

# 白蛋白固定等离子体聚烯丙胺 薄膜及体外血小板粘附行为\*

闫峰, 王进, 杨志禄, 张钊, 孙鸿, 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:**采用脉冲射频等离子体聚合技术,在医用不锈钢表面制备了等离子体聚烯丙胺薄膜,并进一步在聚合薄膜表面固定白蛋白(BSA)分子。采用傅立叶红外光谱(FTIR)、X光电子能谱(XPS)、台阶仪、原子力显微镜和点滴法分别表征结构成分、厚度、表面形貌和水接触角。结果表明:随着放电功率增加,聚烯丙胺薄膜中氮含量及伯胺基浓度减小,薄膜厚度和表面粗糙度增加,接触角增大。XPS分析证明白蛋白分子被固定于聚烯丙胺薄膜表面。体外血小板粘附评价表明,不锈钢表面固定白蛋白的聚烯丙胺薄膜能显著抑制血小板粘附及激活。

**关键词:**等离子体聚合;烯丙胺;白蛋白;医用不锈钢;血小板黏附

中图分类号:TB34;R318 文献标识码:A 文章编号:1672-6278(2008)04-0268-04

## Study on Plasma Polymerized - allylamine Film Immobilized by Albumin and in vitro Platelet Adhesion Behavior

YAN Feng, WANG Jin, YANG Zhilu, ZHANG Zhao, SUN Hong, HUANG Nan

(Key Lab of Advanced Technology for Materials of Education Ministry, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:** In order to improve the anticoagulation of biomedical stainless steel, we fabricated the plasma - polymerized allylamine films on the surface of the biomedical stainless steel by pulsed plasma polymerization technique, and then immobilized the molecules of bovine serum albumin (BSA) on the polyallylamine films. The films were characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X - ray photoelectron spectroscopy (XPS), profile meter, atomic force microscopy (AFM) and contact angle measurement. FTIR spectra indicated that polyallylamine film had polymer - like structure. With the increase of discharged power, XPS show that the content of nitrogen and concentration of primary amine groups ( $\text{NH}_2/\text{C}$ ) decrease gradually; the thickness, the roughness and water contact angle surface of the film increase. XPS further prove that the molecules of BSA are covalently immobilized on the surface of the polyallylamine film. The evaluation of in vitro platelet adhesion reveals that BSA - immobilized films can effectively inhibit adhesion and activation of the platelets.

**Key words:** Plasma polymerization; Allylamine; Bovine serum albumin; Stainless steel; Platelet adhesion

### 1 引言

医用不锈钢由于其优良的力学性能和化学稳定性,在人工心脏瓣膜、血管支架等心血管植、介入器械的制造中得到应用,但是其抗凝血性能仍有待进

一步提高。近年来,国内外陆续开展了将抗凝分子如白蛋白、肝素固定在高分子材料表面以提高抗凝血性的相关研究,并取得了很大的进展<sup>[1-5]</sup>。但由于医用不锈钢材料表面官能团的数量少,难于固定一定浓度的抗凝分子以满足实际应用。因此如何在

\*基金项目:国家自然科学基金资助项目(50673081);教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-07-0715)。

通信作者 Email:jinxwang@263.net

金属材料表面有效地固定抗凝分子来提高其表面的抗凝血性成为研究的难点和重点。脉冲等离子体聚合是一种低温等离子体表面处理技术,它能够在材料表面合成含官能团的聚合物薄膜。将脉冲等离子体聚合薄膜与生物分子固定相结合的表面改性技术,应用于构建生物传感器和生物化表面改性的研究已有一些报道<sup>[6-7]</sup>,但应用于抗凝血表面改性的文献报道很少。

本研究通过脉冲等离子体聚合技术在医用不锈钢表面制备聚烯丙胺薄膜,再共价固定白蛋白生物分子,并对样品进行材料学表征和抗凝血评价。

## 2 实验部分

### 2.1 等离子体聚合薄膜的制备

以镜面抛光的医用不锈钢(AISI 316L)为基底,将烯丙胺(纯度 99.5%,山东省邹平县铭兴化工试剂厂)和氩的混合气体导入本底真空为 1 Pa 的反应室,压强保持为 15 Pa。等离子体聚合过程中脉冲占空比 40% ( $t_{on} = 20 \text{ ms}$ ,  $t_{off} = 30 \text{ ms}$ ) 和直流负偏压 75 V 均保持不变,通过改变射频放电功率,在不锈钢基底沉积出一系列含伯胺基团的等离子体聚烯丙胺薄膜,薄膜沉积时间为 45 min,其它实验参数见表 1,等离子体聚合系统为实验室自制。

