论文

具有一氧化氮催化生成功能的层层自组装含硒人工血管的构建与评价

安军^{①†}, 陈思原^{①†}, 高靖辰^①, 张旭^①, 王园园^①, 李岩冬^②, Sergey Mikhailovsky^③, 孔德领^①, 王淑芳^{①*}

① 南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071;

② 南开大学化学学院高分子化学研究所, 天津 300071;

③ School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, University of Brighton, Brighton, BN2 4GJ, UK

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: wangshufang@nankai.edu.cn

收稿日期: 2014-11-10; 接受日期: 2015-03-03

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2012CB725204)、国家自然科学基金(批准号: 51073081, 31170030, J1103503), 长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT13023)和天津市自然科学基金(批准号: 13JCYBJC24900, 13JCZDJC27800)资助项目

摘要 制备了原位催化生成一氧化氮(NO)的新型仿生人工血管材料. 固载有机硒催化剂的聚乙烯亚胺, 作为 NO 供体催化剂, 和海藻酸钠通过静电层层自组装交替结合到电纺聚己内酯基质的表面上. 这种材料接触到 NO 供体——S-亚硝基谷胱甘肽时, 显示了显著的催化释放 NO 的能力. 在 S-亚硝基硫醇存在的情况下, 该材料可以抑制平滑肌细胞的黏附和铺展, 同时促进内皮细胞的增殖. 体外血小板黏附和动静脉分流实验显示这种材料具有良好的抗血栓性能, 能够抑制血小板激活和聚集, 预防急性血栓形成. 该研究为提高人工血管的细胞功能和抗血栓性能提供一种新方法.

关键词

一氧化氮
催化生成
电纺
人工血管
生物相容性

目前, 冠状动脉阻塞等心血管疾病是严重威胁人类健康的世界性难题^[1]. 这些疾病的主要治疗方法之一就是血管移植术, 而具有抗血栓特性和快速内皮化的内表面是血管移植成功的关键.

作为强力的血管舒张剂和抗血小板分子^[2-4], 一氧化氮(NO)具有独特的功能^[5]. 它可以防止细菌生长^[6], 促进伤口愈合^[7], 抑制血小板的黏附和激活^[10-13], 抑制平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)的增殖^[14]. 天然内皮层完美的抗凝血性部分归因于持续释放的低浓度 NO^[15,16]. 内皮细胞(endothelial cells, ECs)位于人

类健康血管的内壁, 能以 $4 \times 10^{-10} \text{ mol}/(\text{cm}^2 \text{ min})$ 的速度持续释放 NO^[17], 对于心血管系统的生理和功能起重要的调控作用^[18]. 这种 NO 的持续释放可以减少血管再狭窄的发生^[13,19,20]. 因此, 可以释放或原位催化生成 NO 的人工血管可能解决小口径人工血管的血栓形成及内膜增生问题^[21].

近年来, 人们对聚合物的 NO 持续释放完成了一些研究^[5,22-24]. 一些 NO 持续释放材料是通过物理混合或化学修饰的方法将氮烯醇或 S-亚硝基硫醇(S-nitrosothiol, RSNO)等 NO 供体固定到聚合物

引用格式: 安军, 陈思原, 高靖辰, 等. 具有一氧化氮催化生成功能的层层自组装含硒人工血管的构建与评价. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 389-397

英文版见: An J, Chen S Y, Gao J C, et al. Construction and evaluation of nitric oxide generating vascular graft material loaded with organoselenium catalyst via layer-by-layer self-assembly. Sci China Life Sci, 2015, 58, in press

上^[25,26]. 这些材料表现出良好的抗血栓性能, 但是在突释、储存量有限和难以避免的细胞毒性等方面还存在一些问题^[27].

外周血中有多种 NO 供体, 如 S-亚硝基白蛋白和 S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO)^[28,29], 而体内的谷胱甘肽过氧化酶是含有硒的催化酶, 能够催化 RSNO 释放 NO^[30,31]. 因为 RSNO 含量基本不变, 这种内源性 NO 供体可以通过 NO 的持续释放实现良好的抗凝性能.

为了模拟原生血管的功能, 通过层层自组装的方法, 将催化内源性 NO 供体 RSNO 稳定释放 NO 的催化剂——有机硒负载到人工血管上. 作为一种温和的表面涂层技术, 层层自组装有许多优点, 如程序简单, 能够适应多种不同基质^[32], 而且这项技术也越来越多地被用于人工血管和组织工程支架上来改善材料的血液相容性和细胞相容性^[33~38].

