

基于巯基-烯点击反应的 PEG 改性角蛋白膜的制备及其性能研究

陆晨¹ 袁久刚^{1*} 王强¹ 王平¹ 范雪荣¹ 李加双¹ 黄栋²

(1.江南大学生态纺织教育部重点实验室,无锡 214122;2.无锡出入境检验检疫局,无锡 214122)

摘要 通过巯基-烯点击反应将亲水性聚合物聚乙二醇单甲醚甲基丙烯酸甲酯(MPEGMA)接枝到角蛋白大分子上,制备了PEG改性角蛋白,研究了其接枝反应条件及PEG改性角蛋白膜的性能。研究结果显示,MPEGMA成功接枝到角蛋白分子上,其较优反应条件为70℃、1h、引发剂浓度为5.5g/L、 $m(\text{角蛋白}):m(\text{MPEGMA})=100:150$,此时接枝率可以达到128%。经过PEG改性后的角蛋白溶液黏度显著变大,成膜性能得到提高,角蛋白膜的断裂强度随着接枝率的提高逐渐降低而断裂伸长率提高,细胞增殖实验显示,改性后的角蛋白膜材料对细胞无毒性,是良好的生物材料。

关键词 MPEGMA,角蛋白,修饰,流变性,成膜性

Preparation and property of PEG modified keratin film based on thiol-ene click chemistry

Lu Chen¹ Yuan Jiugang¹ Wang Qiang¹ Wang Ping¹ Fan Xuerong¹
Li Jiashuang¹ Huang Dong²

(1.The Key Laboratory of Eco-Textiles, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122; 2.Wuxi Entry-Exit Inspection Quarantine Bureau, Wuxi 214122)

Abstract PEG-modified keratin was prepared by grafting the hydrophilic polymer polyethylene glycol monomethyl ether methyl methacrylate (MPEGMA) onto the keratin by the reaction of thiol-ene click chemistry. The graft reaction conditions and the properties of PEG-modified keratin film were studied in detail. The results showed that MPEGMA could be successfully grafted onto keratin molecules by thiol-ene click chemistry. The optimum reaction conditions were as follows: 70℃, 1h, initiator concentration 5.5g/L, keratin/MPEGMA = 100mg/150mg, then GP can reach 128%. After PEG modification, the viscosity of keratin solution increased significantly and its film-forming property was improved. The breaking strength of film decreased with the increase of GP and the elongation at break increased. Cell proliferation bioassay showed that the film was non-toxic to the cells and could be used as a good biological material.

Key words MPEGMA, keratin, modification, rheological property, film forming ability

角蛋白(Keratin)广泛存在于动物组织中,是构成毛发、羽毛、蹄、角的重要组成部分^[1]。最近的研究表明,还原法得到再生角蛋白,其末端含有独特的RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser)结构^[2],这使其生物相容性比胶原蛋白以及丝素蛋白等生物材料都好^[3]。因此,角蛋白在医用组织材料领域有着广泛的应用前景,可以用作人工肌腱^[4]、皮肤敷料^[5]以及骨折固定棒^[6]等。

然而再生角蛋白却一直存在材料力学脆性的问题,这导致提取后的角蛋白无法有效成纤或成膜,从而难以满足对强度以及韧性要求较高的组织材料的需求。为此,研究者采取了多种方法对角蛋白进行改性。例如,采用壳聚糖^[7]、海藻酸钠^[8]、纤维素^[9]、丝蛋白^[10]以及PEG^[11]等高分子材料进行共混;或者采用含有乙烯基团的单体,如丙烯酸^[12]、丙烯酸/丙烯酰胺^[13]、甲基丙烯酸甲酯^[14]等进行接枝改性。

基金项目:国家自然科学基金(31771039,31300785)

