

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2022.02.009

功能性聚氨酯表面层层自组装透明质酸和胶原

何显运,徐勇军,原波

(广东工贸职业技术学院,广州 510510)

摘要:以功能性聚氨酯(PUR)为基体,用1,3-二氨基丙烷对PUR进行处理,发生胺解反应使PUR表面接枝上氨基($-\text{NH}_2$),然后再利用静电作用在氨基化的PUR材料上自组装透明质酸(HA)和胶原(Col)。采用表面水接触角仪测试PUR材料的亲水情况,采用茚三酮分析法定量测试PUR膜表面接枝 $-\text{NH}_2$ 的密度,采用石英微晶天平(QCM)检测在PUR膜表面上自组装HA/Col的情况,采用原子力显微镜(AFM)观察PUR自组装HA/Col后的表面形貌。结果表明,通过在PUR材料表面接入 $-\text{NH}_2$ 和沉积HA和Col,使材料的亲水性能得到明显改善,沉积HA/Col的材料接触角降到 $(65.5 \pm 1.1)^\circ$ 。茚三酮分析法测试表明氨基化反应使材料接枝上 $-\text{NH}_2$,且深入到材料内部,QCM和AFM测试结果再次证明HA和Col组装在PUR- NH_2 膜的表面。沉积在PUR- NH_2 膜上的HA和Col,使材料的亲水性能得到改善,同时在材料表面形成一个粗糙的纳米形貌结构,这样的表面仿生修饰有利于细胞的粘附及促进细胞的增殖和分化。

关键词:功能性聚氨酯;层层自组装;透明质酸;胶原

中图分类号: TB322 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3539(2022)02-0050-05

Layer-by-Layer Assembly of Hyaluronic Acid and Collagen on Functional Polyurethane Surface

He Xianyun, Xu Yongjun, Yuan Bo

(Guangdong Polytechnic of Industry & Commerce, Guangzhou 510510, China)

Abstract : The functional polyurethane (PUR) was treated with 1,3-diaminopropane. The amino group ($-\text{NH}_2$) was grafted onto the surface of PUR by amination reaction. Hyaluronic acid (HA) and collagen (Col) were self-assembled on the aminated PUR by electrostatic action. Surface water contact angle tester was used to test the hydrophilicity of PUR material. The density of the grafted amino group on PUR film surface was quantitatively measured by ninhydrin analysis method. A quartz microcrystal balance(QCM) was used to detect the self-assembled HA/Col on the surface of PUR membrane. The surface morphology of PUR self-assembled HA/Col was observed by atomic force microscopy (AFM). The results show that the hydrophilic property of PUR material is improved by inserting amines on the surface of PUR material and depositing HA and Col. The contact Angle of deposited HA/Col material is reduced to $(65.5 \pm 1.1)^\circ$. The results of ninhydrin analysis show that by the amination reaction the material graft with $-\text{NH}_2$ which penetrate deep into the material. QCM and AFM test results also show that HA and Col are assembled on the surface of PUR- NH_2 membrane. HA and Col deposited on the PUR- NH_2 membrane can improve the hydrophilicity of the material and form a rough nanometer prolongation structure on the surface of the material. Such biomimetic modified surface should be conducive to cell adhesion and promote cell proliferation and differentiation.

Keywords : functional polyurethane ; layer-by-layer self-assembly ; hyaluronic acid ; collagen

可降解聚氨酯(PUR)材料一般由软段和硬段构成,可以通过改变软硬段的构成和比例,对PUR分子进行设计,从而实现对材料性能、降解方式和降

解速率的调控^[1-2]。PUR材料已经被应用到血管、神经、软骨等组织修复中^[3-5]。但和其他合成高分子材料一样,PUR材料由于亲水性,细胞黏附性较差,

基金项目:广州市科技计划项目(201904010281,201904010269),广东省普通高校特色创新类项目(自然科学)(2019GKTSCX022),广东工贸科研创新团队项目(2021-TD-0-3)

通信作者:何显运,博士,副教授,主要从事生物医用材料的研究

收稿日期:2021-12-01

引用格式:何显运,徐勇军,原波.功能性聚氨酯表面层层自组装透明质酸和胶原[J].工程塑料应用,2022,50(2):50-54.

He Xianyun, Xu Yongjun, Yuan Bo. Layer-by-layer assembly of hyaluronic acid and collagen on functional polyurethane surface[J]. Engineering Plastics Application, 2022, 50(2):50-54.

