文章编号:1000-5404(2013)02-0123-04

论著

碳离子硅橡胶改性材料的表面性能检测及其细胞相容性评价

杨 芷[1],沈丽如[2],石小花[1],张一鸣[1],樊东力[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院整形美容外科[1];610207 四川,核工业西南物理研究院成都同创材料表面新技术工程中心[2])

[摘要] **目的** 采用碳离子对硅橡胶(silicone rubber,SR)进行表面注入改性,并对改性材料进行形貌观察、理化性能检测及其细胞相容性评价。**方法** 采用多功能离子注入机在不同碳离子注入量下对SR进行表面注入改性,得到碳-硅橡胶(Carbon ion implanted silicone rubber,C-SR),并采用扫描电镜(Scanning electron microscope,SEM)、傅立叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer,FTIR)、X射线衍射(X-ray diffraction,XRD)技术对材料的表面性能进行检测。采用细胞增殖实验、免疫荧光及Western blot技术观察人真皮成纤维细胞在改性后材料表面的生长情况。**结果** SEM发现各材料的表面形貌无明显差异,FTIR观察各材料的图谱无明显变化,XRD提示碳离子注入后形成了新的晶体结构,但差异并不显著。细胞增殖实验结果显示C-SR增殖能力较SR有明显提高($P<0.05$)。免疫荧光及Western blot提示碳离子注入后,材料的细胞黏附性增加。**结论** 采用碳离子注入制作的C-SR改性材料,与纯SR相比,表面性能和细胞相容性均得到了提高,有可能作为新的软组织填充材料。

[关键词] 硅橡胶;细胞相容性;离子注入;表面改性
[中图法分类号] R313;R318.08;R62 [文献标志码] A

Surface properties and cell compatibility of carbon ion implanted silicone rubber

Yang Zhi[1], Shen Liru[2], Shi Xiaohua[1], Zhang Yiming[1], Fan Dongli[1] ([1]Department of Plastic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2] Tongchuang Center of New Technology and Engineering for Material Surface, Southwestern Institute of Physics of Ministry of Nuclear Industry, Chengdu, Sichuan Province, 610207, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the morphology, physicochemical properties and cell compatibility of silicone rubber (SR) after carbon ion being injected to its surface. **Methods** Different volumes of carbon ion injection was injected into the surface of SR with the aid of a multi-function ion injection machine. The obtained SR was named as carbon-silicone rubber(C-SR). Scanning electron microscopy(SEM), Fourier transform infrared spectrometry(FTIR) and X-ray diffraction(XRD) were used to analyze the surface properties of modified materials. Cell proliferation, immunofluorescence staining and Western blot analysis were used to analyze the biocompatibility of modified materials after cocultured with human dermal fibroblasts. **Results** SEM and FTIR indicated that there was no any obvious difference in the morphology of the surface of modified C-SR. XRD showed that a new crystal structure was formed on the surface of the modified material after carbon-ion implantation, but the changes were not obvious compared with original materials. Cell proliferation experiment illustrated that human dermal fibroblasts grow better in C-SR than in SR ($P<0.05$). Immunofluorescence staining and Western blotting indicated that the expression of vinculin was enhanced in the C-SR materials, indicating that the carbon-ion implantation increased the cell adhesion. **Conclusion** Carbon-ion implantation to SR improves the surface properties and cell compatibility. C-SR might be used as a new filling material of soft tissue.

[**Key words**] silicone rubber; cell compatibility; ion implantation; surface modification

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071574) and the Foundation for Young Talents of Third Military Medical University (2009XQN36). Corresponding author: Fan Dongli, Tel: 86-23-68774647, E-mail: fdltmmu@sina.com

在整形外科临床应用中,硅橡胶(silicone rubber,SR)因具有良好的理化稳定性、生理惰性、易加工性和耐腐蚀性,目前仍是临床最为常用的填充材料[1]。然而,SR表面呈强烈的疏水性,导致其与组织细胞的相容性较差,加之纤维结缔组织在材料周围形成包囊,并随时间增厚、挛缩,易导致植入材料变形、移位[2]。对该类材料进行合适的表面改性处理,增强其细胞相容性,以提高软组织材料填充后的临床治疗效果,具有重

