



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Biomedical Engineering—Article

基于脱细胞后鱼皮细胞外基质的生物打印水凝胶纺织品用于创面修复

林祥^{a,b}, 张涵^a, 张慧^a, 张倬豪^a, 陈国璞^a, 赵远锦^{a,b,c,*}

^a Department of Rheumatology and Immunology, Nanjing Drum Tower Hospital, School of Biological Science and Medical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China

^b Oujiang Laboratory (Zhejiang Lab for Regenerative Medicine, Vision, and Brain Health) & Wenzhou Institute, University of Chinese Academy of Sciences, Wenzhou 325001, China

^c Chemistry and Biomedicine Innovation Center, Nanjing University, Nanjing 210023, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2021

Revised 6 May 2022

Accepted 23 May 2022

Available online 19 May 2023

关键词

生物打印
鱼皮
细胞外基质
水凝胶
创面修复

摘要

常见的创面修复具有治疗难度大、患者数量多、医疗负担重等特点，一直是临床研究的热点。研究者投入了大量的科研力量来生产各种具有定制需求和功能的伤口敷料。这里，我们提出了基于鱼皮脱细胞的细胞外基质(dECM)水凝胶纺织品用于创面修复。鱼源dECM具有理想的生物相容性，所以生物打印纺织品在细胞黏附和增殖方面表现出优异的性能。此外，基于dECM的水凝胶是使用生物打印方法生成的，因此其表面呈现出可调节的多孔结构，整个纺织品具有良好的透气性。而且，水凝胶骨架上多孔结构中的高比表面积使其能够负载多种活性分子，提高伤口愈合效果。根据体内研究结果，我们证明制备的纺织品在负载活性药物分子姜黄素(Cur)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)后，可以加速慢性创面修复过程。这些结果表明鱼皮dECM纺织品在创面修复和生物医学工程中具有潜在价值。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

皮肤是人体的重要器官，可以感知外界刺激，控制体温，防止组织液流失[1–3]。外伤、擦伤、皮肤溃疡和烧伤可导致各种皮肤创面；它们难以愈合，并可能合并细菌感染产生严重的并发症。因此，创面修复一直是人类健康的基本问题，也是临床研究的重要方向[4–8]。为了实现伤口的快速愈合，已经开发了各种生物医学材料，包括静电纺丝纤维、生物膜、多孔海绵和功能性水凝胶[9–13]。其中，水凝胶因其优越的性能脱颖而出，包括维持湿润的创面愈合环境，降低伤口表面温度，促进细胞增殖和迁移，以及营养物质扩散和渗透[14–16]。许多种类的天

和合成聚合物，包括藻酸盐(Alg)、几丁质、胶原蛋白、聚乳酸和聚乙醇酸，已被用于制造功能性水凝胶伤口敷料[17–20]。尽管已经取得了许多进展，但这些材料的成分大多数并不容易获得，需要经历多次化学反应或生物提取。此外，为了制备伤口敷料，大多数材料必须溶解在有毒溶剂中并在极端条件下聚合，这使得这些材料的毒性和生物相容性成为人们关注的问题[21–25]。基于此，在生物医学领域，对用于制造功能性伤口敷料的新型高分子材料仍有迫切的需求。

在本文中，我们提出了一种新型鱼皮脱细胞后的细胞外基质(dECM)水凝胶纺织品，如图1所示，该纺织品使用生物打印方法制成，并且具有促进伤口愈

* Corresponding author.

E-mail address: yjzhao@seu.edu.cn (Y. Zhao).

合的理想特征。基于 dECM 的材料因其良好的组织相容性、机械性能和组织细胞诱导功能而被认为是具有前景的水凝胶敷料[26–28]。与陆生动物相比，鱼皮中的胶原蛋白由于其热变性温度低、热收缩率低、分子间交联低等特点，具有独特的生物活性[29–30]。因此，鱼皮 dECM 在生物医学领域引起了极大的研究兴趣。然而，现有的鱼皮 dECM 水凝胶结构简单，缺乏透气性，这限制了它们的许多实际应用。三维（3D）生物打印技术作为一种新兴的制备聚合物功能材料的方法，可以快速高效地打印形状复杂的 3D 支架，甚至可以进行个性化定制；它还可以精确调节微米尺度下支架的多孔结构[31–33]。因此，使用 3D 生物打印来生成鱼皮 dECM 纺织品作为一种新型功能性伤口敷料，将为伤口修复提供独特的策略。

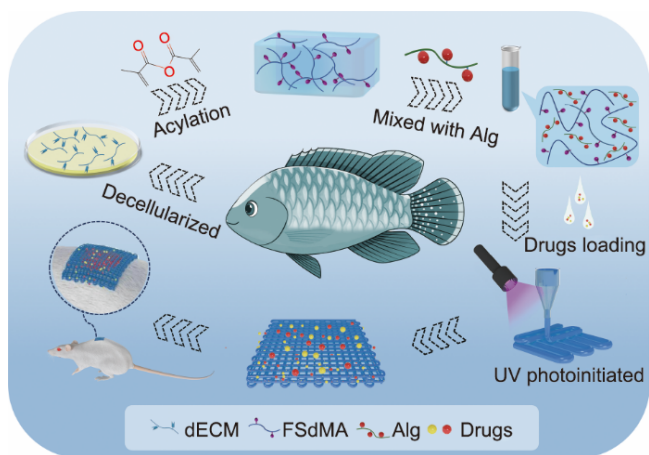


图 1. 生物打印鱼皮 dECM 纺织品的制造和应用示意图。UV: 紫外线; FsdMA: 甲基丙烯酸酐 (MA) 改性的鱼皮 dECM。

在此，我们报道了一种从鱼皮中制备 dECM 并对其改性以获得可光交联水凝胶的方法。通过采用简单的 3D 生物打印方法来挤出水凝胶微纤维并将其打印成 3D 结构纺织品，我们获得了一种用于创面修复的理想纺织品。值得一提的是，Alg 因其快速交联和优异的流变性能而被添加到 dECM 生物墨水中。由于多孔结构的高比表面积，可以将活性药物分子姜黄素 (Cur) 和碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 包裹在鱼皮 dECM 纺织品中，其中 bFGF 促进周围弹性纤维和胶原蛋白的合成，而 Cur 对炎症、细菌感染和氧化活性具有抑制作用。重要的是，事实证明，鱼皮 dECM 纺织品在治疗感染性大鼠创面模型时表现出优异的创面修复能力。这些特性表明鱼皮 dECM 纺织品是创面修复和其他相关生物医学领域的理想选择。

