

# 负载蛋白质的胶原/聚两性电解质 IPN 角膜替代物

梁爽, 杨建海, 刘贵培, 刘文广  
(天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072)

**摘要** 以碳二亚胺/*N*-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)和聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)为交联剂分别对猪皮去端肽 I 型胶原和 3-(甲基丙烯酰胺)丙基-二甲基(3-磺丙)胺(MPDSA)进行交联, 制备了具有互穿聚合物网络(IPN)结构的角膜替代物. 胶原基 IPN 角膜替代物的折光指数和白光透过率与天然人角膜相似. IPN 水凝胶具有优于纯胶原凝胶的力学性能, 同时 PMPDSA 网络的引入明显提高了 IPN 凝胶在胶原酶中的稳定性. 体外细胞培养实验结果表明, IPN 角膜替代物支持人角膜上皮细胞生长. 通过冷冻干燥-溶胀后包覆技术可将牛血清白蛋白(BSA)和神经生长因子(NGF)装载到角膜替代物中, 负载药物的冻干凝胶可干态保存, 避免了湿态下蛋白质等活性因子的失活和漏泄; 再吸水恢复原状的特性可使角膜替代物完好地移植病灶部位, NGF 具有良好的缓释效果. 此负载 NGF 的复合角膜替代物有望促进角膜组织和神经的再生.

**关键词** 去端肽胶原; 角膜替代物; 互穿聚合物网络; 水凝胶; 神经生长因子

**中图分类号** O631 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2010)04-0821-08

目前, 角膜疾病的治疗方法主要以同种异体角膜移植为主, 但角膜供体来源匮乏. 更为严重的是, 人口的老龄化和激光矫正视力手术的实施使可移植的角膜供体量进一步减少. 因此, 研制角膜替代物的工作尤为重要. 胶原作为天然细胞外基质的成分, 广泛用于构建组织工程细胞外基质<sup>[1,2]</sup>. I 型胶原占角膜干重的 71%, 具有特异分子识别信号, 可调控细胞行为, 介导种子细胞的黏附和增长<sup>[3]</sup>. Griffith 等<sup>[4-6]</sup>研制了多种碳二亚胺/*N*-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)交联的胶原基角膜替代物, 其形态、透明性与正常人角膜相似, 植入小型猪 12 个月后, 观察到上皮细胞的重建和角膜神经的再生. 但对于圆锥形角膜、酸碱烧伤角膜及糖尿病性角膜等金属基质蛋白酶或胶原酶分泌过高的情况<sup>[7]</sup>, 单纯 EDC/NHS 交联的胶原角膜替代物降解会更快, 无法完成最终的修复目的. Liu 等<sup>[8]</sup>将 EDC/NHS 交联的胶原与聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)交联的 2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)形成 IPN 凝胶, MPC 聚合物网络的引入明显提高了 IPN 凝胶在胶原酶中的稳定性. 一年以上的小型猪角膜移植同样显示较好的修复效果. 但 MPC 极易吸潮, 且磷酸基团容易水解<sup>[9]</sup>.

近年来, 国内外科人员在组织工程角膜替代物的研究中取得了令人鼓舞的成果<sup>[10~12]</sup>, 但目前研究的角膜替代物均缺乏促进神经再生的功能. 而神经对于维持角膜健康是非常重要的, 当角膜失去敏感性后, 容易受到伤害, 同时并发炎症和溃疡. 异体移植的角膜其神经再生通常需要 5~10 年时间, 在某些情况下中心角膜保持未神经化. 尤其是对于带有单纯疱疹 I 型病毒(HSV-1)的病人, 病毒将导致上皮细胞破坏甚至造成神经破坏, 没有 HSV 病史的人移植角膜后也发现 HSV, 这是由于后期上皮细胞的缺损造成的<sup>[13]</sup>.

鉴于此问题, 本文将构建猪皮去端肽 I 型胶原-聚两性电解质互穿聚合物网络角膜替代物. 去端肽胶原可消除端肽存在的免疫原位点<sup>[14]</sup>; 3-(甲基丙烯酰胺)丙基-二甲基(3-磺丙)胺(MPDSA)属于磺酸型电解质, 其生物相容性良好<sup>[15]</sup>, 它与 MPC 都具有抑制非特异性蛋白吸附的性能<sup>[16,17]</sup>, 且 MPDSA 的结构和性质比 MPC 稳定, 不易吸潮水解<sup>[18]</sup>. 交联 PMPDSA 网络的引入可抑制胶原网络的快速降解, 采用凝胶后包裹技术, 低温条件下水凝胶包覆一定浓度的神经生长因子(NGF), 构建具有生

收稿日期: 2009-06-30.

基金项目: 国家“八六三”计划项目(批准号: 2007AA03Z430)、国家自然科学基金(批准号: 50973082)和天津市自然科学基金(2010)资助.

联系人简介: 刘文广, 男, 博士, 教授, 主要从事软湿材料和非病毒转基因载体的研究. E-mail: wgliu@tju.edu.cn

物活性的复合角膜替代物,期望 NGF 缓慢释放,达到促进神经突的生长和角膜的再生的目的<sup>[19~21]</sup>,且凝胶冷冻干燥再溶胀吸附 NGF 过程未使用任何有机溶剂,避免了生长因子的失活。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

猪皮去端肽 I 型胶原(医用级,颗粒状, I 型胶原含量 >95%, 分子量 300000)购自日本 Meat Packers 公司; 3-(甲基丙烯酰胺)丙基-二甲基(3-磺丙)胺(MPDSAH)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、异硫氰酸荧光素牛血清白蛋白(FITC-BSA)和小鼠神经生长因子(NGF)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA, 平均分子量  $M_n = 575$ )购于瑞士 Fluka 公司; 小鼠神经生长因子- $\beta$  ELISA 试剂盒(美国 A&D 公司)。其它试剂均为分析纯。

