Vol. 30 高等学校化学学报 No. 3
2009 年 3 月 CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES 613 ~ 617

以 PEG 为间隔基固定赖氨酸制备血液相容的聚氨酯材料

胡小洋[1], 张燕霞[1], 张 弢[2], 于 谦[1], 陈 红[1]
(1. 武汉理工大学材料科学与工程学院, 武汉 430070; 2. 南京大学材料科学与工程学院, 南京 210093)

摘要 通过多步表面改性方法制备了血液相容性好的聚氨酯材料. 以 PEG 为间隔基将 ε-赖氨酸通过 Schiff 碱反应和进一步的还原反应连接于聚氨酯表面. 该表面的水接触角和 XPS 结果表明, PEG 和 ε-赖氨酸成功接枝. 用蛋白质吸附和血栓溶解实验对材料的血液相容性进行了研究. 蛋白质吸附结果表明, 相对于改性前的聚氨酯, ε-赖氨酸改性后的表面能减少纤维蛋白原的吸附量近 80%. 血栓溶解测试结果显示, ε-赖氨酸改性后的表面能够在 13 min 内使初生的血栓溶解. 这些结果证实, 改性后的表面不仅能抑制非特异性蛋白质的吸附, 而且在测试条件下能溶解初生的血栓.

关键词 聚氨酯; 聚乙二醇; 赖氨酸; 抗蛋白吸附; 表面改性; 溶解血栓; 血液相溶性
中图分类号 O631 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)03-0613-05

聚氨酯(PU)材料由于具有良好的生物相容性和机械强度而被广泛用于生物医疗领域, 如人工血管及人工心脏等. 但未经表面改性的 PU 的血液相容性仍不令人满意, 在与血液接触时表面会形成血栓, 使其应用受到很大限制[1]. 研究表明, 通过在材料表面接枝亲水性聚合物能够抑制血浆蛋白的非特异性吸附, 从而有效地提高表面的血液相容性[2~4]. 聚乙二醇(PEG)或聚氧乙烯醚(PEO)因其链段的无毒性、亲水性和柔顺性, 被认为是排斥非特异性蛋白质最有效的聚合物之一[5~8]. 此外, 在接枝 PEG 的材料表面上再负载特殊的凝血抑制剂可以进一步改善血液相容性[9]. 如 Chen 等[10]以 PEG 作为间隔臂将肝素修饰于聚二甲基硅氧烷(PDMS)表面, 改善了其抗凝血性. 但这些优化的表面仍不能完全杜绝少量初期血栓的形成. 血纤维蛋白溶酶原(Plasminogen)可以在组织型纤溶酶原激活物 t-PA 作用下转变成具有分解血栓能力的纤维蛋白溶酶. McClung 等[11,12]将带有 ε-氨基的赖氨酸(ε-NH_2-Lysine)修饰于材料表面, 使该表面可以在血浆中选择性吸附 Plasminogen, 因此具有了溶解初生血栓的能力. 本文将 ε-NH_2-Lysine 通过 PEG 固定到 PU 材料表面, 利用 PEG 排斥非特异性蛋白的特性以及 ε-NH_2-Lysine 潜在的溶解初生血栓的活性, 使该表面不仅可以高效排斥血浆蛋白的非特异性吸附, 减少血栓的形成; 而且可以溶解材料表面的初生血栓, 从而提高材料的血液相容性.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

PU 膜(Thermedics Polymer Products), 用打孔器制成固定面积(直径约为 0.5 cm, 厚度约为 0.3 mm)的圆形膜片备用. 4,4′-二苯基甲烷二异氰酸酯(MDI, 纯度 98%, Aldrich 公司), ε 位保护的赖氨酸[HO-Lys (*t*-Boc)-H, Aldrich 公司]; 氰基硼氢化钠(纯度≥95%, Aldrich 公司); *L*-Lysine(昆明杰辉生物技术有限公司); 纤维蛋白原(Fibrinogen, 纯度 50%, Calbiochem 公司); ^{125}I(以 NaI 形式存在, 中国同位素公司); 组织型纤溶酶原激活物(*t*-PA)由 Mcmaster University 提供; 单-2,2-二乙氧基乙基聚乙二醇(DEEPEG, M_n = 700)由南京大学提供; 三氟乙酸(TFA, 上海盈元化工有限公司); 十二烷基磺酸钠(SDS, 武汉亚法生物技术有限公司).

