

可注射透明质酸/羟基磷灰石复合材料: 制备、理化性能和细胞相容性

朱雨桐, 谭佩洁, 林海, 朱向东, 张兴栋

(四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心, 成都 610064)

摘要: 羟基磷灰石(HAP)具有优异的生物相容性、生物活性和缓慢的降解速率等特性, 有可能弥补透明质酸(HA)用作软组织填充材料的不足。本研究采用一步反应法制备均匀负载 HAP 颗粒的 HA-HAP 复合水凝胶, 分析了制备工艺参数对复合水凝胶理化性能的影响及调控方法, 评价了其细胞相容性。结果表明, 采用该方法制备的复合水凝胶含 1.5%~3.0% HA、2.38%~15.8% HAP, 具有良好的灭菌稳定性。通过改变 HAP 含量和交联剂的用量可以调控复合水凝胶的力学性能、溶胀行为等理化性能。利用一阶指数衰减方程可以较好地拟合复合水凝胶的溶胀行为, 质量溶胀率在 1 h 时已达到平衡溶胀率的 90%以上。复合水凝胶具有良好的 HA 酶降解性, 1500 U/mL 的酶作用 2 min 后 HA 降解率超过 95%, 复合水凝胶可以快速溃散; 加入 HAP 颗粒不仅使复合水凝胶有更好的可塑性, 而且更有利于面部软组织填充和轮廓修正。优化制备的可注射 HA-HAP 复合水凝胶具有可调的理化性能和良好的细胞相容性, 可以较长时间地保留在体内, 兼具促进组织修复或重建的潜力, 有望成为优良的软组织填充材料。

关键词: 可注射材料; 透明质酸; 羟基磷灰石; 理化性能; 细胞相容性

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

Injectable Hyaluronan/Hydroxyapatite Composite: Preparation, Physicochemical Property and Biocompatibility

ZHU Yutong, TAN Peijie, LIN Hai, ZHU Xiangdong, ZHANG Xingdong

(National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: With good cytocompatibility, bioactivity, and slow degradation rate, hydroxyapatite (HAP) may remedy drawbacks of hyaluronan (HA) as soft tissue filler. Here, we prepared HA-HAP composite hydrogels by one-step reaction method, investigated various processing parameters on their physicochemical properties, and evaluated their biological performance. As-prepared HA-HAP composite hydrogels contained 1.5%–3.0% HA and 2.38%–15.8% HAP with good sterilization stability. Swelling-ratio and mechanical performance of the composite hydrogels could be adjusted by controlling HAP content and crosslinking reagent. The equilibrium swelling ratio achieved over 90% only after 1 h swell, and the swelling properties fitted well with 1st-order exponential decay equations. By 1500 U/mL HAase solutions, the composites degraded 95% after only 2 min and dispersed rapidly, showing good enzymatic degradability. HAP was demonstrated not only endowing the composite hydrogels with better plasticity for facial soft tissue filler and contour modification, but also providing good microenvironment for attachment and proliferation of

收稿日期: 2021-01-11; 收到修改稿日期: 2021-01-22; 网络出版日期: 2020-03-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32071330) National Natural Science Foundation of China (32071330)

作者简介: 朱雨桐(1997-), 女, 硕士. E-mail: 876073900@qq.com

ZHU Yutong (1997-), female, master. E-mail: 876073900@qq.com

通信作者: 林海, 副研究员. E-mail: linhai028@scu.edu.cn

LIN Hai, associate professor. E-mail: linhai028@scu.edu.cn

fibroblasts. Therefore, the as-prepared HA-HAP composite could be used as a long-acting filler for remodeling extracellular matrix, and thus potentially applied in cosmetic medicine.

Key words: injectable composite; hyaluronan; hydroxyapatite; physicochemical property; cytocompatibility

随着生活水平的提高,人们对美的理解和对形象、面容的要求也逐步提高。医疗美容行业中,材料和技术的发展使得延缓自然生理性衰老成为可能,同时也提供了更多的选择,已受到越来越多的关注。随着年龄增长,面部透明质酸(hyaluronan, HA)流失,真皮的胶原蛋白减少,引起面部松弛、皱纹等生理性衰老问题。这些问题一定程度上可通过可注射性软组织填充材料予以改善和解决。已上市的填充材料主要分为两类:可降解生物材料, (如胶原蛋白、HA等)和不可降解生物材料(如硅胶、聚丙烯酰胺等)^[1-2]。虽然现有产品应用广泛且表现出较好的效果,但有的存在潜在致癌性,有的存在免疫原性,有的降解速率过快,限制了其广泛应用^[3-4]。可注射交联 HA 产品凭借其优良的亲水性、生物相容性、无免疫原性、生物可降解性等优良性能而成为目前市场上应用最广泛的软组织填充材料之一^[5-6]。HA 的强亲水性可以为肌肤带来补水效果,以 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(1, 4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)作为交联剂制备得到的交联 HA 能在一定程度上延长材料在体内的保留时间^[7-9](约 6 个月),但由于人体内存在对应的 HA 酶(HAase),所以可注射 HA 填充材料仍然存在体内停留时间短、降解速率过快的问题,需定期注射填充剂方可保持良好的面部年轻化效果,这不仅造成经济负担,而且存在一定的安全风险。

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HAP), 化学组成为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 是构成人体骨骼的主要无机成分。因其优良的生物相容性和骨传导性, HAP 已被广泛用于人体骨组织的修复^[10]。同时, HAP 对细胞合成、分泌胶原等细胞外基质有一定的促进作用^[11-12]。用 HAP 和其他高分子材料复合制备成的具有生物活性、半永久乃至永久塑形作用的生物材料,近年来倍受医美材料领域的关注^[13]。2006 年通过美国食品药品监督管理局(FDA)认证上市的可注射性填充材料“Radiesse[®]”(中文商品名:微晶瓷)就是一种含约 30% HAP(直径 25~45 μm)颗粒的可注射羧甲基纤维素凝胶医美产品,对成纤维细胞增殖、胶原基质的再生具有促进作用,且在体内保留的时间得到有效延长(约 12 个月),弥补了其他材料(胶原、HA)注射周期短的问题。但是,该产品在临床使用过程

中仍出现了一些并发症^[14-16]。

HA 和 HAP 均是人体内天然存在的物质,材料本身具有良好的生物安全性,以其为原料制备的植入材料具有刺激结缔组织中成纤维细胞分泌并构建细胞外基质的潜力^[10,17]。复合材料中的 HAP 颗粒为无机材料,若与 HA 复合有可能提高填充材料的硬度和弹性,提高材料的塑形能力和抵抗酶降解性能。有研究报道 HAP 在体内的保留时间可通过高温烧结予以调节,至少可停留 12 个月,可与 HA 协同促进注射部位胶原的形成,较好地延长填充材料在体内的保留时间^[16]。

