

表面功能化

儿茶酚-(胺)表面化学介导的一氧化氮 催化释放涂层研究

刘苗¹, 谢鑫¹, 周吴一凡¹, 缪婉¹, 涂秋芬¹, 熊开琴^{1,2}

(1.西南交通大学 材料科学与工程学院 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031;
2.复旦大学 聚合物分子工程国家重点实验室, 上海 200438)

摘要: **目的** 在 316L 不锈钢 (SS) 表面构建原位一氧化氮 (NO) 催化释放涂层, 使其能特异选择性地抗凝血、抑制平滑肌细胞 (SMCs) 增生, 从而促进内皮细胞 (ECs) 生长。**方法** 在弱碱性水溶液中, 选用多巴胺 (DA) 和己二胺 (HD) 为前驱体, 利用多巴胺邻二苯酚结构自聚合沉膜的能力、多巴胺与己二胺的酚-(胺) 表面化学, 通过简单的一锅法在 316L SS 表面构建富氨基粘附涂层 DA/HD。再通过碳二亚胺化学交联反应, 共价接枝螯合 Cu^{2+} 的 1, 4, 7, 10-四氮杂环十二烷-1, 4, 7, 10-四羧酸 (DOTA), 最后获得均匀且稳定的 NO 催化释放涂层 (命名为 Cu-DOTA@DA/HD)。**结果** DA/HD 涂层表面的氨基密度高达 22 nmol/cm^2 , 实现了 Cu-DOTA 的有效固定, 其 NO 催化释放速率可达 $5.2 \times 10^{-10} \text{ mol/(cm}^2 \cdot \text{min)}$ 。Cu-DOTA@DA/HD 涂层显著地抑制了血小板的粘附和激活, 也能有效抑制血栓的形成, 其表面血栓总质量由 316L SS 的 $(40.3 \pm 10.3) \text{ mg}$ 降低至 $(3.0 \pm 0.4) \text{ mg}$ 。Cu-DOTA@DA/HD 涂层催化释放的 NO 赋予了 316L SS 选择性地抑制 SMCs 粘附和增殖, 从而促进了 ECs 生长的功能。**结论** 基于儿茶酚-(胺) 表面化学构建的 NO 催化涂层, 成功地实现了 316L SS 表面持续、稳定的 NO 催化释放, 赋予了其抗凝血、选择性抑制 SMCs 增殖和促进 EC 生长等多重生物学功能, 在血液接触类器械 (如体外循环导管和血管支架表面) 应用方面具有潜在价值。

关键词: 表面化学; 一氧化氮; 抗凝血; 平滑肌细胞; 内皮细胞

中图分类号: R318 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2023)03-0327-11

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2023.03.030

Chemical-mediated Nitric Oxide-generating Coatings on Catechol-(Amine) Surface

LIU Miao¹, XIE Xin¹, ZHOU Wu-yi-fan¹, MIAO Wan¹, TU Qiu-fen¹, XIONG Kai-qin^{1,2}

(1. Key Laboratory of Advanced Technology of Materials of Education Ministry, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Fudan University, Shanghai 200438, China)

收稿日期: 2022-02-24; 修订日期: 2022-05-23

Received: 2022-02-24; Revised: 2022-05-23

基金项目: 国家自然科学基金 (82072072); 南方医科大学附属东莞医院高层次人才支持与发展计划 (K202102); 四川省国际科技创新合作项目 (2021YFH0056)

Fund: The National Natural Science Foundation of China (82072072); The High-level Talents Research and Development Program of Affiliated Dongguan Hospital (K202102); The International Cooperation Project by Science and Technology Department of Sichuan Province (2021YFH0056)

作者简介: 刘苗 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为生物材料及器件的表面改性。

Biography: LIU Miao (1997-), Female, Postgraduate, Research focus: biological materials and surface engineering.

通讯作者: 涂秋芬 (1980—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为生物材料、组织工程与人工器官以及生物传感器。

Corresponding author: TU Qiu-fen (1980-), Female, Doctor, Associate Professor, Research focus: biomaterials, tissue engineering & artificial organs and biosensors.

引文格式: 刘苗, 谢鑫, 周吴一凡, 等. 儿茶酚-(胺) 表面化学介导的一氧化氮催化释放涂层研究[J]. 表面技术, 2023, 52(3): 327-337.

LIU Miao, XIE Xin, ZHOU Wu-yi-fan, et al. Chemical-mediated Nitric Oxide-generating Coatings on Catechol-(Amine) Surface[J]. Surface Technology, 2023, 52(3): 327-337.

ABSTRACT: It is an advanced surface technology that can improve the biocompatibility and hemocompatibility of blood contact-like material surfaces by constructing an in situ nitric oxide (NO) catalytic release coating on the surface of 316L stainless steel (SS) without changing the physical properties of the substrate material. The biocompatibility and hemocompatibility of unmodified 316L stainless steel (SS) are too poor to cause complications such as acute thrombosis and smooth muscle cell proliferation after implantation, which can inhibit the regenerative repair of diseased tissue. Thus, in this work, a NO-catalyzed coating based on the chemical construction of catechol-(amine) surface was investigated, and a sustained and stable NO-catalyzed release from the surface of 316L SS was successfully achieved, endowing it with multiple biological functions such as anti-coagulation, selective inhibition of SMCs proliferation and promotion of EC growth.

In this work, 316L SS disc with 1 cm diameter was used as the study object. First, the samples were cleaned by sonication with acetone and anhydrous ethanol, dried sufficiently and then prepared for use. Subsequently, the samples were immersed in the reaction solution of DA (1 mg/mL) and HD (2.44 mg/mL) dissolved by Tris-base, then the solution reacted at a constant temperature of 37 °C for 24 hours. After the reaction, the DA/HD-coated modified samples were removed and washed thoroughly with distilled water. Subsequently, DOTA (0.01 mg/mL), EDC (0.006 6 mg/mL), NHS (0.0033 mg/mL) and MES (0.65 mol/L) were fully dissolved in deionized water and the pH of the solution was adjusted to 5.4. After the reaction at 37 °C for 30 min, the appropriate amount of CuCl₂·2H₂O was fully dissolved in the above solution to prepare Cu-DOTA solution with a concentration of 0.003 mg/mL. Finally, 1 mL of Cu-DOTA solution was added to the surface of each sample, and after grafting reaction at 25 °C for 24 hours, the samples were removed, then washed with distilled water. Finally, Cu-DOTA@DA/HD coating modified samples were obtained, and a series of characterization analysis was subsequently performed on the resulting coatings. The composition and structure of the coating were analyzed by X-ray photoelectron spectroscopy (K-Alpha), water contact angle tester (DSA100) and enzyme standard (HM-SY96S); The adhesion and activation of platelets on top of the functional coating were observed by scanning electron microscope (JSM 7800F) and the proliferation of smooth muscle cells and endothelial cells were observed by fluorescence microscope (Y-E68). Finally, in order to simulate the most realistic circulatory state of the functional coating in animals, a New Zealand rabbit arteriovenous short-circuit parallel shunt model was used to perform semi-internal circulation (ECC) experiments to realize the circulation of closed blood circulation, and therefore to verify the hemocompatibility of the functional coating.