本研究中, 固载有机硒的聚乙烯亚胺和海藻酸钠通过层层自组装交替结合到电纺聚己内酯(polycaprolactone, PCL)基质的表面上. 通过体外 NO 释放实验检测材料的催化能力; 通过平滑肌细胞黏附、铺展和内皮细胞增殖实验考察改性后人工血管材料的生物功能; 最后, 通过血小板黏附和动静脉分流实验观察材料的抗血栓性能.

1 材料与方法

1.1 材料

聚己内酯(PCL, M_w 80 kD; Solvay Interlox Ltd, 英国); 聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI, M_w 25 kD)和聚二烯丙基二甲基氯化铵(polydiallyldimethylammonium chloride, PDDA, M_w 100-200 kD)(Sigma-Aldrich, 美国); 2-(N-环己氨基)乙磺酸(2-(N-cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid, CHES)和海藻酸钠(AlgNa)及谷胱甘肽(glutathione, GSH)(北京鼎国生物科技有限公司, 中国); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT)(联星生物技术公司, 中国); 细胞膜红色荧光探针(1,1'-diiododecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, DiI)(英杰公司, 中国); Griess 试剂盒(碧云天生物技术研究, 中国).

1.2 支架制备

通过静电纺丝制备 PCL 纳米纤维多孔支架(电纺管用于动静脉分流实验, 电纺膜用于其他实验). 配制 12% PCL 氯仿-无水甲醇电纺溶液(氯仿-无水甲醇的体积比为 5:1), 电纺条件参数为: 流速 2.0 mL/h, 电压 18 kV, 电纺膜用不锈钢滚轴上的锡箔纸接收, 接收距离 20 cm; 电纺管用直径 2.0 mm 的不锈钢芯轴接收, 接收距离 18 cm.

1.3 层层自组装, 构建含硒催化层

根据之前报道的方法合成 SeDPA (3,3'-diselenodipropionic acid)和 SePEI(organoselenium immobilized polyethyleneimine)^[39].

聚合物溶液的浓度均为 1 mg/mL: PDDA 溶于 CHES 缓冲液中, 而聚阳离子 SePEI 溶液和聚阴离子 AlgNa 溶于蒸馏水. 电纺膜在聚阳离子溶液(SePEI 或 PDDA)和聚阴离子溶液(AlgNa)交替浸泡 10 min 进行层层自组装; 每浸泡 1 次用蒸馏水洗涤薄膜表面未结合的离子. 首先组装 1 层 PDDA/AlgNa 作为先驱层, 然后组装确定层数的 SePEI 和 AlgNa((SePEI/AlgNa)_n). 对照组的电纺膜使用 PEI 和 AlgNa((PEI/AlgNa)_n)组装. 对于管状材料, 聚电解质溶液经恒流泵对其进行层层自组装.

1.4 PCL 膜和组装后膜的性能表征

(1) 纤维多孔支架微观形貌的观察. 通过扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM; QUANTA 200, FEI 公司, 美国)对纤维形貌进行观察. SEM 工作电压为 15 kV, 样品在观察前需在表面喷金.

(2) 接触角测量. 为了测量接触角, 将层层自组装的电纺膜固定在载玻片上, 用接触角测量仪(HARKE SPCA, 哈科实验仪器厂, 中国)测定材料对于蒸馏水的接触角. 每个样品选择 5 个不同位置进行实验, 取平均值作为其接触角的数据.

(3) 硒含量测定. 经过 SePEI/AlgNa 双分子层沉积后, 用原子吸收分光光度计(TAS-990, 北京普析通用仪器有限公司, 中国)测定电纺膜上的硒(Se)含量.

(4) 催化剂的负载稳定性. 层层自组装 PCL-(SePEI/AlgNa)₅ 薄膜放在 200 mL 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)中, 37℃ 水浴环境下

静态保存. 每隔 5 天, 取出 5 mL PBS, 并补充 5 mL 空白 PBS 缓冲液. 用原子吸收分光光度计检测 PBS 样品溶液中硒元素含量.

1.5 体外 NO 释放测试

按照文献[40]方法配制 GSNO, 将直径为 1 cm 经过组装的 PCL-(SePEI/AlgNa)₅, PCL-(SePEI/AlgNa)₁₀ 和 PCL-(SePEI/AlgNa)₁₅ 薄膜放入 48 孔板内, 加入 300 μ L 含 200 μ mol/L GSNO, 200 μ mol/L GSH, 2 nmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的 PBS 溶液, 将孔板放入 37 $^{\circ}$ C 气浴摇床内, 保持黑暗, 每 2, 4, 6, 8 h 取样, 用 Griess 试剂检测. 组织培养板(tissue culture plates, TCPS)和 PCL-(PEI/AlgNa)_n 薄膜作为对照.

