高等学校化学学报
CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES
研究论文

负载新型多肽CFAP1的水凝胶敷料在伤口修复中的应用

汪德州，韩春雨，高愉淇，杨　爽，宋文植
（吉林大学中日联谊医院口腔科，长春 130033）

摘要　首先通过固相合成方法制备了含有壳聚糖特异性结合结构域(ChiBD)的成纤维细胞生长因子模拟肽(CFAP1)，CFAP1中的ChiBD序列能够与壳聚糖材料特异性地结合；随后将CFAP1与甲基丙烯酰化羧甲基壳聚糖(CCSMA)按优化的比例共混，通过光固化法制备了一种新型创面修复水凝胶——CCSMA@CFAP1水凝胶．研究结果表明，CCSMA@CFAP1水凝胶对大肠杆菌(*E.coli*)和金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)的生长有明显的抑制作用，并且具有突出的抗氧化特性．同时，CCSMA@CFAP1水凝胶能够显著促进NIH-3T3成纤维细胞的黏附与增殖，并上调细胞中I型胶原蛋白(COL-1)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达．动物实验结果表明，CCSMA@CFAP1能够通过抑制过度炎症、促进组织血管化和组织再生．在修复264 h后，CCSMA@CFAP1组的伤口愈合率达到94.68%．同时，CCSMA@CFAP1水凝胶具有良好的生物安全性．本文研究结果可为相关材料在创面修复方面的应用提供理论和实践数据．

关键词　成纤维细胞生长因子模拟肽；甲基丙烯酰化羧甲基壳聚糖；光固化水凝胶；创面修复
中图分类号　O631　　**文献标志码**　A　　doi：10.7503/cjcu20260015

Application of Hydrogel Dressings Loaded with a Novel Polypeptide CFAP1 in Wound Repair

WANG Dezhou，HAN Chunyu，GAO Yuqi，YANG Shuang，SONG Wenzhi*
（*Stomatology Department*，*China-Japan Union Hospital of Jilin University*，*Changchun* 130033，*China*）

Abstract　A fibroblast growth factor mimetic peptide（CFAP1）containing chitosan-binding domain（ChiBD）was first synthesized *via* the solid-phase synthesis method. The ChiBD sequence in CFAP1 enables specific binding to chitosan-based materials. CFAP1 was blended with carboxymethyl chitosan methacrylate（CCSMA）at an optimized ratio to fabricate a novel wound repair hydrogel through the photo-crosslinking approach. The results demonstrated that the CCSMA@CFAP1 hydrogel exerted a significant inhibitory effect on the growth of *Escherichia coli*（*E.coli*）and *Staphylococcus aureus*（*S.aureus*），and exhibited prominent antioxidant properties. Meanwhile，this hydrogel could remarkably enhance the adhesion and proliferation of NIH-3T3 fibroblasts，as well as upregulate the expression of Type I Collagen（COL-1）and Vascular Endothelial Growth Factor（VEGF）in the cells. The results of *in vivo* study indicated that CCSMA@CFAP1 accelerated wound healing by suppressing excessive inflammation，promoting tissue vascularization. After 264 h of repair，the wound healing rate of the CCSMA@CFAP1 group reached 94.68%. Furthermore，the CCSMA@CFAP1 hydrogel possessed favorable biosafety profiles. Collectively，this research provides theoretical and experimental evidence for the application of related materials in wound repair.

Keywords　Fibroblast growth factor mimetic peptide；Carboxymethyl chitosan methacrylate；Photo-crosslinked hydrogel；Wound healing

收稿日期：2026-01-06. 网络首发日期：2026-04-03.
联系人简介：宋文植，女，博士，教授，主要从事口腔组织再生及口腔先进材料方面的研究．E-mail: songwz@jlu.edu.cn
基金项目：吉林省自然科学基金(批准号: YDZJ202501ZYTS314)资助．
Supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province, China(No.YDZJ202501ZYTS314).

创面管理是一项重要的基础医疗课题，涉及抗菌、抗炎、促血管化及促愈合等多个核心需求[1]. 创面愈合过程中涉及到一系列生理过程，需要性能适用的创面敷料辅助并改善创面修复效果. 目前已开发出多种类型的创面敷料，如水凝胶、凝胶海绵、静电纺丝支架及薄膜等[2,3]. 其中，水凝胶被认为是最具应用潜力的候选材料. 水凝胶具有与天然细胞外基质(ECM)相似的疏松多孔结构，有利于细胞迁移与增殖，同时能够维持创面湿润微环境、调控过量组织渗出液、允许氧气和营养物质扩散，并保护创面免受进一步损伤[4]. 从临床应用角度看，水凝胶可在不规则创面部位形成物理屏障，便于抗菌、抗氧化或抗炎药物的递送和缓释，提高治疗效果，减少副作用，加速组织修复[5,6]. 然而，传统水凝胶通常面临力学稳定性不足、降解速率难以匹配创面愈合进程及生物活性单一等问题，限制了其临床应用效果. 如何开发兼具优异生物相容性和多元生物活性(如协同抗菌-抗炎-促修复)的水凝胶敷料成为当前创面修复材料领域的研究难点.

近年来，多糖基水凝胶因其良好的生物相容性、生物可降解性和促进愈合的生物活性而备受关注. 其含有的羟基、羧基及氨基等活性官能团为多糖的衍生化修饰提供了结构基础，有助于通过多样化交联反应构建水凝胶[7,8]. 在天然多糖中，壳聚糖(Chitosan，CS)是一类重要的阳离子碱性多糖，具有理想的生物安全性及低免疫原性，且兼具抗菌、抗氧化及止血活性[9,10]. 然而，壳聚糖的水溶性较差，这一特性限制了其在水凝胶创面敷料领域的应用. 通过CS的碱化和羧甲基化反应制备的羧甲基壳聚糖(Carboxymethyl chitosan，CMCS)不仅保留了壳聚糖原有的优良特性，还大幅改善了其水溶性[11]. 改性后的CMCS分子同时含有阳离子NH_3^+与阴离子COO^-，反应活性显著提升[12]. 研究结果表明，CMCS能够促进皮肤成纤维细胞增殖，并可增强成纤维细胞的胞外溶菌酶活性[13]. 此外，基于CMCS构建的水凝胶敷料在创面愈合过程中可促进透明质酸合成、抑制细菌感染，同时还能显著促进细胞增殖、血管新生及胶原蛋白沉积[14]. 此外，可控的成胶速率也是创伤修复水凝胶的核心性能指标之一，直接决定材料的临床适用性. 通过甲基丙烯酸酯化改性可在CMCS分子中引入光敏乙烯基基团. 该基团在紫外光照射下可参与自由基聚合反应，使甲基丙烯酰化羧甲基壳聚糖(CCSMA)水溶液在光照下数秒内转化为交联的CCSMA水凝胶网络，增强了该水凝胶材料的易用性[15]. 尽管CCSMA水凝胶通过改性克服了诸多缺陷，兼具良好的生物相容性、反应可控性与临床易用性，但单一CCSMA水凝胶生物活性仍存在显著局限，难以精准匹配创面愈合各阶段的动态需求，尤其在应对慢性创面(如糖尿病足溃疡)等复杂创面环境时，其促修复效能往往不足.

为了提升创面敷料的治疗效果，多种有益因子被用于修饰材料表面. 其中，成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor，FGF)对细胞生长和组织血管化具有积极调控作用，在皮肤再生过程中发挥着关键功效[16,17]. FGF受体(FGF receptor，FGFR)激动肽(FGFR-agonistic peptide 1，FAP1)作为FGFs的替代物，可以特异性地使FGFR磷酸化，并激活丝裂原激活的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases，MAPKs). 在体外，FAP1可诱导细胞增殖并加速伤口愈合. 在体内，FAP1通过增加胶原蛋白的生成及促进角质形成细胞和成纤维细胞的迁移和增殖来改善糖尿病伤口愈合[18]. 作为一种小分子模拟肽，FAP1凭借其独特的分子设计与理化特性，在稳定性、安全性、生产成本及生物材料适配性等方面有显著优势. 然而，小分子多肽进入体内后易从创面部位快速稀释扩散，导致其在体内应用时的生物活性受限[19]. 为了降低活性分子的不稳定性和扩散性，Wang等[20]在碱性成纤维细胞生长因子(basic FGF，bFGF)中引入了几丁质特异性结合结构域(Chitin binding domain，ChtBD)，构建了一种具有优异的促细胞化与促血管生成活性的新型融合蛋白ChtBD-bFGF. 与天然bFGF相比，ChtBD-bFGF在几丁质膜表面的吸附能力显著增强. 进一步研究发现，结合于材料表面的ChtBD-bFGF可有效促进细胞的黏附与增殖及血管的生成.

