

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.15.008

文章编号: 1005-8982(2016)15-0044-06

论著

VEGF-165/ANG-1 双基因共转染血管内皮祖细胞 复合多孔生物活性玻璃的生物相容性研究*

冯永增, 王成贵, 水小龙, 余洋, 蔡乐益, 徐华梓

(温州医科大学附属第二医院 创伤骨科, 浙江 温州 325000)

摘要: **目的** 制备一种具有诱导血管再生活性的新型复合骨组织工程材料, 并评价其生物相容性。**方法** 将血管内皮生长因子-165(VEGF-165)/血管生成素-1(ANG-1)双基因共转染的血管内皮祖细胞(EPCs)复合多孔生物活性玻璃, 制成复合人工骨材料。采用 Western blot、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测已转染 EPCs 中 VEGF-165 及 ANG-1 的表达。噻唑蓝(MTT)细胞毒性试验、骨植入试验及扫描电镜观察细胞在材料表面黏附情况等综合评价材料的生物相容性; CD31 免疫组织化学法染色观察材料中血管再生的情况。**结果** Western blot 检测、RT-PCR 反应显示, 实验组 VEGF-165、ANG-1 的表达较对照组升高。MTT 细胞毒性试验、骨植入试验均显示, 材料无毒性反应。扫描电镜显示, 材料表面有较多血管内皮祖细胞黏附, 并有较多伪足伸出。苏木精-伊红染色法(HE)染色显示, 材料周围组织生长良好, 未见明显的炎症细胞浸润, 材料与周围组织交界处有大量的新骨生成。CD31 免疫组织化学法染色显示, 材料中有较多新生的毛细血管。**结论** VEGF-165/ANG-1 双基因共转染 EPCs 复合多孔生物活性玻璃的骨组织工程材料生物相容性良好, 具备一定的诱导血管再生活性。

关键词: 血管内皮生长因子-165/血管生成素-1 双基因; 生物活性玻璃; 骨材料; 生物相容性; 血管再生
中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A

Biocompatibility of porous bioactive glass-ceramic loaded with VEGF165 and ANG1 gene cotransfected EPCs*

Yong-zeng Feng, Cheng-gui Wang, Xiao-long Shui, Yang Yu, Le-yi Cai, Hua-zi Xu
(Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical
University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Abstract: Objective To prepare a novel bone tissue engineering material with angiogenesis activity, and evaluate the biocompatibility and safety of the composites. **Methods** Endothelial progenitor cells (EPCs) were cotransfected with VEGF165 and ANG1 genes and loaded into porous bioactive glass-ceramic to make the composite. The expressions of VEGF165 and ANG1 in EPCs were detected by RT-PCR and Western blot. MTT cytotoxicity test, bone implantation test and electron microscopic examination were used to comprehensively evaluate the biocompatibility of the composite. Immunohistochemical staining of CD31 was used to analyze revascularization of the composite zones. **Results** Both RT-PCR and Western blot showed cotransfected EPCs expressed increased VEGF165 and ANG1. The results of MTT cytotoxicity test and bone implantation test showed that the material was non-toxic. Scanning electron microscope displayed many EPCs adhered to the surface of the material, and had a lot of pseudopods. HE staining revealed tissue surrounding the material grew well without marked inflammatory cell infiltration. CD31 immunohistochemical staining indicated newly-

收稿日期: 2015-12-28

* 基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(No: 2016KYA138); 浙江省温州市公益性科技计划项目(No: Y20140569)

formed capillaries into the material, demonstrating that the new tissue engineering material has good biocompatibility. **Conclusions** The composite of porous bioactive glass-ceramic loaded with VEGF165 and ANG1 gene cotransfected EPCs has good biocompatibility, and can improve angiogenesis.

