基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000794

SDF-1&Fucoidan涂层的抗凝血及促细胞生长研究

张 彦[1],薛国能[2],王 艳[2],赵安莎[2],叶长荣[2],苏 红[2]
(1.成都军区总医院血管内科,成都 610083;2.材料先进技术教育部重点实验室、西南交通大学材料科学与工程学院,成都 610031)

[摘 要]目的:在材料表面构建SDF-1&Fucoidan复合功能涂层,调控内皮祖细胞(endothelia progenitor cells,EPCs)迁移、增殖和分化为内皮细胞(endothelia cells,ECs)参与血管的修复,解决临床植入材料应用中出现的再狭窄和晚期血栓。方法:在材料表面用硅烷试剂[(3-aminopropyl)triethoxysilane,APTE]进行处理,使表面富含氨基官能团,采用碳二亚胺盐酸盐(ethylcarbodiimide hydrochloride,EDC)和琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide,NHS)催化偶联剂共接枝SDF-1和Fucoidan分子。材料学表征复合涂层的接枝结果和性能,细胞生物学实验评价涂层的抗凝性能和细胞的生长。结果:XPS结果表明SDF-1和Fucoidan分子成功被接枝到材料表面;血小板黏附SEM图像和统计数据证明SDF-1&Fucoidan涂层表面的血小板吸附数量明显减少,激活程度较低,且接枝Fucoidan浓度为100 μg/ml时,抗凝效果达到最佳;EPCs培养结果表明SDF-1&Fucoidan涂层浓度在SDF-1为80 ng/ml与Fucoidan为100 μg/ml时,细胞的黏附和生长状态最好。结论:SDF-1&Fucoidan涂层具备优异的抗凝血性以及明显促进EPCs的黏附与增殖。

[关键词]SDF-1;Fucoidan;内皮祖细胞;抗凝血
[中图分类号]R575.2 [文献标志码]A [收稿日期]2015-04-14

Construction of SDF-1&Fucoidan coatings to improve anti-coagulant and promote EPCs proliferation

Zhang Yan[1], Xue Guoneng[2], Wang Yan[2], Zhao Ansha[2], Ye Changrong[2], Su Hong[2]
(1. Department of Cardiology, Chengdu Milltary General Hospital; 2. Key Laboratory for Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Material Science and Engineering, Southwest Jiaotong University)

[Abstract]***Objective*** To construct SDF-1&Fucoidan bio-coatings to reduce restenosis and later thrombosis existing in implants materials application. ***Methods*** The materials surface was firstly treated with APTE solution to form active amino-group, subsequently SDF-1 and Fucoidan were immobilized by a simply co-immobilization with EDC/NHS coupling agent. Various materials characterization and bio-compatibility evaluation were employed. ***Results*** XPS results showed that SDF-1 and Fucoidan have been successfully grafted on materials surface. SEM image and statistics proved that platelet adhesion on SDF-1 & Fucoidan coatings was decreased and the activation was lowed. In particular, the optimal grafted Fucoidan concentration of the complex coating was about 100 μg/ml. Furthermore, endothelial progenitor cells (EPCs) culture experiment revealed the coating would promote EPCs adhesion and proliferation obviously, the optimal concentrations of SDF-1 and Fucoidan were respectively 80 ng/ml and 100 μg/ml. ***Conclusion*** SDF-1 & Fucoidan complex coating displays excellent anti-coagulant, and promotes EPCs cell proliferation.

[Keywords]SDF-1;Fucoidan;endothelial progenitor cells;anti-coagulant

据世卫组织报道,心血管疾病正在成为人类死亡的第一杀手。冠状动脉介入手术成为治疗心血管疾病的首选,成功的减轻了病人的痛苦,降低了心血管病患者的死亡率[1-2]。药物洗脱支架在临床试验中得到了广泛的应用,然而由于表面内皮化的不足,使得晚期血栓的发病率较高[3]。当前构建与的细胞外基质成分相似的仿生涂层避免晚期血栓的发生正成为研究的热点[4-6]。

SDF-1作为细胞趋化因子,能够促进内皮细胞(endothelia cells,ECs)的生长,以及调控外周血和骨

作者介绍:张 彦,Email:354848184@qq.com,
研究方向:生物医用材料表面改性。
通信作者:赵安莎,Email:anshazhao@263.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目 编号:9732011CB606200、81401522、81330031)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20151022.2102.020.html(2015-10-22)

