

特约专栏

## 葡聚糖/壳聚糖水凝胶的制备及其 作为生长因子载体的研究

彭耿, 王靖, 刘昌胜

(华东理工大学 教育部生物医用材料工程研究中心, 上海 200237)

**摘要:** 合成并表征了磺基葡聚糖(Dex-VS)和巯基化壳聚糖(CS-SH), 利用迈克尔加成反应, 以巯基化壳聚糖为大分子交联剂, 制备了葡聚糖/壳聚糖(Dex/CS)水凝胶。采用扫描电镜(SEM)考察了凝胶支架的形貌, 并研究了其降解行为。研究发现, 水凝胶的降解时间可由前驱物浓度以及磺基取代度来调控。细胞毒性研究表明该水凝胶具有良好的生物相容性。在此基础上, 将其负载骨诱导生长因子人重组骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)后植入老鼠肌袋内, 评价动物体内异位成骨的情况。通过新生异位骨的成骨量以及组织学评价结果表明, 负载 rhBMP-2 的凝胶支架具有良好的异位成骨效果。本研究表明此类凝胶有望作为一种新型的可注射生长因子载体用于组织修复。

**关键词:** 水凝胶; 组织再生; 葡聚糖; 壳聚糖; 生长因子

**中图分类号:** R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2013)10-0599-06

## Preparation of Dextran/Chitosan Hydrogel and Study as the Carriers of Growth Factor

PENG Geng, WANG Jing, LIU Changsheng

(Engineering Research Center for Biomedical Materials of Ministry of Education,  
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** Dextran vinyl sulfone (Dex-VS) and mercapto chitosan (CS-SH) derivatives were synthesized and characterized in the study. In addition, CS-SH was selected as a kind of macromolecular crosslinking agent taking advantage of the Michael addition between -VS and -SH groups, thus generated dextran-based hydrogel network. Morphology of the hydrogel scaffold was inspected through scanning electron microscope (SEM). Various degradation behaviors under different conditions were investigated. The duration time can be regulated via both concentration of dextran precursors and degree of substitutions. Cellular biocompatibility of the hydrogel was confirmed through MTT assay. Based on the above results, the inductive growth factor, rhBMP-2, was loaded into the scaffold and implanted into mouse thigh muscles to investigate ectopic bone formation. Mass of neo-bone was notably observed compared to control group, as well as the histological evaluations. Consequently, such kind of hydrogel might give promising application in tissue regeneration and delivery of growth factors.

**Key words:** hydrogel; tissue regeneration; dextran; chitosan; growth factor

### 1 前言

能在水中溶胀并保持高含水量、具有良好的生物相容性和类似人体组织的高弹性等优点的水凝胶是一种理想的组织修复材料<sup>[1-3]</sup>, 可与生物活性因子或种子细胞

复合直接注射到缺损部位, 适应了微创外科发展的要求<sup>[4-5]</sup>, 因而受到越来越多的关注。但如何制备出兼具良好力学性能和生物相容性的可降解水凝胶仍是生物材料领域的一大挑战<sup>[6-7]</sup>。

葡聚糖(Dextran)是一种可降解细菌多糖, 来源丰富, 具有良好的生物相容性, 广泛用于药物辅料和生物分离。葡聚糖本身的力学强度较差, 但其长链上含有的羟基极易进行修饰得到具有反应活性的葡聚糖衍生物, 并通过不同方式进行交联形成水凝胶网络, 提高其强度<sup>[8-10]</sup>。基于上述思路, 本文以磺基修饰葡聚糖衍生

收稿日期: 2013-06-01

基金项目: 科技部 973 计划项目(2012CB933600)

第一作者: 彭耿, 男, 1987 年生, 硕士研究生

通信作者: 刘昌胜, 男, 1967 年生, 教授, 博士生导师

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2013.10.04

物(Dex-VS)为主链,引入巯基化壳聚糖(CS-SH)作为大分子交联剂,利用CS-SH和Dex-VS间的迈克尔加成反应形成交联网络,制备了葡聚糖/壳聚糖(Dex/CS)凝胶,并且其降解速度可通过葡聚糖浓度以及巯基取代度等参数调节。在此基础上,将其作为生长因子骨形态发生蛋白-2的载体,评价了其在小鼠体内异位成骨的效果。

