



负载生长因子水凝胶的体外生物活性研究

邓明,夏冠赫,刘锋,李佳乐,王秉

(浙江理工大学材料科学与工程学院,杭州 310018)

摘要: 为了开发一种新型生物活性伤口敷料,以丝素蛋白(SF)和酪胺改性明胶(TG)为基体材料,通过辣根过氧化物酶和过氧化氢催化交联制备三维网状水凝胶,并用水凝胶负载碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),制备SF-TG-bFGF水凝胶。对SF-TG-bFGF进行结构分析和形貌表征,检测SF-TG-bFGF对小鼠成纤维细胞L929增殖、迁移和胶原蛋白合成的影响。结果表明:SF-TG-bFGF水凝胶具有良好的力学性能、吸湿保湿性能和生长因子缓释性能;SF-TG-bFGF呈网状微观结构,弹性模量为21 kPa,溶胀率高达700%,能在144 h内缓释bFGF;SF-TG-bFGF能促进L929细胞的增殖、迁移和胶原蛋白合成,细胞存活率可达300%,细胞迁移率可达90%,胶原蛋白质量浓度可达4.5 $\mu\text{g/mL}$ 。该研究制备的SF-TG-bFGF有望作为一种生物活性敷料应用于各类皮肤伤口治疗。

关键词: 生长因子;丝素蛋白;明胶;水凝胶;促胶原蛋白合成

中图分类号: TB 34

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2023)09-0581-08

引文格式: 邓明,夏冠赫,刘锋,等. 负载生长因子水凝胶的体外生物活性研究[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2023,49(5):581-588.

Reference Format: DENG Ming, XIA Guanhe, LIU Feng, et al. Study on the *in vitro* bioactivity of hydrogels loaded with growth factors[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2023,49(5):581-588.

Study on the *in vitro* bioactivity of hydrogels loaded with growth factors

DENG Ming, XIA Guanhe, LIU Feng, LI Jiale, WANG Bing

(School of Materials Science & Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To develop a new bioactive wound dressing, a horseradish peroxidase and hydrogen peroxide cross-linking system was used to catalyze the formation of a three-dimensional reticular hydrogel of silk fibroin (SF) and tyramine-modified gelatin (TG). This hydrogel was loaded with basic fibroblast growth factors (bFGF) and the SF-TG-bFGF hydrogel was formed. The SF-TG-bFGF hydrogel was structurally analyzed and morphologically characterized, and the effect of the SF-TG-bFGF hydrogel on the cell proliferation, migration capacity and collagen synthesis of mouse fibroblasts (L929) was examined. The results show that the SF-TG-bFGF hydrogel exhibits good mechanical properties, moisture absorption and moisture retention properties, and slow release performance of growth factors; SF-TG-bFGF has the network microstructure, the elastic modulus reaches 21 kPa, the swelling rate is as high as 700%, and bFGF is slowly released within 144 h; SF-TG-bFGF can promote the proliferation, migration and collagen synthesis of L929, with the cell survival rate, cell migration rate and mass concentration of collagen reaching 300%, 90% and 4.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. To sum up, the SF-TG-bFGF hydrogel prepared in this study is expected to be used as a bioactive dressing in the treatment of various skin wounds.

Key words: growth factor; silk fibroin; gelatin; hydrogel; promoting collagen synthesis

收稿日期: 2023-01-07 网络出版日期: 2023-05-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(52273096);浙江省自然科学基金项目(LQ15E030004)

作者简介: 邓明(1999-),男,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事生物材料方面的研究。

通信作者: 王秉, E-mail: wbing388@163.com

0 引言

皮肤包覆于人体表面并长期暴露在外界环境中,由于日常活动和自身脆弱性^[1],经常受到创伤、烧伤和手术过程损伤^[2],皮肤的正常结构遭到破坏,形成伤口。伤口的愈合是通过分子和细胞的协调作用恢复受损组织^[3]。在愈合过程中,可能会发生皮肤组织的持续受损和皮肤病的不良诱导等现象,导致伤口愈合变慢。因此,加速高密度局部组织的形成和胶原沉积,促进再上皮化完成,是皮肤伤口快速愈合的重要途径^[4]。

近年来,生物活性敷料被广泛应用于皮肤伤口愈合^[5-6],其中水凝胶敷料备受关注^[7]。水凝胶是一种具有亲水性的三维网状材料^[8],可快速吸收大量水分并在溶胀后保持完整结构。水凝胶具有与天然组织弹性相似、吸收渗液并保证伤口湿愈合、充当屏障防止外物感染^[9]和加速再上皮化^[10]等特性,是最有前景的伤口愈合应用材料之一^[11]。

