

促内皮和抗炎的丹参酮 IIA 洗脱支架涂层研究

杨梦毅, 黄楠, 熊开琴, 杜泽煜, 马青, 徐佳乐, 汪川哲, 涂秋芬*

(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)

摘要: **目的** 针对目前临床心血管支架存在的晚期血栓和支架内再狭窄等问题, 通过超声雾化喷涂技术构建传统中药丹参酮 IIA (TS) 洗脱支架, 探究其在动脉粥样硬化病变部位的治疗作用。 **方法** 采用超声雾化喷涂技术构建 TS 洗脱支架; 利用水接触角 (WCA) 检测仪、傅里叶变换红外吸收光谱仪 (FTIR)、球囊扩张实验及场发射扫描电镜 (SEM) 等对涂层表面的亲疏水性、化学成分及结构、涂层机械性能进行检测分析; 采用紫外-可见分光光度计 (UV-Vis) 对 TS 涂层药物释放行为进行检测; 通过体外溶血率和血小板实验初步评价涂层的血液相容性; 通过体外细胞相容性实验评估 TS 涂层对内皮细胞 (ECs) 和平滑肌细胞 (SMCs) 增殖的影响, 以及对巨噬细胞炎症行为及表型的调节作用; 通过半体内血液循环实验进一步探索涂层抗血栓形成效果。 **结果** WCA、FTIR、SEM 和 UV-Vis 等检测结果证实了 TS 洗脱支架的成功制备, 涂层中 TS 在体外能够保持 28 d 持续释放; 体外生物相容性结果表明, TS 与聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 质量比为 30% 的涂层具有显著抑制血小板的黏附和激活、促进 ECs 及抑制 SMCs 增殖的作用, 同时能够有效调节巨噬细胞的炎症行为; 半体内血液循环实验结果表明, 涂层具有良好的抗血栓形成的效果。 **结论** 制备的 TS 洗脱支架具有选择性促进内皮增殖, 抑制平滑肌增生、调控炎症的作用, 以及优异的抗血栓形成能力, 能够为病变血管修复提供一种潜在的解决方案。

关键词: 丹参酮 IIA; 药物洗脱支架; 促内皮; 抗炎; 抗血栓; 血管细胞相容性

中图分类号: TB34 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-3660(2024)06-0222-12

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2024.06.021

Pro-endothelial and Anti-inflammatory Tanshinone IIA-Eluting Stent Coating

YANG Mengyi, HUANG Nan, XIONG Kaiqin, DU Zeyu, MA Qing, XU Jiale,
WANG Chuanzhe, TU Qiufen*

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

ABSTRACT: Cardiovascular disease is one of the most common causes of death worldwide and is widely recognized as the leading killer of human health. Cardiovascular stent intervention is currently the primary treatment for cardiovascular disease. The most widely used drug-eluting stents (DES) reduce the incidence of restenosis to approximately 3%-20% based on bare metal stents (BMS), but the released drugs inhibit endothelial proliferation while impairing the function of the endothelial layer, causing a series of cellular dysfunctional events such as thrombosis, abnormal proliferation of smooth muscle cells (SMCs),

收稿日期: 2023-03-17; 修订日期: 2023-05-05

Received: 2023-03-17; Revised: 2023-05-05

引文格式: 杨梦毅, 黄楠, 熊开琴, 等. 促内皮和抗炎的丹参酮 IIA 洗脱支架涂层研究[J]. 表面技术, 2024, 53(6): 222-233.

YANG Mengyi, HUANG Nan, XIONG Kaiqin, et al. Pro-endothelial and Anti-inflammatory Tanshinone IIA-Eluting Stent Coating[J]. Surface Technology, 2024, 53(6): 222-233.

*通信作者 (Corresponding author)

inflammatory response, delayed re-endothelialisation and even the development of advanced neoatherosclerosis. To address these issues, an ideal vascular stent should have multiple biological functions such as promoting the proliferation of endothelial cells (ECs), inhibiting the overproliferation of SMCs, regulating inflammation and being antithrombotic. Tanshinone IIA (TS) is one of the most pharmacologically active components isolated from the traditional Chinese medicine *Salvia miltiorrhiza*, which has anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, antioxidant and anti-thrombotic effects. In order to maintain the active structure of TS during application, TS-eluting stents were prepared by ultrasonic atomisation spraying and its therapeutic effects in atherosclerotic site were explored. A coating carrier, polylactic acid-hydroxyacetic acid copolymer (PLGA), which had excellent physical strength, controlled degradation properties and the ability to contain large amounts of drug without altering the degradation pattern was selected. Water contact angle (WCA) detector and Fourier transform infrared absorption spectrometer (FTIR) were selected to examine the hydrophobicity, chemical composition and structure of the coating surface, and the mechanical properties of the coating on the stent surface were evaluated by means of balloon expansion experiments and field emission scanning electron microscopy (SEM) observations. The drug release behavior of the coating was examined by an UV-Vis spectrophotometer. The haemocompatibility of the coating was initially evaluated by *in vitro* haemolysis rate and platelet adhesion and activation assays. The effects of the TS coating on the proliferation of endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs) and the modulation of macrophage inflammatory function were assessed by *in vitro* cellular assays. The modulatory effect of the TS coating on macrophage phenotype was assessed using immunofluorescence staining. The antithrombotic effect of the coating was further explored by *ex-vivo* blood circulation assays. The successful preparation of TS-eluting stent was confirmed by WCA, FTIR, SEM and UV-Vis assays. The TS coating was able to maintain sustained release of TS *in vitro* for 28 d. The TS coating met the haemolysis rate requirement for biomedical implant materials. The *in vitro* cytocompatibility results showed that the TS eluting coating promoted the proliferation of ECs and inhibited the proliferation of SMCs, and could effectively regulate the inflammatory behavior of macrophages. Based on the *in vitro* biocompatibility results, a final concentration of 30% TS (mass ratio of TS to PLGA) was selected as the final application concentration. The results of the *ex-vivo* blood circulation experiments showed that the surface coating had a good inhibitory effect on thrombosis. In conclusion, the TS-eluting stent prepared herein has the ability to selectively promote endothelial proliferation, inhibit smooth muscle proliferation, modulate inflammation as well as excellent anti-thrombogenic ability, which can provide a potential solution for lesion vascular repair.

KEY WORDS: tanshinone IIA; drug-eluting stent; pro-endothelial; anti-inflammatory; anti-thrombosis; vascular cytocompatibility

冠状动脉疾病 (CVD) 是世界范围内的主要死亡原因, 每年造成超 1 750 万人死亡^[1-4]。血管支架介入治疗 (PCI) 凭借创伤小、安全性高及治疗效果佳等优势被广泛应用于临床 CVD 治疗^[5], 但仍然伴随着术后风险。曾被广泛用于 CVD 治疗的裸金属支架 (BMS) 植入 3~6 个月后再狭窄率高达 20%~30%^[6-8]; 2003 年以来药物洗脱支架 (DES) 的使用将再狭窄的发生率降低到 3%~20%, 成为心血管疾病治疗的里程碑^[9-12], 但依然存在内膜剥落和相关炎症及血栓形成问题^[5,13-16]。

为了解决上述血管支架的并发症, 一个理想的血管支架应该具备抗凝、抑制平滑肌细胞 (SMCs) 过度增殖、调控炎症以及促进内皮细胞 (ECs) 生长及修复等多重生物学功能。寻找与天然血管内皮功能匹配的多重生物学功能的活性分子, 成为突破血管支架植入后并发症的有利手段。丹参最早记载于《神农本草经》, 为唇形科植物丹参的根, 味苦、性微寒, 入“心”“心包”和“肝”经^[17-18], 并以其舒张血管、抗凝血、抗炎、清除自由基等特殊作用, 长期以来在

亚洲国家被用于治疗心肌梗塞、心绞痛、中风和动脉粥样硬化 (AS)^[19]。丹参酮 IIA (TS) 是从丹参中分离出的具有药理活性的亲脂性成分之一, 具有抗 AS、抗炎、抗氧化、抗血栓形成等作用^[20-26], 可通过单独使用 (丹参酮 IIA 硫酸钠, STS) 或复方制剂 (复方丹参滴丸[®]) 用于预防及治疗 CVD^[19]。

药物分子的生物活性与其分子结构密切相关, 采用物理装载和超声雾化喷涂方法可以避免药物结构发生变化, 进而保留其最高生物活性。此外, 由于心血管支架在体内需要满足一定时间的服役要求, 支架洗脱涂层聚合物载体的生物相容性及其释放行为对涂层最终效果具有重要影响。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 是经过 FDA 批准的生物相容性材料, 因其出色的物理强度^[27-28], 高度的生物相容性^[29], 高度可控一致的降解特性^[30]以及能够容纳大量药物而不改变降解模式的特性, 已被广泛作为药物、蛋白质和其他各种大分子^[31-33]的受控递送载体^[34]。在 PLGA 聚合物涂层中, 药物的释放与 PLGA 聚合物基质的分解和侵蚀密切相关, 这 2 个过程均可以促进药物分子

