

镁合金支架材料 AZ81 表面 PLGA(PTX)/ PLLA/MAO 涂层的研究

郭美卿¹, 黄 棣¹, 戴 震¹, 许鑫华², 陈维毅¹

(1. 太原理工大学, 山西 太原 030024)

(2. 天津大学 天津市复合材料与功能化重点实验室, 天津 300072)

摘 要: 在 AZ81 镁合金表面制备了抗腐蚀和药物释放复合涂层, 并对其耐蚀性、药物释放性能及生物相容性进行研究。DSC 和红外光谱数据表明, 紫杉醇均匀分散在 PLGA 体系中。药物释放数据表明 30 d 后, 药物释放率在 80% 左右。SEM、电化学阻抗、极化及镁离子释放数据表明, PLLA 涂层通过有效填充微弧氧化膜表面的微孔与裂缝提高了镁合金的耐腐蚀性。血液和细胞实验表明涂层镁合金血液相容性良好, 无细胞毒性。

关键词: 镁合金; 支架; 紫杉醇; PLGA; PLLA

中图分类号: TG146.2+2

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2015)02-0412-07

尽管药物洗脱支架得到了广泛应用, 但仍存在不少问题^[1,2]。由于药物洗脱支架采用金属作为基材, 故不能摆脱金属本体长期存留所造成的副作用, 如血栓源性、持久的物理性刺激、内皮功能障碍等^[3]。因此, 远期疗效并不理想。镁合金作为冠状动脉支架植入材料, 具有良好的生物相容性, 且在完成支撑血管狭窄的作用后被人体降解与吸收, 因此可避免以往支架长期存留体内引起副反应。同时镁离子是人体内仅次于钾的细胞内正离子, 参与体内一系列新陈代谢过程, 具有良好的血液相容性和组织相容性^[4-6]。目前, AZ31, AZ91, WE42 等均已用于镁合金支架研究, 且动物实验均取得良好的结果^[7]。镁合金支架质量为 3~6 mg, 在降解过程中, 释放的镁离子浓度远小于血液生理浓度(0.70~1.05 mmol/L), 而镁离子缺乏会导致心血管疾病, 因此, 支架镁离子的控制释放更为有益^[8]。

支架再狭窄一般出现在支架介入后 24 h 内, 1~3 个月时达到顶峰, 而后进展缓慢, 1 年之后罕有再狭窄发生, 因此作为一种支撑装置, 支架没有长期存留的必要, 理想的支架应该在完成成为血管提供必要的支撑后逐渐降解, 避免长期存留所造成的并发症。然而, 镁合金降解速度过快, 导致血液局部 pH 值过高, 支架径向支撑力下降等, 容易引发再狭窄。因此, 提高镁合金支架的耐腐蚀性同时不损害其生物相容性对于支架的制备至关重要。

生物可降解高分子材料 PLGA(聚乳酸乙醇酸)、PLLA(聚乳酸)具有良好的可降解性和生物相容性, 已用于药物控释载体、手术缝合线及组织工程支架材料^[9,10]。目前药物涂层支架中应用的抗增生药物主要包括雷帕霉素、紫杉醇(PTX)、放线菌素等。相比之下, 紫杉醇具有能够有效抑制细胞增生、摄取速度快、对平滑肌细胞、血小板、白细胞等生长具有抑制作用, 同时不影响血管内皮化进程的优势^[11]。紫杉醇通过作用细胞微管功能来抑制细胞增生, 从而抑制新生内膜增生^[12]。

本实验通过在 AZ81 镁合金微弧氧化膜表面制备 PLGA 载药涂层和 PLLA 腐蚀控释涂层, 一方面利用 PLLA 涂层有效提高膜层的耐腐蚀性, 使支架有效支撑血管防止再狭窄; 另一方面通过 PLGA 载药涂层实现药物的持续缓慢释放, 抑制晚期再狭窄。

1 实 验

1.1 材料与仪器

镁合金 AZ81, 由山西镁业集团提供; 紫杉醇(HPLC, 99.5%), 由北京诺瑞医药技术有限公司提供; PLGA, PLLA 由山东医疗器械有限公司提供; 环氧树脂, 由中蓝晨光化工研究院提供; 原子吸收光谱仪(AA320N), 上海精密仪器科学有限责任公司; 紫外可见分光光度计(UV-1901), 北京谱析通用责任有限公司; 差示扫描量热仪, PerkinElmer 公司; 扫描电子

收稿日期: 2014-02-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助(51301117); 山西省青年科技研究基金资助(2013021003-1, 2013021014-2)

作者简介: 郭美卿, 女, 1984 年生, 博士, 讲师, 太原理工大学力学学院, 山西 太原 030024, 电话: 0351-6014477, E-mail: gm82@sina.com

