

光交联丝素蛋白水凝胶的制备及生物医学应用

李祥明, 王增凯, 董明东, 刘磊

(江苏大学材料科学与工程学院新材料研究院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 水凝胶是一类物理化学性质接近软组织的先进材料, 已有众多聚合物用于水凝胶的制备。丝素蛋白由于具有优异的生物相容性、生物可降解性和易于制备成各种形式的材料等优点, 在生物医学领域中具有广泛的应用, 其中水凝胶是丝素蛋白在生物医学中应用的重要形式。由于分子的独特结构, 丝素蛋白可以通过多种方法形成水凝胶。近年来, 光交联水凝胶由于具有制备条件温和、副产物少、反应过程容易控制等优点, 逐步成为研究的热点。首先对丝素蛋白的分子结构和特性进行了介绍, 总结了丝素蛋白水凝胶的制备方法, 重点阐述了光交联丝素蛋白水凝胶的研究现状, 并讨论了它们在生物医学领域的应用, 最后对光交联丝素蛋白水凝胶未来发展方向进行了展望。

关键词: 丝素蛋白; 光交联; 水凝胶; 生物材料; 生物医学应用

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2020)06-0421-09

Photocrosslinkable Silk Fibroin Hydrogels and Biomedical Application

LI Xiangming, WANG Zengkai, DONG Mingdong, LIU Lei

(Institute for Advanced Materials, School of Materials Science and Engineering, Jiangsu University,
Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Hydrogels are a kind of advanced materials with physical and chemical properties close to soft tissues. Many polymers have been used in the preparation of hydrogels. Silk fibroin has been widely used in biomedical application due to excellent biocompatibility, biodegradability and facility to fabricate into different types of materials. Hydrogel is an important form for silk fibroin in biomedical application and can be constructed by different approaches. Recently, the photocrosslinkable hydrogels have attracted enormous attention due to the impressive advantages such as mild preparation conditions, less by-product and excellent controllability. In this review, firstly, we present the molecular structure and characteristics of silk fibroin. Subsequently, the preparation methods of silk fibroin hydrogels are summarized. Furthermore, the preparation strategies of photocrosslinkable silk fibroin hydrogels are emphatically reviewed, and their applications in the biomedical field are discussed. Finally, the future research of the photocrosslinkable silk fibroin hydrogels is prospected.

Key words: silk fibroin; photocrosslinkable; hydrogel; biomaterial; biomedical application

1 前言

水凝胶是通过物理或/和化学交联的三维网络结构, 是一类高度模拟软组织特性的材料, 能够吸收高达自身重量 70% 的水分。此外, 水凝胶具有细胞外基质 (ECM)

的特性, 能够为细胞的活动和组织的形成提供稳定的微环境, 在药物释放与组织工程等方面具有广泛的应用^[1]。目前用于制备水凝胶的聚合物有很多, 包括合成聚合物和天然聚合物, 其中天然聚合物因具有生物相容性好、免疫反应低和可生物降解等优点^[2-4], 被广泛应用于组织工程和药物递送等领域。

蚕丝是蚕在结茧时吐出来的天然蛋白质纤维 (图 1a)^[5], 主要由约 70% 的丝素蛋白和 30% 的丝胶蛋白组成, 在纺织业中的使用已经有几千年的历史, 作为手术缝线也已有很长的时间^[6]。作为一种天然聚合物, 丝素蛋白具有众多优点, 如来源丰富、生物相容性好、力学性能优异、可生物降解以及可化学改性等^[7]。近年来,

收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-03-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21573097); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (51503087)

第一作者: 李祥明, 男, 1993 年生, 硕士研究生

通讯作者: 刘磊, 男, 1981 年生, 教授, 博士生导师,

Email: liul@ujs.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202003008

研究者对不同形式的丝素蛋白基材料在生物医学方面的应用开展了广泛的研究,包括凝胶^[8]、膜^[9]、纤维^[10]、管^[11]、海绵^[12]和微球^[13]等(图 1b)^[14]。其中,水凝胶是丝素蛋白基材料的重要形式之一。丝素蛋白独特的分子结构,使得能够通过多种方法将其制备为水凝胶,这些水凝胶具有众多可调控的性能,并已在生物医学领域取得了广泛应用。其中,光交联丝素蛋白水凝胶由于制备

条件温和、副产物少、反应过程容易控制,引起了研究者的关注。本文对光交联丝素蛋白水凝胶的制备方法与应用进行了综述。首先介绍丝素蛋白的制备、结构和性质,然后阐述光交联丝素蛋白水凝胶的制备方法及其在生物医学领域中的应用,充分展示光交联丝素蛋白水凝胶的特点与优势,并讨论了未来的发展方向。

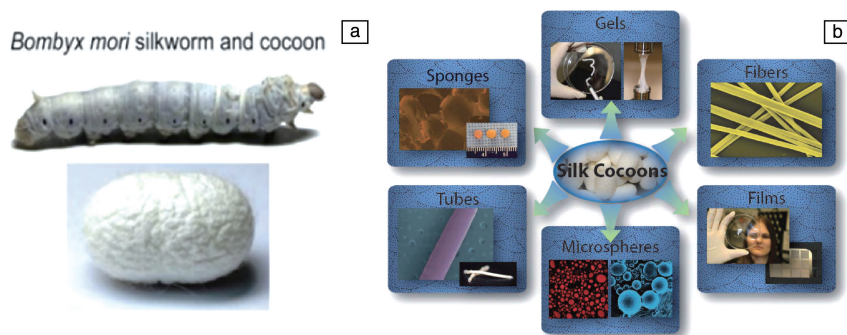


图 1 家养桑蚕及其结出来的茧(a)^[5]; 用蚕茧中丝素蛋白加工成的凝胶、纤维、膜、微球、管和海绵等众多形式的材料(b)^[14]
Fig. 1 Bombyx mori silkworm and cocoon(a)^[5]; Various materials such as gels, fibers, films, microspheres, tubes and sponges processed by silk fibroin extracted from silkworm cocoons(b)^[14]