作者简介:陆晨(1991-),男,硕士,从事纺织生物技术研究。

联系人:袁久刚,副教授,从事纺织生物技术研究。

在这些高分子材料中,PEG 以其生物相容性好、无毒、免疫原性低等特点得到了广泛的研究。

相比共混方法,一般经接枝改性后的角蛋白在机械强度以及功能性上有着更为显著的改善。角蛋白分子链上可以用于接枝的位点主要有以下几种:被还原的胱氨酸侧链上的巯基、赖氨酸侧链上的伯氨基、被氧化的酪氨酸侧链上的苯酚式结构和丝氨酸侧链上的羟基结构等。相比于其他基团,巯基的反应性更高,而且随着巯基点击化学的快速发展,通过巯基对蛋白分子进行修饰,已经成为材料改性的一个绝佳途径。

巯基点击具有反应简单、条件温和,可以在特定区域和官能团间反应,以及不需要使用铜离子等重金属催化剂等优点^[15-16]。这使其在组织材料的制备中具有较强的优势。最近,Li 等^[17]通过巯基-烯点击化学反应成功将角蛋白与 PEG 接枝,制备了具有自组装功能的角蛋白载药胶束,这对于再生角蛋白的功能化改性具有重要意义。本研究在此基础上,利用巯基-烯点击化学对大分子再生角蛋白进行 PEG 化改性,提高其可塑性,制备韧性以及生物相容性都较好的角蛋白再生膜。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

材料:羊毛,无锡协新集团有限公司。

试剂:MPEGMA ($M_n = 300$)、巯基乙醇($\text{SHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$),西亚试剂;十二烷基磺酸钠(SDS)、尿素、过硫酸钾($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$)、亚硫酸氢钠(NaHSO_3)、氢氧化钠、碘化钾、五水硫酸铜和四合水酒石酸钾钠,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

仪器:全数字化核磁共振波谱仪(Aduance III 400MHz),德国布鲁克 AXS 有限公司;旋转流变仪(Physica MCR301 型),奥地利 Anton Paar 有限公司;扫描电子显微镜(SU1510 型),日本 Hitachi 公司;电子万能材料试验机(3385H 型),美国 Instron 公司;酶标仪(Multiskan FC),美国 Thermo 公司;倒置相差显微镜(DMILM),德国 Leica 公司。

1.2 角蛋白的提取

通过还原法来提取角蛋白。溶解体系配比如下:羊毛(1g),巯基乙醇(0.59mL),尿素(8.64g),SDS(0.6g),去离子水(18mL)。用 $\text{pH}=13.5$ 的氢氧化钠溶液调节溶解体系 $\text{pH}=9.5$,经 90°C 处理 6h 后冷却至室温,在去离子水中透析 7d,经过滤和

离心去除杂质得到角蛋白上清液,真空冷冻干燥,得到粉末状角蛋白。

1.3 PEG 改性角蛋白的制备

取 100mg 角蛋白溶解在 4mL 8mol/L 的尿素溶液中,加入 20mg NaHSO_3 ,在 70°C 下处理 2h,之后加入 44mg $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 和一定量的 MPEGMA,于 70°C 下反应 4h,之后在去离子水中透析 2d 除去未反应的 MPEGMA 以及盐类物质后,冷冻干燥即得到改性角蛋白(PEG-g-Krn)。

1.4 接枝率的测定

角蛋白接枝物的接枝率($GP, \%$)为接枝支链的质量占角蛋白质量的百分比,依据式(1)计算:

$$GP = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中, M_0 为双缩脲法^[18]测得的角蛋白质量,g; M_1 为角蛋白接枝物总质量,g。

1.5 $^1\text{H-NMR}$ 核磁共振测试

对 MPEGMA、角蛋白以及 PEG 改性角蛋白进行氢核磁谱图测试,分别称取 50mg 样品溶解在 500 μL 的氘代 DMSO 中,在 25°C 下进行测试。

1.6 溶液流变性

采用 8mol/L 尿素溶液溶解角蛋白和 PEG 改性角蛋白,用旋转流变仪测试其流变行为。剪切速率的测量范围为 $0 \sim 1000\text{s}^{-1}$,测量温度为 25°C 。

1.7 角蛋白膜的制备

配制浓度为 7% 的角蛋白和 PEG 改性角蛋白水溶液,然后加入质量分数 0.5% 的甘油,混匀。将溶液倾倒在聚四氟乙烯板中,在 20°C 、相对湿度 62% 的条件下自然风干成膜。