的扩散,因为随着 PLGA 分子量的降低,聚合物链的交联减少并产生孔隙空间^[16,35-36]。根据 PLGA 所载活性药物以及配比不同,其药物释放速率也有不同,但一般都能满足药物至少 30 d 的持续释放,能够满足支架在病灶部位前期的治疗功能需求^[37-39]。

在本项工作中,通过超声雾化方法在支架表面构建 PLGA 携带 TS 药物洗脱涂层,赋予支架涂层抗血栓形成、促内皮、抑制再狭窄和抗炎的能力,促进支架表面的内皮化,有望解决血管支架的系列临床并发症(图 1)。

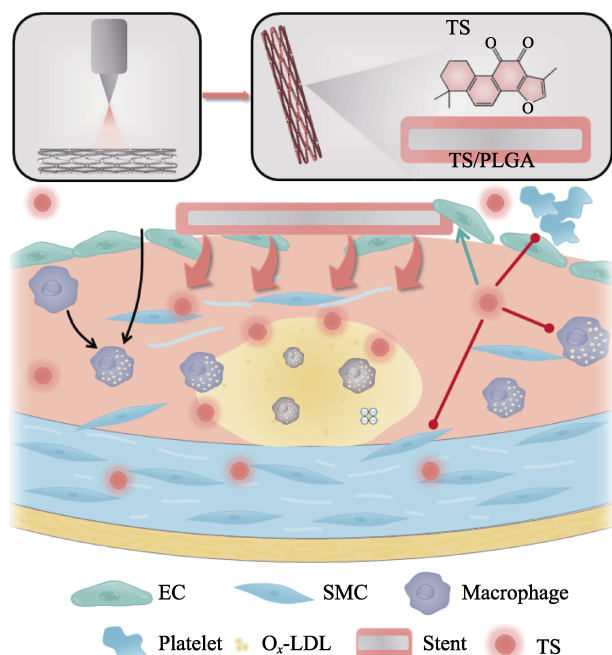


图 1 在 316L SS 支架上喷涂 TS 洗脱涂层,构建具有促进 ECs 增殖、抑制 SMCs 增殖、抑制血小板黏附激活及抗炎作用的血管支架涂层

Fig.1 A TS-eluting coating was sprayed on 316L SS stent to construct a vascular stent coating that promotes the proliferation of ECs, inhibits the proliferation of SMCs, inhibits platelet adhesion activation and has anti-inflammatory effects

1 实验方法

1.1 材料

主要材料包括: 316L 不锈钢(SS)基材由德博钢铁有限公司加工(成都); 316L SS 支架购自 Kossel Medtech 有限公司(苏州); PLGA 75:25(乳酸和羟基乙酸物质的量比 75:25; M_w 为 $10.5 \times 10^4 \sim 12.6 \times 10^4$) 购自岱罡生物工程有限公司(济南); 戊二醛(50% in H_2O), Tanshinone IIA (TS, 纯度 $\geq 98\%$), TritonTM X-100, 牛血清白蛋白(BSA, 纯度 $\geq 98\%$) 购自阿拉丁试剂有限公司(上海); 三氯甲烷、乙醇、丙酮购自科隆化学试剂有限公司(成都); 胰酶(Trypsin

1:250) 购自赛国生物科技有限责任公司(广州); 青链双抗购自道鹏生物(上海); DMEM/F-12 基础培养基和 RPMI 1640 培养基购自赛默飞世尔科技公司(美国); SMCM 培养基购自 ScienCell Research Laboratories(美国); 胎牛血清(FBS)分别购自 HyClone 公司(美国)和依科赛生物科技有限公司(太仓); CCK-8 试剂盒购自同仁化学研究所(日本); 人脐静脉内皮细胞(HUVECs), 人脐动脉平滑肌细胞(HUASMCs)和巨噬细胞购自普诺赛生命科技有限公司(武汉); 4% (均以体积分数计)多聚甲醛购自兰杰柯科技有限公司(北京); 罗丹明 123 染料购自索莱宝科技有限公司(北京); Anti-CD86 抗体、Anti-Mannose Receptor 抗体、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) 和山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 555) 购自艾博抗贸易有限公司(上海)。

1.2 不同 TS 浓度洗脱涂层及支架样品制备

将 PLGA (2 mg/mL) 和不同质量比的 TS (质量比 TS:PLGA 分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 在 25 °C 下以 500 r/min 速度搅拌并完全溶解于三氯甲烷中。洗脱涂层通过蒸发沉积法制备得到; 将 TS/PLGA 混合液体滴加 (50 μ L) 于 316L SS 表面, 在 25 °C 恒温密闭沉积 2 h, 得到不同浓度 TS 涂层。然后在 25 °C 真空干燥箱中干燥 6~8 h, 备用。

316L SS 支架置于丙酮溶液中超声振荡 3 min, 再在无水乙醇溶液中超声振荡 3 min, 然后取出, 晾干。将清洗干净的支架置于超声雾化喷涂系统的支架运动轴上, 设置超声功率为 2 W, TS 溶液流速为 0.75 cm/s, 喷涂 20 个循环。将喷涂好的支架在室温下干燥 6 h, 然后在真空干燥箱 25 °C 真空干燥 12 h, 备用。

1.3 材料学表征

使用 Krüss GmbH DSA 100 Mk 2 测角器 (Hamburg, Germany) 测量不同质量比 TS 涂层的水接触角。对室温下不同涂层上的超纯水 (2 μ L) 固定液滴进行成像, 并使用 DSA1.8 软件对水接触角进行定量分析。每组 4 个样品, 选取涂层的 3 个不同区域进行测试。

使用傅里叶变换红外吸收光谱仪 (GATR-FTIR, NICOLET 5700) 检查涂层的化学结构。使用压片法, 将溴化钾 (100~200 mg) 和固体样品 (1~2 mg) 研磨成粉末并压成薄片 ($\Phi 13$ mm \times 1.0 mm) 进行检测。

通过球囊扩张实验评估 TS 洗脱涂层在心血管支架上的黏附及机械性能。将喷涂有 TS 洗脱涂层的 316L SS 支架 ($\Phi 2.75$ mm \times 18 mm) 安装到球囊扩张导管上, 在 8 个大气压下保持 1 min。使用场发射扫描电镜 (SEM) (JSM-7001F, JEOL, Japan) 观察支架涂层在球囊扩张前后的形貌。

1.4 体外药物释放检测

将 30%(质量比)的 TS 样品孵育在含有 2 mL PBS (pH=7.4, 37 °C) 的玻璃瓶中, 旋转速度为 100 r/min, 每 3 d 替换一次新鲜 PBS。使用紫外分光光度计 (UV-Vis, TU-1901, China) 在 270 nm 波长处测定了 TS 洗脱涂层不同孵育时间 (1、4、7、14、21、28 d) 后洗脱液的吸光度值, 并计算体外释放速率。

1.5 体外血液相容性

新鲜全血取自健康成人志愿者, 所有血样采用柠檬酸钠抗凝 (1:9, 体积比), 符合西南交通大学伦理标准。全血在 1 500 r/min 下离心 15 min 得到富血小板 (PRP), 用于后续血小板黏附实验。

溶血实验根据 ISO10993-4 国际标准进行。将待测样品置于 10 mL 生理盐水中, 取同体积的生理盐水和超纯水作为阳性和阴性对照, 均于 37 °C 孵育 30 min。采集的新鲜血液与生理盐水按照 5:4 体积比稀释, 取 200 μ L 加入样品试管中, 并继续在 37 °C 下孵育 1 h。孵育完成后以 3 000 r/min 转速离心 5 min, 从每个样品上清液中吸取 200 μ L 于 96 孔板中, 在 540 nm 下读取吸光度值, 并通过公式: $R=(A-C1)/(C2-C1) \times 100\%$ 计算样品溶血率, 其中 R 是溶血率, A 是样品吸光度值, $C1$ 是阴性对照吸光度值, $C2$ 是阳性对照吸光度值。

316L SS 及不同 TS (质量比 TS: PLGA 分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 涂层样品放置于 24 孔细胞培养板中, 表面加入 300 μ L PRP 在 37 °C 下孵育 45 min。用生理盐水冲洗 3 次, 除去未黏附的血小板, 随后用 2.5% (质量分数) 戊二醛溶液固定 30 min, 经过 50%、75%、90% 和 100% 乙醇梯度脱水 (每次 30 min) 干燥后, 采用 SEM 观察分析血小板黏附激活情况。

