

# 透明质酸-葡聚糖超分子水凝胶的制备及其细胞包载性能研究

曹璐娟, 施瑜, 陈荆晓, 陈敬华\*

(江南大学药学院, 无锡 214122)

**摘要** 分别制备了经 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)修饰的透明质酸主体大分子(HA-CD), 用2-萘乙酸(2-NAA)修饰的葡聚糖客体大分子(Dex-NAA), 其结构均经核磁共振氢谱进行确认, 接枝率分别为15.53%和7.38%。利用 $\beta$ -环糊精和2-萘乙酸间的主客体识别作用, 制备得到超分子水凝胶。扫描电镜观测表明水凝胶内部为多孔结构, 并且排列规整; 水凝胶经流变学测试其储存模量大于损耗模量, 具有较好的机械强度; 同时, 水凝胶具有良好的细胞相容性, 可有效包裹细胞并促进细胞增殖生长。这种由天然多糖构建的超分子水凝胶有望作为细胞支架应用于组织工程领域。

**关键词** 水凝胶; 细胞包载; 透明质酸;  $\beta$ -环糊精; 主客体作用

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)03-0307-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140310

## Preparation of HA-Dex supramolecular hydrogel for cell encapsulation

CAO Lujuan, SHI Yu, CHEN Jingxiao, CHEN Jinghua\*

School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

**Abstract** In this study, hyaluronic acid/ $\beta$ -cyclodextrin conjugate(HA-CD) and dextrin/2-naphthylacetic acid conjugate(Dex-NAA) were prepared, respectively. Their chemical structures were confirmed by  $^1\text{H}$  NMR, the degrees of substitution(DS) of HA-CD and Dex-NAA were determined to be 15.53% and 7.38%, respectively. A supramolecular hydrogel was subsequently prepared by the host-guest interaction between  $\beta$ -CD and 2-NAA based on these two gelators. Based on scanning electron microscopy(SEM) observation illustrated that the hydrogel had regularly porous architecture. Rheological analysis exhibited that the storage modulus of the hydrogel was higher than the loss modulus, indicating good mechanical strength. Meanwhile, the hydrogel showed favorable biocompatibility and could, therefore, encapsulate cells *in situ*, leading to promotion of cell proliferation and growth. This natural polysaccharide-based supramolecular hydrogel is promising in the application of tissue engineering as cell scaffold.

**Key words** hydrogel; cell encapsulation; hyaluronic acid;  $\beta$ -cyclodextrin; host-guest interaction

This work was supported by the project of the Doctoral Scientific Fund of the Ministry of Education of China(No. 20110093110008); the Natural Science Foundation of Jiangsu Province(No. BK2012557); and the Opening Fund of Key Laboratory of Biomedical Polymers, Ministry of Education, Wuhan University(No. 20110401)

器官及组织缺损严重影响人类健康。临床治疗方式主要为活体器官移植和人工器官替代<sup>[1]</sup>, 但活体器官匮乏、人工器官寿命有限、价格高昂等问题<sup>[2]</sup>限制了其临床应用。近年来发展的组织工

程技术利用具有良好生物相容性、可降解的材料包载细胞, 移植于组织病损部位, 可实现组织重建和功能恢复<sup>[3-4]</sup>。

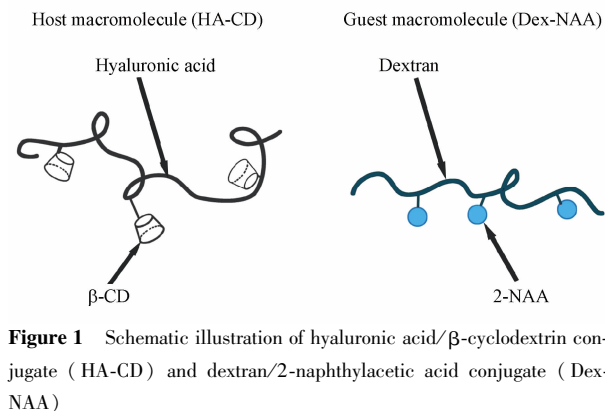
水凝胶是一类高含水的三维网状材料, 在组织

\* 收稿日期 2014-02-27 \* 通信作者 Tel:0510-85911900 E-mail:jhchenwhut@126.com

**基金项目** 教育部博士点基金资助项目(No. 20110093110008); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2012557); 武汉大学生物医用高分子材料教育部重点实验室开放基金资助项目(No. 20110401)

