

γ -聚谷氨酸水凝胶的制备、性能及其应用

庄华红^a 王淑芳^{a*} 高靖辰^a 洪彦航^a 高伟霞^b 宋存江^b

(南开大学生命科学学院,^a生物活性材料教育部重点实验室;

^b分子微生物与技术教育部重点实验室 天津 300071)

摘要 系统介绍了 γ -聚谷氨酸水凝胶的制备方法及其生物可降解性、高吸水性及保湿性、pH敏感性、生物相容性和可修饰性等性能,同时综合介绍了其在组织工程、药物控释和创面修复等方面的应用,结合本研究组工作对其未来的发展进行了展望。

关键词 γ -聚谷氨酸,同聚物,水凝胶,制备

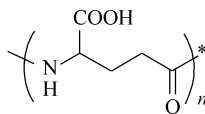
中图分类号:O636.9

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2014)03-0245-11

DOI:10.3724/SP.J.1095.2014.30172

γ -聚谷氨酸[γ -Poly(glutamic acid),简称 γ -PGA]是一种可由多种杆菌发酵合成的均聚氨基酸,是某些微生物荚膜的主要组成部分,相对分子质量在 $10^5 \sim 10^6$ 之间。由D-型和L-型谷氨酸通过 γ -酰胺键连接而成的聚谷氨酸的结构式如Scheme 1所示。可见,该聚合物结构中含有一COOH反应活性基团,因此具有很强的亲水性。



Scheme 1 Structure of γ -PGA

水凝胶(Hydrogel)是能在水中溶胀并保持大量水分而不溶解的高分子网络,一般由亲水性高分子通过各种交联作用构成,这些作用包括化学键、氢键、离子间相互作用和疏水性相互作用等^[1]。水凝胶可分为天然水凝胶和合成水凝胶,天然水凝胶容易降解,但存在批次间差异、性能重复性差、力学强度弱等缺点,因此其应用受到一定的限制,而合成水凝胶的结构与性能可以精确调控,可避免不同批次间的差异^[2]。但是经常用于制备水凝胶的水溶性高分子大多为石油产品,且不能生物降解,易对环境产生污染,所以,可生物降解水凝胶的研制成为近年来一个研究热点。

1 γ -聚谷氨酸水凝胶的制备

γ -聚谷氨酸水凝胶可通过辐射交联或化学交联的方法制备。

1.1 辐射交联

在 γ 射线(⁶⁰Co)的作用下,诱导 γ -PGA主链上亚甲基的碳氢键断裂,再与临近的 γ -PGA链结合,形成具有超强吸水能力的三维网状结构 γ -PGA水凝胶。 γ -PGA的浓度、辐射剂量和辐射剂量率等因素均影响PGA交联物的吸水率。

Choi等^[3]在 γ -PGA质量分数为5%、剂量率为1.6 kGy/h、辐射剂量大于20 kGy条件下,得到了吸水率为350~5000 g/g(去离子水)的 γ -PGA水凝胶。随着剂量的增加,凝胶的收率逐步增加,但凝胶吸

2013-04-10收稿,2013-06-07修回,2013-07-09接受

国家“973”计划(2012CB725204),国家自然科学基金资助项目(51073081,31070039),天津市自然科学基金资助项目(13JCYBJC24900)

通讯联系人:王淑芳,教授;Tel/Fax:022-23503753;E-mail:wangshufang@nankai.edu.cn;研究方向:生物材料与组织工程

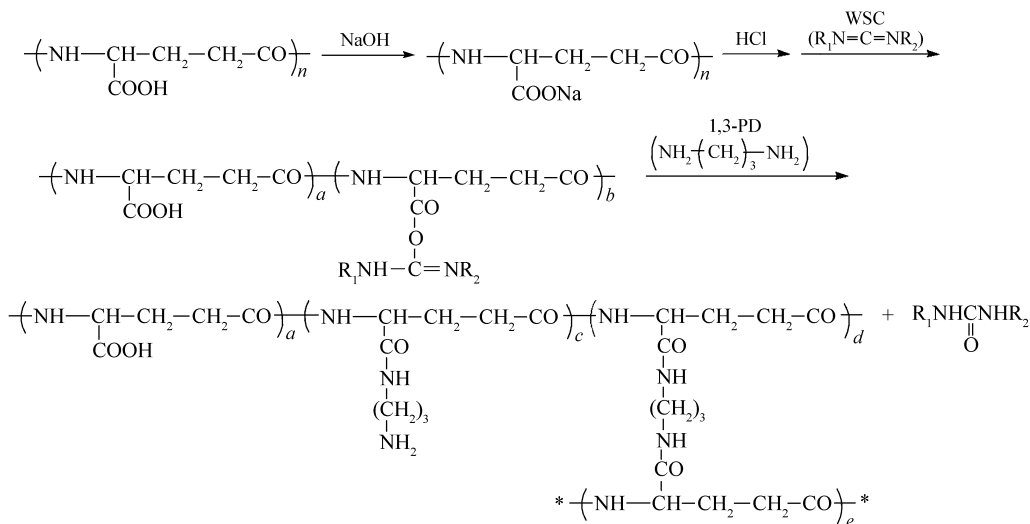
水率显著降低。同时,当吸附介质中存在 NaCl、CaCl₂ 及在酸性环境下,水凝胶的吸水率大大降低。此后,Kunioka 等^[4]在剂量大于 19 kGy 和 γ -PGA 质量分数为 2% 条件下,制备出 pH 敏感、可水解和生物降解的 γ -PGA 水凝胶。刘静等^[5]用 γ -PGA 在质量分数为 6%、总剂量为 10 kGy、剂量率为 1.0 ~ 4.0 kGy/h 条件下,得到了吸水率为 2052 g/g(去离子水)的水凝胶,并测定了其在 NaCl 溶液、人工血、人工尿和碱性条件下的吸水率和溶胀能力,其性能优于 Kunioka 等制备的水凝胶。

辐射交联制备 γ -PGA 水凝胶,反应过程中不需要添加交联剂,产物纯度高,并且操作简便,辐射交联反应在较低温度下发生,同时对产物进行了辐射灭菌。但是需要电子直线加速器或⁶⁰Co 辐射装置,因此其广泛应用受到限制。

1.2 化学交联

1.2.1 二元胺作为交联剂 在水溶液中,以水溶性碳化二亚胺(WSC)为催化剂, γ -PGA 与烷基二胺(如 1,3-丙二胺(1,3-PD)、1,4-丁二胺(1,4-BD)、1,6-己二胺(1,6-HD)等反应可制备 γ -PGA 水凝胶^[6],如 Scheme 2 所示,先用 WSC 活化 γ -PGA 链上的 γ -羧基,然后再加入二元胺进行交联,其吸水率介于 300 ~ 1993 g/g 之间。如果对 PGA-WSC 产物进行冷冻干燥处理后再加入二元胺,得到的水凝胶产率较高。