Keywords: VEGF165; ANG1; bioactive glass-ceramic; bone tissue engineering material; biocompatibility; angiogenesis

由于创伤、感染、肿瘤等原因造成的各种类型骨缺损是临床上遇到的常见问题。研制出理想的骨修复材料一直是生物材料学和临床医学努力探索的一个方向。生物活性玻璃作为一种新型的人工骨材料,因其具有良好的成骨诱导活性而被广泛用于临床治疗和实验研究,但血管化能力差,限制其在骨缺损修复中的推广应用^[1]。转基因工程技术的发展为解决这一难题提供新的思路和方法^[2]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是体内促进血管新生的最重要因子,而 VEGF-165 在 VEGF 家族中活性最强,分布范围广,是体内发挥作用的主要形式。但 VEGF 诱导的新生血管结构不完整,渗漏性强,易形成水肿,不成熟,血管多数难以发挥正常功能^[3]。血管生成素-1(Angiopoietin-1, ANG-1)能够完成血管的精细结构,促使血管成熟,有效防止炎症及 VEGF 所致的血管通透性增加,减少渗出水肿等副反应^[4]。PETERS 等^[5]研究认为,联合应用 VEGF 与 ANG-1 具有协同作用,不但可以促进血管生成,而且会使新生血管结构更成熟稳定,功能更健全,促进缺血心肌、肢体的血管再形成。

本研究将 VEGF-165 与 ANG-1 双基因共转染的血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)种植于多孔生物活性玻璃内,以期制备一种具有诱导血管再生活性的骨组织工程材料,并通过细胞水平和动物水平综合评价其生物相容性。

1 材料与方法

1.1 实验试剂、材料及动物

4 月龄新西兰大耳兔 14 只,体重 3.0~3.5 kg,雌雄不限(4 只用于分离提取血管内皮祖细胞,10 只用于骨植入实验)。

胎牛血清、磷酸缓冲盐溶液、改良达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium, DMEM)(美国 Gibco 公司),胰酶(美国 Gibco 公司),青链双抗(北京 Leagene 公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司),VEGF-165、ANG-1 抗体(英国 Abcam 公司),CD31

(美国 RD Systems 公司),噻唑蓝[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 试剂盒(上海碧云天生物技术研究),Ad.VEGF-165 和 Ad.ANG-1 腺病毒载体(北京诺赛公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 材料的制备及其结构特点 使用磷酸三乙酯(triethyl phosphate, TEP)作为 P_2O_5 的前驱体,正硅酸乙酯(tetraethyl orthosilicate, TEOS)作为 SiO_2 的前驱体,硝酸盐 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 作为碱金属和碱土金属氧化物的前驱体。TEOS 和 TEP 在酸或碱的催化作用下在水溶液中进行水解形成溶胶,然后加入 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 等均均匀混合,陈化后得到凝胶,经过干燥和煅烧后得到玻璃。最后切成 5 mm 厚度的片状,环氧乙烷消毒。扫描电子显微镜观察复合材料的表面微观结构。

1.2.2 血管内皮祖细胞的培养 本研究所采用的细胞为兔血管内皮祖细胞,其原代培养及鉴定参照相关文献^[6-7],细胞密度 >80%后进行传代,每 3 d 换液 1 次。分别于第 3 和 5 天在倒置显微镜下观察细胞形态及生长情况。

1.2.3 双基因腺病毒载体的构建及对兔 EPCs 的转染 构建腺病毒载体 Ad.VEGF-165 和 Ad.ANG-1,取培养的第 3 代血管内皮祖细胞,胰酶消化后,以 1×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔板,置于 5% 二氧化碳 CO_2 浓度,37℃的细胞培养箱中。于对数生长期时,以感染复数为 100 进行体外转染 EPCs。并将 EPCs 分为 4 组:VEGF-165 及 ANG-1 双基因共转染组、VEGF-165 单基因转染组、ANG-1 单基因转染组、无转染 EPCs 组。通过 Western blot 检测、逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)等方法检测 VEGF-165 及 ANG-1 蛋白在细胞内的表达和分泌。

