

成骨细胞在表面酰胺化聚乳酸膜上的黏附和增殖行为

田冶^{1,2}, 王迎军^{1,2}, 周长忍³, 曾庆慧³, 谭炯馨⁴

(1. 华南理工大学教育部特种功能材料实验室, 2. 材料科学与工程学院, 广州 510640;
3. 暨南大学材料科学与工程系, 广州 510630; 4. 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510006)

摘要 利用紫外光接枝聚合丙烯酸酰胺 (Acrylic amide, AAm) 获得表面酰胺化的聚乳酸 (PLA) 膜, 并考察了成骨细胞在酰胺化表面的黏附和增殖行为. 结果表明, 酰胺基的引入改善了 PLA 膜的表面亲水性, 其表面水接触角由 78° 减少到 56°, 自由能由 42.7 mJ/m² 增大到 51.4 mJ/m²; 与对照组相比, 成骨细胞在改性表面培养 3 d 后有大量的丝状伪足伸出, 并且较快地进入了细胞分裂期, 表明 PLA 膜表面的酰胺化能够促进细胞的黏附和增殖.

关键词 聚乳酸; 酰胺化表面; 接枝聚合; 黏附和增殖

中图分类号 O631; O647.11

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)12-2491-05

生物材料的细胞亲和性与其表面性质, 如表面形貌、表面自由能、表面亲疏水性和表面电荷等因素有关^[1-4]. 目前用于组织工程的高分子聚合物, 如 PLA 和 PLGA 等聚酯类材料, 虽然具有优良的机械强度、化学稳定性、可吸收性及环境可降解性, 但这类材料呈惰性的表面没有可供细胞进行识别的特定位置信息, 即缺乏识别位点, 使其不具备细胞外基质的良好细胞相容性, 成为制约其作为理想组织工程支架材料的主要障碍之一.

对 PLA 类材料进行表面改性, 在赋予材料表面良好的细胞相容性的同时, 又可以保留材料本体的性质, 对于促进其在生物材料中的应用具有十分重要的意义. 目前研究的重点集中于将其与具有生物活性的天然高分子如胶原和壳聚糖等复合, 从而改善其细胞亲和性^[5-7]. 但这类方法接枝率较低, 并且天然高分子材料存在的性质不稳定和免疫原性等问题, 将会对后续实验产生影响. 研究表明, 在材料表面单纯引入极性基团, 也能够有效地促进细胞的黏附和增长^[8-10]. 对多种含氮基团与细胞的相互作用的研究结果表明, 所有处理过的表面都支持细胞的黏附和生长, 其中又以酰胺单体处理的表面最好^[11]. 本文通过紫外光接枝技术, 采用无毒的过氧化氢作为光氧化剂代替传统的光敏剂, 引发丙烯酸酰胺单体在 PLA 膜上的接枝聚合, 获得表面酰胺化的 PLA 膜 (PLA-CONH₂), 利用原子力显微镜和流式细胞仪等对成骨细胞在改性后 PLA 膜表面的黏附与增长行为进行了研究.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

聚乳酸 ($M_w = 10^6$), 山东省医疗器械研究所; 丙烯酰胺, A. R. 级, 美国 Sigma 公司.; 过氧化氢, A. R. 级, 广州化学试剂厂; 成骨细胞, 暨南大学生物材料研究室提供. 法国 Vilber Lourmat 公司 BLX-E312 紫外光联仪; 德国 Bruker 公司 EQUINO55 红外光谱仪; 美国 Thermo 公司 AutoProbe CP 原子力显微镜; 美国 Beckman-Coulter 公司 COULTER EPICS XL 流式细胞仪.

1.2 酰胺化 PLA 膜的制备

将 PLA 配成质量分数为 2% 的三氯甲烷溶液, 采用溶液浇铸法在硅片上常温常压下缓慢挥发成

收稿日期: 2009-03-27.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 50732003, 50830101, 50803018) 和广东省自然科学基金 (批准号: 4205786) 资助.