但多数二元胺,如 1,3-丙二胺、1,4-丁二胺和 1,6-己二胺等,熔点较高,室温下是固体,操作困难,反应得率最高才 39.9%,并且二元胺类化合物对于环境和人体有害,制约了其在生物医药领域的应用。Murakami 等^[7]利用天然糖类替代二元胺化合物作为交联剂,与 γ -PGA 在 DMSO 中反应生成水凝胶,所得水凝胶最高吸水率为 3000 g/g。 γ -PGA 与环糊精反应制得的水凝胶吸水率普遍高于 γ -PGA 与直链糖类反应所得水凝胶。Murakami 等^[7]还考察了此种水凝胶在碱性条件下的水解。此外,同样在 WSC 催化下,赖氨酸(PLL)和 γ -聚谷氨酸通过侧链上羰基和氨基以酰胺键结合,得到无毒的可生物降解水凝胶^[8]。

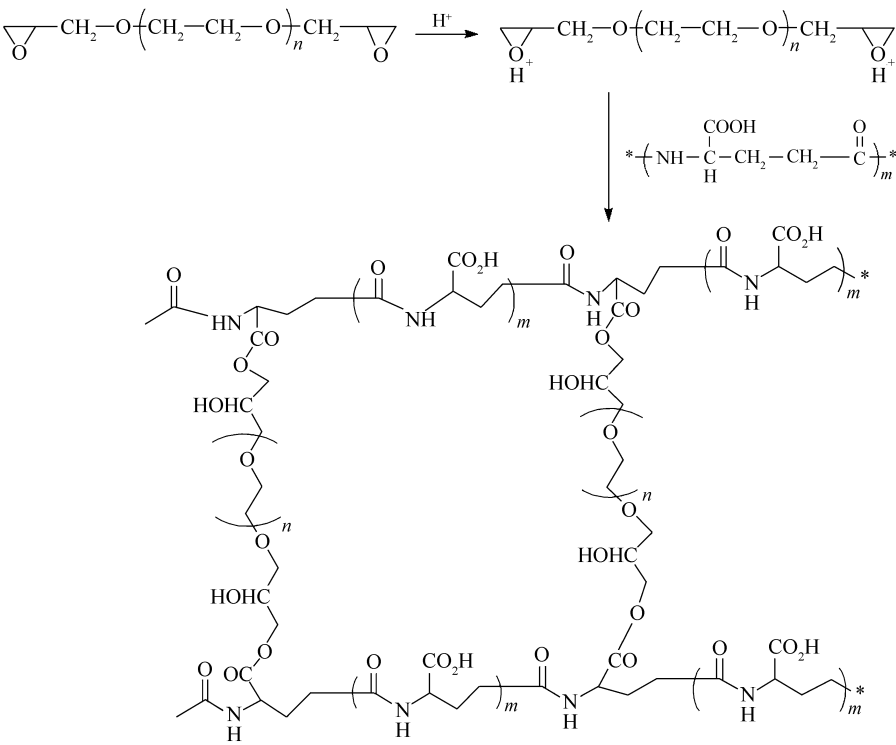


Scheme 2 γ -PGA hydrogel crosslinked by diamine^[6]

1.2.2 环氧树脂作为交联剂 环氧树脂分子内含有 2 个环氧基,性质活泼,与二元胺类通过酰胺键进行的交联反应条件相比,环氧树脂同 γ -PGA 的反应更为温和且易于操作。如 Scheme 3 所示,环氧树脂端基的环氧环在酸性条件下开环,进攻 γ -PGA 侧链的羰基,形成酯键^[9]。反应无需活化过程和有机溶剂,采用含二元环或多元环的环氧树脂进行反应,可制得吸水率不同的水凝胶。

1) 以乙二醇缩水甘油醚为交联剂

张新民等^[10-11]以聚谷氨酸为原料,以乙二醇缩水甘油醚为交联剂,通过交联剂上的环氧基和 γ -PGA 侧链的游离羧基酯化反应,制备得到具有网络结构的 γ -PGA 高吸水树脂。 γ -PGA 质量浓度为 120 g/L,乙二醇缩水甘油醚用量为 γ -PGA 的 18.75%,pH = 5.0,在 60 °C 下反应 44 ~ 48 h,得到吸水率为 950 g/g



Scheme 3 γ -PGA hydrogel crosslinked by epoxy resin^[9]

的高吸水性树脂。

本课题组^[12]以聚谷氨酸为原料,乙二醇二缩水甘油醚为交联剂,通过在制备过程中不断调节 pH 值至初始值,制备得到了吸水率为 1600 ~ 2200 g/g 的高吸水性水凝胶。

2) 以聚乙二醇缩水甘油醚为交联剂

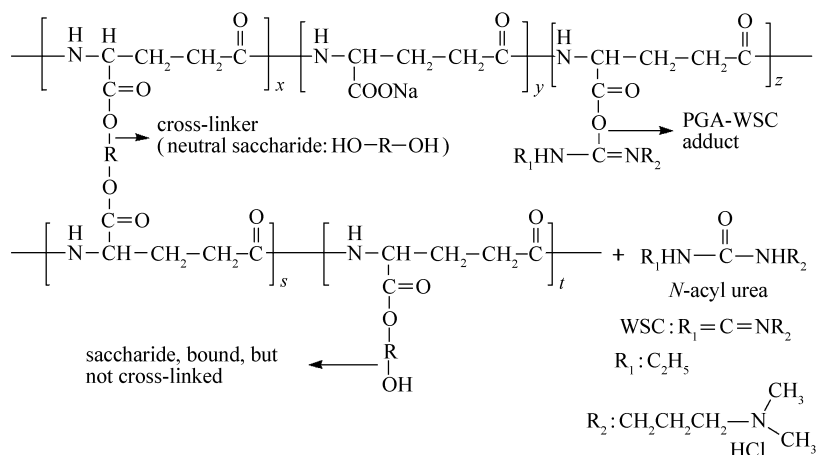
李贺敏等^[9,13]以 γ -PGA 为原料、聚乙二醇缩水甘油醚为交联剂制备高吸水树脂的最佳反应条件为: γ -PGA 质量分数为 18 %,交联剂用量为 γ -PGA 单体摩尔量的 8 %,pH = 4.8,60 °C,反应 40 h 左右。用聚乙二醇相对分子质量为 1000 (PEG-1000) 缩水甘油醚为交联剂合成的吸水树脂的吸水率最大可达 2200 g/g。