### 1.2 胶原/MPDSAH IPN 水凝胶的制备

取质量分数为 13.7% 的胶原溶液 0.4 g 加入到注射器内,并通过 T 型连接另一注射器密封,用微量注射器按比例移入相应体积的 90% (质量体积分数) MPDSAH 水溶液、50% (质量体积分数)的 PEGDA 水溶液和 10% (质量体积分数)的 Irgacure2959 乙醇溶液,在 0 °C 冰水浴中反复推拉注射器,使其混合均匀,其中,  $m(\text{胶原}):m(\text{MPDSAH}) = 3:1$ ,  $m(\text{MPDSAH}):m(\text{PEGDA}) = 2:1$ ,  $n(\text{Irgacure2959}):n(\text{MPDSAH}) = 1:25$ 。

取 10 mg EDC 和 6 mg NHS 溶于 50  $\mu\text{L}$  蒸馏水中,用微量注射器取 20  $\mu\text{L}$  EDC/NHS 混合水溶液注入上述的胶原/MPDSAH 混合溶液中,其中  $n(\text{EDC}):n(\text{NHS}):n(\text{胶原氨基}) = 1:1:1$ ,在 0 °C 冰水浴中混合均匀。用适量的 2 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 5.5,以利于 EDC/NHS 反应。混合均匀后,立即将其转移至有机玻璃板(10 cm  $\times$  10 cm  $\times$  0.5 mm)或塑料模具(厚 500  $\mu\text{m}$ , 直径 12 mm)中,放置于紫外固化箱(XL-1000, 美国 Spectronics 公司)内固化 40 min。然后在 100% 湿度的条件下室温反应 16 h,移入到 37 °C 烘箱内熟化 5 h。打开模具取出凝胶样品放入 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH = 7.4)中浸泡,每隔 12 h 更换新鲜的 PBS,清洗 7 d 后,将样品放入含有 1% (质量分数)氯仿的 PBS 中,于 4 °C 下保存备用。

同样,按照上述方法可以制备 IPN2-1, IPN1-1, IPN1-2 和 IPN1-3 水凝胶,其中胶原与 MPDSAH 的质量比分别为 2:1, 1:1, 1:2 和 1:3,其它成分的比例保持不变。作为对照实验的纯胶原水凝胶是在没有 MPDSAH/PEGDA 的条件下,以相同的方法用 EDC/NHS 交联制得,EDC/NHS/胶原氨基的摩尔比为 1:1:1,样品命名为 Coll。

### 1.3 NGF-水凝胶的制备

将冷冻干燥后的凝胶薄片浸入 500  $\mu\text{L}$  浓度为 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 NGF-BSA [ $m(\text{NGF}):m(\text{BSA}) = 1:300$ ] 溶液中,于 4 °C 下平衡 3~4 d,以保证角膜替代物溶胀至完全恢复形变,凝胶用 PBS 快速冲洗以去除吸附在凝胶表面的 NGF-BSA。

### 1.4 样品的表征

采用傅里叶转换红外光谱仪(Spectrum100 Perkin Elmer)测定经冷冻干燥处理的 IPN 干凝胶样品的红外吸收光谱。将水凝胶样品浸泡在蒸馏水中,每 12 h 更换一次蒸馏水,冲洗 7 d。取出吸去表面的水分,用液氮淬冷,于 -50 °C 下冷冻干燥 48 h,得到多孔的凝胶薄片。喷金 3 min 处理后,用扫描电镜(XL30ESEM, Philips)观察样品的形貌。

### 1.5 力学性能和光学性能测试

通过电子拉力机(LLY206B, 莱州电子仪器有限公司)测试水凝胶薄片的抗张强度、模量和断裂伸长率。水凝胶薄片厚 0.5 mm,测试之前在磷酸盐缓冲液(PBS, pH = 7.4)中平衡,并且切割成 20 mm  $\times$  2 mm 的矩形条。每个水凝胶样品的实际测试长度为 10 mm,拉伸速度为 10 mm/min。每个样品重复实验 3 次。

将水凝胶样品在 PBS 缓冲液中平衡,采用紫外-可见分光光度计(TU-1810, 北京普析通用有限公司),固定波长 500 nm,于 25 °C 下测试样品的白光透过率。采用阿贝折射仪(WAY-2S, 上海精密仪器

科学有限公司), 以溴代萘为标准溶剂, 于 25 °C 下测试水凝胶样品的折光指数.

### 1.6 平衡含水量的测试

将水凝胶样品在 PBS 缓冲液中浸泡至溶胀平衡, 滤去多余的水分, 用滤纸吸干水凝胶表面的水分, 用电子天平称重, 记为该水凝胶样品的湿重, 将已知质量的水凝胶冷冻干燥, 记取水凝胶样品的干重. 用下式计算样品的平衡含水量:

$$\text{平衡含水量}(\%) = [(W_t - W_0) / W_t] \times 100\%$$

式中,  $W_t$  为水凝胶在 PBS 缓冲液中达到溶胀平衡时的质量,  $W_0$  为冻干后凝胶的质量.

### 1.7 体外酶解实验

将 50 ~ 80 mg 的凝胶样品放入 5 mL PBS (pH = 7.4) 中, 加入 60  $\mu$ L 1 mg/mL 的胶原酶溶液, 将样品放入 37 °C 培养箱内, 每隔不同时间将凝胶取出, 吸去表面的水, 称重.

凝胶的残余质量按下式计算: 残余质量 (%) =  $W_t / W_0 \times 100\%$ , 式中,  $W_0$  和  $W_t$  分别为初始和  $t$  时刻凝胶的质量.

