生物医学工程学杂志
J Biomed Eng 2001; 18(2): 169～172

利用自组装单分子层(SAM)研究细胞和表面的相互作用

应佩青　王战会　综述　靳　刚　陶祖莱　审校
(中国科学院 力学研究所, 北京　100080)

摘要　研究细胞和表面相互作用具有重要意义, 利用长链的烷硫醇在金表面或烷基硅烷在羟基化表面形成的自组装单分子层及其微格式化的表面允许以分子水平研究并控制细胞和表面的相互作用。我们概述了自组装单分子层及其格式化表面研究细胞和表面相互作用的最新进展。

关键词　细胞-表面相互作用　自组装单分子层　表面微制作

Using Self-assembled Monolayers to Understand the Interactions of Surfaces with Cells

Ying Peiqing　Wang Zhanhui　Jin Gang　Tao Zulai
(*Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080)

Abstract　It is important to understand the interactions of surfaces with cells. Self-assembled monolayers formed on the adsorption of long-chain alkanethiols to the surface of gold or alkylsilanes to hydroxylated surfaces and their patterned surfaces permit of understanding and controling over the surface-cell interactions at the molecular scale. The present paper reviewed the latest research in using patterned self-assembled monolayers to understand surface-cell interactions.

Key words　Cell - surface interaction　Self-assembled monolayers　Micropatterning

1　引　言

细胞和表面的相互作用在细胞行为中起重要生物学作用。感应粘附的细胞膜受体能在许多方面影响细胞生理学。这些相互作用的例子有白细胞在血管内皮上的滚动和激活; 胚胎基底膜在形成过程中的空间分化; 轴突在粘附蛋白上的延伸; 促有丝分裂因子诱导的细胞的繁殖; 血小板在血管次内皮上的扩展和复原。这些和其它的细胞-表面相互作用影响或控制细胞生理学的许多方面, 比如粘附、扩展、激活、复原、迁移、繁殖和分化[1]。

理解细胞-表面相互作用对于开发提高或抑制细胞-基底相互作用(如组织再生或生物材料整合中增强细胞粘附或在转移或纤维化中减少细胞粘附的药剂)的药用化合物是很重要的。在组织工程这一新起领域, 细胞对培养支持物的粘附对生物杂合皮肤修复、合成关节软骨和肝细胞构架等许多产品是关键。研究细胞-表面相互作用是生物医药和生物工程包括组织工程、生物材料设计、免疫学、肿瘤学、血液学和发展生物学等领域的重要问题。自组装单分子层(SAM)——尤其是由长链烷硫醇在金表面的吸附形成的 SAM ——是新近发展起来的适合于蛋白质和细胞与表面相互作用研究用的有机表面。通过合成可以控制 SAM 的组成和性能, 且在单分子层上很容易形成功能基团图样, 使得这种表面成为蛋白质吸附细胞粘附机理研究的最好表面[2]。

2　自组装单分子层(SAM)

2.1　烷硫醇在金表面的 SAM

从溶液或蒸气中吸附长链烷硫醇[X(CH2)$_n$SH, n= 11～18]到铬或钛涂底的硅基底上, 可以通过金-硫键形成自组装单分子层(SAM)。其结构可以表达为[3,4]:

$$RSH + Au(0)n \rightarrow RS^{-}Au(\mathrm{I})Au(0)n + 1/2H_2(?)$$

其中硫原子与表面的金原子并列, 延伸的长链烷与表面法线约成 30 度角。界面的性能取决于烷硫醇的末端功能基团 X; 通过直接合成可以把复杂的基团引入到表面。SAM 的表面化学可以通过从二种

