

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

台大一號心室輔助器長期動物實驗及生物控制器的研發 —不同 GRGD 接枝條件對 LVAD 導管內皮細胞化之分析

計畫編號：NSC 90-2314-B-002-368-M62

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 7 月 31 日

主持人：王水深 國立台灣大學醫學院外科

一、中文摘要

本文研究內皮細胞 (endothelial cell) 在不同的生物材料上之貼附生長。主要探討的因素有兩種：(1) 粗糙度對內皮細胞生長之影響、(2) 材料上接枝 Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) 對內皮細胞生長之影響。

PU 材料的粗糙度的形成，是以三種分子量 ($M_w = 1100$ 、 2000 、 5000) 混合聚乙二醇分子 (PEG) 混合接枝在 PU 表面，使修飾的 PU 具較大粗糙度之表面 (PU-PEG_{mix})，經由原子力顯微鏡 (AFM) 之量測，PU-PEG_{mix} 平均粗糙度為 56.80 ± 35.09 nm ($n=3$) 大於 PU-PEG₂₀₀₀ 平均粗糙度為 20.10 ± 7.87 nm ($n=3$) 及 PU 材料平均粗糙度為 1.53 ± 0.2 nm ($n=3$)；由細胞貼附生長實驗顯示，PU-PEG_{mix} 材料對細胞生長貼附量比 PU-PEG₂₀₀₀ 高 35%；且細胞活性測試 (MTT test) 也顯示，PU-PEG_{mix} 材料測試吸收值為 0.028 ± 0.003 ($n=6$)，其細胞活性比 PU-PEG₂₀₀₀ 高 25%。此外，將 GRGD 接枝到 PU-PEG 上形成 PU-PEG-GRGD，經 HPLC 分析，GRGD 接枝密度為 4.2×10^8 mole/cm²；PU-PEG-GRGD 細胞生長貼附量比 PU-PEG 高 40%。且在細胞活性測試顯示，PU-PEG-GRGD 材料材料測試吸收值為 0.033 ± 0.002 ($n=6$)，其細胞活性比 PU-PEG 高 16%。

關鍵詞：內皮細胞、PU、粗糙度、GRGD

Abstract

We investigated the adhesion and growth of human endothelial cells (HUVECs) on

different biomaterials, polyurethane (PU) and chitosan. Two factors that might affect the growth HUVECs on the biomaterials have been studied. There are: (a) roughness of the surface, (b) Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) grafted on the surface.

To produce roughness of PU surface, we mixed equivalent molar of polyethylene glycol (PEG) of different molecular weight (M_w) 1100, 2000 and 5000, and then grafted to PU surface (PU-PEG_{mix}). The roughness defined by atomic force microscopic (AFM) measurements were 56.80 ± 35.09 nm ($n=3$), 20.10 ± 7.87 nm and 1.53 ± 0.2 nm for PU-PEG_{mix}, PU-PEG₂₀₀₀ and PU surface, respectively. Regards to growth of HUVECs on those surfaces, the cell density were 35% higher than PU-PEG₂₀₀₀ surface, respectively. MTT test for cell viability also confirmed the results (e.g. The cell viability of HUVECs growth on PU-PEG_{mix} was 25% higher than PU-PEG₂₀₀₀). In addition, PU-PEG grafted with GRGD to form PU-PEG-GRGD surface were also shown 40% higher growth density of HUVECs than PU-PEG without GRGD grafted although GRGD grafted density is only 4.2×10^8 mole/cm². MTT for HUVECs viability test for PU-PEG-GRGD was also show 16% ($n=6$) higher than without grafted.

