

聚合物晶胶的制备、性能及生物医学应用

刘春桃 童国权 陈朝珠 谭子芳 全昌云 张超*

(中山大学工学院 广州 510006)

摘要 利用低温凝胶化技术制备的聚合物晶胶,具有贯通多孔结构,因其化学/机械稳定性,可用于生物微粒(质粒、病毒、细胞器)和细胞的分离、生物分子和细胞的固定化载体以及组织工程三维支架等领域。本文详细介绍了聚合物晶胶的制备条件(如单体浓度、冷冻过程、引发剂浓度、溶剂等)与其结构、性能的关系;同时,对聚合物晶胶功能化改性及其在生物物质的色谱分离和生物医学领域的应用进行了总结与展望。

关键词 聚合物晶胶 低温凝胶化 生物医学

中图分类号:O631; TB381 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2014)07-1190-12

Polymeric Cryogel: Preparation, Properties and Biomedical Applications

Liu Chuntao Tong Guoquan Chen Chaozhu Tan Zifang Quan Changyun Zhang Chao*

(School of Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Polymeric cryogel with interconnected pore structure can be prepared using the cryogelation technique and have been paid intensive attention in the fields of both academia and industry. Because of its high porosity, permeability, and chemical/mechanical stability, polymeric cryogel has been widely used as stationary phase in chromatography separation of particulate-containing fluids and cells, carriers for immobilization of cell/biological particulates, and three-dimensional scaffolds for tissue engineering. This paper introduces in detail the preparation of polymeric cryogel and relationship between its structural parameters and preparation process, such as concentration of monomer/precursor/initiator, freezing process, and solvent. The functionalization of cryogels as well as its biomedical applications are also summarized.

Key words polymeric cryogel; cryogelation; biomedical

Contents

1 Introduction

1.1 Preparation and structure of polymeric cryogels

1.2 Pore structure and the preparation process

1.3 Structure characterization of cryogels

2 Functionalization of polymeric cryogels

2.1 Copolymerization of functional monomers

2.2 Surface coupling of functional groups

2.3 Surface graft polymerization

2.4 Double crosslinking

2.5 Composite cryogels

3 Application of polymeric cryogels

3.1 Stationary phase in chromatography separation of cell/biological particulate

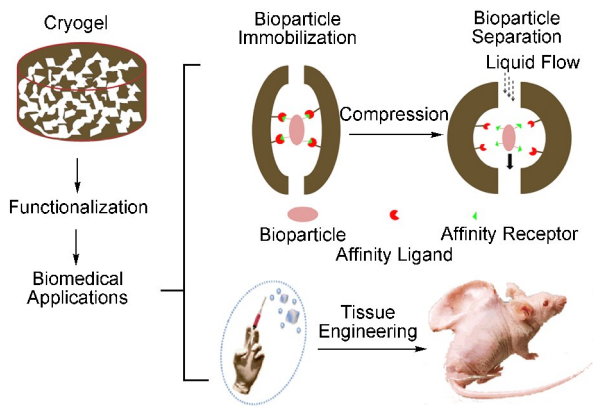
3.2 Carrier for immobilization of cell/biological particulate

3.3 Scaffold for tissue engineering

4 Conclusion and outlook

收稿: 2014 年 1 月, 收修改稿: 2014 年 3 月, 网络出版: 2014 年 6 月 25 日

* Corresponding author e-mail: zhchao9@mail.sysu.edu.cn



Polymeric cryogel with interconnected pore structure can be prepared using the cryogelation technique and have been paid intensive attention in the fields of both academia and industry. This paper introduces in detail the preparation of polymeric cryogel and relationship between its structural parameters and preparation process. The functionalization of cryogels as well as its application in biomedical fields are also summarized.

1 引言

多孔聚合物材料在生物医学工程、生物技术和药物治疗中有广泛的应用,其传统的制备方法有相分离法^[1,2]、气体或液体致孔法^[3,4]、超临界介质法(如超临界 CO₂)或模板合成法^[5]等。低温凝胶化是一种利用冷冻/低温方法制备多孔材料(晶胶)的技术,用这种方法制备的多孔材料具备特征性的贯通孔,有助于常见溶剂的无阻扩散、纳米或微米颗粒的物质传输。晶胶这种特殊的结构及渗透性、化学/机械稳定性,赋予其广泛的生物医学领域应用前景,例如生物微粒(质粒、病毒、细胞器)和细胞的色谱层析、生物分子和细胞的固定、病毒和噬菌体的加工、细胞培养的可溶性产物的俘获和三维组织工程支架等^[6]。

1.1 聚合物晶胶的制备

聚合物晶胶的制备通常遵循三个步骤(图1): (1)含有单体/预聚体、交联剂和引发剂的混合溶液制备,(2)低温凝胶化,(3)解冻。当含有单体等组分的溶液被冷冻至溶剂结晶温度以下,部分溶剂分子形成结晶,单体等组分被浓缩在一个非冷冻液相微区(unfrozen liquid microphase);高浓度单体在低温下发生聚合/凝胶化反应,生成交联聚合物相;反应结束,溶剂晶粒所占据的空间在解冻后形成贯通孔隙^[6]。

1.2 晶胶的结构与制备过程参数

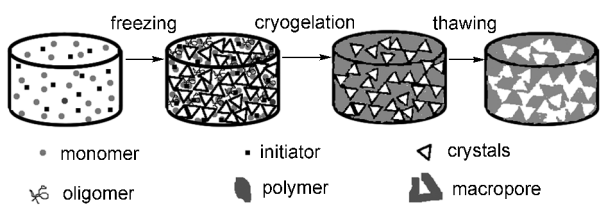


图1 聚合物晶胶的制备过程

Fig.1 The preparation process of polymeric cryogel

孔径及分布、孔壁厚度、孔隙率是晶胶重要的结构参数,并决定其机械性能和用途。上述结构参数与晶胶的制备过程参数密切相关,尤其是单体/预聚体的浓度和冷冻过程。在低温凝胶化过程中,适当控制溶剂的结晶成核速率、晶体生长和凝胶化反应速率,可调控晶胶的多孔结构和机械性能^[7]。其中,成核速率取决于溶剂的性质、冷冻速率和冷冻温度,而凝胶化反应速率由聚合反应引发剂的浓度决定。晶胶孔径可通过单体/引发剂/交联剂的浓度、溶剂/交联剂种类、冷冻温度、冷冻速率来控制。

1.2.1 单体浓度的影响

瑞典隆德大学的 Galaev 等^[8]通过调节单体浓度来调节聚丙烯酰胺(pAAm)晶胶的孔隙率、孔壁厚度和孔的贯通性。他们发现,pAAm 晶胶的孔隙率随着单体浓度的增加而降低,单体浓度为6%时对应的孔隙率为93%,单体浓度为15%时对应的孔隙率为80%。随着单体浓度的增加,pAAm 晶胶的孔壁厚度增加,而孔的贯通性降低。

1.2.2 冷冻过程的影响

冷冻温度和冷冻速率对晶胶的结构有重要影响。冷冻温度越低,冷冻速率越大,溶剂结晶越快,结晶数目越多,导致晶粒越小,相应的晶胶孔径越小;而降低冷冻速率,或提高固定的冷冻温度,利于溶剂结晶的生长,得到的溶剂结晶较大,相应制得的晶胶孔径越大。如果在凝胶化之前就形成结晶,则所得晶胶的孔是贯通的^[9,10]。

瑞典隆德大学 Mattiasson 等^[10]对比了-30℃、-20℃、-12℃三种冷冻温度下 pAAm 晶胶制备过程温度变化及晶胶的结构。冷冻温度为-12℃时,单体溶液在-10℃时形成过冷态,接着在-12℃时进入结晶期,单体溶液由于溶剂结晶而浓缩,液相微区的粘度逐渐增大;随着时间延长,高粘度的液相微区阻碍了结晶的进一步生长,体系温度恒定在-12℃,此时冰晶尺寸基本稳定,晶胶的孔径大小已固定,凝胶化(单体聚合交联)过程在接下来的时间内占据主导地位;冷冻温度为-20℃和

