

• 基础论著 •

一种新型具有内皮祖细胞捕获能力的冠状动脉支架涂层材料体外血液相容性研究

李倩 蔡丹 刁鸿英 刘建根 张基昌 鲁洋 李莹 宋春莉

【摘要】 目的 研究冠状动脉支架材料表面 RGD 修饰 PEG-PLA-PGL 共聚物涂层体外血液相容性,为该聚合物作为冠状动脉内支架涂层材料的临床应用提供实验依据。方法 以裸钢片、PEG-PLA-PGL 聚合物涂层钢片为对照组,通过体外溶血实验、血小板吸附数量测定、抗凝血时间测定及蛋白吸附评价 RGD 修饰 PEG-PLA-PGL 共聚物(PEG-PLA-PGL/RGD)涂层钢片的体外血液相容性。结果 裸钢片、PEG-PLA-PGL 组、PEG-PLA-PGL/RGD 组三组钢片溶血率均 $<5\%$,无溶血作用;与标本血比较,三组钢片 APTT 均表现出明显差异($P=0.047$ 、 0.044 、 0.036),均能改善标本血抗凝血性能;PEG-PLA-PGL 涂层与裸钢片相比,在各项所测指标中未表现出明显差异;接枝 RGD 后 PEG-PLA-PGL/RGD 涂层在血小板吸附及白蛋白吸附方面优于裸钢片,有统计学差异($P=0.046$ 、 0.043),一定程度上提高了裸钢片的血液相容性。结论 与裸钢片相比,RGD 在聚合物表面的接枝提高了其血液相容性,PEG-PLA-PGL/RGD 有望成为广阔发展前景的 EPC 捕获支架生物活性涂层材料。

【关键词】 冠状动脉支架; PEG-PLA-PGL/RGD; 血液相容性

Blood compatibility of a new type of EPC capture coronary stent coating *in vitro* LI Qian, CAI Dan, DIAO Hong-ying, LIU Jian-gen, ZHANG Ji-chang, LU Yang, LI Ying, SONG Chun-li. Department of Cardiology, the Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China

Corresponding author: SONG Chun-li, Email: songchunli@medmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the blood compatibility of PEG-PLA-PGL/RGD on 316L stainless steel surface *in vitro* so as to provide further experimental reference for its clinical application. **Methods** The blood compatibility was evaluated by hemolysis assay, platelet adhesion experiments, anticoagulant time measurement and protein adsorption test. **Results** The hemolysis rate of each group was less than 5%, which suggested they were all avirulent; APTT remarkable prolonged compared with plasma sample, showed anti-coagulant property of steel in three groups($P=0.047$, 0.044 , 0.036). Compared with bare steel, PEG-PLA-PGL steel had no apparent differences in any tests, meanwhile, PEG-PLA-PGL/RGD steel adsorbed less platelets but larger amount of albumin($P=0.046$, 0.043). **Conclusion** Blood compatibility of PEG-PLA-PGL/RGD steel has been improved compared with PEG-PLA-PGL steel and bare steel. PEG-PLA-PGL/RGD might be a potential appropriate material for coronary stent.

【Key words】 Coronary stent; PEG-PLA-PGL/RGD; Blood compatibility

冠状动脉内支架置入术后发生的支架内再狭窄和支架内血栓形成是目前限制该项治疗手段发展的两大最主要因素^[1]。随着内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)研究的深入,EPC捕获支架诞生,基于其对EPC的捕获作用,可通过促进内皮形成降低支架内再狭窄和血栓形成的发生率^[2]。研究表明精氨酸-甘-天冬氨酸三肽聚合物(RGD)体外可吸附EPC,加速内

