

文章编号: 1000-324X(2007)05-0996-05

## Ti-O-N 表面肝素分子的共价固定及抗凝血性研究

侯瑞霞, 翁亚军, 王 进, 王志浩, 冷永祥, 黄 楠

(西南交通大学 材料先进技术教育部重点实验室, 人工器官表面工程四川省重点实验室, 成都 610031)

**摘 要:** 利用磷酸化学吸附方法扩增 Ti-O-N 薄膜表面的羟基, 扩大与 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 化学反应的位点, 进而增加 Ti-O-N 薄膜表面固定的肝素量. 荧光染色法定性分析证明了 APTES 末端氨基的存在, 甲苯胺蓝法定量测定  $H_3PO_4$  处理后的 Ti-O-N 表面肝素浓度为  $6.6\mu g/cm^2$ . 体外血小板粘附实验表明, 经磷酸处理并固定肝素的 Ti-O-N 膜表面能够有效抑制血小板的粘附和变形, 具有良好的抗凝血性能. 这为制备无机材料的抗凝血表面构建提供了一个有效的技术手段.

**关键词:** Ti-O-N 薄膜; 磷酸化学吸附; 共价固定肝素; 抗凝血性  
**中图分类号:** TB34, TB43 **文献标识码:** A

### Study on Covalent Immobilization of Heparin on Ti-O-N Surface and Antithrombogenicity

HOU Rui-Xia, WENG Ya-Jun, WANG Jin, WANG Zhi-Hao, LENG Yong-Xiang, HUANG Nan

(Key Lab. for Advanced Technologies of Materials of Ministry of Education; Lab of Artificial Organs and Surface Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:** Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to characterize the surface component and bonding state, and these analyses show that the content of hydroxyl group on the surface of Ti-O-N film is enhanced by the chemisorption of phosphoric acid, and the reaction sites with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) are amplified, furthermore the concentration of immobilized heparin molecules are increased. Fluorescence staining analysis qualitatively proves that the terminal amino groups of APTES are in existence. The result of the toluidine blue method shows that the concentrations of the immobilized heparin on the Ti-O-N film treated by phosphoric acid are  $6.6\mu g/cm^2$ . The evaluation of the platelet adhesion test *in vitro* indicates that the Ti-O-N film treated by phosphoric acid and then immobilized with the heparin molecules can effectively suppress the adhesion and activation of the platelets, and has a better antithrombotic property.

**Key words:** Ti-O-N film; chemisorption of phosphate; covalent immobilization of heparin; antithrombogenicity

## 1 引言

随着现代医学的发展, 研究开发高性能的无机  
生物医学材料成为重要的研究课题. 近年来, 具有

良好抗凝血性质的生物医学无机薄膜如 Ti-O 和各类碳薄膜的研究已有许多报道<sup>[1,2]</sup>. 为了进一步提高无机材料的表面抗凝血性, 尝试借鉴抗凝血高分子材料的表面构建技术<sup>[3,4]</sup>, 即在无机材料表面共

收稿日期: 2006-09-30, 收到修改稿日期: 2006-11-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”(2005CB623904); 国家自然科学基金(50673081)

作者简介: 侯瑞霞(1981-), 女, 硕士研究生. E-mail: hourx130@163.com. 通讯联系人: 王 进. E-mail: jinxxwang@263.net

价固定抗凝血生物分子如肝素分子的研究目前却少有报道. 本工作的探索性的采用磷酸化学吸附方法扩增表面羟基, 并通过 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷作为偶联搭桥, 实现肝素分子在 Ti-O-N 薄膜表面的共价固定.

## 2 实验方法

### 2.1 样品制备

选择非平衡磁控溅射方法在 Si(100) 片上沉积制备的 Ti-O-N 薄膜为基底材料<sup>[5-7]</sup>.

8.5%(V/V)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub><sup>[8]</sup> 溶液浸泡 Ti-O-N 膜, 30°C 水浴恒温 3h, 再升温至 100°C 水浴 6h 后取出, 120°C 下干燥 3h, 双蒸水超声清洗两次, 以洗去表面物理吸附的磷酸, 样品标记为 TiON-P.

将磷酸处理后样品置于 100°C, 71.67mmol/L 的 APTES/ 甲苯溶液中冷凝回流 4h, 然后用索氏提取器回流清洗 5h, 样品标记为 TiON-P-APTES.