-30 ℃时,单体溶液没有明显的过冷态,在0 ℃附近未观察到结晶平台。已知丙烯酰胺水溶液的共晶点是-20 ℃,当冷冻温度在-30 ℃时,3.3 min 时出现一个小峰,说明液相微区已完全结晶。快速冷冻能够促使小尺寸冰晶的形成,因而当冷冻温度从-12 ℃降到-30 ℃,所得晶胶的孔径变小;由于在低于共晶点温度下聚合反应猝熄,在-30 ℃下制备的晶胶凝胶含量较低,其压缩强度低于-12 ℃或-20 ℃下制备的晶胶。

美国加州大学圣迭戈分校 Varghese 等^[11]以过硫酸铵/四甲基乙二胺(APS/TEMED)为氧化还原引发体系,考察了聚乙二醇(PEG)晶胶制备过程中冷冻温度(-14 ℃和-20 ℃,分别标记为 T_{-14} 和 T_{-20})和冷冻方式(快速冷冻 C_F 和慢速冷冻 C_S)对晶胶多孔结构的影响。 $T_{-14}C_S$ 条件下所得凝胶与传统的水凝胶结构相似; $T_{-14}C_F$ 条件下可制得结构均匀的晶胶。快速冷冻条件下,-14 ℃与-20 ℃制备的晶胶的不同之处在于-14 ℃下得到封闭孔,而-20 ℃下可获得连续贯通孔;其原因可能是前者温度较高,溶剂还来不及完全结晶,单体溶液即发生凝胶化反应。

浙江工业大学姚克俭等^[12]对大尺寸 pAAm 晶胶制备过程中反应液温度进行在线温度检测,发现反应液降温 20~40 min 后发生相变结晶,结晶温度为-4.5~-6.4 ℃;相变后冰点在-2.4 ℃左右。另外,反应液内部温度分布并不均匀。

浙江大学王良华^[13]研究了丙烯酰胺(AAm)反应液的液-固相变和晶胶的成孔规律等。反应液的起始结晶温度(T_c)和冰点温度(T_{mc})随浓度、冷冻速率和冷冻终温的变化呈现不同的规律。冷冻速率对 T_c 与 T_{mc} 的影响较小, T_c 与 T_{mc} 随冷冻终温的下降略有降低, T_{mc} 随反应液浓度增大而减小。晶胶的孔隙结构和性能受床柱尺寸、冷冻终温、冷冻速率、反应液组成、催化剂用量等因素的影响。通过条件优化,在一定内径的床柱内,于合适的冷冻速率下,控制冷冻终温低于-15 ℃,可得孔径 10~100 μm 、孔隙率 82%~85%、孔隙分布均匀、连通性好、理论等板高度 0.5~1.1 mm 的晶胶。

1.2.3 引发剂浓度的影响

大孔凝胶的制备受引发剂添加量的影响。姚克俭^[14]发现在 APS/TEMED 引发剂体系中,TEMED 用量过少会导致聚合反应速度缓慢,单体反应不完全,制备的晶胶形状不规则有缺陷,且易碎。TEMED 用量过大时,聚合反应速度过快,在溶剂结

晶前就完成了聚合反应,所形成的冰晶起不到致孔作用,所得到晶胶孔隙小、结构致密,更接近水凝胶。合适的引发剂用量有助于制备孔隙结构均匀、贯通性好的晶胶。

1.2.4 溶剂的影响

在制备块状聚合物晶胶时,由于溶剂既能影响聚合物和单体的溶解性,又能影响溶剂结晶的尺寸和形状,所以选择合适的溶剂作为致孔剂,对控制聚合物晶胶的多孔结构至关重要。

熔点较低的(但不低于-20 ℃)溶剂常用于制备晶胶;根据与聚合物的混溶能力,溶剂可分为两类:能与单体及聚合物混溶和可与单体混溶但不与聚合物混溶的溶剂。使用不与聚合物混溶的溶剂时,在凝胶化过程中会导致聚合物相发生相分离。Mattiasson 等^[10]研究了水-甲酰胺和水-二氧六环两种混合溶剂对制备的 pAAm 晶胶的影响。甲酰胺和二氧六环的熔点分别是2 ℃和11 ℃,极性大小顺序为:甲酰胺>水>二氧六环。AAm 和 pAAm 均溶于甲酰胺,在聚合中体系不易发生相分离,而二氧六环易导致相分离。通过 SEM 对晶胶形貌的观察,发现以 95% 甲酰胺为溶剂制备的水凝胶具有无孔致密结构;而以 95% 二氧六环为溶剂制备的水凝胶由于在聚合过程中存在相分离现象,出现微孔结构。对于晶胶而言,在 95% 甲酰胺中制备的晶胶有定向的长孔结构,这些长孔是甲酰胺的针状晶体;在 95% 二氧六环溶剂下制备的晶胶则具有大孔、微孔双分布的多孔结构,大孔是二氧六环结晶所致,小孔则是凝胶化过程中聚合物相分离的结果。

1.2.5 其他性质

非冷冻液相微区形成过程中,单体/聚合物局部浓度增大,交联密度增大,形成的孔壁更为致密,强度均高于相同初始浓度下的水凝胶;而晶胶的溶胀率则比相应的水凝胶低 3~6 倍^[7]。同时,聚合物晶胶的贯通大孔结构赋予其较快的复溶胀动力学,能在几秒内快速复溶胀。

晶胶具有弹性材料的特征,形变回复能力强,可承受较大形变。美国哈佛大学 Bencherif 等^[15]分别制备了海藻酸盐水凝胶和晶胶,并考察它们的形变回复能力。从应力-应变曲线来看,微米孔的晶胶被压缩到 90% 形变时未发现机械损伤,并在短时间内恢复形状(图 2);相应的水凝胶在形变 16% 时即发生断裂。晶胶这种形变回复能力类似于形状记忆性能,可用于装载治疗细胞和各种生物因子,然后注射到组织缺损部位,辅助组织修复再生。

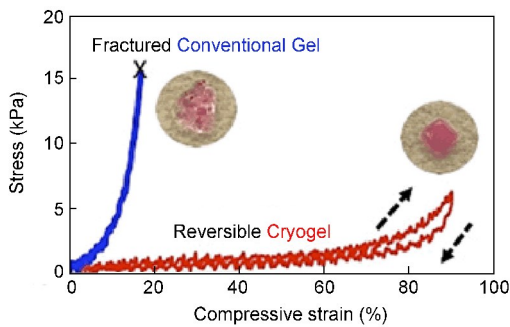


图2 装载罗丹明的微米孔的海藻酸晶胶和纳米孔的海藻酸水凝胶的应力-应变曲线^[15]

Fig. 2 Compressive stress-strain profiles of macroporous and nanoporous rhodamine-loaded alginate hydrogels^[15]

晶胶这种高弹性和形变回复性能还可用来分离通过亲合力绑定的生物微粒^[16] (图3)。用亲合配体修饰的晶胶通过配体-受体作用吸附含有相应受体的生物微粒,当施加适当压力时,晶胶发生弹性形变,配体-受体相互作用被破坏,该生物微粒随着流动的液体离开晶胶而被分离。

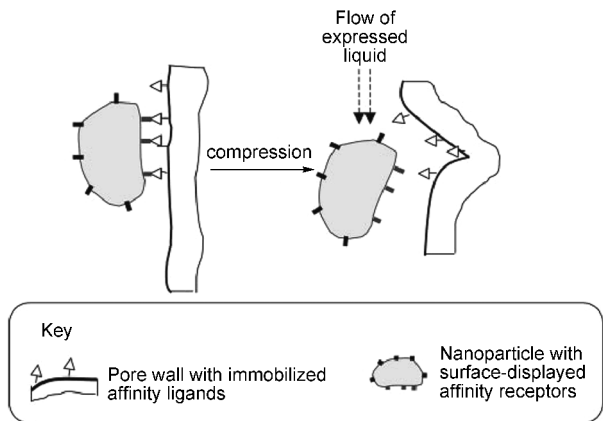


图3 生物微粒通过弹性压缩实现生物微粒分离^[16]

