

聚丙烯微孔膜表面肝素化及其对低密度脂蛋白的吸附特性^{*}

郑细鸣^{1,2} 黄小军² 徐志康^{2**}

(¹武夷学院环境与建筑工程系 武夷山 354300)

(²高分子合成与功能构造教育部重点实验室 浙江大学高分子科学与工程学系 杭州 310027)

摘 要 为了赋予聚丙烯微孔膜(PPMM)选择性吸附低密度脂蛋白(LDL)的能力,发展了一种有效的 PPMM 表面共价固定肝素的方法. 基于紫外引发丙烯酸的接枝聚合,通过碳二亚胺活化,以乙二醇为间隔臂,将肝素共价固定于 PPMM 表面,获得表面肝素化的 PPMM. ATR-FTIR 和 XPS 分析确证了修饰过程中膜表面基团及化学成分的变化. 采用静态水接触角测定和血小板黏附实验,考察了肝素化前后膜表面的亲水性及血液相容性,发现在肝素固定化密度为 $7.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时,膜表面水接触角由 $(138 \pm 7.2)^\circ$ 下降至 $(35.1 \pm 2.7)^\circ$,血液相容性也得到明显改善. 以酶联免疫吸附测定技术(ELISA)分析了肝素化前后 PPMM 对单及二元混合蛋白溶液中 LDL 的吸附与脱吸附性能. 结果表明,肝素化 PPMM 对 LDL 的吸附量明显增大,且受人血清蛋白(HSA)的干扰较小,说明肝素化 PPMM 对 LDL 具有选择性吸附性能;NaCl 溶液能将肝素化 PPMM 表面吸附的 LDL 洗脱除去,说明肝素化 PPMM 对 LDL 的吸附具有可逆性.

关键词 聚丙烯微孔膜, 表面修饰, 肝素化, 低密度脂蛋白(LDL)吸附

降低血液中低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)水平是预防和治疗心脑血管疾病的有效途径之一^[1-3]. 现已报道了多种技术来降低血液中 LDL 的水平^[4-11], 其中,通过体外循环直接从血浆或全血中除去 LDL,被认为是最有效和最有前途的心脑血管疾病治疗方法. 体外循环除去 LDL 的技术包括血浆置换^[6]、双重滤过^[7]、硫酸右旋糖酐纤维素吸附^[8]、免疫吸附^[9]、肝素诱导体外 LDL 沉淀(HELP)^[10] 以及血液灌流吸附(DALI)^[11] 等. 除 DALI 外,在清除 LDL 前,都必须进行血浆分离,然后再对血浆中的 LDL 进行清除. 膜分离是血浆分离的常用方法,因此制备对 LDL 具有选择性吸附的高分子分离膜,在进行血浆分离时,同时实现 LDL 的清除具有重要的现实意义.

LDL 分子呈正电性(其分子中的 B100 结构中含有特有的呈正电性的赖氨酸和精氨酸),肝素带有呈负电性的磺酸基和羧基,二者能够通过静电作用实现特异性结合^[12],将肝素固载到固体表面可以制得对 LDL 具有选择性吸附功能的材

料. Ma 等^[13] 用肝素修饰聚乙烯醇材料、Huang 等^[14] 用肝素修饰聚砜膜表面,发现修饰后的材料均对 LDL 具有选择性吸附性能. Matharu 等^[15] 通过自组合法将肝素固定到载体表面制得对 LDL 具有识别性能的传感器. 研究还表明,将肝素固定于高分子材料表面,可以有效改善材料的表面生物相容性和血液相容性^[14,16,17].

聚丙烯微孔膜(PPMM)由于具有良好力学性能、化学稳定性、价格低廉,成为生物分离的材料之一,但由于疏水性较高而使其生物相容性不好. 研究发现,通过表面改性可以改善其血液相容性^[18,19]. 本研究以 PPMM 为基膜,通过化学方法,将肝素共价固定到 PPMM 表面,以期获得具有优异血液相容性且对 LDL 具有选择识别作用的高分子分离膜材料. 分别采用 ATR-FTIR、XPS、静态水接触角对膜表面组成与性能进行表征,通过酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)技术研究肝素化 PPMM 与 LDL 的相互作用行为,并基于血小板黏附实验考察了膜表面的血液相容性.

^{*} 2010-09-29 收稿,2010-11-15 修稿;国家自然科学基金(基金号 50703034)和国家杰出青年基金(基金号 50625309)资助项目;

^{**} 通讯联系人, E-mail: xuzk@zju.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.10271

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

PPMM 由德国 Membrana 有限公司生产,平均孔径 $0.2\ \mu\text{m}$,孔隙率约 75%;肝素钠(Heparin)为 Aladdin 公司产品;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自上海共价化学科技有限公司;甲苯胺蓝(TB)、柠檬酸、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氢氧化钠、浓硫酸、30%过氧化氢、丙酮、乙二胺(EDA)购自国药集团化学试剂有限公司;正庚烷为上海试剂总厂产品;吐温 20 为温州清明化工有限公司产品;二苯甲酮,上海双香助剂厂生产;以上试剂均为分析纯.丙烯酸(AA)为上海凌峰化学试剂有限公司产品,使用前减压蒸馏提纯;低密度脂蛋白(LDL), $\geq 95\%$,购自 Millipore 公司;牛血清白蛋白(BSA), $\geq 96\%$,上海神航生物科技有限公司;人血清白蛋白(HSA)、抗体一(IgY)、抗体二(IgG)为 Sigma 公司产品;富血小板血浆由杭州献血站提供.

