

明胶-聚苯胺导电水凝胶的制备与研究

吴天一,卜寿山*,庄海,尤莹,张继生,许扬

(南京医科大学第一附属医院口腔科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:明胶-聚苯胺接枝共聚物(gelatin-graft-polyaniline, GP)导电水凝胶的制备和性能研究。方法:采用直接掺杂法制作 GP,使用樟脑磺酸(camphor sulfonic acid, CSA)作为掺杂剂。GP 溶于水形成导电水凝胶(gelatin-graft-polyaniline hydrogel, GPH),以 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC]进行交联。对制备的 GP 和 GPH 的形态结构、生物相容性、溶解性、溶胀比和导电性能进行观察研究。结果:GPH 导电性能良好($1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3}$ S/cm),并随着苯胺含量的增大而增大。但当苯胺的量提高到一定程度,通过明胶共聚获得的 GPH 溶解性大大降低,同时溶胀比增加。结论:GPH 是一种新型的可降解生物材料,具有良好的导电性能,作为支架在组织工程修复中有巨大的应用前景。

[关键词] 导电水凝胶;明胶;聚苯胺

[中图分类号] R783.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)09-1173-04

doi:10.7655/NYDXBNS20170920

Properties of electroactive gelatin-graft-polyaniline hydrogel

Wu Tianyi, Bu Shoushan*, Zhuang Hai, You Ying, Zhang Jisheng, Xu Yang

(Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the preparation and properties of gelatin-graft-polyaniline(GP) hydrogel. **Methods:** GP was synthesized by direct doping technique, and camphor sulfonic acid (CSA) was used as dopant. The copolymer was dissolved in water and then cross-linked by EDC. The morphology and chemical feature, swelling ratios, dissolubility, biocompatibility and conductivity of GP hydrogels(GPH) were observed. **Results:** GPH had good conductivities ($1 \times 10^{-4} \sim 10^{-3}$ S/cm). The electrical property was enhanced with the content of polyaniline. Nonetheless, when the amount of polyaniline improved to a certain degree, the solubility was greatly reduced and swelling ratio was increased at the same time. **Conclusion:** GPH is a biodegradable conductive material and has great application prospects in tissue engineering.

[Key words] electroactive hydrogel; gelatin; polyaniline

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1173-1176, 1184]

在临床工作中,口腔颌面外科常见因外伤或肿瘤造成的面神经损伤,此类外周神经受损的患者通常预后较差,生存质量低。据报道,我国每年有 60~90 万例外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)损伤患者,并且近年来有增加趋势^[1]。目前对于外周神经修复,常用的方法有自体或异体神经移

植,但由于来源受限或免疫排斥等原因无法获得较好的应用,因此寻找一种可用于外周神经修复的人工材料成为研究热点。近年来,组织工程学在神经、骨骼、心肌修复等方面的作用越来越被人们重视。许多研究已经证明,细胞的生长和迁移受到生物材料的润湿性、机械刚度^[2]、弹性^[3]、表面形态^[4]等各种性能的影响。同样,电信号也会对细胞的行为和功能产生作用,一定的电刺激可以促进细胞生长,尤其是本身属于电信号激动的组织^[5-7],使用导电材料构建仿生支架进行外周神经修复成为一个新方向。聚苯胺(polyaniline, PANI)因其良好的导电性、生物相容性、易于加工性而被广泛研究。本征态的 PANI 并不导

[基金项目]国家自然科学基金(81670967);江苏省卫生厅面上项目(H201504);江苏省“六大人才高峰”第八批高层次人才项目(WSW-021)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: bushsh@vip.sina.com

电,但是在进行掺杂后会获得优良的导电性能^[8]。常用的掺杂剂有盐酸、樟脑磺酸(camphor sulfonic acid,CSA)等。与大部分高分子聚合物相同,PANI的溶解及降解性能不理想,将其与其他生物可溶性的材料共混形成共聚物以改善性能成为许多研究的重点^[9]。本研究拟采用直接掺杂法,将明胶与苯胺在一定条件下,以过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)为催化剂发生聚合反应,CSA掺杂的 PANI 羧基与明胶的氨基发生耦合^[10],形成明胶-聚苯胺共聚物(gelatin-graft-polyaniline,GP),在改善溶解性和降解性的同时保留了良好的电导率,成为组织工程修复支架材料的良好选择。

