

• 研究论文 •

一种新型海洋胶原蛋白复合水凝胶的制备及评价

伍乐^{1,3}, 李艳艳¹, 付迎坤^{3,4}, 潘红福³, 常聪³, 郑自琪³, 张正男^{3,4}, 李日旺¹,
段书霞^{3,4*}, 敖宁建^{1,2*}

(1. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632; 2. 广东省教育厅生物材料重点实验室, 广州 510632;
3. 河南亚都实业有限公司, 新乡 453000; 4. 河南省医用防护用品重点实验室, 新乡 453000)

摘要: 海星具有很强的再生能力, 体壁中含有丰富的胶原蛋白(SSC)。以甲基丙烯酸化透明质酸(HAMA)和甲基丙烯酸化胶原蛋白(SSCMA)为原料, 复合海洋源小球藻生长因子(CGF), 采用紫外光交联法制备复合水凝胶, 并对复合水凝胶的力学性能、溶胀性、降解性能、微观结构进行分析, 同时验证了复合水凝胶对细胞的毒性及增殖作用。通过扫描电镜观察到 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶具有明显的孔状结构, 随着 HAMA 比例的增加, 水凝胶的力学性能也得到了提高。当 HAMA 的添加量为 60% 时, 复合水凝胶在 24 h 内的溶胀率最大, 可达到其自身重量的 5 倍左右。经过 30 天, SSCMA/HAMA/CGF-75 发生最大量的降解。SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶对小鼠表皮成纤维细胞(L929)无毒副作用, 表现出良好的细胞相容性, 且对小鼠胚胎成纤维细胞(NIH-3T3)具有明显的增殖作用, 其中 SSCMA/HAMA/CGF-60 对细胞的增殖率最大, 可达 129.70%。

关键词: 海星壳胶原蛋白; 透明质酸; 光交联; 水凝胶; 细胞毒性

Preparation and Evaluation of UV Cross-linked Marine Collagen/Hyaluronic Acid Composite Hydrogel

WU Yue^{1,3}, LI Yan-yan¹, FU Ying-kun^{3,4}, PAN Hong-fu³, CHANG Cong³, ZHENG Zi-qi³,
ZHANG Zheng-nan^{3,4}, LI Ri-wang¹, DUAN Shu-xia^{3,4*}, AO Ning-jian^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Key Laboratory of Biomaterials, Education Department of Guangdong Province, Guangzhou 510632, China;
3. Henan Yadu Industrial Co. Ltd., Xinxiang 453000, China;
4. Key Laboratory of Medical Protective Equipment, Henan Province, Xinxiang 453000, China)

Abstract: Starfish have strong regenerative abilities and are rich in collagen (SSC) in their body walls. Using methacrylated hyaluronic acid (HAMA) and methacrylated collagen (SSCMA) as raw materials, combined with marine source Chlorella growth factor (CGF), the composite hydrogel was prepared by ultraviolet cross-linking method, and the mechanical properties, swelling properties, degradation properties and microstructure of the composite hydrogels were analyzed, and the toxicity and proliferation effects of the composite hydrogels on cells were also verified. The SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogels were observed by scanning electron micros-

收稿: 2022-08-10; 修回: 2022-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976068)

作者简介: 伍乐(1997-), 女, 硕士, 暨南大学生命科学技术学院生物与医药专业

* 通讯联系人: 段书霞, 高级工程师。E-mail: duansx@yadugroup.com, Tel: 13781952999; 敖宁建, 研究员, 博(硕)生导师, 研究方向为新型医用高分子材料与医疗器械产品的研发。E-mail: taonj@jnu.edu.cn, Tel: 13660596766

本文附有电子支持信息, 与本文一并刊登在 www.gfztb.com

doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.05.009

copy to have an obvious pore-like structure, and the mechanical properties of the hydrogels were also improved with the increase of the HAMA ratio. When the addition amount of HAMA is 60%, the swelling rate of the composite hydrogel within 24 h is the largest, which can reach about 5 times of its own weight. After 30 days of degradation, SSCMA/HAMA/CGF-75 undergoes the greatest amount of degradation. SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogel has no toxic and side effects on mouse epidermal fibroblasts (L929), shows good cytocompatibility, and has obvious proliferation effect on mouse embryonic fibroblasts (NIH-3T3), among which SSCMA/HAMA/CGF-60 had the highest cell proliferation rate, reaching 129.70%.

Keywords: Starfish shell collagen; Hyaluronic acid; Photocrosslinking; Hydrogel; Cytotoxicity

皮肤是人体面积最大的器官,也是人体抵御外部刺激的第一道防线^[1~3],在解剖学方面,皮肤由三个不同的层组成:无血管表皮、高度血管化的较厚真皮和血管化良好的皮下组织^[4~7]。体外皮肤损伤,如烧伤、冻伤等以及各种皮肤病或其他疾病都会导致皮肤大面积损伤,治疗需要大量的皮肤源^[8~10]。科学家认为,皮肤损伤的关键问题在于找到合适的皮肤替代物。皮肤替代物可以分为传统皮肤替代物和组织工程皮肤^[11,12]。传统皮肤替代物主要包括同种人工合成膜、同种异体皮和异种皮,由于这些皮肤替代物存在自体皮皮源不足、异种皮免疫原性及传染病等缺点,因此组织工程皮肤成为众多科学家研究的重点之一。基于对皮肤的大量需求和伦理等各方面的考虑,开发一种用于皮肤再生、快速促进伤口愈合,且具有良好的生物相容性和低免疫原性的组织工程皮肤敷料具有很大的科学研究价值和临床应用价值^[13]。

组织工程皮肤由支架材料、细胞和生长因子组成。支架材料主要包括天然生物支架材料、合成生物支架材料和复合支架。天然生物支架材料具有无毒、可降解等优点,但单一的材料无法同时满足力学强度和生物相容性的要求^[14];人工合成生物材料可提高细胞对支架的粘附力和稳定材料的降解速率,但在降解的同时会产生一些酸性物质,对细胞造成损伤^[15]。因此,综合天然生物支架材料和合成生物支架材料各自的优点,制备出了一类复合材料。这种复合材料可以是多种合成材料复合而成,如基于聚谷氨酸修饰的纳米晶纤维素填充聚己内酯(PCL)的新型骨组织再生三维打印支架(PGlu-NCC)^[16];也可以是天然生物材料与合成生物材料复合而成,如 L-谷氨酸(LGA)负载的胶原蛋白/壳聚糖(Col-CS)复合支架,用于加速糖尿病伤口的愈合^[17]。

目前研究较多的复合材料主要是由天然生物材料和人工合成材料共同制备而成的一类组织工

程皮肤。天然生物材料主要包括胶原蛋白、壳聚糖、海藻酸、透明质酸等^[18]。

胶原蛋白(collagen, Col)作为人体皮肤的主要组成成分^[19],在维持人类皮肤的弹性和韧性的同时还具有支撑和保护的作用,此外还主动参与细胞的迁移、分化和增殖代谢,具有良好的生物相容性^[20],因此胶原蛋白在组织工程皮肤领域中有非常广阔的应用前景。目前主要用于生物医用材料研究的胶原蛋白多来自于猪皮、牛跟腱等陆生动物,但此类陆生胶原具有一定的传染病风险,因此对胶原蛋白的研究重心逐渐转到了海洋生物方面^[21,22]。海星作为一种繁殖能力和再生能力强的海洋生物,体壁中含有丰富的胶原蛋白,可促进肉芽组织生成,加速创面的愈合^[23]。海星壳胶原蛋白(starfish shell collagen, SSC)相较于陆生动物源胶原蛋白不仅具有无传染病风险、低免疫原性等优势,而且还可以促进纤维细胞、血管皮细胞的分化并形成基质,激活巨噬细胞的吞噬能力,从而提高机体的免疫活性,降低创面被感染的机会^[24]。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是存在于创面上最主要的氨基葡萄糖,具有良好的保湿性、润滑性、粘弹性及非免疫原性,因此 HA 在临床医学及生物医学工程领域受到广泛关注^[25],如 Zhao 等^[26]利用偶氮苯和与透明质酸链共轭的 β -环糊精基团之间的主客体相互作用形成了光响应性超分子多糖水凝胶,不仅能发挥构造作用,还具有调节功能,同时能够刺激伤口部位的血管生成,加速溃疡创面愈合^[27,28]。此外,有研究发现^[29]当伤口处含有丰富的透明质酸时,通常在伤口愈合后不会留下疤痕,这为皮肤创面无痕修复的研究方向提供了新的思路。但由于透明质酸存在稳定性差、易发生降解、对透明质酸酶敏感^[30],受到强酸、强碱、热等刺激时易发生变性,失去其生理功能等缺点,因此通常在使用时会对其进行改性,如酯化、开环、接枝等各种化学改性方法,以得到性能更好的透明质酸衍生物。

