

ε-聚赖氨酸增强的可注射白蛋白水凝胶

詹月影,赵 瑾*

(天津大学材料科学与工程学院,天津 300350)

摘要:牛血清白蛋白水凝胶拥有优异的生物相容性及生物降解性,被广泛应用于组织工程领域中。目前已经成功制备了可注射牛血清白蛋白水凝胶,但其力学性能仍有待提高。本文利用一种简单的方法提高了该可注射白蛋白水凝胶的力学性能。以尿素为变性剂,谷胱甘肽为还原剂制备由氢键及二硫键协同作用的白蛋白凝胶网络,并在牛血清白蛋白完全解旋后在体系中物理混合阳离子多肽 ε-聚赖氨酸溶液。ε-聚赖氨酸通过静电吸附到牛血清白蛋白分子链中并逐渐与蛋白和尿素形成氢键,对上述网络进行增强。在增强力学性能的同时保留了水凝胶的可注射性。结果显示,添加 ε-聚赖氨酸的水凝胶可将最大压缩应力由 105kPa 提高到 315kPa,储能模量由约 8kPa 提高到 17kPa。力学性能的改善扩展了白蛋白水凝胶在组织工程领域的应用。

关键词:牛血清白蛋白;聚赖氨酸;可注射水凝胶;离子键;氢键

水凝胶是由天然或合成材料制成的由于含有大量水而具有高度柔韧性的三维网络聚合物^[1]。水凝胶的结构与天然的细胞外基质(ECM)相似,因而被广泛应用于组织工程领域^[2,3]。与合成高分子相比,由天然高分子制备的水凝胶往往拥有优异的生物相容性,如基于角蛋白的水凝胶有良好的生物相容性,能够高度模仿 ECM 的关键特征^[4]。蛋白质是自然界中最常见的物质之一,是所有组织的关键组成成分,由于其优异的生物相容性及生物可降解性成为水凝胶设计中的重要组成部分^[5~8]。

牛血清白蛋白(BSA)是源于牛血清的一种球蛋白,具有良好的生物相容性、高稳定性、高纯度及廉价易得等优势,因而被广泛应用于生物医学领域^[9~11]。目前已有研究者合成了 BSA 水凝胶。Raja 等通过氧化还原机制制备了牛血清白蛋白水凝胶,即在还原剂谷胱甘肽存在时,BSA 中的二硫键被还原为巯基,当透析除去还原剂时,BSA 被还原的巯基会被氧化,重新生成二硫键,将 BSA 的各个分子链连接起来,从而形成白蛋白水凝胶^[12]。Sun 等用尿素和盐酸胍为变性剂,二硫苏糖醇(DTT)为还原剂还原分子内二硫键,并将还原的 BSA(re-BSA)作为初始聚合物,最后在 pH 2.2 的条件下利用过氧化氢氧化 re-BSA 的游离巯基,形成分子间二硫键从而得到白蛋白水凝胶^[13]。但上述水凝胶受成胶条件(如需要透析、体系 pH 值及体系中的有毒物质等)的限制无法作为可注射材料。为了拓展白蛋白水凝胶在组织工程领域的应用,我们课题组以尿素为变性剂,谷胱甘肽为还原剂制备了解旋白蛋白水凝胶,不同于前述的水凝胶,该水凝胶由两种平衡反应(尿素-蛋白质和蛋白质与蛋白质之间的氢键平衡和巯基与二硫键之间的交换平衡)共同调节,通过控制体系的氢键和分子间二硫键的形成,在 pH 8.0 的条件下该体系溶液可于 3min~10min 内形成水凝胶,具有良好的生物相容性及生理条件下的可注射性^[14],然而该水凝胶力学性能仍有待提高。

为了提高蛋白基水凝胶的力学强度,一些非共价键,如氢键、离子键被引入到水凝胶体系中^[15~17]。例如,Fan 等将分别将物理交联的聚乙烯醇(PVA)水凝胶与化学交联的聚丙烯酰胺(PAAm)水凝胶冻干之后浸泡在天然多酚化合物单宁酸(TA)溶液中,利用 TA 与聚合物之间的多重氢键作用构建了双重交联的高强度耐溶胀水凝胶^[18]。此外,Khoury 等利用光化学活化反应制备了共价键交联的 BSA 水凝胶,进一步将其浸泡于支化聚乙烯亚胺(PEI)或聚-L-赖氨酸(PLL)溶液中,利用物理吸附的聚电解质 PEI 和 PLL 与 BSA 之间的静电作用增强了该共价交联的蛋白质主网络^[19]。但是 PEI 和 PLL 分子量大,电荷密度高,容易引起细胞毒性。受此启发,我们拟在本组之前工作的基础上^[14]在体系中引入 ε-聚赖氨酸

10.14028/j.cnki.1003-3726.2021.12.006

收稿:2020-10-11;修回:2021-05-08;

作者简介:詹月影(1994-),女,硕士研究生,目前研究领域为生物高分子材料;

* 通讯联系人:赵瑾,副教授,主要从事生物医用材料研究。E-mail:zhaojin@tju.edu.cn.