因此,基于 HA 和 HAP 两种材料的特点,我们设计并制备了一种负载 HAP 的可注射 HA 复合水凝胶。以 BDDE 作为交联剂在碱性条件下交联 HA,形成三维网状结构,从而均匀包裹 HAP 颗粒。通过将复合水凝胶注射植入皮下软组织间或骨膜上,达到软组织填充或面部轮廓修正的目的。同时,复合水凝胶中软组织相容的 HAP 颗粒能够为细胞提供良好的局部微环境,有利于细胞的黏附与增殖,刺激成纤维细胞分泌细胞外基质,起到长期稳定填充软组织的效果。

本研究制备了 HA-HAP 复合水凝胶并对其主要的理化性能作了表征,对细胞相容性作了初步评价,证明其可以满足植入器械的基本要求,有望作为面部填充材料。

1 实验方法

1.1 实验材料

HAP 颗粒由四川拜阿蒙生物活性材料有限公司提供,系液相沉淀法合成得到的浆料经喷雾干燥制备而成,粒径范围在 25~40 μm 。

HA(平均分子量 1380 kDa)购自山东福瑞达医药集团公司,交联剂 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDE)购自北京百灵威科技有限公司。胎牛血清、 α -MEM 培养基、双抗溶液购于美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购于 Hyclone 公司;人皮肤成纤维细胞(中国科学院干细胞库编号:SCSP-109)购自中国科学院干细胞库。其余化学试剂均购自成都市科龙化工试剂厂,使用前均未经任何特殊处理。

1.2 水凝胶的制备

在特定条件下, HA 分子中的伯羟基可以与交联剂 BDDE 的两个环氧基团发生开环交联反应^[18](图 1)。根据 HA 与 BDDE 的基本反应原理, 两者完全反应时 BDDE 的理论完全反应当量(equivalent 1.0) 可以按照如下公式计算。

$$m_{(\text{BDDE})} = 202.25m_{(\text{HA})} / (2 \times 403.21)$$

式中, 403.31 为 HA 钠重复单元的相对分子质量 (403.31 g/mol); 202.25 为 BDDE 相对分子质量 (202.25 g/mol)。

称取一定质量的 HA 充分溶解于 0.8% NaOH(pH=12.99) 溶液中, 配制得到重量比 10% 的 HA 溶液。按照表 1 所示的参数计算并在搅拌下依次加入一定量的 HAP 颗粒和 BDDE。搅拌均匀后置于 40 °C 恒温水浴下反应 4 h, 将形成的凝胶取出后室温下静置过夜。然后, 将凝胶置于透析袋中(截留分子量为 8~12 kDa), 并用去离子水透析 3 d, 期间每天更换三次透析液。透析结束后将得到的凝胶产物密封并放置于 4 °C 冰箱储藏。样品按 HAP 颗粒及 BDDE 用量(当量数), 分别标记为 HA-1.0、HAP15-0.5、HAP30-0.5、HAP30-1.0、HAP45-1.0。

1.3 水凝胶理化性能表征

1.3.1 灭菌稳定性

高温高压的灭菌过程会造成部分 HA 分子链发生断裂, 导致水凝胶内部结构或者外部形态发生改变。

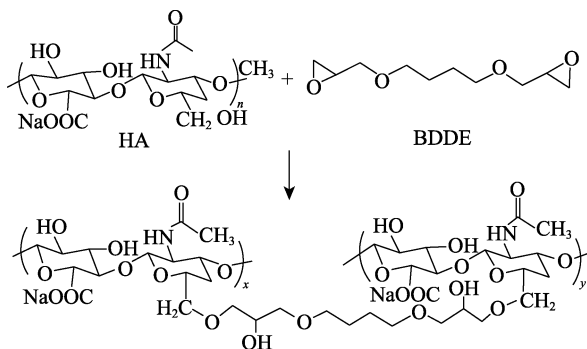


图 1 HA 与 BDDE 的反应示意图

Fig. 1 Diagram of reaction between HA and BDDE

表 1 各复合水凝胶样品制备时 HA、HAP 与 BDDE 的用量

Table 1 Amount of HA, HAP and BDDE in preparing composite hydrogels

Sample	HA/wt%	HAP/wt%	BDDE equivalent
HA-1.0	10	0	1.0
HAP15-0.5	10	15	0.5
HAP30-0.5	10	30	0.5
HAP30-1.0	10	30	1.0
HAP45-1.0	10	45	1.0

变。为探究制备材料的灭菌稳定性, 本实验采用高温蒸汽灭菌法(121 °C, 15 min)考察了灭菌后凝胶的形态变化。

(1) 将上述各组样品(HA-1.0、HAP15-0.5、HAP30-0.5、HAP30-1.0、HAP45-1.0)透析前后的水凝胶作高温蒸汽灭菌, 观察其灭菌前后的外观变化, 探讨透析对复合水凝胶灭菌稳定性的影响。

(2) 由于复合水凝胶中残留的交联剂和碱性成分可能会对其性能产生明显影响, 因此为了更显著地观察到两种因素对水凝胶灭菌后稳定性的影响差异, 本研究在已完全透析的复合水凝胶中人为添加过量(10wt%)的交联剂和碱液以进一步明确特定残留物对灭菌稳定性的影响: 取 HAP45-1.0 透析完全后的样品, 分别加入 10% 的 BDDE 或 10% 的 0.8% NaOH 溶液作高温蒸汽灭菌, 观察灭菌前后复合水凝胶的形态与稳定性变化。

1.3.2 流变性能测试

流变性能测试能够反映水凝胶的力学性能, 采用 Rheometry (R/S) 型旋转流变仪测试凝胶样品在灭菌前后内部力学性能的变化。测量时, 将适量灭菌前后的 HA-1.0 或 HAP45-1.0 材料切割成厚度(约为 1.5 mm)均匀且平整的切片, 置于流变仪样品台上, 调节平面转子(直径 20 mm)高度使其与材料表面均匀贴合, 刮除平面转子外的多余材料部分后, 采用震荡模式-时间扫描, 温度设置在 25 °C, 时间设置 5 min, 300 个测量点, 得到储能模量、损耗模量以及复合黏度随时间的变化曲线。

1.3.3 样品内部形貌观察

将 HA-1.0、HAP30-1.0、HAP45-1.0 三组水凝胶用去离子水冲洗表面后, 放入液氮中快速淬冷并真空冷冻干燥获得多孔支架样品, 进一步用液氮冷冻并脆断获得样品断面, 喷金后用扫描电镜(SEM, S4800, Hitachi, Japan)观察凝胶样品内部微观形貌。

1.3.4 推挤力测试

使用万能材料试验机测定复合水凝胶材料的推挤力, 具体操作步骤如下: 使用不锈钢筛网(250 目, 63 μm)将 HA-1.0、HAP45-1.0 组水凝胶切割成均匀大小的凝胶颗粒后分别灌装于 2 mL 注射器(18 G 针头)中(每组材料 3 个平行样), 排出注射器内气泡。用万能材料试验机以 30 mm/min 的恒定速率, 500 N 的推动力推进注射器样品经针头挤出, 得到推挤力-行程曲线。

