

低弹性模量水凝胶力学性能测定方法的研究



重庆大学硕士学位论文 (学术学位)

学生姓名：龙 洋

指导教师：邹小兵 副教授

专 业：化 学

学科门类：理 学

重庆大学化学与化工学院

二〇一七年四月

An Investigation on Measuring Young's Modulus of Low-elasticity Hydrogels



A Thesis Submitted to Chongqing University
in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Master's Degree of Science

By
Long Yang

Supervised by Associate Professor Zou Xiaobing
Specialty: Chemistry

School of Chemistry & Chemical Engineering of
Chongqing University, Chongqing, China

April 2017

摘 要

体外培养的细胞结构与功能不同于体内细胞。其原因主要是体内三维环境不同于硬质培养皿的固体/液体界面二维生长环境，同时体内细胞外基质的力学硬度也与硬质培养皿存在巨大差异。细胞所处环境的力学性能，对细胞的结构和行为，如细胞的增殖、分化、迁移以及形态，起重要作用。

水凝胶是一种能够在水中溶胀并保持一定水分而又不溶于水，具有三维网络结构的新型功能高分子材料。水凝胶的三维结构与高含水量与体内细胞外基质的结构功能十分相似，因而水凝胶常在细胞培养中模拟细胞外基质的作用。模拟不同组织的细胞力学环境可通过调节水凝胶的力学性能实现。

水凝胶力学性能的测定是控制水凝胶力学性能的关键技术。本文对其力学性能的测定开展了以下三个方面的工作：第一，在浸水拉伸法的基础上，进行了扣除砝码浮力的改进，提高测量结果的精度；第二，用新制备的三种水凝胶验证微球压痕法公式，该公式基于对赫兹公式的指数校正而建立，用数值模拟方法与最优化算法求得公式中的参数；第三，基于重力做功建立计入横向变形的公式，利用拉伸法测得的杨氏模量求出公式中的未知参数，拟合公式。研究表明：校正砝码浮力后，拉伸法的测量精度得到提高；微球压痕法拟合得到的赫兹接触定理新公式，可适用于五种水凝胶弹性模量的测定，计算误差小；基于重力做功建立的压痕重力法，计入了横向形变，拟合出的新公式可准确计算出水凝胶的杨氏模量，与拉伸法相比相对误差 E_r 在 5% 以内。

关键词：水凝胶；杨氏模量；拉伸法；微球压痕法；压痕重力法

ABSTRACT

Cell structure and function which is in vitro conventional cell culture, is different from the cell in vivo. The main reason is that three-dimensional environment is different from the solid/liquid interface in a hardness petri dish, and the mechanical hardness of extracellular matrix is different from hardness petri dish. The mechanical properties of cellular environment play an important role to the behavior of the cells, such as cell proliferation, cell differentiation, cell migration and cell shape.

Hydrogel is a kind of new functional polymer materials, which can swell in the water, keep water and be insoluble in water with three dimensional network structure. Three-dimensional structure of the hydrogel, which is high water content, and cellular environment in the body is similar to the structure and function, thus hydrogel often simulates the effect of extracellular matrix in cell culture. Adjusting the mechanical properties of hydrogels simulates the cell environment of different tissue.

A determination mechanical property of hydrogel is the key technology to control mechanical properties of the hydrogel. In this paper, its mechanical property determination is carried out by the following three aspects: first, on the basis of the submerged tensile method, it deducts the buoyancy of weight, to improve the precision of the measurement result; Second, three new kinds of hydrogel microsphere verifies indentation method formula, which is based on the theory of Hertz, using numerical simulation method and optimization algorithms to get optimal new parameters; Third, putting forward new formula included transverse deformation is based on the gravity work, the unknown parameters in the formula are obtained by young's modulus of microspheres indentation method, and fit the formula. The results of the study are as follows: the measurement precision of the new tensile system, which is included in the weight, is superior to the previous system; The new formula of the Hertz contact theorem obtained by tensile method can be applied to five kinds of hydrogels, and the calculation error is small; indentation gravity method is based on the gravity acting and included transverse deformation, and fitting out the new formula can accurately calculate the young's modulus of hydrogel. Compared to the tensile method, Er is less than 5%

Key words: Hydrogels, young's modulus, tensile method, microsphere indentation

method, indentation gravity method

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
1 绪 论.....	1
1.1 研究意义.....	1
1.2 水凝胶.....	2
1.2.1 水凝胶的定义.....	2
1.2.2 水凝胶的分类.....	2
1.2.3 水凝胶的交联方式.....	2
1.2.4 水凝胶的应用.....	3
1.2.5 常见制备水凝胶的高分子.....	3
1.3 水凝胶力学性能的测量.....	7
1.3.1 拉伸法.....	7
1.3.2 压缩法.....	8
1.3.3 压痕法.....	8
1.4 研究目的.....	10
1.5 研究内容.....	10
2 水凝胶制备条件研究.....	12
2.1 引言.....	12
2.2 实验部分.....	12
2.2.1 实验试剂与仪器.....	12
2.2.2 主要溶液制备.....	12
2.2.3 水凝胶制备.....	13
2.2.4 水凝胶的溶胀时间测定.....	15
2.3 结果与讨论.....	15
2.3.1 水凝胶的透明度.....	15
2.3.2 水凝胶的溶胀率.....	16
2.4 本章小结.....	17
3 拉伸法测量水凝胶弹性模量.....	18
3.1 引言.....	18
3.2 实验部分.....	18
3.2.1 实验试剂与仪器.....	18

3.2.2 主要溶液制备	19
3.2.4 拉伸法测量水凝胶杨氏模量	21
3.3 结果与讨论	22
3.3.1 胡克定律适用性分析	22
3.3.2 拉伸法测量水凝胶杨氏模量	24
3.3.3 砝码浮力对拉伸法的影响	25
3.3.4 拉伸法测量多种水凝胶的杨氏模量	27
3.4 本章小结	27
4 微球法测量水凝胶杨氏模量	28
4.1 引言	28
4.2 实验部分	28
4.2.1 实验试剂与仪器	28
4.2.2 主要溶液制备	29
4.2.3 水凝胶制备	29
4.2.4 微球法测量水凝胶杨氏模量	31
4.3 经典赫兹理论	32
4.4 经典赫兹理论的限制	33
4.5 结果与讨论	35
4.5.1 水凝胶厚度	35
4.5.2 水凝胶表面形貌	35
4.5.3 泊松系数	35
4.5.4 杨氏模量的计算	36
4.6 本章小结	41
5 压痕重力法测量水凝胶杨氏模量	42
5.1 引言	42
5.2 实验部分	42
5.2.1 实验试剂与仪器	42
5.2.2 主要溶液制备	43
5.2.3 水凝胶制备	43
5.2.4 微球法测量水凝胶杨氏模量	45
5.3 压痕重力法公式推导	46
5.4 结果与讨论	48
5.5 本章小结	53
6 结论与展望	54

6.1 主要研究工作与结论	54
6.2 未来展望	55
致 谢	56
参考文献	57

1 绪 论

1.1 研究意义

多细胞生命体体内的细胞大多附着在软材料上，他们周围通常是细胞外基质（extracellular matrix, ECM）或者与其相同的其他细胞。但是传统细胞研究大多是在硬基底上，如玻璃或者塑料，得到的细胞结构功能与体内不同。一个公认的原因是体内细胞生长于三维基底而传统培养在固体/液体界面生长，另外一个差别就是细胞外基质力学硬度^[1]。细胞在体内和体外，细胞外基质是形成细胞结构差异的主要因素。

细胞在细胞外基质^[2,3]生长过程中受多种环境因素影响，如：化学趋向性、接触倾向性、生物电向性和最新的力学趋向性。这些现象分别是对可溶性化学物质、基底黏附分子、电场和基底顺应的梯度响应产生的定向移动。近年来，细胞外基质的力学硬度对细胞行为影响，如形态、运动、迁移、增殖等，越来越受到人们的重视。Engler^[4]的主动脉平滑肌细胞的研究表明，基底硬度对细胞形状影响比绑定细胞粘附配体键的密度更重要。国内外的研究者大多通过体外细胞培养，探究细胞分化与细胞外基质硬度的关系，研究外界物理因素对细胞的影响。早期 Engler^[4]等人的工作验证了 MSCs 可以感知 ECM 的力学硬度，指导 MSCs 分化为神经细胞（<1kPa），肌原细胞（约 10 kPa），和成骨细胞（约 30 kPa）。随后，众多研究工作^[5-8]研究了在细胞体系里与 ECM 属性相关的机械感知信号转换路径。另外，基底顺应梯度对细胞迁移行为也有影响，细胞从基底硬度小的区域向硬度大的区域定向移动^[9]。血管平滑肌细胞在径向梯度顺应性基底表现出机械趋向性，细胞积累在基底硬度最大的区域^[3]。梯度顺应性基底为研究血管平滑肌细胞移动提供了一个有效方法。这对于血管组织工程应用很重要，尤其是控制再狭窄^[10]。

水凝胶是一种能够在水中溶胀并保持一定水分而又不溶于水，具有三维网络结构的新型功能高分子材料。水凝胶的三维结构和高含水量，与体内细胞外基质的结构功能十分相似，并且水凝胶的力学硬度可以调节。具有高含水量与可调节硬度性质的水凝胶，可作为细胞体外培养的良好载体，在细胞培养中模拟细胞外基质。

杨氏模量（Young's modulus）是衡量水凝胶力学硬度的物理量。大部分水凝胶相对薄、软、含水较多且有时是温敏的，水凝胶的这些性质使得水凝胶的杨氏模量测定具有难度^[11]。目前测量水凝胶杨氏模量的方法并没有统一标准。比较常用的有原子力显微镜法^[11, 12]（Atomic Force Microscope, AFM），微球压痕法^[13]，拉伸法。

1.2 水凝胶

1.2.1 水凝胶的定义

水凝胶作为一种新型功能高分子材料，具有三维网络结构，可水中溶胀、并保持一定水分，却不溶于水^[14]。这是由于其主链或支链上含有大量—COOH、—OH、—O—、—NH₂、—CONH₂等亲水性基团^[15]，这些亲水基团可吸附大量水分使得水凝胶成为含有大量水分的三维网络^[16]，保水能力强，吸附的水分远远超过水凝胶高聚物自身的重量，因而水凝胶同时兼含固态与液态的性能。在水凝胶中，水份含量影响水凝胶的网络结构及性质，水在水凝胶网络结构的形式有三种：结合水、界面水以及自由水^[17]。其中结合水与界面水分别以氢键与范德华力同聚合物的基团联在一起，自由水的扩散不受聚合物影响，在聚合物构成的三维网络中自由扩散，对水凝胶的溶胀起重要作用。

1.2.2 水凝胶的分类

分类的标准不同，水凝胶的分类也相应不同：

根据水凝胶的功能，其分类为：传统水凝胶与智能水凝胶。其中智能水凝胶根据水凝胶对各种刺激信号的响应又可细分为：温度智能水凝胶^[18-19]、pH 智能水凝胶^[20-21]、光感智能水凝胶等。

根据水凝胶组分的原料途径，其分类为天然材料水凝胶、合成材料水凝胶与定制型水凝胶。天然高分子水凝胶因为来源于自然界中的动植物，因而具有许多优点：生物相容性好，生物降解性好，原始资源丰富^[25-28]。随着化学的进步与科学的发展，在水凝胶高分子链的基团上添加官能团，根据要求添加细胞所需的生物活性物质，制备定制型水凝胶^[2]，它的出现提高了水凝胶的生物相容性，但由于其制备条件的复杂及设备的昂贵，一般实验室难以制得。合成高分子水凝胶价格便宜，制备简单，在广大实验室条件下也易于操作^[29-31]。

根据水凝胶高聚物组成形式^[32]，其分类为：共聚物水凝胶（copolymeric hydrogels）、均聚物水凝胶（homopolymeric hydrogels）、共聚物互穿聚合物水凝胶（multipolymer interpenetrating polymeric hydrogel, IPN）；应用最广的聚丙烯酰胺水凝胶也是丙烯酰胺的同聚物水凝胶，目前研究成果最多的均聚物水凝胶是聚乙烯醇。IPN 的一个重要特征是可以赋予一种成分的关键属性同时保留另一种成分的重要属性，甚至可以表现出两种单体网络所没有的属性。

1.2.3 水凝胶的交联方式

物理交联与化学交联是水凝胶主要的两种交联方式。水凝胶物理交联以物理结合的方式形成网状结构，主要有缠结点、微晶区、氢键、离子、分子间作用力等。物理交联形成的网络为可逆的。通常的物理交联方式有加热法、冷却法、冷

冻-解冻法、PH 法、混合法以及电解质法,在成胶过程中未使用有毒的化学交联剂。物理交联形成的水凝胶力学性能存在缺陷,因其形成水凝胶不均匀,主要是由于分子间的疏水作用、缠绕会形成簇团单元。

水凝胶化学交联形成的结构是高分子链段间以共价键交联起来的永久交联网络。化学交联时可通过选择不同的交联剂及不同交联剂的用量控制水凝胶的力学性能。通常的化学交联方法有辐射法^[33、34]、交联剂法^[35]、化学反应法与共聚法^[36]等。化学交联相较于物理交联,其最大优点为可精确控制水凝胶的交联密度,但在成胶过程中常引入有毒的交联剂以及在后续降解过程交联键的降解性较差。

1.2.4 水凝胶的应用

水凝胶中离子性基团可选择性吸附带相反电荷的离子,这种特性可用于水处理。水凝胶由于其与体内细胞生长环境相似的三维网状结构,且其可控的力学性能,以及优良的生物相容性,水凝胶常用于生物医学领域。

同时水凝胶具有固体与液体的两种属性,这种特性常被用作分子筛。水凝胶广泛用于卫生用品与农业,因其优异的吸水与保水功能。

1.2.5 常见制备水凝胶的高分子

①聚乙烯醇

聚醋酸乙烯酯水解得到主要产物为聚乙烯醇 (poly(vinyl alcohol), PVA), 一种水溶性高分子,大量的—OH 位于聚乙烯醇分子链上,PVA 为目前研究成果最多的同聚物水凝胶。物理交联和化学交联都可用于制备 PVA 水凝胶。

冷冻-解冻交联法^[37] 是物理交联制备 PVA 通常采用的方法,成胶过程中 PVA 分子链在低温的作用下,不断缠绕形成物理交联点。该方法制备的水凝胶具有特殊结构的半结晶或者结晶,目前只有 PVA 体系可使用冷冻-解冻交联法制备。溶液组成与浓度、冷冻条件都是影响 PVA 成胶的主要因素,同时 PVA 成胶也受解冻条件与循环次数的影响。常用的聚乙烯醇浓度为 7%~15%,虽然聚乙烯醇的浓度越高得到的水凝胶力学强度越好,但当浓度大于 20%时,溶液粘度将会影响微晶形成。

采用 γ 射线^[38]、紫外线、电子束等辐射方法可制备化学交联的 PVA 水凝胶,实验室最常使用化学交联剂制备化学交联 PVA 水凝胶,交联剂常用戊二醛^[39]、硼酸^[40]、环氧氯丙烷。同时聚乙烯醇水溶液可与, Ti^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 等,二价金属离子产生络合反应。但 Ti^{+} 、 Na^{+} 、 Li^{+} 等一价金属离子是聚乙烯醇的沉淀剂,不能形成稳定的水凝胶。 Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 由于与水分子之间存在较强的分子间作用力,既不能与聚乙烯醇形成配位键,但也不是沉淀剂,它们的存在可以增加水凝胶的粘稠度与保水性。

PVA 水凝胶本身没有细胞毒性,具有良好的兼容性, Hoffman^[41]等人采用多

孔可降解 PVA 水凝胶，成功培养肝细胞，细胞毒性测试达标；PVA 水凝胶在水中溶胀性能良好且稳定，链上含有大量的羟基这类亲水官能团，与血液之间的界面自由能达到最低。孟舒献等人^[42]制备了 PVA 化学交联水凝胶薄膜，通过大量试验验证了其血液相容性，具有良好的抗凝血性和优良的组织相容性。

聚乙烯醇在实际运用中仍然存在许多问题。如：干凝胶溶胀率变化缓慢，再溶胀性能较差^[43]。聚乙烯醇水凝胶本身没有生物活性，表面是光滑的，作为一个组织植入材料，结合组织基质性能差，限制其进入组织移植领域^[44]。引入其他成分在 PVA 水溶液中，改变 PVA 水凝胶的性能，制备聚乙烯醇复合水凝胶是 PVA 水凝胶发展方向。

②聚丙烯酰胺

应用最广的聚丙烯酰胺水凝胶（Polyacrylamide hydrogels, PAHG）也是丙烯酰胺的均聚物水凝胶，即 PAHG 是一种由 AM 交联聚合进而得到的高吸水性的化学或物理交联水凝胶^[45-47]。丙烯酰胺的成胶过程经历链引发、链增长与链终止，属于自由基聚合。PAM 的化学结构式如图 1.1

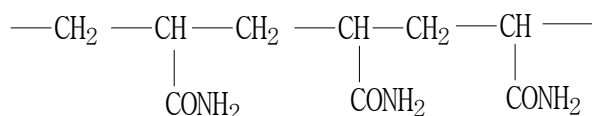


图 1.1 PAM 的结构式

Figure 1.1 Chemical structure of PAM

PAM 的聚合方法有悬浮聚合^[48]、水溶液聚合^[49]、本体聚合^[50]、辐射聚合^[51]和乳液聚合^[52]。PAM 结构的主要特点为：分子主链上存在大量酰胺侧基，同时分子链柔顺性高，具有较强的形状易变性。酰胺基化学活性大，能够和多种化合物形成很强的氢键。

在制备水凝胶时还需要加入交联剂与引发剂，这是由于 PAM 本身独有的物理性质以及化学性质。PAM 是一种线性的水溶性聚合物，为了将其转化为具有网络结构的 PAHG，需要加入能使其形成交联网络的交联剂。AM 聚合由氧化还原反应作链反应的引发反应，常用过硫酸钠、亚硫酸钠等，在交联剂的作用下聚合得到交联聚合物即为水凝胶，常用的交联剂为 N,N-亚甲基双丙烯酰胺。AM 水溶液在聚合时，引发剂种类及浓度、聚合温度、单体浓度与聚合物相对分子质量的大小等诸多因素都对成胶过程有影响。

PAHG 含有大量的亲水基团与疏水基团，温度不同时 PHAG 分子链舒展程度不同而表现出不同的吸水性，因而 PAHG 具有温敏性。PAHG 链上有大量不可自

由移动的羧基^[53]，当溶剂 pH 不同时，链上的羧酸离解度不同，使得链间静电力不同，整个网络表现出不同程度的收缩或者溶胀状态，即 PAHG 的 pH 敏感性。PAHG 作为智能型水凝胶材料，用于接触眼镜片、人工器官材料、蛋白质电泳和药物的控释与酶的包埋等^[54, 55]。

③海藻盐钠

海藻酸钠在自然界中来源于海洋褐藻或马尾藻，提取于海藻细胞膜中的一种天然多糖，无臭无味，为白色或淡黄色固体粉末。海藻酸钠不溶于 pH 小于 3 的酸性溶液，但具有良好的亲水性，不溶于乙醚、氯仿、乙醇等有机溶剂。由 β -D-甘露糖醛酸 (β -D-mannuronic, M) 和 α -L-古洛糖醛酸 (α -L-guluronic, G) 连接的线性共聚物组成的天然高分子^[56]，是电荷密度高的线性聚合物，结构如图：

