环状构象PEG改性表面及其优越的抗凝血性能

金晶, 胡宇, 韩媛媛*, 姜伟*

中国科学院长春应用化学研究所, 高分子物理与化学国家重点实验室, 长春 130022

*通讯作者, E-mail: yyhan@ciac.ac.cn; wjiang@ciac.ac.cn

收稿日期: 2018-03-24; 接受日期: 2018-04-27; 网络版发表日期: 2018-07-03

国家自然科学基金(编号: 51673196, 21674115)、国家重点研发计划(编号: 2017YFC1104800)和吉林省科技发展项目(编号: 20160520139JH)资助

摘要 聚乙二醇(PEG)因其优异的抗蛋白质吸附能力成为抗凝血材料的首选。目前, 多数研究都集中在PEG链长和接枝密度对蛋白质吸附的影响, 鲜有关注PEG链构象影响的研究。本文利用硫金键在石英晶体微天平金片表面构建了两种不同分子量($M_w=1000$ 和 $M_w=5000$)的环状(SH-PEG-SH)和线型(mPEG-SH)构象的PEG改性表面, 并研究了其抗纤维蛋白原吸附机理和抗凝血性能。X射线光电子能谱仪和原子力显微镜确定了不同表面的组成及其相结构。结果发现, 环状构象的PEG表面相对于线型PEG构象能更加有效地抑制纤维蛋白原的吸附, 同时具有更加优异的抗血小板和红细胞黏附性能。分析其蛋白质吸附机理发现, 当PEG分子量较低时($M_w=1000$), 其环状构象PEG表面抗纤维蛋白原吸附机理源于较高的表面覆盖率; 当PEG分子量较高时($M_w=5000$), 其抗纤维蛋白原吸附机理源于高黏弹性和高表面覆盖率共同作用的结果。本工作为构建抗凝血涂层提供了新的思路, 并为制备高性能生物医用材料提供了理论基础。

关键词 聚乙二醇, 环状构象聚合物表面, 蛋白质吸附, 抗凝血性能, 石英晶体微天平

1 引言

聚乙二醇(PEG)作为典型的改善血液相容性单体之一, 由于其优异的抗蛋白质吸附能力^[1]和低毒性而成为抗凝血材料的首选^[2,3]。聚合物分子链的空间排斥效应^[4]和水化层理论^[5]是PEG抗蛋白质吸附的两大机理。PEG层的电中性可以消除界面与蛋白质之间的静电相互作用; 较低折射率可以削弱分子链与蛋白质之间的范德华相互作用; 较大偶极矩使得PEG链为强氢键受体, 因此具有高度水合性。前期工作中我们利用

PEG这一经典体系系统研究了不同链长^[6]和接枝密度^[7]PEG对血浆蛋白质吸附的影响。研究表明, PEG表面覆盖率和PEG接枝层的形变能力是PEG表面抑制蛋白质吸附的两个最重要的因素^[8]。Unsworth等^[9]在考察纤维蛋白原在PEG接枝表面的吸附行为时发现, 当PEG接枝密度达到一定值之后, PEG链段间持续增加的排斥力会导致PEG接枝层释放结合水, 从而导致其抗蛋白质吸附性能下降。但Whitesides等^[10]的研究却表明特殊构象状态下PEG链只需几个乙二醇单元就可以赋予表面优异的抗蛋白质吸附性能。因此, PEG改

引用格式: Jin J, Hu Y, Han Y, Jiang W. Modified surface by poly(ethylene glycol) with looped conformation and its superior anticoagulant property. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 972–980, doi: [10.1360/N032018-00061](https://doi.org/10.1360/N032018-00061)

性表面抑制蛋白质吸附是一个与PEG构象相关的复杂的过程. 通过合理设计PEG链结构, 构建有效水化层以及提高表面PEG黏弹性对研究PEG改性表面蛋白质吸附的内在机理显得十分重要^[11].

目前, 绝大多数的研究都是通过将PEG分子链的一端接枝到表面从而引入PEG分子链. 根据接枝密度不同, 可构建粉饼状、蘑菇状和刷状的PEG构象^[12]. 近年来, 也有一些研究者通过合成设计三嵌段共聚物来构建两端固定于表面的环状构象PEG. Kang等^[13]利用PEG衍生物链两端的多巴胺基团, 构建了将PEG两端同时接枝到表面的PEG改性层. 研究表明, 两端同时固定的PEG呈环状构象, 相对一端固定的刷状或者蘑菇状构象的接枝聚合物, 环状构象具有相对优异的抗蛋白质吸附性能. Lahann等^[14]则通过调控基底与接枝聚合物之间的静电相互作用, 来实现表面接枝聚合物的线型构象与环状构象的可逆转换, 进而实现了表面性质在亲水与疏水之间的可逆转换. 然而, 环状构象PEG层的性质及其抗蛋白质吸附机理还值得进一步探讨. 近期, 我们通过计算机模拟的方法构建了线型和环状聚合物刷表面, 模拟结果发现, 聚合物表面平整度和密实水化层的形成是环状聚合物刷抑制蛋白质吸附的两个重要因素^[15].

