

· 快报 ·

仿细胞外层膜结构修饰交联壳聚糖的研究*

官 铭^{1**} 石玉静¹ 吴伯华¹ 熊善新¹ 官永宽²

(¹ 西安科技大学化学与化工学院 西安 710054)

(² 西北大学 合成与天然功能分子化学教育部重点实验室 化学与材料科学学院 西安 710069)

摘 要 采用溶液自由基聚合,合成甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)-甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅(TSMA)二元共聚物(PMT82),将其涂覆在戊二醛交联壳聚糖(CS-GA)表面,通过三乙胺蒸汽催化处理获得具有仿细胞外层膜结构(CS-GA-PMT82b)的表面.用动态接触角(DCA)、X-射线光电子能谱(XPS)对改性后交联壳聚糖表面的亲疏水性、元素组成等进行表征,并通过血小板黏附实验对其抗凝血性进行评价.研究结果表明,这种利用涂覆催化交联的方式将含有三甲氧基硅可交联基团的磷酸胆碱聚合物交联固定在壳聚糖表面,获得了较为稳定的仿细胞外层膜结构的CS-GA-PMT82b涂层表面.与壳聚糖相比,改性后壳聚糖的血小板黏附显著减少,抗凝血性能显著提高.这种改善材料的方式有望成为生物医用材料表面改性领域的有效的新手段.

关键词 壳聚糖,仿细胞外层膜结构,磷酸胆碱,抗凝血性

壳聚糖因其良好的组织相容性、生物功能性等特点,在生物医用材料领域具有巨大的发展潜力和广阔的应用前景.然而,壳聚糖的聚阳离子特性易引发凝血,形成血栓^[1~3],限制其作为血液净化材料、血管支架材料等与血液接触的材料的的应用.磷酸胆碱基团(phosphorylcholine, PC)是带有正、负异种电荷的两性离子,是细胞膜基本单元卵磷脂的亲水端基,是细胞外层膜中外层官能团.近年来的研究表明^[4~7],用接枝含磷酸胆碱基团小分子的方法改性壳聚糖,可显著改善血液相容性.然而,这种方法较难获得较高含量的磷酸胆碱基团表面,以致限制血液相容性的进一步提高^[8~10].用磷酸胆碱聚合物构建仿生涂层的方法易获得较高含量的磷酸胆碱基团表面^[11~13].然而,磷酸胆碱聚合物涂层在复杂的生理环境中可能会发生溶解、降解,甚至脱落,以致其稳定性较差血液相容性不佳.含有三甲氧基硅可交联基团磷酸胆碱聚合物涂层稳定性的研究结果表明,涂层中的三甲氧基硅基团会水解、交联,或键合基材表面的活性基团,从而使涂层的稳定性显著提高^[14~16].

本文设计合成甲基丙烯酰氧乙基磷酸胆碱(MPC)-甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅(TSMA)二元共聚物(PMT82)^[17],将其涂覆在戊二醛交联壳聚糖(CS-GA)表面,通过三乙胺蒸汽催化处理使涂层聚合物分子链上的三甲氧基硅基团水解并交联形成Si—O—Si键,同时使其与交联壳聚糖表面的氨基或羟基形成共价键,获得稳定的具有仿细胞外层膜结构(CS-GA-PMT82b)的涂层表面.用动态接触角(DCA)、X-射线光电子能谱(XPS)对改性后交联壳聚糖表面的亲疏水性、元素组成等进行表征,并通过血小板黏附实验对其抗凝血性能进行评价.