将肝素 1%(W/V)(50mmol/L 的 2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸为溶剂)、30mg N- 羟基琥珀酰亚胺和 125mg1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺共溶后把样品放入其中, 25 °C 下放置 4h, 样品标记为 TiON-P-APTES-Hep.

### 2.2 薄膜表征

用 NICOLET 5700 红外光谱漫反射方式分析不同薄膜的表面组成; 用 XSAM800 型 X 射线光电子能谱仪表征了薄膜表面化学成分和化学结合态.

采用荧光标记检测 APTES 末端氨基: 称取 15mg 邻苯二甲醛, 加入 1.5mL 无水乙醇溶解后, 用 90mL 的 0.05mmol/L (pH=9.3) 四硼酸钠溶液稀释, 再向其中加入 1.5mL 2- 巯基乙醇, 混匀后置于暗处, 立即使用. 将样品放入上述溶液中反应 10min, 取出后用 pH=9.3 四硼酸钠溶液漂洗, 去除表面物理吸附的邻苯二甲醛, 在 Leica 荧光显微镜下观察样品表面的荧光显色.

表面共价固定肝素量的检测: 在含 9.5μg/mL 肝素钠水溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、1.0、1.2mL 试管中分别加入 NaCl 水溶液 0.2%(w/v), 使总体积为 5.0mL. 向各个试管中分别加入 1mL 甲苯胺蓝 NaCl 水溶液 (50mg/l), 混合均匀. 各加入 3mL 正己烷, 剧烈振荡一段时间, 用分液漏斗取出下层液体测其吸光度并绘制标准曲线, 利用朗伯 - 比尔定律得出接枝肝素的含量<sup>[9]</sup>.

### 2.3 体外血小板粘附试验

分别用 TiON、TiON-P-APTES-Hep 两种样

品, 与新鲜的人富血小板血浆在 37°C、振荡条件下接触培养 4h, 经漂洗、戊二醛溶液固定, 脱水脱醇, CO<sub>2</sub> 临界干燥, 镀金后, 扫描电镜 (QUANTA 2000) 观察<sup>[10]</sup> 并进行数量统计, 用 SPSS 统计软件进行统计分析, 数值变量以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 均数比较采用方差分析, 比较组采用配对 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义.

## 3 结果和讨论

### 3.1 磷酸在 Ti-O-N 膜表面的化学吸附

#### 3.1.1 FTIR 分析

如图 1 所示, 与未经磷酸处理的 TiON 表面相比, TiON-P 表面的吸收峰发生了红移, 3600cm<sup>-1</sup> 处的新吸收峰为 -OH 的伸缩振动峰, 1100~1600cm<sup>-1</sup> 处的宽峰可能是游离 -OH 平面变角振动吸收峰和氢键缔合的 O-H 变角振动峰, P=O 伸缩振动峰与对比样峰重叠. 上述结果表明磷酸分子在 TiON 表面形成化学吸附后<sup>[11]</sup>, 大大增加了 Ti-O-N 薄膜的表面羟基的羟基浓度, 从而在红外光谱下有强吸收.

#### 3.1.2 XPS 分析

比较图 2 中 (a) 和 (b) 可以看出, (a) 图中出现了 Ti、O、N 元素, (b) 图中除了有此三种元素外又新增了结合能在 140eV 的 P2p 和 195eV 的 P2s<sup>[12]</sup>. 说明 Ti-O-N 膜经磷酸处理后, 发生了反应, 因为已经经过多次超声清洗, 因此 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 分子在薄膜表面形成化学吸附而非物理吸附.

表 1 表明磷酸处理前后 [O]/[Ti] 由 0.81 增加到 1.68, [O]/[N] 由 4.56 增加到 6.48. [P]/[Ti] 由 0 增加到 0.30, 经对比分析结合能, 存在键合状态 P=O 和 P-OH 和 P-O-Ti 结构, 这进一步证明了 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 和 Ti-O-N 发生了化学反应.

