

交联方法对草鱼皮胶原蛋白海绵性能的影响

汪海波¹, 梁艳萍¹, 李云雁¹, 王敏¹, 方成¹, 汪海婴^{2*}

(1. 武汉工业学院化学与环境工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 为探讨不同交联方法对草鱼皮胶原蛋白海绵材料性能的影响, 实验以草鱼鱼皮为原料, 提取、纯化胶原蛋白并制备胶原海绵材料。在此基础上, 分别用紫外交联、热交联、戊二醛交联以及 EDC/NHS 交联方法处理胶原海绵, 通过测定材料的交联度、热变性温度、拉伸强度和体外抗酶降解性能, 比较了不同方法的交联效果。结果发现, 提取所得的草鱼皮胶原蛋白为典型的 I 型胶原; 经不同方法交联处理后, 海绵材料交联度依次为戊二醛 (72.0%) > EDC/NHS (32.5%) > 热交联 (29.9%) > 紫外交联 (15.6%); 与对照胶原材料相比, 戊二醛处理后, 胶原材料的热变性峰值温度 (67.4 °C)、最大拉伸强度 (125.6 kPa) 和体外抗酶降解性能均有显著提升 ($P < 0.05$); EDC/NHS 处理后, 胶原材料的热变性焓显著提升 (6.86 J/g), 同时材料的拉伸强度 (98.6 kPa) 和体外抗酶降解性能也得到适度增加 ($P < 0.05$)。紫外交联和热交联对草鱼皮胶原材料性能的改善作用比较有限, 并可能导致胶原分子的部分变性。红外光谱的分析结果表明, 戊二醛处理可导致草鱼皮胶原三螺旋分子内产生新的共价键交联从而使材料性能改善, 而 EDC/NHS 处理主要导致胶原分子间产生新的氢键交联并可提高胶原材料的稳定性。研究表明, 戊二醛和 EDC/NHS 交联能有效提高胶原海绵材料的性能, 而热交联和紫外交联对材料性能的改善作用非常有限。

关键词: 草鱼; 鱼皮; 胶原蛋白; 交联

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

胶原蛋白 (collagen) 是机体结缔组织 (皮肤、跟腱等) 中最主要的结构蛋白之一, 根据其结构和功能的不同又可细分为 I、II、III 等 27 种类型^[1]。由于胶原蛋白具有低免疫原性、良好的细胞相容性等诸多优良的生物学特性, 近年来胶原蛋白在生物医学材料领域中得到了广泛的应用^[2]。如胶原海绵敷料被应用于外科手术的止血、空腔填充以及创面组织的快速修复; 胶原蛋白与壳聚糖或羟基磷灰石形成的复合材料应用于骨组织工程领域; 以胶原蛋白为主要细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的支架材料 (scaffolds) 被应用于体外成纤维细胞培养等皮肤再造组织工程。目前, 应用于生物材料领域的胶原蛋白主要来源于哺乳动物的结缔组织, 如

牛、羊或猪的皮肤和跟腱。但近年来随着疯牛病、口蹄疫等人畜共患疾病的频繁爆发导致该类来源胶原产品的安全性越来越受到使用者的质疑。与此同时, 相对更为安全、制备成本更为低廉的鱼源胶原蛋白及其在生物材料领域的潜在应用价值正逐步受到学者的关注。国内外学者围绕鱼源胶原蛋白的提取、结构及相关理化性能已开展了诸多研究工作, 为鱼胶原蛋白的开发利用提供了大量有价值的科学信息^[3-8]。

与人工合成的生物材料 (如聚乳酸、聚羟基乙酸等) 相比, 热变性温度过低、机体内降解速率过快以及材料机械性能不理想是天然胶原蛋白的主要不足之处。国内外学者围绕天然胶原蛋白的性能

收稿日期: 2012-04-06 修回日期: 2012-09-22

资助项目: 国家自然科学基金面上项目 (21076166); 武汉市科技局科技攻关计划项目 (200920137006); 武汉市农副资源循环利用与新产品开发工程技术中心资助项目 (201120637175); 湖北省自然科学基金重点项目 (2009CDA117); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目 (T201208)

通信作者: 汪海婴, E-mail: 599081953@qq.com

改进开展了大量前沿研究,其中分子交联技术是改善天然胶原蛋白性能的常用手段之一。胶原蛋白的分子交联可分为物理交联法和化学交联法,其中热交联和紫外交联是最常用的物理交联手段,而戊二醛、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)是常用的化学交联试剂^[9]。针对这些交联方法在哺乳动物源胶原蛋白中的应用及性能改进已有相关研究^[10-12],而有关鱼源胶原蛋白的交联技术应用及其对胶原材料性能的影响却鲜有报道。为此,本研究以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)鱼皮为原料,提取鱼皮胶原蛋白,并尝试利用不同的交联方法对该胶原材料进行交联处理,评价不同交联方法对鱼皮胶原性能的影响,为鱼源胶原在生物材料领域中的应用提供有价值的科学信息。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

