

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.25.015 [http://www.crter.org]

高文卿, 李彤, 于美丽, 胡晓旻, 段大为, 许晋. 新型多醛基海藻酸钠-肝素复合涂层的制备和筛选[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(25):4668-4675.

新型多醛基海藻酸钠-肝素复合涂层的制备和筛选***◆

高文卿^{1,2}, 李彤¹, 于美丽³, 胡晓旻¹, 段大为¹, 许晋¹

1 天津市第三中心医院, 天津市 300170
2 天津医科大学研究生院, 天津市 300070
3 天津市人工细胞重点实验室, 天津市 300170

文章亮点:

1 为克服肝素单涂层管道抗蛋白黏附能力、生物相容性差的问题, 实验选择天然无毒、生物相容性好的海藻酸钠, 将其与肝素以共价交联方式固定到化学修饰后的聚氯乙烯管道表面, 充分发挥两种涂层物各自的生物特性。

2 以正交实验分别筛选单独两种涂层的最优条件, 再进行组合, 选取最优组合模式, 并进行生物相容性实验与抗凝血性能实验。

关键词:

生物材料; 组织工程复合支架材料; 海藻酸钠; 肝素; 复合涂层; 共价结合; 氧化; 重氮化; 生物相容性; 抗凝血性能; 省级基金

缩略语:

氧化海藻酸钠: Oxidated sodium alginate, OSA; 低分子肝素: low molecular nitrous acid-converted heparin, LMNH

摘要

背景: 前期实验证明多醛基海藻酸钠-肝素复合涂层具有良好生物相容性和血液相容性, 但对于最优制备条件和最优模式尚不清楚。

目的: 研制一种新型多醛基氧化海藻酸钠-肝素复合涂层, 筛选新型涂层制备的最佳条件。

方法: 以正交实验筛选氧化海藻酸钠(或肝素)最优涂层条件, 获得3种氧化海藻酸钠/肝素复合涂层模式, 将复合涂层通过共价交联的方式固定到氨基化预处理/化学修饰的聚氯乙烯管道表面, 从涂层物定量、蛋白黏附实验和表面接触角实验3个方面筛选最优复合涂层模式, 并检测最优复合涂层的抗凝血性能。

结果与结论: 氧化海藻酸钠涂层物最优涂层条件为50%浓硫酸、0.05%聚乙烯亚胺、反应溶液pH值3.5、反应温度为40℃和氧化海藻酸钠质量浓度为2g/L。肝素涂层物最优涂层条件为70%浓硫酸、0.1%聚乙烯亚胺、反应溶液pH值3.5、反应温度为30℃和肝素质量浓度为0.1g/L。复合涂层物最佳涂层模式氧化海藻酸钠、肝素涂层量分别为(4.07±1.35), (2.13±0.24) μg/cm², 此复合涂层具有良好的生物相容性及抗凝血性能。

Preparation and selection of a new sodium alginate-heparin composite coating with multi-aldehyde groups

Gao Wen-qing^{1,2}, Li Tong¹, Yu Mei-li³, Hu Xiao-min¹, Duan Da-wei¹, Xu Jin¹

1 The Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China
2 Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
3 Key Laboratory of Artificial Cells of Tianjin, Tianjin 300170, China

高文卿★, 男, 1981年生, 山西省朔州市人, 汉族, 2008年天津医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事心脏外科, 人工器官研究。

qw_1224@hotmail.com

通讯作者: 李彤, 博士, 主任医师, 天津市第三中心医院心脏中心, 天津市300170
litongtj@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344
(2013)25-04668-08

收稿日期: 2012-11-26

修回日期: 2012-12-08

(20121020004/GW·Y)

Gao Wen-qing★, Master,
Physician, the Third Central
Hospital of Tianjin, Tianjin
300170, China; Graduate
School of Tianjin Medical
University, Tianjin 300170,
China
qw_1224@hotmail.com

Corresponding author: Li Tong,
M.D., Chief physician, the Third
Central Hospital of Tianjin,
Tianjin 300170, China
litongtj@163.com

Supported by: Key Program of
Science and Technology Support
Plan of Tianjin, No.
11ZCGYSY02000*; General
Program of Science &
Technology Committee of
Tianjin, No. 09JCYBJC27600*

Received: 2012-11-26
Accepted: 2012-12-08

Abstract

BACKGROUND: Preliminary experiments have demonstrated that composite coating of sodium alginate and heparin with multi-aldehyde groups has excellent biocompatibility and hemocompatibility. However, little is known about the optimal condition and pattern of new coating preparation.

OBJECTIVE: To prepare a new composite coating of sodium alginate and heparin, and to optimize the coating preparation conditions.

METHODS: The optimal coating conditions of sodium alginate (or heparin) were screened by orthogonal experiment, to obtain three coating patterns of sodium alginate/heparin composite. Composite coating was covalently bonded on the polyvinyl chloride surface which was preprocessed by amination/chemical modification. The screening methods of optimal composite coating pattern included coating quantification, protein adhesion test and surface contact angle. Anticoagulation properties of optimum composite coating model were assessed.

