

· 研究论文 ·

## 仿生各向异性结构复合水凝胶及其流变学行为

张雪慧<sup>1</sup> 王艳芹<sup>2,3\*</sup> 郑强<sup>1,4\*</sup>

(太原理工大学<sup>1</sup>材料科学与工程学院<sup>2</sup>生物医学工程学院 太原 030024)

(<sup>3</sup>山西浙大新材料与化工研究院 太原 030001)

(<sup>4</sup>高分子合成与功能构造教育部重点实验室 浙江大学高分子科学与工程学系 杭州 310027)

**摘要** 仿生构筑具有动态黏弹性行为的细胞外微环境,是组织工程领域细胞外基质(ECM)设计的重要策略.本研究通过定向冷冻和限域拉伸干燥再溶胀的协同策略构建了具有各向异性结构的聚乙烯醇(PVA)/纤维素纳米纤维(CNF)复合水凝胶.所制备的复合水凝胶呈现出平行于定向冷冻方向的取向纤维排列结构.流变学实验结果表明, PVA/CNF 复合水凝胶具有各向异性的动态模量( $G'_{//} = (76.77 \pm 1.61)$  kPa 和  $G'_{\perp} = (42.93 \pm 1.34)$  kPa;  $G''_{//} = (5.44 \pm 0.26)$  kPa 和  $G''_{\perp} = (3.71 \pm 0.13)$  kPa),其储能模量( $G'$ )和损耗模量( $G''$ )在低频率和低应变区域随 PVA 含量的增加而增大,随 CNF 含量的增加呈现先增大后减小的变化趋势.应力松弛实验结果表明,复合水凝胶基质具有黏弹性特性.本文所总结的具有各向异性结构复合水凝胶的黏弹性性质及其规律,对于指导组织工程仿生 ECM 的设计及其对细胞生物行为的影响方面具有潜在的应用价值.

**关键词** 各向异性, 复合水凝胶, 细胞外基质, 流变行为, 应力松弛

**引用:** 张雪慧, 王艳芹, 郑强. 仿生各向异性结构复合水凝胶及其流变学行为. 高分子学报, doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2023.23275

**Citation:** Zhang, X. H.; Wang, Y. Q.; Zheng, Q. Rheological behavior of biomimetic composite hydrogels with anisotropic structures. *Acta Polymerica Sinica*, doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2023.23275

水凝胶作为一类重要的结构可调且具有黏弹性的生物材料,在组织工程和三维细胞培养中得到了广泛应用<sup>[1,2]</sup>.在组织工程领域,水凝胶作为一种仿生细胞外基质(ECM)不仅可以为细胞提供结构网络,还为其提供生化或生物物理指导线索,对细胞的功能和行为起着至关重要的调节作用<sup>[3-5]</sup>.流变特性作为水凝胶的一种重要动力学特性,是研究水凝胶结构和力学行为的重要方面,也决定了细胞所处基质的动态机械微环境的可变性和可塑性<sup>[6,7]</sup>.此外,水凝胶基质在黏弹性行为(如应力松弛和蠕变)方面对变形或机械载荷

表现出时间依赖的响应,这种响应可以被细胞感知,细胞通过对可重组网络施加牵引力,完成扩散、增殖和迁移等活动<sup>[8,9]</sup>.因此,水凝胶 ECM 的结构、动态力学和黏弹性特性,对于探索基质力学与细胞行为之间的关系,从而调控细胞的迁移、增殖和分化等重要生物学过程至关重要.

为模拟天然 ECM 的力学微环境,许多研究对仿生水凝胶的流变行为进行了详细报道<sup>[10-12]</sup>.例如:刘水莲等<sup>[13]</sup>报道了一种新型羧甲基壳聚糖水凝胶.通过调节水凝胶的交联度可以对其流变行为进行调控,具有较高交联度的羧甲基壳聚糖

2023-11-30 收稿, 2024-03-22 录用, 网络出版; 国家自然科学基金面上项目(项目号 12372310)、山西省自然科学基金(基金号 2021-0302123158)、山西浙大新材料与化工研究院(项目号 2022SX-TD023)和山西省“1331工程”项目和太原市 2021 年度重大科技项目资助.

\* 通信联系人, E-mail: wangyanqin@tyut.edu.cn; zhengqiang@zju.edu.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2023.23275

水凝胶具有较高的储能模量. Dubrovina 等<sup>[14]</sup>报道了琼脂与羧甲基纤维素钠盐复合水凝胶的流变行为. 聚合物组分含量的不同显著影响了复合水凝胶分子间相互作用, 从而对复合水凝胶的流变特性产生影响. 然而, 大多数研究主要集中在各向同性水凝胶上, 且多是通过调节交联度或改变组分含量和化学组成等来调控复合水凝胶的动态力学性能, 忽略了对具有各向异性结构的仿生复合水凝胶基质流变学的探究.

事实上, 各向异性水凝胶基质在不同方向上动态力学性能(频率等相关流变试验或循环加-卸载试验)和静态力学性能(应力松弛或蠕变)的差异对于更好地再现体内各向异性组织的结构和物理特性至关重要. 目前, 通过合理设计和工程方法已经开发了一系列构建各向异性复合水凝胶的方法, 包括静电纺丝、机械拉伸、定向冷冻、外加电场或磁场诱导等<sup>[15-19]</sup>. 例如: Steel 等<sup>[15]</sup>通过静电纺丝在透明质酸纳米纤维中开发了一种由超低浓度多壁碳纳米管组成的导电复合材料, 该取向的纳米纤维凝胶可以有效地传递电信号, 从而增强和加速神经元的再生行为. 然而, 沉积的纳米纤维之间的间距不受控制, 这极大地限制了水凝胶基质孔径和网络结构的可控性. 此外, Lin 等<sup>[20]</sup>通过机械拉伸方法开发了一系列几丁质/二维材料(二硫化钨和电石)的各向异性水凝胶, 仿生的各向异性纳米纤维表现出黏弹性, 可以有效促进细胞成骨分化和定向迁移. 然而, 在实际构建各向异性复合水凝胶的过程中, 机械拉伸策略显示出有限的成功, 因为它需要前体水凝胶足够强韧来承受聚合物分子和/或纳米填料对齐排列所需的大拉伸力. 因此, 有必要设计一种简单、通用和可扩展的协同策略来构建具有各向异性结构的复合水凝胶, 并对其不同方向上的流变行为进行研究. 此外, 考虑到复合水凝胶的各向异性结构设计对其应力松弛的影响机制尚不清晰, 急需解决复合水凝胶的各向异性结构在不同方向上如何影响动态力学性能和黏弹性特性这一关键问题, 这有望为组织工程中构建具有与天然 ECM 相媲美的力学微环境的仿生基质提供新的可能性.

基于此, 本工作提出一种定向冷冻和限域拉伸干燥再溶胀协同作用的方法构建具有各向异性结构的 PVA/CNF 复合水凝胶. 由于在平行和垂直于定向冷冻方向上, 各向异性复合水凝胶基质网

络结构的不同, 赋予其各向异性的动态力学性能. 此外, 复合水凝胶基质还表现出各向异性的黏弹性行为. 基于这些特性, 本工作进一步研究了该各向异性复合水凝胶的流变行为和应力松弛行为, 为组织工程中仿生 ECM 的设计及其对细胞生物行为的力学微环境影响提供了新的思路.

## 1 实验部分

### 1.1 原料

聚乙烯醇(PVA, 1799型, 醇解度98%~99%)、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧自由基(TEMPO, 醇度98%)、溴化钠(NaBr, 99%)、氢氧化钠(NaOH, 96%)购于上海阿拉丁试剂公司. 次氯酸钠(NaClO, 有效氯 $\geq 7.5\%$ )、无水乙醇购于上海泰坦科技股份有限公司. 纤维素棉绒购于山东高密银鹰化纤进出口有限公司.

### 1.2 纤维素纳米纤维(CNF)的制备

根据之前的研究<sup>[21,22]</sup>, 利用 TEMPO 介导纤维素棉绒氧化: (1)将纤维素棉绒(20 g)悬浮在含有 TEMPO (0.05 g)和 NaBr (0.50 g)的去离子水中(1500 mL)室温搅拌 3 h, 进一步超声 20 min 得到纤维素浆液; (2)将 9% NaClO 溶液(5 mmol/g 纤维素棉绒)缓慢加入纤维素浆液中并剧烈搅拌引发氧化; (3)在室温下, 通过添加 NaOH (0.50 mol/L)使混合溶液的 pH 保持在 10~10.50, 持续搅拌 4 h 后加入乙醇(20 mL)淬灭氧化; (4)将氧化后的产物用去离子水彻底清洗至中性, 并进行离心处理(10000 r/min, 8 min), 取沉淀, 得到氧化的纤维素.