原材料 新鲜草鱼(平均体质量每条约 1 000 g,购于武汉市常青花园武商量贩超市),人工分离鱼皮后去除鱼皮上附着鱼肉,随后对鱼皮进行充分洗涤并切成小片,冻藏(-20 ℃)备用。

试剂和仪器 NaOH、NaCl、Na₂CO₃、乙酸、戊二醛等化学试剂均为国产分析纯;胃蛋白酶(800~2 500 U/mg)购置于丰达生物科技有限公司;I 型胶原蛋白酶(酶活力为 30 U/mg)购置于 Sigma 公司;I 型猪皮胶原蛋白,实验室自制。

数显鼓风恒温干燥箱,GZX-9070MBE,英峪子华仪器厂;PHS-3C pH 计,杭州东星仪器设备厂;Cary-50 紫外可见分光光度计,美国 VARIAN 公司;HSSH-2 电热恒温水浴锅,北京长安科学仪器厂;V-1100 可见光分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;LGJ-10D 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;NEXUS 傅里叶红外光谱分析仪,美国 Thermo Nicolet 公司;VARIAN 高效液相色谱仪,美国 VARIAN 公司;QX-W100 微机控制电子万能材料试验机,上海企想公司;S-3000N 扫描电镜,日本日立公司;DSC-Q10 差示扫描量热仪,美国 TA 公司。

1.2 实验方法

草鱼皮胶原蛋白的提取、纯化^[13] 以下所有操作均在低于 20 ℃ 的条件下进行。解冻后的鱼皮原料用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液浸泡 24 h 脱除杂蛋白,随后用去离子水充分洗涤至中性并

用 10% 的正丁醇溶液浸泡脱脂 24 h。脱脂鱼皮用去离子水反复洗涤、沥干后用含有 1.0% (w/v) 胃蛋白酶的 0.5 mol/L 乙酸(1:40, w/v) 搅拌提取 48 h,离心。向上清液中添加 NaCl 至盐浓度为 0.9 mol/L,静置盐析 24 h 后过滤,胶原蛋白沉淀用 0.5 mol/L 的乙酸溶液复溶后依次用 0.1 mol/L 的乙酸和蒸馏水透析,最后冷冻干燥得到草鱼鱼皮胶原蛋白样品。

胶原蛋白的结构表征 分别采用高效液相色谱法和 SDS-PAGE 垂直凝胶电泳分析胶原样品的氨基酸组成和肽链组成。胶原样品经盐酸水解后测定氨基酸组成,测定条件^[14]: Sopium Amino Acid Analysis 色谱柱,线性梯度洗脱, A 相为 0.2 mol/L 柠檬酸钠水溶液 pH 3.00, B 相为 0.2 mol/L 硼酸钠水溶液 pH 9.80,洗脱液流速为 0.4 mL/min,柱温为 65 ℃;SDS-PAGE 垂直凝胶电泳分析条件^[15]:样品缓冲液为 60 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8,含 25% 甘油,2% SDS,14.4 mmol/L β-巯基乙醇,0.1% 溴酚蓝),染色液为 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 甲醇水染色液,脱色液为酸甲醇水(含 10% 乙酸,10% 甲醇),12% 分离胶,5% 堆积胶,电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.3, 0.1% SDS)。

胶原海绵及其交联样品的制备 冻干的鱼皮胶原蛋白样品用 0.05 mol/L 的乙酸充分溶解并配置成浓度为 10 mg/mL 的胶原蛋白溶液,负压脱气处理后,将胶原蛋白溶液注入内径 14 mm,长 20 cm 的硅胶管中,于 -45 ℃ 条件下冻干处理 48 h,制得干燥成形的柱状胶原海绵材料,4 ℃ 条件下密闭保存备用。制备所得的柱状胶原海绵材料分别采用以下几种方法进行交联处理:(1)热交联^[16]:将冻干成型的胶原海绵材料置入真空干燥箱,150 ℃ 真空热交联 48 h。在保持真空的状态下缓慢降温至室温后将材料取出,得到热交联胶原蛋白海绵材料,4 ℃ 下密闭保存备用;(2)紫外交联^[17]:将冻干胶原海绵材料放在铝箔上,用医用紫外灯(功率 30 W)进行紫外照射交联,照射距离 20 cm,波长 254 nm,48 h 后得到紫外交联胶原蛋白海绵材料,4 ℃ 条件下密闭保存备用;(3)戊二醛交联^[10]:将冻干胶原海绵材料浸泡于含 0.2% 戊二醛的 0.05 mol/L 的乙酸溶液中,4 ℃ 条件下交联处理 24 h,随后取出材料并依次用 PBS 缓冲液和去离子水反复冲洗,冻干,得到

戊二醛交联胶原蛋白海绵材料,4℃条件下密闭保存备用;(4)EDC/NHS交联^[12]:将50 mmol/L 2-N-吗啡啉乙磺酸(MES)溶液(pH 5.5)与无水乙醇按体积比2:3配置成缓冲液,取该缓冲液100 mL,将胶原海绵材料浸入,室温下浸泡30 min,然后依次向缓冲液中加入200 mg 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺(EDC)和50 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),反应4 h后,将胶原海绵取出,用0.1 mol/L的Na₂HPO₄缓冲液漂洗两次,每次1 h,最后用蒸馏水冲洗4次,冲洗干净后将胶原海绵冻干备用。