工程、药物传递领域发挥着重要作用<sup>[5-6]</sup>。利用透明质酸(hyaluronic acid, HA)制备的水凝胶因良好的生物活性广泛应用于组织修复领域<sup>[7-8]</sup>。但HA凝胶稳定性不高,通过引入葡聚糖(dextran, Dex)制备复合凝胶,可改善其稳定性<sup>[9-12]</sup>,但化学交联又会降低材料的生物活性。近年来,利用非共价作用力构建的超分子水凝胶受到广泛关注<sup>[13-16]</sup>。其具有制备条件温和、机械强度可控并可保持材料活性等优点<sup>[17-18]</sup>。尤其是基于环糊精(cyclodextrin, CD)与疏水性分子间的主客体作用制备的超分子水凝胶,在细胞包埋、组织支架方面展现了极大的前景<sup>[19-20]</sup>。

本研究分别在HA分子中引入主体 $\beta$ -CD,在Dex分子中引入客体2-萘乙酸(2-NAA),并利用主客体作用,制备超分子水凝胶用于细胞的包载。由于未引入化学交联,这种水凝胶有望保持良好的生物活性,并可有效促进细胞黏附生长,应用于组织工程领域。



**Figure 1** Schematic illustration of hyaluronic acid/ $\beta$ -cyclodextrin conjugate (HA-CD) and dextran/2-naphthylacetic acid conjugate (Dex-NAA)

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

透明质酸钠(HA,  $M_r$ : 1 220 kD)、双醋酸荧光素(FDA)、碘化丙啶(PI)购于上海生工生物工程股份有限公司,透明质酸钠在使用前用阳离子交换树脂置换为透明质酸;葡聚糖(Dex,  $M_r$ : 20 kD)和 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)购于国药集团上海化学试剂有限公司, $\beta$ -CD使用前用水重结晶纯化; $N,N'$ -二环己基碳二亚胺(DCC)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDAC)、对甲苯磺酰氯、 $N$ -羟基琥珀酰亚胺(NHS)、2-萘乙酸(2-NAA)和4-二甲氨基吡啶(DMAP)均购于上海阿拉丁试剂公司;DMEM

高糖培养基、胎牛血清、双抗(青霉素/链霉素)均购自美国Gibco公司;噻唑蓝(MTT)、胰酶购自美国Sigma-Aldrich公司;其他试剂购自国药集团上海化学试剂有限公司,溶剂使用前均干燥新蒸处理。

### 1.2 仪器

Avance DPX-400 型核磁共振波谱仪(德国Bruker公司);S-4800 型扫描电子显微镜(日本Hitachi公司);AR-G2 型流变仪(美国TA公司);Multiskan GO 型酶标仪(美国Thermo公司);DMIL/LED 型荧光显微镜(德国Leica公司);Free-Zone 型冷冻干燥机(美国Labconco公司)。

### 1.3 细胞

小鼠胚胎成纤维细胞(NIH/3T3)购于中国科学院上海生命科学研究院细胞保藏中心。用含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM完全培养基于37℃,含5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱内培养。

## 2 方法

### 2.1 氨基环糊精(EDA- $\beta$ -CD)的制备

氨基环糊精的合成参考文献[21]制备:首先,将 $\beta$ -CD 5 g(4.4 mmol)悬浮于去离子水120 mL中,在搅拌下滴加2.5 mol/L NaOH溶液20 mL,30 min后,于冰浴条件下滴加溶有对甲苯磺酰氯1.3 g(6.9 mmol)的乙腈溶液4 mL,室温下剧烈搅拌2~3 h后调节pH至8,4℃静置过夜。收集沉淀并用丙酮洗涤3次,产品经3次重结晶提纯、真空干燥,得6-对甲苯磺酰化环糊精(6-OTs- $\beta$ -CD),产量1.29 g,产率22.7%。

将6-OTs- $\beta$ -CD 2.5 g(1.9 mmol)溶于乙二胺(EDA)15 mL中,在氮气保护下于80℃搅拌反应48 h。反应结束后,产物用丙酮沉淀。将粗产品溶于水-甲醇(3:1)溶液中,然后在丙酮中重沉淀,重复3次,真空干燥得EDA- $\beta$ -CD,产量1.69 g,产率74.03%。产物用 $^1\text{H}$  NMR确认结构。

### 2.2 主体大分子(HA-CD)的制备及表征

将HA 500 mg(1.24 mmol)溶于去离子水100 mL中,加入EDAC 475.42 mg(2.48 mmol)及NHS 71.36 mg(0.62 mmol)活化30 min,之后加入EDA- $\beta$ -CD 3.14 g(2.48 mmol),室温搅拌反应24 h。反应结束后,用截留相对分子质量为14 kD的透析袋于去离子水中透析3 d除去杂质,冷冻干燥得产物HA-CD。产物用 $^1\text{H}$  NMR确认其结构,并计算 $\beta$ -