Keywords: HUVECs, polyurethane, roughness and GRGD

二、緣由與目的

聚胺基甲酸酯 (PU) 已廣泛被應用於生物醫學材料，並且證明其具有良好的生物相容性。但是，內皮細胞在 PU 表面生長情

形相當不好。所以，若要使細胞在 PU 材料表面生長情況良好，則 PU 材料表面必定要改質。

表面內皮細胞化 (endothelialization)，透過瞭解 RGD peptide 序列和 integrin 蛋白質間的相互作用後，即可發展出改進內皮細胞貼附和成長的生醫材料。Herring *et al.* [1] 於 1978 年首先嘗試將內皮細胞 (endothelial cell) 植在人工血管上，結果顯示可有效改善血管內的血栓形成。但經過 Nichols *et al.* [2] 研究顯示：內皮細胞在 PU 表面生長情形相當不好；除非表面預先塗層一種吸附基質或配體物質 (ligand) 來促進細胞貼附，如包括有 RGD peptide 序列的蛋白質。由於培養內皮細胞技術的進步，能在合理時間內，有效培養足夠數量的內皮細胞，這個研究領域才廣被研究。

近年來有許多研究是有關 RGD peptide 序列的蛋白質，在 1997 年，Grzesiak *et al.* 的研究是利用 RGD 誘導、加強細胞與 collagen/ glycosaminoglycan 材料間的交互作用；利用 RGD 將膠原蛋白材料改質，用內皮細胞、角質細胞、纖維母細胞三種培養於材料上。經實驗結果顯示，改質後之材料均能加強細胞再生時重要的三種細胞間的交互作用。此外，在 2000 年，Kulkarni *et al.* [3] 研究 Dentine matrix protein 1 (DMP1) 物質，DMP1 是一個 non-collagenous ECM，其可以發展成牙齒及骨骼；由實驗結果發現，DMP1 具有 RGD 片段，所以，其可以促進細胞貼附。另外，還有二個合成的含有 RGD 的蛋白質：(1). 2.3kD RGD peptide (P-2)，只含有一個 RGD、(2). 73 kD 合成的 RGD peptide Pronectin F (PnF)；由實驗結果可知，P-2 培養出來的細胞為圓球狀 (round)，而 PnF 培養出來的細胞為平鋪伸展狀 (spread)，兩種合成的蛋白質均可讓細胞貼附於培養盤上，是因為兩種合成的蛋白質均含有 RGD peptides [4]。發現羊毛角質素 (wool keratin) 中含有 RGD 片段，其也可促進纖維母細胞 (fibroblast) 貼附 [5]。RGD 接枝在 PHEMA 及 PET 可以增加纖維母細胞、內皮細胞之貼附 [6]。

另外，在本實驗室先前之研究 [7]，將

PU 材料表面以環己烷二異氰酸鹽 (Hexamethylene diisocyanate, HMDI) 誘導 PU 表面使其具異氰酸鹽官能基 (isocyanate group, -NCO)，用以接枝 polyethylene glycol (PEG) 形成 PU-PEG 材料後，在利用光化學反應接枝上不同濃度之 GRGD 改質 PU 材料，而後培養內皮細胞 (endothelial cell) 於材料上

三、結果與討論

(一) 材料表面特性分析

1. 靜態接觸角量測

利用靜態接觸角量測儀量測 PU、PU-PEG₁₁₀₀、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG₅₀₀₀ 及 PU-PEG_{nix} 等材料表面之接觸角。由表 3-1 可知 PU 未處理前，表面之接觸角高達 $78 \pm 1.93^\circ$ 。PU 材料表面之接觸角高達 $78 \pm 1.93^\circ$ ，顯示其為非親水性材料。將親水性 PEG 長鏈接枝於 PU 表面上，由表 3-1 可知，PU-PEG₅₀₀₀、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG₁₁₀₀ 及 PU-PEG_{nix} 其材料表面之接觸角分別為 $32.38 \pm 1.92^\circ$ 、 $23.63 \pm 1.69^\circ$ 、 $20.63 \pm 2.0^\circ$ 及 $26.5 \pm 4.72^\circ$ ，其接觸角皆明顯下降，顯示具親水性及擺動性佳的 PEG 長鏈，確實提升表面的親水性。