1 试剂与仪器

2-甲基丙烯酰氧基乙基磷酸胆碱(MPC)参照文献[18]方法合成.甲基丙烯酰氧乙基三甲氧基硅(TSMA),Alfa试剂,分析纯.壳聚糖(CS),Wolsen,日本进口分装,脱乙酰度>90%,分子量为 3.3×10^5 .偶氮二异丁腈(AIBN),分析纯.冰醋酸(HAc),分析纯.戊二醛25%溶液(GA),分析纯.三乙胺(TEA),分析纯.玻璃片,18 mm × 18 mm × 0.16 mm,先用95%乙醇洗涤2次,每次8~

* 2013-05-08 收稿,2013-06-03 修稿;国家自然科学基金(基金号 20974087)和西安科技大学博士启动金(基金号 2013QDJ013)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: gongmpc@163.com

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.13153

12 h,然后用 5% (W/W) NaOH 溶液洗涤 2 次,每次 30 min,最后用蒸馏水反复洗涤,待清洗液与蒸馏水的电导率接近为止. 富含血小板的血浆 (PRP),新鲜健康的人血 9 份,加入 1 份 3.8% (W/V)的柠檬酸三钠,1000 r/min 离心 10 min,取上层淡黄色液体,−20 ℃ 冰箱中冷冻保存.

BS201S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司),INOVA400 型超导核磁共振仪(美国 Varian,400MHz),FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),Quanta 200 型环境扫描电镜(荷兰 philips-FEI 公司),AXIS ULTRA 型光电子能谱仪(英国 Kratos Analytical LTD),DCAT21 型表面张力仪(德国 DataPhysies),HH. CP-TW 二氧化碳培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司).

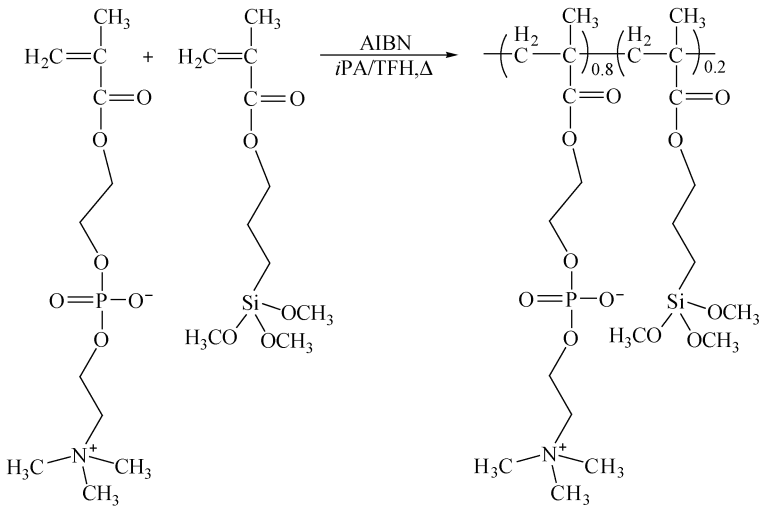


Fig. 1 Synthetic route of the polymer PMT82

2.2 CS 和 CS-GA 膜的制备

参照文献[20]方法,制备壳聚糖膜和交联壳聚糖膜. 具体制备过程如下:配制质量分数为 0.5%的壳聚糖 1% (V/V)醋酸水溶液. G1 砂芯漏斗过滤后,将 0 μL, 25 μL 5%的戊二醛水溶液加入到壳聚糖溶液中搅拌 12 h,即可得到戊二醛交联壳聚糖溶液. 将干净的玻璃片(18 mm × 18 mm × 0.16 mm)竖直浸入上述的溶液中,2 min 后取出、晾干(24 h). 然后将样品先用质量分数为 0.1%的 NaOH 溶液浸泡(1 h),再用蒸馏水浸泡(48 h,每隔 3~4 h 更换 1 次水),直到洗涤液与蒸馏水的表面张力相近为止,最后在 30 ℃下真空干燥(24 h),即可得到壳聚糖膜(CS)和交联壳聚糖膜

