

Study on Selenocystine Immobilization on TiO Surface and It's Endothelial Cell Compatibility

Jin Tang, Yinhong Xie, Yonghong Fan, Yu Zhang, Qian Zhao, Yajun Weng*

Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan
Email: wengyj7032@swjtu.edu.cn

Received: Mar. 23rd, 2018; accepted: Apr. 18th, 2018; published: Apr. 25th, 2018

Abstract

Endothelial cell compatibility is one of the important factors to determine the *in vivo* function of cardiovascular implant. Nitric oxide (NO) release from material may affect growth, adhesion and proliferation of endothelial cells. In this paper, polydopamine was used as linking layer, then selenocystine was immobilized on the surface of titanium oxide film via polydopamine. And NO was released from endogenous NO donor catalyzed by selenocysteine immobilized surfaces. Results of XPS showed that there were obvious Se3d peaks in Se-containing samples. Results showed that Se-containing samples could stably catalyze endogenous NO donors to release NO sustainably. It showed the release rate was consistent with that of healthy endothelial cells. TiO films had good endothelial cell compatibility and the number of adhered endothelial cell was more than that of samples immobilized with selenocystine without nitric oxide donor. However, when endogenous NO donor was added, adhesion number of endothelial cells on selenocystine immobilized surface increased significantly with NO release. The number of adhered endothelial cells was more than that of TiO samples. NO release also promoted migration of endothelial cells on the surfaces. In conclusion, immobilization of selenocystine on the surfaces promoted adhesion and migration of endothelial cells by catalyzing release of NO, and then improved endothelial cell compatibility.

Keywords

Selenocystine, Nitric Oxide, Endothelial Cell Compatibility

TiO膜表面固定硒代胱氨酸及其内皮细胞相容性研究

唐金, 谢银红, 范永鸿, 张雨, 赵倩, 翁亚军*

*通讯作者。

西南交通大学材料科学与工程学院, 材料先进技术教育部重点实验室, 四川 成都
Email: wengyj7032@swjtu.edu.cn

收稿日期: 2018年3月23日; 录用日期: 2018年4月18日; 发布日期: 2018年4月25日

摘要

内皮细胞相容性是心血管材料植入人体后能否持续发挥功能的重要评价指标, 材料释放一氧化氮(NO)可能影响内皮细胞的生长、粘附、增殖等行为。本文采用聚多巴胺作为中间连接层, 将硒代胱氨酸固定在钛氧薄膜表面, 利用硒代胱氨酸催化内源性NO供体释放NO。XPS结果显示, 在含硒样品上出现了明显的Se3d峰, NO释放实验证明, 含硒样品均能够稳定催化内源性NO供体持续释放NO, 且释放速率与健康内皮细胞NO释放速率一致。TiO样品表面具有较好的内皮相容性, 在未添加NO供体时内皮细胞粘附数量多, 优于固定硒代胱氨酸的样品。在添加了内源性供体条件下, 固定硒代胱氨酸表面内皮细胞粘附数量显著增加, 并且随着NO释放速度增加而进一步增强, 内皮细胞的粘附数量均优于Ti-O样品, 同时NO释放还促进了内皮细胞在样品表面的迁移。综合以上结果, 表面固定硒代胱氨酸, 通过催化内源性供体释放NO促进了内皮细胞的粘附及迁移, 改善了材料表面的内皮细胞相容性。

