

脑深部神经刺激微电极的表面改性研究

白宗旭, 刘亚雄, 王会友, 丁玉成

(西安交通大学机械制造系统工程国家重点实验室, 710049, 西安)

摘要: 为了提高脑深部刺激电极的生物相容性,降低脑组织的免疫反应,减少或抑制电极周围包裹物的形成,对电极植入端聚氨酯材料进行了表面改性处理. 首先用 N_2/H_2 进行等离子体处理,在电极表面生成活性基团——氨基,再利用电极表面的氨基基团与 YIGSR 多肽分子发生聚合反应,从而实现在电极表面修饰上对神经细胞具有促进生长作用的多肽分子. 改性电极的大鼠植入实验结果发现,改性电极能够在一定程度上减少胶质包裹物的形成,有利于电极与神经细胞之间接触,增加有效刺激体积,证明了电极聚氨酯材料表面接枝聚合生物大分子的可行性,对今后电极表面改性的深入研究具有一定的参考意义.

关键词: 脑深部刺激;生物电极;等离子体处理;表面改性

中图分类号: TB39;R608 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2011)10-0098-06

Surface Modification of Microelectrode for Deep Brain Stimulation

BAI Zongxu, LIU Yaxiong, WANG Huiyou, DING Yucheng

(State Key Laboratory for Manufacturing System Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract: To improve the biocompatibility of micro-electrode for deep brain stimulation (DBS), and to reduce the immune response of brain tissue and thick encapsulation layer surround the electrode, a surface modification was executed on the polyurethane of DBS electrode head. The electrode surface firstly was modified by N_2/H_2 plasma treatments to achieve the active amino group, and then the polypeptide molecule YIGSR was endowed by a polymerization with the amino group on the electrode surface, consequently, the electrode surface had a layer of polypeptide molecule promoting nerve cell growth. The experiment results of modified electrode implant in rat brain confirm that to a certain degree, the modified electrode can reduce the thick encapsulation layer surround the electrode, it is beneficial for contact between electrode and nerve cells, and the electrode can make a bigger volume of tissue activated. The grafting large-molecule polymer on the polyurethane surface is feasible, and the conclusion gets referable for the further research on bio-electrode surface modification.

Keywords: deep brain stimulation; bioelectrode; plasma treatment; surface modification

脑深部电刺激(DBS)是近年来神经中枢疾病治疗的一项新技术,与毁损术相比,DBS具有手术创伤小、治疗手段可逆、参数可调节的优点.目前,DBS几乎完全取代了毁损术,能够对帕金森等许多重大神经中枢疾病进行有效治疗.然而,随着电极植入时

间的延续,电极刺激的效果往往逐步降低.其主要原因在于,电极在植入脑组织一段时间后,会在植入物的周围形成一层纤维包裹物,隔绝电极刺激点与神经细胞之间的直接接触,降低刺激效果.据研究,这种包裹组织的生成通常与星细胞和成纤维细胞

有关^[1].

为了提高植入电极的生物相容性,降低脑组织的免疫反应,减少包裹物的形成,需要对电极表面进行改性.文献[2]探讨了亚细胞水平的电极尺寸、形状与神经元丢失率、胶质包裹层厚度之间的关系,但不适用于毫米级的电刺激电极.文献[3]研究了在硅基电极表面,利用静电层组装纳米涂层的表面改性方法,但生物涂层是靠静电物理吸附在电极表面的,结合强度较弱.文献[4]利用涂覆改性的聚氨酯薄膜来提高神经电极的生物相容性,但这种涂层的技术操作难度比较高,为了不影响电极的电化学性能,薄膜的厚度必须足够薄,其强度也有待于验证.

