

医用高分子材料表面血浆蛋白吸附 对血小板粘附的影响*

潘仕荣 周 群

(第一附属医院人工心脏研究室)

许教文 唐华欣

(生物化学教研室)

提 要 本文通过电泳法研究了五种高分子材料表面对血浆蛋白的吸附,使用扫描电镜观察了材料表面的血小板粘附状况。研究表明,疏水性的高分子材料表面有较高的白蛋白吸附浓度,其表面粘附的血小板数目较少,变形较轻,可以获得较好的抗凝血性。

关键词 血浆蛋白吸附 血小板粘附

高分子材料是制造人工器官的主要材料之一,高分子材料的抗凝血性是用作生物材料的首要要求,研究材料与血液间的界面现象是设计具有优越抗凝血性的材料的重要依据。高分子材料与血液接触时表面会发生一系列复杂的现象,首先是血浆蛋白吸附,相继是血小板的粘附,变形和聚集,最后导致纤维蛋白原的沉积,形成血栓^[1]。在研究材料的表面性质与抗凝血性关系时,首先要弄清材料表面血浆蛋白吸附对血小板粘附的影响。近十多年来,国外学者对材料表面的血浆蛋白吸附进行过广泛的研究。主要方法有傅利叶红外光谱 ATR-IR 法^[2,3],同位素标记法^[4,6],电泳法^[1,6,7]等。这些方法各有优缺点,从不同的方面说明问题。电泳法是一种简便的方法,由于材料表面吸附的蛋白量一般只有 $0.1 \sim 10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$,因此必须使用很大的表面积才能保证电泳有足够的蛋白浓度。我们对 Owen 的方法^[7]作一定的改进,分析了五种医学上常用的高分子材料的血浆蛋白体外吸附,研究其对血小板粘附的影响。

材 料 与 方 法

主要材料

硅橡胶 PSI, 上海橡胶制品研究所

聚碳酸酯 PC, 四川晨光三厂

聚氯乙烯 PVC, 广西梧州日用塑料厂
聚氨酯/聚硅氧烷共聚物 ZH-Ⅲ, 本室合成^[8]

聚氨酯 Biomer, 美国 Ethicon 公司

牛血 白蛋白, 美国 Sigma 公司

牛血 γ -球蛋白, 美国 Sigma 公司

方法

1. 血浆蛋白的吸附 将 $0.15 \sim 0.25 \text{mm}$ 直径玻璃珠分别涂覆上述五种高分子材料溶液,外膜干燥后,装入内径 7.5mm , 长 280mm 的玻璃管内,每管玻璃珠重量为 17g 。称量牛血蛋白溶解于磷酸盐缓冲溶液中, ($\text{pH} = 7.4$), 浓度为白蛋白 $4 \text{g}/100 \text{ml}$, γ -球蛋白 $2 \text{g}/100 \text{ml}$ 。以注射器吸取 6ml 蛋白溶液注入球柱内, 注意不要让气泡进入液柱。在预定时间后以 10ml 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH} = 7.4$) 排除球柱内的蛋白溶液, 随后以注射筒吸取空气尽量排净柱内之缓冲液, 最后以 12ml TritonX-100 的 1% 溶液把球柱内的玻璃珠全部排出, 收集到一烧杯内, 在冰箱内 ($4 \sim 6^\circ\text{C}$) 浸泡洗脱 48 小时。将上述洗脱液装入透析袋内 (Union Carbide 公司, 分子量 1.2 万以下), 袋外填充聚乙二醇 20000 粉末脱水, 在冰箱内静置 $4 \sim 6$ 小时, 洗脱液浓缩至 1ml 。

*国家自然科学基金会资助课题

作电泳用的聚丙烯酰胺凝胶长6cm,直径0.5cm,3%浓缩胶,6%分离胶,放入Tris-Gly电极缓冲液(pH8.3)。蛋白的浓缩洗脱液加入量为50 μ l,3.0mA通电分离3小时,0.1%考马斯亮兰G-250液染色,7%HAC液洗脱,在Shimadzu UV-200型电泳扫描仪上扫描, $\lambda = 606\text{nm}$,测出各蛋白区带的含量。

2. 血小板的粘附 按文献[9]进行 经甲基硅油处理的注射器从健康雄兔心脏中穿刺采血,注射器内先吸取1/10体积的3.8%枸橼酸钠溶液。所采的兔血以800转/分速度离心20分钟,制得富血小板血浆PRP。取0.5mlPRP备用,并计算血小板数。其余PRP再以3,000转/分离心20分钟,制得贫血小板血浆PPP,通过G6漏斗过滤,即得贫血小板血浆PFP。通过计算将适量的PRP与PFP配制成2,000个/ μ l浓度的稀释血小板悬浮液。