## 2 研究方法

### 2.1 原料和试剂

葡聚糖(Dextran)、巯基乙酸、二甲氨基吡啶(国药集团化学试剂有限公司);壳聚糖(30 kDa,上海卡博生物有限公司);人重组骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2,上海瑞邦生物材料有限公司);碳化二亚胺(EDAC)、二巯基二硝基苯甲酸(DTNB)、二环己基碳二亚胺(DCC)(上海源聚生物有限公司);3-巯基丙酸(3-MPA)(99%,Alfa Aesar);二乙烯基砷(DVS)(99%,上海嘉辰化工有限公司);其他原料均来自上海凌峰化学试剂有限公司。

### 2.2 Dex-VS的合成

按照文献所述方法分两步合成砷基葡聚糖<sup>[11-12]</sup>。首先,将水合对苯磺酸溶解在苯中,共沸蒸馏2 h。将温度降到40~50℃,同时,将对二甲氨基吡啶(DMAP)溶解在40~50℃的苯中,加入到对甲苯磺酸溶液中,立即出现白色悬浮物。反应1.5 h后,将生成物抽滤得到白色粉末。将粗产物溶解在二氯甲烷中,加热至40℃,过滤,取滤液冷却结晶,过滤后得到干燥的4-二甲氨基吡啶-对甲苯磺酸盐(DPTS),熔点165℃。

葡聚糖与苯共沸加热2 h除去水分,充分蒸馏后抽滤,干燥备用。将二乙烯基砷溶解在二甲亚砷(DMSO)中,在搅拌下逐滴加入3-MPA,室温下反应4 h。将Dextran, DPTS, DCC溶解在DMSO中,形成混合溶液,再加入到二乙烯基砷/DMSO溶液中,室温下搅拌反应24 h。过滤除去杂质,然后加入无水乙醇,使产物沉淀,抽滤得到白色固体。将粗产物重新溶解在去离子水中,透析3 d后冻干即得到Dex-VS。

### 2.3 巯基化壳聚糖的合成<sup>[13]</sup>

配制浓度为1%的壳聚糖盐酸溶液,加入50 mmol碳化二亚胺和500 mg 巯基醋酸,用氢氧化钠溶液调节至pH=5,室温搅拌3 h。将混合物转移到透析袋中,置于10℃以下避光透析3 d,透析液分别依次为5 mmol/L盐酸、5 mmol/L盐酸/1%氯化钠溶液、1 mmol/L盐酸,冷冻干燥后得白色絮状产物,4℃储存备用。

### 2.4 Dex/CS凝胶支架的制备

分别用0.01 g 葡聚糖-砷基衍生物与0.01 g 巯基化壳聚糖混合,加入500 μL PBS,充分振荡均匀,静置2 h即可得到Dex/CS凝胶。将凝胶冷冻干燥后,得到多孔凝胶支架。

### 2.5 样品表征

#### 2.5.1 核磁共振

采用AVANCE 500型核磁共振仪对Dex-VS进行<sup>1</sup>H NMR表征,D<sub>2</sub>O作为溶剂。根据谱图计算出Dex-VS的取代度(DS)。

#### 2.5.2 红外光谱

将巯基化壳聚糖和壳聚糖粉末KBr压片,得到巯基化壳聚糖的红外图谱。

#### 2.5.3 CS-SH巯基含量的测定<sup>[14]</sup>

Ellman's试剂的配制:准确称取0.192 g DTNB和0.895 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶解在50 mL去离子水中,充分搅拌均匀后得到DTNB标准溶液,放入棕色瓶密封低温保存。取出0.1 mL标准溶液,加入9.9 mL磷酸盐缓冲液(PBS),得到Ellman's试剂。

采用含有巯基的半胱氨酸建立巯基标准曲线。称取0.01 g CS-SH溶解在100 μL磷酸缓冲溶液中,移取20 μL溶液,加入100 μL Ellman's试剂,10 min后在412 nm处测量其吸光值,并根据巯基浓度标准曲线可计算出壳聚糖中巯基的取代度。

