

等离子体磺酸化丝素蛋白膜聚四氟乙烯复合小口径人工血管的制备***

李少彬¹, 闫玉生¹, 李辉¹, 周颢², 赵连娜³, 雷波³

Preparation of small-caliber expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts applied by silk fibroin film with surface sulfonation by low temperature plasma treatment

Li Shao-bin¹, Yan Yu-sheng¹, Li Hui¹, Zhou Xie², Zhao Lian-na³, Lei Bo³

Abstract

BACKGROUND: Silk fibroin film showed an anti-coagulated blood activity following sulfurous acid treatment; however, its flexibility and anti-tension were poor. If the silk fibroin film was coated on small-caliber expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) vascular grafts prior to surface sulfonation, the adverse effects were improved and the blood compatibility of ePTFE vascular grafts were remarkably enhanced.

OBJECTIVE: To research the preparation of ePTFE vascular grafts applied by surface sulfonation of silk fibroin film by low temperature plasma treatment.

METHODS: The ePTFE vascular grafts were treated with low temperature plasma and coated on the surface of silk fibroin. The compound was then sulfonated with low temperature plasma. The ePTFE vascular grafts were considered as the controls to detect contact angle and sulfonation.

RESULTS AND CONCLUSION: The contact angle was decreased gradually from 87.7° to 65.1° following low temperature plasma treatment. Moreover, the contact angle was 106.2° following coating silk fibroin film and 92.9° following sulfonation. X-ray light-electron spectrometer demonstrated that percents of sulfur element on the surfaces of the combined blood vessel was 2.89%, respectively, while that of the control film was only 0.12%. The X-ray light-electron spectrometer also showed that most of the sulfur element were sulfonic group (-SO₃H). The results suggested the feasibility of the preparation of the combined blood vessel.

Li SB, Yan YS, Li H, Zhou X, Zhao LN, Lei B. Preparation of small-caliber expanded poly(tetrafluoroethylene) vascular grafts applied by silk fibroin film with surface sulfonation by low temperature plasma treatment. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(8):1357-1360. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 丝素蛋白膜用二氧化硫处理后,可表现出抗凝血活性,但丝素成膜后柔韧性及抗牵拉伸展等性能较差,如果将丝素蛋白涂覆于膨体聚四氟乙烯人造血管表面,并对涂覆后的丝素膜进行磺酸化处理,不但解决了上述不良因素,还能显著改善膨体聚四氟乙烯人造血管的血液相容性。

目的: 研究等离子体磺酸化丝素蛋白膜聚四氟乙烯复合小口径人工血管(复合血管)的制备过程,并探讨其制备过程的可行性。

方法: 采用低温等离子体技术处理普通聚四氟乙烯人工血管内表面,将制备并浓缩到一定浓度的丝素蛋白溶液均匀涂覆到人工血管内表面,再次使用低温等离子体技术对人工血管内表面的丝素膜进行磺酸化处理。以普通聚四氟乙烯人工血管为对照,进行接触角及磺酸化效果检测。

结果与结论: 氩气低温等离子体处理前后接触角分别为 87.7°和 65.1°,涂覆丝素蛋白后接触角为 106.2°,二氧化硫低温等离子体处理后接触角为 92.9°;X射线光电子能谱仪检测对照丝素膜表面仅有微量的硫元素(0.12%)存在,经过二氧化硫等离子体处理后丝素膜表面的硫元素含量上升到 2.89%;X射线光电子能谱图中的 S2p 峰拟合曲线显示了复合血管表面的 S 原子主要是磺酸基团(-SO₃H)。说明实验已制备出理论上具有抗凝血性能的血管。

关键词: 聚四氟乙烯;丝素蛋白;血液相容性;低温等离子体;二氧化硫;人工血管

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.08.007

李少彬,闫玉生,李辉,周颢,赵连娜,雷波.等离子体磺酸化丝素蛋白膜聚四氟乙烯复合小口径人工血管的制备[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(8):1357-1360 [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

目前人工血管在代用大动脉方面已取得满意的效果,然而在中小动脉、静脉,尤其是在直径<6 mm小口径血管的移植中,还没有一种人工材料能够完全满足当前小血管系统临床应用的高要求^[1]。其存在的主要问题是小口径人工血管材料自身的血液相容性及抗血栓性能不及自体血管,当与血液接触以后会不同程度的产生纤维蛋白和血小板沉积,造成管腔

