

论著·基础研究

## 自愈合可注射性透明质酸水凝胶的构建及促进血管生成的研究

杨 淑<sup>1,2</sup>, 崔文国<sup>2</sup>, 魏 杰<sup>1#</sup>, 蔡正伟<sup>2#</sup>

1. 华东理工大学材料科学与工程学院, 上海 200237; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海市伤骨科研究所, 上海市中西医结合防治骨与关节病损重点实验室, 上海 200025

**[摘要]** **目的**·构建一种基于透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 的自愈合可注射性水凝胶, 探究不同浓度铜离子对水凝胶性能及其促成血管功效的影响, 评估其应用于临床上伤口愈合的可行性。**方法**·在光引发剂 2959 的存在下, 通过蓝光诱发了巯基化透明质酸 (thiolated hyaluronic acid, HASH) 和丙烯酸化双膦酸盐 (acrylated bisphosphonate, Ac-PD) 之间的巯基-烯点击反应, 制备了双膦酸盐化透明质酸 (bisphosphonated hyaluronic acid, HAPD); 基于 HAPD 和  $\text{Cu}^{2+}$  的金属配位作用, 构建了不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的 HAPD-Cu 水凝胶, 即 HAPD-Cu1、HAPD-Cu2、HAPD-Cu3 以及 HAPD-Cu4。采用核磁氢谱以及傅里叶红外光谱验证 HASH、Ac-PD、HAPD 和 HAPD-Cu 的分子结构; 采用扫描电镜观察 HAPD-Cu 的微观形貌; 采用流变仪验证 HAPD-Cu 的剪切变稀和自修复特性; 采用液相质谱仪测定 HAPD-Cu 的离子释放; 通过活/死细胞染色和 CCK-8 评价 HAPD-Cu 的生物相容性; 通过人脐静脉血管内皮细胞的成小管实验测定 HAPD-Cu 的体外促成血管活性; 通过 CD31 组织染色评估 HAPD-Cu 的体内促成血管活性并建立体外大鼠伤口缺陷模型评价其实际修复效果。**结果**·化学定性和定量分析手段证明材料的成功制备; 体外研究表明, HAPD-Cu 均具有疏松多孔的内部结构, 且具有优异的自愈性、可注射性和可降解性, 降解周期为 7d 并具有突释行为, 满足伤口愈合周期的需求; HAPD-Cu 具有良好的生物相容性, 但 HAPD-Cu4 因  $\text{Cu}^{2+}$  浓度高而具有细胞毒性。此外, 在允许的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度范围内, 其体外或体内的成血管效果随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加而增强; 且体外伤口模型实验表明, 与对照组相比, HAPD-Cu 水凝胶显著促进了伤口的愈合。**结论**·基于金属配位制备的 HAPD-Cu 水凝胶具有优异的形状可塑性, 允许以微创的形式填充缺陷部位, 并释放  $\text{Cu}^{2+}$  以促进早期血管网络的建立, 在用于临床上不规则的伤口修复方面具有良好的应用潜力。

**[关键词]** 自愈合; 可注射水凝胶; 血管生成; 伤口愈合; 软组织修复

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.12.003 **[中图分类号]** R318.08 **[文献标志码]** A

## Fabrication of self-healing injectable hyaluronic acid hydrogel for promoting angiogenesis

YANG Shu<sup>1,2</sup>, CUI Wenguo<sup>2</sup>, WEI Jie<sup>1#</sup>, CAI Zhengwei<sup>2#</sup>

1. School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai, 200237, China; 2. Shanghai Key laboratory for Prevention and Treatment of Bone and Joint Disease, Shanghai Institute of Traumatology and Orthopaedics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

**[Abstract]** **Objective**·To construct a self-healing injectable hyaluronic acid (HA)-based hydrogel (HAPD-Cu) and investigate the effects of different copper ions on the properties of the hydrogel and its vasogenic efficacy to evaluate its feasibility for clinical wound healing. **Methods**·Bisphosphonated hyaluronic acid (HAPD) was prepared via a blue-light mediated thiol-ene click reaction between thiolated hyaluronic acid (HASH) and acrylated bisphosphonate (Ac-PD) in the presence of photoinitiator 2959. Then, HAPD was further interacted with  $\text{Cu}^{2+}$  through metal coordination to prepare HAPD-Cu hydrogels with different  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations, i.e. HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4. The molecular structures of HASH, Ac-PD, HAPD and HAPD-Cu were verified with <sup>1</sup>HNMR and FTIR. Microscopic morphology of HAPD-Cu was observed under SEM. The shear-thinning and self-healing properties of HAPD-Cu were verified by rheometer. The  $\text{Cu}^{2+}$  release from HAPD-Cu was determined with ICP. Live-dead staining and CCK-8 assay were applied to evaluate the biocompatibility of HAPD-Cu. The *in vitro* vasculogenic

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (32101104); 上海市卫生健康委员会基金 (202140127)。

**[作者简介]** 杨 淑 (1999—), 女, 硕士生; 电子邮箱: Yangshu12101999@163.com。

**[通信作者]** 魏 杰, 电子邮箱: jiewei7860@sina.com。蔡正伟, 电子邮箱: caizhengwei@shsmu.edu.cn。<sup>#</sup>为共同通信作者。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (32101104); Foundation of Shanghai Municipal Health Commission (202140127).

**[Corresponding Author]** WEI Jie, E-mail: jiewei7860@sina.com. CAI Zhengwei, E-mail: caizhengwei@shsmu.edu.cn. <sup>#</sup>Co-corresponding authors.



activity of HAPD-Cu was determined by a tubule-forming assay with human umbilical vein vascular endothelial cells and the *in vivo* vasculogenic activity of HAPD-Cu was assessed by CD31 tissue staining. A rat wound defect model was established *in vitro* to evaluate its actual repair effect. **Results** The preparation of the materials was demonstrated through chemical qualitative and quantitative analytical means. *In vitro* studies showed that all HAPD-Cu with a loose porous internal structure exhibited outstanding self-healing, injectability and degradability, with a one-week degradation cycle and abrupt release behavior, which can meet the needs of wound healing cycle. All HAPD-Cu showed good biocompatibility except HAPD-Cu4, due to its high  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations. Moreover, its angiogenic effect *in vitro* or *in vivo* was enhanced with increasing  $\text{Cu}^{2+}$  concentrations within the permissible  $\text{Cu}^{2+}$  concentration range. *In vitro* wound model experiments also showed that the HAPD-Cu hydrogel significantly promoted wound healing compared with the control group. **Conclusion** HAPD-Cu hydrogel constructed *via* the metal coordination shows excellent shape plasticity, allowing the filling of defective sites in a minimally invasive form, and the release of  $\text{Cu}^{2+}$  greatly facilitates the establishment of early vascular networks, with giant potential for use in the repair of clinically irregular wounds.

**[Key words]** self-healing; injectable hydrogel; angiogenesis; wound healing; soft tissue repair

皮肤是人体重要的保护屏障,在保护身体免受微生物感染、辐射或化学腐蚀等方面有着不可或缺的作用<sup>[1-2]</sup>。皮肤通常具有一定的自我修复能力。然而,一些重大创伤(如大面积烧伤)或疾病(如糖尿病)导致的慢性伤口往往难以愈合,常在皮肤表面形成瘢痕或溃疡,严重时甚至需要截肢,对患者造成巨大负担<sup>[3-4]</sup>。伤口愈合是一个多步骤的过程,涉及复杂的病理生理机制,主要包括止血、炎性细胞浸润、血管生成和肉芽组织形成、组织再生和重塑<sup>[3]</sup>。其中,血管向损伤部位的细胞增殖和分化等行为提供营养和氧气等必需物质,在伤口愈合的早期阶段起关键作用。相反,血管的缺乏和血液流动不足则是导致伤口愈合延迟最重要的因素之一<sup>[3,5]</sup>。许多策略已被开发用于促进新生血管形成,包括干细胞疗法或生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )等,然而干细胞和生长因子储存困难且成本高昂,并且存在生长因子从递送部位快速扩散并产生异位副作用等风险<sup>[6]</sup>。因此,为了满足临床需求,迫切需要一种成本低廉、简便快速的基于现成生物材料的可替代性方案。

水凝胶是一种具有三维交联网络结构的软材料,因其力学模量与软组织相似且具有高含水量,被广泛用于组织工程中<sup>[7]</sup>。与传统水凝胶相比,自愈合可注射性水凝胶展示出了更大的优势,因其在受到外部挤压刺激的作用下,能够以微创的形式原位填充到体内靶向部位,并进行自修复以嵌合不规则组织缺陷,避免手术引起的二次伤害的同时也降低了异位风险,大大地提高了药物利用率。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是一种天然多糖,也是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的重要组成部分之一,存在于皮肤、结缔组织等生物组织中。分子结构方