显微镜(XL-30型), 荷兰 Philips 公司; 傅里叶红外光谱仪(spectrum 100), PerkinElmer 公司。

1.2 涂层制备及表征

AZ81 系列镁合金经金相砂纸由 800 目逐级打磨至 2000 目, 后用丙酮、无水乙醇除去表面油污, 在去离子水中超声清洗, 温室干燥。试样有效工作面积为 1 cm^2 , 其余部分用环氧树脂封装。采用自制交流微弧氧化装置, 以不锈钢容器作阴极, AZ81 镁合金试样作阳极, 电解液为 Na_2SiO_3 溶液, 电流密度为 0.3 A , 温度为 $25\sim 45\text{ }^\circ\text{C}$, 微弧氧化 40 min 后, 将样品用去离子水超声清洗 10 min, 吹干。采用浸渍-提拉法对镁合金微弧氧化涂层进行封孔。取一定量 PLLA 加入到 CH_2Cl_2 溶剂中配置封孔溶液, 将样品浸入到 PLLA/ CH_2Cl_2 溶液中 1 min, 待溶液充分浸透填充微弧氧化膜(MAO)表面的微孔后, 将样品以 5 cm/min 的速度提起, 待底部聚合物溶液落尽, 重复以上过程三次, 室温晾干。将一定量 PTX 溶于 PLGA50/50 的二氯甲烷溶液中, 配制 10%PTX 浓度的 PLGA/PTX 溶液, 取一定量 PLGA/PTX 混合溶液滴到 AZ81-MAO/PLLA 样品表面, 室温晾干。

采用 Nicolet570 型傅里叶红外光谱仪对纯 PLGA 薄膜、紫杉醇及 PLGA/PTX 复合薄膜进行分析。采用差示扫描量热仪进行 DSC 分析, 通纯氮气 30 mL/min , 升温速率 $10.00\text{ }^\circ\text{C/min}$, 测试温度范围: $0\sim 235\text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.3 药物释放试验

将涂层镁合金试样置于 50 mL 烧杯中, 加入 20 mL Hank's 模拟体液, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴下进行体外药物释放实验。每隔一定时间取 5 mL 溶液介质, 并加入 1 mL 二氯甲烷, 4000 r/min 离心 5 min, 取下层, 加入 4 mL 介质(乙腈:水(1:1)), 摇晃均匀, 用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜过滤, 然后进行紫外光谱测试, 平行测量 3 次, 取平均值。同时加入 5 mL 新鲜介质。利用紫杉醇标准拟合方程计算累积释放率。

1.4 体外镁离子释放测试

采用 Hank's 模拟体液为腐蚀介质, 溶液体积为 20 mL , 试验温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}(\pm 1\text{ }^\circ\text{C})$ 。将涂层镁合金试样悬挂在腐蚀介质中浸泡, 每隔一定时间取出 7 mL 释放溶液, 进行原子吸收分光光度计测试, 并加入 7 mL Hank's 新鲜模拟体液。

1.5 电化学测试

利用 PARSTAT2263(Princeton)电化学综合测试仪测定镁合金试样在温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, pH 为 7.4 的 Hank's 模拟体液中的动电位极化曲线和阻抗谱。采用三电极体系, 极化曲线扫描速率为 0.5 V/s , 阻抗测试所加正弦波幅值为 10 mV , 频率扫描范围为 $100\text{ kHz}\sim 10\text{ mHz}$ 。

1.6 血液相容性评价

实验材料为 AZ81、AZ81-MAO、AZ81-MAO/PLLA 及 316L 不锈钢(阴性对照组), 新鲜人血由天津总医院健康志愿者提供。将新鲜人血在 3000 r/min 下离心 15 min, 收集上层液, 得到贫血小板血浆; 在 2000 r/min 下离心 10 min, 收集上层液, 得到富血小板血浆。

1.6.1 凝血酶原时间(PT)

测试开始前, 将凝血活酶及相应测试杯在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 预温, 在试样表面滴加 $150\text{ }\mu\text{L}$ 血浆并预温 2 min; 然后移取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 血浆于测试杯中, 将测试杯从预温槽移至测试槽中, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 凝血活酶, 记录凝血酶原时间(PT), 重复 6 次。

1.6.2 血浆复钙时间(RT)

将相应器件及 0.025 mol/L CaCl_2 溶液预温。在试样表面滴加 $150\text{ }\mu\text{L}$ 血浆并预温 2 min; 然后移取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 血浆于测试杯中, 将测试杯从预温槽移至测试槽, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ CaCl_2 溶液, 记录血浆复钙时间(RT), 重复 6 次。

1.6.3 溶血试验

将灭菌后的试样按照表面积/浸提液介质($3\text{ cm}^2/\text{mL}$)比例加入生理盐水, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 浸提 72 h, 待用。生理盐水为阴性对照, 双蒸水为阳性对照。取阴性对照溶液、阳性对照溶液与材料浸提液各 2 mL , 分别加入 2%的人血悬液 2 mL , 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温 1 h, 然后离心取上清液。采用 722S 分光光度计在 428 nm 处测定各试样 OD 值, 计算溶血率。溶血率=(样品 OD 值-阴性对照 OD 值) $\times 100\%$ / (阳性对照 OD 值-阴性对照 OD 值)(溶血率 $< 5\%$ 符合生物材料溶血性的要求)。