本工作通过硫金键在石英晶体微天平(QCM-D)金芯片表面实时在线构建了不同分子量(1K和5K)的一端固定于表面(线型mPEG-SH)和两端固定于表面(环状SH-PEG-SH)的PEG接枝层, 并进一步研究了线型和环状PEG改性表面的纤维蛋白原吸附机理和抗凝血性能(血小板黏附和红细胞黏附). QCM-D可实时记录PEG链的接枝过程以及纤维蛋白原与PEG改性表面的相互作用过程中吸附层性质的变化, 并且分别通过X射线光电子能谱仪(XPS)和原子力显微镜(AFM)确定PEG改性表面组成以及相结构.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

2.1.1 试剂

纤维蛋白原(Fib, Sigma, F8630, 美国); mPEG-SH $M_w=1000$ g/mol (mPEG-SH-1K), mPEG-SH $M_w=5000$ g/mol (mPEG-SH-5K), SH-PEG-SH $M_w=1000$ g/mol (SH-PEG-SH-1K), SH-PEG-SH M_w

$=5000$ g/mol (SH-PEG-SH-5K) ($\geq 95.0\%$, 上海炎怡生物, 中国); 98%浓硫酸, 30%过氧化氢, 氨水(25%, 北京化工厂, 中国); Hellmanex™ II (Sigma, 美国); 磷酸盐缓冲液粉剂(PBS, 北京鼎国科技股份有限公司, 中国). 实验用水为超纯水.

2.1.2 仪器设备

E4型石英晶体微天平(瑞典百欧林公司), Thermo ESCALAB 250型X射线光电子能谱仪(美国Thermo-VG Scientific公司), 原子力显微镜(日本Seiko仪器公司, SPA-300HV), 扫描电子显微镜(荷兰, FEI公司, XL 30ESEM FEG), 激光共聚焦显微镜(德国, 卡尔蔡司, LSM 700).

2.2 实验方法

2.2.1 QCM-D实验

本实验利用QCM-D实时在线监测不同PEG链(SH-PEG-SH或mPEG-SH)在QCM-D金片(QSX301)表面的接枝过程以及纤维蛋白原分子在PEG改性表面的吸附行为. QCM-D实验在瑞典百欧林公司生产的E4型石英晶体微天平(Q-sense AB, Gothenburg, 瑞典)中进行. 实验过程中记录1、3、5、7、9、11、13次倍频的结果, 本文中给出的所有QCM-D结果均为3次倍频.

QCM-D金片清洗过程如下: 首先将金片暴露在185 nm+254 nm的紫外灯下照射15 min以除去金片表面的有机物, 接着将金片置于水:氨水(25%):双氧水(30%)体积比为5:1的混合溶液中, 75℃下浸泡5 min后用大量去离子水冲洗^[16]. 氮气吹干后, 再将金片置于“piranha溶液”(浓硫酸:双氧水=7:3, v/v)中室温下浸泡5 min, 大量去离子水冲洗后氮气吹干待用.

QCM-D实验中, 温度控制在20℃ ($\pm 0.02^\circ\text{C}$), 流速固定在100 $\mu\text{L}/\text{min}$. 不同种类的PEG (SH-PEG-SH或mPEG-SH)的PBS溶液浓度为0.2 mmol/L或者0.002 mmol/L, 纤维蛋白原的PBS溶液浓度为1 mg/mL. 实验首先通入PBS溶液, 待基线稳定后, 通入PEG溶液30 min, 通过硫金键将PEG分子固定在QCM-D金片表面形成抗污层. 通入PBS缓冲溶液清洗掉物理吸附的PEG分子, 接着通入纤维蛋白原溶液30 min, 考察不同PEG构象与蛋白质的相互作用, 最后通入PBS溶液30 min清洗掉以松散状态吸附的蛋白质分子.

