

抗凝血生物材料^{*}

何淑漫 周 健^{**}

(华南理工大学 化学与化工学院 广东省绿色化学产品技术重点实验室 广州 510640)

摘 要 本文对抗凝血材料的研究进展进行了综述,着重介绍了血栓形成及凝血机理、提高生物材料表面抗凝血性能的改性材料和改性技术、抗凝血材料的表征等几方面的内容;分析了当前抗凝血材料研究中存在的问题,并对今后从分子水平上设计新型抗凝血材料进行了展望。

关键词 抗凝血 生物材料 生物相容性 蛋白质吸附 分子模拟

中图分类号: TB34 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2010)04-0760-13

Anticoagulant Biomaterials

He Shuman Zhou Jian^{**}

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Provincial Key Lab for Green Chemical Product Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract In this paper, the research progress on anticoagulant materials is reviewed. The mechanism of blood clotting and thrombus formation, techniques to improve anticoagulant behavior of biomaterials, characterization methods for anticoagulant biomaterials are discussed. In addition, the problems in this field are analyzed and a perspective regarding the molecular design of novel anticoagulant biomaterials is made.

Key words anticoagulation; biomaterials; biocompatibility; protein adsorption; molecular simulation

Contents

- 1 Introduction
- 2 The formation mechanism and pathways of coagulation
- 3 The preparation of modified anticoagulant materials
 - 3.1 Physical and chemical modification of material surfaces
 - 3.2 Biological modification of material surfaces to form pseudointima
 - 3.3 Addition of bioactive materials
 - 3.4 Comparison of anticoagulant materials
- 4 The characterization of anticoagulant materials
 - 4.1 Infrared spectroscopy

- 4.2 Atomic force microscopy
- 4.3 X-ray photoelectron spectroscopy
- 4.4 Scanning electron microscopy
- 4.5 Surface plasmon resonance
- 4.6 Quartz crystal microbalance
- 4.7 Evaluation of characterization techniques
- 5 Conclusion and prospects

1 引言

生物材料是一类可用于动物器官和组织的修复与替换、疾病的诊断与治疗,与动物生物相容、具有特殊性能或功能的材料。抗凝血生物材料是生物材料的重要组成部分,被广泛应用于与人类血液和组织相接触的医用材料上,如血液透析系统、体外循环

收稿: 2009 年 5 月,收修改稿: 2009 年 7 月

* 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-07-0313)、国家自然科学基金项目(No. 20706019, 20876052)和华南理工大学中央高校基本科研业务费项目(No. 2009ZZ0070)资助

** Corresponding author e-mail: jianzhou@scut.edu.cn

系统、人工心脏瓣膜、心脏起搏器、人工血管、血管支架、外科手术线和导管等^[1-5]。以冠状动脉和外围心血管疾病为主的动脉粥样硬化心血管疾病,是世界上死亡率最高的疾病之一。2008年,仅在美国,用于心血管疾病的费用就高达4 485亿美元^[6]。抗凝血材料的市场非常庞大,并且以每年10%—20%的速率增长^[7]。

当外来物与血液接触时,会破坏血红细胞,使血小板活化、聚集,进而形成血栓。目前在临床方面,还没有一种人工医用生物材料能完美应用在人体内^[8]。当抗凝血生物材料与活体组织相接触时,要求材料不仅具有组织相容性,不会对生物体组织引起炎症,还应具有血液相容性,能够抗血栓,不会在材料的表面发生凝血现象^[9]。血液相容性是生物材料最重要的性能指标,抗凝血性能更是决定生物材料能否被应用的决定性因素^[10]。聚氨酯(polyurethane, PU)、聚砜(polysulfone, PSF)、聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)、聚醚砜(polyether sulfone, PES)^[8,11-14]等抗凝血材料因具有良好的力学性能、柔韧性和一定的生物相容性,应用较多,但是它们的抗凝血性能不够理想、不够持久,所以一般都作为基体材料。为了提高材料抗凝血性,需要对基体材料表面进行改性。目前,对材料表面改性的方法有很多种^[15],如改善表面的亲水性能、使表面带负电荷、表面接枝两性离子聚合物、设计微相分离结构、种植内皮细胞、表面肝素化以及表面固定尿激酶等生物大分子。其中,最有效的方法是在材料表面固定肝素、尿激酶、壳聚糖、前列腺素衍生物等生物活性分子^[16]。本文将从抗凝血材料的抗凝血机制、改性抗凝血材料的制备、抗凝血材料的表征及其生物相容性的评价等方面进行综述,并对提高材料的抗凝血性能的方法进行展望。

2 凝血机制和途径

当血液与外来生物材料接触时,血浆蛋白质会迅速吸附沉积在材料表面,形成蛋白质吸附层。蛋白质吸附层的种类、数量、取向等与材料的表面性质有关,且会影响到血小板和材料表面的相互作用。部分蛋白质会促进血小板的黏附,如纤维蛋白原、VWF、纤连蛋白以及玻连蛋白等,其中纤维蛋白原对血小板的黏附起决定作用。吸附在材料表面的蛋白质的变性和活化将启动内、外源凝血途径,同时血小板的黏附、活化和释放又进一步引起血小板的凝血反应,促使纤维蛋白原转化为纤维蛋白。不溶性

的纤维蛋白和血小板使血液凝固,形成血栓^[17]。另外,生物材料还可直接引起凝血因子活化和补体系统激活而导致血栓。生物材料与血液接触后的凝血过程如图1所示。

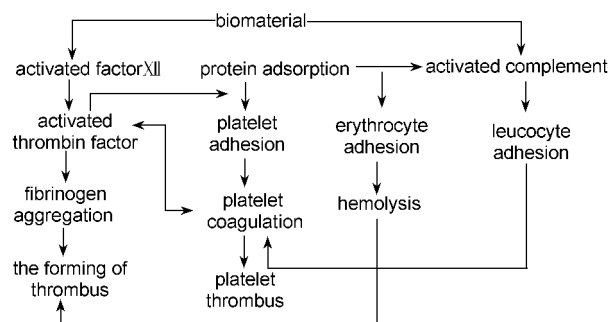


图1 凝血过程示意图^[18]

Fig. 1 The schematic illustration of thrombus^[18]

生物材料与血液接触导致凝血的过程可分为凝血因子激活、血小板黏附与聚集、红细胞黏附和补体系统激活4个途径^[18]。凝血因子XII激活途径是生物材料激活凝血因子,启动凝血形成血栓的过程。血液凝固存在两种不同的方式:内源性途径和外源性途径。当机体组织受损而释放组织因子时按照外源性途径进行,当血管内膜受损或血液接触异物时按内源性途径进行。血小板黏附与聚集途径是指被材料激活的血小板通过其自身的GP II b-III a受体与吸附的纤维蛋白原结合,引起血小板在吸附球蛋白和纤维蛋白原的材料表面黏附、聚集。血小板被激活后变得具有黏性并发生变形,从内部释放血小板因子、ADP等物质,激活内源性凝血系统,使更多的血小板变形、聚集,最终形成血栓导致凝血。在红细胞黏附途径中,红细胞在凝血过程中的作用还不十分清楚,但红细胞被破坏时发生细胞膜破裂,即出现溶血,红细胞释放的红细胞素(促凝血因子)和二磷酸酰苷(ADP)可以引起血小板的黏附、变形和聚集,从而导致凝血。人体补体系统由20多种血浆蛋白组成,C1—C9为9个主要的补体成分。补体系统激活途径是指补体组分在血液中通常以非活化的分子形式存在,当血液与外来物接触后,这些非活化的分子就会裂解成为具有生物活性的蛋白和多肽。生物材料激活补体系统后,吸附在材料表面的C3b能引起吞噬中性粒细胞黏附,这种白细胞黏附后释放血小板激活因子,引起血小板聚集形成血栓。同时,C5—C9的激活产物可以黏附于血小板上,并加大血小板的释放和聚集至血栓的形成。