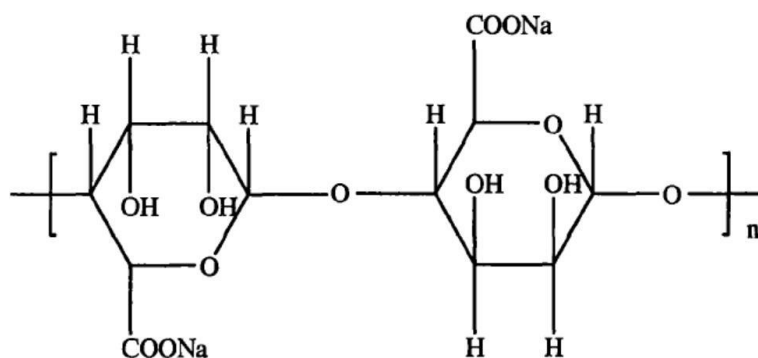


图 1.2 海藻酸钠化学结构式

Figure 1.2 Chemical structure of sodium alginate

水解后的海藻酸钠可得到三种类型的结构片段。M-M 段：由 β -1, 4 键结合的 β -D-甘露糖醛酸形成的均聚物；G-G 段：由 α -1, 4 键结合的 α -L-古洛糖醛酸形成的均聚物；混合交替的 M-G 段： β -D-甘露糖醛酸与 α -L-古洛糖醛酸形成的交替聚合物。

易与海藻酸钠发生离子交换作用的是二价或多价离子，海藻酸钠链上有许多可与金属离子反应的羧基与羟基；一价金属离子与 Mg^{2+} 不能与海藻酸钠结构形成水凝胶^[57]， Ca^{2+} 作为海藻酸钠离子交换剂经常被使用，水凝胶的稳定性取决于 G 片段的含量，由于水解后得到的 G-G、M-M、G-M 片段的结构不同，使得各段在成胶过程中与 Ca^{2+} 作用也不同，其中只有 G 单元才能与 Ca^{2+} (或其他二价阳离子) 发生交联形成凝胶^[58, 59]。G-G 片段分子链结构紧凑，呈双折叠式螺旋结构，形成锯齿型不易弯曲。两个 G-G 片段通过协同作用结合，中间形成一个亲水空间。 Ca^{2+} 占据该空间时，与 G-G 片段上的氧原子发生螯合作用，链间结合更紧密，相互作用力越强，形成三维结构^[60]。M-M 片段韧性大，易弯曲，不与 Ca^{2+} 反应，当 Ca^{2+}

浓度高时,链上羧基在聚电解质行为的作用下伸展为网状结构,G-M 片段在成胶过程起连接作用,最终形成三维网状结构^[64]。

二价金属离子与海藻酸生成可逆水凝胶,离子交换型水凝胶反应条件温和。传统的 Ca^{2+} 交联体系选用的多为氯化钙,但难以控制成胶速度,使得交联密度呈梯度变化,使得结构不均匀,无法获得力学性能与形态良好的三维结构^[62]。碳酸钙体系的溶解度低,成胶时间过长,但形成的水凝胶结构比较均匀。硫酸钙体系的水凝胶常在水凝胶中出现明显的沉淀,影响了水凝胶结构的均匀性^[63]。Ma 等人以^[64] $\text{CaCO}_3\text{-CaSO}_4\text{-GDL}$ (D-葡萄糖- δ -内酯)作为交换体系,通过改变两种钙盐比例调节成胶速率、力学性能及水凝胶的结构。

二胺、二胍类物质^[65, 66]能够同海藻酸钠发生交联反应,由于羧基基团的存在,羧基负离子与氨基脱水缩合得到酰胺共价键,得到稳定海藻酸钠水凝胶。将部分羟基转变为反应活性高的醛基,可提高席夫碱反应的速度,高碘酸钠^[67, 68] 氧化改造过的海藻酸钠,可快速生成水凝胶。化学交联时通过使用不同种类交联剂,选择不同的交联剂浓度制备相应溶胀度、交联密度与力学性能的稳定水凝胶^[69]。共价交联的水凝胶优点良多,但是添加的交联剂通常对细胞有毒,在成胶后需要清除残余交联剂。

④明胶

明胶,一种多肽混合高分子,是由胶原蛋白水解得到的主要产物^[70]。明胶作为来源于动物皮肤与骨头的生物资源,从结构规整的胶原到结构无归的明胶首先是胶原的热水解,使得超螺旋体解体,氢键断裂,得到可溶性的明胶。不溶于冷水,可溶于热水,具有热可逆性^[71],其水溶液在 30°C 至 40°C ,可发生溶胶与凝胶的热可逆转变^[72]。

明胶的成胶机理^[73]:明胶分子与水具有极大的亲和力,因其链上氨基与羧基为极性基团,但其作为线性分子链,分子链之间的亲和力由大于极性基团的亲和力,在水溶液中,线性长链相互依附。温度降低致使分子热运动降低,范德华力作为分子链相互交联力,形成网状结构,分子链相对活动减缓,流动性减小。分子链上的极性基团大量吸附水分子,填充于网状结构之间,成为含水量高的水凝胶。制约明胶凝胶的强度因素较多,主要有明胶分子量、组分含量、凝胶含水量以及溶液 pH 值。

明胶的分子量通常为 50,000-70,000,由常见的 20 多种氨基酸组成,同时明胶侧链上有大量的氨基与羟基等极性基团,具有很高的化学活性,同时还保留有与胶原相似的细胞结合点。作为一种天然高分子,明胶具有许多优良的性能,广泛应用于生物医学方面^[74, 75],如生物膜材料^[76]、组织工程材料^[77, 78]、医用纤维^[79]以及明胶基生物弹体等。力学性能的缺陷制约着天然高分子类凝胶的应用。

化学交联的水凝胶能改变天然高分子水凝胶的某些缺陷，常用的交联剂有醛类^[80]，碳化二亚胺类^[81]、环氧化合物类。随着使用化学交联剂出现问题是细胞毒性增加与生物相容性降低。

1.3 水凝胶力学性能的测量

通常杨氏模量衡量水凝胶力学硬度。胡可定律认为：在材料的弹性限度内，应力与应变成正比。材料的杨氏模量即应力与应变比值：

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l_0}$$

式中 $\sigma = \Delta l/l_0$ 是应力，为单位横截面积所受力 $\varepsilon = F/A$ ；是应变， l_0 为待测材料的原长， Δl 为待测材料在拉力 F 作用下的伸长。

对于水凝胶这种承受负荷较小的材料，通常采用的方法有拉伸法、压缩法、压痕法。

1.3.1 拉伸法



图 1.3 拉伸法测定杨氏模量示意图

Figure 1.3 Schematic diagram of tensile method

胡克定律为拉伸法测量水凝胶杨氏模量的基本原理。但是目前常用的拉伸机^[82]不适合用来测量水凝胶材料的杨氏模量，拉伸机施加于材料的荷载比较大，而水凝胶的杨氏模量通常较低。实验室可用基于胡克定律的拉伸法：样品一端固定，另一端垂直悬挂并添加一定的砝码，记录样品伸长改变，根据胡可定律的公式计算出相关的杨氏模量。水凝胶中水的自重将使形变增加，溶胀平衡后的水凝胶中水分含量高达 80%，产生的误差无法忽略，在水中进行测量最有利的优点是可利

用水凝胶的浮力平衡自身重力，测量体系的精度更高^[82]。本实验将再次对拉伸法进行改良，进一步考虑到测量过程中砝码浮力对测量结果的影响。拉伸法示意图（图 1.3）。但是这种拉伸法不能测量与载玻片结合到一起的水凝胶基底，且不能对细胞培养状态下的水凝胶硬度进行实时测量。

1.3.2 压缩法

压缩法^[84, 85]的基本原理是待测样品受到不同的压力，压头测量待测品产生形变，从而计算样品的力学属性。目前常用于压缩法的有动静态疲劳拉伸实验机与材料万能试验机^[85]，如图 1.4 所示。其应力加载范围广（可从 mg 到 KN）、位移范围广（可从 nm 到 mm）、频率高（200Hz）、高保真度、重复性强。测量水凝胶这类软材料的杨氏模量时，为满足这类材料的测定要求，应力加载与应变分别设置为 mg 级别纳米级别。但是这种仪器的精密度与设备成本是正比的，一般的实验室不易满足实验条件，且在压头下压水凝胶的过程中，水凝胶失水，杨氏模量变大，影响测量结果，该方法不适合测量含水量高的水凝胶软材料。



图 1.4 拉伸试验机 Bose ELF 3330

Figure 1.4 Testing machine Bose ELF 3330

1.3.3 压痕法

压痕法基于 Hertz 接触理论，材料的力学性能通过测量压痕几何深度，得到计算结果。Hertz 接触理论模型研究：受挤压相触的两物体，局部应力和应变的分布规律。原子力显微镜^[86]（Atomic Force Microscope, AFM）与微球压痕法^[8]为目前较为常用的压痕法。

1986 年，在扫描隧道效应显微镜 (STM) 体系中融入轮廓曲线仪到原子力显微镜。AFM 的主要构成：运动检测装置、带针尖的微悬臂、反馈回路、压电陶瓷扫描器件、图像采集、显示及处理系统（如图 1.5）。



图 1.5 原子力显微镜

Figure 1.5 Atomic force microscopy

其工作原理（如图 1.6）：探针的针尖扫描样品时，微悬臂系统对样品施加一个力，微悬臂与样品产生形变，形变信号传输到光电检测器，会转变为激光点的位移，通过特定函数关系转换得到形变量，再计算出材料的杨氏模量。

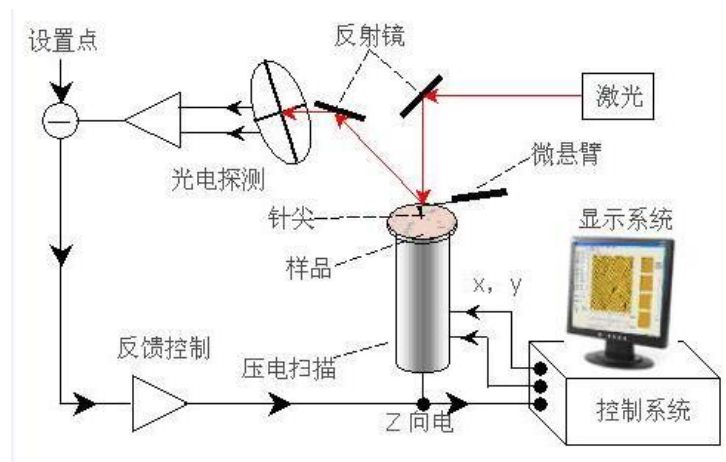


图 1.6 AFM 的工作原理

Figure 1.6 The working principle of AFM

AFM 的关键组分是具有微米尺寸探针的弹性悬臂微结构，微米尺寸探针通常是角锥形的，也可以是球形的。在测量软的水凝胶材料时，需要考虑探针的形状与悬臂的弹性系数。当按压材料时，每个探针都有一个特别的变形场与其相应的力学模型。对于水凝胶软材料而言，为使实验程序简单便利应选择使用球形压头，因为它可引入最小的应力与受力点。

AFM 是目前测量水凝胶材料最常用的方法，但是其最大的缺点是设备成本，探针使用寿命的限制，常常需要替换与校正新的探针。同时水凝胶的测量也被探

针与水凝胶之间的黏附作用影响，使得接触点的计算产生误差。

原子力显微镜很昂贵、低产出，也不能够在细胞培养环境下原地测量。因此，研究者形成了一种新型的方法，可原位测量基底的杨氏模量。Frey 等人^[86]介绍了该测量方法：在水凝胶表面滴一滴荧光微珠铺展开，微球轻轻放置在有水凝胶表面，于荧光显微镜下观察。于水凝胶表面聚焦，测量接触半径 r ，再用磁石移去微珠，再聚焦到微球与水凝胶接触下方最中央，两次聚焦点所在平面的垂直距离即为微球的压痕深度 h 。微球（钢球或者玻璃球）的模量至少是高于基底的数量级的六倍，因此可以看做是刚性体。由刚性微球压的无限厚度凝胶杨氏模量 E 和压痕力 F 和测得的压痕深度 h 的关系有：

$$E = \frac{3(1-\nu^2)f}{4r^{1/2}h^{3/2}}$$

R 是压头半径， F 是微球重量减去浮力， ν 是基底泊松系数。^[6]

Hertz 接触理论限制微观压痕法在水凝胶杨氏模量的使用。赫兹接触理论认为微球与水凝胶的接触为无限半空间凝胶接触^[6]。Rong Long 等人^[8]对该方法进行校正，发现校正因子在参数范围 $0.1 \leq \delta/h \leq 0.4$ 和 $0.3 \leq R/h \leq 6.2$ 时，实验结果最为精确。

1.4 研究目的

在拉伸法体系中，重新考虑砝码浮力对体系的测量精度的影响，验证新拉伸法体系的测量精度；完善本课题组对赫兹接触理论公式的拟合，测量多种低弹性水凝胶的杨氏模量，拟合新赫兹公式中的参数，再求出适用于几种低弹性模量水凝胶的新参数；实际上，微球在水凝胶表面的压痕不仅存在垂直方向上的形变，也存在水平方向的形变，需要建立一种新测量方法和计算公式，以准确计算水凝胶的杨氏模量。

1.5 研究内容

①在拉伸法体系，扣除砝码浮力建立新的拉伸法体系；以已知杨氏模量的聚丙烯酰胺水凝胶为参考系，验证新拉伸法体系的测量精度；测量几种低弹性模量的水凝胶。

②本课题组推导出赫兹接触理论的新公式，式中含有两个未知参数，得到三种低弹性模量水凝胶的参数，本文将再使用微球压痕法测量几种低弹性模量的水凝胶，计算其杨氏模量，对其对应的赫兹接触理论公式中的参数进行求解，再对几组参数进行拟合，得到可适用于低弹性模量水凝胶的参数。

③微球在水凝胶表面的真实压痕不仅存在垂直方向上的形变，也存在水平方

向的形变。以重力做功为原理，通过测量水凝胶在垂直方向与水平方向的形变，建立一种新的测量水凝胶杨氏模量的方法；验证该方法的测量精度。

2 水凝胶制备条件研究

2.1 引言

水凝胶因其具有与体内细胞生长环境相似的三维结构与含水量而广泛用于细胞体外培养。

用构成高聚物组成形式对水凝胶进行分类：共聚物水凝胶（copolymeric hydrogels）、均聚物水凝胶（homopolymeric hydrogels）、共聚物互穿聚合物水凝胶（multipolymer interpenetrating polymeric hydrogel, IPN）；IPN 的一个重要特征是可以赋予一种成分的关键属性同时保留另一种成分的重要属性，甚至可以表现出两种单体网络所没有的属性。在 PAM 与 PAHG 体系中掺入天然高分子可得到具有天然水凝胶与合成水凝胶的共同性能的共聚物互穿聚合物水凝胶。

2.2 实验部分

2.2.1 实验试剂与仪器

移液枪（50 μ L，100 μ L，1000 μ L），（Dragon med，中国）

真空泵（ZGP-100，淄博泽实真空设备有限公司）

分析天平（TG328A，上海天平仪器厂）

超纯水制备系统（Millipore，美国）

恒温水浴锅（HH-2 型）

磁力加热恒温搅拌器（QH-C14H 型）

搅拌桨

容量瓶（50mL，100mL）、六孔板

丙烯酰胺（AM）（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

N,N-亚甲基双丙烯酰胺（BAM）（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

过硫酸铵（APS）（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

聚乙烯醇 1799(PVA)（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

50%戊二醛（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

浓盐酸（分析纯，重庆川东化工有限公司）

明胶（Gel）（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）

海藻酸钠（SA）（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）

2.2.2 主要溶液制备

①10%（w/w）聚乙烯醇溶液：称 10g 聚乙烯醇固体，置于干净圆底烧瓶中，加 50g 水，浸泡 24h，80℃-90℃水浴加热，直至溶液变得澄清透明，加水至总重为 100g。

- ②40%(w/w)丙烯酰胺溶液：称 40g 丙烯酰胺，置于小烧杯中，加入适量水溶解，加水至总重为 100g。
- ③2%(w/w) N,N-亚甲基双丙烯酰胺：称 2g 的 N,N-亚甲基双丙烯酰胺，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。
- ④2%(w/w)海藻酸钠溶液：称取 2g 海藻酸钠，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。
- ⑤10%(w/w)过硫酸铵溶液：称 5g 过硫酸铵，置小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。
- ⑥10%(w/w)明胶溶液：称 10g 明胶，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。
- ⑦50%(v/v) 盐酸溶液：量 25mL 盐酸，于 50mL 容量瓶中，加水定容。
- ⑧2%(w/w)氯化钙溶液：称 2g 的氯化钙，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。

2.2.3 水凝胶制备

①聚乙烯醇-明胶混合水凝胶 (PVA-Gel)：

化学交联：1) 按照表 2.1 中 PVA-Gel 水凝胶的编号分别取 10% 聚乙烯醇水溶液与 10% 明胶溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50% 盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。

2) 将所得混合溶液分别快速转入六孔板中，室温静置 2h，将凝胶从模具中取出，在水中浸泡。

物理交联：1) 按照表 2.1 中 PVA-Gel 水凝胶的编号分别取 10% 聚乙烯醇水溶液与 10% 明胶溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50% 盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。

2) 将所得混合溶液分别快速转入六孔板中，在 -20℃ 中冷冻 18h，在 4℃ 中解冻 6h，反复循环 3 次，从六孔板中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡。

②聚丙烯酰胺-海藻酸钠混合水凝胶 (PAM-SA)

1) 按照表 2.1 中 PAM-SA 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40% 丙烯酰胺溶液、2% 海藻酸钠溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10% 过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min。

2) 将所得混合溶液分别快速转入六孔板中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃ 水浴 2h，移出水浴锅，置于室内自然冷却。

3) 从模具中取出凝胶，室温下在水中浸泡。

③聚丙烯酰胺-明胶混合水凝胶 (PAM-Gel)

- 1) 按照表 2.2 中 PAM- Gel 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40%丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min。
- 2)将所得混合溶液分别快速转入六孔板中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h，移出水浴锅，置于室内自然冷却。
- 3)将凝胶从模具中取出，室温下浸没在 2%氯化钙水溶液中 24h，再移入水中浸泡。

表 2.1 PVA-Gel 和 PAM-SA 中各物质的质量分数表
Table 2.1 The quality score of each substance in PVA-Gel and PAM-SA

PVA-Gel 编号	PVA/%	Gel/%	PAM-SA 编号	AM/%	ABM/%	SA/%
C1	6	1.25	D1	4	0.15	0.25
C2	6	2.5	D2	5	0.15	0.25
C3	7	1.25	D3	10	0.06	0.25
C4	7	2.5	D4	4	0.15	0.5
C5	8	1.25	D5	5	0.15	0.5
			D6	10	0.06	0.5

表 2.2 PAM-Gel 和 PVA-SA 中各物质的质量分数表
Table 2.2 The quality score of each substance in PAM-Gel and PVA-SA

PAM-Gel 编号	AM/%	ABM/%	Gel/%	PVA-SA 编号	PVA/%	SA/%
F1	5	0.15	1.25	G1	6	0.15
F2	5	0.15	2.5	G2	6	0.15
F3	10	0.06	1.25	G3	7	0.06
F4	10	0.06	2.5	G4	7	0.15
F5	10	0.1	1.25	G5	8	0.15
F6	10	0.1	2.5			

④聚乙烯醇/海藻酸钠（PVA-SA）混合水凝胶：

化学交联：1) 按照表 2.2 中 PVA- SA 水凝胶的编号分别取 10%聚乙烯醇水溶液与 2%海藻酸钠溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50%盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。

2)将所得混合溶液分别快速转入六孔板中, 室温静置 2h, 将凝胶从模具中取出, 在水中浸泡。

物理交联: 1) 按照表 2.2 中 PVA- SA 水凝胶的编号分别取 10% 聚乙烯醇水溶液与 2% 海藻酸钠溶液于小烧杯中, 加入水。缓慢加入一定量的 50% 盐酸稀溶液搅拌均匀, 离心去除溶液中气泡。

2)将所得混合溶液分别快速转入六孔板中, 在-20℃中冷冻 18h, 在 4℃中解冻 6h, 反复循环 3 次, 从六孔板中小心取出水凝胶, 室温下在水中浸泡。

2.2.4 水凝胶的溶胀时间测定

用湿润滤纸擦干水凝胶表面的水, 称重; 放入水中浸泡, 隔离一段时间, 滤出水凝胶, 并用湿润滤纸擦去表面水分, 称量并记录。重复操作, 直至水凝胶的重量基本恒定, 并计算其最终的溶胀率 (R_s)。

2.3 结果与讨论

2.3.1 水凝胶的透明度

由于在测量水凝胶的弹性模量时, 需要通过水凝胶内部的平行标记测量其形变, 因而符合测量要求的水凝胶透明度高, 如图 2.1.



