

Preparation and Protein Adsorption of Type I Collagen of Anti-Biofouling Film Based on Liquid Crystal/Polymer Composite

Lei Gong¹, Rong Zeng, Jing-yun Ye, Mei Tu, Jian-hao Zhao, Chang-ren Zhou

¹Department of Materials Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, China

Email:38306262@qq.com

Abstract: Hydroxypropyl cellulose propionate (PPC) could be synthesized by esterification with hydroxypropyl cellulose (HPC) and propionyl chloride. The chemical structure and morphology of the PPC were characterized by IR, NMR and polarizing optical microscopy (POM), respectively. It was found that PPC (degree of substitution = 2.06) displays in the form of cholesteric liquid crystal around the body temperature of 37°C. PPC/polyvinyl chloride (PVC) blend films with different liquid crystal content were prepared by solvent evaporation, and their protein adsorption at 37°C temperature was measured by hydroxyproline method using collagen I. The results showed that the addition of PPC could significantly reduce the protein adsorption amount of collagen I on the PPC/PVC blend films, and the protein adsorption of blend films was affected by not only the content of PPC but also the morphology of liquid crystal domain. PPC may provide an alternative strategy for the development of anti-biofouling polymeric materials.

Keywords: cellulose; blend films; I collagen; anti-biofouling

抗蛋白黏附复合膜的制备及其对胶原蛋白吸附的研究

龚磊¹, 曾戎, 叶菁芸, 屠美, 赵剑豪, 周长忍

¹暨南大学 材料科学与工程系, 广州, 中国, 510632

Email:38306262@qq.com

摘要: 以羟丙基纤维素 (HPC) 为原料, 通过丙酰氯酯化反应合成羟丙基纤维素丙酸酯 (PPC), 采用 IR 和 NMR 表征了 PPC 的化学结构, 偏光显微镜观察证实取代度为 2.06 的 PPC 在体温 37°C 附近呈现液晶态。采用溶剂成膜法制备 PPC/聚氯乙烯 (PVC) 复合膜, 应用测定羟脯氨酸的方法, 测定了在常温下不同 PPC 含量的复合膜对 I 型胶原蛋白的吸附。结果表明: PPC/PVC 复合膜的蛋白吸附随 PPC 含量的增加而减少, PPC 可以显著降低基体聚合物的蛋白吸附量, 有希望用于改善聚合物的抗蛋白黏附性能

关键词: 纤维素; 复合膜; I 型胶原蛋白; 抗蛋白黏附

1 引言

生物相容性问题是生物材料研究所要解决的首要问题, 而生物材料表面的非特异性蛋白吸附是造成生物相容性不理想的主要原因, 当生物医学材料作为异物与血液接触后, 很快会吸附一层血浆蛋白。还可能促使血浆中的纤维蛋白原变成纤维蛋白并附着于材料表面形成血栓^{[1][2]}。此外, 在非体内应用场合, 非特异

性蛋白吸附也有诸多危害, 如生化分离膜的生物垢堵塞等; 在生化分析检测中导致感应探头失准、失效等^[3]。对材料表面蛋白吸附的研究, 不仅可作为评价一种材料血液相容性的重要指标, 而且是医用材料、生化分析、生物化工等领域的重要课题^[4]。

胶原蛋白是一种细胞外蛋白质, 主要分布于皮肤、肌腱等组织, 是人体内含量最多的一种蛋白质, 为改善合成材料表面对蛋白吸附的阻抗性能, 对材料进行生物医用方面的探索, 本研究制备了不同 PPC 含量的复合膜, 研究了复合膜的对 I 型胶原蛋白吸

资助信息: 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30870613), 中央高校基本科研业务费专项基金

附行为，为探究高聚合物复合膜抗蛋白黏附的机理提供依据。

2 实验

2.1 试剂与材料

羟丙基纤维素 (HPC): 美国Aldrich化学公司产品, Mw=100,000; 丙酰氯: 美国Aldrich化学公司产品; 医用级聚氯乙烯(PVC), Mw=230,000, 广州因特圣公司; I型胶原蛋白, Sigma公司; 其它试剂均为国产分