面,HA富含羧基和羟基等多个反应活性位点,允许通过多种手段制备水凝胶。例如,HA除了能够用来制备具有反应性的甲基丙烯酸化透明质酸(hyaluronic acid methacryloyl, HAMA)外,还能通过加成或缩合与硫醇、卤代乙酸、二酰肼、醛和酯胺等基团反应<sup>[8-9]</sup>。此外,多个研究表明,铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )可以通过刺激内皮细胞促进血管生成。比如,LI等<sup>[10]</sup>将含铜生物活性玻璃与蛋壳膜结合构建了纳米复合薄膜(Cu-BG/ESM),体外结果表明5%Cu-BG/ESM能够通过促进VEGF和HIF-1 $\alpha$ 等相关蛋白及基因的表达来刺激血管生成。LIU等<sup>[11]</sup>制备了多酚-铜纳米胶囊,并通过自组装备备了多功能水凝胶伤口敷料,这种胶囊的形式实现了水凝胶中 $\text{Cu}^{2+}$ 的不断释放并在大鼠皮肤缺损模型中验证其促成血管的特性。基于以上研究,构建基于 $\text{Cu}^{2+}$ 的可注射性HA水凝胶体系是一种有前途的替代方案。在这个方案中,可注射性HA-Cu复合水凝胶体系兼具良好生物相容性和促血管特性,适用于临床上不规则的创面修复。

鉴于此,在本研究中,我们首先制备了巯基化透明质酸(thiolated hyaluronic acid, HASH),并在蓝光的诱发下进一步与丙烯酸化双膦酸盐(acrylated bisphosphonate, Ac-PD)发生巯基-烯点击反应得到双膦酸盐改性的透明质酸(bisphosphonated hyaluronic acid, HAPD),最后利用HAPD分子结构中双膦酸基团与 $\text{Cu}^{2+}$ 之间的金属配位作用构建自愈合可注射性水凝胶HAPD-Cu。设计不同浓度的 $\text{Cu}^{2+}$ ,观察水凝胶形态及性能变化;将骨髓干细胞和人脐静脉内皮细胞与不同 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度水凝胶共培养,观察其细胞毒性,并检测不同 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度水凝胶对成血管性能的影响;建立体外伤口模型,观察不同 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度水凝胶治疗软组织修复的功能差异。



## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂与仪器

**1.1.1 实验试剂** 帕米膦酸二钠 (pamidronate disodium, PD; CSN, 美国), 氢氧化钠 (sodium hydroxide, NaOH; 阿拉丁, 规格 $\geq 97\%$ ), 丙烯酰氯 (阿拉丁, 规格 $\geq 99.5\%$ ), 二甲氧基-1, 3, 5-三嗪-2-基-4-甲基吗啉 [4-(4, 6-dimethoxy-1, 3, 5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholin-4-ium chloride, DMTMM; 阿拉丁], HA (山东弗鲁伊达), 3, 3'-二硫代双(丙酸二酰肼) [3, 3'-dithiobis (propionohydrazide), DTP; 阿拉丁], 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO; 麦克林), 三(2-羧乙基)膦盐酸盐 [tris (2-carboxyethyl) phosphine, TCEP-HCl; 麦克林, 规格98%], 2-羟基-4'-(2-羟乙氧基)-2-甲基苯丙酮 [2-hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone, Irgacure 2959; 阿拉丁, 规格 $\geq 98\%$ ], 氯化铜 (阿拉丁, 规格99.99%), calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒 (货号C2015M, Beyotime), 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFM; 货号P0099, Beyotime), 基质胶 (货号354230, 康宁), 鬼笔环肽 (phalloidin; 货号C2205S, Beyotime), 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA; 货号V900933, Sigma), 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; 货号C1002, Beyotime), CD31 (货号NB100-2284, Novus)。

**1.1.2 实验仪器** 微量注射泵 (兰格, LSP01-1A), 365 nm 蓝光固化仪 (3535-ZFX; UVGO), 场发射扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM; 日立, S4800), 能量色散 X 射线光谱 (energy dispersive spectroscopy, EDS; 日立, S4800), 核磁共振氢谱仪 (nuclear magnetic resonance,  $^1\text{H}$ NMR, Ascend 600), 傅立叶变换红外光谱仪 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR; Nicolet), TA 流变仪 (沃特世, ARES-G2, 美国), 高效液相-电感耦合等离子体质谱仪 (inductively coupled plasma spectrometer, ICP; NexION 2000, 美国), 荧光显微镜 (尼康, 日本), 酶标仪 (Infinite F50, TECAN, 瑞士), 激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM; 蔡司, 德国)。

### 1.2 Ac-PD 的制备与表征

1.0 g PD 溶于 30.0 mL NaOH (质量浓度为2%)

溶液中, 冰浴下, 用微量注射泵将 1.0 mL 丙烯酰氯以 20.0  $\mu\text{L}/\text{min}$  的推进速度添加到反应体系中。完成后恢复到室温, 继续搅拌 1.5 h。最后用乙酸乙酯萃取 3~5 次, 将水相进行冷冻干燥。随后, 用冰乙醇洗涤 3 次, 真空抽干得到产物 Ac-PD。分子结构通过  $^1\text{H}$ NMR 验证。

### 1.3 HASH 的制备与表征

将 500.0 mg HA 溶解在 40.0 mL MES 缓冲液 (0.01 mol/L) 中。准备 A 液和 B 液, A 液为 1.0 mL 的 DTP 溶液 (25.3 mg, DMSO), B 液为 1.0 mL DMTMM 溶液 (122.4 mg, 去离子水)。将 A 液和 B 液加入到上述反应体系中, 室温下反应 12 h。然后, 将 151.2 mg TCEP-HCl 添加到混合体系中, 继续搅拌 3 h。最后, 将体系转移到截留相对分子质量为 3 500 的透析袋中, 分别用 0.1 mol/L NaCl 水溶液和去离子水透析 1~2 d。冷冻干燥, 得到 HASH。通过 FTIR 和  $^1\text{H}$ NMR 确认了分子结构。经  $^1\text{H}$ NMR 测定, -SH 的取代度约为 10%。

### 1.4 HAPD 的制备与表征

利用巯基-烯点击反应制备了 HAPD。将 213.5 mg Ac-PD 和 5.5 mg Irgacure 2959 加入 HASH 溶液 (0.01 g/mL, 溶剂为去离子水) 中。完全溶解后, 将整个反应体系在惰性气氛中暴露于蓝光固化仪 25 min。随后, 将体系转移到截留相对分子质量为 3 500 的透析袋中, 并在 pH=3.5 的水溶液中透析 3 d。冷冻干燥, 得到 HAPD。采用 FTIR 和  $^1\text{H}$ NMR 确认了化学结构。经  $^1\text{H}$ NMR 测定, PD 取代度为~65%。

### 1.5 HAPD-Cu 水凝胶的制备与表征

**1.5.1 HAPD-Cu 水凝胶的制备与结构表征** HAPD 溶解在去离子水中, 得到预凝胶体系 (质量浓度为 8%)。然后将 HAPD 溶液分别与不同浓度 (4、8、12 和 20 mmol/L) 的  $\text{Cu}^{2+}$  充分混合均匀, 分别得到自愈合可注射水凝胶 HAPD-Cu1、HAPD-Cu2、HAPD-Cu3、HAPD-Cu4。随后, 将制备好的水凝胶冷冻干燥, 并分别采用 SEM 和 EDS 分析了各组水凝胶的表面形貌和元素分布。各组水凝胶的孔径进一步通过 Photoshop 软件进行半定量分析, 由 Origin 2018 软件进行绘制。

**1.5.2 HAPD-Cu 水凝胶的自愈合及可注射性能测试** 500  $\mu\text{L}$  规格的水凝胶用于自愈合测试。4 组水凝



胶预先加了不同颜色的染料,即HAPD-Cu1(橘色)、HAPD-Cu2(紫色)、HAPD-Cu3(绿色)和HAPD-Cu4(蓝色)。在各组水凝胶的中央制造出直径约为5 mm大小的空白区域,并分别在0、5、15 min的时间点记录凝胶形态,图像于自然光下由相机拍摄。

