

• 研究论文 •

硫酸软骨素 A、C 复配型胶原蛋白基止血抗炎水凝胶的制备及性能研究

吴垵妍^{1,2}, 李渊丽², 周娟^{1*}, 陈敬华^{2*}

(1. 江南大学生物工程学院, 无锡 214122; 2. 江南大学药学院, 无锡 214122)

摘要: 胶原蛋白基水凝胶是较为理想的创面修复敷料材料之一, 但其对伤口的炎症调节作用仍需要强化。本研究以胶原蛋白为基质材料, 复配硫酸软骨素 A (CSA) 和硫酸软骨素 C (CSC) 后, 通过与醛基化聚乙二醇交联制备水凝胶。通过扫描电镜观察到该水凝胶孔隙致密均一, 综合溶胀实验结果显示出良好的吸水率, 利于后期应用于伤口时吸收组织渗液。细胞毒性实验及使用激光共聚焦荧光显微镜观察细胞在水凝胶上的生长情况, 实验表明水凝胶有利于巨噬细胞和成纤维细胞的增殖。水凝胶的溶血率低于 1.5%, 同时凝血指数 (BCI) 明显降低, 扫描电镜观察血细胞凝集效果良好。这些结果都表明胶原蛋白基硫酸软骨素复合水凝胶具备作为止血抗炎敷料的潜力。

关键词: 硫酸软骨素; 胶原蛋白; 止血; 抗炎; 水凝胶

Collagen Based Hydrogel Containing Chondroitin Sulfate A or C with Hemostatic and Anti-inflammatory Potential

WU Shang-yan^{1,2}, LI Yuan-li², ZHOU Juan^{1*}, CHEN Jing-hua^{2*}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The primary consideration in wound treatment is hemostasis and regulating inflammation, so the development of hemostatic and anti-inflammatory dressings is of great significance. In this study, two kinds of hydrogels based on collagen were prepared and their hemostatic and anti-inflammatory effects were tested. Collagen was compounded with chondroitin sulfate A (CSA) and chondroitin sulfate C (CSC), which have anti-inflammatory effects, respectively, and the resulting complex was chemically cross-linked with aldehyde benzoic acid modified polyethylene glycol 6000 (APG6000) to form hydrogels. The hydrogel had a sudden release of chondroitin sulfate A or chondroitin sulfate C, which had the potential of rapid anti-inflammatory when applied to skin wounds. The pores of the hydrogels observed by the scanning electron microscope (SEM) were compact and uniform. The results of swelling experiment showed favorable water absorption. Both of above properties were beneficial to absorb tissue exudation when applying hydrogels to wound. The results of MTT and living cell staining experiments reflected that the two hydrogels contributed to proliferation of macrophages and fibroblasts. The hemolysis rate of the hydrogels was lower than 1.5%, the blood clotting index (BCI) decreased significantly, and the hemagglutination effect was positive. These results indicated that the two hydrogels have the

收稿: 2022-02-03; 修回: 2022-03-09

基金项目: 国家重点研发项目 (2021YFC2103100), 江苏省自然科学基金青年项目 (BK20170203) 资助

作者简介: 吴垵妍 (1996-), 女, 硕士生在读, 研究方向为医用生物材料。E-mail: 6190207013@stu.jiangnan.edu.cn

* 通讯联系人: 周娟, 女, 副研究员, 从事医用生物材料、纳米药物递送系统方面研究。E-mail: juanzhou@jiangnan.edu.cn; 陈敬华, 男, 教授, 从事药剂学、医用生物材料、生物活性高分子、糖药物方面研究。E-mail: chenjinghua@jiangnan.edu.cn

doi: 10.14028/j.cnki.1003-3726.2023.01.006

potential as hemostatic and anti-inflammatory dressings.

Keywords: Chondroitin sulfate; Collagen; Hemostasis; Anti-inflammatory; Hydrogel

皮肤伤口的愈合是一个动态的过程,主要分为止血阶段、炎症阶段、增殖阶段和重塑阶段,是通过一系列不同类型细胞的迁移和增殖、细胞外基质沉积和组织重塑相关的免疫反应进行修复^[1~3]。针对伤口处理已有不少敷料上市,理想的伤口敷料应能快速控制出血量,具有良好的生物相容性,特别是一些难愈合伤口,敷料需兼具炎症调节的作用。传统敷料如多层纱布、棉絮等虽能有效防止伤口遭受外部污染,但其凝血能力差,对渗出液的管理能力有限;针对一些慢性创面,在使用这些敷料时要额外使用消炎药物,患者必须不断地加药换药,依从性较低^[4~9]。另外,大部分敷料在使用时易粘附于伤口上,如果这些敷料的生物相容性差,或者必须被剥离,势必会引起感染或对新的肉芽组织造成继发性损伤,并伴有出血^[1,2,10]。因此,开发具备止血、炎症调节作用的伤口友好型创面敷料是目前皮肤组织工程领域的研究重点之一。

水凝胶因其保水性、形状多调性及易制备等特点,被广泛用作组织工程的支架材料。其中,以天然高分子为基质材料制备的水凝胶因具有良好的生物相容性和环境敏感性,引起越来越多学者的重视并被开发作为伤口敷料^[11,12]。胶原蛋白基质水凝胶是备受关注的伤口敷料选择之一^[13,14]。胶原蛋白本身可以在原发性止血中触发血小板活化,并在继发性止血中激活凝血因子VIII、IX、XI和XII等的表达,可有效发挥凝血的作用^[1,4]。此外,胶原蛋白可以为细胞生长提供最佳微环境,促进细胞纤维网络形成,同时通过与细胞受体相互作用来调节细胞分化和迁移^[5]。胶原蛋白基水凝胶在伤口修复的止血、增殖和重塑阶段都能起到积极的促进效果,但是在炎症调节阶段的作用仍需要强化^[4,15]。止血过程结束及受伤24~48 h内,急性炎症出现,这一过程的特点就是出现大量促炎细胞及促炎因子^[16]。传统的胶原蛋白基辅料在快速调节抗炎症巨噬细胞和促炎症巨噬细胞平衡,进而缓和急性炎症的能力不够强大,因此对伤口的急性炎症情况的作用是局限的。通常会在胶原蛋白基质材料中额外复配药物构建复合材料,以此作为递药平台定位于伤口给药,平衡伤口微环境从而调节急性炎症^[17~19]。另外,每个

原胶原分子由三条 α -肽链组成,这三条 α -肽链借范德华力、氢键及共价交联方式缠绕成“草绳状”三股螺旋结构,使单个胶原具有很高的拉伸强度。但是利用其作为基质组分进行相关宏观材料的构建时,若不进行一定的有序处理,形成的整体是缺乏足够强度的^[20]。同时,胶原蛋白在体内易被胶原酶降解,也大大限制其应用。目前在开展胶原蛋白基生物材料的研究中,通常是对胶原蛋白进行物理或化学交联组成稳定的复合材料,提升机械性能^[14,21~23]。

综上,本文以胶原蛋白(COL)为基质材料,分别复配硫酸软骨素A(CSA)和硫酸软骨素C(CSC),并通过醛基苯甲酸修饰的聚乙二醇(APG)交联形成复合水凝胶(CS/COL/APG)^[14]。其中,糖胺聚糖CSA和CSC已被证明能有效地减少软骨细胞和滑膜细胞,产生促炎症细胞因子、活性氧和NO^[24]。CSC可抑制巨噬细胞的促炎症表型同时提高IL-10水平,可使巨噬细胞转向抗炎/伤口愈合状态^[25]。将其复配于胶原蛋白水凝胶中可赋予水凝胶调节伤口炎症的功效。利用醛基化聚乙二醇交联胶原蛋白可达到提升复合水凝胶机械性能的目的,又可以保证水凝胶的生物相容性。本文系统地分析了水凝胶的微观结构、粘附性能、溶胀性能、降解行为以及释放硫酸软骨素的效率,同时通过细胞实验分析其细胞相容性,最后基于溶血实验、BCI和血小板吸附实验检测水凝胶的凝血作用(图1)。