CNF 分散液的制备: (1)室温下, 通过高速分散均质机将氧化的纤维素分散在去离子水中; (2)通过细胞破碎仪将分散液破碎(450 W, 20 min); (3)将上述分散液进行离心处理(5000 r/min, 20 min), 取上层清液, 得到 CNF 分散液, 并通过 45 °C 浓缩得到浓度为 1.50 g/mL 的 CNF 分散液.

### 1.3 PVA/CNF 各向异性复合水凝胶的制备

将 PVA 和 CNF 分散液溶解于去离子水中, 在 92 °C 的集热磁力搅拌浴中机械搅拌 1 h 使 PVA 完全溶解, 后将混合溶液放置在超声波清洗机中去除气泡. 然后, 将其置于 4 °C 冷藏室冷却至 5~10 °C, 并倒入自制的长方体亚克力模具中进行冰模板定向冷冻(directional freezing, 简称 DF). 其中, 装有前驱液的亚克力模具放置于 1/2 浸没

于液氮中的紫铜块上,并在整个定向冷冻过程中使液氮面保持于这一位置.随后,将整个反应装置置于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温恒湿箱内,待前驱液完全冻结后,将亚克力模具置于真空冷冻干燥机中至完全干燥.进一步,将干燥的凝胶浸泡在去离子水中至溶胀后,在室温下,用拉伸夹具沿与其定向冷冻平行的方向进行拉伸固定,并设置预拉伸应变为80%,待凝胶限域拉伸干燥至恒重后将其再次浸泡于去离子水中至溶胀平衡(confined drying and re-swelling,简称CDR).最后,用吸水纸擦除

水凝胶表面多余的水分即得到PVA/CNF-DF/CDR各向异性复合水凝胶,命名为PVA/CNF-DF/CDR水凝胶,并定义与定向冷冻平行的方向为 $\parallel$ ,与定向冷冻垂直的方向为 $\perp$ (图1).PVA的质量占最终混合溶液的质量分数分别为4 wt%, 5 wt%, 6 wt%, 8 wt%和10 wt%. CNF的质量占最终混合溶液的质量分数分别为0.6 wt%, 0.8 wt%, 1.0 wt%, 1.2 wt%和1.4 wt%.如无特殊说明,PVA的质量占最终混合溶液的质量分数为5 wt%,CNF的质量占最终混合溶液的质量分数为1 wt%.

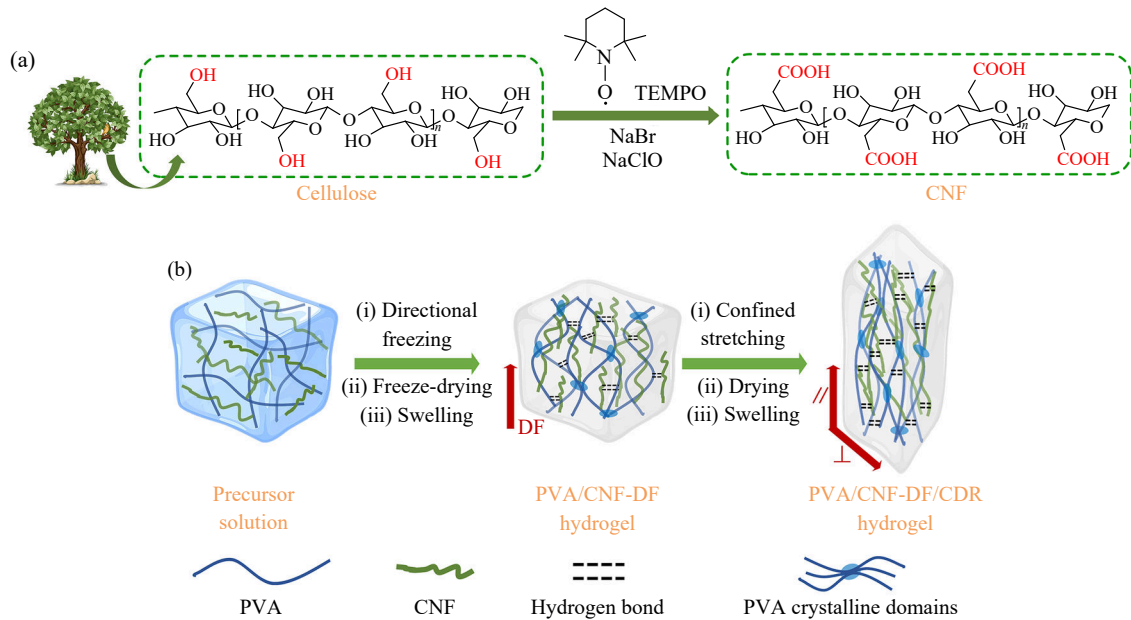


Fig. 1 (a) Schematic illustration of TEMPO-mediated oxidation of cellulose; (b) Designing strategy for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogel.

#### 1.4 结构表征

采用多功能冷冻原位分析系统(ZEISS GeminiSEM 360, 德国)对PVA/CNF-DF/CDR各向异性水凝胶进行扫描电子显微镜(SEM)观察.将水凝胶样品分别沿平行和垂直于定向冷冻的方向用液氮冷冻淬断,在真空冷冻干燥机(FD-1A-80)中冻干.测试前对样品进行喷金处理以提高导电性.

将稀释后的CNF分散液用滴管滴在微栅网上,待其干燥后,用场发射透射电子显微镜(FETEM, JEM-F200, JEOL)观察CNF形貌.

将冻干的样品进行溴化钾压片,采用傅里叶红外光谱仪(FTIR, Bruker INVENIO-S, 德国)对纤维棉绒、CNF和PVA/CNF-DF/CDR各向异性水凝胶进行表征.扫描范围为 $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ .

#### 1.5 流变测试

采用应变旋转流变仪(TA Instruments, ARES-G2, 美国)和配套的Peltier控温装置对PVA/CNF-DF/CDR各向异性水凝胶的流变行为进行测试分析.直径为15 mm,厚度为1 mm的圆柱形水凝胶样品被放置于上下平板之间.采用平行板模式,测试温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,动态频率扫描的频率范围设置为 $0.1\sim 100\text{ rad/s}$ ,恒定应变为0.5%;动态应变扫描的应变范围设置为 $0.1\%\sim 1000\%$ ,恒定频率为1 Hz.动态温度扫描的温度范围设置为 $20\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,恒定频率为1 Hz,升温速率为 $1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ .应力松弛试验的测试温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,恒定剪切应变为5%,测试时间为1000 s.为对不同的应力状态有统一的描述,每组实验的松弛模量由该组的初始松弛模量( $t=0$ 时的松弛模量值)进行归一化

处理得到归一化松弛模量曲线. 为确保测试结果的准确性, 每个样品至少测试3次以得到流变曲线.

## 2 结果与讨论

### 2.1 PVA/CNF 复合水凝胶的制备及表征

受骨骼肌各向异性结构和强韧化机制的启发, 提出了通过定向冷冻和限域拉伸干燥再溶胀协同策略制备具有各向异性结构的PVA/CNF复合水凝胶(PVA/CNF-DF/CDR水凝胶)及改善其流变特性的方法. 首先, 利用冰模板产生的温度梯度, 实现了单向冰晶的成核和有序生长, 将PVA和CNF局限在冰晶之间的间隙; 接着, 通过冷冻干燥和水溶胀的过程, 聚合物链在氢键相互作用下形成了沿定向冷冻方向排列的有序结构; 然后, 在初步取向的复合水凝胶上施加一定的预拉伸应变并进行干燥, 使PVA和CNF沿着拉伸方向整齐排列, 形成各向异性的纤维结构; 最后, 在重新溶胀的水凝胶中保留了各向异性的层次结构. 一方面, 以NaBr和NaClO分别作为催化剂和初级氧化剂, 通过TEMPO介导选择性地将纤维素棉绒表面的伯羟基氧化为羧酸基(图1(a)), 再通过高速搅拌破碎得到CNF分散液. 另一方面, 在定向冷冻过程中, 冰晶沿温度梯度方向成核生长导致聚合物相从水溶液中分离被排挤在冰晶两侧, 基于CNF与PVA之间强的氢键相互作用以及PVA链间形成的结晶域, 聚合物链沿定向冷冻方向聚集缠结形成了取向排列结构(图1(b)). 随后, 在平行于定向冷冻的方向, 通过限制水凝胶的拉伸长度进行干燥和再溶胀处理, 获得了类似骨骼肌的定向纤维结构(图1(b)). 基于PVA链和CNF间存在的氢键相互作用以及拓扑缠结<sup>[23-25]</sup>, 限域拉伸干燥再溶胀的后处理策略将CNF纳米填料在水凝胶网络中的强化效果提高到了一个新的水平. 定向冷冻和限域拉伸干燥再溶胀的协同作用使PVA/CNF复合水凝胶基质在平行方向上具有明显的取向排列结构, 从而增强了水凝胶在这一方向上的流变特性, 赋予其各向异性.