选择1 mL规格的注射器和200  $\mu$ L规格的水凝胶用于可注射性测试,图像于自然光下拍摄。

**1.5.3 HAPD-Cu水凝胶的流变学测试** 采用TA流变仪对200  $\mu$ L规格的水凝胶在室温下利用40 mm平行板进行流变学研究。对于应力-应变测试,用恒定频率(0 Hz)将扫描应变从0.1%扫描到800%以确认水凝胶临界点,即储能模量( $G'$ )与损耗模量( $G''$ )曲线相交时的临界应变值。同样条件下,阶跃应变循环的测定则经过多步骤:10%应变60 s,800%应变60 s,重复4次。

**1.5.4 HAPD-Cu水凝胶的溶胀实验** 在37  $^{\circ}$ C的去离子水中评估凝胶的溶胀率,水凝胶规格为200  $\mu$ L。将各组样品置于去离子水中,在每个时间点(0、3、6、8、12、16、20、24、28、48、96 h)记录水凝胶的重量。溶胀比计算如下:

$$\text{Swelling weight ratio}(\%) = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \times 100\%.$$

其中, $W_0$ 代表初始水凝胶重量; $W_t$ 代表 $t$ 时刻的水凝胶重量。

**1.5.5 HAPD-Cu水凝胶的降解实验** 类似地,将水凝胶(200  $\mu$ L)浸入37  $^{\circ}$ C的1 mL去离子水中,然后置于恒温振荡器。在一定的时间点(0、4、8、14、20 h和1、2、3、4、5、6、7 d)进行测定。降解率计算如下:

$$\text{Weight loss}(\%) = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \times 100\%.$$

其中, $W_0$ 代表初始水凝胶重量; $W_t$ 代表 $t$ 时刻的水凝胶重量。

**1.5.6 HAPD-Cu水凝胶的离子释放实验** 在37  $^{\circ}$ C的去离子水中检测 $\text{Cu}^{2+}$ 的释放情况。取200  $\mu$ L规格的水凝胶浸入1 mL去离子水中,然后置于恒温振荡器。在选定的时间点(0、4、8、20 h和1、3、5、7 d)取出,然后加入等量的新鲜去离子水。收集的清液中的 $\text{Cu}^{2+}$ 的含量通过ICP测定,离子的累计释放计算如下:

$$M_n = C_n V + \frac{V_s}{V} \sum_{i=1}^{n-1} c_i V.$$

其中, $M_n$ 代表在第 $n$ 时刻的累计释放量; $C_n$ 为第 $n$ 时刻的离子的质量浓度; $V_s$ 和 $V$ 分别为样品体积和透析液总体积。

## 1.6 细胞实验

**1.6.1 细胞培养** 分别选择大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)和人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)来评估材料的生物相容性和促成血管性能,细胞来源由上海交通大学医学院附属瑞金医院提供。细胞培养箱的条件设置为37  $^{\circ}$ C,95%的相对湿度和5%的 $\text{CO}_2$ 浓度。培养基的组成为90% Dulbecco的改良鹰培养基(DMEM; Gibco, 美国),10%胎牛血清(FBS; Gibco, 美国)和1%青霉素-链霉素(PS; Gibco, 美国)。实验过程中,培养基每2 d更换1次。整个细胞实验中,各组水凝胶的规格为200  $\mu$ L。

**1.6.2 HAPD-Cu的生物相容性实验** BMSCs被用来评估材料的生物相容性。收集HAPD-Cu1、HAPD-Cu2、HAPD-Cu3以及HAPD-Cu4的浸出液,并以各组浸出液为基础配置各组的细胞培养基。将BMSCs于24孔板中以 $4 \times 10^4$ 个/孔的密度分别培养在各组浸出液中,以普通培养基培养的BMSCs作为对照组。分别培养1、3、5 d后,每孔加入300  $\mu$ L活/死细胞染色溶液,室温避光孵育20 min。然后,用PBS轻柔洗涤3次后,在荧光显微镜下进行观察并采集图像。其中,活细胞被标记为绿色,死细胞被标记为红色。

采用CCK-8法检测各组BMSCs的增殖情况。将各组细胞接种在96孔板中,密度为 $4 \times 10^3$ 个/孔,分别培养1、3、5 d。在各个时间段,每孔加入100  $\mu$ L CCK-8试剂,并于培养箱中孵育2 h,用酶标仪在450 nm波长处检测细胞的光密度( $D$ )值。由Origin 2018软件进行绘制。

**1.6.3 成小管实验** HUVECs被用来评估材料的促成血管特性。首先将200  $\mu$ L基质胶加入到24孔板中,并于培养箱中孵育60 min。然后,将HUVECs以 $4 \times 10^4$ 个/孔的密度接种到基质胶涂层板中。孵育6 h后用4% PFM进行固定。固定完成后,每孔加入200  $\mu$ L的鬼笔环肽染色试剂,室温避光孵育60 min。然后移除鬼笔环肽试剂,每孔加入200  $\mu$ L的DAPI试剂,室温避光孵育5 min。移去DAPI,PBS轻柔洗涤2次后,于荧光显微镜下对新形成的管状结构进行观察并采集



图像。其中,鬼笔环肽将细胞骨架标记为红色,DAPI将细胞核标记为蓝色。通过Image J软件定量分析结点数和管的总长度,并由Origin 2018软件进行绘制。

## 1.7 组织染色实验

**1.7.1 动物模型的建立** 采用24只平均体质量为180 g的3周龄雄性SD大鼠用于构建感染伤口缺损动物模型,以评估HAPD-Cu水凝胶对体内促成血管的能力。SD大鼠购自上海昇敞生物科技公司,于腹膜内注射戊巴比妥钠进行麻醉后,剃掉大鼠背部的皮毛,构建对称的2个直径为1 cm的全层皮肤伤口,并用碘伏对周围进行消毒。

**1.7.2 CD31免疫荧光染色** 选取12只SD大鼠并随机分为4组:对照组、HAPD-Cu1、HAPD-Cu2以及HAPD-Cu3组。对照组未接受治疗,而实验组则被用无菌1 mL规格注射器均匀地注射水凝胶,每组200  $\mu$ L。每次注射水凝胶后,在伤口上覆盖无菌纱布,水凝胶每3d更换1次,术后第7天处死大鼠,收集组织标本。选择CD31作为免疫荧光标记物以评估体内血管生成情况。CD31阳性染色被标记为红色,使用LSCM对组织切片的染色结果进行观察并采集图像。

**1.7.3 创面修复** 选取12只SD大鼠并随机分为4组:对照组、HAPD-Cu1、HAPD-Cu2,以及HAPD-Cu3组。建立好动物模型后,将各实验组200  $\mu$ L水凝胶通过无菌1 mL规格注射器均匀地注射在伤口缺陷部位,每3d更换;对照组未进行任何处理。所有组均在实验期间定期进行碘伏消毒,并分别于术后0天和第14天拍照记录。

## 1.8 统计分析

在研究中,使用3个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 来表示所有分析数据。数据分析使用单因素方差分析计算组间差异。所有统计量化均在高分辨率图像的基础上通过Image J软件和Origin软件得到。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 HAPD-Cu水凝胶的制备

图1为本研究的反应方程式。图2A显示了Ac-PD的 $^1\text{H}$ NMR结果,在5.6~6.2 ppm (1 ppm= $10^{-6}$ )处

发现了丙烯基( $-\text{C}=\text{C}-\text{C}$ )的特征峰,证明成功将活性双键引入到磷酸盐分子结构中<sup>[12]</sup>。图2B显示了HASH的 $^1\text{H}$ NMR结果,在2.6~2.8 ppm处观察到了 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ 的特征峰,证明成功向HA分子结构中引入了巯基( $-\text{SH}$ ),经积分计算, $-\text{SH}$ 取代度为~10%<sup>[13]</sup>。图2C显示了HAPD的 $^1\text{H}$ NMR结果,在2.0~2.2 ppm处出现了磷酸根旁亚甲基 $[-\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{PO}_3\text{H}_2)_2]$ 的特征峰,证明成功得到HAPD,经积分计算,得到双磷酸根的修饰率为~74%<sup>[2]</sup>。上述结果证明了Ac-PD、HASH和HAPD的成功制备。

图2D为各组样品的FTIR结果,在1 750  $\text{cm}^{-1}$ 处有一个新的吸收峰代表羰基 $\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动,而在1 564  $\text{cm}^{-1}$ 处出现新的吸收峰来自仲酰胺基 $[\text{O}=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{NH}-]$ 上N-H键的弯曲振动,说明了HA分子链上增加了新的酰胺基团( $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ ),证明了HAPD的成功制备<sup>[14]</sup>。