1 实验部分

1.1 实验原料和仪器

I型胶原蛋白($M_w \geq 300$ kDa)购自无锡贝迪生物工程有限公司,硫酸软骨素A、C购自上海麦克林生化科技有限公司,胰酶购自美国Sigma公司,青霉素-链霉素、DMEM高糖细胞培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自美国Hyclone公司,剩余试剂均为国药集团化学试剂有限公司。NIH 3T3细胞及RAW 264.7细胞均来自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 水凝胶制备

制备对醛基苯甲酸修饰的聚乙二醇6000:精

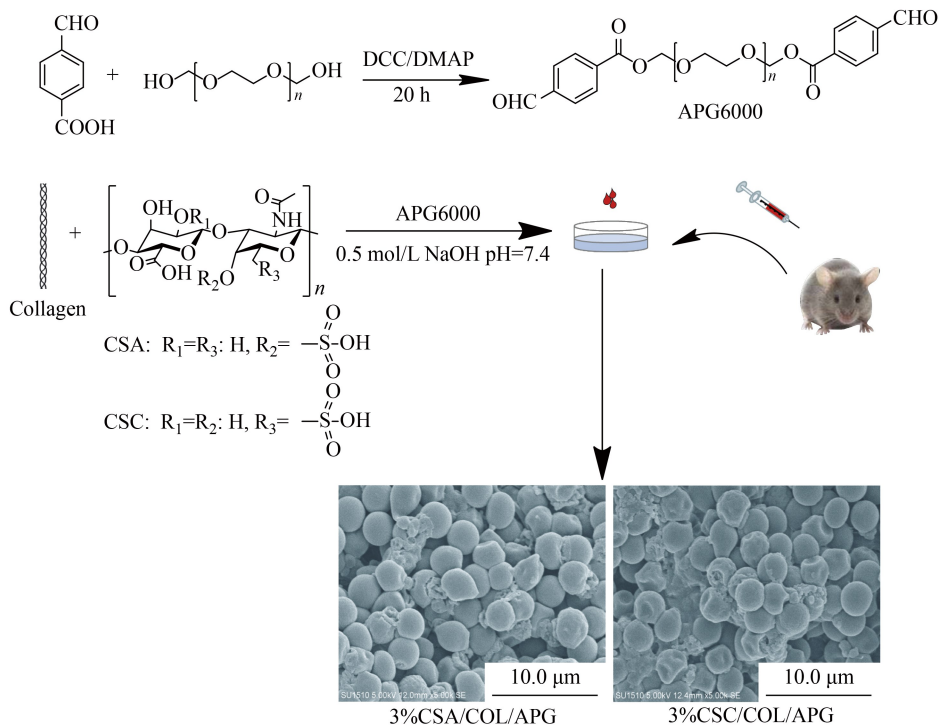


图 1 添加 CSA 或 CSC 具有止血和抗炎潜力的 COL/APG 水凝胶合成示意图

Figure 1 Schematic illustration of CSA or CSC additive COL/APG hydrogels with potential of hemostasis and anti-inflammatory

准称量聚乙二醇($M_w = 6000$, 3.260 g)、4-二甲胺吡啶(DMAP, 0.016 g)、4-甲酰基苯甲酸(0.320 g)溶于无水四氢呋喃(45 mL)中,溶解至澄清溶液。精准称量 N,N -二环己基碳酸二亚胺(DCC, 0.560 g),溶解于无水四氢呋喃(5 mL)中,在氮气保护下缓慢逐滴加入上述澄清溶液。将上述溶液室温搅拌充分反应 20 h 后,抽滤后得到澄清溶液。将抽滤得到的澄清液体缓慢逐滴加入无水乙醚(500 mL)中,充分沉降,抽滤获得白色固体,将其溶解于无水四氢呋喃(20 mL)中,再次继续缓慢逐滴加入无水乙醚(500 mL)中,进行抽滤。抽滤过程重复 3 次,可得到纯化的对醛基苯甲酸修饰的聚乙二醇 6000 (APG6000)^[14,26~28]。对 APG6000 采用德国 Bruker 公司生产的 TENSOR II 型傅里叶变化红外仪进行红外光谱(FT-IR)分析,利用 AVANCE III 型全数字化核磁共振谱仪进行氢谱结构分析(¹H-NMR)^[28]。

配制胶原蛋白/APG6000 (COL/APG) 水凝胶的比例根据前期的工作对比选出^[14]。将 APG6000 (5.3%, W/V)溶解在超纯水中,形成澄清溶液后,加入胶原蛋白(3%, W/V)充分溶解,形成 COL/APG6000 混合溶液。用 NaOH (0.5 mol/L)溶液

调节 pH 值至 7.4 左右,在 7000 r/min 转速下离心 2 min 以消除气泡,随后转移至模具中。

制备复配 CSA、CSC 的 COL/APG6000 水凝胶(CS/COL/APG),方法如上述制备 COL/APG 水凝胶方法。将 CSA 或者 CSC(3%、6%、12%, W/V)分别溶解在 APG6000 (5.3%, W/V)的溶液中,形成澄清溶液,加入 3%(W/V)的胶原蛋白充分溶解,形成 COL/APG6000/CS 混合溶液。用 NaOH 溶液(0.5 mol/L)调节 pH 值至 7.4 左右,在 7000 r/min 转速下离心 2 min 以消除气泡,随后转移至模具中,静置即可得到 CS/COL/APG 水凝胶。

1.3 硫酸软骨素的抗炎性能测试

为探究浓度对硫酸软骨素抗炎效果的影响来确定水凝胶中硫酸软骨素的添加量。选取和 CS/COL/APG 水凝胶中 CSA、CSC 一致的添加量,分别加入添加有 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素、90% DMEM 高糖培养基中,在上述培养基中加入 LPS 作为实验组,将生长状态良好的 RAW 264.7 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板中,用上述培养基培养分别培养细胞 24 h,收集上清液。根据说明书,用 Griess 试剂盒测量一氧化氮产生量^[29]。

1.4 水凝胶的性能测试及结构表征

1.4.1 傅里叶红外变换光谱表征(FT-IR)

在前期结果中 APG6000 在 1717 cm^{-1} 处出现醛基(C=O)特征峰,而 COL/APG 水凝胶在 1648 cm^{-1} 处新出现亚胺(C=N)拉伸振动峰。为检测加入 CSA、CSC 后是否会影响水凝胶交联的亚胺振动峰,将冻干后的水凝胶样品置于样品台,下降探针使之与样品紧密接触,进行测定。采用德国 Bruker 公司生产的 TENSOR II 型傅里叶变换红外仪,扫描次数为 128 次,扫描范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。

1.4.2 扫描电镜(SEM)

水凝胶内部空洞对于后续凝血、吸收组织渗液及溶胀降解等性能尤为重要。为观察加入不同种类及不同浓度的硫酸软骨素是否会影响水凝胶内部孔洞结构,将真空冻干后的水凝胶样品浸入液氮后,快速断开得到样品截面。样品截面向上粘附于贴有导电胶的样品台上,喷金处理后,使用日本日立株式会社生产的 su1510 型扫描电子显微镜,在 5 kV 加速电压下观察内部孔洞结构。

1.4.3 水凝胶的粘合强度测试

作为伤口敷料,水凝胶应具备一定的皮肤组织粘附力。为模拟生理环境,将水凝胶涂抹于脱脂后的猪皮以评估水凝胶样品的粘合强度。使用美斯特工业系统(中国)有限公司生产的 E43 系列的 MTS 电子万能试验机,选用 50 N 测力传感器,以 5 mm/min 的速率拉伸猪皮测试粘合强度^[14,30]。

1.4.4 复配 CSA、CSC 的 COL/APG6000 水凝胶(CS/COL/APG)的 CS 释放

CS/COL/APG 水凝胶释放的硫酸软骨素具有调节炎症的作用,而炎症是贯穿伤口愈合四阶段的重要过程,所以确定 CS/COL/APG 水凝胶释放硫酸软骨素的过程尤为重要。阿利新蓝是一种中心具有铜离子的四价阳离子染料,且在强酸条件下只与硫酸化糖胺聚糖相互作用^[31,32]。所以采用阿利新蓝 8GX 测定方法,评估复配 CSA、CSC 水凝胶中 CSA、CSC 的释放情况。先确定阿利新蓝分别于 CSA、CSC 的吸收波长及标准曲线,再将 $300\text{ }\mu\text{L}$ 体积的水凝胶加入 5 mL pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 100 r/min 的恒温培养箱中,并在固定时间点 1、2、3、6、12、24、36、48、72、120、168 h 取出释放液($500\text{ }\mu\text{L}$),再补充 PBS 缓冲液($500\text{ }\mu\text{L}$)。将上述释放液($100\text{ }\mu\text{L}$)

