

文章编号: 1004-7220(2023)06-1067-12

# 水凝胶的生物力学研究进展

梁婷, 袁章琴, 徐静溪, 刘禹, 李斌

(苏州大学骨科研究所, 江苏 苏州 215000)

**摘要:**水凝胶是生物医用领域的重要生物材料,也是近年来的研究热点。但人体内的细胞与组织的微环境和调控机制非常复杂,水凝胶应用于再生修复领域仍存在一些待解决的科学问题。随着生物力学的发展,越来越多的研究者发现除了水凝胶的材料学及生物学特性以外,其生物力学特性也是调控细胞功能、影响组织再生修复的关键因素之一。本文总结了水凝胶材料的生物力学研究进展,并对未来的研究工作进行了展望。

**关键词:**水凝胶; 弹性模量; 黏弹性; 调控机制; 生物力学

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2023.06.003

## Recent Progress in Biomechanical Studies of Hydrogels

LIANG Ting, YUAN Zhangqin, XU Jingxi, LIU Yu, LI Bin

(Orthopedic Institute, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu, China)

**Abstract:** Hydrogels are important biomaterials in the field of biomedicine. However, the microenvironment and regulation mechanism of cells and tissues in human body are very complex, and there are still some unsolved scientific issues in the application of hydrogels in the field of regeneration and repair. Along with the development of biomechanics, more and more researchers have found that the biomechanical properties of hydrogels are also one of the key factors in regulating cell function and affecting tissue regeneration and repair, in addition to its material and biological properties. In this review, the biomechanical research progress of hydrogel materials was summarized, and the future research was also prospected.

**Key words:** hydrogel; elastic modulus; viscoelasticity; regulation mechanism; biomechanics

水凝胶作为一种以水为分散介质的三维网络结构聚合物材料,因其具有良好的生物相容性、药物负载和缓释特性、独特的多孔结构、渗透性和亲水性,尤其是其高度类似于人体组织的吸水及保湿能力,一直是组织工程与再生医学的研究热点<sup>[1]</sup>。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是细胞生长的微环境,由各种蛋白质和多糖组成,可以调节生长、发育和死亡等各种细胞行为<sup>[2]</sup>。细胞与ECM之间的紧密联系,使它们能够敏锐地感知外部环境

的变化。当ECM力学特性发生变化时,细胞会感知并做出响应,从而导致细胞分化、增殖、生长、迁移、信号转导等一系列生物学功能的变化<sup>[3-4]</sup>。水凝胶作为具有广阔应用前景的类ECM生物材料,其力学设计将对细胞生长增殖、分化及其功能的发挥产生直接影响。本文对水凝胶材料弹性、黏弹性、强度等力学特性对细胞功能的调控作用与机制进行深入讨论。

收稿日期:2023-12-11; 修回日期:2023-12-12

基金项目:国家自然科学基金项目(32130059,32201070,32171350)

通信作者:李斌,教授,博士生导师,E-mail: binli@suda.edu.cn

## 1 水凝胶的弹性

弹性模量(或刚度),指材料在受力时的弹性形变能力<sup>[5]</sup>,是评估生物组织及生物材料力学性能的重要指标<sup>[6-8]</sup>。不同器官的力学性能决定组织功能并调节细胞行为<sup>[9]</sup>。人体不同组织弹性模量存在较大差异,跨越 Pa 到 GPa 数个量级,如人体皮肤的弹性模量为 0.9~20 kPa<sup>[10]</sup>,骨骼的弹性模量为 3~30 GPa<sup>[11]</sup>。组织的弹性模量对细胞功能的发挥至关重要。研究表明,疾病的发生发展都伴随着组织弹性模量的异常<sup>[9,12]</sup>。ECM 的弹性模量与细胞分泌胞外基质成分及其胞外基质蛋白相关修饰等因素密切相关。因此,构建具有再生修复功能的水凝胶材料时,其弹性模量对细胞生长分化、细胞功能的正常发挥都极为重要。

### 1.1 水凝胶弹性模量对细胞功能的影响

由于水凝胶材料与椎间盘髓核组织相近的特性,许多学者开发了针对椎间盘退变、替代髓核的水凝胶支架材料,并研究了弹性模量对髓核细胞的调控作用。研究发现,将髓核细胞培养在刚度不同基质上,低模量基质可促进髓核来源干细胞增殖及成软骨分化,而高模量基质可促进其成骨分化,表明髓核细胞的分化受基质刚度有效调节<sup>[13]</sup>。富含层黏连蛋白的柔软基质可促进髓核细胞增殖、细胞形态、细胞间相互作用和蛋白多糖的产生<sup>[14]</sup>,提示基质刚度可调节细胞的生存<sup>[13,15-16]</sup>。基质刚度提高,可促进髓核细胞铺展面积、高度等形态变化,并且可激活 TRPV2 和 PI3K/AKT 信号通路,线粒体释放细胞色素 C,促进髓核细胞凋亡<sup>[17]</sup>。通过水凝胶来模拟退变髓核组织,发现提高基质刚度,可通过激活 YAP/TEAD1/Cyclin B 刺激髓核细胞的增殖,加剧髓核组织纤维化。此外,提高基质刚度,可诱导 YAP 通过酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 介导髓核细胞脂质过氧化和铁死亡<sup>[18]</sup>。

除髓核细胞外,水凝胶弹性模量对其他细胞也具有调控作用。例如,光介导硬化交联水凝胶相关研究表明,在硬化后的水凝胶上,细胞产生牵引力和 YAP/TAZ 核穿梭减少,肝星状细胞活化减少<sup>[19]</sup>。较软的基质可促进肿瘤组织内动力蛋白相关蛋白(Drp1)线粒体聚集,导致胞内  $Ca^{2+}$  升高,从而诱导线粒体碎裂和 Parkin/PINK1 介导的线粒体

自噬<sup>[20]</sup>。使用动态水凝胶培养间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC),随后水凝胶的硬化,MSC 表现出显著升高的成骨 ECM 分泌、基因表达和 YAP 通路的激活,体内评估进一步表明,动态硬化对 MSC 成骨的增强显著促进了骨重建<sup>[21]</sup>。基质的刚度还可用于指导破骨细胞的命运,增加基质刚度可抑制整合素  $\beta 3$  介导的 RhoA-ROCK2-YAP 力学转导,促进破骨细胞的生成<sup>[22]</sup>。

### 1.2 水凝胶弹性模量调控细胞功能的相关机制

细胞为了与周围的力学环境相协调,需将外部力学刺激转化为影响基因表达的相关生化信号,这一过程被称为力学转导<sup>[2]</sup>。力学信号转导始于整合素和其他黏附蛋白探测微环境的物理特征,然后通过肌动蛋白的收缩性和 F-肌动蛋白(F-actin)骨架来调节自身的张力状态来平衡细胞外力<sup>[23]</sup>,进而产生相关生物信号并在细胞中传导<sup>[24]</sup>。近年来,研究表明,转录调节因子 YAP/TAZ 在细胞力学信号的转导过程中发挥重要作用<sup>[25]</sup>。YAP 和 TAZ 是两个高度相关的转录调节因子,主要分布于细胞质与细胞核中。YAP/TAZ 活性受 F-actin 细胞骨架的构象和分裂调节,而 F-actin 的构象和分裂主要取决于细胞黏附的基质。在大而坚硬的基质上细胞形态铺展,非肌肉肌球蛋白 II 驱动形成细胞骨架及 ROCK 表达水平升高,激活 YAP/TAZ 通路;反之,在较软或较小的基质上细胞变圆,黏附面积减少,抑制 YAP/TAZ 通路<sup>[23]</sup>。在一定程度上,水凝胶基质刚度等微环境可通过影响 YAP/TAZ 的力学传导来决定细胞命运<sup>[23,26-29]</sup>。通过刚度可调节聚丙烯酰胺水凝胶体系进行多能干细胞衍生胚状体研究 3D 培养研究发现,水凝胶的刚度可诱导干细胞中 YAP 相关蛋白力学转导因子的刚度依赖性激活与肌动蛋白细胞骨架重排,进而影响干细胞的分化方向<sup>[30]</sup>。

