

·研究简报·

基于聚多巴胺辅助自组装单分子层技术的 PTFE 表面修饰 及其内皮细胞选择性黏附研究*

肖琳琳 魏雨 计剑**

(浙江大学高分子科学与工程学系 教育部高分子合成与功能构造重点实验室 杭州 310027)

摘 要 利用聚多巴胺技术对 PTFE 进行表面改性, X 射线光电子能谱(XPS)、椭圆偏振、接触角以及石英晶体微天平(QCM-D)证实 DOPA 分子可以在 PTFE 表面自聚形成反应性的超薄膜功能涂层, 并通过聚多巴胺辅助自组装单分子层(SAM)技术构建了活性多肽链段 CGREDVDY 的界面. 细胞黏附实验反映活性链段 CGREDVDY 的修饰表面具备良好的内皮细胞选择性黏附能力. 这种具有内皮细胞选择性黏附能力的界面有望实现材料在复杂生理环境中对内皮细胞的原位诱导, 为制备具有血管内皮原位快速愈合功能的新型血液相容性人造血管提供新途径.

关键词 PTFE, 聚多巴胺, 自组装单分子层, CGREDVDY, 选择性

聚四氟乙烯(PTFE)由于其良好的物理化学性能,是目前人工血管替代物中的主要材料之一. 然而,传统的 PTFE 材料的抗凝血特性并不能满足小口径人工血管应用需求. 探索通过界面固定生物活性分子,原位诱导内皮细胞的黏附和生长,进一步提高 PTFE 材料的血液相容性,是 PTFE 人工血管材料研究的重要方向^[1~7]. 在该研究中,PTFE 特有的化学惰性成为其界面设计的难点问题^[8],寻求简单有效的界面设计和修饰手段,成为 PTFE 人工血管材料研究的关键问题之一.

与此同时,仿生学的研究显示,存在于贻贝等海洋生物足丝中的贻贝粘连蛋白含有大量的多巴胺(3,4-dihydroxyphenethylamine, DOPA),是贻贝在多种不同基材上牢固黏附的关键组成^[9]. 它具有高强度、高韧性和防水性的特点,有广泛的应用前景. 仿贻贝粘连蛋白的 DOPA 技术能在包括 PTFE 在内的多种材料表面自聚成膜^[10~12],在提高表面亲水性和生物相容性的同时,引入活性基团儿茶酚,从而进一步实现含巯基或氨基的功能性物质的单分子层修饰,这种基于多巴胺仿生粘连的界面功能修饰技术被称为聚多巴胺辅助的自组装单分子层(polydopamine-assisted self-assembled monolayer)修饰技术^[11]. 本研究以此为

启示,探索通过聚多巴胺辅助的自组装单分子层修饰技术在 PTFE 表面固定具有内皮细胞选择性黏附的 REDV 活性多肽^[13,14],构建具有内皮细胞选择性的功能界面,为制备具有内皮细胞原位诱导功能的新型心血管植入材料寻求切实可行的途径.

1 试剂与原料

多巴胺(DOPA)购自上海元吉化工有限公司;活性多肽(序列 CGREDVDY, Cys-Gly-Arg-Glu-Asp-Val-Asp-Tyr)和参比多肽(序列 CGREVDY, Cys-Gly-Arg-Glu-Val-Asp-Asp-Tyr)由上海科肽生物技术有限公司合成;内皮细胞 HUVECs 由浙二医院友情提供;平滑肌细胞 HASMCs 购自北京北方伟业发展有限公司上海办事处.

2 多巴胺在材料表面的自聚合及自组装单分子层构建

将 PTFE 膜片或硅片(用于椭圆偏检测)置于清洗液(water/25% ammonia/30% H₂O₂ = 5/1/1)中于 70℃ 处理 10 min,取出后用三蒸水清洗 3 次, N₂ 吹干,而后竖直泡入多巴胺(2 mg/mL)的 10 mmol/L tris-HCl (pH 8.5)溶液中 24 h,取出用 10 mmol/L tris-HCl (pH 8.5)溶液清洗 3 次, N₂

* 2009-09-07 收稿, 2009-11-23 修稿;国家自然科学基金(基金号 50830106)、浙江省自然科学基金(基金号 Y4080250)、教育部博士点基金(基金号 20070335024)和超分子结构与材料国家重点实验室(吉林大学)开放基金(基金号 SKLSSM200911)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: jijian@zju.edu.cn

吹干. 进行 SAM 组装的二次修饰, 将经聚多巴胺预修饰的样品再泡入 1 mmol/L 的 CGREDVDY 或 CGREVDDY 的 10 mmol/L tris-HCl (pH 8.5) 溶液中 24 h, 取出后, 用 10 mmol/L tris-HCl (pH 8.5) 溶液清洗 3 次, N_2 吹干.

