

负载绿原酸的 GelMA/HAMA 水凝胶及其 体外抗氧化抗炎性能的研究

陆海云

上海瀚合瑞医药科技有限公司 上海 201210

【摘要】目的：皮肤损伤后伤口微环境内存在大量活性氧（ROS）和炎症因子导致伤口愈合缓慢。方法：本研究设计了一种负载绿原酸（CA）的甲基丙烯酰化明胶/甲基丙烯酰化透明质酸的复合水凝胶（GelMA/HAMA@CA）。结果：GelMA1/HAMA1@CA 水凝胶可在 12 h 释放约 35%CA，展现出对 ABTS 和 DPPH 自由基良好的清除能力，能够有效保护 L929 和 HUVEC 细胞免受 H₂O₂ 诱导的氧化损伤，显著降低 M1 型巨噬细胞的表达量，可在伤口初期快速清除 ROS 和炎症因子改善伤口微环境。结论：GelMA/HAMA@CA 水凝胶在体外和细胞层面均展现出优异的抗氧化与抗炎性能，有望成为修复皮肤损伤的伤口敷料。

【关键词】：水凝胶；绿原酸；明胶；透明质酸；伤口敷料

DOI:10.12417/2811-051X.26.11.044

在日常生活中，皮肤损伤具有较高的发生概率。根据流行病学调查，一个普通成年人每年会经历 2 到 5 次如擦伤、割伤、烫伤或刺伤等皮肤损伤，而从事体力劳动、运动和儿童的人群，其损伤发生概率更远高于普通成人^[1-2]。在家庭环境中，切割伤、擦伤占有皮肤损伤的 60% 以上，烫伤约占 15%。同时，日常生活中仍有大量未被注意到的表皮损伤不被我们当作伤口记录，但它们同样启动了身体的愈合机制。几乎每个人每几天就会遇到一次皮肤屏障被破坏的情况。

伤口愈合是一个连续且高度协调的生理过程，按照恢复阶段可将其细分为以下四个阶段：止血期、炎症期、增殖期和重塑期^[3]。在皮肤损伤初期，患者机体内的血小板迅速在受损血管组织黏附、富集并活化，释放各种如凝血因子 I、II、III 等凝血因子共同发挥作用激活凝血级联反应，最终形成纤维蛋白网，与血小板形成稳定的凝血块，实现止血，为后续迁移炎症细胞和修复细胞提供了临时的平台。

在开始止血后，伤口进入炎症期，血小板、受损细胞和免疫细胞释放趋化因子，吸引周围组织的中性粒细胞和巨噬细胞等免疫细胞抵达伤口组织，这些细胞产生活性氧（ROS）和炎症因子（例如 TNF- α 、IL-6 等）在伤口组织内快速聚集用于清除入侵的病原体、坏死组织的碎片，但是过量的 ROS 和炎症因子可能会引发氧化应激和炎症反应，导致伤口愈合缓慢，延长伤口愈合周期^[4]。在伤口完成清创，ROS 和炎症反应消退，伤口便进入增殖期和愈合期。正常伤口愈合依赖炎症期的 ROS 和炎症因子来完成杀菌、清创，但深 II 度烧伤因其组织损伤严重，产生过量的 ROS 和炎症因子，不仅破坏止血，还会抑制成纤维细胞增殖、阻止肉芽组织形成和上皮化，使伤口停滞在炎症期。因此，烧伤的治疗重点必须从单纯的清除坏死组织转向主动清除过量 ROS 和炎症因子，重塑伤口微环境，促进伤口的愈合^[5]。

天然多酚类化合物含有大量的酚羟基结构，具有多种药理

活性。绿原酸作为自然界中广泛存在的一种多酚类化合物，可从金银花、杜仲叶、茵陈等中药和咖啡豆、苹果、梨等食物中获取^[6-7]。绿原酸是咖啡酸与奎宁酸通过酯化反应形成的一类天然酚酸。与咖啡酸相比，绿原酸含有更高的水溶性和稳定性。同时绿原酸也与咖啡酸一样，也具有良好的抗氧化和抗炎活性。绿原酸可通过抑制 NF- κ B 活化，抑制 M1 型巨噬细胞的表达，降低 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的表达；同时绿原酸结构中的酚羟基结构具有较高的还原性，可与自由基反应，对 ABTS、DPPH、超氧阴离子等多种自由基具有较高的反应活性，同时也可通过 Kcap1/HO-1 通路和 Nrf2 通路提升细胞抗氧化能力，减轻细胞氧化应激损伤。

