

·研究简报·

具有内皮细胞选择性的细胞膜仿生支架材料的研究*

魏 雨 纪 璿 肖琳琳 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 AIBN 引发自由基反应,由单体 2-(甲基丙烯酰氧基)乙基-2-(三甲基氨基)乙基磷酸酯(MPC)、甲基丙烯酸十八酯(SMA)、对硝基苯氧羰基聚乙二醇甲基丙烯酸酯(MEONP)合成了一种新型类细胞膜仿生涂层材料。MPC 可以阻抗非特异性吸附;MEONP 可以结合抗体或多肽促进特异性识别。通过表面固定的方法引入多肽序列 Arg-Glu-Asp-Val (REDV),使涂层具有内皮细胞选择性。核磁、紫外吸收、红外光谱表征证实聚合物的组成以及 REDV 多肽在表面的固定;并通过血浆复钙化实验表征涂层的血液相容性。细胞黏附与增殖实验反映 REDV 多肽构建的涂层表面具备良好的特异性识别并结合内皮细胞的能力。

关键词 内皮选择性, 支架涂层, 磷酸胆碱, 多肽

新型心血管植入材料的应用已经成为人们战胜心血管疾病的重要手段,然而现有的心血管医用材料还存在包括凝血,术后狭窄等一系列问题^[1,2]。通过功能界面材料实现生物活性分子的固定,原位增强内皮细胞的选择性黏附和竞争性生长,实现血管内皮在植入部位的原位快速愈合,是解决心血管植入材料生物相容性的重要途径之一^[3]。和传统组织工程化单一细胞种植不同,原位捕获要求材料界面具有在人体多细胞复杂环境中高选择性捕获特定细胞的功能。通过对功能界面材料组成和结构的设计,实现复杂环境中的细胞选择性黏附是构建内皮原位捕获功能界面材料的关键问题^[4]。

磷酸胆碱(PC)是一种具有仿细胞膜结构的化合物,基于 PC 基的各类聚合物不仅可有效改善材料的血液相容性,而且可有效实现对包括蛋白质,血小板和细胞的非特异性阻抗,已成为心血管植入材料界面修饰的有效手段之一^[5-10]。本文探索采用自由基共聚的方法将反应性的 MEONP 单体引入 PC 基聚合物,合成了 MPC-SMA-MEONP 三元共聚物。并进一步通过表面固定的方法,引入具有内皮细胞特异性诱导功能的 REDV

活性多肽,探索采用 PC 基聚合物非特异性阻抗和特异性诱导协同作用制备具有内皮细胞选择性功能的心血管涂层材料。

1 试剂与原料

甲基丙烯酸十八酯(SMA)购自 Aldrich 公司,偶氮二异丁腈(AIBN)经无水乙醇重结晶。单体 2-(甲基丙烯酰氧基)乙基-2-(三甲基氨基)乙基磷酸酯(MPC)和对硝基苯氧羰基聚乙二醇甲基丙烯酸酯(MEONP)的合成参照文献[1~13]。三元共聚物的合成以单体 MPC、SMA、MEONP 为单体通过自由基溶液聚合完成。REDV 活性多肽和参比多肽 REVD(序列 Arg-Glu-Val-Asp)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 PMSN 共聚物的合成

PMSN 共聚物的合成路线如图 1 所示。以 AIBN 为引发剂,将反应所需 3 种单体 MPC、SMA 和 MEONP 加入聚合管中,乙醇与四氢呋喃混合作为反应溶剂,除氧、氮气保护下 60℃ 反应 24 h。旋蒸除溶剂,乙醚沉析、过滤、真空干燥。