Fig. 3 Schematic illustration of the mechanism of detachment of bound particles induced by compression^[16]

1.3 晶胶的结构表征

孔结构、孔径分布和孔隙率是晶胶重要的结构参数,可使用压汞法、光学显微镜 (optical microscopy, OM)、扫描电镜 (scanning electron microscopy, SEM)^[10]、环境扫描电镜 (environmental scanning electron microscopy, ESEM)^[8]、共聚焦显微镜 (confocal microscopy, CM) 和微计算机断层扫描技术 (micro-computed tomography, μ CT)^[15] (图4) 等手段测定或检测。

晶胶的孔结构及形貌通常使用光学显微镜或电子显微镜等手段进行定性表征。晶胶须先用染料或化学进展, 2014, 26(7): 1190 ~ 1201

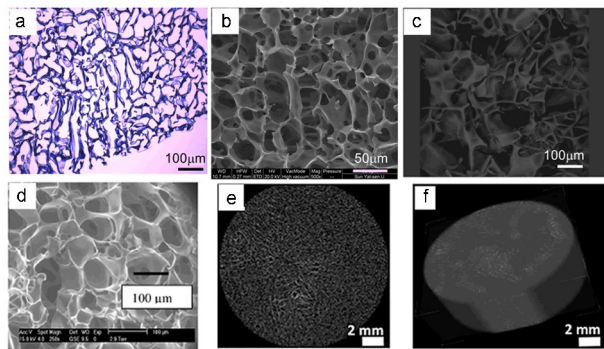


图4 通过不同仪器手段对晶胶的观察:OM (a), SEM (b), CM (c)^[7] and ESEM (d)^[7], 2D- μ CT (e) and 3D- μ CT (f)^[15]

Fig. 4 Cryogels visualized by different instrumental techniques: OM (a), SEM (b), CM (c)^[7] and ESEM (d)^[7], 2D- μ CT (e) and 3D- μ CT (f)^[15]

荧光剂染色,才能在 OM 或 CM 下观察。聚(γ -谷氨酸)晶胶石蜡切片用结晶紫染色后在 OM 下可见 (图4a);图4b 是其相应的 SEM 图像,适用于在干燥状态下观察精细的孔结构。pAAm 晶胶用荧光探针 (fluoresceinamine, isomer I) 偶联后在 CM 下可见 (图4c)。ESEM 的优势在于可观察晶胶不同含水量时的形貌 (如图4d)。微计算机断层扫描技术采用 X 射线成像原理进行高分辨三维成像,可以在不破坏样本的情况下清楚了解样本的内部显微结构;通过计算机软件,进行图像重构,还原成在电脑中可分析的 2D (图4e) 或 3D (图4f) 图像。

晶胶的多孔性质 (如孔隙率、孔径分布和孔贯通性) 也可通过对比水流阻力或流速来间接说明。

晶胶的孔隙率是孔隙体积占凝胶总体积的百分比。Galaev 等^[8] 使用三种测量孔隙率的方法测量 pAAm 晶胶的孔隙率: (1) 水蒸气吸收法 (water vapor adsorption), 孔的体积等于水在晶胶里面的总体积减去聚合物吸收的结合水的体积; (2) 良溶剂 (水)-不良溶剂 (环己烷) 吸收法 (cyclohexane uptake), 亲水性的聚合物在环己烷中不溶胀,测得数据反映干燥样品中的孔体积; (3) 密度法 (swelling), 比较晶胶干燥和溶胀平衡两种状态下的密度,得到孔体积。实验发现三种方法得到的孔隙率一致 (表1)。

此外,根据阿基米德原理,使用比重瓶也可测得晶胶的孔隙率;压汞法不仅可测量孔隙率,还可获得孔径分布。水分子在溶胀的晶胶中主要以三种形式存在:通过氢键结合在聚合物上的结合水、填充在晶胶小孔孔隙中的自由水、填充在大孔孔隙中的自由

水,通过差示扫描量热法(DSC)可测得自由水含量。同时,填充在大孔孔隙中的自由水在晶胶受到挤压发生弹性形变时被排出^[8]。

表1 -12℃下制备的不同单体浓度的 pAAm 晶胶的孔体积^[8]

Table 1 Pore volume of pAAm-cryogels produced at -12℃ from feeds with different monomer concentration^[8]

cryogel sample	pore volume(%)		
	water vapor adsorption	cyclohexane uptake	swelling
6-pAAm	93	93	88.4
10-pAAm	86.6	85	86.5
15-pAAm	81.6	79.2	80.2
18-pAAm	74.7	72.5	74.0
22-pAAm	70.1	68	65.6

2 聚合物晶胶的功能化改性

功能化改性可赋予材料特定功能,促进、扩展材料用途。聚合物晶胶可通过不同的方法进行化学改性,赋予其特定的功能,常用化学改性方法有:功能单体共聚法,表面偶联法,表面接枝聚合法,双交联法,复合法等。

2.1 功能单体共聚法

通过主要单体与功能单体的共聚合反应,可在聚合物晶胶中直接引入功能基团^[17,18]。通常,功能单体的浓度占主要单体总浓度的5~10 mol%。功能单体携带的功能基团在制备晶胶的聚合过程中可发挥特殊作用,使其多孔结构有别于普通单体聚合得到的晶胶。如 Mattiasson 等^[17]在制备具有金属亲合配体亚氨基二乙酸(iminodiacetic acid, IDA)的 pAAm 晶胶时,由于共聚单体中功能基团的作用,聚合过程中发生相分离,孔径呈双峰分布,制得的晶胶贯通大孔的孔壁还镶有小孔;而 AAm 与烯丙基缩水甘油醚(AGE)共聚晶胶则呈单一分布多孔结构,孔壁致密。不同功能单体种类、浓度及制备方法得到的晶胶多孔结构不同;在具体应用中,对特定金属离子和蛋白质的吸附能力也有很大差别。

功能单体共聚可赋予晶胶生物活性。含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)残基序列的多肽可与细胞表面受体结合,具有促进细胞黏附的功能。Galaev 等^[19]将含有 RGD 残基序列的功能单体(abRGDm)通过共聚合的方法接枝到 pAAm 晶胶骨架上,使其能够促进细胞黏附。

2.2 晶胶表面偶联法

将功能配体偶联到晶胶表面,是其功能化改性的方法之一。晶胶表面偶联有很多途径,可以

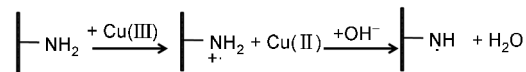
将带有活性基团的单体共聚到晶胶体系,再将配体偶联到活性基团上。如制备功能化 pAAm 晶胶时,通常将含有环氧基的烯丙基缩水甘油醚(AGE)加到 AAm 共聚体系中,再通过配体与环氧基的反应进行表面偶联改性^[17,20]。此外,也可以通过偶联剂(如戊二醛)的方法把配体连接到晶胶表面上^[17,21]。如制备 PVA 晶胶时,通常使用戊二醛偶联剂活化羟基,再将各类蛋白酶连接到晶胶表面^[22]。

2.3 晶胶表面接枝聚合

在晶胶孔壁上接枝聚合物链,改变单体的种类、数量以及接枝步骤,可调控晶胶的表面化学性质。不同的聚合物链,如非离子型的、聚电解质型的、温敏型的、带羟基或环氧基的聚合物链,都可以在水或者水-有机溶剂体系中进行接枝。

Mattiasson 等在 pAAm 晶胶接枝改性方面做了大量的工作。他们首先报道了以二过碘酸合铜为引发剂,在 pAAm 晶胶表面引发甲基丙烯酸二甲胺乙酯(DMAEMA)接枝聚合,制备分离牛血清白蛋白 BSA 的色谱固定相^[23]。pAAm 晶胶的多孔结构为接枝反应提供了合适的反应场所。接枝方法有两种:一步法接枝,即直接将晶胶置于含有引发剂和反应单体的溶液中,从而完成接枝聚合;在两步法接枝中,先将晶胶浸泡在引发剂溶液中引发,再放入单体溶液中进行聚合(图5)。两步法可显著降低可溶性均聚物的生成,接枝效率较高,由于晶胶表面上引发的位点较少,支链长且稀疏,适合吸附更多的 BSA。一步法易产生可溶性均聚物,接枝效率较低,在晶胶表面上引发的位点较多,形成的支链较短,不利于 BSA 的吸附。