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

或更多种烷硫醇溶液形成所谓的混合 SAM。但在高于 70℃或在有氧时受 UV 照射时会分解。

2.2　烷基硅氧烷 SAM

羟基化表面(通常是天然的硅或玻璃)与烷基三氯硅烷(或烷基三乙氧基甲硅烷)溶液反应形成烷基硅氧烷[5,6]。活性硅氧烷基团与水和表面羟基和邻近硅氧烷缩合形成交联网络; 连接键排列不很确定而是依赖于形成 SAM 的条件。这些 SAM 比金表面的烷硫醇形成的 SAM 更具有热稳定性, 也不需要在基底制备时蒸发一层金属。然而, 烷基三氯甲硅烷的活性以及 SAM 形成后引进功能基团的困难限制了表面的基团范围。

2.3　格式化表面微制作

生物材料表面对细胞活性起重要作用。通过表面微制作, 在材料表面形成细胞粘附的微小区域, 可以控制细胞在表面的铺展, 进而控制细胞的功能和活性。

2.3.1　光刻法微制作(Photolithography)[7]　光刻法表面微制作如图 1 所示, 以二甲基二氯硅烷(DMS)和 N-(2-氨乙基)-3-氨丙基-三甲氧基硅烷(EDS)在石英表面形成的格式化表面为例, 基本步骤为: (1)石英上涂上光刻胶; (2)UV 通过光掩膜照射到光刻胶上; (3)紫外照射区蚀化掉; (4)二甲基二氯硅烷(DMS)连接到石英上; (5)去除残余的光刻胶; (6)N-(2-氨乙基)-3-氨丙基-三甲氧基硅烷(EDS)连接到石英上。如 100 μm 宽的 DMS 区域间隔以 50 μm 宽的 EDS 或石英的具平行线图样的基底。在富血清培养基中, 成骨细胞优先粘附于 EDS 或石英上而不是 DMS 上。因为血清蛋白同时吸附到 EDS 和 DMS 上, 有人假设吸附到 EDS 或石英上的血清蛋白分子为正确的组成或构象。另一可能是吸附到 EDS 上的蛋白质分子不同于吸附到 DMS 上的蛋白质分子。

2.3.2　微接触印花法(Microcontact printing technique)[8]　将微米量级的特征图形的橡胶模压印在金表面上, 形成特殊类型的烷硫醇自组装单分子层上, 从而形成许多具有确定形状与尺寸的细胞粘附岛, 以十六烷硫醇和寡聚乙二醇为末端的烷硫醇形成的 SAM 为例, 其具体操作如图 2 所示。与光刻法相比, 微接触印花法虽然也基于光刻过程, 但使用了 PDMS 模, 使用起来更为灵活方便。