如何抑制凝血的发生,提高生物材料的抗凝血

性能,这一课题引起了人们极大的关注。近年来,研究者们根据生物材料与血液接触后的凝血机制及途径,发现很多生物材料因能抑制凝血过程的某一途径或某几个途径的进行而具有良好的抗凝血性能。Baumann 等^[19]研究发现糖胺聚糖抑制凝血途径进行的方式有两种:一种是丝氨酸蛋白酶抑制剂(抗凝血酶有Ⅲ、肝素辅因子Ⅱ)与肝素、硫酸乙酰肝素以及硫酸皮肤素等糖胺聚糖形成 1:1 复合物,使活化凝血因子或蛋白水解酶(凝血酶等)失活;另一种是蛋白质 C 诱导血栓调节蛋白中的硫酸软骨素糖胺聚糖切割凝血因子 Va 和凝血因子Ⅷa 的不同连接位点,使凝血因子失活。总的来说,糖胺聚糖是通过抑制凝血因子激活这一途径来阻止凝血的发生。Bernacca 等^[20]用新鲜人体血液研究了各种改性聚氨酯表面上血小板(β -血小板球蛋白)的释放、补体(C3a)的激活、游离血浆及表面螯合因子Ⅻ的活化。研究表明,各种改性聚氨酯表面均能阻碍血小板黏附、凝血因子激活、补体系统激活等途径的进行,表现出良好的抗凝血性能。其中,抗凝血效果最好的是葡萄糖改性表面,其使各种凝血因子和补体失活的能力最强。Jo 等^[21]从海洋蠕虫(单环刺蠕虫)提取了一种新型抗凝血多肽(Urechis unicinctus anticoagulant peptide, UAP)。研究表明,UAP 能抑制凝血因子 FⅫa、FⅪa 以及引发内源性凝血途径的组分(FⅨa、FⅧa、FⅩ、 Ca^{2+} 、磷脂)的活性,使活化部分凝血活酶时间从(32.3 ± 0.9)s 延长至(59.0 ± 0.8)s,从而提高其抗凝血性能。

总的来说,只要在某种程度上能抑制或阻止凝血因子激活、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。虽然目前抗凝血材料无论是在理论上、还是在实验上的研究都取得了重大进展,但是就抗凝血材料的临床应用而言,这一难题至今还没有得到完美的解决。因此,以生物材料与血液接触之后的凝血与溶血机制为理论指导,设计相应的材料使其具有良好的抗凝血性能至关重要。设计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、溶解已形成的血栓、促进材料伪内膜化、仿生化等。以此设计原则为基准,通过各种技术对材料进行改性处理,可制备出一系列具有生物相容性的抗凝血材料。

3 改性抗凝血材料的制备

3.1 利用各种物理、化学方法对材料表面进行处理

抗凝血材料的血液相容性主要由材料表面性能(组分、结构、形态等)决定^[22]。材料表面性能会影响血液中白蛋白、纤维蛋白原、血小板等组分的黏附,进而引发凝血和血栓的形成。阻止血栓形成主要是在材料上形成血液相容性表面。目前普遍通过对材料进行表面改性来提高材料的血液相容性,包括改善表面的亲/疏水性能、电荷分布、微相分离结构等方法。

3.1.1 改善表面的亲/疏水性能

提高材料表面的亲水性,可以降低表面自由能。表面的亲水性及自由能与血液成分的吸附、变性等有密切联系。提高材料表面亲水性,使表面自由能降低到接近血管内膜的表面自由能值,可取得抗血栓性能^[23]。聚氧乙烯(PEO)由于其独特的高亲水性和高流动性,呈现出良好的生物惰性,可阻抗多种蛋白质和血细胞的黏附,是一种改善高分子材料血液相容性的理想材料^[24]。乙二醇聚合物(PEG、OEG)因具有高亲水性、柔韧性、无毒性及无免疫原性等特点,被广泛地应用于表面改性^[25]。PEG 因为在溶液中具有很高的链稳定性以及很大的排斥体积,能阻抗其他分子的影响^[26]。分子模拟能在分子水平上研究表面的蛋白质吸附,模拟结果是实验结果的补充。Jiang 及其同事^[27,28]通过分子模拟研究发现,PEG 的长链通过构象的弹性变化阻碍蛋白质吸附到材料表面。高表面密度和长链的 PEG 表现出较好的阻抗蛋白质吸附性能。OEG 链短,堆积密度厚,不易通过构象变化来阻抗蛋白质吸附。但是 OEG 通过氢键作用,其表面极易形成一层牢固结合的水屏障,并且当 OEG 表面密度适中时,水分子与 OEG 链之间的氢键越多,OEG 链的弹性越大,阻抗蛋白质吸附的能力越强。因此,很多研究者都用 PEG 作间隔臂连接其他具有抗凝血性能的生物活性大分子对材料表面改性。Salchert 等^[29]将苯甲酰胺衍生物以羧基-PEG 链为间隔臂共价接枝在马来酸酐共聚物表面,研究表明膜的厚度以及羧基的含量与共聚物的亲/疏水性及 PEG 的性质有关。苯甲酰胺对凝血酶的抑制作用与 PEG 的高亲水性、柔韧性和空间位阻效应相互协助,使得改性后的表面膜能高度结合凝血酶,使凝血酶失活,显示出极好的抗凝血效果。Chen 等^[26]在聚二甲基硅氧烷(polydimethyl siloxane, PDMS)表面先用 PEG 改性,再以 PEG 为间隔臂,在其链端上共价结合具有纤溶性和选择性黏结血浆中纤维蛋白溶酶原的 ϵ -赖氨酸。研究表明,这种改性表面的蛋白质移除率可达

94.3% ,表面血栓的溶解也可明显观察到。通过 PEG 减少蛋白质的吸附以及 ϵ -赖氨酸较好的纤溶性这两种途径能有效的防止血栓的形成。虽然 PEO、PEG 被广泛地用作抗凝血材料,但是 PEO 易溶解,暴露在空气中会分解,在表面的稳定性不够长久;在含有氧气和过渡金属的生理环境下,PEG 极易氧化而失去活性。

疏水性极强的材料界面自由能低,对血液成分的吸附能力下降而具有较好的血液相容性。聚四氟乙烯 (poly (tetrafluoroethylene), PTFE) 因其超疏水性而具有良好的血液相容性。Vandencastele 等^[30]研究了氧气等离子体技术改性 PTFE 表面的阻抗蛋白质吸附能力。研究发现,大功率氧气等离子体技术处理过的 PTFE 水接触角可高达 160° ,形成了超疏水性表面。这种超疏水表面增加了表面粗糙度,大大阻抗了蛋白质的吸附。因此,保持材料表面适当的亲/疏水平衡有利于提高抗凝血性能。

3.1.2 使表面带负电荷

血液中的红细胞、白细胞、血小板及部分血浆蛋白质等在血液环境中呈电负性,而血管内壁也带有负电荷。因此通常认为带负电性的血管内壁和负电性的血液组分的静电排斥作用是有利于抗凝血的。使抗凝血生物材料表面也带上负电,可以减少血栓的形成^[31]。带负电的磺酸基和硫酸基在肝素的抗凝血性能中发挥了重要的作用,含有磺酸基和羧基的物质具有类似肝素的抗凝血性能^[32,33]。因此可利用磺化、硫酸化等反应对聚合物材料进行改性来提高材料的亲水性、纤溶能力和抗凝血性。Barbucci 等^[34]研究了硫酸透明质酸的生物相容性,他们发现,硫酸基团通过与凝血酶的静电相互作用使凝血酶失活,带负电的硫酸基团通过静电排斥作用可阻抗带负电的血小板的吸附和聚集。硫酸透明质酸的抗凝血活性与硫酸化程度直接相关。硫酸基团越多,抗凝血性能越强。研究还发现,硫酸透明质酸衍生物与 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 形成的络合物,尤其是与 Cu^{2+} 形成的络合物,能促进内皮细胞的黏附和繁殖,从而提高材料的抗凝血性能。Ma 等^[35]通过磺化反应合成丝素蛋白 (silk fibroin, SF)/磺化丝素蛋白 (sulfonated silk fibroin, SSF) 的复合物,体外血液相容性和细胞繁殖实验表明, SF/SSF 复合膜抗凝血性能有了显著提高、血小板黏附减少、细胞相容性好。甲壳素和壳聚糖是无毒、可降解以及生物相容的天然聚合物。硫酸改性的甲壳素和壳聚糖的结构与天然抗凝血材料肝素的结构类似,它们既保持了原本

的物化性质和生化性质,又增加了新的抗凝血功能^[36],并且硫酸化程度越高,抗凝血性能越好^[37]。

3.1.3 设计微相分离结构

从宏观上看,生物体血管内壁是极其光滑的,微观上却是一个多相分离结构。粗糙度过高的材料容易引起凝血;相反,表面光洁的玻璃,凝血也很严重。具有一定粗糙度的微相分离结构的高分子材料可能具有比较好的血液相容性^[18]。微相分离结构的高分子生物材料由于具有某种特定形态的表面软链段富集,能优先吸附血浆蛋白中的白蛋白,白蛋白具有抑制血小板黏附的作用。聚氨酯表面具有微相分离结构,由多元醇形成的软链段和异氰酸酯形成的硬链段构成^[38]。聚氨酯硬链段疏水性较强,而软链段多为亲水性组分。当亲水性的软链段聚集在聚氨酯材料表面时,材料表面与血液相互作用减少,抗凝血性能提高。Yaseen 等^[39]比较了两种聚氨酯表面与亲水性硅氧烷表面的蛋白质吸附情况。一种是普通的 PU,另外一种添加了倍半硅氧烷的新型聚碳酸酯尿素氨酯 (PU4)。原子力显微镜图像表明,两种聚氨酯表面都具有微相分离结构,但是 PU4 的表面更加粗糙,突起部分为 PU 片段,凹陷部分为 PU-倍半硅氧烷硬链段,纤维蛋白原会选择性吸附在突起的 PU 片段上,使得其亲水性增强、抗凝血效果更好。因此,根据蛋白质在微相分离表面的结构和行为可以采取相应有效的手段来控制蛋白质在材料表面的吸附和黏附,从而提高材料表面的生物相容性。