RESULTS AND CONCLUSION: The optimum coating condition of oxidated sodium alginate in composite coating was 50% concentrated sulphuric acid, 0.05% polyethyleneimine, pH 3.5, reaction temperature 40 °C and 2 g/L oxidated sodium alginate. The optimum coating condition of heparin in composite coating was 70% concentrated sulphuric acid, 0.1% polyethyleneimine, pH 3.5, reaction temperature 30 °C and 0.1 g/L low molecular nitrous acid-converted heparin. The quantities of oxidated sodium alginate and heparin in optimum composite coating pattern were (4.07 ± 1.35) and (2.13 ± 0.24) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. And the composite coating possesses fine anticoagulant property and biocompatibility.

Key Words: biomaterials; tissue-engineered composite scaffolds; sodium alginate; heparin; composite coating; covalent bond; oxidation; diazotization; biocompatibility; anticoagulant property; provincial grants-supported paper

Gao WQ, Li T, Yu ML, Hu XM, Duan DW, Xu J. Preparation and selection of a new sodium alginate-heparin composite coating with multi-aldehyde groups. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(25): 4668-4675.

0 引言

医学技术的发展带动了生物医学材料的研究和应用, 生物医学材料应用面临生物相容性及血液相容性两大问题。涂层技术通过对材料表面的预改性改善生物医学材料表面的生物相容性和抗凝活性^[1], 减轻术后全身炎症反应^[2]。研究表明, 只要在某种程度上能抑制或阻止凝血因子的激活、血小板黏附与聚集、红细胞黏附和补体系统激活这4种凝血途径中的一种或几种凝血途径发生的材料都具有抗凝血性能。设计医用涂层材料的原则包括阻抗蛋白质吸附、减少血小板的黏附和聚集、抑制内源性凝血因子的活化、抑制血栓形成及促进材料伪内膜化等。

目前生物医学材料表面涂层原理可归纳为物理法和化学法^[3]。物理法即通过机械包埋、分子链之间的缠绕和渗透、被有孔材料吸附等方式将肝素固定到生物材料表面, 达到固定化的目的。化学法即通过涂层物分子链上丰富的反应性官能基团, 如磺酸基、氨基、羧基等与目标材料表面上相应的可反应基团进行反应, 以离子键或以共价键的方式将之固定到生物材料表面^[4-5]。

目前应用最广的是肝素涂层技术, 肝素属于酸性黏多糖, 它可以和生物体内的多种凝血抑制因子相互作用, 通过加速或提高这些抑制因子的抗凝活性来达到抗凝血的目的。其中肝素对抗凝血酶III的作用最重要^[5-7]。肝素抗凝效果优良, 但临床应用途径多为静脉注射, 出血及血小板减少等不良反应较大^[8], 且不能达到持续抗凝的目的。同时有研究表明肝素涂层生物相容性较差, 并且不能有效减少蛋白黏附, 且成本较高, 在一定程度上限制了肝素涂层的应用和推广^[9]。海藻酸钠属于聚阴离子大分子多糖, 天然无毒, 具有优良的生物相容性和一定的抗凝效果^[6, 10-11]。设计并制备肝素及海藻酸钠复合涂层能有效改善医学材料表面的生物相容性和血液相容性。同时海藻酸钠价格低廉, 容易获得, 已被广泛应用于医学材料和生物

工程方面^[12-13]。实验旨在研制一种新型多醛基海藻酸钠和肝素复合涂层, 筛选最优的涂层条件和涂层模式。

1 材料和方法

设计: 细胞水平体外观察实验。

时间及地点: 于2011年6月至2012年6月在天津市人工细胞重点实验室完成。

材料:

新型多醛基海藻酸钠-肝素复合涂层制备和筛选实验的主要试剂与仪器:

Main experimental reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
聚氯乙烯管道	东莞科威
海藻酸钠 A2158、高碘酸钠	美国 Sigma
氰基硼氢化钠	Fluka analytical
聚乙烯亚胺	Alorich
亚硝酸	美国 Sigma-Alorich
人血清白蛋白	CSL Behring GmbH
人纤维蛋白原	EMD Chemicals
肝素钠	安徽金鑫生物
红外分光光度计	Thermo, USA
紫外分光光度计	Hitachi, Japan

实验方法:

氧化海藻酸钠(oxidated sodium alginate, OSA)涂层物的制备^[14]: 将海藻酸钠2 g充分溶解于去离子水中, 加入高碘酸钠0.5 mol/L, 常温避光反应24 h, 后于反应液中加入乙二醇0.2 mL终止反应。反应液中加入NaCl 0.3 g, 混匀后缓慢倒入体积分数96%乙醇中, 析出的沉淀物经抽滤、干燥后再次溶于去离子水中, 3 500 u透析袋透析过夜后冷冻, 低温真空干燥后获得OSA粉末。

低分子肝素(low molecular nitrous acid-converted heparin, LMNH)涂层物的制备: 将肝素钠粉剂2 g充分溶解于去离子水中, 并加入亚硝酸钠20 mg, 在酸性环境下0℃反应2 h, 后调定溶液pH值至7.0以中止反应, 得到LMNH溶液。7 000 u透析袋透析过夜后冷冻, 利用低温真空干燥机进行干燥获得LMNH粉末。

涂层物的定性分析: 涂层后将聚氯乙烯管路充分干燥, 剪开管路暴露内表面, 红外扫描探头直接检测涂层管道表面功能基团。海藻酸钠及肝素粉末红外定性均采用溴化钾压片模式, 检测器DTGs KBr, 分束器KBr, 波长范围650-4 000 nm。

