

研究简报

转谷氨酰胺酶催化增强明胶基粘合剂

李 阳, 刘新雨, 李思迪, 赵 瑾*, 侯 信, 原续波

(天津大学材料科学与工程学院, 天津 300350)

摘要:明胶基粘合剂因其良好的生物相容性被广泛的应用于组织工程领域,但其粘合能力仍存在较大提升空间。在本研究中,通过葡聚糖醛与明胶间的席夫碱反应形成一层交联网络,同时加入转谷氨酰胺酶,使其与明胶利用酶促交联反应形成另一层交联网络,通过双交联网络的形成提高了明胶基粘合剂性能。通过小瓶倒置、溶胀、压缩和搭接剪切等测试凝胶性能及粘合剂性能。结果表明,改性后的明胶基粘合剂具有适宜注射使用的凝胶时间,较低的溶胀比,压缩模量最高可达 33.6 kPa,是未改性明胶的 4 倍,粘合强度最高可达 25.9 kPa,是未改性明胶的 12 倍。明胶基粘合剂的性能得到了提升。

关键词:明胶; 水凝胶粘合剂; 转谷氨酰胺酶; 葡聚糖醛; 双交联网络

明胶是由动物结缔组织的胶原部分降解生成的不可逆产物,与细胞外基质的组成成分相似,具有良好的生物可降解性和生物相容性,目前已有部分明胶制品如粘合剂等应用于临床^[1~3]。但是明胶粘合剂较弱的粘合能力使其无法获得更为广泛的应用。而明胶侧链上含有大量活性官能团,使其易于改性,因此通常采用引入交联结构的方式提高明胶粘合剂的性能^[4,5]。如 Soo 等^[6]在明胶粘合剂中加入戊二醛进行交联以提高明胶粘合剂性能。然而传统化学交联使用的交联剂如戊二醛等具有一定的生物毒性,且难以去除,降低了明胶基粘合剂的生物相容性,影响其临床应用^[7]。通过酶促交联方式制备水凝胶,近些年来开始获得关注^[8~10]。与传统化学交联方式相比,酶促交联法以具有良好生物相容性和生物活性的酶作催化剂促进分子链的交联,在人体生理条件下快速凝胶化,不需引入有机溶剂和化学交联剂等有毒物质^[11],对凝胶粘合剂本身的生物相容性影响较小。

除了其良好的生物相容性外,目前也已出现一些具有生物活性的酶被用于酶促交联以进一步增强明胶凝胶的性能,如辣根过氧化物酶、酪氨酸酶及转谷氨酰胺酶等^[12~16]。辣根过氧化物酶的应用最为广泛, Lee 等^[17]制备了两种明胶衍生物—明胶-羟苯基丙酸和明胶-羟苯基丙酸-酪胺,在过氧化氢存在下,通过辣根过氧化物酶介导的反应制备改性的明胶基粘合剂。搭接剪切实验结果显示,改性后的粘合剂组织粘合强度是纤维蛋白胶的 2~3 倍。但是辣根过氧化物酶需在过氧化氢催化下发生作用,而过氧化氢对人体有较强刺激和危害,在临床上的应用受到一定限制。Kim 等^[18]利用酪氨酸酶将酪胺缀合的透明质酸和明胶进行定点偶联,获得体系的本体强度约是明胶的 2 倍,粘合强度是明胶的 4 倍,粘合能力获得较大提升。但是此酶促交联需要其他聚合物的参与或明胶的复杂修饰,单独酪氨酸酶催化的反应无法形成粘合剂^[19]。与之相比,转谷氨酰胺酶能够直接催化明胶粘合剂的形成, Martin 等^[20]利用转谷氨酰胺酶促进明胶交联,成功制备了改性明胶基粘合剂。改性后的粘合剂本体强度是纤维蛋白胶的 1~4 倍,粘合强度与明胶相似,性能有一定的提升,但仍未满足对改性后明胶基粘合剂性能的要求。引入双交联网络结构^[21]被认为可以有效增强凝胶的强度,为进一步提高明胶基粘合剂的综合性能提供了一种可行方法,然而目前尚未见到相关报道。

10.14028/j.cnki.1003-3726.2020.10.005

收稿:2020-04-14;修回:2020-08-17;

作者简介:李阳(1993-),男,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.

本研究采用具有良好生物相容性的改性天然聚合物葡聚糖醛与转谷氨酰胺酶共同作用于明胶粘合剂,通过形成双交联网络的形式提高明胶基粘合剂的性能。转谷氨酰胺酶能够促进明胶中赖氨酸和谷氨酰胺残基催化交联,无需低分子量的交联剂、预先功能化的聚合物骨架或外部刺激^[22,23]。以往报道显示,转谷氨酰胺酶改性的明胶粘合剂具有较好的生物相容性,并且在大鼠肝脏止血实验^[24]及兔视网膜膜修复实验^[25]中有较好的表现。葡聚糖醛则由右旋糖酐氧化制成,在经过纯化后,生物相容性较高^[26],其与明胶的氨基间发生的席夫碱反应,不需催化剂的参与。有研究证明,葡聚糖醛与改性明胶形成的水凝胶在小鼠的软骨再生实验中,无炎症发生,表现出良好的生物相容性^[27]。可见,在已有文献报道中,本研究所采用的交联反应方式在反应的原料、交联剂及产物方面未引起实验动物的免疫和毒性反应,具有较好的生物相容性。两种交联反应均需明胶中氨基基团的参与,而通常在组织粘合表面也富有氨基基团^[28]。因此在交联反应中过量的转谷氨酰胺酶和葡聚糖醛,可以与组织表面的残基继续反应,进一步增强粘合剂与界面间的粘合强度。通过小瓶倒置法、溶胀与形貌测试表征粘合剂基本性能,压缩与流变测试表征其本体强度,搭接剪切实验评价其粘合性能,并讨论转谷氨酰胺酶浓度对其性能的影响。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

