

· 研究简报 ·

基于电聚多巴胺技术一锅法快速构建生物活性界面的研究*

李紫珺 任科峰** 王金磊 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教育部重点实验室 杭州 310027)

摘 要 通过精确控制电化学参数采用循环伏安法在中性无氧水环境中制备得到膜厚可控的电聚多巴胺膜,并将这种电聚多巴胺技术与生物活性分子的负载相结合,通过一锅法电聚得到含 REDV 活性短肽的聚多巴胺活性膜,快速便捷地构建了具有促内皮细胞粘附的生物活性界面.椭圆偏振仪、扫描电子显微镜证实了材料界面上形成了均一的聚多巴胺膜;X 射线光电子能谱以及荧光分析结果证实了 REDV 短肽已负载于电聚多巴胺涂层中.内皮细胞体外黏附实验证实 REDV 短肽保持了良好活性,可有效促进内皮细胞黏附、铺展及粘着斑的形成.这种一锅法快速制备具有生物活性的电聚多巴胺涂层技术有望为复杂的导电生物材料和装置的多功能界面修饰提供新的途径.

关键词 电聚合,聚多巴胺,REDV 短肽,一锅法,内皮细胞

界面修饰方法对生物材料的物理化学性质和生物学应用等具有重要影响.目前常见的材料表面功能化修饰法技术,如层层自组装法^[1]、表面等离子体处理^[2]、单分子自组装法^[3]等往往因为繁琐的制备步骤、苛刻的反应条件或基底材料与修饰基团严格的化学反应配对等原因而受到限制.

Messersmith 等^[4]发现仿贻贝粘连蛋白的多巴胺分子在碱性有氧水环境下能够自聚合,在包括金属、金属氧化物、高聚物甚至超疏水表面等多种材料表面沉积成膜,且该过程不受三维结构限制^[5-7],显示出极为巨大的潜在应用,已经成为表面修饰领域的研究热点之一^[8].虽然聚多巴胺形成机理还不甚清楚^[9],但由于其可以进一步与氨基或巯基发生加成反应,由此可以实现膜表面生物活性分子(多糖、生长因子、蛋白质等)的固定^[10,11],因而被广泛应用于生物材料表面修饰领域^[12].然而,该经典聚多巴胺膜的制备极大依赖于碱性有氧环境,并且生物分子的引入需要通过二次反应,整个过程耗时且步骤繁琐.

研究发现多巴胺分子沉积成膜的首要条件是多巴胺被氧化为多巴醌^[13],而电化学是调控氧化还原反应的有效手段.即使在中性或弱酸性环境

中,多巴胺在电化学作用下也会在电极表面聚合成膜^[14],有研究将酶通过表面固定或同步负载与电聚多巴胺相结合,应用于生物传感器领域^[13,15].本研究以此为启示,将电聚多巴胺技术与具有特异性诱导内皮细胞黏附的 REDV 生物活性短肽相结合,通过一锅法制备得到具有促进内皮细胞黏附的功能界面.与传统的碱性溶液自聚合方法比较,电聚多巴胺一锅法技术使聚合膜的形成、增长和生物活性分子的捕捉或负载在溶液中同步进行,具有简单快速的特点.该技术有望应用于各种成分、形状的导电性装置表面,为快速构建导电材料活性界面寻求切实可行的途径.

1 实验仪器与原料

所有电化学实验均在 CHI660C 电化学工作站上进行.电化学研究采用经典三电极体系,工作电极为金电极或 ITO 玻璃(有效工作面积为 1.0 cm × 1.0 cm),涉及细胞实验时使用 ITO 玻璃,其余均使用金电极.参比电极为饱和甘汞电极(SCE),铂片作为辅助电极.实验中所给出的电位值均相对于 SCE.多巴胺盐酸盐(dopamine hydrochloride)购自 Sigma;活性短肽 REDV(序列 GREVDYK, Gly-Arg-Glu-Asp-Val-Tyr)和参比短肽 REVD(序列 GREVDYK, Gly-Arg-Glu-Val-Asp-

* 2013-06-28 收稿,2013-09-22 修稿;国家自然科学基金(基金号 51025312,50830106,21174126,51103126)和浙江省科技厅优先主题重点社会发展项目(项目号 2010C3025-2)资助.