## 2.2 HAPD-Cu水凝胶的微观结构

图3A、B分别是各组水凝胶横截面的SEM图像及局部放大图,各组均具有多孔结构。HAPD-Cu4组的孔最为致密,而HAPD-Cu1组的孔则较为疏松。元素映射图像(图3C)表明水凝胶中存在 $\text{Cu}^{2+}$ ,证明了HAPD分子链上的磷酸根与 $\text{Cu}^{2+}$ 之间的络合作用。图3D的半定量分析表明,随着 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度的增加,各组水凝胶孔径逐渐呈现缩小趋势。

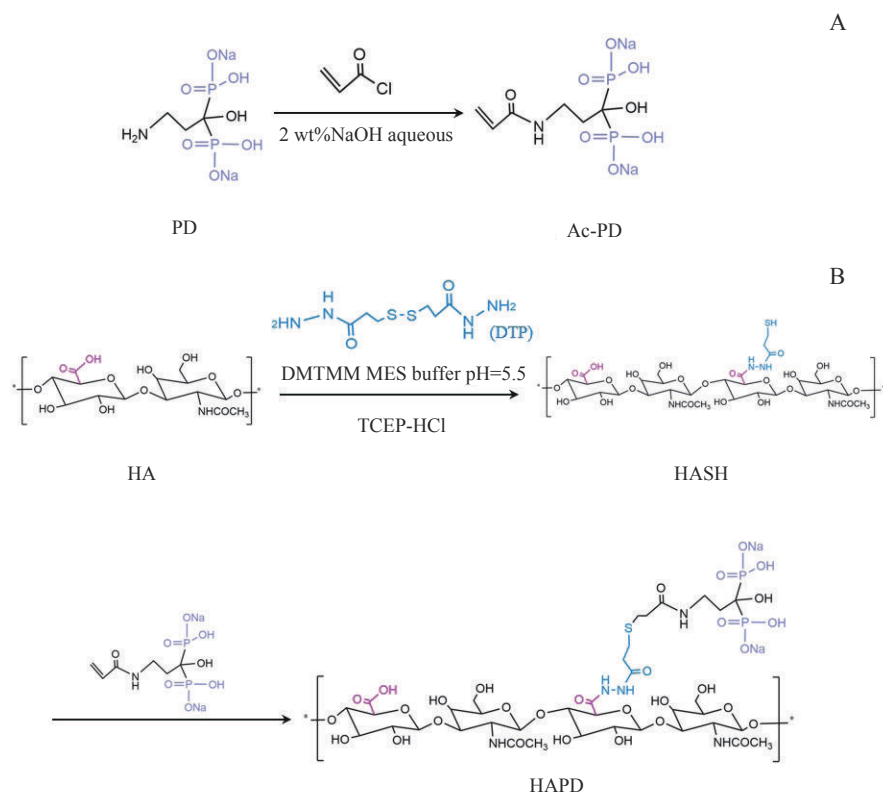
## 2.3 HAPD-Cu水凝胶的自愈和可注射特性

随着时间的推进(0、5、15 min),各组水凝胶均展现出了良好的自愈效果(图4A),具体自愈机制如图4C所示。此外,HAPD-Cu1和HAPD-Cu2组的自愈性明显高于剩下2组,说明凝胶的自愈性能与水凝胶的交联强度有关,离子浓度越高,其分子链间的配位交联程度就越高,机械性能比较强,但其自愈合速率就有所降低。图4B为可注射性的实验照片,表明各组水凝胶都可以通过直径为0.45 mm的注射器针头均匀地被挤压出来。

## 2.4 HAPD-Cu水凝胶的流变力学

HAPD-Cu水凝胶的机械性能随着 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度的增加而增强(图5A)。图5B为各组水凝胶的阶跃应变测量曲线,反复的高/低应变循环测试表明HAPD-Cu水凝胶具有稳定的机械性能。上述结果证明了各组水