髓中的内皮祖细胞（endothelia progenitor cells，EPCs）增殖、迁移和分化，参与血管的修复[7-10]。Fucoidan 与细胞质基质成分肝素性能相似，具有优异的血液相容性[10-12]，同时能够抑制新生内膜增生，促进血管生成因子的表达[11-13]。因此本研究选取 SDF-1 和 Fucoidan 作为支架表面原位内皮化的生物分子。利用 EDC/NHS 接枝方法制备的涂层具有产物稳定和对蛋白破坏程度低的优点。采用材料学表征、血液相容性分析和细胞学评价对涂层表面性能进行分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SDF-1 购自北京博奥生物技术有限公司，Fucoidan，EDC 和 NHS 催化偶联剂购于 Sigma-Aldrich 有限公司，硅烷试剂 APTE 购自 BD 生物技术有限公司，α-MEM 培养基购自于美国 Hyclone 公司，胎牛血清及胰蛋白酶购自于 Gibco 公司，Rhodamine 购自 Sigma-Aldrich 试剂公司，去离子水 RO 来自于实验室自制，其他试剂均来自于成都市科龙化工厂。

1.2 实验方法

1.2.1 SDF-1&Fucoidan 涂层的制备 制备过程示意图如图 1 所示。首先将 SiO_2 玻片浸入到浓硫酸 H_2SO_4 与双氧水 H_2O_2 体积比 7:3 的溶液中，80 ℃恒温 1 h 激活表面羟基，去离子水超声清洗表面 3 次，每次 5 min 将干燥后的样品浸没到 6% 的 APTE（乙醇配制）溶液中，50 ℃恒温 12 h，无水乙醇清洗 3 遍，每次 5 min，110 ℃恒温 1 h 使得表面的氨基官能团稳定；配制 EDC 和 NHS 溶液浓度分别为 10 mmol/L 和 20 mmol/L，随后用其配制不同浓度的 SDF-1 和 Fucoidan，调节 pH 至 5.4，各自滴加 100 μl 到样品表面，37 ℃条件下反应 4 h，用双蒸水清洗表面 3 次，样品制备完毕。

1.2.2 涂层表面材料性能表征 制备的涂层表面成分采用 XPS 电子光谱（Kratos Ltd.，UK）观察确认涂层的构建成功；涂层表面结构的亲疏水性采用水接触角仪器 DSA100 Mk 2 goniometer 测量（Kruss GmbH，Germany）。

1.2.3 血小板黏附实验 将取得的新鲜的人体血液在 1 500 r/min 速度下离心 15 min，取淡黄色上清液即为富血小板血浆。在制备好的样品表面分别加入 50 μl PRP，在 37 ℃条件下培养 45 min。取出样品用氯化钠溶液清洗 3 次后用 2.5% 的戊二醛固定过夜，用无水乙醇和乙酸异戊酯分别脱水脱醇，最后用 CO_2 临界点干燥样品。用扫描电镜 SEM（Joel Inc. JSM-6700F）观察血小板的黏附数量和形态变化。

1.2.4 EPCs 在样品表面的培养 获得的 EPCs 细胞在含有 15% 牛血清蛋白 FBS 的 αEME 培养基中（37 ℃，5%CO_2，95% 的湿度）培养，每隔 2 d 换 1 次液。制备好无菌样品放入到无菌 24 孔板，将稀释得到的密度为 5×10^4 个/ml，将含有 EPCs 的培养基各自滴加 1 ml 到 24 孔板中分别培养 1、3 d，将细胞生长样品用 NaCl 轻柔的清洗 3 遍后用 2.5% 戊二醛固定过夜，罗丹明染色，干燥样品，用荧光显微镜观察细胞数量和形态。

1.3 统计学处理

每个实验进行 3 次重复实验，每次实验设定 3 组平行样，所有数据采用 SPSS 13.0 软件处理，所得数值均以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组数据之间比较采用单因素方差分析，其两两比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 XPS 实验结果

图 2A 显示了 N 元素的高分辨谱，可以看到经过硅烷化处理后的 SiO_2 表面在 398.9 eV 处出现了氨基官能团，SDF-1 涂层表面 N 元素的峰发生了偏移，在 402.1 eV 处出现了酰胺（-CONH）峰，表明 SDF-1 的羧基官能团和基底的活性氨基发生了反应，证明生物分子 SDF-1 生物分子被成功接枝到材料表面。图 2B 结果表明 Fucoidan 在酸性条件下，在 168.1 eV 处出现了磺酸根基团的峰，表明 Fucoidan 能够与蛋白抗体质子化的氨基发生反应。

