论文

pH 诱导聚多巴胺表面质子化作用机理及其细胞黏附行为

谭帼馨^{①*}, 欧阳孔友^①, 周蕾^②, 刘燕^①, 范敬德^①, 李伟平^②, 张兰^③, 宁成云^{②*}^① 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510006^② 华南理工大学材料科学与工程学院, 广州 510641^③ 西安交通大学金属材料国家重点实验室, 西安 710049

*通讯作者, E-mail: tanguoxin@126.com; imcyning@scut.edu.cn

收稿日期: 2015-08-05; 接受日期: 2015-10-20; 网络版发表日期: 2016-03-28

国家重点基础研究发展计划(编号: 2012CB619100)、国家自然科学基金(编号: 51372087)、广东省自然科学基金(编号: 2015A030313493)、广东省工业高新技术领域科技计划(编号: 2014A010105048)和西安交通大学金属材料强度国家重点实验室开放研究项目(编号: 20141607)资助项目

摘要 通过电化学聚合在钛基材表面构建聚多巴胺膜层, 探讨了 pH 诱导聚多巴胺膜表面质子化/去质子化及其电势电荷的变化特性, 并研究了其对骨髓间充质干细胞(BMSCs)的早期黏附行为的影响. 利用拉曼光谱和场发射扫描电镜证实, 通过电化学方法在钛表面可构建均匀致密的聚合多巴胺膜层; 电化学及动力学分析表明, 不同 pH 介质条件下, 聚多巴胺膜的界面电阻不同, 且其随着 pH 的增大而增大, 质子化的聚多巴胺有利于电荷累积; 原子力显微镜结果表明, 质子化和去质子化的聚多巴胺膜表面电势, 在不同 pH 环境下具有可逆周期性变化的特性; 探讨了膜层质子化作用对 BMSCs 的黏附作用机理, 表明质子化的聚多巴胺钛表面带正电荷更有利于细胞的黏附和铺展, 且具有良好的细胞相容性.

关键词 电化学聚合, 聚多巴胺, 质子化/去质子化, 表面电势电荷, 骨髓间充质干细胞

1 引言

多巴胺(dopamine, DA)作为超强黏附性贻贝的黏附蛋白中的功能单元, 可在各基材表面自氧化聚合形成聚多巴胺, 其丰富的胺基和酚羟基可作为二级反应平台, 固定多种生物活性分子, 如生长因子、激素和抗生素等, 有助于制造有特殊针对性功能的植入材料^[1]. 最新研究发现聚多巴胺不仅具有以上特性,

而且具备光、电和温度等外界刺激响应能力, 在制备智能仿生膜材料方面具有重要的价值^[2]. 例如, Nam 等^[3]通过 SiO₂ 表面构建均匀致密的聚多巴胺膜层, 发现其具有信号放大和光控开关特性, 在低电压下产生优异的光电流响应; Kang 等^[4]利用聚多巴胺制备出具有电响应的电极表面, 有效地刺激和控制神经细胞的生长行为; Proks 等^[5]研究表明, 温度诱导聚多巴胺的乙烯胺基团分子内环化, 同时二羟基吡啶脱水

引用格式: 谭帼馨, 欧阳孔友, 周蕾, 刘燕, 范敬德, 李伟平, 张兰, 宁成云. pH 诱导聚多巴胺表面质子化作用机理及其细胞黏附行为. 中国科学: 化学, 2016, 46: 373–381
Tan GX, Ouyang KY, Zhou L, Liu Y, Fan JD, Li WP, Zhang L, Ning CY. The mechanism of pH-induced polydopamine films surface protonation and cell adhesion behavior. *Sci Sin Chem*, 2016, 46: 373–381, doi: 10.1360/N032015-00146