(a) Activation reaction



(b) Graft polymerization

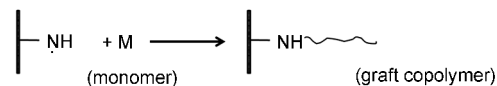


图5 pAAm 晶胶接枝改性机理^[23]

Fig.5 The mechanism of graft polymerization onto pAAm cryogel^[23]

采用相同的方法, Mattiasson 等将阴离子交换型的聚(甲基丙烯酸二甲胺乙酯)(pDMAEMA)及聚[2-(甲基丙烯酰氧)乙基三甲基氯化铵](pMETA),或阳离子交换型的聚丙烯酸酯接枝到 pAAm 晶胶表面,制备离子交换型色谱固定相,并研究其对各种小

分子(如金属、染料)和大分子(如蛋白质)的吸附^[24]。进一步研究发现,接枝聚合反应未显著改变晶胶的多孔结构,但随着接枝聚合物链的密度增加,溶质的流速降低。pAAm 晶胶表面对小分子(如金属、染料)的吸收随着接枝密度的增大而呈线性增加,与接枝方法(一步法或两步法)无关;而对于蛋白大分子,pAAm 晶胶是通过接枝聚合物链以“触手”绑定的方式吸附的,其吸附量受到接枝的聚合物链层结构的影响较大。通过两步法修饰的 pAAm 晶胶,表面含有稀疏的长支链,更易于与带有负电的 BSA 蛋白相互作用,因此蛋白质的吸附量也更高。

此外,Mattiasson 等将丙烯酸接枝到 pAAm 晶胶表面^[25],制备固定溶菌酶的色谱填料。

2.4 双交联法

Mattiasson 等^[26]最先提出使用双交联法制备具有双网络结构的晶胶,即先制备初始晶胶,然后再浸泡在其他单体/预聚体溶液中,再次冷冻聚合-解冻,在初始晶胶的贯通大孔内形成新的晶胶网络。利用双交联法制备的晶胶,初始晶胶网络与第二网络纵横交错,具有开放多孔结构或者梯度的孔隙率,孔径可达 150 μm,第二网络可增强初始晶胶的机械强度和弹性,达到与动物组织相似的机械强度(0.4 ~ 350 MPa)。浙江大学孙建中等^[27]制备了聚(*N*-异丙基丙烯酸酰胺)/聚丙烯酰胺(pNIPAm/pAAm)双网络晶胶,在碱性条件下水解后具有温度/PH 双敏感响应性能,且力学性能明显提高。

双交联法,有助于将具有生物活性的配体、聚合物或者蛋白引入到晶胶网络中,实现晶胶的改性。经过改性的双网络结构晶胶,具有大小合适的贯通孔结构、适宜的机械强度、弹性和形变回复能力,并具有优良的生物相容性,可作为三维组织工程支架材料,具有很好的应用前景。

2.5 复合晶胶法

将填料颗粒(微米颗粒或纳米颗粒)与单体/聚合物预聚体溶液混合,经凝胶化制备复合型晶胶。一些复合晶胶如磁性纳米颗粒-pAAm 复合晶胶^[28]、分子印迹聚合物颗粒-pAAm 复合晶胶^[29]、碳颗粒-pNIPAm 复合晶胶^[30]、多壁碳纳米管-聚乙烯醇复合晶胶^[31]、内嵌 SiO₂ 纳米颗粒的超大孔复合 pAAm 晶胶^[32]等已得到较详细的研究。在复合晶胶制备中,功能性填料颗粒的微孔有可能被聚合物堵塞,从而导致填料的性能降低,如碳颗粒的吸附性能等。为解决上述问题,Mattiasson 等^[30]先合成 *N*-异丙基丙烯酸酰胺-烯丙胺共聚物微粒,然后将碳粒子与含有共聚物颗粒、偶联剂戊二醛的悬浮液共混,冷冻聚合-解冻。由于 *N*-异丙基丙烯酸酰胺-烯丙胺共聚物微粒大于碳微粒的孔径,碳微粒的孔隙在晶胶制备过程中未被堵塞,其吸附性能得以保留。这种方法制备的复合晶胶对苯酚的吸附能力明显优于直接混合法制备的复合晶胶。此外,还有报道将含有转化生长因子-β1(TGF-β1)的微胶囊与明胶晶胶支架复合,调控 TGF-β1 的释放,以达到组织工程应用的要求^[33]。

3 晶胶的应用

通过控制凝胶化速率和溶剂结晶速率,可调控晶胶的结构和性质;而通过表面化学改性,可赋予其特殊的表面性质。通常,孔径小于 1.0 μm 的晶胶适合制备成珠状,而孔径为 10.0 ~ 100 μm 的晶胶可被制成块状、盘状或薄板状。不同形状和孔径的晶胶有不同的应用。弹性珠状的晶胶可用于细胞和酶的固定化,或富集特定小分子。块状晶胶可作为色谱介质,用于病毒、细胞器、微生物和哺乳动物细胞等的色谱分离,亦可用作细胞培养三维支架材料。表 2 总结了各种晶胶体系及用途。

表 2 晶胶体系及用途
Table 2 Overview of cryogels and their applications

monomer/precursor	pore size(μm)	application	ref
acrylamide	10 ~ 200	separation of biological nanoparticles (enzyme, protein) and cells, scaffolds for cell culture	13,19,34 ~ 43,89
graft-pAAm	1 ~ 100	immobilization of dye, lysozyme, protein.	14,23 ~ 25,44 ~ 47
dimethylacrylamide	10 ~ 100	separation of biological nanoparticles	48,49
polyvinylalcohol monoliths	1 ~ 150	separation of biological nanoparticles, scaffolds for cell culture	50,78 ~ 82,91
polyvinylalcohol beads	0.1 ~ 1	immobilization of cells and enzyme	51,52
hydroxyethyl methacrylate		separation of biological nanoparticles, scaffolds for cell culture	53 ~ 56,83 ~ 87
poly (ethylene glycol) diacrylate		separation of protein and polymer nanoparticles, scaffolds for cell culture	57,11,88
agarose		scaffolds for cell culture	58,75,76
chitosan	30 ~ 100	protein purification, scaffolds for cell culture	59 ~ 61, 73
<i>N</i> -isopropyl acrylamide	1 ~ 100	scaffolds for cell culture	16,27
gelatin	100 ~ 300	scaffolds for cell culture	33,58,61,75,77

3.1 生物物质色谱分离材料

生物工程的重要一环是从发酵液或者破碎细胞悬浮液中分离提纯目标产物。尺寸较大的生物纳米颗粒(如质粒、细胞器、病毒、蛋白质涵体、大分子聚集等)或不同种类的细胞具有相对大的粒度(20~300 nm)、低的扩散速率和复杂的分子表面,与一般的可溶性大分子(粒径<10 nm)有很大区别,其分离提纯仍然是一个难题。分离生物微粒的传统方法有超速离心法、微细过滤法和超滤法等,由于细胞碎片和目标微粒的大小和密度相近,这些方法往往分辨率低、分离规模小且耗时。

色谱技术是一种简易、高分辨率、可高通量的分离方法。传统填充床色谱尽管具有优异的分辨率,但其填料易被生物微粒堵塞,致使水流阻力增大并最终导致柱体阻塞,因而不能用于分离含有生物微粒的液体,如细胞悬浮液或细胞匀浆。制备高孔隙率的填充床色谱材料,使其适合分离细胞碎片甚至是整个细胞而不被阻塞,是该领域的研究热点。晶胶的贯通大孔结构能够允许细胞、细胞碎片等生物微粒顺利通过,可在高流速下实现从复杂料液中直接提取和分离目标产物的目的。超大孔连续床晶胶介质材料易得,制备成本较低,操作压力低,目标物在床层内停留时间短,选择性强,在重组大分子蛋白、酶、质粒DNA等生物大分子的分离纯化方面有广阔应用前景^[13]。

