复合材料学报
Acta Materiae Compositae Sinica

聚醚胺ED900-单宁酸构建表面微结构化复合涂层及其细胞相容性的研究

韩健美 夏雨祥 程昉 何炜

Construction of microstructured composite coatings based on polyetheramine ED900-tannic acid and cytocompatibility study

HAN Jianmei, XIA Yuxiang, CHENG Fang, HE Wei

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20220128.001

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

羟基磷灰石的表面改性及其对聚乳酸基多孔支架性能的影响

Surface modification of hydroxyapatite and its influences on the properties of poly(lactic acid)-based porous scaffolds

复合材料学报. 2018, 35(5): 1087-1094 https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20170612.001

BN表面改性对BN/环氧树脂复合材料导热性能的影响

Effects of BN surface modification on thermal conductivity of BN/epoxy composites

复合材料学报. 2018, 35(2): 275-281 https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20170509.002

表面改性对纳米蒙脱土/聚酰胺6-66复合材料性能的影响

Effects of surface modification on properties of nano montmorillonite/polyamide 6-66 composites

复合材料学报. 2020, 37(1): 57-66 https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20190412.005

沥青基短切碳纤维表面改性及与纳米填料并用对天然橡胶力学性能的影响

Influence of PCF surface modification and blending with nanofillers on mechanical properties of Natural Rubber

复合材料学报. 2017, 34(3): 684-690 https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20160523.028

单向竹原纤维表面改性对其增强不饱和聚酯树脂复合材料性能的影响

Effect of surface modification of unidirectional bamboo fiber on the properties of its reinforced unsaturated polyester resin composites

复合材料学报. 2017, 34(2): 314-321 https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20160523.003

纳米SiO_2-NaOH-有机硅烷偶联剂表面改性对苎麻纤维/乙烯基酯树脂复合材料性能的影响

Effects of nano SiO_2-NaOH-silane coupling agent surface treatment on behavior of ramie fiber/vinyl ester resin composite

复合材料学报. 2019, 36(11): 2579-2586 https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20190430.001

复合材料学报
Acta Materiae Compositae Sinica

第 40 卷 第 1 期 1 月 2023 年
Vol. 40 No. 1 Jan 2023

DOI：10.13801/j.cnki.fhclxb.20220128.001

聚醚胺 ED900-单宁酸构建表面微结构化复合涂层及其细胞相容性的研究

分享本文

韩健美[1,2], 夏雨祥[1,2], 程昉[1,2], 何炜*[1,2]

(1. 大连理工大学 精细化工国家重点实验室，大连 116023；2. 大连理工大学 化工学院，大连 116023)

摘 要：为改善医用材料的生物相容性并赋予材料表面一定的生物学功能，本文以单宁酸 (TA) 和聚醚胺 ED900 为组装单元，通过层层自组装的方法制备了复合涂层。采用纳米粒度仪、Zeta 电位分析仪、紫外分光光度计、红外光谱、石英晶体微天平 (QCM-D) 、扫描电子显微镜等仪器对 ED900-TA 复合溶液行为及复合涂层的理化性质进行表征。通过细胞实验考察了涂层对细胞行为的影响。利用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 法和总抗氧化能力检测试剂盒 (FRAP) 法评价了涂层的抗氧化性。最后，分别通过琼脂糖插入实验和细胞培养液浸泡研究涂层的稳定性。结果表明：ED900-TA 涂层具有良好的细胞相容性和抗氧化性，表面的微结构呈现调控亲/憎细胞的能力。此外，涂层在模拟植入的过程未出现脱落。并在细胞培养条件下，涂层形貌在 21 天的评价周期内无显著变化。该复合涂层为生物材料表面多功能化提供了新思路。

关键词：聚醚胺；单宁酸；层层自组装技术；表面改性；细胞-材料相互作用；抗氧化

中图分类号: TB332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3851(2023)01-0396-11

Construction of microstructured composite coatings based on polyetheramine ED900-tannic acid and cytocompatibility study

HAN Jianmei[1,2], XIA Yuxiang[1,2], CHENG Fang[1,2], HE Wei*[1,2]

(1. State Key Laboratory of Fine Chemicals, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China;
2. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

Abstract: To improve biocompatibility of biomaterials and endow the surface with biological functions, a new type of composite coatings was developed using the natural biomacromolecule tannic acid (TA) and polyetheramine ED900 through a layer-by-layer self-assembly method. The behavior of ED900-TA complexation in water and the physical/chemical properties of the ED900-TA coatings were characterized using nanoparticle sizer, Zeta potential analyzer, UV-vis spectrophotometer, FTIR spectrometer, quartz crystal microbalance (QCM-D), and SEM. The effect of coatings on cell behavior was investigated in vitro. The anti-oxidative property was measured by 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) and total antioxidant capacity assay kit (FRAP) assays. Finally, coating stability was evaluated by agarose insertion and incubation in cell culture medium. The results show the coatings being biocompatible and anti-oxidative. Depending on the surface microstructures, the coatings can be cytophilic or cytophobic. Besides, the coatings can withstand the shear force of insertion and the morphology is maintained up to 21 days in culture medium. This composite coating provides a new option for surface functionalization of biomaterials.

Keywords: polyetheramine; tannic acid; layer-by-layer assembly technology; surface modification; cell-material interaction; antioxidant

收稿日期：2021-12-01; **修回日期**：2022-01-09 ; **录用日期**：2022-01-15 ; **网络首发时间**：2022-01-29 07:10:55
网络首发地址：https://doi.org/10.13801/j.cnki.fhclxb.20220128.001
基金项目：国家自然科学基金 (31971255)
National Natural Science Foundation of China (31971255)
通信作者：何炜, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物医用材料 E-mail: wlhe@dlut.edu.cn
引用格式：韩健美, 夏雨祥, 程昉, 等. 聚醚胺 ED900-单宁酸构建表面微结构化复合涂层及其细胞相容性的研究 [J]. 复合材料学报, 2023, 40(1): 396-406.
HAN Jianmei, XIA Yuxiang, CHENG Fang, et al. Construction of microstructured composite coatings based on polyetheramine ED900-tannic acid and cytocompatibility study[J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2023, 40(1): 396-406(in Chinese).

生物医用材料是与人类生命健康息息相关的一类功能性材料，需具有优良的生物相容性和特定的生物学功能。当生物材料植入生物体时，其表面首先与宿主细胞、组织相接触，因此生物材料表面性质至关重要。目前，研究者通过对材料表面进行改性赋予其新的性能，已成为生物材料研究的重点。其中表面修饰技术是表面改性的核心所在。近年来，将多种功能性的物质结合到表面制备生物医用复合涂层，以改善表面生物相容性及赋予涂层生物学功能已成为一种趋势[1-4]。如 Wang 等[3] 通过海藻酸钠、羧甲基壳聚糖、纳米氧化锌共混制备的复合膜具有良好的生物相容性、可降解性，并表现出优异的抗菌性能。朱继翔等[4] 在 β-$Ca_3(PO_4)_2$ 表面沉积的淫羊藿苷-丝蛋白复合涂层不仅表现出优良的生物相容性，还提升了材料的成骨特性。除上述方法外，表面微结构修饰也能够影响细胞与生物材料的相互作用。目前，研究者通过电子束光刻、化学刻蚀、静电纺丝等精密加工技术制备了突起、纤维丝状等多种形貌表面。并通过表面的几何图案及图案尺寸大小对细胞行为进行调控。然而这些微结构加工技术通常需要高端的实验设备，限制了其应用。