表面涂层物定量分析:

OSA固定密度的测定: 参照文献^[15]中苯酚-硫酸法

建立海藻酸钠浓度标准曲线。分别留取反应前后OSA溶液, 硫酸-苯酚法处理后利用紫外分光光度计测量480 nm处Abs值, 根据海藻酸钠标准曲线, 利用差值法计算等价于葡萄糖标准品的涂层密度。

$$\text{OSA 涂层密度}(\mu\text{g}/\text{cm}^2) = (\text{反应前浓度} - \text{反应后浓度}) \times 2/10$$

LMNH固定密度的测定: 参照文献^[16]中甲苯胺蓝定量方法建立肝素浓度标准曲线。待测涂层材料分别剪成10 cm²小碎片, 加入20 mL试管中备用; 试管内依次加入2.5 mL 0.02%的甲苯胺蓝溶液和2.5 mL PBS, 振荡混匀, 室温下反应50 min; 后抽取反应液, 利用紫外分光光度计测量630 nm处Abs值, 并根据标准曲线推算涂层密度。

$$\text{LMNH 涂层密度}(\mu\text{g}/\text{cm}^2) = \text{肝素测定浓度} \times 5 \text{ mL}/10 \text{ cm}^2$$

最优涂层条件筛选:

聚氯乙烯管道表面涂层方法: 见图1所示, 首先用H₂SO₄·K₂MnO₄溶液分别对聚氯乙烯管道进行酸化预处理, 在材料表面形成羧基(-COOH), 与强阳性聚乙烯亚胺的氨基(-NH₂)结合在材料表面构建大量以氨基为主的“空间臂”, 增加结合位点, 然后与重氮化处理后肝素末端的醛基(-CHO)或氧化海藻酸钠末端的醛基结合, 制成共价键结合涂层材料, 具体分如下3种模式。

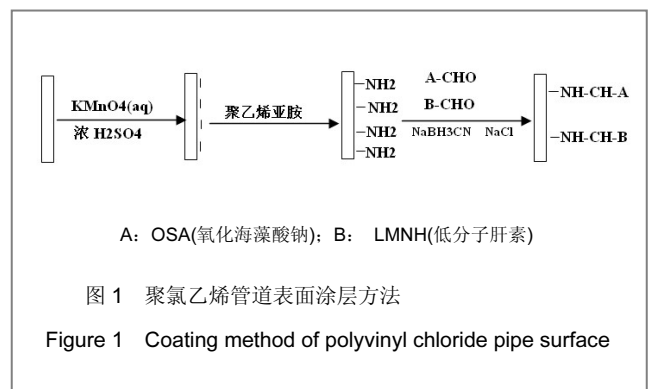


图1 聚氯乙烯管道表面涂层方法

Figure 1 Coating method of polyvinyl chloride pipe surface

OSA最优涂层条件筛选: 利用正交设计的方法, 将酸浓度、聚乙烯亚胺浓度、OSA溶液质量浓度、OSA溶液pH值和温度作为5种因素, 每种因素3个水平, 酸的浓度分别为40%, 50%和70%, 聚乙烯亚胺浓度分别为0.05%, 0.1%, 0.5%, OSA溶液质量浓度分别为0.1, 0.5, 2 g/L, pH值分别为3.5, 6, 9, 温度分别为30, 40, 50℃; 通过SPSS 17.0生成正交实验表; 按生成的正交表设计实验, 并重复3次, 采用硫酸-苯酚法定量涂层的密度, 并进行统计学分析, 筛选最佳涂层条件。

OSA最优涂层条件筛选正交实验设计:

编号	酸浓度 (%)	聚乙烯亚胺浓度 (%)	OSA 质量浓度 (g/L)	pH 值	温度 (°C)
1	50	0.10	0.5	6.0	30
2	50	0.05	2.0	3.5	50
3	40	0.10	2.0	3.5	40
4	70	0.50	2.0	9.0	30
5	40	0.05	0.1	3.5	30
6	40	0.05	0.5	9.0	30
7	70	0.05	0.5	3.5	50
8	40	0.50	0.1	6.0	50
9	40	0.50	0.5	3.5	40
10	50	0.50	0.1	3.5	30
11	70	0.05	0.1	6.0	40
12	50	0.05	0.1	9.0	40
13	40	0.05	2.0	6.0	30
14	70	0.10	0.1	3.5	30
15	40	0.05	0.1	3.5	30
16	40	0.10	0.1	9.0	50

LMNH最优涂层条件筛选: 同样利用正交设计的方法, 将酸的浓度、聚乙烯亚胺浓度、LMNH溶液质量浓度、LMNH溶液pH值和温度作为5种因素, 酸的浓度分别为40%, 50%和70%, 聚乙烯亚胺浓度分别为0.05%, 0.1%, 0.5%, LMNH溶液质量浓度分别为0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g/L, pH值分别为3.5, 6, 9, 温度分别为30, 40, 50 °C; 通过SPSS 17.0生成正交实验表; 按生成的正交表设计实验, 并重复3次, 采用硫酸-苯酚法定量涂层的密度, 并进行统计学分析, 筛选最佳涂层条件。

LMNH最优涂层条件筛选正交实验设计:

编号	酸浓度 (%)	聚乙烯亚胺浓度 (%)	LMNH (g/L)	pH 值	温度 (°C)
1	70	0.01	0.1	6.0	30
2	40	0.10	0.1	3.5	50
3	70	0.50	0.1	3.5	30
4	50	0.05	0.1	9.0	40
5	50	0.50	0.4	3.5	30
6	70	0.10	0.2	9.0	30
7	40	0.05	0.8	3.5	30
8	70	0.50	0.8	6.0	50
9	70	0.01	0.8	3.5	40
10	70	0.10	0.4	3.5	40
11	50	0.10	0.8	6.0	30
12	50	0.10	0.2	9.0	50
13	40	0.10	0.4	6.0	30
14	40	0.50	0.2	3.5	40
15	70	0.05	0.4	3.5	50
16	70	0.05	0.2	9.0	30

最佳复合涂层模式筛选: 结合OSA及LMNH单涂层最佳涂层条件, OSA/LMNH复合涂层模式具体分如下3种: OSA₁LMNH₁、OSA₁LMNH₂和LMNH₁OSA₂。用苯酚-硫酸法和甲苯胺蓝法对OSA和LMNH进行定量分析, 通过蛋白定量和表面接触角实验别对3种涂层模式聚氯乙烯管道进行生物相容性评价, 筛选最优涂层模式。

OSA₁LMNH₁涂层模式: 取最优浓度的OSA和LMNH各100 mL, 常温预混30 min, 加入1.75 g NaCl和20 mg NaBH₃CN充分混匀, 调节pH值为最优pH值, 将聚氯乙烯样管浸入反应液中, 最优温度振荡反应2 h。留取反应前后反应液进行OSA定量。反应结束后用蒸馏水冲洗聚氯乙烯样管3次, 待干燥后做LMNH定量分析。

OSA₁LMNH₁涂层模式: 先取最优浓度OSA溶液200 mL, 加入1.75 g NaCl和20 mg NaBH₃CN充分混匀, 调节pH值为最优pH值, 将聚氯乙烯样管浸入反应液中, 最优温度振荡反应2 h。用蒸馏水将第1次反应后样管冲洗3次, 然后加入到最优浓度LMNH反应液中, 最优温度反应2 h。留取第一次振荡反应前后液体, 苯酚-硫酸法定量OSA。留取第二次振荡反应后聚氯乙烯样管, 常温干燥后甲苯胺蓝法定量LMNH。

LMNH₁OSA₂涂层模式: 先取最优浓度LMNH溶液200 mL, 加入1.75 g NaCl和20 mg NaBH₃CN充分混匀, 调节pH值为最优pH值, 将聚氯乙烯样管浸入反应液中, 最优温度振荡反应2 h。用蒸馏水将第1次反应后样管冲洗3次, 然后加入到最优浓度OSA反应液中, 最优温度反应2 h。留取第1次振荡反应后聚氯乙烯样管, 常温干燥后甲苯胺蓝法定量LMNH。留取第2次振荡反应前后液体, 苯酚-硫酸法定量OSA。

聚氯乙烯涂层管道的生物相容性评价:

涂层表面亲水性实验: 微量进样器在干燥后样品表面滴加2 μL纯水, 用动态接触角测量仪记录接触角随时间的变化, 每个样品每次测量5个点, 每点计量10次取平均值。通过测定涂层前后材料表面接触角的变化, 来表征涂层的亲水特性。

涂层表面蛋白吸附实验: 依据文献[17]中BCA蛋白定量法及BCA试剂盒方法建立蛋白浓度标准曲线。将待测样品剪成0.5 cm×0.5 cm碎片, 加入24孔培养板; 配置0.2 g/L人血清白蛋白和人纤维蛋白原稀释液; 配置BCA工作液; 向放置待测样品的培养孔中, 分别加入1.5 mL人血清白蛋白和人纤维蛋白原稀释液, 将材料完全浸没, 放入恒温水箱中, 37 °C孵浴1 h; 将孵育后蛋白液全部取出, 加入离心管中振荡混匀后待测; 取100 μL待测蛋白液, 加入洁净的离心小管中, 同时加入

BCA工作液1 mL, 再次振荡混匀后, 60 °C恒温孵浴30 min; 利用紫外分光光度计测定孵浴后混合液在562 nm波长处Abs值, 根据标准曲线计算反应前后蛋白差值, 即为材料表面蛋白黏附量。

涂层表面血液凝固时间: 首先取健康志愿者新鲜全血20 mL, 3 000 r/min离心10 min, 离心半径13.5 cm, 获得贫血小板血浆, 测定凝血功能指标活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血酶原时间和纤维蛋白原; 然后分别取10 cm²最优复合涂层的材料和未涂层材料, 剪成约0.5 cm×0.5 cm碎片, 置于24孔培养板; 每个涂层样品孔中分别加入贫血小板血浆 700 μL, 37 °C恒温水箱孵育2 h; 抽取孵育后血浆, 加入离心管中振荡混匀30 s, 再次测定4项凝血指标, 计算每组样品凝血时间差值。

