中国科学: 技术科学 2010 年 第 40 卷 第 3 期: 291 ~ 297
www.scichina.com tech.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

海藻酸-纳米羟基磷灰石构建可降解原位成型水凝胶

鲁路[①②], 齐欲莎[①], 周长忍[①②*], 焦延鹏[①②]

① 暨南大学材料科学与工程系, 广州 510632;
② 人工器官与材料教育部工程研究中心, 广州 510632
* E-mail: tcrz9@jnu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-30; 接受日期: 2009-07-20
国家高技术研究发展计划(“863”计划) (批准号: 2007AA091603)和广东高校优秀青年创新人才培育项目(批准号: LYM08018)资助项目

摘要 可注射原位成型水凝胶支架材料能填充任意形状的缺损, 并在很大程度上降低植入对机体组织的侵入性, 且方便与药物和活性物质复合. 采用原位释放法将海藻酸钠与纳米羟基磷灰石复合构建了可降解的原位成型水凝胶, 体系的凝胶化时间 10~15 min, 材料具有多孔结构, 孔径 20~300 μm, 孔内及孔壁上有大量羟基磷灰石晶体连续均匀分布. 体内植入试验证明该水凝胶材料可实现原位成型且具有良好的细胞相容性和组织相容性.

关键词
海藻酸
纳米羟基磷灰石
可注射
水凝胶

水凝胶是由无限大的三维网络与水共同构成的物质, 具有和天然细胞外基质类似的物理和化学环境, 可与体液进行交换, 为细胞和组织的生长提供营养物质, 因此具有良好的生物安全性和组织相容性. 该类支架材料的突出特点是存在溶液-凝胶转变, 可直接将溶液注射到所需部位原位成型, 因此避免了创伤性的外科手术, 还可以满足不同创伤的复杂形状. 此外水凝胶中易于添加具有药物缓释作用、生物活性的粒子以及复合生长因子等, 制备出具有特殊功能的支架材料. 因此可注射型支架特别适用于微创伤修复, 是组织工程支架发展的主导方向之一[1].

海藻酸是一种天然多糖, 是直链键合的*β-D*-甘露糖醛酸(M)和*α-L*-古洛糖醛酸(G)的无规嵌段共聚物, 其中G是M在C-5位的立体异构体. 海藻酸钠在水溶液中能够与二价金属阳离子螯合迅速形成凝胶, 并且具有良好的生物相容性, 因此在药物控释、细胞免疫隔离和组织工程等领域都有重要的应用[2,3].

海藻酸盐水溶液凝胶化的临界行为及凝胶特性受到海藻酸的分子量、组成和序列分布、离子种类等多种因素的影响[4~6]. 对钙-海藻酸凝胶而言, 由于 G 嵌段和 M 嵌段的构象不同, 使得均聚的 G 嵌段、均聚的 M 嵌段和 GM 交替嵌段在海藻酸与 Ca^{2+}形成凝胶的结构中所起的作用也不同. Ca^{2+}能够与 G 嵌段上的多个氧原子发生螯合作用, 形成“蛋盒”结构; 均聚的 M 嵌段柔性较大, 不能与 Ca^{2+}形成类似的“蛋盒”结构, 只在 Ca^{2+}浓度非常高的情况下才由羧基阴离子按一般的聚电解质行为反应, 生成伸展的交联网状结构; GM 交替嵌段在生成凝胶的过程中并不具有直接的作用, 而是起将各嵌段连接起来的作用. 因此 G 嵌段含量高的海藻酸容易与钙离子形成凝胶, 而且凝胶的强度比较高[4], 当均聚的 G 嵌段单元数为 3~8 时, 所形成的交联区域强度最大[7]. 海藻酸随着分子

引用格式: Lu L, Qi Y S, Zhou C R, et al. Rapidly *in situ* forming biodegradable hydrogels by combining alginate and hydroxyapatite nanocrystal. Sci China Tech Sci, 2010, 53: 272–277, doi: 10.1007/s11431-009-0332-9

链长度的增加而愈加不灵活, 所以在相同 M/G 值条件下, 钙-海藻酸凝胶的强度随海藻酸分子量的增大而增大[6].

