

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

臺大一號心室輔助器長期動物實驗及生物控制的研發-  
RGDS 接枝聚酯胺表面對內皮細胞於剪切力流場下粘著  
與生長之影響以及內皮化表面血液相容性之探討

計畫類別： 個別型計畫          整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2320 - B - 002 - 148 - M08

執行期間：1999 年 08 月 01 日至 2000 年 07 月 31 日

計畫主持人：王水深    國立台灣大學醫學院

共同主持人：鐘次文    中原大學醫學工程系

                                阮若屈    中原大學化學工程系

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國立台灣大學醫學院外科

中 華 民 國 八 十 九 年 十 月 三 十 一 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 臺大一號心室輔助器長期動物實驗及生物控制的研發-RGDS 接枝聚胺表面對內皮細胞於剪切力流場下粘著與生長之影響以及內皮化表面血液相容性之探討

### Endothelial cells adhesion and growth on PU surfaces with grafted RGDs peptides and blood compatibility of the endothelialized surfaces: Response to shear stress

計畫編號：NSC89-2320-B-002-148-M08

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：王水深 國立臺灣大學醫學院外科

共同主持人：鐘次文 中原大學醫學工程系

阮若屈 中原大學化學工程系

計畫參與人員：邱少華 國立臺灣大學醫學院外科

王毓萱 中原大學醫學工程系

#### 一、中文摘要

我們使用光化學反應方法將不同濃度的 Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) peptide 接枝於 PU-PEG 材料上，經過 ATR-FTIR 分析測得其皆具有 GRGD-peptide 之特性吸收峰；同時由 ESCA 分析也發現，其表面的氮元素 ( $N_{1s}$ ) 有明顯的增加。透過 SEM 觀察 PU-PEG-GRGD 材料表面發現，血漿在室溫下靜置 30 分鐘之後，表面有許多血小板黏著，且大多數的血小板已活化變形並有偽足的現象發生。在動態測試中，在 25 下，設定剪切率為  $1290S^{-1}$  並作用 3 分鐘，發現血小板黏著的個數雖較靜置的少，但其活化情形較為顯著，且聚集成較大的團塊。另外，以此材料做內皮細胞貼附試驗發現，內皮細胞的貼附率隨著 GRGD 接枝濃度增加而增加。

**關鍵詞：**光化學反應、GRGD、動態測試、內皮細胞

**Abstract**

We tested blood compatibility on the modified polyurethane (PU) surface in static and dynamic flow conditions. We had been succeeding to graft glycol-Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) peptide on the PU surface by photo-chemical reaction. To characterize the PU-PEG-GRGD, ATR-FTIR and ESCA analysis were applied to confirm this result. ESCA analysis showed that the surface of PU-PEG-GRGD increased the its component of  $N_{1s}$  atom. In addition, PU-PEG-GRGD surface showed the adsorption peak on FTIR absorption analysis, which might indicate GRGD peptide being grafted. We did grafted different concentration of GRGD to PU-PEG surfaces, and found that the surfaces can facilitate endothelia cell adhesion and growth with the increasing of the concentration of GRGD.

**Keywords:** blood compatibility, PU, GRGD, photo- chemical reaction, ESCA, endothelia cell

#### 二、計畫緣由與目的

自從人工血管、人工心臟輔助器及血液透析器等相繼發展之後，材料與血液之間之相互作用，便成這類材料被選擇與否的先決條件，其中材料表面的粗糙度（surface roughness）、微相分離所造成的親-疏水性區域平衡、表面電荷、表面微觀結構、分子鏈的規則性等均會影響材料的血液相容性[1]。而使用聚胺基甲酯（polyurethane；PU）是因為其具有很優良的物理性質、機械耐久性（mechanical durability）、抗摩擦以及良好的生物適應性和血液相容性[2]，已廣泛應用在許多血液接觸之應用之材料上[3-4]。但在經常性的臨床應用裝置上，還是受到纖維蛋白（fibrin）的黏著而誘導表面引發之血栓所限制[5]。