关键词

硒代胱氨酸, 一氧化氮, 内皮细胞相容性

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

具有血液相容性和内皮细胞相容性是心血管材料的两大功能需求, 也是目前该领域的研究热点。释放一氧化氮的心血管材料能够抑制血小板的聚集和粘附[1], 研究表明 NO 能够通过 cGMP 途径抑制血小板活化[2], 提高材料的血液相容性。而对于释放 NO 材料的内皮细胞相容性, 文献中出现了不同的研究结果[3] [4] [5]。Meenakshi Kushwaha 等[4]制备了可释放 NO 的类细胞外基质涂层, 发现具有涂层能够抑制血小板的粘附及平滑肌的增殖, 并且能够促进内皮细胞的粘附与增殖。Bonnie L 等[5]发现加入 NO 供体能够抑制由于精氨酸琥珀酸合酶表达减少导致的内皮细胞凋亡。Katarzyna [6]等发现低浓度的 NO 供体存在条件下, 内皮细胞的粘附量明显增加。Shunichi Shimizu [7]等人发现 NO 供体的加入显著降低了内皮细胞数量和生长速率。由于上述研究并未给出具体的 NO 释放速率且 NO 供体的类型和浓度各不相同, 因此 NO 释放对内皮细胞的作用结果完全不同并且难以解释。由于上述研究中采用的是 NO 供体或供体型 NO 释放材料, 这类材料带来往往伴随着 NO 突释, 不具有持续稳定的 NO 释放速率, 难以获得规律性的认识。本实验拟通过在氧化钛薄膜上沉积多巴胺并固定硒代胱氨酸, 构建可持续性催化内源性供体释放 NO 的表面, 研究一氧化氮释放对于内皮细胞行为的影响。

2. 实验部分

2.1. 材料和仪器

材料: 硅片; 人脐静脉内皮细胞株; 蒸馏水、丙酮试剂为分析纯; 多巴胺、硒代胱氨酸、NaOH; F12

培养基、胎牛血清。

仪器:UBMS450 型高真空非平衡磁控溅射设备;ESCALB MK-IIx 射线光电子能谱分析;DSA100 接触角测量仪;美国 Sievers 280i 型化学发光检测仪;Olympus 荧光显微镜。

2.2. 材料表面沉积不同层数多巴胺薄膜固定硒代胱氨酸及其表征

利用 UBMS450 型高真空非平衡磁控溅射设备在硅片上溅射沉积 TiO 膜,将沉积 TiO 薄膜的硅片切为 8 mm × 8 mm 尺寸,样品标记为 TiO。称取一定量多巴胺溶于浓度为 1.2 mg/ml Tris 溶液中,得到终浓度为 2 mg/ml 多巴胺溶液。将已清洗的 TiO 薄膜样品放入培养皿,多巴胺溶液倒入其中,室温下静置反应 12 h。通过上述步骤沉积一次多巴胺记为一层多巴胺。分别重复 3、5、8 次,得 3、5、8 层多巴胺样品,将 5 层多巴胺样品标记为 Dopa。将一定量硒代胱氨酸溶于 6 mM 的 NaOH,得到终浓度为 3 mM 硒代胱氨酸溶液。将硒代胱氨酸溶液倒入已放入 3、5、8 层多巴胺样品的 24 孔板,室温下静置 24 h,样品分别标记为 3-Se、5-Se、8-Se。

通过 XPS 分析样品表面化学元素。通过滴法表征样品表面亲疏水性。通过 NO 释放分析材料催化释放 NO 能力。

2.3. 内皮细胞静态培养

将内皮细胞接种于细胞培养瓶中,在条件为 37°C, 5% CO₂ 细胞孵箱中培养,当细胞的融合度为 60%~80%左右可进行实验。将密度为 2 × 10⁴ 个/ml 的细胞均匀种植于样品表面,NO 释放实验组中另加入 GSH 及 GSNO 至其终浓度分别为 130 uM 及 60 uM,在 1 d 时间点取出,用 NaCl 清洗样品表面,用 2.5% 戊二醛固定细胞 24 小时,清洗样品后在样品表面滴加罗丹明染色 15 分钟。

2.4. 内皮细胞迁移实验

将钛箔剪成 1 × 3 cm 大小,将其折叠成 L 型,将“L”的短臂置于 24 孔板底部,沉积多巴胺薄膜并固定硒代胱氨酸后,再由明显的多巴胺边缘折叠。实验时,首先将未改性的一臂置于 24 孔板底部并种植密度为 2 × 10⁴ 个/ml 的内皮细胞,培养 1 天;然后移除培养基并将钛箔翻转,使其改性表面置于孔板底部,加入新鲜培养基,NO 释放实验组另加入 GSH 及 GSNO 至其终浓度分别为 130 uM 及 60 uM,继续培养 1 天后取出样品,NaCl 清洗样品表面,并用 2.5% 戊二醛固定细胞过夜,清洗后滴加罗丹明染色 15 分钟。