(EPL)进一步提高可注射 BSA 凝胶的强度。EPL 是微生物发酵产生的一种天然氨基酸聚合物,它由 25 到 30 个赖氨酸残基通过 α 羟基和 ϵ 氨基间形成的酰胺键连接而成^[20]。作为天然阳离子多肽,EPL 易于与带负电的物质产生较强的静电吸附作用^[24]。更重要的是,相比于合成高分子 PLL,EPL 无生物毒性,生物相容性好,水溶液粘度低,有利于进入凝胶主网络从而充分与凝胶组分分子及基团发生相互作用,增强 BSA 水凝胶的力学性能。此外,EPL 的良好抑菌能力、高安全性和稳定性好以及廉价易得等优点有助于进一步拓展可注射体系的应用范围^[21~23]。

基于上述设想,利用尿素将 BSA 解旋,待 BSA 完全解旋后,加入谷胱甘肽粉末和不同浓度的 ϵ -聚赖氨酸溶液。在此过程中,BSA 分子链与尿素优先形成氢键,BSA 中的二硫键被谷胱甘肽还原为巯基, ϵ -聚赖氨酸通过静电吸附到 BSA 分子链中并与尿素和蛋白间形成氢键,巯基被氧化形成链间二硫键,从而制备了 EPL 增强的可注射白蛋白水凝胶,通过调节体系中 EPL 的浓度来调节水凝胶的凝胶时间和力学性能。通过 Zeta 电位测试和傅里叶变换红外光谱对水凝胶增强机理进行验证;小瓶倒置法测定凝胶时间,对可注射性进行表征;压缩测试、流变测试表征水凝胶机械性能;CCK-8 比色法和活死细胞染色来对水凝胶的细胞毒性进行测试。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, $\geq 98\%$)购于美国 sigma 公司;尿素(Urea, $\geq 99\%$)、还原型谷胱甘肽(Reduced glutathione,99%)购于上海源叶生物科技有限公司;磷酸氢二钠(Sodium hydrogen phosphate),磷酸二氢钠(Sodium dihydrogen phosphate),氯化钠(sodium chloride)购于天津市科密欧化学试剂有限公司;聚赖氨酸(ϵ -polylysine,98%)购于天津市希恩思生化科技有限公司;胎牛血清(Fetal Bovine Serum, $> 98\%$)、1640 培养基(Roswell Park Memorial Institute 1640)、CCK-8 试剂盒(Cell counting kit-8)、活死细胞染色检测试剂盒(Calcein-AM/PI Double Staining Kit)均购于大连美仑生物科技有限公司。未特别说明的试剂纯度均为分析纯。

电热恒温鼓风干燥箱(PHG-9076A,上海精宏仪器设备有限公司),冷冻干燥机(SCIENTZ-10N,宁波新芝生物科技股份有限公司),DHR 流变仪(HR-2,沃特斯中国有限公司),钨灯丝扫描电镜(su1510,日本日立),激光扫描共聚焦显微镜(A1R+,日本尼康仪器有限公司),傅里叶变换红外光谱仪(Thermo Scientific Nicolet iS10,赛默飞世尔科技中国有限公司),电子万能实验机(UTM2102,深圳三思纵横科技股份有限公司),多功能微孔板检测仪(Synergy H1,美国博腾仪器有限公司),电热恒温水浴箱(HH-ZK600,巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 水凝胶制备及凝胶时间

用 pH=8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)制备浓度为 9mol/L 的尿素溶液,用上述尿素溶液分别制备浓度为 25mg/mL、50mg/mL、75mg/mL、100mg/mL 的聚赖氨酸溶液。取 0.2g BSA 溶于 800 μ L 尿素溶液中,涡旋使 BSA 充分溶解并解旋,静置 5min。称取 3mg 谷胱甘肽加入上述 BSA 溶液中,混合均匀,分别在上述溶液中加入 200 μ L 尿素溶液(对照组)和 25mg/mL、50mg/mL、75mg/mL、100mg/mL 的聚赖氨酸溶液(实验组),制备了聚赖氨酸含量不同的凝胶溶液。将凝胶溶液放置在 37 $^{\circ}$ C 条件下反应 3min~10min 即可制得凝胶。用小瓶倒置法测定凝胶时间^[25],每个试样重复测试三次。水凝胶的样品简称及原料比例如表 1 所示。

1.3 扫描电镜

用扫描电镜来观察水凝胶的内部结构。按照 1.2 中的方法制备 BSA-EPL0、BSA-EPL25、BSA-EPL50、BSA-EPL75、BSA-EPL100 水凝胶样品,之后将水凝胶冷冻干燥,在液氮中骤冷后脆断,喷金 50s。在 10kV 下放大 1000 倍观察。

表 1 水凝胶样品简称及原料比例

Table 1 Abbreviations of hydrogels and their contents

样品编号	样品简称	BSA 浓度 (mg/mL)	EPL 浓度 (mg/mL)
1	BSA-EPL0	200	0
2	BSA-EPL25	200	5
3	BSA-EPL50	200	10
4	BSA-EPL75	200	15
5	BSA-EPL100	200	20