1 材料和方法

1.1 材料

明胶 A 型、苯胺、CSA、APS、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC]、1-甲基-2-吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(分析纯, Sigma-Aldrich 公司, 美国); CCK8 试剂盒(同仁公司, 日本); 乙醚、氨水等常规试剂均为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 制备纯 PANI^[11]

100 mg 苯胺溶于 100 mL 双蒸水,加入 230 mg CSA 及 245 mg APS 后搅拌 12 h,1 L 乙醚沉淀,0.1 mol/L 氨水脱掺杂后真空干燥。

1.2.2 制备 GP 及 GP 导电水凝胶(gelatin-graft-polyaniline hydrogel,GPH)

称取一定量^[9, 12]的明胶溶解于 100 mL 双蒸水,加入 10 mg 的苯胺和相同摩尔质量的 CSA 及 APS,搅拌 12 h 后,乙醇、乙醚混合溶液(体积比 1:1)沉淀,NMP 作溶剂去除游离 PANI^[9],沉淀后真空干燥获得 GP(表 1)。配制成 10%的工作液,加入一定浓度的 EDC 混合均匀,置于 4 °C 下交联 12 h 形成水

表 1 制备不同苯胺含量的 GP

Table 1 The preparation of different contents of aniline in GP

名称	明胶(mg)	苯胺(mol)	CSA(mol)	APS(mol)
GP1	200	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}
GP2	200	2×10^{-4}	2×10^{-4}	2×10^{-4}
GP3	200	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}
GP4	200	8×10^{-4}	8×10^{-4}	8×10^{-4}
GP5	200	1×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}

凝胶 GPH(图 1)。

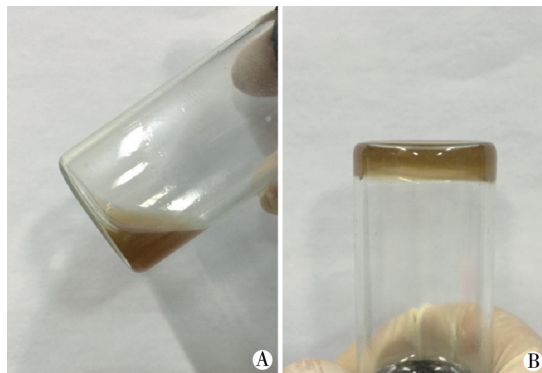


图 1 10% GP3 溶液(A)和 GPH3(B)

Figure 1 The 10% GP3 solution(A) and GPH3(B)

1.2.3 ¹H 核磁共振波谱 (¹H nuclear magnetic resonance spectrum, ¹H NMR)检测

使用 DMSO 作为溶剂和内标准,通过核磁共振波谱仪检测 PANI 和 GP。

1.2.4 导电性能检测

将凝胶浸入双蒸水足够时间以达到最大溶胀比,转移至固定直径和长度的圆柱体模具,滤纸擦干表面后在流动空气下静置 30 min,使用便携式电导率测试仪测量电导率。

1.2.5 形态观察

将凝胶置于 37 °C 恒温箱中 48 h,拭干表面水分后喷金,置于扫描电镜下观察。

1.2.6 凝胶溶胀比(swelling ratio,SR)^[13]检测

不同 EDC 浓度(5 mmol/L 及 10 mmol/L)^[14-15]交联后的凝胶用滤纸擦干表面后称重,放入含 50 mL 双蒸水的瓶中,在 37 °C 下前 12 h 每隔 1 h 取出,后每隔 12 h 取出,滤纸擦干称重。 $SR=(W_k-W_i)/W_i \times 100%$, W_i 表示初始重量, W_k 表示溶胀后各时间段重量。

