

# 基于多巴胺自聚合及多肽固定的聚三亚甲基碳酸酯的细胞相容性评价\*

张江, 刘阳, 袁书恒, 温煦, 许芷菡, 杨晓婷, 王进, 黄楠

(西南交通大学 材料学院 材料先进技术教育部重点实验室 成都 610031)

**摘要:** 针对聚三亚甲基碳酸酯 (PTMC) 内皮细胞相容性不足的特点, 通过在其表面沉积聚多巴胺涂层并固定精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸-缬氨酸 (REDV) 多肽改善 PTMC 的细胞相容性。水接触角测试表明 PTMC 表面沉积聚多巴胺及固定 REDV 后亲水性得到显著改善; 原子力显微镜观察可以发现相比于 PTMC, 沉积聚多巴胺及固定 REDV 后的表面粗糙度明显增加; QCM-D 结果显示表面固定的 REDV 密度可达到  $98.4 \text{ ng/cm}^2$ , 证明 REDV 可实现对 PTMC 薄膜的固定修饰。体外内皮细胞和平滑肌细胞粘附与增殖评价表明 REDV 改性的 PTMC 薄膜可促进内皮细胞的粘附与增殖, 但对平滑肌细胞粘附增殖的促进作用并不显著。  
**关键词:** 药物洗脱支架; 聚三亚甲基碳酸酯; REDV; 多巴胺; 细胞相容性

中图分类号: R318.08

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1001-9731.2014.20.009

## 1 引言

药物洗脱支架是治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的主要手段, 其开创了介入治疗新的里程碑<sup>[1]</sup>, 随着药物洗脱支架的广泛应用, 其弊端也逐渐显露<sup>[2]</sup>。临床陆续报道药物洗脱支架引发晚期血栓等不良事件<sup>[3]</sup>, 主要由于支架涂层在抑制平滑肌细胞增生的同时也抑

制内皮细胞的修复, 从而造成内皮愈合延迟及愈合不完全<sup>[4]</sup>。因此, 支架表面内皮化对支架植入后抗晚期血栓及再狭窄具有重要作用。

聚三亚甲基碳酸酯是一种聚碳酸酯类高分子, 其较高的力学性能和表面溶蚀的降解特点显示其作为支架药物载体的潜力<sup>[5-6]</sup>。然而, 侯瑞霞等<sup>[7]</sup>研究表明 PTMC 表面几乎无内皮细胞的粘附增殖, 其内皮细胞相容性较差。因此有必要对 PTMC 进行表面改性, 改善其内皮细胞相容性。

多巴胺 (dopamine) 是一种生物体内的神经传导物质。Lee 等<sup>[8]</sup>发现多巴胺在碱性溶液中可发生氧化交联反应, 在金属表面形成具有超强粘附力的聚多巴胺涂层。研究表明<sup>[8-10]</sup>, 多巴胺粘附机理来自于分子中邻苯二酚与氨基官能团, 其可与材料表面建立共价和非共价相互作用, 通过物理化学作用稳定牢固附着在材料表面。Lee 等<sup>[8]</sup>在多种聚合物表面沉积多巴胺, 反应 12 h 后涂层厚度达 50 nm; Xi 等<sup>[11]</sup>在聚四氟乙烯表面沉积多巴胺, 显著改善疏水聚合物表面亲水性。此外, 聚多巴胺层富含邻苯二酚, 这些基团易被氧化成醌基, 可与含硫醇、氨基的分子发生迈克尔加成和席夫碱反应 (图 1), 将功能分子引入材料表面<sup>[12-13]</sup>。