1.6 细胞培养

所有细胞都在 37 °C, 5% (体积分数) CO_2 的细胞培养箱中进行传代培养。HUVECs 在 DMEM/F12 完全培养基 (15% (体积分数) Excell FBS, 1% (均以体积分数计) 青链双抗) 中培养; HUASMCs 在 RPMI 1640 完全培养基 (15% (体积分数) HyClone FBS, 1% 青链双抗) 与 SMCM 体积比 1:1 培养基中培养; 巨噬细胞在 RPMI 1640 完全培养基 (15% HyClone FBS) 中培养。当细胞达到约 80% 密度时进行传代培养, 本文中所有细胞实验所用细胞均为第 3~12 代细胞。

1.7 细胞黏附和增殖

细胞 (HUVECs, HUASMCs) 分别以 2×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔细胞培养板中不同 TS 浓度涂层样品表面, 孵育 24、72 h 后, 样品表面细胞活力

通过 CCK-8 试剂盒检测, 结束后采用 4% 多聚甲醛对细胞进行过夜固定, 随后进行罗丹明 123 染色, 并使用倒置荧光显微镜 (Thermo Scientific, EVOS M5000) 对细胞进行观察。

1.8 巨噬细胞表型调节实验

将巨噬细胞以 3×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔板中的 316L SS、PLGA 及 TS 涂层样品上 (采用 100 ng/mL 脂多糖 (LPS) 建立巨噬细胞 AS 炎症模型), 孵育 48 h 后, 用生理盐水漂洗, 并用 4% 多聚甲醛固定 20 min。依次在 0.1% (体积分数) 的 TritonTM X-100 中浸泡 5 min, PBS 漂洗 3 次, 1.5% (质量分数) BSA 室温封闭 1 h, 经 PBS 漂洗 3 次后, 加入 150 μ L Anti-CD86 抗体 (1:500, 体积比) 和 Anti-Mannose Receptor 抗体 (1:500, 体积比) 的溶液混合 4 °C 过夜, 孵育完成后, PBS 漂洗 3 次, 加入 150 μ L 山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 488) (1:200, 体积比) 和山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor[®] 555) (1:200, 体积比) 抗体混合溶液室温孵育 1 h, 通过激光共聚焦显微镜 (LSM900 with Airyscan2, Zeiss, Germany) 进行观察。

1.9 半体内血液循环实验

所有动物实验程序均符合国家《实验动物保护和利用指南》的要求。所有手术均在无菌条件下进行, 导管通过环氧乙烷灭菌, 样品通过紫外灭菌。在本研究中, 总共使用 8 只成年新西兰白兔 (购自四川达硕生物科技有限公司), 质量为 2.5~3.5 kg, 实验结束后安乐处死。

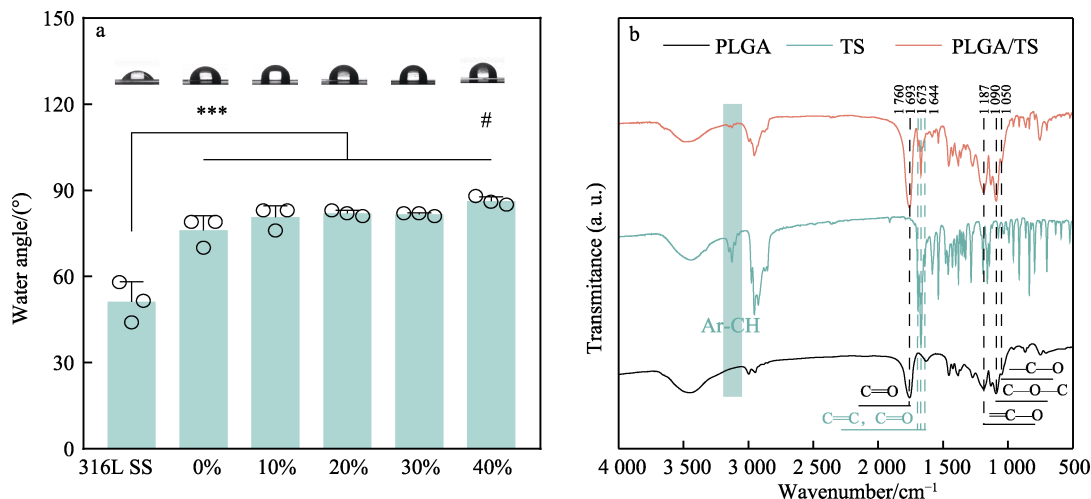
在无菌手术台上将麻醉后的新西兰白兔剥离暴露出右颈动脉和左颈静脉, 将无涂层和 TS 涂层的 316L SS 箔 (9 mm \times 15 mm) 卷曲于商用双通手术导管内侧, 每组有 4 个平行样本, 每个双通导管中放置 316L SS (或 PLGA) 和 TS 组, 并用该导管连接兔右颈动脉和左颈静脉, 建立动静脉体外循环, 该循环装置如图 11a 所示。监测 2 h 后收集样品导管并进行清洗、称量、拍照, 测试生理盐水流速, 计算堵塞率, 并用 2.5% (质量分数) 戊二醛溶液固定 12 h, 通过 SEM 观察涂层表面。

2 结果与讨论

2.1 不同浓度 TS 涂层的制备

对涂层进行了水接触角及 FTIR 检测分析。如图 2a 所示, 相比于 316L SS, 表面沉积 PLGA 之后, 水接触角由 (51.230 ± 6.957) $^\circ$ 增加到 (76.000 ± 5.196) $^\circ$, 这是由于聚合物中疏水基团占比较高造成的, 表明成功在 316L SS 表面沉积了 PLGA 涂层, 水接触角随着 PLGA 装载 TS 质量比的增加而发生变化, 到 TS 质量

比 40% 时与 PLGA 相比具有显著性差异, 推测这是由于 TS 涂层中苯环、双键等疏水官能团所致, 佐证了 PLGA 涂层可以成功实现 TS 的装载。FTIR 结果如图 2b 所示, 在 PLGA 光谱中, 1760 cm^{-1} 处出现了较为明显的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰, 在 1187 和 1090 cm^{-1} 处分别归属于分子中的 $-\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰和 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 伸缩振动峰, 1050 cm^{-1} 处为 $-\text{C}-\text{O}$ 对称伸缩振动峰。



Note: * compared with 316LSS, # with PLGA; one symbol indicates $p < 0.05$, two symbols indicate $p < 0.01$, and three symbols indicate $p < 0.005$ (the same below); Data are exhibited as the mean $\pm E_{SD}$ ($n=4$) and analyzed through a one-way ANOVA.

图 2 316L SS (a) 和不同 TS (质量比 TS: PLGA 分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 涂层的水接触角;

PLGA、TS 和 PLGA/TS 的红外光谱图 (b)

Fig.2 Water contact angle of 316L SS (a) and different TS coatings (mass ratio TS: PLGA of 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, respectively) and FTIR spectra (b) of PLGA, TS and PLGA/TS.

2.2 TS 洗脱支架的机械性能测试

作为治疗 CVD 常见和主要的生物医学设备之一, 心血管支架在使用时首先要经受在血管成形球囊扩张时发生的复杂和严酷的变形。因此, 通过 SEM 观察 TS 洗脱支架撑开前后的形貌对涂层的机械性能进行评估。从 SEM 图像 (图 3a~b) 中可以清楚地看到, 在 316L SS 支架上成功形成了连续、均匀、光滑的 TS 涂层。在经历了扩张后, TS 涂层保持完整, 没有分层或破坏 (图 3c~d)。这表明 TS 洗脱涂层具有优异的机械性能, 不会开裂或剥落, 能够适应血管支架在应用中的变形要求。

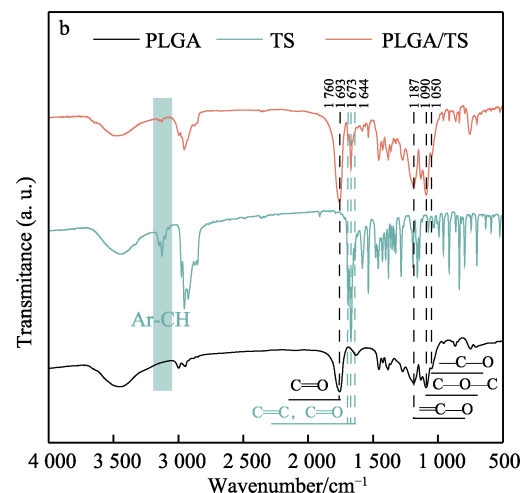
2.3 TS 涂层的药物体外释放行为

PLGA 涂层中 TS 药物的体外释放行为表明 (图 4), TS 涂层在 15 d 后释放速率有变缓的趋势, 并能够维持稳定持续释放。在第 28 天后达到 $(38.510 \pm 6.145)\%$ 的释放量。由此可见, 这种 TS 洗脱涂层满足至少 28 d 稳定可控释放 TS 药物的要求。