本文选用单宁酸 (TA) 和聚醚胺 ED900 通过层层自组装 (LBL) 方法制备复合涂层。该涂层制备简单，兼具 TA 和 ED900 的特性，并进一步整合表面微结构实现亲/憎细胞的调控。其中 TA 是一种天然多酚类化合物[5]，具有抗氧化性。ED900 为伯胺封端的聚 (环氧丙烷)-聚 (环氧乙烷)-聚 (环氧丙烷) (PPO-PEO-PPO) 三嵌段共聚物。其结构中的 PPO-PEO-PPO 嵌段赋予 ED900 良好的生物相容性，氨基基团则在生理 pH 条件下带正电性而促进细胞黏附。本文将 ED900 和 TA 组装到表面，研究 ED900-TA 涂层的理化性质。考察涂层的细胞相容性及微结构尺寸对细胞行为的影响。借助小鼠成纤维细胞 (L929 细胞) 来评估涂层的生物相容性。PC12 细胞为仿神经细胞株，其贴壁性较差，通常需要在培养基底表面预涂覆带正电的物质 (如聚赖氨酸、聚乙烯亚胺) 来促进黏附[6-7]。因此，选用 PC12 细胞评估涂层对神经细胞的影响，并初步探究 ED900-TA 涂层应用于神经界面的潜力。此外，还考察了 ED900-TA 涂层的抗氧化性和稳定性。

1 实验材料及方法

1.1 原材料

单宁酸，美国 Alfa Aesar 公司，结构式见图 1(a)；聚醚胺 ED900，美国 Huntsman Chemical 公司，结构式见图 1(b)；尿素 (Urea)、十二烷基硫酸钠 (SDS) (科美欧化学试剂有限公司)；硝酸银、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) (美国 Sigma-Aldrich 公司)；福林酚溶液、4% 多聚甲醛、Triton X-100 (索莱宝科技有限公司)；活/死染色检测试剂盒、Hoechst 33342 试剂盒、总抗氧化能力检测试剂盒 (FRAP) (碧云天公司)；Phalloidin-FITC (李记生物科技有限公司)；实验用水为超纯水。

1.2 ED900-TA 混合溶液和涂层的制备

ED900-TA 混合溶液：配制 0.5~2.0 mg/mL 系列浓度的 ED900 水溶液和 TA 水溶液。用 1 mol/L 盐酸和氢氧化钠调节溶液 pH。利用纳米粒度仪 (美国 Brookhaven 公司)、Zeta 电位分析仪 (美国 Brookhaven 公司) 和紫外分光光度计 (日本 Hitachi，U-3900) 分别对混合物的粒径、Zeta 电位和浊度进行测定。向 ED900-TA 混合溶液中添加 Urea 或 SDS，分析 ED900 与 TA 之间的相互作用。

ED900-TA 涂层：采用 LBL 方法将 ED900-TA 组装在硅基表面。基底使用前用食人鱼溶液清洗，丰富其表面羟基。将清洗后的硅片交替浸泡在 ED900 溶液 (2 mg/mL，pH 7) 和 TA 溶液 (2 mg/mL，pH 5) 10 min，其间用超纯水进行冲洗。重复以上循环 n 次得到 $(ED900\text{-}TA)_n$ 涂层。紫外分光光度计和石英晶体微天平 (QCM-D) (瑞士 Biolin，Q-Sense E1) 研究涂层的生长过程。用正置光学显微镜 (日本 Olympus，BX53) 和扫描电子显微镜 (SEM) (美国 FEI，NanoSEM 450) 观察涂层形貌，通过 Image J 软件计算图片中圆形微域的尺寸。用接触角测量仪 (中国上海中城，JC2000D1) 表征涂层亲疏水性。采用福林酚法分析涂层的 TA 含量。

1.3 体外细胞培养

采用 L929 和 PC12 细胞探究不同组装循环数的 ED900-TA 涂层对细胞黏附和增殖的影响。将细胞以 10 000 细胞/cm^2 的密度接种到紫外灭菌处理的样品表面。ED900-TA 涂层生物相容性检测：用活/死检测试剂对培养 24 h 时样品表面黏附的 L929 细胞进行染色，在荧光显微镜 (BX53，日本 Olympus) 下观察各样品表面的细胞状态。SEM 表

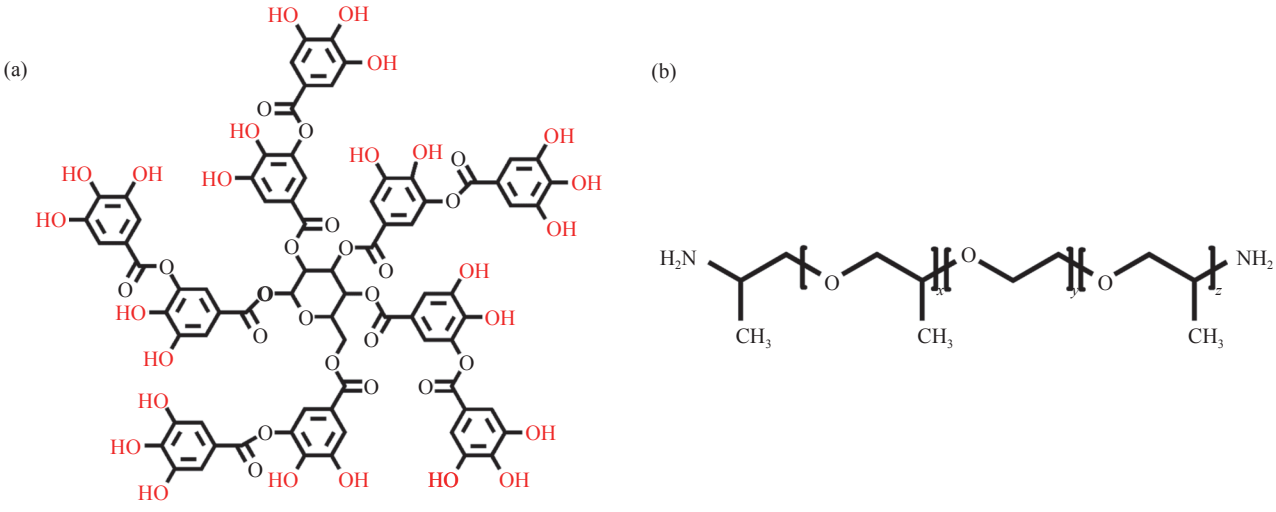


图 1　单宁酸 (TA) (a) 和聚醚胺 ED900 (b) (x+z：~6；y：~12.5) 化学结构式

Fig. 1　Chemical structures of tannic acid (TA) (a) and polyetheramine ED900 (b) (x+z: ~6; y: ~12.5)

征细胞形态：将培养 24 h的样品用 2.5% 戊二醛溶液固定，随后梯度脱水，风干，喷金后用 SEM 表征。荧光染色实验：将培养 24 h、48 h 和 72 h 的样品用 4% 多聚甲醛固定，经 0.1% Triton X-100 透化细胞膜后，依次用 Phalloidin-FITC 和 Hoechst 33342 对细胞进行骨架肌动蛋白丝和细胞核的染色。采集各样品的荧光图像，并量化细胞黏附数量。

1.4　抗氧化实验

采用 DPPH 法和 FRAP 法评价涂层的抗氧化性能。将硅片及不同组装循环数的 ED900-TA 涂层置于 DPPH 或 FRAP 工作液中 10 min 后，分别收集各组样品中的工作液，采用酶标仪 (美国 Thermo Fisher，Varisokan LUX) 测定各组样品在特征吸收峰处 (DPPH：515 nm；FRAP：593 nm) 的吸光度。FRAP 法中各组样品的总抗氧化活性通过 $FeSO_4$ 标准曲线计算。

1.5　涂层稳定性实验

将不同组装循环数的 ED900-TA 涂层插入模拟脑组织的 0.2% 琼脂糖凝胶中，通过肉眼及光学显微镜观察涂层插入后形貌变化，评估材料与基底结合的稳定性。将 $(ED900\text{-}TA)_{20}$ 涂层在 37℃ 的细胞培养液中浸泡至 21 天，通过光学显微镜观察涂层形貌及福林酚法检测涂层 TA 含量，评估涂层在细胞培养条件下的稳定性。