表面血栓形成: 将待测10 cm²最优复合涂层样品和未涂层材料(空白对照), 真空干燥后称量干质量 m_1 , 然后适当修剪加入12孔培养板中; 抽取新鲜未抗凝全血, 迅速加入至样品孔中, 浸没材料; 37 °C恒温孵育60 min后取出涂层样品, PBS冲洗3遍, 3%戊二醛固定, 梯度乙醇处理后真空干燥, 再次称量干质量样品 m_2 , 计算孵育前后样品干质量差值。

$$\text{涂层材料表面血栓黏附率}=(m_2-m_1)/m_1$$

主要观察指标: ①红外扫描对涂层管道表面的涂层物进行定性。②紫外分光光度计对管道表面涂层物进行定量。③表面接触角检测涂层管道的亲水活性。④蛋白黏附实验检测涂层管道的生物相容性。⑤凝血时间和血栓形成检测涂层管道的抗凝血性能。

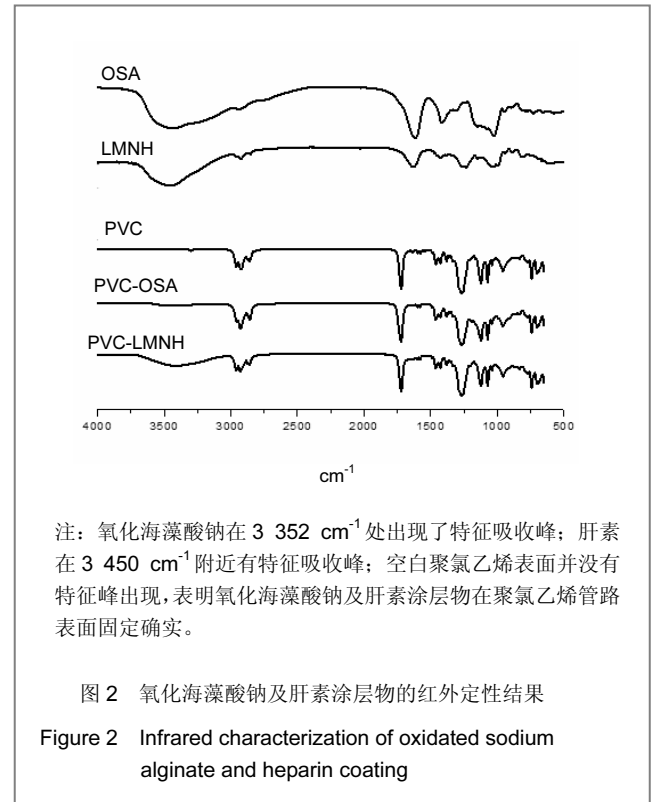
统计学分析: 所有定量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 所得数据利用SPSS 17.0软件进行统计分析, 用方差分析进行多组间比较, 两两比较利用SNK-*q*检验, 统计学差异检验标准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 聚氯乙烯管道表面OSA及LMNH涂层物的定性检测结果 红外谱图显示, OSA在3 352 cm⁻¹处出现了特征吸收峰; LMNH在3 450 cm⁻¹附近有特征吸收峰。空白聚氯乙烯表面并没有特征峰出现, 表明OSA及LMNH涂层物在聚氯乙烯管路表面固定确实, 见图2。

2.2 涂层物定量标准曲线 根据标准曲线建立方法, 得OSA定量标准曲线方程为 $y=12.955x-0.009 5$ ($R^2=0.994 2$, x : 4-100 mg/L)。LMNH定量标准曲线方

程 $y=-0.037 5x+2.078 2$ ($R^2=0.997 8$, x : 2-32 mg/L)。



2.3 OSA最优涂层条件 重复5因素3水平正交实验3次, 对应正交实验设计表格1-16编号OSA涂层密度分别为(49.19±17.03), (101.19±7.92), (28.63±11.85), (17.93±3.72), (16.97±3.33), (30.28±2.38), (27.20±6.09), (18.22±7.73), (16.72±5.34), (57.98±6.86), (4.84±1.99), (77.22±22.80), (5.90±2.59), (25.10±12.04), (19.17±9.38), (4.53±2.02) μg/cm²。根据分析结果筛选出最佳涂层条件为: 50%浓硫酸、0.05%聚乙烯亚胺、反应溶液pH值3.5、反应温度为40 °C和OSA质量浓度为2 g/L。

2.4 LMNH最优涂层条件 重复5因素多水平正交实验3次, 对应正交实验1-16编号LMNH涂层密度分别为(1.40±0.14), (1.26±0.22), (1.66±0.05), (1.11±0.19), (1.40±0.30), (1.61±0.03), (1.21±0.03), (1.12±0.04), (1.32±0.08), (1.54±0.19), (1.35±0.15), (1.03±0.12), (0.82±0.19), (1.24±0.14), (1.06±0.11), (1.27±0.15) μg/cm²。根据分析结果筛选出最佳涂层条件为70%的浓硫酸、0.1%聚乙烯亚胺、反应溶液pH值3.5、反应温度为30 °C和LMNH质量浓度为0.1 g/L。

2.5 复合涂层物最优涂层模式 表1结果表明, 与

OSA₁LMNH₂、LMNH₁OSA₂模式相比, OSA₁LMNH₁模式涂层物定量差异无显著性意义($P > 0.05$), 蛋白黏附量显著降低($P < 0.05$), 表面接触角显著减小($P < 0.05$)。所以OSA₁LMNH₁模式涂层物为最优涂层。