2 丝素蛋白分子的结构和特性

目前在生物医学领域研究最为广泛的是家养的桑蚕丝,桑蚕丝由芯部的丝素蛋白(silk fibroin, SF)纤维和包覆在丝素蛋白纤维表面的丝胶蛋白组成(图 2a)^[5]。桑蚕丝在使用前往往先将 SF 纤维外层包裹的丝胶蛋白去除(称作脱胶)(图 2a)^[5],脱胶普遍采用的方法是将蚕茧浸泡在一定浓度的碳酸钠沸水中煮特定的时间,脱胶时间是影响 SF 分子质量的关键因素^[14],因此必须严格控制。为了得到再生 SF 水溶液,需要对脱胶后的 SF 纤维进行进一步溶解(图 2a)^[5]。常用的方法是将脱胶后的 SF 纤维溶解在 9.3 mol/L 的溴化锂(LiBr)水溶液和摩尔比为 1:2:8 的氯化钙-乙醇-水三元体系中进行处理,并进一步在去离子水中透析 3 d 左右,然后离心或过滤以去除杂质,便可得到再生 SF 水溶液^[14, 15]。

SF 是构建 SF 基材料的基元。它主要由重链和轻链构成,其中轻链的相对分子质量仅为 26 kDa,而重链的相对分子质量则高达 390 kDa,它们通过二硫键连接在一起,另外还有一种含量较少的糖蛋白(P25)以疏水作用的方式与重链和轻链相结合^[5],三者复合形成胶束单元,在蚕的纺丝腺体内流动,最终在多种因素的协同作用下形成 SF 纤维^[16-18]。在 SF 分子的组成上,轻链由非重复性且亲水性较高的氨基酸序列组成,而重链则含有较多重复性的疏水氨基酸序列,包括甘氨酸-丙氨酸-甘氨酸-

丙氨酸-甘氨酸-丝氨酸(GAGAGS)和甘氨酸-丙氨酸/丝氨酸/酪氨酸(G-A/S/T)二肽序列,这些疏水性较强的序列形成 12 个结晶区域并与亲水性的非结晶区序列交替分布形成一整条重链^[5, 19](图 2b)。其中,甘氨酸含量较高的重复序列可以在众多因素(如温度、甲/乙醇、剪切力、金属离子和 pH 等)的诱导下形成疏水性较强的反平行 β -折叠纳米结晶区域^[20, 21],利用 SF 的这一特性,外部诱导可以使 SF 分子构象由无定形结构向 β -折叠结构转变,从而形成交联网络,这是制备 SF 基水凝胶常用方法的基本原理。

SF 纤维有着优异的力学性能,这一方面得益于结晶区内 β -折叠结构在纳米空间上存在的限制;另一方面, SF 纤维具有明显的层级结构,这种基于 β -折叠自组装形成的层级结构(图 2c)对增强 SF 纤维的力学性能同样起到至关重要的作用^[22, 23]。 β -折叠在 SF 基材料力学性能上也扮演了重要的角色, β -折叠含量不同,材料的力学性能也有所不同。为此,很多研究者尝试通过不同方式处理 SF 基材料,以调控材料内部 β -折叠的含量。例如,室温退火能够诱导 30% 的 β -折叠形成,而高压蒸汽处理能得到含量大约为 60% 的 β -折叠^[24]。此外,采用 SF 制备的材料具有可降解的特性^[25]。研究表明,这种降解性能受材料内 β -折叠含量的影响,因此可以通过控制 β -折叠的含量来调控材料的降解性能^[26, 27]。值得注意的是,富含 β -折叠的 SF 基材料并不像阿尔兹海默症中通过 β -折

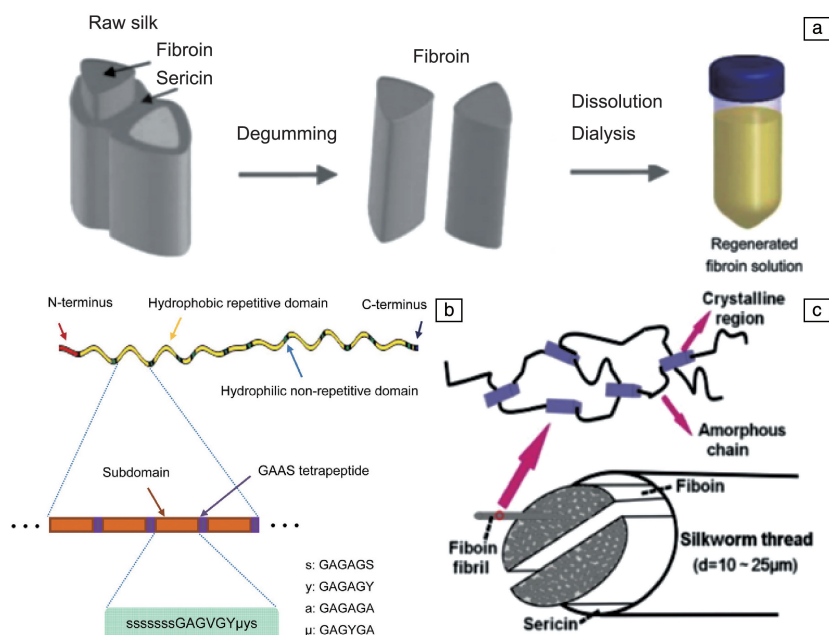


图2 蚕丝纤维的宏观结构和再生丝素蛋白水溶液的制备过程(a)^[5]; 丝素蛋白重链的分子结构(b)^[5]; 蚕丝纤维的层级结构(c)^[22]
 Fig.2 Macrostructure of silk fiber and preparation process of regenerated silk fibroin aqueous solution (a)^[5]; Molecular structure of the heavy chain of silk fibroin (b)^[5]; The hierarchical structure of silk fibers (c)^[22]

叠组装的淀粉样多肽聚集体有着致病性^[28]。研究结果表明, SF 基材料具有很好的生物相容性, 早在 1993 年就被美国食品和药物管理局(FDA)批准作为生物材料使用^[29-31]。

3 丝素蛋白基水凝胶的制备方法

由于具有良好的生物相容性, SF 在生物材料中得到了广泛使用, 尤其是 SF 基水凝胶更受青睐。根据聚合物组成的不同, SF 基水凝胶可以分为纯 SF 水凝胶和共聚 SF 水凝胶。纯 SF 水凝胶指参与水凝胶形成的聚合物组分只有 SF, 而共聚 SF 水凝胶指除了 SF 以外还有其他聚合物组分。参与 SF 共聚的聚合物通常包括聚乙二醇(PEG)^[32]和聚乙烯醇(PVA)^[33]等合成聚合物, 以及蛋白质^[34]和多糖^[35]等天然聚合物。对于一些特殊的应用环境, 单一组分制备的水凝胶表现出来的性能往往无法满足实际应用的需求, 因此通过与其它材料复合来调控它们的性能成为有效的解决方案。SF 与其他聚合物组分通过共混制备的复合水凝胶, 能够实现 SF 与其他聚合物性能之间的互补, 从而得到性能增强的材料。

