

负载小鼠脐带间充质干细胞壳聚糖双胍盐酸盐水凝胶的制备与表征

邓国东, 杨佳, 刘杨

<https://doi.org/10.12307/2024.120>

投稿日期: 2022-12-13

采用日期: 2023-03-13

修回日期: 2023-04-21

在线日期: 2023-05-25

中图分类号:

R459.9; R394.2; R318

文章编号:

2095-4344(2024)13-01989-07

文献标识码: A

文章快速阅读: 壳聚糖双胍盐酸盐水凝胶的制备与表征

壳聚糖、 β -甘油磷酸钠、
胶原蛋白、碳酸氢钠

壳聚糖双胍盐酸盐

复合水凝胶

显微
形态孔隙
率和
溶胀
比降
解
性
能溶
血
性
能细
胞
毒
性细
胞
黏
附细胞共
培养凝
胶支
架活/死
细胞检测

结论:

壳聚糖-壳聚糖双胍盐酸盐- β -甘油磷酸钠-胶原蛋白-碳酸氢钠交联形成的水凝胶绿色安全、性能优良,有望作为负载干细胞治疗的组织工程材料。

文题释义:

壳聚糖: 是一种由甲壳素经过脱乙酰化生产出的多糖类生物活性聚合物,含有游离的氨基基团,具有天然、安全、无毒害等许多独特的性质。**壳聚糖双胍盐酸盐:** 是采用双胍胺对壳聚糖进行改性,将二甲双胍结构引入壳聚糖之中,以利用壳聚糖的特性增加双胍药物生物相容性而得到的产物。**胶原蛋白:** 是细胞外基质的主要成分,具有良好的物理化学性质,与细胞的黏附、生长、表达有密切关系。 **β -甘油磷酸钠:** 具备作为有机磷酸供体的功能,常作为一种水凝胶或支架组分用于组织工程学。**碳酸氢钠:** 是一种无机化合物,呈白色结晶性粉末,溶于水,可用以调节水凝胶的pH值。

摘要

背景: 随着水凝胶材料研究的深入,水凝胶的适用领域也逐渐拓宽,搭载干细胞进行疾病治疗成为研究的一个新方向,但如何构建适宜于细胞生长的水凝胶材料,是目前需要解决的关键问题。**目的:** 探究壳聚糖-壳聚糖双胍盐酸盐-胶原蛋白复合水凝胶的理化性能并评价其负载小鼠脐带间充质干细胞的能力。**方法:** 以壳聚糖、壳聚糖双胍盐酸盐和胶原蛋白为原料,加入交联剂 β -甘油磷酸钠和碳酸氢钠物理交联制备水凝胶,根据成胶时间和成胶效果筛选出合适的水凝胶(以此记为Gel-1、Gel-2、Gel-3)。表征3组水凝胶电子显微镜下的形态、孔隙率、溶胀性能、降解性,并进行溶血实验考查3组水凝胶的溶血情况。将小鼠脐带间充质干细胞与表征综合性性能最好的水凝胶共培养,测定复合水凝胶的细胞毒性、细胞存活情况、细胞黏附效应,从而评价该水凝胶负载脐带间充质干细胞的性能。**结果与结论:** ①扫描电镜表征结果显示,3组水凝胶内部均呈多孔网状结构,添加了壳聚糖双胍盐酸盐的Gel-2、Gel-3内部结构更加多孔且立体;②Gel-3组水凝胶孔隙率高于其余两组,孔隙率高且孔径分布均匀;③3组水凝胶溶胀性能都在100%以上,且具有壳聚糖双胍盐酸盐组分的水凝胶溶胀性能更好;④3组水凝胶的降解率在15 d的时间尺度内可以降解90%以上,降解性能良好;⑤溶血性能测定结果表明各组水凝胶搭载鸡红细胞所测得的吸光度值与生理盐水搭载鸡红细胞所测得的吸光度值基本相同,无溶血现象出现;⑥毒性实验和活死细胞染色实验显示各组水凝胶中细胞存活率都在100%以上,表明无明显细胞毒性,脐带间充质干细胞可在水凝胶包裹下生存且水凝胶对细胞存活率有正向的影响;⑦脐带间充质干细胞可以黏附在水凝胶表面且形态正常。**关键词:** 智能水凝胶; 脐带间充质干细胞; 物理交联; 壳聚糖; 2型糖尿病

Preparation and characterization of chitosan biguanide hydrochloride hydrogels loading mouse umbilical cord mesenchymal stem cells

Deng Guodong, Yang Jia, Liu Yang

Department of Biology, School of Science, Shantou University, Guangdong Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou 515063, Guangdong Province, China

Deng Guodong, Department of Biology, School of Science, Shantou University, Guangdong Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou 515063, Guangdong Province, China

Corresponding author: Liu Yang, MD, Professor, Department of Biology, School of Science, Shantou University, Guangdong Key Laboratory of Marine Biotechnology, Shantou 515063, Guangdong Province, China

汕头大学理学院生物系, 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东省汕头市 515063

第一作者: 邓国东, 男, 2002年生, 广东省佛山市人, 汉族, 汕头大学本科在读。

通讯作者: 刘杨, 博士, 教授, 汕头大学理学院生物系, 广东省海洋生物技术重点实验室, 广东省汕头市 515063

<https://orcid.org/0000-0002-5717-471X> (刘杨)

基金资助: 广东省高等学校省级重大科研项目(2021ZDZX2051), 项目负责人: 刘杨

引用本文: 邓国东, 杨佳, 刘杨. 负载小鼠脐带间充质干细胞壳聚糖双胍盐酸盐水凝胶的制备与表征[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(13):1989-1995.



Abstract

BACKGROUND: With the in-depth research of hydrogel materials, the applicable fields of hydrogel have been gradually broadened, and carrying stem cells for disease treatment has become a new direction of research, but how to construct a hydrogel suitable for stem cell growth is the key problem that needs to be solved at present.

OBJECTIVE: To investigate the physicochemical properties of chitosan-chitosan biguanide hydrochloride-collagen composite hydrogels and to evaluate their ability to load mouse umbilical cord mesenchymal stem cells.