洁净的硅片上涂上 2 μm 厚的光刻胶聚(乙丁烯酸甲酯)后烤干。UV 通过含所需花样的光刻掩膜照射到硅片上(i)。硅片显影, UV 掩盖处留下 2 μm

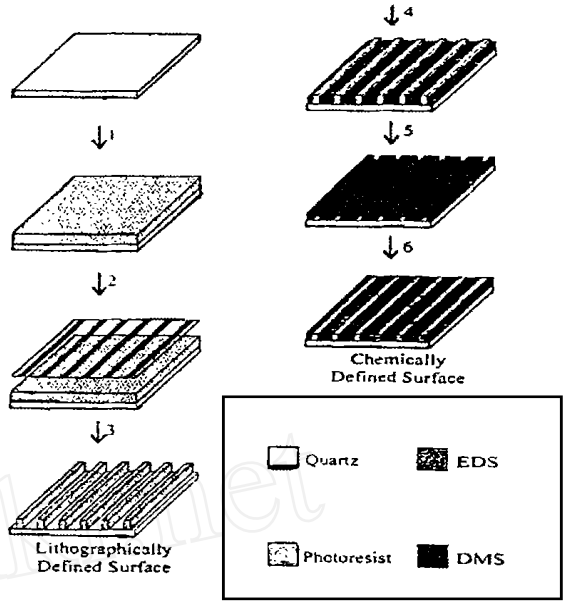

图 1　烷氧硅固定化到石英基底上的格式化制作

Fig 1　Patterning technique for immobilizing alkyloxysilanes on quartz substrates

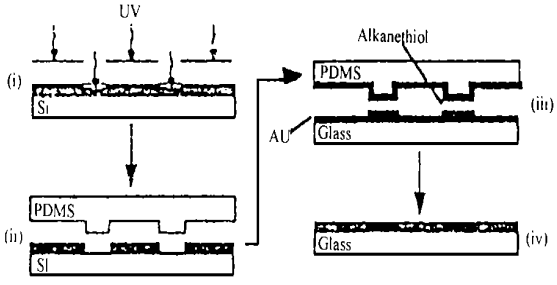

图 2　微接触印花法微制作

Fig 2　Microcontact printing patterning technique

厚的光致抗蚀剂, 其余部分为裸露的硅片。预聚合物在该原版上聚合制备得到聚二甲基硅烷(PDMS)压模(ii)。由钛(1.5 nm)和金(12 nm)薄膜电子束物理挥发沉积到玻璃片上(0.20 mm, No. 2, corning)制得基底。用十六烷硫醇($HS(CH_2)_{15}CH_3$, 2 mM 于乙醇中)浸湿棉签, 将棉签一次性擦拭 PDMS 压模表面。压模以氮气吹干 10s, 轻置于渡金玻璃片上, 使用足够的压力以确保压模和基底共形接触(iii)。5s 后, 压模从基底上移开, 小心不要压成双重压印。玻璃片马上浸入三(乙二醇)为末端的烷硫醇的乙醇溶液中($HS(CH_2)_{11}(OCH_2CH_2)_3OH$, 2mM), 30 min 后, 取出玻璃片, 以乙醇洗, 氮气吹干(iv)。蛋白质可快速且不可逆地吸附到十六烷硫醇的疏水表面上, 有寡聚乙二醇基团的 SAM 可有效抑制蛋白质吸附。因此, 当这些基底浸入 50 μg/ml 的粘连蛋白(FN)缓冲液中时, FN 快速吸附到压印区域。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 蛋白质调节的细胞-表面相互作用

细胞粘附一般是通过细胞粘连蛋白(如 Fibronectin)或含细胞-表面受体(如 Integrin)的蛋白多糖(Proteoglycan)来调节的。很明显,细胞不含合成聚合物的受体,因此,可以认为合成聚合物不支持细胞的粘附。然而,当聚合物材料植入体内或在体外接种时,事实上很容易支持细胞粘附。这是由于体液或细胞培养基质中的细胞粘附蛋白被吸附于聚合物材料上,细胞与吸附的蛋白结合而不是直接与聚合物材料相互作用[9]。因此,细胞对基质的粘附的控制依赖于对基质蛋白在表面吸附的控制。大多数非亲水性表面由于粘附蛋白(如粘连蛋白、胶原和玻璃体结合蛋白)的优先吸附而支持细胞生长。而非离子亲水性表面(如纤维素和聚乙烯醇)很少吸附蛋白质,为非粘附表面。因此在二维或三维表面构建亲水和非亲水微区域,就可以控制蛋白质在表面的粘附,进而控制细胞的粘附和生长[1]。

蛋白质也可固定化在基底上,从而改变其生物学性能细胞粘附蛋白的共价结合已被用来使细胞非粘附聚合物材料成为细胞粘附的。胶原和粘连蛋白已被共价粘附到聚乙烯醇(PVA)水凝胶中,角膜上皮细胞当植入表面固定化有粘连蛋白的 PVA 水凝胶薄片上时,可以粘附并繁殖[10,11];而无蛋白质固定化时该薄片是非粘附性的。而且,以粘连蛋白预处理扩充的聚四氟乙烯脉管接枝物时,可以增进体内细胞内皮化[12]。

