

# 等离子体聚合胺基功能薄膜及其细胞吸附性研究

谢芬艳<sup>1</sup>, 胡文娟<sup>1</sup>, 翁静<sup>2</sup>, 陈强<sup>\*1</sup>

1-北京印刷学院印刷包装北京市重点实验室, 北京大兴, 102600

2-首都医科大学基础医学部, 北京右安门, 100069

**摘要:** 本文采用射频等离子体(13.56MH), 以丙烯胺(allylamine)为聚合单体, 氩气为辅助气体, 合成含胺基的生物功能薄膜。利用接触角测定仪(WCA), 傅立叶变换红外光谱(FTIR), X-射线光电子能谱(XPS), 原子力显微镜(AFM)对功能薄膜的结构, 成分以及形貌进行测试表征。同时也通过体外细胞培养的方式研究了胺基生物功能薄膜对细胞黏附以及细胞生长的作用, 并在倒置显微镜下观察细胞的黏附以及生长情况。研究了不同等离子体参数如: 功率, 工作气压, 放电模式, 占空比等对聚合功能薄膜表面结构成分、功能团含量以及生物性能等的影响。结论是: RF等离子体聚合的胺基功能薄膜具有良好的生物相容性, 能较好地促进细胞在其表面的黏附以及生长。

**关键词:** 胺基功能薄膜; 等离子体聚合; 细胞吸附

## Properties of amine-containing functional films by plasma polymerization

Fenyan Xie<sup>1</sup>, Wenjuan Hu<sup>1</sup>, Jing Weng<sup>2</sup>, Qiang Chen<sup>\*1</sup>

1- Laboratory of Plasma Physics and Materials, Beijing Institute of Graphic Communication, Beijing, 102600

2- Capital Medical University, Beijing, China, 100069

**Abstract:** Using allylamine monomer, amine-containing functional films were prepared by plasma polymerization. The surface composition and microstructure of amine-containing functional films were characterized by water contact angle measure(WCA), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), and atomic force microscopy (AFM) measurements. In vitro cell culture cells adsorption and growth were also carried out in this paper, which the cell adsorption and morphology were acquired with a phase contrast microscope. The influence of plasma parameters, such as plasma power, discharge modes, explosive times on densities of amine were investigated in detail. And the functional films with a high concentration of amine promoting cell adsorption are also investigated in this paper. The conclusions show that RF plasma can polymerize excellent amine-containing functional films, which can effectively promote the cells adsorption and growth.

**Key words:** amine-containing functional films; plasma polymerization; cell adhesive

### 1、引言

近几十年来, 合成医用高分子材料在人工脏器、硬组织、植入物以及临床医用方面的应用日益广泛。但是, 实践中常常发现, 许多高分子材料在与生物体相接触时, 二者会在界面处发生一系列复杂的相互作用, 导致凝血反应和血栓的形成以及对生物体组织产生毒性作用<sup>[1]</sup>, 从而使合成高分子材料在生物学上的应用受到极大限制。

等离子体聚合是一种较好的材料改性以及薄膜沉积的手段, 它能够在材料表面制备出化学惰性的涂层而不破坏和改变材料本身的结构和性质<sup>[2]</sup>。所制备的涂层不仅可以有效地降低血液在材料表面的凝结, 而且能够促进细胞在其表面的黏附以及生长, 从而成为一种广受欢迎的表面改性方法<sup>[3]</sup>。采用等离子体放电的方式聚合材料/薄膜具有表面无针孔、膜质均匀和基体的结合力强、聚合效率高、速度快等优点, 已广泛用在包括生物膜、超导膜、超硬膜的制备等方面<sup>[4,5]</sup>。Seiphia<sup>[6]</sup>通过氨等离子体改性培替氏培养皿表面的方法达到了促进细胞在其上的粘附与生长的效果。杨建<sup>[7]</sup>等通过无水氨改性聚(D, L-乳酸)膜表面, 研究了改性前、后材料表面亲疏水性的变化, 并通过对 3T3 成纤维细胞的培养, 研究了氨等离子体处理的材料表面对细胞粘附与生长的影响。

据此, 我们拟采用等离子体在脉冲和连续两种放电模式下, 以丙烯胺(allylamine)为反应单体, 采用等离子体增强化学气相沉积生成含有胺氨基的功能薄膜, 研究比较了两种放电模式下聚合功能薄膜的性能。特别是采用脉冲等离子体, 可以有效、方便、简易地裁减聚合反应的分子链长、基团长短及其大小, 达到控