胶原海绵性能分析 在胶原海绵材料制备的基础上,开展材料的相关性能分析。(1)交联度测定^[18]:采用测定交联前后胶原蛋白分子中游离氨基基团数量变化的方法评价胶原海绵的交联度,测定方法为精确称取2~4 mg的胶原冻干材料,浸入1.0 mL 4% (w/v)的NaHCO₃溶液,随后加入1.0 mL 0.5% (w/v)的2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)溶液,40℃反应2 h后加入3.0 mL浓度为6 mol/L的HCl溶液,60℃保温反应90 min后向反应液中加入5.0 mL的去离子水,定容至10 mL,测定该反应液345 nm处吸光度值。交联度(%) = [1 - (交联样品的吸光度值/交联样品的质量)/(未交联样品的吸光度值/未交联样品的质量)] × 100;(2)热稳定性分析:采用差式扫描量热仪测定样品变性温度,仪器测定前用金属钢进行校正,用空铝盒做对照,扫描温度范围20~80℃;升温速率2℃/min,样品室氮气流量为20 mL/min;(3)体外酶降解性能分析^[19]:准确称取胶原蛋白材料样品40 mg置于20 mL的胶原蛋白酶溶液中(胶原蛋白酶浓度0.5 mg/mL,缓冲体系为含0.8 mmol/L NaN₃和5 mmol/L CaCl₂的0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.4),随后将该样品液转移至透析袋中(截留分子量>14 000 u),37℃条件下透析,透析外液为总体积100 mL的0.01 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)。实时测定透析外液中羟脯氨酸总含量并绘制胶原蛋白样品的体外酶降解曲线。采用分光光度法定量测定羟脯氨酸含量^[20],测定标准曲线为 $Y = 0.1106x + 0.0193$ ($R^2 = 0.9998$, x 代表羟脯氨酸的质量浓度, Y 代表吸光值)。胶原蛋白降解率(%) = (透析外液中羟脯氨酸总量/胶原蛋白材料中初始羟脯氨酸总量) × 100;(4)材料机械性

能分析:将冻干成型的胶原蛋白柱状材料剪成大约7 cm长的样品,用游标卡尺测量材料外径后将材料两端固定在电子万能材料试验机的拉伸测定夹具上,材料的有效拉伸长度为40 mm,以50 mm/min的速率匀速拉伸至材料断裂,每组材料重复测定5次,计算材料的抗张强度(T/S , kPa)。抗张强度 = T_{\max}/S ,其中, T_{\max} 为材料最大拉伸力(N), S 为材料横截面积(mm²)。

胶原海绵材料结构解析 采用红外光谱和扫描电镜方法分析胶原海绵材料的微观结构。红外光谱测定条件为将胶原蛋白材料样品研磨成细粉后,取样约5 mg与150 mg KBr充分混匀,压片,放入样品室,测定扫描范围为4 000~400/cm,分辨率2/cm,扫描4次;扫描电镜分析条件为:将冻干成型的胶原蛋白材料样品裁剪成直径4 mm厚2 mm大小的小片,真空喷金后,扫描电镜观察样品表面结构。

1.3 数据处理

采用Origin 6.0自带统计学软件进行数据分析,计算平均值和标准偏差(SD),采用单因素方差分析进行多组间比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 草鱼鱼皮胶原蛋白的提取、纯化及结构表征

采用草鱼皮胶原蛋白的提取、纯化方法提取的草鱼鱼皮胶原蛋白冻干物为白色、蓬松状样品。该样品的SDS-PAGE凝胶电泳分析表明(图1),提取所得的草鱼皮胶原蛋白的亚基组成为两种 α 肽链(α_1 和 α_2),其中 α_1 肽链电泳条带的色度明显高于 α_2 ,提示草鱼皮胶原蛋白中可能存在2条同源 α_1 肽链。此外,从电泳图谱中还可以观察到少量的肽链二聚体(β -肽链)和三聚体(γ -肽链)片段,说明在该电泳条件下仍存在少量未完全解离的多肽链聚集体。草鱼鱼皮胶原蛋白的SDS-PAGE电泳图谱与对照猪皮胶原高度相似,同时也与文献报道的其他I型胶原电泳图谱基本一致^[21],说明提取所得的草鱼皮胶原蛋白为典型的I型胶原(由2条同源的 α_1 肽链和1条 α_2 肽链构成)。草鱼皮胶原蛋白样品的氨基酸组成分析表明(表1),该胶原蛋白富含甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸,同时还含有胶原蛋白的特征氨基酸——羟脯氨酸,其氨基酸组成与文献报道的其他鱼源胶原蛋白的氨基酸组成基本

一致^[22],但其脯氨酸和羟脯氨酸总含量(155 个残基/1 000 个氨基酸残基)低于猪皮胶原蛋白(166 个残基/1 000 个氨基酸残基)。国外学者的研究表明,脯氨酸和羟脯氨酸残基总含量与胶原蛋白的热变性温度存在正相关性,由此推测草鱼皮胶原蛋白的热变性温度低于猪皮胶原蛋白。