右旋糖酐(Dextran),购自天津希恩思生化科技有限公司;盐酸羟胺(Hydroxylamine hydrochloride),购自天津希恩思生化科技有限公司;高碘酸钠(Sodium periodate),购自天津元立化工有限公司;明胶颗粒(Gelatin particles),购自Sigma-Aldrich公司;转谷氨酰胺酶(Transglutaminase,酶活性为1000U/g),购自北京索莱宝科技有限公司。未特殊说明的药品与试剂均为分析纯级别,按照药品说明使用。

超低温冷冻干燥机(SCIENTZ-12N型,中国宁波新芝生物科技有限公司);液体核磁共振仪(400MHz型,德国布鲁克科技有限公司);傅里叶变换红外光谱(IS10型,中国赛默飞世尔科技有限公司);电子万能试验机(UTM2102型,深圳三思纵横科技有限公司);热场发射扫描电子显微镜(JSM-7800F型,日本JEOL仪器公司)。

1.2 葡聚糖醛的合成及表征

葡聚糖醛的制备原理如图1所示,使用160ml蒸馏水溶解2g右旋糖酐,配制成为右旋糖酐溶液。1.989g高碘酸钠溶于40ml蒸馏水,搅拌均匀后滴加到右旋糖酐溶液中。在室温环境下,避光搅拌24h。随后将所得产物在蒸馏水中透析72h,除去未反应的小分子。在透析后冻干处理,得到的产物保存在无水干燥的密封袋中。

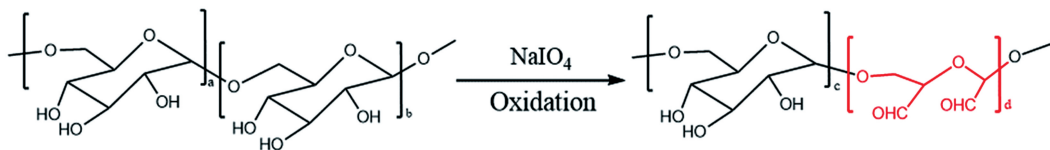


图1 右旋糖酐氧化生成葡聚糖醛的反应机理

Figure 1 Reaction mechanism of oxidation of dextran to oxidized dextran

在室温下分别测定右旋糖酐和葡聚糖醛的核磁氢谱和红外光谱。通过盐酸羟胺法^[29]定量测试葡聚糖醛中醛基的含量,并根据下式计算。

$$[\text{CHO}] = \frac{n_{\text{CHO}}}{2n_{\text{ODex}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中,[CHO]为葡聚糖醛中醛基含量; n_{CHO} 为滴定法算出的醛基的物质的量; n_{ODex} 为葡聚糖醛的物质的量。

1.3 粘合剂的合成

以磷酸盐缓冲液(pH=7.4,浓度为10mmol/L)作为溶剂,配制浓度为300mg/mL的明胶溶液(Gelatin solution,以下简称Gel)、浓度为100mg/mL的葡聚糖醛溶液(Oxidized dextran,以下简称ODex)和梯度浓度的转谷氨酰胺酶溶液(Transglutaminase,以下简称TG,浓度分别为25mg/mL、50mg/mL、75mg/mL和100mg/mL)。将ODex溶液、TG溶液和Gel溶液以1:1:2的体积比混合均匀后,加入注射器中,得到粘合剂的前驱液,粘合剂的原料比例如表1所示。

表 1 粘合剂简称及所含成分
Table 1 Abbreviations of adhesives and their contents

组别	样品简称	Gel 浓度/ (mg·mL ⁻¹)	ODex 浓度/ (mg·mL ⁻¹)	TG 浓度 mg·mL ⁻¹
实验组	Gel-ODex-TG-25	150	25	6.25
	Gel-ODex-TG-50	150	25	12.5
	Gel-ODex-TG-75	150	25	18.75
	Gel-ODex-TG-100	150	25	25
对照组	Gel	150	0	0
	Gel-ODex	150	25	0
	Gel-TG	150	0	25

1.4 凝胶时间的测定

通过小瓶倒置法^[30]测定实验组与对照组粘合剂的凝胶时间,将制备好的粘合剂前驱液,注入透明玻璃小瓶中,并向上放置在37℃的恒温水浴箱中,每隔30s进行观察,当小瓶倒置且液面不发生移动时,记为粘合剂的凝胶时间。

