

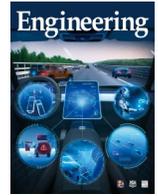


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Medical Engineering—Article

## 基于离子印迹的二价铜离子非标记检测平台预防听力损失

王欢<sup>a,c,#,\*</sup>, 张慧<sup>b,#</sup>, 张小莉<sup>d</sup>, 陈红<sup>d</sup>, 陆玲<sup>d,\*</sup>, 柴人杰<sup>b,e,f,g,h,\*</sup>

<sup>a</sup> The Eighth Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Shenzhen 518033, China

<sup>b</sup> State Key Laboratory of Digital Medical Engineering, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Zhongda Hospital & Advanced Institute for Life and Health, Southeast University, Nanjing 210096, China

<sup>c</sup> Guangdong Key Laboratory for Biomedical Measurements and Ultrasound Imaging, Department of Biomedical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

<sup>d</sup> Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Jiangsu Provincial Key Medical Discipline, Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

<sup>e</sup> Co-Innovation Center of Neuroregeneration, Nantong University, Nantong 226001, China

<sup>f</sup> Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, China

<sup>g</sup> Institute for Stem Cell and Regeneration, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

<sup>h</sup> Beijing Key Laboratory of Neural Regeneration and Repair, Capital Medical University, Beijing 100069, China

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 July 2023

Revised 21 August 2023

Accepted 3 September 2023

Available online 15 September 2023

#### 关键词

结构色

微流控

离子印迹

非标记检测

听力损失

### 摘要

铜是一种微量元素,在体内具有重要的生理功能。然而,过量的铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )可能会导致严重的健康问题,如毛细胞凋亡,进而造成听力损失。因此,对 $\text{Cu}^{2+}$ 的测定具有重要意义。在本文中,我们将离子印迹技术与结构色水凝胶微球相结合,制备了基于壳聚糖的离子印迹水凝胶微球(IIHBs),并将其作为低成本、高特异性的 $\text{Cu}^{2+}$ 检测平台。这些IIHBs具有内部贯穿的大孔微纳结构,宏观尺寸均匀、颜色明亮,同时还具备磁响应性。将其孵育于 $\text{Cu}^{2+}$ 溶液中时,IIHB可以识别 $\text{Cu}^{2+}$ 并表现出反射峰变化,从而实现无标记检测。此外,受益于离子印迹技术,IIHBs显示出良好的特异性和选择性,在 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时印迹因子为19.14。这些特征表明,所开发的IIHBs有望用于 $\text{Cu}^{2+}$ 检测,进而预防听力损失。

© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

听力损失是一种严重而又普遍存在的听力系统疾病,全球超过15亿人受此影响,其中超过4亿人患有中度或重度听力损失[1]。这种疾病不仅降低了患者的生活质量,还会导致患者严重的心理负担。因此,预防和治疗听力损失至关重要[2–5]。在各种治疗方法中,减少铅、镉、铜等重金属离子的摄入是一种可行的策略。目前,铜制剂广

泛应用于农业和工业[6–10]。虽然铜是人体重要的微量元素,但环境和食物中铜离子( $\text{Cu}^{2+}$ )的过量摄入往往会导致严重的健康问题[11–13]。例如,过量的 $\text{Cu}^{2+}$ 会产生羟基自由基,诱导毛细胞(HCs)凋亡,进而导致听力损失[14–18],因此有必要控制 $\text{Cu}^{2+}$ 的摄取。监测食物和饮用水中的 $\text{Cu}^{2+}$ 水平是一种可能的方法,目前已有许多技术用于 $\text{Cu}^{2+}$ 检测,包括荧光法[19–21]、分光光度法[22]、电感耦合等离子体-原子发射光谱法[23]、电感耦合等离子体

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: wangh679@mail.sysu.edu.cn (H. Wang), entuling60@126.com (L. Lu), renjie@seu.edu.cn (R. Chai).

# These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2023 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering*, 2024, 33(2): 276–282

引用本文: Huan Wang, Hui Zhang, Xiaoli Zhang, Hong Chen, Ling Lu, Renjie Chai. Ionically Imprinting-Based Copper (II) Label-Free Detection for Preventing Hearing Loss. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.09.001>

谱法[24]、原子吸收光谱法[25]和电化学方法等[26–27]。尽管这些技术具有良好的准确性和特异性，但往往需要复杂的样品预处理措施和昂贵的设备，其应用仍有一定的局限性。因此，一种简便、低成本、高特异性的 $\text{Cu}^{2+}$ 检测平台仍有待开发。

在本文中，我们开发了基于壳聚糖的反蛋白石结构 $\text{Cu}^{2+}$ 印迹水凝胶微球（IIHBs）用于 $\text{Cu}^{2+}$ 的非标记检测（图1）。壳聚糖是一种天然衍生的聚合物，具有丰富的官能团，可以与各种阳离子形成配位键，因此被广泛应用于诸多领域[28–36]。单纯壳聚糖材料也被开发用于结合和去除重金属离子，但选择性很差，不适合用于重金属离子的检测[37–39]。相比之下，印迹聚合物是具有印迹位点的材料，可以特异性地与印迹的分子和离子结合[40–42]。因此，离子印迹聚合物被广泛用于离子识别和去除[43–44]。反蛋白石是一种具有有序微纳孔洞结构的材料，通常通过复制胶体晶体来制备[45–53]，在传感、催化和组织工程方面已显示出巨大的应用潜力[54–61]。此外，反蛋白石由于其独特的微观结构，还具有明亮的结构色。因此，当其与响应性水凝胶结合时，水凝胶对刺激的可能导致反蛋白石的颜色变化，这使得反蛋白石水凝胶成为非标签检测的理想传感器。

