

甲基丙烯酰化明胶 / 甲基丙烯酰化壳聚糖水凝胶的制备与性能研究

张雨晗, 吕莹, 姚艺玮, 李颖, 张雪琴*

(北京工商大学, 北京 100048)

摘要 目的: 制备用于组织工程的具有良好力学性能的明胶 / 壳聚糖水凝胶。方法: 通过将甲基丙烯酰化明胶 (GelMA) 和甲基丙烯酰化壳聚糖 (CSMA) 以一定比例共混后进行光聚合, 制备出了机械强度有良好提升的 GelMA/CSMA 水凝胶, 并对所得水凝胶进行了相应的力学性能测试及生物相容性测试。结果: 实验结果表明, CSMA 与 GelMA 的比例对所得水凝胶的力学性能、溶胀性能有较大的影响, 配方中的光引发剂对水凝胶的生物安全性影响不大。具体而言, 随着 CSMA 含量的增加, 水凝胶的压缩强度提升至约 0.87 MPa, 同时抗溶胀性能增强, 溶胀率下降至 350%。细胞培养试验证实了 GelMA/CSMA 水凝胶的良好生物相容性。结论: 利用光聚合法可以成功制备出明胶 / 壳聚糖水凝胶, 通过调节 CSMA 在体系中的含量能够有效提升水凝胶的性能。

关键词 明胶; 壳聚糖; 水凝胶; 机械性能; 溶胀性能

中图分类号: TQ2

文献标志码: A

文章编号: 2097-3365(2024)11-0124-03

1 研究背景

明胶 (Gelatin) 是胶原蛋白的变性产物, 其含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (RGD) 肽序列, 与人体细胞外基质结构相似, 因此具有高生物相容性、低抗原性, 并且能够有效促进细胞贴附增殖, 使细胞附着并沿水凝胶基质扩散, 是一种理想的水凝胶材料^[1-2]。此外, 明胶分子中含有的基质金属蛋白酶 (MMP) 肽使其具有自然降解的能力^[3-4]。这些特点都使得明胶在组织工程和细胞行为研究领域具有广阔的应用前景^[5]。明胶分子表面含有大量的羟基、氨基等可用于改性的位点, 因此能够用于制备多种明胶衍生物, 进一步扩大了明胶的应用范围。其中, 甲基丙烯酰化明胶 (Gelatin methacryloyl, GelMA) 为烯烃双键改性明胶, 与光引发剂混合后, 能够在紫外光或可见光照射下迅速发生光固化反应, 生成具有一定强度和弹性的凝胶体。GelMA 的改性过程并不会改变明胶分子中的氨基酸结构, 因此无论是 GelMA 还是光固化后的凝胶体都保持了其优异的生物相容性和酶降解性, 具有良好的物理可调节性, 已经被广泛应用于组织工程、生物 3D 打印等领域^[6]。然而, 单一组分的 GelMA 水凝胶虽具有良好的生物相容性, 但其力学性能较差^[7]。

壳聚糖是甲壳素的 N-脱乙酰基产物, 与甲壳素和纤维素具有相近的化学结构。壳聚糖在医药领域应用

广泛, 主要得益于其良好的生物相容性、可降解性和生物活性。同时, 壳聚糖还具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种生物活性, 能够用于制备各种功能性医用材料。壳聚糖分子中的氨基基团比甲壳素分子中的乙酰氨基基团反应活性更强, 这使得壳聚糖具有优异的生物学功能和化学修饰潜力^[8]。其中, 甲基丙烯酰化壳聚糖 (CSMA) 作为壳聚糖的一种重要衍生物, 通过在壳聚糖分子链上引入甲基丙烯酸酯基团, 赋予壳聚糖水凝胶光固化能力^[9-10]。然而无论是单一组分的明胶还是单一组分的壳聚糖水凝胶力学性能都相对较差, 单独使用时无法满足需求^[11]。

因此, 本研究将 GelMA 与甲基丙烯酰化的壳聚糖进行混合后, 通过光聚合制备了 GelMA/CSMA 交联水凝胶, 并调节 CSMA 中甲基丙烯酰基团的接枝度及 CSMA 的含量, 从而改善 GelMA/CSMA 水凝胶的性能。

2 材料与方法

2.1 主要原料

甲基丙烯酰化明胶 (1 g, 麦克林); 甲基丙烯酰化壳聚糖 (1 g, 麦克林); 溴化钾 (Potassium bromide), (5 g, 麦克林); 苯基 (2, 4, 6-三甲基苯甲酰基) 磷酸锂 (1 g, 毕得); PBS 缓冲液 (500 mL, 百瑞极)。

2.2 主要设备及仪器

电子天平, FA1004, LICHEN; 上海力辰仪器科技有

*本文通讯作者, E-mail: zhangxueqin@btbu.edu.cn.