为了证明纤维素被氧化和PVA/CNF-DF/CDR水凝胶的成功制备, 采用FTIR光谱仪对所制备复合凝胶的化学结构进行表征. 如图2所示, CNF的FTIR光谱图在 $1639\text{ cm}^{-1}$ 处出现新的红外特征峰, 其归属于羧酸基中羰基的C=O伸缩振

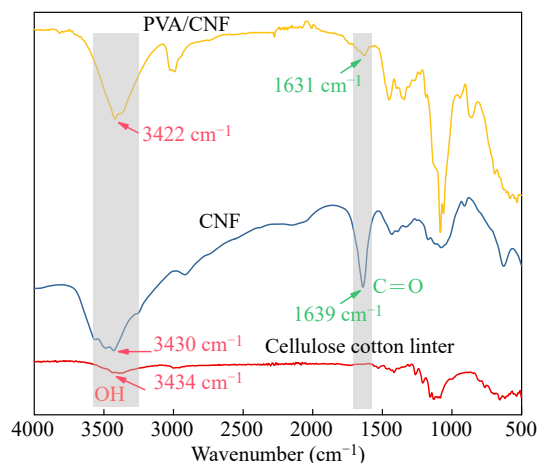


Fig. 2 FTIR spectra of cellulose cotton linter, CNF, and the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogel.

动峰, 表明纤维素棉绒被成功氧化. 羰基峰从CNF中的 $1639\text{ cm}^{-1}$ 移动到PVA/CNF-DF/CDR水凝胶中的 $1631\text{ cm}^{-1}$ , 以及羟基峰从CNF中的 $3430\text{ cm}^{-1}$ 移动到PVA/CNF-DF/CDR水凝胶中的 $3422\text{ cm}^{-1}$ 处, 表明在水凝胶的形成过程中CNF上丰富的含氧官能团和PVA链上的羟基通过分子间氢键相互作用形成了物理交联<sup>[26,27]</sup>, 复合水凝胶基质中存在较强的氢键相互作用.

### 2.2 PVA/CNF 复合水凝胶的微观形貌

如图3所示, 采用透射电子显微镜(TEM)观察了CNF的微观形貌. CNF的直径为 $(83.07 \pm 23.60)\text{ nm}$ , 长度为几十到几百微米. 纳米纤维能够在聚合物网络中发生缠结而构建致密的网络结构, 高纵横比有利于其在外力作用下取向形成定向排列结构.

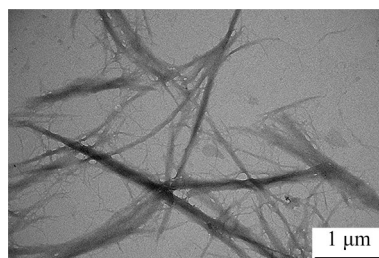
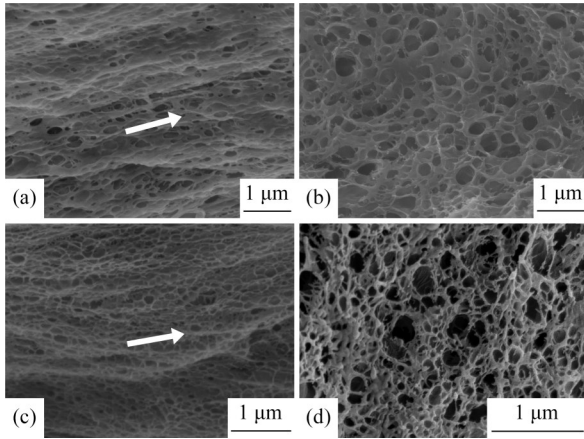


Fig. 3 TEM image of CNF.

采用扫描电子显微镜(SEM)研究了不同CNF含量对PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质微观形貌的影响(图4). 复合水凝胶的纵截面(即平行于定向冷冻方向的截面)形貌为取向排列的纳米纤维结构(图4(a)和4(c)), 且取向排列方向平行于水凝胶定向冷冻的方向; 横截面(即垂直于定向冷



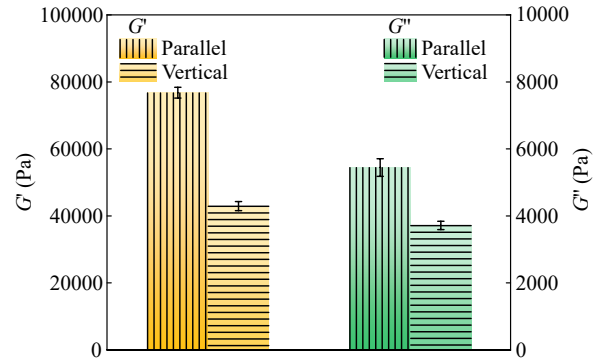
**Fig. 4** SEM images of the longitudinal sectional view (a) and the cross-sectional view (b) of the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogel with 5 wt% PVA and 0.6 wt% CNF; SEM images of the longitudinal sectional view (c) and the cross-sectional view (d) of the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogel with 5 wt% PVA and 1 wt% CNF. The red arrows were the oriented alignment of the hydrogels.

冻方向的截面)形貌为相互连接的三维纳米网状多孔结构(图4(b)和4(d)). 相比之下, CNF含量为1 wt%所制备的PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质的网络结构更加致密, 取向排列的纳米纤维之间可以明显观察到桥接纤维的连接和交织(图4(c)). 这是由于复合水凝胶在限制拉伸长度进行干燥的过程中, CNF和PVA链均沿拉伸方向取向, 链间氢键发生断裂和重塑, 随着CNF含量的增加, 氢键形成的数量增加, 桥接纤维的连接增强, 从而实现了复合水凝胶的强化. 横截面的网状多孔结构也随着CNF含量的增加变得更为致密, 孔径由 $(275.31 \pm 51.41)$  nm (图4(b))减小为 $(191.11 \pm 31.70)$  nm (图4(d)). 致密的网状结构也解释了PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质具有更好的流变行为.

### 2.3 PVA/CNF复合水凝胶的流变行为

#### 2.3.1 PVA/CNF复合水凝胶的各向异性动态模量

复合水凝胶的各向异性微观结构可导致各向异性流变行为. 图5为PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质在平行和垂直于定向冷冻方向上的储能模量( $G'$ )与损耗模量( $G''$ ). 在1 Hz时, 复合水凝胶的 $G'_{//}$ 和 $G'_{\perp}$ 分别为 $(76.77 \pm 1.61)$  kPa和 $(42.93 \pm 1.34)$  kPa;  $G''_{//}$ 和 $G''_{\perp}$ 分别为 $(5.44 \pm 0.26)$  kPa和 $(3.71 \pm 0.13)$  kPa. 为了量化复合水凝胶的流变各向异性特性, 定义平行方向( $//$ )测量的动态模量与垂直方向( $\perp$ )测量的动态模量的比值为各向异性比值.  $G'$ 和 $G''$ 的各

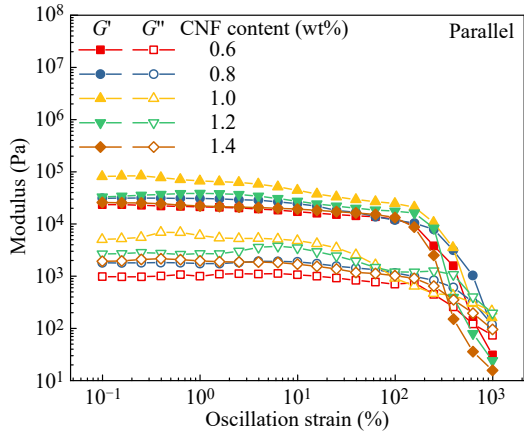


**Fig. 5** Storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) of the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel ( $//$ ) and vertical ( $\perp$ ) to the direction of directional freezing at 1 Hz.