皮化^[3-4]。目前最常用的支架材料是316L不锈钢,本实验组在与中国科学院长春应用化学研究所长期合作基础上,在316L不锈钢表面合成生物可降解载体材料聚乙二醇-聚乳酸-聚谷氨酸[pol(ethyleneglycol)-b-poly(-lactide)-b-poly(-l-glutamic acid)]三段聚合物(PEG-PLA-PGL),并通过化合法成功在三段聚合物表面接枝RGD(PEG-PLA-PGL/RGD)。在前期的研究中,已证实PEG-PLA-PGL/RGD及PEG-PLA-PGL具有良好的细胞相容性^[5-6]。除了具备良好的细胞相容性外,冠状动脉支架上与血液直接接触的涂层材料,还应具有良好的血液相容性,因为血栓和支架内再狭窄与支架材料本身的血液相容性亦密切相关。因此,本

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.18.042

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(51103059);吉林省自然科学基金(201115071)

作者单位:130041 长春,吉林大学白求恩第二医院心血管内科

通讯作者:宋春莉,Email:songchunli@medmail.com

文在前期大量研究工作基础上,以裸钢片、PEG-PLA-PGL聚合物涂层钢片为对照组,通过体外溶血、血小板吸附数量测定及蛋白吸附三个实验,评价RGD修饰PEG-PLA-PGL共聚物(PEG-PLA-PGL/RGD)涂层钢片的体外血液相容性,为该材料为新型EPC捕获支架涂层材料的临床应用提供实验依据。

材料和方法

一、材料

316 L 不锈钢钢片,即裸钢片组(购自上海浩程金属有限公司,规格为直径 6 mm,厚度 1 mm,圆形);用强酸性水溶液处理使钢片表面生成活性羟基,以此羟基为初始基团在钢片上引发聚合反应,使钢片接枝聚乙二醇-聚乳酸-聚谷氨酸(PEG-PLA-PGL),即得 PEG-PLA-PGL 组;在钢片上的聚合物中引入-COOH 接口,利用化学耦合接枝 RGD,即得 PEG-PLA-PGL/RGD 组。上述钢片制备过程由中国科学院长春应用化学研究所协助完成。各组钢片经环氧乙烷消毒后,4℃冰箱冷藏备用。健康人抗凝血液(长春市血站提供);氯化钙、无水乙醇、戊二醛等化学试剂均为国产试剂,分析纯;PBS(自行配置,0.067 mol/L, pH 7.4)。酶标仪(Thermo scientific, Multiskan MK3)等。

二、方法

1. 溶血实验^[7]:取新鲜抗凝血 4 ml,加入 5 ml 生理盐水混匀制得稀释血液备用,分为裸钢片组、PEG-PLA-PGL 组、PEG-PLA-PGL/RGD 组及阳性对照组(10 ml 蒸馏水)和阴性对照组(10 ml 生理盐水)。每组加入物质如下:前 3 组分别加入蒸馏水清洗过的裸钢片及 PEG-PLA-PGL 钢片、PEG-PLA-PGL/RGD 钢片及生理盐水 10 ml;阳性对照组加入蒸馏水 10 ml;阴性对照组加入生理盐水 10 ml。将上述组分加至 6 孔板中,各 37℃恒温 60 min,之后分别加入上述制备的稀释血液。再次 37℃恒温 60 min 后将各组液体收集到 2 ml 离心管中以转速 1500 r/min 离心 5 min。取各组中上清液 200 μl,转移至 96 孔板,酶标仪测 545 nm 处吸光度值。溶血率按下式计算:溶血率(%)=(实验组吸光度-阴性对照组吸光度)/(阳性对照组吸光度-阴性对照组吸光度)×100%。

2. 吸附血小板数量计数^[8]:首先制备富血小板血浆(PRP):将新鲜抗凝血以 1200 r/min,离心 10 min,取上清液即得 PRP。将 3 组钢片用 PBS 清洗 3 次,分别置于 48 孔板中,每孔中加入 0.5 ml PRP,37℃恒温培养 30 min。PBS 清洗未吸附的血小板,戊二醛固定,不同体积浓度梯度的乙醇逐级脱水,干燥后瑞氏染色