2 聚合物 PMT82 涂层的制备及其表征方法

2.1 聚合物 PMT82 的合成及表征

参照文献[19]方法,合成甲基丙烯酰氧乙基磷酰胆碱-甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅二元共聚物(PMT82). 具体操作过程如下:首先按摩尔比 8:2 称取单体 MPC、TSM,用异丙醇(iPA)溶解,同时称取单体总质量 0.5%的引发剂偶氮二异丁腈(AIBN),并用四氢呋喃(THF)溶解,然后将上述溶液混匀. 在 N₂、80 ℃ 搅拌下,将单体及引发剂的混合液滴加到装有冷凝回流装置的三颈瓶中,控制滴加速度在 3~4 h 内滴加完毕. 停止通 N₂,密封体系,继续反应 12 h. 之后,补加单体总质量 0.5%的引发剂 AIBN,继续反应 12 h. 反应结束后,浓缩反应液,用无水乙醚反复沉淀 3 次. 最后,在 30 ℃下真空干燥 24 h,即可得到 PMT82 聚合物(图 1),并通过核磁对其进行表征.

(CS-GA).

2.3 仿细胞外层膜结构涂层的制备

将 PMT82 聚合物配成 1 mg/mL 甲醇溶液滴涂在交联壳聚糖膜表面,涂覆均匀(30 μL/面,涂层厚度约为 100 nm). 晾干后样品记为 CS-GA-PMT82a,置于室温 0.5% (V/V)三乙胺水溶液的蒸汽中催化处理,经过大量蒸馏水冲洗,即可获得具有仿细胞外层膜结构(CS-GA-PMT82b)的涂层表面. 通过测定三乙胺蒸汽催化前后仿细胞外层膜结构涂层的动态接触角,衡量聚合物涂层的亲疏水性和稳定性.

2.4 XPS 表征

用英国 Kratos Analytical LTD, AXIS ULTRA

型光电子能谱仪对壳聚糖(CS),交联壳聚糖(CS-GA)和仿细胞外层膜结构涂层(CS-GA-PMT82b)样品表面的元素组成进行分析测试.测试条件如下:激发源为AlK α ,起飞角为70°,分析腔的真空度为 3×10^{-9} MPa,X-射线功率为150 W,用C $_{1s}$ 的电子结合能峰(284.8 eV)校正.

2.5 血小板黏附

将壳聚糖(CS)和仿细胞外层膜结构涂层(CS-GA-PMT82b)样品置于PBS中浸泡2 h.取20 μ L PRP滴加在样品表面,置于37℃二氧化碳培养箱中培养2 h.待培养结束后,用PBS洗涤黏附不牢的血小板.然后将样品浸泡于2.5%的戊二醛溶液中固定1 h,依次用PBS、蒸馏水淋洗,-50℃下冷冻干燥12 h.用SEM看样品片上血小板的形貌,并拍照^[21, 22~25].

3 聚合物PMT82及其涂层的研究

3.1 PMT82聚合物的表征

用400 MHz核磁共振仪以 $V(\text{CDCl}_3)/V(\text{CD}_3\text{OD})=1:1$ 为溶剂,测试PMT82聚合物的 $^1\text{H-NMR}$ (图2).PMT82聚合物出峰在 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中已标示,其中 $\delta=3.28$ 处为磷酸胆碱基团中与氮相连3个甲基的峰, $\delta=3.6\sim3.8$ 处为磷酸胆碱基团中与氮相连亚甲基的峰, $\delta=0.6\sim0.8$ 处为与三甲氧基硅基团相连亚甲基的峰($\delta=7.61, 4.74, 3.36$ 处分别为 $\text{CDCl}_3, \text{D}_2\text{O}, \text{CD}_3\text{OD}$ 溶剂的残留峰).在 $\delta=5\sim7$ 处未见出峰,表明所得二元共聚物中已无单体残余. $^1\text{H-NMR}$ 测试结果表明,已成功合成了含三甲氧基硅可交联的二元随机聚合物.由于 $\delta=3.36$ 处溶剂残留峰对磷酸胆碱基团上3个甲基在 $\delta=3.28$ 出峰干扰较大,用 $\delta=3.6\sim3.8, 0.6\sim0.8$ 处峰面积来计算聚合物中MPC, TSMA单体的摩尔百分比,

