

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.01.001

· 基础研究 ·

原位可注射壳聚糖基温敏水凝胶的制备及其在预防 ESD 术后
食管狭窄中分阶段释药应用研究*李 宁¹ 宁 敏² 宛新建^{2Δ} 刘坚华^{3Δ} 何伟娜^{3Δ}

(1 上海交通大学基础医学院基础医学实验教学中心 上海 200025;

2 上海交通大学附属上海市第六人民医院消化内科 上海 200233;

3 上海交通大学基础医学院药物化学与生物信息学中心 上海 200025)

摘要 目的:构建一种可以分阶段释放药物的原位可注射水凝胶,通过直接注射在 ESD(Endoscopic Submucosal Dissection, 内镜黏膜下剥离术)术后伤口处,形成水凝胶敷料,起到保护伤口的作用。同时凝胶中的两种药物通过分阶段释放的方式,更好地促进伤口的无瘢痕愈合,为 ESD 术后食管狭窄的预防提供一种新的参考方案。**方法:**在壳聚糖/ β -甘油磷酸钠(CS/ β -GP)温敏水凝胶的体系中加入聚多巴胺(PDA),制备壳聚糖/ β -甘油磷酸钠/聚多巴胺(CS/ β -GP/PDA)水凝胶。通过在载药水凝胶中加入聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸(PEG-PLGA)纳米载药微粒制备 CS/ β -GP/PDA/NPs 双载药水凝胶,通过两种载药体系的复合,实现药物的分阶段释放。通过流变学实验测定 CS/ β -GP、CS/ β -GP/PDA、CS/ β -GP/PDA/NPs 凝胶体系的相转变温度以及凝胶强度。通过高效液相色谱法检测 CS/ β -GP/PDA/NPs 水凝胶中两种药物的释放动力学特征。通过 CCK-8 细胞增殖实验评价 CS/ β -GP/PDA、CS/ β -GP/PDA/NPs 温敏水凝胶的生物相容性。在体外猪食管中,模拟 ESD 术后创口,通过内镜辅助将水凝胶母液注射在伤口处,并通过内镜观察水凝胶的凝胶状态。**结果:**得到了粘附性显著增强的壳聚糖/ β -甘油磷酸钠/聚多巴胺(CS/ β -GP/PDA)凝胶体系。流变学实验证明聚多巴胺(PDA)的加入可以显著降低水凝胶的凝胶温度,缩短原位成胶时间。CCK-8 实验显示 CS/ β -GP/PDA、CS/ β -GP/PDA/NPs 凝胶体系无潜在的细胞毒性。在体外猪食管模拟实验中,将其凝胶母液注射在伤口处后,可原位形成凝胶,且凝胶贴合伤口,具有较强的粘附性。通过体外释药速率测定,验证了 CS/ β -GP/PDA/NPs 水凝胶中所载两种药物释放速率存在明显差异,可实现药物的分阶段释放。**结论:**设计的 CS/ β -GP/PDA/NPs 凝胶体系适用于 ESD 术后的伤口修复,并能够实现分阶段释药,对于预防 ESD 术后食管狭窄具有潜在的应用价值。

关键词:内镜黏膜下剥离术;食管狭窄;壳聚糖水凝胶;原位注射;温敏凝胶;分段释药

中图分类号:R735.1;R-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)01-01-08

In Situ Forming Injectable Hydrogel for Phased Dosing in Preventing
Post-ESD Esophageal Stricture*LI Ning¹, NING Min², WAN Xin-jian^{2Δ}, LIU Jian-hua^{3Δ}, HE Wei-na^{3Δ}

(1 Basic Medical Experiment Teaching Center, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai, 200025, China;

2 Department of Gastroenterology, Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, 200233, China;

3 Medical Chemistry and Bioinformatics Center, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To construct an insitu injectable Chitosan-based hydrogel for phased dosing, of which the sol solution is injected directly into the wound after ESD (Endoscopic Submucosal Dissection) surgery to form a hydrogel dressing in situ. After introducing drug-loaded nanoparticles into the hydrogel dressing, the dual drug-loaded hydrogel can promote the scar-free healing of wounds through different release kinetics of the drugs contained in the gel and nanoparticles, which will be a good solution for preventing post-ESD esophageal stricture. **Methods:** Polydopamine (PDA) is added to chitosan/sodium glycerophosphate (CS/ β -GP) thermosensitive hydrogel to prepare chitosan/sodium glycerophosphate/polydopamine (CS/ β -GP/PDA) hydrogel. The CS/ β -GP/PDA/NPs dual drug-loaded hydrogel was prepared by adding drug-loaded polyethylene glycol-poly lactic acid-co-glycolic acid (PEG-PLGA) nanoparticles to the drug-loaded hydrogel, and the staged release of the drugs was achieved through the combination of the two drug carrier systems. The phase transition temperature and rheological properties of CS/ β -GP, CS/ β -GP/PDA, CS/ β -GP/PDA/NPs gels were determined by rheo-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(21504104);上海市卫健委"优青计划"(2017YQ080);上海市教委"晨光项目"(16GC14)

作者简介:李宁(1990-),男,硕士研究生,实验员,主要研究方向:设计构建水凝胶载药系统,E-mail: 19921585273@163.com

Δ 通讯作者:宛新建,男,博士生导师,主任医师,E-mail: slwanxj2019@163.com;

刘坚华,男,硕士生导师,副研究员,E-mail: jhliu7912@sjtu.edu.cn;

何伟娜,女,硕士生导师,副研究员,E-mail: hewn0319@sjtu.edu.cn

(收稿日期:2022-05-23 接受日期:2022-06-18)

logical tests. The release kinetics of the two drugs in CS/ β -GP/PDA/NPs hydrogels was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The biocompatibility of CS/ β -GP/PDA, CS/ β -GP/PDA/NPs gels was evaluated by CCK-8 cell proliferation experiments. In the porcine esophagus in vitro, the wound that would generate after ESD was simulated. The sol solution was injected into the wound with the aid of endoscopy, and the state of the hydrogel was observed through an endoscope. **Results:** A chitosan/ β -sodium glycerophosphate/polydopamine (CS/ β -GP/PDA) gel with significantly enhanced adhesion was prepared. Rheological experiments proved that the addition of PDA could significantly reduce the gel temperature of the hydrogel and shorten the in situ gelling time. CCK-8 experiments showed that CS/ β -GP/PDA and CS/ β -GP/PDA/NPs gel systems both exhibit minimal cytotoxicity. In the porcine esophagus simulation experiment in vitro, after the sol was injected into the wound, the gel could be formed in situ, and the gel adhered to the wound strongly. Through measuring the drug release rate, it was verified that the release rate of the two drugs contained in the CS/ β -GP/PDA/NPs hydrogel was significantly different, suggesting that the phased dosing could be achieved. **Conclusion:** The designed CS/ β -GP/PDA/NPs gel system is suitable for post-ESD wound repair, and could achieve phased dosing, revealing its potential for preventing post-ESD esophageal stricture.