3. 结果与讨论

3.1. 材料学表征

图 1 为各样品的 XPS 全谱图,从图中可以看出,固定硒代胱氨酸后,各样品均出现了 Se3d 峰,说明硒代胱氨酸固定成功。而通过计算,从表 1 可以看出硒的相对百分含量差距并不明显,5 层多巴胺表面固定的硒代胱氨酸略多于 3 层与 8 层样品。

图 2 为各样品水接触角测量结果,TiO 薄膜的水接触角大约为 30°左右,固定多巴胺后水接触角升高,这可能是由于沉积的多巴胺中含有疏水基团,如苯环等,暴露在 TiO 薄膜的表面,导致水接触角变大。固定硒代胱氨酸后,材料的亲疏水性并没有明显变化。

健康内皮细胞能够持续释放一氧化氮,其释放 NO 的速率为 0.5 - 4 × 10⁻¹⁰ mol·cm⁻²·min⁻¹ [8]。硒代胱氨酸中的双硒键能催化 NO 从内源性 NO 供体中稳定释放[9]。图 3 为各样品催化释放 NO 速率,结果显示,三组样品 NO 释放速率均在健康内皮细胞释放速率范围内,5-Se 样品催化释放 NO 速率(1.1 ± 0.1 × 10⁻¹⁰ mol·cm⁻²·min⁻¹)明显高于 3-Se 样品(0.5 ± 0.1 × 10⁻¹⁰ mol·cm⁻²·min⁻¹)以及 8-se 样品(0.5 ± 0.1 × 10⁻¹⁰

$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$), 3-Se 样品与 8-Se 样品基本相同, 此结果与 XPS 得到的表面硒含量结果趋势一致, 即 5 层聚多巴胺表面固定了较多的硒代胱氨酸而具有较大的催化释放 NO 的能力。

3.2. 内皮细胞静态培养结果

如图 4 所示为内皮细胞静态培养 1 d 结果图, 从图 4(a)可以看出, 每组样品表面内皮细胞均能呈现了

Table 1. Content of Se Obtained via XPS of sample 3-Se, 5-Se and 8-Se Surfaces

表 1. 各样品表面硒元素的相对含量

Sample	Se (%)
3-Se	0.7
5-Se	0.9
8-Se	0.7

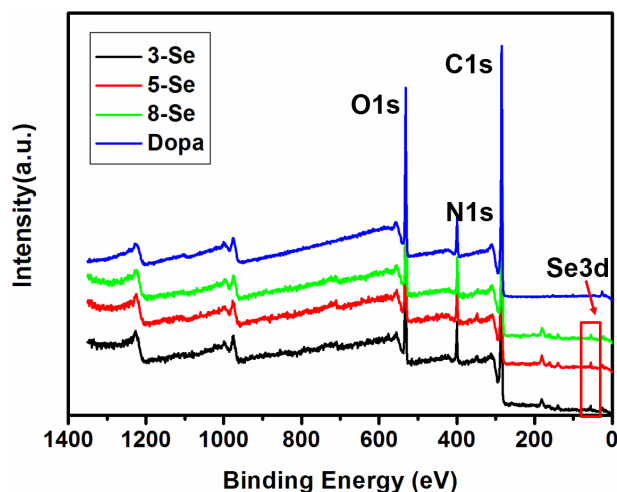


Figure 1. Wide-scan spectra XPS of samples

图 1. 各样品的 XPS 全谱图

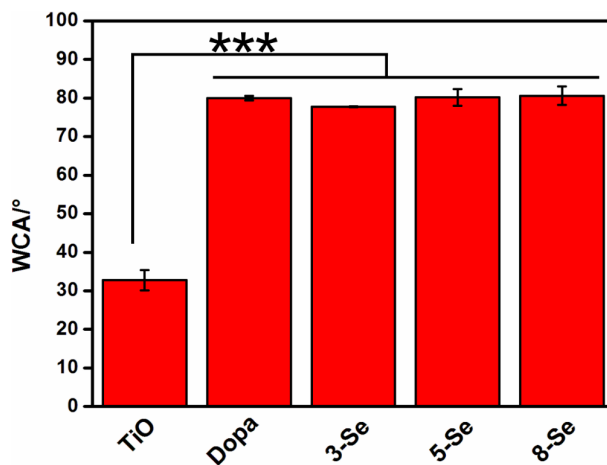


Figure 2. Water contact angle of samples ($n \geq 6$, $***p < 0.001$)