### 2.2 薄膜表征

NICOLET 5700 型傅立叶红外光谱仪,采用 OMNI 附件,扫描范围  $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ ;XSAM800 型 X 射线光电子能谱仪,所用阳极靶为镁靶,能量为 1253.6 eV;液滴形状分析系统 DSA100 (德国, Gmbh Hambur) 测量接触角,测试液体为蒸馏水和  $\text{CH}_2\text{I}_2$ ;AMBiosXP-2 台阶仪测量薄膜厚度;CSPM 扫描探针显微镜检测薄膜表面形貌及粗糙度。采用对三氟甲基苯甲醛作为生化法反应单体用于检测等离子体聚烯丙胺薄膜中的伯胺基浓度<sup>[8-9]</sup>。

### 2.3 BSA 固定

将等离子体聚烯丙胺薄膜 PPAa-1 置于浓度为 1wt% 的戊二醛溶液中,室温下反应 3 h 后将其取出并用蒸馏水反复清洗。将清洗过的样品浸泡在浓度为 10 mg/ml 牛血清白蛋白溶液中,于 4℃ 反应 24 h,将反应后的样品用蒸馏水漂洗 3 次,每次漂洗时间为 30 min<sup>[10]</sup>。白蛋白固定后的样品标记为 BSA-PPAa-1。

### 2.4 抗凝血性评价实验

样品放入 24 孔培养板中,将离心后所得的新鲜人血小板血浆 (PRP) 注入到放有样品的孔中,在

37℃ 的恒温水浴中培养 120 min,用生理盐水漂洗 1~2 min 后,用戊二醛固定液固定。将固定后的样品分别经脱水脱醇后采用 CPD030 型临界点干燥仪 (BALZERS 公司) 进行  $\text{CO}_2$  临界点干燥,然后用扫描电镜 (Quanta 200 型,荷兰 FEI 公司) 进行血小板观察。采用乳酸脱氢酶 (LDH) 法定量检测材料表面血小板粘附数量。采用 GMP-140 方法定量检测材料表面粘附的血小板激活数量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 红外光谱分析

图 1 为烯丙胺单体和 PPAa-1 的红外光谱图,通过比较二者红外光谱得知,等离子体聚合薄膜较好地保留了原单体的结构成分。 $2930 \text{ cm}^{-1}$  和  $2865 \text{ cm}^{-1}$  处的两个 C-H 伸缩振动峰 ( $\text{CH}_2$  中对称和不对称 C-H 伸缩振动峰) 及  $3350 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1635 \text{ cm}^{-1}$  处的 N-H 伸缩震动和变形振动峰强虽有所减弱,但仍然为主导特征峰。红外光谱的结果也表明在等离子体聚合过程中,伯胺基 ( $-\text{NH}_2$ ) 部分转化为胍基 ( $-\text{C}(\text{N}, 2100 \text{ cm}^{-1} - 2300 \text{ cm}^{-1})$ ),亚胺 ( $\text{C}=\text{N}$ ,  $1395 \text{ cm}^{-1}$ ) 以及一些其他含氮的官能团如  $\text{O}=\text{C}=\text{N}-$ ,  $-\text{C}=\text{NH}$  ( $1650 \sim 1680 \text{ cm}^{-1}$ ), 仲胺基 ( $-\text{NH}-$ ) 等官能团。由于仲胺基、亚胺基的生成以及  $-\text{CH}=\text{CH}_2$  的削弱,在 PPAa 的红外光谱中出现了一个由 N-H 和 C-H 伸缩振动峰组成的范围在  $3400 \sim 3000 \text{ cm}^{-1}$  的一个宽吸收带。