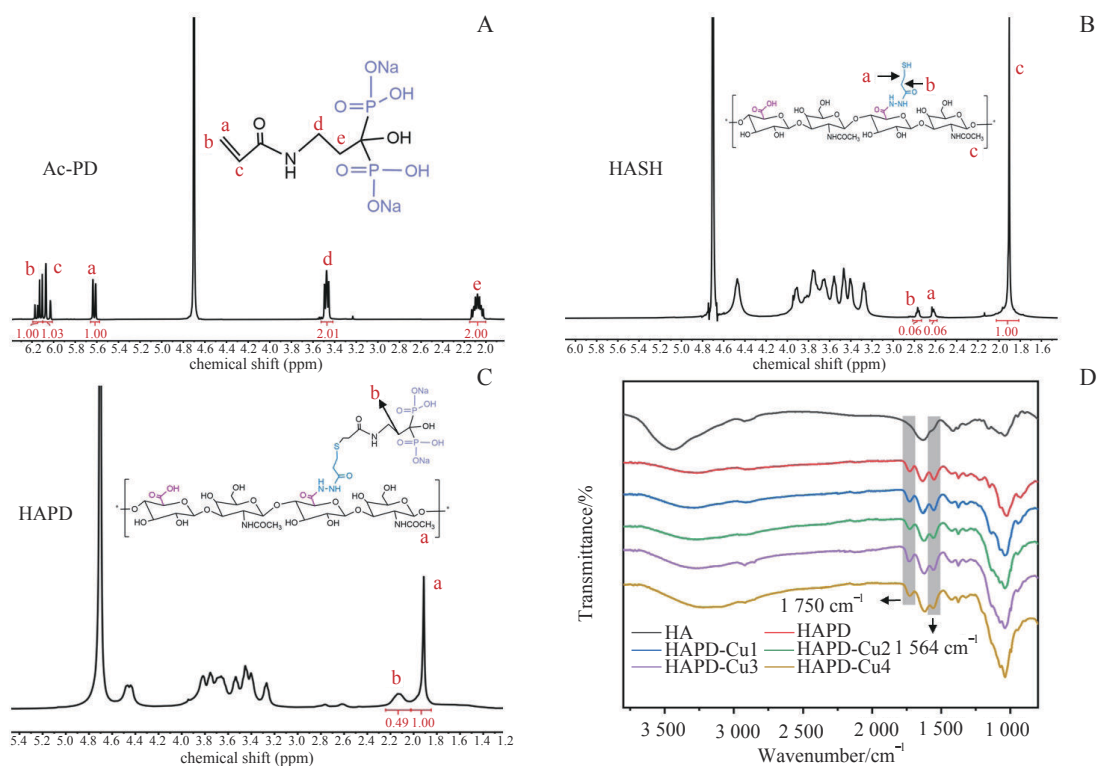




**Note:** A. Reaction equations of Ac-PD. B. Reaction equations of HASH and HAPD.

图1 Ac-PD、HASH 和 HAPD 的化学反应方程式

Fig 1 Chemical reaction equations of Ac-PD, HASH, and HAPD

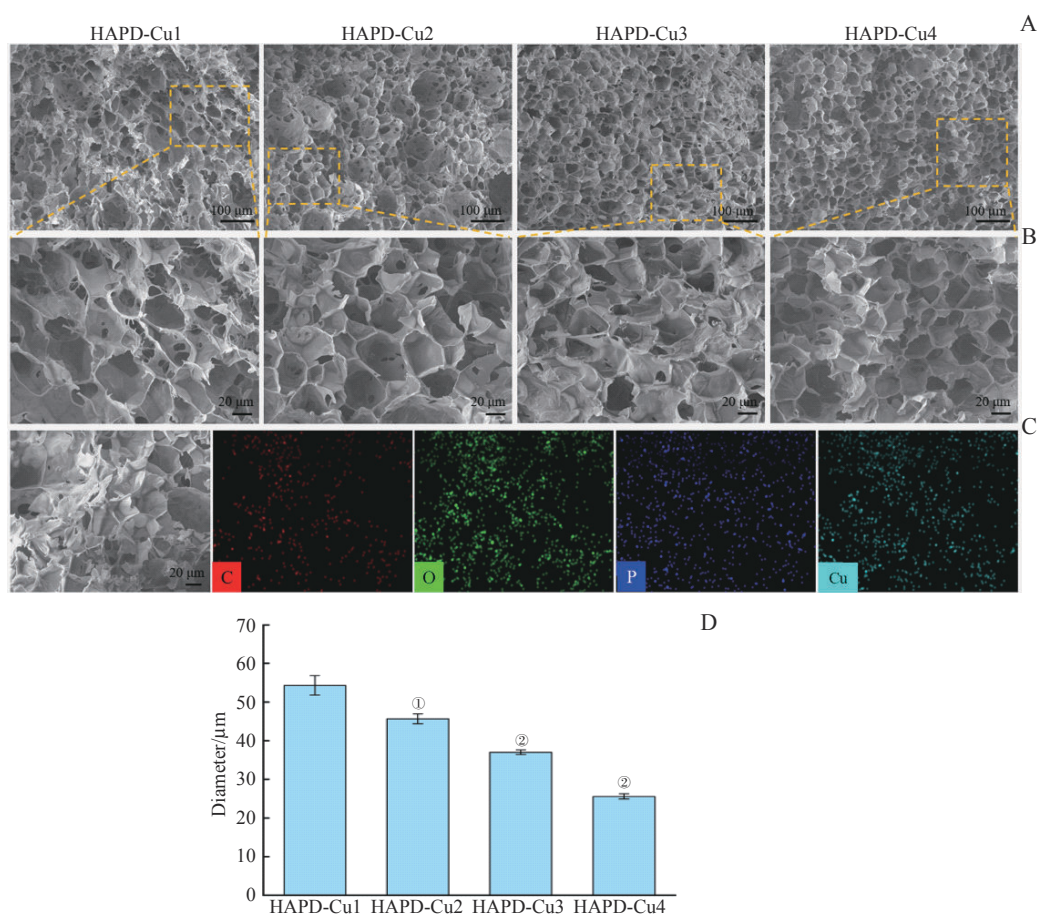


**Note:** A.  $^1\text{H}$ NMR of Ac-PD. B.  $^1\text{H}$ NMR of HASH. C.  $^1\text{H}$ NMR of HAPD. D. FTIR of samples (HA, HAPD, HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4).

图2 Ac-PD、HASH、HAPD 和 HAPD-Cu 的化学表征分析

Fig 2 Chemical characterization analysis of Ac-PD, HASH, HAPD, and HAPD-Cu





**Note:** A.  $\times 150$  SEM images of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4). B.  $\times 400$  SEM images of the local areas of A. C. Elemental mapping images of HAPD-Cu1 hydrogel samples. D. Semi-quantitative analysis of the pore diameter of hydrogels. <sup>①</sup> $P = 0.004$ , <sup>②</sup> $P = 0.000$ ; compared with the HAPD-Cu1 group.

**图3 HAPD-Cu的微观结构**

**Fig 3** Microstructure of HAPD-Cu

凝胶均表现出了良好的剪切稀化特性和自愈合性能，能够被反复挤压并实现可注射性。

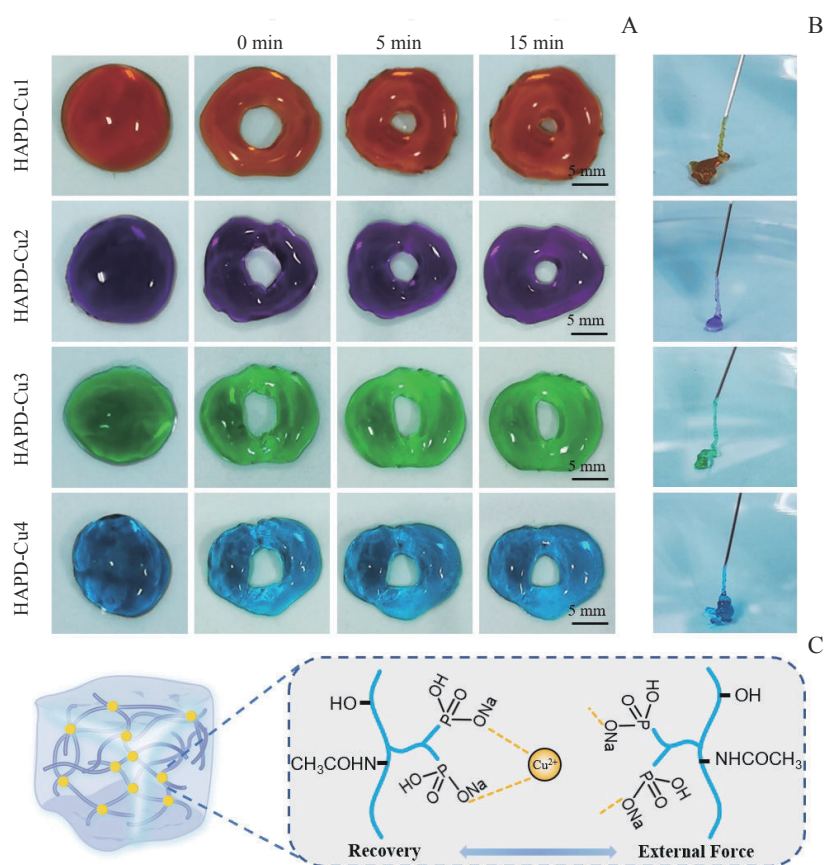
### 2.5 HAPD-Cu水凝胶的溶胀、降解和离子释放

图6A显示了各组水凝胶的溶胀曲线，图6B为平衡状态下的溶胀率。各组均具有很强的吸水能力，溶胀率高达300%。而且，HAPD-Cu3和HAPD-Cu4组的溶胀程度显著低于其他2组，这是由于 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度的增加，增强了聚合物的交联网络，导致吸水性降低<sup>[15]</sup>。图6C为各组水凝胶的降解曲线，各组水凝胶在第一天质量均损失了约30%，而后降解速率减缓，直到第7天基本完全降解。降解过程中 $\text{Cu}^{2+}$ 的释放情况如图6D所示，类似地， $\text{Cu}^{2+}$ 在第1天时的累计释放总量达到了约30%，而后释放速率减缓，与降解过程相匹配，并在第7天时最大释放总量能达到约79%。这些结果表明，HAPD-Cu水凝胶降解周期约为7d，并在早期存在离子突释行为。

### 2.6 HAPD-Cu水凝胶的生物相容性

分别使用活/死细胞染色和CCK-8法检测了BMSCs的活力和增殖行为。图7A为活/死细胞染色结果，图7B为细胞存活率的量化表征。与对照组相比，HAPD-Cu1、HAPD-Cu2以及HAPD-Cu3组无明显差异，图像中均呈现大量绿色，表明具有良好的生物相容性。然而，在第3天时，HAPD-Cu4组的细胞存活数量与其他组相比有所降低，第5天时的差异更甚，而死细胞的数量明显增加，其细胞存活率约为63%，说明HAPD-Cu4组存在潜在的细胞毒性。图7C为CCK-8检测结果，与活/死细胞染色结果一致：与对照组相比，HAPD-Cu1、HAPD-Cu2和HAPD-Cu3组的OD值无统计学差异，而HAPD-Cu4组的OD值明显下降，说明高浓度的 $\text{Cu}^{2+}$ 对BMSCs的生存产生了毒副作用，抑制了细胞增殖行为。另外，由于HAPD-Cu4的毒副作用，接下来的相关测试均不包含该实验组。

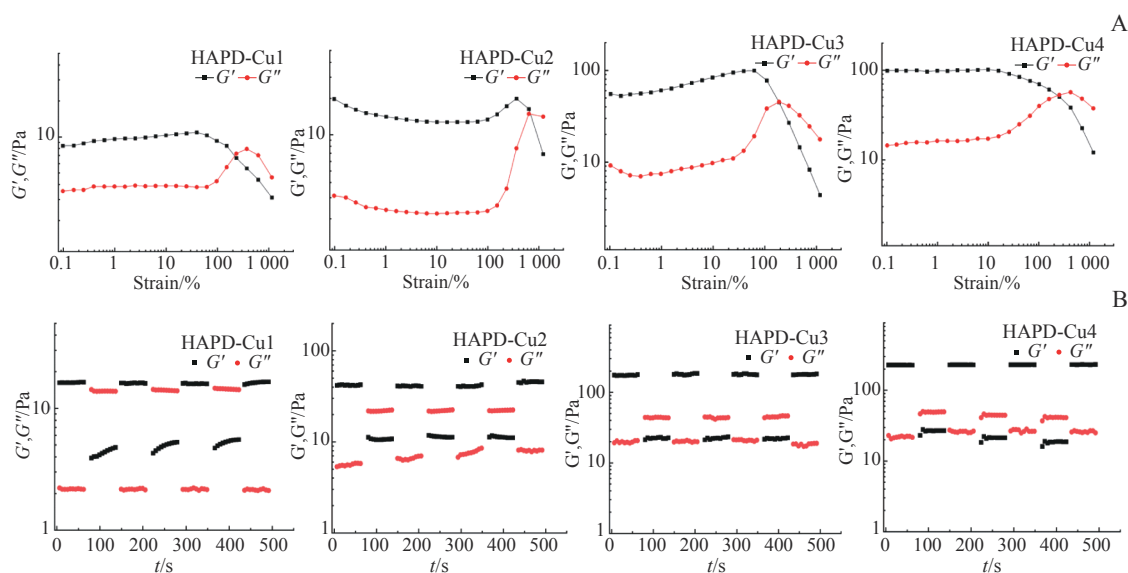




**Note:** A. Self-healing photographs of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4) at various time points (0, 5, 15 min). B. Injectable photographs of samples from each group (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4). C. Self-healing mechanism of HAPD-Cu hydrogels.