1.8 机械性能测试

参照 GB/T 3923.1—2013 测定膜的断裂强度和断裂伸长率,膜的长为 80mm,宽为 5mm,平均厚度 0.45mm。每组样品分别测试 10 个,取其平均值。

1.9 毒理性能的研究

按照 ISO 0993-5—2009 方法,采用直接接触的方法测试细胞毒理性,将样品经过 24h 的乙醇(75%)消毒杀菌后,用培养基 DMEM 配置浓度为 5mg/mL 的样品溶液备用。将 100 μL 的 NIH/3T3 细胞悬浮液($5 \times 10^4/\text{mL}$)注入 96 孔细胞培养板,加 50 μL 样品于细胞培养板中,稀释至 500 μL 。在 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 24h,最后加 10 μL CCK-8 溶液到各孔板中反应 2h,用 ELISA 酶标仪记录 450nm 处的吸光度,每个样品重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 $^1\text{H-NMR}$ 分析

为考察 MPEGMA 是否成功接枝到角蛋白上。分别对角蛋白、MPEGMA 以及 PEG 改性后的角蛋白进行 $^1\text{H-NMR}$ 谱图分析,结果如图 1 所示。

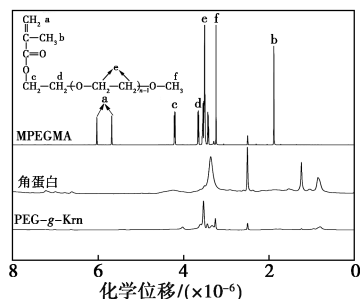


图 1 角蛋白、MPEGMA 以及 PEG 改性后的角蛋白的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

在图 1 中, $\delta = 2.5 \times 10^{-6}$ 处的化学位移是由溶剂的质子吸收所引起。MPEGMA 的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中,其典型特征峰分别出现于 $\delta (\times 10^{-6}) = 1.87$ ($-\text{C}-\text{CH}_3$)、 3.23 ($-\text{O}-\text{CH}_3$)、 3.51 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$)、 3.63 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$)、 4.19 ($\text{O}=\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2$)、 5.67 和 6.04 处 ($-\text{C}=\text{CH}_2$)。经过 PEG 改性后,与原角蛋白相比,其 $^1\text{H-NMR}$ 谱图中,出现了 $\delta = 3.51$ 处的化学位移,此化学位移是 MPEGMA 链段中 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$) 亚甲基上的氢引起的,并且 $\delta = 5.67 \times 10^{-6}$ 和 6.04×10^{-6} 处 ($-\text{C}=\text{CH}_2$) 的特征峰消失,这是由于 $\text{C}=\text{C}$ 和 $\text{S}-\text{H}$ 发生了巯基烯点击化学反应使得双键打开,导致 $\text{C}=\text{C}$ 上的质子所处的去屏蔽区域消失,化学位移向高场移动,这充分表明 MPEGMA 成功接枝到角蛋白大分子中。

2.2 反应条件对接枝率的影响

分别对不同反应温度、反应时间、MPEGMA 用量以及引发剂浓度下的接枝实验进行接枝率测试,结果如图 2—图 5 所示。

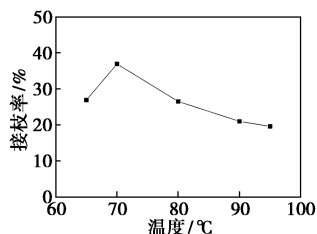


图 2 不同反应温度下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化

[$t = 60\text{min}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 5.5mg/mL ,
 $m(\text{角蛋白}):m(\text{MPEGMA}) = 100:60$]