小球藻是存在于海洋中的一类普生性单细胞绿藻,是 20 亿年前出现在地球上最早的真核细胞生物,它含有多种生物活性物质,其中小球藻的生长因子(chlorella growth factor,CGF)是决定其每 20 h 就可以增长 4 倍的关键^[31],没有任何一种生物能达到这样高的增长速率,因此将这种生长因子用于皮肤创面修复研究具有重大意义。CGF 是海洋生物绿藻独有的活性成分,据报道 CGF 不仅具有促进正常细胞增殖、增强机体免疫等多种生物活性^[32],还可以激活淋巴细胞,增强机体免疫力,活化人体细胞,使生长发育加快,促进人体受伤组织修复^[33,34]。有研究证明,CGF 能够提高正常细胞再生能力达 25%以上,可以产生更优质的细胞。

目前水凝胶的交联方法主要包括物理交联(如离子交联、热凝胶等)和化学交联(如点击化学、Michael 加成^[35]、席夫碱反应^[36,37]、光交联等)。与物理交联水凝胶相比,化学交联形成的水凝胶显示出了更好的机械强度和凝胶行为。光交联水凝胶是指在紫外光、蓝光或可见光的照射下,含有光敏基团的物质通过分子内或分子间交联形成的三维网络结构材料^[38]。相比于其他触发(如改变 pH、改变温度等)或自发(如环氧-胺反应、硫醇-烯/炔反应等)的交联方式,光引发交联具有非物理接触、时空精准可控、反应条件温和、副产物少等优势^[39]。光交联水凝胶包括可聚合材料、光引发剂和光源三部分反应体系。通常采用含甲基丙烯酸酯的聚合物对材料进行改性使其获得可发生光交联的光敏基团^[40,41]。

由于制备光交联水凝胶需要以双键或巯基作为交联前提,因此本课题将通过甲基丙烯酸酐(MA)分别对海星壳胶原蛋白(SSC)和透明质酸(HA)进行改性,以引入活性双键,同时添加生长因子 CGF,采用紫外光交联法制备 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶,探究复合水凝胶的理化性能和生物学性能,以此得到一种可抑制伤口感染,促进伤口快速愈合的复合水凝胶。

1 实验方法

1.1 实验试剂

透明质酸(HA)、胃蛋白酶,上海麦克林生化科技有限公司;海星,山东烟台海生海鲜有限公司;氢氧化钠,西陇科学股份有限公司;冰乙酸,广州东巨有限公司;聚乙二醇二丙烯酸酯(PEG-

DA),深圳市文乐生物科技有限公司;甲基丙烯酸酐,上海麦克林生化科技有限公司;光引发剂(2-羟基-2-甲基-1-[4-(2-羟基乙氧基)苯基]-1-丙酮,I2959),北京沃凯生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒,广州捷威斯生物科技有限公司;L929 细胞、NIH-3T3 细胞,中科院细胞库;胎牛血清,Gibco;DMEM 培养基,广州先度生物科技有限公司。

1.2 实验仪器

磁力搅拌器(SZCL-3B),IKA,德国;电子天平(FA1104),上海一恒科技有限公司;冷冻干燥机(ALPHA1-4/2-4/LSC),德国 CHRIST;离心机(KA-1000),上海安亭科学仪器厂;场发射扫描电子显微镜(TM3030),日本;紫外可见分光扫描仪(Cary 4000),马来西亚;傅里叶红外光谱分析仪(EQUINOX55),德国布鲁克(Bruker);圆二色光谱仪(Chirascan),英国;电子万能试验机(PHILIPS TECNAI 10),荷兰飞利浦公司。

1.3 复合水凝胶的制备

1.3.1 海星壳胶原蛋白的提取

将海星壳洗净切碎,按照 m (海星壳/g): V (氢氧化钠/mL)=1:10 加入质量分数为 0.1% 氢氧化钠溶液搅拌浸泡以除去杂蛋白,用纯水清洗至中性。然后在 10 倍体积的 2% 盐酸溶液中持续搅拌,进行脱钙,每 4 h 更换一次酸液,直至无气泡产生,再次用纯水洗至中性。用含有 1% 胃蛋白酶的 0.5% 的乙酸溶液(pH=3)进行抽提 36 h。离心后收集上清液,以纯水透析 1 天,经冻干即得到海星壳胶原蛋白^[42]。

1.3.2 海星壳胶原蛋白改性

将上一步提取得到的海星壳胶原蛋白溶解在 0.1 mol/L 盐酸溶液中,用 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液调节 pH 至 7.5,然后按照摩尔比为 MA(C=C):Col(—NH₂)=2:1 加入适量甲基丙烯酸酐溶液(MA)(图 1a),反应 8 h 后以 10 mmol/L 的盐酸溶液对反应溶液进行透析(3500 D),透析液经冷冻干燥,得到甲基丙烯酸化胶原蛋白(SSCMA)^[43]。

1.3.3 透明质酸改性

制备浓度质量分数为 1% 的透明质酸水溶液,在冰浴条件下,将适量甲基丙烯酸酐逐滴加入透明质酸水溶液中(图 1b),用 5 mol/L 的氢氧化钠溶液维持 pH 在 8.5 左右,然后在冰浴条件下继续反应 24 h。用纯水透析 3 天(8~14 kD),冻干后得到甲基丙烯酸化透明质酸(HAMA)^[44]。

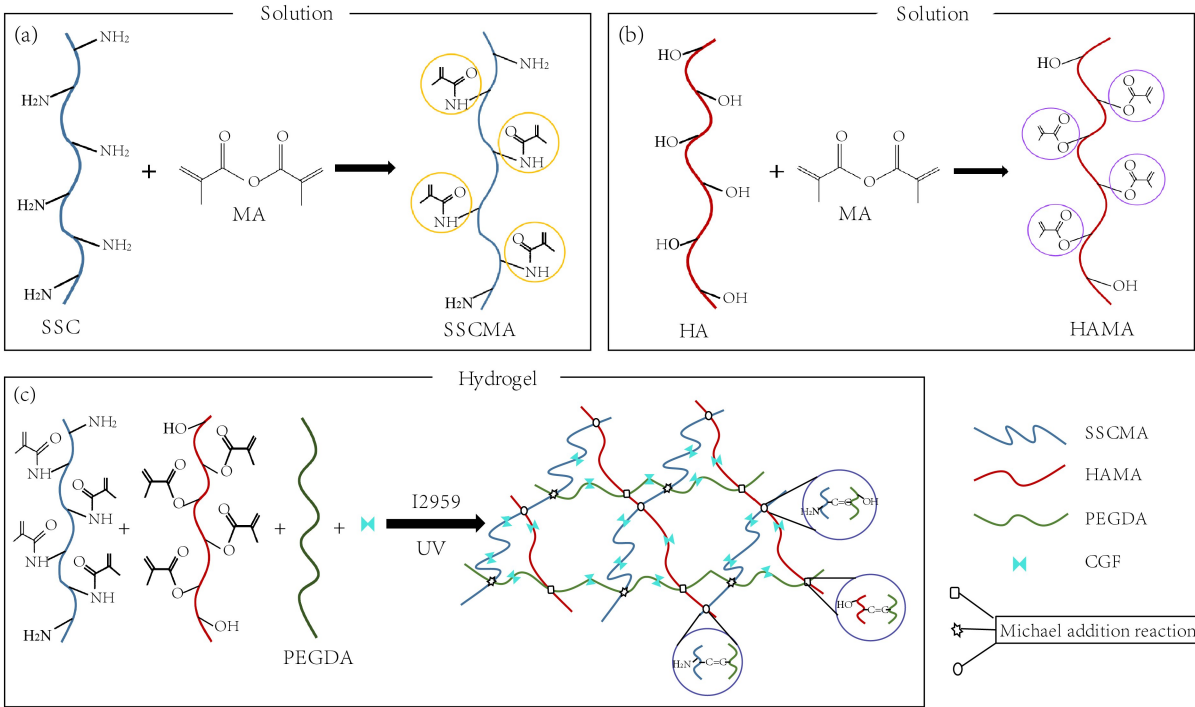


图 1 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的制备流程图：(a) SSCMA，(b) HAMA，(c)复合水凝胶的制备