目前,水凝胶已应用于伤口愈合领域,如可注射水凝胶能够填充并黏附于各种不规则伤口部位^[12],负载活性物质的水凝胶^[13]有利于加速全层皮肤缺损伤口愈合,水凝胶成功披覆纱线表面用于构建生物活性敷料支架^[14]等。但水凝胶力学性能较差^[15]限制了其在伤口愈合领域的广泛应用。常规水凝胶只能提供湿愈合环境和基本的三维网状结构,无法提供促细胞增殖、抗炎和促血管生成等生物活性。为了扩大水凝胶在伤口愈合领域的应用,科研人员开发了具有优异力学性能的生物活性水凝胶,以满足其作为理想伤口敷料的要求^[16]。负载生长因子的生物活性水凝胶避免了生长因子直接使用而失活,延长了生长因子的半衰期,对伤口愈合起到了显著的促进作用^[17]。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)可以促进成纤维细胞的增殖和胶原蛋白合成,从而加速伤口愈合,但bFGF的半衰期非常短,约1.5 min,且随着伤口部位bFGF的快速扩散和伤口渗出液对bFGF的分解,bFGF的活性也会从给药部位迅速丧失。因此,将bFGF负载到水凝胶等生物材料中,是提高bFGF生物利用率的有效途径。桑蚕茧中丝素蛋白(SF)和动物身上提取的明胶(Gel)具有优异的生物相容性,通过对两种物质的改性和复合可以制备水凝胶。如He等^[18]制备了丝素蛋白水凝胶,可以有效释放人酸性成纤维细胞生长因子,加速伤口愈合,但该水凝胶的力学性能较差;Partlow等^[19]使用辣根过氧化物酶

(HRP)和过氧化氢(H_2O_2)促进丝素蛋白交联,形成水凝胶,但该水凝胶不具备生物活性,无法加速伤口愈合。

本文从桑蚕茧中提取丝素蛋白,对明胶进行改性得到酪胺改性明胶(TG),并采用辣根过氧化物酶(HRP)和过氧化氢(H_2O_2)使SF和TG产生交联反应,形成复合水凝胶(SF-TG);在SF-TG交联网络形成过程中掺入碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),形成生物活性水凝胶SF-TG-bFGF;对SF-TG-bFGF进行形貌、力学性能、溶胀性能等的表征及测试,并在体外生理环境中检测bFGF的释放能力;评估SF-TG-bFGF促进L929细胞增殖、迁移和胶原蛋白合成的能力。本文为SF-TG-bFGF在生物活性伤口敷料中的应用提供一定的理论指导。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料

桑蚕茧(杭州富丝工贸有限公司);碳酸钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);氯化钙、盐酸酪胺(上海麦克林生化科技有限公司);无水乙醇(分析纯AR,杭州高晶精细化工有限公司);明胶(来自猪皮,A型,Sigma-Aldrich上海贸易有限公司);吗啉乙磺酸(上海罗恩化学技术有限公司);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC,上海麦克林生化科技有限公司);N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,上海源叶生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(HRP,上海麦克林生物化学);过氧化氢(H_2O_2 ,上海凌峰化学);小鼠成纤维细胞(L929,中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库);磷酸盐缓冲液、DMEM高糖培养液(浙江森瑞生物科技有限公司);胎牛血清、青霉素-链霉素溶液和CCK-8试剂(上海碧云天生物技术有限公司);碱性成纤维细胞生长因子ELISA试剂盒(96 T,江苏酶免实业有限公司)和羟脯氨酸测定试剂盒(48 T,南京建成生物工程研究所)。

1.1.2 实验仪器

高速冷冻离心机(Biofuge Stratos,美国赛默飞)、真空冷冻干燥机(FD-1A-50,北京博医康实验仪器有限公司)、超低温冰箱(TF-86-30LA,上海田枫机械设备有限公司)、紫外-可见分光光度计(TU-1950,北京普析通用仪器有限公司)、扫描电子显微

镜(SU8010,日本日立公司)、傅立叶红外光谱仪(Nicolet is50,美国热电)、万能材料试验机(5943,美国 Instron)、双功能水浴恒温振荡器(SHA-B,常州金坛一恒仪器厂)、酶标仪(DR-3518,无锡华卫德朗仪器有限公司)和倒置显微镜(37XBZ,上海长方光学仪器有限公司)。

1.2 样品制备

1.2.1 SF 的提取

将1 g 桑蚕茧加入到100 mL 质量分数为0.5%的碳酸钠水溶液中,煮沸,30 min后取出,用去离子水冲洗干净,重复上述步骤6次,完成脱胶过程。将脱胶后的蚕丝放置在60℃的烘箱中干燥12 h,称重,并按照水浴比1:25加入到氯化钙混合溶液中(氯化钙、乙醇和去离子水按摩尔比1:2:8混合),在60℃下溶解1 h,室温冷却后使用8000 Da的透析袋在去离子水中进行透析,每隔6 h更换一次去离子水;透析2 d后,将透析好的SF溶液转入离心管中,在高速冷冻离心机的条件下(12000 r/min、5℃)离心20 min去除杂质,取上清液,冷冻干燥得到纯净的SF。