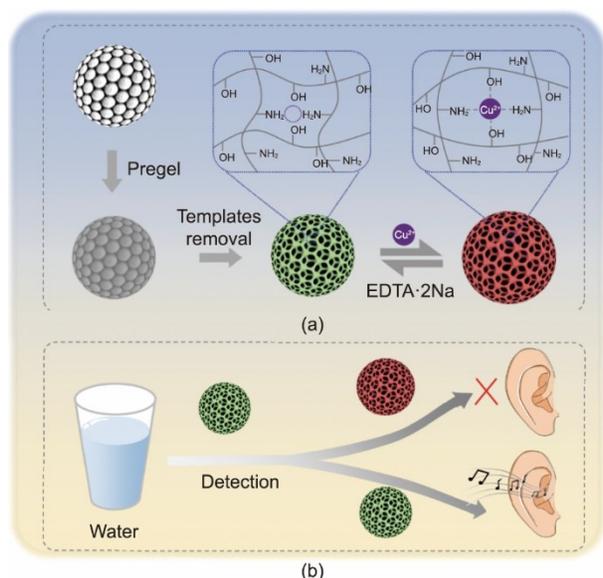


图1. 制造过程示意图。(a) 反应机制；(b) IIHBs的应用。EDTA 2Na: 乙二胺四乙酸二钠。

我们将基于壳聚糖的离子印迹水凝胶与二氧化硅胶体晶体微球（SCCBs）模板结合在一起，建立了一个非标记 $\text{Cu}^{2+}$ 检测平台。壳聚糖、聚乙二醇二丙烯酸酯（PEGDA）和 $\text{Cu}^{2+}$ 的混合物被用作预凝胶来复制SCCBs。通过预凝胶聚合，去除 $\text{Cu}^{2+}$ 和SCCBs模板，得到了具有反蛋白石结

构的IIHBs。IIHBs具有良好的球形度和单分散性，结合磁性纳米颗粒后，还具有良好的移动可控性。当IIHBs浸泡在含 $\text{Cu}^{2+}$ 的溶液中时，它们能够识别 $\text{Cu}^{2+}$ 并与之结合，表现出与 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度相关的反射峰偏移，并具有良好的特异性和重复性。值得注意的是，我们证明了过量的 $\text{Cu}^{2+}$ 对House Ear Institute-Organ of Corti 1 (HEI-OC1)细胞的活性有明显的负面影响，揭示了 $\text{Cu}^{2+}$ 检测在听力损失预防中的积极意义。随后，我们通过对自来水中 $\text{Cu}^{2+}$ 的测定证实了IIHBs的实际应用潜力。这些结果表明，本文所提出的IIHBs是一种简便、低成本、高特异性的 $\text{Cu}^{2+}$ 检测平台，有望用于食品和饮用水中 $\text{Cu}^{2+}$ 的检测和听力损失的预防。

## 2. 实验部分

### 2.1. 材料

壳聚糖（脱乙酰度80%~95%，50~800 mPa·s）、乙二胺四乙酸二钠（EDTA·2Na）、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 和 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 购自上海国药试剂公司。2-羟基-2-甲基苯丙酮（HMPP）和PEGDA购自Sigma-Aldrich。戊二醛（GA）、氢氟酸（HF，40%，V/V）、甲基硅油、二乙基二硫代氨基甲酸钠（DDTC·Na）、乙酸购自上海麦克林试剂公司。其他试剂均为分析纯或更高级别纯度，使用前未经任何处理。实验中所用水均经过纯化，电阻率大于 $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ 。

### 2.2. SCCBs的制备

根据先前报道的方法制备SCCBs。首先将二氧化硅纳米颗粒分散在水中形成均匀溶液（20%，w/V）。然后将溶液泵入单乳液微流控芯片，并用硅油切割成液滴。这些液滴被收集在一个装有硅油的容器中，并放置在75 °C的烘箱中过夜。随后用正己烷除去硅油。最后将烘干的微球收集在坩埚中，在800 °C的马弗炉中煅烧4 h。

### 2.3. 壳聚糖IIHBs的制备

将约200个SCCBs加入到20  $\mu\text{L}$ 由壳聚糖（2%，w/V）、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 和PEGDA（15%，w/V）组成的预凝胶溶液中浸泡6 h，然后在紫外线下聚合10 s，GA处理4 h，然后将微球从水凝胶中分离出来，在EDTA·2Na溶液（2%，w/V）中孵育3 h。最后用HF（2%，w/V）处理2 h。非印迹水凝胶微球（NIHBs）制备方法与上述步骤相同，但不含 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 。

### 2.4. IIHBs用于 $\text{Cu}^{2+}$ 检测

在用于检测前，首先测量IIHBs和NIHBs的反射光

谱, 然后将其浸于 3 mL 不同浓度的  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  溶液中 (0, 1  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 10  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10^2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10^3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10^4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10^5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $10^6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 2 h。最后, 将 IHBs 和 NIHBs 轻缓冲洗后, 再次测量其反射光谱。每组均测量 5 颗 IHBs 和 NIHBs 微球。

### 2.5. IHBs 的选择性

在用于检测前, 首先测量 IHBs 的反射光谱, 然后将其浸于 3 mL 不同离子的溶液中 ( $10^5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 2 h。最后, 将 IHBs 轻缓冲洗后再次测量其反射光谱。每种溶液均测量 5 颗 IHBs 微球。

### 2.6. IHBs 的定量分析

将 DDTC·Na 溶液与不同浓度的  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  溶液混合反应 10 min, 检测溶液在 452 nm 处的吸光度, 得到  $\text{Cu}^{2+}$  的标准曲线。取 300  $\mu\text{L}$  IHBs 和 300  $\mu\text{L}$  NIHBs 分别在 5 mL  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 溶液中孵育 3 h。取 50  $\mu\text{L}$  上清液加入到 50  $\mu\text{L}$  DDTC·Na 溶液 ( $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 100  $\mu\text{L}$  氨溶液 (pH 9.0~9.2) 的混合液中反应 10 min, 在 452 nm 处测定吸光度。每个实验均重复 5 次。

### 2.7. $\text{Cu}^{2+}$ 对 HEI-OC1 细胞的生物毒性

将 HEI-OC1 细胞与含有 0、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  的培养基在 12 孔板上共培养。孵育 1 h 和 6 h 后, 在培养液中加入 1  $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$  的钙黄绿素 (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI), 孵育 30 min。将 HEI-OC1 细胞加入 96 孔板, 分别在含有 0、20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 300  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  的培养基中培养。孵育 1 h 和 6 h 后, 按照厂家说明书使用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 处理细胞, 在 450 nm 处用微孔板读取吸光度。

