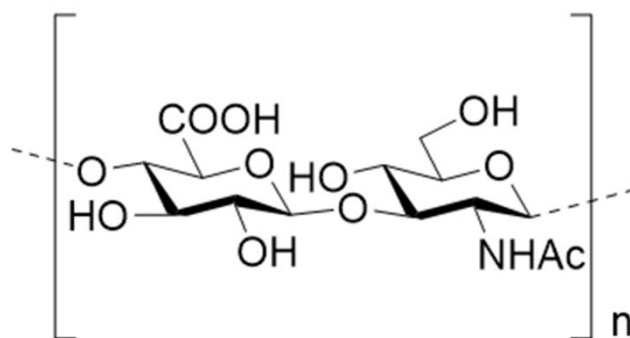


图 1-5 透明质酸的结构式

Figure 1-5 The structural formula of hyaluronic acid

1.2.3.3 淀粉

淀粉是一种没有明显细胞毒性的天然多糖，且来源丰富、价格低廉。一般将淀粉按照结构进行两大分类：直链淀粉和支链淀粉^[55]。直链淀粉顾名思义其结构为线性结构，主要通过 α -1,4 糖苷键进行连接；支链淀粉是在直链淀粉的基础上的分支，分支结构主要通过 α -1,6 糖苷键进行连接（图 1-6）。淀粉的主要来源是木薯、土豆、大米和玉米等农作物，除了具有价格低廉的优点，还具有可再生、可大规模生产、可降解、对环境友好等优点。但在实际应用的过程中，也发现了淀粉会存在机械强度低、稳定性差、容易老化脆断等问题，这些缺点限制了它的使用范围。所以只能通过物理法、化学法、生物酶法等淀粉改性的方式来克服淀粉自身存在的缺陷，从而扩大其在污水处理、生物医学、组织工程等领域的应用范围。在水处理领域，用低成本的聚丙烯酰胺和淀粉作为原料的杂化水凝胶被用于吸附废水中的有机污染物苯酚，在淀粉和交联

剂用量为 $21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时，水凝胶对苯酚的吸附量达到最大。此外，解吸研究表明，约 60% 的苯酚得到释放，说明用于苯酚废水处理后的水凝胶可进行重复利用^[56]；在生物医药领域，化学改性后的乙醛羟乙基淀粉（AHES）和氨基羧甲基壳聚糖（ACC）可通过醛与氨基的席夫碱反应制备 AHES/ACC 水凝胶。水凝胶的凝胶时间、溶胀率、降解率和机械拉伸等理化性能可以随着氨基和醛含量的变化而变化，具有可调节性。实验结果同时也表明，接种在 AHES/ACC 水凝胶上的骨髓间充质干细胞具有良好的活力，体内生物相容性实验也证实 AHES/ACC 水凝胶对心、肝、肾等器官均无毒害作用，且具有良好的组织黏附和凝血能力^[57]；在组织工程领域，Hsieh 等人^[58] 用化学的方法使聚乙烯醇（PVA）和淀粉交联，形成吸水率高达 800%、机械强度可达 $4 \times 10^{-2} \text{ MPa}$ 、28 天内被各种酶降解高达约 30%-60%、支持小鼠的 NIH3T3 成纤维细胞生长和增殖的三维支架。以羧化淀粉和壳聚糖为原料制备的复合支架，随着淀粉含量的增加，支架的机械强度、羧基含量和溶胀率均有较大幅度的提高，细胞培养的实验表明，较高的淀粉含量有利于促进成骨样细胞（MG63）的增殖、ALP 活性和基质矿化^[59]。

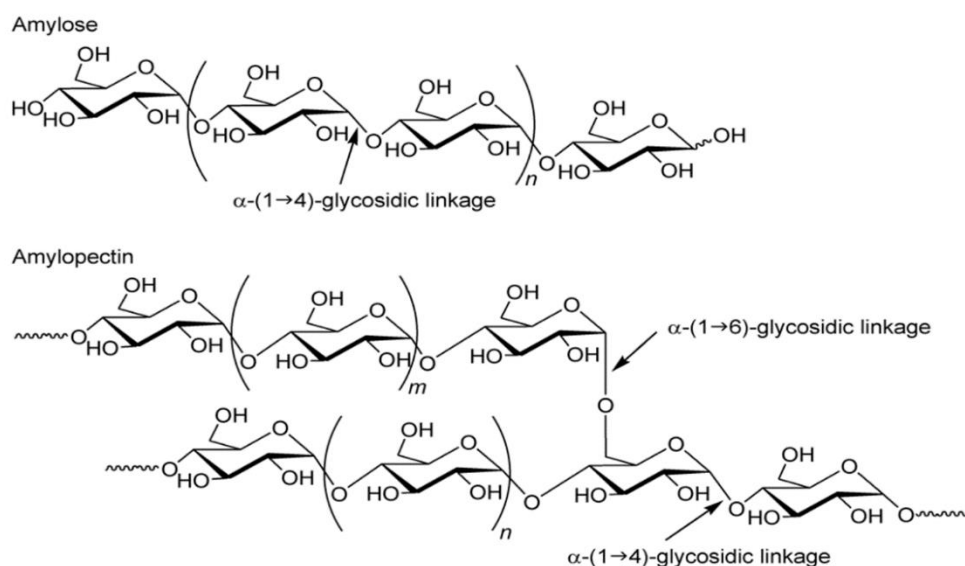


图 1-6 直链淀粉和支链淀粉的结构式^[55]

Figure 1-6 The structural formula of amylose and amylopectin

1.2.3.4 壳聚糖

壳聚糖（CS）是甲壳素的脱乙酰基衍生物，是一种从海洋生物壳类废弃物中发现并大量提取的聚阳离子多糖，也是在自然界中尚存的独一无二的天然聚阳离子多糖^[60]。它由 β -(1→4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖和 β -(1→4)-2-对乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖所组成（图 1-7），因为这个结构类似于细胞外基质的多糖结构，故可以加强 CS 水凝胶与细胞之间的相互作用，促进细胞的黏附和增殖^[61]。CS 投产惯用的方法是酸碱法，但此方法仍然存在许多有待解决的问题，例如酸碱性过强、降解速度较慢、降解产物聚合度

低、产物纯化困难等。基于此，CS 的其他提取方法也在逐步开发，例如酶法和微生物发酵法。

由于 CS 分子内和分子间含有大量的伯氨基，它们之间的氢键相互作用使得 CS 成为难溶于水和碱性液体的物质，但这些氨基可以被质子化带正电，使得 CS 展现其阳离子的性质，所以在酸性条件下可以增加 CS 的溶解度^[62]。也有一些研究人员对 CS 分子链进行了脱乙酰化^[63]、羧甲基化^[64]、季铵盐化^[65]等化学基团的修饰，从而使得 CS 的溶解度得到较大的提高，但化学试剂的使用同时也会使材料的生物活性受到一定的影响。天然的 CS 由于具有良好的生物相容性、无毒性、抗菌活性、生物降解性和较低的免疫原性等优点，被许多国家的研究人员当作一种理想的医学和组织工程生物材料使用^[66]。将可注射的 CS 水凝胶作为填充材料加入到 3D 打印多孔钛植入物中，并通过引入 CaCl_2 和 CO_2 扩散进行原位矿化，被证明可以促进骨间充质干细胞（BMSCs）的粘附和增殖，在骨组织工程中具有很大的应用潜力^[67]。当具有导电性能的材料与 CS 形成复合凝胶时，可导电性能和 CS 的亲水性可以促进细胞的黏附和增殖，故其可以作为一种敷料用于伤口修复^[68]。除此之外，经过炎症反应导致的细胞迁移和生长因子的释放，使得成纤维细胞可以被激活从而进行增殖，CS 的抗菌性能得到发挥，从而具有更好的止血效果和促进组织再生的作用^[69]。