表 1 氧化海藻酸钠与肝素复合涂层组合的性能指标评价

Table 1 Property evaluation of composite coating ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	涂层量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		接触角($^\circ$)
	氧化海藻酸钠	肝素	
OSA ₁ LMNH ₁	4.07±1.35	2.13±0.24	37.67±4.00
OSA ₁ LMNH ₂	3.81±1.04	1.94±0.38	49.33±2.83
LMNH ₁ OSA ₂	3.80±1.02	2.10±0.65	57.85±2.27

组别	蛋白黏附($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		接触角($^\circ$)
	人血清白蛋白	人纤维蛋白质	
OSA ₁ LMNH ₁	35.53±6.29	35.53±6.29	37.67±4.00
OSA ₁ LMNH ₂	44.24±2.58	44.24±2.58	49.33±2.83
LMNH ₁ OSA ₂	45.08±3.41	45.08±3.41	57.85±2.27

注: 与 OSA₁LMNH₂、LMNH₁OSA₂ 模式相比, OSA₁LMNH₁ 模式涂层物定量差异无显著性意义($P > 0.05$), 蛋白黏附量显著降低($P < 0.05$), 表面接触角显著减小($P < 0.05$)。

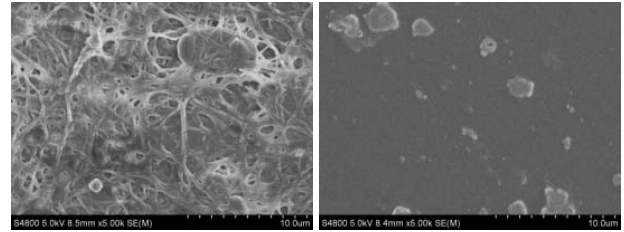
2.6 最优涂层模式抗凝血性能的评价 表2结果表明, OSA₁LMNH₁模式组与空白对照组相比, 活化部分凝血活酶时间及凝血酶时间显著延长($P < 0.05$), 血栓形成量显著减少($P < 0.05$)。图3扫描电镜结果同样表明, OSA₁LMNH₁涂层管道表面血栓形成量显著减少。

表 2 氧化海藻酸钠与肝素复合最优涂层模式抗凝血性能的评价

Table 2 Anticoagulation property of optimal coating pattern in two groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	实验组	空白对照组
活化部分凝血活酶时间(s)	57.68±3.12	36.72±0.58
凝血酶时间(s)	32.18±6.44	16.78±0.36
凝血酶原时间(s)	15.91±1.12	12.72±0.42
纤维蛋白原(s)	15.37±2.18	6.47±0.58
血栓黏附量(mg)	46.86±1.63	67.00±3.20
血栓黏附率(%)	4.95±0.17	7.08±0.34

注: 实验组为复合涂层物最佳涂层模式氧化海藻酸钠、肝素涂层量分别为(4.07±1.35)、(2.13±0.24) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的聚氯乙烯管道, 空白对照为未涂层聚氯乙烯管道; 与空白对照组相比, 实验组活化部分凝血活酶时间及凝血酶时间显著延长($P < 0.05$), 血栓形成量显著减少($P < 0.05$)。



A: 涂层前

B: 实验组

注: 实验组为复合涂层物最佳涂层模式氧化海藻酸钠、肝素涂层量分别为(4.07±1.35)、(2.13±0.24) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的聚氯乙烯管道; 涂层管道表面血栓形成量较涂层前显著减少。

图 3 聚氯乙烯管道涂层前后的表面血栓形成($\times 5\ 000$)

Figure 3 Thrombus formation before and after polyvinyl chloride pipe coating ($\times 5\ 000$)

3 讨论

肝素涂层应用最早也最广泛^[18-19], 很好地解决了医用高分子材料血液相容性差的问题^[13]。Gott等^[20]第1次通过离子键将肝素固定到生物医学材料表面。离子键固定肝素较物理吸附稳定, 能够维持肝素的天然构象, 最大限度优化抗凝效果。但离子键多层结合并不能很好地暴露抗凝血酶结合序列, 抗凝活性不能很好发挥, 加之肝素易被血液中其他阴离子组分置换或是由于离子键的断裂而快速释放, 使得生物材料表面很快失去抗凝活性, 不满足体外长时间转流的需要。Bioline Coating® (Jostra)通过共价键和离子键结合的方法将高分子量肝素Liquemin®与生物材料表面预固定的多肽涂层共聚结合, 与非涂层灌注系统相比延迟了接触激活, 降低了白细胞变性和凝血活性, 改善了血小板保护。AOTel®(Artificial organ technology)放弃了传统肝素固定中使用的聚酰胺和阳离子表面活性剂, 采用与自然内皮表面相似的蛋白多糖做粘连剂与低分子肝素共价偶联。Corline®(Corline Systems AB)是将大分子肝素缀合物通过特殊黏合剂共价结合到生物材料表面的多胺链上, 这种共价结合保证了固定肝素的五糖序列, 肝素的生物活性完整保存^[21]。Favia等^[22-23]通过射频辉光放电法及等离子体增强化学气相沉积法在聚乙烯表面引入羧基, 再通过“空间嫁接”剂二氨基乙烷及聚乙二醇固定肝素, 这种光化学固定方法操作复杂, 化学偶联剂使用较多, 有潜在毒性。Henry等^[24-25]利用超分子静电自组装原理, 通过静电引力的作用一次吸附相反电荷的聚电解质, 从而形成具有多种功能的超薄膜, 利用肝素

