

# 蛋白质在纳米拓扑结构材料表面的吸附

宋巍<sup>①</sup> 陈红<sup>①②\*</sup>

(武汉理工大学 ① 材料科学与工程学院; ② 材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070.)

\* 联系人, E-mail: [hongchen@whut.edu.cn](mailto:hongchen@whut.edu.cn)

**摘要** 蛋白质在生物医用材料表面的吸附行为与材料的生物相容性密切相关。长期以来, 大量的研究报道基本上都集中在生物医用材料表面化学组成对蛋白质吸附行为的影响, 而单独考察材料表面拓扑结构对蛋白质吸附行为影响的研究近年来才刚刚开始。本文介绍了材料表面纳米拓扑结构对蛋白质吸附行为影响的研究进展。所涉及的材料表面纳米尺度拓扑变量包括粗糙度、曲面曲率和特定几何形状等, 而蛋白质的吸附行为则包括蛋白质吸附量、吸附后蛋白质的活性和吸附蛋白层的形貌等。

**关键词** 表面纳米拓扑结构 蛋白质吸附 材料生物相容性 纳米生物效应

生物相容性是生物医用材料的关键性能。材料生物相容性的好坏主要取决于材料表面与生物环境的一系列生理反应, 而蛋白质在材料表面的吸附是其中的首要过程, 所形成的蛋白质吸附层结构和组成决定着后续反应的类型和程度<sup>[1]</sup>。因此, 研究蛋白质的吸附行为对于提高材料的生物相容性具有至关重要的作用。

蛋白质吸附是受各种因素综合影响的复杂过程。这些因素主要包括蛋白质自身性质、材料表面性质以及所处的环境。蛋白质吸附过程涉及界面层中带电基团的重新分布、蛋白质与材料表面的疏水相互作用以及蛋白质分子结构重排等<sup>[2]</sup>。

材料表面的化学组成和拓扑结构都会影响蛋白质的吸附行为。几十年来, 研究人员就材料表面的化学组分对蛋白质吸附的影响开展了广泛、深入的研究<sup>[3-8]</sup>, 而拓扑结构对蛋白质吸附的影响近年来才受到关注。关于拓扑结构对生物相容性影响的研究多集中在表面拓扑结构对细胞黏附的作用上。早在 1964 年, 人们就发现细胞所处环境的拓扑结构对其行为能产生一定影响<sup>[9]</sup>。组织工程学研究的发展更进一步引起了人们对表面拓扑结构与细胞之间相互作用的关注<sup>[10,11]</sup>。但是, 以往表面拓扑结构对细胞行为影响的研究大多都是定性的描述, 它们之间的内在机理有待更深入地阐明。而进一步的研究必然会涉及到蛋白质吸附与表面拓扑结构的关联。这是由于细胞膜上分布有多种蛋白质, 这些蛋白质(如调节细胞黏附的整联蛋白)功能的表达直接影响到细胞的行

为。构筑与这些蛋白质尺寸相当的三维纳米拓扑结构, 以研究这些结构和蛋白质激活、细胞识别的相互关系, 将有助于最终阐明拓扑结构对细胞形貌、黏附、增殖、分化和生长等行为的影响。此外, 生物体内(如血管内壁等)许多与蛋白质直接接触的表面的特殊微纳拓扑结构与其生物相容性的关系也有待于进一步认识; 蛋白质组学中蛋白质芯片、微流控装置等的表面微结构是生物医学检测的关键因素之一; 纳米材料的生物安全性也涉及到蛋白质吸附与材料表面微纳拓扑结构的关系。因此, 蛋白质在具有拓扑结构表面的吸附行为值得深入考察和研究。

相对于微米级的细胞, 蛋白质的尺寸在纳米级。因此, 为了在蛋白质相近尺度内单独考察拓扑结构对蛋白质吸附的影响, 需要在材料表面构筑化学组分均一、尺寸可控的纳米级拓扑结构。随着纳米科学技术的发展, 在材料表面构筑纳米结构已成为可能<sup>[12]</sup>, 这为考察蛋白质在其表面的吸附行为、作用机制及对随后的细胞黏附等生理反应影响的研究提供了一个有效的平台。本文介绍了近期材料表面纳米拓扑结构对蛋白质吸附影响的主要研究进展。