[基金项目] 国家自然科学基金(81071574);第三军医大学青年人才基金(2009XQN36)
[通信作者] 樊东力,电话:(023)68774647,E-mail:fdltmmu@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121207.1023.019.html(2012-12-07)

要的意义。目前,对于硅橡胶材料的表面改性,可采取等离子体处理[3]、接枝共聚[4]、仿生涂层[5]等方法,但均有一定的缺陷,如步骤繁琐、条件不易控制、基材温度不易控制等。本研究将用于金属、半导体材料的离子注入技术引入硅橡胶材料表面改性,具有其特有的优势[6]:该法能控制基材温度,并且可选择多种离子源,还能在材料表面形成微图形结构;同时,表面的改性不影响材料本身的性质。本研究采用不同的离子注入剂量,对硅橡胶进行表面注入处理,并采用扫描电镜(Scanning electron microscope,SEM)、傅立叶红外光谱(Fourier transform infrared spectrometer,FTIR)、X射线衍射(X-ray diffraction,XRD)等技术观察材料的表面性能,采用细胞增殖实验、免疫荧光、Western blot等技术观察人真皮成纤维细胞在改性后材料表面的生长情况,对改性材料的应用前景进行评价分析。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

双组分医用液体硅橡胶(SR),由深圳市红叶有机硅材料有限公司提供。多功能离子注入机(核工业西南物理研究院,中国);AMRAY1000-B20KV扫描电镜(Amray公司,美国);470型傅氏红外光谱仪(Thermo Nicolet公司,美国);D/MAX-3C型X射线衍射仪(Rigaku公司,日本);激光共聚焦(Leica公司,德国);Bio-Rad垂直电泳仪、蛋白转印仪(Bio-Rad公司,美国);Chemilmager 5500型自动电泳凝胶成像分析仪(Alpha Innotech公司,美国);干燥器;真空泵;电热恒温培养箱。

1.2 方法

1.2.1 SR和碳-硅橡胶(C-SR)的制备 在室温为20 ℃、湿度为50%的条件下,将双组分医用液态硅橡胶(各3 mL)按1∶1比例混合,搅拌均匀,注入金属平板模具(100 mm×100 mm×0.5 mm)中,放置在-0.1 MPa条件的真空泵中30 min后取出,室温静置硫化、固化6 h,固化完全后选择表面平整光滑、无缺损、无明显杂质的材料进行后续试验。

选择表面平整光滑、无缺损、无明显杂质的普通SR(100 mm×100 mm×0.5 mm),以高纯度石墨作为碳(C)离子源,选择离子注入条件:离子能量10 keV,离子剂量10^{15}、3×10^{15}、10^{16} ion/cm^2,束流密度0.6 mA/cm^2,残余气压小于1×10^{-4} Pa,采用多功能离子注入机对SR进行C离子注入,得到3种不同的C-SR,分别标记为C-SR1(1×10^{15} ion/cm^2)、C-SR2(3×10^{15} ion/cm^2)、C-SR3(1×10^{16} ion/cm^2)。

1.2.2 材料表面性能评价

1.2.2.1 SEM 分别切取大小为10 mm×10 mm的SR、C-SR1、C-SR2和C-SR3等4种材料于37 ℃孵箱干燥后,置入真空泵中,在负压状态下向表面喷金镀膜,待其冷却后,使用扫描电镜观察其表面形貌。

1.2.2.2 FTIR 将4种材料剪裁成10 mm×10 mm大小,使用无水乙醇对表面进行适度清洁,待乙醇蒸发、样品干燥后进行测定,波数为4 cm^{-1},扫描范围为4 000~400 cm^{-1},通过光谱采集对涂层材料的表面成分进行测定。

