不同分子量的 PEG 改性聚氨酯以及表面的血液相容性研究

杨明璨,朱楚洪 (第三军医大学基础部人体解剖学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 研究经不同分子量 PEG 修饰后聚氨酯(PU)膜的血液相容性。**方法** 采用两步法将不同分子量的 PEG(400、800、1 000和2 000)修饰到 PU 膜上,获得了不同分子量 PEG 修饰的 PU 膜,进行凝血因子试验、复钙时间的测定、血小板计数和血细胞计数,实验的数据行统计分析。**结果** 随着修饰剂 PEG 分子量的增加,复钙时间延长、凝血因子消耗量和血小板的吸附量降低。**结论** 经过修饰的 PU 膜和血液相容性得到了明显改善,并且随着分子量的增加,这种相容性也在增加,PEG 的分子量为 1 000时,这种效果达到最好。

[关键词] 聚氨酯;PEG;血液相容性;血栓
[中图分类号] R318.08 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)03-0259-03

Blood compatibility of polyurethane membrane modified by PEG of different molecular weights

YANG Ming-can, ZHU Chu-hong (Department of Anatomy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the blood compatibility of polyurethane (PU) membrane modified by PEG of different molecular weights. **Methods** PEG of different molecular weights (400, 800, 1 000 and 2 000) were used to modify PU membrane by a two-step method respectively, thus generating various modified PU membranes. The membranes underwent coagulation factor assays to determine the recalcification time. The number of platelets and blood cells were counted. And all the data were statistically analyzed. **Results** As the molecular weight of PEG increased and the recalcification time prolonged, the coagulation factor consumption and platelet absorption decreased. **Conclusion** PEG modification improves the blood compatibility of PU membrane and the blood compatibility becomes better when the molecular weight of PEG increases, with its prime at PEG molecular weight of 1 000.

Keywords: polyurethane; PEG; blood compatibility; thrombus

聚氨基甲酸酯简称为聚氨酯(PU),是由有机二异氰酸酯或多异氰酸酯与二羟基或多羟基化合物加聚而成。因具有优良的物理机械性能和良好的生物相容性,目前在许多人工器官和医疗装置中发挥着至关重要的作用[1]。但是在临床上,聚氨酯依然会带来如血栓形成等类似的不良生物反应,因此,对其进行改性获得更加优良的生物相容性的聚氨酯材料是非常必要和有意义的[2]。已有研究表明通过在疏水性材料表面嫁接亲水性物质能有效的减少和降低这种作用,从而抑制凝血现象的发生[3]。在众多的亲水性改性材料中,聚乙二醇因能够有效的防止蛋白吸附和血小板的粘附而被受亲睐[4-5]。因此,本研究采用两步法将不同分子量的 PEG 修饰到 PU 膜上,而后考察其凝血因子试验、复钙时间、血小板计数和血细胞计数实验,检测不同分子量修饰的 PU 膜的血液相容性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

聚乙二醇400、聚乙二醇800、聚乙二醇1000和聚乙二醇2000(Aldrich 公司),4,4-二苯甲基二异氰酸酯(MDI,Aldrich 公司),琥珀亚胺碳酸二酯(DSC,Aldrich 公司),甲苯,DMF,聚氨酯均为国药试剂,分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 纯化 PU 以及制膜 为了去除 PU 胶粒中的添加剂和其他杂质,首先在 Soxhelt 中使用乙醇提取 48 h,然后放在真空干燥箱中,50 ℃下干燥 24 h 以去除乙醇。将干燥的提纯的 3 g PU 溶解于 30 mL 的 DMF 中,然后倒入培养皿中后置于干燥箱中,65 ℃下加热 2 d 使其成膜。而后将其转入真空干燥箱中,65 ℃下继续干燥 24 h 以除去微量残余的溶剂。用打孔器将干燥的膜敲成固定体积的圆形膜片。

1.2.2 不同分子量的 PEG 修饰 PU 膜 在 N_2 保护下,将 PU 膜片置于 7.5%(wt/v)的 MDF/无水甲苯中,缓慢滴加三乙胺,在甲苯中的含量大约为 2.5%(wt/v),在 50 ℃下反应 2 h,获得 PU-NCO 膜,最后用无水甲苯对膜进行清洗,去除膜表面物理吸附的 MDI。将 PU-NCO 膜转移到 5%(wt/v)的不同分子量的 PEG/甲苯溶液中,在 N_2 保护下,50 ℃下反应 2 h,后取出膜并用甲苯和乙醇洗去表面粘有的未反应的 PEG,在真空干燥将膜烘干,便得到了PEG400-PU、PEG800-PU、PEG1000-PU、PEG2000-PU 的膜。