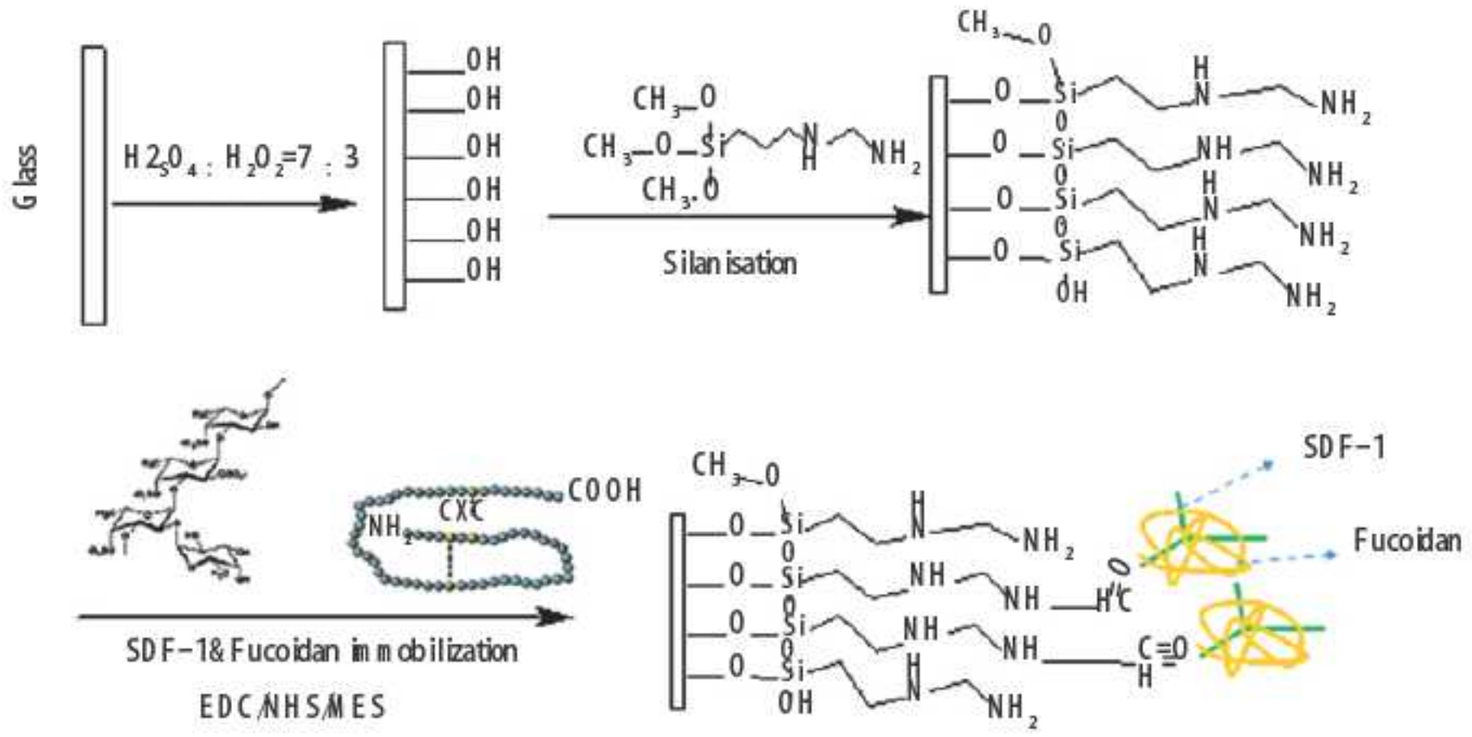
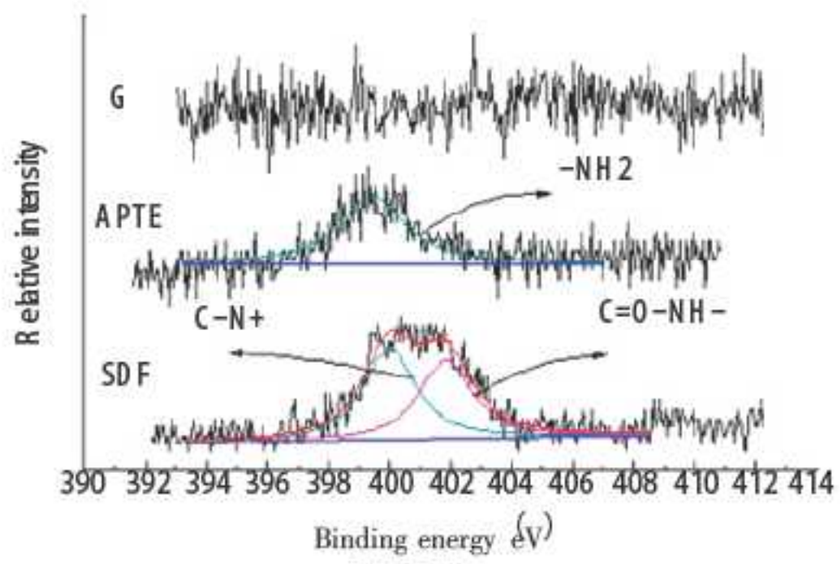