离子交联的海藻酸盐水凝胶也存在一些不足, 例如在环境中易失去二价反离子导致力学强度降低, 海藻酸分子链上缺乏与细胞的特异性相互作用位点, 在体内环境降解缓慢等, 这些在一定程度上限制了海藻酸在组织工程领域的应用[8~10]. 针对海藻酸盐的这些缺陷, 国内外已开展了大量的相关研究工作, 现有结果表明, 将海藻酸部分糖醛酸单元的羟基转变成醛基有利于改善其降解性能[11], 另一方面由于醛基的反应活性相对较高, 也可以通过引入醛基向海藻酸盐偶联生物活性物质, 包括活性蛋白、多肽、特异氨基酸序列等, 从而对其本体结构进行适宜修饰, 以提高水凝胶材料与细胞的相互作用[12]. 在胶原和海藻酸钠的有机溶液中加入羟基磷灰石, 借助胶原体外自组装特性, 经冷冻干燥、交联能够形成胶原-海藻酸钠-羟基磷灰石复合凝胶支架[13]. 氧化改性后的海藻酸钠经碳酸钙-葡糖酸内酯交联, 可以制备具有良好降解性能的水凝胶[14].

本文在前期研究工作的基础上, 采用原位释放法将纳米羟基磷灰石($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, Hydroxyapatite, HAP)与氧化海藻酸钠复合制备可降解的原位成型水凝胶, 并在体系中复合骨形态发生蛋白(BMP), 进行体内植入试验, 为海藻酸盐水凝胶在骨组织工程领域的应用奠定一定的实验基础.

1 实验部分

1.1 海藻酸钠试样的精制与氧化

海藻酸钠(青岛晶岩生物科技开发有限公司)溶于去离子水配成 1.5 wt%的水溶液, 加入等体积的 Sevage 溶液恒温振荡 15 h, 3000 r/min 离心分离, 弃下层蛋白复合物有机相, 此过程重复三次. 之后加入与海藻酸钠等质量的活性炭, 搅拌、静置, 无水乙醇沉淀. 沉淀溶解后, 依次用 0.45 和 0.22 μm 滤膜过滤, −70℃冷冻干燥.

可降解的海藻酸钠的制备采用高碘酸钠部分氧化海藻酸得到含有缩醛结构的氧化海藻酸钠(ADA). 具体步骤如下: 海藻酸钠的乙醇悬浮液中加入$NaIO_4$溶液, 25℃闭光条件下磁力搅拌 10 h, 通过控制$NaIO_4$的加入量控制海藻酸钠的氧化度(1%, 3%, 5%). 反应产物在蒸馏水中透析直至透析液中无游离高碘酸盐存在(在透析液中加入硝酸银溶液无沉淀产生). 冷冻干燥得到部分氧化的海藻酸钠样品.

氧化前后的海藻酸钠试样采用 KBr 压片, 使用傅立叶变换红外光谱仪(Bruker EQUINOX55)对试样进行红外光谱分析. 氧化前后海藻酸钠试样的分子量和降解速率的测定采用乌氏粘度计, 以 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液为溶剂, 分别测定海藻酸钠水溶液于 37℃保存一定时间后的流出时间 t 与纯溶剂的流出时间 t_0. 为了避免动能校正, 溶剂的流出时间在 100~120 s, 为了得到正确的外推, 最高浓度溶液的相对粘度(t/t_0)小于 1.8. 根据 Fedors 方程[15,16]外推得到溶液的临界交叠浓度, 进一步利用 Mark-Houwink 公式计算样品的粘均分子量[17].

1.2 纳米羟基磷灰石的制备与表征

采用化学沉淀法, 将浓度为 0.3 mol/L 的$(NH_4)_2HPO_4$溶液逐滴滴加至高速搅拌的等体积浓度为 0.5 mol/L 的$Ca(NO_3)_2·4H_2O$溶液中, 反应过程中用$NH_3·H_2O$控制溶液的 pH 值在 10.5~11 范围内, 反应结束后, 静置陈化 12 h, 过滤产物用无水乙醇洗涤 3 次, 80℃干燥, 研磨. 产物的 X 射线衍射及透射电镜结果如图 1 和 2 所示, 结果证明合成的 HAP 结晶度较低, 晶粒尺寸在 20~40 nm.

