

自抗凝透析器的制备及动物透析性能研究

柳杨^{1,2}, 王辉^{1,2}, 刘富^{1*}

(1. 中国科学院 宁波材料技术与工程研究所, 宁波 315201;

2. 青岛科技大学 高分子科学与工程学院, 青岛 266042)

摘要: 血液透析是治疗肾脏及血液疾病的主要治疗手段, 目前临床应用的透析器的核心材料主要是聚砜或聚醚砜透析膜, 在透析过程中需要注射低分子肝素钠等抗凝剂, 而长期高频的肝素注射会引起出血风险以及多种透析综合症, 因此无肝素或减量肝素透析是临幊上急需的透析技术。分别发展了界面溶胀交联、疏水吸附以及界面植入凝胶策略制备了3种自抗凝聚砜透析器, 分别对中空纤维膜表面形貌及亲水性、血液相容性(活化部分凝血酶时间和凝血酶时间、蛋白黏附、溶血率、补体激活)进行了表征, 通过动物透析实验评价了自抗凝透析器的毒素清除率。3种改性透析器血液相容性都得到了明显提高, 凝血时间延长, 蛋白黏附减少, 溶血降低, 补体激活也得到了有效抑制。界面溶胀交联法制备的透析器毒素清除率略有下降, 其余两种方法制备的透析器毒素清除率相对于原膜有明显提高。分别介绍了每种改性方法的优点以及存在的不足, 最终制备了具有良好临床应用前景的自抗凝透析器。

关键词: 自抗凝透析器; 无肝素透析; 界面溶胀; 疏水吸附; 界面植入

中图分类号: TQ050 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-8924(2020)01-0084-09

doi: 10.16159/j.cnki.issn1007-8924.2020.01.012

终末期肾脏病(ESRD)是指肾脏不可逆的失去清除人体多余水分、代谢废物和内毒素的功能, 所有慢性肾脏病患者最终都会进展成终末期肾脏病。1990年全球ESRD维持透析的患者为42.6万人, 2000年增至106.5万人, 2008年增至231万人, 并以每年7%的比例增加, 远远超过世界人口增长率^[1]。血液透析是治疗终末期肾脏病的主要手段, 血液透析器俗称人工肾, 其作用是代替人的肾脏清除体内蓄积的代谢废物和多余的水分, 同时补充人体内所需的物质, 维持电解质和酸碱平衡。早期的血液透析膜材料主要是纤维素及其衍生物, 但是血液相容性不够好, 孔径可调节范围小, 对于中分子毒素清

除率低, 此外还存在生物热稳定性差, 压密性差的缺点^[2-6]。聚砜及聚醚砜具有良好的化学稳定性、耐水性、耐热性、优异的尺寸稳定性和成膜性, 是目前临幊上主要的血液透析膜材料^[7-8]。但是在透析过程中, 为了防止血栓形成, 需要注射肝素钠等抗凝剂^[9]。肝素代谢困难, 长期肝素体内积累会影响人体正常的凝血功能, 诱发出血、瘙痒性过敏反应、血小板减少症等系列透析副作用。对此, 研究者通过表面接枝和共混等方法改善透析膜的亲水性及血液相容性。Yue等^[10]利用表面引发原子转移自由基聚合将两性离子聚(磺基三甲胺乙内酯甲基丙烯酸甲酯)(PSBMA)表面接枝到聚砜上, 从而提高了聚合材料

收稿日期: 2019-11-22; 修改稿收到日期: 2020-01-06

基金项目: 国家自然科学基金(51973230); 浙江省杰出青年科学基金(LR20E030002); 浙江省万人计划-青年拔尖人才(ZJWR0108020); 中科院青年创新促进会优秀会员(2014258); 宁波科学技术局(2017C110034, 2014B81004)

第一作者简介: 柳杨(1993-), 女, 山东青岛人, 硕士, 从事功能膜分离研究, E-mail: liuyang123@nimte.ac.cn. * 通讯作者, E-mail: fu.liu@nimte.ac.cn

引用本文: 柳杨, 王辉, 刘富. 自抗凝透析器的制备及动物透析性能研究[J]. 膜科学与技术, 2020, 40(1): 84-92.

Citation: Liu Y, Wang H, Liu F. Preparation of self-anticoagulant dialyzer and study on animal dialysis performance[J]. Membrane Science and Technology(Chinese), 2020, 40(1): 84-92.

的亲水性。Zhao 等^[11]合成了一种两亲性嵌段的三嵌段共聚物,与聚砜材料共混,最终得到了亲水性和血液相容性提高的材料。但是表面接枝和共混的方式操作复杂,多是针对实验室中的平板膜进行改性。而临床使用的透析器内部是由超过 10 000 根、内径为 200 μm 的中空纤维膜封装而成,本论文通过界面溶胀交联、疏水吸附以及界面植入凝胶策略分别制备了 3 种自抗凝聚砜透析器,并系统对比了其血液相容和动物透析清除性能。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

对苯乙烯磺酸钠(SSNa),丙烯酸(AA),乙烯基三乙氧基硅烷(VTES),偶氮二异丁腈(AIBN),N,N-二甲基乙酰胺(DMAc),N,N-二甲基甲酰胺(DMF),过硫酸钾(K₂S₂O₈),海藻酸钠(SA)均从阿拉丁采购。富血小板血浆(PRP)以及贫血小板血浆(PPP)由宁波市中心血站提供。活化部分凝血酶时间(APTT),凝血酶时间(TT)测试试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司。半自动凝血仪(PUN-2048A),北京普朗新技术有限公司。C3a 以及 C5a 酶联免疫吸附测定试剂盒(ELISA)由武汉华美生工程有限公司提供。聚砜透析器(LSHT 160-A)由江苏朗生生命科技有限公司提供。

