

酚 - 胺表面化学构建一氧化氮催化涂层

杨潇潇, 熊开琴, 杨志禄*

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, 四川 成都
Email: *zhiluyang1029@swjtu.edu.cn

收稿日期: 2021年3月25日; 录用日期: 2021年4月20日; 发布日期: 2021年4月27日

摘要

一氧化氮(NO)作为内皮功能关联因子, 因其具有多重生物学功能, 被广泛应用于多学科领域。发展先进的表面涂层技术固定NO催化功能分子是构建NO-催化型材料的常用手段。然而, 材料表面实现功能分子的修饰往往涉及到复杂的表面预处理工艺以及功能分子接枝所需的多重步骤和昂贵试剂。因此, 本研究发展“酚-胺”表面化学, 选用具有邻苯二酚结构的酚类化学物质和具有类NO催化活性的分子胱胺(CySA)为涂层制备原材料, 在弱碱性有氧的简单水溶液体系, 基于“酚-胺”化学交联反应, 通过“一步浸涂”法在材料表面构建以双硫键为NO催化活性中心的聚合粘附涂。该涂层通过催化内源性NO供体亚硝基硫醇实现NO持续释放, 从而赋予材料抗凝、抑制平滑肌细胞增殖和促进内皮细胞生长的多重生物学功能。该简单、低成本、绿色的NO-催化型表面涂层方法显示出在血液接触类植入/介入器械表面改性上的广阔应用前景。

关键词

酚-胺化学, 一步浸涂法, 一氧化氮, 表面改性, 生物相容性

Phenol-Amine Surface Chemical for Creating Nitric Oxide-Generating Coatings

Xiaoxiao Yang, Kaiqin Xiong, Zhilu Yang*

Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan
Email: *zhiluyang1029@swjtu.edu.cn

Received: Mar. 25th, 2021; accepted: Apr. 20th, 2021; published: Apr. 27th, 2021

*通讯作者。

Abstract

Nitric oxide (NO), as a correlative factor of endothelial function, has been widely used in multidisciplinary fields due to its multiple biological functions. The development of advanced surface coating technology to immobilize NO catalytic functional molecules is a common means to construct NO-catalytic materials. However, the modification of functional molecules on the surface of materials often involves complex surface pretreatment processes, multiple steps and expensive reagents required for graft of functional molecules. Therefore, this research developed “phenol-amine” surface chemistry, chose phenol with catechol with class NO catalytic activity and the chemical molecules in (CySA) as the coating preparation of raw materials, in weak alkaline aerobic simple aqueous solution system, based on the chemical crosslinking reaction, through the “step dip-coating” method in material surface building with double sulphur keys to NO catalytic activity center of polymer adhesive coating. The coating catalyzes the continuous release of NO through the endogenous nitrite mercaptan of NO donor, thus endowing the material with multiple biological functions of anticoagulation, inhibition of smooth muscle cell proliferation and promotion of endothelial cell growth. This simple, low-cost, green NO-catalyzed surface coating method shows a broad application prospect in the surface modification of blood contact implants/interventional devices.

Keywords

Phenol-Amine Chemistry, One-Step Dip Coating, Nitric Oxide, Surface Modification, Biocompatibility

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

一氧化氮(NO)是在 1980 年提出的内源性血管舒张因子[1] [2], 于内皮细胞生成, 由一氧化氮合酶(NOS)催化氧化 L-精氨酸末端胍基中的氮产生。最近的研究证明信号分子 NO 对于诸如心血管系统稳态、骨代谢、免疫应答、癌症和神经传递等生理学过程起到关键作用[3] [4] [5] [6] [7]。在过去的二十年中, 开发可用于临床治疗可释放、产生和催化 NO 的材料, 受到很大的关注[7] [8] [9] [10]。值得关注的是, NO 在抑制血小板激活和聚集、调节血管 SMCs 增生和血管舒张方面也起到重要的作用。NO 的抗血小板聚集和调节止血的功能促使很多研究者去设计基于 NO 的抗凝表面。例如, Major 等[11]报道了存在 NO 释放的聚合物涂层能显著减小血小板激活和血栓形成。Kushwaha 等[12]发现被释放或催化产生的 NO 不仅能显著减少血小板活化聚集, 而且还能抑制 SMCs 的增生。

然而, NO 以可控、安全和稳定的速率释放或产生是确保其在体内成功应用的关键。目前, 人们大多采用两种方案针对 NO 表面改性, 一种是聚合物装载技术制备 NO 释放型材料, 但这个方法制备的材料在体内的应用面临许多挑战。比如 NO 供体的半衰期较短、NO 释放剂量的不稳定以及 NO 释放时间不够理想等[13] [14] [15]。第二种方案是 NO 催化型材料, 常用的制备方法是通过在材料表面固定有机硒化合物或者具有类谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)催化活性的胱胺等分子, 通过与内源性供体作用催化产生 NO [16] [17]。然而, 现有的方法通常涉及到复杂的基底预处理工艺, 同时也受限于材料的种类和被固定目标

分子与基底结合力[18] [19] [20] [21]。

针对以上问题,我们着力研究开发一种简单且通用的策略制备可控催化 NO 速率的涂层材料。近来, Lee 等人报道了聚多巴胺(PDAM),即基于贻贝仿生化学的粘附策略[22]。其发现 PDAM 可以很好地粘附于各种基底,并且还能提供反应性官能团以固定其他生物分子。正如 Lee 等报道[23],将基底材料浸没到目标分子和儿茶酚胺表面改性剂的混合溶液中,这样简单的一步法就可以调控待改性材料的界面性质。基于共价键合的方法,成功合成了含肝素和多巴胺的复合分子,该衍生物能容易地与聚氨酯基底结合并表现出良好的抗凝血性。Hong 等人还证明 PDAM 能有效降低心血管材料引发的体内细胞毒性作用[24]。这些报道表明 PDAM 涂层在心血管植入器械如:血管支架和人工血管表面改性上具有潜在的应用价值。

我们选用具有邻苯二酚结构的酚类化学物质(如图 1(C), 图 1(D), 图 1(E), 图 1(F)),如没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、没食子酸(GA)、多巴胺(Dopa)和邻苯二酚(Ca)和具有类 GPx 催化活性的化合物 CySA (图 1(A))为反应组分,利用“一步涂层浸涂”法(图 1(B)),通过胺基与不同儿茶酚的酚-胺化学反映在目标改性材料表面沉积具有 NO 催化活性的复合聚合粘附涂层。研究目的主要包括以下几个方面: 1) 对 NO 催化粘附聚合涂层的形成机理进行探索性研究; 2) 研究 NO 催化聚合粘附涂层的 NO 催化活性和持久力; 3) 系统研究 NO 催化聚合粘附涂层与血液、内皮细胞(ECs)和 SMCs 作用机制。

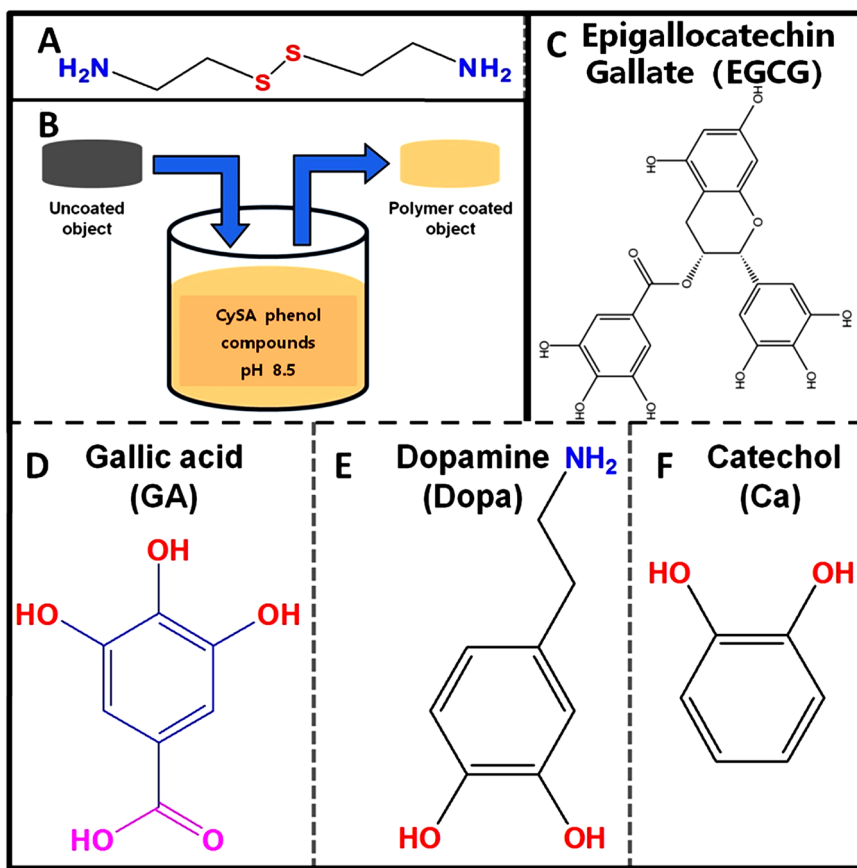


Figure 1. Chemical structure of (A) cysteamine CySA (A), (C) epigallocatechin gallate EGCG, (D) gallate GA, (E) dopamine and catechol Ca (F). Schematic diagram of “one-step dip-coating method” surface modification (B)

图 1. (A) 胱胺 CySA (A), (C) 表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG, (D) 没食子酸 GA, (E) 多巴胺(Dopa)和邻苯二酚 Ca (F) 化学结构。“一步浸涂法”表面改性示意图(B)

2. 实验部分

2.1. 实验材料

Dopa (纯度 $\geq 98.0\%$)、GA (纯度 $\geq 99.0\%$)、Ca (纯度 $\geq 99.0\%$)、EGCG (纯度 $\geq 95.0\%$ ，均购于 Sigma 公司)，CySA (纯度 98.0% ，购于 Aldrich 公司)，CD62p 抗体(GMP-140, Serotec Co.); HRP 抗体(KPL Co.); 乙二胺四乙酸(EDTA); Griess (Sigma-Aldrich);