许多从粘附蛋白中得到的短肽序列如 Arg-Gly-Asp (RGD)[13]、YIGSR[14]和 GREDVY[15]已被确定为可以结合到细胞-表面受体上并调节细胞粘附,其亲合力类似于利用完整蛋白质时所得的。寡肽可能与完整蛋白质相比更好,因为它们不受变性的限制且可能更不易发生蛋白质水解作用。Takashi 等人将 RGD 肽段通过光固定到特定区域聚乙烯醇上,形成格式化细胞粘附表面,可以将内皮细胞限定在特定的区域[16]。

通过吸附含硫醇的功能化桥接并接着共价嫁接配基[17],或通过吸附含烷硫醇配基[18],生物配基的自装配单分子层(SAM)可被固定化到金基底上。含 RGD 肽段可以这种方式固定化到金基底上形成可控制细胞形状和功能的高度确定性表面。

据报道从粘连蛋白得到的肽序列 REDV 支持内皮细胞的吸附而不吸附其它脉管或血管壁细胞如血小板、成纤维细胞或平滑机细胞[19]。这是肽序列用于生物活性聚合物以支持单一细胞类型粘附的首次报道。

另外其它生物活性配基如蛋白多糖、肝素、生长因子等也已被整合到表面上调节细胞粘附[9]。

4 结果和讨论

已有一些人就利用 SAM 及图形化的 SAM 研究细胞-表面相互作用做了一些研究工作。如,Elaine Cooper 等[20]用接触角测量和 X-射线光电子光谱描述了在金表面的烷硫醇(Alkylthiols) SAM 表面特性。鼠成纤维细胞 3T3 在分别以羧酸和甲基为末端的单组份基底上,测量 90min 内的吸附率,发现吸附粘附到羧酸末端速率约为甲基末端的 2 倍。24 h 后,粘附到亲水单分子层上的 3T3 细胞比疏水层上的更多。鼠细胞 3T3 也被培养于用光刻法制备的格式化基底上。细胞专一地粘附于羧酸功能化区域。格式化花样也影响粘附细胞的形态。Colin[21]等将人成骨细胞(Osteoblast)粘附到分别以羧基和甲基为末端金表面的烷硫醇 SAM 上。90min 后,粘附到羧基末端的细胞是甲基末端的 2 倍。在图形化表面,细胞专一粘附到羧基末端表面。24 h 后,细胞跨过位于羧基末端区域之间、以 75 μm 的甲基末端分隔的区域,但以 150 μm 的甲基末端分隔的却没有。6 d 后,在图样的羧基末端区域成骨细胞形成多层。Christopher S. Chen 等[8]人利用微接触印花法在金表面制备烷硫醇 SAM,并在基底上制作微型胞外基质(ECM)小岛,以非粘附区域间隔开。结果表明,粘附小岛的大小可以控制内皮细胞的生长和凋亡,从而证实了细胞形态在细胞功能中的作用。

利用图形化的 SAM,形成支持胞外基质蛋白吸附和细胞粘附的确定形状和尺寸的小岛,有可能将目标细胞放置到一个预定的位置和相隔一定的阵列上,从而规约它们的形状。限制细胞的铺展程度提供了对细胞生长和蛋白质分泌的控制。这种方法在实验上是很简单的并且有很灵活的可适应性。细胞的铺展程度影响它的生长与功能,所以将大量的细胞以确定的形状维系在图化的基底上,这不单单是控制单个的细胞行为的一种有效方法,而且也是控制整个培养细胞层性能的一种有效方法。实验表明,铺展程度很差的细胞的生长几乎完全受到了抑制,这似乎表明,是细胞的铺展程度而不是 ECM (胞外基质)配体的密度在规约着细胞是向生长状态转化,还是向分化状态转化[22]。总之,这种可用分子来修饰、表面图形化自组装单分子层,可用于控制细胞的生

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

长和形状,从而有助于进一步分析细胞形状与功能之间耦合的机制的。

参 考 文 献

1 Bernhard O. Palsson, Jeffrey A. Hubbell. Tissue engineering. In The Biomedical Engineering Handbook. CRC press. Joseph D. Bronzino, Ph. D, P. E, 1995; 1583

