



吴冬冬, 四川大学国家生物医学材料工程技术研究中心/生物医学工程学院特聘研究员, 博士生导师, 国家级重要人才计划青年项目入选者, 四川省重要人才计划入选者, 成都市人才计划入选者。聚焦生物分子材料前沿领域, 以生物相容、可降解、结构可设计、功能多元的多肽为核心原料, 突破传统多肽基材料在稳定性、力学性能、多功能集成及生物电活性等方面的瓶颈, 系统开展高性能多肽生物材料的基础研究与应用转化攻关, 为生物医用、智能传感、组织工程等领域提供兼具生物相容性与优异服役性能的新型材料体系。以第一作者和通信作者身份在 Nature、JACS、Angew、Nat Commun、AFM 等杂志发表学术论文 20 余篇, 并获授权发明专利 10 余件, 其中已有多件实现专利转化。

多肽刚性纳米纤维复合 I 型胶原水凝胶的 制备工艺与力学性能研究

何艳梅, 吴冬冬

(四川大学生物医学工程学院, 成都 610065)

摘要: I 型胶原蛋白是人体中最丰富的胶原蛋白。I 型胶原水凝胶虽因优异的生物相容性与软骨诱导性成为仿生支架首选, 但其力学强度低、降解过快, 难以满足长期植入需求。多肽刚性纳米纤维(PRNs)是一种新型仿生材料, 具有类胶原的多股螺旋结构(直径约 2 nm), 经甲基丙烯酸酐改性后可赋予光敏活性(MA-PRNs), 其超高强度与多修饰位点为胶原基材料增强提供一种可行路径。本研究通过物理掺杂与光交联两种策略, 构建不同 PRNs/MA-PRNs 掺杂比例的胶原基复合水凝胶。研究结果表明, 物理复合体系中 5% PRNs 掺量时抗形变能力最优, 但是物理复合体系仅依赖非共价缠结, 网络稳定性差, 在 5 h 内降解完全。光交联策略则通过 MA-PRNs 与胶原网络的共价桥接, 显著提升材料性能。3% MA-PRNs 掺量时可增加网络交联密度, 实现致密化, 使压缩模量达 0.01 MPa, 降解速率最慢。本研究明确了填料含量与交联模式对胶原水凝胶力学及降解行为的调控规律, 通过精准设计可实现材料性能的定制化, 为高性能纳米复合生物材料的开发提供了关键理论与实验依据。

关键词: 多肽; 刚性纳米纤维; I 型胶原; 水凝胶

中图分类号: R318.08

文献标志码: A

DOI: 10.19907/j.0490-6756.260219

Fabrication and mechanical properties of type I collagen hydrogels reinforced with peptide rigid nanofibers

HE Yanmei, WU Dongdong

(School of Biomedical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Type I collagen is the most abundant collagen in the human body. Type I collagen hydrogels are often used as biomimetic scaffolds because of their biocompatibility and chondroinductive properties, but

收稿日期: 2026-07-06 修回日期: 2026-07-31 接受日期: 2026-07-31

基金项目: 中央高校基本科研业务费(YJ202129)

作者简介: 何艳梅(1994—), 女, 新疆库尔勒人, 博士研究生, 副研究员, 主要从事多肽基生物复合材料研究. E-mail: hym@scu.edu.cn

通信作者: 吴冬冬. E-mail: wudd@scu.edu.cn

their low mechanical strength and rapid degradation limit long-term implantation. Peptide rigid nanofibers (PRNs) are a biomimetic material with a collagen-like multistranded helical structure approximately 2 nm in diameter. Photosensitivity can be introduced through methacrylic anhydride modification (MA-PRNs), and their high strength and multiple modification sites may be used to reinforce collagen-based materials. In this study, collagen-based composite hydrogels containing different proportions of PRNs or MA-PRNs were prepared by physical blending or photocrosslinking. In the physically blended system, the best resistance to deformation was obtained at 5% PRNs. However, because the network depended only on noncovalent entanglement, its stability was low, and complete degradation occurred within 5 h. In the photocrosslinked system, material properties were improved through covalent bridging between MA-PRNs and the collagen network. At 3% MA-PRNs, the crosslink density was increased and the network was densified, resulting in a compressive modulus of 0.01 MPa and the slowest degradation rate. The effects of filler content and crosslinking mode on the mechanical properties and degradation behavior of collagen hydrogels were determined. These properties can be adjusted through material design, providing theoretical and experimental information for the development of nanocomposite biomaterials.

Keywords: peptides; rigid nanofibers; type I collagen; hydrogels

关节软骨的再生修复高度依赖于支架材料的力学支撑与生物功能的协同。理想的软骨支架不仅需要具备仿生的化学信号,更必须拥有能够抵抗关节动态载荷的力学强度及匹配组织再生的降解周期^[1-3]。在众多天然高分子中,I型胶原作为人体组织内最丰富的结构蛋白,长期以来被视为构建仿细胞外基质(ECM)的首选材料^[4-5]。张兴栋院士课题组围绕I型胶原水凝胶开展了大量软骨构建研究,证实了其在维持细胞表型、促进软骨再生方面具有独特的优势^[6-9]。然而,从材料的角度来看,纯I型胶原水凝胶属于典型的软物质体系,其较低的交联密度导致力学模量(通常仅几千帕)远不能满足负重关节的生理需求;同时,其易受基质金属蛋白酶(MMPs)侵蚀的特性导致了体内降解速率过快,难以维持长期的立体结构稳定性。为了突破这一性能瓶颈,研究人员通常采取复合增强的策略。传统的增强相(如羟基磷灰石、生物玻璃或合成纤维)虽然能提高模量,但往往面临界面不相容、韧性下降(脆断)以及生物惰性等问题,破坏了胶原原有的生物活性微环境^[10-12]。因此,开发一种本身具有类胶原特征、同时又能提供超强刚度的“纳米增强体”,是实现胶原水凝胶高性能化的关键。

我们在前期报道了一种肽基刚性纳米棒(Peptide-based rigid nanorods),通过共价键引入至甲基丙烯酸明胶,构建了NSG水凝胶,在提升力学性能的同时,保留其光固化和生物相容性优势,已经用于解决承重组织修复与增材制造的核心材料

瓶颈。在此基础上,多肽刚性纳米纤维(Peptide-based rigid nanofibers, PRNs)有望为本研究提供理想的材料学解决方案。PRNs是一种通过精准分子设计合成的仿生纳米材料,具有与天然胶原类似的三聚 α -螺旋二级结构,直径约为2 nm,能够在纳米尺度上与胶原纤维实现结构匹配;PRNs不同于柔性高分子链,PRNs由反向平行四聚体(纳米束 Bundlemer)通过点击化学反应聚合而成,这种致密的交联结构赋予了其极高的轴向刚度和强度,具有作为复合材料中的纳米钢筋的潜力^[13-15]。同时,PRNs表面富含多种活性基团(如巯基、双键),提供了丰富的化学修饰位点,使其能够与胶原分子链发生化学反应和强界面相互作用,从而有效传递应力并延缓降解^[16-17]。

本研究立足于上述材料学特性,旨在通过物理共混与化学交联的双重策略,将PRNs引入I型胶原基质中。我们系统探究了不同PRNs掺杂比例对复合水凝胶微观结构演变、力学性能及降解性能的影响。期望通过这种“刚柔并济”的仿生复合策略,制备出一种力学强度可调节、降解行为可控的新型复合水凝胶(图1),为软骨组织工程领域的胶原基功能材料提供新的素材。