2.4 体外血液相容性

不良血液接触材料表面接触血液后可能引发溶血, 溶血率小于 5% (GB/T 14233.2) 被认为材料达

到溶血标准。图 5 结果表明, 各样品溶血率均低于国家标准, 表明不同浓度 TS 涂层都满足生物医用植入材料的溶血性能要求。



到溶血标准。图 5 结果表明, 各样品溶血率均低于国家标准, 表明不同浓度 TS 涂层都满足生物医用植入材料的溶血性能要求。

在支架植入后的早期阶段, 支架上的早期急性血栓形成是首先面对的关键问题。因此, 抗血栓形成是所有血液接触材料, 尤其是心血管支架基本的要求之一。由于血栓形成的级联反应与血小板黏附、聚集等生化过程密切相关, 有研究表明 TS 能够显著抑制血小板黏附和激活^[40-42], 因此检测了 TS 涂层体外抗血小板特性。如图 6 中不同样品表面血小板的 SEM 图像 (图 6a)、黏附 (图 6b) 和激活情况 (图 6c) 统计结果所示, 随着 TS 质量比的不断提高, 血小板黏附的数量和激活率总体呈现下降趋势; 当 TS 浓度为 30% 或 40% (质量比) 时, 涂层对血小板黏附数量和激活率均存在显著性的统计学差异。

2.5 体外细胞相容性

支架在植入过程中会不可避免地造成血管壁损伤, 造成一系列后续病理反应, 例如血栓形成、SMCs 增殖迁移和炎症等, 最终导致支架内再狭窄 (ISR)。密集健康的 EC 层在预防 ISR 方面起着关键作用, SMCs 过度增殖和炎症反应则是导致支架表面再内皮化延迟的 2 个关键因素^[43]。因此, 赋予血管支架对

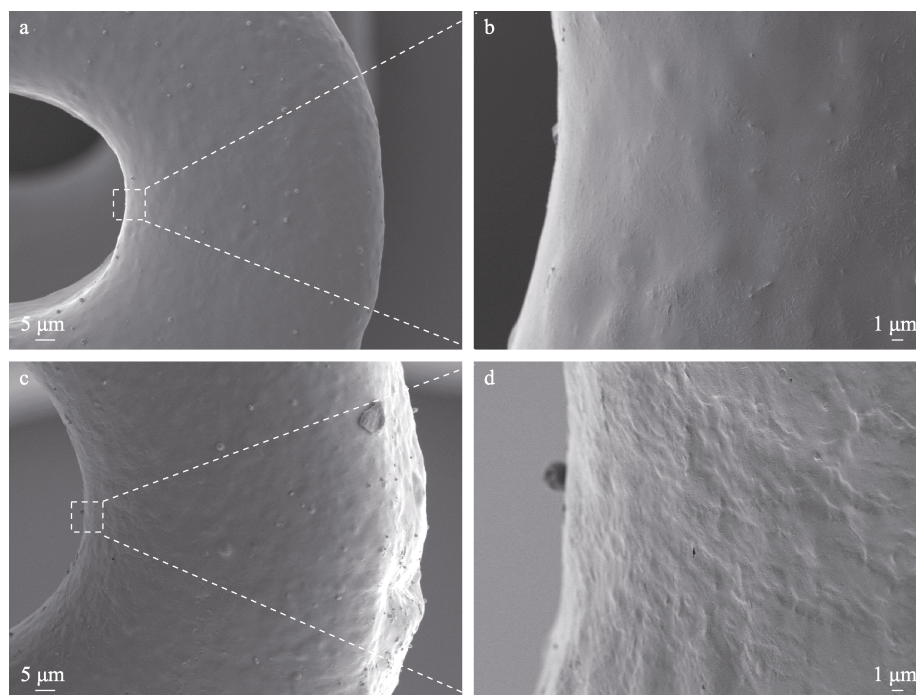


图 3 TS 洗脱支架在经受球囊扩张前 (a~b) 和经受球囊扩张后 (c~d) 的 SEM 图像
Fig.3 SEM images of TS-eluting stents before (a-b) and after (c-d) balloon dilatation

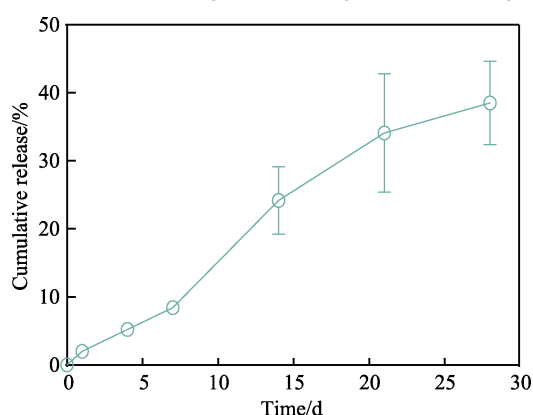


图 4 TS 洗脱涂层 (质量比 TS: PLGA 为 30%) 在 0、1、4、7、14、28 d 的累计释放量
Fig.4 Cumulative release curves for TS coatings (mass ratio TS: PLGA of 30%) at 0, 1, 4, 7, 14, 28 d

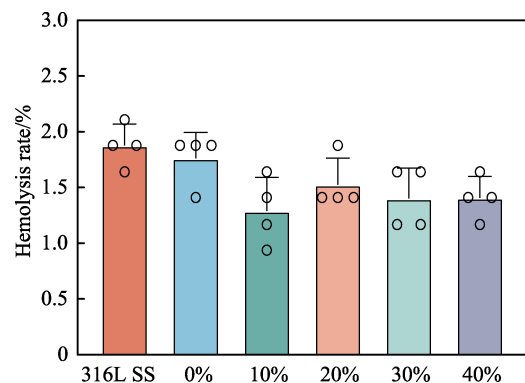


图 5 316L SS 和不同 TS (质量比 TS: PLGA 分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 洗脱涂层的溶血率
Fig.5 Haemolysis rates for 316L SS and different TS (TS: PLGA mass ratios of 0%, 10%, 20%, 30%, 40%) eluting coatings

ECs、SMCs 和炎症细胞的选择性调控作用是至关重要的。有研究表明, TS 具有促进 ECs 增殖的作用^[44-45]; 通过阻断细胞 G0/G1 期, 阻断丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 信号通路和下调 c-fos 表达, 通过抑制 Akt 的磷酸化等机制, 从而抑制 SMCs 的增殖和迁移作用^[46-49]; 具有抑制巨噬细胞产生炎症介质的作用^[50-52], 也正是由于这些不同通路的作用, TS 涂层具有选择性调控 AS 病变相关细胞的潜力。因此分别探究了 TS 涂层在体外对 3 种细胞的影响。

如图 7 所示, ECs 的荧光照片和 CCK-8 测试结果表明, 培养 24 和 72 h 后, 与 316L SS 组相比, 随着 TS 浓度的提高, HUVECs 的增殖能力明显增强, 细胞形态也越发紧密; 相比于 PLGA 组, TS 质量比 30% 和 40% 组对 HUVECs 的增殖都具有显著的促进作用。随着 TS 浓度的提高, HUASMCs 的增殖能力明显降低; 与 PLGA 组相比, 30% 和 40% 组对 HUASMCs 的增殖具有显著性的抑制作用 (图 8)。与 316L SS 相比, PLGA 对 HUVECs 和 HUASMCs 的增殖无明显促进或抑制作用。以上结果表明, PLGA 涂层中装载的 TS 对 ECs/SMCs 具有良好的选择性调控作用。

在 BMS 和 DES 中, ISR 的发生率随着植入时间的延长而逐渐增加, 通常与新生动脉粥样硬化发生有关^[53]。支架植入过程对血管造成的急性损伤、植入后的血液湍流, 以及支架本身引发的长期慢性炎症反应都会促使单核细胞激活为巨噬细胞, 吸收氧化低密度脂蛋白, 并大量表达促炎因子, 最终导致新生动脉粥样硬化。因此, 调控炎症细胞对支架涂层的治疗效果很重要。本研究通过对巨噬细胞分泌的炎性因子的表

