

ZnO 纳米材料抗凝血性能的初步评价

李潮, 胡国栋, 何艳花

(北京大学第三医院, 北京 100083)

摘要:采用体外动态凝血时间实验评价了 ZnO 纳米材料的抗凝血性能. 纳米材料的平均粒度在 10~30 nm. 实验分为对照组(抗凝全血 1 ml)、无纳米组(抗凝全血 1 ml, 包括搅拌血浆 0.4 ml)、ZnO 纳米材料组(抗凝全血 1 ml, 包括搅拌血浆 0.4 ml, 加入 ZnO 纳米材料 1 mg)和 Fe 纳米材料组(抗凝全血 1 ml, 包括搅拌血浆 0.4 ml, 加入 Fe 纳米材料 1 mg). 每组样品分别在 5, 15, 30 及 45 min 测定光密度值, 计算结果表明, ZnO 纳米材料的抗凝血率在 45 min 时仍保持在 70%, 而对照组和 Fe 纳米材料组的抗凝血率在 15 min 时已降至 30%. 实验表明 ZnO 纳米材料具有良好的抗凝血作用.

关键词: 抗凝血; ZnO; 纳米材料

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2003)01-0034-03

1 前言

抗凝血性能是评价人工医用材料的一项基本指标. 尤其是对于与血液相接触的医用材料, 例如心血管造影导管、人工血管等, 良好的抗凝血性能更是决定材料能否被应用的决定性因素. 为改进人工医用材料的抗凝血性能, 目前在临床上对导管主要是采用肝素涂覆的方法. 由于肝素在与血液接触后对机体凝血系统有一定的影响, 且涂覆的肝素本身也在不断消耗, 因此肝素涂覆并未解决导管的抗凝血问题. 由于有凝血危险的困扰, 人工血管主要用于较大直径的血管替换, 小血管替换多采用自体血管替代. 显然, 积极改进人工医用材料的抗凝血性能是推动医学发展的当务之急.

另一方面, 纳米材料已经在物理、化学等广泛领域显示出独特的应用前景, 但纳米材料的生物医学效应尚未被充分研究. 本实验发现, ZnO 纳米材料具有抗凝血作用.

2 材料与方法

2.1 材料

实验用纳米材料为 ZnO 和 Fe, 由北京大学化学学院提供, 平均粒度在 10~30 nm. 实验用抗凝全血由北京大学第三医院提供. 其它试剂均为分析纯.

2.2 动态凝血时间实验

体外动态凝血实验是观察凝血过程的一种方法, 其基本原理是根据凝血块形成后游离红细胞减少的现象, 通过在不同时间向试样中加入蒸馏水以使未参与凝血的红细胞在低渗透压环境下立即破裂, 并对红细胞破裂后释放出的血红蛋白进行浓度测定. 由于实验所观察的是未参与凝血的红细胞破裂后所释放出的血红蛋白, 而凝血块中的红细胞不再释放血红蛋白, 所以凝血块中已参与凝血形成的红细胞对实验结果无明显影响. 依据不同时间所释放的血红蛋白浓度可以推算凝血发展的程度和速度. 由于凝血过程是一个酶促反应, 一般在 3~5 min 后才明显出现, 所以主要观察凝血启动 5 min 后的凝血程度与速度.

2.2.1 实验准备

测定抗凝全血光密度:取抗凝全血 0.2 ml 加入体积约 7 ml 的玻璃试管中,以 50 ml 蒸馏水流注于样品表面,并收集流注液.用分光光度计在 540 nm 波长测定流注液的光密度值,作为该样品的光密度对照值.

制备血浆的方法:将抗凝全血在 2000 r/min 转速下离心 5 min,所分离的上层液为血浆.

分散纳米材料的方法:采用 IKA ULTRA TURRAX(细胞分散器)进行搅拌分散.为避免搅拌对红细胞的破坏作用,在搅拌前将血浆从全血中分离出来,将纳米材料加入无红细胞的血浆中进行搅拌后,再与原血样中的红细胞相混合.

2.2.2 实验分组

对照组:取抗凝全血 1 ml 加入试管;

无纳米组:取抗凝全血 1 ml 加入试管,经离心后取出血浆 0.4 ml,搅拌 5 min 后与原试管中剩余的血样混合;

ZnO 组:取抗凝全血 1 ml 加入试管,经离心后取出血浆 0.4 ml,加入 ZnO 纳米材料 1 mg,搅拌 5 min 后与原试管中剩余的血样混合;

Fe 组:取抗凝全血 1 ml 加入试管,经离心后取出血浆 0.4 ml,加入 Fe 纳米材料 1 mg,搅拌 5 min 后与原试管中剩余的血样混合.