1.6 细胞毒性实验

对于细胞实验(1.6~1.9), 材料制备成直径为 1 cm 小圆片, 置入 48 孔板内紫外过夜灭菌.

48 孔板内每孔加入 300 μ L 含 1×10^4 个 3T3 细胞以及 200 μ mol/L GSNO/GSH, 2 nmol/L EDTA 的杜氏培养液(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM), 37 $^{\circ}$ C 孵育. 每 2 天换一次液, 在 1, 3, 5 天, 细胞数量采用 MTT 法进行测定.

1.7 平滑肌细胞黏附实验

将薄膜放入 48 孔板内, 每孔加入 300 μ L 含有经 DiI 标记的 2×10^4 个人源平滑肌细胞, 以及 200 μ mol/L GSNO, 200 μ mol/L GSH 的 DMEM 培养基(10%血清), 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 然后吸去溶液, PBS 润洗 2 次, 4%多聚甲醛固定样品 10 min, 荧光显微镜观察.

1.8 平滑肌细胞铺展实验

将薄膜放入 48 孔板内, 每孔加入 300 μ L 含有 5×10^4 个人源平滑肌细胞, 以及 200 μ mol/L GSNO, 200 μ mol/L GSH 的 DMEM 培养基(10%血清), 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 然后吸去溶液, PBS 润洗 2 次, 材料中的细胞一部分用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的鬼笔环肽进行荧光标记, 使用激光共聚焦观察细胞形态; 另一部分细胞用 2.5%的戊二醛溶液进行固定, 梯度乙醇脱水后, 采用 SEM 进行细胞形态观察.

1.9 内皮细胞增殖实验

将薄膜放入 48 孔板内, 每孔加入 300 μ L 含有 2×10^3 个人脐静脉内皮细胞, 以及 200 μ mol/L GSNO, 200 μ mol/L GSH 的 DMEM 培养基(10%血清), 37 $^{\circ}$ C 条件下培养. 每 12 h 添加 6 μ L 20 mmol/L GSNO 溶液以及 3 μ L 100 mmol/L GSH 溶液. 培养 1, 3, 5 天后采用 MTT 法检测细胞增殖情况.

1.10 体外血小板黏附实验

将薄膜放入 48 孔板内, 每孔加入 300 μ L 含有 1×10^7 个血小板的血浆, 同时含有 200 μ mol/L GSNO, 200 μ mol/L GSH. 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 吸去溶液, PBS 溶液润洗, 然后用 2.5%的戊二醛溶液进行固定, 梯度乙醇脱水后, 采用 SEM 进行观察.

1.11 动静脉分流(AV-shunt)实验

动静脉分流(AV-shunt)实验用管状材料在雄性 SD 大鼠(*Sprague dwley*)上实验, 从而考察改性材料的血液相容性. 所有动物实验程序经南开大学动物委员会批准. 用肝素将管状材料 PCL 和 PCL-(SePEI/AlgNa)₅ 预处理 30 min, 10%水合氯醛麻醉 SD 大鼠, 用量为 3 mL/kg; 肝素作为抗凝剂, 用量为 100 Units/kg. 打开 SD 大鼠腹腔后, 对腹主动静脉血管进行剥离. 使用留置针将动脉血流经材料回输至静脉血管内, 体外循环 1 h, 生理盐水润洗材料, 材料中的一部分用 4%多聚甲醛固定 4 h, 体式显微镜观察; 另一部分用 2.5%戊二醛固定, 梯度乙醇脱水后, 采用 SEM 进行观察.

1.12 统计分析

所有实验样品数量为 6, 除了特殊说明之外的实验数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示. 用 *t* 检验进行统计学显著性分析. $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果与讨论

2.1 制备材料的性能

本研究中纤维直径在 100~400 nm 范围内(图 1G), 分布均匀且表面较为光滑. 层层自组装后, (SePEI/AlgNa)_n 纤维膜较(PEI/AlgNa)_n 纤维膜清晰, 形貌没有明显变化.