为了提高FAP1与CCSMA水凝胶的结合能力，提高其时效性，本文通过固相合成法制备了含有壳聚糖特异结合结构域(Chitosan binding domain，ChiBD)的FAP1(CFAP1)；然后将CFAP1与CCSMA按优化的比例共混，通过光固化的方法制备新型创面修复水凝胶(CCSMA@CFAP1)；通过体外实验和大鼠全层皮肤缺损修复实验，检测了CCSMA@CFAP1水凝胶的抗菌性、生物相容性、生物活性和促进创面

修复能力，为相关材料在创面修复方面的应用提供了理论和实践数据.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

CCSMA，苏州EFL公司；锂苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基磷酸盐(LAP，纯度≥95%)，美国Sigma-Aldrich公司；胰蛋白胨和酵母提取物，美国Oxoid公司；Calcein AM试剂盒，上海碧云天生物技术有限公司；DMEM培养基(高糖)和磷酸盐缓冲液(PBS，pH值为7.2~7.4)，武汉赛维尔科技有限公司；胎牛血清，美国Gibco公司；细胞计数试剂盒(CCK-8)、胰蛋白酶消化液(质量分数0.25%)、罗丹明标记鬼笔环肽和活性氧物种(ROS)检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；兔抗鼠血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、I型胶原(COL-I)单克隆抗体和羊抗兔FITC荧光标记二抗，美国Invitrogen公司；大肠杆菌(*E. coli*，革兰氏阴性菌)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*，革兰氏阳性菌)，中国工业微生物菌种保藏管理中心；小鼠胚胎成纤维细胞系(NIH3T3)，中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库；雄性SD大鼠，辽宁长生生物技术股份有限公司.

Gemini-2型扫描电子显微镜(SEM)，德国Zeiss公司；Maestro型小动物活体成像仪，美国CRi公司；E80i型倒置荧光显微镜，日本Nikon公司；LDZX-75L型立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂；WDW-5kN型万能试验机，长春新特试验机有限公司；SW-CJ-1BU型超净工作台，苏州净化设备厂；THZ-320型恒温摇床，上海精宏实验设备有限公司；M200型多功能酶标仪，瑞士Tecan公司；Tissue FAXS型全景组织显微成像系统，德国Zeiss公司；PYXE-80IR型CO_2培养箱，青岛海尔生物医疗股份有限公司.

1.2 实验过程

1.2.1 多肽的设计与合成 根据FAP1(RERNE VNHYR TY)[18]和ChiBD(TTNPG VSAWQ VNTAY TAGQL VTYNG KTYKC LQPHT SLAGW EPSNV PALWQ LQ)[20]的氨基酸序列设计CFAP1的序列，并在两段氨基酸序列之间添加由3个连续的甘氨酸组成的柔性链，避免空间折叠产生的位阻影响多肽功能. 委托吉尔生化(上海)股份有限公司合成CFAP1多肽(TTNPG VSAWQ VNTAY TAGQL VTYNG KTYKC LQPHT SLAGW EPSNV PALWQ LQGGG RERNE VNHYR TY). 采用固相合成法将多肽链从C端到N端逐步偶联在不溶性树脂上，通过重复脱保护-偶联-洗涤循环实现肽链延伸，最后切割纯化得到目标肽FITC-CFAP1，FITC-FAP1和FAP1，并用于多肽与水凝胶结合能力检测，其中FAP1作为实验对照组.

1.2.2 水凝胶的制备与理化性质表征 用PBS配制含有不同浓度(10 ng/mL，100 ng/mL，1 μg/mL和10 μg/mL)的CFAP1多肽溶液. 然后使用不同浓度的CFAP1多肽溶液配制0.25%(质量分数)LAP光引发剂. 分别将1mL含有不同浓度CFAP1多肽的LAP光引发剂溶液加入到20 mg的CCSMA中，反复振荡使CCSMA充分溶解. 最后将混合溶液超声脱泡5 min后，分别吸取0.1 mL混合溶液到96孔板中，置于405 nm紫外光下照射10 s至溶液完全凝胶化，形成CCSMA@CFAP1复合水凝胶块. 通过检测大鼠背部包埋后植入部位的血管化程度来确定最佳的CFAP1浓度，以不含CFAP1多肽的水凝胶作为Control组. 对各组水凝胶的外观进行观察并拍照；将各组水凝胶进行冷冻干燥处理，液氮冷冻后进行脆断，利用SEM观察材料脆断面的微观形貌.

利用万能试验机检测水凝胶的力学性能. 将水凝胶样品放置在拉伸夹具中，设定预加载力为0.005 N，拉伸速度1 mm/min；沿纵轴方向施加静态拉伸负荷，直至样品被拉断；在拉伸过程中，记录不同应变下的负荷变化.

为了检测多肽与水凝胶的结合能力，分别将100 mg水凝胶加入到的FITC-CFAP1(1 μg/mL)和FITC-FAP1(1 μg/mL)溶液中于37 ℃孵育2 h；用PBS充分冲洗水凝胶后，利用小动物活体成像仪对水凝胶中结合的CFAP1与FAP1多肽进行拍摄.

为了检测水凝胶中多肽的释放行为，将100 mg 1 μg/mL的CFAP1水凝胶浸泡于3 mL的PBS(pH=7.2)中，并置于避光的37 ℃恒温摇床中(50 r/min). 于设定的时间点吸取1 mL上清液，并补充1 mL新

鲜的PBS；利用酶标仪检测上清液样品的荧光强度，通过标准曲线换算成多肽浓度，最终得到水凝胶中多肽的累计释放率.

1.2.3 水凝胶的体外活性检测 将解冻复苏的NIH-3T3细胞在37 ℃及5%(体积分数)CO_2条件下进行培养传代. 将CCSMA组、CCSMA@FAP1组及CCSMA@CFAP1组水凝胶铺展于24孔板孔内并光照固化，随后将1×10^5个细胞培养至第三代的NIH-3T3细胞均匀地点滴于水凝胶表层，置于细胞培养箱中在37 ℃、5%(体积分数)CO_2条件下培养24 h；用吸管吸出培养基，并加入PBS清洗除去未黏附的细胞；加入Calcein-AM荧光染液，完全覆盖住水凝胶支架，于常温染色10 min后除去染液，并使用PBS洗涤2次；将处理好的样本置于荧光倒置显微镜下，观察细胞的黏附情况.

将水凝胶铺展于96孔板孔内并光照固化，随后将1×10^4个细胞培养至第3代的NIH-3T3细胞种植于96孔板中，放入细胞培养箱中在37 ℃、5%(体积分数)CO_2条件下培养；分别于培养的第24 h和第72 h移除细胞培养基，每孔加入100 μL CCK-8工作液. 在37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中孵育培养4 h后，用酶标仪检测450 nm处的吸光度值，评价细胞的增殖活力.

通过划痕愈合实验检测水凝胶的促细胞迁移和生长能力. 向24孔板的每个孔中加入约5×10^4个细胞，在37 ℃、5%(体积分数)CO_2细胞培养箱中孵育培养24 h后，使用无菌的10 μL移液器吸头，垂直于孔板进行划痕操作；划痕后，使用PBS对细胞进行3次洗涤，去除被划下的细胞，用Calcein-AM染色液染色并拍照记录.

通过免疫荧光染色检测了水凝胶促进细胞内关键蛋白表达的能力. 将水凝胶铺展于24孔板孔内并光照固化，随后将5×10^4个细胞培养至第3代的NIH-3T3细胞种植于水凝胶表层，放入细胞培养箱中培养72 h；用吸管吸出培养基，用4%多聚甲醛(PFA)固定细胞15 min；吸出PFA并用PBS充分清洗；用含有1%(质量分数)牛血清白蛋白(BSA)和0.25%(体积分数)Triton-X 100的PBS溶液封闭细胞，然后依次用一抗和二抗对细胞进行抚育孵育染色；最后，分别使用DAPI和罗丹明标记的鬼笔环肽对细胞核和细胞骨架进行染色；染色完成后，在荧光显微镜下观察并拍摄照片.