1.2.4 MTT 细胞毒性试验 将制备好的片状材料浸没于含 10%胎牛血清、1%青链双抗的 DMEM 培养基中,固液比例为 0.2 g/ml,37℃浸提 48 h,浸提液经 0.22 μm 过滤器过滤后置于 4℃冰箱冷冻保存备

用。将上述 4 组 EPCs 分别接种于 25 mm² 细胞培养瓶中,置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中。于对数生长期时,用 2.5%胰蛋白酶消化 1~2 min,轻轻吹打制成细胞悬液。按 2 000 细胞/孔的密度接种于 96 孔板上,置于 37℃细胞培养箱中培养 4 h 后,待细胞贴壁后去除原先的培养基,各组分别加入上述预先制备好的材料培养基浸提液。于接种后的第 1、3 和 5 天分别取出各一块 96 孔板,每孔加入 10 μl MTT 试剂,4 h 后用酶标仪测波长 570nm 处的光密度。

1.2.5 扫描电镜 将 VEGF-165/ANG-1 双基因共转染的 EPCs,在其对数生长期时,用 2.5%胰蛋白酶消化,制成细胞悬液,接种于已制备好的多孔生物活性玻璃,并加入细胞培养基,37℃,5%CO₂ 细胞培养箱中培养 72 h。取出骨材料,2.5%戊二醛固定,酒精及叔丁醇梯度脱水,离子溅射喷金,于扫描电镜下观察材料表面细胞的形态变化和生长状况。

1.2.6 骨植入试验 取 20 只健康新西兰大耳白兔,随机分成实验组和对照组,每组 10 只。用 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔麻醉后,于右侧膝关节外侧备皮,碘伏消毒后,暴露股骨外侧髁,保护神经和血管。剥离骨膜后于外侧髁上以直径 5 mm 的钻头钻孔,钻入长度为 10 mm。实验组植入转染双基因 EPCs 的复合材料,对照组植入无复合任何种子细胞的材料。然后逐层缝合切口。术后 80 万 u 青霉素抗感染 3 d。各组分别于术后 4 和 8 周将 5 只兔子安乐死,取材做病理切片,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法观察新骨生长及材料周边的炎症情况。CD31 免疫组织化学法染色观察材料中血管再生的情况。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较用方差分析,若方差齐则两两之间的多重比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多孔生物活性玻璃的表面微观结构

制得的 SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ 多孔生物活性玻璃孔隙率在 70%左右,而且孔径大小为 100~300 μm,孔隙之间的连通性良好,具备种子细胞生长的良好条件。见图 1。

2.2 细胞形态及生长状况

培养的第 3 天可见细胞基本贴壁并开始进入增殖分裂。第 5 天细胞数量明显增多,基本长满培养

瓶,可见细胞增殖旺盛,生长状况良好。见图 2。

2.3 Western blot 检测

实验组与对照组比较,VEGF-165 及 ANG-1 双基因共转染组血管内皮祖细胞中 ANG-1、VEGF-165 的表达量均高于对照组。见图 3。

2.4 RT-PCR 反应

各组血管内皮祖细胞中 VEGF-165 和 ANG-1 的表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($F = 9.419$ 和 28.413 , $P = 0.003$ 和 0.000)。VEGF-165 及 ANG-1 双基因共转染组血管内皮祖细胞中 VEGF-165 和 ANG-1 的表达量与对照组比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义($t = -1.260$ 和 -1.960 , $P = 0.001$ 和 0.000),VEGF-165 及 ANG-1 双基因共转染组血管内皮祖细胞中 VEGF-165 和 ANG-1 的表达量较对