1.7 细胞毒性评价

1.7.1 制备材料浸提液

将样品置于无菌瓶中, 按照材料表面积/浸提液($3\text{ cm}^2/\text{mL}$)向无菌瓶中加入无菌培养液, 恒温 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 放于 5% CO_2 饱和湿度孵箱中浸泡 24 h, 制备浸提液。

1.7.2 细胞培养

采用胶原酶消化法、贴块法从新生儿脐带中提取人脐动脉平滑肌细胞(HUASMC), 并将其进行传代培养, 分别经免疫组化方法鉴定 VIII 因子、 $\alpha\text{-SMA}$ 相关抗原阳性。取 2~3 代 HUASMC 细胞, 制备单细胞悬液, 用培养基终止消化, 将细胞浓度稀释为 $2\times 10^4/\text{mL}$, 按照每孔细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 接种于 96 孔培养板中。细胞

贴壁 24 h 后, 用移液管吸除原培养液, 每孔分别加入细胞培养液及浸提液各 100 μL , 将实验分组, 316L 不锈钢组(阴性对照组)、AZ81 组、AZ81-MAO 组、AZ81-MAO/PLLA 组, 每组设 8 个复孔。

1.7.3 细胞毒性检测

当细胞与浸提液作用 24, 48, 72 h 后, 采用 MTT 比色法, 用酶标仪在 570 nm 波长处测光密度(OD)值。增殖率 $\text{RGR} = (\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{本底}}) \times 100\% / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{本底}})$ 。

1.8 统计学分析

实验结果的统计学分析是用 SPSS13.0 软件进行的, 结果表示为平均值 \pm 标准差组 ($n=3$), 所有的统计检验中, $p < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 DSC 分析

玻璃化转变与非晶聚合物或结晶聚合物非晶部分中分子链段的微布朗运动和自由体积有关, 药物与聚合物的相互作用会影响聚合物的玻璃化转变温度, 从而可以表征药物与聚合物的相容性。药物分散于聚合物中所形成的分散体系与药物浓度相关, 当药物浓度在一定范围内时, 药物与聚合物发生混溶, 形成均匀的分散体系, 在 DSC 曲线中不会观察到药物的熔融吸热峰, 但是药物与聚合物的相互作用会引起聚合物的玻璃化温度发生变化; 当药物浓度超过一定量时, 药物与聚合物会发生相分离, 载体中除药物和聚合物混溶的无定型体, 还存在纯药物的玻璃态团簇, 这些玻璃态团簇不受聚合物保护, 会趋向于重结晶, 在 DSC 曲线中表现出熔融吸热峰^[13]。从图 1 可以看出, 紫杉醇在 226.09 $^{\circ}\text{C}$ 处具有尖锐的分布较窄的熔融吸热峰, 这是因为紫杉醇是结晶物质。纯 PLGA 载药膜的玻璃化温度在 52.3 $^{\circ}\text{C}$, 而药物含量为 10 % 和 15 % 的 PLGA/PTX 载药膜的玻璃化温度分别为 56.6 和 68.66 $^{\circ}\text{C}$, 这是因为紫杉醇是小分子结晶物质, 相对分子质量较小, 当紫杉醇添加到 PLGA 体系中时, 会填充 PLGA 高分子链段之间的空隙, 导致体系自由体

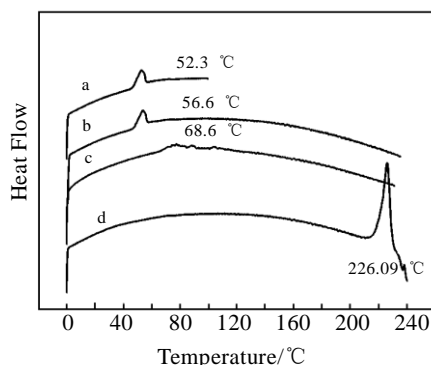


图 1 样品的 DSC 曲线

Fig.1 DSC curves of different samples: (a) PLGA, (b) 10%PTX/PLGA films, (c) 15%PTX/PLGA films, and (d) PTX

