

生物医用材料的生物相容性研究现状

何秋月¹,张桂斋¹,郑业萌¹,苗振威¹,靳涛^{1,2}

(1. 山东农业工程学院 资源与环境工程学院,山东 淄博 255300;

2. 山东科技大学 材料科学与工程学院,山东 青岛 266590)

摘要:生物材料是一个发展十分迅速的领域,良好的生物相容性是生物材料必须满足的基本要求,生物相容性主要指材料的组织相容性和血液相容性。主要概述了生物医用材料的种类和提高生物相容性的方法,包括人工血管内皮细胞化技术、离子束改性技术、自组装单分子层膜技术和材料表面肝素化技术等。材料表面改性,不仅能改善其生物相容性,还能提高其有关物理性能。目前常用的生物相容性的评价方法包括四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法、细胞培养法、测血小板法等。提高生物医用材料的应用效果,并大力发展这一新高科技产业,将具有重要的民生和社会意义。

关键词:生物相容性;表面改性;内皮细胞化技术;表面肝素化;血液相容性

中图分类号:TB34

文献标志码:A

Research status of biocompatibility of biomedical materials

HE Qiuyue¹, ZHANG Guizhai¹, ZHENG Yemeng¹, MIAO Zhenwei¹, JIN Tao^{1,2}

(1. School of Resources and Environmental Engineering, Shandong Agricultural and Engineering University, Zibo 255300, China;

2. College of Materials Science and Engineering, Shandong University of Science and Technology, Qingdao 266590, China)

Abstract: As a rapidly developing field, biomaterials must meet the basic requirement of biocompatibility, which mainly refers to the histocompatibility and blood compatibility. This paper summarizes the types of biomedical materials and the main methods to improve biocompatibility of materials, including the artificial vascular endothelial cell technology, the ion beam modification technology, the self-assembly monolayer technology and the material surface heparinization technology. The surface modification of materials not only can improve the biocompatibility but also can promote their related physical properties. The commonly used evaluation methods of biocompatibility include microenzyme reaction colorimetric method of tetramethylazazole salt, cell culture method, and platelet measurement method. To enhance the application effect and vigorously develop the new hi-tech industry of biomedical materials will be of great significance to people's livelihood and social progress.

Key words: biocompatibility; surface modification; endothelial cell technology; surface heparinization; blood compatibility

随着社会和经济的发展,生物医用材料在保障人类健康上的作用愈发突出,能够辅助诊断和有效治疗疾病、显著降低死亡率。目前,生物材料行业发展迅猛,仅 2019 年全世界的生物医用材料和相关制品销售额约

收稿日期:2022-04-03

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2021ME125);山东省大学生创新创业实践项目(S202114439025S)

作者简介:何秋月(1991—),女,四川遂宁人,讲师,博士,主要从事植物生态学和生物材料改性研究。

靳涛(1972—),男,山东曲阜人,教授,博士,主要从事非金属矿物、生物材料的改性设计和生物除臭剂应用研究,本文通信作者。E-mail:jintaoqiao@126.com

为1 808亿美元。生物材料早已有之,5 500年前,古埃及人开始使用棉花纤维、马鬃当作缝合线;公元16世纪,黄金板开始用来修复颞骨,一些陶瓷材料用来做齿根,某些金属用来固定内骨板和种植牙齿等^[1]。进入21世纪,医学、材料学和工程学快速发展,生物材料迎来了新机遇。目前生物材料行业重点的研究领域有再生医学生物材料和植入器械、生物材料表面改性、药物/基因控释载体以及相关系统的开发等。

生物医用材料是生物医学工程学的四大支柱之一,也是诸多学科相互交叉、相互渗透的一门学科^[2]。按材料的属性可分为以下几大类:

1) 无机生物材料。包括生物惰性和活性陶瓷,在生理环境下,生物惰性陶瓷(如医用碳素材料等)的作用是构建界面并保持稳定^[3];生物活性陶瓷(如生物活性玻璃等)的作用是促进骨组织沉淀,同时可被分解并被新的组织代替。

2) 有机生物材料。包括天然生物材料和合成生物材料。天然生物材料(如胶原蛋白类)有较好的组织相容性。目前发展最快的是合成高分子医用材料,具有良好的物理力学性能和一定的生物相容性。合成高分子材料中的软材料通常被用作人体软组织的替代品,如血管、食道和手指关节;合成硬材料可用作心脏瓣膜、球形瓣膜等。

3) 金属及合金材料。包括钴铬合金、钴铬镍合金、钛合金、不锈钢和镍钛形状记忆合金,制造的产品包括人工关节、人工骨和血管内支架。其中,镍钛合金具有智能记忆功能,可用于骨科、心血管外科等。

4) 复合生物材料。由两种或两种以上不同材料复合构成,可以修复或替换人体组织或器官,根据组成基材又分为高分子基、金属基和陶瓷基复合材料,例如碳纤维增强生化玻璃等;生物聚合物材料可用作高分子生物传感器,如酶、抗原、抗体和激素。

5) 杂化生物材料。是生物材料和非生物材料组成的复合体,包括天然合成材料和生物材料的杂化,以及上述材料和细胞的杂化。

6) 生物衍生材料。是一种非生物活性材料,其结构和功能类似天然组织,如人工心脏瓣膜等。

1 生物医用材料的生物相容性

生物相容性包括组织相容性和血液相容性^[4]。组织相容性反映了物质与活组织之间的相互调节程度。一般来说,材料的硬度、弹性模量等物理性能,材料表面的形态结构以及材料中所包含的杂质,材料的形状、化学结构与分子结构及性质都影响材料的组织生物学反应,都会影响组织相容性,引发身体产生防御或过敏反应。血液相容性主要是指材料与血液发生直接接触后,是否会引引起血小板聚集、凝血、形成血栓或发生溶血现象,一旦发生,材料的使用效率和处理效果将大大降低。此外,材料的钙化、老化、耐磨性差等问题均影响生物医用材料的使用效果。为此,现已发展出许多高新技术对材料表面和其本体材料进行改性。以下是主要的改性和修饰方法。