PHI-5000C ESCA X-射线光电电子能谱,美国 Perkin Elmer 公司;Nexus 470 型衰减全反射红外光谱,美国 Thermo Nicolet 公司;CTS-200 型接触角测定仪,宁波迅高智能科技有机公司;UV-2450 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;ELx800 型酶标仪,美国 BioTek 公司;场发射扫描电子显微镜 SIRION-100,荷兰 FEI 公司;紫外光接枝聚合装置(功率 500 W,主要工作波长 365 nm),实验室自制.

1.2 PPMM 表面肝素的固定化

1.2.1 AA 在 PPMM 表面的光引发接枝聚合

以二苯甲酮(BP)为光敏剂,通过紫外光(功率 500 W,主要工作波长 365 nm)照射激发夺取 PPMM 上氢生成自由基,进而引发 AA 在 PPMM 表面的接枝聚合,具体过程如下:将经过丙酮清洗的 PPMM 在 25 mmol/L BP 正庚烷溶液中浸泡 60 min 后,在空气中晾干,使 BP 包埋到 PPMM 中.用丙酮浸润 3~4 s,将膜迅速用两张滤纸夹覆,置于培养皿中,注入约 2 mL 0.5%~4.0% (V/V) AA 溶液,紫外光照射 15 min 后将膜取出,用去离子水反复洗涤,烘干后置于干燥器中备用.

1.2.2 乙二胺的固定化

将 AA 接枝的 PPMM 置于 15 mL 的锥形瓶中,加入 4 mL 去离子水、2 mL pH = 5.6 的柠檬酸

缓冲溶液、2.3 mL 50 mg/mL NHS 水溶液及 1.0 mL 20 mg/mL EDC·HCl 水溶液,混合后于 20℃ 恒温水浴中振荡反应 90 min,将膜取出,用柠檬酸缓冲溶液洗涤 3 次后,浸入到乙二胺溶液中振荡反应 24 h.将膜取出,用去离子水反复洗涤,烘干后置于干燥器中备用.

1.2.3 肝素的固定

将 50 mg 肝素溶于 10 mL pH = 5.6 的柠檬酸缓冲溶液中,加入 50 mg EDC·HCl 及 30 mg NHS 后,再将已固定有乙二胺的 PPMM 浸入其中,混合后于室温下振荡反应 24 h,用 pH = 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)反复清洗,烘干后置于干燥器中备用.

1.3 肝素固定化密度的测定

采用 TB 法测定肝素的固定量^[20].将表面固定肝素的 PPMM 样品剪成直径 1.4 cm 的圆片,置于 24 孔板中.加入 1 mL 0.2 wt% 的 NaCl 溶液以及 1 mL TB 标液(将 TB 溶于含有 0.2 wt% NaCl 的 0.01 mol/L HCl 溶液中,制成 0.005% 的 TB 标准溶液),振荡反应 30 min,使得膜表面的肝素与溶液中的 TB 充分反应,移取液相 1.5 mL 并加入 1.5 mL 0.2 wt% 的 NaCl 溶液混合均匀,倒入比色皿中,测其在 631 nm 处的吸光度.根据标准曲线计算膜表面肝素的密度.所有数据均为 5 次测量的平均值.

1.4 膜的表征

采用 ATR-FTIR 分析改性过程中膜表面基团的变化,XPS 分析样品表面组成及各元素的相对含量.

采用座滴法测量样品的静态接触角.测量时,将样品用双面胶带平整地贴于载玻片上,将 2 μL 液滴滴在膜表面,用摄像机迅速拍摄液滴曲面,然后经电脑拟合计算,得出样品的静态水接触角.所有数据均为 5 次测量的平均值.