分子本身的阴离子和其他含阳离子的分子通过静电吸引作用在材料表面交替、自发的组装上肝素分子膜,使材料表面形成有序的肝素涂层。这种固定方法肝素分子空间有序性高,但稳定性还有待提高。Carmeda Bioactive Surface®(Medtronic Inc)涂层产品即利用特殊的终点固定法将末端修饰后的肝素固定到材料表面,肝素分子的功能活性部分可以从人工材料表面伸出与血液分子自由结合,很好地发挥抗凝活性^[4]。肝素单涂层管道抗蛋白黏附能力差^[26],生物相容性差的问题仍不能彻底解决,且肝素成本较高,一定程度上限制临床应用。海藻酸钠作为酸性多糖大分子,天然无毒、生物相容性好^[10,12],自身还具有一定的抗凝活性^[14]。目前有研究人员从海藻中提取硫酸化半乳糖和硫酸化岩藻聚糖^[27-29],研究表明海藻多糖显示出抗凝活性。实验选取肝素和海藻酸钠两种涂层物,旨在通过共价交联将其固定到化学修饰后的聚氯乙烯管道表面,充分发挥两种涂层物各自的生物特性。经表面酸化预处理及聚乙烯亚胺修饰后,体外循环用聚氯乙烯管道表面固定有大量活性氨基,重氮化作用及高碘酸氧化法使肝素及海藻酸钠分子末端暴露活性醛基,通过终点固定方式固定到预修饰管道表面。终点固定的多糖大分子空间构象好,与血液接触面积大。涂层技术同样重点关注3个问题:涂层物的固定与否、固定量以及固定涂层物生物活性保持。化学交联反应受多方面因素影响,如反应温度、反应液pH值、反应物浓度及反应时间等。

实验结果示,红外谱图扫描显示OSA及LMNH均固定确实,证实了重氮化处理及高碘酸氧化使OSA及LMNH分子活性醛基暴露,多醛基的OSA及LMNH与酸化及氨基化预修饰的聚氯乙烯管道进行了有效的共价交联。正交筛选结果表明,涂层物浓度、实验温度、反应液pH值对OSA及LMNH固定量均有显著影响,反应时间及3种涂层模式对涂层物固定量无显著影响。进一步的生物相容性实验证实,复合涂层物涂层模式对涂层表面的生物活性有显著影响,OSA₁LMNH₁模式表面接触角显著减小,表明预混模式亲水性更优。OSA₁LMNH₁模式与OSA₁LMNH₂、LMNH₁OSA₂模式相比,人血清白蛋白及人纤维蛋白原吸附量显著减少,具有更好的抗蛋白黏附性能,生物相容性更好,分析原因:OSA₁LMNH₂、LMNH₁OSA₂模式均经历了2次加热反应,一方面反复加热后OSA的表面活性可能受到了抑制,另一方面LMNH可能竞争性的与聚氯乙烯表面的氨基活性位点结合,从而使OSA的有效结合位点减少。OSA₁LMNH₁模式中,

OSA及LMNH两种涂层物提前预混,使二者达到均匀的空间缠绕,同时二者竞争性的与氨基化修饰的聚氯乙烯表面结合,结合位点均衡,同时反应加热只进行一次,OSA及LMNH各自的生物活性能得到最大程度的保持。最优涂层模式OSA₁LMNH₁随后进行了抗凝血指标检测,与空白对照组相比,最优涂层组活化部分凝血活酶时间及凝血酶时间显著延长,血栓形成量显著减少。活化部分凝血活酶时间及凝血酶时间反映内源性凝血系统,OSA₁LMNH₁涂层通过阻断内源性凝血系统使凝血时间显著延长。分析原因,OSA₁LMNH₁涂层良好抗凝血性能的获得可能与“肝素-AT-III”复合物的形成有关,“肝素-AT-III”复合物的形成使得AT-III上的抗凝活性位点-精氨酸反应中心被暴露出来。这种含有活性凝血酶控制中心的复合物可以与凝血酶IIa、Xa等结合,结合后形成三元复合物,阻断内源凝血瀑布级联反应,从而达到抗凝血的目的。整个过程中肝素只起催化作用,其抑制作用完成后从聚合物上脱离,催化下一个AT-III,AT-III与凝血酶的反应速度较慢,在肝素存在的情况下,反应速度会增加几千倍。海藻酸钠也具有一定的抗凝血性能,海藻酸钠可能也以“海藻酸钠-AT-III”形式发挥抗凝血功能。抗凝血实验结果一方面证明了LMNH和OSA固定确实,另一方面也证实了醛基化后的肝素和海藻酸钠抗凝活性得到了保持。

综上所述,新多醛基海藻酸钠-肝素复合涂层中涂层物固定确实,固定量与涂层条件呈显著相关,初步的性能测定实验证实最优涂层模式为OSA₁LMNH₁,OSA₁LMNH₁涂层物生物相容性及抗凝血性能优良。