图4 HAPD-Cu的自愈合和可注射性能

**Fig 4** Self-healing and injectable properties of HAPD-Cu

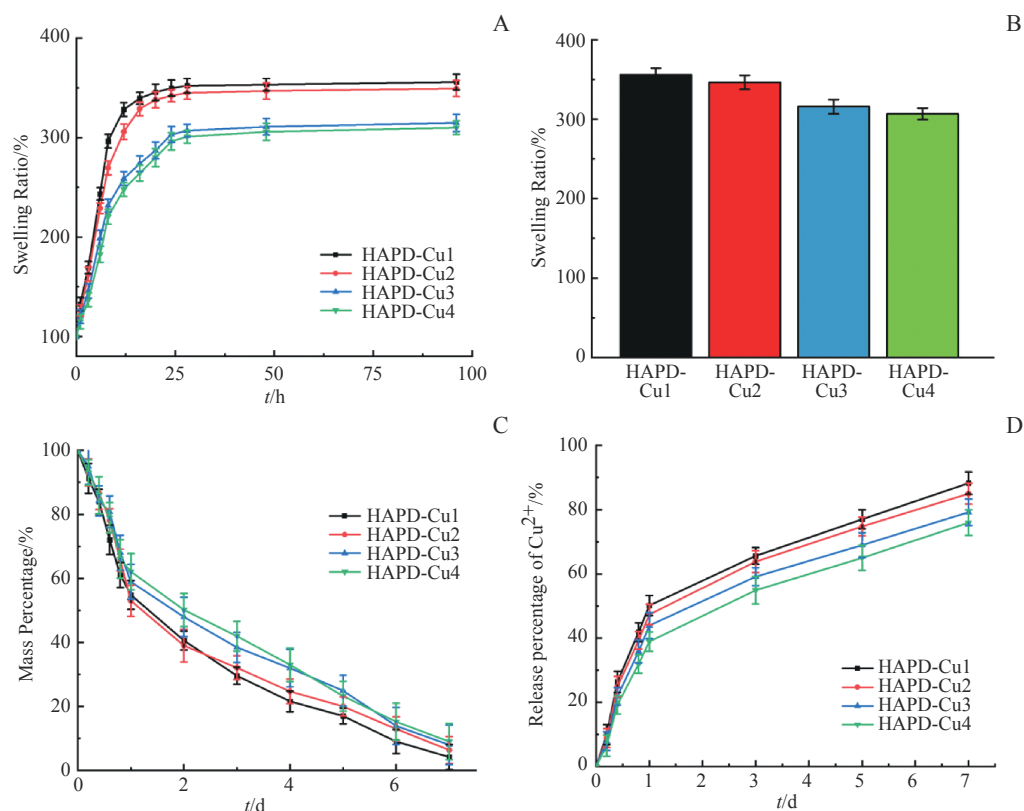


**Note:** A. Strain scan curves of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4) with amplitudes of oscillatory strain scanned from 0.1% to 800% at constant frequency (0 Hz). B. Strain cycling curves of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4): high strain (800%) for 60 s and low strain (10%) for 60 s, cycled 4 times.

图5 HAPD-Cu的流变力学

**Fig 5** Rheology of HAPD-Cu

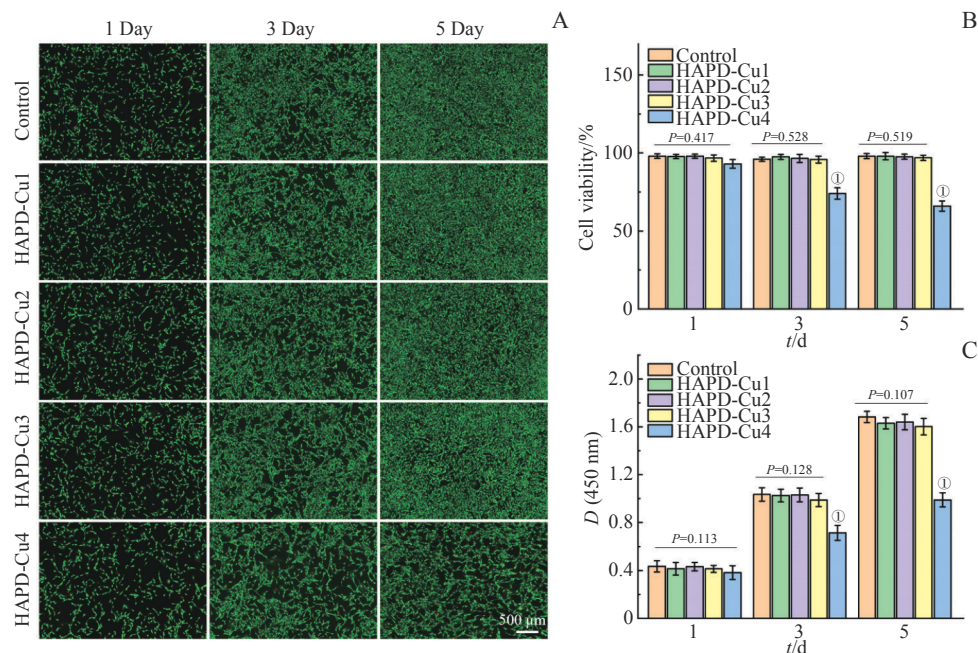




**Note:** A. Swelling-time curves of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4). B. Equilibrium swelling rate of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4). C. Degradation-time curves of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4). D. Cumulative Cu<sup>2+</sup> release curves of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4).

图6 HAPD-Cu的溶胀、降解和离子释放

Fig 6 Swelling, degradation and ion release of HAPD-Cu



**Note:** A. Images of live/dead staining of BMSCs co-cultured with extracts from each group of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4) for 1, 3 and 5 days. B. Cell viability of BMSCs co-cultured with extracts from each group of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4) for 1, 3 and 5 days (<sup>①</sup>*P* = 0.000, compared with the control group). C. CCK-8 results of BMSCs co-cultured with extracts from each group of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2, HAPD-Cu3 and HAPD-Cu4) for 1, 3 and 5 days (<sup>①</sup>*P* = 0.000, compared with the control group). Controls were cells cultured in normal medium.