CD 的取代度。

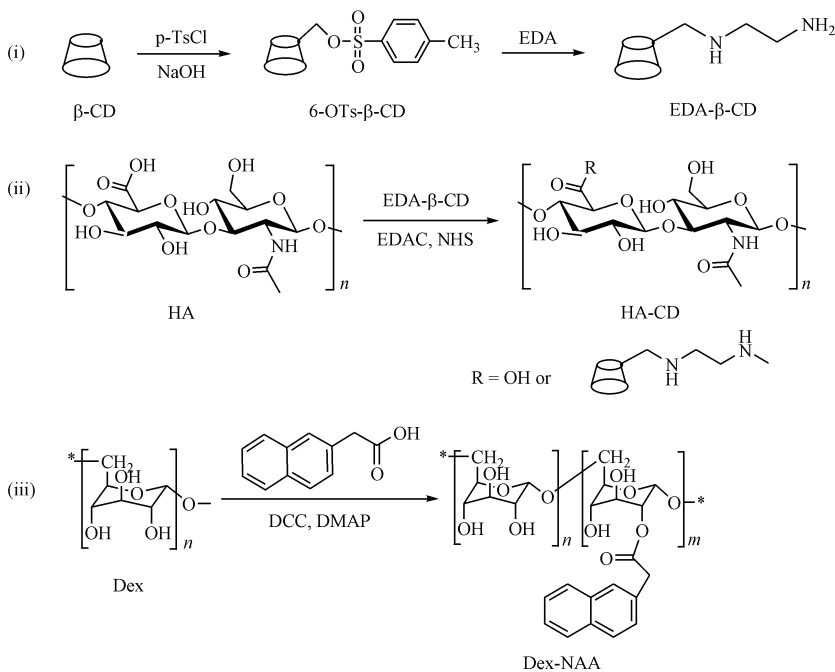


Figure 2 Synthesis of mono-6-ethylenediamine-β-cyclodextrin (EDA-β-CD) ,HA-CD and Dex-NAA

2.3 客体大分子 (Dex-NAA) 的制备及表征

将 2-NAA 1.28 g (6.87 mmol) 溶于 DMSO 10 mL,加入 DCC 1.91 g (9.30 mmol) 及 DMAP 0.11 g(0.90 mmol),活化 3 h,再将活化液缓慢加入到溶有 Dex 0.74 g(4.14 mmol) 的 DMSO 溶液 30 mL 中,于 N<sub>2</sub> 保护下,25 ℃继续搅拌反应 24 h。反应结束后滤除沉淀、浓缩,用冰乙醇沉淀。之后将沉淀溶解于水中,用截留相对分子质量为3 500 的透析袋透析 3 d,冻干后得产物 Dex-NAA。产物经<sup>1</sup>H NMR 确认其结构,并计算 NAA 的取代度。

2.4 包合体系稳定常数测定

包合体系稳定常数(*K<sub>s</sub>*)计算根据 Benesi-Hildebrand 方程进行<sup>[22]</sup>,如公式(1)所示。该公式要求主体浓度远远大于客体浓度,因此本研究配制浓度为 4.02 × 10<sup>-5</sup> mol/L 的 2-NAA 溶液及浓度为 0.95 × 10<sup>-5</sup> ~ 8.55 × 10<sup>-5</sup> mol/L 的 β-CD 主体分子溶液,二者等体积混合均匀,室温下静置 24 h,至包合作用达到平衡。之后用紫外-可见分光光度计测定其在 225 nm 处吸收度(*A*)。计算 2-NAA 与 β-CD 生成包合物的稳定常数 *K*。

$$\frac{c_H \cdot c_G}{A} = \frac{c_H}{\Delta \epsilon} + \frac{1}{\Delta \epsilon K_s} \tag{1}$$

式中:*c<sub>H</sub>* 为主体大分子浓度,单位 mol/L;*c<sub>G</sub>* 为客体大分子浓度,单位 mol/L; $\Delta \epsilon$  为包合物与自由客体的消光系数差。

2.5 透明质酸/葡聚糖凝胶的制备及表征

将 HA-CD 与 Dex-NAA 分别溶解于 pH 7.4 的 PBS 溶液中,配制成质量分数为 10.0% 的溶液,将两种溶液等体积混合,室温下涡旋震荡混合均匀,静置后得到 HA-Dex 主客体水凝胶。

红外光谱 (FT-IR) 法鉴定超分子凝胶包合物的形成:将 1 ~ 2 mg 的 HA-CD、Dex-NAA、HA-CD 与 Dex-NAA 的物理混合物及所制备的 HA-Dex 主客体凝胶采用溴化钾 (KBr) 压片,傅里叶红外光谱仪在 4 500 ~ 500 cm<sup>-1</sup> 范围内进行扫描,扫描次数为 32 次,分辨率为 4 cm<sup>-1</sup>。