1.2.2 TG 的制备

将质量分数为2%的明胶粉末加入到50 mmol/L的吗啉乙磺酸溶液中,56℃下搅拌,直至充分溶解,待溶液冷却至室温后,加入质量分数为1%的盐酸酪胺,充分搅拌;依次加入质量分数为0.74%的EDC和质量分数为0.22%的NHS,室温下搅拌、反应12 h,将反应后的混合溶液装入12000 Da的透析袋,放在去离子水中透析,每隔6 h更换一次去离子水,透析3 d。透析结束后,将混合溶液冷冻干燥,得到TG,保存备用。

1.2.3 SF-TG-bFGF 的制备

将质量分数均为8%的TG和SF充分混合,加入混合液体积分数为5%且质量浓度为2.5 μg/mL的bFGF,混匀后加入100 U/mL的HRP溶液,搅拌均匀;加入与HRP溶液相同量的16.5 mmol/L H₂O₂溶液,37℃充分交联1 h,最终形成负载生长因子的SF-TG-bFGF。

1.3 测试与表征

1.3.1 紫外光谱表征

将改性前后的Gel溶于去离子水,形成质量分数为0.1%的溶液,使用紫外-可见分光光度计测试改性前后Gel的紫外光谱。

1.3.2 形貌表征

利用聚四氟乙烯模具制备直径和高均为10 mm

的水凝胶(SF-TG和SF-TG-bFGF);然后进行冷冻干燥,形成水凝胶支架;喷金后,利用扫描电子显微镜观察横截面形貌。

1.3.3 红外光谱表征

将质量分数均为8%的SF和TG混匀,经过冷冻干燥,得到SF/TG,使用傅立叶红外光谱仪测试SF、SF/TG和SF-TG的红外吸收光谱。测试条件:分辨率为4 cm⁻¹,扫描次数为64次,测试波数范围为4000~400 cm⁻¹。

1.3.4 弹性模量测试

利用聚四氟乙烯模具制备直径和高均为10 mm的SF-TG-bFGF,采用万能材料试验机在室温下压缩SF-TG-bFGF,将压缩速率设为1 mm/min,以SF-TG作为对照,每组5个平行样。

1.3.5 溶胀性能测试

利用聚四氟乙烯模具制备直径和高均为10 mm的SF-TG-bFGF,冷冻干燥后,将SF-TG-bFGF浸泡在磷酸盐缓冲液(PBS)中,分别在0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、9.0、12.0、15.0 h和24.0 h取样测试其溶胀性能,每组5个平行样。溶胀率按式(1)计算:

$$S/\% = \frac{W_s}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

其中:S为SF-TG-bFGF的溶胀率,%;W_s为溶胀后SF-TG-bFGF的质量,g;W_d为初始冻干SF-TG-bFGF的质量,g。

1.3.6 bFGF 的体外释放实验

将2 g SF-TG-bFGF置于西林瓶中,加入2 mL的PBS,将西林瓶放入37℃的双功能水浴恒温振荡器中进行孵育,以100 r/min的转速振摇,分别于3、6、12、24、48、72、96、120 h和144 h取10 μL样液,每组5个平行样,按照碱性成纤维细胞生长因子ELISA试剂盒的操作步骤严格测定bFGF的含量,计算释放率。

1.3.7 细胞增殖

用含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素溶液的DMEM高糖培养液,在37℃、5%CO₂的环境下对L929细胞进行培养。使用96孔板制备高为2 mm的SF-TG-bFGF,并冷冻干燥,将L929细胞以1×10⁴个/孔的密度种于96孔板中,培养过夜,使细胞与孔充分黏附,吸除孔板中旧培养液,加入200 μL新鲜培养液。将制备好的SF-TG-bFGF从孔板中取出,加入到含有细胞的孔板中,以SF-TG作为阴性对照,纯细胞作为空白对照,每组5个平行

样,共培养 1、2 d 和 3 d 后取出孔板,除去 SF-TG、SF-TG-bFGF 和残余培养液,向每孔加入 110 μL 的 CCK-8 试剂和新鲜培养液(比例为 1:10),继续培养 2 h,随后取出孔板,使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