1.2.2.3 XRD 将待测材料经无水乙醇清洁后,真空加热去除样品表面污物,分析材料表面的化学组成。

1.2.3 材料生物学性能评价

1.2.3.1 细胞增殖实验 将人真皮成纤维细胞(原代培养)种植于孔底铺有材料的96孔板内,孵箱培养48 h后按每100 μL培养液中加入10 μL CCK-8溶液,孵育1 h,用酶标仪在波长450 nm检测光密度值,每组6个复孔。

1.2.3.2 纽蛋白(Vinculin)免疫荧光染色 将人真皮成纤维细胞种植于孔底铺有材料的6孔板内,孵箱培养48 h后进行实验,一抗4 ℃过夜孵育Vinculin抗体(1∶400,Sigma公司,美国),37 ℃孵育Cy3标记山羊抗小鼠二抗(1∶500,碧云天公司,中国)1 h,Hoechst33342(碧云天公司,中国)室温下染核5 min。

1.2.3.3 Western blot分析Vinculin表达 将人真皮成纤维细胞种植于孔底铺有材料的6孔板内(对照组为未加材料的细胞组),孵箱培养48 h后用RIPA细胞裂解液提取细胞总蛋白,蛋白上样量为25 μg;蛋白转印至PVDF膜(Millipore公司,美国)后,一抗4 ℃过夜:小鼠抗人Vinculin抗体(1∶1 000,Sigma公司,美国),兔抗人β-actin抗体(1∶200,Santa Cruz公司,美国)。二抗室温孵育2 h:Vinculin用辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗小鼠,β-actin使用辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗兔;采用ECL显色试剂盒(碧云天公司,中国)于凝胶成像仪中显色。

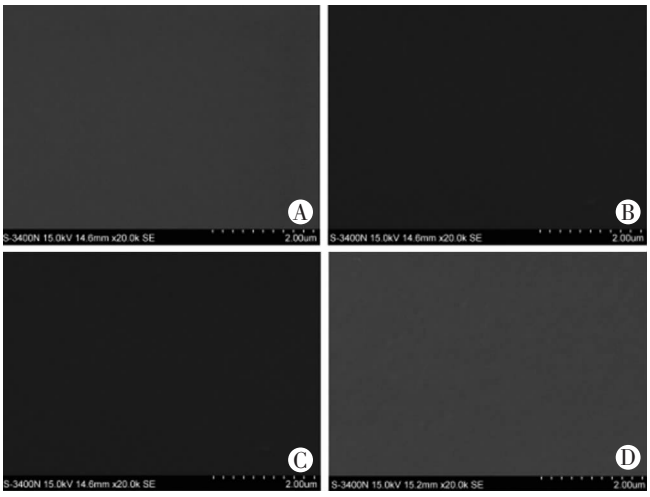
1.3 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,使用SPSS 20.0统计软件进行单因素方差分析和Tukey显著性检验。

