doi: 10.3969/j.issn.1009–7090.2010.03.005

·基础研究·

改性聚偏氟乙烯膜的生物相容性研究

田鹃鹏[1],向慧玲[2],李亚静[1],吕晓龙[1]

摘 要:目的 通过测定改性聚偏氟乙烯(PVDF)的生物相容性,判断其应用于医用分离材料领域的可行性。**方法** 分别用聚乙二醇(PEG)和聚吡咯烷酮(PVP)对 PVDF 共混改性,将 PEG 改性的 PVDF 称为 $PVDF_1$,将 PVP 改性的 PVDF 称为 $PVDF_2$。测定其亲水性、蛋白吸附性、细胞毒性、溶血率和动态凝血性,并与临床常用分离膜材料聚醚砜(PES)相比较。**结果** PVDF 材料的蛋白吸附性能优于 PES;改性后的 PVDF 膜($PVDF_1$ 和 $PVDF_2$)的亲水性提高,接触角从 86.5 °下降为 63.8 °、65.7 °左右。同时 $PVDF_1$、$PVDF_2$ 对牛血清白蛋白的吸附也从 58.6 mg/m^2 下降为 25.7 mg/m^2、38.5 mg/m^2;细胞毒性为一级,细胞增殖率 > 80 %;溶血率为分别为 2.9 %、2.4 %,均小于 5.0 %,符合国标 GB/T16886 对材料溶血性的要求;改性 PVDF 的动态抗凝血性和体外细胞毒性比 PES 材料略好。**结论** 改性 PVDF 具有良好的生物相容性,可以作为医用材料进一步研究。

关键词:聚偏氟乙烯;亲水改性;生物相容性

中图分类号:R318 **文献标识码:**A **文章编号:**1009–7090(2010)03–0207–05

Biocompatibility of modified polyvinylidene fluoride membranes

TIAN Kun–peng[1], XIANG Hui–ling[2], LI Ya–jing[1], Lü Xiao–long[1] (*1.Institute of Biological and Chemical Engineering, Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300160, China; 2. Tianjin Third Central Hospital, Tianjin 300170, China*)

Corresponding author: Lü Xiao–long. E–mail: luxiaolong@263.net

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of applying the modified polyvinylidene fluoride(PVDF) in medical biomaterials by determination the biocompatibility modified PVDF. **Methods** The polyethylene glycol(PEG) and polyethylene pyrrole(PVP) blended with PVDF respectively and prepared membranes. The PEG modified PVDF was named $PVDF_1$ and PVP modified PVDF was named $PVDF_2$. The hydrophilic, protein adsorption, cell toxicity, hemolysis rate, dynamic coagulation of membranes were determinated, and compared with clinical separation membrane materials polyether sulfone(PES). **Results** The protein adsorption performance of PVDF was better than PES. The modified PVDF membranes had increased hydrophilicity, contact angle decreased from 86.5 ° to 63.8 °, 65.7 °. The $PVDF_1$ and $PVDF_2$ adsorption of bovine serum albumin decreased from 58.6 mg/m^2 to 25.7 mg/m^2 and 38.5 mg/m^2, respectively; Cell proliferation rate of them were more than 80 %, and cytotoxicity was at level 1. Hemolysis test showed that haemolysis rate of these 2 membranes were 2.9 % and 2.4 % respectively, which were coincident with the criteria of biomaterial materials from GB/T 16886. Dynamic coagulation test showed that the anticoagulation activity of modified PVDF was slightly superior to PES material. **Conclusion** It is demonstrated that modified PVDF have excellent biocompatibility, thus it could be further studied as biomedical materials.