1.3.8 细胞迁移

使用 6 孔板制备高为 10 mm 的 SF-TG-bFGF,并冷冻干燥;另取 6 孔板,在背面每孔用记号笔划线 3 条,将 L929 细胞以 2×10^5 个/孔的密度种于 6 孔板中,培养过夜,使细胞与孔壁充分黏附,用 100 μL 枪头垂直于划线制造划痕,除去旧培养液,用无菌 PBS 冲洗细胞 3 次去除划痕中的细胞,每孔加入 8 mL 不含胎牛血清的新鲜培养液。将 SF-TG-bFGF 加入到含有细胞的孔板中,以 SF-TG 作为阴性对照,纯细胞作为空白对照,每组 3 个平行样。利用倒置显微镜在 0、6、12 h 和 24 h 取样拍照,用 Image J 软件处理迁移图,细胞迁移率按式(2)计算:

$$M/\% = \frac{S_0 - S_t}{S_0} \times 100 \quad (2)$$

其中: M 为 L929 细胞的迁移率,%; S_0 为 0 h 的原始面积,pixel; S_t 为特定时刻的面积,pixel。

1.3.9 细胞胶原蛋白合成

使用 6 孔板制备高为 10 mm 的 SF-TG-bFGF,并冷冻干燥。将 L929 细胞以 2×10^5 个/孔的密度种于 6 孔板中,培养过夜,使细胞与孔壁充分黏附。除去旧培养液,加入 4 mL 新鲜培养液,将 SF-TG-bFGF 加入到含有细胞的孔板中,以 SF-TG 作为阴性对照,纯细胞作为空白对照,每组 3 个平行样,共培养 24 h 后每孔收集 0.5 mL 培养液。按照羟脯氨酸测定试剂盒说明书中的操作步骤和计算公式,严格测定培养液在 550 nm 处的吸光度并计算羟脯氨酸含量,该含量表示培养液中胶原蛋白的质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱分析

采用紫外-可见分光光度计测试明胶酪胺改性前后的紫外吸收峰,结果如图 1 所示。图 1 显示,TG 在 275 nm 处的吸光度明显高于 Gel 在 275 nm 处的吸光度,这是由于 EDC/NHS 的偶联作用,活化了 Gel 中大量存在的羧基,而盐酸酪胺含有大量酚羟基,从而导致酪胺与明胶内氨基酸残基中的羧基成功偶联,形成吸光度更高的 TG。正如 Sakai 等^[20]所述,利用 EDC/NHS 的偶联作用,可活化明胶羧基并引入酚羟基,获得酪胺改性的明胶即 TG。

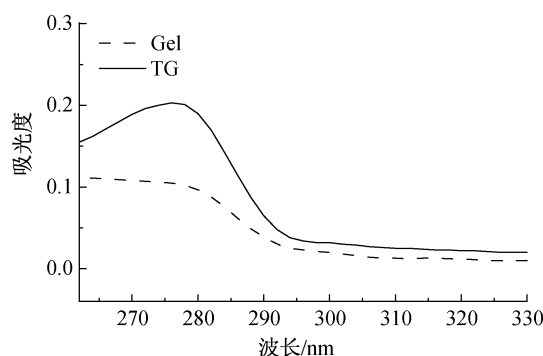


图 1 明胶改性前后的紫外吸收光谱图

2.2 负载 bFGF 前后的水凝胶形貌分析

对 SF-TG 和 SF-TG-bFGF 进行 SEM 测试,结果如图 2 所示。由图 2 可知,SF-TG 呈现出三维网状结构,且孔径密集均匀;负载 bFGF 后,SF-TG-bFGF 的表面变得光滑,且孔状结构减少,有一些孔向外延展为片状,其原因可能是占有一定体积的大分子多肽 bFGF 滞留在了 SF-TG 的网壁上。因此,将 SF-TG-bFGF 应用于伤口愈合时,这样的微观结构有利于控制湿度和缓慢释放生长因子,从而保持生长因子的活性^[21]。

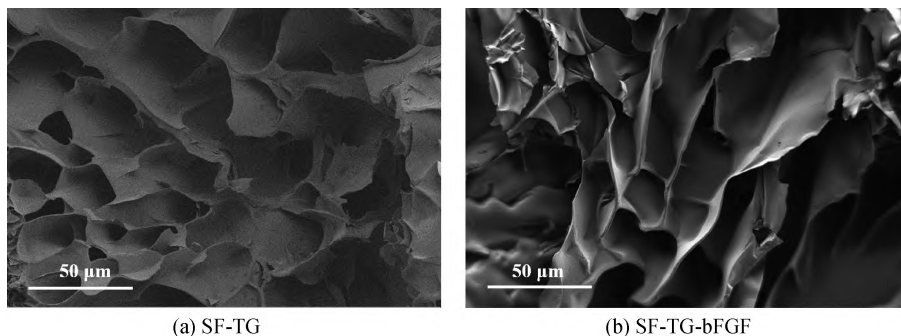


图 2 水凝胶的 SEM 图

2.3 红外光谱分析

SF、SF/TG 和 SF-TG 的红外光谱如图 3 所示。从图 3 可见, SF 和 SF/TG 在酰胺 I 区的吸收峰均在 1637 cm^{-1} 处, 而 SF-TG 的峰发生了偏移, 移动至 1627 cm^{-1} 处, 表明 SF 在形成水凝胶时发生了构象变化。SF 的酪氨酸残基^[19]与 TG 上新形成的酪胺根中都含有酚羟基, 酚羟基的邻位很容易在 HRP/ H_2O_2 体系下交联^[22], 从而形成水凝胶。