图 2 为不同反应温度下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化趋势。

从图 2 可以看出,在温度低于 70°C 时,随着反应温度的增加,接枝率增加;当温度大于 70°C 后,接枝率发生下降。这是由于温度对引发剂氧化能力影响比较大,在温度较低时,引发剂热分解速度慢,产生的自由基较少,因此接枝率较低。而当温度升高后,引发剂容易发生氧化还原反应,从而使接枝率增加。但温度超过 70°C 后,由于引发剂热分解速度加快,产生大量的自由基,使得角蛋白上的巯基被氧化终止的趋势增加,且 MPEGMA 与引发自由基的接触率提高,从而导致 MPEGMA 自聚的趋势增加,所以接枝率下降。

图 3 为不同反应时间下, MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化趋势。

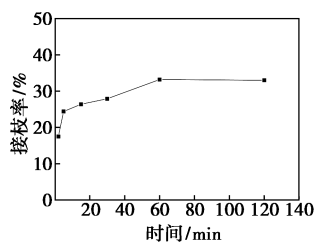


图 3 不同反应时间下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化

[$T = 70^\circ\text{C}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 11mg/mL ,
 $m(\text{角蛋白}):m(\text{MPEGMA}) = 100:60$]

由图 3 可以看出,随着反应时间的延长,接枝率逐渐增加,当反应超过 60min 后,接枝率基本保持不变。这是由于在反应体系中, MPEGMA 和巯基自由基的量是一定的,随着时间的增加, MPEGMA 不断地被消耗,当 MPEGMA 被消耗殆尽,接枝率保持不变。在下面的实验中时间选择 60min 。

图 4 为不同 MPEGMA 用量下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化趋势。

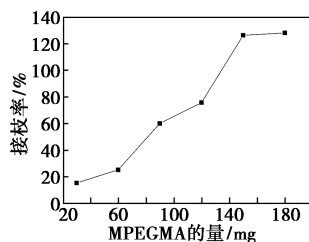


图 4 不同 MPEGMA 用量下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化

($T = 70^\circ\text{C}$, $t = 60\text{min}$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 11mg/mL , 角蛋白 100mg)

从图 4 可以看出,随着 MPEGMA 用量的增加,

接枝率增加,这是由于 MPEGMA 与角蛋白上的巯基接触率提高,从而使得接枝率增加,但 MPEGMA 的量超过 150mg 时,接枝率随 MPEGMA 量的增加而基本保持不变。这是由于角蛋白上的巯基自由基量是一定的,随着 MPEGMA 量的增加,巯基自由基不断被消耗,最终被消耗殆尽,所以接枝率保持不变。

图 5 为不同引发剂浓度下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化趋势。

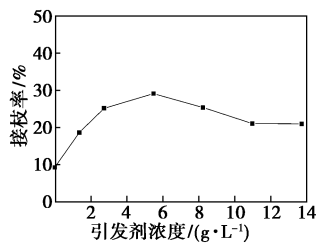


图 5 不同引发剂浓度下 MPEGMA 在角蛋白上的接枝率变化

[$T=70^{\circ}\text{C}$, $t=60\text{min}$, $m(\text{角蛋白}):m(\text{MPEGMA})=100:60$]

从图 5 可以看出,在引发剂浓度较低时,随着引发剂浓度的增加,接枝率快速增加,这是由于引发剂浓度的增加,使得角蛋白上的自由基接枝反应位点增加,从而导致接枝率增加。当引发剂浓度超过 5.5g/L 时,接枝率开始降低,这是由于过多的引发剂会使得角蛋白上的巯基被氧化终止的趋势增加,且引发剂与 MPEGMA 接触率提高,使得 MPEGMA 自聚趋势增加,从而导致接枝率下降。

2.3 流变性能

PEG 改性前后角蛋白溶液黏度的变化如图 6 所示。

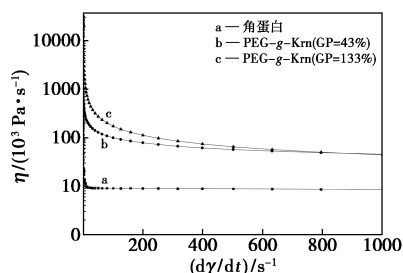


图 6 角蛋白及 PEG 改性角蛋白黏度与剪切速率的关系(角蛋白质量分数 15%)