联系人简介: 周长忍, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物医用材料方面研究. E-mail: tcz9@jnu.edu.cn

膜,再真空干燥 48 h,放入干燥器中备用.

将 PLA 膜浸入放有 5 mL 体积分数为 30% 的过氧化氢溶液的石英管中,将石英管置于紫外交联仪中,在常温下紫外光辐照 30 min 进行光氧化,然后用少量蒸馏水漂洗以除去 PLA 膜表面游离的过氧化氢分子.

将光氧化后的 PLA 膜浸入放有 5 mL 质量分数为 3% 的单体溶液的石英管中,预热至 40 °C,将石英管置于紫外交联仪中,紫外光辐照 30 min 进行接枝聚合反应.

接枝反应结束后将膜取出,用大量蒸馏水反复冲洗浸泡 48 h,以除去未反应的单体及反应中产生的均聚物,洗涤后的材料真空干燥后备用.

1.3 酰胺化 PLA 膜的表面性能表征

以未经处理的 PLA 膜为对比,采用衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)对酰胺化 PLA 膜的表面化学结构进行分析.

在保持温度为 28 °C,湿度为 65% 的条件下,以去离子水为介质,测定 PLA 膜的表面接触角,取 5 次测定的平均值;通过测定去离子水和二碘甲烷(CH₂I₂)的接触角,以调和平均法计算得到表面自由能,其计算公式如下^[12]:

$$(1 + \cos\theta_1)\gamma_1 = 4[\gamma_1^d \times \gamma_s^d / (\gamma_1^d + \gamma_s^d) + \gamma_1^p \times \gamma_s^p / (\gamma_1^p + \gamma_s^p)] \quad (1)$$

$$(1 + \cos\theta_2)\gamma_2 = 4[\gamma_2^d \times \gamma_s^d / (\gamma_2^d + \gamma_s^d) + \gamma_2^p \times \gamma_s^p / (\gamma_2^p + \gamma_s^p)] \quad (2)$$

式中, γ^d 为色散分量; γ^p 为非色散分量; γ_s 为表面自由能; θ_1 为水接触角; θ_2 为二碘甲烷接触角.在水中, $\gamma_1 = 72.8 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_1^d = 22.1 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_1^p = 50.7 \text{ mJ/m}^2$;在二碘甲烷中, $\gamma_2 = 50.8 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_2^d = 44.1 \text{ mJ/m}^2$, $\gamma_2^p = 6.7 \text{ mJ/m}^2$.

1.4 细胞亲和性评价

将培养 12 h 和 5 d 的成骨细胞消化后,轻轻吹打使细胞分散成单细胞悬液,在倒置显微镜下用血球计数板计数,平行 4 个孔,则细胞的相对黏附率和增殖率为

$$\text{相对黏附率}(\%) = (\text{材料表面的细胞黏附数} / \text{空白板上的细胞数}) \times 100\%$$

$$\text{增殖率}(\%) = (\text{培养 5 d 的细胞数} / \text{12 h 黏附细胞数}) \times 100\%$$

利用原子力显微镜对培养 3 d 后的成骨细胞进行形态观察,测定前细胞用质量分数为 2.5% 的戊二醛于 4 °C 固定过夜;图像采取接触模式成像,图像的采集采用该仪器配置的软件.实验采用 100 μm 扫描器,UL20D 硅探针(微悬臂长 85 μm ,力常数 0.58 N/m,针尖曲率半径约为 10 nm).

将培养 3 d 的细胞进行消化,调整细胞浓度为 $5.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ Cell/mL}$,吸取 1 mL 细胞悬液,加入 1 mL 温度为 4 °C 的 PBS,于 1000 r/min 条件下离心 5 min,去除上清液,加入 300 μL 含 10% 血清的 PBS,吹散细胞后缓慢加入 100 μL 温度为 -20 °C 的无水乙醇,振荡溶液,有白色沉淀析出,于 4 °C 静置 30 min 以上,轻轻摇匀溶液,再加入 1 mL PBS,以 1000 r/min 离心 5 min 后去除上清液,再加入 PBS,摇匀,重复上述步骤 2 次后去除上清液,加入 300 μL 包含 RNAaseA 的 PI 染液,PI 染液终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,RNAaseA 终浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$,轻轻摇匀后,避光反应 30 min.采用流式细胞仪检测细胞周期.