* 2010-02-26 收稿,2010-05-12 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

doi:10.3724/SP.J.1105.2010.10052

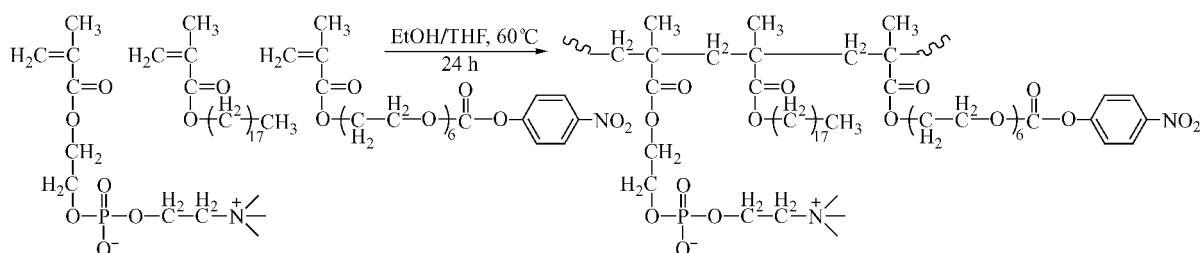


Fig. 1 Reaction scheme for the preparation of MPC-based polymers

3 涂层的制备

涂层的制备以 PET (聚对苯二甲酸乙二酯薄膜) 为基材. 将 50 mg PMSN 加入 10 mL 四氢呋喃中, 配制 5 mg/mL 的 PMSN 的 THF 溶液, 将超声清洗干燥后的洁净 PET 膜切割为 10 mm × 20 mm 的尺寸大小, 用浸涂 (dip-coating) 的方法, 使 PET 表面均匀的涂覆 PMSN 共聚物, 然后匀速提起, 在空气中静置一段时间, 待 THF 挥发后, 重复以上操作 6 次, 真空干燥成膜, 放在真空干燥器中备用.

4 复钙化凝血时间 (PRT)

将已预热至 37°C 的人体抗凝血浆 (已除 Ca^{2+}) 100 μL 和生理盐水 100 μL 依次加入到置于 37°C 恒温水浴中的硅化玻璃试管, 加入已预热的 0.025 mol/L CaCl_2 溶液 100 μL , 同时开动秒表计时. 将一根不锈钢小钩伸入溶液中均匀缓慢地搅动, 并检查是否有纤维蛋白的形成. 记录小钩上刚开始出现丝状物的时间, 此时间即是复钙化凝血时间.

5 细胞培养及荧光染色观察

用含有胎牛血清 10%, 青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RPMI Medium1640 培养基对内皮细胞 HUVEC 进行传代培养^[4].

用含有胎牛血清 10%、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、葡萄糖和谷氨酸盐浓度为 4.5 mg/mL 的 DMEM 高糖培养基对平滑肌细胞 HASMC 进行传代培养^[5].

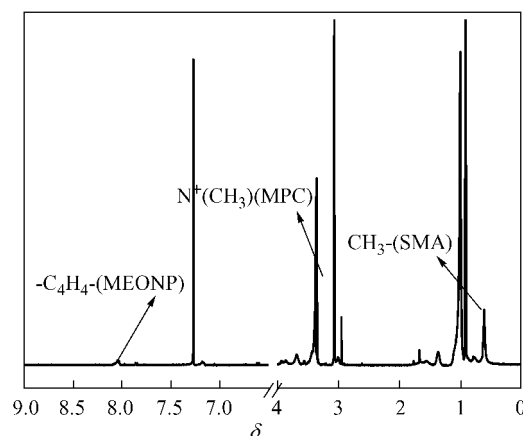
用 2.5% 的胰蛋白酶-EDTA 来消化细胞, 并用含血清培养基分散细胞得到细胞悬液. 将细胞种植在已放入膜片的 96 孔细胞培养板中, 种植密度为 5000/孔, 加入相应培养基, 放入含 5% CO_2 和 95% 空气的培养箱培养.

培养一定时间后, 取出细胞培养板, 每孔加入浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的活细胞染料荧光素二乙酯 (FDA) 20 μL , 在培养箱中静置染色 15 min, 然后吸出培养基, 用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗 6 遍,

20 倍荧光显微镜下观察细胞形态.