1.3 可注射型海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶的构建与表征

采用原位释放法利用可缓慢水解的葡萄糖酸内酯(GDL)调节体系 pH, 将 HAP 中的钙离子逐渐释放

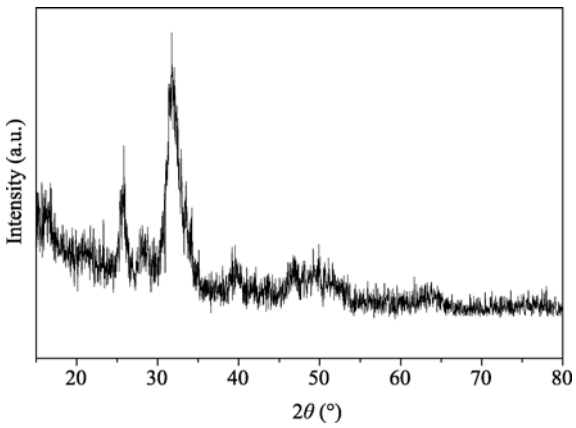

图 1 HAP 样品的 XRD 谱图

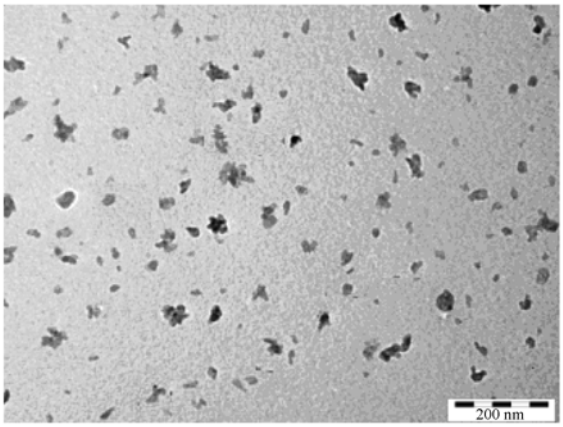

图 2　HAP 样品的透射电镜照片

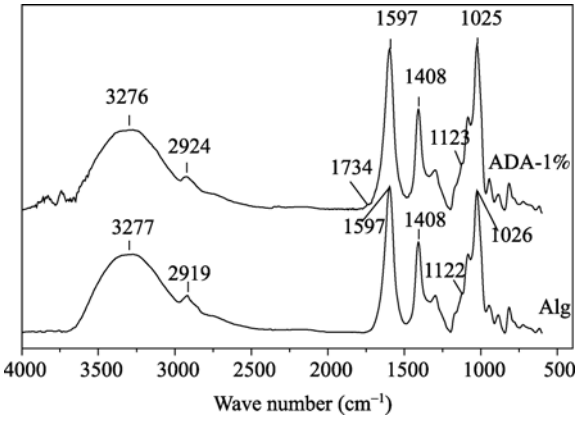

图 3　氧化前后海藻酸钠的红外光谱图

出来与海藻酸交联, 从而制备了结构均匀、透明的海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶. 具体方法如下: 将海藻酸钠试样用模拟体液配成一定浓度的溶液, 加入一定量的 HAP 悬浮液(定义 f 为钙离子与海藻酸中羧基的摩尔比, 即 $f=Ca^{2+}/[COO^-]$), 加入新配制的 GDL 水溶液, 混和均匀, 置于 Φ 15 mm×10 mm 的圆柱形模具中于 10℃静置 24 h. 通过调节葡萄糖酸内酯与钙离子的摩尔比控制体系 pH 在 6.8~7.2 之间.

采用动态粘弹谱仪(TA, ARES-RFS-II)测定体系在溶液-凝胶转变中的动态粘弹性, 测定温度(37±0.1)℃, 角频率 ω = 10 rad/s, 应变 3%(线性粘弹性范围). 用万能拉力机(岛津 SHIMADZUG-I)测定材料的压缩强度, 温度 37℃, 形变速率 1 mm/min. 扫描电镜(Philips XL-30 ESEM)观察水凝胶的表面形貌.