1.2 自抗凝透析器的制备

1.2.1 界面溶胀交联制备自抗凝透析器

图 1 为界面溶胀交联制备自抗凝透析器示意图。首先通过自由基聚合合成了预聚物聚(乙烯基三乙氧基硅烷-丙烯酸-对苯乙烯磺酸钠)(P(VTES-AA-SSNa)),将其溶解于 N,N-二甲基乙酰胺(DMAc)和水的混合溶剂中,体积比为 1:1,随后

将此预聚物溶液通过模拟透析装置,在其血液闭环管路中循环 30 min,然后将整支透析器置于 60 ℃水浴中反应 10 h。最后,将透析器用大量去离子水清洗,去除残留单体及有机溶剂,然后在真空干燥箱中烘干备用,记为 M-1^[12]。

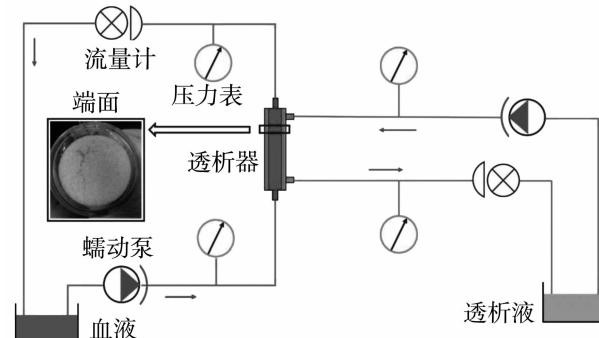


图 1 界面溶胀交联制备自抗凝透析器示意图

Fig. 1 Schematic illustration of self-anticoagulation dialyzer prepared by interface micro-swelling cross-linking method

1.2.2 疏水吸附制备自抗凝透析器

聚砜材料为疏水材料,由于疏水吸附作用易吸附血液中的蛋白质从而引发凝血瀑布产生血栓。利用这一疏水吸附特性,我们合成了一种两亲性聚合物,聚(甲基丙烯酸月桂酯-对苯乙烯磺酸钠-丙烯酸)[P(LMA-SSNa-AA)],带有长烷基疏水侧链,能够通过疏水吸附作用黏附在膜材料的表面^[13](如图 2 所示)。聚合物由于两亲特性,可溶于有机溶剂和水的混合溶剂中,N,N-二甲基甲酰胺(DMF)与水的体积比为 1:9,有效减少了有机溶剂残留。通过上述同样模拟透析装置将聚合物溶液通入透析器中,然后在 4 ℃下放置 12 h 即完成改性。用去离子水将透析器清洗干净,在真空干燥箱中烘干备用,记为 M-2。

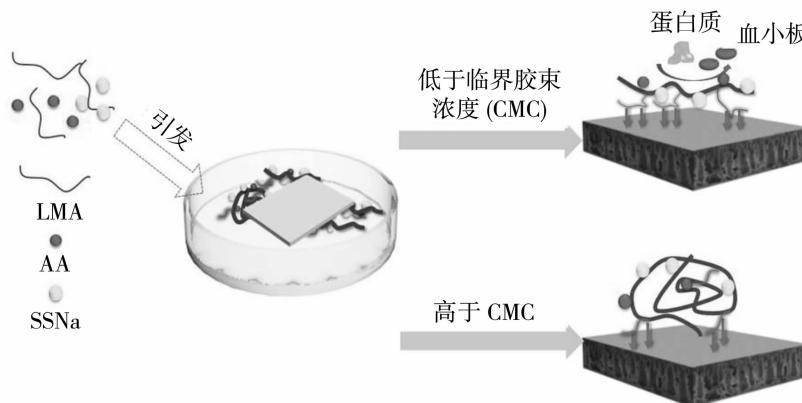


图 2 聚(甲基丙烯酸月桂酯-对苯乙烯磺酸钠-丙烯酸)在膜表面的疏水吸附机理示意图

Fig. 2 Schematic illustration of poly(LMA-SSNa-AA) adsorption mechanism on membranes

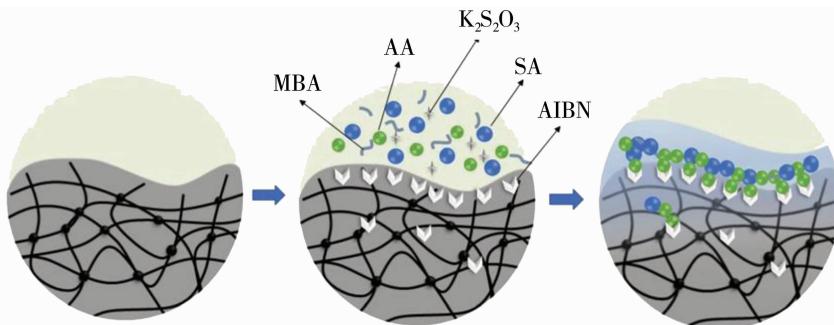


图3 聚(海藻酸钠-丙烯酸)的膜界面植人凝胶机理

Fig. 3 Schematic illustration of ploy(SA-AA) hydrogel seeded in PSf membrane

1.2.3 界面植人凝胶制备自抗凝透析器

为了避免改性过程有机溶剂的残留及提高改性涂层与膜基体的结合力,发展了一种界面互穿凝胶法制备自抗凝透析器(如图3所示),首先将油溶性引发剂AIBN溶解在乙醇中,然后通过模拟透析装置将溶液打入透析器中,停留3~5 min,引发剂扩散植入膜皮层内,然后将溶液排出,通入氮气干燥,随后配制海藻酸钠(SA)和丙烯酸(AA)水溶液,并加入水溶性引发剂过硫酸钾($K_2S_2O_8$)和交联剂N,N-亚甲基双丙烯酰胺(MBA),将混合溶液用同样的模拟透析装置通入透析器中,在80 °C下反应6 h,反应完成后用去离子水清洗干净,烘干备用,命名为M-3。