1.2.4 水凝胶的抗菌性能检测 将10 mL *E. coli*或*S. aureus*菌液(浓度1×10^4 CFU/mL)分别与100 mg不同水凝胶共孵育，孵育条件为37 ℃下以150 r/min的速度振荡1 h；孵育结束后，将10 mL菌液以4000*g*的速度离心10 min，弃去上清液后用1 mL PBS重新悬浮沉淀菌体；将100 μL稀释1000倍的菌液均匀涂布于固体LB琼脂平板上，于37 ℃孵育12 h后观察菌落生长情况，计数菌落形成单位(CFU)数量.

1.2.5 水凝胶的抗氧化性能检测 为评估支架材料的抗氧化能力，检测了与水凝胶共培养细胞内的ROS水平. 实验操作流程如下：将5×10^4个细胞接种于24孔板中培养24 h，加入终浓度100 μmol/L的过氧化氢(H_2O_2)和不同的水凝胶材料共培养12 h后，除去培养基并用PBS洗掉残留的H_2O_2，并加入浓度为10 μmol/L的2′,7′-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)溶液中，于37 ℃孵育20 min；用荧光显微镜进行观察拍照，并采用Image J软件对免疫荧光染色结果进行定量分析.

1.2.6 水凝胶的创面修复效果检测 本文涉及的动物实验方案均通过长春维石检测技术服务有限公司实验动物福利伦理委员会审查，所有实验操作严格遵循相关规范进行. 选取8周龄SD大鼠(体重约200 g)，随机分为对照组(control)、CCSMA组、CCSMA@FAP1组及CCSMA@CFAP1组，每组4只；经小动物麻醉机吸入异氟烷进行全身麻醉后对其背部进行备皮处理；随后于背部构建直径10 mm的圆形全层皮肤缺损创面；将不同组别水凝胶预混液均匀滴注并覆盖创面，采用便携式光源照射促使水凝胶固化成型；对照组不加任何材料；术后于多个时间节点(术后24，72，120，168，216和264 h)对创面进行观察与拍照，评估创面闭合情况；术后11 d对大鼠实施安乐死，取创面修复部位组织标本，依次进行苏木精-伊红(H&E)染色、Masson染色及免疫荧光染色，并采用Image J软件对免疫荧光染色结果进行定量分析.

1.2.7 水凝胶的生物安全性检测 为评估支架材料体内植入后的生物安全性，收集处死动物的心脏、肝脏、脾脏、肺脏及肾脏等主要脏器. 将脏器标本置于4%(质量分数)多聚甲醛溶液中固定，经石蜡包埋后制备成3 μm厚的组织切片；对切片进行H&E染色后，观察组织是否出现典型病理特征.

2 结果与讨论

2.1 不同CFAP1含量的水凝胶的促体内血管生成能力

为了确定水凝胶中CFAP1的最适添加量，研究了不同CFAP1含量的CCSMA水凝胶的体内促血管生成效果．图1为植入不同CFAP1含量的CCSMA水凝胶的组织中CD31免疫荧光染色图，绿色荧光代表组织中的CD31．结果表明，含CFAP1水凝胶组周围组织的绿色荧光强度要显著高于Control组（$p<0.05$），说明水凝胶中的CFAP1可以有效促进组织血管化．此外，当水凝胶中的CFAP1含量不超过1 μg/mL时，组织中的绿色荧光强度随着CFAP1含量的增加而显著升高（$p<0.05$）；而当水凝胶中的CFAP1含量超过1 μg/mL时，组织中的绿色荧光强度便不再升高．这一结果说明，CCSMA水凝胶中的CFAP1含量≥1 μg/mL后，组织的血管化效果最佳．如果水凝胶中CFAP1含量过低，会降低水凝胶敷料在伤口修复中的生物学作用，不能达到预期的治疗效果；相反，如果水凝胶敷料中CFAP1含量过高，也会造成一定程度的浪费，导致整个伤口治疗周期的费用升高．因此，选择合适的CFAP1的浓度具有重要意义．基于以上实验结果，选择在水凝胶中添加1 μg/mL的CFAP1的浓度进行后续实验．

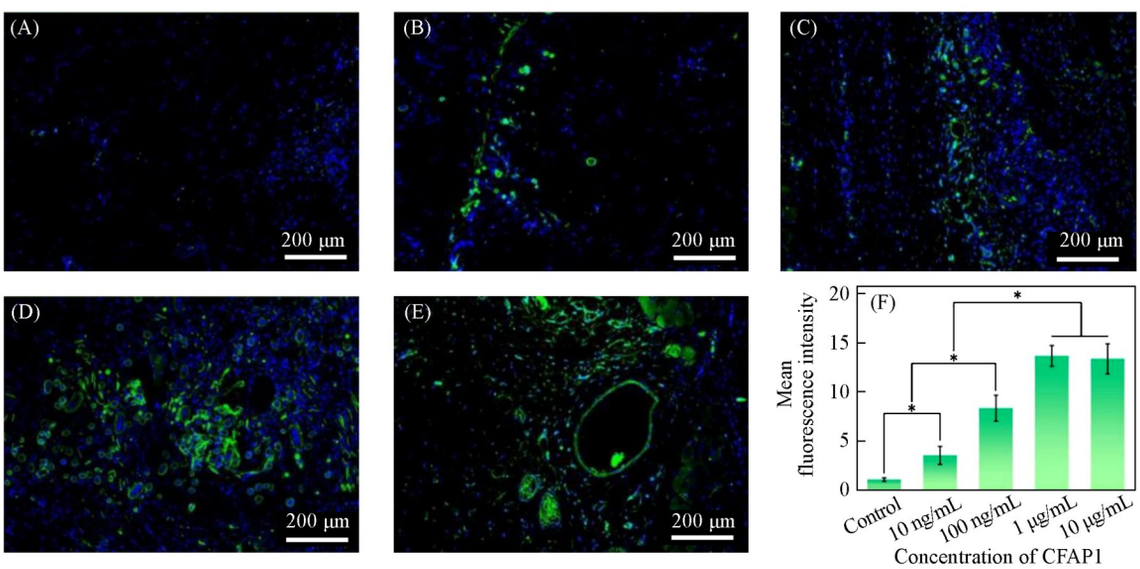


Fig. 1 The *in vivo* angiogenic promoting effect of CCSMA hydrogels with different CFAP1 contents

(A—E) CD31 staining images of tissues surrounding hydrogels in the control group (without CFAP1, A) and groups with 10 ng/mL(B), 100 ng/mL(C), 1 μg/mL(D), and 10 μg/mL(E) CFAP1; (F) the intensity of green fluorescence in the images, $n=3$, * $p<0.05$.

2.2 复合水凝胶的理化性质

图2(A)~(C)为复合水凝胶的外观照片．可以看出，光固化水凝胶呈透明均匀凝胶状，成型性良好，无明显流动性．FAP1和CFAP1的添加未明显改变水凝胶的形状，说明多肽的加入没有影响CCSMA水凝胶的固化成型．图2(D)~(F)为复合水凝胶脆断面的SEM照片．可见，各组水凝胶均具有典型的微观孔道结构．与对照组相比，加入多肽后的CCSMA水凝胶的微观形貌无明显变化．

采用荧光分析法对FAP1和CFAP1与CCSMA水凝胶的结合能力进行了检测．图3(A)示出了水凝胶结合不同类型多肽后的激发荧光图片和荧光强度．可见，CFAP1组的荧光信号强度显著高于FAP1组及control组（$p<0.05$）．上述结果表明，CFAP1与CCSMA水凝胶的结合能力显著高于FAP1．图3(B)为复合水凝胶在拉伸状态下的应力应变曲线．可见，各组水凝胶的最大拉伸强度介于2.5~3.0 kPa之间，最大拉伸形变量约为16%，FAP1和CFAP1的加入对CCSMA水凝胶的拉伸性能无明显影响．以累积释放率-时间曲线为指标，对复合水凝胶中FAP1和CFAP1的释放行为进行了表征，结果如图3(C)所示．不含ChiBD的FAP1呈现出明显的突释效应，在最初48 h，约68%的FAP1从水凝胶中释放出来，168 h后的累计释放率达到80%．CFAP1在复合水凝胶体系中表现出缓释特性，前48 h内的初始累计释