### 1.8 体外生物相容性评价

将正方形凝胶片浸泡在 75% 乙醇中, 在紫外灯下灭菌 30 min 后, 再浸入 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培养基中置换出乙醇. 然后将凝胶片移至 48 孔细胞培养板中, 每孔加入 300  $\mu$ L 的永生化人角膜上皮细胞悬液接种于凝胶表面, 接种密度为  $1.67 \times 10^4$  个/孔, 置于 37 °C, 5% (体积分数) CO<sub>2</sub> 培养箱中培养. 培养 1, 3, 5, 7 d 后, 在 AxioVert 显微镜 (放大 10 倍) 下观察细胞在凝胶支架上黏附及生长情况, 每个凝胶片取 3 个平行孔进行照相, 以未加水凝胶样品的细胞培养板作为空白对照. 用 Northern Eclipse 软件计算细胞生长的速率.

### 1.9 体外释放

取负载 FITC-BSA 的水凝胶样品, 用 0.5 mL PBS 冲洗以去除表面的 FITC-BSA, 放入 0.5 mL PBS 中, 于 37 °C 培养箱中保存, 每 24 h 将释放液取出, 同时补充新鲜的 PBS 缓冲液, 收集的释放液于 4 °C 下保存, 用酶标仪 (BIO-TEK, 美国) 测定释放液的荧光强度 (激发波长 490 nm, 发射波长 520 nm), PBS 作为空白对照, 每一样品连续测定 3 次, 取其平均值. 释放曲线由 FITC-BSA 的累积释放量为纵坐标, 以释放时间为横坐标得到.

取负载 NGF-BSA 的胶原水凝胶样品, 用 500  $\mu$ L PBS 冲洗以去除表面的 NGF, 放入 500  $\mu$ L PBS 中, 于 37 °C 培养箱中保存, 每 24 h 将释放液取出, 同时补充新鲜的 PBS 缓冲液, 收集的释放液于 -20 °C 下保存, 用 Sandwich ELISA 试剂盒在酶标仪上测定释放的 NGF 浓度.

## 2 结果与讨论

### 2.1 水凝胶的结构表征

图 1 为纯胶原凝胶和不同的 IPN 水凝胶样品的红外光谱图. 由谱线  $a$  可以看出, 纯胶原凝胶在  $3300 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$  处存在 N—H 伸缩振动吸收峰, 在  $1660 \text{ cm}^{-1}$  处存在酰胺上 C=O 伸缩振动吸收峰, 在  $1438 \text{ cm}^{-1}$  处存在 —CH<sub>2</sub>— 或 —CH<sub>3</sub>— 弯曲振动吸收峰. 由谱线  $d$  可以看出, 交联 MPDSAHA 的特征峰包括  $3300 \sim 3500 \text{ cm}^{-1}$  处的酰胺上 N—H 伸缩振动吸收峰,  $1726 \text{ cm}^{-1}$  处酯键的 C=O (交联剂 PEGDA) 伸缩振动吸收峰,  $1642 \text{ cm}^{-1}$  处的酰胺上 C=O (单体 MPDSAHA) 伸缩振动吸收峰,  $1535 \text{ cm}^{-1}$  处的酰胺上 N—H 弯曲振动吸收峰,  $1175 \text{ cm}^{-1}$  处的 S=O 不对称伸缩振动吸收峰,  $1035 \text{ cm}^{-1}$  处的 S=O 对称伸缩振动吸收峰<sup>[18]</sup>. 通过对比发现, 不同比例的胶原-MPDSAHA IPN 水凝胶含有纯胶原凝胶和 PMPDSAHA 的两种特征吸收峰, 证明在光引发剂 Irgacure2959 引发下, 合成了胶原-MPDSAHA 互穿聚合物网络. 红外光谱证实 IPN 的形成<sup>[22,23]</sup>.

图 2 为 PMPDSAHA 和经胶原酶处理过的 IPN1-1 和 IPN1-3 凝胶的全反射红外光谱图. 由图 2 可见, 经胶原酶处理过的 IPN1-1 和 IPN1-3 凝胶的特征峰与 PMPDSAHA 的特征峰完全吻合, 证明胶原-MPDSAHA 凝胶经胶原酶降解后, 在较短的时间内胶原网络被彻底破坏, 降解产物分子量相对较小, 从凝胶主体中溶出, 而 MPDSAHA/PEGDA 网络不受胶原酶的影响. 进一步验证了胶原-MPDSAHA 互穿聚合

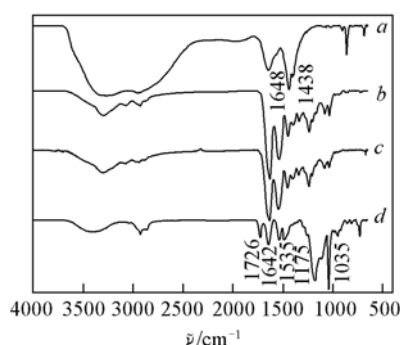


Fig. 1 FTIR spectra of hydrogels

a. Pristine collagen hydrogel; b. IPN1-1 hydrogel;  
c. IPN1-3 hydrogel; d. PMPDSAH.

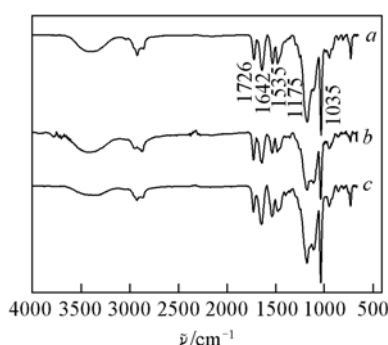


Fig. 2 FTIR spectra of collagenase treated hydrogels

a. PMPDSAH; b. collagenase treated IPN1-3 hydrogel; c. collagenase treated IPN1-1 hydrogel.

物网络的形成.