1 材料与方法

1.1 多肽刚性纳米纤维的制备

1.1.1 多肽1和多肽2的合成与质谱表征

首先,采用固相合成法合成多肽1和多肽2,并在N端修饰不同的反应基团(图2)。具体实验方

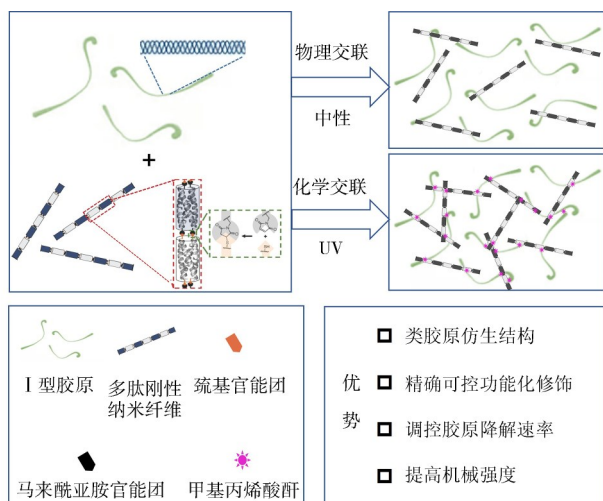


图 1 多肽刚性纳米纤维复合 I 型胶原水凝胶的路线示意图
Fig. 1 The route diagram of PRNs composite type I collagen hydrogel

法是使用基于 Fmoc 标准方案的氨基树脂,在 Liberty blue 微波多肽合成仪 (CEM) 上通过固相多肽标准合成法 (SPPS) 以 0.25 mmol 的摩尔数从 C 端到 N 端合成所有多肽的氨基酸序列。通过在 90 °C 下微波加热 2 min,使树脂与氨基酸 (0.2 mmol)、氧基 (羟亚胺基乙酸乙酯) (Oxyma 1 mmol) 和 N, N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC 0.5 mmol) 的 N, N'-二甲基甲酰胺 (DMF) 混合溶液发生偶联反应。然后用 DMF 洗涤树脂 4 次。使用 20% 哌啶的 DMF 溶液在 90 °C 下通过微波加热对氨基酸保护基团进行 0.5 min 的脱保护。在固相多肽合成仪上合成后,将 N-(3-羧丙基)马来酰亚胺 (1 mmol)、O-(1H-苯并三唑-1-基)-N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸盐 (HBTU 1 mmol) 和 N, N'-二异丙基乙胺 (2.5 mmol) 的 DMF 混合溶液加入树脂中进行偶联反应,摇晃反应溶液 1 h 后,用 DMF 溶液洗涤树脂三次。随后,再次添加相同的化合物以实现二次 N-(3-羧丙基)马来酰亚胺偶联反应。反应结束后,采用 DMF (10 mL, 3 次) 和二氯甲烷 (DCM, 10 mL, 2 次) 洗涤树脂。然后,使用由 95% 三氟乙酸 (TFA)、2.5% 三异丙基硅烷 (TIPS) 和 2.5% 去离子水组成的裂解液裂解树脂 3 h,然后将裂解液沉淀在冰乙醚中三次,得到多肽 1 的粗品 (图 3)。多肽 2 在微波辅助的固相多肽合成仪上直接进行 SPPS。然后使用由 92.5% TFA、2.5% TIPS、2.5% 1,2-乙二硫醇 (EDT) 和 2.5% 去离子水组成的裂解溶液直接裂解树脂 3 h,并将裂解溶液沉淀在冰乙醚中,得到多肽 2 (图 4) 的粗产品。

多肽	结构
多肽 1	
多肽 2	

图 2 多肽 1 和多肽 2 的组分设计与结构

Fig. 2 Design and structure of polypeptide 1 and 2

准确称取适量的多肽 1 或多肽 2 溶解于乙腈和水的混合溶液 ($V_{CH_3CN}:V_{H_2O}=4:6$) 中,浓度为 10 mg/mL。混合溶液经过 0.45 μ m 有机滤头过滤,每次利用注射器向高效液相仪打入混合溶液 3 mL,根据仪器显示的荧光强度-时间曲线收集多肽溶液,完成纯化步骤。将收集到的多肽溶液进行旋蒸收缩体积至 30 mL,冷冻并冻干。最终得到多肽 1 或多肽 2 的纯产物。检测条件:流动相是含 1% 三氟乙酸的乙腈:含 1% 三氟乙酸的水溶液=2:8,温度 25 °C,检测波长为 220 nm。准确称取适量的多肽 1 或多肽 2 溶解于乙腈和水的混合溶液 ($V_{CH_3CN}:V_{H_2O}=4:6$) 中制备浓度为 0.05 mg/mL 的多肽溶液。多肽溶液经过 0.45 μ m 有机滤头过滤后,利用 1 mL 注射器向 Waters K13 QSM 178A 质谱仪进样并采集质谱数据。

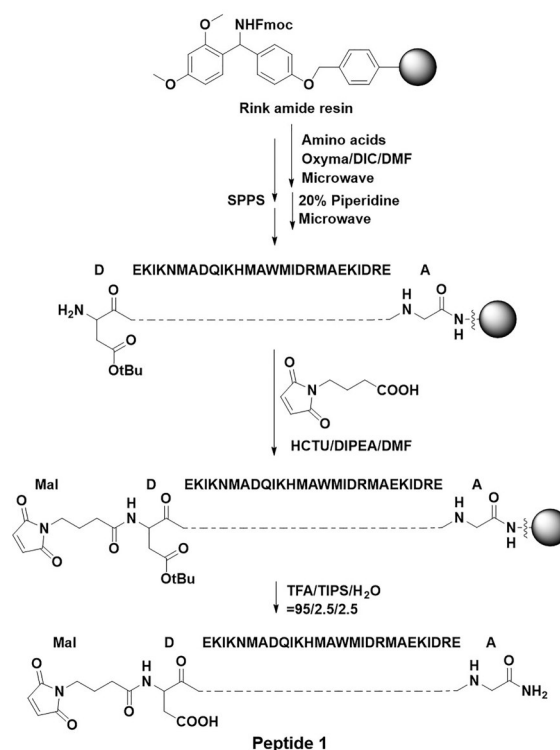


图 3 多肽 1 的合成路线

Fig. 3 Synthesis of peptides 1

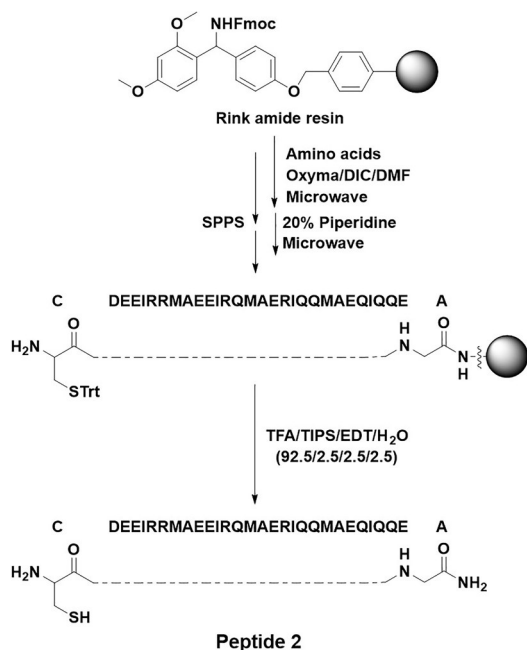


图4 多肽2的合成路线

Fig. 4 Synthesis of peptides 2

1.1.2 多肽3和多肽4的合成与质谱表征

将多肽1与多肽2羧基端(C端)倒数第17位氨基酸替换为Fmoc-Lys(Alloc)-OH,具体多肽序列如图5所示。具体合成路径如图6和图7所示,采用标准固相多肽合成(SPPS)技术,在树脂上完成29个氨基酸残基的多肽链合成,合成规模为0.25 mmol,所得多肽的所有侧链基团及氨基端(N端)均处于保护状态。随后参照Thieriet等1997年报道的文献方法^[18],脱除赖氨酸侧链的Alloc保护基。脱保护前,先用10 mL二氯甲烷(DCM)对树脂进行5次洗涤处理。接着配制10 mL含四(三苯基膦)钯($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 0.10倍当量)与苯基硅烷(PhSiH_3 , 24倍当量)的DCM溶液,用于Alloc基团脱保护;室温反应20 min后,更换新鲜反应液重复脱保护操作一次。反应结束后,采用10 mL二氯甲烷将树脂洗涤8次,彻底去除残留反应试剂。然后向处理后的树脂中加入含1 mmol 甲基丙烯酸酐,1.5 mmol N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和2 mmol N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)反应液,室温振荡反应5 h,完成多肽侧链的甲基丙烯酸酐化修饰。随后开展多肽氨基端的功能化修饰,接枝马来酰亚胺与巯基官能团:向修饰完甲基丙烯酸的树脂中加入8 mL现配的DMF混合反应液,包含1 mmol N-(3-羧丙基)马来酰亚胺、1 mmol六氟磷酸2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-