析纯。

2.2 羟丙基纤维素丙酸酯液晶的合成与表征

将1g羟丙基纤维素溶于12ml丙酮中, 缓慢加入3ml丙酰氯(等当量反应时为0.78ml), 在60℃下反应5h, 得到的产物经去离子水充分洗涤, 真空干燥, 得到目标产物羟丙基纤维素丙酸酯(PPC), 化学反应方程式如图1:

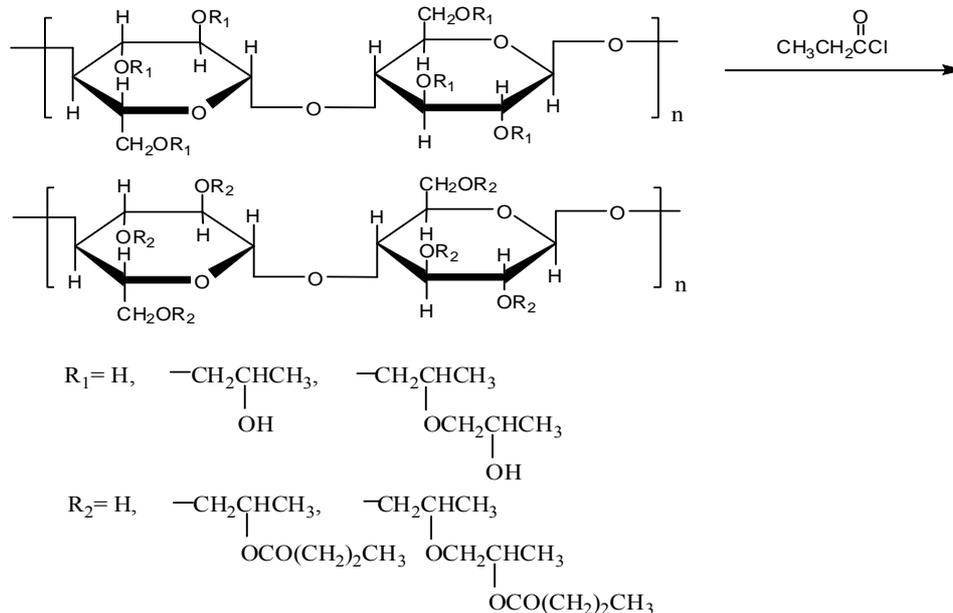


Fig 1 Synthesis of PPC

图1. 合成羟丙基纤维素丙酸酯化学反应方程式

采用EQUINOX55型傅立叶红外光谱仪(Bruker)分析产物的化学结构, 扫描范围: 4000cm^{-1} - 400cm^{-1} , 溴化钾压片法制样。以氘代氯仿为溶剂, 用BrukerUX-400型(400MHz)核磁共振仪测试其 $^1\text{H-NMR}$ 。将微量的PPC涂于盖玻片表面, 取另一只盖玻片垂直压下, 排出气泡, 压紧, 采用Axioskop40型偏光显微镜(ZEISS)观察其经剪切作用前后的形态结构。

2.3 PPC/PVC复合膜的制备及表征

分别配制PVC和PPC的四氢呋喃溶液, 浓度均为1wt%^[5]。将PPC溶液和PVC溶液以不同比例混合, 静置成膜, 得到液晶质量分数分别为0%、10%、20%、30%、40%、100%的PPC/PVC复合膜^[6]。

2.4 蛋白吸附研究

蛋白质结构中存在着两种肽键形式: 氢原子肽键和亚氨肽键。后者为脯氨酸或羟脯氨酸的杂环氮原子肽键。超过25%脯氨酸和羟脯氨酸构成的胶原蛋白(占人体30%蛋白总量)和明胶蛋白的肽键是杂环氮原子肽键。它们是结缔组织的主要构架蛋白, 以提供组织的耐久性。羟脯氨酸的检测常用于评价组织胶原蛋白的水平。基于羟脯氨酸, 由氯胺T(对甲苯氯磺酰胺钠盐)氧化后, 其产物吡咯-2-羧酸在偶氮染料二甲基-4-氨基苯甲醛的作用下, 产生红色产物, 通过分光光度计(558nm波长), 测定羟脯氨酸的含量^{[7][8]}。