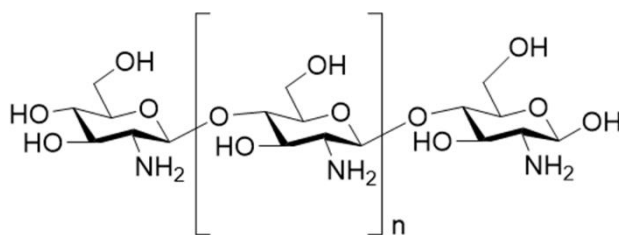


图 1-7 壳聚糖的结构式

Figure 1-7 The structural formula of chitosan

1.2.3.5 海藻酸钠

虽然海藻作为食物的历史悠久，但海藻酸钠（SA）在 19 世纪 80 年代才被科学家 Stanford 从褐藻中提取出来^[70]。SA 是由 β -D-1,4-甘露糖醛酸（M）和 α -L-1,4-葡萄糖醛酸（G）组成的天然聚阴离子多糖（图 1-8），分子链上存在着 MM、GG、GM 三种片段，这三种片段分别代表了 SA 的粘弹性与刚性，三种片段按照粘弹性排列的顺序为： $\text{MG} > \text{MM} > \text{GG}$ ，各片段刚性与粘弹性的排列顺序正好相反^[71]。一般情况下 G 段的活性比 M 段要强，M 段比 G 段更具柔性，G 段比 M 段更具刚性。材料中 M 段和 G 段的比例主要由材料的来源所决定，同时 M 段和 G 段的比例反过来也会影响材料的性能^[72]。SA 的 G 段与二价阳离子螯合形成“蛋盒”结构，故 SA 能与二价阳离子（如 Ca^{2+} ， Mg^{2+} ）发生相互作用来制备离子交联的水凝胶^[73]。但因为二价阳离子与 SA 螯合的速度过快，所以形成的 SA 水凝胶的机械强度不均匀，稳定性较差^[74]。带有阴离子特性

的 SA 还可以与其他带阳离子性质的物质产生静电相互作用，形成聚合物水凝胶。然而，由于阴阳离子间的静电相互作用的反应速度太快，通常也会导致凝胶不均匀，使得水凝胶机械强度不稳定^[75]。所以，控制交联反应的速度是提高 SA 水凝胶力学强度和稳定性的关键因素之一。

因为 SA 具有生物相容性高、容易凝胶、来源广泛和物美价廉等优点，现今已成为水凝胶制备的重要原料，广泛应用于药物输送、伤口愈合和组织工程等领域^[76]。在药物输送领域，以 SA 作为主要原料的水凝胶可以用于药物包封，随着凝胶在体内的降解药物逐渐得到释放，从而控制药物的释放速度，增强药效作用时长达到缓释的治疗效果^[77]。在伤口愈合领域，以 SA 为主要原料制备了不同类型的凝胶作为伤口敷料，这些类型的凝胶包括水凝胶、薄膜、海绵等，且都具有可注射的性质。它们与药材相结合，除了可以释放出促进伤口愈合的活性因子，还具备止血、吸取伤口渗出液等功能。可注射性使其可以准确地到达伤口创面，减少因外科手术带来的二次创面面积^[78]。在组织工程领域，通过利用 3D 打印技术构建了 SA/CS 复合支架，将人脂肪来源的干细胞接种在该水凝胶上，发现其可以促进干细胞的黏附和增殖^[79]；以 SA 为主要原料制备的水凝胶也被用于成纤维细胞的体外培养，该 SA 水凝胶可模仿人类皮肤的功能^[80]；SA 水凝胶在人骨骼肌祖细胞（hSMPCs）的体外培养中可促进细胞的增殖和分化，在骨骼肌组织工程领域具有很大的应用潜力^[81]。

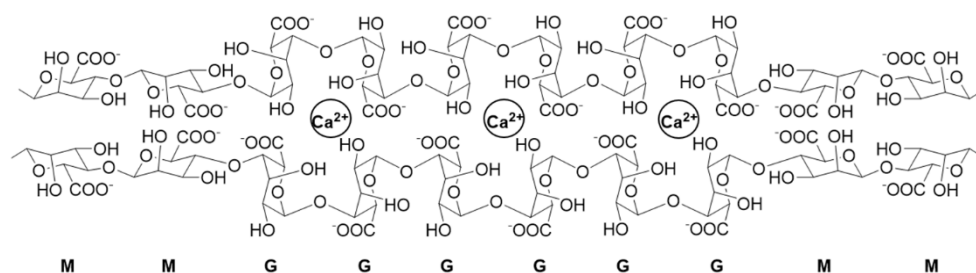


图 1-8 海藻酸钠分子链上的三种结构片段以及螯合反应原理

Figure 1-8 Three structural segments of SA molecular chains and principles of chelation reaction

1.3 骨骼肌再生相关因素

在目前的骨骼肌再生修复的研究中，研究者们大多都将其分为三个阶段：清除期，修复期，塑形期^[82]。受伤的骨骼肌首先会出现炎症反应，由巨噬细胞和炎症细胞等细胞将坏死的组织和细胞碎片进行清除；炎症反应激活成肌前体细胞，前体细胞开始增殖，然后在生长因子和生肌调节因子的作用下进行肌源性分化，形成的肌纤维再进一步生长和成熟。总之，骨骼肌组织工程中受损肌肉的再生修复是肌肉干细胞（MuSCs）和生肌调节因子在生物支架材料上的相互协调、相互作用的一个过程。

1.3.1 肌肉干细胞

MuSCs 也被称为肌肉卫星细胞, 是骨骼肌再生的主要干细胞来源, 在骨骼肌的发育、维持、修复和再生过程中发挥着无可替代的作用^[83]。骨骼肌由无数的肌纤维组成, MuSCs 与肌纤维的联系紧密, 在成熟肌纤维的肌膜下可以找到干细胞, 其位于肌纤维的肌膜和基板之间。MuSCs 在胚胎发育时期就与骨骼肌一起存在, 其数量在新生儿时期就趋于稳定并达到最大值, 然后随着年龄的增长 MuSCs 的数量会随之减少, 但这些留下来的干细胞依旧具有很强的成肌分化能力^[84]。一般情况下 MuSCs 均处于静止状态, 但当肌肉受损时, 它会被激活转变为成肌细胞, 成肌细胞在受伤的肌肉部位生长、分化, 然后融合形成新的肌管, 促进肌肉受损部位的修复与再生^[85]。在 MuSCs 被激活增殖得到成肌细胞的同时, 它也会进行自我更新。MuSCs 的特征是配对盒转录因子 7 (Pax7) 的特异性表达, Pax7 作为 MuSCs 从静止状态到激活状态的一个可量化的标记物, 在 MuSCs 的正常生长发育过程中发挥着无可取代的作用。当小鼠被敲除了控制 Pax7 表达的基因后, 小鼠的骨骼肌会丧失其再生功能, 说明 Pax7 在小鼠骨骼肌再生中发挥着主导作用^[86], 故可以通过 Pax7 对 MuSCs 进行识别。