图1 制备的支架材料的微观形态

A: (PEI/AlgNa)₅; B: (SePEI/AlgNa)₅; C: (PEI/AlgNa)₁₀; D: (SePEI/AlgNa)₁₀; E: (PEI/AlgNa)₁₅; F: (SePEI/AlgNa)₁₅; G: PCL

测量材料的接触角可以考察材料的亲疏水性从而检测组装是否完成. 当材料的表面为聚阳离子 SePEI 或聚阴离子 AlgNa 时, 接触角分别为 $103^{\circ} \pm 5^{\circ}$ 和 $93^{\circ} \pm 3^{\circ}$ (图 2). 单分子层间的接触角呈锯齿状变化, 这说明了层层自组装的发生.

用原子吸收分光光度计测定电纺膜上的硒含量 (图 3). 直径 1 cm 的电纺膜上的硒含量在前 3 个双分子层迅速增加, 而在第 8 个双分子层中增加相对缓慢, 并达到最大值, 即 $1.53 \times 10^3 \mu\text{g}/(\text{L cm}^2)$. 在第 9 个双分子层中, 硒含量略微降低, 这是因为经过数次沉积之后, 材料表面的电荷密度达到稳定状态^[41].

图2 不同组装层数(SePEI/AlgNa)_n 支架材料的水接触角
奇数表示 SePEI 为最外层, 而偶数表示 AlgNa 为最外层

图3 (SePEI/AlgNa)₁₀ 支架材料在每次加载双分子层后的 Se 含量

用 Se 在电纺膜中的保留率来评价负载催化剂的稳定性. 保留率就是材料在 PBS 中浸泡后 Se 含量与原来 Se 含量的比值. 经过长达 35 天的实验, 结果表明, Se 的保留率可达 80%.

2.2 NO 释放

体外催化 NO 释放的结果如图 4 所示, 由于体系中含有 EDTA, 可以排除 Cu(II) 等金属离子对 GSNO 的催化分解. 如图 4A~C 所示, 负载催化剂材料 ((SePEI/AlgNa)_n) 能够显著提高 NO 供体 GSNO 的 NO 释放量. 因此, 预期本研究中通过这种方法制备的材料接触含有 NO 供体的外周血时能够实现原位催化

图 4 不同组装层数的支架材料体外催化 NO 释放

 A: (SePEI/AlgNa)₅; B: (SePEI/AlgNa)₁₀; C: (SePEI/AlgNa)₁₅; D: (SePEI/AlgNa)_n. 数据表示为 $\bar{x} \pm SD$, $n=6$

NO 生成.

通过比较不同组的结果可以看出, 随着组装层数的增加, NO 的累积生成释放量同时升高. 材料上的 Se 含量与组装层数成正比, 因此, 这种方法可以调控材料的催化 NO 释放的能力(图 4).

2.3 细胞行为评价

通过 MTT 实验检测 3T3 成纤维细胞在材料中的增殖, 从而评估材料的细胞相容性, 图 5 显示, PCL-(SePEI/AlgNa)₅ 较对照组 PCL-(SePEI/AlgNa)₅, PCL, TCPS 细胞数较高, 这一结果表明, 聚阳离子 SePEI 和聚阴离子 AlgNa 具有良好的细胞相容性, 另外, 其对膜表面的亲水性增加可能是细胞数量更高的原因.

催化生成 NO 对 SMCs 的黏附和铺展的影响也进行了评估. (SePEI/AlgNa)₅ 膜上 SMCs 的黏附减少, 显示的细胞数量也较少(图 6); 同时通过 SEM 和共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察细胞形态可以发现在负载催化剂的膜上

 图 5 (SePEI/AlgNa)₅ 支架材料的细胞相容性

 数据表示为 $\bar{x} \pm SD$, $n=6$

SMCs 的铺展受到抑制(图 7). SMCs 在 PCL 或 (PEI/AlgNa)₅ 膜上完全铺展, 而在(SePEI/AlgNa)₅ 膜上表现出收缩的状态. 因为 SMCs 是内膜增生和再狭窄的重要参与细胞, 而据报道, NO 能够抑制 SMCs 的

黏附和增殖^[20], 本研究所构建的材料可以通过长期原位催化 NO 生成来减少新内膜的发生。

通过观察 ECs 在膜材料上的增殖考察负载催化的膜材料对 ECs 生长的影响。从结果可以看出, (SePEI/AlgNa)₅ 上的细胞数目要明显大于 PCL 和

(PEI/AlgNa)₅(图 8)。内皮细胞在预防血栓形成和调节细胞增殖方面发挥重要作用, 因此快速内皮化成为构建人工血管的一个关注点。据报道, NO 能够刺激 ECs 的增殖^[20], 因而, 本研究所采用的表面改性方法有助于促进人工血管的快速内皮化。