狭窄,血管闭塞^[2]。因此,如果能够选择出合适的材料及方法开发出适合中小动静脉血管代用移植的小口径人工血管,无疑将会有着十分重要的临床实用价值。本实验旨在利用低温等离子体、磺酸化技术等制备出具有抗凝血功能的小口径人工血管。

1 材料和方法

设计: 随机对照的前瞻性实验。

时间及地点: 实验于2009-03/12分别于中山

¹Department of Cardiothoracic Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China;
²School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China;
³South China University of Technology, Guangzhou 510641, Guangdong Province, China

Li Shao-bin★, Studying for master's degree, Department of Cardiothoracic Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
lsb19821023.student@sina.com

Correspondence to: Yan Yu-sheng, Doctor, Chief physician, Department of Cardiothoracic Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Supported by: the Medical Scientific Research Foundation of Guangdong Province, No. WSTJJ20071104410 303197905132512*; Science and Technology Planning Project of Guangdong Province, No. 93025*

Received: 2009-12-20
Accepted: 2010-01-23

¹ 南方医科大学珠江医院胸心外科, 广东省广州市 510282; ² 中山大学药学院, 广东省广州市 510006; ³ 华南理工大学, 广东省广州市 510641

李少彬★, 男, 1982 年生, 河南省平顶山市人, 汉族, 南方医科大学在读硕士, 主要从事血液保护, 人工血管方面的研究。lsb19821023.student@sina.com

通讯作者: 闫玉生, 博士, 主任医师, 南方医科大学珠江医院胸心外科, 广东省广州市 510282

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)08-01357-04

收稿日期: 2009-12-20
修回日期: 2010-01-23
(20091220004/M·H)

大学药学院实验室, 华南理工大学特种功能材料教育部重点实验室, 南方医科大学珠江医院中心实验室完成。

材料:

材料和仪器	来源
膨体聚四氟乙烯(ePTFE) 人工血管(内径 6 mm)	德国贝朗医疗公司
蚕茧	华南农业大学动物科学学院蚕学系提供
S-450 扫描电镜	日立, 日本
低温等离子体表面 处理仪(LTP-010)	德菲科学仪器 有限公司
表面接触角检测仪 (OCA15)	DATAPHYSICS, Germany
X-射线光电子能谱仪 (X-ray Photoelectron Spectroscopy/ESCA, ESCALAB 250)	Thermo Fisher Scientific

实验方法:

氩气等离子体预处理ePTFE人工血管^[3-5]: 采用低温等离子体表面改性仪预处理ePTFE人工血管, 处理气体: 氩气; 处理条件: 固定放电电压压强70 Pa, 放电功率20 W, 放电时间10 min, 处理后的样品在空气中放置10 min备用, 处理前后使用表面接触角分析仪检测接触角变化。

丝素蛋白膜复合聚四氟乙烯血管的制备: 蚕丝于0.5% Na₂CO₃溶液中煮沸30 min, 除去蚕丝表面的丝胶蛋白^[6-8], 蒸馏水清洗干净后烘干, 加入CaCl₂: H₂O: 乙醇=1: 8: 2(摩尔比)的三元溶剂, 80 ℃水浴溶解; 然后分别在水、去离子水中透析3 d; 抽滤去除杂质后即得到丝素蛋白溶液。溶液浓度用紫外吸收法测定。将20 g/L丝素溶液用无菌注射器注入两端封口的氩气低温等离子体预处理过的ePTFE血管内, 均匀翻滚血管并干燥24 h, 使丝素蛋白均匀涂覆在血管内表面成膜, 制备成复合血管。

等离子体磺酸化处理复合血管: 采用低温等离子体技术对复合血管进行磺酸化处理^[9], 处理气体: 二氧化硫(SO₂); 反应条件: 流量20 SCCM, 压力20 Pa, 放电功率30 W, 处理时间30 min, 于紫外灯下消毒。将处理血管取下部分, 利用X射线光电子能谱仪进行表面元素分析, 评价磺酸化效果。

表面形态观察: 以复合血管为实验组, 普通ePTFE人工血管为对照组, 取两组血管各1支, PBS缓冲液漂洗3遍, 各10 min, 以专用电镜固定液固定, 置入4 ℃冰箱固定12 h、后予PBS

缓冲液漂洗3遍, 10 min, 并经冷冻干燥、喷金, 使用扫描电镜来观察血管表面形态。

表面元素分析: 用X射线光电子能谱仪进行磺酸化评价, 工作真空度: $\sim 2 \times 10^{-7}$ Pa(打开X射线源的情况下), X射线源: 单色化的Al K α 源(Mono AlK α)能量为1 486.6 eV, 15 kV 150 W, 束斑大小为500 μ m; 扫描模式: CAE; 透镜模式: Large Area XL; 定性、定量分析采用Wagner (Al靶) Library; 全谱扫描: 通能为150 eV; 窄谱扫描: 通能为20 eV; 荷电校正以表面污染C1 s (284.8 eV)为标准进行能量校正。