2. 材料和方法

2.1. 材料

新鲜罗非鱼购自南京进香河路市场。从美国 Sigma-Aldrich 获得海藻酸钠、胃蛋白酶、甲基丙烯酸酐 (MA)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、NaOH、罗丹明 B [RhB, $\geq 95\%$, 高效液相色谱 (HPLC) 级]、2-羟基-2-甲基苯丙酮 (HMPP) 和二甲基亚砜 (DMSO)。SYTOX 绿 (SYTO) 和碘化丙啶 (PI) 来自江苏凯基生物科技有限公司。异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白 (FITC-BSA) 购自北京中科晨阳科技有限公司。基因组 DNA 提取试剂盒由 TaKaRaBio (日本) 提供。NIH3T3 细胞系由中国科学院 (上海) 提供。在金陵医院购买了 200–220 g 的 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠。大鼠实验经鼓楼医院动物调查伦理委员会 (批准号: 2021AE02018) 审查后进行。

2.2. 表征

使用体视显微镜实时记录纺织品的生物打印过程和图片 (JSZ6S, 中国)。使用场发射扫描电子显微镜 (SEM, UltraPlus, 蔡司, 德国) 表征生物打印水凝胶纺织品的形态。流变仪 (MCR302, 奥地利安东帕) 用于测量预凝胶溶液的流变特性。对于核磁共振 (NMR) 测试，将样品溶解在 D_2O 并用 AVANCEIIIHD600MHz 核磁共振波谱仪 (德国布鲁克) 测量。对于凝胶渗透色谱 (GPC) 测试 (安捷伦 1260, 安捷伦科技公司, 德国)，将样品通过微孔膜 ($0.22 \mu m$) 过滤。然后，取 $50 \mu L$ 样品进行检测。流速为 $2 mL \cdot min^{-1}$ ，并且通过洗脱时间确定样品的分子量分布。

2.3. dECM 提取

将鱼皮清洗并浸泡在 $0.5 mol \cdot L^{-1}$ 氢氧化钠溶液 24 h。样品/碱性溶液的浴比为 1:40 (w/V)，在处理过程中使用磁振荡器进行搅拌。之后，使用 3% H_2O_2 对样品进行脱色。在脱脂过程中，样品/丁醇的比例为 1:30 (w/V)。随后，在 10% (V/V) 丁醇和 2% SDS 的溶液中进行进一步的脱细胞过程 36 h。将脱细胞的鱼皮彻底清洗，然后冷冻干燥。为了提取 dECM，将冻干的残留物浸入含有 0.5% 胃蛋白酶和 $1 mol \cdot L^{-1}$ 乙酸的溶液中 3 天，样品/溶液比例设置为 1:50 (w/V)。然后将 dECM 溶液冷冻干燥以备进一步使用。

2.4. DNA 含量

对细胞核进行 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 染色以评估鱼皮表面残留细胞核的存在。为了进一步测量

DNA 含量, 通过基因组 DNA 提取试剂盒从天然鱼皮和去细胞鱼皮中提取 DNA, 并使用 NanoDrop 8000 分光光度计 (美国赛默飞世尔科技) 对提取的基因组 DNA 进行定量。

2.5. MA 修饰鱼皮 dECM 的合成 (FSdMA)

将总共 2 g dECM 放入装有 100 mL 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) /10 mmol·L⁻¹ HCl 的烧杯 (带转子) 中并在 4 °C 下搅拌直至完全溶解。然后, 将 0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 加入缓冲液直至 pH 达到 7.5。为了接枝 MA, 以逐滴方式将 5 mL MA 加入上述溶液中, 并在冰浴中避光搅拌 8 h。当溶液系统稳定时, 加入剩余的 150 mL PBS 缓冲液, 混合物继续反应 1~2 h。溶液再次澄清后, 将烧杯中的溶液倒入透析带中, 浸入冰水中 168 h 以上。每天换水三次, 前两天换水的次数适当增加。透析后, 将液体倒入容器中并冷冻干燥。

2.6. FSdMA/Alg 纺织品的制造

首先, 将打印平台用紫外线 (UV) 灭菌 2 h。然后, 使用长波 (365 nm) 紫外灯的生物打印平台 (Regenovo 生物) 来打印水凝胶纺织品。为了测试可打印性, 使用 3D Studio Max 设计了不同形状的纺织品, 并且所有纺织品都在室温下打印。将合成的 FSdMA (15%) 与一定比例的 Alg (1%、2%、3% 或 5%) 混合, 形成预打印凝胶 (含 0.5% HMPP)。所有混合的墨水都充分溶解并在打印前放置过夜。

2.7. 纺织品的药物释放性能

对于药物分布和释放动力学分析, 选择 RhB 和 FITC-BSA。我们将每种选定的药物溶解在配方墨水中, 以生成含有 1 mg·mL⁻¹ RhB 或 1 mg·mL⁻¹ FITC-BSA 的水凝胶纺织品。采用荧光显微镜观察不同时间点药物分布释放的效果。对于药物释放动力学, 将 5 mg 载药水凝胶纺织品浸入 1 mL 的 PBS 溶液中; 在每个测试周期中, 取出 100 μL 释放培养基并加入相同量的 PBS 缓冲液。

采用一步固体分散法制备了负载 Cur 的水凝胶。简而言之, 将 Cur 溶解在乙醇中, 然后加入配制的水凝胶溶液中, 终浓度为 1 mg·mL⁻¹。接下来, 通过旋转蒸发器除去溶剂。释放过程在含有吐温-80 (0.5 wt%) 的 PBS 溶液中在 37 °C 下进行。根据释放介质的光密度 (OD) 值 (奥林巴斯, CKX41, 日本) 计算 RhB 和 Cur 的释放量。通过荧光强度测量 FITC-BSA 的释放量 (奥林巴斯, CKX41)。