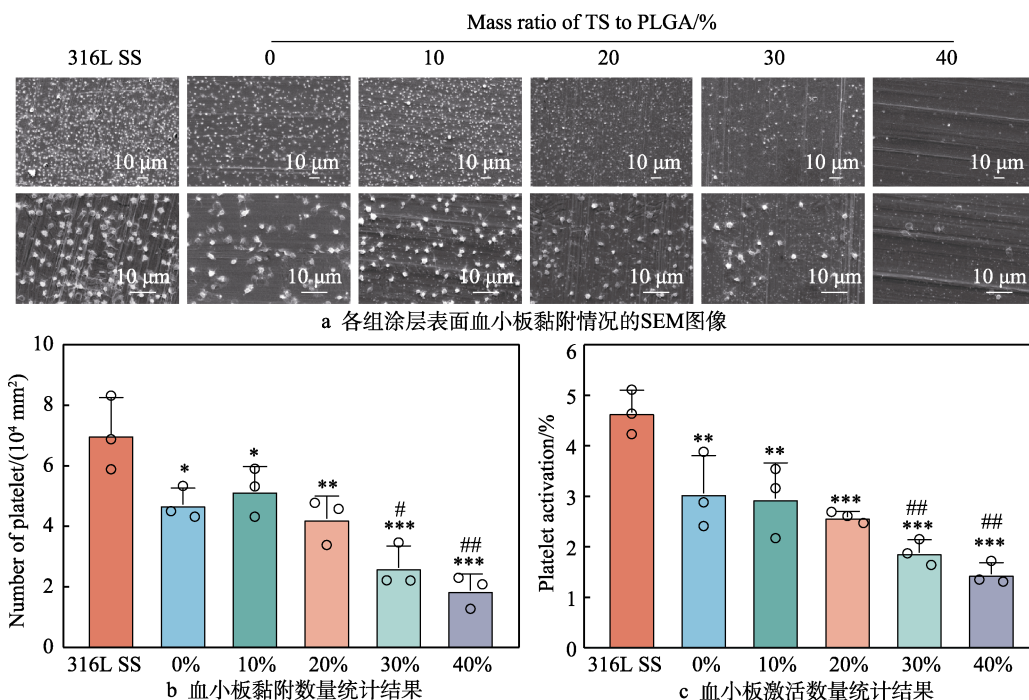


图 6 316L SS 和不同 TS 洗脱涂层 (TS: PLGA 质量比分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 上血小板黏附与激活情况
Fig.6 Platelet adhesion and activation on 316L SS and different TS-eluting coatings (mass ratio TS: PLGA 0%, 10%, 20%, 30% and 40%, respectively: a) SEM images of platelet adhesion on the surface of each group of coatings; b) statistical results of the number of platelet adhesion; c) statistical results of the number of platelet activation

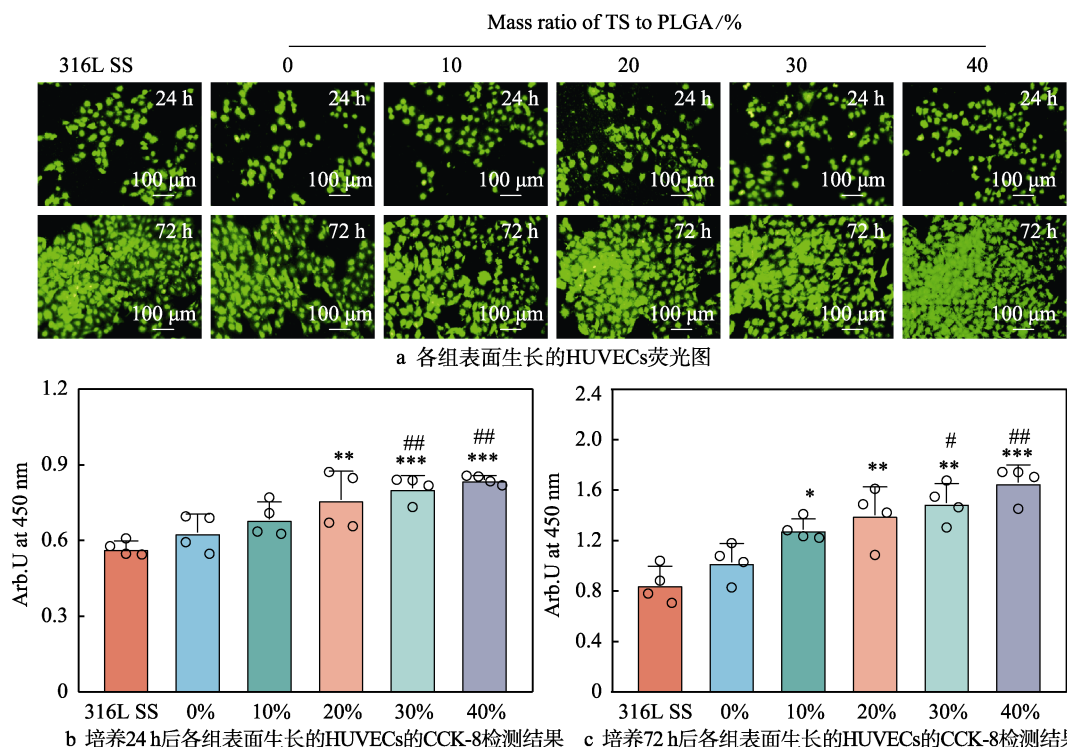


图 7 不同浓度 TS 洗脱涂层 (质量比 TS: PLGA 分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 上 HUVECs 的增殖情况
Fig.7 Proliferation of HUVECs on different TS coatings (mass ratio TS: PLGA of 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, respectively): a) fluorescence images of HUVECs grown on the surface of each group; b) CCK-8 assay results of HUVECs grown on the surface of each group after 24 h incubation; c) CCK-8 assay results of HUVECs grown on the surface of each group after 72 h incubation

达进行了检测,与 PLGA 相比 TS 质量比 10%、20%、30%组显著抑制了 TNF- α 的表达(图 9a)。与 316L SS

或 PLGA 组相比,所有 TS 涂层显著上调巨噬细胞抗炎因子 TGF- β 1 (图 9b) 的表达,说明 TS 对巨噬细

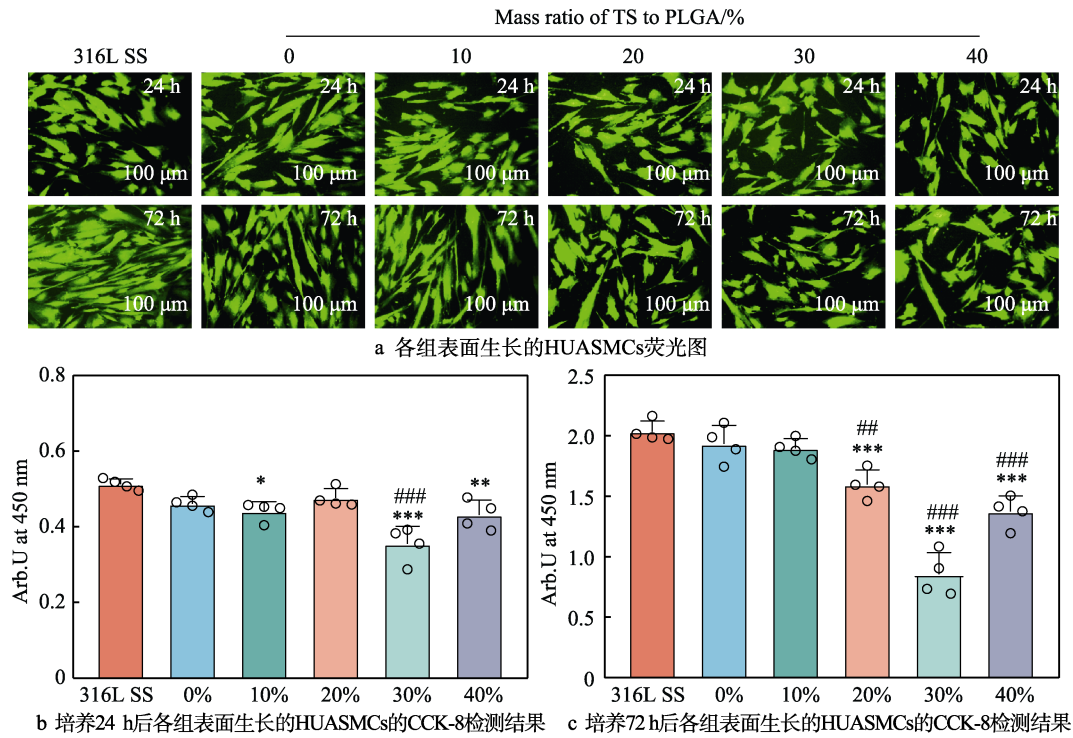


图 8 不同 TS 洗脱涂层 (TS: PLGA 质量比分别为 0%、10%、20%、30%、40%) 上 HUASMCs 的增殖情况
Fig.8 Proliferation of HUASMCs on different TS coatings (mass ratio TS: PLGA of 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, respectively):
a) fluorescence images of HUASMCs grown on the surface of each group; b) CCK-8 assay results of HUASMCs grown on the surface of each group after 24 h incubation; c) CCK-8 assay results of HUASMCs grown on the surface of each group after 72 h incubation