由于 DBS 电极的封装采用聚氨酯材料,受到现有研究的启发,为了提高电极的生物相容性,减少电极周围胶质包裹物的形成,本文首先在电极的聚氨

酯表面进行 N_2/H_2 混合气体的等离子体处理^[5-6],使聚氨酯表面产生氨基活性基团.将带有氨基基团的聚氨酯与配制好的多肽溶液反应,最终在聚氨酯表面接枝聚合上能促进神经元细胞的粘附的多肽分子 YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg)^[7].最后,将经过表面处理后的聚氨酯材料植入远交群(SD)雄性大鼠脑内,两周后对大鼠脑组织进行解剖观察,以验证电极等离子体接枝聚合多肽分子改性的可行性.

1 材料与方法

实验选用电极封装用的聚氨酯材料,按照图 1 所示的聚氨酯表面改性流程,首先对聚氨酯表面进行 N_2/H_2 等离子体处理,提高材料表面的亲水性,再通过处理表面的接枝聚合反应,最终在聚氨酯表面接枝多肽分子.

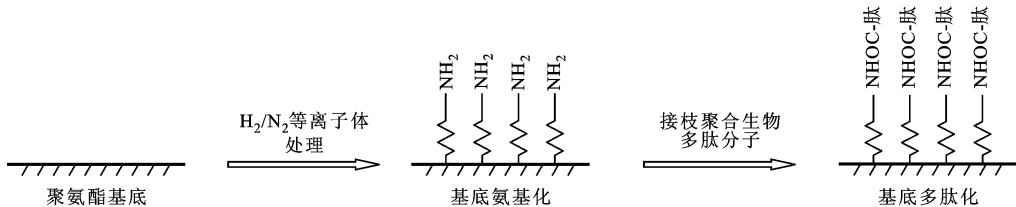


图 1 聚氨酯改性流程示意图

1.1 N_2/H_2 等离子体处理实验

等离子体处理使用 N_2 与 H_2 体积比为 1 : 3 的混合气代替直接用 NH_3 进行放电处理.影响等离子体处理效果的主要参数有气体组成、能量密度、气体速率和处理时间^[8],本文仅研究了放电功率和处理时间这两个参数对处理效果的影响.为了确定最佳的处理参数,实验采用了单因素法,实验参数如表 1 所示.通过测量处理后样品表面静态水接触角和生成的氨基密度,确定了最佳的实验参数.

表 1 N_2/H_2 等离子体处理的参数取值

处理时间/s	60	120	240	480	960
放电功率/W	80	90	100	110	120

为便于表征,进行等离子体处理的样品是一块 20 mm×20 mm×1 mm 的聚氨酯片(图 2 所示),且每个聚氨酯片都被分成了 9 个小区域,并标有数字编号.

不同参数下等离子体处理效果的表征,用测量处理后样品表面静态水接触角和生成的氨基密度来进行.进行接触角测量时,在一件样品每个小区域至

少取一个点,最后取它们的平均值来代表整个片子的值.因此,每个参数下的水接触角为一件样品 9 个小区域中接触角的平均值.

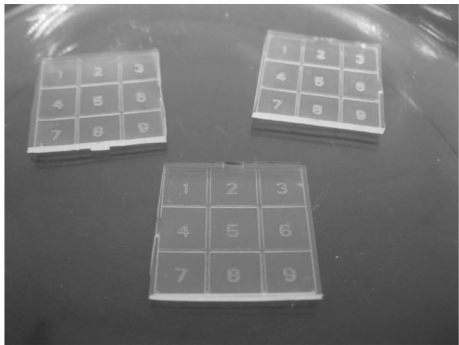


图 2 用于等离子体处理的聚氨酯片

1.2 电极表面多肽分子的接枝聚合

为了便于最终进行电极植入实验,对电极进行了简化处理.在芯线为直径 0.37 mm 的钨丝外部涂覆有一层厚度约为 30 μm 的双组份聚氨酯,来代替神经刺激电极的聚氨酯封装部分.把电极放入等离子体处理设备中,在放电功率为 100 W、处理时间为 480 s 的参数下,按 1.1 节的过程进行 N_2/H_2 等离

子体处理. 在处理结束后,立即放入配制好的多肽溶液中,在 40 ℃下保温 3.5 h 进行接枝聚合反应. 多肽溶液的配制方法及接枝聚合过程以文献[9-10]的研究为基础,多肽溶液由以下成分组成:50 mmol/L 的 YIGSR 五肽,1.25 g/L 的二甲基甲酰胺,以及质量分数为 2%的 N-乙基吗啉.