水凝胶是一类由亲水性聚合物组成的三维网状结构的高分子材料，其结构含有大量孔道，可负载自身重量 80% 以上的水分，这种具有孔隙结构和高含水量的特点可为伤口细胞生长提供透气、湿润的微环境^[8]。同时水凝胶也具有细胞外基质类似的功能，可为细胞生长、繁殖提供临时支架支撑。透明质酸是一种非硫酸化的糖胺聚糖的天然多糖，广泛存在于皮肤、组织的细胞外基质中与体内，具有优异的水合能力和易塑性^[9]；明胶是由胶原蛋白发生部分水解得到的高分子聚合物，其保留了胶原蛋白的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸（RGD）序列的同时，可提供细胞生长提供良好的微环境，可作为细胞增殖、分裂的支架材料^[10]。二者均可作为水凝胶的成胶材料，由其组成的水凝胶模拟了天然细胞外基质中蛋白聚糖与结构蛋白的结合，为伤口愈合提供了理想微环境。明胶主要解决细胞黏附问题，而透明质酸则提供优异的保水性和动态环境的适应性。

基于上述研究，本研究制备了一种负载绿原酸的透明质酸/明胶复合水凝胶，在体外实验、细胞实验中验证水凝胶的抗氧化、抗炎活性。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

甲基丙烯酸酐 (MA) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 绿原酸 (CA) (上海麦克林生化科技股份有限公司); 透明质酸 (HA)、明胶 (Gel)、ABTS 自由基试剂盒、DPPH 自由基试剂盒 (北京伊诺凯有限公司); 苯基-(2,4,6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂盐 (Lap) (苏州永沁泉智能设备有限公司); 过氧化氢 (H_2O_2) (国药集团化学试剂有限公司); CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 小鼠成纤维上皮细胞 (L929)、人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)、小鼠单核巨噬细胞 (RAW264.7) (北京中生奥邦生物科技有限公司); DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS)、青链霉素、胰酶 (美国 Gibco 公司); 脂多糖 (LPS) (北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 仪器

UV-6100S 型紫外-可见分光光度计 (上海元析分析仪器有限公司); FV4000 型光学显微镜 (日本奥林巴斯有限公司); Sartorius BS110S 电子分析天平 (北京赛多利斯科学仪器有限公司); Elx800 多功能酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); Mars 60 (德国 Haake 公司); Bruker 400MHz (德国 Bruker 科技有限公司); YTLG-10AN-60 冷冻干燥机 (上海叶拓科技有限公司); MCR302 流变仪 (奥地利 Anton Paar 公司)。

2 方法

2.1 甲基丙烯酸酐明胶 (GelMA) 的合成

将 2 g Gel 溶解于 50℃ 100mL 磷酸盐缓冲液中, 在搅拌状态下缓慢滴加 2 mL MA, 反应 2 h 后收集反应液 8000 rpm 离心 30 min, 收集上清液并置于透析袋 (截留分子量, 7 kDa) 内透析 3 天, 每天换水 3 次, 冷冻干燥即得 GelMA。

2.2 GelMA 的结构表征

(1) 1H NMR: Gel、GelMA 样品溶解于重水中, 用 Bruker 400MHz 核磁共振波谱仪进行分析测试。

(2) 接枝度 (DOF) 测定: GelMA 的甲基丙烯酸酐化程度通过 1H NMR 图谱计算, 公式如下:

$$DOF (\%) = (1 - A_{GelMA}/A_{Gel}) \times 100\%$$

A_{GelMA} 和 A_{Gel} 分别代表 GelMA 和 Gel 中赖氨酸亚甲基峰面积 (2.85–3.0 ppm)。

2.3 甲基丙烯酸酐透明质酸 (HAMA) 的合成

在 4℃ 下将 1 g HA 溶解于 100mL 去离子水中, 搅拌下缓慢滴加 2 mL MA, 氢氧化钠调节 pH 至 8.5, 继续在 4℃ 下搅拌过夜。加入无水乙醇沉淀后, 收集反应液并置于透析袋 (截留分子量, 7 kDa) 内透析 3 天, 每天换水 3 次, 冷冻干燥即得 HAMA。