The results showed that the HD introduced by this modification strategy provided a large amount of amino groups to the coating surface, and the amount of surface amino groups increased from 2 nmol/cm² to 22 nmol/cm² compared to the bare 316L SS substrate. The large amount of exposed amino groups provided the active site for the grafted functional molecule Cu-DOTA, resulting in a catalytic release rate of 5.2×10^{-10} mol/(cm²·min) from the coating, which was close to the NO release rate from normal endothelial cells. In vitro results showed that Cu-DOTA@DA/HD coating significantly inhibited platelet adhesion, with the number of adhesions decreasing from 23 cells/1 000 cm² to 6 cells/1 000 cm² compared to 316L SS, and inhibited platelet activation; cellular experiments showed that the number of adhesions of HUVSMCs on the NO-catalyzed release surface was only 526 cells/mm², compared to 1 182 /mm² on the surface of 316L SS, and the number of HUVECs adhering was 4 251 /mm², which was 2.5 times higher than that on the surface of 316L SS (1 700 /mm²); the semi-in vivo results showed that the Cu-DOTA@DA/HD coating significantly inhibited thrombus formation, compared to 316L SS, the blockage rate of the coated modified samples was reduced from 80% to 5%, and the total surface thrombus mass was reduced from (40.3 ± 10.3) mg to (3.0 ± 0.4) mg.

The NO-catalyzed coating based on catechol-(amine) surface chemistry successfully achieves sustained and stable NO-catalyzed release from the surface of 316L SS, endowing it with multiple biological functions such as anti-coagulation, selective inhibition of SMCs proliferation and promotion of EC growth, which are potentially valuable for the application on the surface of blood-contacting devices such as extracorporeal circulation catheters and vascular stents.

KEY WORDS: surface chemistry; nitric oxide; anticoagulant; SMCs; EC

心血管疾病 (CVD) 是一类由心脏或心血管系统功能异常而造成的疾病, 因其较高的致死率, 它已持

续成为人类健康的第一杀手。心血管疾病主要包括脑血管病、冠心病、心力衰竭、动脉疾病、风湿性心脏

病等。随着当今社会老龄化与城市化不断加快, 中国的 CVD 患病率无论是在农村还是城市都处于上升阶段, 并且有着低龄化的发展趋势。《中国心血管健康与疾病报告 2020 概要》显示, 我国 CVD 患者人数估计超过 3.3 亿, 其死亡率高于肿瘤及其他疾病, 随着患高血压、糖尿病等疾病绝对人数的增加, 心血管疾病的发病率和死亡率将进一步被推高^[1]。

血管支架介入治疗作为 CVD 重要的治疗手段之一, 挽救了众多患者的生命。血管支架经过更新迭代发展 30 余年, 经历了裸金属支架、药物洗脱支架 (DES) 和生物可降解药物洗脱支架 3 个时代。尽管血管支架的应用救治了众多危重患者的生命, 然而临床上依然伴随着再狭窄、晚期血栓及晚期再发动脉粥样硬化等系列并发症发生的风险, 制约着临床治疗的效果^[2-4]。究其原因, 是目前临床应用的血管支架均不具备促进病变血管组织再生修复功能, 难以实现病灶治愈。例如, 尽管 DES 可通过释放抑制 SMCs 增殖的药物 (如紫杉醇、雷帕霉素及其衍生物) 在植入短期内将支架再狭窄率降低到 10% 以下^[5-6], 然而因该类药物不具备细胞选择性, 其在抑制 SMCs 增殖的同时, 也抑制了 ECs 的生长, 显著延缓了内皮化进程, 导致了临床晚期血栓发生率显著升高^[7]。DES 在调控病变血管再生修复上失败的原因在于其没有充分考虑到支架植入病灶后所引起的复杂病理响应。随着基础研究的深入和临床应用的普及, 科研和医疗学者发现, 血管支架在介入治疗过程中, 不可避免地因机械作用力损伤病变血管内膜, 从而引发包括血栓、炎症反应、SMCs 表型异常和过度增殖、基质沉积和血管重塑等在内的一系列病理响应, 最终导致支架再狭窄的发生^[8-12]。因此, 通过表面功能修饰赋予血管支架抗凝血、选择性抑制 SMCs 和选择性促进 ECs 生长等多重功能, 促进具有正常生理功能的内皮细胞再生, 创造良好的微环境, 对解决临床支架再狭窄问题具有重要意义。

研究具有多重生物学功能的活性分子和相应的表面功能修饰技术成为构建多功能血管支架的关键。NO 是一种高活性自由基, 具有抑制血小板激活与粘附、促进血管内膜修复、调节血管稳态等广泛的生理活性^[13-14]。已有研究通过在材料表面构建聚合物涂层固定 S-亚硝基硫醇、N-偶氮烯二醇等 NO 供体, 实现 NO 的释放。然而此种策略易受到供体不稳定性的影响, 造成短时间内 NO 的局部突释, 给细胞或血管带来毒性, 难以满足血管支架的长期治疗效果。如何稳定、长效地在体内释放 NO 成为关键所在。体内有恒定的内源性亚硝基硫醇 (RSNO)、谷胱甘肽过氧化氢酶 (GP_x) 催化内源性 RSNO 分解是体内 NO 产生的另一途径, 所以在材料表面引入具有 GP_x 样催化活性的 Se 或铜离子可以实现 NO 的持续稳定释放^[15-16]。Zhang 等^[17]使用 Cu^{2+} 制备了 NO 催化释放 $DA@Cu^{2+}$ 涂层, 实现了 NO 催化释放速率接近正常内皮释放速率, 显著改善了支架的血液相容性、选择性调控 ECs 生长而抑制 SMCs 的粘附与增殖。然而, 这类涂层基于儿茶酚的酚羟基和铜离子配位构建的 NO 催化涂层存在不饱和配位的缺陷, 会导致螯合的铜离子流失, 从而影响其催化活性保持力。

大环多胺包括 DOTA, 因其与铜离子具有很强的螯合能力, 被用于构建具有稳定 NO 催化活性的材料^[18]。为了构建具有稳定、持续催化 NO 释放功能的表面, 本研究在弱碱性水溶液条件下进行。因为多巴胺在酸性条件下不会发生氧化, 在碱性条件下才能发生氧化, 且碱性越强, 其氧化速率越快。由于多巴胺聚合形成涂层不仅需要共价键作用, 还需要依靠低聚物通过物理组装形成涂层。物理组装过程是比较缓慢的, 如果反应溶液碱性过大, 虽然氧化的速率会提高, 但是会影响物理组装的过程, 导致沉膜失败, 所以反应环境需要是弱碱性。多巴胺氧化自聚合沉膜机理如图 1 所示, 邻二苯酚基团先被氧化, 生成具有邻苯二醌

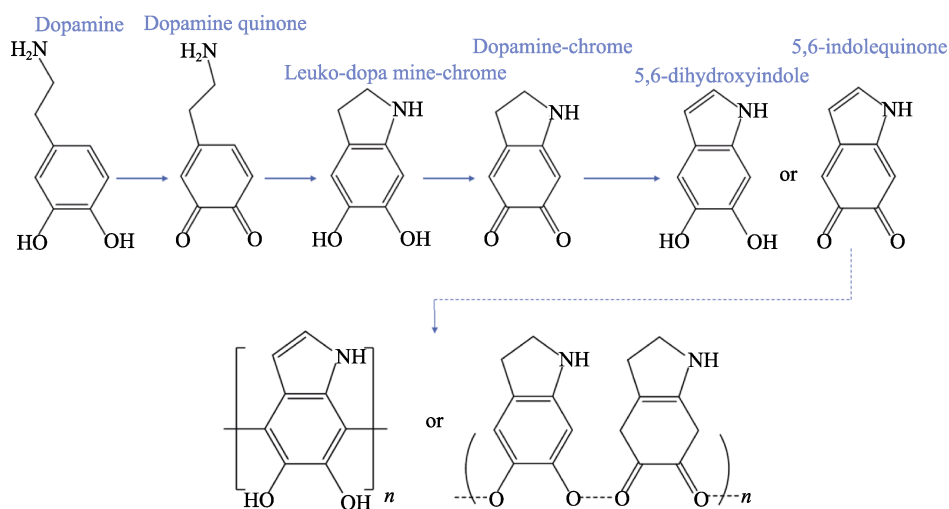


图 1 多巴胺氧化自聚合

Fig.1 Schematic diagram of oxidative self-polymerization of dopamine

结构的多巴胺醌, 然后通过 1, 4 迈克尔加成发生内环化反应, 经过氧化和重排生成 5, 6-二羟基吲哚、吲哚 5, 6-醌, 最后低聚物通过共价键和非共价键协同, 物理组装成高聚物^[19]。试验选取多巴胺(DA)和己二胺(HD)为前驱体, 利用多巴胺邻二苯酚结构自聚合沉膜的能力、多巴胺与己二胺的酚-(胺)表面化学, 通过简单的“一步沉积法”(“一步沉积法”与“一锅法”本质上没有区别, 一步法更强调方法策略简单, 一锅法则更加形象具体, 代表参加反应的分子或者化合物种类多), 在