基)-1,1,3,3-四甲基铵盐(HCTU)及2.5 mmol DIPEA,室温振荡反应3 h。为保证偶联充分,更换等量新鲜反应液重复偶联操作。偶联反应完成后,依次用10 mL DMF洗涤树脂3次、10 mL二氯甲烷(DCM)洗涤树脂2次。再采用体积分数20%的哌啶/DMF溶液(每次10 mL,反应10 min,重复2次),脱除多肽的全部保护基。本实验后续的裂解、提纯和质谱表征方法与前文1.1.1完全一致(多肽3对应多肽1,多肽4对应多肽2)。

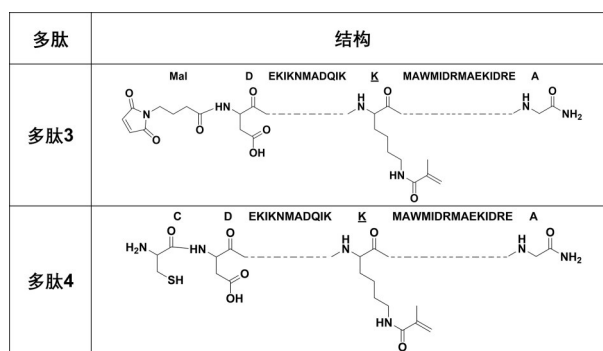


图5 多肽3和多肽4的组分设计与结构

Fig. 5 Design and structure of polypeptide 3 and 4

1.1.3 多肽纳米束的制备

准确称取适量的多肽1、多肽2、多肽3和多肽4分别溶解在去离子水中摇晃过夜。多肽1、多肽2、多肽3和多肽4自组装形成多肽纳米束1(Bundlemer 1)、零维多肽纳米束2(Bundlemer 2)、多肽纳米束3(Bundlemer 3)、零维多肽纳米束4(Bundlemer 4)。

1.1.4 多肽刚性纳米纤维的制备和形貌表征

将Bundlemer 1(Bundlemer 3)和Bundlemer 2(Bundlemer 4)摩尔比1:1溶于磷酸盐缓冲液后(pH 6, 25 mmol/L),加入聚合反应的催化剂2-羧乙基膦(TCEP,马来酰亚胺基团摩尔量的0.2倍当量),浓度为100 mmol/L形成混合反应溶液,混合溶液在室温下摇晃反应24 h(图8)。随后用去离子水透析混合溶液1 d,得到含有多肽刚性纳米纤维的水溶液,将其冻干备用。使用Bruker公司的Dimension ICON仪器进行原子力显微镜(AFM)形貌测试。将干净的云母片作为样品沉积的基材,使用双面胶将云母片固定在载玻片上。预先制备样品溶液,在云母片上滴加5 μL 溶液,自然风干后用于AFM表征。

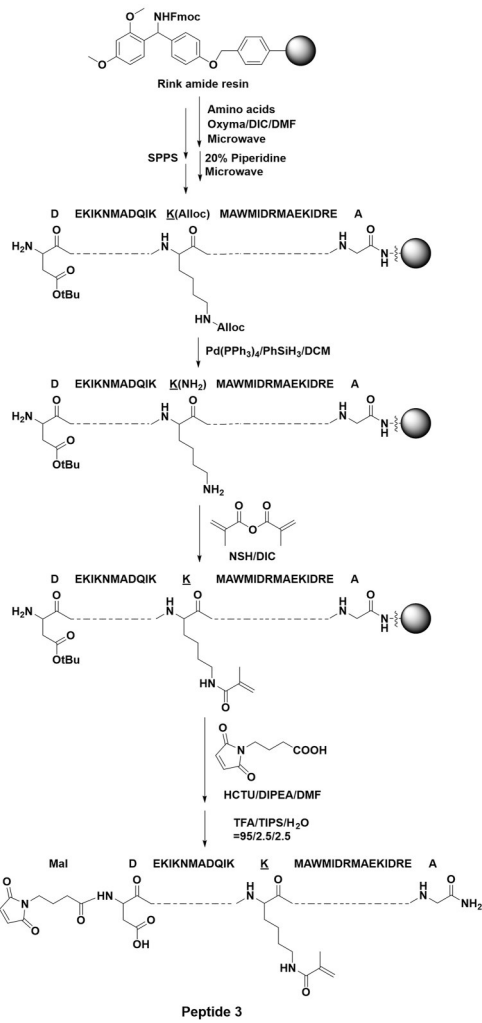


图 6 多肽 3 的合成路线

Fig. 6 Synthesis of peptides 3

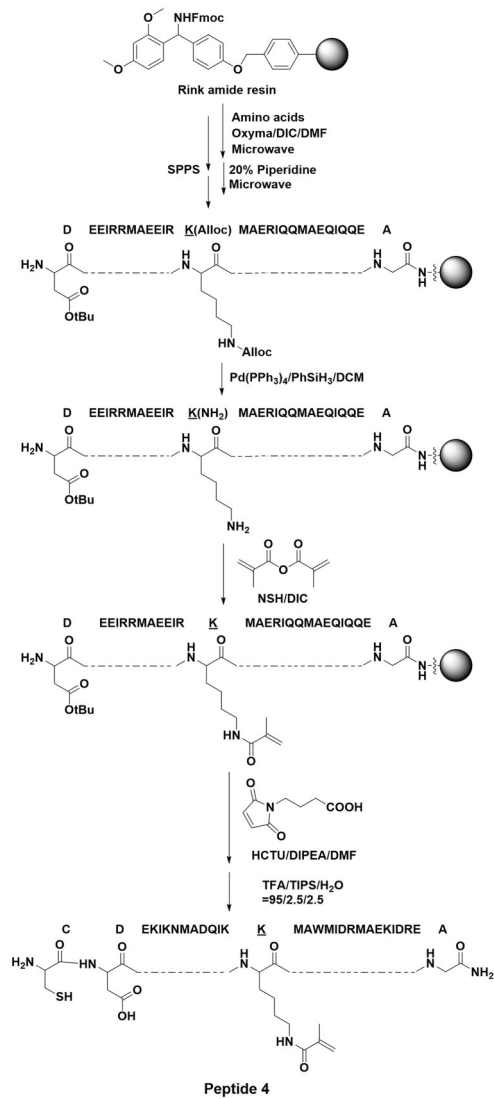


图 7 多肽 4 的合成路线

Fig. 7 Synthesis of peptides 4

1.2 多肽刚性纳米纤维复合 I 型胶原水凝胶的制备工艺

1.2.1 I 型胶原(Col-I)的提取

本实验采用酶解法提取小牛皮源 I 型胶原^[19]。酸性低离子强度环境可破坏胶原分子电荷平衡,解离盐键与希夫碱交联结构,促使胶原纤维溶胀溶解,释放酸溶性胶原。天然胶原的端肽结构会阻碍其溶于稀酸,而胃蛋白酶可特异性切割端肽,对胶原进行限制性降解,在保留完整三螺旋结构的前提下,释放可溶性胶原组分,实现 I 型胶原的高效纯化,具体工艺如下:去除小牛皮皮毛并洗净,采用无水乙醇/氯仿(1:1)混合溶液脱脂 24 h,再经无水乙醇浸泡 24 h 去除残留杂质。随后加入 20 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液,以 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 10.5~11.0,浸泡 12 h 螯合去除金属离子,最后用 10% NaCl 溶液清洗 8 h,完成原料预处理。以 1:30 料液比配制胃蛋白酶-0.5 mol/L