限公司光固化箱, AC 180V-250V, 中山紫固照明电器厂; 冷冻干燥机, Alpha 1-2 LD plus, 德国 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen 有限公司; 万能试验机, CMT 5305, Mechanical Testing & Simulation 有限公司; DLP 3D 打印机, Photon Mono 4K, 深圳市纵维立方科技有限公司; 电热鼓风烘箱, DGX-9143BC-1, 上海福玛实验设备有限公司。

2.3 样品制备

按照表 1 中的配比, 将称量好的 CSMA 放入装有去离子水的 50 mL 烧杯中, 在 50 °C 的条件下磁力搅拌混合。待 CSMA 完全溶解后, 加入 GelMA, 继续搅拌约 2 h 使 GelMA 完全溶解。完全溶解后, 加入光引发剂苯基(2, 4, 6-三甲基苯甲酰基)磷酸锂(LAP), 在避光环境下搅拌 10 min 使溶液混合均匀。再将混合溶液放到超声仪中超声 10 min, 获得不同配比的光固化前驱体。将制备的不同配方的光固化前驱体固化为直径和高度均为 1 cm 的圆柱体样品。

表 1 GelMA/CSMA 水凝胶原料配比表

样品名	CSMA/wt%	GelMA/wt%	LAP/wt%
GelMA	0		
GelMA/CSMA-0.25	0.25		
GelMA/CSMA-0.5	0.5	20	0.5
GelMA/CSMA-0.75	0.75		
GelMA/CSMA-1	1		

2.4 性能测试

1. 压缩性能测试: 利用万能材料试验机测试不同配比 GelMA/CSMA 水凝胶的压缩强度。样品直径 10 mm, 高度 10 mm。压缩速度为 10 mm/min。每种配比重复 5 次实验。

2. 溶胀性能测试: 冷冻干燥后得到水凝胶干重记作 W_0 , 将样品在去离子水中浸泡 12 h 后, 轻轻取出水凝胶并称量, 得到 t 时刻样品重量记作 W_t 。通过公式(1)计算水凝胶的溶胀率 SR。

$$SR = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100\%$$

3. 细胞毒性测试: 采用激光扫描共聚焦显微镜, 表征 GelMA/CSMA 水凝胶的细胞毒性。将不同样品在室温下浸入 50 mL 乙醇中 7 天, 然后进行高压蒸汽灭菌。将小鼠成纤维细胞(L929)以每孔 1.0×10^5 个细胞的密度接种到聚合物片上, 在温度为 37 °C、二氧化碳含量为 5% 的培养箱内孵育 2 天后进行活/死染色。用在 PBS 中培养的细胞作对照组, 将聚合物片上补加 4.0 μ l 钙黄绿素 AM (1.0 mg mL⁻¹) 和 6.0 μ l 碘化丙啶 (1.0 mg/mL)