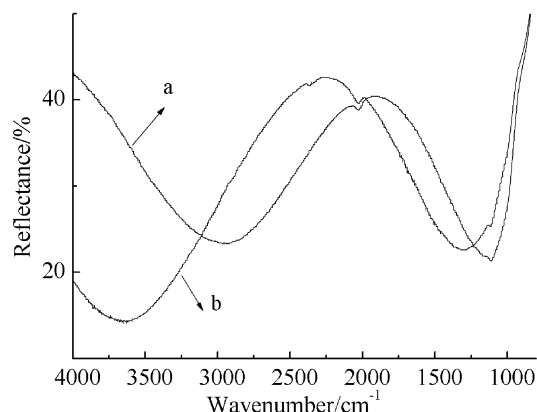


图 1 (a)TiON 和 (b)TiON-P 的红外光谱

Fig. 1 FTIR spectra of (a) TiON and (b) TiON-P

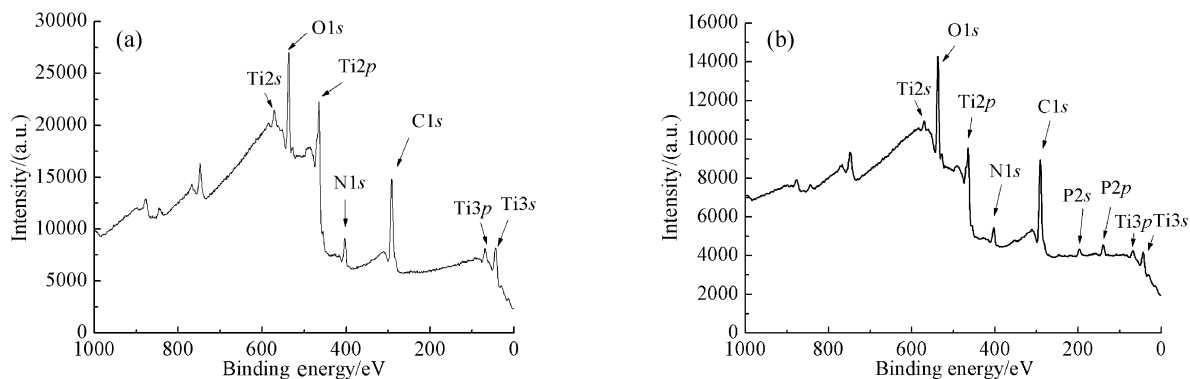


图 2 TiON(a) 和 TiON-P(b) 的 XPS 全谱

Fig. 2 XPS survey spectra of TiON (a) and TiON-P (b)

表 1 TiON 和 TiON-P 的高分辨谱分析结果

Table 1 High resolution spectra of TiON and TiON-P

Samples	[Ti]	[O]	[N]	[P]	[O]/[Ti]	[N]/[Ti]	[P]/[Ti]	[O]/[N]
TiON	8091.5	6520.0	1430.1	0	0.81	0.18	0	4.56
TiON-P	3215.5	5412.9	835.4	952.1	1.68	0.26	0.30	6.48

### 3.2 APTES 在薄膜表面的偶联

APTES 是一种含有  $-\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$  和  $-\text{NH}_2$  的双官能团硅烷偶联剂, 具有生物安全性, 常被应用于生物材料的表面改性<sup>[13,14]</sup>.

图 3 显示了 APTES 分子在 TiON-P 表面偶联的样品的红外光谱结果, 与图 1 中 b 曲线比较, 在  $3600\text{cm}^{-1}$  处对应于  $-\text{OH}$  的红外吸收消失, 这可能是由于样品表面的大部分羟基与 APTES 分子发生了反应,  $2928\text{cm}^{-1}$  新出现的峰是  $-\text{CH}_2-$  的非对称伸缩振动峰, 这来源于 APTES 分子, 红外光谱结果证实了 APTES 在表面形成了偶联.

图 4 是利用荧光染色方法分析不同 Ti-O-N 薄膜表面  $-\text{NH}_2$  的分布. (a) 图中的 Ti-O-N 膜完全没有产生荧光反应. (b) 图中, 样品表面有许多均匀的小亮点, 表明荧光染色较均匀. 固定 APTES 分

子的薄膜呈现出荧光性是因为 APTES 末端  $-\text{NH}_2$  与荧光显色液中的邻苯二甲醛、2-巯基乙醇在碱性条件下反应生成五元环, 该五元环与邻苯二甲醛的苯环形成共桥连体系从而增加了生成物的刚性, 导致荧光的产生<sup>[15]</sup>. 而 Ti-O-N 薄膜表面没有

