

可释放一氧化氮的高分子材料

董伟兵, 葛志强^{*}

(天津大学化工学院制药工程系, 天津 300072)

摘要:临床应用的许多生物医学装置在与血液或组织接触时,会导致装置表面血小板粘附、活化和血栓形成等,引发各种不良并发症,干扰这些装置的功能并产生毒副作用。一氧化氮是有效的血小板粘附和活化抑制分子。可产生和释放一氧化氮的高分子材料用于这些医学装置可以有效地抑制血小板的活化,防止血栓形成,提高其生物适应性。本文就近年来可产生和释放一氧化氮的高分子材料的制备和特性进行了综述。

关键词:一氧化氮;高分子材料;血栓;生物适应性

现有临床应用的许多生物医学装置(如血管移植物、生物传感器、体外血液循环管道、导尿管等)在与血液或组织接触时,会发生生物反应,导致血小板聚集和活化,在装置表面形成血栓或细菌感染等不良并发症,从而干扰这些装置的功能并产生毒副作用。为了提高这些装置的血液和组织生物适应性,科研工作者采用了多种方法,其中包括应用更高生物配伍性的疏水膜(如硅酮橡胶和聚亚胺酯)、内皮细胞播种、白蛋白包衣和抗生素包裹等,但至今这些策略在临床上没有一个完全成功,血小板活化和凝聚仍是影响这些方法成功的关键问题。

体内正常内皮细胞所包含的抗凝血功能分子有一氧化氮、前列腺素(PGI₂)、血栓调节素(TM)、肝素等。其中一氧化氮(NO)不仅是有效的血小板聚集抑制剂,而且还具有抑制血管平滑肌细胞增生和细菌粘附以及促进创伤愈合^[1]等功能;此外,其扩张血管的性能还可用于气囊血管成形术后再狭窄的治疗,尤其是其具有相对短的半衰期,减少了其它如肝素导致的出血等副作用,因此 NO 成为改善医用聚合物高分子材料生物相容性重要的功能分子。近年来人们通过各种方法来制备可释放 NO 的高分子材料(NO-Releasing polymers)。这些方法包括将 NO 供体直接混合进高分子材料或者将 NO 供体共价连接到各种高分子材料上;另外就是 Zhang 等^[2]提出的利用 NO 供体制备高分子衍生物,然后再将这些衍生物混合进或连接到各种高分子材料上;还有就是合成可催化内源性 NO 前体释放 NO 的高分子材料^[3]。本文拟对这些材料的制备和特性作一简要介绍。

1 混合或共价连接 NO 供体高分子材料

将 NO 供体作为分散的分子掺入无毒的聚合物材料或者共价连接到聚合物骨架上,形成了早期的可释放 NO 的高分子材料。这些材料增加了 NO 供体的稳定性,可以制备成皮下植入或透皮给药的固体膜或凝胶以及其它医学装置的包衣材料,其最大的优点是可以通过改变聚合物基质或 NO 供体结构来调节 NO 释放速率,达到长效可控的释放 NO,从而增加这些材料包裹或组成的医学装置的效率并延长其使用周期。

早在 1996 年 Smith 等^[4]就将 NO 供体斯德酮亚胺类(NONOates)用于制备可释放 NO 的高分子材料,他们采用三种不同的方式制备此类材料(见图 1): (1)分散的非共价小分子斯德酮亚胺类掺入聚合物; NO 供体二乙胺/N₂O₂(DEA/N₂O₂)和二醇二氮烯^[5]修饰的精胺(SPER/N₂O₂)均匀掺和进水溶性的聚乙二醇(PEG)和聚己酸内酯中; (2)斯德酮亚胺类以共价键连接到聚合物的侧链;二丙烯基三胺与 NO 反应生成

基金项目:国家自然科学基金资助(20236040);

作者简介: 董伟兵(1982-),男,硕士研究生,研究方向为化学制药。

^{*} 通讯联系人 gezhiq63@yahoo.com.cn.