### 2.8. 对自来水中 $\text{Cu}^{2+}$ 的检测

采用标准加样法测定自来水中的  $\text{Cu}^{2+}$  浓度。在检测前, 首先测量 IHBs 的反射光谱。之后, 将它们在 3 mL 含有不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  (分别为 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的溶液中孵育 2 h。最后, 将 IHBs 轻缓冲洗后再次测量其反射光谱。各浓度组均测量 5 颗 IHBs 微球。

## 3. 结果与讨论

在实验中, 我们采用微流控技术制备模板 SCCBs [62–69]。微流控技术是一种可靠的微流体操纵技术, 可

以生成尺寸均匀的微粒和纤维[70–72]。我们首先将二氧化硅纳米颗粒分散在水中形成胶体溶液, 作为单乳液微流控芯片的内相, 硅油作为外相。当微流控系统运行时, 外相将内相切割成液滴, 收集在装有硅油的容器中。经过干燥和煅烧后, 纳米颗粒自组装成 SCCBs。由于微流体的精确控制, SCCBs 表现出良好的单分散性 (见附录 A 中的图 S1)。为了获得 IHBs, 我们使用含有 CS、 $\text{Cu}^{2+}$  和 PEGDA 的预凝胶溶液来复制 SCCBs 的微观结构。研究表明, 壳聚糖可以通过配位键和静电相互作用与  $\text{Cu}^{2+}$  结合形成复杂的结构, 然后与 GA 交联形成壳聚糖水凝胶。然而, 纯壳聚糖水凝胶往往易碎, 弹性差, 并且所得的 IHBs 结构色不明显。因此, 我们在预凝胶溶液中加入 PEGDA, 聚合后形成柔软的水凝胶网络, 改善了所得 IHBs 的光学性能。将 SCCBs 置于预凝胶溶液中孵育时, 溶液填充微球的纳米空隙, 聚合后得到 SCCBs/水凝胶复合微球。在 EDTA·2Na 和氢氟酸 (HF) 处理后, 可以去除  $\text{Cu}^{2+}$  和二氧化硅模板, 从而获得 IHBs [73–74]。

我们通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察微球的微纳结构, 结果如图 2 所示。可以发现, 二氧化硅纳米颗粒在 SCCBs 表面紧密排列[图 2 (a)], 并一直延伸到微球内部[图 2 (b)]。纳米颗粒之间形成的许多纳米空隙允许水凝胶预聚物溶液灌注填充, 聚合后形成二氧化硅/水凝胶复合微球[见附录 A 中的图 S2 (a)]。IHBs 由复合微球去除二氧化硅模板后得到。然而, 由于壳聚糖水凝胶的机械强度较差, 往往会导致微观结构的崩溃[见附录 A 中的图 S2 (b)]。因此, 我们使用高浓度的交联剂作为替代形成反蛋白石结构。如图 2 (c) 和 2 (d) 所示, 反蛋白石微球的表面和内部呈现有序贯穿的微孔结构, 表明 IHBs 成功复制并继承了 SCCBs 的微观结构。

微球独特的微纳结构可形成光子带隙, 抑制特定频率光的传播并将其反射以显示相应的结构色。一般情况下, 反射光谱的峰值位置  $\lambda$  可以用 Bragg-Snell 定律估计:

$$\lambda = 1.633dn_{\text{average}} \quad (1)$$

式中,  $d$  为相邻的纳米颗粒或纳米孔中心到中心的距离;  $n_{\text{average}}$  为整个微球的平均折射率。因此通过改变  $d$  和  $n_{\text{average}}$ , 可以调整微球的结构色。在本研究中, 由于微球的组成成分和周围溶液环境的变化可以忽略不计, 所以  $n_{\text{average}}$  相对稳定, 结构颜色主要依赖于  $d$ 。如图 3 (a)、附录 A 中的图 S3 和图 S4 所示, 不同尺寸的二氧化硅纳米颗粒形成了具有不同结构色的 SCCBs。此外, 从 SCCBs 衍生的复合微球和 IHBs 显示出与 SCCBs 相应的颜色[图 3 (b)、(c)]。一般来说, 复合微球与 SCCBs 具有相同的  $d$ , 但  $n_{\text{average}}$  略高, 这导致颜色轻微的红移。相比之下, IHBs 的

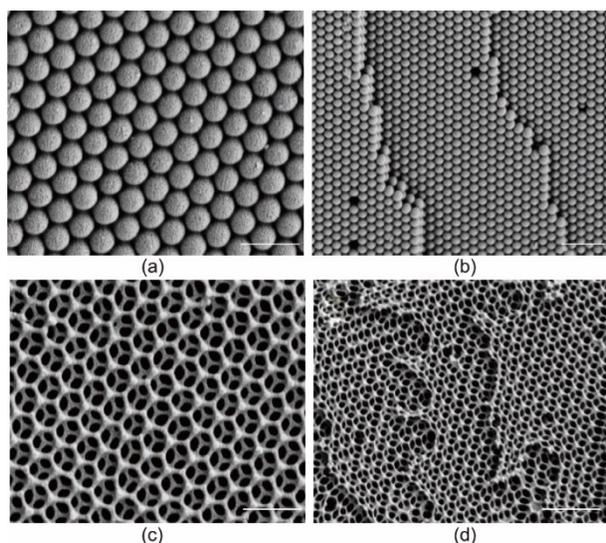


图2. SEM表征。SCCB的表面 (a) 和内部 (b)；反蛋白石结构的表面 (c) 和内部 (d)。(a) 和 (c) 中的比例尺为500 nm, (b) 和 (d) 中的比例尺为1  $\mu\text{m}$ 。

$n_{\text{average}}$  较低, 因此表现出明显的蓝移。

值得注意的是, IIHBs的密度与水接近。因此, 为了实现IIHBs与溶液的快速分离, 我们利用磁性纳米颗粒对IIHBs进行功能化, 以赋予IIHBs磁控运动性能。如图4和附录A中的视频S1所示, 将磁功能化的IIHBs放置在培养皿的一侧, 当从培养皿的另一侧施加磁场时, IIHBs表现出出色的响应性, 并沿磁场方向快速移动。该结果表明, 利用磁场可以快速富集和分离IIHBs, 从而节省收集IIHBs的时间。