研究表明,基质刚度可通过整合素聚集 F-actin 来影响细胞的形态及其产生张力的能力,调控 YAP/TAZ 通路,进而调控细胞的功能<sup>[31-35]</sup>。例如,肝纤维化现在被认为是肝硬化患者肝再生特性丧失和癌症出现的一个重要因素,这种坚硬 ECM 的形成主要因为肝星状细胞转分化为肌成纤维细胞。这种转化是 YAP/TAZ 依赖性的,通过强化基底材料可导致 YAP/TAZ 活化和纤维化<sup>[19]</sup>。上述研究结果

表明,基质刚度这一力学微环境可通过 YAP/TAZ 力学转导调控细胞生存分化与正常功能的发挥。

水凝胶基质刚度作为一种力学刺激,其在细胞内的传导过程也依赖于对力学敏感的离子通道。Piezo1 作为一种力学敏感离子通道,其可被肌动蛋白骨架拖动并在相关力学刺激下诱发门构象变化,调控阳离子选择性跨膜运输(例如  $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Cs^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、TMA, TEA)进而调控细胞生长增殖与分化。Wang 等<sup>[36]</sup>研究了人退变椎间盘的基质弹性模量,试验结果表明退变组织中基质刚度增加,且组织中 Piezo1 表达量上升,这提示较硬的胞外基质可导致 Piezo1 通道激活,使得胞内  $Ca^{2+}$  水平增加,细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平以及 GRP78 和 CHOP 增加,导致氧化应激和内质网应激。Ke 等<sup>[37]</sup>将髓核细胞培养在不同刚度的聚乙烯板上,并探究了 Piezo1 与凋亡相关蛋白的表达情况;结果表明, Piezo1 的激活参与并调节 Drp1 的翻译后修饰,基质刚度增加,导致 Piezo1 激活, Drp1 磷酸化水平增加,进而导致线粒体裂变细胞凋亡。Piezo1 可感知基质刚度的变化,调节胞内阳离子浓度,影响到线粒体及线粒体相关蛋白,从而对细胞的生存产生一定的影响;此外,其还可通过影响细胞内源性的炎症因子的分泌而对周围细胞供供功能产生一定影响<sup>[38]</sup>。

心肌素相关转录因子 A (myocardin related transcription factor-A, MRTF-A), 主要分布于细胞质,是一类对胞外力学刺激信号敏感的转录辅激活因子,其可与 G-actin 结合<sup>[23]</sup>。力学刺激信号促进 F-actin 组装消耗细胞质内 G-actin, 导致游离状态 MRTF-A 增多导致穿梭入核的数量大于出核数量,引起核 MRTF-A 水平升高<sup>[39]</sup>。Fearing 等<sup>[40]</sup>使用层黏连蛋白功能化的聚乙二醇水凝胶,探究了 MRTF-A 对髓核细胞的细胞表型的影响,其结果表明随水凝胶基质刚度增加,导致 F-actin 聚集细胞呈现扁平扩散状,核内 MRTF-A 水平升高,髓核细胞标志物表达降低并伴随生物合成功能降低。细胞膜上及胞质中力学敏感相关蛋白,可感知基质刚度,并将力学信号转化为生化信号,进而对细胞或周围细胞的功能产生一定的影响。因此,诸如 Piezo1、MRTF-A 等力学敏感相关蛋白可能是靶向干扰细胞功能研发生物材料的新靶点。

## 2 水凝胶的黏弹性

黏弹性是一个具有时间维度的重要力学参数,主要体现为应力松弛、蠕变、率相关等应力应变响应。黏弹性作为天然组织的一种常见和基本的力学特征,已在活体组织和器官中得到广泛验证,包括皮肤、肌肉、软骨、血管、肌腱、大脑、肝脏、乳房和胚胎等<sup>[41]</sup>。组织的黏弹性主要源于 ECM 和细胞生物化学成分和组织特异性结构的多样性。ECM 富含生物大分子物质,如蛋白聚糖、透明质酸、胶原蛋白、纤维蛋白和层黏连蛋白,其力学行为表现出时间依赖性特征<sup>[42-43]</sup>。细胞对其周围的动态微环境进行感知和响应,以实现细胞功能。

### 2.1 水凝胶黏弹性能对细胞功能的影响

随着生物力学的发展,大家越来越认识到 ECM 动态力学特性对细胞行为的调控、维持组织生理状态、病理的发生与发展以及组织再生修复的重要性。近年来的研究发现,基质黏弹性可以影响细胞的各种行为,包括细胞黏附、迁移、增殖以及干细胞分化,甚至影响 ECM 合成<sup>[44-46]</sup>。美国哈佛大学 David Mooney 院士团队开发了一系列具有不同应力松弛时间特性的海藻酸钠水凝胶来模拟活体组织的黏弹性,发现基材黏弹性对干细胞的行为和分化产生巨大影响<sup>[4,47]</sup>。华南理工大学边黎明教授设计了一种由较大解离常数可逆共价键构建的黏弹性水凝胶,可诱导封装干细胞的快速扩散、组装和分化,并利于细胞的浸润和增殖,明确表明基质环境的时间-力学特性对细胞行为有直接调控作用<sup>[48-50]</sup>。Marozas 等<sup>[46]</sup>报道了一种共价适应性硼酸盐水凝胶,水凝胶的快速松弛促进了细胞与基质间的相互作用,导致核体积扩散和增大,并在较长时间内诱导了 YAP/TAZ 的核定位。Arkenberg 等<sup>[51]</sup>通过将多功能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)封装在硫醇-降冰片烯交联的 PEG 水凝胶中,发现与静态水凝胶相比,黏弹性水凝胶显著提高了细胞的存活率。Chaudhuri 等<sup>[4]</sup>通过使用不同分子量和交联密度的钙来调节海藻酸盐水凝胶的松弛速率,发现随着快应力松弛水凝胶促进了 MSC 的铺展和增殖,且抑制成脂、促进成骨。同样,本研究团队也曾利用小分子 3,4 二羟苯甲醛与苯硼酸化明胶反应生成硼酸酯键和席夫碱键,结合甲基丙烯酸酯化明

胶的自由基聚合制备了明胶基黏弹性水凝胶,发现具有较高损耗模量的水凝胶促进了骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)的铺展、增殖、成骨和软骨分化,降低了成脂分化<sup>[52]</sup>。此外,基质黏弹性还会影响细胞周期,Najmina等<sup>[53]</sup>研究发现,具有较快体积弛豫时间的黏弹性液体基质通过氧化应激影响乳腺癌细胞的细胞周期,揭示了黏性物质黏弹性基质中的整体应力松弛在调控乳腺癌细胞的细胞周期阻滞中的潜在作用。水凝胶黏弹性能对免疫系统也起到调控作用<sup>[54]</sup>。Feng等<sup>[55]</sup>研究发现,黏弹性水凝胶能使巨噬细胞浸润和原位极化,而静态水凝胶不能影响免疫细胞主动进行自我调节。同样,Majedi等<sup>[56]</sup>通过制备黏弹性水凝胶对T细胞进行3D培养,发现T细胞可以感知其3D力学环境,并做出相应的行为改变。Vining等<sup>[57]</sup>通过藻酸盐和I型原纤维胶原的互穿网络,模拟天然ECM的原纤维结构及可调的刚度和黏弹性,研究结果表明基质的黏弹性和刚度可影响MSC免疫调节标记物的蛋白表达。Liu等<sup>[58]</sup>构建了一系列类似ECM黏弹性特征的液晶细胞模型,研究表明所有黏弹性基质促进巨噬细胞生长并维持细胞活性,但不同黏弹性能对巨噬细胞向M1或M2极化的影响不同。