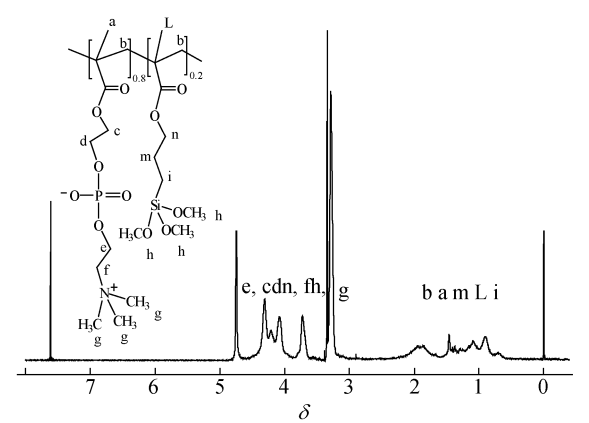


Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the copolymer PMT82

PMT82 聚合物中 MPC 的摩尔百分含量为14%.采用飞行时间质谱法(MALDI-TOF-MS)对PMT82聚合物的分子量进行测定.结果表明,PMT82聚合物的质荷比在7100~7400范围内,其分子量应该大于7000.

3.2 仿细胞外层膜结构涂层的制备

PMT82 聚合物改性壳聚糖前后的动态接触角,如图3所示.由图可以看出,与壳聚糖和交联壳聚糖相比,PMT82 聚合物涂层在三乙胺溶液的蒸汽处理前后前进角及后退角均降低.PMT82 聚合物甲醇溶液涂覆于交联壳聚糖膜表面,形成PMT82 聚合物涂层,通过三乙胺溶液的蒸汽处理,使得聚合物中的三甲氧基硅基团交联固定,提高涂层表面的磷酸胆碱基团的含量,从而获得较为稳定的具有仿细胞外层膜结构的表面,使其亲水性提高,前进角后退角有所降低.

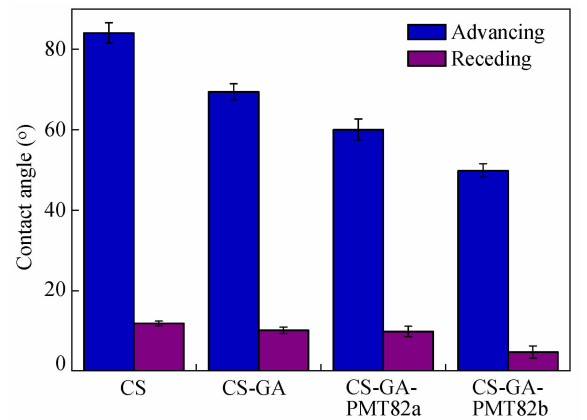


Fig. 3 Dynamic contact angles of CS, CS-GA and CS-GA-PMT82 films as prepared (CS-GA-PMT82a) and treated with triethylamine (CS-GA-PMT82b)
Bars represent SD ($n=3$).

3.3 仿细胞外层膜结构涂层的稳定性

用动态接触角研究交联对PMT82 聚合物涂层稳定性的影响(图3).与未催化PMT82 聚合物涂层相比,三乙胺蒸汽催化交联可使得亲水性磷酸胆碱聚合物(PMT82)固定在聚糖表面,亲水性提高前进角和后退角降低.这说明三乙胺蒸汽催化交联固定在交联壳聚糖表面PMT82 聚合物较多,增加PMT82 聚合物涂层的稳定性,使得涂层的亲水性较好.交联使得PMT82 涂层稳定性提高,与文献报道的结果一致^[14~16].