NO 供体,再以溴化氰做偶合剂,共价连接到多糖侧链上;(3)斯德酮亚胺类直接以共价键连接到聚合物主链上,1,4-丁二醇二环氧丙醚与聚乙烯亚胺(PEI)交联反应,产物再与 NO 反应,形成 NO 供体直接共价连接到主链上的非水溶性聚合物 PEI/ N_2O_2 ,其在动物体内实验中明显抑制血小板活性,减少血小板沉积。

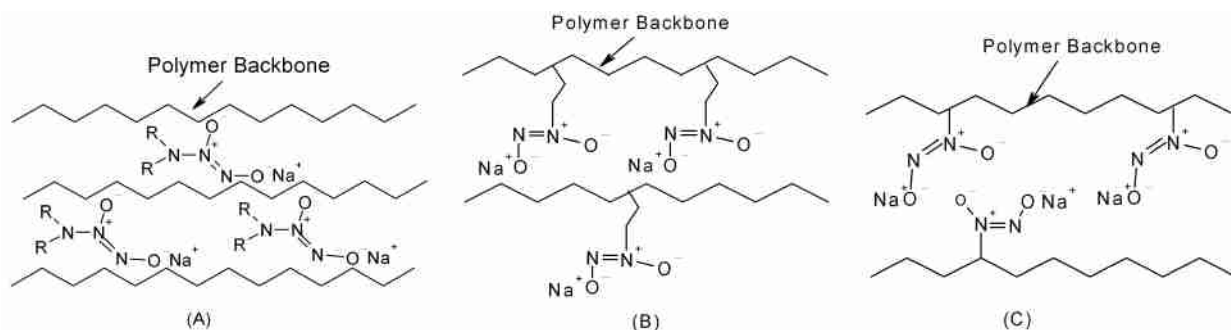


图1 斯德酮亚胺制备可释放 NO 高分子材料的方法

Figure 1 Synthesis methods of NO-releasing polymers with NONOates

近年来,各种新的材料和制备方法被用于制备该类材料,大大改善了其特性。Mowery 等^[5]将斯德酮亚胺类 NO 供体均匀掺进聚氯乙烯(PVC)或聚氨酯(PU)膜中,制成中间包含此膜的三层膜结构,可以有效地避免像 Smith 等制备的单层膜表面出现小坑的现象,这种材料能有效地抑制血小板活性,可用于制备离子电极、体外氧合器、透析、心肺旁路的管线。随后 Seabra 等^[6]利用生物和机械性能优越的聚乙烯醇(PVA)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)与一氧化氮供体 S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)混合,制成了三种固体高分子膜材料 PVA-GSNO、PVP-GSNO 和 PVP/PVA-GSNO,这三种材料有效地减少了 GSNO 的热分解,与水溶性 GSNO 相比,NO 的一级释放速率常数减少 8~16 倍 (PVA/PVP-GSNO 在 37℃ 可以有效释放 NO 24h)。通过电镜扫描显示,含 9.3%(wt)GSNO 的 PVP/PVA 膜包裹的不锈钢呈现光滑的表面,可以有效地减少像体内支架、体外导管等金属表面的剪切力,减少血栓形成。此外 还可通过调节掺入的 GSNO 的量,使 NO 释放量控制在 nmol/L 到 mmol/L 的水平,用于不同的治疗目的(nmol 水平可扩张血管,mmol 水平可提供足够的 NO 用于经皮给药治疗)^[7]。Thierry 等^[8]合成了生物可降解壳聚糖-聚氧 乙烯(CH-PEO)膜材料,已有的研究揭示壳聚糖和聚氧 乙烯都拥有良好的生物适应性,优越的机械特性(延展性和弹性),而且阴离子物质还可以通过离子交换反应共价连接到壳聚糖上,所以他们把 NO 供体硝普钠(SNP)通过离子交换反应连接到 CH-PEO 分子上,用该材料制成 CH-PEO-SNP 膜,与不含 SNP 的 CH-PEO 膜对比研究,发现前者可显著的减少血小板黏附(60%~70%),这种膜可用于植入性内窥镜、血管移植植物等的包衣材料。

此外,为了提高这类聚合物材料所能释放的 NO 的量。Parzuchowski 等^[9]通过甲基丙烯酸与各种包含仲胺的物质酯化缩合形成甲基丙烯酸酯单体,这些包含各种仲胺的单体再聚合并与 NO 反应制备阴离子二醇二氮烯^[10]修饰的聚甲基丙烯酸酯类,随着仲胺含量的增加,NO 释放量增加,作为血管内氧传感器的包衣材料,制成的 NO 释放传感器比对照组显示出优越的抗凝作用。Reynolds 等^[10]通过两种不同的方法将各种二胺共价连接到 PU 骨架上(见图 2),与 NO 反应生成偶氮烯醇修饰仲胺氮原子的 PU/ N_2O_2 ,在生理缓冲液中,每毫克 PU 的 NO 释放量可达 17~21nmol,释放时间在 6 天以上。