1.4 水凝胶压缩测试

使用 1.2 的方法制备实验组 and 对照组共五个凝胶溶液。将六种凝胶溶液分别放在 2mL 注射器中, 37℃下反应形成凝胶。室温下, 在万能电子试验机上对水凝胶进行压缩测试, 设置速度为 5mm/min, 测定样品所受压力随位移的变化, 并绘制应力-应变曲线。

1.5 水凝胶流变测试

按 1.2 中所述方法制备五种凝胶溶液各 1mL。将凝胶溶液分别放入直径为 25mm 的圆形反应皿中, 37℃下形成凝胶。使用 25mm 平行板, 固定形变 0.2%, 测试 0.1rad/s~100rad/s 范围内的储能模量 (G') 随频率 (ω) 的变化, 并绘制储能模量-频率曲线。

1.6 Zeta 电位表征

用分析天平称取 BSA 及 EPL 各 10mg 分别溶解于 1mL pH 8.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS, 10mmol/L), 随后用注射器将 BSA 溶液, EPL 溶液及二者混合溶液转移至 Zeta 电位样品池中, 通过 Zeta 电位仪测定样品的 Zeta 电位。

1.7 红外光谱测试

按 1.2 中方法制备 BSA-EPL0 和 BSA-EPL100 水凝胶试样, 待凝胶稳定后将凝胶试样冷冻干燥, 研成粉末。另取 0.2g BSA 溶解于 PBS 磷酸盐缓冲液中, 冻干成粉末, 作为对照。采用 KBr 压片法将待测样品粉末与干燥的 KBr 混合后, 在玛瑙研钵中将混合粉末研磨均匀, 之后装入压片机进行压片。采集 $400\text{cm}^{-1}\sim 4000\text{cm}^{-1}$ 范围内的红外光谱。

1.8 细胞毒性测试

细胞增殖及毒性检测试剂盒 (CCK-8) 是一种广泛应用于细胞毒性的快速高灵敏度检测的试剂盒, CCK-8 操作简便快速, 对实验者和环境危害更低^[26]。使用水凝胶的浸提液培养细胞, 测试细胞存活量与对照组进行对比, 计算细胞存活率。制备对照组 BSA-EPL0 和实验组 BSA-EPL25、BSA-EPL50、BSA-EPL75、BSA-EPL100 水凝胶样品, 分别将水凝胶以 10mg/mL 的浸提率分别浸泡在含有 10% FBS 和 1% 双抗的 1640 培养基中 24h。将各组浸提液以 10000 转速离心 15min 后取上清液, 用 $0.22\mu\text{m}$ 的微孔滤膜除菌以获得浸提液。将 L929 小鼠成纤维细胞以 5×10^3 /孔的数量铺入 96 孔板, 对照组和实验组均加入 $200\mu\text{L}$ 水凝胶浸提液, 空白组加入 $200\mu\text{L}$ 1640 完全培养基 (含有 10% FBS 和 1% 双抗)。将 96 孔板放入 CO_2 培养箱中分别培养 1 天和 3 天, 之后每孔中加入 $100\mu\text{L}$ 浓度为 10% 的 CCK-8 增强型溶液, 放入 CO_2 培养箱中孵育 1h, 用多功能酶标仪检测每孔溶液在 450nm 处的吸光度, 计算各组细胞的存活率。

1.9 活死细胞染色

按 2.2 中方法制备 BSA-EPL100 水凝胶样品, 用 75% 的酒精对其进行灭菌, 将灭菌后的水凝胶置于 pH 为 7.4 的无菌 PBS 中除去酒精。使用将 L929 细胞以 5×10^4 /孔的数量接种到 6 孔板中, 将细胞与水凝胶共培养 72h 后取出水凝胶, 空白组为不加水凝胶的培养基与细胞共培养。利用活死细胞染色试剂盒对细胞进行染色, 在共聚焦显微镜下以 490nm 激发波长观察活细胞 (黄绿色荧光) 和死细胞 (红色荧光), 另外使用 545nm 激发波长单独观察死细胞。

1.10 统计学分析

利用统计学方法对样品进行显著性检验。每个样品至少制备 3 个,进行三组平行实验。采用 Origin、GraphPad 以及 Excel 进行数据及图表处理,使用 t 检验判断差异显著性,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$ 代表有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 水凝胶形成及增强机制

本文凝胶的形成及增强机理如图 1 所示。首先利用尿素将 BSA 解旋,此时 BSA 的二级结构变为无规卷曲,蛋白中的二硫键暴露出来,能被随后加入的还原剂 GSH 还原为巯基,最后加入 EPL。在这个过程中,BSA 分子链与尿素形成氢键($\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$),随后巯基逐渐被氧化形成链间二硫键,这两种作用力可以把 BSA 分子链连接起来^[14]。BSA 被完全解旋后体系中的 EPL 由于与 BSA 带有相反电荷,可以通过静电吸附到 BSA 分子链中^[19],EPL 中含有羰基和氨基,可与尿素和 BSA 间形成分子间氢键($\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$),提高了白蛋白水凝胶的交联密度,从而形成了 ϵ -聚赖氨酸增强的可注射白蛋白水凝胶。