与阿利新蓝 8GX 标准液(0.4 mg/mL)混合 15 min 后,在先前确定的吸收波长下使用岛津国际贸易有限公司生产的 UV2250 型紫外分光光度计测量紫外吸光值。

1.4.5 样品溶胀性能测试

伤口敷料若具备优异的溶胀性能可以应对伤口出血、有组织渗液等特殊情况的发生,将真空冻干后的水凝胶样品置于 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜上,该滤膜置于装满 pH7.4 的 PBS 缓冲液的容器上,使液体可以自由穿过滤膜,以此模拟伤口渗液测定 CS/COL/APG 水凝胶的溶胀性能^[33]。整个体系置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下,并在固定时间点 2、5、10、15、20、30、40、60、90 min,2、3、4、6、8、10、12、24、48 h 取出,用滤纸除去表面多余水分并称重。水凝胶溶胀率(SR)计算公式如下:

$$\text{SR}(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中, m_0 为初始样品重量, m_t 为不同时间点样品重量。

1.4.6 样品降解性能测试

按照上述 1.4.5 节模拟伤口渗液方法,在固定时间点 1、2、3、5 天取出水凝胶样品,用超纯水润洗水凝胶后,将水凝胶真空冻干称重。降解率(DR)计算公式如下:

$$\text{DR}(\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100\% \quad (2)$$

其中, m_0 为初始样品重量, m_t 为不同时间点样品重量。

1.4.7 水凝胶抗炎性能表征

探究 CS/COL/APG 水凝胶的抗炎性能,采用水凝胶浸提液方法。将水凝胶加入添加有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素、90% DMEM 高糖培养基中,在上述培养基中加入 LPS 作为实验组,将生长状态良好的 RAW 264.7 细胞以 2×10^5 /孔接种于 6 孔板中,用上述培养基培养分别培养细胞 24 h,收集上清液。根据说明书,用 Griess 试剂盒测量一氧化氮产生量^[29]。

1.4.8 水凝胶的细胞毒性测试

极低的细胞毒性是优异的水凝胶伤口敷料具备的最基本条件。采用 MTT 比色法评估水凝胶对 NIH 3T3 细胞和 RAW 264.7 细胞的毒性。将水凝胶以 $50\text{ }\mu\text{L}$ /孔铺于 96 孔板中,超净台中紫外照射 30 min ^[14]。将 NIH 3T3 细胞和 RAW 264.7 细胞以 5000 个/孔接种于上述 96 孔板中,在

37 °C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中分别培养 24、48、72 h 后吸出原培养基,每孔加入 MTT 磷酸缓冲液(100 μL,0.5 mg/mL),继续在 37 °C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱下培养 4 h。吸出 MTT 磷酸缓冲液后,加入二甲基亚砜(DMSO)室温静置 15 min,使用美国伯乐公司生产的 680 型酶标仪测量 570 nm 处溶液吸光值。其中,未铺水凝胶培养细胞的孔板为空白对照组。细胞相对活性(CV)计算方法如下:

$$CV(\%) = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{hydrogel}}}{OD_{\text{control}}} \times 100\% \quad (3)$$

其中,OD_{sample}、OD_{hydrogel}、OD_{control} 分别代表加入细胞培养后的吸光值、水凝胶的吸光值、空白对照组的吸光值。

1.4.9 细胞在水凝胶上的形貌特征

采用荧光共聚焦显微镜微观观察细胞在水凝胶上生长的形貌特征,将水凝胶铺于共聚焦皿内,以 1×10⁵ 个/皿细胞数量接种于共聚焦皿内。在 37 °C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱下培养 24、48、72 h,其中每隔 24 h 更新培养基。培育结束后,用 PBS 缓冲溶液轻柔清洗 2 次后,加入 4 μmol/L 钙黄绿素-AM 染色 25 min,再用 PBS 缓冲溶液轻柔冲洗 3 次,最后加入 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min 后,继续用磷酸缓冲溶液轻柔冲洗 3 次。使用日本 Nikon 公司生产的 Ti2-E+AI 型全自动倒置荧光共聚焦显微镜观察细胞在水凝胶上的形态。

1.4.10 水凝胶溶血实验

为防止血液与材料接触后,材料可能会导致红细胞破裂而发生溶血现象,首先评估水凝胶材料的溶血性能^[34]。小鼠取血,将血液与柠檬酸葡萄糖溶液(ACD)按 5:1 混合,制备抗凝小鼠血液。5000 r/min 离心 5 min,加入适量 PBS 缓冲液冲洗,此过程重复 3 次。吸取下层细胞沉淀液,加入 PBS 缓冲液混合均匀制得 5% 的红细胞(RBCs)悬液。将 500 μL 红细胞(RBCs)悬液与 950 μL PBS 缓冲液加入装有水凝胶的离心管中,37 °C 培养箱中培养 2 h 后,以 5000 r/min 离心 5 min 得到上层清液,用酶标仪测量 540 nm 处的吸光值。其中,阳性对照组为 500 μL RBCs 悬液与 950 μL 去离子水混合后的 OD 值,阴性对照组为 500 μL RBCs 悬液与 950 μL PBS 缓冲液混合后的 OD 值。溶血率(HR)的计算公式如下:

$$HR(\%) = \frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{negative}}}{OD_{\text{positive}} - OD_{\text{negative}}} \times 100\% \quad (4)$$

其中,OD_{sample} 为样品吸光值,OD_{negative} 为阴性对照组吸光值,OD_{positive} 为阳性对照组吸光值。

1.4.11 水凝胶凝血实验

水凝胶凝血特性通过体外凝血指数(BCI)评估^[35]。用 0.1 mol/L CaCl₂ 来活化抗凝小鼠血液,在 24 孔板中制备 100 μL 水凝胶,每块水凝胶上加入 50 μL 活化血液。37 °C 培养箱内培养,在不同时间点 5、10、30、60、90、120 min 加入 2 mL 去离子水溶解未凝固的血液,用紫外可见光谱测试 540 nm 处的 OD 值。其中,以 50 μL 小鼠全血溶解在 2 mL 去离子水中 OD 值为对照组,体外抗凝血指数(BCI)计算公式如下:

$$BCI(\%) = \frac{OD_{\text{sample}}}{OD_{\text{reference}}} \times 100\% \quad (5)$$

其中,OD_{sample} 为样品吸光值,OD_{reference} 为对照组吸光值。

1.4.12 水凝胶血细胞粘附实验

观察血细胞在水凝胶上的粘附情况可以更直观评价水凝胶的止血效果^[35]。取小鼠血液,离心机 1500 r/min 转速条件下离心 15 min,使小鼠全血分层。富血小板血浆层(PRP)位于中间薄层,可多次离心提取富血小板血浆层(PRP),尽可能取出富血小板血浆层(PRP)。水凝胶(100 μL)制备在 24 孔板中,加入富血小板血浆(PRP,100 μL),37 °C 培养箱内培养 3 h。培养结束,用 PBS 缓冲溶液轻柔清洗水凝胶以去除未粘附的血细胞,共清洗 3 次。滴加 2.5% 戊二醛溶液在水凝胶样品上以固定血小板,放入 4 °C 冰箱冷藏 2 h。随后取出样品,用 PBS 缓冲液冲洗,冲洗后重复上述步骤 3 次。固定后,进行样品脱水处理。依次用浓度为 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的乙醇溶液浸泡 5 min。脱水处理结束,将样品放入 4 °C 冰箱,自然干燥后进行扫描电镜(SEM)拍摄,观察血小板在水凝胶上的粘附情况^[30]。

2 结果与讨论

2.1 胶原蛋白基复合水凝胶的制备及结构表征

在前期工作中,我们采用不同分子量的醛基化聚乙二醇(M_w=2000,4000,6000)交联胶原蛋白制备水凝胶,并进行了机械性能测定,结果表明分子量 6000 的醛基化聚乙二醇(APG6000)交联