1.5 实验组粘合剂溶胀性能与形貌表征

按照粘合剂的合成方法,制备表1中实验组的粘合剂样品,待凝胶形成后,冻干处理,得到淡黄色的固体样品。称量干重 w_d (mg)后浸泡在适量的PBS缓冲液中,每隔一段时间取出,吸取表面多余水分,称量湿重 w_t (mg)。并按照如下公式计算样品的溶胀比(Swelling Ratio)。

$$\text{Swelling Ratio}(\%) = \frac{(w_t - w_d)}{w_d} \times 100\%$$

将粘合剂样品切割成同样大小的薄片,冻干后喷金45s,采用热场发射扫描电子显微镜观察样品形貌,加速电压5kV。

1.6 粘合剂本体强度表征

为了探究双交联改性对明胶基粘合剂本体强度的影响效果,进行粘合流变与压缩性能的表征。按照粘合剂的合成方法,制备Gel-ODex-TG-50、Gel-ODex-TG-100两组明胶基粘合剂,对照组中的Gel-ODex粘合剂。三组粘合剂样品制成直径15mm,高1mm的圆柱体,并利用流变仪测试样品的流变性能,固定应变为1%,动态频率扫描频率为0.1~10Hz,记录储能模量 G' 和损耗模量 G'' 随频率的变化情况。测试在室温下进行。

制备实验组与对照组共七组粘合剂,将粘合剂前驱液,注入圆柱状模具,制备成直径为10mm,高为13mm的圆柱状。采用电子万能试验机进行压缩性能的测试,压缩速度为5mm/min,当接触力为0.02N时开始记录。记录当应变为60%时的压缩模量。

1.7 粘合剂粘合性能表征

为测定七组粘合剂的粘合强度,采用湿态下的肠衣作为粘结物,利用搭接剪切的方式进行测试^[31]。

将长约 5cm,宽约 1.75cm 的肠衣放置于 PB 缓冲液中浸泡,保持其湿润状态。测试前将肠衣取出,取长为 1.5cm、宽为 1.75cm 的区域作为待测界面,涂抹约 400 微升混合均匀后的粘合剂前驱液,与另一肠衣粘合,最终长度为 8.5cm。静置粘合 5min 后,使用电子万能试验机进行测试,将两端未涂抹粘合剂的肠衣夹在夹具上,拉伸速度为 5mm/min,记录相应的数据,计算粘合强度。

1.8 统计学分析

各组样品至少制备三个,进行性能表征时进行三次平行实验。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 代表有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 葡聚糖醛的合成与表征

利用高碘酸钠将右旋糖酐中的羟基氧化为醛基,得到 ODex^[32],通过红外光谱与核磁氢谱表征 ODex 的制备效果。在图 2a 的红外光谱表征结果中可以看到,与右旋糖酐相比,ODex 的谱线在 1734cm⁻¹ 处有峰,对应半缩醛基的特征峰。在右旋糖酐上的羟基被部分氧化成醛基后,未被氧化的羟基与相邻的醛基发生反应生成比游离醛更为稳定的环状半缩醛结构^[33]。在图 2b 中,ODex 的¹H-NMR 谱图与右旋糖酐的谱图不同,在 $\delta=4.0\sim6.0$ ppm 中出现了新的氢质子峰,在 $\delta=9.7$ ppm 出现了醛基基团的氢质子峰, $\delta=4.9\sim5.7$ ppm 之间也出现了半缩醛基团的氢质子宽峰。因此红外与核磁表征的结果,表明右旋糖酐中的部分羟基已被氧化成醛基。

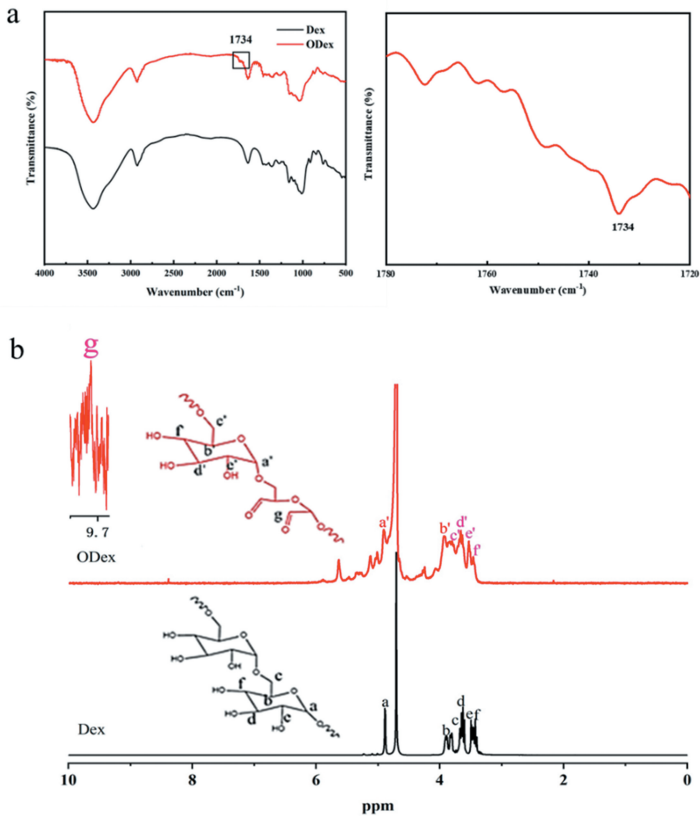


图 2 a. ODex 与右旋糖酐的红外光谱;b. ODex 与右旋糖酐的核磁共振氢谱

Figure 2 a. Fourier transform infrared spectroscopy of ODex and dextran; b. ¹H-NMR of ODex and dextran

而为了保证 ODex 在粘合剂中的作用效果,采用盐酸羟胺滴定法,对 ODex 中的醛基含量进行定量。在滴定过程中溶液的颜色变化明显,通过公式(1)计算得出此批次制备的 ODex 中醛基的含量约为 64%。

