

PLGA 经多巴胺改性后负载纤连蛋白对 MC3T3-E1 细胞黏附的影响

陈汉帮¹, 陈刚^{1,2}, 李娜^{1,2}, 刘珏¹, 夏阳^{1,2*}, 章非敏^{1,2*}

(¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属口腔医院修复科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:建立以聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]为基底,经多巴胺(dopamine, DP)负载纤连蛋白(fibronectin, FN)的材料模型,研究 FN 对 MC3T3-E1 细胞黏附的影响。方法:使用红外光谱分析仪,接触角仪和石英晶体损耗检验微量天平测量样品表面基团、膜的亲水性和 FN 负载量;在磷酸盐缓冲液(PBS)环境中,分别接种 MC3T3-E1 细胞于各样品,使用延时照相系统每隔 3 min 观察细胞黏附情况,CCK-8 法测量接种细胞后 0.5、1.0、4.0、8.0 h 黏附细胞的吸光度。结果:红外光谱分析显示 DP 成功结合于 PLGA 膜表面,接触角测量表明 PLGA 膜经 DP 处理后亲水性改善,石英晶体损耗检验微量天平测得 FN 的负载量为 22.5 ng/cm², 延时照相系统和 CCK-8 检测结果显示负载 FN 的 PLGA 膜上细胞黏附比例和数量显著高于 PLGA 膜和 PLGA 的 DP 涂层膜($P < 0.05$)。结论:在 PBS 环境中,MC3T3-E1 细胞可在负载 FN 的 PLGA 膜上正常黏附。

[关键词] PLGA;多巴胺;纤连蛋白;细胞黏附

[中图分类号] R783

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)01-031-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150107

Effects of fibronectin modified PLGA membranes via dopamine on cell adhesion of MC3T3-E1 cells

Chen Hanbang¹, Chen Gang^{1,2}, Li Na^{1,2}, Liu Yu¹, Xia Yang^{1,2*}, Zhang Feimin^{1,2*}

(¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Prosthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare a fibronectin (FN) modified poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) membrane via dopamine (DP), and evaluate the effects of FN on cell adhesion of ME3T3-E1. **Methods:** Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), contact angle meter and quartz crystal microbalance with dissipation were performed to measure the surface groups, contact angle and FN loading of the samples; Time lapse imaging system was performed to observe cell adhesion of ME3T3-E1 every 3 min, and cell counting Kit-8 was used to measure the cell adhesion 0.5, 1.0, 4.0, 8.0 h after cell vaccination in phosphate buffered saline (PBS). **Results:** FTIR and contact angle showed DP was successfully grafted onto PLGA, and improved hydrophilicity was acquired on DP modified PLGA surfaces. Quartz crystal microbalance with dissipation showed that FN loading was 22.5 ng/cm². Higher cell adhesion ratio was observed with time lapse imaging system and CCK-8 tests in FN loading samples than in PLGA and PLGA-DP membranes ($P < 0.05$). **Conclusions:** MC3T3-E1 can adhere to FN modified PLGA membranes via DP in PBS successfully.

[Key words] PLGA; dopamine; fibronectin; cell adhesion

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(01):031-035]

创伤、炎症、肿瘤、先天畸形所引起口腔颌面部骨缺损的修复一直是口腔医学的难题。骨组织工程

通过生物材料支架可为细胞提供三维生存空间,有利于细胞获得足够的营养物质,进行充分代谢,使细胞在三维环境中发生黏附、移行、增殖和分化,从而达到不断修复缺损的目的。细胞成功黏附于支架材料表面,是其得以移行、增殖和分化的前提,也是支架材料得以发挥其特定生物学功能的前提,因此,最大程度地促进细胞成功黏附于支架表面,将有助于支架行使其功能。

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20140911);江苏高校优势学科建设工程资助(2011-137);江苏省医学领军人才与创新团队

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xiayangxy@sina.com; fmzhang@njmu.edu.cn

细胞黏附是由一系列蛋白共同介导和参与的复杂行为,目前已知的主要蛋白有:纤连蛋白(fibronectin, FN)、整合素蛋白(integrin)、I 型胶原(type I collagen)、玻连蛋白(vitronectin)和纤维蛋白原(fibrinogen)等^[1-4]。FN 是连接细胞外基质与细胞骨架肌动蛋白的桥梁,是参与细胞黏附活动的重要蛋白, FN 的分子结构中含有与以上蛋白的结合位点^[5]。FN 可在材料表面与其他参与细胞黏附行为的相关蛋白相互结合,并结合细胞骨架肌动蛋白,使黏附行为发生。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]是一种已被美国食品和药品管理局(FDA)认证的可降解功能性高分子有机化合物,具有良好的生物相容性,被广泛应用于制药、医用工程材料和现代化工业领域^[6]。本研究以 PLGA 作为支架材料基底。