形成醌基,促使聚多巴胺化学结构发生变化。然而,相对于光、电和温度等外界刺激响应,聚多巴胺的 pH 响应鲜有报道。Chen 等^[6]研究证明,通过 pH 调控壳聚糖的质子化或去质子化,在基材上可构建不同的电荷表面,具有控制纤粘蛋白和细胞的黏附和脱附行为;从结构上分析,聚多巴胺具有 pH 响应特征的两性离子基团(胺基和酚羟基),在不同介质条件下形成正或负电荷的表面^[7]。因此,聚多巴胺的 pH 响应在医用钛植入体表面性能研究方面具有潜在的重要价值,其作为材料的环境影响因素对细胞增殖黏附行为研究具有重要意义。

另一方面,化学自聚合多巴胺方法已广泛应用于修饰基材表面,但该方法仍有不足之处:自聚合的多巴胺之间存在非共价键合;在强酸或强碱性的环境中易解离^[8]。电化学聚合方法可有效解决以上问题,不仅能使多巴胺直接发生氧化还原反应,形成更稳定的共价键合,而且能有效控制多巴胺聚合的氧化还原过程,Falk 等^[9]在硅晶片基材上发现,电化学聚合比化学自聚合的聚多巴胺膜层具有更优的离子选择渗透性能。本研究通过电化学循环伏安法在钛基材表面构建聚多巴胺膜,利用 pH 诱导其质子化和去质子化,探讨聚多巴胺膜在不同 pH 介质的铁氰化钾溶液中的电化学行为,进一步根据表面电势电荷变化分析其 pH 响应的可逆性能;通过聚多巴胺膜表面质子化/去质子化对小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)相互作用进行机理研究,有望为临床构建出具有 pH 调控细胞黏附和铺展行为的聚多巴胺钛基骨修复材料,提供研究基础和理论依据。

2 实验部分

2.1 试剂

医用钛片(titanium, 直径 1 cm, 厚度 0.2 mm, 宝鸡钛业股份有限公司, 中国); 丙酮(99.0%, 天津大茂试剂公司, 中国); 磷酸盐缓冲液(PBS, Hyclone, 美国); 小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs, ATCC, 美国); FITC 标记的毒蕈肽探针(Actin-Tracker Green)、DAPI 染色液和 4%多聚甲醛(碧云天生物技术公司, 中国); 氢氟酸(40%, HF)、硝酸(65%, HNO₃)、三羟甲基氨基甲烷(99.9%, Tris)、盐酸多巴胺(98%, Dopamine)、铁氰化钾(99.5%, K₃[Fe(CN)₆])、亚铁氰化钾(99.5%, K₄[Fe(CN)₆])、氯化钾(99.5%, KCl)、乙醇(99.8%) (上海阿拉

丁公司, 中国)。以上试剂均未经处理直接使用。

2.2 电化学聚合构建聚多巴胺膜

医用钛片分别经过丙酮、乙醇和水超声清洗 10 min, 将洗涤后的钛片放入体积比为 1:1 的 HF (0.54 mol/L)和 HNO₃ (0.29 mol/L)混合溶液中搅拌处理 5 min (制备的钛样品命名为 pTi)。为了增加多巴胺在钛表面电化学聚合的导电性能,置于小型离子溅射仪(JFC-1600, 日本),金作为靶材,溅射 120 s, 喷金钛片(Ti=pTi+Au)作为电化学工作电极。通过 CHI660E 电化学工作站(electrochemical workstation, CHI660E, 中国)循环伏安法制备聚多巴胺膜层, Ti 作为工作电极,饱和甘汞电极作为参比电极,铂丝作为辅助电极,配制 pH 7.0 的 1 mg/mL 盐酸多巴胺和 10 mmol/L Tris 混合溶液作为电解液,电化学聚合前通 30 min 高纯 N₂ 以除去溶液中溶解的氧。循环电位范围为-0.5~0.5 V, 循环扫描速率为 20 mV/s, 静止时间为 10 s, 循环 20 圈的条件在钛电极上构建聚多巴胺膜(Ti-PDA)^[10]。

