

doi:10.3969/j.issn.1001-3539.2017.04.002

类肝素聚乳酸微孔膜的血液相容性^{*}

李井龙¹, 王辉¹, 贺继东¹, 刘富²

(1. 青岛科技大学高分子科学与工程学院, 山东青岛 266000; 2. 中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 浙江宁波 315201)

摘要: 通过在生物基聚乳酸 (PLA) 膜表面进行类肝素化修饰, 得到了具有良好血液相容性的生物基聚合物膜。首先通过自由基聚合合成了聚(乙烯基吡咯烷酮-乙烯基三乙氧基硅烷) [P(VP-VTES)] 预聚物, 进一步通过其界面交联, 将高含量的聚乙烯基吡咯烷酮固化到 PLA 膜表面, 提高膜表面的亲水性和抗污性能。其次通过自由基聚合合成类肝素预聚物苯乙烯磺酸钠-乙烯基三乙氧基硅烷-丙烯酸三元共聚物 [P(SSNa-VTES-AAH)], 并利用预聚物中 VTES 链段的水解缩合反应将类肝素共聚物固定在 PLA 膜表面, 从而提高膜的血液相容性。通过红外光谱确定了 PLA 膜表面亲水层 P(VP-VTES) 和 P(SSNa-VTES-AAH) 的分子结构。通过接触角测试表明类肝素分子修饰的 PLA 膜具有良好的亲水性, 并可以抑制膜表面血小板的吸附和聚集。同时, 凝血测试结果表明类肝素分子修饰的 PLA 膜表面具有良好的血液相容性。

关键词: 类肝素; 聚乳酸膜; 抗凝; 血液相容性; 透析

中图分类号: R318.021 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3539(2017)04-0007-05

Hemocompatibility of PLA Microporous Membrane via Heparin-Mimicking Strategy

Li Jinglong¹, Wang Hui¹, He Jidong¹, Liu Fu²

(1. School of Polymer Science and Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266000, China;

2. Ningbo Institute of Materials Technology and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, China)

Abstract: PLA microporous membrane decorated by heparin-mimicking polymer with good hemocompatibility was prepared. P(VP-VTES) was immobilized on the PLA membrane surface via the interfacial crosslinking method to enhance the hydrophilicity and fouling resistance. Heparin-mimicking prepolymer P(SSNa-VTES-AAH) was synthesized by free radical polymerization and then immobilized on the membrane surface via the hydrolysis and condensation. ATR-FTIR was used to confirm the chemistry variation of the membrane surface. Contact angle measurements indicate that the modified membrane possesses excellent hydrophilicity, which inhibits the adsorption and aggregation of platelets. The blood concretion items show that heparin-mimicking surface has good hemocompatibility.

Keywords: heparin-mimicking; PLA membrane; anti-clotting; hemocompatibility; dialysis

聚合物微孔膜广泛应用于血液净化领域, 例如聚砜^[1]、聚醚砜^[2]、聚甲基丙烯酸甲酯^[3]、聚丙烯腈、聚酰胺等的微孔膜。相比于上述传统的石油基聚合物膜材料, 生物基聚乳酸 (PLA) 具有碳中性、环境友好、成本低等优点, 已经大量应用于人体内骨钉、手术缝合线等生物医用领域^[4-5]。PLA 作为一种新型的可持续生物基聚合物膜材料, 在血液净化、分离领域具有潜在应用前景。而 PLA 膜表面较为疏水, 易导致膜污染, 造成膜分离性能下降, 引起膜寿命缩短; 同时会影响膜表面的血液相容性^[6-7], 导致凝血现象发生, 从造成凝血以及各种氧化应激反应。因此提高生物基 PLA 膜表面的亲水性以及血液相容性具有重要的科学意义^[8]。

