

# 可注射性壳聚糖基温敏性凝胶的制备及其生物相容性\*

闫继红<sup>\*</sup>, 孙海梅, 尚宏伟, 张立新, 路欣

首都医科大学基础医学院人体解剖与组织胚胎学系, 北京 100069

**摘要:** 以壳聚糖 (Chitosan, CH) 为基, 加入不同配比的  $\beta$ -甘油磷酸钠 (Glycerophosphate salt, GP) 和羟乙基纤维素 (Hydroxyethyl cellulose, HEC) 制备成不同组成的壳聚糖基温敏性凝胶体系。研究了 2 种凝胶体系初始凝胶化温度、成凝胶化时间、在缓冲溶液中的溶胀性、对骨髓间充质干细胞的细胞毒性及生物相容性, 并用扫描电镜观察了干凝胶的微观结构。结果表明: 所制备的壳聚糖- $\beta$ -甘油磷酸钠 (CH-GP) 和壳聚糖- $\beta$ -甘油磷酸钠-羟乙基纤维素 (CH-GP-HEC) 温敏性的凝胶, pH 为 6.8~7.4, 当温度升高到某一温度时可以形成凝胶。CH-GP 凝胶随 GP 浓度的增加初始凝胶温度降低, 37°C 成凝胶时间缩短, 凝胶中较低磷酸盐浓度 (GP 质量浓度为 100~400 mg/mL) 有利于细胞的生长。在 CH-GP 凝胶的基础上, 加入不同浓度的羟乙基纤维素 (HEC), 可以降低凝胶支架中的  $\beta$ -甘油磷酸钠含量, 并可调节成凝胶化时间, 初始凝胶化温度以及凝胶强度。HEC 的加入量与 37 °C 凝胶时间及初始化成胶温度呈反比。

**关键词:** 壳聚糖; 甘油磷酸钠; 羟乙基纤维素; 可注射性水凝胶; 生物相容性

中图分类号: R94

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110714.0928.001

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110714.0928.001.html>

## Preparation and Biocompatibility of Injectable Chitosan-Based Hydrogel

YAN Ji-hong · SUN Hai-mei · SHANG Hong-wei · ZHANG Li-xin · LU Xin

Department of Histology & Embryology, Capital Medical University, Beijing 100069, China

**Abstract:** The thermo-sensitive gel system based on chitosan-glycerophosphate salt (CH-GP) complex and chitosan-glycerophosphate salt-hydroxyethyl cellulose complex (CH-GP-HEC) were prepared in this study. Various factors affecting the properties of gels (the gelation time, the incipient gelation temperature (IGT), microstructure of the hydrogels, the swelling degrees of gels in buffer solutions, cell toxicity and the biocompatibility with bone mesenchymal stem cells (BMSC) were tested. The results showed the gels system can be quickly gelated with pH values from 6.8-7.4. The gelation time and IGT were reduced with GP concentration increasing. The results of biocompatibility showed that lower GP concentration (100-400 mg/mL) was beneficial for cell proliferation and growth. Based on keeping the properties of the gels, the glycerophosphate salt contents of the complex could be decreased largely, and gelation time, IGT and gel strength could be modulated by addition of various concentration of hydroxyethyl cellulose (HEC) to CH-GP complex. The HEC concentration is the opposite to gelation time and IGT.

**Key words:** chitosan(CH); glycerophosphate salt(GP); hydroxyethyl cellulose(HEC); injectable gel; biocompatibility

壳聚糖 (Chitosan, CH) 是一种具有良好生物相容性的天然阳离子多糖, 是用途非常广的生物材料。壳聚糖溶液具有正常生理值, 在室温下呈液态, 可以包裹活性细胞和治疗蛋白质, 当注射入体内后, 可在体温下, 在注射处原位形成生物可降解凝胶<sup>[1]</sup>。该体

系作为包裹活性细胞的载体, 被成功地应用于生命体内传递生物活性生长因子及组织工程<sup>[2-3]</sup>。

本试验制备了不同配比组成的壳聚糖基温敏性水凝胶材料 CH-GP 和 CH-GP-HEC, 通过调整其不同组成, 考察其表征及生物相容性, 从而为选择具有最

\* 基金项目: 北京市自然科学基金项目 (3102010)

作者简介: 闫继红, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 组织工程。

收稿日期: 2010-10-24

网络出版时间: 2011-07-14 09:28

\*\* 通讯作者

优配比组分的温敏性凝胶作为组织缺损的填充材料提供必要的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 壳聚糖(DDA 为 84%, Polysciences, USA);  $\beta$ -甘油磷酸钠 (cell cultured, Sigma, USA); 羟乙基纤维素 (Fluka, 瑞士)。