1.2.7 CCK8 检测生物安全性

将 50 μ L 10% 明胶和 GP 溶液分别加至 96 孔板,各加相同量(5 mmol/L)的 EDC,置于 37 °C 12 h。每孔 PBS 洗 3 遍、培养基洗 2 遍,每次时间 30 min。大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)接种于 96 孔板上,分别在共培养后的 1、3、7 d 取样,每孔加 10 μ L CCK8 溶液,在细胞孵育箱内继续孵育 2 h,于 450 nm 波长测定吸光度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件,计量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行 t 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凝胶的电导率

电导率如图 2 所示, 随着苯胺含量的增加, GPH 电导率最高可达 $(1.01 \pm 0.04) \times 10^{-3} \text{ S/cm}$, GPH3 与 GPH4 比较差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。选择 GPH3 进行后续实验。

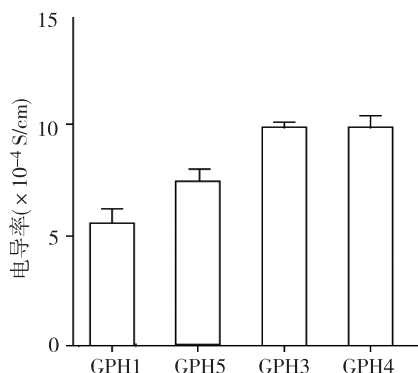


图 2 GPH 在不同苯胺含量下的电导率

Figure 2 Conductivities of GPH with different contents of aniline

2.2 形态与结构

GPH3 表面结构如图 3 所示, 可见网状支架结构。PANI ^1H NMR 光谱显示 3 个同样强度的等距峰, 分别在 6.913、7.256、7.659 ppm 处, 符合 PANI ^1H NMR 的光谱特征^[16]。GP 共聚物(GP3)在 7.345 ppm 同样有 1 个宽峰对应于 PANI, 并且在 1.90~2.72 ppm 间存在代表明胶烷基的峰, 表明 PANI 成功接枝到明胶主链上(图 4)。

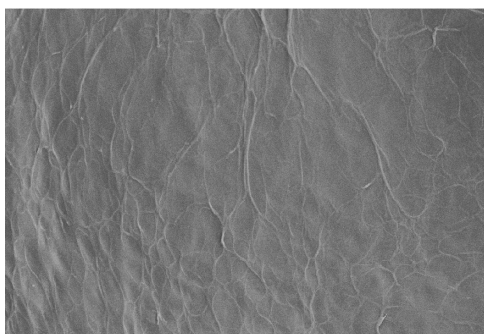


图 3 GPH3 表面形态($\times 130$)

Figure 3 Surface morphology of GPH3($\times 130$)

2.3 凝胶的 SR

组织工程学中水凝胶的溶胀性对其应用有着重要影响。明胶溶液成胶后 SR 最大达到 45%, 而 GPH 在 72 h 时可达 400% 以上, 并且可以通过交联剂的量控制 SR(图 5), 以获取需要的凝胶。

2.4 CCK8 检测生物安全性

细胞接种至 GPH 后各个检测时间点的吸光度

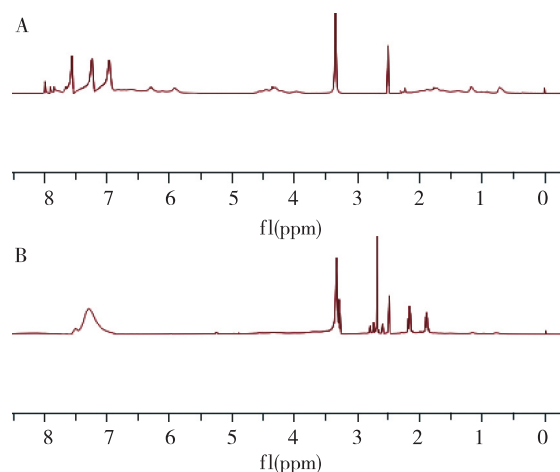


图 4 PANI(A)及 GP3(B)的 ^1H NMR 光谱特征

Figure 4 The ^1H NMR spectral signatures of PANI(A) and GP3(B)