主要观察指标: 接触角, 表面形态, 表面元素分析。

设计、实施、评估者: 实验由第三作者设计, 由第一作者实施并进行资料收集, 由第四、五、六作者采用盲法进行评估。

2 结果

2.1 接触角检测 实验中氩气低温等离子体处理前后接触角分别为87.7°(图1)和65.1°(图2), 涂覆丝素蛋白后接触角为106.2°(图3), 二氧化硫低温等离子体处理后接触角为92.9°(图4)。

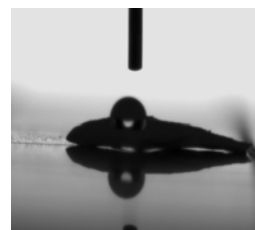


Figure 1 Contact angle prior to low temperature argon plasma treatment
图1 氩气低温等离子体处理前接触角



Figure 2 Contact angle following low temperature argon plasma treatment
图2 氩气低温等离子体处理后接触角

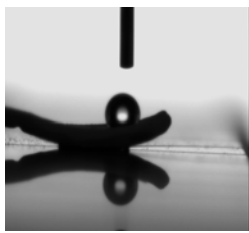


Figure 3 Contact angle following coating silk fibroin
图3 涂覆丝素蛋白后接触角

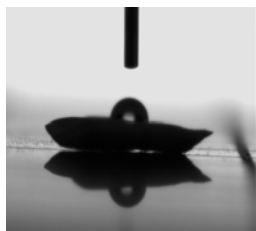


Figure 4 Contact angle following surface sulfonation combined with low temperature plasma treatment
图4 二氧化硫低温等离子体处理后接触角

2.2 表面形态观察 由图5可见, 与原始人工血管相比, 在处理人工血管内表面可见到一层膜, 此即为涂覆的并经二氧化硫等离子体磺酸化处理的丝素膜。

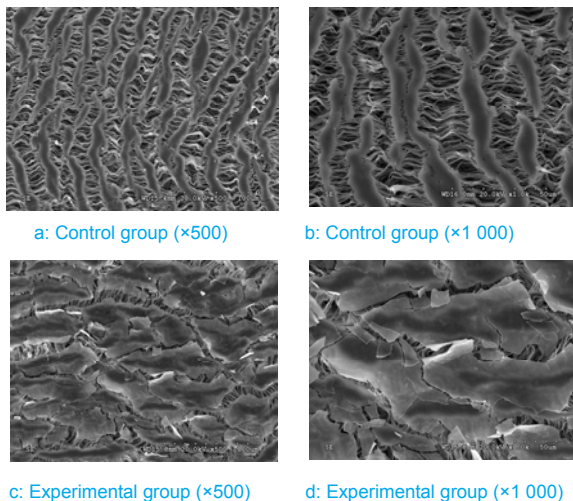


Figure 5 Surface morphology of blood vessel under scanning electron microscope
图5 扫描电镜观察血管表面形态

2.3 X射线光电子能谱分析 从表1中可以看出对照丝素膜表面仅有微量的硫元素(0.12%)存在, 经过二氧化硫等离子体处理后丝素表面的硫元素含量上升到2.89%。结果表明这种方法可以在丝素材料的表面接入含有硫元素的基团, 这些含硫基团可能是磺酸基团($-\text{SO}_3$), 也可能是其他基团如巯基($-\text{SH}$), 这两种S原子

的电子结合能有一定的差别, 利用软件对X射线光电子能谱图中的S2p峰作拟合处理, 所得的拟合曲线如图6所示。二氧化硫等离子体处理后丝素材料表面的S原子有两种键合方式, 结合能位于168.9 eV处的S原子是以磺酸基团($-\text{SO}_3\text{H}$)的形式存在, 而且含量较多, 而结合能位于164.1 eV处的S原子是二价S, 其存在形式是巯基($-\text{SH}$), 相对含量较少。

表1 各组样品表面元素含量
Table 1 Percents of element on the surfaces (%)

Group	C1s	O1s	N1s	S2p	F1s
Experimental	31.98	11.04	3.59	2.89	50.49
Control	31.37	3.01	1.37	0.12	63.07