2.4 HAMA 的结构表征

(1) 1H NMR: HA、HAMA 样品溶解于重水中, 用 Bruker 400MHz 核磁共振波谱仪进行分析测试。

(2) 接枝度 (DOF) 测定: HAMA 的甲基丙烯酸酐化程度通过 1H NMR 图谱计算, 公式如下:

$$DOF (\%) = (A_{5.6-6.2}/2) / (A_{1.8-1.95}/3) \times 100\%$$

$A_{5.6-6.2}$ 和 $A_{1.8-1.95}$ 分别代表 HAMA 中乙烯基质子峰 (5.6–6.2 ppm) 和甲基质子峰 (1.8–1.95 ppm)。

2.5 GelMA/HAMA 水凝胶的制备

称取 GelMA、HAMA 溶解于去离子水中, 配制浓度为 3% 的 GelMA、HAMA 溶液。将二者溶液以不同体积比 (2:1、1:1、1:2) 混合并加入 0.5% 的 Lap 和 2% 的 CA, 得到不同的 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体, 分别命名为 GelMA2/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA2@CA 水凝胶前体。当水凝胶前体经过 405 nm 激光照射 1 min 固化后, 得到 GelMA/HAMA 水凝胶, 分别命名为 GelMA2/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA2@CA 水凝胶。

2.6 水凝胶成胶性能考察

采用小瓶倒置法测定 GelMA/HAMA@CA 水凝胶成胶时间, 即小瓶倒置 30 s 内液体不流动即为水凝胶形成。

2.7 水凝胶形貌特征考察

将 GelMA2/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA2@CA 水凝胶置于培养皿中, 液氮迅速冷却固定水凝胶形貌, 冷冻干燥 18 h。将冻干后的水凝胶切成块状, 固定于导电胶上, 表面喷金, 采用扫描电子显微镜观察水凝胶内部形貌特征, 加速电压设定为 5 kV。

2.8 水凝胶流变性能考察

将 GelMA2/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA2@CA 水凝胶置于流变仪平行板上, 固定应变值 (1%), 进行动态频率扫描, 扫描范围为 0.1–100 rad/s。最后, 将 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体置于平板固定应变值为 1%, 扫描频率为 10 rad/s, 扫描时间为 2 min, 在 40 s 时用 405 nm 激光照射固化水凝胶, 考察水凝胶在时间扫描下的流变性能。

2.9 水凝胶黏附性能考察

利用搭接剪切实验考察 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体、GelMA/HAMA@CA 水凝胶的生物粘附性。去除新鲜猪皮多余的脂肪与毛发, 并将其剪切为长宽高分别为 75 mm、25 mm 和 3.0 mm 的长方体。将 50 μ L GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体均匀涂布在猪皮上, 涂布面积约为 25 mm $\times$ 25 mm。其中 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体在涂布均匀后, 在猪皮表面经过 405 nm 已照射 1 min 固化成型, 记为 GelMA/HAMA@CA 水凝

胶组。将另一块猪皮覆盖在水凝胶表面，用 500 g 砝码压制 1 h 后，将待测样品转移至试验机上，使用夹具夹紧猪皮，以 0.3 mm/min 的速度进行拉伸实验，记录拉伸过程中作用力，待到两块猪皮发生分离，停止记录。通过将拉伸过程最大张力除以搭接截面积来计算水凝胶的组织黏附强度（单位为 kPa）。

2.10 水凝胶释药性能考察

利用紫外分光光度法测定水凝胶中 CA 的释放行为。将 1 mL 圆柱形 GelMA/HAMA@CA 水凝胶浸没于 20 mL 37°C 的 PBS 溶液中，在 0.5、1、2、3、4、5 天取出 1 mL 溶液，并补加等量的 PBS 溶液，将样品于 278 nm 处测定紫外吸光度，并计算 GelMA/HAMA@CA 水凝胶的药物累计释放度，绘制药物释放曲线。

2.11 水凝胶体外抗氧化性能考察

(1) GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 DPPH 自由基清除能力考察

将 500 μ L GelMA1/HAMA1、GelMA2/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA2@CA 水凝胶与 1 mL DPPH 溶液 (0.5 mM) 避光反应 1 h，以 PBS 和乙醇分别代替水凝胶作为空白组，在 517 nm 测定样品吸光度，并计算 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 DPPH 自由基清除能力 (SD)，计算公式如下：

$$SD(\%) = (1 - (OD_{\text{Ethanol}} - OD_{\text{Hydrogel}}) / OD_{\text{PBS}}) \times 100\%$$

其中 OD_{Hydrogel} 为样品在 517 nm 处的响应值， OD_{Ethanol} 和 OD_{PBS} 分别代表以乙醇和 PBS 代替 CCS/BGM 水凝胶时的响应值。