Key words: polyvinylidene fluoride; hydrophilic modification; biocompatibility

中空纤维膜已经广泛应用于血液透析,目前比较广泛应用的膜材料为聚砜(polysulfone,PSF)和聚醚砜(polyether sulfone,PES)等。由于 PES 的氧醚键取代了 PSF 的异丙基,因此 PES 与 PSF 相比具有更好的亲水性、耐热性和耐腐蚀性,在与强氧化剂接触时不产生自由甲基,因而被认为是目前生物相容性最好的材料之一[1]。聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)是一种性能优良的高分子材料,其突出的化学稳定性、耐辐射特性、抗污染性和耐热性使其广泛应用于膜分离领域[2]。并且 PVDF 膜材料表面光滑,表面性能低,蛋白吸附量较低,不易污染,有望成为血液分离新材料,目前尚未见报道。

生物相容性包括血液相容性和组织相容性[3]。生物材料的血液相容性是指生物材料表面抑制血栓形成和生物材料对血液的溶血现象、血小板功能降低、白细胞暂时性减少、功能下降及补体激活等血液生理功能的影响。它与材料表面亲疏水性、表面能、界面张力及表面荷电性等有密切关系。而材料表面的亲疏水性是影响溶血的一个重要推动力,也是影响蛋白吸附、细胞黏附的一个重要因素[4]。PVDF 树脂由于表面能极低,

作者单位:1.天津工业大学 生物化工研究所,天津 300160;2.天津市第三中心医院,天津 300170

收稿日期:2009–12–08;修回日期:2010–01–05

作者简介:田鹃鹏(1980–),男,河南周口人,硕士研究生,主要从事膜材料在生物医学领域的应用。

通讯作者:吕晓龙。E–mail:luxiaolong@263.net

有极强的憎水性,因此需要对其进行亲水改性。聚乙二醇 (polyethylene glycol,PEG) 和聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)是已知应用比较广且生物相容性好的制膜及改性添加剂,而共混是改善膜性能的最简便而又有效的方法,它可以使膜具有共混材料的综合优点。因此,笔者采用 PEG 和 PVP 两种广泛应用的生物相容性材料对 PVDF 共混改性,制备亲水改性 PVDF 膜,与 PES 相比较,评价其生物相容性。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

PVDF(进口);二甲基乙酰胺(dimethyl acetamide,DMAC)(工业级,韩国三星);PVP(相对分子质量 30 000,进口分装);PEG(相对分子质量为 6 000,进口分装);牛血清白蛋白(相对分子质量 68 000,上海生工生物工程技术服务有限公司进口分装),PES 聚合度 470,进口分装)。

超净工作台 SW-CJ-1F 型(苏州净化设备公司);Thermo Forma371 型 CO_2 细胞培养箱 (美国 Forma 公司); 倒置显微镜 DP71 型 (日本 Olympus 公司); Genios Pro 酶标仪(TECAN 公司)。紫外可见光分光光度计 TU-1810 (北京普析通用仪器有限公司);YH-168A 型接触角测定仪(北京哈科实验仪器厂)。

新西兰大白兔,体质量 2 ~ 3 kg(军事医学科学院动物实验室提供)。

1.2　聚偏氟乙烯的改性

采用共混改性, 将 PEG 和 PVP 分别与 PVDF 按一定配比溶入溶剂之中,配成铸膜液,加入添加剂,在 80 ℃条件下搅拌均匀, 静置 6 h 脱泡后在平板上刮成膜。浸入凝固浴中,待膜自动剥离后,用清水漂洗,然后放置水中冷浸 24 h 备用。笔者将 PEG 改性的 PVDF 称为 $PVDF_1$,将 PVP 改性的 PVDF 称为 $PVDF_2$。

1.3　牛血清标准曲线的配置

用移液管分别精确移取上述标准溶液 10 mL,放于 7 个容量瓶中,加水分别稀释成 500、400、300、200、100、50、25 mg/L 7 种质量浓度,摇匀。以纯水为空白试样,用 TU-1810 紫外可见分光光度计在 278.95 nm 处分别测定吸光度。

1.4　改性聚偏氟乙烯的亲水性测试

将改性 PVDF($PVDF_1$、$PVDF_2$)膜、PES 膜材料洗净烘干,在室温条件下,用 YH-168A 型接触角测试仪测试其接触角,每个样品测 5 次取平均值。