的水凝胶最为稳定,因此本文选择 APG6000 作为交联剂开展水凝胶的制备。

首先利用傅里叶变换红外验证 APG6000 交联的复配不同浓度硫酸软骨素(3%, 6%, 12%)的水凝胶结构。醛基化聚乙二醇与胶原蛋白/硫酸软骨素复合物复配,调节 pH 到中性条件后,醛基化聚乙二醇的醛基和胶原蛋白上的伯胺发生缩合反应生成亚胺基团,即希夫碱^[36,37]。如图 2(a)所示,复合水凝胶包含了胶原蛋白和硫酸软骨素的所有特征峰,表明水凝胶体系中各成分的有效复配。此外,1648 cm⁻¹ 处出现了亚胺(C=N)拉

伸振动吸收峰,该峰来源于 APG6000 中醛基与胶原蛋白中氨基的相互反应,证明了醛基化聚乙二醇对胶原蛋白的成功交联。紧接着对水凝胶的内部结构进行了观察分析,扫描电镜结果显示 COL/APG 水凝胶的孔径在 100~200 μm (图 2b)。加入不同浓度 CSA 或 CSC 后,水凝胶的孔径明显变小(20~60 μm)且孔道形貌更加规则,同时孔径不随加入 CSA 或 CSC 的浓度变化而变化(图 2c)。这有利于后期硫酸软骨素的均匀释放。丰富且规则的孔道有利于水凝胶对伤口渗出液的吸收,也提升了水凝胶的稳定性能。

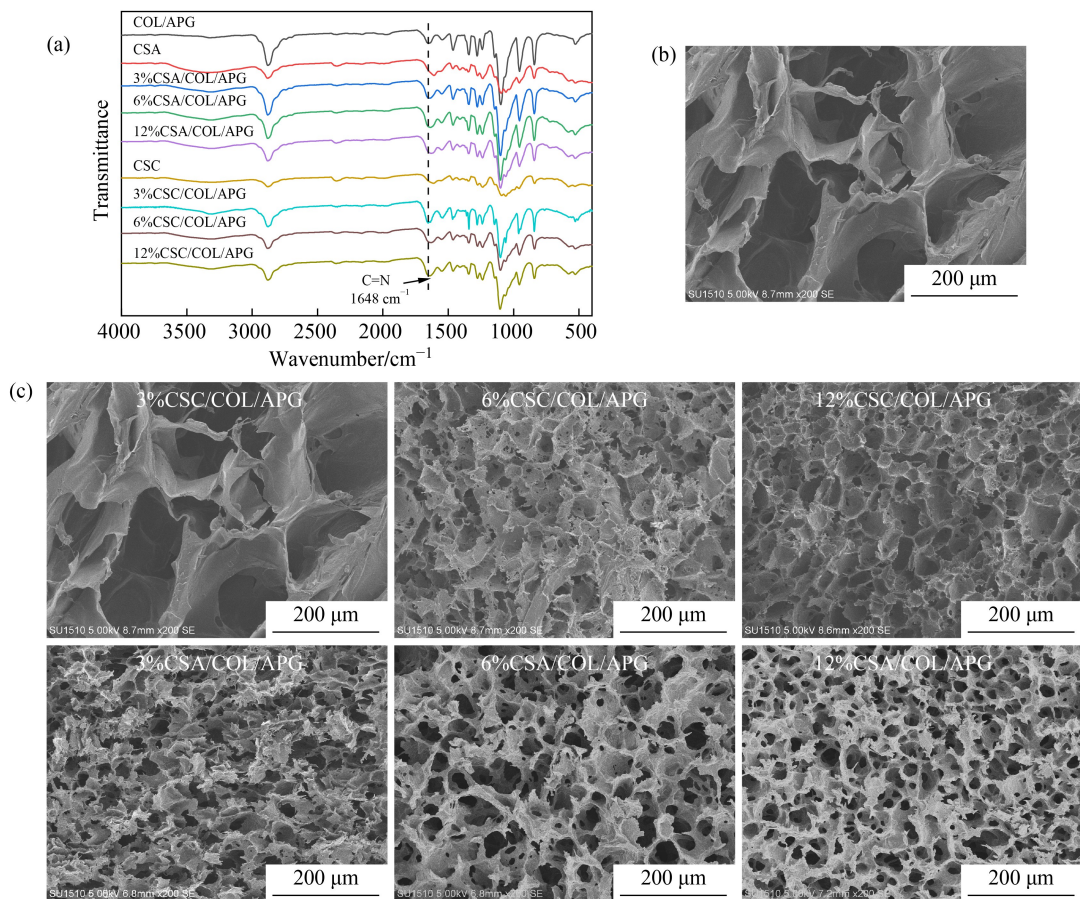


图 2 (a) 复配 CSA 或 CSC 的 COL/APG 水凝胶傅里叶红外图谱;

(b) COL/APG 水凝胶和(c) CS/COL/APG 水凝胶的 SEM 图

Figure 2 (a) FT-IR spectra of COL/APG6000 hydrogels with chondroitin sulfate A or C; SEM images of cross sections of (b) COL/APG6000 hydrogel and (c) CS/COL/APG hydrogels

2.2 胶原蛋白基复合水凝胶的硫酸软骨素释放情况

对胶原蛋白基复合水凝胶释放硫酸软骨素的能力进行了评估,验证其作为含水凝胶平台的潜力。从图 3(a)可以看出,复配 6%、12% CSA 的水凝胶 6% CSA/COL/APG, 12% CSA/COL/

APG 在 3 h 时都突释到 70%,最终释放平衡时分别达到 80%和 98%。复配 3%CSA 的水凝胶 3% CSA/COL/APG 在 3 h 时释放 45%的硫酸软骨素,在接下来的一周内呈现稳定释放模式,最终达到 70%的释放量。同样,复配 3% CSC 的 3% CSC/COL/APG 水凝胶在起初的 3 h 内释放约

50%的硫酸软骨素,在接下来的一周内缓慢释放,最终 CSC 的释放量达 86%。而复配 6%、12% CSC 的水凝胶 6% CSC/COL/APG, 12% CSC/COL/APG 在 3 h 时都突释 60%,并最终达到 95%的 CSC 的释放率(图 3b)。复配 6%、12% 硫酸软骨素的水凝胶在短时间内发生突释行为的原因主要

是负载量过高,产生硫酸软骨素的倾泻,这样的释放模式会造成创面伤口的药物浓度激增,进而可能引发毒性风险。而水凝胶 3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 释放硫酸软骨素的方式,尤其是后期稳定的释放行为,有利于伤口部位维持一定的药物浓度。

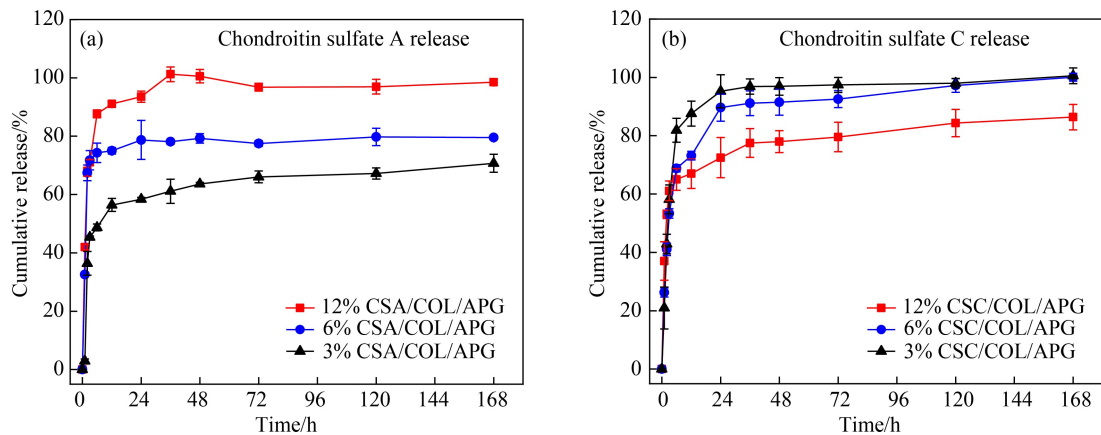


图 3 水凝胶在 PBS (pH=7.4) 中的 (a) CSA 和 (b) CSC 释放曲线 ($n=3$)

Figure 3 (a) CSA and (b) CSC release curves of hydrogels in PBS (pH=7.4) ($n=3$)