当IIHBs孵育于含 $\text{Cu}^{2+}$ 的溶液中时, 它们与 $\text{Cu}^{2+}$ 结合并表现出反射光谱的变化。如图5所示, 在 $\text{Cu}^{2+}$ 溶液中, IIHBs呈现红移, 且红移随 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度的增加而增大。此外, 与NIHBs相比, IIHBs的光谱位移十分明显, 表明这种位移是由印迹位点与 $\text{Cu}^{2+}$ 相互作用引起的。因此, 只需测量IIHBs在溶液中孵育前后的反射光谱, 即可实现对

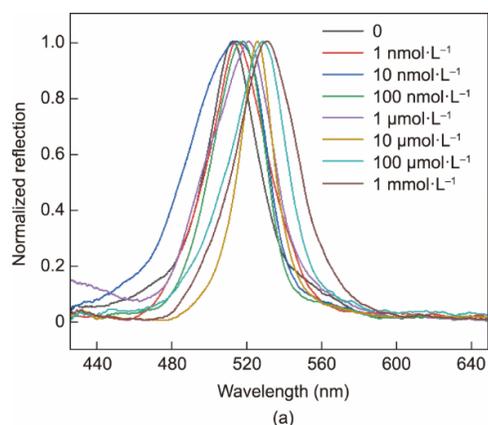


图5. IIHBs的 $\text{Cu}^{2+}$ 检测能力。(a) IIHBs在不同浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 溶液中的反射光谱; (b) IIHBs和NIHBs在不同浓度 $\text{Cu}^{2+}$ 溶液中的光谱偏移值。

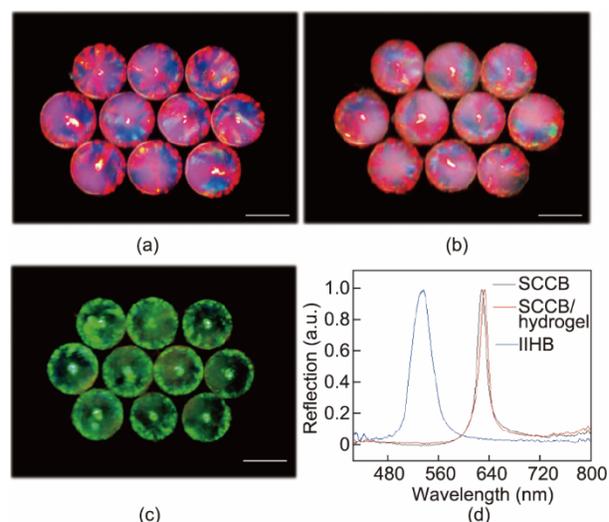


图3. 光学表征。红色SCCB (a)、相应的复合微球 (b) 和IIHBs (c) 的光学图像; (d) (a) ~ (c) 中微球的相应反射波长。(a) ~ (c) 中的比例尺为200  $\mu\text{m}$ 。a.u.: 任意单位。

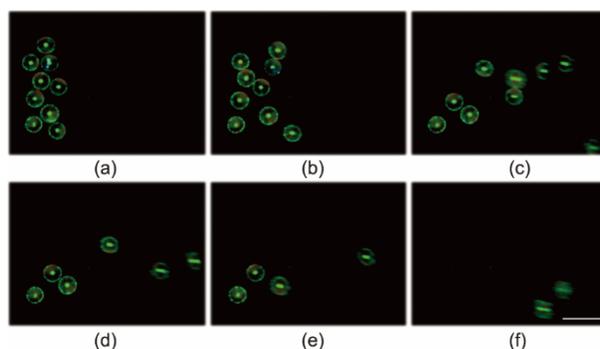
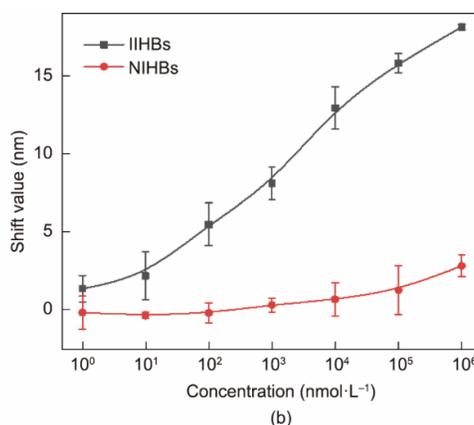


图4. 磁场调节的可动性。(a) IIHBs在初始位置; (b) ~ (f) IIHBs在磁场触发下的运动。比例尺为500  $\mu\text{m}$ 。

$\text{Cu}^{2+}$ 浓度的非标记检测。值得注意的是, 虽然 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度越高, IIHBs的位移值越大, 但NIHBs的位移值也相应增大, 说明发生了更多的非特异性吸附。为了保证检测的准确性, IIHBs应在 $\text{Cu}^{2+}$ 浓度低于1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液中使用。



随后, 我们通过定量分析进一步研究了 IHBs 和 NIHBs 对  $\text{Cu}^{2+}$  的不同结合能力。DDTC·Na 是一种灵敏的铜检测试剂。在 pH 为 9.0~9.2 的氨溶液中, 可与  $\text{Cu}^{2+}$  形成棕黄色配合物, 并在 452 nm 处有明显的吸收峰[附录 A 中的图 S5 (a)], 且其吸收峰强度与  $\text{Cu}^{2+}$  浓度呈线性关系[附录 A 中的图 S5 (b)]。基于此机理, 我们将 IHBs 和 NIHBs 在  $\text{Cu}^{2+}$  溶液 ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 中孵育 3 h, 分析反应后  $\text{Cu}^{2+}$  残留浓度。如图 6 (a) 和附录 A 中的表 S1 所示, IHBs 和 NIHBs 对  $\text{Cu}^{2+}$  表现出了明显的吸附差异, 印迹因子为 19.14, 表明所制备的 IHBs 具有良好的特异性。

此外, 我们还研究了 IHBs 的选择性。为此, 我们用

$100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  不同阳离子溶液处理 IHBs。结果显示, IHBs 在  $\text{Cu}^{2+}$  溶液中显示出较大的位移值 (15.67 nm), 而在其他阳离子溶液中的位移值小于 4 nm。这一结果证实了 IHBs 对  $\text{Cu}^{2+}$  的选择性[图 6 (b)]。