图 2.1 水凝胶透明度的俯视图与侧面图

Figure 2.1 The top view and profile of the transparency of the hydroGel

但 PVA-SA 水凝胶制备得到的水凝胶透明度低, 不论使用化学交联或者物理交联。物理交联使用的为冷冻-解冻方法, 在 PVA-SA 混合溶液进行第一次冷冻时, 水凝胶已呈先出乳白色, 循环次数越多, 水凝胶的不透明度增加。由于 PVA 存在, 物理交联得到的水凝胶具有相当的结晶度, 光线在微晶面的反射, 使得水凝胶呈现出不透明。化学交联时, 由于海藻酸钠与充当催化剂的盐酸反应时, 同样呈现出透明度低的产物, 继而整块凝胶呈现出不透明度增加, 同时水凝胶的均匀性也不是很好。同理, PVA-Gel 水凝胶在物理交联时, 得到的水凝胶同样存在微结晶, 影响水凝胶的透明度, 不符合拉伸法的测量要求。

符合拉伸法测量要求水凝胶的有三种,分别为 PVA-Gel(化学交联)、PAM-Gel、PAM-SA。

2.3.2 水凝胶的溶胀率

水凝胶由高分子链之间通过化学键或者物理作用,形成交联网络结构,作为一种溶胀体,同时具有高分子溶液与高弹性固体的特性,一些小分子物质可以在其中渗透、扩散。交联结构中的高聚物不可被溶剂溶解,可吸收溶剂而溶胀。溶剂向高聚物分子间空隙渗透,高聚物体积溶胀;同时高聚物体积膨胀,网状分子链向三维空间伸展,分子链网络受到应力作用,产生弹性收缩,分子也跟随网络收缩。当伸张力与收缩力达到平衡,即水凝胶的溶胀平衡。交联物在溶胀平衡时的体积或质量与溶胀前的体积或质量之比为溶胀率(R_s),常用来表示水凝胶的溶胀能力,温度、压力、高聚物溶液浓度、溶剂等都可影响溶胀率。

$$R_s = \frac{V_t - V_0}{V_0} \quad (2.1)$$

$$\text{或 } R_s = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad (2.2)$$

在细胞培养中,细胞在水凝胶上的细胞行为耗时较长,并且通常情况下,细胞培养需要将水凝胶浸泡在营养液中,水凝胶可吸收营养液中的水分而溶胀,导致水凝胶的含水率改变。水凝胶含水率的改变将改变其力学性能,因而达到溶胀平衡的水凝胶才会在细胞培养过程中使用。测量符合透明度要求的三种水凝胶的溶胀率: PVA-Gel(化学交联)、PAM-Gel、PAM-SA,如图 2.2、图 2.3 与图 2.4。

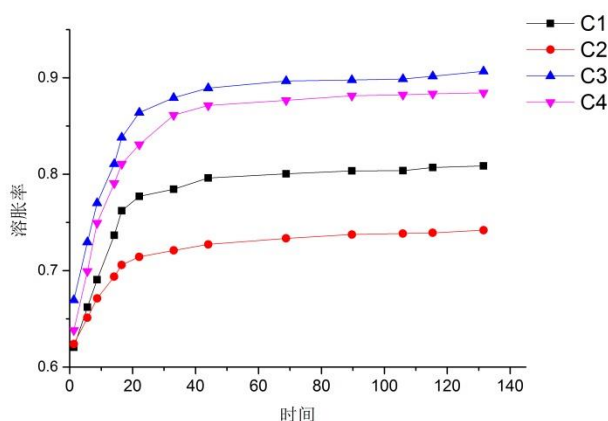


图 2.2 PVA-Gel 水凝胶溶胀率的变化图

Figure 2.2 The variation diagram of PVA-Gel hydrogel swelling rate

从图 2.2、图 2.3 与图 2.4 可以看出,在溶胀过程的前 20h,水凝胶的溶胀迅速,溶胀率基本随时间呈线性增加;溶胀过程的第二阶段:第 20h 至 40h,溶胀速度减慢,溶胀率增长缓慢;40h 到 50h 之间,水凝胶溶胀率微微增加;50h 以后,水凝

胶达到溶胀平衡，溶胀率基本不变。

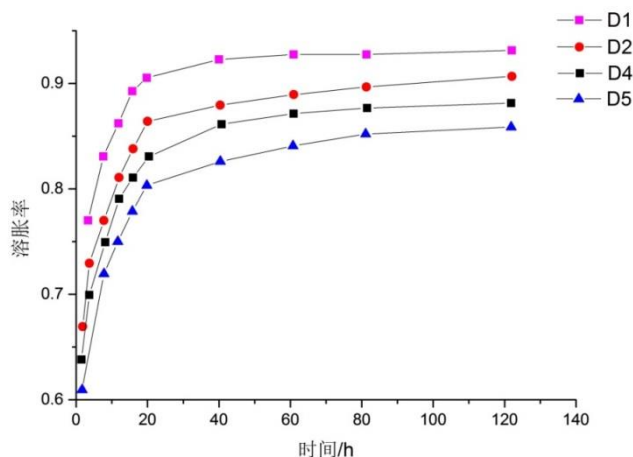


图 2.3 PAM-SA 水凝胶溶胀率的变化图

Figure 2.3 The variation diagram of PAM-SA hydroGel swelling rate

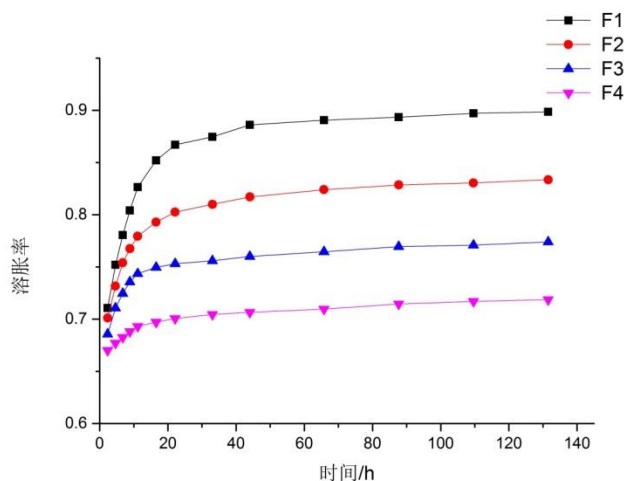


图 2.4 PAM-Gel 水凝胶溶胀率的变化图

Figure 2.4 The variation diagram of PAM-Gel hydrogel swelling rate

本文对水凝胶力学性能的测定，是在其达到溶胀平衡以后进行的，因为水凝胶的含水率是影响其力学性能重要的因素。

2.4 本章小结

由于受到测量水凝胶的透明度影响，后续用于测量方法研究的水凝胶为 PVA-Gel（化学交联）、PAM-Gel、PAM-SA，这三种水凝胶透明度高。制备得到的水凝胶需要达到溶胀平衡，在室温浸泡 48h，力学性能稳定，才能用于测量。

3 拉伸法测量水凝胶弹性模量

3.1 引言

在物体得到弹性限度内，应力与应变成正比，比值就是材料的杨氏模量：

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l_0}$$

其中 $\sigma = F/A$ 是应力，为单位横截面积所受力； $\varepsilon = \Delta l/l_0$ 是应变， l_0 为待测材料的原长， Δl 为待测材料在拉力 F 作用下的伸长。这个公式中的系数都是可以在实验中试剂测的，且实验操作简单，一般的实验室都能满足。

水凝胶网络结构中的水含量则是影响其力学性能的重要因素。在传统拉伸法中，水凝胶中水的含量会给水凝胶带来较大的形变，且在拉伸过程中水凝胶会失去部分水，使得拉伸前后的含水量不一样。制备水凝胶时，用头发丝作平行标记。拉伸过程在水中进行。每次拉伸都采集图片，使用图像处理软件 ImageJ 测量拉伸的形变，减小误差。

将水凝胶置于水中测量的拉伸法，可有效平衡水凝胶自重带来的形变，且解决了拉伸过程中水凝胶水分流失的问题。在胡可定律公式中应力 $\sigma = F/A$ 中的 F 为砝码重力，但在水中的砝码还有受到水施加的浮力，由于水凝胶在拉伸过程中的形变较小，因而砝码的浮力不可忽略，则

$$F = m_{\text{砝码}}g - F_{\text{浮}}$$

$m_{\text{砝码}}$ ：砝码质量； $F_{\text{浮}}$ ：砝码所受浮力； g ：重力加速度 9.8m/s^2 。

3.2 实验部分

3.2.1 实验试剂与仪器

移液枪（50 μL ，100 μL ，1000 μL ），（Dragon med，中国）

真空泵（ZGP-100，淄博泽实真空设备有限公司）

超纯水制备系统（Millipore，美国）

分析天平（TG328A，上海天平仪器厂）

恒温水浴锅（HH-2 型）

磁力加热恒温搅拌器（QH-C14H 型）

搅拌浆

砝码（1g，2g，5 g，10 g，20 g，50 g）

数码相机（OLYMPUS SP-600UZ）

容量瓶 (50mL, 100mL)

水槽

自制玻璃模型

丙烯酰胺 (AM) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (BAM) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

过硫酸铵 (APS) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

聚乙烯醇 1799(PVA) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

50%戊二醛 (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

浓盐酸 (分析纯, 重庆川东化工有限公司)

明胶 (Gel) (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)

海藻酸钠 (SA) (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)

3.2.2 主要溶液制备

①10% (w/w) 聚乙烯醇溶液: 称 10g 聚乙烯醇固体, 置于干净圆底烧瓶中, 加 50g 水, 浸泡 24h, 80℃-90℃水浴加热, 直至溶液变得澄清透明, 加水至总重为 100g。

②40%(w/w)丙烯酰胺溶液: 称 40g 丙烯酰胺, 置于小烧杯中, 加入适量水溶解, 加水至总重为 100g。

③2%(w/w) N,N-亚甲基双丙烯酰胺: 称 2g 的 N,N-亚甲基双丙烯酰胺, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加水至总重为 100g。

④2% (w/w)海藻酸钠溶液: 称取 2g 海藻酸钠, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加入水至总重为 100g。

⑤10% (w/w)过硫酸铵溶液: 称 5g 过硫酸铵, 置小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加水至总重为 100g。

⑥10% (w/w) 明胶溶液: 称 10g 明胶, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加入水至总重为 100g。

⑦50% (v/v) 盐酸溶液: 量 25mL 盐酸, 于 50mL 容量瓶中, 加水定容。

⑧2% (w/w)氯化钙溶液: 称 2g 的氯化钙, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加水至总重为 100g。

3.2.3 水凝胶制备

①.聚丙烯酰胺水凝胶 (PAM)

1)取干净的玻璃板 (10cm*10cm*0.5cm) 两块, 自制厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块, 硅胶片上固定一组平行的头发作为标记, 三明治式组装成带有平行标记的玻璃模具。

2)按照表 3.1 中 PAM 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40% 丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水, 于小烧杯中, 加入总质量 1/100 的 10%过硫酸

铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min

3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h.

②.聚乙烯醇水凝胶：(PVA)

1)取干净的玻璃板(10cm*10cm*0.5cm)两块，自制厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，硅胶片上固定一组平行的头发作为标记，三明治式组装成带有平行标记的玻璃模具。

2)按照表 3.1 中 PVA 水凝胶的编号分别取 10%聚乙烯醇水溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50%盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。

3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，室温静置 2h，将凝胶从模具中取出，在水中浸泡 48h。

表 3.1 PAM, PVA 和 PVA-Gel 中各物质的质量分数表

Table 3.1 The quality score of each substance in PAM,PVA and PVA-Gel

PAM 编号	AM/%	ABM/%	PVA 编号	PVA/%	PVA-Gel 编号	PVA/%	Gel/%
A1	3	0.225	B1	6	C1	6	1.25
A2	4	0.15	B2	7	C2	6	2.5
A3	5	0.15	B3	8	C3	7	1.25
A4	10	0.06	B4	9	C4	7	2.5
A5	5	0.25	B5	10	C5	8	1.25
A6	10	0.1					

③聚乙烯醇-明胶混合水凝胶（PVA-Gel）

1)取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，硅胶片上固定一组平行的头发作为标记，三明治式组装成带有平行标记的玻璃模具。

2) 按照表 3.1 中 PVA-Gel 水凝胶的编号分别取 10%聚乙烯醇水溶液与 10%明胶溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50%盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。

3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，室温静置 2h。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h.

④ 聚丙烯酰胺-海藻酸钠混合水凝胶 (PAM-SA)

1)取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，硅胶片上固定一组平行的头发作为标记，三明治式组装成带有平行标记的玻璃模具。

2)按照表 3.2 中 PAM-SA 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40% 丙烯酰胺溶液、2%海藻酸钠溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min。

3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h，移出水浴锅，置于室内自然冷却。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h.

表 3.2 PAM-SA 和 PAM-Gel 中各物质的质量分数表

Table 3.2 The quality score of each substance in PAM-SA and PAM-Gel

PAM-SA 编号	AM/%	ABM/%	SA/%	PAM-Gel 编号	AM/%	ABM/%	Gel/%
D1	4	0.15	0.25	F1	5	0.15	1.25
D2	5	0.15	0.25	F2	5	0.15	2.5
D3	10	0.06	0.25	F3	10	0.06	1.25
D4	4	0.15	0.5	F4	10	0.06	2.5
D5	5	0.15	0.5	F5	10	0.1	1.25
D6	10	0.06	0.5	F6	10	0.1	2.5

⑤聚丙烯酰胺-明胶混合水凝胶 (PAM-Gel)

1)取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，硅胶片上固定一组平行的头发作为标记，三明治式组装成带有平行标记的玻璃模具。

2)按照表 3.2 中 PAM- Gel 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40%丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min。

3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下浸没在 2%氯化钙水溶液中 24h，室温下在水中浸泡 48h。

3.2.4 拉伸法测量水凝胶杨氏模量

①将浸泡 48h 的水凝胶，剪成适当的形状，注意不能将作标记的头发弄掉。如图 1

所示。

- ②用自制的夹板夹住水凝胶的两端，没入水槽中。
- ③用固定相机，保证相机在实验过程始终位移同一位置。
- ④记录下水凝胶原始状态，在下面夹板上添加砝码。每次添加砝码后，待水凝胶与砝码静止后，拍摄照片。砝码重量为 5g、7g、10g、12g、15g、17g.....47g。
- ⑤利用软件 ImageJ 测量不同照片中平行标记的距离 l。

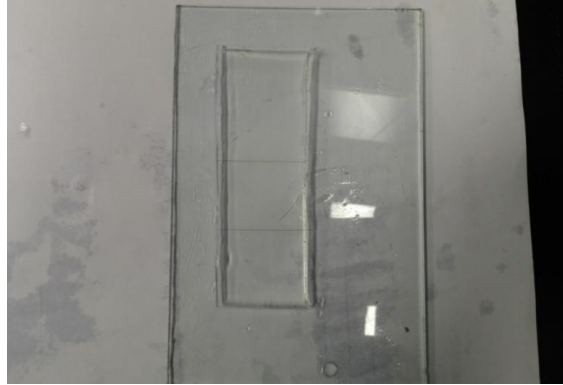


图 3.1 带有平行标记的水凝胶

Figure 3.1. Hydrogel with parallel markets

3.3 结果与讨论

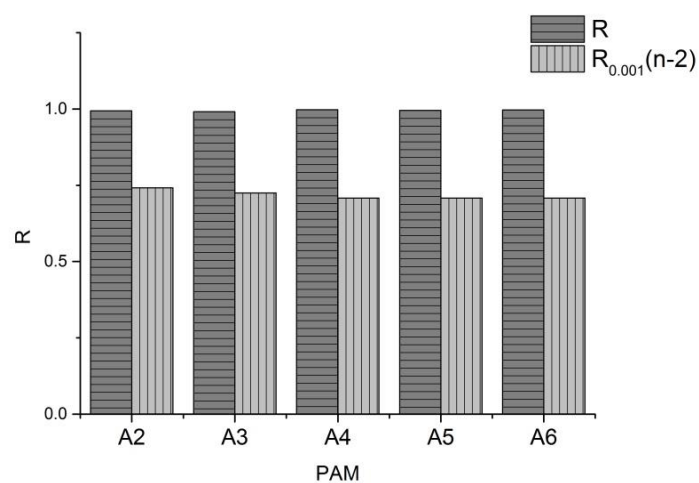
3.3.1 胡克定律适用性分析

材料在弹性形变的范围内，应力与应变成正比的关系。使用拉伸法测量水凝胶的杨氏模量，要求测量范围应在材料的弹性形变内。

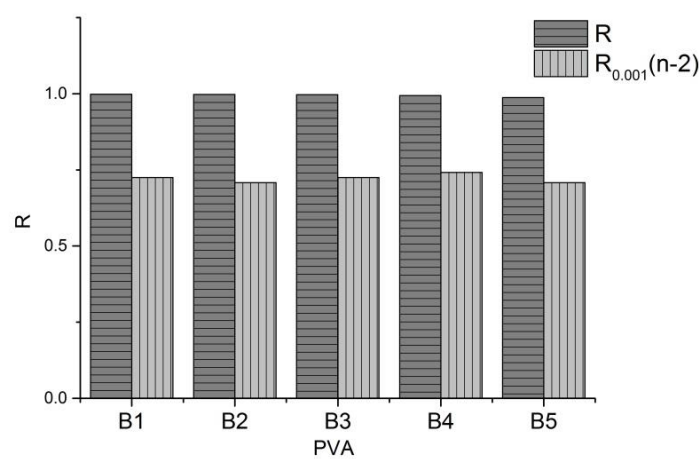
测量水凝胶的杨氏模量使用拉伸法：

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l_0}, \quad F = m_{\text{砝码}}g - F_{\text{浮}}$$

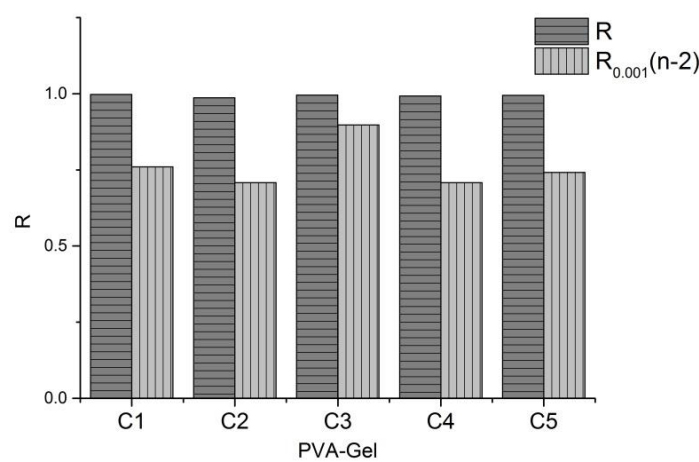
以应变 $\delta = \Delta l/l_0$ 为变量 x，以应力 $\varepsilon = F/A$ 为变量 Y。建立 x 与 y 的经验回归直线模型 $y = Ex$ ，其中 E 为水凝胶的杨氏模量。用 Excel 数据分析中的回归工具对每组数据进行线性检测，置信度为 99.9%，检验 x 与 y 的线性关系。每种原料不同组分的水凝胶得到的实际 R 值与相关系数临界值 $R_{0.001(n-2)}$ 的关系如图 3.2：