1.3.2 生肌调节因子

肌肉的修复和再生过程会受到生肌调节因子的影响, 生肌调节因子的特异性表达主要受成肌调节因子家族 (MRFs) 的调控。MRFs 家族的生肌调节因子成员主要包括: 成肌分化因子 (MyoD)、生肌决定因子 5 (Myf5)、肌细胞生成素 (MyoG) 和生肌决定因子 4 (Myf4), 这些家族成员间的协同或拮抗作用可以调控细胞的转录^[87], 对肌肉发育和再生过程中的肌源性分化和维持起着重要作用。在骨骼肌受损后, MuSCs 被激活从而特异性表达 Pax7, Pax7 表达量的增加可以使得 Myf5 和 MyoD 的表达量也迅速增加, MuSCs 再通过 MyoD 和 Myf5 的表达来启动成肌程序, 大量增殖形成成肌细胞。成肌细胞开始分化后, Pax7 表达量逐渐减少, 并转由 MyoG 和 Myf4 来促进成肌细胞的终末分化^[88]。MRFs 家族成员之间的表达量可以相互影响、相互调控, 当细胞内缺少 MyoD 表达的基因时, MyoG 在细胞内表达量也会随之降低, 反之则增加。MyoG 可以对 Pax7 的表达起抑制作用, 故又可以反过来对 MyoD 的表达形成正反馈或负反馈的作用。表达 MyoD 和 Myf5 的基因被敲除时, 成肌分化会受到抑制^[89]。此外, 在骨骼肌的再生过程中, 可以根据 Pax7 和 MyoD 的表达情况对 MuSCs 的状态进行分析判断: Pax7⁺/MyoD⁻表示 MuSCs 处于静止状态; Pax7⁺/MyoD⁺表示 MuSCs 处于增殖状态; Pax7⁻/MyoD⁺表示 MuSCs 正处于肌源性分化阶段, 随后细胞会逐渐融合形成多核肌管, 多核肌管成熟后形成肌纤维。Pax7⁺/MyoD⁻除了可以表示静止状态的 MuSCs, 还可以表示小部分由被激活的 MuSCs 产生的非分裂单核细胞, 这小部分细胞恢复到静止状态后又变回静止的 MuSCs, 这个过程被称为 MuSCs 储备库的自我更新过程, 这一过程保障了肌肉再生的可持续性。在骨骼肌再生的过程中, 被激活的 MuSCs 的表面存

在 MyoD, 故检测干细胞的表面抗原标志物 MyoD 的表达也可作为一种鉴定细胞是否为 MuSCs 的方法。

1.3.3 肌球蛋白重链

肌球蛋白重链 (MyHC) 是一种蛋白质, 它由两条重链和四条轻链组成, 作为肌球蛋白的基本组成单位, 其主要任务是维持肌细胞的正常功能^[90]。骨骼肌的单个肌小节中有一个由肌球蛋白头和肌动蛋白相互连接而成的交叉桥, ATP 被酶水解以后释放的能量会使得该交叉桥交替循环形成, 从而引起肌肉的收缩运动。在哺乳动物骨骼肌内有四种具有不同的收缩力和氧化性能的肌纤维, 这四种肌纤维的类型分别是: 慢速氧化 I 型, 快速氧化 IIA 型, 快速糖酵解 IIB 型和中间性质 IIX 型。MyHC 也参与成肌细胞的终末分化, 促使成肌细胞融合为肌管, 肌管进一步成熟形成肌纤维, 至此完成骨骼肌的修复和再生过程, 所以 MyHC 的表达水平在很大程度上决定肌纤维的类型, 从而决定肌肉的收缩和生理特性^[91]。例如, 在人体中, 当肌纤维类型为氧化型时, 肌纤维的收缩速率较慢, 但抗疲劳的能力较强; 当肌纤维类型为快速糖酵解型时, 肌纤维的收缩速率较快, 但相应的抗疲劳能力较弱。故 MyHC 是否存在特异性表达可以用来鉴定 MuSCs 是否具有成肌分化的能力。

1.4 本文研究意义及内容

1.4.1 研究意义

理想的组织工程支架应该具备有利于细胞黏附、生长和增殖的三维环境, 允许营养物质、废物传递以及组织再生的孔隙结构, 合适的机械强度, 良好的生物相容性, 以及一定的可塑性。基于以上特点, 大量不同的支架材料被运用到组织工程领域, 极大地促进了组织工程的发展。但是, 目前的支架材料的构建还无法完全达到理想支架的要求, 还存在一定差距。因此, 寻找天然可再生、来源广泛、生物相容性高、降解性好、与骨骼肌组织结构和性能接近的支架材料, 制备出质地均匀、形状可控, 具有良好的降解性、合适的机械强度、表面有利于细胞黏附生长等优点的组织工程支架是骨骼肌组织工程领域发展的关键因素, 同时也可促进天然可再生材料在骨骼肌组织工程领域的开发和应用。

本文以 CaCO_3 作为 SA 交联的钙源, 制备了以 CS 与 SA 为主的物理交联双网络 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架。通过将各组分材料物理共混, 采用缓慢凝胶的方法, 将离子交联与异种电荷之间的静电交联相结合而形成双网络结构, 实现了 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶的均相交联, 从而避免了因剧烈瞬时的离子和静电相互作用所造成的不均匀絮凝沉淀导致水凝胶的形状不可控、质地不均匀的问题, 提高了 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架结构的均匀性和规整性。物理共混的方法, 使得 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架保留了天然多糖材料本身所具有的良好生物相容性。双网络结构既提高了 CS/SA/ Ca^{2+} 水凝胶支架的力学

性能，又提高了其在生理盐水中的稳定性。通过组分优化也实现了材料之间的优势互补，赋予 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架许多优异的理化性能，在骨骼肌组织工程领域具有一定的应用潜力。

1.4.2 研究内容

本文研究内容主要包括以下两个部分：

(1) 将 CS、SA 和 CaCO₃ 结合在一起，制备物理交联双网络 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架。通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、x 射线光电子能谱 (XPS)、扫描电子显微镜 (SEM)、压缩测试和降解测试等实验，测定不同摩尔比的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的交联强度、孔隙结构、机械性能和降解率等理化性质。

(2) 先研究商业化小鼠骨骼肌成肌细胞 (C2C12) 和猪肌肉干细胞 (PMuSCs) 在 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架上的黏附、生长和增殖的情况。原代干细胞与商业化细胞系相比，具有更接近机体细胞的生物学性状，可更好地反映细胞在体内的生长状态。因此，进一步从仔猪背最长肌组织中分离提取原代肌肉干细胞 (MuSCs) 并进行生物学鉴定，然后将提取的 MuSCs 接种于 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架上，观察 MuSCs 在 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的生长、黏附和增殖的情况，评估物理交联双网络 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架在骨骼肌组织工程领域应用的潜力。