2 结果与讨论

2.1 PLA 膜表面的化学结构

利用无毒的过氧化氢作为光氧化剂取代光引发剂能够有效地在材料表面产生过氧键,从而引发单体在材料表面的接枝聚合^[13].图 1 为改性前后 PLA 膜的红外光谱图.接枝前后的 PLA 膜在 2800 ~ 3000 cm^{-1} 处都存在一个尖锐的吸收峰,这是由分子链中甲基、亚甲基和次甲基中的 C—H 伸缩振动所引起的;所有样品在 1750 cm^{-1} 处也均有一强的吸收峰,为分子链中的酯键羰基特征吸收峰.而在 PLA-CONH₂ 谱图中,分别在 1650 和 1630 cm^{-1} 处出现了 2 个新峰,分别对应于酰胺基上的 C=O 伸缩振动峰和 N—H 键的面内弯曲伸缩振动吸收峰,而在 3000 ~ 4000 cm^{-1} 范围,PLA-CONH₂ 还有一明显的

宽峰, 对应于酰胺基上的 N—H 的伸缩振动吸收峰. 由此可以证明, 通过接枝反应在 PLA 膜表面实现了酰胺化.

2.2 PLA 膜表面的亲/疏水性及表面自由能变化

材料表面的亲疏水平衡和表面自由能与材料的细胞相容性有密切的关系. 本文首先通过静态水接触角测定法对 PLA 膜接枝前后的表面亲/疏水性的变化进行了表征. 由表 1 可见, 未处理的 PLA 膜的水接触角为 78° , 为典型的疏水性物质, 这是因为 PLA 类聚酯高分子链上具有大量疏水的酯键, 并且其侧基缺少极性基团, 而接枝 AAm 后的 PLA 膜的表面接触角下降为 56° , 其亲水性得到一定的提高. 进一步对 PLA 膜的表面自由能变化进行计算, 结果表明, 改性后 PLA 膜的表面自由能由 42.7 mJ/m^2 增大到 51.4 mJ/m^2 . 材料的表面自由能由色散分量(非极性组分)和非色散分量(极性组分)两部分组成, 而表 1 中自由能的增大主要是由它的非色散分量显著提高所致, 其色散分量甚至稍有下降, 非色散分量的显著提高说明了接枝后材料表面的极性组分得到提高. 由极性组分含量 X_p ($X_p = r_p^d/r_s$) 结果可见, 表面自由能中 X_p 由 33% 上升到 53%. 表明酰胺基极性基团的引入提高了 PLA 膜的表面亲水性和表面自由能.

Table 1 Change of hydrophilicity/hydrophobicity and free energy of PLA film before and after grafting

Group	$\theta(\text{H}_2\text{O})/(\text{^\circ})$	$\theta(\text{CH}_2\text{I}_2)/(\text{^\circ})$	$\gamma_s/(\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$\gamma_s^d/(\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$\gamma_s^d/(\text{mJ} \cdot \text{m}^{-2})$	$X_p (X_p = r_p^d/r_s)$
PLA	78	44	42.7	14.1	28.6	0.33
PLA-CONH ₂	56	40	51.4	27.2	24.2	0.53

2.3 细胞黏附率及增殖率测定

图 2 为成骨细胞在 PLA 膜及表面酰胺化 PLA 膜上的黏附与增殖情况. 由图 2 可见, 引入酰胺基能够显著促进成骨细胞在 PLA 膜表面的黏附与增殖, 与未处理的 PLA 膜相比, 在酰胺化表面, 成骨细胞的相对黏附率由 81.7% 增大到 92.2%, 而增殖率由 260.4% 增大到 387.4%. 酰胺基对细胞黏附与增殖性能改善的贡献主要有以下两方面: (1) 极性基团的引入在一定程度上提高了材料的表面亲水性, 亲水性的表面对与细胞黏附与增殖有关的蛋白吸附力较弱, 使蛋白比较容易伸缩, 结构重组形成纤维状结构, 而这种蛋白结构更适合细胞的黏附与生长; (2) 培养基中还含有大量阳离子物质, 而酰胺基带有微弱的负电荷, 能够很好地吸附这些物质. 通过蛋白质吸附层及阳离子的媒介作用, 使得细胞能够在带负电荷的材料表面良好生长^[14].