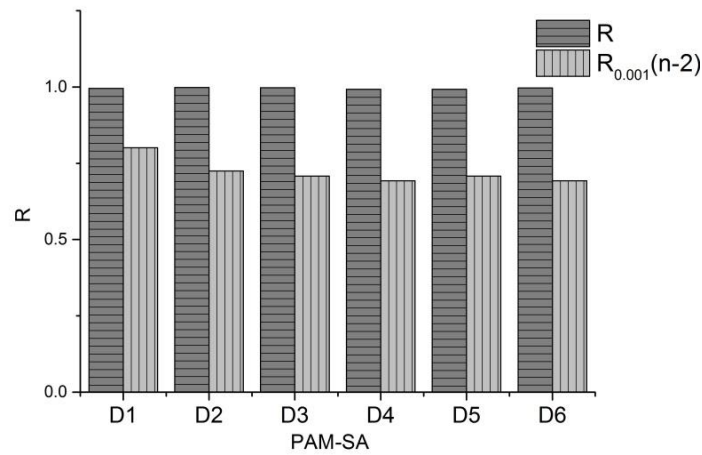
a.PAM 水凝胶线性检验图



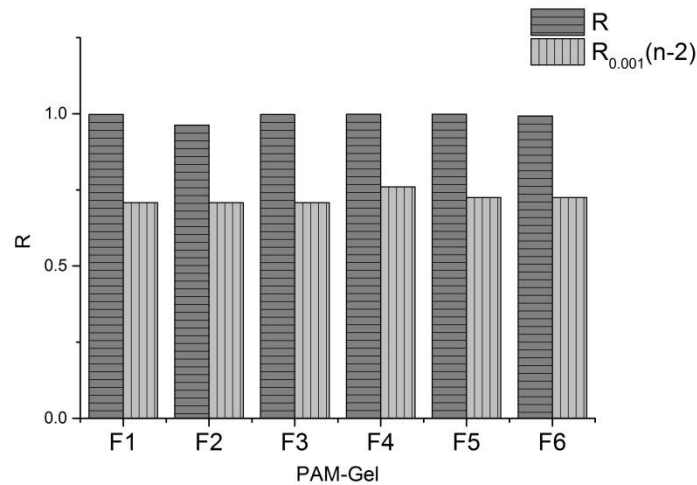
b.PVA 水凝胶线性检验图



c.PVA-Gel 水凝胶线性检验图



d. PAM-SA 水凝胶线性检验图



e. PAM-Gel 水凝胶线性检验图

图 3.2 线性检验图

Figure 3.2. The linear test figure of five kinds of Hydrogel

当 $R > R_{0.001}(n-2)$ 时, 则 x 与 y 是线性关系, 即测量范围在材料的弹性形变内。胡克定律适用于拉伸法。

3.3.2 拉伸法测量水凝胶杨氏模量

以拉伸法测量时, 通过平行标记之间距离来测量水凝胶在应力的作用下产生的应变, 计算出 Δl , 结合公式得到的拉伸法杨氏模量 E_1 , 结果如表 3.3 所示。

表 3.3 中参考值 E_0 出自于“实验室指南 (Current Protocols)”系列中《细胞生物学实验指南》(Current Protocols in Cell Biology) 一书中, 该书含有 PAM 水凝胶的详细制备方法及不同杨氏模量的配方。参考值为 AFM (原子力显微镜) 平行测量 50 次所得到的结果, 就目前的研究结果来看, 该配方以及该方法测量得到的杨

氏模量是最为准确的。因而在本文中用作参考值。

表 3.3 拉伸法得到实验值与参考值的对比

Table 3.3 The comparison of reference value and experimental value of tensile method

参考值	实验值	相对误差/%
2.55	2.38	6.67
3.24	3.47	7.10
4.47	4.64	3.80
7.43	7.8	4.98
8.44	8.98	6.40
10.61	10.12	4.62
16.7	17.76	6.35

拉伸法得到实验值与参考值，用 excel 的数据分析工具——“F-检验 双样本方差分析”进行分析，置信度为 95%，结果如表 3.4。

表 3.4 F-检验 实验值与参考值的方差分析

Table 3.4 F - test of variance analysis of test value and reference value

	实验值	参考值
平均	7.634286	7.878571
方差	24.48423	27.34068
观测值	7	7
df	6	6
F	1.028992	
$P_{(F<=f)}$ 单尾	0.486606	
F 单尾临界	4.283866	

表 3.4 中 $F < F_{\text{单尾临界}}$ ，则两样本之间无显著差异。即拉伸法所得到的实验值与参考值之间不存在显著差异。所以改良后的拉伸法所得到的实验值是十分可靠的。

3.3.3 砝码浮力对拉伸法的影响

在测量过程中，作为平行标记物的发丝之间的距离随砝码重量的变化很小。杨氏模量为 30Kpa 左右时，从无砝码到添加 47g 砝码的形变 Δl 仅为 0.178cm，所以砝码给水凝胶的应力计算需要更为准确。砝码的浮力在拉伸过程一直都是存在的，且对计算结果存在一定影响。以参考值 E_0 ，忽略砝码浮力影响得到的杨氏模量 E_1 以及减去砝码浮力得到的杨氏模量 E_2 作图 3.3.

图 3.3 中是 E_{r1} 和 E_{r2} 分别 E_1 和 E_2 与 E_0 之间的相对误差，可以看出总体上 E_2 与 E_0 更为接近， E_{r2} 总体上是小于 E_{r1} 。说明扣除砝码浮力之后的改良拉伸法精度更高。

同时对忽略砝码浮力影响得到的杨氏模量 E_1 以及减去砝码浮力得到的杨氏模量 E_2 进行 F-检验，置信度为 95%。结果如表 3.5。

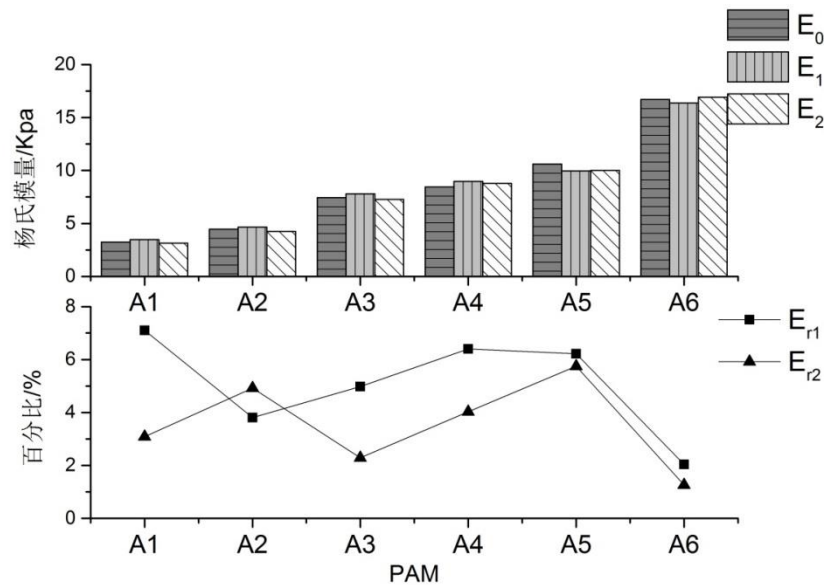


图 3.3 拉伸法对比图

Figure 3.3 Contrast figure tensile method

表 3.5 F-检验 E_1 与 E_2 的方差分析

Table 3.5 F - test of variance analysis of E_1 and E_2

	E_1	E_2
平均	8.533333333	8.39
方差	20.95926667	24.26272
观测值	6	6
df	5	5
F	0.863846538	
$P_{(F \leq f)}$ 单尾	0.438158783	
F 单尾临界	0.1980069	

表中 $F > F_{\text{单尾临界}}$ ，则两样本存在显著性差异。即砝码浮力对拉伸法体系的精度存在着影响。

3.3.4 拉伸法测量多种水凝胶的杨氏模量

由胡克定律

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta l/l_0}, \quad F = m_{\text{砝码}}g - F_{\text{浮}}$$

可计算出水凝胶的杨氏模量。对各种原料不同配方的水凝胶进行拉伸法测量其杨氏模量，其结果如表 3.6.

表 3.6 拉伸法测得水凝胶的杨氏模量 E_1

Table 3.6 The experimental value E_1 of tensile method

PVA	E_1/kPa	PVA-Gel	E_1/kPa
B1	8.07	C1	5.28
B2	13.7	C2	6.00
B3	17.24	C3	8.48
B4	23.66	C4	10.76
B5	31.03	C5	23.59
PAM-SA	E_1/kPa	PAM-Gel	E_1/kPa
D1	4.62	F1	4.87
D2	5.43	F2	5.52
D3	10.06	F3	6.24
D4	9.81	F4	8.15
D5	11.44	F5	12.85
D6	17.7	F6	10.67

3.4 本章小结

减去砝码浮力的拉伸法测量范围在材料的弹性形变内，可使用胡克定律进行计算。砝码浮力对计算结果影响不可忽略，扣除砝码浮力的改进拉伸法计算的结果更准确。

4 微球法测量水凝胶杨氏模量

4.1 引言

目前许多研究都证明了细胞基底对细胞粘附、细胞结构和细胞机械结构有重要影响。培养基底杨氏模量的准确测量都影响着这些研究。用于细胞培养的水凝胶基底通常都制成薄薄的一层黏在培养皿上，拉伸法就不再适用于这些水凝胶杨氏模量的准确测量。通常由于以下几点原因，水凝胶的杨氏模量的原位实时测量显得非常有必要：（1）水凝胶较软，宏观样品较难处理；（2）水凝胶含水量高，且有时是温敏性的，小的样品更为均匀也更容易处理；（3）水凝胶常与底部的培养皿黏在一起，会影响到水凝胶的扩张与压缩；（4）细胞粘附到水凝胶表面，测量水凝胶表面的杨氏模量，可提供对细胞行为更可靠的数据。水凝胶杨氏模量的测量，因水凝胶含水量高、质软等特点，受到一定限制。

压缩法、拉伸法、微球压痕法等是现在常用的测量方法。压缩法的测量过程中容易挤出水凝胶中的水，改变其含水量，测量误差大。拉伸法不能进行原位测量，对于已培养细胞的水凝胶不能实时测量。目前原位测量方法常用的是原子力显微镜（Atomic Force Microscope, AFM），但是 AFM 的操作需要专业的人员，且仪器昂贵，并且压头的使用寿命短、成本高以及其繁琐的校正过程，都使得一般的实验室难以使用该方法测量。微球法就是基于原子力显微镜法改进而来的，其方法也是基于赫兹接触理论，而且该方法操作简单，产出高，一般实验室都可操作。

4.2 实验部分

4.2.1 实验试剂与仪器

移液枪（50 μ L，100 μ L，1000 μ L），（Dragon med，中国）

真空泵（ZGP-100，淄博泽实真空设备有限公司）

超纯水制备系统（Millipore，美国）

分析天平（TG328A，上海天平仪器厂）

恒温水浴锅（HH-2 型）

磁力加热恒温搅拌器（QH-C14H 型）

搅拌浆

砝码（1g，2g，5 g，10 g，20 g，50 g）

容量瓶（50mL，100mL）

自制玻璃模型

荧光倒置显微镜 (Nikon (TI-FL542396), 日本尼康公司)

钢珠 (0.6mm, 中山红润泰精密钢球有限公司)

铅珠 (0.6mm, 天津金瑞源有色金属有限公司)

丙烯酰胺 (AM) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (BAM) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

过硫酸铵 (APS) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

聚乙烯醇 1799(PVA) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

50%戊二醛 (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

浓盐酸 (分析纯, 重庆川东化工有限公司)

明胶 (Gel) (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)

海藻酸钠 (SA) (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂)

氯化钙 (CaCl_2) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

荧光微珠 (分析纯, 厦门鑫海盛世生物有限公司)

4.2.2 主要溶液制备

①10% (w/w) 聚乙烯醇溶液: 称 10g 聚乙烯醇固体, 置于干净圆底烧瓶中, 加 50g 水, 浸泡 24h, 80℃-90℃水浴加热, 直至溶液变得澄清透明, 加水至总重为 100g。

②40%(w/w)丙烯酰胺溶液: 称 40g 丙烯酰胺, 置于小烧杯中, 加入适量水溶解, 加水至总重为 100g。

③2%(w/w) N,N-亚甲基双丙烯酰胺: 称 2g 的 N,N-亚甲基双丙烯酰胺, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加水至总重为 100g。

④2% (w/w)海藻酸钠溶液: 称取 2g 海藻酸钠, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加入水至总重为 100g。

⑤10% (w/w)过硫酸铵溶液: 称 5g 过硫酸铵, 置小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加水至总重为 100g。

⑥10% (w/w) 明胶溶液: 称 10g 明胶, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加入水至总重为 100g。

⑦50% (v/v) 盐酸溶液: 量 25mL 盐酸, 于 50mL 容量瓶中, 加水定容。

⑧2% (w/w)氯化钙溶液: 称 2g 的氯化钙, 置于小烧杯中, 加入适量水使其溶解, 加水至总重为 100g。

4.2.3 水凝胶制备

①.聚丙烯酰胺 (PAM) 水凝胶

1)取干净的玻璃板 (10cm*10cm*0.5cm) 两块, 自制厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块, 三明治式组装玻璃模具。

2)按照表 4.1 中 PAM 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40%

丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min

3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h。

②.聚乙烯醇（PVA）水凝胶：

1)取干净的玻璃板（10cm*10cm*0.5cm）两块，自制厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，三明治式组装玻璃模具。

2) 按照表 4.1 中 PVA 水凝胶的编号分别取 10%聚乙烯醇水溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50%盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。

3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，室温静置 2h，将凝胶从模具中取出，在水中浸泡 48h。

表 4.1 PAM，PVA 和 PVA-Gel 中各物质的质量分数表

Table 4.1 The quality score of each substance in PAM,PVA and PVA-Gel

PAM 编号	AM/%	ABM/%	PVA 编号	PVA/%	PVA-Gel 编号	PVA/%	Gel/%
A1	3	0.225	B1	6	C1	6	1.25
A2	4	0.15	B2	7	C2	6	2.5
A3	5	0.15	B3	8	C3	7	1.25
A4	10	0.06	B4	9	C4	7	2.5
A5	5	0.25	B5	10	C5	8	1.25
A6	10	0.1					

③聚乙烯醇-明胶（PVA-Gel）混合水凝胶

1)取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，三明治式组装玻璃模具。

2) 按照表 4.1 中 PVA-Gel 水凝胶的编号分别取 10%聚乙烯醇水溶液与 10%明胶溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50%盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。

3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，室温静置 2h。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h。

④ 聚丙烯酰胺-海藻酸钠（PAM-SA）混合水凝胶

- 1)取两块干净的玻璃板,厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块,三明治式组装玻璃模具。
- 2) 按照表 4.2 中 PAM-SA 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40%丙烯酰胺溶液、2%海藻酸钠溶液、水,于小烧杯中,加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液,搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑,除氧 30min。
- 3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中,保鲜膜密封,置于水浴锅中,60℃水浴 2h,移出水浴锅,置于室内自然冷却。
- 4)从模具中小心取出水凝胶,室温下在水中浸泡 48h。

表 4.2 PAM-SA 和 PAM-Gel 中各物质的质量分数表

Table 4.2 The quality score of each substance in PAM-SA and PAM-Gel

PAM-SA 编号	AM/%	ABM/%	SA/%	PAM-Gel 编号	AM/%	ABM/%	Gel/%
D1	4	0.15	0.25	F1	5	0.15	1.25
D2	5	0.15	0.25	F2	5	0.15	2.5
D3	10	0.06	0.25	F3	10	0.06	1.25
D4	4	0.15	0.5	F4	10	0.06	2.5
D5	5	0.15	0.5	F5	10	0.1	1.25
D6	10	0.06	0.5	F6	10	0.1	2.5

⑤聚丙烯酰胺-明胶 (PAM-Gel) 混合水凝胶

- 1)取两块干净的玻璃板,厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块,三明治式组装玻璃模具。
- 2) 按照表 4.2 中 PAM- Gel 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40%丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水,于小烧杯中,加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液,搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑,除氧 30min。
- 3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中,保鲜膜密封,置于水浴锅中,60℃水浴 2h。
- 4)从模具中小心取出水凝胶,室温下浸没在 2%氯化钙水溶液中 24h,室温下在水中浸泡 48h。

4.2.4 微球法测量水凝胶杨氏模量

- ①取出溶胀饱和的水凝胶,切割成载玻片大小,静置于载玻片上,用滤纸轻轻吸走表面水分。
- ②将荧光微珠溶液滴于水凝胶表面,轻轻震荡使其涂覆于水凝胶表面。
- ③在水凝胶表面轻轻放置钢珠,载玻片迅速置于显微镜下,调节焦距,寻找水凝胶表面所处的平面,测量接触半径 r ; 调节焦距,寻找钢珠底部所处平面,此时以

磁石吸走钢珠，重新聚焦到水凝胶表面所处平面，两个平面高度差，即为凝胶陷入深度 h 。

④同一标号的水凝胶重复测量 30 次。

⑤根据公式计算出杨氏模量。

4.3 经典赫兹理论

材料最常见的两个机械性能—弹性模量 E 和硬度 H 由负载和深度传感器测量。从压头形状、载荷—位移函数独立地推定接触面积的方法可直接用于提供 E 和 H 的独立测量。基于计算应力和位移，由刚性、轴对称加载压头的弹性体势能理论等方法得出的，最初由 Boussinesq 与 Hertz 提出。Hertz 通过简单实验接触力学理论领域的工作，分析了两个具有不同半径和弹性常数的球形表面之间的弹性接触问题，整理出一套理论框架。Sneddon 得到了固体接触光滑荷载位移的一般关系。对于许多简单几何形状的压头，荷载-位移关系为：

$$P = \alpha h^m \quad (4.1)$$

其中 P 是压头的荷载， h 是压头的弹性位移， α 与 m 为常数。对于不同的几何形状， m 的值不同：柱体 $m=1$ 、抛物面 $m=1.5$ 、锥体 $m=2$ 。

Stillwell 和 Tabor 研究了圆锥形状的压头，用卸载曲线测得材料弹性模量的方法。得出了重要的结论：卸载曲线和恢复位移都是，球形与圆锥压头对应的接触压痕尺寸与弹性模量的函数。压头也存在非刚性的，引进了等效弹性模量 E_r ，其定义为

$$\frac{1}{E_r} = \frac{(1-\nu^2)}{E} + \frac{(1-\nu_i^2)}{E_i} \quad (4.2)$$

式中， E_i ：压头的弹性模量， ν_i ：压头的泊松比， E ：待测材料的弹性模量， ν ：待测材料的泊松比。等效弹性模量可有卸载曲线获得。

$$S = \left. \frac{dP_u}{dh} \right|_{h=h_{\max}} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} E_r \sqrt{A} \quad (4.3)$$

则

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{S}{\sqrt{A}} \quad (4.4)$$

式中， P_u ：卸载载荷， S ：实验所测的卸载曲线开始部分的斜率。 E_r 为等效弹性模量， A 是弹性接触的投影面积（ $A = \pi a^2$ ）。Bulychev 证明了等式（4.3）同样适用于球形压头和平直圆柱压头，虽然它最早是由圆锥压头推导出来的。

令 $m = \frac{3(1-\nu^2)}{2}$ ，将等式（4.1）代入等式（4.3）则

$$S = \frac{dP}{dh} = m\alpha h^{m-1} = m\alpha \frac{h^m}{h} = m \frac{P}{h} = \frac{3(1-\nu^2)P}{2h} \quad (4.5)$$

将等式 (4.5) 带入等式 (4.4) 得到

$$E = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \cdot \frac{1}{\sqrt{\pi a^2}} \cdot \frac{3(1-\nu^2)P}{2h} = \frac{3(1-\nu^2)P}{4ha} \quad (4.6)$$