晶胶作为生物物质的色谱分离材料研究,发展时间较短,但国内外已有较丰富的研究成果。瑞典的隆德大学的 Mattiasson 和 Galaev 课题组专注于以 pAAm 晶胶为主体的离子交换色谱柱和固定金属亲和色谱柱研发,在其工作基础上已发表多篇综述。土耳其的 Denizli、印度的 Kumar 和俄国的 Lozinsky 课题组在用于蛋白分离的晶胶色谱柱研究方面也有突出的成果。国内浙江工业大学、浙江大学、清华大学、西安交通大学、天津大学等也有学者致力于该方面的研究,并取得了丰硕的成果。

Mattiasson 等^[35]使用丙烯酰胺、烯丙基缩水甘油醚(AGE)制备孔径为10~100 μm的晶胶,并在其表面偶联亚氨基二乙酸(IDA);以该晶胶为色谱填料,从大肠杆菌细胞匀浆中分离提纯组氨酸标记的乳酸脱氢酶((His)₆-LDH)。在0.01 MPa下,水流可以750~2000 cm/h的线流速自由通过4 cm高的晶胶色谱柱;相比之下,高效液相色谱在大于2~10 MPa下,流速仅为300~1700 cm/h^[6]。使用晶胶色谱柱材料,大肠杆菌细胞匀浆不需预先过滤或者

浓缩,大大简化操作步骤;分离可在较低柱压下进行,细胞匀浆中的生物微粒不会堵塞色谱柱。经过6次反复的分离,色谱柱柱效不变,且无明显损坏。此外,将伴刀豆球蛋白固定在类似的晶胶上,可用于分离人血浆中的人类免疫球蛋白G(IgG)^[37]。Hilder^[62]将带有正电荷(-NR₄⁺)或负电荷(SO₃⁻)的纳米颗粒物理包埋在PEG晶胶中,提高标准蛋白的分离效果。

贯通多孔结构的晶胶还可用来分离纯化不同种类的细胞。Mattiasson 等^[34]制备了两种含有不同配体的 pAAm 晶胶色谱柱:含有阴离子交换配体2-二甲氨基乙基的离子交换色谱柱(ion-exchange chromatography, IEC)、含有螯合剂亚氨基二乙酸(IDA)的固定金属亲和层析柱(immobilized metal affinity chromatography, IMAC);两种色谱柱均具有连续贯通的多孔结构(孔径10~100 μm),可允许大肠杆菌细胞(1×3 μm)无阻通过。在低离子强度下,表面带负电荷的大肠杆菌细胞由于静电作用被吸附在带有正电荷的IEC柱上,使用0.35~0.40 M NaCl溶液可洗脱出70%~80%的细胞;通过金属配体作用,表面带有咪唑基的大肠杆菌细胞可被吸附在IMAC柱上,使用10 mM咪唑溶液或20 mM EDTA溶液可洗脱出~80%的细胞。另外,大肠杆菌细胞在吸附和洗脱两个过程中,都能保持活性。上述结果说明,功能化的聚合物晶胶色谱柱可用来分离纯化微生物细胞。

浙江大学王良华课题组^[13]通过固载金属离子,制备金属螯合亲和 pAAm 晶胶;通过孔内直接接枝法,固载磺酸基和氨基功能基团制备离子交换晶胶;以酵母发酵液中三磷酸胞苷(CTP)和三磷酸腺苷(ATP)的分离为例探讨晶胶的应用。

此外,张凯^[63]利用晶胶作为固定相,初步完成制备型连续床层析仪的系统开发,实现了连续床层析分离的自动控制。

3.2 生物分子、细胞固定材料

聚合物晶胶具有高比表面积及可修饰性,可用于固定生物大分子(如酶、多糖、核酸)和细胞。

生物大分子在晶胶中的固定有两种方式,一种是包埋在孔壁里,另一种是偶联在孔的内表面。前者直接将生物大分子和丙烯酸酯单体共混/共聚制备而成^[64,65]。通过这种方法固定的生物大分子被包裹在致密的聚合物网络中,与外界介质隔离。低分子量的底物可通过扩散进入聚合物晶胶孔壁,与固定的生物大分子相互作用。这种固定方式中,生

物大分子的有效浓度比实际的要低。后一种固定方式是将生物大分子通过共价键的形式偶联到晶胶孔的内表面,例如将枯草杆菌蛋白酶^[51]、猪胰腺脂肪酶^[52]、脂蛋白脂酶^[66]、胰凝乳蛋白酶^[67]、嗜热菌蛋白酶^[68]等共价偶联到珠状聚乙烯醇(PVA)晶胶表面。这种方法固定的生物大分子直接暴露在晶胶表面和孔隙内表面,容易与外界介质中的各种高分子量或低分子量的底物结合,生物活性高。但这种固定方式的生物大分子数量有限,蛋白负载能力为1~10 mg/mL 数量级。^[67,68] 多孔结构的晶胶可为各种生物催化反应提供良好的物质运输环境。

此外,晶胶还适合用作固定细胞的载体。与生物大分子的固定相似,细胞的固定也有两种方式:化学作用(共价偶联或吸附)和物理包埋。Lusta 等^[69]将大肠杆菌细胞通过化学键偶联到醛基衍生化的pAAm 晶胶上。Mattiasson 等^[70]制备含有亲和配体蛋白 A 的 PVA 珠状晶胶,然后通过抗体-免疫球蛋白作用,吸附固定人类血液淋巴细胞。

通过包埋方式固定时,细胞被包埋在晶胶的孔壁中或大孔隙里。具体方法是将微生物(如细菌、孢子、细胞器)与凝胶预聚体(单体溶液^[71]或者

活性聚合物和交联剂溶液^[72])混合,然后通过低温凝胶化技术制备多孔凝胶,细胞被固定在孔壁的交联网络中或孔隙里。

3.3 组织工程支架

在组织工程研究中,支架材料为细胞提供物理支持及合适的生化信号,以促进细胞在支架材料上的黏附、增殖、迁移、分化、细胞外基质分泌等功能。为了模拟体内的三维微环境,支架材料须满足以下条件:开放的多孔结构(孔径一百微米至数百微米)、合适的孔隙率、良好的细胞/生物相容性、适宜的机械强度、易灭菌、耐存储等。

晶胶的三维贯通多孔结构利于营养物质、氧气、代谢产物的扩散及输运,适宜作为组织工程支架材料,并具有明显的优势和良好的发展前景。使用细胞/生物相容性好的前体/单体,可制备适于细胞培养的组织工程支架材料。另外,晶胶可以承受高压灭菌处理,能够快速干燥并储存在干燥环境中,也可以迅速复溶胀。根据制备晶胶材料的不同,用于组织工程支架的聚合物晶胶及其应用领域归纳如表 3。其中天然聚合物有明胶、壳聚糖、琼脂糖、藻酸盐、葡聚糖等;合成聚合物有 PVA、pHEMA、pAAm、PEG 等。