2 NO 供体衍生的高分子材料

获得可释放 NO 高分子材料的另外一种策略就是先制备 NO 供体衍生物,再将这些衍生物加入不同的聚合物基质中,通过调整聚合物基质比例、种类以及填料的比例起到不同的 NO 释放作用。例如,Zhang 等^[2]将包含不同烷基胺的硅烷通过酯化缩合连接到烟雾硅胶颗粒上与 NO 反应制备成偶氮烯醇修饰(0.2~0.3 μ m 的 $\text{SiI-N}_2\text{O}_2\text{M}$ ($\text{M}=\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Li}^+$) 颗粒,然后再将该微粒植入疏水基质聚氨酯中,作为体外导管的包衣,在动物试验中,其 NO 持续释放在 4 小时以上,且与对照组比较可显著减少血小板粘附。Shin 等^[11]近来制备了一种新型的衍生的可释放 NO 的溶胶-凝胶/PU 混合膜材料: N-(6-氨基己基)氨基丙基三甲氧

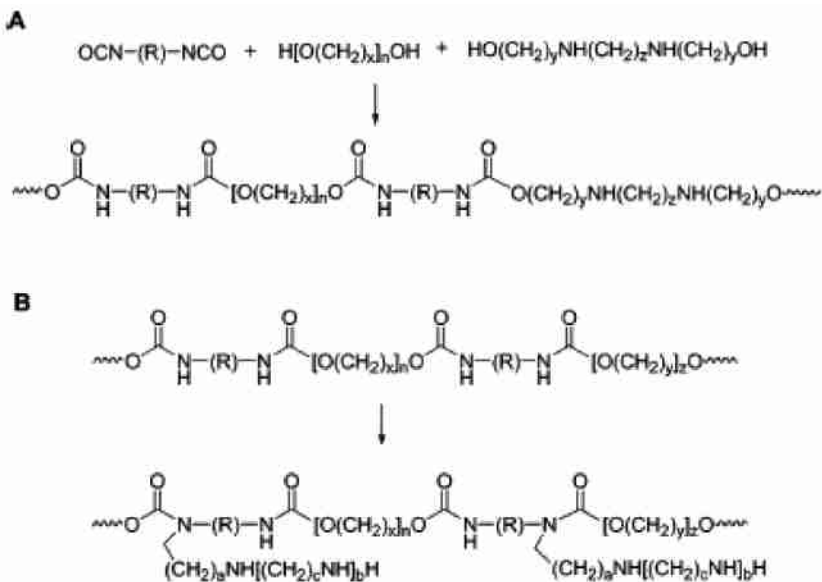


图 2 两种二胺与 PU 骨架连接方法

Figure 2 Two connection strategies of diamine with polyurethanes framework

基硅烷(AHAP³)与甲基三甲氧基硅烷或异丁基三甲基硅烷混合制备溶胶-凝胶颗粒 SGP_s, 含氨基的 SGP_s 与 NO 反应生成偶氮烯醇修饰的溶胶-凝胶颗粒(N₂O₂-SPG_s), N₂O₂-SPG_s 添加到 PU 膜中, 再被其它三层 PU 膜夹在中间制成四层膜结构。四层膜结构可减少 SPG_s 的滤出, 同时可通过改变 PU 膜中 SPG_s 的量控制 NO 的释放。该材料包裹的葡萄糖生物传感器, 具有高的灵敏度、大的线性范围和较快的反应时间的特点, 体外实验指出可以有效地抑制细胞粘附。

Nablo 等^[12] 制备的 PU 包衣的斯德酮亚胺衍生溶胶-凝胶, 稳定性实验显示亲水性的溶胶-凝胶颗粒的稳定性显著增加, 他们之前研究的 PVC 包衣的斯德酮亚胺衍生溶胶-凝胶的 NO 释放量在 24h 后会减少 10%~15%^[13], 而在此比 PVC 厚 2~5 倍的 PU 并不抑制 NO 的释放, 指出与 PVC 相比 NO 在 PU 中更容易扩散。说明可以通过不同材料的包衣得到不同的 NO 释放速率, 用于不同的治疗目的。Stamler 等^[14] 通过含多硫醇基团的多糖的硝基化和亚硝基化制备 NO_x 衍生的新的聚合物, 这些聚合物与已有的可释放 NO 聚合物相比, 弹性明显提高, 如果在这些聚合物中再加入 NO 供体(如 SNAP 等)可显著的增加聚合物的稳定性和提高 NO 的储存(3 周)和释放时间(生理条件下 24h 以上); 此外, 可以通过含不同连接原子(S、C、N、O 等)的亲核基团的聚合物的亚硝基化或硝基化获得不同 NO 释放速率的衍生聚合物材料。运用各种方法制备不同的 NO 供体衍生物并掺合进不同的基质中, 提高这些聚合物的稳定性和 NO 释放的可控性以减少毒性副产物的产生是这类材料今后的发展方向。