6 材料的表征

PMSN 聚合物由 3 部分组成, 亲水的 MPC 单体、疏水的 SMA 单体以及带有活性酯基团的 MEONP 单体. 单体组成及比例可以通过核磁谱图检测, 如图 2 核磁谱图所示. 其中位置为 3.28、0.9 和 8.1 分别为 $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (MPC)、 CH_3 (SMA) 以及 $-\text{CH}$ (MEONP 苯环) 基团中 H 的峰. 利用核磁氢谱上的积分面积的比值可以计算共聚物中 3 种单体的摩尔百分含量之比 $n(\text{MPC}) : n(\text{SMA}) : n(\text{MEONP}) = (I(3.28/9)) : (I(0.90/3)) : (I(8.10/2)) = 14:68:18$. 因此, 由核磁氢谱可以计算出共聚物中各个单体所占的摩尔组成为 $\text{MPC}_{14}\text{SMA}_{68}\text{MEONP}_{18}$, 与投料时的理论摩尔含量 $\text{MPC}_{20}\text{SMA}_{60}\text{MEONP}_{20}$ 相近.

Fig. 2 ^1H -NMR spectrum of PMSN polymer

涂层在水中浸泡不同时间后在 DSA10-MK2 型接触角测试仪 (Kruss) 上测其接触角. 经过计算, PET 的接触角滞后值为 2.7°; 而 PMSN 仿生涂层的接触角滞后值为 46.7°, 明显高于 PET 的接触角滞后值. 这说明界面可能存在一个从疏水表面到亲水表面的转变过程. 涂层表面的静态接触角随时间的变化结果 (图 3) 可反映这一转变过程. 不含 MPC 亲水单体的二元聚合物涂层随着水

化时间的延长,接触角几乎没有变化,始终处于疏水状态;而含有 MPC 单体的共聚物涂层随着水化时间的延长,其接触角逐渐变小,即涂层的亲水性逐渐增加.这是因为,当涂层处于空气界面时(疏水界面),十八烷基会向表面迁移,以降低聚合物/空气界面的自由能;而 PC 基团具有强烈的亲水性,当涂层处于水环境中时,PC 基团会自发的迁移到表面,从而使得聚合物/水界面的自由能达到最低.当仿生涂层在水环境中达到平衡后,涂层的表面会形成一个 PC 基团富集的表面,这种 PC 基团富集的表面对于仿生涂层的生物相容性的改善具有至关重要.

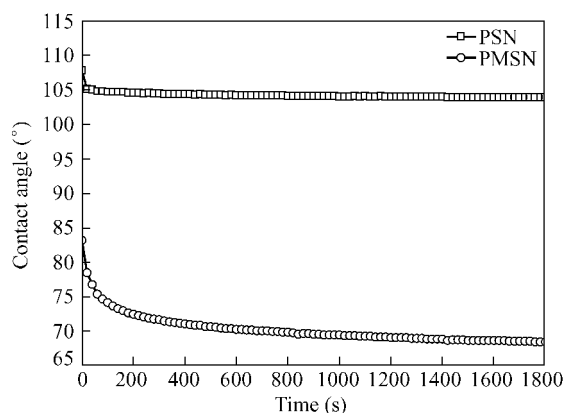


Fig. 3 Changes of static contact angle at polymer/water interface of coatings

7 表面 REDV 多肽的固定

与 REDV 多肽的结合采用表面固定的方法如图 4 所示. 首先将 REDV 多肽溶于 PBS 中,配成 0.2 mg/mL 的溶液. 将聚合物膜片浸入 REDV 的溶液中,4℃ 下静置反应 24 h,将膜片取出用三蒸水冲洗以取出膜片表面的反应产物对硝基苯酚. 然后将膜片放入 BSA(白蛋白)的 PBS 溶液中浸泡 24 h 以除去表面剩余的对硝基苯酯基团. 最后用三蒸水冲洗、氮气吹干备用. 得到具有内皮细

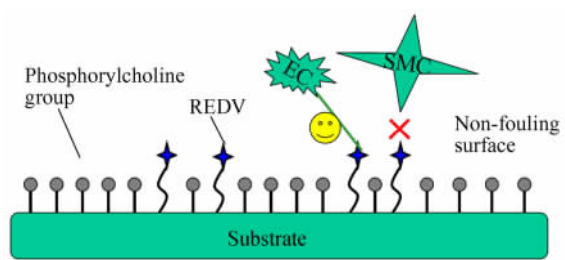


Fig. 4 Schematic illustration of the PMSN surface coated with REDV immobilized via an oxyethylene chain

胞选择性的涂层.