血液透析临床治疗过程中, 未分级肝素及低分子量肝素是广泛使用的抗凝剂, 起到抗凝血、抗血栓、抗炎、抗过敏、降血脂、抗动脉粥样硬化等多种功用。然而大量肝素的使用往往加大了患者的出血风险, 并且肝素长期依赖也会导致皮肤反应, 血浆脂解活性的抑制, 嗜酸粒细胞增多, 高钾血症, 骨质疏松等副作用。因此如何降低肝素剂量, 甚至通过透析膜改性方式实现无肝素注射治疗, 是目前血液透析的临床急需。肝素在膜表面的固定化可改善膜的抗

^{*} 国家自然科学基金面上项目 (51473177), 中国科学院青年创新促进会项目 (2014258)

联系人: 刘富, 研究员, 博士, 主要从事分离膜材料研究

收稿日期: 2017-02-18

凝血及血液相容性。目前肝素化修饰膜材料的方法主要有以下几种:(1)通过 $-\text{COO}-$ 与 $-\text{NH}_2$ 发生酰胺化反应将肝素分子直接接枝到膜表面^[9]; (2)将肝素分子涂覆到其它大分子物如人血清白蛋白表面,得到分子量较大的包覆物,然后将该包覆物通过物理的方式镶嵌到基体膜表面^[10-11]; (3)通过纳米凝胶与类肝素预聚物层层自组装的方式将类肝素预聚物接枝到基体膜材料内部^[12]。这几种方法简便可行,可以制备出具有良好血液相容性的血液透析膜。然而肝素作为一种生物体直接提取物,如果直接和血液接触可能会导致潜在的副作用,如出血现象、血小板减少综合征,并且作为生物制剂,其成本较高。因此从分子结构模拟出发,设计出与肝素分子类似的结构,同时又具有肝素分子活性的类肝素分子具有重要研究意义。

结合上述生物相容性修饰方法以及类肝素分子设计思路,笔者提出通过聚(乙烯基吡咯烷酮-乙烯基三乙氧基硅烷)[P(VP-VTES)]预聚物的交联聚合作用对PLA膜表面进行亲水改性,提高PLA膜表面的亲水、抗污功能;其次通过自由基聚合反应合成苯乙烯磺酸钠-乙烯基三乙氧基硅烷-丙烯酸三元共聚物[P(SSNa-VTES-AAH)],其具有大量的类肝素的磺酸以及羧酸基团;进一步将P(SSNa-VTES-AAH)通过乙烯基三乙氧基硅烷(VTES)链段在水环境诱导下的水解、缩聚、交联反应,在PLA膜表面形成稳定的类肝素分子层,从而提高膜表面的血液相容性。

1 实验部分

1.1 原材料

PLA: 2003D, 美国 Natural Works 公司;

1-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、*N,N*-二甲基乙酰胺(DMAc)、1-乙烯基-2-吡咯烷酮(NVP): 分析纯, 纯度均大于99.0%, 阿拉丁控股集团有限公司;

偶氮二异丁腈(AIBN): 重均分子量(M_w)=164.21, 阿拉丁控股集团有限公司;

聚环氧乙烷(PEO): M_w =100 000, 阿拉丁控股集团有限公司;

丙烯酸(AAH, M_w =72.06)、苯乙烯磺酸钠(SSNa, M_w =206.19)、VTES (M_w =190.31)、磷酸三乙酯(TEP, M_w =182.15): 国药集团化学试剂有限公司;

活化部分凝血酶时间(APTT)和纤维蛋白原(FIB)测试盒: 上海太阳生物科技有限公司;

人体全血由宁波血液中心提供。

1.2 仪器及设备

扫描电子显微镜(SEM): S-4800型, 日本 Hitachi 公司;

半自动凝血分析仪: PUN-2048A型, 北京普朗新技术有限公司;

接触角测量仪: OCA20型, 德国 Dataphysics 公司;

傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)仪: Nicolet6700型, 美国 Thermo 公司。

1.3 试样制备

(1) 亲水性 PLA 膜的制备。

将 18.0 g PLA 和 6.0 g PEO 溶解在 76.0 g NMP 中, 在 80℃下加热搅拌 12 h, 搅拌速度为 230 r/min。脱泡后得到混合均匀的铸膜液, 用间隙为 200 μm 的刮刀将铸膜液均匀刮涂在无纺布上, 及时将其浸入 25℃的水浴中凝固。将制备的 PLA 膜彻底地冲洗、干燥^[13-14], 记为 PLA-M0。

