

·快报·

含悬挂羧基手臂聚乳酸材料的合成与血小板粘附性研究^{*}

王 蔚 贾小华 刘 媛 王 亮 袁 直^{**}

(功能高分子材料教育部重点实验室 南开大学高分子研究所 天津 300071)

摘 要 制备了乳酸- β -苹果酸共聚物,并在此基础上进一步修饰合成了含悬挂羟基(PLMAHE)以及悬挂羧基(PCA-PLA)的聚乳酸共聚物,利用原子力显微镜及环境扫描电镜,观察了聚合物膜的表面形貌以及粘附在聚合物膜上的血小板数量与形态.结果表明含悬挂羟基材料表面粘附血小板时发生聚集并有伪足生成,含悬挂羧基材料表面血小板粘附数量较少且形态正常,有望成为优良的抗凝血材料.

关键词 功能化聚乳酸, 聚苹果酸, 血小板粘附

脂肪族聚酯,特别是聚乳酸类聚合物由于其良好的生物降解性及优良的组织相容性,在骨修复、人造皮肤以及药物递送系统的领域均有广泛的应用^[1,2].但聚乳酸亲水性较差,血液相容性欠佳,限制了这类材料在血管替代物等方面的应用^[3].为解决这一问题,研究者多年来采用了多种方法对聚乳酸进行改性,如表面改性、端基修饰及物理涂敷^[4]等.其中采用共聚改性来改善聚乳酸性能的方法,由于其合成方法成熟,结构可控以及产物稳定等优点,而成为研究的热点.

苹果酸是三羧酸循环中间产物,具有良好的组织相容性.采用苹果酸与乳酸共聚,不仅可改善材料的亲水性,还可提供用于进一步修饰改性的侧羧基,以增强材料的血液相容性及细胞亲和性^[5].

本文合成了乳酸-苹果酸共聚物(PLMA),通过对其侧羧基进行修饰,得到了含悬挂羟基及悬挂羧基的共聚物(PLMAHE, PCA-PLA).并通过血小板粘附实验及原子力显微镜,环境扫描电镜,考察改性聚乳酸材料的血液相容性.结果表明,改性后的材料均可在一定程度上降低血小板的粘附;PLMAHE表面的血小板呈聚集状,并有大量伪足

出现;PCA-PLA表面只有极少量的血小板粘附,且形态正常,有望成为新型抗凝血材料.

1 材料与仪器

丙交酯,北京元生融科技有限公司;辛酸亚锡,丁二酸酐,钯碳催化剂(Pd/C, 10%),均购自Aldrich试剂公司.其他化学试剂均为分析纯. MERCURY. VX300 核磁共振波谱仪; KW-4A 匀胶机; Sysmex SE-9000 血细胞分析仪; Nano III (R) A system 原子力显微镜; FEI(Quanta 200) 环境扫描电镜.

2 材料的合成表征与血小板粘附实验

聚乳酸、PLMA 以及 PLMAHE 的合成参考文献[6, 7]的方法.称取 0.6 g PLMAHE 共聚物溶解于 50.0 mL 1,4-二氧六环,向该溶液中加入 1.5 g 丁二酸酐,反应体系于 40℃ 搅拌反应 12 h.反应完毕后,减压除去溶剂,大量乙醇中沉淀,烘干.将所得产品溶于少量乙酸乙酯,将此溶液倒入大量乙醚中,得到白色沉淀.将沉淀真空干燥,得到含悬挂羧基聚乳酸共聚物 PCA-PLA.各聚合物结构如图 1 所示.

通过核磁确定各聚合物的结构与组成,其结果如下. PLMA, $\delta = 5.17$ 和 1.57 处的峰为聚乳酸结构单元中的次甲基 CH 和甲基 CH_3 的信号;

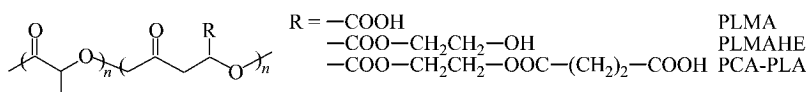


Fig. 1 Structure of the functional polylactides

^{*} 2007-09-19 收稿, 2007-11-07 修稿. 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 项目号 2005CB623904)资助项目; ^{**} 通讯联系人, E-mail: zhiy@nankai.edu.cn