剂染色,用全自动血细胞分析仪计数钢片上吸附的血小板数量。

3. 抗凝血特性-APTT 检测^[9]:首先制备贫血小板血浆(PPP):将新鲜抗凝血以 3000 r/min,离心 15 min,取上清液即得 PPP。将各组钢片 PBS 清洗后置入 6 孔板中,每孔加入 3 ml PPP,37℃共浴 30 min,以 PPP 为对照,从各孔中取出 2 ml 液体,全自动凝血分析仪检测 APTT(活化部分凝血活酶时间)。

4. 蛋白吸附实验^[7]:采用 BCA 法测定各组钢片吸附人血白蛋白及纤维蛋白量。

三、统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件,实验所得数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验。所有的统计检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 溶血实验:各组离心后上层均为无色清亮液体,下层为红细胞沉淀物,涂片镜检未见红细胞破裂或凝聚。结果见表 1。材料溶血率大小表示材料对红细胞破坏作用强弱,溶血率越高,表明材料表面对红细胞破坏越多。血液相容性合格的材料,一般其溶血率应 < 5%。由表 1 可见,各组钢片溶血率均达标。

表 1 不同材料的溶血率

组别	OD 值($\bar{x} \pm s$)	溶血率(%)
裸钢片组	0.112±0.002	2.9
PEG-PLA-PGL 组	0.105±0.001	0.9
PEG-PLA-PGL/RGD 组	0.107±0.003	1.4
阴性对照组	0.102±0.001	0
阳性对照组	0.450±0.002	100

2. 血小板吸附数量测定:结果见图 1。与裸钢片相比,PEG-PLA-PGL 组吸附血小板数量无明显差异($P > 0.05$);但 PEG-PLA-PGL/RGD 组与裸钢片及 PEG-PLA-PGL 组比较,吸附血小板数量减少,有统计学差异($P = 0.046$ 、 0.033)

3. 抗凝血特性-APTT 测定:结果见图 2。与血浆样本比较,各组 APTT 时间均延长,且统计学分析有显著差异(裸钢片、PEG-PLA-PGL 组、PEG-PLA-PGL/RGD 组 P 值分别为 0.047、0.044、0.036),但各组之间无明显差异($P > 0.05$)。

4. 蛋白吸附实验:结果如表 2 所示。与裸钢片相比,两组涂层钢片吸附白蛋白均增多,有统计学差异(PEG-PLA-PGL 组、PEG-PLA-PGL/RGD 组 P 值分别 0.032、0.043);PEG-PLA-PGL 组与 PEG-PLA-PGL/RGD 组比较无明显差异($P > 0.05$);对于纤维蛋白吸附量,各组两两比较均无明显差异($P > 0.05$)。

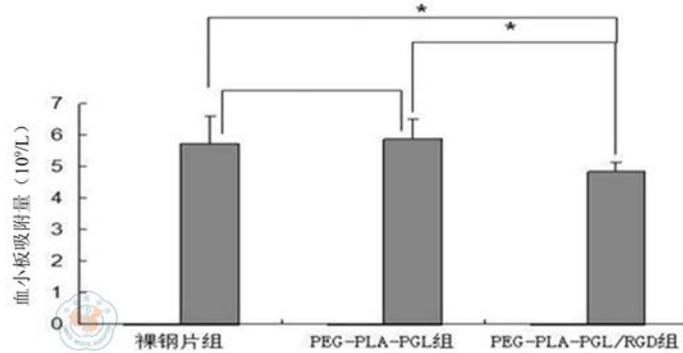


图1 不同材料对血小板吸附数量的测定结果。PEG-PLA-PGL/RGD组与PEG-PLA-PGL组、裸钢片组比较, * $P < 0.05$, PEG-PLA-PGL组与裸钢片组比较, $P > 0.05$