3.1.4 接枝两性离子聚合物

两性离子聚合物表面含有两性离子基团或阴阳离子端基基团混合物。带电端基官能团的溶剂化作用和氢键作用能使两性离子聚合物表面形成水合层^[40],这种基于静电作用形成的水合层表面可有效阻抗非特异蛋白质吸附^[41]。在抗凝血材料表面接枝两性离子聚合物可大大提高材料的抗凝血性能。磷酸胆碱 (phosphorylcholine, PC) 是一类亲水的具有磷脂结构的化合物,其两性离子基团部分可以在表面形成水化层,有效降低材料表面蛋白质构象的变化,阻抗蛋白质的吸附。2-甲基丙烯酸氧乙基磷酸胆碱 (2-methacryloyloxyethyl phosphoryl-choline, MPC) 因其含有磷酸胆碱基团,与未添加抗凝剂的血液接触时,仍能抑制蛋白质的吸附和细胞的黏附。用 MPC 对传统生物材料表面改性可显著提高其生物相容性和抗血栓活性^[42]。Chen 等^[43]研究发现两性离子磷酸胆碱自组装膜 (PC-SAMs) 有很强的阻抗蛋白质吸附的能力,并且用实验和计算机模拟两种

方式来检测影响其无污染性质的因素。研究表明, PC-SAMs 表面的两性离子通过静电相互作用能形成水合层, 且具有平衡电荷和最小偶极矩的两性离子聚合物是极好的无污染材料和抗凝血材料。He 等^[44]采用计算机分子模拟的方法, 研究了蛋白质(溶菌酶)和 PC-SAMs 的相互作用。模拟结果显示, PC-SAMs 表面产生了一个紧密结合的水边界, 当蛋白质接近表面时, 水合层就产生一个很强的排斥力来阻抗蛋白质吸附, 从而使其具有抗凝血性能。Jiang 及其同事^[45-49]研究发现自由基聚合反应合成的聚合物表面增加了两性离子官能团密度、膜厚度及其软链段的位阻效应, 这种聚合物表面阻抗非特异蛋白质吸附的能力更强。通过原子转移自由基聚合反应(atom transfer radical polymerization, ATRP)在金表面合成聚磺酸甜菜碱甲基丙烯酸甲酯(sulfobetaine methacrylate, SBMA)和聚羧酸甜菜碱甲基丙烯酸甲酯(carboxybetaine methacrylate, CBMA)。结果表明, 这类两性离子聚合物表面都能高度阻抗蛋白质吸附, 纤维蛋白原的吸附显著下降。接枝了 PSBMA 或 PCBMA 的表面在浓度为 1mg/ml 的纤维蛋白原溶液中吸附的纤维蛋白原少于 0.3ng/cm², 显示出了极好的抗凝血性能。进一步研究发现^[50], 蛋白质吸附量是关于聚合物膜厚度的函数。利用 ATRP 合成不同厚度的 PSBMA, 当 PSBMA 的膜厚度很薄时, 短链聚合物不能形成足够的涂层来阻抗蛋白质吸附。当 PSBMA 膜厚度过厚时, 长的聚合物链可能会自我聚集, 削弱表面的水化作用, 导致蛋白质吸附增加。因此, 合适的聚合物膜厚度会使其阻抗非特异蛋白质吸附的效果最佳。由于 SBMA 和 CBMA 单体结构的不同, 在 SBMA 单体中, 阴、阳离子基团相隔 3 个碳原子, 而 CBMA 只相隔两个碳原子。CBMA 单体上阴阳离子官能团的近距离增强了这些官能团上水合层的相互作用, 形成了一个更加均匀和牢固的水合层。因此, PCBMA 的阻抗非特异蛋白质吸附能力比 PSBMA 更强, 抗凝血性能更好。另外, CBMA 中的羧基基团可结合其他生物活性物质, 来提高其复合性能。Cheng 等^[51, 52]研究了一种新型可控聚合物表面涂层, 含有 CB(羧酸甜菜碱)基团的带正电的聚合物, 其综合了两性离子聚合物表面的无污染性能和带正电材料抗菌的优点。带正电的 PCBMA-1 C2 能杀死 99.9% 的大肠杆菌(*E. coli* K12), 当其水解成两性离子聚合物 PCBMA 时会释放已死亡的细菌, 并保持 PCBMA 的无污染活性。黏附在材料表面的细菌的释放依赖于

带正电的 PCBMA-1 C2 向两性离子聚合物 PCBMA-1 的转化率。甜菜碱的水解速率受几个因素的影响, 如季铵盐与羧基间间隔臂的长度、水解官能团的性质、温度、pH 值等。通过调节合适水解速率, 这种新型的可控聚合物表面涂层将会在可移植医用设备中得到广泛的应用。由于从实验上很难测量某个溶质与水分子之间的相互作用, 而分子模拟能在分子水平上来描述溶质-水之间的相互作用及结构。Hower 等^[53]采用恒温恒压系综(NPT)的分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟来证实由偏摩尔体积估算水合能力这种方法的正确性。通过 CHARMM 能更好地检测到水合水分子的实际数目, 根据与溶质分子相互作用的水化分子的数量可大约了解溶质的水化能力。非特异蛋白质吸附可以通过表面涂覆一层既具有高度水合能力又有适当的表面弹性及堆积密度的涂层得到阻止。

3.2 形成伪内膜的材料表面生物修饰方法

伪内膜(pseudointima)表面是在材料与血液的界面上, 先沉积上纤维蛋白原、血细胞等, 形成一个很薄的血栓层, 继而成纤维细胞和内皮细胞在血栓层上生长, 形成伪内膜。在材料表面形成伪内膜的方法有多种, 如种植内皮细胞、涂布白蛋白层、导入磷脂基团等。这些物质都是人体的组成部分, 是天然的血液相容性材料。材料表面形成的伪内膜可显著改善血液与材料接触状况, 防止破坏血液成分, 是提高材料抗凝血性能最直接、最有效的方法。

3.2.1 种植内皮细胞

血管内皮细胞存在于血管的内表面, 形成了血液与组织之间的界面并调节血液-组织屏障。血管内皮细胞具有抗凝和促凝的双重功能, 内皮细胞通过分别释放或保留不同的血管活性因子来保持血液动态平衡^[54], 完整的血管内皮细胞层是维持血管表面不产生凝血的重要因素。含有细胞外基质蛋白的天然生物材料能使细胞在其上黏附和生长, 被植入体内后能促使内皮组织等再生组织的形成。如果抗凝血剂与这种天然生物材料混合后能一直保持良好的血液相容性至内皮组织形成, 那么这种形成内皮细胞的抗凝血材料就能获得长期、极好的血液相容性。尽管表面改性技术取得了很大的进步, 但完美的血液接触表面还是内皮细胞^[6]。在仿生条件下形成的内皮细胞能有效阻抗纤维蛋白原的沉积和血栓的形成^[55]。因此能在表面自发形成内皮细胞或是内皮细胞能在其上黏附和繁殖的材料具有完美的抗凝血性能。Lv 等^[6]研究发现, 丝素蛋白和肝素的

混合物能在 28d 内一直保持良好的生物相容性直至内皮细胞形成。形成内皮细胞后,该混合物具有极好的血液相容性,是一种新型的、有潜力的抗凝血材料。Avcı-Adalı 等^[61]认为直接将内皮细胞培植在人工合成表面是昂贵并且费时的,他们采取了一种新措施:聚合物表面涂覆能捕获血液中内皮细胞的分子后,如 RGD 肽链、环糊精(cyclodextrin, CD34)抗体、磁性分子及核酸适体等,与血液接触时能自发在合成材料表面形成内皮细胞。Lim 等^[55]利用微波诱导等离子体技术对聚氨酯表面改性来提高其血液相容性。等离子体改性的聚氨酯表面不仅适当增加了表面的粗糙度、降低了水接触角、提高了亲水性,还显著增加了人脐静脉内皮细胞的黏附、生长和繁殖,且细胞繁殖量随着等离子体处理时间及培养时间的增加而增加。Wetzel 等^[56]通过物理气相沉积技术在聚氨酯表面涂覆一层纯铂,用人脐静脉内皮细胞来研究材料表面细胞的黏附、繁殖、保存及形态。结果表明,铂改性聚氨酯的表面大大提高了人脐静脉内皮细胞的黏附和繁殖。