而在后续实验表征中,使用相同批次的 ODex,以保证醛基含量不变,对明胶粘合剂的作用效果相同。

2.2 粘合剂的制备与凝胶时间测定

粘合剂制备的反应机理如图 3 所示,ODex 中的醛基与明胶中氨基反应生成席夫碱键,促进明胶中氨基酸链段聚合并形成交联网络。TG 则是通过催化明胶中赖氨酸与谷氨酰胺残基间反应,形成肽键,促进交联网络的生成。在该反应体系中,两种交联形式均需氨基酸的参与,因此明胶所占比例较高。然而明胶溶液浓度过高时,易导致注射针头的堵塞,因此明胶的溶解浓度固定为可注射的最大浓度 300mg/mL。

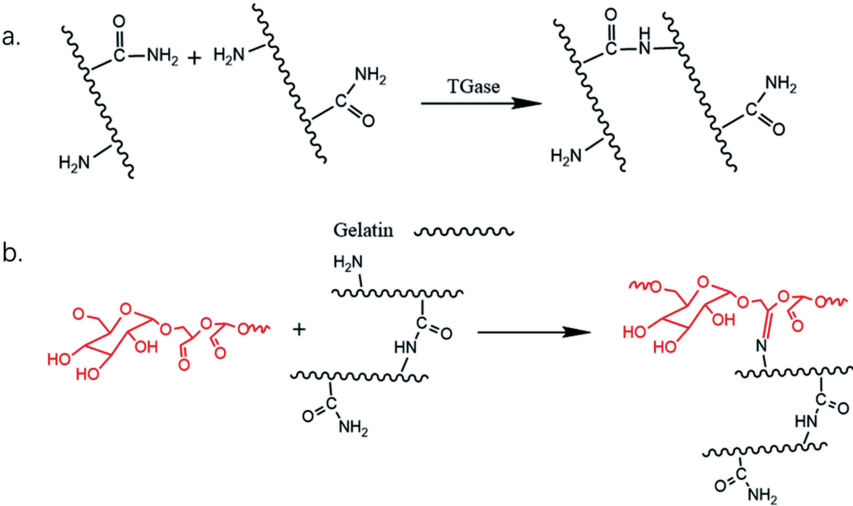


图 3 a. 酶促交联反应机理;b. 席夫碱交联反应机理

Figure 3 a. Enzymatic cross-linking reaction mechanism; b. Schiff base cross-linking reaction mechanism

为了探究不同 TG 浓度对于双交联改性明胶粘合剂性能的影响,固定 ODex 溶液的浓度为 100mg/mL,明胶溶液浓度为 300mg/mL。在生物相容性实验研究^[14]中,TG 最大安全使用浓度为 10% w/v,因此 TG 溶液梯度浓度设为 100mg/mL、75mg/mL、50mg/mL 和 25mg/mL。

本研究通过小瓶倒置法进行凝胶时间的测试,其方法如图 4a 所示。此外,可见改性后的明胶基粘合剂呈现淡黄色。凝胶时间测定结果为图 4b,可见实验组粘合剂凝胶时间在 3~6min 左右,且随着 TG 浓度的提高,凝胶时间缩短。这是因为在凝胶过程中,TG 作为催化剂,能够促进明胶中赖氨酸与谷氨酰胺残基间的交联反应。当 TG 的浓度提高时,其与活性基团触发反应的效率得到提高,凝胶形成时间也相应的变短。而在对照组粘合剂的凝胶时间对比中,可以看到未经改性的明胶粘合剂 Gel 的凝胶时间在 15min 左右,过长的凝胶时间易导致粘合剂的流失,改性的明胶粘合剂的粘合时间与之相比有显著的缩短(***p<0.001)。在适合原位注射的情况下,凝胶时间适当的缩短能够避免粘合剂的稀释流失^[34]。

对照组粘合剂中,Gel-TG 粘合剂与 Gel-ODex 粘合剂的凝胶时间近似,这有利于实验组粘合剂双交联网络的形成。因为在双交联水凝胶形成过程中,当交联网络形成速度差异较大时,率先形成的交联网络阻碍成分交换过程,导致后续交联反应无法进行,难以形成双网络结构。

2.3 转谷氨酰胺酶浓度对明胶基粘合剂交联结构的影响

在凝胶时间的表征中,TG 的浓度与实验组粘合剂的凝胶速率正相关。为了进一步探究 TG 浓度与粘合剂基本性能之间的关系,进行溶胀与形貌表征。将实验组粘合剂浸泡在 PBS 缓冲液中,进行溶胀性能的测试,溶胀比随时间的变化曲线如图 5 所示。冻干后的粘合剂吸收缓冲液,质量随之升高,但由于其内部交联网络的限制,存在溶胀平衡状态。