REDV 多肽可以通过氧乙烯链与 MEONP 的活性酯基反应,并生成对硝基苯酚. 通过在石英表面涂膜,并计算石英片浸泡后 REDV 溶液中对硝基苯酚的紫外吸收 (270 nm),可以得到聚合物涂层表面固定的 REDV 多肽的量,约为 31.3 ng/cm².

8 功能涂层的血液相容性和内皮细胞选择性评价

通过生物学的评价,表征了聚合物涂层的生物相容性. 采用空白玻璃管做参照,测定了聚合物涂层的复钙化凝血时间,空白玻璃的复钙化时间为 (200 ± 15) s,而聚合物涂层的复钙化凝血时间为 (331 ± 21) s. 仿生涂层的引入可以明显的延长复钙化凝血时间,具有良好的血液相容性.

研究进一步采用人脐静脉内皮细胞与平滑肌细胞在聚合物表面进行培养增殖,细胞 48 h 增殖结果的荧光形貌照片如图 5 所示. 可以看出,PET 表面细胞相容性很好,HUVEC 与 HASMC 铺展良好,但对内皮细胞和平滑肌细胞没有表现出明显差异. 对照组的 SMA-MPC (PMS) 聚合物涂层修饰界面上只有很少量的内皮细胞与平滑肌细胞,且呈现未铺展的球形,表现出 PC 基聚合物涂层具有良好的非特异性阻抗性能. SMA-MEONP (PSN) 涂层在经过 REDV 修饰后 (PSN-REDV) 内皮细胞和平滑肌细胞的黏附与增殖量均显著升高,但内皮细胞增殖的数量要大于平滑肌细胞. 表明这种内皮细胞的选择性来源于 REDV 多肽的特异性作用. 进一步采用 MPC-SMA-MEONP (PMSN) 固定 REDV (PMSN-REDV) 后,尽管内皮细胞数量和 PSN-REDV 界面基本相同,但界面的平滑肌细胞被显著抑制. 相同界面采用不同氨基酸序列的多肽 REDV 固定后 (PMSN-REVD),HUVEC 与 HASMC 经过 48 h 后的增殖率近似相等,并没有显示出这种选择特性,证明 REDV 对内皮细胞没有特异性黏附作用^[6].

进一步的细胞增殖率统计学数据如图 6 所示. 可以看出,在误差范围内 PMSN-REVD 涂层具有良好的内皮细胞选择性,证明了采用 PC 非特异性阻抗和 REDV 特异性诱导相结合的协同作用可显著提高界面的内皮细胞选择性功能.