先前的报道表明, 过量的  $\text{Cu}^{2+}$  会产生羟基自由基, 诱导毛细血管凋亡, 从而导致听力损失。因此, 监测饮用水中的  $\text{Cu}^{2+}$  水平以控制  $\text{Cu}^{2+}$  的吸收具有重要意义。在实际应用之前, 我们先研究了  $\text{Cu}^{2+}$  对 HEI-OC1 细胞的影响。如图 7 (a)、(b) 所示, HEI-OC1 细胞在不含  $\text{Cu}^{2+}$  的培养基中正常生长。然而, 当培养基中加入  $\text{Cu}^{2+}$  时, 细胞的生存能力明显降低, 且降低程度与加入  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度密切相关。细胞

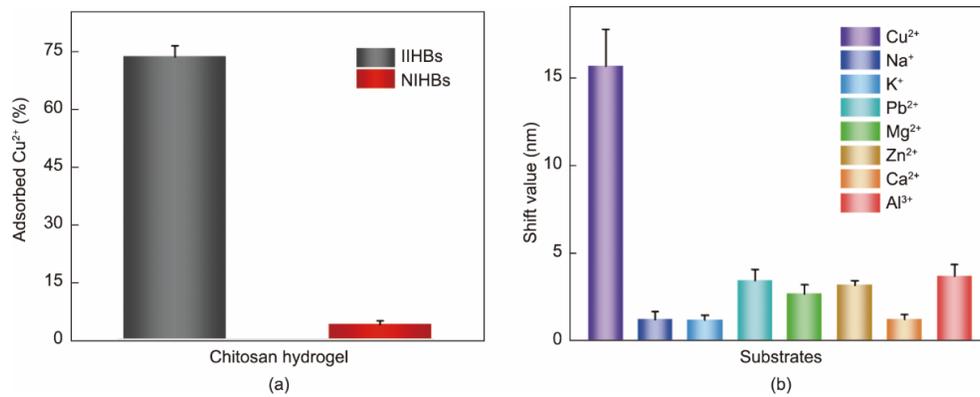


图 6. IHBs 的特异性与选择性。(a) IHBs 和 NIHBs 对  $\text{Cu}^{2+}$  的吸附能力对比; (b) 在不同阳离子溶液中 IHBs 的位移值。各组离子浓度均为  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

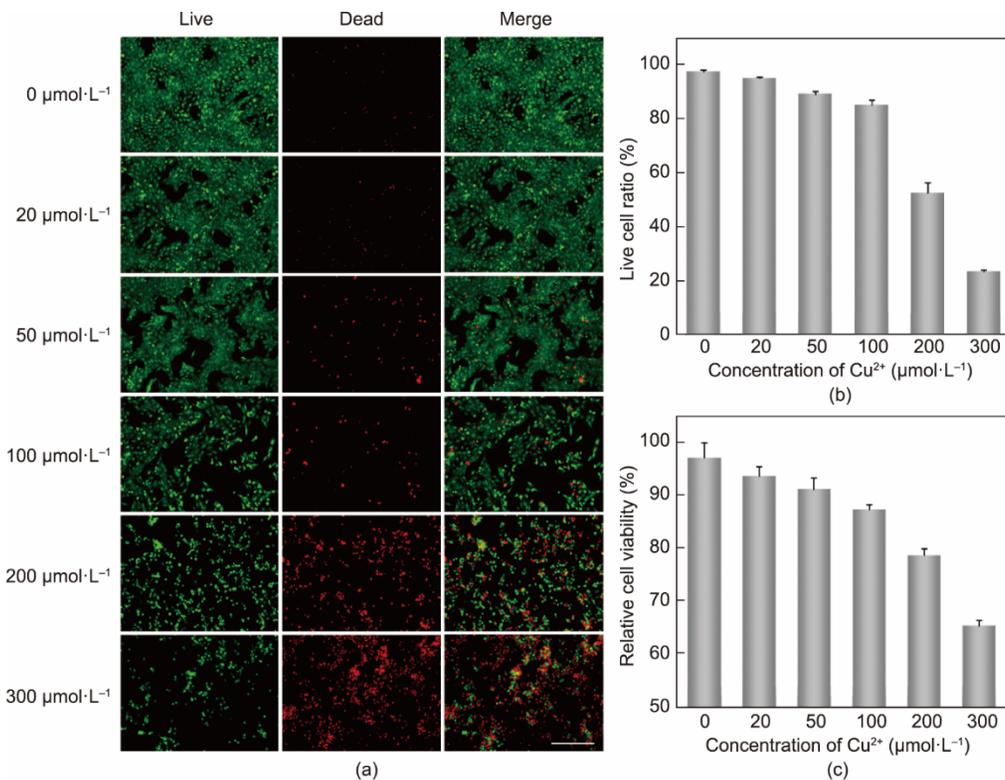


图 7.  $\text{Cu}^{2+}$  对 HEI-OC1 细胞的生物毒性。(a) HEI-OC1 细胞在不同浓度  $\text{Cu}^{2+}$  培养基中培养 6 h 后的活/死染色照片; (b) HEI-OC1 细胞在不同  $\text{Cu}^{2+}$  浓度培养基中培养 6 h 后的细胞存活率 (b) 和细胞活性 (c)。比例尺为  $500 \mu\text{m}$ 。

活力测定结果与活/死染色结果一致[图7(c)]。这些结果说明  $\text{Cu}^{2+}$  对 HEI-OC1 细胞具有明显的毒害作用，因此避免高浓度  $\text{Cu}^{2+}$  的摄入是预防听力损失的必要条件。为了实现这一目标，我们使用开发的 IIHBs 来监测食物和饮用水中的  $\text{Cu}^{2+}$ 。在本研究中，我们用 IIHBs 和标准加样法测定自来水中的  $\text{Cu}^{2+}$ 。如表 1 和附录 A 中的图 S6 所示，溶液中的 IIHBs 的反射光谱随  $\text{Cu}^{2+}$  的增加而变化，并表现出了可接受的回收率，同时说明自来水中  $\text{Cu}^{2+}$  含量很少。这些结果表明，所制备的 IIHBs 在实际样品中的  $\text{Cu}^{2+}$  检测中具有良好的应用前景。

表 1 利用 IIHBs 和标准加样法检测自来水中的  $\text{Cu}^{2+}$

Spiked ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Detected ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Recovery (%)	RSD (%)
1	0.853	85	3.9
5	5.220	104	5.1
10	8.830	88	4.2
50	47.060	94	6.5
100	114.040	114	4.9