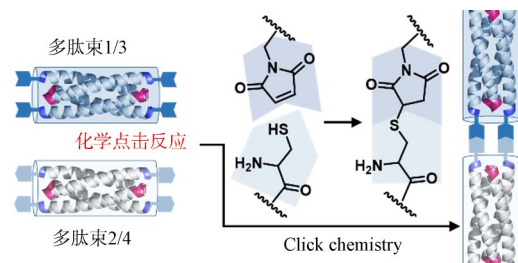


图 8 多肽刚性纳米纤维的制备

Fig. 8 Preparation of peptide-based rigid nanofibers

醋酸酶解液,低温酶解原料 5~7 d。酶解后于低温 8000 r/min 离心 15 min,经盐析、二次离心与盐析提纯得到胶原粗产物。将产物复溶于 0.5 mol/L 醋酸,置于 8000~14 000 Da 透析袋中透析 7 d,每日换液 3~4 次以彻底除杂,待溶液澄清透明后,于 4℃避光保存。实验全程无菌操作,体系温度恒定

低于6℃,可有效保护胶原三螺旋结构,避免其变性降解。

1.2.2 多肽刚性纳米纤维物理复合I型胶原水凝胶的制备工艺

选用体积分数3%的I型胶原溶液作为母液,待完全溶解后,采用氢氧化钠溶液调节体系pH至7.0~7.5,配制成胶原终浓度7 mg/mL。在此基础上引入多肽刚性纳米纤维(PRNs)作为功能性增强相,设置四组梯度添加比例进行对照实验(质量百分比为0%、3%、5%和10%)。精准称量并混匀胶原原液与对应比例的PRNs分散液,充分搅拌均匀得到均一稳定的胶原-PRNs复合前驱混合液。取洁净圆柱形模具,模具内径8 mm、高度2 mm,采用注射器缓慢吸取各组复合溶液,匀速注射填充至模具内部,避免注射过程中产生气泡影响凝胶成型结构。随后向体系内逐滴添加氢氧化钠溶液缓慢调节混合液酸碱度,直至体系pH稳定至7.0,消除酸碱失衡对胶原自组装交联的干扰。将装填混合液的模具平稳放置于37.5℃恒温培养箱中恒温孵育,持续静置2 h。经过胶原分子交联、PRNs网络协同组装后,混合液逐步发生溶胶-凝胶转变,最终成型为质地均匀的乳白色复合水凝胶(Col-PNRs)。

1.2.3 多肽刚性纳米纤维化学交联复合I型胶原水凝胶的制备工艺

参照张兴栋课题组前期研究工作^[20-22],在4℃条件下,以20 mmol/L盐酸溶液为溶剂配制5 mL、浓度为2 mg/mL的I型胶原溶液,持续搅拌12 h至胶原完全溶解。随后采用0.2 mol/L磷酸氢二钠缓冲液与5 mol/L氢氧化钠溶液调节溶液pH至7.5。向体系中加入37.5 μL甲基丙烯酸酐(MA),持续搅拌反应4 h;反应全程以5 mmol/L氢氧化钠溶液维持体系pH稳定在7.5(图9)。反应结束后,将反应液移入截留分子量8000~14 000 Da的透析袋,于4℃搅拌条件下梯度透析纯化。以含50%(体积分数)乙醇的20 mmol/L盐酸溶液为初始透析液,逐次递减10%乙醇体积分数进行透析,最后用20 mmol/L盐酸溶液透析48 h。透析产物经冷冻干燥后,于-80℃避光保存备用。称取甲基丙烯酸化I型胶原(Col-I-MA)的核磁氢谱图冻干样品和未改性I型胶原冻干样品各5 mg,溶解于0.5 mL氘代二甲基亚砜(DMSO)中,用600 MHz核磁共振波谱仪测定其在化学位移为(0~13)×

10⁻⁶区间的¹H的吸收波谱。

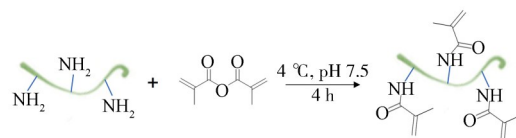


图9 Col-I-MA的合成示意图

Fig. 9 Schematic diagram of the synthesis of Col-I-MA

分别称取上述甲基丙烯酸化胶原14 mg及未改性胶原冻干样品,以20 mmol/L盐酸溶液溶解,配制14 mg/mL胶原母液。待完全溶解后,采用氢氧化钠溶液调节体系pH至7.0~7.5,加入光引发剂I2959,配制成胶原终浓度7 mg/mL、光引发剂终浓度为0.5 mg/mL(本研究选用的I2959浓度处于安全范围,后续研究可进一步优化浸泡洗脱工艺,最大限度去除残留光引发剂,持续提升材料的生物安全性)的凝胶预聚液;若体系浓度偏高,可补加磷酸盐缓冲液微调。随后再引入甲基丙烯酸化多肽刚性纳米纤维(MA-PRNs)作为增强相,设置0%、3%和5%(质量分数)三组梯度添加量进行对照实验,将不同比例MA-PRNs与胶原预聚液充分混匀,得到复合预聚液。将混合液在8 W/cm²紫外光下照射30 s,通过光交联固化,形成光交联胶原水凝胶(Col-I-MA-PRNs)。

1.3 多肽刚性纳米纤维复合I型胶原水凝胶的力学性能测试

1.3.1 流变力学检测

将制备好的水凝胶样品置于流变仪测试台上,缓慢下降平行板转子(或测试平板)。待转子接触样品后继续下压,直至其与测试台的间隙达到1 mm,并用刮板小心清除边缘挤出的多余样品。随后开展流变学测试:首先进行应变扫描(振幅扫描),在固定角频率1 rad/s下,设定应变范围为0.01%~1%,通过监测模量随应变的变化以确定样品的线性粘弹区(LVE)。随后进行频率扫描,设定固定应变为1%(位于线性粘弹区内),角频率范围为0.01~1 rad/s,通过分析模量随频率的变化规律,评估水凝胶的动态粘弹性能与网络结构稳定性。

1.3.2 动态力学分析(DMA)测试

利用动态热机械分析仪(DMA)对水凝胶的粘弹性行为进行定量表征。测试环境为室温(~25℃),相对湿度控制在50%左右以防止水分蒸发对测试结果产生影响。样品几何形状为圆柱

体,通过定制模具成型,精确控制其直径为 8.00 mm,高度为 2.00 mm。为避免个体差异带来的误差,每组配方准备 3 个独立平行试样。测试过程中,选用压缩夹具固定样品。初始阶段施加 5 mN 的微力作为预载荷,以消除探头与样品间的空隙并建立稳定的力学接触。随后,在 20 μm 的恒定振幅下,对样品施加正弦交变应力。为了考察频率依赖性,测试频率依次设定为 1 Hz、2 Hz 和 5 Hz。在每个目标频率下,均执行 10 个完整的加载-卸载循环。所有数据均由仪器配套软件自动采集并处理,最终模量值以 3 次平行实验的平均值 $\pm$ 标准差呈现。

1.4 多肽刚性纳米纤维复合 I 型胶原水凝胶的降解性测试

将直径 6 mm、高度 2 mm 的圆柱型水凝胶样品冷冻干燥并称重,记为初始质量 W_0 ($n=3$)。配制母液浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 I 型胶原酶溶液,依据本批次 COA 标称比活力 125 U/mg 计算,该母液对应酶活力为 12.5 U/mL,经 1:2.5 (v/v) 稀释后,降解体系终活力为 5 U/mL。5 U/mL 属生理相关酶活区间 (1~10 U/mL); 取 1 mL 上述 5 U/mL 酶溶液浸没样品,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下恒温孵育。随后在不同时间取出水凝胶,用滤纸吸水后,冻干称重 (W_t),并在每个时间点更换新的缓冲液。根据降解率 (%) = $(W_0 - W_t) / W_0$ 计算水凝胶的降解速率。

2 结果与讨论

2.1 PRNs 和 MA-PRNs 的构建与表征

参照本课题组前期建立的合成策略,采用固相多肽合成法 (SPPS) 分别制备了用于构建刚性纳米纤维的核心组分——多肽 1 和多肽 2。如图 10 所示,质谱 (MS) 表征结果显示,多肽 1 和多肽 2 的检测分子量分别为 3685 Da 和 3665 Da,与理论设计值完全吻合,且基线平稳,未见明显的副产物或杂质峰,这从分子水平上确证了目标多肽的成功合成与高纯度。