1.5 LDL 的吸附与脱吸附实验

1.5.1 LDL 的吸附实验

将肝素固定化前后的 PPMM 剪成直径 1.4 cm 的圆片,置于 24 孔板中,依次在 500 μL 不同浓度 LDL (或 LDL 与 HSA 二元混合蛋白质,溶解在 pH = 7.4 的 PBS 中)、封闭剂(含 1% BSA 的 PBS 溶液)、抗一(用含 0.1 wt% BSA 的 PBS 溶液稀释 5000 倍)、抗二(用含 0.1 wt% BSA 的 PBS 溶液稀释 10000 倍)中培育 60、30、60、60 min,前两次培育后用 1 mL pH = 7.4 的 PBS 洗 3 遍,后两

次培育后用 TBS 溶液(含 137 mmol/L 的 NaCl, 1.4 mmol/L 的 KH_2PO_4 , 4.3 mmol/L 的 Na_2HPO_4 以及 2.7 mmol/L 的 KCl, 用 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液标定至 $\text{pH} = 7.4$, 再加入 0.1% 的吐温 20) 洗 3 遍. 然后将膜转移至一个新的 24 孔板中, 加入 500 μL 底物溶液(含 0.2 mol/L Na_2HPO_4 和 0.1 mol/L 柠檬酸混合液), 室温反应 10 min 后加入 500 μL 终止剂(1 mol/L 的 H_2SO_4), 用酶标仪测定溶液在 450 nm 处的吸光度, 平行测定 3 次取平均值.

1.5.2 LDL 的脱吸附实验

在含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL 和 1.0 mg/mL HSA 二元混合蛋白质溶液中培育 1 h 后, 将膜片浸入不同浓度的 NaCl 溶液中洗 3 遍, 然后按吸附实验过程测量膜表面剩余的 LDL 的量, 平行测定 3 次取平均值.

1.6 吸附选择性的考察

配制不同比例的 LDL 与 HSA 混合蛋白溶液, 用改性前后 PPMM 膜对溶液中的 LDL 进行吸附, 并按 1.5.1 节方法测定吸光度. 用 HSA 对 LDL 吸附量的影响程度来评价膜的选择性.

1.7 血小板黏附性能测试

取大约 20 μL 富血小板血浆与膜接触 30 min 左右; 用 PBS ($\text{pH} = 7.4$) 清洗多次, 然后放入 2.5% 的戊二醛/PBS 溶液中固定 30 min; 固定后的膜用去离子水冲洗后, 依次放入 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇溶液各浸泡 30 min 脱水, 最后以扫描电镜观察血小板在 PPMM 表面的黏附情况.

2 结果与讨论

2.1 PPMM 表面的肝素固定化

如图 1 所示, 通过紫外光引发 AA 接枝聚合, 制得表面被聚丙烯酸修饰、带有一 COOH 基团的 PPMM (PPMM-COOH); 然后将 PPMM-COOH 膜浸入到 EDC 和 NHS 溶液中, 形成易与伯胺反应的 NHS 酯, 再与过量的乙二胺(EDA)反应, 使其以酰胺键的形式键合到膜表面, 形成表面带胺基的 PPMM (PPMM-NH₂); 最后再通过 EDC 和 NHS 对肝素分子中的羧基进行活化, 使之与膜表面的胺基反应形成酰胺键, 从而将肝素固定到膜表面, 获得表面肝素化 PPMM (PPMM-Heparin)^[21-23].

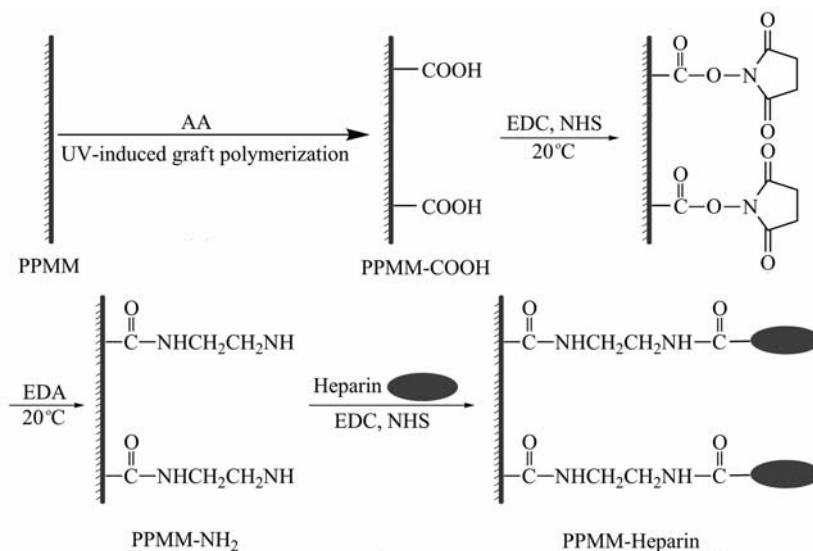


Fig. 1 Scheme of heparin immobilization on PPMM

PPMM-COOH 表面的羧基含量是影响肝素固定化密度的主要因素之一, 可通过紫外接枝时 AA 的浓度变化来改变膜表面的羧基含量^[24], 从而有效调控膜表面肝素的固定化密度, 图 2 显示了紫外接枝时 AA 浓度与肝素固定化密度的关系. 随 AA 浓度的增大, PPMM 表面羧基含量增大, EDA 的键合密度也因此增大, 从而有利于肝

素在膜表面的固定化. 但由于肝素大分子流动体积较大, 空间位阻作用以及固定化反应的非均相特性, 使得膜表面的氨基与肝素分子反应难以高效进行, 导致肝素在 PPMM 表面的固定密度难以达到较高水平^[14,20].