将普通的离心管的内腔改成平底(用有机玻璃浇注并固化),把上述材料的试片分别贴在底部平面上。实验时分别在每样品管上加入1ml血小板悬浮液,5个样品同时以3,500转/分的速度离心1分钟,然后倒出悬浮液,用台氏缓冲液漂洗3次。注意从滴加到漂洗期间,血小板悬浮液与试片接触时间不超过5分钟。试片用2.5%戊二醛的磷酸盐缓冲液(pH7.4)固定,台氏缓冲液漂洗,2%四氧化锇溶液固定,台氏缓冲液再漂洗,由系列浓度乙醇脱水,醋酸正戊酯浸泡,临界点干燥,镀金,最后在HITACH-450型扫描电镜上观察血小板的粘附情况。

3. 临界表面张力的测定 在Jy-82型接触角测定仪上进行。

结果与讨论

一、高分子材料表面对血浆蛋白的吸附

由表1我们可以看到,在吸附的初期,吸附的白蛋白占较高的比例,随着吸附时间的延长,白蛋白吸附浓度相应减少,逐渐达到一稳定值。对于ZH-Ⅲ, Biomer和PVC,在20'时白蛋白吸附浓度达到稳定值,PSi和PC在40'

表1 不同样品的蛋白质吸附量与百分组成

样 品	吸附时间 分	蛋白质 吸附量 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	吸附蛋白质的 百分组成%	
			白蛋白	γ -球蛋白
ZH-Ⅲ	5	0.18	85	15
	20	0.42	81	19
	40	0.47	82	18
	60	0.60	82	18
PSi	5	0.21	78	22
	20	0.47	75	25
	40	0.69	79	21
	60	0.56	80	20
Biomer	5	0.21	75	25
	20	0.14	73	27
	40	0.28	70	30
	60	0.55	72	28
PVC	5	0.18	77	23
	20	0.14	74	26
	40	0.48	75	25
	60	0.38	75	26
PC	5	0.21	77	23
	20	0.36	62	36
	40	0.39	68	32
	60	0.52	68	32

时白蛋白吸附浓度达到稳定值,该白蛋白吸附浓度的稳定值大小决定于材料的性质,与吸附时间长短无关。ZH-Ⅲ有较高的吸附白蛋白浓度,PSi, PVC, Biomer, PC的白蛋白吸附浓度依次递减。

材料的总蛋白吸附量在开始接触5'时的数值已相当于最后的60'时数值的30%以上,说明接触早期有较大的蛋白吸附速率。随着时间的推移,蛋白质吸附量逐渐增加,但吸附速率已明显减慢。表1的个别数据出现一些波动,但总的趋势如上所述。

二、血小板在材料表面的粘附

ZH-Ⅲ与PSi粘附血小板数量最少,变形最轻, Biomer, PVC依次增加。PC表面粘附的血小板发生大量聚集变形。

表2 血小板在试样表面的粘附状况

材 料	血小板粘附数(个)/1000 μm^2	血 小 板 粘 附 形 态
PSi	48.4	单个血小板粘附,伸出伪足,变形较轻
ZH-Ⅱ	49.8	单个血小板粘附,伸出伪足,变形较轻
Biomer	81.9	单个血小板粘附,密度较大
PVC	105	血小板三两成群聚集
PC	111	大量血小板网状聚集

*血小板粘附数由4个视野几何平均数

表3 五种材料的临界表面张力与表面自由能

材 料	临界表面张力 (达因/厘米)	表面自由能 (尔格/厘米 ²)
PSi	22	20
ZH-Ⅱ	27	31
Biomer	30	34
PVC	37	37
PC	39	40

三、材料的临界表面张力

临界表面张力PSi最小,ZH-Ⅱ,Biomer,PVC,PC依次增大,其疏水性随上次序减少。

四、材料表面血浆蛋白吸附对血小板粘附的影响

疏水性较大的高分子材料如PSi和ZHⅡ,有较高的白蛋白吸附浓度,其表面粘附的血小板较少,材料表现较高的抗凝血性。疏水性较低的高分子材料如PC,有较低的白蛋白吸附浓度,表面血小板粘附较多,材料的抗凝血性最差。Biomer是一种抗凝血性的材料,其白蛋白吸附浓度稍低,血小板粘附数中等,出现这一偏差我们认为是在制样时表面存在许多微孔,表面粗糙不平所致。

在材料与血液接触时,表面吸附的血浆蛋白浓度越高,其粘附的血小板数目就越少,该材料有较好的抗凝血性,我们的研究支持了上述的结论。

参 考 文 献

[1] Lyman D J, et al. The effect of chemical

structure and surface properties of synthetic polymers on the coagulation of blood [J], In vivo adsorption of protein on polymer surfaces, Trans Am Soc Artif Int Organs 1974; 20:474.