表 3 用于组织工程的晶胶研究概况

Table 3 Overview of cryogels used for tissue engineering

cryogel	modification	cell	application	ref
chitosan-gelatin	—	fibroblast (Cos-7)	tissue engineering	61
chitosan	RGD	fibroblast, endothelial cells	soft tissue and hard tissue	73
dextran or gelatin	laminin,	human umbilical cord blood stem cell	neural tissue regeneration	74,17
gelatin	polyelectrolyte microcapsules with TGF-β1	myofibroblast	tissue engineering	33
agarose	gelatin	pancreatic islets, insulinoma cell, Cos-7 cell	tissue engineering	58,75
agarose-alginate	—	fibroblast (NIH-3T3), bacterial cell (BL21)	tissue engineering	76
alginate	ACRL-PEG-RGD	murine mesenchymal stem cell, luciferase-transduced B16-F10 cell	tissue engineering, cell therapy	15
alginate	gelatin	human mononucleated cell, primary chondrocyte, Cos-7, NIH-3T3	tissue engineering, cell therapy	77
polyvinyl alcohol (or PVA)	chitosan, gelatin, starch, haemoglobin,	endothelial cell, smooth muscle cell	vascular tissue engineering	78~82,91
hydroxyethylmethacrylate (or HEMA)	dextran, gelatin, bovine type-I collagen, human fibrinogen, lactate	myoskeletal cell lines, fibroblast, chondrocyte	soft tissues, cartilage tissue engineering, and others	83~87
polyacrylamide (or pAAm)	type I collagen, abRGDm, NIPAAm,	human colon cancer HCT116, human acute myeloid leukemia KG-1 cell, embryonic fibroblast	tissue engineering	19,89
poly(ethylene glycol) (or PEG)	collagen type I, mineralization	human mesenchymal stem cell, bovine chondrocyte	tissue engineering	11,88

合成聚合物材料具有良好的机械性能,但生物相容性欠佳,可通过复合/接枝天然高分子(如明

胶、胶原)或生物活性分子(RGD 或蛋白质)等改性手段提高细胞在材料表面的黏附能力。

在聚合物晶胶中加入明胶可增加细胞黏附能力。其中,研究较多的是 PVA/明胶晶胶^[78,81,82],主要用于血管组织工程。爱尔兰都柏林城市大学 McGuinness 等^[78]将壳聚糖、明胶和淀粉分别与 PVA 溶液混合,制备相应的晶胶。天然高分子的加入能促进蛋白质吸附和牛血管内皮细胞的增殖,其中 PVA/明胶晶胶的效果最好。以色列特拉维夫大学的 Bloch 等^[58]发现胰岛细胞在琼脂糖/明胶晶胶中能较好地粘附,并且其胰岛素分泌明显高于相应的二维培养的情况。

印度理工学院 Kumar 课题组较多研究了细胞在晶胶中培养。他们发现成纤维细胞(Cos-7)在壳聚糖/明胶晶胶^[61]、琼脂糖/明胶晶胶^[75]中均表现出高效的细胞黏附、增殖和细胞外基质分泌。另外,该课题组对比不同交联方式(戊二醛、碳化二亚胺/*N*-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS))制备的两种藻酸盐-明胶复合晶胶(藻酸盐-明胶-戊二醛、藻酸盐-明胶-EDC/NHS)对细胞生长的影响;发现交联方式不仅影响支架材料的物理化学性质,而且导致细胞在材料上表现不同的粘附形态。细胞在戊二醛交联的晶胶中均匀分布,铺展较好;细胞在 EDC-NHS 体系制备的晶胶中呈团簇分布,铺展较差(图 6)^[77]。

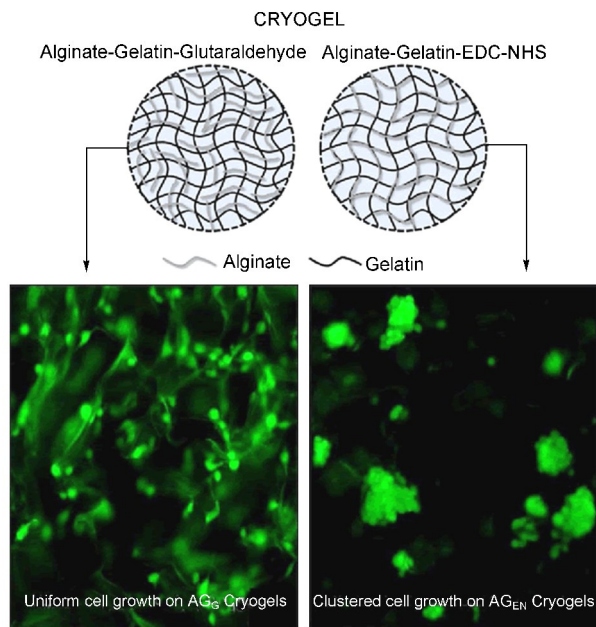


图 6 细胞在不同交联方式制备的藻酸盐-明胶晶胶里的粘附形态^[77]

Fig. 6 Cell adhesion in alginate-gelatin cryogels prepared under different crosslinking conditions^[77]

RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)多肽序列存在于多种细胞外基质中,可与 11 种整合素特异性结

合,有效促进细胞在材料表面黏附。西班牙 Aguilar 课题组^[73]合成含有 RGD 序列的低聚多肽(GRGDGY),以戊二醛为偶联剂将 GRGDGY 连接到壳聚糖晶胶表面;在 32 μM ~ 63 μM 范围内,提高晶胶表面 RGD 密度可促进人成纤维细胞的黏附和增殖;当 RGD 浓度大于 0.13 mM 时,细胞增殖受到抑制。RGD 修饰的壳聚糖晶胶具有生物活性和生物降解性,适合于作为软组织和硬组织的支架材料。

Galaev 等^[19]使用由胍基丁胺修饰的模拟 RGD 的大分子单体(abRGDm)改性 pAAm 晶胶或 pAAm-pNIPAAm 晶胶,发现成纤维细胞在 abRGDm 修饰的晶胶中铺展较好,形成触角和粘附斑,增殖较快;无 abRGDm 修饰的 pAAm 晶胶里,成纤维细胞收缩成球状,没有触角和粘附斑,增殖较慢。

美国哈佛大学 Mooney 等^[15]制备基于甲基丙烯酸酯基海藻酸盐(MA-alginate)的可注射晶胶。该晶胶具有优异的形状记忆性能(图 2),可承受 90% 的压缩应变且无永久形变或机械破坏。使用丙烯酸酯-聚乙二醇-RGD(ACRL-PEG-RGD)共聚改性该晶胶,与未经改性的晶胶相比,RGD 的加入能促进细胞在晶胶表面及内部的铺展和粘附(图 7)。

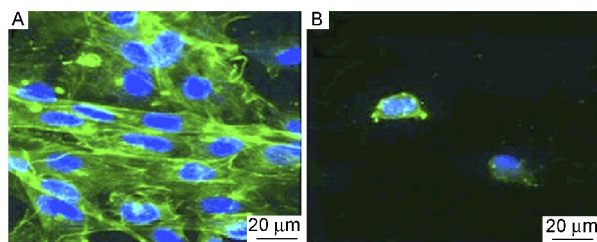


图 7 MSC 在 RGD 修饰(A)和未修饰(B)的 MA-alginate 晶胶中培养 5 天后的黏附、铺展情况^[15]

Fig. 7 Adhesion and spreading of MSCs after 5 d of culture in a RGD-modified cryogel (A), and non-modified cryogel (B)^[15]

生物活性分子在晶胶上的修饰方法对其在晶胶中的空间分布、密度、构象有重要影响,从而影响细胞与材料的表面相互作用。Galaev 课题组^[85]采用本体改性法和表面改性法将 I 型胶原(CG)和人纤维蛋白原(Fg)连接到 pHEMA 晶胶上,其中本体改性的晶胶记为 CG/pHEMA 和 Fg/pHEMA,表面改性的晶胶标记为 CG-epHEMA 和 Fg-epHEMA。CG-epHEMA 和 Fg-epHEMA 晶胶的蛋白浓度依次为 80 ~ 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 130 ~ 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。实验观察到成纤维细胞在 Fg-epHEMA 晶胶里的增殖情况最好,说明 Fg 表面改性晶胶过程中未改变 Fg 的天然构象,而

采用本体改性法将蛋白质连接到晶胶上,大部分的活性配体被包埋在聚合物基体里,无法与细胞发生相互作用,因而不能促进细胞的黏附和增殖。McGuckin 等^[74]将层粘连蛋白连接到葡聚糖晶胶和明胶晶胶上,发现层粘连蛋白的加入能促进人脐带血干细胞在体外向人工神经组织分化。晶胶植入大鼠的脑组织或器官型海马脑片(organotypic hippocampal slices)里,未引起小胶质细胞介导的炎症反应,同时阻止神经胶质疤形成。含有层粘连蛋白的晶胶支架能够促进神经细胞的渗透,具有优异的神经营生性能。