2.2 膜表面的化学组成与亲水性

采用 ATR-FTIR 对改性前后膜表面基团的变

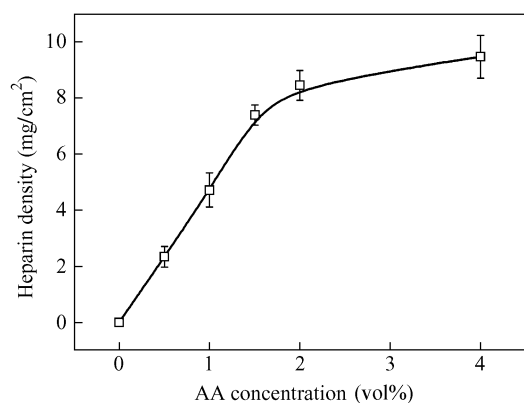


Fig. 2 Relationship between the AA concentration and the heparin immobilization density on PPMM

化进行了分析,结果如图 3 所示. AA 接枝后, PPMM 在 3413 cm^{-1} 和 1721 cm^{-1} 处分别出现了归属于 O—H 和 C=O 的伸缩振动吸收峰. 与 EDA 反应后,在 1645 cm^{-1} 和 1561 cm^{-1} 处分别出现了酰胺 I 带和酰胺 II 带的吸收峰,且 1721 cm^{-1} 处 C=O 的伸缩振动吸收峰明显减弱,说明 AA 接枝膜上的羧基经 EDC、NHS 活化后,与 EDA 分子中的胺基之间通过酰胺键相连接. 膜表面肝素固定化后,在 1071 cm^{-1} 处出现了归属于 S=O 的对称伸缩振动吸收峰,证实了膜表面肝素的存在,且受肝素分子中大量羟基的影响, 3400 cm^{-1} 处的吸收峰明显增强.

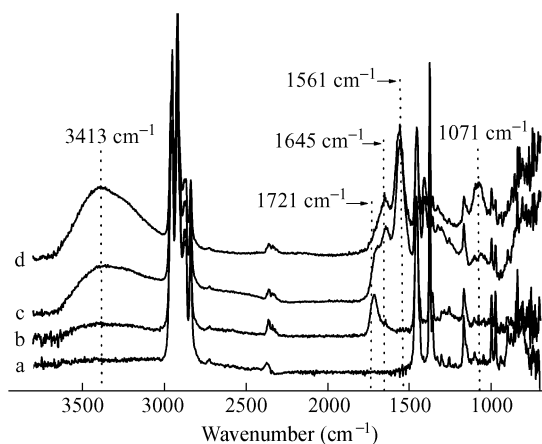


Fig. 3 ATR-FTIR spectra of the membranes: (a) nascent PPMM, (b) PPMM-COOH ($151.43\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$), (c) PPMM-NH₂ ($55.74\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and (d) PPMM-Heparin ($7.39\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

采用 XPS 分析了改性过程中膜表面化学成分的变化,结果见图 4 和表 1. 通过对比发现, AA 接枝后,在 537 eV 处增加了归属于 O 1s 的发射峰;用 EDA 修饰后,在 404 eV 处增加了归属于 N

1s 的发射峰, N 元素含量为 5.64% ; 膜表面固定肝素后,分别在 237 eV 和 172 eV 处增加了归属于 S 2s 和 S 2p_{3/2} 的发射峰, S 元素含量为 0.86% .

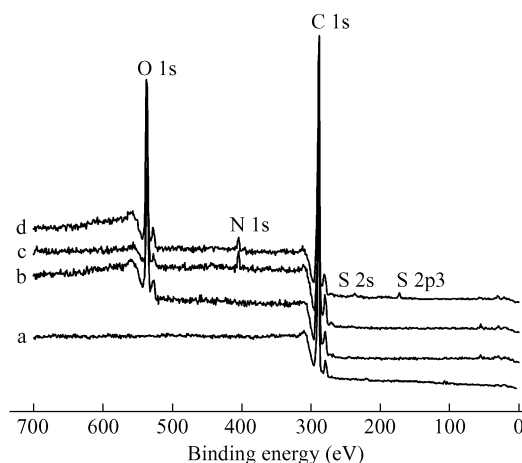


Fig. 4 XPS spectra of the membranes: (a) nascent PPMM, (b) PPMM-COOH ($151.43\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$), (c) PPMM-NH₂ ($55.74\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and (d) PPMM-Heparin ($7.39\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Table 1 Chemical composition of the membrane surfaces calculated from XPS spectra

Membrane sample	Molar relative content (%)			
	[C]	[O]	[N]	[S]
PPMM	100	—	—	—
PPMM-COOH ($151.43\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	77.03	22.97	—	—
PPMM-NH ₂ ($55.74\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	81.15	13.21	5.64	—
PPMM-Heparin ($7.39\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	70.06	24.75	4.33	0.86

图 5 显示了 PPMM 和 PPMM-Heparin 表面的静态水接触角. 可见, PPMM 表面固定肝素后, 静态水接触角明显减小. 当肝素固定密度为 $7.39\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时, 静态水接触角由 PPMM 的 $(138 \pm 7.2)^\circ$ 下降至 $(35.1 \pm 2.7)^\circ$, 表明 PPMM-Heparin 表面的亲水性明显得到改善. 此外, 随着肝素固定密度的增大, PPMM 的静态水接触角逐渐减小, 说明表面亲水性逐渐增强.