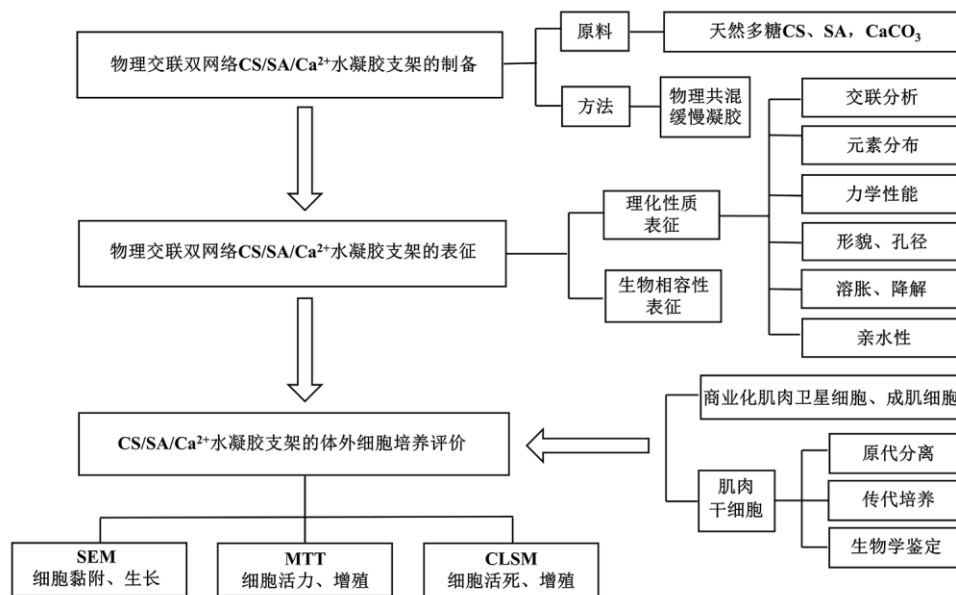


图 1-9 本研究技术路线图

Figure 1-9 Technology roadmap of this study

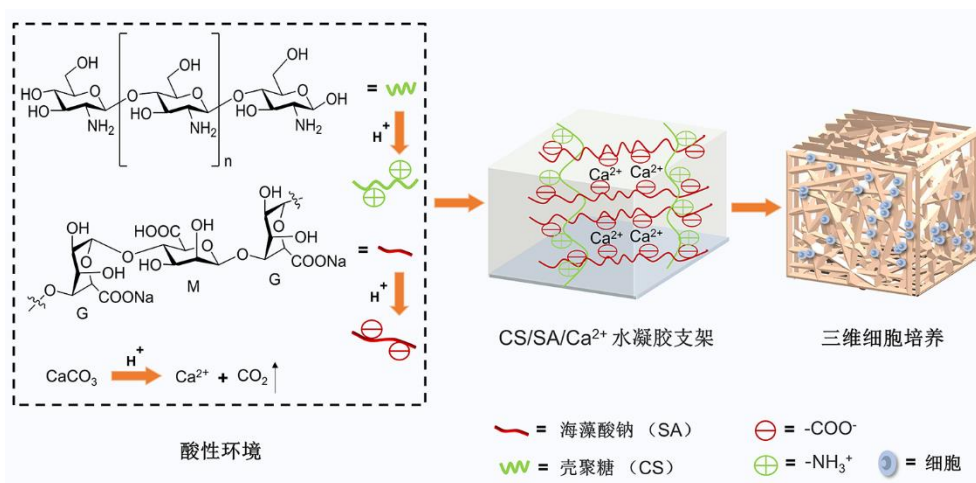
第二章 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的制备及表征

2.1 引言

水凝胶具有类似细胞外基质的性质，生物相容性好且含水量高，是由亲水性聚合物链组成的三维（3D）分子网络，降解率、孔隙率以及其他的理化性质都可以进行设计调节。与二维（2D）细胞培养相比，具有 3D 结构的支架可以更好地模拟细胞生长及促进营养物质和氧气扩散的体内微环境，故 3D 支架已被广泛用作组织工程的细胞培养支架^[14]。然而，对基于天然多糖制备的水凝胶而言，其机械强度较差，因而在实际应用过程中的稳定性也比较差，这也是天然多糖水凝胶在组织工程领域应用中的一个主要限制因素。为了提高天然多糖水凝胶的机械强度，目前的方法主要是通过改变水凝胶的交联方式，其中包括纳米复合交联^[92]、疏水缔合^[93]和双网络交联^[94]等。

由两个互穿或半互穿的聚合物网络交联形成的水凝胶被称为双网络水凝胶或双交联网络水凝胶^[95]。两个网络的形成互相独立、互不干扰，且两个网络的交联密度有所区别。一般来说主要交联网络的交联密度较为紧密，次要交联网络的交联密度较为松散。交联紧密的主要网络使得水凝胶具有一定的压缩模量，从而使水凝胶具有一定的机械强度；交联松散的次要网络除了可以增强水凝胶的稳定性以外，还可以使得水凝胶具有一定的韧性。两个网络之间相互取长补短，通过优化两个网络之间的材料组成，可以调节水凝胶的各种性质，使得水凝胶更具灵活性。然而，这些双网络水凝胶通常需要使用额外的具有细胞毒性的交联剂来确保机械强度^[96, 97]，在提升水凝胶稳定性的同时也降低了水凝胶的生物活性。开发合适的支架是组织工程的关键要求之一，物理交联的双网络结构，可以提高水凝胶的稳定性，减少水凝胶的细胞毒性，促进水凝胶在骨骼肌组织工程领域的应用。

天然多糖 CS 和 SA 具有良好的生物相容性，来源广泛，价格低廉。质子化的 CS 和 SA 携带相反的电荷，可以通过静电相互作用形成聚电解质水凝胶。但在形成聚电解质水凝胶时，由于阴阳离子间的瞬时相互作用，很容易出现沉淀不均匀和机械强度不稳定的情况。在本研究中，往 CS、SA 和 CaCO₃ 的混合物中加入一定量的酸，形成前驱溶液，可以提高 CS 的溶解度，防止其因重力沉淀。然后，前驱溶液在酸性环境中缓慢形成凝胶，从而使得水凝胶的结构更均匀、机械强度更稳定。CaCO₃ 作为 SA 的交联钙源，缓慢释放的 Ca²⁺ 可以与 SA 中的 G 嵌段螯合，增强水凝胶的稳定性。此外，其在酸性环境中能产生二氧化碳气体，在水凝胶中产生所需的微孔结构。探讨了不同 CS/SA/Ca²⁺ 摩尔比对提高 CS/SA/Ca²⁺ 水凝胶支架凝胶均匀性和机械强度的作用，对 CS/SA/Ca²⁺ 水凝胶支架的形态、孔隙结构、溶胀率、降解率、流变性能和细胞毒性等方面的影响，该水凝胶具有成为骨骼肌组织工程细胞培养支架的潜力。

图 2-1 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的制备及其在三维细胞培养中的应用示意图Figure 2-1 Schematic of production of the CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffold and its application in 3D muscle cell cultured

2.2 实验材料

2.2.1 材料和试剂

本章使用到的主要材料和试剂如表 2-1 所示。

表 2-1 材料和试剂

Table 2-1 Materials and reagents

名称	规格	生产厂家
海藻酸钠	低粘度，纯度≥95%	Sigma-Aldrich 公司
壳聚糖	脱乙酰度≥95%，粘度 100-200 mpa·s	上海麦克林生化科技有限公司
碳酸钙	分析纯	上海麦克林生化科技有限公司
冰乙酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
二甲基亚砜	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
胰酶	生物试剂	Sigma-Aldrich 公司
DMEM 培养基	生物试剂	Gibco-Invitrogen 公司
青霉素-链霉素	生物试剂	Gibco-Invitrogen 公司
胎牛血清	生物试剂	Thermo Fisher 公司
胰蛋白酶	生物试剂	上海阿拉丁工业公司
新生牛血清	生物试剂	杭州四季青有限公司
噻唑蓝	生物试剂	上海生工生物工程股份有限公司