由于神经刺激电极的主要治疗方式就是通过与神经元建立点的联系,因此本文选择了对神经元具有促进作用的 YIGSR 五肽进行接枝聚合. YIGSR 五肽购于上海波泰生物科技有限公司,质量分数为 99%.

1.3 改性电极的大鼠植入实验

实验动物为 SD 雄性大鼠 2 只,由西安交通大学医学院医学实验动物中心提供. 植入实验以没有经过等离子体处理的电极作为参照电极,等离子体处理并接枝聚合多肽分子的电极为验证电极. 两种电极分别植入大鼠的左右半球的丘脑底核靶点,左半球为改性后电极,右半球为参照电极.

所有电极在植入动物脑组织前都要在 120 ℃下进行蒸汽高压灭菌 30 min. 选择一只 250 g 左右的 SD 雄性大鼠,腹腔注射 1%的戊巴比妥钠. 待大鼠麻醉后,放入植入手术台固定. 沿大鼠脑部中线位置切开皮肤,剥离骨膜. 在大鼠右半球颅骨的适当位置,用牙科钻钻开一直径为 1 mm 的孔,植入参照电极,用骨水泥密封固定. 而后在对侧钻孔,并植入改性电极,同样用骨水泥密封固定. 完成后缝合皮肤,并消毒处理. 植入两周后,对大鼠脑组织做解剖观察,以验证电极等离子体接枝聚合多肽分子改性的可行性.

2 结果与讨论

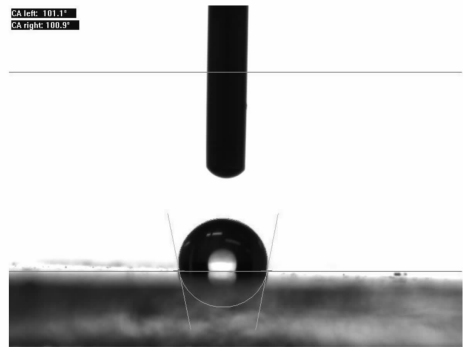
2.1 N₂/H₂ 等离子体处理实验结果

等离子体处理后,需要对样品表面产生的极性基团进行定性和定量的分析. 有研究^[11]证实,材料表面越亲水,生物相容性越好,越有利于细胞的粘附. 本实验进行的是生成氨基的等离子体处理,以静态水接触角测量表征材料表面的亲疏水特性,用染色法对等离子体处理后对材料表面的氨基密度进行表征,辅之以射线光电子能谱法(XPS)对 N₂/H₂ 等离子体处理结果进行定性分析.

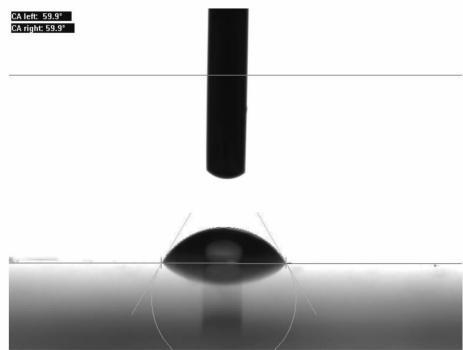
2.1.1 静态水接触角 接触角测量所用设备为德国 Dataphysics 公司的 OCA20 型视频光学接触角测量仪,测量时取溶液的体积为 0.5 μL. 图 2 所示样品的每个标号区域至少取一个点进行测量,取平

均值作为样品的水接触角值. 放电功率为 100 W 时,不同等离子体处理参数下静态水接触角测量结果如图 3 所示. 从图 3 中可以看出,等离子处理后聚氨酯表面静态水的接触角明显减小,在本实验条件下,当放电功率为 100 W、处理时间为 480 s 时,接触角最小.