Figure 1 Preparation process of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogel:the preparation of (a) SSCMA, (b) HAMA and (c) composite hydrogel

1. 3. 4 光交联复合水凝胶的制备

配制 5 g/L 的 SSCMA 醋酸溶液作为溶液 A，然后向溶液 A 中加入 1 mg/mL 的小球藻生长因子 CGF；在避光条件下配制含有 3 g/L HAMA 和 1% I2959 的 150 mmol/L PEGDA 水溶液，作为溶液 B^[45]。用 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液和 0.5 mol/L 盐酸溶液将溶液 A 调至中性。使 HAMA 加入的比例为 25%、33%、40%、50%、60%、66%、75%，所制得的复合水凝胶分别标记为 SSCMA/HAMA/CGF-25、SSCMA/HAMA/CGF-33、SSCMA/HAMA/CGF-40、SSCMA/HAMA/CGF-50、SSCMA/HAMA/CGF-60、SSCMA/HAMA/CGF-66、SSCMA/HAMA/CGF-75。

1. 4 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的性能评价

1. 4. 1 微观形貌

将 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶冷冻干燥后分别对其横切面、纵切面及正面进行表面喷金，采用扫描电子显微镜在 10.0 kV 加速电压下观察凝胶内部的微观形态。

1. 4. 2 力学性能测试

在室温下使用通用机械试验机(BOSS,德国)评估水凝胶的抗压强度^[46]。用直径为 6.5 mm、高度

为 7 mm 的圆柱体制备出不同配比的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶，分别以 1 mm/min、60% 的变形速率进行表征。取三个测量值的平均值作为每个样品的结果。

同时在室温下利用通用机械试验机评估水凝胶的弹性性能。用直径为 6.5 mm、高度为 7 mm 的圆柱体制备出不同配比的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶，分别以 1 mm/min、20%、40% 及 60% 的变形速率进行表征，并拍照记录压缩前、压缩中及压缩后水凝胶的形态变化。

1. 4. 3 黏附性能测试

为了清晰地展现复合水凝胶的粘附行为，通过将水凝胶与不同重量的物体进行黏附，以评价其对固体材料的黏附效果。

1. 4. 4 溶胀性能测试

在室温下，通过在过量的 PBS 缓冲液中浸泡冻干后的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶，直到复合水凝胶达到溶胀平衡。将复合水凝胶制备成直径 13 mm、高 7 mm 的圆柱体，第一次干重称重，然后在 1、3、5、7、9 和 11 h 各称重一次，直到复合水凝胶达到溶胀平衡，每个样品取 3 次测量的平均值。溶胀率按式(1)计算：

溶胀率(%) = (M_s - M_d)/M_d × 100% (1)

M_d 为溶胀前复合水凝胶的初始质量; M_s 为溶胀后复合水凝胶的质量。

1.4.5 降解性能测试

在室温下,将 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶制备成直径 13 mm、高 7 mm 的圆柱体,冷冻干燥,然后将复合水凝胶浸泡于 PBS 缓冲液中,置于 37 ℃ 的摇床中,转速设置为 120 r/min。分别在第 5、10、15、20、25 和 30 天取样,干燥至恒重后称重,并计算降解率。降解率按式(2)计算:

降解率(%) = $(M_i - M_t)/M_i \times 100\%$ (2)
 M_i 为降解前复合水凝胶的初始质量; M_t 为降解后复合水凝胶的质量。

1.4.6 细胞毒性测试

采用 CCK-8 法分别检测 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶对 L929 细胞的细胞相容性,具体步骤按照中华人民共和国国家标准 GB/T 16886.5-2003“医疗器械生物学评价:体外细胞毒性试验”的要求。

(1)SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶浸提液的制备

样品经紫外灭菌后,用含有 10 wt% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基配成 0.1 g/mL 的悬液(用于 L929 细胞),置于 37 ℃,CO₂ 含量为 5% 的培养箱中浸提 24 h,然后将样品取出,用规格为 0.22 μm 的滤膜过滤待用。

(2)复合水凝胶的细胞相容性评价

当细胞生长到 80% 后,将 L929 细胞接种到每孔 5×10^3 个细胞(100 μL)的 96 孔板中,在 37 ℃ 和 CO₂ 含量为 5% 的培养箱中培养 24 h。然后分别加入不同浓度的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶浸提液(每孔 100 μL),同时设置空白对照组(只加 100 μL 培养基,内无细胞)和阴性对照组(100 μL 培养基,内有细胞)。让细胞粘附并生长 1、3 和 7 天。在每个时间点,将 10 μL CCK-8 加入 96 孔板中,孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 处测定每个孔的吸光度值。以阴性对照的平均值为 100% 的细胞增殖率,各组的细胞增殖率按如下公式计算:

$$RPR\% = \frac{(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白}})}{(OD_{\text{阴性对照}} - OD_{\text{空白}})} \times 100\% \quad (3)$$

样品的细胞毒性大小,根据 RGR% 进行判断,RGR 值对应的毒性分级如表 1 所示。

1.4.7 细胞增殖试验

取第 3 代的 NIH-3T3 细胞,待其密度达到

表 1 细胞毒性分级

Table 1 Classification of cytotoxicity

RGR (%)	细胞毒性等级	毒性评价
≥100	0	无细胞毒性
75~99	I	无细胞毒性
50~74	II	轻度细胞毒性
25~49	III	中度细胞毒性
1~24	IV	中毒细胞毒性
<1	V	重度细胞毒性

90% 以上后,0.25% 胰酶消化 3 min 后,用 2 倍体积的 DMEM 完全培养基终止消化,1000 r/min 离心 5 min 收集细胞后重悬于完全培养基中。将处理的细胞悬液按 5×10^3 细胞密度接种于 96 孔板中,在 37 ℃ 和 CO₂ 含量为 5% 的培养箱中培养 24 h。然后分别加入不同浓度的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶浸提液(每孔 100 μL),同时设置空白对照组(只加 100 μL 培养基,内无细胞)和阴性对照组(100 μL 培养基,内有细胞)。让细胞粘附并生长 1、3 和 7 天。在每个时间点,将 10 μL CCK-8 加入 96 孔板中,孵育 4 h。使用酶标仪在 450 nm 处测定每个孔的吸光度值。以阴性对照的平均值为 100% 的细胞增殖率,各浓度组的细胞增殖率按式(3)计算。

AO/EB 细胞染色:按照上述细胞培养步骤,在 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶浸提液和细胞共培养 1、3 和 7 天后,通过 AO/EB 细胞染色试剂盒评估细胞活力。用 PBS 洗涤 3 次细胞,然后将细胞在 AO/EB 标准溶液中孵育 10 min。染色后,再次用 PBS 洗涤细胞,并立即用荧光倒置显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 复合水凝胶的微观结构评价

图 2 为制备好的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶示意图,从图中可以看出各组水凝胶均呈白色,部分呈现出半透明状,且能保持稳定的结构。

图 3 为 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶在 200× 下得到的扫描电镜(SEM)图。从图中可以看出 7 组水凝胶的微观结构均表现出明显的多孔结构。其中 SSCMA/HAMA/CGF-40 的孔径最小,其孔状结构呈不规则的圆形。而其余几组水凝胶的孔状结构均形似蜂窝状,且孔径更大。这