基于前期研究基础,我们利用多肽 1 和多肽 2 在水溶液自发共组装的特性,将其按 1:1 的摩尔比例混合,成功制备了多肽刚性纳米纤维 (PRNs) (图 11a)。为了直观验证其微观形貌,我们采用了原子力显微镜 (AFM) 进行表征。如图 11b 所示,PRNs 呈现出典型的均匀纤维状结构。纳米纤维的直径高度均一,集中在 2 nm 左右 (图 11c),这一尺寸与纳米束组装体的理论直径相符;同时,进一

步进行统计学分析,纤维的平均长度约为 495 nm (图 11f),表明在未修饰状态下,多肽分子间具有适中的组装驱动力。

为了赋予该纳米纤维体系光交联活性,以便后续进行水凝胶化或图案化加工,我们在保留多肽自组装序列的前提下,对其侧链进行了选择性化学修饰。具体而言,利用甲基丙烯酸酐 (MA) 与氨基的亲核加成反应,在多肽 1 和多肽 2 的侧链上成功引入了甲基丙烯酰基,分别得到了功能化衍生物——多肽 3 和多肽 4。为了验证修饰反应的精准性与产物的纯度,我们综合运用了高效液相色谱 (HPLC) 与质谱技术进行双重表征。如图 7 及支撑信息图 S1、S2 所示, HPLC 图谱中单一的出峰位置表明了产物具有极高的化学纯度,无未反应原料残留;同时,质谱数据显示多肽 3 和多肽 4 的分子量分别为 3794 Da 和 3783 Da,相较于修饰前分别增加了约 109 Da 和 118 Da,这一增量与单个 MA 基团的分子质量 (约 98 Da) 加上结构微扰的理论值精确对应,确凿地证实了甲基丙烯酸基团已成功接枝到多肽分子链上。

随后,我们将多肽 3 与多肽 4 按 1:1 的比例进行共组装,旨在构建甲基丙烯酸修饰的多肽刚性纳米纤维 (MA-PRNs)。AFM 表征结果 (图 11d) 显示,尽管引入了体积较大的不饱和双键侧基,多肽分子依然能够保持原有的组装模式,形成形态均一的纳米纤维结构。从高度分析图 11e 来看,MA-PRNs 的直径仍稳定在 2 nm 左右,这说明侧链的化学修饰并未破坏组装核心,纤维的刚性骨架得以完整保留。然而,与未修饰的 PRNs 相比,MA-PRNs 的平均长度缩短至 356 nm 左右 (图 11f)。这种长度的变化可能归因于 MA 基团的空间位阻效应削弱了纤维末端的纵向生长能力,或是改变了组装过程中的动力学平衡。总体而言,MA-PRNs 的成功制备不仅保留了原始纳米纤维的物理尺寸特征,更重要的是引入了可聚合的双键位点,为后续的光固化成型及复合材料的构建奠定了坚实的材料基础。

2.2 Col-I 与 Col-I-MA 的核磁分析

图 12 展示了 Col-I 及 Col-I-MA 的 ^1H -NMR 谱图。其中,6.6、7.1 及 7.9 ppm 处的特征峰归属于胶原分子骨架上芳香族氨基酸残基 (如酪氨酸或苯丙氨酸) 苯环上的质子信号。值得注意的是,这些峰位在 MA 改性前后未发生显著位移,可作为定性的内标参照。相比之下,Col-I-MA 谱图中于

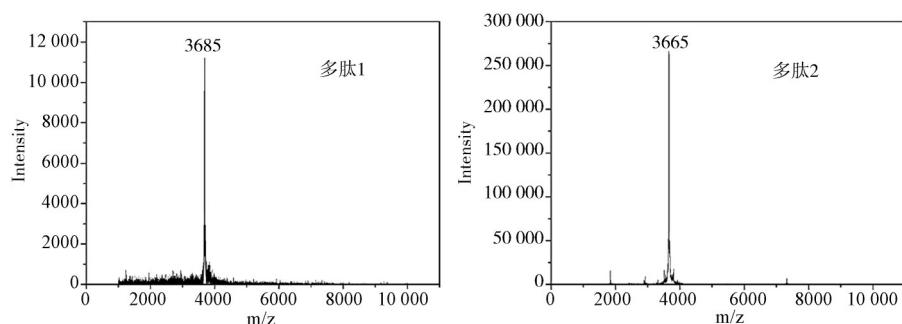
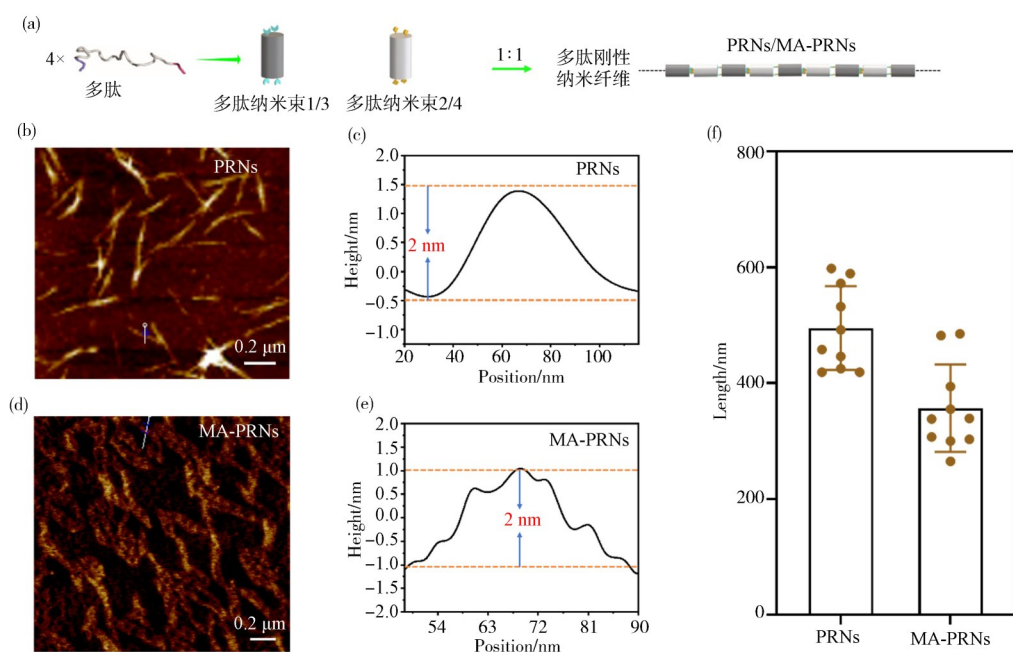


图10 多肽1和多肽2的质谱

Fig. 10 Mass spectra of peptide 1 and peptide 2



(a) 多肽1/3和多肽2/4分别形成的束按照1:1的比例聚合成多肽刚性纳米纤维;(b) PRNs的原子力显微镜图;(c) PRNs的高度分析图;(d) MA-PRNs的原子力显微镜图;(e) MA-PRNs的高度分析图;(f) PRNs和MA-PRNs的长度统计图,所有数据表示为均值±标准差(mean±SD)。

图11 多肽刚性纳米纤维的构建与表征

Fig. 11 Construction and characterization of peptide rigid nanofibers

5.3和 5.6×10^{-6} 处出现了两个新的双键质子信号峰,对应于甲基丙烯酰基($-\text{C}=\text{CH}_2$)的特征吸收;同时,在 1.9×10^{-6} 处观察到了归属于 $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$ 的质子共振峰。上述MA特征化学位移的出现,确证了甲基丙烯酸酐(MA)已成功接枝到胶原分子链上。

2.3 多肽刚性纳米纤维复合I型胶原水凝胶的力学性能分析

为了探究多肽刚性纳米纤维(PRN)对胶原基支架力学性能的增强效应,我们先采用物理共混的方式,将PRNs引入Col I水凝胶网络中,系统考察了不同复合比例对水凝胶流变学行为的影