3 催化内源 NO 前体释放 NO 的高分子材料

可以利用内源性 NO 前体在局部产生 NO 的高分子聚合物材料是此类材料未来发展的方向之一。上面介绍的两类可释放 NO 的材料虽有各种制备和性能的改进, 但它们仍只有固定的 NO 储量, 因此限制了 NO 持续长期的释放。人体内存在着 S-亚硝基硫醇类和亚硝酸盐等内源性的可释放 NO 的物质。内源性 NO 在体内多与蛋白质连接, 如 S-亚硝基蛋白质(AbISNO), 其可以与低分子的硫醇(RSHs)如 L-半胱氨酸(Cys) 之间发生快速的亚硝基转换反应: $\text{AbISNO} + \text{CysSH} = \text{AbSH} + \text{CysSNO}$, 转化后得到的 CysNO 在体内是不稳定的, 可快速释放 NO。因此可将诸如 L-半胱氨酸或包含 L-半胱氨酸的复合物固定在材料表面或者将还原剂以及 NO 前体混合进聚合物基质中, 利用上述的反应来释放 NO, 发挥其生物活性。这种设计的优势一是可利用天然存在于体内的 NO 供体, 二是可保障得到长期的 NO 供给, 三是只在被修饰的材料表面发挥作用。利用上述原理, Duan 和 Lewis^[15] 将 L-半胱氨酸固定于聚对苯二甲酸(乙二)醇酯(PET)和 PU 表面, 自由的硫醇基团可与血液中的亚硝基硫醇类(S-亚硝基-血清白蛋白等)发生 NO 交换

反应,转化后的这些不稳定的 S-亚硝基半胱氨酸随后分解释放 NO,与对照组相比,血小板粘附减少 50%~60%。今后可通过不同的表面固定技术如表面微点阵排列等增加材料表面固定的硫醇基团,从而增加 NO 释放量,用于体内小型医学装置。

利用体内抗坏血酸或硫醇阴离子可以将 Cu^{2+} 还原为 Cu^{+} ,后者可以催化还原亚硝酸盐或硫醇产生 NO 的原理。Oh 等^[16]用亲酯性的二价铜螯合剂 DITC 将 Cu^{2+} 及亚硝酸离子对(TDMANO_2)一起混合进以 PVC 作为基质、间硝基苯辛酸酯-NPOE 作为可塑剂的高分子膜中,制成 $\text{TDMANO}_2/\text{Cu}^{2+}$ -DITCT 复合膜(见图 3)。该膜在水溶性缓冲溶液中 NO 释放量达 300nM,血浆中 350nM,血液中为 250nM,远高于目前应用于植入传感器和体外导管的 NO 释放硅胶树脂膜。然而体内亚硝酸离子会影响血压、心率等,所以今后需制备催化活性更高的这类铜离子复合物以 控制亚硝酸离子的滤出,减少副作用的发生。总的来说,这类利用内源性 NO 前体产生 NO 的高分子材料可以有效地解决体内血管支架等长期移植物的生物适应性,因此在临床上有着更大的应用前景。

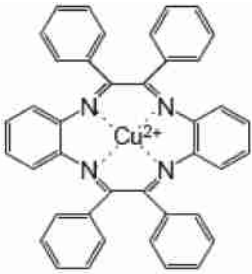


图 3 Cu(II)-DITCT 的结构式
Figure 3 Structure Cu(II)-DITCT

4 结语

血液或组织接触的医学装置的生物反应,导致的并发症以及装置功能的失效是临床应用上普遍存在的问题。体内除了 NO 是可以抑制血栓形成和细菌黏附的功能分子外,肝素、血栓调节素、前列环素也是抗血栓和血小板活性的重要功能分子,因此只单纯的利用 NO 或许并不能很好地解决医用材料表面血栓形成等问题。而多种抗血栓分子的协同作用可能会更好地模拟内皮细胞,防止血栓地形成。在这样的理念下,Zhou 等^[17]开发了一种新的聚合物材料(见图 4),这是一种即可释放 NO、表面又固定了肝素的双功能材料,利用 NO 的抗血小板活性和肝素抑制凝血因子 Xa 和凝血酶发挥双重功效。其它的抗血栓功能分子(前列环素、血栓调节素等)也可照此方式组合。此外,如 S-亚硝基硫醇掺合进 Pluronic F127 凝胶,热或光催化用于局部和靶向释放 NO,这类可释放 NO 的高分子材料可用于 NO 的靶向输送,发挥 NO 在抗肿瘤、心血管疾病、脑部疾病、创伤愈合等方面的治疗作用。目前,可释放 NO 高分子材料已用于体内氧传感器、葡萄糖传感器等。随着材料学、表面化学、生理学等的不断的发展,将会有更多的具有良好生物学性能的高分子聚合物材料用于各种临床医学装置,为人类健康服务。