2.3 聚多巴胺膜电化学性能及表面电势测定

采用激光拉曼光谱(Raman, LabRAM HR 800, 法国)表征膜层表面基团;采用场发射扫描电镜(FE-SEM, Carl Zeiss Ultra 55, 德国)观察材料表面形貌;电化学工作站以三电极体系,即 Ti-PDA 作为工作电极,饱和甘汞电极作为参比电极,铂丝作为辅助电极,在 5 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-}和 1 mol/L KCl 混合电解液中,调节 pH 分别为 3.0、7.0 和 11.0,测试样品在不同 pH 介质中的循环伏安特性(CV, 20 mV/s)和电化学阻抗特性(扫描频率 10⁵~0.01 Hz)。在 pH 3.0 的[Fe(CN)₆]^{3-/4-}混合电解液中,以 10~80 mV/s 的扫描速率进行循环伏安实验,研究其电化学动力学行为。

周期性改变介质的 pH,材料在 pH 为 7.0、3.0 和 11.0 的 PBS 溶液中浸泡 30 min (分别为 Ti-PDA-7、Ti-PDA-3 和 Ti-PDA-11),进行聚多巴胺膜质子化和去质子化实验,为了验证其质子化/去质子化结构的稳定性,材料在中性溶液中再超声清洗 30 min 备用。采用原子力显微镜(AFM, MFP-3D, 美国)通过非接触式悬臂以 42 N/m 力常量、320 kHz 共振频率和 1 Hz 扫描速率分析材料表面形貌(1 μm×1 μm),用开尔文探针力显微技术(KPFM)测定 pH 诱导 Ti-PDA 表面的电势周期性变化情况。

2.4 骨髓间充质干细胞黏附实验及统计学分析

将 pTi、Ti-PDA-3、Ti-PDA-7 和 Ti-PDA-11 4 组样品分别置于 48 孔培养板中, BMSCs 悬液以 4×10^4 cells/mL 浓度进行接种, 置于 37°C 和 5% CO₂ 细胞培养箱内分别培养 12 和 24 h. 取出样品, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 再清洗 3 次, 用 Actin-Tracker Green 探针对细胞骨架荧光染色 1 h, DAPI 染色液进行细胞核复染 15 min, PBS 清洗 3 次后避光保存, 通过倒置荧光显微镜观察材料表面细胞的黏附情况, 用 Image J 软件计算细胞铺展面积, 并采用 SPSS15.0 统计学软件进行数据处理.

3 结果与讨论

3.1 钛表面聚多巴胺的电化学构建及其表征

传统的化学聚合多巴胺的方法中, 在碱性溶液或氧化剂作为聚合引发条件时, 会导致多巴胺在溶液中形成大量的聚多巴胺颗粒, 限制了其在基材表面继续发生氧化反应, 降低了单体的转化率^[10], 因此

本研究利用循环伏安电化学聚合方法构建聚多巴胺膜. 图 1(a) 为喷金钛在多巴胺溶液 (1 mg/mL, pH 7.0) 中的循环伏安曲线, 第一圈出现一个明显氧化峰 (0.23 V, P_{a1}) 和两个还原峰 (0.10 和 -0.37 V, 分别为 P_{c1} 和 P_{c2}), 随着循环圈数的增加, 第二圈开始出现另一氧化峰 (-0.20 V, P_{a2}). 其原因为: 多巴胺 (dopamine) 和多巴胺醌 (dopaminequinone) 是氧化还原对 I (P_{a1}/P_{c1}), 5,6-二羟基吲哚啉 (leucodopaminechrome) 和 2,3-二氢-1*H*-吲哚-5,6-二酮 (dopaminechrome) 是氧化还原对 II (P_{a2}/P_{c2})^[9]. 第一圈反应过程如化学反应式(1)所示, 大量的多巴胺 P_{a1} 失去电子发生氧化反应生成多巴胺醌 P_{c1} , 多巴胺醌 P_{c1} 在电极表面获得电子还原为多巴胺 P_{a1} , 从而出现氧化还原对 I; 第二圈反应过程如反应式(2)所示, 电化学聚合过程中部分多巴胺醌的胺基自发与邻位成环形成 5,6-二羟基吲哚啉 P_{a2} , 5,6-二羟基吲哚啉 P_{a2} 继续获得电子还原为 2,3-二氢-1*H*-吲哚-5,6-二酮 P_{c2} , 但由于初始氧化反应并未形成 2,3-二氢-1*H*-吲哚-5,6-二酮 P_{c2} , 因而在第一圈的氧化还原反应中并未出现氧化峰 P_{c2} 而在第二圈的