2.2.3 实验步骤

分别取对照组、无纳米组、ZnO 组和 Fe 组样品 0.2 ml 加入试管,10 min 后各试管加入 0.02 mol/L CaCl_2 0.2 ml,开始计时.在 5, 15, 30 及 45 min 时分别以 50 ml 蒸馏水流注于样品表面,并收集流注液.用分光光度计在 540 nm 波长测每份流注液的光密度值.各组实验重复 5 次,取平均值.

2.2.4 结果计算

规定时间的实验样品抗凝血率由下式计算,同时将测得的数据绘制成动态凝血时间曲线.

$$\text{规定时间的实验样品抗凝血率} = (\text{实验样品光密度值} / \text{光密度对照值}) \times 100\%.$$

3 结果与讨论

3.1 实验结果

实验材料的动态凝血时间曲线见图 1.由图可见,对照组、无纳米组和 Fe 组样品的抗凝血率在 15 min 时已降至 30%,提示大部分血样已成凝血块,而 ZnO 组样品的抗凝血率在 45 min 仍保持在 70%,提示无凝血发生,表明 ZnO 纳米材料具有一定的抗凝血作用,而 Fe 纳米材料不具有抗凝血作用.

3.2 讨论

发生凝血必须有两个基本条件:一是有异物(或其他内源性因素)存在,并可被凝血系统所识别,从而启动凝血过程;二是凝血系统蛋白酶的逐级放大过程能正常推进,凝

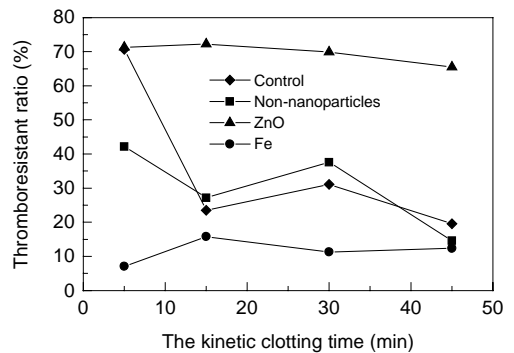


图 1 实验材料的动态凝血时间曲线

Fig.1 The kinetic clotting time of the tested samples

血过程能充分实现,使异物被足够的凝血块覆盖. 针对凝血的发生过程,抗凝血的方法也可分为两类:一是屏蔽异物,使凝血系统不能识别异物,从而使凝血系统不被激活;二是阻断凝血系统的正常放大过程,使凝血块不能最终产生. 本实验中,全血在玻璃试管中逐渐发生凝血是由于有玻璃表面作为异物存在而启动了凝血过程. 在有纳米 ZnO 掺杂到全血中之后,即使仍有玻璃作为异物存在,凝血过程却明显受到抑制. 这很可能是由于阻断了凝血过程,而非屏蔽了异物. 本实验只是发现了纳米材料对凝血过程的影响,而其作用的机理需要通过更为深入的研究来揭示,ZnO 纳米材料的抗凝血效应也有待在体实验的进一步证实.

参考文献:

- [1] Dahlback B. Blood Coagulation [J]. *Lancet*, 2000, 355: 1627–1632.
- [2] Levy M, Hartman A R. Heparin-coated Bypass Circuits in Cardiopulmonary Bypass: Improved Biocompatibility or Not [J]. *Inter J. Cardiology*, 1996, 53(Suppl.): S81–S87.
- [3] Imai Y, Nose Y. A New Method for Evaluation of Antithrombogenicity of Materials [J]. *J. Biomed. Mater Res.*, 1972, 6(3): 165–172.
- [4] Andreas von F R. Handbook of Biomaterials Evaluation: Scientific, Technical and Clinical Testing [M]. Ann Arbor. MI: Edwards, 1998. 353–385.
- [5] 郝和平. 医疗器械生物学评价标准实施指南 [M]. 北京, 中国标准出版社, 2000. 92–93.

Preliminary Evaluation of the Thromboresistance of ZnO Nanoparticles

LI Chao, HU Guo-dong, HE Yan-hua

(Peking University Third Hospital, Beijing 100083, China)

Abstract: Evaluation of antithrombogenicity of ZnO nanoparticles was carried out based on the measurements of in vitro kinetic clotting time. The average size of the ZnO nanoparticles was 10~30 nm. The research was divided into the control group (1 ml of whole blood), the non-nanoparticles group (1 ml of whole blood, including 0.4 ml of the stirred plasma), the ZnO group (1 ml of whole blood, including 0.4 ml of the stirred plasma and 1 mg of ZnO nanoparticles) and the Fe group (1 ml of whole blood, including 0.4 ml of the stirred plasma and 1 mg of Fe nanoparticles). Measurements of clotting time of every group were carried out at 5, 15, 30 and 45 min. The calculated results revealed that the thromboresistant ratio was remained at 70% in 45 min in the ZnO nanoparticles group, while the ratio dropped to 30% in 15 min in the control group, the non-nanoparticles group and the Fe group. The results predict that the ZnO nanoparticles have excellent thromboresistant property.

Key words: thromboresistance; ZnO; nanomaterials