QCM-D数据拟合过程如下: PEG分子和蛋白质的

质量和厚度都利用Voigt黏弹性模型进行拟合. 根据实验中3、5、7、9、11、13次倍频的结果, 我们利用Q-Tools软件(Q-Sense)软件拟合出芯片表面PEG接枝量和纤维蛋白原吸附量随时间的变化. 在拟合过程中参数设置如下: 层密度 $\rho_1=1200 \text{ kg/m}^3$ (认为层密度值介于蛋白质密度 1400 kg/m^3 和结合水密度 1000 kg/m^3 之间)^[17]; 液相密度设为 1000 kg/m^3 , 液相黏度设为 0.001 kg/ms , 每一层的密度在拟合中通过迭代的方法找出合适的值然后固定. 层参数的边界设置为: 黏度范围设为 $0.0001\sim 0.1 \text{ kg/ms}$, 剪切力范围设为 $1\times 10^5\sim 1\times 10^7 \text{ Pa}$, 厚度范围设为 $1\times 10^{-11}\sim 1\times 10^{-6} \text{ m}$ ^[18].

2.2.2 表面相形貌测试

样品表面相形貌均使用AFM进行测定. 所有样品的PEG接枝过程都在QCM-D中进行, 样品从QCM-D样品池中取出后用去离子水冲洗以除去表面残留的PBS缓冲溶液的无机盐, 然后用高纯氮气吹干. 扫描探针使用硅悬臂(弹性常数为 42 N/m , 共振频率约为 70 kHz), 采用轻敲模(tapping-mode)进行测试.

2.2.3 表面元素成分分析

采用Thermo ESCALAB 250型X射线光电子能谱仪(美国)对不同PEG改性表面进行元素分析, 样品制备方法同上AFM测试. XPS测试条件: 室温, 射线源为Mg K α ($h\nu=1253.6 \text{ eV}$), 分析内腔压强为 $8\times 10^{-8} \text{ Pa}$. 测量时, 样品的测量掠入射角为 30° , 并在 $0\sim 1200 \text{ eV}$ 内进行全扫描, 测定样品的XPS全扫描谱图. 随后采集所需元素的高分辨扫描谱并用软件进行数据分析. 结合能采用EC 1s= 284.7 eV 进行校正, 参考ECu 2p (0价或+1价)= 932.7 eV 进行零点校正, 测试元素为C、Au和S. 表面元素含量利用对应元素的峰面积进行计算.

2.2.4 血小板黏附测试

富血小板血浆(PRP)的制备: 采集新鲜兔血于含有浓度为 $3.8 \text{ wt\%}$ 的柠檬酸钠为抗凝剂的采血管中, 在 1000 r/min 下离心 15 min , 取上层淡黄色液体得到富血小板血浆. 血小板黏附实验: 将PEG改性样品置于微孔板中, 用PBS浸泡过夜, 取 $20 \mu\text{L}$ PRP加于样品表面, 37°C 下孵化 120 min . 之后用PBS冲洗3次, 浸入 2.5% 的戊二醛PBS溶液中于 4°C 下固定 8 h . 将样品用去离子水浸洗一次后依次用 30% 、 50% 、 70% 、 90% 以及 100%

乙醇溶液脱水. 后用扫描电子显微镜(SEM)喷金观察血小板在不同改性表面的黏附情况.

同时, 将用戊二醛固定并用乙醇脱水后的不同改性表面的血小板用激光共聚焦显微镜(CLSM)进行观察分析并统计光强. 实验中所用的CLSM (LSM700-Zeiss, 德国)配置了3种波长的激光光源, 波长分别为 405 、 488 以及 555 nm . 在本实验中所用波长为 488 nm . 实验中用相同的设置观察所有样品, 采用Zen 2011软件进行分析(Carl Zeiss).

2.2.5 红细胞黏附

采集新鲜兔血于含有浓度为 $3.8 \text{ wt\%}$ 的柠檬酸钠为抗凝剂的采血管中, 离心处理(3000g , 5 min), 吸除上清液(富含血小板的血浆), 得到红细胞浓缩液. 利用PBS清洗3次, 配制成 2% 的红细胞悬浮液. 将样品置于PBS缓冲溶液中 37°C 浸泡 2 h , 移除PBS后, 加入 2 mL 红细胞悬浮液, 在 37°C 下孵化 1 h . 加入 2.5% 戊二醛PBS溶液, 之后使用PBS清洗, 用 30% 、 50% 、 70% 、 90% 以及 100% 的乙醇溶液依次脱水. 最后用激光共聚焦显微镜进行观察, 所用波长为 555 nm . 实验中用相同的设置观察所有样品, 实验结果用Zen 2011软件进行分析(Carl Zeiss).