图 1 (a) 多巴胺溶液 (1 mg/mL, pH 7.0) 在钛表面的电化学聚合循环伏安曲线 (扫描速率为 20 mV/s, 扫描圈数为 20); (b) Raman 光谱; (c, d) pTi 和 Ti-PDA 的 FE-SEM 表面形貌

-0.20 V 出现. 随着循环伏安扫描圈数增多, 氧化还原电对 I 和 II 的氧化还原峰峰电流减弱, P_{a1}/P_{c1} 和 P_{a2}/P_{c2} 的峰间距增大, 表明多巴胺经过扫描 20 圈后, 在钛基材表面形成惰性的聚多巴胺绝缘膜层.

通过 Raman 光谱对聚多巴胺膜层基团进行分析(图 1(b)), 与 pTi 的拉曼峰相比, Ti-PDA 在 1283、1385 和 1585 cm^{-1} 出现拉曼峰, 分别为 PDA 的羟基伸缩振动峰、酚羟基伸缩振动峰和弯曲振动峰^[11]. 利用场发射扫描电镜分析聚多巴胺膜的钛表面形貌, 由图 1(c) 可见, pTi 的表面结构为 HF 刻蚀形成的均匀突起; 随着电化学反应的进行, 多巴胺在钛表面失去电子形成带负电荷的多巴胺醌, 经过电化学氧化还原与钛基材表面形成化学键合^[10], 随着反应圈数的增大, 多巴胺醌在基材与溶液界面聚合逐渐形成均匀致密的聚多巴胺膜层(图 1(d)). 综上所述, 可通过电化学方法在钛表面构建出富含酚羟基且均匀致密的聚多巴胺膜.

3.2 聚多巴胺膜质子化及其细胞相互作用机理

为了探讨聚多巴胺膜质子化/去质子化对细胞作用的机理(图 2), 将 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 负离子化学探针模拟细胞外基质的负电荷蛋白, 对其表面电化学行为进行研究(图 3). 图 3(a) 为 Ti-PDA 在不同 pH 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 中的循环伏安曲线, pH 3.0 时 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 出现明显的氧化还原峰. Ryu 等^[12] 研究发现, 聚多巴胺具有层状结构且间距为 3.47 Å, Ti-PDA 的胺基被质子化后, 其结构内的分子间产生静电排斥增大了层状结构的间距(图 2(a)), 有利于水合直径为 6.0 Å^[13] 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针能够在膜层透过, 增加了电极表面与溶液中的电子转移速率; 在静电作用下, 聚多巴胺的胺基质子化带正电荷, 对负电荷 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针向电极表面扩散具有一定的促进作用. Ti-PDA 在 pH 7.0 和 11.0 时, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的氧化还原峰明显减弱(图 3(a)), PDA 被去质子化. 由于 PDA 等电点为 4.0^[2], 在中性或碱性条件下带负电荷, 表明去质子化的 PDA 阻碍负探针在电极表面反应, 降低了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液的电子转移速率; 同时 Yu