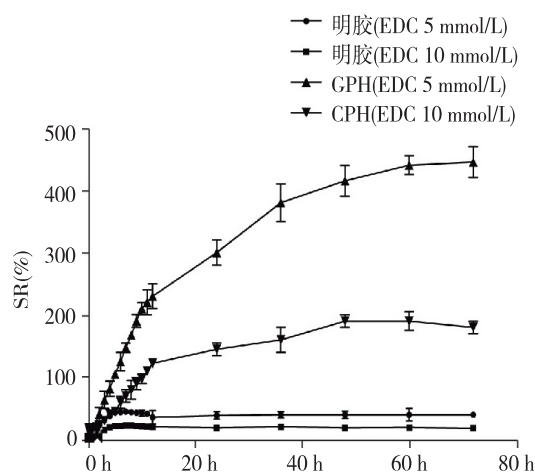


图 5 不同 EDC 交联对凝胶 SR 的影响

Figure 5 Effect of different contents of EDC on SR

值均略小于明胶对照组(图 6), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明 GPH 的生物安全性与明胶相仿。

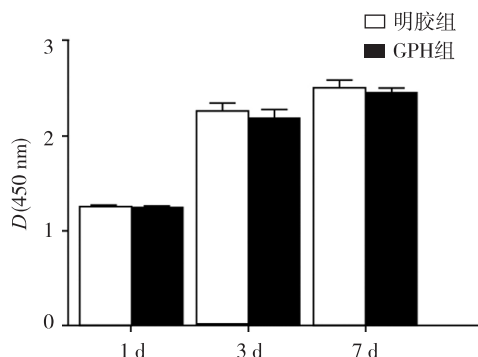


图 6 第 1、3、7 天吸光度

Figure 6 Absorbance on day 1, 3, 7

3 讨论

PANI 作为一种导电材料已经得到了广泛研究,

它同时具有十分良好的生物相容性,在动物及体外实验中均得到证实^[17-19]。本征态的 PANI 不导电,但经过质子酸掺杂后会获得具有良好导电性的掺杂态 PANI,且采用 CSA 掺杂可极大改善 PANI 的溶解性^[11],虽然无机酸如盐酸等掺杂 PANI 可以获得更大的电导率,但其只能部分溶解于一些强极性有机溶剂,无法形成水凝胶,需要利用电纺技术等加工成型。不同掺杂剂所获得的导电性不一致,这是由于掺杂物分子量大小的影响,分子量大的掺杂剂使得分子链间间距变大,阻碍了电荷在链间的转运,从而降低了电导率^[8-20]。PANI 本身降解性能差,在组织生物学上的应用受到很大限制,明胶作为一种天然生物高分子材料,具有极为优秀的生物相容性和生物降解性,可以改善 PANI 在组织修复方面的缺点。

共聚物 GP 与明胶相似,溶于水后在 35 °C 以上时保持流动,这使得 GPH 可以直接注射成胶,在组织工程方面应用更为广泛。GP5 无法完全溶于水,并且不能通过 EDC 成胶。GPH4 电导率最高,但与 GPH3 的差异没有统计学意义,并且需要提高 EDC 的用量(20 mmol/L)或配置成 15% 的溶液才能成胶。这是由于随着苯胺量的增加,虽然电导率也随之升高,但结合在明胶上的 PANI 占据了明胶大部分的游离氨基,影响了聚合物的交联,选用 EDC 10 mmol/L 已足够成胶。具有良好导电性的 GPH,可以传导外周神经发出的电信号从而促进神经修复,在组织修复方面有巨大潜力。SR 与材料的孔隙有关,孔隙直径和孔隙率越大,SR 越大。凝胶的 SR 可通过苯胺和交联剂的含量来控制,以满足不同需要,如在周围神经修复中作为支架材料,一定的 SR 可以保证支架内环境的稳定,以免支架塌陷压迫神经,并且有利于细胞和生长因子的黏附聚集。EDC 具有较低的细胞毒性,但其作为交联剂本身并不会成为实际交联的一部分,只是促进明胶的羧基和氨基之间形成酰胺键^[21],可通过水洗等方法去除 EDC。为了确保生物安全,进行 CCK8 细胞毒性检测,结果与对照明胶组的差异无统计学意义,表明经 EDC 交联后的 GPH 无生物毒性。