## 2.2 角膜替代物的物理性能

表 1 列出了凝胶样品的光学性能和平衡含水量数据. 由表 1 可见, 所有凝胶样品的含水量均在 90% ~ 95% 之间, 大于人角膜的含水量, 较高的含水量将有利于氧气和营养物质的渗透. 折光指数均在 1.35 附近, 比人角膜基质折光指数 (1.373 ~ 1.380)<sup>[24]</sup> 略低. 可能是胶原基 IPN 水凝胶在制备过程中胶原微观有序结构降低, 导致折光率较低. 从表 1 可以看出, 白光透过率均大于 85%, 与人角膜相比性能较好. 其中纯胶原凝胶的白光透过率可达到 90%, 而胶原-MPDSAH IPN 凝胶白光透过率均低于纯胶原凝胶, 且 MPDSAH 含量越高白光透过率越低. PMPDSAH 是两性聚电解质, 由于季铵基团和磺酸根—SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 相互吸引, 导致高分子疏水性增加, 使之在溶液中的溶解度下降, 凝胶的透光率降低<sup>[25]</sup>. 另一方面, 两性聚电解质的分子结构中可离子化基团的离子化程度与外部溶液的环境密切相关, 凝胶在 PBS 缓冲液中受小分子盐的屏蔽作用, 破坏了阴阳离子基团间的静电引力, 分子链不断伸展, 这是典型的反聚电解质行为<sup>[26]</sup>. 也是 PMPDSAH 网络的存在没有很大程度地减低凝胶透光率的原因.

Table 1 Physical properties of hydrogels

Sample	White light transmission (%)	Refractive index	Water content (%)
Coll	90.0 ± 1.0	1.3506 ± 0.0021	91.08 ± 0.78
IPN3-1	87.6 ± 1.1	1.3585 ± 0.0031	92.14 ± 0.40
IPN2-1	86.4 ± 0.7	1.3570 ± 0.0033	92.45 ± 0.34
IPN1-1	88.9 ± 1.8	1.3556 ± 0.0031	94.37 ± 0.42
IPN1-2	85.6 ± 1.4	1.3475 ± 0.0041	90.24 ± 0.44
IPN1-3	85.4 ± 0.9	1.3586 ± 0.0024	92.57 ± 0.74
Human cornea	87	1.373—1.380	78

原凝胶的白光透过率可达到 90%, 而胶原-MPDSAH IPN 凝胶白光透过率均低于纯胶原凝胶, 且 MPDSAH 含量越高白光透过率越低. PMPDSAH 是两性聚电解质, 由于季铵基团和磺酸根—SO<sub>3</sub><sup>-</sup> 相互吸引, 导致高分子疏水性增加, 使之在溶液中的溶解度下降, 凝胶的透光率降低<sup>[25]</sup>. 另一方面, 两性聚电解质的分子结构中可离子化基团的离子化程度与外部溶液的环境密切相关, 凝胶在 PBS 缓冲液中受小分子盐的屏蔽作用, 破坏了阴阳离子基团间的静电引力, 分子链不断伸展, 这是典型的反聚电解质行为<sup>[26]</sup>. 也是 PMPDSAH 网络的存在没有很大程度地减低凝胶透光率的原因.

图 3 为不同类型凝胶的拉伸强度、断裂伸长率和杨氏模量的比较. 由图 3 可见, IPN 凝胶的拉伸断裂强度明显高于纯胶原凝胶, 其中 IPN1-3 的拉伸强度 (0.571 MPa) 约为纯胶原凝胶 (0.230 MPa) 的 2 倍多. 胶原-MPDSAH 互穿聚合物网络中两网络间存在氢键和离子对间的相互作用, 由此加强了两相之间的内聚力, 从而使材料的拉伸强度增加<sup>[27,28]</sup>. IPN 凝胶的断裂伸长率整体上高于纯胶原凝胶, 但变化不是很明显. 在 IPN 水凝胶的制备过程中, 加入 MPDSAH 和 PEGDA 水溶液和交联剂, 导致原溶液稀释, 增加了交联点间的距离, 从而导致断裂伸长率的增加. 虽然 IPN 水凝胶的拉伸强度低于天然人角膜 [(3.81 ± 0.40) MPa], 但对于体内移植来说, 已经满足缝合的要求.

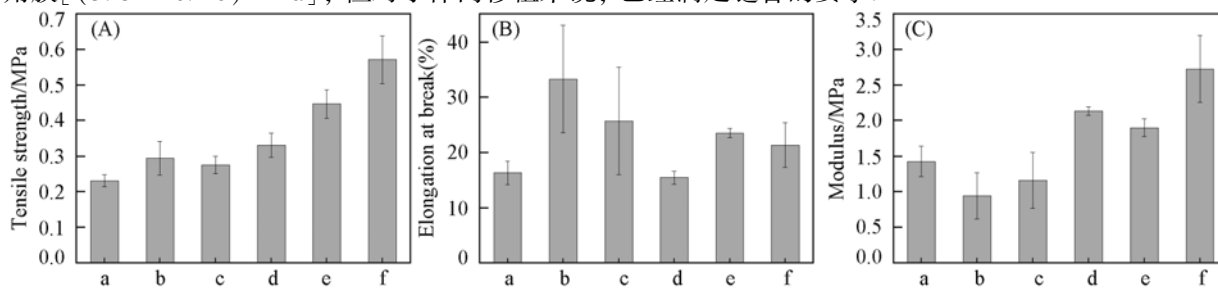


Fig. 3 Tensile strength (A), elongation at break (B) and modulus (C) of the hydrogels

a. Collagea; b. IPN3-1; c. IPN2-1; d. IPN1-1; e. IPN1-2; f. IPN1-3.

胶原/MPC 互穿聚合物网络用于角膜替代物的相关研究已有报道<sup>[8]</sup>, 且被证实 IPN 技术能有效提高胶原基角膜替代物的抗张强度, 但与 MPDSAHA 相比, MPC 极易吸潮, 且磷酸酯基容易水解, 存在不稳定性. MPDSAHA 结构和性质比 MPC 稳定, 不易吸潮水解, 而且具有抑制抗菌吸附性能, 生物相容性良好. 因此, 从这一方面考虑, MPDSAHA 具有更大的优势.