在图 5 中,随着 TG 浓度的提高,粘合剂的平衡溶胀比降低,Gel-ODex-TG-25 组粘合剂的平衡溶胀

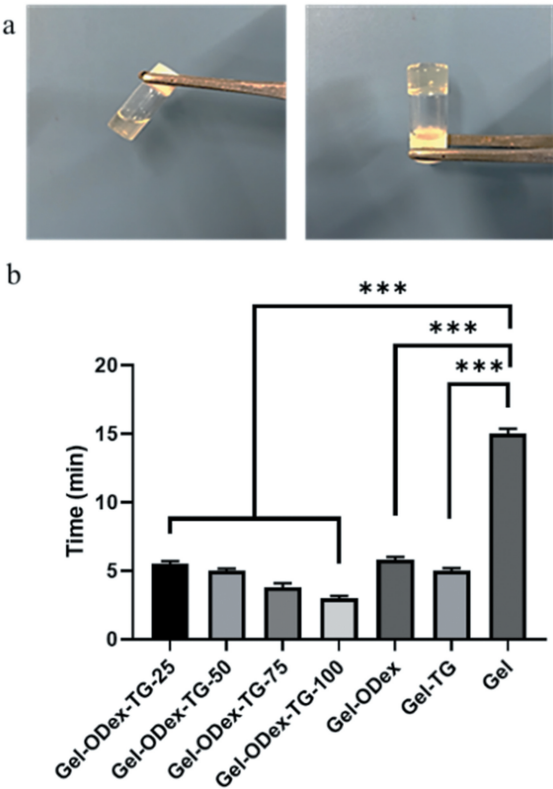


图 4 a. 小瓶倒置法测定凝胶时间示意图;b. 粘合剂的凝胶时间
(采用 t 检验分析样本间显著性差异,**p<0. 01,***p<0. 001 为有显著差异)

Figure 4 a. Schematic diagram of the vial inversion method; b. Comparison of gelation time of adhesives
(Statistically significant differences between the samples were analyzed using the t-test, and significant differences were considered when **p<0. 01, ***p<0. 001)

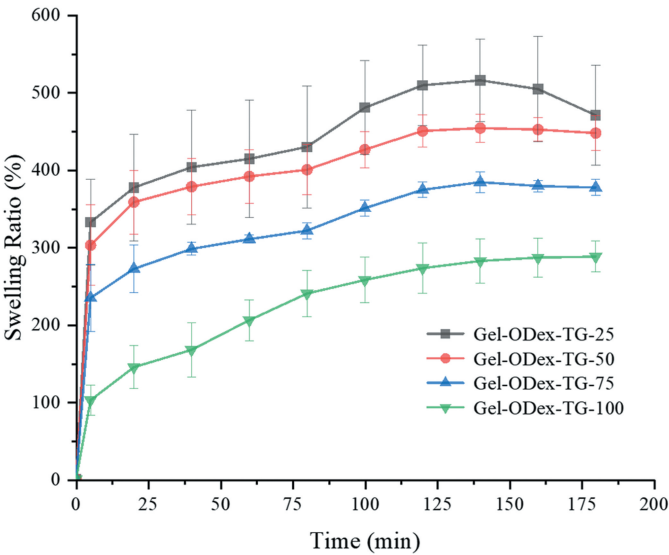


图 5 实验组明胶基粘合剂在 PBS 缓冲液中的溶胀比随时间变化曲线

Figure 5 Swelling ratio of four groups of modified gelatin adhesives in PBS buffer

比约为 515%,Gel-ODex-TG-100 组在 287%左右。较低的溶胀比有利于其在组织粘合的应用,因为当平

衡溶胀比较高时,易吸收体液,对组织表面的压迫,形成疤痕^[35]。凝胶的溶胀度通常是由其内部交联密度决定。可见,随着 TG 浓度的升高,凝胶的交联密度增加。这在凝胶内部形貌表征中得到印证。

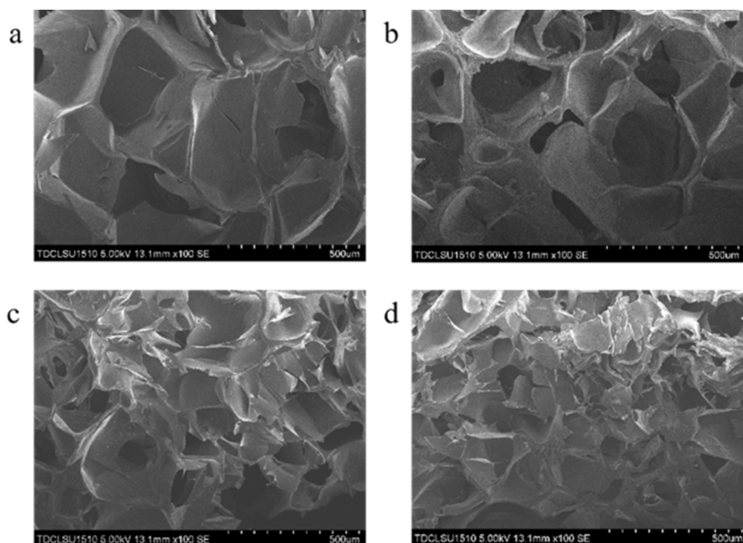


图 6 实验组明胶基粘合剂样品的扫描电镜图

Figure 6 Scanning electron microscope images of four groups of modified gelatin adhesives

(a:Gel-ODex-TG-25;b: Gel-ODex-TG-50;c:Gel-ODex-TG-75;d:Gel-ODex-TG-100)

SEM 图显示,冻干后的双交联改性明胶基粘合剂呈现疏松多孔状,孔隙明显。这是因为水凝胶粘合剂中富含水分,冻干处理使水分迅速升华,可以直观的看到粘合剂中的交联结构网络。在 TG 的浓度提高后,孔隙孔径大小从 $200\mu\text{m}$ 缩小到 $50\mu\text{m}$ 左右,交联网络更加紧密。紧密的交联网络与较小的结构孔隙是保证粘合剂具有较高本体强度的基础。