2.3 胶原蛋白基复合水凝胶的粘合及溶胀性能测试

具有粘性的水凝胶可以很好地粘附伤口,形成密闭的环境,进而可促进微血管的增生和肉芽组织的形成,加速创面愈合。本文制备的水凝胶中胶原蛋白和硫酸软骨素都具备一定的粘性,因此利用万能拉力机测试了模拟生理环境下水凝胶的粘合强度。图 4(a)显示 COL/APG 水凝胶的粘合强度约 15 kPa,加入 CSA 或 CSC 后水凝胶的粘合强度都有不同程度的增加,达到约 20 kPa,均比市售的纤维蛋白黏附剂(5 kPa)优异。这样的粘合强度足以粘附伤口且很好地封闭伤口。

水凝胶的溶胀性能可以直观地反映其吸收伤口渗出液的能力。选择复配有 3% CSA 或 3% CSC 的水凝胶为代表进行了溶胀实验。图 4(b)显示在模拟伤口渗液环境中, COL/APG、3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 三种水凝胶都可以在 30 min 内快速达到 600% 的溶胀率,在 10 h 后,三种水凝胶都达到了溶胀平衡状态。由于添加 CSA 或者 CSC 后,水凝胶的孔隙更为丰富,3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 水凝胶的溶胀率均大于 COL/APG 水凝胶的最终溶胀率。但三种水凝胶都可以吸收自身重量 10 倍及以上的液体,可用于吸收伤口渗液。如

图 4(c)所示, COL/APG 第一天的降解率为 61%, 5 天降解率达到 66%。水凝胶的降解为细胞的生长粘附提供更多可能性,同时为组织再生也提供空间。另外,由于 CSA、CSC 未交联于 COL/APG6000 水凝胶中,因此 3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 水凝胶的失重情况高于单纯 COL/APG 水凝胶。

2.4 硫酸软骨素 A、C 及胶原蛋白基复合水凝胶抑炎性能的验证

为了验证胶原蛋白基复合水凝胶调节伤口炎症的作用,我们首先在细胞层面评估 CSA、CSC 的抑炎性能,并监测其添加量对抑炎性能的影响。先利用脂多糖(LPS)诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 释放 NO,然后向细胞培养皿中加入 CSA、CSC 进行调节,最后利用 Griess 反应测定 NO 的量,进而评估硫酸软骨素的抑炎性能。如图 5(a)所示, LPS 诱导后 RAW 264.7 细胞释放约 20 mmol/mL 的 NO,添加硫酸软骨素后, NO 的释放量得到了明显的抑制,抑制效率与硫酸软骨素的用量成反向趋势。其中加入了 3% CSA、3% CSC 的细胞样品里产生的 NO 约 2 mmol/mL,几乎与正常 RAW 264.7 细胞的 NO 释放量持平,表明其优异的抑炎性能。结合水凝胶的释药行为以及硫酸软骨素的抑炎性能结果,最终选择 3%

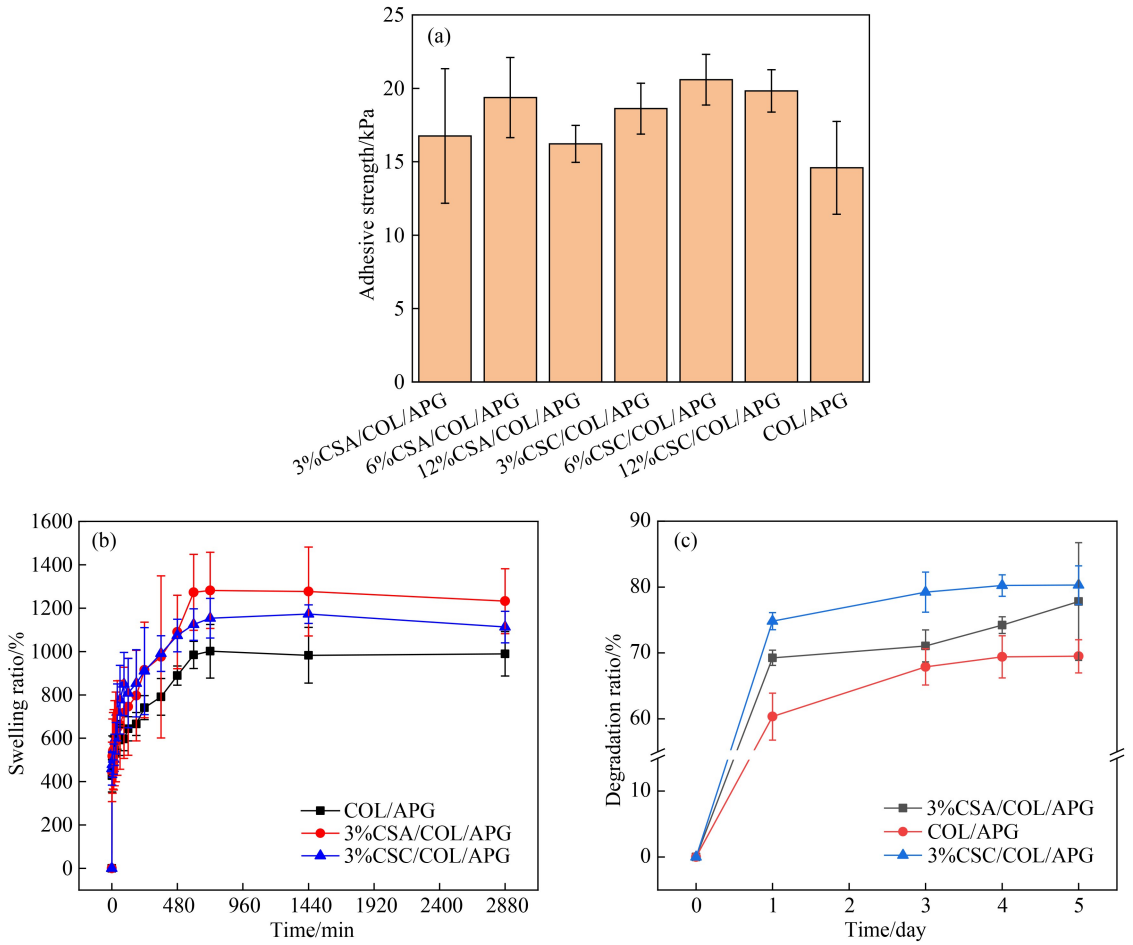


图 4 (a)水凝胶的黏附曲线,在 PBS (pH=7.4)的(b)溶胀曲线(n=5)和(c)降解曲线(n=5)

Figure 4 (a) Adhesive strength curves, (b) swelling ratio curves and (c) degradation ratio of hydrogels in PBS (n=5)

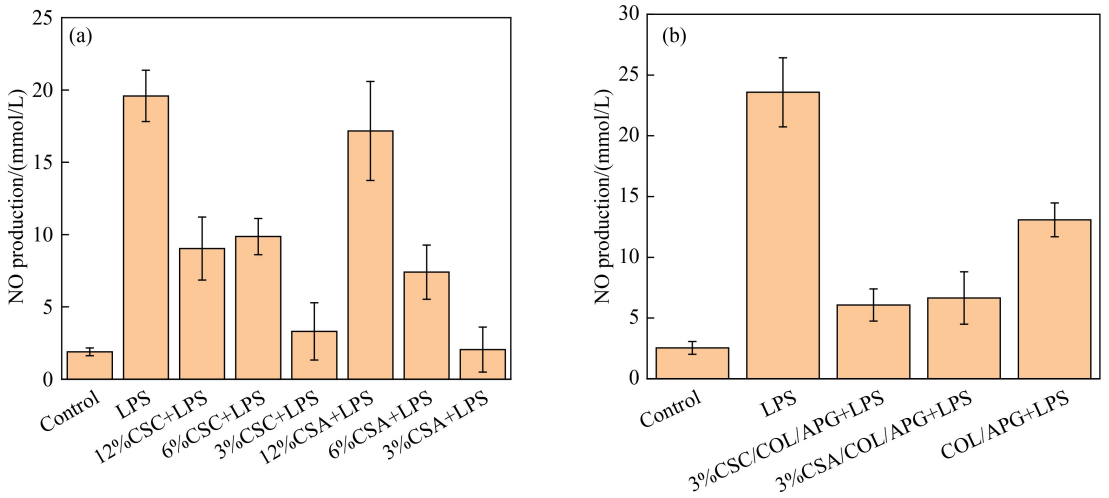


图 5 (a) CSA 或 CSC 和 (b) CS/COL/APG 对 LPS 诱导 RAW 264.7 细胞产生 NO 的影响(n=6)