3 结果与讨论

3.1 单双巯基PEG-1K改性表面纤维蛋白原吸附

mPEG-SH-1K和SH-PEG-SH-1K分别通过“grafting-to”的方式被接枝到QCM-D金芯片表面, 由此获得一端被固定的和两端均被固定的PEG刷状(mPEG-SH-1K)和环状(SH-PEG-SH-1K)改性表面. 图1给出了不同种类PEG-1K在高浓度(0.2 mmol/L)和低浓度(0.002 mmol/L)下分别通入QCM-D芯片表面接枝的频率曲线, 以及后续纤维蛋白原吸附图. 图2给出了每个样品对应的频率值. 芯片表面频率的绝对值变化与表面吸附层质量的变化成正比^[19]. 当PEG-1K在高浓度(图1(a))下接枝时, SH-PEG-SH-1K的频率变化为 $27.4\pm 3.0 \text{ Hz}$, 而mPEG-SH-1K的频率变化为 $16.6\pm 2.0 \text{ Hz}$, 说明环状构象SH-PEG-SH-1K在高浓度下接枝量更高. 为了获得相同的环状和线型PEG-1K接枝量, 我们将PEG-1K的浓度降低为 0.002 mmol/L (图1(b)). 此时SH-PEG-SH-1K和mPEG-SH-1K的频率改变

图1 PEG-1K在表面接枝和后续纤维蛋白原吸附的频率. 0.2 mmol/L (a)和0.002 mmol/L (b) (网络版彩图)

Figure 1 The frequency changes of PEG-1K surface grafting and the subsequent fibrinogen adsorption, 0.2 mmol/L (a) and 0.002 mmol/L (b) (color online).

分别为 22.6 ± 1.3 和 21.4 ± 1.3 Hz, 由此获得几乎相同的表面接枝量. 同时, 芯片表面PEG-1K的接枝量可以由XPS测试进一步确定(表1). 低浓度下, SH-PEG-SH-1K表面的硫含量约为mPEG-SH-1K表面的2倍, 证明二者有着几乎相同的接枝质量. 从随后的纤维蛋白原吸附数据可以发现, 无论SH-PEG-SH-1K与mPEG-SH-1K改性表面的接枝量是否相同, SH-PEG-SH-1K表面上纤维蛋白原吸附量始终小于mPEG-SH-1K. 由此证明, 当分子量为1K时, 环状构象SH-PEG-SH-1K改性表面的抗纤维蛋白原吸附能力相对于线型mPEG-SH-1K得到了提高, 有利于抗凝血性能的改善.

为了进一步阐明不同PEG-1K抑制纤维蛋白原吸附的本质, 我们分析了PEG-1K在接枝过程中耗散(ΔD)随频率(Δf)变化的曲线, 如图3所示. 在QCM-D中, 芯片表面所产生的耗散变化反映出表面吸附层黏弹性质. $\Delta D/\Delta f$ 的比值小, 说明PEG链接枝过程中没有引起很大

图2 PEG-1K在表面接枝和后续纤维蛋白原吸附的频率值. 0.2 mmol/L (a)和0.002 mmol/L (b) (网络版彩图)

Figure 2 The frequency values of PEG-1K surface grafting and the subsequent fibrinogen adsorption, 0.2 mmol/L (a) and 0.002 mmol/L (b) (color online).

表1 不同样品表面元素分析

Table 1 Surface elemental analysis of samples

样品	XPS原子含量 (at%)		
	[C]	[Au]	[S]
SH-PEG-SH-1K-H	44.63	50.73	4.64
mPEG-SH-1K-H	34.65	64.12	1.23
SH-PEG-SH-1K-L	44.63	51.73	3.64
mPEG-SH-1K-L	44.85	53.28	1.87

的耗散变化, 即PEG接枝层刚性较强. 反之, $\Delta D/\Delta f$ 的比值大, 就说明得到了一个黏弹性较好的PEG层. 从图3中可以发现, 在高浓度(0.2 mmol/L)下, 环状构象SH-PEG-SH-1K的 $\Delta D/\Delta f$ 值比线型构象mPEG-SH-1K的略高, 这主要由接枝量差异所造成; 在低浓度下(0.002 mmol/L), 线型和环状构象PEG改性表面的接枝量相同的情况下, 得到的 $\Delta D/\Delta f$ 比值几乎相同, 说明在分子量

图3 PEG-1K接枝过程频率和耗散关系图(高浓度mPEG-SH-H、SH-PEG-SH-H (0.2 mmol/L)和低浓度mPEG-SH-L、SH-PEG-SH-L (0.002 mmol/L)) (网络版彩图)

Figure 3 The relations of frequency and dissipation of PEG-1K, high concentration mPEG-SH-H, SH-PEG-SH-H (0.2 mmol/L) and low concentration mPEG-SH-L, SH-PEG-SH-L (0.002 mmol/L) (color online).