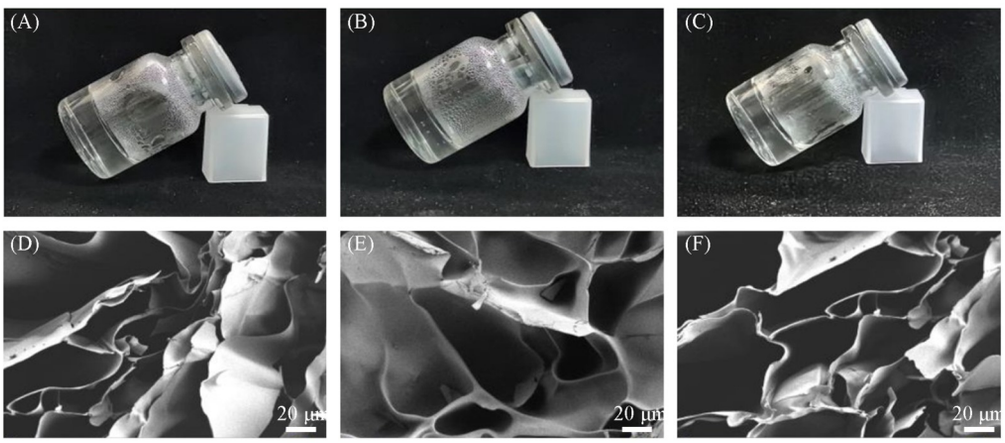


Fig. 2 Optical images(A—C) and SEM images(D—F) of CCSMA(A, D), CCSMA@FAP1(B, E) and CCSMA@CFAP1(C, F) hydrogels

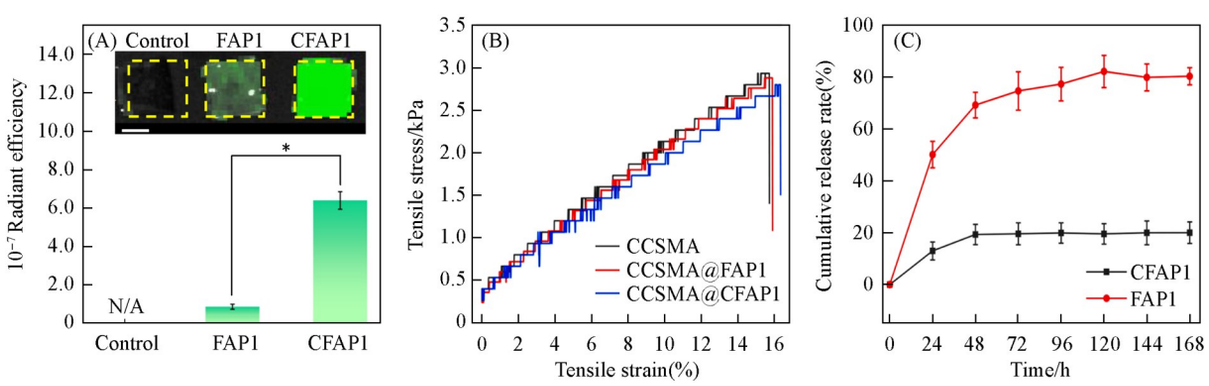


Fig. 3 Fluorescence images and binding ability of FAP1 and CFAP1 to CCSMA hydrogel detected *via* fluorescence method(n=3, * p<0. 05)(A), tensile stress-strain curves of hydrogels(B), and cumulative release rate of FAP1 and CFAP1 in the hydrogels over time(n=3)(C)

放率仅为19. 6 %，之后则呈现缓慢释放的趋势，经过168 h的释放后，仍有约80%的CFAP1与水凝胶紧密结合．上述结果表明FAP1是通过扩散形式发挥作用的．

已有研究表明，水凝胶具有与天然细胞外基质(ECM)相似的疏松多孔结构，有利于细胞迁移与增殖，同时能够维持创面湿润的微环境、调控过量组织渗出液、允许氧气和营养物质扩散[21,22]．本文研究结果表明，光固化的CCSMA水凝胶具有与其它水凝胶一致的疏松多孔结构和相似的性质．但单一的CCSMA水凝胶生物活性仍存在局限，促修复效能不足．为了提高生物活性，本文将对壳聚糖有特异性结合能力的CFAP1引入到CCSMA水凝胶中．研究结果表明，ChiBD使CFAP1与CCSMA水凝胶之间的结合力大大增强，这种结合方式可使CFAP1以非扩散形式与细胞和组织发生相互作用[23]．此外，CFAP1在水凝胶体系中表现出缓释特性也可以延长其作用的时效性．

2.3 复合水凝胶促进细胞黏附、增殖和迁移的效果

为评价多肽对复合水凝胶表面细胞黏附的影响，通过Calcein-AM染色检测了NIH-3T3在复合水凝胶表面的黏附情况．图4(A)~(C)示出了各组水凝胶表面NIH-3T3细胞的Calcein-AM染色结果．在所有组别的水凝胶中，CCSMA@CFAP1水凝胶表面的细胞黏附数量是最多的．同时，CCSMA@FAP1水凝胶表面的细胞黏附数量也明显多于CCSMA水凝胶组．细胞增殖实验(CCK-8)的检测结果[图4(D)]显示，培养24 h时，CCSMA@CFAP1组细胞的增殖能力是最强的，但与其它两组无显著差异．培养至72 h时，与CCSMA和CCSMA@FAP1组相比，CCSMA@CFAP1组细胞的增殖能力显著增强(p<0. 05)．

为检测复合水凝胶对细胞迁移的影响，将各组水凝胶与划痕后的NIH-3T3细胞进行共培养，染色

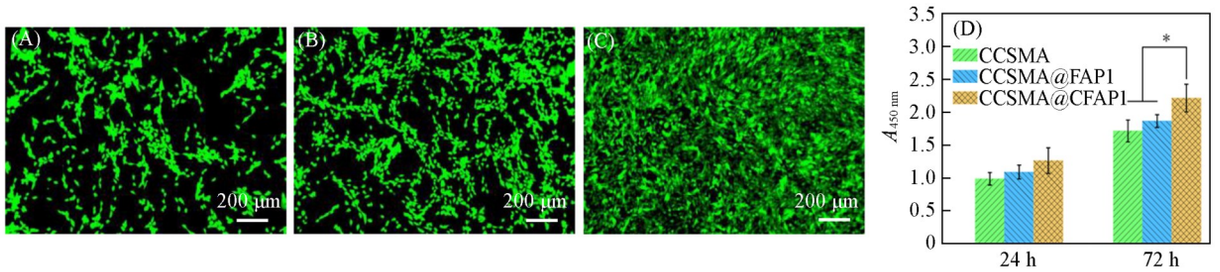


Fig. 4 Calcein-AM staining images of NIH-3T3 cells cultured for 24 h on the surfaces of CCSMA(A), CCSMA@FAP1(B), and CCSMA@CFAP1(C) hydrogels, and the results of proliferation of NIH-3T3 cells on the surface of hydrogels detected *via* CCK-8(D)

(D) n=3, * p<0. 05.

[图5(A)]和定量检测[图5(B)]结果显示，共培养24 h后，各组的细胞划痕面积都有不同程度的减小. 与其它两组相比，CCSMA@CFAP1组的细胞划痕面积更小，划痕两侧的细胞已经形成了连接. CCSMA@CFAP1组迁移和增殖的细胞对划痕的覆盖率超过70%，显著高于CCSMA组和CCSMA@FAP1组.