1.1 人工血管内皮细胞化技术

人工血管在临床上应用,必须具有良好的生物相容性、结构稳定性、抗菌抗感染性等特性。内皮细胞可调节机体的凝血平衡,有效防止血栓、血小板凝聚以及血液凝固。但人工血管不具有内皮细胞,因此,移植人工血管后,内皮细胞增殖能否顺利产生是很重要的衡量指标,是移植后血管内皮化临床检测的重要依据;研究人员运用酶联免疫吸附试验法,对血管内皮生长因子的水平进行了测定,发现血管移植后内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)浓度增加^[5]。因此要提高人工血管移植后的内皮化程度,重点就是如何增加内皮祖细胞在外周血液中的数量和活性。新血管的通道可以通过持续分泌细胞在细胞外的血管移植物(transplant extracellular vascular grafts, TEVGs)上的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)来再生,需要内皮祖细胞具有较好的血液相容性和优良的增殖能力^[6]。

Heissig等^[7]发现金属蛋白酶-9基质(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)可促进受体阳性祖细胞迁移到骨髓微环境中的血管区域,促进骨髓内皮祖细胞的增殖和释放,可显著增加内皮祖细胞浓度。他汀类药物可以通过单磷酸肌醇-3-羟自由基激酶/血清蛋白/苏氨酸激酶途径提高核转录因子,提高其转录活性和MMP-9的表达,促进内皮祖细胞的增殖、动员、归巢和分化^[8]。Hererling等^[9]在1978年首次报道了内皮细

胞种植技术,成为移植后内皮化的一条新途径,但由于成熟内皮细胞对血管假体的粘附能力有限、增殖分化能力差,制约了其应用,所以利用内皮祖细胞成为首选。与成熟内皮细胞相比,内皮祖细胞具有粘附性较好、在原位分化和生殖活性较优秀、易于扩增和培养等特点。

利用内皮祖细胞转化为内皮细胞来增加人工血管内皮细胞化,最重要的是增加内皮祖细胞对血管的粘附性。李杰等^[10]认为,适当的剪应力可增加 t-PA 的分泌,促进 t-PA mRNA 的表达,从而发挥重要的降凝作用,减少血栓形成,预防内膜增生和狭窄。将细胞外基质(ECM)复合到血管假体的内表面,增加内皮祖细胞对血管假体的粘附性,ECM 中的一些活性成分,如胶原蛋白、纤维连接蛋白和层粘连蛋白,作为内皮祖细胞粘附的框架,通过信号传导促进内皮祖细胞向内皮细胞的转化,增加内皮细胞的数量,进而增加人工血管内皮细胞化的成功性^[11-12]。人工血管内皮细胞化能够提高其血液相容性并维持其长期通畅率,多功能基因递送系统可以促进血管内皮细胞增殖,从而实现人工血管快速内皮化。近年来,功能多肽和阳离子聚合物为开发低毒且高效的多功能基因递送系统提供了有效途径。另外,在合金支架表面嫁接活性有机生物分子也能促进血管内皮细胞化的增殖。Sun 等^[13]为了研究支架对抗凝和内皮化的生物学效应,采用镍钛合金薄片模拟支架,结合血管内皮(细胞)生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和抗 cd34 抗体的特性,制备了一种基于聚多巴胺的生物因子包覆的镍钛合金片,并与肝素嫁接,同时负载 VEGF 和抗 cd34 抗体,采用血液相容性表征方法,进行细胞增殖实验、细胞迁移实验和内皮祖细胞(EPC)捕获实验,研究了生物因子包覆支架对促进内皮化的影响。结果表明,制备的支架具有良好的生物相容性,同时能有效促进其表面的内皮细胞生长。Bedair 等^[14]为了克服支架内狭窄、血栓形成和延迟再内皮化的问题,通过表面改性技术,在钴铬支架表面包覆一层抗氧化性的生物分子,如没食子酸(gallic acid, GA)和芦丁(Rutin, Ru)以及相应的过硫(S)酸盐衍生物。体外内皮细胞实验结果表明,过硫酸盐衍生物能够获得快速再内皮化,特别是 Ru-S 物质的形成促进了内皮祖细胞的增殖,且没有引起任何炎症反应。可见,支架表面改性技术在促进血管细胞内皮化方面有着广阔的发展前景,尤其在药物洗脱支架和血液医疗植入物领域具有改善血液相容性^[15]、快速再内皮化的巨大潜力。

1.2 离子束改性、陶瓷薄膜改性技术

自上世纪 70 年代,离子束表面改性技术在优化材料表面、增强材料表面生物相容性方面取得了较大进展^[16-17],目前常用的离子注入、离子束混合及离子束增强沉积等技术都属于这一领域。陈运等^[18]将 N^+ 离子注入到钛合金组织表面中,显著改善了合金材料的生物相容性。现在所使用的生物材料存在很多功能缺陷,如修复和重建人体硬组织的缺损问题。对生物材料表面形貌、成分以及性质的分析是改善这些缺陷的前提,X 射线光电子能谱法(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)作为一种强大的表面分析技术,以高灵敏度和高分辨率定性和半定量地分析材料表面元素的类型和价态,已广泛应用于金属生物医学材料的研究^[19]。离子束处理技术通常在室温(或低温)和真空下进行,整个过程清洁、无污染、对材料本体无影响,可靠性高、重复性好,可有效提高生物材料的生物相容性^[20-21]。