### 2.3 体外胶原酶降解

体外胶原酶降解以凝胶的剩余质量分数随时间的变化关系来表示. 通常, 纯胶原凝胶在高浓度胶原酶溶液中降解较快(图 4), EDC/NHS 交联的纯胶原凝胶在 9 h 内能够完全降解. 由图 4 还可看到, 与纯胶原凝胶相比, 胶原-MPDSAHA IPN 凝胶的抗胶原酶降解能力明显增强, 而且随着 MPDSAHA 比例的增加, 材料在胶原酶中的稳定性增强(图中只给出 50 h 的降解数据). 其中, IPN1-2 凝胶在开始 9 h 内只降解了约 25%, 30 d 后完全降解(图中未给出); IPN1-3 凝胶在开始 9 h 内只降解了约 15%, 40 d 能够完全降解(图中未给出). 这充分证明了 MPDSAHA/PEGDA 第二网络的引入明显提高了 IPN 凝胶在胶原酶中的稳定性. 由于胶原和 PMPDSAHA 高分子网络同时互穿、缠结, 胶原酶只能与表面的胶原充分接触, 使其较快降解, 而凝胶内部的胶原受到 PMPDSAHA 网络的保护, 降解较慢, 因为胶原酶分子需要适当的空间攻击胶原分子链才能使其降解.

### 2.4 人角膜上皮细胞在 IPN 水凝胶表面的生长情况

图 5 为人角膜上皮细胞在 IPN 水凝胶表面生长情况的显微镜照片, 对照组为细胞培养板. 在接种

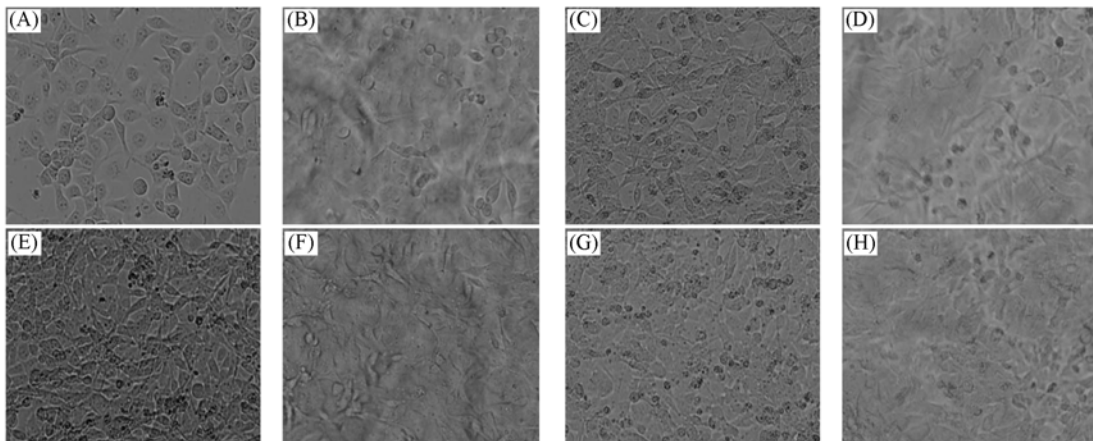


Fig. 5 Human corneal epithelial growth on hydrogel surface

Control post-seedig: (A) 1 d, (C) 3 d, (E) 5 d, (G) 7 d; IPN1-3 hydrogel post-seedig: (B) 1 d, (D) 3 d, (E) 5 d, (H) 7 d.

初期少量细胞贴附在凝胶表面, 24 h 后贴附细胞数量明显增加, 细胞伸展呈不规则多角形或椭圆形, 培养 7 d 后细胞几乎完全融合, 排列紧凑, 表明胶原-MPDSAHA IPN 凝胶可以较好地支持人角膜上皮细胞的生长和增殖, 但看起来细胞密度仍低于对照组. 图 6 为角膜上皮细胞密度随时间变化关系. 由图 6 可以看出, IPN1-3 凝胶在每个时间段内的细胞密度均较明显地低于对照组, 这是由于聚两性电解质 PMPDSAHA 具有抑制蛋白吸附和细胞贴附的能力<sup>[29]</sup>.

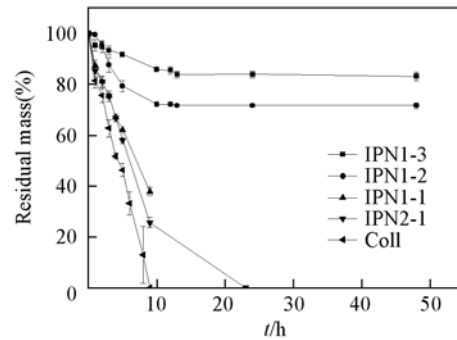


Fig. 4 *In vitro* biodegradation of hydrogels in collagenase

图 5 为人角膜上皮细胞在 IPN 水凝胶表面生长情况的显微镜照片, 对照组为细胞培养板. 在接种

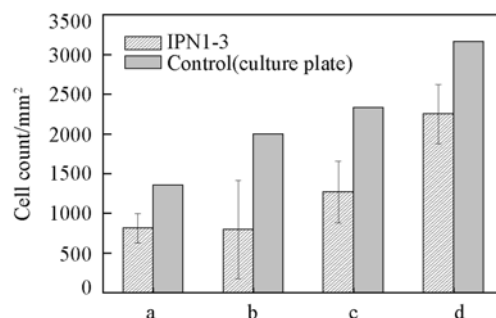


Fig. 6 Cell density of human corneal epithelia on IPN hydrogel surface

a. 1 d; b. 3 d; c. 5 d; d. 7 d.