水凝胶用液氮冰冻后,冻干除水,样品通过扫描电子显微镜于加速电压 1.0 kV 条件下进行观察其形貌和孔隙结构。

水凝胶的流变性能采用流变仪进行表征。采用 20 mm 平行板夹具,水浴控温 37 ℃。样品的凝胶化动力学采用动态时间扫描模式进行表征,将主客体溶液混合后迅速置于平行板上进行测试,固定频率为 1 rad/s;样品进行动态频率扫描时的扫描

范围为0.1~100 rad/s。

## 2.6 材料的细胞毒性测试

主、客大分子的细胞毒性测试采用MTT法。将细胞以每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞的密度接种于96孔培养板,37℃孵育,24 h后弃去培养基,分别于每孔中加入不同浓度的HA-CD与Dex-NAA的DMEM溶液100  $\mu$ L,继续孵育48 h。培养结束后,小心移除培养板中的溶液,加入含0.5 mg/mL MTT的PBS溶液110  $\mu$ L,继续孵育4 h后,弃去孔中的MTT溶液,加入DMSO溶液100  $\mu$ L并在室温下振荡10 min混合均匀,之后用酶标仪记录570 nm处的吸收度。计算细胞相对存活率(%),每个样品平行测4组。

## 2.7 水凝胶的细胞相容性测试

水凝胶的细胞相容性测试采用双醋酸荧光素/碘化丙啶(FDA/PI)双色荧光法<sup>[23]</sup>。将FDA溶于丙酮中,配成质量浓度为5 mg/mL的溶液;PI用PBS溶液(pH 7.4)配成质量浓度为400  $\mu$ g/mL的溶液,均置4℃冰箱中保存。待细胞生长至对数生长期,用胰酶消化,之后分别离心并重悬于含HA-CD和Dex-NAA质量分数均为10.0%的DMEM溶液中,细胞密度为每毫升 $5 \times 10^6$ 个细胞。将两种含有细胞的溶液混合均匀,待水凝胶形成后,于37℃在培养箱内培养,2 d后将包埋细胞的水凝胶取出,用PBS润洗3次后,加入终浓度分别为100, 60  $\mu$ g/mL的FDA/PI溶液,放置30 min后,用PBS润洗3次,之后用荧光显微镜观察细胞形态及染色情况。FDA最大激发波长为493 nm,发射波长为510 nm;PI最大激发波长为535 nm,发射波长为615 nm。取照片上500  $\mu$ m $\times$ 500  $\mu$ m的范围定量计算活细胞和死细胞的数目( $n=4$ )<sup>[24-28]</sup>。对照组用新鲜的DMEM培养48 h后,相同方法染色后拍照。

# 3 结果与讨论

## 3.1 主体大分子(HA-CD)的结构表征

6-OTs- $\beta$ -CD及EDA- $\beta$ -CD的<sup>1</sup>H NMR谱图如图3-A所示。与6-OTs- $\beta$ -CD相比较,EDA- $\beta$ -CD中 $\delta$ 在7.42及7.74处苯环的峰消失, $\delta$ 在2.53~2.92处新出现乙二胺上亚甲基的峰,说明成功制备得到氨基环糊精。与未修饰的HA的氢谱相比,主体大分子(HA-CD)的谱图中, $\delta$ 在5.02左右出

现的峰对应 $\beta$ -CD葡萄糖重复单元C-1位上的氢,2.53~2.92处新出现的峰对应EDA- $\beta$ -CD上的亚甲基,通过其与1.96处透明质酸N-乙酰氨基葡萄糖单元上甲基氢峰面积相比较,可计算得到环糊精的取代度为15.53%(即每百个透明质酸双糖单元上连接有15个环糊精)。

## 3.2 客体大分子(Dex-NAA)的结构表征

Dex-NAA的<sup>1</sup>H NMR谱图如图3-B所示。 $\delta$ 在7.42~7.96处新出现的峰对应萘环结构,由此说明2-NAA已成功连接到葡聚糖分子上。利用萘环上芳氢与 $\delta$ 在5.31处葡聚糖单元C-1位上氢的峰面积相比较,可计算得到2-NAA的取代度为7.38%(即每百个Dex糖单元上连接7个2-NAA)。

## 3.3 包合体系稳定常数测定及包合物鉴定

根据公式(1), $c_H$ 对 $c_G \cdot c_H/A$ 作图,拟合得线性回归方程 $y = 2.254 \times 10^{-5}x + 2.025 \times 10^{-9}$ ( $R^2 = 0.9992$ ),稳定常数 $K_s = 1.113 \times 10^4$  L/mol,与文献报道<sup>[22]</sup>一致,说明 $\beta$ -CD对2-NAA的包合作用较强,可形成稳定的包合物。