将公式 (4.6) 用于微球压痕法, 式中 E : 杨氏模量; ν : 泊松比; P : 微球重量; h : 压痕深度; a : 压痕半径。经典赫兹理论主要用于工程上如滚珠轴承类材料接触的问题。

4.4 经典赫兹理论的限制

水凝胶原位测量的方法基本都是基于赫兹接触理论, 即压痕对已知结构探针应力的响应。基于实验成本, 大多数的原位测量都使用微痕法, 即微球 (如微米级的钢珠或者铅珠) 的水凝胶压痕用显微镜来测量 (如图 4.1)。该方法最早有国内的实验室提出, 广泛应用于实验的原因在于: (1) 在细胞培养的条件下, 提供简单的方法快速测量; (2) 可直接使用观察细胞行为的显微镜, 不需要昂贵、实验室不常用的仪器 (如流变仪和原子力显微镜); (3) 高产出。

在赫兹接触理论里, 有 4 点假设: (1) 应变小并且在弹性形变范围内; (2) 待测样品的接触面远远小于微球半径, 即接触面为一个无限半空间; (3) 接触面是连续的; (4) 接触面与压头之间无摩擦力。

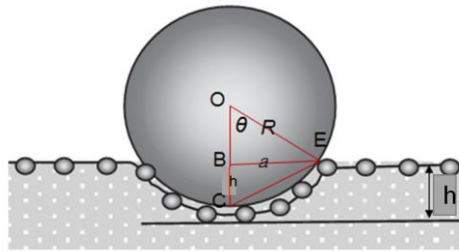


图 4.1 赫兹理论中球体与弹性半空间的接触面示意图

Figure 4.1 An illustration of the indentation made by a microsphere placed on the elastic half space in Hertz theory

在经典赫兹假理论中, 若半径为 R 的球体在材料上压出的凹痕深度为 h , 产生的接触面半径为 a , 则材料弹性计算公式为

$$E = \frac{3(1-\nu^2)f}{4ha} \quad (4.7)$$

R 是压头半径, f 是微球重量减去浮力, ν 是基底泊松系数。等式 (4.7) 主要

适用于工程上如滚珠轴承类材料。

由于当时测量技术受到限制，不能测量到接触半径。图 4.1 中，赫兹经典理论认为压痕深度 h 远小于微球半径 R ，接触角 θ 很小； $\angle OEC$ 接近 90° ，则三角形 OBE 相似于三角形 EBC ，根据相似三角形原理可求得

$$a = \sqrt{hR} \quad (4.8)$$

由于当时测量技术受到限制，不能测量到接触半径。赫兹等人在球体与弹性半空间的接触问题研究中提出，用等式 (4.8) 计算接触半径，同时它也是赫兹假定公式的成立基础。等式 (4.8) 带入等式 (4.7) 得到赫兹假定公式

$$E = \frac{3(1-\nu^2)f}{4R^{1/2}h^{3/2}} \quad (4.9)$$

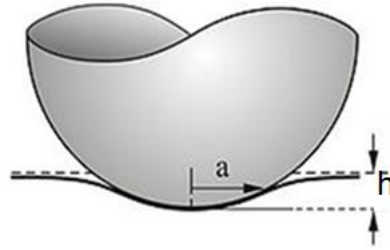


图 4.2 钢球与水凝胶接触面示意图

Figure 4.2 An illustration of the indentation made by a steal microsphere placed on hydrogel

在水凝胶的实际接触中如图 4.2，接触角 θ 的存在一定的数值，压痕深度 h 与微球半径 R 在同一数量级，比值也不可忽略。经典赫兹理论公式，不适用于水凝胶这类软材料的杨氏模量计算。随着技术的发展，我们可通过测量技术测量 a ，实验验证 $a \neq \sqrt{hR}$ 。（本课题组已经证明过）^[87]。

经典赫兹理论认为压痕深度与接触半径对水凝胶样式模量的贡献相同，表现为其指数均为 1。研究发现压痕深度与接触半径对杨氏模量的贡献并不一样，但其总量纲为 2。给予公式系数 k ，则赫兹接触理论新公式为

$$E = \frac{k(1-\nu^2)P}{a^\alpha h^{2-\alpha}} \quad (4.10)$$

本课题组通过对 PVA 与 PAM 水凝胶对进一步改进的公式 (4.10) 进行拟合。得到两个新的计算公式：

$$\text{对于 PAM: } E = \frac{3.12(1-\nu^2)P}{a^{1.07}h^{0.93}} \quad (4.11)$$

$$\text{对于 PAM: } E = \frac{3.19(1-\nu^2)P}{a^{1.04}h^{0.96}} \quad (4.12)$$

4.5 结果与讨论

4.5.1 水凝胶厚度

实验室制备水凝胶的方法与倒置显微镜的操作需要，水凝胶越薄，更容易形成均匀性良好的水凝胶，同时厚的水凝胶会降低图片质量。但是在使用微球压痕法测量水凝胶时，水凝胶太薄，会影响压痕的深度。因而需要选择合适的水凝胶厚度。Rong Long 等人对该方法进行校正，发现校正因子在参数范围 $0.1 \leq h/H \leq 0.4$ 和 $0.3 \leq R/H \leq 6.2$ 时（ H 为水凝胶厚度），实验结果最为精确。微球法中使用微珠为购买的半径为 0.6mm 钢珠与铅珠，因而选择水凝胶的厚度为 1mm。

4.5.2 水凝胶表面形貌

在微球压痕法中使用的微珠半径为 0.6mm，当水凝胶的杨氏模量超过 20KPa 时，压痕深度只有小至几十微米。测量结果直接受水凝胶表面的平整度影响。使用原子力显微镜对水凝胶的表面进行扫描（图 4.3），从图中可以水凝胶表面是凹凸不平的，存在无数的伞状小凸起，但是凸起高度最大的为 44.59nm，对于微米量级的压痕深度，对其测量没有影响，可以将水凝胶平面看作是平滑的。

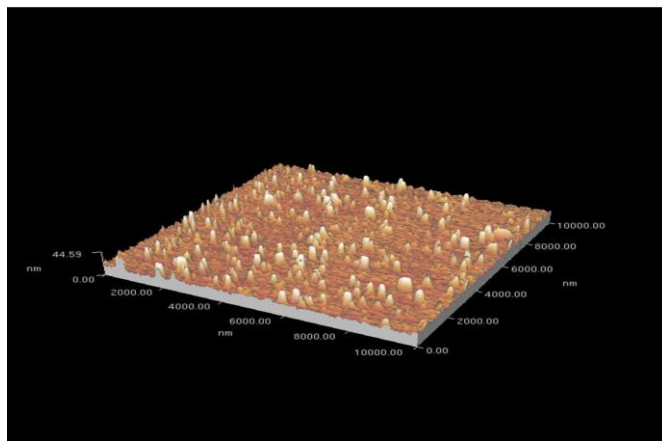


图 4.3 水凝胶的 AFM 扫描图

Figure 4.3 The AFM scanning image of hydrogel

4.5.3 泊松系数

微球压痕法的测量过程在较短的时间内完成，通常为几分钟。在这个时间段内，小溶剂分子是不能运动到水凝胶网络内部。通过水凝胶模量、水的粘度、接触半径及水凝胶渗透率可以计算出分散时间。以渗透率为 $5 \times 10^{-19} \text{m}^2$ 的 PAM 水凝

胶为例，分散时间为 5 到 13 小时，远远大于实验时间。因此水凝胶在微球压痕法中表现为不可压缩材料，其泊松系数 $\nu = 0.5$ 。

4.5.4 杨氏模量的计算

运用拉伸法得到的杨氏模量 E 、泊松系数 ν 以及微球法实验测得的压痕深度 h 、接触半径 a ，可对公式 (4.10)

$$E = \frac{k(1-\nu^2)P}{a^\alpha h^{2-\alpha}}$$

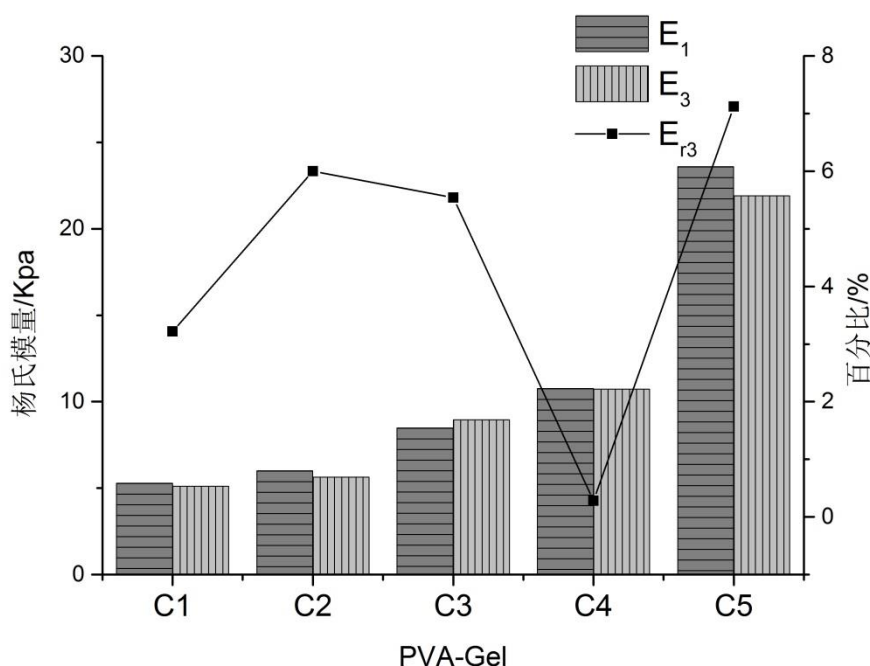
进行拟合，运用数值模拟与最优化算法求得三种共聚物互穿聚合物水凝胶 (IPN) (PVA-Gel、PAM-SA、PAM-Gel) 的参数 k 、 α 。将参数 k 、 α 分别带入公式 (4.10)，得到对应的计算公式：

$$\text{对于 PVA-Gel: } E = \frac{3.19(1-\nu^2)P}{a^{1.03}h^{0.97}} \quad (4.13)$$

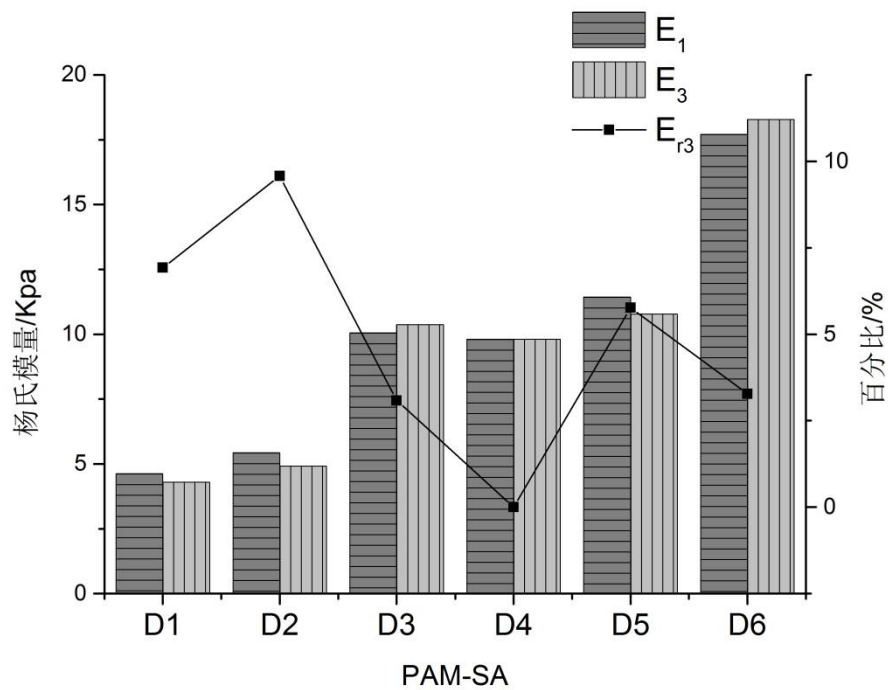
$$\text{对于 PAM-Gel: } E = \frac{3.17(1-\nu^2)P}{a^{1.05}h^{0.95}} \quad (4.14)$$

$$\text{对于 PAM-SA: } E = \frac{3.17(1-\nu^2)P}{a^{1.04}h^{0.96}} \quad (4.15)$$

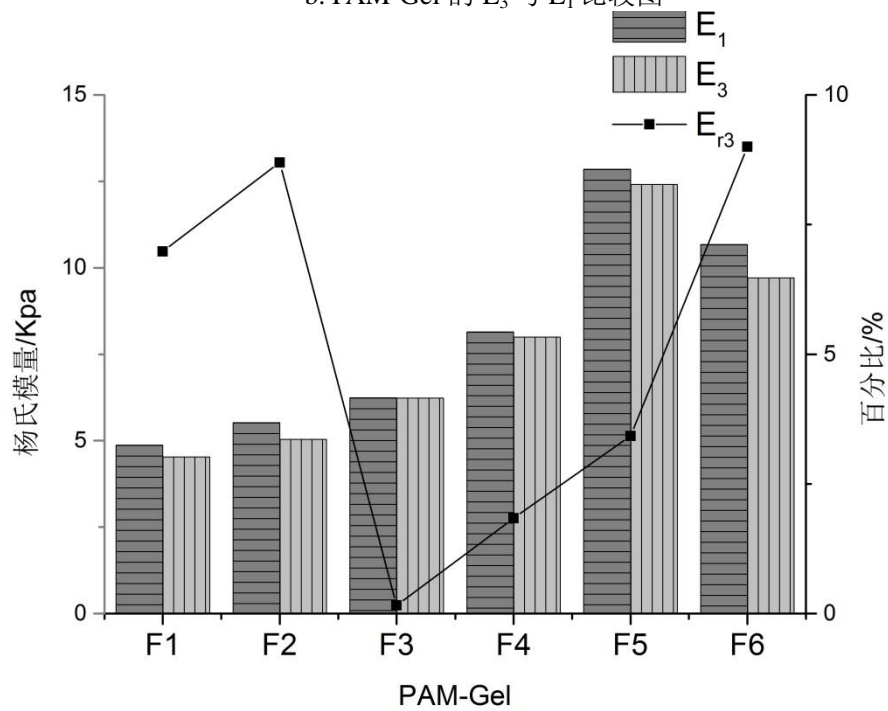
用公式 (4.13)、(4.14)、(4.15) 计算各种水凝胶的杨氏模量 E_3 ，并与拉伸法所得结果 E_1 比较，结果如图 4.4。第一次拟合公式的计算结果与拉伸法的测量结果接近，误差较小。



a. PVA-Gel 的 E_3 与 E_1 比较图



b. PAM-Gel 的 E_3 与 E_1 比较图



c. PAM-SA 的 E_3 与 E_1 比较图

图 4.4 微球压痕法计算值(E_3)与拉伸法参考值(E_1)比较图

Figure 4.4 Comparison graph of experimental values of microsphere indentation method (E_3) and reference values of tensile method (E_1)

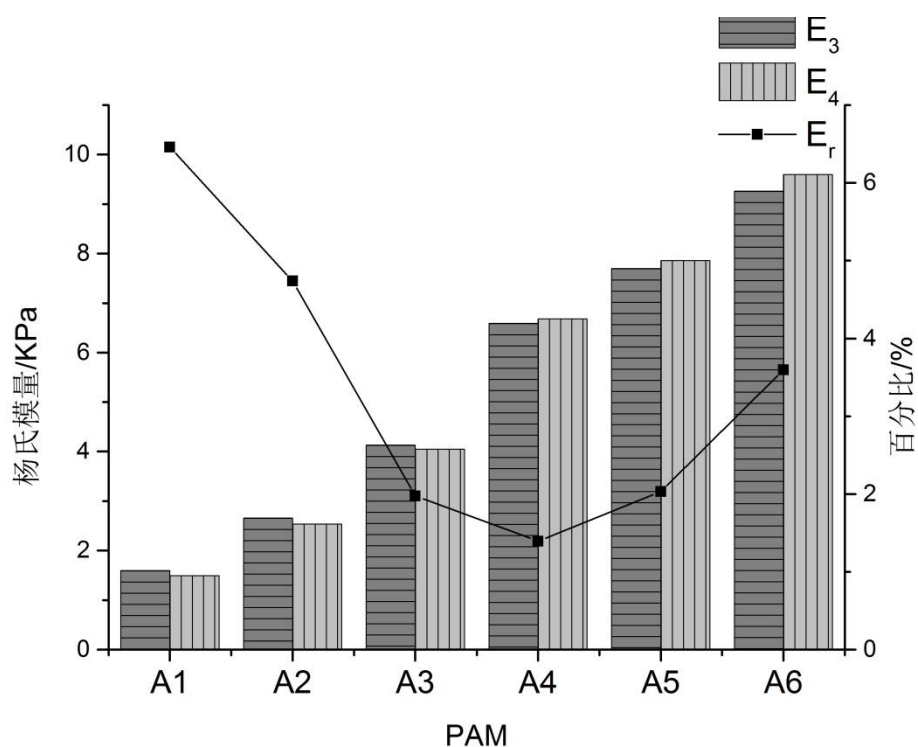
表 4.3 五种水凝胶 k 和 α 的拟合结果

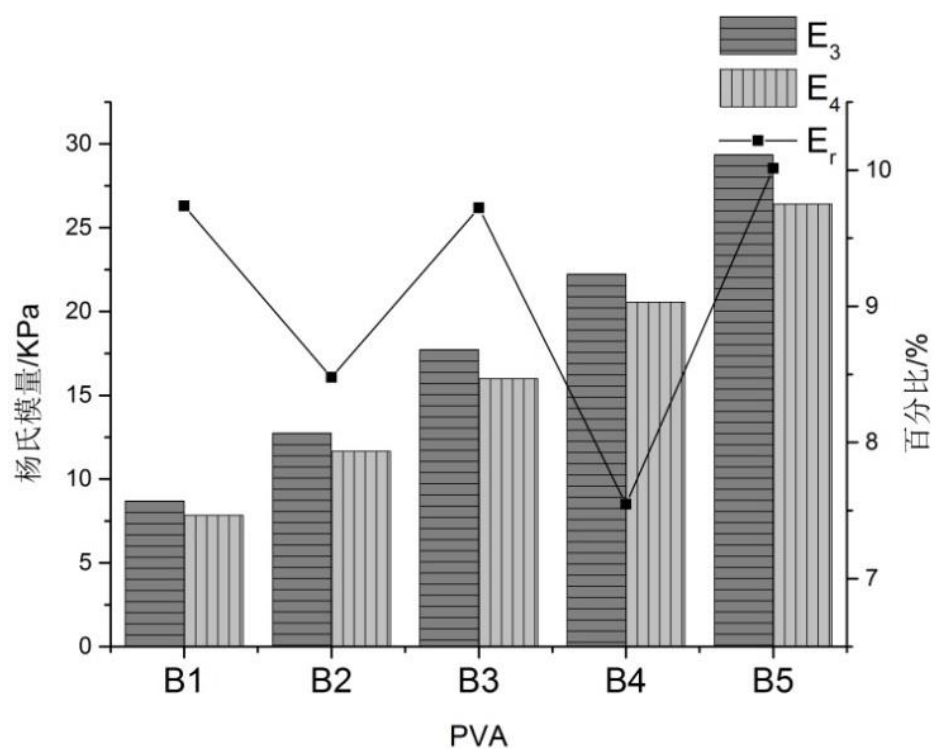
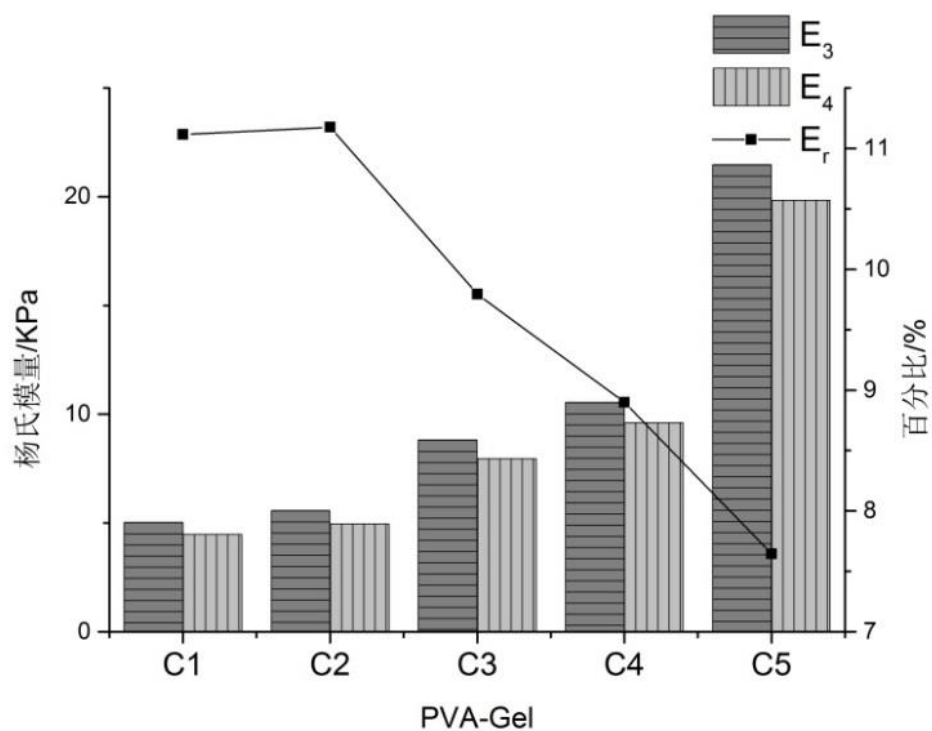
Table 4.3 k and α for fitting results of five kinds of hydrogel		
水凝胶种类	k	α
PAM	3.12	1.07
PVA	3.19	1.04
PVA-Gel	3.19	1.03
PAM-SA	3.17	1.04
PAM-Gel	3.17	1.05