向异性比值为1.79和1.47, 这是由于在平行方向上取向的聚合物链间形成致密的纤维结构, 氢键相互作用增强; 然而, 垂直方向上的网状多孔结构, 使得动态模量较低. 各向异性的水凝胶基质可以在多个方向上为细胞提供不同的力学微环境, 从而对细胞行为产生影响.

#### 2.3.2 CNF含量对PVA/CNF复合水凝胶动态模量的影响

为了定量分析CNF含量对PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质动态黏弹性力学行为的影响, 图6显示了复合水凝胶在平行于定向冷冻方向上, 振动频率为1 Hz时 $G'$ 与 $G''$ 随CNF含量变化的振幅扫描曲线. 在此测试中, 对复合水凝胶施加正弦变化的应变, 并记录响应应力数据. 同相响应反映了由于弹性变形而储存在复合水凝胶中的能量, 称为弹性或储能模量( $G'$ ), 而失谐响应反映了在测试过程中以热形式损失的能量, 称为黏性或损耗模量( $G''$ ). 从图6中可以观察到在低应变区,  $G'$ 与 $G''$ 较为稳定, 这一范围为复合水凝胶的线性黏弹区, 水凝胶内部网络结构完整且稳定, 施加于网络结构上的形变是可逆的. 在线性黏弹区,  $G''$ 明显小于 $G'$ , 表明复合水凝胶处于类固体状态, 网络结构稳定存在. 随着剪切应变逐渐增大,  $G''$ 与 $G'$ 相交, 出现了凝胶转变点, 此后复合水凝胶产生流动行为, 表明复合水凝胶内部网络结构遭到破坏, 产生的形变是不可回复的. 当CNF含量从0.6 wt%增加到1.0 wt%时, 低应变区 $G'$ 与 $G''$ 明显增大; 但当CNF含量从1.0 wt%继续增加到1.4 wt%时, 低应变区 $G'$ 与 $G''$ 逐渐减小. 这是由于适量纳米填料的掺杂可以有效地改善复合水凝胶的动态力学性能<sup>[16,28,29]</sup>, 但过量的纳米

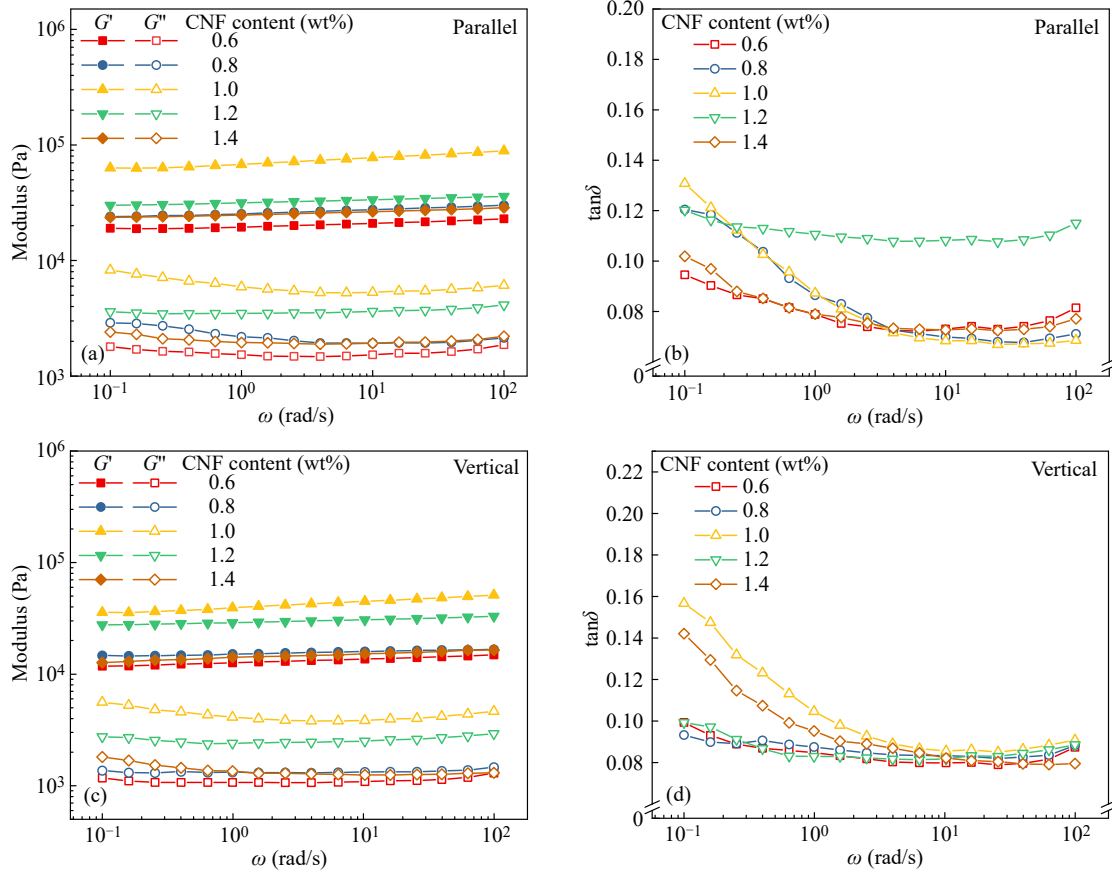


**Fig. 6** Storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) at 1 Hz as a function of strain for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel (//) to the direction of directional freezing with varying contents of CNF (0.6 wt%, 0.8 wt%, 1.0 wt%, 1.2 wt%, and 1.4 wt%, respectively).

填料会出现聚集缠结的现象反而不利于其动态模量的提高.

图7为不同CNF含量所制备的PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质的频率扫描曲线, 在扫描的角

频率范围(0.1~100 rad/s)内, 复合水凝胶的 $G'_{//}$ 和 $G'_{\perp}$ 随频率的增加而增大, 特别是当CNF含量为1.0 wt%时, 复合水凝胶的 $G'$ 表现出明显的频率依赖性(图7(a)和7(c)), 且 $G''$ 始终远小于 $G'$ , 损耗因子 $\tan\delta_{//}(G''_{//}/G'_{//})$ 和 $\tan\delta_{\perp}(G''_{\perp}/G'_{\perp})$ 始终 $<1$ (图7(b)和7(d)), 即在0.5%的恒定剪切应变下, 复合水凝胶在剪切外力的作用下, 其黏弹性基本不发生变化, 弹性特性处于主导地位<sup>[29-31]</sup>, 这说明复合水凝胶内部分子链间相互作用较强形成了具有良好稳定性的三维网络结构. 从图7(a)和7(c)中可以看出, PVA/CNF复合水凝胶在平行和垂直方向上的 $G'$ 与 $G''$ 随CNF含量的增加均呈现出先增大而后减小的趋势, 当CNF含量为1.0 wt%时, 复合水凝胶的 $G'$ 与 $G''$ 达到最大值(在1 Hz时,  $G'_{//}=75.62$  kPa和 $G''_{//}=5.26$  kPa,  $G'_{\perp}=43.88$  kPa和 $G''_{\perp}=3.80$  kPa), 且呈现出明显的各向异性. 当CNF含量从0.6 wt%增加到1.0 wt%时,  $G'_{//}$ 和 $G''_{//}$ 分别增加3.66和3.52倍;  $G'_{\perp}$ 和 $G''_{\perp}$ 分别增加3.26和3.54倍. 当CNF含量从1.0 wt%增

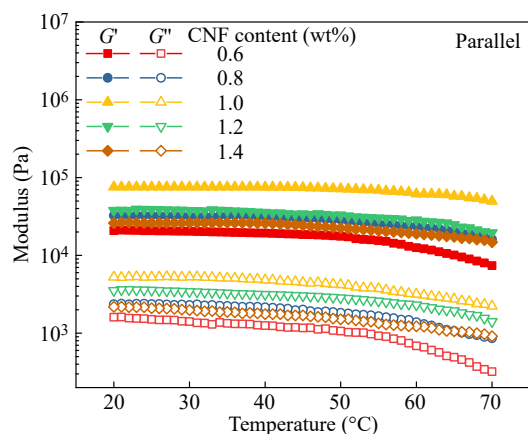


**Fig. 7** Storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), and loss coefficient ( $\tan\delta$ ) at shear strain of 0.5% as a function of frequency for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel (//) (a, b) and vertical ( $\perp$ ) (c, d) to the direction of directional freezing with varying contents of CNF (0.6 wt%, 0.8 wt%, 1.0 wt%, 1.2 wt%, and 1.4 wt%, respectively).