2.8. 抗菌能力测试

选择大肠杆菌和金黄色葡萄球菌来研究 Cur 负载纺织品的抗菌能力。简而言之, 每种细菌悬浮液的浊度控制在约 0.5 (McFarland 标准)。将 Cur 混合到 20% (w/v) FSdMA/Alg 溶液中, 终浓度为 2 mg·mL⁻¹、3 mg·mL⁻¹ 或 4 mg·mL⁻¹。将干重为 5 g 的 Cur 负载水凝胶纺织品放入具有 1 mL PBS 缓冲液的 24 孔板。接下来, 将 100 μL 细菌重悬液滴入每个孔中, 并在 24 °C 下共培养 37 h。然后, 将溶液用 SYTO9 和 PI 染色 15 min, 取出 100 μL 溶液。随后, 使用荧光显微镜记录结果。

2.9. 生物相容性测试

将 3T3 细胞分成对照和实验组, 细胞密度为 2 × 10⁵ mL⁻¹。培养 72 h 后, 将 1.0 μL 钙黄绿素-AM (Molecular Detector, Beyotime Biotechnology, 中国) 滴入培养基中观察活细胞。对于 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) 试验, 将细胞与每组共培养 1 天、2 天或 3 天。在加入 MTT 溶液之前除去残留溶液。接下来, 将 MTT 溶液 (50 μL) 滴入每组中, 并将孔板在 4 °C 下再共培养 37 h。除去每个孔中的培养基, 并加入 600 μL 的 DMSO 作为溶解单元。通过酶标仪 (奥林巴斯, CKX41) 获得吸光度。

2.10. 创面修复研究

为了评价水凝胶纺织品在伤口修复中的功能, 建立了大鼠全层感染伤口模型。将 24 只健康的 SD 大鼠分为四组。所有动物都被麻醉, 并去除背表面的毛发。注射 10 μL 金黄色葡萄球菌 [每毫升 10⁸ CFU (colony-forming units)] 于直径 1 cm 的圆形伤口。实验组采用包封法加载 Cur 和 bFGF, 最终浓度分别为 3.0 mg·mL⁻¹ 和 0.1 mg·mL⁻¹。四组分别用 PBS (I 组)、FSdMA/Alg 纺织品 (II 组)、Cur 负载 FSdMA/Alg 纺织品 (III 组) 和 (Cur + bFGF) 负载 FSdMA/Alg 纺织品 (IV 组) 处理。之后, 所有动物都被放在分开的笼子里。伤口的光学图像在 0、3 天、5 天、7 天、9 天后获得。将肉芽组织与周围组织分离并储存在冷的多聚甲醛中, 以进行进一步的组织学和免疫组织化学分析。

2.11. 统计分析

采用 SPSSAU 24.0 评价统计学意义。处理后的数据表示为平均值 ± 标准差。使用独立样本 *t* 检验来评估对照组与实验组之间的显著差异。选择 *p* < 0.05 作为显著性水平, 其中, *代表 0.01 < *p* < 0.05, **代表 *p* < 0.01。

3. 结果和讨论

在典型的实验中，我们使用罗非鱼皮作为制备水凝胶纺织品的原材料。首先，清洁后的鱼皮经过氢氧化钠（NaOH）和十二烷基硫酸钠（SDS）的处理，去除不需要的细胞和色素；然后，用胃蛋白酶从鱼皮中提取dECM。所得产品经过冷冻干燥以备后续使用[附录A中的图S1（a）~（c）]。随后，进行了DNA含量测试，以验证细胞的有效去除。去细胞化的鱼皮中细胞残留物少于 $50 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，这使得材料避免了免疫原性问题[图S1（d）~（f）]。为了扩大生成的dECM的应用，我们用甲基丙烯酸（MA）改性鱼皮dECM，得到一种光交联的水凝胶。核磁共振谱结果显示在5~6 ppm处有双峰，表明MA改性取得成功（附录A中的图S2）。FSdMA的分子量表明，dECM主要含有胶原水解后的明胶[附录A中的图S3（c）、（d）]。然而，FSdMA的水溶液通常具有相对较低的黏度，不符合生物打印的要求。因此，我们添加海藻酸盐（Alg）来优化FSdMA的流变性能。如附录A中的图S4（a）所示，发现混合的预凝胶溶液在剪切速率增加时呈现剪切变稀行为。在从5 °C到45 °C的加热过程中，FSdMA/Alg预凝胶溶液的黏度随着Alg浓度的增加而显著增加[图S4（b）]。此外，FSdMA/Alg预凝胶溶液在室温下呈现凝胶状，有助于保持打印的水凝胶纺织品的形态和结构[图S4（c）]。这些发现表明混合油墨适合于生物打印。

之后，使用改进的3D生物打印机（包括注射器和四个长波紫外线灯）来生成水凝胶纺织品。将制备好的FSdMA/Alg预凝胶溶液注入铝箔包裹的注射器中，以防止过早凝胶化；接下来，如图2（a）所示将混合的预凝胶溶液通过注射器挤出以制造所需的纺织品。通过调整预凝胶溶液的挤出速度以匹配3D打印机注射器的移动速度，在挤出过程中用紫外线照射后生成具有均匀形态和3D结构的纺织品[图2（b）、（c）]。此外，增加Alg浓度显著提高了油墨黏度，确保挤出的长丝具有光滑的表面，以提高打印过程的准确性。

为了提高印花纺织品的精度，我们选择在随后的实验中使用15% FSdMA和5% Alg的混合凝胶（附录A中的图S5）。为了打印高质量的FSdMA/Alg水凝胶纺织品，我们首先研究了不同打印参数下的可打印性。显然，使用较大的喷嘴直径导致打印纤维直径 D 更大，如附录A中的图S6（a）所示。值得注意的是，由于黏弹性预凝胶溶液的膨胀效应，挤出纤维的直径大于喷嘴直径。研究表明，挤出力越大，模具膨胀效果越明显，导致打印纤维直径 D 随压力增大而增大[图S6（b）]。此外，可以改变纤维之

间的距离和纤维的交叉角以调整孔的形态（附录A中的图S7）。这些打印设置可用于有效控制生物打印的纤维直径 D 和孔长。此外，可以改变3D模型的切片形状以获得具有不同形状的纺织品（附录A中的图S8）。

此外，还表征了FSdMA/Alg水凝胶纺织品的微观结构，发现生成的纺织品具有多孔的粗糙表面[图2（d）、（e）]。生物打印的FSdMA/Alg水凝胶纺织品在冷冻干燥后也表现出相互连接的内部孔隙[图2（f）]。FSdMA/Alg水凝胶纺织品的这些独特的微观结构为药物装载和释放提供了潜力。