Key words: ESD; Esophageal stricture; Chitosan hydrogel; in situ injection; Thermosensitive gel; Phased dosing

Chinese Library Classification(CLC): R735.1; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)01-01-08

前言

食管癌是一类发生在消化道的癌症,具有较高的发病率及死亡率,据世界卫生组织 2020 年的统计数据显示,全球食管癌一年的新发病例为 60.41 万,其中我国就有 32.44 万新发病例,占全球发病总数的 53.7%,而全球 54.4 万例的死亡病例也使得对食管癌的治疗至关重要^[1]。在食管癌早期,癌细胞仅存在于食管黏膜层和黏膜下层,尚未发生淋巴结转移,可直接通过手术进行切除治疗^[2]。内镜黏膜下剥离术(Endoscopic Submucosal Dissection, ESD)是一种内镜切除技术,具有创伤小、并发症少、恢复快等优点,可减少病变组织的残留和癌症复发^[3]。相比于以往的内镜下黏膜切除技术,ESD 可将肿瘤整块切除,提供完整的病理学标本,因此对于早期食管癌治疗,ESD 术已成为国内外广泛认可的首选治疗方案^[4]。

然而 ESD 术后食管狭窄一直是影响预后的主要问题,尤其对于食管环周病变切除者而言,术后狭窄发生率几乎达到 100%^[5]。食管狭窄会导致吞咽困难,同时伴有不同程度的不适,给病人带来了极大的痛苦。临床上常用的预防 ESD 术后食管狭窄的方法有内镜下球囊扩张和放置食管支架两种,前者易产生食管穿孔,并且需要的治疗次数多、频率高;而后者易发生支架脱落,植入时间过长还易引发局部组织过度增生^[6],治疗效果不甚理想。现今,还有研究报道细胞膜片移植^[7],黏膜移植^[8,9]等方法,对预防 ESD 术后食管狭窄具有一定疗效。但此类探索仍处于研究的初步阶段,相关报道较少,仍需要更多的基础和临床研究来验证其可行性和安全性。

ESD 术后伤口的愈合涉及炎症反应、细胞增殖、组织再生等过程,这三个先后依次发生的生理过程在时间上也有着一定的重叠^[10]。伤口愈合过程中纤维细胞的过度增殖会导致瘢痕的产生,这被认为是 ESD 术后食管狭窄的主要成因^[11]。糖皮质激素类药物可抑制胶原的合成,同时促进胶原分解,从而减少瘢痕的形成^[12]。有临床报道指出口服糖皮质激素类药物可明显降低 ESD 术后食管狭窄的发生率^[13-15]。Hashimoto^[16]等报道了局部注射糖皮质激素曲安奈德可有效防止 ESD 术后食管狭窄。虽

然糖皮质激素类药物被证实可以有效预防 ESD 术后食管狭窄的发生,但是大剂量口服糖皮质激素类药物易发生全身不良反应^[17],而局部注射不但需要术后多次注射,又易引发食管穿孔^[18],治疗效果不佳。因此,寻找一种高效的减少瘢痕形成的方法,就可以降低 ESD 术后食道狭窄的发生率,从而大大提高 ESD 的安全性。

为了解决这一临床需求,本文设计了一种可以分阶段释放药物的原位可注射温敏性水凝胶。在术后通过内镜辅助,可将该水凝胶母液注射于 ESD 术伤口处,在体内温度下形成水凝胶敷料,起到保护伤口的作用。同时为了降低炎症的发生,以及实现伤口的无瘢痕愈合,该水凝胶辅料中加载了抗炎药物和糖皮质激素类药物,分别用来应对伤口愈合的炎症反应以及细胞的过度增殖。由于炎症反应期的发生早于细胞增殖期,本文采用了凝胶骨架复合载药微粒的方法来实现两种药物的分阶段释放,即先释放抗炎药物,再释放糖皮质激素。

本文使用壳聚糖/ β -甘油磷酸钠(Chitosan/ β -sodium glycerophosphate, CS/ β -GP)温敏凝胶作为主体骨架,将具有抑菌消炎作用的抗生素类药物利福霉素直接包覆于水凝胶中,将具有抗瘢痕作用的糖皮质激素类药物曲安奈德包封于聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸(PEG-PLGA)胶束颗粒后与水凝胶复合。由于 PEG-PLGA 的包封作用,曲安奈德的释放速率明显慢于利福霉素,可实现分阶段释药的目的。同时,为了增强温敏水凝胶的粘附性,我们在凝胶体系中加入聚多巴胺(PDA),形成壳聚糖/ β -甘油磷酸/聚多巴胺/纳米颗粒(CS/ β -GP/PDA/NPs)复合温敏水凝胶(图 1)。聚多巴胺中的邻苯二酚基团很容易被氧化成邻苯二醌,而醌基的结构很不稳定,具有很强的反应活性,可以参与多种化学反应,例如与氨基反应可以生成亚胺,引发迈克尔加成,或产生自由基后形成联芳结构^[19]。利用了 PDA 这一特性可以为整个水凝胶体系提供较强的生物粘附性,使其能够紧贴组织表面,更好的发挥保护伤口和分阶段给药的作用。

在制备获得所设计的 CS/ β -GP/PDA/NPs 复合温敏水凝胶后,我们对该水凝胶的流变特性、微观形貌、药物释放速率和生物安全性进行了评估。通过流变学实验测得加入 PDA 后的水

凝胶体系凝胶温度降低,凝胶时间减少;同时,随着 PDA 的加入,同一温度下水凝胶的储能模量逐渐增大,这表明 PDA 的加入提高了水凝胶的强度。通过高效液相色谱法(HPLC)测定了该水凝胶体系中不同方式装载药物的释药速率,结果显示水凝

胶中的两种药物释药速率差异明显,能较好地达到分阶段释药的目的。通过内镜直视下的体外食管注射,验证了 ESD 术后原位注射水凝胶的可行性。本文为预防 ESD 术后食管狭窄提供了一种全新的方案和思路。