图 1 SDF-1&Fucoidan 生物涂层制备过程示意图

Fig.1 Schematic of constructing SDF-1&Fucoidan bio-coating



G、A、S、F 分别代表 glass、APTE、SDF-1 和 Fucoidan，SDF-1 的浓度单位为 ng/ml，Fucoidan 浓度单位为 g/ml

图 2　不同改性样品表面的高分辨谱

Fig.2　XPS high-solution of different modified sample surfaces

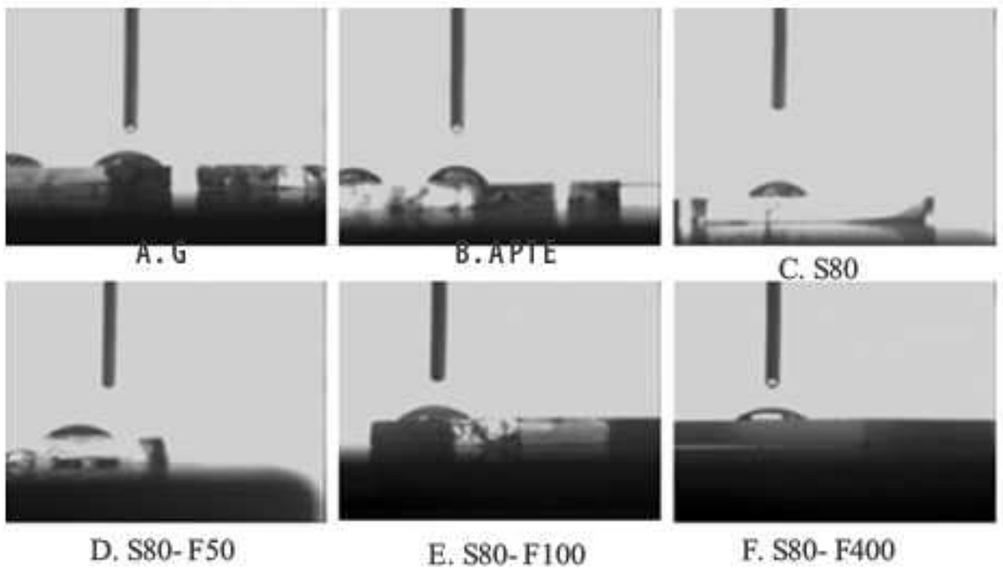


图 3　不同改性样品的水接触角测量图

Fig.3　Water contact angle image of different modified surface samples

2.2　接触角测量

水接触角测量图如图 3 所示，可知经过 APTE 处理后，水接触角显著增加，APTE 改性表面的疏水性增强。接枝 SDF-1 与材料表面后，引入了亲水集团氨基和羧基，但由于 SDF-1 羧基与表面的氨基发生反应，使得表面亲水性增加少许，同时对水接触角进行统计学分析（表 1），实验数据具有统计学意义（F=476.900，P=0.000），可知 SDF 涂层相对于 APTE 涂层亲水性增强（P=0.031）。SDF-1&Fucoida 涂层表面的接触角明显降低，亲水性显著增强；当接枝 Fucoidan 浓度为 50 μg/ml 亲水性增加明显（P=0.000），达到 100 μg/ml 时，接触角变化不是太大（P=0.024），然而当 SDF-1 & Fucoidan 涂层浓度大于 100 μg/ml 时，接触角几乎没变，可能是涂层表面可能已经被亲水的 Fucoidan 完全覆盖。因此构建 SDF-1 & Fucoidan 具有高亲水性，有助于提高 EPCs 细胞和生长因子的黏附。