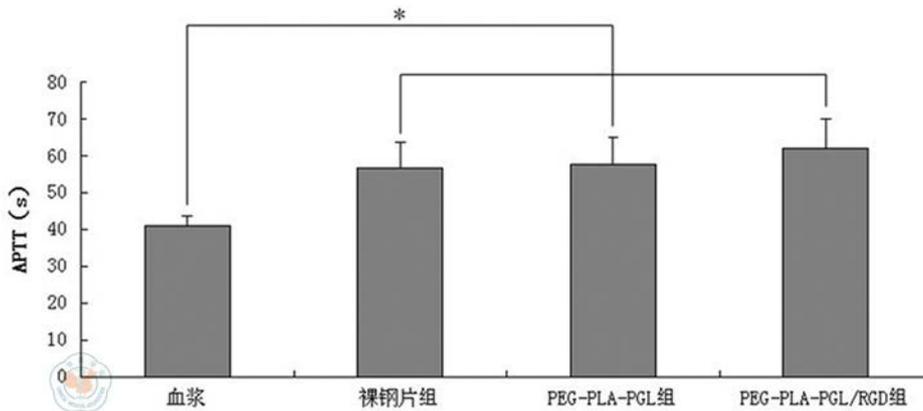


图2 标本血浆和各组材料APTT测定结果。各组与血浆样本比较, * $P < 0.05$

表2 不同材料蛋白吸附结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	白蛋白($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	纤维蛋白($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
裸钢片	17.68 \pm 0.491	2.037 \pm 0.056
PEG-PLA-PGL组	23.59 \pm 1.803 ^a	2.102 \pm 0.073 ^b
PEG-PLA-PGL/RGD组	24.02 \pm 1.790 ^{ac}	1.979 \pm 0.095 ^{bc}

注:与裸钢片相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$;与PEG-PLA-PGL组相比, ^c $P > 0.05$

讨论

以内皮损伤为重要启动因素的支架内再狭窄和血栓形成是限制冠状动脉支架发展的两大因素。支架表面再内皮化对恢复血管正常功能、防止血栓和再狭窄起极其重要的作用;采用不同促内皮化及支架材料表面改进措施,来改善血液相容性是补救内皮损伤最理想的治疗途径^[10]。EPC,可以通过快速内皮化达到再内皮化最终促进受损内膜修复的目的^[11]。新兴的EPC捕获支架也因此成为当今研究的热点。RGD被国内外多项研究证实在体外有捕获EPC的能力^[3-4],有望成为新型EPC捕获支架生物活性涂层材料。作为与血液直接接触的支架涂层材料,必须具有良好的血液相容性。本研究在前期研究基础上进行了对PEG-PLA-PGL/RGD体外血液相容性研究,进一步完善了RGD的实验资料。具有良好血液相容性的支架材料应具备^[8]:(1)无

溶血作用;(2)不激活凝血系统;(3)黏附血小板较少,不激活血小板,不发生血栓;(4)不对其他血液成分产生不利的影响。本实验中三组钢片均有合格的溶血率。支架置入后,血小板在受到凝血酶、胶原等影响下会黏附并活化进一步形成血栓,因此血小板的吸附是评估血液相容性的重要方面^[12]。实验中带有RGD的涂层表现出3个材料组中最好的抗血小板黏附性能。抗凝血性能测试,尤其是APTT通常用于抗凝药物的药效评价。对于支架材料,基本的要求是不应引起促凝效应。实验结果显示各组涂层钢片APTT时间均长于裸钢片,均能改善抗凝血能力。血小板的黏附是形成血栓的基础,其黏附除受凝血酶、补体等影响外,还受材料表面吸附蛋白的影响。研究表明如果材料表面吸附的是纤维蛋白原,则易于使血小板黏附,并释放因子促进凝血;若吸附的是白蛋白,则不易发生血小板的黏附,从而抵制凝血的发生^[13]。与裸钢片比较,RGD的修饰减少材料表面纤维蛋白的吸附,这可能也是PEG-PLA-PGL/RGD具有抗血小板黏附作用且有一定抗凝性能的原因之一。PEG-PLA-PGL本身是亲水性聚合物,RGD又是亲水性很强的分子,增加了材料界面的亲水性,降低表面自由能,表面自由能对血液成分的吸附、变性等有密切联系。此外,RGD表