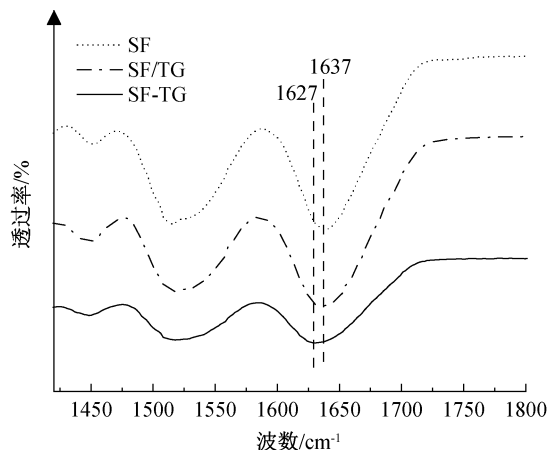


图3 SF、SF/TG 和 SF-TG 的红外光谱图

2.4 负载 bFGF 前后水凝胶的弹性模量

将负载 bFGF 水凝胶进行压缩测试, 结果如图 4 所示。图 4 中, SF-TG 的弹性模量略高于 SF-TG-bFGF, 表明 bFGF 加入后, SF-TG-bFGF 的网状结构有所延展, 孔状结构减少, 导致弹性模量略微下降; SF-TG-bFGF 仍然保留有基本的三维网络结构, 其弹性模量约为 21 kPa。材料硬度对细胞黏附和增殖有显著影响, 细胞在弹性模量低于 30 kPa 软基底上表现出更好的细胞黏附和增殖效果, 而在弹性模量为 30~100 kPa 的硬基底上只能保持固有的较低的黏附和增殖^[23]。因此, SF-TG-bFGF 具有适合不同伤口环境的力学性能, 更适合用作伤口敷料。

2.5 SF-TG-bFGF 的溶胀率

将 SF-TG-bFGF 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ PBS 中浸泡 24 h, 并通过监测重量变化测定 SF-TG-bFGF 溶胀率, 结果如图 5 所示。图 5 表明, SF-TG-bFGF 在孵育 12 h 后达到溶胀平衡, 溶胀率约 700%。在 24 h 内保持稳定, 没有重量损失。使用丝素蛋白和甲基丙烯酰化明胶形成的复合水凝胶仅具有约 400% 的溶胀率^[24], 溶胀性能差于 SF-TG-bFGF。稳定的三维网状结构可以使水凝胶溶胀性能提高, 具备优异的吸湿保湿能力^[25]。综上所述, SF-TG-bFGF 溶胀性能

非常好, 适合用作具有优异吸湿保湿能力的伤口敷料。

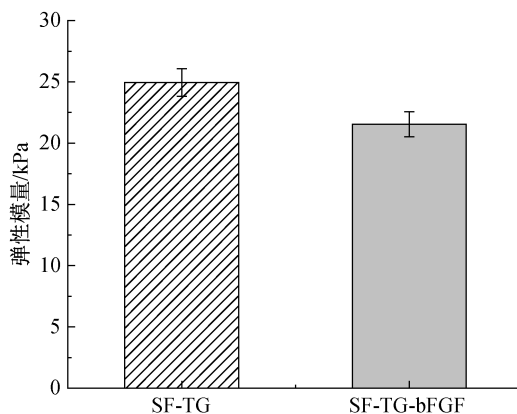


图4 SF-TG 和 SF-TG-bFGF 的弹性模量图

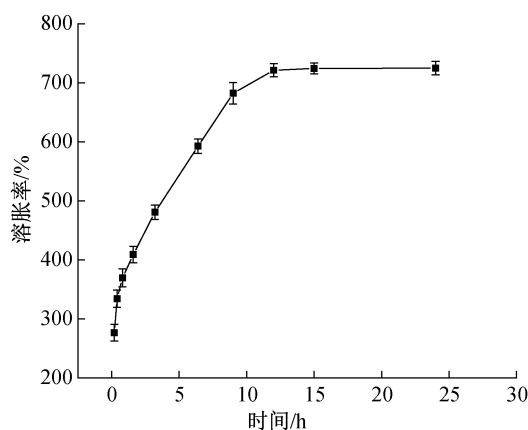


图5 SF-TG-bFGF 在 PBS 溶液中的溶胀率变化曲线

2.6 bFGF 的体外释放

在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ PBS 的体外生理条件下, SF-TG-bFGF 中 bFGF 的释放结果如图 6 所示。图 6 表明, 在水凝胶的负载下, bFGF 可以缓慢释放, 在 96 h 内, 释放率不断提高, bFGF 持续释放到体外的生理环境中; 在 96 至 144 h 期间, bFGF 持续稳定地释放, 最终释放率约为 81%, He 等^[18]制备的丝素蛋白水凝胶负载的人酸性成纤维细胞生长因子在 80 h 释放率仅为 70%, 缓释性能低于 SF-TG-bFGF。上述结果表明, SF-TG-bFGF 完全适用于缺乏生长因子正向反馈作用的伤口, 可作为一种生物活性伤口敷料。