收稿日期: 2008-08-04.
基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20574055, 20634030)和国家"九七三"前期计划(批准号: 2008CB617510)资助.
联系人简介: 陈 红, 女, 博士, 教授, 主要从事生物医用高分子材料研究. E-mail: hongchen@whut.edu.cn

JJC-Ⅰ型接触角测试仪(长春第五光学仪器厂); VG Multilab 2000 型 X 光电子能谱仪(英国 VG 公司); 1480 型伽马计数器(美国 Perkin Elmer 公司); Microplate Spectro-photometer-1500 酶标仪(芬兰 Thermo Labsystems 公司).

1.2 PU 表面改性

PU 表面改性的合成路线见图 1. 将 PU 膜片放入含有质量体积分数为 5% 的 MDI 的甲苯溶液中, 加热至 50 ℃后加入一定量的三乙胺[TEA, m(TEA):m(MDI) = 1:3], 反应 60 ~ 120 min. 取出膜片用甲苯洗涤 3 次后放入质量体积分数为 5% DEEPEG 的甲苯溶液中, 于 40 ℃反应 24 h. 将膜片用甲苯洗涤 3 次并浸泡 48 h, 真空干燥去除甲苯. 取出 40 片该膜片放入 30 mL 1 mol/L 盐酸溶液中去缩醛保护, 5 ~ 15 h 后取出膜片. 用蒸馏水洗净后将膜片放入 10 mL 含有 5 mg/mL H-Lys(t-Boc)-OH 的 PBS (0.0025 mol/L, pH = 8.8, 下同)溶液中, 5 h 后加入 0.5 g 氰基硼氢化钠, 继续搅拌反应, 3 h 后取出膜片, 用蒸馏水洗涤并干燥. 最后将膜浸入体积分数为 15% ~ 25% 的 TFA 水溶液中, 室温下搅拌反应 30 min, 所得膜片先用 PBS 溶液浸泡洗涤多次, 再用蒸馏水冲洗去除膜表面的酸液, 减压烘干. 整个反应过程均在干燥的 N_2 气保护下进行. 另外, 为进行对照实验, 用相同的方法制备了普通 Lysine 接枝的 PU 表面[用 PU-PEG-ALD-Lys(N)表示].

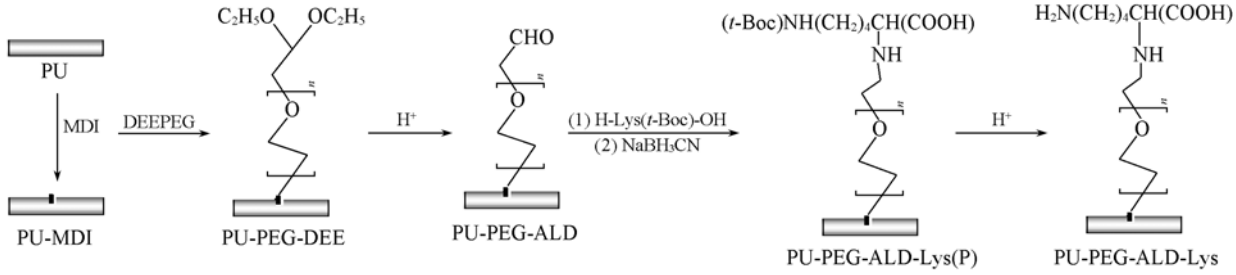

Fig. 1 Preparation of ε-lysine modified PU surface

1.3 水接触角和 XPS 测试

水接触角测定在 JJC-I 型接触角测试仪上完成, 每种样品平行测定 6 次, 求其平均值.

XPS 测试采用 VG Multilab 2000 型 X 光电子能谱仪在起飞角为 90°时进行测试, XPS 谱图和分峰采用软件 Thermo Avantage V3.45 进行分析处理.