2.3 肝素化 PPMM 对 LDL 的吸附与脱吸附行为

ELISA 技术具有稳定性高、方便迅速、特异性强等优点, 已广泛用于生物材料与蛋白质相互作用行为的研究^[14,25,26]. 在抗体一稀释 5000 倍、抗体二稀释 10000 倍的条件下, 采用 ELISA 技术获

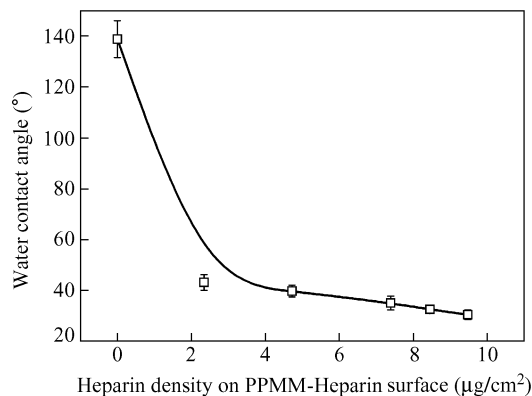


Fig. 5 Water contact angle of the PPMM-Heparin membranes with different heparin densities

得的吸光度与 LDL 在膜上的吸附量具有良好的线性关系, $Y = 0.1982 + 1.902X$ (Y 为吸光度, X 为 LDL 浓度, 浓度单位为 $\mu\text{g/mL}$), 线性相关系数 $R = 0.99902$. 这表明可借助 ELISA 技术来比较 LDL 在 PPMM 表面吸附量的大小. 因此, 我们采用 ELISA 技术来研究 LDL 在肝素固定前后 PPMM 表面的吸附、脱吸附情况.

研究发现, 肝素化膜对 LDL 的吸附量随着膜表面肝素接枝密度的增大而逐渐增大, 但当肝素接枝量为大于 $7.39 \mu\text{g/cm}^2$ 时, 肝素化膜表面部分微孔被堵, 膜对 LDL 吸附量的增大幅度明显减弱, 在接枝密度达 $8.45 \mu\text{g/cm}^2$ 时, 膜对 LDL 的吸附量趋于饱和. 因此在以下的研究中, 均选用肝素接枝量为 $7.39 \mu\text{g/cm}^2$ 的膜. 图 6 为 PPMM 及 PPMM-Heparin 对单蛋白质溶液中 LDL 的等温吸附曲线. 从图可知, 两种膜对 LDL 的吸附量均随着 LDL 浓度的增大而增加, 并逐渐趋于饱和, 属于 Langmuir 型单分子层吸附. 蛋白质与疏水材料间主要靠疏水作用力相吸附^[27,28], PPMM 表面固定肝素后, 膜表面的亲水性明显提高, 有利于形成界面水层, 抑制膜表面与蛋白质之间的疏水相互作用, 但研究结果却发现, PPMM-Heparin 对 LDL 的吸附量却明显高于 PPMM. 这说明固定肝素后, LDL 在 PPMM-Heparin 的吸附已不是靠疏水作用力, 而主要靠静电作用力^[15,29,30].

对比了 PPMM 及 PPMM-Heparin 对二元混合蛋白质溶液中 LDL 的吸附量差异, 结果如图 7 所示. 从图 7(a) 可见, 当维持二元混合蛋白质溶液中 LDL 以较低的浓度 $10 \mu\text{g/mL}$ 不变时, 随着 HSA 浓度的不断增大, PPMM 对 LDL 的吸附量显著下降, 但 PPMM-Heparin 对 LDL 的吸附量减小

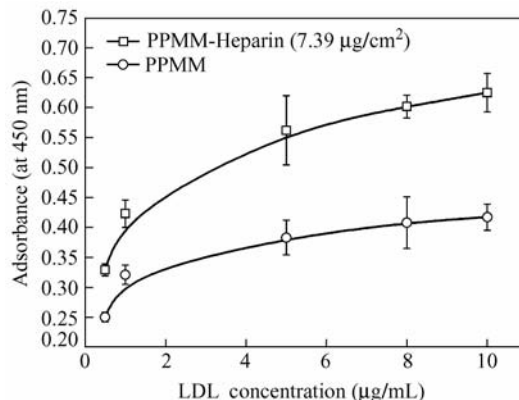


Fig. 6 Adsorption of LDL from single protein solution with different concentrations on the nascent PPMM and PPMM-Heparin