系下降, 因此载药膜的玻璃化温度上升。同时在载药膜的 DSC 曲线中没有观察到紫杉醇的熔融峰, 说明紫杉醇与 PLGA 形成了均匀的分散体系。

2.2 红外光谱分析

图 2 为 PLGA 载药涂层的红外光谱图。曲线 a 为紫杉醇的红外光谱图, 波数 2962 cm^{-1} 处的吸收峰是紫杉醇六元环结构中 $-\text{CH}_2$ 的伸缩振动引起的吸收峰, 波数 1740 cm^{-1} 处为紫杉醇结构中 $\text{C}=\text{O}$ 的伸缩振动所引起的吸收峰, 波数 1482, 1664 cm^{-1} 处的峰为苯环骨架振动引起的吸收峰, 波数 720 cm^{-1} 处为取代苯环的吸收峰, 波数 1100 cm^{-1} 处为紫杉醇结构中 $\text{C}-\text{O}$ 伸展吸收峰。曲线 b 为 PLGA 的红外光谱图, 在 3500 cm^{-1} 处有 1 个特征吸收峰, 由 $-\text{OH}$ 的伸缩振动引起, 波数 1750 cm^{-1} 为 PLGA 中 $\text{C}=\text{O}$ 的特征吸收峰, 而在 1372 cm^{-1} 处出现的弱吸收峰以及出现在 2998 cm^{-1} 的强峰是由 PLGA 中大量 $-\text{CH}_3$ 的变形振动所引起的, 波数 720 cm^{-1} 的吸收峰处可能是 $-\text{CH}_2$ 的摇摆振动引起。曲线 c 为 10%PTX 的 PLGA 膜的红外图谱图, 与曲线 a, b 相比, 没有出现新吸收峰, 说明载药膜中, PLGA 与紫杉醇没有发生化学反应, 只是简单的物理混合。

2.3 PLGA 涂层对药物释放速率的影响

从图 3 可以看出, 动态释放第 1 d 的释放率为 12.08%, 前 3 d 的累积释放率为 28.54%, 静态药物释放率第 1 d 仅为 8.47%, 前 3 d 累积释放率为 22.90%, 表明动态药物释放时, 突释明显, 且释放率高于静态药物释放率。这是因为, 前期药物释放受扩散控制, 在动态释放时, 容器中模拟体液是流动的, 释放出的药物不断被体液流动带走, 因此载药膜内外的药物浓度差只取决于载体内药物浓度, 药物浓度差始终处于较高水平, 扩散动力大, 释放速率快。但随着释放的进行, 扩散不再是药物释放的主要机制, 药物释放受 PLGA 降解控制, 静态药物释放时, PLGA 降解产物

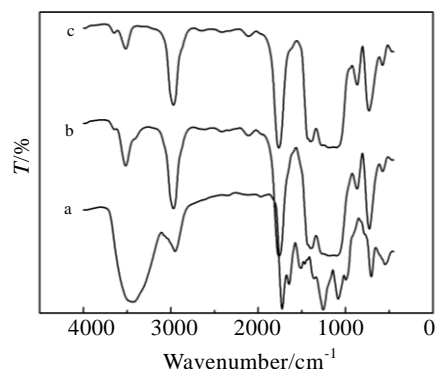


图 2 样品红外光谱

Fig.2 Fourier transforms infrared spectroscopy of different samples: (a) PTX, (b) PLGA, and (c) 10% PTX/PLGA

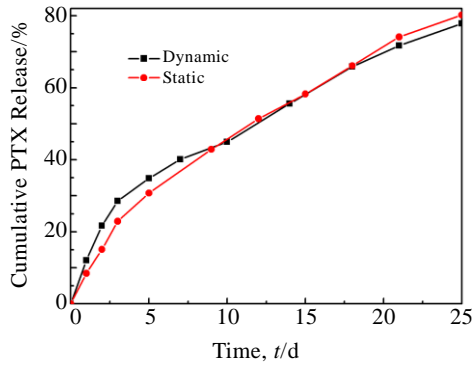


图 3 PLGA 膜紫杉醇动态和静态药物释放曲线

Fig.3 Dynamic and static release curves of paclitaxel in PLGA

进入模拟体液，pH值下降，降解加速，同时考虑到降解产物的羧基与紫杉醇结构中羟基的相互作用，后期紫杉醇静态释放率增加，10 d后静态药物释放率几乎与动态药物释放率持平，在18 d后高于动态药物释放率。

2.4 微弧氧化膜 PLLA 涂层镁合金的 SEM 分析

如图4a所示，镁合金微弧氧化膜表面存在许多孔洞及微小的裂纹，孔洞主要是由微弧氧化过程中热熔产物与氧气沿放电通道形成的，而裂纹则是由于熔融产物遇冷的电解液快速固化所产生的热应力引起的^[14]。如图4b所示，经PLLA封孔处理后，涂层光滑致密，没有裂纹与孔隙，PLLA有效地填充了微弧氧化膜表面的孔洞与裂纹。从图4c可以看出，AZ81微弧氧化膜的厚度为40 μm，微弧氧化膜的断面形貌表明微弧氧化膜由两层结构构成，外层为疏松的多孔结构，并伴随少量