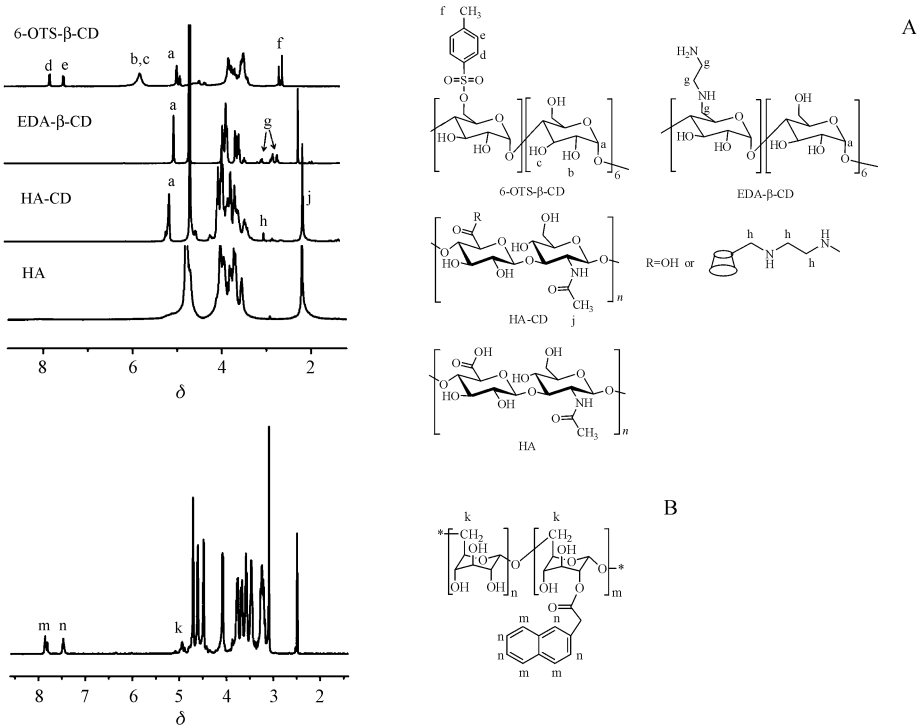
主体大分子(HA-CD)、客体大分子(Dex-NAA)及其包合物和物理混合物的红外图谱如图4所示。客体分子Dex-NAA的主要红外特征基团为萘环,1274  $\text{cm}^{-1}$ 为萘环C=C骨架伸缩振动,914  $\text{cm}^{-1}$ 处为萘环2位取代产生的芳环骨架的面外变形振动。Dex-NAA的特征吸收峰在物理混合物谱图中表现很明显,只是叠加了其HA-CD的吸收峰。两者形成的超分子凝胶的红外图谱中,萘环的特征峰消失,说明2-NAA包合在 $\beta$ -CD的空腔内部,HA-CD与Dex-NAA通过 $\beta$ -CD与2-NAA之间的包合作用形成超分子凝胶而不是简单的物理混合。

## 3.4 水凝胶的制备及形貌

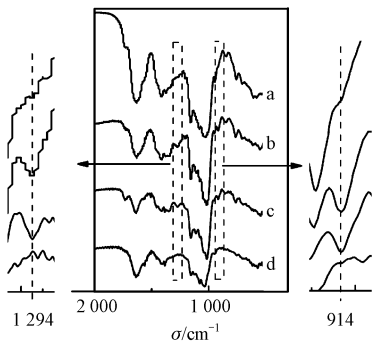
将HA-CD溶液与Dex-NAA溶液混合均匀后,大分子主体上连接的 $\beta$ -CD即会与大分子客体上的2-NAA分子发生主客体识别作用。通过分子自组装,疏水性的2-NAA分子会进入到 $\beta$ -CD的疏水性空腔当中形成包合物,产生非共价作用的交联点。主体大分子透明质酸和客体大分子葡聚糖在水溶液中排列形成网络,锁住水分子,从而形成倒置不流动的水凝胶(图5-A)。图5-B为水凝胶的SEM微观形态,从图中可以看出,水凝胶样品具有规整有序、分布均匀的多孔网状结构,其孔径大小约为20~50  $\mu$ m,孔与孔之间的通透性良好。这些

规则的多孔网络结构及通透性可提升材料被细胞识别的能力,并为细胞提供稳定的生长环境,且有利于细胞在材料内与外界自由交换养分。HA-Dex

水凝胶的多孔结构、适宜的孔径大小及通透性能够为细胞提供稳定的生长环境,有利于营养物质及代谢产物的传递,可用于细胞的包载。



**Figure 3**  $^1\text{H}$  NMR spectra of mono-6-(p-tolylsulfonyl)- $\beta$ -cyclodextrin (6-OTS- $\beta$ -CD) in  $\text{DMSO}-d_6$ , EDA- $\beta$ -CD in  $\text{D}_2\text{O}$ , HA-CD and HA in  $\text{D}_2\text{O}$  (A) and Dex-NAA in  $\text{DMSO}-d_6$  (B)