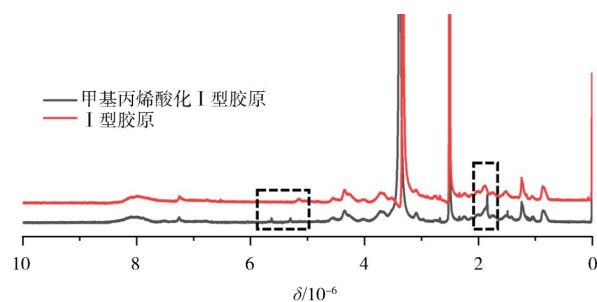


图12 Col-I与Col-I-MA的核磁共振谱图

Fig. 12 ^1H NMR spectra of Col-I and Col-I-MA

响。我们以7 mg/mL的纯胶原水凝胶为基质,设定PRNs的复合质量分数分别为0%、3.2%、5%和10%,成功构建了系列物理复合水凝胶体系

(Col-PNRs)。利用旋转流变仪对水凝胶的粘弹性进行了频率扫描测试。结果表明,随着 PRNs 复合比例的提升,Col-PNRs 的储能模量(G')与损耗模量(G'')交点所对应的临界剪切应变(γ)呈先增大后减小的非线性变化趋势(图 13 和 14),这表明 PRNs 的引入能够显著调控胶原网络的抗形变能力,且该能力在某一特定比例下达到最优。经多次重复实验验证,当 PRNs 复合比例为 5% 时,水凝胶的抗形变性能达到峰值(图 15a 和图 S3)。然而,值得注意的是,所有物理复合水凝胶的储能模量均低于 1000 Pa,显示出较低的力学刚度。

进一步的应变扫描与应力松弛测试揭示了该物理复合体系的局限性。应变扫描结果显示,各组成水凝胶的线性黏弹区(LVR)边界均低于 10% 应变(图 14)。在应力松弛行为方面,物理复合水

凝胶均表现出典型的应力衰减现象,而且模量普遍低于 80 Pa(图 15b)。特别值得关注的是,尽管 5% 复合比例的水凝胶在抗形变测试中表现最佳,但在应力松弛实验中却表现出最快的模量衰减速率,其初始模量甚至低于 10 Pa。这一反常现象暗示了物理缠结的非共价作用(如氢键、疏水相互作用)在高应力载荷下极易发生解离,导致网络结构的快速失效。

综上所述,虽然 PRNs 的引入可以通过比例调控在一定程度上优化胶原水凝胶的力学响应,但单纯依靠 PRNs 与胶原纤维间的物理缠绕及非共价相互作用,难以构建出具有足够承载能力和抗松弛特性的网络结构,亟需通过化学交联等手段进一步强化网络结点。

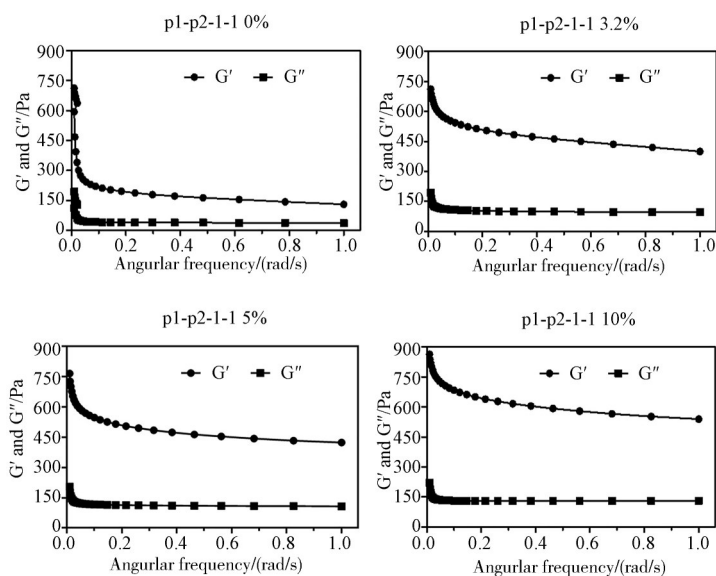


图 13 固定应变为 1%, Col-PNRs 水凝胶的振荡频率扫描(0.01~1 rad/s)

Fig. 13 The oscillation frequency scanning of Col-PNRs hydrogel (0.01~1 rad/s) was performed at a fixed strain of 1%

为克服物理复合体系中非共价相互作用力较弱的局限,本研究构建了基于光交联的化学复合策略。首先,利用甲基丙烯酸酐对 I 型胶原进行改性,成功在其分子链上引入了光敏双键;核磁氢谱($^1\text{H-NMR}$)中特征烯氢质子峰(δ 5.3×10^{-6} 及 5.6×10^{-6})的出现确证了 Col-I-MA 的成功合成。与此同时,如前文所述,我们对多肽刚性纳米纤维(PNRs)也进行了甲基丙烯酸(MA)侧链修饰,AFM 表征显示改性后的 MA-PNRs 仍保持良好的单分散纳米纤维形貌,表明光敏基团的成功接枝并未破坏其刚性骨架结构。基于物理复合组在 5% 掺量时综合性能最优,10% 掺量呈现性能下

降趋势。为避免高比例物理填料干扰化学交联网络的均匀性及力学贡献,光交联组掺量设定为 5% 及以下,以确保两组在化学交联主导机制下的可比性。因此,我们将 MA-PNRs 按 3% 和 5% 的质量分数分散于 Col-I-MA 预聚液中,经紫外光引发自由基聚合,成功制备了化学交联的复合水凝胶(Col-I-MA-PNRs,图 16)。

为评估该复合体系在生理载荷下的力学响应,采用动态热机械分析仪(DMA, Q-800, TA Instruments)对其粘弹性进行了频率扫描测试。鉴于人体关节软骨在日常活动中承受的载荷频率通常介于 1~5 Hz 之间,我们特意选取了 1、2 及 5 Hz

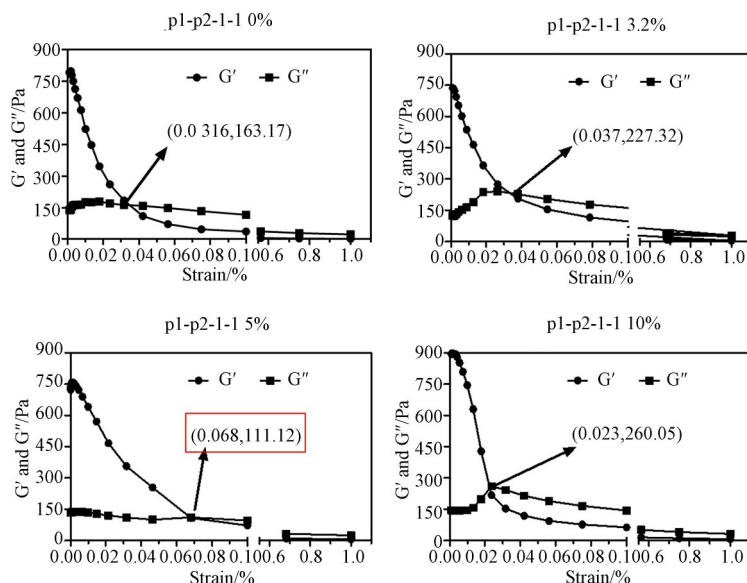


图 14 固定频率为 1 rad/s, Col-PNRs 水凝胶的振荡应变扫描(0.01%~1%)

Fig. 14 The oscillatory strain scanning of Col-PNRs hydrogel (0.01%~1%) was performed at a fixed frequency of 1 rad/s

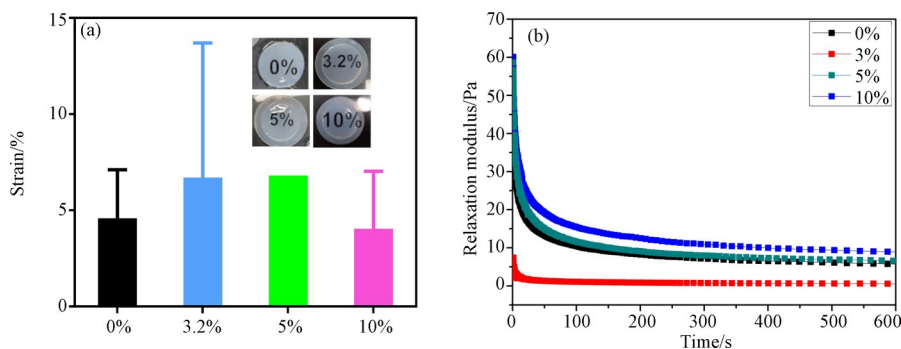


图 15 Col-PNRs 水凝胶的应变交汇点(a)和弛豫曲线(b)