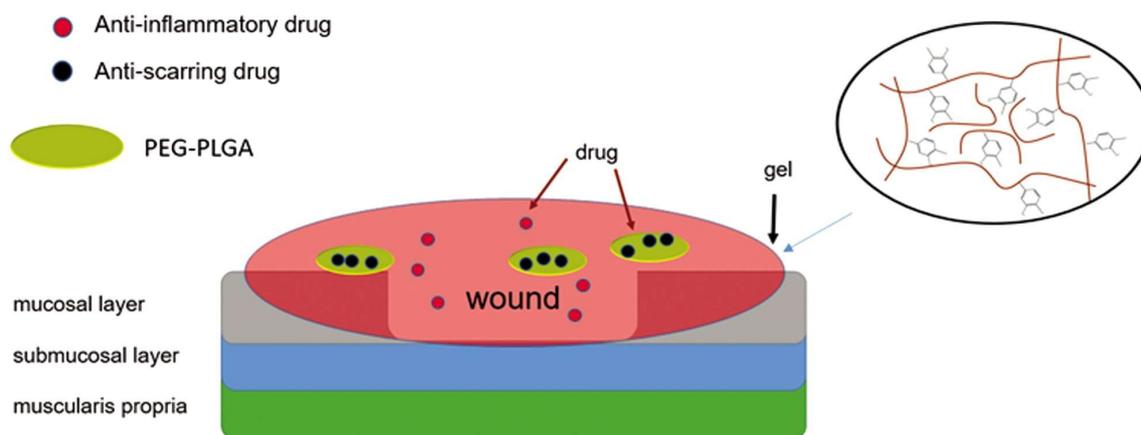


图1 原位可注射双载药 CS/β-GP/PDA/NPs 复合温敏水凝胶的设计示意图

Fig.1 Design of the in situ injectable dual-drug-loaded CS/β-GP/PDA/NPs composite thermosensitive hydrogel

1 材料与方 法

1.1 主要材料和仪器

β-甘油磷酸钠(化学纯)、碳酸氢钠(化学纯)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,壳聚糖(分析纯)购自美国 Sigma 试剂公司,曲安奈德、利福霉素标准品均购自国药集团上海有限公司,聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸(PEG-PLGA)购自广州市碳水科技有限公司,透析袋(截留相对分子质量为 1000 或 3500)购自上海源叶生物科技有限公司,小鼠结缔组织 L929 细胞株、马血清、CCK-8 试剂盒购自苏州天斯睿生物技术有限公司,安捷伦 1260 高效液相色谱仪购自安捷伦科技有限公司, Sirion 200 高分辨场发射扫描电子显微镜购自美国 FEI 公司,多功能酶标仪购自美国 Bio Tek 公司, Gemini 200 HR 旋转流变仪购自美国 TA Instruments 公司, GIH-H260 电子胃镜购自奥林巴斯(北京)销售服务有限公司。

1.2 壳聚糖/β-甘油磷酸钠/聚多巴胺(CS/β-GP/PDA)温敏水凝胶母液的制备

将 1.0 g 壳聚糖(CS)粉末溶于 50 mL 0.1 mol/L 的 HCl 溶液,配制成 2%(m/v)的壳聚糖溶液。将 5.0 g β-甘油磷酸钠(β-GP)溶于 10 mL 0.1 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液,配制成 50%(m/v)的 β-甘油磷酸钠溶液。称取 100 mg 多巴胺(DA),加入 10 mL 的碱性水溶液(pH=10.0)中过夜搅拌后,过滤去除不溶物后得到聚多巴胺(PDA)溶液。将制备获得的上述 CS 溶液与 PDA 溶液分别以体积比为 1.5:0、1.5:0.1、1.5:0.3、1.5:0.4、1.5:0.5、1.5:0.8 和 1.5:1 的比例混合后搅拌过夜。在冰水浴中,使用自动进样装置将 1 mL 上述配制的 β-GP 溶液以 0.05 mL/min 的速度滴加至混合反应液中。每份混合液用 0.1 mol/L 的 NaHCO₃ 溶液定容至 3.5 mL,充分搅拌混匀后,得到一系列不同浓度的 CS/β-GP/PDA 温敏水凝胶母液。将水凝胶母液转移至螺口瓶中,置于 4 °C 冰箱中保存。

1.3 PEG-PLGA 载药微粒的制备

参照 Hirani 等人对 PEG-PLGA 载药微粒的制备方法^[20]。将曲安奈德(TA)与 PEG-PLGA 同时溶于丙酮,充分溶解后,转移至截留分子量为 3500 的透析袋中,将透析袋置于 25 °C 透析液(去离子水)中,每 1 h 更换一次透析液,共更换 12 次,得到载药微粒悬浮液。将载药微粒悬浮液转移至离心管中,在 2500 rpm 的转速下离心 15 min,分离得到载药微粒,同时收集上清液。将载药微粒分散于甲醇中,混匀后在 2500 rpm 的转速下离心 15 min,洗去未被包封的药物,将分离得到的载药颗粒再次悬浮于甲醇后离心纯化,重复上述操作 3 次后,收集纯化后的载药微粒,同时收集上清液。将所有上清液合并,通过高效液相色谱法测定其中的曲安奈德含量,得出未被包封的药物质量,采用如下公式计算包封率:

$$\text{包封率} = \frac{\text{加入的 TA 总质量} - \text{未被包封的 TA 质量}}{\text{加入的 TA 总质量}} \times 100\%$$

曲安奈德色谱检测条件:安捷伦 SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:体积比为 7:3 的甲醇/水混合液;流速:1.0 mL/min;检测波长:240 nm;柱温:25 °C;进样量:30 μL。

1.4 双载药 CS/β-GP/PDA/NPs 水凝胶母液的制备

用实验方法 1.2 记录的方法制备 CS/β-GP/PDA 的体积比为 1.5:1:0.5 的 CS/β-GP/PDA 水凝胶母液,总体积 3.0 mL(未加 NaHCO₃ 溶液定容),将 20 mg 利福霉素与实验方法 1.3 中制备的 PEG-PLGA 载药微粒悬浮液 0.5 mL 依次加入上述 CS/β-GP/PDA 水凝胶母液中,搅拌混匀,得到 CS/β-GP/PDA/NPs 双载药复合水凝胶母液(PDA 含量 14.3%,见 1.8),置于 4 °C 冰箱中保存。