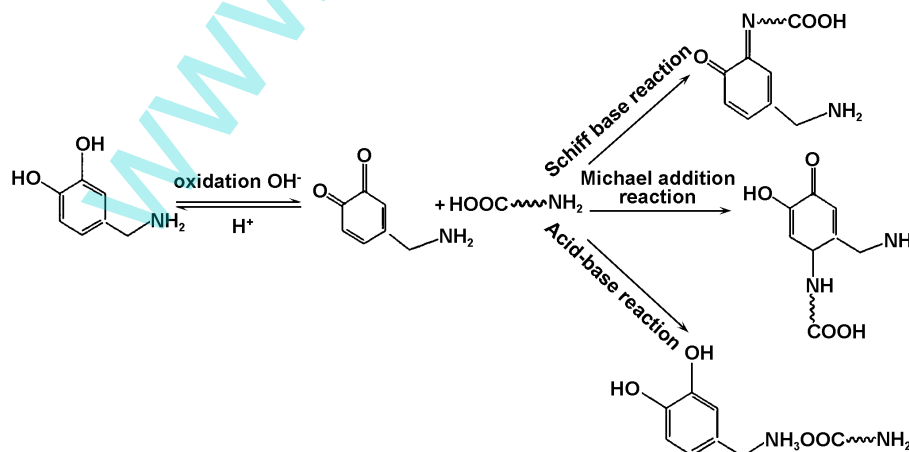


图 1 醌基与氨基反应原理

Fig 1 Reaction principle of quinone and amino

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (51173149, 81330031); 国家大学生创新训练计划资助项目 (201310613009)  
收到初稿日期: 2014-03-05 收到修改稿日期: 2014-06-15 通讯作者: 王进 E-mail: jinxxwang@263.net  
作者简介: 张江 (1989-) 男, 石家庄人, 在读硕士, 师承王进教授, 从事生物医用材料表面改性研究。

REDV是由精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸-结氨酸组成的四氨基酸序列,属细胞外基质纤维粘连蛋白CS5区域的功能性短肽。REDV能特异性识别整合素 $\alpha 4\beta 1$ ,而整合素 $\alpha 4\beta 1$ 是一种存在于内皮细胞膜表面的具有调控内皮细胞粘附功能的蛋白,其可通过识别内皮细胞膜表面的整合素 $\alpha 4\beta 1$ 介导内皮细胞在材料表面的粘附<sup>[14-15]</sup>。Hubbell等<sup>[16]</sup>发现REDV可增强内皮细胞的粘附,且具有内皮细胞特异性粘附作用。Plouffe等<sup>[17]</sup>研究了固定REDV的微流道在剪切力作用下对

内皮和平滑肌细胞的选择性粘附,发现微流道吸附内皮细胞的能力显著增强。魏雨等<sup>[18]</sup>发现REDV修饰的支架涂层呈现内皮细胞选择性粘附生长。

本文通过在PTMC表面沉积聚多巴胺涂层,并以该涂层为平台,利用聚多巴胺涂层表面大量的醌基,通过迈克尔加成和席夫碱反应将含氨基( $-NH_2$ )的REDV固定在聚多巴胺修饰的PTMC表面,改善PTMC的细胞相容性(图2)。

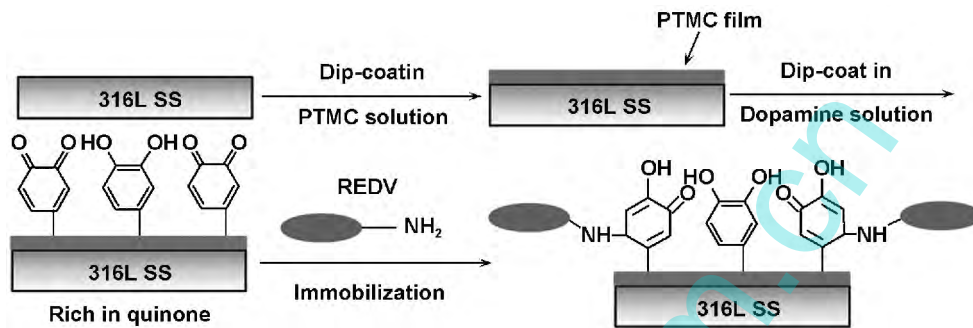


图2 不锈钢表面沉积多巴胺并固定REDV示意图

Fig 2 Illustrations of dopamine self-polymerization and subsequent REDV immobilization

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

PTMC( $M_n = 500\ 000$ ),山东岱罡生物工程有限公司;  $CH_2Cl_2$ ,成都金山化学试剂有限公司,分析纯; Dopamine, Sigma-Aldrich公司; REDV,上海科肽生物科技有限公司。

### 2.2 PTMC薄膜的制备、表面沉积多巴胺及多肽固定

用溶液浇注法在不锈钢表面制备纯PTMC薄膜;将PTMC样品置于2 mg/mL多巴胺-Tris缓冲液(pH值=8.5)中反应48 h,然后超声清洗3次并吹干,得到表面沉积聚多巴胺的PTMC薄膜,标记为P-D-48 h;将REDV溶于1.2 mg/mL的Tris缓冲液中得到0.1 mg/mL的多肽溶液,然后将P-D-48 h薄膜置于多肽溶液中,37 °C下反应24 h,用蒸馏水洗去未反应的多肽,烘干备用,标记为P-D-REDV。