2　结果与讨论

2.1　ED900 与 TA 水溶液的复合行为

首先研究 ED900 与 TA 在水中的复合作用，为后续两者在表面的组装提供参数。通过表征 ED900-TA 复合物的粒径、Zeta 电位和浊度，探究 pH 值、时间和浓度对复合的影响。如图 2(a) 所示，随着溶液 pH 从 3 上升到 9，复合物 Zeta 电位从+43 mV 降至 0 mV 进而变为–58 mV，粒径则先增大后减小。复合物粒径的变化趋势与 Zeta 电位变化相关。随着复合物的表面正电荷降低，静电斥力逐渐减弱，复合物易发生聚集，导致粒径增大。碱性条件下，复合物由于 TA 的去质子化 (pK_a≈8.5) 而呈电负性，因此与 pH 7 相比，复合物粒子间静电斥力增强，导致粒径减小。如图 2(b) 所示，混合物浊度随 pH 值的增加而增加，表明在碱性条件下 ED900-TA 复合物的溶解度降低。这种 pH 对复合物的效应在 TA 和溶菌酶的相互作用体系中也有报道[8]。图 2(c) 和图 2(d) 为时间对 ED900-TA 复合物的影响。由图可见，24 h 内复合物的粒径、Zeta 电位无明显变化，浊度略有降低，复合物体系整体稳定。随后考察了溶液浓度同比变化对 ED900-TA 复合的影响。如图 2(e) 和图 2(f) 所示，随着溶液初始浓度从 0.5 mg/mL 增至 2 mg/mL，复合物的尺寸、Zeta 电位和浊度都随之增加，表明组分浓度的提高使单位体积内分子数目增加，有利于 ED900-TA 的复合。

Urea 是一种被广泛使用的氢键抑制剂[9]。SDS 可破坏有机物中的疏水相互作用，是一种理想的增溶剂[10]。因此，向 ED900-TA 复合物体系中分别添加 200 mmol/L Urea 和 10 mmol/L SDS，进而研究 ED900 与 TA 之间的复合机制。图 3(a) 中含 Urea 的 ED900-TA 混合溶液整体维持浑浊状态，而经 SDS 处理的样品浊度随时间的推移明显

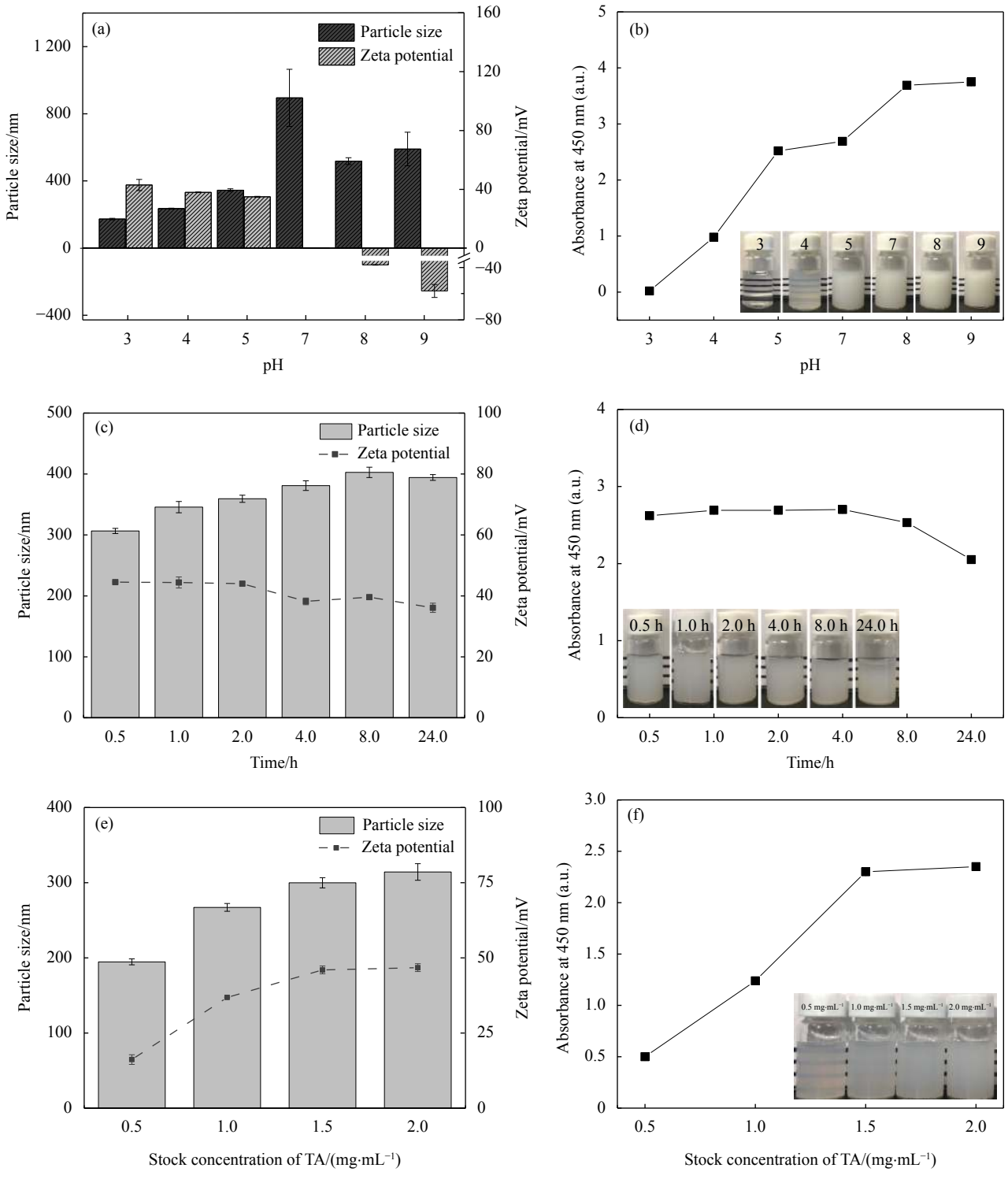


图 2 ED900-TA 水溶液复合 (2 mg/mL ED900 与 2 mg/mL TA 等体积混合) 对混合物粒径、Zeta 电位及浊度的影响：((a)、(b)) pH 值；((c)、(d)) 时间 (ED900 (pH 7)、TA (pH 5))；((e)、(f)) TA 溶液浓度

Fig. 2 Effect of ED900-TA solution on particle size, Zeta potential and turbidity of mixtures (Equal volume of 2 mg/mL ED900 with 2 mg/mL TA): ((a), (b)) pH; ((c), (d)) Time (ED900 (pH 7) and TA (pH 5)); ((e), (f)) TA concentration

下降，并在 24 h 时完全变透明，表明复合物中 ED900 与 TA 之间存在显著的疏水作用。从图 2(a) 和图 2(b) 的 pH 值研究结果推测，ED900 与 TA 之间可能存在离子相互作用。相关文献 [11-12] 表明：离子化 TA (—O^-) 比质子化 TA(—OH) 的紫外吸收波长更长。因此，对 0.06 mg/mL TA 溶液 (pH 5)、2 mg/mL

ED900 溶液 (pH 7) 及 2 mg/mL ED900(pH 7) 与 2 mg/mL TA(pH 5) 等体积混合物的紫外特征吸收峰进行表征。如图 3(b) 所示，复合物的特征吸收峰在 213 nm 和 282 nm 处。与 TA 自身的特征吸收峰相比，复合物中 TA 的紫外特征吸收峰发生了红移，表明复合物中存在电离的 TA，使其能与 ED900(—NH_3^+) 形成离子作用。