水凝胶的黏弹性也是组织再生修复中的关键因素之一。Whitehead等<sup>[59]</sup>证明了赋予黏弹性藻酸盐水凝胶动态力学性能是增强MSC球状体骨形成和修复治疗潜力的有效策略。同样的,Jung等<sup>[60]</sup>制备包封MSC的黏弹性水凝胶并缓慢释放地塞米松,黏弹性水凝胶增强了被包裹细胞的增殖、糖胺聚糖的合成和软骨基因表达,并促进了新软骨的形成。本研究团队将不同损耗模量的明胶基黏弹性水凝胶植入大鼠股骨髁缺损处,结果发现具有较高损耗模量的水凝胶能够促进体内骨、软骨缺损的修复,说明适宜的动态力学微环境可通过调控细胞行为促进组织修复<sup>[52]</sup>。此外,Lin等<sup>[61]</sup>制备了一种由离子交联透明水凝胶制成的黏弹性粘合贴片,它能适应心肌的循环变形,在逆转大鼠急性和亚急性心肌梗死后左心室重塑和恢复心脏功能方面优于大多数现有的无细胞心外膜贴片。Mooney团队使用具有相似弹性但不同应力松弛曲线的水凝胶,发现快速松弛的水凝胶可促进间充质干细胞球体的迁移

和融合<sup>[62]</sup>。进一步,该团队研究表明基质的被动黏弹性特性在空间和时间上指导乳腺上皮细胞球形组织的增殖,表明以应力松弛为特点的组织生长动力学是形态发生和致癌的基本过程<sup>[63]</sup>。以上发现强调了基质黏弹性在组织工程和再生医学策略中的重要作用,以及ECM环境的生物分子和物理线索调节集体细胞动力学和组织模式。

椎间盘处于动态力学环境中,椎间盘的黏弹性在维持椎间盘稳态中起着至关重要的作用。髓核通过负电荷的糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)调节组织渗透压负责水的吸收和保留而赋予其黏弹性特性<sup>[64-65]</sup>。在椎间盘退变的过程中,髓核含水量逐渐降低,ECM中的胶原以及蛋白多糖被降解,糖胺聚糖含量降低,导致其力学性能发生变化,特别是黏弹性行为出现明显的丢失<sup>[13,66-68]</sup>。近些年来,也有一些学者开发了仿生髓核用黏弹性材料。Jia等<sup>[69]</sup>研究发现,具有类似髓核黏弹性的水凝胶更有利于髓核细胞中相应特征性ECM如II型胶原、糖胺聚糖、SOX-9等的表达,可以缓解髓核细胞受到过度力学加载后的ECM降解,在大鼠尾椎针刺损伤模型以及髓核置换模型中获得较好的治疗效果<sup>[70-71]</sup>。将聚乙烯醇(PVA)和聚乙烯(PVP)以1:1的摩尔比混合获得的水凝胶,在动态条件下的剪切和压缩应力下的黏弹性行为与健康人髓核的性能相似,可以被认为是一种很有前途的用于髓核置换的材料<sup>[72]</sup>。通过交联丝素蛋白(silk fibroin, SF)和透明质酸(hyaluronic acid, HA)制备HA/SF-IPN(互穿网络)水凝胶(HS-IPN),增加HS-IPN水凝胶中SF的量可增加水凝胶的黏弹性能,同时发现适宜黏弹性的水凝胶可促进了人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cell, hBMSC)向NP细胞的分化<sup>[73]</sup>。Leone等<sup>[74]</sup>开发了一种新的海藻酸酰胺衍生物,以获得一种具有黏度的多糖,并以1,3-二氨基丙烷为交联剂对改性多糖进行交联,发现氨基海藻酸盐基支架是一种很有前途的NP替代材料。不过基质黏弹性对髓核作用的具体分子生物学作用机制还鲜有报道。

## 2.2 基质黏弹性的力学传导及调控机制

虽然天然水凝胶在细胞培养中得到了广泛应用,但黏弹性的生物学影响近些年才引起关注。许多研究发现,细胞生物学行为,包括黏着斑的形成、

细胞扩散、MSC 分化、细胞迁移和 ECM 合成,都受基质黏弹性而非初始弹性模量的调节。细胞对基质的动态力学重塑由黏弹性性质实现<sup>[75]</sup>。研究表明,基质黏弹性能可通过黏着斑(focal adhesion, FA)将力学刺激传导到细胞中并启动后续信号通路,FA 可通过跨膜受体(如整合素)将细胞内肌动蛋白细胞骨架束与 ECM 成分动态连接<sup>[76]</sup>。最新研究表明,FA 的形成也受到基质黏弹性的影响,并且在具有更快弛豫的水凝胶中观察到促进 FA 的形成。在包封在 RGD 偶联的离子交联海藻酸盐水凝胶中的 MSC 外围观察到  $\beta 1$  整合素的积累增加,表明 FA 的形成增加,具有更快的应力松弛<sup>[4]</sup>。另一项研究显示,当人骨肉瘤细胞(U2OS)细胞在应力松弛的海藻酸盐水凝胶上培养时,FA 的形成增加,表现为 Paxillin 的定位<sup>[47]</sup>。Chaudhuri 等<sup>[45]</sup>将天然 ECM 成分透明质酸和 I 型胶原形成具有不同应力松弛时间的水凝胶用于 3D 培养,并发现应力松弛水凝胶促进了 MSC 中 FA 的发育。在具有更快应力松弛的水凝胶中,黏附配体倾向于聚集和聚集,这促进了 FA 的形成。然而,也有些相互矛盾的发现。当人间质干细胞(human mesenchymal stem cell, hMSC)在具有不同损耗模量和相似初始储能模量的胶原 I 包被的 PAM 基水凝胶上培养时,FA 长度随着损耗模量的增加而显著减少,可能是细胞骨架牵引力因时间依赖性损耗模量而降低,阻碍了 FA 的发育和成熟<sup>[77]</sup>。另一项研究也报告了类似的结果,聚丙烯酰胺(PAM)基水凝胶的弹性模量和黏性模量独立调节时,黏弹性水凝胶抑制了 FA 的发育,可能是非塑性 PAM 基水凝胶不能被细胞施加的力重塑,因而由黏附配体聚集引起的对 FA 形成的上调作用减弱<sup>[78]</sup>。Huang 等<sup>[79]</sup>研究认为,胶原水凝胶黏弹性可调节黏着斑的形成和成熟,并通过 ROCK 依赖性肌动蛋白(actomyosin)收缩介导早期 MSC 软骨分化的启动,以及通过 ROCK 依存性细胞凋亡介导后期软骨形成。

关键力学转导因子 YAP/TAZ 也与基质黏弹性调控细胞密切相关。研究表明,YAP/TAZ 在具有快速应力弛豫的基底上的核定位增强<sup>[47,80]</sup>。基材黏弹性调控细胞行为与 YAP 在细胞中的定位相关。例如,斯坦福大学 Ovijit Chaudhuri 教授发现,基材黏弹性调控人类诱导干细胞形态发生与 YAP 从细

胞核到细胞质的易位相关<sup>[4]</sup>。本研究团队也发现,黏弹性水凝胶损耗模量可通过 BMSC 的 integrin  $\beta 1$  激活 YAP,进而促进 Smad2/3 和  $\beta$ -catenin 的核移位及 ECM 分泌,最终促进软骨和骨形成<sup>[52]</sup>。此外,具有高损耗模量的基质可促进 MSC 向多个谱系分化<sup>[77]</sup>。在基础培养基中具有高损耗模量的基质上的 MSC 表现出向平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)谱系分化的倾向,表现为平滑肌标志物  $\alpha$ -平滑肌( $\alpha$ -SMA)作用和钙蛋白酶的表达显著增强。随后的一项研究发现,这是 SMC 诱导因子表达上调的结果<sup>[81]</sup>。Rho 家族 GTP 酶,包括 Rac 和 Rho,是肌动蛋白细胞骨架和力学转导的重要调节因子<sup>[82]</sup>。高损耗模量的基质可激活细胞中 Rac1 活性,进而介导 N-钙黏蛋白表达,促使 MSC 向 SMC 分化<sup>[81,83]</sup>。然而应力松弛海藻酸盐水凝胶中的成骨作用受到肌动蛋白收缩性的促进,而不依赖于 Rho 信号<sup>[47]</sup>。此外,Heilshorn 团队开发了一种黏弹性可调的水凝胶,探究了其基质黏弹性对于神经祖细胞(neural progenitor cell, NPC)发育的影响,发现与纯弹性水凝胶相比,黏弹性水凝胶中 NPC 的伸展更好,形态更接近于成熟的神经细胞,而 RGD 启动的 integrin 信号传导是 NPC 感知基质应力松弛速率差异的关键<sup>[84]</sup>。