根据交联机制, 可以将 SF 基水凝胶分为物理交联水凝胶和化学交联水凝胶。物理交联 SF 基水凝胶是指参与水凝胶形成的聚合物链通过非共价键相互作用形成交联网络, 如氢键、静电作用和疏水相互作用等^[36]。SF 分子结构中交替排列的重复序列具有较强的疏水性, 在外界因素作用下易发生疏水区域的自组装, 形成 β -折

叠结构的物理交联网络。常用的物理交联手段包括升高温度^[37]、旋流处理^[38]和超声处理^[39]等。物理交联时间普遍较长, 且由于分子之间形成 β -折叠限制了聚合物链的移动, 得到的水凝胶虽然强度较高但是通常较脆。化学交联 SF 基水凝胶是指参与水凝胶形成的聚合物链之间形成了共价键交联^[40], 这种方法通常包括交联剂交联、酶交联和光交联。其中, 交联剂交联是一种简便的化学交联方法, 戊二醛和京尼平是常用的水凝胶交联剂, 它们能够与蛋白质分子链上的侧基反应生成共价键。SF 分子链侧基上含有较多活性官能团, 如羟基、羧基和氨基等, 可以为这些交联剂化学交联提供活性位点^[41, 42]。但是需要注意的是, 戊二醛等交联剂可能存在毒性, 当这些交联剂制备的水凝胶用作医用材料时, 如果它们从水凝胶内释放到周围组织中, 可能对机体产生毒性^[4]。对于化学交联的 SF 基水凝胶, 研究者又发展出了酶交联和光交联 SF 基水凝胶。酶交联是一种更绿色安全的方法, 其凝胶化能够在体温、中性 pH 和水溶液环境下进行。这种温和的方法有利于细胞和一些不稳定活性分子的包埋, 而且可以实现前驱液可注射的原位凝胶化。酶交联法虽然具有众多优点, 但是也有很多不足, 如凝胶时间较长、酶容易失活, 从而导致交联形成凝胶的效率下降等。与酶交联相比, 光交联不仅具有制备条件温和、副产物少、生物相容性好的优点, 还克服了酶交联耗时长的缺点, 同时这种高效率的交联方式还具有较高的可控性。

4 光交联丝素蛋白基水凝胶

4.1 光交联体系及其优势

光交联 SF 基水凝胶的制备机理主要源于自由基引发链聚合反应。光引发剂在吸收光源的能量后形成自由基, 攻击预聚物上面的活性基团, 受攻击的活性基团之间发生化学反应从而形成聚合物链之间的交联。光引发交联制备水凝胶通常包括 3 个要素: 光源、光引发剂和带有活性基团的预聚物。光源通常包括紫外光(200~400 nm)和可见光(400~800 nm), 其中紫外光使用较为广泛, 但其可能对 DNA 造成破坏并导致细胞死亡^[43], 因此, 人们渐渐避免使用紫外光, 改用可见光引发交联, 减少可能造成的损害。

在选择光引发剂时, 需要考虑光引发剂产生的自由基的潜在细胞毒性, 特别是应用于生物医药方面时需要尤为注意^[44]。自由基聚合光引发剂因其优异的生物相容性得到了广泛的应用, 其中 Irgacure 2959 具有适度的水溶性、低的细胞毒性和相对较小的免疫原性等优点, 因此被普遍使用在紫外光引发聚合中。此外, 一些引发效率高、生物相容性好和水溶性更好的光引发剂, 如苯基-2,4,6-三甲基苯甲酰基膦酸锂(LAP)和偶氮引发剂 VA-068 也逐渐进入人们的视野并得到应用^[45]。与此同时, 为了避免使用紫外光聚合造成的潜在危害, 可见光下构建的交联系统引起了人们的注意。与紫外光相比, 可见光具有更高的安全性, 同时在可见光下使用的光引发剂如曙红 Y 和樟脑醌等具有相对更低的细胞毒性和更高的水溶性^[45, 46]。因此, 在可见光下构建的交联系统用于医用材料中更凸显优势。然而, 在比紫外光能量低的可见光下交联, 固化速率可能会变慢^[47]。

带有活性基团的预聚物是制备光交联水凝胶的另一个必备要素。预聚物的活性基团是指在光交联过程中, 经光引发剂作用后能够发生化学反应并使聚合物发生交联的官能团。这些官能团可以是聚合物分子自身携带的, 也可以是额外修饰的, 主要起交联作用。预聚物的选择决定了最终水凝胶的很多关键性能, 如降解性能和力学性能等。例如, 同样采用紫外光交联的体系, 以合成聚合物聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)制备的水凝胶和天然蛋白质甲基丙烯酸甲酯化明胶(GelMA)制备的水凝胶在降解性能和力学性能方面都存在明显差异。

与其他的交联方式相比, 光驱动聚合物交联形成水凝胶的方法具有众多优点。首先, 通过光源的开关, 能够很容易地实现聚合反应的开始和终止; 其次, 可以通过精确调节光剂量来实现材料功能的可调性; 此外, 能够实现对曝光时间和空间的精确控制, 从而达到对材料整体或局部

生物学性能的调控; 最后, 光驱动聚合能够在体内以一种非入侵的方式进行, 具有良好的生物医学应用前景^[47]。

4.2 光交联丝素蛋白基水凝胶的制备方法

基于以上优点, 近年来研究人员做了大量的工作, 试图将光交联方法与 SF 的特性结合, 制备出性能出众的水凝胶。按照光交联体系中所使用的光源, 可以将光交联 SF 基水凝胶分为紫外光交联 SF 基水凝胶和可见光交联 SF 基水凝胶。