## 1 各种表面纳米拓扑结构对蛋白质吸附的影响

材料表面的拓扑结构多种多样, 表面结构特征也各具特色, 主要包括粗糙度、曲面曲率和特定几何形状。通过调控构建这些结构特征可以研究纳米级的拓扑结构表面对蛋白质吸附行为产生的影响。

2007-06-19 收稿, 2007-10-08 接受

国家自然科学基金(批准号: 90606013, 20634030)和教育部科学技术研究重点项目(批准号: 107080)资助

### 1.1 粗糙度

任何材料表面都有一定的粗糙度. 不同粗糙度对材料表面的浸润性和表面能都有显著影响<sup>[13]</sup>, 而这势必会对与其相接触的生物分子的行为产生一定影响.

有关纳米级表面粗糙度对蛋白质吸附量的影响程度尚无定论. Cai<sup>[14]</sup>和Han<sup>[15]</sup>等人的实验结果表明: 粗糙度与吸附量之间没有线性关系, 粗糙度对蛋白质的吸附量没有显著影响. 而Rechendorff等人<sup>[16]</sup>的研究结果表明: 增大表面粗糙度可提高蛋白质的吸附量. 他们发现, 随着钽表面粗糙度的增加, 相应的纤维蛋白原饱和和吸附值增加了大约70%, 尽管钽表面积也增加了大约20%. 很显然, 表面粗糙度影响了蛋白质的吸附量. 作者认为, 上述不同结论的得出与研究者所选基材、蛋白质及测试吸附量的方法有关, 所得出的结论自然也依赖于研究者自身的评判标准, 因此有关纳米级表面粗糙度对蛋白质吸附量的影响程度有待进一步研究.

粗糙度对材料表面蛋白质吸附层形貌的影响也不可忽视. Dufrêne等人<sup>[17]</sup>发现胶原蛋白在3种不同聚合物表面的吸附量差别不大, 但是吸附层的形貌却有很大的不同. 作者认为, 其原因在于表面起伏高度影响了吸附的胶原蛋白的活动能力. 具有刚性三螺旋结构的胶原蛋白直径为1.5 nm, 所选双酚A聚碳酸酯(PC)、聚对苯二甲酸乙二酯(PET)和聚偏氟乙烯(PVDF)的粗糙度大约分别为0.5, 1和4 nm. 由于PC表面的起伏高度低于胶原蛋白的厚度, 胶原蛋白分子可相对自由移动, 在材料表面形成的点状结构是其相互聚集或黏附于基材二者竞争的结果; 相反, PET和PVDF表面的起伏高度接近或大于胶原蛋白的厚度, 胶原蛋白分子的移动受到限制, 难以形成相同形貌的吸附层.

由此看来, 纳米级的粗糙度会影响蛋白质的吸附行为, 应该重视粗糙度这一因素对材料生物相容性的影响.

### 1.2 曲面曲率

自然界中不乏各种纳米级的弯曲表面, 例如亚细胞器的膜表面. 这些弯曲表面可起到稳定蛋白质、核酸和其他具有二级和三级结构的生物分子的作用. 在纳米蛋白药物控制释放体系中, 药物载体也多为球形表面, 这些弯曲表面的曲面曲率也会对蛋白质

等生物分子产生影响.

Lundqvist等人<sup>[18]</sup>将人碳酸酐酶I (human carbonic anhydrase I, HCA I) 吸附于直径分别为6, 9和15 nm的纳米二氧化硅粒子, 发现纳米粒子的曲率影响蛋白质的二级结构. 当纳米粒子的直径逐渐增大、曲率逐渐减小时, 蛋白质与粒子之间的相互作用面积就逐渐增大, 粒子弯曲表面对蛋白质二级结构产生的扰动就越强烈. 例如, 直径15 nm的粒子对蛋白质二级结构的改变比直径6 nm的粒子大6倍左右. Vertegel等人<sup>[19]</sup>做了类似的实验, 所用的蛋白质为溶菌酶, 纳米二氧化硅粒子的直径分别为4, 20和100 nm. 他们所提出的理论模型认为: 纳米粒子的直径越大、曲率越小; 当蛋白质接近该粒子时, 分子边缘与粒子表面的距离就越小, 相互作用就越强, 结果使得蛋白质的 $\alpha$ 螺旋结构减少, 相应的蛋白质活性也减弱.

