

# 可注射透明质酸 / 海藻酸钠水凝胶修复耳软骨缺损的应用研究

元红艳

中国科学院大学深圳医院(光明)耳鼻喉科 广东 深圳 518107

**【摘要】:**目的: 制备一种可注射水凝胶, 并研究该水凝胶的理化性能及生物相容性。方法: 以透明质酸和海藻酸钠为主要原料加入氯化钙溶液后制备可注射水凝胶, 通过流变学测试、凝胶时间测试和体外细胞实验对其流变学性能、溶胀和降解性能进行表征, 及细胞生物相容性分析。结果: HA/SA (2%) 水凝胶具有介于固态和液态之间的流变学特征, 凝胶时间约为 3min, 在 PBS 溶液中浸泡 30d 后质量损失率为 45wt.%。HA/SA (2%) 水凝胶浸提液对细胞增殖无任何毒性, 并促进了细胞增殖。结论: HA/SA (2%) 水凝胶具有良好的可注射性、可降解性和生物相容性。

**【关键词】:** 注射水凝胶; 耳软骨缺损; 修复; 海藻酸钠

## Application study of injectable hyaluronic acid/sodium alginate hydrogel for repairing ear cartilage defects

Hongyan Yuan

Department of Otolaryngology, University of Chinese Academy of Sciences (Guangming), Shenzhen, Guangdong 518107

**Abstract:**Objective: To prepare an injectable hydrogel and to investigate the physicochemical properties and biocompatibility of the hydrogel. Methods: An injectable hydrogel was prepared by adding hyaluronic acid and sodium alginate as the main raw materials to calcium chloride solution, and its rheological properties, swelling and degradation properties were characterized by rheological tests, gel time tests and in vitro cellular experiments, and cellular biocompatibility analysis. Results: HA/SA (2%) hydrogel had rheological characteristics between solid and liquid state, with a gel time of about 3 min and a mass loss rate of 45 wt.% after 30 d immersion in PBS solution. HA/SA (2%) hydrogel extracts were not toxic to cell proliferation and promoted cell proliferation. Conclusion: HA/SA (2%) hydrogel has good injectability, degradability and biocompatibility.

**Keywords:** injectable hydrogel; ear cartilage defect; repair; sodium alginate

### 前言

先天性畸形、外伤引起的耳廓软骨损伤不仅增加患者痛苦, 还会影响外观, 不利于患者身心健康<sup>[1]</sup>。近年来, 随着组织工程技术的发展, 以可降解性的生物材料作为重建及修复软骨组织, 能在一定程度上修复软骨损伤, 改善软骨组织外观, 但可降解支架稳定性较差, 其构建的细胞-支架复合物力学性能无法持久, 仍需要不断改进<sup>[2]</sup>。

目前的可注射型生物材料仍然具有成骨活性不高的缺陷, 在临床上的应用受到限制<sup>[3]</sup>。传统可注射水凝胶虽然可以实现微创治疗并有效填充不规则缺损, 但细胞在注射过程中会受到较大的剪切应力, 除此之外, 凝固后的水凝胶支架内部没有大孔结构, 营养供给不充分, 这些都容易引起细胞凋亡, 影响软骨再生<sup>[4]</sup>。诸多前沿研究通过设计可控降解凝胶网络, 在凝胶形成后利用网络降解为细胞生长和组织形成提供一定的空间, 尝试解决凝胶致密网络对细胞生长和组织形成的不利影响<sup>[5]</sup>。海藻酸盐(SA)是一种从海藻中分离出来的天然杂多糖, 其结构类似于细胞外基质的主要成分之一糖胺聚糖。在Ca<sup>2+</sup>离子存在下, 海藻酸钠通过离子交联变成物理水凝胶形态<sup>[6]</sup>。作为刚性/半刚性线性多糖, 海藻酸钠的性质很大程度上决定了多种有序

天然材料的形态和功能, 因此使其成为最为广泛的组织修复水凝胶基质之一<sup>[7]</sup>。透明质酸(HA)是一种天然的、生物相容性的、可生物降解的多糖。此外, HA是关节软骨中发现的滑液和GAG的主要成分, 并已被证明支持细胞增殖和维持软骨形成表型。已经证明, 将HA掺入胶原蛋白或藻酸盐水凝胶中可以增加软骨细胞软骨基质的产生<sup>[8,9]</sup>。