1.3 自抗凝透析器性能表征膜的结构表征

中空纤维膜的形貌通过扫描电镜(SEM)进行观察。将未改性的透析器和3种改性透析器内的中空纤维取出,制样喷金后观察内表面和外表面的形貌变化。改性前后的亲疏水性变化由接触角测试进行表征。

1.3.1 抗凝性能测试

活化部分凝血酶时间(APTT),取21 cm长的中空纤维,将其折叠放入含有贫血小板血浆的反应杯底部,37 °C下孵育5 min。然后,取在37 °C下保温的0.025 mol/L的 $CaCl_2$ 溶液0.1 mL加入反应杯中,记录血浆固化所需时间即为APTT数值。

凝血酶时间(TT),中空纤维膜样品(21 cm)与0.2 mL贫血小板血浆在反应杯中共同孵育5 min,温度设定在25 °C。然后加入0.2 mL TT试剂,记录反应时间即为TT数值。

1.3.2 补体激活测试

利用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测试样品的抗补体性能。将样品浸入人全血中,在37 °C下孵育

2 h。在3 000 r/min下离心30 min得到血浆。依据试剂盒说明书进行操作对各个样品进行测试。对照样用同一血液进行测试,只是在孵育时不加入样品膜。

1.3.3 溶血率测试

先后用去离子水和质量分数0.9% NaCl水溶液润洗各样品(21 cm中空纤维)10 min,然后浸入质量分数0.9% NaCl水溶液中,37 °C下恒温水浴30 min。向每一个NaCl溶液中滴加200 μ L人体新鲜全血,继续37 °C下孵化1 h。1 500 r/min下离心10 min,取上清液,并在紫外分光光度计下测定上清液在545 nm处的吸收峰值。同时以去离子水为阳性对照,质量分数0.9% NaCl为阴性对照,重复上述实验过程,并测定上清液吸收峰值。通过公式(1)计算溶血率:

$$HR = \frac{AS - AN}{AP - AN} \quad (1)$$

式中,AS为待测样品处理过的上清液545 nm处的吸收峰值,AP和AN分别为生理盐水和去离子水处理过的血液上清液545 nm处的吸收峰值。

1.4 动物模拟透析实验

1.4.1 模拟透析实验过程

为了验证透析器的透析效果,选用肾衰模型的迷你巴马小猪(40 kg)进行模拟透析实验。在实验猪的颈部动静脉造瘘,按照顺序连接模拟透析装置。首先将透析器用生理盐水预充30 min,排出管路中的气泡,控制管路中的跨膜压为13.3 kPa(100 mmHg),测量单位时间超滤液的量。调整透析液侧流速为600 mL/min,血液侧进口端流速为200 mL/min,出口端的血液流速通过流量计进行监测。透析器的超滤系数 Kuf (mL/h·mmHg)计算如下:

$$Kuf = \frac{Q_i - Q_o}{TMP} \quad (2)$$

式中, Q_i 为血液侧进口端流速, mL/h, 控制为 200 mL/min; Q_o 为血液侧出口端血液流速, mL/h; TMP 为管路中的跨膜压差, 为 100 mmHg.

由于透析管路及接口不具备抗凝特性, 因此透析开始前, 注射一支肝素钠预充管路, 防止管路发生堵塞, 肝素钠的注射量根据动物的体重计算(12 500 USP, 2 mL), 透析开始后, 未改性透析器需要每隔半小时注射一次肝素钠(3 000 USP, 0.48 mL), 改性透析器只在开始前使用一支肝素钠预充管路, 在实验过程中不再额外注射肝素, 透析过程均为 1 h.

1.4.2 血小板黏附

透析完成的透析器用生理盐水进行冲洗, 将黏附不牢的血小板洗去, 然后将透析器剖开, 取出其中的中空纤维, 剖开中空纤维露出内表面, 喷金后用扫描电镜观测血小板、蛋白及血细胞在中空纤维上的黏附情况.

1.4.3 毒素清除率

透析器的主要功能是代替人体肾脏清除血液中的代谢废物和内毒素, 抗凝改性之后的透析器可能会由于抗凝涂层的覆盖, 有机溶剂溶胀破坏孔状结构等原因, 导致毒素清除率下降, 通过改性前后透析器清除率的变化, 可以确认此种改性方法是否破坏了透析器的孔状结构. 取透析之前的肾衰动物模型的静脉血液, 检测其中尿素、肌酐、无机磷和 β_2 -微球蛋白的浓度. 每支透析器的透析时长为 1 h, 透析

过后, 取定量的静脉端血液, 对血液中的小分子毒素的浓度进行测量. 通过下述公式计算透析器对每种毒素的清除率(CR , mL/min):

$$CR = \frac{C_{Bi} - C_{Bo}}{C_{Bi}} Q_{Bi} + \frac{C_{Bo}}{C_{Bi}} Q_{UF} \quad (3)$$

式中, C_{Bi} 为透析前血液中各毒素的浓度; C_{Bo} 为透析后血液中各毒素的浓度; Q_{Bi} 为血液侧血液的流速; Q_{UF} 为超滤率.