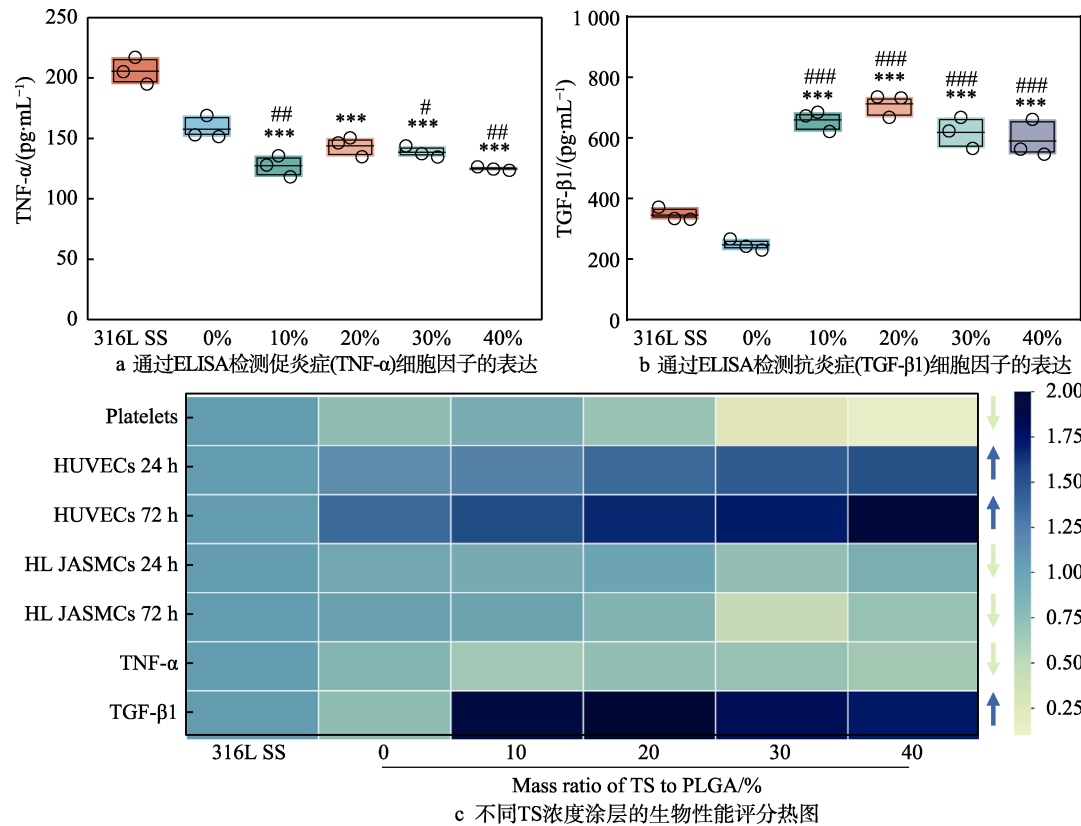


图 9 TS 涂层的抗炎性能以及不同质量比 TS 涂层的生物学性能评分热图
Fig.9 Anti-inflammatory properties of different TS coatings and heat map of the biological performance scores:
a) expression of pro-inflammatory (TNF-α) cytokines; b) expression of anti-inflammatory (TGF-β1) cytokines;
c) heat map of the biological performance scores for different TS concentrations.
Data are exhibited as the mean ±E_{SD} (n=4) and analyzed through a one-way ANOVA

胞的炎症行为具有良好的调控作用。

为了更加直观地筛选出最佳的 TS 质量比,对不同质量比 TS 涂层的不同生物学行为依据实验结果进行评分并做了均一化处理。结果如图 9c 所示,其中 316L SS 为 1,根据 TS 涂层应用需求,“HUVECs 24 h”“HUVECs 72 h”“TGF- β 1”项评分越高越好,“Platelets”“HUASMCs 24 h”“HUASMCs 72 h”“TNF- α ”项评分越低越好。质量比为 30%、40%的 TS 涂层均具有优异的多重生物学功能,符合应用于血管支架表面改性涂层的需求。基于对药物洗脱涂层中高分子载体的降解行为影响最小化的原则,综合该热图评分情况,最终筛选出质量比 30%的 TS 涂层作为最终应用涂层。TS 洗脱涂层体外药物释放曲线以及后续实验均采用 30% (质量比) 进行。

近年来越来越多研究者们认同 AS 疾病实质上是一种炎症性疾病。巨噬细胞能感知到 AS 病变中的各种脂质类别,从而诱发高度特异的转录程序和表型变化^[54-55],成熟为促炎的 M1 表型或抗炎的 M2 表型。调节巨噬细胞表型向 M2 型方向转变可能会有助于减轻斑块部位炎症的发展^[56-58],有利于病变部位的修复和再生。为了探索 TS 涂层对病变部位炎症行为的调节,通过免疫荧光染色来观察 TS 涂层对巨噬细胞 M1 型标志物 CD86 (红色) 和 M2 型标志物 CD206

(绿色)表达的影响。如图 10 所示,316L SS 和 PLGA 组 CD206 的表达都比较弱,而 TS 涂层上巨噬细胞的 CD206 具有较强的表达,并且促炎表型标志物 CD86 的表达较弱,暗示调节巨噬细胞表型转变的行为可能是 TS 涂层的抗炎机制之一。

2.6 半体内血液循环实验

通过半体内血液循环实验进一步评价在血液环境中 TS 涂层的抗血栓形成能力。如图 11a 所示,循环 2 h 后,316L SS 表面形成严重的血栓,而具有 TS 释放的涂层几乎没有血栓 (图 11b); 血栓质量 (图 11c)、堵塞率 (图 11d) 及管腔中血液流速 (图 11e) 的定量结果显示,与 316L SS 和 PLGA 相比,TS 涂层上血栓质量分别从 (30.000 \pm 2.805)、(14.630 \pm 3.172) mg 明显减少至 (1.725 \pm 0.435) mg,样品堵塞率也明显降低,3 组样品管腔中血液流速测定结果则呈上升趋势,TS 组与其他 2 组相比均明显上升。SEM 结果 (图 11f) 进一步揭示了 316L SS 表面形成了典型的血栓,血小板和红细胞被包裹在纤维蛋白网络中,PLGA 样品表面也形成了血栓,而 TS 涂层上几乎没有任何血细胞黏附。以上结果表明,TS 涂层与 316L SS、PLGA 相比具有优异的抗血栓性能。

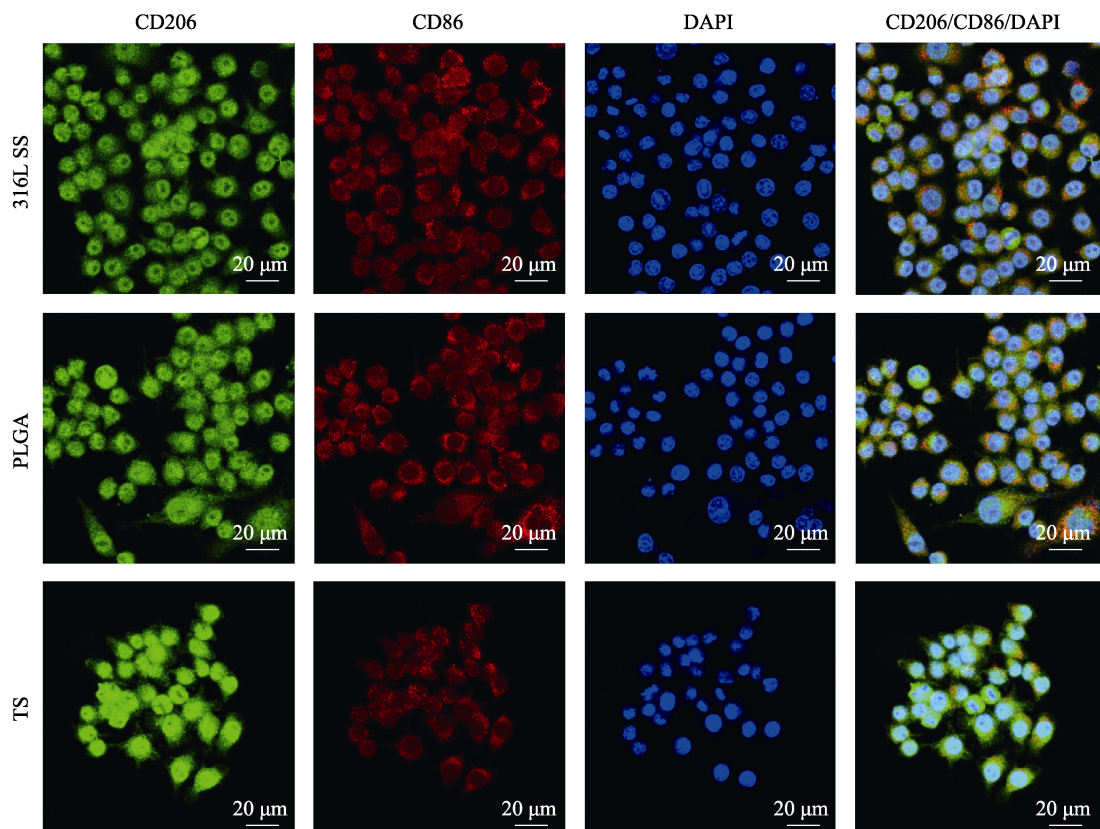


图 10 316L SS、PLGA、TS 涂层上生长的巨噬细胞的 CD206 和 CD86 表达

Fig.10 CD206 and CD86 expression in macrophages cultured on 316L SS, PLGA, TS coatings