METHODS: The hydrogels were prepared by physically cross-linking chitosan, chitosan biguanide hydrochloride and collagen with the cross-linking agents β -glycerophosphate sodium and sodium bicarbonate, and the suitable hydrogels were screened according to the gel formation time and gel formation effect (noted as Gel-1, Gel-2 and Gel-3 in this way). Morphology, porosity, swelling properties, and degradability of the three groups of hydrogels were observed by scanning electron microscopy. Hemolysis experiments were performed to examine the hemolysis of the three groups of hydrogels. The mouse umbilical cord mesenchymal stem cells were co-cultured with the hydrogel with the best comprehensive performance of characterization. The cytotoxicity, cell survival and adhesion effect of the composite hydrogel were determined to evaluate the performance of this hydrogel loaded with umbilical cord mesenchymal stem cells.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Scanning electron microscopy characterization results showed that all three groups had porous mesh structures inside, and the internal structure of Gel-2 and Gel-3 with the addition of chitosan biguanide hydrochloride was more porous and three-dimensional. (2) The hydrogel porosity of the Gel-3 group was higher than the remaining two groups, with high porosity and uniform pore size distribution. (3) The swelling performance of all three groups of hydrogels was above 100%, and the swelling performance of hydrogels with chitosan biguanide hydrochloride component was better. (4) The degradation rate of the three groups of hydrogels could be degraded by more than 90% in a time scale of 15 days, with good degradation performance. (5) The results of the hemolytic properties showed that the absorbance values measured by each group of hydrogels carrying chicken erythrocytes were basically the same as those of saline carrying chicken erythrocytes, and no hemolysis occurred. (6) The toxicity experiment and living and dead cell staining showed that the survival rate of umbilical cord mesenchymal stem cells in each group of hydrogels was above 100%, indicating that there was no obvious cytotoxicity. Umbilical cord mesenchymal stem cells could survive under the hydrogel package and the hydrogels had a positive effect on the survival rate of umbilical cord mesenchymal stem cells. (7) The cells in the umbilical cord mesenchymal stem cell adhesion assay can survive under the hydrogel package and can adhere to the surface of the hydrogel with normal morphology.

Key words: smart hydrogel; umbilical cord mesenchymal stem cell; physical crosslinking; chitosan; type II diabetes

Funding: Provincial Major Scientific Research Project of Higher Education Institutions in Guangdong Province, No. 2021ZDZX2051 (to LY)

How to cite this article: DENG GD, YANG J, LIU Y. Preparation and characterization of chitosan biguanide hydrochloride hydrogels loading mouse umbilical cord mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(13):1989-1995.

0 引言 Introduction

水凝胶是三维网状聚合物体系，能够容纳大量的水而不改变内部结构的聚合物材料^[1]，具有良好的生物相容性。近年来，智能水凝胶的研究越来越深入，智能水凝胶除了具备水凝胶的基本特征之外，还对外界多种信号刺激产生响应。在组织工程领域，智能水凝胶可在填充空间损伤、传送生物活性物质以及提供组织细胞发育所需的三维结构等领域使用。在生物医药领域，智能水凝胶药物控释体系能够感应外界环境刺激如温度、光、pH值、磁和电等^[2-6]，从而改变水凝胶在水中的溶胀和降解行为，赋予其“智能”特性，还具有良好的促创面愈合效果和抗菌性能^[7-11]，在肿瘤治疗方面也有应用^[12-13]。此外，智能水凝胶还在传感器、电池发电、环境保护等领域都有较好的研究前景^[14-18]。基于智能水凝胶材料在组织工程、生物医用领域以及其他领域的优势，课题组设计一种绿色安全、具备适宜的干细胞生长微环境、性能优良的蛋白-糖基天然生物大分子温敏可注射水凝胶组织支架材料。

天然碱性多糖壳聚糖(chitosan, CS)作为生物医学领域最重要的生物高分子材料之一，具有良好的生物降解性、生物相容性且毒性低等特性而备受关注^[19]，这些特性促使壳聚糖成为生物医学领域理想的原材料^[20]。然而，天然高分子材料一般不具备足够的机械性能和加工性能，在医学中应用更多的是其衍生物或进行化学改性或与其他材料结合。二甲双胍是世界各国临床指南推荐治疗2型糖尿病的首选药物，将二甲双胍的结构引入壳聚糖中得到壳聚糖双胍盐酸盐(chitosan biguanide hydrochloride, CGH)，利用壳聚糖天然、安全、无毒害的特性增加二甲双胍药物的生物相容性，这样做可以结合两者的优势，提高双胍药物的生物利用效率^[21]。鱼胶原蛋白

白富含人体需要的氨基酸，研究发现鱼胶原蛋白具有调节人体免疫力、止血、缓解关节疼痛、防治贫血等功能，其生物相容性好、免疫原性低、生物可降解性适宜^[22]。鱼胶原蛋白的氨基酸组成与哺乳动物的胶原蛋白相似^[23]，有望在组织工程支架中取代哺乳动物胶原。鱼胶原蛋白是最为常用的天然来源软骨组织工程支架，包埋细胞植入体内后，促进细胞分化增殖，可逐步转化为正常组织。

间充质干细胞是一类来源于中胚层的多能干细胞，具有多向分化潜能和免疫调节功能^[24]，广泛分布于多种器官组织，如骨髓、脐带等。脐带间充质干细胞是指存在新生儿脐带中的一种干细胞，具有来源充足、取材方便、培养简单、致瘤性低、多向分化潜能等特点，在改善血糖、心脏、肺、角膜损伤方面发挥着免疫调节和再生修复的作用^[25-28]。利用人脐带间充质干细胞治疗2型糖尿病小鼠^[29]，可改善胰岛细胞功能，维持血糖稳定，是治疗糖尿病的良好种子细胞。近年来，由于干细胞和复合水凝胶材料的优越性，负载干细胞水凝胶治疗疾病的模式逐渐成为研究热点^[30-31]。

该研究以壳聚糖、CGH和鱼胶原蛋白为原料，加入交联剂 β -甘油磷酸钠和碳酸氢钠，采用物理交联法制备复合水凝胶并进行表征，选择出综合性能最优秀的复合水凝胶并评价其负载小鼠脐带间充质干细胞的能力，以期开发一种生物相容性优良和负载干细胞能力优越的新型组织工程材料。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 水凝胶支架的制备与表征，实验数据采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2021年9月至2022年5月在汕头大学海洋生物技术重点实验室H407完成。