2 结果与讨论

2.1 透析膜表面形貌及亲水性

表面改性往往会改变膜的表面形貌及结构, 从而影响膜的透析性能. 改性前后膜的内外表面形貌如图 4 所示, 改性后的中空纤维膜的内外表面形貌未有明显改变. M-1 膜内表面孔径略有收缩, 这主要是由于界面微溶胀交联过程中采用了大量的有机溶剂, 将聚砜膜内壁进行微溶胀, 使得大分子的预聚物进入皮层然后发生交联; M-2 膜内表面孔径及孔径分布基本没有发生变化, 主要归因于改性溶液中有机溶剂的比例大幅度下降(10%); 界面植入凝胶法制备的 M-3 膜, 内外面的微孔结构基本没有变化. 此外, 3 种方法在膜表面形成的聚合物涂层厚度均在纳米级, 因此也未发生表面微孔堵塞情况. 外表面孔径为 2 μm 左右, 内表面孔径为 13 nm 左右.

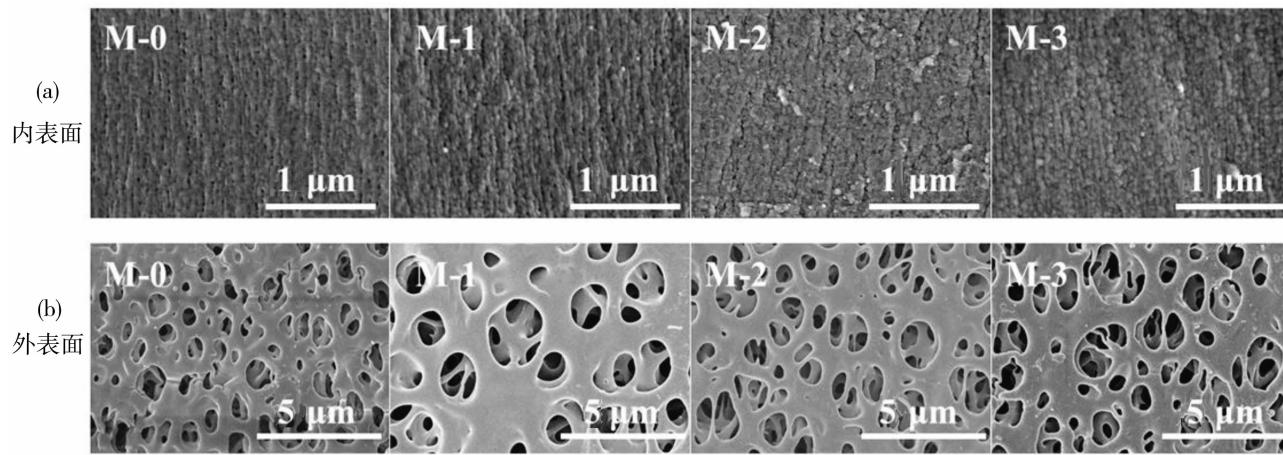


图 4 未改性透析膜(M-0)和改性透析膜(M-1、M-2 和 M-3)(a)内表面和(b)外表面电镜图

Fig. 4 SEM micrographs of inner surfaces (a) and outer surfaces (b) of pristine dialyzer(M-0) and three different modification dialyzers (M-1, M-2, M-3)

由于改性聚合物的功能基团为羧酸根和磺酸根, 为亲水基团, 因此中空纤维的亲水性也有一定的改善. 亲水性的提高可以提高水的渗透能力, 并

吸附水分子形成水合层, 阻挡蛋白质的黏附, 从而防止血小板的凝结和血栓的形成. 如图 5 所示, 从水接触角数据可以看出, 3 种改性方法对于疏水的

中空纤维的亲水性都有一定的提高。未改性透析膜M-0的水接触角为90°,M-1和M-2改性透析膜的水接触角分别为80°和76°,M-3透析器的水接触角为35°,亲水性大幅度提高。M-3改性膜表面含有海藻酸钠和丙烯酸,表现出一定的水凝胶特性,因此亲水性大大提高^[14]。

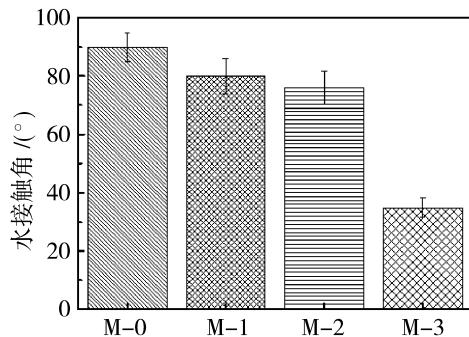


图5 未改性透析膜(M-0)和改性透析膜(M-1、M-2 和 M-3)的接触角

Fig. 5 Water contact angle of original membrane (M-0) and different modified membranes (M-1, M-2 and M-3)

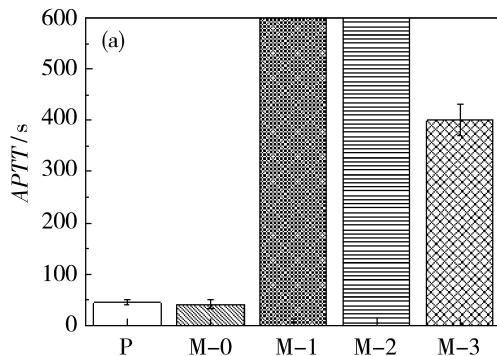


图6 未改性透析器(M-0)和不同方法改性的透析器(M-1、M-2 和 M-3)的抗凝血检测,活化部分凝血酶时间(a)和凝血酶时间(b)检测

Fig. 6 APTT (a) and TT (b) anticoagulant test for pristine dialyzer (M-0) and modified dialyzer treated with different methods (M-1, M-2 and M-3)