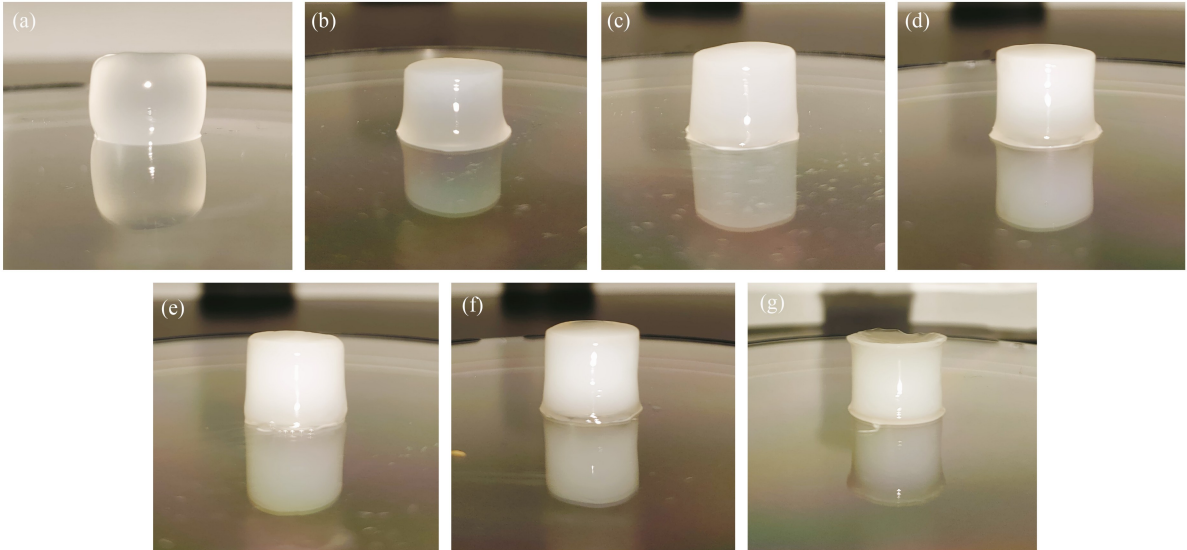


图 2 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶示意图：(a) SSCMA/HAMA/CGF-25，(b) SSCMA/HAMA/CGF-33，(c) SSCMA/HAMA/CGF-40，(d) SSCMA/HAMA/CGF-50，(e) SSCMA/HAMA/CGF-60，(f) SSCMA/HAMA/CGF-66，(g) SSCMA/HAMA/CGF-75

Figure 2 Schematic diagram of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogels: (a) SSCMA/HAMA/CGF-25, (b) SSCMA/HAMA/CGF-33, (c) SSCMA/HAMA/CGF-40, (d) SSCMA/HAMA/CGF-50, (e) SSCMA/HAMA/CGF-60, (f) SSCMA/HAMA/CGF-66, (g) SSCMA/HAMA/CGF-75

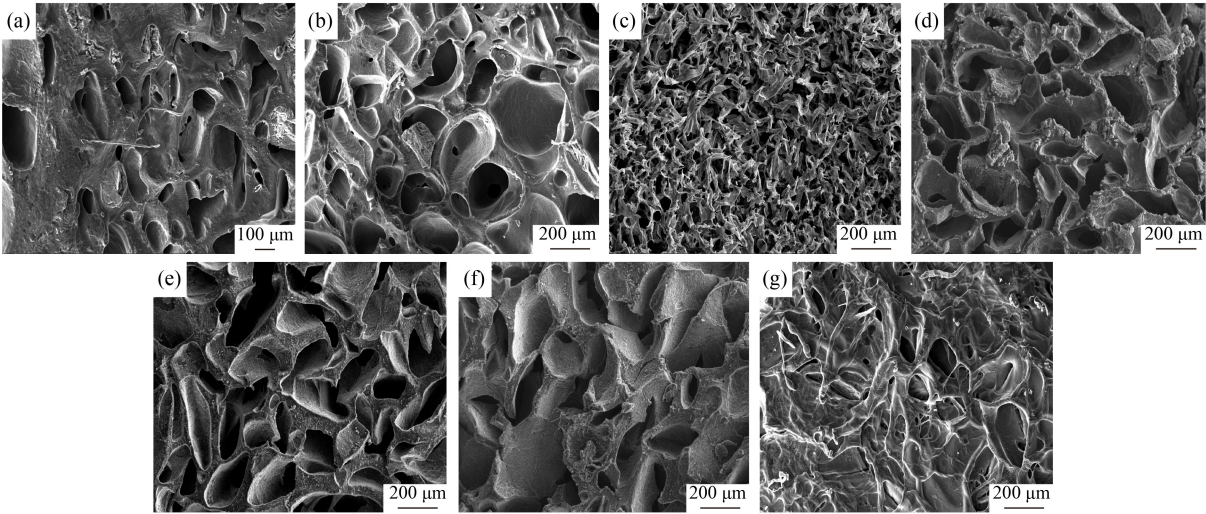


图 3 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的扫描电镜图：(a) SSCMA/HAMA/CGF-25，(b) SSCMA/HAMA/CGF-33，(c) SSCMA/HAMA/CGF-40，(d) SSCMA/HAMA/CGF-50，(e) SSCMA/HAMA/CGF-60，(f) SSCMA/HAMA/CGF-66，(g) SSCMA/HAMA/CGF-75

Figure 3 Scanning electron microscopy (SEM) images of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogels: (a) SSCMA/HAMA/CGF-25, (b) SSCMA/HAMA/CGF-33, (c) SSCMA/HAMA/CGF-40, (d) SSCMA/HAMA/CGF-50, (e) SSCMA/HAMA/CGF-60, (f) SSCMA/HAMA/CGF-66, (g) SSCMA/HAMA/CGF-75

种均匀的孔状结构可以增加水凝胶的溶胀性能。从 SEM 图中可以观察到，当 SSCMA 和 HAMA 之间的占比相差较大时，形成的孔隙结构不均匀，孔径大小也存在差异；而当 SSCMA 和 HAMA 占比差不多时，所形成的孔状结构相对更加均一，孔

径大小的差异甚小。如 SSCMA/HAMA/CGF-40、SSCMA/HAMA/CGF-50 和 SSCMA/HAMA/CGF-60 这三组水凝胶的孔状结构及孔径大小都较为均一。这种丰富的多孔结构有助于成纤维细胞更加方便地进入^[47]，可为细胞的黏附、增殖和迁

移提供有利的微环境^[48]。另外,从图 3 中还可以看到有颗粒状的 CGF 分布,这增加了水凝胶的比表面积,使得水凝胶的力学性能得到提高;且这种颗粒结构可使水凝胶内部孔壁变得粗糙,更加有利于细胞的附着。

2.2 复合水凝胶的力学性能评价

图 4 为按照多种 HAMA 添加量制备出的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的应力-应变和压缩强度示意图。可以看出,在 7 组 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶中,SSCMA/HAMA/CGF-75 的压缩强度最大,可达 86.03 ± 3.09 kPa,其次 SSCMA/HAMA/CGF-66、SSCMA/HAMA/CGF-60 较强,分别为 80.00 ± 3.72 、 71.50 ± 2.28 kPa,SSCMA/HAMA/CGF-25、SSCMA/

HAMA/CGF-33、SSCMA/HAMA/CGF-40 和 SSCMA/HAMA/CGF-50 的压缩强度相对较小,依次为 7.27 ± 2.93 、 14.22 ± 2.77 、 36.03 ± 13.81 、 48.57 ± 9.93 kPa。这可能是因为 HAMA 的加入使得水凝胶内部的交联网络结构更加坚韧,抑制了压缩时水凝胶内部的结构断裂,因此水凝胶的压缩强度会随着 HAMA 含量的增加而增大;而当水凝胶中 SSCMA 比 HAMA 多时,水凝胶的硬度则会降低。

图 5 为复合水凝胶的弹性测试图。从图中可以看到当 HAMA 含量较多时,水凝胶的弹性较差,当 SSCMA 含量较多时,水凝胶的弹性较好。如 SSCMA/HAMA/CGF-25 和 SSCMA/HAMA/CGF-33 的弹性最好,在 20%、40%、60% 的压缩速