## 4. 结论

总而言之，我们开发了一种新型的基于壳聚糖的球形 IIHBs，该微球尺寸均匀，具有磁控运动能力，可用于非标记检测水中的  $\text{Cu}^{2+}$ ，从而预防过量的  $\text{Cu}^{2+}$  摄取及其导致的听力损失。壳聚糖组分可以与  $\text{Cu}^{2+}$  结合形成印迹位点，而 PEGDA 则改善了水凝胶的力学性能。IIHBs 可以特异性结合  $\text{Cu}^{2+}$ ，并表现出反射光谱的红移，其检测范围可覆盖能对 HEI-OC1 细胞造成损伤的浓度。我们还通过标准加样法检测了自来水中  $\text{Cu}^{2+}$  的浓度以评价 IIHBs 的适用性。这些结果表明，我们所提出的 IIHBs 在检测水中  $\text{Cu}^{2+}$  方面具有可行性，有望用于食品和饮用水中  $\text{Cu}^{2+}$  的检测，进而预防听力损失。

## 致谢

本工作由国家重点研发计划(2021YFA1101300, 2021YFA1101800, 2020YFA0112503)、国家自然科学基金(82030029, 81970882, 92149304, 22302231)、四川省科技厅(2021YFS0371)、广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515011986)、深圳市基础研究计划(JCYJ20190814 093401920, JCYJ20210324125608022, JCYJ2019081315261 6459, JCYJ20190808120405672)、福田区卫生健康研究项目(FTWS2022013 and FTWS2023080)、复旦大学基因工程

国家重点实验室开放研究基金(SKLGE-2104)、中山大学中央高校基本科研业务费专项经费(23qnp153)资助。

## Author contributions

Huan Wang and Renjie Chai provided the idea and designed the experiment. Huan Wang carried out experiments and data analysis. Huan Wang and Hui Zhang wrote the manuscript. Xiaoli Zhang, Hong Chen, and Ling Lu contributed to the scientific discussion.

## Compliance with ethics guidelines

Huan Wang, Hui Zhang, Xiaoli Zhang, Hong Chen, Ling Lu, and Renjie Chai declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.09.001>.

## Reference

- [1] Haile LM, Kamenov K, Briant PS, Orji AU, Steinmetz JD, Abdoli A, et al. Hearing loss prevalence and years lived with disability, 1990–2019: findings from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2021;397(10278):996–1009.
- [2] Li CM, Zhang X, Hoffman HJ, Cotch MF, Themann CL, Wilson MR. Hearing impairment associated with depression in US adults, National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2010. *Jama Otolaryngol* 2014; 140(4): 293–302.
- [3] Chadha S, Kamenov K, Cieza A. The world report on hearing, 2021. *Bull WHO* 2021;99(4):242–A.
- [4] Chen H, Zhang H, Dai Y, Zhu H, Hong G, Zhu C, et al. Magnetic hydrogel microrobots delivery system for deafness prevention. *Adv Funct Mater* 2023; 33(35):2303011.
- [5] Monzani D, Galeazzi GM, Genovese E, Marrara A, Martini A. Psychological profile and social behaviour of working adults with mild or moderate hearing loss. *Acta Otorhinolaryngo* 2008;28(2):61–6.
- [6] Abdelrahman EA, Abou El-Reash YG, Youssef HM, Kotp YH, Hegazy RM. Utilization of rice husk and waste aluminum cans for the synthesis of some nanosized zeolite, zeolite/zeolite, and geopolymer/zeolite products for the efficient removal of Co(II), Cu(II), and Zn(II) ions from aqueous media. *J Hazard Mater* 2021;401:123813.
- [7] Fayazi M, Ghanei-Motlagh M, Karami C. Application of magnetic nanoparticles modified with L-cysteine for pre-concentration and voltammetric detection of copper(II). *Microchem J* 2022;181:107652.
- [8] Ye K, Zhang G, Ni B, Guo L, Deng C, Zhuang X, et al. Steering  $\text{CO}_2$  electrolysis selectivity by modulating the local reaction environment: An online DEMS approach for Cu electrodes. *eScience* 2023;3(4):100143.
- [9] Bai S, Qiu H, Song M, He G, Wang F, Liu Y, et al. Porous fixed-bed photoreactor for boosting C-C coupling in photocatalytic  $\text{CO}_2$  reduction.