(2) GelMA/HAMA 水凝胶对 ABTS 自由基清除能力考察

将 ABTS 溶液与过硫酸钾溶液在黑暗条件下反应 12 h 得到 ABTS 自由基溶液，并用适量的无水乙醇稀释至吸光度约为 0.70（在 734 nm 处测定其响应值）的工作母液。将 500 μ L GelMA1/HAMA1、GelMA2/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA1/HAMA2@CA 水凝胶与 2.5 mL 的 ABTS 自由基溶液避光反应 1 h。以 PBS 和乙醇分别代替水凝胶作为空白组，在 734 nm 测定样品吸光度，并计算 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 ABTS 自由基清除能力 (SA)，计算公式如下：

$$SA(\%) = (1 - (OD_{\text{Ethanol}} - OD_{\text{Hydrogel}}) / OD_{\text{PBS}}) \times 100\%$$

其中 OD_{Hydrogel} 为样品在 517 nm 处的响应值， OD_{Ethanol} 和 OD_{PBS} 分别代表以乙醇和 PBS 代替 CCS/BGM 水凝胶时的响应值。

2.12 水凝胶的细胞抗氧化能力考察

利用 DCFH-DA 探针技术检测 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 L929 细胞和 HUVEC 细胞氧化损伤保护机制研究。将 L929 细胞和 HUVEC 细胞分别以每孔 3×10^4 个细胞接种于 24 孔板

内，37°C 过夜孵育使 L929 和 HUVEC 细胞完全贴壁。分别向各孔板内的细胞中加入 20 μ L 10 mM H_2O_2 溶液刺激细胞 2 h 发生使其氧化应激，加入 GelMA/HAMA@CA 水凝胶共孵育 3 h。随后，吸尽培养基和水凝胶，并用 PBS 清洗细胞，向孔板内加入 10 μ M DCFH-DA 探针溶液，37°C 孵育 15 min，在荧光显微镜下拍照记录细胞状态，消化细胞并将其收集在 96 孔板内，以未经 H_2O_2 处理的细胞为对照组，分别用酶标仪检测其荧光强度。

2.13 水凝胶的细胞抗炎能力考察

将 RAW264.7 细胞以每孔 6×10^5 个细胞接种于 6 孔板内，37°C 孵育 24 h 使细胞完全贴壁。向细胞内加入 30 μ L 100 ng/mL LPS 溶液刺激细胞 3 h 使其极化为 M1 型巨噬细胞，加入 GelMA/HAMA@CA 水凝胶共孵育 12 h。随后，吸尽培养基和水凝胶，并用 PBS 清洗细胞，向孔板内加入 CD86 和 CD11b 抗体溶液共孵育 30 min，收集吹打消化后细胞，以未经 H_2O_2 处理的细胞为对照组，用流式细胞术测定 M0 型和 M1 型巨噬细胞比例。

3 结果

3.1 GelMA 的结构表征

Gel 的 $-NH_2$ 可与 MA 中羰基碳发生亲核取代反应，生成酰胺键，制备具有光固化性能的 GelMA（图 1）。NMR 结果表明，GelMA 在 5.4 ppm 和 5.6 ppm 处新增甲基丙烯酸双键特征峰，证明甲基丙烯酸成功连接至 Gel 骨架上，GelMA 合成成功（图 2）^[1]。经过 NMR 计算，GelMA 的接枝度为 63.75%。