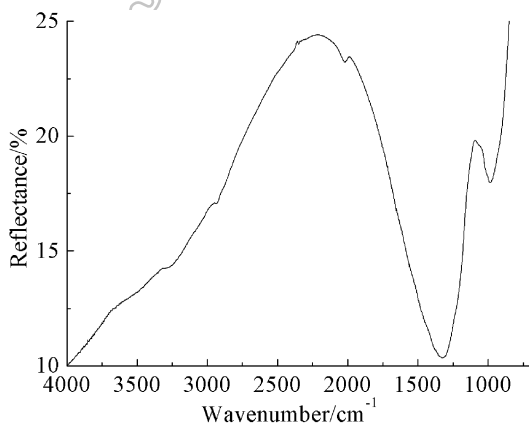


图 3 TiON-P-APTES 的红外光谱

Fig. 3 FTIR spectrum of TiON-P-APTES

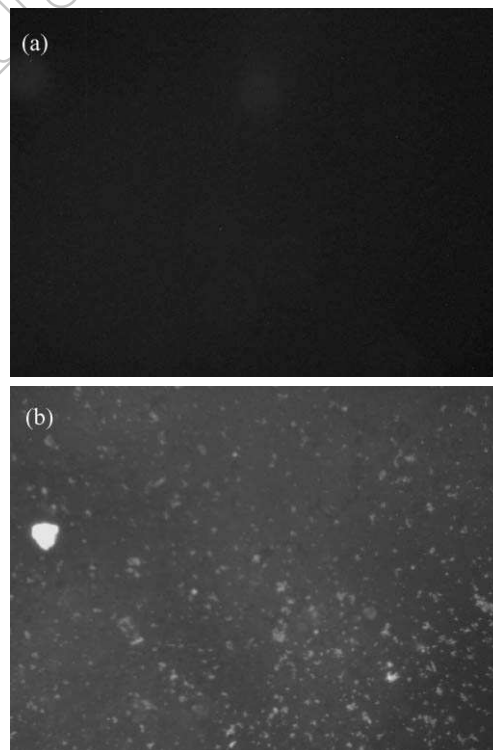
图 4 荧光标记法检测  $-\text{NH}_2$  的光镜照片

Fig. 4 Light microscope photos of fluorescence labeled amino group

(a) TiON; (b) TiON-P-APTES

伯胺基团的存在, 所以 (a) 样品表面不能观察到荧光现象. 荧光检测结果表明, APTES 分子在 TiON-P-APTES 样品表面较均匀地通过  $-\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$  与羟基反应键合,  $-\text{NH}_2$  作为“尾部基团”悬挂于薄膜表面, 这为下一步在表面接入生物大分子提供了反应位点.

### 3.3 肝素共价固定

肝素分子是一种线性阴离子多糖, 它的阴离子活性基团与抗凝血酶 III(AT-III) 的阳离子基团结合, 能加速抗凝血酶和凝血酶复合体形成, 进而凝血酶失去活性产生抗凝<sup>[16]</sup>.

#### 3.3.1 XPS 全谱分析

图 5 的 XPS 全谱中出现了 S、Na 等元素, S 元素来自肝素中的磺酸根, Na 元素的存在是与固定肝素中的磺酸根形成钠盐, 可以初步判断肝素分子被固定到薄膜表面<sup>[17,18]</sup>.

#### 3.3.2 FTIR 分析

图 6(a) 中 TiON 在  $2971$  和  $1110\text{cm}^{-1}$  有两个强的吸收峰, 接枝肝素后的样品发生了红移, 两个峰分别移到  $3548\text{cm}^{-1}$  和  $1000\sim 1750\text{cm}^{-1}$  的宽峰,  $3548\text{cm}^{-1}$  左右可能是氢键化  $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}$  拉伸振动和对比样的峰发生重叠.  $1000\sim 1750\text{cm}^{-1}$  的宽峰可能是游离  $\text{C}=\text{O}$  伸缩振动、氢键化  $\text{C}=\text{O}$  伸缩振动(酰胺 I)、 $-\text{NH}$  变形振动(酰胺 I)、 $\text{S}=\text{O}$  伸缩振动的特征吸收峰、游离  $-\text{OH}$  平面变角振动吸收峰和氢键缔合的  $\text{O}-\text{H}$  变角振动峰和对比样几种峰的重叠. 表明肝素分子已经共价固定于薄膜表面<sup>[19]</sup>.