2.2.2 仪器与设备

本章使用到的主要仪器与设备如表 2-2 所示。

表 2-2 仪器与设备

Table 2-2 Instruments and equipment

名称	型号	生产厂家
电子天平	AX224ZH/E	奥豪斯仪器有限公司
磁力搅拌器	T09-1S	上海司乐仪有限公司
高压蒸汽灭菌锅	Autolave	致微厦门仪器有限公司
冷冻干燥机	Free Zone Plus 6	美国 LABCONCO 公司
红外光谱仪	Nicolet iS50	Thermo Fisher 公司
x 射线光电子能谱仪	Thermo EscaLab 250Xi	Thermo Fisher 公司
万能试验机	E43.104	美国 MTS 公司
旋转流变仪	DHR3	美国 TA 公司
细胞培养箱	Thermo	Thermo Fisher 公司
酶标仪	1510	Thermo Fisher 公司
超纯水仪	Milli-Q Biocel	Millipore 公司
扫描电子显微镜	Quanta 200	FEI 公司
离心机	Centrifuge 5804R	Eppenddorf 公司

2.2.3 细胞株

本章使用到的细胞株如表 2-3 所示。

表 2-3 细胞株

Table 2-3 Cells

名称	来源
小鼠胚胎成纤维细胞 (3T3)	中国科学院上海细胞库
小鼠骨骼肌成肌细胞 (C2C12)	中国科学院上海细胞库
人皮肤成纤维细胞 (HFF-1)	中国科学院上海细胞库

2.3 实验方法

2.3.1 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的制备方法

保持 CS 和 SA 的总含量为 2 wt% 不变, CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架根据一定的 CS/SA/Ca²⁺摩尔比进行制备 (表 2-4)。首先将一定量的 CaCO₃ 粉末与去离子水加入烧杯中并置于磁力搅拌器上, 室温搅拌均匀后, 加入一定量的 SA 粉末, 继续搅拌直至 SA 完全溶解。然后将一定量的 CS 粉末加入到 SA 溶液中继续搅拌, 并在搅拌过程中逐滴加入醋酸 (用量占溶液体积的 1%), 持续搅拌直到 CS 均匀地分布在 SA 溶液中形成一个浆状的前驱溶液。将前驱溶液倒入事先准备好的注射器模具中, 再把模具置于装有醋酸的离心管内, 然后将离心管密封并在室温下放置 24 h, 直至前驱溶液在酸性环境下缓慢转变为水凝胶。将完全凝胶后的水凝胶从注射器模具中取出, 用去离子

水多次浸泡冲洗以除去多余的醋酸，然后直接保存在 4°C 冰箱中或者在冷冻干燥机上冻干备用。

表 2-4 样品的表示方法和制备水凝胶的 CS/SA/CaCO₃ 的组成

Table 2-4 Sample notation and the composition of the CS/SA/CaCO₃ formulations used for the fabrication of hydrogels

样品组别	摩尔比		
	CS	SA	CaCO ₃
H-1.0	1	1.0	0.20
H-1.1	1	1.1	0.22
H-1.2	1	1.2	0.24
H-1.3	1	1.3	0.26
H-1.4	1	1.4	0.28
H-1.8	1	1.8	0.36
H-2.2	1	2.2	0.44
H-2.6	1	2.6	0.52
H-3.0	1	3.0	0.60
H-3.4	1	3.4	0.68

2.3.2 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的理化性能及生物相容性的表征

2.3.2.1 傅里叶变换红外光谱测试

傅里叶变换红外光谱（FTIR）可以测定特定化学基团的存在。采用衰减全折射（ATR）方法在红外光谱仪上测量了 CS、SA 以及冻干的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的红外光谱。设置的测试条件：扫描范围 4000-600 cm⁻¹，分辨率 0.5 cm⁻¹，扫描次数 32 次。

2.3.2.2 x 射线光电子能谱测试

通过 x 射线光电子能谱（XPS）检测 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的表面元素，验证 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的材料组成。以 Al 靶材为阳极靶材，设置总光谱为 0-1200 eV 扫描，得到的数据通过 vantage 软件进行处理。

2.3.2.3 扫描电子显微镜分析

将冻干的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架浸泡在液氮中，小心掰断以获得水凝胶支架的内部横截面。CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架样品经过金溅射后用导电胶粘贴在样品台上，使用扫描电子显微镜（SEM）在 5 kV 加速电压下观察水凝胶支架的微观结构。并在 200 μm 标尺下（n = 10），利用 Nano Measurer 1.2 软件和 SEM 图像测量水凝胶支架的平均孔径。使用 SEM 配置的能量色散光谱仪（EDS）检测 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架表面的元素分布情况。

2.3.2.4 孔隙率测试

采用液体置换的方法对 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的孔隙率进行测定。首先将冻干的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架完全浸泡在无水乙醇中，待其吸附饱和后取出并用滤纸轻轻擦拭水凝胶支架表面的无水乙醇。分别称量 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架在浸入无水乙醇前后的重量，每组设置三个平行实验。使用公式（1）计算 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的孔隙率：

$$\text{孔隙率 (\%)} = (w_1 - w_0) / \rho_0 V \times 100 \% \quad (1)$$

式（1）中 ρ_0 为无水乙醇的密度， V 为冻干 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架在浸入无水乙醇前的体积， w_0 为冻干 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架浸入无水乙醇前的重量， w_1 为浸入无水乙醇后 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的重量。

2.3.2.5 机械性能测试

使用万能试验机来测试 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的压缩性能。将 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架（ $d = 12 \text{ mm}$ ， $h = 10 \text{ mm}$ ）放置在万能测试机的圆形金属板与称重传感器（50 kgf）之间，以 $1 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 的十字头速度将 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架样品压缩至其厚度应变的 80%。CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的压缩模量由其应力-应变曲线的线性弹性区域的斜率进行计算，以压缩应力为 10% 的应变来表示 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的抗压强度。

2.3.2.6 旋转流变仪测试

使用旋转流变仪测定了 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架（ $d = 12 \text{ mm}$ ， $h = 10 \text{ mm}$ ）在振荡频率模式下的储能模量（ G' ）和损耗模量（ G'' ）。在应变 $\gamma = 0.5\%$ ，角频率 $\omega = 0.1 \sim 100 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ 的条件下，将每组 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架样品置于直径为 40 mm、间隙为 500 μm 的平行板之间，设置温度为 25°C。

通过稳定速率扫描的方法测量了 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架前驱溶液的粘度，在 25°C 的条件下，设置固定应变 $\gamma = 0.5\%$ ，剪切速率从 0.01 到 1000 s^{-1} 。

2.3.2.7 平衡溶胀性能测试

将 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架（ $d = 12 \text{ mm}$ ， $h = 10 \text{ mm}$ ）在冷冻干燥机中进行冷冻干燥。称量冻干后的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的重量，然后在 37°C 条件下将水凝胶支架完全浸入 PBS 溶液（ $\text{pH} = 7.4$ ）中，静置 24 h。等待 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架吸水溶胀平衡后，立即测量水凝胶支架样品的重量。每组设置三个平行实验，使用公式（2）计算 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的溶胀率：

$$\text{溶胀率 (\%)} = (w_1 - w_0) / w_0 \times 100 \% \quad (2)$$

式（2）中 w_1 表示吸水溶胀后的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的重量， w_0 表示冻干 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的原始重量。

2.3.2.8 降解性能测试

将冻干后的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架 ($d = 12\text{ mm}$, $h = 10\text{ mm}$) 进行称重并记为 W_0 , 在 37°C 条件下将其置于装有 PBS 溶液 ($\text{pH} = 7.4$) 或含有 $1\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶原酶的 PBS 溶液的离心管中。在预定时间 (1、3、7、14 和 21 d) 对离心管内剩余的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架进行冷冻干燥并称量, 重量记为 W_1 。每组设置三个平行实验, 使用公式 (3) 计算 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的降解率:

$$\text{降解率 (\%)} = (w_1 - w_0)/w_0 \times 100\% \quad (3)$$

2.3.2.9 亲水性测试

采用座滴法通过静态水接触角测定 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的亲水性。将超纯水水滴 ($1\text{--}2\text{ }\mu\text{L}$) 通过重力沉积在 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的表面, 并测量其与水凝胶支架表面的接触角。水接触角的测量采用德国德尔福仪器有限公司的光学接触角和轮廓分析系统。

