

Langmuir-Blodgett 方法构建聚合物仿细胞外层膜结构涂层*

杨 珊^{1,2,3} 官 铭^{2,4} 官永宽^{2**}

(¹ 陕西师范大学材料科学与工程学院 西安 710062) (² 西北大学化学与材料科学学院 西安 710069)

(³ 渭南师范学院化学与生命科学学院 渭南 714099) (⁴ 西安科技大学化学与化工学院 西安 710054)

摘 要 以盖玻片为基质,采用 Langmuir-Blodgett (LB)方法制备含磷酰胆碱基团的两亲性无规共聚物聚(2-甲基丙烯酸酞氧基乙基磷酰胆碱(MPC)-甲基丙烯酸十八烷基酯(SMA)- γ -甲基丙烯酸酞氧丙基三甲氧基硅(TSMA))(简称 PMST)的单层、双层和三层薄膜.薄膜的表面亲疏水性和表面形貌分别用动态接触角(DCA)和原子力显微镜(AFM)进行测试.结果表明,PMST 在盖玻片表面形成了致密的膜层,薄膜的致密程度随层数而增加.在水中前进/后退测试 DCA 过程中,聚合物薄膜在气相/水相界面存在基团的迁移取向,且膜层内会发生交联.双层膜具有仿细胞外层膜结构,单层和三层膜具有反细胞外层膜结构;双层膜的亲水性比单层和三层膜的要好.

关键词 磷酰胆碱, LB 技术, 接触角, 表面改性, 生物材料

磷脂双分子层是生物细胞膜的骨架,对于维持生命体的结构和功能起着重要的作用^[1-3]. 血红细胞外层膜的主要磷脂的亲水头部为磷酰胆碱(PC)基团,这是其良好生物相容性的根源.因此,众多学者研究生物材料的表面 PC 基改性,以提高材料的生物相容性^[3-9]. 生物材料表面接枝 PC 基化合物^[3,8]或聚合物^[5,10-12]以及涂覆 PC 基聚合物^[1,4,5]是最常见的改性方式.然而,接枝过程复杂且 PC 基团的接枝密度不高^[3,9];涂覆的方式有聚合物涂层溶解以及 PC 基团难以固定在外表面的问题^[1,4]. 我们合成了一系列不同亲疏水性的含可水解交联三甲氧基基团的 PC 基无规共聚物,通过与基材接枝或涂层交联改善了涂层的稳定性,可以调控固定仿细胞外层膜结构^[1,4,5,13,14].

两亲性的有机小分子如磷脂^[2,15,16]、脂肪酸酯/盐类等表面活性剂很容易在水表面形成单分子层(Langmuir 膜);通过 LB (Langmuir-Blodgett)方法将 Langmuir 膜转移到固体片基上得到层数和结构不同的 LB 膜. LB 方法是制备两亲性单分子膜最有效的方法之一,可以精确控制单分子层的层数、膜厚度和分子排列的有序性,因而常被用于仿生薄膜的制备、化学修饰电极等多方面^[2,15,17-19]. 然而,有机小分子 LB 膜存在热稳定性差、机械强度低、不

耐有机溶剂等问题,而聚合物 LB 膜可能是解决这些问题的最佳途径^[20,21]. 到目前为止,尚鲜见到研究 PC 基聚合物 LB 薄膜的报道. 本文采用含 PC 基团、十八烷基及三甲氧基硅丙基的两亲性聚甲基丙烯酸酯的无规共聚物 PMST,制备仿细胞外层膜结构的 LB 膜并研究其表面亲疏水性及形貌. 可交联基团三甲氧基硅丙基的引入有望进一步提高聚合物 LB 膜的稳定性,为仿细胞膜结构涂层的构建与功能优化提供新途径.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LB 膜制备仪(英国 Nima 科技公司), DCAT21 型表面界面张力仪(德国 DataPhysics 公司), NanoScope IIIa-3243 型原子力显微镜(美国 DI 公司), HS-4 型精密恒温浴槽(成都仪器厂), UPK-II-5 型优普超纯水机(成都超纯科技有限公司),盖玻片(24 mm × 24 mm × 0.17 mm,上海帆船,按照文献[1]的方法洗涤).