### 3 水凝胶的动态力学特性与动态载荷联合作用对细胞的调控作用

#### 3.1 水凝胶的循环力学特性

人体内的生理载荷大多是动态循环载荷,因此对于水凝胶来说,其循环力学性能直接影响其力学可靠性和结构完整性。具有良好循环性能的水凝胶应该能够在多次加载和卸载循环中保持其力学强度和形状恢复能力,而不会发生断裂或失去功能。Li 等<sup>[85]</sup>研究发现,NF-SF/PRP@SA 水凝胶在压缩测试中显示出较高的弹性模量和抗压能力。在疲劳测试中,该水凝胶在 10 次压缩循环中保持了较高的最大应力,并且在第 3 次循环后保持了相对稳定的形变,最大应力达到了 16 kPa,并且在第 1 次压缩后仍保持在最大应力的 75% 以上。Ho 等<sup>[86]</sup>研究用于椎间盘再生的水凝胶在 40 个循环内没有明显变化,表明整个 IVD 支架经过连续的压缩加载和卸载循环后能够保持其完整性,并恢复到其原始

形状而不发生永久变形。Brissenden 等<sup>[87]</sup>研究一种新型用于椎间盘再生的水凝胶,在评估循环加载的性能时以 20% 应变进行 1 000 次循环压缩,3 种材料 P (TMOE-3) 2-PEG、P (TMOE-3) 2-12 mer、P (TMOE-3) 2-12 mer + CS 在循环过程中水凝胶的模量没有明显下降,3 种配方也均在 5 min 内恢复到初始高度。Dey 等<sup>[88]</sup>开发一种用于组织工程的 Gel-PEG(凝胶-聚乙二醇)混合水凝胶并对其进行了循环压缩测试,在第 1 个循环期间,最大应力为 0.56 MPa,但在随后的循环中最大应力逐渐降低并变得稳定,在多个循环后达到 0.46 MPa 恒定值,体现了应力软化效应。Xiang 等<sup>[89]</sup>研究一种可作为骨支架的水凝胶,对聚乙烯醇/羟基磷灰石/1.5 单宁酸 (PVA/HA/1.5TA) 水凝胶进行了循环加载-卸载压缩试验,结果显示,水凝胶在每次循环后的最大载荷略有下降,但残余应变保持较小。从第 3 到第 10 次加载循环中,水凝胶的应力-应变基本保持一致。在连续 10 次循环后,最大应力仍为初始应力的 74.1%,这表明水凝胶具有良好的力学稳定性和出色的能量耗散能力。Jia 等<sup>[90]</sup>研究一种用于治疗椎间盘退变的水凝胶并测试其在动态压缩加载下的力学性能,测试结果显示其循环能量耗散很小;连续循环压缩 100 次后,几乎没有明显的形变;在 5 min 内释放压力后水凝胶能够完全恢复到大变形之前的状态,显示出自恢复特性。Re 等<sup>[91]</sup>研究一种用于骨组织工程和伤口愈合的壳聚糖水凝胶,在进行高达 50% 应变循环压缩试验下,水凝胶的刚度和应力在前几个循环降低后保持了性能稳定。Yu 等<sup>[92]</sup>研究了一种可注射用于原位股形成的水凝胶,该水凝胶在循环压缩的过程中强度下降很低,并且无需外力就能恢复。Hu 等<sup>[93]</sup>通过制备 PVA/pectin 复合水凝胶来诱导骨再生,经过拉伸和压缩测试发现该水凝胶能在 100% 拉伸或者 50% 压缩后仍然能恢复到初始形态。Dong 等<sup>[94]</sup>研究一种用于软骨再生的多功能 3D 打印复合水凝胶,通过力学循环测试,在 30% 应变下,经过 15 次压缩试验循环后未出现断裂现象,说明该水凝胶的循环力学性能稳定。Hu 等<sup>[95]</sup>开发了一种丝素/聚氨酯水凝胶用来取代退变髓核,该水凝胶在压缩疲劳试验(频率 5 Hz, 10<sup>6</sup> 次循环)后,未观察到样品发生疲劳破

坏。Yuan 等<sup>[96]</sup>通过仿生昆虫角质层的微观结构制备了一种壳聚糖水凝胶,在进行了 1 000 次疲劳试验后仍有高达 40% 的力学性能。

### 3.2 水凝胶力学特性与动态载荷协同调控细胞功能的作用与机制

细胞的自然力学环境除了 ECM 的力学特性,还有从外部载荷施加到细胞上的剪切力、张力和压缩力等。组织力学特性与动态载荷协同调控细胞周围力学微环境,维持组织正常的结构与功能。因此,近些年来,许多研究开始探讨多模式力学刺激来调节细胞行为,包括弹性、黏弹性、基质形貌和外部力学刺激。Frank 等<sup>[97]</sup>为了模拟骨髓细胞在体内的动态细胞外环境,设计了一种基于物理交联水凝胶替代骨髓干细胞基质,发现在频繁的力学应力刺激下,无论基质的弹性如何,MSCs 多能性的潜在标志物 Stro-1 在该水凝胶上 hMSCs 的表达都能超过 20 d。本研究团队通过组装微图案胶原膜构建具有仿骨特性的支架并加载力学刺激以提供适当的微环境,结果表明,各向异性微沟槽胶原膜能够有效地引导 MC3T3-E1 细胞排列,结合周期性拉伸力学刺激后,具有更好的成骨潜力<sup>[98]</sup>。Zhang 等<sup>[99]</sup>基于椎间盘纤维环显示出各向异性的微观结构以及梯度力学性能,制备了具有模拟纤维环微观结构特征的角层结构的微图案胶原支架。然后在支架中培养 BMSC,并加载周期性拉伸应力刺激,结果表明在力学负载下排列的细胞显示出基质合成代谢相关基因和蛋白质的表达升高,在促纤维环再生方面表现出巨大的潜力。Yu 等<sup>[100]</sup>将人牙周膜韧带(periodontal ligament, PDL)细胞种植在纳米图案化基质上,并予以循环拉伸应力处理,发现多模态力学刺激可调节成骨和韧带基因活性,对 PDL 细胞形态、增殖以及成骨和韧带分化皆有影响,在调节牙周细胞行为方面至关重要。此外,Wang 等<sup>[101]</sup>通过开发一种微力学刺激器,研究主动力学加载和基质力学特性对细胞定向的组合作用。结果表明,通过取向微纳米结构预排列的细胞可以通过循环平面内应变而改变,在外力加载过程中,微/纳米结构可以抵抗循环平面内应变的重新定向效应。以上研究表明,基质力学结构特性与动态载荷等多种力学因素在指导细胞行为方面发挥协同作用。