3.2.2 涂布白蛋白涂层

生物材料表面吸附的白蛋白(albumin, AL)具有抗凝血性能,蛋白质和细胞不会黏附在天然白蛋白改性的生物材料表面,将白蛋白共价结合在生物材料表面对凝血过程有重要的影响。白蛋白不仅能减少血小板的黏附和聚集,还可降低纤维蛋白原的吸附和血浆蛋白质的吸附。当生物材料表面的白蛋白比纤维蛋白原多很多时,这种材料表面几乎能完全抵抗血小板的黏附^[57]。在材料表面预先吸附一层蛋白质,这种饱和的材料表面就不会粘附和活化其他的蛋白质^[58]。因此,预先在生物材料表面涂覆一层白蛋白或用白蛋白改性材料表面可显著提高材料的抗凝血性能。Bayramoglu 等^[59]对肝素改性聚甲基丙烯酸羟乙酯(heparin-poly(hydroxyethyl methacrylate), pHEMA-HEP)及肝素改性聚甲基丙烯酸羟乙酯-白蛋白复合物(pHEMA-AL-3-HEP)的生物相容性进行了比较。研究表明,复合了白蛋白的 pHEMA-AL-3-HEP 的表面纤维蛋白原的吸附和血小板的黏附大大减少,抗凝血性能大大提高。这与白蛋白本身的抗血栓活性及白蛋白的添加增加了亲水性、减少了 HEMA 聚合物的链长有关。Sperling 等^[60]通过层层自组装技术在 PES 铝箔表面涂覆肝素和白蛋白的多层膜,该膜有效地减少了血小板的黏附/活化以及白细胞的黏附。另外,白蛋白/肝素多层膜能阻止补体激活凝血途径的活化,表现出极

好的抗凝血性能。Yamazoe 等^[61]利用天然白蛋白易溶于水、有效抵抗蛋白质的吸附和细胞黏附的特性,制备了一种不溶于水的白蛋白膜。该膜不仅有天然白蛋白抵抗蛋白质吸附的性能,还有一定的力学性能和柔韧性。细胞黏附实验表明,该膜表面没有细胞的黏附,能有效防止血栓的形成。

当生物材料与血液接触时,材料表面对白蛋白的吸附会受到纤维蛋白原和其他凝血因子的竞争吸附,使得吸附的白蛋白的量减少。因此预先在材料表面涂布一层白蛋白,形成血液相容性表面,能极大地降低纤维蛋白原和凝血因子等蛋白质的竞争吸附,从而显著提高抗凝血性能。

3.2.3 导入磷脂基团

MPC 的结构类似于细胞膜外壁,MPC 上的磷脂质极性基团能强烈吸附血液中磷脂分子,形成一层自组装仿生膜。磷脂基团能结合大量的水分子,在表面形成一层水合层阻止蛋白质和细胞的黏附^[42,62]。MPC 具有极好的生物相容性,与人体血液接触时能保持生物惰性、减少蛋白质吸附、抑制细菌黏附和细胞黏结^[63]。Kobayashi 等^[64]将 MPC 交联在嵌段聚氨酯上形成互穿聚合物网络结构的复合物,将其应用在心室辅助装置(ventricular assist devices, VAD)以提高生物相容性。研究表明,这种 VAD 连续工作两周后,仍能保持较好的力学性能和 MPC 的抗凝血性能。因此,MPC 改性嵌段聚氨酯表面形成的互穿聚合物网络表面可用于心脏病患者慢性循环治疗的血泵表面,起到抗凝血的效果。Seo 等^[65]通过膨胀-溶胀方法在 PDMS 表面上接枝 MPC 形成 ABA 型嵌段共聚物。静态接触角和 XPS 测量结果表明,PDMS 表面接枝 PDMS 后由疏水性表面变成亲水性表面,蛋白质吸附和细胞黏附显著下降,抗凝血性能大大提高。

3.3 引入生物活性物质

利用生物化学手段在材料表面固化某些能干扰血液与材料表面相互作用的生物活性物质,形成生物活性表面可改善抗凝血材料的生物相容性,提高其抗凝血性能。这类方法将能抑制血栓形成的生理活性物质(如肝素、水蛭素、前列腺素等)和溶解血栓的纤溶性活化酶(尿激酶)固定在材料表面,目前应用最广泛的方法之一是表面肝素化。

3.3.1 表面肝素化

肝素(heparin)是一种分子量在20 000左右、含硫量为9%—12.9%的天然硫酸多糖类化合物。肝素是目前应用最广泛的调节血栓的试剂^[66]。肝素

的抗凝血机制有多种^[67],目前普遍认为肝素的抗凝血机制与血液中的抗凝血酶Ⅲ(antithrombin Ⅲ, AT-Ⅲ)有关^[68]。肝素分子上的羧基和磺酸基是结合 AT-Ⅲ的重要官能团,并能维持 AT-Ⅲ的构象和活性^[69]。AT-Ⅲ可与许多凝血因子(如凝血酶、凝血酶原、因子Ⅸ-Ⅻ等)络合成很强的复合物,抑制凝血因子的活性,进而显示出良好的抗凝血性能^[70,71]。另一种观点认为,人体血液中还可能存在一种凝血酶抑制剂——肝素辅因子Ⅱ(heparin cofactor Ⅱ, HCⅡ), HCⅡ是一种不同于 AT 的糖蛋白,浓度虽只有 AT 的一半^[72],但也能阻止凝血因子的激活,具有抗凝血性能。

肝素的抗凝血活性是基于抗凝血酶(antithrombin, AT)对血液凝结途径中的丝氨酸蛋白酶具有抑制活性,其抗凝血机制是抗凝血酶构象的变化。Verli 等^[73]用 MD 来定量研究肝素中五糖化合物与 AT 之间的相互作用。模拟发现五糖化合物具有诱导 AT 构象变化的用途。因此,MD 模拟是一个理解抗凝血材料作用机制以及促进辅助新型抗凝血剂设计的一个强大工具。Adachi 等^[74]从分子水平上解释了肝素阻抗血小板黏附的机理。血小板黏附是由 von Willebrand factor (VWF)黏结血小板糖蛋白Ⅰb(GPIb)引起的。他们从分子水平上发现,肝素通过与 VWF 上原本联结 GPIb 的位点直接快速的结合,抑制了 VWF-GPIb 之间的相互作用,因此降低了血小板的黏附。由于肝素能与 VWF 结合,从而减少了 VWF 与血小板的黏附。但是,当血液中血小板不能正常黏附时,就会出现出血现象。

Thorslund 等^[75]在 PDMS 表面用肝素改性。这种改性表面是在中性、合适的闭合微系统中,用一种简单而又快速的一步溶剂法合成的。研究发现,改性 PDMS 表面的肝素均匀、稳定,较之未改性 PDMS 表面,在相同条件下,其复钙化时间延长 1h,且没有纤维蛋白的黏附,显示出极好的抗凝血性能。Klement 等^[76-78]报道,抗凝血酶(AT)和肝素的共价复合物(ATH)对凝血酶和因子 Xa 显示出超强的抗凝血活性。ATH 较之天然肝素优点更多,它在材料表面的接枝密度增加,能降低血浆蛋白质的堆积和凝聚、组织纤维蛋白的形成,加快了结合凝血酶及抑制因子 Xa 活性的速率、增加心血管设备应用时与血液表面的抗凝血活性,并且 ATH 不受结合在肝素上的其他蛋白质的影响。相对于有效期只有 8d 的未改性的导管,涂覆 ATH 的导管使用期高达 106d。肝素分为天然肝素和低分子量肝素两种。由于天然

肝素有引起出血、血小板减少等缺陷,近年来低分子量肝素在临床上得到了应用^[79,80]。Rhodes 等^[81]比较了低分子量肝素、天然肝素、口服华法林三者之间的抗凝血效果。结果表明,天然肝素、口服华法林都会引起高出血率,还需要频繁检测和调整试剂的用量。而一天注射一次低分子量肝素的效果并不比天然肝素差,甚至更好;注射后其药效可以预测,并且用量与肾清除率无关,无需反复进行检测和调整试剂用量;减少了形成血栓栓塞的危险而没有增加出血的危险。

