

透明质酸凝胶的制备及其在关节软骨再生中的应用

张勤勤¹, 谌亮¹, 岑莲^{1*}, 于凤宾²

(1. 华东理工大学, 上海 200237; 2. 湖州市 98 医院, 浙江 湖州 313000)

摘要:透明质酸(HA)较短的生物体内停留时间在一定程度上限制了其应用,以1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)为交联剂对HA进行化学改性,制备了HA凝胶,并考察了其力学性能、流变性、溶胀性以及HA凝胶的关节软骨再生性能。结果表明,HA凝胶断裂伸长率为159%,是一种弹性凝胶;其横截面表现出多孔联通结构,孔径在40 μm左右;溶胀性约为凝胶干重的33倍,具有很强的吸水能力。将HA凝胶用于兔子关节软骨缺损修复,8周后发现其能促进关节软骨再生。因此,该工艺制备的HA凝胶有望用于关节软骨缺损修复的生物医用材料。

关键词:透明质酸;凝胶;软骨修复

中图分类号:TH3

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2019)10-0128-04

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2019.10.028

Preparation of hyaluronic acid gel and its application in articular cartilage regeneration

ZHANG Qin-qin¹, SHEN Liang¹, CEN Lian^{1*}, YU Feng-bin²

(1. East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Huzhou 98 Hospital, Huzhou 313000, China)

Abstract: Hyaluronic acid (HA) can maintain a short residence time in organisms, which limits its application to some extent. HA gel is prepared through modifying HA by 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE). The mechanical, rheological, swelling and articular cartilage regeneration properties of HA gel are investigated. It is shown that the elongation at break of HA gel is 159%, indicating that it is an elastic gel. HA gel's cross section exhibits a porous but inter-connected morphology, with an average pore size of about 40 μm. HA gel has a strong water absorption capacity with a swelling ratio of 33. When HA gel is used to repair articular cartilage defects in rabbits, it can promote articular cartilage to regenerate after 8 weeks. Therefore, HA gel prepared by this technology is a promising bio medical material for repairing articular cartilage defects.

Key words: hyaluronic acid; gel; cartilage repair

透明质酸(Hyaluronic acid, HA)是由N-乙酰氨基葡萄糖与葡萄糖醛酸通过糖苷键连接而成的长链酸性粘多糖,是细胞间基质和细胞内基质的重要组成部分,具有良好的生物相容性和生物可降解性^[1]。HA在骨骼生长、发育、重建以及细胞迁移、组织形成、伤口愈合等生物学过程中扮演着不可忽视的作用。但是天然的HA分子在生物体内易被降解和扩散^[2],导致体内停留时间极短,限制了其应用^[3]。通常需要对HA进行改性以获得改变其性质的水凝胶,包括机械性能、停留时间、生物降解性、生物活性等;常见的HA改性方法有化学改性、物理改性,化学改性是指通过化学方法在HA分子间以化

学键连接而形成三维网络结构,而物理改性是通过物理作用而形成的水凝胶,如聚合物链间的氢键作用、范德华力、静电作用等^[4]。其中化学改性已得到广泛报导和验证^[5],化学改性主要发生在HA分子的羧基、羟基以及N-乙酰基基团上,如代表性的羧基的酯化、酰胺化反应以及与碳二亚胺的介导反应^[6-8];羟基的醛交联以及与双环氧氧化物的交联反应^[9-10];N-乙酰基的脱乙酰化后游离氨基与京尼平的交联反应^[11]。改性后的HA凝胶可广泛应用于组织再生和修复、药物传递等方面^[12-13]。

关节软骨缺损是临床上一种常见且较为棘手的问题,主要原因是软骨损伤后其自我恢复能力有

收稿日期:2019-01-07;修回日期:2019-08-11

基金项目:公益性应用研究项目(2017GY38)

作者简介:张勤勤(1993-),女,硕士研究生,研究方向为生物医用材料,1049768225@qq.com;岑莲(1978-),女,博士,教授,研究方向为生物材料化学工程,通讯联系人,liancen@ecust.edu.cn。