### 2.3 材料学表征

采用型号为DSA100的接触角测量仪(KRÜSS, Germany)对样品表面的水接触角进行测量。采用石英晶体微天平(QCM-D, Q-Sense AB, Sweden)动态检测表面REDV多肽的组装过程。采用原子力显微镜(AFM, CSPM5500, 北京本原)对薄膜表面形貌和粗糙度进行分析,扫描区域 $10\ \mu m \times 10\ \mu m$ 。

### 2.4 体外细胞相容性评价

#### 2.4.1 体外细胞粘附与增殖实验

将取自于人脐静脉的内皮细胞和人脐动脉的平滑肌细胞分别滴入装有样品的24孔板中,置于恒温细胞培养箱中培养1和3 d。之后,取出样品,吸干细胞悬

液,每孔加入350  $\mu L$ 含有10% (体积分数) CCK-8试剂的M199全液。恒温培养箱中孵化4 h后,溶液移入96孔板中,用酶标仪读取其在450 nm处的吸光度。

#### 2.4.2 细胞罗丹明染色和DAPI细胞核染色

取出培养内皮细胞和平滑肌细胞不同时间的样品,用磷酸盐缓冲液洗去未粘附的细胞,用2.5%的戊二醛溶液固定。在样品表面滴加50  $\mu L$ 罗丹明试剂,避光静置15 min,清洗3次,再向样品表面加入50  $\mu L$  DAPI,避光静置5 min后,用生理盐水清洗3次,避光保存。用荧光显微镜观察内皮细胞和平滑肌细胞并拍照。

### 2.5 统计学分析

应用SPSS Statistics 17.0软件,采用最小显著差法(LSD)对数据进行单因素方差分析。

## 3 结果和讨论

### 3.1 水接触角测量

材料表面水接触角大小主要与表面化学组成和形貌有关。图3为样品表面水接触角测量结果。结果表明,PTMC较疏水,其水接触角为 $(85 \pm 0.7)^\circ$ ;表面沉积聚多巴胺后,由于多巴胺的结构中带有亲水的酚羟基和氨基,水接触角明显下降,为 $(53.9 \pm 2.3)^\circ$ ;固定REDV后薄膜的表面水接触角与P-D-48 h相比几乎没有变化,为 $(52.5 \pm 0.9)^\circ$ 。经统计学分析沉积聚多巴胺以及固定REDV后其表面亲水性显著提高( $P < 0.001$ )。材料表面的水接触角变化表明生物分子成功固定在PTMC表面。