1.1.2 细胞: 骨髓间充质细胞 (BMSC) 取自 6 周龄雄性 SD 大鼠 (约 150 g, 购自中科院实验动物中心), 取其股骨和胫骨, 提取 BMSCs, 体外纯化鉴定, 取体外扩增培养后第 3 代细胞用于试验。

### 1.2 方法

1.2.1 CH-GP及CH-GP-HEC温敏性凝胶的制备 将 120 mg的壳聚糖溶解在 9 mL 67mmol/L的稀盐酸中。分别将 100, 200, 400, 600, 800 mg的 $\beta$ -甘油磷酸钠溶解在 1 mL蒸馏水中配制成不同质量浓度的 GP溶液。在不断搅拌下,将不同质量浓度的GP溶液分别逐滴滴入CH溶液中, 制备成 100 mg/mL CH- GP(I), mg/mL CH-200 GP(II), 400 mg/mL CH- GP(III), 600 mg/mL CH- GP(IV), 800 mg/mL CH- GP(V),溶液。

将 5~25 mg的HEC溶解在 1 mL的PBS中, 配成 2.5, 5, 10, 20, 25 mg/mL的HEC溶液。然后将 400 mg/mL CH- GP与不同浓度HEC分别以 5: 1 (v/v) 的比例混合制备成不同HEC配比的CH-GP-HEC凝胶溶液。

1.2.2 干凝胶的制备 将制备的溶胶放在恒温水浴箱中, 在不同的温度下使之转变为凝胶,  $-40^{\circ}\text{C}$  冷冻 48 h, 在冷冻干燥机中冻干成干凝胶。

1.2.3 初始凝胶化温度 (IGT) 与凝胶化时间的测定 将装有 5 mL不同溶液的试管分别置于不同温度的恒温水浴箱中, 测试温度范围为  $18\sim 90^{\circ}\text{C}$ , 记录不同温度下溶液的成凝胶行为。观察并记录其凝固时间与凝胶温度。为保证溶液/凝胶达到平衡, 每隔 30 min升温 1次, 每次升温  $1^{\circ}\text{C}$ , 观察溶液的凝胶现象。

1.2.4 溶胀率分析 将形成的凝胶冷冻干燥, 取干凝胶约 50 mg ( $W_0$ ) 置于 pH 7.4的PBS溶液 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 中, 隔段时间取样, 擦去凝胶表面的水, 称重 W。溶胀度公式: 溶胀度 =  $(W - W_0) / W_0$ 。

1.2.5 干凝胶形貌观察 采用 FEI SIRION 200/INCA OXFORD型扫描电镜 (美国FEI公司) 观察干凝胶的孔径大小及形貌。

1.2.6 凝胶的生物学评价 浸提液制备: 按  $10\text{ mL/cm}^2$  的标准, 将直径 0.8 cm的壳聚糖水凝胶材料分别加入不同体积的培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$  下保持 24 h。

在 96孔培养板里接种 BMSCs 细胞, 细胞浓度为  $2 \times 10^4$  个/mL, 每孔加入 0.1 mL。放入  $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 24 h后取出, 每孔加入浸提液 0.1 mL, 空白对照组加入 0.1 mL 培养液, 重新放入培养箱内,

分别于 24, 48 h后取出 1 块培养板, 每孔加入 MTT  $20\mu\text{L}$ , 4 h后加 DMSO  $150\mu\text{L}$ , 震荡 10 min, 用酶标仪检测, 记录 OD 值。

取处理好的铺有 CH-400 mg/mL GP-20 mg/mL HEC(VI)凝胶膜材料的 6 孔板,将细胞悬液以  $2 \times 10^5$  个/孔的密度种植于该凝胶膜上, 在  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$  的培养箱中培养 24 h, 用滴管小心将培养液吸出, 用无菌的 PBS 溶液洗涤 2 次, 去除游离态的细胞。在不同时间点, 加入 乙二酸荧光素 (FDA) 染料, 在荧光显微镜下观察细胞形态。MTT 法检测 BMSCs 在凝胶膜上的增殖情况。

1.2.7 凝胶体内相容性 SD 大鼠 18 只随机分为对照组、试验组, 分别将 CH-GP 和 CH-GP-HEC 凝胶注射到大鼠大腿肌肉内, 对照组注射生理盐水, 分别于术后 4, 8, 12 周处死大鼠, 进行大体标本以及光镜观察。