1.3.5 溶胀性能和稳定性测试

(1) 溶胀性能测试

取 HAP45-1.0 组材料制备成大小相同的圆形水凝胶切片, 测量样品的表面积、体积、质量, 每组三

个平行样放置于一定体积的生理盐水中,浸提参数和方法参考 GB 16886.12《医疗器械生物评价:样品制备与参照材料》。置于 37 °C 恒温箱中,分别在 1、2、3、5、8 h 取出用游标卡尺准确测量圆形切片样品的直径和高度,计算其表面积、体积,并称重,得到样品的体积溶胀率和质量溶胀率(计算公式如下)随时间的变化曲线。

$$V_{sr} = (V - V_i) / V_i \times 100\%$$

$$m_{sr} = (m - m_i) / m_i \times 100\%$$

式中, V_{sr} 为体积溶胀率, V 为溶胀后体积, V_i 为溶胀前体积; m_{sr} 为质量溶胀率, m 为溶胀后质量, m_i 为溶胀前质量。

(2) 体外稳定性测试

为进一步探究 HAP-HA 复合水凝胶在磷酸缓冲溶液(PBS)中的稳定性,本实验将 HAP45-1.0 组材料制成圆形切片($\phi 8 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$)放置在培养皿中加入 PBS 后置于 37 °C 恒温箱中,分别在 1、7 和 14 d 观察其形态变化。

1.3.6 体外降解行为测试

交联 HA 在 HAase 作用下水解成葡萄糖醛酸,葡萄糖醛酸会与吡啶试剂发生显色变成紫红色,显色程度可以通过紫外分光光度计测定,其吸光度大小与葡萄糖醛酸的含量成正比,进而可以计算得到被降解的 HA 含量。具体步骤如下:

(1) 体外降解率测定: 称取 6 份 12 mg 的 HAP45-1.0 组样品,分别加入 2 mL 浓度为 120 U/mL 的 HAase 溶液并密封容器,置于 37 °C 恒温水浴; 分别于 1、1.5、2、2.5 和 3 h 后将样品溶液放置于 100 °C 烘箱内加热 30 min, 然后取出以 7000 r/min 离心 12 min, 取 1 mL 上清液, 作为待测试样。

(2) 体外快速降解速率测定: 取 12 mg HAP45-1.0 组材料, 加入 2 mL 浓度为 1500 U/mL 的 HAase 溶液并密封容器。将其置于 37 °C 恒温水浴 2 min 后再在 100 °C 烘箱中加热 30 min, 然后取出以 7000 r/min 离心 12 min, 取 1 mL 上清液作为待测试样。

(3) 葡萄糖醛酸(GA)标准溶液配制: 称取 0.1 g 葡萄糖醛酸, 置于 100 mL 容量瓶中, 加水溶解稀释至刻度线, 摇匀, 配置成 1 mg/mL 的贮备液; 后依次将贮备液稀释为 50、40、30、20、10 $\mu\text{g/mL}$, 不含 GA 的溶液作为对照, 记为 0 $\mu\text{g/mL}$, 以 6 种溶液作为 GA 的标准溶液。

(4) 硫酸-吡啶显色法测定糖醛酸含量: 将所有葡萄糖醛酸标样和待测试样一起置于冰水浴中, 并在冰水浴中向标样和待测样中加入 6 mL 的浓硫酸, 摇匀后, 改在 85 °C 水浴中加热 10 min, 取出后迅速冷却至室温, 在各管中加入 1 mL 0.1% 吡啶溶液,

室温下保持 1 h。最后用紫外分光光度计在 530 nm 处测定各样品吸光度, 再根据以下公式计算得到 HA 的降解量。

$$D_r = 2.0675 C_i / C_0 \times 100\%$$

其中, D_r 为降解率, C_i 为待测溶液的糖醛酸含量 ($\mu\text{g/mL}$), C_0 为待测溶液的初始浓度 ($\mu\text{g/mL}$); 常量 2.0675 为 HA 分子单体与葡萄糖醛酸的相对分子质量的比值。

1.4 体外细胞培养

1.4.1 细胞的培养、传代和材料的准备

取冻存的人皮肤成纤维细胞(编号: SCSP-109)接种于培养液(α -MEM 培养基, 10% 胎牛血清和 1% 双抗溶液)中, 置于细胞培养箱中培养(37 °C, 5% CO_2 , 95% 湿度)作扩增培养。扩增培养后的细胞以浓度 $5 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ 在各组材料上接种。将 HA-1.0 和 HA45-1.0 组材料分别制成圆片($\phi 8 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$)放置于硅胶模具后一同放入六孔细胞培养板孔中, 每个材料表面加入 100 μL 培养基后, 在细胞培养箱中培养 1、4 和 7 d 取出材料进行检测。探究 HA 水凝胶和 HAP-HA 复合水凝胶的细胞相容性, 以及细胞在凝胶表面的贴附增殖情况。

1.4.2 细胞形态观察及增殖测试

用细胞质荧光染料荧光素双醋酸酯(FDA)和细胞核荧光染料碘化丙啶(PI)联合染色法观察成纤维细胞活力。分别取 HA-1.0 组和 HAP45-1.0 组材料培养细胞 1、4 和 7 d 后的样品, 用 PBS 清洗后置于 48 孔板中, 加入含 5 $\mu\text{g/mL}$ FDA 和 5 $\mu\text{g/mL}$ PI 的混合溶液中, 使材料完全被浸没, 染色 3 min, 取出用 PBS 清洗干净后使用激光共聚焦显微镜(CLSM, TCS SP5, Leica)观察细胞活性。

用 CCK-8 试剂盒测定成纤维细胞在 HA-1.0 组和 HAP45-1.0 组材料上的增殖。收集两组材料培养 1、4 和 7 d 后的样品, 置于 48 孔培养板中, 先后加入 1 mL 不含血清的新鲜培养基和 100 μL CCK-8 试剂, 在培养箱避光孵育 2 h。每个样品分别吸取 100 μL 于 96 孔培养板中。使用酶标仪测定溶液在 450 nm 处的吸光值。

2 结果与讨论

2.1 复合水凝胶透析前后 HAP 含量变化

透析完成后, 根据水凝胶的质量增加量可得其吸水量, 从而计算得到透析后各组水凝胶中 HA 与 HAP 的百分含量, 表 2 给出了 5 组凝胶样品透析前后的 HA 和 HAP 含量的变化。从表中数据对比可见,

表2 复合水凝胶透析前后的HA与HAP含量

Table 2 Contents of HA and HAP in different composites before and after dialysis

Sample	Before dialysis		After dialysis	
	HA/%	HAP/%	HA/%	HAP/%
HA-1.0	10	0	2.01	-
HAP15-0.5	10	15	1.58	2.38
HAP30-0.5	10	30	1.54	4.63
HAP30-1.0	10	30	2.19	7.73
HAP45-1.0	10	45	3.00	15.8