JY-82 接触角仪购自河北承德仪器厂; 傅里叶红外光谱仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; NO 分析仪购自美国 GE analytical instruments 公司; X-射线光电子能谱仪购自美国 Thermo Electron 公司; 电子显微镜购自日本 Jeol 公司。

2.2. NO 催化涂层的制备

由不同多酚化合物 Dopa/GA/Ca/EGCG 和 CySA 投料摩尔比为 1:1 加入到 Tris 缓冲溶液(1.2 mg/mL)中，尔后将清洗干净并干燥的 316L SS 浸没于上述反应溶液中，每个样品加入 1 mL 上述反应溶液，在室温下沉积 12 小时，然后用蒸馏水超声清洗 NO 催化聚合粘附涂层改性样品，清洗过程重复三次后对样品进行干燥。制备所得的共聚薄膜分别对应标记为 Ca/CySA、Dopa/CySA、EGCG/CySA、GA/CySA。

2.3. 材料学表征

2.3.1. X 射线光电子能谱

采用 XPS 进行涂层化学成分检测。其中，XPS 检测设备型号为 Kratos, Axis Ultra DLD。激发源为 X-ray 单色 Al K- α ($h\nu = 1486.6$ eV)，运行参数为 15 kV 和 150 W，荷电位移校正取 $C(1s) = 284.8$ eV (饱和羟碳原子)，光电子起飞角为 30° 。检测前，待检对照样品 316L SS 采用氩等离子进行表面清洗。

2.3.2. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析

MALDI-TOF MS 检测采用 MALDI 微型 MX 时间飞行质谱仪(Waters, Milford, MA)的反射模式。MALDI 源配置为 337 nm N₂ 激光，运行条件为 4 ns 持续脉冲。使用 N,N-二甲基苯胺(DHB)作为基质，激光脉冲能量为 200 单位(AU)。质谱的检测范围设置 50~4000 m/z 。每组质谱结果取于十次激光束的平均值。每个样品的质谱数据综合十次质谱检测结果。DHB 溶解于 TFA/乙腈(体积比 1:4)以获得的 20 mg/mL 的基质溶液。聚合薄膜直接修饰的 MALDI 靶(不锈钢)用于 MALDI 检测。在检测之前，滴加 1 μ L 基质溶液到经聚合薄膜修饰后的 MALDI 靶表面。

2.3.3. 表面亲水性和形貌分析

采用原子力显微镜(AFM, SPI 3800, NSK Inc., Japan)考察样品的表面形貌和粗糙度。

采用扫描电子显微镜(SEM, Quanta 200, FEI, Holland)对形貌进行观察。

薄膜表面静态接触角采用 Krüss GmbH DSA 100 Mk 2 接触角测定仪进行检测。本文选用极性溶剂双蒸水和非极性溶液二碘甲烷(CH₂I₂, Sigma-Aldrich, Purity $\geq 99.0\%$)进行接触角检测，在常温下，将 5 μ L 的待测液体滴于样品表面，待液滴稳定时，拍取液滴图片，采用 DSA 1.8 软件进行接触角分析。

2.3.4. NO 催化释放

采用 Griess 方法检测不同多酚化合物与脘胺聚合涂层在 60 分钟内的 NO 催化释放速率。将样品浸没于由 0.5 mL 的 Griess(4 mM)与等体积供体(20 μ M SNAP/GSH, 1 mM EDTA)组成的混合溶液中。在预期设定的反应时间内取出样品以终止催化反应。取每个时间点 NO 催化反应的反应液 200 μ L 加入 96 孔板中，静止 15 分钟后用酶标仪于 496 nm 波长下读取吸光度值。同时，选取合适浓度梯度的供体来绘制标准曲

线, 其中选用 HgCl_2 作为催化剂。具体实验步骤如下: 将梯度稀释的 $97.5 \mu\text{L}$ 供体与等体积 Griess 混合加入 96 孔板中, 然后加入 $5 \mu\text{L}$ 的 HgCl_2 进行催化反应(HgCl_2 的催化供体产生 NO 速度极快, 故此用做标准曲线的制定), 反应结束后静止 15 分钟, 然后置于酶标仪中于 496 nm 波长下读取吸光度值。标准曲线所拟合的方程用于 NO 催化速率的计算。

2.4. 生物相容性评价

2.4.1. NO 催化涂层对血小板和 HUASMCs 的影响

新鲜血液由成都血液中心提供。志愿者在献血前两周末服用阿司匹林药物。将采集的血液与柠檬酸钠抗凝剂以体积比 9:1 混合, 12 小时内开展血液实验评价。全血以 1500 转离心 15 分钟获得富血小板血浆 (PRP)。血小板粘附具体实验步骤如下: 每 1 mL PRP 中加入 $10 \mu\text{L}$ 由 S-亚硝基乙酰青霉胺 (SNAP, $10 \mu\text{M}$) 和谷胱甘肽 (GSH, $10 \mu\text{M}$) 组成的供体。此外, 每 1 mL 的 PRP 中加入 $10 \mu\text{L}$ 胶原溶液 ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) 用于诱导血小板激活以模仿支架在体内撑开时损伤血管的环境。每个样品中加入 $500 \mu\text{L}$ 的 PRP 并于 37°C 条件下孵化 30 min。随后样品用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 清洗以去除未牢固粘附的血小板, 随后样品浸泡在 4% 戊二醛中过夜固定。固定后, 样品逐级脱水/脱醇和临界点干燥。最后, 样品喷金于 SEM 下观察拍照。

HUASMCs 生长行为评价选用额外添加供体 ($10 \mu\text{M}$ SNAP/GSH) 和无供体的培养基进行细胞培养。细胞培养时间分别为 2 小时和 24 小时。罗丹明荧光染色法用于细胞形态表征, 细胞增殖检测试剂盒 CCK-8 用于细胞增殖评价。荧光染色法用于细胞形态分析, 选取密度为 $5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ 的 HUASMCs 用于材料表面接种。使用鼠抗人 α -SMA 抗体对材料表面粘附的 HUASMCs 进行免疫荧光染色。具体步骤如下: 将置于含 HUASMCs 的培养基中的样品在分别培养 1 天和 3 天后取出, 用 PBS 充分清洗, 并于 4% 多聚甲醛溶液中固定细胞 1 小时。染色前, 吸去多聚甲醛固定液, 将样品用 PBS 清洗 3 次。随后, 加入牛血清白蛋白 (BSA, 1%) 封闭 30 分钟, 随即用 PBS 充分漂洗。尔后, 再加入鼠抗人 α -SMA 抗体 (1:100), 并于 37°C 下孵育 30 分钟。样品孵育后用 PBS 清洗, 随即再加入 FITC 标记的羊抗鼠免疫球蛋白, 于 37°C 下孵育 30 分钟。最终, 经 PBS 充分清洗后用荧光显微镜进行拍照观察。

使用 CCK-8 试剂盒检测样品表面 HUASMCs 的增殖行为, 材料表面 HUASMCs 的接种密度为 $5 \times 10^4 \text{ cells}/\text{cm}^2$ 。细胞培养 1 天和 3 天后取出样品, 用 PBS 清洗两次, 随后每个样品中分别加入 $350 \mu\text{L}$ 含有 10% CCK-8 试剂的 DMEM-F12 培养基 (含 5% FBS, 无酚红)。标准培养条件 37°C 下孵育 3 小时后, 从每个样品中吸取 $200 \mu\text{L}$ 培养基至 96 孔板, 置于酶标仪中于 450 nm 处读取吸光度值。细胞在样品表面培养时间设定为 2 小时和 24 小时

采用环磷酸鸟苷 cGMP ELISA 试剂盒 (上海沪峰生物科技有限公司, 中国) 定量检测血小板合成的 cGMP 浓度。首先, 将样品浸泡于 PRP 中孵化, 其实验步骤与血小板粘附类似。孵化 30 分钟后, 加入 $100 \mu\text{L}$ 10% triton-X 超声破碎。接着将破碎后的 PRP 混合液在 2500 转下离心, 分离细胞碎片, 吸取上清液用于 cGMP 检测, 其中 cGMP 检测过程参考试剂盒说明。采用 cGMP ELISA 试剂盒定量检测 HUASMCs 合成的 cGMP 浓度。其中, HUASMCs 培养时间为 2 小时。实验方法与血小板合成的 cGMP 浓度检测类似。

2.4.2. NO 催化涂层对 HUVECs 的影响

为了评价 HUVECs 的生长行为, 同样使用添加供体 ($10 \mu\text{M}$ SNAP/GSH) 和无供体的培养基作为对照。实验方法与 HUASMCs 类似。

2.4.3. NO 催化涂层对 SMCs 与 ECs 共培养的影响

HUVECs 与 HUASMCs 共培养用于评价细胞间竞争粘附行为。HUVECs 和 HUASMCs 分别在含有 5

mM Cell Tracker Green CMFDA 和 5 mM Orange CMTMRECs 的 DMEM/F12 培养基(含 15%胎牛血清 FBS) 中孵育 20 分钟; 经 PBS 清洗过后, 用无染料的 DMEM/F12 培养基继续孵育 30 分钟。随后, 采用 0.25% 的胰酶分别对荧光标记的 HUVECs 与 HUASMCs 进行消化, 收集细胞悬液并于 1200 rpm 离心 5 分钟; DMEM/F12 完全培养基重悬细胞, 并分别调整细胞密度至 5×10^4 cells/mL。最后 HUVECs 与 HUASMCs 以 1:1 的种植密度接种到样品表面, 于 5% CO_2 , 37°C 条件下分别培养 2 小时和 24 小时后采用荧光显微镜观察材料表面粘附的细胞并对粘附的细胞进行数量统计分析。