1.3 材料

1.3.1 细胞 小鼠脐带间充质干细胞购于上海炬雅生物科技有限公司。

1.3.2 试剂 壳聚糖 (西安普瑞斯生物工程有限公司, 中国); 盐酸 (优级纯, 西陇化工股份有限公司, 中国); 双氰胺 (山东华特威生物科技有限公司, 中国); 无水乙醇 (分析纯, 西陇科学股份有限公司, 中国); 乙酸 (分析纯, 西陇科学股份有限公司, 中国); β -甘油磷酸钠 (Sigma-Aldrich 公司, 美国); 鱼胶原蛋白、CCK-8、4% 组织固定液、溶菌酶、4% 鸡红细胞悬液 (北京索莱宝科技有限公司, 中国); 碳酸氢钠 (分析纯、广东光华科技股份有限公司, 中国); 1×PBS 缓冲液 (Biosharp, 中国); DMEM 培养基 (赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 北京); 胎牛血清 (Zeta Life, 美国); 青霉素-链霉素、0.25% 胰蛋白酶、Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 (Beyotime, 中国); 二甲基亚砜 (MP Biomedicals, LLC, 美国); 生理盐水注射液 (广东科伦药业有限公司, 中国); 脐带间充质干细胞完全培养基 (Peocell, 中国)。

1.3.3 仪器 37 °C 恒温水浴锅、磁力搅拌水浴锅 (上海坤诚科学仪器有限公司, 中国); SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵 (郑州特尔仪器设备有限公司, 中国); 扫描电子显微镜 (泰思肯有限公司, 中国); 电子天平 (Sartorius, 德国); 冷冻干燥机 (青岛永合创信电子科技有限公司, 中国); 24 孔板、细胞培养皿、冻存管、离心管、一次性细胞培养皿、6 孔板、24 孔板、96 孔板、0.22 μ m 滤膜 (Biofil, 中国); 多功能微孔板检测仪 (Biotek, 美国); 3-5 N 离心机 (湖南恒诺仪器设备有限公司, 中国); CO₂ 无菌培养箱 (Thermo, 美国); 光学显微镜 (宁波舜宇仪器有限公司, 中国)。

1.4 实验方案

1.4.1 壳聚糖的改性 4 g 壳聚糖溶于 100 mL 0.2 mol/L 盐酸, 50 °C 水浴加热搅拌 1 h, 待壳聚糖溶解后加入 3 g 双氰胺和 50 mL 去离子水的混合溶液, 并在 90 °C 下搅拌 1 h, 同时向液体中滴加 2 mL 0.1 mol/L 盐酸调节 pH 值 (反应开始时和反应结束前 30 min 加入, 共 2 次, 每次 2 mL)。反应结束后静置冷却至室温, 加入无水乙醇析出絮状沉淀, 减压抽滤, 无水乙醇洗涤。将产品冻干, 研磨, 得到 CGH 粉末。反应式见图 1^[32]。

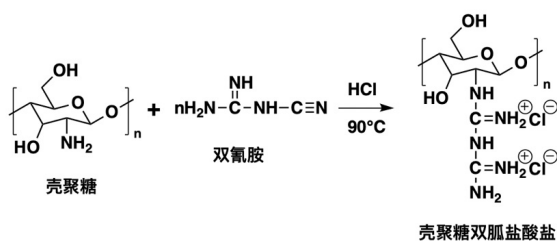


图 1 | 壳聚糖双胍盐酸盐反应式图

Figure 1 | Chitosan biguanide hydrochloride reaction formula

1.4.2 复合水凝胶的制备

(1) 原料准备: ① 2% 壳聚糖: 2 g 壳聚糖溶于 100 mL 0.1 mol/L 乙酸; ② 2%CGH: 2 g CGH 溶于 100 mL 去离子水;

③ 50% β -甘油磷酸钠: 17.714 g β -甘油磷酸钠, 用去离子水定容至 25 mL; ④ 0.5% 鱼胶原蛋白: 0.25 g 鱼胶原蛋白溶于 50 mL 去离子水; ⑤ 2% 碳酸氢钠: 2 g 碳酸氢钠溶于 100 mL 去离子水。

(2) 水凝胶配比优化: 用上述原料尝试配制水凝胶, 成胶温度设定为 37 °C。以水凝胶成胶时间、成胶效果、pH 值范围为标准, 探究符合条件的水凝胶配比。为了对比壳聚糖改性后对水凝胶的影响, 遵循制备标准, 利用未改性的壳聚糖制备水凝胶, 以及再添加 CGH 制备水凝胶, 对它们进行理化性质的表征。

1.4.3 小鼠脐带间充质干细胞的培养

(1) 脐带间充质干细胞的复苏: 将购置的脐带间充质干细胞于 37 °C 水浴解冻后将其转移至离心管, 1 200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入 1 mL 基本培养基 (90% DMEM 培养基, 体积分数为 10% 胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素) 轻轻悬浮脐带间充质干细胞, 转移到一次性细胞培养皿, 加入 4 mL 基本培养基, 放入 CO₂ 无菌培养箱培养。

(2) 脐带间充质干细胞的换液: 将一次性培养皿中的培养基倒出, 用 1 mL PBS 洗两三次, 再加入 5 mL 基本培养基, 每 2 d 换液 1 次。

(3) 脐带间充质干细胞的传代: 脐带间充质干细胞铺满整个培养皿底部 80% 以上即可传代。将一次性培养皿中的培养基倒出, 用 1 mL PBS 洗两三次, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化, 在 CO₂ 无菌培养箱温育 2 min, 轻拍培养皿壁且显微镜观察脐带间充质干细胞从培养皿底部消化下来, 加入 1 mL 基本培养基 (至少与加入酶体体积一致) 终止消化, 消化液全部转移至离心管, 1 200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入 3 mL 基本培养基轻轻悬浮脐带间充质干细胞, 均分到 3 个一次性培养皿中, 每个培养皿加入 4 mL 基本培养基继续培养, 脐带间充质干细胞代数不超过 10 代。

(4) 脐带间充质干细胞的冻存: 为保证细胞活性和提高实验容错率, 对部分脐带间充质干细胞 (第 2 代) 进行冻存。将一次性培养皿中的培养基倒出, 用 1 mL PBS 洗两三次, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化, 在 CO₂ 无菌培养箱温育 2 min, 轻拍培养皿壁且显微镜观察脐带间充质干细胞从培养皿底部消化下来, 加入 1 mL 基本培养基 (至少与加入酶体体积一致) 终止消化, 消化液全部转移至离心管, 1 200 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入 2 mL 冻存液 (1 mL 二甲基亚砜 + 9 mL 基本培养基), 轻轻悬浮细胞, 全部溶液转移到冻存管中并于 -80 °C 冰箱冻存。