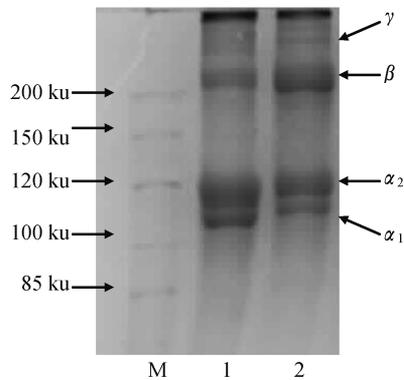


图 1 SDS-PAGE 电泳图谱

M. 蛋白质分子量标准; 1. 草鱼皮胶原蛋白; 2. 猪皮胶原蛋白。

Fig. 1 SDS-PAGE pattern

M. high molecular maker; 1. grass carp skin collagen; 2. pig skin collagen.

表 1 草鱼皮胶原蛋白的氨基酸组成分析
(氨基酸残基数/1 000 个氨基酸残基)

Tab. 1 Amino acid composition of grass carp skin collagen (residue number/1 000 residues)

氨基酸 amino acid	草鱼皮胶原蛋白 grass carp skin collagen	猪皮胶原蛋白 pig skin collagen
天冬氨酸 aspartic acid	61	56
苏氨酸 threonine	29	22
丝氨酸 serine	33	25
谷氨酸 glutamic acid	75	68
甘氨酸 glycine	380	396
丙氨酸 alanine	121	104
缬氨酸 valine	15	17
蛋氨酸 methionine	11	5
异亮氨酸 isoleucine	9	9
亮氨酸 leucine	18	25
酪氨酸 tyrosine	2	2
苯丙氨酸 phenylalanine	12	13
组氨酸 histidine	0	16
赖氨酸 lysine	22	28
精氨酸 arginine	57	48
脯氨酸 proline	79	92
羟脯氨酸 hydroxyproline	76	74
总计 total	1 000	1 000

注:色氨酸(tryptophan)在酸水解条件下被破坏,故未能测定。

Notes: The tryptophan was destroyed in hydrochloric acid, so the data of tryptophan was not expressed.

2.2 草鱼皮胶原蛋白海绵的交联及性能

本实验中,以提取所得的草鱼皮胶原蛋白为原料经冻干成型制备得到柱状胶原海绵材料,分别用不同的交联方法对该海绵材料进行交联处理,分析材料性能,考察不同交联方法对材料性能的影响。不同交联方法处理后材料的交联度、热稳定性及拉伸强度测定结果如表 2 所示。

交联度 在所选择的 4 种交联方法中,材料交联度大小依次为戊二醛 > EDC/NHS > 热交联 > 紫外交联 ($P < 0.05$)。该结果提示,与物理交联方法相比,化学交联方法(戊二醛和 EDC/NHS)能使目标胶原材料产生更多的分子内或分子间交联,这可能与几种交联方法的反应机制有关。尽管戊二醛参与的胶原蛋白的分子间交联机制目前尚没有完全明晰,但可以肯定的是,戊二醛通过与胶原分子链上的赖氨酸或羟基赖氨酸残基上的游离氨基反应,生成中间产物,然后通过该中间产物与其他的胶原分子或戊二醛分子以共价键形式形成分子间或分子内交联。EDC 诱导的胶原分子交联机制是 EDC 与胶原分子链中天冬氨酸或谷氨酸残基的羧基反应生成中间产物并通过该中间产物与相邻的胶原分子间形成异构肽键,从而形成胶原分子的分子间交联。与化学交联机制不同,物理交联没有因外来化学试剂介入而产生共价键产物,而是通过物理环境变化,诱导胶原分子自身基团之间产生键合交联。其中,紫外交联与胶原分子中酪氨酸、苯丙氨酸等芳香残基中未配对基团间的反应有关,而热交联与胶原分子中结合水的脱除以及胶原分子链中游离羧基和氨基间的脱水缩合反应有关^[9]。由于胶原蛋白分子中的芳香氨基酸残基含量很低(表 1),且羧基和氨基之间发生的脱水缩合反应需要较长的反应时间和较高的反应温度,因此物理交联方法的交联效率低于化学交联法。

热稳定性 提高胶原蛋白生物材料热稳定性是交联处理的主要目的之一。I 型胶原典型的结构特征是由 3 条 α 肽链通过肽链间形成的氢键相互缠绕形成的三螺旋结构(triple helix structure)。在极性溶剂(如水或酸溶液)存在条件下,当胶原分子经受热处理后,三螺旋结构间的氢键发生断裂而导致螺旋结构的解离,该过程称为胶原分子的热变性。热变性后,胶原分子的诸多理化性质会发生明显的改变,同时其许多重要