3. 结果分析

3.1. 材料学结果分析

3.1.1. X 射线光电子能谱

XPS 全谱显示, 四种不同多酚所制备的涂层均出现了儿茶酚和 CySA 的特征元素 C、N、O 和 S 峰, 而基底材料 316L SS 的 Fe, Ni, Cr 特征元素消失(图 2), 说明 Ca/CySA、Dopa/CySA、EGCG/CySA 和 GA/CySA 涂层已成功覆盖于基底材料表面。XPS 结果显示, 不同儿茶酚所制备的聚合涂层的 S 含量显示出明显的差异(表 1)。这就表明使用不同种类儿茶酚可调控聚合涂层的 S 含量, 继而调控 NO 催化释放速率。

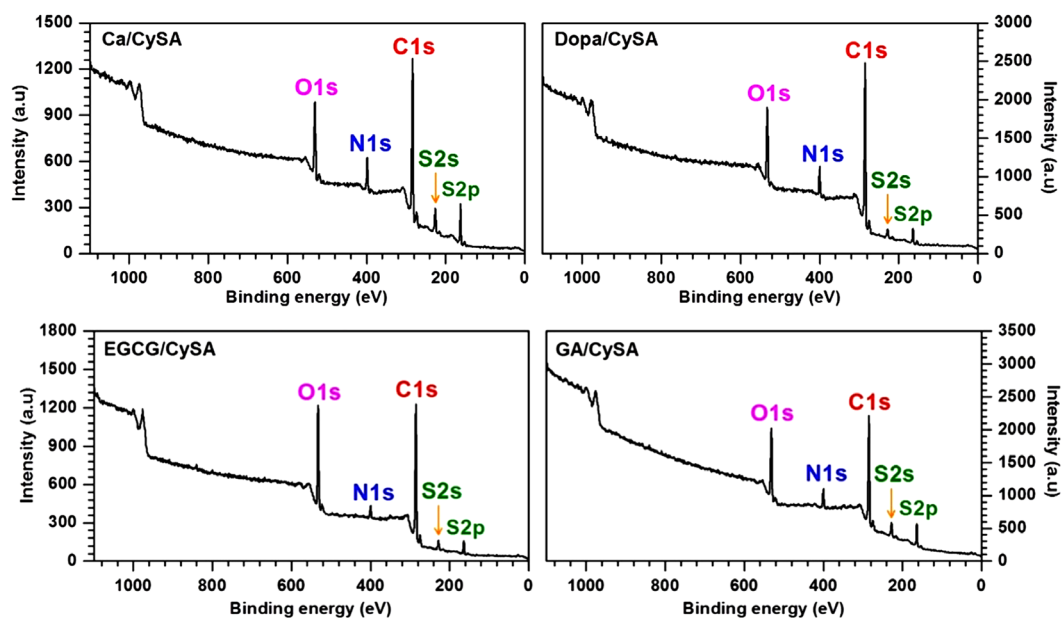


Figure 2. XPS of Ca/CySA, DOPA/CySA, EGCG/CySA and GA/CySA coatings deposited on 316L SS surface

图 2. 316L SS 表面沉积的 Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA 和 GA/CySA 涂层的 XPS

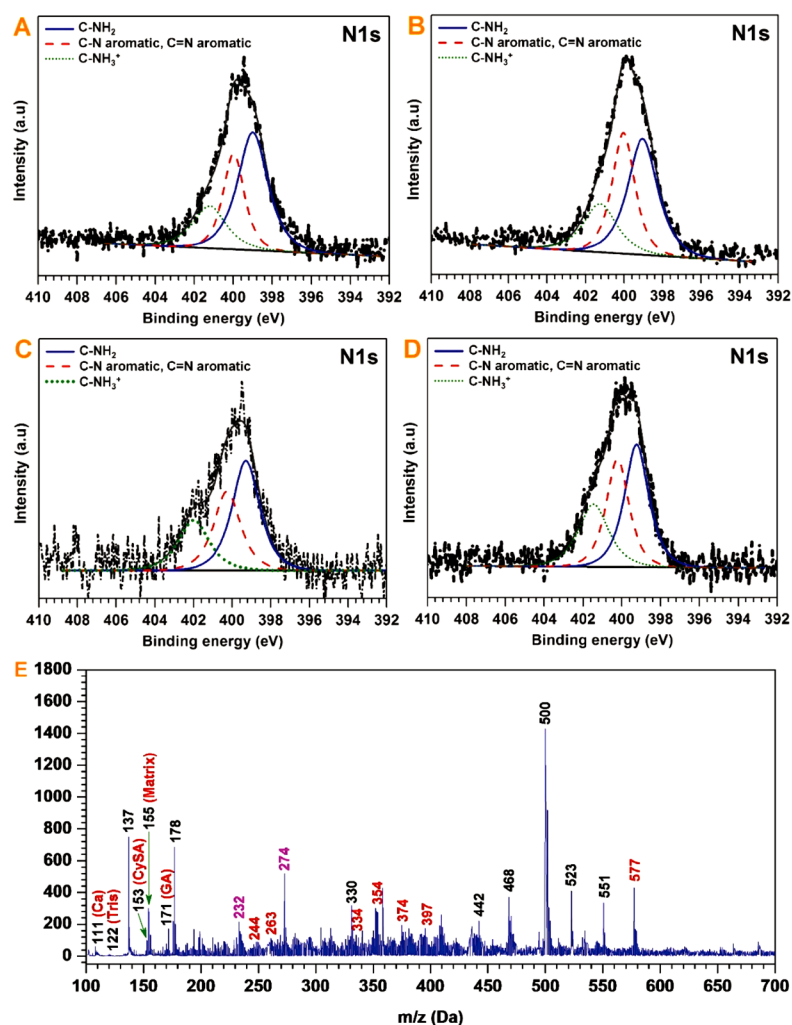
Table 1. Elemental composition of Ca/CySA, DOPA/CySA, EGCG/CySA and Ga/CySA coatings deposited on 316L SS surface

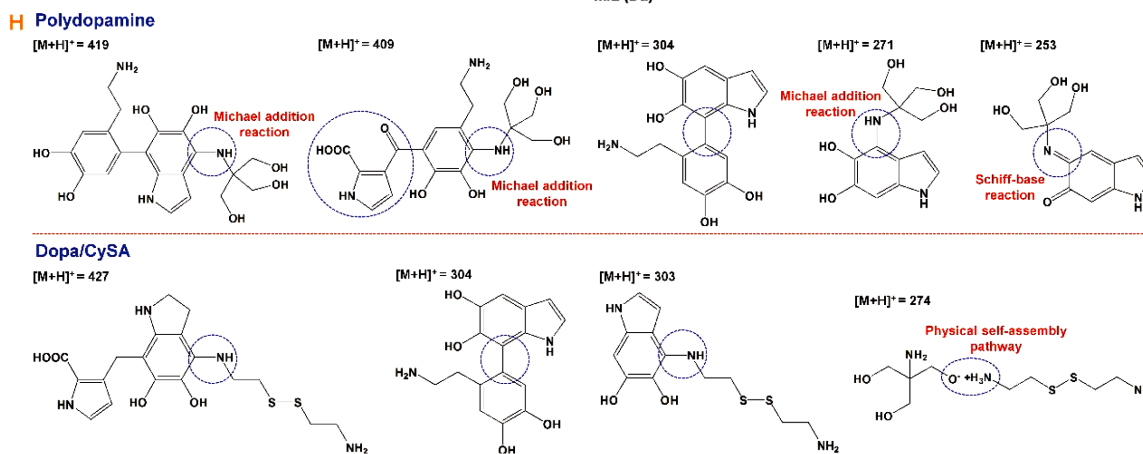
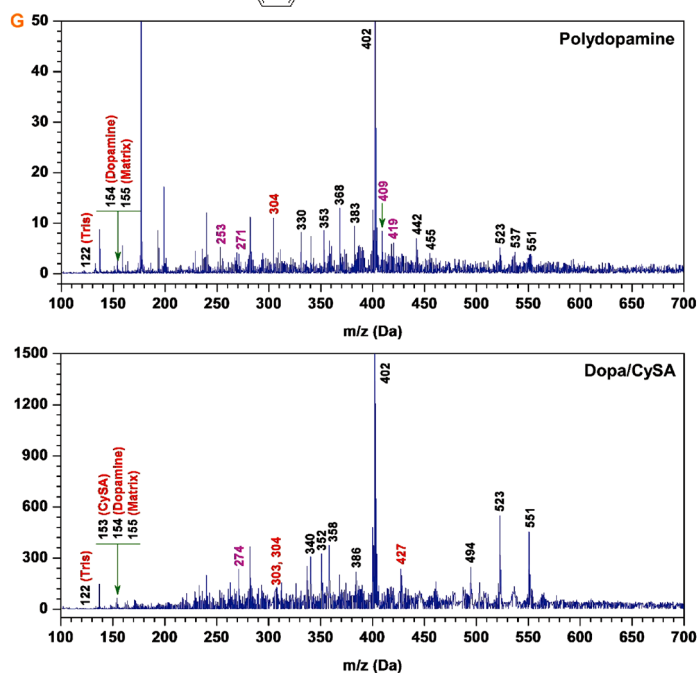
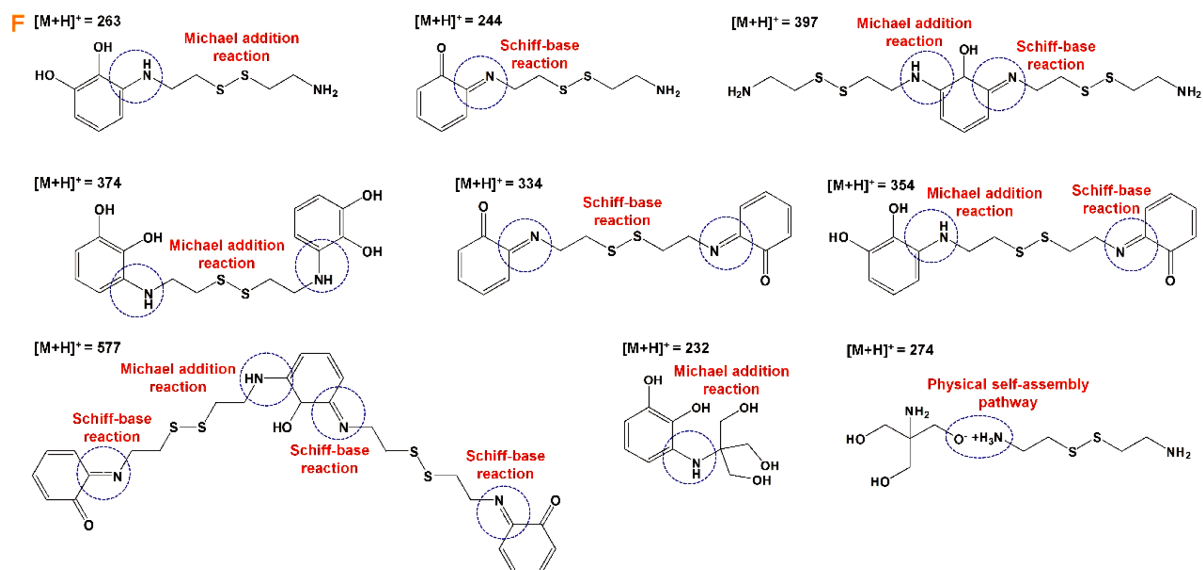
表 1. 316L SS 表面沉积 Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA 和 GA/CySA 涂层元素组成