1.5 凝胶时间的测定

分别吸取实验方法 1.2 中配制的各个比例的 CS/β-GP/PDA 温敏水凝胶母液 2.0 mL,转移至螺口瓶中,放入 37 °C 恒温摇床中,每隔 5 s 取出,将螺口瓶倒置观察水凝胶母液能否流动,倒置后不流动即为成胶,记录成胶时间。另取一份按照实验方法 1.4 中制备的未载药空白 CS/β-GP/PDA/NPs 进

行同样操作,进行比较。

1.6 水凝胶流变行为表征

采用流变仪测定水凝胶的流变性能。通过滴管将低温状态下按照实验方法 1.2 中获得的 CS/ β -GP/PDA 温敏水凝胶母液滴在流变仪中,于不同温度(5 °C ~ 37 °C)下,测试频率为 1 HZ,测定待测样品的储能模量(G')、损耗模量(G'')。同时,另取一份按照实验方法 1.4 中制备的未载药空白 CS/ β -GP/PDA/NPs 进行相同操作,进行比较。

1.7 扫描电子显微镜分析

将实验方法 1.2 中获得的 CS/ β -GP/PDA 温敏水凝胶置于液氮中脆断,用导电胶将样品断面朝上贴于样品台上,喷金 60 s 后,于 5 kV 加速电压的扫描电子显微镜下观察样品断面的微观形貌。

1.8 内镜辅助体外猪食管注射模拟

在体外,通过刮蚀猪食管以模拟 ESD 术后创口。将猪食管浸泡在 37 °C 恒温水浴中,在内镜直视下,通过直径为 3 mm 注射管于伤口处注射 CS/ β -GP/PDA 温敏水凝胶母液,观测母液的凝胶化过程。根据临床使用内镜导管的实际长度以及 CS/ β -GP/PDA 温敏水凝胶母液的凝胶时间,设置实验时间,经反复测试后,最终选取 PDA 含量为 14.3%的水凝胶进行后续评估研究。

1.9 双载药水凝胶的制备与体外药物释放速率的测定

通过高效液相色谱法分别绘制利福霉素和曲安奈德的标准曲线。

曲安奈德色谱检测条件同实验操作 1.3。

利福霉素色谱检测条件:安捷伦 SB-C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:体积比为 30:30:36:4 的甲醇/乙腈/磷酸氢钾溶液(0.075 mol/L)/枸橼酸溶液(1.0 mol/L)混合液;流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μ L。

将载药的 CS/ β -GP/PDA/NPs 凝胶置于 10 mL 生理盐水中,间隔一定时间更换生理盐水,用高效液相色谱法测定被更换的生理盐水中的药物含量,绘制 CS/ β -GP/PDA/NPs 载药凝胶的释药曲线。

1.10 细胞实验

使用 L929 细胞测定水凝胶的生物安全性。从 -80 °C 冰箱中取出细胞冻存管,于 37 °C 下加热使其迅速融解,并不断摇晃,以复苏细胞。用无菌枪头吸取细胞悬液,置于含细胞完全培养基的离心管中,上下吹打 5 次,使细胞悬液与完全培养基充分混匀。离心,移去上清液,用移液枪吸取培养液 1 mL,混合,打匀后,转移至培养皿内。往培养皿中加入 10 mL 培养液,盖好盖子,混匀,于显微镜下观察细胞分散情况。将装有分散均匀细胞的培养皿置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,次日更换一次细胞培养液,继续培养。

细胞传代:从培养箱中取出待传代的细胞,于显微镜下观察细胞生长状况,弃去旧培养基。在培养皿中加入 3 mL 胰蛋白酶 EDTA 消化液,静置 3 min,于显微镜下观察细胞消化情况,加入 3 mL 细胞完全培养基终止消化。轻轻吹打后,将所有细胞悬液收集至干净的 15 mL 离心管内。室温下以 1500 rpm 的转速离心 5 min,离心后弃去上清液。将细胞重悬于 2 mL 完全培养基,吹打混匀。取 10 μ L 细胞悬液和 10 μ L 的 0.4%台盼蓝染

料等体积混合,混匀后在室温下孵育 2 min,转移至细胞计数仪下进行活细胞计数。向离心管中加入 2 mL 完全培养基,将细胞悬液稀释一倍后,吹打混匀。取 1 mL 细胞悬液(约含 100 w 细胞)于培养皿中,加入 15 mL 完全培养基,摇匀。将培养皿置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,每 2 天更换一次培养基。

通过 CCK-8 细胞增殖实验测定体外细胞毒性。分别取 PDA 含量 0 mL/3.5 mL、0.2 mL/3.5 mL、0.4 mL/3.5 mL、0.8 mL/3.5 mL 的 CS/ β -GP/PDA 水凝胶母液以及 CS/ β -GP/PDA/NPs 温敏水凝胶母液(PDA 含量 14.3%,未加入药物)置于 6 孔板中,每孔 0.8 mL 母液,在 37 °C 下,静置 5 min,待形成水凝胶后加入培养液 8 mL,浸提 72 h,得到水凝胶提取液。在 96 孔板中每孔种下 5000 个细胞,每孔 100 μ L,以制备 L929 细胞悬液。将培养板置于培养箱中培养 24 h。在实验组中,向培养板各孔中加入上述水凝胶浸提液。而在空白组中,加入新鲜培养基,其他实验条件和操作均相同。将培养板放入培养箱中继续培养。培养不同时间(0、24、48、72 h)后,向每孔中加入无血清培养基稀释的 CCK-8 溶液 100 μ L。轻轻摇匀后,将培养板放入培养箱中孵育 1 h。用酶标仪测定细胞悬液于 450 nm 处的吸光度(OD)。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差表示,统计方法采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 温敏水凝胶的凝胶时间和流变行为表征

CS/ β -GP 温敏凝胶体系中加入聚多巴胺(PDA)后,随着 PDA 的浓度从 0%增加至 28.6%,凝胶时间从 237 s 减少至 67 s(图 2)。未载药的空白 CS/ β -GP/PDA/NPs(PDA 含量 14.3%)凝胶时间为 130 s,PEG-PLGA 的加入并未影响凝胶时间。流变学表征显示,PEG-PLGA 的加入并未影响凝胶温度以及 37 °C 时的储能模量(图 3a,图 3b)。并且随着 PDA 的含量由 0%逐步增加至 28.6%,CS/ β -GP/PDA 凝胶体系的相变温度从 25 °C 逐渐降低至 7.5 °C(图 3c),37 °C 时的储能模量也从 383 Pa 增加至 1.34 kPa(图 3d)。