** 通讯联系人,E-mail:renkf@zju.edu.cn; jijian@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2014.13225

Tyr) 以及荧光标记的活性短肽 REDV^{FITC} 购自上海科肽生物技术有限公司。

2 电聚多巴胺膜 (ePDA) 及含活性短肽的复合膜 (ePDA@REDV) 制备

工作电极每次使用前用丙酮和水 (Milli-Q) 依次超声 5 min, 氮气吹干, 最后在 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中从 -0.2 V 到 1.4 V 进行循环伏安扫描, 直到获得稳定的伏安曲线。然后将电极置于 1.0 mg/mL 多巴胺的磷酸缓冲溶液 (PBS, 0.01 mol/L, pH = 7.4) 中采用循环伏安法聚合一定时间后 PBS 清洗 3 次, N_2 吹干。其电位扫描区间为 -0.5 ~ 0.5 V, 扫描速度为 50 mV/s。对于一锅法负载活性短肽膜的制备, 在 1.0 mg/mL 多巴胺溶液中加入 REDV 或 REDV 短肽 (0.5 mg/mL), 然后以上述循环伏安法进行电聚 4 h 制备得到 (ePDA@REDV) 复合膜。对涉及 XPS 测试与荧光测试的复合膜的制备, 采用 REDV/REDV^{FITC} (2:3, W:W) 混合的荧光标记体系。所有电聚合反应均在通氮除氧环境下室温中进行。

3 材料的表征及细胞实验

为证实多巴胺在电极表面电聚成膜的过程, 椭圆偏振仪 (椭圆, model VASE, J. A. Woollam Inc., Lincoln, NE) 观察了电聚多巴胺膜厚度的动力学增长, 场发射扫描电子显微镜 (FE-SEM, Hitachi S-4800) 观察了膜表面形貌。

对于一锅法负载活性短肽体系, 采用 X 射线光电子谱 (XPS, Kratos Axis Ultra DLD) 检测电极表面修饰前后元素组成变化。复合膜中负载的活性短肽在模拟生理环境的 PBS (pH = 7.4) 中的稳定性通过孔板荧光计检测 (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Scientific)。

为检验 ePDA@REDV 复合膜对 endothelial cell 黏附行为的影响, 在 ePDA、ePDA@REDV 及参照体系 ePDA@REDV 表面按 14000 cells/cm² 的种植密度种上人脐带静脉内皮细胞 (HUVECs), 在 37 °C, 5% CO_2 的培养箱中培养 1 h。然后多聚甲醛 (3.7%) 室温固定细胞 10 min 后进行免疫荧光染色。使用罗丹明-鬼笔环肽 (1:800, Sigma) 及 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (2 $\mu\text{g/mL}$) 分别染色细胞骨架和细胞核。使用一抗 (1:400, V9131, Sigma) 和二抗 (1:500, A11029, Invitrogen) 对 vinculin 染色。细胞在荧光显微镜 (Zeiss Axiovert 200 microscopy) 或激光共聚焦显微镜 (Leica Wetzlar) 下观察, 每组 3 个平行样, 每个

样品至少取 5 张照片, 用 ImageJ 软件对图片处理以及细胞计数, 统计不同表面的细胞黏附情况。

4 多巴胺电聚膜的表征

首先用椭圆跟踪了电聚多巴胺膜的厚度, 图 1 显示电聚多巴胺膜的厚度在电聚合刚开始的 1 h 内迅速增大, 随后膜厚增速渐缓, 至 8.3 h 时膜厚达到 28.6 nm。由于聚多巴胺为不导电膜, 因此我们认为这个现象的主要原因可能是由于聚多巴胺膜层的电绝缘性阻隔了电极表面与溶液中多巴胺分子的电子传递, 导致氧化聚合反应逐渐受到抑制。随后通过 SEM 观察了电聚多巴胺膜的表面形貌, 从图 2 可以清楚地观察到电极表面形成了具有一定粗糙度的聚多巴胺膜, 但该膜整体均匀平整。这些数据均证明了电聚多巴胺膜的成功制备。

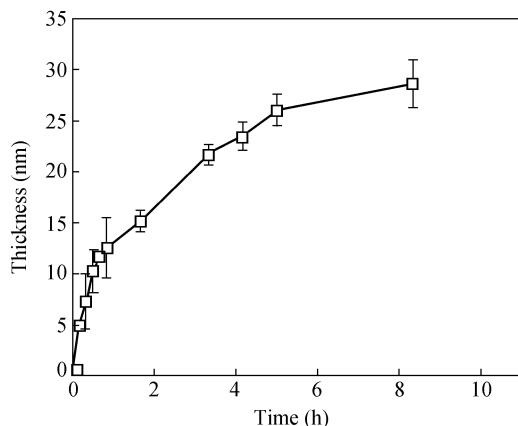


Fig. 1 Thickness growth of polydopamine fabricated on gold surface versus time based on electrochemistry treatment