3.4 涂层表面XPS表征

壳聚糖(CS),交联壳聚糖(CS-GA)和仿细胞外层膜结构涂层(CS-GA-PMT82b)样品表面各元

素的光电子能谱精细图谱如图 4 所示. 与壳聚糖 (CS) 和交联壳聚糖 (CS-GA) 相比, 涂敷改性后的交联壳聚糖 (CS-GA-PMT82b) 表面出现了磷、硅元素的信号峰, 是 PMT82 聚合物中磷酰胆碱基团中的磷元素、三甲氧基硅基团中的硅元素, 而且氮

在 402 eV 处新出现的峰为磷酰胆碱基团上 $-N^+$ (CH_3)₃ 的特征峰. 由于样品表面经过大量的二次蒸馏水洗涤, 物理吸附的未交联固定的 PMT82 会清除, 因而通过涂覆催化交联的方式将亲水性聚合物 PMT82 涂层固定在交联壳聚糖表面.

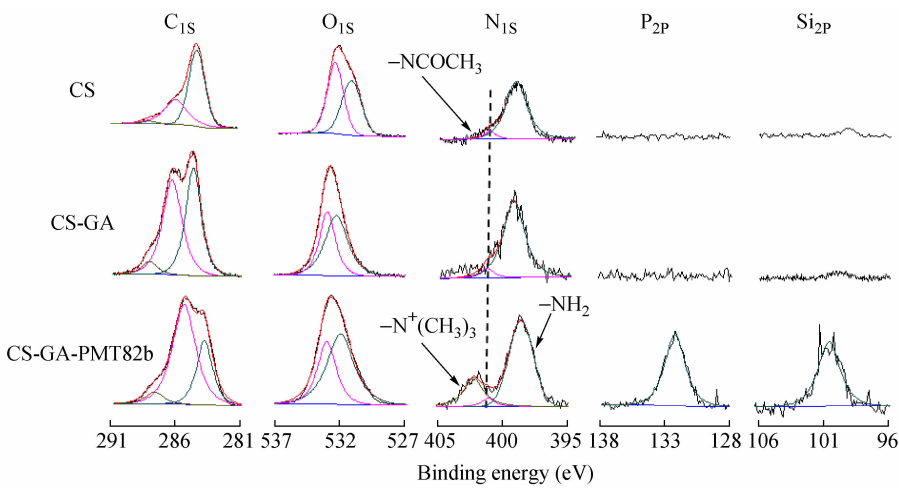


Fig. 4 High resolution C_{1s}, N_{1s}, O_{1s}, P_{2p} and Si_{2p} XPS spectra of the CS, CS-GA and CS-GA-PMT82b surfaces

3.5 涂层表面血小板黏附

血小板黏附是评价生物医用材料血液相容性最常用、最有效的手段. 血小板在壳聚糖膜和仿细胞外层膜结构涂层 (CS-GA-PMT82b) 表面黏附的 SEM 照片如图 5 所示. 壳聚糖膜表面存在较多血小板黏附及聚集, 交联壳聚糖表面的血小板黏附有所减少但仍有聚集, 而在 CS-GA-PMT82b 涂层

表面仅有少量的血小板黏附, 并未聚集. 通过三乙胺蒸汽催化 PMT82 中的三甲氧基硅基团交联、固定, 使聚合物涂层表面的磷酰胆碱基团含量增加, 从而在交联壳聚糖膜表面形成具有仿细胞外层膜结构的涂层 CS-GA-PMT82b. 这种改性方式可以显著改善材料的抗凝血性能, 可以明显地降低对血小板黏附和聚集.