的 2.0 mL PBS 溶液中清洗。再孵育 15 min 洗涤后并通过 CLSM (Nikon A1R-si) 观察 L929 细胞生长情况。

3 结果与分析

3.1 GelMA/CSMA 水凝胶的压缩性能分析

水凝胶的压缩性能是评估其力学性能的重要指标, 我们探究了 GelMA/CSMA 水凝胶的压缩性能, 其结果如图 1 所示。由图 1 可知, 加入 CSMA 后, 水凝胶的压缩强度较纯 GelMA 有了大幅提升, 且随着 CSMA 浓度的增加, GelMA/CSMA 的压缩强度有显著提高。当 CSMA 的浓度由 0.25% 增加到 1% 时, 压缩强度从 0.37 MPa 增大到 0.87 MPa。随着 CSMA 浓度的增加, GelMA/CSMA 水凝胶的压缩性能增大。这可能是由于在 GelMA/CSMA 中, 经紫外光照射和引发剂的作用, CSMA 分子中的甲基丙烯酸酯基团与 GelMA 中的相应基团发生共聚反应, 形成了更为紧密的网络结构, 从而提高了水凝胶的机械强度。其次, CSMA 分子本身具有较高的刚性和强度, 其在水凝胶网络中的均匀分布有效耗散了外部应力, 使得整体压缩性能得到提升。最后, 随着 CSMA 浓度的提升, 体系的固含量有所提升, 液相含量减少, 也会提高水凝胶的压缩强度。压缩性能测试结果表明, 改变 GelMA 与 CSMA 的配比可调控 GelMA/CSMA 力学性能, 这也表明该 GelMA/CSMA 水凝胶具有良好的物理可调节性, 这一特性有助于推广 GelMA/CSMA 水凝胶在组织工程、生物 3D 打印等领域的应用。

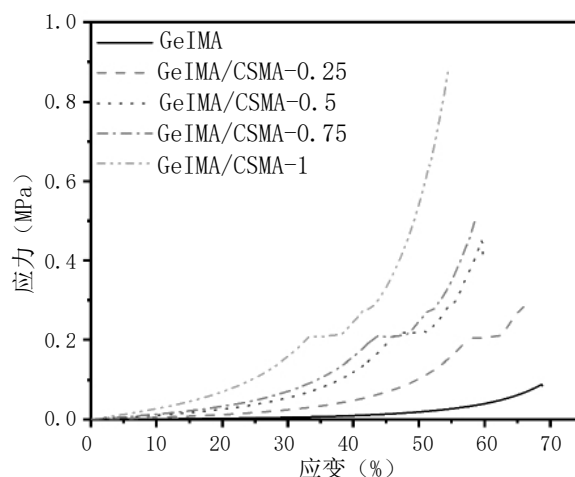


图 1 (a) GelMA/CSMA4; (b) GelMA/CSMA6; (c) GelMA/CSMA8 的压缩应力—应变曲线

3.2 GelMA/CSMA 水凝胶的溶胀性能分析

水凝胶的抗溶胀性是其作为生物医用材料、组织工程及其他领域应用中的一项重要性能指标, 若在水中或生理环境中水凝胶溶胀程度过高, 则会导致其力

学性能大幅下降,限制其在组织工程领域的应用。为此,我们探究了CSMA/Ge1MA水凝胶的抗溶胀性能,结果如图2所示。由图2可知,纯Ge1MA的溶胀率达到了1200%,而随着CSMA含量的提升,Ge1MA/CSMA水凝胶的溶胀率显著下降。当CSMA的浓度为0.25%时,Ge1MA/CSMA-1的溶胀率下降至了596%,随着CSMA浓度由0.25% w/v提升至1% w/v,Ge1MA/CSMA水凝胶的溶胀率由596%下降到了350%,抗溶胀性能实现了显著提升。一方面是由于随着CSMA含量的提升,水凝胶网络中的交联点数量显著提升,形成了更加致密的网络结构,从而限制了水分子的渗透,降低了溶胀率。另一方面是CSMA分子中的亲水基团与Ge1MA中的亲水部分相互作用,形成了更为稳定的交联网络,减少了水分子的渗透和扩散,进一步降低了水凝胶的溶胀率。此外,CSMA的刚性结构也可能在一定程度上限制了水凝胶网络的膨胀,更进一步地增强了其抗溶胀能力。