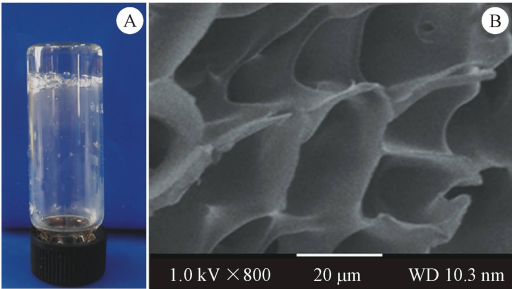
**Figure 4** FT-IR spectra of HA-Dex inclusion complex (a), physical mixture of HA-CD and Dex-NAA (b), Dex-NAA (c) and HA-CD (d)

3.5 水凝胶的流变学分析

制备凝胶的储存模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )随时间和频率的变化曲线如图 6 所示。首先对其进行动态应变扫描,以确定其线性黏弹范围,通过固定应变为 1% 对样品进行动态测试。如图 6-A 所示,在时间扫描过程中, $G'$  大于  $G''$ ,说明所形成的水凝胶具有一定的弹性。这是因为 HA-CD 与 Dex-NAA 两种凝胶因子在水溶液中混合后,迅速产生主客体识别作用而形成包合物,构成凝胶网络结构所需的物理交联点,凝胶的网络结构逐渐形成,体系以弹性为主。而如图 6-B 所示,凝胶的储存模量大于损耗模量,且储存模量基本不随频率变化。这说明该体系的弹性较大、黏度较小,表现出凝胶的流变学性质。此外,从测试结果中也可以看出材料的机械强度并不高,这有利于细胞在凝胶内部的铺展及生长,适宜用于细胞的包载。

3.6 主体大分子和客体大分子的细胞毒性

制备的主体大分子和客体大分子对 NIH/3T3 细胞的毒性经 MTT 法测定,结果如图 7 所示。在



**Figure 5** Photograph (A) and SEM images (B) of hydrogel

10 ~ 500  $\mu\text{g/mL}$  质量浓度范围内,随着药物浓度的增大,细胞存活率并没有明显降低。48 h 后,HA-CD 与 Dex-NAA 质量浓度高达 500  $\mu\text{g/mL}$  时,NIH/3T3 细胞的存活率仍然高于 90%,说明制备的主、客体大分子材料对细胞没有明显毒性。

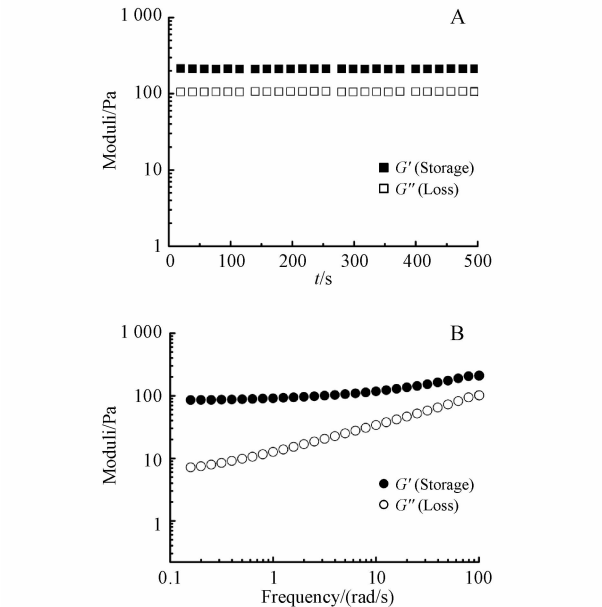


Figure 6 Rheological analysis of hydrogel: (A) time sweep curves; (B) frequency sweep curves