- [2] Brash J L, et al. Adsorption of plasma protein in solution to uncharged hydrophobic polymer surfaces, J Biomed Mater Res 1969; 3:175.
- [3] Randy G L, et al. Adsorption onto hydrophobic polymer surfaces: Adsorption isotherms and kinetics, J Biomed Mater Res 1974; 8:251.
- [4] Sung W K, et al. Role of protein and fatty acid adsorption on platelet adhesion and aggregation at the blood-polymer interface. J Biomed Mater Res 1977; 8:23.
- [5] Ihlenfeld J V, et al. Transient in vivo protein adsorption onto polymeric biomaterials. J Biomed Mater Res 1979; 13:577.
- [6] Tien C C, et al. Electrophoretic analysis of protein adsorbed on polymer surfaces. J Biomed Mater Res 1981; 15:781.
- [7] Owen D R, et al. Interactions of plasma protein with selective artificial surfaces. Trans Am Soc Artif Organs 1985; 31:240.
- [8] 潘仕荣,等. ZH-Ⅱ医用弹性体—聚醚聚氨酯/聚二甲基硅氧烷共聚物的研制. 中国生物医学工程学报 1987; 6(2):103.
- [9] Coleman D L, et al. Blood-materials interaction: the minimum interfacial free energy and the optimum polar/apolar ratio hypotheses. J Biomed Mater Res 1982; 16:38.1

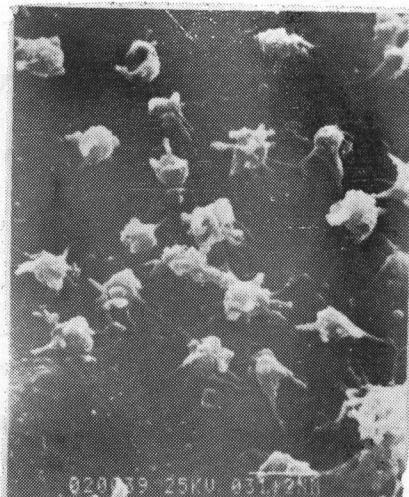
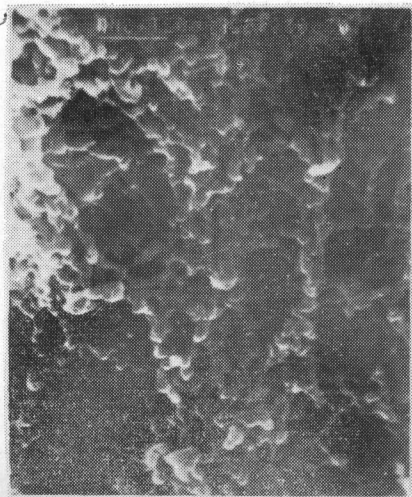


图 2H-Ⅲ与PC表面血小板粘附的扫描电镜照片

— ※ — ※ — ※ — ※ —

抗胰腺癌单克隆抗体的研究 (正文见第30页)

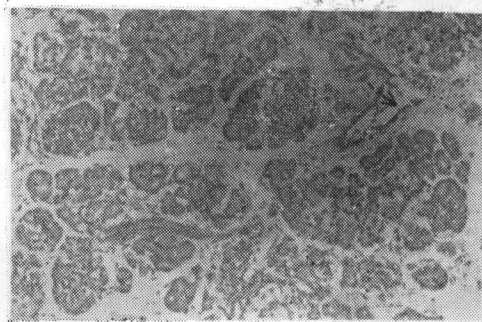


图1 正常胰腺,胰外分泌导管上皮呈弱阳性(如箭头所示),ABC染色 $\times 100$

图2 胰腺高分化导管细胞腺癌,癌细胞膜和癌性腺腔内分泌物呈强阳性(如箭头所示),ABC染色 $\times 100$

— ※ — ※ — ※ — ※ —

卵巢睾丸母细胞瘤2例报告 (正文见第68页)

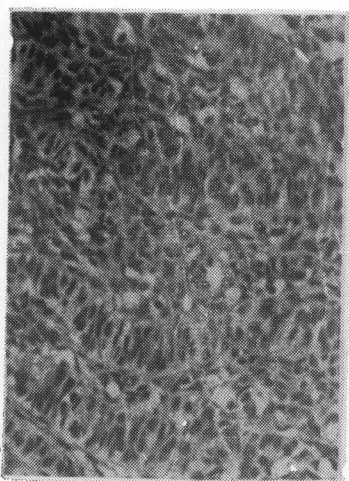


图1 肿瘤细胞呈巢索状及管状排列

图2 支持细胞呈双行排列

图3 间质细胞呈巢状胞浆内含丰富类脂质