1.2.3 凝血因子试验 凝血因子测定采用凝血法,在试管中先后加入健康成人鲜血 3 mL 和不同分子量 PEG 修饰的 0.074 g材料,经 8 min 后用全自动生化分析仪进行测定。

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201303010
[收稿日期] 2013-02-22 [修回日期] 2013-03-10

1.2.4 复钙时间测定 复钙时间的测定采用第一条丝状物出现的时间,具体方法是在质量分数 0.9% 的 NaCl 溶液中放入不同分子量 PEG 修饰的 0.2 cm × 0.2 cm 材料,浸泡 24 h,然后将浸泡的材料、0.2 mL 的血浆和 0.025 mol/L $CaCl_2$ 溶液先后移至试管内,37 ℃恒温。

1.2.5 血小板计数 血小板的分析采用全自动血细胞分析仪,具体的操作方法:将不同分子量 PEG 修饰的 3 cm × 3 cm 材料浸入 0.5 mL 新鲜的兔血中,加入质量分数为 3.8% 的柠檬酸三钠[9:1(w/w)],30 min 后用 pH = 7.2 的磷酸盐洗去吸附不牢固的血小板,用戊二醛固定 30 min,然后用质量分数 40% ~ 100% 的 7 个梯度下的乙醇水溶液脱水 15 ~ 30 min,在超净环境下自然干燥并用瑞氏染色剂染色。

1.2.6 血细胞计数 血细胞的计数主要是针对白细胞和红细胞,采用自动血细胞分析仪来计算。具体方法是:将不同分子量 PEG 修饰的 0.074 g 材料和 3 mL 健康成人静脉血放入装有 EDTA 抗凝剂的试管中,8 min 后测定。

2 结果

2.1 不同 PU 的凝血因子和复钙时间

从图 1 和图 2 中可以看出,随着修饰剂 PEG 分子量的增加,凝血因子 IV 的消耗量在不断下降,而复钙时间在不断增加。但是当分子量达到 1000 后,其凝血因子 IV 的消耗量和复钙时间的增幅都明显放缓。凝血因子 IV 和 Ca^{2+} 在激活血小板中起着非常关键的作用,通过 PEG 的修饰,能有效的减少复钙时间和降低凝血因子 IV。这是因为,PEG 具有疏水性,经过修饰后,PU 膜的亲水性提高,可有效的延缓对凝血因子的激活,因此表现出了随着修饰剂 PEG 分子量的增加,复钙时间延长和凝血因子消耗量降低[6]。

2.2 不同 PU 的血小板吸附量实验

人体受物理损伤后,血小板会受到损伤部位激活因素的刺激,出现血小板的聚集,成为血小板凝块,起到初级止血作用。接着血小板又经过复杂的变化产生凝血酶,使邻近血浆中的纤维蛋白原变为纤维蛋白,互相交织的纤维蛋白使血小板凝块与血细胞缠结成血凝块,即血栓。同时血小板的突起伸入纤维蛋白网内,血小板微丝(肌动蛋白)和肌球蛋白的收缩使血凝块收缩,血栓变得更坚实,能更有效地起止血作用,这是二级止血作用。因此,血小板是参与凝血过程的一种很重要的物质。当医用材料和血液接触后,血浆蛋白之间会发生竞争性的吸附,而血小板就会贴壁在吸附在材料表面的血浆蛋白,当达到一定量的时候,血小板就会聚集,形成血栓。二相聚集发生时纤维蛋白原变成纤维蛋白,导致凝血。因此,几乎所有的医用材料改性其目的都是有效地降低血小板的吸附量,不激活凝血途径[7-8]。