在 1991 年 Desai *et al.* 的研究 [8]，是將 polyethylene oxide (PEO) 接枝在 polyethylene terephthalate (PET) 表面，PEO 的分子量分別有 5k、10k、18.5k、100k 四種，其實驗結果顯示，PET 材料表面接枝上 PEO 後，其材料表面之接觸角由 65.3° 下降至 22.2° 、 23.1° 、 24.3° 、 24.6° ，顯示接枝 PEO 的材料表面其親水性增加許多，且材料表面之接觸角會隨 PEO 的分子量增加而增加。

2. 原子力顯微鏡

以原子力顯微鏡 (AFM)，來量測 PU、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG_{nix}、PU-PEG₂₀₀₀-GRGD 及 PU-PEG_{nix}-GRGD 等材料之粗糙度及其表面型態。表 3-2 為 PU、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG_{nix}、PU-PEG₂₀₀₀-GRGD 及 PU-PEG_{nix}-GRGD 表面之 AFM 所量測之粗糙度值，圖 3-1 為其材料表面之原子力顯微鏡表面之型態。其量測的條件為 scan size $2 \mu\text{m}$ 、data scan 500 nm，粗糙度為量測時所的平均粗糙度 Ra。

3. 高效能液相層析法-HPLC

利用 HPLC 來量測 PU-PEG 材料表面以光化學反應接枝 GRGD 之接枝率，當光化學反應後，用去離子水沖洗材料表面，將未接枝的 SANPAH-GRGD 沖洗下來，將 SANPAH-GRGD 溶液稀釋後來分析。

經 HPLC 量測其 SANPAH-GRGD 之吸收峰在 3.5 分鐘時出現 (圖 3-2 所示)，經軟體換算後可分析出 SANPAH-GRGD 之接枝率為 67%，SANPAH-GRGD 起始的接枝濃度為 0.025M，PU-PEG 材料接枝的面積為 40 cm²，所以，PU-PEG-GRGD 其接枝密度為 4.2 × 10⁻⁸ mole/cm²。

(二) 細胞在 PU 材料上生長情形

1. 細胞生長情形

藉由 Propidium iodide (PI) 螢光染料只與細胞中的細胞核反應，可觀察內皮細胞在材料表面生長的情形。當內皮細胞放置於材料表面貼附生長 24 小時，Polystyrene (PS)、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG_{mix}、PU-PEG₂₀₀₀-GRGD 及 PU-PEG_{mix}-GRGD 表面上皆有內皮細胞黏著貼附在材料表面。

圖 3-3 為細胞在材料上 24 小時之生長情形。由圖可以看出，PU-PEG_{mix} 材料表面內皮細胞生長貼附密度比 PU-PEG₂₀₀₀ 高 35%。由此可以看出，PU 材料經不同分子量混合接枝之 PU-PEG_{mix} 與 PU-PEG₂₀₀₀ 相比較，內皮細胞較易在粗糙度大的材料表面上貼附生長。

未接枝上 GRGD peptides 的材料 (PU-PEG) 與接枝上 GRGD peptides 後材料 (PU-PEG-GRGD) 來比較其細胞生長情形，由圖 3-3 可知，PU-PEG-GRGD 的細胞貼附密度比 PU-PEG 高 40%。

所以，粗糙較大的材料表面或含有 RGD peptides 物質的材料，細胞在這些材料上具有較佳的貼附生長情形。

2. 細胞活性測試-MTT Test

MTT 量測為一種細胞活性測定法，主要是粒腺體中的琥珀酸去氫作用而將 MTT 由黃色轉變呈藍紫色液體。此反應只在活細胞中進行，不會與死細胞反應，所以可以測定細胞的活性 [9]。當內皮細胞在材料表面貼附、增生數量愈多時，MTT 與細胞作用的生成物之顏色愈深，即 UV 量測之吸收值會愈高。