5 REDV 活性短肽的一锅法负载

为了进一步探索利用电聚技术便捷地实现复杂功能界面的构建, 我们在上述电聚多巴胺膜的技术基础上引入生物活性分子, 希望能够一锅法制备生物活性聚多巴胺界面。REDV 活性短肽是一种内皮细胞特异性分子, 它可以通过与 $\alpha_4\beta_1$ 整合素亚基作用诱导内皮细胞黏附和迁移^[16, 17]。将多巴胺和 REDV 短肽分子混合溶液进行一锅法电聚 4 h 后, 椭圆测试 ePDA@REDV 膜厚达到 23.2 nm, 和单纯 ePDA 膜厚 22.4 nm 相比无差异, 说明 REDV 短肽对膜厚的增长没有影响, 这可能与短肽自身的分子量比较小有关。XPS 谱图 (图 3) 显示, 经一锅法修饰的表面除了多巴胺沉积膜所含有的 C、N、O 3 种元素峰外, 在 160 eV 处还出现了属于 REDV-FITC 的 S 元素峰, 表明多巴

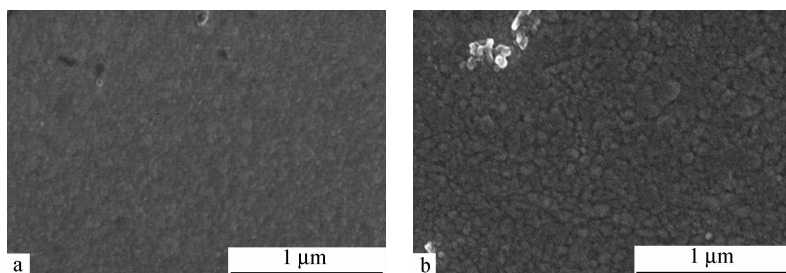


Fig. 2 SEM photographs of bare gold (a) and polydopamine (b) obtained by electropolymerization for 4 h

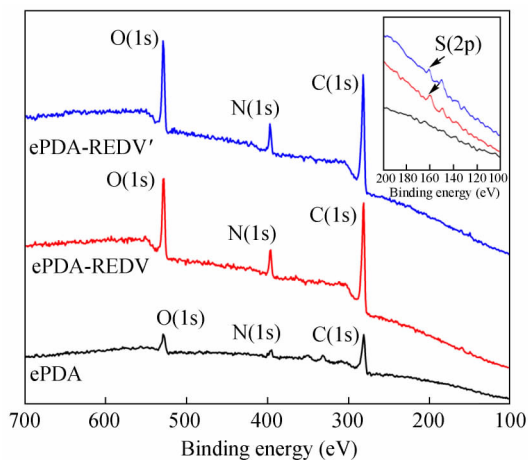


Fig. 3 XPS spectra of ePDA, ePDA@ REDV and ePDA@ REDV'

ePDA@ REDV' represents a modified surface obtained by immersion of ePDA-REDV in PBS for 15 h. The inset shows a sulfur peak at the range of 100 eV to 200 eV.

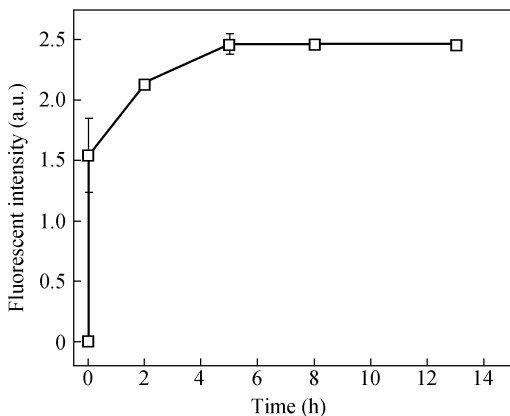


Fig. 4 Releasing behavior of REDV^{FITC} from ePDA@ REDV film in PBS (pH = 7.4)

胺沉积膜通过一锅法成功负载了 REDV 短肽. 为研究 REDV 短肽负载后其在膜内的稳定性, 将该膜置于模拟生理环境的 PBS 缓冲溶液中, 通过荧光强度变化观察复合膜内 REDV 分子的释放行为. 荧光数据表明 (图 4), 溶液荧光值随时间增加