制功能基团的含量；同时也通过体外细胞培养的方式研究了胺基生物功能薄膜对细胞黏附以及细胞生长的作用，并对胺基生物功能与细胞的相互作用机理有着初步的了解。

## 2、实验部分

胺基功能薄膜的制备是在平板式电容耦合等离子体化学气相沉积装置上进行，实验装置简图见图 1。平行板电极间距为 47mm，13.56MHz 射频源通过匹配器耦合输入到上电极，而下电极接地，基片放置于下电极表面。单体丙烯胺由辅助电离气体 Ar 载入，从上极板表面均匀分布的小孔进入真空室。装置本底真空在 10Pa 左右。

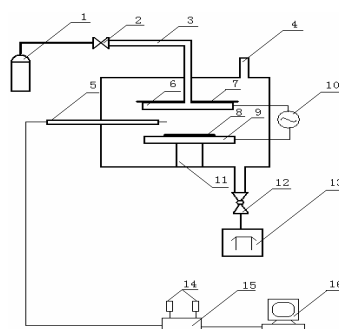


Fig1. The schematic diagram of the experimental setup

图 1 等离子体实验装置简图 (1 工作气体 2 阀① 3 进气管 4 真空计 5 朗缪探针 6 上电极 7 玻璃挡板 8 基片 9 下电极 10 射频 (RF) 发生器 11 支架 12 阀② 13 机械泵 14 直流电源 15 朗缪探针扫描电源 16 计算机)

薄膜制备工艺为：首先将真空室抽至 10Pa，通氩气 20sccm，在功率为 100W 条件下对基片（单晶硅、载玻片、或 KBr 压片）清洗 10min；然后将腔体抽至本底气压为 10Pa，打开单体进气阀，使真空室气压达到一定的值；接通电源，调整好放电功率，开始放电；放电时间达到 30min 后，关闭电源停止放电，继续通单体 5min 后，再取出样品。

为了达到对聚合薄膜的分析要求，基片采用不同的材料：在薄厚均匀的 KBr 压片上聚合薄膜进行 FTIR 分析；在 P-Si(100) 单晶硅表面聚合薄膜，用 X 射线光电子能谱分析 (XPS) 以及原子力显微镜 (AFM) 研究成膜的结构和形貌；在载玻片上聚合薄膜，研究薄膜的亲水性以及成膜速度和功率、气压的关系。在盖玻片上聚合薄膜，研究薄膜对细胞的吸附以及细胞生长的作用。其中玻璃片与单晶硅基片在放入真空室之前，都在乙醇溶液中超声清洗 5 分钟，氮气吹干后备用。而盖玻片则按照哺乳动物细胞培养实验中基材的清洗要求处理。基材放入真空室腔体后，用氩等离子体清洗 10 分钟。

对材料性能分析，红外光谱测试 (FTIR) 使用日本岛津公司的 FTIR-8400 红外光谱仪，精度为  $\pm 4\text{cm}^{-1}$ ；X 射线光电子能谱 (XPS) 分析采用 PHI-5300/ESCA，Al/Mg 双阳极靶，能量分辨率为 0.8eV。原子力显微镜 (AFM) 采用的 CSPM3000 多模式扫描探针显微镜 (北京本原纳米仪器有限公司)。薄膜的生物性能测试采样体外细胞培养，结果通过倒置显微镜观察拍照。

## 3、结果与分析

### 3.1 FTIR

图 2 中所示的丙烯胺单体和等离子体聚合薄膜 (50W) 红外谱图，对比单体和聚合体结构变化。从整个红外光谱图中的主要特征峰看来，胺基功能薄膜已经形成。单体一级胺的性质由两个 N-H 伸展吸收峰 (区域  $3500\text{--}3300\text{cm}^{-1}$ ) 显示，而聚合体的这个区域只有一个吸收峰，表明合成的聚合体是一个二级胺或亚胺。单体中  $1642\text{cm}^{-1}\text{C}=\text{C}$  伸所振动峰被聚合物中  $1630\text{cm}^{-1}$  的  $\text{C}=\text{N}$  伸所振动峰取代。单体  $3100\text{--}3000\text{cm}^{-1}$  的  $=\text{CH}_2$  和  $=\text{CH}-$  基团中的 CH 伸所振动峰在胺基功能薄膜的红外光谱中消失了。胺基功能薄膜可以进一步的通过在  $2190\text{cm}^{-1}$  处的一个新的吸收峰确定，对应于  $\text{C}\equiv\text{N}$  伸缩振动峰。此外在  $2860\text{cm}^{-1}$  处对应于二级胺 (—