含磷酰胆碱基团的无规共聚物聚(2-甲基丙烯酸酞氧基乙基磷酰胆碱(MPC)-甲基丙烯酸十八烷基酯(SMA)- γ -甲基丙烯酸酞氧丙基三甲氧基硅(TSMA))(简称 PMST)(结构见图 1)按照文献

* 2013-12-18 收稿,2014-01-24 修稿;国家自然科学基金(基金号 20974087, 21374087)、陕西省自然科学基金基础研究计划(项目号 2013JQ2021)和陕西省教育厅科研计划(项目号 2013JK0656)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: gongyk@nwu.edu.cn

doi:10.11777/j.issn1000-3304.2014.13457

[13]方法制备,单体 MPC、SMA 及 TSMA 用异丙醇溶解,其摩尔比为 36/44/20,引发剂 AIBN 为单体总质量的 1%,用 THF 溶解并与单体混合.在 N_2 保护下滴加入 80 $^{\circ}C$ 恒温、搅拌的反应釜,在 3~4 h 内滴完.滴加完毕,密封体系反应 24 h.反应液旋蒸浓缩为 1/3 体积后,滴入无水乙醚中沉淀;倾出上清液,将沉淀用甲醇溶解、乙醚沉淀,反复 3 次,真空干燥沉淀. PMST 的结构由 ^1H -NMR 谱确认(400 MHz, $V(CDCl_3):V(CD_3OD)=1:1$, δ):0.7(CH_2Si),0.9($((CH_2)_{15}CH_3)$),1.2~1.5($((CH_2)_{15})$),3.29($N^+(CH_3)_3$).由此计算得单体摩尔比为 40/44/16. PMST 平均分子量约 10^5 ,DSC 测得其 T_g 为 -1.9 $^{\circ}C$.实验用水为超纯水(自制,25 $^{\circ}C$ 时表面张力为 72.8 mN/m),氯仿(分析纯,直接使用).

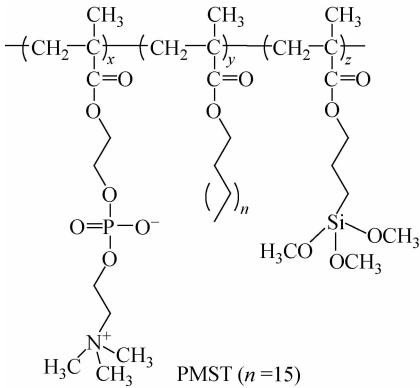


Fig. 1 Molecular structure of PMST polymer

1.2 实验方法

1.2.1 测定 PMST 聚合物 LB 膜的 π -A 曲线

配制 2 mg/mL 的 PMST 的氯仿溶液,轻轻滴加一定体积(20~40 μL)的溶液到 LB 槽子的水面上,挥发掉溶剂,用 Wilhelmy 吊片式膜天平测量膜的表面压力.以 5.0 cm/min 的速率压缩滑障,测定压力-面积曲线(简称 π -A 曲线).图 2 所示为 PMST 的 π -A 曲线,随着膜面积的压缩,膜压增大,膜经历从气态膜(a $\rightarrow$ b)到液态膨胀膜(b $\rightarrow$ c)再到转变膜(c $\rightarrow$ d),最后形成更加紧密排列的液态凝聚膜(d $\rightarrow$ e)^[15];继续增大压力,膜破裂,压力和面积迅速降低.图 2 中 e 点处的压力为崩溃压.