2.2 ED900-TA 涂层的制备

基于上述 ED900 与 TA 水溶液复合行为的研究，选择 2 mg/mL ED900 (pH 7) 和 2 mg/mL TA (pH 5) 开展表面涂层的制备。鉴于硅基底表面富含羟基 (—O^-)，可与 ED900(—NH_3^+) 进行静电作用，因此将其作为组装的初始层。借助紫外监测 ED900-TA 的组装过程。图 4(a) 中，随着组装循环数的增加，TA 的两个特征吸收峰均增强并红移。表明 ED900-TA 涂层成功在表面组装，同时体现了组装过程中两组分之间的离子相互作用。由于 ED900 无紫外特征吸收峰，因此借助红外光谱表征其存在。如图 4(b) 所示，$(ED900\text{-}TA)_{30}$ 光谱中 2 916 cm^{-1} 处对应 ED900 分子结构中环氧丙烷 (PO) 重复单元所含侧甲基的 C—H 不对称伸缩振动吸收峰，表明涂层含有 ED900。此外，TA 自身的红外光谱显示，C=O 特征峰由于其与—OH 之间的氢键作用出现在 1 716 cm^{-1} 处。$(ED900\text{-}TA)_{30}$ 光谱中，TA 的 C=O 伸缩振动吸收峰蓝移至 1 723 cm^{-1} 处，再次表明涂层中 TA 的酚羟基发生

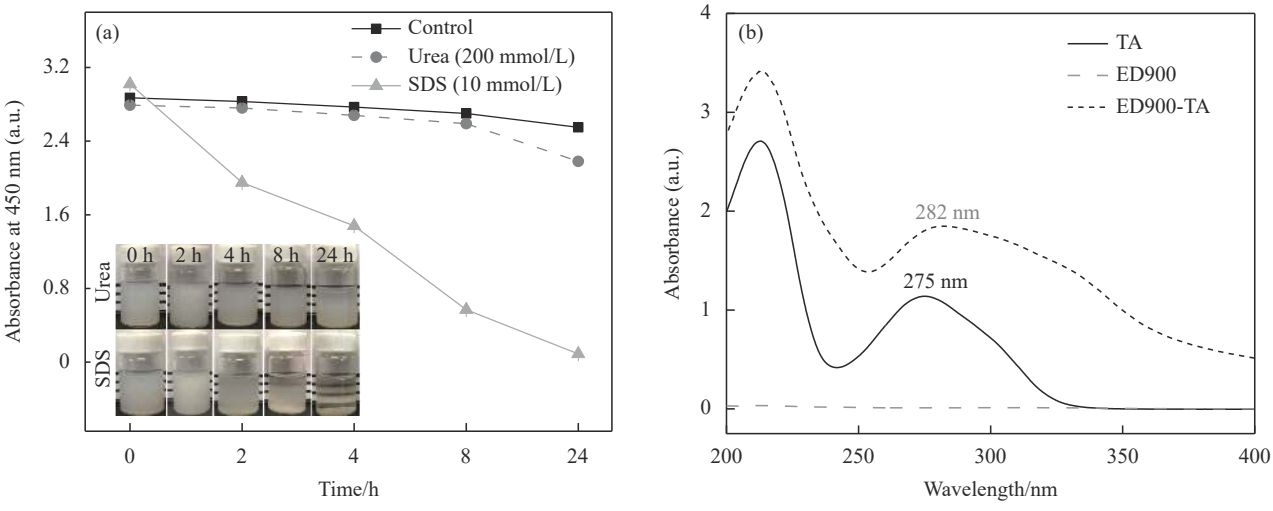


图 3 (a) 尿素或十二烷基硫酸钠 (SDS) 影响下 ED900-TA 混合物的宏观状态及浊度随时间的变化；(b) 各样品的紫外光谱

Fig. 3 (a) Macroscopic state and turbidity changes of ED900-TA mixture as a function of time under the influence of urea or sodium dodecyl sulfate (SDS); (b) UV-vis spectra of various samples

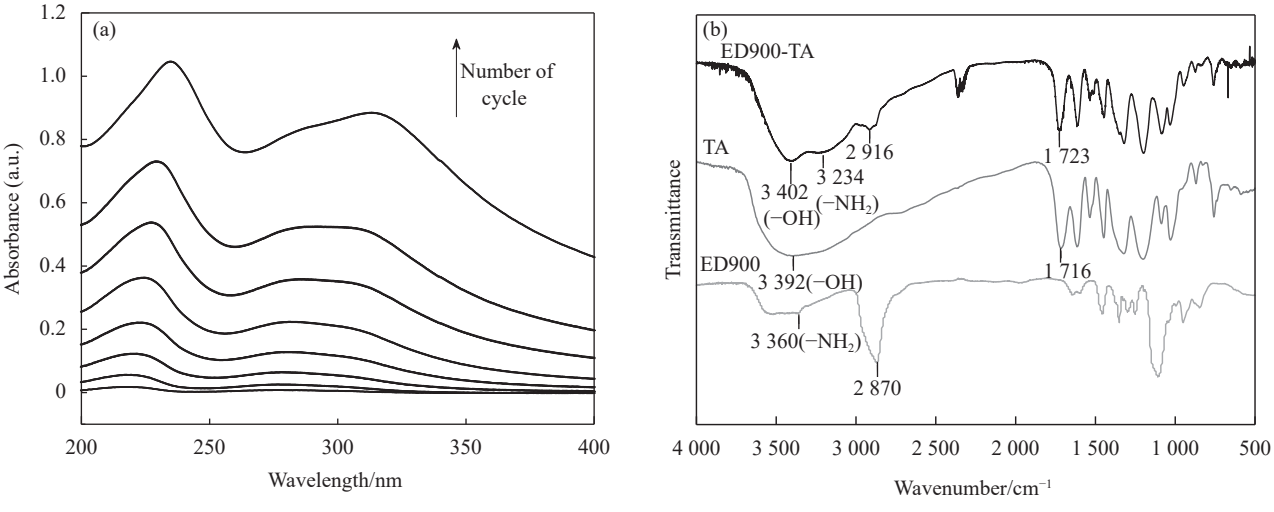


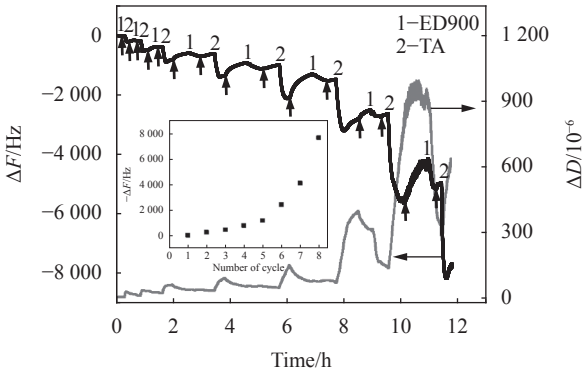
图 4 (a) 石英基底表面组装 ED900-TA 8 个循环过程的紫外光谱；(b) $(ED900\text{-}TA)_{30}$、TA 和 ED900 的红外光谱

Fig. 4 (a) UV-vis study of assembly process for eight cycles of ED900-TA on quartz substrate; (b) FTIR spectra of $(ED900\text{-}TA)_{30}$, TA and ED900

了去质子化。

通过 QCM-D 技术原位表征硅片表面 ED900-TA 的组装过程。在此实验中，频率的下降与吸附材料的质量呈正比，耗散则代表吸附材料的黏弹性，其值越大表明吸附的材料越柔软[13]。图 5 总结了 ED900-TA 组装 8 个循环过程中频率和耗散随时间的变化。可以看出，频率随时间逐渐降低，表明涂层构建成功。耗散的变化随组装的进行愈加显著，其中 $(ED900\text{-}TA)_8$ 对应的耗散峰值达到了 980×10^{-6}，表明该涂层呈软弹性。频率变化净值与循环数的关系体现了 ED900-TA 涂层生长模式为指数型。

选取组装层数梯度较大的 4、8、16 和 20 层进行 ED900-TA 涂层形貌的表征。如图 6(a) 所示，在水合条件下，涂层均呈离散的圆形微域，尺寸



ΔF—Frequency change; ΔD—Dissipation change

图 5 石英晶体微天平 (QCM-D) 研究 ED900-TA 组装过程中频率及耗散随时间的变化 (竖直箭头为冲洗步骤) (插图为净频率随循环周期的变化)

Fig. 5 Quartz crystal microbalance (QCM-D) study frequency and dissipation changes as a function of time during assembly of ED900-TA (Vertical arrows indicate rinsing steps) (Inset: Net change in frequency as a function of assembly cycles)