3.3.2 表面固定尿激酶

尿激酶是一种作溶栓剂的生理性蛋白质,是血纤维蛋白溶酶原活化剂,可用来治疗外周血管内血栓、肺栓塞、心肌梗塞^[82,83]。溶栓剂发展可分为 3 个阶段:尿激酶为第一代,促尿激酶和血纤维蛋白溶酶原活化剂及其复合物为第二代,血纤维蛋白溶酶原活化剂的衍生物以及以血栓为靶向的溶栓剂为第三代。但尿激酶具有出血、血小板重新聚集等缺陷,Zhang 等^[82]发现在尿激酶中混合抗血小板试剂后,可有效地解决这一问题。他们合成了一种复合了能阻抗血小板聚集的抗栓肽(decorsin)、单链尿激酶(ScuPA-33K)^[84]以及能抑制血栓的 C-末端水蛭素的新型血纤维蛋白溶酶原活化剂—dscuPA33khC。这种新型纤溶活化酶不仅具有很高的血小板-靶向溶栓活性,还有抗血栓功能,大大提高了其抗凝血性能。Ding 等^[85]合成了一种由膜融合蛋白 B1(Annexin B1)、低分子单链尿激酶(ScuPA-32K)及纤维黏附肽(fibrin-adherent peptide)组成的新型溶栓剂—AnxB1ScuPAFap。膜融合蛋白 B1 有很强的抗凝血活性和血小板亲和力;低分子单链尿激酶具有促尿激酶的氨基酸,保持了尿激酶的纤溶能力;纤维黏附肽能阻止纤维单体的聚合和纤溶潜力。体外和体内实验表明,该新型溶栓剂具有双重溶栓、增加血管再灌注、减少血液流失以及抑制凝血因子 Xa 活化的功能。尿激酶虽然能溶解血栓,但是并不能防止血栓的形成,只在血栓形成后才发挥作用,可通过与其他抗凝血材料复合发挥抗栓-溶栓的双重功效。

目前,国内外研究者还发现很多其他具有抗凝血性能的材料。Mao 等^[86]从可再生海洋绿藻-礁膜中提取两种硫酸化多糖聚合物类肝素物质:WF1 和 WF3。研究发现,它们含有多种硫酸化半乳糖和硫酸化脱氧半乳糖,从而具有很高的抗凝血性。WF3 的抗凝血性较 WF1 高,它们抗凝血活性不同

不仅是因为分子大小的不同,还与硫酸根浓度、硫酸化位置以及与鼠李糖残基的结合方式等密切相关。Matsusaki 等^[16]研究发现人血栓调节蛋白(human thrombomodulin, hTM)是与内皮细胞相关的蛋白质,能够将凝血酶从促凝血蛋白酶转化为抗凝血蛋白酶,显示出超强的天然抗凝血性能。与凝血酶结合的 hTM 能使蛋白 C 的活性增大 1 000—2 000 倍,活化的蛋白 C 可抑制凝血因子 V a 和 VIII a、抑制血小板受体的活性,进而降低血小板聚集和纤维蛋白聚集,阻抗凝血的发生。将 hTM 物理吸附到 PSF 上,不仅能保持 hTM 的天然构象以及蛋白 C 的催化活性,并且能保持其超强的抗凝血性能,抑制血栓的形成。硫酸皮肤素能催化肝素辅因子 II (heparin cofactor II) 对凝血酶 T 的抑制,从而显示出良好的抗血栓活性。硫酸皮肤素的这种性能对动脉和静脉血栓有很好的预防、治疗效果和低出血率^[72]。Alberto 等^[87]研究发现,由过氧基解聚反应得到的低分子量硫酸皮肤素在增加纤溶活性的同时,还延长了凝血酶的凝固时间。低分子量硫酸皮肤素在防止血栓形成和溶栓方面不仅有着与硫酸皮肤素一样的效果,对经典的引起凝血的补体激活途径也有很强的抑制作用。口服抗凝剂方面, Spyropoulos^[88]介绍了几种新型口服抗凝血剂,它们分别是因子 Xa 抑制剂,如 rivaroxaban、apixaban、YM-150、DU-176B;凝血酶抑制剂,如 debigatran。这些新型口服抗凝血剂克服了传统口服抗凝血剂(天然肝素、华法林等)需要反复检测、药物与食物相互作用复杂的内在缺陷。

3.4 改性抗凝血材料的比较

目前,广泛用于表面改性的抗凝血材料是肝素、PEG、磷酸胆碱以及两性离子聚合物。肝素涂覆在生物材料的表面技术已经商业化,肝素是用来抗凝血的较经典的材料,但是肝素价格昂贵、出血率高且缺乏长期的稳定性。共价结合到材料表面的肝素构象易变性,失去生物活性,抗凝血效果不持久。PEG 改性材料因具有极好的亲水性,可有效地阻抗非特异性蛋白质吸附,且价格便宜、易合成。亲水性表面虽然能减少蛋白质吸附,但是并不能保证能阻抗细胞、细菌或其他微生物的黏附,且 PEG 在生理环境中氧气和过渡金属离子存在的情况下,极易氧化失活。MPC 作为细胞膜的组分,具有天然的抗凝血性能。但是 MPC 易水解,极不易合成和处理。两性离子聚合物如聚 SBMA、聚 CBMA 等,不仅能有效地阻抗非特异性蛋白质吸附,还可以通过原子转移自由基聚合反应快速方便地合成和处理,因此在近几年得到

了广泛的研究和应用。

4 抗凝血生物材料的表征

抗凝血生物材料的抗凝血性能是由材料的表面化学性质决定的,其表面化学组成和结构最重要。近年来发展较快、较准确的,用于表征抗凝血生物材料表面化学组成和结构的表面分析技术有以下几种^[89]。

4.1 红外光谱法(IR)

用红外光照射样品分子,引起分子中振动能级的跃迁所测得的吸收光谱称为红外吸收光谱,其原理是所有的化合物都有其特定的红外吸收光谱,根据红外吸收曲线的吸收峰的位置、强度以及形状可以判断化合物中是否存在某些官能团。近几年,具有高稳定性、低噪声、高灵敏度探测器以及宽频率范围的衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)等的相继出现,使得该项技术成功地应用于抗凝血材料表面的研究,它是抗凝血材料表面研究中最常规也是最简便的分析方法。Kung 等^[90]研究 PSF 接枝 PAA 的表面(PSF-AA)共价结合共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, CLA)后对凝血系统的影响,运用 ATR-FTIR 技术来确定共轭油酸是否已经共价接枝到 PSF 表面。从 FTIR 谱图中可以观察到 $3\ 385\text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 674\text{cm}^{-1}$ 处有很强而宽的特征峰,证明了羧基的存在,也即说明 CLA 已经成功共价结合到 PSF 表面。改性后的 CLA-PSF 膜与未改性的 PSF 膜相比,具有稳定、凝血时间长、血浆蛋白质的吸附少等特点,极大地提高了材料表面抗凝血性能。

4.2 原子力显微镜法(AFM)

原子力显微镜的原理是由于被测物表面原子与扫描探针针尖上原子之间存在及其微弱的原子间力,通过控制原子间力恒定的工作模式,扫描得到表面的原子结构。Michanetzi 等^[91]利用 AFM 技术比较了两种简单的肝素化技术(间接法和直接法)改性聚乙烯材料后的抗凝血效果。研究发现,间接肝素化材料表面呈现树突状形态且涂层分布均匀,直接肝素化材料表面为点状形态且涂层分布不均匀,而均匀的肝素化材料显示出良好的血液相容性。AFM 分析结果表明,肝素层的形态对肝素化材料的血液相容性起着重要的作用。AFM 能清楚地解释肝素的形态和黏附力是如何影响肝素分子的生物性能以及血液接触时的抗凝血性能的。Chuang 等^[92]利用 AFM 技术,比较了两种表面交联剂六亚甲基二异氰酸酯(hexamethylene diisocyanate,

HMDI) 以及 3-氨基丙基-三乙氧硅烷 (3-aminopropyl-triethoxysilane, APTS) 活化的 316L 不锈钢表面的形态结构变化对冠状动脉支架固定抗凝血剂的影响。从 AFM 的三维图像可以看出, HMDI-316L 表面比 APTS-316L 更光滑。冠状动脉支架光滑的表面能减小熵以及支架与血液之间的接触面积, 可使黏附的蛋白质最少, 从而获得良好的血液相容性。