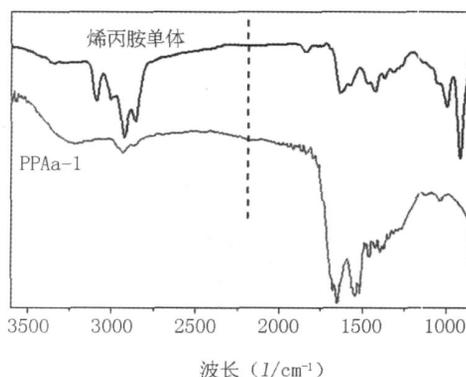


图 1 烯丙胺及 PPAa-1 薄膜的红外光谱图

Fig 1 FT- IR of the allylamine and the PPAa-1 film

### 3.2 薄膜厚度

图 2 为在其它聚合工艺参数不变的条件下,放电功率对薄膜厚度的影响。随着放电功率的增大,不锈钢表面沉积的聚烯丙胺薄膜厚度呈现出逐渐增大的趋势,当放电功率增加到 120 W 时,薄膜厚度达

380 nm。这是因为放电功率的增大使得产生的等离子体密度增加,等离子体中的粒子碰撞能量增大,从而产生出更多的活性粒子为成膜提供充足的原料供应。

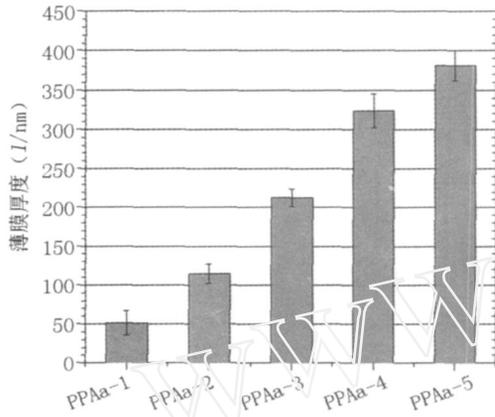


图2 不同放电功率制备的聚烯丙胺薄膜的厚度

Fig 2 Thickness of the films fabricated under different power

### 3.3 薄膜表面形貌

图3为功率为30 W和120 W时合成的脉冲等

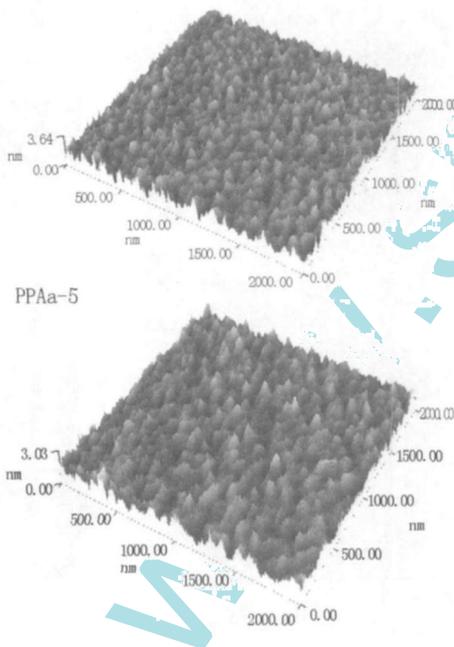


图3 硅基底上沉积的 PPAa - 2 和 PPAa - 5 薄膜的三维原子力显微镜图像

Fig 3 AFM images of the PPAa - 2 and PPAa - 5 films deposited on the silicon substrates

离子体聚烯丙胺薄膜三维原子力显微镜图像。30 W合成薄膜(PPAa - 2)的均方根粗糙度为0.381 nm,整个薄膜表面较均匀。而120 W合成薄膜(PPAa - 5)的均方根粗糙度为1.524 nm,薄膜平整度较低。由此可

见,随着放电功率的提高,薄膜表面形貌粗糙度增大,薄膜粒子均匀化程度降低。因为对于等离子体聚合薄膜来说,聚合过程是薄膜粒子生成与形核形成的动态竞争过程,并且随着放电功率的增加,形核形成/薄膜粒子生长率增大。低功率等离子体聚合过程中,形核形成速率较慢,在新形核形成并沉积在聚合薄膜表面形成新的薄膜层之前,先前的形核有足够的时间供其生长并覆盖薄膜表面,故所得的薄膜表面规整、粗糙度低。然而,随着放电功率的增大,聚合单体的离化程度加剧,等离子体密度增加,为形核的形成、生长提供了丰富的原材料,当第一批形成的形核开始生长、形成薄膜完全覆盖在以前的薄膜之前,又有大量的新形核形成,薄膜沉积速率加剧,粒子堆积较无序,故形成的薄膜规整度低,薄膜粗糙度大。

