

表面功能化

钛表面 PAMAM-BVLD/TPS 修饰层构建及 TPS 浓度对生物相容性的影响

郝港桐, 陈俊英, 李莉, 张鼎, 翁亚军

(西南交通大学 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031)

摘要: **目的** 在钛表面构建 BVLD/TPS 修饰层, 并研究 TPS 浓度对其表面生物相容性的影响, 从而筛选出最优 TPS 浓度。**方法** 将树枝状分子 (PAMAM) 接到钛表面, 借助其端部氨基基团, 将抗凝分子 BVLD、促内皮功能分子 TPSLEQRTVYAK 肽 (TPS) 引入, 构建出 PAMAM-BVLD/TPS 修饰层, 重点研究 TPS 浓度对构建层生物相容性的影响。采用扫描电镜 (SEM)、免疫荧光染色、傅里叶变换红外吸收光谱仪 (FT-IR)、水接触角测量等对修饰层形貌、结构、表面亲疏水性等进行表征; 使用酸性橙、Micro-BCA 对 Ti 表面修饰层的活性基团进行测试。采用血小板粘附与激活试验、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 评价血液组分与修饰层之间的相互作用。采用半体内循环试验评价修饰层与全血的相互作用。**结果** 成功构建修饰层, 修饰层表面血小板粘附数量和激活程度均明显降低, 其中 TPS 浓度为 3 mol/L 时, 激活程度较低。APTT 时间显著延长, 其中修饰层 APTT 为 37 s 左右, 相比对照组延长 10 s 左右。细胞相容性评价结果表明, 与 Ti 表面相比, 修饰层表面 ECs 粘附数量和增殖活性均增加, 其中 TPS 浓度为 3、5 mol/L 时, 内皮细胞生长情况最好, 半体内循环试验结果表明, 修饰层能够显著抑制血栓的形成。**结论** 在钛表面成功构建了 BVLD/TPS 修饰层, 并初步探索出 TPS 的最优浓度, 即当 TPS 浓度为 3 mol/L 时, 其血液相容性以及细胞学评价良好, 可以用于钛表面生物修饰层的研发与应用。

关键词: 表面改性; 比伐卢定; 促内皮; 抗凝; 细胞相容性

中图分类号: TG146.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2023)02-0343-09

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2023.02.032

Construction of PAMAM-BVLD/TPS Modification Layer on Titanium Surface and Effect of TPS Concentration on Biocompatibility

HAO Gang-tong, CHEN Jun-ying, LI Li, ZHANG Ding, WENG Ya-jun

(Key Laboratory of Advanced Materials Technology of Ministry of Education, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT: At present, stent implantation is the main way for clinical treatment of atherosclerosis. However, after

收稿日期: 2022-01-21; 修订日期: 2022-05-18

Received: 2022-01-21; Revised: 2022-05-18

基金项目: 国家自然科学基金 (31870955)

Fund: The National Natural Science Foundation of China (31870955)

作者简介: 郝港桐 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为心血管材料表面改性。

Biography: HAO Gang-tong (1997-), Female, Postgraduate, Research focus: surface modification of cardiovascular materials.

通讯作者: 陈俊英 (1968—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为材料表面工程。

Corresponding author: CHEN Jun-ying (1968-), Female, Doctor, Professor, Research focus: material surface engineering.

引文格式: 郝港桐, 陈俊英, 李莉, 等. 钛表面 PAMAM-BVLD/TPS 修饰层构建及 TPS 浓度对生物相容性的影响[J]. 表面技术, 2023, 52(2): 343-351.

HAO Gang-tong, CHEN Jun-ying, LI Li, et al. Construction of PAMAM-BVLD/TPS Modification Layer on Titanium Surface and Effect of TPS Concentration on Biocompatibility[J]. Surface Technology, 2023, 52(2): 343-351.

implantation, restenosis, thrombosis, inflammation and other problems may lead to treatment failure because the surface biocompatibility of implant materials does not meet the clinical requirements. Surface modification is one of the main methods to improve the biocompatibility of materials. At present, since the functional molecules modified by single function molecule can no longer meet the requirements of implant materials, the modification of multiple biomolecules on the surface of scaffolds has become a new hot spot. Therefore, the work aims to select anticoagulant molecule BVLD (Bivalirudin) and the endothelial-promoting molecule TPS (TPSLEQRTVYAK peptide) to construct BVLD/TPS modification layer on titanium surface and study the effect of TPS concentration on the biocompatibility of titanium surface, so as to obtain the optimal TPS concentration. For covalent construction of PAMAM-BVLD/TPS modification layer, titanium as a cardiovascular metal implant material, was firstly polished and then activated by NaOH to create a large number of hydroxyl reactive functional groups for electrostatic binding of positively charged PAMAM. Subsequently, according to the amino and amidation reaction of PAMAM terminal, BVLD and TPS were covalent immobilized onto surface, the PAMAM-BVLD/TPS modification layer was thus formed. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the changes of the surface morphology of titanium. It was found that the surface roughness of titanium grafted with BVLD and TPS decreased. In immunofluorescence staining, the surface of the polypeptide grafted with FITC fluorescein gave off a large area of fluorescence. In FT-IR results, the successful graft of PAMAM could only be preliminarily judged. However, the successful graft of polypeptide could not be judged because the functional groups of the grafted molecules were similar. The acid orange experiment could further help to prove the successful graft of PAMAM. According to the Micro BCA experiment, the density of phenolic hydroxyl groups on the surface of the material was detected. The content of phenolic hydroxyl groups on the surface of the grafted peptide samples was significantly different from that of the contrast samples due to the unique phenolic hydroxyl group of polypeptide, proving the successful graft of the polypeptide. In the measurement of water contact Angle (WCA), the polypeptide molecule had better hydrophilicity than the other molecules, and with the increase of TPS concentration, the hydrophilicity was further improved. These experiments proved the successful construction of the BVLD/TPS modification layer. The effect of TPS concentration on the biocompatibility of the modification layer was studied in detail. In the platelet adhesion and activation experiment, the platelet activation degree on the titanium plane surface of the grafted polypeptide decreased, and the activation degree was the lowest when the TPS concentration was 3 mol/L. In the APTT experiment, the partial activation time of thrombin grafted with BVLD sample was still significantly longer than control sample, and the TPS concentration had no significant effect on the time. The APTT time of the modification layer was about 37 s, which was about 10 s longer than that of the control group. The experiment results of endothelial cell adhesion and proliferation disclosed that, compared with the control group, the number and activity of the endothelial cells adhered to the modification layer surface grafted by polypeptide increased, and the growth of the endothelial cells was excellent when the TPS concentration was 3 and 5 mol/L. Based on the above results, it was proved that the biocompatibility of modified titanium surface was optimal at the TPS concentration of 3 mol/L. Half body experiment showed that the modification layer could significantly inhibit thrombosis. Obviously, the co-immobilization of BVLD and TPS onto biomaterials surface, is expected to be used for the cardiovascular interventional materials with functionalization. BVLD/TPS modification layer is successfully constructed on titanium surface, and the optimal concentration of TPS is preliminarily explored, that is, when the concentration of TPS is 3 mol/L, its blood compatibility and cytological evaluation are good, which can be used for the development and application of biological modification layer on titanium surface.