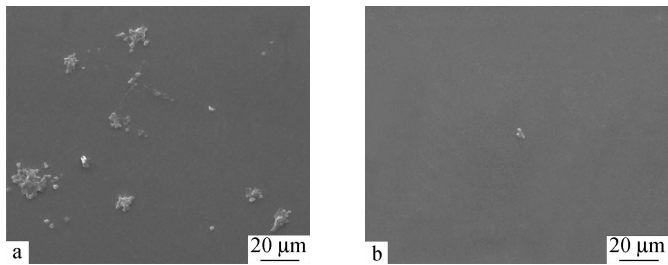


Fig. 5 SEM pictures of platelet adhesion on the surfaces of (a) CS and (b) CS-GA-PMT82b

4 结论

本文利用涂覆方法将甲基丙烯酰氧乙基磷酰胆碱-甲基丙烯酰氧丙基三甲氧基硅二元共聚物 (PMT82) 涂覆于交联壳聚糖膜表面, 通过三乙胺水溶液的蒸汽催化作用使聚合物涂层中三甲氧基硅基团交联固定在壳聚糖表面. 用动态接触角 (DCA)、X-射线光电子能谱 (XPS) 对改性后的涂层表面的亲疏水性、元素组成进行了表征. 结果表明, 这种利用涂覆催化交联的改性方式成功地将

含有三甲氧基硅基团和磷酰胆碱基团的二元共聚物交联固定在壳聚糖表面, 获得了较为稳定的仿细胞外层膜结构的 CS-GA-PMT82b 涂层表面. 血小板黏附实验结果表明, 与壳聚糖相比, 改性后表面的血小板黏附显著减少, 抗凝血性能显著提高. 此改善材料的方式有望成为生物医用材料表面改性领域的有效的新手段, 得到的改性壳聚糖将在抗凝血材料、药物控释、组织工程等领域具有较大的研究价值和广阔的应用市场.

REFERENCES

1 Zhu A P,Zhang M,Shen J. Appl Surf Sci,2005,241(3-4):485~492

2 Beneseh J,TengVall P. Biomaterials,2002,23(12):2561~2568

3 Wang X H,Li D P,Wang W J,Feng Q L,Cui F Z,Xu Y X,Song X H,Werf M. Biomaterials,2003,24(19):3213~3220

4 Gong Y K,Mwale F,Wertheimer M R,Winnik F M. J Biomater Sci,2004,15(11):1423~1434

5 Hayward J A,Chapman D. Biomaterials,1984,5(3):135~142

6 Ishihara K,Aragaki R,Tomoko U,Watenabe A,Nakabayashi N. J Biomed Mater Res,1990,24(8):1069~1099

7 Xu Y,Takai M,Ishihara K. Biomaterials,2009,30(28):4930~4938

8 Zong M M,Gong Y K. Chinese J Polym Sci,2011,29(1):53~64

9 Reisch A,Voegel J C,Gonthier E,Decher G,Senger B,Schaaf P,Me? sini P J. Langmuir,2009,25(6):3610~3617

10 Tristan F,Palestino G,Menchaca J L,Perez E,Atmani H,Cuisinier F,Ladam G. Biomacromolecules,2009,10(8):2275~2283

11 Kyomoto M,Moro T,Miyaji F,Hashimoto M,Kawaguchi H,Takatori Y,Nakamura K,Ishihara K. J Biomed Mater Res,Part A,2009,90(2):362~371

12 Kyomoto M,Moro T,Miyaji F,Hashimoto M,Kawaguchi H,Takatori Y,Nakamura K,Ishihara K. J Biomed Mater Res,Part A,2008,86(2):439~447

13 Kyomoto M,Moro T,Miyaji F,Konno T,Hashimoto M,Kawaguchi H,Takatori Y,Nakamura K,Ishihara K. J Biomed Mater Res,Part B: Appl Biomat,2008,84(2):320~327

14 Lewis A L,Cumming Z L,Goreish H H,Kirkwood L C,Tolhurst L A,Stratford P W. Biomaterials,2001,22(2):99~111

15 Lewis A L,Berwick J,Davies M C,Roberts C J,Wang J H,Small S,Dunn A,O' Byrne V,Redman R P,Jones S A. Biomaterials,2004,25(15):3099~3108