以金属、陶瓷、聚合物及其化合物等为基础,开发的生物医学材料有着广泛的用途,可采用表面改性的方法对生物材料进行处理。为提高一些高分子材料在医学领域中的适用性,利用载能离子注入的方法,可显著改变高分子材料表面的性质。这是因为离子同材料表面发生系列的级联碰撞,造成旧化学键断裂,同时产生新键或新的基团,从而改变表层组织和性质,如表面能、抗凝血性、抗钙化性等。可见,不论在材料表面接枝有机分子^[22-25],还是通过离子注入技术进行表面改性,都改变了材料表面基团性质,增强了有机生物相容性。

在一些材料基体表面合成薄膜,也可实现对材料表面性质的改变,增强材料的生物相容性,常用等离子体化学气相沉积(plasma chemical vapor deposition, PCVD)、物理气相沉积(physical vapor deposition, PVD)、等离子聚合技术等方法^[26-31]。在医学领域,人工心脏瓣膜材料用途广泛、用量较大,目前利用 PCVD、PVD 等方法都可在其表面合成 TiN 薄膜、SiC 薄膜、类金刚石薄膜、热解碳薄膜等,这些表面组织明显提高其血液相容性等性能。另外,为增强人工骨、人工关节体材料的耐久性、耐磨性和组织的生物相容性,通常在其表面涂一层具有生物功能的陶瓷薄膜。例如将羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)混合二氧化锆掺杂的氧化钇通过等离子喷涂法镀在人工骨上形成薄膜层,不仅增加了强韧型,也增强了和骨组织的结合性能。

1.3 高能辐射技术

高能辐射法是指通过高能源射线(γ 射线、A射线、C射线、紫外线)实现对材料改性的方法。一般分两步:首先,在材料表面产生改性活性点;然后,将要改性的材料在高能射线照射时,同活性酶等一些高活性的物质进行结合,实现材料表面性质的改变。活性物质嫁接到生物材料表面,有直接固定、接枝聚合等形式。例如,将生物酶固定在生物材料表面,可通过 γ 射线辐射处理来实现;在低温下高能辐射纤维素片材,可实现在纤维素表面接枝共扼 N-羟基琥珀酰亚胺与丙烯酰胺,进而能有效地嫁接天门冬酰胺酶。辐射接枝改性是高分子生物材料制备中最重要的技术之一,具有很多显著优点:高能辐射能被物质非选择性地吸收且不受温度和分子结构的限制,可以制得预期的化学结构产物;通过控制材料中接枝单体的分布方式,使反应发生在材料表面、内部或者中间等不同部位;辐射接枝不需要添加剂,易于制备高纯度材料;辐射接枝比大多数其他化学接枝方法更安全可靠^[32]。

高能辐射技术通过改善生物医用材料特性,可以极大提高材料的生物相容性。常见的医用高分子材料,因为表面疏水性,植入生物体内以后很容易引起发炎等并发症,并且材料对血液蛋白的吸附容易引起血栓。高能辐射技术能将亲水性分子接枝到疏水性分子材料表面,使其接触角下降,提高材料表面的可湿润性,亲水性提高的同时减少了蛋白质和脂类沉淀,大大提高材料的生物相容性。方月娥等^[33]利用辐射接枝改性技术,在医用硅胶膜上接枝亲水性单体甲基丙烯酸 β -羟乙酯,材料含水率提高了30%,该医用硅橡胶水凝胶膜在治疗骨关节损伤疾患等手术中,可有效预防组织粘连。在整形手术中,为了避免植入普通硅凝胶乳房假体后产生的纤维囊壁挛缩,在假体表面使用高能辐射技术接枝亲水性单体 N-乙烯基吡咯酮(N-vinyl pyrrolidone, N-VP),可以形成一层稳定的水凝胶,降低界面能,大大减少人体组织对材料的异物反应,避免假体周围纤维包裹的形成^[34]。

1.4 选择性激光熔覆技术

选择性激光熔覆(selective laser melting, SLM)技术由美国 ACVO EVERETT RES LABINC 公司的 Gnanamuthu 于 1974 年提出,通过把预涂材料放置在基体表面,再使用高能激光束辐照基体表面,可以使粉末熔覆,与基体构成冶金结合^[35],用以对材料表面进行修饰和改性。在生物材料制备上,许胜等^[36]利用 SLM 技术制作了口腔微孔种植体,机械强度较高,并且针对骨内不同骨质的骨密度和弹性模量分布表现出良好的适应性。制作的方形联通微孔结构,在种植体植入后骨传导性、骨诱导性表现良好,并且八角形支架单元和 22 边立方体单元结构强度、孔隙率较高,低孔径成功率高。另外,利用 SLM 技术制作的口腔微孔种植体,生物相容性表现优秀,能促进骨重建、加速早期的骨矿化沉积和骨质间结合,可形成种植体与骨内部较牢固的机械锁节。同时,这类口腔微孔种植体,可用不完全熔化的金属粉末、钙磷酸盐、聚乙酸内酯、甲磺酸去铁胺等处理种植体表面,经酸蚀、碱处理提高表面微观强度,并能显著促进细胞附着和血管形成。在材料表面覆盖有优良性能的熔覆层,可改善基体材料的特性。邹林等^[37]以纳米钽粉(Ta)为原料,采用激光镀膜技术,制备了两侧对称纳米钽涂层的新型钛合金棒材。经四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(microenzyme reaction colorimetric method of tetramethylazazole salt, MTT)的细胞毒性试验和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性试验,评估了新型纳米钽钛合金对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化的影响。结果显示,该材料能显著促进 MC3T3-E1 细胞的增殖和骨细胞的骨化。盛波等^[38]利用激光熔覆技术,在钛合金 TC4 表面制备掺杂不同含量 SiO₂ 的生物陶瓷涂层,发现当 Si 掺杂量为 7.5% 时,涂层细胞增值最大,细胞能够紧贴涂层表面生长,大大提高了涂层的生物相容性和活性。彭兰等^[39]利用宽带激光熔覆技术在钛合金表面制备不同梯度的 Ca-P 生物陶瓷涂层,发现 Ca-P 生物陶瓷涂层有良好的生物矿化能力,形成更多类骨磷灰石,表现出良好的生物相容性和生物活性。