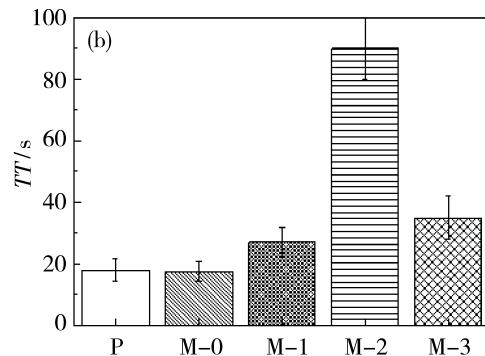
2.2.2 血小板黏附

当人体的血液一接触到外部的材料,首先会发生蛋白质的吸附,蛋白质上特殊的受体会黏附血小板,血小板发生聚集,最终形成血栓。改性后的透析器能够抑制蛋白质的吸附,从而能够防止血栓的形成。由图7(a)可以看出,透析器在完成巴马猪的透析试验后,用生理盐水进行冲洗,未改性透析器外表面上有明显的血液红色,挂血现象严重,而改性透析器的外表面则较为干净,挂血现象得到明显抑制。进一步由图7(b)的电镜图可以看到,M-0膜内表面形成

2.2 血液相容性

2.2.1 抗凝性能

通过活化部分凝血酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)对透析器内的中空纤维膜丝进行抗凝血性能表征,凝血时间的延长标志着透析膜具有优异的抗凝性能。通过实验结果分析得到,3种改性方法都大大延长了凝血时间,如图6所示。M-0透析膜的APTT凝血时间只有44 s,M-1和M-2的APTT的时间延长到600 s以上,M-3透析器的APTT时长达到400 s,抗凝效果显著。M-1和M-2膜表面改性的类肝素聚合物中羧酸根和磺酸根共同发挥抗凝作用,磺酸根能够和纤维蛋白原结合,阻止其向纤维蛋白转变;羧酸根能够螯合钙离子^[15],阻止因子IX,X和凝血酶原的激活,从而阻断凝血级联反应的发生。因此类肝素改性的透析膜APTT和TT的时间都大幅度延长^[16-18]。而M-3表面凝胶涂层负载了海藻酸钠和丙烯酸,只有羧酸根离子起作用,因此此种方法改性的透析膜的APTT和TT时间延长程度相对较低。



了一层很厚的血栓,中空纤维膜内腔很容易被堵塞。经过改性之后,亲水性的提高以及功能基团的抗凝作用使得中空纤维内部形成的血栓显著减少。M-1的内表面上仍能看到血细胞,但是相对于原膜,数量大大减少。M-2表面上血小板的黏附数量相对于原膜有比较明显的降低。M-3中空纤维膜的内表面非常光滑,基本上没有血小板、血细胞及蛋白附着,表现出优异的抗凝特性。一方面亲水性的提高可以有效抑制蛋白质的黏附,从而阻止了血栓的形成^[18],此外,虽然M-1和M-2的亲水性提高较小,也有较

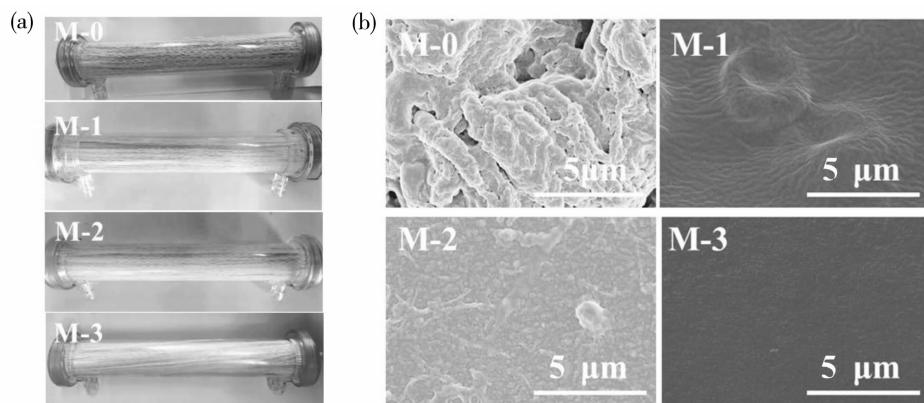


图 7 未改性透析器(M-0)和改性透析器(M-1、M-2 和 M-3)
透析后的透析器(a)外表面(b)透析膜内表面蛋白黏附情况电镜图

Fig. 7 SEM micrographs of (a) Outer surfaces and (b) inner surfaces of pristine (M-0) and modified dialyzers (M-1, M-2 and M-3) after circulating blood

多的蛋白质黏附,但是羧酸根和磺酸根功能基团的存在可以阻断凝血瀑布,从而抑制蛋白质的进一步凝结团聚,也具有较好的抗凝特性。

2.2.3 溶血率

改性透析器血液相容性的提高还体现在溶血率的降低。当未经任何处理的材料与人体血液进行接触时,由于材料中的化学物质等原因致使红细胞发生破裂而发生溶血现象。通过抗凝改性,改善了透析器与人体血液的相容性。通过实验发现,如图 8 所示,改性前后的材料溶血率都在 3.5% 以下,但是未经改性的透析器的溶血率为 4.1%。改性透析膜的溶血率都有较为显著的改善。M-1 溶血率为 3.5%,可能是由于透析器中有机溶剂的残留影响。界面溶胀交联法改性过程由于使用了大量有机溶剂溶解类肝素聚合物,以及溶胀聚合物微孔膜的表面,因此对于中空纤维型透析器存在溶剂残留的问题,增加了