2.3.2.10 细胞的培养

将装有小鼠胚胎成纤维细胞 (3T3)、人皮肤成纤维细胞 (HFF-1) 和小鼠骨骼肌成肌细胞 (C2C12) 的 T25 培养瓶放置在 37°C 、 $5\%\text{ CO}_2$ 的培养箱中。3T3 细胞培养瓶中的 DMEM 培养基含有 10% 的新生牛血清、1% 的青霉素/链霉素; HFF-1 细胞和 C2C12 成肌细胞培养瓶中的 DMEM 培养基含有 10% 的胎牛血清、1% 的青霉素/链霉素。在细胞的培养过程中每隔两天更换一次培养基, 待细胞的汇合度为 80%-90% 时, 视情况用胰酶 37°C 消化 1-3 min, 再加入 DMEM 培养基终止消化, 然后进行传代或者冻存。

(1) 细胞传代: 在超净台内, 首先弃去培养瓶内的 DMEM 培养基, 吸取 4 mL PBS 溶液轻柔且快速地洗去瓶内的死细胞。加入 0.5 mL 胰酶, 将培养瓶平放使胰酶浸没整个瓶壁的细胞层。在显微镜下观察到细胞与细胞之间有针孔样缝隙并有细胞脱落时, 加入 2 mL DMEM 培养基, 轻轻吹打瓶壁, 使细胞尽可能处于单个的悬浮状态。将细胞悬液转移到 15 mL 离心管中, 1000 rpm 离心 3 min。将离心好的细胞悬液上层培养液弃去, 细胞沉淀加入 1 mL DMEM 培养基重悬, 视情况将细胞按 1:3 或 1:5 传代。

(2) 细胞冻存: 胰酶消化后的细胞悬液移入一个 15 mL 的离心管中, 800 rpm 离心 5 min。将离心好的细胞悬液上层培养液弃去, 细胞沉淀加入配置好的 1.5 mL 冻存液 (组成比例 DMEM:FBS:DMSO = 7:2:1) 重悬, 吹打均匀后将细胞悬液移入冻存管中。将标记后的冻存管放入程序降温盒, -80°C 冰箱过夜后, 再转移到液氮中存放。

(3) 细胞复苏: 从液氮中取出细胞冻存管放入冰盒中, 然后将冻存管从冰盒中取出迅速放入 37°C 水浴锅中加热。冻存管内只有少量液体未溶解时即可取出, 利用余温将其彻底溶解。在超净台内, 将细胞悬液转入含有 4 mL 培养基的 15 mL 离心管中, 混

匀后 1000 rpm 离心 3 min, 将离心后的上层培养液弃去, 细胞沉淀加入 1 mL DMEM 培养基重悬, 转入含 4 mL 培养基的 T25 培养瓶中, 然后置于 37°C、5% CO₂ 培养箱内进行培养。

2.3.2.11 细胞毒性测试

使用 3T3、HFF-1 细胞和 C2C12 成肌细胞通过 MTT 法来评估 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的细胞毒性。将水凝胶支架完全浸泡在 DMEM 培养基中 (0.25 cm³·mL⁻¹) 24 h 后得到 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架提取物。将细胞培养 96 孔板放置在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中, 在 100 μL DMEM 培养基中以每孔 5000 个细胞的密度接种于 96 孔板上。24 h 后, 用 100 μL CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架提取物替换 DMEM 培养基。加入 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架提取液的细胞在培养箱内经过 48 h 孵育后, 在每孔中加入 20 μL MTT 试剂 (5 mg·mL⁻¹), 再继续培养 4 h, 然后除去每孔内的 DMEM 培养基, 加入 100 μL DMSO 溶解甲瓚晶体。每孔的 OD 值用酶标仪在 570 nm 处进行测量, 以 PBS 溶液作为空白组 (OD₀), CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架提取物作为实验组 (OD₁), DMEM 培养基作为对照组 (OD₂)。使用公式 (4) 计算细胞在 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架提取物中的存活率:

$$\text{存活率 (\%)} = (\text{OD}_1 - \text{OD}_0) / (\text{OD}_2 - \text{OD}_0) \times 100\% \quad (4)$$

根据 ISO 10993-5:2009 对生物材料生物相容性的要求, 生物材料的细胞毒性评价可按照表 2-5 进行分级。当细胞毒性级别在 0 级或 1 级时, 生物材料合格; 当细胞毒性级别在 2 级时, 生物材料的细胞毒性需要通过细胞的生长状态进行综合分析; 当细胞毒性级别在 3 级及以上时, 生物材料不合格。

表 2-5 生物材料细胞毒性等级

Table 2-5 Cytotoxicity levels of biomaterials

细胞存活率 (%)	≥100	75-99	50-74	25-49	24-1	0
毒性等级	0	1	2	3	4	5

2.4 结果与讨论

2.4.1 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的制备

将 CS 和 CaCO₃ 分散在 SA 溶液中, 形成含有一定体积 (1%) 酸的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶前驱溶液, 在弱酸性的条件下可以提高 CS 的溶解度, 防止其由于重力作用沉降到模具底部。将前驱溶液装入模具彻底暴露在酸性环境中, 直至溶液形成凝胶 (图 2-2)。CS 和 CaCO₃ 与 SA 之间剧烈地相互作用会形成不均匀的絮凝沉淀, 从而影响水凝胶结构的均匀性和稳定性, 所以控制交联速率是保证海藻酸盐凝胶具有一定机械强度和稳定性的关键。在弱酸性的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶前驱溶液中, CaCO₃ 释放出 Ca²⁺与 SA 的

G 段螯合，增加了前驱溶液的粘度，也可以有效地阻止不溶性 CS 的重力沉降。CS/SA/Ca²⁺水凝胶前驱溶液在酸性环境中，CS 的-NH₂ 缓慢质子化为-NH₃⁺与 SA 的-COO⁻通过静电相互作用形成第一个 CS/SA 交联网络，缓慢凝胶的方式使得 CS/SA/Ca²⁺水凝胶的结构更均匀、机械强度更稳定。与此同时，CaCO₃ 在酸性条件下逐渐释放 Ca²⁺与 SA 的 G 段螯合，形成第二个 SA/Ca²⁺交联网络，进一步增强 CS/SA/Ca²⁺水凝胶的稳定性。此外，CO₂ 气体的产生也使得 CS/SA/Ca²⁺水凝胶中出现更多有利于溶胀和细胞黏附的微观孔隙。

