

文章编号:1671-6833(2009)01-0134-05

川芎嗪衍生物改性丝素材料体外抗凝血性研究

连小洁¹, 王松^{1,2}, 朱鹤孙²

(1. 北京理工大学材料科学与工程学院, 北京 100081; 2. 北京理工大学材料科学研究中心, 北京 100081)

摘要: 为了提高丝素材料的抗凝血性能, 尝试用活血化淤中草药川芎的有效成分川芎嗪对其进行改性。首先对川芎嗪的侧链进行结构修饰引入活性基团羟基, 然后通过酯化反应引入双键, 将得到的中间体进一步在无引发剂条件下接枝聚合在丝素材料表面。用傅立叶变换红外光谱 (FTIR)、傅里叶变换衰减全反射红外光谱 (ATR-FTIR)、扫描电镜 (SEM) 对改性丝素进行了结构鉴定。改性丝素的抗凝血性能通过部分凝血活酶时间 (APTT) 和血小板粘附等实验进行评价, 和未改性丝素相比, 改性后的丝素 APTT 时间延长, 同时在富血小板血浆中培养 30 min 后未发现有粘附的血小板, 说明川芎嗪衍生物改性丝素材料的体外抗凝血活性有所改善。

关键词: 丝素蛋白; 中草药; 四甲基吡嗪; 抗凝血材料

中图分类号: TB 324 **文献标识码:** A

0 引言

丝素蛋白为天然高分子材料, 是蚕丝的主要成分。由于其具有良好的生物相容性而广泛用于酶固定化技术, 细胞培养基质, 人工皮肤, 药物缓释材料等生物医用材料领域。然而, 丝素作为抗凝血材料的研究起步较晚, 目前, 主要通过材料表面肝素化^[1-2]、磺酸化^[3]等方法来提高丝素膜抗凝血性。有文献报道使用浓硫酸对丝素纤维进行处理, 得到了具有优良抗凝血性能的硫酸化丝素, 但这种处理会对丝素蛋白分子的链结构乃至整体性质造成影响^[4]。因此, 有必要进一步研究丝素纤维表面接枝其它抗凝血剂的方法。川芎嗪, 化学名为 2,3,5,6-四甲基吡嗪 (TMP), 是活血化淤中草药川芎的主要有效成份之一, 现在已可由人工合成。临床治疗及药理研究表明川芎嗪具有改善微循环、抑制血小板聚集、防止血栓形成等作用^[5], 并且从上世纪 70 年代起已成为国内临床治疗心脑血管病的常用药物。研究还发现, 川芎嗪的多种代谢产物有与川芎嗪相似的药理活性^[6]。作者受此启发对川芎嗪进行结构修饰, 合成了代谢产物, 并进一步在其侧链上引入乙烯基单体, 在无引发剂条件下接枝聚合与丝素材料表面, 得到改

性丝素纤维, 并将部分丝素纤维溶解制膜。这一研究对拓展中草药在生物医用材料领域中的应用具有重要意义。

1 原料与仪器

磷酸川芎嗪, 购自北京燕京制药厂; 丙烯酰氯, 购自 Alfa Aesar 公司; 其余试剂, 均购自北京化学试剂公司, 且均为 AR; 蚕丝, 购自中国纺织进出口总公司; 血浆采自健康人体, 购自北京北太平庄血站; 部分凝血活酶 (APTT) 试剂购自上海医科大学华山医院技协生物试剂公司。

ATR-FTIR 分析采用 Tensor 27 红外光谱仪; FTIR 分析采用 PE683 型红外分光光度计; 倒置显微镜 (IX-71, Olympus); APTT 测定采用半自动四通道凝血仪 (Coag-A-Mate XM); SEM 用 JSM-35C 型扫描电镜。

2 川芎嗪衍生物改性丝素蛋白材料的制备

川芎嗪衍生物改性丝素蛋白材料的制备路线如图 1 所示。其中 2,5-二羟甲基-3,6-二甲基吡嗪 (TMPD2) 为川芎嗪在体内的代谢产物。

收稿日期: 2008-09-15; 修订日期: 2008-10-30

基金项目: 国家“973”计划资助项目 (2005CB623906)

作者简介: 连小洁 (1982-), 女, 山西长子人, 北京理工大学博士研究生, 主要从事生物医用材料方面的研究。Email: yuhalian@126.com; wangsongbit@hotmail.com