1.4 蛋白吸附测定

采用同位素标记法测定蛋白吸附值. 先将目标蛋白(Fibrinogen)进行 ^{125}I 标记, 利用 ^{125}I 的示踪作用来定量测试其吸附情况. 先将样品浸泡于 TBS 溶液(pH = 7.4)中过夜, 然后将其取出放入 96 孔板中, 加入 0.25 mL 标记过的 Fibrinogen 溶液(1 mg/mL, TBS 缓冲溶液, pH = 7.4), 室温静置浸泡 2 ~ 3 h 后取出. 膜片用 0.25 mL TBS 溶液静置浸泡洗涤(10 min × 3)后转入 EP 管并放入伽马计数器中测试放射量. 测试完毕, 取出 EP 管加入 1 mL SDS 溶液(2%)摇匀后在室温下静置 4 h, 再放入 4 ℃环境下静置 12 h. 取出膜片用 1 mL TBS 溶液静置洗涤(10 min × 3), 再按同样的操作测试放射量. 每种样品取 3 片同时测试, 取平均值. 蛋白吸附量计算公式为 $m_s = C_s/C_wS$, 其中, m_s 为样品单位面积上的蛋白吸附量(μg/cm^2); C_s 为样品吸附后的放射量计数; C_w 为蛋白溶液中 1 μg 蛋白质的放射量计数; S 为样品的吸附面积(cm^2).

1.5 溶解血栓能力测试

采用 Microplate Spectro-photometer-1500 酶标仪对改性前后膜片的溶解血栓能力进行检测. 先将样品在 TBS 溶液中浸泡 12 h, 取出后垂直放到 96 孔板中, 每孔加入血浆 0.25 mL, 室温下浸泡 2 ~ 3 h 后取出膜片, 用 TBS 溶液静置洗涤(10 min × 3), 然后垂直浸泡于 t-PA 溶液中, 30 min 后取出膜片并用 TBS 溶液洗涤(10 min × 5). 最后将其沿同一方向放入灭菌的 96 孔板中, 分别在样品孔中依次加入 0.1 mL 血浆(37 ℃)和 0.1 mL $CaCl_2$(0.0025 mol/L, 37 ℃)水溶液. 5 min 后在酶标仪上测量 405 nm 处的吸光度, 同时进行对照实验. 所有样品和对照样均有 3 个平行样. 扫描时间间隔为 30 s, 测试时间为 30 min. 用所得数据的平均值作"吸光度-时间"曲线.

2　结果与讨论

2.1　PU 表面改性

对 PU 表面进行官能化以及接枝 PEG 的方法与文献[13]相同. 选用了两端不同端基的DEEPEG，其一端能与 NCO 反应使其接枝到表面，另一端通过水解后能形成醛基用于下一步链接赖氨酸. 由于普通的赖氨酸具有两个能与醛基发生反应的氨基(—NH_2)，为保证赖氨酸是通过 α-NH_2连接到 PU 表面而使 ε-NH_2处于自由态，采用 ε-NH_2被 *t*-Boc 保护的赖氨酸[HO-Lys(*t*-BOC)-H]. 该赖氨酸是通过 Schiff 碱反应链接于 PEG 的末端，随即将膜表面进行氢化还原处理，使氨基与醛基反应后产生稳定的 C—N 键，保证了赖氨酸链接的稳定性. 最后在酸性条件下脱保护，使改性后的表面带有自由的 ε-NH_2.

2.2　表面亲水性分析

改性前后 PU 表面的静态水接触角变化情况如表 1 所示. PEG 接枝在 PU 表面后，水接触角从 78° 迅速下降至 37 °. 经过几步改性后得到的 PU 表面的水接触角均在 35°～45°之间，其中 PU-PEG-ALD-Lys 表面的水接触角为 43°，相对于未改性 PU 表面降低了近 47% . 由此表明，PEG 改性的 PU 表面经过了几步的化学反应后仍能保持较好的亲水性，为排斥血浆蛋白质的非特异性吸附提供了可能.