3) 1,4-丁二醇二缩水甘油醚(BDDGE)作为交联剂

YAO 等^[14]以 BDDGE 作交联剂制备 γ -PGA 水凝胶的条件是:0.2 g γ -PGA,16 mg BDDGE,8 mg 溴化四乙胺作催化剂,溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,在 60 °C 水浴摇床反应 48 h。 γ -PGA 的质量分数低于 15 %,不能与交联剂有效交联,得不到水凝胶,BDDGE 和羧基的摩尔比低于 0.022,也不能形成水凝胶。随着 BDDGE 增加,凝胶交联度增加,力学强度也增加,BDDGE 用量太小时,形成的凝胶很软,吸水状态下很易变形;BDDGE 太多时,力学强度增大,但吸水率很低,而且很容易破碎。pH 值在 2 ~ 10,凝胶的吸水率随着 pH 值增大而上升。pH 值小于 5,凝胶吸水率随着羧基的电离而增大,pH 值大于 7,在碱性条件下凝胶合成时引入的大量氢键被破坏,凝胶吸水率增加。因此,吸水率随 pH 值增加而增大的凝胶变化范围更大,更有可能用作 pH 敏感材料。

1.2.3 糖类作为交联剂 Murakami 等^[7]以糖类为交联剂制备了 γ -PGA 水凝胶,如 Scheme 4 所示, γ -PGA 的侧链羧基与糖类中的羟基酯化形成水凝胶。100 mg (0.77 mmol) γ -PGA、9.4 mg (0.077 mmol) DMAP、糖(果糖、乳糖、环糊精,用量为 γ -PGA 摩尔分数的 25%)和 1 mL DMSO 加到一起超声溶解,完全溶解后加入 80 mg WSC,25 °C 搅拌反应 24 h,若用水溶性壳聚糖则反应体系体积减半。反应结束后加入过量丙酮分离产物。得到的产物保存到 pH = 7 的磷酸缓冲液中过夜,然后加入 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8,再把溶液透析 1 周,每天换 1 次蒸馏水,再除去过多水分后冻干,得到干燥的凝胶。用环糊精作交联剂时所得凝胶的吸水率比其它糖类要高得多。随着糖用量的增加,凝胶交联度增加,吸水率降

低。用糖交联得到的凝胶可以完全生物降解。

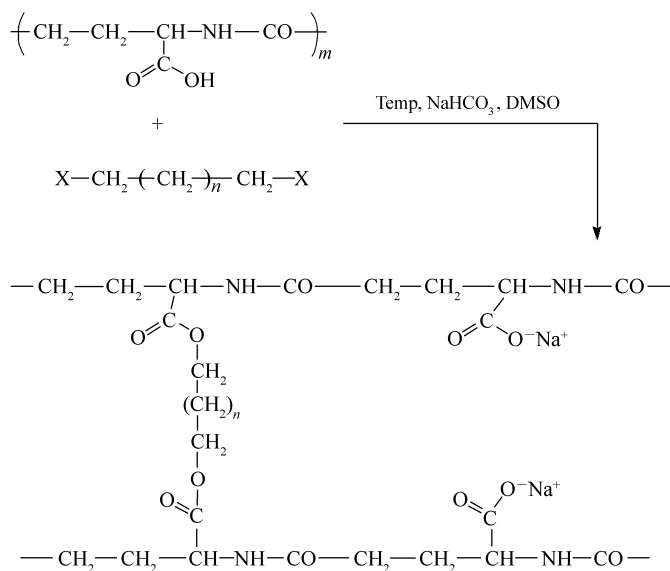


Scheme 4 Possible structure of γ -PGA gels cross-linked by neutral saccharides^[7]

本课题组^[15]以 γ -PGA 为原料,采用低相对分子质量壳聚糖(也叫壳寡糖)为交联剂,在水溶液中进行反应,利用碳化二胺和 *N*-羧基琥珀酰亚胺活化聚谷氨酸上的羧基使之与壳寡糖的游离氨基形成酰胺键,进而形成具有三维网状结构的具有生物相容性的 γ -PGA 水凝胶。

γ -PGA 水凝胶可以应用于环境和生物医学有关领域,最终在环境或者人体内降解。以天然化合物为交联剂的最终降解产物对环境或者人体无害^[7]。

1.2.4 卤代烷作为交联剂 二卤代烷作为交联剂在二甲亚砜(DMSO)和 NaHCO_3 中与 γ -PGA 形成水凝胶。如 Scheme 5 所示^[16],但反应条件苛刻,它必须用游离型的聚谷氨酸,按照一定质量比(如 20/80)溶解在 DMSO 中,经 NaHCO_3 的催化与聚谷氨酸交联。 NaHCO_3 用量一般是聚谷氨酸单体摩尔量的 0.5 ~ 2 倍,在此范围内随着 NaHCO_3 用量的增加,凝胶得率增加。此法优点是产物的得率较高(95% 以上),并且对 γ -PGA 的酯化有借鉴作用。缺点在于反应步骤多、工艺复杂、凝胶吸水率比较低(100 倍左右)。反应须在有机相(DMSO)中进行,且须使用催化剂,给分离带来困难。而 γ -PGA 与正丙基溴发生酯化反应,所得丙酯化的 γ -PGA 在 NaCl 溶液中表现出温敏特性,酯化后的 γ -PGA 与六甲撑二异腈酸酯反应生成的低吸水率水凝胶同样具有 pH 敏感性和温敏的特性,可应用于生物领域^[17]。

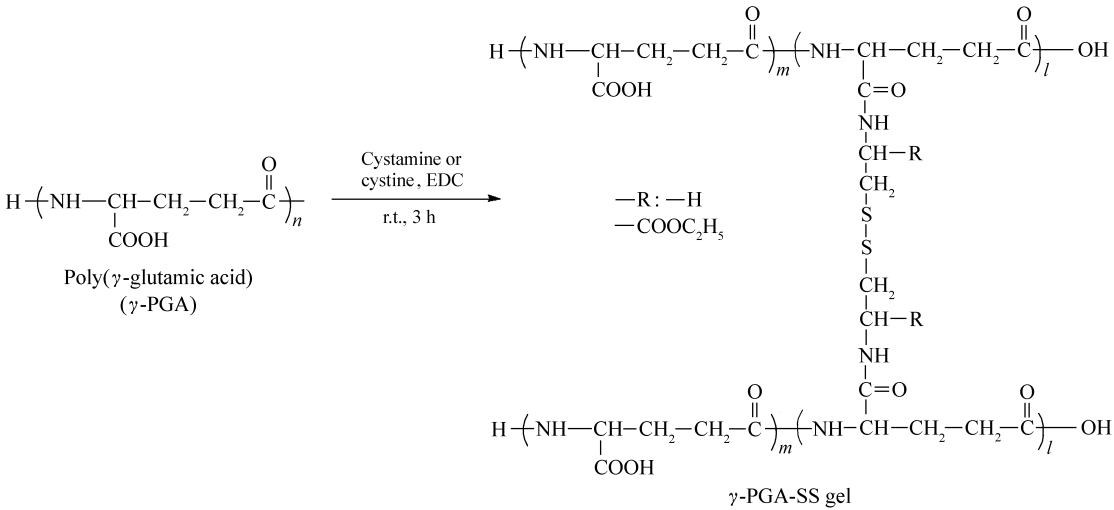


Scheme 5 γ -PGA hydrogel crosslinked by saturated dihalide^[16]