在可注射型海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶中复合 BMP, 进行体内植入试验. 选健康的 SD 大鼠 10 只(中山大学动物实验中心提供, 平均体重(140±0.2) g), 固定后腹腔注射适量的 10%水合氯醛麻醉, 选取四肢外侧作为注射点, 皮下注射复合 BMP 的海藻酸-纳米羟基磷灰石水溶液, 原位形成凝胶, 一个月后处死 SD 大鼠, 将试样和周围软组织一起取出, 修剪后置于 4%多聚甲醛–0.1M PBS 溶液中固定 24 h, 石蜡包埋、切片, 行 HE 染色, 光镜下观察标本组织病理形态学改变.

2　结果与讨论

2.1　氧化海藻酸钠的结构、分子量和降解速率

氧化前后海藻酸钠试样的红外谱图如图 3 所示, 图中给出氧化度为 1%的海藻酸钠试样的红外谱图, 氧化度为 3%和 5%的试样谱图与此类似, 图中不一一给出. 部分氧化后的海藻酸钠试样在 1734 cm^{-1} 处出现了一个新的特征峰, 该峰应归属于醛基的 C=O 振动吸收峰. 而醛基的另一特征峰 ν(CO-H)应在 2820 cm^{-1} 和 2720 cm^{-1} 附近出现, 但被烷基的 ν(C-H)吸收带所掩盖. 强氧化剂高碘酸钠可以氧化邻二醇结构, 使其成为醛或酮, 海藻酸钠糖醛酸结构单元中具有顺式邻二醇结构, 因而能与高碘酸钠反应, 发生碳-碳键断裂, 生成两个醛基. 这种反应是定量进行的, 每断一个碳-碳键消耗 1 mol 高碘酸钠, 因此可以通过严格控制高碘酸钠的摩尔量来控制海藻酸钠的氧化度[12,14].

氧化前后海藻酸钠试样的粘均分子量如表 1 所示, 随着氧化度的提高, 海藻酸钠分子量呈降低趋势, 氧化度控制在 5%以内, 氧化前后试样的分子量在同一数量级, 为制备水凝胶的力学性能提供了保证.

试样在 37℃ 0.1 M 的 NaCl 水溶液中分子量的变化如图 4 所示, 氧化前海藻酸钠试样在 NaCl 水溶液中几乎不发生降解, 相同条件下部分氧化后的试样随时间增加分子量呈显著下降趋势, 30 天分子量降低到初始分子量的 50%左右. 海藻酸钠被氧化后顺二醇结构转化为醛基, 糖环打开, 此时原糖醛酸上的 C(1)结构成为同碳二元醚, 可将其看作类似缩醛的结构, 缩醛结构极易发生水解, 因此部分氧化海藻酸钠可能按类似缩醛的水解机理降解[11].