以上研究所考察的都是尺寸较小的球形蛋白质. Roach等人<sup>[20]</sup>对大小、形状完全不同于球形蛋白质的纤维蛋白原进行了研究, 结果发现曲面曲率对棒状的纤维蛋白原的影响不同于球形蛋白质, 即纳米粒子的直径越小、曲率越大, 纤维蛋白原的构象变化反而越大, 纤维蛋白原很可能包裹在半径小于30 nm的纳米粒子表面; 而当纳米粒子的半径增大、曲率减小, 则不会引起纤维蛋白原的这一结构变化.

因此, 蛋白质吸附与曲面曲率这一表面结构特征之间有一定的相关性, 曲面曲率会对不同类型蛋白质的构象或结构产生不同的影响.

### 1.3 特定几何形状

生物医用材料或器件都具有一定几何外形. 在医学诊断等领域使用的材料有时还需要在其表面引入特定的微/纳米结构. 因此, 需要研究这些几何结构对蛋白质等生物分子行为的影响, 为材料设计提供理论指导.

(1) 凹槽结构. 以前的研究已经表明, 细胞能够“识别”材料表面微米级的拓扑结构, 沿着具有特定宽度和深度的凹槽黏附生长<sup>[10]</sup>. 随着尺度减小至纳米级, 蛋白质是否会像细胞那样“识别”材料表面凹槽结构是个很有吸引力的问题. 解决这一问题的一个关键是构筑表面化学组分均一、尺度为纳米级的凹槽结构.

Galli等人<sup>[21,22]</sup>使用原子力显微镜(atomic force microscopy, AFM)通过局部阳极氧化(local anodic

oxidation, LAO)在硅和钛表面制得了与蛋白质尺寸大小相似的纳米凹槽结构,首先开展了这一研究.他们选用蛋白质A(protein A)和F-肌动蛋白(F-actin)作为两种不同类型的模型蛋白质.实验发现,在硅表面,F-肌动蛋白在纳米凹槽区域的吸附量低于平整区域,而且倾向于沿着纳米凹槽吸附.在钛表面,F-肌动蛋白的吸附密度和表面拓扑结构的高度有关.相对于高度3~4 nm的纳米凹槽,它更易于沿着高度1~2 nm的纳米凹槽吸附.因为F-肌动蛋白是由肌动蛋白单体形成的宽为6.5~8.2 nm的肌动蛋白纤维,所以作者认为这种1 nm高的纳米凹槽使表面的粗糙度增加,即增加了表面与F-肌动蛋白的接触面积,有利于其沿着凹槽吸附;而3~4 nm的高度已达到F-肌动蛋白直径的一半,不利于其沿着纳米凹槽吸附.蛋白质A不同于F-肌动蛋白,它是一种直径3 nm的球形蛋白质,无论是在纳米凹槽还是在平整的硅表面,它与表面的接触面积都是恒定的,因而吸附行为和活性在不同的拓扑结构表面没有区别.但是,作者猜测蛋白质A在尺寸大小与其直径相当的圆形线圈拓扑结构表面的吸附密度有可能会增加.

以上研究表明,如同细胞能够“识别”微米级的表面拓扑结构,蛋白质也能够“识别”纳米级的表面拓扑结构,但根据蛋白质形状、大小等性质的不同,对不同的纳米拓扑结构有着不同程度的反应.

(2) 金字塔形结构. 金字塔具有独特的几何外形,其顶部、3个侧面和底部边缘各具不同的结构特征,因而纳米金字塔这一不同寻常的拓扑结构很可能会改变蛋白质的构象,从而影响其最终的生物活性.

Riedel等人<sup>[23]</sup>在硅表面化学气相沉积锗,经过外延生长得到了纳米级的金字塔形拓扑结构.这种金字塔高约6 nm,底部宽约60 nm.他们发现,纳米金字塔拓扑结构对牛 $\gamma$ -球蛋白(bovine  $\gamma$ -globulin, BGG)的吸附及其活性有明显影响.在平整表面,BGG的活性几乎不变;而在纳米金字塔结构表面,BGG的吸附量显著增加,相对活性随着表面纳米金字塔堆积的密度增加而降低.如果材料表面完全由纳米金字塔覆盖,那么BGG的活性将完全丧失.作者认为,正是纳米金字塔拓扑结构使BGG在吸附时构象发生了变化,影响了其活性.