#### 3.3.3 薄膜表面肝素分子的定量分析

采用甲苯胺蓝定量法测得 TiON-P-APTES-Hep 样品表面共价固定的肝素量达到  $6.6\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . 结合前面的一系列结果, 证明通过  $\text{H}_3\text{PO}_4$  化学吸附, 增加了材料表面羟基的含量, 进而增加了 APTES

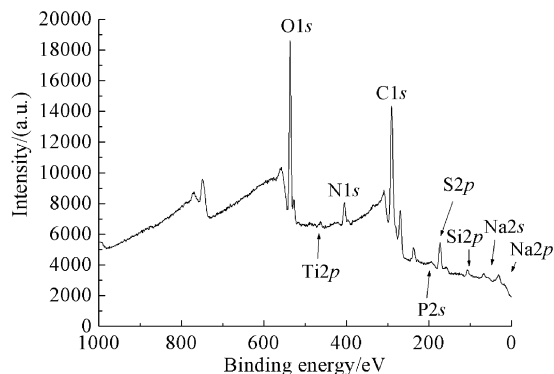


图 5 TiON-P-APTES-Hep 的 XPS 全谱

Fig. 5 XPS survey spectrum of TiON-P-APTES-Hep

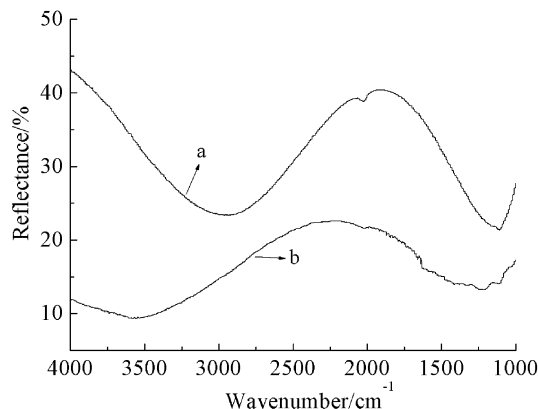


图 6 (a)TiON 和 (b)TiON-P-APTES-Hep 的红外光谱  
Fig. 6 FTIR spectra of (a) TiON and (b) TiON-P-APTES-Hep

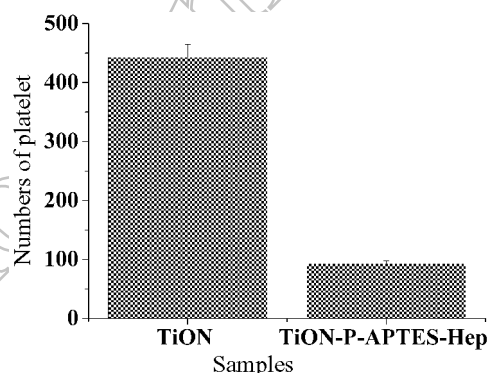


图 7 TiON 和 TiON-P-APTES-Hep 表面血小板粘附统计结果(富板浆中培养 240min)

Fig. 7 Statistical quantity of platelets adhered on the surface of TiON and TiON-P-APTES-Hep after 240min of incubation in PRP

分子在薄膜表面的偶联量, 从而提供更多的反应位点  $-\text{NH}_2$  来固定肝素分子, 增加了共价固定的肝素量.

#### 3.3.4 体外血小板粘附评价

血小板粘附实验表明, TiON-P-APTES-Hep 能明显抑制表面血小板的粘附. 在未肝素改性的 Ti-O-N 薄膜表面, 平均粘附  $443.0\pm 42.9$  个血小板. 在同样的面积上, TiON-P-APTES-Hep 表面粘附血小板数为  $94.0\pm 10.6$ , 降低了约 78%. 材料表面粘附的血小板扫描电镜照片(图 8)显示: 未肝素改性的 Ti-O-N 薄膜的血小板聚集和变形程度较高, 多数血小板都呈现出伪足和聚集, 而 TiON-P-APTES-Hep 薄膜表面血小板粘附数量少, 无聚集, 变形量小. 由上可以得到: TiON-P-APTES-Hep 的抗凝血性优于 Ti-O-N. 这说明在 Ti-O-N 薄膜表面共价固定抗凝分子肝素后表现出抗凝活性, 能有效阻止血小板的激活和变形, 这为制备抗凝血性无机材料抗凝血表面构建提供了一个很好的技术手段<sup>[20,21]</sup>.