2 结果

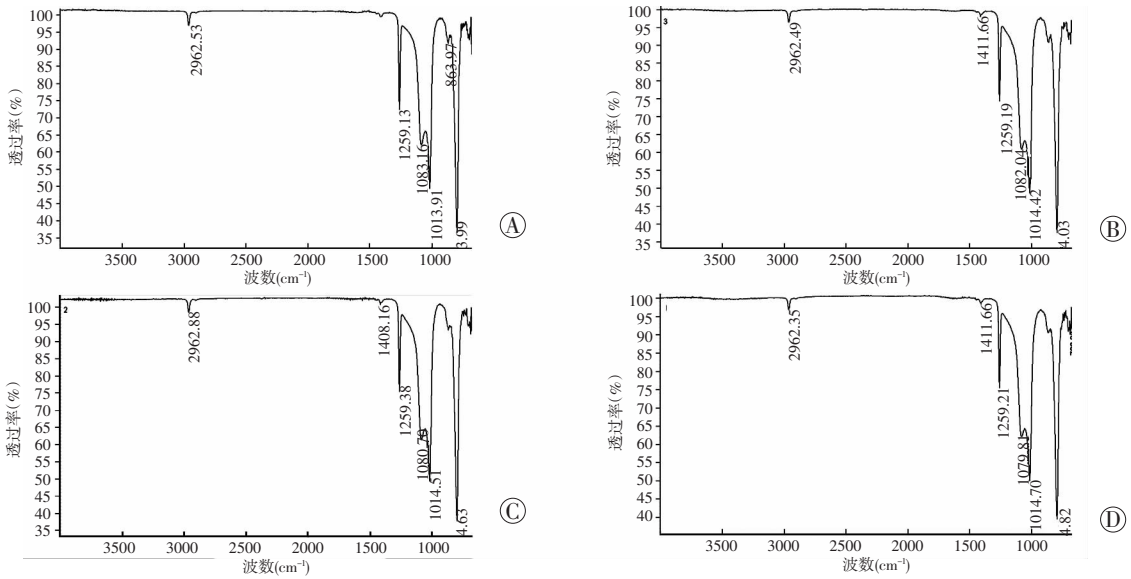
2.1 表面性能评价

在20 000倍放大倍数下,SR、C-SR1、C-SR2与C-SR3的微观形貌无明显差异(图1),说明C离子注入后,是在更加微观的尺度上对材料表面结构进行改变。用C原子进行注入后,材料表面的FTIR无明显变化(图2),提示C注入后材料表面亲水性的提高不是靠改变有机官能团的构成来实现的。C-SR的XRD图谱较SR有所改变,几种C-SR材料较SR在箭头所示处发生了明显的变化,形成了新的峰(图3),提示C离子的注入在SR表面形成了新的晶体结构,但差异并不显著。



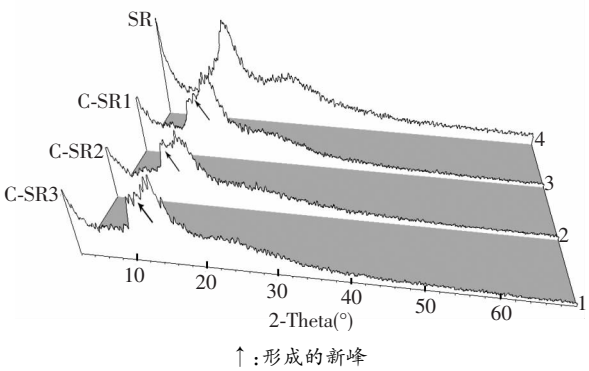
A:SR;B:C-SR1;C:C-SR2;D:C-SR3

图1 硅橡胶及3种不同离子注入量的碳-硅橡胶材料的扫描电镜图



A:SR;B:C-SR1;C:C-SR2;D:C-SR3

图 2　硅橡胶及 3 种不同离子注入量的碳-硅橡胶材料的傅立叶红外光谱分析图



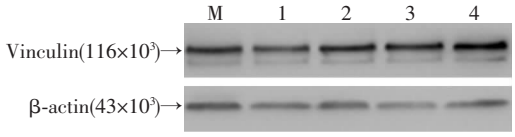
↑:形成的新峰

图 3　硅橡胶及 3 种不同离子注入量的碳-硅橡胶材料的 X 射线衍射图

2.2　细胞相容性检测

2.2.1　细胞增殖实验　　用 CCK-8 法检测各材料的细胞增殖情况,培养在培养皿里的细胞(对照组)光密度值为(0.56 ± 0.07);SR、C-SR1、C-SR2、C-SR3 分别为(0.23 ± 0.01)、(0.35 ± 0.08)、(0.40 ± 0.05)、(0.47 ± 0.04),C-SR1、C-SR2、C-SR3 分别与 SR 比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),说明 C-SR 各组更有利于细胞增殖。C-SR1、C-SR2 和 C-SR3 之间相互两两比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组与 SR、C-SR1、C-SR2 相比差异具有统计学意义($P < 0.05$),而与 C-SR3 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 C-SR3 最有利于细胞增殖。