#### 2.5.4 降解<sup>[15]</sup>

将不同取代度(DS=9, DS=12.5)的Dex-VS和CS-SH分别溶解在PBS中,制备固定体积(500 μL)Dex/CS凝胶。称重湿凝胶初始质量记为W<sub>0</sub>。随后加入5 mL PBS于凝胶表面,置于37℃恒温振荡箱,振荡频率为100 r/min。每隔一定时间吸去PBS,将湿凝胶称重记为W<sub>i</sub>。试管中补加5 mL PBS后凝胶继续放置溶胀。每组做3个平行样。以不同时间下凝胶重量与初始重量的比例W<sub>i</sub>/W<sub>0</sub>计算凝胶残余量。

#### 2.5.5 凝胶支架形貌表征

将制备的Dex/CS水凝胶冻干后放入液氮中冷却,取出迅速淬断,用双面胶固定在样品台上,喷金后用日立S-4800场发射扫描电镜观察干凝胶断面形貌。

### 2.6 细胞相容性

将CS-SH和Dex-VS消毒灭菌,加入经0.22 μm微孔滤膜过滤的PBS溶液中,充分振荡均匀,得到Dex/CS水凝胶,冷冻干燥后得到凝胶支架材料。

选取DMEM培养液作为浸提介质。将支架材料用DMEM培养液浸泡,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养24 h,并加入10%的胎牛血清(FBS)实验组为干凝胶支架材料的浸提液,对照组为含10%FBS的DMEM

培养液。

取对数生长期的鼠成肌细胞 C2C12, 用胰酶消化后轻轻吹打成单细胞悬浮液, 调整细胞浓度为  $3 \times 10^4$  个/mL, 接种在 96 孔培养板中, 每孔 100  $\mu$ L。在 37  $^{\circ}$ C, 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱培养 24 h。吸去原培养液, 将浸提液接种在 96 孔板中, 每孔接种 100  $\mu$ L, 在 37  $^{\circ}$ C, 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱培养 24 h。吸去上清液后, 每孔加入 100  $\mu$ L DMSO 混匀后, 在 492 nm 处测量吸光值。

$$\text{相对活性}(\%) = \frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

## 2.7 小鼠体内异位成骨

### 2.7.1 负载 rhBMP-2 凝胶支架制备

采用上述 2.6 方法得到凝胶支架材料。配制浓度为 500  $\mu$ g/mL 的 rhBMP-2 溶液。滴加 10  $\mu$ L 在凝胶支架材料上, 待充分吸附后, 再将凝胶支架冻干, 即得到负载 rhBMP-2 的凝胶支架。

### 2.7.2 动物实验

将 8 只 20g 左右的昆明种小白鼠随机分成 A, B 两组, 每组 4 只, 其中每组小鼠的右腿植入负载 rhBMP-2 的凝胶支架, 左腿植入不含 rhBMP-2 的纯凝胶作为对照组。实验分组如表 1 所示。

表 1 植入小鼠体内凝胶支架材料配比

Table 1 The material ratio of hydrogel scaffold used for ectopic bone formation

Group	Dex-VS/g	CS-SH/g	PBS/ $\mu$ L	Concentration/%
A	0.005 (DS=9)	0.005	250	4
B	0.005 (DS=12.5)	0.005	250	4

腹腔注射小鼠体重 3% 的戊巴比妥钠溶液使其麻醉, 将其仰卧固定在手术板上。将小鼠大腿外侧剃毛消毒, 切开 0.5 cm 左右的伤口, 分别将上述支架材料植入小鼠的左腿和右腿肌袋中, 缝合后放入饲养盒中, 以洁净的标准饲料正常喂养。