1.4.4 表征与测试

(1) 扫描电子显微镜观察冻干水凝胶的横截面形貌以及孔径大小及分布: 先将水凝胶样品冷冻干燥 48 h 后得到干燥凝胶样品, 用液氮淬断干燥凝胶样品, 表面真空喷金 20 min 以提高导电率, 扫描电镜观察, 电压 10 kV。

(2) 复合水凝胶孔隙率和溶胀比测定: 称取适量水凝胶干品记其质量 m_0 和体积 v , 浸泡于 50 mL 无水乙醇中, 使液

体充分进入凝胶孔隙，用滤纸吸干表面的乙醇，记录凝胶质量 m ，重复 3 次平行实验，以公式 (1) 计算孔隙率：

$$\text{孔隙率}(\%) = \frac{m - m_0}{0.789 \times v} \times 100\% \quad (1)$$

称取适量水凝胶干品记其质量 m_0 ，将样品浸泡在 PBS 中，按 1 h 为时间间隔取出，用滤纸轻轻吸干表面的水，并立即称质量 m_t ，重复 3 次平行实验，以此进行 10 h 时间长度的质量。由公式 (2) 计算溶胀比：

$$\text{溶胀比}(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

(3) 复合水凝胶体外降解性能测定：将水凝胶冻干称质量记作 m_0 ，利用 2% 溶菌酶对水凝胶冻干样进行降解，每 3 d 更换 1 次降解液，分别在 1, 3, 5, 7, 11, 15 d 取出样品冻干称质量记作 m_n ，重复 3 次平行实验，利用公式 (3) 计算降解率：

$$\text{降解率}(\%) = \frac{m_0 - m_n}{m_0} \times 100\% \quad (3)$$

(4) 复合水凝胶毒性测定：选取表征综合性能最好的水凝胶，制备并称取 0.4 g 水凝胶于 10 mL 基本培养基中浸泡 24 h，将浸提液过滤后得到 0.04 g/mL 的原液，将其稀释至 0.02 g/mL 作为母液，再将母液稀释 10 倍、100 倍得到稀释液。

将培养至第 3 代的脐带间充质干细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化，将细胞浓度调整为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ，用基本培养基悬浮后接种到 96 孔板，每孔加 100 μL 脐带间充质干细胞悬液，过夜培养，待细胞贴壁后，PBS 洗 2 次，每孔加入 100 μL 梯度稀释的稀释液，以每孔加入 100 μL 基本培养基为对照，培养 24 h 后加入 CCK-8，每孔 10 μL ，孵育 48 h 后在酶标仪 450 nm 处测吸光度值，每组重复 5 次平行实验，以公式 (4) 计算脐带间充质干细胞的存活率。

$$\text{存活率}(\%) = \frac{\text{凝胶组吸光度值}}{\text{空白组吸光度值}} \times 100\% \quad (4)$$

(5) 复合水凝胶溶血性能测定：先将 4% 鸡红细胞悬液用生理盐水稀释得到 2% 鸡红细胞悬液。制备表征综合性能最好的水凝胶，取 0.1 g 凝胶于 6 mL 生理盐水中，37 $^{\circ}\text{C}$ 浸泡 24 h，然后取 2 mL 凝胶提取液，向其中加入 100 μL 2% 鸡红细胞悬液，以 2 mL 生理盐水中加入 100 μL 2% 鸡红细胞悬液做负对照，2 mL 去离子水中加入 100 μL 2% 鸡红细胞悬液做正对照，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h，8 000 r/min 离心 5 min，取上清，每组重复 5 次平行实验，在酶标仪 545 nm 处测凝胶组和负对照组的吸光度值，比对凝胶组和负对照组的吸光度值分析其溶血性能。

(6) 脐带间充质干细胞黏附效应测定：将表征综合性能最好的水凝胶原料过 0.22 μm 滤膜除菌后配制水凝胶前体液，在 6 孔板中加入 3 mL 水凝胶前体液，放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱成胶。将第 3 代脐带间充质干细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化，将细胞浓度调整为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ，用完全培养基重悬。水凝胶成胶后在 6 孔板每孔加入 1 mL 细胞悬液和 4 mL 脐带间充质干细胞完全培养基，培养 2 d 后吸出 3 mL 旧培养基，再加入 3 mL

新培养基，培养 3 d 后吸出全部培养基，加入 4% 组织固定液固定 30 min，然后进行乙醇梯度脱水 (体积分数为 10%，30%，50%，70%，85%，90%，100%)，冻干后置于扫描电镜下观察。

(7) 复合水凝胶与脐带间充质干细胞共培养后活死细胞染色：将配制表征综合性能最好的水凝胶原料用 0.22 μm 滤膜除菌后配制水凝胶前体液，用水凝胶前体液悬浮第 3 代脐带间充质干细胞后接种到 24 孔板中，每孔 500 μL ，然后将 24 孔板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱成胶，成胶后每孔加入 2 mL 脐带间充质干细胞完全培养基，在培养的第 2, 4, 8 天进行活死细胞染色。

1.5 主要观察指标 水凝胶的形态、孔隙率、溶胀性能、降解性以及溶血情况。水凝胶的细胞毒性、细胞存活情况、细胞黏附效应。

2 结果 Results

2.1 水凝胶配方优化

2.1.1 水凝胶配方优化 采用倒置试管的方法测试水凝胶在 37 $^{\circ}\text{C}$ 状态下的成胶状态，溶胶混匀加入试管后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅即刻开始计时，一定时间后倒置试管，如果混合液不流动则认为混合液由溶液状态转变为凝胶状态，记录成胶时间。

(1) 未改性前凝胶配比优化：初步筛选出 pH 值范围为 6.7–7.0 的水凝胶配比，再以成胶质量、缩短成胶时间为目的，进行下一步的优化，优化配比见表 1。

表 1 | 未改性前凝胶配比优化

Table 1 | Optimization of gel proportioning before unmodification

序号	A (mL)	B (mL)	C (mL)	D (mL)	pH 值	成胶时间 ^a
1-1	10	3	1	2	6.71	7.67 min
1-2	10	4	1	2	6.79	6.17 min
1-3	10	5	1	2	6.87	7.17 min
1-4	10	4	1	8	6.93	2 min
1-5	10	4	1	8 ^b	6.83	3.5 min

表注：a 指溶胶混匀加入试管后即刻放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅至变成不澄清胶状质经过的时间；b 指加入碳酸氢钠浓度为 1%。A：2% 壳聚糖；B：50% β -甘油磷酸钠；C：0.5% 鱼胶原蛋白；D：2% 碳酸氢钠