2.7 SF-TG-bFGF 对细胞增殖的影响

将 L929 细胞与不同类型的水凝胶共培养 1、2 d 和 3 d 后, 采用 CCK-8 试剂测定细胞增殖情况, 结果如图 7 所示。图 7 表明, 共培养 1 d 后, SF-TG-bFGF 的细胞存活率接近 200%, 是空白对照组的两倍, 同时高出 SF-TG 40%, 说明 SF-TG-bFGF 比 SF-TG 更能促进 L929 细胞增殖; 共培养 2 d 和 3 d

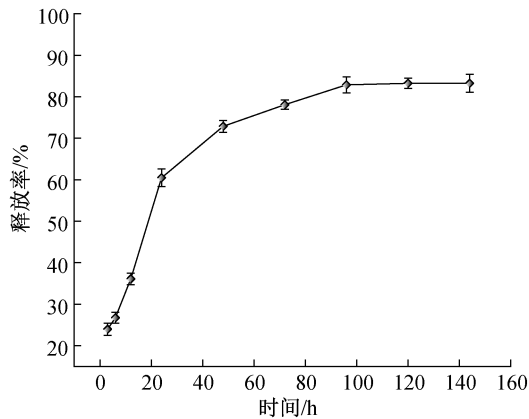


图6 SF-TG水凝胶中bFGF的释放率变化曲线

后, SF-TG的细胞存活率与空白对照组相近, 而 SF-TG-bFGF的细胞存活率仍显著高于空白对照组和 SF-TG, 存活率高达 300%, 表明 SF-TG 此时已经几乎没有促进细胞增殖的作用了, 而 SF-TG-bFGF 仍能显著地促进 L929 细胞的增殖。上述结果表明, SF-TG-bFGF 能加速高密度皮肤组织形成, 促进再上皮化。

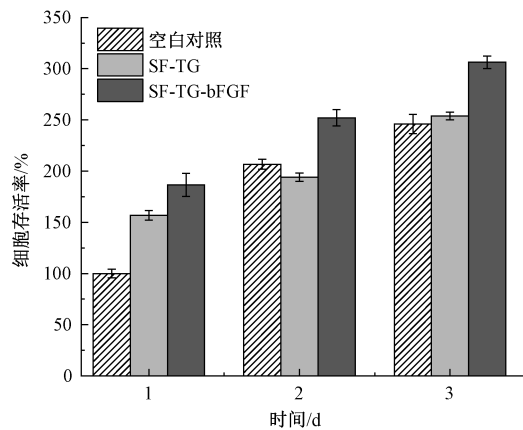


图7 SF-TG和SF-TG-bFGF的细胞增殖

2.8 SF-TG-bFGF 对细胞迁移的影响

不同时间点的细胞迁移如图8所示。将图8导入到 Image J 软件进行处理, 通过像素点的差异计算 6、12 h 和 24 h 的细胞迁移率, 结果如图9所示。图8中, 细胞随时间向划痕迁移进行愈合, 空白对照组直到 12 h 才有少量细胞迁移; SF-TG 在 6 h 就有少量细胞迁移; SF-TG-bFGF 在 6 h 有大量细胞迁移。结合图9, 空白对照组细胞在 24 h 迁移率仅有 20%, 一直处于缓慢迁移状态, 迁移率很低; SF-TG 迁移率在 24 h 为 40%, 迁移现象不明显, 迁移率较低, 表明 SF-TG 对 L929 细胞迁移仅有一定的促进作用; 而 SF-TG-bFGF 的迁移率在 24 h 达到 90%, 表明 SF-TG-bFGF 能明显提高细胞迁移率, 加速 L929 细胞的迁移, Guan 等^[26]制备的丝素蛋白水凝胶 24 h 的细胞迁移并不明显, 直到 36 h 才达到 90% 的迁移率, 对细胞迁移的促进效果低于 SF-TG-bFGF。上述结果表明, SF-TG-bFGF 能显著促进皮肤组织细胞的迁移, 加速伤口愈合。

2.9 SF-TG-bFGF 对细胞胶原蛋白合成的影响

各组培养液中胶原蛋白的质量浓度如图10所示。SF-TG与空白对照组的胶原蛋白质量浓度相近, 约为 $3.2 \mu\text{g/mL}$, 说明 SF-TG 对 L929 细胞合成胶原蛋白几乎没有影响; SF-TG-bFGF 的胶原蛋白质量浓度明显高于前面两组, 达到了 $4.5 \mu\text{g/mL}$, 说明 SF-TG-bFGF 显著促进了 L929 细胞合成大量胶原蛋白(图10)。胶原蛋白为高生理活性细胞和细胞成分提供支架材料, 为细胞附着、增殖和分化提供天然基质, 有助于促进伤口愈合过程中的血管生成和再上皮化^[27]。综上所述, SF-TG-bFGF 通过提高胶原蛋白质量浓度, 促进伤口愈合。

