



磷灰石/钛基涂层表面携载高黄芩苷/低槲子苷 配伍的协同促内皮抗增殖作用

杨旭¹, 陈岑¹, 丁亚辉^{2,3}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018;

2. 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310014; 3. 浙江省人民医院心内科, 杭州 310014)

摘要: 槲子苷、黄芩苷具有抗血栓、抗炎等药用价值, 磷灰石涂层作为药物洗脱支架涂层具有抑制平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)增殖能力。为探究磷灰石药物洗脱支架涂层携载黄芩苷/槲子苷对 SMCs 增殖与内皮细胞(endothelial cells, ECs)生长的作用, 将 SMCs 和 ECs 分别培养于含 50、25 mg/L 和 12.5 mg/L 黄芩苷或槲子苷的培养基中, 观察细胞活性, 筛选有效作用浓度; 在磷灰石涂层表面分别携载 10、100 μg 和 150 μg 槲子苷或黄芩苷, 并将细胞接种于涂层表面, 观察细胞活性; 将 150 μg 黄芩苷/10 μg 槲子苷配伍、150 μg 槲子苷/10 μg 黄芩苷配伍载于磷灰石涂层表面, 通过 CCK-8、细胞骨架/细胞核染色检测并观察细胞活性及细胞形貌。结果表明: 黄芩苷、槲子苷均能在前期抑制 SMCs 活性并促进 ECs 增殖。150 μg 黄芩苷/磷灰石涂层对 SMCs 的细胞活性有明显的抑制作用, 10 μg 槲子苷/磷灰石涂层相较于 100 μg 和 150 μg 对 SMCs 的活性影响更大, 而对 ECs 无明显作用; 配伍实验显示 150 μg 黄芩苷/10 μg 槲子苷可显著降低 SMCs 活性, 且对 ECs 作用较小。因此, 高黄芩苷/低槲子苷配伍的磷灰石洗脱涂层有望应用于新一代药物洗脱支架的研究与开发。

关键词: 槲子苷; 黄芩苷; 磷灰石; 配伍载药; 平滑肌细胞; 内皮细胞; 药物洗脱支架

中图分类号: Q28

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2022) 01-0123-08

The endothelial promotion and anti-proliferation effects of the combination of high baicalin/low geniposide on apatite/ titanium-based coating surface

YANG Xu¹, CHEN Cen¹, DING Yahui^{2,3}

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China; 3. Department of Cardiology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

Abstract: Geniposide and baicalin have antithrombotic, anti-inflammatory and other medicinal values. Apatite as the coating of drug-eluting stent is able to inhibit the proliferation of smooth muscle cells (SMCs). To explore the effects of drug eluting stent coating with geniposide and baicalin on the proliferation of SMCs and the growth of endothelial cells (ECs), SMCs or ECs were cultured in the medium containing baicalin or geniposide (50, 25 mg/L, and 12.5 mg/L). Then, the cell activity was observed to screen the effective concentration. SMCs and ECs were inoculated on the surface of apatite coating with 10, 100 μg and 150 μg of geniposide or baicalin, respectively, to observe the cell activity. A

收稿日期: 2021-09-03 网络出版日期: 2021-09-18

基金项目: 浙江省中医药管理局计划项目(2018ZB011)

作者简介: 杨旭(1998—), 女, 江苏省扬州人, 本科生, 主要从事心血管支架方面的研究。

通信作者: 丁亚辉, E-mail: doctordyh@163.com

combination of 150 μg geniposide/10 μg baicalin and 150 μg baicalin/10 μg geniposide were loaded on the surface of apatite coating, respectively. CCK-8 and cytoskeleton/nucleus staining were used to observe the cell activity and morphology. The results showed that both baicalin and geniposide could inhibit SMC proliferation and promote EC growth in the early stage. 150 μg baicalin/apatite coating had a significant inhibitory effect on the cell activity of SMCs, 10 μg geniposide/apatite coating had a greater effect on the cell activity of SMCs compared to 100 μg geniposide/apatite coating and 150 μg geniposide/apatite coating, while no significant effects were shown on ECs. It was found that the combination of 150 μg baicalin/10 μg geniposide significantly decreased SMCs proliferation and had little effect on endothelial cells. Therefore, the combination of high baicalin/low geniposide on apatite coating is expected to be applied to the R & D of new-generation drug-eluting stents.