样品	C (%)	N (%)	O (%)	S (%)	S/N (%)
Ca/CySA	70.6	8.7	13.4	7.3	83.9
Dopa/CySA	74.7	8.4	13.7	3.2	38.1
EGCG/CySA	73.3	4.0	19.5	3.2	80.0
GA/CySA	69.7	7.2	17.3	5.8	80.6

3.1.2. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)分析

MALDI-TOF MS 对不同儿茶酚制备的 NO 催化涂层的聚合机理进行分析研究。首先,对 N1s 高分辨进行拟合分析。结果表明,四种不同儿茶酚制备的 NO 催化聚合涂层的 N1s 拟合峰在 400.5 eV 处出现了儿茶酚和 CySA 分子中均不存在的芳香 C-N 和芳香 C=N(图 3(A))。芳香 C-N 的产生证实了儿茶酚与 CySA 或 Tris 之间发生了迈克尔加成反应,而芳香 C=N 的出现证明了儿茶酚与 CySA 或 Tris 存在西佛碱反应。结合 MALDI-TOF MS 质谱(图 3(E), 图 3(G), 图 3(I))分析,推导出 Ca/CySA、Dopa/CySA 和 EGCG/CySA 涂层形成的可能反应途径(图 3(F), 图 3(H), 图 3(J))。与 GA/CySA 形成的聚合机理类似, Ca/CySA 和 EGCG/CySA 的聚合形成也主要涉及两类反应类型,其中一类是以 Tris 和 CySA 静电作用为主的物理自组装,另外一类是以儿茶酚 Ca 和 EGCG 与 CySA 进行希夫碱和迈克尔加成共价反应(图 3(F), 图 3(J))。由于 PDAM 的形成涉及到较为复杂的氧化聚合方式,因此,在解析 Dopa/CySA 聚合机理之前先对 PDAM 的聚合涂层进行 MALDI-TOF MS 分析。MALDI-TOF MS 质谱分析发现 419、409、271 和 253 m/z 峰位的出现证实了 Tris 参与多巴胺聚合。在多巴胺中加入 CySA 制备共聚涂层 Dopa/CySA 时,我们发现 CySA 的加入削弱了多巴胺的自聚行为。在与多巴胺的聚合反应过程中, CySA 与多巴胺主要以迈克尔加成的方式进行反应(图 3(H))。此外, Dopa/CySA 涂层 N1s 高分辨图谱中 401.7 eV 处出现的 NH_3^+ 强吸收峰以及 MALDI-TOF MS 质谱中的 274 m/z 峰证实了 CySA 与 Tris 以物理自组装的形式参与了聚合(图 3(B))。





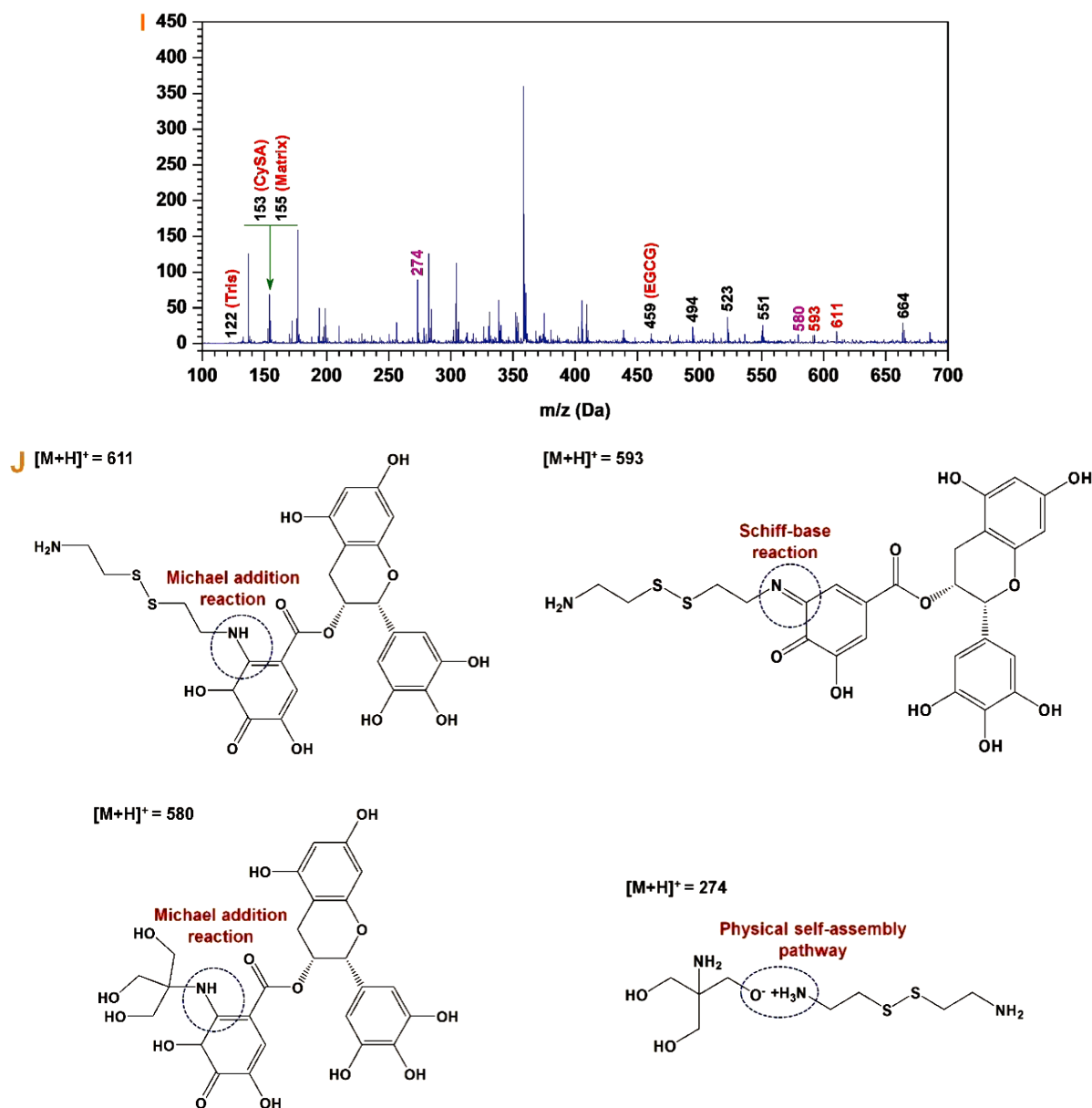


Figure 3. N1s high resolution spectra of (A) Ca/CySA, (B) DOPA/CySA, (C) EGCG/ CySA and (D) Ga/CySA coatings. (E) Analysis of MALDI-TOF MS results for Ca/CySA coatings and (F) possible physical self-assembly and covalent oxidation polymerization pathways involved. (G) MALDI-TOF MS analysis results of DOPA/CySA and control PDAM coatings and (H) possible physical self-assembly and covalent oxidation polymerization pathways involved. (I) MALDI-TOF MS analysis of EGCG/ CySA coatings and (J) possible physical self-assembly and covalent oxidation polymerization pathways involved. The appearance of a new peak at the 401.2 to 401.7 eV binding energy in the N1s high-resolution atlases confirmed the physical self-assembly between $-NH_3^+$ of CySA and O^- of Tris. The presence of aromatic C-N and C=N peaks at 400.5 eV confirmed that the covalent oxidation polymerization method involved in the polymerization process was mainly Schiff base and Michael addition reaction

图 3. (A) Ca/CySA, (B) Dopa/CySA, (C) EGCG/CySA 和 (D) GA/CySA 涂层的 N1s 高分辨谱。(E) Ca/CySA 涂层的 MALDI-TOF MS 结果解析及其 (F) 可能涉及到的物理自组装和共价氧化聚合反应两条途径。(G) Dopa/CySA 和对照 PDAM 涂层的 MALDI-TOF MS 解析结果和 (H) 可能涉及到的物理自组装和共价氧化聚合反应两条途径。(I) EGCG/CySA 涂层的 MALDI-TOF MS 解析结果和 (J) 可能涉及到的物理自组装和共价氧化聚合反应两条途径。而 N1s 高分辨率图谱中 401.2 到 401.7 eV 结合能处新峰出现证实了 CySA 的 $-NH_3^+$ 和 Tris 的 O^- 之间的物理自组装。400.5 eV 处芳香 C-N 和 C=N 峰的出现证实了聚合过程中涉及到的共价氧化聚合方式主要为希夫碱和迈克尔加成反应