2.2 扫描电子显微镜分析

通过扫描电子显微镜观察水凝胶的微观形貌。未加入 PDA 的 CS/ β -GP 水凝胶(图 4a)结构中孔空隙较大且不均匀,而加入 PDA 的 CS/ β -GP/PDA 水凝胶(图 4b)由于壳聚糖链之间排布更为紧密,结构中的孔隙也变得更小。

2.3 内镜辅助体外猪食管注射模拟

选取猪食管进行体外水凝胶性能检测。在猪食管中模拟 ESD 术后创口,通过内镜直视,使用导管在伤口处分别注射 CS/ β -GP/PDA 水凝胶母液(图 5a)和 CS/ β -GP 水凝胶母液(作为对照)。通过内镜观察,CS/ β -GP/PDA 水凝胶母液在 30 s 时已于伤口处形成凝胶,150 s 后已经完全与伤口贴合(图 5b)。通过在食管中注水模拟喝水动作,并在外部揉搓食管模拟食管蠕动,均未发现水凝胶脱落。而未加 PDA 的 CS/ β -GP 水凝胶母液虽然可以于 60 s 时成胶并于 300 s 后粘附贴合于伤口处,但是在食管中注水(模拟进食)后随即发生了凝胶的脱落。

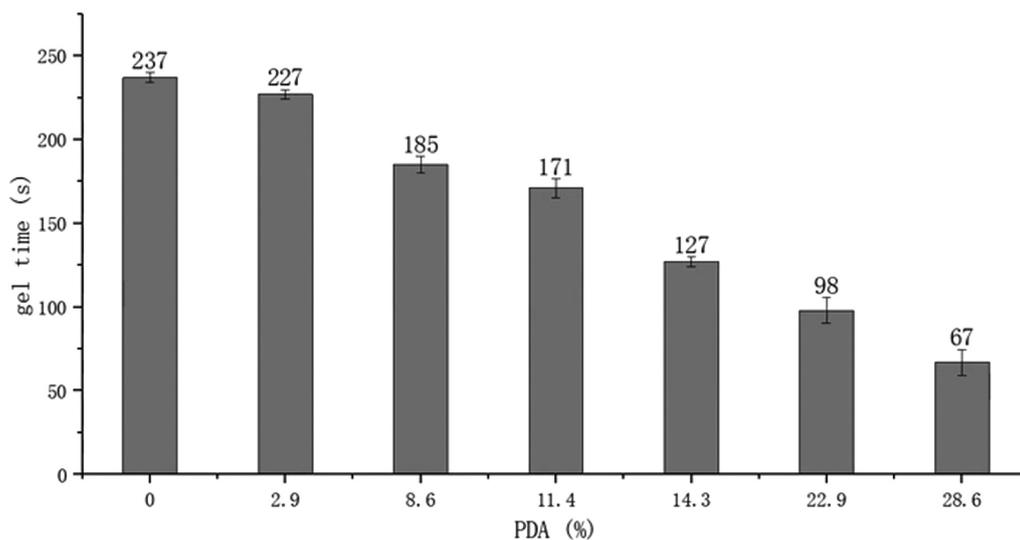


图2 通过倒置法测定不同比例CS/β-GP/PDA水凝胶母液的凝胶时间(各个浓度的凝胶进行相互比较, $P < 0.05$, 具有统计学意义)

Fig. 2 Gel time of CS/β-GP/PDA sol solutions with various component ratios observed by inverting the samples (The gels of each concentrations were compared with each other, $P < 0.05$, which was statistically significant)