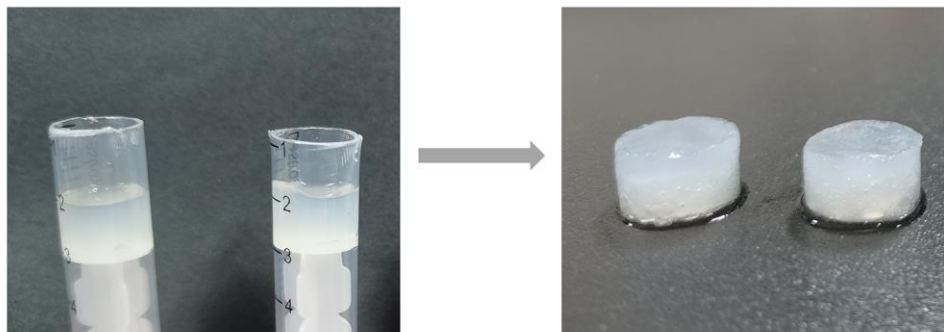


图 2-2 CS/SA/Ca²⁺水凝胶的形状

Figure 2-2 The shape of the CS/SA/Ca²⁺ hydrogels

2.4.2 交联分析

分析 CS、SA 和 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的 FTIR 图像（图 2-3a），在 1657 cm⁻¹（酰胺-I）和 1591 cm⁻¹（酰胺-II）处观察到 CS 的特征峰^[98]，双酰胺峰对应甲壳素的部分 N-脱乙酰作用。CS/SA/Ca²⁺水凝胶形成后，CS 的双酰胺峰消失，是由于 CS 的-NH₂ 质子化为 -NH₃⁺^[99]。SA 在 1594 cm⁻¹和 1405 cm⁻¹处的特征峰，可分别归因于-COO⁻基团的不对称和对称拉伸振动。当 CS/SA/Ca²⁺水凝胶发生交联后，SA 的这些特征峰又分别移动到 1559 cm⁻¹和 1407 cm⁻¹处，说明-COO⁻与-NH₃⁺和 Ca²⁺分别发生了静电相互作用和离子相互作用^[100]。与 CS 和 SA 的 FTIR 光谱图相比，观察到 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架在 O-H 的拉伸振动区域 3200-3500 cm⁻¹的波段更宽更强，表明 CS 和 SA 聚电解质作用的发生，使得 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的氢键得到了加强^[79, 100]。

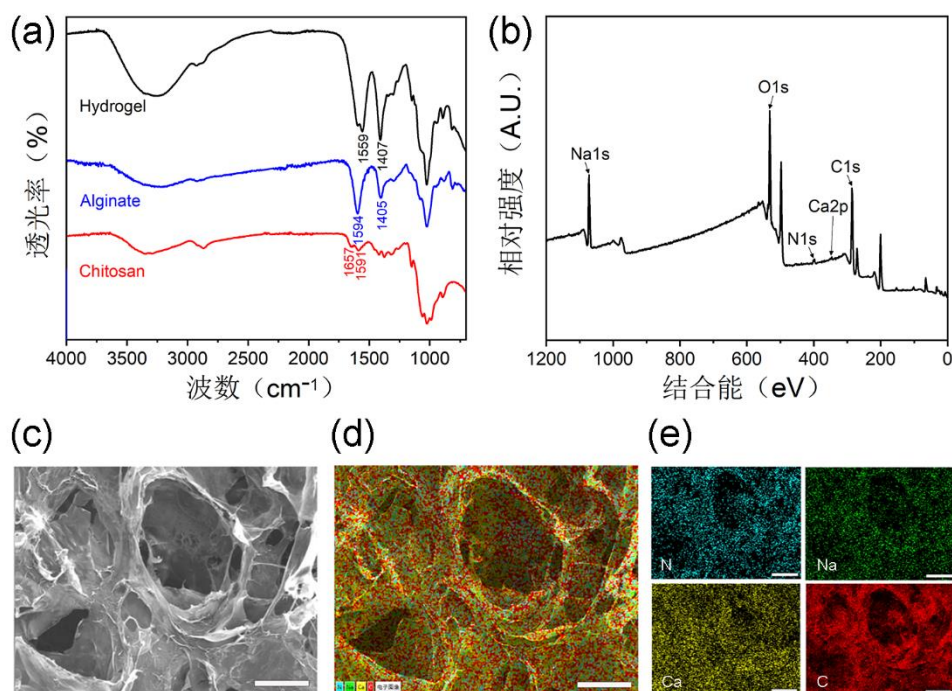


图 2-3 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的交联结构分析。(a) SA、CS 和水凝胶支架的 FTIR 图；(b) 水凝胶支架的 XPS 元素分析；(c) EDS 元素映射相对应的 SEM 图像；(d) EDS 全映射图像；

(e) N、Na、Ca、C 在水凝胶支架中的 SEM-EDS 分布图。比例尺：100 μm

Figure 2-3 Cross-linked structural analysis of CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffold. (a) FTIR image of SA, CS, and the hydrogel scaffold; (b) XPS elemental analysis of the hydrogel scaffold; (c) Corresponding EDS elemental mappings SEM image; (d) Full mapping image of EDS; (e) SEM-EDS distribution maps for N, Na, Ca, and C in the hydrogel. Scale bar: 100 μm

另外，通过 XPS 实验验证了 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的材料组成。在全光谱上检测到了 Na1s、O1s、N1s、Ca2p 和 C1s 元素的信号（图 2-3b）。其中，Na 和 N 元素分别是 SA 和 CS 的组成元素，Ca 元素则来自 CaCO₃。此外，通过区域选择 SEM-EDS 作图来确定水凝胶中 N、Na、Ca 和 C 元素的分布^[101]。在 EDS 伪彩色图像中（图 2-3d），可以清楚地区分由 N、Na 和 Ca 元素组成的 CS、SA 和 CaCO₃ 材料，N、Na 和 Ca 元素的高度重叠可以表明 CS、SA 和 CaCO₃ 材料在 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架表面分布均匀，高效凝胶（图 2-3e）。这些结果证实了双网络 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的成功交联。

2.4.3 扫描电子显微镜测试分析

为了优化 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的结构，将 CS/SA/Ca²⁺的摩尔比从 1:1.0:0.20 调整到 1:3.4:0.68，以改变双网络结构的组成。通过 SEM 测定了各组 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的微观结构。可以看到不同 CS/SA/Ca²⁺摩尔比的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的 SEM 图像显示出良好的三维形貌和多孔结构（图 2-4）。CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的多孔结构允许细胞迁移到水凝胶支架的内部进行生长，扩大了细胞可生长的表面空间，同时也

有利于细胞的黏附和迁移。多孔结构还有利于水凝胶支架的溶胀，可以使水凝胶支架更好的吸收培养基，为生长在其内部的细胞提供足够的营养物质。

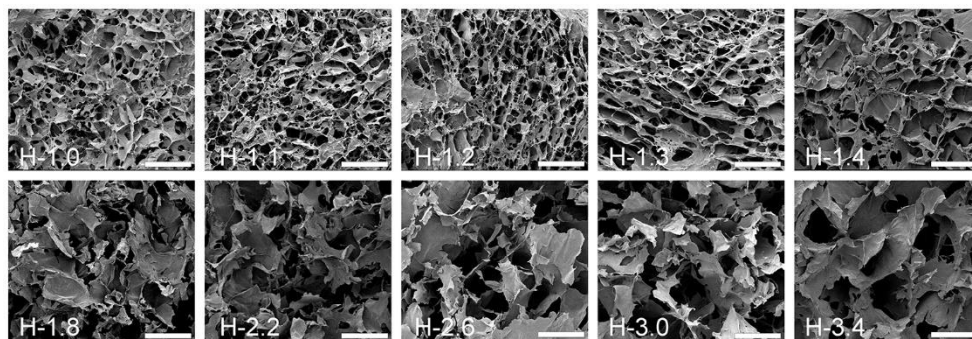


图 2-4 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的 SEM 图像，比例尺：200 μm

Figure 2-4 SEM images of CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds, scale bar: 200 μm