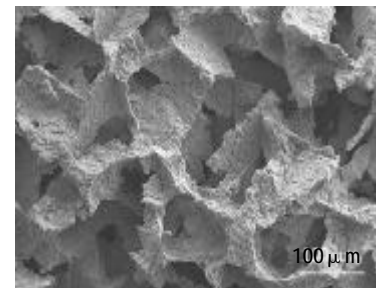


图 1 电镜观察制备的 SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ 多孔结构骨材料

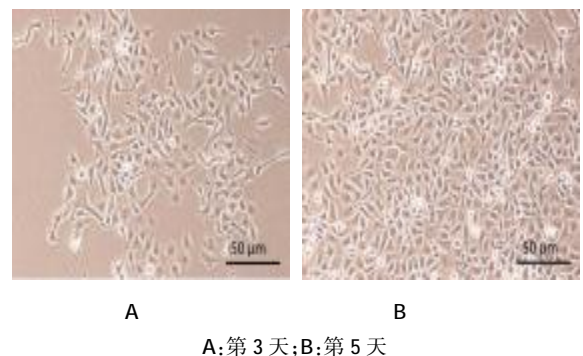
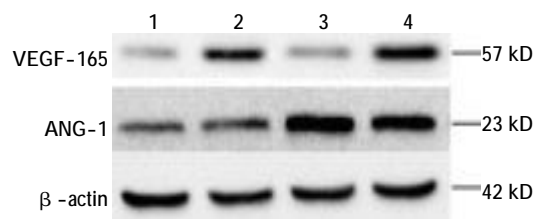


图 2 细胞的生长状况 (×200)



1: 对照组; 2: +Ad.VEGF-165; 3: +Ad.ANG-1; 4: +Ad.VEGF-165/Ad.ANG-1

图 3 血管内皮祖细胞中 ANG-1、VEGF-165 翻译水平的相对表达量

照组增高。见图 4。

2.5 MTT 细胞毒性试验

细胞接种后第 1、3 和 5 天进行 MTT 检测,采用重复测量数据的方差分析结果:①不同时间点测得的光密度值比较差异有统计学意义($F=59.420, P=0.004$),各组光密度值均随着时间的延长而升高;②不同组别间的光密度值比较,差异无统计学意义($F=9.358, P=0.098$),表明各组细胞增殖能力一致。见附表和图 5。

2.6 扫描电镜

扫描电镜可见血管内皮祖细胞黏附在材料表面,形态饱满,呈梭形,有较多的伪足伸出并相互连接融合。种植后第 8 与第 4 天扫描电镜结果比较,

可见血管内皮祖细胞显著增多,表明细胞与复合材料的生物相容性良好。见图 6。

2.7 骨植入试验

病理切片 HE 染色显示,实验组和对照组材料

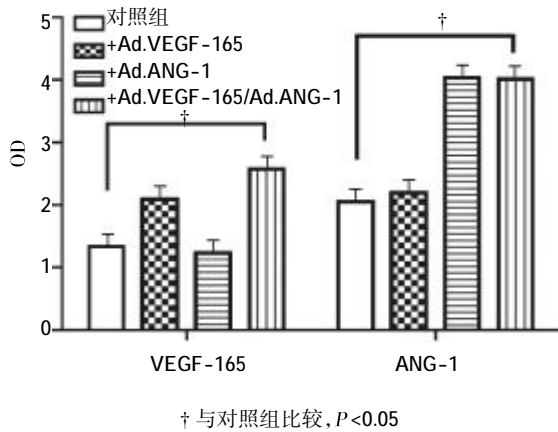


图 4 血管内皮祖细胞中 VEGF-165、ANG-1 转录水平的相对表达量

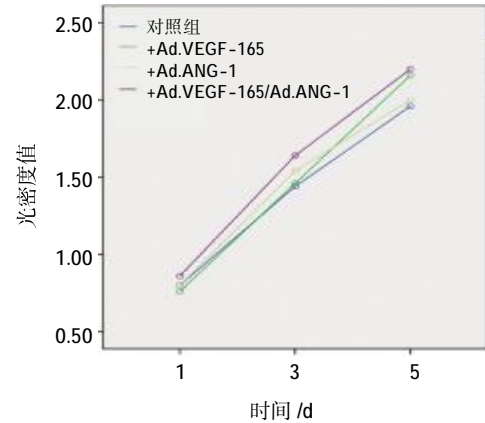
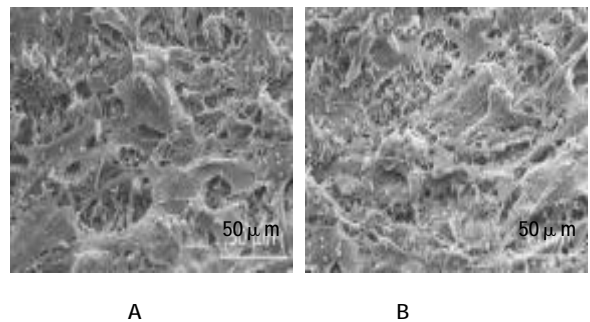