多巴胺(dopamine, DP)在弱碱性环境中聚合为聚多巴胺(polydopamine),可吸附于几乎任何类型材料表面,所形成的涂层仍可利用其多余的活性基团参与材料表面的二次修饰,是一种可靠的携带修饰基团的方式^[7-8],在此基础上二次修饰的物质还可进行精确的定性与定量检测。多巴胺的化学结合性能相比于其他修饰方法如传统的表面浇筑法或浸渍法,其化学结合带来的修饰效果更加稳定,修饰成分不因溶液环境改变而改变,并且,修饰量更为可控。本研究拟以 PLGA 为基底,利用 DP 涂层后,吸附 FN,建立模型。

细胞的体外培养中,常选择培养基搭配血清作为培养环境,培养基成分复杂,除无机盐外,还含有多种氨基酸成分;血清则来自动物血,其成分仍未完全清晰,但已知其含有 FN 等参与黏附行为的蛋白。因此,为排除血清及培养基中蛋白质等成分的干扰,本实验以磷酸盐缓冲液(PBS)为培养环境,研究 FN 对细胞黏附活动的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

PLGA(岱罡生物工程有限公司,济南);小鼠颅骨成骨细胞系 MC3T3-E1(中国科学院细胞库);改良型 α -MEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司,美国);0.25%胰酶-EDTA(GIBCO 公司,美国);二甲基亚砜、二氯甲烷(广州化学试剂厂);CCK-8 试剂盒(Cell Counting Kit-8,碧云天,上海);盐酸多巴胺(阿拉丁公司,杭州);TRIS 盐酸(碧云天,上海);

纤连蛋白(Sigma 公司,美国);延时照相系统(Bio-station IMQ, Nikon 公司,日本);衰减全反射傅里叶红外光谱仪(Fourier Transform Infrared Spectrometer, FTIR, Nicolet 6700, Thermo Scientific 公司,美国);接触角仪(SL200B,上海梭伦科技有限公司);酶标仪(ELX800, Bio-Tek 公司,美国);石英晶体损耗检验微量天平(quartz crystal microbalance with dissipation, QCM-D, Biolin-Scientific 公司,瑞典)。

1.2 方法

1.2.1 PLGA 膜、PLGA 多巴胺涂层(PLGA-DP)膜、PLGA 经 DP 负载 FN(PLGA-FN)膜的制备

PLGA 膜:取 1 ml 二氯甲烷配制的 10% PLGA 溶液均匀涂于 3.5 cm 玻璃皿底部,待溶剂挥发,真空干燥 24 h。PLGA-DP 膜:DP 以 2 mg/ml 溶于 TRIS 盐酸,PLGA 膜浸入,12 h 后,去离子水漂洗 3 遍,真空干燥 24 h。PLGA-FN 膜:PLGA 经 DP 涂层膜浸泡于 100 μ g/ml FN 溶液,12 h 后取出,去离子水漂洗 3 遍,真空干燥 24 h。

1.2.2 红外光谱测量

取真空干燥后样品置于测量平面,固定,测量。

1.2.3 接触角测量

同一样品上随机选取 4 个点,以蒸馏水静滴法进行测试,每组测试 5 张。

1.2.4 FN 负载量测量

使用旋转涂膜法将 PLGA 涂于金芯片表面, QCM-D 设备激发,通入 DP 溶液,液封 12 h 后去离子水冲洗,通入 100 μ g/ml FN 溶液,待其信号稳定后,去离子水冲洗。

1.2.5 延时照相系统观测

样品置于 3.5 cm 培养皿,MC3T3-E1 细胞悬于 PBS 溶液,以 1×10^5 个/ml 接种于材料表面,放入延时照相系统生物工作站观察,3 min 为间隔拍照,连续观察 12 h。

1.2.6 细胞计数

样品置于 96 孔板,每孔接种 5 000 个细胞,分别于接种后 0.5、1.0、4.0、8.0 h 弃去原溶液, PBS 漂洗 2 遍,加入含 10%胎牛血清的培养液,24 h 后,每孔加入 CCK-8 液 10 μ l,2 h 后吸取液体,于 450 nm 波长下测试吸光度值。