### 3.4 XPS 分析

结合对三氟甲基苯甲醛衍生法,采用 XPS 测试技术,定量检测了薄膜中各元素的含量及伯胺基浓度( $\text{NH}_2/\text{C}$ ),见表1。随着射频放电功率的增加,薄

表1 不同功率等离子体聚烯丙胺薄膜与固定 BSA 后的聚烯丙胺薄膜各组成元素含量与伯胺基浓度

Table 1 Elemental and atomic composition obtained by XPS and extracted from XPS measurement after derivatization of the film

样品	放电功率 (W)	C (%)	N (%)	O (%)	$\text{NH}_2/\text{C}$ (%)	S (%)
PPAa - 1	10	72.5	22.1	5.4	2.9	0
PPAa - 2	30	74.3	20.1	5.6	2.4	0
PPAa - 3	60	75.8	18.3	5.9	2.3	0
PPAa - 4	90	77.6	16.3	6.1	2.0	0
PPAa - 5	120	79.9	14.1	6.0	1.8	0
BSA - PPAa - 1	10	70.1	14.9	14.3	—	0.7

膜中 C 含量逐渐增大,N 及  $\text{NH}_2/\text{C}$  含量逐渐降低。与 10 W 下合成的薄膜相比,放电功率增加到 120 W 时,N 与  $\text{NH}_2/\text{C}$  含量分别由 22.1 %和 12.1 %下降到 2.9 %和 1.8 %。这是由于随着放电功率的提高,单体被等离子体化程度加剧,单体结构破坏较大,成膜时薄膜中 N 与  $\text{NH}_2/\text{C}$  含量较低。此外,不同放电功率下制备的薄膜含有 5 %~6 %的氧。而 O 元素引入主要是由于真空室的本底真空不够高,真空室残存的氧及器壁上物理吸附的氧在等离子体聚合过程中直接参与成膜反应,此外,由于薄膜中残留了大量的活性粒子和基团,当薄膜暴露在大气中时会与空气中的氧气、水蒸气、二氧化碳等反应,进一

步造成氧元素的引入。这可以从图 1 中的红外光谱图得到验证。用工艺 PPAa - 1 固定了 BSA 后,C、N、O 各元素均发生了明显变化,而且还增加了 S 元素,说明 BSA 分子被成功地固定在聚烯丙胺薄膜表面。

### 3.5 薄膜亲水性及表面能

图 4 结果表明,与未改性的不锈钢相比,PPAa 系列薄膜改性后的不锈钢表面的亲水性都有不同程度的增加,这是由于薄膜中含有大量的胺基等亲水性基团。随着放电功率的提高,薄膜亲水性总体呈下降趋势,显示出与薄膜 N 含量具有一致的变化趋势(见表 1),这可能是由薄膜中含 N 元素的极性基团如胺基减少所造成的。与 PPAa - 1 相比,其固定白蛋白后,样品表面自由能有所增加,这是由于白蛋白分子接枝增加了薄膜表面的亲水性,从而提高了表面自由能<sup>[11]</sup>。

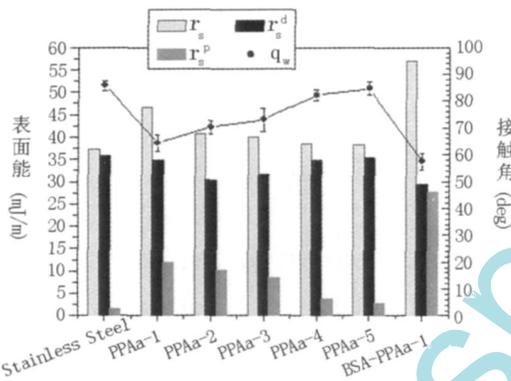


图 4 不锈钢、不同功率等离子体聚烯丙胺薄膜及固定白蛋白分子的 PPAa - 1 薄膜的水接触角及表面能

Fig 4 Water contact angle surface energy and of stainless steel and, plasma polymeric allylamine films and BSA immobilized plasma polymeric allylamine film

### 3.6 体外血小板粘附

体外血小板粘附一直是生物材料血液相容性评价的重要指标。获得材料表面血小板的粘附与活化行为的信息不仅是进行材料血液相容性评价的需要,而且对于揭示材料表面与血液的相互作用过程和机制尤其重要。