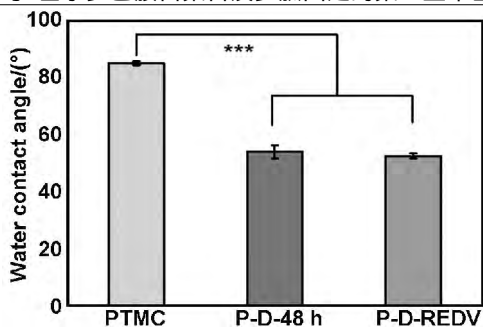


图3 PTMC、P-D-48 和 P-D-REDV 表面的水接触角

Fig 3 Water contact angle of PTMC ,P-D-48 h and P-D-REDV surface

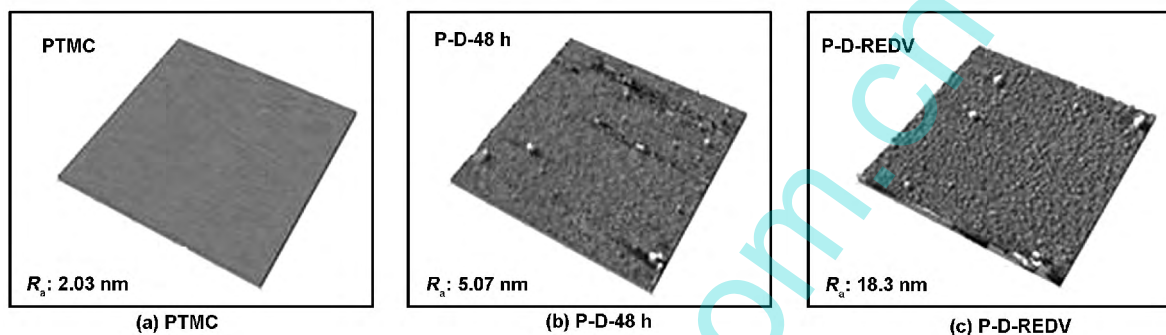


图4 PTMC、P-D-48 h 和 P-D-REDV 表面原子力显微镜结果

Fig 4 AFM results of PTMC ,P-D-48 h and P-D-REDV surface

3.3 QCM-D 检测薄膜表面 REDV 定量分析结果

聚多巴胺涂层表面的醌基(C=O)与 REDV 多肽上的氨基(-NH<sub>2</sub>)可以通过迈克尔加成或希夫碱反应进行共价固定。图5为 QCM-D 检测实时动态追踪 P-D-48 h 样品表面固定 REDV 的定量结果。QCM-D 结果表明,P-D-48 h 表面固定的 REDV 密度达到 98.4 ng/cm<sup>2</sup>。Massia 等<sup>[19]</sup>将短肽固定在玻璃表面,其多肽浓度在 10 fmol/cm<sup>2</sup> (10<sup>-4</sup> ng/cm<sup>2</sup>) 即可观察到细胞粘着斑的形成,对细胞的粘附发生作用。

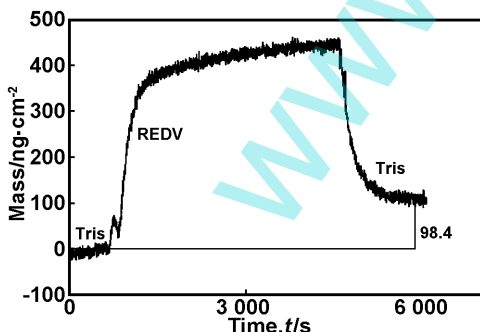


图5 QCM-D 定量检测 REDV 的固定

Fig 5 Quantitative result of REDV-immobilization on sample surface by QCM-D

3.4 体外内皮细胞( EC )粘附与增殖评价

图6为内皮细胞培养1和3 d的荧光照片。1 d时,内皮细胞在不锈钢(SS)表面生长良好,开始铺展,

3.2 薄膜表面 AFM 结果

图4为 PTMC、P-D-48 h 和 P-D-REDV 表面 AFM 结果。相比于 P-D-48 和 P-D-REDV ,PTMC 薄膜表面较为平整,其表面平均粗糙度( $R_a$ )为 2.03 nm;沉积聚多巴胺涂层后表面有颗粒状凸起,这主要是由于多巴胺分子在 PTMC 薄膜表面沉积聚合所致,其  $R_a$  为 5.07 nm;固定 REDV 后的表面更加粗糙,且表面由于多肽在聚多巴胺涂层上固定而呈现出均匀颗粒状,其表面平均粗糙度  $R_a$  为 18.3 nm。

3 d时,表面内皮细胞数量增大,呈长梭形,细胞伪足明显,表明内皮细胞在 SS 表面有较好的粘附增殖能力。与 SS 相比,PTMC 表面粘附的内皮细胞数量极少,形态较差,说明 PTMC 与内皮细胞的相容性较差,这与侯瑞霞等<sup>[8]</sup>的研究结果一致。表面沉积聚多巴胺涂层后的 P-D-48 h 样品,1 d 时有少量内皮细胞粘附,3 d 时,内皮细胞数量增加,开始铺展呈长梭形。REDV 多肽改性后的样品 1 d 时内皮细胞均在表面粘附铺展,3 d 时内皮细胞几乎铺满样品表面,呈现内皮细胞典型的“铺路石”状,且样品表面细胞排列紧密,该结果说明 REDV 短肽的固定显著改善了 PTMC 薄膜的内皮细胞相容性问题。

图7为内皮细胞在样品表面培养1和3 d的 CCK-8 结果。CCK-8 是一种表征细胞活性和数量的评价方法,纵坐标的吸光度值越高表示细胞活性和数量越大。1 d 时,PTMC 表面活细胞的数量最少,沉积聚多巴胺涂层后表面的细胞数量和活性有所增加,但比 SS 样品表面少,而经 REDV 多肽改性的样品表面细胞活性和数量比 SS 显著增加,表面内皮细胞增殖最快。SS、PTMC、P-D-48 h 和 P-D-REDV 样品表面内皮细胞的活性及数量的显著性差异 ( $P < 0.001$ ),表明 REDV 短肽固定改性的 PTMC 薄膜可以促进内皮细胞的增殖,与内皮细胞相容性良好。