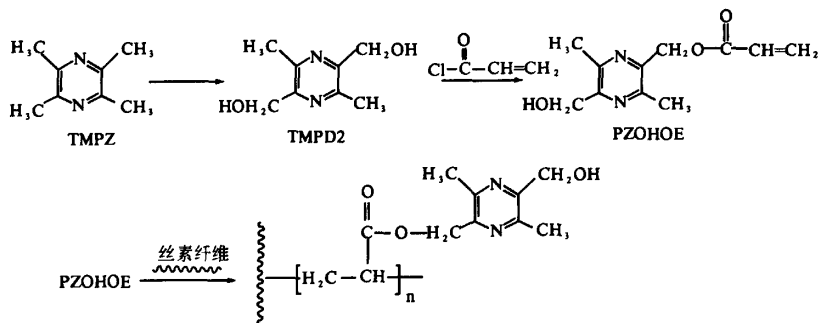


图1 川芎嗪衍生物改性丝素材料 PZOHOE-g-SF 的合成路线

Fig. 1 The synthesis route of PZOHOE-g-SF

2.1 2-丙烯酰氧亚甲基-5-羟甲基-3,6-二甲吡嗪(PZOHOE)的制备

图1中TMPD2的合成参考文献[7-8],用磷酸川芎嗪和双氧水在98℃下反应24h后,再将产物溶于乙酸酐中150℃下回流加热4h,加入NaOH调PH值至9~10,静置,过滤,乙酸乙酯萃取,旋转蒸发,进一步用硅胶色谱柱分离纯化,流动相:氯仿/石油醚/乙醇(20:11:2, v/v/v),得到产物TMPD2. FTIR (KBr): 3 241 cm^{-1} ($\nu\text{O}-\text{H}$), 2 931 cm^{-1} ($\nu\text{C}-\text{H}$), 1 450~1 650 cm^{-1} ($\nu\text{N}=\text{C}$). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (TMS, mg/ug): 2.47(s, 6H), 4.73(s, 4H), 4.21(s, 2H). 元素分析: Calcd.: C57.14, H7.14, N16.6; Found: C57.23, H7.15, N16.3.

将1.23 g TMPD2溶于DMF和吡啶的混合溶液中,强烈搅拌下滴加入含0.7 mL 丙烯酰氯的DMF的混合液,滴完后继续反应24 h. 滤除吡啶盐,用乙醚沉淀分离共混物,得橘色黏稠液体,反复用乙醚溶解、沉淀3次,分液,收集沉淀,真空挥发剩余溶剂,得到橘色较大黏度的目标产物2-丙烯酰氧亚甲基-5-羟甲基-3,6-二甲吡嗪(PZOHOE). FTIR (KBr): 1 735 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{O}$, 酯羰基), 1 489 cm^{-1} ($-\text{N}=\text{C}-$, 吡嗪环), 1 172 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$).

2.2 改性丝素蛋白纤维的制备

将蚕丝在0.5% NaHCO_3 溶液中煮沸脱去丝胶,用去离子水洗涤数次,并用丙酮抽提12 h以除去蚕丝中的蜡质物,室温真空干燥获得丝素蛋白纤维(SF).

文献[9]无引发剂条件下将乙烯基单体接枝聚合在丝素材料表面的方法. 称取一定量丝素蛋白纤维加入到新合成的PZOHOE的V(水): V(二氧六环)=1:1溶液中. 在真空条件下85℃水浴中反应3 h. 取出丝素蛋白纤维用丙酮和水

洗涤数次以除去没有接枝到丝素上的PZOHOE均聚物. 室温真空干燥,得到改性丝素纤维(PZOHOE-g-SF). 接枝率 η 的计算如下式:

$$\eta = [(W - W_0)/W_0] \times 100\% \quad (1)$$

式中: W_0 、 W 分别是丝素蛋白纤维接枝前后的重量.

将改性前后的丝素蛋白纤维分别溶解在80℃、80%的 ZnCl_2 水溶液中,在蒸馏水中透析4 d,随着透析的进行,溶液中逐渐析出沉淀,收集沉淀,干燥,进行红外光谱测试.

将改性前后丝素溶液分别涂敷在5 mm × 5 mm的正方形聚苯乙烯材料表面,50℃干燥成膜,并用乙醇浸泡处理,以减小丝素膜的水溶失率.