KEY WORDS: surface modification; Bivalirudin; endothelium-promoting; anticoagulation; cytocompatibility

近些年来, 心血管疾病占我国公民死亡率首位^[1], 严重威胁人们的生命健康。治疗方法主要有药物治疗、手术治疗以及介入治疗。药物治疗周期较长, 效果不明显; 手术治疗对患者造成的损伤大、风险较高; 相比之下, 介入治疗手术所需风险低, 术后恢复时间短。血管支架植入是目前临床上治疗心血管疾病的主要手段, 然而, 在支架植入晚期时, 大多数支架都会引发再狭窄、血栓、炎症等一系列反应^[2-4]。通过对材料表面改性, 可有效改善支架材料的生物相容性。

目前, 研究者通过在金属材料表面修饰功能分子, 例如细胞外基质蛋白^[5]、多肽^[6]、肝素^[7]、抗体^[8]等, 可有效改善支架材料的生物相容性。其中, 作为三维球状大分子, 聚酰胺树枝状分子(PAMAM)备受研究者关注。PAMAM 外部官能团丰富, 内部空腔具有一定的装载性, 在药物治疗、药物传递以及材料表面改性中应用广泛, 在心血管材料领域应用有很大潜力^[9-10]。然而, PAMAM 生物相容性较差, 需要对其进一步修饰, 改善其血液及细胞相容性^[11-13]。比

伐卢定 (Bivalirudin, BVLD) 是由人工合成的新型抗凝血临床药物, 可与凝血酶发生特异性结合, 直接抑制凝血酶活性, 效果较肝素更为强大^[14]。目前 BVLD 作为肝素抗凝治疗的替代药物之一, 常被研究者用于血液接触材料表面抗凝修饰^[15-17]。TPSLEQRTVYAK (TPS) 属于功能性多肽, 是于 2007 年 Veleva 等人筛选出来可与血液中内皮祖细胞 (EPCs) 特异性结合的多肽适配子^[18], 2008 年 Veleva 等人证实了 TPS 可特异性粘附 EPCs 以及 EPCs 来源的内皮细胞 (ECs)^[19]。之后又有研究者证实, 接枝 TPS 的材料表面支持血管内皮细胞的粘附及增殖^[20]。然而, 关于 TPS 浓度对于内皮细胞的影响未见报道。本研究拟将树枝状分子 (PAMAM) 吸附到钛表面, 借助 PAMAM 端部的氨基基团, 采用 EDC-NHS 体系, 将抗凝分子 BVLD、促内皮功能分子 TPS 引入, 在钛表面构建 PAMAM-BVLD/TPS 修饰层, 探究不同浓度 TPS 对构建层生物相容性的影响。

1 试验

1.1 材料与方法

试验主要用材料有: 钛基质 ($\phi 10$ mm, 宝鸡有

色金属股份有限公司)、树枝状分子聚酰胺胺 (PAMAM, 晨源分子新材料有限公司)、BVLD (95%, 上海科肽)、TPS (95%, 鸿拓生物)、氢氧化钠、EDC、NHS、酸性橙、MicroBCA 试剂盒、APTT 试剂盒等。

修饰层的构建方式如图 1 所示。具体操作步骤为:

1) 将纯钛打磨并抛光, 再用无水乙醇、超纯水分别超声清洗 5 min, 并标记为 Ti。

2) 将 Ti 浸没于 3 mol/L 的氢氧化钠溶液中, 在 80 °C 条件下反应 12 h, 再用超纯水超声清洗 5 min, 获得碱活化处理后的 Ti。

3) 将碱活化处理后的 Ti 浸没于 PAMAM 溶液中 (浓度为 1 mol/L), 常温下反应 12 h, 并标记为 Ti-OHP。

4) 在浓度为 0.1 mol/L 的 BVLD 溶液中加入 $n_{\text{COOH}} : n_{\text{NHS}} : n_{\text{EDC}} = 1 : 3 : 5$ 的 NHS/EDC 的羧基活化剂, 将共混液体滴加到 Ti-OHP 样品表面, 在常温下反应 12 h, 并标记为 Ti-OHPB。

5) 之后在一定浓度的 TPS 溶液中 (浓度分别为 1、3、5 mol/L) 加入 $n_{\text{COOH}} : n_{\text{NHS}} : n_{\text{EDC}} = 1 : 3 : 5$ 的 NHS/EDC 的羧基活化剂, 将共混液体滴加到 Ti-OHPB 样品表面, 常温下反应 24 h, 标记为 Ti-OHPBT (TPS 浓度)。