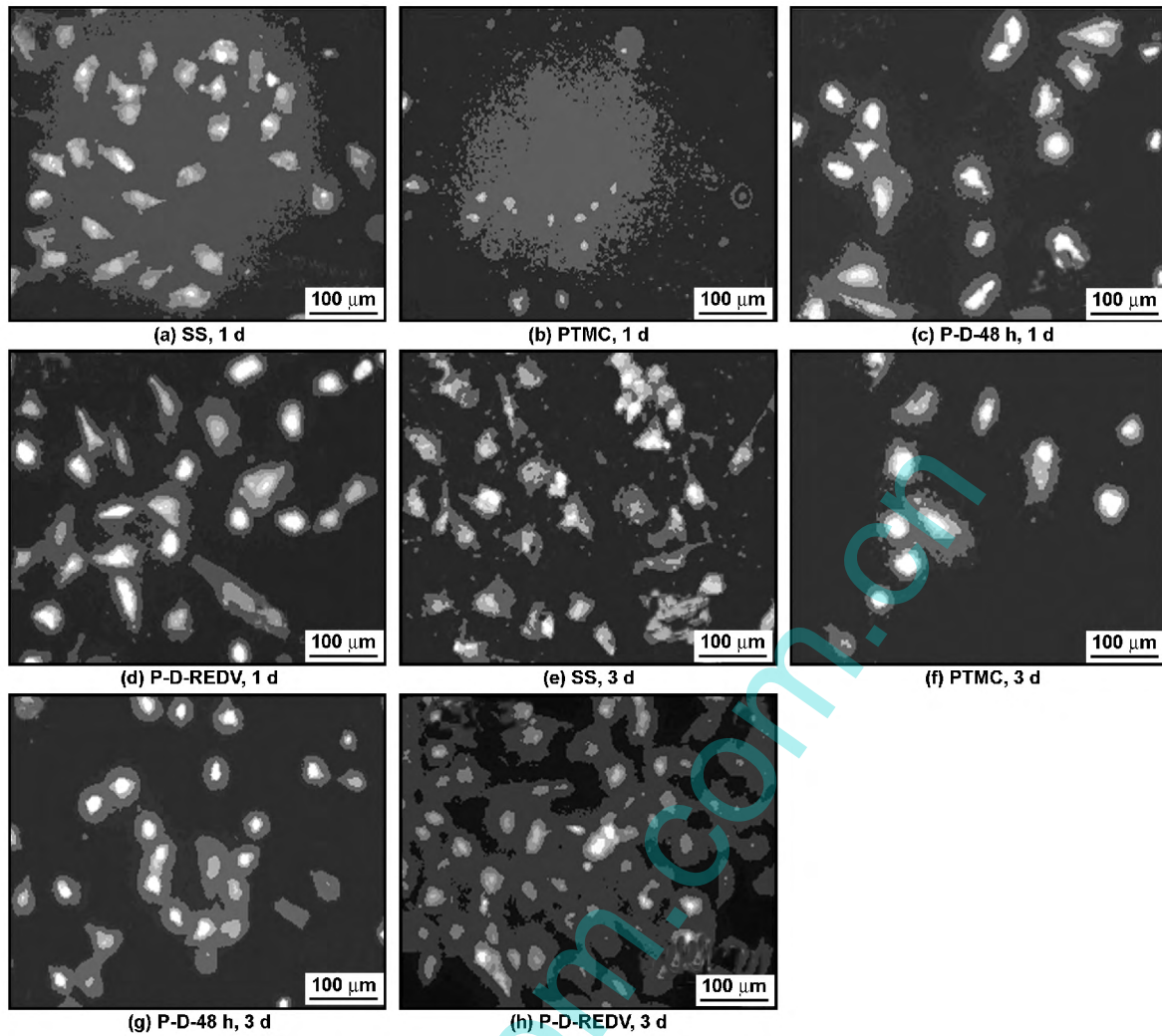


图 6 PTMC、P-D-48 h and P-D-REDV 表面内皮细胞染色结果

Fig 6 Staining of endothelial cells seeded onto PTMC, P-D-48 h and P-D-REDV surface