Table 1　Water contact angles of the sample surfaces

Sample	Static water contact angle/(°)
PU	78 ± 6
PU-PEG-DEE	37 ± 2
PU-PEG-ALD-Lys(P)	35 ± 3
PU-PEG-ALD-Lys	43 ± 2

2.3　表面 XPS 分析

图 2 为改性前及 PEG 和赖氨酸接枝后的高分辨 C_{1s}图谱. 从图 2(A)可以看出，C_{1s}结合能主峰在 284.6 eV 处，该峰归属于 C—C 和 C—H 的结合能，说明 PU 表层结构中的 C 主要以 C—H 和 C—C 形式存在；在 286.4 eV 处的肩峰与 PU 本体中软段中的 C—O 有关，而在高结合能处的小峰与氨酯键中的羰基有关. 与图 2(A)相比，图 2(B)中最明显的变化是 286.4 eV 处的 C—O 峰从 C—C 和 C—H 峰中分离出来并且强度明显增大，说明 PU-PEG-DEE 表面 C—O 结构的含量增多，由此可推断 PEG-DEE 链段已成功接枝到 PU 表面. 与图 2(B)不同的是，图 2(C)中 286.4 eV 处的峰相对于 284.6 eV 处的峰强度明显降低，这说明 PU-PEG-Lys 表面的 C—O 结构相对于 C—H 和 C—C 结构有所减少，这主要是因为 PEG-DEE 末端的双乙氧基在进一步改性过程中脱除，并且引入赖氨酸后导致表面 C—H 和C—C 结构增多. 另外，图 2(C)中 288.9 eV 处 O—C ═ O 结构峰的强度增加也进一步说明了赖氨酸已被成功引入到 PU 表面.

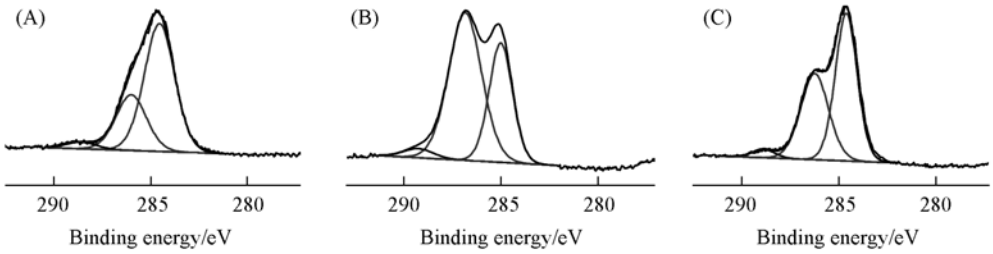

Fig. 2　High resolution C_{1s} spectra of PU(A), PU-PEG-DEE(B) and PU-PEG-Lysine(C)

2.4　表面的抗蛋白吸附性能

图 3 为改性前后 PU 膜片在 Fibrinogen 溶液(1 mg/mL)中的吸附结果. 未改性的 PU 表面 Fibrinogen 的吸附量为 757 ng/cm^2，经 SDS 溶液洗脱后降至 78 ng/cm^2，只有原来的 10% 左右. 这是因为 Fibrinogen 主要是通过物理吸附在 PU 表面，绝大部分可被 SDS 溶液洗脱下来. 当 DEEPEG 接枝到表面后，Fibrinogen 吸附量明显降低，只有 131 ng/cm^2，降低了 83% ，体现出亲水性 PEG 链段的良好的排斥血浆蛋白的非特异性吸附的能力[14,15]. PU-PEG-DEE 表面脱去缩醛保护后，相对于 PU-PEG-DEE 表面，吸附量有所上升，这是由于 PU-PEG-ALD 表面上 PEG 链段末端的醛基与蛋白质中的氨基之间可以进行化学反应. 但由于醛基与蛋白质中氨基之间是 Schiff 碱反应，没有进行还原，因此所形成的化学键