缺乏细胞识别信号位点,即生物相容性不是很好,所以其在生物医用方面的应用受到较大的限制。为了改善其生物相容性,通常的方法是对材料的表面进行仿生修饰,在材料表面接枝或者沉积细胞外基质成分,在保留 PUR 优异力学性能的同时,又能提高其生物相容性^[6-13]。Hsieh 等^[14]开发了一种可生物降解的水性 PUR/透明质酸 3D 打印墨水,且 3D 打印制备了复合软骨组织工程支架,与大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)共培养,结果表明该成分能诱导 MSCs 成软骨分化,将该支架植入兔膝盖软骨缺损模型可诱导兔软骨再生。Lukas 等^[15]采用聚碳酸酯二醇制备了 PUR,并用等离子体技术进行表面处理,接枝上肝素,纤连蛋白、多肽等生物大分子,能明显改善内皮细胞的黏附与增殖,同时能够抑制血栓的形成。Kawamoto 等^[16]利用等离子体技术处理 PUR 材料管的内表面,将牛内皮细胞种植在 PUR 管的内表面,改善了材料的血液相容性,且促进了内皮细胞的黏附和增殖。Fang 等^[17]制备了可生物降解 PUR 弹性体,通过马来酰亚胺修饰的多肽成功接枝在静电纺丝的 PUR 材料上,改善了内皮细胞的黏附。Duy 等^[18]在静电 PUR 纳米纤维上通过自组装氧化石墨烯(R-GO),制备了可拉伸化学响应性的纳米复合物 PUR/R-GO,该复合物对 NO₂ 具有出色的灵敏度,为可穿戴化学传感的应用提供了良好的基础。笔者以自制的功能性 PUR 为基体,该 PUR 是以赖氨酸二异氰酸酯为硬段,聚己内酯为软段,具有药理活性的异山梨醇为扩链剂,利用二步逐步合成的一种脂肪族可生物降解的聚合物,且降解产物呈弱碱性,没有毒性或者毒性很小,支持细胞的生长和增殖^[19]。通过胺解作用,在 PUR 材料表面接枝上氨基(—NH₂),再利用带负电的透明质酸(HA)和带正电的胶原(Col),通过静电作用,层层自组装(LBL)沉积到材料表面,既尽量保留了 HA 和 Col 的生物活性,又达到了对 PUR 材料表面的生物活性修饰,期望制得的表面修饰化 PUR 材料能够应用于组织工程支架。用自组装方法在 PUR 材料表面沉积上透明质酸和胶原的研究,国内尚未见报道。

1 实验部分

1.1 主要原料及试剂

PUR:自制;

1,3-二氨基丙烷:生物试剂级,阿拉丁试剂(上海)有限公司;

I 型 Col:生物试剂级,美国 BD bioscience 公

司;

HA:生物试剂级,美国 Sigma 公司;

茚三酮:分析纯,广州齐云生物试剂有限公司。

1.2 主要设备及仪器

真空干燥箱:DZF-6050 型,上海一恒科学仪器有限公司;

表面接触角分析仪:OCA20 型,德国 DATAPHYSICS 公司;

石英微晶天平(QCM):Q-SenseE4 型,瑞典 Q-Sense 公司;

原子力显微镜(AFM):MFP-3D-S 型,美国 Asylum Research 公司。

1.3 实验过程

(1) PUR 膜的制备。

将自制的 PUR 用少量的四氢呋喃溶剂进行溶解,倒入到聚四氟乙烯模具中,形成薄薄的一层溶液,然后转到 40℃ 的鼓风干燥箱中,静置 24 h,让溶剂慢慢挥发,最后转入温度为 30℃ 真空干燥箱中至恒重,制得 PUR 薄膜。

(2) 氨基化 PUR 膜(PUR-NH₂)的制备。

将上述制备的 PUR 膜在乙醇/水溶液(体积比 1:1)中浸泡一段时间,再用去离子水漂洗,完后用一定浓度的 1,3-二氨基丙烷溶液进行处理,然后再用去离子水充分漂洗以去除未反应的 1,3-二氨基丙烷,最后转到温度为 30℃ 的真空干燥箱至恒重,制得 PUR-NH₂ 膜。图 1 是 PUR 膜与 1,3-二氨基丙烷反应的示意图。