1.2.5 多价金属离子作为交联剂 张绪瑛等^[18]用 γ -PGA 作为载体,螯合金属离子钙,得到一种新型

的钙制剂,γ-PGA 质量分数 1%,氯化钙(CaCl₂)浓度 0.5 mol/L,37 ℃ 反应 2 h,当羧基与钙离子摩尔比为 1:2 时,结合率可达 54%,具有缓释能力,在酸性及中性条件下均能缓慢释放钙。张绪瑛等^[19]还用 γ-PGA 为载体,螯合金属离子锰,当羧基与锰离子物质的量比为 1:2 时,结合率可高达 91%,具有良好的抗氧化作用及缓释作用。Huang 等^[20]用质量分数 10% 的 γ-聚谷氨酸钙盐(Ca-γ-PGA)和质量分数为 5% 的海藻酸钠制得的水凝胶膜片,具有 pH 敏感性,用作伤口辅料,可有效地促进凝血。张新民等^[11]以聚谷氨酸为原料,十二水硫酸铝钾(明矾)为交联剂,得到网络结构的 γ-PGA 高吸水树脂。当 2 g 聚谷氨酸、5 mL 0.2 mol/L 十二水硫酸铝钾、7 mL 蒸馏水混合时,在 pH = 4.2,40 ℃ 反应 32 h,可得吸水率为 115 g/g 高吸水性树脂。

1.2.6 二硫键交联 γ-PGA 与半胱氨酸在 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)催化下发生缩合反应,制备得到含有二硫键交联的 γ-PGA 水凝胶在生理环境下易于降解,体内的还原剂(如半胱氨酸和谷胱甘肽)均可使二硫键断裂形成硫醇,如 Scheme 6 所示。此种水凝胶可视为构建细胞和细胞外基质三维组织工程的模型,是培养细胞和细胞产胶原的新型高密度复合材料,可广泛应用于组织工程领域^[21]。



Scheme 6 γ-PGA hydrogel crosslinked by disulfide bond^[21]

1.2.7 其它交联剂 γ-PGA 水凝胶具有 pH 敏感性,通常与具有温度敏感性的聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)及其共聚物制备具有 pH 和温度双重敏感的水凝胶。Zhao 等^[22]将聚(NIPAM-co-HEMA)(PNH)和 γ-PGA 共 100 mg,按一定比例加入并溶解在 1.5 mL 的 DMSO 中,完全溶解后加入 50 mg EDC·HCl 和 6 mg 4,4-二甲基氨基吡啶(DMAP)的溶液作为引发剂和催化剂,充分混匀后在室温下反应 24 h,制得的水凝胶具有 pH 敏感和温度敏感性。Rodriguez-Felix 等^[23]以 1,5-二溴戊烷为交联剂制得 γ-PGA 水凝胶。然后将干燥的 γ-PGA 水凝胶置于丙烯酰胺溶液(29 g 丙烯酰胺和 1 g *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺)中溶胀,*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺为交联剂,然后加入过硫酸铵(引发剂)以及四甲基乙二胺(催化剂)。冰浴条件,γ-PGA 水凝胶充分溶胀,反应约 10 min,制得具有 pH 和温度双重敏感性水凝胶。

综上所述,通过物理作用力形成的 γ-PGA 水凝胶受热时可转变成溶液,而采用化学交联剂制备的 γ-PGA 水凝胶具有永久性,但有可能影响包埋物质的性质,而且交联剂本身往往有毒,所以在使用之前一定要除去未反应的交联剂,以免影响水凝胶的生物相容性。

2 γ-聚谷氨酸水凝胶的性能

2.1 生物可降解性

Matsusaki 等^[24]将 γ-PGA(*M_w* = 1.23 × 10⁶) 在 80 ℃ 下置于磷酸缓冲溶液(pH = 7.4)中 48 h。体系中存在低聚物 γ-PGA(*M_w* = 2 × 10³),并且随着时间的延长,低聚物的含量增加。Kunioka 等^[25]将 γ-射线辐射交联制得的 γ-PGA 水凝胶置于去离子水中,在 40 ℃ 加热 3 h 后,水凝胶没有降解;而将温度升至

100 ℃、45 min 后,有 76% 的 γ -PGA 水凝胶降解。

王敬等^[26]以 γ -PGA 为原料,甲基丙烯酸羟乙酯作交联剂制得的 γ -PGA 水凝胶在 37 ℃ 下,加入木瓜蛋白酶,5 d 后能降解 60%,15 d 时仅残余少量水凝胶,具有良好的生物降解性。

2.2 高吸水性及保湿性

γ -PGA 含有侧链羧基,具有很强的亲水性,将其通过物理或者化学方法制备成为三维网状结构,使得 γ -PGA 水凝胶既具有很高的吸水性(可高达几千倍的吸水量)又具有很好的保湿性。Murakami 等^[7]用天然糖类作为交联剂与 γ -PGA 在 DMSO 中反应,所得水凝胶最高吸水率为 3000 g/g; Lee 等^[27]制备出以 γ -PGA 为主要成分的水凝胶,其水汽透过率为 (2.97 ± 0.11) kg/(m²·d),将其用于创伤敷料,可有效地防止创伤部位水分流失。

2.3 pH 敏感性

γ -PGA 含有侧链羧基,在酸性条件下发生质子化,减少了电荷排斥,凝胶分子网格塌陷,使得溶胀体积收缩;而在碱性条件下,则充分去质子化,生成大量的羧基负离子,产生电荷排斥,溶胀率较高。即随着 pH 值的增大, γ -PGA 水凝胶的溶胀率也逐渐变大,具有 pH 敏感性。Kunioka 等^[25]通过辐射交联制备得到的 γ -PGA 水凝胶,在不同 pH 值缓冲溶液中的溶胀率如图 1 所示。从图 1 可以看出, γ -PGA 水凝胶在碱性条件下的溶胀率高于在酸性介质中。

2.4 良好的生物相容性

水凝胶的表面对于蛋白质及细胞的粘附性很小。并且含有大量的水,柔软而类似生物体组织^[28]。生物来源的 γ -PGA 水凝胶具有良好的组织相容性且无毒。王敬等^[26]对 γ -PGA 水凝胶的细胞毒性实验检测表明,L929 细胞在 γ -PGA 水凝胶浸提液中的形态正常;MTT 检测表明 γ -PGA 水凝胶浸提液组毒性为 0 级或 1 级。