等^[7]发现, 在聚多巴胺膜层中, 水合直径为 6.4 Å 的正离子探针 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 在 pH 11.0 的介质中去质子化, 可发生氧化还原反应, 而 pH 7.0 时 PDA 会阻碍 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 反应. 以上分析结果可推测, 聚多巴胺膜层在酸性或碱性介质中由于自身分子质子化或去质子化, 引起聚多巴胺基团间的正负电荷的静电排斥, 膜层层状结构的间距增大, 促使离子选择性通过; 中性介质中(pH 7.0)聚多巴胺分子间基团静电排斥作用降低, 聚多巴胺层状结构收缩, 阻碍了离子的进出(图 2(a)). 另一方面, Hsiao 等^[14]和 Aldo 等^[15]一致认为, 正电荷的表面通过静电作用吸引细胞表面带负电荷的纤粘蛋白和层粘连蛋白, 如图 2(b)所示, pH 3.0 时, 聚多巴胺质子化的胺基带正电荷能促进带负电荷的蛋白静电吸附, 为细胞伪足提供黏附位点, 有利于细胞向外铺展; pH 7.0 和 11.0 时, 聚多巴胺酚羟基去质子化形成负电荷表面, 抑制细胞与基底的黏附位点, 从而抑制细胞铺展行为. 进一步通过细胞黏附实验可证明, pH 诱导聚多巴胺表面电荷变化与细胞作用机理.

交流阻抗实验可用于分析聚多巴胺膜层在不同 pH 时 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的界面电阻性能, 图 3(b) 为 Ti-PDA 在不同 pH 介质的奈奎斯特(Nyquist)图, 实验结果表明, pH 3.0 的 Nyquist 曲线半径明显小于 pH 7.0 和 11.0. 通过构建电路模拟聚多巴胺膜电阻情况, 选

图 2 聚多巴胺质子化/去质子化与细胞作用机理图. (a) pH 诱导聚多巴胺膜结构和表面电荷的变化; (b) BMSCs 细胞铺展形貌(网络版彩图)

图 3 Ti-PDA 在不同 pH $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 中的循环伏安曲线 (a)、Nyquist 曲线 (b) 和等效电路图 (c). R_s 为电解液阻抗, C_d 为膜电容, R_{ct} 为界面电阻, Z_w 为 Warburg 阻抗 (网络版彩图)

表 1 Nyquist 曲线拟合阻抗图电化学参数

Samples	R_{ct} (Ω)	C_d (μF)	n	Z_w ($\times 10^{-3} \Omega \text{ s}^{1/2}$)	R_s (Ω)
Ti-PDA-3	1610	129.2	0.80	3.97	77.31
Ti-PDA-7	2057	79.91	0.80	2.97	74.61
Ti-PDA-11	2309	1.152	0.80	2.82	76.59

用图 3(c) 所示的 Randles' 电路模型对 Nyquist 曲线进行拟合^[6], 拟合参数包括电解液阻抗 R_s 、膜电容 C_d 、电子转移个数 n 、界面电阻 R_{ct} (主要是动力学控制) 以及 Warburg 阻抗 Z_w (主要是扩散控制)^[7,9], 结果见表 1. 其中 R_s 和 Z_w 是探针离子从电解液扩散到电极

表面的性质, 且不受电极表面电子转移反应的影响, 理想情况下 R_s 和 Z_w 不变. 研究结果表明, Ti-PDA-3、Ti-PDA-7 和 Ti-PDA-11 的 R_{ct} 分别为 1610、2057 和 2309 Ω , 界面电阻 R_{ct} 随 pH 的增大而增大, 证实了负电荷化学探针的电化学行为受电极表面的质子化/去质子化控制; 另一方面, 三者的膜电容 C_d 分别为 129.2、79.91 和 1.152 μF , 表明了被质子化的 PDA 层状结构间距明显增大, 更有利于电荷累积.

3.3 质子化条件下聚多巴胺膜电化学动力学分析

进一步研究了聚多巴胺在质子化条件下的电化学动力学行为, 探讨峰电流与电位扫描速率的关系. 图 4(a) 为 Ti-PDA 在 pH 3.0 的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 溶液中不同扫描速率 (10~80 mV/s) 下的 CV 曲线, 实验结果表明, 随扫描速率的增加, 氧化峰电流 (I_{pc}) 变正, 还原峰电流 (I_{pa}) 变负, 峰间距随扫描速率的增大而逐渐增加, 即反应的可逆性随扫描速率的增加而降低, 表明电极反应过程为准(半)可逆过程, 这主要是聚多巴胺