Key words: geniposide; baicalin; apatite; combination of medicines; smooth muscle cells; endothelial cells; drug eluting stents

0 引 言

冠心病是危害人类健康的常见病,2018 年中国冠心病患病人数高达 1100 万,成为头号健康杀手^[1]。经皮冠状动脉介入治疗(Percutaneous coronary intervention, PCI)是目前治疗冠心病最有效的手段之一,2017 年手术例数已突破 75 万^[1]。血管支架的使用量以年复合 20%~30% 的速度增长,但 PCI 术后支架内再狭窄和晚期支架内血栓风险增加的问题严重影响了患者的远期预后^[2]。目前临床上主要通过长期口服双联抗血小板聚集药物和他汀类药物降低支架内再狭窄和血栓风险,但长期服用药物会增加患者出血风险及消化系统并发症^[3]。如何降低支架内再狭窄风险,同时促进支架部位血管内皮化、减少支架金属暴露引起的支架内血栓风险,是当前支架改进的主要研究方向。

表面修饰作为生物医学材料领域的核心技术之一,已被广泛应用于心血管植入材料的表面改性以提高其相容性^[4-5]。在支架材料表面制备一层有机或无机薄膜,可显著提高材料抗腐蚀性和血液相容性^[6-7]。羟基磷灰石(Hydroxyapatite, HA)是一种磷酸钙盐,是天然骨的主要无机成分。磷灰石具有较低的细胞毒性和良好的生物相容性,因此羟基磷灰石具有成为理想生物材料的潜能^[8]。大量相关研究表明,磷灰石涂层植入物没有毒性且比其他常用的聚合物涂层具有更好的生物相容性^[8-10]。基于磷灰石用以传递药物的无机载体的材料已广泛应用于生物领域^[11]。VESTAsync-洗脱支架由不锈钢支架和含有低剂量西罗莫司的微孔羟基磷灰石涂层组成,可有效缓解血管延迟愈合的症状^[12-13]。本文前期研究中在钴铬合金表面构建了雷帕霉素/磷灰石

药物洗脱涂层^[14]。体外细胞实验表明,雷帕霉素/磷灰石涂层可有效抑制平滑肌细胞(Smooth muscle cells, SMCs)的增殖,且磷灰石涂层本身对 SMCs 的细胞活性具有显著的抑制作用^[14]。

在现代医学发展的早期阶段,从植物中提取的具有生物活性的化合物在对抗疾病方面起着至关重要的作用^[15]。梔子苷(Geniposide)是利用乙醇从梔子果实中提取的天然成分,几百年来在亚洲国家一直被传统地用作民间药物^[16],作为环烯醚萜苷和胰高血糖素样肽受体激动剂,梔子苷能够发挥草药的多种生物学作用^[18]。迄今为止,梔子苷由于很少引起对细胞严重的毒性作用而被广泛使用^[19]。并且,梔子苷有抗氧化应激、抗炎症、抗凋亡、抗血栓、抗内质网应激以及抗真菌等很多不同的药理性质^[20-22]。作为一种十分有治疗前景的天然药物,梔子苷已经被应用于多种疾病如神经障碍、肝脏疾病、糖尿病、心血管疾病、肿瘤等的临床前模型^[23-25]。黄芩苷(Baicalin)是黄芩属植物中主要的类黄酮成分^[26]。黄芩苷具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤、抗心血管疾病、抗糖尿病、护肝、抗病毒、抗溃疡性结肠炎、抗血栓、护眼和保护神经等药理活性^[27-29]。黄芩苷预处理高浓度葡萄糖培养的人脐静脉内皮细胞(Endothelial cells, ECs)可以通过减少的 NF- κ B、细胞黏附分子表达、细胞与细胞之间的黏附迁移以及扰乱内皮屏障功能来抑制血管炎症^[30]。在颈动脉球囊损伤模型中,相较于对照组,用黄芩苷处理血管受伤的大鼠,其左颈动脉的厚度减少了 55%^[31]。因此,黄芩苷可能是改善动脉粥样硬化疾病的潜在药物。

梔子苷、黄芩苷在抗炎症、抗血栓、治疗心血管疾病方面是具有很好应用前景的天然药物^[20,31],而磷灰石具有作为药物洗脱支架的洗脱涂层的潜

力^[8]。目前关于磷灰石涂层表面携载栀子苷/黄芩苷对 SMCs、ECs 毒性作用未见相关文献报道。为了获得最佳给药质量浓度以及涂层载药量以抑制 SMCs 增殖,促进 ECs 增殖,本文探究了不同给药质量浓度及涂层载药量对 SMCs 和 ECs 的活性以及增殖影响,以期在设计药物洗脱支架的研究者提供理论参考。

1 实验部分

1.1 材料与仪器

大鼠 SMCs 和 ECs 购于中国科学院细胞库;胎牛血清、胰酶消化液、罗丹明-鬼笔环肽骨架染色液(Rodamine phalloidin)、杜氏磷酸缓冲液(Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, 不含钙镁)、氯化钙溶液、胎牛血清和青霉素-链霉素双抗溶液购于美国 ThermoFisher 公司;高糖 DMEM 培养基购于美国 Hyclone 公司;CCK-8 试剂盒、TritonX-100、4%多聚甲醛固定液、免疫染色洗涤液和 DAPI 细胞核染色液购于碧云天生物技术研究;黄芩苷购于索莱宝生物科技有限公司;栀子苷购于源叶生物科技有限公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 钛片碱热