## 2 结果

### 2.1 不同组成的凝胶溶液的成胶时间和初始化凝胶温度

制备的 CH-GP 和 CH-GP-HEC 水凝胶在较低温的状态下成流动的液体, 在温度升高后 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 凝固成胶。

由表 1 可知, 随着 GP 浓度的增加, CH-GP 溶液的 pH 值逐渐增大, 凝胶的初始凝胶化温度 (IGT) 降低, 而在  $37^{\circ}\text{C}$  下的凝胶化时间明显缩短。含  $10\%(\text{w/w})$  GP 的 CH-GP 溶液未能成胶, 当 GP 浓度为  $800\text{ mg/mL}$  时,  $37^{\circ}\text{C}$  约 30 min 即可成胶。当 GP 浓度为  $400\text{ mg/mL}$ , 其初始化凝胶温度  $46^{\circ}\text{C}$ , 在  $37^{\circ}\text{C}$ , 3 d 才可成胶。这是因为加入 GP 后, 一部分 GP 与体系中的游离的  $\text{H}^+$  中和, 因此使溶液的 pH 值增大。另外, 随着 GP 浓度的增大, 与壳聚糖配合的  $\beta$ -GP 增多, 增大了体系的离子吸引力, 从而导致溶液体系的 IGT 往低温方向移动。

表 1 GP 浓度对凝胶溶液 pH, 初始成胶温度、成胶时间的影响

Table 1. Effect of GP concentration on pH, IGT and gelation time of CH-GP

项目 Item	GP 浓度 / (mg/mL) GP concentration				
	100	200	400	600	800
pH	6.4	6.8	7.02	7.10	7.20
初始成凝胶 温度/ $^{\circ}\text{C}$	—	65	46	38.5	36.8
IGT 37 $^{\circ}\text{C}$ 成胶时间/h	—	—	72	1	0.5
Gelation time in 37 $^{\circ}\text{C}$	—	—	72	1	0.5

注: “—”定义为在试验条件内未成胶

Note: “—” indicates no gelling under experimental conditions

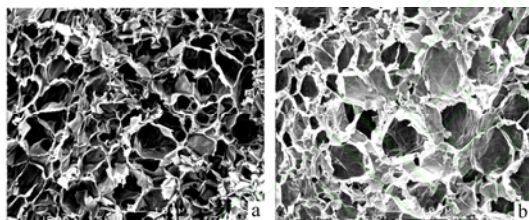
由表 2 可知, 在 CH-GP-HEC 溶液, 随着 HEC 质量浓度的增加, 对溶液的 pH 值影响不大, 溶液的初始成凝温度降低, 在 37℃ 下的初始凝胶化时间明显缩短, 含 20mg/mL 的 HEC 凝胶溶液在 7min 内就可成凝胶。在对材料的生物相容性的研究中, 壳聚糖采用高压消毒(120℃, 15 min), 消毒后壳聚糖的动态粘度有所降低, 力学性能明显降低, 但对温敏性无明显影响。在 CH-GP-HEC 溶液中, 其中 GP 的浓度是 400 mg/mL

表2 HEC的浓度对凝胶溶液的pH、初始成胶温度、成胶时间的影响

HEC 浓度 / (mg/mL)	0	2.5	5	10	20	25
pH	7.02	7.03	7.07	7.12	7.18	7.21
初始成凝温度/℃	46	39	22	18	13	4
37℃成胶时间/min	4320	70	30	11	7	3

## 2.2 凝胶的微观形貌

由图1可见, 400 mg/mL CH- GP和20 mg/mL CH-GP- HEC干凝胶内部为网状结构, 孔径约为100 μm。



a. CH-GP截面 CH-GP section; b.CH- GP-HEC 截断面CH- GP-HEC transverse section

图 1 干凝胶的扫描电镜照片

Fig.1. Representative scanning electron micrograph of Ch-GP and CH-GP-HEC section structure

## 2.3 溶胀性能分析

由图 2 可见, 2 种凝胶都在 2 h 后基本达到平衡, 溶胀率为 5-8 倍。20 mg/mL CH-GP- HEC 的溶胀度高于 400 mg/mL CH- GP 的溶胀率, 这是由于 HEC 含有羟基, 更易吸收水。