3 材料的表征及细胞实验

多巴胺在材料表面的自聚合及随后的 SAM 组装过程如图 1 所示. 其中交联原理为 DOPA 的酚式结构被氧化成醌式结构, 然后或者通过醌式结构和酚式结构反歧化反应而实现交联^[12], 或者通过醌式结构与 DOPA 上的伯胺基团发生 Michael 加成反应而实现交联^[9]. 之后的 SAM 组装原理是 DOPA 的醌式结构和 CGREDVDY 末端的巯基发生 Michael 加成反应. 为证实这种过程, 采用 XPS (Kratos Axis Ultra DLD) 检测材料表面元素及官能团变化, 检验 PTFE 表面形成的聚多巴胺; 椭偏 (model VASE; J. A. Woollam Inc., Lincoln, NE) 观察聚多巴胺厚度与反应时间的关系以及随后的自组装单分子层厚度; 石英晶体微天平 (model Q-SENSE E4) 检测多肽分子在 DOPA 预修饰表面的单分子层组装密度; 接触角 (Krüss,

Germany) 观察经过 DOPA 以及 SAM 技术处理后表面亲水性的变化.

为检验活性多肽在表面组装后对细胞黏附行为的影响, 在 PTFE, PTFE-DOPA, PTFE-DOPA-REDV 及 PTFE-DOPA-REVD 表面分别种植入脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 和人大动脉平滑肌细胞 (HASMCs), 这两种细胞均培养于 37℃, 5% CO_2 的培养箱中. 二者使用的培养基为含有双抗和 10% 胎牛血清的 1640 培养基. 当细胞在培养盘底部铺满时, 用含 0.25% EDTA 的胰酶消化, 离心, 重新在培养基中分散. 调节细胞在样品膜片上的种植密度约为 13000 cells/cm², 在相同条件下培养 4 h, 再用浓度为 0.05 mg/mL CMFDA 染色 20 min, PBS 缓冲液漂洗, 荧光显微镜 (Zeiss Axiovert 200 microscopy) 观察, 选择在激发波长和接收波长分别为 (480 ± 30) nm 和 (535 ± 40) nm 的模式下拍照 (每种样品设置 3 个平行样本, 每个样本上取 5 张照片, 同种实验重复 3 次), 进行细胞计数, 统计不同表面的细胞黏附情况, 同时利用 origin 软件中的 *t* 检验来比较不同样品对细胞黏附的显著性差异.

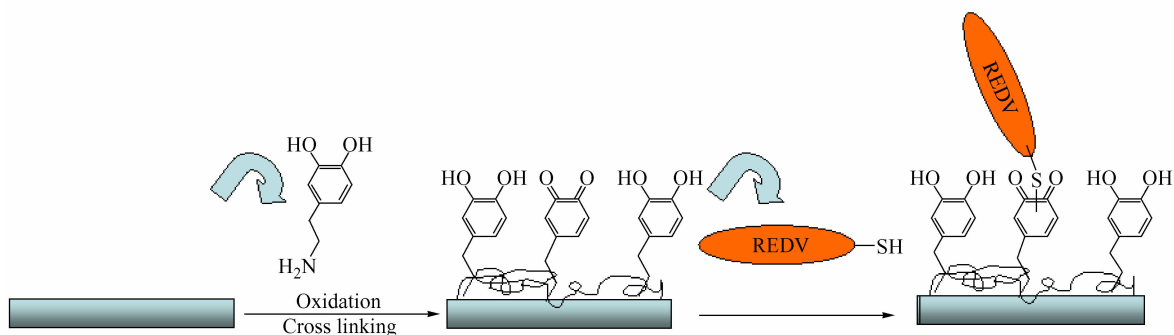


Fig. 1 The scheme of self-crossing of DOPA onto the PTFE surface and the subsequent REDV attachment to polydopamine