用砂纸(600#)将直径为 10 mm、高度为 2 mm 的钛圆片的表面打磨平整,依次在二甲基酮、乙醇(99.5%)和纯净水中超声清洗 15 min,氮气吹干。将备好的样品水平置于反应釜中,加入 10 mL 新配置的 NaOH(1 mol/L)溶液。将反应釜置于 140 °C 烘箱,反应 6 h 后取出样品,纯净水超声清洗 3 次(10 min/次),干燥后,得到活化钛片。

1.3 仿生矿化溶液的配制

将氯化钙溶液(100 mg/L)加到无钙镁离子的 DPBS 溶液中,配置成钙离子质量浓度为 0.1 mg/L 的 DPBS 溶液(mDPBS)。

1.4 磷灰石涂层制备

将活化钛片样品放入 15 mL 离心管中,加入 5 mL mDPBS 溶液,37 °C 孵育 24 h,取出样品,用去离子水清洗 2 次,每次 3 min,在氮气环境下风干,得到磷灰石/钛基样品。将得到的磷灰石/钛基样品置于超净台内,75%乙醇浸泡 30 min,去离子水清洗浸泡 30 min,再紫外照射 30 min,得到无菌样品。

1.5 SMCs 与 ECs 的复苏与传代培养

取胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液置于 4 °C 冰箱解冻,放入无菌超净台,在 500 mL DMEM 高糖培养基中加入 5 mL 双抗溶液,再加入 50 mL 胎牛

血清,混合均匀后得到细胞培养基。取出氮罐中的细胞,置入 37 °C 恒温水浴锅中摇晃,加入细胞培养基中,离心后再加入培养基重悬,放于培养皿中,将培养皿置于 37 °C 二氧化碳培养箱培养。当细胞长满至培养皿底部 70%~90%时,吸去培养皿中的培养基,加入 PBS 溶液清洗细胞,加入胰酶消化液,置于培养箱中消化,再加入细胞培养基终止消化,消化下的细胞转移至离心管中,在 800 r/min 条件下离心 3 min。离心结束后,除去上清液,加入 1 mL 培养基重悬细胞,细胞计数,吸取含 1×10^5 个细胞的细胞悬液于含有 8 mL 培养基的培养皿中,摇晃均匀,放入 37 °C 二氧化碳培养箱中培养。

1.6 给药浓度实验

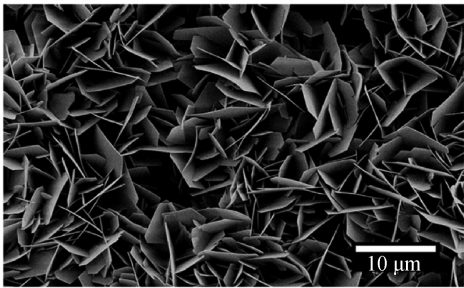
将栀子苷、黄芩苷溶解在细胞培养基中,配置 12.5、25 mg/L 和 50 mg/L 的栀子苷、黄芩苷溶液。分别将 SMCs 或 ECs 按 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板,培养 12 h 贴壁后,吸出细胞培养上清液,每孔加入 100 μ L 不同的培养基。a) 细胞培养基(TCP 组),b) 含 12.5、25 mg/L 和 50 mg/L 的栀子苷培养液,c) 含 12.5、25 mg/L 和 50 mg/L 的黄芩苷培养液。培养 1、2 d 和 3 d 后,每孔加入 10 μ L CCK-8,培养箱避光孵育 1 h,吸出 100 μ L 培养液于 96 孔板,用酶标仪测定波长 490 nm 处细胞培养基的吸光度值。利用 Sigmaplot 软件对实验数据进行分析。

1.7 涂层载药实验

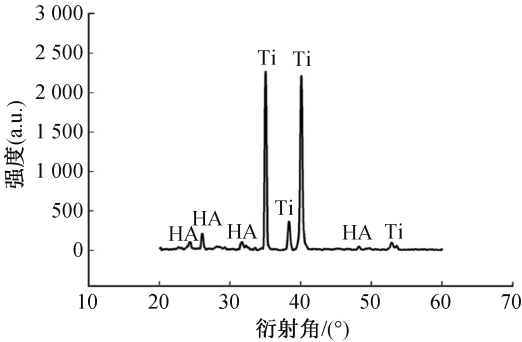
在无菌磷灰石/钛基样品表面分别滴加含药量为 10、100 μ g 和 150 μ g 的栀子苷和黄芩苷无菌溶液,置于超净台内风干,制得载药样品。将 SMCs 或 ECs 分别按 5×10^4 /孔接种于样品表面。a) 对照组(TCP 组),b) 磷灰石涂层组,c) 栀子苷组(10、100 μ g 和 150 μ g),d) 黄芩苷组(10、100 μ g 和 150 μ g)。分别培养 3 d 和 7 d,每孔加入 25 μ L CCK-8,放入培养箱避光孵育 1 h,吸出 100 μ L 培养液于 96 孔板,用酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度值。利用 Sigmaplot 软件对实验数据进行分析。