CH=NH) 功能团中的 C-H 伸缩振动峰<sup>[8]</sup>。由此可以推断：单体中一级胺 (-CH-NH<sub>2</sub>) 被转换成二级胺 (-CH=NH) 和一个腈基 (-C≡N)，其他的研究者也发现含氮的单体在等离子体聚合时，生成腈基的趋势较强<sup>[9]</sup>。

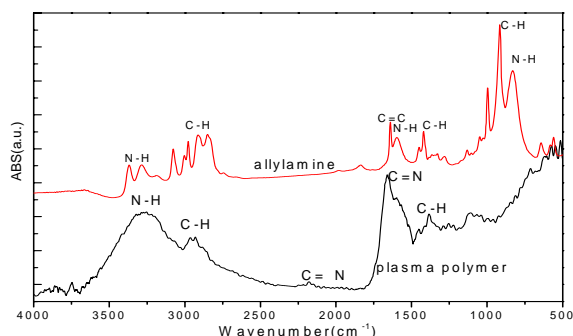


Fig 2 FTIR spectra of monomer and plasma polymerization amine-containing functional films

图 2 等离子体聚合的氨基功能薄膜以及单体的红外光谱图

图 3(a)所示，采用单体丙烯胺 (allylamine) 在连续等离子体放电模式下，聚合 -NH<sub>2</sub> 功能薄膜。谱图中在 3200—3300cm<sup>-1</sup> 之间的吸收峰分别代表 N-H 反对称伸缩振动和对称伸缩振动，同时也表明胺基功能薄膜形成。2160cm<sup>-1</sup> 对应 C≡N 的伸缩振动表明 -NH<sub>2</sub> 薄膜已经形成一定程度的交联，且随着功率的上升薄膜的交联程度而加剧。

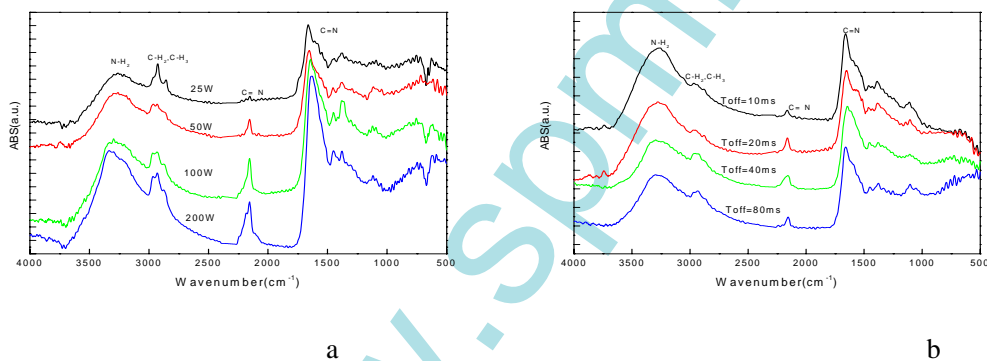


Fig.3 The dependent of FTIR spectra of plasma polymerization amine-containing functional films on a-discharge power, b- duty cycle of MD

图 3 等离子体制备的氨基薄膜的红外光谱图和 a-放电功率，b-脉冲占空比的关系

在脉冲等离子体放电的模式下，等离子体聚合的 -NH<sub>2</sub> 薄膜的红外光谱见图 3 (b)。改变等离子体脉冲间隔时间 (T<sub>off</sub>)，保持等离子体脉冲时间 (T<sub>on</sub>) 不变，薄膜在 3300cm<sup>-1</sup> 处的吸收峰宽度随着 T<sub>off</sub> 的延长而变宽；薄膜的亲水性也随着 T<sub>off</sub> 的延长而更好，测试的接触角值从 26° 变化到 10° 左右。比较图 3 中的 a 和 b，可明显地看出在连续放电制备的薄膜在 2900cm<sup>-1</sup> 波段附近的 C-H 的吸收峰要比脉冲条件下的明显强烈，表明在连续等离子体聚合反应中，薄膜结构中碳的含量增加；当脉冲等离子体聚合时，则刚刚相反。