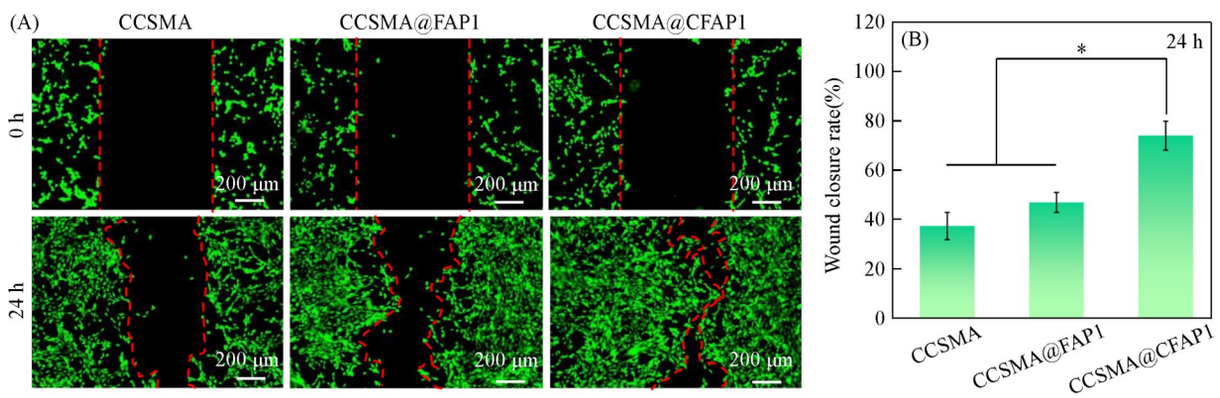


Fig. 5 Images of cell staining showing the promotion of wound healing by CCSMA, CCSMA@FAP1 and CCSMA@CFAP1(A), and quantitative detection results of the cell scratch experiment(B)

(B) n=3, * p<0. 05.

理想的创面敷料应具备优良的细胞相容性与促细胞增殖能力，其核心是能为创面修复提供适宜的微环境，减少炎症反应并加速组织再生. 作为FGFR的有效激动剂，FAP1能够激活FGF相关通路，发挥与FGF相似的生物学功能[18]. 本文研究结果表明，CFAP1稳定地与CCSMA水凝胶结合，提高了作用时效性，进而显著提高了CCSMA@CFAP1水凝胶的生物活性，促进了细胞的黏附、增殖和迁移，为创面修复敷料的研发提供了重要实验依据.

2.4 复合水凝胶促进表皮修复相关蛋白的表达

胶原蛋白是皮肤组织的关键结构性蛋白，也是细胞外基质的主要成分. COL-I是人体中最丰富的胶原蛋白类型，参与肉芽组织的生成[24]. VEGF是血管形成的重要指标，在创面修复中具有重要作用[25]. 其中，COL-I的高效表达可增强细胞外基质的完整性和机械强度，为创面愈合提供稳定的结构支撑，而VEGF的高表达能有效诱导新生血管形成，改善创面局部供血，为细胞增殖和组织修复提供充足营养. 为进一步评估复合水凝胶支架的生物活性，采用免疫荧光染色检测了各组NIH-3T3细胞中COL-1和VEGF的表达. 图6结果表明，与CCSMA组相比，含有FAP1和CFAP1的水凝胶能够显著地促进COL-I和VEGF的表达(p<0. 05). 同时，CCSMA@CFAP1组COL-1和VEGF的表达水平也显著高于CCSMA@FAP1组(p<0. 05). 以上研究结果表明，FAP1多肽能够促进细胞中COL-1和VEGF的表达，而CCSMA@CFAP1中CFAP1的稳定长效作用进一步提高了细胞中COL-1和VEGF的表达水平. 这将有利于复合水凝胶发挥其促进细胞外基质生成和组织血管化的功能，进而促进创面的修复.

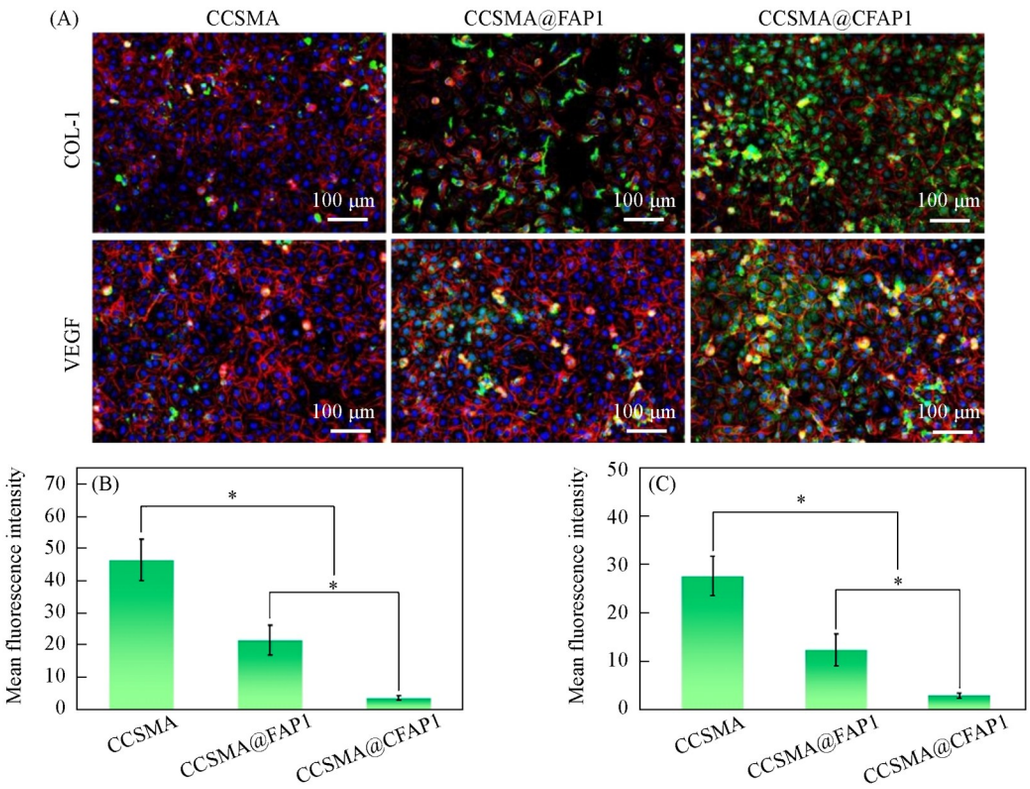


Fig. 6 Images of immunofluorescence staining of COL-1 and VEGF in NIH-3T3 cells on the surface of CCSMA, CCSMA@FAP1 and CCSMA@CFAP1(A), and quantitative analysis of immunofluorescence staining of COL-1(B) and VEGF(C)

n=3, * p<0. 05.

2.5 复合水凝胶的抗菌性和抗氧化性

在中性环境(如伤口微环境、体液)中，羧甲基壳聚糖因溶解性好，能更均匀地接触细菌，对*E. coli*或*S. aureus*等常见致病菌具有良好的抗菌作用[26]. 其抗菌机制主要在于分子中的羧甲基和氨基可破坏细菌细胞膜完整性，阻碍细菌代谢与繁殖，有效降低创面致病菌定植量. 此外，羧甲基壳聚糖分子链上存在大量的羟基(—OH)和氨基(—NH_2)，同时引入了羧甲基(—CH_2COOH)基团. 这些基团中的氢原子具有较高的反应活性，能够与体系中的ROS自由基发生反应，起到抗氧化作用[27]. 由图7(A)~(C)可

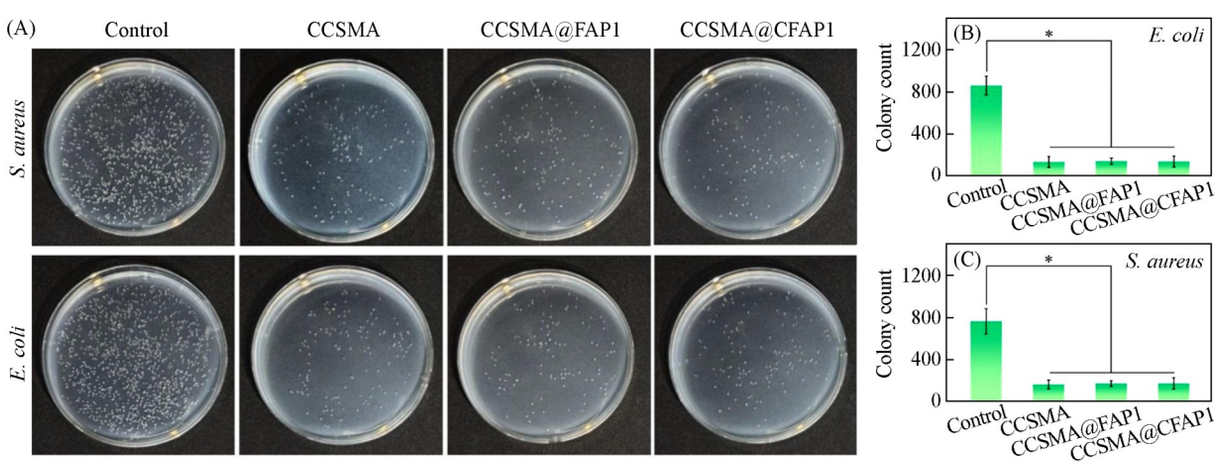


Fig. 7 Typical photos of the colonies formed by *E. coli* and *S. aureus* growing on solid LB agar medium(A) and colony count statistics(B, C)

(B, C) n=3, * p < 0. 05.