1.8 配伍载药实验

在无菌磷灰石/钛基样品表面分别携载不同比例的栀子苷和黄芩苷配伍。a) 黄芩苷 150 μ g/栀子苷 10 μ g(150/10 配伍),b) 黄芩苷 10 μ g/栀子苷 150 μ g(10/150 配伍)。将载好药的样品置于 48 孔板内,并将 SMCs 或 ECs 按 5×10^4 /孔接种于不同样品表面。a) 对照组(TCP 组),b) 磷灰石涂层组,c) 150/10 配伍,d) 10/150 配伍。培养 3 d,每孔加入



(a) 磷灰石/钛基表面电镜图



(b) 磷灰石/钛基涂层X射线衍射图

图 1 磷灰石/钛基表征结果

细胞活性没有显著作用。因此,栀子苷或黄芩苷对 SMCs 增殖均具有一定的抑制作用,且抗 SMCs 增生能力与药物质量浓度呈正相关。由图 2(b)可知,培养初期(1 d),黄芩苷培养液中 ECs 的细胞活性略低于 TCP 组,而随着培养时间的延长(2 d 和 3 d),黄芩苷可显著提高 ECs 的细胞活性。图 2(d)表明,栀子苷培养液对 ECs 的增殖无促进作用,且在培养 3 d 后,栀子苷对 ECs 的细胞活性具有轻微的抑制作用,相较于 TCP 组,50、25 mg/L 和 12.5 mg/L 栀子苷培养液中 ECs 的细胞活性为 74%、79%、79%。因此,栀子苷的浓度与 SMCs 和 ECs 的细胞增殖无相关性,而高质量浓度黄芩苷选择性地抗增生促内皮效果更为明显。

2.3 栀子苷、黄芩苷/磷灰石涂层对 SMCs 和 ECs 增殖的作用

理想的药物洗脱支架应该具有选择性抑制 SMCs、促进 ECs 生长增殖的能力,达到抗血栓,促进血管内皮修复的目的^[32]。上述实验证明,黄芩苷、栀子苷仅在最初期(1 d)表现出抑制 SMCs 增殖、促进 ECs 增殖的作用。因此,需要选用合适的药物洗脱涂层携带栀子苷或黄芩苷,以期提高药物的作用效能。本文前期研究表明,磷灰石具有较低的细胞毒性和良好的生物相容性,其本身对 SMCs 增殖有一定的抑制作用^[14],本文进一步在磷灰石涂层表面携带不同剂量的栀子苷、黄芩苷,探究药物洗脱涂层对 SMCs 或 ECs 的细胞增殖的调控作用。

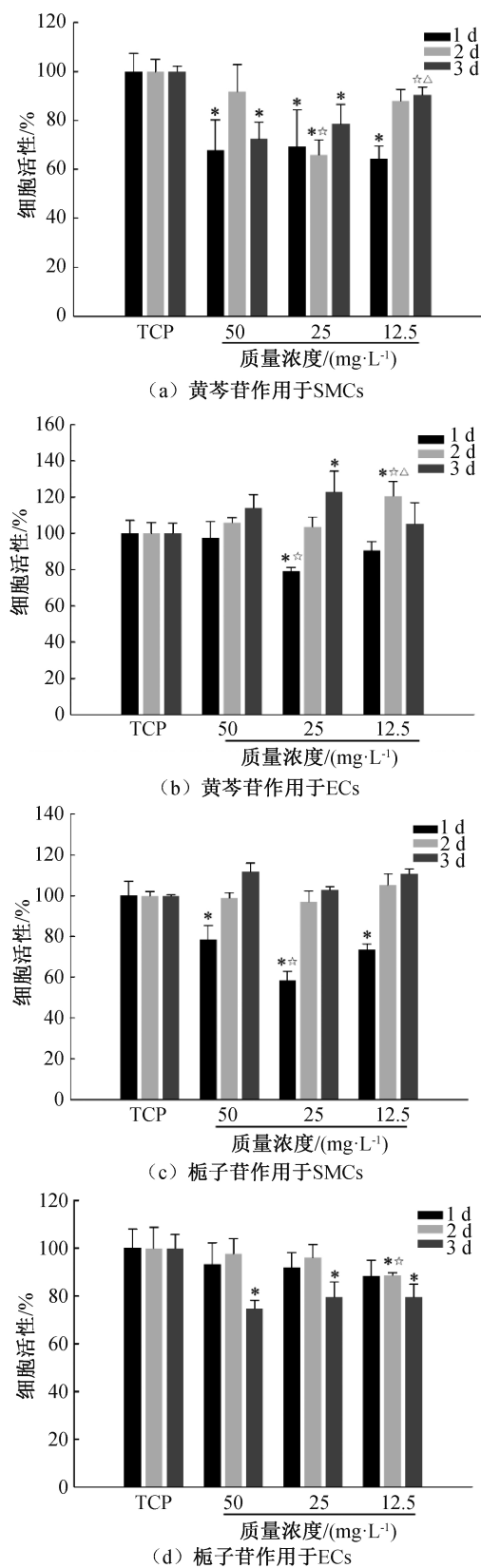


图 2 不同质量浓度栀子苷或黄芩苷处理对 SMCs、ECs 的细胞活性影响的检测

注: 单因素方差分析。与 TCP 组比较, * 表示 $p < 0.05$; 与 50 mg/L 组比较, ☆ 表示 $p < 0.05$; 与 25 mg/L 组比较, △ 表示 $p < 0.05$ 。