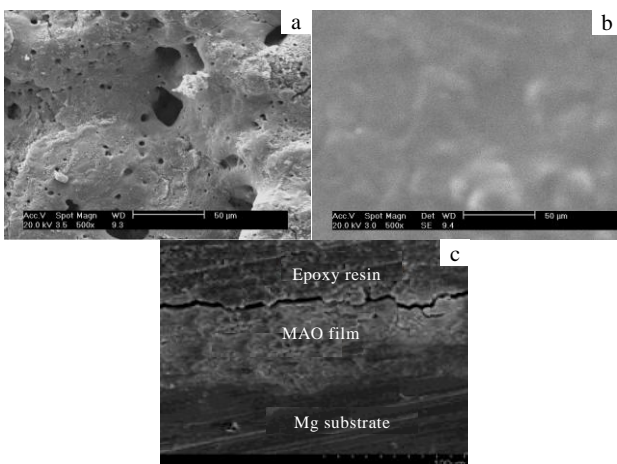


图 4 镁合金微弧氧化封孔前后的表面和断面形貌图

Fig.4 SEM images of MAO coating before (a), and after (b) sealing the hole and the cross section morphology (c)

微裂纹，内层为冶金结合的致密结构。外层结构会吸附较多的电解液离子，不利于耐蚀性的提高，而内层致密结构可以有效阻挡电解液离子向镁合金基体的扩散与渗透，有效地提高镁合金的耐腐蚀性。

2.5 涂层镁合金的电化学

对图5的极化曲线进行Tafel拟合，其结果如表1所示。从表中可看出，AZ81空白镁合金的自腐蚀电位最低，自腐蚀电流最高；经微弧氧化后，自腐蚀电位正向移动，自腐蚀电流下降了2个数量级，表明微弧氧化能够提高镁合金的耐蚀性；而PLLA封孔处理后的镁合金自腐蚀电位最高，与微弧氧化镁合金相比，自腐蚀电流下降2个数量级，表明PLLA封孔能够有效提高微弧氧化镁合金的耐腐蚀性。

如图6所示，空白镁合金的阻抗值仅为5 kΩ，AZ81-MAO涂层镁合金的阻抗为110 kΩ，阻抗值明显提高，表明经微弧氧化后，镁合金的耐蚀性提高。这是因为，经微弧氧化后，镁合金表面形成包含两层冶金结合结构的陶瓷层，内层结构致密(图4c所示)，无孔隙与裂纹，有效阻挡了腐蚀离子的侵蚀，降低了镁合金基体的腐蚀，耐腐蚀阻抗提高。而AZ81- MAO/ PLLA封孔的镁合金样品的阻抗值为300 kΩ，与封孔前相比，阻抗值提高了1.7倍，表明PLLA封孔进一步提高了膜层的耐腐蚀性。这是因为微弧氧化膜外层结构

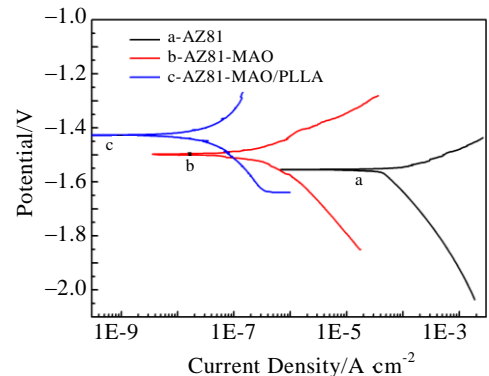


图 5 AZ81, AZ81-MAO和AZ81-MAO/PLLA样品的极化曲线

Fig.5 Potential polarization curves of AZ81, AZ81-MAO and AZ81-MAO/PLLA

表 1 AZ81, AZ81-MAO 和 AZ81-MAO/PLLA 的 E_{corr} 和 I_{corr}

Table 1 E_{corr} and I_{corr} of AZ81, AZ81-MAO and AZ81-MAO/PLLA

Material	E_{corr}/V	$I_{corr}/\mu A$
AZ81	-1.56	61.1
AZ81-MAO	-1.51	0.45
AZ81-MAO/PLLA	-1.42	0.053

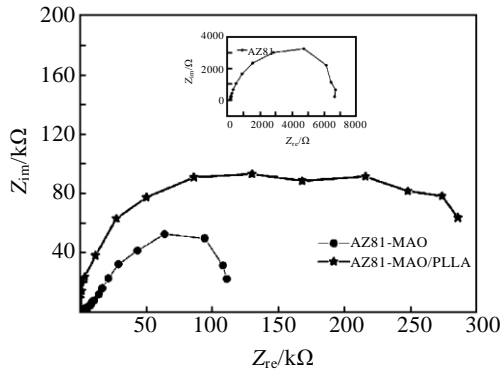


图 6 镁合金、微弧氧化膜和封孔处理后的 EIS 谱

Fig.6 EIS spectra of AZ81 magnesium alloy, MAO coating and that after sealing the hole

疏松多孔，表面高的孔隙率与裂纹通过加大与腐蚀离子的接触面积会吸附更多的腐蚀离子加速对镁合金的侵蚀，而 PLLA 封孔可以有效填充微弧氧化膜外层的微孔与裂纹(图 5b 所示)，通过形成物理嵌锁结构，阻挡了腐蚀介质向基体的侵蚀，有效提高镁合金的耐腐蚀性。