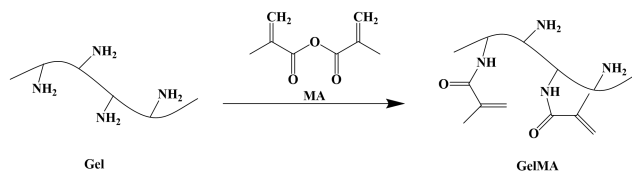


图 1 GelMA 合成路线

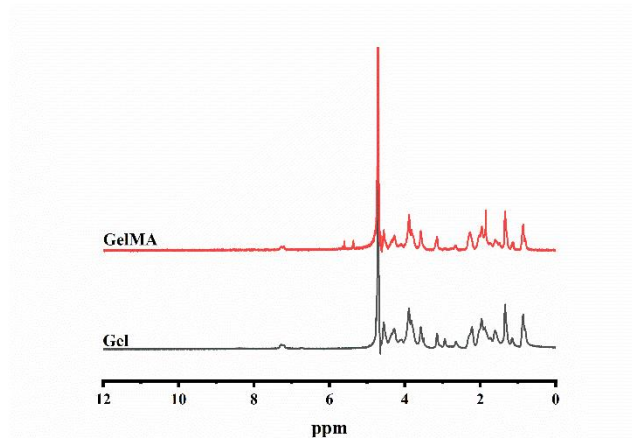


图 2 Gel 和 GelMA 核磁图谱

3.2 HAMA 的结构表征

HA 的-OH 可与 MA 中羰基碳发生亲核取代反应, 生成酰胺键, 制备具有光固化性能的 HAMA (图 3)。NMR 结果表明, HAMA 在 5.3 ppm 和 5.6 ppm 处新增甲基丙烯酸双键特征峰, 证明甲基丙烯酸成功连接至 HA 骨架上, HAMA 合成成功 (图 4) [12]。经过 NMR 计算, HAMA 的接枝度为 27.38%。

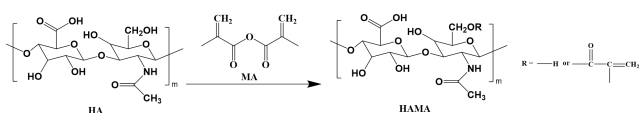


图 3 HAMA 合成路线

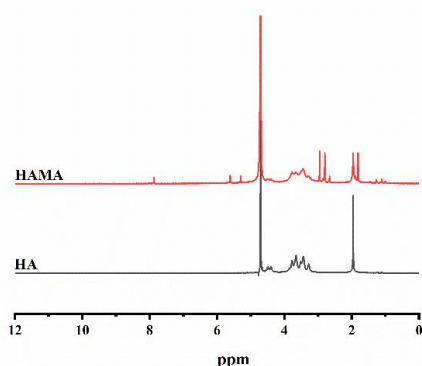


图 4 HA 和 HAMA 核磁图谱

3.3 GelMA/HAMA@CA 的制备与性质表征

通过小瓶倒置实验表明, 未固化的 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体以溶液状态存在, 经过 405 nm 激光照射 1 min 后, 所有的 GelMA/HAMA@CA 水凝胶均能固化成型, 这是因为水凝胶中的 GelMA 和 HAMA 具有甲基丙烯双键, 可通过光引发的自由基反应固化成型 (图 5)。

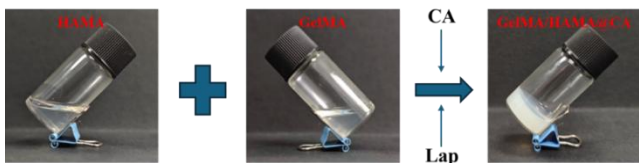


图 5 GelMA/HAMA@CA 水凝胶制备示意图

通过 SEM 可观察到冻干后的 GelMA/HAMA@CA 水凝胶具有明显孔道结构, 可有效吸收皮肤创面伤口的渗出液, 也为伤口细胞的生长提供了湿润、透气的微环境 (图 6)。

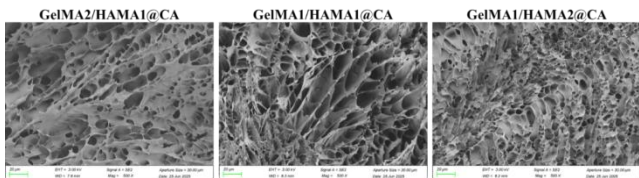


图 6 GelMA/HAMA@CA 水凝胶扫描电镜图

储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 可代表水凝胶固体和流体性质。未光固化的 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体 G' 高于 G'' , 代表水凝胶前体呈现流体状态, 而经过固化后的水凝胶储能模量与损耗模量显著上升, 且 G' 高于 G'' , 证明水凝胶以固态形式存在, 这种模量的变化有助于伤口的保护 (图 7A)。频率扫描也证明了 GelMA/HAMA@CA 水凝胶具有良好的固态性能, 结构稳定, 具有典型的粘弹性行为 (图 7B)。

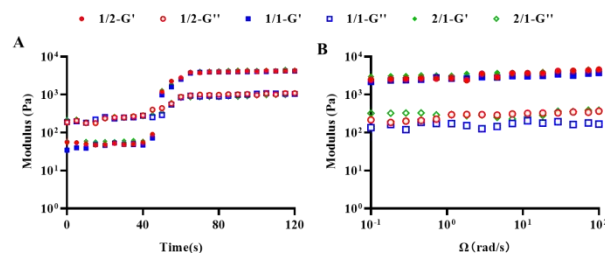


图 7 GelMA/HAMA@CA 水凝胶流变性能

(A) 时间扫描 (B) 频率扫描注: 1/2、1/1、2/1 代表 GelMA1/HAMA2@CA、GelMA1/HAMA1@CA、GelMA2/HAMA1@CA