表 1　氧化前后海藻酸钠试样的分子量

Sample	Alg	ADA-1%	ADA-3%	ADA-5%
M_η(×10^5)	5.59	4.54	3.04	2.51

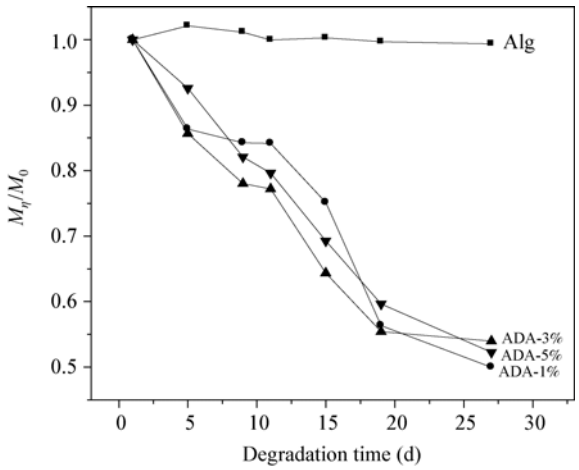

图 4　氧化前后海藻酸钠试样在 0.1 M NaCl 中的降解行为

2.2　海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶的力学强度

本工作考察了羟基磷灰石添加量和海藻酸浓度对体系压缩强度的影响. 当海藻酸盐浓度固定, C= 2 wt%时, 不同f值的水凝胶的压缩强度如图5(a)所示, 随着f值的增加, 即体系中 HAP 的用量增加, 能够提供更多的 Ca^{2+}与海藻酸钠结合, 体系的交联密度增大, 压缩强度提高, 同时过量的 HAP 也对体系起到增强的作用. 如图 5(b)所示当羟基磷灰石的用量比固定, f = 0.5 时, 随海藻酸盐浓度的增加水凝胶的压缩强度增大, 这主要是由于海藻酸盐浓度的增大使得大分子链之间的间距减小, 海藻酸分子链与钙离子的螯合更加容易, 凝胶网络的空间填充更加紧密的缘故. 当海藻酸盐浓度达到 2 wt%时, 压缩强度不再随海藻酸盐浓度的变化而变化, 此时水凝胶的压缩强度为 101.9 kPa. 这主要是由于海藻酸盐浓度增加, 体系粘度增大, GDL 与 HAP 在体系中的分散受限造成的.

2.3　海藻酸-纳米羟基磷灰石的凝胶化时间和动态粘弹性

采用动态粘弹谱仪跟踪了体系从溶液逐渐形成网络结构的凝胶化转变, 测定了试样的储存模量G'和损耗模量G''随时间的变化, 结果如图 6 所示. 为了避免数据的重叠, 不同试样的曲线沿纵轴方向移动了10^{α}, α值在图 6 中给出, 图 6 中的实心点为储存模量 G', 空心点为损耗模量 G''.

不同氧化度的海藻酸钠试样与纳米羟基磷灰石构建的体系在起始阶段 $G''>G'$, 体系为均相粘弹

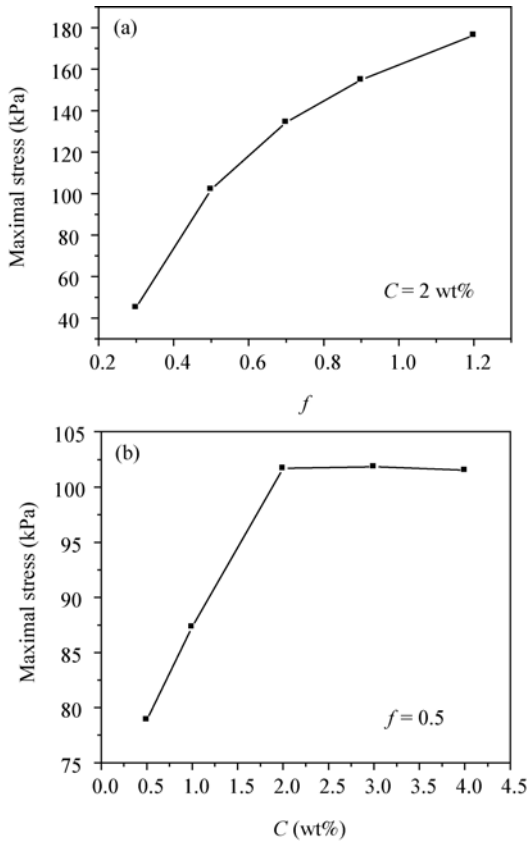

图 5　海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶的压缩强度

(a) HAP 添加量的影响; (b) 海藻酸盐浓度的影响

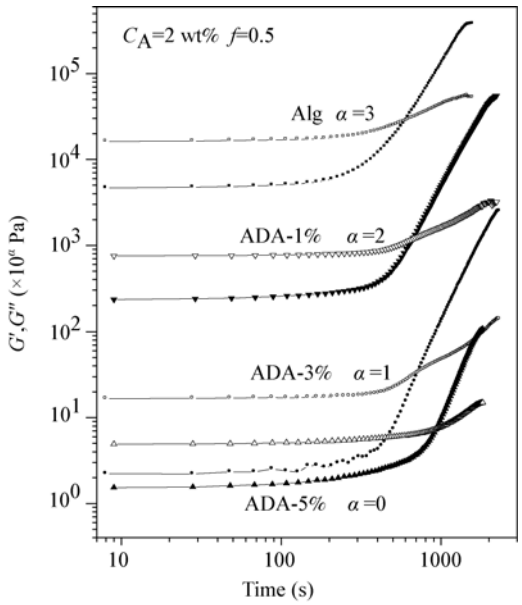

图 6　海藻酸-纳米羟基磷灰石凝胶化的动态模量随时间的变化(实心点为储存模量 G', 空心点为损耗模量 G'')