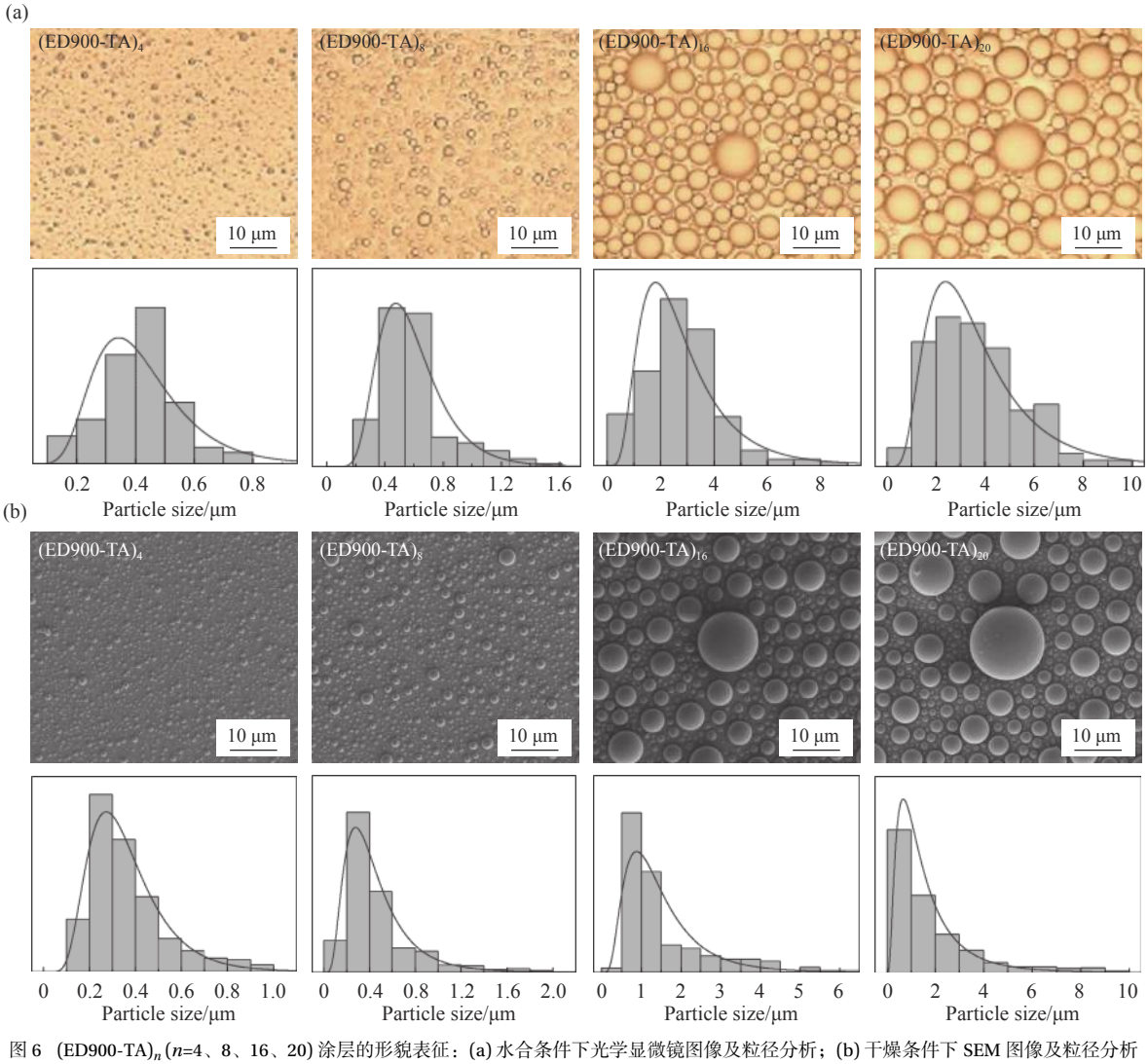


图 6 $(ED900\text{-}TA)_n$ (n=4、8、16、20) 涂层的形貌表征：(a) 水合条件下光学显微镜图像及粒径分析；(b) 干燥条件下 SEM 图像及粒径分析

Fig. 6 Surface morphologies of $(ED900\text{-}TA)_n$ (n=4, 8, 16, 20) coatings: (a) Optical microscope images and size analysis of hydrated samples; (b) SEM images and size analysis of dry samples

则随组装循环数的增加而增大。各涂层表面粒子大小不一，并随组装层数的增加，粒子尺寸分布越宽。其中低层数的涂层粒子尺寸主要在 400~600 nm，高层数则以 2~4 μm 为主。图 6(b) 为干燥的 ED900-TA 涂层形貌及尺寸分布。与湿态条件相比，涂层形貌未发生显著变化，但量化结果表明粒径减小，其中低层数集中在 200~400 nm，高层数则在 1~2 μm，说明涂层中粒子有一定的水合能力。虽然前期 TA 与非离子型聚醚 P188 的涂层研究展示了类似的湿态微观形貌[14]，但此特征在干态条件下不复存在[15]。本文中制备的 ED900-TA 涂层，凭借两者间的离子相互作用，显著的增强了其在干燥过程中的形貌稳定性，便于涂层保存。

除形貌外，涂层的润湿性也是表面的重要特性之一，关乎细胞与材料之间的相互作用[16]。图 7(a) 中 ED900-TA 涂层的水接触角明显小于硅片，说明涂层使基底表面更亲水。这得益于涂层中 ED900 组分的 PEO 亲水链段。TA 量化结果总结于图 7(b)。随着循环数从 4 增至 20，涂层中 TA 浓度从 0.4 μg/cm^2 增加到 31 μg/cm^2。

2.3 ED900-TA 涂层的体外细胞响应

选用 L929 细胞探究 ED900-TA 涂层的细胞相容性。如图 8 所示，硅片及各涂层表面黏附的细胞均为活细胞，表明涂层无显著毒性。随后研究了 L929 细胞在复合涂层上的黏附和增殖情况。如图 9 所示，在 24 h 时，与硅片相比，$(ED900\text{-}TA)_{4,8}$ 表面细胞形态较铺展 (图 9(a))，细胞数量明显增加 (图 9(b))。而在 $(ED900\text{-}TA)_{16,20}$ 表面，部分细胞呈圆形形态 (图 9(a))，细胞数量明显减少 (图 9(b))。涂层不仅影响细胞黏附，也影响了细胞的增殖。如图 9(c) 所示，$(ED900\text{-}TA)_{4,8}$ 表面促进了细胞的早期增殖，$(ED900\text{-}TA)_{16,20}$ 表面则有抑制效应。

PC12 细胞在 ED900-TA 涂层上的响应总结于图 10。在 24 h 时，与硅片相比，ED900-TA 涂层对 PC12 细胞的黏附具有良好的支持 (图 10(a))。随着培养时间的延长，涂层上的细胞数量逐渐增加，其中以 $(ED900\text{-}TA)_{4,8}$ 样品上的增加最为显著 (图 10(b)、图 10(c))。

总的来说，ED900-TA 涂层对 L929 和 PC12 细胞的影响可以归因于其表面的化学性质、亲疏水性和形貌特征。由于氨基的存在，ED900-TA 涂层表面带正电，促进带负电的细胞黏附，尤其是 PC12 细胞。并且，表面的亲疏水性也影响细胞行