综上所述,本研究通过明胶与 CSA 掺杂 PANI 接枝共聚形成 GP 共聚物,提高了导电性能的同时保留了明胶的溶解性和生物相容性,获得了可降解的导电水凝胶 GPH,在组织工程学中尤其是外周神经修复方面具有良好的应用前景。

[参考文献]

- [1] Wu R, Wang L, Chen F, et al. Evaluation of artificial nerve conduit and autografts in peripheral nerve repair in the rat model of sciatic nerve injury[J]. *Neurol Res*, 2016, 38(5): 461-466
- [2] Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate[J]. *Science*, 2005, 310(5751): 1139-1143
- [3] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 677-689
- [4] Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface [J]. *Science*, 2005, 310 (5751): 1135-1138
- [5] Bassett CA, Pawluk RJ, Becker RO. Effects of electric currents on bone *in vivo* [J]. *Nature*, 1964, 20 (4959)4: 652-654
- [6] Park H, Bhalla R, Saigal R, et al. Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2(5): 279-287
- [7] Radisic M, Park H, Shing H, et al. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(52): 18129-18134
- [8] Sinha S, Bhadra S, Khastgir D. Effect of dopant type on the properties of polyaniline[J]. *J Appl Polym Sci*, 2009, 112(5): 3135-3140
- [9] Marcasuzaa P, Reynaud S, Ehrenfeld F, et al. Chitosan-graft-polyaniline-based hydrogels: Elaboration and properties[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(6): 1684-1691
- [10] Liu Y, Hu J, Zhuang X, et al. Synthesis and characterization of novel biodegradable and electroactive hydrogel based on aniline oligomer and gelatin[J]. *Macromol Biosci*, 2012, 12(2): 241-250
- [11] Pang Z, Fu J, Lv P, et al. Effect of CSA concentration on the ammonia sensing properties of CSA-doped PA6/PANI composite nanofibers[J]. *Sensors (Basel)*, 2014, 14(11): 21453-21465
- [12] Li L, Ge J, Ma PX, et al. Injectable conducting interpenetrating polymer network hydrogels from gelatin-graft-polyaniline and oxidized dextran with enhanced mechanical properties[J]. *RSC Adv*, 2015, 5(112): 92490-92498
- [13] Wu Y, Chen YX, Yan J, et al. Fabrication of conductive gelatin methacrylate-polyaniline hydrogels[J]. *Acta Biomater*, 2016, 33: 122-130
- [14] Pinkas O, Goder D, Noyvirt R, et al. Structuring of composite hydrogel bioadhesives and its effect on properties

(下转第 1184 页)

CA199 羧基末端糖蛋白配体的激活,能增加肠道黏膜上皮细胞的 G1/S 期比例,抑制肿瘤细胞凋亡^[10]。本研究发现,结肠癌组织中 TK1、CEA、CA199 的阳性表达率明显高于结肠息肉组($P<0.05$),提示 TK1、CEA、CA199 在结肠癌中呈高表达。

TK1、CEA、CA199 的高表达,能够通过影响结肠癌细胞的侵袭、增加淋巴结转移风险、增强肿瘤细胞对腹膜或盆腔组织的浸润,促进结肠癌病情进展。有研究在探讨不同临床分期或病情的结肠癌患者的发病机制中发现,CEA、CA199 等肿瘤糖蛋白均呈明显高表达,且患者的临床分期越晚、病情越重,远期临床预后越差,TK1、CEA、CA199 等的阳性表达率越高^[11-12]。本研究发现,TK1、CEA、CA199 的阳性表达率与肿瘤组织学类型、分期、大小以及是否有淋巴结转移均显著相关,提示 TK1、CEA、CA199 等与患者的临床病理特征密切相关。

综上所述,TK1、CEA、CA199 在结肠癌中呈高表达,且与患者的病理特征密切相关,对结肠癌的诊断及预后评估有重要意义。

[参考文献]