性液体, 没有形成分子链拓扑缠结交联的网络结构; 随着时间的推移体系模量增加, G'出现突变, 随后 $G'>G''$, 动态模量中弹性的贡献已超过了粘性的贡献, 体系发生了凝胶化, 形成了三维交联的网络结构. 将储存模量和损耗模量的交点作为凝胶化点[18,19], 可见随着海藻酸钠试样氧化度的提高, 体系的凝胶化时间略有增加. 随着氧化度的提高, 海藻酸分子链上与钙离子螯合的 G 单元 O-2、O-3 减少[20], 同时在氧化过程中海藻酸钠试样的分子量有一定程度的降低, 因此凝胶化时间增加. 在本实验中四种试样的凝胶化时间均在 10~15 min 的范围内, 符合可注射材料的临床使用要求.

2.4　凝胶形貌观察

扫描电镜下观察水凝胶样品冷冻干燥后的形貌(图 7), 如图所示材料具有多孔结构, 孔径在 20~300 μm 范围, 支架孔内及孔壁上有大量细小的 HAP 晶体连续均匀分布. HAP 是组成人体骨骼及牙齿的重要无机成分, 具有良好的生物相容性和生物活性, 能与骨形成很强的化学结合. 在体液的作用下, 会发生逐渐降解, 释放出钙和磷, 并被人体吸收、利用, 生长出新的骨组织. 对纳米羟基磷灰石粒子的研究发现它较普通的羟基磷灰石具有更强的生物活性和力学性能[21,22]. 因此体系中过量的羟基磷灰石一方面可以增加水凝胶的强度, 缓解由于钙离子的流失而造成的体系力学强度的迅速减小, 另一方面也为材料提供了更多的细胞结合位点, 增加了材料的生物相容性和骨传导性.

2.5　体内植入试验

海藻酸-纳米羟基磷灰石体系皮下注射 4 周后的组织切片如图 8 所示. 水凝胶材料与周围组织界限已不大明显, 材料与组织界面处只有少量的淋巴细胞和中性粒细胞等炎症细胞, 材料与组织有良好的相容性. 含 BMP 的水凝胶材料皮下注射 4 周后可见新生软骨组织生成, 软骨陷窝明显, 未见明显炎性细胞浸润. 部分软骨组织已转化为成熟骨组织, 可见骨细胞、骨陷窝、板层骨结构及髓腔. 材料中有新生血管形成. 结果表明海藻酸钠-纳米羟基磷灰石水凝胶具有良好的细胞相容性和组织相容性.