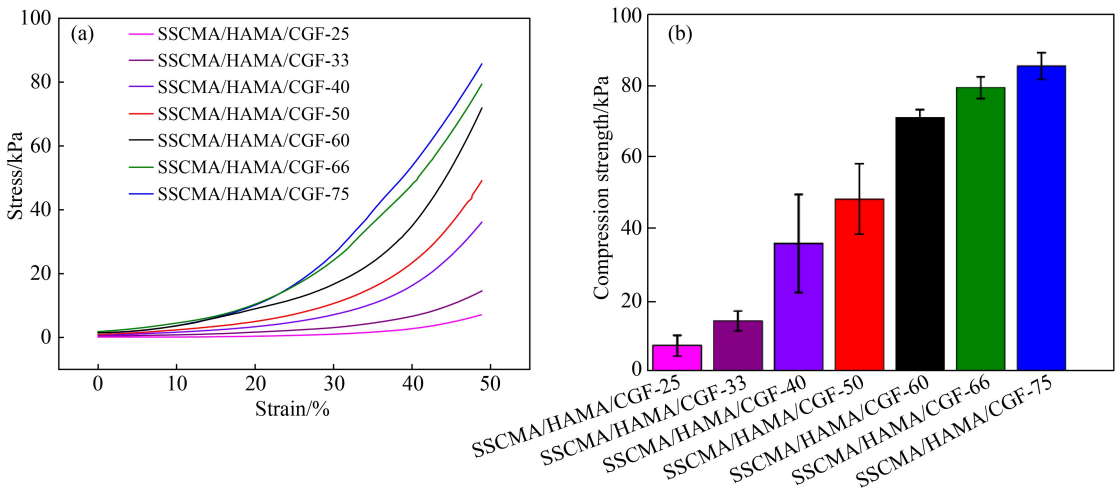


图 4 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的应力-应变曲线(a)和压缩强度(b)

Figure 4 The stress-strain curves (a) and compressive strength (b) of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogel

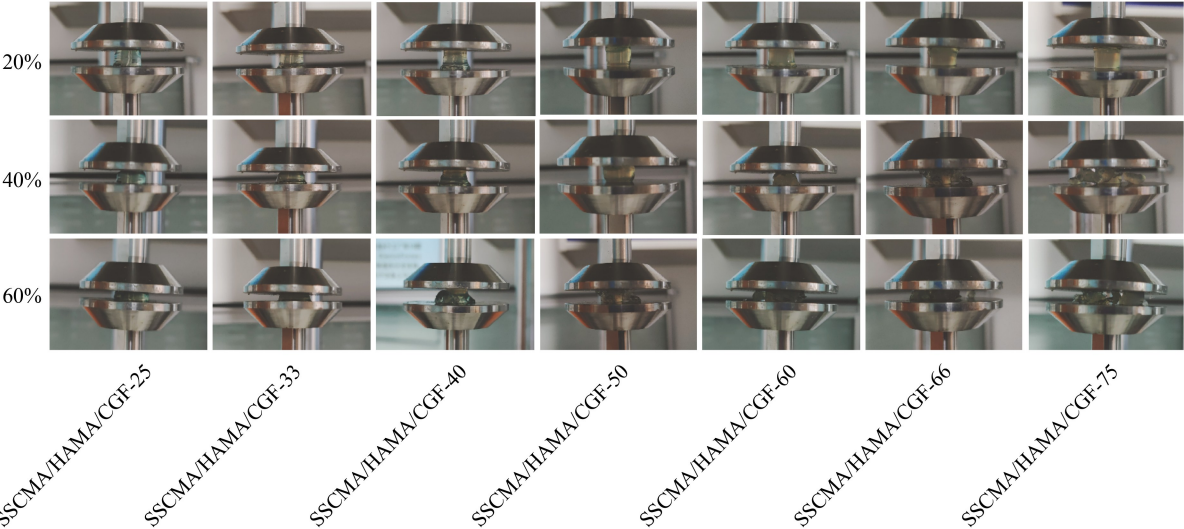


图 5 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的弹性测试图

Figure 5 Elasticity test diagram of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogel

率下均未破裂，在压缩后能快速恢复原状；SSCMA/HAMA/CGF-40 的弹性效果较次，仅在 60% 压缩速率下出现轻微破裂；其余几组水凝胶则只能在 20% 的压缩速率下保持原状。这可能是由于胶原蛋白的加入提高了水凝胶的延展性，使得弹性效果得到提高。详见电子支持信息图 S1。

2.3 复合水凝胶的黏附性能评价

水凝胶的黏附性能在生物医用材料中发挥极大的作用。因此，探究了 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶与不同重量固体材料的黏附表现。如图 6 所示，在不添加任何促进粘附力成分的情况下，各组水凝胶仍能很容易地黏附起各重量的固体材料，这说明 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶具有良好的黏附性能。

2.4 复合水凝胶的溶胀性能评价

水凝胶的溶胀性能在伤口治愈过程中起着重要作用，不仅能够帮助吸收伤口渗出的脓液，还能维持创口处的湿润环境^[49]。图 7(a)显示了 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶在 PBS 缓冲溶液中的溶胀率测试结果。从图中可以看到，每组水凝胶均在 1 h 后达到溶胀平衡。其中 SSCMA/HAMA/CGF-60 的溶胀率最大，可达自身重量的 5 倍，这主要是由于 HAMA 的添加量较大；同时，结合其扫描电镜结果可以分析得知，具有更加均匀孔状结构以及合适的孔径大小更有利于水分子的进入

与保持。而 SSCMA/HAMA/CGF-75、SSCMA/HAMA/CGF-66、SSCMA/HAMA/CGF-50、SSCMA/HAMA/CGF-25、SSCMA/HAMA/CGF-40、SSCMA/HAMA/CGF-33 这 6 组复合水凝胶的溶胀率则依次降低，其中 SSCMA/HAMA/CGF-33 的溶胀率为最低，仅达到自身重量的 3.73 倍。从这 7 组不同配比复合水凝胶的溶胀率测试图中可以看出，当水凝胶中 HAMA 添加量较少时，其溶胀率均出现了降低，而当 HAMA 添加量较多时，其溶胀率得到了提高，这可能是由于在 HAMA 中含有比 SSCMA 更多的亲水性基团，如—OH、—COOH 等，这些基团可以帮助更多的水分子进入到水凝胶内部网络结构中，从而使溶胀率增大。同时，水凝胶的微观结构即孔结构的差异也会对溶胀性能产生影响。

2.5 复合水凝胶的降解性能评价

如图 7(b)为 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的降解率。从图中可以看出，各组复合水凝胶经过 30 天的降解后仍保留了超过 80% 的重量，同时保持了其原始结构。在第 5 天时，各组均发生了一定的降解，SSCMA/HAMA/CGF-25、SSCMA/HAMA/CGF-33、SSCMA/HAMA/CGF-40、SSCMA/HAMA/CGF-50、SSCMA/HAMA/CGF-60、SSCMA/HAMA/CGF-66、SSCMA/HAMA/CGF-75 分别降解到其原始重量的 98.74%、98.61%、97.93%、