图 5 为不锈钢和 BSA - PPAa - 1 表面典型的血小板粘附扫描电镜显微照片,未经改性的不锈钢表面具有大量的血小板粘附,并且血小板变形和团聚比较严重,有大量伪足产生,这表明在未改性的不锈钢表面血小板激活程度较大。而表面固定 BSA 的聚烯丙胺涂层的不锈钢样品,其表面只有较低数量的血小板粘附、激活和变形。

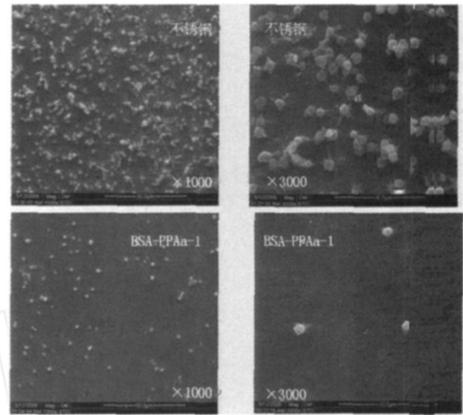


图 5 不锈钢和 BSA - PPAa - 1 表面粘附血小板的 SEM 照片(培养时间为 120min)

Fig 5 Morphology of adherent platelets on the stainless steel, and BSA - PPAa - 1 film (120 min incubation in PRP) observed using SEM

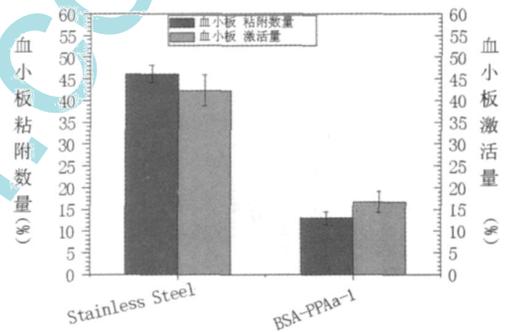


图 6 不锈钢和 BSA - PPAa - 1 样品 LDH 和 GMP - 140 评价结果  
Fig 6 Percent of adherent platelets (results obtained by LDH assay) and percent of activated platelets (results obtained by GMP - 140 assay) of stainless steel, BSA - PPAa - 1

图 6 中 LDH 评价的血小板黏附量在不锈钢表面为 46.1%,而 BSA - PPAa - 1 薄膜表面血小板黏附量为 13.0%,降低了 33.1%。图 6 中通过评价 GMP - 140 而得到的样品表面粘附的血小板激活量由不锈钢的 42.3% 下降至 BSA - PPAa - 1 的 16.7%。这表明:与不锈钢相比,表面固定 BSA 的等离子体聚烯丙胺薄膜表面能抑制血小板的黏附和活化,与在医用高分子材料表面固定白蛋白抑制血小板的黏附的相关报道一致<sup>[12]</sup>。

## 4 结 论

采用脉冲可调控射频等离子体聚合技术,在医用不锈钢表面沉积了含伯胺基(-NH<sub>2</sub>)的烯丙胺薄膜,并以伯胺基为反应位点固定了生物分子 BSA,体外血小板粘附结果表明,固定 BSA 的等离子体聚烯丙胺薄膜表面可显著抑制血小板粘附及激活。(下转第 280 页)

## 4 结论

由模拟结果可以得到如下结论:

(1) 无论力学激励是  $0.4 \times 10^6 \text{ N}$ 、 $6 \times 10^6 \text{ N}$ , 模型均保持良好的平衡状态, 这体现了骨组织对力学环境的适应性及稳定性。随着时间的增加, 孔隙率逐渐增加, 骨量均逐渐减少, 不过力学激励为  $6 \times 10^6 \text{ N}$  时的孔隙率明显小于力学激励为  $0$  和  $4 \times 10^6 \text{ N}$  时的孔隙率, 因此运动强度较大时, 可以有效减缓骨量丢失。

(2) 快速收敛性。对于不同的废用状态, 即载荷废用 20%、50%、80% 时模型均能在一定时间内快速收敛, 载荷废用 80%, 力学激励为  $6 \times 10^6 \text{ N}$ , 只需 100 天左右就达到平衡时的孔隙率值。每种废用状态, 模型都将达到一个新的平衡, 这种平衡下的孔隙率值是模型对新的力学载荷的适应值。