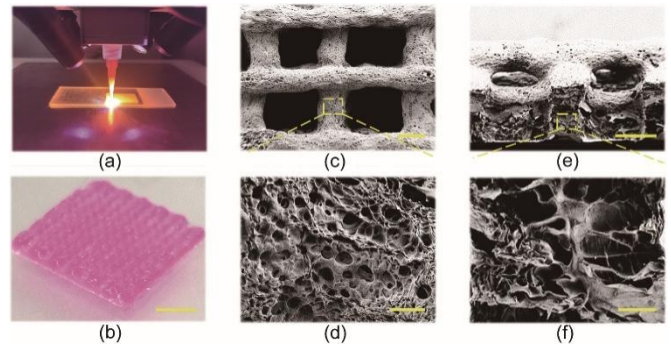


图2. (a) 使用FSdMA/Alg预凝胶溶液打印纺织品的数字图像；(b) 生物打印纺织品的光学图像；(c)~(f) FSdMA/Alg水凝胶纺织品在表面(c)和其放大场(d)以及横截面(e)和其放大场(f)处的扫描电子显微镜(SEM)图像。比例尺在(b)部分中为5 mm，在(c)和(e)部分中为300 μm ，在(d)和(f)部分中为20 μm 。

水凝胶纺织品的多孔表面以及相互连接的内部孔隙，赋予了其巨大的比表面积、大量的纳米孔和复杂的纳米通道，以加载许多生物活性物质。因此，可以想象FSdMA/Alg纺织品可以用作含有活性试剂的缓释支架。为了评估这种能力，我们首先选择了RhB和FITC-BSA，分别用小分子药物和蛋白质药物表征纺织品的药物释放性能。通过封装进行药物装载。荧光图像显示，两种药物都可以完全均匀地分布在纺织品中，然后随着时间的推移释放，表明药物加载成功[图3（a）、（b）]。

我们还研究了小分子药物和蛋白质药物的释放动力学[图3（c）、（d）]。标准曲线记录在附录A中的图S9（a）、（b）中。观察到小分子药物RhB在前6 h内快速释放，随后持续长达12 h的持续释放过程。然后在24 h内逐渐达到平衡。对于负载了FITC-BSA的纺织品，由于蛋白质药物的分子量较大，很明显，其释放过程比负载RhB的纺织品慢。此外，RhB纺织品的释放百分比高于负载FITC-BSA的纺织品，这是因为小分子药物更容易通过纺织品的内部小孔和通道逸出。因此，生物墨水凝胶纺织品可以装载不同分子量的药物以达到不同的目的。

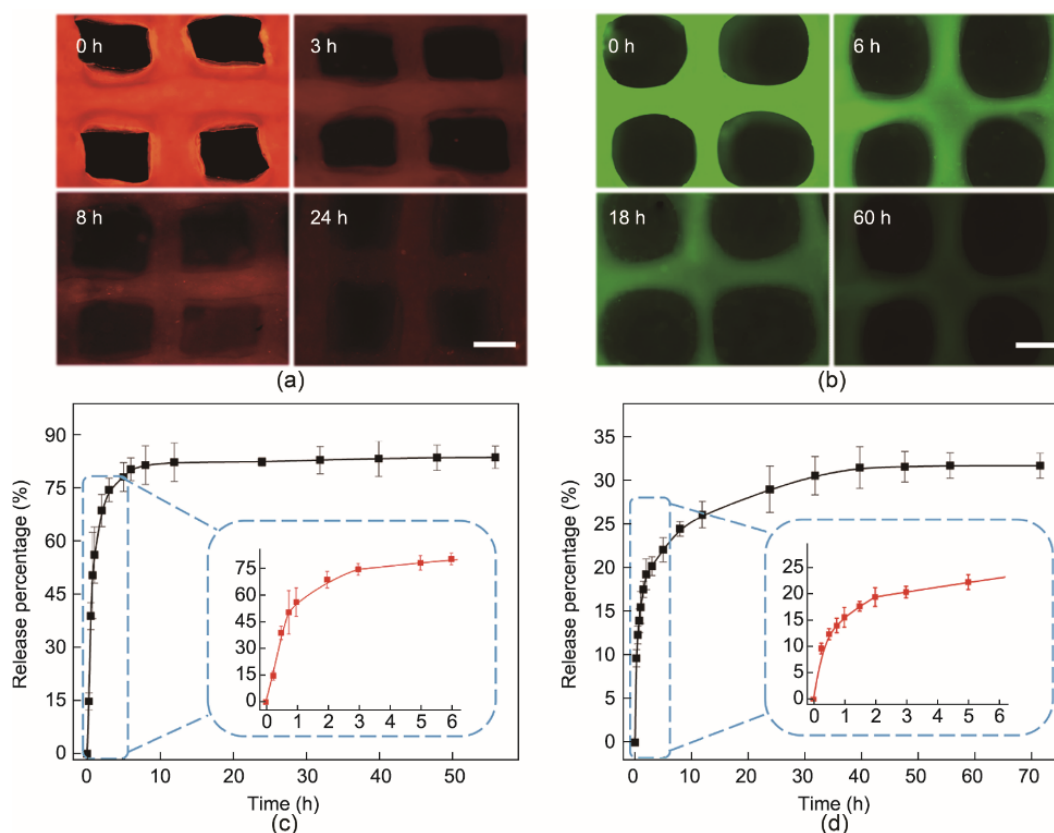


图3. (a) 负载RhB的水凝胶纺织品在0、3 h、8 h和24 h后的荧光图像；(b) 负载FITC-BSA的水凝胶纺织品在0、6 h、18 h和60 h后的荧光图像；(c) 负载RhB的纺织品在PBS溶液中的释放情况，其中，右下曲线为6 h内的释放情况($n=4$)；(d) 负载FITC-BSA的纺织品在PBS溶液中的释放情况，其中右下曲线为6 h内的释放情况($n=4$)。误差棒代表标准差。(a) 和 (b) 中的比例尺为400 μm 。