幅度较小. 当 HSA 浓度增大到 10.0 mg/mL 时 (此时 LDL 与 HSA 的浓度比例为 1:1000, 远远低于正常人体血浆中 LDL 与 HSA 的浓度比 (正常人体血浆中 LDL 与 HSA 的比例为 1:30~50, 高血脂症患者体内血浆中 LDL 与 HSA 的比例约为 1:18~30^[1,2])), PPMM 对 LDL 的吸附量已非常小, 而 PPMM-Heparin 对 LDL 却仍有较大的吸附量. 研究还采用紫外分光光度法考察了肝素化前后膜对 HSA (溶解在 $\text{pH} = 7.4$ 的 PBS 中) 的吸附情况, 结果发现肝素化后膜对 HSA 的吸附能力减弱, 且随肝素接枝密度的增大而减弱, 当肝素接枝密度达 $7.39 \mu\text{g/cm}^2$ 时, 膜对 HSA (浓度为 1.0 mg/mL) 的吸附量约为修饰前的 20%. 以上结果说明了 PPMM-Heparin 对 LDL 的吸附具有选择性. 此外, 当维持二元混合蛋白质溶液中 HSA 浓度为 1.0 mg/mL 不变时, 不同 LDL 浓度对膜表面蛋白质吸附的影响如图 7(b) 所示. 结果发现, 随着 LDL 浓度的增大, 膜对 LDL 的吸附量逐渐增大, 但 PPMM-Heparin 对 LDL 吸附量的增大幅度更为明显, 进一步证实了 PPMM-Heparin 对 LDL 的吸附具有选择性.

以不同浓度的 NaCl 溶液作为洗脱剂, 对膜表面吸附的 LDL 进行了洗脱, 结果如图 8 所示.

从图可知, PPMM-Heparin 表面上 LDL 的脱附量较大, 且随 NaCl 浓度的增大而增大, 但 PPMM 表面上 LDL 的脱附量却非常小. 这说明 PPMM-Heparin 表面吸附的 LDL 能够被 NaCl 溶液洗脱下来, 且随着洗脱剂 NaCl 浓度的增大, LDL 被洗脱下来越多, 而 PPMM 表面吸附的 LDL 却难以被 NaCl 溶液洗脱. 这主要是由于 LDL 带有大

量正电荷微区,容易与 PPMM 表面固定的肝素(带大量磺酸基、羧基等阴离子基团)发生静电相互作用,这种静电相互作用容易被溶液中的电解质所干扰,从而将吸附于 PPMM-Heparin 表面的 LDL 洗脱. 以上结果表明,PPMM 表面对 LDL 的吸附是不可逆吸附,一旦吸附 LDL 后膜难以再生;而 PPMM-Heparin 对 LDL 的吸附是可逆吸附,可以对膜进行洗脱再生,有利于膜的重复使用.

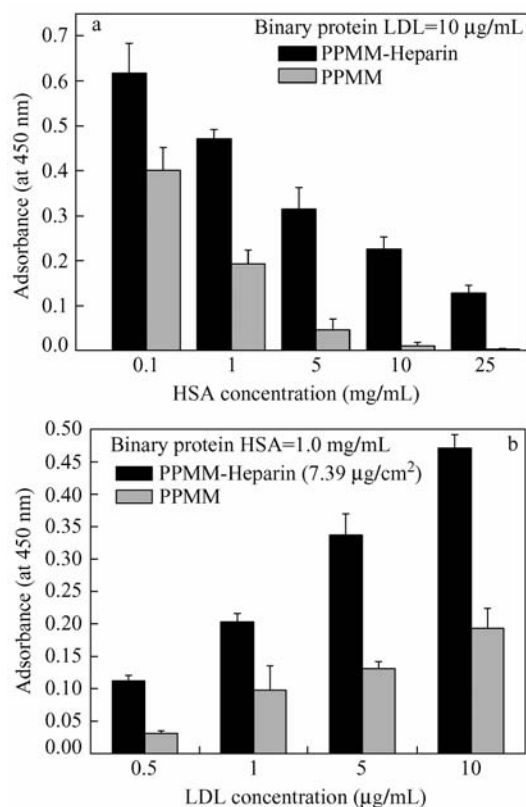


Fig. 7 Adsorption of LDL on the nascent PPMM and PPMM-Heparin from binary protein solution of LDL and HSA: (a) LDL = 10 $\mu\text{g/mL}$, HSA = 0.1, 1.0, 5.0, 10, 25 mg/mL and (b) HSA = 1.0 mg/mL, LDL = 0.5, 1.0, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$