见，与空白对照组相比，各水凝胶组都能够显著地抑制 *E. coli* 和 *S. aureus* 生长，表现出突出的抗菌性. 同时，抗氧化研究结果[图8(A)和(B)]表明，水凝胶共培养组的细胞内ROS明显减少(p<0.05). 以上结果充分说明，CCSMA水凝胶具有突出的抗菌性和抗氧化性，具有抑制创面感染和过度炎症反应的潜力.

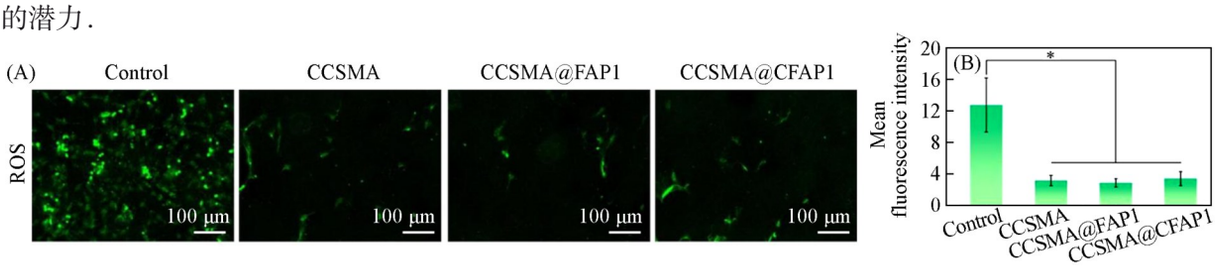


Fig. 8　DCFH-DA staining images of intracellular reactive oxygen species(ROS)(A) and fluorescence quantitative statistics(B)

(B) n=3, * p < 0.05.

2.6　复合水凝胶促进创面修复

为评估水凝胶辅料对创面的修复效果，建立了大鼠全层皮肤损伤动物模型. 将不同组水凝胶预混液滴加在创面并光照固化后，观察水凝胶对创面愈合的影响. 由图9(A)可见，各组创面的面积随时间的延长逐渐减小. 创面闭合率的统计结果[图9(B)]显示，从术后72 h开始，空白对照组的创面闭合率就一直低于其它实验组，而CCSMA@CFAP1的创面闭合率则一直高于其它组. 终末时间点的创面闭合率统计结果[图9(C)]显示，在术后264 h时，CCSMA@CFAP1组的创面闭合率最高，达到92%，并且显著高于其它各组(p<0.05). 此外，CCSMA@FAP1组的创面闭合率也明显高于CCSMA组(p<0.05). 空白

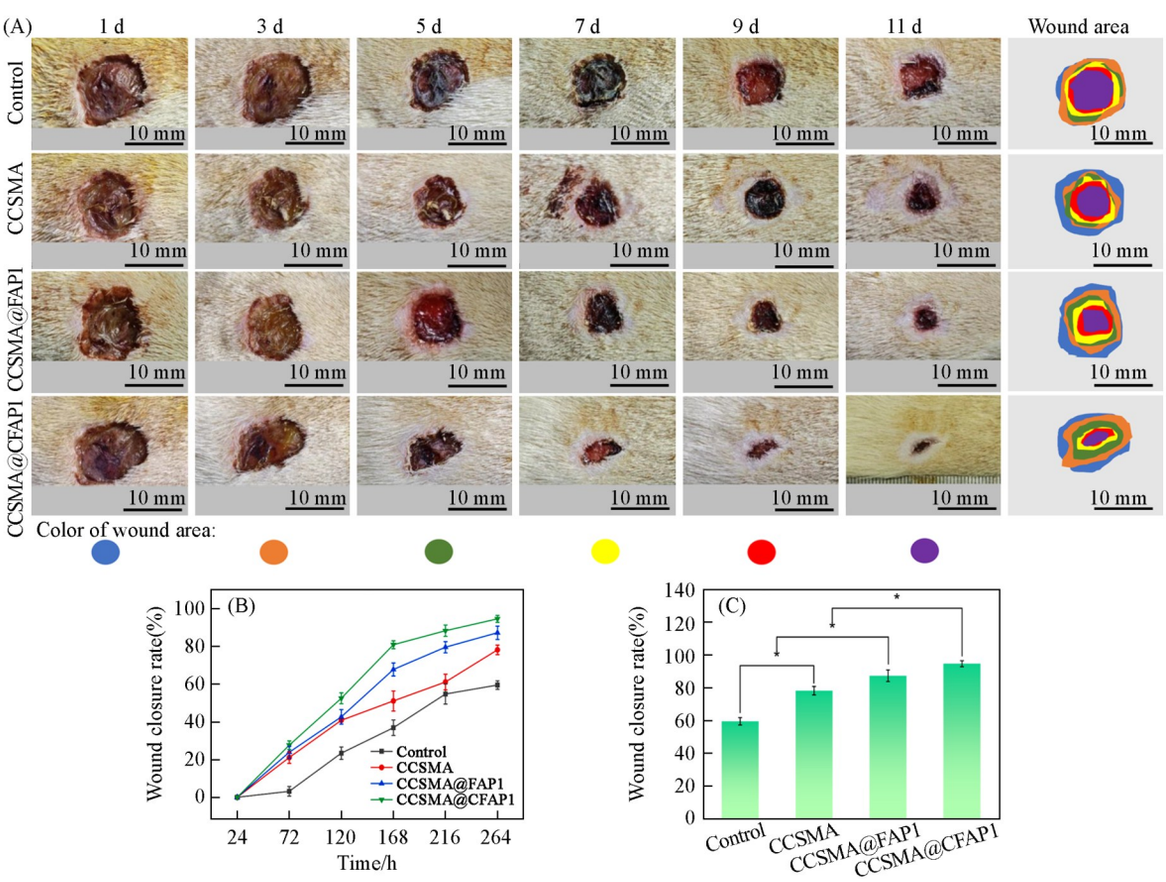


Fig. 9　Repair effects of hydrogels on full-thickness wound in rats

(A) Photographs of the wound at different time points; (B) closure rates of the wound at different time points, n=3; (C) closure rate of the wound at the final time point(11 d), n=3, * p < 0.05.

对照组的创面闭合率仅为60%，显著低于其它3组(p<0. 05).

通过H&E和Masson染色检测了水凝胶对创面愈合组织学影响. 图10结果显示，空白对照组和CCSMA组创面仍存在血痂，且未形成完整的表皮结构，皮下可见大量的炎性细胞浸润. CCSMA@FAP1和CCSMA@CFAP1组的血痂已经脱落，并在创面上形成了较完整的表皮结构. 与CCSMA@FAP1组相比，CCSMA@CFAP1组的表皮重建更加完整，厚度更均匀，且皮下组织中的炎性细胞浸润较少，胶原纤维更加规整，表明CCSMA@CFAP1组的创面修复程度更高.