(3) 凹陷与凸起结构. Sutherland等人<sup>[24]</sup>在材料表面制得了直径40 nm、深度10 nm的凹陷结构,分

别在纳米凹陷结构和平整表面吸附纤维蛋白原.石英晶体微天平(quartz crystal microbalance, QCM)测试结果表明,蛋白质在这两种表面上的吸附量相似.为了检验纳米凹陷结构对所吸附的纤维蛋白原的活性是否产生影响,作者将这两种预先吸附有纤维蛋白原的不同拓扑结构的表面浸入未活化的血小板溶液中,结果发现血小板在纳米凹陷结构表面的黏附更多.推测这是由于表面拓扑结构的不同使得吸附的纤维蛋白原采取不同的构象和取向,在纳米凹陷结构表面的构象和取向更有利于纤维蛋白原与血小板膜上的受体结合,使得血小板的黏附增多.

Denis等人<sup>[2]</sup>将直径约23 nm的聚苯乙烯小球吸附于金属钛表面,然后在这种钛表面和无聚苯乙烯小球的平整钛表面上沉积一层金,最后通过末端为疏水甲基的烷基硫醇自组装来化学修饰这两种金表面,从而得到疏水平整的和纳米凸起的结构表面.胶原蛋白在这两种表面的吸附量相近,吸附层的形貌却不相同.在平整表面,胶原蛋白是一种伸长的超分子聚集;在纳米凸起结构表面则没有观察到这种现象.与前述的粗糙度对蛋白质运动性的影响相似,在平整表面,胶原蛋白的运动能力不受影响,而纳米凸起粗糙表面阻碍了胶原蛋白的运动,最终影响了其吸附层的形貌.

因此,表面纳米凹陷与凸起拓扑结构会影响蛋白质的生理功能、运动能力和吸附层形貌.

## 2 研究的发展趋势

综上所述,表面纳米拓扑结构的确会对蛋白质的吸附行为产生影响.但是,蛋白质吸附仅仅是材料与生物环境接触后所引起的一系列反应中的第一步,其后的细胞、血小板黏附等行为决定着材料的最终生物相容性.因此,表面纳米拓扑结构对蛋白质吸附行为影响的研究仅是开端,表面所吸附的蛋白质其结构、构象和取向如何受到材料表面纳米拓扑结构的影响,蛋白质结构发生的相应变化对随后细胞在该表面上的行为会带来哪些进一步的影响,这些都是值得深入细致地研究与探讨的问题.

此外,材料表面拓扑结构和化学组成是同一问题的两个方面,两者既相对独立——各自影响着蛋白质等生物分子的吸附行为,又相辅相成——共同决定着材料的生物相容性.因此,在优化的拓扑结构表面进行化学改性,或在特定化学组分表面构筑拓扑结构,通过两者的协同效应以得到最理想的材料表面



也是今后研究的另一个发展趋势。例如,作为血液接触材料,其表面需抑制非特异性蛋白质吸附或有利于白蛋白吸附以阻止血液细胞黏附。而作为组织替代材料,其表面则需要促进纤连蛋白等以正确的取向和构象吸附,以利于细胞结合。将特定的表面纳米结构和化学组成结合构筑材料表面可以分别满足以上两种截然相反的要求。

### 3 结束语

蛋白质吸附是材料表面与生物环境接触后发生的首要过程。虽然单独考察材料表面纳米拓扑结构与蛋白质吸附行为之间关系的研究才开始不久,但已取得了可喜的进展,加深了人们对蛋白质与表面相互作用的认知,这无疑会影响生物医用材料/器件的设计理念。材料表面纳米拓扑结构与蛋白质吸附相关性的研究,涉及材料科学、生命科学、纳米科学等多学科的交叉与渗透,相信随着研究的不断深入,必将有利于相关生物医用材料科学与技术的发展与应用。同时,该方面的研究对于启发人们如何通过调控材料表面拓扑结构,改善用于心脑血管介入诊疗材料的血液相容性,提高纳米生物检测器件的性能等,具有重要科学意义,是值得关注和开展研究的前沿科学领域。