图 3 为 SMCs、ECs 在不同载药量的栀子苷/磷灰石涂层或黄芩苷/磷灰石涂层表面培养 3 d 和 7 d 后进行 CCK-8 细胞活性检测的结果。图 3(a)和图 3(c)结果表明: 培养 3 d, 相较于 TCP 组, 磷灰石涂层、栀子苷/磷灰石涂层和黄芩苷/磷灰石涂层均能显著抑制 SMCs 增殖, 相较于磷灰石涂层组, 栀子苷/磷灰石涂层对 SMCs 的细胞活性没有显著作用, 而黄芩苷/磷灰石涂层可进一步抑制 SMCs 增殖, 其抑制作用与黄芩苷的载药量呈正相关; 培养 7 d, 磷灰石涂层和栀子苷/磷灰石涂层上 SMCs 的细胞活性略低于 TCP 组, 而相较于 TCP 组和磷灰石涂层组, 高载药量的黄芩苷/磷灰石涂层 (150 μ g) 仍可持续抑制 SMCs 的细胞活性。图 3(b)和 3(d)表明: 培养 3 d, 相较于 TCP 组, 磷灰石涂层、栀子苷/磷灰石涂层和黄芩苷/磷灰石涂层可显著降低 ECs 的细胞活性, 相较于磷灰石涂层组, 栀子苷/磷灰石涂层和黄芩苷/磷灰石涂层对 ECs 的细胞活性没有明显作用, 且与药物的载药量无相关性; 培养 7 d, 栀子苷/磷灰石涂层对 ECs 的作用趋势不变, 而黄芩苷/磷灰石涂层对 ECs 的细胞活性具有促进作用, 相较于 TCP 组, 150、100 μ g 和 10 μ g 黄芩苷/磷灰石涂层表面 ECs 的细胞活性为 66%、87%、108%。因此, 栀子苷/磷灰石涂层的载药量和 SMCs、ECs 的细胞增殖无关联效应; 黄芩苷/磷灰石涂层对 SMCs 和 ECs 细胞增殖的调控作用与载药量呈相关性, 且随着药物洗脱涂层与细胞相互作用的时间延长, 黄芩苷对 SMCs 和 ECs 的选择性调控作用效果更好。张海燕^[33]通过制备 PLGA 膜并在膜上载有不同剂量的栀子苷和黄芩苷来检测不同载药量对 SMCs、ECs 的活性影响, 其中最佳促进 ECs 增殖的栀子苷载药薄膜载药量为 10%, 其载药结果与本文的结果一致, 但本文涂层的载药量远低于张海燕^[33]所报道的载药量。

2.4 栀子苷/黄芩苷配伍在磷灰石涂层表面载药对 SMCs 和 ECs 增殖的作用

上述实验证明, 黄芩苷载药量与其抑制 SMCs 活性能力呈正相关, 栀子苷载药量的高低及作用时间的长短对 SMCs、ECs 活性无决定性影响作用。因此, 本文选择在磷灰石涂层表面携载高黄芩苷/低栀子苷配伍 (150/10 配伍) 和低黄芩苷/高栀子苷配伍 (10/150 配伍), 并对比两种配伍对 SMCs 和 ECs 细胞活性影响的差异。图 4 为 SMCs、ECs 在不同配伍涂层表面培养 3 d 和 7 d 后进行 CCK-8 细胞活性检测的结果。图 4 表明: 培养 3 d 和 7 d 后, 相较于磷灰石涂层组, 150/10 配伍可显著抑制 SMCs 增