4.2.1 紫外光交联丝素蛋白基水凝胶

紫外光驱动制备水凝胶在很多聚合物中都有研究, 如 PEGDA、GelMA 和透明质酸(MeHA)等^[48-50]。这些紫外光交联系统的共同特点是利用光引发剂形成的自由基攻击聚合物分子上的乙烯基团, 随后乙烯基团间进一步反应, 促使聚合物分子间形成化学键, 最终形成水凝胶^[51]。乙烯基团间反应形成的共价键在交联的过程中起到了重要的作用, 明胶和透明质酸等天然聚合物中修饰的乙烯基, 也是起到同样的交联作用。

对于 SF 来说, 尽管在早期就有研究将乙烯基团接枝到脱胶 SF 纤维表面^[52, 53], 但是在 SF 分子链上进行修饰的研究并不多, 而且相关水凝胶的研究也鲜有报道。因此, 制备紫外光交联 SF 基水凝胶经常采用的策略是将没有紫外光交联能力的 SF 与具有紫外光交联能力的其他聚合物进行共混, 制备半互穿网络(semi-IPN)水凝胶和互穿网络(IPN)水凝胶。半互穿网络水凝胶是指当有两种或两种以上的聚合物共混制备水凝胶时, 若只有其中一种聚合物发生交联形成聚合物网络, 而其他聚合物只是简单地分布在这些网络之间, 则会形成半互穿网络水凝胶。若每种聚合物交联得到单独的网络并交织在一起, 则会形成互穿网络水凝胶^[33]。在半互穿网络水凝胶的研究中, Kunda 等制备出了光交联的聚乙烯醇(PVA)/SF 半互穿网络水凝胶, 经甲基丙烯酸异氰基乙酯修饰后 PVA 具有光交联的能力, 将其与 SF 共混并经紫外光引发聚合, 便会形成半互穿网络水凝胶。其中能够在紫外光下交联的 PVA 形成自己单独的网络, SF 不具备交联能力, 便会分布在 PVA 形成的网络之间^[33]。在互穿网络水凝胶的研究中, Xiao 等将 GelMA 与 SF 共混制备出了 GelMA 和 SF 分别独立交联的双网络水凝胶。GelMA 是明胶经甲基丙烯酸酐修饰后的产物, 具有紫外光交联能力, GelMA 在紫外光和光引发剂 Irgacure 2959 存在的条件下发生交联, 形成化学交联的明胶网络, 随后将其暴露于甲醇溶液中, 诱导 SF 形成 β -折叠结构的物理交联网络, 两个网络交织在一起形成互穿网络水凝胶(图 3)。与 GelMA/SF 形成的半互穿网络水凝胶相比, 这种互穿网络水凝胶在机械强度和降解性能方面都有大幅度的改

善^[34]。但是用于包载细胞等活性物质时, 往往要避免使用有机溶剂。因此, 研究者在此基础上进一步改进方法, 采用超声而非甲醇处理的方法诱导 SF 形成 β -折叠网络, 从而避免有机溶剂对细胞等活性物质的损伤。此外, 采用改进方法制得的 GelMA/SF 互穿网络水凝胶显示出高溶胀率、优异的力学性能以及对胶原酶促降解的抵抗能力^[54]。互穿网络水凝胶具有单一聚合物网络无法呈现

的性能, 可以通过调控聚合物的比例实现对材料性能的调控, 这被称为协同增益现象, 在其它研究中有类似报道^[55, 56]。因此, 利用紫外光引发交联制备的 SF 互穿网络水凝胶, 不仅能够实现光驱动体系下 SF 参与水凝胶的制备, 而且能够实现 SF 和其他聚合物之间性能的互补, 达到意想不到的增益效果, 这一思路在 SF 水凝胶开发中具有巨大的潜力。

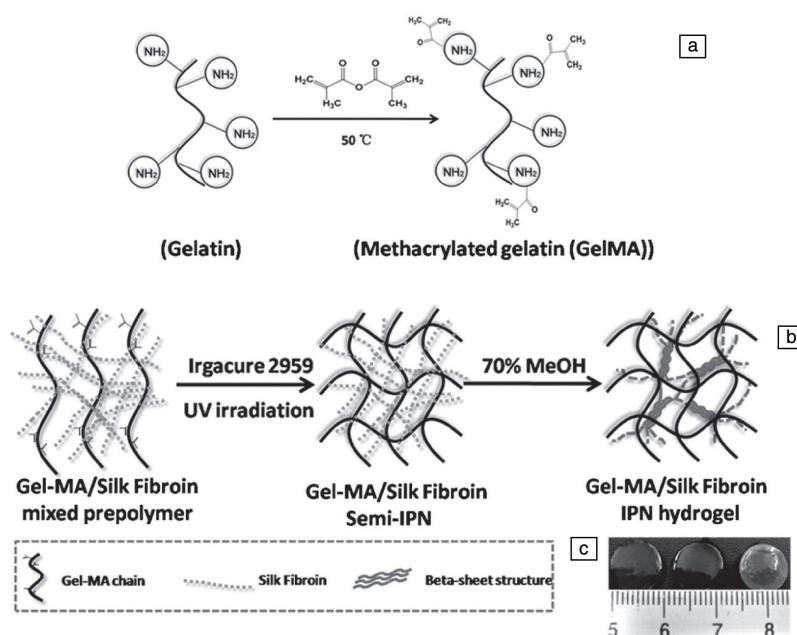


图3 改性明胶(a)和 GelMA/SF 互穿网络水凝胶(b)制备示意图; GelMA 水凝胶、GelMA/SF-1 半互穿网络水凝胶和 GelMA/SF-1 互穿网络水凝胶(从左往右)的光学照片(c)^[34]

Fig. 3 Schematic diagram of preparation of gelatin methacrylate (a) and GelMA/SF IPN hydrogel (b); Representative optical images of GelMA, GelMA/SF-1 semi-IPN and GelMA/SF-1 IPN hydrogel (from left to right) (c)^[34]