的生物学性能也随之丧失。本次实验中,采用 PBS 为溶剂,胶原材料经充分溶胀后测定其热变性起始温度、峰值温度以及热变性焓,考察不同交联方法对其热稳定性的影响。实验结果表明,未交联样品(对照)的变性峰值温度为 44.0 °C,高于去离子水溶胀条件下草鱼胶原蛋白的变性峰值温度(35.2 °C)^[23],说明 PBS 溶剂中的离子对胶原热稳定性有促进作用。戊二醛交联后,胶原材料的热变性起始温度和峰值温度均有显著提升($P < 0.05$),这显然与戊二醛交联后导致胶原分子三螺旋结构中产生了新的共价键种类有关;热交联和 EDC/NHS 交联后,胶原材料的变性起始温度和变性峰值温度仅有轻微提高($P > 0.05$),这是因为热交联和 EDC/NHS 交联主要是在胶原分子间而非三螺旋分子内形成交联键,因此其对胶原分子热变性温度提升的贡献度不大。但值得注意的是,与对照相比,EDC/NHS 交联处理后,胶原分子的热变性焓有显著提高,而热交联则正好相反($P < 0.05$)。该结果提示,EDC/NHS 交联后,单位质量胶原变性所需的能量明显提高,而热

交联在导致胶原分子间形成交联键的同时,胶原分子的三螺旋结构也已产生部分热解离。与对照材料相比,胶原材料经紫外交联后,其热变性起始温度、峰值温度和热变性焓均出现不同程度的下降($P < 0.05$),说明紫外照射对胶原分子三螺旋结构有弱化作用。

拉伸强度 胶原基生物材料应用于创伤修复和组织重构时会受到来自于机体组织内部和外部各种力的作用,只有当生物材料具有足够的力学性能时,其各项生物功能才能得以充分发挥。天然胶原材料的力学强度较低是其主要不足之处,而分子交联是改进胶原基生物材料力学性能的有效手段之一。胶原材料拉伸强度测定的实验结果表明(表 2),在所选择的 4 种交联方法中,戊二醛交联和 EDC/NHS 交联对胶原材料的拉伸强度均有显著的提升作用($P < 0.05$),而热交联和紫外交联对材料力学性能的影响较为有限($P > 0.05$),说明在提高胶原材料力学性能方面,化学交联法比物理交联法具有明显的优势。

表 2 交联方法对胶原材料性能的影响

Tab. 2 Effect of crosslinking on biological properties of grass carp skin collagen sponges

样品 samples	变性起始温度/°C onset transition temperature	变性峰值温度/°C maximum transition temperature	变性焓/(J/g) transition enthalpy	拉伸强度/kPa tensile strength	交联度/% degree of crosslinking
对照 control	39.3 ± 0.3 ^a	44.0 ± 0.4 ^a	2.09 ± 0.05 ^a	27.3 ± 3.6 ^a	—
戊二醛交联 glutaraldehyde crosslinking	61.4 ± 0.2 ^b	67.4 ± 0.4 ^b	1.42 ± 0.06 ^b	125.6 ± 9.2 ^b	72.0 ± 0.5 ^a
热交联 dehydrothermal crosslinking	40.6 ± 0.4 ^a	45.2 ± 0.6 ^a	0.22 ± 0.04 ^c	35.8 ± 4.1 ^a	29.9 ± 0.3 ^b
EDC/NHS 交联 EDC/NHS crosslinking	40.5 ± 0.3 ^a	45.6 ± 0.6 ^a	6.86 ± 0.10 ^d	98.6 ± 5.8 ^c	32.5 ± 0.4 ^c
紫外交联 UV crosslinking	32.3 ± 0.3 ^c	41.3 ± 0.3 ^c	1.50 ± 0.08 ^b	31.6 ± 4.3 ^a	15.6 ± 0.3 ^d

注:实验数据用平均值 ± SD 表示, $n = 5$ 。同列上方字母相同代表无显著性差异($P > 0.05$),不同字母表示显著性差异($P < 0.05$)。

Notes: Experiment datas were expressed as mean values ± SD, $n = 5$. The same letters in each line mean no significant difference ($P > 0.05$), the different letters mean significant difference ($P < 0.05$).

体外抗酶降解性能 在生物医学材料中,体内植入型材料要求具有良好的抗酶降解性能,从而保证生物材料在机体组织内能持久的发挥其生物功效。交联处理是提高胶原材料抗酶降解性能的常用手段之一。未交联(对照)和 4 种不同方法交联处理的草鱼皮胶原材料在胶原蛋白酶溶液中的降解性能如图 2 所示。从图中可以看到,与未交联的对照材料相比,戊二醛交联处理、热交联处理和 EDC/NHS 交联处理后胶原海绵的抗酶降解性能均有明显提升($P < 0.05$),其中以戊二醛交联处理后材料抗酶降解性能提升最为显著

($P < 0.01$),而紫外交联后材料的体外抗酶降解性能变化不大($P > 0.05$)。酶解 72 h 后,几种胶原海绵材料的酶降解率依次为对照(100%) > 紫外交联(98.2%) > 热交联(94.2%) > EDC/NHS(82.6%) > 戊二醛(18.2%)。结合交联度的测定结果(表 2)可以发现,胶原材料抗酶降解性能的提升与材料交联度之间存在正相关性,即交联度越高,则材料的抗酶降解性能越好。该结果提示,交联处理导致材料抗酶降解性能的提升可能是由于交联后胶原分子间的有效聚集阻碍了胶原酶的酶解位点,从而使酶解效率降低。