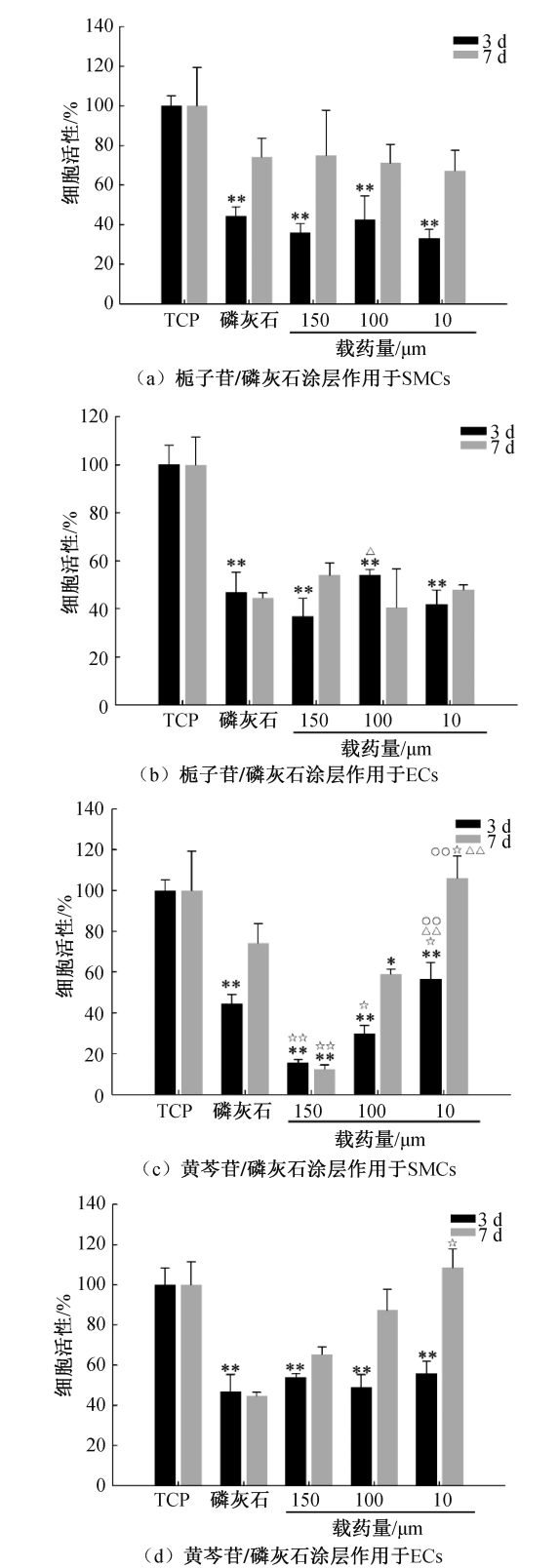


图3 不同质量浓度梔子苷/黄芩苷分别对 SMCs、ECs 作用 3 d 和 7 d 的 CCK-8 检测细胞活性

注:单因素方差分析。与 TCP 组比较,*表示 $p<0.05$, **表示 $p<0.01$;与磷灰石涂层组比较,☆表示 $p<0.05$, ☆☆表示 $p<0.01$;与 150 μg 组比较,△表示 $p<0.05$,△△表示 $p<0.01$;与 10 μg 组比较,○表示 $p<0.05$,○○表示 $p<0.01$ 。

殖,ECs 的细胞活性仅略低于磷灰石涂层组;而 10/150 配伍对 ECs 的细胞活性无显著影响,却对 SMCs 细胞增殖具有显著的促进作用。对比 3 d 和 7 d 的细胞活性结果,150/10 配伍对 SMCs 增殖具有持续的抑制作用,并可逐渐促进 ECs 的细胞增殖。因此,相较于不同的单独载药量或低黄芩苷/高梔子苷配伍,高黄芩苷/低梔子苷配伍具有更为优异的选择性调控 SMCs、ECs 细胞增殖的能力。

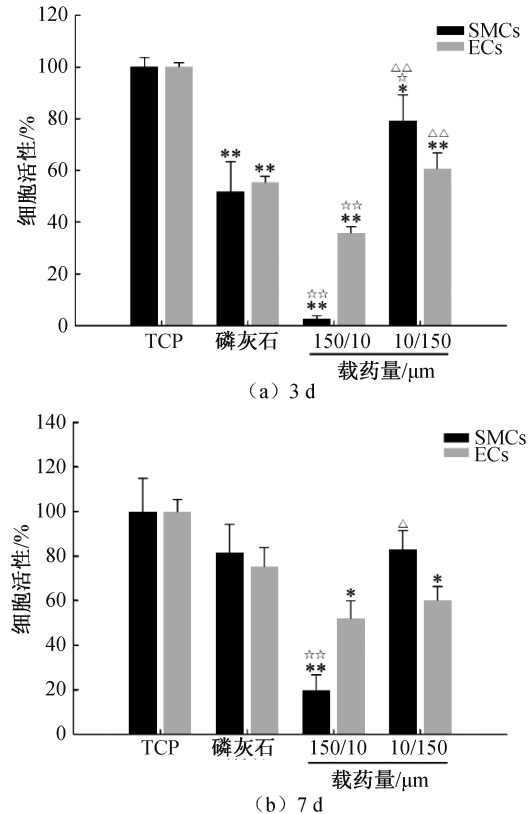


图4 黄芩苷与梔子苷配伍对 SMCs、ECs 处理 CCK-8 检测细胞活性

注:单因素方差分析。与 TCP 组比较,*表示 $p<0.05$, **表示 $p<0.01$;与磷灰石涂层组比较,☆表示 $p<0.05$, ☆☆表示 $p<0.01$;与 150/10 组比较,△表示 $p<0.05$, △△表示 $p<0.01$ 。

为了进一步观察配伍涂层表面 SMCs、ECs 的细胞形态,选用 Rodamine phalloidin (EdU, 红色) 和 DAPI (蓝色) 分别标记细胞骨架和细胞核,结果如图 5 所示。图 5 表明:在 150/10 配伍涂层表面,视野中 SMCs 数量远低于其他 3 组,而 ECs 数量高于 SMCs;而在 10/150 配伍涂层表面,SMCs、ECs 数量明显比 150/10 配伍涂层表面多,且和磷灰石涂层组区别不明显。细胞染色结果与图 4 的细胞活性检测结果相一致,进一步说明高黄芩苷/低梔子苷配伍可选择性地调控 SMCs、ECs 的生长行为,为下一代药物洗脱支架的设计构建提供新的思路。