交联剂BDDE的使用量(当量数)和HAP初始含量对复合水凝胶的吸水溶胀过程均有影响。由HAP30-0.5、HAP30-1.0组可知, BDDE用量越高(1.0 eq), 水凝胶的交联度越高, 交联水凝胶的三维网状结构越紧密稳定, 越能限制水分子的进入, 所以透析后水凝胶吸水量降低, HA含量较高。由HA-1.0、HAP30-1.0、HAP45-1.0组可知, 凝胶中HAP的固有含量越高, 水凝胶内部填充更紧密, 水分子可以自由通过的空间更有限, 同时HAP自身带有极性, 静电作用和界面效应使得HAP在水溶液环境中可以在分子表面形成一层固化水层, 抑制了水分子的扩散, 从而大量分散在水凝胶内部的HAP颗粒表面形成了固化水层, 抑制了外部水分子的自由进入, 从而减少了水凝胶的吸水量^[19], 使得最终的HA和HAP含量都相对较高。因此, 改变HAP的负载量和HA交联度对凝胶的溶胀性能有明显影响, 可以通过HAP的含量和HA的交联度调控复合水凝胶性能。

2.2 复合水凝胶的灭菌稳定性

2.2.1 透析对灭菌后凝胶形态稳定性的影响

作为一种天然高分子材料, HA分子柔软且不能耐受高温和辐照, 而植入材料必须无菌, 所以寻求不显著影响产品性能的灭菌方法和适宜的工艺条件是HA水凝胶商品化必须解决的问题^[20], 而交联反应是改善其灭菌稳定性的有效方法之一^[21]。本实验采用的交联剂BDDE可以有效地交联HA分子, 形成较为稳定的三维网络结构^[22], 同时添加的HAP也有利于复合水凝胶的灭菌稳定性。

常规高温高压条件(121 °C、15 min)一般可以达到灭菌效果, 然而HA水凝胶在该条件下灭菌会导致形态和粘度发生显著变化, 因此有研究尝试改变灭菌条件, 如降低灭菌温度、缩短灭菌时间, 以达到水凝胶灭菌与保持性能稳定之间的平衡^[23]。由图2可知, 本研究中透析完全后复合水凝胶采用常规灭菌参数达到完全灭菌的情况下, 复合水凝胶的外

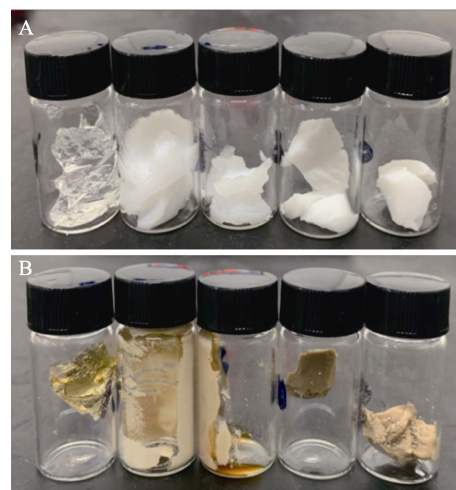


图2 复合水凝胶灭菌前后的形态

Fig. 2 Appearance of composite hydrogels before and after autoclaving

(A) Fully dialyzed; (B) Not dialyzed. From left to right: HA-1.0, HAP15-0.5, HAP30-0.5, HAP30-1.0, and HAP45-1.0

观并无显著差异, 稳定性较好; 相比而言, 未透析的复合水凝胶在灭菌后出现了变黄、降解。未透析的水凝胶呈碱性且含有残留的BDDE, 由HAP15-0.5、HAP30-0.5两组可知, 在BDDE用量不足时, 参与反应的HA分子没有形成足够的交联密度, 获得的水凝胶网络结构在高温条件下难以维持而被水解破坏, 导致复合水凝胶样品中出现明显的固液分离; 而HA-1.0、HAP30-1.0、HAP45-1.0组材料灭菌后结构完好, 表明三组凝胶交联程度较高且在高温下能够较好地维持形态。所以增加BDDE的使用量, 提高HA交联度能够增强水凝胶的灭菌稳定性。同时, 未透析的五组材料在灭菌后均变为焦黄色, 推测高温为凝胶中化合物中可能存在的化学反应提供了活化能, 例如碱性氢氧根离子造成HA中部分基团改变(酰胺键的水解), 最终导致凝胶外观和分子结构发生改变。因此, 通过透析过程清除凝胶内部的碱性物质对于保证凝胶的灭菌形态稳定性十分必要。

2.2.2 透析残留物对复合水凝胶灭菌稳定性的影响

医用注射填充材料对材料中的BDDE残留量有明确的限制, 以保证植入材料的安全性。除此之外, 残留的BDDE对于复合水凝胶的稳定性也存在一些影响。由图3可知, 如果复合水凝胶中含有较高含量的交联剂BDDE, 在高温蒸汽灭菌过程中会破坏凝胶结构, 负载在其中的HAP会有明显的沉降; 如果复合水凝胶中还含有一定量的碱性成分, 在高温条件下会发生诸多的副反应, 使得复合水凝胶变为焦黄色, 且凝胶结构会部分破坏, 出现固液分离的



图 3 含残留交联剂的复合水凝胶 HAP45-1.0 灭菌后的形态
Fig. 3 Appearance of composite hydrogels HAP45-1.0 with remained crosslinking reagents

From left to right: fully dialyzed, alkali-contained, cross linker-contained

现象。BDDE 的热稳定性较差,在高温下易分解。BDDE 分子链上三元环刚性较大,极易发生开环,环氧基开环后生成的氧负离子具有亲核性,对 HA 分子链上显正电基团(例如羰基碳原子)发生亲核攻击,导致原始结构改变。BDDE 与空气接触后, α 位上的 H 原子会发生氧化,生成不易挥发的过氧化物^[24],过氧化基团导致 HA 分子链断裂,且灭菌时的升温过程加速了 HA 的氧化反应,所以灭菌后额外增加 BDDE 的凝胶除了被降解外,还会变黄。在高温下,凝胶本身的碱性可能造成 HA 上酰胺基团发生水解,同时高温下氧参与生成新的产物、副产物使得材料外观发生改变^[25]。高温条件下,凝胶内部残留物参与化学反应的机理复杂,尚不明确,需后续深入研究。

2.2.3 灭菌对凝胶流变性能的影响

由图 4 可知,HA-1.0 组水凝胶的储能模量(G')与文献中采用类似参数的交联 HA 水凝胶结果相近(约为 1750 Pa)^[26],而 HAP45-1.0 组水凝胶 G' 、损耗模量(G'')均高于 HA-1.0 组。储能模量表示黏弹性材料在形变过程中由于弹性形变而储存的能量,表明 HAP45-1.0 组材料具有更强的弹性。损耗模量描述的是材料产生形变时能量转变为热能而损失的量度,HA-1.0、HAP45-1.0 组损耗模量值相差不大,HA-1.0 组略低表明该组材料黏性更大。复合黏度(η)反