4.3 X 射线光电子能谱法 (XPS)

XPS 的原理是当单色光照射生物材料时, X 光子与被测生物材料表面原子内层的电子相互作用, 并传递能量给电子, 当电子有了足够的能量, 便从表面逸出, 这些光电子带有生物材料表面的信息, 所得 XPS 谱图可进行单个物相的鉴定。Gouzy 等^[93]在聚十八烷-*alt*-马来酸酐表面以 PEG 为间隔臂共价结合苯甲脒衍生物, 该苯甲脒衍生物是一种凝血酶抑制剂 (thrombin inhibitor, TI)。这种材料能减少蛋白质的吸附, 降低凝血、抑制血小板以及补体系统的活化。他们利用 XPS 测量改性前后的材料表面 C_{1s} 、 O_{1s} 、 N_{1s} 、 Si_{2p} 4 种元素的含量变化以及 TI 的表面厚度证实了该 TI 已经共价结合到聚合物的最外层界面上。分析结果表明, 随着 N_{1s} 含量的增加, 吸附的蛋白减少, 纤维蛋白以及血细胞的黏附也减少。Thierry 等^[94]利用 XPS 技术检测到 NiTi 合金表面是否成功共价结合以聚乙烯醇为间隔臂的透明质酸。根据 XPS 谱图中 C_{1s} 峰面积的增大以及 C-O 表面浓度的增加, 证明透明质酸已经固定到表面。透明质酸改性 NiTi 合金表面与未改性的合金表面相比能显著减少 62% 血小板的黏附, 从而大大提高其血液相容性。

4.4 扫描电子显微镜法 (SEM)

SEM 是以非常细的电子束作为照明源, 以光栅状扫描方式照射到被测物表面, 然后把激发出的表面信号加以处理放大。其特点是可以对表面形貌进行立体观察和分析, 放大倍数连续可变, 能实时跟踪观察。众所周知, 当材料与血液接触后, 血小板会黏附在“异物”的表面, 最终会变形、伸出伪足, 这样直接导致血液在材料表面的凝固。根据这一特点, 研究抗凝血生物材料的工作者需要对与血液接触后的生物材料表面吸附血小板的数目及形态变化有定性和定量的认识, 而 SEM 是最便捷的一种。Barbucci 等^[95]研究了一系列聚合物以及改性后材料表面的血小板黏附和活化情况。用 SEM 检测不同材料表面形态以及与血液接触后的血小板黏附情况。从实验所得的 SEM 图像可以看出, 硫酸化透明质酸改性

和肝素化改性的聚氨酯-聚酰胺材料表面因能有效地阻止纤维蛋白原构象变化, 其黏附的血小板数量极少或没有, 从而可证明这种材料具有极好的抗凝血性能。Gouzy 等^[93]用 SEM 观察以 PEG 为间隔臂共价结合苯甲脒衍生物的改性聚十八烷-*alt*-马来酸酐表面的血细胞黏附、形态变化以及纤维蛋白的形成情况。由 SEM 图像可知, 以 PEG 为间隔臂共价结合苯甲脒衍生物的改性聚十八烷-*alt*-马来酸酐表面相较于未改性的聚十八烷-*alt*-马来酸酐表面黏附的血小板极少, 黏附的血小板没有形成伪足和白细胞, 吸附的纤维蛋白明显减少。SEM 结果表明, 改性后的表面大大提高了材料的抗凝血性能。

4.5 表面等离子波共振法 (SPR)

表面等离子波共振技术利用了金属薄膜的光学耦合产生的一种物理光学现象。当一束平面单色偏振光在一定的角度范围内照射到镀在玻璃表面的金属银和金的薄膜上发生全反射时, 当入射光的波向量与金属表面等离子波的振荡频率相匹配时, 光线即被耦合进入金属膜, 引起电子发生共振, 即表面等离子波共振。在基于 SPR 原理的生物传感器中, 使用最多、应用范围最广的是 Pharmacia 公司生产的 BIAcore 仪器, 并由此发展出生物分子相互作用分析技术 (biomolecular interaction analysis, BIA)。在 BIA 测定中, 待测的一对分子中的一个被固定在传感片的表面, 另一种分子的溶液流过表面。如果两者有相互作用而结合, 将使传感片表面结合的物质质量发生变化, 导致传感片表面折射率的变化, 从而引起 SPR 角度的变化, 可以通过检测这一变化监测分子间相互作用^[96]。Zhang 等^[52]利用 SPR 传感器实时检测了带正电聚羧酸甜菜碱酯水解成两性离子聚合物前后表面的纤维蛋白原吸附情况。根据波长变化来检测表面吸附的纤维蛋白原浓度 (单位面积的质量) 的变化, 从而可知表面纤维蛋白原吸附情况。SPR 结果表明, 接枝带正电的聚合物表面吸附大量的纤维蛋白原, 而接枝水解成两性离子聚合物后的表面能显著阻抗蛋白质吸附, 成为无污染表面。

4.6 石英晶体微天平法 (QCM)

QCM 技术是根据压电效应发展起来的, 能够同时实时检测界面上有关高分子的质量和结构变化。QCM 主要由石英晶体、振荡电路、频率计数器和数据处理 4 部分组成。石英表面的吸附层将导致共振频率的移动, 通过测量振动频率的移动就可以确定吸附分子的质量^[97, 98]。传统的 QCM 只提供与质量变化 (频率) 相关的信息, 应用领域仍然十分有限。

1996年,Rodahl等^[99]根据石英晶体表面薄膜的频率和耗散因子(dissipation factor)的变化,制成了QCM-D。QCM和QCM-D适用于真空和液态环境,因此能检测到聚合物表面的蛋白质吸附情况。Bodin等^[100]利用QCM-D技术研究了用木糖葡聚糖-RGD(XG-RGD)复合物修饰改性纤维素后表面的蛋白质吸附和细胞黏附及增殖情况。QCM-D结果表明,这种改性方法因增强了纤维素表面的湿度和亲水性,从而使得表面黏附蛋白质的减少甚至没有蛋白质吸附。QCM-D研究还进一步表明了XG-RGD改性纤维素表面发生细胞的黏附和增殖是由于XG上存在的RGD的作用,而不是由于细胞培养液中的纤维黏连蛋白的非特异性吸附。Hovgaard等^[101]通过QCM-D技术研究了光滑的和微观粗糙的钽氧化物表面的纤维黏连蛋白吸附,并着重研究吸附过程中纤维黏连蛋白的构象变化和表面蛋白质层的黏弹性。QCM-D结果表明,微观粗糙的表面能增加饱和纤维黏连蛋白层的硬度,并会显著改变饱和纤维黏连蛋白的吸附量,其表面质量浓度的增加量比表面积的增加量要低。

4.7 抗凝血生物材料表征方法的评价

ATR-FTIR和XPS是使用最广泛的检测生物材料表面化学结构的光谱技术。光谱技术的表面特异性是一个在正确解释结果时非常重要的因素。ATR-FTIR不是完全的表面特异性分析技术,其信号来自表面以及基体,只适用于分析基体表面形成的单分子膜。另外,ATR-FTIR只能分析几百纳米的样品厚度,对于只有几纳米或几十纳米厚的样品很难检测。XPS能通过观察 N_{1s} 的峰,检测到只有几纳米厚的样品表面的化学结构。目前,用来观察生物材料表面形态的仪器中,运用得最普遍的是SEM,但是SEM图像只在与材料表面的垂直方向的分辨率高。AFM无论是在垂直方向上和水平方向上都有较高的分辨率,能轻易地检测到表面小至几纳米的脊和坑。另外,AFM比SEM优越的方面在于AFM能用于溶液研究中,而这正是生物材料所处的环境。SPR技术测定生物分子相互作用的优越性表现在:反应物无须标记甚至纯化,反应过程可以实时监控,多组分反应的每一步可以分别记录,因此可以进行复合物的分析、实时记录反应的结合和解离,提供反应的动态过程,这是其他技术无法比拟的。QCM用于蛋白质吸附能够实时动态观察蛋白在表面的吸附行为、对吸附过程的检测具有高效性、生物样品无需标记、传感器表面可再生、重复利用等优点。目前

QCM用于蛋白质吸附的研究都是以单一蛋白质为对象,用QCM探讨多种蛋白质之间的相互作用及其竞争吸附行为的研究还鲜见报道。

5 生物材料抗凝血性能的评价方法

生物材料抗凝血性能的测定方法很多,现有评价方法基本上可分为3大类方法,即体外法(in vitro)、半体内法(ex vivo)、体内法(in vivo)^[102]。体外法具有快速、敏感、经济的特点;体内法具有相对的准确性、真实性,但手术复杂、费时,并且由于实验动物种系选择及个体差异,常造成相互矛盾的实验结果;半体内法兼顾体外法快速、敏感及体内法接近临床实际的优点,故被较多研究者采用。

通常评价血液相容性的方法有:动态凝血实验、体外血小板黏附实验、凝血因子测定实验。动态凝血实验利用分光光度计测量血液在材料表面上形成凝血前后分光度的变化,并据此来表征材料的抗凝血性能。体外血小板黏附实验从血小板参与凝血的角度,通过观察和测定黏附在材料表面的血小板的形态、变形情况及数量来评价材料的血液相容性;血小板越少、变形越小,材料的血液相容性越好^[103],在实验室常用于测定凝血因子的测试方法有活化部分凝血活酶时间(activated partially thromboplastin time, APTT)、血浆凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)。APTT和PT、TT分别是评价内、外源性凝血系统中的凝血因子活性最常用的筛选实验^[59]。当内源性凝血系统中的凝血因子减少时,APTT值增加;当外源性凝血系统中的凝血因子减少时,PT、TT值也会增加。