当放电时间为 60 s 时,不同放电功率下的静态水接触角如表 2 所示,对应的曲线为图 4. 当放电功率为 100 W 时,不同放电时间下的静态水接触角如表 3 所示,对应的水接触角曲线为图 5.



(a) 未经等离子处理



(b) 处理时间为 60 s



(c) 处理时间为 480 s

图 3 不同等离子体处理时间的静态水接触角测量

从图 4 可以看出,当放电时间为 60 s、放电功率为 100 W 时,静态水接触角最小,为 62.8°. 在放电

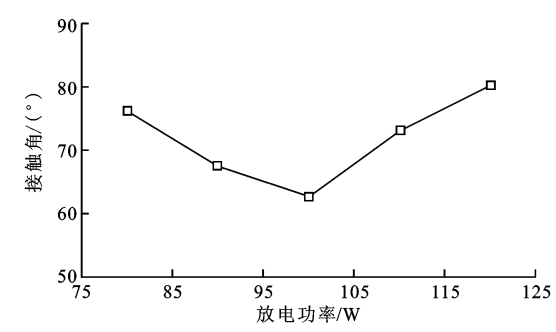


图 4 不同放电功率下的静态水接触角曲线

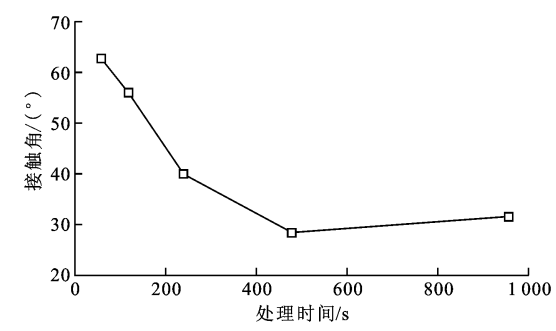


图 5 不同处理时间下的静态水接触角曲线

功率为 100 W 的条件下,随着处理时间的延长,聚氨酯表面的接触角由大变小,之后再变大的过程.放电时间为 480 s 时,静态水接触角最小,达到了 28.4°.因此,可知最佳的放电功率和时间分别为 100 W 和 480 s.

表 2 不同放电功率下的静态水接触角

放电功率/W	80	90	100	110	120
接触角/(°)	76.3	67.6	62.8	73.1	80.4

表 3 不同处理时间下的静态水接触角

处理时间/s	60	120	240	480	960
接触角/(°)	62.8	56.2	40.0	28.4	31.5

等离子体处理过程是一个电子、离子、激发态粒子、自由基和辐射光子等各种粒子综合作用的过程,存在着沉积-刻蚀的双重作用^[12].当放电功率较小、处理时间较短时,沉积作用占主导,这时在材料表面产生活性基团.随着放电功率和处理时间的增加,材料表面的极性基团增多,形成亲水层,因而材料表面的接触角变小;当放电功率和处理时间增大到一定程度后,刻蚀过程起主导作用.随着放电功率的增加、处理时间的延长,材料表面产生的活性基团由于粒子的刻蚀作用而消失,材料表面也会因刻蚀作用

而变得粗糙,所以接触角又回升.

2.1.2 聚氨酯表面氨基密度 对于氨基来说,可以使用酸性橙 7^[6,13]或者 9-蒽醛^[14]进行氨基基团的定量分析.文献^[13]中提到,低分子量的阴离子与聚电解质薄层之间存在 Langmuir 型吸附.在一定条件下,含有单个磺酸基团的酸性橙 7 染料会与氨基基团之间产生等摩尔吸附.这样,通过检测样品表面的酸性橙 7 的吸附量,就可以间接确定样品表面的氨基密度.

样品表面的氨基密度与水接触角之间的关系曲线如图 6 所示.从图中可以看到,接触角越小,样品表面的氨基密度越大,二者呈反比关系.当接触角为最小的 28.4 °C 时,表面氨基密度达到最大,为 $2.1 \times 10^{-8} \text{ mol/cm}^2$.接触角变大有两方面的原因:一是等离子体的刻蚀作用,除去了已产生的极性基团;或者是等离子体处理的参数不足以产生较多的极性基团数量.