术后 4 周处死小鼠。每组随机选取 1 只小鼠, 取出植入材料连同周围的软组织浸入 10% 的福尔马林溶液中浸泡 24 h 以上, 再用 30% 的甲酸-福尔马林脱钙液脱钙 72 h, 洗涤、梯度乙醇脱水、浸蜡、包埋、切片后, 苏木精-伊红染色进行组织学观察。将另外 3 只小鼠解剖取出肌袋中新生骨评价成骨情况, 采用两种方式表达考察新生骨的成骨效果: ①新骨的鲜重; ②放入 600  $^{\circ}$ C 高温炉中煅烧 6 h 后称其灰分的重量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 Dex-VS、CS-SH 的合成及表征

二乙烯基砷与 3-MPA 反应形成乙烯基砷丙酸, 然

后以 DPTS 为催化剂, DCC 用作缩合剂, 同葡聚糖发生缩合反应, 生成 Dex-VS。Dex-VS 的核磁共振氢谱图如图 1 所示。在  $\delta(2.8 \sim 3.0) \times 10^{-6}$  处出现了乙烯基砷丙酸主链上碳原子的特征位移; 在  $\delta 6.5 \times 10^{-6}$  的特征峰则归属于  $(m, -\text{SO}_2\text{CH}=\text{CH}_2)$ 。通过计算特征峰的面积, 可以推算出葡聚糖主链上砷基的取代度。

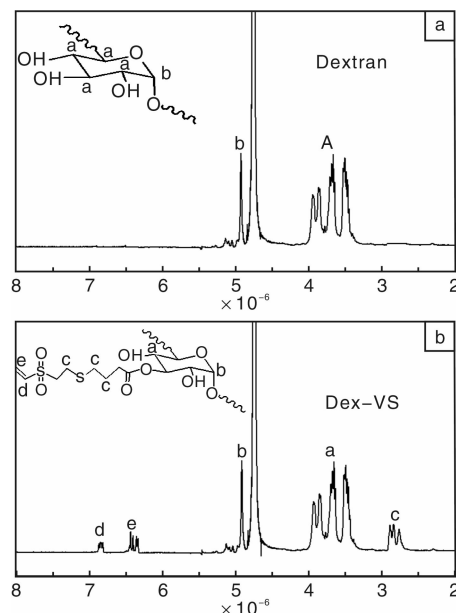


图 1 (a) 葡聚糖 (Dextran) 和 (b) 砷基葡聚糖 (Dex-VS) 核磁共振氢谱图 (溶剂: 氘)

Fig. 1  $^1\text{H}$ NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) of (a) dextran and (b) Dex-VS

合成 CS-SH 的方法有很多种<sup>[16-17]</sup>, 本文主要选取巯基乙酸为巯基化试剂, 碳化二亚胺 (EDAC) 作为催化剂, 将巯基接枝到壳聚糖上。EDAC 能够活化巯基乙酸分子中的羧基, 成为巯基乙酸-EDAC 中间体, 使得活性羧基能和壳聚糖分子上的伯氨基发生酰化反应, 从而将巯基以酰胺键的形式接枝到壳聚糖分子上。

与纯壳聚糖相比, 巯基化壳聚糖的红外谱图 (图 2) 在 1525  $\text{cm}^{-1}$  处出现了酰胺键的特征吸收峰, 表明巯基

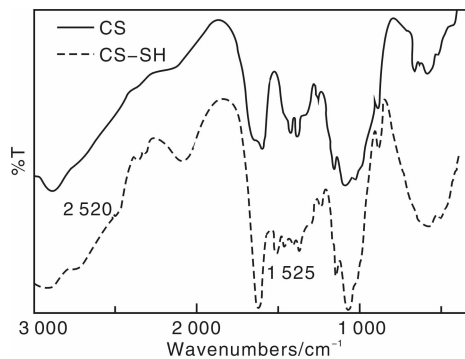


图 2 巯基化壳聚糖和壳聚糖分子的红外图谱

Fig. 2 FTIR of CS and CS-SH

通过酰胺键接枝到了壳聚糖分子上。在  $2520\text{ cm}^{-1}$  处附近也出现了隶属于巯基的吸收峰。采用 Ellman's 试剂法定量检测巯基接枝的程度, 对照标准曲线, 得出所制备的巯基化壳聚糖的巯基含量为  $200\text{ }\mu\text{mol/g}$ 。