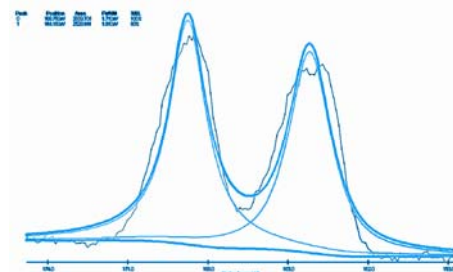


Figure 6 S2p spectrum of silk fibroin surface following surface sulfonation combined with low temperature plasma treatment
图6 二氧化硫等离子体处理后的丝素表面 S2p 光谱分析

3 讨论

对肝素抗凝作用机制的研究表明, 肝素类药物本身不具有直接的活性, 其抗凝作用在于肝素分子中的葡萄糖胺单元中含 $-\text{NH}-\text{SO}_3-$ 基团, 该基团可与抗凝血酶(antithrombin, AT-III)特异地结合, 从而使抗凝血酶的构型发生改变, 暴露出活性中心, 灭活血浆中的凝血因子IIa(凝血酶), IXa, Xa, XIa 和XIIa等丝氨酸蛋白酶类。研究已经证实在人工血管材料等生物医学装置的表面上进行磺酸化, 使材料表面具有和肝素分子一样的磺酸基团, 就能够使材料在血液中表现出和天然抗凝物质肝素类似的生物活性^[10-13]。

研究发现, 采用低温等离子体磺酸化技术将丝素蛋白膜用二氧化硫处理后, 可使丝素膜含有大量的磺酸基, 使其具有抗凝血活性, 同时不改变材料的体相和物理性质。但丝素成膜后柔韧性及抗牵拉伸展等性能较差, 如果将丝素蛋白涂覆于ePTFE人造血管表面, 并对涂覆后的丝素膜进行磺酸化处理, 不但解决了上述不良因素, 同时还显著改善了ePTFE人造血管的血液相容性^[14-17]。

由于ePTFE是惰性高分子, 其表面能比较低, 如果采用丝素蛋白直接涂覆, 黏附的稳定性较差, 若对

ePTFE人造血管首先进行等离子体预处理,降低ePTFE的表面自由能,再将丝素蛋白膜涂覆上去,就可以使涂覆的丝素蛋白膜有效黏附在ePTFE表面,解决血管内衬黏附的稳定性问题^[18-19]。如实验中所描述,氩气低温等离子体处理前后接触角分别为87.7°和65.1°,表明普通ePTFE血管经氩气低温等离子体处理后,血管表面接触角减小,血管亲水性增加,表面能增加,因此丝素蛋白易于涂覆ePTFE血管,且涂覆后稳定性较好。涂覆丝素蛋白后接触角为106.2°,疏水性增加,与丝素蛋白疏水性相关;涂覆丝素蛋白后的人工血管经二氧化硫低温等离子体处理后接触角为92.9°,较前减小,与二氧化硫低温等离子体处理时丝素膜表面自由能增加有关。尽管如此,经二氧化硫低温等离子体处理后的人工血管的接触角仍然大于普通ePTFE人工血管,即处理血管与普通血管相比,前者疏水性较好,这对于植入体内的人工血管来说无疑是增加了血管的抗黏附性能。

通过扫描电镜,在处理血管内表面见到一层涂覆的并经二氧化硫等离子体磺酸化处理的丝素膜。经X射线光电子能谱仪检测,普通血管的硫元素含量为0.12%,经过二氧化硫等离子体处理后丝素表面的硫元素含量上升到2.89%,有了较大提高,这与Gu等^[9]报道的从0.32%上升到4.03%的结果大致相同,因为本实验磺酸化处理的是管状血管的内表面,所以经二氧化硫等离子体处理后丝素表面的硫元素含量(2.89%)低于顾晋伟等实验中的4.03%。对X射线光电子能谱图中的S2p峰拟合处理后所得的拟合曲线显示了二氧化硫等离子体处理后丝素材料表面的S原子主要是以磺酸基团(-SO₃H)的形式存在。

因此通过本实验,找到了一种新的抗凝血人工血管的制备方法:采用低温等离子体的方法降低ePTFE人工血管的表面能,增加了涂覆的丝素蛋白膜的稳定性,同时利用低温等离子体磺酸化技术使涂覆于ePTFE人工血管内表面的丝素蛋白具备了抗血液凝固性质,成功制备出等离子体磺酸化丝素蛋白膜聚四氟乙烯复合小口径人工血管。虽然通过本实验方法制备的复合人工血管的抗凝血性能有待于检测,但有理由相信本实验中所运用的制备抗凝血血管的方法是具有可行性的。

4 参考文献

- [1] Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ Res*. 2006;98(1):25-35.
- [2] Hoenig MR, Campbell GR, Rolfe BE, et al. Tissue-engineered blood vessels: alternative to autologous grafts? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1128-1134.
- [3] Zhang K. Beijing: China Petrochemical Press. 1997:200-205. 张开. 高分子界面科学[M]. 北京:中国石化出版社,1997:200-205.