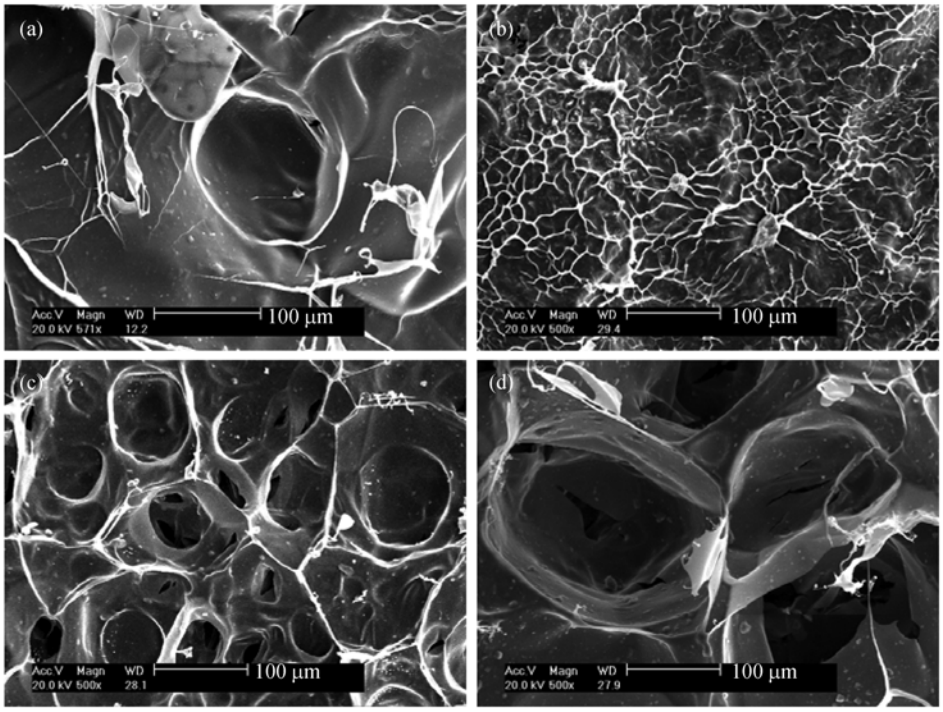

图 7　海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶的扫描电镜观察
(a) Alg-HAP; (b) ADA 1%-HAP; (c) ADA 3%-HAP; (d) ADA 5%-HAP

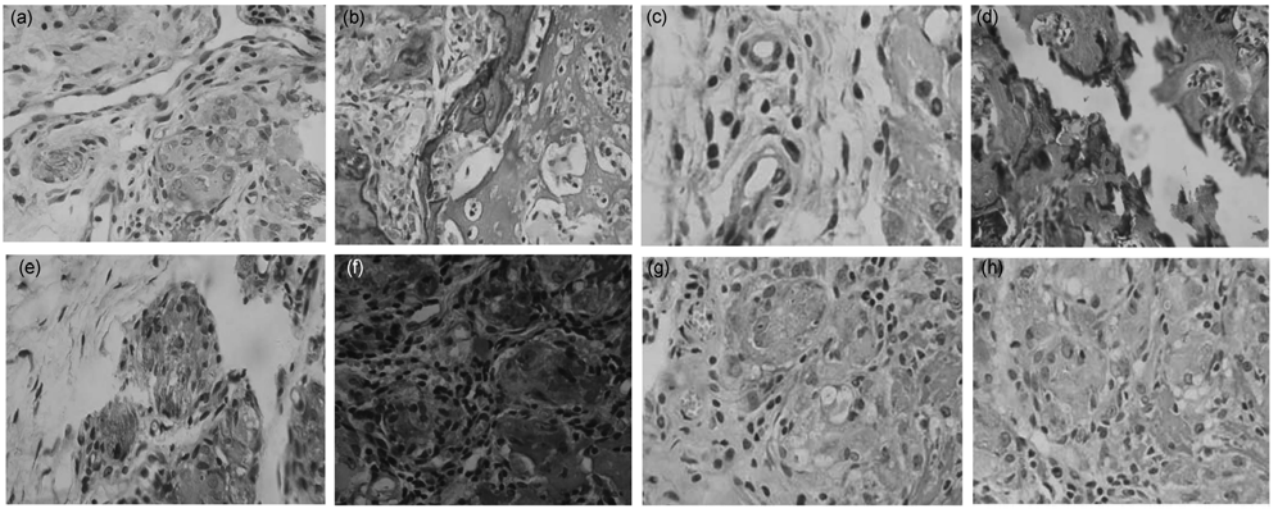

图 8　海藻酸-纳米羟基磷灰石水凝胶体内植入 4 周后石蜡切片(放大 50 倍)

(a) Alg-HAP 材料与组织界面; (b) Alg-HAP 材料内部; (c) ADA 1%-HAP 材料与组织界面; (d) ADA 1%-HAP 材料内部; (e) ADA 3%-HAP 材料与组织界面; (f) ADA 3%-HAP 材料内部; (g) ADA 5%-HAP 材料与组织界面; (h) ADA 5%-HAP 材料内部

3　结论

本文通过原位释放法将氧化海藻酸钠与纳米羟基磷灰石复合构建了可降解的原位成型水凝胶, 通过引入醛基实现海藻酸盐在体内环境的降解, 同时醛基可为材料引入新的活性细胞结合位点, 提高生物相容性. 采用过量的纳米羟基磷灰石作为钙离子来源, 对水凝胶起到增强和保持力学强度的作用, 同时增加了可注射体系的骨传导性. 在该水凝胶体系中可复合 BMP 等生长因子和药物等, 为细胞的增殖和组织修复提供更加有利的条件.