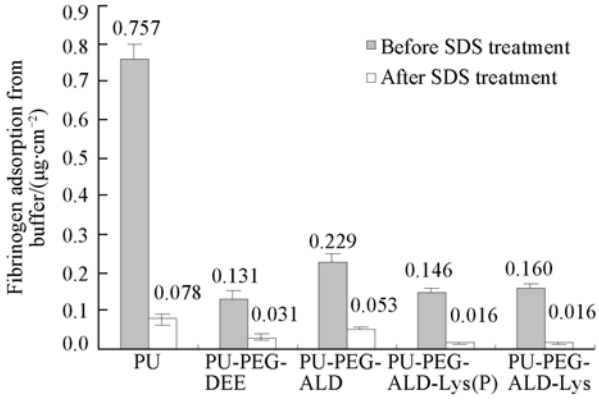

Fig. 3 Fibrinogen adsorption from buffer(1 mg/mL) before and after SDS treatment

DEE, PU-PEG-ALD-Lys(P), PU-PEG-ALD-Lys 表面吸附 Fibrinogen 的量均在 16.5 ng/cm^{2}以下，相对于 PU 表面均降低了 80% 左右，表明改性后的材料表面在血浆中大量蛋白质的存在下仍然具有很好的抗 Fibrinogen 吸附的能力.

不稳定，样品用 SDS 洗脱后，蛋白质的剩余量并没有明显增加. 链接了 HO-Lys(*t*-Boc)-H 后，蛋白吸附量又重新下降(为 146 ng/cm^2)，并且在 *t*-Boc 脱保护前后均能保持明显的抗蛋白吸附效应.

由于血浆中有 200 多种蛋白质，各种蛋白质彼此之间的相互作用以及同材料表面的相互作用会对所研究的目标蛋白质在材料表面的吸附造成影响，因此研究材料在血浆中对目标蛋白质的吸附将更具有代表意义. 表 2 是改性前后材料从 10% 的血浆中吸附 Fibrinogen 的实验结果. 可以看出，PU-PEG-

Table 2 Fibrinogen adsorption from 10% plasma

Sample	Fibrinogen adsorption from 10% plasma/(ng · cm^{-2})	Reduction rate(%)
PU	70.0 ±9.4	——
PU-PEG-DEE	16.5 ±2.3	76.4
PU-PEG-ALD-Lys(P)	13.3 ±0.5	81.0
PU-PEG-ALD-Lys	15.5 ±4.0	77.9

2.5 表面的溶解血栓性能

实验中通过测试复钙化作用(Recalcification)后样品体系在 405 nm 处的吸光度变化反映样品表面血栓(血凝块)形成或溶解的情况. 根据光密度检测原理，在“吸光度-时间”图中吸光度上升表示血栓不断形成，吸光度后续下降表示血栓逐渐溶解. 从图 4 可以看出，未改性的 PU 和 PU-PEG-Lys(P)表面曲线走势很相近，都是吸光度先上升到一最大值而后保持基本不变，表明二者表面的血栓量自复钙化作用后迅速增大直到血栓全部形成. 虽然赖氨酸脱保护前后具有同样的抗 Fibrinogen 吸附的能力，但在血栓溶解实验中发现二者曲线的走势并不相同. 未经保护的赖氨酸修饰的表面 PU-PEG-ALD-Lys(N)与 PU 表面类似. 而 PU-PEG-ALD-Lys 表面的吸光度先上升到最大值(t = 6 min 时)后开始缓慢下降，13 min 后回到最初的吸光度值，说明复钙化作用后形成的初期血栓量在 13 min 后能完全溶解. 实验表明，用 ε-NH_2未经保护的赖氨酸改性的表面并不具有溶解血栓的能力，这可能是由于 ε-NH_2在接枝过程中也参与了反应而被消耗. 只有当赖氨酸中有自由 ε-NH_2存在时，才具有血栓溶解功能.

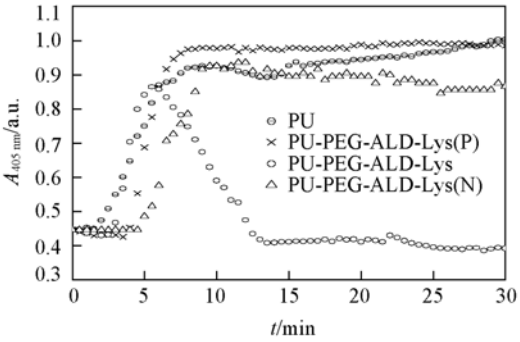

Fig. 4 Clot formation in plasma expressed as absorbance at 405 nm *versus* time of PU, PU-PEG-ALD-Lys(P), PU-PEG-ALD-Lys and PU-PEG-ALD-Lys(N)