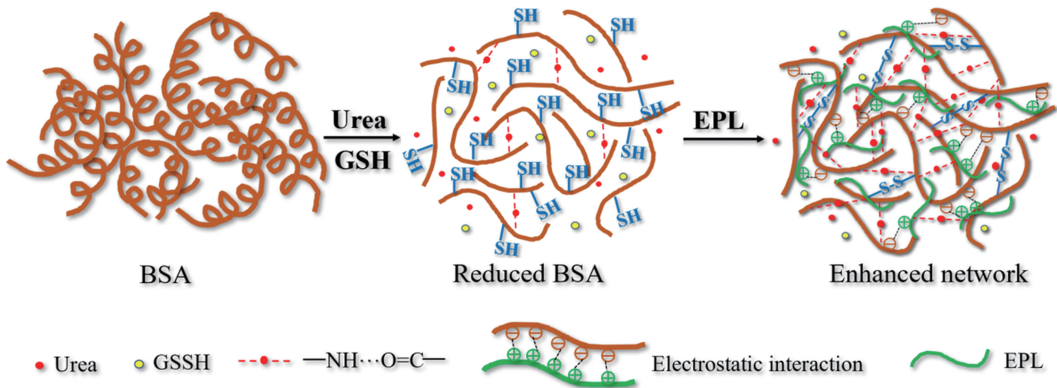


图 1 EPL 增强水凝胶形成示意图
Figure 1 Schematic diagram of EPL enhanced hydrogel formation

选择 EPL 加入量为 20mg/mL 的 BSA-EPL100 对水凝胶增强机制进行验证。通过 Zeta 电位和红外光谱对水凝胶中的相互作用进行表征。由表 2 可以看出在实验条件下,BSA 的 Zeta 电位约为 -12.90mV ,EPL 的电位约为 9.69mV ,二者混合后的电位约为 -3.74mV ,说明在实验条件下带负电的 BSA 与带正电的 EPL 之间存在静电引力,即存在离子键。在红外光谱中氢键的形成会使对应官能团的吸收谱带向波数减小的方向移动,即蓝移^[28]。由图 2 可以看出,BSA 的酰胺 I 带位于 1654cm^{-1} ,对照组 BSA-EPL0 的酰胺 I 带位于 1590cm^{-1} ,实验组 BSA-EPL100 的酰胺 I 带位于 1586cm^{-1} ,即实验组的酰胺 I 带向波数小的方向移动,说明体系中的氢键数量增加^[29]。综上所述,水凝胶的增强是依靠聚赖氨酸与 BSA 间的离子键及 EPL 与 BSA 和尿素之间的氢键。

表 2 BSA 和 EPL 及二者混合后在 pH 8.0 时的 Zeta 电位	
Table 2 Zeta potentials of BSA, EPL and the mixture of the two under pH 8.0	
原料名称	Zeta 电位(mV)
BSA	-12.90 ± 1.00
EPL	9.69 ± 0.50
Mixture	-3.74 ± 0.50

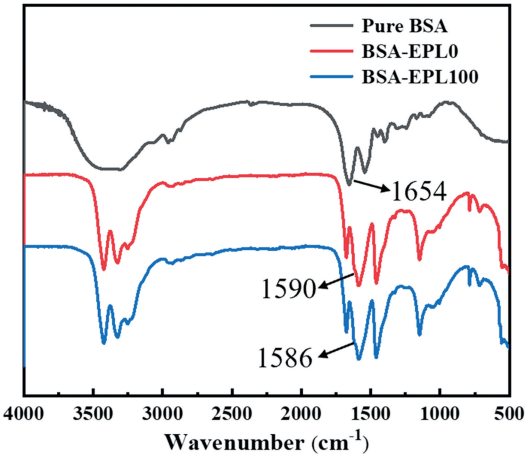


图 2 纯 BSA、BSA-EPL0 和实验组 BSA-EPL100 水凝胶的红外光谱图
Figure 2 Infrared spectra of pure BSA and hydrogels of BSA-EPL0 and BSA-EPL100

2.2 凝胶时间测定

凝胶时间是可注射水凝胶的一个重要参数。按 1.2 中方法制备了 BSA-EPL0、BSA-EPL25、BSA-EPL50、BSA-EPL75、BSA-EPL100 凝胶溶液,用小瓶倒置法测得了各个凝胶试样的凝胶时间。如图 3a 所示,凝胶体系中的各种组分均匀分散在体系中,并且随着 EPL 含量的增加,凝胶时间由约 330s 降为