316L SS(一种被广泛应用于血管支架制造金属材料)表面构建具有丰富伯氨基的 DA/HD 涂层。随后利用其表面引入的伯氨基为反应位点, 基于碳二亚胺化学交联法(羧酸与胺的酰胺缩合反应), 实现具有 NO 催化活性分子(Cu-DOTA)的牢固固定(如图 2 所示)。Cu^{II}通过催化血液中亚硝基硫醇(RSNO)原位分解产生 NO, 实现 316L SS 兼具抑制血小板粘附/激活、抑制 SMCs 增殖、促进 ECs 生长的功能, 为血管支架实现调控病变血管再生修复的表面功能修饰策略提供借鉴。

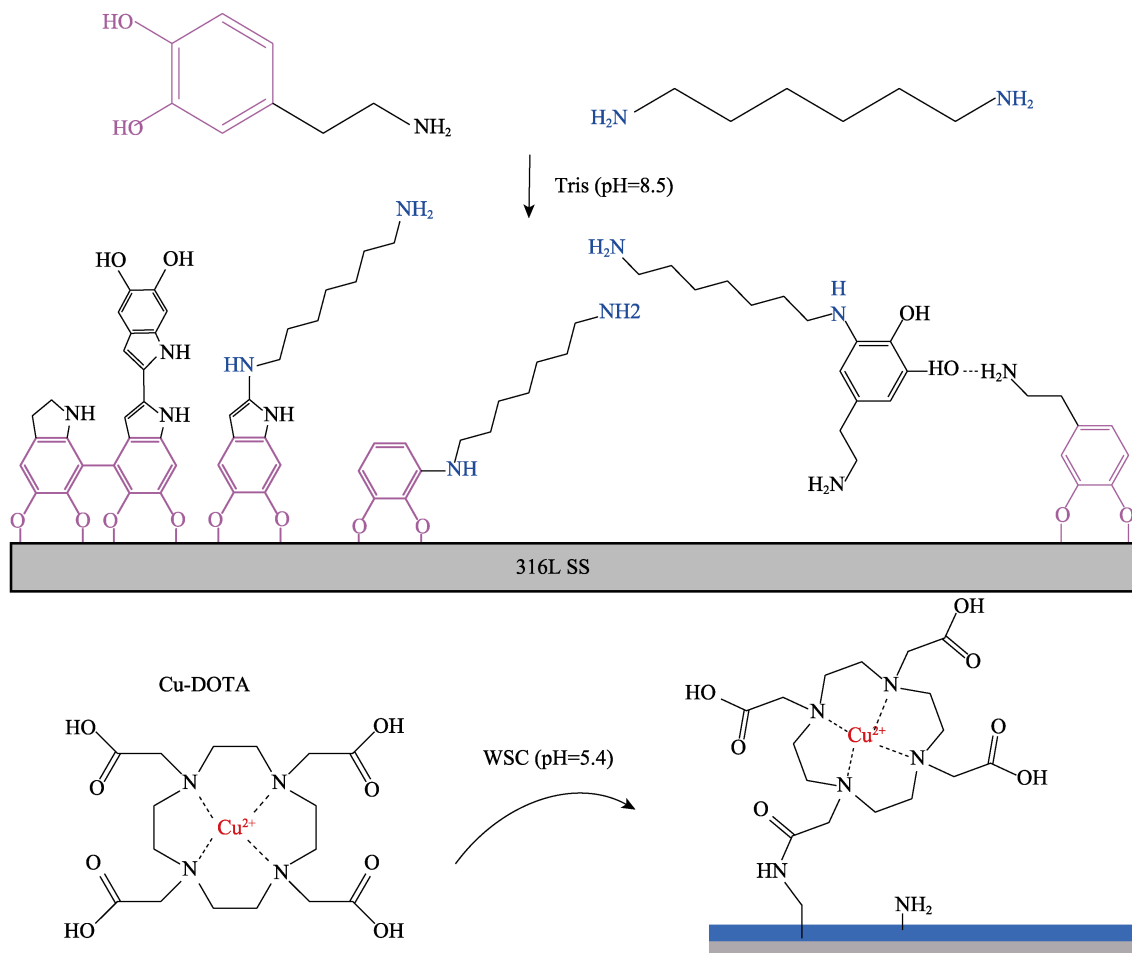


图 2 表面改性机理

Fig.2 Schematic diagram of surface modification mechanism

1 试验

1.1 Cu-DOTA@DA/HD 涂层的制备

试验采用直径为 1 cm 的 316L SS 圆片作为研究对象。首先, 将试样用丙酮、无水乙醇超声清洗干净后备用。随后, 将试样浸没在由 Tris-base 溶解的 DA (1 mg/mL) 和 HD (2.44 mg/mL) 反应溶液中, 于 37 °C 恒温条件下进行涂层改性。涂层沉积 24 h 后(经过工艺筛选, 24 h 涂层表面氨基量能达 20 nmol/cm² 以上, 满足二次接枝需求), 将 DA/HD 涂层改性的 316L SS 取出, 并用蒸馏水充分清洗。随后, 将 DOTA

(0.01 mg/mL)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-以及碳二亚胺(EDC)(0.006 6 mg/mL)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(0.003 3 mg/mL)和 4-吗啉乙磺酸(MES)(0.65 mol/L)充分溶解于去离子水中, 并调节 pH 至 5.4, 于 37 °C 反应 30 min。再将 CuCl₂·2H₂O (0.003 mg/mL) 充分溶解于上述反应液中, 超声整合 10 min 后, 获得 Cu-DOTA 配位物。最后, 将 DA/HD 改性的 316L SS 试样置于上述反应溶液中, 室温反应 24 h (经过工艺筛选, 接枝 24 h, 样品表面 Cu²⁺的固定量可以实现 5.2×10⁻¹⁰ mol·cm⁻²·min⁻¹ 的 NO 催化释放, 满足功能需求)。反应完毕后, 将接枝 Cu-DOTA 的样品取出, 并用蒸馏水充分清洗, 干燥后得到 Cu-DOTA@DA/

HD 涂层改性样。

1.2 Cu-DOTA@DA/HD 涂层的成分表征

本试验采用 X-射线光电子能谱分析、水接触角分析、表面氨基定量分析, 对 316L SS、DA/HD、Cu-DOTA@DA/HD 样品进行成分表征。采用化学发光法试验对 Cu-DOTA@DA/HD 样品进行 NO 释放检测。所用仪器有傅里叶红外光谱仪 (Nicolet 5700, USA)、X-射线光电子能谱 (XPS, Thermo Electron, USA)、接触角测定仪 (Krüss GmbH DSA 100 Mk 2, Germany)、NOA280i 仪器、酶标仪 (MQuant, Bio-tek Instruments Inc, USA) 等。