从图 6 可以看出,对于角蛋白及 PEG 改性角蛋白尿素溶液,由于分子间作用力大,当剪切速率较小时,难以破坏分子间作用力,因此黏度较大,随着剪切速率的增加,这些相互作用力被破坏,导致黏度急剧下降,均表现为假塑型流体行为。但随着剪切速率的继续增加,角蛋白及 PEG 改性角蛋白在溶液中

的形态和相互作用均不再发生变化,溶液的黏度不再随剪切速率的增大而改变,溶液又表现为牛顿流体行为。PEG 改性角蛋白的黏度要高于角蛋白尿素溶液的黏度,同时黏度伴随着接枝率的增加而增加,这是由于 PEG 亲水性使得角蛋白肽链变得舒展,且分子量和支化程度增加,因此分子间的作用力增加。

2.4 膜的机械性能

为考察 MPEGMA 对角蛋白机械性能的影响,对不同接枝率下的 PEG 改性角蛋白进行铺膜,测试其断裂强度和断裂伸长率,结果如表 1 所示。

表 1 角蛋白膜的拉伸强度和断裂伸长率

样品名称	拉伸强度/MPa	断裂伸长率/%
原角蛋白	—	—
PEG-g-Krn(GP=43%)	1.68	5.51
PEG-g-Krn(GP=133%)	1.11	7.78

天然的角蛋白本身成膜性很差,非常脆,这是由于角蛋白分子间作用力强,在受到外力作用时,由于分子链间相对运动时所受的阻力大,分子链不易发生滑移,所以膜的韧性低,因此,即使添加大量的甘油也无法铺成完整的膜。经过接枝后,PEG 改性角蛋白非常容易成膜,而且随着 PEG 接枝率的增加,角蛋白的断裂强度降低而断裂伸长率增加。这主要是由于 MPEGMA 引入后,其所含的大量醚键能够在分子内和分子间形成新氢键,从而破坏角蛋白分子间的氢键作用,当受到外力拉伸时,分子链的滑移变得比较容易,改性膜的柔韧性得到显著提高。

2.5 毒理性能

为考察 MPEGMA 接枝对角蛋白毒理性能的影响,测试了改性前后细胞的存活率,结果如图 7 所示。

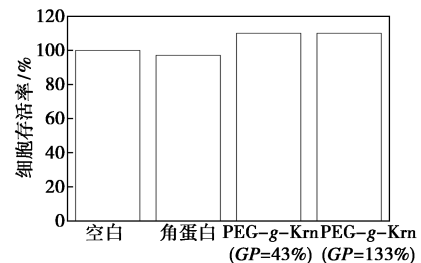


图 7 细胞存活率分析(样品浓度均为 0.05mg/mL)

由图 7 可以看出,在所测的浓度范围内,几种物质的细胞存活率均大于 75%,为无细胞毒性,其中角蛋白的毒性级别为 1 级,PEG 改性角蛋白的毒性为 0 级。经过 PEG 改性后的角蛋白相比原角蛋白,其细胞存活率均超过 100% 以上,这说明 PEG 改性角蛋白不仅无毒,而且对细胞具有增殖作用,同时也

充分说明通过巯基点击反应得到的 PEG 改性角蛋白生物相容性非常好。

3 结论

综上所述可以看出,采用巯基-烯点击反应可以非常容易地将 MPEGMA 接枝到角蛋白分子链上,经过 PEG 改性后的角蛋白,具有较好的成膜性能,膜的机械性能也得到很大程度改善。而且,采用此种方法对角蛋白进行改性,具有反应条件温和、无金属离子残留、可以在特定官能团上进行定向接枝等特点,这对于扩展角蛋白在组织材料中的应用具有重要意义。