3.1.3. 表面亲水性和形貌分析

我们采用 AFM 对涂层的表面形貌和粗糙度进行分析。每个样品表面随机选择 6 个不同 $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ 区域进行检测, 所得形貌图谱用于粗糙度的计算。从图 4(A)中的 AFM 图片可以看出, 经过抛光后的 316L SS 表面相对光滑, 其表面均方根粗糙度(RMS)为 $3.4 \pm 0.2 \text{ nm}$ 。涂层的沉积导致了 316L SS 表面粗糙度的增加, 其涂层的 RMS 范围为 $5.8\sim 10.4 \text{ nm}$, 均远小于血液相容性的限制要求粗糙度的最小值 50 nm 。

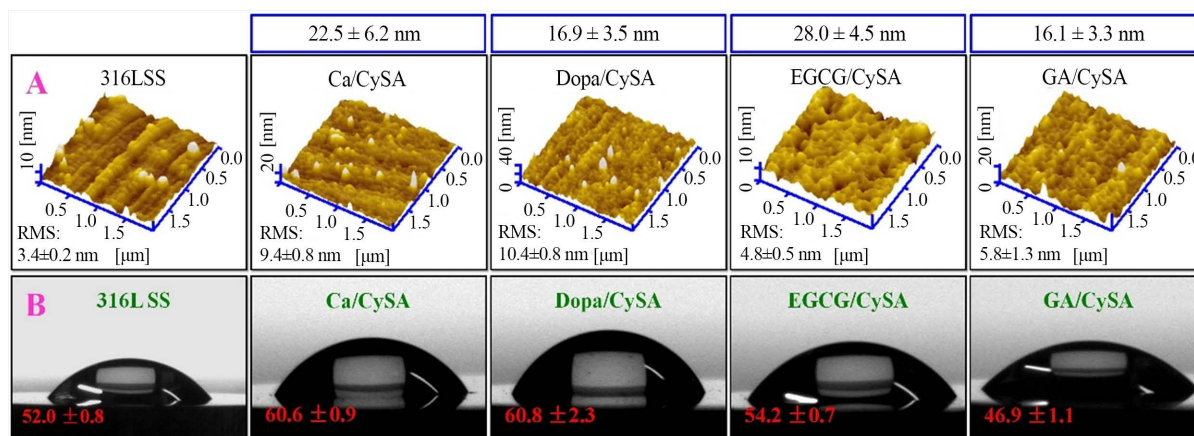


Figure 4. Thickness of Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA and Ga/CySA coatings deposited on 316L SS surface (top), AFM morphology (A) and water contact angle (B)

图 4. 316L SS 表面沉积的 Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA 和 GA/CySA 涂层的厚度(图上方)、AFM 形貌图(A)和水接触角(B)

3.1.4. NO 催化释放

我们制备具有不同 S-S 含量涂层的目的是为了实现 NO 释放速率的调控, 以满足不同临床应用的需求。图 5 的 NO 催化速率评价结果显示, 4 种具有不同 S-S 含量的涂层在 NO 催化释放速率上表现出显著性的差异。NO 催化涂层的催化释放速率均表现出两种 NO 催化释放模式即快模式和慢模式。快模式的发生是由 S-S 直接通过裂解供体产生 NO。而慢模式主要涉及到 S-S 与还原性谷胱甘肽和供体之间的多级反应。在反应进行的前三分钟内, NO 催化速率表现出一级释放模式。3 分钟之后, NO 催化释放速率开始显著下降表现为慢速模式, 其催化速率由 3 分钟的 $1.5 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$ 下降到 60 分钟的 $0.1 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$, 且数值均落在正常药理学范围内($4\sim 0.5 \times 10^{-10} \text{ mol} \times \text{cm}^{-2} \times \text{min}^{-1}$)。而 NO 催化释放速率的逐渐下降是由于反应过程中供体 SNAP 和 GSH 的不断消耗而导致。

3.2. 生物相容性结果分析

3.2.1. NO 催化涂层对血小板和 HUASMCs 的影响

在心血管系统中, NO 的其中一个重大生理作用是通过促进 cGMP 的合成, 在 NO-cGMP 信号通路的介导下发挥着许多重要生理作用如: 抑制血小板激活和聚集和 HUASMCs 增殖等。因此, 我们首先对与 NO 催化涂层作用的血小板以及 HUASMCs 的 cGMP 合成进行评价。如图 6(A)、图 6(B)所示, 四种不同儿茶酚聚合所得的 NO 催化涂层在添加供体条件下与血小板和 SMCs 作用后, 均大幅上调了血小板和 HUASMCs 的 cGMP 合成, 有效地证实了 NO 对 cGMP 的生理效应, 同时间接地证明了涂层的 NO 催化作用。然而, 我们发现四种不同儿茶酚聚合所得的 NO 催化涂层的血小板和 HUASMCs 合成 cGMP 浓度与 NO 释放速率并未显示严格的线性相关性。NO 催化释放速率最大的 Ca/CySA 涂层, 其血小板和 HUASMCs 合成的 cGMP 浓度最低。这可能是由于涂层在 PRP 和培养基环境下与 PBS 环境下催化供体产

生 NO 能力不同导致的。在 PRP 和含 SMCs 的培养基中，涂层表面的血小板和 SMCs 快速粘附导致其 NO 催化位点的掩盖，而不同的涂层表面性质相差较大，其表面快速粘附的血小板和 SMCs 也会有所差异，从而导致涂层表面 NO 催化位点掩盖程度不一，进而导致不同程度的 NO 催化能力的下降。为了研究血小板在 NO 催化涂层表面的粘附行为，我们选择了无供体 SNAP/GSH 添加的 PRP 和额外添加供体 SNAP/GSH 的 PRP 进行血小板培养实验。如图 7 所示，在未添加 SNAP/GSH 的对照组中，NO 催化涂层表面均有大量血小板粘附，且粘附的血小板处于高度激活、聚集状态，大部分血小板伴随内容物在材料表面完全铺展。在添加 SNAP/GSH 组中，316L SS 上的血小板粘附数量和激活程度与未添加 SNAP/GSH 组相比并无显著性改变。然而，添加供体 SNAP/GSH 后，四种 NO 催化涂层均表现出极大的血小板抑制作用，其表面只有少量血小板粘附，且粘附的血小板为典型的静息圆球形态。血小板的粘附实验有力地证实了血小板的 cGMP 合成结果。进一步的，开展了对 SMCs 生长行为的评价。图 8 显示，SMCs 的生长行为表现出与血小板粘附相类似的现象。HUASMCs 在样品表面培养 2 小时后，我们发现，培养基中无论添加供体 SNAP/GSH 与否，316L SS 表面粘附的 HUASMCs 都充分铺展(图 8(A))。与此形成鲜明对比的是，培养基中未添加 SNAP/GSH 时，与 316L SS 表面一样，四种 NO 催化涂层表面粘附了大量铺展的 HUASMCs，而当培养基里添加供体 SNAP/GSH 后，NO 的产生促进了 HUASMCs 的 cGMP 合成(图 6)，进而抑制了 HUASMCs 粘附、铺展(图 8(A))、骨架伸展(图 8(B))和增殖(图 8(C))。

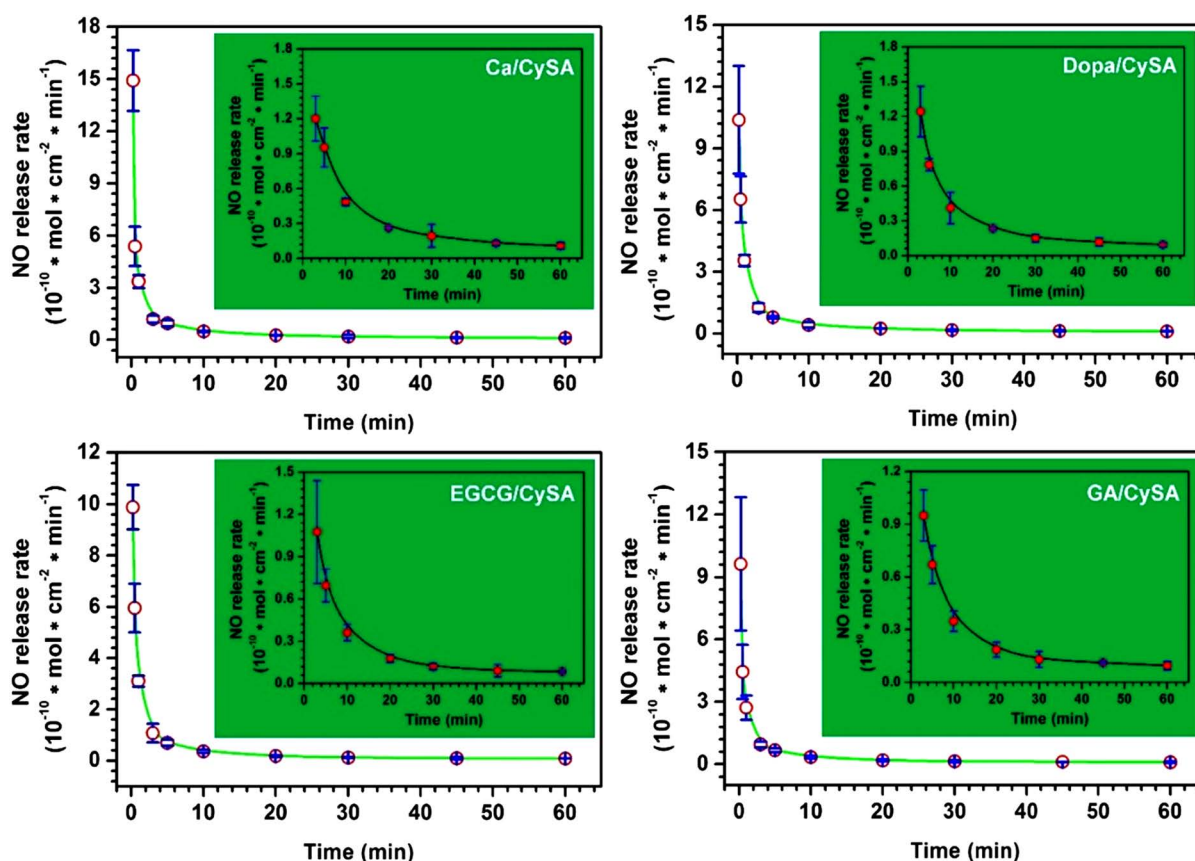


Figure 5. NO catalytic release rates of Ca/CySA, DOPA/CySA, EGCG/ CySA and Ga/CySA (mean \pm standard deviation, $n = 4$; the donor was composed of $10 \mu\text{M}$ SNAP/GSH and $500 \mu\text{M}$ EDTA. The inner illustration is a vertical magnification of a 3~60 minute partial release curve)