1.3 血小板的粘附与激活试验

将新鲜人血液以 1 500 r/min 速度离心 15 min, 得到富血小板血浆 (PRP)。分别将 0.2 mL PRP 滴加至 316L SS、DA/HD、Cu-DOTA@DA/HD 样品 (每组 4 个平行样) 表面, 在人为补充供体 (10 μ mol/L GSNO 和 10 μ mol/L GSH) 的条件下 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后, 用 37 $^{\circ}$ C 生理盐水清洗 3 遍, 再用质量分数为 2.5% 的戊二醛固定 12 h。固定完毕后, 用体积分数为 50%、75%、90%、100% 的酒精对样品进行梯度脱水, 用扫描电子显微镜观察血小板的粘附和激活情况。

1.4 半体内抗凝血试验

采用 2.5~3.0 kg 的新西兰大白兔动静脉短路并联分流模型进行半体内循环 (ECC) 试验, 来评价 NO 催化释放涂层在体内同时实现抗血栓和抗血小板的功能。在试验过程中, 不加任何添加抗凝剂, 循环 2 h 后, 收集包含测试样品的导管, 用生理盐水在自然重力下对导管进行冲洗, 直至流出的液体不含血液。随后对用 15 mL 的生理盐水流经各官腔所需时间计算血流率, 然后对导管进行称量, 并拍照记录导管截面。最后使用 2.5% 的戊二醛固定, 固定完毕后, 用体积分数为 50%、75%、90%、100% 的酒精对样品进行梯度脱水, 用扫描电子显微镜观察样品。

1.5 平滑肌细胞和内皮细胞的粘附与增殖

将 316L SS、DA/HD、Cu-DOTA@DA/HD 样品 (每组 4 个平行样) 置于 24 孔板中进行紫外辐射灭菌。将培养好的 HUVMSCs、HUVECs 用 0.25% 的胰酶消化计数, 调整细胞浓度为 2×10^4 cells/mL, 然后每孔加入 1 mL 的上述细胞液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的细胞培养箱静置培养 24、72 h (每 6 h 补充一次供体)。培养结束后, 吸出培养液, 用生理盐水冲洗, 使用 CCK-8 试剂盒检测。最后将样品固定、清洗、染色后进行荧光拍摄。

2 结果与讨论

2.1 Cu-DOTA@DA/HD 涂层的成分评价

XPS 全谱试验结果如图 3 所示, 在各样品表面都检测到 C、N、O 的特征峰, 且 DA/HD 表面 C、N 含量较 316L SS 表面高, 这是因为 HD 在样品表面引入了大量的氨基官能团。接枝了 Cu-DOTA 以后, DOTA 中的羧基基团不仅使得 O 元素含量增加, 而且使得 Cu 元素含量显著变化, 说明 Cu-DOTA@DA/HD 涂层成功构建。各涂层化学组分及原子分数如图 4a 所示, Cu-DOTA@DA/HD 组 Cu 的原子分数达到 0.84%, 显著高于 316L SS 组 (0.12%)、DA/HD 组 (0.06%), 说明 Cu-DOTA 成功接枝。316L SS 表面出现微量 Cu 元素, 这是因为试验所用 316L SS 化学成分中含有一定的 Cu。DA/HD 组表面 Cu 元素降低至 316L SS 的 1/2, 可能是因为 DA/HD 涂层均匀覆盖在 316L SS 表面, 而 X 射线作为一种光子束, 辐射样品时存在一定的深度限制。氨基定量结果如图 4b 所示, DA/HD 表面具有丰富的氨基, Cu-DOTA 的接枝, 导致表面氨基量的下降, 与上述结论一致。水接触角的结果也能证实上述结论, 如图 4c 所示。316L SS 的水接触角约为 66 $^{\circ}$, DA/HD 涂层改性后, 表面的水接触角降低了 40 $^{\circ}$ 左右, 是因为氨基是一种亲水基团。Cu-DOTA 引入以后, 消耗了大量氨基, 接触角又有所增加, 但因为 Cu-DOTA 含有亲水基团羧基, 所以涂层水接触角 (45 $^{\circ}$) 依旧显著低于 316L SS。

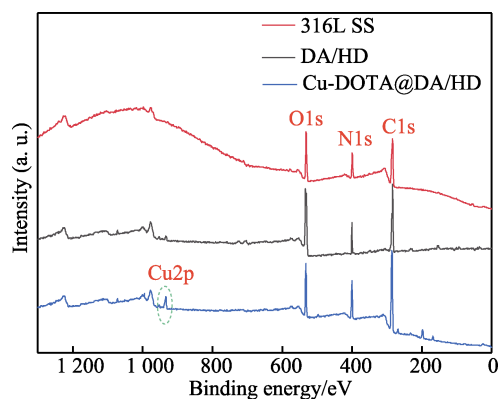


图 3 XPS 全谱分析
Fig.3 XPS full spectrum analysis

2.2 Cu-DOTA@DA/HD 涂层的功能评价

2.2.1 Cu-DOTA@DA/HD 涂层 NO 的催化释放率评价

本研究构建 Cu-DOTA@DA/HD 涂层的目的是通过化学接枝稳定地将铜离子固定在涂层中, 从而持续催化 NO 释放。NO 是内皮功能最重要的分子, 可以通过一氧化氮合酶 (eNOS) 转化 L-精氨酸产生, 健康的血管内皮细胞可持续产生 $0.5 \times 10^{-10} \sim 4 \times 10^{-10}$ mol/(cm 2 ·min) 的 NO, 以维持血管健康^[14,20]。本研究采用化学发光

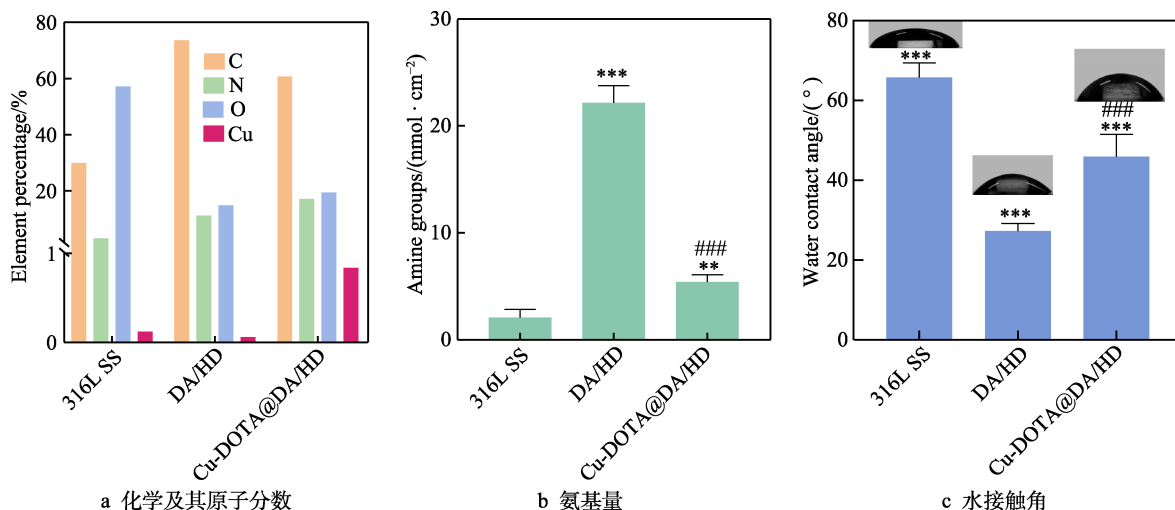


图4 各涂层化学组分及原子分数、氨基定量和水接触角分析
Fig.4 Percentage of chemical components and elemental content (a), quantitative analysis of amino groups (b) and water contact angle analysis (c) of each coating