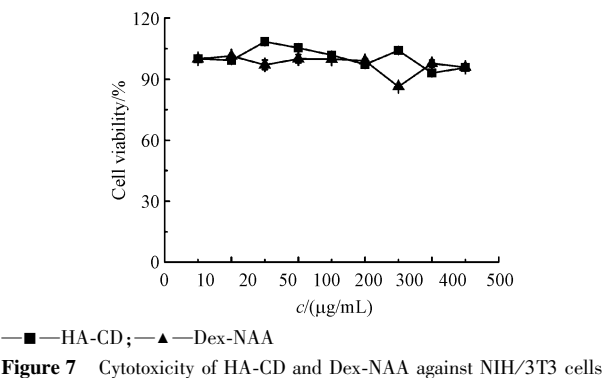


Figure 7 Cytotoxicity of HA-CD and Dex-NAA against NIH/3T3 cells

### 3.7 水凝胶的细胞相容性

通过 FDA/PI 双色荧光法对细胞在水凝胶中的存活和伸展情况进行了观测,结果如图 8 所示。活细胞由于具有完整的细胞膜,FDA 水解的荧光素不断在细胞内积累,使细胞在蓝色光下发出绿色荧光,而 PI 则在细胞凋亡后,与细胞内 DNA 和 RNA 作用,在蓝光下发出红色荧光。从图中可以看出活细胞数目远大于死细胞数目,这说明细胞可以较好地在水凝胶中生长。同时,细胞可有效分散在水凝胶内部,这种立体生长更接近于人体组织,这

表明所制备的水凝胶可用作细胞支架。此外,通过对细胞进行计数、定量分析(图 8-C),在培养 48 h 后,水凝胶组的细胞存活率为 91.48%,空白对照组细胞存活率则为 94.16%,凝胶中细胞的存活率与培养板相当。这说明水凝胶不仅能有效包载细胞,并且由于凝胶内含有透明质酸这种来源于细胞外基质当中的成分,可有效促进细胞的生长。

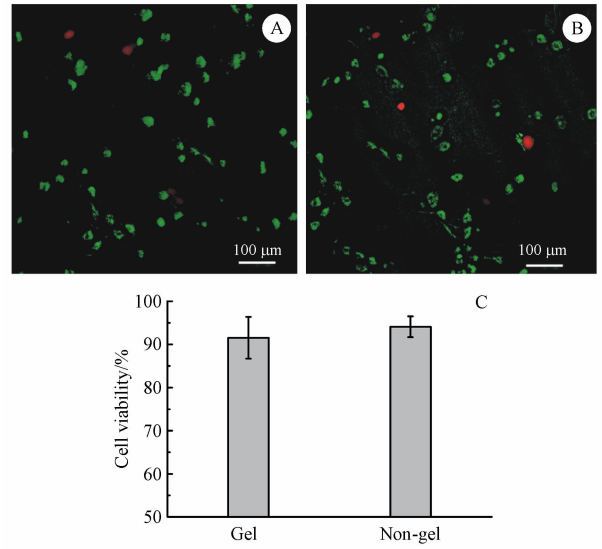


Figure 8 Fluorescent live-dead assay on the NIH/3T3 cells in (A) hydrogel and (B) non-gel coated well, FDA (green, live cells) and PI (red, dead cells); (C) viability of NIH/3T3 cells cultured in hydrogel (gel) and in the non-gel coated well (Non-gel)

## 4 结 论

本研究制备了 HA-CD 与 Dex-NAA 两种大分子凝胶因子,通过  $\beta$ -CD 和 2-NAA 之间的主客体包合作用,形成 HA-Dex 超分子水凝胶。结果表明,所制备的水凝胶材料具有均一规整的多孔结构,孔径大小约为 20 ~ 50  $\mu\text{m}$ 。流变学研究表明,所构建的 HA-Dex 凝胶体系,储存模量( $G'$ )大于损耗模量( $G''$ ),水凝胶具有一定的弹性,并且力学强度适宜。材料细胞相容性良好,可有效实现对 NIH/3T3 细胞的包载,双荧光染色结果显示所制备的水凝胶还可有效促进细胞的生长。这种具有良好生物相容性的超分子水凝胶将有望用于细胞支架及组织修复等领域。

### 参 考 文 献

[1] Ren J, Zhu J. Recent Development of fabrication technology of biodegradable porous scaffold for tissue engineering [J]. J