较低时, 环状构象PEG表面抗纤维蛋白原的优越性并不依赖于PEG接枝层的黏弹性。同时可以发现, 相比于高浓度下构建的PEG层, 低浓度下构建的PEG层的 $\Delta D/\Delta f$ 都要低, 说明低浓度下构建的PEG层更加刚性。结合图2的结果也可以发现, 在低浓度下SH-PEG-SH-1K改性表面的接枝量(22.6 ± 1.3 Hz)比高浓度下SH-PEG-SH-1K改性表面的接枝量(27.4 ± 3.0 Hz)低, 前者PEG的黏弹性(图3黑线)远不如后者(图3红线), 但前者的抗纤维蛋白原吸附能力却比后者有所提高。这与传统的增加PEG链的黏弹性有利于提高其位阻排斥能力, 从而抑制蛋白质吸附的理论相悖^[20,21]。因此, 以上实验结果说明了一个重要的事实, 那就是低分子量的PEG-1K改性表面的抗纤维蛋白原吸附能力并不依赖于表面的黏弹性质, 即不依赖于表面的位阻排斥作用。

3.2 单双巯基PEG-5K改性表面纤维蛋白原吸附

前面利用短链PEG-1K的环状和线型结构证明了环状构象PEG-1K具有更加优越的抗纤维蛋白原性能, 其PEG-1K环状表面的抗纤维蛋白原吸附能力并不依赖于表面PEG的黏弹性。与此类似, 我们将PEG分子量提高到5K, 进一步考察了其环状和线型结构PEG-5K对纤维蛋白原吸附的影响。

图4(a)给出了QCM-D中PEG-5K分子链接枝以及随后纤维蛋白原吸附过程中频率变化的结果。由图可以发现, 在PBS淋洗后, SH-PEG-SH-5K和mPEG-SH-

图4 (a) 不同种类的PEG-5K在QCM-D芯片表面接枝和后续纤维蛋白原吸附的频率图; (b) 接枝过程频率和耗散关系图(网络版彩图)

Figure 4 (a) The frequency changes of PEG-5K surface grafting and the subsequent fibrinogen adsorption. (b) The relations of frequency and dissipation of PEG-5K (color online).

5K的接枝量基本相同; 纤维蛋白原吸附结果表明, SH-PEG-SH-5K改性表面拥有比mPEG-SH-5K改性表面更好的抗纤维蛋白原吸附性能。图4(b)给出了不同PEG5K分子链接枝过程中耗散随频率的变化结果。与PEG-1K改性表面的实验结果不同, 环状SH-PEG-SH-5K具有比线型mPEG-SH-5K更高的 $\Delta D/\Delta f$ 值, 由此证明环状SH-PEG-SH-5K具有较高的黏弹性。说明, 环状构象PEG无论在高分子量5K还是低分子量1K时都具有优于线型构象PEG的抗蛋白质吸附能力, 长链环状SH-PEG-SH-5K抗纤维蛋白原机理源于PEG-5K较高的黏弹性。

3.3 环状构象PEG抗蛋白质吸附机理

PEG抗蛋白质吸附的机理, 根据PEG的链长分为位阻排斥理论和水化层理论。位阻排斥理论一般用于解释长链PEG的抗蛋白质吸附机理^[22]。研究发现, 随

着PEG分子链长度以及分子链密度的增加,其蛋白质吸附量降低.水化层理论一般用来解释短链PEG、两性离子聚合物等的抗蛋白质吸附机理^[23].前面的实验结果表明,PEG-1K改性表面的抗纤维蛋白原吸附能力并不依赖于PEG表面的黏弹性质.在PEG抗蛋白质吸附机理的研究中,PEG分子链与金表面的相互作用是一个十分重要却又常常被忽略的问题. Taylor等^[24,25]研究证明了这种相互作用力的存在,接枝在表面的PEG链起到了site-blocking的作用.蛋白质与PEG链在表面竞争吸附位点,PEG分子比蛋白质分子更加有效地吸附到表面.但是,PEG分子链在表面不可避免的密度波动会导致蛋白质在PEG改性表面吸附,并且这种波动决定了蛋白质吸附量的大小.