限^[14]。考虑到 HA 是关节软骨的主要成分之一,笔者以 HA 为原料、1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)为交联剂制备了 HA 水凝胶,并对其性能表征,考察其在关节软骨缺损中的应用。

1 原料与方法

1.1 试剂与仪器

透明质酸钠($1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^6$ Da),山东福瑞达生物医药有限公司生产;BDDE,美国 Sigma Aldrich 公司生产;氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl),分析纯,上海泰坦科技股份有限公司生产;磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司生产;去离子水,华东理工大学生产。

HD2004W 电动搅拌机,上海司乐仪器有限公司生产;MCR 302 流变仪,奥地利 Anton Paar 公司生产;HY-U350 万能拉力机,上海衡翼精密仪器有限公司生产;Nova Nano SEM 450 型场发射扫描电镜,FEI 公司生产。

1.2 HA 凝胶的制备

称取一定量的 HA 粉末,溶解在质量分数为 1% 的 NaOH 溶液中,使其质量分数为 10%,机械搅拌至完全溶解;加入交联剂 BDDE,控制其体积分数为 0.5%;将搅拌均匀的混合物移入培养皿中,并在 40℃ 下反应 5 h;然后将培养皿放入干燥器中,4℃ 下干燥。干燥后用去离子水溶胀和彻底清洗,即得 HA 凝胶。

1.3 分析与测试方法

1.3.1 扫描电镜

通过 Nova Nano SEM 450 扫描电镜观察凝胶的截面形态。表征之前需将溶胀至平衡的凝胶用液氮速冻并脆断以获得断截面,然后冷冻干燥 48 h,干燥完成后的凝胶需喷 Pt 以增强其导电性。

1.3.2 机械性能

测试机械性能之前需对材料进行预处理,制得的凝胶薄膜用去离子水浸泡溶胀后调节至 HA 质量浓度为 20 mg/mL;将凝胶裁剪为长 50 mm、宽 14 mm 的长方形后,用医用棉裹住凝胶两端,然后用 HY-U350 万能拉力机测试其拉伸性能。断裂伸长率的计算公式为:

$$\text{断裂伸长率} = \Delta L / H$$

其中: ΔL 为凝胶断裂时的位移; H 为拉伸前上下夹具之间的距离。

1.3.3 溶胀性

依据质量的变化来评价凝胶的吸水溶胀性^[15]。将制得的 HA 凝胶用去离子水浸泡至溶胀平衡后,冷冻干燥并称其干重,记为 M_0 ;投入 500 mL PBS 缓冲液中(NaCl: 9 mg/mL; KH_2PO_4 : 0.03 mg/mL; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.14 mg/mL),浸泡 24 h,记录浸泡后的凝胶质量,记为 M_1 ,计算凝胶的溶胀性 Q :

$$Q = (M_1 - M_0) / M_0$$

1.3.4 流变性

凝胶的流变性主要通过 MCR 302 流变仪来测定。测量过程中使用的转子型号为 PP25,测试参数设置为温度 37℃,恒定应变 1%,范围 0.1 ~ 10 Hz,测试距离 1 mm,在动态振荡频率扫描模式下进行。测试前需将制得的凝胶薄膜用去离子水浸泡溶胀,调节至 HA 质量浓度为 20 mg/mL,并裁剪为 25 mm 左右的圆形膜片。

1.3.5 软骨缺损修复实验

将充分浸泡以除去残留交联剂 BDDE 的 HA 凝胶调节至 HA 质量浓度为 20 mg/mL 后,裁剪成直径 3.5 mm、厚 3 mm 的圆形膜片,高温灭菌后备用。并以新西兰白兔为实验对象,通过钻孔在右后腿滑车凹槽中心形成全层软骨缺损。将 6 只新西兰大白兔均分为 2 组,即对照组和 HA 凝胶组。对于 HA 凝胶组,将 HA 凝胶填入缺陷部位即可,而对照组为同样缺损未经过任何处理。术后动物可以在笼子里自由活动,四肢可以承受全部质量,其健康状况由兽医监测。最终于 8 周时对兔子进行安乐死处理以评估其软骨再生情况。