图 5. Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA 和 GA/CySA 的 NO 催化释放速率(平均值 \pm 标准差, $n = 4$; 供体由 $10 \mu\text{M}$ SNAP/GSH 和 $500 \mu\text{M}$ EDTA 组成; 内插图为纵坐标放大的 3~60 分钟的部分释放曲线)

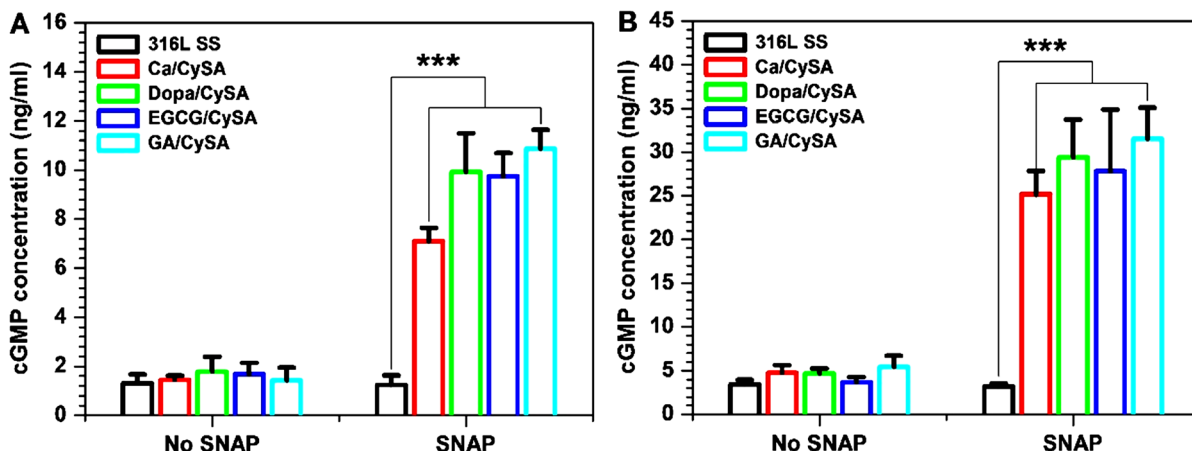


Figure 6. (A) The cGMP concentration of platelets cultured on 316L SS, Ca/CySA, DOPA/CySA, EGCG/ CySA and GA/CySA for 30 min. HuASMCs were cultured on the surface of 316L SS, Ca/CySA, DOPA/CySA, EGCG/CySA and GA/CySA for 2 h at cGMP concentration (Donor composition: 10 μ M SNAP/GSH; Mean \pm standard deviation, n = 4; One-way ANOVA, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

图 6. (A) 血小板在 316L SS, Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA 和 GA/CySA 表面培养 30 分钟的 cGMP 合成浓度。HUASMCs 在 316L SS, Ca/CySA, Dopa/CySA, EGCG/CySA 和 GA/CySA 表面培养 2 小时的 cGMP 合成浓度(供体组成: 10 μ M SNAP/GSH; 平均值 \pm 标准差, n = 4; 单因素方差分析, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

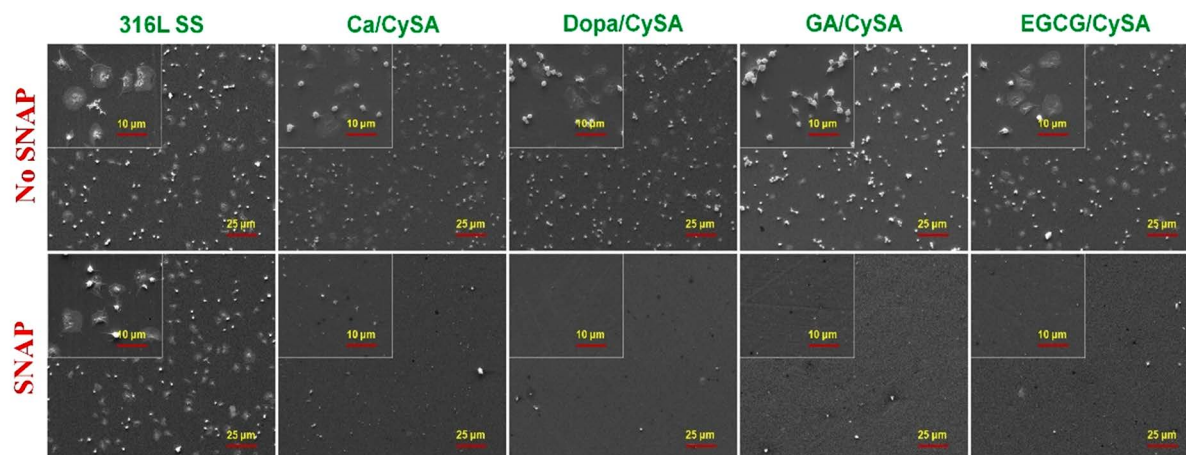
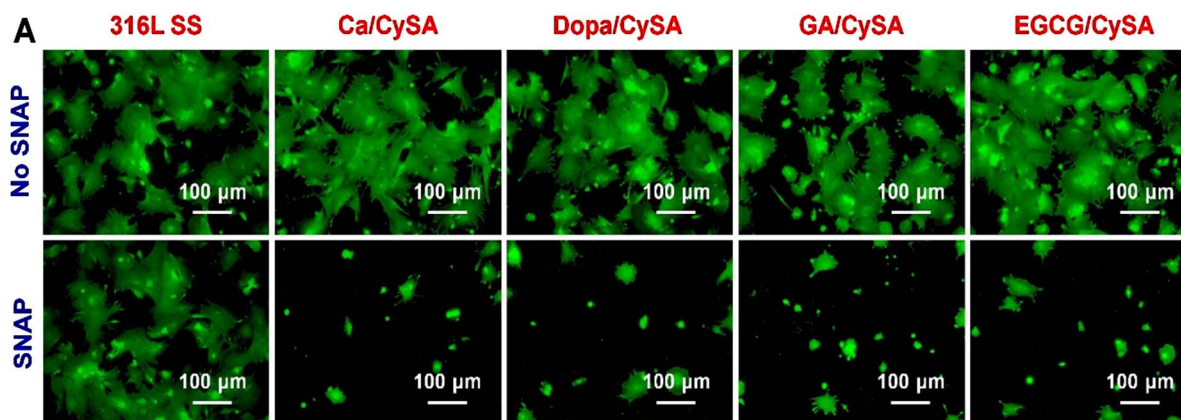


Figure 7. SEM morphology of platelet adhesion on different samples

图 7. 不同样品表面粘附血小板的 SEM 形貌图



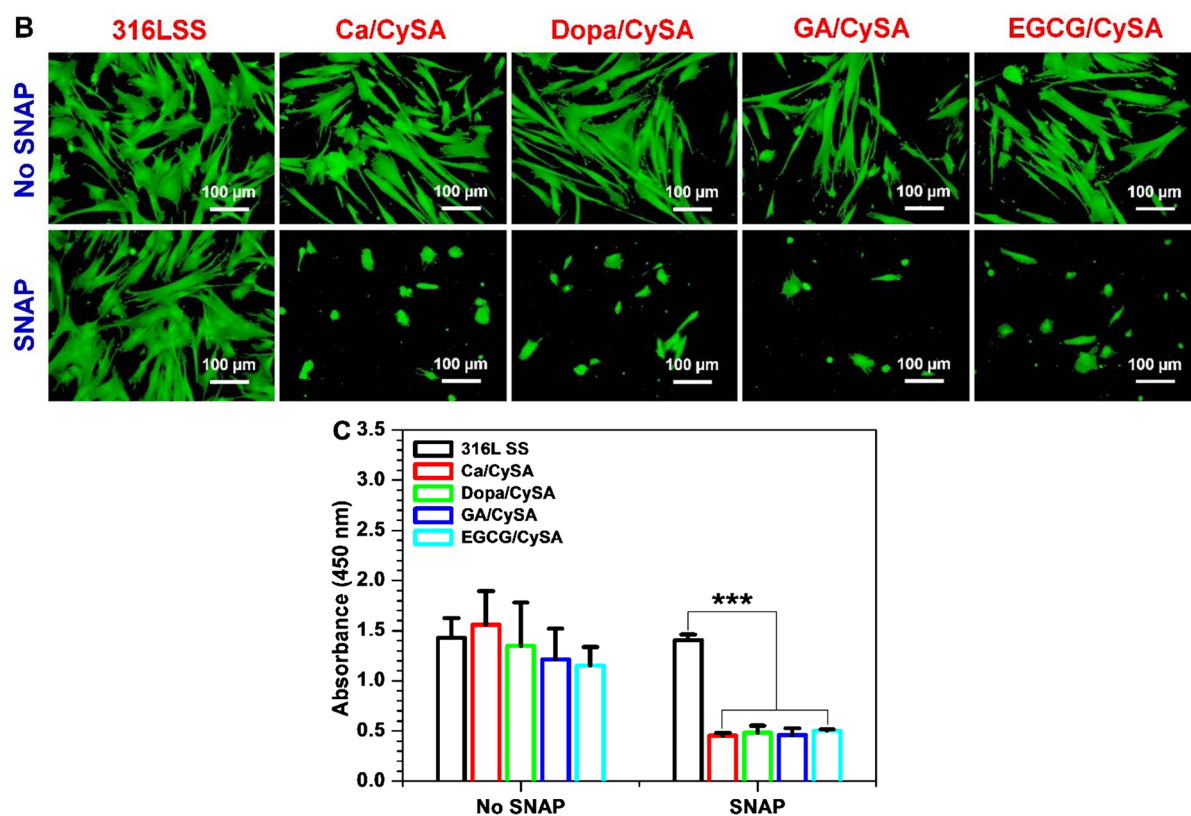


Figure 8. Fluorescence staining of HuASMCs cultured on different samples for 2 h (A) and 1 day (B) and proliferation results for 1 day (C) (Donor composition: 10 μ M SNAP/GSH; Mean \pm standard deviation, $n = 4$; One-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