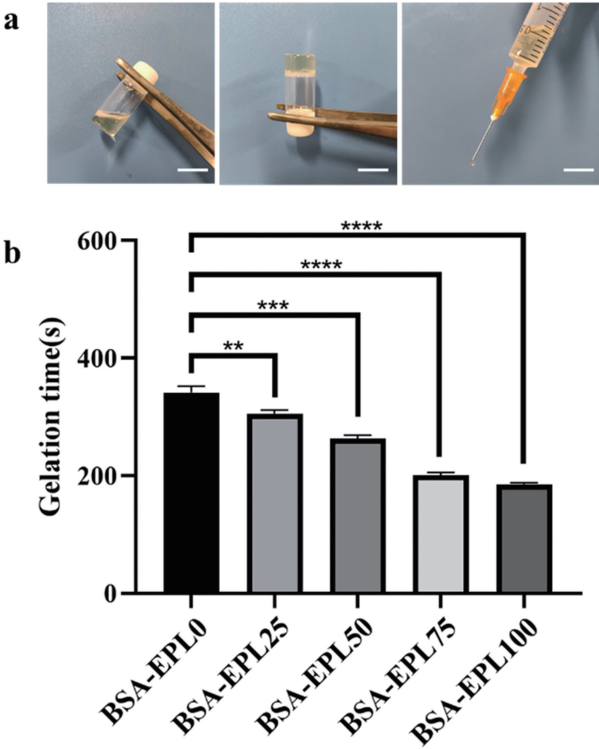
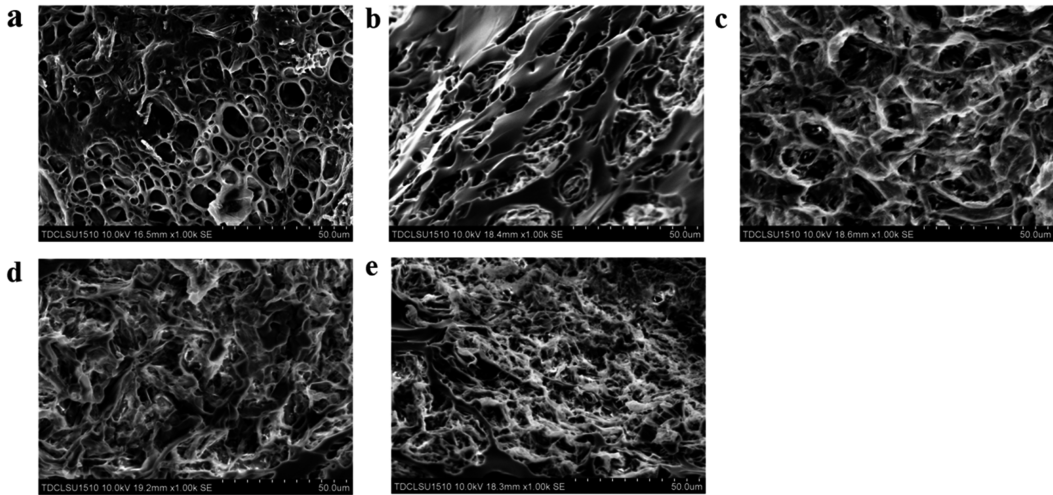


图 3 a. BSA-EPL100 水凝胶形成前后及凝胶注射数码照片(比例尺:10mm);b. 不同 EPL 含量的体系的凝胶时间
(采用 t 检验分析样本间显著性差异,** $p<0.01$,*** $p<0.001$,**** $p<0.0001$ 为有显著差异)
Figure 3 a. Photos of the hydrogel before and after formation and the gel injection (Scale:10mm); b. Gelation time of hydrogels with different EPL contents. (Statistically significant differences between the samples were analyzed using the t-test, and significant differences were considered when ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$)

约 185s,有显著的缩短(*** $p<0.0001$),说明随着 EPL 含量的增加,EPL 与 BSA 分子链间的静电力越强,所形成的氢键越多,凝胶溶液的交联密度越高,因而凝胶时间缩短。为了检验凝胶的可注射性,将 BSA-EPL100 的凝胶溶液装入 2mL 注射器中,由图 3b 可以观察到凝胶的可注射性得以保持。

2.3 扫描电镜

水凝胶的内部结构对水凝胶的机械性能有较大影响。为了观察水凝胶的内部结构,利用扫描电镜对样品进行了测试。从图 4 中可以看出,所有水凝胶样品均能观察到不规则的多孔结构,并且随着 EPL 的含量的增加,水凝胶的孔状结构更为规则致密。说明随着添加的 EPL 含量增加,凝胶内部的离子键与氢键数量也随之增加,使交联密度提高,从而孔洞更加规则致密。



(a:BSA-EPL0;b:BSA-EPL25;c:BSA-EPL50;d:BSA-EPL75;e:BSA-EPL100)

图 4 EPL 增强白蛋白水凝胶的扫描电镜图像

Figure 4 Scanning electron microscope images of EPL enhanced hydrogels

2.4 水凝胶压缩测试

水凝胶的力学性能是其作为组织工程支架重要性质之一。这里我们用压缩测试来对水凝胶的抗压性能进行测试。如图 5a 所示,我们测试对照组 BSA-EPL0 与实验组 BSA-EPL25、BSA-EPL50、BSA-EPL75、BSA-EPL100,可以发现随着 EPL 含量的增加,水凝胶的最大压缩应力逐渐增加,BSA-EPL100 最大压缩应力达到了 315kPa,比对照组水凝胶提高了 3 倍左右,由图 5b 可以看出,二者之间存在显著性差异(*** $p<0.0001$)。对照组 BSA-EPL0 的最大压缩应变约为 60%。BSA-EPL75 的最大压缩应变最佳,约为 65%。当 EPL 的含量继续增加时,水凝胶的最大压缩应变略有降低,约为 62%。当 EPL 的含量持续增加时,凝胶网络内部交联点持续增加,使弹性降低,因而最大压缩应变降低。进一步增加 EPL 的用量,最大压缩应力开始下降(数据未列出),可能是由于过量的聚赖氨酸电荷发生了排斥,破坏了水凝胶的均一微观结构,导致增强结果变差。