1.3.6 组织切片染色

苏木素-伊红染色(H&E染色):用 4% 的多聚甲醛将标本进行固定 24 h,梯度酒精和二甲苯脱水,石蜡包块;将标本切为 5 μm 厚的薄片,铺于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,置于 60℃ 烤箱中烤 1 h;然后用二甲苯脱蜡 10 min,共进行 3 次;接着将切片放入 100%、95%、85%、75% 的梯度酒精水化,每梯度 5 s,自来水冲洗;苏木素染液染色 10 min,并洗去玻片上多余染液;用 1% 盐酸乙醇溶液分色 10 s 后,流水冲洗 30 min;接着用伊红染液染色 2 min;再依次用 75%、85%、95%、100% 的乙醇脱水,每梯度 5 s;最后以二甲苯为透明剂透明 3 次并拭去多余的二甲苯;用中性树脂胶封片即可。

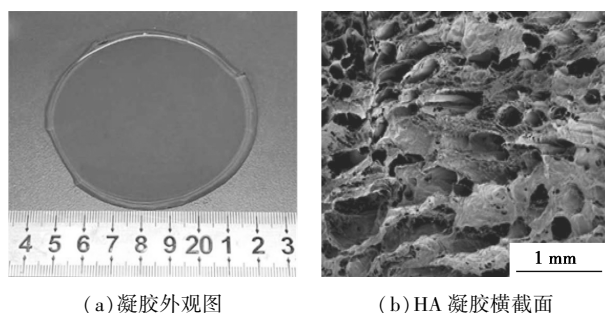
甲苯胺蓝染色(TBO染色):用 4% 的多聚甲醛将标本进行固定 24 h,梯度酒精和二甲苯脱水,石蜡包块;将标本切为 4 μm 厚的薄片,铺于涂有多聚赖

氨酸的载玻片上,置 60℃ 烤箱中烤 1 h;然后用二甲苯脱蜡 10 min,共进行 3 次;接着将切片放入 100%、95%、85%、75% 的梯度酒精水化,每梯度 5 s,自来水冲洗;将切片置于 1% 甲苯胺蓝溶液染色 12~24 h;充分水洗后用中性树胶封片即可。

2 结果

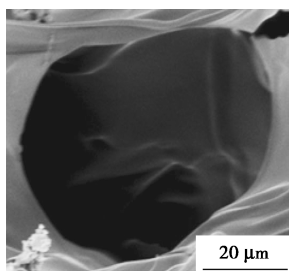
2.1 凝胶形貌分析

HA 凝胶的外观图及截面形貌的 SEM 图如图 1 所示。从图 1(a) 中可以看出,HA 凝胶吸水溶胀后是透明膜片,外表面光滑,具有固定的形状。



(a) 凝胶外观图

(b) HA 凝胶横截面



(c) HA 凝胶局部放大图

图 1 HA 凝胶的外观图及 SEM 图

从图 1(b)、图 1(c) 可以看出,HA 凝胶具有水凝胶的典型特征——多孔结构,孔壁表面光滑;利用 Imagesj 软件对图 1(c) 进行孔径分析可知,孔径在 40 μm 左右。而孔道附近的细丝则主要是由于液氮速冻脆断产生的。

2.2 机械性能分析

HA 凝胶的机械性能如表 1 所示。

表 1 HA 凝胶机械及溶胀性能数据

性能	断裂伸长率/%	溶胀性能
均值	158.93	32.78
标准偏差	10.67	1.01

在一定范围内,HA 凝胶受力拉伸会发生形状上的变化,一旦松开,能够变回原状,表明 HA 凝胶是一种弹性凝胶。由表 1 可以看出,HA 凝胶的断裂伸长率为 159%,具有一定的拉伸性能,因而能为