图 8. HUASMCs 在不同样品表面培养 2 小时(A)、1 天(B)的荧光染色图以及培养 1 天的增殖结果(C) (供体组成: 10 μ M SNAP/GSH; 平均值 \pm 标准差, $n = 4$; 单因素方差分析, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

3.2.2. NO 催化涂层对 HUVECs 的影响

尽管 NO 在心血管疾病治疗中具有许多独特的优势, 但是过量的外源性 NO 引入会导致与超氧化物发生反应, 反应形成的过氧硝酸盐会引起许多副反应, 典型的如细胞毒性。因此, 我们进一步开展了 NO 催化涂层对 EC 生长行为的评价。图 9 为 HUVECs 在 NO 催化涂层表面培养不同时间的粘附和增殖结果。HUVECs 培养 2 小时后的典型荧光染色结果显示(图 9(A)), 培养基在没有添加 SNAP/GSH 条件下, 316L SS 表面粘附的细胞大多呈现圆球形, 而四种涂层表面粘附的细胞大部分呈铺展状态, 这说明 NO 催化涂层表面具有适宜的 HUVECs 粘附和生长微环境。细胞粘附统计结果显示, 四种涂层均显著的促进了细胞的初期粘附(图 9(C))。图 9(D)和图 9(E)中的细胞形态统计结果表明, 四种催化涂层上的单个细胞铺展面积较 316L SS 表面粘附的细胞面积增大了 80%~150%, 细胞短/长轴比值却无显著性差异。当细胞培养基中添加供体 SNAP/GSH 后, 316L SS 表面粘附的细胞生长行为并未发生明显变化。与此不同的是, 培养基中 SNAP/GSH 的添加对 NO 催化涂层上的细胞生长行为造成了显著性的影响。添加 SNAP/GSH 后, NO 催化涂层表面细胞粘附数量显著增加, 细胞铺展面积显著增大。其中 Ca/CySA 和 Dopa/CySA 涂层表面粘附的细胞短/长轴比明显下降, 这意味着其表面具有更强的细胞迁移能力。这些数据表明, NO 催化涂层催化产生的 NO 可有效促进 HUVECs 粘附、铺展和骨架发展, 且有利于细长型 HUVECs 的形成, 进而增强细胞的迁移和增殖能力。为了证实这个推论, 我们进行了长时间的细胞培养实验。如图 9(B)和图 9(F)所示, 在没有添加 SNAP/GSH 的条件下, 与 316L SS 相比, 四种儿茶酚制备的 NO 催化涂层提供了

更有利于细胞生长的微环境，其表面具有更好的细胞粘附和增殖。在添加 SNAP/GSH 后，四种儿茶酚制备的 NO 催化涂层因 NO 的催化释放进一步促进了细胞的增殖。

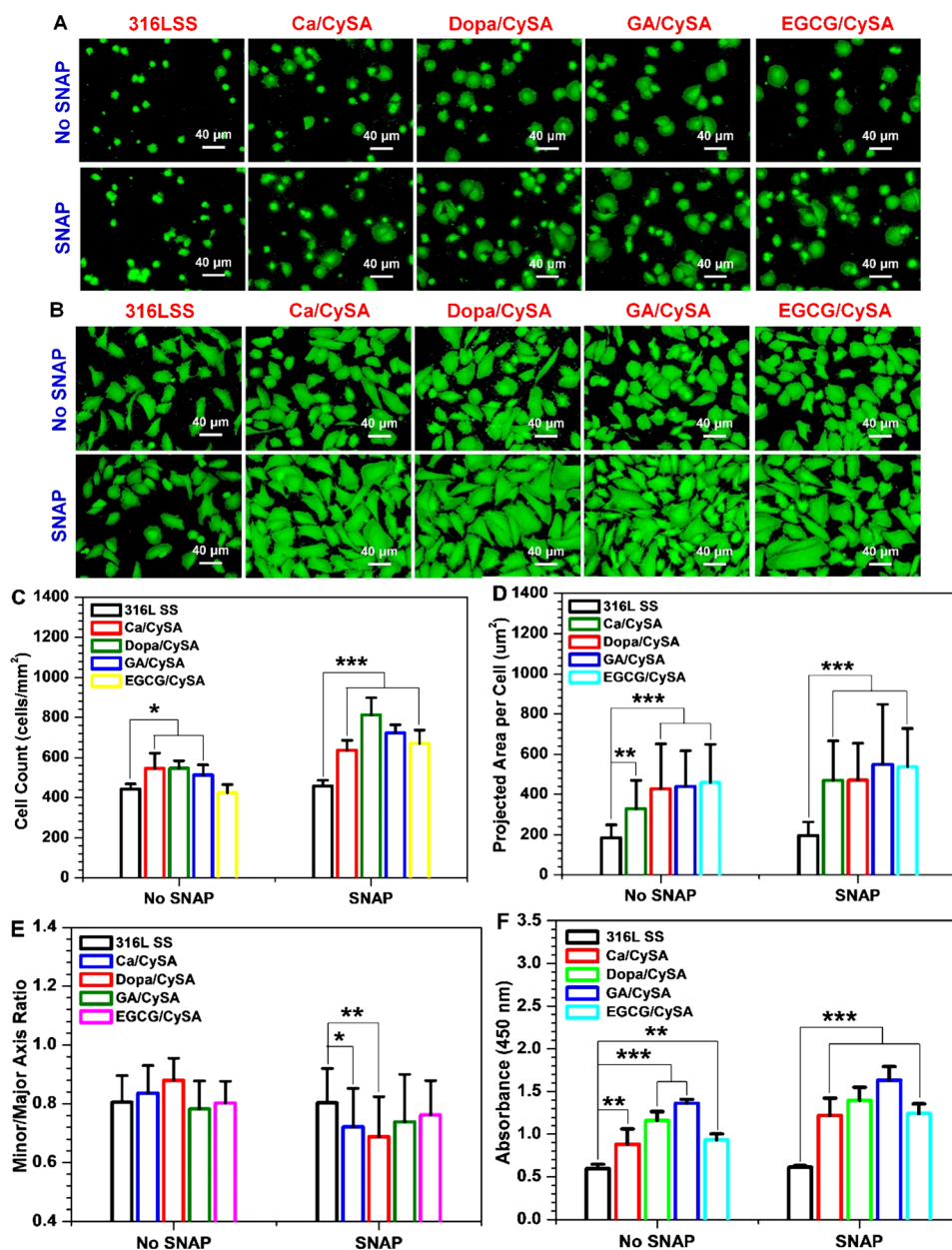


Figure 9. Fluorescence staining images of HUVECs after 2 h (A) and 1 day (B) culture on the surface of 316L SS and 4 different NO catalytic coatings; (C) Statistical results of the number of adherent cells cultured for 2 hours (no less than 12 pictures were used for the number of adherent cells); (D) Single cell spreading area (E) and short/long axis ratio (no less than 12 pictures were used for cell morphological statistical analysis, and the number of cells was greater than 100); (F) HUVEC proliferation results (Donor composition: 10 μM SNAP/GSH; Mean ± standard deviation, n = 4; One-way ANOVA, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

图 9. HUVECs 于 316L SS 和 4 种不同 NO 催化涂层表面培养 2 小时(A)和 1 天(B)后的荧光染色图片; (C) 细胞培养 2 小时的粘附数量统计结果(用于细胞粘附数量统计的图片不少于 12 张); (D) 单个细胞铺展面积(E)和短/长轴比值(用于细胞形态统计学分析的图片不少于 12 张, 且细胞个数大于 100); (F) HUVEC 增殖结果(供体组成: 10 μM SNAP/GSH; 供体组成: 10 μM SNAP/GSH; 平均值 ± 标准差, n = 4; 单因素方差分析, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

3.2.3. NO 催化涂层对 HUASMCs 和 HUVECs 共培养的影响

为了评价 HUVECs 与 HUASMCs 之间的竞争行为, 进一步开展了细胞共培养实验, 用于细胞共培养的 HUVECs 和 HUASMCs 的接种比值为 1。如图 10 所示, 细胞在无 SNAP/GSH 添加的培养基中培养 2 小时后, 316L SS 表面的 HUVECs/HUASMCs 比值为 0.96, 非常接近接种比值 1。而 NO 催化涂层 HUVECs/HUASMCs 比值增加至 1.9~2.1, 这说明 NO 催化涂层表面具有选择性促 HUVECs 粘附和生长能力。当培养基添加 SNAP/GSH 后, 316L SS 表面的 HUVECs 与 HUASMCs 比值为 0.94, 无显著性变化。然而, NO 催化涂层因供体 SNAP/GSH 的添加连续催化释放 NO, 而 NO 的出现进一步增强了对 HUVECs 的选择性, 其表面粘附的 HUVECs 与 HUASMCs 比值提高至 2.4~3.1。其中 GA/CySA 表面粘附的 HUVECs/HUASMCs 比值最高, 为 3.1, 是 316L SS 表面粘附的 HUVECs/HUASMCs 比值的 3.3 倍。这说明 NO 具有选择性调控 HUVECs 和 HUASMCs 生长的生物学功能。