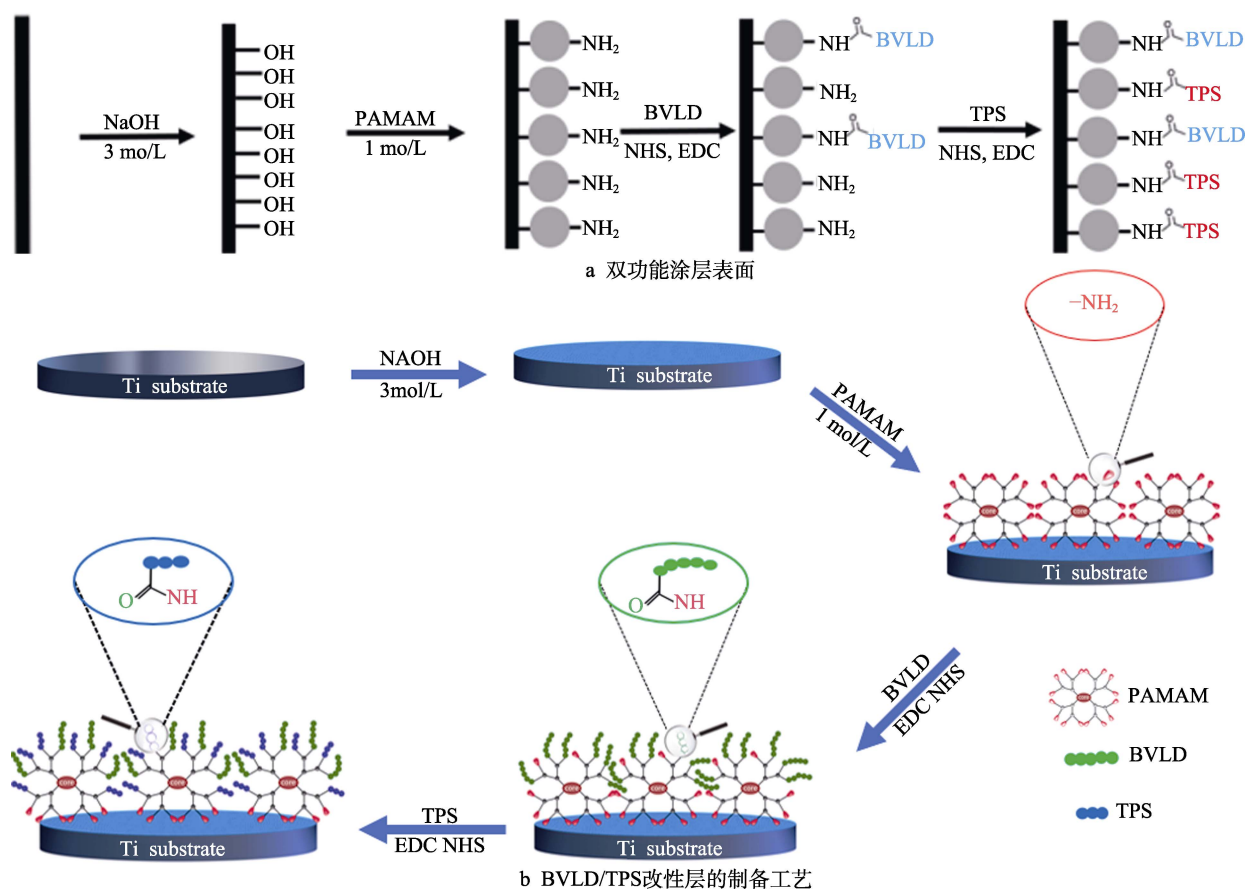


图 1 双功能修饰层的制备过程

Fig.1 Preparation of dual-functional modification coating: a) dual-functional coating surface; b) preparation process of BVLD/TPS modification layer

1.2 材料学表征

采用场发射扫描电镜 (JSM 7800F) 观察材料的表面形貌。采用免疫荧光法对材料表面接枝的多肽进行定性检测。采用傅立叶红外光谱仪 (NICOLET 5700) 对样品表面的官能团结构进行分析。采用酸性橙方法检测材料表面氨基的变化量。采用 Micro BCA 方法检测材料表面酚羟基的变化量。采用接触角测定仪对修饰前后材料表面水接触角的变化进行检测。

1.3 血液学评价

具体试验步骤为: 取新鲜抗凝人血, 以 1 500 r/min 离心 30 min, 收集上层液体富血小板浆 (PRP); 将试验样品浸泡于 PRP 中 (37 °C, 30 min); 浸泡结束后, 用生理盐水清洗 3 次, 多聚甲醛液固定; 采用荧光显微镜观察材料表面的血小板; 将样品脱水、脱醇处理, 并在干燥后喷金; 采用场发射扫描电镜 (JSM 7800F) 对不同样品表面的血小板形态进行观察。

取新鲜抗凝人血, 按照 3 000 r/min 转速离心 30 min, 收集上层液体贫血小板浆 (PPP)。再将材料浸泡于 PPP 中 (37 °C, 5 min), 采用 APTT 试剂盒以及秒表检测并记录样品的活化部分凝血活酶时间。

1.4 体外细胞学评价

在材料表面体外种植内皮细胞 (ECs), 种植密度为 1×10^4 cells/mL, 种植时间为 1、3 d。通过荧光显微镜 (OLYMPUS) 观察样品表面 EC 形态。使用 CCK-8 试剂检测样品表面 ECs 活性。

2 结果及分析

2.1 形貌观察与免疫荧光染色

扫描电镜可以直观反映样品接枝分子前后表面形貌的变化。由图 2a 可得, 经过碱活化后的钛片表面形成了 100~200 nm 的网络孔洞状结构, 与文献中报道相符^[21]。样品 Ti-OHP 表面有少量粘附的物质, 相比之下, 样品 Ti-OHPBT 表面孔洞中有一些填充在其中的物质, 但并不能确定具体是什么, 因此需要进一步表征证明分子接枝的成功。免疫荧光染色结果如图 2b 所示。2 种样品表面的荧光强度有很大区别, 在样品 Ti-OHPBT 表面, 由于多肽修饰了 FITC 荧光素, 因此在材料表面发出大面积且均匀的绿色荧光。反之, 样品 Ti-OHP 表面并未有绿色荧光发出。该结果表明功能分子成功接枝到材料表面。