1.2.2 LB 膜的制备

清洗 LB 槽子,注满水,滴加 40 μL 的 PMST 氯仿溶液到水面上,挥发掉溶剂之后,在水温 20.0 $^{\circ}C$ 、恒定压力 35 mN/m 条件下,向洁净的盖玻片上转移 PMST 单分子膜,压膜速率 5 mm/

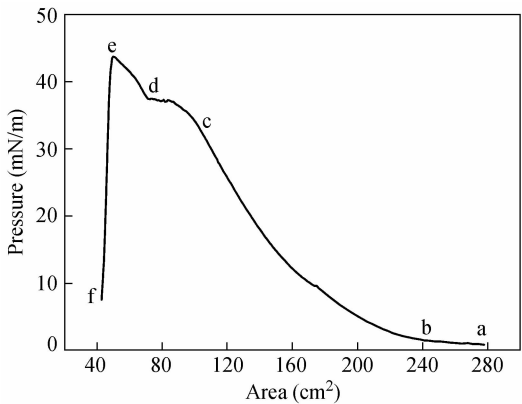


Fig. 2 The π -A curve of PMST polymer (20.0 $^{\circ}C$)

min,拉膜速率 2 mm/min,转移高度 18~20 mm.由于盖玻片表面亲水,在片基下降浸入时 PMST 膜无转移,上升过程中转移第一层到玻璃片基表面.然后再下降浸入时转移第二层,再上升时转移第三层膜,这种膜的结构(沉积方式)为 Y 型^[15].为了 LB 膜的稳定性,每转移一层膜之后等待约 10 min,待压力稳定后再进行拉膜.拉膜过程可从压力-和面积-时间曲线(图 3)上监测.在恒定压力下,转移过程中膜的面积随时间减小表明膜转移成功,如图 3 中 a $\rightarrow$ b、c $\rightarrow$ d、e $\rightarrow$ f 所示;若面积不变则表示没有转移,面积增大则意味着转移到片基上的膜发生了溶解或脱落.

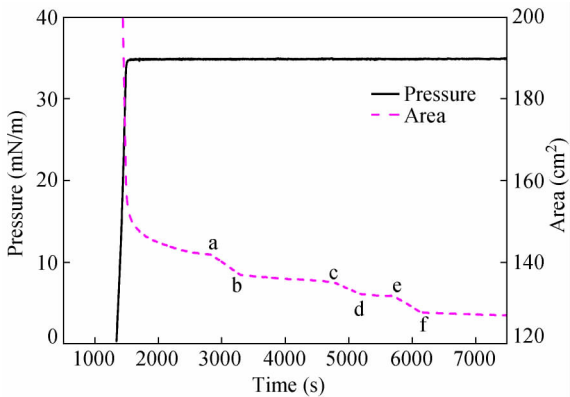


Fig. 3 Pressure- and area-time curves during film transferring process

1.2.3 LB 膜的表征

使用 DCAT21 型表面界面张力仪测试 LB 膜的动态接触角(DCA)来对表面的亲、疏水性质进行表征.对空白盖玻片和不同层数的 LB 膜进行测试,测试条件:以超纯水为润湿介质,测试温度 20 $^{\circ}C$,前进角和后退角的测试速率皆为 0.05 mm/s,表面张力测定阈值 5.00 mg,浸入深度 10.00 mm,连续测

试 3 个循环,测试取点频率为 5.00 Hz.

用原子力显微镜 (AFM) 对空白盖玻片和不同层数的 LB 膜表面进行形貌的观测. 测试条件:室温,敲击式,使用单晶硅针尖在空气氛环境中测试.

2 结果与讨论

2.1 LB 膜的制备

LB 方法制膜操作过程需要在安静、干净的环境中进行,纯净的水对于有序膜的形成很重要,因为环境中的灰尘和气流扰动会破坏膜的规整性. 拉膜的压力、转移速率、水温以及体系 pH 是制膜的关键因素. 拉膜压力过高时,膜处于液态凝聚态,规整性虽好,但容易破裂,不利于转移;压力过低时,膜处于气态或气液过渡态,转移容易,但规整性较差;适当的压力时,膜处于液态膨胀态到液态凝聚态的过渡,规整性好,转移也相对容易. 实验证明,从 π -A 曲线上选取目标压力低于崩溃压大约 5 mN/m 比较恰当. 若膜的转移速率过快,则膜在片基表面的转移率(转移率 = Langmiur 膜减小的面积/片基进入水中的总面积)较低,片基表

面 PMST 各基团的密度较小. 控制拉膜速度在 2 ~ 5 mm/min 可得到较密实的 PMST 膜,其转移率大于 90%. 水温过高不利于聚合物在水面上形成有序的单分子膜,水温过低则膜流动性差^[2],膜的脆性较大、易崩溃. 实验发现,对 PMST 而言,适当的水温为 20 ~ 25 °C. 陈益等^[2]报道,卵磷脂由于带等量正负电荷,在酸性或碱性环境中都难以形成单分子膜,最佳成膜条件是在中性或近中性环境. 而 PMST 有类似卵磷脂的结构(亲水头部皆为 PC 基团,PMST 疏水尾部为十八烷基链),因而在中性环境中成膜较好.