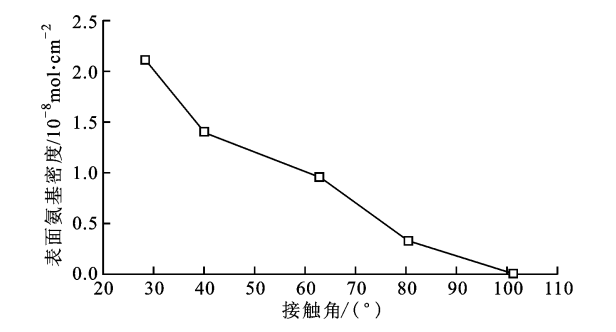


图 6 不同水接触角下的样品表面氨基密度

2.1.3 X 射线衍射图谱测试结果 X 射线光电子能谱测试在西安理工大学的现代分析测试中心完成,测试样品的等离子体处理参数为:放电功率 100 W,处理时间 60 s.改性前后聚氨酯样品的 XPS 图谱如图 7 所示.等离子处理前后聚氨酯表面的 XPS 谱除了部分峰的强度有所增加外,没有太大差别.由图 7 可见,未经等离子处理的聚氨酯表面含有 C_{1s}和 O_{1s}峰,但 N_{1s}峰很小.改性后聚氨酯表面的 N_{1s}峰较改性前有明显增高,表明聚氨酯表面含 N 量有所增加.进一步分析 N_{1s}峰(见图 8)发现,在结合能约为 399.2 eV 处有谱峰存在,根据文献^[6]所述,即可判断表面有氨基生成.

2.2 改性电极的大鼠植入实验结果

待植入两周后,取出大鼠脑组织制作病理切片,并做苏术精-伊红染色法染色,以观察植入电极周围的免疫反应情况.如图 9 和图 10 所示,图中箭头所指的位置为植入电极与神经组织的界面.大鼠脑组

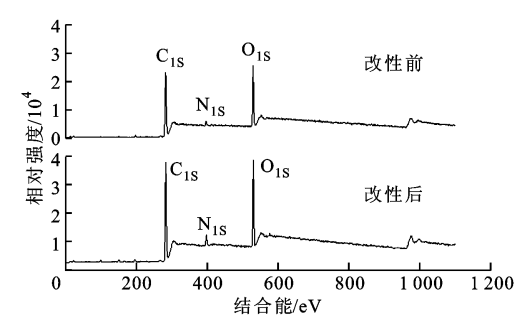


图 7 改性前后聚氨酯表面的 XPS 图谱

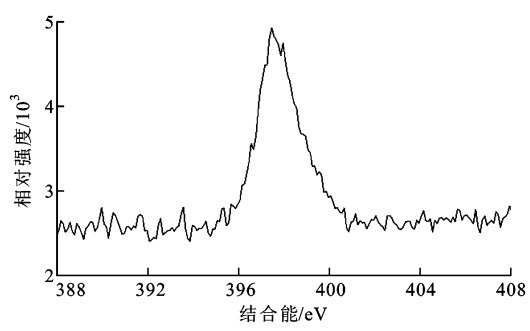
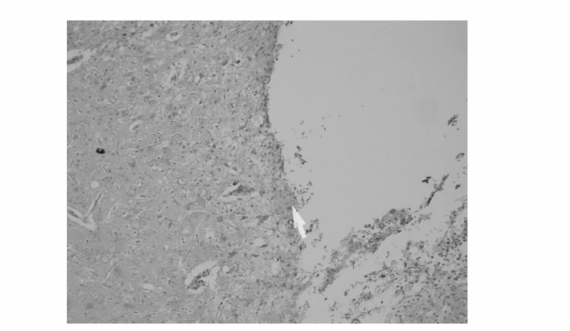
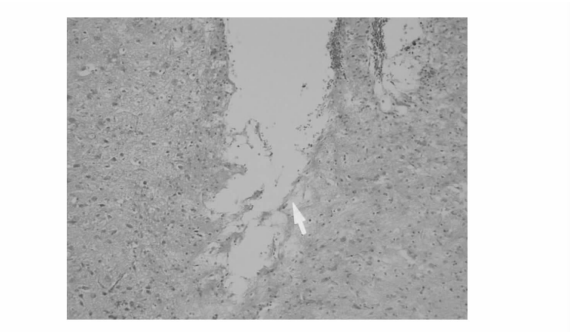