其清洗和后续临床应用难度。M-2 相对于 M-1 溶血率也有了降低,为 2.7%,这与疏水吸附方法中有有机溶剂使用比例降低有关。M-3 的溶血率最低,约有 1.2%,水性改性溶液大幅度减少了溶出物,亲水凝胶皮层降低了膜表面蛋白质的黏附,与血细胞具有良好的相容性。

2.2.4 补体激活

补体激活在非特异性和特异性免疫中都起着至关重要的作用,一旦体外物质与血液接触,免疫反应就会迅速发生,导致宿主防御机制被激活,会发生免疫细胞溶解或者和免疫溶血等免疫生物学现象。补体激活会释放内过敏毒素因子,其中最主要的成分是人补体片段 3a (C3a) 和人补体活性片段 5a (C5a),通过测量此两种补体片段的浓度可以评价补体激活的程度,浓度由 ELISA 试剂盒进行测定^[20-22]。实验结果如图 9 所示,与原膜相比,改性透析器的 C3a 和 C5a 的浓度都有降低,其中 M-3 的下降最明显,这归因于材料表面亲水性提高,表面接枝的聚合物与水分子作用强,形成一层水合层,有效阻挡了材料本身与血液中成分的接触,从而抑制补体激活反应的发生。上述结果说明这 3 种方法都成功提高了透析器的血液相容性,有效抑制了补体激活。

2.3 透析性能

透析器的主要功能是清除血液中的多余水分和中小分子毒素,例如肌酐、尿毒、无机磷和 β_2 -微球蛋白等。超滤系数 [$\text{mL}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$] 是透析器的一个重要指标,反映了水的通过能力。如图 10 所示,未改性透析器 M-0 的超滤系数为 $20.5 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$,

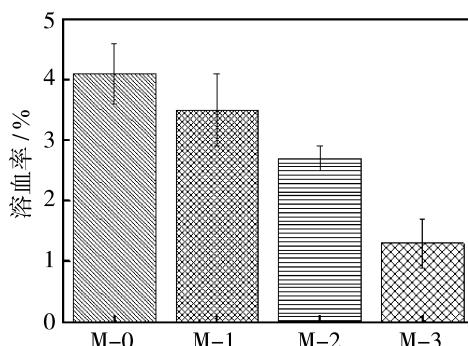


图 8 未改性透析器(M-0)和 3 种不同方法处理的改性透析器(M-1、M-2 和 M-3)的溶血率测试

Fig. 8 Hemolysis examination of pristine dialyzer (M-0) and different modified dialyzers (M-1, M-2 and M-3)

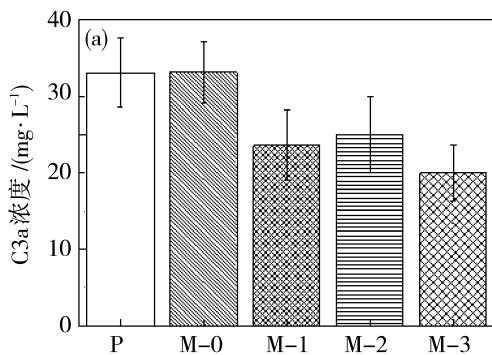


图 9 未改性透析器(M-0)和改性透析器(M-1、M-2 和 M-3)补体激活程度测定, (a)C3a 和(b)C5a 浓度检测

Fig. 9 Generated concentration of C3a (a) and C5a (b) after incubating the different hollow fibers of pristine dialyzer (M-0) and modified dialyzer (M-1, M-2 and M-3) with the whole human blood

M-1 透析器的超滤系数略有下降, 降为 $17.6 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$, 这主要是因为溶胀交联过程会使得内表面微孔发生微溶胀, 导致孔径收缩, 孔隙率降低, 增加了水的传质阻力, 因此超滤系数降低。M-2 的超滤系数提高到 $23 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$, M-3 的超滤系数提高到 $28 \text{ mL}/(\text{h} \cdot \text{mmHg})$, 这主要归因于疏水吸附和界面植入凝胶方法不但没有改变膜表面微孔结构, 还大大提高了透析膜的亲水性, 从而提高了超滤系数。

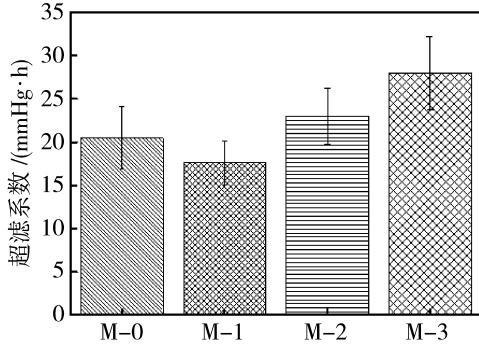


图 10 未改性透析器(M-0)和改性透析器(M-1、M-2 和 M-3)的超滤系数

Fig. 10 Ultrafiltration coefficient (K_{uf}) of pristine dialyzer (M-0) and modified dialyzers (M-1, M-2 and M-3)

透析器的清除效率通过动物实验得到, 主要测定了 4 种毒素的清除率: 小分子毒素肌酐、尿素、磷酸盐, 以及中分子毒素 $\beta 2$ -微球蛋白。如图 11 所示, 经过改性之后, 除了 M-1 由于有机溶剂界面溶胀使得膜内壁变得较致密, 因而毒素清除率略有下降之外, 其余两种改性方法得到的透析器 M-2 和 M-3, 小分子毒素清除率均有明显提高, 中分子毒素与原膜的清除率基本一致。随着亲水性提高, 水透过的能力增强, 小分子毒素通过的能力也会增强, 因此毒素