在这项研究中, 我们研究了含有HA的可注射海藻酸钠水凝胶。HA/SA水凝胶是通过将钙离子引入从而形成固态形状。通过评估HA/SA水凝胶的微观结构、凝胶化时间、细胞相容性、溶胀和降解等, 为下一步用于体内耳软骨修复研究提供前期理论基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 主要实验仪器材料

透明质酸(HA, MW=550,000Da, 中国山东福瑞达生化有限公司); 海藻酸钠(SA, 中国山东青岛明月有限公司); 氯化钙(CaCl<sub>2</sub>, 中国医药集团有限公司); 培养基(DMEM, Gibco公司, 美国); 胎牛血清(FBS, Gibco公司, 美国); 流变仪(CP5000, 中国广州来美科技有限公司); 一次性注射器(济南秦鲁药业科技有限公司); 电子扫描显微镜

(SEM, Sigma300/500, ZIESS)。

### 1.2 可注射水凝胶的制备

HA/SA 混合物的制备方法如下。首先, 在室温条件下, 将 HA (5g) 和不同的 SA 称量后放入 50ml 的小烧杯中, 将其溶于去离子水中 (PH=7.4, 0.01M), 然后在 50°C 下 500rpm 搅拌, 形成均匀的混合溶液, 配制比例 HA/SA(1%), HA/SA (2%) 和 HA/SA (3%)。最后在超净工作台中紫外照射 2h, 进行灭菌处理备用。

CaCl<sub>2</sub> 无菌溶液配制: 将 0.75gCaCl<sub>2</sub> 溶于去离子水中, 超声处理 30min, 用无菌过滤器过滤, 即可得到无菌的饱和氯化钙 (w/v1.5%, CaCl<sub>2</sub>)。

### 1.3 测试与表征

#### 1.3.1 凝胶时间测试

本实验凝胶化时间是用倒置的测试方法来评估。首先将 2 毫升 CaCl<sub>2</sub> 溶液 (w/v1.5%) 分别加入到上述制备的 5ml 不同比例的 HA/SA 混合溶液中, 在 37°C 条件, 观察溶液的流动到停止流动时间, 即凝胶化时间。

#### 1.3.2 水凝胶微观结构观察

HA/SA (1%), HA/SA (2%) 和 HA/SA (3%) 水凝胶的微观结构形态通过扫描电子显微镜进行研究。冷冻冻干的凝胶被放在双面胶带上, 溅射镀金, 然后拍照不同倍数的照片。

#### 1.3.3 水凝胶的体外降解测试

本实验采用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 浸泡的方法测试水凝胶的体外生物降解性能。将 HA/SA (1%), HA/SA (2%) 和 HA/SA (3%) 水凝胶样品放入 50ml 离心管中, 称其水凝胶重量为 W<sub>0</sub>; 按照 0.1g/ml 浓度加入 PBS 溶液, 放置在 37°C 恒温箱中, 每隔一天对溶液进行更换。按照时间间隔:

3d, 7d, 14d, 21d 和 30d 浸泡后, 测试各个水凝胶的重量 W<sub>t</sub>。最后计算其相对于原始水凝胶样品重量损失的百分比, 将其定义为水凝胶的降解率。

$$\text{降解率} = W_t/W_0 \quad (1)$$

#### 1.3.4 水凝胶的溶胀性能分析

本实验在室温下将水凝胶浸泡在 PBS 溶液中, 直到达到肿胀平衡。分别取出各个水凝胶样品, 用滤纸轻轻擦拭表面水, 在不同的预定时间称重。膨胀率按以下公式计算:

$$\text{膨胀率} = (W_s - W_d) / W_d \times 100\% \quad (2)$$

其中 W<sub>s</sub> 和 W<sub>d</sub> 是膨胀的和非膨胀的重量。

#### 1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS18.0 软件进行统计学分析, 均表示为平均值 ± 标准差。两组间比较采用 Student's t 检验。每个实验使用至少三个独立样本统计分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 凝胶时间特性分析