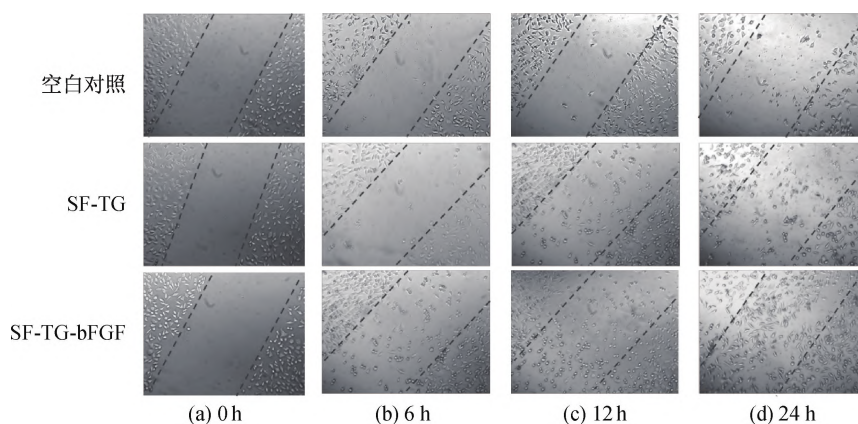


图8 L929细胞与SF-TG和SF-TG-bFGF共培养时的迁移图

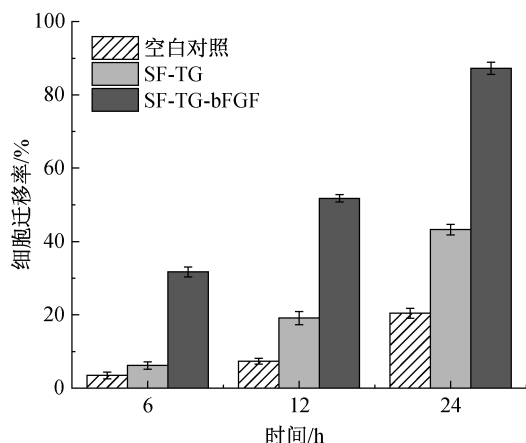


图9 L929 细胞与 SF-TG 和 SF-TG-bFGF 共培养时的迁移率

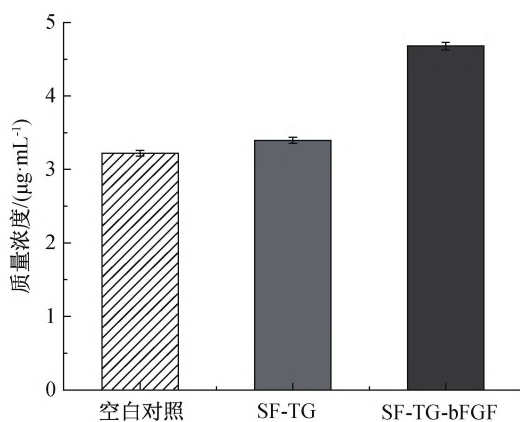


图10 SF-TG 和 SF-TG-bFGF 与 L929 细胞共培养时细胞合成的胶原蛋白质量浓度

3 结论

本文将丝素蛋白和生物功能材料明胶结合,制备了负载 bFGF 生长因子的 SF-TG-bFGF,得出以下结论:

a) SF-TG 具有三维网状结构,适合负载生长因子;bFGF 的体外释放则进一步说明了 SF-TG 不仅能负载 bFGF 生长因子,保护活性,还能缓慢释放,延长 bFGF 的半衰期。

b) SF-TG-bFGF 在体外生理环境下具有优异的吸湿保湿能力,有利于促进伤口的湿愈合。同时,复合改性明胶使 SF-TG-bFGF 具有良好的力学性能,可以适应不同伤口环境并保护伤口。

c) SF-TG-bFGF 显著促进了细胞的增殖、迁移和胶原蛋白合成,并具备在皮肤伤口愈合领域广泛应用的生物活性。

参考文献:

[1] Liang Y P, He J H, Guo B L. Functional hydrogels as

wound dressing to enhance wound healing [J]. ACS Nano, 2021, 15(8): 12687-12722.

[2] Kharaziha M, Baidya A, Annabi N. Rational design of immunomodulatory hydrogels for chronic wound healing [J]. Advanced Materials, 2021, 33(39): e2100176.

[3] Gong X Y, Luo M, Wang M, et al. Injectable self-healing ceria-based nanocomposite hydrogel with ROS-scavenging activity for skin wound repair [J]. Regenerative Biomaterials, 2021, 9: rbab074.