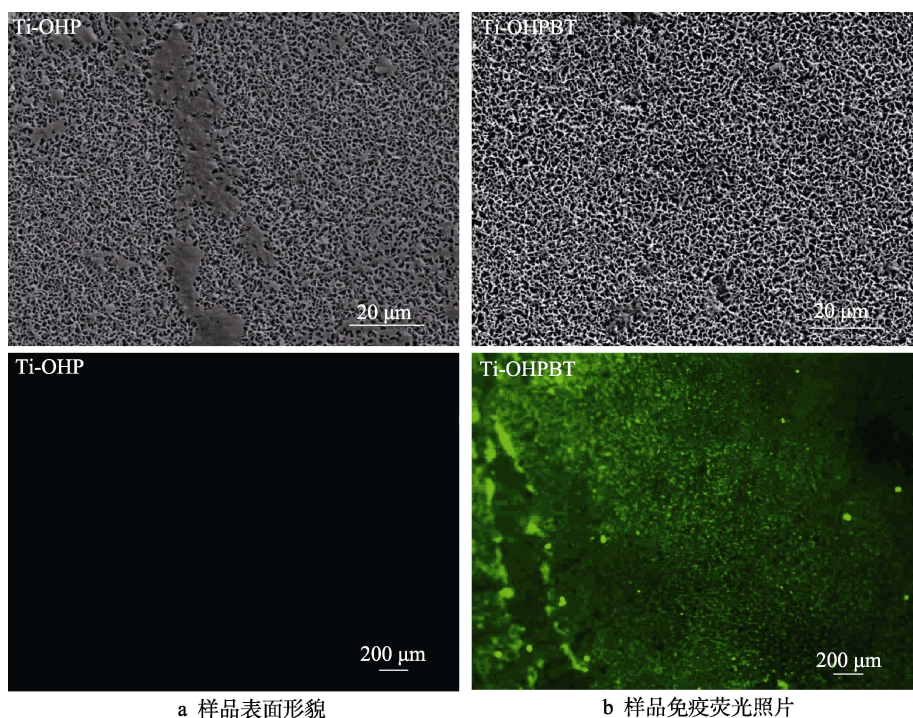


图 2 接枝样品对改性钛表面形貌的影响

Fig.2 Effect of grafted specimens on the surface morphology of modified titanium: a) surface morphologies of specimens; b) immunofluorescence pictures of specimens

2.2 FT-IR 与基团定量

图 3 为傅里叶红外漫反射结果。在 $3\ 300\text{ cm}^{-1}$ 波长附近处, 样品 Ti-OHP 和 Ti-OHPBT 都有吸收峰,

该峰为羟基 (—OH) 的伸缩振动峰。由于样品 Ti-OHP 表面有大量的胺基, 引入了 N—H 伸缩振动, 特征伸缩振动吸收峰会在 $3\ 680\sim 3\ 230\text{ cm}^{-1}$ 处发生重叠; 而在 Ti-OHPBT 表面, 由于功能分子带有苯环以及羧

基, 引入了 C—H 伸缩振动, 使该处峰变得相对宽而平缓。在 $1\ 663$ 、 $1\ 532\ \text{cm}^{-1}$ 波长处, 分别出现了酰胺 I 带 C=O 的伸缩振动吸收峰及酰胺 II 带的 C—N、N—H 面内弯曲振动吸收峰, 可以初步判断 PAMAM 成功接枝。同时, 在 $1\ 663$ 、 $1\ 532\ \text{cm}^{-1}$ 处, Ti-OHPBT 表面的酰胺 I 带和酰胺 II 带吸收峰有所加深, 这是由于 BVLD 和 TPS 都具有酰胺键。因此, 该结果表明 BVLD 和 TPS 接枝成功。

酸性橙定量检测样品表面氨基密度结果如图 4 所示。本试验以 Ti-OHP 作为对照组, 其表面氨基密度大约为 $12.5\ \text{nmol}/\text{cm}^2$, 这是由于 PAMAM 端部有大量的氨基基团。相比对照组, Ti-OHPBT 表面氨基密度无显著性差异。这是由于修饰层表面的功能分子 BVLD 和 TPS 结构中也有氨基基团。

通过 Micro BCA 法定量检测表面酚羟基密度, 结果如图 5 所示。本试验以 Ti-OHP 作为对照组, Ti-OHPBT 表面酚羟基密度为 $0.07\sim 0.12\ \text{nmol}/\text{cm}^2$, 且随着 TPS 浓度的增加, 材料表面酚羟基密度也随之增加, 相比对照组, 有显著性差异。本试验说明功能分子在材料表面接枝成功。

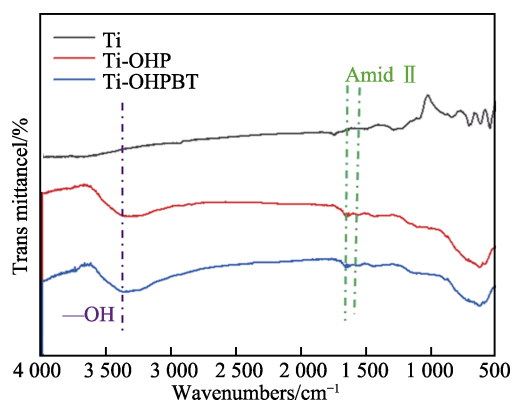


图 3 各步处理红外光谱图
Fig.3 FT-IR spectra of treated titanium in each step

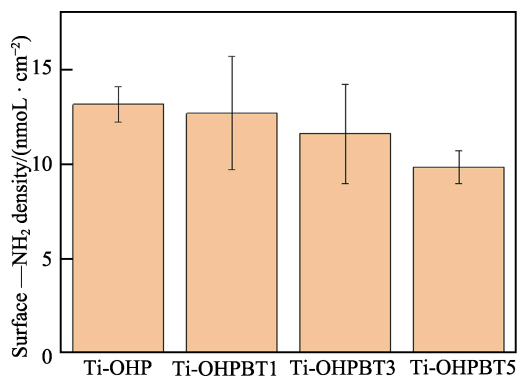


图 4 样品表面氨基密度
Fig.4 Density of amino groups on specimen surface

2.3 水接触角测量

不同样品表面水接触角的变化如图 6 所示, 其反

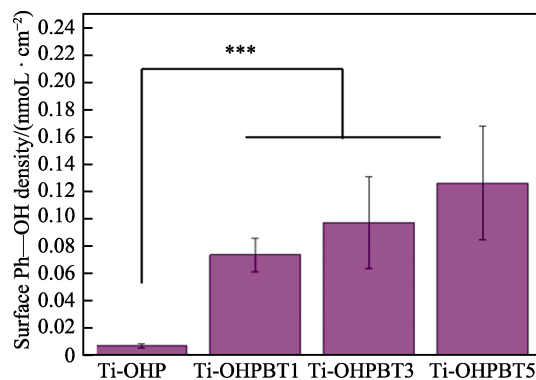


图 5 样品表面酚羟基密度
Fig.5 Density of phenolic hydroxyl groups on specimen surface

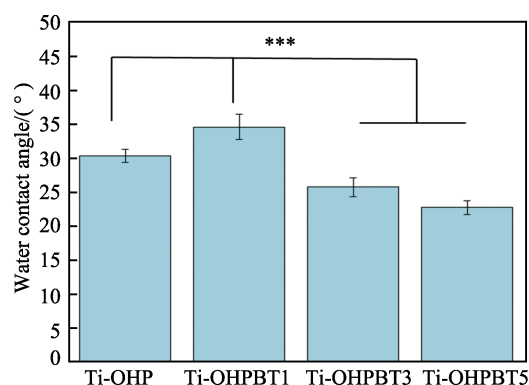


图 6 各样品表面的水接触角变化
Fig.6 Water contact angle of different specimen surfaces

映了材料表面亲疏水性的变化。由图 6 可知, Ti-OHP 表面的水接触角为 $30.4^\circ \pm 0.9^\circ$, 相较纯钛表面 (水接触角约为 56° ^[22]), 亲水性有很大提升。这是由于碱活化后, 钛表面为网状多孔结构, 且 PAMAM 端部有大量的亲水性基团氨基。Ti-OHPBT1 表面水接触角略有增加, 这是由于 BVLD 和 TPS 分子中有疏水性结构苯环。随着 TPS 浓度的升高, 材料表面的水接触角减小, 这是因为 BVLD 和 TPS 分子还有大量的亲水性基团, 如氨基、羧基等^[23]。目前有相关研究表明, 提高材料表面的亲水性, 在一定程度上可以有效改善材料表面的生物相容性^[24]。