加到 1.4 wt% 时,  $G'$  和  $G''$  均呈下降趋势.

损耗因子( $\tan\delta$ )是描述复合材料在应力作用下能量损失程度的重要参数, 被定义为损耗模量( $G''$ )和储能模量( $G'$ )的比值, 通常用来评估材料的黏弹性质. 图 7(b) 和 7(d) 给出了不同 CNF 含量的 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶基质的损耗因子  $\tan\delta$  随测试频率的变化曲线. 可以看出, 复合水凝胶的  $\tan\delta$  随着测试频率的增加而减小, 说明 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶的强度随频率的增加而增大, 这可以有效保护复合水凝胶在高频条件下承载而不受损伤. 在低频区(0.1~4 rad/s), 复合水凝胶的  $\tan\delta_{//}$  随着 CNF 含量的增加先增大后减小, 在平行方向上, 大量的 CNF 同 PVA 分子链相互作用导致分子间摩擦增加, 限制了聚合物的分子链段运动<sup>[32,33]</sup>. 随着 CNF 含量从 0.6 wt% 到 1.0 wt%,  $\tan\delta_{\perp}$  逐渐增大, 而当 CNF 含量从 1.0 wt% 继续增加到 1.4 wt% 时,  $\tan\delta_{\perp}$  先减小后再度增加. 不同 CNF 含量的复合水凝胶表现出不同的黏弹性特性.

图 8 为不同 CNF 含量所制备的 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶基质的动态模量随温度变化的曲线. 在 20~40 °C 的扫描温度范围内, 复合水凝胶的  $G'$  和  $G''$  随温度变化幅度较小, 说明在这一阶段, 复合水凝胶内部的网络结构较为稳定, 未发生破坏. 随着温度从 40 °C 继续升高至 70 °C, 复合水凝胶的  $G'$  和  $G''$  明显下降, 表明其网络结构出现破坏, 这主要是由于各向异性复合水凝胶网络内部的氢键在高温下首先被破坏, 随着温度的持续

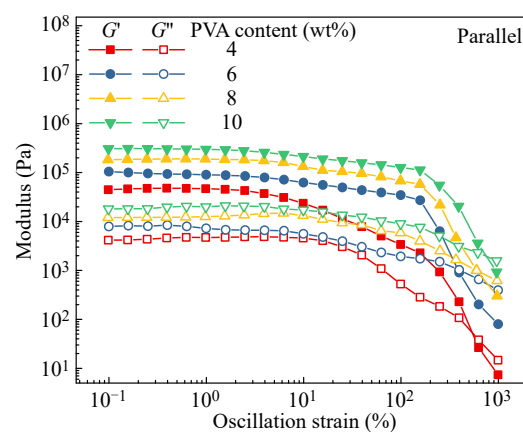


**Fig. 8** Storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) at 1 Hz as a function of temperature for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel (//) to the direction of directional freezing with varying contents of CNF (0.6 wt%, 0.8 wt%, 1.0 wt%, 1.2 wt%, and 1.4 wt%, respectively).

升高, 聚合物链之间的结晶域也出现破坏, 导致动态模量的大幅度降低. 随着 CNF 含量的增加,  $G'$  和  $G''$  呈现先增大后减小的趋势. CNF 含量为 0.6 wt% 时, 复合水凝胶的  $G'$  和  $G''$  随温度的升高呈现明显的下降趋势. 随着 CNF 含量的不断增加, 复合水凝胶的  $G'$  和  $G''$  均随温度升高表现出缓慢下降趋势, 说明 CNF 的掺杂使网络结构更加致密, 网络内部氢键相互作用增强, 在剪切过程中聚合物分子链段运动减慢, 这与 SEM 观察到的各向异性复合水凝胶基质的形貌结构相统一.

### 2.3.3 PVA 含量对 PVA/CNF 复合水凝胶动态模量的影响

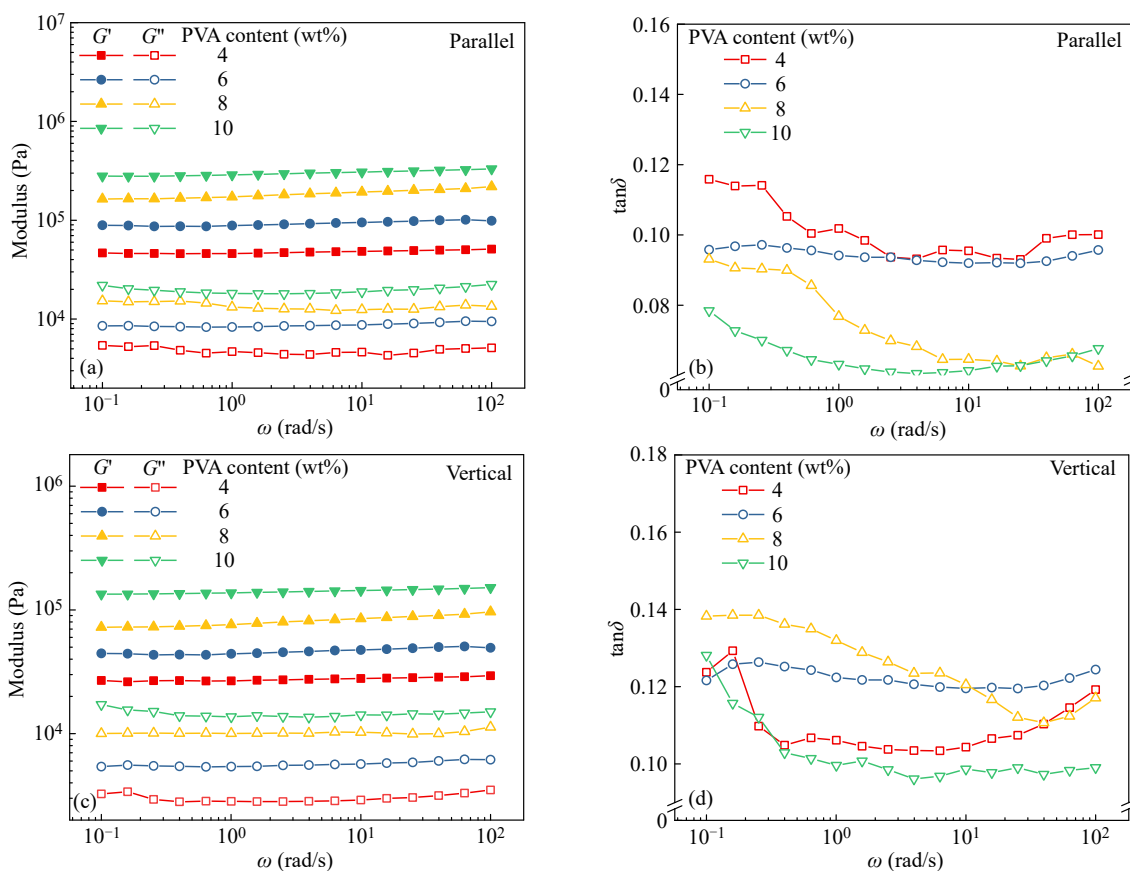
为了进一步研究 PVA 含量对 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶基质流变行为的影响, 图 9 测试了不同 PVA 含量所制备的 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶的动态模量随应变的变化曲线. 在平行于定向冷冻方向上, 1 Hz 时复合水凝胶的  $G'$  在低应变区(0.1%~2.5%)不随应变而变化, 表明低应变下聚合物链有足够的时间进行重排和重组使复合水凝胶的网络结构稳定存在. 同时,  $G'$  明显大于  $G''$ , 复合水凝胶表现为类固态性质. 随着 PVA 含量从 4 wt% 增加到 10 wt%, 低应变区  $G'$  和  $G''$  逐渐增大, 这是由于 PVA 含量的增加使复合水凝胶中 PVA 链缠结增强进而形成更多结晶域, 限制了聚合物分子链的运动, 导致其动态模量的增加. 此外, 随着剪切应变的不断增大,  $G'$  快速减小并最终小于  $G''$ , 复合水凝胶基质产生不可回复变形, 内部网络结构发生破坏.