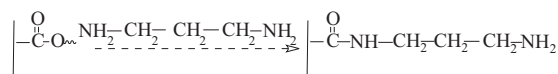


图 1 PUR 膜与 1,3-二氨基丙烷反应示意图

(3) PUR-NH₂ 膜层层自组装 HA 和 Col。

将上述制得的 PUR-NH₂ 膜用 0.012 mol/L 的盐酸溶液进行酸化处理,接着用大量去离子水冲洗以去除表面吸附的盐酸,然后将其浸泡到 HA 溶液中,使其表面吸附一层 HA,再浸泡到 Col 溶液中,使其吸附一层 Col,如此反复,使其层层沉积上 HA 和 Col,最后转到温度为 30℃ 的真空干燥箱至恒重,制得 PUR-NH₂/HA/Col 膜。图 2 是 PUR-NH₂ 自组装 HA/Col 的过程示意图。

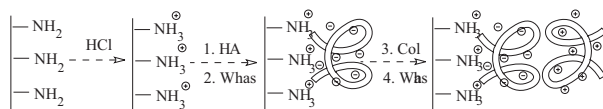


图 2 PUR-NH₂ 自组装 HA/Col 过程示意图

1.4 性能测试

采用表面接触角分析仪测试 PUR 膜的亲水性情况。

采用茚三酮分析法定量测试 PUR 膜表面接枝 —NH_2 的密度。

采用 QCM 检测在 PUR 膜表面上自组装 HA/Col 的情况。

采用 AFM 观察 PUR 自组装 HA/Col 后的表面形貌。

2 结果与讨论

2.1 材料表面水接触角

为表征材料表面的亲水性能,通过接触角测量仪测试材料的亲、疏水接触角。表 1 是 PUR, PUR- NH_2 和 PUR- NH_2 /HA/Col 三种膜测试得到的水接触角。PUR 膜接触角为 $(86.5 \pm 1.1)^\circ$, 接触角较大, 表示亲水性能不够好; PUR 膜通过氨基化后得到的 PUR- NH_2 的接触角下降到 $(78.8 \pm 0.8)^\circ$, 说明 PUR- NH_2 的亲水性能变好; 而通过在 PUR- NH_2 表面自组装得到的 PUR- NH_2 /HA/Col 的接触角降到 $(65.5 \pm 1.1)^\circ$, 材料的表面亲水性能得到明显改善。其原因是在 PUR- NH_2 表面沉积上 HA 和 Col, 使得该膜表面富集了大量的极性基团, 从而使材料的亲水性能变好。而材料的亲水性能变好, 有利于细胞的黏附, 改善细胞跟材料的亲和力, 提高材料的生物相容性。

表 1 PUR、PUR- NH_2 和 PUR/HA/Col 膜的水接触角 ($^\circ$)

样品	接触角
PUR 膜	86.5 ± 1.1
PUR- NH_2 膜	78.8 ± 0.8
PUR- NH_2 /HA/Col 膜	65.5 ± 1.1

2.2 茚三酮分析法测试 PUR- NH_2 膜表面的 —NH_2 密度

采用茚三酮分析法对 PUR- NH_2 膜表面 —NH_2 密度进行定量分析。图 3 是用 1,3-二氨基丙烷水溶液 (9%) 浸泡 PUR 膜, PUR 膜表面 —NH_2 密度与浸泡时间的关系曲线。PUR- NH_2 膜表面 —NH_2 密度开始随浸泡时间增加而增大, 当接近 2 h 时, PUR 膜表面 —NH_2 密度达到最大值, 而随着浸泡时间继续延长, PUR 膜表面 —NH_2 的密度有所下降。其原因是 PUR 膜浸泡在 1,3-二氨基丙烷中, 发生胺解反应, 随着时间的增加, 接枝在 PUR 膜表面的 —NH_2 量增, 相应的 —NH_2 密度也增大, 但随着处理的