Fig. 15 Strain intersection point (a) and relaxation curve (b) of Col-PNRs hydrogel

三个特征频率,分别模拟人体低速行走、正常步态及奔跑状态下的受力环境。如图 16 所示,在测试频率范围内,所有组分的储能模量(G')与损耗模量(G'')均随频率升高而增大。尤为重要的是,随着 MA-PNRs 复合比例的增加,水凝胶的储能模量显著提升,数值介于 2~12 kPa 之间。这表明刚性纳米纤维与化学交联网络产生了良好的协同增强效应,高长径比的 MA-PNRs 作为多功能交联结点,通过表面共价键与胶原网络形成了协同增强的互穿结构,有效限制了高分子链段的运动。

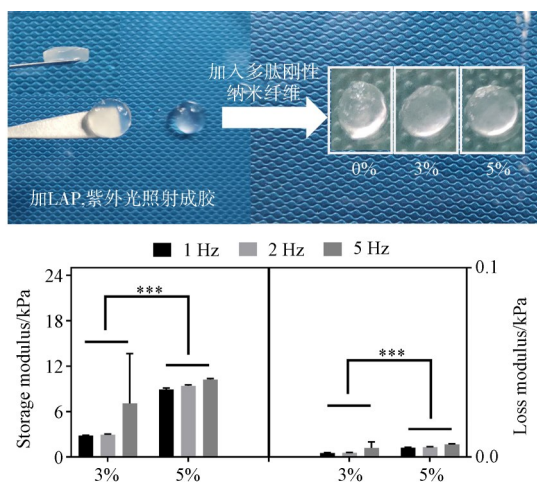
综合比较而言,纯胶原水凝胶、5% PNRs 物理复合水凝胶、3% MA-PNRs 光交联复合水凝胶的 G' 和 G'' 分别为 12 Pa、75 Pa、2800 Pa 和 150 Pa、100 Pa 和 500 Pa; 损耗因子 $\tan\delta$ 依次为 12.5、1.33、0.17。由结果可见,经 MA-PNRs 介导构建共价交联网络后,复合水凝胶的储能模量 G' 显著提升,同时 $\tan\delta$ 明显下降。该现象证实 MA-

PNRs 可通过共价桥接作用优化胶原分子网络结构,有效提升体系弹性组分占比,构筑力学稳定性更强的三维水凝胶网络。

进一步的压缩力学测试结果显示,随着 MA-PNRs 含量的增加,复合水凝胶的杨氏模量呈现先升高后降低的趋势(图 17)。其中,含 3% MA-PNRs 的组份表现出最优的压缩承载能力,其压缩模量达到最大值 0.01 MPa。这说明通过调节 MA-PNRs 的复合比例,能够调控水凝胶的力学性能,展现更为优异的可设计性。同时证明化学交联不仅强化了纳米填料与基质间的界面结合,更有效传递了载荷,凸显了刚性纳米纤维在增强软物质基体中的核心作用,为设计高性能纳米复合水凝胶提供了重要的材料学依据。

2.4 多肽刚性纳米纤维复合 I 型胶原水凝胶的抗降解性分析

随后,我们系统考察了多肽刚性纳米纤维



所有数据表示为均值±标准差(Mean±SD)。采用单/双因素方差分析开展组间统计学比较。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

图 16 Col-I-MA-PRNs 水凝胶的形成图片(a)和 DMA 数据图(b)

Fig. 16 The formation pictures (a) and DMA (b) data of Col-I-MA-PRNs hydrogels

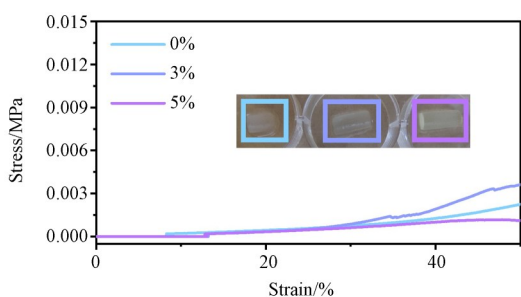


图 17 Col-I-MA-PRNs 水凝胶的应力-应变图

Fig. 17 The stress-strain diagram of Col-I-MA-PRNs hydrogel

(PRNs) 掺量对物理复合 I 型胶原基水凝胶体外降解行为的影响(图 18)。降解动力学数据显示, 除 3% 组外, 其余含 PRNs 组别的降解速率均显著

高于空白对照组。同时,流变学表征显示这些物理复合水凝胶的线性黏弹区边界均低于 10% 应变(图 18a)。这种低模量与较差的抗形变能力,本质上源于物理缠结网络较弱的结点作用力,导致其在生理环境下难以维持结构的长期稳定性,仅仅 5 小时就降解完全。物理复合体系中,纳米纤维与胶原链间的物理缠结为提升水凝胶抗形变能力的主导作用,可有效分散应力、优化凝胶力学支撑结构;氢键辅助增强界面结合作用。两类非共价作用仅能改善凝胶短时力学抗形变性能,无稳定化学键约束,无法限制胶原分子链的解离与溶胀,因此对降解稳定性几乎无提升作用,最终导致物理复合凝胶快速降解失效。鉴于此,我们引入了光交联策略以强化网络结点。体外降解实验表明,光交联水凝胶的降解行为呈现出显著的浓度依赖性:降解速率排序为 $3\% < 0\% < 5\%$, 即 3% 掺量组表现出最慢的降解速率(图 18b)。我们推测该现象背后的机制在于 PRNs 对胶原网络致密化的调控作用:当 MA-PRNs 引入 MA-Col 体系后,光引发的交联反应在纤维与胶原基质间形成了稳固的化学桥接,使得网络结构更加紧致,有效阻碍了水解酶的侵入与扩散,从而延缓了降解进程。然而,这种致密化效应并非随纤维掺量呈线性增长。当纤维投料比超过 3% 时,过量的刚性纳米纤维易发生局部聚集,破坏了胶原分子原有的紧密缠绕结构,反而导致网络中出现微观缺陷与孔隙率增加。这种结构上的松散化不仅降低了网络对外界应力的耐受性,更为外界侵蚀性物质(如酶、水分子)提供了便捷的扩散通道,从而加速了基体的降解。

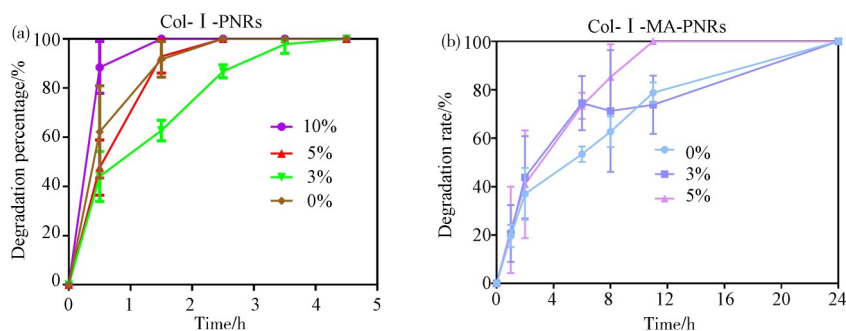


图 18 Col-I-PNRs 水凝胶(a)和 Col-I-MA-PRNs 水凝胶(b)的降解曲线

Fig. 18 Degradation curves of Col-I-PNRs hydrogel (a) and Col-I-MA-PRNs hydrogel (b)