### 3.2 支架形貌

图 3 所示为冻干的 Dex/CS 凝胶支架材料在液氮中淬断后喷金所观察到的扫描电子显微镜图, 可以看到支架内部为多孔结构。

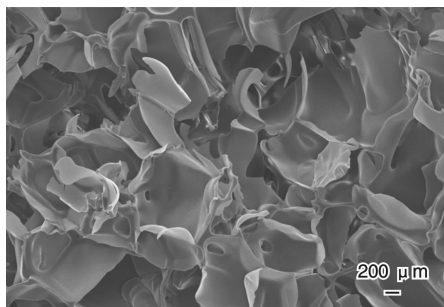


图 3 凝胶断面扫描电子显微镜图

Fig. 3 SEM of the Dex-VS/CS-SH hydrogel scaffold

### 3.3 DexS/CS 凝胶支架的降解

Dex /CS 凝胶支架材料的降解曲线如图 4 所示。凝胶在溶液中都呈现出先溶胀、随后降解两种行为。从图 4a 可以发现, 在 1 d 内, 所有支架的质量都表现出增大的趋势, 这是由于水凝胶吸水溶胀所致, PBS 溶液能够进入凝胶内部, 并且填满凝胶内部的多孔孔隙, 使凝胶的溶胀明显大于降解, 所以支架质量增大。当凝胶达到溶胀平衡后, 质量逐渐减少, 此后凝胶在溶液中更多地表现出降解行为。

研究发现 Dex-VS 的取代度和凝胶前驱物的浓度影响凝胶的溶胀程度。从图 4b 可以看到, 在溶胀的过程中, 当  $\text{DS}=9$ , 浓度为 2% (质量分数) 时, 支架的溶胀率为 1.21; 当  $\text{DS}=9$ , 浓度为 4% (质量分数) 时, 溶胀率为 1.13。可见取代度一定, 前驱体浓度越高时, 支架的溶胀率越低。当  $\text{DS}=12.5$ , 浓度为 2% (质量分数) 时, 凝胶溶胀率为 1.18。可见当浓度一定时, 取代度越高, 凝胶的溶胀率也越低。Dex 主链上较高的砒基取代度和以及较高的前驱体浓度导致形成凝胶时更高的凝胶网络密度, 冻干后支架内部的孔隙减小。反之, 在较低的 Dex-VS 取代度和凝胶前驱物浓度下, 由于交联密度较低, 支架内部的孔隙增大, 因而导致支架的溶胀率增大。

当达到溶胀平衡后, 凝胶质量不再增长。此时凝胶开始表现出降解, 质量逐渐减少, 这里把凝胶完全崩解的时间定义为降解时间。可以发现, 凝胶在 PBS 中都能完全降解。当  $\text{DS}=9$ , 浓度为 2% (质量分数) 时, 凝胶

的降解时间为 40 d, 而相同浓度下  $\text{DS}=12.5$  时, 凝胶的降解时间为 45 d。可见浓度一定, 取代度越大, 降解时间越长; 而当  $\text{DS}=9$ , 浓度为 4% (质量分数) 凝胶的降解时间为 55 d。可见取代度一定, 浓度越大, 降解时间越长。这是因为当砒基取代度和前驱体浓度越大时, 形成凝胶的内部网络密度更大, 所以降解也越缓慢。