3 体外抗凝血性评价

3.1 体外凝血时间APTT的测定

测定丝素纤维的APTT,首先称取0.5 mg的材料铺满比色杯底部,加入0.1 mL血浆,37℃下预热3 min,再加入0.1 mL APTT试剂,活化3 min,最后加入0.1 mL浓度为30 mmol/L的氯化钙溶液,测样品的APTT值,重复测三次取平均值. 样品的对照组是空白血浆.

3.2 血小板粘附实验

按文献[10]方法进行丝素膜血小板粘附实验:富血小板血浆(PRP)由健康人血浆离心分离后得到. 样品先在pH=7.4的PBS磷酸缓冲溶液中浸泡1 h,取出后放入37℃的富血小板血浆中培养30 min,用PBS漂洗3次以除去粘附不牢的血小板. 然后将样品浸入体积分数为2.5%的戊二醛水溶液中固定30 min,再依次用体积分数为50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%的乙醇溶液浸泡,逐级脱水,室温干燥. 表面喷涂金后用扫描电镜(SEM)观察其形貌.

4 结果与讨论

4.1 改性丝素蛋白的制备与结构表征

药理学研究表明川芎嗪的药效基团为吡嗪环,其体内代谢产物仍具有与母药川芎嗪相似的抗凝血活性。笔者合成了川芎嗪的代谢产物TMPD2,通过酯化反应将其连接在乙烯基单体上得到PZOHOE。进一步参考文献[9]报道的方法,将PZOHOE通过无引发剂聚合反应接枝于丝素纤维表面。我们发现,PZOHOE极易自聚,合成后需立即使用。

图2是未改性丝素纤维(SF)和接枝率为13%的改性丝素纤维PZOHOE-g-SF的ATR-FTIR谱图。图中谱线a是SF红外光谱,在1620

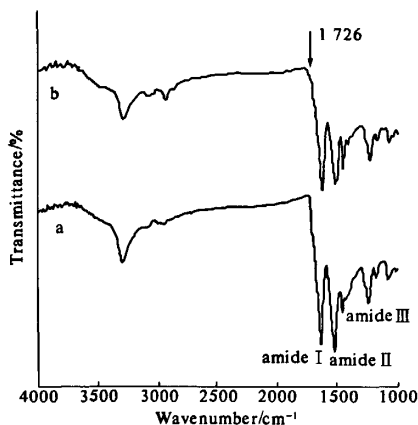


图2 SF和改性SF的红外光谱

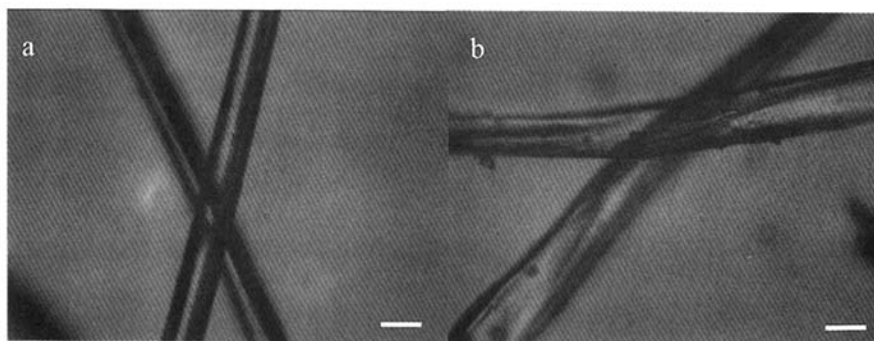
Fig.2 ATR-FTIR spectra of (a) SF;
(b) 13% PZOHOE-g-SF

cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1226 cm^{-1} 处的吸收带分别归属于丝素纤维的 amide I、amide II 和 amide III,是典型的 β 折叠构象,表明纯丝素纤维具有较高的结晶度;谱线b是改性SF的红外光谱,与谱线a比较,amide I、amide II 和 amide III 三个峰的峰位未发现明显位移,显示了丝素纤维接枝改性后仍保留了 β 折叠构象。另外,谱b中出现了新峰,其中,波数为 1726 cm^{-1} 是酯羰基 $\text{C}=\text{O}$ 吸收峰,表明PZOHOE已经接枝在丝素纤维表面。

改性前后丝素蛋白纤维的表面形态从图3的显微镜照片可以看出,未接枝的丝素蛋白纤维表面光滑、均匀,而接枝后的丝素蛋白纤维表面粗糙、不均匀,这是由于在接枝聚合过程中聚合链沉积在丝素纤维表面造成的。