值得注意的是,与未进行 MA 修饰的物理复合水凝胶相比,光交联策略显著降低了水凝胶的整

体降解速率,并有效延长了胶体的完全降解时间。上述结果不仅证实了化学交联在提升材料结构稳

定性方面的优越性,更确立了纤维掺量和降解速率之间的构效关系,表明通过精确调控刚性纳米纤维的复合比例,可实现对胶原基水凝胶降解动力学的定制化设计。

3 结 论

本研究构建了I型胶原与多肽刚性纳米纤维(PRNs)复合水凝胶体系,阐明了纳米填料与聚合物网络的构效关系,对比了物理交联与光化学交联两种体系的材料性能差异。单纯物理缠结的复合水凝胶受弱非共价作用限制,结构稳定性差、抗形变能力弱、降解速度快,仅能通过调控PRNs比例小幅优化性能。研究利用多肽可修饰性,通过甲基丙烯酸酐改性实现PRNs与胶原网络的化学桥接,大幅提升材料综合性能。两种交联体系的最优PRNs掺量存在差异:物理交联体系5%掺量力学性能最优,3%掺量抗降解能力最佳;光交联体系以3% MA-PRNs为临界阈值,可实现协同增强,获得0.01 MPa最高压缩模量与最优抗降解效果,过量掺量会引发纤维团聚、产生结构缺陷,加速材料降解。性能对比显示,光交联体系稳定性显著优于物理交联体系,但与天然关节软骨力学性能差距较大。该材料压缩模量与现有报道的胶原基水凝胶水平基本一致,多处于1~20 kPa区间^[22-25]。kPa量级力学性能无法承受关节循环载荷,不适用于负重关节软骨修复,更适配皮肤创面、软组织缺损等低载荷组织修复场景^[26]。后续可通过复合无机纳米相、构建梯度交联及双网络结构等策略提升支架刚度,缩小与天然软骨的力学差距、拓展应用范围^[27]。本研究明确了填料含量与凝胶结构的内在关联,为阐释刚性纳米填料软基质增强机制提供实验依据,为高性能组织工程纳米复合生物材料研发奠定理论基础。

参考文献:

- [1] Pei Z, Xu H, Guo M, *et al.* A soft-hard hybrid scaffold for osteochondral regeneration through integration of composite hydrogel and biodegradable magnesium [J]. *Biomaterials*, 2026, 324: 123493.
- [2] Dehghan-Baniani D, Mehrjou B, Chu P K, *et al.* Recent advances in “functional engineering of articular cartilage zones by polymeric biomaterials mediated with physical, mechanical, and biological/chemical cues” [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12 (10): 2202581.
- [3] Zhang Y, Yu W. Recent advances in bionic scaffolds for cartilage tissue engineering[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2025, 13: 1625550.
- [4] Ullah S, Zainol I. Fabrication and applications of bio-functional collagen biomaterials in tissue engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 298: 139952.
- [5] Amirrah I N, Lokanathan Y, Zulkiflee I, *et al.* A comprehensive review on collagen type I development of biomaterials for tissue engineering: from bio-synthesis to bioscaffold [J]. *Biomedicines*, 2022, 10(9): 2307.
- [6] Liu Q, Dai W, Gao Y, *et al.* The degradation rate of collagen-based hydrogels regulates chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Collagen & Leather*, 2025, 7: 39.
- [7] Gao Y, Wang J, Dai W, *et al.* Collagen-based hydrogels induce hyaline cartilage regeneration by immunomodulation and homeostasis maintenance [J]. *Acta Biomater*, 2024, 186: 108-124.
- [8] Huang D, Li Y, Ma Z, *et al.* Collagen hydrogel viscoelasticity regulates MSC chondrogenesis in a ROCK-dependent manner[J]. *Sci Adv*, 2023, 9(6): eade9497.
- [9] Li K F, Guo L K, Fan Y J, *et al.* Experimental study on collagen hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering [J]. *Chin J Reparative Reconstr Surg*, 2012, 26(11): 1356-1361. [李奎峰, 郭立坤, 樊渝江, 等. 胶原水凝胶支架用于软骨组织工程的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(11): 1356-1361.]
- [10] Ma L, Tan Y, Tong Q, *et al.* Collagen fibrillar matrices with tunable modulus and stress relaxation: Alginate-activated organoapatite nanoparticles yield dual reinforcement effects [J]. *Chem Eng J*, 2025, 517: 164591.
- [11] Shen Y J, Cheng W, Ma X T, *et al.* Research advance of collagen/inorganic composite scaffolds in bone defect repair [J]. *Chin J Dent Mater Devices*, 2024, 33(1): 42-49. [申亚杰, 程雯, 马晓婷, 等. 胶原/无机物复合支架在骨缺损修复中的研究进展[J]. *口腔材料器械杂志*, 2024, 33(1): 42-49.]
- [12] Vladu A F, Albu Kaya M G, Truşcă R D, *et al.* The role of crosslinking agents in the development of collagen-hydroxyapatite composite materials for bone tissue engineering [J]. *Materials*, 2025, 18(5): 998.
- [13] Kim K, Kloxin C J, Saven J G, *et al.* Nanofibers produced by electrospinning of ultrarigid polymer

- rods made from designed peptide bundlemers [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2021, 13(22): 26339-26351.
- [14] Wu D, Sinha N, Lee J, *et al.* Polymers with controlled assembly and rigidity made with click-functional peptide bundles [J]. Nature, 2019, 574(7780): 658-662.
- [15] He Y, Wu D, Zhang X. Bottom-up on-surface synthesis based on click-functionalized peptide bundles [J]. Nanoscale, 2023, 15(20): 8996-9002.
- [16] Zhu J, Wei Y, Yang G, *et al.* Peptide-based rigid nanorod-reinforced gelatin methacryloyl hydrogels for osteochondral regeneration and additive manufacturing [J]. Nat Commun, 2025, 16: 7090.
- [17] Wei Y, Gao Z, Ye H, *et al.* Polymers with tunable rigidity enable thermal stiffening peptide hydrogels and ultra-tough polyvinyl alcohol membranes [J]. Small, 2025, 21(45): e08045.
- [18] Thieriet N, Alsina J, Giralt E, *et al.* Use of Alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions [J]. Tetrahedron Lett, 1997, 38(41): 7275-7278.
- [19] Xiao S W, Dan N H, Zeng R, *et al.* Extraction methods for collagen from pelts [J]. West Leather, 2009, 31(15): 17-21. [肖世维, 但年华, 曾睿, 等. 从动物皮中提取胶原蛋白的方法 [J]. 西部皮革, 2009, 31(15): 17-21.]
- [20] Tang Y, Wang J, Qiu H, *et al.* The chondrogenic differentiation of BMSCs in collagen hydrogels and the effect of MMPs among cell-material interactions [J]. Collagen & Leather, 2024, 6: 31.
- [21] Yang K, Sun J, Wei D, *et al.* Photo-crosslinked mono-component type II collagen hydrogel as a matrix to induce chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. J Mater Chem B, 2017, 5(44): 8707-8718.
- [22] Zheng L, Liu S, Cheng X, *et al.* Intensified stiffness and photodynamic provocation in a collagen-based composite hydrogel drive chondrogenesis [J]. Adv Sci, 2020, 7(6): 2000588.
- [23] Ravichandran R, Islam M M, Alarcon E I, *et al.* Functionalised type-I collagen as a hydrogel building block for bio-orthogonal tissue engineering applications [J]. J Mater Chem B, 2016, 4(2): 318-326.
- [24] Weng H, Decarli M C, He L, *et al.* Mechanical reinforced and self-healing hydrogels: bioprinted biomimetic methacrylated collagen peptide-xanthan gum constructs for ligament regeneration [J]. Adv Healthc Mater, 2025, 14(25): 2502341.
- [25] Huang C J, Lei H, Tang X J. Study on the repair of articular cartilage defects by EDC/NHS cross-linked recombinant collagen hydrogel [J]. Mater China, 2024, 43(4): 344-354. [黄长瑾, 雷桓, 唐晓军. EDC/NHS 交联重组胶原蛋白水凝胶修复关节软骨缺损 [J]. 中国材料进展, 2024, 43(4): 344-354.]
- [26] Wu J, Yun Z, Song W, *et al.* Highly oriented hydrogels for tissue regeneration: design strategies, cellular mechanisms, and biomedical applications [J]. Theranostics, 2024, 14(5): 1982-2035.
- [27] Hashemi-Afzal F, Fallahi H, Bagheri F, *et al.* Advancements in hydrogel design for articular cartilage regeneration: a comprehensive review [J]. Bioact Mater, 2025, 43: 1-31.

(责任编辑: 白林含)