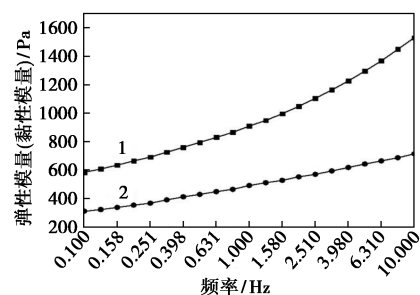
组织修复时细胞的增殖及组织的再生提供支撑作用。

2.3 溶胀性能分析

溶胀性是凝胶材料使用考察的关键标准之一,主要是因为凝胶浸泡溶胀之后,不仅会带来体积的变化,也有可能引起力学性质、颜色等其他方面的变化,从而导致其综合性能发生改变^[16]。由表 1 可以看出,HA 凝胶的溶胀率约为凝胶干重的 33 倍,说明其具有很强的吸水能力。

2.4 流变性能分析

一般情况下,用流变性参数弹性模量 G' (存储模量)、黏性模量 G'' (消耗模量) 来表征凝胶的粘弹性。HA 凝胶的流变曲线如图 2 所示。



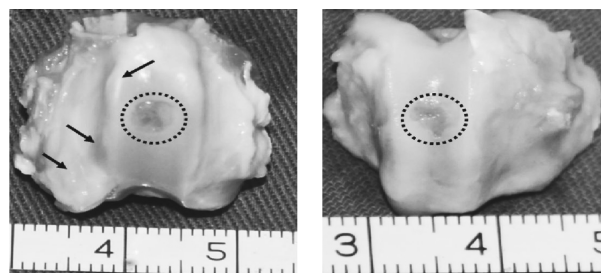
1—弹性模量 G' ; 2—黏性模量 G''

图 2 HA 凝胶的流变曲线

由图 2 可以看出,HA 凝胶的 G' 和 G'' 均表现出相似的非线性流变曲线,且随着频率的增大, G' 和 G'' 值逐渐增加;在 0.1~10 Hz 范围内,HA 凝胶的弹性模量均大于黏性模量,表明在体系中弹性模量占主导地位,HA 凝胶是一种弹性凝胶。

2.5 软骨缺损修复应用分析

软骨缺损修复的总体评估如图 3 所示。从图 3 中可以看出,HA 凝胶组软骨再生良好,8 周后缺损已得到明显改善,且关节软骨表面较为光滑。而对照组中,软骨在宏观上便可观察到一些骨赘和软骨的磨损(图中以黑色箭头表示)。



(a) 对照组

(b) 凝胶组

图 3 8 周软骨修复的宏观观察

不同再生软骨组织的 H&E 染色分析如图 4 所

示。从图4中可以看出,与对照组相比,HA凝胶组显示出良好的软骨重建性能。在对照组中,软骨空槽中被纤维组织填满,还有下层骨的塌陷。

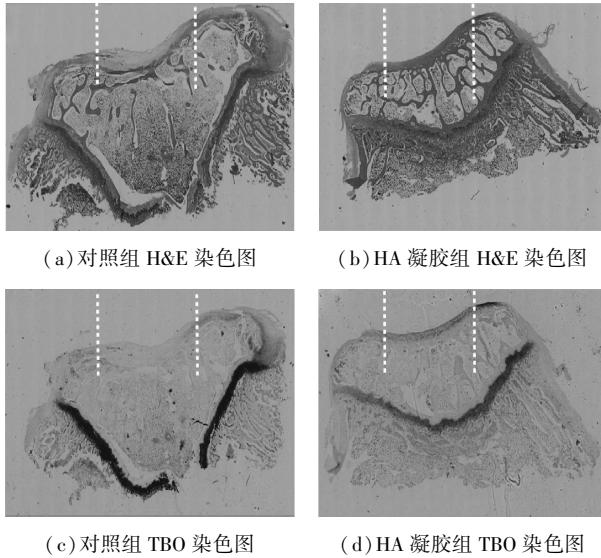


图4 8周软骨修复组织的H&E和TBO染色

从图4中还可以看出不同软骨缺损修复组织的TBO染色分析。对照组中的软骨连续性被打断,缺损区域被纤维组织填满;而HA凝胶组中则可以看到更多的软骨组织,软骨缺损也已完全愈合。因此,HA凝胶在软骨修复过程中,确实有助于软骨基质生成的增强。