在本工作中,SH-PEG-SH-1K分子链两端被同时固定到表面而形成环状构象,这种构象的PEG分子能更加有效地覆盖基底表面.同时由于PEG分子两端固定,分子链的移动性降低,因此表面PEG分子链的密度波动会显著减小,从而使得出现可供蛋白质吸附的空白位点难度增加.而线型mPEG-SH-1K,PEG的密度波动明显增大,造成蛋白质有可能吸附的位点存在.因此环状SH-PEG-SH-1K改性表面的抗蛋白质吸附能力要优于线型mPEG-SH-1K.另一方面,环状SH-PEG-SH-1K改性表面的PEG呈平躺的环状构象,如图5(a)所示.这种平躺的环状构象PEG分子使得SH-PEG-SH-1K改性表面在拥有与线型mPEG-SH-1K改性表面相同的接枝量时,比后者拥有更大的PEG表面覆盖率.因此,SH-PEG-SH-1K改性表面能更加有效地形成一个完整的水化层来抑制纤维蛋白原的吸附.图6给出了不同PEG改性表面的AFM相图. mPEG-SH-1K改性表面显得比较混杂(图6(a)),有明显的微相结构,说明线型PEG不能有效地覆盖基底,从而使得一些基底表面裸

图5 不同分子量环状PEG抗蛋白质吸附机理图(网络版彩图)

Figure 5 The protein adsorption mechanisms of looped PEG with different molecular weight (color online).

图6 不同PEG改性表面的AFM相图(网络版彩图)

Figure 6 The AFM phase diagram of PEG modified surfaces (color online).

露出来.而SH-PEG-SH-1K改性表面(图6(b))呈现出均一的表面相形貌,说明基底表面能够被PEG有效地覆盖.与此同时,我们的模拟结果也佐证了PEG表面的平整度和密实水化层的形成是环状PEG抑制蛋白质吸附的两个重要因素^[15].

在前期的实验工作中^[8],我们也研究了不同分子量PEG改性表面的抗纤维蛋白原吸附.结果发现,PEG-5K表面优异的黏弹性使其拥有良好的形变能力.不管PEG-5K分子链呈现蘑菇状构象还是刷状构象,其表面始终拥有较好的抗纤维蛋白原吸附性能.因此,提高PEG-5K改性表面的黏弹性是提高其抗蛋白质吸附能力的关键.在本工作中,我们进一步构建出环状SH-PEG-SH-5K和线型mPEG-SH-5K进行比较,结果发现,环状构象SH-PEG-SH-5K不仅黏弹性优于线型mPEG-SH-5K,其抗纤维蛋白原性能也显示出更加明显的优越性.这种优越性的体现,不仅是由于两端固定的长链其黏弹性明显提高,同时其表面结构的均一性(图6(b')),即表面覆盖率的提高,也有助于其抑制蛋白质的吸附.综上所述,对于环状构象SH-PEG-SH-5K改性表面,PEG分子链的表面覆盖率更大,接枝表面更加均一,使其拥有更加优异的抗纤维蛋白原吸附性能.同时环状构象能够有效提高表面PEG接枝层的黏弹性,从而进一步改善其抗纤维蛋白原吸附性能.

3.4 抗凝血性能

3.4.1 血小板黏附

在血液与材料表面相接触时, 血浆蛋白质与表面发生相互作用后, 会诱发血细胞与材料表面的相互作用, 从而导致凝血、溶血、炎症及感染等不良反应. 血细胞包括血小板、红细胞和白细胞^[3]. 不同PEG改性表面的血小板黏附SEM如图7所示. 为了对黏附的血小板数量进行定量分析, 我们用CLSM观察了黏附的血小板并测定了表面血小板的荧光强度. 图8显示出不同PEG改性表面血小板黏附的CLSM图及数量统计. 整体而言, PEG-1K样品表面血小板的黏附数量和激活程度都比PEG-5K要高, 尤其是线型构象mPEG-SH-1K改性表面, 血小板不仅数量很大($\sim 743.4 \pm 125.9$), 而且都呈现高度的激活、铺展和明显伪足态. 说明分子量的提高有利于改善PEG改性表面的血液相容性. PEG-5K接枝层具有良好的黏弹性和构象变化能力, 因此能够通过调整自身构象来降低表面与纤维蛋白原分子间的相互作用, 从而有效抑制纤维蛋白原的吸附, 进而减少血小板的激活和黏附^[8]. 进一步对比环状构象PEG表面SH-PEG-SH-1K ($\sim 367.9 \pm 108.6$)、SH-PEG-SH-5K ($\sim 22.5 \pm 11.2$)和线型PEG表面mPEG-SH-1K ($\sim 743.4 \pm 125.9$)、mPEG-SH-5K ($\sim 33.5 \pm 10.5$), 可以发现, 环状构象PEG改性表面确实能够有效抑制血小板的黏附. 在SH-PEG-SH-5K表面上, 无论是SEM还是CLSM的结果, 几乎都没有血小板的黏附, 证明了高分子量环状构象PEG优越的抗血小板黏附性能.