表 1　不同改性样品表面水接触角比较分析（$\bar{x}\pm s$）

Tab.1　Comparison of water contact angles of different modified sample surfaces（$\bar{x}\pm s$）

样品	水接触角
G	45.460± 0.921
APTE	57.600± 1.212[a]
S80	54.812± 1.810
S80-F50	39.501± 2.143[b]
S80-F100	34.691± 1.650[c]
S80-F400	33.422± 1.571
F 值	476.900
P 值	0.000

注：a，与 S80 样品比较 P=0.031；b，与 S80 样品比较 P=0.000；c，与 S80-F50 样品比较 P=0.024

2.3　血小板黏附实验结果

良好的血液相容性对于血管植入材料十分关键。据图 4 扫描电镜图像可以看到空白样品和经过硅烷处理的表面极易吸附血小板，且血小板激活程度较大，意味着材料表面血液相容性较低；SDF-1 涂层表面血小板吸附数量相对硅烷化表面明显减少，且激活程度较低。然而在材料表面共接枝 SDF-1 和 Fucoidan 复合涂层血小板黏附数量急剧减少，激活程度较低，证明复合具有极好的抗凝血性能。为了比较分析不同浓度 Fucoidan 的血小板黏附结果，对血小板黏附数量进行了计数（表 2），方差分析具有明显的统计学差异（F=109.800，P=0.000），结果表明在材料表面共接枝 Fucoidan 的浓度为 100 μg/ml 时，相对于接枝浓度为 50 μg/ml 的样品，血小板吸附数量减少约 50%（P=0.031），然而在接枝浓度达到 400 μg/ml 时，血小板黏附数量开始明显增加（P=0.008），因此本文认为复合涂层 SDF-1&Fucoidan 在接枝 Fucoidan 为 100 μg/ml 时抗凝效果最好，能够提高涂层表面的血液相容性。

表 2　不同 Fucoidan 浓度接枝表面吸附的血小板数量比较（$\bar{x}\pm s$，1000）

Tab.2　Comparison of platelet number of different Fucoidan concentration samples（$\bar{x}\pm s$，1000）

样品	水接触角血小板数量
S80-F50	17.000 ± 1.512[a]
S80-F100	7.636± 1.532
S80-F400	25.333± 2.081[b]
F 值	109.800
P 值	0.000

注：a，与 Fucoidan 浓度 100 g/ml 比较 P=0.031；b，与 Fucoidan 浓度 100 g/ml 比较 P=0.008

2.4 EPCs 细胞的黏附与增生实验

细胞学评价是涂层性能评价的关键指标，具有促进和提高 EPCs 增殖与黏附的功能涂层是加速内皮层形成的重要举措，本文主要进行了 EPCs 细胞 1、3 d 的培养结果分析。

1 d 的 EPC 培养实验结果如图 5 所示，从中可以看出 SDF-1 涂层表面 EPCs 生长状况良好，细胞数量较多，细胞呈鹅卵石的铺展形态，并且在 SDF-1 浓度为 80 ng/ml 时细胞数量最多，细胞活性较好；在 SDF-1 涂层表面引入 Fucoidan 后，SDF-1&Fucoidan 复合涂层表面的细胞增殖与黏附数量增幅明显，细胞活性最好，表明接枝在 SDF-1 涂层表面引入 Fucoidan 有利于细胞的黏附与增生。据 3 d 的 EPCs 培养结果（图 6B）表明，APTE 改性样品表面几乎没有 EPCs 生长，APTE 对于细胞生长具有毒性；SDF-1 改性涂层表面细胞数量显著增加，且在浓度 80 ng/ml 时，细胞数量最多；同时在 SDF-1 & Fucoidan 复合涂层表面接枝 Fucoidan 浓度为 100 μg/ml 时，细胞的增殖数量和生长形态最好。综上所述，在材料表面接枝 SDF-1 浓度为 80 ng/ml 的 SDF-1 以及 Fucoidan 浓度为 100 μg/ml 时，能够同时促进内皮祖细胞生长和黏附的目的。