而迅速增大并在 6 h 后趋于平缓, 表明膜中有部分 REDV 短肽释放进入溶液中, 然而膜表面的 XPS 谱图 (图 3) 显示仍有 S 元素的存在, 说明一锅法制备的 ePDA@ REDV 膜在仿生理条件下, 最终仍有部分 REDV 短肽可稳定修饰于膜表面. 这种现象可能与 REDV 短肽负载于聚多巴胺膜的方式有关. 数据表明, REDV 短肽既有物理吸附和包埋进入膜中, 也有部分通过化学共价方式修饰于膜内, 短肽的氨基与聚多巴胺的醌式结构发生 Michael 加成反应从而与膜形成共价连接. 因此荧光数据表现出 REDV 短肽短时间内的快速释放.

6 ePDA@ REDV 复合膜促进内皮细胞黏附

我们在 ePDA@ REDV 复合膜表面进行内皮细胞的培养, 以验证该种生物活性膜的作用. 内皮细胞在 3 种膜表面黏附 1 h 后, 对其细胞骨架进行染色, 并对细胞黏附密度和铺展面积进行了统计和分析. 从荧光照片数据中, 可以看到, 内皮细胞均能够在 3 种表面黏附和铺展 (图 5). 然而, ePDA@ REDV 膜表面能够明显促进内皮细胞的黏附和铺展, 相对于负载了参照短肽 (REVD) 的膜与单纯 ePDA 膜, 表现出更高的细胞黏附密度和平均铺展面积 (图 5, 5(a3)、5(b1)、5(b2)). 由此说明 ePDA@ REDV 膜中负载的 REDV 短肽显现出了对内皮细胞特异的促黏附效果. 我们进一步考察了黏附后内皮细胞的骨架和黏着斑. 图 6 为内皮细胞在 3 种膜表面的 F-actin 和 vinculin 的荧光标记. 可以观察到, 当内皮细胞在 ePDA@ REDV 膜表面黏附 1 h 后, 可以观察到明显的斑点状的黏着斑结构. 而在另 2 种膜的表面还未能观察到类似的黏着斑, 由此说明, REDV 短肽的确是通过促进整合素与黏着斑的形成, 从而加快内皮细胞的黏附和铺展. 这些内皮细胞黏附实验证明, 一锅法 ePDA@ REDV 膜中的 REDV 短肽保持了其特有的生物活性.