本实验制备的可注射水凝胶主要是由于 SA 与 CaCl<sub>2</sub> 的钙离子螯合反应形成网络结构。图 1 显示了水凝胶溶液形成固体水凝胶的流程。通过添加不同比例的 CaCl<sub>2</sub>, 可调节水凝胶的凝胶时间, 如表 1 所示。可以明显看出随着 SA 含量增加, 凝胶时间减少。但是 SA 为 3% 时, 凝胶时间小于 1min, 时间过短, 需要对医生的操作技能十分严格, 而 SA 为 1% 时, 凝胶时间为 5.11±0.22, 时间过长, 注射后容易造成凝胶流动, 不易形成理想形状。因此观察 HA/SA (2%) 的配比最为优选。

表 1 凝胶时间

样品	时间 (min)
HA/SA (1%)	5.11±0.22
HA/SA (2%)	3.09±0.36
HA/SA (3%)	0.78±0.03

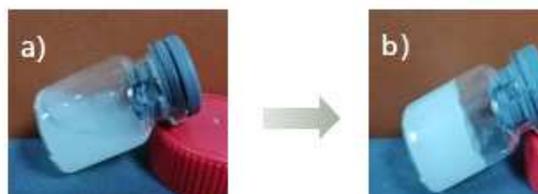


图 1

### 2.2 水凝胶的微观结构

从图 2 可以观察到不同比例 SA 水凝胶的微观结构的

不同。随着 SA 的比例增加, 孔洞变少, 这可能是由于 SA 含量越高, 形成的网络结构越紧密。

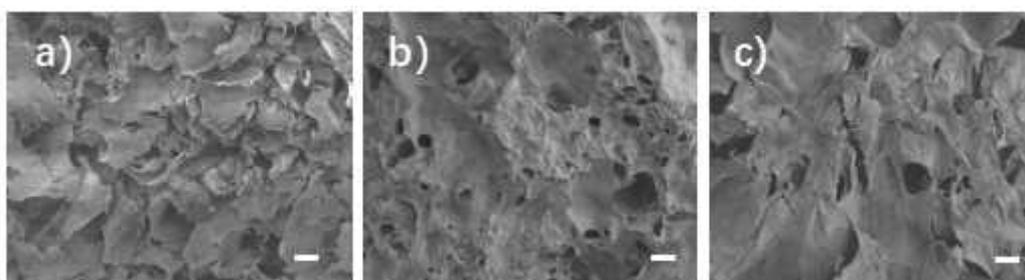


图 2 HA/SA (1%) (a), HA/SA (2%) (b) 和 HA/SA (3%) (3) 水凝胶的形态的高倍放大图 (比例尺: 10 $\mu$ m)

### 2.3 水凝胶的溶胀和降解分析

图 3 显示了水凝胶的溶胀和降解速率。从图 3 (a) 可以看出, 三种水凝胶在大约 5 小时达到溶胀平衡, 其中 HA/SA (1%) 水凝胶的溶胀率最高 (329 $\pm$ 17.5%), 溶胀

率随着时间增加, 并且比 HA/SA (2%) 和 HA/SA (3%) 水凝胶高, 这可能是由于 HA/SA (1%) 水凝胶的孔洞比较多, 吸水性较强, 与上述水凝胶微观结构分析结果一致。