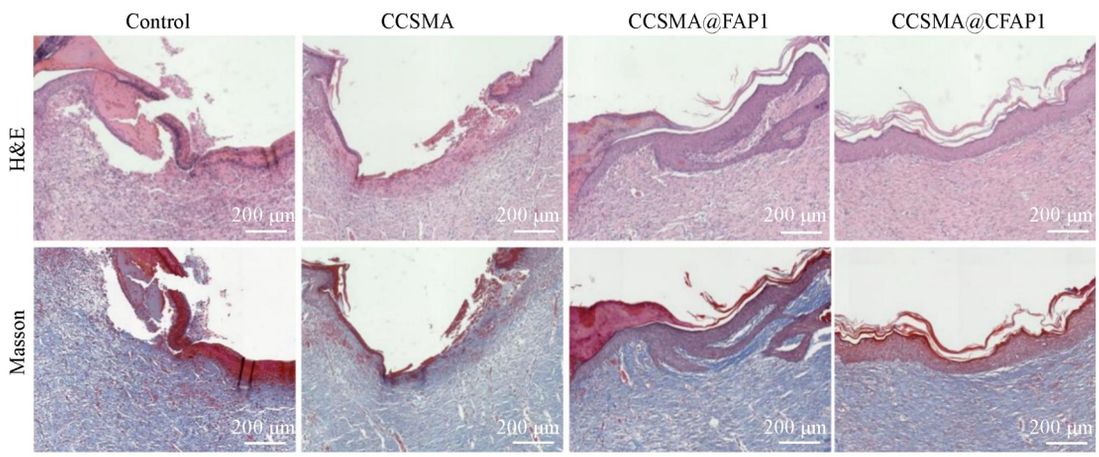


Fig. 10 H&E and Masson staining images of tissues after wound repair in the Control group, CCSMA group, CCSMA@FAP1 group, and CCSMA@CFAP1 hydrogel dressing group

白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)均为机体炎症反应中核心的促炎细胞因子，二者功能高度协同，共同介导炎症的启动、放大与调控，同时也参与免疫调节、组织修复等生理病理过程[28]. 免疫荧光染色结果(图11)表明，与空白对照组相比，各水凝胶组能够显著抑制组织中IL-6和TNF-α的

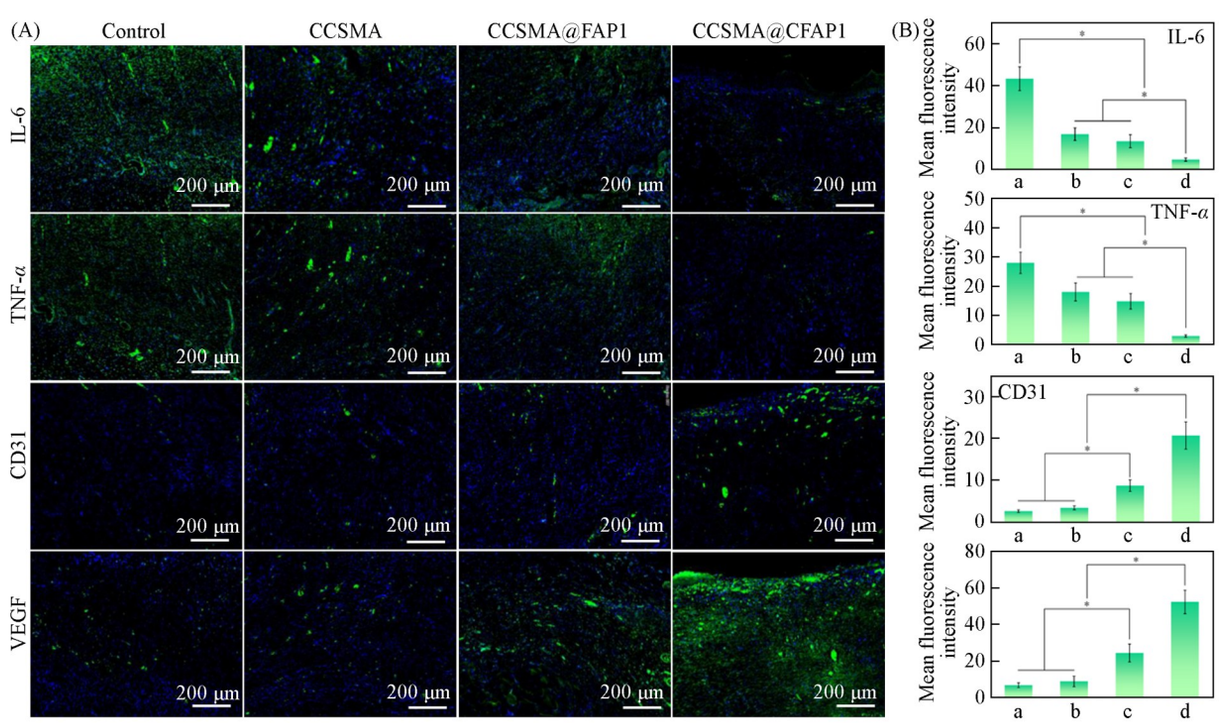


Fig. 11 Immunofluorescence staining images of IL-6, TNF-α, CD31 and VEGF in wound repair tissues from the Control group, CCSMA group, CCSMA@FAP1 group and CCSMA@CFAP1 hydrogel dressing group(A) and statistical results of fluorescence intensity(B)

(B) n=3, * p < 0. 05. a. Control; b. CCSMA; c. CCSMA@FAP1; d. CCSMA@CFAP1.

表达，这可能与CCSMA水凝胶的抗菌和抗氧化性能有关．通过抑制创面的细菌生长和清除组织中的ROS，CCSMA水凝胶有效抑制了组织中的过度炎症反应．此外，CCSMA@CFAP1组组织中的IL-6和TNF-α含量与其它三组相比显著降低．

组织血管化是创面修复的重要过程之一[29]．通过对组织中CD31和VEGF进行免疫染色，评价了复合水凝胶的促组织血管化能力．结果显示，含多肽的水凝胶组组织内CD31和VEGF的量明显高于空白对照组和单纯CCSMA水凝胶组．这表明水凝胶中的FAP1可以有效促进组织的血管化．此外，CCSMA@CFAP1组的CD31和VEGF表达量与CCSMA@FAP1组相比明显提高，说明长效作用的CFAP1能够进一步提升组织的血管化程度，这与体外实验的结果相符．同时，血管化程度的提高加速了组织内炎症因子的转运清除，为组织再生提供了良好的微环境，这也是CCSMA@CFAP1组的IL-6和TNF-α含量与其它3组相比显著降低的原因．

2.7　复合水凝胶的生物安全性

为了评估复合水凝胶是否具有潜在的器官毒性，在动物实验终末时间点提取了大鼠的主要脏器（心、肝、脾、肺、肾），开展组织学分析．组织染色结果（图12）显示，所有实验组的脏器组织完整性均保持良好，组织细胞排列紧密，且在所有受检组织中均未观察到明显的出血和炎症细胞浸润，亦无细胞变性坏死等病理改变．重要脏器未出现任何组织病理学异常，这一结果证实各水凝胶材料具有良好的生物安全性．