对 1-1、1-2、1-3 成胶状态进行观察，发现溶胶转变为不透明的胶状质地，都发生溶胶向凝胶的转变过程，虽已初步成胶，但流动性仍较强，其中 1-2 稳定性明显好于 1-1、1-3。在 1-2 的基础上增加碳酸氢钠的量配制 1-4 在 2 min 时就已成胶，成胶后极其稳固，说明碳酸氢钠有增强体系稳定性的作用，碳酸氢钠量的增加使得 pH 值升高，壳聚糖析出，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时壳聚糖链间部分片段发生物理结合形成凝胶。但考虑到 1-4 可能不易注射且碳酸氢钠含量过高产生的不良影响，将碳酸氢钠浓度降低为 1% 配制 1-5，成胶时间为 3.5 min，虽然成胶时间相比 1-4 有所延长，但对比 1-1、1-2、1-3，成胶时间明显缩短，且成胶后稳定、可注射，因此将 1-5 命名为 Gel-1。

(2) 改性后凝胶配比优化：为了拓宽水凝胶适用性，将此筛选过程的 pH 值范围设定为 7.0–7.2，再以成胶质量、缩

短成胶时间为目的, 进行下一步的优化, 优化配比见表 2。

表 2 | 改性后凝胶配比优化

Table 2 | Optimization of gel proportioning after modification

序号	A (mL)	B (mL)	C (mL)	D (mL)	E (mL)	pH 值	成胶时间 ^a
2-1	2	3	1	2	6	7.12	2.5 min
2-2	3	3	1	2	6	7.11	2.17 min
2-3	3	4	1	2	6	7.13	2.17 min
2-4	3	4	1	2	7	7.11	2.33 min
2-5	3	3	0	2	6	7.06	2.67 min

表注: a 是指溶液混匀加入试管后即刻放入 37 °C 水浴锅至变成不澄清胶状物质经过的时间。A: 2% 壳聚糖; B: 50% β- 甘油磷酸钠; C: 0.5% 鱼胶原蛋白; D: 2% 碳酸氢钠; E: 2% 壳聚糖双胍盐酸盐

加入 CGH 后, 对比表 1 结果, 成胶状态好、成胶时间都明显缩短。直接对比成胶时间发现 2-2 的成胶时间最短, 虽然其与 2-3 成胶时间一致, 在节省原料的情况下, 优先选择 2-2。为了探究鱼胶原蛋白对成胶结果的影响, 将 2-2 的配比去除鱼胶原蛋白配置 2-5。将 2-5 命名为 Gel-2; 2-2 命名为 Gel-3。

2.1.2 水凝胶室温下的成胶状态 最终确定的 3 种水凝胶配比如表 3 所示, 室温下溶胶状态的溶胶以及 37 °C 下的 Gel-1、Gel-2、Gel-3 如图 2 所示。Gel-1 的成胶时间是 3.5 min, Gel-2、Gel-3 的成胶时间分别为 2.67, 2.17 min, 说明通过加入 CGH, 水凝胶的成胶时间明显缩短; 对比 Gel-2 和 Gel-3, 也说明了鱼胶原蛋白对水凝胶体系内交联起到了重要作用。

表 3 | Gel-1、Gel-2、Gel-3 水凝胶配比

Table 3 | Gel-1, Gel-2 and Gel-3 hydrogel ratios

序号	A (mL)	B (mL)	C (mL)	D (mL)	E (mL)
Gel-1	10	4	1	8 ^a	0
Gel-2	3	3	0	2	6
Gel-3	3	3	1	2	6

表注: a 指加入碳酸氢钠的浓度为 1%。A: 2% 壳聚糖; B: 50% β- 甘油磷酸钠; C: 0.5% 鱼胶原蛋白; D: 2% 碳酸氢钠; E: 2% 壳聚糖双胍盐酸盐

2.2 复合水凝胶电子显微镜下形态 在壳聚糖和 CGH 的体系中, 水凝胶因静电力、氢键、疏水相互作用 3 种物理作用力交联, 通过图 3 扫描电镜可观察到复合多糖水凝胶内部均呈多孔网状结构且孔径大小不均一。Gel-1 内部孔径普遍较大且孔壁较为粗糙; Gel-2、Gel-3 内部多孔结构明显且连通, 两组水凝胶孔径普遍都较小, Gel-3 的多空网状结构更加明显立体, 孔壁较为光滑, 说明 CGH 可以使凝胶孔径缩小, 使内部结构更加致密。而 Gel-3 的内部结构相比 Gel-2 更加立体且孔壁更为光滑, 说明鱼胶原蛋白有利于加强水凝胶内部联结形成立体结构, 这种形态结构有利于细胞的黏附以及细胞间的相互作用。

2.3 复合水凝胶孔隙率和溶胀性能分析 如图 4, 实验测得 Gel-1、Gel-2、Gel-3 的孔隙率分别为 (72.84±11.61)%, (75.09±7.89)%, (85.71±5.92)%, 结果表明 3 组水凝胶都具有较高的孔隙率, Gel-2 孔隙率比 Gel-1 略高一些, 说明 CGH 的加入对凝胶的孔隙率有所提高。Gel-3 的孔隙率比其他 2 种水凝胶高十个百分点, CGH 和鱼胶原蛋白同时存在使其孔

隙增大, 这对 Gel-3 孔径丰富起到了印证的作用, 合适的孔隙率有利于细胞的黏附以及营养物质的扩散, 有利于细胞三维培养。

溶胀结果如图 5 所示, Gel-1、Gel-2、Gel-3 水凝胶在前 1 h 快速溶胀, 1 h 后溶胀曲线平缓, 基本都在 2 h 达到溶胀平衡。Gel-1 的溶胀率最高为 120% 左右, 并且达到最高后会小幅度下降, 平衡溶胀率最终保持在 (100.0±13.9)%; Gel-2 和 Gel-3 的溶胀率随时间一直增加, 整体上溶胀率达到峰值后平衡溶胀率分别稳定在 (159.6±4.14)% 和 (169.48±1.72)%。Gel-3 溶胀率比 Gel-2 高一些。从结果可以看出, 加入 CGH 后, 水凝胶的溶胀率达到了更高的水平, 这可能是因为凝胶内部致密多孔, 更容易吸水发生溶胀, 进而使平衡溶胀度升高, 说明该水凝胶有明显的吸水溶胀性能。