在 25℃、氮气保护条件下, 将 5.50 g VTES, 7.50 g NVP 和 0.16 g AIBN 分别加入到 250 mL 三口烧瓶中, 随后向上述三口烧瓶中加入 200 g TEP 并搅拌 30 min。在 80℃条件下加热反应 20 h, 进而制备出预聚物 P(VP-VTES)。将 P(VP-VTES)/TEP 体系与 H₂O 以体积比 1:1 混合, 并及时将干燥的 PLA 膜浸泡在上述溶液中 90 min。最后在 60℃下将浸泡后的 PLA 膜样品转移到 1.0% 的柠檬酸溶液中, 加热时间控制在 600 min。最后将亲水改性的 PLA 膜清洗、干燥处理^[15], 记为 PLA-M1。

(2) P(SSNa-VTES-AAH) 的合成及膜表面修饰。

在室温、氮气保护条件下, 将 3.48 g AAH, 9.94 g SSNa 和 0.16 g AIBN 溶解在 200 g DMAc 中, 并搅拌 30 min。随后将温度控制在 80℃, 加热 20 h 诱发自由基聚合反应得到类肝素预聚物 P(SSNa-VTES-AAH), AAH 与 SSNa 的物质的量比为 1:1。同样方法制备出 AAH 与 SSNa 投料物质的量比为 1:2 及 1:3 的类肝素预聚物。随后, 将 P(SSNa-VTES-AAH)/DMAc 体系与水按 1:1 体积比混合, 将干燥过且去除无纺布后的 PLA-M1 膜浸泡在上述溶液中, 搅拌 1.5 h。然后将微溶胀的 PLA 膜转移到 1.0% 的柠檬酸溶液中, 并在 60℃下加热 10 h。最后将类肝素修饰 PLA-M1 浸洗干燥处理。AAH 与 SSNa 投料物质的量比为 1:1, 1:2 及 1:3 的类肝素预聚物修饰 PLA 膜分别记

为 M-1-1, M-1-2, M-1-3。

1.4 性能测试

(1) 亲水性测试。

水接触角通过接触角测量仪来测定。具体步骤如下:将 PLA 样品膜 (2 cm×3 cm) 粘附在洁净且干燥的载玻片上,然后在样品膜表面滴加 1 μL 蒸馏水,通过自动测量蒸馏水滴在样品膜表面接触角随时间的变化趋势来反映样品膜的亲水性强弱。

(2) 血液相容性检测。

将 10 mL 健康人的血浆 (含血小板) 在 3 000 r/min 速度下离心 10 min,得到的上层清液为祛除血小板的血浆 (PPP),主要用于检测凝血指标 (APTT, FIB)。同时祛除离心血浆中间层所得到的下层血浆 (PRP) 富含大量的血小板,用于样品膜表面血小板吸附测试。凝血四项指标由半自动凝血分析仪测定。

(3) APTT 检测。

将膜样品 (1 cm×1 cm) 放置于测试专用反应杯中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下将 0.1 mL 血浆 (PPP) 和 0.1 mL APTT 试剂 (鞣花酸) 分别加入到上述反应杯中,孵化时间为 5 min,然后及时将 0.1 mL CaCl_2 溶液 (0.025 mol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下预热) 快速注射到反应杯中。通过半自动凝血分析仪记录血浆凝固时间即 APTT 值,重复试验三次取平均值。空白对照组中不加入样品膜,其他操作条件及操作方式完全相同。