映了材料中不同构成成分及分子间作用力大小,HAP45-1.0 组材料由于凝胶内部含有大量的 HAP 颗粒,其分子间距离减小,作用力增大,黏度增大。两组材料在灭菌后储能模量和复合黏度降低,损耗模量未发生明显变化,表明灭菌过程会一定程度地破坏材料内部的分子网络结构,使其弹性减弱,而黏性变化较小。由于材料储能模量远大于损耗模量,材料主要发生弹性形变,所以复合水凝胶整体仍更偏向于固态材料的力学性能^[27]。另外,采用 BDDE 交联的 HA 水凝胶比其它交联剂,如二乙烯基砒(DVS)能更好地提高水凝胶的流变性能。本研究中,BDDE 交联分子量为 1380 kDa 的 HA 后比 DVS 交联分子量为 2000 kDa 的 HA 有更高的储能模量:前者灭菌前后约为 1750 和 1300 Pa,而后者要低于 400 Pa^[23]。而本研究中复合 HAP 后复合水凝胶表现出更高的储能模量,灭菌前后分别超过 4000 和 3000 Pa。由此可见,采用 BDDE 交联后的 HAP-HA 复合水凝胶不易发生形变,能更好地维持产品的形态,具有较好的可塑性。

2.3 复合水凝胶形貌观察

空白 HA 水凝胶内部呈片状网状结构(图 5),孔径介于 50~250 μm ,可能更有利于水分子或其它小分子通过;HAP-HA 复合水凝胶中内部网络结构更为紧密,不同 HAP 含量的复合水凝胶样品中,HAP 颗粒均分散均匀且被交联 HA 网络结构紧密包裹,具有较好的稳定性;HAP 颗粒的粒径在 25~40 μm 之间,由图可见 HAP 颗粒基本呈球形,尺寸较为均一且分散均匀。研究表明,HA 水凝胶若具有更低的溶胀率、内部 HA 网络结构更紧密,则能更有效地限制酶或氧化性自由基的渗入,从而对 HA 的降解速率产生减缓作用^[28]。结合 HAP-HA 复合水凝胶的吸水性能以及内部形貌可以推断,该复合材料凭借更低的溶胀率和更致密的内部结构,可展现出更优良的抗降解性和更长的体内保留时间。

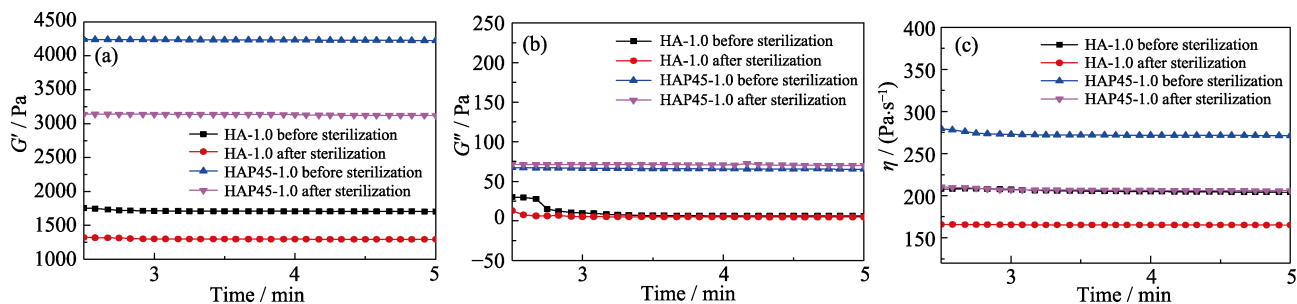


图 4 水凝胶材料灭菌前后储能模量(a)、损耗模量(b)及复合黏度(c)的变化

Fig. 4 Storage modulus (a), loss modulus (b) and composite viscosity (c) of hydrogels before and after sterilization

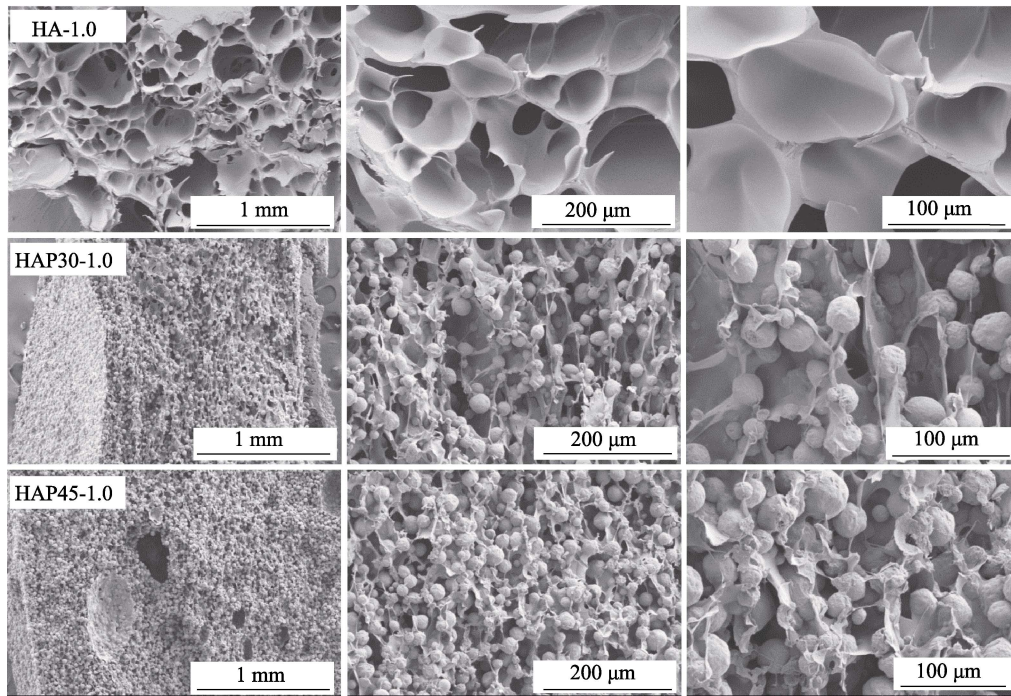


图5 水凝胶的扫描电镜照片
Fig. 5 SEM morphologies of hydrogels

结合上述实验结果, BDDE 与 HA 反应程度越高, 交联密度越大, 形成的复合水凝胶结构稳定性越好, 弹性越大, 灭菌稳定性越好; HAP 含量越高, 复合水凝胶的吸水量越少, 所以 HAP45-1.0 组材料可能表现出更优异的软组织填充性能。为了进一步掌握材料性能及作为可注射材料的可行性, 本研究选择 HAP45-1.0 组材料作后续性能表征。