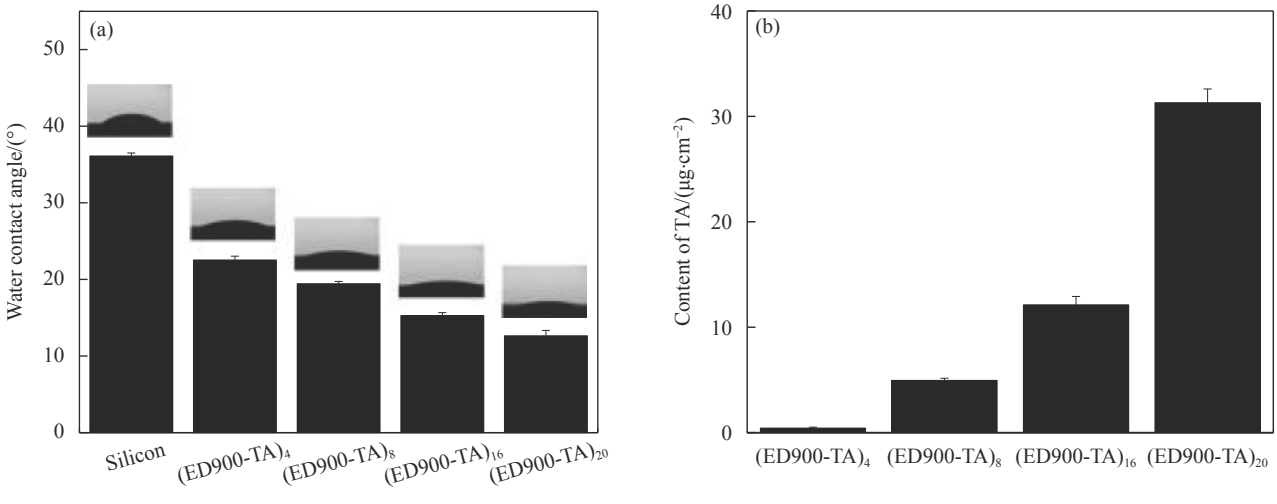


图 7 $(ED900\text{-}TA)_n$ (n=4、8、16、20) 样品的水接触角与水滴照片 (a) 及表面 TA 浓度量化 (b)

Fig. 7 (a) Water contact angles and water droplets photos of $(ED900\text{-}TA)_n$ (n=4, 8, 16, 20) samples; (b) Quantification of surface concentrations of TA

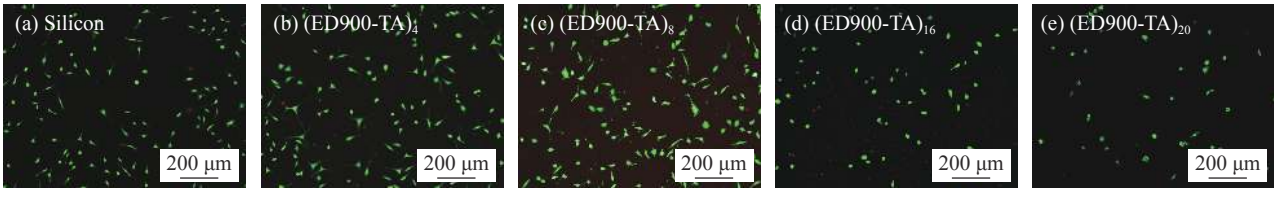


图 8 硅片及 ED900-TA 涂层上培养 24 h 的 L929 细胞的活/死染色结果 (活细胞：绿色；受损细胞：红色)

Fig. 8 Live/dead staining of L929 cells on silicon and ED900-TA coatings after 24 h culture (Viable cells: Green; Damaged cells: Red)

为[16-17]，适度亲水的表面有利于细胞的黏附、增殖和分化[17]。ED900-TA 涂层改善了硅片表面的亲水性，为细胞黏附提供有利条件。此外，表面形貌的尺寸大小对细胞的行为具有重要影响[18-20]。相关研究表明，细胞更易黏附在与细胞器尺寸相当的表面[21-22]。例如，纳米级尺度的表面与细胞器 (丝状伪足及神经突均为纳米级) 尺寸相一致，从而有利于细胞的黏附[21-22]。从图 6(a) 对涂层颗粒尺寸的统计可知，$(ED900\text{-}TA)_{4,\,8}$ 表面形貌为纳米级尺度主导，$(ED900\text{-}TA)_{16,\,20}$ 表面则为微米级。

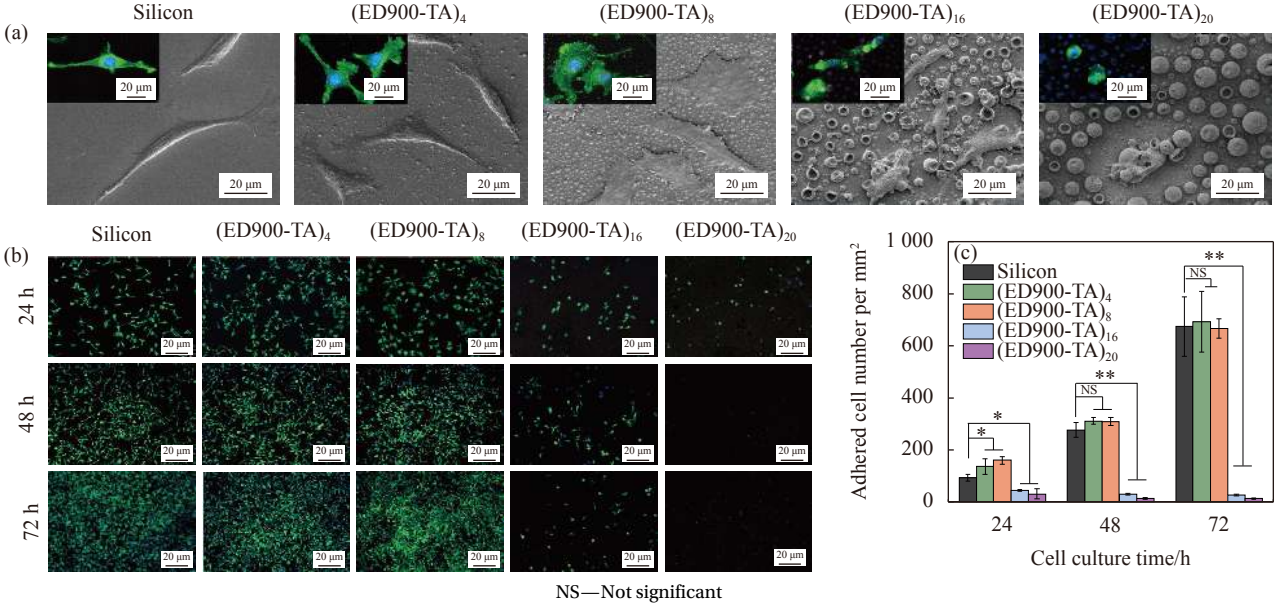


图 9 L929 细胞在 ED900-TA 涂层的响应：(a) 24 h 时细胞 SEM 图像和荧光图像；((b)、(c)) 各个样品表面细胞在不同培养时间点的荧光图像和细胞数量化统计图 (平均值±std (标准差)，样本数 n=4，*代表概率 $p<0.05$，**代表 $p<0.01$)

Fig. 9 L929 cell response of ED900-TA coating: (a) SEM and fluorescent images of cells cultured for 24 h; ((b), (c)) Fluorescent images and cell number quantification at various time points (Average ± std (Standard deviation), number of samples n = 4, * indicates probability $p<0.05$, ** indicates $p<0.01$)