- Tongji Univ*( 同济大学学报),2005,**33**(12):1 664 – 1 676.
- [2] Zhang X. Applications of tissue-engineered cartilage and scaffold constructed using different materials[J]. *J Tissue Eng Res*( 中国组织工程研究),2012,**16**(8):1 491 – 1 495.
- [3] Wang T, Jiang XJ. Intelligent hydrogel in *in situ* myocardial tissue engineer[J]. *Adv Caedivasc Dis*( 心血管病学进展),2008,**29**(5):683 – 685.
- [4] Yu YT. *Bio-medical Materials*( 生物医用材料)[M]. Tian Jin: Tianjin University Press,2003:243.
- [5] Gutowska A, Jeong B, Jasionowski M. Injectable gels for tissue engineering[J]. *Anat Rec*,2001,**263**(4):342 – 349.
- [6] Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications[J]. *Adv Drug Deliver Rev*,2002,**54**(1):3 – 12.
- [7] Bulpitt P, Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels[J]. *J Biomed Mater Res A*,1999,**47**(2):152 – 169.
- [8] Oh EJ, Park K, Kim KS, *et al.* Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives[J]. *J Control Release*,2010,**141**(1):2 – 12.
- [9] Luo Y, Kobler JB, Heaton JT, *et al.* Injectable hyaluronic acid-dextran hydrogels and effects of implantation in ferret vocal fold [J]. *J Biomed Mater Res B*,2010,**93**(2):386 – 393.
- [10] Pescosolido L, Schuurman W, Malda J, *et al.* Hyaluronic acid and dextran-based semi-IPN hydrogels as biomaterials for bioprinting [J]. *Biomacromolecules*,2011,**12**(5):1 831 – 1 838.
- [11] Jin R, Teixeira LS, Dijkstra PJ, *et al.* Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering [J]. *Biomaterials*,2010,**31**(11):3 103 – 3 113.
- [12] Wennink JH, Niederer K, Bochynska AI, *et al.* Injectable hydrogels by enzymatic co-crosslinking of dextran and hyaluronic acid tyramine conjugates [J]. *Macromol Symp*,2011,**309/310**(1):213 – 221.
- [13] DeForest CA, Polizzotti BD, Anseth KS. Sequential click reactions for synthesizing and patterning three-dimensional cell microenvironments[J]. *Nat Mater*,2009,**8**(8):659 – 664.
- [14] Chiu YL, Chen SC, Su CJ, *et al.* pH-triggered injectable hydrogels prepared from aqueous *N*-Palmitoyl chitosan; *in vitro* characteristics and *in vivo* biocompatibility [J]. *Biomaterials*,2009,**30**(28):4 877 – 4 888.
- [15] Ma D, Zhang LM. Supramolecular gelation of a polymeric prodrug for its encapsulation and sustained release [J]. *Biomacromolecules*,2011,**12**(9):3 124 – 3 130.
- [16] Wang Q, Jamal S, Detamore MS, *et al.* PLGA-chitosan/PLGA-alginate nanoparticle blends as biodegradable colloidal gels for seeding human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *J Biomed Mater Res A*,2011,**96**(3):520 – 527.
- [17] Yang JY, Balasundaram G, Lo SL, *et al.* Microfibers fabricated by non-covalent assembly of peptide and DNA for viral vector encapsulation and cancer therapy[J]. *Adv Mater*,2012,**24**(24):3 280 – 3 284.
- [18] Dong S, Luo Y, Yan X, *et al.* A dual-responsive supramolecular polymer gel formed by crown ether based molecular recognition [J]. *Angew Chem Int Ed*,2011,**50**(8):1 905 – 1 909.
- [19] Charlot A, Auzly-Velty R. Synthesis of novel supramolecular assemblies based on hyaluronic acid derivatives bearing bivalent  $\beta$ -cyclodextrin and adamantane moieties [J]. *Macromolecules*,2007,**40**(4):1 147 – 1 158.
- [20] Neralagatta M, Sangeetha. Supramolecular gels: functions and uses[J]. *Chem Soc Rev*,2005,**34**(10):821 – 836.
- [21] Quan CY, Chen JX, Wang HY, *et al.* Core-shell nanosized assemblies mediated by the cyclodextrin dimer with a tumor-triggered targeting property[J]. *ACS Nano*,2010,**4**(7):4 211 – 4 219.
- [22] Benesi HA, Hildebrand JH. A spectrometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons[J]. *J Am Chem Soc*,1949,**71**(8):2 703 – 2 707.
- [23] Xu XD, Liang L, Han C, *et al.* Construction of therapeutic glycopeptide hydrogel as a new substitute for antiproliferative drugs to inhibit postoperative scarring formation[J]. *J Math Chem*,2012,**22**(35):18 164 – 18 171.
- [24] Park KM, Yang JA, Jung H, *et al.* *In situ* supramolecular assembly and modular modification of hyaluronic acid hydrogels for 3D cellular engineering[J]. *ACS Nano*,2012,**6**(4):2 960 – 2 968.
- [25] Mahler A, Reches M, Rechter M, *et al.* Rigid, self-assembled hydrogel composed of a modified aromatic dipeptide [J]. *Adv Mater*,2006,**18**(11):1 365 – 1 370.
- [26] Yang B, Zhang YL, Zhang XH, *et al.* Facile prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier [J]. *Polym Chem*,2012,**3**(12):3 235 – 3 238.
- [27] Jayawarna V, Richardson SM, Hirst AR, *et al.* Introducing chemical functionality in Fmoc-peptide gels for cell culture [J]. *Acta Biomater*,2009,**5**(3):934 – 943.
- [28] Liang L, Xu XD, Chen CS, *et al.* Evaluation of the biocompatibility of novel peptide hydrogel in rabbit eye [J]. *J Biomed Mater Res B*,2010,**93**(2):324 – 332.