5.50 和 2.90 处的峰分别为苹果酸内酯结构单元中的次甲基 CH 和 CH_2 的信号。PLMAHE, $\delta = 5.19$ 和 1.57 处的两组峰为聚乳酸结构单元的次甲基 CH 和甲基 CH_3 的信号。5.53 和 3.00 处的峰为内酯结构单元中在聚合物主链上的次甲基 CH 和亚甲基 CH_2 的信号。4.30 和 3.79 处的峰分别为内酯结构单元中侧链基团的亚甲基 CH_2 的信号。PCA-PLA: $\delta = 5.19$ 和 1.57 处信号峰分别归属为聚乳酸结构单元的次甲基 CH 和甲基 CH_3 的信号。5.53 和 3.00 处为内酯结构单元中在聚合物主链上的次甲基 CH 和亚甲基 CH_2 的信号。4.3 处为内酯结构单元中侧链基团的亚甲基 CH_2 的信号；在 2.56 处为丁二酸酐上的 CH_2 的氢的信号峰。

通过聚合物上的峰面积比,可以计算出各共聚物中功能单体含量约为 10% ;悬挂羧基接枝率约为 83% 。聚合物的分子量及分子量分布通过 GPC 测定,其结果见表 1。

Table 1 Molecular weight and composition of the polymers				
Polymer	Functional unit content (%)	Molecular weight		
		M_n	M_w	M_w/M_n
PLA	0	62100	73300	1.18
PLMA	9.4	29100	60900	1.56
PLMAHE	9.0	40600	58500	1.44
PCA-PLA	7.5	41300	54200	1.31

将以上聚合物各配制成浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的聚合物乙酸乙酯溶液,过膜($22\text{ }\mu\text{m}$),在无菌条件下滴加于固定在匀胶机的玻璃片上,旋转成膜(2000 r/min , 5 s ; 18000 r/min , 20 s)。将涂有聚合物薄膜的玻璃片取下,75% 乙醇溶液浸泡 2 h,紫外照射 30 min 灭菌,分别得到 PLA, PLMA, PLMAHE 和 PCA-PLA 膜,经 AFM 测定,膜厚度均约为 50 nm。

将新鲜人血在 800 r/min 速度下离心 10 min 后得富血小板血浆 (PRP)。取 PRP 0.5 mL,加入预先涂有聚合物薄膜的 5 mL 圆底瓶中,在 37°C 二氧化碳恒温箱中分别孵育 30 min 和 60 min,取出后将圆底瓶固定于玻球粘附仪的转动盘上,以 3 r/min 的速度转动 15 min,粘附前后血样经血细胞分析仪测定血小板数量,其差值即为血小板粘附量。每个样品测定 2 次取平均值。

将涂有共聚物薄膜的玻璃片用生理盐水浸泡 1 h,真空干燥。在原子力显微镜 (Nano III (R) A system, Veeco Inc.) 观察空白聚合物膜表面形态。

取 $200\text{ }\mu\text{L}$ PRP 用生理盐水稀释 5 倍后放入事

先铺好有聚合物薄膜盖玻片的培养瓶中,在 37°C 恒温箱中孵育 30 min,60 min 后分别取出移走血浆,用生理盐水漂洗 3 次,之后用 3% 戊二醛固定 5 h。固定完毕移走戊二醛,用生理盐水漂洗 3 次,30% 乙醇浸泡 5 min 进行脱水,最后用真空泵进行进一步干燥脱水脱醇。干燥后喷金在环境扫描电镜及原子力显微镜下观察血小板形态及数量。

3 讨论

从图 2 可以发现,在材料与血液接触 30 min 后,PCA-PLA 上的血小板粘附率明显少于其它材料。在 1 h 后,3 种改性聚乳酸材料上的血小板数量均较聚乳酸 (PLA) 有显著下降,特别是在含悬挂羧基聚乳酸材料上 (PCA-PLA) 几乎无血小板的粘附。说明功能化聚乳酸尤其是拥有悬挂羧基的材料,可以明显减少材料表面对血小板的粘附,具有优良的抗凝血效果。