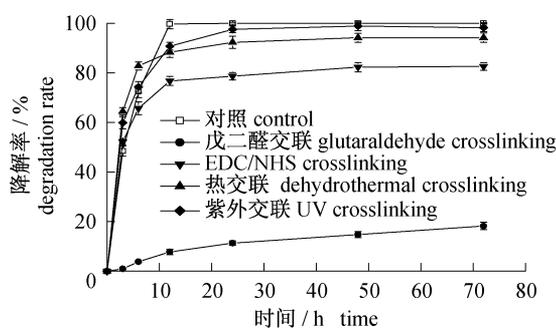


图2 不同交联方法对胶原材料体外抗酶降解性能的影响 ($n=3$)

Fig. 2 Effect of different crosslinking methods on the enzymatic sensitivity of collagen sponges ($n=3$)

2.3 胶原海绵材料的结构解析

红外光谱分析 红外光谱分析的结果表明,所有未交联和交联处理的草鱼皮胶原海绵材料均显示出胶原蛋白的特征红外吸收谱。不同样品的特征峰吸收波长值如表3所示。其中,酰胺A带是蛋白肽链骨架上N-H的伸缩振动峰;酰胺B带是 CH_2 的不对称伸缩振动峰;酰胺I带与 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动有关;酰胺II带归属于N-H和C-N的弯曲振动;酰胺III带与肽链中甘氨酸和脯氨酸残基的 CH_2 振动有关^[24]。国外学者的

研究表明,归属于酰胺A带的N-H的伸缩振动峰可反映胶原分子间的氢键键合程度。当肽链上的氨基以游离态为主时,其吸收波长多出现在 $3\ 400\sim 3\ 440/\text{cm}$,当氨基参与氢键键合时,酰胺A带的吸收峰波长发生蓝移^[25]。对比交联前后草鱼皮胶原蛋白酰胺A带的吸收波长,可以发现,紫外交联和EDC/NHS交联后,其酰胺A带由 $3\ 417/\text{cm}$ 蓝移至 $3\ 343/\text{cm}$,而热交联与戊二醛交联则未出现该变化,提示紫外交联和EDC/NHS交联主要导致胶原分子间氢键键合的增多。戊二醛交联后,胶原蛋白酰胺B带吸收峰发生明显蓝移($2\ 958/\text{cm}$ 蓝移至 $2\ 927/\text{cm}$),证实胶原蛋白肽链中的 CH_2 基团参与了戊二醛交联反应。胶原蛋白经不同方法交联处理后,其酰胺I带变化最为显著,如热交联后其 $1\ 639/\text{cm}$ 并肩峰发生红移(可能是羧基脱水缩合所致),紫外交联后, $1\ 639/\text{cm}$ 并肩峰消失,戊二醛和EDC/NHS交联后在 $1\ 627/\text{cm}$ 处产生新的并肩峰,提示胶原蛋白肽链中的羧基是参与各种交联反应最为活跃的基团。与其他交联方法相比,热交联后胶原蛋白红外吸收峰变化最小,该结果提示热交联主要导致胶原样品的重度脱水效应而非产生新的化学键合。

表3 交联前后草鱼皮胶原材料红外吸收峰的波长变化

Tab. 3 The changes in FTIR wavelength of grass carp collagen after crosslinked by different methods

样品 samples	酰胺A带/ ($/\text{cm}$) Amide A	酰胺B带/ ($/\text{cm}$) Amide B	酰胺I带/ ($/\text{cm}$) Amide I	酰胺II带/ ($/\text{cm}$) Amide II	酰胺III带/ ($/\text{cm}$) Amide III		
对照 control	3 417	2 958	1 658	1 639	-	1 565	1 238
热交联 dehydrothermal crosslinking	3 417	2 958	1 658	1 643	-	1 565	1 234
紫外交联 UV crosslinking	3 343	2 935	1 658	-	-	1 565	1 241
戊二醛交联 glutaraldehyde crosslinking	3 415	2 927	1 658	1 643	1 627	1 565	1 241
EDC/NHS交联 EDC/NHS crosslinking	3 343	2 958	1 654	1 643	1 627	1 565	1 241

扫描电镜分析 图3是交联前后各样品的扫描电镜图谱。从图中可以看到,未交联胶原样品为典型的多孔疏松结构,其超微结构较为杂乱、孔径大小分布极不均匀(图3-a)。热交联和紫外交联后,材料结构仍处于不均匀的分布状态,但材料孔径明显减小。与之相比,EDC/NHS交联后,材料表面光滑,孔径小且分布均匀,是生物材料理想的微观结构形式(该结构既能提供良好的介质传递通道又能提供良好的机械性能),而戊二醛交联样品呈现规则的层状皱褶结构,仅有少量大