1.3 统计学分析

采用统计分析软件 SPSS20.0 分析,定量数据两组比较用独立样本 t 检验,多组数据比较用方差分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 红外光谱测量

红外光谱显示 PLGA-DP 在 $3\ 347\ \text{cm}^{-1}$ 处有特征峰(图 1),该峰为 $-\text{NH}_2$,为 DP 特有,表明 DP 已成功涂层于 PLGA 表面。

2.2 接触角测量结果

PLGA 膜的接触角为 $(70.15 \pm 3.90)^\circ$,PLGA-DP 膜的接触角为 $(19.60 \pm 8.04)^\circ$,具有统计学差异(图 2)。PLGA-DP 膜与 PLGA 膜相比,亲水性显著改善。

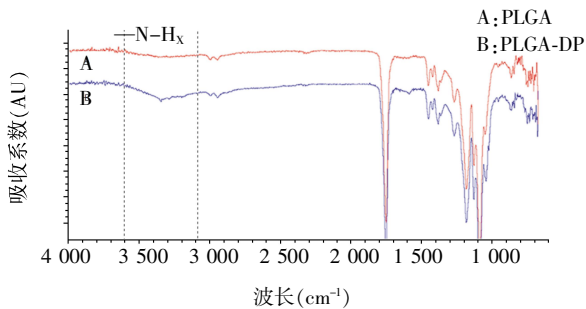
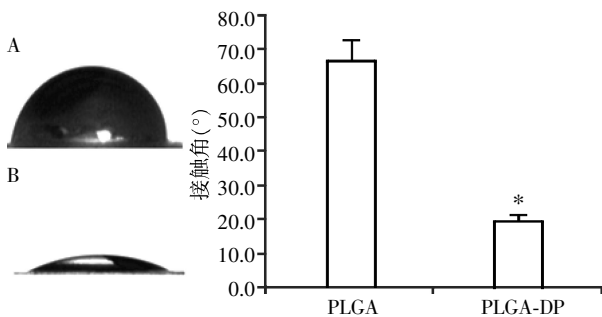


图 1 PLGA 膜与 PLGA-DP 膜的红外光谱图

Figure 1 FTIR spectra of pure PLGA and PLGA-DP membranes



A: PLGA; B: PLGA-DP; 与 PLGA 比较, $*P < 0.05$ 。

图 2 PLGA 膜与 PLGA-DP 膜接触角测试图片及统计结果

Figure 2 Contact angles of pure PLGA and PLGA-DP membranes

2.3 石英晶体损耗检验微量平衡技术测量结果

图 3 中,箭头 1 通入蛋白溶液,箭头 2 通入去离子水冲洗。使用 Sauerbrey 方程计算可得,蛋白冲洗前的吸附质量为 $90.6\ \text{ng}/\text{cm}^2$,冲洗后的实际吸附量为 $22.5\ \text{ng}/\text{cm}^2$ 。

2.4 延时照相系统

经延时照相系统可观察到在 PBS 环境中,PLGA-FN 组细胞可顺利黏附铺展(图 4),而 PLGA 组与 PLGA-DP 组的细胞粘附铺展情况较差,通过观察视野内粘附细胞数量,以细胞是否伸出伪足为依据,3 min 为单位,统计各时间点粘附细胞占视野总细胞数的百分比,可见 PLGA-FN 组细胞在 15 min 后已几乎全部发生黏附,而 PLGA 组与 PLGA-DP 组的细胞黏附比例显著低于 PLGA-FN 组(图 5)。

2.5 细胞吸光度检测

图 6 示接种 MC3T3-E1 细胞 0.5、1.0、4.0、8.0 h 后,发生黏附细胞在含 10%胎牛血清的培养液中培养 24 h 后的 CCK8 吸光度变化,各时间点 PLGA-FN 组的吸光度均显著高于 PLGA 组与 PLGA-DP 组($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞活动依赖于细胞周围环境与细胞自身分泌的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的共同作用,细胞周围环境提供细胞活动所必须的盐类、氨基酸和蛋白质^[9]。在骨组织工程的研究中,体外实验为模拟细胞体内生长环境,使用培养液搭配血清,其中含有细胞生长各阶段所必需的营养物质,生物支架与细胞相作用往往以特定蛋白质作为桥梁^[10],因此研究蛋白质与支架材料的适合性较直接研究支架材料与细胞的相互作用更具基础性和前瞻性。