2.4 粘合剂的本体强度

常用的组织粘合剂的失效形式主要有界面失效和本体失效,可注射粘合剂因其可注射的特性,通常具有较长的凝胶时间,较弱的交联网络。因此通常需要增强本体强度。

本研究通过压缩性能与流变性能的测试,表征粘合剂的本体强度。图 7 为粘合剂的流变性能表征结果,通过比较 Gel-ODex, Gel-ODex-TG-50 与 Gel-ODex-TG-100 这三组粘合剂储能模量 G' 随频率变化的情况,可以看出随着 TG 浓度的提高,粘合剂的储能模量增加。表明 TG 浓度与改性明胶基粘合剂的本体强度正相关,而这在压缩模量表征结果中也有体现。

图 8 为压缩模量柱状图,记录粘合剂在形变为 60% 时的压缩模量。在图中,实验组粘合剂的压缩模量在 $13.6\text{kPa}\sim 33.6\text{kPa}$ 。而且随着 TG 浓度的提高,压缩模量明显提高。压缩模量的高低,通常由粘合剂内部的交联网络结构决定。因此压缩模量的提高,也表明粘合剂内部交联网络更加致密,与溶胀等测试表征的结果一致。

在图 8 中,未经改性的明胶粘合剂 Gel 的压缩性能最差为 8.5kPa , ODex 与 TG 改性的明胶粘合剂与之相比存在显著性差异($**p<0.01$),分别在 10.3kPa 和 11.8kPa 左右。而实验组粘合剂与明胶粘合剂 Gel 之间的压缩性能差异最为显著($***p<0.001$)。

流变与压缩性能结果均显示,酶促双交联改性后的明胶基粘合剂的本体强度与 TG 的浓度正相关,而且双交联改性的方式与单独改性方式相比,能够更为显著的提高明胶基粘合剂的本体强度。但是粘合剂使用时,其粘合能力受多种影响因素影响,本体强度的提高并不意味着粘合能力的增强^[36]。

2.5 粘合剂的粘合性能

通过搭接剪切实验能够较为全面的表征粘合剂的粘合能力,测试得到的结果为图 9。在图中,实验

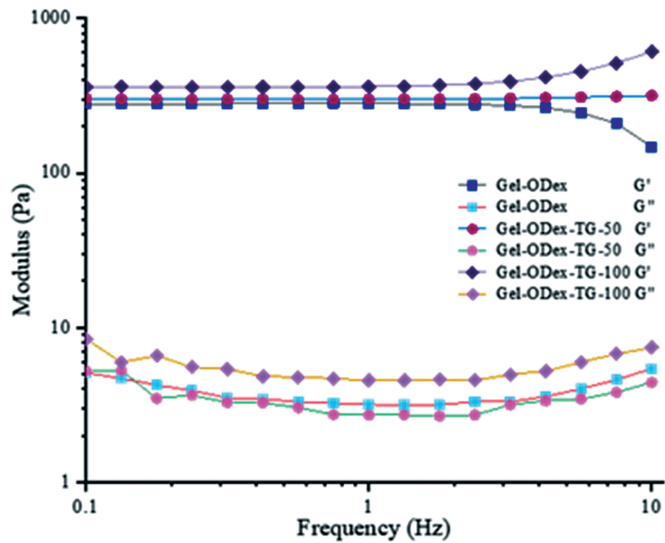


图 7 明胶改性粘合剂的储能模量 G' 与损耗模量 G'' 随频率变化曲线

Figure 7 Variation curve of storage modulus G' and loss modulus G'' of gelatin modified adhesive with frequency

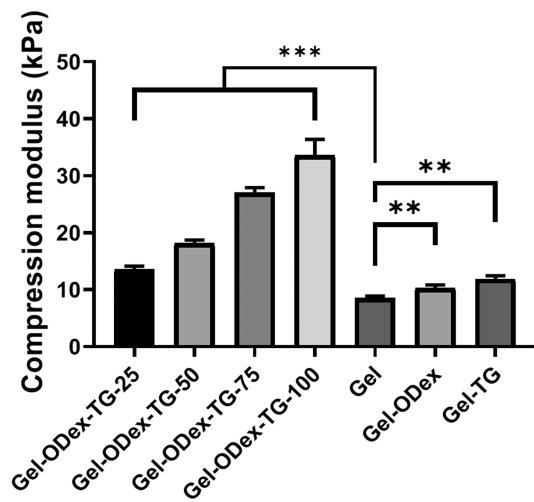


图 8 粘合剂在应变为 60% 时的压缩模量

(采用 t 检验分析样本间显著性差异, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 为有显著差异)

Figure 8 Compression modulus of adhesives at a strain of 60%

(Statistically significant differences between the samples were analyzed using the t-test, and significant differences were considered when $**p < 0.01$, $***p < 0.001$)

组粘合剂的粘合强度在 10.9kPa~25.9kPa 左右,值得注意的是粘合性能最好的粘合剂为 Gel-ODex-TG-50 组,而不是 TG 浓度最高的组别。结合压缩模量的测试结果,发现 TG 浓度提高后,实验组粘合剂的本体强度得到提高,但粘合性能先升高后降低。而在对照组粘合剂中,Gel 组粘合剂表现出较差的粘合性能,粘合强度仅为 2.1kPa。ODex 改性的 Gel-ODex 组粘合剂粘合性能明显改善($**p < 0.01$),粘合强度是 Gel 组的 4 倍左右。TG 改性的 Gel-TG 组粘合剂的粘合强度在 22.2kPa 左右,与 Gel 组相比,差异更为显著($***p < 0.001$)。对照组中,单纯的明胶粘合剂性能较弱,ODex 或 TG 的改性均能较好的改善其粘合效果,TG 的改性效果更为显著。