## 4 水凝胶的其他力学特性

### 4.1 水凝胶的力学强度

水凝胶材料用于代替或者修复受损的生物组织时,与周围组织一起提供力学支撑和保护,因此,水凝胶需要足够的力学强度来承受生理载荷。尽管与其他生物材料相比,水凝胶的强度相对较低,但学者们仍致力于开发具有高强度、高韧性和良好的回弹性能的水凝胶材料。Li等<sup>[85]</sup>研究纳米纤维增强的海藻酸钠水凝胶在椎间盘中的应用发现,纳米纤维的添加可以显著提高水凝胶的抗压能力,纳米纤维含量增加时,水凝胶的弹性模量也随之增加,使其能承受高达50 kPa应力(应变为30%)。Chen等<sup>[102]</sup>研究出一种生物水凝胶基于氧化锌海藻酸盐明胶(ZOG)用作多功能的核酸传递平台。ZOG与核酸抗镜像RNA-204-3p(AM)结合后形成的ZOGA能够与椎间盘组织交联,形成高强度的胶原网络,改善椎间盘的力学性能,使用氧化锌海藻酸钠-明胶添加antagomir-204-3p后压缩模量增加到了254.86 kPa。Alinejad等<sup>[103]</sup>研究可注射壳聚糖水凝胶在椎间盘再生中的应用,通过将壳聚糖(CH)与碳酸氢钠(SHC)和/或磷酸甘油酯(BGP)和/或磷酸盐缓冲液(PB)3种胶凝剂的不同组合制备了新型水凝胶,相比传统的壳聚糖水凝胶具有更高的抗压性能和更好的变形能力,其中SHC0.075BG0.1和SHC0.075PB0.2在50%应变时应力大于120 kPa。Ho等<sup>[86]</sup>通过研究双网络水凝胶用于椎间盘仿生支架发现,添加了海藻酸盐的双网络水凝胶在压缩加载下具有更高的力学强度和应变能力,相比于纤维素水凝胶,加入海藻酸盐后,DN水凝胶在压缩载荷下表现出更高的力学强度(351 kPa)。Cui等<sup>[104]</sup>研究了用于软骨修复的基于聚乙烯醇/硼酸钠(PVA/SB)三重网络水凝胶的力学性能,发现PVA/SB三重网络水凝胶相比纯PVA水凝胶具有更好的力学性能,抗压强度随着SB的含量而先增大后减小,当SB含量在0.4wt%时,抗压强度最高可达1.6 MPa,比于纯PVA抗压强度提升了4倍。Wei等<sup>[105]</sup>研究促进h型血管的注射水凝胶,使用4%/2.67%的合成氨基改性明胶(Gel-CDH)/醛改性的透明质酸(HA-CHO)比例制作水凝胶,其抗拉强度在60%应变达到20 kPa。Stricher等<sup>[106]</sup>研究一种在组织功

能中使用的水凝胶,对纤维素/聚乙烯醇(PVA)复合支架的力学性能进行测试和分析,结果发现,盐浸出孔隙率的引入显著增加了材料的刚度,对于二醛纤维素(DAC)18%/PVA(2:1)水凝胶,模量从19.05 kPa增加到57.21 kPa。Gossla等<sup>[107]</sup>研究一种用于软骨组织工程的水凝胶,通过将海藻酸盐水凝胶与壳聚糖植绒支架(CFS+ALG)相结合,开发了具有各向异性特性的纤维增强水凝胶;在50%应变下,CFS+ALG试样的抗压强度最高,为(50.65±6.3) kPa,显著高于ALG试样的抗压强度[(29.45±5.3) kPa]。Yuan等<sup>[108]</sup>研究的水凝胶主要用于软骨组织工程中的药物传递,羧甲基纤维素-氧化软骨素(CMC-OCS)和CMC-OCS@KGN(卡托吉宁)水凝胶的压缩弹性模量分别为(4.90±0.68) kPa和(5.78±0.62) kPa,而水凝胶@MPs的压缩弹性模量明显大于CMC-OCS和CMC-OCS@KGN水凝胶[(23.40±1.34) kPa],表明与MPs混合可以显著改善其力学性能。Lee等<sup>[109]</sup>开发一种适用于软骨组织工程的三元可注射水凝胶,通过实验测量了不同含量的海藻酸钠(GG)、丝素蛋白(SF)和壳聚糖(CS)组成的水凝胶的力学性能。结果显示,随着GG含量的增加,水凝胶的初始弹性模量增加。同时,GG/SF/CS复合水凝胶的力学性能明显高于以前研究中的其他水凝胶材料。0.75%GG/3.25%SF/CS和1%GG/3%SF/CS水凝胶在应变增加时表现出更高的极限应力和强度,这可能是由于三元基体间的强相互作用和GG基体的高物理交联引起的。Zhang等<sup>[110]</sup>开发了一种用于软骨组织工程的新型酶交联丝素纳米硅酸盐增强水凝胶,发现将 $\alpha$ -淀粉掺入丝素蛋白(SF)显著提高了水凝胶的力学强度,SF-100水凝胶压缩模量为(65.61±8.39) kPa,显著高于SF水凝胶。Zhao等<sup>[111]</sup>采用双重交联的生物活性玻璃功能性水凝胶(GH-NbBG)来解决骨缺损修复的问题,与单纯的GH水凝胶相比,GH-NbB的压缩模量有着显著提高,达到70 kPa。

### 4.2 水凝胶的降解力学特性

水凝胶的降解性能直接影响其在体内的生物相容性和生物力学特性,在降解过程中水凝胶仍需要一定的力学特性来匹配修复组织及周围的力学环境。Nair等<sup>[112]</sup>对壳聚糖和聚羟基丁酸-共-戊酸酯(PHBV)复合水凝胶的降解进行研究,通过测量

复合水凝胶的刚度、弹性模量和黏性模量来评估其降解性能,发现水凝胶的黏性模量随着时间的推移而降低,表明其在降解过程中逐渐失去黏性。Dey等<sup>[88]</sup>研究发现,在降解过程中,水凝胶的刚度和强度逐渐降低,这是由于网络的聚合物链断裂导致整体交联密度降低。降解时间越长,水凝胶在两个方向上的性能变化越明显。该研究还发现,降解对于水凝胶模量的各向异性比没有明显的影响,表明凝胶-PEG杂化水凝胶的降解是均匀和均质的,这对于生物医学应用特别是药物递送非常关键。Re等<sup>[91]</sup>研究的壳聚糖水凝胶在降解 21 d 中虽然模量和强度都呈下降趋势,但是仍能保持 50% 的初始刚度和强度。目前应用于大段骨缺损、皮肤等承重部位的可降解水凝胶有很多相关研究<sup>[113-116]</sup>,但对于材料应用过程中的降解力学性能研究仍存在很多空白,未来工作中应予以关注。

## 5 总结与展望

本文归纳了水凝胶材料力学特性及其对细胞功能的调控作用和机制。可以看出,水凝胶的力学特性不仅关系到其在体内承重情况下的力学可靠性,其弹性模量及黏弹性能更直接影响细胞周围力学微环境从而调控细胞的生物学功能。然而水凝胶力学特性与外部载荷如何协同调控细胞功能的研究,仍存在很多未阐明的作用和机制。例如,水凝胶力学特性针对细胞的作用是否有一定规律,最终指向一个最优的力学参数?降解过程中的力学性能变化能否可控,使其适配疾病或再生修复的不同进程?用于承重部位的水凝胶材料,其降解疲劳特性如何保证其力学功能?此外,水凝胶力学特性调控细胞的机制研究,也将为组织再生修复和靶向递送药物等治疗方法提供新思路和新途径。

### 参考文献:

[ 1 ] LI P, ZHANG M, CHEN Z, *et al.* Tissue-engineered injectable gelatin-methacryloyl hydrogel-based adjunctive therapy for intervertebral disc degeneration [ J ]. ACS Omega, 2023, 8(15): 13509-13518.

[ 2 ] VOGEL V, SHEETZ M. Local force and geometry sensing regulate cell functions [ J ]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(4): 265-275.

[ 3 ] FEARING BV, HERNANDEZ PA, SETTON LA, *et al.*

Mechanotransduction and cell biomechanics of the intervertebral disc [ J ]. JOR Spine, 2018, 1(3): e1026.

[ 4 ] CHAUDHURI O, GU L, KLUMPERS D, *et al.* Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity [ J ]. Nat Mater, 2016, 15(3): 326-334.

[ 5 ] SILVER FH, BRADICA G, TRIA A. Elastic energy storage in human articular cartilage: Estimation of the elastic modulus for type II collagen and changes associated with osteoarthritis [ J ]. Matrix Biol, 2002, 21(2): 129-137.