基于这些特点，我们设计了一种负载Cur的新型抗菌纺织品。Cur通过抑制细菌生物膜的形成对许多微生物表现出抗菌特性，可用于治疗传染性细菌性疾病。我们发现，作为一种小分子药物，Cur的释放过程比RhB慢，这可能归因于亲水性的差异[附录A中的图S9 (c)、(d)]。值得注意的是，虽然Cur可以很好地分散在聚合物胶束中，但很难将其溶解在水中(附录A中的图S10)。

为了评估Cur负载纺织品的体外抗菌能力的潜在影响，我们分别选择不同Cur负载浓度的FSdMA/Alg纺织品作为细菌生长底物，并使用两种不同类型的细菌(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)进行实验。活细菌和死细菌的荧光图像以及不同组中细菌活力的统计分析如图4 (a) ~ (e)所示。结果发现，与对照组相比，负载Cur的FSdMA/Alg纺织品组中两种细菌的死菌数量都较多。此外，通过提高浓度，负载Cur的纺织品对金黄色葡萄球菌具有更显著的抗菌效果。这一发现可能归因于大肠杆菌与金黄色葡萄球菌之间生物膜成分和结构的差异。特别是，当预凝胶溶液中的Cur浓度增加到 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时，90%的活金黄色葡萄球菌被杀死。由于Cur是一种生物活性药物，Cur浓度的增加会影响生物医学应用材料的生物相容性。因此，将适

当的Cur浓度设定为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

在探索所生成的载药纺织品在体内的实际应用价值之前，对其生物相容性进行了研究。荧光显微镜图像显示，3天后各组3T3细胞均表现出良好的形态，表明FSdMA和混合水凝胶具有优异的生物相容性[附录A中的图S11 (a)]。此外，为了定量研究不同组细胞的细胞活力，进行了MTT测定[图S11 (b)]，发现结果与荧光图片一致。这些发现证明了FSdMA/Alg水凝胶体内应用的可行性。

此外，我们还进行了体内实验来评估FSdMA/Alg纺织品用于伤口愈合的潜力(图5)。除了具有抗菌特性的纺织品外，在实验中还使用了含有Cur和bFGF的水凝胶纺织品，后者可以促进多种细胞类型的增殖，以改善伤口修复过程。将测试样本分为四组：仅用PBS清洗伤口(第一组)；用FSdMA/Alg纺织品处理的伤口(第二组)；用负载Cur的FSdMA/Alg纺织品处理伤口(第三组)；用负载Cur + bFGF的FSdMA/Alg纺织品(第四组)治疗伤口。记录伤口愈合过程中伤口的闭合情况，进行详细分析[图5 (a)、(c)]。结果发现，在Cur+bFGF的作用下，IV组的闭合率最高，而I组的伤口愈合相对缓慢。为了进一

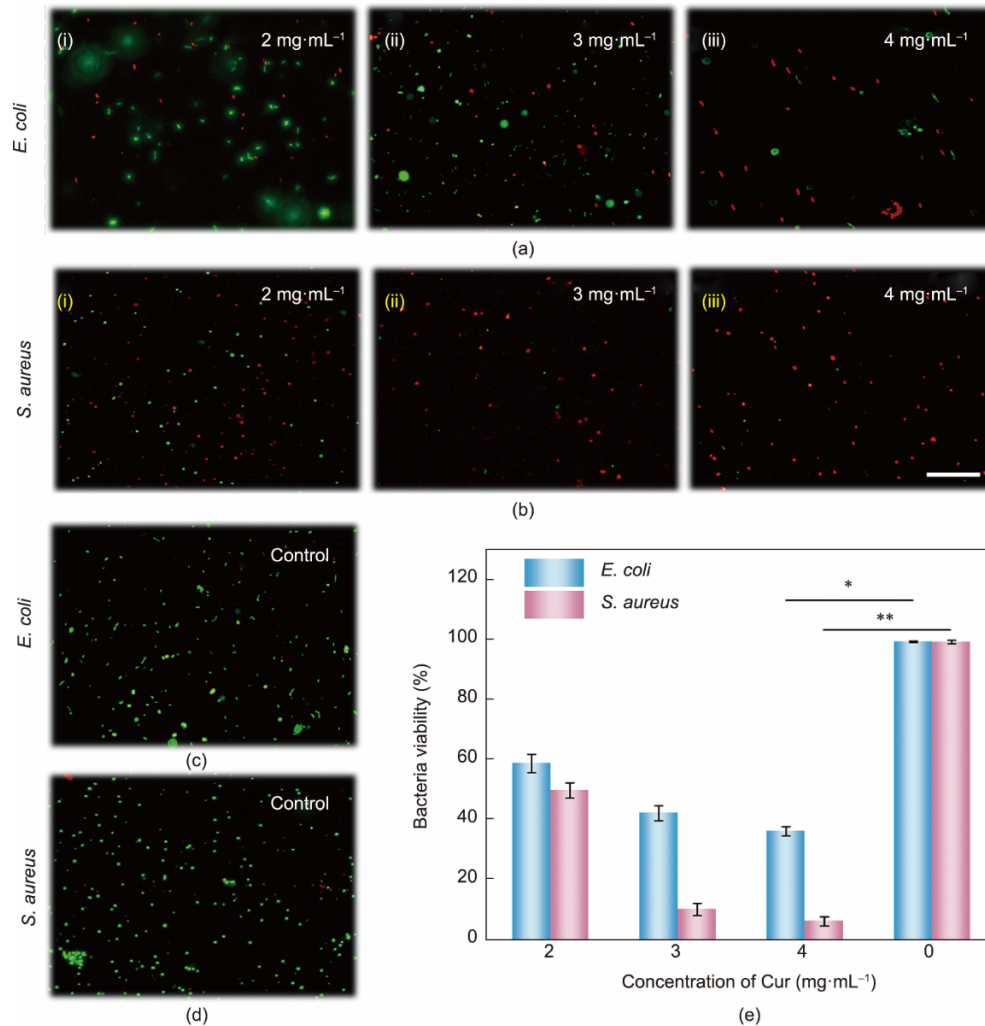


图4. 大肠杆菌 (a) 和金黄色葡萄球菌 (b) 与 Cur 负载的 FSdMA/Alg 纺织品共培养的活/死染色: (i) 2 mg·mL⁻¹ Cur; (ii) 3 mg·mL⁻¹ Cur; (iii) 4 mg·mL⁻¹ Cur。对大肠杆菌 (c) 和金黄色葡萄球菌 (d) 的 PBS 对照组。(e) 不同细菌群体生存能力的统计图像。n = 5; 误差棒代表标准差。* p < 0.05, ** p < 0.01。比例尺为 50 μm。