4 多巴胺自聚过程的表征

经 DOPA 自聚修饰后, 材料表面接触角从修饰前的 118° 降到 68° 左右, 表面亲水性明显提高. 修饰后样品的 XPS 谱图 (图 2a) 显示, 除 PTFE 中含有的 C 和 F 两种元素峰外, 还出现了 O、N 元素峰; 在 C1s 的高分辨窄谱图 (图 2b) 中, 出现 284.6, 286.2 和 292.0 eV 3 个峰, 分别对应 C—H/C—C, C—O 和 C—F 键, 表明修饰表面存在可能由多巴胺自聚形成的有机薄膜涂层. DOPA 分子在碱性环境中可在 PTFE 膜界面沉积, 椭偏结果显示, DOPA 自聚膜厚度随成膜时间增长并最终趋于饱和, 在 35 h 左右基本饱和和最后形成 12

nm 厚的超薄膜.

5 CGREDVDY 活性多肽的自组装单分子层修饰

依据 Messersmith 报道的巯基分子在多巴胺自聚界面自组装形成单分子功能涂层的原理^[9,11], 我们采用单端含巯基的 CGREDVDY 活性多肽, 探索采用自组装单分子层修饰构建生物活性界面. 研究结果显示, CGREDVDY 活性多肽修饰后, 材料表面亲水性进一步提高, 对水的接触角降为 (35 ± 1)°. 椭偏检测结果显示表面形成了厚度为 (1.185 ± 0.061) nm (接近 CGREDVDY 以 α -螺旋形成的分子长度 1.2 nm) 的单分子功能修饰涂层. 利用 QCM-D 检测聚多巴胺表面

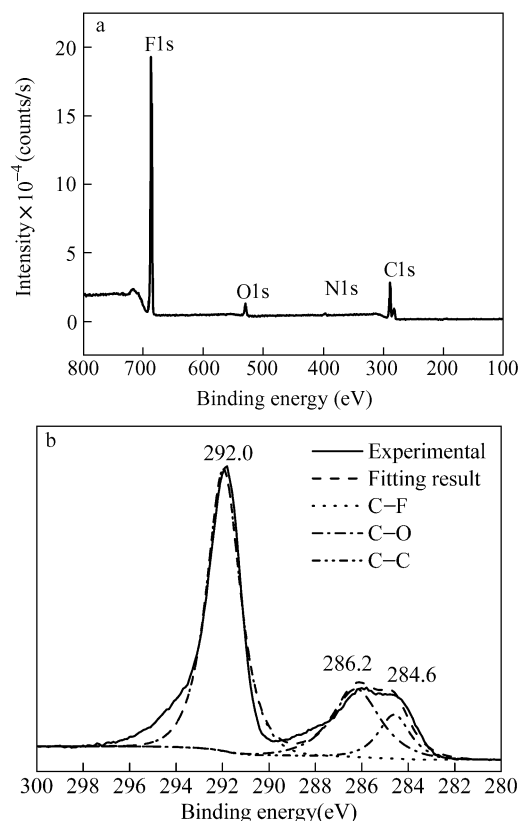


Fig. 2 XPS spectra of PTFE-DOPA (a) and high-resolution XPS scans of the C1s region of PTFE-DOPA (b)

CGREDVDY 单分子层自组装过程(图 3), 通入组装溶液后, 芯片表面质量快速增加, 经过 24 h 后趋于平缓, 此时通入 tris-HCl 缓冲液, 洗去物理吸附的 CGREDVDY, 表面质量明显减少, 最后趋于平衡. 利用 Sauerbrey 模型^[15]拟合, 结果显示 CGREDVDY 在 DOPA 预修饰表面的组装密度约为 $25 \text{ ng}/\text{cm}^2$.