(4) FIB 检测。

FIB 是通过标准曲线读出。其中标准曲线是以确定浓度下纤维蛋白原的含量 (单位为 mg/dL) 为 X 轴,各浓度纤维蛋白原所对应的模拟血浆凝固时间 (单位为 s) 为 Y 轴作图得到标准曲线。测试方案如下:测试的血浆用一定量缓冲溶液稀释,然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下将 200 μL 稀释血浆孵化培养 3 min。最后及时将 100 μL 凝血酶测试液注入到反应杯中,记录稀释血浆固化时间。测量的样品中 FIB 含量可以直接从标准曲线得到,重复试验三次取平均值。空白对照组中不加入样品膜,其他操作条件及操作方式完全相同。

(5) 血小板吸附。

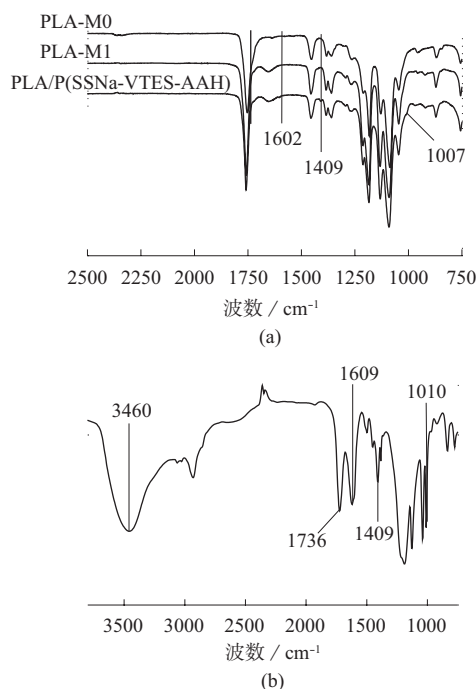
用移液枪将 0.1 mL 新制备的 PRP 注入到 24 孔细胞培养板中。然后将待测样品膜 (1 cm×1 cm) 均匀浸泡于 PRP 中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵化培养 1 h。随后用生理盐水将样品膜表面浸洗三次以便除去在样品表面吸附不牢固的血小板。然后将

样品膜及时浸泡在戊二醛溶液 (2.5%) 中 12 h,以便更好地固定吸附在膜表面的血小板。最后将上述预处理好的样品膜分别用一系列的乙醇水溶液干燥。在室温下将样品膜放置在洁净真空烘箱中干燥处理,通过 SEM 来观察样品膜表面血小板的形貌及其在膜表面的分布状况。

2 结果与讨论

2.1 合成产物的化学结构表征

采用 ATR-FTIR 仪表征纯 PLA 膜 (PLA-M0), 亲水性 PLA 膜 (PLA-M1) 和类肝素 PLA 膜 [PLA/P(SSNa-VTES-AAH)] 的化学结构,如图 1 所示。PLA-M0 和 PLA-M1 在 1 741 cm^{-1} 处显示了较强的吸收峰,分别为酯基和 PVP 结构中 $\text{C}=\text{O}$ 键的伸缩振动。由于类肝素分子中羧基等官能团含有大量的 $\text{C}=\text{O}$,因此 PLA/P(SSNa-VTES-AAH) 在该位置吸收强度大于 PLA-M0。PLA/P(SSNa-VTES-AAH) 膜在 1 602 cm^{-1} 和 1 409 cm^{-1} 处出现了微弱新吸收峰,为 SSNa 分子中苯环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动吸收峰。另外,在 1 007 cm^{-1} 处有较弱吸收峰,为磺酸根吸收峰,表明膜表面 SSNa 的存在。图 1b 为类肝素预聚物 P(SSNa-VTES-AAH) 的红外图谱。3 460 cm^{-1} 处显示出较强的宽吸收峰为 P(SSNa-VTES-AAH) 水解后产生的 $-\text{OH}$ 伸缩振动吸收



a—PLA-M0, PLA-M1 和 PLA/P(SSNa-VTES-AAH);
b—P(SSNa-VTES-AAH)