2.4 复合水凝胶体外降解性能分析 图 6 中 Gel-1、Gel-2 和 Gel-3 的体外降解曲线发现: 各组水凝胶的降解率随着时间延长逐渐增加, Gel-1 第 1 天降解率为 (68.00±1.35)%, 第 15 天降解率为 (93.00±0.75)%; Gel-2 第 1 天降解率比 Gel-1 更高, 为 (76.00±1.16)%, 第 15 天降解率为 (92.00±1.87)%; Gel-3 第 1 天降解率为 (54.00±0.52)%, 第 15 天降解率为 (92.00±2.29)%。Gel-3 在第 1 天的时候降解率最低, 因有 CGH 和鱼胶原蛋白的存在, 使凝胶内部交联结构更加稳定, 降解速率相较 Gel-1、Gel-2 较慢, 但从 15 d 的时间跨度总体上看, 水凝胶在 15 d 时降解率都达到了 90% 以上, 实验结果表明水凝胶具有良好的可降解性。

2.5 复合水凝胶细胞毒性分析 如图 7 所示, 脐带间充质干细胞分别在 0.000 2, 0.002, 0.02, 0.04 g/mL 水凝胶提取液中培养 48 h, 细胞存活率都超过 100%。随着凝胶提取液的质量浓度升高, Gel-1 组细胞存活率渐渐升高, 其他两组水凝胶的存活率则上下浮动, 但整体上还是呈上升趋势。因此, 水凝胶基本无细胞毒性, 细胞可以正常活动, 且可一定程度上提高细胞的存活率, 促进细胞增殖, 可作为安全的组织工程材料。

2.6 复合水凝胶溶血性能分析 如图 8 所示, 右图为酶标仪测得负对照组和凝胶组在 545 nm 波长下的吸光度值, 凝胶组的吸光值和负对照组的吸光度值基本上一致, 负对照组是生理盐水, 模拟的是组织液的环境, 凝胶携带鸡红细胞不会导致红细胞破裂而溶血, 说明凝胶注入机体后基本上不会发生溶血现象。从图 8 左图可以看出对比正对照组, 3 组水凝胶的上清液颜色都与负对照组一致, 澄清透明。因此, 该复合水凝胶材料成分安全可靠。

2.7 复合水凝胶与脐带间充质干细胞共培养结果分析 细胞活死染色结果如图 9 所示, 可以看到活细胞都被染成绿色, 虽然接种的细胞数量较少, 但共培养的细胞在 2, 4, 8 d 基本上都能存活, 2 d 后细胞数量增长虽较为缓慢, 但这可以通过改变接种细胞浓度达到合适的需求。因此, Gel-3 水凝胶三维培养脐带间充质干细胞形态正常, 该结果进一步说明了复合水凝胶具有良好的生物相容性。

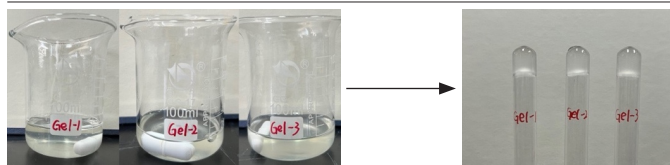
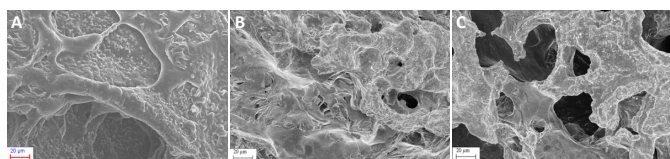


图 2 | 室温和成胶温度下的凝胶状态

Figure 2 | Gel state at room temperature and gelation temperature



图注: A-C 依次为 Gel-1、Gel-2、Gel-3。比例尺 =20 μm

图 3 | 复合水凝胶扫描电镜图

Figure 3 | Scanning electron microscopy of composite hydrogels

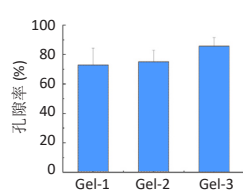


图 4 | 复合水凝胶孔隙率

Figure 4 | Poriness of the composite hydrogels

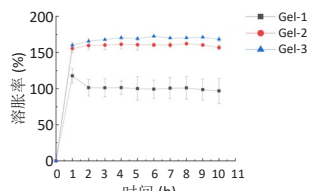


图 5 | 复合水凝胶溶胀曲线

Figure 5 | Swelling curves of the composite hydrogels

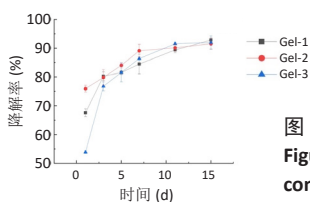


图 6 | 复合水凝胶降解率曲线

Figure 6 | Degradation rate curves of the composite hydrogels

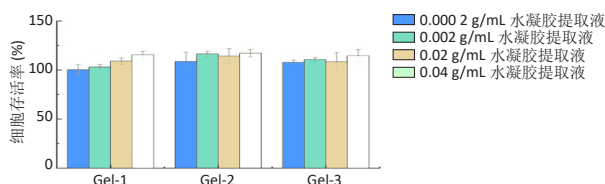
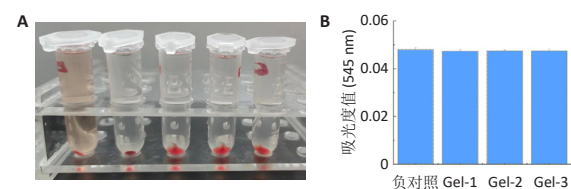


图 7 | 小鼠脐带间充质干细胞存活率

Figure 7 | Survival rates of mouse umbilical cord mesenchymal stem cells



图注: 图 A 为溶血情况, 离心管顺序依次为正对照组、负对照组、Gel-1、Gel-2、Gel-3; B 为凝胶组和负对照组吸光度对比图

图 8 | 复合水凝胶溶血情况对比

Figure 8 | Comparison of hemolysis of the composite hydrogels

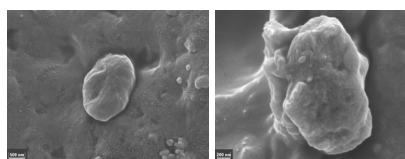


图注: 图 A-C 分别为复合水凝胶与脐带间充质干细胞共培养 2, 4, 8 d (比例尺 50 μm)

图 9 | 荧光显微镜观察活死染色后的细胞状态

Figure 9 | Fluorescence microscope observation of cells after living and dead staining