图 6 (SePEI/AlgNa)₅ 支架材料上的 SMCs 黏附

A1: (SePEI/AlgNa)₅, 10x; A2: (SePEI/AlgNa)₅, 20x; B1: (PEI/AlgNa)₅, 10x; B2: (PEI/AlgNa)₅, 20x; C: 细胞密度

图 7 (SePEI/AlgNa)₅ 支架材料上的 SMCs 铺展

A: PCL; B: (PEI/AlgNa)₅; C: (SePEI/AlgNa)₅; 1: CLSM 图像; 2: SEM 图像

图 8 (SePEI/AlgNa)₅ 支架材料上的 ECs 增殖数据表示为 $\bar{x} \pm SD$, $n=6$

2.4 抗血栓形成的性能评价

本研究通过体外血小板黏附和 AV-shunt 实验来考察 NO 释放材料的抗血栓形成性能. 扫描电子显微镜图如图 9 所示, (SePEI/AlgNa)₅ 膜表面血小板黏附的数量相比对照组明显要少.

为了评估改性材料防止急性血栓形成的性能, AV-shunt 实验中使用管状 (SePEI/AlgNa)₅ 材料接触流动血液 1 h. 体式显微镜显示, 移植血管的细胞内腔表面干净光滑, 没有明显的血栓(图 10B1). SEM 图片显示, 大量的血小板黏附在 PCL 材料上(图 10A2), 而 (SePEI/AlgNa)₅ 材料上血小板很少(图 10B2), 这表明 (SePEI/AlgNa)₅ 表面生成的 NO 抑制了血小板黏附. 由于血小板的黏附和激活是血栓形成的关键和初始

图 9 (SePEI/AlgNa)₅ 支架材料上的血小板黏附A: PCL; B: (PEI/AlgNa)₅; C: (SePEI/AlgNa)₅ 图 10 (SePEI/AlgNa)₅ 支架材料的血液相容性A: PCL; B: (SePEI/AlgNa)₅; 1: 体式显微镜图像; 2: 扫描电子显微镜照片

步骤, 所以催化剂改性材料可能减少急性血栓形成的风险, 并且拥有更好的血液相容性。

3 结论

本研究提出了一种通过在电纺管内表面加载有机硒催化剂改善人工血管的血液相容性和生物活性的新方法。负载了催化剂的材料显示出原位催

化生成 NO 的能力, 而且这种催化能力可以通过装载聚电解质层的数量来进行调整。改性膜具有良好的细胞相容性, 并能抑制 SMCs 的黏附和铺展, 促进 ECs 增殖; 降低血小板黏附和预防急性血栓形成的实验结果证明了这种原位催化 NO 生成的材料具有令人满意的抗血栓性能。本研究为构建具有良好抗血栓性能和理想生物功能的人工血管提供了一种新方法。