2.6 镁离子释放速率

从图 7 可以看出，空白镁合金镁离子释放速率较高，经微弧氧化后，镁离子释放速率下降，经 PLLA 涂层封孔后，镁离子释放速率进一步降低。

AZ81 空白镁合金在模拟体液中浸泡一定时间后，初期，随浸泡时间的延长，释放速率上升，10 d 之后，随浸泡时间的延长，释放速率下降。这是因为随着腐蚀产物的沉积，在试样表面形成保护层，减少了腐蚀

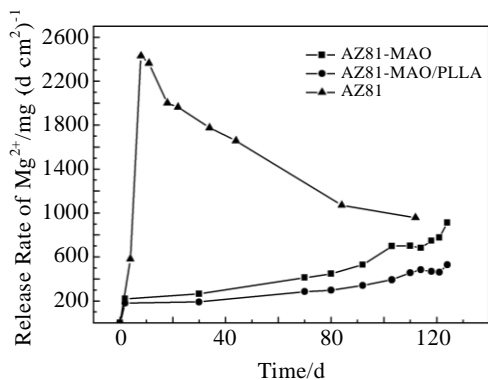


图 7 AZ81 镁合金在 MAO/PLLA 改性前后浸泡在 37 °C, pH 为 7.4 的 Hank's 模拟体液中镁离子释放曲线

Fig.7 Magnesium ions release rate of magnesium alloy AZ81 after MAO/PLLA composite coating modification submerged in Hank's solution at 37 °C (pH 7.4)

介质与试样的接触，释放速率下降。AZ81-MAO 试样在模拟体液中浸泡一定时间后，初期，由于微弧氧化膜内层的防护作用，释放速率变化不大，随浸泡时间的延长，微弧氧化膜外层疏松多孔的结构，可吸附更多的腐蚀离子，加速腐蚀进行，释放速率上升，后期随着腐蚀产物的沉积，减少了腐蚀离子跟试样表面的接触，释放速率下降。MAO/PLLA 涂层镁合金的释放速率随浸泡时间的延长，变化始终不大。这是因为，与微弧氧化镁合金相比，阻抗和极化曲线表明经 PLLA 涂层封孔后微弧氧化膜层的耐腐蚀性能明显提高。另外，PLLA 可有效填充微弧氧化膜外层的微孔与裂纹，涂层表面平整光滑，无缺陷(图 5b 所示)，减少了微弧氧化膜外层疏松结构对腐蚀离子的吸收，腐蚀速率缓慢，因此镁离子释放速率缓慢。然而，随 PLLA 的降解，涂层逐渐发白，分子链断链成小分子，腐蚀离子渗透进入，随着涂层被降解，腐蚀加速，释放速率上升，随后随腐蚀产物的积累，释放速率降低。

2.7 血液相容性

2.7.1 静态血小板粘附

血小板在正常血液循环中处于静息状态，当血管内皮损伤或在某些生理或病理刺激因子作用下，血小板发生活化反应。材料与血液接触后，首先会在材料表面形成复杂的蛋白质吸附层，血小板就会粘附在蛋白层表面，血小板受到材料的刺激后粘性会增加，进一步聚集释放大量的凝血因子而导致凝血。从图 8 可以看出，316L 不锈钢表面粘附有大量血小板，AZ81 与 AZ81-MAO/PLLA 样品表面粘附的血小板相对较少，呈现典型的圆盘状，表明与 316L 相比，AZ81 与 AZ81-MAO/PLLA 的抗凝血性能更好。而 AZ81 与

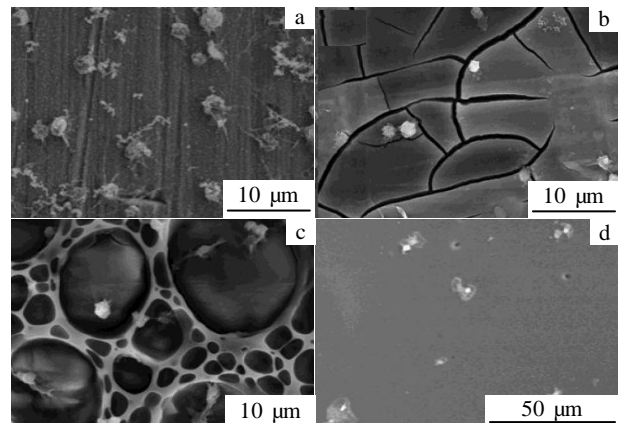


图 8 样品的静态血小板粘附的 SEM 照片

Fig.8 SEM images after in vitro platelet adhesion tests: (a) 316L, (b) AZ81, (c) AZ81-MAO/PLLA, and (d) PLGA/PTX

AZ81-MAO/PLLA 镁合金之间的差别不大, 表明抗凝血性能无显著差异, 这与溶血性结果一致。AZ81 和 AZ81-MAO/PLLA 镁合金表面血小板较少, 可能是因为镁合金在腐蚀过程中会产生大量 OH⁻, 导致溶液局部 pH 值升高, 同时释放的镁离子会抑制血栓素的形成, 导致血小板的活性较低。PLGA/PTX 涂层的样品表面粘附有更少的血小板, 呈现典型的圆盘状, 表明 PLGA/PTX 能够抑制血小板的粘附和活化, 提高材料的抗凝血性能。