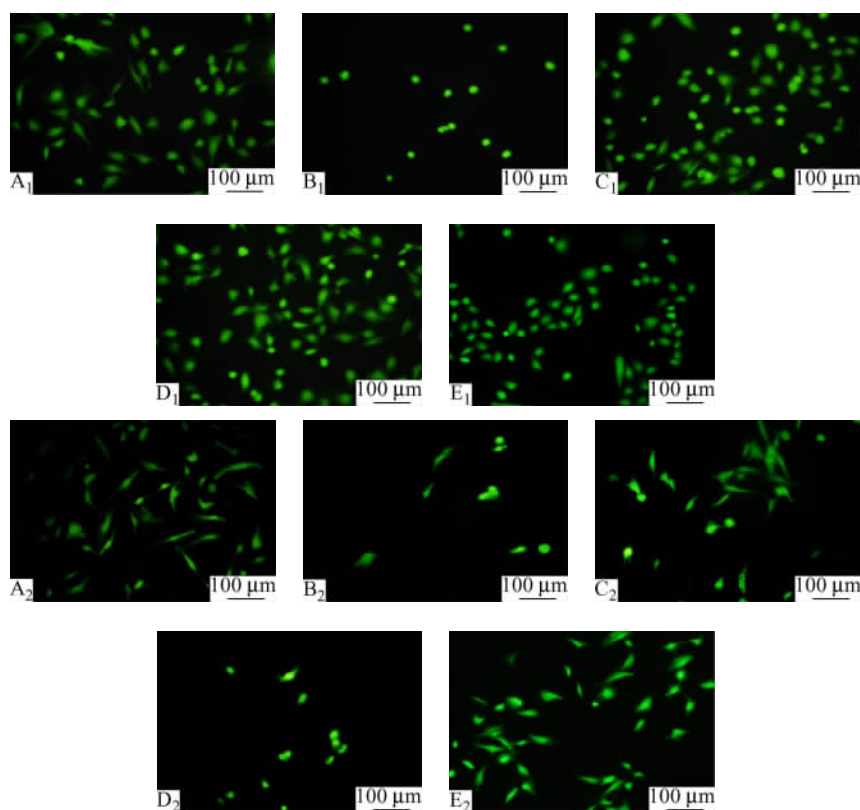


Fig. 5 Fluorescence micrographs of HUVEC (1) and HASMC (2) adhered on PET (A), PMS (B), PSN-REDV (C), PMSN-REDV (D) and PMSN-REDV (E) at $\times 20$ after 48 h incubation, respectively

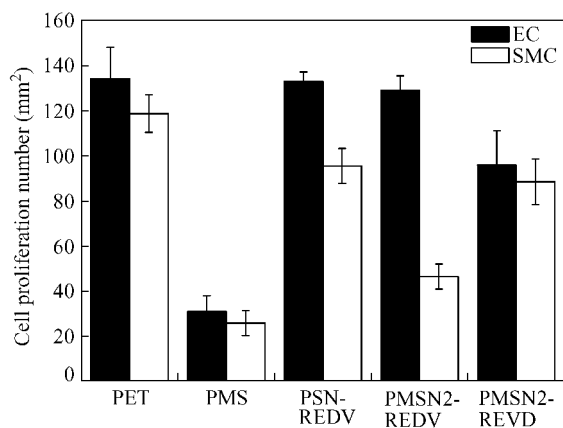


Fig. 6 Proliferation results of HUVECs and HASMCs attached to surfaces for 48 h incubation

9 结论

以上研究结果表明,基于 MPC 构建的三元共聚物表面具有阻抗非特异性吸附和特异性识别的双重功能,接触角数据和复钙化时间表明涂层具有很好的亲水性和良好的血液相容性,在聚合物涂层表面引入具有特异性识别内皮细胞的 REDV 多肽,可以实现涂层的内皮细胞选择性. 细胞数据显示,这种表面固定多肽的涂层在阻抗平滑肌细胞生长的同时,可以有效促进内皮细胞的黏附与增殖,为构建内皮细胞选择性功能界面提供了实验依据. 这种具有内皮细胞高选择性的表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,在新型血管原位快速内皮化支架涂层方面具有诱人的应用前景.

REFERENCES

- 1 Lüscher T F, Steffel J, Eberli F R, Joner M, Nakazawa G, Tanner F C, Virmani R. Circulation, 2007, 115: 1051 ~ 1058
- 2 Deamon J, Wenaweser P, Tsuchida K, Abrecht L, Vaina S, Morger C, Kukreja N, Jüni P, Sianos G, Hellige G, Domburg R T, Hess O M, Boersma E, Meier B, Windecker S, Serruys P. Lancet, 2007, 369: 667 ~ 678
- 3 Avcı-Adalı M, Paul A, Ziemer G, Wendel H P. Biomaterials, 2008, 29: 3936 ~ 3945
- 4 Cho S W, Lim J E, Chu H S, Hyun H J, Choi C Y, Hwang K C, Yoo K J, Kim D I, Kim B S. J Biomed Mater Res, 2006, 76A: 252 ~ 263