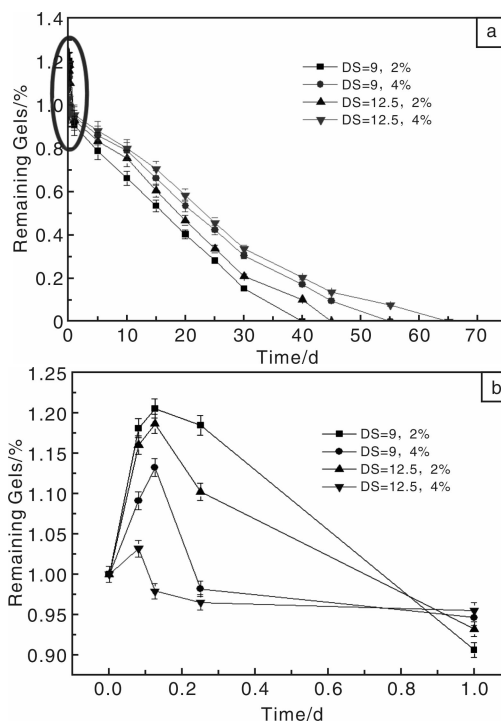


图 4 剩余凝胶质量随时间的变化: (b) 为 (a) 的放大

Fig. 4 The remaining gel (%) at regular time with different DS and concentration: (b) is the amplification of (a)

### 3.4 细胞毒性

本文选取 C2C12 细胞, 采用 MTT 方法考察浸提液的细胞毒性, 以此来评价 Dex /CS 凝胶的细胞相容性。图 5 是用浸提液培养细胞 1 d 后加入 DMSO 测量其吸光值 (OD)。从图 5 中看出其相对细胞活性都大于 80%,

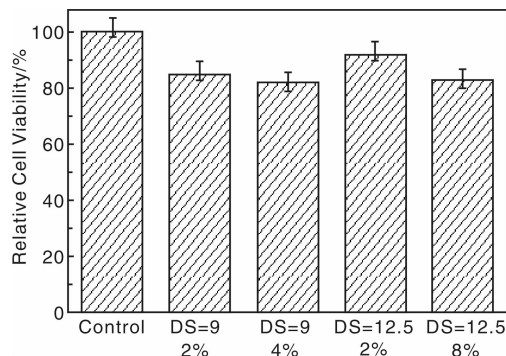


图 5 凝胶支架浸提液的相对细胞活性

Fig. 5 Relative cytotoxicity of hydrogels scaffolds from extracted dissolution

表明 Dex /CS 是一种生物相容性良好的支架材料。化学交联的水凝胶往往会因引入交联剂而带来细胞毒性。本文以高分子巯基化壳聚糖为交联剂, 利用官能团间的迈克尔加成反应形成凝胶, 避免了传统方法中由于引入自由基交联剂可能导致的细胞毒性。

### 3.5 小鼠体内异位成骨

将 DS = 9, DS = 12.5、浓度为 4% (质量分数) 的两组 Dex /CS 凝胶支架材料分别植入小鼠左腿和右腿的肌袋中, 其中右腿为负载 rhBMP-2 的凝胶支架材料, 左腿为纯的凝胶支架材料作为对照组。4 周后取样, 实验过程中无动物死亡, 饮食、活动正常, 植入部位无红肿及溃烂。

将小鼠解剖, 在每组 4 只老鼠的左腿肌袋中未发现新骨产生, 并且还发现未降解完的材料残余。而右腿肌袋中均产生了新骨。将新骨取出, 分别进行成骨量和组织学观察。

#### 3.5.1 成骨量

采用骨灰分含量和鲜骨重量来评价异位形成的新骨, 其中灰分含量表示形成的新骨中无机盐矿物含量。图 6 为两组支架材料植入小鼠肌袋 4 周后所形成的异位新骨的湿重和灰分含量, 从图 6 中可以看出, 在 4 周后两组支架材料诱导形成的新骨的湿重分别为 197 mg 和 132 mg, 煅烧后骨灰分重量分别为 18.7 mg 和 14.9 mg。

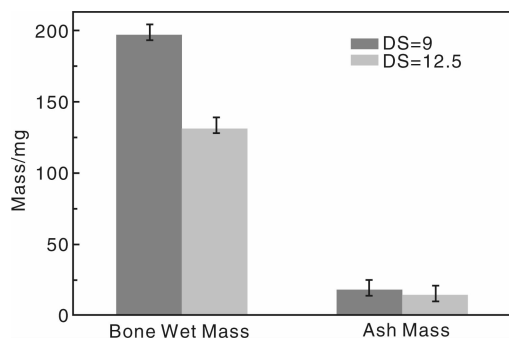


图 6 rhBMP-2 在小鼠体内 4 周诱导形成新骨的湿重和灰分含量

Fig. 6 Wet mass and Ash mass of ectopic bone induced by rhBMP-2 in vivo at 4 week