**Fig. 9** Storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) at 1 Hz as a function of strain for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel (//) to the direction of directional freezing with varying contents of PVA (4 wt%, 6 wt%, 8 wt%, and 10 wt%, respectively).

图10为CNF含量为1 wt%, PVA含量分别为4 wt%、6 wt%、8 wt%和10 wt%所制备的4种PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质的 $G'$ 和 $G''$ 随频率的变化曲线. 由图可知, 在扫描范围(0.1~100 rad/s)内, 复合水凝胶在平行和垂直方向上的 $G'$ 和 $G''$ 均随测试频率的增加基本保持不变(图10(a)和10(c)), 同时,  $G''$ 远小于 $G'$ . 随着PVA含量不断增大到10 wt%时, 复合水凝胶的 $G'$ 和 $G''$ 达到最大值(在1 Hz时,  $G'_{//}=303.72$  kPa,  $G''_{//}=18.47$  kPa和 $G'_{\perp}=142.30$  kPa,  $G''_{\perp}=13.78$  kPa), 且 $G'$ 和 $G''$ 的各向异性比值分别为2.13和1.34, 在平行方向上, 聚合物链沿预拉伸方向取向聚集形成紧密排列的纳米纤维束, 具有明显优于垂直方向的动态模量,

表现出各向异性的流变行为. PVA含量的增加使复合水凝胶基质中聚合物链之间的交联结构更加致密, 分子链段运动受到限制, 从而使得复合水凝胶基质呈现出较高的动态模量. 此外, 由图10(b)可知, PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质的 $\tan\delta_{//}$ 随PVA含量的增加而减小, 这可能因为复合水凝胶是由弹性特性的CNF, 黏弹性特性的PVA, 和纯黏性的自由水组成, 随着PVA含量的增加而导致水含量的下降, 从而引起 $\tan\delta$ 的减小<sup>[34]</sup>. 同时,  $\tan\delta_{//}$ 和 $\tan\delta_{\perp}$ 均随着测试频率的增加而呈现出先减小后增大的趋势(图10(b)和10(d)).

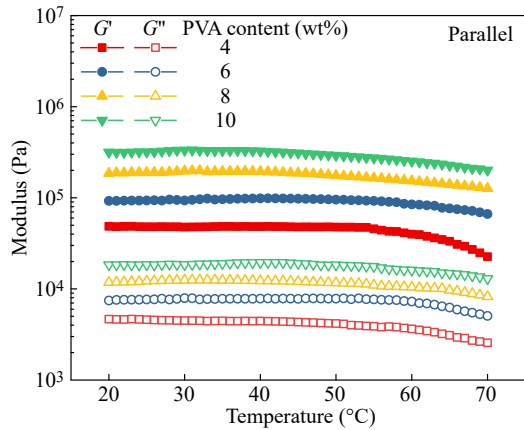


**Fig. 10** Storage modulus ( $G'$ ), loss modulus ( $G''$ ), and loss coefficient ( $\tan\delta$ ) at shear strain of 0.5% as a function of frequency for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel ( $//$ ) (a, b) and vertical ( $\perp$ ) (c, d) to the direction of directional freezing with varying contents of PVA (4 wt%, 6 wt%, 8 wt%, and 10 wt%, respectively).

图11为不同PVA含量所制备的PVA/CNF-DF/CDR水凝胶基质的温度扫描曲线. 随着温度的升高, 复合水凝胶的 $G'$ 和 $G''$ 逐渐减小, 说明高温会破坏凝胶网络中氢键相互作用和聚合物链间的微晶结构, 导致分子热运动和相互滑动增

加, 网络结构逐渐松弛, 从而导致 $G'$ 减小, 同时降低了复合水凝胶的能量损耗.  $G'$ 和 $G''$ 随PVA含量的增加而增大, 且在温度不断升高时,  $G'$ 和 $G''$ 下降趋势变小, 说明较高的PVA含量使复合水凝胶基质中聚合物链聚集形成更多的微晶结





**Fig. 11** Storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) at 1 Hz as a function of temperature for the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel (//) to the direction of directional freezing with varying contents of PVA (4 wt%, 6 wt%, 8 wt%, and 10 wt%, respectively).

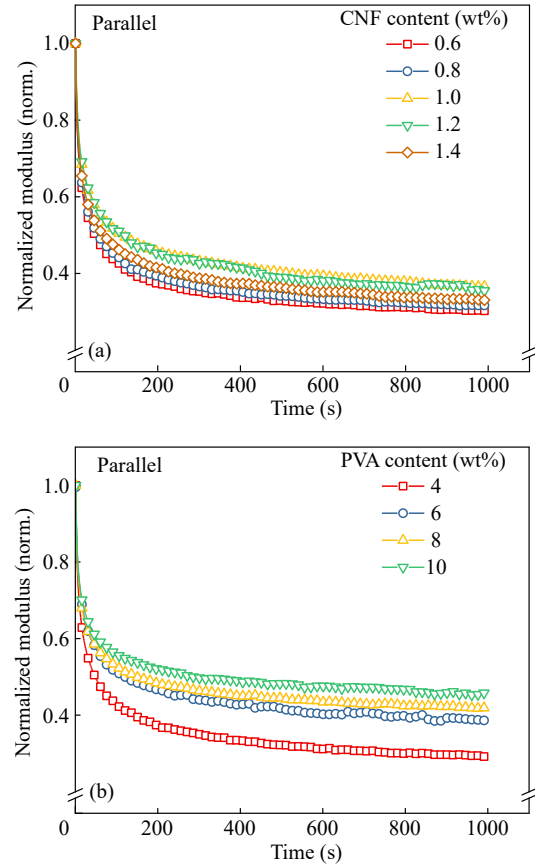
构，相互作用增强。

#### 2.4 PVA/CNF 复合水凝胶的应力松弛

应力松弛是表征复合水凝胶黏弹性特性的常用方法，黏弹性水凝胶基质通常表现出弹性固体和粘性液体的结合特性，表现出随时间变化的力学响应。应力松弛是应力  $\sigma(t)$  的度量，是复合水凝胶在受到恒定应变 ( $\varepsilon_0$ ) 加载后，随着时间 ( $t$ ) 的推移应力逐渐减小的现象。其中，松弛模量  $G(t)$  是描述复合水凝胶应力松弛行为的一个重要参数，具有时间依赖性，可以反映复合水凝胶随时间应力逐渐减小的能力，以及复合水凝胶内部结构和分子运动的变化动态，可以用如下数学关系表达：

$$G(t) = \sigma(t) / \varepsilon_0 \quad (1)$$

图 12(a) 为不同 CNF 含量的 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶基质的归一化松弛模量随时间的变化规律。由图可知，复合水凝胶的应力松弛可大致分为初始 (0~100 s) 的快速松弛阶段，后期 (100~1000 s) 的慢速松弛阶段，以及最终达到松弛平衡的状态。在相同时间下，复合水凝胶的松弛模量随 CNF 含量的增加呈现先增大后减小的变化趋势。当 CNF 含量从 0.6 wt% 增加至 1 wt% 时，平衡后的归一化松弛模量从 0.30 增至 0.37；随着 CNF 含量继续增加至 1.4 wt% 时，归一化松弛模量降低为 0.33，表明复合水凝胶中 CNF 含量的增加会使其消散冲击载荷的能力先增强后减弱。这是由于 CNF 和 PVA 链之间的相互作用和桥接结构的形成可以有效地消散应力，提高复合水



**Fig. 12** Normalized stress relaxation tests of the PVA/CNF-DF/CDR composite hydrogels in parallel (//) to the direction of directional freezing with 5 wt% PVA content and varying contents of CNF (0.6 wt%, 0.8 wt%, 1.0 wt%, 1.2 wt%, and 1.4 wt%, respectively) (a) and with 1 wt% CNF content and varying contents of PVA (4 wt%, 6 wt%, 8 wt%, and 10 wt%, respectively) (b).