Herring 等人，首先嘗試將內皮細胞（endothelial cell）移植於人工血管（dacron）上，而可有效改善血管內血栓形成[6]。同樣的，將內皮細胞植於 PTFE 上，經過體內（in vivo）測試發現可顯著的降低血小板的聚集。但經過 Gospodarwicz 等人研究顯示，內皮細胞在 PU 表面生長情形相當不好[7]，除非表面經過預先塗層一種吸附基質或配體物質（ligand）來促進細胞貼附（attachment）；例如包括 RGD peptide 序列的蛋白質。

本研究以修飾改善聚胺基甲酯（polyurethane；PU）表面結構，使其提高長期抗凝血性為目的。並使用以光化學反應，將 GRGD 接枝於 PU-PEG 表面上，並改變不同的 GRGD 濃度，作為內皮細胞附著生長的條件，以達到改善 PU 表面長期抗凝血的目的。

### 三、結果與討論

以光化學反應將不同濃度的 GRGD 序列接枝於 PU 表面上，由 ATR-FTIR 分析表面結構如圖一所示。其中 PU-PEG-GRGD 於  $1615.89\text{cm}^{-1}$  處產生胺基的特性峰值，以及在  $1343.6\text{cm}^{-1}$  處出現一吸收波峰，此為 GRGD 序列中的甘胺酸結構（ $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}-$ ）；另外分別在  $1279.2$  及  $964.59\text{cm}^{-1}$  也出現特性波峰，此為天門冬胺酸之  $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$

官能基與  $\text{COOH}$  官能基。而分別在  $1144.9$  及  $843.16\text{cm}^{-1}$  出現一較小的吸收峰，此為精胺酸之  $\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-$  及  $-\text{CH}_2\text{NH}_2$  官能基的吸收峰。再由 ESCA 分析中可得知（圖二），氮元素的比例隨著 GRGD 濃度的降低而降低（如圖二 A-C），這個結果和 Lin 等人所分析的結果相同[8]。這是因為原本 PU-PEG 材料上的氮元素經 EASA 分析後發現其比例為 1.36%（data not show），又 GRGD 上具有較多的氮元素，因此經氮元素的加成作用之後，使得氮元素比例隨著 GRGD 接枝濃度增加而增加，即使是使用接枝濃度為 0.002M 的 GRGD，其氮元素比例（1.84%）也高於未接枝 GRGD 之前時的比。由此兩種分析我們可證明，GRGD 已經成功被接枝於 PU 表面上了。

接下來我們進行了血漿在 PU-PEG-RGD 材料上靜態和動態的貼附實驗，其經 SEM 分析的結果如圖三所示。在上一年度的計畫中，我們曾經研究過血漿在 PU-PEG 材料上靜態和動態的貼附實驗，經發現無論是靜態和動態的貼附實驗，血小板均無法順利的貼附在此材料表面上。但由圖三中可以發現，血漿於室溫下靜置於 PU-PEG-RGD 材料 30 分鐘後，血小板其貼附型態相當明顯（圖三 a）；若是同樣在室溫下，以一個剪切率流場  $1290\text{s}^{-1}$  下作用 3 分鐘後，血小板數目已經有些許減少，但其貼附情況仍相當良好（圖三 b）。這個現象可以讓我們得到一個初步的假設，內皮細胞應亦可良好的貼附在 PU-PEG-GRGD 的材料表面上，我們將在下列實驗中證明，內皮細胞亦可良好的貼附在 PU-PEG-GRGD 的材料表面上。