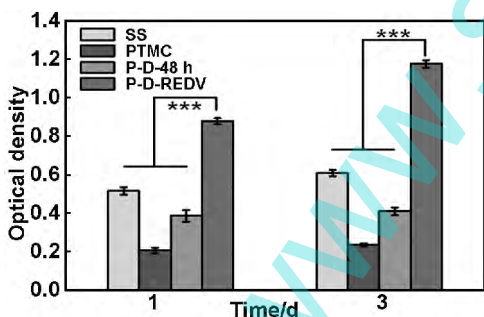


图 7 PTMC、P-D-48 h and P-D-REDV 表面内皮细胞 CCK-8 结果

Fig 7 CCK-8 of endothelial cells seeded onto PTMC, P-D-48 h and P-D-REDV surface

### 3.5 体外平滑肌细胞(SMC)粘附与增殖评价

图 8 为平滑肌细胞培养 1 和 3 d 的荧光照片。结果表明,平滑肌细胞培养 1 d 时几乎铺满 SS 表面,呈现典型的长梭形。3 d 时,细胞已完全铺满样品表面,而且细胞呈现一定的取向,平滑肌细胞的这种取向更加接近其在体内的生长状况。从平滑肌细胞在 SS 表面生长趋势看,SS 有利于平滑肌细胞的粘附增殖。在 PTMC 表面培养 1 d 时只有少量平滑肌细胞的粘附,细胞

呈球形,未出现铺展,培养 3 d 后呈不规则细长型,数量仍很少,表明 PTMC 可抑制平滑肌细胞的粘附和增殖。P-D-48 h 样品 1 d 时表面只有少量平滑肌细胞粘附,3 d 时细胞开始在表面增殖,呈长梭形有一定取向性,说明 PTMC 表面沉积聚多巴胺后有利于平滑肌细胞的粘附增殖。P-D-REDV 表面 1 和 3 d 平滑肌细胞的粘附数量远少于其它样品,且没有呈现出平滑肌细胞典型的长梭形,说明平滑肌细胞的增殖能力较差,这表明 REDV 多肽接枝的表面未表现出对平滑肌细胞粘附增殖能力的显著促进。

图 9 为平滑肌细胞在样品表面培养 1 和 3 d 后 CCK-8 的检测结果。对比各个样品的吸光度值可知,SS 样品表面 1 和 3 d 的吸光度值均为最高;PTMC 样品表面的活细胞数量在各个时间点都是所有样品中最少的,这也与图 4 中平滑肌细胞荧光照片相一致,说明 PTMC 可抑制平滑肌细胞的增生;P-D-REDV 样品表面的平滑肌细胞相比于 SS 增殖速度较缓慢,说明 REDV 固定的样品表面并未促进平滑肌细胞在样品表面的增殖。