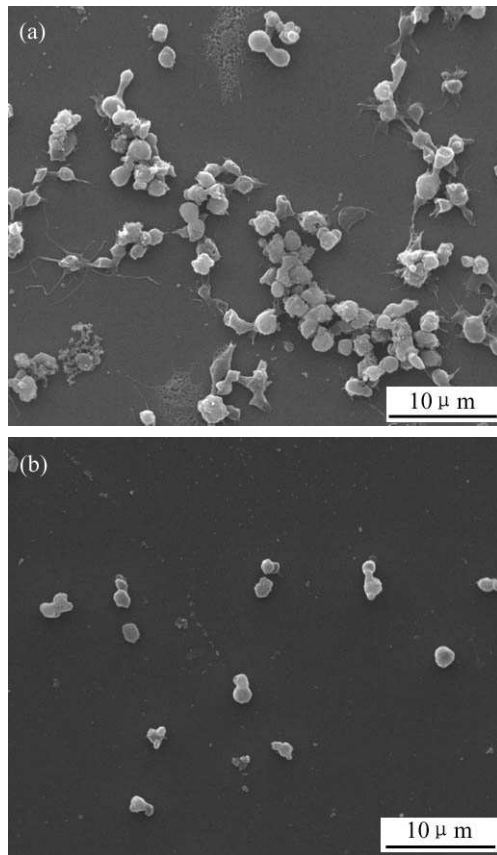


图 8 血小板粘附的扫描电镜照片 (a)TiON, (b)TiON-P-APTES-Hep(富板浆中培养 240min)

Fig. 8 Morphology of adherent platelets on (a) TiON and (b) TiON-P-APTES-Hep after 240min of incubation in PRP observed by SEM

#### 4 结论

1. 通过  $H_3PO_4$  化学吸附起到的“化学放大”作用可以增加 Ti-O-N 薄膜表面的羟基浓度, 从而进一步增加 APTES 分子在薄膜表面的偶联。

2. 通过 APTES 分子的偶联作用, 抗凝生物分子-肝素成功地共价固定到 Ti-O-N 薄膜表面, 表面肝素浓度可达  $6.6\mu g/cm^2$ 。

3. 扫描电镜观察结果表明表面固定肝素分子的 Ti-O-N 薄膜能显著抑制粘附的血小板的激活和

变形。

#### 参考文献

- [1] Huang N, Yang P, Leng Y X, *et al. Biomaterials*, 2003, **23**: 2177-2187.
- [2] Yang P, Huang N, Leng Y X, *et al. Biomaterials*, 2003, **24**: 2821-2829.
- [3] Thomas C, Gladwin S D, Robert F W, *et al. Biomaterials*, 2000, **21**: 699-712.
- [4] Philip R B, Elijah W M, Elodie M M, *et al. Thromb. Res.*, 2000, **98**: 249-256.
- [5] Chen Song-Zhe, Zhang Ping-Yi, Zhuang Da-Ming, *et al. Catalysis Communications*, 2004, **5**: 677-680.
- [6] 万国江, 黄楠, 冷永祥, 等 (WAN Guo-Jian, *et al.*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2003, **18** (4): 904-910.
- [7] 李艳红, 曹文斌, 韦祎, 等. 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2006, **21** (5): 1067-1072.
- [8] Ellen S G, Kristina B R, Mark S D, *et al. Langmuir*, 2001, **17**: 6743-6745.
- [9] 刘建伟, 陈元维, 唐昌伟, 等. 四川大学学报, 2004, **36** (1): 41-44.
- [10] Joseph I Z, Claire G, Peter H, *et al. J. Surg. Res.*, 1997, **67**: 4-8.
- [11] Philip R D, Nicholas G N. *Appl. Surf. Sci.*, 2001, **181**: 296-306.
- [12] Chen Y X, Liu W M, Ye C F, *et al. Materials Research Bulletin*, 2001, **36**: 2605-2612.
- [13] 刘敬肖, 杨大智, 蔡英骥. 材料研究学报, 2002, **16** (5): 529-535.
- [14] 姚超, 高国生, 林西平, 等 (YAO Chao, *et al.*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2006, **21** (2): 315-321.
- [15] 王忠东, 王玉田. 光谱学与光谱分析, 2005, **25** (10): 1645-1647.
- [16] 王琴梅, 潘仕荣, 郑振声. 北京生物医学工程, 1997, **16** (1): 44-49.
- [17] Kristensen E M E, Larsson R, Sanchez J, *et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, **49**: 1-7.
- [18] Denis L, Christine V, Cedric C, *et al. Biomaterials*, 2005, **26**: 5075-5084.
- [19] 王琴梅, 潘仕荣, 郑振声. 功能材料, 1997, **28** (6): 644-647.
- [20] Yali L, Neoh K G, Kang E T. *Polymer*, 2004, **45**: 8779-8789.
- [21] 邱永兴, 胡勇, 计剑, 等. 高分子学报, 1997, (3): 263-270.