2.4 细胞形态观察

与细胞黏附和生长密切相关的各类蛋白质中均含有大量的酰胺基. 为进一步考察酰胺化表面对成骨细胞生长的影响, 采用 AFM 技术对培养 3 d 后的成骨细胞的微观形态进行观察. 利用 AFM 技术观察细胞的优点在于 AFM 不受样品导电性的影响, 对细胞的前期处理相对较简单, 仅需对细胞进行固定, 因而能够较好的保持细胞原有形态; 另外, AFM 的高分辨率可对细胞纳米尺度结构进行观察^[15]. 图 3 为在 PLA 膜表面和酰胺化 PLA 膜表面上生长的单个成骨细胞的形态, 细胞突起处局部放大及其三维立体图. 可见, 在 PLA-CONH₂ 膜上生长的细胞突起处有丰富的丝状伪足伸出, 这些丝状伪足有利于细胞在材料表面的黏附和铺展, 而在 PLA 膜上的细胞突起处伸出的丝状伪足较少. 由此可见, 酰胺基的引入刺激了细胞丝状伪足的大量生长, 从而在一定程度上改善了细胞的黏附与铺展性能.

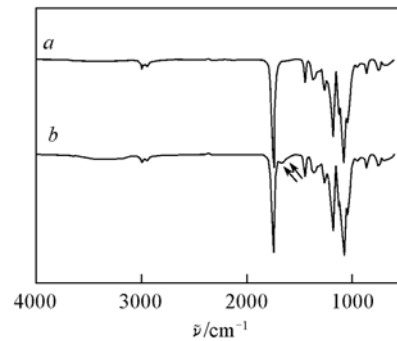


Fig. 1 ATR-FTIR spectra of PLA film (a) and PLA-CONH₂ film (b)

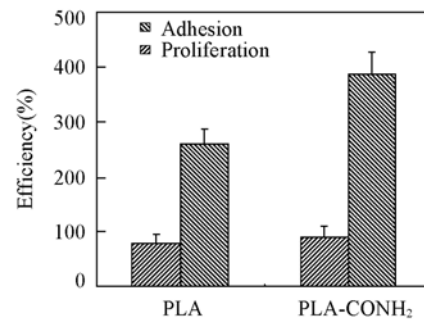


Fig. 2 Relative adhesion and proliferation efficiency of osteoblast on PLA and PLA-CONH₂ films