1.5 自组装单层膜技术

自组装单分子层膜(self-assembled monolayer, SAMs)是一种广泛应用于生物和消费电子领域的材料技术^[40],是研究最广泛、最深入的一种非生物自组装体系,具有十分广阔的发展前景,对深入研究有机材料表面基团类型、性质以及与生物体的作用机制具有重要意义。在有机材料表面形成高度有序的单分子层,通常使用的改性分子有硫烷[HS(CH₂)_nX]、三氯硅烷[SiCl₃(CH₂)_nX]等,其中 X 代表 CH₃、PO₄H₂、COOH、

CONH₂、OH、CF₃、[(CH₂)₁₁OCOCH₃]等基团。这些活性基团可同生物介质发生作用,通过调控基团的种类和性质,使材料表面能量性质、电荷性质等发生变化,从而使有机质的作用特性发生变化,例如对蛋白质的吸附行为;也可以利用长链有机分子的化学吸附和自组织在特定基底上自发形成有序分子膜。SAMs是通过将基底浸入待安装的分子溶液或暴露于蒸汽中来制备,如金表面组装长链硫醇、硅或玻璃表面组装长链有机硅烷分子等。其中,金-硫醇自组装单分子层^[41]在改性领域应用最广泛,能高效模拟人体微环境,经长链烷基硫醇 X-(CH₂)_n-SH 在金表面产生的化学吸附,形成一种单分子膜,可调控界面结构和性质,能有效衡量同细胞基质间的相互作用。硫化物同金表面上的原子自组装成膜依赖 Au-S 键的形成,该过程是热力学自发的,因此能产生热量。含硫化合物,如硫醇、硫醚或二硫醚衍生物,这类化合物中的 S 和 Au 表面原子有类似的热力学作用,能自发形成 Au-S 共价键。金的表面可以通过烷基化物或溴化物的自由基交叉反应被烷基修饰^[42],这类自组单分子生物膜层表现出优异的热稳定性、涂层致密性和分子组装的有序性。He 等^[43]利用诱导电喷雾法在带电液滴电离过程中产生的分子离子,在金表面制备了一层蛋白质膜,这是借助于带电液滴内胺和羧酸之间有效的酰胺键的形成和衍生的生物分子在带电微滴环境下通过 Au-S 键在裸金表面上自组装。对自组装分子膜的循环伏安分析显示,半胱氨酸加速了蛋白质的衍生化,使蛋白质以共价形式固定在金表面,并且在过氧化氢水溶液中具有较强的生物活性。此外,自组单分子生物膜还表现出优良的生物分子吸附选择性。谷氨酸(E)和赖氨酸(K)是构成人体的第一和第二丰富的氨基酸,E 和 K 的两性离子对是蛋白质表面最常见的两性离子对,其次是天冬氨酸(D)。Chang 等^[44]制备了含有 EK 和 DK 重复单元的自组装单分子层膜(肽-SAMs),蛋白质吸附和细胞粘附测试表明,具有 EK 和 DK 重复单位的肽-SAMs 表现出良好的抗生物污染性能和血液相容性,使用原子力显微镜进行表面力的测量,结果显示,EK-SAMs(固定在探针和底物上)和 DK-SAMs 之间具有约 8 nm 范围内的水诱导排斥作用,斥力的强度与 SAMs 的蛋白质和细胞抗性有明显的相关性,表明 EK 和 DK-SAMs 附近的界面水是阻止蛋白质和细胞吸附或粘附的物理屏障。可见,自组装单分子层膜技术是优良的改性技术,能很好改变基底材料表面性质,提高对生物分子的相容性和选择性。

1.6 材料表面肝素化

生物材料表面分子的类型、组成和结构会显著影响其吸附活性,也会影响所吸附的蛋白等生物分子的类型、组成和结构。因此,要提高材料的生物相容性,可通过修饰方法对材料表面进行分子设计,将多肽、酶、细胞生长因子、蛋白质和肝素分子等生物分子接枝到材料表面形成过渡层,担任邻近细胞、基质或可溶性因子受体,增加与生物活体相适应的程度,增加界面相容性,减小排斥反应,并有效增加同组织、细胞的结合力。其中,肝素化方法在材料学、医学等领域研究较多。

所谓肝素化,就是以足量肝素达到全身性适度抗凝的治疗方法^[45]。肝素是一种抗凝剂,是一种由葡萄糖胺、L-艾杜糖醛苷、N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸交替组成的黏多糖硫酸脂,平均分子量为 15 kD,呈强酸性,生理情况下血浆中含量甚微。其原理是抑制形成凝血活素或对抗已形成的凝血活素、抑制凝血酶原变成纤维蛋白单体以及防止血小板集聚和破坏。无论在体内还是体外,肝素的抗凝作用都很强,故临床上作为抗凝剂广泛使用^[46],主要用于血栓栓塞性疾病、心肌梗死、心血管外科、心导管术、体外循环、血液透析等。随着药理学和临床医学的发展,肝素的应用正在扩大。肝素首先在肝脏中被发现,也存在于肺、血管壁、肠黏膜等组织中,是动物体内天然抗凝剂,目前主要从牛肺或猪小肠黏膜中提取。

聚己内酯(polycaprolactone, PCL)是生物医学学科中研究与应用都较为深入的一种生物材料,该材料表面经肝素化修饰,能表现出很好的生物相容性,肝素和聚己内酯通过共价键进行结合,具有良好的稳定性。原理是醛基和氨基发生席夫碱反应,使得肝素被固定。通过甲苯胺蓝染色法,可测得固化效率为 6 μg/cm²。通过 X 射线光电子能谱或傅里叶红外光谱分析,氮、硫、钠等元素的结合形式表明,肝素与 PCL 之间存在共价 C-N 和 N-H 等的结合,显示出结构良好的稳定性和生物学活性。