步探讨伤口愈合情况, 采用苏木精-伊红 (H&E) 染色观察再生肉芽组织[图 5 (b)]。第 9 天第 I、II、III、IV 组肉芽组织厚度分别为 (1.05±0.16) mm、(1.50±0.10) mm、(1.64±0.09) mm、(2.02±0.17) mm [图 5 (d)]。与 I 组相比, 不同类型载药功能性 FSdMA/Alg 水凝胶纺织品的两组 (III 组和 IV 组) 肉芽组织厚度均有所改善。这些结果表明载药组的伤口愈合效率提高。

分别对 TNF-α、CD31 和 IL-6 进行免疫组织化学 (IHC) 染色, 以评估炎症和血管生成 (图 6)。伤口感染是慢性伤口的主要原因, 因此通过 TNF-α 和 IL-6 研究 Cur-loaded 纺织品预防感染的功效。在 IV 组中, IHC 染色几乎没有显示炎症或感染的迹象, TNF-α 和 IL-6 分泌水平较低, 这表明用载药 FSdMA/Alg 纺织品处理后免疫反应较低。相反, 在 I 组中观察到大量的 TNF-α 和 IL-6 [图 6 (a)、附录 A 中的图 S12]。此外, 在伤口愈合和重塑的最

后阶段, 胶原蛋白作为伤口部位的皮肤成分沉积。IV 组的定向排列程度和胶原蛋白沉积表明功能化 FSdMA/Alg 纺织品在伤口愈合方面具有良好的性能[图 6 (b)、(d)]。新生血管的激活促进再生组织的形成, 提供充足的营养和氧气, 促进细胞因子的转运和细胞迁移。还观察到, 与 I 组相比, IV 组新形成的血管数量明显更多。这一结果可能归因于 bFGF 的存在, bFGF 可以促进新生血管形成。此外, II 组和 III 组中存在中等水平的血管结构。这些结果证明了载药 FSdMA/Alg 水凝胶纺织品在血管生成中的优异功能[图 6 (c)、(e)]。

4. 结论

总之, 我们提出了一种来自鱼皮的 dECM 并对其进行修饰以获得功能性 FSdMA 水凝胶。使用酸和胃蛋白酶提

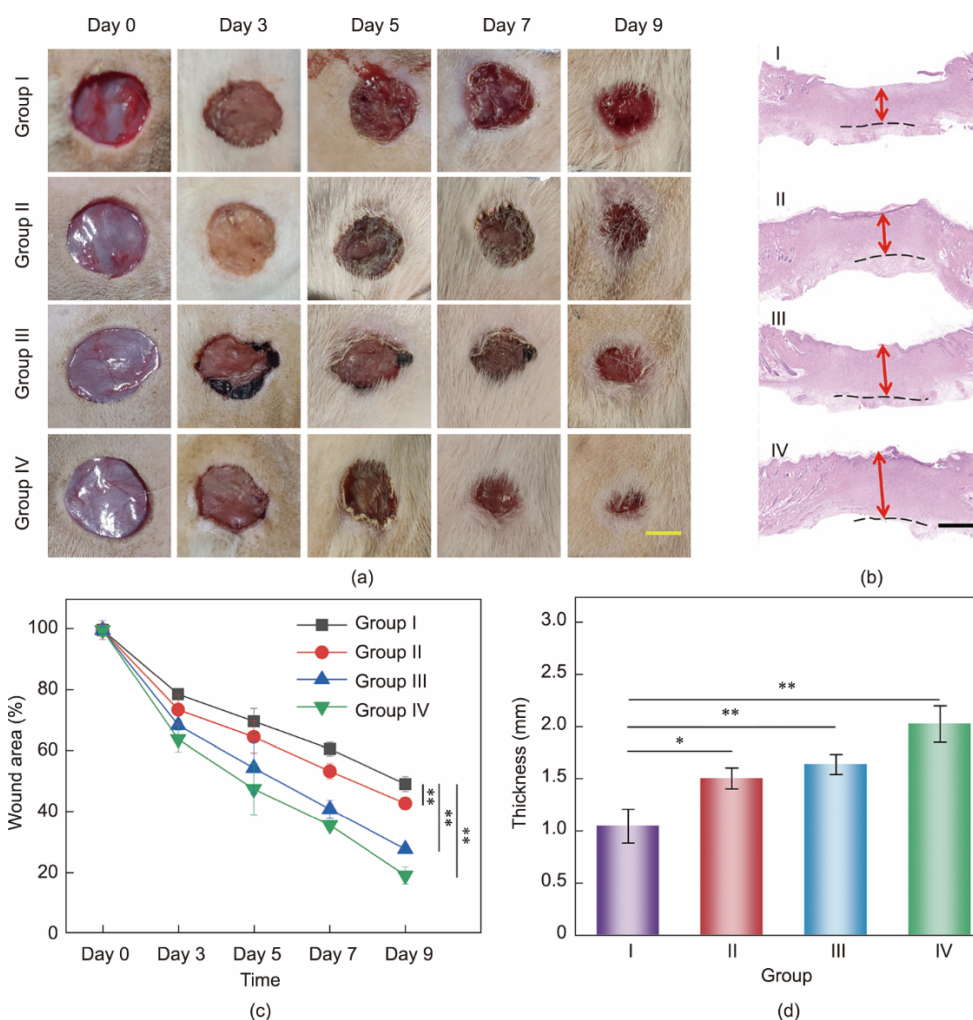


图5. (a) 第0、3、5、7和9天组织缺损的代表性图像；(b) 9天后分离组织的苏木精-伊红染色（虚线和箭头分别表示肉芽组织的边界及其厚度）；(c) 第0、3、5、7和9天伤口面积的量化；(d) 9天后肉芽组织厚度的量化。 $n = 3$ ；误差棒代表标准差。 $*p < 0.05$ ， $**p < 0.01$ 。(a) 部分中的比例尺为5 mm，(b) 部分中的比例尺为500 μm 。