1.5　牛血清白蛋白吸附性能测试

参见文献[5,6],采用间歇实验法将牛血清白蛋白配成质量浓度 1 000 mg/L 的蛋白溶液,调节 pH 为 7.4。将清洗干净的 PVDF($PVDF_1$、$PVDF_2$)膜、PES 膜材料浸泡在配好的蛋白液中 24 h。待其平衡后用 TU-1810 紫外可见分光光度计在 278.95 nm 下测定剩余蛋白液的浓度。

1.6　体外细胞毒性实验

将 PVDF 膜、$PVDF_1$ 膜、$PVDF_2$ 膜、PES 膜裁成 3 cm×4 cm 方块,做无菌处理,制成无菌样品。参见文献[7]制备浸提液。浸提介质:含 10 %血清的细胞培养液。样品浸提比例:每 6 cm^2 样品加 1 mL 浸提介质。阴性对照(高密度聚乙烯):5 %浓度。阳性对照[二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)]:5 %浓度。空白对照:含 10 %血清的细胞培养液。浸提条件:37 ℃,48 h。

培养 L929 达到对数生长期末, 细胞趋于融合,用细胞消化液分散细胞,用细胞培养液配制成密度 1.25×10^4/mL 的细胞悬液。取一块 96 孔板,每孔加入 100 μL 细胞悬液,再补加新鲜的细胞培养液至每孔 200 μL,放置于(37 ± 2) ℃、体积分数 5 % CO_2 培养箱内培养 24 h。

24 h 后,弃去原培养液,每孔分别加入 150 μL 空白对照液、阴性浸提液、阳性浸提液、样品浸提液。每组设 4 个平行组。置于(37 ± 2) ℃、体积分数 5 % CO_2 培养箱内培养。

培养 44 h 后,每孔加入 50 μL MTT(质量浓度 2 μg/mL),置于(37 ± 2) ℃、体积分数 5 % CO_2 培养箱内培养 4 h。弃去原培养液, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)漂洗各孔 1 次,每孔加入 150 μL DMSO,水平震荡 5 min,用酶标仪测定在 490 nm处的吸光度。计算:细胞相对增殖率(RGR)= $\frac{\text{实验样品的吸光度}}{\text{空白对照组的吸光度}}\times100\ \%$。

1.7　溶血实验

将 PVDF 膜、$PVDF_1$ 膜、$PVDF_2$ 膜、PES 膜裁成 3 cm × 4 cm 方块,做无菌处理,制成无菌样品。按照参考文献[8]测试待测膜材料的溶血实验。按 1 cm^2/mL 在(37.0 ± 0.5) ℃无菌条件下用 0.9 % NaCl 溶液洗涤待测膜材料 72 h,制备浸提原液。加入同体积 0.9 % NaCl 溶液制备 50 %浸提液。采用心脏穿刺法抽取兔血 20 mL,加入质量浓度 20 g/mL 草酸钾 1 mL。取新鲜抗凝兔血 2.0 mL,加入 2.5 mL 0.9 % NaCl 溶液制成新鲜抗凝稀释兔血。全部试管在(37.0±0.5) ℃的水浴中预热 30 min。

阳性对照组:蒸馏水 8.0 mL + 稀释兔血 0.2 mL。阴性对照组:0.9 % NaCl 溶液 8.0 mL + 稀释兔血 0.2 mL。实验组:洗涤液 8.0 mL + 稀释兔血 0.2 mL。50 %洗涤