最近, 在 SF 分子链上修饰乙烯基团进行光交联水凝胶制备的研究取得进展。Kim 等在 SF 溶解的过程中, 将甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)单体加入到溶解 1 h 的 SF/LiBr 混合液中, 然后在 60 °C 下搅拌 3 h 后进行透析和冻干, 即可得到乙烯基团修饰的 SF 分子(图 4a 和 4b)^[57]。整个修饰过程在水溶液中完成, 不使用有机溶剂, 绿色环保。为了增加 SF 修饰时的稳定性和修饰后的水溶性, 他们首先降解 SF, 然后将降解的 SF 溶解于氯化锂/二甲基亚砜中, 随后加入甲基丙烯酸异氰基乙酯并在氮气保护下实现了乙烯基团在 SF 分子上的修饰。修饰后的 SF 在磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲液)中显示出很好的溶解性, 制备得到的水凝胶展现出很好的弹性和触变性^[58]。此外, 他们利用 3D 打印技术将修饰后的 SF 水溶液作为打印墨水, 实现了各种器官的高分辨率打印。利用光引发交联提高水凝胶的稳定性, 打印出来的三维结构水凝胶具有较高的分辨率(图 4c)和优异的回弹性(图 4d)^[57]。除 SF 分子修饰外, 有研究报道在 SF 纳米/微米颗粒上修

饰乙烯基团。将这些修饰后的颗粒与修饰了乙烯基团的壳聚糖共混, 在紫外光下进行共聚, 实现光交联 SF 水凝胶的制备^[59], 成功在 SF 分子上修饰乙烯基团, 使得单独的 SF 在紫外光下能够交联形成水凝胶网络, 这将丰富光交联 SF 水凝胶的制备方法和拓宽 SF 水凝胶的应用范围。

除了以上方法外, 利用核黄素在紫外光下交联 SF 也被研究者报道。核黄素是一种天然的光引发剂, 其光交联是非特异性的, 在很多材料如 PEG、胶原蛋白和藻酸盐的交联中均有应用。Kuang 等将核黄素和辣根过氧化物酶(HRP)添加到 SF 水溶液中, 并向反应体系中持续通入氧气, 在紫外光照下, 核黄素被激发产生活性氧自由基, 这些活性氧自由基能够与 SF 分子上的氨基和苯酚基等作用, 最终引发 SF 交联形成水凝胶。这种水凝胶具有很好的弹性和透明度, 在细胞培养中展现出优异的细胞相容性。虽然该方法避免了 SF 上的修饰, 制备的水凝胶也具有一定的优异特性, 但是这种方法形成水凝胶的时间相对较长(大约 30 min), 仍有很大的改进空间^[60]。

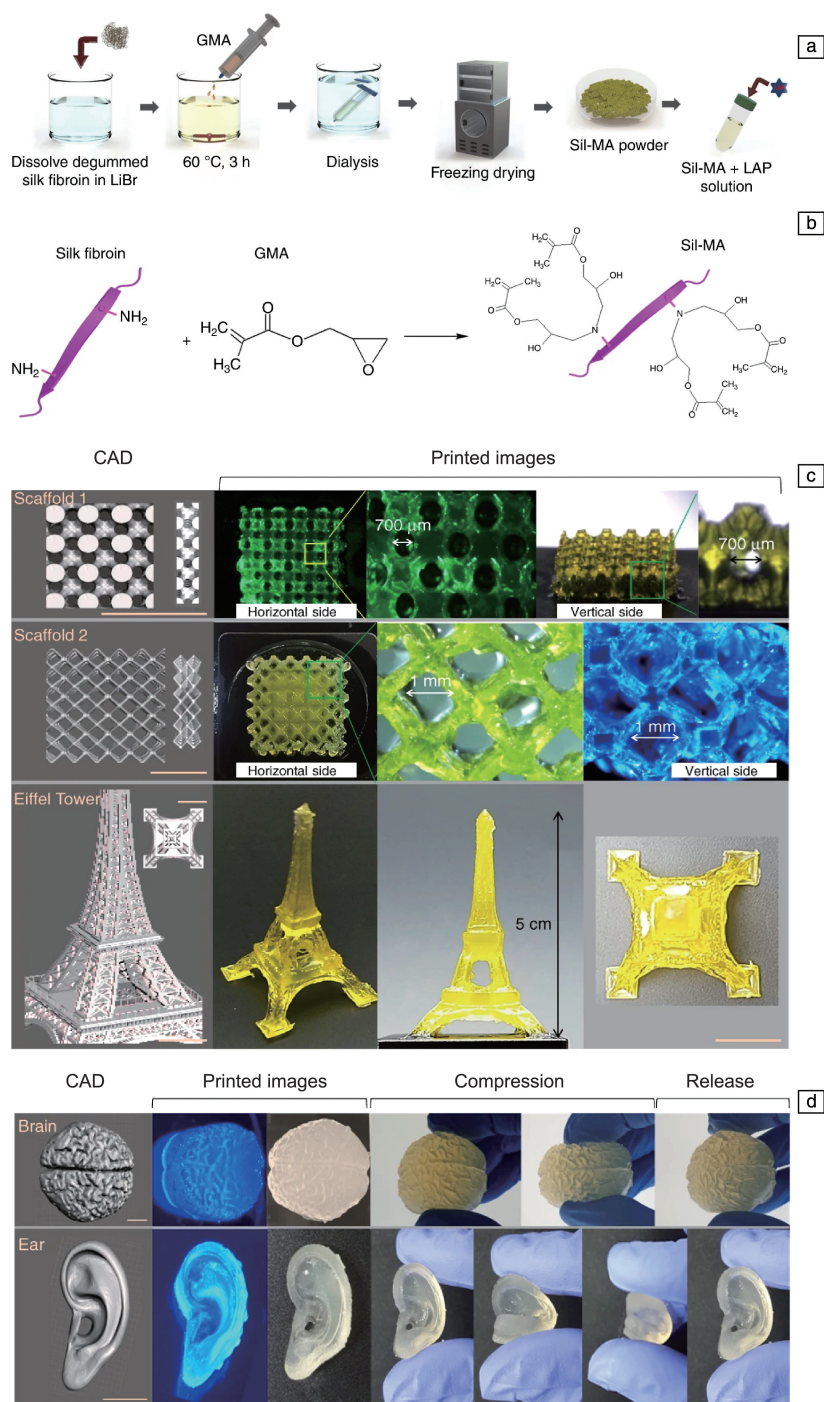


图 4 GMA 改性 SF 的制备(a); GMA 改性 SF 分子的示意图(b); 3D 打印的三维结构 SF 水凝胶具有较高的分辨率(c)和优异的回弹性(d)^[57]