时间继续增加, 胺解反应会使材料的表层脱离, 从而使接枝上的 —NH_2 从材料表面脱落, 相应的 —NH_2 密度也就下降。

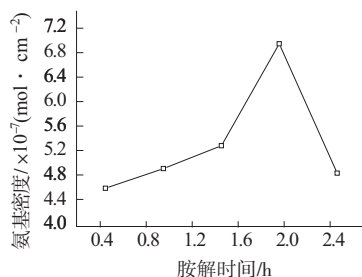


图 3 PUR 膜表面 —NH_2 密度与浸泡时间的关系曲线

图 4 是 PUR- NH_2 膜表面的 —NH_2 密度随浸泡的 1,3-二氨基丙烷水溶液浓度不同而变化的曲线。由图 4 可以看到, 浸泡时间同为 1 h, 1,3-二氨基丙烷浓度为 12% 时, PUR 膜的 —NH_2 密度最大, 为 $11.4 \times 10^{-7} \text{ mol/cm}^2$ 。假设 —NH_2 只接枝在 PUR 膜表面, 由此计算得到含一个 —NH_2 的分子链所占的面积约为 0.00014 nm^2 。这个计算结果显然是不合理的, 说明 PUR 膜的胺解反应不是单纯发生在 PUR 膜的表面一层, 而深入到膜的里层。

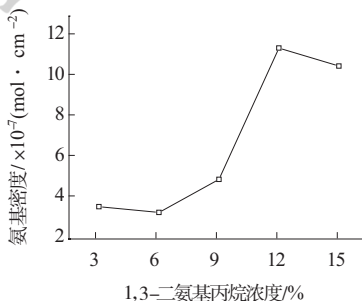


图 4 PUR 膜表面 —NH_2 密度与浸泡水溶液浓度的关系曲线

2.3 QCM 检测 PUR- NH_2 膜表面上 LBL 自组装 HA/Col

为了监测 PUR- NH_2 膜表面层层自组装 HA/Col 的过程, 采用 QCM 进行检测。图 5 是 PUR- NH_2 膜表面自组装 HA/Col 时金片振动频率 (F) 和耗散因子 (D) 随时间的变化曲线图。

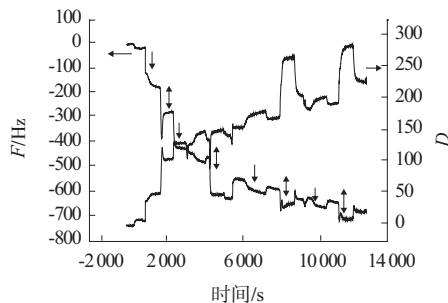


图 5 金片 F 和 D 的变化曲线图

从图 5 可以看到,随着 HA 溶液和 Col 溶液的通入, F 不断降低,而 D 则不断增大。其原因就是由于 HA 和 Col 通过静电作用吸附在金片上,从而使金片的质量增大,相应的振荡频率也就减小,而耗散因子则相应地增大。由此说明 HA 和 Col 沉积在 PUR-NH₂ 膜上。

2.4 AFM 观察 PUR 膜和 PUR 自组装 HA/Col 膜的表面形貌

图 6 是采用 AFM 扫描得到的 PUR 膜和 PUR-NH₂ 膜自组装 HA/Col 的表面形貌图。从图 6 可以看到,单纯的 PUR 膜表面相对比较光滑;而沉积了 HA 和 Col 的 PUR-NH₂ 膜,表面覆盖了一层物质,表面看起来比较粗糙,有比较多的小突起,大小在纳米级,而这样的表面纳米结构应该有利于细胞的粘附,从而改善材料的生物相容性。文献 [20] 报道了用浓 NaOH 溶液处理 PLGA 工程支架,使支架表面形成粗糙的纳米结构,用这样的支架培养细胞,能够明显促进细胞的增殖和分化。因此,通过在 PUR 材料表面自组装上 HA 和 Col,从表面形貌上可以得到这样的一个纳米表面结构,从而达到改善材料的生物相容性。

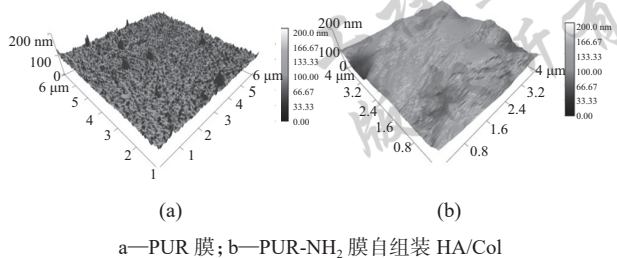


图 6 PUR 膜和 PUR-NH₂ 膜自组装 HA/Col 表面形貌图

3 结论

以功能 PUR 为基体,在 1,3-二氨基丙烷的作用下,在 PUR 材料的表面引入—NH₂,然后在材料的表面通过静电作用机制层层自组装上 HA 和 Col。茚三酮分析法测试结果表面 PUR 膜成功接枝上了—NH₂。QCM 和 AFM 测试结果表明 HA 和 Col 组装在 PUR—NH₂ 膜的表面。沉积在 PUR—NH₂ 膜上的 HA 和 Col,使材料的亲水性能得到改善,同时在材料表面形成一个粗糙的纳米形貌结构。通过这样的表面仿生修饰,将有利于细胞的粘附及促进细胞的增殖和分化,为该 PUR 材料应用于组织支架奠定基础。