## 2.4 BMSCs 细胞在不同组成的浸提液中的生长情况

从图 3 中不同时间点的 MTT 可以看出, 在 GP 的浓度为 800 mg/mL 时, 浸提液对细胞的生长有明显的抑制作用。这是因为含 800 mg/mL GP 的溶液离子浓度较高, 因此溶液的渗透压也较高, 远高于人体细胞正常的生理渗透压环境, 引起细胞脱水而死亡。含较低的 GP 浓度的 CH-GP 浸提液比较利于细胞的生

长。从试验结果可以看出当 GP 的浓度为 100-400 mg/mL 有利于细胞的生长。

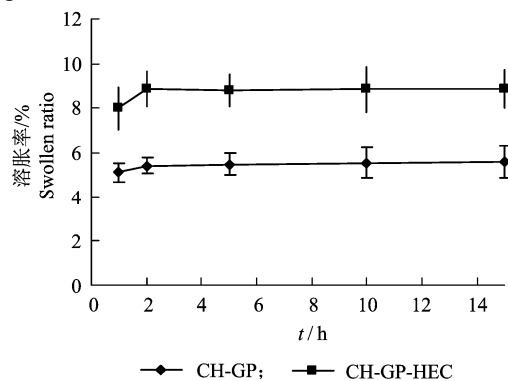


图2 CH-GP和CH-GP-HEC的溶胀率曲线

Fig.2. The swollen curve of CH-GP and CH-GP-HEC

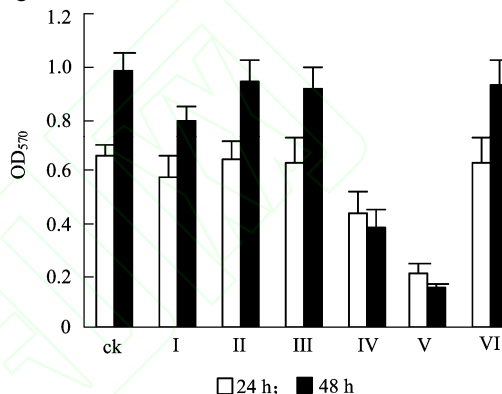


图 3 BMSCs细胞在不同组成的CH-GP和CH-GP-HEC浸提液中的生长情况

Fig.3. Proliferation of BMSCs in extraction fluid medium of CH-GP and CH-GP-HEC as a function of time of culture

## 2.5 BMSCs 细胞在 CH-GP-HEC 温敏凝胶膜上的生长情况

BMSCs 在 CH-GP-HEC 温敏凝胶膜上刚刚种植后细胞呈圆形, 部分细胞成聚集性生长。种植 7 d 已经开始伸出伪足, 且大部分细胞已经贴附、铺展(图 4)。从 MTT 的结果可以看出(图 5), 在 BMSCs 随着种植时间的增加, 数量有所增加, 由此证明所制备的 CH-GP-HEC 凝胶膜与 BMSCs 具备良好的细胞相容性。

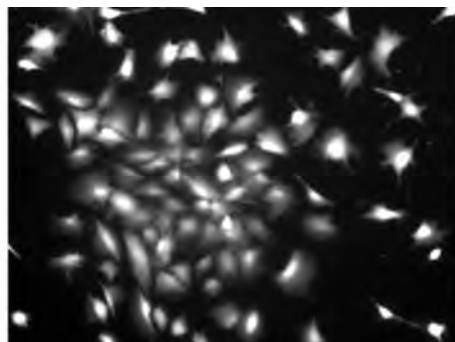


图 4 BMSCs 种植在 CH-GP-HEC 温敏凝胶膜上培养 7d 细胞的形态

Fig.4. Living cell fluorescent staining photomicrography of cell-seeded CH-GP-HEC after 7 days

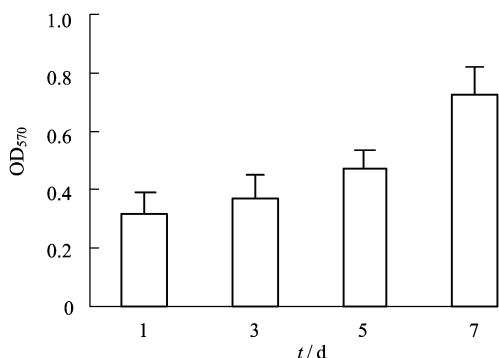


图 5 BMSCs细胞在CH-GP-HEC浸提液中的生长情况  
Fig.5. Proliferation of BMSCs in extraction fluid medium of CH-GP-HEC