利用搭接剪切法考察 GelMA/HAMA@CA 水凝胶在猪皮上的生物黏附性。当水凝胶以前体形式 (未光固化) 涂抹在猪皮表面时, 水凝胶的生物黏附力均在较低水平, 分别为 7.25 KPa、9.28 KPa 和 9.01 KPa; 但当水凝胶固化后, 其生物黏附力显著提升, 分别为 16.91 KPa、22.99 KPa 和 18.93 KPa, 这证明了水凝胶经过光固化后与伤口有更高的生物粘附性, 可以更好地保护伤口组织免受外界破坏 (图 8)。

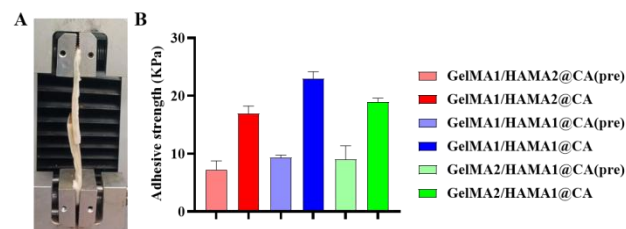


图 8 GelMA/HAMA@CA 水凝胶黏附性能 ($n=3$)

(A) 实验过程图 (B) 水凝胶黏附性能; GelMA/HAMA@CA(pre) 代表 GelMA/HAMA@CA 水凝胶前体, GelMA/HAMA@CA 代表 GelMA/HAMA@CA 水凝胶

3.4 GelMA/HAMA@CA 水凝胶体外释药性能考察

为了实现水凝胶可以降低伤口微环境中的活性氧和炎症因子, 水凝胶负载的 CA 应具备一定的释放能力。图 9 显示了 GelMA/HAMA@CA 水凝胶中 CA 释放行为, 可以观察到随着 GelMA 和 HAMA 比例降低, CA 的累计释放量逐渐增大, 这可能是由于具有较低含量的 GelMA 和 HAMA 的水凝胶孔径较大, 有利于 CA 的释放 [13]。各 GelMA/HAMA@CA 水凝胶在 96 h 内均可稳定释放 CA, 其中 GelMA1/HAMA1@CA 在 12 h

时释放 35% 左右, 在 24 h 时可以释放近 50%, 具有最快的释放速度, 且在后期呈现缓慢释放趋势。这种在前期快速释放, 后期缓慢释放 CA 的行为有助于伤口敷料对伤口部位的细菌、微生物进行快速清除、杀灭, 并且可以快速清除伤口微环境中的活性氧与炎症因子, 改善伤口微环境, 有助于缩短伤口愈合周期。

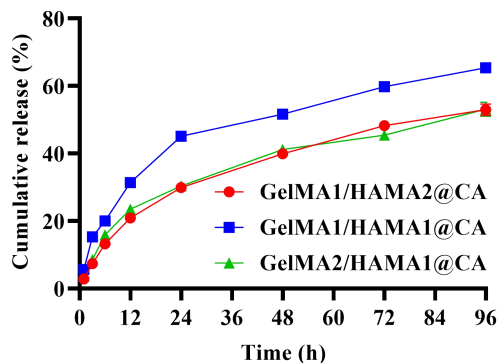


图9 GelMA/HAMA@CA 水凝胶的 CA 累计释放度 (n=3)

3.5 GelMA/HAMA@CA 水凝胶体外抗氧化能力考察

DPPH 和 ABTS 自由基是两种比较常用的自由基, 可用于验证水凝胶体外抗氧化能力^[14-15]。与 GelMA1/HAMA1 水凝胶相比, 三种 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 DPPH 和 ABTS 两种自由基均有良好的清除效果, 证明水凝胶中的 CA 发挥了关键的清除自由基作用。但是三者的清除效率仍有一定区别, 随着 GelMA 和 HAMA 比例的增大, 两种自由基清除效率呈现下降趋势, 这是因为随着 GelMA 和 HAMA 比例的增加, 水凝胶交联紧密程度增加, CA 分子不易从水凝胶中释放出来, 导致其对 ABTS 和 DPPH 自由基清除能力随之下降 (图 10)。