我們將取自於臍帶靜脈血管中之內皮細胞（初代細胞）來培植於不同濃度 GRGD 所接枝的 PU-PEG 材料上，研究內皮細胞在材料表面上的貼附效率，其結果如圖四所示。在實驗中的對照組，我們則採用 polystyrene 材質的組織培養盤為貼附材料。當我們將組織培養盤上的內皮細胞培養 48 小時後，以 MTT test 分析其活性（測量產生細胞素的含量），我們將此所測得的內皮細胞活性視為相對貼附率 100%。因

此，我們在相同的條件之下，將內皮細胞分別移植在以濃度為 0.05M、0.01M 以及 0.002M 的 GRGD 所接枝的 PU-PEG 材料上，我們發現細胞貼附率隨著 GRGD 接枝濃度的下降而下降，相對貼附效率分別為 64%、51% 以及 29%，而且，如果沒有接上 GRGD 材料（也就是 PU-PEG 材料時），內皮細胞並不會貼附在材料表面上。由此實驗可以得知，內皮細胞可以順利的貼附在經 GRGD 接枝後的 PU-PEG 材料上。但是，卻無法貼附在 PU-PEG 的材料上。

#### 四、計畫成果自評

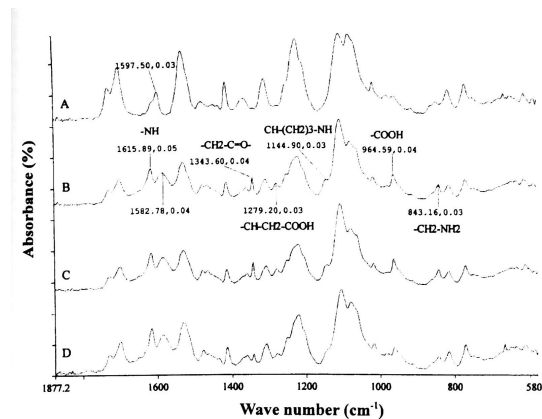
本次執行計畫不但很成功的將 GRGD 以光化學反應方式接枝於 PU 材料上，而且經內皮細胞貼附測試結果亦相當良好，因此我們將為臺大一號人工心臟的材料選擇又向前邁向一大步。因為在上年度的計畫研究中，我們僅利用 PU 改質材料來當作為臺大一號人工心臟的材料選擇，但是由於血液相容性並不盡理想，所以僅能使用在外部且為短期（暫時性）的人工心臟。由於本計畫的研究成果，使得 PU-PEG-GRGD 材料能夠讓細胞貼附的話，則未來一定能夠使得人工心臟移植至體內，並且讓心臟長期運作使用。至於此研究仍潛藏著有許多未來展望，例如：將 GRGD 接枝濃度提高，以期達到更高的內皮細胞貼附率以及測試內皮細胞繼代生長，來試驗此 PU-PEG-GRGD 材料可以讓內皮細胞貼附的時間。因此我們創造了一個開端，可以在未來計畫研究中繼續測試此一材料的功能性。

#### 五、參考文獻

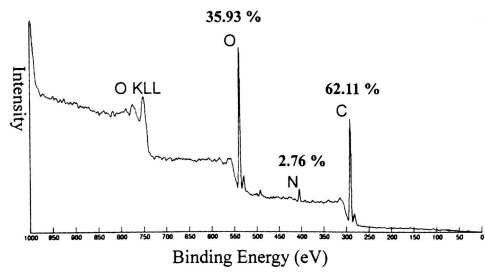
- [1] D. K. Han, K. D. Park, S. Y. Ahn, and Y. H. Kim, *Biomed. Mater. Res.: Applied Biomedicals*, 23 (1989) 87-104.
- [2] M. D. Lelah, and S. L. Cooper, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. (1986)
- [3] S. L. Cooper, and A. V. Tobolsky, *J. Appli. Polym. Sci.* 10 (1966) 1837.