2.5 可修饰性

γ -PGA 水凝胶主链上的大量羧基易于修饰,因而易于和药物结合,有效提高药物的水溶性及稳定性,提高药物生物利用度,降低药物毒副作用。Matsusaki 等^[24]用 γ -PGA 和牛磺酸为原料,在 γ -PGA 侧链羧基上链接上磺酸基,如 Scheme 7 所示,实验证明,该磺化 γ -PGA 具有抗凝性。Lin 等^[29]以 γ -PGA/明胶为原料制备水凝胶,负载庆大霉素后,将其用作创伤敷料,可有效地促进伤口愈合。 γ -PGA 水凝胶还可以通过控制条件使之具备很好的缓释和控释性能,因而在生物医学领域,可用作药物传输体系、药物控释体系、创伤敷料的药物载体、生物分子和细胞的固定化载体等^[30]。

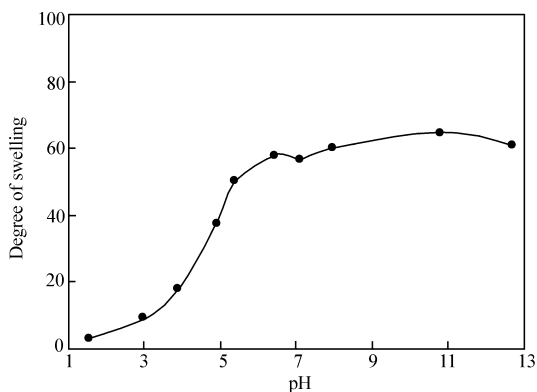
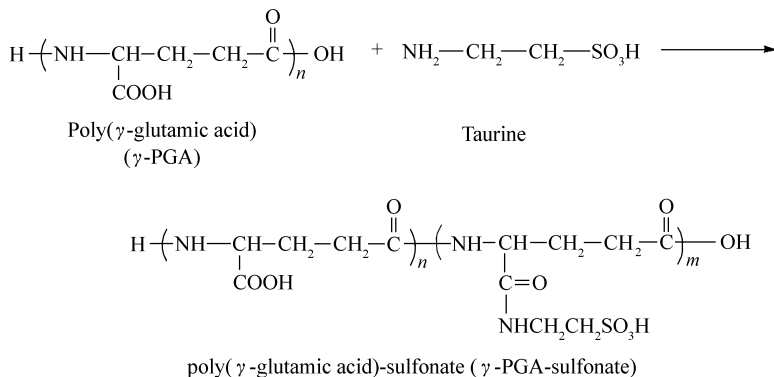


图 1 不同 pH 值缓冲溶液中溶胀变化

Fig. 1 Degree of swelling change as a function of pH at constant ionic strength(25 mmol/L)^[25]



Scheme 7 Synthesis of poly(γ -glutamic acid sulfonate) (γ -PGA-sulfonate)^[24]

3 γ -聚谷氨酸水凝胶的应用

无论是均聚 γ -PGA 水凝胶还是共聚水凝胶,均具有良好的生物相容性和亲水性,适用于多种组织工程材料和药物缓释材料。同时,由于 γ -PGA 水凝胶的保水能力和絮凝能力,还可广泛应用于美容化妆和农业生产领域。

3.1 组织工程材料

理想的组织工程材料应具有以下几点:1)生物相容性好,在体内不引起炎症反应和毒性反应;2)降解速率可根据不同细胞的组织再生速率而进行调整;3)表面化学特性和表面微结构利于细胞的粘附和生长;4)一定的力学强度。 γ -PGA 水凝胶既具有良好的生物可降解性以及组织相容性,又具有较强的力学强度,同时其侧链含有可修饰的羧基,可以负载生长因子等,因此可以用于组织工程材料。

以 72% 磺化的 γ -PGA 和纯 γ -PGA 为原料,乙二醇二缩水甘油醚(EGDGE)为交联剂,形成半互穿网络高聚物^[31]。这种具有 pH 敏感性的水凝胶可包裹成纤维细胞生长因子(FGF-2),并可由 pH 调控释放具备生物活性的 FGF-2,是新一代组织工程材料^[32]。

Yoshida 等^[33]将含有二硫键的 γ -PGA 水凝胶进行静电纺丝,制备出了新型还原反应支架材料,能对特定还原剂——半胱氨酸产生降解行为,故称为还原反应支架材料。这种全新的电纺材料具备良好的生物相容性,利于细胞粘附和细胞增殖,可作为新兴抗感染组织工程支架材料。Gentilini 等^[34]将苯基修饰的 γ -PGA(γ -PGA-Bn)进行静电纺丝,制备出新型的没有细胞毒性有利于细胞粘附的支架材料。

Lee 等^[35]以 γ -PGA、磷灰石为原料制得的 γ -PGA/磷灰石复合物有利于 MC3T3-E1 细胞的增殖,并且其中含有组成骨骼的重要组分,因此可以应用于骨组织工程支架材料。

3.2 药物载体材料

γ -PGA 水凝胶具有良好的生物相容性和生物可降解性,作为药物载体可表现出药物缓释性、靶向性,提高药物水溶性,降低药物的不良反应,从而提高药效^[36]。

Lin 等^[37]由 γ -PGA 钠溶液和 PVA 间形成氢键制得具有血液相容性的新型共聚水凝胶。虽然该水凝胶的力学强度有所下降,但可减少血小板吸附和降低细胞毒性,将成为与血液接触类药物载体的优良材料。Lee 等^[38]用冷冻干燥和热交联的方法制备了由 PVA 和 γ -PGA 组成的 pH 敏感阴离子水凝胶。这种水凝胶也具备良好的生物相容性,可作为口服药物载体材料。Rodriguez-Felix 等^[39]以聚丙烯酰胺和 γ -PGA 为原料制得具有 pH 和温度双重敏感性水凝胶,用以负载阿莫西林,其药物释放量随着温度、pH 值以及 γ -PGA 含量的增大而增加,因此这种水凝胶对阿莫西林具有控制释放功能。

3.3 创面修复材料

传统创伤敷料可以起到保护创面、吸收渗出液,从而促进创面愈合的作用,但是容易与创面黏连,移除时给创面造成二次伤害。而水凝胶敷料具有良好的生物相容性和亲水性,可以吸出创面渗出液,同时保持创面清洁湿润,更重要的是水凝胶能够减少疤痕形成,阻止细菌侵入,防止感染。再加之 γ -PGA 侧链羧基具有很好的修饰性,因此既可以通过物理包埋,又可以对其进行化学链接的方法负载一些药物,从而更好地促进创面愈合。

Wang 等^[40]用 γ -PGA/壳聚糖复合材料制备了具有一定抗菌作用的创伤修复材料。Tsao 等^[41]用 γ -PGA 为聚阴离子,壳聚糖为聚阳离子制得具有抗菌活性和生物相容性的生物材料。该聚电解质复合物可以给创面提供较为合适的湿润环境,同时又具有很好的力学性能,可以从创面移除而不给创面带来二次伤害,可以作为创伤敷料促进伤口愈合^[42]。