- 5 Li G Z, Cheng G, Xue H, Chen S F, Zhang F B, Jiang S Y. *Biomaterials*, 2008, 29: 4592 ~ 4597
- 6 Chen Y W, Chen N C, Qiu Z, Wang L J, Wan C X, Luo X L, Li S M. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 413 ~ 420
- 7 Feng W, Brash J L, Zhu S P. *Biomaterials*, 2006, 27: 847 ~ 855
- 8 Xu Fangming (徐方明), Xu Jianping (徐建平), Ji Jian (计剑), Shen Jiacong (沈家骢). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2008, (10): 1006 ~ 1009
- 9 Su Y L, Li C, Zhao W, Shi Q, Wang H J, Jiang Z Y, Zhu S P. *J Membrane Science*, 2008, 322: 171 ~ 177
- 10 Jia Lan (贾兰), Xu Jianping (徐建平), Ji Jian (计剑), Shen Jiacong (沈家骢). *Acta Polymerica Sinica (高分子学报)*, 2008, (11): 1108 ~ 1112
- 11 Ishihara K, Ueda T, Nakabayashi N. *Polym J*, 1990, 22: 355 ~ 360
- 12 Konno T, Watanabe J, Ishihara K. *Biomacromolecules* 2004, 5: 342 ~ 347
- 13 Park J, Kurosawa S, Watanabe J, Ishihara K. *Anal Chem*, 2004, 76: 2649 ~ 2655
- 14 Wang D A, Feng L X, Ji J, Sun Y H, Zheng X X, Elisseff J H. *J Biomed Mater Res*, 2003, 65A: 498 ~ 510
- 15 Han Y L, Cui J F, Tao J, Guo L, Guo P, Sun M Y, Kang J, Zhang X L, Yan C H, Li S H. *Experimental Cell Research*, 2009, 315: 3301 ~ 3311
- 16 Heilshorn S C, DiZio K A, Welsh E R, Tirrell D A. *Biomaterials*, 2003, 24: 4245 ~ 4252

CONSTRUCTION OF BIOMIMETIC POLYMER SURFACE FOR ENDOTHELIAL CELL SELECTIVITY

WEI Yu, JI Ying, XIAO Linlin, JI Jian

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

Abstract This paper aimed to describe a bioactive polymer biointerface for endothelial cells specifically recognition. In particular, biomembrane mimetic polymers with a phospholipid group were designed. A phospholipid polymer-poly [2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)-co-n-stearyl methacrylate (SMA)-co-p-nitrophenyloxycarbonyl poly(ethylene glycol) methacrylate (MEONP)] (PMSN) was synthesized using AIBN as an initiator and coated on substrate (PET) by solvent evaporation. MPC unit could reduce nonspecific adsorption such as platelet, protein and cells. MEONP unit contains active ester groups on the side chains for immobilization of antibody or peptide such as REDV. The peptide sequence Arg-Glu-Asp-Val (REDV) was known to bind preferentially to endothelial cells. As a result, MEONP units could conjugate REDV and enhance the specific endothelial cells adsorption. HNMR, UV and FTIR spectrum were used to characterize the composition of polymer and immobilization of REDV peptide. Plasma recalcification time (PRT) was detected to show the hemocompatibility of polymer coating. Cell adhesion and proliferation experiments showed excellent specific recognition of endothelial cells on biomimetic coatings. Many endothelial cells were observed and the number of endothelial cells adhering to the PMSN polymer surfaces increased but cell adhesion was markedly reduced on poly (MPC-co-SMA) (PMS). For smooth muscle cells (SMC), many adherent cells were observed and well spread on PET but little on PMS and PMSN by the reason of nonspecific adhesion of MPC for smooth muscle cells. In conclusion, MEONP units and MPC units of PMSN are important for supporting ECs and for reducing SMCs. The PMSN-coated surface was suitable for biorecognition and preservation of cell function. The biomembrane mimetic phospholipid polymer produced an excellent prospect in cardiovascular stent coating.

Keywords Endothelial cell selectivity, Stent coating, MPC, REDV peptide