2.4 血小板粘附与激活

血小板荧光图和扫描电镜图见图 7。Ti-OHP 表面血小板数量相对较多, 且大部分血小板出现了严重激活, 呈现铺展状态。Ti-OHPBT1、Ti-OHPBT3、Ti-OHPBT5 表面的血小板数量均较少, 且在 Ti-OHPBT3 表面粘附的血小板激活程度较低, 呈圆球形, 几乎无伪足伸出, 表明了其具有良好的血液相容性^[25]。

2.5 活化部分凝血活酶时间检测

不同样品的活化部分凝血活酶 (APTT) 时间如

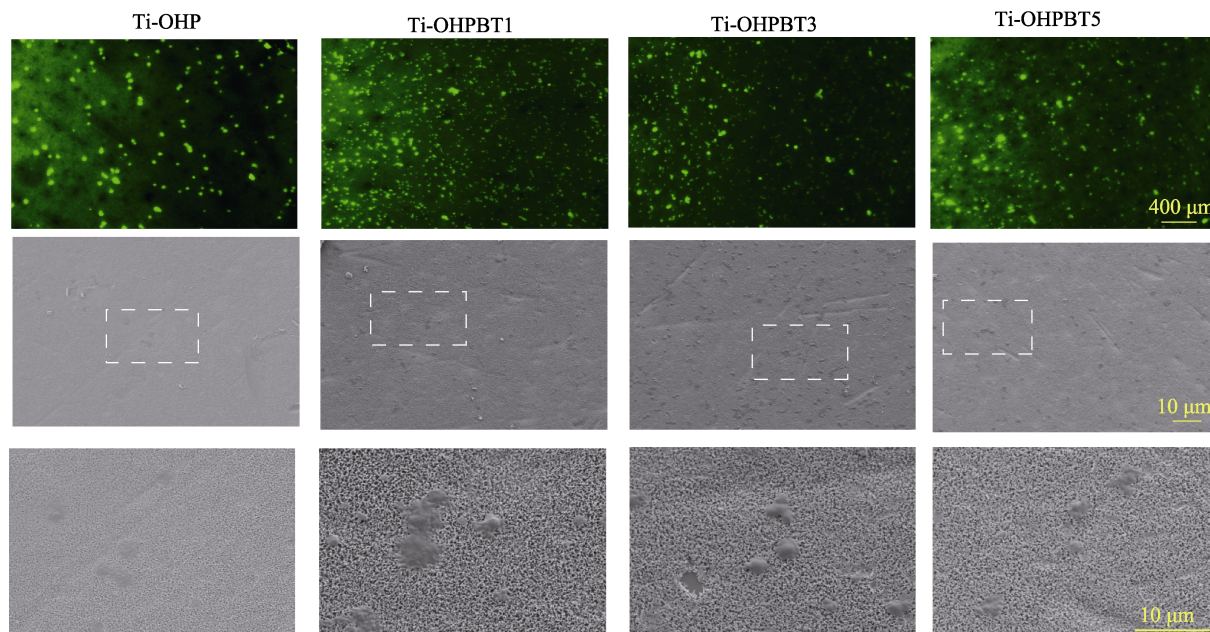


图 7 血小板的粘附与激活
Fig.7 Platelet adhesion and activation

图 8 所示。由图 8 可以看出,修饰层样品 Ti-OHPBT 的活化部分凝血活酶时间显著长于对照组 Ti-OHP。其中,修饰层 APTT 时间约为 37 s,时间大约是对照组的 1.4 倍,且 TPS 浓度对其时间的影响并不大。这表明,修饰层可以显著延长活化部分凝血活酶时间。这是由于修饰层表面接枝的 BVLD 可以通过直接抑制凝血酶的活性,作用于内源性凝血途径,发挥抗凝作用,与文献[26]的结果一致。通常情况下,相较于对照样,其 APTT 值延长 10 s 及以上,说明其抗凝效果良好。这表明本研究创建的修饰层具有良好的抗凝效果。

2.6 内皮细胞增殖与活性

支架材料表面除了满足基本的抗凝能力外,还应具备促进内皮细胞粘附与增殖的能力。从荧光观察(见图 9a)和 CCK-8 检测统计结果(见图 9b)可以看出,ECs 培养 1 d 时,各样品组的细胞数量及活性方

面并无显著性差异。其中,Ti-OHPBT1 以及 Ti-OHPBT3 表面大部分 EC 表现出长梭形,表明其有利于 EC 的粘附。相比之下,EC 培养 3 d 时,各样品组的细胞数量及活性有明显的增加。其中,修饰层表面 EC 呈铺路石形态铺展,表明细胞状态良好,且 Ti-OHPBT3