肝素虽然是一种常用的天然抗凝剂,但存在易出血的缺点。因此,以高效、副作用小的抗凝材料来替代肝素制剂,是行之有效的方法。通过对肝素分子结构的分析和抗凝血机制的理论研究发现:肝素分子链上的磺酸、羧酸和磺胺等基团是影响抗凝血性的主要因素。将这类基团接枝到某聚合物表面,可显著提高聚合

物的抗凝血性。这类被修饰过的聚合物也称为类肝素化聚合物,目前常用的接枝肝素的方法有:离子键法^[47],该法得到的材料相容性好、抗凝血活性高且长期稳定;共价键方法^[48],该法得到的材料具有力学性能良好、亲水和长效抗凝的特性,并且绿色环保;以及吸附法^[26]、偶联剂法^[27]、光化学固定法^[28]、等离子体法^[29]等。肝素分子中含有一COOH、—OH、—NH₂等基团,其构型或构像的变化会影响生物活性,这些功能基团一旦被多点键合,可能会影响其结构,有些活性可能被部分包埋或破坏,造成抗凝血性下降,因此必须有选择地进行肝素分子修饰。

2 组织和血液相容性的评价方法

2.1 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法

四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(microenzyme reaction colorimetric method of tetramethylazazole salt, MTT)由 Mosroam 在 1983 年提出,最初应用于免疫学领域,近年应用于生物材料的细胞毒性评价^[49],操作简便、敏感性高,可作定量评价。该方法的原理是线粒体琥珀酸脱氢酶能催化四甲基偶氮唑盐形成蓝色结合体,形成数目的多寡与活细胞数目和功能状态呈正相关。另外,对于 DNA 合成检测方法、细胞完整性测定等方法,也可从不同角度评价生物材料中毒性成分对细胞的作用,但是这些方法之间的相关性以及这些方法的评价结果与其他生物学评价结果的相关性还有待进一步研究。而 MTT 法不仅简单快捷、灵敏度高,还能有效反映生物相容性的效果,如采用聚丙烯酸钠(Sodium polyacrylate, PAA-NA)作为稳定剂,通过 MTT 法评价纳米羟基磷灰石血液相容性,发现纳米羟基磷灰石具有良好的血液相容性,对静脉注射药物也具有一定的安全性^[50]。

2.2 细胞培养法

人体植入材料必须具有良好的生物相容性和生物安全性,如镍钛记忆合金植入人体时,必须关注材料表面性质对生物相容性的影响^[51]。通常可用细胞培养法进行对比观察,将钛镍记忆合金分为两组,表面改性处理的材料为实验组,未处理的材料为空白组。体外培养骨髓基质细胞,通过 MTT 法检测两组材料中细胞存活数。采用扫描电子显微镜观察实验组材料表面的变化,测定材料的溶血率和动态凝固时间。结果发现,实验组材料溶血率降低,凝固时间延长;骨髓基质细胞培养的第 4 天和第 6 天,实验组的吸收明显高于空白组,表明改性后具有良好的生物安全性和生物相容性^[52]。对于血液接触植入物,其抗凝性是生物相容性的核心问题。目前,临床应用,还没有一种医用生物材料能够满足体内植入的长期抗凝要求。抗凝药物的表面组装可以在一定程度上改善材料的血液相容性,但这些药物在材料表面的长期使用仍存在问题^[52],因此,抗凝性材料的开发仍有较大的发展空间和潜力。

2.3 测血小板数法

血小板数也能在一定程度上反映生物材料的血液相容性。例如,利用氧气低温等离子体技术,在天然纤维素纸张材料的表面,接枝一定数量的肝素分子。首先,进行体外凝血时间实验测试并观察红细胞形态,再进行全血和血小板粘附实验,通过测血小板数判断其血液相容性。研究发现,体外凝血时间显著增加,抗溶血和血小板数、血细胞粘附能力等均明显改善^[53]。在对体外血液灌流器(输血器)的血液研究中,也常以流经输血器后血小板数量的变化作为评价输血器血液相容性的指标^[54-55]。

3 结论

材料的生物相容性主要包括组织和血液相容性,是材料学、生命科学与医学等重点研究方向之一^[56-58],人工血管内皮细胞化技术、离子束表面改性技术、高能辐射技术、材料表面分子设计等技术的应用,不仅能改变生物材料的表面性质、结构和电荷状态,也能显著增加组织相容性和血液相容性,在保证良好生物相容性的基础上,努力提高其物理力学性能和应用效果,已成为科研、应用方面的共识。

虽然目前常用的金属类、无机类及有机类生物材料与人体组织或血液组织的相容性仍存在不少问题,如会引起凝血甚至血栓,但是提高相容性的技术方法日益改进。同时,对凝血和血栓形成在生理水平上的机理研究也取得不少成果,并正加速在临床上的应用研究。另外,对生物高分子的改性方法和途径还较少,主要

是接枝改性、共聚改性等,而对多嵌段共聚物、链段间的不相容问题还有待深入研究。同时,还存在肝素分子活性保持问题、内皮化细胞寿命问题等。目前使用的多数方法还处于研究或试验阶段,尤其评价方法还需进一步多样化,对抗凝血机理和改性机理等要深入研究,提高临床上的应用效率仍是今后较长时期的重要任务。因此,从基因水平上研究、设计和开发新型的生物相容性更好的材料,将是重要的研究课题。

参考文献:

- [1] 张阳德,欧阳洋.临床常用生物材料及其应用前景[J].中国医学工程,2004,12(5):34-37.
ZHANG Yangde,OUYANG Yang.Common clinical biomaterials and their application prospects[J].China Medical Engineering,2004,12(5):34-37.
- [2] 袁毅君,王廷璞,陈学梅,等.生物医用材料生物相容性评价研究进展[J].天水师范学院学报,2014,34(5):17-20.
YUAN Yijun,WANG Tingpu,CHEN Xuemei,et al.Research progress of biocompatibility evaluation on biomaterials[J].Journal of Tianshui Normal University,2014,34(5):17-20.
- [3] 熊威,唐睿康,马为民,等.仿生无机纳米材料改造生物体的研究进展[J].无机化学学报,2019,35(1):1-24.
XIONG Wei,TANG Ruikang,MA Weimin,et al.Research progress on modification of organisms by biomimetic inorganic nanomaterials[J].Chinese Journal of Inorganic Chemistry,2019,35(1):1-24.
- [4] 徐择贤,金嘉长,侯雷,等.超亲水性医用导管的制备及其动物体内组织相容性研究[J].生物医学工程学杂志,2019,36(2):238-244.
XU Zexian,JIN Jiachang,HOU Lei,et al.Fabrication of hydrophilic medical catheter with hydrogel grafting and the in vivo evaluation of its histo-compatibility[J].Journal of Biomedical Engineering,2019,36(2):238-244.
- [5] 夏克尔·赛塔尔,李超婧,邹婷,等.人工血管的发展现状及趋势展望[J].产业用纺织品,2019,37(3):1-5.
XIAKEER Saitaer,LI Chaojing,ZOU Ting,et al.Development status and trend of the artificial blood vessel[J].Technical Textiles,2019,37(3):1-5.
- [6] WU J X,HU C M,TANG Z C,et al.Tissue-engineered vascular grafts:Balance of the four major requirements[J].Colloid and Interface Science Communications,2018,23:34-44.
- [7] HEISSIG B,HATTORI K,DIAS S,et al.Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand[J].Cell,2002,109(5):625-637.
- [8] 沈根,张顺,叶红华.他汀类药物对内皮祖细胞作用的研究进展[J].新医学,2015,46(12):789-792.
SHEN Gen,ZHANG Shun,YE Honghua.Research progress of the effect of statin therapy on endothelial progenitor cells[J].New Medicine,2015,46(12):789-792.
- [9] HERRING M,GARDNER A,GLOVER G.A single staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium[J].Surgery,1978,84(4):498-504.
- [10] 李杰,吕伟明,李晓曦.血管内皮祖细胞在人工血管移植后内皮化中的作用及其机制[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(47):9617-9620.
LI Jie,LÜ Weiming,LI Xiaoxi.Roles and mechanisms of endothelial progenitor cells in the post-transplant tacho-endothelialization of vascular prosthesis[J].Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2007,11(47):9617-9620.
- [11] 胡星友,毛迎,关国平,等.涤纶经编小口径人工血管的制备工序对其生物相容性的影响[J].产业用纺织品,2018,36(5):17-23.
HU Xingyou,MAO Ying,GUAN Guoping,et al.The effect of preparation process of the polyester warp knitted small-diameter vascular grafts on compatibility[J].Technical Textiles,2018,36(5):17-23.
- [12] 白凌闯,赵静,冯亚凯.多功能基因递送系统促进内皮细胞增殖[J].化学进展,2019,31(2/3):300-310.
BAI Lingchuang,ZHAO Jing,FENG Yakai.Multifunctional gene delivery systems to promote the proliferation of endothelial cells[J].Progress in Chemistry,2019,31(2/3):300-310.
- [13] SUN A Q,HUANG X H,JIAO Y P,et al.Construction of biological factor-coated stent and its effect on promoting endothelialization[J].Materials Science & Engineering C,2021,122:111943-111953.
- [14] BEDAIR T M,BEDAIR H M,KO K W,et al.Persulfated flavonoids accelerated re-endothelialization and improved blood compatibility for vascular medical implants[J].Colloids and Surfaces B:Biointerfaces,2019,181:174-184.
- [15] WANG M Q,WANG Y,CHEN Y J,et al.Improving endothelialization on 316L stainless steel through wettability control-