2.4 水凝胶推挤力的影响因素

图 6 分别为 HA-1.0 和 HAP45-1.0 两组材料的推挤力-行程曲线。HAP45-1.0 复合水凝胶平行样之间的推挤力差异不大且较平缓, 说明除灌装时有少量小气泡外, 材料均匀性较好, HAP 颗粒分散均匀。HA-1.0 水凝胶推挤力约为 (32.3 ± 0.5) N, 而 HAP-HA 复合水凝胶为 (217.0 ± 2.5) N。两组材料推挤力差异较

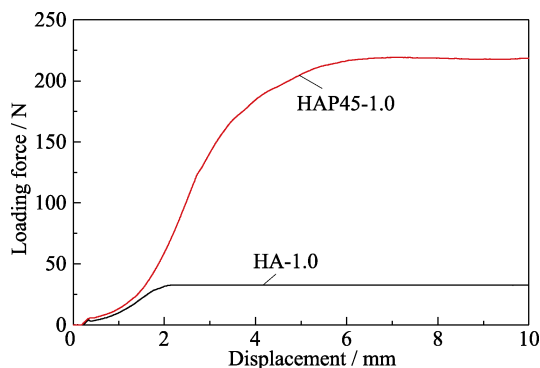


图6 水凝胶的推挤力-行程变化曲线
Fig. 6 Push-out strain-stress curves of hydrogels

大, 说明 HAP 颗粒对水凝胶的可注射性能影响较大, HAP 固含量越高, 相互作用力越大, 复合材料的推挤力越大。

2.5 水凝胶的溶胀性能和体外稳定性

2.5.1 复合水凝胶的体积溶胀率和质量溶胀率

高分子水凝胶的溶胀行为一方面与水凝胶中高分子链的亲、疏水性和舒展状态有关系, 另一方面也受高分子网络稳定性的影响, 因此复合水凝胶的溶胀性能是其作为可注射性填充材料的一个关键评价指标。复合水凝胶质量溶胀率和体积溶胀率随溶胀时间的变化曲线(图 7(A))中, 质量溶胀率与文献^[26]报道(约 45%)接近。为了更好地反映复合水凝胶的溶胀行为, 本实验使用一阶指数衰减方程($y = A \exp(-x/t) + y_0$)拟合得到质量溶胀率和体积溶胀率随时间变化的趋势图, 拟合参数如表 3 所示。由表 3 的数据可知, 该方程能较好地拟合复合水凝胶的溶胀过程($R^2 \geq 0.998$)。溶胀平衡时复合水凝胶的质量溶胀率和体积溶胀率分别达到 51.65%、78.66%。由此表明, 该复合水凝胶表现出良好的亲水溶胀性能, 将有利于细胞和其它亲水性生物小分子扩散、渗透进入水凝胶网络, 有利于组织更好地识别、利用并进一步改造植入物。由溶胀曲线可见, 复合水凝胶浸泡 1 h 时质量已经达到平衡溶胀率的 93.90%, 而体积溶胀率为 68.34%, 表明复合水凝胶中亲水性良好的 HA 和 HAP 可以从周围环境中快速吸收水分并达到质量稳定。而复合水凝胶中的高分子网络由于

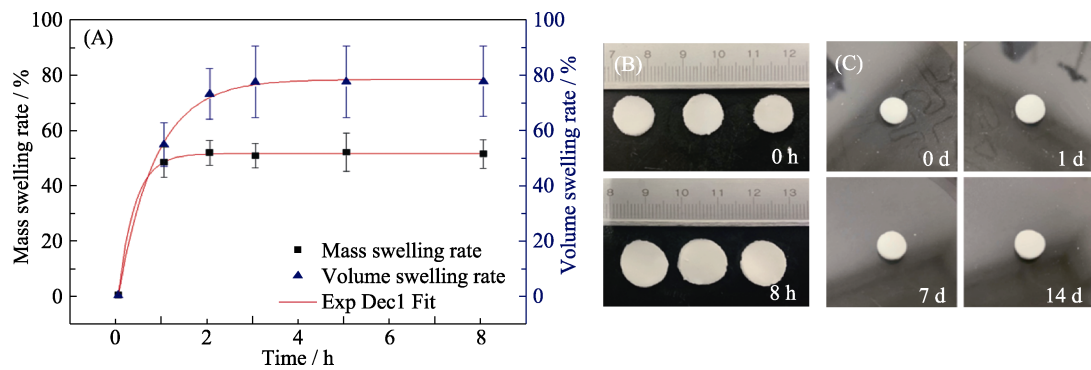


图 7 复合水凝胶 HAP45-1.0 的溶胀行为及稳定性

Fig. 7 Swelling behavior of composite hydrogel HAP45-1.0 and stabilization *in vitro*

(A) Mass and volume swelling rate; (B) Sizes of samples before and after swelling for 8 h; (C) Stability of the samples immersed in PBS for different periods

表 3 复合水凝胶 HAP45-1.0 溶胀率的一阶指数衰减拟合参数

Table 3 The 1st order exponential decay equation fitting results of hydrogel HAP45-1.0 swelling behavior

	A	y_0	R^2
Mass swelling rate	-51.64	51.64	0.9992
Volume swelling rate	-78.81	78.66	0.9984

交联而不能快速舒展平衡, 导致体积溶胀相对滞后, 这将为临床使用该材料时提供参考。图 7(B)显示复合水凝胶溶胀 8 h 时的形态与溶胀前保持一致, 轮廓清晰。

2.5.2 复合水凝胶的体外稳定性

如图 7(C), HAP45-1.0 组材料在 PBS 中 37 °C 条件下浸泡 1、7 和 14 d 后依旧保持完整的形态结构, 表明复合水凝胶具有较高的稳定性, 可塑性较好, 在溶液环境内不易发生形变。鉴于 BDDE 交联的 HA 水凝胶和 HAP 颗粒经临床证实均具有良好的安全性与有效性^[18,29], 所以本研究制备的以物理形式复合的 HAP-HA 水凝胶材料在快速达到溶胀平衡状态后, 也具有较好的安全性, 且能够长时间、稳定地起到体内填充效果。

2.6 复合水凝胶的降解性能

在 120 U/mL 的 HAase 作用下, HA 的降解率随着酶解时间的延长而逐渐上升(图 8)。在酶最适反应条件下, 酶与底物接触的初期, 由于底物比表面积较大, HAase 能够快速渗透进入材料空隙并与降解底物接触, 所以凝胶降解速率较快(15 min); 随后降解逐渐减缓, 降解率缓慢增长之后逐渐趋于平衡, 最终在酶解 3 h 内达到近 70% 的降解, 并引起复合水凝胶的溃散。血管栓塞是 HA 类软组织填充材料在临床应用时出现较为严重的并发症之一^[2], 一旦发现血管栓塞就须及时注射高浓度 HAase(1500 U/mL^[30]), 以快速降解 HA 水凝胶从而疏通血管。采用 1500 U/mL 的酶降解 HAP45-1.0 复合水凝胶, 2 min 后的 HA 降