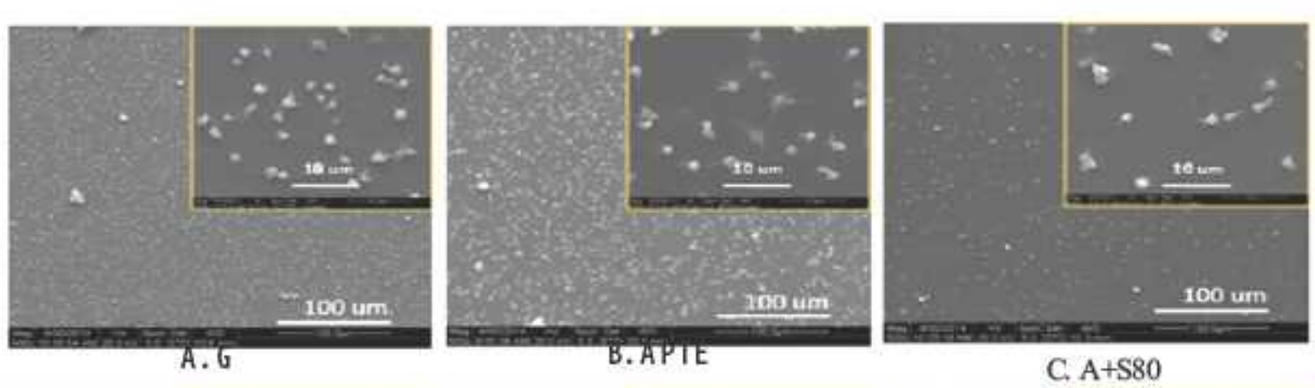


图 4 不同改性样品表面的血小板吸附实验结果

Fig.4 Platelet adhesion SEM image of different modified surface sample

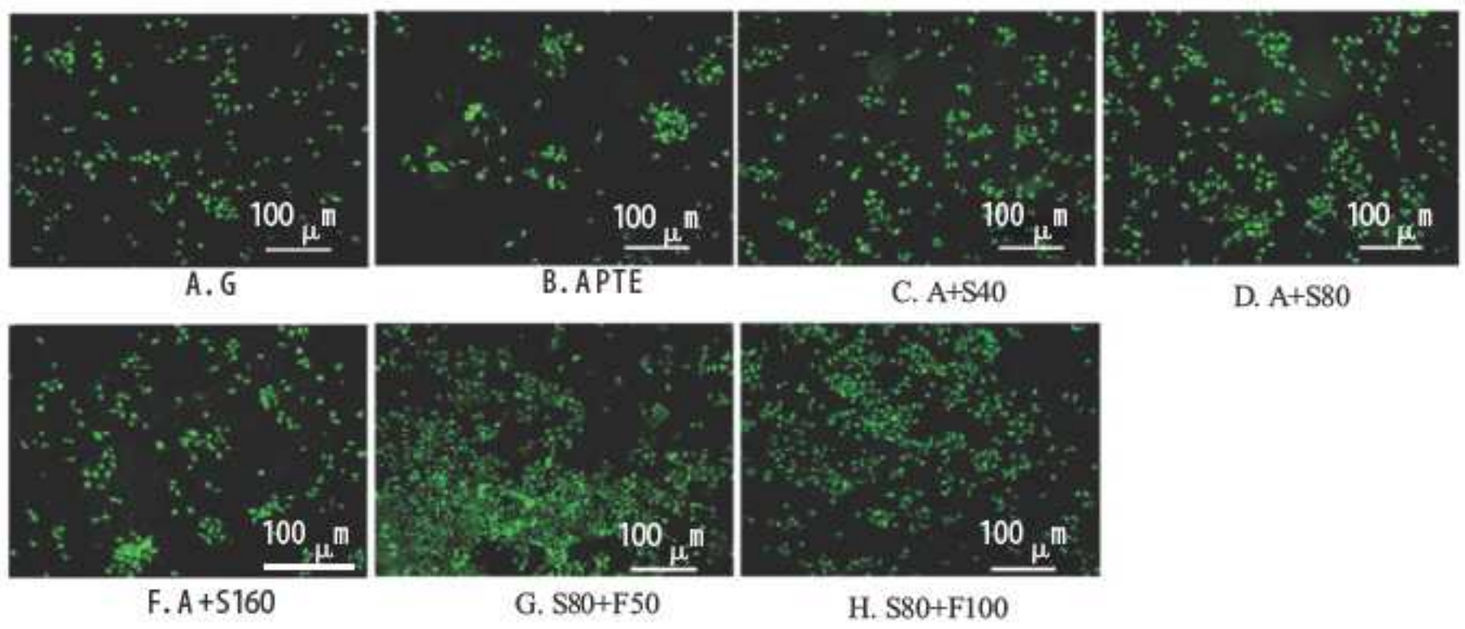


图 5 EPCs 细胞在不同样品表面培养 1 d 的荧光图

Fig.5 Fluorescence of EPCs cultured on different sample surfaces on d1

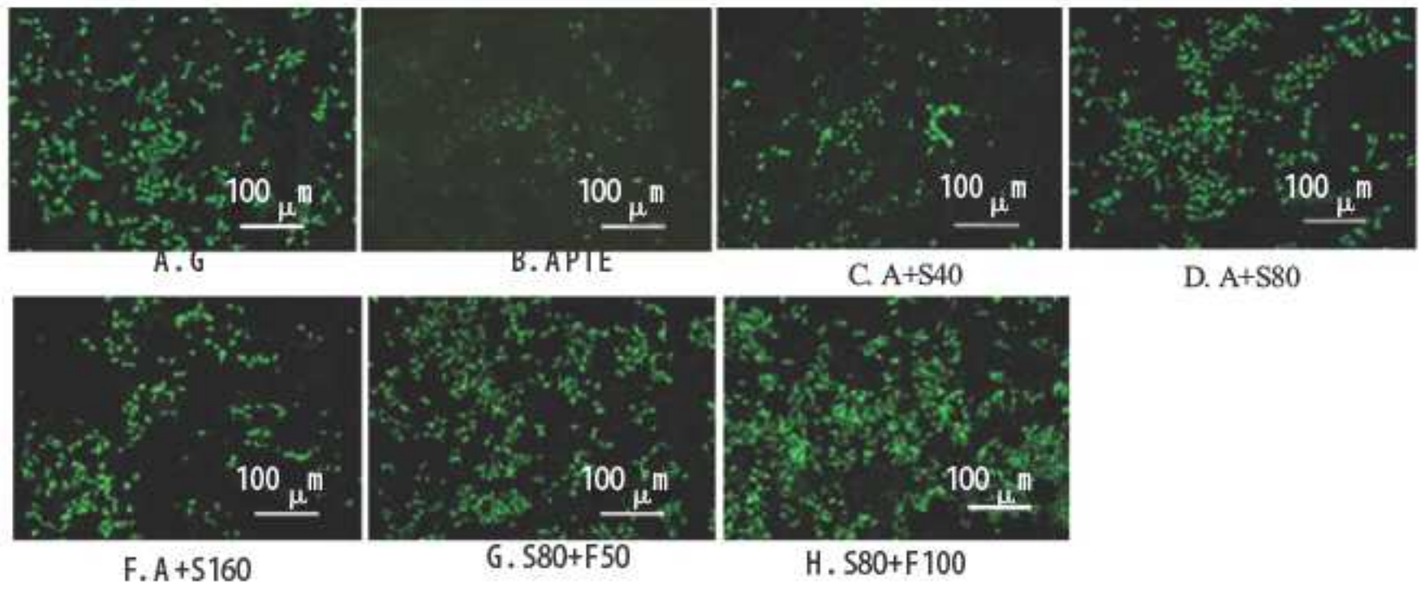


图 6 EPCs 细胞在不同样品表面培养 3 d 的荧光图

Fig.6 Fluorescence of EPCs cultured on different sample surfaces on d3

为了进一步定量比较不同改性样品的 EPCs 的增殖与黏附效果，本研究进行了 CCK-8 细胞学评价（表 3），方差分析表面数据有着明显的统计学差异（F=143.271，P=0.000，1 d；F=680.780，P=0.000，3 d）从中可以得出在 SDF-1 改性涂层表面，接枝 SDF-1 浓度为 80 ng/ml 时 CCK8 值最大，细胞的黏附与增殖效果较好。在 SDF-1 涂层表面引入 Fucoidan 后，EPCs 的数量增加非常显著，因此在材料表面增加接枝一定量浓度的 Fucoidan，有助于促进内皮祖细胞的黏附与增殖，从而达到促内皮的目的，并且随着培养时间的增加，发现在共混接枝的 Fucoidan 在浓度为 100 μg/ml 时效果最好，进一步验证了内皮祖细胞荧光染色的实验结果。