综合实验组粘合剂与对照组粘合剂的粘合性能表征结果,实验组粘合剂均具有较好的粘合性能,粘

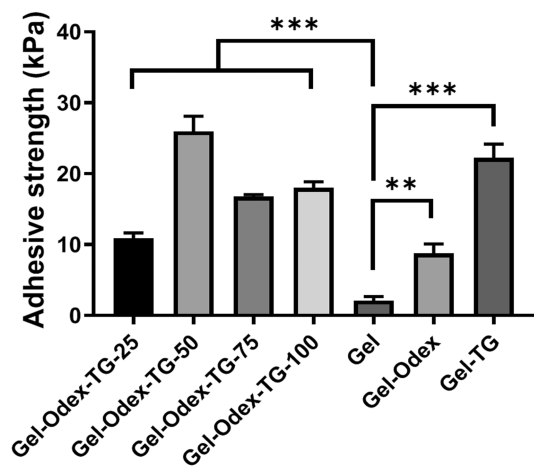


图 9 通过搭接剪切实验测定的七组粘合剂的粘合强度

(采用 t 检验分析样本间显著性差异,**p<0. 01,***p<0. 001 为有显著差异)

Figure 9 Adhesive strength of seven groups of adhesives measured by lap shear test

(Statistically significant differences between the samples were analyzed using the t-test, and significant differences were considered when **p<0. 01, ***p<0. 001)

合强度高于 Gel 组与 Gel-ODex 组。对比 Gel-ODex-TG-50 组粘合剂、Gel-ODex 组粘合剂和 Gel-TG 组粘合剂,TG 的加入确实提高了明胶基粘合剂的粘合能力,而且 50%浓度的 TG 与 ODex 组合改性形成的粘合剂的粘合性能好于 TG 单一改性的粘合剂。但是 Gel-ODex-TG-75 与 Gel-ODex-TG-100 组在自体强度较好的情况下,粘合能力与预期增长的趋势不符,出现了粘合能力的下降。

结合前文所述的表征结果,随着 TG 浓度的提高,粘合剂中酶促交联反应效率提高,交联网络形成的速度加快,结构更紧密。这一过程能够使粘合剂的自体强度得到提高,但是也使粘合剂内部运动受阻^[37]。而且在本研究中明胶基粘合剂与组织表面之间主要通过形成化学键而粘合。当粘合剂内分子运动受阻时,粘合剂中交联剂与参与界面反应的官能团接触并发挥作用的几率降低,导致界面强度下降,也就使 Gel-ODex-TG-75 与 Gel-ODex-TG-100 组粘合剂易发生界面失效。所以在粘合性能表征中,与 Gel-ODex-TG-50 组相比粘合强度出现下降趋势。因此在粘合剂性能改善过程中,做好粘合剂的自体强度与界面强度之间的平衡尤为重要。在七组粘合剂中,粘合性能最好的粘合剂为 Gel-ODex-TG-50 组粘合剂。

3 结论

本研究以明胶为原料,转谷氨酰胺酶及葡聚糖醛为交联剂,成功制备了综合性能良好的双交联改性明胶基粘合剂。改性后的明胶基粘合剂的凝胶时间为 3~6min,适宜注射,且凝胶具有较低的溶胀率。改性后的明胶基粘合剂压缩模量最高可达 33. 6kPa,是未改性明胶的 4 倍,粘合强度最高可达 25. 9kPa,是未改性明胶的 12 倍。所制备粘合剂的综合性能与转谷氨酰胺酶的浓度有关,随着转谷氨酰胺酶浓度的提高,自体强度增加,然而较高的酶浓度也导致界面强度降低,粘合性能降低。因此在本研究所涉酶浓度范围内,当 TG 浓度为 12. 5mg/mL 时,粘合剂的综合性能最佳。本研究中制备的改性明胶基粘合剂有望成为一种综合性能优良的可注射医用材料。

参考文献:

[1] Alexandra G P, Ana M S, Oana C. Int J Biol Macromol, 2019, 138: 854~865.
[2] Su K, Wang C. Biotechnol Lett, 2015, 37(11): 2139~2145.