图 2. 各样品的水接触角($n \geq 6$, $***p < 0.001$)

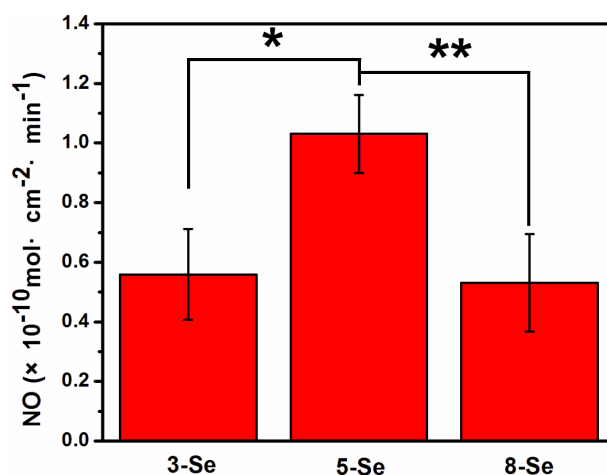


Figure 3. NO release catalyzed by samples from GSNO
图 3. 样品催化 GSNO 释放 NO 速率

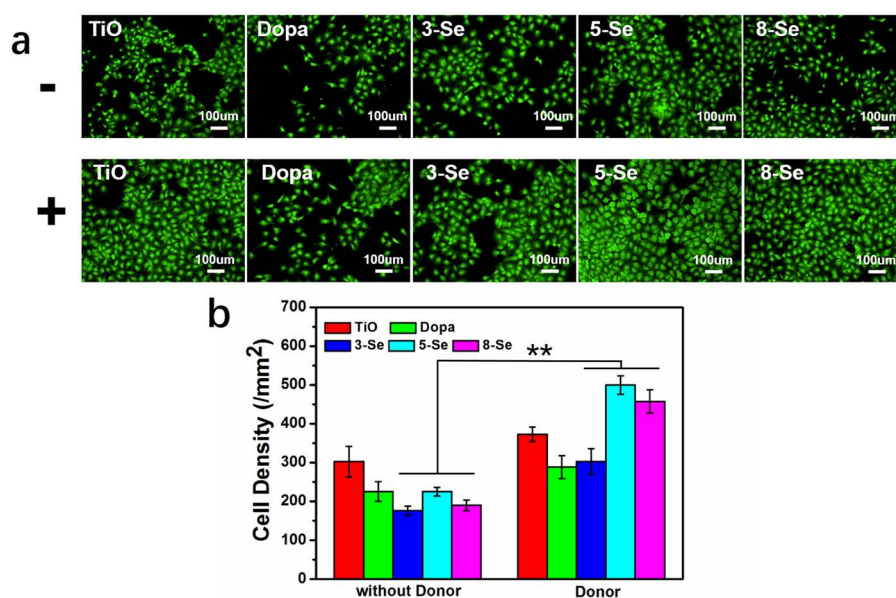


Figure 4. Evaluation of ECs' adhesion and cell density on samples. (a) Fluorescent images of ECs adhesion on samples for 1 day without and with NO donor. The “-” represented without donor and the “+” represented with donor. (b) ECs' density on samples for 1 day. (n = 4, **p < 0.05)

图 4. 内皮细胞粘附及细胞密度评价。(a) 不同样品表面 ECs 在无供体和有供体条件下培养 1d 的荧光染色结果；“-”表示未添加 NO 供体，“+”表示添加 NO 供体；(b) 不同样品表面 ECs 培养 1d 的细胞密度统计(n = 4, **p < 0.05)