[ 6 ] PASZEK MJ, ZAHIR N, JOHNSON KR, *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype [ J ]. Cancer Cell, 2005, 8(3): 241-254.

[ 7 ] BARRIGA EH, FRANZE K, CHARRAS G, *et al.* Tissue stiffening coordinates morphogenesis by triggering collective cell migration [ J ]. Nature, 2018, 554(7693): 523-527.

[ 8 ] THOMPSON AJ, PILLAI EK, DIMOV IB, *et al.* Rapid changes in tissue mechanics regulate cell behaviour in the developing embryonic brain [ J ]. Elife, 2019, 8: e39356.

[ 9 ] YE H WC, LI PC, JENG YM, *et al.* Elastic modulus measurements of human liver and correlation with pathology [ J ]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28(4): 467-474.

[ 10 ] WAHLSTEN A, STRACUZZI A, LÜCHTEFELD I, *et al.* Multiscale mechanical analysis of the elastic modulus of skin [ J ]. Acta Biomater, 2023, 170: 155-168.

[ 11 ] BAYRAKTAR HH, MORGAN EF, NIEBUR GL, *et al.* Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue [ J ]. J Biomech, 2004, 37(1): 27-35.

[ 12 ] SCHIAVI A, CUCCARO R, TROIA A. Functional mechanical attributes of natural and synthetic gel-based scaffolds in tissue engineering: Strain-stiffening effects on apparent elastic modulus and compressive toughness [ J ]. J Mech Behav Biomed Mater, 2022, 126: 105066.

[ 13 ] NAVARO Y, BLEICH-KIMELMAN N, HAZANOV L, *et al.* Matrix stiffness determines the fate of nucleus pulposus-derived stem cells [ J ]. Biomaterials, 2015, 49: 68-76.

[ 14 ] GILCHRIST CL, DARLING EM, CHEN J, *et al.* Extracellular matrix ligand and stiffness modulate immature nucleus pulposus cell-cell interactions [ J ]. PLoS One, 2011, 6(11): e27170.

[ 15 ] NIU L, JIA Y, WU M, *et al.* Matrix stiffness controls cardiac fibroblast activation through regulating YAP via AT<sub>1</sub>R [ J ]. J Cell Physiol, 2020, 235(11): 8345-8357.

[ 16 ] BEAMISH JA, CHEN E, PUTNAM AJ. Engineered extracellular matrices with controlled mechanics modulate renal proximal tubular cell epithelialization [ J ]. PLoS One, 2017, 12(7): e0181085.



- [17] ZHAO R, YANG L, HE S, *et al.* Nucleus pulposus cell senescence is regulated by substrate stiffness and is alleviated by LOX possibly through the integrin beta1-p38 MAPK signaling pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 417 (2): 113230.
- [18] KE W, LIAO Z, LIANG H, *et al.* Stiff substrate induces nucleus pulposus cell ferroptosis via YAP and N-cadherin mediated mechanotransduction [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(23): e2300458.
- [19] CALIARI SR, PEREPELYUK M, COSGROVE BD, *et al.* Stiffening hydrogels for investigating the dynamics of hepatic stellate cell mechanotransduction during myofibroblast activation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21387.
- [20] CHEN Y, LI P, CHEN X, *et al.* Endoplasmic reticulum-mitochondrial calcium transport contributes to soft extracellular matrix-triggered mitochondrial dynamics and mitophagy in breast carcinoma cells [J]. *Acta Biomater*, 2023, 169: 192-208.
- [21] LI X, LIU S, HAN S, *et al.* Dynamic stiffening hydrogel with instructive stiffening timing modulates stem cell fate *in vitro* and enhances bone remodeling *in vivo* [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023; e2300326.
- [22] WANG X, JI L, WANG J, *et al.* Matrix stiffness regulates osteoclast fate through integrin-dependent mechanotransduction [J]. *Bioact Mater*, 2023, 27: 138-153.
- [23] ARAGONA M, PANCIERA T, MANFRIN A, *et al.* A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors [J]. *Cell*, 2013, 154(5): 1047-1059.
- [24] TOTARO A, PANCIERA T, PICCOLO S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(8): 888-899.
- [25] DUPONT S, MORSUT L, ARAGONA M, *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction [J]. *Nature*, 2011, 474 (7350): 179-183.
- [26] HE C, WANG T, WANG Y, *et al.* ILK regulates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells through YAP-mediated mechanical memory [J]. *Oral Dis*, 2023, 29(1): 274-284.
- [27] LOOMIS T, HU LY, WOHLGEMUTH RP, *et al.* Matrix stiffness and architecture drive fibro-adipogenic progenitors' activation into myofibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 13582.
- [28] APRILE P, WHELAN IT, SATHY BN, *et al.* Soft hydrogel environments that facilitate cell spreading and aggregation preferentially support chondrogenesis of adult stem cells [J]. *Macromol Biosci*, 2022, 22(6): e2100365.
- [29] TIAN KK, HUANG SC, XIA XX, *et al.* Fibrous structure and stiffness of designer protein hydrogels synergize to regulate endothelial differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(4): 1777-1788.
- [30] NATTASIT P, NIIBE K, YAMADA M, *et al.* Stiffness-tunable hydrogel-sandwich culture modulates the YAP-mediated mechanoresponse in induced-pluripotent stem cell embryoid bodies and augments cardiomyocyte differentiation [J]. *Macromol Biosci*, 2023, 23(7): e2300021.
- [31] NARDONE G, OLIVER-DE LA CRUZ J, VRBSKY J, *et al.* YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15321.
- [32] ZHANG X, CAO D, XU L, *et al.* Harnessing matrix stiffness to engineer a bone marrow niche for hematopoietic stem cell rejuvenation [J]. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(4): 378-395. e8.
- [33] BLACKFORD SJI, YU TTL, NORMAN MDA, *et al.* RGD density along with substrate stiffness regulate hPSC hepatocyte functionality through YAP signalling [J]. *Biomaterials*, 2023, 293: 121982.
- [34] JAGIEŁŁO A, CASTILLO U, BOTVINICK E. Cell mediated remodeling of stiffness matched collagen and fibrin scaffolds [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 11736.
- [35] LI H, RAGHUNATHAN V, STAMER WD, *et al.* Extracellular matrix stiffness and TGFβ2 regulate YAP/TAZ activity in human trabecular meshwork cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 844342.
- [36] WANG B, KE W, WANG K, *et al.* Mechanosensitive ion channel piezo1 activated by matrix stiffness regulates oxidative stress-induced senescence and apoptosis in human intervertebral disc degeneration [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, doi: 10.1155/2021/8884922. eCollection, 2021.
- [37] KE W, WANG B, LIAO Z, *et al.* Matrix stiffness induces Drp1-mediated mitochondrial fission through Piezo1 mechanotransduction in human intervertebral disc degeneration [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 711.
- [38] EMIG R, KNOTT W, KRUSSIG MJ, *et al.* Piezo1 channels contribute to the regulation of human atrial fibroblast mechanical properties and matrix stiffness sensing [J]. *Cells*, 2021, 10(3): 663.
- [39] LIU X, NIU W, ZHAO S, *et al.* Piezo1: The potential new therapeutic target for fibrotic diseases [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2023, 184: 42-49.
- [40] FEARING BV, JING L, BARCELLONA MN, *et al.* Mechanosensitive transcriptional coactivators MRTF-A and YAP/TAZ regulate nucleus pulposus cell phenotype through cell shape [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 14022-14035.