参考文献

- Cleary M A, Geiger E, Grady C, et al. Vascular tissue engineering: the next generation. *Trends Mol Med*, 2012, 18: 394–404
- Krejcy K, Schmetterer L, Kastner J, et al. Role of nitric oxide in hemostatic system activation *in vivo* in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15: 2063–2067
- Salvemini D, Masini E, Anggard E, et al. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 169: 596–601
- Samama C M, Diaby M, Fellahi J L, et al. Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*, 1995, 83: 56–65
- Brisbois E J, Handa H, Major T C, et al. Long-term nitric oxide release and elevated temperature stability with S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP)-doped Elast-eon E2As polymer. *Biomaterials*, 2013, 34: 6957–6966
- Mancinelli R L, McKay C P. Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46: 198–202
- Rizk M, Witte M B, Barbul A. Nitric oxide and wound healing. *World J Surg*, 2004, 28: 301–306
- Witte M B, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg*, 2002, 183: 406–412
- Broughton G, Janis J E, Attinger C E. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117: 12s–34s
- Diodati J G, Quyyumi A A, Hussain N, et al. Complexes of nitric oxide with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide: antiplatelet effect. *Thromb Haemost*, 1993, 70: 654–658
- Ignarro L J, Buga G M, Wood K S, et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 9265–9269
- Radomski M W, Palmer R M, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 5193–5197
- Feldman P L, Griffith O W, Stuehr D J. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*, 1993, 71: 26–38
- Sarkar R, Webb R C. Does nitric oxide regulate smooth muscle proliferation? A critical appraisal. *J Vasc Res*, 1998, 35: 135–142
- Radomski M W, Vallance P, Whitley G, et al. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res*, 1993, 27: 1380–1382
- Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*, 2003, 196: 430–443
- Vaughn M W, Kuo L, Liao J C. Estimation of nitric oxide production and reaction rates in tissue by use of a mathematical model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1998, 274: H2163–H2176
- Miller M R, Megson I L. Review-recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol*, 2007, 151: 305–321
- Moncada S, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991, 43: 109–142
- Bredt D S, Snyder S H. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*, 1992, 266: 68–77
- Conklin B S, Richter E R, Kreutziger K L, et al. Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys*, 2002, 24: 173–183
- Cai W Y, Wu J F, Xi C W, et al. Diazeniumdiolate-doped poly(lactic-co-glycolic acid)-based nitric oxide releasing films as antibiofilm coatings. *Biomaterials*, 2012, 33: 7933–7944
- Cai W Y, Wu J F, Xi C W, et al. Carboxyl-ebesen-based layer-by-layer films as potential antithrombotic and antimicrobial coatings. *Biomaterials*, 2011, 32: 7774–7784
- Hofler L, Meyerhoff M E. Modeling the effect of oxygen on the amperometric response of immobilized organoselenium-based S-nitrosothiol sensors. *Anal Chem*, 2011, 83: 619–624
- Reynolds M M, Frost M C, Meyerhoff M E. Nitric oxide-releasing hydrophobic polymers: preparation, characterization, and potential biomedical applications. *Free Radical Biol Med*, 2004, 37: 926–936

- 26 Zhang L, Wang K, Zhao Q, et al. Core-shell fibrous vascular grafts with the nitric oxide releasing property. *Sci China Chem*, 2010, 53: 528–534
- 27 Seabra A B, da Silva R, de Souza G F P, et al. Antithrombogenic polynitrosated polyester/poly(methyl methacrylate) blend for the coating of blood-contacting surfaces. *Artif Organs*, 2008, 32: 262–267
- 28 Giustarini D, Milzani A, Colombo R, et al. Nitric oxide and S-nitrosothiols in human blood. *Clin Chim Acta*, 2003, 330: 85–98
- 29 Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1999, 1411: 273–289
- 30 Muges G, Singh H B. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: glutathione peroxidase activity. *Chem Soc Rev*, 2000, 29: 347–357
- 31 Oh B K, Meyerhoff M E. Spontaneous catalytic generation of nitric oxide from S-nitrosothiols at the surface of polymer films doped with lipophilic copper(II) complex. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 9552–9553
- 32 Lin Q K, Van J J, Qiu F Y, et al. Heparin/collagen multilayer as a thromboresistant and endothelial favorable coating for intravascular stent. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96A: 132–141
- 33 Picart C. Polyelectrolyte multilayer films: from physico-chemical properties to the control of cellular processes. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 685–697
- 34 Tang Z Y, Wang Y, Podsiadlo P, et al. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Adv Mater*, 2006, 18: 3203–3224
- 35 Thierry B, Winnik F M, Merhi Y, et al. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules*, 2003, 4: 1564–1571
- 36 Meng S, Liu Z J, Shen L, et al. The effect of a layer-by-layer chitosan-heparin coating on the endothelialization and coagulation properties of a coronary stent system. *Biomaterials*, 2009, 30: 2276–2283
- 37 Chen J L, Li Q L, Chen J Y, et al. Improving blood-compatibility of titanium by coating collagen-heparin multilayers. *Appl Surf Sci*, 2009, 255: 6894–6900
- 38 Yang J, Welby J L, Meyerhoff M E. Generic nitric oxide (NO) generating surface by immobilizing organoselenium species via Layer-by-Layer assembly. *Langmuir*, 2008, 24: 10265–10272
- 39 Koch T, Suenson E, Henriksen U, et al. The oxidative cleavability of protein cross-linking reagents containing organoselenium bridges. *Bioconj Chem*, 1990, 1: 296–304
- 40 Heikal L, Martin G P, Dailey L A. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosoglutathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelates. *Nitric Oxide*, 2009, 20: 157–165
- 41 Zheludkevich M L, Shchukin D G, Yasakau K A, et al. Anticorrosion coatings with self-healing effect based on nanocontainers impregnated with corrosion inhibitor. *Chem Mater*, 2007, 19: 402–411