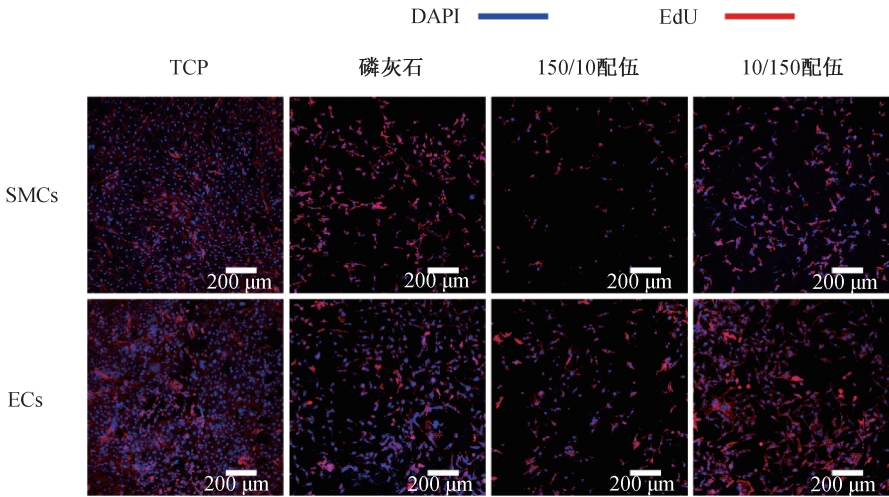


图 5 黄芩苷与栀子苷配伍对 SMCs、ECs 作用 3 d 的细胞骨/架细胞核染色图

3 结 论

本文制备了一种可应用于药物洗脱支架表面的磷灰石载药涂层,并携载具有抗血栓、抗炎的栀子苷和/或黄芩苷,选择性地调控 SMCs、ECs 的生长行为,以分析磷灰石药物洗脱支架涂层携载黄芩苷/栀子苷对 SMCs 增殖与 ECs 生长的作用。主要结果如下:

- a)黄芩苷/磷灰石涂层可有效抑制 SMCs 增殖及促进 ECs 细胞生长,其调控性能与药物剂量呈相关性;
- b)栀子苷/磷灰石涂层对 SMCs 有轻微的抑制作用,对 ECs 细胞增殖无影响,其作用效能与药物剂量无相关性;
- c)高黄芩苷/低栀子苷配伍的磷灰石载药涂层不仅具有显著性地抑制 SMCs 增殖,其抑制效果并未随时间的延长而减弱,且对 ECs 表现出明显的促增殖作用。

本文结果为栀子苷/黄芩苷载药磷灰石涂层应用于药物洗脱支架以解决术后血管支架内皮化、再狭窄及炎症等问题提供理论依据。

参考文献:

[1] Ma L Y, Chen W W, Gao R L, et al. China cardiovascular diseases report 2018: An updated summary[J].Journal of Geriatric Cardiology, 2020, 17(1):1-8.

[2] Simard T, Hibbert B, Ramirez F D, et al. The evolution of coronary stents: A brief review [J]. Canadian Journal of Cardiology, 2014, 30(1):35-45.

[3] Modery C L, Ravikumar M, Wong T L, et al. Heteromultivalent liposomal nanoconstructs for enhanced targeting and shear-stable binding to active platelets for site-selective vascular drug delivery [J].

Biomaterials, 2011, 32(35):9504-9514.

[4] Lu X, Leng Y, Zhang X D, et al. Comparative study of osteoconduction on micromachined and alkali-treated titanium alloy surfaces in vitro and in vivo [J]. Biomaterials, 2005, 26(14):1793-1801.

[5] Yang Y Z, Ong J L, Tian J M. Deposition of highly adhesive ZrO₂ coating on ti and CoCrMo implant materials using plasma spraying[J]. Biomaterials, 2003, 24(4):619-627.

[6] Takebe J, Itoh S, Okada J, et al. Anodic oxidation and hydrothermal treatment of titanium results in a surface that causes increased attachment and altered cytoskeletal morphology of rat bone marrow stromal cells in vitro [J].Journal of Biomedical Materials Research, 2000, 51 (3):398-407.

[7] Nayab S N, Jones F H, Olsen I. Effects of calcium ion-implantation of titanium on bone cell function in vitro [J]. Journal of Biomedical Materials Research A, 2007, 83(2):296-302.

[8] Eppley B L, Pietrzak W S, Blanton M W. Allograft and alloplastic bone substitutes: A review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon[J]. The Journal of Craniofacial Surgery, 2005, 16(6):981-989.