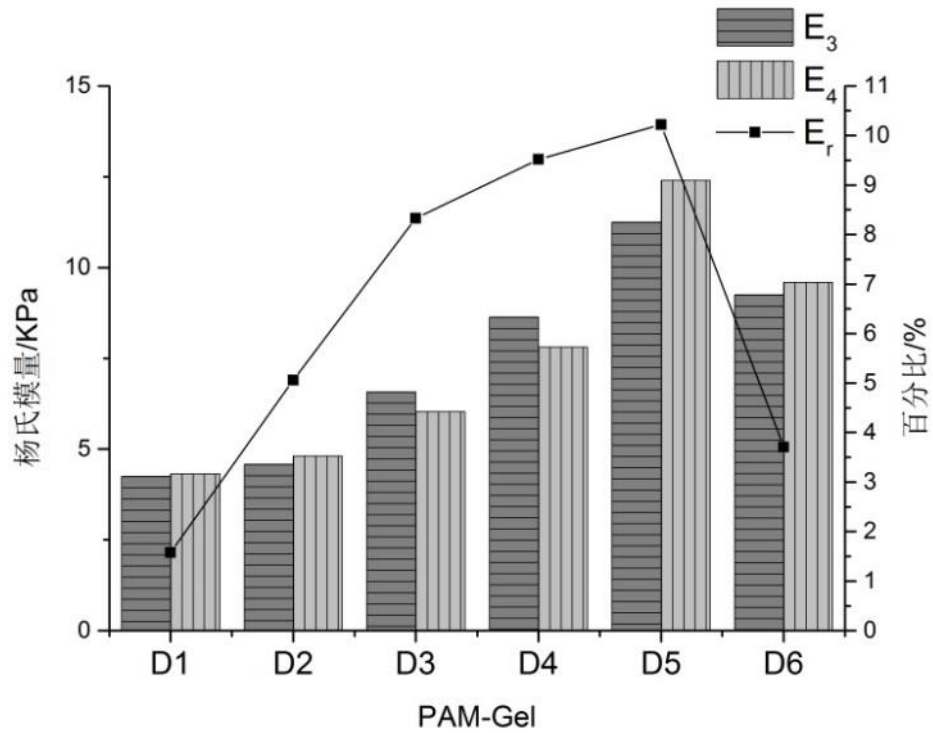
从表 4.3 可知, 五种水凝胶的 k 、 α 值都较为接近。对所得 k 、 α 值进行总体拟合, 取参数结果与实验结果的均方差最小时的参数, 得到的 $k=3.17$, $\alpha=1.02$ 。带入公式 (4.12) 为

$$E = \frac{3.17(1-\nu^2)P}{a^{1.02}h^{0.98}} \quad (4.16)$$

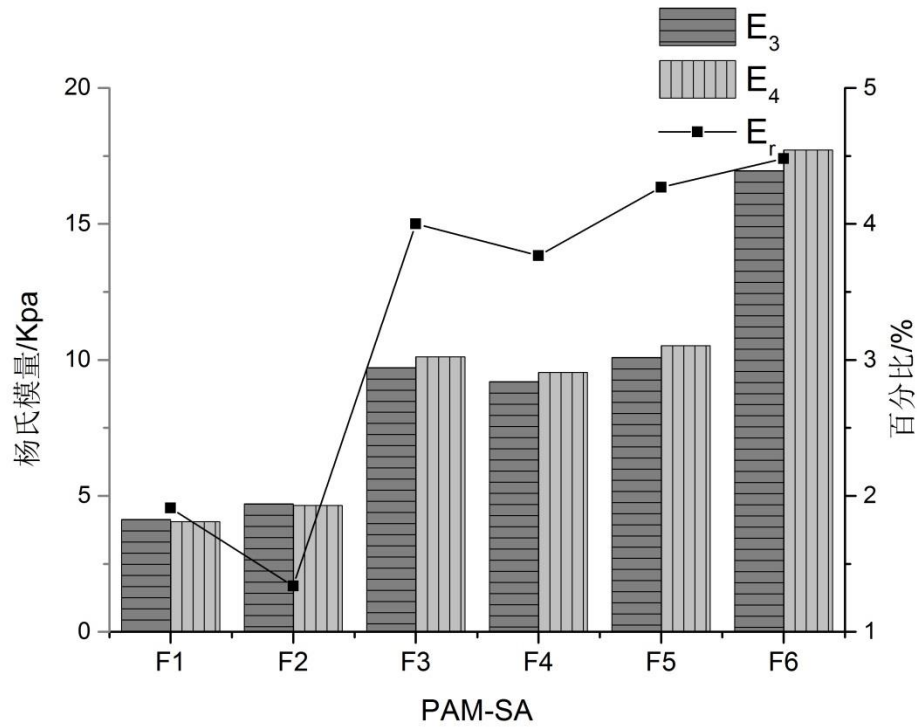
用进一步拟合新公式 (4.16) 计算所得杨氏模量 E_4 , 并与第一次拟合公式计算所得杨氏模量 E_3 进行比较, 结果如图 4.5.

a.PAM 的 E_3 与 E_4 比较图

b. PVA 的 E_3 与 E_4 比较图c. PVA-Gel 的 E_3 与 E_4 比较图



d. PAM-Gel 的 E_3 与 E_4 比较图



e. PAM-SA 的 E_3 与 E_4 比较图

图 4.5. E_3 与 E_4 比较图

Figure4.5 Comparison graphs E_3 and E_4

从图 4.5.中可看出，第一次拟合的计算值与进一步拟合的计算值比较接近，误

差较小。

对 E_3 与 E_4 的数值进行方差检验，使用 F-检验双样本方差分析，其中置信度为 95%，结果如表 4.5

表 4.5. F-检验各自拟合计算值(E_3)与总体拟合值(E_4)方差分析

Tab4.5 F - test of variance analysis of calculated values of fitting respectively (E_3) and
calculated values of fitting ensemble (E_4)

	E_3	E_4
平均	10.01483	9.696897
方差	42.32735	36.92459
观测值	29	29
df	28	28
F	1.146319	
$P_{(F \leq f)} \text{单尾}$	0.360193	
F 单尾临界	1.882079	

表 4.5 中 $F < F_{\text{单尾临界}}$ ， E_3 与 E_4 不存在显著性差异。

图 4.5 与表 4.5 表明了，进一步拟合的公式可准确计算五种低弹性模量水凝胶的杨氏模量且计算结果与第一次拟合公式的结果误差小。

4.6 本章小结

对于以上五种水凝胶，赫兹接触理论公式进行修正，通过数值模拟与最优化计算，得到进一步拟合指数 $k=3.17$ ， $\alpha=1.02$ ，带入公式得

$$E = \frac{3.17(1-\nu^2)P}{a^{1.02}h^{0.98}}。$$

该公式适用于这五种低弹性模量水凝胶。验证了该公式的计算结果与第一次拟合公式的计算结果相近，误差小；且该公式的计算结果与新拉伸法测量结果接近，计算结果准确。

5 压痕重力法测量水凝胶杨氏模量

5.1 引言

水凝胶因其含水量高、弹性好，其测量受到一定的限制。第二章中讨论过的拉伸法，虽能准确的测量水凝胶的杨氏模量，但其不能用于原位测量，对于已培养细胞的水凝胶不能实时测量。目前原位测量方法常用的是原子力显微镜 (Atomic Force Microscope, AFM)，需要专业的人员与昂贵的仪器，并且压头的使用寿命短、成本高以及其繁琐的校正过程，都使得一般的实验室难以使用该方法测量。在第四章讨论过的微球法就是基于原子力显微镜法改进而来的，其方法也是基于赫兹接触理论，而且该方法操作简单，产出高，一般实验室都可操作。但在微球接触水凝胶表面的实际接触中，同时存在水平方向与垂直方向的形变。微球压痕法的测量中并未考虑到水凝胶的水平形变。压痕重力法基于重力做功为原型，测量水凝胶水平方向与垂直方向的形变来计算水凝胶的杨氏模量。

5.2 实验部分

5.2.1 实验试剂与仪器

移液枪 (50 μ L, 100 μ L, 1000 μ L), (Dragon med, 中国)

真空泵 (ZGP-100, 淄博泽实真空设备有限公司)

超纯水制备系统 (Millipore, 美国)

分析天平 (TG328A, 上海天平仪器厂)

恒温水浴锅 (HH-2 型)

磁力加热恒温搅拌器 (QH-C14H 型)

搅拌桨

容量瓶 (50mL, 100mL)

电泳槽 (BIO-RAD, 美国伯乐公司)

自制玻璃模型

荧光倒置显微镜 (Nikon (TI-FL542396), 日本尼康公司)

钢珠 (0.6mm, 中山红润泰精密钢球有限公司)

铅珠 (0.6mm, 天津金瑞源有色金属有限公司)

丙烯酰胺 (AM) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

N,N-亚甲基双丙烯酰胺 (BAM) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

过硫酸铵 (APS) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

聚乙烯醇 1799(PVA) (分析纯, 成都科龙化工试剂厂)

50%戊二醛（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

浓盐酸（分析纯，重庆川东化工有限公司）

明胶（Gel）（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）

海藻酸钠（SA）（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）

氯化钙（ CaCl_2 ）（分析纯，成都科龙化工试剂厂）

荧光微珠（分析纯，厦门鑫海盛世生物有限公司）

5.2.2 主要溶液制备

①10%（w/w）聚乙烯醇溶液：称 10g 聚乙烯醇固体，置于干净圆底烧瓶中，加 50g 水，浸泡 24h，80℃-90℃水浴加热，直至溶液变得澄清透明，加水至总重为 100g。

②40%（w/w）丙烯酰胺溶液：称 40g 丙烯酰胺，置于小烧杯中，加入适量水溶解，加水至总重为 100g。

③2%（w/w）N,N-亚甲基双丙烯酰胺：称 2g 的 N,N-亚甲基双丙烯酰胺，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。

④2%（w/w）海藻酸钠溶液：称取 2g 海藻酸钠，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加入水至总重为 100g。

⑤10%（w/w）过硫酸铵溶液：称 5g 过硫酸铵，置小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。

⑥10%（w/w）明胶溶液：称 10g 明胶，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加入水至总重为 100g。

⑦50%（v/v）盐酸溶液：量 25mL 盐酸，于 50mL 容量瓶中，加水定容。

⑧2%（w/w）氯化钙溶液：称 2g 的氯化钙，置于小烧杯中，加入适量水使其溶解，加水至总重为 100g。

5.2.3 水凝胶制备

①.聚丙烯酰胺（PAM）水凝胶

1)取干净的玻璃板（10cm*10cm*0.5cm）两块，自制厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，三明治式组装玻璃模具。

2)按照表 5.1 中 PAM 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40% 丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min

3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h。

4)从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h.

②.聚乙烯醇（PVA）水凝胶：

1)取干净的玻璃板（10cm*10cm*0.5cm）两块，自制厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，

三明治式组装玻璃模具。

- 2) 按照表 5.1 中 PVA 水凝胶的编号分别取 10% 聚乙烯醇水溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50% 盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。
- 3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，室温静置 2h，将凝胶从模具中取出，在水中浸泡 48h。

表 5.1 PAM, PVA 和 PVA-Gel 中各物质的质量分数表

Table 5.1 The quality score of each substance in PAM, PVA and PVA-Gel

PAM 编号	AM/%	ABM/%	PVA 编号	PVA/%	PVA-Gel 编号	PVA/%	Gel/%
A1	3	0.225	B1	6	C1	6	1.25
A2	4	0.15	B2	7	C2	6	2.5
A3	5	0.15	B3	8	C3	7	1.25
A4	10	0.06	B4	9	C4	7	2.5
A5	5	0.25	B5	10	C5	8	1.25
A6	10	0.1					

③ 聚乙烯醇-明胶（PVA-Gel）混合水凝胶

- 1) 取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，三明治式组装玻璃模具。
- 2) 按照表 5.1 中 PVA-Gel 水凝胶的编号分别取 10% 聚乙烯醇水溶液与 10% 明胶溶液于小烧杯中，加入水。缓慢加入一定量的 50% 盐酸稀溶液搅拌均匀，离心去除溶液中气泡。在离心得到溶液中缓慢加入一定比例的戊二醛（戊二醛与羟基单体的摩尔比为 0.0044）。
- 3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，室温静置 2h。
- 4) 从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h。

④ 聚丙烯酰胺-海藻酸钠（PAM-SA）混合水凝胶

- 1) 取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，三明治式组装玻璃模具。
- 2) 按照表 5.2 中 PAM-SA 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40% 丙烯酰胺溶液、2% 海藻酸钠溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10% 过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min。
- 3) 将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃ 水浴 2h，移出水浴锅，置于室内自然冷却。
- 4) 从模具中小心取出水凝胶，室温下在水中浸泡 48h。

表 5.2 PAM-SA 和 PAM-Gel 中各物质的质量分数表

Table 5.2 The quality score of each substance in PAM-SA and PAM-Gel

PAM-SA 编号	AM/%	ABM/%	SA/%	PAM-Gel 编号	AM/%	ABM/%	Gel/%
D1	4	0.15	0.25	F1	5	0.15	1.25
D2	5	0.15	0.25	F2	5	0.15	2.5
D3	10	0.06	0.25	F3	10	0.06	1.25
D4	4	0.15	0.5	F4	10	0.06	2.5
D5	5	0.15	0.5	F5	10	0.1	1.25
D6	10	0.06	0.5	F6	10	0.1	2.5

⑤聚丙烯酰胺-明胶（PAM-Gel）混合水凝胶

- 1)取两块干净的玻璃板，厚度 0.5cm 的 U 型硅胶片一块，三明治式组装玻璃模具。
- 2)按照表 5.2 中 PAM- Gel 水凝胶的编号分别取 2% N,N-亚甲基双丙烯酰胺溶液、40%丙烯酰胺溶液、10%明胶溶液、水，于小烧杯中，加入总质量 1/100 的 10%过硫酸铵溶液，搅拌均匀。将混合液置于真空泵抽虑，除氧 30min。
- 3)将所得混合溶液分别快速转入玻璃模具中，保鲜膜密封，置于水浴锅中，60℃水浴 2h。
- 4)从模具中小心取出水凝胶，室温下浸没在 2%氯化钙水溶液中 24h，室温下在水中浸泡 48h。

5.2.4 微球法测量水凝胶杨氏模量

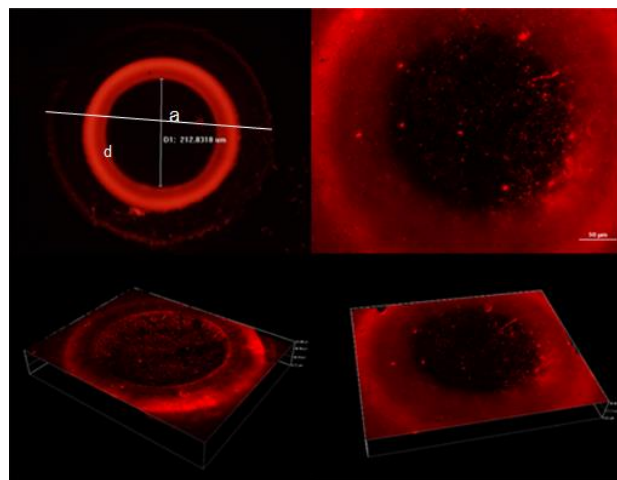


图 5.1 体式显微镜下的观测图

Figure 5.1 The pictures observed by stereomicroscope

- ①取出溶胀饱和的水凝胶，切割成载玻片大小，静置于载玻片上，用滤纸轻轻吸走表面水分。
- ②将荧光微珠溶液滴于水凝胶表面，轻轻震荡使其涂覆于水凝胶表面。
- ③在水凝胶表面轻轻放置钢珠，载玻片迅速置于显微镜下，调节焦距，寻找水凝胶表面所处的平面，测量接触半径 a 与压痕半径 d ；调节焦距，寻找钢珠底部所处平面，此时以磁石吸走钢珠，重新聚焦到水凝胶表面所处平面，两个平面高度差，即为凝胶陷入深度 h 。
- ④同一标号的水凝胶重复测量 30 次。
- ⑤根据公式计算出杨氏模量。