- lable coating by sol-gel technology[J]. *Applied Surface Science*, 2013, 268: 73-78.
- [16] NOVOTN A, FRANC J. Corrigendum: Application of convolutional neural networks in neutrino physics[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2021, 1730(1): 12144-12145.
- [17] LIU Y Z, ZHANG K L, HAN J H, et al. One-step method to enhance biotribological properties and biocompatibility of DLC coating by ion beam irradiation[J]. *Friction*, 2022, 10(7): 1114-1126.
- [18] 陈运. 表面织构与氮离子注入对医用钛耐磨损性能的影响[D]. 南京: 暨南大学, 2018.
CHEN Yun. Effect of Surface texture and nitrogen ion implantation on wear resistance of medical titanium[D]. Nanjing: Jinnan University, 2018.
- [19] 刘丽婷, 王岩, 李怡雪, 等. XPS 表面分析技术在生物医用金属材料研究中的应用[J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*: 2021, 49(4): 9-22.
LIU Liting, WANG Yan, LI Yixue, et al. Application of XPS surface analysis technique in the research of biomedical metallic materials[J]. *Journal of Shaanxi Normal University(Natural Science Edition)*, 2021, 49(4): 9-22.
- [20] WHITLOW H J, NORARAT R, ROCCIO M, et al. MeV ion beam lithography of biocompatible halogenated Parylenes using aperture masks[J]. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2015, 354: 34-36.
- [21] MIRALAM R, HAIDER H, SHARP J G, et al. Surface nano-modification by ion beam-assisted deposition alters the expression of osteogenic genes in osteoblasts[J]. *Proceedings of The Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine*, 2019, 233(9): 921-930.
- [22] 章红萍, 王中英, 姜秀菊, 等. 间断肝素吸附法在高危出血患者连续性肾替代治疗中的应用和护理[J]. *护士进修杂志*, 2011, 26(22): 2050-2052.
ZHANG Hongping, WANG Zhongying, JIANG Xiuju, et al. Application and nursing of intermittent heparin adsorption in continuous renal replacement therapy for patients with high risk of bleeding[J]. *Journal of Nurse Education*, 2011, 26(22): 2050-2052.
- [23] 艾飞, 袁幼菱, 吴一多, 等. 血液相容材料的合成研究 VIII. 磺铵两性离子单体在聚醚氨酯表面的臭氧活化接枝[J]. *高分子学报*, 2002(4): 535-539.
AI Fei, YUAN Youling, WU Yiduo, et al. Synthetic studies on blood compatible materials VIII. Poly(ether-urethane) surface grafted with sulfo-ammonium zwitterion monomer activated by ozone[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2002(4): 535-539.
- [24] 郑细鸣, 黄小军, 徐志康. 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[J]. *高分子学报*, 2011(7): 791-798.
ZHENG Ximing, HUANG Xiaojun, XU Zhikang. Surface heparinization of polypropylene microporous membranes for selective adsorption of low-density lipoprotein[J]. *Acta Polymerica Sinica*, 2011(7): 791-798.
- [25] 刘庆丰, 冯胜山, 褚衡. 光化学固定法表面改性医用高分子材料研究进展[J]. *中国塑料*, 2007, 21(12): 8-11.
LIU Qingfeng, FENG Shengshan, CHU Heng. Research progress in photochemical immobilization surface modified medical polymeric materials[J]. *China Plastics*, 2007, 21(12): 8-11.
- [26] GAUS K, HALL E A H. Evaluation of surface plasmon resonance (SPR) for heparin assay[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1997, 194(2): 373-378.
- [27] MEN J Y, WANG R X, HU X Y, et al. Preparation of heparin-functionalized microspheres and study on their adsorption characteristic for basic protein lysozyme[J]. *Macromolecular Research*, 2016, 24(2): 114-122.
- [28] MURUGESAN S, XIE J, LINHARDT R J. Immobilization of heparin: Approaches and applications[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2008, 8(2): 80-100.
- [29] ZHU Q, YE P, GUO F, et al. A heparin-functionalized covered stent prepared by plasma technology[J]. *Journal of Biomaterials Applications*, 2021, 36(7): 1243-1253.
- [30] STEINERT A, HENDRICH C, MERKLEIN F, et al. Standardized testing of bone implant surfaces with an osteoblast cell culture cyste. III. PVD hard coatings and Ti₆Al₄V[J]. *Biomedizinische Technik/ Biomedical Engineering*, 2000, 45(12): 349-355.
- [31] LIU X J, ELKHOOLY T A, ZHANG R R, et al. Selective deposition of CaCO₃ on chemical gradient surface generated by plasma polymerization and its effect on cell adhesion[J]. *Materials Letters*, 2018, 186: 90-93.
- [32] 吴志宏, 蒋波, 张兴栋. 辐射技术在生物材料领域的研究及应用进展[J]. *材料导报*, 2005, 19(2): 27-30.

- WU Zhihong,JIANG Bo,ZHANG Xindong.Developments of radiation technology in biomaterials Science[J].Materials Letters,2005,19(2):27-30.
- [33] 方月娥,史天义,梅宝珊,等.硅橡胶水凝胶膜预防骨科手术组织粘连的临床应用[J].生物医学工程学杂志,1998,15(3):298-230.
- FANG Yue'e,SHI Tianyi,MEI Baoshan,et al.Clinical application of hydrogel membrane of silicone rubber for preventing adhesion in orthopedics[J].Journal of Biomedical Engineering,1998,15(3):298-230.
- [34] 展望,朱飞,方月娥,等.硅凝胶乳房假体辐射接枝水凝胶的实验研究[J].中华医学美容杂志,2001,7(4):201-203.
- ZHAN Wang,ZHU Fei,FANG Yue'e,et al.Experimental study on the radiation grafting of N-VP onto the surface of silicone breast implants[J].Chinese Journal of Medical Aesthetics and Cosmetology,2001,7(4):201-203.
- [35] 张津超,石世宏,龚燕琪,等.激光熔覆技术研究进展[J].表面技术,2020,49(10):1-11.
- ZHANG Jinchao,SHI Shihong,GONG Yanqi,et al.Research progress of laser cladding technology[J].Surface Technology,2020,49(10):1-11.
- [36] 许胜,蒋伟.选择性激光熔覆技术制备的口腔微孔种植体机械性能、生物性能及表面处理方法研究进展[J].山东医药,2019,59(27):106-110.
- XU Sheng,JIANG Wei.Research progress on mechanical properties,biological properties and surface treatment methods of oral microporous implants prepared by selective laser cladding technology[J].Shandong Medicine,2019,59(27):106-110.
- [37] 邹琳,江建明,杨勇,等.激光熔覆技术制备的纳米钽-钛合金棒结构特征及生物相容性[J].南方医科大学学报,2014,34(6):852-856.
- ZOU Lin,JIANG Jianming,YANG Yong,et al.Structural characteristics and biocompatibility of a new Nano-Ta-Ti alloy rod fabricated by laser melting technique[J].Journal of Southern Medical University,2014,34(6):852-856.
- [38] 盛波,顾怀章,李龙,等.激光熔覆 $\text{SiO}_2/\text{La}_2\text{O}_3$ 梯度生物陶瓷涂层生物活性研究[J].表面技术,2020,49(7):35-41.
- SHENG Bo,GU Huaizhang,LI Long,et al.Bioactivity of $\text{SiO}_2/\text{La}_2\text{O}_3$ gradient bioceramic coating fabricated by laser cladding[J].Surface Technology,2020,49(7):35-41.
- [39] 彭兰,张国芬,罗迪迪,等.不同 Ca/P 对宽带激光熔覆生物陶瓷涂层性能的影响[J].表面技术,2022,51(7):363-369.
- PENG Lan,ZHANG Guofen,LUO Didi,et al.Effects of different Ca/P on properties of bioceramic coating prepared by broadband laser cladding[J].Surface Technology,2022,51(7):363-369.
- [40] 卢建红,甄崇礼,沈玉,等.自组装单分子膜的研究现状及展望[J].材料保护,2018,51(8):114-119.
- LU Jianhong,ZHEN Chongli,SHEN Yu,et al.Research and future prospects of self-assembled monolayers[J].Material Protection,2018,51(8):114-119.
- [41] 沙赞颖,李岩,胡婧,等.自组装单分子层技术的应用研究进展[J].农家参谋,2019(19):179-182.
- SHA Yunying,LI Yan,HU Jing,et al.Application research progress of self-assembled monolayer technology[J].Farm Staff,2019(19):179-182.
- [42] BERISHA A,COMBELLAS C,KANOUI F,et al.Alkyl-modified gold surfaces:Characterization of the Au-C bond[J].Langmuir,2018,34:11264-11271.
- [43] HE Q,BADU-TAWIAH A K,CHEN S M,et al.In situ bioconjugation and ambient surface modification using reactive charged droplets[J].Analytical Chemistry,2015,87:3144-3148.
- [44] CHANG R,QUIMADA-MONDARTE E A,PALAI D,et al.Protein- and cell-resistance of zwitterionic peptide-based self-assembled monolayers:Anti-biofouling tests and surface force analysis[J/OL].Frontiers in Chemistry,2021,9.DOI:10.3389/fchem.2021.748017.
- [45] 杨倩,谢艳新,沈宇杰,等.肝素化/类肝素化高分子膜材料的研究进展[J].功能材料,2019,50(12):12059-12065.
- YANG Qian,XIE Yanxin,SHEN Yujie,et al.Research progress of heparinized/heparin-like polymer membrane materials [J].Functional Materials,2019,50(12):12059-12065.
- [46] WANG D F,WANG X F,LI X Y,et al.Biologically responsive,long-term release nanocoating on an electrospun scaffold for vascular endothelialization and anticoagulation[J].Materials Science & Engineering C,2020,107:110212-110223.
- [47] 陆威,康亚红,冯德军,等.一种医用材料及其表面制备抗凝血涂层的方法:201910969460.8[P].2019-10-12.
- [48] 洪枫,胡高铨,李格丽,等.表面接枝肝素涂层的小口径人工血管及其制备方法:202010239004.0[P].2020-03-30.
- [49] 秦慧莲,匡彦德.四甲基偶氮唑盐比色法测定白细胞介素-2 活性及淋巴细胞增殖反应[J].上海医科大学学报,1987,14