Lee 等^[27]制备了由海藻酸盐/壳聚糖/ γ -聚谷氨酸组成的层状水凝胶,其吸水率达 1000%,且具有良好的透气性,可有效地促进创面伤口的愈合。Lin 等^[29]由 γ -PGA/明胶为原料制得的负载庆大霉素的水凝胶,具有较高的溶胀率及较低的粘附性,可以有效地促进创伤修复。

本课题组^[43]以 γ -聚谷氨酸为原料,以乙二醇二缩水甘油醚为交联剂,制备出负载有超氧化物歧化酶(SOD)的水凝胶。用牛磺酸制得的磺化 γ -PGA,模拟肝素结合区,提高了与蛋白类物质氨基的结合能力和 SOD 的负载量。体外细胞毒性实验表明,该凝胶体系具有较好的生物相容性,无细胞毒性。同时,

糖尿病鼠体内实验表明,该负载有 SOD 的水凝胶体系可以有效地促进伤口愈合。本课题组^[43]还采用 EDC/NHS 活化体系,以 SOD 的赖氨酸残基及聚谷氨酸侧链羧基,形成 SOD- γ -PGA 固定化产物,并用二胺类交联剂脲胺二盐酸制得复合 γ -聚谷氨酸/SOD 凝胶体系。SOD 固定量对凝胶的细胞毒性无影响,而抗氧化性能明显提升。由于 SOD 是人体内清除超氧阴离子的抗氧化酶,可有效抵抗氧化应激对皮肤创伤修复的伤害,因此这 2 种负载有 SOD 的 γ -聚谷氨酸水凝胶体系可用作慢性皮肤创伤修复敷料,促进伤口愈合。

3.4 其它生物应用

Zhou 等^[44]首先合成了聚(苯基谷氨酸)-共-聚谷氨酸(PBLG-co-PGA),然后与胶原交联(交联剂 NHS,EDC)生成全新的复合型生物材料。

Kuo 等^[45]用离子交换方法将海藻酸盐接枝到 γ -PGA 支链上,制备得到海藻酸盐/ γ -聚谷氨酸接枝共聚物,然后通过 EDC 的作用在海藻酸盐支链链接上磺化的 NHS,以便更好地负载神经元生长因子(NGF)。用这种负载有神经元生长因子的海藻酸盐/ γ -PGA 水凝胶体系可成功诱导全能性干细胞(iPS)分化,生成神经细胞。

3.5 环境领域

由 γ 射线辐射交联制得的 γ -PGA 水凝胶具有出色的絮凝吸附能力,可用于吸附,如高岭土、铁、镁等重金属离子和污水处理。Inbaraj 等^[46]制得的 γ -PGA 吸附剂,在 pH 值为 6、温度为 30 °C 时,对重金属镁的吸附量为 96.79 mg/g。Taniguchi 等^[47-49]通过⁶⁰Co 辐射制得的交联 γ -PGA 在辐射剂量为 20 kGy 时的吸水能力为 1005.6 mL/g。在高岭土悬浮液中只加入交联的 γ -PGA(C-L γ -PGA)时,没有出现絮凝现象,若用聚合氯化铝(PAC)预处理 C-L γ -PGA,则出现很明显的絮凝现象。C-L γ -PGA 的絮凝能力与其吸水能力有关,而与粘度无关。絮凝机理可以解释为 C-L γ -PGA、PVC 与被吸附成分(高岭土等)之间的静电作用,中和了这些组分的界面电势电位,从而起到絮凝的作用。日本公司研制出可用于污水处理的 γ -PGA 水凝胶促凝剂,少量该促凝剂(1 g/ton)和聚合氯化铝(PAC)就可用于污水处理^[50]。

3.6 食品领域

γ -PGA-Ca 具有抗冻性,可用于食品储存;另外,在食品中添加 γ -PGA-Ca 可以提高钙的浓度,防止骨质疏松症^[51]。

4 结论与展望

γ -PGA 水凝胶作为一种新型生物材料,具有良好的生物相容性、低细胞毒性、亲水性和保水性等优良性能,可广泛应用于生物医药、组织工程、农业生产和食品工程等诸多领域。不同的制备方法,所得 γ -PGA 水凝胶特性不同,因此,应从应用角度考虑 γ -PGA 水凝胶的合成和修饰方法,使其结构能满足其应用性能的要求,并拓宽其应用范围。

参 考 文 献

- [1] GUO Shengrong. Biomedicine Biodegradable Materials [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 201-208 (in Chinese).
郭圣荣. 医药用生物降解性高分子材料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 201-208.
- [2] CHEN Xiangbiao. Research of Hydrogel Wound Dressings[J]. *Light Text Ind Technol*, 2011, **40**(1): 66-68 (in Chinese).
陈向标. 水凝胶医用敷料的研究概况[J]. 轻纺工业与技术, 2011, **40**(1): 66-68.
- [3] Choil H J, Kunioka M. Preparation Conditions and Swelling Equilibria of Hydrogel Prepared by γ -Irradiation from Microbial Poly(γ -glutamic acid)[J]. *Radiat Phys Chem*, 1995, **46**(2): 175-179.
- [4] Kunioka M. Biodegradable Water Absorbent Synthesized from Bacterial Poly(amino acid)s[J]. *Macromol Biosci*, 2004, **4**(3): 324-329.
- [5] LIU Jing, JIN Yinghong, YANG Chao, et al. Preparation of Microbial Polyglutamic Acid Absorbent by Co γ -Ray and Research of Water Absorption Properties[J]. *Ion Exch Adsorpt*, 2007, **23**(2): 129-136 (in Chinese).
刘静, 金映虹, 杨超, 等. 利用 Co γ -射线制备微生物聚谷氨酸类吸水剂及其吸水性能研究[J]. 离子交换与吸附, 2007, **23**(2): 129-136.