5.3 压痕重力法公式推导

在赫兹接触理论中，不论是球形（或抛物面）压头（图 5.1.a），或者圆锥压头（图 5.1.b），都只考虑到垂直方向的形变，忽略了水平方向上的形变。

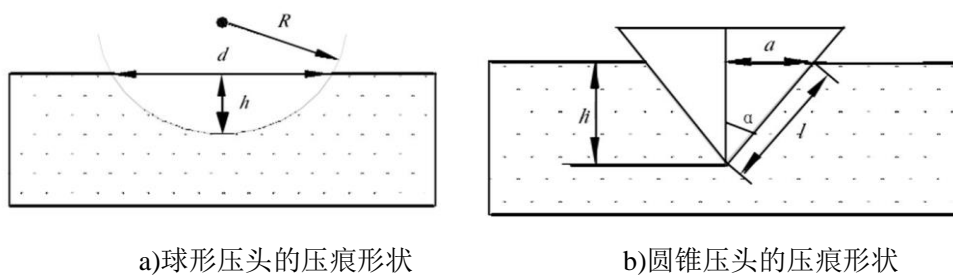


图 5.2 各种压头的压痕示意图

Figure 5.2 The illustration of the indentation made by kinds of indenters

实际上，压头与待测材料接触面周边材料的表面会产生位移量，以锥形压头为例（图 5.2）。

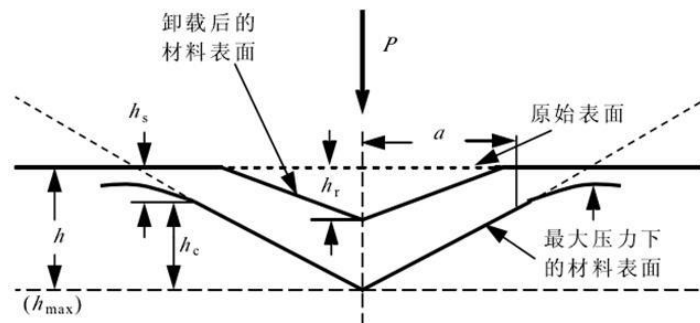


图 5.3 锥形压头的实际压痕示意图

Figure 5.3 An actual illustration of the indentation made by pyramidal indenter

在当变量即测量物件很小时，忽略水平方向的形变会带来一定的误差的。图

5.3 中, h_s 为水平方向上的位移, 但在赫兹理论中常常忽略了该位移, 只计算了 h_c 。微球压痕法, 采用微球作为压头对水凝胶产生压痕, 是球形压头。

在实际测量中, 在水平方向与垂直方向都会产生压痕 (如图 5.4)。图 5.4 中 a 为接触面半径, R 为钢珠半径, h 为压痕深度, d 为压痕半径。设钢珠质量密度与水的密度之差为 ρ , 则使基底变形所做的功来自钢珠势能的减少, 大小为:

$$W = \frac{4}{3} \pi R^3 \rho g h \quad (5.1)$$

对于完全压缩的弹性体, 若杨氏模量为 E , 单向压缩的体积变形为 V 时所做的功为:

$$W_1 = \frac{1}{2} E V \quad (5.2)$$

基底变形所需的功 W_2 与弹性模量成正比, 与变形体积大小有关, 所以有:

$$W = \frac{1}{2} E f(V) \quad (5.3)$$

由量纲比较可知 $f(V)$ 的单位为长度单位的 3 次方, 与 V 单位相同, 所以有:

$$W = \frac{1}{2} E k V \quad (5.4)$$

其中 k 为无量纲的常数。比较 (4.16)、(4.19) 可得:

$$E = \frac{8 \pi R^3 \rho g h}{3 k V} \quad (5.5)$$

钢珠与基底接触面部分为球缺, 对应的体积为:

$$V_1 = \pi h_0^2 \left(R - \frac{h_0}{3} \right), \quad h_0 = R - \sqrt{R^2 - a^2} \quad (5.6)$$

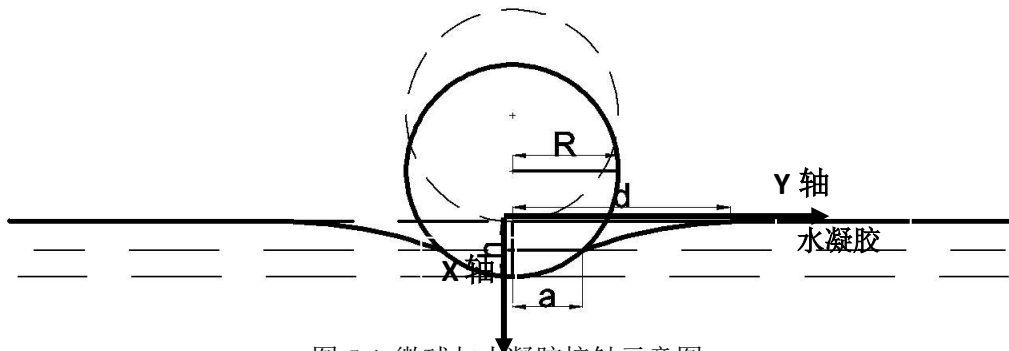


图 5.4 微球与水凝胶接触示意图

Figure 5.4 An illustration of the indentation made by microsphere placed on hydrogel

以垂直与 Y 轴的半径为 X 轴, 以水凝胶平面为 Y 轴, 水凝胶平面与 X 轴交点为原点, 建立直角坐标系如图 5.4。压痕中心点坐标为 $(h, 0)$, 压痕半径与 Y 轴的交点坐标为 $(0, d)$, 用函数

$$y = A\sqrt{x} + Bx + d \quad (5.7)$$

来近似拟合曲线 L。该函数方程与曲线 L 有相同的函数值与导数值。可求出：

$$\begin{aligned} A &= \frac{2a}{\sqrt{h-h_0}} + \frac{2(R-h_0)}{r} \sqrt{h-h_0} - \frac{2d}{\sqrt{h-h_0}} \\ B &= \frac{d-a}{h-h_0} - \frac{2(R-h_0)}{a} \end{aligned} \quad (5.8)$$

由 L 绕 x 轴旋转的旋转体的体积为：

$$V_2 = \pi \int_0^{h-h_0} (A\sqrt{x} + Bx + d)^2 dx \quad (5.9)$$

将 (4.23) 带入 (4.24) 计算得到

$$\begin{aligned} V_2 &= \frac{11}{15} \pi (d-a)^2 (h-h_0) - \frac{8}{15} \pi \frac{(d-a)(R-h_0)(h-h_0)^2}{a} \\ &+ \frac{2}{15} \pi \frac{(R-h_0)^2 (h-h_0)^3}{a^2} - \frac{3}{5} \pi d (d-a) (h-h_0) \\ &+ \frac{4}{15} \pi \frac{d(R-h_0)^2 (h-h_0)^2}{a} + \pi d^2 (h-h_0) \end{aligned} \quad (5.10)$$

所以压痕的体积为：

$$\begin{aligned} V &= V_1 + V_2 = \pi h_0^2 \left(R - \frac{h_0}{3} \right) + \frac{11}{15} \pi (d-a)^2 (h-h_0) \\ &- \frac{8}{15} \pi \frac{(d-a)(R-h_0)(h-h_0)^2}{a} + \frac{2}{15} \pi \frac{(R-h_0)^2 (h-h_0)^3}{a^2} \\ &- \frac{3}{5} \pi d (d-a) (h-h_0) + \frac{4}{15} \pi \frac{d(R-h_0)^2 (h-h_0)^2}{a} \\ &+ \pi d^2 (h-h_0) \end{aligned} \quad (5.11)$$

5.4 结果与讨论

如图 5.3，在微球压在水凝胶表面上时，不仅会产生垂直反向上的形变，同时在水平反向上存在形变即为图中形变 d。微球在水凝胶表面下落的过程中是微球重力在做功，产生形变。通过微球重力做功求得水凝胶的样式模量的方法，本文称之为压痕重力法。其基本的方法原理基于公式 (5.5)。

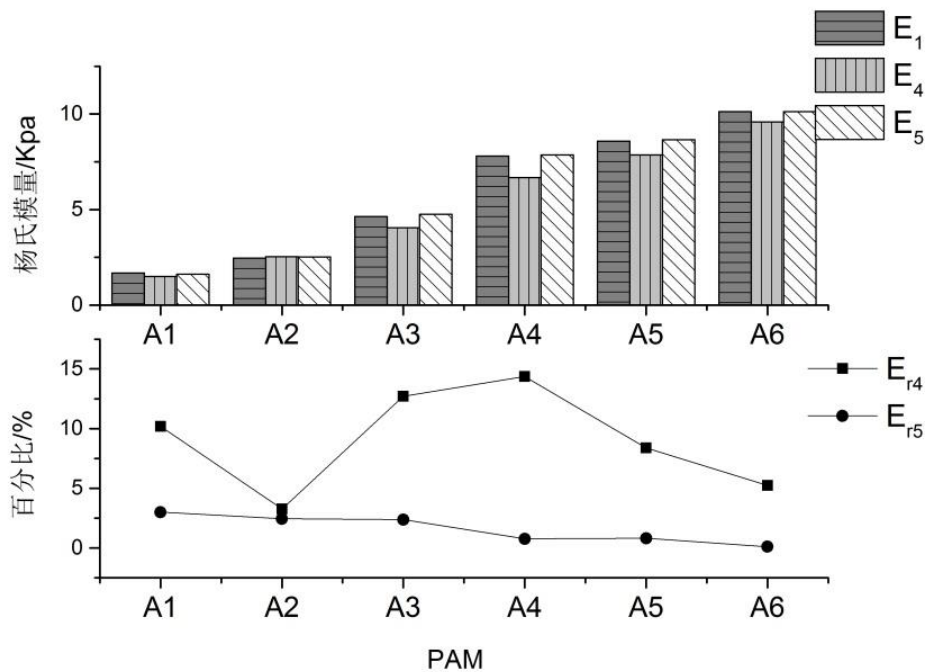
以公式 (5.5) 与拉伸法测量的水凝胶杨氏模量为参考值 E_1 ，运用数值模拟与最优化算法求解未知系数 k ，如表 5.3 在用计算得到的 K 值，带入压痕重力公式计算水凝胶的杨氏模量。

表 5.3 拟合的 k 值

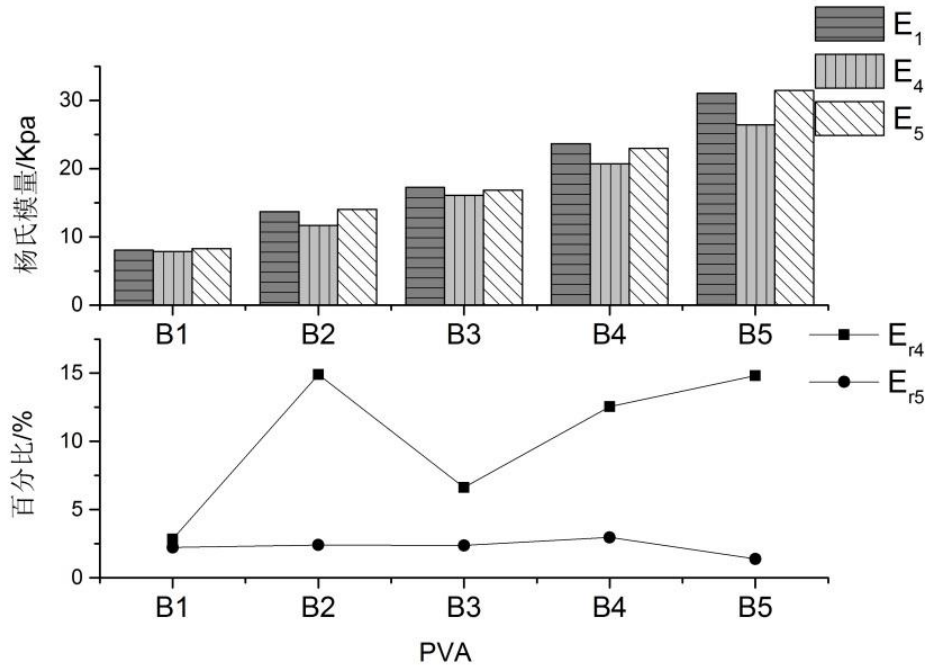
Table 5.3 K value of the fitting	
凝胶种类	k
PVA	1.056
PAM	1.043
PVA (Gel)	1.067
PAM-SA	1.045
PAM (Gel)	1.032

与拉伸法计算结果 E_1 (参考值)、微球法计算结果 E_4 以及压痕重力法计算结果 E_5 做比较, 图 5.4 中误差 E_{R4} 为微球法计算结果 E_4 与参考值拉伸法计算结果 E_1 之间的误差, 误差为压痕重力法计算结果 E_5 与参考值拉伸法计算结果 E_1 之间的误差。

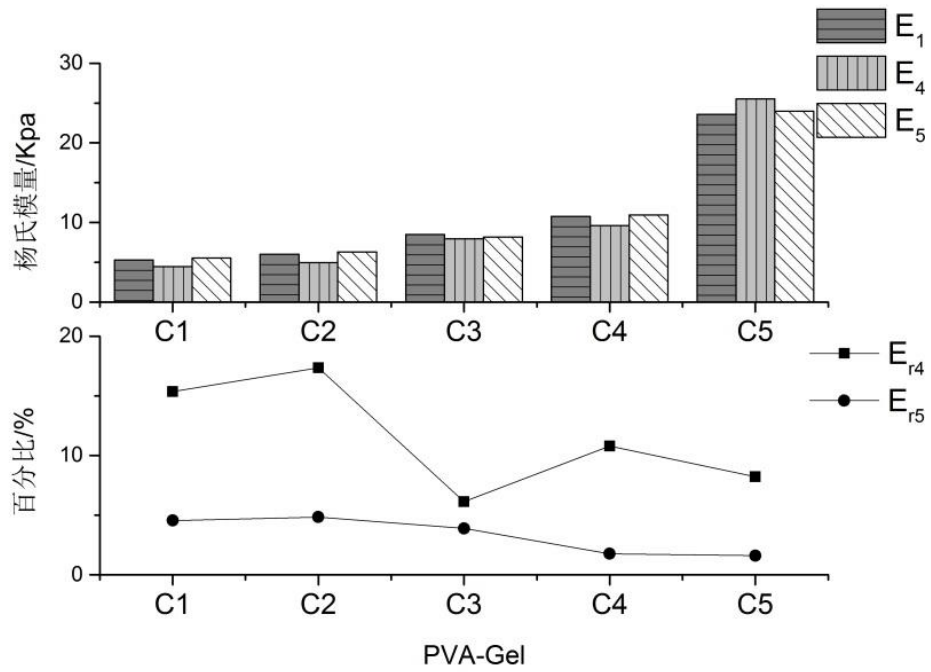
从图 5.4 中, 以拉伸法的计算结果作为参考值, 对比微球法计算结果 E_4 与压痕重力法计算结果 E_5 , 可发现压痕重力法的测量结果与拉伸法的结果更接近, 误差较小。且 E_{R5} 基本上小于 E_{R4} , 且均小于 5%。压痕重力法的测量结果更准确。



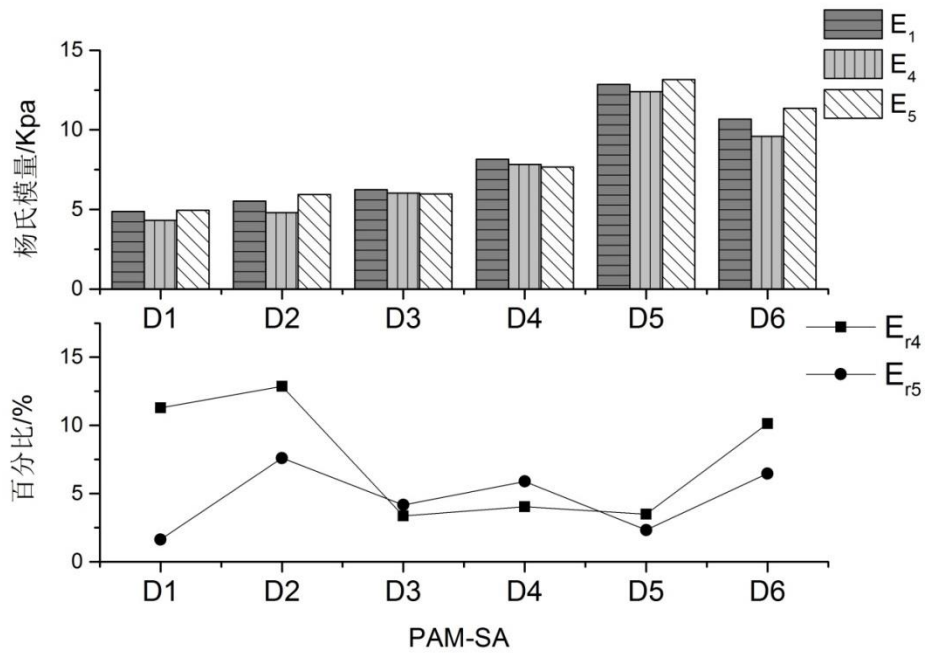
a. PAM 三种测量方法的杨氏模量对比图



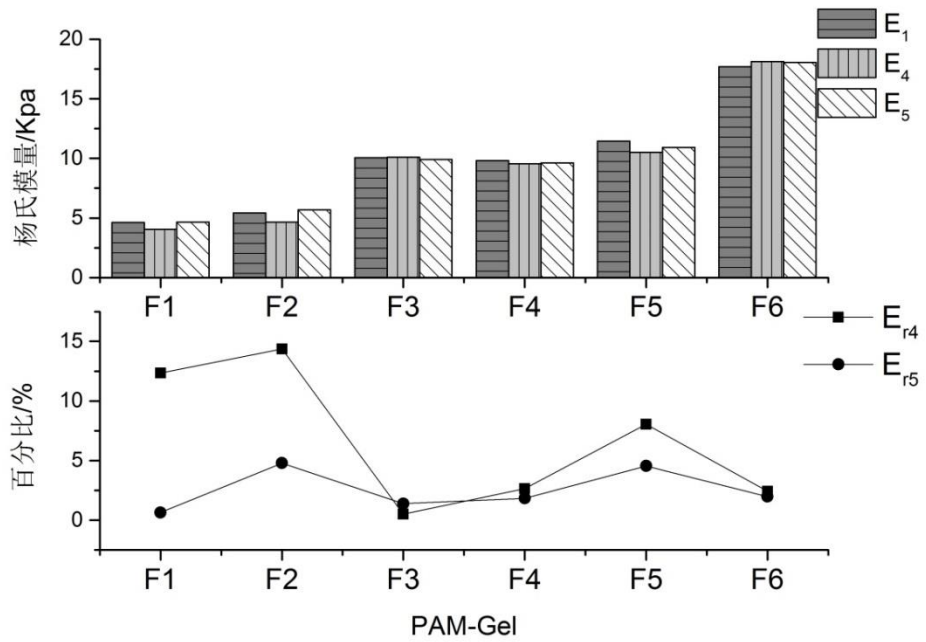
b. PVA 三种测量方法的杨氏模量对比图



c. PVA-Gel 三种测量方法的杨氏模量对比图



d. PAM-SA 三种测量方法的杨氏模量对比图



e. PAM-Gel 三种测量方法的杨氏模量对比图

图 5.5.三种测量方法的杨氏模量对比图

Figure 5.5 Comparison graph of Young 's modulus of three measures

表 5.4 F-检验 拉伸法参考值(E_1)与压痕重力计算值(E_5)方差分析Table 5.4 F - test of variance analysis of reference values of tensile method (E_1) and experimental values of indentation gravity method (E_5)

	E_1	E_5
平均	10.3725	10.42286
方差	46.90376	47.08902
观测值	28	28
df	27	27
F	0.996066	
$P_{(F \leq f)}$ 单尾	0.495952	
F 单尾临界	1	

对 E_1 与 E_5 的数值进行方差检验, 使用 F-检验双样本方差分析, 其中置信度为 95%, 结果如表 5.4

表 5.4 中 $F < F_{\text{单尾临界}}$, E_1 与 E_5 不存在显著性差异。即拉伸法与压痕重力法的测量结果无差异, 两种方法的测量测量结果无统计学上的差别。

用 F-检验双样本方差分析对 E_4 与 E_5 的数值进行方差检验, 置信度为 95%, 结果如表 5.5.