Koh等^[104]通过研究聚乳酸-羟基乙酸与碳纳米管(PLGA-CNT)形成的纳米结构上血小板的黏附情况发现,PLGA-CNT表面形态结构为微相分离结构,亲水性比PLGA表面的强,从而使得PLGA-CNT表面黏附的血小板少,更适合用作抗凝血材料。Bayramoglu等^[56]通过凝血因子实验,比较几种材料的PT和APTT值,研究发现pHEMA-AL-3-HEP的APTT值最大,可达119.4s。由此可知,该材料的抗凝血性能最好,与SEM、细胞黏附等实验结果一致。

目前,大多数的抗凝血性能评价实验都是通过测定成分单一基质溶液中蛋白质的吸附量,一般采用牛血清蛋白、人血浆蛋白、纤维蛋白原、血小板等,对于材料表面在实际的人体内环境中,对不同类蛋白质吸附量进行评价的研究较少。材料表面在单一基质和人体复杂生物基质中,对蛋白质的吸附行为

是大不相同的。

6 结论及展望

近年来,生物医用高分子材料发展很快,抗凝血材料的研究也取得一定进展,但还存在一些问题,如材料的抗凝血机制十分复杂、对抗凝血机理的认识不够深入;固定天然生物材料的手段不先进使其抗凝血活性不持久、不稳定;材料表面的结构变化对抗凝血性能的影响还不是十分清楚;评价材料的抗凝血性能主要是在体外,抗凝血材料的体内研究还未得到广泛的临床应用;另外,检验材料表面的血液相容性,大多是通过测定在单一蛋白质溶液中材料表面的蛋白质吸附情况,而蛋白质吸附在血浆中比在单一蛋白质溶液中的过程复杂得多,血浆是浓缩的、多蛋白质溶液,血浆中蛋白质吸附是一个选择性、竞争性的过程。能高度抵抗某单一蛋白质吸附的无污染表面不一定能高效抵抗血浆中的蛋白质吸附。

目前还没有一种生物材料表面具有天然血管壁内皮细胞所特有的抗凝血和止血功能。要解决这些问题,提高抗凝血材料的生物相容性,还需进一步研究凝血因子、血小板、红细胞、补体系统等在凝血过程中的影响;分子水平上血液组分与生物材料表面微观结构、化学成分的相互作用;人体细胞赖以生存的生物化学环境及其环境中的化学成分对细胞黏附、生长的影响。随着化学、材料学、医学、生命科学等学科的相互渗透抗凝血机理会被进一步的认识,并可为新型抗凝血材料的设计开发提供理论指导。随着计算机技术的飞速发展,通过计算机分子模拟在分子水平上研究材料表面的微纳结构和化学组成对抗凝血性能的影响也有助于抗凝血机理的深入了解。相信随着各学科研究的不断深入,各种研究手段、临床技术的开发和改进,抗凝血材料一定能得到飞速的发展,为广大的心血管疾病患者带来福音。

参 考 文 献

- [1] Gastaldello K, Melot C, Kahn R J, et al. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2000, 15: 224—230
- [2] Suzuki Y, Daitoku K, Minakawa M, et al. *J. Arti. Organs.*, 2008, 11: 111—116
- [3] Kwok S C H, Yang P, Wang J, et al. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2004, 70A: 107—114
- [4] Santerre J P, Woodhouse K, Laroche G, et al. *Biomaterials*, 2005, 26: 7457—7470
- [5] Losi P, Lombardi S, Briganti E, et al. *Biomaterials*, 2004, 25: 4447—4455
- [6] Avci-Adali M, Paul A, Ziemer G, et al. *Biomaterials*, 2008, 29: 3936—3945
- [7] Lv Q, Cao C B, Zhu H S. *Polymer International*, 2005, 54: 1076—1081
- [8] Wheatley D J, Raco L, Bernacca G M, et al. *Eur. J. Cardio-Thor. Surgery*, 2000, 17: 440—447
- [9] 沈健(Shen J). 南京理工大学硕士学位论文(Master Thesis of Nanjing University of Science and Technology), 2004
- [10] 马银陈(Ma Y C), 周宁琳(Zhou N L), 陈亚红(Chen Y H)等. *功能材料(Journal of Functional Materials)*, 2007, 38(10): 1713—1716
- [11] Morimoto N, Iwasaki Y, Nakabayashi N, et al. *Biomaterials*, 2002, 23: 4881—4887
- [12] Sawada S I, Iwasaki Y, Nakabayashi N, et al. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2006, 79A: 476—484
- [13] 项昭保(Xiang Z B), 霍丹群(Huo D Q), 侯长军(Hou C J). *化工新型材料(New Chemical Materials)*, 2005, 33: 57—59
- [14] 项昭保(Xiang Z B), 霍丹群(Huo D Q), 侯长军(Hou C J). *材料科学与工艺(Materials Science and Technology)*, 2007, 15: 869—872
- [15] 刘芸(Liu Y), 陈杰瑭(Chen J R). *高分子通报(Polymer Bulletin)*, 2006, 3: 42—46
- [16] Matsusaki M, Omichi M, Maruyama I, et al. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 2008, 84A: 1—9
- [17] 计剑(Ji J), 封麟先(Feng L X), 沈家骢(Shen J C). *高等学校化学学报(Chemical Journal of Chinese Universities)*, 2002, 12(23): 2369—2374
- [18] 易树(Yi S), 尹光福(Yin G F). *中国口腔种植学杂志(Chinese Journal of Oral Implantology)*, 2003, 8(2): 83—88
- [19] Baumann H, Richter A, Klemm D, et al. *Macromol. Chem. Phys.*, 2000, 201: 1950—1962
- [20] Bernacca G M, Gulbransen M J, Wilkinson R, et al. *Biomaterials*, 1998, 19: 1151—1165
- [21] Jo H Y, Jung W K, Kim S K. *Process Biochem.*, 2008, 43: 179—184
- [22] Wang Y X, Robertson J L, Spillman W B, et al. *Pharm. Res.*, 2004, 21: 1362—1373
- [23] 张安兄(Zhang A X), 吕德龙(Lv D L), 钟伟(Zhong W)等. *上海生物医学工程(Shanghai Journal of Biomedical Engineering)*, 2004, 25(3): 53—58
- [24] 陈宝林(Chen B L), 计剑(Ji J), 季任天(Ji R T)等. *高分子学报(Acta Polymerica Sinica)*, 1999, 4: 449—453
- [25] Laredo J, Xue L, Husak V A, et al. *Journal of Vascular Surgery*, 2004, 39: 1059—1065
- [26] Chen H, Wang L, Zhang Y X, et al. *Macromol. Biosci.*, 2008, 8: 863—870
- [27] Li L Y, Chen S F, Zheng J, et al. *J. Phys. Chem. B*, 2005, 109: 2934—2941
- [28] Zheng J, Li L Y, Tsao H K, et al. *Biophys. J.*, 2005, 89: 158—166
- [29] Salchert K, Gouzy M F, Glorius M, et al. *Acta Biomaterialia*, 2005, 1: 441—449
- [30] Vandencastele N, Nisol B, Viville P, et al. *Plasma Proc.*

Polymer ,2008 ,5: 661—671

[31] 吉岩 (Ji Y) ,常津 (Chang J) ,许晓秋 (Xu X Q) 等. 化学工业与工程 (Chemical Industry and Engineering) ,2001 ,18 (1) : 44—51

[32] Tamada Y. J. Appl. Polym. Sci. ,2003 ,87: 2377—2382

[33] Taddei P ,Arosio C ,Monti P ,et al. Biomacromolecules ,2007 ,8: 1200—1208

[34] Barbucci R ,Magnani A ,Rappuoli R , et al. J. Inorg. Biochem. ,2000 ,79: 119—125

[35] Ma X L ,Cao C B ,Zhu H S. J. Biomed. Mater. Res. Part B—Appl. Biomater. ,2006 ,78B: 89—96

[36] Jayakumar R ,Nwe N ,Tokura S , et al. Int. J. Biol. Macromol. ,2007 ,40: 175—181

[37] Prashanth K V H ,Tharanathan R N. Trends Food Sci. & Technol. ,2007 ,18: 117—131

[38] Wang W S ,Guo Y L ,Otaigbe J U. Polymer ,2008 ,49: 4393—4398

[39] Yaseen M ,Salacinski H J ,Seifalian A M , et al. Biomed. Mater. ,2008 ,3: art. no. 034123