Fig. 4 Preparation of GMA modified SF (a); Schematic diagram of modification of SF molecule with GMA (b); 3D printed three-dimensional structure SF hydrogels with high resolution (c) and excellent resilience (d)^[57]

4.2.2 可见光交联丝素蛋白水凝胶

与紫外光驱动的光交联 SF 基水凝胶相比,可见光交联 SF 水凝胶的报道相对较少。Whittaker 等提出了在可见光(452 nm)下钌介导 SF 交联形成水凝胶的方法,在该体

系下,钌作为催化剂,过硫酸铵充当电子受体,在可见光下形成的中间体使得 SF 分子上的酪氨酸被氧化并发生相互间的反应,形成二酪氨酸交联(图 5)。研究结果表明,利用该方法制备出的水凝胶在完全吸水的情况下表

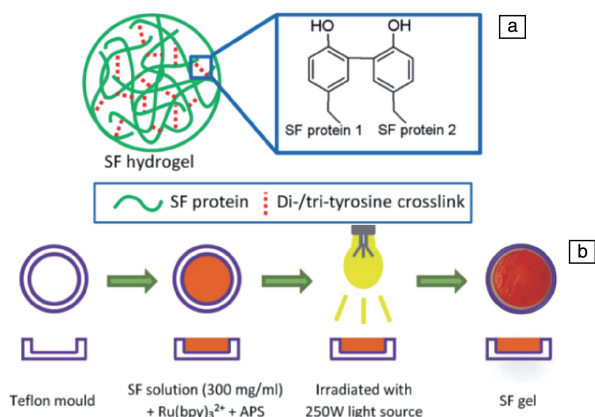


图5 钉介导丝素蛋白分子酪氨酸交联示意图(a); 钉介导丝素蛋白交联制备水凝胶的过程(b)^[61]

Fig. 5 Schematic diagram for ruthenium-mediated tyrosine cross-linking of SF (a); The procedure of constructing the ruthenium-mediated SF cross-linking hydrogel (b)^[61]

现出约 78 MPa 的储能模量, 对小鼠的软骨前细胞培养表现出良好的生物相容性和细胞增殖效果。此外, 这种方法实现 SF 凝胶化的转变仅仅需要 2 min, 克服了京尼平和酶交联耗时长的缺点^[61]。为了调控并改善水凝胶的力学性能, Whittaker 和 Balu 等又进一步利用此原理制备出钉介导的可见光交联 SF/弹性蛋白共聚水凝胶、SF/聚(N-乙烯基己内酰胺)双网络水凝胶和 SF/石墨烯复合水凝胶^[62-64]。这些水凝胶都表现出与干细胞之间具有良好的相容性, 以及在兆帕范围内储能模量的可调控性。然而, 该方法使用的催化剂钉和电子受体过硫酸铵具有潜在的毒性^[65, 66]。为此, Applegate 等提出用核黄素作为光引发剂、在可见光下驱动 SF 交联的策略。前面曾提到核黄素作为紫外光引发剂交联 SF, 事实上, 核黄素也可以作为引发剂在可见光下交联 SF。在可见光下, 核黄素吸收光能后夺取 SF 分子上酪氨酸的电子并形成酪氨酸自由基, 酪氨酸自由基之间发生反应最终生成二酪氨酸键。此方法在一定程度上和钉介导的 SF 光交联有相似的地方, 但是避免了其潜在的毒性。该方法形成的 SF 水凝胶同样表现出良好的弹性以及光学透明性, 这可能是二酪氨酸键交联形成 SF 水凝胶的共同特点^[66]。

5 光交联丝素蛋白基水凝胶的应用

5.1 药物释放

人体的一些组织如骨和软骨等天生缺乏血管, 当这些部位发生病变或者受到外界损伤时, 全身性给药比较困难。在这类情况下, 局部给药效率较高, 成为替代全身性给药的治疗方法。水凝胶作为局部给药的药物载体材料, 不仅具有独特的结构和性质, 还可以负载药物分子进行缓释, 因而受到广泛关注。近年来, 研究者对局

部给药治疗中作为药物载体的光交联 SF 基水凝胶进行了初步探索。

Kundu 等评估了模型药物荧光标记的右旋糖酐在 SF/PVA 光交联半互穿网络水凝胶中的释放性能。结果表明, 右旋糖酐的释放特性依赖水凝胶中 SF 的含量和右旋糖酐的相对分子质量。通过控制 SF 的含量或者右旋糖酐的相对分子质量能够实现对药物释放的调控, 这种可控的水凝胶体系具有作为缓释药物递送载体的潜力^[33]。视黄酸是维生素 A 的代谢产物, 在眼睛发育和信号传导过程中起着至关重要的作用, Bhattacharjee 等将其偶联到核黄素光交联的 SF 水凝胶上, 用于角膜基质细胞的培养。研究结果表明, 这种水凝胶能更好地支持细胞粘附、增殖, 促使细胞外基质的形成和角膜细胞相关基因的表达^[67]。考虑到 SF 基水凝胶的生物相容性优势, 它更适合递送激素类和多肽类等具有高生物活性的药物, 还可以通过控制光交联程度实现药物的可控释放, 如长效释放和短期释放等。

5.2 组织工程

光交联 SF 水凝胶具有固化效率高、水凝胶性能可控性高和易原位成型等优点, 在组织工程中具有巨大的应用潜力。近年来, 光交联 SF 水凝胶在组织工程特别是在软骨组织工程的应用中取得了突破性进展。在软骨组织工程中, 来自膝关节、气管等组织的软骨细胞可在人工基质上生长, 经皮下植入并在体内成熟后, 表现出类天然软骨组织的形态学和生物学功能。基于此, Hong 等将甲基丙烯酸缩水甘油酯修饰的 SF 通过 3D 打印的方式制成水凝胶, 并用于软骨细胞的体外分化能力研究和小鼠气管体内移植的可行性研究。经过长达 4 周的体外细胞培养, 这种水凝胶依然能够维持软骨细胞的活性, 并支持细胞的增殖和分化。兔模型上气管的体内移植实验表明, 移植的 SF 水凝胶周围有新的软骨样组织和上皮细胞形成。该研究表明, 利用 3D 打印制备的 SF 水凝胶可应用于软骨再生等相关的组织工程领域^[68]。此外, 外伤或疾病等对角膜造成的损伤会影响视力甚至可能导致失明, 角膜移植在治疗角膜疾病或角膜损伤上表现出良好的治疗效果, 但是可用于角膜治疗的供体往往比较有限, 目前角膜组织工程为这一问题提供了解决方案。光交联 SF 水凝胶在角膜组织工程上也有应用。核黄素可见光交联的 SF 水凝胶具有透明度高、与角膜接触紧密和弹性好等优点, 有望在医用领域作为人工角膜使用^[66]。另一方面, 负载视黄素的紫外光交联 SF 水凝胶用于体外促进人角膜干细胞的生长和分化研究。实验结果表明, 这种复合 SF 支架对人角膜细胞的形成具有促进作用^[67]。