## 2.5 蛋白质在水凝胶中的包载

胶原/PMPDSAH 互穿聚合物网络凝胶支架的微结构是影响角膜再生重建的关键因素之一. 采用液氮淬冷干燥方法, 可以使水凝胶的孔洞结构得到较好的保持. 由图 7 可以看到, 交联胶原凝胶冻干后紧密有序, 呈现相互连接、交错排列的多孔状结构, 孔径在  $50 \sim 150 \mu\text{m}$  之间变化, 这种微孔结构有利于细胞和组织的长入和药物、生长因子的装载. 同样, IPN 水凝胶冻干后也呈现相似的尺寸均匀的网络结构, 无团聚及相分离, 说明胶原网络与 PMPDSAH 高分子链均匀互穿. 从冻干水凝胶和吸水再溶胀后的照片(图 8)可以看出, 冻干后的凝胶吸水后仍然可以恢复原有的角膜形状, 且表面光滑, 与未冻干的角膜替代物基本相同. 说明凝胶冻干再溶胀包载药物后, 可干态保存, 避免了湿态下蛋白质等活性因子的失活和漏泄; 再吸水恢复原状的特性可使角膜替代物完好地移植病灶部位.

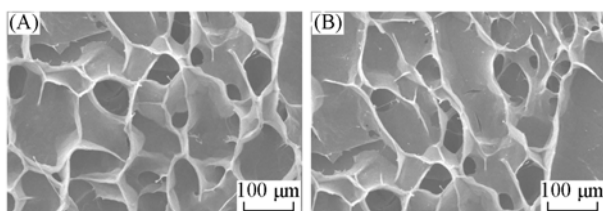


Fig. 7 SEM images of freeze-dried collagen hydrogel (A) and IPN1-3 hydrogel (B)

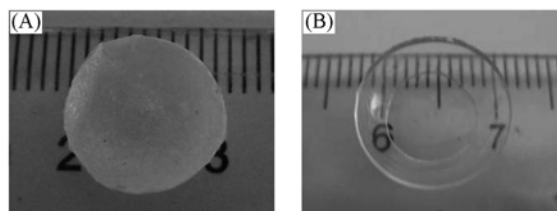


Fig. 8 Pictures of freeze-dried (A) and reswollen corneal substitutes (B)

用牛血清白蛋白 (BSA) 作为模型药物考察胶原基凝胶的吸附能力. 将凝胶冻干后再溶胀吸附 FITC-BSA, 用倒置荧光显微镜观察 FITC-BSA 在凝胶中的分布. 从图 9 可以看出, 在荧光显微镜下, 未吸附 FITC-BSA 的凝胶没有任何荧光, 而吸附 FITC-BSA 的凝胶 (释放前) 能够激发出绿色荧光, BSA 均匀地分布在凝胶内, 释放 28 d 的凝胶同样也有绿色荧光激发出, 但荧光强度明显减弱, 表明 BSA 的释出. 凝胶在冷冻干燥后具有三维多孔结构, 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  溶胀过程中实现对蛋白质药物包裹, 这种凝胶后包裹技术<sup>[30]</sup> 不涉及任何有机溶剂, 不仅可以提高载药量, 同时低温对保持蛋白质的生物活性非常有利. 当凝胶达到水平衡时, 孔径缩小, 蛋白质药物即被包埋在其中. 由于未使用任何有机溶剂或高温处理, 原则上未被包裹的生长因子溶液可以再次使用, 以节约成本.

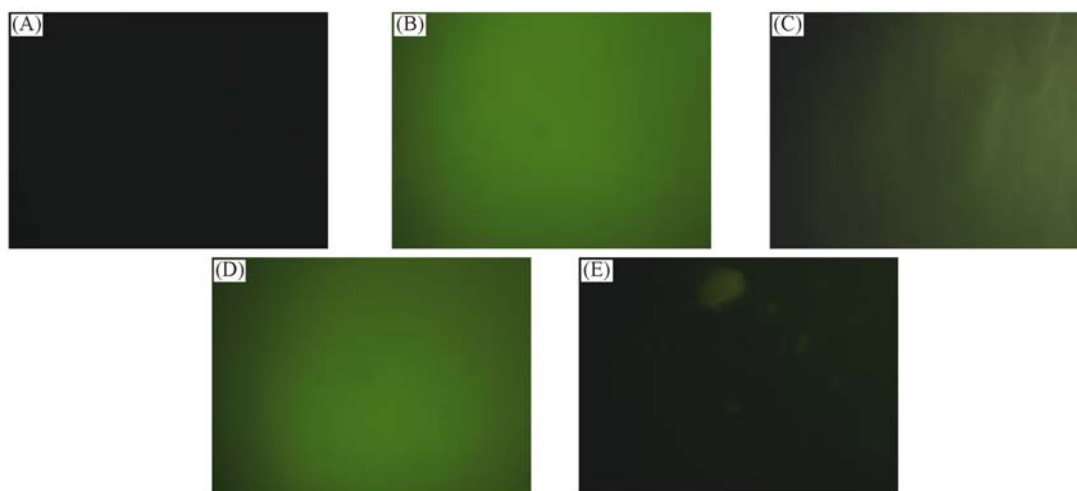


Fig. 9 Fluorescence microscope images of BSA-hydrogels

(A) Blank hydrogel; (B) FITC-BSA collagen hydrogel (before release); (C) FITC-BSA collagen hydrogel at 28 d after release; (D) FITC-BSA IPN1-3 hydrogel (before release); (E) FITC-BSA IPN1-3 hydrogel at 28 d after release.