面带电荷情况及 RGD 修饰后材料表面形貌、粗糙度等的改变也可能是提高血液相容性的原因之一^[14-15], 在接下来的研究中会涉及。总之, 三组钢片均有合格的溶血率, 均能改善标本血抗凝血性能; PEG-PLA-PGL 涂层与裸钢片相比, 在各项所测指标中未表现出明显差异; 接枝 RGD 后 PEG-PLA-PGL/RGD 涂层在血小板吸附及白蛋白吸附方面均优于裸钢片, 一定程度上提高了裸钢片的血液相容性。因此, PEG-PLA-PGL/RGD, 具有对 EPC 捕获能力且有着良好的细胞相容性和血液相容性, 有望成为广阔发展前景的 EPC 捕获支架生物活性涂层材料。

参 考 文 献

- [1] Patel N, Banning AP. Bioabsorbable scaffolds for the treatment of obstructive coronary artery disease: the next revolution in coronary intervention? *Heart*, 2013, 99: 1236-1243.
- [2] 李娜, 李向东, 杨跃进. 内皮祖细胞捕获支架治疗冠心病的研究进展. *中国分子心脏病学杂志*, 2013 (13): 443-446.
- [3] Blindt R, Vogt F, Astafieva I, et al. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47: 1786-1795.
- [4] 宋玉林, 黄华斌, 郑启新, 等. 含 RGD 及 K₁₆肽表面改性的 PLGA-(ASP-PEG)对 BMSCs 黏附及分化的研究. *生物医学工程学杂志*, 2009(6): 1281-1285.
- [5] 宋显晶, 刘斌, 李淑梅, 等. 生物可降解材料聚乙二醇-聚乳酸-聚谷氨酸三嵌段共聚物与人脐静脉内皮细胞的细胞相容性. *吉林大学学报: 医学版*, 2007, 33: 514-517.
- [6] 刘斌, 张基昌, 陈宏勃, 等. 生物可降解冠状动脉支架涂层材料聚乙二醇-聚乳酸-聚谷氨酸共聚物的生物相容性研究. *中国实验诊断学*, 2006, 10: 975-978.
- [7] 薛歆, 范立双, 牛利, 等. 316L 钢表面纳米银镀层的制备、性质及血液相容性. *高等学校化学学报*, 2012, 33: 2289-2294.
- [8] 薛正翔, 陈登龙, 李敏, 等. 静电纺丝制备小直径血管支架及其血液相容性的研究. *功能材料*, 2009, 10: 1716-1719.
- [9] Chen JL, Li QL, Chen JY, et al. Improving blood-compatibility of titanium by coating collagen-heparin multilayers. *Applied Surface Science*, 2009, 255: 6894-6900.
- [10] 崔晓倩, 崔燕, 张基昌. 加速内皮化与支架术后再狭窄防治进展 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6: 1511-1513.
- [11] Padfield GJ, Newby DE, Mills NL. Understanding the role of endo-thelial progenitor cells in percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55: 1553-1565.
- [12] Li QL, Huang N, Chen C, et al. Oriented immobilization of anti-CD34 antibody on titanium surface for self-endothelialization induction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 94A: 1283-1293.
- [13] Sheppard JI, McClung WG, Feuerstein IA. Adherent platelet morphology on adsorbed fibrinogen: Effects of protein incubation time and albumin addition. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1994, 28: 1175-1186.
- [14] Liu S, Liu T, Chen J, 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. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013, 101A: 1144-1157.
- [15] Bae IH, Park IK, Park DS, et al. Thromboresistant and endothelialization effects of dopamine-mediated heparin coating on a stent material surface. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23: 1259-1269.

(收稿日期: 2013-08-28)

(本文编辑: 张岚)

李倩, 蔡丹, 刁鸿英, 等. 一种新型具有内皮祖细胞捕获能力的冠状动脉支架涂层材料体外血液相容性研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7 (18): 8275-8278.

中 华 临 床 医 师 杂 志