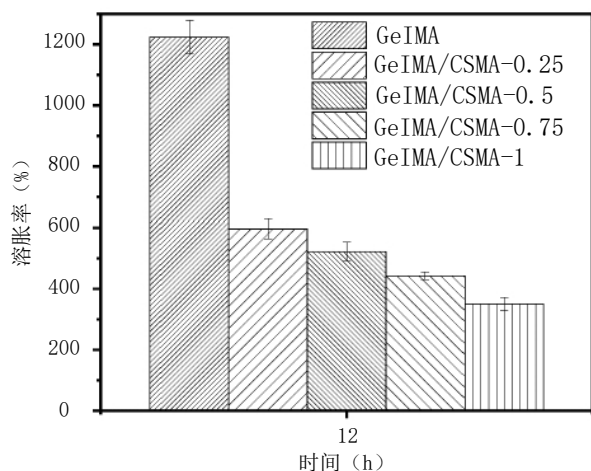


图2 (a) Ge1MA/CSMA4; (b) Ge1MA/CSMA6; (c) Ge1MA/CSMA8的溶胀率变化图

3.3 Ge1MA/CSMA水凝胶的细胞毒性分析

将L929小鼠成纤维细胞在水凝胶表面孵育2天后,根据小鼠成纤维细胞活/死染色情况来探究Ge1MA/CSMA水凝胶的生物相容性。经2天孵育后,小鼠成纤维细胞在水凝胶表面保持了良好的生长情况,表明Ge1MA/CSMA水凝胶具有良好的生物相容性。尽管CSMA的引入显著改变了Ge1MA基水凝胶的物理化学性质,但其生物相容性并未受到明显影响。Ge1MA的改性过程并不会改变明胶分子中的氨基酸结构,CSMA的改性过程也不会改变壳聚糖分子的多糖分子链结构,因此无论是Ge1MA、CSMA还是光固化后的凝胶体都具有良好的生物相容性。同时,在制备过程中,我们严格控制了反应条件和纯化步骤,确保了最终产物的纯度和安全性。

此外,CSMA的加入可能还促进了水凝胶表面细胞黏附相关分子的表达,从而进一步提升了其生物相容性。这一发现为Ge1MA/CSMA水凝胶在生物医用领域的广泛应用提供了有力支持。

4 结束语

本研究成功将CSMA引入Ge1MA基水凝胶中,制备了新型复合水凝胶材料Ge1MA/CSMA水凝胶,拓展了水凝胶材料的改性的策略,为开发高性能生物医用材料提供了新的思路。通过调控CSMA的用量,实现了对Ge1MA基水凝胶力学性能、溶胀性能及生物相容性的优化。CSMA的引入显著提升了Ge1MA基水凝胶的压缩性能和溶胀性能,且其生物相容性几乎没有变化。这对于提高水凝胶在承重组织修复、药物控释等领域的应用潜力具有重要意义。未来工作可以进一步探索CSMA接枝率和用量对Ge1MA/CSMA水凝胶其他性能(如降解性、药物释放性能等)的影响,以及该水凝胶在特定生物医用领域(如组织工程、药物控释等)的潜在应用。此外,还可以尝试将其他功能性分子或纳米材料引入Ge1MA/CSMA水凝胶中,以进一步拓展其性能和应用范围。这些研究将有助于推动高性能生物医用材料的发展,为人类健康事业做出更大贡献。

参考文献:

- [1] 刘润朋.高抗冻明胶水凝胶的制备及性能研究[D].济南:齐鲁工业大学,2024.
- [2] 石秀梅,董默,高原,等.明胶改性水凝胶在骨再生与修复中的应用[J].中国医药科学,2022,12(18):48-51.
- [3] 王珊珊,刘楠,孙永,等.水产蛋白源明胶的研究进展[J].食品研究与开发,2020,41(10):207-213.
- [4] 严梦玲.光交联水凝胶可打印性与生物活性研究[D].杭州:浙江大学,2019.
- [5] 陈渭,孙哲.明胶基水凝胶生物材料的研究进展[J].青海师范大学学报,2022,38(01):24-34.
- [6] 张孝利,余优成,吴兴文,等.GelMA水凝胶在骨组织工程中的研究进展[J].复旦学报,2021,48(06):847-851.
- [7] 康董青,王子凡,李智颖.壳聚糖抗菌复合骨修复材料的研究进展[J].生物化工,2024,10(03):229-235.
- [8] 同[7].
- [9] 施昌劲,姚宇,吴刚,等.光聚合水凝胶在软骨组织工程中的应用进展[J].浙江医学,2021,43(04):443-446.
- [10] 郑德铭,姜芮,胡嘉伟,等.丙烯酰化壳聚糖的制备[J].当代化工,2019,48(09):1983-1985,1989.
- [11] 王赛楠,王晓菲,张莉.甲基丙烯酰明胶水凝胶作为细胞三维培养支架在骨组织工程中的应用[J].中国组织工程研究,2024,28(22):3576-3582.