发法来评估 Cu-DOTA@DA/HD 涂层的 NO 催化能力。在 NO 供体存在的情况下,使用 NOA280i 仪器对接枝了 Cu-DOTA 的样品进行 NO 催化释放检测,结果如图 5 所示。在 5 min 时将样品插入反应腔室,该样品在铜离子的快速催化下,NO 释放速率突然增加,达到 $5.2 \times 10^{-10} \text{ mol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$,之后速率趋于稳定。速率趋于稳定是因为 DOTA 与铜离子具有很强的螯合能力,铜离子能够稳定地固定在样品表面,使得 NO 能够持续稳定的释放。此速率略高于健康血管内皮产生 NO 速率,这是因为当血管内环境处于炎症状态时,我们期望 NO 的释放速率能稍微高于正常状态,既能避免 NO 前期释放速率过快,造成组织局部浓度过高,从而显示出细胞毒性,又能避免后期释放能力不足导致抗凝效果差等问题。Zhang 等^[17]研究的 DA@Cu²⁺涂层 NO 催化释放速率为 $5.5 \times 10^{-10} \text{ mol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$,该 NO 催化释放涂层显著地改善了支架的血液相容性,2 周内便实现了支架表面快速内皮化。故本研究所制备的 Cu-DOTA@DA/HD 涂层显示出较为理想的 NO 催化释放速率,能够促进内皮细胞激活与粘附,抑制平滑肌细胞激活与粘附,以及实现长期体内抗凝抗增生。

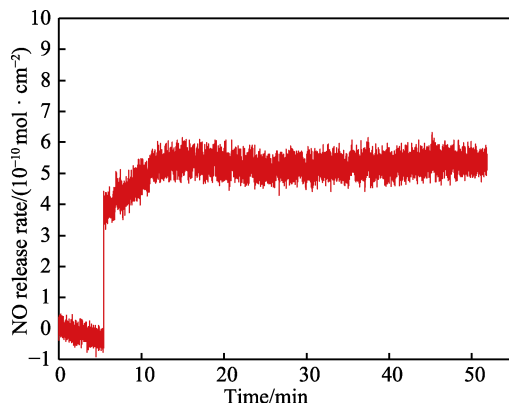


图5 NO 的催化释放速率检测
Fig.5 Catalytic release rate of NO

2.2.2 血小板激活与粘附

血小板粘附与激活结果如图 6 所示,316L SS 样品表面血小板的粘附数量较多,激活严重,且部分血小板完全铺展开,大量长出伪足的血小板聚集在一起。与 316L SS 相比,DA/HD 修饰的表面,由于表面有大量氨基基团,导致血小板的数量和聚集度进一步上升,数量上表现为 316L SS 的 2 倍左右。在 Cu-DOTA@DA/HD 表面,由于消耗了大量氨基^[21],且有 NO 的催化释放,粘附激活的血小板急剧减少,仅有少量血小板的粘附。血小板粘附统计结果(如图 6b 所示)也表明,Cu-DOTA@DA/HD 修饰表面的血小板粘附明显减少,激活被抑制,其血小板粘附数量仅为 4 cells/1 000 cm²,相较于 DA/HD 组(35 cells/1 000 cm²)、316L SS 组(24 cells/1 000 cm²),表现出显著的抑制作用。此外,血小板的状态为静息状态,说明 NO 能有效抑制血小板的粘附激活与聚集。在心血管系统中,NO 的生理活性与 cGMP 信号传导密切相关,cGMP 的上调可以防止血小板活化/聚集^[22-23]。

2.2.3 平滑肌细胞 (HUVSMCs)、内皮细胞 (HUVECs) 的粘附与增殖

HUVSMCs 的粘附与增殖结果如图 7a 所示,HUVSMCs 在不同样品表面的粘附与生长行为有所不同。培养 24 h 后 Cu-DOTA@DA/HD 表面的 HUVSMCs 的粘附量明显低于 316L SS 和 DA/HD 组,Cu-DOTA@DA/HD 表面细胞粘附数量仅为 526 /mm²,相比于 316L SS 表面(1 182 /mm²)、DA/HD 表面(1 048 /mm²),有显著的差异。此外,316L SS 表面和 DA/HD 表面的 HUVSMCs 大多呈树枝或长梭状,而 Cu-DOTA@DA/HD 表面则大多为细长、纺锤状,展现出一定的 HUVSMCs 抑制作用。继续培养至 72 h,各个样品总体的增殖趋势与 24 h 结果类似,Cu-DOTA@DA/HD 表面细胞覆盖率最低,仅有 25.2%,是 316L SS 表面

细胞覆盖率的 1/2 左右。各样品间细胞形态差异不大。CCK 细胞活性检测结果与上述一致 (如图 8 所示)。在人为补充供体的情况下, Cu^{II} 能够催化供体释放 NO, NO 能够通过上调 P21 蛋白的水平来抑制 CDK2 的活性^[24], 进而影响 HUVSMCs 的细胞周期, 抑制 HUVSMCs 的粘附与增殖。

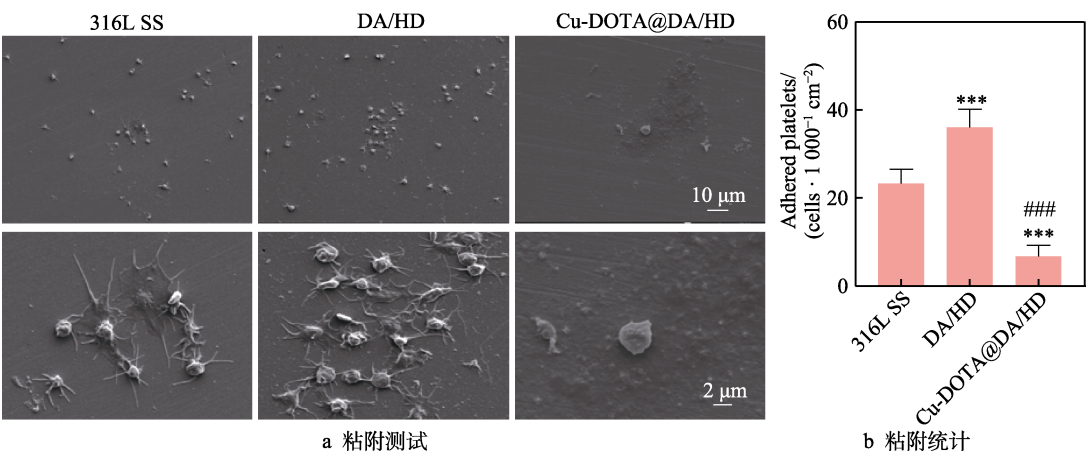


图 6 血小板粘附测试和统计学分析
Fig.6 Platelet adhesion test (a) and statistical analysis (b)

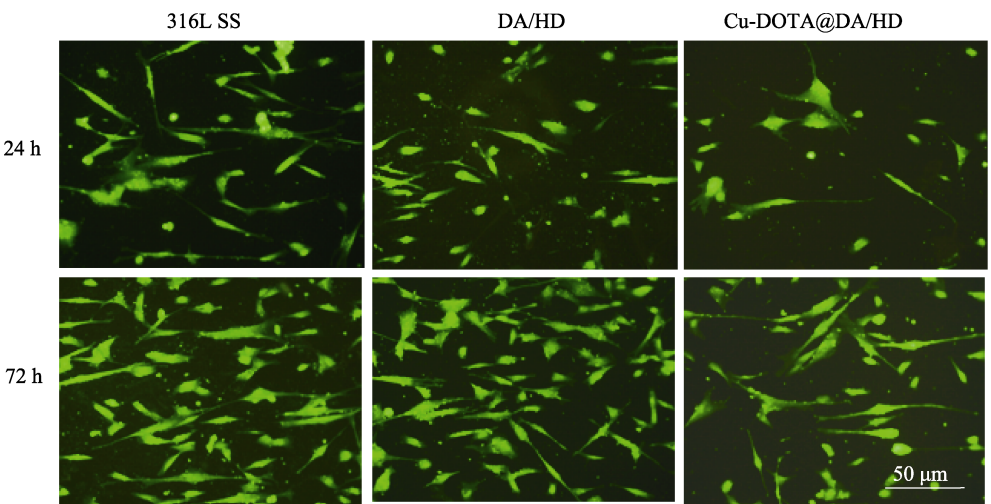


图 7 平滑肌细胞 24、72 h 增殖显微荧光图
Fig.7 24 and 72 h proliferation microscopic fluorescence images of smooth cells