(3) 高度非线性。模型中的载荷与孔隙率成负相关, 载荷废用越严重, 骨组织的抵抗适应过程越激烈, 新的骨重建平衡的孔隙率越低, 但不同的废用情况不是简单的线性比例关系, 这是由骨适应的生理过程决定的。

由此可见, 不同运动方式和运动强度对防止和减缓骨质疏松有较大的影响, 模拟结果较符合临床实际和统计调查数据, 因此对于研究骨质疏松的发病机理、影响因素、治疗方法和骨功能适应性的研究等有一定的参考价值。

### 参考文献:

- [1] 黎小坚, Frost HM, 朱绍舜, 等. 基础骨生物学新观(二)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7(3): 253 - 261.
- [2] 刘忠厚. 骨矿与临床[M]. 中国科技出版社, 2006.
- [3] 朱兴华, 宫赫等. 弹性模量与表观密度的分段函数关系用于股骨近端的机构模拟[J]. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(3): 250 - 257.
- [4] Hazelwood SJ, Martin RB, Rashid MM, et al. A mechanistic model for internal bone remodeling exhibits different dynamics responses in disuse and overload[J]. Journal of Biomechanics, 2001, 34: 299 - 308.
- [5] 张春秋等. 废用对松质骨结构的影响[J]. 生物医学工程研究, 2004, 23(3): 129 - 132.
- [6] Kasra M, Grynbas MD. Static and dynamic finite element analyses of an idealized structural model of vertebral trabecular bone[J]. Journal of Biomechanical Engineering, 1998, 120: 267.

(收稿日期: 2008 - 06 - 23)

(上接第 271 页)

### 参考文献:

- [1] Benoit D S W, Durney A R, Anseth K S. The effect of heparin functionalized PEG hydrogels on three - dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation[J]. Biomaterials, 2007, 28: 66 - 77.
- [2] Koromila G, Michanetzis CPA, Missirlis Y F, et al. Heparin incorporating liposomes as a delivery system of heparin from PET - covered metallic stents: effect on haemocompatibility[J]. Biomaterials, 2006, 27: 2525 - 2533.
- [3] Laredo J, Xue L, Husak V A, et al. Silyl - heparin adsorption improves the in vivo thromboresistance of carbon - coated polytetrafluoroethylene vascular grafts[J]. The American Journal of Surgery, 2003, 186: 556 - 560.
- [4] Weber N, Wendel H P, Ziener G. Hemocompatibility of heparin coated surfaces and the role of selective plasma protein adsorption[J]. Biomaterials, 2002, 23: 429 - 439.
- [5] Patel S, Berry L R, Chan A K C. Covalent antithrombin - heparin complexes[J]. Thrombosis Research, 2007, 120: 151 - 160.
- [6] Liu T Y, Lin W C, Huang L Y. Hemocompatibility and anaphylatoxin formation of protein-immobilizing polyacrylonitrile hemodialysis membrane[J]. Biomaterials, 2005, 26: 1437 - 1444.
- [7] Yin J, Wei W Z, Liu X Y, et al. Immobilization of bovine serum albumin as a sensitive biosensor for the detection of trace lead ion in solution by piezoelectric quartz crystal impedance[J]. Analytical Biochemistry, 2007, 360: 99 - 104.
- [8] Harsch A, Calderon J, Timmons RB, et al. Pulsed plasma deposition of allylamine on polysiloxane: a stable surface for neuronal cell adhesion[J]. Journal of Neuroscience Methods, 2000, 98: 135 - 144.
- [9] Choukourov A, Biederman H, Slavinska D, et al. The influence of pulse parameters on film composition during pulsed plasma polymerization of diaminocyclohexane[J]. Surface and Coatings Technology, 2003, 174 - 175: 863 - 866.
- [10] Liu X Q, Xing J M, Guan Y P. Synthesis of amino - silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects, 2004, 238: 127 - 131.
- [11] Chen J S, Lau S P, Sun Z, et al. Metal - containing amorphous carbon films for hydrophobic application[J]. Thin Solid Films, 2001, 398 - 399: 110 - 115.
- [12] Tsai W B, Grunkemeier J M, Hørbett T A, et al. Variations in the ability of adsorbed fibrinogen to mediate platelet adhesion to polystyrenebased materials: a multivariate statistical analysis of antibody binding to the platelet binding sites of fibrinogen[J]. J Biomed Mater Res A, 2003, 67A(4): 1255 - 1268.

(收稿日期: 2008 - 08 - 25)