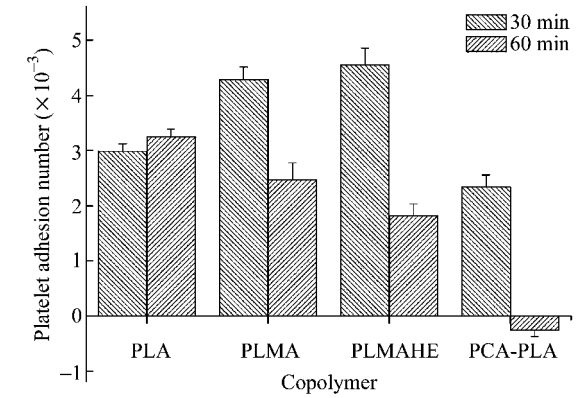


Fig. 2 The platelet adhesion number on the copolymer films
Original number of PRP is 1.3×10^4 .

图 3 显示了空白聚合物膜的表面形貌特征。通过 AFM 研究,可以看到不同聚合物膜的粗糙程度稍有区别。PLA 与 PLMA 薄膜表面显得比较平滑,而 PLMAHE 与 PCA-PLA 表面略显粗糙,PCA-PLA 表面还有一些岛状或坑状形貌,这在接枝聚合物的成膜过程中较为常见,这种情况在其他文献中也有报道^[8]。但其起伏程度均在 15 nm 以内,不会对血细胞的粘附造成影响。

图 4 和图 5 显示了血小板在聚乳酸及其共聚物膜上的粘附数量与形态(孵育 30 min 后)。从图 4(c)和图 5(c),(c') 中可见,PLMAHE 材料表面血小板多聚集,形状变得扁平,且有大量伪足生成。PCA-PLA 表面粘附的血小板数量明显少于其他材料,且血小板均呈球状,无聚集现象。

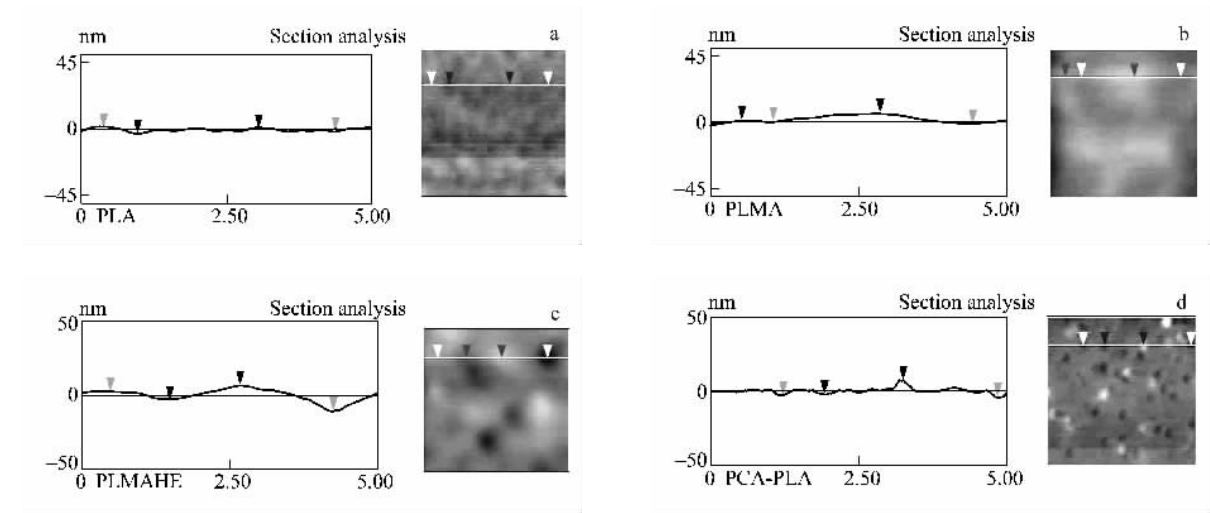


Fig. 3 Surface morphology of the polymer films
a) PLA ; b) PLMA ; c) PLMAHE ; d) PCA-PLA ; Scan size = 5 μm ; Data scale = 100 nm ; Scan rate = 1 Hz