图 4 质子化 Ti-PDA 以不同扫描速率的循环伏安曲线 (a) 及其峰电流与扫描速率线性拟合 (b) (网络版彩图)

膜层的阻碍作用, 电子转移受扩散步骤控制, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的扩散速率小于扫描速率, 反应的不可逆性增大。

将扫描速率的 $1/2$ 次方与电流关系作图, 如图 4(b)所示, 氧化还原峰电流与扫描速率的 $1/2$ 次方呈线性关系, 其回归方程(I_p : mA; v : mV/s)和相关系数 R^2 分别为:

$$I_{pc} = 0.02199v^{1/2} + 0.03669, R^2 = 0.9952 \quad (3)$$

$$I_{pa} = 0.02148v^{1/2} - 0.08519, R^2 = 0.9631 \quad (4)$$

式(3)和(4)表明, 电极反应过程是由 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 向电极/溶液界面扩散所控制, 基本符合可逆单电子反应的特征^[9]。由式(5)计算 25℃时扩散控制的扩散系数 D ^[7]:

$$I = 268ACD^{1/2}v^{1/2} \quad (5)$$

式中 $A=0.785 \text{ cm}^2$ 为工作电极的有效面积, $C=5.0 \text{ mmol/L}$ 为电解质浓度, $v \text{ (V/s)}$ 为扫描速率。由此计算出扩散系数 D 为 $4.35 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, 说明质子化的聚多巴胺在低扫描速率下, 电子传递速率大于 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 到达电极表面的扩散速率, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 能够完全发生电极反应^[9]。

3.4 聚多巴胺膜表面电势分析

通过 AFM 和 KPFM 研究聚多巴胺膜微区表面形貌和表面电势变化可进一步理解细胞与 PDA 膜质子化/去质子化相互作用机理。图 5 所示, Ti-PDA-3、Ti-PDA-7 和 Ti-PDA-11 均出现微米级粗糙突起结构(图 5(a~c)), 表面的均方根粗糙度分别为 $R_{rms}=16 \pm 3.3$ 、 24 ± 2.6 和 $27 \pm 4.3 \text{ nm}$, 与 Ti-PDA 电镜(图 2(b))结果相一致; 三者的表面平均电势分别为 349 ± 3.8 、 507 ± 9.7 和 $601 \pm 13.9 \text{ mV}$, 其电势随着 PDA 的质子化作用增强而降低, 其原因是聚多巴胺等电点为 4.0 ^[2], 酸性条件下 PDA 自身胺基与 H^+ 结合发生质子化形成正电荷, PDA 膜表面的正电荷更有利于吸附 PBS 溶液中的磷酸根等负离子, 从而降低聚多巴胺的表面电势; 相反, 碱性条件下 PDA 自身酚羟基 H^+ 解离发生去质子化形成负电荷, 阻碍 PBS 溶液中的磷酸根等负离子吸附于 PDA 表面, 促使 PDA 膜表面电势增加^[16]。因此, 对聚多巴胺进行胺基质子化和酚羟基去质子化处理, 表面电势从 $349 \pm 3.8 \text{ mV}$ 增加至 $601 \pm 13.9 \text{ mV}$, 表明不同 pH 介质能够有效地改变膜表面电势。通过周期性改变 pH 介质对 Ti-PDA 质子化和去质子化处理, 探讨了聚多巴胺表面电荷变化的

图 5 (a~c) Ti-PDA-3、Ti-PDA-7 和 Ti-PDA-11 的表面形貌 AFM 及其电荷 KPFM 图; (d) Ti-PDA 质子化和去质子化的表面电势可逆变化(网络版彩图)

图 6 BMSCs 细胞黏附 12 h (a~d) 和 24 h (e~h) 的细胞荧光染色图(绿为细胞微丝, 蓝为细胞核) (网络版彩图)

可逆性, 如图 5(d) 所示. 研究结果表明, 聚多巴胺质子化表面电势分别为 349 ± 3.8 和 360 ± 2.6 mV, 去质子化的表面电势分别为 601 ± 13.9 和 565 ± 23.9 mV, 质子化与去质子化的表面电势差分别为 252 和 205 mV, 结果证实 PDA 具有 pH 周期性响应变化特性.