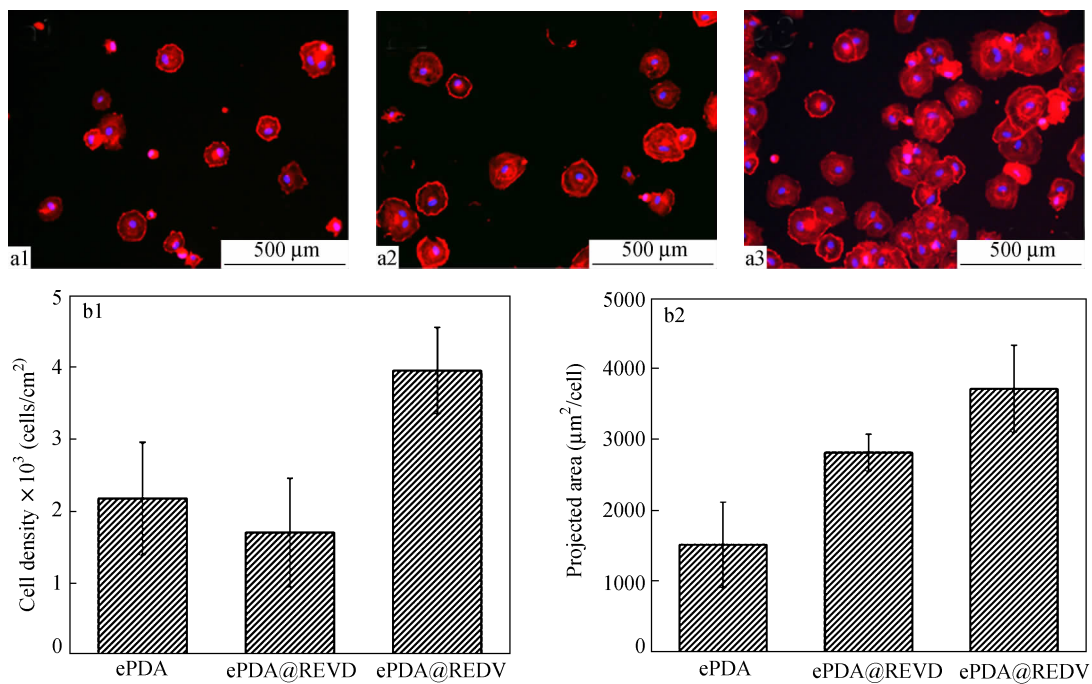


Fig. 5 Microimages of HUVECs adhered to ePDA (a1), ePDA@REVD (a2) and ePDA@REDV (a3) for 1 h. Cells were stained with nucleus (blue) and F-actin (red); The quantification results of cell density (b1) and spreading area (b2).

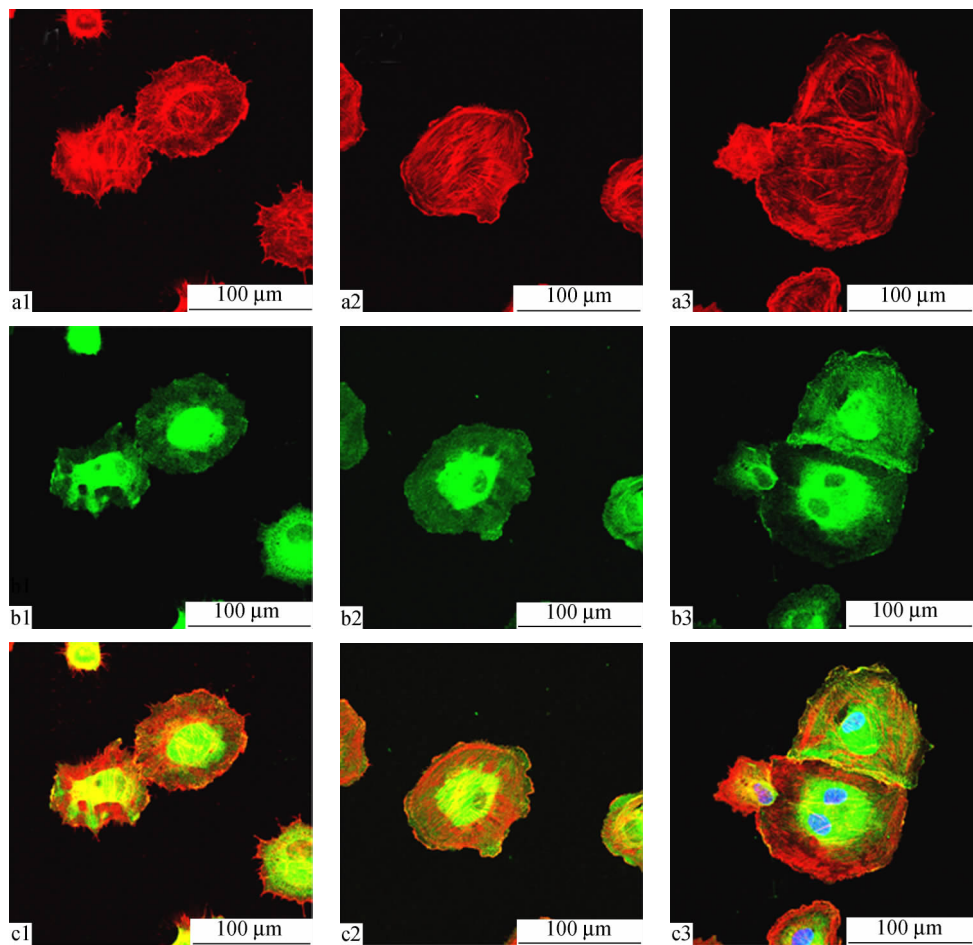


Fig. 6 Confocal images of HUVECs adhered to ePDA (a1 ~ c1), ePDA@REVD (a2 ~ c2) and ePDA@REDV (a3 ~ c3) for 1 h. Cells were stained for F-actin (a1 ~ a3), vinculin (b1 ~ b3) and merge (c1 ~ c3).

7 结论

多巴胺通过电化学聚合方法可在导电材料表面聚合成膜,并且通过与生物活性分子相结合,一锅法制备带活性短肽 REDV 的聚多巴胺膜,实现生物活性分子的快速负载. 细胞研究结果表明通过上述方式修饰了 REDV 的膜表面可有效促进

内皮细胞的黏附、铺展和黏着斑的形成,提高材料表面细胞亲和力,为电聚技术实现更复杂材料和器件表面的多功能修饰提供依据. 该种电聚多巴胺表面修饰技术将在生物材料、医用装置等领域有着潜在的重要应用.