2.8 脐带间充质干细胞黏附结果分析 接种到 Gel-3 水凝胶的脐带间充质干细胞如图 10 所示, 培养 3 d 后可见细胞黏附于水凝胶表面, 且伸展良好。在高倍镜下观察的细胞具备“把手”型的黏附状态, 稳固地结合在水凝胶表面, 说明了 Gel-3 水凝胶具有良好的脐带间充质干细胞黏附能力。



图注: 培养 3 d 后可见细胞黏附于水凝胶表面, 且伸展良好, 在高倍镜下观察细胞稳固地结合在水凝胶表面

图 10 | 扫描电镜下观察脐带间充质干细胞在水凝胶上的黏附状态

Figure 10 | Adhesion of umbilical cord mesenchymal stem cells to hydrogel under scanning electron microscope

3 讨论 Discussion

随着组织工程研究的不断发展, 水凝胶因与水有较强的亲和性, 能够吸水且含水量高, 在创面愈合、空间损伤填充、传送生物活性物质以及刺激组织细胞实现所需组织发育等领域的优势凸显, 利用温和的水凝胶搭载干细胞治疗糖尿病等疾病成为研究的新方向。

该研究以壳聚糖为原料, 通过化学改性壳聚糖得到 CGH, 加入鱼胶原蛋白, 与交联剂 β -甘油磷酸钠和碳酸氢钠物理交联, 通过控制其配比, 调节水凝胶的成胶时间和成胶性能, 以获得符合筛选条件的水凝胶。文中得到了 3 种合适的凝胶配比, 壳聚糖: β -甘油磷酸钠: 鱼胶原蛋白: 1% 碳酸氢钠体积比为 10:4:1:8 制备凝胶 Gel-1; CGH: 壳聚糖: β -甘油磷酸钠: 鱼胶原蛋白: 2% 碳酸氢钠分别以体积比 6:3:3:0:2 和 6:3:3:1:2 制备凝胶 Gel-2 和 Gel-3, 并表征比较了不同配比水凝胶的性能。在 37 °C 恒温水浴条件下可迅速成胶, Gel-1 的成胶时间为 3.5 min; Gel-2、Gel-3 的成胶时间分别为 2.67 min 和 2.17 min。一般认为在壳聚糖、CGH、鱼胶原蛋白混合溶液中主要存在 3 种分子间物理作用力促使其成胶: ①静电相互作用: 壳聚糖中的胺基与鱼胶原蛋白中的羧基、与 β -甘油磷酸钠磷酸根之间产生静电相互作用力。改性后的 CGH 胺基数量增加, 与鱼胶原蛋白、 β -甘油磷酸钠之间形成的静电相互作用力会更加稳定。②氢键作用: 壳聚糖的羟基、胺基使壳聚糖分子间以及与水分子形成氢键, 氢键的强度在壳聚糖改性后也会增强; 鱼胶原蛋白羧基端、 β -甘油磷酸钠的甘油部分与水分子之间也会形成氢键。③疏水相互作用: 壳聚糖分子链上疏水基团 (-CH₃) 之间会发生疏水相互作用。扫描电子显微镜和孔隙率实验结果表明, 通过物理交联可以制备具有丰富多孔内部结构的水凝胶, 复合多糖水凝胶内部呈现多孔网状结构, 表面粗糙, 各组水凝胶的孔隙率都较高, 这种形态结构有利于细胞的黏附以及细胞间的相互作用, 且加入鱼胶原蛋白和 CGH 改变水凝胶成分, 使得内部结构联结更加稳固、立体, 也有利于提升溶胶的孔隙率, 有助于脐带间充质干细胞在其表面正常黏附、铺展。溶胀实验结果证实了水凝胶可以吸水溶胀, 都具有优异的溶胀性能, 在加入鱼胶原蛋白和 CGH 后, 水凝胶的溶胀性能得到近 60% 的提升, 且溶胀率一直保持在较

高的水平,可能因为水凝胶在吸水溶胀后,内部紧密的结构使其携带水的能力更强。此课题制备的水凝胶在前 7 d 基本上都能达到 85% 的降解程度,7 d 后降解速度逐步放缓,但加入鱼胶原蛋白和 CGH 后,在前 2 d 的降解速率明显下降,这是水凝胶内部结构的改变使得其结构更加稳定导致的,但在 15 d 的长时间尺度来看,水凝胶的降解性能都较为优异。结合上述表征的实验结果,可以得知在加入鱼胶原蛋白和 CGH 后,表征的各项性能都有所提升,其中 Gel-3 水凝胶综合性能最优越。

基于优异的综合性能,对 Gel-3 水凝胶进行进一步的细胞实验,评价其携带脐带间充质干细胞的能力。复合水凝胶溶血性能测定凝胶组和生理盐水组吸光值基本相同,表明该复合水凝胶环境基本上与机体环境相同,几乎不会发生溶血现象,不会对机体造成损伤。复合水凝胶毒性测定和复合水凝胶与脐带间充质干细胞共培养染色证实了水凝胶材料无明显毒性,可以作为安全的组织工程材料。脐带间充质干细胞在水凝胶环境下有较高的存活率,且随着凝胶浓度的升高,细胞的存活率在 100% 上下浮动或有细微的升高,属于一个较高的水平。通过染色观察到存活的绿色细胞,但随着培养天数的增加,细胞的数量增长较为缓慢。细胞黏附实验表示脐带间充质干细胞可以在 Gel-3 水凝胶表面正常黏附铺展并具有特殊的黏附形态。从上述利用 Gel-3 水凝胶进行细胞实验的结果来看,其具备优秀的携带脐带间充质干细胞的能力,Gel-3 水凝胶搭载干细胞治疗有望为治疗 2 型糖尿病提供新的思路,为壳聚糖等多糖水凝胶在疾病治疗领域奠定基础。

综上所述,该研究制备的温敏壳聚糖-CGH-鱼胶原蛋白复合水凝胶材料,成胶迅速,具有良好的生物相容性、可降解性、无毒、负载脐带间充质干细胞效果优越的特性。为了更好地利用该水凝胶,可以进一步设计基于该体系凝胶负载脐带间充质干细胞治疗 2 型糖尿病小鼠的动物实验,探究该水凝胶治疗 2 型糖尿病的效果和机制,为多糖体系水凝胶负载间充质干细胞在 2 型糖尿病等疾病治疗领域的应用拓展提供参考。

作者贡献: 邓国东负责论文撰写、数据文章校对; 杨佳、邓国东负责实验实施、数据分析处理、细胞培养与指标检测; 刘杨负责论文的实验内容总体设计。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

4 参考文献 References

- CATOIRA MC, FUSARO L, DI FRANCESCO D, et al. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2019;30(10):115.
- LI B, ZHANG L, WANG D, et al. Thermo-sensitive hydrogel on anodized titanium surface to regulate immune response. *Surf Coat Tech.* 2020;405:126624.