图 1 合成产物的 ATR-FTIR 图谱

峰。1736 cm^{-1} 出现的特征吸收属于 VTES 分子中 $\text{C}=\text{O}$ 吸收振动峰。1609 cm^{-1} 和 1409 cm^{-1} 处同样出现了较强吸收峰为 SSNa 分子中苯环 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动吸收峰。在 1010 cm^{-1} 处有较强吸收峰,为磺酸根吸收峰。对比图 1a 与图 1b,表明类肝素三元共聚物 P(SSNa-VTES-AAH) 被成功固定在 PLA 膜表面。

2.2 膜的亲水性

对于生物材料,表面良好的亲水性通常可提高其抗污染性能。PLA 膜表面的水接触角随时间的变化趋势如图 2 所示。纯 PLA 膜表面相对疏水,初始接触角为 94° 。随着时间的延长(120 s),水接触角减小到 91° ,稳定几乎不变化。PLA-M1 膜亲水性显著提高,接触角在 21 s 内从 95° 减小到 0° 。这是由于界面交联的 P(VP-VTES) 在膜表面形成亲水层,并且亲水层的存在可促进三元共聚物在 PLA 膜表面的吸附,水解及交联。类肝素共聚物 P(SSNa-VTES-AAH) 修饰后的 PLA 膜表面的亲水性有所降低。M-1-3 的水接触角变化范围整体要高于 M-1-1,这是由于磺酸根的亲水性低于羧酸根。但在 120 s 时,类肝素修饰 PLA 膜 M-1-1 的水接触角可降低到 56° ,相比于 PLA-M0 (91°) 较低,因此也具有较好的亲水性。

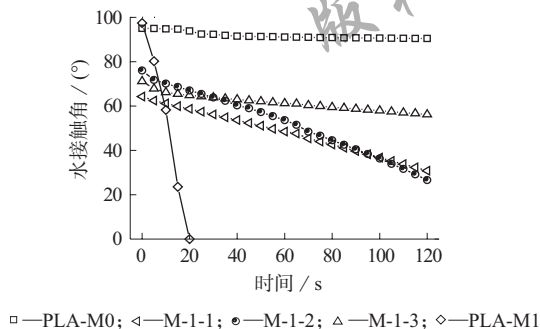


图2 PLA微孔膜的水接触角随时间的变化趋势

2.3 膜的血液相容性

类肝素修饰 PLA 膜的血液相容性可通过 APTT 和 FIB 以及血小板吸附来表征。图 3 为 APTT 及 FIB 转化为纤维蛋白的量的测试结果。APTT 主要反映内源性凝血系统状况^[16-17],对照组 PPP, PLA-M0 和 PLA-M1 的 APTT 测试结果分别为 47.6, 47.9, 49.2 s, 因此膜的亲水性对 APTT 影响不大。类肝素预聚物修饰膜测试后的 APTT 数值可达到 61.8 s (M-1-2)。FIB 在凝血酶的作用下会转变为纤维蛋白,这是血液凝固的最主要反应机理

^[15]。如图 3 所示类肝素预聚物修饰 PLA 膜后, FIB 从 128.5 mg/dL 最低降到 97.9 mg/dL 。类肝素分子与血浆凝血酶接触后,凝血酶不能够将 FIB 转化为纤维蛋白,从而直接抑制血液凝固,进而达到抗凝的效果。无论 APTT 测试项还是 FIB 测试项, M-1-2 样品膜测试效果要高于 M-1-3 样品膜。因此, SSNa 在类肝素预聚物 P(SSNa-VTES-AAH) 中的含量调控对膜表面血液相容性具有较大影响。