图7 不同PEG改性表面血小板黏附图(SEM) (网络版彩图)

Figure 7 The SEM figures of platelets adhered on PEG modified surfaces (color online).

图8 不同PEG改性表面血小板黏附及数量统计(网络版彩图)

Figure 8 The platelets adhered on PEG modified surfaces (CLSM) and quantitative statistic (color online).

3.4.2 红细胞黏附

图9列出了不同PEG改性表面红细胞黏附的CLSM图以及数量统计. 从CLSM荧光统计可以发现, 环状PEG表面的相对于线型PEG而言, 红细胞数量大量减少; PEG-5K样品和PEG-1K样品相比, 红细胞的数量几乎可以忽略不计. 这与前面的血小板黏附的数据相一致. 与血小板黏附结果不同的是, 各个样品之间红细胞黏附量之间的差异性并不像血小板那样明显. 这主要是由于血小板是一种黏附型血细胞, 而红细胞是一种悬浮型血细胞. 由此证明, 环状构象PEG有着优越的抗红细胞黏附性能. 分子量越高, 其抗红细胞黏附效果越好.

图9 不同PEG改性表面红细胞黏附及数量统计(网络版彩图)

Figure 9 The red blood cells adhered on PEG modified surfaces (CLSM) and quantitative statistic (color online).

4 结论

本文在QCM-D芯片表面通过硫金键构建了两种不同分子量($M_w=1000$ 和 $M_w=5000$)的环状(SH-PEG-SH)和线型(mPEG-SH)构象的PEG改性表面, 研究了PEG接枝过程以及纤维蛋白原的吸附机理. 从分子量的角度而言, 相对于短链的PEG ($M_w=1000$), 长链PEG ($M_w=5000$)因为拥有高的黏弹性从而具有更优异的抗纤维蛋白原吸附能力, 从而具有较好的抗凝血性能. 从PEG构象角度来分析, 环状构象PEG (SH-PEG-SH)拥有比线型构象(mPEG-SH)优异的抗纤维蛋白原吸附性能, 其抗血小板和红细胞的黏附性能也优于线型构象PEG. 尤其是分子量为5K的SH-PEG-SH-

5K改性表面, 几乎没有血小板和红细胞的黏附. 但是, 环状构象SH-PEG-SH-1K和SH-PEG-SH-5K表面的纤维蛋白原吸附机理却完全不同. 短链环状构象SH-PEG-SH-1K的表面覆盖率是影响其抗纤维蛋白原吸附的重要因素; 而长链环状构象SH-PEG-SH-5K的抗纤维蛋白原吸附机理是由于高的黏弹性和环状构象PEG高的表面覆盖率. 因此, 在不增加接枝质量的前提下, 可以通过增加PEG分子链的表面覆盖率以及提高PEG接枝层的黏弹性来改进材料表面的抗凝血性能. 本工作为如何构建更加有效抗纤维蛋白原吸附的PEG改性表面提供了新的思路, 并为制备高性能生物医用材料提供了理论基础.