[9] Shepperd J A, Apthorp H. A contemporary snapshot of the use of hydroxyapatite coating in orthopaedic surgery [J]. Journal of Bone Joint Surgery Br, 2005, 87(8): 1046-1049.

[10] Pezzatini S, Solito R, Morbidelli L, et al. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on microvascular endothelial cell viability and functions [J]. Journal of Biomedical Materials Research A, 2006, 76(3):656-663.

[11] Kester M, Heakal Y, Fox T, et al. Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and

- encapsulated chemotherapeutic drug delivery to cancer cells[J]. *Nano Letters*, 2008, 8(12):4116-4121.
- [12] Costa J R, Abizaid A, Costa R, et al. Preliminary results of the hydroxyapatite nonpolymer-based sirolimus-eluting stent for the treatment of single de novo coronary lesions a first-in-human analysis of a third-generation drug-eluting stent system[J]. *JACC Cardiovascular Interventions*, 2008, 1(5):545-551.
- [13] Costa J R, Abizaid A, Costa R, et al. 1-year results of the hydroxyapatite polymer-free sirolimus-eluting stent for the treatment of single de novo coronary lesions: The vestasync i trial [J]. *JACC Cardiovascular Interventions*, 2009, 2(5):422-427.
- [14] Chen C X, Yao C X, Yang J, et al. Biomimetic apatite formed on cobalt-chromium alloy: A polymer-free carrier for drug eluting stent [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 151(12):156-164.
- [15] Sultana B, Yaqoob S, Zafar Z, et al. Escalation of liver malfunctioning: A step toward herbal awareness[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2018, 216(1): 104-119.
- [16] Chang W L, Wang H Y, Shi L S, et al. Immunosuppressive iridoids from the fruits of gardenia jasminoides[J]. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(11):1683-1685.
- [17] Koo H J, Lee S, Shin K H, et al. Geniposide, an anti-angiogenic compound from the fruits of gardenia jasminoides[J]. *Planta Medica*, 2004, 70(5):467-469.
- [18] Tsai T R, Tseng T Y, Chen C F, et al. Identification and determination of geniposide contained in gardenia jasminoides and in two preparations of mixed traditional chinese medicines [J]. *Journal of Chromatographic A*, 2002, 961(1):83-88.
- [19] Sato S, Kitamura H, Chino M, et al. A 13-week oral dose subchronic toxicity study of gardenia yellow containing geniposide in rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45(8):1537-1544.
- [20] Jiang Y Q, Chang G L, Wang Y, et al. Geniposide prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in h9c2 cells: Improvement of mitochondrial dysfunction and activation of glp-1r and the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016, 39(1):407-421.
- [21] Zhang H Y, Liu H, Yang M, et al. Antithrombotic activities of aqueous extract from gardenia jasminoides and its main constituent[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2013, 51(2):221-225.
- [22] Lee H Y, Lee G H, Lee M R, et al. Eucommia ulmoides oliver extract, aucubin, and geniposide enhance lysosomal activity to regulate er stress and hepatic lipid accumulation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e81349.
- [23] Zhao C, Lv C, Li H, et al. Geniposide protects primary cortical neurons against oligomeric a β 1-42-induced neurotoxicity through a mitochondrial pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4):e0152551.
- [24] Ma Z G, Dai J, Zhang W B, et al. Protection against cardiac hypertrophy by geniposide involves the GLP-1 receptor/AMPK α signalling pathway [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2016, 173(9):1502-1516.
- [25] Cheng Z, Xu H, Wang X, et al. Lactobacillus raises in vitro anticancer effect of geniposide in HSC-3 human oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 14(5):4586-4594.
- [26] Chen L J, Games D E, Jones J. Isolation and identification of four flavonoid constituents from the seeds of oroxylum indicum by high-speed counter-current chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 988(1):95-105.
- [27] Lee W, Ku S K, Bae J S. Anti-inflammatory effects of baicalin, baicalein, and wogonin in vitro and in vivo [J]. *Inflammation*, 2015, 38(1):110-125.
- [28] Xiao J R, Do C W, To C H. Potential therapeutic effects of baicalein, baicalin, and wogonin in ocular disorders [J]. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 2014, 30(8):605-614.
- [29] Moghaddam E, Teoh B T, Sam S S, et al. Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:5452.
- [30] Ku S K, Bae J S. Baicalin, baicalein and wogonin inhibits high glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo[J]. *BMB Reports*, 2015, 48(9):519-524.
- [31] Dong L H, Wen J K, Miao S B, et al. Baicalin inhibits PDGF-BB-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation through suppressing PDGFR β -ERK signaling and increase in p27 accumulation and prevents injury-induced neointimal hyperplasia [J]. *Cell Research*, 2010, 20(11):1252-1262.
- [32] Simard T, Hibbert B, Ramirez F D, et al. The evolution of coronary stents: A brief review[J]. *Canadian Journal of Cardiology*, 2014, 30(1):35-45.
- [33] 张海燕, 栀子苷/黄芩苷心血管作用及应用于血管支架药物涂层研究[D]. 成都:西南交通大学, 2014:125-133.