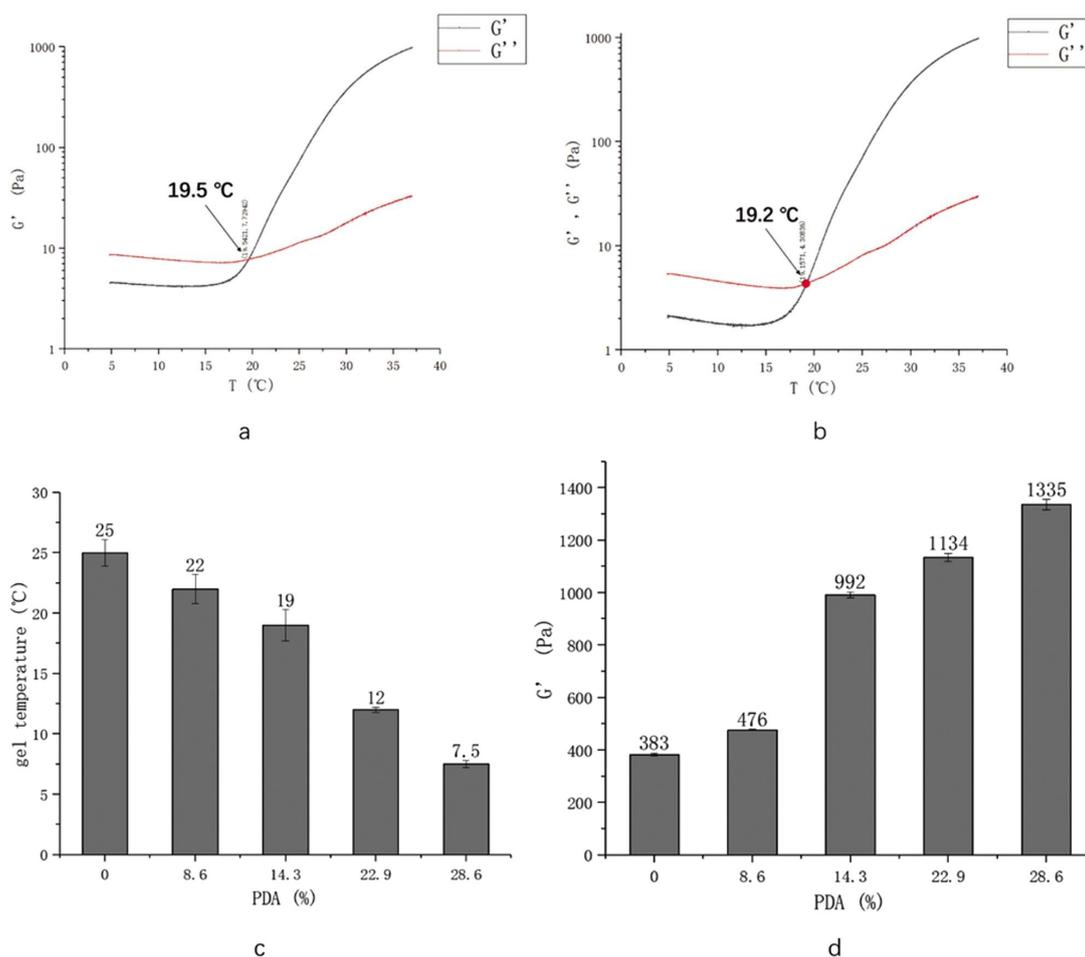


图3 水凝胶的流变学表征(a为PDA含量14.3%未载药的空白CS/β-GP/PDA/NPs凝胶流变学表征;b为PDA含量14.3%的CS/β-GP/PDA水凝胶流变学表征;c为不同PDA含量的CS/β-GP/PDA水凝胶的凝胶温度;d为37℃时不同PDA含量CS/β-GP/PDA的水凝胶储能模量;c和d中各个浓度的凝胶相互比较, $P < 0.01$, 具有统计学意义)

Fig. 3 Rheological characterization of the hydrogel (a is the rheological characterization of CS/β-GP/PDA/NPs with 14.3% of PDA without drug loading, the gel temperature is 25 °C, and the storage modulus G' is 994.97 Pa at 37 °C; b is the rheological characterization of CS/β-GP/PDA hydrogel with 14.3% of PDA, the gel temperature is 19 °C, the storage modulus G' is 992.51 Pa at 37 °C; c is the gel temperature of CS/β-GP/PDA hydrogels with different PDA contents; d is the storage modulus of CS/β-GP/PDA hydrogels with different PDA contents at 37 °C; the gels of each concentration in c and d are compared with each other, $P < 0.01$, which is statistically significant)

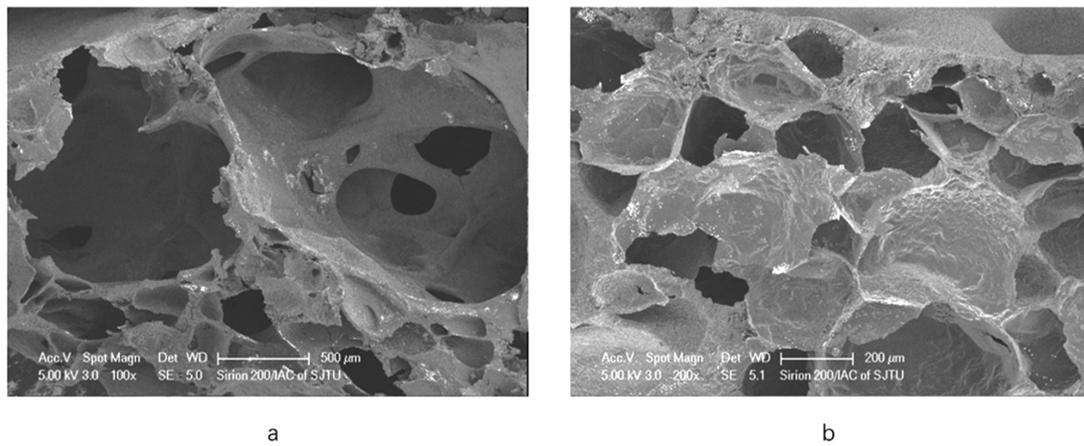


图 4 水凝胶的微观形貌(a 为 PDA 含量 0% 的 CS/β-GP 水凝胶, b 为 PDA 含量 14.3% 的 CS/β-GP/PDA 水凝胶)

Fig. 4 Microstructures of the hydrogel (a is CS/β-GP hydrogel containing 0% PDA, b is CS/β-GP/PDA hydrogel containing 14.3% PDA)

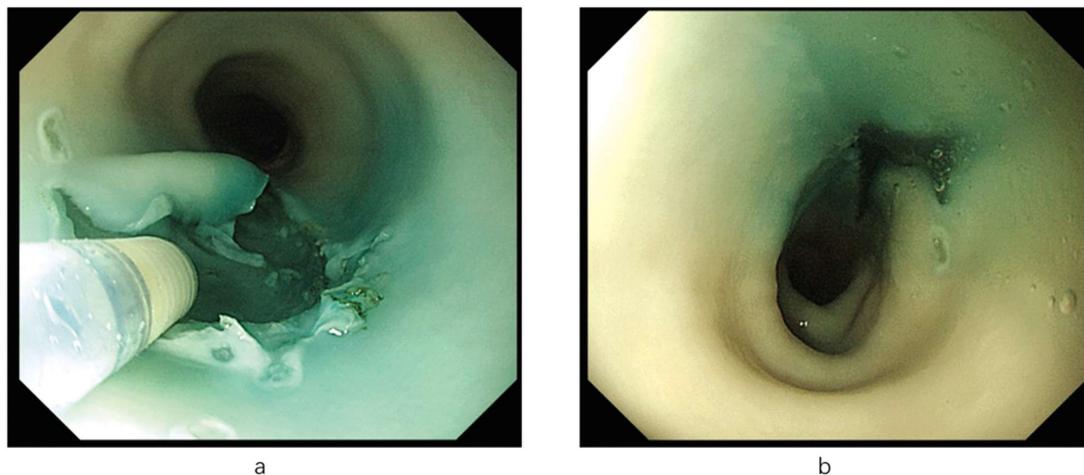


图 5 内镜辅助体外猪食管注射 CS/β-GP/PDA 凝胶母液(a 为导管放在 ESD 术后伤口处准备注射水凝胶, b 为 150 s 后水凝胶在伤口处成胶, 并与伤口贴合)

Fig.5 Endoscopy-assisted in vitro porcine esophagus injection of CS/β-GP/PDA sol solution (a: The catheter is placed on the wound after ESD to inject hydrogel, b: 150 s later, the hydrogel gels and adheres to the wound)

2.4 载药微粒的制备与体外释药速率的测定

实验测得的载药微粒粒径大小及分散系数(PDI)数据如下(表 1)。当载药微粒包封曲安奈德后,其粒径大小略有增大,空白微粒以及载药微粒的分散系数均良好。载药微粒的包封率为 86.7%。使用高效液相色谱法分别测定利福霉素以及曲安奈德(TA)的吸光度标准曲线后,同样使用高效液相色谱法分别绘