2.5 水凝胶流变测试

对于组织工程应用,生物支架材料的机械性能在细胞分化及调节组织功能中起着关键作用^[27]。水凝胶的流变性能如图 6 所示。通过比较的对照组 BSA-EPL0 与实验组 BSA-EPL25、BSA-EPL50、BSA-EPL75、BSA-EPL100,可以看出,实验组水凝胶样品的储能模量与对照组相比均有增加,且随着 EPL 的含量增加,水凝胶的储能模量随之增加。对照组的储能模量约为 8kPa,水凝胶 BSA-EPL100 的储能模量最高约为 17kPa,是对照组 BSA-EPL0 的 2 倍左右,说明随着 EPL 含量的增加,凝胶内部离子键与氢键数量增加,交联密度上升,因而储能模量增加。这与压缩测试的结果相对应。

2.6 水凝胶细胞毒性

水凝胶的细胞毒性由 CCK-8 比色法测得,CCK-8 可以简单准确地分析细胞毒性。在细胞毒性测试

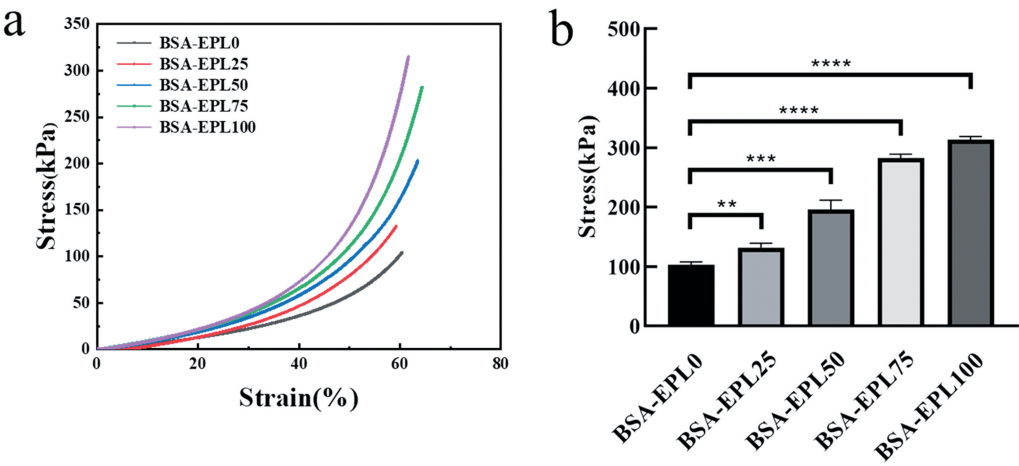


图 5 a. 不同 EPL 含量的水凝胶的压缩应力随应变变化曲线;b. 水凝胶的最大压缩应力
(采用 t 检验分析样本间显著性差异,** p<0.01、*** p<0.001 及**** p<0.0001 为有显著差异)

Figure 5 a. Compression stress-strain curves of hydrogels with different EPL contents;b. Maximum compressive stress of hydrogels. (Statistically significant differences between the samples were analyzed using the t-test, and significant differences were considered when ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001)

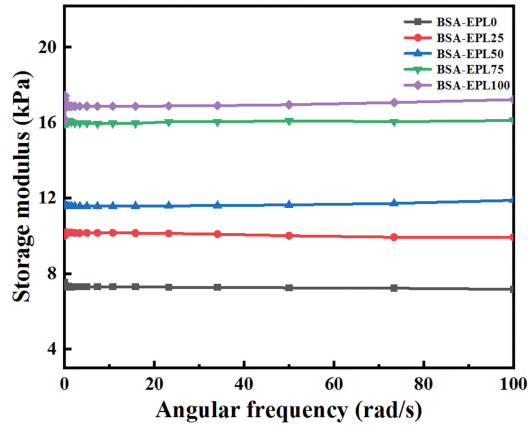


图 6 不同 EPL 含量水凝胶的储能模量随频率变化曲线

Figure 6 Curves of storage modulus (G') varied with angular frequency of hydrogels with different EPL content

中使用的是 L929 小鼠成纤维细胞。如图 7 所示,将 L929 细胞在不同含量 EPL 的水凝胶浸提液中培养 24h 和 72h,测得细胞存活率均在 80% 以上。用水凝胶浸提液培养细胞 24h,细胞存活率最大为 89%,培养 72h 后细胞存活率最大为 87%。含有 EPL 的实验组与不含 EPL 的对照组相比,细胞存活率相差不大,并且细胞存活率并没有因为 EPL 的含量提高而降低。培养时间延长至 72h 时,细胞存活率并没有降低。可以认为,制备的水凝胶生物相容性良好。这是因为制备水凝胶的材料均是天然无毒的,并且水凝胶在 pH8.0 条件下形成,容易被生物体接受。