细胞黏附是细胞活动的最初行为,是细胞移行、增殖、分化的前提。细胞黏附活动的具体机制仍

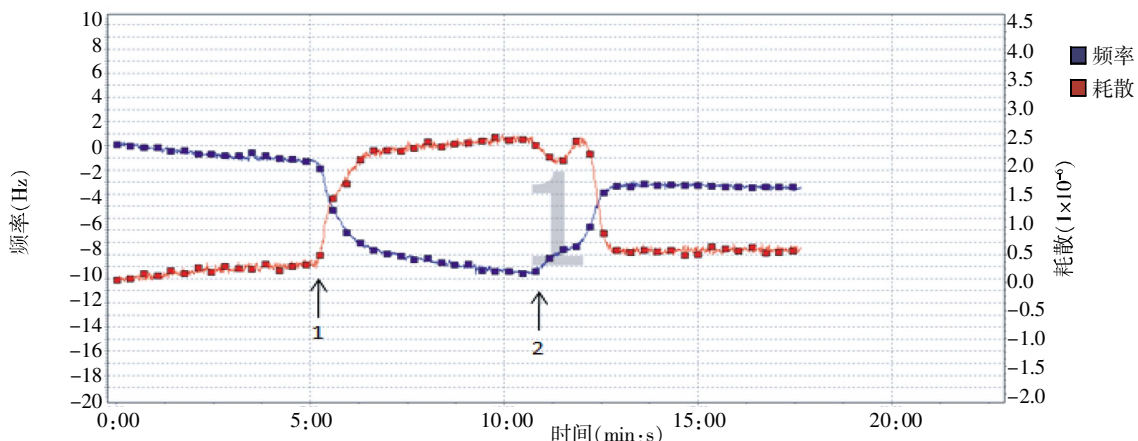


图 3 FN 蛋白溶液吸附结果

Figure 3 FN immobilization onto PLGA surface shown by QCM-D

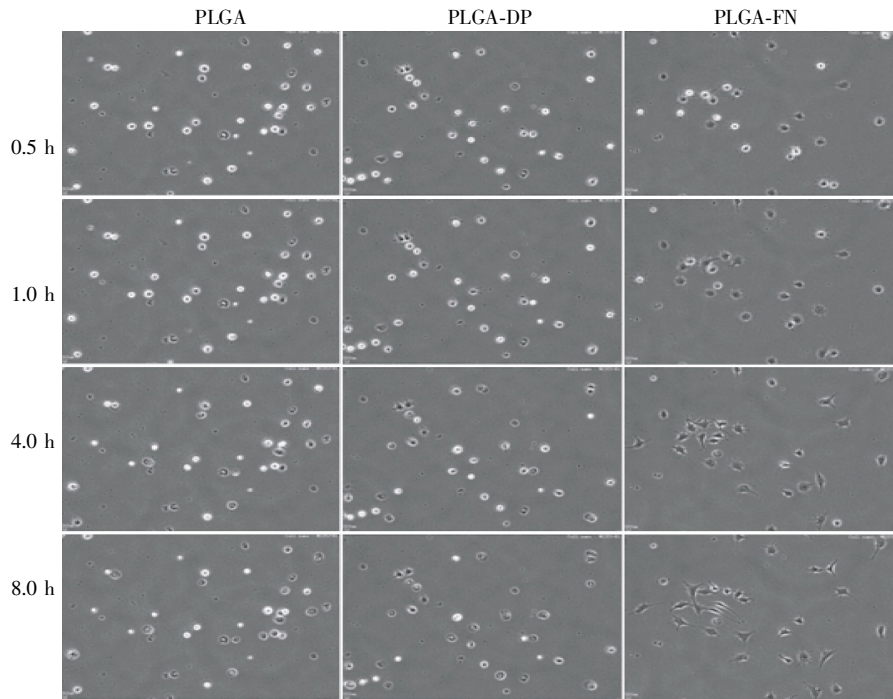


图 4 细胞在 PBS 环境中的黏附情况

Figure 4 Cell adhesion on PLGA, PLGA-DP and PLGA-FN surfaces in PBS shown by Time Lapse Imaging System