利用 LB 技术在亲水的玻璃片基上能够成功的获得单层、双层和三层 PMST 聚合物膜,而 4 层及其以上的膜则在转移过程中极易出现溶解、脱落现象.

2.2 表面亲、疏水性

采用 LB 方法在玻璃片基上沉积 PMST 聚合物的 LB 膜,在测试接触角的过程中水的表面张力前后没有变化,这表明 LB 膜对水稳定,没有溶解、脱落^[1]. 单层、双层、三层膜及玻璃片基的接

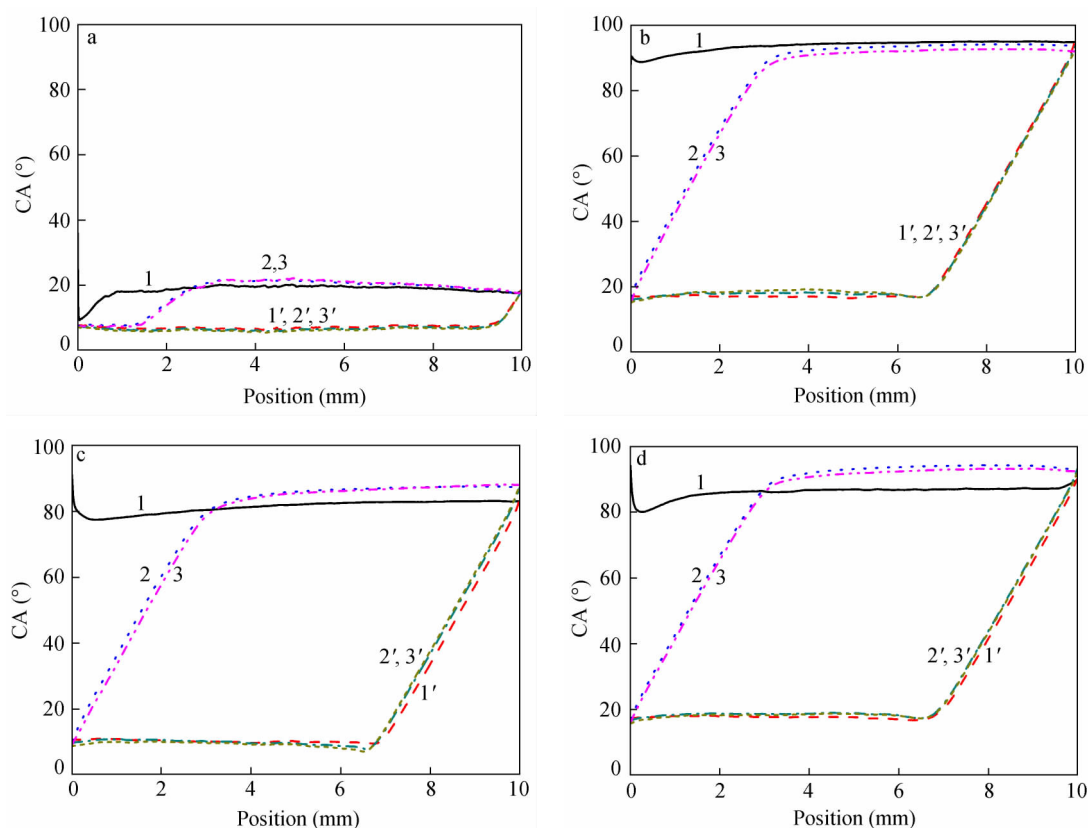


Fig. 4 Dynamic contact angles testing cycles of different layers LB films of PMST polymer: (a) cover glass, (b) monolayer film, (c) bilayer film and (d) trilayer film