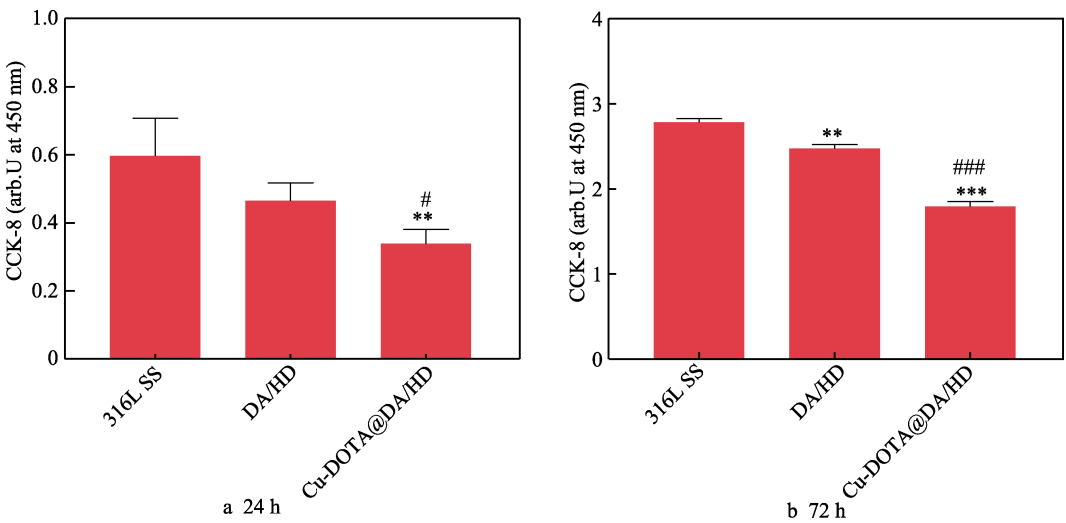


图 8 平滑肌细胞 CCK-8 试剂检测结果
Fig.8 CCK-8 reagent test results of smooth cells

HUVECs 粘附与增殖结果如图 9 所示。24 h 结果表明,相较于 316L SS 表面与 DA/HD 表面,Cu-DOTA@DA/HD 表面能显著促进 HUVECs 的粘附,其粘附数量为 $4\,251/\text{mm}^2$,分别是 316L SS 表面 ($1\,700/\text{mm}^2$) 与 DA/HD 表面 ($1\,584/\text{mm}^2$) 的 2.5、2.68 倍。72 h 后,各组的 HUVECs 都快速增殖, Cu-DOTA@DA/HD 表

面几乎被完全覆盖,甚至有部分重叠,但总体趋势和 24 h 类似。CCK-8 (如图 10 所示) 结果与上述结果一致。以上结果表明, NO 有很显著的促内皮效应,虽然暂未任何报道 NO 促进内皮细胞生长的机制,可能是 NO 本身作为内皮细胞分泌的信号分子,能为 HUVECs 生长构建一个良好的微环境。

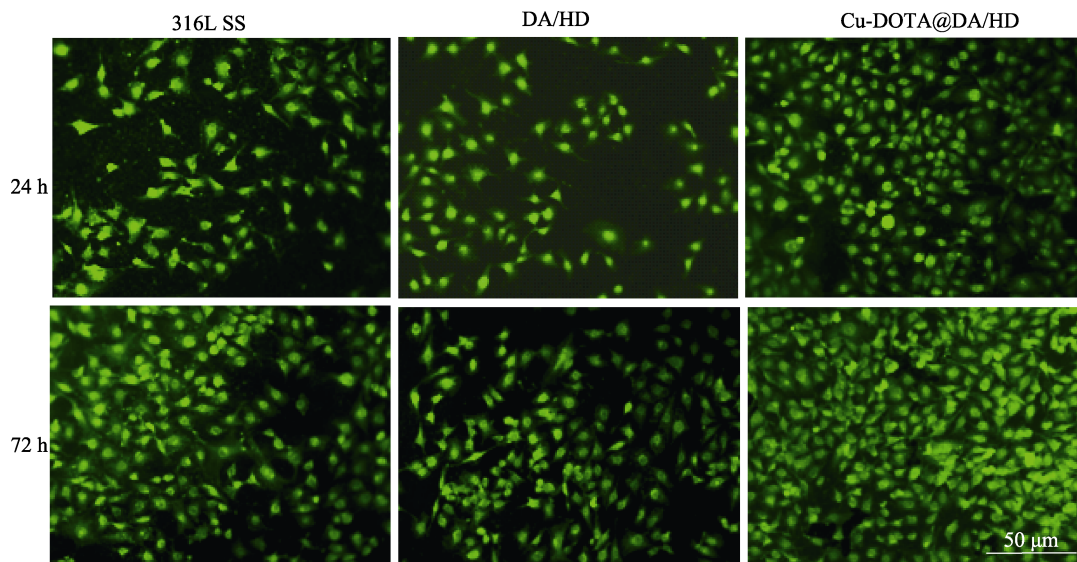


图 9 内皮细胞 24、72 h 增殖显微荧光图

Fig.9 24 and 72 h proliferation microscopic fluorescence images of endothelial cells

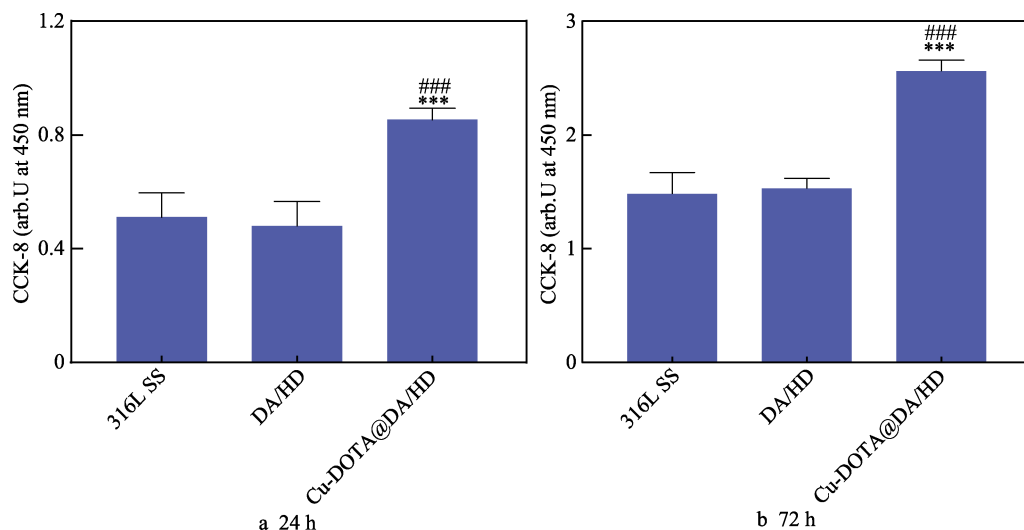


图 10 内皮细胞 CCK-8 试剂检测结果

Fig.10 CCK-8 reagent test results of endothelial cells

2.3 半体内循环血栓形成试验

半体内血液循环试验示意图如图 11 所示,红色部分均为连接导管,虚线框内为样品。血液循环 2 h 后,取下样品,结果如图 12 所示。316L SS 及 DA/HD 样品组均出现严重堵塞,其中 DA/HD 样品组几乎被血栓完全堵塞,可能是由于表面大量的氨基基团促进了凝血的发生,而 Cu-DOTA@DA/HD 样品组则体现了有效的抗凝性能,管内全段几乎没有堵塞。随后,