REFERENCES

1 Decher G. *Science*,1997,277(5330):1232 ~ 1237
2 Favia P,d' Agostino R. *Surf Coat Tech*,1998,98(1):1102 ~ 1106
3 Hudalla G A,Murphy W L. *Soft Matter*,2011,7(20):9561 ~ 9571
4 Lee H,Dellatore S M,Miller W M,Messersmith P B. *Science*,2007,318:426 ~ 430
5 Wang J L,Ren K F,Chang H,Jia F,Li B C, Ji Y, Ji J. *Macromol Biosci*,2013,13(4):483 ~ 493
6 Zhang X,Wang S,Xu L,Feng L, Ji Y,Tao L, Li S, Wei Y. *Nanoscale*,2012,4(18):5581 ~ 5584
7 Zhang X,Liu M,Zhang Y, Yang B, Ji Y, Feng L, Tao L, Li S, Wei Y. *RSC Adv*,2012,2(32):12153 ~ 12155
8 Ye Q,Zhou F,Liu W. *Chem Soc Rev*,2011,40(7):4244 ~ 4258
9 Hong S,Na Y S,Choi S,Song I T,Kim W Y,Lee H. *Adv Funct Mater*,2012,22(22):4711 ~ 4717
10 Lyngé M E,van der Westen R,Postma A,Stadler B. *Nanoscale*,2011,3(12):4916 ~ 4928
11 Lee Y B,Shin Y M,Lee J H,Jun I,Kang J K,Park J C,Shin H. *Biomaterials*,2012,33(33):8343 ~ 8352
12 Wei Q,Li B,Yi N,Su B,Yin Z,Zhang F,Li J,Zhao C. *J Biomed Mater Res Part A*,2011,96(1):38 ~ 45
13 He H,Xie Q,Yao S. *J Colloid Inter Sci*,2005,289(2):446 ~ 454
14 Li Y L,Liu M L,Xiang C H,Xie Q J,Yao S Z. *Thin Solid Films*,2006,497(1-2):270 ~ 278
15 Fu Y,Li P,Xie Q,Xu X,Lei L,Chen C,Zou C,Deng W,Yao S. *Adv Funct Mater*,2009,19(11):1784 ~ 1791
16 Plouffe B D,Njoka D N,Harris J,Liao J H,Horick N K,Radisic M,Murthy S K. *Langmuir*,2007,23(9):5050 ~ 5055
17 Wei Y, Ji Y, Xiao L L, Lin Q K, Xu J P, Ren K F, Ji J. *Biomaterials*,2013,34(11):2588 ~ 2599

One-pot Preparation of Bioactive Surface by Electropolymerization of Dopamine

Zi-jun Li, Ke-feng Ren^{*}, Jin-lei Wang, Jian Ji^{*}

(MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of
Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract An electrochemical technique involved facile method of cyclic voltammetric oxidation of dopamine to fabricate thickness controllable PDA films (ePDA) was reported. This process was preceded under a neutral environment and in the absence of oxygen. Most importantly, with precisely controlled electrochemical parameters, this dopamine electropolymerization technique can be further combined with bioactive molecules modification *via* a one-pot strategy to construct functionalized surfaces. By electropolymerization of dopamine in a one-pot mixture with REDV peptide, an endothelial cells (ECs) specific ligand, ECs adhesion enhanced bioactive surface incorporated with REDV was obtained. Ellipsometry and scanning electron microscopy (SEM) confirmed the homogeneous ePDA film fabrication. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and fluorescence analysis results demonstrated the successful incorporation of REDV peptide into ePDA films (ePDA@REDV). Cells adhesion experiments suggested an excellent activity of incorporated REDV peptide was retained. Furthermore, ECs exhibited improved attachment, spreading and vinculin formation on ePDA@REDV functionalized surface. This dopamine electropolymerization assisted one-pot strategy for rapid construction of bioactive surfaces provides an innovative approach for multifunctional modification of complicated conductive biomaterials and devices.

Keywords Electropolymerization, Polydopamine, REDV peptide, One-pot, Endothelial cells

^{*} Corresponding authors: Ke-feng Ren, E-mail: renkf@zju.edu.cn

Jian Ji, E-mail: jijian@zju.edu.cn