2.4 血小板的黏附

进一步通过膜表面的血小板黏附行为考察了 PPMM-Heparin 表面的血液相容性,结果如图 9 所示. 从图中可以看到,PPMM 表面黏附了大量的血小板,而 PPMM-Heparin 表面血小板黏附数量明显减少,且随肝素固定密度的增加而减少. 说明固定肝素层有效地抑制了血小板在 PPMM 表面的黏附. 此外,粘附血小板的形貌也有显著差别. 在 PPMM 表面,血小板间发生明显的聚集和变形,并有伪足伸出,这是由于膜表面血液相容性差导致凝血因子的释放. 而 PPMM-Heparin 膜表面黏附

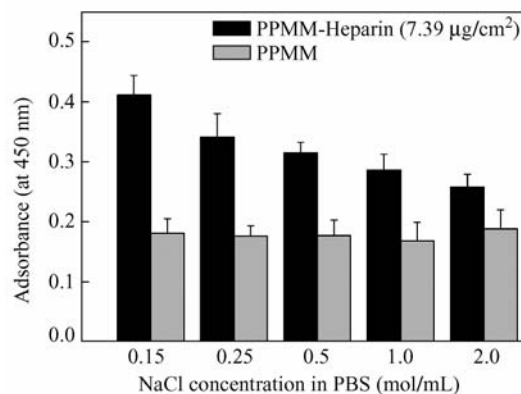


Fig. 8 Desorption of LDL from nascent PPMM and PPMM-Heparin by NaCl solution with different concentrations

的血小板呈紧凑的圆球形,未见伪足形成.

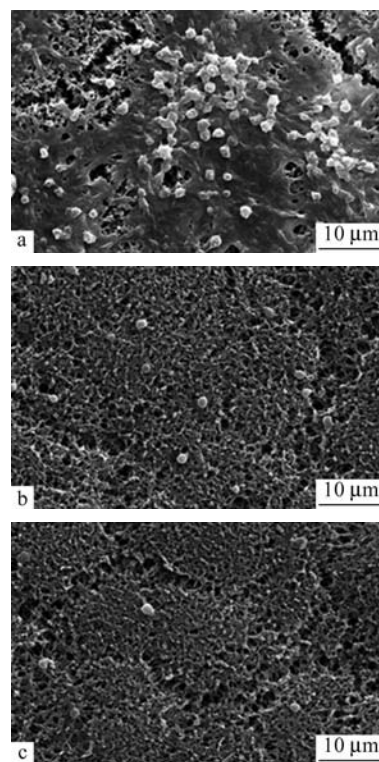


Fig. 9 Scanning electron micrographs of adhered platelets on the membrane surfaces: (a) nascent PPMM; (b) PPMM-Heparin (2.34 $\mu\text{g/cm}^2$) and (c) PPMM-Heparin (7.39 $\mu\text{g/cm}^2$)

3 结论

通过丙烯酸接枝、羧基活化、共价键合三步反应,将肝素固定到 PPMM 表面,且膜表面肝素的固定密度可以通过改变紫外接枝时 AA 的浓度进行调控. 固定肝素后膜的亲水性和血液相容性均得到明显的改善,在肝素固定密度为 7.39 $\mu\text{g/}$

cm^2 时,水接触角由 PPMM 的 $(138 \pm 7.2)^\circ$ 下降至 $(35.1 \pm 2.7)^\circ$ 。LDL 吸附结果表明,固定肝素后,PPMM 对 LDL 的吸附量明显增大,且吸附具有选