图 5 各组细胞第 1、3 和 5 天 MTT 检测结果的变化趋势

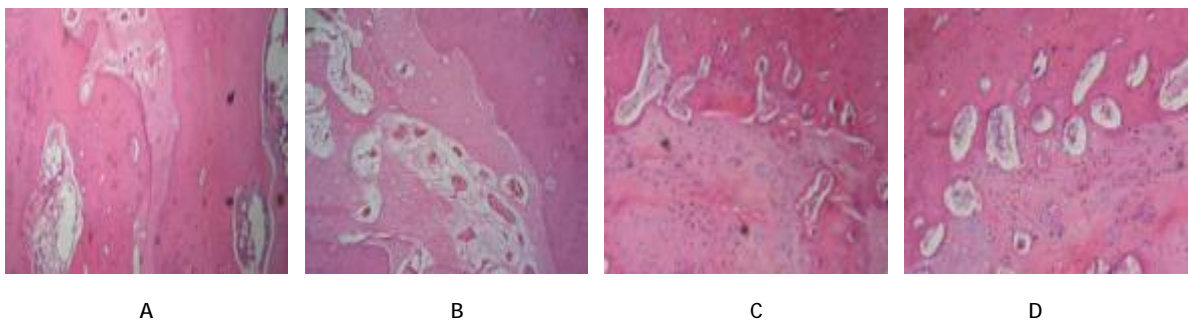


A: 第 4 天; B: 第 8 天

图 6 材料表面种植细胞后第 4 和 8 天扫描电镜结果

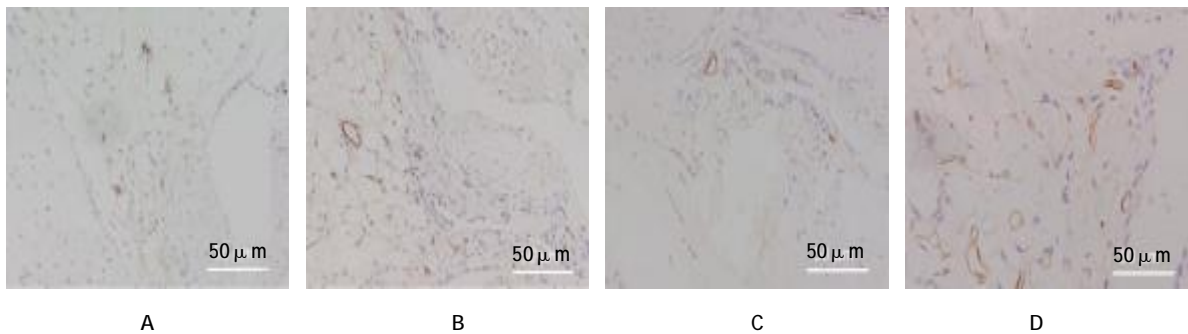
附表 各组细胞第 1、3 和 5 天光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第 1 天	第 3 天	第 5 天
对照组	5	0.800 ± 0.158	1.440 ± 0.219	1.960 ± 0.114
+Ad.VEGF-165	5	0.760 ± 0.194	1.460 ± 0.240	2.160 ± 0.304
+Ad.ANG-1	5	0.800 ± 0.187	1.540 ± 0.114	2.000 ± 0.365
+Ad.VEGF-165/Ad.ANG-1	5	0.860 ± 0.207	1.640 ± 0.181	2.200 ± 0.264