参考文献

- [1] 张全彬,敖宁建.角蛋白在生物材料中的应用[J].材料导报,2012,26(s2):270-272.
- [2] Yamauchi K, Hojo H, Yamamoto Y, et al. Enhanced cell adhesion on RGDS-carrying keratin film[J]. Materials Science & Engineering C, 2003, 23(4): 467-472.
- [3] Rouse J G, Dyke M E V. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications[J]. Materials, 2010, 3(2): 999-1014.
- [4] 陆声,杨海伟,李其训,等.人发角蛋白人工腱材料体外生物相容性的实验研究[J].中国医师杂志,2005,7(6):759-761.
- [5] 陈英华,董为人,陈清元,等.复合生物敷料人发角蛋白-胶原海绵-聚甲基丙烯酸羟乙酯对大鼠烧伤创面的治疗作用[J].中国组织工程研究,2009,13(8):1432-1437.
- [6] 尹东,原林,赵卫东,等.人发角蛋白复合聚乳酸棒的力学强度测试及体内降解观察[J].南方医科大学学报,2003,23(5):442-444.
- [7] Kakkar P, Verma S, Manjubala I, et al. Development of keratin-chitosan-gelatin composite scaffold for soft tissue engineering[J]. Materials Science & Engineering C, 2014, 45: 343-347.
- [8] Silva R, Singh R, Sarker B, et al. Hybrid hydrogels based on keratin and alginate for tissue engineering[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2014, 2(33): 5441-5451.
- [9] 张猛,马博谋,何春菊.离子液体法制备再生纤维素/角蛋白共混膜的研究[J].东华大学学报(自然科学版),2013,39(1):13-15.
- [10] Vasconcelos A, Freddi G, Cavaco-Paulo A. Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(4): 1299-1305.
- [11] Silvia Maria Martelli, João Borges Laurindo. Chicken feather keratin films plasticized with polyethylene glycol[J]. International Journal of Polymeric Materials & Polymeric Biomaterials, 2012, 61(1): 17-29.
- [12] Wattie B, Dumont M J, Lefsrud M. Synthesis and properties of feather keratin-based superabsorbent hydrogels[J]. Waste & Biomass Valorization, 2018, 9(3): 391-400.
- [13] 袁久刚,王平,孙桂岩.羊毛角蛋白接枝聚丙烯酸-丙烯酰胺吸水树脂的制备[J].环境工程学报,2013,7(9):3695-3700.
- [14] Martínez Hernández A L, Velasco Santos C, Icaza M D, et al. Grafting of methyl methacrylate onto natural keratin[J]. e-Polymers, 2013, 3(1): 209-219.
- [15] Shyam M G, Xiong Xiaobing, Lu Changhai, et al. Application of click chemistry in the preparation of poly(ethylene oxide)-block-poly(ϵ -caprolactone) with hydrolyzable cross-links in the micellar core[J]. Macromolecules, 2011, 39(44): 2058-2066.
- [16] Luo K, Yang J, Kopečková P, et al. Biodegradable multiblock poly[*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] via reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization and click chemistry[J]. Macromolecules, 2011, 44(8): 2481-2488.
- [17] Li Q, Zhu L, Liu R, et al. Biological stimuli responsive drug carriers based on keratin for triggerable drug delivery[J]. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22(37): 19964-19973.
- [18] 陈钧辉,李俊.生物化学实验[M].北京:科学出版社,2014:58-60.

收稿日期:2017-06-28

修稿日期:2017-09-07

大连化物所纳米反应器研究取得新进展

近日,中国科学院大连化学物理研究所微纳米反应器与反应工程学创新特区研究组(05T7组)刘健研究员团队在微/纳米反应器的构筑方面取得新进展:通过设计一种亚微米反应器,实现了苯乙炔加氢高选择性的制取苯乙烯。

设计合适的反应器并优化操作条件是化学工程中至关重要的步骤。在自然界中,化学转化往往以串联反应

的形式在限域的空间内完成,这种限域的空间可以是几个纳米的酶,也可以是微米级的细胞。在材料科学领域,通过模拟细胞而设计的微/纳米反应器,不但可以提高反应的效率和选择性,而且这些“人造细胞”在高温烧结下还可以表现出优异的稳定性。然而,在设计微/纳米反应器时,如何精确控制组成,以及如何选择活性位点这两个催化反应所必需的问题仍然具有挑战性。(新型)