择性和可逆性,有利于膜的再生与重复使用,可望用于体外循环直接从血浆或全血中除去 LDL。

REFERENCES

- 1 Fox K M, Gandhi S K, Bullano M F, Ohsfeldt R L, Davidson M H. *Circulation*, 2008, 117: E425 ~ 426
- 2 Shah P K. *Circulation*, 2002, 106: 2039 ~ 2040
- 3 Putz G, Eckes J, Schmah O, Winkler K, Wieland H. *Ther Apher Dial*, 2008, 12: 2 ~ 12
- 4 Masana L, Villoria J, Sust M, Ros E, Plana N, Perez-Jimenez F, Franco M, Olivan J J, Pinto X, Videla S. *Eur J Pharmacol*, 2004, 496: 205 ~ 212
- 5 Davidson M, McGarry T, Bettis R, Melani L, Lipka L, LeBeaut A, Suresh R, Sun S, Veltri E, Grp E S. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39: 226 ~ 227
- 6 Thompson G R, Lowenthal R, Myant N B. *Lancet*, 1975, 1: 1208 ~ 1211
- 7 Matsuda Y, Malchesky P S, Nose Y. *Artif Organs*, 1996, 20: 346 ~ 354
- 8 Asahi T, Yamamoto T, Kutsuki H. *Ther Apher Dial*, 2003, 7: 73 ~ 77
- 9 Stoffel W, Demant T. *Proc Nati Acad Sci USA*, 1981, 78: 611 ~ 615
- 10 Wang Y, Walli A K, Schulze A, Blessing F, Fraunberger P, Thaler C, Seidel D, Hasbargen U. *Transfus Apher Sci*, 2006, 35: 103 ~ 110
- 11 Bosch T, Lennertz A, Kordes B, Samtleben W. *Ther Apher*, 1999, 3: 209 ~ 213
- 12 Gaus K, Hall E A H. *J Colloid Interf Sci*, 1999, 217: 111 ~ 118
- 13 Ma K W, Ma L, Cai S X, Wang X, Liu B, Xu Z L, Dai X Z, Yang J Y, Jing A H, Lei W J. *J Mater Sci-Mater M*, 2008, 19: 3255 ~ 3261
- 14 Huang X J, Guduru D, Xu Z K, Vienken J, Groth T. *Acta Biomater*, 2010, 6: 1099 ~ 1106
- 15 Matharu Z, Arya S K, Sumana G, Gupta V, Malhotra B D. *J Mol Recognit*, 2008, 21: 419 ~ 424
- 16 Pu Hongting(浦鸿汀), Wang Yongxing(王永星), Kong Xiangqing(孔祥清), Wan Decheng(万德成). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2007, (8): 719 ~ 724
- 17 Zhu Liping(朱利平), Xu Youyi(徐又一), Xi Zhenyu(奚振宇), Zhu Baoku(朱宝库). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2009, (4): 394 ~ 397
- 18 Xu Z K, Kou R Q, Liu Z M, Nie F Q, Xu Y Y. *Macromolecules*, 2003, 36: 2441 ~ 2447
- 19 Li Gang(李刚), Sun Qiushi(孙求实). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 1998, (4): 589 ~ 591
- 20 Chen H, Chen Y, Sheardown H, Brook M A. *Biomaterials*, 2005, 26: 7418 ~ 7424
- 21 Teste B, Vial J, Descroix S, Georgelin T, Siaugue J M, Petr J, Varenne A, Hennion MC. *Talanta*, 2010, 81: 1703 ~ 1710
- 22 Monier M, Wei Y, Sarhan A A, Ayad D M. *Polymer*, 2010, 51: 1002 ~ 1009
- 23 Jiang K Y, Schadler L S, Siegel R W, Zhang X J, Zhang H F, Terrones M. *J Materia Chem*, 2004, 14: 37 ~ 39
- 24 Yu H Y, Xu Z K, Yang Q, Hu M X, Wang S Y. *J Membr Sci*, 2006, 281: 658 ~ 665
- 25 Men J S, Lang L W, Wang C Y, Wu J H, Zhao Y, Jia P Y, Wei W Q, Wang Y X. *Anal Biochem*, 2010, 401: 211 ~ 216
- 26 Bon B, Houze S, Talabani H, Magne D, Belkadi G, Develoux M, Senghor Y, Chandenier J, Ancelle T, Hennequin C. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 1716 ~ 1719
- 27 Nakamura K, Matsumoto k. *J Membr Sci*, 2006, 285: 126 ~ 136
- 28 Bayramoglu G, Yalcin E, Arica M Y. *Biochem Eng J*, 2005, 26: 12 ~ 21
- 29 Gigli M, Consonni A, Ghiselli G, Rizzo V, Naggi A, Torri G. *Biochemistry-Us*, 1992, 31: 5996 ~ 6003
- 30 Cardin A D, Randall C J, Hirose N, Jackson R L. *Biochemistry-Us*, 1987, 26: 5513 ~ 5518

SURFACE HEPARINIZATION OF POLYPROPYLENE MICROPOROUS MEMBRANES FOR SELECTIVE ADSORPTION OF LOW-DENSITY LIPOPROTEIN

ZHENG Ximing^{1,2}, HUANG Xiaojun², XU Zhikang²

(¹ Department of Environment and Architectural Engineering of Wuyi University, Wuyishan 354300)

(² MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization,

Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract To endow polypropylene microporous membrane (PPMM) with adsorption selectivity to low-density lipoprotein (LDL), a versatile method was developed to covalently immobilize heparin on the PPMM surface. This was achieved by grafting acrylic acid (AA) on the PPMM surface by UV irradiation, and subsequent chemical binding of heparin with ethylenediamine as a spacer. The membrane surfaces were characterized by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy. The hydrophilicity and blood compatibility of the PPMM surface were improved obviously by the surface heparinization. Water contact angle of the membrane surface was decreased from $(138 \pm 7.2)^{\circ}$ for the nascent PPMM to $(35.1 \pm 2.7)^{\circ}$ for the heparinized PPMM with $7.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ heparin. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to analyze the adsorption of the LDL on the nascent and heparinized PPMMs. It was found that the surface heparinization greatly enhanced the adsorption of LDL both from single protein solution and binary protein solution containing human serum albumin (HSA), and the heparinized PPMM could selectively adsorb LDL from binary protein solution. In addition, the adsorbed LDL could be desorbed from the heparinized PPMM with sodium chloride solution, which indicated the adsorption was of reversibility.

Keywords Polypropylene microporous membrane, Surface modification, Heparinization, LDL adsorption