凝胶的归一化松弛模量；而过量的 CNF 会出现聚集缠结现象引起应力集中反而不利于复合水凝胶承载。

图 12(b) 为不同 PVA 含量的 PVA/CNF-DF/CDR 水凝胶基质的归一化松弛模量随时间的变化规律。由图可知，随着 PVA 含量从 4 wt% 增加至 10 wt% 时，复合水凝胶的平衡归一化松弛模量从 0.29 逐渐增大至 0.46，这是由于复合水凝胶内部网络结构变化所引起的。随着 PVA 含量的增加，复合水凝胶内部氢键密度增大，PVA 分子链聚集形成的结晶域数量增多，使网络结构更加致密，在宏观上表现为更慢的松弛速率和更大的松弛模量。此外，在松弛初始阶段，复合水凝胶因内部网络变形和间隙水的挤出产生很大的应力，分子链的键长和键角发生变化而产生瞬时弹性形变，导致归一化松弛模量在初始阶段快速下

降. 随着时间的推移, 松弛时间较长的分子链段的相互运动产生较大的摩擦力, 运动减慢. 同时, 聚合物网络中的间隙水逐渐重新分配, 分子结构逐渐重新排列, 分子间相互作用逐渐重新建立, 导致后期复合水凝胶应力松弛速率减缓, 直至达到松弛平衡.

### 3 结论

本工作提出了一种定向冷冻和限域拉伸干燥再溶胀协同作用的策略, 构筑了具有高度各向异性结构的PVA/CNF复合水凝胶仿生细胞外基质. 利用定向冷冻过程中冰晶的成核和取向生长促使PVA链和CNF在氢键相互作用下沿温度梯度聚集生长, 随后在平行于定向冷冻的方向上施加预拉伸应变对PVA链和CNF进行取向, 通过分子间氢键作用在取向排列的纤维束间形成纳米桥接纤维以固定有序排列结构, 实现对各向异性复合

水凝胶基质的设计并赋予其高模量和各向异性. 复合水凝胶基质中CNF和PVA含量的不同会直接影响网络结构的致密性和聚合物链的取向度, 从而对其流变行为和应力松弛行为产生影响. CNF含量为1 wt%和PVA含量为10 wt%的各向异性复合水凝胶基质在平行方向上的储能模量、损耗模量和归一化应力松弛模量最大, 分别为303.72 kPa, 18.47 kPa和0.46, 且其储能模量和损耗模量的各向异性比值( $G_{//}/G_{\perp}$ )分别为2.13和1.34. 复合水凝胶基质中CNF和PVA含量的增加均会影响其网络结构的致密性和分子间相互作用, 进而对其动态模量产生相应影响. 本工作为研究各向异性复合水凝胶基质在不同方向上的流变行为和应力松弛行为的影响机制提供了理论支持, 可为支撑各向异性复合水凝胶在组织工程中作为细胞外基质的可行性提供合理的依据.

### REFERENCES

- 1 Nancy, K.; Sina, K.; Eugenia, K. Structurally anisotropic hydrogels for tissue engineering. *Trends Chem.*, **2021**, 3(12), 1002–1026.
- 2 Lou, J. Z.; Mooney, D. J. Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture. *Nat. Rev. Chem.*, **2022**, 6(10), 726–744.
- 3 Li, J. W.; Chen, G. J.; Xu, X. Q.; Abdou, P.; Jiang, Q.; Shi, D. Q.; Gu, Z. Advances of injectable hydrogel-based scaffolds for cartilage regeneration. *Regen. Biomater.*, **2019**, 6(3), 129–140.
- 4 Ma, Y. F.; Han, T.; Yang, Q. X.; Wang, J.; Feng, B. C.; Jia, Y. B.; Wei, Z.; Xu, F. Viscoelastic cell microenvironment: Hydrogel-based strategy for recapitulating dynamic ECM mechanics. *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, 31(24), 2100848.
- 5 Wang, Y. Q.; Zhang, X. H.; Wang, J. H.; Fan, Y. B. Viscoelastic modeling of the stress relaxation behavior for the bionic extracellular matrix polymer scaffold. *Med. Nov. Technol. Devices*, **2022**, 16, 100181.
- 6 Hang, J. T.; Xu, G. K.; Gao, H. J. Frequency-dependent transition in power-law rheological behavior of living cells. *Sci. Adv.*, **2022**, 8(18), eabn6093.
- 7 Zuidema, J. M.; Rivet, C. J.; Gilbert, R. J.; Morrison, F. A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **2014**, 102(5), 1063–1073.
- 8 Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P. A.; Mooney, D. J.; Shenoy, V. B. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature*, **2020**, 584(7822), 535–546.
- 9 Park, J. S.; Burckhardt, C. J.; Lazcano, R.; Solis, L. M.; Isogai, T.; Li, L. Q.; Chen, C. S.; Gao, B. N.; Minna, J. D.; Bachoo, R.; DeBerardinis, R. J.; Danuser, G. Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture. *Nature*, **2020**, 578(7796), 621–626.
- 10 Zhou, Z. P.; Deng, T.; Tao, M. X.; Lin, L. S.; Sun, L. Y.; Song, X. M.; Gao, D. X.; Li, J. X.; Wang, Z. J.; Wang, X. Z.; Li, J. P.; Jiang, Z. X.; Luo, L.; Yang, L.; Wu, M. Y. Snail-inspired FAG/GelMA hydrogel accelerates diabetic wound healing via inflammatory cytokines suppression and macrophage polarization. *Biomaterials*, **2023**, 299(8), 122141.
- 11 Fu, M.; Sun, Z. X.; Liu, X. B.; Huang, Z. K.; Luan, G. F.; Chen, Y. T.; Peng, J. P.; Yue, K. Highly stretchable, resilient, adhesive, and self-healing ionic hydrogels for thermoelectric application. *Adv. Funct. Mater.*, **2023**, 33(43), 2306086.
- 12 Arno, M. C.; Inam, M.; Weems, A. C.; Li, Z. H.; Binch, A. L. A.; Platt, C. I.; Richardson, S. M.; Hoyland, J. A.; Dove, A. P.; O'Reilly, R. K. Exploiting the role of nanoparticle shape in enhancing hydrogel adhesive and mechanical properties. *Nat. Commun.*, **2020**, 11(1), 1420.
- 13 刘水莲, 周洋, 陈福花, 朱寿进, 宿烽, 李速明. 新型羧甲基壳聚糖水凝胶流变性能, 药物释放及细胞相容性研究. *化学学报*, **2015**, 73(1), 47–52.