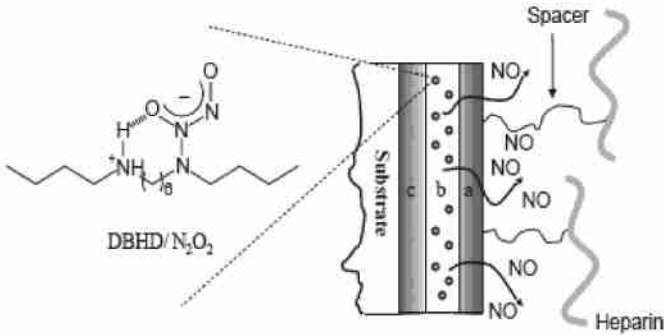


图 4 NO 释放和表面束缚肝素双功能材料示意图

a. 外层:表面束缚肝磷脂的氯化材料(10~20μm);b 中层:拥有 NO 供体 DBND/N₂O₂(100μm)的聚氯乙烯或聚氨酯层,
c 底层:致密的材料(10~20μm)

Figure 4 Illustration of dual acting biomimetic coating with combined NO release and surface-bound heparin

参考文献:

[1] Isenberg J S, Richour L A, Espey M G, et al. Microsurgery, 2005, 25(5): 442~451.
(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

- [2] Zhang H P, Annich G M, Miskulin J, et al. J Am Chem Soc, 2003, 125(17): 5015~5024.
- [3] Oh B K, Meyerhoff M E. J Am Chem Soc, 2003, 125(32): 9552~9553.
- [4] Smith D J, Chakravarthy D, Pulfer S, et al. J Med Chem, 1996, 39(5): 1148~1156.
- [5] Mowery K A, Schoenfisch M H, Saavedra J E, et al. Biomaterials, 2000, 21(1): 9~21.
- [6] Seabra A B, de Oliveira M G. Biomaterials, 2004, 25(17): 3773~3782.
- [7] Seabra A B, da Rocha L L, Eberlin M N, et al. J Pharm Sci, 2005, 94(5): 994~1003.
- [8] Thierry B, Merhi Y, Silver J, et al. J Biomed Mater Res, 2005, 75A(3): 556~566.
- [9] Pazuchowski P G, Frost M C, Meyerhoff M E. J Am Chem Soc, 2002, 124(41): 12182~12191.
- [10] Reynolds M M, Hrabie J A, Oh B K, et al. Biomacromolecules, 2006, 7(3): 987~994.
- [11] Shin J H, Marxer S M, Schoenfisch M H. Anal Chem, 2004, 7(3): 987~994.
- [12] Nablo B J, Schoenfisch M H. Biomaterials, 2005, 26(21): 4405~4415.
- [13] Nablo B J, Rothrock A R, Schoenfisch M H. Biomaterials, 2005, 26(8): 917~924.
- [14] Stamler J S, Toone E J, Stack R S. USP, 0132904. 2004, 6-8.
- [15] Duan X B, Lewis R S. Biomaterials, 2002, 23(4): 1197~1203.
- [16] Oh B K, Meyerhoff M E. Biomaterials, 2004, 25(2): 283~293.
- [17] Zhou Z R, Meyerhoff M E. Biomaterials, 2005, 26(33): 6506~6517.

Nitric Oxide-Releasing Polymeric Materials

DONG Wei-bing, GE Zhi-qiang

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: The preparation and characterization of the various NO-releasing polymeric materials are reviewed in this article. Although a large number of polymeric materials are currently employed to prepare various blood or tissue-contacting medical devices, the thrombogenic nature of such materials can cause serious complications in patients, and ultimately functional failure. Nitric oxide is a well-known anti-platelet agent that can inhibit the thrombosis. Hence, polymeric materials that can release NO locally may effectually solve the adverse problems of such materials.

Key words: Nitric Oxide; Polymers; Thrombus; Biocompatibility