### 参 考 文 献

- Ostuni E, Yan L, Whitesides G M. The interaction of proteins and cells with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold and silver. *Colloid Surf B*, 1999, 15(1): 3—30[DOI]
- Denis F A, Hanarp P, Sutherland D S, et al. Protein adsorption on model surfaces with controlled nanotopography and chemistry. *Langmuir*, 2002, 18(3): 819—828[DOI]
- Nath N, Hyun J, Ma H, et al. Surface engineering strategies for control of protein and cell interactions. *Surf Sci*, 2004, 570(1-2): 98—110 [DOI]
- Chen H, Brook M A, Sheardown H D, et al. Generic bioaffinity silicone surfaces. *Bioconjugate Chem*, 2006, 17: 21—28[DOI]
- Chen H, Chen Y, Sheardown H D, et al. Immobilization of heparin on a silicone surface through a heterobifunctional PEG spacer. *Biomaterials*, 2005, 26: 7418—7424[DOI]
- Chen H, Brook M A, Chen Y, et al. Surface properties of PEO-silicone composites: Reducing protein adsorption. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 2005, 16(4): 531—548[DOI]
- Chen H, Zhang Z, Chen Y, et al. Protein repellent silicone surfaces by covalent immobilization of poly(ethylene oxide). *Biomaterials*, 2005, 26: 2391—2399[DOI]
- Chen H, Brook M A, Sheardown H. Silicone elastomers for reduced protein adsorption. *Biomaterials*, 2004, 25: 2273—2282[DOI]
- Curtis A S G, Varde M. Control of cell behaviour: Topological factors. *J Nat Cancer Res Inst*, 1964, 33: 15—26
- Curtis A, Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 1997, 18(24): 1573—1583[DOI]
- Desai T A. Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs. *Med Eng Phys*, 2000, 22(9): 595—606[DOI]
- Geissler M, Xia Y. Patterning: Principles and some new developments. *Adv Mater*, 2004, 16(15): 1249—1269[DOI]
- Sun T L, Feng L, Gao X F, et al. Bioinspired surfaces with special wettability. *Acc Chem Res*, 2005, 38: 644—652[DOI]
- Cai K, Bossert J, Jandt K D. Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Colloid Surface B*, 2006, 49(2): 136—144[DOI]
- Han M, Sethuraman A, Kane R S, et al. Nanometer-scale roughness having little effect on the amount or structure of adsorbed protein. *Langmuir*, 2003, 19(23): 9868—9872[DOI]
- Rechendorff K, Hovgaard M B, Foss M, et al. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*, 2006, 22(26): 10885—10888[DOI]
- Dufrène Y F, Marchal T G, Rouxhet P G. Influence of substratum surface properties on the organization of adsorbed collagen films: *In situ* characterization by atomic force microscopy. *Langmuir*, 1999, 15(8): 2871—2878[DOI]
- Lundqvist M, Sethson I, Jonsson B H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir*, 2004, 20(24): 10639—10647[DOI]
- Vertegel A A, Siegel R W, Dordick J S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 2004, 20(16): 6800—6807[DOI]
- Roach P, Farrar D, Perry C C. Surface tailoring for controlled protein adsorption: Effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(12): 3939—3945[DOI]
- Galli C, Coen M C, Hauert R, et al. Protein adsorption on topographically nanostructured titanium. *Surf Sci*, 2001, 474(1-3): L180—L184[DOI]
- Galli C, Coen M C, Hauert R, et al. Creation of nanostructures to study the topographical dependency of protein adsorption. *Colloid Surf B*, 2002, 26(3): 255—267[DOI]
- Riedel M, Müller B, Wintermantel E. Protein adsorption and monocyte activation on germanium nanopyramids. *Biomaterials*, 2001, 22(16): 2307—2316[DOI]
- Sutherland D S, Broberg M, Nygren H, et al. Influence of nanoscale surface topography and chemistry on the functional behaviour of an adsorbed model macromolecule. *Macromol Biosci*, 2001, 1(6): 270—273[DOI]