小和分布不均一的孔洞存在,这显然是该材料具有最大拉伸强度的主要原因。

3 讨论

本实验以草鱼鱼皮为原料,采用酸-酶体系提取并分离纯化鱼皮胶原蛋白,经冻干成型制备得到柱状胶原海绵材料。在此基础上,分别采用热交联、紫外交联、戊二醛交联和EDC/NHS交联方法对该胶原海绵材料进行交联处理并通过材料性能测定考察各交联方法对海绵材料性能的影响。

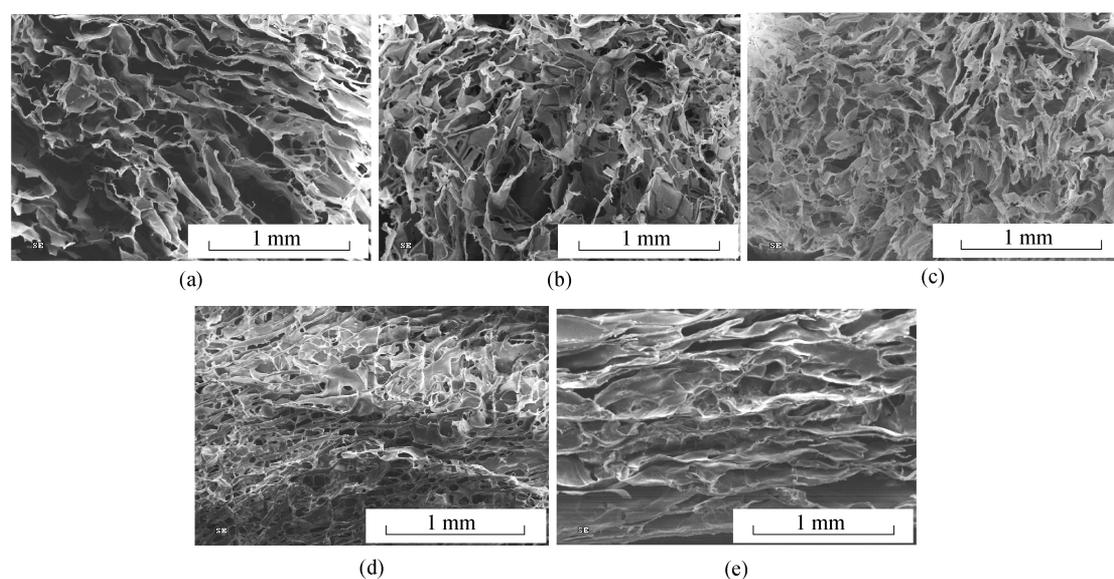


图3 交联前后胶原材料的扫描电镜观察图谱(×200)

a. 对照; b. 热交联; c. 紫外交联; d. EDC/NHS 交联; e. 戊二醛交联。

Fig. 3 Scanning electron micrograph of collagen sponges crosslinked by different methods

a. control; b. dehydrothermal; c. UV; d. EDC/NHS; e. glutaraldehyde.

响。实验结果表明,戊二醛处理可使胶原三螺旋分子内形成广泛的共价键交联,产品交联度高,材料的热变性温度、抗酶降解性能和拉伸性能等均得到明显改善;EDC/NHS 处理主要导致胶原分子间形成氢键和共价键交联,其产品的交联度低于戊二醛交联但高于紫外和热交联。EDC/NHS 交联后,胶原海绵的热变性温度无明显改变但其热变性焓显著提升。与对照样品相比,EDC/NHS 交联产品的机械性能和抗酶降解性能有所改善,但效果不及戊二醛交联。与化学交联方法相比,紫外交联和热交联产品的交联度较低,交联后产品的机械性能和体外抗酶降解性能改善并不明显,且采用这两种交联方法均会导致样品出现不同程度的蛋白质变性现象。

在目前已应用或正在研究的各种交联方法中,戊二醛交联是应用最广泛且效果最佳的方法,但戊二醛交联存在醛类残留以及细胞毒性等问题,使其产品应用受到限制。EDC/NHS 作为一种新型化学交联剂,具有接近戊二醛的交联效果,且 EDC/NHS 的细胞生物毒性远低于戊二醛,是一种极具应用前景的交联方法。紫外和热交联等物理交联法虽然不存在引入外来化学物质的潜在危险,但其交联度和对材料性能的改进效果有限,因此仅适用于作为一种辅助的性能改进方法。本研究采用的交联条件均是参考相关学者的研究

成果,如何对不同交联方法的交联条件进一步优化并因此产生更佳的材料性能尚需更深入的研究。

参考文献:

- [1] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 221 (1 - 2): 1 - 22.
- [2] Friess W. Collagen-biomaterial for drug delivery [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998, 45 (2): 113 - 136.
- [3] Zhang M, Liu W T, Li G Y. Isolation and characterization of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*) [J]. Food Chemistry, 2009, 115 (3): 826 - 831.
- [4] Zeng S K, Zhang C H, Lin H, et al. Isolation and characterization of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2009, 116 (4): 879 - 883.
- [5] Zhang J J, Duan R, Tian Y Y, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Food Chemistry, 2009, 116 (1): 318 - 322.
- [6] Duan R, Zhang J J, Du X Q, et al. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Food Chemistry, 2009, 112 (3): 702 - 706.