图 11 半体内血液循环试验示意图

Fig.11 Schematic diagram of blood circulation experiment in the half body

进一步对导管所含样品段的血流速率以及堵塞率进行统计分析。从图 13a 可以看出, 经过 2 h 的半体内循环后, 316L SS 及 DA/HD 样品组导管血流速率严重减缓, 特别是 DA/HD 样品组, 仅还剩 6.3%±4.8% 的流通速率, 几乎停滞。Cu-DOTA@DA/HD 样品组则显著优于 316L SS 及 DA/HD 样品组, 其血流速率达到了 64%。将样品取出, 沿卷曲方向展开 (如图 14 所示), 316L SS 与 DA/HD 样品组表面均有明显的血栓存在, Cu-DOTA@DA/HD 样品组表面仅有一层非常薄的血栓。图 13b 为堵塞率分析, 其值是根据样品横截面管腔内血栓面积除以管腔面积得到。结果表明, Cu-DOTA 改性的样品组显著优于对照组 (316L SS 和 DA/HD), Cu-DOTA@DA/HD 样品组的堵塞率仅为 12%。最后对样品表面血栓质量进行了统计 (结果如图 13c 所示), 结果与堵塞率具有高度的一

致性。Cu-DOTA@DA/HD 样品组表面血栓质量为 (3.0±0.4) mg, 远低于 316L SS 的 (40.3±10.3) mg, 以及 DA/HD 的 (54.2±4.7) mg。为了进一步探究样品表面血栓微观形貌, 将半体内循环 0.5 h 样品脱水脱醇后进行 SEM 拍摄, 结果如图 15 所示。316L SS 和 DA/HD 样品组表面都有大量的血小板和红细胞, 以及由网状纤维蛋白结构组成的纤维网络状血栓, 而 Cu-DOTA@DA/HD 样品组表面仅有一层薄薄的纤维网络, 以及少量的形态正常的红血, 显示了 NO 在抗血栓应用的优异性。半体内试验结果表明, NO 能够赋予材料优异的抗血栓形成能力, 有助于减少材料表面血栓生成, 在维持其血流畅通率及减少堵塞率方面有良好效果, 从而也证实了基于 NO 原位催化释放的抗凝血功能涂层构建策略在应用于血液接触类器械方面具有巨大潜力。

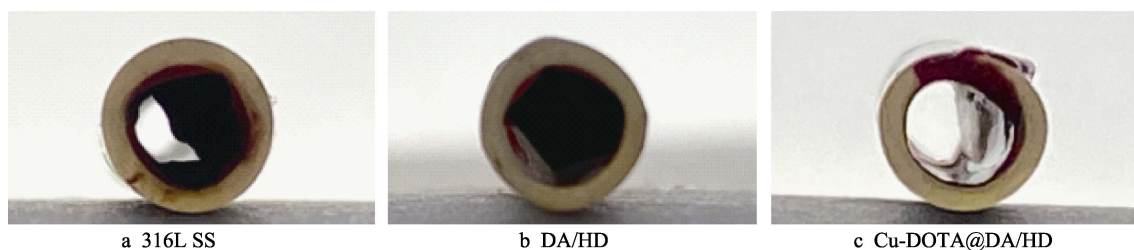


图 12 血液循环 2 h 后样品处导管截面

Fig.12 Cross-sectional view of the catheter at the sample after blood circulation for 2 hours

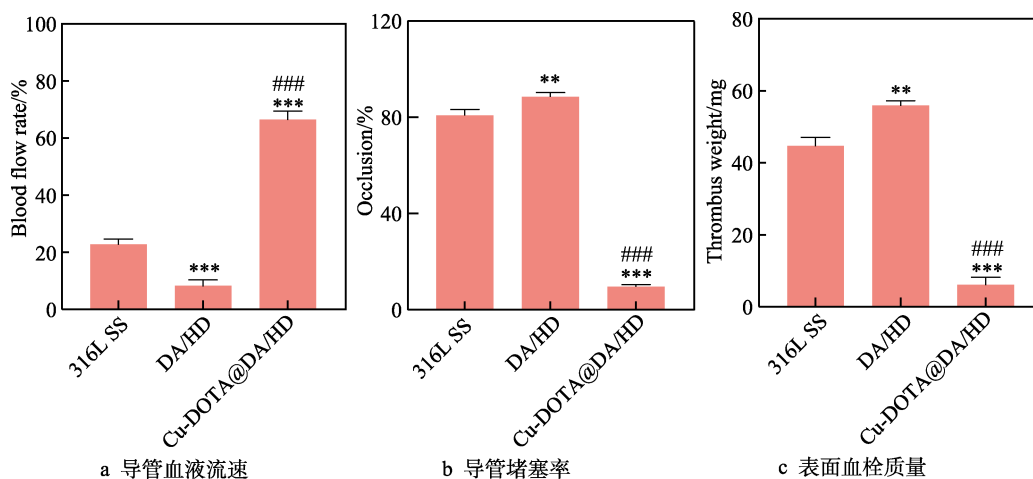


图 13 试验样品处导管血液流速、导管堵塞率统计和表面血栓质量

Fig.13 Statistical results of blood flow velocity (a) and clogging rate (b) of the catheter and the quality of thrombus on the surface (c) at the experimental sample



图 14 试验样品血栓展开

Fig.14 Expanded view of thrombus in the experimental sample

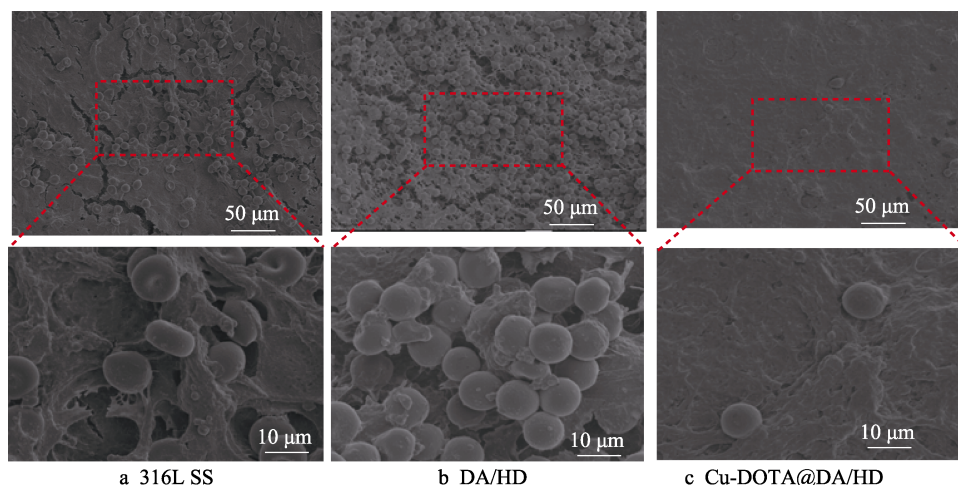


图 15 试验样品表面 SEM 形貌

Fig.15 SEM images on the surface of the experimental sample

3 结论

1) 利用贻贝灵感多巴胺(DA)分子的粘附能力、邻苯二酚结构与己二胺(HD)的酚胺化学以及大环多氨配体与过渡金属离子(铜离子)的配位能力,通过简单的一锅法和二次接枝法在血液接触类器械表面构建了铜-多巴胺-己二胺(Cu-DOTA@DA/HD)涂层。