The numbers in figures represent the testing cycles: 1, 2, 3 refer to the advancing process, and 1', 2', 3' refer to the receding process

触角测试结果如图 4 和表 1 所示. 洁净的盖玻片的前进角(θ_A)、后退角(θ_R)及滞后角($\theta_H = \theta_A - \theta_R$)都较小, 这表明玻璃表面亲水性良好. 有 PMST 聚合物 LB 膜的盖玻片, 其表面的 θ_A 、 θ_R 及 θ_H 显著增大, 这表明 LB 膜制备成功. 单层膜和三层膜的 θ_A 和 θ_R 基本相同, 皆高于双层膜的 θ_A 和 θ_R , 可见单层和三层膜的疏水性比双层膜要强. 较大的 θ_H 表明表面结构在气相/水相界面上存在基团取向^[4], 在气相中疏水烷基链向外取向, 而在水相中亲水的 PC 基团向外取向, 这是由 PMST 聚合物的柔性和两亲性所致. 结合 LB 膜的制备过程可知, 单层和三层膜中疏水的烷基链向外取向, 因而疏水性较强; 而双层膜中亲水的 PC 基团向外取向, 亲水性相对较好.

Table 1 The contact angles of different layers LB films on surfaces

Surface	$\theta_A(^{\circ})$	$\theta_R(^{\circ})$	$\theta_H(^{\circ})$
	1 st ; 2 nd ; 3 rd	1 st ; 2 nd ; 3 rd	1 st ; 2 nd ; 3 rd
Virgin cover glass	19; 21; 21	6; 6; 6	13; 15; 15
Monolayer film	95; 93; 92	19; 19; 20	76; 74; 72
Bilayer film	83; 86; 86	10; 10; 10	73; 76; 76
Trilayer film	87; 92; 93	19; 19; 19	68; 73; 74

PMST 聚合物 LB 膜在 DCA 测试过程中表面结构的变化如图 5 所示. 由于可交联三甲氧基硅基团的交联作用, LB 膜中亲疏水基团的取向作用受限, 因而 DCA 测试第一、二循环的前进角有差异. 在空气中, 疏水的烷基链趋向于在膜层表面取向, 以降低膜层的表面能, 因而双层 LB 膜未能按照预期的 Y 型沉积方式形成亲水的 PC 基团完全靠外取向的结构. 由 DCA 结果可知, 双层 LB 膜表面仅部分 PC 基团向外取向. 然而, 随着接触水的次数增加, 膜层中亲疏水取向的不断进行, 单层膜、双层膜和三层膜的前进角逐渐趋于一致; 同时聚合物链通过 Si—O—Si 键相互交联或被“粘接”到片基表面, 使膜层不会从片基表面溶解、脱落.

2.3 表面形貌

PMST 聚合物的 LB 膜在测试 DCA 之前和之后的表面形貌用 AFM 观测, 如图 6 所示. 空白盖玻片表面(图 6(a))除个别的灰尘污染点外, 为细小、致密的平整结构. 测试 DCA 之前的单层、双层、三层膜表面(图 6(b)、6(d)、6(f))有 30 ~ 60 nm 均匀分布的岛状结构, 表面粗糙度和表面颗粒的大小随着膜层数的增多而增大. PMST 聚合物