- (6):407-412.
- QING Huilian, KUANG Yande. Determination of interleukin-2 activity and lymphocyte blastogenesis by the modified MTT colorimetric assay[J]. Acta Academiae Medicinae Shanghai, 1987, 14(6):407-412.
- [50] 王海, 王友法, 李世普. 化学沉淀法制备纳米 HAP-sol 及其血液相容性研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2006, 23(1):47-50.
- WANG Hai, WANG Youfa, LI Shipu. Preparation of nano-HAP-sol by chemical precipitation and its blood compatibility [J]. Journal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine, 2006, 23(1):47-50.
- [51] 路坦, 田博, 张江峰, 等. 镍钛形状记忆合金表面改性后的血液相容性[J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(47):8817-8820.
- LU Tan, TIAN Bo, ZHANG Jiangfeng, et al. Effect of surface treatment on the hemocompatibility of Ni-Ti shape memory alloy[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(47):8817-8820.
- [52] 钟司. 聚多巴胺介导的二氧化钛纳米管负载比伐卢定及其生物相容性研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2014.
- ZHONG Si. Polydopamine mediated titanium dioxide nanotubes for bivalirudin loading and its biocompatibility study[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2014.
- [53] 吕文志, 周小凡, 王慧丽, 等. 血液相容纤维素基纸张的制备及其负载生长因子的研究[J]. 功能材料, 2017, 48(1):1153-1158.
- LV Wenzhi, ZHOU Xiaofan, WANG Huili et al. Preparation of hemocompatible cellulose-based paper and its performance in loading growth factor[J]. Functional Materials, 2017, 48(1):1153-1158.
- [54] 曹晔, 乔春霞, 刘嘉馨, 等. 一次性使用输血器的血液相容性研究[J]. 中国输血杂志, 2021, 34(6):603-606.
- CAO Ye, QIAO Chunxia, LIU Jiaxin et al. Assessing hemocompatibility of transfusion sets for single use[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2021, 34(6):603-606.
- [55] 许建霞, 王召旭, 王春仁. 一次性使用血液灌流器的体外血液相容性[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(4):588-592.
- XU Jianxia, WANG Zhaoxu, WANG Chunren. Blood compatibility of disposable blood perfusion device in vitro[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2021, 25(4):588-592.
- [56] 靳涛, 李惠琪. 微波等离子体在肝素修饰人工晶体表面中的应用[J]. 山东科技大学学报(自然科学版), 2004, 23(4):108-110.
- JIN Tao, LI Huiqi. Application of microwave plasma in modification of intraocular lens surfaces in with heparin[J]. Journal of Shandong University of Science and Technology(Natural Science), 2004, 23(4):108-110.
- [57] 刘慧敏. Bi 基纳米材料的制备及其在肿瘤治疗中的应用研究[D]. 青岛: 山东科技大学, 2020.
- LIU Huimin. Synthesis and application in tumor therapy of bi-based nanomaterials[D]. Qingdao: Shandong University of Science and Technology, 2020.
- [58] 纪晓静. 镁合金表面自组装及其生物矿化复合涂层的耐蚀、抗菌和生物相容性研究[D]. 青岛: 山东科技大学, 2020.
- JI Xiaojing. Corrosion resistance, antibacterial property and biocompatibility of self-assembled and its biomineralized composite coating on magnesium alloy[D]. Qingdao: Shandong University of Science and Technology, 2020.

(责任编辑: 吕海亮)