图7 HAPD-Cu的生物相容性

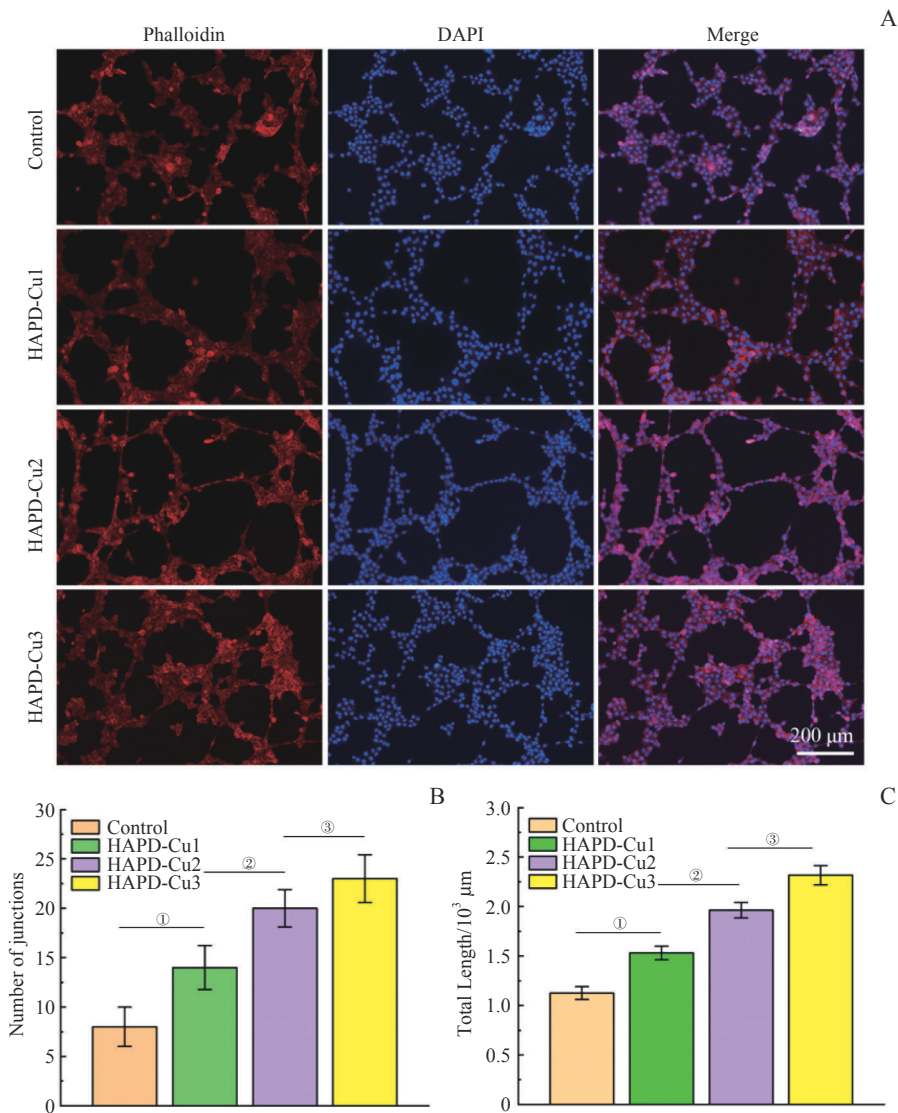
Fig 7 Biocompatibility of HAPD-Cu



## 2.7 HAPD-Cu 水凝胶的促成血管作用

图 8A 为各组的成管染色结果。与对照组相比, HAPD-Cu1、HAPD-Cu2 和 HAPD-Cu3 显著促进了

HUVECs 的管形成。定量分析的结果显示 (图 8B、C), 随着实验组  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加, HUVECs 的成管效果也逐渐有所改善。



**Note:** A. Tube formation images of HUVECs co-cultured with the extracts of each group of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2 and HAPD-Cu3) for 6h. B. Junctions of HUVECs co-cultured with the extracts of each group of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2 and HAPD-Cu3) for 6h (<sup>①</sup> $P = 0.018$ , <sup>②</sup> $P = 0.010$ , <sup>③</sup> $P = 0.034$ ). C. Total length of HUVECs co-cultured with the extracts of each group of samples (HAPD-Cu1, HAPD-Cu2 and HAPD-Cu3) for 6h (<sup>①</sup> $P = 0.000$ , <sup>②</sup> $P = 0.004$ , <sup>③</sup> $P = 0.001$ ); controls were cells cultured in normal medium.

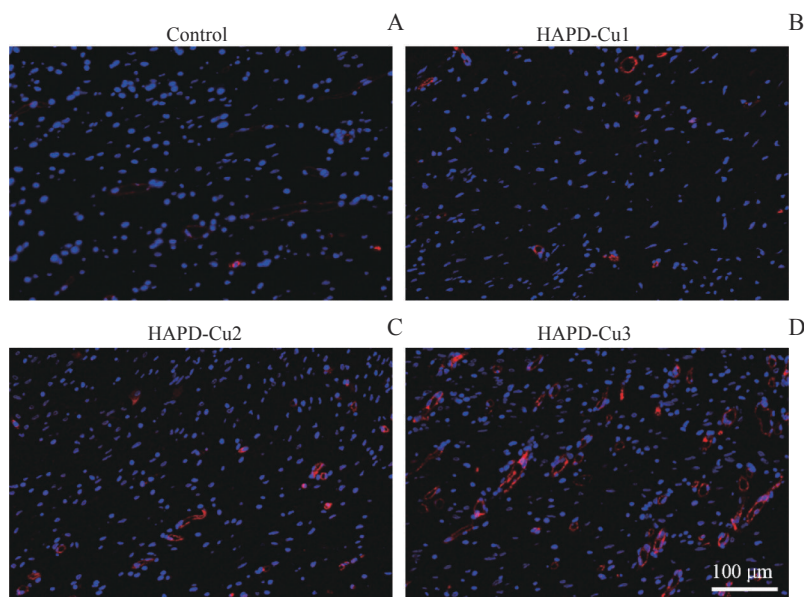
图 8 HAPD-Cu 的管形成实验

Fig 8 Tube formation experiments of HAPD-Cu

上述实验结果证明了 HAPD-Cu 水凝胶在体外对 HUVECs 的促成管作用。另外, 为了进一步研究对体内的实际成血管效果以评估对软组织损伤的修复情况, 建立了大鼠伤口模型, 并收集组织切片对其进行 CD31 免疫荧光染色。图 9A—D 为各治疗组的染色结果。如图所示, 对照组中呈现大片的蓝色, CD31 的阳性 (红色) 表达极少。而随着实验组  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加, 在 HAPD-Cu1、HAPD-Cu2 以及

HAPD-Cu3 组中均能清楚地观察到 CD31 的阳性表达, 特别是 HAPD-Cu3 组, 显示出了最佳的促进血管生成的潜力。这些实验结果表明, 尽管高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  会对细胞产生毒副作用, 但中等浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  会促进血管生成。伤口创面修复实验结果如图 10 所示, 各组创面均未见明显感染, 且与对照组相比, 各实验组愈合情况良好, 特别是 HAPD-Cu3 组, 基本完全愈合。

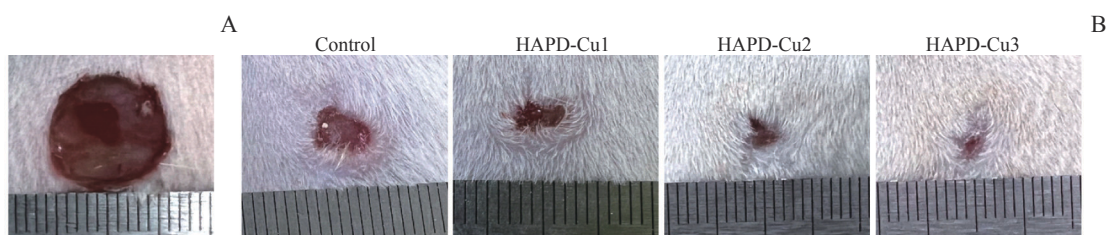




**Note:** A. CD31 staining image of Control. B. CD31 staining image of HAPD-Cu1. C. CD31 staining image of HAPD-Cu2. D. CD31 staining image of HAPD-Cu3.

**图9** HAPD-Cu 的 CD31 免疫荧光染色

**Fig 9** CD31 immunofluorescence staining and optical photographs of wound repair of HAPD-Cu



**Note:** A. Original wound healing model. B. Wound healing at day 14.

**图10** HAPD-Cu 的创面愈合观察实验 ( $n=3$ )

**Fig 10** Observation of diabetic wound healing of HAPD-Cu ( $n=3$ )

### 3 讨论

目前,临床上治疗皮肤缺损的常用策略是自体移植,然而这种手段面临着供体部位感染以及来源有限等风险,治疗效果并不理想<sup>[16]</sup>。皮肤损伤的快速愈合离不开早期高效率的血管网络的构建,若细胞与周围血管的最近距离超过 100~200  $\mu\text{m}$  时,细胞将会因缺乏营养和氧气而死亡<sup>[17]</sup>。因此,血管的缺乏是导致伤口愈合延迟甚至不愈合的最重要因素之一,通过改善血管生成以加速伤口愈合进程或许是一种有效的办法。

自愈合可注射性水凝胶由于具备微创治疗和局部靶向性等优势而具有独特的临床应用前景。金属配位是构建自愈合水凝胶的最常用方法之一,因为其设计参数广泛且可调节性高,而且其内在的物理化学性质和离子的特性均可以由所得的生物材料赋予(如抗