A: 术后 4 周对照组; B: 术后 4 周实验组; C: 术后 8 周对照组; D: 术后 8 周实验组

图 7 术后 4 和 8 周骨切片 HE 染色结果 ($\times 100$)



A: 术后 4 周对照组; B: 术后 4 周实验组; C: 术后 8 周对照组; D: 术后 8 周实验组

图 8 术后 4 和 8 周 CD31 免疫组织化学法染色结果 (×100)

周围组织及交界部位生长状态良好,未见明显的炎症细胞浸润,材料外层已经开始降解;实验组有较多的新生骨质(见图 7)。CD31 免疫组织化学法染色显示,实验组材料中有较多新生的毛细血管(见图 8)。

3 讨论

由于创伤、感染、肿瘤等原因造成的各种类型骨缺损是临床上遇到的常见问题。目前自体骨移植仍然是治疗骨缺损的金标准^[6]。但自体骨存在供骨量少,不能满足大面积植骨的需求,且供区易出现损伤、感染、疼痛等并发症^[9]。因此,研制出理想的人工骨修复材料已成为临床医学和生物材料学努力探索的一项热门课题。单一成分的组织工程骨修复小段骨缺损时,其早期成骨及后期骨愈合效果良好,但在用于修复大段骨缺损时,其材料内部往往容易出现缺血性坏死,导致修复失败,其主要原因就在于没有很好地解决组织工程骨的血管化问题,血管化问题现已成为制约组织工程骨应用于临床的瓶颈^[10]。

EPCs 是一群尚未表达成熟血管内皮细胞表型,具有游走性,能分化为血管内皮细胞,参与血管形成,并能在出生后的血管新生过程中促进血管生成^[11-12]。这一发现也为解决组织工程骨血管化问题提供新的思路^[13]。但是由于 EPCs 的细胞数量少,获取难度大,体外培养周期长,培养时需要扩增等缺点,限制其在临床研究及动物实验中的应用。近年来,随着基因工程技术的飞速发展,转基因的组织工程技术为血管化提供新的思路和方法。SHE 等^[14]报道,应用 VEGF-165 基因转染的 EPCs 能明显促进缺血心肌中血管新生,从而明显改善大鼠急性心肌梗死后的心功能。SHEN 等^[15]研究表明,单纯应用 VEGF 或 ANG-1 基因转染,仅能使脑缺血体积分别减少 36% 和 33%,假如两者协同转染,可使脑缺血体积减少 44%。因此,学者们可以通过将 VEGF-165 与 ANG-1

双基因共转染 EPCs,弥补其数量不足的缺点,增强 EPCs 的新生血管特性,能大大优化 EPCs 的促血管新生效果。

目前,生物活性玻璃支架材料的研究与应用已经成为生物医学材料学科的研究热点^[16]。ZHOU^[17]和 SANTOCILDES-ROMERO 等^[18]实验研究证实,生物活性玻璃能够在早期诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化和基质矿化,说明其具有一定的骨诱导性,但其血管化能力差限制其在节段性骨缺损中的应用^[1]。因此,笔者将转染双基因的 EPCs 种植于多孔生物活性玻璃内,以期构建兼具骨诱导及血管生成诱导活性的组织工程骨材料,并对其生物相容性进行研究。

组织工程骨作为一种植入人体的医用材料,必须具有良好的生物相容性和生物安全性^[19]。根据我国卫生部门的相关标准,对于长期植入人体的材料必须进行生物安全性评价^[20]。因此,本实验从细胞水平和动物水平两方面,观察复合组织工程骨的生物相容性。从细胞水平来看,MTT 细胞毒性实验、扫描电镜的结果表明,所制备的材料对转染的 EPCs 无毒性,细胞在材料表面增殖明显。从动物水平来看,病理切片 HE 染色及 CD31 免疫组织化学法染色可见组织工程骨周围与其交界处有较多的新生骨质,植入的材料周围组织生长良好,未见明显的炎症细胞浸润,同时材料中已长入较多的新生毛细血管,表明复合材料的生物相容性良好,具备一定的诱导血管生成活性和促进骨缺损修复的作用。