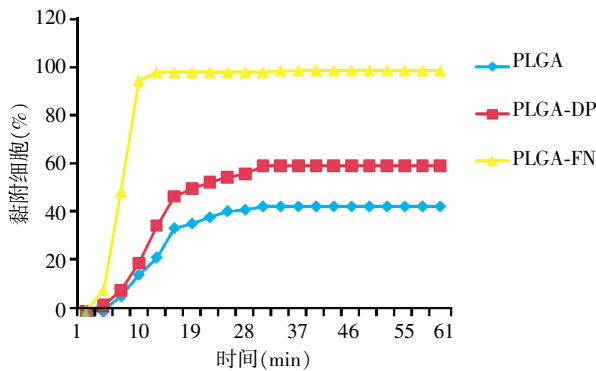


图 5 各时间点黏附细胞占比

Figure 5 Cell adhesion ratio at different time points

未完全清晰,但已知需要多种蛋白如 FN、整合素蛋白、胶原蛋白等共同参与。FN 存在于血清中,其结构序列中含有整合素、胶原、肌动蛋白及其他蛋白的结合位点,是连接细胞外基质与细胞骨架的重要蛋白^[11]。本研究探讨细胞黏附行为,选择 PBS 为培养环境,将参与细胞黏附的 FN 负载于支架材料表面,观察细胞在材料表面的黏附。

本研究选择 PLGA 作为基底,以 DP 为媒介将 FN 修饰于材料表面。PLGA 良好的生物安全性、机械性能及生物降解性已被证实,但其亲水性能不及天然高分子聚合物,通过多种表面涂层或修饰方法可显著改善 PLGA 的亲水性,而修饰具有特殊功能的生物活性基团则可为 PLGA 提供相应的生物学性能^[12]。DP 因在弱碱性环境中,其特有基团邻苯二酚

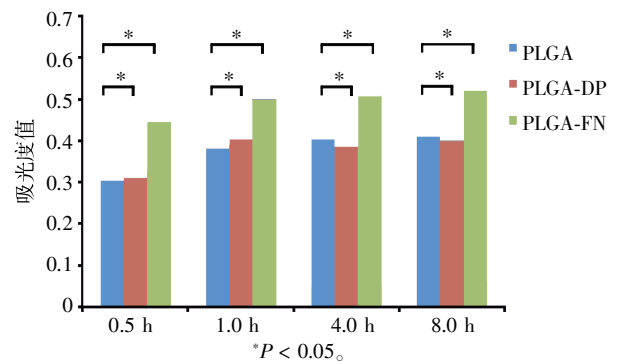


图 6 CCK-8 吸光度检测结果

Figure 6 The CCK-8 results of MC3T3-E1 seeded on different PLGA surfaces

发生氧化反应成为醌基,可涂层于材料表面,该涂层可显著改善材料的亲水性,醌基可作为功能基团,参与生物活性基团的吸附,对材料形成二次修饰^[13]。目前,DP 已成为一种常用的修饰手段。

因此,本研究基于 DP 对 PLGA 浇筑膜涂层,负载 FN,观察在 PBS 环境中,MC3T3-E1 细胞在该膜上的黏附活动。

红外光谱测试显示,PLGA-DP 膜在 3347 cm^{-1} 处有特征峰,该峰为 DP 特有的 -NH_2 基团产生,红外结果证明 DP 已成功在 PLGA 表面形成涂层;接触角测试显示,PLGA-DP 组显著低于 PLGA 组,亦能证明该涂层的存在,并表明 PLGA 的亲水性显著改善^[14]。在负载 FN 后,红外光谱测试和接触角测量均未见差异,为定性和定量 FN,本实验采用石英晶

体损耗检验微量平衡技术测量 FN 的负载量。石英晶体损耗检验微量平衡技术通过对检测对象频率与耗散变化分析计算样品的质量变化,图 3 箭头分别表示通入蛋白溶液开始负载和通入去离子水冲洗,通过计算前后频率与耗散的差值,得到 FN 的实际负载量^[15],为 22.5 ng/cm²。至此,实验模型建立完成。