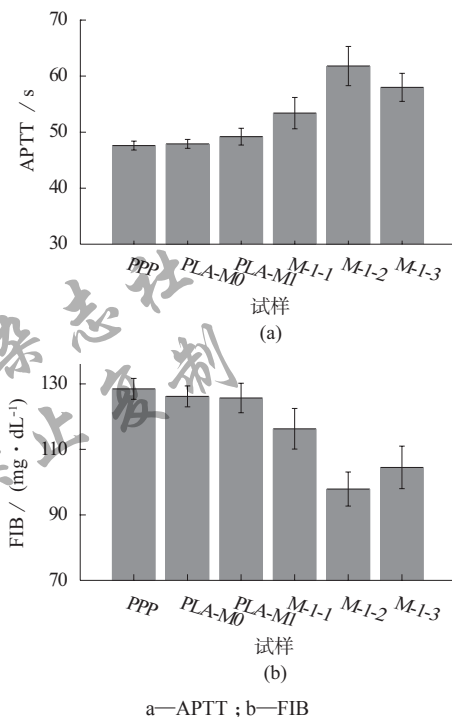
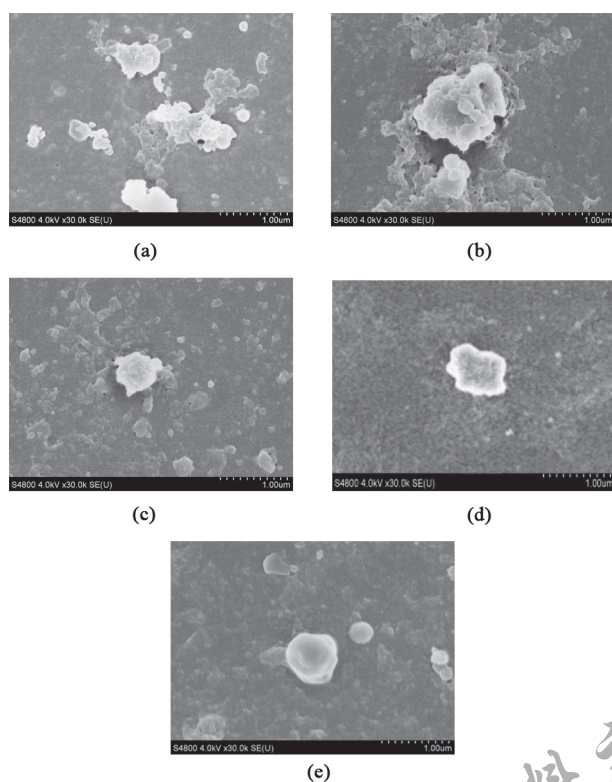


图3 APTT 及 FIB 转化为纤维蛋白的量测试结果

一般情况下血浆与血液相容性不好的膜材料接触后,血浆中的血小板就会大量富集到材料表面^[18]。图 4 为 PLA 膜表面血小板吸附形貌 SEM 照片。由图 4 可看出,血小板在 PLA-M0 表面的聚集现象比较严重,这主要是由于 PLA-M0 表面的疏水基团激活血小板活性因子,从而导致血小板的聚集。相反,亲水性 PLA 膜 (PLA-M1) 表面由生物相容性物质 PVP 界面层修饰,不会触发血小板表面的活性因子,因此亲水性 PLA 膜表面血小板或蛋白质吸附及聚集现象受到抑制。修饰膜表面的类肝素预聚物也会抑制血小板或蛋白质的吸附,其中 M-1-2 样品膜表面抗血小板聚集现象最明显,主要原因是由于类肝素预聚物的抗凝作用可以切断 FIB 转化为纤维蛋白,间接抑制血小板或血浆蛋白聚集。

3 结论

PLA 膜表面经 P(VP-VTES) 预聚物修饰之后,



a—PLA-M0 ; b—PLA-M1 ; c—M-1-1 ; d—M-1-2 ; e—M-1-3

图4 PLA膜表面血小板吸附形貌SEM照片

亲水性大幅度提高。通过血小板在膜表面的吸附实验表明,亲水改性后的PLA膜表面具有良好的抗污性能。类肝素分子P(SSNa-VTES-AAH)修饰的PLA膜表面,亲水膜的亲水性有所降低。血液相容性测试结果表明当AAH与SSNa的投料物质的量比为1:2时制备出的类肝素预聚物修饰的PLA膜具有最高APTT测试值(61.8 s),以及最低的FIB的含量测试值(97.9 mg/dL)。上述结果表明,类肝素分子修饰的PLA膜(M-1-2)具有良好的抗污性能和血液相容性。