制 CS/β-GP/PDA/NPs 双载药复合水凝胶中两种药物的体外释药速率曲线。其中,利福霉素 6 h 释药量超过 50%,24 h 释药量达到 72.16%(图 6a)。曲安奈德 6 h 释药量仅为 2.13%,24 h 释药量为 15.64%,85 h 释放量为 31.14%(图 6b)。上述两种药物在 CS/β-GP/PDA/NPs 双载药复合水凝胶中的释放行为都符合本项目的设计初衷。

表 1 载药微粒粒径大小及分散系数

Table 1 Particle size and dispersion coefficient of drug-loaded particles

	Particle size (nm)	PDI
NPs	234.7± 17.89	0.245± 0.013
NPs/TA	324.8± 23.57	0.454± 0.024

2.5 细胞毒性实验

通过 CCK-8 测试了 CS/β-GP/PDA 以及未载药的 CS/β-GP/PDA/NPs 的细胞毒性(图 7)。随着时间的增加,各时间段组的 OD 值均明显变高,其中 48 h 以及 72 h 组由于时间的增加,细胞活性逐步增加,各浓度的水凝胶 OD 值与空白组有明显差异,但 OD 值均没有明显低于空白组,故随着 PDA 浓

度的增高,以及 PEG-PLGA 的加入,均不会影响细胞增殖。

3 讨论

ESD 手术是目前国内外早期食管癌的首选治疗方案,其术后食管狭窄一直是令人困扰的难题。我国是世界上食管癌患者最多的国家之一^[1],因此对 ESD 术后食管狭窄的预防研究尤为

迫切。本文将 CS/β-GP/PDA 水凝胶作为快释药物载体,在其中引入作为慢释药物载体的纳米载药颗粒,制备得到了 CS/β-GP/PDA/NPs 水凝胶,实现了利福霉素和曲安奈德的分阶

段释放,期望通过两种药物的共同/先后作用促进 ESD 术后伤口的无瘢痕愈合,从而预防食管狭窄的发生。

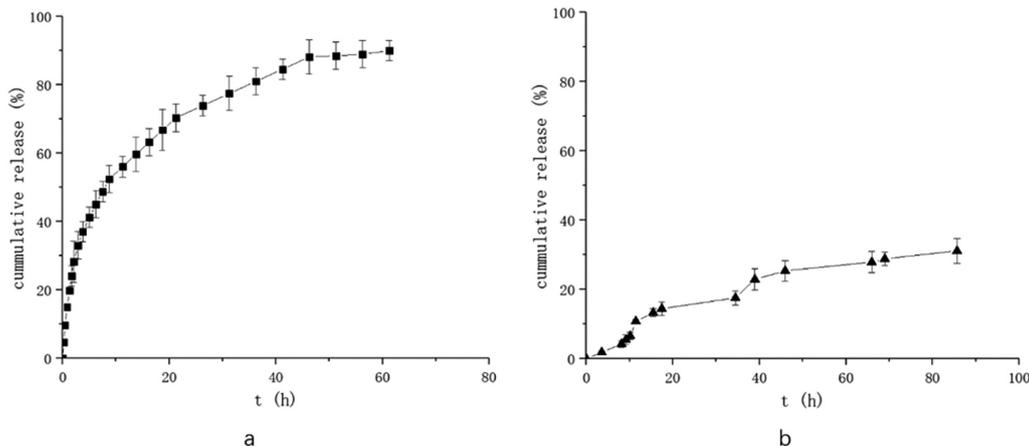


图 6 水凝胶中两种药物的释药速率(a 为利福霉素释药曲线, b 为曲安奈德释药曲线)

Fig. 6 The release rates of two drugs in the hydrogel (a is the release curve of rifamycin, and b is the release curve of triamcinolone acetonide)

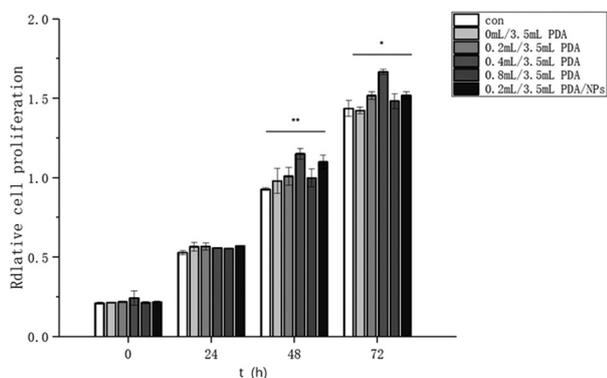


图 7 与不同浓度 PDA 水凝胶共孵育的细胞增殖情况(各浓度与空白组对比,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Fig.7 The proliferation of cells incubated with different concentrations of PDA hydrogel (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, compared with the control group)

ESD 手术后,凝胶母液通过内镜导管注射至创口处,在体内温度下快速形成凝胶,并贴附于伤口处,为伤口提供及时保护,并为伤口的愈合提供湿润的环境。随后该载药凝胶可在创口原位、持续、分阶段地释放药物。由于食管中的湿润环境以及人体吞咽带来的食管形变,凝胶敷料需要具备较高的机械强度和较强的粘附性。为了满足上述要求,本文于 CS/β-GP 水凝胶体系中加入 PDA 对原有体系进行改性,制备得到了 CS/β-GP/PDA 凝胶体系。

改性后的 CS/β-GP/PDA 水凝胶体系各种性能均优于未加 PDA 的 CS/β-GP 水凝胶体系。流变学实验中,储能模量 G' 是材料变形后回弹的指标,反映了待测样品的弹性, G' 越大说明水凝胶的抗形变能力越强;损耗模量 G'' 是材料在发生形变时,由于粘性形变(不可逆)而损耗的能量大小,反映了待测样品的粘性。在低温时,储能模量 G' 小于损耗模量 G'' ,待测样品呈现溶胶状态,更多表现为流动性;当储能模量 G' 大于损耗模量 G'' 时,待测样品呈现凝胶状态,两者的交点即为溶胶-凝胶相转变温度。实验发现,随着 PDA 的含量由 0% 逐步增加至 28.6%,凝胶体系的相变温度从 25 °C 降低为 7.5 °C。较低的溶

胶-凝胶相转变温度可保证该水凝胶母液在伤口处更快的形成凝胶,更有利于临床应用。并且,随着凝胶体系中 PDA 含量的提升,水凝胶的储能模量 G' 的数值逐渐增大,说明 PDA 的加入有助于提升凝胶的机械强度。