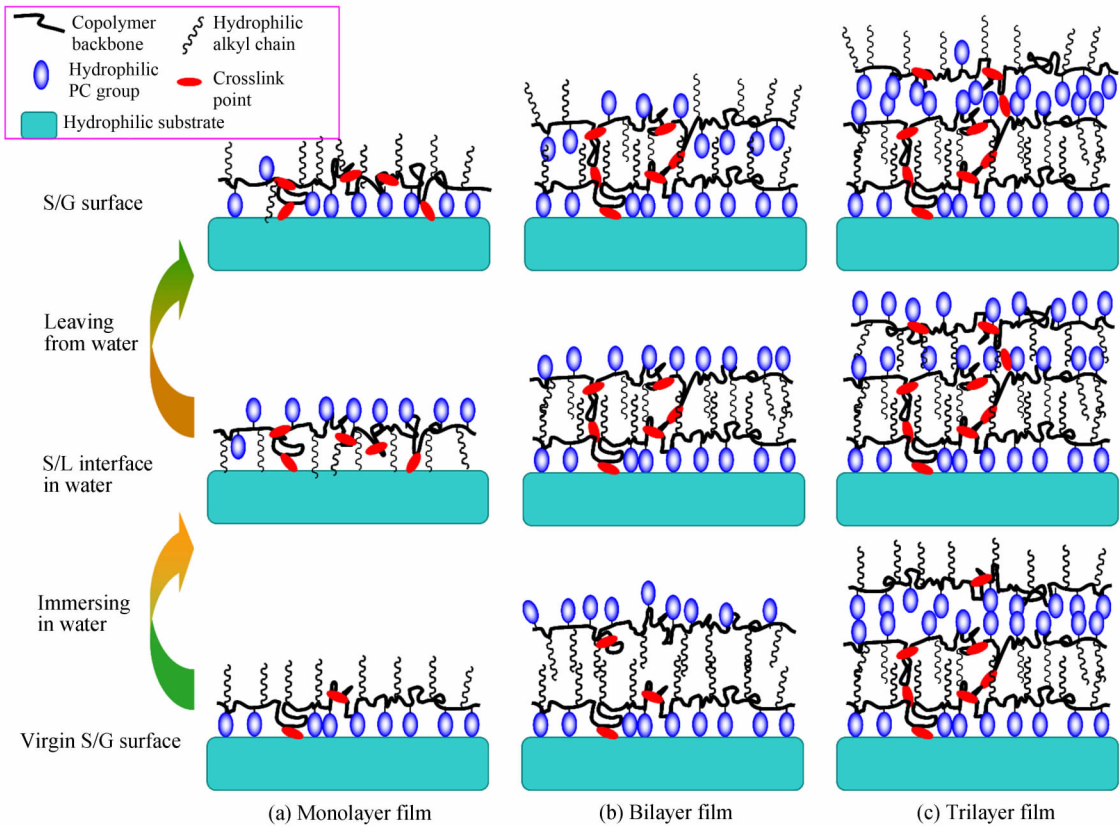


Fig. 5 Schematic illustration of the surface and interface structures of PMST polymer LB films corresponding to the process of dynamic contact angles testing