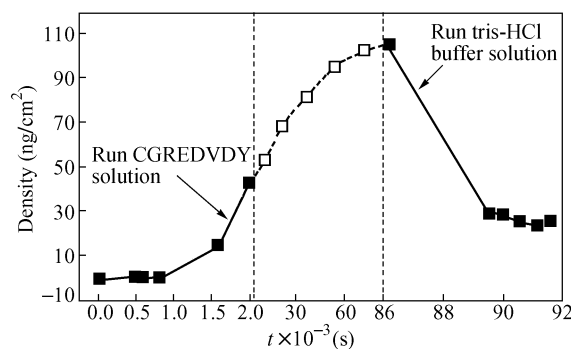


Fig. 3 QCM-D detection of self-assembly on DOPA pretreated surface

6 细胞黏附实验

对上述功能界面进行细胞培养后发现, 无论是荧光照片的定性结果(图 4)还是细胞个数统计的定量结果(图 5)都显示, 经过 DOPA 技术处理后的 PTFE 对细胞的亲和性提高, 但对内皮细胞和平滑肌细胞没有表现出明显差异. 而在 DOPA 预修饰的 PTFE 表面再进行 CGREDVDY 自组装单分子层修饰后, 相对于 PTFE-DOPA 表面, 材料表面对内皮细胞的黏附量显著提高($p < 0.05$), 对平滑肌细胞的黏附却没有明显变化, 表现出一定的选择性; 作为参照组, 改变氨基酸序列的多肽(CGREDVDY)单分子层自组装界面则没有对两种细胞的黏附呈现明显的差异, 表明 CGREDVDY 单分子层自组装活性界面的内皮细胞选择性主体来源于特定氨基酸序列的 CGREDVDY 多肽和细胞的特异性作用. 通过活性多肽 CGREDVDY 在 PTFE-DOPA 活性界面自组装修饰后, 可在有效提

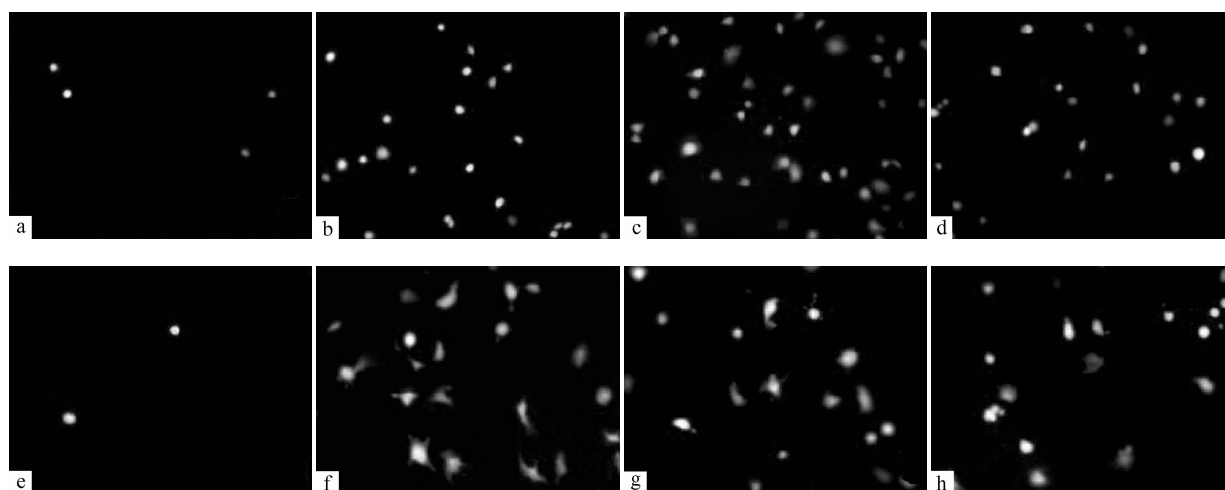


Fig. 4 Fluorescent images of HUVECs (a~d) and HASMCs (e~h) on PTFE (a, e), PTFE-DOPA (b, f), @-REDV (c, g) and @-REVD (d, h) after incubation for 4 h in medium containing 10% FBS

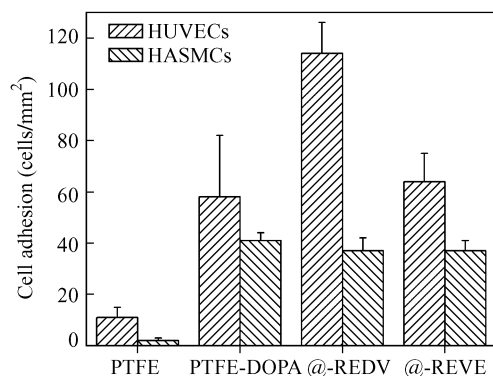


Fig. 5 Adhesion number of HUVECs and HASMCs attached to surfaces after incubation for 4 h in medium containing 10% FBS

高内皮细胞黏附的同时,获得具有内皮细胞选择

性的功能界面.