3.5 骨髓间充质干细胞早期黏附研究

植入体表面性能对植入体周围的细胞形态具有显著性影响, 是决定骨整合性能的一个重要因素, 体外细胞在材料表面的活力一定程度上能够反映材料在体内促进细胞和组织生长的能力^[17]. 本研究通过免疫荧光染色实验观察细胞的黏附和铺展行为, 探讨由 pH 诱导聚多巴胺表面质子化/去质子化变化对 BMSCs 细胞黏附和铺展行为的影响(图 6). 在细胞黏附初期(图 6(a~d)), BMSCs 经过 12 h 的培养, 4 组样品的细胞大多数以收缩呈球形态黏附, 且细胞密度无明显差别, 通过 Image J 软件计算细胞平均铺展面积 ($n=4$) 如图 7 所示, 细胞在基材表面培养 12 h 的铺展面积并无显著性差异. BMSCs 经过 24 h 的培养, 4 组样品部分细胞开始铺展(图 6(e~h)), 从图 6(h₁) 可见, 去质子化的 Ti-PDA-11 表面主要以收缩呈球形态黏附于基材表面; 由图 6(e₁, g₁) 可见, 在 pTi 和 Ti-PDA-7 表面, 细胞伪足缓慢向外延伸铺展; 质子化的 Ti-PDA-3 细胞铺展尤为明显(图 6(f₁)), 细胞伪足已完全向四周铺展; 同时, 如图 7 所示, 质子化的 Ti-PDA-3 的细胞铺展面积相对于 pTi 和 Ti-PDA-7 具有显著性

图 7 BMSCs 细胞黏附 12 和 24 h 的细胞铺展面积($n=4$, * $p<0.05$ 和 ** $p<0.01$) (网络版彩图)

差异($p<0.05$), 相对于去质子化的 Ti-PDA-11 尤为显著($p<0.01$), 结果表明, 质子化的聚多巴胺更有利于细胞黏附铺展. 综上所述, 聚多巴胺的胺基经过质子化处理使基材表面带正电荷, 有利于静电作用吸附细胞的纤连蛋白, 促使细胞伪足接触而铺展^[18]; 相反, 聚多巴胺的酚羟基去质子化使基材带负电荷, 静电排斥作用使细胞伪足难以向外黏附, 致使细胞保持收缩球形^[19]. 由此证实本研究对聚多巴胺膜质子化及其细胞相互作用机理的推导: 改变 pH 能够诱导聚多巴胺的胺基质子化和酚羟基的去质子化, 在材料表面实现可控的细胞早期黏附和铺展行为.

4 结论

采用电化学聚合方法在钛基材表面成功构建致密均匀的聚多巴胺膜层,通过 pH 调控质子化和去质子化的聚多巴胺表面电荷,研究结果表明,分子间静电排斥作用有利于膜层间距增加与电荷累积;聚多巴胺质子化的胺基和去质子化的酚羟基表面电势分

别为 349 ± 3.8 和 601 ± 13.9 mV, pH 介质不仅可有效改变表面电势,而且其电势具有可逆性变化;探讨了聚多巴胺的质子化/去质子化与细胞相互作用机理,结果表明,质子化的聚多巴胺膜带正电荷,具有促进细胞黏附铺展行为的作用. 本研究将为 pH 诱导聚多巴胺钛基材植入体表面智能化设计提供新的方向并奠定理论基础.