- Ji W, Wu Q, Han X, et al. Photosensitive hydrogels: from structure, mechanisms, design to bioapplications. *Sci China Life Sci.* 2020;63(12):1813-1828.
- GACANIN J, HEDRICH J, SIESTE S, et al. Autonomous Ultrafast Self-Healing Hydrogels by pH-Responsive Functional Nanofiber Gelators as Cell Matrices. *Adv Mater.* 2019;31(2):e1805044.
- 高飞. 磁场响应型纳米复合材料的合成及磁热生物学效应 [D]. 西安: 西北大学, 2019.
- CARAYON I, GAUBERT A, MOUSLY Y, et al. Electro-responsive hydrogels: macromolecular and supramolecular approaches in the biomedical field. *Biomater Sci.* 2020;8(20):5589-5600.
- 耿志杰, 于珊, 曾志文, 等. 壳聚糖/海藻酸钠自修复水凝胶的制备与性能 [J]. 暨南大学学报 (自然科学与医学版), 2022, 43(3): 322-331.
- 吕宁宇, 李冀, 赵之栋, 等. 羟丁壳聚糖联合生物矿化硅复合水凝胶修复小鼠皮肤创伤实验研究 [J]. 解放军医学院学报, 2022, 43(5): 563-569.
- 吴爱军, 朱敏, 朱钰方. 含铜硅酸钙纳米棒复合水凝胶用于肿瘤治疗和皮肤伤口愈合性能研究 [J]. 无机材料学报, 2022, 37(11): 1203-1216.
- 赵宁, 汪伟, 谢锐, 等. 金属有机骨架/聚乙烯醇双交联网络复合水凝胶的构建及其抗菌性能研究 [J]. 现代化工, 2022, 42(4): 116-122.
- 徐群娜, 杨羽西, 闫文飞, 等. 抗菌黏附型酪蛋白基纳米复合水凝胶的制备 [J]. 精细化工, 2022, 39(3): 496-504.
- WEI C, JIN X, WU C, et al. Injectable composite hydrogel based on carbon particles for photothermal therapy of bone tumor and bone regeneration. *J Mater Sci Technol.* 2022;23:64-72.
- KHAN MUA, RAZAK SIA, HAIDER S, et al. Sodium alginate-f-GO composite hydrogels for tissue regeneration and antitumor applications. *Int J Biol Macromol.* 2022;208:475-485.
- ZHANG W, XU L, ZHAO M, et al. Stretchable, self-healing and adhesive sodium alginate-based composite hydrogels as wearable strain sensors for expansion-contraction motion monitoring. *Soft Matter.* 2022;18(8):1644-1652.
- 杨光, 陈纪超, 刘瑞雪, 等. 高拉伸自黏附导电 P(AAS-VPA)/P(EA-MAA) 复合水凝胶的传感应用 [J]. 高分子材料科学与工程, 2022, 38(2): 156-166.
- XU H, DU Y, CHEN Y, et al. Electricity generation in simulated benthic microbial fuel cell with conductive polyaniline-polypyrrole composite hydrogel anode. *Renew Energ.* 2022;183:242-250.
- DAI M, ZHANG Y, ZHANG L, et al. Multipurpose Polysaccharide-based composite hydrogel with magnetic and thermoresponsive properties for phosphorus and enhanced copper (II) removal. *Compos Part A Appl Sci Manuf.* 2022;157:106916.
- CHEN Z, PAN Y, CAI P. Sugarcane cellulose-based composite hydrogel enhanced by g-C3N4 nanosheet for selective removal of organic dyes from water. *Int J Biol Macromol.* 2022;205:37-48.
- HAMED H, MORADI S, HUDSON SM, et al. Chitosan based bioadhesives for biomedical applications: A review. *Carbohydr Polym.* 2022;282:119100.
- WANG Q, LI H, LEI Y, et al. Chitosan as an Adjuvant to Improve Isoprazam Azoxystrobin against Leaf Spot Disease of Kiwifruit and Enhance Its Photosynthesis, Quality, and Amino Acids. *Agriculture-Basel.* 2022;12(3):373.
- 李苑. 壳聚糖双胍酸盐的制备及其对胰岛素抵抗 HepG2 细胞的影响 [D]. 天津: 天津大学, 2016.
- Li J, Wang M, Qiao Y, et al. Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochem.* 2018;74: 156-163.
- NURILMALA M, SURYAMAREVITA H, HUSEIN HIZBULLAH H, et al. Fish skin as a biomaterial for halal collagen and gelatin. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(2):1100-1110.
- EL OMAR R, BEROUJ J, STOLTZ JF, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(5):523-544.
- LIU Y, CHEN J, LIANG H, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells not only ameliorate blood glucose but also protect vascular endothelium from diabetic damage through a paracrine mechanism mediated by MAPK/ERK signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):258.
- MIRZA A, KHAN I, QAZI RE, et al. Role of Wnt/ β -catenin pathway in cardiac lineage commitment of human umbilical cord mesenchymal stem cells by zebularine and 2'-deoxycytidine. *Tissue Cell.* 2022;77:101850.
- WU K, LI J, CHAO W, et al. Immunomodulation via MyD88-NF κ B Signaling Pathway from Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci.* 2022;23(10):5295.
- MA S, YIN J, HAO L, et al. Exosomes From Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Treat Corneal Injury via Autophagy Activation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:879192.
- YIN Y, HAO H, CHENG Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells direct macrophage polarization to alleviate pancreatic islets dysfunction in type 2 diabetic mice. *Cell Death Dis.* 2018;9(7):760.
- 刘司麒, 吴明芮, 乔铃然, 等. 负载人脐带间充质干细胞的水凝胶对糖尿病小鼠皮肤创面愈合的疗效 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(1): 21-27.
- 张振坤. PDGF-BB/SA/Dex 水凝胶负载 BMSCs 对小鼠全层皮肤切除伤口的修复作用与机制研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- 徐宁宁, 谢琳琳, 唐阳, 等. 壳聚糖双胍酸盐络合碘制备及抑菌性能 [J]. 化工进展, 2015, 34(7): 1979-1982.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)