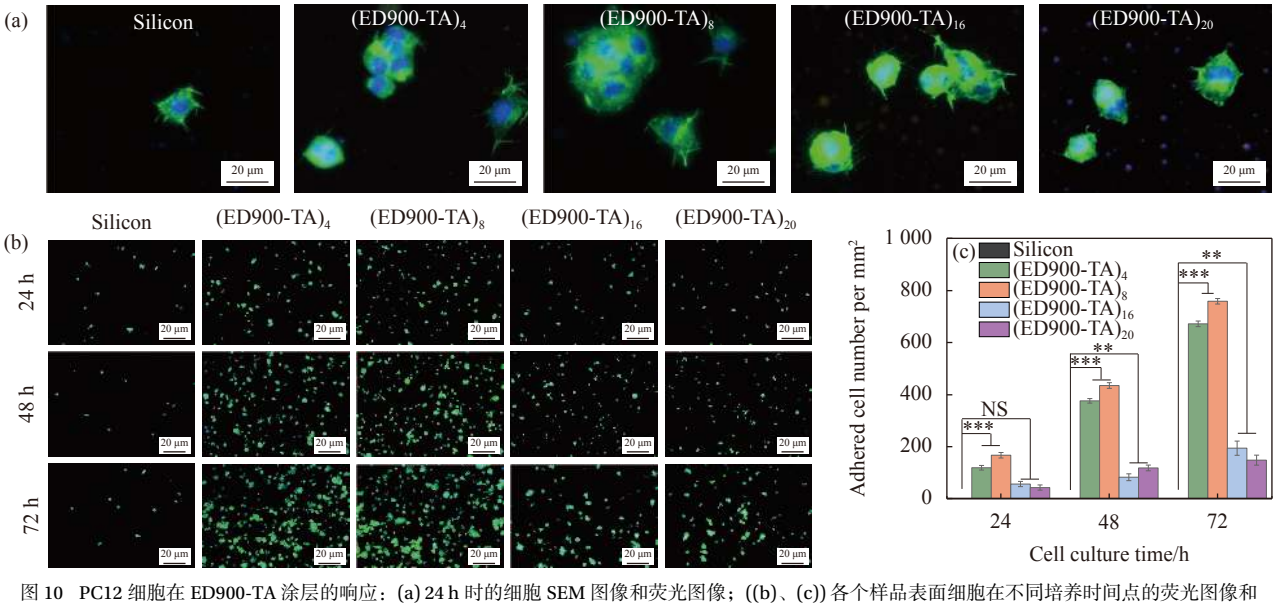


图 10 PC12 细胞在 ED900-TA 涂层的响应：(a) 24 h 时的细胞 SEM 图像和荧光图像；((b)、(c)) 各个样品表面细胞在不同培养时间点的荧光图像和细胞数量化统计图 (平均值 ± std，n=4，**代表 $p<0.01$，***代表 $p<0.001$)

Fig. 10 PC12 cell response of ED900-TA coating: (a) SEM images and fluorescent images of cells cultured for 24 h; ((b), (c)) Fluorescent images and cell number quantification at various time points (Average ± std, n=4, ** indicates $p<0.01$, *** indicates $p<0.001$)

因此，与高层数的 ED900-TA 涂层相比，低层数的涂层更有利于促进细胞的黏附。

2.4 ED900-TA 涂层的抗氧化性

ED900-TA 涂层的抗氧化性由 DPPH 自由基清除和 FRAP 法总抗氧化能力共同展示。图 11(a) 中 DPPH 在 515 nm 处的特征吸收峰强度随着 ED900-TA 组装循环数的增加而降低，表明涂层具有清除 DPPH 自由基能力。与 $(ED900\text{-}TA)_{4,8}$ 涂层相比，$(ED900\text{-}TA)_{16,20}$ 清除能力更强。图 11(b) 表明该复合涂层具有总抗氧化能力，并同样因层数的增多而显著提升。涂层的抗氧化源于其中的 TA 组分，并与 TA 含量呈正相关 (图 7(b))。

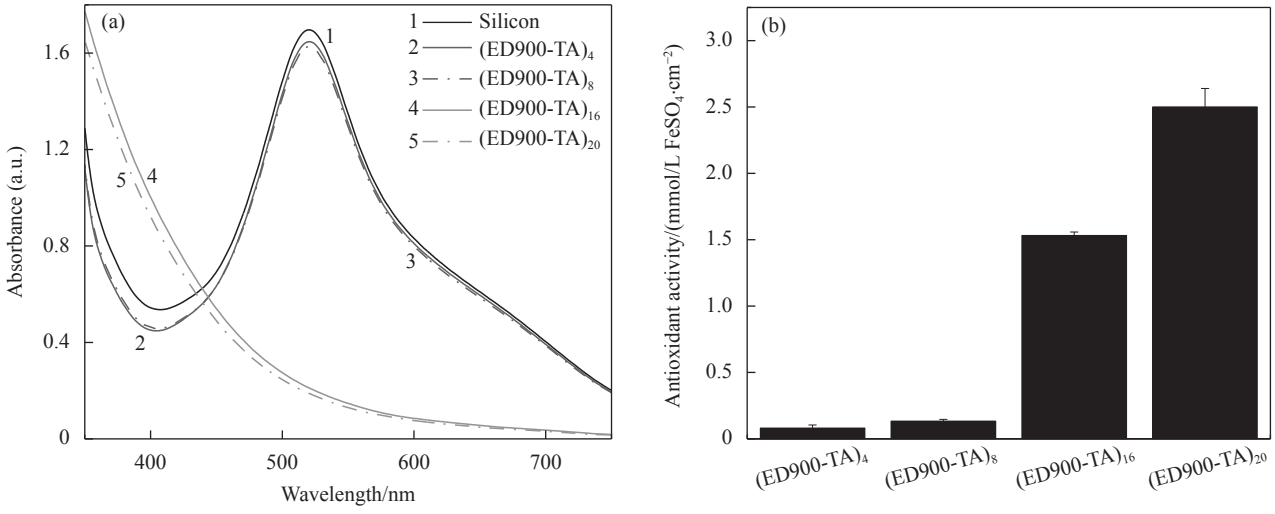


图 11 (a) 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH) 溶液分别与硅片和 ED900-TA 涂层作用后的紫外光谱；(b) ED900-TA 涂层总抗氧化性

Fig. 11 (a) UV-vis spectra of the 1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) solution after incubation with silicon substrates with or without various repeats of ED900-TA assembly; (b) Total antioxidant activity of silicon substrates with various modifications

2.5 ED900-TA 涂层的稳定性

ED900-TA 涂层通过非共价作用修饰在硅片表面，因此需对涂层的稳定性进行评价。图 12 为 ED900-TA 涂层插入琼脂糖凝胶实验。宏观及微观表征下，涂层与凝胶作用区域的表面形貌未发生明显变化，表明 ED900-TA 涂层与基底之间的结合力可以承受插入过程中的剪切力。此外，检测涂层在细胞培养条件下的稳定性。如图 13(a) 所示，随着浸泡时间的延长，$(ED900\text{-}TA)_{20}$ 涂层的形貌未有显著改变，说明涂层未解体脱落，但表面观察到棕褐色，可能与 TA 被氧化有关。图 13(b) 的量化结果显示样品表面 TA 的浓度随时间的延长而降低，间接说明涂层中的 TA 具有抗氧化性。

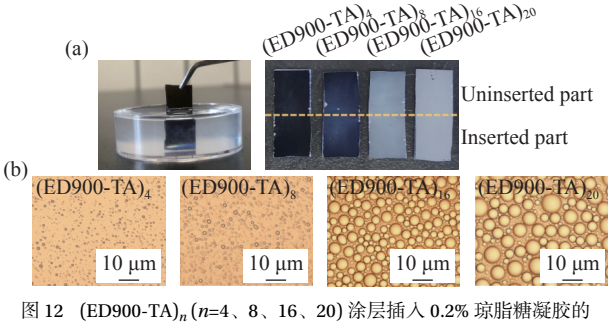


图 12 $(ED900\text{-}TA)_n$ (n=4、8、16、20) 涂层插入 0.2% 琼脂糖凝胶的稳定性：(a) 涂层插入琼脂糖凝胶的照片；(b) 涂层插入部分的光学图像

Fig. 12 Stability of the $(ED900\text{-}TA)_n$ (n=4, 8, 16, 20) coating inserted into 0.2% agarose gel: (a) Photographs; (b) Optical microscope images of inserted surfaces

3 结论

(1) 采用层层组装方法在硅表面制备了聚醚胺 ED900-单宁酸 (TA) 复合涂层。并表明涂层的成功构建主要归因于两组分间疏水和离子相互作用。

(2) ED900-TA 涂层形貌呈离散的圆形微域，其尺寸随组装循环数的增加而增大。干态下的涂层仍能保持与湿态相一致的形貌，有利于样品的存储。

(3) 体外细胞实验结果表明，与高组装循环数 ED900-TA 涂层相比，低组装循环数的涂层有利于促进细胞的黏附和增殖。表明涂层的带电性、亲疏水及表面微结构的尺寸共同影响细胞的行为。