- [6] Kunioka M, Furusawa K. Poly (γ -glutamic acid) Hydrogel Prepared from Microbial Poly (γ -glutamic acid) and Alkanediamine with Water-soluble Carbodiimide[J]. *J Appl Polym Sci*,1998,**65**(10):1889-1896.
- [7] Murakami S, Aoki N. Bio-based Hydrogels Prepared by Cross-linking of Microbial Poly(γ -glutamic acid) with Various Saccharides[J]. *Biomacromolecules*,2006,**7**(7):2122-2127.
- [8] Akagi T, Watanabe K, Kim H, *et al.* Stabilization of Polyion Complex Nanoparticles Composed of Poly(amino acid) Using Hydrophobic Interactions[J]. *Langmuir*,2010,**26**(4):2406-2413.
- [9] LI Hemin, ZHU Hongjun. Characterization of Poly Glutamic Acid Superabsorbent Resin[J]. *Chem Ind Times*,2006,**20**(9):26-28(in Chinese).
李贺敏,朱红军. 聚谷氨酸高吸水树脂的表征[J]. 化工时刊,2006,**20**(9):26-28.
- [10] ZHANG Xinmin. Preparation of γ -Poly Glutamic Acid and Superabsorbent Resin[D]. Nanjing:Nanjing University of Technology,2003(in Chinese).
张新民. γ -聚谷氨酸及高吸水树脂的制备研究[D]. 南京:南京工业大学,2003.
- [11] ZHANG Xinmin, YOU Qinghong, XU Hong. Preparation of Biodegradable Poly-glutamic Acid Superabsorbent Resin[J]. *Polym Mater Sci Eng*,2003,**19**(2):203-205(in Chinese).
张新民,游庆红,徐虹. 生物可降解型聚谷氨酸高吸水树脂的制备[J]. 高分子材料科学与工程,2003,**19**(2):203-205.
- [12] WANG Shufang, HU Yubin, HONG Yanhang, *et al.* A Process for Preparing the Poly Glutamic Acid Hydrogel: CN, ZL201010202161.8[P],2011-12-21(in Chinese).
王淑芳,胡玉彬,洪彦航,等. 一种聚谷氨酸水凝胶的制备方法:中国,ZL201010202161.8[P],2011-12-21.
- [13] LI Hemin. Preliminary Study for Synthesis and the Modification of Poly glutamic acid Superabsorbent Resin[D]. Nanjing:Nanjing University of Technology,2005(in Chinese).
李贺敏. 聚谷氨酸高吸水树脂的合成及改性的初步研究[D]. 南京:南京工业大学,2005.
- [14] Yao B, Yang C, Zhang K, *et al.* Syntheses and Characterization of pH-Sensitive Hydrogel from Poly(γ -glutamic) Acid[J]. *Mater Sci-Poland*,2009,**27**(1):319-327.
- [15] WANG Shufang, HONG Yanhang, ZHANG Mingrui, *et al.* A Process of Preparation of Biocompatible γ -Poly (glutamic acid):CN,ZL201110261625. X[P],2012-08-29(in Chinese).
王淑芳,洪彦航,张明睿,等. 生物相容性 γ -聚谷氨酸水凝胶制备方法:中国,ZL201110261625. X[P],2012-08-29.
- [16] Gonzales D, Fan K, Sevoian M. Synthesis and Swelling Characterizations of A Poly (gamma-glutamic acid) Hydrogel[J]. *J Polym Sci Pol Chem*,1996,**34**(10):2019-2027.
- [17] Shimokuri T, Kaneko T, Akashi M. Specific Thermosensitive Volume Change of Biopolymer Gels Derived from Propylated Poly(γ -glutamate)s[J]. *J Polym Sci Pol Chem*,2004,**42**(18):4492-4501.
- [18] ZHANG Xuying, YANG Yan, HUANG Jing, *et al.* Preparation and Properties of γ -Glutamic Acid Calcium[J]. *Food Sci*,2009,**30**(8):76-79(in Chinese).
张绪瑛,杨燕,黄静,等. γ -聚谷氨酸钙的制备及其性质研究[J]. 食品科学,2009,**30**(8):76-79.
- [19] ZHANG Xuying, LIU Wen, HUANG Jing, *et al.* Preparation and Properties of γ -Glutamic Acid Manganese[J]. *J Yunnan Univ*,2009,**31**(2):204-207(in Chinese).
张绪瑛,刘雯,黄静,等. γ -聚谷氨酸锰的制备及其性质研究[J]. 云南大学学报,2009,**31**(2):204-207.
- [20] Huang M H, Yang M C. Swelling and Biocompatibility of Sodium Alginate/Poly(γ -glutamic acid) Hydrogels[J]. *Polym Adv Technol*,2010,**21**(8):561-567.
- [21] Matsusaki M, Yoshida H, Akashi M. The Construction of 3D-engineered Tissues Composed of Cells and Extracellular Matrices by Hydrogel Template Approach[J]. *Biomaterials*,2007,**28**(17):2729-2737.
- [22] Zhao C W, Zhuang X L, He P. Synthesis of Biodegradable Thermo- and pH-responsive Hydrogels for Controlled Drug Release[J]. *Polymer*,2009,**50**(18):4308-4316.
- [23] Rodriguez-Felix D E, Castillo-Ortega M M, Real-Felix D. Synthesis and Swelling Properties of pH- and Temperature-Sensitive Interpenetrating Polymer Networks Composed of Polyacrylamide and Poly(γ -glutamic acid) [J]. *J Appl Polym Sci*,2011,**119**(6):3531-3537.
- [24] Matsusaki M, Serizawa T, Kishida A, *et al.* Novel Functional Biodegradable Polymer:Synthesis and Anticoagulant Activity of Poly(γ -Glutamic Acid) sulfonate[J]. *Bioconjugate Chem*,2002,**13**(1):23-28.
- [25] Choi H J, Kunioka M. Preparation Conditions and Swelling Equilibria of Hydrogel Prepared by γ -Irradiation from Microbial Poly(γ -glutamic acid) [J]. *Radiat Phys Chem*,1995,**46**(2):175-179.
- [26] WANG Jing, GAO Pei, SHEN Jing, *et al.* Preparation and Biological Safety Evaluation of γ -Polyglutamic Acid Hydrogel [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*,2008,**12**(1):56-62(in Chinese).
王敬,高陪,沈竞,等. γ -多聚谷氨酸水凝胶制备及生物安全性评价[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,

12(1):56-62.