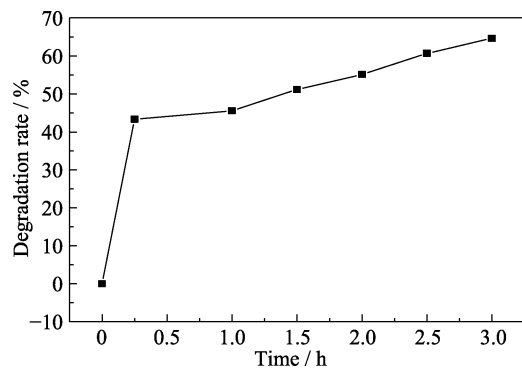


图 8 在 120 U/mL 的 HAase 作用下, 复合水凝胶 HAP45-1.0 的体外酶降解

Fig. 8 Enzymatic degradation of composite hydrogel HAP45-1.0 *in vitro* by HAase at 120 U/mL

解速率为 234.9 $\mu\text{g}/\text{min}$, 降解率高达 95.4%, 远高于在 120 U/mL 酶浓度下的降解率, 可以使复合水凝胶快速溃散。据文献报道, 人真皮下神经丛小动脉直径为 100~400 μm ^[31], 视网膜小动脉平均直径为 $(141.6 \pm 18.6) \mu\text{m}$, 小静脉平均直径为 $(209.3 \pm 26.1) \mu\text{m}$ ^[32], 而市售常见的 HA 填充剂颗粒直径为 20~1000 μm , 平均为 185~250 μm ^[31,33]。本研究中采用的 HAP 粒径在 25~40 μm , 与现有的 HA 填充剂颗粒相比更小。因此使用复合水凝胶不会额外增加该类填充材料的血管栓塞风险等并发症, 无需改变 HA 类填充材料的应急预案。

2.7 体外细胞评价

2.7.1 细胞粘附

成纤维细胞分别在 HAP45-1.0、HA-1.0 材料上培养 1、4 和 7 d 时, 用 FDA/PI 染色, 在 CLSM 下观察显示(图 9), HA 虽然具有极好的亲水性, 但并不利于细胞的粘附^[26], 所以成纤维细胞在 HA-1.0 水凝胶中的粘附不理想, 该组材料的表面未观察到粘附的成纤维细胞。相反, HAP45-1.0 组材料中由于

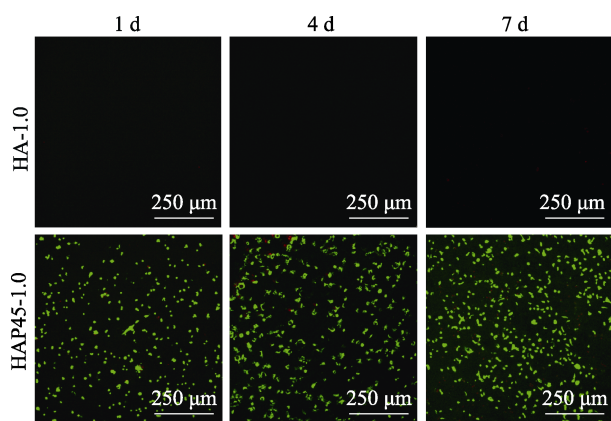


图9 成纤维细胞在水凝胶材料表面的粘附观察
Fig. 9 Fibroblast adhesion after being seeded on the surface of hydrogels observed by confocal fluorescence microscope

含有 HAP 颗粒, 为细胞提供了大量的粘附位点^[34], 使得细胞在复合水凝胶表面明显粘附且具有良好的增殖趋势。由此可见, 成纤维细胞在 HAP45-1.0 组材料上贴附生长良好, 且细胞密度日渐增长, 未见细胞死亡后细胞核被 PI 染为红色的死细胞, 表明 HA-HAP 复合水凝胶细胞相容性良好, 能为细胞的粘附、增殖提供良好的微环境, 更有利于细胞外基质的分泌和沉积。

2.7.2 细胞增殖

进一步采用 CCK-8 试剂测定了成纤维细胞在 HAP45-1.0 和 HA-1.0 两组水凝胶材料中的增殖。由图 10 可知, 成纤维细胞在 HAP45-1.0 组材料表面增殖良好, 培养 7 d 内始终处于增殖状态, 且细胞数量显著高于 HA 水凝胶组; 而 HA-1.0 组细胞由于粘附不佳, 细胞几乎无增殖。结合 CLSM 观察和 CCK-8 测定结果可知, 复合水凝胶 HAP45-1.0 组材料没有细胞毒性, 还能成纤维细胞提供良好的生长微环境, 促进成纤维细胞的增殖, 使得细胞数量整体呈增长趋势, 同时 HAP 颗粒的存在对后续的细胞外基质分泌和胶原的沉积具有潜在的促进作用^[28,35-36]。

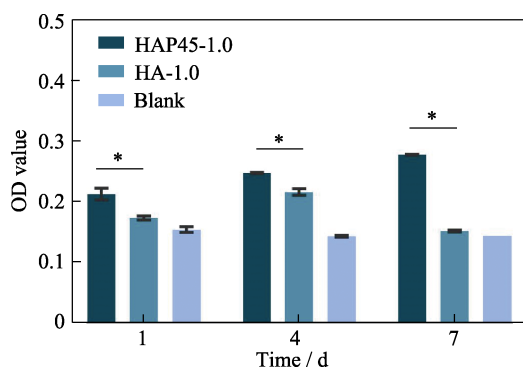


图10 成纤维细胞在水凝胶表面的增殖 (* $p < 0.05$)
Fig. 10 Proliferation of fibroblasts on surface of hydrogels (* $p < 0.05$)

3 结论

本研究采用一步反应法制备得到了均匀负载 HAP 颗粒的 HA-HAP 复合水凝胶, 经一系列分析和测定可得出如下结论:

1) 所制备的复合水凝胶经透析完全后均能够保持良好的灭菌稳定性。

2) 复合水凝胶中的 HAP 含量和交联程度对凝胶溶胀性能具有一定影响, 通过该参数可以调控目标水凝胶的组成及溶胀行为。

3) 引入 HAP 颗粒能提高水凝胶的弹性和稳定性, 使得复合水凝胶具有更好的可塑性, 利于用作面部轮廓整形修正等软组织填充材料。

4) HAP 颗粒还能提高复合水凝胶的细胞粘附性, 为成纤维细胞提供适宜的生长环境, 有利于后续的细胞外基质分泌, 延长其体内停留时间, 有可能促进组织修复或重建。

综上, 与 HA 水凝胶相比, HA-HAP 复合水凝胶凭借其较低的溶胀率、良好的力学性能、更好的细胞粘附性, 在面部软组织填充领域具有更好的应用潜力。

参考文献:

- [1] DE VRIES C G, GEERTSMA R E. Clinical data on injectable tissue fillers: a review. *Expert Review of Medical Devices*, 2013, **10(6)**: 835–853.
- [2] ORTIZ A E, AHLUWALIA J, SONG S S, *et al.* Analysis of U.S. food and drug administration data on soft-tissue filler complications. *Dermatologic Surgery*, 2020, **46(7)**: 958–961.
- [3] BUCK D W, ALAM M, KIM J Y S. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2009, **62(1)**: 11–18.
- [4] ALIJOTAS-REIG J, FERNÁNDEZ-FIGUERAS M T, PUIG L. Inflammatory, immune-mediated adverse reactions related to soft tissue dermal fillers. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2013, **43(2)**: 241–258.
- [5] BRANDT F S, CAZZANIGA A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. *Clinical Interventions in Aging*, 2008, **3(1)**: 153–159.
- [6] SHARMA P, SHARMA S. Comparative study of a new dermal filler uma jeunesse and juvéderm. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2011, **10(2)**: 118–125.
- [7] YANG R, TAN L, CEN L, *et al.* An injectable scaffold based on crosslinked hyaluronic acid gel for tissue regeneration. *RSC Advances*, 2016, **6(20)**: 16838–16850.
- [8] CHOI S C, YOO M A, LEE S Y, *et al.* Modulation of biomechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2015, **103(9)**: 3072–3080.
- [9] YEOM J, BHANG S H, KIM B S, *et al.* Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, **21(2)**: 240–247.

- [10] LOGHEM J V, YUTSKOVSKAYA Y A, WERSCHLER W P. Calcium hydroxylapatite: over a decade of clinical experience. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 2015, **8(1)**: 38–49.
- [11] GRAIVIER M H, BASS L S, BUSSO M, *et al.* Calcium hydroxylapatite (radiessse) for correction of the mid- and lower face: consensus recommendations. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 2007, **120(Suppl. 6)**: 55S–66S.
- [12] EMER J, SUNDARAM H. Aesthetic applications of calcium hydroxylapatite volumizing filler: an evidence-based review and discussion of current concepts. *Journal of Drugs in Dermatology Jdd.*, 2013, **12(12)**: 1345–1354.
- [13] LIU Y, WU Y H, LIN H, *et al.* Study on an injectable biomedical paste using cross-linked sodium hyaluronate as a carrier of hydroxyapatite particles. *Carbohydrate Polymers*, 2018, **195**: 378–386.
- [14] REDBORD K P, BUSSO M, HANKO C W. Soft-tissue augmentation with hyaluronic acid and calcium hydroxyl apatite fillers. *Dermatologic Therapy*, 2011, **24(1)**: 71–81.
- [15] EVIATAR J, LO C, KIRSZROT J. Radiessse: advanced techniques and applications for a unique and versatile implant. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2015, **136(Suppl. 5)**: 164S–170S.
- [16] JEONG S H, FAN Y F, BAEK J U, *et al.* Long-lasting and bioactive hyaluronic acid-hydroxyapatite composite hydrogels for injectable dermal fillers: physical properties and *in vivo* durability. *Journal of Biomaterials Applications*, 2016, **31(3)**: 464–474.
- [17] FAKHARI A, BERKLAND C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9(7)**: 7081–7092.
- [18] BOULLE K, GLOGAU R, KONO T, *et al.* A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery*, 2013, **39(12)**: 1758–1766.
- [19] PAN H H, TAO J H, WU T, *et al.* Molecular simulation of water behaviours on hydroxyapatite crystal faces. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2006, **22(8)**: 1392–1400.
- [20] DAI Z, RONHOLM J, TIAN Y P, *et al.* Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *J. Tissue Eng.*, 2016, **7**: 1–13.
- [21] GALANTE R, PINTO T J A, COLACO R, *et al.* Sterilization of hydrogels for biomedical applications: a review. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2017, **B6**: 106.
- [22] WENDE F J, COHIL S, NORD L I, *et al.* 1D NMR methods for determination of degree of cross-linking and BDDE substitution positions in HA hydrogels. *Carbohydr. Polym.*, 2017, **157**: 1525–1530.
- [23] HARIDAS J, ROSEMARY M J. Effect of steam sterilization and biocompatibility studies of hyaluronic acid hydrogel for viscosupplementation. *Polymer Degradation and Stability*, 2019, **163**: 220–227.
- [24] FENG X D. Study on the mechanism of initial dark oxidation of ether. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 1998, **19(7)**: 1181–1183.
- [25] LÓPEZ J F, DEGLESNE P A, ARROYO R, *et al.* Detection of a new reaction by-product in BDDE cross-linked autoclaved hyaluronic acid hydrogels by LC–MS analysis. *Medical Devices: Evidence and Research*, 2018, **11**: 367–376.
- [26] BAEK J, FAN Y F, JEONG S H, *et al.* Facile strategy involving low-temperature chemical cross-linking to enhance the physical and biological properties of hyaluronic acid hydrogel. *Carbohydr. Polym.*, 2018, **202**: 545–553.
- [27] FERRY J D. *Viscoelastic Properties of Polymers*, 2nd edition. New York: Wiley-Interscience, 1970, **8**: 595.
- [28] BARBUCCI R, LAMPONI S, BORZACCHIELLO A, *et al.* Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, 2002, **23**: 4503–4513.
- [29] CHANG J W, KOO W Y, KIM E K, *et al.* Facial rejuvenation using a mixture of calcium hydroxylapatite filler and hyaluronic acid filler. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2020, **31(1)**: e18–e21.
- [30] WIBOWO A, KAPOOR K M, PHILIPP-DORMSTON W G. Reversal of post-filler vision loss and skin ischaemia with high-dose pulsed hyaluronidase injections. *Aesthetic Plastic Surgery*, 2019, **43(5)**: 1337–1344.
- [31] KIM D W, YOON E S, JI Y H, *et al.* Vascular complications of hyaluronic acid fillers and the role of hyaluronidase in management. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2011, **64**: 1590–1595.
- [32] TANO T, ONO K, HIRATSUKA Y, *et al.* Retinal vessel diameters in a Japanese population: the locomotive syndrome and health outcome in Aizu cohort study. *Acta Ophthalmologica*, 2016, **94(6)**: 431–441.
- [33] WANG M, LI W, ZHANG Y, *et al.* Comparison of intra-arterial and subcutaneous testicular hyaluronidase injection treatments and the vascular complications of hyaluronic acid filler. *Dermatologic Surgery*, 2017, **43(2)**: 246–254.
- [34] OHBA S, SUMITA Y, UMEBAYASHI M, *et al.* Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma. *Arch. Oral. Biol.*, 2016, **61**: 23–27.
- [35] FLINT P W, CORIO R L, CUMMINGS C W. Comparison of soft tissue response in rabbits following laryngeal implantation with hydroxylapatite, silicone rubber, and Teflon. *Ann. Oto. Rhinol. Laryn.*, 1997, **106(5)**: 399–407.
- [36] REBELLATO P R O, TORRE D S, RASTELLI G J C, *et al.* Calcium hydroxylapatite for collagen biostimulation in the neck. *Int. J. Dermatol. Venereology Leprosy Sci.*, 2020, **3(1)**: 27–31.