Figure 5 Effects of (a) CSA or CSC and (b) CS/COL/APG hydrogels on NO production in LPS induced RAW 264.7 cells (n=6)

CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 进行后续水凝胶相关性能的验证。图 5(b)实验结果显示,3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 水凝胶浸提液培养 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞

产生的 NO 量分别为 6.0 和 6.2 mmol/mL,均小于单纯 COL/APG 浸提液培养的 RAW 264.7 细胞产生的 NO 量,表明复配 CSA,CSC 的水凝胶同样能抑制 NO 的释放,证明 3% CSA/COL/APG

和 3% CSC/COL/APG 水凝胶具有抗炎性能。

2.5 胶原蛋白基复合水凝胶的细胞相容性测试

细胞相容性是水凝胶能否作为生物组织材料

的先决条件。选用小鼠单核巨噬细胞 RAW 264.7 和小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 作为模型细胞系,采用直接接触法评估水凝胶的毒性。如图 6(a)和 6(b)所示,RAW 264.7 细胞和 NIH 3T3 细胞在

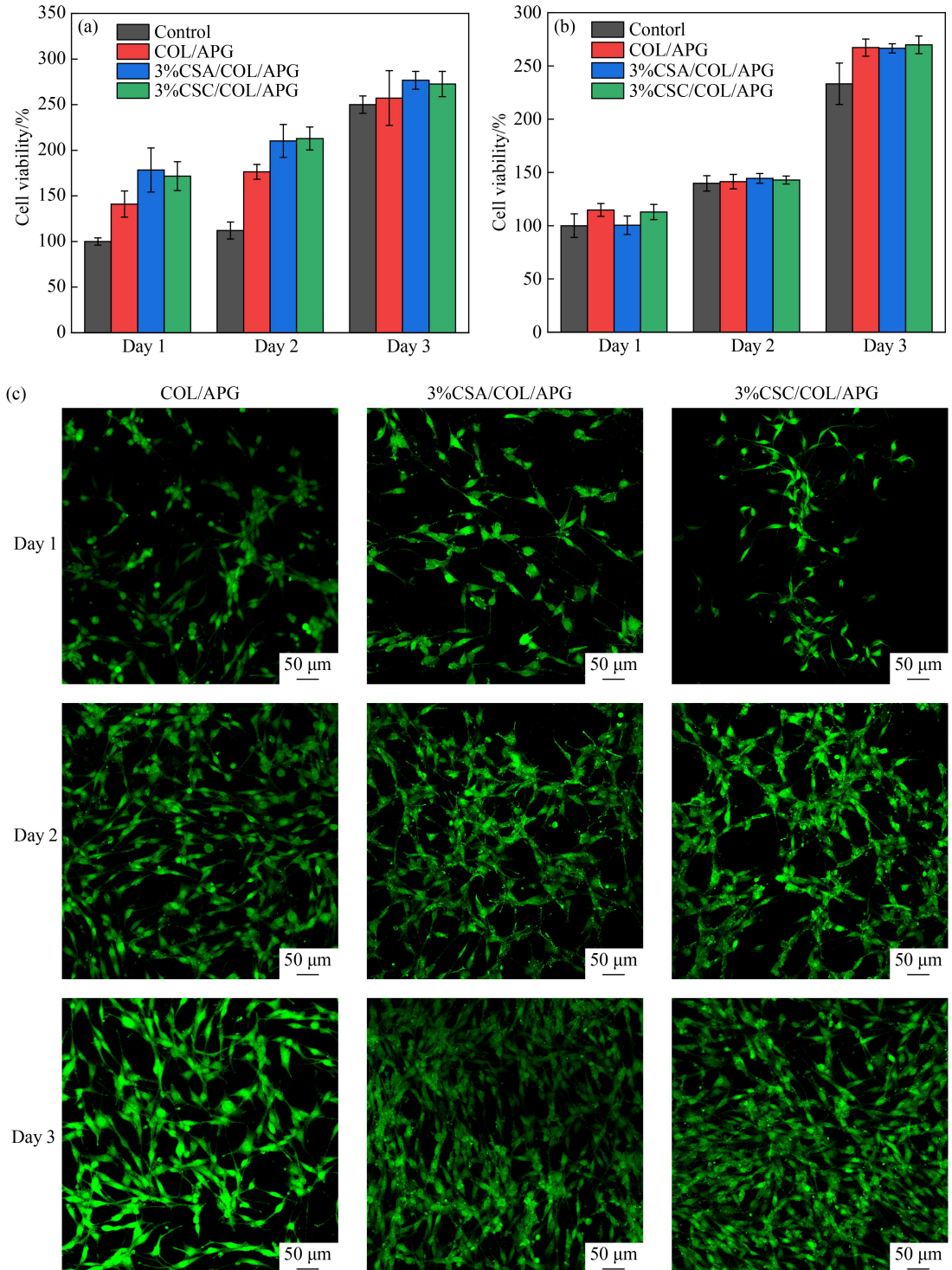


图 6 水凝胶对(a)RAW 264.7 细胞和(b)NIH 3T3 细胞的细胞毒性;

(c)共聚焦拍摄 NIH 3T3 细胞在水凝胶上生长情况:1 天,2 天,3 天

Figure 6 Cytotoxicity test of hydrogels on (a) RAW 264.7 and (b) NIH 3T3; (c) CLSM of NIH 3T3 cells on hydrogels for 1 day, 2 days, 3 days

三种水凝胶 COL/APG、3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 上均呈现增殖的状态,其中细胞在复合水凝胶 3% CSA/COL/APG 和 3% CSC/