表 5.5 F-检验 微球法计算值(E_4)与压痕重力计算值(E_5)方差分析Table 5.5 F - test of variance analysis of experimental values of indentation gravity method (E_4) and reference values of indentation gravity method (E_5)

	E_4	E_5
平均	9.265357143	10.42285714
方差	33.33688505	47.08902116
观测值	28	28
df	27	27
F	0.707954513	
$P_{(F \leq f)}$ 单尾	0.18757458	
F 单尾临界	0.524983164	

表 5.5 中 $F > F_{\text{单尾临界}}$, E_4 与 E_5 存在显著性差异。从图 5.4 与表 5.5 可验证, 压痕重力法的计算结果与微球压痕法的结果存在统计学上的差异, 且压痕重力法的测量结果优于微球压痕法。

5.5 本章小结

以重力做功为原理，同时计入压痕垂直方向的形变与水平方向形变，得到压痕重力法杨氏模量计算公式

$$E = \frac{8\pi R^3 \rho gh}{3kV}$$

通过数值模拟与最优化算法求解得到五种水凝胶的 k 值。验证了压痕重力法与拉伸法的计算结果接近，误差小；但压痕重力法与微球压痕法进一步拟合公式的计算结果差异较大，且压痕重力法的测量结果优于微球压痕法。压痕重力法适用于这五种低弹性模量水凝胶，与拉伸法相比，测量的相对误差在 5% 以内。

6 结论与展望

6.1 主要研究工作与结论

水凝胶广泛应用于组织培养中，影响细胞行为的重要因素是水凝胶力学性能。本文以几种低弹性模量的水凝胶为源探索低弹性模量水凝胶的测量方法，基于前人的方法，再加以改进。本文的研究结果如下：

①本文在探索拉伸法测量水凝胶的杨氏模量时，基于本实验室的传统，改良拉伸法如下：1)在水中测量水凝胶。在水中拉伸测量可有效较少水凝胶自重带来的形变增加，同时也可减少因拉伸而造成的挤压使得水凝胶失水；2)在制备水凝胶的过程中，给水凝胶作好平行标记，在测量时使用相机拍照，之后在用图像处理软件 ImageJ 来测量平行标记之间的距离求得拉伸形变。除了这些改良之外，本文的工作中还考虑到砝码浮力对测量精度的影响，扣除了砝码的浮力，测量精度大大提高。拉伸法的实验设备要求低，操作简单，可操作性大。

②本实验室的以前的研究中发现，基于赫兹接触理论的微球压痕法，推导出的新公式中虽然有未知系数，但是这些系数与水凝胶的材料特性相关性不大。因而在前人的基础，本研究再测量了三种不同的低弹性水凝胶，PAV(gel)、PAM-Gel、PAM-SA，大量数据拟合了得到三组系数。与前人得到的两组数据，拟合得到新系数 $k=3.17$ ， $\alpha=1.02$ 。带入公式得到：

$$E = \frac{3.17(1-\nu^2)P}{a^{1.02}h^{0.98}}。$$

该公式适用于这五种低弹性模量水凝胶。验证了该公式的计算结果与第一次拟合公式的计算结果相近，误差小；且该公式的计算结果与新拉伸法测量结果接近。

③以重力做功为原理，同时计入压痕垂直方向的形变与水平方向形变，得到压痕重力法杨氏模量计算公式

$$E = \frac{8\pi R^3 \rho gh}{3kV}$$

通过数值模拟与最优化算法求解得到五种水凝胶的 k 值。验证了压痕重力法与拉伸法的计算结果接近，误差小；但压痕重力法与微球压痕法进一步拟合公式的计算结果差异较大，且压痕重力法的测量结果优于微球压痕法。压痕重力法适用于这五种低弹性模量水凝胶。

6.2 未来展望

本文对水凝胶杨氏模量的几种测量方法——拉伸法、微球压痕法与压痕重力法分别进行了改良、完善与建立，但每种测量方法依然存在着可改进之处：

①微球压痕法测量过程中，硬度大的水凝胶，其压痕深度较小，由于本课题组需要的水凝胶都较软。因而对于少数硬度大的水凝胶在测量过程中尝试使用了密度更大的铅球，计算得到的杨氏模量更为准确。后续可进一步研究微球压痕法在更大硬度的水凝胶的应用。

②压痕重力法充分考虑了压痕在水平方向与垂直方向的形变。但该方法得到关于压痕体积 V 过于繁琐，某些项的因素、指数有相似处，后续的工作可根据这些相似的因素对体积 V 的计算再进行推导，使之计算过程更简洁。

③压痕重力法中五种低弹性模量水凝胶求解得到的 k 值都十分接近，可测量更多的低弹性模量水凝胶，求解其 k 值，判断 k 值是否与材料特性有关。

致 谢

转眼间又到了3月，3年前怀着一份敬畏与憧憬来到了这所高校面试，心中满是忐忑与激动。3年后的今天，怀着几分不舍与怀念渡过学生生涯的最后几月。时光过隙，恍如昨日。在重庆大学经历的点点滴滴将会陪伴我以后的道路。

在研究生的三年里，我过得非常满足。有幸进入黄岂平老师的课题组，更有幸成为邹老师的学生。特别要感谢的就是我的导师邹老师，在我懵懂迷茫的时候，邹老师的敦敦教诲让我找到了方向；在我实验室不顺利，研究没有进展的时候，邹老师的宽容鼓励让我重拾信心。在建立压痕重力法公式推导的过程中，数统学院的于光磊老师给了我莫大的帮助。同时我还必须感谢生物学院的黄岂平老师与王红兵老师，这几年我的成长离不开各位老师的帮助与鼓励。各位老师严于律己，精于专研的精神更是让我万分佩服与感动。

在重大学习的三年里，我还认识了一大批优秀的同学，充分感受到了“优秀是种习惯”深刻含义。感谢单洁林师姐、夏婷婷师姐与周蕙师姐在我初入实验室的耐心帮助与指导；感谢卫宏毅同学对我的帮助与宽容；同时也要感谢室友对我的照顾与帮助。

我要特别感谢我的父母与妹妹，他们一直默默地支持我，不论我做什么样的决定，不论我处于什么样的境况，家人总是我最温暖的港湾，唯愿一生安康。感谢我的人生挚友王大鹏同学，在我落寞困难的时候对我的宽容、陪伴与支持，愿慢慢一生执手相携。

最后，衷心感谢在百忙之中评审论文以参加答辩的各位老师！

龙 洋

二〇一七年三月 于重庆

参考文献

- [1] Yeung T, Georges P C, Flanagan L A, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion[J]. *Cell Motility & the Cytoskeleton*, 2005, 60(1):24–34.
- [2] Wang Y, Zhao Q, Zhang H, et al. A novel poly(amido amine)-dendrimer-based hydrogel as a mimic for the extracellular matrix.[J]. *Advanced Materials*, 2014, 26(24):4163.
- [3] Wong J Y, Velasco A, Rajagopalan P, et al. Directed Movement of Vascular Smooth Muscle Cells on Gradient-Compliant Hydrogels†[J]. *Langmuir*. 2003, 19(5): 1908-1913.
- [4] Engler A. Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses[J]. *Biophysical Journal*, 2004, 86(1):617.
- [5] Gao L, Mcbeath R, Chen C S. Stem Cell Shape Regulates a Chondrogenic Versus Myogenic Fate Through Rac1 and N-Cadherin †[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(3):564-572.
- [6] George R P A. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2008, 295(4):C1037.
- [7] Keung A J, Asuri P, Kumar S, et al. Soft microenvironments promote the early neurogenic differentiation but not self-renewal of human pluripotent stem cells[J]. *Integrative Biology Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 2012, 4(9):1049..
- [8] Guvendiren M, Burdick J A. Stiffening hydrogels to probe short- and long-term cellular responses to dynamic mechanics[J]. *Nature Communications*, 2012, 3(4):792.
- [9] Lee J, Abdeen A A, Huang T H, et al. Controlling cell geometry on substrates of variable stiffness can tune the degree of osteogenesis in human mesenchymal stem cells[J]. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2014, 38(3):209-218.
- [10] Sunyer R, Jin A J, Nossal R, et al. Fabrication of hydrogels with steep stiffness gradients for studying cell mechanical response[J]. *Plos One*, 2012, 7(10):e46107.
- [11] Frey M T, Engler A, Discher D E, et al. Microscopic methods for measuring the elasticity of gel substrates for cell culture: microspheres, microindenters, and atomic force microscopy[J]. *Methods in Cell Biology*, 2007, 83:47-65.
- [12] Dimitriadis E K, Horkay F, Maresca J, et al. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope.[J]. *Biophysical Journal*, 2002, 82(5):2798.
- [13] Long R, Hall M S, Wu M, et al. Effects of gel thickness on microscopic indentation measurements of gel modulus.[J]. *Biophysical Journal*, 2011, 101(3):643.
- [14] 李宗良, 廖双泉, 廖建和,等. 丙烯酰胺接枝天然胶乳制备吸水橡胶研究[J]. *热带作物学*

- 报, 2006, 27(3):90-93.
- [15] 赵玉强. PVA/SA/ST复合凝胶微球的制备及性能研究[D]. 西南交通大学, 2009.
- [16] Ma J, Bing F, Liang B, et al. Synthesis and characterization of Poly(N -isopropylacrylamide)/Poly(acrylic acid) semi-IPN nanocomposite microgels[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2010, 341(1):88-93.
- [17] Nagura M, Takagi N, Katakami H, et al. States of water in poly(vinyl alcohol) hydrogels [J]. Polymer gels and networks.1997,5(5):455-468.
- [18] Cejková J, Hanus J, Štěpánek F. Investigation of internal microstructure and thermo-responsive properties of composite PNIPAM/silica microcapsules[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2010, 346(2):352-60.
- [19] Su J L, Bae Y, Kataoka K, et al. In vitro Release and in vivo Anti-tumor Efficacy of Doxorubicin from Biodegradable Temperature-sensitive Star-shaped PLGA-PEG Block Copolymer Hydrogel[J]. Polymer Journal, 2008, 40(2):171-176.
- [20] Birgersson E, Li H, Wu S. Transient analysis of temperature-sensitive neutral hydrogels[J]. Journal of the Mechanics & Physics of Solids, 2008, 56(2):444-466.
- [21] Sutar P B, Mishra R K, Pal K, et al. Development of pH sensitive polyacrylamide grafted pectin hydrogel for controlled drug delivery system[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008, 19(6):2247.
- [22] 李忠阳, 戴晓兵, 付人俊,等. PMMA基凝胶聚合物电解质研究进展[J]. 功能材料, 2004, 35(s1):2057-2061.
- [23] Nair S H, Pawar K C, Jog J P, et al. Swelling and mechanical behavior of modified poly(vinyl alcohol) / laponite nanocomposite membranes[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2007, 103: 2896-2903.
- [24] 冯立刚, 贾玉玺, 陈希亮,等. 酶凝干酪素物理凝胶化过程的有限元模拟[J]. 高分子学报, 2008, 1(6):529-536.
- [25] 李华岳, 陈维毅, 董江峰,等. 关节软骨细胞的琼脂糖凝胶培养研究[J]. 太原理工大学学报, 2009, 40(2):195-199.
- [26] Shen X, Chen L, Cai X, et al. A novel method for the fabrication of homogeneous hydroxyapatite/collagen nanocomposite and nanocomposite scaffold with hierarchical porosity.[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2011, 22(2):299-305.
- [27] 曾蓉, 冯志程, SMITH Ray,等. 变温核磁共振对壳聚糖/磷酸甘油盐温敏性水凝胶的初步研究[J]. 化学学报, 2007, 65(21):2459-2465.
- [28] Gao S, Guo J, Wu L, et al. Gelation of konjac glucomannan crosslinked by organic borate[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 73(3):498-505.

- [30] 董勤正, 李小红, 金海琴, 等. CPE/P(AA-MPEGMA)吸水膨胀弹性体的研究[C]// “时代新材杯”全国橡胶制品技术研讨会. 2007.
- [31] 杨妮. 聚甲基丙烯酸酯类润滑油降凝剂的合成及降凝机理的研究[D]. 西北大学, 2010.
- [32] Ahmed E M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review[J]. Journal of Advanced Research, 2015, 6(2):105.
- [33] Zhang Q S, Li X W, Zhao Y P, et al. Preparation and performance of nanocomposite hydrogels based on different clay.[J]. Applied Clay Science, 2009, 46(4):346-350.
- [34] Haraguchi K, Takada T. Synthesis and characteristics of nanocomposite gels prepared by in situ photopolymerization in an aqueous system[J]. Macromolecules, 2010, 43(9):4294-4299.
- [35] 林建明, 唐群委, 吴季怀. 高强度PAM/PVA互穿网络水凝胶的合成[J]. 华侨大学学报(自然版), 2010, 31(1):41-48.
- [36] Gao S, Guo J, Nishinari K. Thermoreversible konjac glucomannan gel crosslinked by borax[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 72(2):315-325.
- [37] Zhang H, Cooper A. I. Aligned Porous Structures by Directional Freezing[J]. Advanced Materials, 2010, 19(11):1529-1533.
- [38] Hatice Bodugöz, Pekel N, Olgun Güven. Preparation of poly(vinyl alcohol) hydrogels with radiation grafted citric and succinic acid groups[J]. Radiation Physics & Chemistry, 1999, 55(5-6):667-671.
- [39] Kazimierska-Drobny K, El F M, Kaczmarek M. Determination of mechanical and hydraulic properties of PVA hydrogels[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015, 48(48):48-54.
- [40] Li X, Hu A, Lin Y. Structure and Property of Porous Polyvinylalcohol Hydrogels for Microorganism Immobilization[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2011, 19(2):398-404.
- [41] Cabral J, Moratti S C. Hydrogels for biomedical applications.[J]. Future Medicinal Chemistry, 2011, 3(15):1877.
- [42] 孟舒献, 温晓娜, 冯亚青, 等. 聚乙烯醇生物相容性的研究[J]. 天津大学学报(自然科学与工程技术版), 2003, 36(4):473-477.
- [43] Veronese F M, Mammucari C, Schiavon F, et al. Pegylated enzyme entrapped in poly(vinyl alcohol) hydrogel for biocatalytic application[J]. Farmaco, 2001, 56(8):541.
- [44] Hassan C M, Stewart J E, Peppas N A. Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: applications to protein controlled release from multilaminate devices.[J]. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2000, 49(2):161-165.
- [45] Hirokawa Y, Tanaka T. Volume phase transition in a nonionic gel[J]. Journal of Pharmaceutical Science, 1984, 81(12):6379-6380.

- [46] Tokuhito T, Amiya T, Mamada A, et al. NMR study of poly(N-isopropylacrylamide) gels near phase transition[J]. *Macromolecules*, 1991, 24(10):2936-2943.
- [47] Dai T, Qing X, Wang J, et al. Interfacial polymerization to high-quality polyacrylamide/polyaniline composite hydrogels[J]. *Composites Science & Technology*, 2010, 70(3):498-503.
- [48] 惠泉. 反相乳液聚合和水分散聚合制备阳离子聚丙烯酰胺及其絮凝性能研究[D]. 青岛科技大学, 2008.
- [49] 翟茂林, 伊敏, 哈鸿飞. 水溶性的温度敏感性聚合物、活性共聚物的辐射合成及性质研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 1994(3):133-139.
- [50] Bao H, Li L, Gan L H, et al. Thermo- and pH-Responsive Association Behavior of Dual Hydrophilic Graft Chitosan Terpolymer Synthesized via ATRP and Click Chemistry[J]. *Macromolecules*, 2010, 43(13):5679-5687.
- [51] 翟茂林, 哈鸿飞. 水凝胶的合成、性质及应用[J]. *大学化学*, 2001, 16(5):22-27.
- [52] Peppas N A, Carr D A. Impact of Absorption and Transport on Intelligent Therapeutics and Nano-scale Delivery of Protein Therapeutic Agents.[J]. *Chemical Engineering Science*, 2011, 64(22):4553-4565.
- [53] J. Kopeček, P. Kopečková, H. Brøndsted, et al. Polymers for colon-specific drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 1992, 19(1-3):121-130.
- [54] Chickering D E, Mathiowitz E. Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa[J]. *Journal of Controlled Release*, 1995, 34(34):251-262.
- [55] Goh C H, Heng P W S, Lai W C. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 88(1):1-12.
- [56] 郝晓丽. 海藻酸钙冻干膜及海藻酸钙基互穿网络膜材料的制备与性能研究[D]. 青岛大学, 2010.
- [57] 周世海, 蔡继业, 陈勇. 钙离子对海藻酸钠自组装行为影响的AFM研究[J]. *药物生物技术*, 2004, 11(2):81-85.
- [58] Grant G T, Morris E R, Rees D A, et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg - box model[J]. *Febs Letters*, 1973, 32(1):195-198.
- [59] Chan A W, Whitney R A, Neufeld R J. Semisynthesis of a Controlled Stimuli-Responsive Alginate Hydrogel[J]. *Biomacromolecules*, 2009, 10(3):609-16.
- [60] Gudmund Skjå. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1989, 10(1):31-54.
- [61] Stevens M M, Qanadilo H F, Langer R, et al. A rapid-curing alginate gel system: utility in

- periosteum-derived cartilage tissue engineering.[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(5):887-894.
- [62] § K Y L † ‡, † J A R, Petra Eiselt ‡, et al. Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density[J]. *Macromolecules*, 2000, 33(11):4291-4294.
- [63] Petra Eiselt †, Kuen Yong Lee,†,‡,§ and, § D J M † ‡. Rigidity of Two-Component Hydrogels Prepared from Alginate and Poly(ethylene glycol)–Diamines[J]. *Macromolecules*, 1999, 32(17):5561-5566.
- [64] Le-Tien C, Millette M, Lacroix M, et al. Modified alginate matrices for the immobilization of bioactive agents[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2004, 39(2):189-98.
- [65] Balakrishnan B, Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(18):3941-3951.
- [66] Shoichet M S, Li R H, White M L, et al. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose[J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 1996, 50(4):374.
- [67] Kuo C K, Ma P X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(6):511.
- [68] Ottani V, Martini D, Franchi M, Raspaniti M. Hierarchical structures in fibrillar collagens[J]. *Micron*, 33: 587-596.
- [69] Gilsenan P M, Ross-Murphy S B. Shear creep of gelatin gels from mammalian and piscine collagens.[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2001, 29(1):53-61.
- [70] Gornall J L, Terentjev E M. Helix-coil transition of gelatin: helical morphology and stability[J]. *Soft Matter*, 2008, 4(3):544-549.
- [71] Rhee S, Lee J D, Tanaka J. Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemical Interaction with Collagen[J]. *Journal of the American Ceramic Society*, 2010, 83(11):2890-2892.
- [72] Haider S, Park S Y, Saeed K, et al. Swelling and electroresponsive characteristics of gelatin immobilized onto multi-walled carbon nanotubes[J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2007, 124(2):517-528.
- [73] Yan C, Pochan D J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications[J]. *Cheminform*, 2010, 41(51):3528.
- [74] Cheng M, Deng J, Yang F, et al. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions ☆ [J]. *Biomaterials*, 2003, 24(17):2871-2880.
- [75] Lien S M, Li W T, Huang T J. Genipin-crosslinked gelatin scaffolds for articular cartilage

- tissue engineering with a novel crosslinking method[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2008, 28(1):36-43.
- [76] Lien S M, Ko L Y, Huang T J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering.[J]. *Acta Biomaterialia*, 2009, 5(2):670-679.
- [77] Li M, Guo Y, Wei Y, et al. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications.[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(13):2705-2715.
- [78] Rivero S, Garc á M A, Pinotti A. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films.[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(2):369-375.
- [79] Damink O, Dijkstra P J, Luyn V. GLlutaraldehyde as a cross-linking agentfor collagen-based biomaterials [J]. *Mater Sci. Mat Med*, 1995, 6 (8) :460-472
- [80] Khor E. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses[J]. *Biomaterials*, 1997, 18(2):95-105.
- [81] 王建全, 吴文辉. 不同交联剂对甲基丙烯酸- β -羟乙酯/E-51双甲基丙烯酸酯聚合物水凝胶性能的影响[J]. *高分子学报*, 2005(6):868-873.
- [82] 邹小兵, 刘美霞, 于光磊,等. 用于细胞培养的聚乙烯醇水凝胶力学性能模拟及定量控制[J]. *世界科技研究与发展*, 2013(6): 679-682.
- [83] 吕鹤翔, 郑裕东, 孟昊业,等. 多孔PVA水凝胶的组成、形貌及泊松比等力学性能研究[J]. *高分子学报*, 2009, 1(11): 1096-1100..
- [84] Ramaraj B, Ganga R. Hydrogel capsules for sustained drug release[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 51(6):979-988.
- [85] 潘育松, 熊党生, 陈晓林. 聚乙烯醇水凝胶的制备及性能[J]. *高分子材料科学与工程*, 2007, 23(6):228-231.
- [86] Frey M T, Engler A, Discher D E, et al. Microscopic methods for measuring the elasticity of gel substrates for cell culture: microspheres, microindenters, and atomic force microscopy[J]. *Methods in Cell Biology*, 2007, 83:47-65.
- [87] 单洁玲. 低弹性模量聚丙烯酰胺水凝胶力学性能测定 方法的研究[D]. 重庆大学, 2015.