一种比较好的铺展形态，而无论是否具有 NO 释放，Dopa 样品表面的内皮细胞数量均少于其他样品表面，这可能是由于 Dopa 样品表面具有高反应性，能够与大多数蛋白质氨基酸残基中的氨基或巯基反应，并没有选择性的原因。在没有 NO 释放条件下，各组样品内皮细胞的粘附生长情况并无太大差异，但在 TiO 薄膜样品表面内皮细胞粘附的数量多于其他样品，说明 TiO 薄膜是一种生物相容性较为良好的材料。而在有内源性 NO 供体存在条件下，固定硒代胱氨酸样品表面的内皮细胞数量均大于 TiO 样品，呈现出铺路石状细胞形态，生长状况良好，这可能是因为样品催化释放 NO，提高了内皮细胞的活性，使内皮细胞具有较强的粘附、生长能力。图 4(b)内皮细胞 1 天的细胞密度统计结果进一步证实，NO 的持续稳定释

放能够明显增加细胞粘附数量，并且趋势与 NO 释放速率一致。5-Se 样品表面内皮细胞数量更多，这可能是因为 5-Se 样品表面催化释放 NO 的能力更强，说明在适宜的 NO 释放范围内，较大的 NO 释放速率有利于内皮细胞的粘附。

3.3. 内皮细胞迁移结果

图 5 为内皮细胞在各组样品上的迁移情况，细胞迁移是评价材料是否具有良好的细胞相容性和是否具有快速内皮化能力的重要指标。根据图 5(a)内皮细胞迁移的荧光结果图来看，无 NO 供体组样品表面内皮细胞的迁移距离均低于有 NO 供体组样品。由于 NO 供体存在微弱的自分解能力，在无催化活性的 TiO 和 Dopa 样品表面也会有非常弱的 NO 释放(由于太弱，NO 化学发光检测仪不能检测到)，所以内皮细胞的迁移距离均大于未添加供体组。对于固定硒代胱氨酸样品，内皮细胞在表面迁移距离相比于未添加供体组增加更为显著，5-Se 样品表面内皮细胞迁移距离最大。从图 5(c)内皮细胞迁移范围内的细胞密度统计可以看出，未添加 NO 供体组，其表面内皮细胞密度均低于添加 NO 供体组样品表面细胞密度，同时，未添加供体组中，TiO 薄膜样品表面的细胞密度大于固定硒代胱氨酸样品，但加入 NO 供体后，固定硒代胱氨酸样品表面内皮细胞数量大于 TiO 样品，这与内皮细胞静态培养的实验结果一致。本实验结果显示，适宜的 NO 释放速率能够促进内皮细胞的增殖和迁移，但是对 NO 促进内皮细胞迁移的机制尚不明确，需要进一步的实验和探索。

4. 结论

通过在 TiO 薄膜表面沉积聚多巴胺并固定硒代胱氨酸分子，制备了具有催化活性的新型心血管材料，其催化释放 NO 的速率与健康内皮细胞释放 NO 速率相当。在此范围内，较大的 NO 释放速率有利于内