参考文献

- [1] Zhao C, Liu X, Nomizu M, et al. DNA-loaded PSf microspheres used in environmental application[J]. Separation Science and Technology, 2004, 39(13):3 043–3 055.
- [2] Zhao C S, Liu T, Lu Z P, et al. An evaluation of a polyethersulfone hollow fiber plasma separator by animal experiment[J]. Artificial Organs, 2001, 25(1):60–63.
- [3] Yamashita A C, Tomisawa N. Membrane materials for blood purification in critical care[M]. Acute Blood Purification, Karger Publishers, 2010, 166:112–118.
- [4] Mackiewicz N, Nicolas J, Handké N, et al. Precise engineering of multifunctional PEGylated polyester nanoparticles for cancer cell targeting and imaging[J]. Chemistry of Materials, 2014, 26(5):1 834–1 847.
- [5] Ding C, Qiao Z, Jiang W, et al. Regeneration of a goat femoral head using a tissue-specific, biphasic scaffold fabricated with CAD /CAM technology[J]. Biomaterials, 2013, 34(28):6 706–6 716.
- [6] Van der Bruggen B. Chemical modification of polyethersulfone nanofiltration membranes:a review[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2009, 114(1):630–642.
- [7] Koh M, Clark M M, Howe K J. Filtration of lake natural organic matter:Adsorption capacity of a polypropylene microfilter[J]. Journal of Membrane Science, 2005, 256(1):169–175.
- [8] Agenson K O, Uruse T. Change in membrane performance due to organic fouling in nanofiltration(NF) / reverse osmosis(RO) applications[J]. Separation and Purification Technology, 2007, 55(2):147–156.
- [9] Ren X, Xu L, Xu J, et al. Immobilized heparin and its anti-coagulation effect on polysulfone membrane surface[J]. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2013, 24(15):1 707–1 720.
- [10] Ichimose K, Okamoto T, Tanimoto H, et al. Comparison of a new heparin-coated dense membrane lung with nonheparin-coated dense membrane lung for prolonged extracorporeal lung assist in goats[J]. Artificial Organs, 2004, 28(11):993–1 001.
- [11] Bayramoglu G, Yilmaz M, Batislam E, et al. Heparin-coated poly (hydroxyethyl methacrylate /albumin) hydrogel networks:In vitro hemocompatibility evaluation for vascular biomaterials[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2008, 109(2):749–757.
- [12] Xia Y, Cheng C, Wang R, et al. Surface-engineered nanogel assemblies with integrated blood compatibility, cell proliferation and antibacterial property:Towards multifunctional biomedical membranes[J]. Polymer Chemistry, 2014, 5(20):5 906–5 919.
- [13] Wang P, Ma J, Wang Z, et al. Enhanced separation performance of PVDF / PVP-g-MMT nanocomposite ultrafiltration membrane based on the NVP-grafted polymerization modification of montmorillonite(MMT)[J]. Langmuir, 2012, 28(10):4 776–4 786.
- [14] Bi Q, Li Q, Tian Y, et al. Hydrophilic modification of poly (vinylidene fluoride) membrane with poly(vinyl pyrrolidone) via a cross-linking reaction[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2013, 127(1):394–401.
- [15] Li J, Liu F, Qin Y, et al. A novel natural hirudin facilitated anti-clotting polylactide membrane via hydrogen bonding interaction[J]. Journal of Membrane Science, 2017, 523:505–514.
- [16] Yuan S, Ferrell C, Chandler W L. Comparing the prothrombin time INR versus the APTT to evaluate the coagulopathy of acute trauma[J]. Thrombosis Research, 2007, 120(1):29–37.
- [17] Greinacher A, Warkentin T E. The direct thrombin inhibitor hirudin[J]. Thromb Haemost, 2008, 99(5):819–829.
- [18] Seifert B, Romaniuk P, Groth T. Covalent immobilization of hirudin improves the haemocompatibility of polylactide-polyglycolide in vitro[J]. Biomaterials, 1997, 18(22):1 495–1 502.