综上所述,VEGF-165/ANG-1 双基因共转染 EPCs 复合多孔生物活性玻璃人工骨材料具有良好的生物相容性,并具备一定促进血管生成和骨缺损修复的作用。但是,该复合材料在修复节段性骨缺损的作用如何,材料的具体降解速率及新生血管的定量分析都将有待下一步的动物实验及临床应用检验。

参 考 文 献:

- [1] DETSCH R, STOOR P, GRÜNEWALD A, et al. Increase in VEGF secretion from human fibroblast cells by bioactive glass S53P4 to stimulate angiogenesis in bone[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(11): 4055-4061.
- [2] ZOU D, ZHANG Z, HE J, et al. Blood vessel formation in the tissue-engineered bone with the constitutively active form of HIF-1 α mediated BMSCs[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2097-2108.
- [3] ADAS G, PERCEM A, ADAS M, et al. VEGF-A and FGF gene therapy accelerate healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study)[J]. *Int J Surg*, 2011, 9(6): 467-471.
- [4] OHARA S, KAWASAKI Y, ABE Y, et al. Role of vascular endothelial growth factor and angiopoietins 1 in renal injury in hemolytic uremic syndrome[J]. *Am J Nephrol*, 2012, 36(6): 516-523.
- [5] PETERS K G. Vascular endothelial growth factor and the angiopoietins: working together to build a better blood vessel[J]. *Circ Res*, 1998, 83(3): 342-343.
- [6] 王盛, 管珩. 兔血管内皮祖细胞的分离及诱导分化[J]. *心肺血管病杂志*, 2008, 27(5): 297-300.
- [7] 吴波, 卢正茂, 王尧, 等. 兔骨髓源性血管内皮祖细胞的分离、培养及鉴定[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(2): 454-457.
- [8] SHI Q, LI Y, SUN J, et al. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(28): 6644-6649.
- [9] CHEN J, SHI Z D, JI X, et al. Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(5/6): 716-728.
- [10] POST M J, RAHIMI N, CAOLO V. Update on vascularization in tissue engineering[J]. *Regen Med*, 2013, 8(6): 759-770.
- [11] ZHANG M, MALIK A B, REHMAN J. Endothelial progenitor cells and vascular repair[J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(3): 224-228.
- [12] MITCHELL A, FUJISAWA T, NEWBY D, et al. Vascular injury and repair: a potential target for cell therapies[J]. *Future Cardiol*, 2015, 11(1): 45-60.
- [13] KERAMARIS N C, KAPTANIS S, MOSS H L, et al. Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in bone healing[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2012, 7(4): 293-301.
- [14] SHE Q, XIA S, DENG S B, et al. Angiogenesis in a rat model following myocardial infarction induced by hypoxic regulation of VEGF165 gene-transfected EPCs[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(6): 1281-1287.
- [15] SHEN F, WALKER E J, JIANG L, et al. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(12): 2343-2351.
- [16] BI L, ZOBELL B, LIU X, et al. Healing of critical-size segmental defects in rat femora using strong porous bioactive glass scaffolds[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2014, 42(9): 816-824.
- [17] ZHOU Y, LI H, LIN K, et al. Effect of heat treatment on the properties of SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ bioactive glasses[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(9): 2101-2108.
- [18] SANTOCILDES-ROMERO M E, CRAWFORD A, HATTON P V, et al. The osteogenic response of mesenchymal stromal cells to strontium-substituted bioactive glasses[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, 9(5): 619-631.
- [19] LEDERMAN M, SHARON E, LIPOVEZKY-ADLER M, et al. Biocompatibility of composites-literature review[J]. *Refuat Hapeh Vehashinayim*, 2015, 32(1): 21-29.
- [20] 须建, 彭坤, 甘晓玲, 等. D,L-聚乳酸基形状记忆聚合物的生物安全性和细胞相容性[J]. *中国组织工程研究*, 2013, (38): 6753-6758.

(童颖丹 编辑)