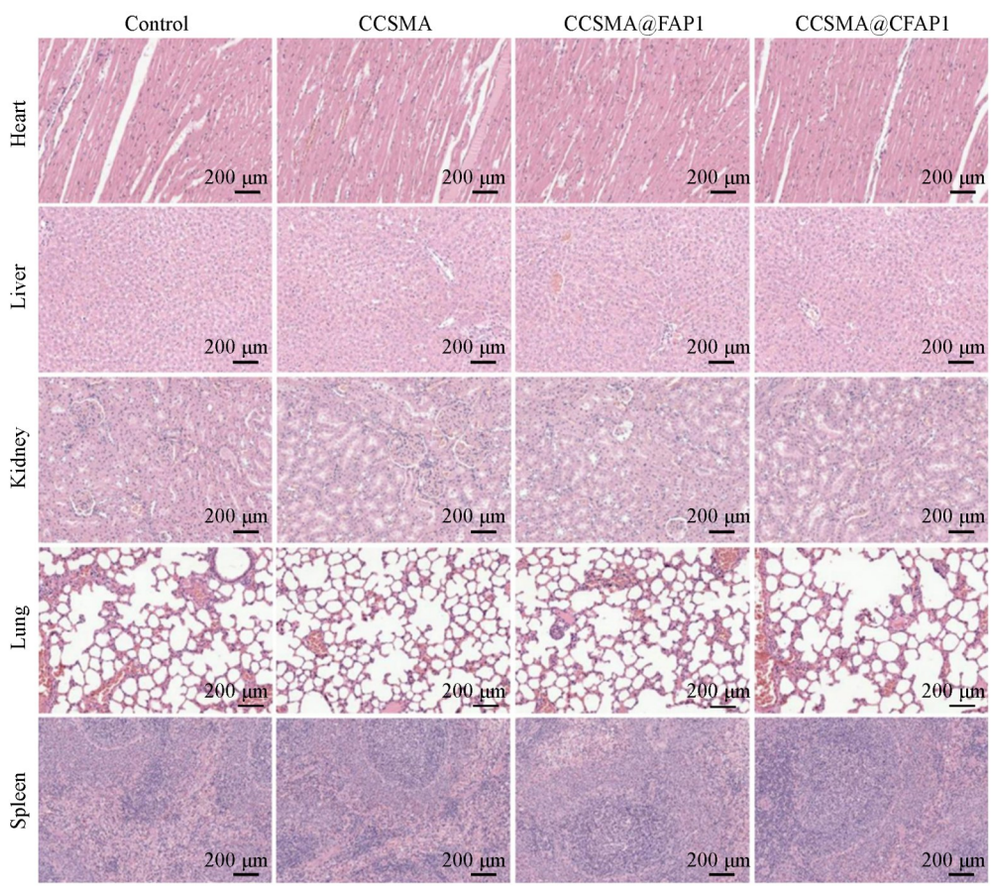


Fig. 12　H&E staining images of heart, liver, spleen, lung and kidney in rats after wound repair in the Control group, CCSMA group, CCSMA@FAP1 group and CCSMA@CFAP1 hydrogel dressing group

3　结　　论

设计制备了一种对CCSMA具有特异性结合能力的FGFR激动肽CFAP1．大鼠皮下植入实验结果证明，含有1 μg/mL的CCSMA@CFAP1水凝胶组在促进新血管生长中达到最优浓度．多肽结合实验结果

证明多肽中ChiBD接头的引入显著增强了CFAP1与CCSMA的结合能力．CCSMA@FAP1在48 h的释放周期内就完成了68%的突释行为，而CCSMA@CFAP1则在168 h的释放周期内展现了缓慢释放的特性．体外细胞迁移实验和CCK-8细胞增殖实验结果也证明CCSMA@CFAP1组展现了最大的细胞迁移率和细胞增殖率．CCSMA@CFAP1组水凝胶也能显著促进伤口修复相关基因VEGF和细胞外基质蛋白COL-I的表达．在抗菌方面，水凝胶中的CCSMA组分对*E. coli*和*S. aureus*均展现了良好的抗菌效果．同时也表现出良好的抗氧化作用．在大鼠全皮层伤口修复模型中，CCSMA@CFAP1水凝胶修复的伤口几乎完全愈合，组化切片结果显示表皮重建基本完成．免疫组化结果显示水凝胶中的CCSMA组分能够显著下降伤口位置炎症因子的表达，水凝胶中CFAP1组分可以显著地上调CD31和VEGF的表达．心肝脾肺肾染色结果表明CCSMA@CFAP1作为伤口修复敷料没有产生明显的脏器毒性．因此，制备的含有CCSMA特异结合接头的CFAP1多肽能够显著增强伤口位置的新血管生成和伤口修复相关生长因子VEGF和基质蛋白COL-I的表达．该伤口修复敷料在临床上难愈合伤口治疗中应用前景广阔．

参　考　文　献

[1] Gurtner G. C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M. T., *Nature*, **2008**, *453*(7193), 314—321
[2] Sadeghi-Aghbash M., Rahimnejad M., Adeli H., Feizi F., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **2023**, *24*(9), 1079—1093
[3] Lagoa T., Queiroga M. C., Martins L., *Pharmaceuticals*, **2024**, *17*(9), 1110
[4] Liang Y. P., He J. H., Guo B. L., *ACS Nano*, **2021**, *15*(8), 12687—12722
[5] Liu H., Wang C. Y., Li C., Qin Y. G., Wang Z. H., Yang F., Li Z. H., Wang J. C., *RSC Adv.*, **2018**, *8*(14), 7533—7549
[6] Yao H., Wu M., Lin L. W., Wu Z. L., Bae M., Park S., Wang S. L., Zhang W., Gao J. F., Wang D. A., Piao Y. Z., *Materials Today Bio.*, **2022**, *16*, 100429
[7] Raina N., Pahwa R., Thakur V. K., Gupta M., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2022**, *223*, 1586—1603
[8] Li H. Y., Wang Y. P., Guo L.P., Huang L. Q., Li X., Gao W. Y., *Chem. Eng. J.*, **2024**, *497*, 154143
[9] Cao S. J., Ji P. H., Hao L. L., Sun C., Mao H. L., Gu Z. W., *Carbohydr. Polym.*, **2025**, *347*, 122699
[10] Zhang X. Y., Liang Y. P., Huang S. F., Guo B. L., *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2024**, *332*, 103267
[11] Upadhyaya L., Singh J., Agarwal V., Tewari R. P., *Carbohydr. Polym.*, **2013**, *91*(1), 452—466
[12] Vosoughi P., Naghib S. M., Mozafari M. R., *Mini-Rev. Org. Chem.*, **2025**, *22*(5), 479—504
[13] Klosinski K. K., Wach R. A., Girek-Bak M. K., Rokita B., Kolat D., Kaluzinska-Kolat Z., Klosinska B., Duda L., Pasieka Z. W., *Polymers*, **2023**, *15*(1), 144
[14] Chen X. G., Wang Z., Liu W. S., Park H. J., *Biomaterials*, **2002**, *23*(23), 4609—4614
[15] Li J., Yang J. H., Wang S. G., *Gels*, **2025**, *11*(8), 651
[16] Syromiatnikova V. Y., Kvon A. I., Starostina I. G., Gomzikova M. O., *Arch. Dermatol.l Res.*, **2024**, *316*(7), 405
[17] Kashimoto R., Kamei Y., Nonaka S., Kondo Y., Yamamoto S., Furukawa S., Ohashi A., Satoh A., *Developmental Biology*, **2023**, *498*, 14—25
[18] Farooq M., Hwang M., Khan A. W., Batool M., Ahmad B., Kim W., Kim M. S., Choi S., *Life Sci.*, **2025**, *364*, 123432
[19] Roy A., Dodd-o J. B., Shadpoor B., Patel S. K., Gharati G., Hanna M., Lateef-Fnu A., Heffernan C., Kumar V. A., *Advanced Biology*, **2025**, *9*(11), e00327
[20] Wang Y., Fu C., Wu Z. X., Chen L., Chen X. S., Wei Y., Zhang P. B., *Carbohydr. Polym.*, **2017**, *174*, 723—730
[21] Hao X. T., Miao S., Li Z. Q., Wang T. R., Xue B. B., Chen J. D., Xian C. X., Bi L., *Materials & Design*, **2023**, *227*, 111729
[22] Liu B., Jin M., Wang D. A., *Acta Biomater.*, **2023**, *161*, 67—79
[23] Qu L. F., Chen Z. L., Chen J. H., Gan Y. B., Tan X., Wang Y., Zhang C., Chen B., Dai J. W., Chen J. X., Shi C. M., *Biomater. Sci.*, **2023**, *11*(24), 7926—7937
[24] Heino J., Huhtala M., Käpylä J., Johnson M. S., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2009**, *41*(2), 341—348
[25] Melincovici C. S., Bosca A. B., Susman S., Marginean M., Mihu C., Istrate M., Moldovan I. M., Roman A. L., Mihu C. M., *Rom. J. Morpho. Embryo.*, **2018**, *59*(2), 455—467
[26] Anitha A., Rani V. V. D., Krishna R., Sreeja V., Selvamurugan N., Nair S. V., Tamura H., Jayakumar R., *Carbohydr. Polym.*, **2009**, *78*(4), 672—677
[27] Sun X. Q., Zhang J. J., Mi Y. Q., Miao Q., Tan W. Q., Li Q., Guo Z. Y., *J. Oceanol. Limnol.*, **2022**, *40*(1), 284—295
[28] Sato Y., Ohshima T., *Int. J. Legal Med.*, **2000**, *113*(3), 140—145
[29] Moreira H. R., Marques A. P., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2022**, *73*, 253—262

(Ed.: W, K, M)