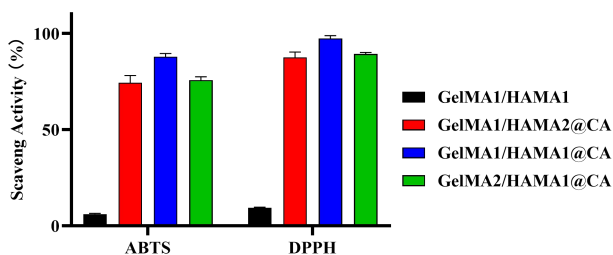


图10 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 ABTS 和 DPPH 自由基清除效率 (n=3)

3.6 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对氧化应激细胞内 ROS 的影响

基于之前研究验证了 GelMA/HAMA@CA 具有高效的体外自由清除活力, 利用 DCFH-DA 染色法进一步测定其在 L929 和 HUVEC 细胞上的 ROS 清除能力^[16]。L929 和 HUVEC 细胞分别可用于模拟伤口表皮细胞和血管内皮细胞, 代表了皮肤伤口愈合过程中组织重塑和血管生成过程。与 H₂O₂ 孵育后的

L929 和 HUVEC 细胞可见明显绿色荧光, 证明细胞产生大量 ROS (图 11A)。然而, 经过与 GelMA/HAMA@CA 水凝胶共孵育后的细胞绿色荧光显著降低 (P<0.001), 证实了 GelMA/HAMA@CA 水凝胶可保护细胞免受 H₂O₂ 诱导产生的氧化应激。同时三种 GelMA/HAMA@CA 水凝胶相比, 经过 GelMA1/HAMA1@CA 孵育后的细胞绿色荧光强度最低, 这也与之前体外自由基清除实验数据相一致, 交联越紧密的水凝胶, CA 释放速度越慢, 其抗氧化活性较低 (图 11B)。

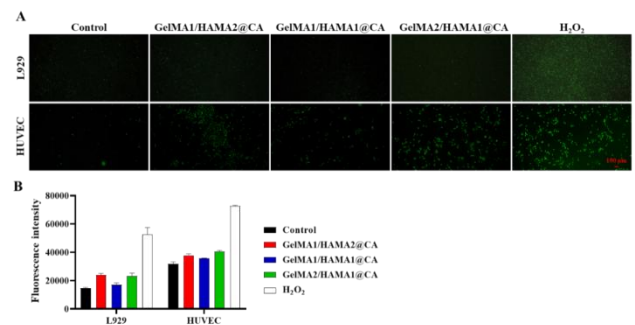


图11 GelMA/HAMA@CA 水凝胶对 L929 和 HUVEC 细胞抗氧化能力

(A) DCFH-DA 染色法测定 L929 和 HUVEC 细胞内 ROS 荧光图 (B) L929 和 HUVEC 细胞的平均荧光强度 (n=3)

3.7 GelMA/HAMA@CA 水凝胶的抗炎能力

M0 型巨噬细胞受到外界刺激后可分化成具有促炎作用的 M1 型巨噬细胞。本实验利用 LPS 刺激 M0 型巨噬细胞 (RAW 264.7 细胞) 分化成 M1 型巨噬细胞^[17]。与未经 LPS 刺激组相比, 经 LPS 刺激后, M1 型巨噬细胞特征物——CD86 表达量显著增加。经过 GelMA/HAMA@CA 水凝胶治疗后, CD86 表达量有不同程度的降低, 证明 M1 型巨噬细胞表达量降低。其中 GelMA1/HAMA1@CA 组中的 M1 型巨噬细胞表达量最低, 具有最优异的抗炎功能, 这也与之前 GelMA/HAMA@CA 水凝胶的 CA 释放规律相一致, GelMA1/HAMA1@CA 水凝胶的 CA 释放量最大, CA 可以快速起效。

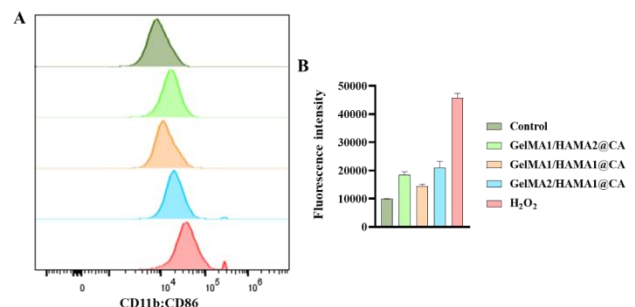


图12 GelMA/HAMA@CA 水凝胶的细胞抗炎能力

(A) 各组流式细胞图 (B) M1 巨噬细胞的平均荧光强度 (n=3)