## 2.6 水凝胶的载药量和包封率

图 10 显示了不同状态凝胶对 BSA 的载药量和包封率的影响. 可以看出, 冻干后的凝胶比湿态的凝胶对 BSA 的吸附能力更强, 原因在于冷冻干燥后的凝胶具有三维多孔结构, 比表面积大, 有利于 BSA 溶液的扩散和吸附. 胶原-MPDSAH IPN 凝胶的蛋白质吸附能力普遍弱于纯胶原凝胶, 而且随着 MPDSAH 比例的增加, 凝胶对蛋白质吸附能力减弱, IPN1-3 凝胶的载药量与纯胶原凝胶相比已经减少

了近 1/3. PMPDSAHA 属于磺酸型聚甜菜碱类两性电解质, 其分子链中存在季铵基团和磺酸根 $-\text{SO}_3^-$ , 是一类典型的电解质响应性高分子. Kourosh 等<sup>[31]</sup>研究了磺酸型聚甜菜碱的电解质响应行为, 结果表明, 在一定范围内随着 NaCl 的不断加入, 小分子电解质对相反电荷屏蔽的作用使聚甜菜碱的分子链不断伸展. 当 IPN 凝胶浸在 BSA 溶液中时, PBS 对 PMPDSAHA 的电荷屏蔽作用, 使带负电的磺酸根 $-\text{SO}_3^-$ 裸露在外侧, 与带负电的 BSA 相互排斥, 从而在一定程度上抑制了 BSA 的吸附. 28 d 的释放结果显示, BSA 从纯胶原、IPN3-1 和 IPN1-3 凝胶中的累积释放量分别为 53.9%, 59.2% 和 65.6%.

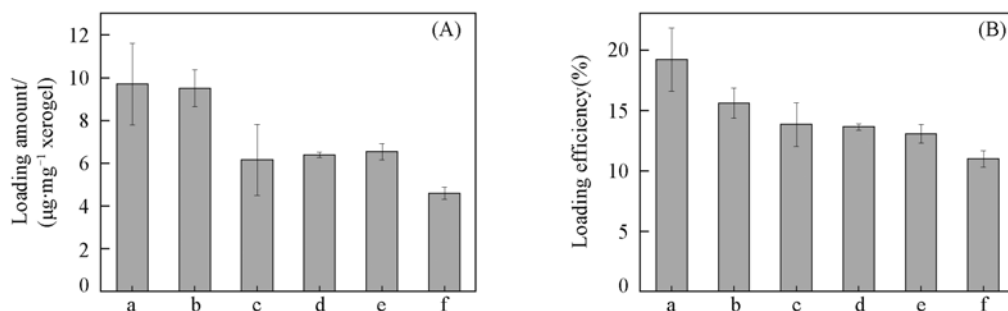


Fig. 10 Loading amount (A) and loading efficiency (B) of BSA in hydrogels

Xerogel: a. collagena; b. IPN3-1; c. IPN2-1. Hydrogel: d. IPN1-1; e. IPN1-2; f. IPN1-3.

## 2.7 NGF-水凝胶的体外释放行为

通过对比实验发现, 角膜替代物进行冷冻干燥处理后具有更强的吸附能力, 有效地提高了凝胶的载药量和包封率. 由此, 选用冷冻干燥处理的凝胶包裹 NGF, 初步研究其体外释放行为.

图 11 为冻干凝胶包覆 NGF 后的释放曲线. 可以看出, IPN1-3 凝胶对 NGF 的释放速度快于纯胶原凝胶. 释放溶液的 pH 为 7.4, 大于 NGF 的等电点, 此时 NGF 带负电荷, 同样存在与 PMPDSAHA 的静电排斥作用. 22 d 后 NGF 的总释放量不到 10%, 导致这种差异性的原因可能是 NGF 半衰期短, 部分 NGF 变性所致; 另一原因是 NGF 紧密地结合到高分子网络内, 抑制了其外释. 但这种方法仍然高于微球包载 NGF 的释放率. 我们曾用反相乳液法将 NGF 包载到胶原微凝胶内, 然后将装载 NGF 的微凝胶包在角膜替代物内, 将此复合物角膜置于 PBS 中观测 NGF 释放行为, 研究结果发现, 最终仅有 0.01% 的 NGF 被释放出来. 本文报道的冻干凝胶后溶胀包裹技术的 NGF 释放效率远远高于微球包载技术.

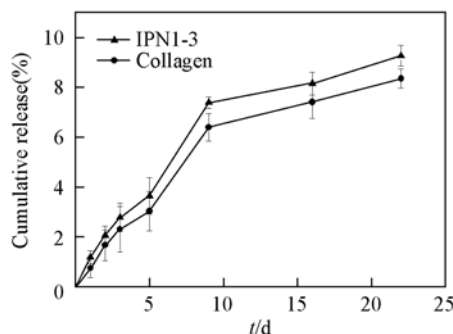


Fig. 11 NGF release from freeze-dried hydrogels

## 3 结 论

分别以碳二亚胺和聚乙二醇二丙烯酸酯为交联剂, 对胶原和 3-(甲基丙烯酰胺)丙基-二甲基(3-磺丙)胺(MPDSAHA)进行交联, 形成胶原/磺酸型聚两性电解质 IPN 结构的水凝胶, 在模具中可制成具有与人角膜相似大小和曲率的角膜替代物. 该角膜替代物的白光透过率、力学性能和热性能基本达到角膜组织工程支架材料的要求. PMPDSAHA 的引入提高了角膜替代物的力学强度. 通过调节胶原与 MPDSAHA 的比例实现水凝胶生物降解的可控性. 体外细胞培养实验结果表明, IPN 角膜替代物能够支持人角膜上皮细胞的黏附和增殖. 通过冷冻干燥-溶胀后包裹技术将牛血清白蛋白和神经生长因子装载到角膜替代物中, 此复合角膜替代物具有缓释蛋白质的功能.