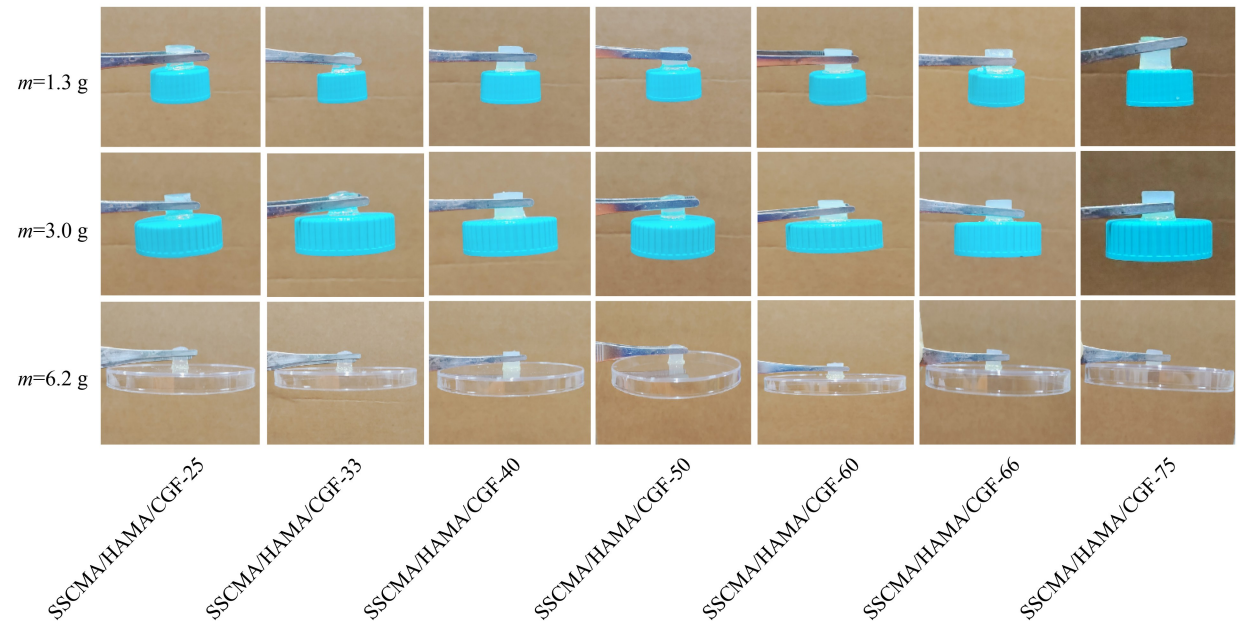


图 6 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶对不同重量固体材料的黏附性能展示
Figure 6 Adhesion performance of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogels to solid materials of different weights

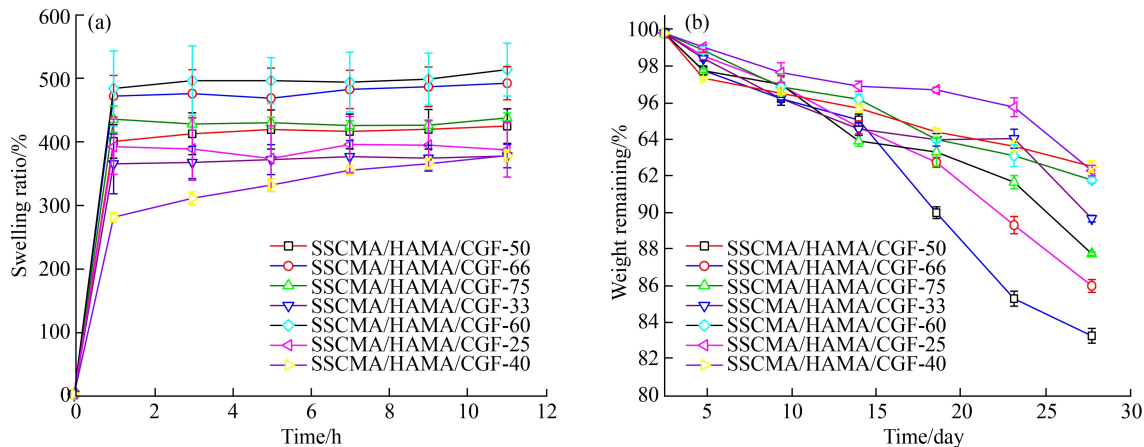


图 7 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的溶胀率(a)及降解率(b)

Figure 7 Swelling ratio (a) and degradation rate (b) of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogels

97.53%、99.23%、99.06%、97.95%。降解到第 30 天时, SSCMA/HAMA/CGF-75、SSCMA/HAMA/CGF-25、SSCMA/HAMA/CGF-60 的降解量较多,分别降解到了其原始重量的 83.30%、86.06%、87.83%。结果表明,SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶中双键的引入可以有效地缓解水凝胶的降解速率,水凝胶的降解稳定性得到了提高^[50],这种较慢的降解速率有利于细胞的长期培养^[51]。

2.6 复合水凝胶的细胞毒性评价

为了评估水凝胶的生物相容性,研究了不同比例的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶对 L929 细胞的细胞毒性。图 8 为复合水凝胶的细胞毒性评价。从图中可以看出,7 组复合水凝胶细

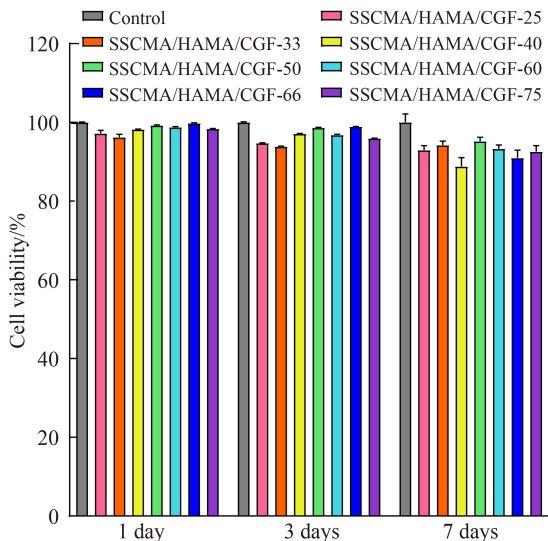


图 8 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的细胞毒性

Figure 8 Cytotoxicity of SSCMA/HAMA/CGF composite hydrogel

胞活力值都高于 90%,细胞毒性等级为 I 级,无毒副作用,说明 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶具有良好的细胞相容性,对小鼠成纤维细胞无毒,可以安全地应用于生物医用材料。

2.7 复合水凝胶的细胞增殖评价

图 9 是 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的细胞增殖评价,Control 组为阴性对照组,其增殖

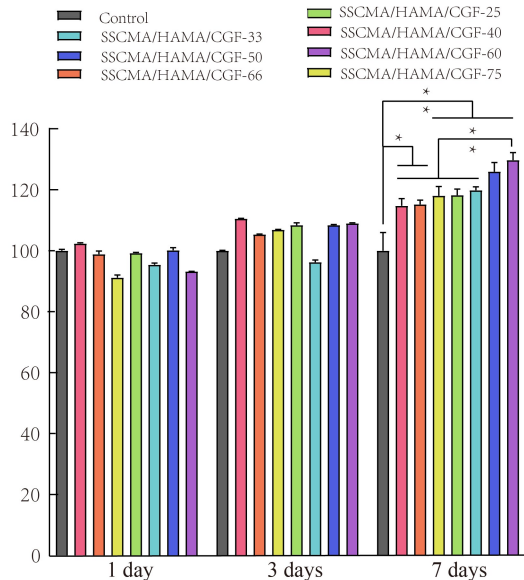


图 9 用阴性对照组和 7 组 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶处理 1 day、3 days 和 7 days 后 NIH-3T3 细胞的细胞增殖率(* $p < 0.05$,** $p < 0.01$,实验组和阴性对照组比较)

Figure 9 Cell proliferation rate of NIH-3T3 cells after 1 day, 3 days, and 7 days were treated with negative control group and 7 sets of SSCMA/HAMA/CGF complex hydrogels (* $p < 0.05$,** $p < 0.01$, comparing the experimental group with the negative control group)

率默认设置为 100 %。从图中可以看出,SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶上的 NIH-3T3 细胞在培养 3 天和 7 天后均显示出了较好的细胞活力。到第 7 天时,SSCMA/HAMA/CGF-25、SSCMA/HAMA/CGF-33、SSCMA/HAMA/CGF-40、SSCMA/HAMA/CGF-50、SSCMA/HAMA/CGF-60、SSCMA/HAMA/CGF-66、SSCMA/HAMA/CGF-75 的细胞增殖率分别为:118.22 %、119.80 %、114.71 %、125.94 %、129.70 %、118.02 %、115.15 %,均明显高于 Control 组,说明小球藻生长因子对细胞的增殖的确有一定的促进作用。其中 SSCMA/HAMA/CGF-60 对细胞的增殖效率最好,这可能是由于其

孔状结构更加均一,表面积大,孔壁更加粗糙,能供给更多的细胞附着生长,且降解速率较慢,因此更有利于细胞的长期培养。

图 10 为对应的细胞荧光图。从图中可以看出,在 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶与 NIH-3T3 细胞的培养过程中,细胞长势良好,呈梭形,数量也有明显增加。并且,在第 3 天和第 7 天时,SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶上的细胞数量明显多于 Control 组。因此,我们认为 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶对细胞无毒且有利于细胞的附着和增殖。