3 结论

HA具有良好的生物相容性和可降解性,广泛地应用在骨骼生长、发育、重建以及细胞迁移、伤口愈合等生物学过程中,但是其较短的体内停留时间也在一定程度上限制了其应用前景。因此,以BDDE为交联剂对HA进行化学改性制得HA凝胶,并对其性能表征,结果表明,HA凝胶具有一定的拉伸性能,是一种弹性凝胶,断裂伸长率为159%;其横截面表现出多孔联通结构,孔壁光滑,孔径在40 μm 左右;其溶胀性约为凝胶干重的33倍,具有很强的吸水能力。同时,HA凝胶对软骨缺损修复和重建具有明显的促进作用,说明HA凝胶确实有望用于关节软骨缺损修复。

参考文献

- [1] Shah C B. Hyaluronic acid gels [C]. Acs Symposium Series, 2009.
- [2] Lubomir Lapeik J, Lapeik L, Smedt S D, et al. Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications [J]. Chemical Reviews, 1998, 98(8): 2663-2684.
- [3] Burdick J A, Prestwich G D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications [J]. Advanced Materials, 2011, 23(12): 41-56.
- [4] Mathur A M, Moorjani S K, Scranton A B. Methods for synthesis of hydrogel networks: A review [J]. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews, 1996, 36(2): 405-430.
- [5] 吴莉娟, 栾途, 张飞, 等. 生物医用透明质酸多糖的改性和功能化研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1690-1695.
- [6] Lee H, Lee K, Park T G. Hyaluronic acid-paclitaxel conjugate micelles: Synthesis, characterization, and antitumor activity [J]. Bioconjugate Chemistry, 2008, 19(6): 1319-1325.
- [7] Prestwich G D, Marecak D M, Marecek J F, et al. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: Synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives [J]. Journal of Controlled Release, 1998, 53(1-3): 93-103.
- [8] Jie C, Cheng P, Nie J, et al. Lyophilization as a novel approach for preparation of water resistant HA fiber membranes by crosslinked with EDC [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102(3): 8-11.
- [9] Collins M N, Birkinshaw C. Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2007, 104(5): 3183-3191.
- [10] Wende F J, Gohil S, Nord L I, et al. 1D NMR methods for determination of degree of cross-linking and BDDE substitution positions in HA hydrogels [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 1525-1530.
- [11] Crescenzi V, Francescangeli A, Renier D, et al. New cross-linked and sulfated derivatives of partially deacetylated hyaluronan: Synthesis and preliminary characterization [J]. Biopolymers, 2010, 64(2): 86-94.
- [12] Wang T, Lai J H, Yang F. Effects of hydrogel stiffness and extracellular compositions on modulating cartilage regeneration by mixed populations of stem cells and chondrocytes in vivo [J]. Tissue Engineering Part A, 2016, 3(5): 1-9.
- [13] Choi K Y, Yoon H Y, Kim J H, et al. Smart nanocarrier based on PEGylated hyaluronic acid for cancer therapy [J]. ACS Nano, 2011, 5(11): 8591-8599.
- [14] Ochi M. Clinical results of transplantation of tissue-engineered cartilage and future direction of cartilage repair-novel approach with minimally invasive procedure [J]. Yonsei Medical Journal, 2004, 45(s1): 45-74.
- [15] Carmen Remunan L, Bodmeier R. Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate Flms [J]. Journal of Controlled Release, 1997, 44(2-3): 215-225.
- [16] Davidovich-Pinhas M, Bianco-Peled H. A quantitative analysis of alginate swelling [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 79(4): 1020-1027. ■