## 参 考 文 献

- [1] Duan X. D., McLaughlin C., Griffith M., et al. Biomaterials[J], 2007, 28(1): 78—88
- [2] Zhong S. P., Teo W. E., Zhu X., et al. Biomacromolecules[J], 2005, 6(6): 2998—3004
- [3] Newsome D. A., Foidart J. M., Hassell J. R., et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. [J], 1981, 20(6): 738—750



- [ 4 ] Liu Y. , Gan L. , Carlsson D. J. , *et al.* . Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. [J] , 2006 , **47**(5) : 1869—1875
- [ 5 ] Liu Y. , Griffith M. , Watsky M. A. , *et al.* . Biomacromolecules[J] , 2006 , **7** : 1819—1828
- [ 6 ] Liu W. , Merrett K. , Griffith M. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2008 , **29** : 1147—1158
- [ 7 ] Garrana R. M. , Zieske J. D. , Assouline M. , *et al.* . Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. [J] , 1999 , **40**(6) : 1266—1270
- [ 8 ] Liu W. , Deng C. , McLaughlin C. R. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2009 , **30**(8) : 1551—1559
- [ 9 ] Wang D. A. , Williams C. G. , Li Q. A. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2003 , **24**(22) : 3969—3980
- [ 10 ] CHEN Lie-Huan(陈列欢) , LIU Wan-Shun(刘万顺) , HAN Bao-Qin(韩宝芹) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2006 , **27**(5) : 880—884
- [ 11 ] Zhang Y. Q. , Zhang W. J. , Liu W. , *et al.* . Tissue Eng. : Part A[J] , 2008 , **14** : 295—303
- [ 12 ] Lawrence B. D. , Marchant J. K. , Pindrus M. A. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2009 , **30**(7) : 1299—1308
- [ 13 ] Rezende R. A. , Uchoa U. B. C. , Raber I. M. , *et al.* . Am. J. Ophthalmol. [J] , 2004 , **137**(3) : 415—419
- [ 14 ] Lynn A. K. , Yannas I. V. , Bonfield W. . J. Biomed. Mater. Res. Part B; Appl. Biomater. [J] , 2004 , **71**(2) : 343—354
- [ 15 ] Dai F. Y. , Wang P. F. , Liu W. G. , *et al.* . Polymer[J] , 2008 , **49** : 5322—5328
- [ 16 ] Ladd J. , Zhang Z. , Chen S. F. , *et al.* . Biomacromolecules[J] , 2008 , **9**(5) : 1357—1361
- [ 17 ] Chang Y. , Chen S. F. , Zhang Z. , *et al.* . Langmuir[J] , 2006 , **22** (5) : 2222—2226
- [ 18 ] Cho W. K. , Kong B. Y. , Choi I. S. . Langmuir[J] , 2007 , **23** (10) : 5678—5682
- [ 19 ] Bhang S. H. , Lee T. J. , Lim J. M. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2009 , **30**(1) : 126—132
- [ 20 ] Lambiase A. , Manni L. , Bonini S. , *et al.* . Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. [J] , 2000 , **41**(5) : 1063—1069
- [ 21 ] Jhaveri S. J. , Hynd M. R. , Dowell-Mesfin N. , *et al.* . Biomacromolecules[J] , 2009 , **10**(1) : 174—183
- [ 22 ] Mandal B. B. , Kapoor S. , Kundu S. C. . Biomaterials[J] , 2009 , **30**(14) : 2826—2836
- [ 23 ] Zhao Y. , Kang J. , Tan T. W. . Polymer[J] , 2006 , **47** : 7702—7710
- [ 24 ] Patel S. , Marshall J. , Fitzke F. W. . J. Refract. Surg. [J] , 1995 , **11**(2) : 100—105
- [ 25 ] Kourosh K. , Sara F. D. . Polym. Adv. Technol. [J] , 2005 , **16** : 659—666
- [ 26 ] Mary P. , Bendejacq D. D. , Labeau M. P. , *et al.* . J. Phys. Chem. B[J] , 2007 , **111**(27) : 7767—7777
- [ 27 ] Han Y. A. , Lee E. M. , Ji B. C. . Fibers and Polymers[J] , 2008 , **9**(4) : 393—399
- [ 28 ] Myung D. , Waters D. , Wiseman M. , *et al.* . Polym. Adv. Technol. [J] , 2008 , **19**(6) : 647—657
- [ 29 ] Kong B. , Choi J. S. , Jeon S. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2009 , **30**(29) : 5514—5522
- [ 30 ] Zhang Y. , Zhu W. , Wang B. B. , *et al.* . J. Controlled Release[J] , 2005 , **105**(3) : 260—268
- [ 31 ] Kourosh K. , Sara F. D. . Polym. Adv. Technol. [J] , 2005 , **16** : 659—666

## Corneal Substitutes of Protein-loaded Collagen/Polyzwitterion IPN

LIANG Shuang, YANG Jian-Hai, LIU Gui-Pei, LIU Wen-Guang\*

(School of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

**Abstract** Collagen/polyzwitterion IPN based corneal substitutes were fabricated by crosslinking porcine type I atelocollagen and *N*-[3-(methacryloylamino) propyl]-*N,N*-dimethyl-*N*-(3-sulfopropyl) ammonium hydroxide (MPDSAH) with 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide and poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA), respectively. The white light transmission and refractive indices of IPN corneal substitutes were similar to those of natural human cornea. IPN hydrogels had superior mechanical properties and collagenase resistance compared to pristine collagen hydrogels. Human corneal epithelia grew well on the surface of IPN hydrogel. Bovine serum albumin (BSA) and nerve growth factor (NGF) were efficiently encapsulated in corneal substitute by freeze-drying and re-swelling, and drug-embedded xerogels could be stored in dry state, avoiding the denaturation and leakage of active factors in wet state. It is expected that the completely shape-recovered corneal substitutes after re-swelling can be implanted into diseased site. BSA and NGF were found to release from IPN hydrogel in a sustainable manner. NGF-loaded composite corneal substitute shows promise in promoting the regeneration of corneal tissue as well as nerve.

**Keywords** Atelocollagen; Corneal substitute; Interpenetrating polymer network; Hydrogel; Nerve growth factor

(Ed.: W, Z)