2.7.2 PT 与 RT

凝血过程分为两种途径, 分别是内源性和外源性凝血途径。如图 9 所示, 从内源性凝血过程看, AZ81、AZ81-MAO 及 AZ81-MAO/PLLA 镁合金的 RT 值均高于 316L 不锈钢($p < 0.05$), 表明 AZ81 及改性后镁合金的抗凝血性能均优于 316L 不锈钢。且 AZ81 的 RT 明显高于改性后的镁合金样品($p < 0.05$), 表明 AZ81 镁合金的抗凝血性能优于改性后镁合金。这是因为在细胞外 Mg²⁺与 Ca²⁺竞争结合位点, 是 Ca²⁺的天然拮抗剂, 它可通过 Na⁺-Ca²⁺交换机制, 维持细胞内钙离子浓度, 从而稳定纤维蛋白原, 延迟血小板聚集, 所以镁有抗凝作用^[15]。AZ81 及改性后镁合金样品在与血液接触过程中, 有气泡产生, 说明血液和镁合金接触后发生了反应, 有氢气生成, 并伴随有镁离子释放, 使血浆中局部镁离子浓度升高, 阻滞了钙的通道, 引起血浆中游离钙浓度降低, 最终导致内源性凝血激活程度减小, 凝血时间延长。而空白 AZ81 镁合金的耐蚀性最差, 释放的镁离子浓度较高, 因此凝血时间延长, 抗凝血性能最高。从外源性凝血过程分析, 各组之间 PT 比较差异无统计学意义($p > 0.05$), PT 均在正常范围内。

2.7.3 溶血性

AZ81、AZ81-MAO与AZ81-MAO/PLLA组之间

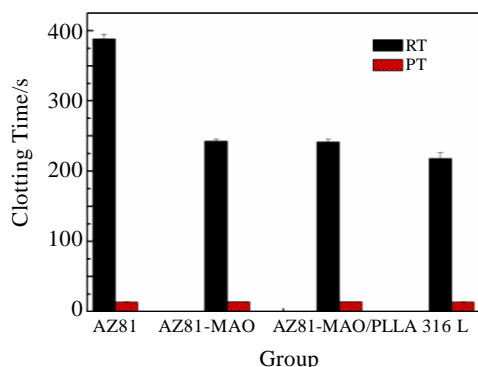


图 9 材料浸提液的 PT 与 RT 对比

Fig.9 Comparison of anti-coagulant properties of samples: PT and RT ($n=6$, mean \pm S.D.)

的 OD 值无统计学意义($p > 0.05$), 而与阴性对照组之间有明显差异($p < 0.05$)。从表 2 可以看出, AZ81、AZ81-MAO、AZ81-MAO/PLLA 组的溶血率分别为 2.20%、1.19%和 0.97%, 均符合生物材料溶血性的要求。

2.8 细胞毒性

如表 3 所示, AZ81、AZ81-MAO 和 AZ81-MAO/PLLA 样品在不同时期的细胞毒性等级均为 1 级, 表明 3 种材料均无细胞毒性。从表中可看出, 空白镁合金的细胞相对增殖率最低; 经微弧氧化改性后, 细胞相对增殖率升高; 经 MAO/PLLA 改性的镁合金的细胞相对增殖率最高。这是因为, 镁合金在降解过程中会产生大量 OH⁻, 导致溶液局部 pH 值升高, 而细胞对环境变化尤其是 pH 值变化非常敏感, 局部 pH 值升高会引起细胞活性下降, 不利于细胞增殖; 经微弧氧化处理后, MAO 膜由于内层具有致密陶瓷结构可以有效抵挡腐蚀离子的侵蚀, 提高耐腐蚀性, 因此与 AZ81 镁合金相比, 释放的 OH⁻较少, 局部 pH 变化不大, 细胞增殖率较高; 而 MAO 膜外层具有疏松多孔结构, 不利于耐蚀性的提高, 经 PLLA 封孔后, 有效填充了 MAO 膜表面的孔隙与裂纹, 耐腐蚀性进一步提高, 释放的 OH⁻最少, 局部 pH 变化最小, 因此细胞增殖率最高^[16]。

表 2 不同材料浸提液的溶血率

Material	OD	Hemolysis/%	p
AZ81	0.068 \pm 0.00424	2.20	<0.05
AZ81-MAO	0.0633 \pm 0.00273	1.19	<0.05
AZ81-MAO/PLLA	0.0623 \pm 0.0032	0.97	<0.05
Negative control	0.0578 \pm 0.00436		
Positive control	0.5213 \pm 0.00367		

表 3 不同材料浸提液对 HUVASMS 的 RGR 及细胞毒性级别

Table 3 RGR and rank of the cytotoxicity of the extracts of the different materials on HUVASMS