2 Milan Mrksich, George M. Whitesides. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of manmade surfaces with proteins and cells. Annu. Rev Biophys Biomol Struct, 1996; 25: 55

3 Dubois LH, Nuzzo RG. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. Annu Rev Phys Chem, 1992; 43: 437

4 Whitesell JK, Gorman CB. Self-assembled monolayers: models for organic surface chemistry. In: Handbook of Surface Imaging and Visualization, A T Hubbarded(ed), Boca Raton, FL: CRC Press, 1995; 713-732

5 McGovern ME, Kallury KMR, Thompson M. Role of solvent on the silanization of glass with octadecyltrichlorosilane. Langmuir, 1994; 10: 3607

6 Parikh AN, Allara DL, Azouz IB, *et al*. An intrinsic relationship between molecular structure in self-assembled n-alkylsiloxane monolayers and deposition temperature. J Phys Chem, 1994; 98: 7577

7 Healy KE, Thomas CH, Rezania A, *et al*. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry. Biomaterials, 1996; 17: 195

8 Christopher S. Chen, Milan Mrksich, Sui Huang, *et al*. Micropatterned surfaces for Control of Cell Shape, Posotion, and Function. Biotechnol Prog, 1998; 14: 356

9 Jennifer L. West, Jeffrey A. Hubbell. Bioactive polymers. In Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds, Anthony Atala, David Mooney(Eds), Birkhauser, Boston, 1997; 83

10 Kobayashi H, Ikada Y. Covalent immobilization of proteins onto the surface of poly(vinyl alcohol) hydrogel. Biomaterials, 1991; 12: 747

11 Kobayashi H, Ikada Y. Corneal cell adhesion and proliferation on hydrogel sheets bound with cell-adhesive proteins. Curr Eye Res, 1991; 10: 899

12 Seeger JM, Klingman N. Improved in vivo endothelialization of prosthetic grafts by surface modification with fibronectin. J Vasc Surg, 1988; 8: 476

13 Humphries MJ. The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. J Cell Sci, 1990; 97: 585

14 Massia SP, Rao SS, Hubbell JA. Covalently immobilized laminin peptide Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) supports cell spreading and co-localization of the 67kilodalton laminin receptor with α-actinin and vinculin. J Biol Chem, 1993; 268: 8053

15 Holt DB, Eberhart RC, Prager MD. Endothelial cell binding to Dacron modified with polyethylene oxide and peptide. ASAIO J, 1994; 40: 858

16 Takashi Sugawara, Takehisa Matsuda, Photochemical surface derivatization of a peptide containing Arg-Gly-Asp (RGD). J Biomed Mater Res, 1995; 29: 1047

17 Duan C, Meyerhoff ME. Separation-free sandwich enzyme immunoassays using microporous gold electrodes and self-assembled monolayer/immobilized capture antibodies. Anal Chem, 1994; 66: 1369

18 Spinke J, Liley M, Guder H-J. Molecular recognition at self-assembled monolayers: The construction of multicomponent multilayers. Langmuir, 1993; 9: 1821

19 Hubbell JA, Massia SP, Desai NP, *et al*. Endothelial cell-selective tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. Bio/Technology, 1991; 9: 568

20 Elaine Cooper, Robin Wiggs, David A, *et al*. Rates of attachment of fibrolasts to self-assembled monolayers formed by the adsorption of alkylthiols onto gold surfaces. J Mater Chem, 1997; 7(3): 435

21 Colin A Scotchford, Elaine Cooper, Graham J, *et al*. Growth of human osteoblast-like cells on alkanethiol on gold self-assembled monolayers: The effect of surface chemistry. J Biomed Mater Res, 1998; 41(3): 431

22 Rahul Singhvi, Amit Kumar, Gabriel P, *et al*. Engineering cell shape and function. Science, 1994; 264: 696

(收稿, 1999-09-02)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net