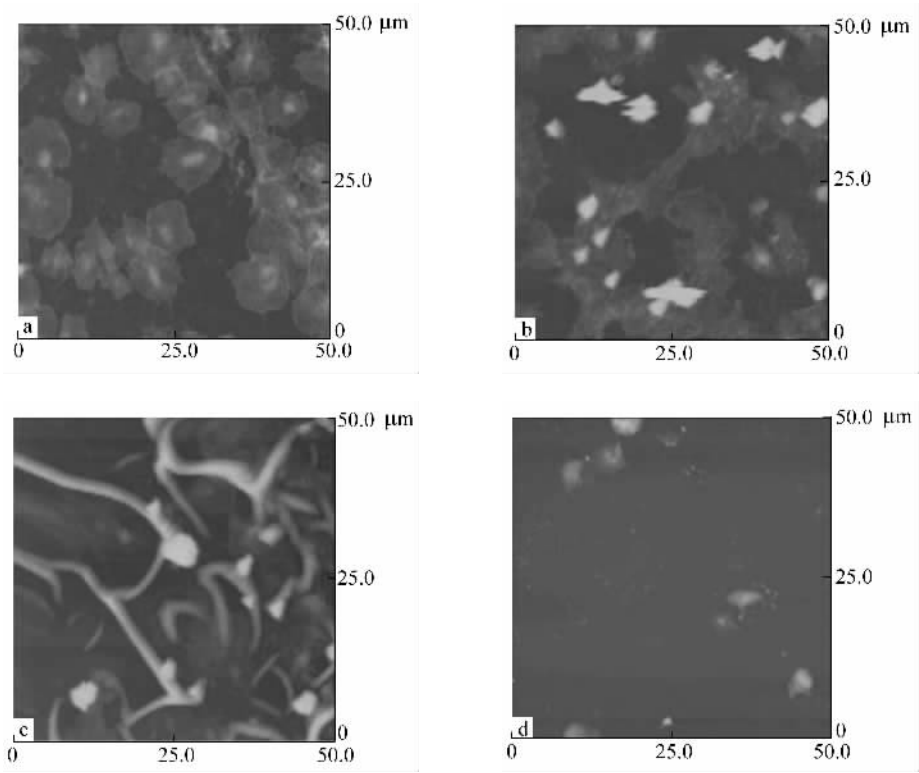


Fig. 4 AFM images of platelet adhered on polymer films (30 min)
a) PLA ; b) PLMA ; c) PLMAHE ; d) PCA-PLA ; Scan size = 50 μm , Data Scale = 5 μm , Scan rate = 0.5 Hz

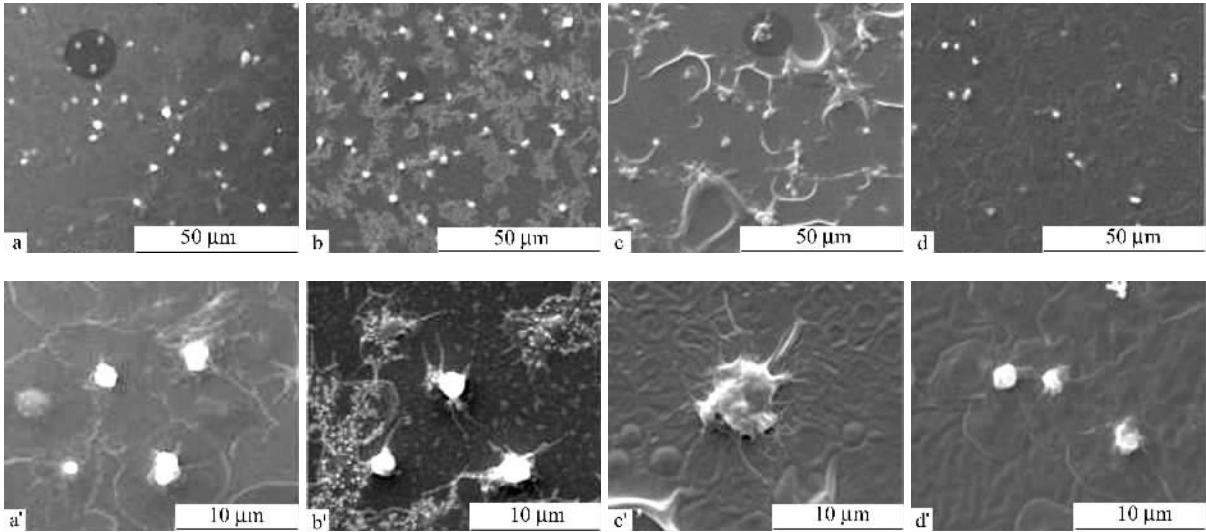


Fig. 5 SEM images of platelet adhered on polymer films (30 min)
a) PLA ; b) PLMA ; c) PLMAHE ; d) PCA-PLA ; (a') ~ (d') show the amplificatory images of red region in (a) ~ (d)