PS 培養盤、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG_{mix}、PU-PEG₂₀₀₀-GRGD 及 PU-PEG_{mix}-GRGD 等材料，內皮細胞於材料表面經過 24 小時培養之後，量測內皮細胞貼附於材料表面的細胞之活性 (表 3-3)。由表 3-3 可知，內皮細胞於 PS 培養盤、PU-PEG₂₀₀₀、PU-PEG_{mix}、PU-PEG₂₀₀₀-GRGD 及 PU-PEG_{mix}-GRGD 等材料上的活性，經由 MTT 試劑與細胞反應，經由 UV 光量測其吸收值 (OD=OD_{570nm}-OD_{630nm}) 分別為 0.048、0.021、0.028、0.030、0.033，內皮細胞生長速率以 PS 培養盤為 100%，則內皮細胞於各種材料上之生長速率其分別為 44%、58%、63%、69%。

由此可看出，PU-PEG_{mix} 材料貼附生長之細胞活性比 PU-PEG₂₀₀₀ 高 25%，內皮細胞於粗糙之材料表面上生長情形較佳。另外，對於 PU-PEG 材料表面接枝上 GRGD peptides 部分，PU-PEG_{mix}-GRGD 材料貼附生長之細胞活性比 PU-PEG₂₀₀₀-GRGD 高 16%，PU-PEG_{mix}-GRGD 的生長速率亦較佳於 PU-PEG₂₀₀₀-GRGD；所以，對於較粗糙之表面較易內皮細胞之貼附更是一項有力的證明。未接枝上 GRGD peptides 的材料 (PU-PEG) 與接枝上 GRGD peptides 後材料 (PU-PEG-GRGD) 來比較其細胞生長情形，由表 3-3 可知，PU-PEG-GRGD 的生長速率亦較佳於 PU-PEG。由 MTT 量測所的值之數值與圖 3-3。

四、參考文獻

- [1] M. Herring, A. Gardner, and J.A. Glover, A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium., *Surgery*, 84, 498-504, 1978.
- [2] N.K. Nichols, D. Gospodarwicz, T.R. Kessler and D.B. Oslen, Increased adherence of vascular endothelial cells to Biomer precoated with extracellular matrix., *Trans. Am. Sec. Artif. Intern. Organs*, 27, 208-211, 1981.
- [3] G.V. Kulkarni, B. Chen, J.P. Malone, A.S. Narayanan, and A. George, Promotion of selective cell attachment by the RGD sequence in dentine matrix protein 1., *Archives of Oral Biology*, 45, 475-484,

- 2000.
- [4] K. Bhadriraju, and L.K. Hansen, Hepatocyte adhesion, growth and differentiated function on RGD-containing proteins., *Biomaterials*, 21, 267-272, 2000.
- [5] A. Tachibana, Y. Furuta, H. Takeshima, T. Tanabe, and K. Yamauchi, Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation., *Journal of Biotechnology*, 93, 165-170, 2002.
- [6] S. Woerly, E. Pinet, L. de Robertis, D.V. Diep, and M. Bousmina, Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel™), *Biomaterials*, 22, 1095-1111, 2001.
- [7] Y.S. Lin, S.S. Wang, T.W. Chung, Y.H. Wang, S.H. Chiou, J.J. Hsu, N.K. Chou, K.H. Hsieh, and S.H. Chu, Growth of endothelia cells on different concentrations of Gly-Arg-Gly-Asp photochemically grafted in polyethylene glycol modified polyurethane., *Artificial Organs*, 25(8), 617-621, 2001.
- [8] N.P. Desai, and J. Hubbell, Biological responses to polyethylene oxide modified polyethylene terephthalate surfaces., *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, 829-843, 1991.
- [9] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *Journal of immunological methods*, 65, 55-63, 1983.