液组：洗涤液 4.0 mL + 0.9 % NaCl 溶液 4.0 mL + 稀释兔血 0.2 mL。

在(37.0 ± 0.5) ℃水浴保温 1 h。在 2 000 r/min 条件下离心 5 min。去上清液，在 550 nm 处测吸光度。

$$OD = (Dt - Dnc)/(Dpc - Dnc)$$

其中：Dt 实验组吸光度；Dnc 阴性对照组吸光度；Dpc 阳性对照组吸光度。

1.8　动态凝血实验

参考文献[9]。将 0.2 mL 新鲜抗凝血滴于 PVDF 膜、$PVDF_1$ 膜、$PVDF_2$ 膜、PES 膜表面，使其滴样大小尽量一样。然后加 0.2 μL 浓度 0.2 mol/L $CaCl_2$ 溶液，同时记录时间在 10、20、30、40、50、60 min 时用蒸馏水冲洗试样表面，将洗液移取至 96 孔板，用酶标仪在 550 nm 处测定每孔的吸光度。做吸光度–时间曲线。

2　结果

2.1　牛血清标准曲线的配置

由该标准液得到的直线方程为 C = 1 536.171 42 (Abs) – 18.743 19。该方程的 R = 0.999 5，表明牛血清白蛋白在此范围内与吸光度呈良好的线性关系。见图 1。

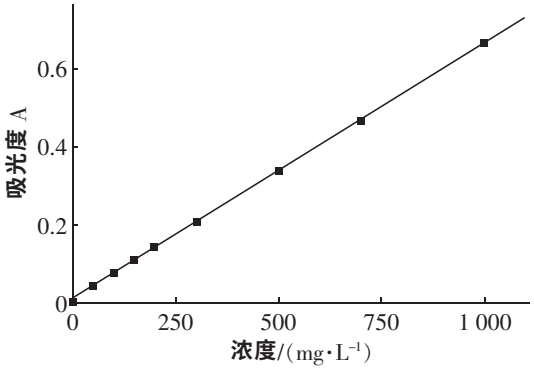

图 1　牛血清白蛋白的标准曲线

Figure 1　Standard curve of bovine serum albumin

2.2　不同膜材料亲水性能和蛋白吸附性能比较

由表 1 可以看出，PES 膜的蛋白吸附量最高，为 93.6 mg/m²，大于 PVDF 膜的蛋白吸附量，这与文献报道的 PVDF 膜的抗污染性一致。改性 PVDF($PVDF_1$ 和 $PVDF_2$)亲水性明显提高，接触角从 86.5°下降为 63.8°、65.7°左右；对牛血清白蛋白的吸附也从 58.6 mg/m² 下降为 25.7 mg/m² 和 38.5 mg/m²，这与材料亲水性提高可降低蛋白吸附性的理论值一致。PES 和 PVDF 在相同的改性条件下，两者的亲水性类似，但是 PVDF 比 PES 有更低的蛋白吸附率。分别用 PEG 和 PVP 改性 PVDF 在亲水性相近的条件下，PEG 改性 PVDF 具有更低的蛋白吸附量，这是由于 PEG 和 PVP 具有电荷性不同引起的表面极性色散比、界面张力、临界表面张力等的不同从而引起对白蛋白的吸附性不同。

表 1　PVDF 和 PES 的亲水性及牛血清白蛋白的吸附

Table 1　Hydrophilcity and bove serum albumin adsorption of PVDF and PES

序号	材料	添加剂	接触角/°	单位蛋白吸附量/mg/m²
1	PVDF	—	86.5	58.6
2	PES	PEG	66.7	93.6
3	$PVDF_1$	PEG	63.8	25.7
4	$PVDF_2$	PVP	65.7	38.5

2.3　体外细胞毒性实验

显微镜下观察：聚乙烯对照组细胞贴壁性良好，形态正常，呈圆形疏松贴壁的细胞少于 10 %。阳性组细胞溶解较多，细胞形态多为圆形。样品组细胞贴壁性良好，形态正常，呈圆形疏松贴壁的细胞少于 20 %，偶见细胞溶解。

阴性对照组的细胞增殖率为 92 %，阳性对照组的细胞增殖率为 38 %，改性的 PVDF 的细胞增殖率分别为 86 %和 81 %，细胞毒性为一级。在相同条件下，PES 的细胞毒性为 78 %，比 PVDF 的细胞毒性稍高，细胞毒性为二级。因此，在细胞毒性上，改性的 PVDF 更符合生物材料对细胞毒性的要求。见图 2。