在组织工程中,通常引入生长因子,以调控细胞行为。然而,生长因子的输运面临分子量高、半衰期短、组织渗透慢等问题。同时,生长因子具有潜在的毒性和副作用,需严格控制剂量及释放量。晶胶可作为生长因子的合适载体。比利时根特大学 De Geest 等^[33]将含有转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的微胶囊包进明胶晶胶里,调控 TGF- $\beta 1$ 的释放,以达到组织工程应用的要求。微胶囊未明显改变晶胶的形貌、机械强度及细胞装载能力;同时,释放出的 TGF- $\beta 1$ 仍保留生物活性。

Varghese 等^[88]研究了不同结构晶胶(海绵状多孔晶胶和柱状多孔晶胶)对人类间充质干细胞(hMSCs)存活、增殖、成骨分化的影响。在体外培养中,细胞在两种晶胶中的存活率和增殖相似,但海绵状多孔晶胶更促进细胞的成骨分化。矿化晶胶,无论有无外源 hMSCs,都能促进活体异位骨的形成。无外源细胞的未矿化晶胶植入活体后,未观察到新生骨组织。柱状多孔晶胶利于宿主细胞的渗入和血管化,而海绵状多孔晶胶不利于宿主细胞的渗入。这主要与晶胶的孔径大小和贯通性相关。

国内浙江大学、四川大学、天津大学等单位开展了聚合物晶胶用于组织工程支架的相关研究。姚善泾等^[89]制备了复合 TiO_2 纳米颗粒的 pAAm 珠状晶胶,其力学性能和稳定性都有提高,该具有网络结构的珠状凝胶利于营养物质和氧气的传送,在生物技术方面有一定应用前景。四川大学林伟等^[90]制备的双醛淀粉交联胶原晶胶具有无毒,具有血液相容性,有望用作创伤敷料。天津大学姜山等^[91]在二甲亚砜-水混合溶剂中制备 PVA 晶胶,其力学性能与猪肝相似,可用作动物组织变形研究的替代物。

4 结语与展望

低温凝胶化技术是制备聚合物多孔材料的重要化学进展, 2014, 26(7): 1190 ~ 1201

方法,具有操作简单、材料结构易控制等独特优点;通过合适的功能化改性,聚合物晶胶在生物分子/细胞的固定化、色谱分离等方面已获得广泛研究与应用。

聚合物晶胶具备连续贯通的多孔结构,利于营养物质、氧气和细胞代谢产物的输运;同时,聚合物晶胶具有与软组织相似的弹性和强度;因此,聚合物晶胶在组织工程领域有极大的应用潜力。当前,聚合物晶胶作为组织工程支架材料的研究还处于起步阶段,一些重要的基础问题亟待研究,如提高晶胶的机械强度,晶胶与细胞的相互作用机理,晶胶的力学与结构特征如何影响细胞行为、功能及命运等;同时,聚合物晶胶作为支架材料用于细胞培养或组织工程领域的研究也将获得更广泛的研究。

参 考 文 献

[1] Hjertén S, Liao J L, Zhang R. J. Chromatogr. A, 1989, 473: 273.

[2] Nam Y S, Park T G. J. Biomed. Mater. Res., 1999, 47: 8.

[3] Wood C D, Cooper A I. Macromolecules, 2001, 34: 5.

[4] Kabiri K, Omidian H, Zohuriaan-Mehr M J. Polym. Int., 2003, 52: 1158.

[5] Hentze H P, Antonietti M. Rev. Mol. Biotechnol., 2002, 90 (1): 27.

[6] Lozinsky V I, Galaev I Y, Plieva F M, Savina I N, Jungvid H, Mattiasson B. Trends Biotechnol., 2003, 21: 445.

[7] Plieva F M, Galaev I Y, Mattiasson B. J. Sep. Sci., 2007, 30: 1657.

[8] Plieva F M, Karlsson M, Aguilar M R, Gomez D, Mikhalevsky S, Galaev I Y. Soft Matter, 2005, 1: 303.

[9] Plieva F M, Savina I N, Deraz S, Andersson J, Galaev I Y, Mattiasson B. J. Chromatogr. B, 2004, 807(1): 129.

[10] Plieva F M, Xiao H T, Galaev I Y, Bergenstahl B, Mattiasson B. J. Mater. Chem., 2006, 16: 4065.

[11] Hwang Y S, Zhang C, Varghese S. J. Mater. Chem., 2010, 20: 345.

[12] Tang S Z, Shen S C, Yun J X, Yao K J. J. Chem. Eng. Chin. Univ., 2010, 24(6): 974.

[13] 王良华 (Wang L H). 浙江大学博士论文 (Doctoral Dissertation of Zhejiang University), 2008

[14] 陈芳 (Chen F). 浙江工业大学硕士论文 (Master Dissertation of Zhejiang University of Technology), 2008.

[15] Bencherif S A, Sands R W, Bhatta D, Arany P, Verbeke C S, Edwards D A, Mooney D J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, 109(48): 19590.

[16] Dainiak M B, Kumar A, Galaev I Y, Mattiasson B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103(4): 849.

[17] Plieva F M, Bober B, Dainiak M, Galaev I Y, Mattiasson B. J. Mol. Recognit., 2006, 19: 305.