图4为改性前后丝素溶液经4 d透析后析出物的FTIR光谱,与图2中丝素纤维的ATR-FTIR光谱比较,amide I、amide II 的波数分别移向 1627 cm^{-1} , 1528 cm^{-1} ,显示其链构象由 β 折叠向无规卷曲转变的趋势。另外,与谱线a比较谱线b在 3285 cm^{-1} (吡嗪环侧链羟甲基上-OH伸缩振动峰),和 1449 cm^{-1} (吡嗪环上 $\text{N}=\text{C}$ 伸缩振动峰)的吸收明显增强,表明透析4 d后改性丝素上药物分子接枝链的存在。

图5为纯丝素溶液与改性丝素PZOHOE-g-SF溶液在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥成膜后的扫描电镜照片。从图中可以看到纯丝素膜表面较均匀;改性丝素膜表面则出现均匀分布的球形颗粒,有可能是带有川芎嗪接枝链的丝蛋白与纯丝蛋白(片段)互不相容的缘故。



Bar = $10\text{ }\mu\text{m}$

图3 (a)SF和(b)13% PZOHOE-g-SF显微镜照片($\times 600$)

Fig.3 Microscopy images of (a) SF and (b) 13% PZOHOE-g-SF

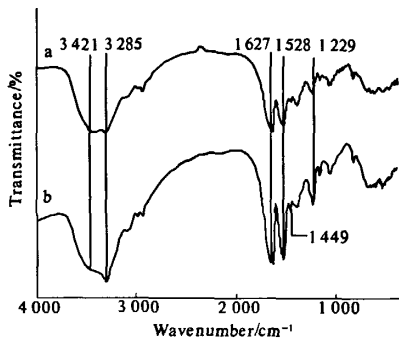


图 4 (a)SF 和 (b)13% PZOHOE - g - SF 溶解透析后析出物的 FTIR 光谱

Fig.4 FTIR spectra of (a) SF; (b) 13 % PZOHOE - g - SF

4.2 体外抗凝血性评价

表 1 是未改性丝素纤维 SF 和改性丝素纤维

PZOHOE - g - SF 的体外凝血时间 APTT 分析结果. 表中可以看出样品的 APTT 均高于空白血浆, 而用川芎嗪衍生物改性丝素纤维的 APTT 高于未改性丝素纤维.

表 1 丝素接枝前后的 APTT 变化

Tab.1 APTT of PZOHOE - g - SF and SF

sample	control	SF	PZOHOE - g - SF
η /%		0	13
APTT/S	35.1 \pm 0.1	37.2 \pm 0.5	42.1 \pm 0.1

血小板粘附实验是评价材料抗凝血性能的重要方法. 图 6 是改性前后丝素膜的扫描电镜照片. 图 6(a)中纯丝素膜表面粘附有许多活化变形的血小板; 而图 6(b)中改性丝素膜表面未发现粘附的血小板, 表明川芎嗪衍生物改性丝素材料具有较好的抗凝血性能.