[1] Haga E, Endo Y, Haruta M, et al. Therapy of peritoneally disseminated colon cancer by TAP-deficient embryonic stem cell-derived macrophages in allogeneic recipients [J]. *J Immunol*, 2014, 193 (4): 2024-2033

[2] Yamashita S, Odisio BC, Huang SY, et al. Embryonic origin of primary colon cancer predicts survival, in patients undergoing ablation for colorectal liver metastases [J]. *EJSO*, 2017, 43 (6): 1040-1049

[3] 李娜,李宏斌,朱蕾,等.血清 CEA、CA199 和

CA153 检测对判定结肠癌发生发展的价值分析[J]. *实用癌症杂志*, 2016, 31(3): 396-398

[4] 朱磊,赵阳,韩仕峰,等.术前血清 CEA 和 CA19-9 水平检测对结肠癌术后早期复发转移的预测价值[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(8): 1170-1174

[5] 张瑜,李馨,骆雯,等.联合检测血清肿瘤标志物对结肠癌根治术后患者复发转移的预测价值[J]. *重庆医学*, 2015, 44(26): 3616-3617, 3621

[6] 王勇,傅赞,封益飞,等.腹腔镜下完整结肠系膜切除术治疗左半结肠癌的临床疗效[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36 (5): 620-622

[7] 任若冰,许頰,李亚芬,等.血清胸苷激酶 1 在乳腺肿瘤中的表达及其临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24(1): 41-45

[8] 王良义.结肠癌患者血清 CEA、CA19-9、CA724 联合检测的意义[J]. *贵阳中医学院学报*, 2013, 35 (5): 102-103

[9] 廖琳. CEA、CA72-4 与 CA199 联合检测对结肠癌的诊断应用[J]. *中国卫生产业*, 2013(34):3-4

[10] 荆卫娟,任传路,丁磊,等.血清 TuM2-PK、TSGF 与 CEA、CA199、CA242 联合检测在结肠癌诊断中的临床价值[J]. *标记免疫分析与临床*, 2015, 22 (11): 1121-1124

[11] 魏海龙,林振海. CEA 在结肠癌中的表达及临床意义[J]. *临床和实验医学杂志*, 2013, 12 (15): 1251-1252

[12] 李艳艳,丁修冬,李潇,等. TSGF、IGF-1、CEA、CA19-9 联合检测在结肠癌的诊断及预后评价的应用[J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2014, 23 (12): 1022-1024

[13] 陈静静,门万琪,成祖群,等.结肠癌患者血清 IL-6、CEA 和 CA199 联合检测的临床意义[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29 (12): 1071-1073

[收稿日期]2017-07-06

(上接第 1176 页)

and bonding mechanism[J]. *Acta Biomater*, 2017, 51: 125-137

[15] Abozeid SM, Hathout RM, Abou-Aisha K. Silencing of the metastasis-linked gene, AEG-1, using siRNA-loaded choline surface-modified gelatin nanoparticles in the breast carcinoma cell line MCF-7 [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 145: 607-616

[16] Wang X, Sun T, Wang C, et al. ¹H NMR determination of the doping level of doped polyaniline[J]. *Macromol Chem Phys*, 2010, 211(16): 1814-1819

[17] Kamallesh S, Tan P, Wang J, et al. Biocompatibility of electroactive polymers in tissues[J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 52(3): 467-478

[18] Bidez PRr, Li S, Macdiarmid AG, et al. Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation

of cardiac myoblasts[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006, 17(1/2): 199-212

[19] Prabhakaran MP, Ghasemi-Mobarakeh L, Jin G, et al. Electrospun conducting polymer nanofibers and electrical stimulation of nerve stem cells[J]. *J Biosci Bioeng*, 2011, 112(5): 501-507

[20] Qazi TH, Rai R, Boccaccini AR. Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: a review[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(33): 9068-9086

[21] Serban MA, Knight T, Payne RG, et al. Cross-linked gelatin microspheres with continuously tunable degradation profiles for renal tissue regeneration[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2014, 61(2): 75-81

[收稿日期] 2017-03-27