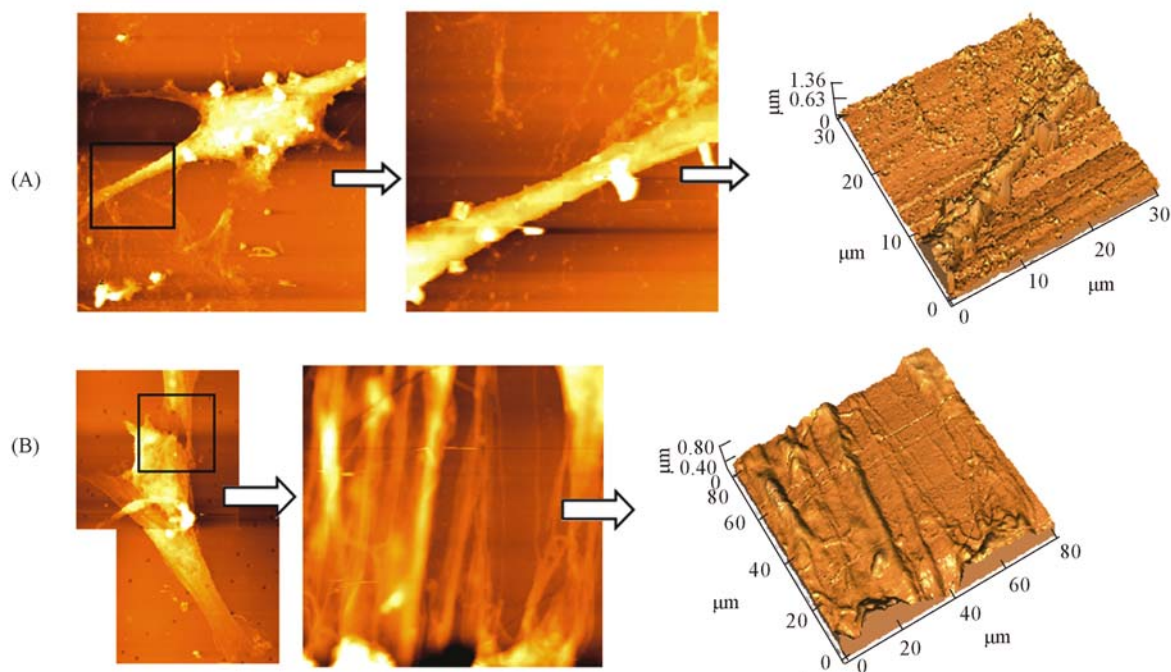


Fig. 3 AFM images of osteoblast cultured on PLA film (A) and PLA-CONH₂ (B) films

2.5 细胞周期的测定

细胞增殖周期简称为细胞周期,指细胞从一次有丝分裂结束开始到下一次有丝分裂完成所经历的整个有序过程.细胞周期由G₁, S, G₂和M期组成,其中G₁, S, G₂期合称为间期(Interphase),M期即为有丝分裂期(Mitotic phase).

表2和图4为成骨细胞在PLA和PLA-CONH₂膜上培养3d后,通过流式细胞仪对其进行的细胞周期分析的测试结果,其中P2, P3, P4分别代表处于DNA合成前期(G₀-G₁)、DNA合成期(S)和DNA合成后期(G₂-M)的细胞群.可见,酰胺基的引入对细胞的生长周期产生一定的影响,处于DNA合成前期的细胞量(71.9%)要明显少于在PLA上生长的细胞(76.1%),而处于DNA合成期和DNA合成后期的细胞量较多(分别为9.7%和15.3%),显示酰胺基的引入能够有效地缩短细胞在材料表面的适应期,减少成骨细胞在G₀-G₁期的滞留时间,从而使细胞较快地进入正常的细胞分裂周期,实现细胞的增殖.

Table 2 Effect of amide on the cell cycle of osteoblast

Group	G ₀ -G ₁ (%)	S (%)	G ₂ -M (%)
PLA	76.1	8.5	12.1
PLA-CONH ₂	71.9	9.7	15.3

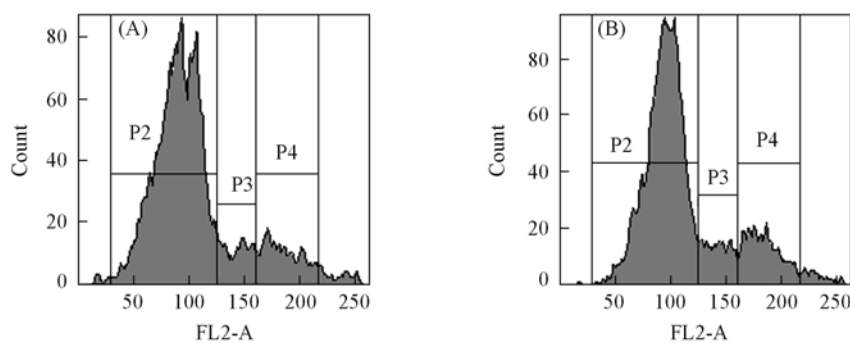


Fig. 4 Cell cycle of osteoblast cultured on PLA film (A) and PLA-CONH₂ film (B)

P2: G₀-G₁; P3: S; P4: G₂-M.