- eScience 2022;2(4):428–37.
- [10] Xiong F, Jiang Y, Cheng L, Yu R, Tan S, Tang C, et al. Low-strain  $\text{TiP}_2\text{O}_7$  with three-dimensional ion channels as long-life and high-rate anode material for Mg-ion batteries. *Interdiscip Mater* 2022;1(1):140–7.
- [11] Tang S, Lin L, Wang X, Yu A, Sun X. Interfacial interactions between collected nylon microplastics and three divalent metal ions (Cu(II), Ni(II), Zn(II)) in aqueous solutions. *J Hazard Mater* 2021;403:123548.
- [12] Yang W, Li J, Lyu Y, Yan X, Yang P, Zuo M. Bioinspired 3D hierarchical  $\text{BSA-NiCo}_2\text{O}_4@\text{MnO}_2/\text{C}$  multifunctional micromotors for simultaneous spectrophotometric determination of enzyme activity and pollutant removal. *J Cleaner Prod* 2021;309:127294.
- [13] Xiao T, Wang Y, Hao Y, Cai Z, Song M, He J, et al. Resonance Rayleigh scattering method for highly sensitive detection of copper ions in water based on salicylaldehyde-copper (II)-2-methylimidazole supramolecular. *Microchem J* 2022;181:107744.
- [14] Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1995;50(1):123–6.
- [15] Yu H, Lin Q, Wang Y, He Y, Fu S, Jiang H, et al. Inhibition of H3K9 methyltransferases G9a/GLP prevents ototoxicity and ongoing hair cell death. *Cell Death Dis* 2013;4(2):e506.
- [16] Monroe JD, Rajadinakaran G, Smith ME. Sensory hair cell death and regeneration in fishes. *Front Cell Neurosci* 2015;9:131.
- [17] Olivari FA, Hernandez PP, Allende ML. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 2008;1244:1–12.
- [18] Hernandez PP, Moreno V, Olivari FA, Allende ML. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res* 2006;213(1–2):1–10.
- [19] Wu X, Meng X, Hou B, Sun Z, Zhang Y, Li M. Rapid fluorescent color analysis of copper ions on a smart phone via ratiometric fluorescence sensor. *Microchim Acta* 2022;189(2):67.
- [20] Okamoto Y, Kishikawa N, Hagimori M, El-Maghrabey M, Kawakami S, Kuroda N. A turn-on hydrazide oxidative decomposition-based fluorescence probe for highly selective detection of  $\text{Cu}^{2+}$  in tap water as well as cell imaging. *Anal Chim Acta* 2022;1217:340024.
- [21] Ho VTTX, Park H, An S, Kim G, Ly NH, Lee SY, et al. Coumarin–lipoic acid conjugates on silver nanoparticle-supported nanopipettes for in situ dual-mode monitoring of intracellular Cu(II) and potential chemodynamic therapy applications. *Sens Actuators B* 2021;344:130271.
- [22] Lutfullah S, Sharma S, Rahman N, Azmi SNH, Iqbal B, Amburk MIBB, et al. UV spectrophotometric determination of Cu(II) in synthetic mixture and water samples. *J Chin Chem Soc* 2010;57(4A):622–31.
- [23] Manousi N, Kabir A, Furton KG, Anthemidis AN. Dual lab-in-syringe flow-batch platform for automatic fabric disk sorptive extraction/back-extraction as a front end to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal Chem* 2022;94(38):12943–7.
- [24] Larner F, Rehkämper M, Coles BJ, Kreissig K, Weiss DJ, Sampson B, et al. A new separation procedure for Cu prior to stable isotope analysis by MC-ICP-MS. *J Anal At Spectrom* 2011;26(8):1627–32.
- [25] González-Álvarez RJ, Bellido-Milla D, Pinto JJ, Moreno C. A handling-free methodology for rapid determination of Cu species in seawater based on direct solid micro-samplers analysis by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 2020;206:120249.
- [26] El Badry MM, Frag EY, El Brawy MH. Rapid potentiometric sensor for determination of Cu(II) ions in food samples. *Microchem J* 2021;164:106065.
- [27] Liu T, Zhou M, Pu Y, Liu L, Li F, Li M, et al. Silver nanoparticle-functionalized 3D flower-like copper (II)-porphyrin framework nanocomposites as signal enhancers for fabricating a sensitive glutathione electrochemical sensor. *Sens Actuators B* 2021;342:130047.
- [28] Wang H, Zhang H, Xie Z, Chen K, Ma M, Huang Y, et al. Injectable hydrogels for spinal cord injury repair. *Eng Regener* 2022;3(4):407–19.
- [29] Ma Y, Chen Q, Li W, Su H, Li S, Zhu Y, et al. Spinal cord conduits for spinal cord injury regeneration. *Eng Regener* 2023;4(1):68–80.
- [30] Qiu L, Kong B, Kong T, Wang H. Recent advances in liver-on-chips: design, fabrication, and applications. *Smart Med* 2023;2(1):20220010.
- [31] Zhang H, Xu D, Zhang Y, Li M, Chai R. Silk fibroin hydrogels for biomedical applications. *Smart Med* 2022;1(1):e20220011.
- [32] Liu S, Yu JM, Gan YC, Qiu XZ, Gao ZC, Wang H, et al. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. *Mil Med Res* 2023;10(1):16.
- [33] Wang J, Huang D, Yu H, Cheng Y, Ren H, Zhao Y. Developing tissue engineering strategies for liver regeneration. *Eng Regener* 2022;3(1):80–91.
- [34] Furtado M, Chen L, Chen Z, Chen A, Cui W. Development of fish collagen in tissue regeneration and drug delivery. *Eng Regener* 2022;3(3):217–31.
- [35] Li D, Yue G, Li S, Liu J, Li H, Gao Y, et al. Fabrication and applications of multi-fluidic electrospinning multi-structure hollow and core-shell nanofibers. *Engineering* 2022;13:116–27.
- [36] Zhou L, Guo P, D'Este M, Tong W, Xu J, Yao H, et al. Functionalized hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Engineering* 2022;13:71–90.
- [37] Peighambaroudi SJ, Aghamohammadi-Bavil O, Foroutan R, Arsalani N. Removal of malachite green using carboxymethyl cellulose-g-polyacrylamide/montmorillonite nanocomposite hydrogel. *Int J Biol Macromol* 2020;159:1122–31.
- [38] Hajri AK, Jamoussi B, Albalawi AE, Alhawiti OHN, Alsharif AA. Designing of modified ion-imprinted chitosan particles for selective removal of mercury (II) ions. *Carbohydr Polym* 2022;286:119207.
- [39] Upadhyay U, Sreedhar I, Singh SA, Patel CM, Anitha KL. Recent advances in heavy metal removal by chitosan based adsorbents. *Carbohydr Polym* 2021;251:117000.
- [40] Guo Z, Zhao M, Liu Z. Molecularly imprinted and cladded nanoparticles for high-affinity recognition of structurally closed gangliosides. *Microchim Acta* 2022;189(8):289.
- [41] Pang J, Li P, He H, Xu S, Liu Z. Molecularly imprinted polymers outperform lectin counterparts and enable more precise cancer diagnosis. *Chem Sci* 2022;13(16):4589–97.
- [42] Xing R, Guo Z, Lu H, Zhang Q, Liu Z. Molecular imprinting and cladding produces antibody mimics with significantly improved affinity and specificity. *Sci Bull* 2022;67(3):278–87.
- [43] Alizadeh T, Mousavi Z. Molecularly imprinted polymer specific to creatinine complex with copper(II) ions for voltammetric determination of creatinine. *Microchim Acta* 2022;189(10):393.
- [44] Wang X, Chu Z, Huang Y, Chen G, Zhao X, Zhu Z, et al. Copper ion imprinted hydrogel photonic crystal sensor film. *ACS Appl Polym Mater* 2022;4(6):4568–75.
- [45] Wang H, Liu Y, Chen Z, Sun L, Zhao Y. Anisotropic structural color particles from colloidal phase separation. *Sci Adv* 2020;6(2):eaay1438.
- [46] Wei X, Bian F, Zhang H, Wang H, Zhu Y. Multiplex assays of bladder cancer protein markers with magnetic structural color hydrogel microcarriers based on microfluidics. *Sens Actuators B* 2021;346:130464.
- [47] Zhang H, Zhang Z, Zhang H, Chen C, Zhang D, Zhao Y. Protein-based hybrid responsive microparticles for wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021;13(16):18413–22.
- [48] Zhang H, Guo J, Wang Y, Sun L, Zhao Y. Stretchable and conductive composite structural color hydrogel films as bionic electronic skins. *Adv Sci* 2021;8(20):2102156.
- [49] Zhang H, Liu Y, Chen G, Wang H, Chen C, Li M, et al. Immunotherapeutic silk inverse opal particles for post-surgical tumor treatment. *Sci Bull* 2020;65(5):380–8.
- [50] Wang H, Zhao Z, Liu YX, Shao CM, Bian FK, Zhao YJ. Biomimetic enzyme cascade reaction system in microfluidic electro-spray microcapsules. *Sci Adv* 2018;4(6):eaat2816.
- [51] Zhang Z, Chen Z, Wang Y, Chi J, Wang Y, Zhao Y. Bioinspired bilayer structural color hydrogel actuator with multi-environment responsiveness and survivability. *Small Methods* 2019;3(12):1900519.
- [52] Sun L, Chen Z, Bian F, Zhao Y. Bioinspired soft robotic caterpillar with cardiomyocyte drivers. *Adv Funct Mater* 2020;30(6):1907820.
- [53] Zhang H, Wang H, Wen B, Lu L, Zhao Y, Chai R. Ultrasound-responsive composited conductive silk conduits for peripheral nerve regeneration. *Forthcoming* 2023.
- [54] Zhang H, Guo J, Wang Y, Shang L, Chai R, Zhao Y. Natural polymer-derived bioscaffolds for peripheral nerve regeneration. *Adv Funct Mater* 2022;32(41):2203829.
- [55] Wang H, Gu H, Chen Z, Shang L, Zhao Z, Gu Z, et al. Enzymatic inverse opal hydrogel particles for biocatalyst. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9(15):12914–8.
- [56] Wang H, Cai L, Zhang D, Shang L, Zhao Y. Responsive janus structural color hydrogel micromotors for label-free multiplex assays. *Research* 2021;2021:9829068.