2.7 水凝胶活死细胞染色

良好的生物相容性是水凝胶应用于生物医学领域所必需的性能之一。我们利用活死细胞染色法对与水凝胶共培养的细胞的活力进行评估。实验组将 L929 细胞与浸有 BSA-EPL100 水凝胶的培养基共培养,对照组将 L929 与 1640 培养基共培养。如图 8 所示,在共聚焦显微镜下观察到实验组大部分细胞均呈现绿色(活细胞),并且几乎观察不到死细胞(红色),并且细胞数量与空白组几乎无差别,说明所合成的水凝胶细胞毒性较低,不会影响细胞的正常生长,有望应用于生物医学领域。

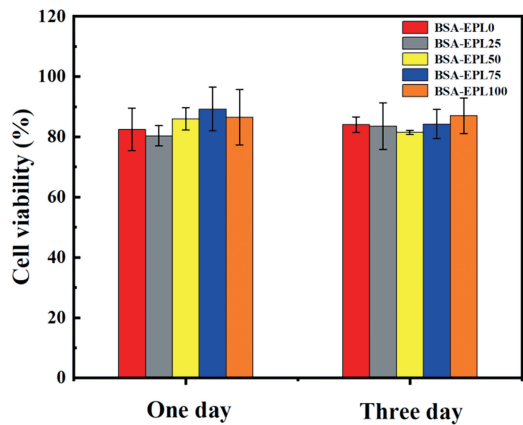


图 7 CCK-8 法检测细胞与不同 EPL 含量水凝胶浸提液培养 1 天和 3 天后的细胞毒性
Figure 7 The cytotoxicity of cells cultured with hydrogel extract with different EPL contents for 1 and 3 days determined by CCK-8 method

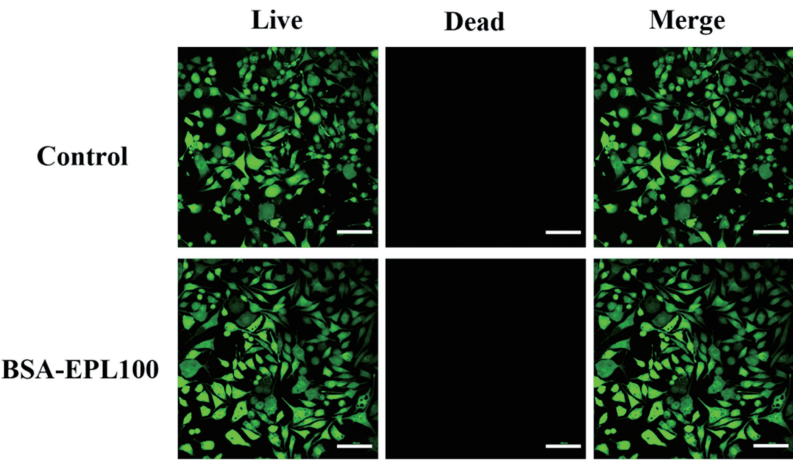


图 8 BSA-EPL100 与细胞共培养 72 小时后的 L929 细胞的活死细胞染色图(比例尺:100μm)
Figure 8 Live and dead cell stain of L929 cells cultured with the BSA-EPL100 hydrogel for 72 hours. (Scale:100μm)

3 结 论

本研究在课题组前期可注射 BSA 水凝胶工作的基础上^[14],在体系中引入 ε-聚赖氨酸对体系进行增强,通过 ε-聚赖氨酸与牛血清白蛋白之间的静电作用及 ε-聚赖氨酸与蛋白和尿素间的氢键作用,提高体系的交联密度。压缩应力和储能模量的测试结果显示水凝胶的最大压缩应力与储能模量均与体系中 EPL 的浓度成正比,在 EPL 大的浓度达到 20mg/mL 时,最大压缩应力达到 315kPa,是未引入 EPL 体系的 3 倍左右;其储能模量最高可达 17kPa,是未引入 EPL 体系的 2 倍左右。加入 ε-聚赖氨酸后的水凝胶在 pH8.0 的条件下凝胶时间为 3min~5min,因此加入 ε-聚赖氨酸后的水凝胶仍适宜注射。细胞毒性测试和活死细胞染色显示水凝胶对细胞无毒性,生物相容性良好。这些结果表明,通过在体系中引入 EPL 可在保持牛血清白蛋白水凝胶体系可注射性的基础上,提高其力学性能,制备出同时具有可注射性、力学强度高、生物相容性好的综合性能良好的白蛋白水凝胶,拓展了白蛋白水凝胶在组织工程领域的应用。

参考文献:

[1] Ullah F, Othman M B H, Javed F, Ahmad Z. Mate Sci Eng C, 2015, 57: 414~433.