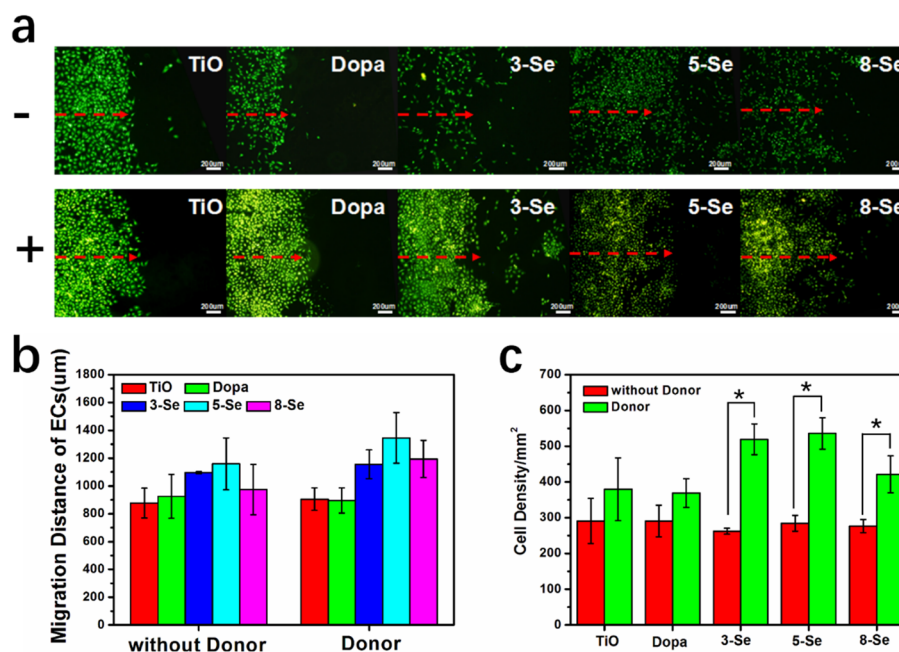


Figure 5. Evaluation of ECs migration on samples without and with NO donor. (a) Fluorescent images of ECs migration. The “-” represented without donor and the “+” represented with donor. (b) ECs migration distance measured. (c) ECs density measured. (n = 4, *p < 0.05)

图 5. 在无供体和有供体条件下内皮细胞迁移的评价。(a) 不同样品表面 ECs 迁移的荧光图像。“-”表示未添加 NO 供体，“+”表示添加 NO 供体。(b) 内皮细胞迁移距离的结果统计图。(c) 内皮细胞迁移部分细胞密度的结果统计图(n = 4, *p < 0.05)

皮细胞的粘附生长及增殖，增强了内皮细胞的活性，有利于内皮细胞在材料表面的迁移。

参考文献

- [1] Förstermann, U. (2006) Janus-Faced Role of Endothelial No Synthase in Vascular Disease: Uncoupling of Oxygen Reduction from No Synthesis and Its Pharmacological Reversal. *Biological Chemistry*, **387**, 1521-1533. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.190>
- [2] Beghetti, M., Sparling, C., Cox, P.N., Stephens, D. and Adatia, I. (2003) Inhaled No Inhibits Platelet Aggregation and Elevates Plasma but Not Intraplatelet Cgmp in Healthy Human Volunteers. *American Journal of Physiology Heart & Circulatory Physiology*, **285**, H637-42. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00622.2002>
- [3] Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (1997) Nitric Oxide and Apoptosis: Another Paradigm for the Double-Edged Role of Nitric Oxide. *Nitric Oxide*, **1**, 275-281. <https://doi.org/10.1006/niox.1997.0133>
- [4] Kushwaha, M., Anderson, J.M., Bosworth, C.A., Andukuri, A., Minor, W.P. and Lancaster Jr., J.R., *et al.* (2010) A Nitric Oxide Releasing, Self Assembled Peptide Amphiphile Matrix That Mimics Native Endothelium for Coating Implantable Cardiovascular Devices. *Biomaterials*, **31**, 1502-1508. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.051>
- [5] Goodwin, B.L., Solomonson, L.P. and Eichler, D.C. (2004) Argininosuccinate Synthase Expression Is Required to Maintain Nitric Oxide Production and Cell Viability in Aortic Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 18353-18360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308160200>
- [6] Luczak, K., Balcerzyk, A., Soszyński, M. and Bartosz, G. (2004) Low Concentration of Oxidant and Nitric Oxide Donors Stimulate Proliferation of Human Endothelial Cells *in Vitro*. *Cell Biology International*, **28**, 483-486. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.03.004>
- [7] Shimizu, S., Kageyama, M., Yasuda, M., Sasaki, D., Naito, S., Yamamoto, T. and Kiuchi, Y. (2004) Stimulation of *in Vitro* Angiogenesis by Nitric Oxide through the Induction of Transcription Factor ETS-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 114-122. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00170-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00170-5)
- [8] Vaughn, M.W., Kuo, L. and Liao, J.C. (1998) Estimation of Nitric Oxide Production and Reaction Rates in Tissue by Use of a Mathematical Model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **274**, H2163-H2176. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.6.H2163>
- [9] Fan, Y., Pan, X., Ke, W., Wu, S., Han, H., *et al.* (2016) Influence of Chirality on Catalytic Generation of Nitric Oxide and Platelet Behavior on Selenocystine Immobilized TiO₂ Films. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, **145**, 122. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.043>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-7613, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: ms@hanspub.org