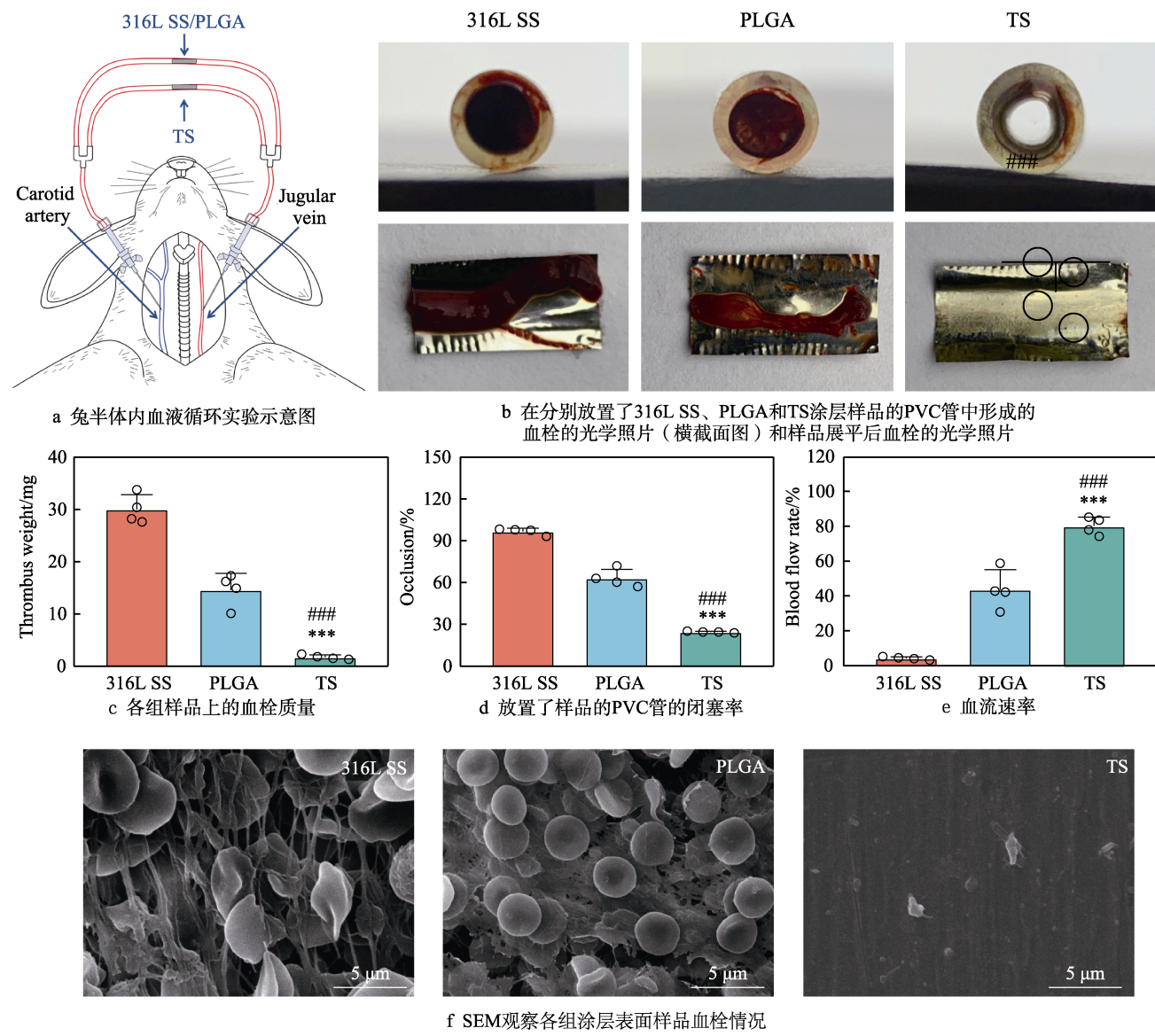


图 11 半体内血液循环实验

Fig.11 *Ex-vivo* blood circulation experiment: a) diagram of rabbit *ex-vivo* blood circulation experiment; b) optical photographs of thrombus formed in PVC tubings installed with 316L SS, PLGA and TS samples (cross-sectional view) and those on flattened samples; c) thrombus weight on the samples; d) occlusion rate of the sample-installed PVC tubings; e) blood flow rate of the sample-installed PVC tubings; f) SEM observation of thrombus on each group of coated surface samples

3 结论

- 1)通过超声雾化喷涂方法制备了一种 TS 药物洗脱支架,且涂层中 TS 药物能够在体外保持至少 28 d 持续释放。
- 2)体外血液相容性实验结果表明,TS 涂层满足生物医用植入材料的溶血率要求;涂层显著抑制血小板的黏附和激活,具有优异的血液相容性。
- 3)体外细胞相容性实验结果表明,TS 质量比 30%、40%的 TS 洗脱涂层能够有效促进 ECs 增殖,抑制 SMCs 增殖,所有质量比 TS 洗脱涂层均具有显著抗炎效果。
- 4)综合体外生物相容性实验结果选择质量比 30% TS 洗脱涂层(TS 与 PLGA)作为最终应用浓度。

5)半体内血液循环实验结果表明,相比于 316L SS 和 PLGA,TS 洗脱涂层具有优异的抗血栓能力。

综上所述,本文制备的 TS 洗脱涂层具有促进 ECs 增殖、抑制平滑肌增殖、抗炎、抗血栓的作用,为心血管病变部位微环境的快速调控及内皮再生修复提供了一个很好的解决方案,有望实现支架表面的快速内皮化,从而缓解血管支架的系列临床并发症。

参考文献:

[1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2020, 76(25): 2982-3021.

- [2] FROSTEGÅRD J. Immunity, Atherosclerosis and Cardiovascular Disease[J]. *BMC Medicine*, 2013, 11: 117.
- [3] LIBBY P. The Changing Landscape of Atherosclerosis[J]. *Nature*, 2021, 592(7855): 524-533.
- [4] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, et al. Atherosclerosis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019, 5: 56.
- [5] 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.
- [6] HOFFMANN R, MINTZ G S, DUSSAILLANT G R, et al. Patterns and Mechanisms of In-Stent Restenosis. a Serial Intravascular Ultrasound Study[J]. *Circulation*, 1996, 94(6): 1247-1254.
- [7] FOIN N, LEE R D, TORII R, et al. Impact of Stent Strut Design in Metallic Stents and Biodegradable Scaffolds[J]. *International Journal of Cardiology*, 2014, 177(3): 800-808.
- [8] COCKERILL I, SEE C W, YOUNG M L, et al. Designing Better Cardiovascular Stent Materials-a Learning Curve[J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(1): 2005361.
- [9] COSTA M A, SIMON D I. Molecular Basis of Restenosis and Drug-Eluting Stents[J]. *Circulation*, 2005, 111(17): 2257-2273.
- [10] BLAGOSKLONNY M V, DARZYNKIEWICZ Z, HALICKA H D, et al. Paclitaxel Induces Primary and Postmitotic G1 Arrest in Human Arterial Smooth Muscle Cells[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(8): 1050-1056.
- [11] OTSUKA F, VORPAHL M, NAKANO M, et al. Pathology of Second-Generation Everolimus-Eluting Stents Versus First-Generation Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents in Humans[J]. *Circulation*, 2014, 129(2): 211-223.
- [12] BRENER S J, KEREIAKES D J, SIMONTON C A, et al. Everolimus-Eluting Stents in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention: Final 3-Year Results of the Clinical Evaluation of the XIENCE V Everolimus Eluting Coronary Stent System in the Treatment of Subjects with de Novo Native Coronary Artery Lesions Trial[J]. *American Heart Journal*, 2013, 166(6): 1035-1042.
- [13] TORII S, JINNOUCHI H, SAKAMOTO A, et al. Drug-Eluting Coronary Stents: Insights from Preclinical and Pathology Studies[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2020, 17(1): 37-51.
- [14] RIDKER P M, MACFADYEN J G, THUREN T, et al. Effect of Interleukin-1 β Inhibition with Canakinumab on Incident Lung Cancer in Patients with Atherosclerosis: Exploratory Results from a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial[J]. *The Lancet*, 2017, 390(10105): 1833-1842.
- [15] RIDKER P M, EVERETT B M, THUREN T, et al. Anti-inflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2017, 377(12): 1119-1131.
- [16] ABBASNEZHAD N, ZIRAK N, CHAMPMARTIN S, et al. An Overview of in Vitro Drug Release Methods for Drug-Eluting Stents[J]. *Polymers*, 2022, 14(13): 2751.
- [17] CHEN Z, XU H. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Mechanism of Tanshinone IIA for Atherosclerosis[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2014, 2014: 267976.
- [18] SHANG Q H, XU H, HUANG L. Tanshinone IIA: A Promising Natural Cardioprotective Agent[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2012, 2012: 716459.
- [19] GAO S, LIU Z P, LI H, et al. Cardiovascular Actions and Therapeutic Potential of Tanshinone IIA[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(1): 3-10.
- [20] ZHU J, CHEN H, GUO J N, et al. Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Inhibits Vascular Endothelial Cell Pyroptosis via the AMPK Signaling Pathway in Atherosclerosis[J]. *Journal of Inflammation Research*, 2022, 15: 6293-6306.
- [21] XUAN Y, GAO Y, HUANG H, et al. Tanshinone IIA Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice Infected with *Porphyromonas Gingivalis*[J]. *Inflammation*, 2017, 40(5): 1631-1642.
- [22] JACOBSEN K, LUND M B, SHIM J, et al. Diverse Cellular Architecture of Atherosclerotic Plaque Derives from Clonal Expansion of a few Medial SMCS[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(19): e95890.
- [23] WANG J Y, HE X Y, CHEN W N, et al. Tanshinone IIA Protects Mice Against Atherosclerotic Injury by Activating the TGF- β /PI3K/Akt/eNOS Pathway[J]. *Coronary Artery Disease*, 2020, 31(4): 385-392.
- [24] WANG B C, GE Z W, CHENG Z Y, et al. Tanshinone IIA Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Inhibiting the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells and the Proliferation and Migration of Macrophages Induced by Ox-LDL[J]. *Biology Open*, 2017, 6(4): 489-495.
- [25] CHEN Z, GAO X, JIAO Y, et al. Tanshinone IIA Exerts Anti-Inflammatory and Immune-Regulating Effects on Vulnerable Atherosclerotic Plaque Partially via the TLR4/MyD88/NF- κ B Signal Pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 850.
- [26] XU J Y, ZHANG C H, SHI X Q, et al. Efficacy and Safety of Sodium Tanshinone IIA Sulfonate Injection on Hypertensive Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1542.
- [27] MAKADIA H K, SIEGEL S J. Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier[J]. *Polymers*, 2011, 3(3): 1377-1397.
- [28] KIRILLOVA A, YEAZEL T R, ASHEGHALI D, et al. Fabrication of Biomedical Scaffolds Using Biodegradable Polymers[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(18): 11238-11304.
- [29] GUNATILLAKE P A, ADHIKARI R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering[J]. *European Cells & Materials*, 2003, 5: 1-16.
- [30] GENTILE P, CHIONO V, CARMAGNOLA I, et al. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(3): 3640-3659.
- [31] JAIN R A. The Manufacturing Techniques of Various Drug Loaded Biodegradable Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) Devices[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(23): 2475-2490.
- [32] BOUISSOU C, ROUSE J J, PRICE R, et al. The Influence of Surfactant on PLGA Microsphere Glass Transition and Water Sorption: Remodeling the Surface Morphology to Attenuate the Burst Release[J]. *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(6): 1295-1305.