- [57] Wang H, Zhang H, Zhang D, Wang J, Tan H, Kong T. Enzyme-functionalized structural color hydrogel particles for urea detection and elimination. *J Cleaner Prod* 2021;315:128149.
- [58] Wang H, Wang J, Wang Y, Liu Y, Liu R, Wang X, et al. Oriented boronate affinity-imprinted inverse opal hydrogel for glycoprotein assay via colorimetry. *Microchim Acta* 2020;187(6):348.
- [59] Hu Y, Zhang H, Wei H, Liao M, Chen X, Xing J, et al. Conductive PS inverse opals for regulating proliferation and differentiation of neural stem cells. *Eng Regener* 2023;4(2):214–21.
- [60] Zhang H, Zhang H, Wang H, Zhao Y, Chai R. Natural proteins-derived asymmetric porous conduit for peripheral nerve regeneration. *Appl Mater Today* 2022;27:101431.
- [61] Fu F, Chen Z, Wang H, Liu C, Liu Y, Zhao Y. Graphene hybrid colloidal crystal arrays with photo-controllable structural colors. *Nanoscale* 2019; 11(22): 10846–51.
- [62] Shang L, Cheng Y, Zhao Y. Emerging droplet microfluidics. *Chem Rev* 2017; 117(12):7964–8040.
- [63] Shang L, Ye F, Li M, Zhao Y. Spatial confinement toward creating artificial living systems. *Chem Soc Rev* 2022;51(10):4075–93.
- [64] Wang J, Huang D, Ren H, Shang L. Biomimic trained immunity-MSCs delivery microcarriers for acute liver failure regeneration. *Small* 2022; 18(36): 2200858.
- [65] Zhang H, Liu Y, Chen C, Cui W, Zhang C, Ye F, et al. Responsive drug-delivery microcarriers based on the silk fibroin inverse opal scaffolds for controllable drug release. *Appl Mater Today* 2020;19:100540.
- [66] Hao Y, Hu F, Chen Y, Wang Y, Xue J, Yang S, et al. Recent progress of electrospun nanofibers for zinc – air batteries. *Adv Fiber Mater* 2021; 4(2): 185–202.
- [67] Hu J, Zhao XW, Zhao YJ, Li J, Xu WY, Wen ZY, et al. Photonic crystal hydrogel beads used for multiplex biomolecular detection. *J Mater Chem* 2009; 19:5730–6.
- [68] Zhao Y, Zhao X, Pei X, Hu J, Zhao W, Chen B, et al. Multiplex detection of tumor markers with photonic suspension array. *Anal Chim Acta* 2009;633(1): 103–8.
- [69] Luo Z, Che J, Sun L, Yang L, Zu Y, Wang H, et al. Microfluidic electro spray photo-crosslinkable  $\kappa$ -Carrageenan microparticles for wound healing. *Eng Regener* 2021;2:257–62.
- [70] Wang H, Zhang H, Chen Z, Zhao Y, Gu Z, Shang L. Polymer-based responsive structural color materials. *Prog Mater Sci* 2023;135:101091.
- [71] Zhu Y, Kong B, Liu R, Zhao Y. Developing biomedical engineering technologies for reproductive medicine. *Smart Med* 2022;1(1):e20220006.
- [72] Gao Y, Ma Q. Bacterial infection microenvironment - responsive porous microspheres by microfluidics for promoting anti-infective therapy. *Smart Med* 2022;1(1):e20220012.
- [73] Monier M, Bukhari AAH, Elsayed NH. Designing and characterization of copper (II) ion-imprinted adsorbent based on isatin functionalized chitosan. *Int J Biol Macromol* 2020;155:795–804.
- [74] Shao C, Yu Y, Fan Q, Wang X, Ye F. Polyurethane-poly pyrrole hybrid structural color films for dual-signal mechanics sensing. *Smart Med* 2022; 1(1): e20220008.