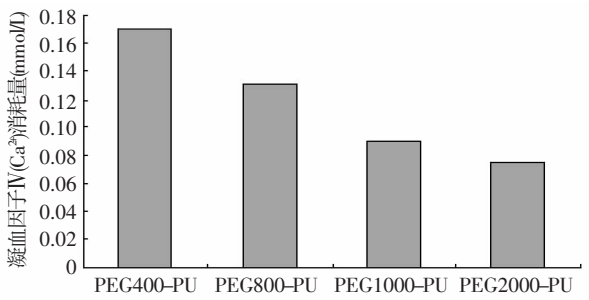


图 1 不同 PU 凝血因子Ⅳ(Ca^{2+})消耗量

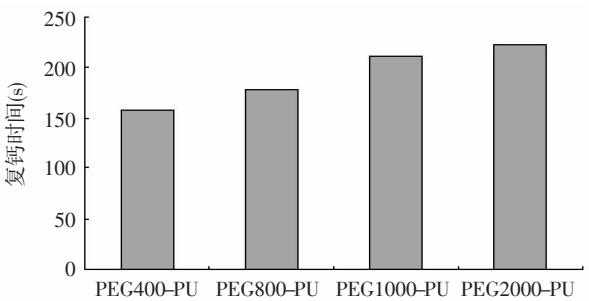


图 2 不同 PU 复钙时间

从图 3 中可以看出,随着修饰剂 PEG 分子量的增加,血小板的吸附量在逐渐的降低,说明了 PEG 分子量的增加能有效的减少血小板的吸附量。从图 3 中也可以看出,当 PEG 的分子量达到 1 000 时,血小板的吸附量增加速率就放缓了,当 PEG 的分子量达到 2 000 时,和 1 000 时相差不大。不同分子量 PEG 修饰的 PU 膜能有效地降低血小板的吸附量,与 PEG 亲水特性有着密切的关系,在一定程度下,随着亲水性的增加,一方面是由于吸附在材料表面的血浆蛋白降低,而血小板必须吸附在血浆蛋白上才能发挥作用,由于附着位点的减少导致了血小板吸附量的降低。另一方面是修饰的亲水性的 PEG 直接导致血小板吸附量的降低[9]。

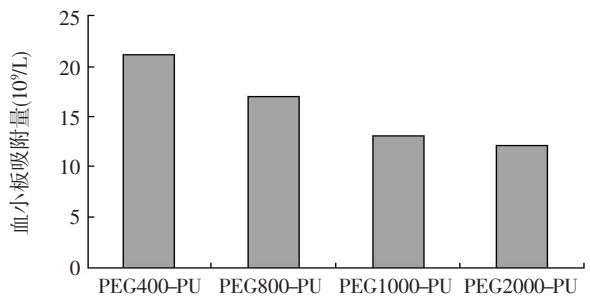


图 3 不同 PU 血小板吸附量

2.3 不同 PU 的血细胞计数实验

从 4 种不同分子量的 PEG 修饰的 PU 膜来看,随着 PEG 分子量的增加,红细胞和白细胞的数目都在明显降低,而白细胞数目也一直明显低于红细胞数目。血细胞数目的降低反应了材料和血液的兼容性。血细胞数目的降低有利于减少血栓的形成。

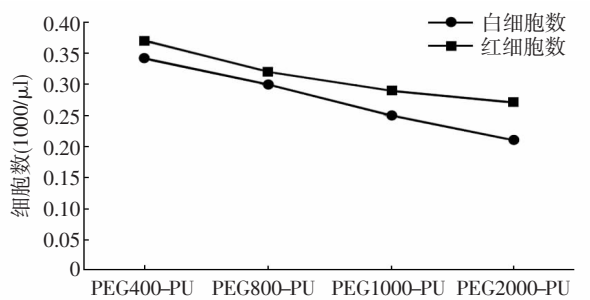


图 4 不同 PU 血液中白细胞和红细胞的数目

3 讨论

本实验将 PU 纯化后,用 4,4-二苯甲基二异氰酸酯形成 PU-NCO 膜,将 PU-NCO 膜和 PEG 反应形成分子量 400、800、1 000 和 2 000 的 PEG-PU 膜,该过程采用 PEG 进行修饰,由于 PEG 具有亲水性,经过修饰后,能使 PU 膜的亲水性提高,可有效的延缓对凝血因子的激活,表现出随着修饰剂 PEG 分子量的增加,复钙时间的延长和凝血因子消耗量的降低,从而有效的减少复钙时间和降低凝血因子 IV。人类血小板是参与凝血过程的一种很重要的物质。当普通医用材料和血液接触后,血浆蛋白之间会发生竞争性的吸附,而血小板就会贴壁在材料表面的血浆蛋白上,当达到一定量的时候,血小板就会发生聚集,形成血栓,二相聚集发生时纤维蛋白原变成纤维蛋白,导致凝血。因此,有效的降低血小板的吸附量,且不激活凝血途径是几乎所有的医用材料改性的目的。本实验通过血小板计数和血细胞计数实验,检测不同分子量 PEG 修饰后 PU 膜的血液相容性。实验结果表明修饰后的 PU 膜能有效的降低的血小板的吸附量,这和 PEG 亲水特性有着密切的关系。在一定环境中,一方面血小板必须吸附在血浆蛋白上才能发挥凝集作用,随着经修饰后的 PU 膜亲水性增加,吸附在材料表面的血浆蛋白浓度降低,从而导致了血小板吸附量的降低。另一方面,有研究表明修饰的亲水性 PEG 可以直接导致血小板吸附量的降低[9-10]。通过分析,经过 PEG 修饰后的 PU 膜,凝血因子吸附数量降低,复钙时间延长,血细胞和血小板吸附量随着 PEG 分子量的增加而降低,这种 PU 膜和血液相容性得到了明显改善,并且随着分子量的增加,这种相容性也在增加,当 PEG 的分子量为 1 000 时,这种效果就达到最高。这种经过 PEG 修饰后的 PU 膜在抗血液凝集方面明显优于普通 PU 膜。

[参考文献]

[1] 何淑漫,周 健. 抗凝血生物材料[J]. 化学进展,2010,22(4):760-772.