- [7] 梁艳萍,王艳,汪海波,等.草鱼鱼鳞胶原蛋白体外自组装行为的研究[J].食品科学,2011,32(23):15-20.
- [8] 汪海波,汪海婴,梁艳萍,等.草鱼鱼鳞胶原蛋白的凝胶性能研究[J].功能材料,2012,43(4):433-437.
- [9] 曹正国,李成章.常用蛋白交联方法及其对胶原的影响[J].国外医学生物医学工程分册,2001,24(4):187-191.
- [10] Olde Damink L H H, Dijkstra P J, Vanluyn M J A, *et al.* Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995, 6(8):460-472.
- [11] Olde Damink L H H, Dijkstra P J, Vanluyn M J A, *et al.* Crosslinking of dermal sheep collagen using hexamethylene diisocyanate[J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995, 6(7):429-434.
- [12] Lee J M, Edwards H H L, Pereira C A, *et al.* Crosslinking of tissue-derived biomaterials in 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) [J]. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1996, 7(9):531-541.
- [13] Wang L, An X X, Yang F M, *et al.* Isolation and characterization of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*) [J]. Food Chemistry, 2008, 108(2):616-623.
- [14] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Isolation and Characterisation of collagen from the skin of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4):1519-1526.
- [15] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259):680-685.
- [16] Tierney C M, Haugh M G, Liedl J, *et al.* The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering [J]. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2009, 2(2):202-209.
- [17] 李沫,罗卓荆,胡学昱,等.壳聚糖与I型胶原复合制作新型人工神经支架材料及其性能研究[J].中华创伤骨科杂志,2008,10(8):755-758.
- [18] Chen Y H, Zhang M, Liu W T, *et al.* Properties of alkali-solubilized collagen solution crosslinked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid [J]. Korea-Australia Rheology Journal, 2011, 23(1):41-48.
- [19] Nam K, Kimura T, Kishida A. Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gels [J]. Biomaterials, 2007, 28(1):1-8.
- [20] Reddy G K, Enwemeka C S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissue [J]. Clinical Biochemistry, 1996, 29(3):225-229.
- [21] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, *et al.* Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food chemistry, 2005, 89(3):363-372.
- [22] Nagai T, Worawattanamateekul W, Suzuki N, *et al.* Isolation and characterization of collagen from rhizostomous jellyfish (*Rhopilema asamushi*) [J]. Food Chemistry, 2000, 70(2):205-208.
- [23] 汪海波,梁艳萍,汪海婴,等.草鱼鱼鳞胶原蛋白的提取及其部分生物学性能[J].水产学报,2012,36(4):1-9.
- [24] Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, *et al.* Molecular interactions in collagen and chitosan blends [J]. Biomaterials, 2004, 25(5):795-801.
- [25] Doyle B B, Bendit E G, Blout E R. Infrared spectroscopy of collagen and collagen-like polypeptides [J]. Biopolymers, 1975, 14(5):937-957.

Effect of crosslinking method on biological properties of grass carp skin collagen sponges

WANG Haibo¹, LIANG Yanping¹, LI Yunyan¹, WANG Ming¹, FANG Cheng¹, WANG Haiying^{2*}

(1. Department of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: In this study, the effect of crosslinking method on biological properties of grass carp skin collagen sponge was discussed. Collagen was extracted from skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and collagen sponge was prepared from this collagen. Then, this collagen sponge was crosslinked with different methods, such as UV, dehydrothermal, EDC/NHS and glutaraldehyde crosslinking processes. At the same time, the biological and mechanical properties of those collagen sponges, including degree of crosslinking, denaturation temperature, tensile strength and enzymatic sensitivity *in vitro*, were evaluated and compared. Experiment results indicated that the grass carp skin collagen was type I collagen. The degree of crosslinking of different crosslinking methods decreased in the order of glutaraldehyde (72.0%) > EDC/NHS (32.5%) > dehydrothermal (29.9%) > UV (15.6%). Compared with control collagen sponges, the denaturation temperature (67.4 °C), tensile strength (125.6 kPa) and enzymatic sensitivity *in vitro* of collagen sponges crosslinked by glutaraldehyde were significantly improved ($P < 0.05$); EDC/NHS crosslinking could lead to obvious increasing in denaturation enthalpy (6.86 J/g) and moderate improving on tensile strength (98.6 kPa) and enzymatic sensitivity for collagen sponge ($P < 0.05$). The changes of biological and mechanical properties of collagen sponges after being crosslinked by dehydrothermal and UV crosslinking processes were not notable. The results of FTIR showed that glutaraldehyde crosslinking could improve properties of collagen sponges by forming new covalent bond in triple helix structure of collagen, while EDC/NHS crosslinking do that by forming new hydrogen bonds among collagen molecules. This research shows that glutaraldehyde and EDC/NHS crosslinking could lead to obvious improvement in properties of collagen sponges but the influences on properties of collagen sponges after being crosslinked by dehydrothermal and UV crosslinking processes were limited.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; skin; collagen; crosslinking

Corresponding author: WANG Haiying. E-mail: 599081953@qq.com