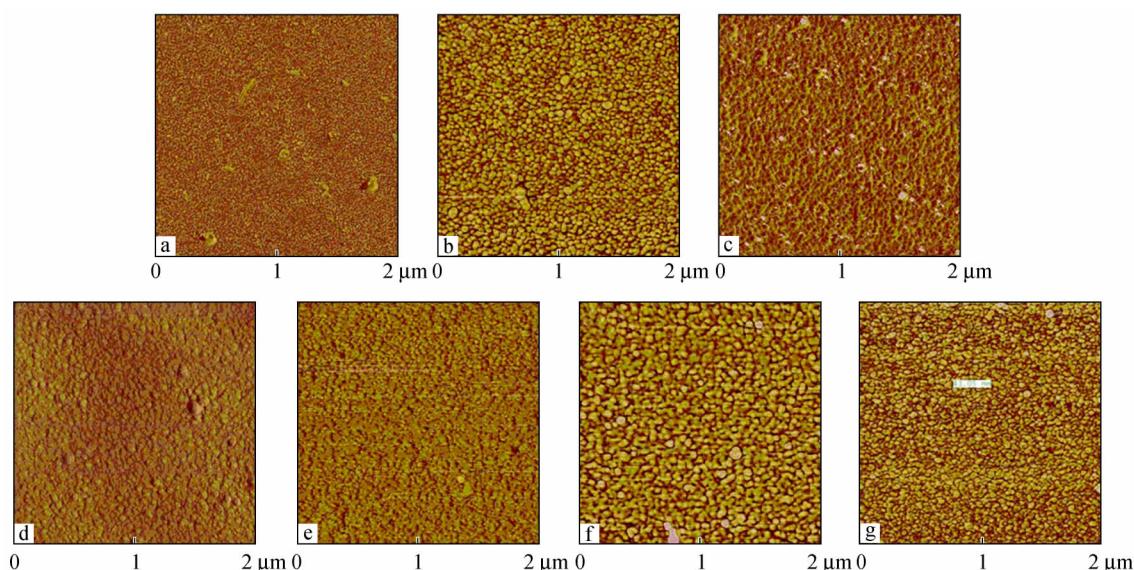


Fig. 6 The AFM phase images of different layers LB films of PMST polymer in air phase: (a) virgin glass surface, (b) monolayer film, (c) monolayer film after DCA measurement, (d) bilayer film, (e) bilayer film after DCA measurement, (f) trilayer film and (g) trilayer film after DCA measurement (The white pink particles in figures are dust particles.)

LB 膜表面形貌与盖玻片表面的显著差别表明 LB 膜制备成功. 单层和三层膜表面颗粒的边界清晰、污染的灰尘颗粒也较多; 双层膜表面颗粒的边界相对模糊、灰尘颗粒较少. 单层和三层膜疏水基团在外, 与细胞外层膜结构相反, 容易吸附灰尘; 而双层膜的 PC 基团在外, 具有仿细胞外层膜的结构, 亲水性较好, 吸附空气中的水分形成水合层使得 PMST 聚集结构的轮廓不如单层和三层膜疏水基团在外的结构明显. 在水中测过 DCA 的 LB 膜表面(图 6(c)、6(e)、6(g))趋于平整紧密, 颗粒明显变小, 这很可能是由于测试 DCA 过程中, PMST 膜层内发生了一 $\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ 基团的水解、缩合反应所致.

3 结论

本文报道了用两亲性无规共聚物制备仿细胞外层膜结构的 LB 膜的方法. 通过研究无规共聚物 PMST 单分子膜的 π -A 曲线确定了 LB 方法的制备条件, 并成功制备了含细胞外层膜磷酰胆碱基团无规共聚物的单层、双层和三层薄膜. 通过动态接触角和原子力显微镜测试研究了聚合物膜在水相/气相界面的结构调整及表面形貌. 随着堆积层数增加, PMST LB 膜表面聚集结构的尺寸增大. 在水中经前进/后退多次处理后, 不仅明显使 PMST LB 膜聚集结构变小, 也会改变膜层表面的基团取向. 本研究结果对于制备有序的聚合物薄膜及用于生物材料仿细胞外层膜结构表面改性有指导意义.

REFERENCES

- 1 Yang Shan(杨珊), Wang Yanbing(王彦兵), Zong Mingming(宗明明), Gong Ming(宫铭), Ma Jiani(马佳妮), Gong Yongkuan(宫永宽). Chem J Chinese Universities(高等学校化学学报), 2012, 33(7): 1579 ~ 1585
- 2 Chen Yi(陈益), Sun Runguang(孙润广). Chinese J Liquid Crystals and Displays(液晶与显示), 2006, 21(4): 357 ~ 362
- 3 Yang Shan(杨珊), Yang Zhanxian(杨占娴), Gong Yongkuan(宫永宽). J Functional Materials and Devices(功能材料与器件学报), 2012, 18(5): 371 ~ 376
- 4 Gong M, Yang S, Ma J N, Zhang S P, Winnik F M, Gong Y K. Appl Surf Sci, 2008, 255(2): 555 ~ 558
- 5 Gong M, Dang Y, Wang Y B, Yang S, Winnik F M, Gong Y K. Soft Matter, 2013, 9(17): 4501 ~ 4508
- 6 Ye S H, Jang Y S, Yun Y H, Shankarraman V, Woolley J R, Hong Y, Gamble L J, Ishihara K, Wagner W R. Langmuir, 2013, 29(26): 8320 ~ 8327
- 7 Iwasaki Y, Matsumoto A, Yusa S. ACS Appl Mater Interfaces, 2012, 4(6): 3254 ~ 3260