延时照相系统观察了 MC3T3-E1 细胞接种于 3 种 PLGA 膜上黏附情况,PLGA 组和 PLGA-DP 组的细胞仅能部分黏附,且铺展较差,而 PLGA-FN 组的细胞几乎全部黏附,且可进行铺展。通过对黏附细胞的计数统计(图 5),在 PBS 环境中,PLGA-FN 组的黏附比例高于 PLGA 组和 PLGA-DP 组。PLGA-DP 组的黏附比例与 PLGA 组相比虽然略高,在 60%左右趋于稳定,与 PLGA-FN 组趋于 100%仍有很大差距,这一点充分证明了 FN 在细胞黏附活动中的重要作用。图 5 的统计图表明,细胞的黏附活动在接种后的 0.5 h 内较为活跃,此后趋于稳定。相比于完全培养基环境下的细胞体外培养,细胞在短时间内即可完成较好的黏附与铺展,而本研究因以 PBS 为培养环境,PBS 中缺乏促进细胞黏附的蛋白质成分,因而在 PLGA 组和 PLGA-DP 组中,细胞黏附效率较低,且难以铺展,而在 PLGA-FN 组中,细胞几乎全部黏附且铺展,证明 FN 对于细胞早期黏附有重要促进作用。PLGA 组和 PLGA-DP 组仍发生了部分细胞的黏附行为,参与这部分细胞黏附行为的蛋白质可能来自于细胞自身携带和分泌。

CCK-8 吸光度测试通过检测发生黏附的细胞吸光度,以吸光度值反映细胞数量,在 0.5、1.0、4.0、8.0 h,PLGA-FN 组的细胞数量都多于 PLGA 组和 PLGA-DP 组,同时印证了延时照相系统的观察结果。

在延时照相系统观测中,PLGA-DP 组的细胞黏附比例高于 PLGA 组,证明亲水性的改善对细胞黏附活动亦有促进作用,而 PLGA-FN 组则证明 FN 仍在黏附活动中起主导作用。

本实验选择 PBS 为观察环境,将参与细胞黏附的 FN 负载于支架材料表面,而 MC3T3-E1 细胞仍能成功黏附,说明特定功能蛋白负载于材料表面仍能行使其功能,这将为实验者进行后期生物支架材料的研究提供指导。

[参考文献]

[1] Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion:RGD and integrins[J]. Science, 1987, 238 (4826):491-497
[2] Halperin A, Kroger M. Thermoresponsive cell culture substrates based on PNIPAM brushes functionalized with ad-

hesion peptides;theoretical considerations of mechanism and design [J]. Langmuir, 2012, 28(48):16623-16637
[3] Rea VE, Lavecchia A, Di Giovanni C, et al. Discovery of new Small molecules targeting the vitronectin-binding site of the urokinase receptor that block cancer cell Invasion[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(8):1402-1416
[4] Rosenberg N, Sheptovitsky V, Romanenco ON, et al. Involvement of protein disulfide isomerase (PDI) in beta3 integrin-mediated adhesion of nucleated cells to immobilized fibrinogen[J]. J Thromb Haemost, 2013, 11:500
[5] Henderson B, Nair S, Pallas J, et al. Fibronectin;a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins [J]. FEMS Microbiol Rev,2011,35(1):147-200
[6] Wu YC, Shaw SY, Lin HR, et al. Bone tissue engineering evaluation based on rat calvaria stromal cells cultured on modified PLGA scaffolds[J]. Biomaterials, 2006,27 (6):896-904
[7] Lee YJ, Lee JH, Cho HJ, et al. Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration[J]. Biomaterials, 2013,34(21):5059-5069
[8] Yang K, Lee JS, Kim J, et al. Polydopamine-mediated surface modification of scaffold materials for human neural stem cell engineering [J]. Biomaterials,2012,33(32): 6952-6964
[9] Tadeo I, Berbegall AP, Escudero LM, et al. Biotensegrity of the extracellular matrix;physiology, dynamic mechanical balance and implications in oncology and mechanotherapy [J]. Front Oncol, 2012,27(22):693-705
[10] Lebkowski JS, Schain LR, Okarma TB, et al. Serum-free culture of hematopoietic stem cells;a review [J]. Stem Cells, 1995,13(6):607-612
[11] Smith ML, Gourdon WC, Little KE, et al. Force-induced unfolding of fibronectin in the extracellular matrix of living cells[J]. PLoS Biol, 2007,5(10):e268
[12] Goddard JM, Hotchkiss JH. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds [J]. Prog Polym Sci, 2007,32(10):698-725
[13] Wang JL, Ren KF, Chang H, et al. Direct adhesion of endothelial cells to bioinspired poly(dopamine) coating through endogenous fibronectin and integrin alpha5 beta1 [J]. Macromol Biosci, 2013,13(4):483-493
[14] Chen G, Xia Y, Lu X, et al. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts[J]. J Biomed Mater Res A, 2013,101(1):44-53
[15] Hubbard B, Buczek-Thomas JA, Nugent MA, et al. Heparin-dependent regulation of fibronectin matrix conformation[J]. Matrix Biol, 2013,34:124-131