- [41] CHAUDHURI O. Viscoelastic hydrogels for 3D cell culture [J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(8): 1480-1490.
- [42] NELSON CM, BISSELL MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: Tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer [J]. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 2006, 22: 287-309.
- [43] WANG N, TYTELL JD, INGBER DE. Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2009, 10(1): 75-82.
- [44] BROWN TE, CARBERRY BJ, WORRELL BT, *et al.* Photopolymerized dynamic hydrogels with tunable viscoelastic properties through thioester exchange [J]. *Biomaterials*, 2018, 178: 496-503.
- [45] LOU JZ, STOWERS R, NAM SM, *et al.* Stress relaxing hyaluronic acid-collagen hydrogels promote cell spreading, fiber remodeling, and focal adhesion formation in 3D cell culture [J]. *Biomaterials*, 2018, 154: 213-222.
- [46] MAROZAS IA, ANSETH KS, COOPER-WHITE JJ. Adaptable boronate ester hydrogels with tunable viscoelastic spectra to probe timescale dependent mechanotransduction [J]. *Biomaterials*, 2019, 223: 119430.
- [47] CHAUDHURI O, GU L, DARNELL M, *et al.* Substrate stress relaxation regulates cell spreading [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6364.
- [48] XU XY, FENG Q, MA X, *et al.* Dynamic gelatin-based hydrogels promote the proliferation and self-renewal of embryonic stem cells in long-term 3D culture [J]. *Biomaterials*, 2022, 289: 121802.
- [49] YANG BG, WEI KC, LOEBEL C, *et al.* Enhanced mechanosensing of cells in synthetic 3D matrix with controlled biophysical dynamics [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3514.
- [50] YUAN X, YUAN WH, DING L, *et al.* Cell-adaptable dynamic hydrogel reinforced with stem cells improves the functional repair of spinal cord injury by alleviating neuroinflammation [J]. *Biomaterials*, 2021, 279: 121190.
- [51] ARKENBERG MR, DIMMITT NH, JOHNSON HC, *et al.* Dynamic click hydrogels for xeno-free culture of induced pluripotent stem cells [J]. *Adv Biosyst*, 2020, 4(11): e2000129.
- [52] LIU CJ, YU QF, YUAN ZQ, *et al.* Engineering the viscoelasticity of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels via small "dynamic bridges" to regulate BMSC behaviors for osteochondral regeneration [J]. *Bioact Mater*, 2023, 25: 445-459.
- [53] NAJMINA M, EBARA M, OHMURA T, *et al.* Viscoelastic liquid matrix with faster bulk relaxation time reinforces the cell cycle arrest induction of the breast cancer cells via oxidative stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(23): 14637.
- [54] LIU YN, SEGURA T. Biomaterials-Mediated Regulation of Macrophage Cell Fate [J]. *Front Bioeng Biotech*, 2020, 8: 609297.
- [55] FENG Q, WEI KC, LIN SE, *et al.* Mechanically resilient, injectable, and bioadhesive supramolecular gelatin hydrogels crosslinked by weak host-guest interactions assist cell infiltration and in situ tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2016, 101: 217-228.
- [56] MAJEDI FS, HASANI-SADRABADI MM, THAULAND TJ, *et al.* T-cell activation is modulated by the 3D mechanical microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2020, 252: 120058.
- [57] VINING KH, STAFFORD A, MOONEY DJ. Sequential modes of crosslinking tune viscoelasticity of cell-instructive hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2019, 188: 187-197.
- [58] LIU LC, HUANG T, XIE Z, *et al.* Liquid crystalline matrix-induced viscoelastic mechanical stimulation modulates activation and phenotypes of macrophage [J]. *J Biomater Appl*, 2023, 37(9): 1568-1581.
- [59] WHITEHEAD J, GRIFFIN KH, GIONET-GONZALES M, *et al.* Hydrogel mechanics are a key driver of bone formation by mesenchymal stromal cell spheroids [J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120607.
- [60] JUNG H, PARK JS, YEOM J, *et al.* 3D tissue engineered supramolecular hydrogels for controlled chondrogenesis of human mesenchymal stem cells [J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15(3): 707-714.
- [61] LIN X, LIU Y, BAI AB, *et al.* A viscoelastic adhesive epicardial patch for treating myocardial infarction [J]. *Nat Biomed Eng*, 2019, 3(8): 632-643.
- [62] WU DT, DIBA M, YANG SPN, *et al.* Hydrogel viscoelasticity modulates migration and fusion of mesenchymal stem cell spheroids [J]. *Bioeng Transl Med*, 2022, 8(3): e10464.
- [63] ELOSEGUI-ARTOLA A, GUPTA A, NAJIBI AJ, *et al.* Matrix viscoelasticity controls spatiotemporal tissue organization [J]. *Nat Mater*, 2023, 22(1): 117-127.
- [64] URBAN JPG, ROBERTS S. Degeneration of the intervertebral disc [J]. *Arthritis Res Ther*, 2003, 5(3): 120-130.
- [65] IATRIDIS JC, NICOLL SB, MICHALEK AJ, *et al.* Role of biomechanics in intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: What needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair? [J]. *Spine J*, 2013, 13(3): 243-262.
- [66] DETIGER SEL, HOOGENDOORN RJW, VAN DER VEEN AJ, *et al.* Biomechanical and rheological characterization of mild intervertebral disc degeneration in a large animal

- model [J]. *J Orthop Res*, 2013, 31(5): 703-709.
- [67] BHADOURIA N, BERMAN AG, WALLACE JM, *et al.* Raloxifene Stimulates Estrogen Signaling to Protect Against Age- and Sex-Related Intervertebral Disc Degeneration in Mice [J]. *Front Bioeng Biotech*, 2022, 10: 924918.
- [68] BOXBERGER JI, ORLANSKY AS, SEN S, *et al.* Reduced nucleus pulposus glycosaminoglycan content alters intervertebral disc dynamic viscoelastic mechanics [J]. *J Biomech*, 2009, 42(12): 1941-1946.
- [69] JIA HR, LIN X, WANG D, *et al.* Injectable hydrogel with nucleus pulposus-matched viscoelastic property prevents intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Transl*, 2022, 33: 162-173.
- [70] MARSHALL SL, JACOBSEN TD, EMSBO E, *et al.* Three-dimensional-printed flexible scaffolds have tunable biomimetic mechanical properties for intervertebral disc tissue engineering [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(12): 5836-5849.
- [71] CHEN YC, SU WY, YANG SH, *et al.* *In situ* forming hydrogels composed of oxidized high molecular weight hyaluronic acid and gelatin for nucleus pulposus regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(2): 5181-5193.
- [72] LEONE G, CONSUMI M, LAMPONI S, *et al.* Thixotropic PVA hydrogel enclosing a hydrophilic PVP core as nucleus pulposus substitute [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 98: 696-704.
- [73] CHUNG TW, CHEN WP, TAI PW, *et al.* Roles of silk fibroin on characteristics of hyaluronic acid/silk fibroin hydrogels for tissue engineering of nucleus pulposus [J]. *Materials*, 2020, 13(12): 2750.
- [74] LEONE G, TORRICELLI P, CHIUMIENTO A, *et al.* Amidic alginate hydrogel for nucleus pulposus replacement [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 84(2): 391-401.
- [75] NAM S, LEE J, BROWNFIELD DG, *et al.* Viscoplasticity enables mechanical remodeling of matrix by cells [J]. *Biophys J*, 2016, 111(10): 2296-2308.
- [76] BURRIDGE K, CHRZANOWSKAWODNICKA M. Focal adhesions, contractility, and signaling [J]. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 1996, 12: 463-518.
- [77] CAMERON AR, FRITH JE, COOPER-WHITE JJ. The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(26): 5979-5993.
- [78] CHARRIER EE, POGODA K, WELLS RG, *et al.* Control of cell morphology and differentiation by substrates with independently tunable elasticity and viscous dissipation [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 449.
- [79] HUANG DY, LI YH, MA ZH, *et al.* Collagen hydrogel viscoelasticity regulates MSC chondrogenesis in a ROCK-dependent manner [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(6): eade9497.
- [80] KNAPP DM, BAROCAS VH, MOON AG, *et al.* Rheology of reconstituted type I collagen gel in confined compression [J]. *J Rheol*, 1997, 41(5): 971-993.
- [81] CAMERON AR, FRITH JE, GOMEZ GA, *et al.* The effect of time-dependent deformation of viscoelastic hydrogels on myogenic induction and Rac1 activity in mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(6): 1857-1868.
- [82] SCHOFIELD AV, BERNARD O. Rho-associated coiled-coil kinase (ROCK) signaling and disease [J]. *Crit Rev Biochem Mol*, 2013, 48(4): 301-316.
- [83] GAO L, MCBEATH R, CHEN CS. Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(3): 564-572.
- [84] ROTH JG, HUANG MS, NAVARRO RS, *et al.* Tunable hydrogel viscoelasticity modulates human neural maturation [J]. *Sci Adv*, 2023, 9(42): eadh8313.
- [85] LI M, WU Y, LI H, *et al.* Nanofiber reinforced alginate hydrogel for leak-proof delivery and higher stress loading in nucleus pulposus [J]. *Carbohydr Polym*, 2023, 299: 120193.
- [86] HO CY, WANG CC, WU TC, *et al.* Peptide-functionalized double network hydrogel with compressible shape memory effect for intervertebral disc regeneration [J]. *Bioeng Transl Med*, 2023, 8(2): e10447.
- [87] BRISSENDEN AJ, AMSDEN BG. *In situ* forming macroporous biohybrid hydrogel for nucleus pulposus cell delivery [J]. *Acta Biomater*, 2023, 170: 169-184.
- [88] DEY K, AGNELLI S, SARTORE L. Designing viscoelastic gelatin-PEG macroporous hybrid hydrogel with anisotropic morphology and mechanical properties for tissue engineering application [J]. *Micro*, 2023, 3(2): 434-457.
- [89] XIANG C, ZHANG X, ZHANG J, *et al.* A porous hydrogel with high mechanical strength and biocompatibility for bone tissue engineering [J]. *J Funct Biomater*, 2022, 13(3): 140.
- [90] JIA H, LIN X, WANG D, *et al.* Injectable hydrogel with nucleus pulposus-matched viscoelastic property prevents intervertebral disc degeneration [J]. *J Orthop Transl*, 2022, 33: 162-173.
- [91] RE F, SARTORE L, MOULISOVA V, *et al.* 3D gelatin-chitosan hybrid hydrogels combined with human platelet lysate highly support human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation [J]. *J Tissue Eng*, 2019, 10: 2041731419845852.
- [92] YU T, HU Y, HE W, *et al.* An injectable and self-healing hydrogel with dual physical crosslinking for *in-situ* bone formation [J]. *Mater Today Bio*, 2023, 19: 100558.