- [27] Lee Y H, Chang J J, Yang M C, *et al.* Acceleration of Wound Healing in Diabetic Rats by Layered Hydrogel Dressing[J]. *Carbohydr Polym*, 2012, **88**(3):809-819.
- [28] RAO Zhigao, ZHOU Mingyuan, ZHANG Jianqing, *et al.* Preparation of Hydrogels and Application in Medical Science[J]. *Chinese J Med Instrum*, 2007, **13**(11):17-20 (in Chinese).
饶志高, 周明元, 张健清, 等. 水凝胶的制备及其在医学上的运用[J]. 中国医疗器械信息, 2007, **13**(11):17-20.
- [29] Lin Y H, Lin J H, Peng S F, *et al.* Multifunctional Gentamicin Supplementation of Poly(γ -glutamic acid)-Based Hydrogels for Wound Dressing Application[J]. *J Appl Polym Sci*, 2011, **120**(2):1057-1068.
- [30] WANG Hao, YANG Liping, QIAO Jun, *et al.* Research Progress of γ -Poly(glutamic acid)[J]. *Shandong Food Ferment*, 2011, (163):30-34 (in Chinese).
王浩, 杨丽萍, 乔君, 等. γ -聚谷氨酸的研究进展[J]. 山东食品发酵, 2011, (163):30-34.
- [31] Matsusaki M, Akashi M. Novel Functional Biodegradable Polymer IV: pH-Sensitive Controlled Release of Fibroblast Growth Factor-2 from a Poly(γ -glutamic acid)-Sulfonate Matrix for Tissue Engineering[J]. *Biomacromolecules*, 2005, **6**(6):3351-3356.
- [32] Lee K Y, Yuk S H. Polymeric Protein Delivery Systems[J]. *Prog Polym Sci*, 2007, **32**(7):667-669.
- [33] Yoshida H, Klinkhamer K, Matsusaki M, *et al.* Disulfide-Crosslinked Electrospun Poly(γ -glutamic acid) Nonwovens as Reduction-Responsive Scaffolds[J]. *Macromol Biosci*, 2009, **9**(6):568-574.
- [34] Gentilini C, Dong Yixiang, May J R, *et al.* Functionalized Poly(γ -Glutamic Acid) Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering[J]. *Adv Healthcare Mater*, 2012, **1**(3):308-315.
- [35] Lee E H, Kamigaito Y, Tsujimoto T, *et al.* Preparation of Poly(γ -glutamic acid) Hydrogel/Apatite Composites and Their Application for Scaffold of Cell Proliferation[J]. *Seni Gakkainshi*, 2010, **66**(4):104-111.
- [36] LI Jingbo, LI Ding, DENG Maocheng, *et al.* Properties, Preparation and Application of Poly(γ -glutamic acid)[J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2008, **27**(11):1789-1799 (in Chinese).
李晶博, 李丁, 邓毛程, 等. γ -聚谷氨酸的特性、生产及应用[J]. 化工进展, 2008, **27**(11):1789-1799.
- [37] Lin W C, Yu D G, Yang M C. Blood Compatibility of Novel Poly(γ -glutamic acid)/Polyvinyl Alcohol Hydrogels[J]. *Colloid Surface B*, 2006, **47**(1):43-49.
- [38] Lee Y G, Kang H S, Kim M S, *et al.* Thermally Crosslinked Anionic Hydrogels Composed of Poly(vinyl alcohol) and Poly(γ -glutamic acid): Preparation, Characterization, and Drug Permeation Behavior[J]. *J Appl Polym Sci*, 2008, **109**(6):3768-3775.
- [39] Rodriguez-Felix D E, Perez-Martinez C J, Castillo-Ortega M M, *et al.* pH- and Temperature-sensitive Semi-interpenetrating Network Hydrogels Composed of Poly(acrylamide) and Poly(γ -glutamic acid) as Amoxicillin Controlled-release System[J]. *Polym Bull*, 2012, **68**(1):197-207.
- [40] Wang C C, Su C H, Chen J P, *et al.* An Enhancement on Healing Effect of Wound Dressing: Acrylic Acid Grafted and γ -Polyglutamic Acid/Chitosan Immobilized Polypropylene Non-woven[J]. *Mater Sci Eng C*, 2009, **29**(5):1715-1724.
- [41] Tsao C T, Chang C H. Antibacterial Activity and Biocompatibility of A Chitosan- γ -poly(glutamic acid) Polyelectrolyte Complex Hydrogel[J]. *Carbohydr Res*, 2010, **345**(12):1774-1780.
- [42] Tsao C T, Chang C H, Lin Y Y, *et al.* Evaluation of Chitosan/ γ -Poly(glutamic acid) Polyelectrolyte Complex for Wound Dressing Materials[J]. *Carbohydr Polym*, 2011, **84**(2):812-819.
- [43] HONG Yanhang. Preparation of γ -Poly(glutamic acid) and Application in Wound Healing[D]. Tianjin: Nankai University, 2012 (in Chinese).
洪彦航. γ -聚谷氨酸凝胶体系制备及创伤修复应用[D]. 天津: 南开大学, 2012.
- [44] Zhou X M, Wang Y J, Ren L, *et al.* Novel Biomimetic Composite Based on Collagen and Poly(γ -benzyl L-glutamate)-co-poly(glutamic acid)[J]. *Polym Adv Technol*, 2008, **19**(3):244-249.
- [45] Kuo Y C, Chang Y H. Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells Toward Neurons in Hydrogel Biomaterials[J]. *Colloid Surf B*, 2013, **102**:405-411.
- [46] Inbaraj B S, Wang J S, Lu J F, *et al.* Adsorption of Toxic Mercury(II) by an Extracellular Biopolymer Poly(γ -glutamic acid)[J]. *Bioresour Technol*, 2009, **100**(1):220-207.
- [47] Taniguchi M, Kato K, Shimauchi A, *et al.* Physicochemical Properties of Cross-linked Poly-Glutamic Acid and Its Flocculating Activity against Kaolin Suspension[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, **99**(2):130-135.
- [48] Tarul Y, Lida H, Ono E, *et al.* Biosynthesis of Poly- γ -Glutamic Acid in Plants; Transient Expression of Poly- γ -Glutamate Synthetase Complex in Tobacco Leaves[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, **100**(4):443-448.
- [49] Taniguchi M, Kato K, Shimauchi A, *et al.* Proposals for Wastewater Treatment by Applying Flocculating Activity of Cross-linked Poly- γ -Glutamic Acid[J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, **99**(3):245-251.

- [50] Kunioka M. Biodegradable Water Absorbent Synthesized from Bacterial Poly(aminoacid)s[J]. *Macromol Biosci*, 2004, 4(3):324-329.
- [51] Buescher J M, Margaritis A. Microbial Biosynthesis of Polyglutamic Acid Biopolymer and Application in the Biopharmaceutical, Biomedical and Food Industries[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2007, 27(1):1-19.

Preparation, Performances and Application of γ -Polyglutamic Acid Hydrogel

ZHUANG Huahong^a, WANG Shufang^{a*}, GAO Jingchen^a,

HONG Yanhang^a, GAO Weixia^b, SONG Cunjiang^b

(^a*Education Ministry Key Laboratory of Bioactive Materials*;

^b*Education Ministry Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China*)

Abstract Preparation and performances of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) hydrogel were introduced systematically in this paper, including biodegradability, high water absorption and moisture retention, pH sensitivity, biocompatibility and modifiability. A comprehensive review of γ -PGA hydrogel in tissue engineering, drug delivery, wound healing and other applications was given. In addition, combined with the work of the authors, the future development of γ -PGA hydrogel was prospected.

Keywords γ -polyglutamic acid, homopolymer, hydrogel, preparation

Received 2013-04-10; Revised 2013-06-07; Accepted 2013-07-09

Supported by National Key Basic Research Program of China(“973” Program)(No. 2012CB725204), National Natural Science Foundation of China(No. 51073081, No. 31070039) and Tianjin Natural Science Foundation(No. 13JCYBJC24900)

Corresponding author: WANG Shufang, professor; Tel/Fax: 022-23503753; E-mail: wangshufang@nankai.edu.cn; Research interests: biomaterials and tissue engineering