- 8 Lv J A, Ma J N, Huangfu P B, Yang S, Gong Y K. *Appl Surf Sci*, 2008, 255 (2): 498 ~ 501
- 9 Gong Yongkuan (宫永宽), Winnik F M. *Acta Chim Sinica* (化学学报), 2005, 63 (7): 643 ~ 647
- 10 Kyomoto M, Ishihara K. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2009, 1 (3): 537 ~ 542
- 11 Chen J, Nho Y C, Hoffman A S. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004, 15 (7): 841 ~ 849
- 12 Wang N, Trunfio-Sfarghiu A M, Portinha D, Descartes S, Fleury E, Berthier Y, Rieu J P. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 108: 285 ~ 294
- 13 Yang S, Wang Y B, Gong M, Gong Y K. *Adv Mater Res*, 2011, 311-313: 1630 ~ 1633
- 14 Wang Y B, Gong M, Yang S, Nakashima K, Gong Y K. *J Membrane Sci*, 2014, 452: 29 ~ 36
- 15 Girard-Egrot A P, Blum L J. Langmuir-Blodgett technique for synthesis of biomimetic liquid membranes. In: Martin D, ed. *Fundamental Biomedical Technologies* (Vol 1), New York: Springer US, 2007. 23 ~ 74
- 16 Qiao Jinjing (乔进京), Sun Runguang (孙润广), Hao Changchun (郝长春), Yang Jing (杨静), Ma Xiuzi (马秀梓), Wang Xiaomei (王小梅). *Chem J Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2013, 34 (9): 2125 ~ 2130
- 17 Jiao T, Leca-Bouvier B D, Boullanger P, Blum L J, Girard-Egrot A P. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects*, 2010, 354 (1-3): 284 ~ 290
- 18 Liu Q, Wang F, Qiao Y, Zhang S, Ye B. *Electrochim Acta*, 2010, 55: 1795 ~ 1800
- 19 Zheng Huajing (郑华靖), Jiang Yadong (蒋亚东), Xu Jianhua (徐建华), Yang Yajie (杨亚杰). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 2010, (8): 1043 ~ 1049
- 20 Xu Zhikang (徐志康), Xu Youyi (徐又一). *Functional Polymer* (功能高分子学报), 1993, 6 (1): 82 ~ 96
- 21 Bian Fenglan (边凤兰), Yang Yi (杨毅), Huang Jinman (黄金满), Gao Qian (高倩), Gao Mingyuan (高明远), Shen Jiacong (沈家骢). *Acta Polymerica Sinica* (高分子学报), 1994, (6): 736 ~ 740

Preparation of a Copolymer Film with Cell Outer Membrane Mimetic Structure by Langmuir-Blodgett Method

Shan Yang^{1, 2, 3}, Ming Gong^{2, 4}, Yong-kuan Gong^{2*}

(¹ School of Materials Science and Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

(² College of Chemistry & Materials Science, Northwest University, Xi'an 710069)

(³ College of Chemistry and Life Science, Weinan Normal University, Weinan 714099)

(⁴ School of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054)

Abstract The Langmuir-Blodgett (LB) technique was used to prepare thin films with cell outer membrane mimetic structure on the surface of cover glass. A crosslinkable amphiphilic random copolymer PMST, which was synthesized with acrylate monomers 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), stearyl methacrylate (SMA) and 3-trimethoxysilylpropyl methacrylate (TSMA) by free radical polymerization in solution, was applied to prepare the monolayer, bilayer, and trilayer LB films according to the Y-type deposition mode. The surface hydrophilicity and surface morphology were measured by dynamic contact angles (DCA) and atomic force microscope (AFM) methods. The PMST polymer formed a dense and regular film on the surface of the cover glass, and the density of film increased with the number of layers. The surface hydrophilicity of monolayer and trilayer film was similar, and the bilayer was better than them in hydrophilicity. The difference can be attributed to the different surface structure: the bilayer film has the cell outer membrane mimetic structure and the other two have a reversed structure of the cell outer membrane. Once it contacts with water, the film surface structure will change as a result of the migration and reorientation of surface groups at the gas/water interface.

Keywords Phosphorylcholine, LB film, Contact angle, Surface modification, Biomaterials

* Corresponding author: Yong-kuan Gong, E-mail: gongyk@nwu.edu.cn