取鱼皮dECM；然后用MA酰化并与Alg混合以获得具有良好打印性能的混合溶液。通过调整切片形状、针孔直径和气压等打印参数，可以控制多孔支架的形状和单纤维的直径。此外，通过负载抗菌药物Cur和生长因子bFGF，赋予纺织品抗菌性能和促生长性能，使其能够更好地抑制细菌生长，促进细胞增殖，加速伤口愈合。FSdMA/Alg水凝胶纺织品用于治疗细菌感染和损伤的SD大鼠，表现出令人满意的治疗效果。因此，上述特征赋予所提出的水凝胶纺织品在临床环境中伤口愈合方面的实用价值。

致谢

本工作得到了国家重点研发计划(2020YFA0908200)、国家自然科学基金(T2225003和52073060)、南京医科大学科技发展基金(ZKX21019)、南京鼓楼医院临床试验(2022-LCYJ-ZD-01)、广东省基础与应用基础研究基金(2021B151512005

4)以及深圳市基础研究计划(JCYJ20190813152616459和JCYJ20210324133214038)的支持。

Authors' contributions

Yuanjin Zhao conceived the idea and designed the experiment. Xiang Lin conducted experiments and data analysis. Han Zhang and Hui Zhang assisted with data analysis and paper writing. Zhuohao Zhang and Guopu Chen contributed to the scientific discussion of the article. Xiang Lin and Yuanjin Zhao wrote the manuscript.

Compliance with ethics guidelines

Xiang Lin, Han Zhang, Hui Zhang, Zhuohao Zhang,

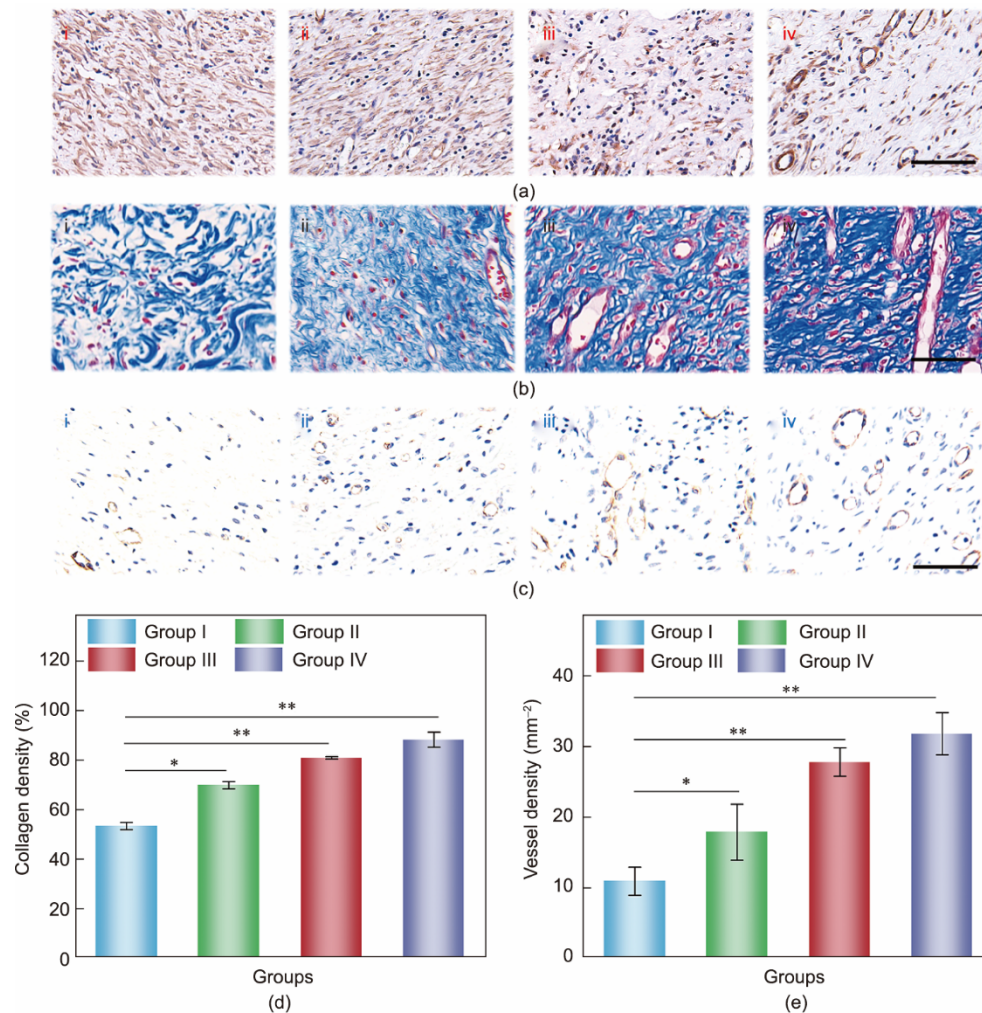


图 6. (a) 9天后 TNF- α 的免疫组织化学染色, i-iv 分别代表 I-IV 组; (b) 9天后肉芽组织的 Masson 染色图像, i-iv 分别代表 I-IV 组; (c) 9天后肉芽组织的 CD31 染色, i-iv 分别代表 I-IV 组; (d) 9天后胶原蛋白密度的量化; (e) 血管密度的量化。n = 3; 误差棒代表标准差。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。比例尺均为 100 μm 。

Guopu Chen, and Yuanjin Zhao declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.05.022>.