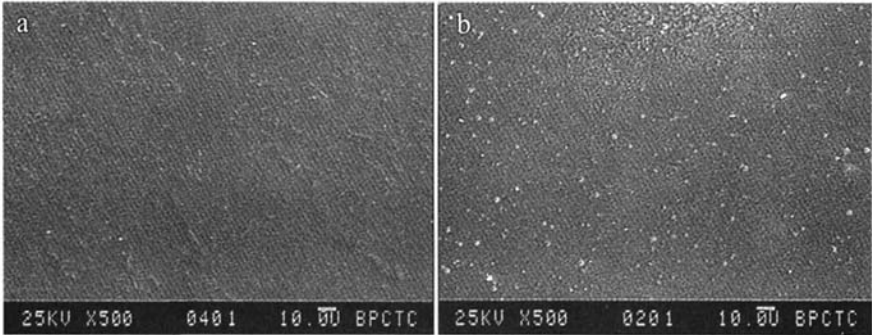


图 5 (a)SF 和 (b)13% PZOHOE - g - SF 丝素膜 SEM 照片

Fig.5 SEM images of (a) SF film; (b) 13 % PZOHOE - g - SF film

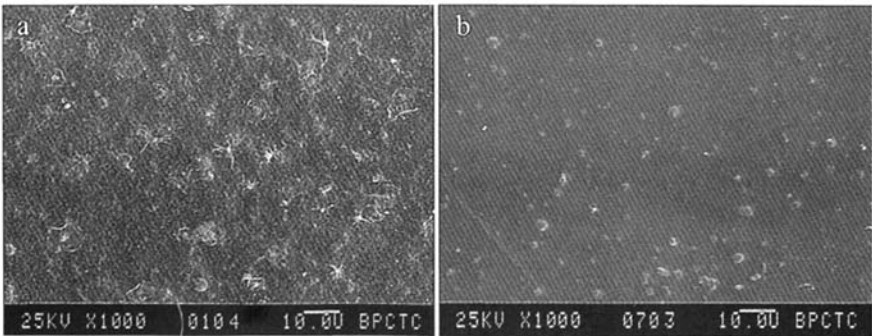


图 6 (a)SF 和 (b)13% PZOHOE - g - SF 丝素膜血小板黏附扫描电镜照片

Fig.6 SEM images of SF films after 30 min of human PRP exposure. (a) SF film; (b) 13 % PZOHOE - g - SF film

5 结论

合成了川芎嗪的衍生物并将其在无引发剂的条件下接枝聚合在丝素材料表面, 得到川芎嗪衍生物改性丝素材料. 改性丝素材料的部分凝血活酶时间比纯丝素材料延长, 血小板粘附数量也较

纯丝素材料减少, 显示了较好的抗凝血性.

参考文献:

[1] LV Q, CAO C B, ZHU H S. Clotting times and tensile properties of insoluble silk fibroin films containing heparin [J]. Polymer International, 2005, 54 (7):

- 1076-1081.
- [2] 冯桂龙,王松,朱鹤孙. 丝素改性胶原膜的肝素化及其体外抗凝血性能评价[J]. 功能材料, 2005, 36(1): 150-156.
- [3] 顾晋伟,杨新林,王俐勇,等. 丝素蛋白膜表面的等离子体磺酸化及体外抗凝血性能[J]. 高技术通讯, 2001, (8): 10-13.
- [4] 卢神州,李明忠,王志青. 丝素膜表面磺酸化研究[J]. 高分子材料科学与工程, 2005, 21(2): 296-299.
- [5] 徐睿,李源,黄熙. 川芎嗪药物代谢动力学研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(1): 58-61.
- [6] 程先超,刘新泳,徐文方. 川芎嗪的结构改造及修饰[J]. 药学进展, 2005, 29(6): 241-246.
- [7] 林妮妮. 川芎嗪-聚丙烯酸共轭物的合成及体外抗凝血活性[D]. 北京: 北京理工大学硕士学位论文, 2005.
- [8] 徐国良. 川芎嗪聚丙烯酸酯和褐藻酸酯的制备、表征及性能研究[D]. 北京: 北京理工大学硕士学位论文, 2007.
- [9] 刘剑洪,于同隐. 丝素蛋白纤维的接枝聚合(II)[J]. 复旦大学学报, 1994, 33(4): 371-376.
- [10] YUAN Y L, ZHANG J, LIN S C. Surface modification of SPEU films by ozone induced graft copolymerization to improve hemocompatibility[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, (29): 247-256.
- [6] 程先超,刘新泳,徐文方. 川芎嗪的结构改造及修饰

Surface Modification of Silk Fibroin with Chuanxiongqin Derivatives and in Vitro Antithrombogenicity

LIAN Xiao-jie¹, WANG Song^{1,2}, ZHU He-sun²

(1. School of Material Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China; 2. Research Center of Material Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to improve the antithrombogenicity of silk fibroin (SF), chuanxiongqin (tetramethyl pyrazine, TMPZ), which is an active ingredient of Chinese herbal medical - Ligusticum chuanxiong Hort, was used to modify SF in this paper. C=C was introduced into the side group of TMP, and then they were grafted onto SF surface without initiators. The resulting products were characterized by the attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). Their antithrombogenicity in vitro was evaluated by the activated partial thromboplastin time (APTT) and platelet adhesion assay. It shows that grafted SF has the longer APTT than SF. Furthermore, blood contacting surface of modified SF does not display any platelet attachment after being incubated in PRP for 30 min. On the contrary, SF surface exhibits a large number of adhered platelets. So it concludes that TMP-modified-SF materials show better antithrombogenicity than SF. The study provides a good example for improving SF with Chinese herb to prepare antithrombotic materials.

Key words: silk fibroin; Chinese herbal medicine; tetramethyl pyrazine; antithrombotic material