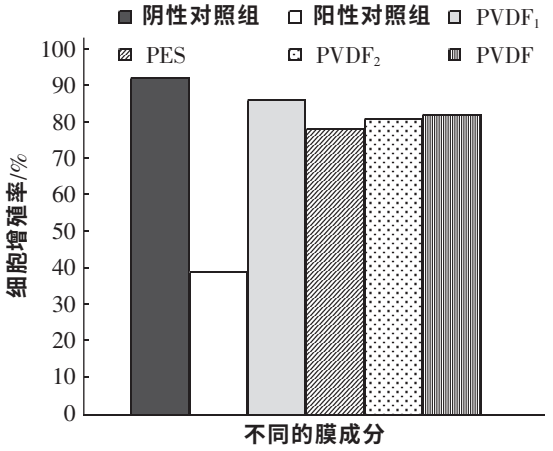

图 2　PVDF 改性前后和 PES 体外细胞毒性实验

Figure 2　*In vitro* cell toxicity tests of PVDF, modified PVDF and PES

2.4　溶血实验

从表 2 中可以看出 PES 实验组和 50 % PES 组溶血率最低，分别为 1.8 %和 0.5 %。改性前 PVDF 和 50 % PVDF 的溶血率分别为 3.9 %和 2.5 %，略小于 5 %的标准，用 PEG、PVP 改性后，PVDF 的溶血率有所下降分别为 2.9 %和 2.4 %，比改性前更符合医用生物材料的溶血实验要求。

2.5　动态凝血实验

从图 3 可以看出，经过改性后，PVP 改性 PVDF 表面抗凝血性能比对照组 PES 膜材料略好，PEG 改

表 2　PVDF 改性前后和 PES 的溶血实验

Table 2　Heamolysis-test of PVDF, modified PVDF and PES

实验分组	吸光度			平均值	溶血率 /%
	1#	2#	3#		
阳性对照组	0.276 0	0.270 7	0.275 5	0.274 0	
阴性对照组	0.016 5	0.016 9	0.014 7	0.016 0	
PES 浸提液	0.026 0	0.016 4	0.019 9	0.020 8	1.8
50 %PES 浸提液	0.016 4	0.016 2	0.019 5	0.017 4	0.5
$PVDF_2$ 浸提液	0.026 3	0.026 2	0.014 5	0.023 3	2.4
50 % $PVDF_2$ 浸提液	0.017 5	0.019 0	0.018 6	0.018 4	0.9
$PVDF_1$ 浸提液	0.023 6	0.019 9	0.027 6	0.023 7	2.9
50 % $PVDF_1$ 浸提液	0.020 4	0.015 6	0.024 5	0.020 2	1.6
PVDF 浸提液	0.027 6	0.026 9	0.024 1	0.026 2	3.9
50 % PVDF 浸提液	0.024 5	0.020 5	0.022 3	0.022 4	2.5