水凝胶支架的孔径大小是影响细胞粘附、迁移、增殖和分化的另一个重要因素^[102]，为了适应细胞生长的需要，水凝胶支架的孔径不宜过大或者过小。过小的孔径会阻碍细胞的迁移和黏附，而过大的孔径则容易使细胞从水凝胶支架上掉落，也不利于其在水凝胶支架上的黏附和生长。H-1.1、H-1.2 和 H-1.3 组 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的孔径分别为 $92.7 \pm 1.31 \mu\text{m}$ 、 $104.06 \pm 2.64 \mu\text{m}$ 和 $114.15 \pm 2.56 \mu\text{m}$ （表 2-6），该范围的孔径大小已被多项研究报道有利于促进细胞的黏附和增殖^[103]。

表 2-6 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的平均孔径

Table 2-6 Average pore size of CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds

样品组别	平均孔径 (μm)
H-1.0	80.14 ± 1.46
H-1.1	92.70 ± 1.31
H-1.2	104.06 ± 2.64
H-1.3	114.15 ± 2.56
H-1.4	123.25 ± 1.48
H-1.8	148.70 ± 1.32
H-2.2	163.69 ± 4.21
H-2.6	178.67 ± 2.64
H-3.0	196.04 ± 2.16
H-3.4	219.87 ± 4.98

2.4.4 孔隙率测试分析

通过液体置换的方法，测得不同 CS/SA/Ca²⁺摩尔比的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的孔隙率在 85%-95%之间（图 2-5）。CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架具有较高的孔隙率，有利于水凝胶支架的溶胀、细胞黏附和细胞迁移。因为较高的孔隙率意味着水凝胶支架具有相对较大的表面积，支架的放大表面积可以很容易地包裹细胞，为细胞生长和繁殖提供

足够的空间。此外，在新组织形成期间，水凝胶支架的多孔表面有助于促进支架与周围组织之间形成连接^[104]。

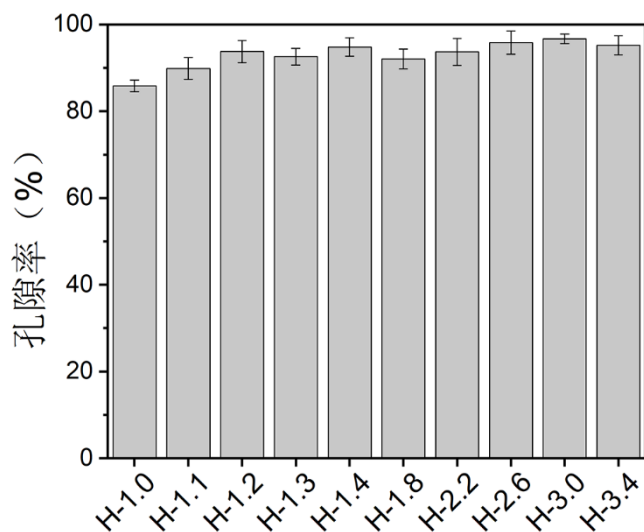


图 2-5 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的孔隙率

Figure 2-5 The porosity of CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds

2.4.5 机械性能测试分析

组织的修复和再生需要支架具有合适的机械性能^[105]。对 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架进行压缩试验，所有水凝胶支架即使压缩变形达到 80%也未被破坏（图 2-6a），表现出良好的压缩性能^[106]。支架的刚度是控制细胞生长命运和组织重塑的关键力学因素之一^[107]。通过测量 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的压缩模量，得到水凝胶支架的刚度与不同 CS/SA/Ca²⁺摩尔比之间的关系。CS/SA/Ca²⁺摩尔比可以影响水凝胶支架的压缩性能，随着 CS/SA/Ca²⁺摩尔比的降低，CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架压缩模量从 7.5 kPa 逐渐增加到 57.6 kPa（图 2-6b）。CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架抗压强度的提高是由于质子化的 CS 以及 CaCO₃ 释放的 Ca²⁺与 SA 之间的交联强度增加，所以水凝胶的机械性能得到加强。有报道称，在压缩模量为 40 kPa 的聚乙烯醇和透明质酸水凝胶中，人骨髓间充质干细胞（hBMSCs）被诱导分化为肌肉细胞^[108]。H-1.2 组 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的压缩模量为 40.00 ± 2.52 kPa，接近天然骨骼肌^[109]。

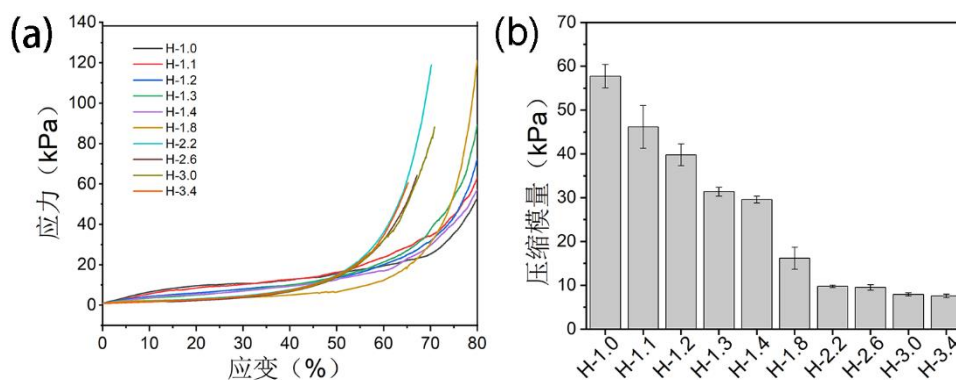


图 2-6 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的机械性能。(a) 水凝胶支架的压缩应力-应变曲线；(b) 水凝胶支架的压缩模量

Figure 2-6 Mechanical properties of CS/SA/Ca²⁺ hydrogel scaffolds. (a) Compression stress-strain curve of hydrogel scaffolds; (b) Compression modulus of hydrogel scaffolds

2.4.6 流变测试与可打印性分析

储能模量 (G') 又称弹性模量, 是指水凝胶形成过程中由于可逆变形而存储的能量, 可以用来测量材料的弹性大小^[110]。损耗模量 (G'') 是描述物质粘度特性的特征参数, 也称为粘度模量^[111]。所有组别的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的 G' 和 G'' 曲线之间没有交点, 彼此之间只有微小的差异 (图 2-7a), 说明在较宽的剪切频率范围内 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的力学性能是相对稳定的, G' 和 G'' 值均随水凝胶支架 CS/SA/Ca²⁺摩尔比的增大而减小, 所有 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的 G' 值均高于 G'' , 说明 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架可以形成稳定的具有网状结构的弹性材料^[112]。这主要是因为, 在较低的 CS/SA/Ca²⁺摩尔比条件下 CS 添加量较多, 使得体系中 CS 的 -NH₃⁺ 与 SA 的 -COO⁻ 的交联次数增加, 双网络形成了更密集的纠缠, 这有利于形成更稳定的水凝胶。物理交联双网络 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架无需使用额外的有毒交联剂即可获得适当的机械强度从而增强水凝胶支架的稳定性, 不需要使用有毒的交联剂但可以增强水凝胶稳定性的双网络水凝胶已有报道^[113]。

生物墨水的剪切稀化特性是其能通过 3D 打印喷嘴连续挤出和具有可打印性的关键。所有组别的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架前驱溶液的粘度均可随剪切速率的增加而迅速下降 (图 2-7b), 具有剪切稀化的特性。此外, 所有组别的 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的前驱溶液都可以从针孔中连续挤出形成各种形状 (图 2-7c), 证明 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架的前驱溶液具有良好的打印保真度。这些结果表明 CS/SA/Ca²⁺水凝胶支架在骨骼肌组织工程生物 3D 打印方面具有很大的潜力。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/345214120240011113>