表 3 不同改性样品 EPCs 培养的 CCK-8 实验结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab.3 CCK-8 results of different modified surfaces（$\bar{x}\pm s$）

样品	1天 EPCs	3天 EPCs
G	0.275± 0.014[a]	0.423± 0.007
APTE	0.261± 0.013	0.239± 0.008
S40	0.310± 0.012	0.336± 0.015
S80	0.381± 0.009	0.458± 0.005
S160	0.345± 0.007	0.401± 0.008
S80+F50	0.456± 0.012	0.585± 0.016
S80+F100	0.437± 0.072	0.596± 0.011[b]
F 值	143.271	686.780
P 值	0.000	0.000

注：a，与 APTE 样品的比较 P=0.129；b，与 S80+F50 样品的比较 P=0.04

3 讨 论

本文成功构建了新颖的多功能的复合生物涂层 SDF-1&Fucoidan，并且复合涂层表面具有显著的亲水性。血液相容性评价结果表明 SDF-1&Fucoidan 涂层具备优异的抗凝血性能，且接枝 Fucoidan 浓度为 100 μg/ml 时抗凝效果最佳，因此具有较好的血液相容性。EPCs 细胞培养评价证明 SDF-1&Fucoidan 复合涂层有助于 EPCs 细胞的黏附与增殖，并且在 SDF-1 接枝浓度为 80 ng/ml 和 Fucoidan 接枝浓度为 100 μg/ml 时，EPCs 细胞的增殖、活性最好。因此本课题制备的复合生物涂层对于血管支架的开发研究具有较大的应用参考价值。

参 考 文 献

[1] 陈卓玥.钛表面固定特异性识别内皮祖细胞多肽适配子的研究[D].成都：西南交通大学，2012.

[2] Hiwatashi N，Hirano S，Mizuta M，et al.Biocompatibility and efficacy of collagen/gelatin sponge scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor on vocal fold fibroblasts in 3-dimensional culture[J].Annals of Otology，Rhinology & Laryngology，2014：0003489414546396.

[3] Joner M，Finn AV，Farb A，et al.Pathology of drug-eluting stents in humans：delayed healing and late thrombotic risk[J].Journal of the American College of Cardiology，2006，48（）：193-202.

[4] Hiwatashi N，Hirano S，Mizuta M，et al.Biocompatibility and efficacy of collagen/gelatin sponge scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor on vocal fold fibroblasts in 3-dimensional culture[J].Ann Otol Rhinol Laryngel，2015，124（2）：116-125.

[5] Li J，Zhang K，Wu J，et al.Co-culture of endothelial cells and patterned smooth muscle cells on titanium：Construction with high density of endothelial cells and low density of smooth muscle cells[J].Biochem Biophys Res Commun，2015，456（2）：555-561.

[6] Wang HG，Yin TY，Ge SP，et al.Biofunctionalization of titanium surface with multilayer films modified by heparin-VEGF-fibronectin complex to improve endothelial cell proliferation and blood compatibility[J].J Biomed Mater Res A，2013，101（2）：413-420.

[7] Ghadge SK，Mühlstedt S，Özcelik C，et al.SDF-1α as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction[J].Pharmacol Ther，2011，129（）：97-108.

[8] Cuchiara ML，Horter KL，Banda OA，et al.Covalent immobilization of stem cell factor and stromal derived factor 1α for in vitro culture of hematopoietic progenitor cells[J].Acta Biomater，2013，9（12）：9258-9269.

[9] Song M，Jang H，Lee J，et al.Regeneration of chronic myocardial infarction by injectable hydrogels containing stem cell homing factor SDF-1 and angiogenic peptide Ac-SDKP[J].Biomaterials，2014，35（8）：2436-2445.

[10] Sharma M，Afrin F，Satija N，et al.Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling：indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow[J].Stem Cells Dev，2010，20（6）：933-946.

[11] Nardella A，Chaubet F，Boisson-Vidal C，et al.Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed Ascophyllum nodosum[J].Carbohydr Res，199（289）：201-208.

[12] Hlawaty H，Suffee N，Sutton A，et al.Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression[J].Biochem Pharmacol，2011，81（2）：233-243.

[13] Zemani F，Benisvy D，Galy-Fauroux I，et al.Low-molecular-weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotype of endothelial progenitor cells[J].Biochem Pharmacol，2005，70（8）：1167-1175.

（责任编辑：冉明会）