五、附圖

表 3-1 靜態接觸角量測

(n=8, Mean±SD)

Materials	PU	PU-PEG ₃₀₀₀	PU-PEG ₂₀₀₀	PU-PEG ₁₁₀₀	PU-PEG _{mix}
Angle(°)	78±1.93	32.38±1.92	23.63±1.69	20.63±2.0	26.5±4.72

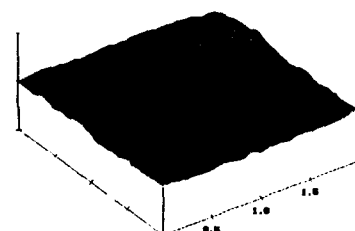
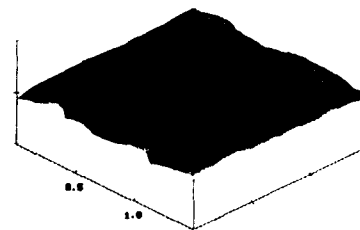
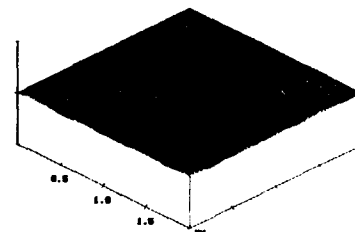
表 3-2 材料表面之平均粗糙度

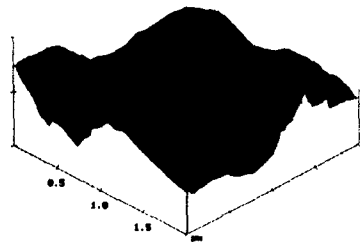
(n=3, mean±S.D.)

Materials	PU	PU-PEG ₂₀₀₀	PU-PEG _{mix}	PU-PEG ₂₀₀₀ -GRGD	PU-PEG _{mix} -GRGD
Roughness (Ra, nm)	1.53±0.2	20.10±7.87	56.80±35.09	18.63±5.30	37.13±13.28

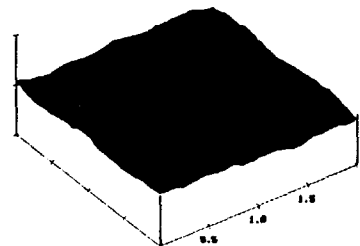
圖 3-1 材料表面之原子力顯微鏡表面之型態—PU 材料；

scan size 2 μm · data scan 500 nm





(D) PU-PEG_{mix}



(E) PU-PEG_{mix}-GRGD

圖 3-2 HPLC 分析 SANPAH-GRGD 溶液稀釋 200 倍的吸收圖

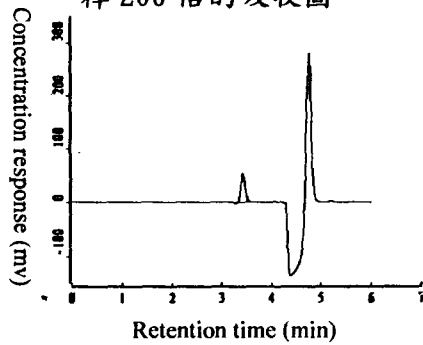


圖 3-12 內皮細胞於 PU-PEG 材料生長 24 小時之情形，其表面型態(40x)



PS



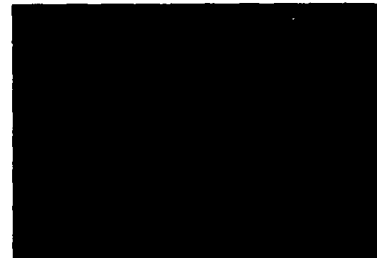
(B) PU-PEG₂₀₀₀



(C) PU-PEG_{mix}



(D) PU-PEG₂₀₀₀-GRGD



(E) PU-PEG_{mix}-GRGD

表 3-3 細胞於 PU-PEG 各種材料上之生長速率 $OD = OD_{570} - OD_{630}$
($n=6$, Mean \pm S. D. ; 細胞生長速率以 PS 為 100%)

Materials	PS	PU-PEG ₂₀₀₀	PU-PEG _{mix}	PU-PEG ₂₀₀₀ -GRGD	PU-PEG _{mix} -GRGD
OD	0.048 ± 0.003	0.021 ± 0.002	0.028 ± 0.003	0.030 ± 0.004	0.033 ± 0.002
Cell growth rate	100 %	44 %	58 %	63 %	69 %