5.3 其他应用

以肽和蛋白质构建的具有精确空间图案以及微纳米

结构的生物材料有着重要的应用。光刻技术为加工这些复杂图案和结构提供了一种快速、直接和高保真的选择。利用光刻技术将乙烯基改性 SF 溶解在六氟异丙醇或甲酸中, 将其作为光致抗蚀剂, 在紫外光下构造精密复杂图案已经得到实现^[69, 70]。此外, 在可见光下以核黄素作为光引发剂, 水作为溶剂, 利用 SF 作为光致抗蚀剂, 光刻得到的图案能达到 40~50 μm 的分辨率^[67, 71]。通过这些手段得到的具有微结构的材料可作为生物友好的纳米结构支架和柔性微设备来研究基底和细胞的相互作用, 同时也可应用于生物电子学、光子学和治疗学等领域的研究^[72]。

6 结 语

近年来, 由于光响应的众多优点, 光驱动聚合物形成凝胶的研究成为热点。利用紫外光和可见光驱动形成 SF 基水凝胶的研究取得了阶段性进展。这些水凝胶可用于药物释放和组织工程等相关生物医用领域, 尽管取得了一些阶段性成果, 但目前仍有很多问题需要解决, 仍有很多工作需要进一步探索。首先, 虽然目前已经开发出了多种光交联制备 SF 水凝胶的方法, 但部分光交联体系下, SF 形成水凝胶的机理还有待进一步的理解; 其次, 制备的水凝胶作为载药或组织工程支架在体内使用时, 药物递送性能、力学性能和降解性能等还需深入研究; 最后, 利用光交联的优势, 将 SF 与其他功能性、生物学信号丰富的聚合物或无机物相结合, 制备出能满足实际需求的复合材料, 还有待进一步发展和探索。这些研究和探索将为构建 SF 基生物医用材料提供良好的理论和实验指导, 最终使这些材料在临床中得到应用。

参考文献 References

- [1] ALGE D L, ANSETH K S. *Nature Materials*[J], 2013, 12(11): 950-952.
- [2] YUE K, SANTIAGO T D, ALVAREZ M M, *et al.* *Biomaterials*[J], 2015, 73: 254-271.
- [3] LUO K, YANG Y, SHAO Z Z. *Advanced Functional Materials*[J], 2016, 26(6): 872-880.
- [4] REDDY N, REDDY R, JIANG Q. *Trends in Biotechnology*[J], 2015, 33(6): 362-369.
- [5] KOH L D, CHENG Y, TENG C P, *et al.* *Progress in Polymer Science*[J], 2015, 46: 86-110.
- [6] TAO W, LI M, ZHAO C. *International Journal of Biological Macromolecules*[J], 2007, 40(5): 472-478.
- [7] MURPHY A R, KAPLAN D L. *Journal of Materials Chemistry*[J], 2009, 19(36): 6443-6450.
- [8] CHAO P H G, YODMUANG S, WANG X, *et al.* *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*[J], 2010, 95(1): 84-90.
- [9] LING S, LI C, ADAMCIK J, *et al.* *Advanced Materials*[J], 2014, 26(26): 4569-4574.
- [10] ZHANG F, ZUO B, FAN Z, *et al.* *Biomacromolecules*[J], 2012, 13(3): 798-804.
- [11] LOVETT M, CANNIZZARO C, DAHERON L, *et al.* *Biomaterials*[J], 2007, 28(35): 5271-5279.
- [12] SIONKOWSKA A, PŁANECKA A. *Journal of Molecular Liquids*[J], 2013, 178: 5-14.
- [13] WENK E, WANDREY A J, MERKLE H P, *et al.* *Journal of Controlled Release*[J], 2008, 132(1): 26-34.
- [14] ROCKWOOD D N, PREDA R C, YÜCEL T, *et al.* *Nature Protocols*[J], 2011, 6(10): 1612.
- [15] WANG H Y, ZHANG Y Q. *Biotechnology Progress*[J], 2015, 31(3): 630-640.
- [16] LU Q, ZHU H, ZHANG C, *et al.* *Biomacromolecules*[J], 2012, 13(3): 826-832.
- [17] INOUE S, TANAKA K, ARISAKA F, *et al.* *Journal of Biological Chemistry*[J], 2000, 275(51): 40517-40528.
- [18] VOLLRATH F, KNIGHT D P. *Nature*[J], 2001, 410(6828): 541-548.
- [19] ZHOU C Z, CONFALONIERI F, JACQUET M, *et al.* *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*[J], 2001, 44(2): 119-122.
- [20] HAYASHI C Y, SHIPLEY N H, LEWIS R V. *International Journal of Biological Macromolecules*[J], 1999, 24(2/3): 271-275.
- [21] HUEMMERICH D, SLOTTA U, SCHEIBEL T. *Applied Physics A*[J], 2006, 82(2): 219-222.
- [22] LI G, LIU H, LI T, *et al.* *Materials Science and Engineering: C*[J], 2012, 32(4): 627-636.
- [23] KETEN S, XU Z, IHLE B, *et al.* *Nature Materials*[J], 2010, 9(4): 359.
- [24] FAROKHI M, MOTTAGHITALAB F, FATAHI Y, *et al.* *European Polymer Journal*[J], 2019, 115: 251-267.
- [25] CAO Y, WANG B. *International Journal of Molecular Sciences*[J], 2009, 10(4): 1514-1524.
- [26] HU X, SHMELEV K, SUN L, *et al.* *Biomacromolecules*[J], 2011, 12(5): 1686-1696.
- [27] WANG Y, RUDYM D D, WALSH A, *et al.* *Biomaterials*[J], 2008, 29(24/25): 3415-3428.
- [28] NUMATA K, CEBE P, KAPLAN D L. *Biomaterials*[J], 2010, 31(10): 2926-2933.
- [29] JIN H J, JINGSONG C, VASSILIS K, *et al.* *Biomaterials*[J], 2004, 25(6): 1039-1047.
- [30] MINOURA N, AIBA S I, HIGUCHI M, *et al.* *Biochemical and Biophysical Research Communications*[J], 1995, 208(2): 511-516.
- [31] PADOL A, JAYAKUMAR K, SHRIDHAR N, *et al.* *Toxicology International*[J], 2011, 18(1): 17.
- [32] WANG X, PARTLOW B, LIU J, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J],