- [2] Cho K H, Uthaman S, Park I K, Cho C S. Tissue Eng Regen Med, 2018, 15(5): 559~574.
- [3] Kondiah P J, Choonara Y E, Kondiah P P D, Marimuthu T, Kumar P, Toit L C D, Pillay V. Molecules, 2016, 21(11): 1580.
- [4] Wang J, Hao S L, Luo T T, Cheng Z J, Li W F, Gao F Y, Guo T W, Gong Y H, Wang B C. Colloids Surf. B, 2017, 149: 341.
- [5] Cheng L, Cai Z W, Ye T J, Yu X H, Chen Z J, Yan Y F, Qi J, Wang L, Liu Z H, Cui W G, Deng L F. Adv Funct Mater, 2020, 30: 2001196.
- [6] Li Y L, Rodrigues J, Tomas H. Chem Soc Rev, 2012, 41(6): 2193~2221.
- [7] Jonker A M, Löwik D W P M, Van H J C M. Chem Mater, 2012, 24(5): 759~773.
- [8] 王晓威,王晓曼,冉隆豪. 高分子通报, 2014, 8: 44~55.
- [9] Borzova V A, Markossian K A, Kara D A, Kurganov B. Int J Biol Macromol, 2015, 80: 130~138.
- [10] Arabi S H, Aghelnejad B, Schwieger C, Meister A, Kerth A, Hinderberger D. Biomater Sci, 2018, 6(3): 478~492.
- [11] Zhao J Z, Justin A W, Markaki A E. Biotechnol Bioeng, 2019, 116(12): 3457~3468.
- [12] Raja S T K, Thiruselvi T, Mandal A B, Gnanamani A. Sci Rep-UK, 2015, 5:15977.
- [13] Sun Y L, Huang Y B. J Mater Chem B, 2016, 4: 2768~2775.
- [14] Bai Y, Li S D, Li X P, Han X, Li Y, Zhao J, Zhang J T, Hou X, Yuan X B. J Biomat Sci-Polym Ed, 2019, 30: 662~678.
- [15] 袁涛,孙俊奇. 高分子学报, 2019, 50(12): 1263~1271.
- [16] Zavahir S, Krupa I, AlMaadeed S A, Tkac J, Kasak P. Environ Sci Technol, 2019, 53(15): 9260~9268.
- [17] Meng H, Xiao P, Gu J C, Wen X F, Xu J, Zhao C Z, Zhang J W, Chen T. Chem Commun, 2014, 50(82): 12277~12280.
- [18] Fan H L, Wang J H, Jin Z X. Macromolecules, 2018, 51(5): 1696~1705.
- [19] Khoury L R, Popa I. Nat Commun, 2019, 10(1): 1~9.
- [20] Shima S, Sakai H. Agric Biol Chem, 1977, 41(9): 1807~1809.
- [21] Zhang S, Wang G, Lin X, Chatzinikolaïdou M, Jennissen H P, Laub M, Uludag H. Biotechnol Prog, 2008, 24(4): 945~956.
- [22] Shukla C S, Singh A, Pandey A K, Mishra A. Biochem Eng J, 2012, 65: 70~81.
- [23] Medermott M K, Chen T H, Williams C M, Markley K M, Payne G F. Biomacromolecules, 2004, 5(4): 1270~1279.
- [24] Gu Z P, Huang K, Luo Y, Zhang L, Kuang T, Chen Z, Liao G. Wires Nanomed Nanobi, 2018, 10(6): 1520.
- [25] Zhou Y L, Nie W, Zhao J, Yuan X Y. J Mater Sci: Mater Med, 2013, 24: 2277~2286.
- [26] Zhang L W, Baumer W, Monteiro-Riviere NA. Nanomedicine, 2011, 6(5): 777~791.
- [27] James E I, Jenkins L D, Murphy A R. Macromol Mater Eng, 2019, 304(11): 1900285.
- [28] Qin L, Bi J N, Li D M, Dong M, Zhao Z Y, Dong X P, Zhou D Y, Zhu B W. Molecules, 2016, 21(11): 1546.
- [29] 张奇,唐春雪,丁克毅,何达海. 中国皮革, 2019, 48(6): 12~16.

Injectable Albumin Hydrogels Enhanced by ϵ -Polylysine

ZHAN Yue-ying, ZHAO Jin*

(School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract: Bovine serum albumin hydrogel has excellent biocompatibility and biodegradability, and is widely used in the field of tissue engineering. So far, injectable bovine serum albumin hydrogel has been successfully prepared, but its mechanical properties still need to be improved. This paper used a simple method to improve the mechanical properties of the injectable albumin hydrogel. Urea was used as a denaturant and glutathione was used as a reducing agent to prepare an albumin gel network with the synergistic effect of hydrogen bonds and disulfide bonds, and the cationic polypeptide ϵ -polylysine was physically mixed in the system after the protein was completely denatured. ϵ -polylysine was adsorbed into the chains of bovine serum albumin molecular by electrostatic interaction and gradually formed hydrogen bonds with bovine serum albumin and urea to strengthen the bovine serum albumin gel network while the injectability of the hydrogel was retained. The results showed that the hydrogel with ϵ -polylysine could increase the maximum compressive stress from 105kPa to 315kPa, and the storage modulus from about 8kPa to 17kPa. The improvement of mechanical properties expands the application of albumin hydrogel in the field of tissue engineering.

Key words: Bovine serum albumin; ϵ -Polylysine; Injectable hydrogel; Ionic bonding; Hydrogen bonding