Material	24 h	24 h	48 h	48 h	72 h	72 h
	RGR	toxicity	RGR	toxicity	RGR	toxicity
AZ81	96.79	1	95.57	1	90.21	1
AZ81-MAO	97.30	1	96.55	1	95.37	1
AZ81-MAO/PLLA	97.56	1	97.38	1	96.60	1

3 结 论

1) 载药涂层的DSC和红外光谱数据表明,紫杉醇均匀分散在PLGA体系中,二者具有很好的相容性。

2) PLLA涂层能够有效提高微弧氧化镁合金的耐蚀性,降低镁离子释放速率。

3) PLGA载药涂层能够实现药物的缓慢持续释放,释放初期,动态药物释放率高于静态药物释放率;后期,二者累积药物释放率相差不大。

4) AZ81、AZ81-MAO、AZ81-MAO/PLLA镁合金具有良好的抗凝血性和溶血性,可满足生物材料溶血性和抗凝血性的要求。细胞毒性测试结果表明AZ81、AZ81-MAO、AZ81-MAO/PLLA样品在不同时期的细胞毒性等级均为1级,3种材料均无细胞毒性。

参考文献 References

- [1] Kathuria Y P. *Mat Sci Eng A* [J], 2006, 417(1-2): 40
- [2] Hu Tao (胡涛), Yu Zhentao (于振涛), Zhou Lian (周廉) *et al. Rare Metal Materials and Engineering* (稀有金属材料与工程) [J], 2009, 38(9): 1552
- [3] Ma Bo (马波), Wang Keguang (王克光), Li Zhengxian (李争显) *et al. Rare Metal Materials and Engineering* (稀有金属材料与工程) [J], 2005, 34(8): 1341
- [4] Erne P, Schier M, Resink T J. *CardioVas Inter Rad* [J], 2006, 29(1): 11
- [5] Regar E, Sianos G, Serruys P W. *Brit Med Bull* [J], 2001, 59(1): 227
- [6] Lu Ping (逯平), Fang Mingzhong (方铭中), Cao Lu (曹路) *et al. Rare Metal Materials and Engineering* (稀有金属材料与工程) [J], 2011, 40(12): 2232
- [7] Zeng R, Dietzel W, Witte F *et al. Adv Eng Mater* [J], 2008, 10(8): B3
- [8] Sthülinger H. *J Clin Basic Cardiol* [J], 2002, 5(1): 55
- [9] O'Brien B, Carroll W. *Acta Biomater* [J], 2009, 5(4): 945
- [10] Kukreja N, Onuma Y, Daemen J *et al. Pharmacol Res*[J], 2008, 57(3): 171
- [11] Zhang Juntian (张均田), Bao Tuya (包图娅), Cao Enhua (曹恩华) *et al. Modern Experimental Methods In Pharmacology* (现代药理实验方法) [M]. Beijing: Chinese Xiehe Medical University Joint Publisher, 1998: 1215
- [12] Farb A, Heller P F, Shroff S *et al. Circulation* [J], 2001, 104: 473
- [13] Six K, Verreck G, Peeters J *et al. J Pharmaceutical Science* [J], 2004, 93(1): 124
- [14] Duan H P, Du K Q, Yan C W *et al. Electrochim Acta*[J], 2006, 51(14): 2898
- [15] Huang Jingjing (黄晶晶), Ren Yibin (任伊宾), Zhang Bingchun (张炳春) *et al. Rare Metal Materials and Engineering* (稀有金属材料与工程) [J], 2007, 36(6): 1102
- [16] Serre C M, Papillard M, Chavassieux P *et al. J Biomed Mater Res* [J], 1998, 42: 626

PLGA(PTX)/PLLA/MAO Coating on the Surface of AZ81 Magnesium Alloy Stent Materials

Guo Meiqing¹, Huang Di¹, Dai Zhen¹, Xu Xinhua², Chen Weiyi¹

(1. Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China)

(2. Tianjin Key Laboratory of Composite and Functional Material, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A composite coating was prepared to control drug release and corrosion of magnesium alloys stent materials AZ81, and the corrosion resistance, drug release and biocompatibility were investigated. IR spectrum and DSC results show that paclitaxel can be evenly dispersed in the PLGA. The drug-release curves indicate that the cumulative release rate after 30 d reaches approximately 80%. SEM, the electrochemical impedance spectroscopy, polarization curve and magnesium release results suggest that the PLLA coating improve the corrosion resistance by preventing the corrosive ions from diffusing to the magnesium substrate. The blood and cell test results reveal that the samples have good hemocompatibility and no cytotoxicity.

Key words: magnesium alloys; stent; paclitaxel; PLGA; PLLA

Corresponding author: Chen Weiyi, Ph. D., Professor, Institute of Applied Mechanics and Biomedical Engineering, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, P. R. China, Tel: 0086-22-27406127, E-mail: gmgg82@sina.com