图 8 改性后聚氨酯的 XPS 高分辨率 N_{1s} 峰



(a) 脑组织对参照电极的免疫反应情况



(b) 脑组织对改性电极的免疫反应情况

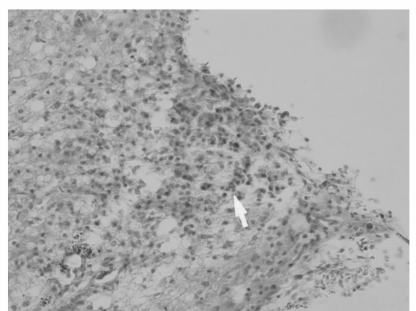
图 9 大鼠脑组织对植入电极的免疫反应 ×200

织的切片制作在西安交通大学医学院完成,切片厚度为 7 μm ,切片方向为平行于电极植入方向。

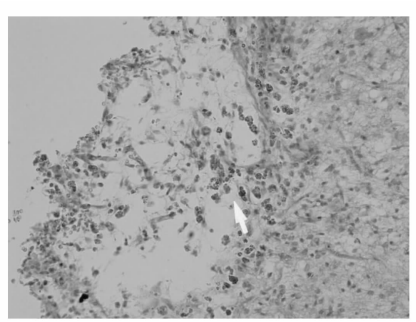
由图 9a 可以看到,在电极植入轨道的边缘区域

有胶质纤维的增生,且周围的脑细胞有轻度的水肿.经放大观察后发现,星形胶质细胞反应明显,个别区域胶质细胞聚集呈节状,如图 10a 所示.另外,在植入参照电极的脑组织周围,部分区域有出血和脑组织坏死现象,小胶质细胞发生了增殖,并吞噬、分解了红细胞,以至于在胞浆内形成含铁血黄素,如图 10b 所示。

与参照电极的免疫反应情况相比,在植入改性电极的脑组织周围,星形胶质细胞和胶质纤维的增生以及小胶质细胞的吞噬和增生情况均较轻,如图 9b 所示。



(a) 星形胶质细胞的增生



(b) 小胶质细胞分解红细胞后形成的血黄素

图 10 大鼠脑组织对参照电极的免疫反应 ×400

以上情况说明,在本案例中,大鼠脑组织对改性电极的炎症反应较弱,改性电极在一定程度上减少了周围胶质包裹物的形成.但是,对于电极周围神经元的生长情况,二者的对比反应并不明显,可能与电极植入时间过短等因素有关,有待于进一步的研究。

3 结 论

本文通过用 N_2/H_2 进行等离子体处理,在电极聚氨酯材料表面生成活性基团——氨基,利用电极表面的氨基基团与 YIGSR 多肽分子发生聚合反应,从而实现了在电极表面修饰上对神经细胞具有促进生长作用的多肽分子.改性电极的大鼠植入实

验表明,植入电极改性后在一定程度上提高了电极的生物相容性,降低了脑组织的免疫反应,减少或抑制了电极周围包裹物的形成。

从改性电极的大鼠植入实验结果来看,改性电极能够在一定程度上减少胶质包裹物的形成,但是对神经元促进生长作用不明显,这可能与电极的植入时间过短有关。实验结果验证了在电极表面进行等离子体处理,并接枝聚合生物大分子的可行性。尽管大鼠植入实验并不具有严格的生物学统计意义,但是作为一种尝试,期望能为以后电极表面改性的深入研究提供参考。