### 3.2 XPS

为了进一步分析等离子体聚合的胺基功能薄膜中 -NH<sub>2</sub> 的含量，我们通过 XPS 分析计算薄膜中的 -NH<sub>2</sub> 键的含量及 C, N 比值。胺基功能薄膜的 XPS 光谱图如图 4 所示。从谱图中可以得到，等离子体聚合的胺基功能薄膜主要由氮、碳和氧原子组成。采用峰面积积分法，计算得到 C、N、O 元素含量的百分比以及 C/N 的比值，

具体的数值见表 1。其中在  $T_{on}$  不变而  $T_{off}$  较长的脉冲条件下所制备的胺基功能薄膜中 N 的含量最高，可达到为 19.02%，C/N 比值为 3.28，接近丙烯胺单体中 C/N 的比值 (C/N=3)。采用高斯法对 C1s 拟合为 284.5eV (C-C)，285.6eV (C-N)，286.6eV (C-O, C=N) 和 287.8eV (C=O, O=C-NH) 四个峰<sup>[10]</sup>，其中 C-N 峰面积较大，由此也可以推断薄膜中胺基含量较大。

表 1 丙烯胺单体和等离子体聚合的胺基功能薄膜的元素含量以及 C/N 比值

C%	N%	O%	C/N	聚合条件
75	25	—	3	allylamine
70	14.4	15.6	4.86	10Pa, 40Pa, 50W, 20min
62.39	19.02	18.59	3.28	10Pa, 40Pa, 10W, $T_{on}=3ms$ , $T_{off}=80ms$ , 50min
67.9	15.8	16.3	4.29	10Pa, 40Pa, 10W, $T_{on}=3ms$ , $T_{off}=20ms$ , 50min

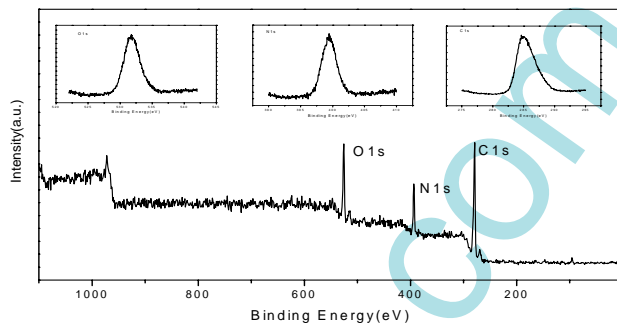


Fig 4 XPS spectra of plasma polymerized amine-containing functional films

图 4 等离子体聚合胺基功能薄膜的 XPS 谱图

### 3.3 薄膜的稳定性分析

图5为功率为50W的连续条件下聚合的胺基功能薄膜在PBS溶液浸泡12h前后的红外光谱图。浸泡后的薄膜的主要特征峰基本不变，表明薄膜的稳定性较好。原因可能是等离子体聚合过程中形成了具有三维的交联网络结构，导致在浸泡过程中薄膜尚未溶解、脱落，薄膜保持良好的稳定性。

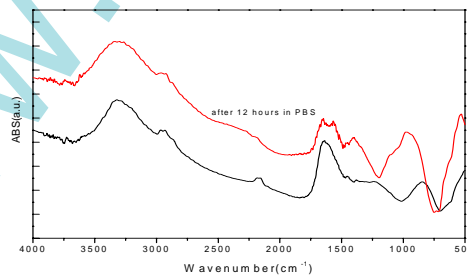


Figure 5 Samples FTIR spectra before and after immersion PBS

图 5 等离子体聚合胺基薄膜在PBS中浸泡前后的红外光谱图

### 3.4 细胞培养实验

将传至第二代的卵巢细胞，用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化，吹打，离心，制成单细胞悬液，调制细胞密度为  $1 \times 10^5$ /mL，种于事先置有基片的 12 孔板中。再加入含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液 1ml，于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 12h, 24h, 48h，然后在倒置显微镜下观察细胞的形态，并拍照。