7 结论

通过 DOPA 界面自聚可建立一种简单有效的针对惰性材料 PTFE 的表面改性方式,可在提高表面亲水性的同时,构建反应性的功能表面,并实现含巯基分子的自组装单分子层修饰. 在 PTFE-DOPA 表面引入特异性诱导分子 CGREDVDY 的自组装单分子层,能够在惰性材料表面实现对内皮细胞特异性诱导黏附的作用,为构建内皮细胞高选择性的功能界面提供了实验依据. 这种具有内皮细胞高选择性的界面有望实现材料在复杂生理环境中对内皮细胞的原位诱导,为制备具有血管内皮原位快速愈合功能的新型人造血管提供新途径.

REFERENCES

- 1 Ratner B D, Hoffman A S, Schoen F J, Lemons J E. *Biomaterials Science, an Introduction to Materials in Medicine*, 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2004. 470 ~ 494
- 2 Fields G B, Lauer J L, Dori Y, Forns P, Yu Y C, Tirrell M. *Biopolymers (Peptide Science)*, 1998, 47: 143 ~ 151
- 3 Merzkirch C, Davies N, Zilla P. *Anat Rec*, 2001, 263: 379 ~ 387
- 4 Meinhart J, Deutsch M, Zilla P. *Am Soc Artif Intern Org J*, 1997, 43: M515 ~ 521
- 5 Meinhart J G, Deutsch M, Fischlein T, Howanietz N, Froschl A, Zilla P. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71: S327 ~ 331
- 6 Meng S, Liu Z J, Shen L, Guo Z, Chou L L, Zhong W, Du Q G, Ge J B. *Biomaterials*, 2009, 30: 2276 ~ 2283
- 7 Deutsch M, Meinhart J, Fischlein T, Preiss P, Zilla P. *Surgery*, 1999, 126: 847 ~ 855
- 8 Reichert J, Brückner S, Bartelt H, Jadt K D. *Adv Eng Mater*, 2007, 9(12): 1104 ~ 1113
- 9 Lee H, Dellatore S M, Miller W M, Messersmith P B. *Science*, 2007, 318: 426 ~ 430
- 10 Waite J H. *J Biol Chem*, 1983, 258(5): 2911 ~ 2915
- 11 Lee H, Lee B P, Messersmith P B. *Nature*, 2007, 448: 338 ~ 342
- 12 Zhu Liping(朱利平), Xu Youyi(徐又一), Xi Zhenyu(奚振宇), Zhu Baoku(朱宝库). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (4): 394 ~ 397
- 13 Heilshorn S C, DiZio K A, Welsh E R, Tirrell D A. *Biomaterials*, 2003, 24: 4245 ~ 4252
- 14 Plouffe B D, Njoka D N, Harris J, Liao J H, Horick N K, Radisic M, Murthy S K. *Langmuir*, 2007, 23: 5050 ~ 5055
- 15 Rodahl M, Höök F, Fredriksson C, Keller C A, Krozer A, Brzezinski P, Voinova M, Kasemo B. *Faraday Discuss*, 1997, 107: 229 ~ 246

SURFACE TAILORING OF PTFE FOR ENDOTHELEAL CELLS SELECTIVITY BASED ON POLYDOPAMINE-ASSISTED SELF-ASSEMBLY MONOLAYER TECHNIQUE

XIAO Linlin, WEI Yu, JI Jian

(*Department of Polymer Science and Engineering, Key Laboratory of Macromolecule Synthesis and Functionalization,
Ministry of Education, Zhejiang University, Hangzhou 310027*)

Abstract An endothelial preferential PTFE was developed *via* polydopamine-assisted self-assembly monolayer (SAM) technique. XPS, ellipsometer, QCM-D and contact angle data confirmed the self-polymerization process of DOPA and subsequently self-assembly monolayer formation of CGREDVDY. In cell adhesion experiments, both endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs) exhibited improved attachment on DOPA modified PTFE surfaces, but the surfaces did not have noticeable preference between the two cell types. However, after further SAM formation, those surfaces containing bioactive peptides CGREDVDY showed significant selection toward ECs. ECs preferential surface based on such approaches might open another window towards in situ endothelialization in those complex physiological environments in vivo.

Keywords PTFE, DOPA, SAM, CGREDVDY, Selectivity