低取代度组 (DS = 9) 成骨量高于高取代度组 (DS = 12.5)。这主要是植入一个月后, Dex /CS 支架尚未完全降解, 因此支架中负载的 rhBMP-2 并未完全释放, 此时取代度低的支架材料由于内部孔隙大, 降解相对较快, 导致释放 rhBMP-2 的量也就比取代度高的支架更多, 所以其成骨量较高。

#### 3.5.2 组织切片

图 7 为 4 周后异位成骨的组织学观察。图 4a 是空白

凝胶对照组, 从图 4a 中可以看到, 当植入小鼠体内 4 周后, 空白凝胶组没有新骨产生, 而且还残留一定的材料, 证明在小鼠体内 4 周材料并没有完全降解 (M 区域)。图 4b 是材料负载 rhBMP-2 实验组, 从图 4b 中可以看出 4 周后在材料植入区域有明显的新骨产生, 新骨质中已有骨小梁、骨陷窝和骨细胞形成 (A 区域), 表明已有成熟骨的生成。而在区域中仍然发现未降解的干凝胶材料 (M 区域), 表明在小鼠体内 4 周材料还未完全降解。

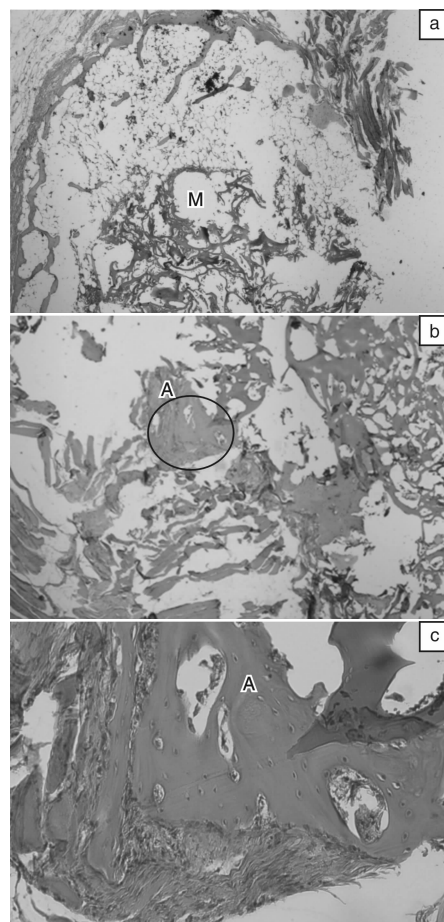


图 7 植入 4 周后新生骨组织切片图: (a) 空白凝胶, (b) 负载 rhBMP-2 异位成骨 (20 ×), (c) 负载 rhBMP-2 异位成骨 (100 ×)

Fig. 7 Histological evaluation of the harvested implants at 4 week: (a) the gel without rhBMP-2, served as control, (b) ectopic bone formed by Gel/BMP (20 ×), and (c) ectopic bone formed by Gel/BMP (100 ×)

## 4 结 论

(1) 成功合成了氨基葡聚糖和巯基化壳聚糖, 并利用氨基和巯基的迈克尔加成反应, 制备了交联葡聚糖/壳聚糖水凝胶。

(2) 研究发现氨基取代度和前驱物浓度越高, 降解

也越缓慢。

(3) 凝胶支架冻干后其形貌表现为内部多孔结构, 适合作为组织修复支架。初步细胞毒性评价显示该水凝胶具有良好的生物相容性。

(4) 将 Dex /CS 凝胶其作为 rhBMP-2 的载体材料, 考察了动物体内的异位成骨情况。支架负载 rhBMP-2 植入 4 周后, 有明显的成骨效果, 并且其成骨量也与材料的砒基取代度有关。