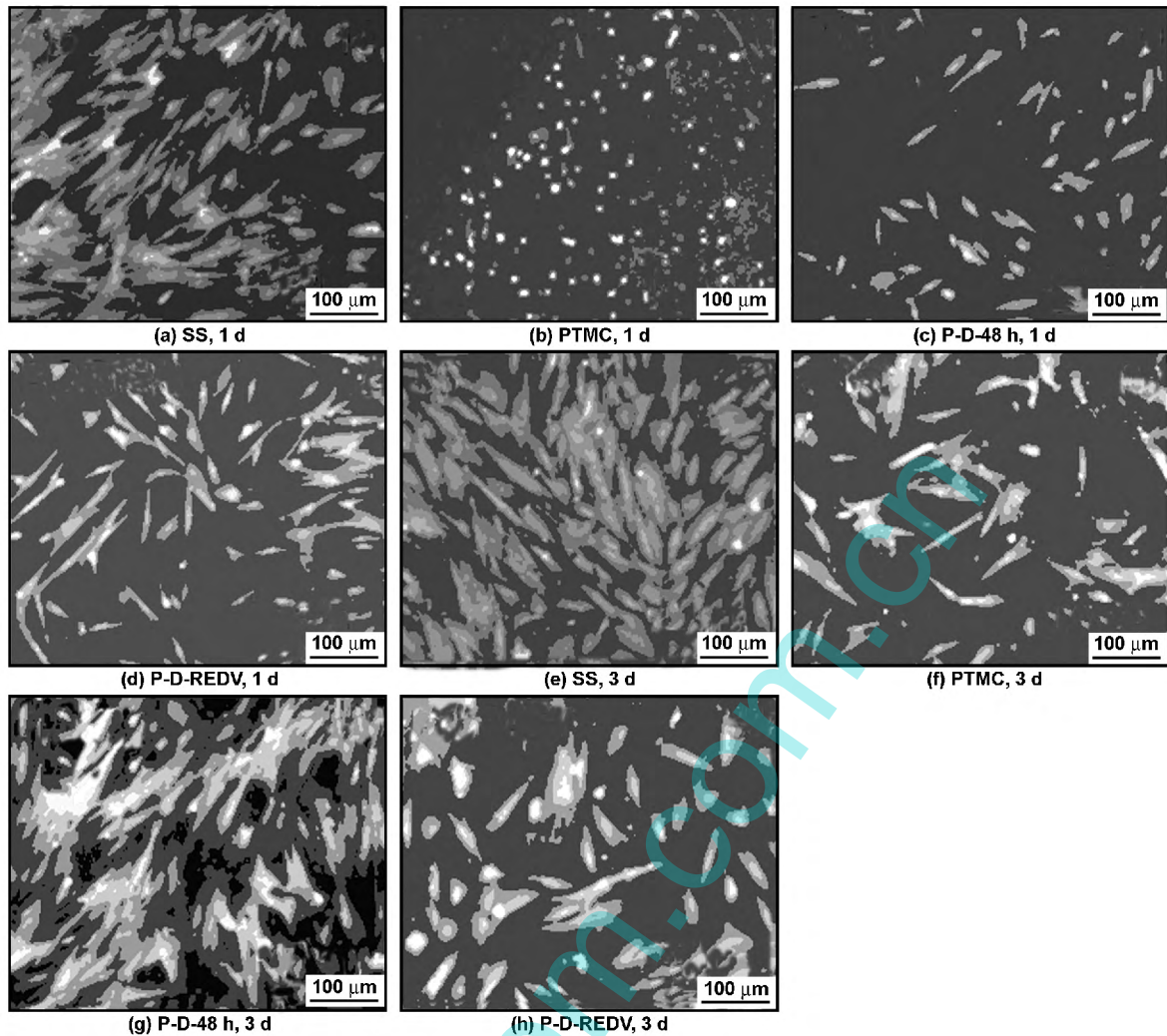


图8 PTMC、P-D-48 h and P-D-REDV 平滑肌细胞染色结果

Fig 8 Staining of smooth muscle cells seeded onto PTMC, P-D-48 h and P-D-REDV surface

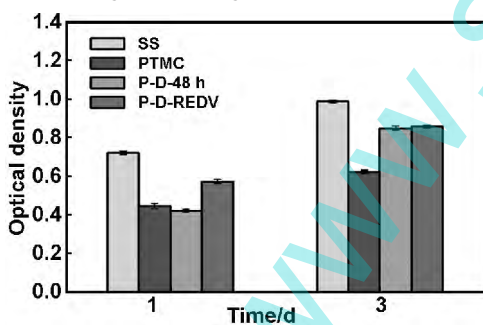


图9 PTMC、P-D-48 h and P-D-REDV 表面平滑肌细胞 CCK-8 结果

Fig 9 CCK-8 of smooth muscle cells seeded onto PTMC, P-D-48 h and P-D-REDV surface

#### 4 结论

通过在 PTMC 薄膜表面沉积多巴胺涂层,利用其表面的醌基成功实现了多肽 REDV 的固定。AFM 结果显示沉积多巴胺及固定 REDV 后的 PTMC 薄膜表面粗糙度明显增加;QCM-D 检测表明薄膜表面固定的 REDV 多肽密度为 98.4 ng/cm<sup>2</sup>;体外细胞相容性评价表明固定 REDV 的 PTMC 薄膜可显著促进内皮细胞

的粘附与增殖,但未表现出对平滑肌细胞粘附与增殖的显著促进作用。因此,PTMC 表面固定 REDV 多肽,可较显著地改善内皮细胞相容性,有望成为药物洗脱支架的表面涂层载体。

#### 参考文献:

- [1] Hehrlein C, Arab A, Bode C. Drug-eluting stent: the magic bullet for prevention of restenosis [J]. Basic Research in Cardiology, 2002, 97(6): 417-423.
- [2] Aminian A, Kabir T, Eeckhout E. Treatment of drug-eluting stent restenosis: an emerging challenge [J]. Catheterization and Cardiovascular Interventions, 2009, 74(1): 108-116.
- [3] Kozinski M, Sukiennik A. Drug-eluting stent-associated thrombosis: clinical relevance of impaired vessel-wall healing [J]. Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczonej, 2008, 62(1): 185-200.
- [4] Chatterjee S, Pandey A. Drug eluting stents: friend or foe? A review of cellular mechanisms behind the effects of paclitaxel and sirolimus eluting stents [J]. Current Drug Metabolism, 2008, 9(6): 554-566.
- [5] Pêgo A P, Luyn M. In vivo behavior of poly(1,3-trimethyl-