COL/APG 上的存活率均高于 COL/APG 水凝胶和对照组。同时利用钙黄绿素-AM 对 NIH 3T3 活细胞进行荧光标记,通过荧光共聚焦显微镜观

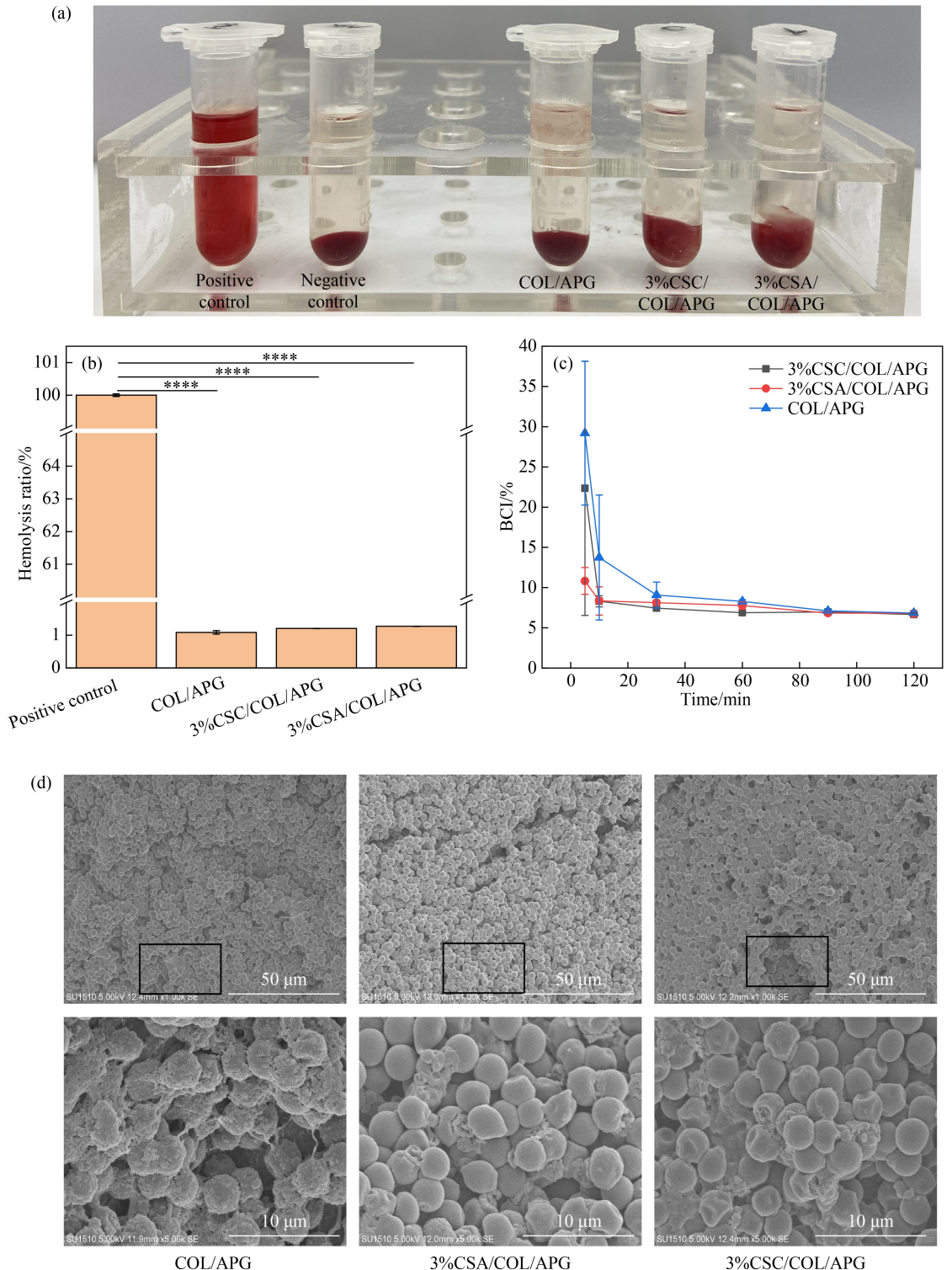


图 7 水凝胶的(a)凝血效果图;(b)凝血率;(c) BCI;(d)血细胞黏附的 SEM 图

Figure 7 (a) Hemolysis effect of hydrogels; (b) Hemolysis ratio of hydrogels; (c) BCI of hydrogels; (d) Scanning electron micrograph of platelet adhesion on hydrogels

察 NIH 3T3 细胞在水凝胶上的生长状况。如图 6(c)所示,共培 2 天时细胞已经在水凝胶上向四周延伸生长,到第 3 天时细胞几乎全覆盖在水凝胶表面,呈现良好的生长态势。以上结果表明水凝胶对两种细胞均没有毒性,并且是良好的支撑细胞附着、增殖的支架材料。

2.6 胶原蛋白基复合水凝胶的凝血性能测试

与血液直接或间接接触的医用材料需具备血液相容性,包括不产生溶血效应,因此,首先对胶原蛋白基复合水凝胶的血液相容性进行评估。如图 7(a)水凝胶溶血效果图显示,与阳性对照组相比,离心后水凝胶各组上清液均与阴性对照组一致,为澄清透明溶液。对溶血效果进行量化计算,结果显示 COL/APG、3%CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 三种水凝胶的溶血率均低于 1.5%(图 7b),符合《医疗设备的生物评估。第 4 部分:与血液相互作用选择(DIN EN ISO 10093-4)》这一国际化标准中生物材料的溶血率应低于 5%的要求,显示出胶原蛋白基复合水凝胶优异的血液相容性。

最后,通过凝血性能指数(BCI)和血细胞、血小板粘附实验对水凝胶的止血性能进行评估。BCI 数值越低表明凝血速率越快,如图 7(c)所示,三种水凝胶 COL/APG、3%CSA/COL/APG 和 3% CSC/COL/APG 的 BCI 值随时间延长均有所下降,并且在 30 min 内达到凝血平衡,表明三种水凝胶均能有效促进血液凝固。在整个过程中,两种复合水凝胶的 BCI 值一直低于 COL/APG 水凝胶,表明硫酸软骨素的加入有助于提升水凝胶的凝血效率。通过图 7(d)可以看出,血红细胞和血小板均能粘附和沉积在复合水凝胶表面并且相互聚集成团,表明血小板在凝胶表面能够发生变形并凝集成团,同时刺激血浆内的凝血酶原变为凝血酶,进而催化纤维蛋白原变成丝状的纤维蛋白,笼括血小板和血红细胞形成凝血块^[11]。

3 结论

本文针对传统伤口敷料止血效率低且无法调节伤口炎症的缺陷,制备了硫酸软骨素复配型胶原蛋白基复合水凝胶,即将硫酸软骨素 A 或硫酸软骨素 C 加入胶原蛋白并通过醛基化聚乙二醇交联形成水凝胶。硫酸软骨素 A 或硫酸软骨素 C 被验证能抑制被诱导的巨噬细胞中 NO 的释放,进

而调节炎症的作用。另外,所制备的复合水凝胶呈多孔状态且孔道形貌规则,具有较好的溶胀性能和一定的粘附能力,细胞相容性良好,血液相容性和凝血效率优异。这些优异的性能表明硫酸软骨素复配型胶原蛋白基水凝胶对伤口可以起止血和调节伤口炎症的作用,进而促进其高质量愈合,为伤口治疗领域提供了具有潜在应用价值的止血抗炎型敷料。

参考文献:

- [1] Guo, B. L.; Dong, R. N.; Liang, Y. P.; Li, M. Haemostatic materials for wound healing applications. *Nat. Rev. Chem.*, **2021**, 5(11), 773-791.
- [2] Willenborg, S.; Eming, S. A. Cellular networks in wound healing. *Science*, **2018**, 362(6417), 891-892.
- [3] Sun, G. M.; Shen, Y. I.; Harmon, J. W. Engineering pro-regenerative hydrogels for scarless wound healing. *Adv. Healthcare Mater.*, **2018**, 7(14), 1800016.
- [4] Zheng, C.; Liu, X. H.; Luo, X. M.; Zheng, M. H.; Wang, X. C.; Dan, W. H.; Jiang, H. E. Development of a novel bio-inspired "cotton-like" collagen aggregate/chitin based biomaterial with a biomimetic 3D microstructure for efficient hemostasis and tissue repair. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7(46), 7338-7350.
- [5] Naomi, R.; Ratanavaraporn, J.; Fauzi, M. B. Comprehensive review of hybrid collagen and silk fibroin for cutaneous wound healing. *Materials (Basel)*, **2020**, 13(14), 3097.
- [6] Lord, M. S.; Cheng, B.; McCarthy, S. J.; Jung, M.; Whitelock, J. M. The modulation of platelet adhesion and activation by chitosan through plasma and extracellular matrix proteins. *Biomaterials*, **2011**, 32(28), 6655-6662.
- [7] He, H. C.; Xiao, Z. C.; Zhou, Y. J.; Chen, A. Q.; Xuan, X.; Li, Y. Y.; Guo, X.; Zheng, J.; Xiao, J.; Wu, J. Zwitterionic poly(sulfobetaine methacrylate) hydrogels with optimal mechanical properties for improving wound healing *in vivo*. *J. Mater. Chem. B*, **2019**, 7(10), 1697-1707.
- [8] Liu, C. Y.; Liu, X.; Liu, C. Y.; Wang, N.; Chen, H. L.; Yao, W. H.; Sun, G. Z.; Song, Q. L.; Qiao, W. H. A highly efficient, *in situ* wet-adhesive dextran derivative sponge for rapid hemostasis. *Biomaterials*, **2019**, 205, 23-37.