- [18] Ozmen M M, Okay O. *Polymer*, 2005, 46(19): 8119.
- [19] Dainiak M B, Savina I N, Musolino I, Kumar A, Mattiasson B, Galaev I Y. *Biotechnol. Prog.*, 2008, 24(6): 1373.
- [20] Arvidssona P, Plieva F M, Lozinsky V I, Galaeva I Y, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2003, 986: 275.
- [21] Kumar A, Plieva F M, Galaeva I Y, Mattiasson B. *J. Immunol. Methods.*, 2003, 283: 185.
- [22] Lysogorskaya E N, Roslyakova T V, Belyaeva A V, Lozinskii V I, Filippova I Y. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2008, 44(3): 241.
- [23] Savina I N, Galaev I Y, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1092(2): 199.
- [24] Savina I N, Galaev I Y, Mattiasson B. *J. Mol. Recognit.*, 2006, 19: 313.
- [25] Savina I N, Galaev I Y, Mattiasson B. *Polymer*, 2005, 46: 9596.
- [26] Plieva F M, Ekstrom P, Galaev I Y, Mattiasson B. *Soft Matter*, 2008, 4: 2418.
- [27] Zhao Q, Sun J Z, Wu X F, Lin Y T. *Soft Matter*, 2011, 7(9): 4284.
- [28] Yao K J, Yun J X, Shen S C, Wang L H, He X J, Yu X M. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1109: 103.
- [29] Noir M L, Plieva F M, Hey T, Guieysse B, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1154: 158.
- [30] Hajizadeh S, Kirsebom H, Mattiasson B. *Soft Matter*, 2010, 6: 5562.
- [31] Kueseng P, Thammakhet C, Thavarungkul P, Kanatharana P. *Microchem. J.*, 2010, 96: 317.
- [32] Xu P P, Yao Y C, Shen S C, Yun J X, Yao K J. *Chin. J. Nucl. Phys.*, 2010, 18(4): 667.
- [33] De Cock L J, De Wever O, Vlierberghe S, Vanderleyden E, Dubruel P, De Vos F, Vervaeke C, Remon J P, De Geest B G. *Soft Matter*, 2012, 8(4): 1146.
- [34] Arvidsson P, Plieva F M, Savina I N, Lozinsky V I, Fexby S, Bulow L, Galaev I Y, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2002, 977: 27.
- [35] Arvidsson P, Plieva F M, Lozinsky V I, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2003, 986: 275.
- [36] Dainiak M B, Plieva F M, Galaev I Y, Hatti-kaul R, Mattiasson B. *Biotechnol. Prog.*, 2005, 21: 644.
- [37] Babac C, Yavuz H, Galaev I Y, Piskin E, Denizli A. *React. Funct. Polym.*, 2006, 66(11): 1263.
- [38] Yan L D, Shen S C, Yun J X, Yao K J. *Chin. J. Nucl. Phys.*, 2011, 5: 876.
- [39] Zhan X Y, Lu D P, Lin D Q, Yao S J. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2013, 130(5): 3082.
- [40] Shen S C, Wang L Y, Sun Z T, Li M F, Liu C Z, Tian B, Yun J X, Hua Y J. *Chin. J. Nucl. Phys.*, 2013, 21(6): 663.
- [41] 沈绍传 (Shen S C). 浙江大学博士论文 (Doctoral Dissertation of Zhejiang University), 2011.
- [42] Yu X M, Zhao P, Zhang W B, Zhang Y K, Zhang L H. *Prog. Modern Biomed.*, 2013, 13(6): 1015.
- [43] 何兴娇 (He X J). 浙江工业大学硕士论文 (Master Dissertation of Zhejiang University of Technology), 2007.
- [44] Guo Y T, Shen S C, Yun J X, Yao K J. *Chin. J. Biotech.*, 2012, 28(8): 995.
- [45] Yun J X, Dafoe J T, Peterson E, Xu L H, Yao S J, Daugulis A J. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1284: 148.
- [46] Wang L H, Chen F, Yun J X, Yao K J, Yao S J. *J. Chem. Eng. Chin. Univ.*, 2009, 23(3): 480.
- [47] Yun J X, Dafoe J T, Peterson E, Xu L H, Yao S J, Daugulis A J. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1284: 148.
- [48] Dainiak M B, Kumar A, Plieva F M, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1045: 93.
- [49] Noppe W, Plieva F M, Galaev I Y, Mattiasson B. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1101: 79.
- [50] Plieva F M, Karlsson, Mattiasson B. *J. Appl. Polym. Sci.*, 2006, 100(2): 1057.
- [51] Bacheva A V, Plieva F M, Lysogorskaya E N, Filippova I Y, Lozinsky V I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, 11: 1005.
- [52] Plieva F M, Kochetkov K A, Singh I, Parmar V S, Belokon Y N, Lozinsky V I. *Biotechnol. Lett.*, 2000, 22: 551.
- [53] Bereli N, Andac M, Baydemir G, Say R, Filippova I Y, Galaev I Y, Denizli A. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1190: 18.
- [54] Baydemir G, Bereli N, Andac M, Say R, Galaev I Y, Denizli A. *Colloid. Surface. B*, 2009, 68: 33.
- [55] Derazshamshir A, Baydemir G, Andac M, Say R, Galaev I Y, Denizli A. *Macromol. Chem. Phys.*, 2010, 211: 657.
- [56] Deng Y P, Zhang G H, Xu L H, Shen S C, Yun J X, Yao K J. *J. Chem. Eng. Chin. Univ.*, 2013, 21(1): 119.
- [57] Chen Z Y, Xu L, Liang Y, Wang J B, Zhao M P, Li Y Z. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1182: 128.
- [58] Bloch K, Lozinsky V I, Galaev I Y, Yavriyantz K, Vorobeychik M, Azarov D, Damshkaln L G, Mattiasson B, Vardil P. *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, 2005, 75A(4): 802.
- [59] Sun S J, Tang Y H, Fu Q, Zhao Y D. *J. Sep. Sci.*, 2012, 35(7): 893.
- [60] Sun S J, Tang Y H, Fu Q, Liu X, Guo Y A, Zhao Y D, Chang C. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, 50(4): 1002.
- [61] Kathuria N, Tripathi A, Kumar A. *Acta. Metall.*, 2009, 5: 406.
- [62] Arrua R D, Haddad P R, Hilder E F. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1311: 121.
- [63] 张凯 (Zhang K). 中国地质大学硕士论文 (Master Dissertation of China University of Geosciences), 2012.
- [64] Kumakura M. *Polym. Adv. Technol.*, 2001, 12: 415.
- [65] Sutani K, Kaetsu I, Uchida K. *Radiat. Phys. Chem.*, 2001, 61: 49.
- [66] Hayashi T, Hyon S H, Cha W I, Ikada Y. *J. Appl. Polym. Sci.*, 1993, 49: 2121.
- [67] Belokon Y N, Kochetkov K A, Plieva F M. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2000, 88: 97.
- [68] Filippova I Y, Bacheva A V, Baibak O V, Plieva F M, Lysogorskaya E N, Oksenoit E S, Lozinsky V I. *Russ. Chem.*

Bull. , 2001, 50: 1896.

[69] Lusta K A, Starostina N G, Gorkina N B, Fikhte B A, Lozinskiĭ V I. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. , 1988, 24(4) : 504.

[70] Kumar A, Caballero A R, Plieva F M, Galaev I Y, Nandakumar K S, Kamihira M, Holmdahl R, Orfao A, Mattiasson B. J. Mol. Recognit. , 2005, 18: 84.

[71] Lusta K A, Chung K, Sul W, Park H S, Shin D. Process. Biochem. , 2000, 35: 1177 – 1182

[72] Scardi V. Methods Enzymol. , 1987, 135B: 293.

[73] Kirsebom H, Aguilar M R, Roman J S, Fernandez M, Prieto M A, Bondar B. J. Bioact. Compat. Pol, 2007, 22(6) : 621.

[74] Jurga M, Dainiak M B, Sarnowska A, Jablonska A, Tripathi A, Plieva F M, Savina I N, Strojek L, Jungvid H, Kumar A, Lukomska B, Janik K D, Forraz N, McGuckin C P. Biomaterials, 2011, 32(13) : 3423.

[75] Tripathi A, Kathuria N, Kumar A. J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2009, 90A(3) : 680.

[76] Tripathi A, Kumar A. Macromol. Biosci. , 2011, 11(1) : 22.

[77] Tripathi A, Vishnoi T, Singh D, Kumar A. Macromol. Biosci. , 2013, 13: 838.

[78] Liu Y, Vrana N E, Cahill P A, McGuinness G B. J. Biomed. Mater. Res. B, 2009, 90B(2) : 492.

[79] Mathews D T, Birney Y A, Cahill P A, McGuinness G B. J. Biomed. Mater. Res. B, 2008, 84B(2) : 531.

[80] Bajpai A K, Saini R. J. Mater. Sci. Mater. Med. , 2009, 20(10) : 2063.

[81] Vrana N E, Cahill P A, McGuinness G B. J. Biomed. Mater. Res. A, 2010, 94A(4) : 1080.

[82] Vrana N E, Matsumura K, Hyon S H, Geever L M, Kennedy J E, Lyons J G, Higginbotham C L, Cahill P A, McGuinness G B. J. Tissue. Eng. Regen. Med. , 2012, 6(4) : 280.

[83] Bolgen N, Vargel I, Korkusuz P. J. Biomed. Mater. Res. A, 2009, 91A(1) : 60.

[84] Singh D, Nayak V, Kumar A. Int. J. Biol. Sci. , 2010, 6(4) : 371.

[85] Savina I N, Dainiak M, Jungvid H, Mikhlovsky S V, Galaev L Y. J. Biomater. Sci. , Polym. Ed. , 2009, 20(12) : 1781.

[86] Bölgen N, Yang Y, Korkusuz P, Güzel E, Haj A J, Pişkin E. J. Tissue. Eng. Regen. Med. , 2011, 5(10) : 770.

[87] Singh D, Tripathi A, Nayak V, Kumar A. J. Biomater. Sci. , Polym. Ed. , 2011, 22(13) : 1733.

[88] Phadke A, Hwang Y S, Kim S H, Kim S H, Yamaguchi T, Masuda K, Varghese S. Eur. Cells. Mater. , 2013, 25: 114.

[89] Zhan X Y, Lu D P, Lin D Q, Yao S J. J. Appl. Polym. Sci. , 2013, 12(5) : 3082.

[90] Mu C D, Liu F, Cheng Q S, Li H L, Wu B, Zhang G Z, Lin W. Macromol. Mater. Eng. , 2010, 295(2) : 100.

[91] Jiang S, Liu S, Feng W H. J. Mech. Behav. Biomed. , 2011, 4(7) : 1228.