## 参考文献 References

- [1] Thomas B, Mieke V, Jorg S, *et al.* A Review of Trends and Limitations in Hydrogel-Rapid Prototyping for Tissue Engineering [J]. *Biomaterials*, 2012, 33 (26): 6 020 – 6 041.
- [2] Santo V E, Gomes M E, Mano J F, *et al.* Controlled Release Strategies for Bone, Cartilage, and Osteochondral Engineering-Part II: Challenges on the Evolution from Single to Multiple Bioactive Factor Delivery [J]. *Tissue Engineering*, 2013, 19B: 327 – 352.
- [3] Oommen P, Wang S J, Kisiel M, *et al.* Smart Design of Stable Extracellular Matrix Mimetic Hydrogel: Synthesis, Characterization, and in Vitro and in Vivo Evaluation for Tissue Engineering [J]. *Advanced Functional Materials*, 2013, 23: 1 273 – 1 280.
- [4] Min S B, Yang D H, Lee J B, *et al.* Photo-Cured Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Containing Simvastatin as a Bone Tissue Regeneration Scaffold [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (32): 8 161 – 8 171.
- [5] Park K M, Lee S Y, Joung Y K, *et al.* Thermosensitive Chitosan – Pluronic Hydrogel as an Injectable Cell Delivery Carrier for Cartilage Regeneration [J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5 (6): 1 956 – 1 965.
- [6] Amosi N, Zarzhitsky S, Gilsohn E, *et al.* Acidic Peptide Hydrogel Scaffolds Enhance Calcium Phosphate Mineral Turnover into Bone Tissue [J]. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8, (7): 2 466 – 2 475.
- [7] Chiu Y C, Kocogoez S, Larson J C, *et al.* Evaluation of Physical and Mechanical Properties of Porous Poly (Ethylene Glycol) -Co- (L-Lactic Acid) Hydrogels during Degradation [J]. *Plos One*, 2013, 8 (4): e60 728.
- [8] Liu Y X, Chan P M. A Biomimetic Hydrogel Based on Methacrylated Dextran-Graft-Lysine and Gelatin for 3D Smooth Muscle Cell Culture [J]. *Biomaterials*, 2010, 31 (6): 1 158 – 1 170.
- [9] Sun G M, Shen Y L, S K, *et al.* Functional Neovascularization of Biodegradable Dextran Hydrogels with Multiple Angiogenic Growth Factors [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (1): 95 – 106.
- [10] Khanh N, Phuong N D, Eben A. Functionalized, Biodegradable Hydrogels for Control over Sustained and Localized Sirna Delivery to Incorporated and Surrounding Cells [J]. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9 (1): 4 487 – 4 495.
- [11] Hiemstra C, Aa V D, Feijen, J, *et al.* Novel in Situ Forming, Degradable Dextran Hydrogels by Michael Addition Chemistry: Synthesis, Rheology, and Degradation [J]. *Macromolecules*, 2007, 40: 1 165 – 1 173.
- [12] Yang F, Wang J, Peng G, *et al.* PEG-Based Bioresponsive Hydrogels with Redox-Mediated Formation and Degradation [J]. *Journal of Material Science: Material in Medicine*, 2012, 23: 697 – 710.
- [13] LouXiang (娄翔), Luo Xiaoyan (罗晓燕), Yin Yuji (尹玉姬), *et al.* 巯基化壳聚糖/明胶的制备研究 [J]. *Chemistry Bulletin (化学通报)*, 2005, 68 (6): 452 – 457.
- [14] Ellman G L. A Colorimetric Method for Determining Low Concentrations of Mercaptans [J]. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 1958, 74: 443 – 450.
- [15] Hawkins A M, Tolbert M E, Newton B, *et al.* Tuning Biodegradable Hydrogel Properties Via Synthesis Procedure [J]. *Polymer*, 2013, 54 (17): 4 422 – 4 426.
- [16] Anitha A, Deepa N, Chennazhi K P, *et al.* Development of Mucoadhesive Thiolated Chitosan Nanoparticles for Biomedical Applications [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83 (1): 66 – 73.
- [17] Andreas B S, Davide G, Yvonne P. Thiolated Chitosans: Development and in Vitro Evaluation of a Mucoadhesive, Permeation Enhancing Oral Drug Delivery System [J]. *Journal of Controlled Release*, 2004, 94 (1): 177 – 186.