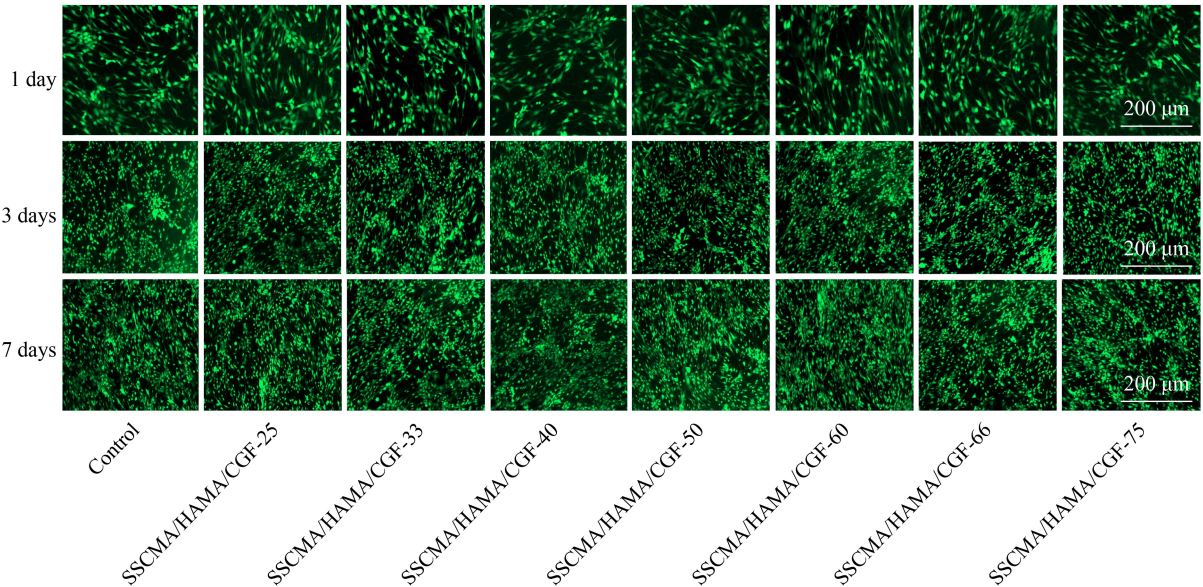


图 10 用阴性对照组和 7 组 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶处理 1 天、3 天和 7 天后 NIH-3T3 细胞的 AO-EB 染色

Figure 10 The AO-EB staining of NIH-3T3 cell after 1 day, 3 days and 7 days treatment with negative control group and 7 sets of SSCMA/HAMA/CGF complex hydrogels

3 结论

以 SSCMA 和 HAMA 为材料,复合小球藻生长因子 CGF,借助光引发剂 I2959 在紫外光辐照条件下制备得到了光交联复合水凝胶,考察不同配比的 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶在微观形貌、力学性能、溶胀性能和降解性能等区别,同时对复合水凝胶的细胞毒性和细胞增殖进行了体外评价。

(1) 通过扫描电镜分析,结果表明光交联 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶中由于双键的结合,使得水凝胶内部得到大量孔状结构,且孔壁较厚,SSCMA 和 HAMA 的配比不同会使得水凝

胶内部的孔径大小及孔隙密度发生变化,另外 CGF 的加入也使得复合水凝胶的比表面积增大。

(2) 通过对 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶的物理性能进行表征,结果表明复合水凝胶具有良好的力学性能、溶胀性能和降解稳定性,结合各项理化表征分析,SSCMA/HAMA/CGF-60、SSCMA/HAMA/CGF-66 和 SSCMA/HAMA/CGF-75 三组水凝胶的理化性能较优。

(3) 体外细胞毒性实验结果表明 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶无细胞毒性,具有良好的细胞相容性,且对 NIH-3T3 细胞具有良好的增殖作用,其中 SSCMA/HAMA/CGF-60 对细胞的增殖效果最好。

综上所述,7 组 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶都表现出了均匀的多孔微观结构,良好的力学性能、溶胀性能和降解稳定性,且无细胞毒性,同时有利于促进细胞的增殖。因此,所制备的光交联 SSCMA/HAMA/CGF 复合水凝胶在生物医学工程皮肤伤口敷料中具有优异的发展前景。

参考文献:

- [1] Böttcher-Haberzeth, S.; Biedermann, T.; Reichmann, E. Tissue engineering of skin. *Burns*, **2010**, 36(4), 450-460.
- [2] Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenke-Layland, K. Skin tissue engineering: *in vivo* and *in vitro* applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2011**, 63(4-5), 352-366.
- [3] Biedermann, T.; Boettcher-Haberzeth, S.; Reichmann, E. Tissue engineering of skin for wound coverage. *Eur. J. Pediatr. Surg.*, **2013**, 23(5), 375-382.
- [4] Supp, D. M.; Boyce, S. T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. *Clin. Dermatol.*, **2005**, 23(4), 403-412.
- [5] Vijayavenkataraman, S.; Lu, W. F.; Fuh, J. Y. H. 3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes. *J. Bio-fabrication*, **2016**, 8(3), 032001.
- [6] Takeo, M.; Lee, W.; Ito, M. Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2015**, 5(1), a023267.
- [7] Varkey, M.; Ding, J.; Tredget, E. E. Advances in skin substitutes-potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *J. Funct. Biomater.*, **2015**, 6(3), 547-563.
- [8] Chambers, E. S.; Vukmanovic-Stejić, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology*, **2020**, 160(2), 116-125.
- [9] Gudjonsson, J. E.; Kabashima, K.; Eyerich, K. Mechanisms of skin autoimmunity: cellular and soluble immune components of the skin. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2020**, 146(1), 8-16.
- [10] Jiang, Y. F.; Huang, S.; Fu, X. B.; Liu, H. W.; Ran, X. W.; Lu, S. L.; Hu, D. H.; Li, Q.; Zhang, H. W.; Li, Y.; Wang, R. X.; Xie, T.; Cheng, B.; Wang, L. F.; Liu, Y.; Ye, X. B.; Han, C. M.; Chen, H. D. Epidemiology of chronic cutaneous wounds in China. *Wound Repair Regen.*, **2011**, 19(2), 181-188.
- [11] Guba, M.; Szűcs, D.; Kemény, L.; Veréb, Z. Tissue engineered skin products in research and therapeutic applications. *Orv. Hetil.*, **2022**, 163(10), 375-385.
- [12] 肖仕初, 郑勇军. 组织工程皮肤现状与挑战. **2020**, 36(3), 166-170.
- [13] Tavakoli, S.; Klar, A. S. Bioengineered skin substitutes: advances and future trends. *Appl. Sci.*, **2021**, 11(4), 1493.
- [14] 林苗远, 李豫皖, 刘毅, 陈贝, 张莉. 组织工程皮肤的研究热点及应用价值. *中国组织工程研究*, **2022**, 26(1), 153-159.
- [15] Chaudhari, A. A.; Vig, K.; Baganizi, D. R.; Sahu, R.; Dixit, S.; Dennis, V.; Singh, S. R.; Pillai, S. R. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, 17(12), 1974.
- [16] Averianov, I.; Stepanova, M.; Solomakha, O.; Gofman, I.; Serdobintsev, M.; Blum, N.; Kafturev, A.; Baulin, I.; Nashchekina, J.; Lavrentieva, A.; Vinogradova, T.; Korzhikov-Vlakh, V.; Korzhikova-Vlakh, E. 3D-Printed composite scaffolds based on poly(ϵ -caprolactone) filled with poly(glutamic acid)-modified cellulose nanocrystals for improved bone tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **2022**, 110(11), 2422-2437.
- [17] Sanapalli, B. K. R.; Tyagi, R.; Shaik, A. B.; Pelluri, R.; Bhandare, R. R.; Annadurai, S.; Karri, V. V. S. R. L-Glutamic acid loaded collagen chitosan composite scaffold as regenerative medicine for the accelerated healing of diabetic wounds. *Arab. J. Chem.*, **2022**, 15(6), 103841.
- [18] 王军. 组织工程化皮肤支架与创面敷料的研究. 南京: 东南大学, **2004**.
- [19] Shoulders, M. D.; Raines, R. T. Collagen structure and stability. *Annu. Rev. Biochem.*, **2009**, 78, 929-958.
- [20] Frantz, C.; Stewart, K. M.; Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *J. Cell Sci.*, **2010**, 123(24), 4195-4200.
- [21] León-López, A.; Morales-Peñaloza, A.; Martínez-Juárez, V. M.; Vargas-Torres, A.; Zeugolis, D. I.; Aguirre-Álvarez, G. Hydrolyzed collagen-sources and applications. *Molecules*, **2019**, 24(22), 4031.
- [22] Milan, E. P.; Rodrigues, M. Á. V.; Martins, V. C. A.; Plepis, A. M. G.; Fuhrmann-Lieker,