性 PVDF 的抗凝血性能比对照组 PES 有了很大提高,更符合国家标准对材料的抗凝血性能要求。

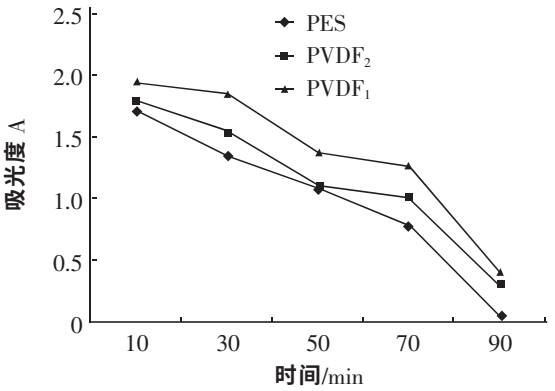

图 3　改性 PVDF 与 PES 的动态凝血时间比较

Figure 3　Dynamic coagulation time of PVDF, modified PVDF and PES

3　讨论

生物相容性是生物材料研究贯穿的主题,国际标准化组织制定了医用材料的生物相容性评价指导原则及标准实验方法的国际标准。近期许多学者认为应该用整体的观念来研究生物材料的生物相容性。现代研究生物相容性要从如下 3 个方面考虑:材料对人体免疫防御系统的作用,以及这种作用反过来对材料相互作用的影响;局部反应引起全身反应,全身反应又影响到材料间的相互作用;局部反应与全身反应相互作用的时间顺序。明确生物材料的生物相容性反应不仅要了解材料的表面变化,还要考虑到体液和细胞的全身变化[10,11]。国际标准化组织规定与人体接触的医疗器械与材料必须进行细胞毒性实验,这是因为细胞毒性实验具有通用性。因为膜状材料比重小,实验采用的浸提液细胞毒性实验,阴性对照组的细胞增殖率大于 90 %, 改性 PVDF 的细胞增殖率大于 80 %,说明应用 PEG 和 PVP 改性 PVDF 只有轻微的细胞毒性。

由于凝血机制和体内环境的复杂性,生物材料的血液相容性研究比组织相容性更困难,到目前为止还没有建立一套相关的评价标准,只能提出评价的基本要求,从溶血、凝血、血栓生成等方面进行评价[12]。溶血实验是通过对材料与血红细胞在体外接触所导致的红细胞溶解和血红蛋白游离程度的测定来评价材料的血液相容性,该实验能敏感地反映实验材料对血红细胞的毒性,是一种特别的材料筛选方式。实验采用的新西兰大白兔血红细胞和草酸钾制成的新鲜抗凝兔血来进行实验,PVP 和 PEG 改性 PVDF 溶血率均不大于 5 %,符合医用材料的溶血率要求。

对于凝血系统的检查有各种凝血时间的测定,比如凝血酶原时间和活化部分凝血酶时间等。凝血时间越长说明凝血因子被激活的程度越低,从而材料的抗凝血效果越好。实验中,两种改性 PVDF 的抗凝血性能都比 PES 有一定的提升,更符合临床要求。从材料凝血机制方面看, 血液凝固时有血液中的血浆蛋白、凝血因子等参加的复杂反应,材料的介入使凝血反应更加复杂。当血液和材料相接触,首先发生血浆蛋白的吸附,随后的凝血反应发生在血液和吸附的蛋白相互作用中。改性 PVDF 膜与 PES 膜比较,两者亲水性类似,但对白蛋白与纤维蛋白的吸附不同,从而对血小板的黏附不同导致抗凝血效果不同[13~15]。

实验选择细胞毒性实验、溶血实验、蛋白吸附实验、凝血实验对改性 PVDF 的生物相容性做了初步评价, 证明了 PEG 和 PVP 改性 PVDF 对 L929 细胞的毒性较小,对兔的溶血率小于 5 %,抗凝血效果较好,有良好的生物相容性,为以后进一步研究改性 PVDF

的临床应用提供依据。

4 结论

(1)应用 PEG 和 PVP 共混改性 PVDF 膜的亲水性能提高,同时蛋白吸附性下降。

(2)亲水改性 PVDF 膜的细胞毒性为一级,溶血率小于 5%,抗凝血性能较好,有良好的血液相容性,符合医用材料的溶血实验要求。

参考文献:

[1] SU Bai-hai, LI Mei, TAO Ye, *et al*. A clinical trial of polyethersulfone highflux dialyzer for uremic patients[J]. Chinese Journal of Evidence-based, 2006, 6(7): 475-478.[苏白海,李玫,陶冶, 等. 国产高通量聚醚砜血液透析器对尿毒症患者进行血液透析的随机双盲对照试验[J]. 中国循证杂志,2006,6(7):475-478.]