- 2015, 12: 51–61.
- [33] KUNDU J, POOLE-WARREN L A, MARTENS P, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2012, 8(5): 1720–1729.
- [34] XIAO W, HE J, NICHOL J W, *et al.* *Acta Biomaterialia*[J], 2011, 7(6): 2384–2393.
- [35] RAI A N R, PARTLOW B P, MCGILL M, *et al.* *Biomaterials*[J], 2017, 131: 58–67.
- [36] AHMED E M. *Journal of Advanced Research*[J], 2015, 6(2): 105–121.
- [37] KIM U J, PARK J, LI C, *et al.* *Biomacromolecules*[J], 2004, 5(3): 786–792.
- [38] YUCEL T, CEBE P, KAPLAN D L. *Biophysical Journal*[J], 2009, 97(7): 2044–2050.
- [39] ZHANG W, WANG X, WANG S, *et al.* *Biomaterials*[J], 2011, 32(35): 9415–9424.
- [40] ZHU J, MARCHANT R E. *Expert Review of Medical Devices*[J], 2011, 8(5): 607–626.
- [41] SRISAWASDI T, PETCHAROEN K, SIRIVAT A, *et al.* *Materials Science and Engineering: C*[J], 2015, 56: 1–8.
- [42] SUN W, INCITTI T, MIGLIARESI C, *et al.* *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*[J], 2016, 10(10): 876–887.
- [43] ANNABI N, RANA D, SANI E S, *et al.* *Biomaterials*[J], 2017, 139: 229–243.
- [44] ROUILLARD A D, BERGLUND C M, LEE J Y, *et al.* *Tissue Engineering Part C: Methods*[J], 2011, 17(2): 173–179.
- [45] CHOI J R, YONG K W, CHOI J Y, *et al.* *BioTechniques*[J], 2019, 66(1): 40–53.
- [46] NEZHAD-MOKHTARI P, GHORBANI M, ROSHANGAR L, *et al.* *International Journal of Biological Macromolecules*[J], 2019, 139: 760–772.
- [47] PEREIRA R F, BÁRTOLO P J. *Engineering*[J], 2015, 1(1): 90–112.
- [48] JABBARI E, SARVESTANI S K, DANESHIAN L, *et al.* *PloS One*[J], 2015, 10(7): e0132377.
- [49] ASSMANN A, VEGH A, GHASEMI-RAD M, *et al.* *Biomaterials*[J], 2017, 140: 115–127.
- [50] POLDERVAART M T, COVERSEN B, DE RUIJTER M, *et al.* *PloS One*[J], 2017, 12(6): e0177628.
- [51] ANNABI N, TAMAYOL A, UQUILLAS J A, *et al.* *Advanced Materials*[J], 2014, 26(1): 85–124.
- [52] FURUZONO T, ISHIHARA K, NAKABAYASHI N, *et al.* *Biomaterials*[J], 2000, 21(4): 327–333.
- [53] TSUKADA M. *Journal of Applied Polymer Science*[J], 1988, 35(4): 965–972.
- [54] XIAO W, LI J, QU X, *et al.* *Materials Science and Engineering: C*[J], 2019, 99: 57–67.
- [55] GONG J P. *Soft Matter*[J], 2010, 6(12): 2583–2590.
- [56] GAN Y, LI P, WANG L, *et al.* *Biomaterials*[J], 2017, 136: 12–28.
- [57] KIM S H, YEON Y K, LEE J M, *et al.* *Nature Communications*[J], 2018, 9(1): 1620.
- [58] KIM H H, KIM J W, CHOI J, *et al.* *Polymer*[J], 2018, 153: 232–240.
- [59] ZHOU Y, LIANG K, ZHAO S, *et al.* *International Journal of Biological Macromolecules*[J], 2018, 108: 383–390.
- [60] KUANG D, JIANG F, WU F, *et al.* *International Journal of Biological Macromolecules*[J], 2019, 134: 838–845.
- [61] WHITTAKER J L, CHOUDHURY N R, DUTTA N K, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2014, 2(37): 6259–6270.
- [62] WHITTAKER J L, DUTTA N K, ELVIN C M, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2015, 3(32): 6576–6579.
- [63] WHITTAKER J L, DUTTA N K, ZANNETTINO A, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2016, 4(33): 5519–5533.
- [64] BALU R, REEDER S, KNOTT R, *et al.* *Langmuir*[J], 2018, 34(31): 9238–9251.
- [65] KIM M H, PARK W H. *International Journal of Nanomedicine*[J], 2016, 11: 2967.
- [66] APPELEGATE M B, PARTLOW B P, COBURN J, *et al.* *Advanced Materials*[J], 2016, 28(12): 2417–2420.
- [67] BHATTACHARJEE P, FERNÁNDEZ-PÉREZ J, AHEARNE M. *Materials Science and Engineering: C*[J], 2019, 105: 110093.
- [68] HONG H, SEO Y B, LEE J S, *et al.* *Biomaterials*[J], 2020, 232: 119679.
- [69] KURLAND N E, DEY T, KUNDU S C, *et al.* *Advanced Materials*[J], 2013, 25(43): 6207–6212.
- [70] BUCCIARELLI A, PAL R K, MANIGLIO D, *et al.* *Macromolecular Materials and Engineering*[J], 2017, 302(7): 1700110.
- [71] BRIF A, LAITY P, CLAEYSSENS F, *et al.* *ACS Biomaterials Science & Engineering*[J], 2020, 6(1): 705–714.
- [72] KURLAND N E, DEY T, WANG C, *et al.* *Advanced Materials*[J], 2014, 26(26): 4431–4437.

(编辑 吴锐)