- [4] K. Mrinal, and M. Stephrn, *J. Appli. Polym. Sci.* 61 (1996) 1939-1948.
- [5] M. Szycher, *Lancaster USA.* (1983) 1-33.
- [6] M. Herring, A. Gardner, and J. A. Glover, *Surgery*, 84 (1978) 498-504.
- [7] D. Gospodarwicz, N. K. Nichols, T. R. Kessler, and D. B. Oslen, *Trans. Am. Sec. Artif. Intern. Organs*, 27 (1981) 208-211.
- [8] H. B. Lin, W. Sun, D. F. Mosher, C. G. Echeverria, P. I. Lelkes, and S. L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 329-342.

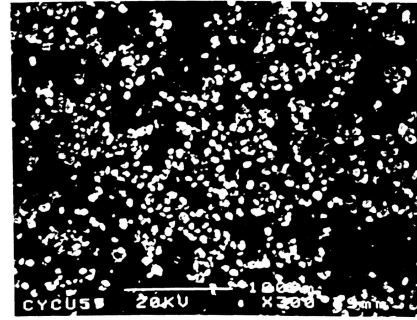
#### 六、附圖



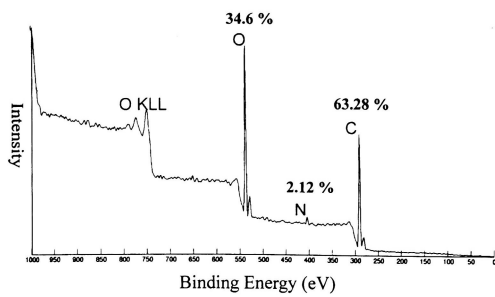
圖一 不同濃度的 GRGD 接枝在 PU 材料表上的 ATR-FTIR 分析圖。其中 GRGD 接枝濃度為：(A) 0M; (B) 0.05M; (C) 0.01M; (D) 0.002M。



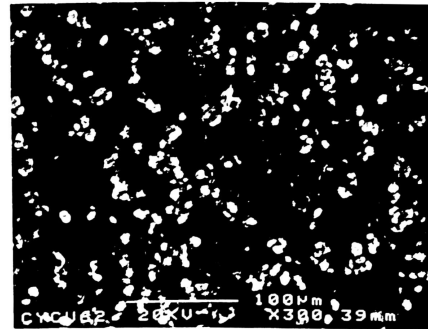
(A)



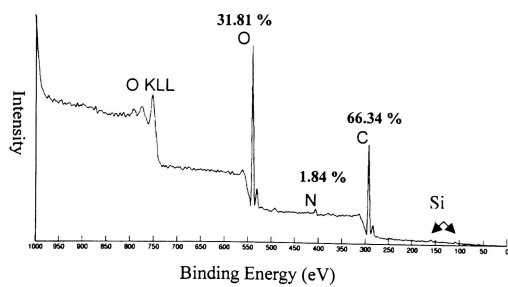
(A)



(B)



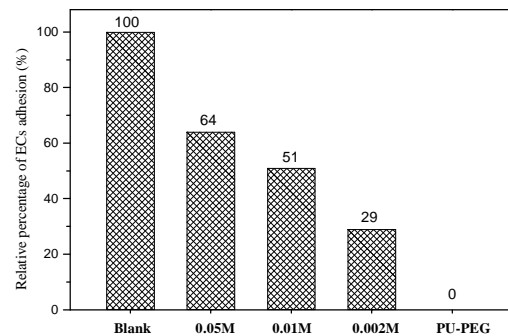
(B)



(C)

圖二 不同濃度的 GRGD 接枝在 PU 材料表上的 ESCA 分析圖。其中 GRGD 接枝濃度為：(A) 0.05M；(B) 0.01M；(C) 0.002M。

圖三 血漿在 PU-PEG-GRGD 下的靜態及動態 SEM 分析圖。(A) 室溫下放置 30 分鐘；(B) 室溫下，以一個剪切率流場  $1290s^{-1}$  下作用 3 分鐘。



圖四 內皮細胞在 PU-PEG-GRGD 材料上貼附情形。