参考文献

[1] Naureen Bushra, Haseeb A S M A, Basirun W J, et al. Synthesis and degradation of 3D biodegradable polyurethane foam

scaffolds based on poly (propylene fumarate) and poly[(R)-3-hydroxybutyrate][J]. Materials Today Communications, 2021, 28:756–763.

[2] 何显运,何军拥,王迎军,等.不同软硬段比例可降解聚氨酯的合成与性能研究[J].材料导报,2014,28(4):54–57.

He xianyun, He Junyong, Wang Yingjun, et al. Study on synthesis and properties of degradable polyurethane with different proportion of soft segment to hard segment[J]. Materials Review, 2014, 28(4):54–57.

[3] Liu Z S, Fang L M, Delaitre G, et al. Heparinized polyurethane surface via a one-step photografting method[J]. Molecules, 2019, 24(4):12.

[4] 冯照喧.生物基可降解聚氨酯的合成、功能化改性及医学应用研究[D].北京:北京科技大学,2020.

Feng Zhaoxuan. Synthesis, functional modification and medical application of bio-based and degradable polyurethane[D]. Beijing: University of Science and Technology Beijing, 2020.

[5] 任旭彤.功能化多孔聚氨酯的制备及其生物医用研究[D].南京:南京师范大学,2016.

Ren Xutong. Preparation of functionalized porous polyurethane and its biomedical research[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2016.

[6] 刘小龙.高强度可生物降解聚酯型聚氨酯的制备及其膜表面改性研究[D].济南:山东师范大学,2019.

Liu Xiaolong. Preparation of biodegradable poly(ester-urethane)s with high mechanical properties and studies on film surface modification[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2019.

[7] 肖将尉,史丹丹,术蓉,等.HSNGPLPL 短肽修饰的聚氨酯的体内反应性分析[J].中国临床解剖学杂志,2017,35(3):271–275,281.

Xiao Jiangwei, Shi Dandan, Shu Rong, et al. In vivo reactivity analysis of HSNGPLPL-modified polyurethane[J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2017, 35(3):271–275, 281.

[8] 李亚萍,隋智慧,闫晨,等.生物改性水性聚氨酯研究进展[J].聚氨酯工业,2021,36(3):4–7.

Li Yaping, Suizhi, Yan Chen, et al. Research progress of biomass modified waterborne polyurethane[J]. Polyurethane Industry, 2021, 36(3):4–7.

[9] 张玮.医用聚氨酯材料的表面改性及其生物相容性研究[D].上海:华东理工大学,2014.

Zhang Wei. Study on surface modification and biocompatibility of medical polyurethane materials[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2014.

[10] Zuber M, Zia F, Zia K M, et al. Collagen based polyurethanes-a review of recent advances and perspective[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80:366–374.