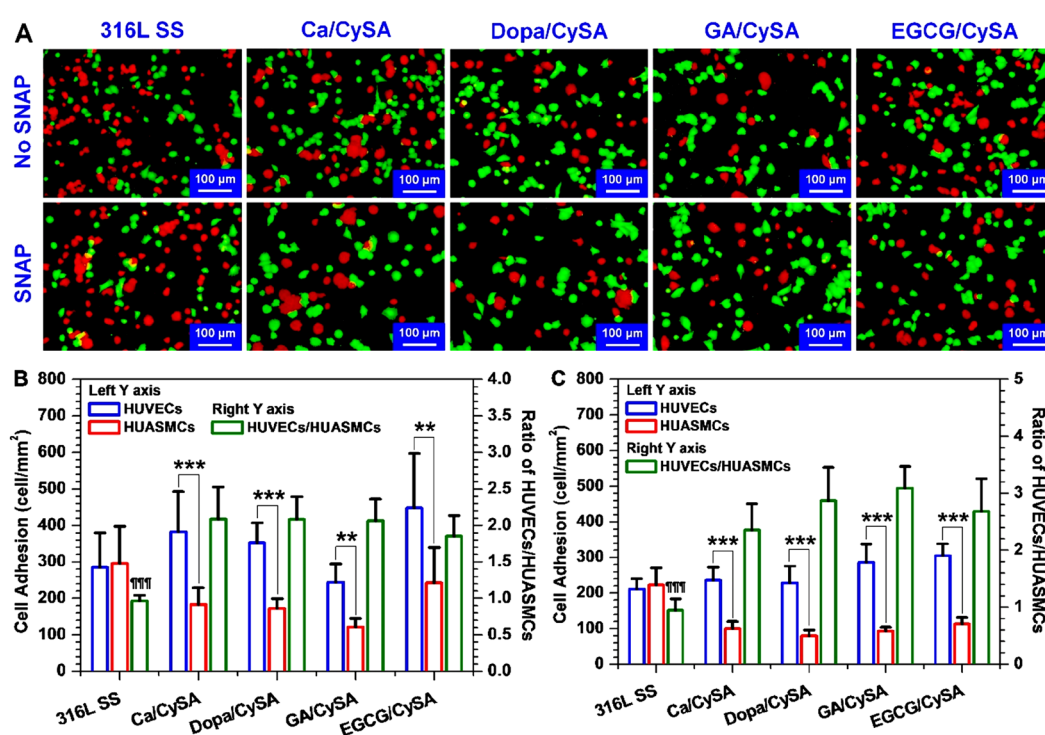


Figure 10. (A) 2 h fluorescence images of HUVECs and HUASMCs co-cultured on 316L SS, Ca/CySA, DOPA/CySA, GA/CySA and EGCG/CySA surfaces (CMFDA-labeled HUVECs in green and CMTMR labeled HUASMCs in red); (B) Statistical results of the amount of cell adhesion on the surface of non-donor group samples; (C) Statistical results of the amount of cell adhesion on the surface of the donor group samples. (Mean \pm standard deviation, $n = 4$; One-way ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

图 10. (A) 316L SS, Ca/CySA, Dopa/CySA, GA/CySA 和 EGCG/CySA 表面 HUVECs 与 HUASMCs 共培养 2 小时的荧光图(CMFDA 标记 HUVECs 为绿色, CMTMR 标记 HUASMCs 为红色); (B) 非供体组样品表面的细胞粘附数量统计结果; (C) 供体组样品表面的细胞粘附数量统计结果。(供体组成: 10 μ M SNAP/GSH; 平均值 \pm 标准差, $n = 4$; 单因素方差分析, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4. 总结

我们发展了一种简单的制备含 CySA 的 NO 催化复合聚合粘附涂层方法。通过脲胺与不同儿茶酚的酚-胺化学反应, 利用“一步涂层浸涂”法成功地在材料表面构建具有一氧化氮(NO)催化活性的复合聚合粘附涂层, 得到可控催化 NO 速率的涂层材料。NO 催化涂层催化产生的 NO 不仅可以显著地抑制胶原

诱导的血小板激活与聚集, HUASMCs 粘附、增殖和迁移, 而且还能有效促进 HUVECs 粘附、增殖和迁移。涂层因具有制备过程简单、高效等特点, 在血液接触类材料表面改性上具有广阔的应用前景。

致 谢

这项工作由四川省青年科技基金——杰出青年资助计划(2016JQ0027)支持。

参考文献

- [1] Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 9265-9268. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- [2] Palmer, R.M., Ferrige, A.G. and Moncada, S. (1987) Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature*, **327**, 524-526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>
- [3] Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R. and Billiar, T.R. (2002) Nitric Oxide and Wound Repair: Role of Cytokines? *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **7**, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S1089-8603\(02\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1089-8603(02)00002-2)
- [4] Napoli, C., de Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Pignalosa, O., Sica, V. and Ignarro, L.J. (2006) Nitric Oxide and Atherosclerosis: An Update. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **15**, 265-279. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2006.03.011>
- [5] Moncada, S. (1999) Nitric Oxide: Discovery and Impact on Clinical Medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **92**, 164-169. <https://doi.org/10.1177/014107689909200402>
- [6] Mocellin, S., Bronte, V. and Nitti, D. (2007) Nitric Oxide, a Double Edged Sword in Cancer Biology: Searching for Therapeutic Opportunities. *Medicinal Research Reviews*, **27**, 317-352. <https://doi.org/10.1002/med.20092>
- [7] Ignarro, L.J., Cirino, G., Casini, A. and Napoli, C. (1999) Nitric Oxide as a Signaling Molecule in the Vascular System: An Overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **34**, 879-886. <https://doi.org/10.1097/00005344-199912000-00016>
- [8] Frost, M.C., Reynolds, M.M. and Meyerhoff, M.E. (2005) Polymers Incorporating Nitric Oxide Releasing/Generating Substances for Improved Biocompatibility of Blood-Contacting Medical Devices. *Biomaterials*, **26**, 1685-1693. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.006>
- [9] Keefer, L.K. (2003) Progress toward Clinical Application of the Nitric Oxide-Releasing Diazeniumdiolates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **43**, 585-607. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135831>
- [10] Yoo, J.W., Acharya, G. and Lee, C.H. (2009) *In Vivo* Evaluation of Vaginal Films for Mucosal Delivery of Nitric Oxide. *Biomaterials*, **30**, 3978-3985. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.004>
- [11] Major, T.C., Brant, D.O., Reynolds, M.S.M., Bartlett, R.H., Meyerhoff, M.E., Handa, H. and Annich, G.M. (2010) The Attenuation of Platelet and Monocyte Activation in a Rabbit Model of Extracorporeal Circulation by a Nitric Oxide Releasing Polymer. *Biomaterials*, **31**, 2736-2745. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.028>
- [12] Kushwaha, M., Anderson, J.M., Bosworth, C.A., Andukuri, A., Minor, W.P., Jr., J.R.L., Anderson, P.G., Brott, B.C. and Jun, H.W. (2010) A Nitric Oxide Releasing, Self Assembled Peptide Amphiphile Matrix That Mimics Native Endothelium for Coating Implantable Cardiovascular Devices. *Biomaterials*, **31**, 1502-1508. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.051>
- [13] Jo, Y.S., van der Vlies, A.J., Gantz, J., Thacher, T.N., Antonijevic, S., Cavadini, S., Demurtas, D., Stergiopoulos, N. and Hubbell, J.A. (2009) Micelles for Delivery of Nitric Oxide. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 14413-14418. <https://doi.org/10.1021/ja905123t>
- [14] Johnson, T.A., Stasko, N.A., Matthews, J.L., Cascio, W.E., Holmuhamedov, E.L., Johnson, C.B. and Schoenfisch, M.H. (2010) Reduced Ischemia/Reperfusion Injury via Glutathione-Initiated Nitric Oxide-Releasing Dendrimers. *Nitric Oxide*, **22**, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2009.11.002>
- [15] Michele, C.J., María, C.S., Robert van, L. and Guillermo, A.A. (2012) Polymer-Based Nitric Oxide Therapies: Recent Insights for Biomedical Applications. *Advanced Functional Materials*, **22**, 239-260. <https://doi.org/10.1002/adfm.201101707>
- [16] Hou, Y., Guo, Z., Li, J. and Wang, P.G. (1996) Seleno Compounds and Glutathione Peroxidase Catalyzed Decomposition of S-Nitrosothiols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **228**, 88-93. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1620>
- [17] Cha, W. and Meyerhoff, M.E. (2007) Catalytic Generation of Nitric Oxide from S-Nitrosothiols Using Immobilized Organoselenium Species. *Biomaterials*, **28**, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.019>
- [18] Naghavi, N., de Mel, A., Alavijeh, O.S., Cousins, B.G. and Seifalian, A.M. (2013) Nitric Oxide Donors for Cardi-

-
- ovascular Implant Applications. *Small*, **9**, 22-35. <https://doi.org/10.1002/sml.201200458>
- [19] Bohl, K.S. and West, J.L. (2000) Nitric Oxide-Generating Polymers Reduce Platelet Adhesion and Smooth Muscle Cell Proliferation. *Biomaterials*, **21**, 2273-2278. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00153-8)
- [20] Major, T.C., Brant, D.O., Burney, C.P., Amoako, K.A., Annich, G.M., Meyerhoff, M.E., *et al.* (2011) The Hemocompatibility of a Nitric Oxide Generating Polymer That Catalyzes S-Nitrosothiol Decomposition in an Extracorporeal Circulation Model. *Biomaterials*, **32**, 5957-5969. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.036>
- [21] Kelm, M. (1999) Nitric Oxide Metabolism and Breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1411**, 273-289. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00020-1)
- [22] Lee, H., Dellatore, S.M., Miller, W.M. and Messersmith, P.B. (2007) Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings. *Science*, **318**, 426-430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>
- [23] Kang, S.M., Hwang, N.S., Yeom, J., Park, S.Y., Messersmith, P.B., Choi, I.S., Langer, R., Anderson, D.G. and Lee, H. (2012) One-Step Multipurpose Surface Functionalization by Adhesive Catecholamine. *Advanced Functional Materials*, **14**, 2949-2955. <https://doi.org/10.1002/adfm.201200177>
- [24] Hong, S., Kim, K.Y., Wook, H.J., Park, S.Y., Lee, K.D., Lee, D.Y. and Lee, H. (2011) Attenuation of the *In Vivo* Toxicity of Biomaterials by Polydopamine Surface Modification. *Nanomedicine*, **6**, 793-801. <https://doi.org/10.2217/nmm.11.76>