References

- [1] Zhou F, Hong Y, Liang R, Zhang X, Liao Y, Jiang D, et al. Rapid printing of bioinspired 3D tissue constructs for skin regeneration. *Biomaterials* 2020;258:120287.
- [2] Correa-Gallegos D, Jiang D, Christ S, Ramesh P, Ye H, Wannemacher J, et al. Patch repair of deep wounds by mobilized fascia. *Nature* 2019;576(7786):287–92.
- [3] Kurita M, Araoka T, Hishida T, O'Keefe DD, Takahashi Y, Sakamoto A, et al. *In vivo* reprogramming of wound-resident cells generates skin epithelial tissue. *Nature* 2018;561(7722):243–7.
- [4] Zhao X, Liang Y, Huang Y, He J, Han Y, Guo B. Physical double-network hydrogel adhesives with rapid shape adaptability, fast self-healing, antioxidant and NIR/ pH stimulus-responsiveness for multidrug-resistant bacterial infection and removable wound dressing. *Adv Funct Mater* 2020;30(17):1910748.
- [5] Zhao Y, Li Z, Song S, Yang K, Liu H, Yang Z, et al. Skin-inspired antibacterial conductive hydrogels for epidermal sensors and diabetic foot wound dressings. *Adv Funct Mater* 2019;29(31):1901474.
- [6] Pang Q, Lou D, Li S, Wang G, Qiao B, Dong S, et al. Smart flexible electronics-integrated wound dressing for real-time monitoring and on-demand treatment of infected wounds. *Adv Sci* 2020;7(6):1902673.
- [7] Liang Y, Chen B, Li M, He J, Yin Z, Guo B. Injectable antimicrobial conductive hydrogels for wound disinfection and infectious wound healing. *Biomacromolecules* 2020;21(5):1841–52.
- [8] Gao G, Jiang YW, Jia HR, Wu FG. Near-infrared light-controllable on-demand antibiotics release using thermo-sensitive hydrogel-based drug reservoir for combating bacterial infection. *Biomaterials* 2019;188:83–95.
- [9] Cheng H, Shi Z, Yue K, Huang X, Xu Y, Gao C, et al. Sprayable hydrogel dressing accelerates wound healing with combined reactive oxygen species-scavenging and antibacterial abilities. *Acta Biomater* 2021;124:219–32.
- [10] Yao X, Zhu G, Zhu P, Ma J, Chen W, Liu Z, et al. Omniphobic ZIF-8@hydrogel membrane by microfluidic-emulsion-templating method for wound healing. *Adv Funct Mater* 2020;30(13):1909389.
- [11] Qu J, Zhao X, Liang Y, Xu Y, Ma PX, Guo B. Degradable conductive injectable hydrogels as novel antibacterial, anti-oxidant wound dressings for wound healing. *Chem Eng J* 2019;362:548–60.
- [12] Yang J, Wang K, Yu DG, Yang Y, Blich SWA, Williams GR. Electrospun Janus

- nanofibers loaded with a drug and inorganic nanoparticles as an effective antibacterial wound dressing. *Mater Sci Eng C* 2020;111:110805.
- [13] Zhang XX, Chen GP, Yu YR, Sun LY, Zhao YJ. Bioinspired adhesive and antibacterial microneedles for versatile transdermal drug delivery. *Research* 2020;2020:3672120.
- [14] Wang C, Lai J, Li K, Zhu S, Lu B, Liu J, et al. Cryogenic 3D printing of dual-delivery scaffolds for improved bone regeneration with enhanced vascularization. *Bioact Mater* 2021;6(1):137–45.
- [15] Qiao Z, Lian M, Han Y, Sun B, Zhang X, Jiang W, et al. Bioinspired stratified electrowritten fiber-reinforced hydrogel constructs with layer-specific induction capacity for functional osteochondral regeneration. *Biomaterials* 2021; 266: 120385.
- [16] Chaudhuri O, Cooper-White J, Janmey PA, Mooney DJ, Shenoy VB. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature* 2020; 584(7822):535–46.
- [17] Mao X, Cheng R, Zhang H, Bae J, Cheng L, Zhang L, et al. Self-healing and injectable hydrogel for matching skin flap regeneration. *Adv Sci* 2019; 6(13): 1901124.
- [18] Hamad K, Kaseem M, Yang HW, Deri F, Ko YG. Properties and medical applications of polylactic acid: a review. *Express Polym Lett* 2015;9(5):435–55.
- [19] Mogoşanu GD, Grumezescu AM. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm* 2014;463(2):127–36.
- [20] Bagher Z, Ehterami A, Safdel MH, Khastar H, Semiari H, Asefnejad A, et al. Wound healing with alginate/chitosan hydrogel containing hesperidin in rat model. *J Drug Deliv Sci Technol* 2020;55:101379.
- [21] Chen X, Villa NS, Zhuang YF, Chen LZ, Wang TF, Li ZD, et al. Stretchable supercapacitors as emergent energy storage units for health monitoring bioelectronics. *Adv Energy Mater* 2020;10(4):1902769.
- [22] Zhang H, Chen G, Yu Y, Guo J, Tan Q, Zhao Y. Microfluidic printing of slippery textiles for medical drainage around wounds. *Adv Sci* 2020; 7(16): 2000789.
- [23] Ghavami Nejad A, Park CH, Kim CS. In situ synthesis of antimicrobial silver nanoparticles within antifouling zwitterionic hydrogels by catecholic redox chemistry for wound healing application. *Biomacromolecules* 2016; 17(3): 1213–23.
- [24] Gupta A, Briffa SM, Swingler S, Gibson H, Kannappan V, Adamus G, et al. Synthesis of silver nanoparticles using curcumin-cyclodextrins loaded into bacterial cellulose-based hydrogels for wound dressing applications. *Biomacromolecules* 2020;21(5):1802–11.
- [25] Yang K, Han Q, Chen B, Zheng Y, Zhang K, Li Q, et al. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. *Int J Nanomedicine* 2018;13:2217–63.
- [26] Kim BS, Lee JS, Gao G, Cho DW. Direct 3D cell-printing of human skin with functional transwell system. *Biofabrication* 2017;9(2):025034.
- [27] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011;32(12):3233–43.
- [28] Karimi A, Navidbakhsh M. Material properties in unconfined compression of gelatin hydrogel for skin tissue engineering applications. *Biomed Eng/Biomed Te* 2014;59(6):479–86.
- [29] Subhan F, Hussain Z, Tauseef I, Shehzad A, Wahid F. A review on recent advances and applications of fish collagen. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2021;61(6): 1027–37.
- [30] Chen J, Gao K, Liu S, Wang S, Elango J, Bao B, et al. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process *in vivo*. *Mar Drugs* 2019;17(1):33.
- [31] Yang Q, Li H, Li M, Li Y, Chen S, Bao B, et al. Rayleigh instability-assisted satellite droplets elimination in inkjet printing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9(47):41521–8.
- [32] Luo Y, Wei X, Wan Y, Lin X, Wang Z, Huang P. 3D printing of hydrogel scaffolds for future application in photothermal therapy of breast cancer and tissue repair. *Acta Biomater* 2019;92:37–47.
- [33] De Santis MM, Alsafadi HN, Tas S, Bölükbas DA, Prithiviraj S, Da Silva IAN, et al. Extracellular-matrix-reinforced bioinks for 3D bioprinting human tissue. *Adv Mater* 2021;33(3):2005476.