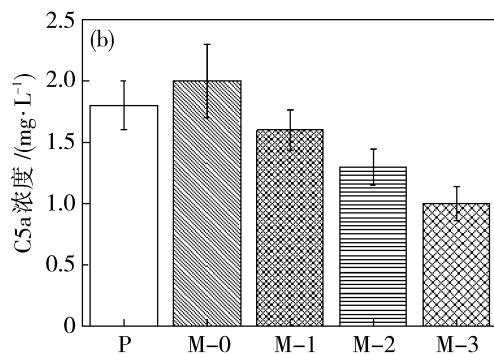


图 9 未改性透析器(M-0)和改性透析器(M-1、M-2 和 M-3)补体激活程度测定, (a)C3a 和(b)C5a 浓度检测

清除率上升了, 中分子毒素由于尺寸较大, 其改性前后的清除率变化不大, 也进一步验证了改性方法对中空纤维膜的微孔结构没有破坏。

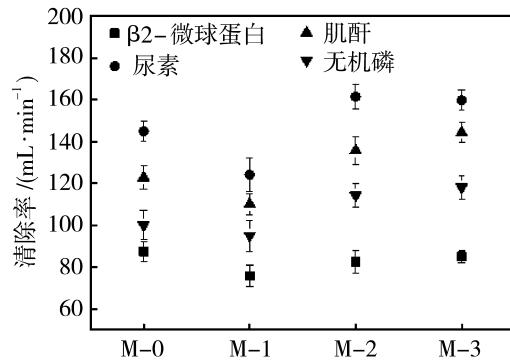
图 11 未改性透析器(M-0)和改性透析器(M-1、M-2 和 M-3)对中小分子毒素(尿素、肌酐、 $\beta 2$ -微球蛋白和磷酸盐)的清除率

Fig. 11 Clearance rate of different molecular toxins (Urea, creatinine, $\beta 2$ -microglobulin and phosphate) with pristine dialyzer (M-0) and modified dialyzer (M-1, M-2 and M-3)

3 结论

我们通过界面溶胀交联、疏水吸附和界面植入凝胶策略成功制备出了 3 种具有自抗凝特性的透析器, 并对 3 种透析膜的微孔结构、血液相容性和动物透析性能做了系统研究。M-1 和 M-2 表面负载丰富的类肝素基团(羧酸和磺酸), 磺酸基团能够结合纤维蛋白原, 阻止其向纤维蛋白转化; 羧酸根能够螯合钙离子, 阻止凝血因子 IX, X 和凝血酶原的激活, 从而阻断凝血级联反应的发生, 因此 M-1 和 M-2 表现出优异的抗凝血性能(APTT>600 s)。但是类肝素聚合物的亲水性提高不明显, 仍然会有蛋白质

黏附在中空纤维膜内部。其中, M-1 需要大量有机溶剂参与以确保类肝素预聚物能够溶胀进聚合物膜内部, 透析器紧密的中空纤维结构使得残留有机溶剂很难清除。M-2 减少了有机溶剂的参与, 但是在长期运行过程中, 物理结合的类肝素聚合物存在脱落的风险。M-3 膜表面仅负载了羧酸基团, 因而抗凝性能相对 M-1 和 M-2 较弱($\text{APTT} \approx 400\text{ s}$), 但是亲水性提高显著, 表现出优异的抗蛋白黏附特性。3 种透析器最终都表现出了优异的血液相容性, 在动物透析实验中, 在肝素限制使用的条件下(仅预冲使用 12 500 USP 肝素钠, 透析过程不注射肝素), 透析顺利完成, 透析器内挂血现象明显改善。M-1 由于大量有机溶剂的参与, 使得膜孔被溶胀破坏, 因此毒素清除率具有较为明显的下降。M-2 和 M-3 对小分子毒素的清除率上升, 对中分子 $\beta 2$ -微球蛋白的清除率基本不变, 证明此两种改性方法下的透析器膜孔结构保存得较为完整。界面植入凝胶法制备的透析器 M-3, 不仅抗凝涂层和基体材料的结合紧密, 而且聚合物体系为水溶液体系, 避免了有机溶剂的参与, 改性方法更为绿色高效, 因而具有更实际的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 肖 月, 隋宾艳, 赵 琛. 我国终末期肾病现状及透析技术的应用、费用及支付情况分析[J]. 中国卫生政策研究, 2011, 4: 29—33.
- [2] 唐克诚, 李 谦, 王 瑞, 等. 血液透析膜材料的研究进展[J]. 医疗设备信息, 2007, 22: 49—51.
- [3] Lipps B, Stewart R, Perkins H. The hollow fiber artificial kidney[J]. Trans Am Soc Artif Interm Org, 1969, 13: 200—206.
- [4] Jing D, Katsuji S, Zheng C. The anticonvulsants lamotrigine, riluzole, and valproate differentially regulate AMPA receptor membrane ligation: Relationship to clinical effects in mood disorders[J]. Neuropsychopharmacology, 2007, 32: 793—802.
- [5] 高爱林, 刘 富, 薛立新. 生物基聚乳酸微孔膜的制备及透析性能[J]. 膜科学与技术, 2013, 33(4): 29—34.
- [6] 刘耀东, 黄 鑫, 王伟平. 聚砜中空纤维膜式人工肺的等离子体改性研究[J]. 膜科学与技术, 2015, 35(4): 35—39.
- [7] 俞学敏, 朱丽静, 高爱林. 血液透析膜的制备改性及组件设计[J]. 膜科学与技术, 2015, 35(4): 110—122.
- [8] 王丹丹, 杨 宁, 贾雪梦. 抗氧化聚砜血液透析膜的构建与性能研究[J]. 膜科学与技术, 2018, 38(2): 26—32.
- [9] Folwaczny C, Wiebecke C, Loeschke K. Unfractionated heparin in the therapy of patients with highly active inflammatory bowel disease [J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94: 1551—1555.
- [10] Yue W W, Li H J, Xiang T, et al. Grafting of zwitterion from polysulfone membrane via surface-initiated ATRP with enhanced antifouling property and biocompatibility[J]. J Membr Sci, 2013, 446: 79—91.
- [11] Zhao Y F, Zhu L P, Yi Z, et al. Improving the hydrophilicity and fouling-resistance of polysulfone ultrafiltration membranes via surface zwitterionicalization mediated by polysulfone-based triblock copolymer additive [J]. J Membr Sci, 2013, 440: 40—47.
- [12] Wang H, Hou W, Liu F, et al. Preparation and evaluation of a self-anticlotting dialyzer via an interface crosslinking approach[J]. J Membr Sci, 2018, 563: 115—125.
- [13] Gao A L, Liu F, Xue L X. Preparation and evaluation of heparin-immobilized poly(lactic acid) (PLA) membrane for hemodialysis[J]. J Membr Sci, 2014, 452: 390—399.
- [14] Ji H, Xu H, Jin L, et al. Surface engineering of low-fouling and hemocompatible polyethersulfone membranes via in-situ ring-opening reaction[J]. J Membr Sci, 2019, 581: 373—382.
- [15] He M, Cui X, Jiang H, et al. Super-anticoagulant heparin-mimicking hydrogel thin film attached substrate surfaces to improve hemocompatibility[J]. Macromol Biosci, 2017, 17: 1600281.
- [16] Tamada Y, Murata M, Hayashi T, et al. Anticoagulant mechanism of sulfonated polyisoprenes[J]. Biomaterials, 2002, 23(5): 1375—1382.
- [17] Park H D, Lee W K, Ooya T, et al. Anticoagulant activity of sulfonated polyrotaxanes as blood-compatible materials[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 60(1): 186—190.
- [18] Strnad S, Velkova N, Saake B, et al. Influence of sulfated arabino- and glucuronoxylans charging-behavior regarding antithrombotic properties[J]. React Funct Polym, 2013, 73(12): 1639—1645.
- [19] Tang M, Xue J, Yan K, et al. Heparin-like surface modification of polyethersulfone membrane and its biocompatibility[J]. J. Colloid Interface Sci, 2012, 386: 428—440.
- [20] Zhou H, Cheng C, Qin H, et al. Self-assembled 3D biocompatible and bioactive layer at the macro-interface via graphene-based supermolecules[J]. Polym Chem, 2014, 5(11): 3563—3575.