参考文献

1　Varghese S, Elisseeff J H. Hydrogels for musculoskeletal tissue engineering. Adv Polym Sci, 2006, 203: 95—144

2　Kong H J, Smith M K, Mooney D J. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. Biomaterials, 2003, 24(22): 4023—4029

3　Kuo C K, Ma P X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. Biomaterials, 2001, 22(6): 511—521

4　Lu L, Liu X, Dai L, et al. Difference in concentration dependence of relaxation critical exponent *n* for alginate solutions at sol-gel transition induced by calcium cations. Biomacromolecules, 2005, 6(4): 2150—2156

5　Lu L, Liu X, Tong Z. Critical exponents for sol-gel transition in aqueous alginate solutions induced by cupric cations. Carbohyd Polym, 2006, 65(4): 544—551

6　Lu L, Liu X, Tong Z. Critical exponents and self-similarity for sol-gel transition in aqueous alginate systems induced by calcium cations. J Phys Chem B, 2006, 110(49): 25013—25020

7　Stokke B T, Smidsrod O, Zanetti F, et al. Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties-2: Enrichment of β-*D*-mannuronic acid and depletion of α-*L*-guluronic acid in sol fraction. Carbohyd Polym, 1993, 21(1): 39—46

8　Lansdown A B G, Payne M J. An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate (kaltostat) following subcutaneous implantation in rat. J Roy Coll Surg Edin, 1994, 39(5): 284—288

9　Lin H, Yeh Y J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and *in vitro* studies. Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2004, 71B(1): 52—65

10　Awad H A, Wickham M Q, Leddy H A, et al. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and

gelatin scaffolds. Biomaterials, 2004, 25(16): 3211—3222
11 Bouhadir K H, Lee K Y, Alsberg E, et al. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. Biotechnol Prog, 2001, 17(5): 945—950
12 Bouhadira K H, Hausmana D S, Mooney D J. Synthesis of cross-linked poly (aldehyde guluronate) hydrogels. Polymer, 1999, 40(12): 3575—3584
13 姜建明, 王晓亮, 王晓敏, 等. 复合凝胶途径制备胶原-海藻酸钠-羟基磷灰石支架材料. 化学研究与应用, 2007, 19(6): 695—698
14 何淑兰, 张敏, 耿占杰, 等. 部分氧化海藻酸钠的制备与性能. 应用化学, 2005, 22(9): 1007—1011
15 Fedors R F. An equation suitable for describing the viscosity of dilute to moderately concentrated polymer solutions. Polymer, 1979, 20(12): 225—228
16 Rao M V S. Viscosity of dilute moderately concentrated polymer solutions. Polymer, 1993, 34(3): 592—596
17 Smidsrod O, Haug A. A light scatering study of alginate. Acta Chem Scandinavica, 1968, 22(12): 797—810
18 Nijenhuis T K. Investigation into the aging progress in gels of gelation/water system by the measurement of their dynamic moduli: Part II. Mechanism of the aging process. Colloid Polym Sci, 1981, 259(12): 1017—1026
19 Ross-Murphy S B. Structure and rheology of gelatin gels: Recent progress. Polymer, 1992, 33(23): 2622—2627
20 Moe S T, Draget K I, Skjåk-Bræk, et al. Alginate. In: Stephen A M, ed. Food Polysaccharides and Their Applications. New York: Marcel Dekker, 1995. 263
21 Li Y B, Wijn J D, Groot K D, et al. Preparation and characterization of nanograde osteoapatite-like rod crystals. J Mater Sci: Mater Med, 1994, 5(5): 252—254
22 Li Y B, Groot K D, Wijn J D, et al. Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment. J Mater Sci: Mater Med, 1994, 5(6-7): 326—333