首先以I型胶原蛋白标准溶液浓度为横坐标, 以558nm波长处吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 发现蛋白浓度20-100 $\mu\text{g/ml}$ 内与其吸光度呈良好的线性关

系，回归方程为 $Y=0.000428571+ 0.000521429X$ ($R=0.9994$)。将各比例的PPC/PVC复合膜剪裁成 $1\times 1\text{cm}^2$ 规格，浸没于2ml浓度为 $100\mu\text{g/ml}$ 的I型胶原蛋白溶液中，于常温下保持4小时。随后取出1ml与样品接触后的蛋白溶液置于新试管中，加氯氨T溶液1ml，摇匀后于室温放置20min，加入显色剂1ml，摇匀在 60°C 恒温20min取出，冷却后在560nm处测定吸光值。采用紫外分光光度仪在558nm处测量紫外吸收强度。根据所测定的吸光度值，对照标准曲线，确定不同吸光度所对应的蛋白液浓度，可计算出复合膜蛋白吸附量，重复三次取平均值。

3 结果与讨论

3.1 PPC的合成与化学结构

3.1.1 红外光谱

图2为原料HPC和产物PPC的红外光谱。从图中可以明显看到HPC的红外谱图上在 3446cm^{-1} 左右有一个强而宽的吸收峰，这应是羟丙基纤维素上羟基的伸缩振动吸收峰，而在PPC的红外谱图上，此吸收峰基本消失；而在 1735cm^{-1} 和 1243cm^{-1} 处出现了酯基的特征吸收峰，表明HPC分子中的羟基(-OH)氢已被丙酰基取代，酯化生成了羟丙基纤维素丙酸酯(PPC)，并且丙酰化作用比较完全。

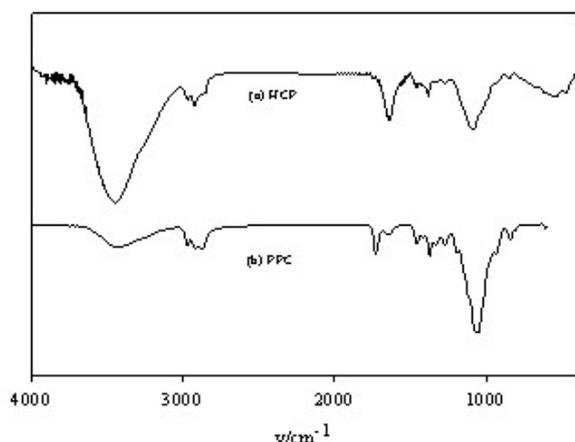


Fig 2 FTIR spectra of HPC and PPC (a)HPC; (b)PPC

图2 HPC和PPC 的红外光谱图 (a)HPC; (b)PPC

3.1.2 偏光形态结构观察

图3是PPC在 37°C 下的偏光显微镜照片，其中(a)是未经剪切的照片，(b)是剪切后的照片。未受剪切力

作用时，PPC在偏光显微镜下可观察到胆甾型液晶特殊的油状纹理结构；当在盖玻片上轻轻施加剪切力时，偏光显微镜中可清晰观察到载玻片与盖玻片之间呈粘稠状的PPC产生流动，而此时PPC依然保持着彩虹纹理结构，同时偏光显微镜下还可观察到明暗相间的彩色条带结构，条带走向几乎平行。以上现象说明：PPC在体温 37°C 附近呈现胆甾型液晶态。



(a) (b)

Fig 3 The texture of PPC(37°C 、 $\times 500$) (a)before shear; (b)after shear

图3 PPC的液晶结构(37°C 、 $\times 500$) (a)剪切前; (b)剪切后

3.1.3 核磁共振分析

图4是羟丙基纤维素丙酸酯(PPC)的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图，a峰对应于侧链上未反应羟基氢的吸收峰；b峰对应于羟丙基取代的亚甲基氢和碳环上氢的互相交叠吸收峰；c峰对应于引入的丙酰基上与脂键相连的亚甲基氢的吸收峰；d峰对应于引入的丙酰基上甲基氢的吸收峰。PPC中单位糖环上丙酰基取代度DS（完全取代时