将 CS/β-GP 水凝胶于体外猪食管中进行模拟实验,发现未加 PDA 的 CS/β-GP 水凝胶母液虽然可以成胶并粘附于伤口处,但是在食管中注水(模拟进食)后即发生了凝胶的脱落。而加入 PDA 改性后的 CS/β-GP/PDA 水凝胶母液不仅可在伤口处成胶快速,并且在食管中注水以及外部揉搓食管模拟食管蠕动的情况下,该水凝胶均未发生脱落,显示了较好的强度及粘附性。

本研究在水凝胶中加载纳米颗粒实现药物的分阶段释放达到了预期的效果。在药物释放实验中,所装载的利福霉素和曲安奈德两种药物释放速率存在明显差异。该种释药速率差异性可以通过药物与不同装载场所的不同相互作用来进行解释。CS/β-GP 水凝胶本身具有良好的生物相容性^[21]。通过 CCK-8 细胞增殖实验可以看到,随着 PDA 的浓度增高,以及 PEG-PLGA 的加入均未影响细胞增殖,证明 CS/β-GP/PDA 以及 CS/β-GP/PDA/NPs 水凝胶均具有较好的生物安全性。

4 结论

CS/β-GP/PDA 水凝胶相较于 CS/β-GP 水凝胶具备更强的粘附性。通过流变学表征验证,PDA 的加入会引起凝胶强度的提高,及凝胶温度的降低,可得到在体内温度下可快速成胶、具有强黏附性的凝胶敷料。通过 PEG-PLGA 载药微粒的加入实现了两种药物的分段释放,这样的给药方式更贴合伤口的修复过程,可以实现促进 ESD 术后创口无瘢痕愈合的目的。同时,CS/β-GP/PDA 以及 CS/β-GP/PDA/NPs 水凝胶均具有较好的生物安全性。综上所述,本文设计的 CS/β-GP/PDA/NPs 双载药复合水凝胶可以作为体内药物释放的载体,为预防 ESD 术后食管狭窄提供一种新的方案。

参 考 文 献(References)

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 1(3): 209-249
- [2] 史磊, 刘勇, 贺舜, 等. 大范围食管早期癌及癌前病变内镜黏膜下剥离术后发生顽固性狭窄的危险因素分析 [J]. *中华消化内镜杂志*, 2021, 38(4): 288-292
- [3] Lorenzo F, Thierry. Colorectal endoscopic submucosal dissection (ESD)[J]. *Best Pract Res Cl Ga*, 2017, 31(4): 473-480
- [4] Tang J, Kong F, Li J, et al. Independent risk factors for esophageal refractory stricture after extensive endoscopic submucosal dissection[J]. *Surg Endosc*, 2020, 35(7): 3618-3627
- [5] Ishihara R. Prevention of esophageal stricture after endoscopic resection [J]. *Dig Endosc*, 2019, 31(2): 134-145
- [6] Wen J, Lu Z, Yang Y, et al. Preventing stricture formation by covered esophageal stent placement after endoscopic submucosal dissection for early esophageal cancer[J]. *Digest Dis Sci*, 2014, 59(3): 658-663
- [7] Yamaguchi N, Isomoto H, Kobayas S, et al. Oral epithelial cell sheets engraftment for esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection of squamous cell carcinoma and airplane transportation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17460
- [8] Liao Z, Liao G, Yang X, et al. Transplantation of autologous-esophageal mucosa to prevent stricture after circumferential endoscopic submucosal dissection of early esophageal cancer (with video). *Gastroint Endosc*, 2018, 88(3): 543-546
- [9] Guillaume P, Laetitia P, Sophie C, et al. ADSC-sheet Transplantation to Prevent Stricture after Extended Esophageal Endoscopic Submucosal Dissection[J]. *JOVE-J Vis Exp*, 2017, 120: 55018
- [10] Nagami Y, Ominami M, Fujiwara Y. Safe technique of steroid injection utilizing submersion in saline to prevent stricture after esophageal endoscopic submucosal dissection [J]. *Dig Endosc*, 2020, 32(7): 169-170
- [11] Yamaguchi N, Isomoto H, Nakayama T, et al. Usefulness of oral prednisolone in the treatment of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection for superficial esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Gastroint Endosc*, 2011, 73(6): 1115-1121
- [12] Ekstein SF, Wyles SP, Moran SL, et al. Keloids: a review of therapeutic management[J]. *Int J Dermatol*, 2020, 60(6): 661-671
- [13] Isomoto H, Yamaguchi N, Minami H, et al. Management of complications associated with endoscopic submucosal dissection/endoscopic mucosal resection for esophageal cancer [J]. *Digest Endosc*, 2013, 25(S1): 29-38
- [14] Qiu Y, Shi R. Roles of Steroids in Preventing Esophageal Stricture after Endoscopic Resection[J]. *Can J Gastroenterol*, 2019, 5380815
- [15] Seiichiro A, Prasad GI, Ichiro O, et al. Approaches for stricture prevention after esophageal endoscopic resection [J]. *Gastroint Endosc*, 2017, 86(5): 779-791
- [16] Hashimoto S, Kobayashi M, Takeuchi M, et al. The efficacy of endoscopic triamcinolone injection for the prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection [J]. *Gastrointest Endosc*, 2011, 74(6): 1389-1393
- [17] Yasuaki N, Masaki O, Masatsugu S, et al. Prediction of esophageal stricture in patients given locoregional triamcinolone injections immediately after endoscopic submucosal dissection [J]. *Dig Endosc*, 2018, 30(2): 198-205
- [18] Yamashita S, Kato M, Fujimoto A, et al. Inadequate steroid injection after esophageal ESD might cause mural necrosis [J]. *En dosc Int Open*, 2019, 7(2): E115-E121
- [19] Ryu JH, Yuhan Lee, Won Ho Kong, et al. Catechol-Functionalized Chitosan/Pluronic Hydrogels for Tissue Adhesives and Hemostatic Materials [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(7): 2653-2659
- [20] Hirani A, Grover A, Lee Y W, et al. Triamcinolone acetamide nanoparticles incorporated in thermoreversible gels for age-related macular degeneration[J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21(1): 61-67
- [21] 张国光, 邓春梅, 康欣煌, 等. 可注射甘油磷酸钠-壳聚糖/海藻酸钠符合水凝胶的制备及性能研究[J]. *化学与生物工程*, 2019, 36(4): 33-37