参考文献

- 1 Lynge ME, Westen RV, Postma A, Stadler B. *Nanoscale*, 2011, 3: 4916–4928
- 2 Liu YL, Ai KL, Lu LH. *Chem Rev*, 2014, 114: 5057–5115
- 3 Nam HJ, Cha JH, Lee SH, Yoo WJ, Jung DY. *Chem Commun*, 2014, 50: 1458–1461
- 4 Kang KG, Lee SY, Kim RY, Choi IS, Nam YK. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 13101–13104
- 5 Proks V, Brus J, Pop GO, Eva V, Waldemar WK, Kotek J, Matrino U, Rypacek F. *J Macromol Sci Phys*, 2013, 214: 499–507
- 6 Chen YH, Chung YC, Wang IJ, Young TH. *Biomater*, 2012, 33: 1336–1342
- 7 Yu B, Liu JX, Zhou F. *Chem Commun*, 2010, 46: 5900–5902
- 8 Wei HL, Ren J, Han B, Xu L, Han LL, Jia LY. *Colloid Surface B*, 2013, 110: 22–28
- 9 Falk B, Voegel JC, Ball V. *Electrochim Acta*, 2011, 56: 3914–3919
- 10 Wang JL, Li BC, Li ZJ, Ren KF, Jin LJ, Zhang SM, Chang H, Sun YX, Ji J. *Biomater*, 2014, 35: 7679–7689
- 11 Shalev T, Gopin A, Baure M, Stark RW, Rahimpour S. *J Mater Chem*, 2012, 22: 2026–2032
- 12 Ryu JK, Ku SH, Lee M, Park CB. *Soft Matter*, 2011, 7: 7201–7206
- 13 Gao BW, Su L, Tong Y, Guan M, Zhang XJ. *J Phys Chem B*, 2014, 118: 12781–12787
- 14 Hsiao CW, Bai MY, Chang Y, Chung MF, Lee TY, Wu CT, Maiti B, Liao ZX, Li RK, Sung HW. *Biomater*, 2013, 34: 1063–1072
- 15 Aldo LE, Aranzazu DC, Aldo RB. *Adv Mater*, 2013, 25: 4049–4057
- 16 Zhang W, Liu N, Shi HG, Liu J, Shi LX, Zhang B, Wang HY, Ji JH, Chu PK. *Sci Rep*, 2015, 5: 9369–9379
- 17 Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L. *Trends Cell Biol*, 2012, 22: 299–310
- 18 Liu XJ, Feng QL, Bachhuka A, Vasilev K. *ACS Appl Mater Interf*, 2014, 6: 9733–9741
- 19 Luo RF, Tang LL, Zhong S, Yang ZL, Wang J, Weng YJ, Tu AF, Jiang CX, Huang N. *ACS Appl Mater Interf*, 2013, 5: 1704–1714

The mechanism of pH-induced polydopamine films surface protonation and cell adhesion behavior

Guoxin Tan^{1*}, Kongyou Ouyang¹, Lei Zhou², Yan Liu¹, Jingde Fan¹, Weiping Li², Lan Zhang³, Chengyun Ning^{2*}

¹ School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

² College of Materials Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China

³ State Key Laboratory for Mechanical Behavior of Materials; Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China

*Corresponding authors (email: tanguoxin@126.com; imcynning@scut.edu.cn)

Abstract: In this paper, polydopamine films were deposited on titanium surface by electropolymerization method. The change of surface potential for the pH effects on the amino and catechol groups was investigated. The experimental results showed that the interface resistance of polydopamine films increased with the increase in pH, and the protonation of polydopamine exhibited higher charge storage capacity at pH 3.0. The surface potential of

polydopamine was switched from 349 ± 3.8 to 601 ± 13.9 mV after protonation/deprotonation cycles, resulting the reversible change of surface potential under acidic (pH 3.0) or alkaline (pH 11.0) conditions. Moreover, the *in vitro* effect of the pH-induced protonation/deprotonation of polydopamine films on behavior of cells was studied. The protonation of polydopamine also accelerated the cell spreading response manifested by extensive flattening and an increase in mean cellular area. The surface protonation process increased in the cell adhesion activity were correlated with previously demonstrated the positive charge of polydopamine films at pH 3.0.

Keywords: electropolymerization, polydopamine, protonation/deprotonation, surface potential and charge, bone marrow mesenchymal stem cells

doi: 10.1360/N032015-00146