[2] LI Yan, Lü Xiao-long. Research progress of modification of poly (vinylidene fluoride) porous membrane[J]. Journal of Tianjin Institute of Textile Science and Technology, 2001,20(5): 77-81.[黎雁, 吕晓龙. 聚偏氟乙烯多孔膜的改性研究进展[J]. 天津工业大学学报,2001,20(5):77-81.]

[3] Demirkan F, Eskandari MM, Arslan E. Salvage by heparinized blood injection through the alternate pedicle in a toe transplant[J]. Plast Reconstr Surg, 2001, 108(2): 579-580.

[4] Peppas NA, Langer R. New challenges in biomaterials[J]. Science, 1994,263(5154): 1715-1720.

[5] CHEN Hong, LIN Yi-zheng, JIANG Cheng-zhang. Adsorption of protein on polysulfone ultrafiltration membrane[J]. Technologe of Water Treatment, 1992, 18(5): 303-308.[陈红, 林一铮,江成璋. 聚砜超滤膜的蛋白质吸附行为[J]. 水处理技术,1992,18(5):303-308.]

[6] YU Tian, WANG Hai-tao, DU Qi-yun, *et al*. The adsorption properties for BSA of PES membrane[J]. Journal of Functional Materials, 2009, 40(2): 301-304.[于湉,王海涛,杜启云,等. 聚醚砜微孔膜对牛血清蛋白吸附性能的研究[J]. 功能材料,2009,40(2):301-304.]

[7] GB/T 16886.5-2003/ISO 10993-5: 1999, Biological evaluation of medical devices- Part 5: Test for *in vitro* cytotoxicity[S]. 80-85. [GB/T 16886.5-2003/ISO 10993-5:1999,医疗器械生物学评价第 5 部分:体外细胞毒性试验[S]. 80-85.]

[8] HAO Li-bo, ZHANG Xiao-bin, XING Qing-chang, *et al*. Blood compatibility of RNA III inhibiting peptide/bioinspired phosphorylcholine-based cytomembrane coating[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008,12(45): 8823-8826.[郝立波,张晓斌,邢庆昌,等. RNAIII抑制肽/磷酸胆碱基细胞膜仿生药物涂层的血液相容性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(45):8823-8826.]

[9] LI Xiao-yan, JIANG Rong-jing, LIU Jian-ping, *et al*. Blood compatibility of 316L stainless steel applied with silk peptide/chitosan polymeric coating[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008,12(23): 4461-4464.[李晓燕,蒋容静,刘建平,等. 316L 不锈钢经丝素肽/壳聚糖聚合物涂层后的血液相容性[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(23):4461-4464.]

[10] From yesterday to today: The advances of biomaterial research [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(3): 442-443. [让昨天告诉今天:生物材料研究的学术与技术进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(3):442-443.]

[11] WU Gang-qiang, LANG Zhong-min, HE Wen-xiu, *et al*. Application and development prospects of biomedical materials[J]. Inner Mongulia Petrochemical Industry, 2009, 21: 5. [吴刚强,郎中敏,赫文秀,等. 生物医学材料的应用现状及发展前景[J]. 内蒙古石油化工,2009,21:5.]

[12] Borsani E, Salgarello S, Mensi M, *et al*. Histochemical and immunohistochemical evaluation of gingival collagen and metalloproteinases in pri-implantitis[J]. Acta Hitochem, 2005, 107(3): 233-240.

[13] Chua PH, Neoh KG, Kang ET, *et al*. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion[J]. Biomaterials, 2008, 29(10): 1412-1421.

[14] Brynda E, Houska M, Jirousková M, *et al*. Albumin and heparin multilayer coatings for blood-contacting medical devices[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(2): 249-257.

[15] Xiong J, Li Y, Wang X, *et al*. Mechanical properties and bioactive surface modification via alkali-heat treatment of a porous Ti-18Nb-4Sn alloy for biomedical applications[J]. Acta Biomater, 2008, 4(6): 1963-1968.