致谢:感谢天津人工细胞重点实验室在实验过程中的帮助,感谢天津第三中心医院营养科和临床检验科在实验检测中提供的帮助。

基金资助:天津市科技支撑计划重点项目(11ZCGYSY02000);天津市科委一般项目(09JCYBJC27600)。

作者贡献:第一作者对发表研究的构思、设计和执行做出了贡献,并完成本论著,第一作者对文章负责;通讯作者指导论文构架、审校论文并提出了重要修改意见。

利益冲突:课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求:健康自愿者自愿捐献血液样本。

作者声明:文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他

人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Apostolakis EE, Koletsis EN, Baikoussis NG, et al. Strategies to prevent intraoperative lung injury during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Surg*. 2010;11(5):1.
- [2] Suzuki Y, Daitoku K, Minakawa M, et al. Poly-2-methoxyethylacrylate-coated bypass circuits reduce activation of coagulation system and inflammatory response in congenital cardiac surgery. *J Artif Organs*. 2008;11(3):111-116.
- [3] Bai SY, Zhu DM, Wang W. Zhongguo Tiwai Xunhuan Zazhi. 2009; 7(2):124-128.
柏淑颖, 朱德明, 王伟. 涂层技术在体外循环装置中的应用及意义[J]. 中国体外循环杂志, 2009, 7(2):124-128.
- [4] Larm O, Larsson R, Olsson P. A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. *Biomater Med Devices Artif Organs*. 1983; 11(2-3):161-234.
- [5] Andersson LO, Hoffman J, Holmer E, et al. Mechanisms of anticoagulant effects of some sulphated polysaccharides. *Thromb Res*. 1982; 28(6):741-748.
- [6] Bouhadir KH, Lee KY, Alsberg E, et al. Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnol Prog*. 2001;17(5):945-995.
- [7] Petitou M, Barzu T, Hérault JP, et al. A unique trisaccharide sequence in heparin mediates the early step of antithrombin III activation. *Glycobiology*. 1997;7(3):323-327.
- [8] Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, et al. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials*. 2005;26(35):7457-7470.
- [9] Gunaydin S. Clinical significance of coated extracorporeal circuits: a review of novel technologies. *Perfusion*. 2004; 19(1):33-41.
- [10] Nishino T, Yokoyama G, Dobashi K, et al. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr Res*. 1989; 186(1):119-148.
- [11] Manju S, Muraleedharan CV, Rajeev A, et al. Evaluation of alginate dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel as a biodegradable sealant for polyester vascular graft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;98(1):139-188.
- [12] Bron JL, Vonk LA, Smit TH, et al. Engineering alginate for intervertebral disc repair. *Mech Behav Biomed Mater*. 2011; 4(7):1196-1205.
- [13] Popa EG, Gomes ME, Reis RL. Cell delivery systems using alginate-carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. *Biomacromolecules*. 2011; 12(11):3952-3961.
- [14] Wang QH, Zhang YX, Li ZP, et al. *Yingyong Huaxue*. 2010;27(2):155-158.
王琴梅, 张亦霞, 李卓萍, 等. 多醛基海藻酸钠交联剂的制备及性能[J]. 应用化学, 2010, 27(2):155-158.
- [15] Smith PK, Mallia AK, Hermanson GT. Colorimetric Method for the Assay of Heparin content in immobilized heparin preparations. *Anal Biochem*. 1980;109(2):466-473.
- [16] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956; 28(3):350-356.
- [17] Ishihara K, Fukumoto K, Iwasaki Y, et al. Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 1. Surface characterization. *Biomaterials*. 1999; 20(17):1545-1551.
- [18] Islam T, Butler M, Sikkander SA, et al. Further evidence that periodate cleavage of heparin occurs primarily through the antithrombin binding site. *Carbohydr Res*. 2002;337(21):2239-2243.
- [19] Murugesan S, Xie J, Linhardt RJ. Immobilization of heparin: approaches and applications. *Curr Top Med Chem*. 2008;8(2):80-100.
- [20] GOTT VL, WHIFFEN JD, DUTTON RC. Heparin bonding on colloidal graphite surface. *Science*. 1963;142 (3597):1297-1298.
- [21] Larsson R, Larm O, Olsson P. The search for thromboresistance using immobilized heparin. *Ann NY Acad Sci*. 1987;516:102-107.
- [22] Favia P, Palumbo F, D'Agostino R, et al. Immobilization of heparin and highly-sulfated hyaluronic acid onto plasma-treated polyethylene. *Plasmas Polym*. 1998;3(2):77-96.
- [23] Favia P, Stendardo MV, d'Agostino R. Selective grafting of amine groups on polyethylene by means of NH₃-H₂ RF glow discharges. *Plasmas Polym*. 1996; 1(2):91-112.
- [24] Stryer L. *Biochemistry*. 4nd. New York: W H Freeman and Company, 1995:252-257.
- [25] Henry BL, Desai UR. Recent research developments in the direct inhibition of coagulation proteinases--inhibitors of the initiation phase. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008; 6(4):323-36.
- [26] Keuren JF, Wielders SJ, Willems GM, et al. Thrombogenicity of polysaccharide-coated surfaces. *Biomaterials*. 2003;24 (11):1917-1924.
- [27] Matsubara K, Matsuura YM, Baci A, et al. Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*. *Int J Biol Macromol*. 2001; 28(5):395-399.
- [28] Farias WRL, Valente AP, Pereira MS, et al. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. *J Biol Chem*. 2000; 275(38):29299-307.
- [29] Pereira MS, Mulloy B, Mourao PAS. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem*. 1999;274(12):7656-7667.