综上所述，通过化学接枝的方法，利用两端带异型官能团的聚乙二醇(PEG)为间隔基将带自由 ε-氨基的赖氨酸(ε-NH_2-Lysine)固定到聚氨酯材料表面. 该表面将 PEG 链段阻抗血浆蛋白非特异性吸附作用和 ε-NH_2-Lysine 的纤溶活性有机结合起来，既能有效的降低非特异性蛋白的吸附量，减少血栓的形成，又能在测试环境中溶解初生的血栓，为提高生物材料的血液相容性提供了新的途径.

参 考 文 献

[1] Flemming R. G., Capelli C. C., Cooper S. L., *et al*.. Biomaterials[J], 2000, **21**(3): 273—281

[2] Dalsin J. L., Messersmith P. B.. Mater. Today[J], 2005, **8**(9): 38—46

[3] Chen H., Yuan L., Song W., *et al*.. Prog. Polym. Sci.[J], 2008, **33**: 1059—1087

[4] Tatsuro G., Tomohiro K., Madoka T., *et al*.. Colloids Surf. B[J], 2007, **54**(1): 67—73

[5] Chen H., Brook M. A., Sheardown H.. Biomaterials[J], 2004, **25**(12): 2273—2282

[6] Chen H., Zhang Z., Chen Y., *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**(15): 2391—2399
[7] Chen H., Hu X. Y., Zhang Y. X., *et al.*. Colloids Surf. B[J], 2008, **61**(2): 237—243
[8] Chen H., Wang L., Zhang Y. X., *et al.*. Macromol. Biosci.[J], 2008, **8**(9): 863—870
[9] Goddard J. M., Hotchkiss J. H.. Prog. Polym. Sci.[J], 2007, **32**(7): 698—725
[10] Chen H., Chen Y., Sheardown H., *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**(35): 7418—7424
[11] McClung W. G., Clapper D. L., Anderson A. B., *et al.*. J. Biomed. Mater. Res.[J], 2003, **66**A(4): 795—801
[12] McClung W. G., Clapper D. L., Hu S. P., *et al.*. Biomaterials[J], 2001, **22**(13): 1919—1924
[13] Freij-larsson C., Wesslen B.. J. Appl. Polym. Sci.[J], 1993, **50**: 345—352
[14] Malmsten M., Emoto K., Van Alstine J.. J. Colloid Interf. Sci.[J], 1998, **202**: 507—517
[15] Kingshott P., Thissen H., Griesser H.. Biomaterials[J], 2002, **23**: 2043—2056

Lysine Immobilization Through Poly(ethylene glycol) Spacer for Bloodcompatible Polyurethane Surface

HU Xiao-Yang[1], ZHANG Yan-Xia[1], ZHANG Tao[2], YU Qian[1], CHEN Hong[1*]
(1. *School of Materials Science and Engineering*, *Wuhan University of Technology*, *Wuhan* 430070, *China*;
2. *Department of Materials Science and Engineering*, *Nanjing University*, *Nanjing* 210093, *China*)

Abstract A blood-compatible polyurethane surface was prepared by multiply steps surface modification. ε-Lysine was conjugated to polyurethane surface through PEG spacer *via* Schiff-base and reduce reaction. The results of water contact angle and XPS measurements suggest that both PEG and lysine are immobilized to the surface successfully. Protein adsorption and plasma clot lysis measurements were performed to investigate the bloodcompatibility of the modified surface. Comparing with the unmodified surface, ε-lysine modified surface reduced fibrinogen adsorption by 80%. It was shown in clot lysis experiment that the ε-lysine modified surface could break down the incipient fibrinous clot within 13 min. The results demonstrate that ε-lysine modified surface not only suppress non-specific protein adsorption, but also degrade fibrin in an evolving clot.

Keywords Polyurethane; Poly(ethylene glycol); Lysine; Protein adsorption resistance; Surface modification; Clot lysis; Bloodcompatibility

(Ed.: D, Z)