- [21] Qin H, Sun C, He C, et al. High efficient protocol for the modification of polyethersulfone membranes with anticoagulant and antifouling properties *via* in situ cross-linked copolymerization[J]. *J Membr Sci*, 2014, 468(20): 172–183.
- [22] Nie S, Tang M, Cheng C, et al. Biologically inspired membrane design with a heparin-like interface: Prolonged blood coagulation, inhibited complement activation, and bio-artificial liver related cell proliferation [J]. *Biomater Sci*, 2014, 2(1): 98–109.

Preparation of self-anticoagulant dialyzer and study on animal dialysis performance

LIU Yang^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, LIU Fu¹

(1. Zhejiang Province, Ningbo Institute of Materials Technology & Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, China; 2. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: Hemodialysis is the main treatment method for the treatment of kidney and blood diseases. The majority of material in clinical used is polysulfone or polyethersulfone. During the dialysis process, low-molecular-weight heparin sodium and other anticoagulants are indispensable. However, high-frequency heparin injection can cause bleeding risk and various dialysis syndromes, so heparin-free or reduced-heparin dialysis is an urgently needed dialysis technique. Herein, we developed interface swelling and cross-linking, hydrophobic adsorption, and interface implantation gel three strategies to prepare self-anticoagulant dialyzers, then the surface morphology, hydrophilicity and blood compatibility (activated partial clotting enzyme time and thrombin time, protein adhesion, hemolysis rate, complement activation) of as-prepared dialyzers were characterized respectively. And animal dialysis experiments were performed to verify changes in toxin clearance by the modified dialyzer. The blood compatibility of the three modified dialyzers was significantly improved, clotting time was dramatically prolonged, protein adhesion and hemolysis were obviously decreased and complement activation was effectively inhibited. The clearance rate of the dialyzer toxin prepared by the interfacial swelling and cross-linking method decreased slightly, while the clearance rate of the dialyzer toxin prepared by the other two methods significantly improved compared with the original membrane. The advantages and disadvantages of each modification method are introduced separately, and a self-anticoagulant dialyzer with good clinical application prospect is finally prepared.

Key words: self-anticoagulant dialyzer; heparin-free dialysis; interfacial swelling; hydrophobic adsorption; interfacial implantation

(上接第83页)

synthesized. The poly *L*-glutamic acid methyl ester, poly *L*-glutamic acid ethyl ester and poly *L*-glutamic acid benzyl ester were prepared into enantioselective membranes, and their structures were characterized by scanning electron microscope. The effects of different molecular weight poly *L*-glutamic acid ester, different acetonitrile content in dialysis solvent, concentration of feed solution, dialysis time and temperature on the resolution of *p*-hydroxyphenylglycine racemate were studied. Under optimum experimental conditions, the value of e.e. for chiral resolution of these membranes to *p*-hydroxyphenylglycine can reach more than 45%, and poly *L*-glutamic acid methyl ester > poly *L*-glutamic acid ethyl ester > poly *L*-glutamic acid benzyl ester. This study provides a new way for the preparative separation of *p*-hydroxyphenylglycine racemate.

Key words: D,L-*p*-hydroxyphenylglycine; poly *L*-glutamic acid ester; enantioselective membrane; chiral separation