参考文献:

- [1] KAM L, SHAIN W, TURNER J N, et al. Selective adhesion of astrocytes to surfaces modified with immobilized peptides [J]. *Biomaterials*, 2002, 23 (2): 511-515.
- [2] SEYMOUR J P, KIPKE D R. Neural probe design for reduced tissue encapsulation in CNS [J]. *Biomaterials*, 2007, 28 (25): 3594-3607.
- [3] HE W, BELLAMKONDA R V. Nanoscale neuro-integrative coatings for neural implants [J]. *Biomaterials*, 2005, 26 (16): 2983-2990.
- [4] 肖文杰,王定芳,鲁艺,等. 涂覆聚氨酯材料植入神经电极的细胞相容性评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(12): 2278-2282.
- XIAO Wenjie, WANG Dingfang, LU Yi, et al. Cyto-compatibility of polyurethane-coated implanted neural electrode [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2009, 13(12): 2278-2282.
- [5] MEYER-PLATH A A, FINKE B, SCHRODER K, et al. Pulsed and CW microwave plasma excitation for surface functionalization in nitrogen-containing gases [J]. *Surface and Coatings Technology*, 2003, 174: 877-881.
- [6] SIOW K S, BRITCHER L, KUMAR S, et al. Plasma methods for the generation of chemically reactive surfaces for biomolecule immobilization and cell colonization: a review[J]. *Plasma Processes and Polymers*, 2006, 3 (6/7): 392-418.
- [7] 赵铁华,邓淑华,杨鹤松,等. 抗粘附肽 YIGSR 的衍生物对 Lewis 肺癌侵袭、转移能力的抑制作用[J]. *上海免疫学杂志*, 2000, 20(4): 207-210.
- ZHAO Tiehua, DENG Shuhua, YANG Hesong, et al. The anti-tumor adhesive and metabolic activities of equal/unequal fork peptide of YIGSR [J]. *Shanghai J of Immunology*, 2000, 20(4): 207-210.
- [8] MULLER M, OEHR C. Plasma aminofunctionalisation of PVDF microfiltration membranes: comparison of the in plasma modifications with a grafting method using ESCA and an amino-selective fluorescent probe [J]. *Surface & Coatings Technology*, 1999, 116: 802-807.
- [9] DEE K C, RUEGER D C, ANDERSEN T T, et al. Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface: a model in vitro study[J]. *Biomaterials*, 1996, 17 (2): 209-215.
- [10] OLBRICH K C, ANDERSEN T T, BLUMENSTOCK F A, et al. Surfaces modified with covalently-immobilized adhesive peptides affect fibroblast population motility[J]. *Biomaterials*, 1996, 17 (8): 759-764.
- [11] KIM M S, KHANG G, LEE H B. Gradient polymer surfaces for biomedical applications [J]. *Progress in Polymer Science*, 2008, 33 (1): 138-164.
- [12] 梁红军, 侯晓淮. 用低温等离子体处理方法改性高分子材料表面[J]. *化学通报*, 1999(6): 1-8.
- LIANG Hongjun, HOU Xiaohuai. Modification of high molecular material surface by low-temperature plasma surface treatment[J]. *Chemistry*, 1999(6): 1-8.
- [13] 蔡谨, 王文序. 染色法定量检测氨气等离子体改性膜表面的氨基[J]. *浙江大学学报:工学版*, 1999, 33(1): 74-76.
- CAI Jin, WANG Wenxu. Determination of amino groups of ammonia plasma modified polypropylene surface by a staining method [J]. *Journal of Zhejiang University: Natural Science*, 1999, 33(1): 74-76.
- [14] 赵剑英, 李玉邯, 郭海全, 等. 生物芯片表面氨基密度检测及稳定性研究[J]. *分析化学*, 2006, 34(9): 1235-1238.
- ZHAO Jianying, LI Yuhan, GUO Haiquan, et al. Relative surface density and stability of the amines on the bio-chip[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2006, 34(9): 1235-1238.

(编辑 杜秀杰)