- ene carbonate) and copolymers of 1,3-trimethylene carbonate with D,L-lactide or epsilon-caprolactone: degradation and tissue response [J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2003, 67(1): 1044-1054.
- [6] Zhang Z, Kuijjer R. The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate) [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(2): 1741-1748.
- [7] Hou Ruixia, Wu Leigang. Investigation on biological properties of tacrolimus loaded poly(1,3-trimethylene carbonate) [J]. *Applied Surface Science* 2010, 256: 5000-5005.
- [8] Lee H, Dellatore S M. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings [J]. *Science*, 2007, 318: 426-430.
- [9] Lee H, Scherer N F. Single molecule mechanics of mussel adhesion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 29: 12999-13003.
- [10] Kang S M, Hwang N S, Lee H. One-step multipurpose surface functionalization by adhesive catecholamine [J]. *Adv Funct Mater*, 2012, 22: 2949-2955.
- [11] Xi Z Y, Xu Y Y. A facile method of surface modification for hydrophobic polymer membranes based on the adhesive behavior of poly DOPA and polydopamine [J]. *J Membr Sci*, 2009, 327: 244-253.
- [12] Jiang J H, Zhu L P. Surface modification of PE porous membranes based on the strong adhesion of polydopamine and covalent immobilization of heparin [J]. *J Membr Sci*, 2010, 364: 194-202.
- [13] Hu Ke, Chen Junying, Huang Nan. Immobilization of poly-L-lysine/heparin nanoparticle on titanium surface to improve the blood compatibility [J]. *Journal of Functional Materials*, 2012, 43(19): 2685-2693.
- [14] Hubbell J A, Massia S P, Desai N P. Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor [J]. *Biotechnology (N Y)*, 1991, 9: 568-572.
- [15] Ceylan H, Tekinay A B, Guler M O. Selective adhesion and growth of vascularendothelial cells on bioactive peptide nanofiber functionalized stainless steel surface [J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 8797-8805.
- [16] Massia S P, Hubbell J A. Vascular endothelial-cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the II-ICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha-4-beta-1 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(20): 14019-14026.
- [17] Plouffe B D, Njoka D N. Peptide-mediated selective adhesion of smooth muscle and endothelial cells in microfluidic shear flow [J]. *Langmuir*, 2007, 23(9): 5050-5055.
- [18] Wei Yu, Ji Ying, Ji Jian. REDV/peptide conjugated rapamycin-loaded polymer matrix for endothelial cells selectivity [J]. *Chem J Chinese Universities* 2012, 12: 193-198.
- [19] Massia S P, Hubbell J A. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact fiber formation [J]. *J Cell Biol*, 1991, 114(26): 1089-1100.

## Study on cytocompatibility of poly(trimethylene carbonate) via self-polymerization of dopamine and covalent immobilization of peptide

ZHANG Jiang, LIU Yang, YUAN Shu-heng, WEN Xu, XU Zhi-han, YANG Xiao-ting, WANG Jin, HUANG Nan

(Key Laboratory of Advanced Technology for Materials of Education Ministry,

School of Material Science and Engineering of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:** In this study, due to the poor compatibility of poly(trimethylene carbonate) (PTMC) with endothelial cells (ECs), the polydopamine coating and further immobilization of the peptide REDV (Arg-Glu-Asp-Val) were used to promote adhesion and proliferation of ECs. The hydrophilicity of PTMC film modified by polydopamine coating and immobilization of the peptide REDV was significantly improved; compared to the surface of PTMC, the surfaces of P-D-48 h and P-D-REDV had higher average roughness. The result of QCM-D indicated that 98.4 ng/cm<sup>2</sup> REDV was immobilized on the PTMC. Endothelial cells in vitro indicated that the PTMC film immobilized with REDV peptide can promote the adhesion, spreading and proliferation of ECs, but this REDV-modified PTMC film had no significant influence on the adhesion and proliferation of smooth muscle cells.

**Key words:** drug-eluting stents; poly(trimethylene carbonate); dopamine; REDV; biocompatibility