[40] Chen S F ,Zheng J ,Li L Y ,et al. J. Am. Chem. Soc. ,2005 ,127: 14473—14478

[41] Chen S F ,Yu F C ,Yu Q M , et al. Langmuir ,2006 ,22: 8186—8191

[42] Yao K ,Huang X D ,Huang X J ,et al. J. Biomed. Mater. Res. Part A ,2006 ,78A: 684—692

[43] Chen S F ,Zhang J ,Li L Y ,et al. J. Am. Chem. Soc ,2005 ,127(41) : 14473—14478

[44] He Y ,Hower J ,Chen S F , et al. Langmuir ,2008 ,24: 10358—10364

[45] Ladd J ,Zhang Z ,Chen S , et al. Biomacromolecules ,2008 ,9: 1357—1361

[46] Zhang Z ,Chao T ,Chen S F , et al. Langmuir ,2006 ,22: 10072—10077

[47] Zhang Z ,Chen S F ,Chang Y , et al. J. Phys. Chem. B ,2006 ,110: 10799—10804

[48] Zheng Z ,Min Z ,Chen S F , et al. Biomaterials ,2008: 4285—4291

[49] Cheng G ,Zhang Z ,Chen S F , et al. Biomaterials ,2007 ,28: 4192—4199

[50] Yang W ,Chen S F ,Cheng G , et al. Langmuir ,2008 ,24: 9211—9214

[51] Cheng G ,Xite H ,Zhang Z , et al. Angew. Chem. Int. Ed. ,2008 ,47: 8831—8834

[52] Zhang Z ,Gang C ,Carr L R , et al. Biomaterials ,2008 ,29 (32) : 4719—4725

[53] Hower J C ,Bernards M T ,Chen S F , et al. J. Phys. Chem. B ,2009 ,113: 197—201

[54] Peters K ,Unger R E ,Stumpf S , et al. J. Mater. Sci. Mater. Med. ,2008 ,19: 1637—1644

[55] Lim H R ,Baek H S ,Lee M H , et al. Surf. Coat. Technol. ,2008 ,202(22/23) : 5768—5772

[56] Wetzel C ,Hollstein F ,Funk R H W , et al. Surf. Coat. Technol. ,2008 ,202: 5728—5732

[57] Khan W ,Kapoor M ,Kumar N. Acta Biomaterialia ,2007 ,3: 541—549

[58] Pascu M C ,Popescu M C ,Vasile C. J. Phys. D—Appl. Phys. ,2008 ,41

[59] Bayramoglu G ,Yilmaz M ,Batislam E , et al. J. Appl. Polym. Sci. ,2008 ,109: 749—757

[60] Sperling C ,Houska M ,Brynda E , et al. J. Biomed. Mater. Res. Part A ,2006 ,76A: 681—689

[61] Yamazoe H ,Tanabe T. J. Biomed. Mater. Res. Part A ,2008 ,86A: 228—234

[62] Ogawa R ,Watanabe J ,Ishihara K. Sci. Technol. Adv. Mater. ,2003 ,4: 523—530

[63] Furuzono T ,Ishihara K ,Nakabayashi N , et al. Biomaterials ,2000 ,21: 327—333

[64] Kobayashi K ,Ohuchi K ,Hoshi H , et al. J. Artif. Organs ,2005 ,8: 237—244

[65] Seo J H ,Matsuno R ,Konno T , et al. Biomaterials ,2008 ,29: 1367—1376

[66] 刘荷英 (Liu H Y) ,何淑漫 (He S M) ,陈楚敏 (Chen C M) 等. 化工进展 (Chemical Industry and Engineering Progress) ,2009 ,28(3) :429—436

[67] Petitou M ,Casu B ,Lindahl U. Biochimie ,2003 ,85: 83—89

[68] 文志红 (Wen Z H) ,邹素华 (Wu S H) ,陈维涛 (Chen W T) . 塑料 (Plastics) ,2005 ,34(2) : 26—30

[69] Chuang T W ,Lin D T ,Lin F H. J. Biomed. Mater. Res. Part A ,2008 ,86A: 648—661

[70] 张建荣 (Zhang J R) ,刘文广 (Liu W G) ,李永胜 (Li Y S) 等. 化工进展 (Chemical Industry and Engineering Progress) ,2003 ,22(7) : 699—702

[71] Santos J C ,Mesquita J M F ,Belmiro C L R , et al. Thrombosis Research ,2007 ,121: 213—223

[72] Calabrese G C ,Alberto M F ,Tubio R , et al. Thrombosis Research ,2004 ,113: 243—250

[73] Verli H ,Guimaraes J A. J. Mol. Graphics & Modell. ,2005 ,24: 203—212

[74] Adachi T ,Matsushita T ,Dong Z Y , et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. ,2006 ,339: 1178—1183

[75] Thorslund S ,Sanchez J ,Larsson R , et al. Colloids Surf. ,B—Biointerfaces ,2005 ,45: 76—81

[76] Du Y J ,Brash J L ,McClung G , et al. J. Biomed. Mater. Res. Part A ,2007 ,80A: 216—225

[77] Klement P ,Du Y J ,Berry L R , et al. Biomaterials ,2006 ,27: 5107—5117

[78] Klement P ,Du Y J ,Berry L , et al. Biomaterials ,2002 ,23: 527—535

[79] Daskalopoulos M E ,Daskalopoulou S S ,Tzortzis E , et al. Eur. J. Vascular and Endovascular Surgery ,2005 ,29: 638—650

[80] Spyropoulos A C ,Turpie A G ,Dunn A S , et al. Am. J. Cardiol. ,2008 ,102: 883—889

[81] Rhodes S ,Bond S. Eur. J. Oncol. Nurs. ,2008: 1—5

[82] Zhang L L ,Wang J ,Yu M M , et al. Mol. Gene. Metabolism ,

2004 , 82 : 304—311

[83] Piras A M , Chiellini F , Fiumi C , et al. Int. J. Pharm. , 2008 , 357 : 260—271

[84] Schenk-Braat E A M , Morser J , Rijken D C. Eur. J. Biochem. , 2001 , 268 : 5562—5569

[85] Ding F X , Yan H L , Lu Y M , et al. J. Biotechnol. , 2006 , 126 : 394—405

[86] Mao W J , Fang F , Li H Y. Carbohydr. Polym. , 2008 , 74 : 834—839

[87] Alberto M F , Romero D G , Lazzari M , et al. Thrombosis Res. , 2008 , 122 : 109—116

[88] Spyropoulos A C. Thrombosis Res. , 2008 , 123 : S29—S35

[89] 陈柄灿 (Chen B C) , 霍丹群 (Huo D Q) , 侯长军 (Hou C J). 生物医学工程学杂志 (Journal of Biomedical Engineering) , 2005 , 22 (2) : 428—432

[90] Kung F C , Yang M C. Int. J. Bio. Macromol. , 2006 , 38 : 157—164

[91] Michanetzis G P A , Katsala N , Missirlis Y F. Biomaterials , 2003 , 24 : 677—688

[92] Chuang T W , Chen M H , Lin F H. J. Biomed. Mater. Res. Part A , 2008 , 85A : 722—730

[93] Gouzy M F , Sperling C , Salchert K , et al. Biomaterials , 2004 , 25 : 3493—3501

[94] Thierry B , Winnik F M , Merhi Y , et al. Langmuir , 2008 , 24 : 11834—11841

[95] Barbucci R , Lamponi S , Aloisi A M. Biomaterials , 2002 , 23 : 1967—1973

[96] 杨帆 (Yang F) , 杨秀荣 (Yang X R). 生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology) , 2001 , 17 : 375—379

[97] 李贵才 (Li G C) , 朱生发 (Zhu S F) , 杨苹 (Yang P) 等. 传感器世界 (Sensor World) , 2007 , 12 : 6—10

[98] 刘光明 (Liu G M) , 张广照 (Zhang G Z). 高分子通报 (Polymer Bulletin) , 2008 , 8 : 174—188

[99] Rodahl M , Kasemo B. Sens. Actuators A , 1996 , 54 : 448—456

[100] Bodin A , Ahrenstedt L , Fink H , et al. Biomacromolecules , 2007 , 8 : 3697—3704

[101] Hovgaard M B , Rechendorff K , Chevallier J , et al. J. Phys. Chem. B , 2008 , 112 : 8241—8249

[102] 程青 (Cheng Q) , 王国斌 (Wang G B). 上海生物医学工程 (Shanghai Journal of Biomedical Engineering) , 2001 , 22 (3) : 31—33

[103] Okpalugo T I T , Ogwu A A , Maguire P D , et al. Diamond Relat. Mater. , 2004 , 13 : 1088—1092

[104] Koh L B , Rodriguez I , Zhou J J. J. Biomed. Mater. Res. Part A , 2008 , 86A : 394—401