2.2.2　Western blot 分析 Vinculin 表达　　C-SR 各组 Vinculin 的表达量高于 SR 及对照组,且随着离子注入量的加大其表达逐渐增高。见图 4。



M:标准;1: SR;2: C-SR1;3: C-SR2; 4: C-SR3

图 4　Western blot 检测硅橡胶及碳-硅橡胶材料上培养的成纤维细胞中 Vinculin 的表达

2.2.3　Vinculin 的免疫荧光染色　　细胞在 C-SR 改性材料上的生长情况优于 SR,Vinculin 免疫荧光染色提示(红色的亮点)细胞与材料的黏附情况,以 C-SR3 为例,Vinculin 的表达量明显高于 SR。见图 5。

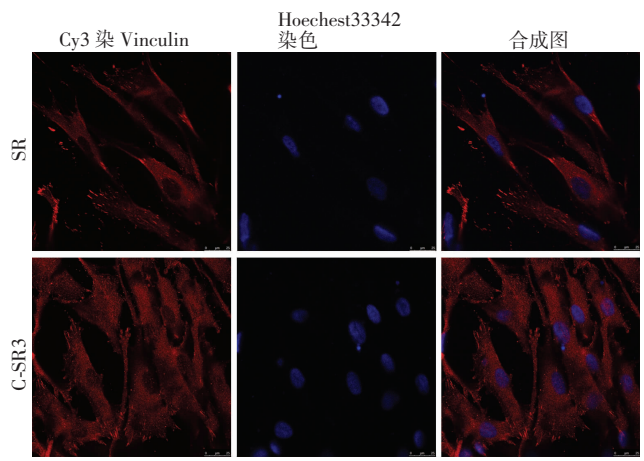


图 5　免疫荧光染色观察硅橡胶及碳-硅橡胶材料上培养的成纤维细胞中 Vinculin 的表达(激光共聚焦显微镜 ×400)

3　讨论

对于先天性或外伤等原因造成的体表组织器官的畸形和缺损,采用 SR 在畸形和缺损部位进行植入,是其主要的治疗方式,但 SR 细胞相容性较差,组织细胞不易黏附到材料表面,容易在材料表面形成纤维包膜,造成假体变形、移位,甚至引起皮肤感染和破溃[7]。对 SR 进行表面改性,获得具有良好相容性的改性材料,可望进一步提高临床治疗效果。本研究对 SR 进行 C 离子注入改性,采用 SEM、FTIR 和 XRD 技术分析

了材料的表面性能,并观察了 C-SR 的细胞相容性,为进一步的动物体内试验作出初步分析与筛选。

本研究中,采用 SEM、FTIR 和 XRD 对受试材料进行表面性能分析。SEM 未发现 SR 和 C-SR 的形貌有明显差异,而文献[8]在对钛合金进行离子注入后,发现其表面结构有发生明显改变,这可能是由于 SR 属于有机聚合物,C 离子的注入量有限,SEM 不足以观察到 C 离子注入对 SR 表面形貌的改变。下一步研究中,拟采用 AFM 对 SR 和 C-SR 进行纳米级别的表面形貌观察。用 C 原子进行注入后,材料表面的 FTIR 无明显变化,说明 C 注入后,C 离子未参与 SR 侧链有机官能团的形成。结合 XRD 分析,C 离子注入后,形成了新的峰,提示以 C 为中心,在 SR 表面形成了新的晶格结构。

C 离子注入后,材料表面性能发生了改变,由于材料表面特性可影响材料的细胞相容性[9-10],进一步研究中,我们对改性材料的细胞相容性进行了观察。CCK8 试验提示人真皮成纤维细胞在 C-SR 表面的增殖情况优于普通 SR,从形态学角度,改性材料表面细胞的附着、伸展等优于 SR(图5),说明 C-SR 较 SR 更有利于细胞的黏附和生长。细胞在材料表面的黏附主要依赖黏附复合体的形成[11]。作为黏附复合体的特征性蛋白之一,Vinculin 通过与其他粘着斑蛋白、细胞骨架蛋白结合并相互作用,影响细胞的黏附、伸展、运动、增殖和存活等[12-15]。在本研究中,采用 Western blot 观察到 C-SR 各组 Vinculin 的表达量高于普通 SR 及对照组,且随着离子注入量的提高其表达量逐次增高,以 C-SR3 为例,免疫荧光染色也提示 Vinculin 表达量的提高。