16 Xu J P, Ji J,Chen W D,Fan D Z,Sun Y F,Shen J C. Eur Polym J,2004,40(2):291~298

17 Kyomoto M,Moro T,Saiga K,Miyaji F,Kawaguchi H,Takatori Y,Nakamura K,Ishihara K. Biomaterials,2010,31(4):658~668

18 Ishihara K,Ueda T,Nakabayashi N. Polym J,1990,22(5):355~360

19 Lewis A L,Hughes P D,Kirkwood L C,Leppard S W,Redman R P,Tolhurst L A,Stratford P W. Biomaterials,2000,21(18):1847~1859

20 Huangfu P B,Gong M,Zhang C F,Yang S,Zhao J,Gong Y K. Colloids Surf B:Biointerfaces,2009,71(2):268~274

21 Chen Y M,Tanaka M,Gong J P,Yasuda K,Yamamoto S,Shimomura M Y. Biomaterials,2007,28(10):1752~1760

22 Zhang Xiucui(张秀彩),Zhong Wei(钟伟),Cheng Weizhuang(程为庄),Du Qiangguo(杜强国). Journal of Biomedical Engineering(中国生物医学工程学报),2006,25(1):92~95

23 Kaladhar K,Sharma C P. Langmuir,2004,20(25):11115~11122

24 Ji Jian(计剑),Feng Linxian(封麟先),Shen Jiacong(沈家骢). Chemical Journal of Chinese University(高等学校化学学报),2002,23(12):2369~2374

25 Yang Shan(杨珊). Synthesis and Application of Biomembrane Mimetic Polymers(仿细胞膜结构聚合物的合成及其应用研究). Doctoral Dissertation of Sichuan University(西北大学博士学位论文),2009

FABRICATION AND ANTICOAGULATION PROPERTIES OF CELL OUTER MEMBRANES MIMETIC ON GLUTARALDEHYDE-CROSSLINKED CHITOSAN

Ming Gong¹, Yu-jing Shi¹, Bo-hua Wu¹, Shan-xin Xiong¹, Yong-kuan Gong²
(¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Xian University of Science and Technology, Xian 710054)
(² Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecule Chemistry of Ministry of Education,
College of Chemistry & Materials Science, Northwest University, Xian 710069)

Abstract The copolymer PMT82 was synthesized by free radical polymerization of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) and trimethoxysilylpropyl methacrylate (TSMA) with the monomer ratio of 8:2. The copolymer PMT82 was dip-coated onto glutaraldehyde-crosslinked chitosan (CS-GA) surfaces to prepare phosphorylcholine-coated CS-GA film (CS-GA-PMT82a) and then stabilized by the amine-catalyzed crosslinking reactions of the trimethoxysilane groups, obtaining the phosphorylcholine-crosslinked CS-GA surfaces (CS-GA-PMT82b). The hydrophilicity and elementary composition of the modified surfaces were characterized by dynamic contact angle (DCA) measurements and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The obvious decrease in the contact angles and the new signals for P_{2p} , Si_{2p} and $-N^+(CH_3)_3$ provided strong evidences for the successful establishment of PMT82 on the CS-GA surface. The anticoagulation property of the surfaces was estimated by platelet adhesion measurements. Compared with the chitosan films, the CS-GA-PMT82b surfaces massively reduced the platelet adhesion, indicating that the cell outer membrane mimetic structures were formed on the modified surfaces with PMT82 as the coat, which led to the significantly improved anticoagulation property of the modified surfaces of the composite material. This facile method of fabricating the stable cell outer membrane mimetic surfaces by dip-coating and catalytic crosslinking may have potential applications in the fields of anticoagulation property coatings, drug delivery, and tissue engineering.

Keywords Chitosan, Cell outer membrane mimetic structures, Phosphorylcholine, Anticoagulation