### 3.6 体内植入试验

所有动物均没有出现感染死亡,材料与周围组织紧密结合,组织可长入材料内。试验组小鼠均无明显炎症反应,12周后材料体积较植入4周时有所减小。说明该凝胶材料具备良好生物相容性,无毒性及免疫原性,可在体内缓慢降解。

## 3 讨论

壳聚糖是自然界存在的唯一带阳电荷的碱性多糖,在体内可降解,生物相容性好,在生物医学工程有着广泛的应用。近年来,已有利用壳聚糖制备温敏性凝胶的报道<sup>[3-5]</sup>。然而,这些研究对如何调节控制凝胶成胶的条件以及选择最优生物相容性的配比组成少有研究。

本研究对制备的壳聚糖基温敏性溶液的性能以及影响凝胶形成的多种因素,调节控制凝胶成胶的条件以及良好生物相容性的最佳组成进行了深入研究。结果显示当壳聚糖和GP浓度愈低时,其溶液的流动性愈好,在GP浓度较低时,凝胶的pH值较低,显酸性,而在浓度较高时,凝胶的pH值接近人体体液的pH值。pH值在CH/GP温控凝胶化过程中的具有重要的作用,pH值较低时由于存在链间静电排斥力,阻碍了氢键的形成,这种排斥力的作用,使得凝胶化的初始温度较高。随着GP的浓度增加,溶液的初始温度逐渐降低,在37℃时的成胶时间逐渐缩短。这是由于GP的加入直接影响壳聚糖链之间的静电力、疏水作用和氢键作用的结果。

结果表明含800 mg/mL GP的凝胶溶液初始温度为36.8℃,可在体内温度下成凝胶化,成胶时间约为30 min。但从材料的细胞毒性的MTT结果显示,

较高磷酸盐(GP)浓度抑制细胞的生长,GP浓度为100~400 mg/mL时有利于细胞的生长,含高GP浓度(600~800 mg/mL)的溶液,具有较强的细胞毒性,可引起细胞的死亡。这是因为含800 mg/mL GP的溶液的渗透压约为1080 mOsm,大大高于人体细胞的正常渗透压,抑制细胞的生长,因此在考虑溶液成胶时间的同时也要兼顾细胞的生长情况。含400 mg/mL GP的溶液,在37℃时成胶时间较长,达不到在体内环境下能迅速成胶的要求。

因此,本研究在400 mg/mL CH-GP凝胶配方的基础上加入不同浓度的HEC,HEC的加入降低了溶液的成胶时间,其加入量与凝胶时间成反比。结果显示,CH-400 mg/mL GP的初始凝胶温度为46℃,加入20 mg/mL HEC后初始温度为13℃,前者在37℃的成胶时间为72 h,而后者只有7 min,且对细胞的生长有促进的作用。

溶胀结果可以看出,CH-GP-HEC具备更良好的溶胀性能,材料大量吸收水分的特性,增加了与组织的亲和性,因而具有更好的生物相容性。

在组织工程的支架材料中,细胞的活力和功能与材料表面的化学结构是相关的。本研究结果表明,CH-400 mg/mL GP凝胶中加入HEC,不仅缩短了成胶时间,降低了初始温度,而且由于选择低β-甘油磷酸钠(400 mg/mL GP)含量增加了其生物相容性。另外,羟乙基纤维素的加入,还起到了疏松剂和交联剂的作用,促使壳聚糖水凝胶更快凝结为固体,同时也有利于细胞合成和分泌细胞外基质,可用于组织工程支架材料领域。

### 参考文献:

- [1] Qingpu Hou, Paul A. De Bank, et al. Shakesheff. Injectable scaffolds for tissue regeneration [J]. *J Mater Chem*, 2004, 14, 1915-1923
- [2] Hoemann C D, Sun J. Tissue engineering of cartilage using an injectable and adhesive chitosan-based cell-delivery vehicle [J]. *OsteoArthritis and Cartilage*, 2005, 13(4): 318-329.
- [3] Chenite A, Chaput C, Wang D, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ [J]. *Biomaterials*, 2000, 21: 2155-2161.
- [4] Stephen M, Richardson b, Nesta Hughesb Hoylanda, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels [J]. *Biomaterials*, 2008, 29: 85-93
- [5] Molinaro G, Leroux J C, Damas J, et al. Biocompatibility of Thermosensitive Chitosan-based Hydrogels: An In vivo Experimental Approach to Injectable Biomaterials [J]. *Biomaterials*, 2002, 23(13): 2717-2722.