(4) ED900-TA 涂层保留 TA 的抗氧化性能，为涂层进一步提供了生物医学功能。

(5) 涂层与基底结合较稳定。并在细胞培养条

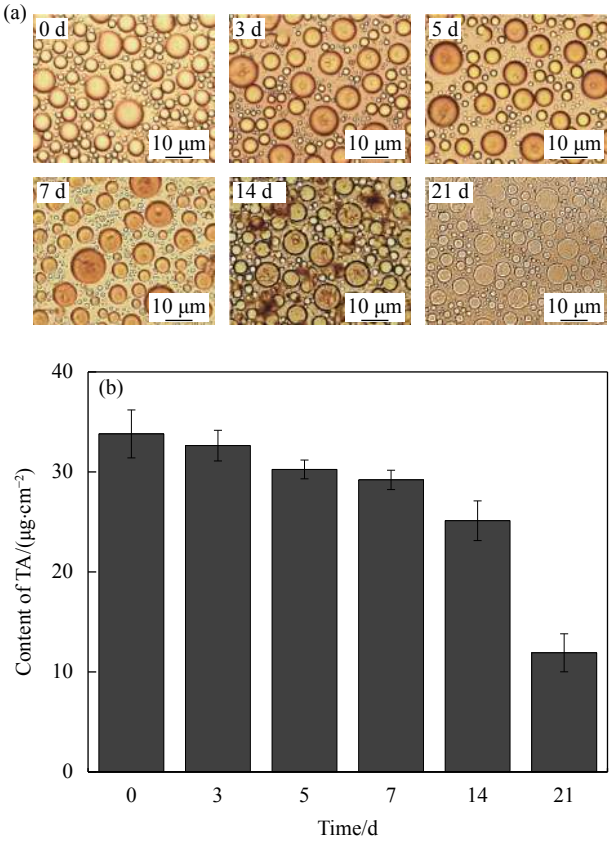


图 13 $(ED900\text{-}TA)_{20}$ 在 37℃ 细胞完全培养基中浸泡不同时间的稳定性：(a) 光学图像；(b) 表面 TA 浓度量化

Fig. 13 Stability of $(ED900\text{-}TA)_{20}$ immersed in complete culture medium at 37°C for different time: (a) Optical microscope images; (b) Quantification of the surface concentrations of TA

件下，涂层在 21 天内未解体脱落。

本文将 ED900 与 TA 两者的化学特性进行理性整合，运用灵活、简便、绿色的制备方法，在硅基底表面形成非连续性微结构的多功能复合涂层来协同调控细胞行为，为生物医用材料表面改性提供了新的策略。

参考文献：

[1] 赵鸣岐, 黄威嫔, 胡米, 等. 生物医用材料表面高分子基涂层的功能化构筑[J]. 材料导报, 2019, 33(1)：27-39.
ZHAO Mingqi, HUANG Weibin, HU Mi, et al. Functional-polymer-based coatings for biomedical materials' surface[J]. Materials Reports, 2019, 33(1): 27-39(in Chinese).

[2] 郭志君, 邹琴, 王立军, 等. 钛表面聚氨酯涂层的生物矿化及其细胞生物学响应[J]. 复合材料学报, 2014, 31(6)：1612-1617.
GUO Zhijun, ZOU Qin, WANG Lijun, et al. Biomineralization of polyurethane-coated titanium surface and cell behavior[J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2014, 31(6): 1612-1617(in Chinese).

[3] WANG H P, GONG X C, MIAO Y L, et al. Preparation and characterization of multilayer films composed of chitosan, sodium alginate and carboxymethyl chitosan-ZnO nanoparticles[J]. Food Chemistry, 2019, 283: 397-403.

[4] 朱继翔, 李树祎, 阳范文, 等. 负载淫羊藿苷的丝蛋白/β-磷酸三钙复合骨修复材料制备及性能[J]. 复合材料学报, 2017, 34(11)：2580-2585.
ZHU Jixiang, LI Shuyi, YANG Fanwen, et al. Preparation and properties of icariin loaded silk fibroin/β-tricalcium phosphate bone repair composite[J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2017, 34(11): 2580-2585(in Chinese).

[5] CHUNG K T, WONG T Y, WEI C I, et al. Tannins and human health: A review[J]. Critical Review in Food Science and Nutrition, 1998, 38(6): 421-464.

[6] WANG J, TIAN L L, CHEN N, et al. The cellular response of nerve cells on poly-L-lysine coated PLGA-MWCNTs aligned nanofibers under electrical stimulation[J]. Materials Science & Engineering C, 2018, 91(1): 715-726.

[7] VANCHA A R, GOVINDARAJU S, PARSA K V L, et al. Use of polyethyleneimine polymer in cell culture as attachment factor and lipofection enhancer[J]. BMC Biotechnology, 2004, 4(1): 23-34.

[8] SU J M, SUN Y, LI Z S, et al. Effect of tannic acid on lysozyme activity through intermolecular noncovalent binding[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2019, 1: 100004.

[9] SAGLE L B, ZHANG Y J, LITOSH V A, et al. Investigating the hydrogen-bonding model of urea denaturation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2009, 131(26): 9304-9310.

[10] DUARTE A, JONG E, KOEHORST R, et al. Conformational studies of peptides representing a segment of TM_7 from H^+-V_O-ATPase in SDS micelles[J]. Biophysics of Structure and Mechanism, 2010, 39(4): 639-646.

[11] EREL I, SUKHISHVILI S A. Hydrogen-bonded multilayers of a neutral polymer and a polyphenol[J]. Macromolecules, 2008, 41(11): 3962-3970.

[12] FEI L, KOZLOVSKAYA V, ZAVGORODNYA O, et al. Encapsulation of anticancer drug by hydrogen-bonded multilayers of tannic acid[J]. Soft Matter, 2014, 10(46): 9237-9247.

[13] HOOK F, RODAHL M, KASEMO B, et al. Structural changes in hemoglobin during adsorption to solid surfaces: Effects of pH, ionic strength, and ligand binding[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(21): 12271-12276.

[14] PENG L H, CHENG F, ZHENG Y N, et al. Multilayer assembly of tannic acid and an amphiphilic copolymer Po-

loxamer 188 on planar substrates toward multifunctional surfaces with discrete microdome-shaped features[J]. Langmuir, 2018, 34(36): 10748-10756.

[15] HAN J M, XIA Y X, CHENG F, et al. Mechanistic understanding of the discrete morphology formed by multi-cycle assembly of tannic acid with Poloxamer 188 on silicon using QMC-D[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2021, 628: 127302.

[16] LAMPIN M, WAROCQUIER-CLEROUT R, LEGRIS C, et al. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration[J]. Journal of Biomedical Materials Research, 1997, 36(1): 99-108.

[17] BACAKOVA L, FILOVA E, PARIZEK M, et al. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 739-767.

[18] ZHAO L Z, MEI S L, CHU P K, et al. The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions[J]. Biomaterials, 2010, 31(19): 5072-5082.

[19] NGUYEN A T, SATHE S R, YIM E K F. From nano to micro: Topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance[J]. Journal of Physics: Condensed Matter, 2016, 28(18): 183001.

[20] LI J G, ZHANG K, YANG P, et al. Human vascular endothelial cell morphology and functional cytokine secretion influenced by different size of HA micro-pattern on titanium substrate[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 110: 199-207.

[21] DALBY M J, RIEHLE M O, JOHNSTONE H, et al. Investigating the limits of filopodial sensing: A brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia[J]. Cell Biololgy International, 2004, 28(3): 229-236.

[22] KANG K, CHOI S E, JANG H S, et al. In vitro developmental acceleration of hippocampal neurons on nanostructures of self-assembled silica beads in filopodium-size ranges[J]. Angewandte Chemie, 2012, 124(12): 2839.