- [9] Xuan, C. K.; Hao, L. J.; Liu, X. M.; Zhu, Y.; Yang, H. S.; Ren, Y. P.; Wang, L.; Fujie, T.; Wu, H. K.; Chen, Y. H.; Shi, X. T.; Mao, C. B. Wet-adhesive, haemostatic and antimicrobial bilayered composite nanosheets for sealing and healing soft-tissue bleeding wounds. *Biomaterials*, **2020**, 252, 120018.
- [10] Yao, S.; Chi, J. J.; Wang, Y. T.; Zhao, Y. J.; Luo, Y.; Wang, Y. A. Zn-MOF encapsulated antibacterial and degradable microneedles array for promoting wound healing. *Adv. Healthc. Mater.*, **2021**, 10(12), e2100056.
- [11] Zhao, X.; Guo, B. L.; Wu, H.; Liang, Y. P.; Ma, P. X. Injectable antibacterial conductive nanocomposite cryogels with rapid shape recovery for noncompressible hemorrhage and wound healing. *Nat. Commun.*, **2018**, 9, 2784.
- [12] Liu, X. Y.; Niu, Y. Q.; Chen, K. C.; Chen, S. G. Rapid hemostatic and mild polyurethane-urea foam wound dressing for promoting wound healing. *Mater. Sci. Eng. C*, **2017**, 71, 289-297.
- [13] Vijayan, V.; Sreekumar, S.; Singh, F.; Govindarajan, D.; Lakra, R.; Korrapati, P. S.; Kiran, M. S. Praseodymium-cobaltite-reinforced collagen as biomimetic scaffolds for angiogenesis and stem cell differentiation for cutaneous wound healing. *ACS Appl. Bio Mater.*, **2019**, 2(8), 3458-3472.
- [14] Zhang, L.; Zhou, Y. T.; Su, D. D.; Wu, S. Y.; Zhou, J.; Chen, J. H. Injectable, self-healing and pH responsive stem cell factor loaded collagen hydrogel as a dynamic bioadhesive dressing for diabetic wound repair. *J. Mater. Chem. B*, **2021**, 9(29), 5887-5897.
- [15] El Ayadi, A.; Jay, J. W.; Prasai, A. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(3), E1105.
- [16] Delgado, L. M.; Bayon, Y.; Pandit, A.; Zeugolis, D. I. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices. *Tissue Eng. Part B Rev.*, **2015**, 21(3), 298-313.
- [17] Andrade Del Olmo, J.; Pérez-Álvarez, L.; Sáez-Martínez, V.; Benito-Cid, S.; Ruiz-Rubio, L.; Pérez-González, R.; Vilas-Vilela, J. L.; Alonso, J. M. Wound healing and antibacterial chitosan-gelatin hydrogels with controlled drug delivery for synergistic anti-inflammatory activity. *Int. J. Biomed. Macromol.*, **2022**, 203, 679-694.
- [18] Sánchez-Sánchez, R.; Martínez-Arredondo, E.; Martínez-López, V.; Melgarejo-Ramírez, Y.; Brenna-Molina, A.; Lugo-Martínez, H.; Gómez-García, R.; Garciadiego-Cázares, D.; Silva-Bermúdez, P.; Márquez-Gutiérrez, E.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. Development of hydrogel with anti-inflammatory properties permissive for the growth of human adipose mesenchymal stem cells. *J. Nanomater.*, **2016**, 2016, 1-8.
- [19] Chen, P. L.; Wu, Z. G.; Leung, A.; Chen, X. B.; Landao-Bassonga, E.; Gao, J. J.; Chen, L. Z.; Zheng, M.; Yao, F.; Yang, H.; Lidgren, L.; Allan, B.; Liu, Y. N.; Wang, T.; Zheng, M. H. Fabrication of a silver nanoparticle-coated collagen membrane with anti-bacterial and anti-inflammatory activities for guided bone regeneration. *Biomed. Mater.*, **2018**, 13(6), 065014.
- [20] Sorushanova, A.; Delgado, L. M.; Wu, Z. N.; Shologu, N.; Kshirsagar, A.; Raghunath, R.; Mullen, A. M.; Bayon, Y.; Pandit, A.; Raghunath, M.; Zeugolis, D. I. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv. Mater.*, **2019**, 31(1), e1801651.
- [21] Perez-Puyana, V.; Romero, A.; Guerrero, A. Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *J. Biomed. Mater. Res.*, **2016**, 104(6), 1462-1468.
- [22] Wang, Y. S.; Ruan, Y. L.; Du, B. B.; Li, J.; Eboroff-Heidepriem, H.; Wang, X. C. Real-time Raman analysis of the hydrolysis of formaldehyde oligomers for enhanced collagen fixation. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2022**, 264, 120285.
- [23] Bax, D. V.; Davidenko, N.; Gullberg, D.; Hammaia, S. W.; Farndale, R. W.; Best, S. M.; Cameron, R. E. Fundamental insight into the effect of carbodiimide crosslinking on cellular recognition of collagen-based scaffolds. *Acta Biomater.*, **2017**, 49, 218-234.
- [24] Jomphe, C.; Gabriac, M.; Hale, T. M.; Héroux, L.; Trudeau, L. E.; Deblois, D.; Montell, E.; Vergés, J.; du Souich, P. Chondroitin sulfate inhibits the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in interleukin-1beta-stimulated chondrocytes. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **2008**, 102(1), 59-65.
- [25] Tan, G. K.; Tabata, Y. Chondroitin-6-sulfate at-

- tenuates inflammatory responses in murine macrophages *via* suppression of NF- κ B nuclear translocation. *Acta Biomater.*, **2014**, 10(6), 2684-2692.
- [26] Zhang, Y. L.; Tao, L.; Li, S. X.; Wei, Y. Synthesis of multiresponsive and dynamic chitosan-based hydrogels for controlled release of bioactive molecules. *Biomacromolecules*, **2011**, 12(8), 2894-2901.
- [27] Zhang, Z.; Wang, X. L.; Wang, Y. T.; Hao, J. C. Rapid-forming and self-healing agarose-based hydrogels for tissue adhesives and potential wound dressings. *Biomacromolecules*, **2018**, 19(3), 980-988.
- [28] Zhang, X.; Xu, J. Y.; Lang, C.; Qiao, S. P.; An, G.; Fan, X. T.; Zhao, L. L.; Hou, C. X.; Liu, J. Q. Enzyme-regulated fast self-healing of a pillararene-based hydrogel. *Biomacromolecules*, **2017**, 18(6), 1885-1892.
- [29] Jiang, S. X.; Yin, H. N.; Qi, X. H.; Song, W. G.; Shi, W. W.; Mou, J. J.; Yang, J. Immunomodulatory effects of fucosylated chondroitin sulfate from *Stichopus chloronotus* on RAW 264.7 cells. *Carbohydr. Polym.*, **2021**, 251, 117088.
- [30] Zhou, J.; Wu, Y. Z.; Zhang, X. H.; Lai, J. H.; Li, Y. L.; Xing, J.; Teng, L. P.; Chen, J. H. Enzyme catalyzed hydrogel as versatile bioadhesive for tissue wound hemostasis, bonding, and continuous repair. *Biomacromolecules*, **2021**, 22(4), 1346-1356.
- [31] 熊双丽, 金征宇. 硫酸化糖胺聚糖的简易分光光度测定法. *光谱实验室*, **2005**, 22(6), 1294-1297.
- [32] Cui, H.; Wang, Q. M.; Zhang, Y.; Barboiu, M.; Zhang, Y.; Chen, J. H. Double-network heparin dynamic hydrogels: dynagels as anti-bacterial 3D cell culture scaffolds. *Chemistry*, **2021**, 27(24), 7080-7084.
- [33] Saporito, F.; Sandri, G.; Rossi, S.; Bonferoni, M. C.; Riva, F.; Malavasi, L.; Caramella, C.; Ferrari, F. Freeze dried chitosan acetate dressings with glycosaminoglycans and traxenamic acid. *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 184, 408-417.
- [34] 范瑶, 梁文城, 王友长, 郎美东. 聚乙烯醇/ ϵ -聚赖氨酸水凝胶伤口敷料的制备及性能. *功能高分子学报*, **2022**, 35(1), 85-92.
- [35] Teng, L.; Shao, Z. W.; Bai, Q.; Zhang, X. L.; He, Y. S.; Lu, J. Y.; Zou, D. R.; Feng, C. L.; Dong, C. M. Biomimetic glycopolyptide hydrogels with tunable adhesion and microporous structure for fast hemostasis and highly efficient wound healing. *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, 31(43), 2105628.
- [36] Wu, M.; Chen, J. S.; Huang, W. J.; Yan, B.; Peng, Q. Y.; Liu, J. F.; Chen, L. Y.; Zeng, H. B. Injectable and self-healing nanocomposite hydrogels with ultrasensitive pH-responsiveness and tunable mechanical properties; implications for controlled drug delivery. *Biomacromolecules*, **2020**, 21(6), 2409-2420.
- [37] 王芹, 邱钰智, 乔鞞华, 董念国, 杨亚江. 硫酸软骨素类可注射水凝胶体系及其凝胶化机制. *功能高分子学报*, **2021**, 34(3), 243-259.