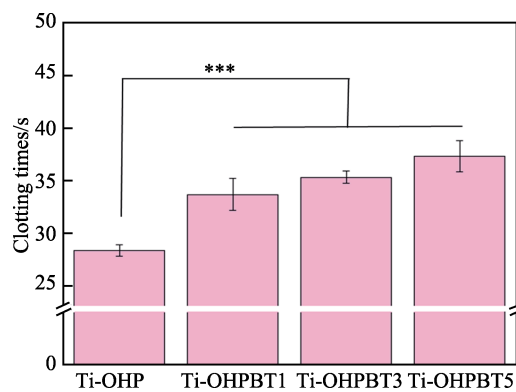


图 8 不同样品的活化部分凝血酶时间
Fig.8 APTT time of different specimens

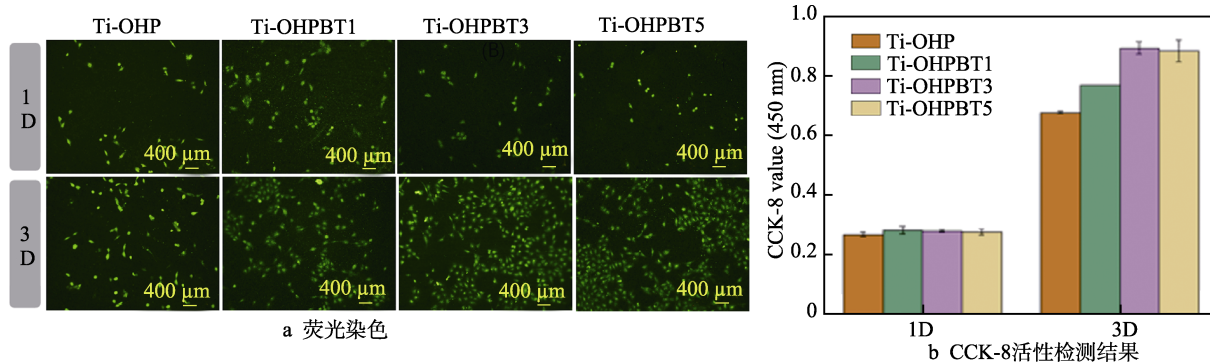


图 9 不同样品表面 EC 的粘附与增殖
Fig.9 Adhesion and proliferation of ECs on the surface of different specimens: a) fluorescence staining; b) CCK-8 activity detection results

及 Ti-OHPBT5 表面粘附 EC 数量相对较多,活性较好。

2.7 半体内血液循环试验结果分析

综合前文研究,选取 TPS 浓度为 3 mol/L (即样品 Ti-OHPBT3) 用于半体内试验研究。样品的半体内循环兔子模型如图 10 所示,样品所在导管截面以及展开示意图见图 11。由图 11 可得,Ti-OHP 表面有少量的血栓;而在 Ti-OHPBT3 表面几乎看不到有血栓的形成。样品所在的导管堵塞率统计如图 12 所示。统计分析表明,Ti-OHP 管腔堵塞率为 11%左右,而 Ti-OHPBT3 所在管腔未发现明显的堵塞情况,其管腔堵塞率为 1.5%左右,显著低于 Ti-OHP。样品所在导管的血液流速率统计如图 13 所示。由图 13 可得,Ti-OHPBT3 的血液流速率在 97%以上,显著高于 Ti-OHP (血管流速约为 78%)。样品表面血栓质量统计如图 14 所示。该数据与图 12、13 互相对应,即管腔堵塞率越小,血液流速率越大,样品表面的血栓质量越小。这表明本研究构建的修饰层有良好的抗血栓形成能力。

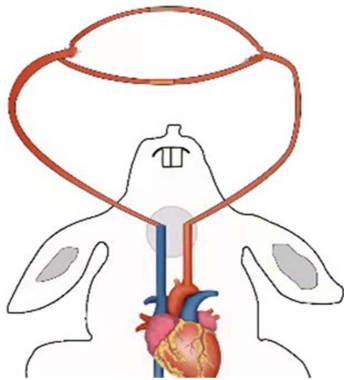


图 10 半体循环 30 min 示意图
Fig.10 Schematic diagram of 30 min blood circulation in half body

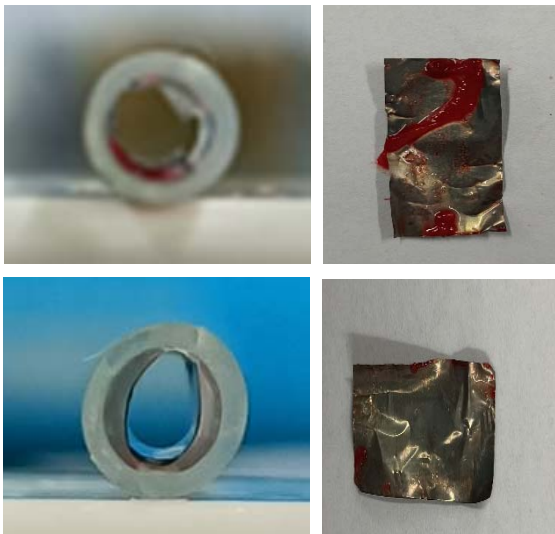


图 11 样品所在导管截面及展开示意图
Fig.11 Schematic diagram of cross section and deployment of the catheter with specimen

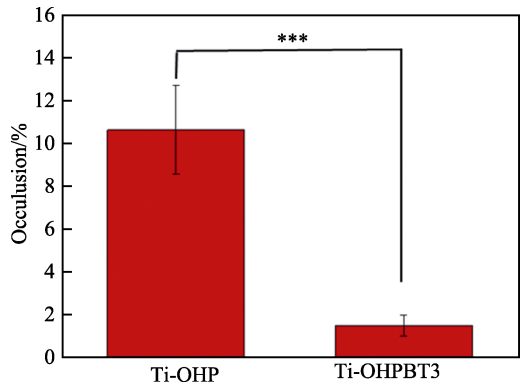


图 12 样品所在导管的堵塞率
Fig.12 Blockage rate of the catheter with specimen

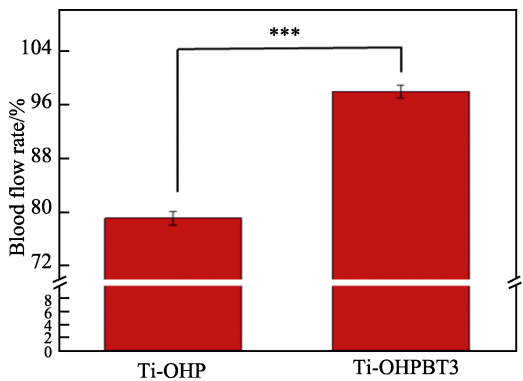


图 13 样品所在导管的血液流速率
Fig.13 Blood flow rate of the catheter with specimen

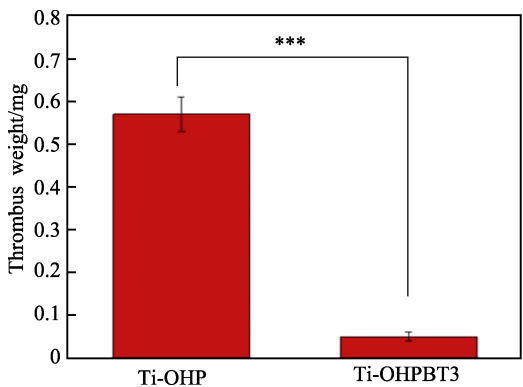


图 14 样品表面的血栓质量
Fig.14 Thrombus weight on specimen surface

通过 SEM 观察样品半体循环 30 min 的表面形貌,结果如图 15 所示。由图 15 可知,Ti-OHP 表面有很多纤维蛋白丝形成的网状结构,包裹了大量被激活的血小板,同时材料表面粘附有类似于白细胞物质。Ti-OHPBT3 表面仅粘附有少量未被激活的血小板。综上所述,本研究构建的修饰层可以显著性地抑制血栓形成,同时具备优异的抗污能力。