- T.; Horn, M. M. Mineralization of phosphorylated fish skin collagen/mangosteen scaffolds as potential materials for bone tissue regeneration. *Molecules*, **2021**, 26(10), 2899.
- [23] 吴鹏, 李平亚, 李启洋. 海星胶原蛋白成分及生物活性的研究进展. *时珍国医国药*, **2006**, 17(7), 1296-1298.
- [24] 厉盈颖, 张俊杰, 吴志明, 马德蓉. 胶原蛋白的制备、生物学特性及应用. *食品工业*, **2021**, 42(8), 192-196.
- [25] 田廷璿, 解从霞, 于世涛. 透明质酸水凝胶制备的研究进展. *粘接*, **2016**, 37(5), 80-85.
- [26] Zhao, W. Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Zhang, R.; Hu, Y.; Boyer, C.; Xu, F. J. Photo-responsive supramolecular hyaluronic acid hydrogels for accelerated wound healing. *J. Control. Release*, **2020**, 323, 24-35.
- [27] Sierra-Sánchez, Á.; Fernández-González, A.; Lizana-Moreno, A.; Espinosa-Ibáñez, O.; Martínez-Lopez, A.; Guerrero-Calvo, J.; Fernández-Porcel, N.; Ruiz-García, A.; Ordóñez-Luque, A.; Carriel, V.; Arias-Santiago, S. Hyaluronic acid biomaterial for human tissue-engineered skin substitutes: preclinical comparative *in vivo* study of wound healing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, **2020**, 34(10), 2414-2427.
- [28] Alven, S.; Aderibigbe, B. A. Hyaluronic acid-based scaffolds as potential bioactive wound dressings. *Polymers*, **2021**, 13(13), 2102.
- [29] Mast, B. A.; Flood, L. C.; Haynes, J. H.; DePalma, R. L.; Cohen, I. K.; Diegelmann, R. F.; Krummel, T. M. Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: implications for healing by regeneration. *Matrix*, **1991**, 11(1), 63-68.
- [30] 徐晶, 艾玲, 白绘宇, 江金强, 夏文水, 刘晓亚. 透明质酸改性研究进展. *高分子通报*, **2011**, (2), 78-84.
- [31] Kitano, M.; Yoshida, T.; Maeda, K.; Matsukawa, R.; Hasene, Y.; Uchiyama, S.; Karube, I. Degradation of *Chlorella* cells during composting. *J. Biotechnol.*, **1998**, 66, 187-193.
- [32] 秦文. 小球藻生长因子(CGF)活性物质的初步分离纯化以及生物活性的研究. 上海: 上海师范大学, **2014**.
- [33] 黄燕娟, 王小芬, 陈向凡. 小球藻的营养及药用价值. *现代生物医学进展*, **2013**, 13(32), 6396-6398.
- [34] Morishita, H.; Sano, T.; Kamiya, N.; Okuda, M. Growth-stimulating substances for *Vibrio alginolyticus* contained in chlorella extract. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **1978**, 44(6), 665-671.
- [35] Palumbo, F. S.; Fiorica, C.; Di Stefano, M.; Pittarresi, G.; Gulino, A.; Agnello, S.; Giammona, G. *In situ* forming hydrogels of hyaluronic acid and inulin derivatives for cartilage regeneration. *Carbohydr. Polym.*, **2015**, 122, 408-416.
- [36] Xiong, L.; Luo, Q. J.; Wang, Y.; Li, X. D.; Shen, Z. Q.; Zhu, W. P. An injectable drug-loaded hydrogel based on a supramolecular polymeric pro-drug. *Chem. Commun. (Camb)*, **2015**, 51(78), 14644-14647.
- [37] Liu, C.; Wu, J.; Gan, D. L.; Li, Z. Q.; Shen, J.; Tang, P. F.; Luo, S. Y.; Li, P. F.; Lu, X.; Zheng, W. The characteristics of mussel-inspired nHA/OSA injectable hydrogel and repaired bone defect in rabbit. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **2020**, 108(5), 1814-1825.
- [38] 严梦玲. 光交联水凝胶可打印性与生物活性研究. 杭州: 浙江大学, **2019**.
- [39] 鲍丙坤, 刘湍, 林秋宁, 朱麟勇. 光交联水凝胶材料的研究与生物医学应用进展. *高分子学报*, **2021**, 52(6), 646-662.
- [40] 王元斗, 宿烽, 李速明. 光交联水凝胶在组织工程中的研究进展. *中国生物工程杂志*, **2020**, 40(4), 91-96.
- [41] Ifkovits, J. L.; Burdick, J. A. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng.*, **2007**, 13(10), 2369-2385.
- [42] 郝林华, 李八方. 多棘海盘车体壁胶原蛋白的研究. *中国水产科学*, **1999**, 6(2), 18-21.
- [43] Pien, N.; Pezzoli, D.; van Hoorick, J.; Copes, F.; Vansteenland, M.; Albu, M.; De Meulenaer, B.; Mantovani, D.; van Vlierberghe, S.; Dubruel, P. Development of photo-crosslinkable collagen hydrogel building blocks for vascular tissue engineering applications: a superior alternative to methacrylated gelatin? *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **2021**, 130, 112460.
- [44] Schuurmans, C. C. L.; Brouwer, A. J.; Jong, J. A. W.; Boons, G. J. P. H.; Hennink, W. E.; Vermonden, T. Hydrolytic (In)stability of methacrylate esters in covalently cross-linked hydrogels based on chondroitin sulfate and hyaluronic acid methacrylate. *ACS Omega*, **2021**, 6(40), 26302-

- 26310.
- [45] 袁静, 邱立朋, 陈敬华. 透明质酸/胶原蛋白/聚乙二醇复合水凝胶的研究. *功能材料*, **2015**, 46(15), 15052-15057.
- [46] Gan, D. L.; Xu, T.; Xing, W. S.; Ge, X.; Fang, L. M.; Wang, K. F.; Ren, F. Z.; Lu, X. Mussel-inspired contact-active antibacterial hydrogel with high cell affinity, toughness, and recoverability. *Adv. Funct. Mater.*, **2019**, 29(1), 1805964.
- [47] Liu, Y.; Vrana, N. E.; Cahill, P. A.; McGuinness, G. B. Physically crosslinked composite hydrogels of PVA with natural macromolecules: Structure, mechanical properties, and endothelial cell compatibility. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **2009**, 90(2), 492-502.
- [48] Bružauskaitė, I.; Bironaitė, D.; Bagdonas, E.; Bernotienė, E. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*, **2016**, 68(3), 355-369.
- [49] Rezvani Ghomi, E.; Khalili, S.; Nouri Khorasani, S.; Esmaeely Neisiany, R.; Ramakrishna, S. Wound dressings: current advances and future directions. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2019**, 136(27), 47738.
- [50] Xu, Z. L.; Yuan, L.; Liu, Q. S.; Li, D. F.; Mu, C. D.; Zhao, L.; Li, X. Y.; Ge, L. M. Crosslinking effect of dialdehyde cholesterol modified starch nanoparticles on collagen hydrogel. *Carbohydr. Polym.*, **2022**, 285, 119237.
- [51] Vila, A.; Torras, N.; Castaño, A. G.; García-Díaz, M.; Comelles, J.; Pérez-Berezo, T.; Corregidor, C.; Castaño, Ó.; Engel, E.; Fernández-Majada, V.; Martínez, E. Hydrogel co-networks of gelatine methacrylate and poly(ethylene glycol) diacrylate sustain 3D functional *in vitro* models of intestinal mucosa. *Biofabrication*, **2020**, 12(2), 025008.