以上实验结果表明,此类含羟基材料可在一定条件下激活血小板,对于研制促凝材料有一定的意义.另外我们的研究发现 PCA-PLA 的悬挂羧基结构不仅表现出优良的抗凝血性,还有非常优

异的细胞粘附性,在内皮细胞粘附实验中其细胞粘附率明显高于其他 3 种材料(数据并未给出),有望用作新型抗凝血材料.

REFERENCES

1 Lewis D H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In Chasin M, Langer R eds. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. New York :Marcel Dekker,1990. Chapter 1,1 ~ 41
2 von Recum A F. Handbook of Biomaterials Evaluation. Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials. New York :Macmillan,1986
3 Margaret D M E, Steel J G. J Biomed Mater Res, 1998, 40 :621 ~ 630
4 Pu Ming(哺 鸣), Ji Jian(计 剑), Li Xiaolin(李 晓 林), Shen Jiacong(沈 家 骢). Acta Polymerica Sinica(高 分 子 学 报), 2006, (5) :703 ~ 706
5 He Bin(何 斌), Wan Yuqing(万 玉 青), Bei Jianzhong(贝 建 中), Wang Shenguo(王 身 国). Acta Polymerica Sinica(高 分 子 学 报), 2004, (5) :693 ~ 699
6 He B, Wan Y Q, Bei J Z, Wang S G. Biomaterials, 2004, 25 (22) :5239 ~ 5247
7 Wang L, Jia X H, Yuan Z. Polymer, 2006, 47 (20) :6978 ~ 6985
8 Krishna O D, Kim K, Byun Y. Biomaterials, 2005, 26 :7115 ~ 7123

SYNTHESIS AND PLATELET ADHESION CAPACITIES STUDY OF
FUNCTIONALIZED POLYLACTIDES WITH PENDANT CARBOXYL ARMS

WANG Wei, JIA Xiaohua, LIU Yuan, WANG Liang, YUAN Zhi

(Key Laboratory of Functional Polymer Materials, Ministry of Education, Institute of Polymer Chemistry,
Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract The use of synthetic vascular for cardiovascular and cerebrovascular tissue engineering has made tremendous progress in the past thirty years, but the clinical use of vascular conduits with diameters less than 6 mm remains unsuccessful because of the thrombus formation. Poly(lactic acid) (PLA) was well-suited for applications as tissue engineering materials due to their good biocompatibility and biodegradability. To improve the blood compatibility of polylactide, three polymers based on PLA and poly(malic acid) were synthesized by ring-opening polymerization, namely poly(lactide-co-β-malic acid) (PLMA), poly(lactide-co-RS-hydroxyethyl-b-malolactonate) (PLMAHE) and PLA with pendant carboxyl arms (PCA-PLA). The structure, composition and molecular weight of the copolymers were confirmed by 1H-NMR and GPC. AFM was first used to observe the morphology of the adhered platelets on the polymer films. The platelet adhesion amount on the polymer films was calculated by Hematology Analyzer. The results showed that the copolymers with functional side chains especially with pendant carboxyl arms could obviously reduce the platelet adhesion capacity on the copolymer films compared with PLA. The platelet amount adhered on PLA, PLMA and PLMAHE was 3.2×10^3 , 2.5×10^3 and 1.8×10^3 after 30 min, respectively, and there was few platelets adhered on the film with pendant carboxyl arms after 1 hour. The thickness of polymer films was determined by AFM, all films of each polymer were about 50 nm thick. From the images of AFM and SEM, it could be seen that only the polymer with hydroxyl groups could activate the platelet. In conclusion, the copolymer with pendant carboxyl was a hopeful material for vessel substitution with good blood compatibility.

Keywords Polylatides, Poly(malic acid), Platelet ! Adhesion