- 14 Goncharuk, V. V.; Dubrovina, L. V. Rheological properties and water-retaining power of agar hydrogels with carboxymethyl cellulose. *Russ. J. Appl. Chem.*, **2020**, 93(7), 1019–1026.
- 15 Steel, E. M.; Azar, J. Y.; Sundararaghavan, H. G. Electrospun hyaluronic acid-carbon nanotube nanofibers for neural engineering. *Materialia*, **2020**, 9, 100581.
- 16 Zhang, X. H.; Lang, B.; Yu, W. W.; Jia, L.; Zhu, F. B.; Xue, Y. R.; Wu, X. G.; Qin, Y. X.; Chen, W. Y.; Wang, Y. Q.; Zheng, Q. Magnetically induced anisotropic conductive hydrogels for multidimensional strain sensing and magnetothermal physiotherapy. *Chem. Eng. J.*, **2023**, 474, 145832.
- 17 Dong, X. Y.; Guo, X.; Liu, Q. Y.; Zhao, Y. J.; Qi, H. B.; Zhai, W. Strong and tough conductive organo-hydrogels via freeze-casting assisted solution substitution. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(31), 2203610.
- 18 Zhang, X. H.; Wang, Y. Q.; Wu, X. G.; Zhu, F. B.; Qin, Y. X.; Chen, W. Y.; Zheng, Q. A universal post-treatment strategy for biomimetic composite hydrogel with anisotropic topological structure and wide range of adjustable mechanical properties. *Biomater. Adv.*, **2022**, 133, 112654.
- 19 Zhu, Q. L.; Dai, C. F.; Wagner, D.; Daab, M.; Hong, W.; Breu, J.; Zheng, Q.; Wu, Z. L. Distributed electric field induces orientations of nanosheets to prepare hydrogels with elaborate ordered structures and programmed deformations. *Adv. Mater.*, **2020**, 32(47), 2005567.
- 20 Lin, X. H.; Xing, X.; Li, S. S.; Wu, X. Y.; Jia, Q. Q.; Tu, H.; Bian, H. L.; Lu, A.; Zhang, L. N.; Yang, H. Y.; Duan, B. Anisotropic hybrid hydrogels constructed via the noncovalent assembly for biomimetic tissue scaffold. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32(21), 2112685.
- 21 Zheng, C. X.; Lu, K. Y.; Lu, Y.; Zhu, S. L.; Yue, Y. Y.; Xu, X. W.; Mei, C. T.; Xiao, H. N.; Wu, Q. L.; Han, J. Q. A stretchable, self-healing conductive hydrogels based on nanocellulose supported graphene towards wearable monitoring of human motion. *Carbohydr. Polym.*, **2020**, 250, 116905.
- 22 Pan, Z. Z.; Nishihara, H.; Iwamura, S.; Sekiguchi, T.; Sato, A.; Isogai, A.; Kang, F. Y.; Kyotani, T.; Yang, Q. H. Cellulose nanofiber as a distinct structure-directing agent for xylem-like microhoneycomb monoliths by unidirectional freeze-drying. *ACS Nano*, **2016**, 10(12), 10689–10697.
- 23 Choi, Y.; Cho, D. H.; Kim, S.; Kim, H. J.; Park, T. J.; Kim, K. B.; Park, Y. M. Synergistic enhancement of hydrogel adhesion via tough chemical bonding and physical entanglements. *Polym. Test.*, **2022**, 107, 107482.
- 24 Lopes da Silva José, A. Thermorheological complex behaviour of maltosyl-chitosan derivatives in aqueous solution. *React. Funct. Polym.*, **2012**, 72(9), 657–666.
- 25 梁子毅, 黄鸿键, 倪鹏, 徐仁凤, 王正朝, 刘海清. 贻贝黏附蛋白启发的甲壳素纳米晶须增强湿态黏附水凝胶的研究. *高分子学报*, **2023**, 54(3), 365–380.
- 26 Yan, M. Z.; Cai, J. Q.; Fang, Z. Q.; Wang, H.; Qiu, X. Q.; Liu, W. F. Anisotropic muscle-like conductive composite hydrogel reinforced by lignin and cellulose nanofibrils. *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2022**, 10(39), 12993–13003.
- 27 Shi, Y.; Xiong, D.; Li, J.; Wang, N. *In situ* reduction of graphene oxide nanosheets in poly(vinyl alcohol) hydrogel by  $\gamma$ -ray irradiation and its influence on mechanical and tribological properties. *J. Phys. Chem. C*, **2016**, 120(34), 19442–19453.
- 28 Liu, K. Z.; Han, L.; Tang, P. F.; Yang, K. M.; Gan, D. L.; Wang, X.; Wang, K. F.; Ren, F. Z.; Fang, L. M.; Xu, Y. G.; Lu, Z. F.; Lu, X. An anisotropic hydrogel based on mussel-inspired conductive ferrofluid composed of electromagnetic nanohybrids. *Nano Lett.*, **2019**, 19(12), 8343–8356.
- 29 Ma, Y. Z.; Ma, A. J.; Luo, T.; Xiao, S. Y.; Zhou, H. W. Fabrication of anisotropic nanocomposite hydrogels by magnetic field-induced orientation for mimicking cardiac tissue. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2023**, 140(1), e53248.
- 30 秦晶晶, 刘丹, 高翔, 宁晓辉, 鲍琳, 李延. 瓜尔豆胶清洁胶的流变学性能研究. *湘潭大学学报(自然科学版)*, **2023**, 45(3), 66–74.
- 31 谭魏葳, 雷苏苏, 龙涛, 徐志朗, 李德富, 穆畅道, 葛黎明. 具有葡萄糖响应性释药的多糖基可注射自愈水凝胶. *高分子学报*, **2023**, 54(8), 1155–1165.
- 32 Ai, J. Y.; Li, K.; Li, J. B.; Yu, F.; Ma, J. Super flexible, fatigue resistant, self-healing PVA/xylan/borax hydrogel with dual-crosslinked network. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, 172, 66–73.
- 33 Du, C.; Zhang, X. N.; Sun, T. L.; Du, M.; Zheng, Q.; Wu, Z. L. Hydrogen-bond association-mediated dynamics and viscoelastic properties of tough supramolecular hydrogels. *Macromolecules*, **2021**, 54(9), 4313–4325.
- 34 Mano, J. F. Viscoelastic properties of bone: mechanical spectroscopy studies on a chicken model. *Mater. Sci. Eng. C*, **2005**, 25(2), 145–152.

## Rheological Behavior of Biomimetic Composite Hydrogels with Anisotropic Structures

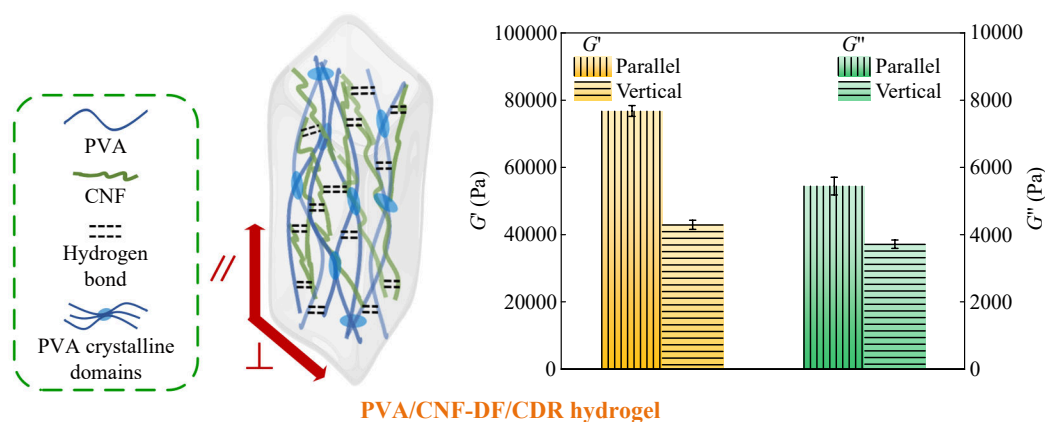
Xue-hui Zhang<sup>1</sup>, Yan-qin Wang<sup>2,3\*</sup>, Qiang Zheng<sup>1,4\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Materials Science & Engineering, <sup>2</sup>College of Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024)

(<sup>3</sup>Shanxi-Zheda Institute of Advanced Materials and Chemical Engineering, Taiyuan 030001)

(<sup>4</sup>Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

**Abstract** Biomimetic construction of extracellular microenvironment with dynamic viscoelastic behavior is an important strategy for the design of extracellular matrix (ECM) in tissue engineering. In this study, a poly(vinyl alcohol) (PVA)/cellulose nanofiber (CNF) composite hydrogel with anisotropic structure was constructed through the cooperative strategy of directional freezing (DF) and confined drying and re-swelling (CDR). The prepared composite hydrogel showed the oriented fiber arrangement structure parallel to the directional freezing direction. Rheological experiments showed that PVA/CNF composite hydrogel had anisotropic dynamic modulus ( $G'_{//} = (76.77 \pm 1.61)$  kPa and  $G'_{\perp} = (42.93 \pm 1.34)$  kPa;  $G''_{//} = (5.44 \pm 0.26)$  kPa and  $G''_{\perp} = (3.71 \pm 0.13)$  kPa). The energy storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) improved with the increase of PVA content in the low frequency and low strain regions, and showed a tendency of increasing and then decreasing with the increase of CNF content. The results of stress relaxation experiments indicated that the composite hydrogel had viscoelastic properties. Therefore, the viscoelastic properties and rules of the composite hydrogel with anisotropic structures summarized in this study have potential applications in guiding the design of tissue-engineered biomimetic ECM and its effect on cell biological behavior.



**Keywords** Anisotropy, Composite hydrogel, Extracellular matrix, Rheological behavior, Stress relaxation

\* Corresponding authors: Yan-qin Wang, E-mail: wangyanqin@tyut.edu.cn

Qiang Zheng, E-mail: zhengqiang@zju.edu.cn