- [3] Jaipan P, Nguyen A, Narayan R J. *MRS Commun*, 2017, 7(3): 416~426.
- [4] Liu Y, Sai Cheong N G, Yu J S, Wei B T. *Colloid Surface B*, 2019, 174: 316~323.
- [5] Afewerki S, Sheikhi A, Kannan S, Ahadian S, Khademhosseini A. *Bioeng Transl Med*, 2019, 4(1): 96~115.
- [6] Soo K B, Tae H S, Jong D K. *J Adhes Sci Technol*, 2002, 16(4): 361~372.
- [7] Yang G, Xiao Z H, Long H Y, Ma K L, Zhang J P, Ren X M, Zhang J. *Sci Rep-UK*, 2018, 8(1): 1616.
- [8] Scott Z, Tsatsral B, Timothy S. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(2): 195~222.
- [9] Guebitz G M, Nyanhongo G S. *Trends Biotechnol*, 2018, 36(10): 1040~1054.
- [10] Teixeira L S M, Feijen J, van Blitterswijk C A, Dijkstra P J, Karperien M. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1281~1290.
- [11] Nezhad-Mokhtari P, Ghorbani M, Roshangar L, Rad J S. *Int J Biol Macromol*, 2019, 139: 760~772.
- [12] Lee Y, Bae J W, Lee J W, Suh W, Park K D. *J Mater Chem B*, 2014, 44(2): 7712~7718.
- [13] Choi Y C, Choi J S, Jung Y J, Cho Y W. *J Mater Chem B*, 2013, 2(2): 201~209.
- [14] Xie X, Tian J K, Lv F Q, Wu R, Tang W B, Luo Y K, Huang Y Q, Tang J. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(7): 983~988.
- [15] Hu W Q, Liu M, Yang X S, Zhang C, Zhou H Y, Xie W G, Fan L H, Nie M. *Carbohydr Polym*, 2019, 206: 468~475.
- [16] Le T P, Lee Y, Nguyen D H, Park K D. *J Mater Chem B*, 2017, 4(5): 757~764.
- [17] Lee Y, Bae J W, Oh D H, Park K M, Chun Y W, Sung H J, Park K D. *J Mater Chem B*, 2013, 1(18): 2407~2414.
- [18] Kim S H, Lee S H, Lee J E, Park S J, Kim K, Kim I S, Lee Y S, Hwang N S, Kim B G. *Biomaterials*, 2018, 178: 401~412.
- [19] Chen T H, Embree H D, Brown E M, Taylor M M, Payne G F. *Biomaterials*, 2003, 24(17): 2831~2841.
- [20] Mcdermott M K, Chen T H, Williams C M, Markley K M, Payne G F. *Biomacromolecules*, 2004, 5(4): 1270~1279.
- [21] Gu Z P, Huang K, Luo Y, Zhang L, Kuang T, Chen Z, Liao G. *Wires Nanomed Nanobi*, 2018, 10e: 1520.
- [22] Gaspar A L C, de Góes-Favoni, Silvana P. *Food Chem*, 2015, 171: 315~322.
- [23] Crescenzi V, Francescangeli A, Taglienti A. *Biomacromolecules*, 2002, 3(6): 1384~1391.
- [24] Lv F, Cong X N, Tang W S, Han Y M, Tang Y, Liu Y R, Su L Q, Liu M Y, Jin M F, Yi Z F. *Sci China Life Sci*, 2017, 4: 67~73.
- [25] Yamamoto S, Akira Hirata. *Graef Arch Clin Exp*, 2013, 251(4): 1109~1114.
- [26] Li S D, Wang J W, Song L F, Song L F, Zhou Y L, Zhao J, Hou X, Yuan X B. *Biomed Mater*, 2016, 12(1): 015012.
- [27] Pan J f, Yuan L, Guo C A, Geng X H, Fei T, Fan W S, Li S, Yuan H F, Yan Z Q, Mo X M. *J Mater Chem B*. 2014, 2(47): 8346~8360.
- [28] Bouten P J M, Zonjee M, Bender J, Yauw S T K, Goor H, Jan C M, Richard H. *Prog Polym Sci*, 2014, 39(7): 375~405.
- [29] Zhao H, Heindel N D. *Pharm Res-Dordr*, 1991, 8(3): 400~402.
- [30] Peters G M, Skala L P, Davis J T. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(1): 134~139.
- [31] Zhou J J, Defante A P, Lin F, Xu Y, Yu J Y, Gao Y H, Childers E, Dhinojwala A, Becker M L. *Biomacromolecules*, 2015, 16(1): 266~274.
- [32] Berillo D, Elowsson L, Kirsebom H. *Macromol Biosci*, 2012, 12: 1090~1099.
- [33] Berillo D, Volkova N. *J Mater Sci*, 2014, 49(14): 4855~4868.
- [34] Huaping T, Marra K G. *Materials*, 2010, 3: 1746~1767.
- [35] Zhu C H, Lei H, Fan D D, Duan Z G, Li X, Li Y, Gao J, Wang S S, Yu Y Y. *J Mater Sci*, 2018, 53(3): 5909~5928.
- [36] Cohen B, Pinkas O, Foox M, Zilberman M. *Acta Biomater*, 2013, 9(11): 9004~9011.
- [37] Hu B H, Messersmith P B. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(47): 14298~14299.

Transglutaminase Enhanced Gelatin-based Adhesives

LI Yang, LIU Xin-yu, LI Si-di, ZHAO Jin^{*}, HOU Xin, YUAN Xu-bo

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

Abstract: Because of their good biocompatibility, gelatin-based adhesives are widely used in the field of tissue engineering, but their adhesive ability still needs to be improved. In this paper, the oxidized dextran and gelatin formed one cross-linking network through Schiff base reaction, while enzymatic cross-linking reaction between transglutaminase and gelatin formed another cross-linking network. The formation of the double cross-linking network can enhance the bulk strength of gelatin adhesive. The properties of the adhesive were characterized by vial inversion, swelling, compression, lap shear, etc. The modified gelatin-based adhesive's gelation time was suitable for injection, and the obtained gel showed a lower swelling ratio. The adhesive's compression modulus was up to 33.6kPa, which is 4 times that of unmodified gelatin. And the bonding strength of adhesive was up to 25.9kPa, it is 12 times that of unmodified gelatin. The performance of gelatin-based adhesives has been improved.

Key words: Gelatin; Hydrogel adhesive; Transglutaminase; Oxidized dextran; Double crosslinked network