[4] Sivaraj D, Chen K, Chattopadhyay A, et al. Hydrogel scaffolds to deliver cell therapies for wound healing[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021, 9: 660145.

[5] Asadi N, Pazoki-Toroudi H, Del Bakhshayesh A R, et al. Multifunctional hydrogels for wound healing: special focus on biomacromolecular based hydrogels [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 170: 728-750.

[6] 董鸿斐, 黄启林, 杨熊, 等. 真皮细胞外基质水凝胶促进大鼠急性皮肤创面修复[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(10): 1555-1560.

[7] Zhao X, Sun X M, Yildirim L, et al. Cell infiltrative hydrogel fibrous scaffolds for accelerated wound healing [J]. Acta Biomaterialia, 2017, 49: 66-77.

[8] 姚晶, 徐国平, 王悦, 等. 聚乳酸/壳聚糖/明胶复合丝线的性能分析[J]. 浙江理工大学学报(自然科学版), 2022, 47(2): 159-165.

[9] Qiu W W, Han H, Li M, et al. Nanofibers reinforced injectable hydrogel with self-healing, antibacterial, and hemostatic properties for chronic wound healing [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 596: 312-323.

[10] Chen K, Tong C C, Cong P F, et al. Injectable melatonin-loaded carboxymethyl chitosan (CMCS)-based hydrogel accelerates wound healing by reducing inflammation and promoting angiogenesis and collagen deposition [J]. Journal of Materials Science & Technology, 2021, 63: 236-245.

[11] Yang Z F, Huang R K, Zheng B N, et al. Highly stretchable, adhesive, biocompatible, and antibacterial hydrogel dressings for wound healing [J]. Advanced Science, 2021, 8(8): 2003627.

[12] Li J D, Ding Z Z, Zheng X, et al. Injectable silk nanofiber hydrogels as stem cell carriers to accelerate wound healing[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(37): 7771-7781.

[13] Tan J Y, Li L, Wang H R, et al. Biofunctionalized fibrin gel co-embedded with BMSCs and VEGF for

- accelerating skin injury repair[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, 121: 111749.
- [14] 刘玉, 徐国平, 祝佳琼. PLA/PVA/SA 复合纱线的制备与表征[J]. *浙江理工大学学报(自然科学版)*, 2019, 41(6): 723-729.
- [15] Tonsomboon K, Butcher A L, Oyen M L. Strong and tough nanofibrous hydrogel composites based on biomimetic principles [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2017, 72: 220-227.
- [16] Liang W C, Lu Q H, Yu F, et al. A multifunctional green antibacterial rapid hemostasis composite wound dressing for wound healing[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(21): 7124-7133.
- [17] Xiao Z C, Zheng X Y, An Y, et al. Zwitterionic hydrogel for sustained release of growth factors to enhance wound healing[J]. *Biomaterials Science*, 2021, 9(3): 882-891.
- [18] He S R, Shi D, Han Z G, et al. Heparinized silk fibroin hydrogels loading FGF1 promote the wound healing in rats with full-thickness skin excision[J]. *Biomedical Engineering Online*, 2019, 18(1): 97.
- [19] Partlow B P, Hanna C W, Rnjak-Kovacina J, et al. Highly tunable elastomeric silk biomaterials[J]. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24(29): 4615-4624.
- [20] Sakai S, Hirose K, Taguchi K, et al. An injectable, *in situ* enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(20): 3371-3377.
- [21] Wang C M, Yu Y M, Chen H, et al. Construction of cytokine reservoirs based on sulfated chitosan hydrogels for the capturing of VEGF *in situ* [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(11): 1882-1892.
- [22] Partlow B P, Applegate M B, Omenetto F G, et al. Dityrosine cross-linking in designing biomaterials[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016, 2(12): 2108-2121.
- [23] Xu Z H, Hwang D G, Bartlett M D, et al. Alter macrophage adhesion and modulate their response on hydrophobically modified hydrogels [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 165: 107821.
- [24] Ghalei S, Douglass M, Handa H. Nitric oxide-releasing gelatin methacryloyl/silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels for tissue engineering applications[J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2022, 8(1): 273-283.
- [25] Claudio-Rizo J A, Escobedo-Estrada N, Carrillo-Cortes S L, et al. Highly absorbent hydrogels comprised from interpenetrated networks of alginate-polyurethane for biomedical applications [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2021, 32(6): 70.
- [26] Guan Y, Sun F, Zhang X J, et al. Silk fibroin hydrogel promote burn wound healing through regulating TLN1 expression and affecting cell adhesion and migration[J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2020, 31(5): 48.
- [27] Sklenářová R, Akla N, Latorre M J, et al. Collagen as a biomaterial for skin and corneal wound healing [J]. *Journal of Functional Biomaterials*, 2022, 13(4): 249.

(责任编辑:张会巍)