- [4] Chung YM, Jung MJ, Lee MW, et al. Surface modification effects on film growth with atmospheric Ar/Ar+O₂ plasma. *Surface and Coatings Technology*. 2003;175:1038-1042.
- [5] Chen JR. Beijing: Science Press. 2001:161-162. 陈杰容. 低温等离子体化学[M]. 北京:科学出版社,2001:161-162.
- [6] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24(3):401-416.
- [7] Santin M, Motta A, Freddi G, et al. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res*. 1999;46(3):382-389.
- [8] Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2005;26(2):147-155.
- [9] Gu JW, Yang XL, Zhu HS. Surface sulfonation of Silk Fibroin Film by plasma treatment and in vitro antithrombogenicity study. *Materials Science & Engineering. C*. 2002;20(2):199-202.
- [10] Ma X, Cao C, Zhu H. The biocompatibility of silk fibroin films containing sulfonated silk fibroin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;78(1):89-96.
- [11] Sun HX, Wang S, Zhu HS. Surface modification of blend films composed of silk fibroin and poly(ethylene glycol) macromer and their in vitro antithrombogenicity. *Gaofenzi Kexue: Yingwenban*. 2004;22(4):399-403.
- [12] Tamada Y. Sulfation of silk fibroin by chlorosulfonic acid and the anticoagulant activity. *Biomaterials*. 2004;25(3):377-383.
- [13] Stegemann JP, Kaszuba SN, Rowe SL. Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng*. 2007;13(11):2601-2613.
- [14] Feng GL, Wang S, Zhu HS. Gaojishu Tongxun. 2005;15(6):58-62. 冯桂龙,王松,朱鹤孙. 丝素改性胶原膜的低温等离子体改性及体外抗凝血性研究[J]. 高技术通讯, 2005,15(6):58-62.
- [15] Padamwar MN, Pawar AP. Silk sericin and its applications: A review. *J Scientific & Industrial Res*. 2004;63(4): 323-329.
- [16] Gao Z, Wang S, Zhu HS, et al. Improvements of anticoagulant activities of silk fibroin films with fucoidan. *Frontiers of Materials Science in China*. 2008;2(2):221-227.
- [17] Vepari C, Kaplan DL. Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci*. 2007;32(8-9):991-1007.
- [18] Chen JR, Yan JL, Zhang YZ. Surface modification of medical PVC by remote oxygen plasma. *Composite Interfaces*. 2004;11(2): 123-130.
- [19] Zhou WQ, Sun FL. *Huaxue Gongchengshi*. 2006;125(2):25-27. 周武庆,孙奉葵. 等离子体在PTFE表面改性方面的研究[J]. 化学工程师,2006,125(2):25-27.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 广东省医学科学技术研究基金 (WSTJJ20071104410303197905132512); 广东省科技计划项目(93025)。

利益冲突: 无利益冲突。

课题意义: 磺酸化的丝素蛋白膜因具有磺酸基团而具有抗凝血特性,但由于丝素成膜后柔韧性及抗拉伸性能较差,不易制备成血管并应用于临床,而将丝素膜涂覆于普通聚四氟乙烯人工血管内表面,即可制成可植入的抗凝血人工血管,提高人工血管的组织相容性,解决冠脉搭桥手术及其他血管旁路手术中小口径人工血管远期通畅率低的问题。

设计或课题的偏倚与不足: 实验样本量较小,同时实验中丝素膜涂覆的均匀性尚待进一步的提高。本文为方法学介绍,在以后的实验中要进一步完善抗凝血特性相关指标的检测及动物实验相关的指标检测,来进一步论证本方法在临床应用方面的可行性。

提供临床借鉴的价值: 如果通过本实验方法能够开发出新型的具有良好血液相容性的小口径人工血管材料,将解决临床中小口径人工血管远期通畅率较低的问题,同时,运用此技术还可以用来开发新型的不需抗凝或低强度抗凝的人工瓣膜以及体外循环、辅助循环管道等,无疑对整个心脏、血管外科领域的发展有巨大的促进作用。