- [93] HU Z, CHENG J, XU S, *et al.* PVA/pectin composite hydrogels inducing osteogenesis for bone regeneration [J]. *Mater Today Bio*, 2022, 16: 100431.
- [94] DONG L, HAN Z, LI X. Tannic Acid-mediated Multifunctional 3D Printed Composite Hydrogel for Osteochondral Regeneration [J]. *Int J Bioprint*, 2022, 8 (3): 587.
- [95] HU J, LU Y, CAI L, *et al.* Functional compressive mechanics and tissue biocompatibility of an injectable SF/PU hydrogel for nucleus pulposus replacement [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2347.
- [96] YUAN F, ZHANG XX, WU K, *et al.* Damping chitin hydrogels by harnessing insect-cuticle-inspired hierarchical structures [J]. *Cell Rep Phys Sci*, 2023, 4(11): 101644.
- [97] FRANK V, KAUFMANN S, WRIGHT R, *et al.* Frequent mechanical stress suppresses proliferation of mesenchymal stem cells from human bone marrow without loss of multipotency [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24264.
- [98] YU L, CAI Y, WANG H, *et al.* Biomimetic bone regeneration using angle-ply collagen membrane-supported cell sheets subjected to mechanical conditioning [J]. *Acta Biomater*, 2020, 112: 75-86.
- [99] ZHANG WD, WANG H, CHU GL, *et al.* Mechanically conditioned multilayered angle-ply collagen scaffolds promote annulus fibrosus regeneration [J]. *Appl Mater Today*, 2023, 31: 101751.
- [100] YU N, PRODANOV L, TE RIET J, *et al.* Regulation of periodontal ligament cell behavior by cyclic mechanical loading and substrate nanotexture [J]. *J Periodontol*, 2013, 84(10): 1504-1513.
- [101] WANG Q, HUANG HY, WEI K, *et al.* Time-dependent combinatory effects of active mechanical loading and passive topographical cues on cell orientation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(10): 2191-2201.
- [102] CHEN T, QIAN Q, MAKVANDI P, *et al.* Engineered high-strength biohydrogel as a multifunctional platform to deliver nucleic acid for ameliorating intervertebral disc degeneration [J]. *Bioact Mater*, 2023, 25: 107-121.
- [103] ALINEJAD Y, ADOUNGOTCHODO A, GRANT MP, *et al.* Injectable chitosan hydrogels with enhanced mechanical properties for nucleus pulposus regeneration [J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25(5-6): 303-313.
- [104] CUI L, CHEN J, YAN C, *et al.* Mechanical and biotribological properties of PVA/SB triple-network hydrogel for biomimetic artificial cartilage [J]. *J Bionic Eng*, 2022, 20(3): 1072-1082.
- [105] WEI J, DUAN D, JING Y, *et al.* Heparin-conjugated injectable hydrogels with sustained releasing capability for promotion of H-type vessels formation and rat femoral bone defects repair [J]. *Mater Design*, 2023, 235: 112407.
- [106] STRICHER M, SARDE CO, GUENIN E, *et al.* Cellulosic/polyvinyl alcohol composite hydrogel: Synthesis, characterization and applications in tissue engineering [J]. *Polymers*, 2021, 13(20): 3598.
- [107] GOSSLA E, BERNHARDT A, TONNDORF R, *et al.* Anisotropic chitosan scaffolds generated by electrostatic flocking combined with alginate hydrogel support chondrogenic differentiation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (17): 9341.
- [108] YUAN FZ, WANG HF, GUAN J, *et al.* Fabrication of injectable chitosan-chondroitin sulfate hydrogel embedding kartogenin-loaded microspheres as an ultrasound-triggered drug delivery system for cartilage tissue engineering [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(9): 1487.
- [109] LEE S, CHOI J, YOUN J, *et al.* Development and evaluation of gellan gum/silk fibroin/chondroitin sulfate ternary injectable hydrogel for cartilage tissue engineering [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1184.
- [110] ZHANG W, ZHANG Y, ZHANG A, *et al.* Enzymatically crosslinked silk-nanosilicate reinforced hydrogel with dual-lineage bioactivity for osteochondral tissue engineering [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 127: 112215.
- [111] ZHAO F, YANG Z, XIONG H, *et al.* A bioactive glass functional hydrogel enhances bone augmentation via synergistic angiogenesis, self-swelling and osteogenesis [J]. *Bioact Mater*, 2023, 22: 201-210.
- [112] NAIR MB, BARANWAL G, VIJAYAN P, *et al.* Composite hydrogel of chitosan-poly (hydroxybutyrate-co-valerate) with chondroitin sulfate nanoparticles for nucleus pulposus tissue engineering [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, 136: 84-92.
- [113] XU X, SONG J. Segmental long bone regeneration guided by degradable synthetic polymeric scaffolds [J]. *Biomater Transl*, 2020, 1(1): 33-45.
- [114] HU Y, XIONG Y, TAO R, *et al.* Advances and perspective on animal models and hydrogel biomaterials for diabetic wound healing [J]. *Biomater Transl*, 2022, 3 (3): 188-200.
- [115] DING XY, YU YR, YANG CY, *et al.* Multifunctional GO hybrid hydrogel scaffolds for wound healing [J]. *Research*, 2022, 2022: 9850743.
- [116] CHEN WK, ZHANG H, ZHOU QR, *et al.* Smart hydrogels for bone reconstruction via modulating the microenvironment [J]. *Research*, 2023, 6: 0089.