参考文献

- 1 Song W, Chen H. *Chin Sci Bull*, 2007, 52: 2701–2704 (in Chinese) [宋巍, 陈红. 科学通报, 2007, 52: 2701–2704]
- 2 Mangold C, Wurm F, Frey H. *Polym Chem*, 2012, 3: 1714–1721
- 3 Shi Q, Luan S, Jin J, Shi H, Yin Y, Li Y. *Mater China*, 2014, 33: 212–223 (in Chinese) [石强, 栾世方, 金晶, 石恒冲, 殷敬华, 李勇刚. 中国材料进展, 2014, 33: 212–223]
- 4 Sang IJ, Andrade JD. *Bull-Korean Chem Soc*, 1992, 13: 245–248
- 5 Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM. *Langmuir*, 2001, 17: 5605–5620
- 6 Jin J, Huang F, Hu Y, Jiang W, Ji X, Liang H, Yin J. *Colloids Surfs B*, 2014, 123: 892–899
- 7 Jin J, Jiang W, Yin J, Ji X, Stagnaro P. *Langmuir*, 2013, 29: 6624–6633
- 8 Hu Y, Jin J, Han Y, Yin J, Jiang W, Liang H. *RSC Adv*, 2014, 4: 7716–7724
- 9 Unsworth LD, Sheardown H, Brash JL. *Langmuir*, 2005, 21: 1036–1041
- 10 Prime KL, Whitesides GM. *J Am Chem Soc*, 1993, 115: 10714–10721
- 11 Michel R, Pasche S, Textor M, Castner DG. *Langmuir*, 2005, 21: 12327–12332
- 12 Jin J, Han Y, Zhang C, Liu J, Jiang W, Yin J, Liang H. *Colloids Surfs B*, 2015, 136: 838–844
- 13 Kang T, Banquy X, Heo J, Lim C, Lynd NA, Lundberg P, Oh DX, Lee HK, Hong YK, Hwang DS, Waite JH, Israelachvili JN, Hawker CJ. *ACS Nano*, 2015, 10: 930–937
- 14 Lahann J, Mitragotri S, Tran TN, Kaido H, Sundaram J, Choi IS, Hoffer S, Somorjai GA, Langer R. *Science*, 2003, 299: 371–374
- 15 Han Y, Ma J, Hu Y, Jin J, Jiang W. *Langmuir*, 2018, 34: 2073–2080
- 16 Kern W. *J Electrochem Soc*, 1990, 137: 1887
- 17 Höök F, Vörös J, Rodahl M, Kurrat R, Böni P, Ramsden JJ, Textor M, Spencer ND, Tengvall P, Gold J, Kasemo B. *Colloids Surfs B*, 2002, 24: 155–170
- 18 Malmström J, Agheli H, Kingshott P, Sutherland DS. *Langmuir*, 2007, 23: 9760–9768
- 19 Liu G, Zhang G. *J Phys Chem B*, 2005, 109: 743–747
- 20 Zheng J, Li L, Chen S, Jiang S. *Langmuir*, 2004, 20: 8931–8938
- 21 Jeon SI, Lee JH, Andrade JD, De Gennes PG. *J Colloid Interface Sci*, 1991, 142: 149–158
- 22 Unsworth LD, Sheardown H, Brash JL. *Langmuir*, 2008, 24: 1924–1929
- 23 Chen S, Zheng J, Li L, Jiang S. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 14473–14478
- 24 Taylor W, Jones RAL. *Langmuir*, 2010, 26: 13954–13958
- 25 Taylor W, Jones RAL. *Langmuir*, 2013, 29: 6116–6122

Modified surface by poly(ethylene glycol) with looped conformation and its superior anticoagulant property

Jing Jin, Yu Hu, Yuanyuan Han^{*}, Wei Jiang^{*}

State Key Laboratory of Polymer Physics and Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China

^{*}Corresponding authors (email: yyhan@ciac.ac.cn; wjiang@ciac.ac.cn)

Abstract: Poly(ethylene glycol) (PEG) is currently the gold standard for anticoagulant coatings. Up to now, most researchers focused on the impact of chain length and grafting density of PEG on protein adsorption, but few concerned about the effect of PEG conformation. Gold surfaces of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) with looped (SH-PEG-SH) and linear (SH-PEG) PEGs with different molecular weights ($M_w=1000$ and $M_w=5000$) are prepared. Subsequently, fibrinogen adsorption and anticoagulant properties are measured as well. The compositions and phase structures of PEG modified surfaces are characterized by XPS and AFM. Compared with linear PEG surface, we find that looped PEG surface more efficiently prohibits fibrinogen adsorption, and then has superior antiplatelet and anti-erythrocytes adhesions properties. Fibrinogen adsorption results suggest that when the molecular weight of PEG is low ($M_w=1000$), the main reason for the fibrinogen resistance of looped PEG is the large surface coverage; when the molecular weight of PEG is high ($M_w=5000$), the fibrinogen resistance mechanism of looped PEG is a combination of the high viscoelasticity and the large surface coverage. This article provides valuable evidence and guidance for anticoagulant coating and application of high-performance biomaterials.

Keywords: poly(ethylene glycol), looped polymer surface, protein adsorption, anticoagulant, QCM-D

doi: [10.1360/N032018-00061](https://doi.org/10.1360/N032018-00061)