- [33] RUHE P Q, HEDBERG E L, PADRON N T, et al. RHBMP-2 Release from Injectable Poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/Calcium-Phosphate Cement Composites[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume, 2003, 85: 75-81.
- [34] RAPIER C E, SHEA K J, LEE A P. Investigating PLGA Microparticle Swelling Behavior Reveals an Interplay of Expansive Intermolecular Forces[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 14512.
- [35] ZHU X X, BRAATZ R D. Modeling and Analysis of Drug-Eluting Stents with Biodegradable PLGA Coating: Consequences on Intravascular Drug Delivery[J]. Journal of Biomechanical Engineering, 2014, 136(11): 1110041-11100410.
- [36] FREDENBERG S, WAHLGREN M, RESLOW M, et al. The Mechanisms of Drug Release in Poly(lactic-co-glycolic acid)-Based Drug Delivery Systems: A Review[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 415(1/2): 34-52.
- [37] ZHU X X, BRAATZ R D. A Mechanistic Model for Drug Release in PLGA Biodegradable Stent Coatings Coupled with Polymer Degradation and Erosion[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2015, 103(7): 2269-2279.
- [38] CHOI J, JANG B N, PARK B J, et al. Effect of Solvent on Drug Release and a Spray-Coated Matrix of a Sirolimus-Eluting Stent Coated with Poly(lactic-co-glycolic acid)[J]. Langmuir, 2014, 30(33): 10098-10106.
- [39] BEDAIR T M, PARK W, PARK B J, et al. Dual-Layer Coated Drug-Eluting Stents with Improved Degradation Morphology and Controlled Drug Release[J]. Macromolecular Research, 2018, 26(7): 641-649.
- [40] LI X J, ZHOU M, LI X H, et al. Effects of Tanshinone IIA on Cytokines and Platelets in Immune Vasculitis and Its Mechanism[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2009, 17(1): 188-192.
- [41] JIANG K Y, RUAN C G, GU Z L, et al. Effects of Tanshinone II-a Sulfonate on Adhesion Molecule Expression of Endothelial Cells and Platelets in Vitro[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao = Acta Pharmacologica Sinica, 1998, 19(1): 47-50.
- [42] LI C Z, YANG S C, ZHAO F D. Effects of Tanshinone II-a Sulfonate on Thrombus Formation, Platelet and Blood Coagulation in Rats and Mice[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao = Acta Pharmacologica Sinica, 1984, 5(1): 39-42.
- [43] MATSUSHITA K, MORRELL C N, CAMBIEN B, et al. Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor[J]. Cell, 2003, 115(2): 139-150.
- [44] WU T W, ZENG L H, FUNG K P, et al. Effect of Sodium Tanshinone IIA Sulfonate in the Rabbit Myocardium and on Human Cardiomyocytes and Vascular Endothelial Cells[J]. Biochemical Pharmacology, 1993, 46(12): 2327-2332.
- [45] CHEN L L, GUO Q H, CHANG Y, et al. Tanshinone IIA Ameliorated Endothelial Dysfunction in Rats with Chronic Intermittent Hypoxia[J]. Cardiovascular Pathology, 2017, 31: 47-53.
- [46] LI X, DU J R, YU Y, et al. Tanshinone IIA Inhibits Smooth Muscle Proliferation and Intimal Hyperplasia in the Rat Carotid Balloon-Injured Model through Inhibition of MAPK Signaling Pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 129(2): 273-279.
- [47] LI X, DU J R, BAI B, et al. Inhibitory Effects and Mechanism of Tanshinone IIA on Proliferation of Rat Aortic Smooth Muscle Cells[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008, 33(17): 2146-2150.
- [48] ZHANG H H, CHEN Y C, LIANG L, et al. Tanshinone II a Inhibits in Vitro Cellular Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cell of Rabbit[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University Medical Science Edition, 2008, 39(2): 188-192.
- [49] PAN Y J, LI X Y, YANG G T. Effect of Tanshinone II a on the Calcineurin Activity in Proliferating Vascular Smooth Muscle Cells of Rats[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2009, 29(2): 133-135.
- [50] JANG S I, JEONG S I, KIM K J, et al. Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza* Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Production of TNF-Alpha, IL-1beta and IL-6 in Activated RAW 264.7 Cells[J]. Planta Medica, 2003, 69(11): 1057-1059.
- [51] CHEN T H, HSU Y T, CHEN C H, et al. Tanshinone IIA from *Salvia Miltiorrhiza* Induces Heme Oxygenase-1 Expression and Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Expression in RAW 264.7 Cells[J]. Mitochondrion, 2007, 7(1/2): 101-105.
- [52] FAN G W, GAO X M, WANG H, et al. The Anti-Inflammatory Activities of Tanshinone IIA, an Active Component of TCM, are Mediated by Estrogen Receptor Activation and Inhibition of iNOS[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 113(3/4/5): 275-280.
- [53] JINNOUCHI H, KURAMITSU S, SHINOZAKI T, et al. Difference of Tissue Characteristics between Early and Late Restenosis after Second-Generation Drug-Eluting Stents Implantation - an Optical Coherence Tomography Study[J]. Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society, 2017, 81(4): 450-457.
- [54] ADAMSON S, LEITINGER N. Phenotypic Modulation of Macrophages in Response to Plaque Lipids[J]. Current Opinion in Lipidology, 2011, 22(5): 335-342.
- [55] LEITINGER N, SCHULMAN I G. Phenotypic Polarization of Macrophages in Atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013, 33(6): 1120-1126.
- [56] KOELWYN G J, CORR E M, ERBAY E, et al. Regulation of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis[J]. Nature Immunology, 2018, 19(6): 526-537.
- [57] BROWN B N, RATNER B D, GOODMAN S B, et al. Macrophage Polarization: An Opportunity for Improved Outcomes in Biomaterials and Regenerative Medicine[J]. Biomaterials, 2012, 33(15): 3792-3802.
- [58] WISSING T B, BONITO V, BOUTEN C V C, et al. Biomaterial-Driven in Situ Cardiovascular Tissue Engineering-a Multi-Disciplinary Perspective[J]. NPJ Regenerative Medicine, 2017, 2: 18.