[11] Zia K M, Zia F, Zuber M, et al. Alginate based polyurethanes:a

- review of recent advances and perspective[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79:377–387.
- [12] Zia F, Zia K M, Zuber M, et al. Heparin based polyurethanes: a state-of-the-art review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 84:101–111.
- [13] Fatima Z, Khalid M Z, Mohammad Z, et al. Starch based polyurethanes: A critical review updating recent literature [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 134:784–798.
- [14] Hsieh F, Lin H, Hsu S. 3D bioprinting of neural stem cell-laden thermoresponsive biodegradable polyurethane hydrogel and potential in central nervous system repair[J]. Biomaterials, 2015, 71:48–57.
- [15] Lukas K, Thomas U, Gessner A, et al. Plasma functionalization of polycarbonateurethane to improve endothelialization-effect of shear stress as a critical factor for biocompatibility control[J]. Journal of Biomaterials Applications, 2015, 30(9):1 417–1 428.
- [16] Kawamoto Y, Nakao A, Ito Y, et al. Endothelial cells on plasma-treated segmented-polyurethane[J]. Journal of Material Science: Material in medicine, 2017(8):551–557.
- [17] Fang J, Ye S H, Wang J, et al. Modification of cyclic disulfide containing biodegradable polyurethane urea elastomers[J]. Biomacromolecules, 2015, 16(5):1 622–1 623.
- [18] Duy L T, Trung T Q, Hanif A, et al. A stretchable and highly sensitive chemical sensor using multilayered network of polyurethane nanofibers with self-assembled reduced graphene oxide[J]. 2D Materials, 2017, 4(2):1–12.
- [19] 何显运, 王迎军, 吴刚. 功能性 LDI 硬段医用可降解聚氨酯的合成与性能 [J]. 高分子材料科学与工程. 2013, 29(3):22–25, 30. He Xianyun, Wang Yingjun, Wu Gang. Synthesis and properties of degradable medical polyurethane with L-Lysine ethyl ester diisocyanate as hard segment[J]. Polymer Materials Science & Engineering, 2013, 29(3):22–25, 30.
- [20] Park G E, Pattison M A, Park K, et al. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds[J]. Biomaterials 2005, 26(16):3 075–3 082.

投稿须知

1 稿件内容

稿件应注重科学性、实用性及时效性,要求技术新颖,论点明确,论据可靠,数据准确,文字通顺、简练。稿件内容必须真实,避免抄袭,请作者文责自负。引用他人成果时,请按《著作权法》有关规定说明出处。内容应未曾发表过或被其他出版物刊载过,且无一稿多投。

2 稿件要求

凡属于重大科技获奖的论文和重点项目资助的论文,请在来稿第一页注明名称及批准号,本刊将优先刊登。

(1) 题目、作者署名及单位。题目力求简明、醒目,反映出文章的主题,一般不超过 20 个汉字。作者姓名在题目下按序排列,不同工作单位的作者,应在姓名右上角加注阿拉伯数字序号。作者单位须写全称并注明省份、城市和邮政编码。联系人信息(包括姓名、学历或职称、主要研究方向)注在第一页下方。

(2) 摘要及关键词。论文需要同时提供中文和英文摘要,摘要以提供论文的内容梗概为目的,不加评论和补充解释,应简明、确切地论述研究目的、原理和结论,具有相对独立性。中文和英文摘要均要求采用报道性摘要类型。具体要求:中英文摘要均为一段式,内容比较具体,一般需要列举关键数据。中英文摘要内容基本一致,中文摘要以 200~300 字为宜,英文摘要可略详。关键词要求 3~8 个。

(3) 正文。正文各部分都应简洁明了。层次标题一律用阿拉伯数字连续编号,尽量减少层次;不同层次的数字之间用小圆点相隔,末位数字不加标点符号。如“1”,“1.1”等。文中量、单位及符号的使用应符合国际标准和国家标准。

(4) 图表。图表要设计合理,简单自明。每一幅图都应有图序和简短确切的图名,横纵坐标均要注明物理量及其单位,线条图要用矢量格式的图,或将 *.opg, *.dwg, *.eps 等格式的图打包压缩随投稿一起上传。表格请使用三线表,每一表格都应有表序和简短确切的表题。图表标题一律用中文表达。

(5) 参考文献。以作者亲自阅读过的主要原始文献为限,不可引用非公开出版或发表的文献,不能引用其他文章中引用的但未经核对原文的文献,要注意引用最新的文献。参考文献要有一定的数量,研究性论文至少 15 篇。参考文献的著录按文章中引用的顺序依次排列,中文参考文献要有对照英文部分(英文部分不编号)。无论中外文的作者,一律采用姓前名后的形式著录;作者不超过 3 人时可全部著录,超过 3 人时,只著录前 3 位,其后加“等”或“et al”。综述类论文的参考文献著录项目适当简化,可参见本刊相关栏目文章样式。作者对所引文献的准确性和完整性负责。

3 投稿方式

请作者登陆“工程塑料网”(http://www.epa1973.net),进入杂志社之页,点击“网上投稿”后投稿。来稿请注明详细地址、电话、邮箱等信息,便于通知联系。一般一个月左右可以查询稿件审理意见,超过 3 个月未收到修改意见或回复的可自行处理。

4 注意事项

为适应我国信息化建设需要,扩大学术交流渠道,本刊已编入国内外著名数据库。稿件一经录用,将同时被数据库收录,作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意收录,请在投稿时声明,否则将视为同意。