本研究对改性材料 C-SR 进行了表面性能和细胞相容性的观察分析,发现碳离子注入后,改性材料的表面性能较 SR 发生了一定改变,主要在于以 C 为中心,在 SR 表面形成了新的晶格结构,结合文献分析,这种表面性能的改变可能影响了材料表面的亲疏水性,使材料对细胞外基质蛋白的吸附能力提高,从而促进细胞在材料表面的黏附和增殖[16]。进一步的研究也证实 C-SR 较 SR 更利于细胞的黏附及增殖。这提示我们,若改性材料植入体内,会与周围组织具有良好的亲和能力,可能会减少材料周围包膜形成的程度,减少植入材料变形移位等并发症的发生。下一步研究中将对改性材料 C-SR 进行动物体内植入试验等材料生物学评价研究,以评估其临床应用前景。

参考文献:

[1] Hatamleh M M, Watts D C. Mechanical properties and bonding of maxillofacial silicone elastomers[J]. Dent Mater, 2010, 26(2): 185-191.

[2] Ma Z, Mao Z, Gao C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007, 60(2): 137-157.

[3] Ren T B, Weigel T, Groth T, *et al*. Microwave plasma surface modification of silicone elastomer with allylamine for improvement of biocompatibility[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 86(1): 209-219.

[4] Cordeiro A L, Zschoche S, Janke A, *et al*. Functionalization of poly(dimethylsiloxane) surfaces with maleic anhydride copolymer films[J]. Langmuir, 2009, 25(3): 1509-1517.

[5] Khanna R, Katti K S, Katti D R. Nanomechanics of surface modified nanohydroxyapatite particulates used in biomaterials[J]. J Eng Mech, 2009, 135(5): 468-478.

[6] Gan B K, Nosworthy N J, McKenzie D R, *et al*. Plasma immersion ion implantation treatment of polyethylene for enhanced binding of active horseradish peroxidase[J]. J Biomed Mater Res A, 2008, 85(3): 605-610.

[7] Bellamy K, Limbert G, Waters M G, *et al*. An elastomeric material for facial prostheses: synthesis, experimental and numerical testing aspects[J]. Biomaterials, 2003, 24(27): 5061-5066.

[8] De-Maeztu M A, Alava J I, Gay-Escoda C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6Al4V dental implants[J]. Clin Oral Implants Res, 2003, 14(1): 57-62.

[9] Thevenot P, Hu W J, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility[J]. Curr Top Med Chem, 2008, 8(4): 270-280.

[10] Hauser J, Zietlow J, Koller M, *et al*. Enhanced cell adhesion to silicone implant material through plasma surface modification[J]. J Mater Sci Mater Med, 2009, 20(12): 2541-2548.

[11] Nebe J G, Luethen F, Lange R, *et al*. Interface interactions of osteoblasts with structured titanium and the correlation between physicochemical characteristics and cell biological parameters[J]. Macromol Biosci, 2007, 7(5): 567-578.

[12] Carisey A, Ballestrem C. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling[J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(2/3): 157-163.

[13] 胡丽芳, 赛爱荣, 商澎. Vinculin 在细胞响应力学刺激中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(9): 805-810.

[14] Ziegler W H, Gingras A R, Critchley D R, *et al*. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin[J]. Biochem Soc Trans, 2008, 36(2): 235-239.

[15] Lee J H, Rangarajan E S, Vonrhein C, *et al*. The metavinculin tail domain directs constitutive interactions with raver1 and vinculin RNA[J]. J Mol Biol, 2012, 422(5): 697-704.

[16] Wang Y X, Robertson J L, Spillman W B Jr, *et al*. Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility[J]. Pharm Res, 2004, 21(8): 1362-1373.

(**收稿**:2012-08-22;**修回**:2012-10-09)

(编辑 栾 嘉)