综上所述,利用紫外光接枝聚合 AAm 获得表面酰胺化的 PLA 膜,改善了 PLA 膜的表面亲水性,并在一定程度上促进了成骨细胞的黏附与增殖.与接枝天然高分子相比,引入酰胺基不存在免疫原性和天然高分子所带来的二次污染等问题,而且同样能够达到改善材料表面细胞亲和性的目的.

参 考 文 献

- [1] Berry C. C. , Campbell G. , Spadicino A. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2004 , **25** : 5781—5788
- [2] Chen R. S. , Chen Y. J. , Chen M. H. , *et al.* . J. Biomed. Mater. Res. A[J] , 2007 , **83** : 241—248
- [3] Zhao G. , Schwartz Z. , Wieland M. , *et al.* . J. Biomed. Mater. Res. A[J] , 2005 , **74** : 49—58
- [4] Schneider G. B. , English A. , Albraham M. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2004 , **25** : 3023—3028
- [5] Ding Z. , Chen J. N. , Gao S. Y. , *et al.* . Biomaterials[J] , 2004 , **25** : 1059—1067
- [6] MA Zu-Wei(马祖伟) , GAO Chang-You(高长有) , GONG Hong-Yi(龚逸鸿) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2004 , **25** (4) : 749—752
- [7] ZHU Ya-Bin(竺亚斌) , GAO Chang-You(高长有) , LIU Yun-Xiao(刘云肖) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J] , 2004 , **25** (7) : 1347—1350
- [8] Tamada Y. , Ikada Y. . J. Biomed. Mater. Res. A[J] , 1994 , **28** : 783—794
- [9] Smetana K. . Biomaterials[J] , 1993 , **14** : 1046—1050
- [10] Lee J. H. , Jung H. W. , Kang I. K. , *et al.* . Biomaterials[J] , 1994 , **15** : 705—711
- [11] Griesser H. J. , Chatelier R. C. , Gengenbach T. R. , *et al.* . J. Biomater. Sci. Polym. Ed. [J] , 1994 , **5** : 531—554
- [12] Yang J. , Bei J. Z. , Wang S. G. . Polymers for Advanced Technologies[J] , 2002 , **13** : 220—226
- [13] Guan J. J. , Gao C. Y. , Feng L. X. , *et al.* . Journal of Applied Polymer Science[J] , 2000 , **77** : 2505—2512
- [14] Vandevondele S. , Voros J. , Hubbell J. A. . Biotechnology and Bioengineering[J] , 2003 , **82** : 784—790
- [15] LIU Yang-Ming(刘艳鸣) , YANG Li(杨力) , WANG Hong-Bing(王红兵) , *et al.* . Analytical Instrumentation(分析仪器)[J] , 2007 , **3** : 5—8

Adhesion and Proliferation of Osteoblast on the Amidation Surface of Polylactide Film

TIAN Ye^{1,2} , WANG Ying-Jun^{1,2} , ZHOU Chang-Ren^{3*} , ZENG Qing-Hui³ , TAN Guo-Xing⁴

(1. Key Laboratory of Special Functional Materials, Ministry of Education,

2. School of Materials Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;

3. Department of Materials Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

4. Institute of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract Acrylic amide (AAm) was polymerized onto polylactide (PLA) film *via* UV irradiation to achieve amidation surface, furthermore the adhesion and proliferation of osteoblast on this surface was investigated. The results show that the hydrophilicity of PLA film is improved by introduction amido: the contact angle decreases from 78° to 56° and the free energy increases from 42.7 mJ/m² to 51.4 mJ/m². Compared with the control, osteoblast spread out more filopodia after 3 d incubation on amidation surface, and it entered cell division phase more quickly, which indicated that the surface amidation could promote the cell's adhesion and proliferation on the PLA film.

Keywords Polylactide; Amidation surface; Graft polymerization; Adhesion and proliferation

(Ed. : W, Z)