[2] 侯长军,袁 泉. 聚醚砜改性及生物相容性研究[J]. 化学推进剂与高分子材料,2006,4(14):49-55.

[3] 麦伟忠,王培连,屠 美,等. 聚氨酯材料表面微波辅助接枝聚乙二醇的研究[J]. 功能材料,2012, 43(6):783-787.

[4] Li D,Chen H,Glenn McClung W,et al. Lysine-PEG-modified polyurethane as a fibrinolytic surface: Effect of PEG chain length on protein interactions, platelet interactions and clot lysis[J]. Acta Biomaterialia, 2009,5(6):1864-1871.

[5] Chen H,Zhang Y,Li D,et al. Surfaces having dual fibrinolytic and protein resistant properties by immobilization of lysine on polyurethane through a PEG spacer[J]. J Biomed Mater Res A,2009,90(3):940-946.

[6] 袁 江,表幼菱,沈 健,等. 聚氨醋表面构建磺按两性离子结构及其抗血小板粘附性的研究[J]. 高等学校化学学报,2003,5(24):919-919.

[7] 张 戎,陈 雪,曹 雪. PMAE 抗凝血材料的研究进展与应用[J]. 科技视界,2012,4(12):55-56.

[8] 胡小洋,张燕霞,张 弢,等. 以 PEG 为间隔基固定赖氨酸制备血液相容的聚氨酯材料[J]. 高等学校化学学报,2009,30(3):613-617.

[9] Kang IK,Kwon OH,Kim MK,et al. In vitro blood compatibility of functional group-grafted and heparin-immobilized polyurethanes prepared by plasma glow discharge[J]. Biomaterials,1997,18(16):1099-1107.

[10] 雷 达,韦莉萍,徐耿明,等. 血脂吸附剂的合成及吸附性能研究[J]. 第一军医大学分校学报,2004,27(2):109-110.

(编辑:左艳芳)

(上接第 258 页)

迟强化。瘤体主要由梭形细胞组成,CD34、Vimentin 为阳性,是一种比较罕见间叶肿瘤。

[参考文献]

[1] Gengler C,Guillou L. Solitary fibrous tumour and haemangiopericy-toma:evolution of a concept[J]. Histopathology,2006,48(1):63-74.

[2] 冯 超. 胸膜孤立性纤维瘤的临床分析(附 40 例病例报道)[D]. 南开大学,2010.

[3] de Perrot M,Kurt AM,Robert JH,et al. Clinical behavior of solitary fibrous tumors of the pleura[J]. Ann Thorac Surg,1999,67(5):1456-1459.

[4] Gorden P,Hendricks CM,Kahn CR,et al. Hypoglycemia associated with non-islet-cell tumor and insulin-like growth factors[J]. N Engl J Med, 1981,305(24):1452-1455.

[5] 邹宗楷,吴文乔,苏海燕,等. 胸腔巨大不典型孤立性纤维性肿瘤伴阵发性低血糖症一例[J]. 中华病理学杂志,2007,36(1):67.

[6] Dotan ZA,Mor Y,Olchovsky D,et al. Solitary fibrous tumor presenting as perirenal mass associated with hypoglycemia[J]. J Urol,1999,162(6):2087-2088.

[7] 蔚 青,金晓龙. 胸腔孤立性纤维瘤伴阵发性低血糖症 1 例报道并文献复习[J]. 诊断病理学杂志,2003,10(3):163-165.

[8] 张 炜,陆洁莉,王卫庆,等. 胸膜孤立性纤维瘤引起的低血糖一例[J]. 上海医学,2003,26(2):161-162.

[9] 陈卉娇,张红英,李 响,等. 26 例孤立性纤维性肿瘤临床病理及免疫组化特征[J]. 四川大学学报(医学版),2004,35(5):675-679.

[10] Moriyama S,Yano M,Sasaki H,et al. Pedunculated solitary fibrous tumor of the pleura manifesting as a migrating chest mass:report of a case[J]. Surg Today,2012,42(4):395-397.

(编辑:杨 颖)