通过体外细胞培养实验可以发现，胺基功能薄膜能较好的促进细胞在其表面的黏附以及生长，结果如图



6 所示。从图中可以知道胺基功能薄膜能促进卵巢细胞的黏附以及生长。图 6 (a) 中卵巢细胞在胺基功能薄膜上的黏附性好, 且黏附的卵巢细胞发生迁移与聚集, 图 6 (b) 中的细胞具有明显蜂窝状, 卵巢细胞形成汇合, 图 6 (c) 中的卵巢细胞新陈代谢旺盛, 细胞增殖作用明显。

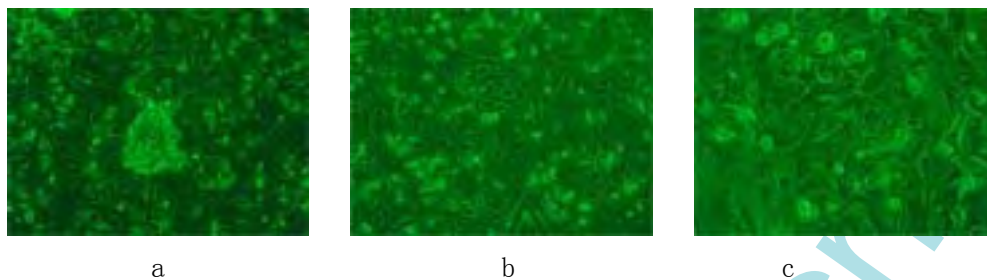


Fig 6 The optical images of cells absorption and growth on the surface of plasma polymerization amine-containing functional films (a-12h; b-24h;c-48h)

图 6 细胞在等离子体聚合胺基薄膜上的黏附与生长(a-12h; b-24h; c-48h。)

#### 4、结论

利用 RF 等离子体聚合的胺基功能薄膜表面的亲水性得到了极大的改善。通过调整放电功率工作气压, 放电模式以及脉冲占空比等等离子体参数研究了胺基功能薄膜的结构成分以及性能。其中在较短的脉冲时间而较长的脉冲时间间隔的条件下, 所制备的胺基功能薄膜功能团含量较高, 其中 N 能达到 19.02%。在胺基的生物性能研究中, RF 等离子体制备氨基功能薄膜能有效的促进卵巢细胞在其表面的黏附以及生长, 提高了薄膜的血液相容性和组织相容性。

#### 5、致谢

本课题受国家自然科学基金(10475010), 北京市留学人员重点资金, 北京市人才强校拔尖人才计划, 和北京印刷学院北京市重点实验室开放课题(kf060201)资助, 在此表示感谢!

#### 参考文献:

- [1]Szycher M. Biocompatible Polymers, Metals and Composites, Szycher M Ed, Technomic Publishin Co Inc, Pennsylvaniz, 1983, 1-33
- [2]A.Choukourov, H.Biederman., D.Slavinska, Surf. Coat. Technol. 174-175, 863 (2003)
- [3]Jian Yang, Guixin Shi, Jianzhong Bei. Fabrication and surface modification of macroporous Poly (L-acetic acid) and Poly(L-lactic-co-glycolic acid)(70/30) cells scaffold for human skin fibroblast cells culture, J. Biomed. Mater. Res, 2002,62:438-446.
- [4] 赵化侨, 等离子体化学与工艺[M], 合肥, 中国科学技术大学出版社, 1993, 45 - 50
- [5] 张光华译, 等离子体与成膜基础[M], 北京, 国防科技出版社, 1994, 62 - 70
- [6]Sipeh ia R. The enhanced attachment and grow th of endo thelial cells on anhydrous ammonia gaseous plasmamodified surfaces of polystyrene and poly ( tetrafluoroethylene ). Biomat Art Cells Art Org, 1990; 18 (3) : 437
- [7]杨健, 贝建中, 王身国. 改进高分子材料细胞亲和性的研究—聚(D, L-乳酸)的等离子体处理改性, 中国修复重建外科杂志 2001 年第 15 卷第 5 期 269-272
- [8]V. Krishnamurthy, Ihabl. Kamel, Analysis of plasma polymerization of allylamine by FTIR, Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry, 1989, 27, 1211-1224
- [9]K. W. Bieg, D. K. Ottesen, Plamsa polymerization, M.Shen and A.T.Bell, Eds., ACs Symp. Ser., 108-128(1979)
- [10]Guangliang Chen, Wenjun Zhao, ShihuaChen et al, Preparation of nanocones for immobilizing DNA probe by a low-temperature plasma plume, Applied Physics Letters 89, 121501(2006)