4 结论

皮肤损伤后伤口内活性氧(ROS)和炎症因子难以有效清除而导致伤口愈合延长。本文以生物相容性良好的明胶(Gel)和透明质酸(HA)为基础材料,通过改性研究制备了具有光固化性能的甲基丙烯酰化明胶(GelMA)和甲基丙烯酰化透明质酸(HAMA),并负载具有抗炎、抗氧化功能的天然酚酸——绿原酸(CA),构建了GelMA/HAMA@CA复合水凝胶体系。其中,GelMA1/HAMA1@CA水凝胶表现出良好的药物释

放行为:在12 h时释放35%的CA,24 h内释放50%的CA,有望在伤口愈合初期快速清除伤口微环境中的ROS和炎症因子。同时,体外实验表明该水凝胶具有良好的自由基清除能力,能够保护L929和HUVEC细胞免受H₂O₂诱导的氧化应激损伤,并显著降低M1型巨噬细胞的表达量。综上所述,设计并制备的GelMA1/HAMA1@CA水凝胶在体外和细胞层面展现了优异的抗氧化、抗炎活性,有望成为用于治疗皮肤损伤修复的伤口敷料,改善伤口微环境,缩短伤口愈合周期。

参考文献:

- [1] 赵兰英,陈云凤,金云.水胶体敷料在预防危重新生儿压力性皮肤损伤中的应用效果[J].妇儿健康导刊,2023,2(20):178-180.
- [2] 陈伟伦.中国冲浪运动员运动损伤调查与预防策略研究[D],2023.
- [3] Fang D,Chen S,Wu C,et al.In situ photocrosslinking ROS-adaptive caffeoyl chitosan/boronic acid-grafted gelatin hydrogels for treatment of combined radiation-burn injury[J].Biomaterials Advances,2026,183.
- [4] Shen J,Jiao W,Chen Z,et al.Injectable multifunctional chitosan/dextran-based hydrogel accelerates wound healing in combined radiation and burn injury[J].Carbohydrate Polymers,2023,316.
- [5] Zhang W,Zhang S,Zhao T,et al.An injectable sequential dual-crosslinking catechol-functionalized hyaluronic acid hydrogel for enhanced regeneration of full-thickness burn injury[J].Journal of Controlled Release,2024,369:545-555.
- [6] 李阳昱,李庆蓉,陈孝红等.绿原酸抗菌作用及机制的研究进展[J].中国抗生素杂志,2024,49(2):141-150.
- [7] 陈泽秦,朱丹.绿原酸调控 HMGB1/TLR4 通路对干眼症大鼠角膜炎症的影响[J].眼科新进展,2026,46(01):31-36.
- [8] 吴睿,梁靛,李奕怀等.水凝胶及应用研究进展[J].化工新型材料,2025,53(05):248-254.
- [9] 李宜凝,仝涛.透明质酸与皮肤健康的研究进展[J].食品与发酵工业,2026,52(07):402-409.
- [10] 王瑞瑞.明胶基智能材料的开发研究进展[J].材料导报,2025,39(18):247-254.
- [11] 孔艳辉,张琳萍,毛志平等.甲基丙烯酰化明胶纤维膜的制备及其止血性能[J].纺织学报,2026,47(01):1-10.
- [12] 李文铭,李永航,严才平等.增强自噬的可注射水凝胶微球改善软骨微环境抗软骨细胞衰老[J].中国组织工程研究,2025,29(22):4710-4719.
- [13] 方昊,罗珏君,李梦妍等.电沉积法制备丝素蛋白基水凝胶及其释药性能研究[J].丝绸,2023,60(07):1-9.
- [14] 梁红敏,任继波,李彦奎等.改良的 DPPH 与 ABTS 自由基法评价不同葡萄籽油抗氧化能力[J].中国粮油学报,2018,33(01):85-91.
- [15] 白海娜,王振宇,刘瑞海等.白藜芦醇与黑木耳多糖协同清除 ABTS 自由基活性的研究[J].现代食品科技,2014,30(03):64-68.
- [16] 马立威,陈哲,李旭等.十枣汤诱导乳腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡的作用及机制研究[J].中国比较医学杂志,2026,36(06):1-10.
- [17] 杨金伟,周毅,肖凡等.左归降糖舒心方含药血浆对脂多糖诱导巨噬细胞损伤及焦亡的影响[J].中药新药与临床药理,2025,36(02):206-213.