2) 所制备涂层物理化学性质稳定, Cu-DOTA@DA/HD 涂层中的铜离子提供了谷胱甘肽过氧化物酶(GP_x)的催化活性,成功地实现了 316L SS 表面稳定、可控、持久的 NO 气体催化释放, NO 催化释放速率可达 $5.2 \times 10^{-10} \text{ mol}/(\text{cm}^2 \cdot \text{min})$ 。

3) 满足血液接触类器械抗凝、抑制内膜增生的功能需求。在抗凝血方面,通过 NO 对血小板的抑制作用,血小板的粘附数量($4 \text{ cells}/1000 \text{ cm}^2$)下降为 316L SS 表面($24 \text{ cells}/1000 \text{ cm}^2$)的 1/6,显著改善了血液相容性;在抗增生方面, Cu-DOTA@DA/HD 表面平滑肌细胞粘附数量仅为 $526/\text{mm}^2$,相比于 316L SS 表面($1182/\text{mm}^2$),表现出显著的平滑肌抑制作用; Cu-DOTA@DA/HD 表面能显著促进 HUVECs 的粘附, HUVECs 粘附数量为 $4251/\text{mm}^2$,是 316L SS 表面($1700/\text{mm}^2$)的 2.5 倍,提高了材料的生物相容性。

4) 本研究所制备涂层具有优异的抗血栓形成能力,能够有效减少材料表面血栓生成,在维持其血流畅通率及减少堵塞率方面有良好效果,从而也证实基于 NO 原位催化释放的抗凝血功能涂层构建策略在应用于血液接触类器械方面具有巨大潜力。

5) 本研究所开发策略的制造成本较低,工艺流程简单,在 24 h 即可获得理想的功能涂层。再者,该策略具有广阔的发展前景,若进一步有针对性地优化参数,结合本策略所述工艺,有望继续提高材料的

综合性能,实现产业化应用。

参考文献:

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on Cardiovascular Health and Diseases Burden in China: An Updated Summary of 2020[J]. Chinese Circulation Journal, 2021, 36(6): 521-545.
- [2] SHLOFMITZ E, IANTORNO M, WAKSMAN R. Restenosis of Drug-Eluting Stents: A New Classification System Based on Disease Mechanism to Guide Treatment and State-of-the-Art Review[J]. Circulation Cardiovascular Interventions, 2019, 12(8): e007023.
- [3] TOMBERLI B, MATTESINI A, BALDERESCHI G I, et al. A Brief History of Coronary Artery Stents[J]. Revista Espanola De Cardiologia (English Ed), 2018, 71(5): 312-319.
- [4] LI Jin-gan, WANG Shuo, SHENG Yu-long, et al. Designing HA/PEI Nanoparticle Composite Coating on Biodegradable Mg-Zn-Y-Nd Alloy to Direct Cardiovascular Cells Fate[J]. Smart Materials in Medicine, 2021, 2: 124-133.
- [5] LÜSCHER T F, STEFFEL J, EBERLI F R, et al. Drug-Eluting Stent and Coronary Thrombosis: Biological Mechanisms and Clinical Implications[J]. Circulation, 2007, 115(8): 1051-1058.
- [6] IQBAL J, GUNN J, SERRUYS P W. Coronary Stents: Historical Development, Current Status and Future Directions[J]. British Medical Bulletin, 2013, 106(1): 193-211.
- [7] RÄBER L, WOHLWEND L, WIGGER M, et al. Five-Year Clinical and Angiographic Outcomes of a Rando-

- mized Comparison of Sirolimus-Eluting and Paclitaxel-Eluting Stents: Results of the Sirolimus-Eluting Versus Paclitaxel-Eluting Stents for Coronary Revascularization LATE Trial[J]. *Circulation*, 2011, 123(24): 2819-2828.
- [8] SIGWART U. The Stent Story: How it all Started...[J]. *European Heart Journal*, 2017, 38(28): 2171-2172.
- [9] CROCE K, LIBBY P. Intertwining of Thrombosis and Inflammation in Atherosclerosis[J]. *Current Opinion in Hematology*, 2007, 14(1): 55-61.
- [10] FRANK P G, PAVLIDES S, LISANTI M P. Caveolae and Transcytosis in Endothelial Cells: Role in Atherosclerosis[J]. *Cell and Tissue Research*, 2009, 335(1): 41-47.
- [11] PATEL S D, WALTHAM M, WADOODI A, et al. The Role of Endothelial Cells and Their Progenitors in Intimal Hyperplasia[J]. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 2010, 4(2): 129-141.
- [12] SCHWARTZ B G, ECONOMIDES C, MAYEDA G S, et al. The Endothelial Cell in Health and Disease: Its Function, Dysfunction, Measurement and Therapy[J]. *International Journal of Impotence Research*, 2010, 22(2): 77-90.
- [13] KUSHWAHA M, ANDERSON J M, BOSWORTH C A, et al. A Nitric Oxide Releasing, Self Assembled Peptide Amphiphile Matrix that Mimics Native Endothelium for Coating Implantable Cardiovascular Devices[J]. *Biomaterials*, 2010, 31(7): 1502-1508.
- [14] CONESKI P N, SCHOENFISCH M H. Nitric Oxide Release: Part III. Measurement and Reporting[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(10): 3753-3758.
- [15] KELM M. Nitric Oxide Metabolism and Breakdown[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1999, 1411(2/3): 273-289.
- [16] BRISBOIS E J, HANDA H, MAJOR T C, et al. Long-Term Nitric Oxide Release and Elevated Temperature Stability with *S*-nitroso-*N*-Acetylpenicillamine (SNAP)-Doped Elast-Eon E2As Polymer[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(28): 6957-6966.
- [17] ZHANG Feng, ZHANG Qiang, LI Xiang-yang, et al. Mussel-Inspired Dopamine-Cu^{II} Coatings for Sustained *in Situ* Generation of Nitric Oxide for Prevention of Stent Thrombosis and Restenosis[J]. *Biomaterials*, 2019, 194: 117-129.
- [18] WOODS M, KOVACS Z, KIRALY R, et al. Solution Dynamics and Stability of Lanthanide(III) (S)-2-(p-Nitrobenzyl) DOTA Complexes[J]. *Inorganic Chemistry*, 2004, 43(9): 2845-2851.
- [19] CHEN Xu, GAO Yi-qiu, WANG Yun-long, et al. Mussel-Inspired Peptide Mimicking: An Emerging Strategy for Surface Bioengineering of Medical Implants[J]. *Smart Materials in Medicine*, 2021, 2: 26-27.
- [20] GOOCH K J, DANGLER C A, FRANGOS J A. Exogenous, Basal, and Flow-Induced Nitric Oxide Production and Endothelial Cell Proliferation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1997, 171(3): 252-258.
- [21] 闫峰, 王进, 杨志禄, 等. 白蛋白固定等离子体聚烯丙胺薄膜及体外血小板粘附行为[J]. *生物医学工程研究*, 2008, 27(4): 268-271.
- YAN Feng, WANG Jin, YANG Zhi-lu, et al. Study on Plasma Polymerized-Allylamine Film Immobilized by Albumin and in Vitro Platelet Adhesion Behavior[J]. *Journal of Biomedical Engineering Research*, 2008, 27(4): 268-271.
- [22] JEN M C, SERRANO M C, VAN LITH R, et al. Polymer-Based Nitric Oxide Therapies: Recent Insights for Biomedical Applications[J]. *Advanced Functional Materials*, 2012, 22(2): 239-260.
- [23] OH B K, MEYERHOFF M E. Spontaneous Catalytic Generation of Nitric Oxide from S-Nitrosothiols at the Surface of Polymer Films Doped with Lipophilic Copper(II) Complex[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, 125(32): 9552-9553.
- [24] BRUGAROLAS J, BRONSON R T, JACKS T. P21 is a Critical CDK2 Regulator Essential for Proliferation Control in Rb-Deficient Cells[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1998, 141(2): 503-514.

责任编辑: 刘世忠