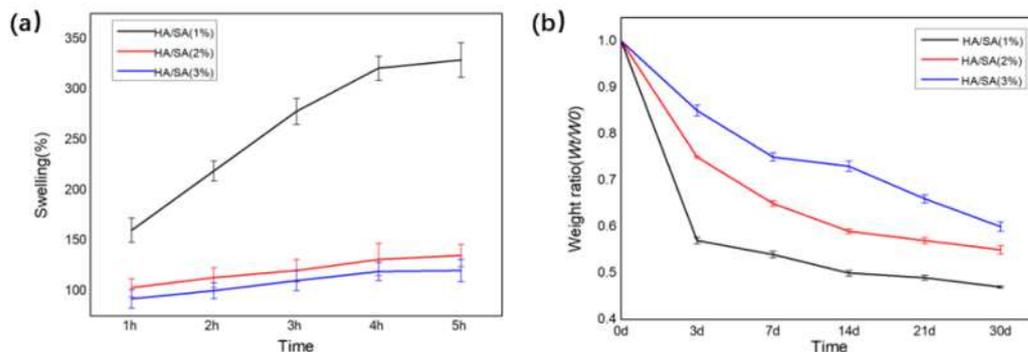


图 3 HA/SA (1%) (a), HA/SA (2%) (b) 和 HA/SA (3%) 水凝胶的溶胀和降解

水凝胶的降解率如图 4 (b) 所示。结果显示, 在降解实验中, 三种水凝胶随时间均发生了降解。在第 3d 时, 水凝胶降解速度较快, 其中 HA/SA (1%) 水凝胶质量损失量达到 46%; HA/SA (2%) 水凝胶在第 3d 周损失了初始质量的 25%, 随后逐渐降解减缓, 30d 时降解至初始质量的 45% 左右。HA/SA (3%) 水凝胶在第一周损失了初始质量的 15%, 然后逐渐降解减缓, 大约 30d 后降解到初始质量的 40%。SA 上大量的活性基团增加了水凝胶的交联密度, 防止了水凝胶的过度溶胀, 延缓了其降解。此处观察到的溶胀特性适用于临床应用, 不仅可以填充缺损部位, 还可以防止水凝胶材料过度溢出造成的伤害。

### 3 总结

通过将利用海藻酸钠与钙离子的螯合反应, 同时加入透明质酸钠, 制备了一种具有优异材料和生物学性能的新型可注射骨修复水凝胶。此外, HA/SA 水凝胶的可注射性能和材料性能满足临床应用要求。经筛选, HA/SA (2%) 的胶凝时间适合临床操作, 同时溶胀性能和降解性能, 适合也临床使用。HA/SA (2%) 水凝胶生物相容性显示无任何细胞毒性, 并能促进 NIH3T3 的增殖。因此, HA/SA (2%) 可注射水凝胶在耳软骨缺损修复方面具有潜在的应用价值。

### 参考文献:

[1] M.de Boutray, A. Veyssiere, F. Bekara, and N. Graillon, "Repair of gauge earlobe medium defect[J].Stomatol. Oral. Maxillofac. Surg., 2020, 121(4). 430-433,  
[2] B. M. Hong, H. C. Kim, J. E. Jeong, S. A. Park, and W. H. Park, Visible-light-induced hyaluronate hydrogel for soft tissue fillers[J] Biological Macromol,2020, 165:. 2834-2844.

[3] H. Park, B. Choi, J. Hu, and M. Lee, Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering[J]. Acta Biomater., 2013, 9(1). 4779-4786.  
[4] A. Marionneaux, J. Walters, H. Guo, and J. Mercuri, Tailoring the subchondral bone phase of a multi-layered osteochondral construct to support bone healing and a cartilage analog[J].Acta Biomater. 2018, 78:351-364.  
[5] B. Kong,et al.Fiber reinforced GelMA hydrogel to induce the regeneration of corneal stroma[J.Nat Commun, 2020, 11(1).  
[6] B. Niu et al. In vitro and in vivo release of diclofenac sodium-loaded sodium alginate/carboxymethyl chitosan-ZnO hydrogel beads[J]. Biological Macromol, 2019:1191-1198.  
[7] L. Chen et al., "Drug-Loadable Calcium Alginate Hydrogel System for Use in Oral Bone Tissue Repair[J]IJMS, 2017, 18(5). 989.  
[8] N. L. D'Elia, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures[J].Nanoscale, 2015, 7(44). 18751-18762.  
[9] Y. Yang, X. Wang, F. Yang, L. Wang, and D. Wu, Highly Elastic and Ultratough Hybrid Ionic-Covalent Hydrogels with Tunable Structures and Mechanics[J].Adv. Mater., 2018, 30(18).  
项目名称: 深圳市光明区软科学研究项目: 复合可注射多空自增强水凝胶负载 Sox9 修饰 SMSCs 在调控外泌体 lncRNA 传递修复不规则耳软骨缺损中的效应及分子调控机制, 项目编号: 2021R01073。