2.8 分析讨论

心血管材料表面改性过程中,理想的心血管材料应该具有一定强度的机械性,良好的生物相容性等特

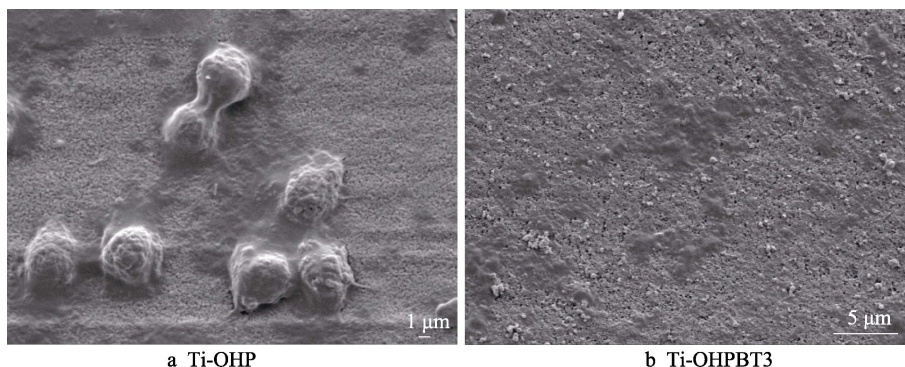


图 15 半体循环 30 min 样品表面形貌

Fig.15 Surface morphologies of specimen after 30 min half-body circulation

性。钛以及钛合金拉伸强度高、柔韧性好、耐腐蚀性能强、生物相容性一般,因此已成为生物医学领域常用的植入材料之一^[27]。研究者致力于在钛表面修饰多种功能分子,改善材料的生物相容性。刘涛等^[28]将肝素/聚 L-赖氨酸纳米颗粒固定多巴胺薄膜表面,通过调控不同比例的 Hep:PLL 纳米颗粒进行改性。结果表明,改性后表面的生物相容性良好。刘诗卉等^[29]在钛表面分别接枝 VEGF 颗粒、CD34 抗体、肝素,将其共修饰于材料表面。结果表明,修饰层可以有效地促进材料表面内皮化的进程。本研究借助 PAMAM 端部氨基基团,成功引入功能分子 BVLD 和促 TPS,研究了不同浓度 TPS 对表面修饰层生物相容性的影响。水接触角试验中,随着 TPS 浓度的增加,材料表面的水接触角逐步减小,材料亲水性也随之提高。亲水性表面有利于保持蛋白质的正常构象,从而减少材料表面对血液中其他组分的吸附及作用^[30]。

理想的植入材料还应具备良好的生物相容性。其一是抗凝,血小板在材料表面的状态将决定材料在植入体内后是否会引发血栓等症状,在血小板粘附与激活试验中,修饰层表面的血小板数量相对较少,且血小板激活程度较低。其中,TPS 浓度为 3 mol/L 时,血小板激活程度最低。APTT 是现阶段最常用于判断内源性凝血途径的可靠性试验,可以反映材料表面接枝分子是否可以有效抑制内源性凝血途径。试验中,修饰层与对照组有显著性差异,且 TPS 浓度的变化对其无明显影响。其二是促内皮,体外静态培养内皮细胞试验结果表明,修饰层可以促进内皮细胞的粘附和增殖,且随着 TPS 浓度的增加,其粘附数量以及增殖活性都有所增加,但 TPS 浓度为 3、5 mol/L 时,并无显著性差异。半体内血液循环试验结果表明,本文所构建的修饰层具有良好的抗血栓形成的能力。

3 结论

1) 基于聚酰胺胺树枝状分子 (PAMAM-NH₂),借助其端部基团氨基,将 BVLD 和 TPS 引入修饰层,成功构建了一种生物相容性良好的修饰层。

2) 荧光和扫描电镜观察结果表明,修饰层表面血小板数量及激活程度相比 Ti-OHP 都有所降低,其中 Ti-OHPBT3 血小板激活程度最低。APTT 试验中,修饰层的 APTT 时间相比 Ti-OHP 显著延长,且对于不同 TPS 浓度的样品,无显著性差异。

3) 体外内皮细胞粘附与增殖试验结果均说明修饰层具有良好的细胞相容性,其中 Ti-OHPBT3 和 Ti-OHPBT5 表面的细胞数量较多,活性极佳。

4) 半体内血液循环 30 min 试验结果表明,相比对照组,修饰层可以抑制血栓形成。

综上所述,本研究探索出 TPS 的最优浓度为 3 mol/L,其血液相容性以及细胞学评价良好,可以用于修饰层的研发与应用。

参考文献:

- [1] 《中国心血管健康与疾病报告 2020》编写组.《中国心血管健康与疾病报告 2020》概述[M].北京:科学出版社 2021.
"Chinese Cardiovascular Health and Disease Report 2020" Compilation group. "Overview of Chinese Cardiovascular Health and Disease" Report 2020[M]. Beijing: Science Press, 2021.
- [2] TORRES N, GUEVARA-CRUZ M, VELÁZQUEZ-VILLEGAS L A, et al. Nutrition and Atherosclerosis[J]. Archives of Medical Research, 2015, 46(5): 408-426.
- [3] KHAN S U, SINGH M, VALAVOOR S, et al. Dual Antiplatelet Therapy after Percutaneous Coronary Intervention and Drug-Eluting Stents: A Systematic Review and Network Meta-Analysis[J]. Circulation, 2020, 142(15): 1425-1436.
- [4] BYRNE R A, JONER M, KASTRATI A. Stent Thrombosis and Restenosis: What Have we Learned and where are we Going? The Andreas Grüntzig Lecture ESC 2014[J]. European Heart Journal, 2015, 36(47): 3320-3331.
- [5] YU Cheng-long, YANG Hua-guang, WANG Lu, et al. Surface Modification of Polytetrafluoroethylene (PTFE) with a Heparin-Immobilized Extracellular Matrix (ECM) Coating for Small-Diameter Vascular Grafts Applications[J]. Materials Science and Engineering: C, 2021, 128:

- 112301.
- [6] WEI Yu, ZHANG Jing-xun, JI Ying, et al. REDV/Rapamycin-Loaded Polymer Combinations as a Coordinated Strategy to Enhance Endothelial Cells Selectivity for a Stent System[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 136: 1166-1173.
 - [7] QIU Hua, TU Qiu-fen, GAO Peng, et al. Phenolic-Amine Chemistry Mediated Synergistic Modification with Polyphenols and Thrombin Inhibitor for Combating the Thrombosis and Inflammation of Cardiovascular Stents[J]. *Biomaterials*, 2021, 269: 120626.
 - [8] DUAN Yi-yuan, YU Shan, XU Pei-fang, et al. Co-Immobilization of CD133 Antibodies, Vascular Endothelial Growth Factors, and REDV Peptide Promotes Capture, Proliferation, and Differentiation of Endothelial Progenitor Cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 96: 137-148.
 - [9] LABIENIEC-WATALA M, WATALA C. PAMAM Dendrimers: Destined for Success or Doomed to Fail? Plain and Modified PAMAM Dendrimers in the Context of Biomedical Applications[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 104(1): 2-14.
 - [10] PARSIAN M, MUTLU P, YALCIN S, et al. Half Generations Magnetic PAMAM Dendrimers as an Effective System for Targeted Gemcitabine Delivery[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 515(1/2): 104-113.
 - [11] CIOLKOWSKI M, PETERSEN J F, FICKER M, et al. Surface Modification of PAMAM Dendrimer Improves Its Biocompatibility[J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2012, 8(6): 815-817.
 - [12] KHARWADE R, MORE S, WAROKAR A, et al. Starburst Pamam Dendrimers: Synthetic Approaches, Surface Modifications, and Biomedical Applications[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2020, 13(7): 6009-6039.
 - [13] TARACH P, JANASZEWSKA A. Recent Advances in Preclinical Research Using PAMAM Dendrimers for Cancer Gene Therapy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(6): 2912.
 - [14] VALGIMIGLI M, FRIGOLI E, LEONARDI S, et al. Bivalirudin or Unfractionated Heparin in Acute Coronary Syndromes[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2015, 373(11): 997-1009.
 - [15] HE Ting, HE Jin-hui, WANG Zhao-hui, et al. Modification Strategies to Improve the Membrane Hemocompatibility in Extracorporeal Membrane Oxygenator (ECMO)[J]. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 2021, 4(4): 847-864.
 - [16] 黄彩标. ePTFE 人工小血管基于多巴胺自聚并接枝比伐芦定的表面改性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
 - [17] HUANG Cai-biao. Study on Surface Modification of ePTFE Artificial Small Blood Vessel Based on Dopamine Self-Polymerization and Graft Bivaludin[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2019.
 - [18] ERLINGE D, OMEROVIC E, FRÖBERT O, et al. Bivalirudin Versus Heparin Monotherapy in Myocardial Infarction[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2017, 377(12): 1132-1142.
 - [19] VELEVA A N, COOPER S L, PATTERSON C. Selection and Initial Characterization of Novel Peptide Ligands that Bind Specifically to Human Blood Outgrowth Endothelial Cells[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(1): 306-312.
 - [20] VELEVA A N, HEATH D E, COOPER S L, et al. Selective Endothelial Cell Attachment to Peptide-Modified Terpolymers[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(27): 3656-3661.
 - [21] CHEN Zhuo-yue, LI Quan-li, CHEN Jia-long, et al. Immobilization of Serum Albumin and Peptide Aptamer for EPC on Polydopamine Coated Titanium Surface for Enhanced in-Situ Self-Endothelialization[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 60: 219-229.
 - [22] LI Qian, WANG Zhi-hong, ZHANG Suai, et al. Functionalization of the Surface of Electrospun Poly(epsilon-caprolactone) Mats Using Zwitterionic Poly(carboxybetaine methacrylate) and Cell-Specific Peptide for Endothelial Progenitor Cells Capture[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2013, 33(3): 1646-1653.
 - [23] LI Gui-cai, ZHANG Feng-ming, LIAO Yu-zhen, et al. Coimmobilization of Heparin/Fibronectin Mixture on Titanium Surfaces and Their Blood Compatibility[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 81(1): 255-262.
 - [24] KURUP A, DHATRAK P, KHASNIS N. Surface Modification Techniques of Titanium and Titanium Alloys for Biomedical Dental Applications: A Review[J]. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 39: 84-90.
 - [25] THOMPSON A J, MA L J, MAJOR T, et al. Assessing and Improving the Biocompatibility of Microfluidic Artificial Lungs[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 112: 190-201.
 - [26] HENSLER M E, FROJMOVIC M, TAYLOR R G, et al. Platelet Morphologic Changes and Fibrinogen Receptor Localization. Initial Responses in ADP-Activated Human Platelets[J]. *The American Journal of Pathology*, 1992, 141(3): 707-719.
 - [27] YANG Zhi-lu, TU Qiu-fen, MAITZ M F, et al. Direct Thrombin Inhibitor-Bivalirudin Functionalized Plasma Polymerized Allylamine Coating for Improved Biocompatibility of Vascular Devices[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 7959-7971.
 - [28] ROY P, BERGER S, SCHMUKI P. TiO₂ Nanotubes: Synthesis and Applications[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2011, 50(13): 2904-2939.
 - [29] LIU Tao, LIU Yang, CHEN Yuan, et al. Immobilization of Heparin/Poly-(L)-Lysine Nanoparticles on Dopamine-Coated Surface to Create a Heparin Density Gradient for Selective Direction of Platelet and Vascular Cells Behavior[J]. *Acta Biomaterialia*, 2014, 10(5): 1940-1954.
 - [30] LIU Shi-hui, LIU Tao, CHEN Jun-ying, et al. Influence of a Layer-by-Layer-Assembled Multilayer of Anti-CD34 Antibody, Vascular Endothelial Growth Factor, and Heparin on the Endothelialization and Anticoagulation of Titanium Surface[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, 101(4): 1144-1157.
 - [31] VLADKOVA T. Surface Modification Approach to Control Biofouling[M]. Heidelberg: Springer, 2008: 135-163.

责任编辑: 刘世忠