菌、成骨、成血管)等<sup>[18-20]</sup>。本研究以铜离子作为中心金属,双膦酸基团作为螯合配体,通过金属配位作用制备了 HAPD-Cu 水凝胶,并在体外表现出了良好的自愈合和可注射特性(图 4A、B)。而且流变学的测试表明,在循环施加低剪切速率和高剪切速率时,4 种水凝胶的  $G'$  和  $G''$  均能在几秒钟内恢复 100% (图 5B)。有研究指出,松散多孔的网络结构有利于细胞粘附和迁移,保持湿润环境,吸收伤口渗出物并加速伤口愈合等<sup>[11]</sup>。SEM 结果表明(图 3A、B),4 组 HAPD-Cu 水凝胶均具有内部相连的多孔结构,有利于细胞浸润和营养交换。此外,理想生物材料的降解速率须与组织的再生过程相匹配。如果降解太快,则不足以支持组织的向内生长;若降解太慢,则会促使纤维化阻碍组织的正常再生过程<sup>[21]</sup>。通常,伤口愈合的周期为 1~2 周, HAPD-Cu 的降解实验(图 6C)和离子释放实验(图 6D)表明, HAPD-Cu



的降解周期约为7 d,并在前期存在离子突释行为,这有利于促进早期血管网络的建立,从而为后续伤口愈合奠定坚实的生物学基础。

铜离子作为一种功能性活性离子,也是人体必需微量元素之一,能够通过刺激 HUVECs 增殖,上调 VEGF 和 HIF-1 $\alpha$  等相关蛋白及基因的表达来促进血管生成,因此常作为添加剂以促进血管生成而被广泛用于组织工程中。活/死细胞染色实验(图 7A)和 CCK-8 测试(图 7C)以及成小管实验(图 8)和 CD31 组织染色实验(图 9)表明,适量浓度的铜离子具有良好的生物相容性,并能有效促进 HUVECs 的成血管行为,而高浓度的铜离子则会对细胞产生毒副作用,抑制细胞活性。

综上,本研究制备一种基于金属配位作用的自愈合可注射性水凝胶,通过促成血管以加速创面愈合。本研究中,金属配位键源自 Cu<sup>2+</sup>和双膦酸基团之间的动态非共价作用,并在体外表现出了优异的自愈性和可注射性,允许其以微创形式注射到损伤部位。体外及体内实验均表明,除去高浓度铜离子的实验组(HAPD-Cu4)外,低浓度和中浓度铜离子的 HAPD-Cu 水凝胶(HAPD-Cu1、HAPD-Cu2、HAPD-Cu3)具有良好的细胞相容性和促成血管特性,可以更好地应用于不规则皮肤创面的修复,具有较大的临床转化潜力。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过上海交通大学医学院实验动物研究伦理委员会审批(审批号 SYXK 2018-0027)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》进行。

All animal experiments involved in this study have been approved by the Experimental Animal Research Ethics Committee of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (SYXK 2018-0027), and all experimental procedures are carried out in accordance with the regulations for the *Administration of Affairs Concerning Experimental Animals*.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

杨淑、蔡正伟参与了实验设计,杨淑参与了论文的写作,魏杰、崔文国、蔡正伟参与了论文的审查和修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by YANG Shu and CAI Zhengwei. The manuscript was drafted by YANG Shu. The manuscript was reviewed and revised by WEI Jie, CUI Wenguo and CAI Zhengwei. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-11-08
- Accepted: 2023-12-11
- Published online: 2023-12-28

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] WU F, YUAN Z C, SHAFIQ M, et al. Synergistic effect of glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide and ZnO on the antibacterial, hemostatic, and wound healing properties of nanofibrous dressings[J]. *J Biosci Bioeng*, 2022, 134(3): 248-258.
- [2] SHI L Y, ZHAO Y N, XIE Q F, et al. Moldable hyaluronan hydrogel enabled by dynamic metal-bisphosphonate coordination chemistry for wound healing[J]. *Adv Healthc Mater*, 2018, 7(5): 10.1002/adhm.201700973.
- [3] RAI V, MOELLMER R, AGRAWAL D K. Stem cells and angiogenesis: implications and limitations in enhancing chronic diabetic foot ulcer healing[J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2287.
- [4] OKONKWO U A, DIPIETRO L A. Diabetes and wound angiogenesis[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7): 1419.
- [5] ZHANG W Y, WANG L T, GUO H Y, et al. Dapagliflozin-loaded exosome mimetics facilitate diabetic wound healing by HIF-1 $\alpha$ -mediated enhancement of angiogenesis[J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(7): e2202751.
- [6] SIDDIQUI Z, SARKAR B, KIM K K, et al. Angiogenic hydrogels for dental pulp revascularization[J]. *Acta Biomater*, 2021, 126: 109-118.
- [7] QIU W W, HAN H, LI M N, et al. Nanofibers reinforced injectable hydrogel with self-healing, antibacterial, and hemostatic properties for chronic wound healing[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2021, 596: 312-323.
- [8] CHANG L K, XU Y L, WU Z Y, et al. Hyaluronic acid methacrylate/laponite hydrogel loaded with BMP4 and maintaining its bioactivity for scar-free wound healing[J]. *Regen Biomater*, 2023, 10: rbad023.
- [9] BURDICK J A, PRESTWICH G D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications[J]. *Adv Mater*, 2011, 23(12): H41-H56.
- [10] LI J Y, ZHAI D, LV F, et al. Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing[J]. *Acta Biomater*, 2016, 36: 254-266.
- [11] LIU N B, ZHU S J, DENG Y Z, et al. Construction of multifunctional hydrogel with metal-polyphenol capsules for infected full-thickness skin wound healing[J]. *Bioact Mater*, 2022, 24: 69-80.
- [12] ZHANG K Y, LIN S E, FENG Q, et al. Nanocomposite hydrogels stabilized by self-assembled multivalent bisphosphonate-magnesium nanoparticles mediate sustained release of magnesium ion and promote in situ bone regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2017, 64: 389-400.
- [13] LIU H, CAI Z W, WANG F, et al. Colon-targeted adhesive hydrogel microsphere for regulation of gut immunity and flora[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(18): e2101619.
- [14] ZHOU Y, GU Z P, LIU J, et al. Arginine based poly (ester amide)/hyaluronic acid hybrid hydrogels for bone tissue Engineering[J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 230: 115640.
- [15] LIU J, SU C Y, CHEN Y T, et al. Current understanding of the applications of photocrosslinked hydrogels in biomedical engineering[J]. *Gels*, 2022, 8(4): 216.



- [16] XIA H T, ZHANG Y, XIN H M, et al. Metal-phenolic network-based polydopamine@Cu within a polyvinyl alcohol hydrogel film for improved infected wound healing through antibacterial and pro-angiogenesis activity[J]. *Mater Des*, 2022, 221: 110904.
- [17] LEE J H, PARTHIBAN P, JIN G Z, et al. Materials roles for promoting angiogenesis in tissue regeneration[J]. *Prog Mater Sci*, 2021, 117: 100732.
- [18] FENG X Z, WANG C, SHANG S B, et al. Multicolor fluorescent cellulose hydrogels actuators: lanthanide-ligand metal coordination, synergetic color-changing and shape-morphing, and antibacterial activity[J]. *Chem Eng J*, 2022, 450: 138356.
- [19] ZHAO Z Y, LI G, RUAN H T, et al. Capturing magnesium ions via microfluidic hydrogel microspheres for promoting cancellous bone regeneration[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(8): 13041-13054.
- [20] LUO M, WANG Y D, XIE C X, et al. Multiple coordination-derived bioactive hydrogel with proangiogenic hemostatic capacity for wound repair[J]. *Adv Health Mater*, 2022, 11(18): e2200722.
- [21] ZHAO Y C, CHEN Z J, SHAO W J, et al. Black phosphorus-enhanced injectable hydrogel for infected soft tissue healing[J]. *APL Bioeng*, 2023, 7(1): 016103.

[本文编辑] 徐 敏

### 学术快讯

## 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心江帆团队揭示屏幕暴露内容 对儿童早期心理健康的影响

2023年12月4日, 国家儿童医学中心(上海)、上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心江帆教授, 与上海交通大学中国医院发展研究院儿童健康管理研究所张云婷副研究员领衔团队, 在 *JAMA Pediatrics* 杂志发表题目为 *Types of on-screen content and mental health in kindergarten children* 的研究成果, 揭示屏幕暴露影响儿童早期心理健康的影响。该团队利用“SCHEDULE-P (Shanghai Children's Health, Education and Lifestyle Evaluation-Preschool)”学龄前儿童队列, 纵向追踪了15 965名幼儿园儿童小班—中班—大班3年的数据。研究结果显示: 学龄前儿童无论观看何种屏幕内容, 每日屏幕暴露时间超过1 h, 儿童心理健康风险会显著增加, 且随着时间延长风险也相应增高; 观看屏幕时间相同情况下, 相较于观看教育类节目, 儿童观看娱乐类节目、非儿童类节目心理健康的风险更大。该研究结果为指导家长科学育儿行为提供了有力的科学依据。