

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)12-1074-03

# 携载 VEGF 基因的聚四氟乙烯血管材料对内皮细胞生长的促进作用

陶思丰 陈力 许远 田华 李国刚 陈健 (浙江大学医学院附属第二医院普外科 浙江 杭州 310009)

## Promotive effect of polytetrafluoroethylene vascular grafts carrying VEGF gene on the growth of endothelial cells

TAO Si-Feng, CHEN Li, XU Yuan, TIAN Hua, LI Guo-Gang, CHEN Jian

Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

**【Abstract】** AIM: To investigate whether vascular endothelial growth factor (VEGF) gene plasmid carried by polytetrafluoroethylene (PTFE) vascular grafts can be transferred to endothelial cells (ECs) and promote the growth of ECs. **METHODS:** The PTFE vascular grafts carrying pCDI-hVEGF<sub>121</sub> or pCDI were soaked in normal saline. The optical density of the solution at 260 nm and the DNA concentration were measured at 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 and 72 h, then the release curve was made. ECs were derived from human umbilical vein. ECs were seeded on the PTFE materials carrying pCDI-hVEGF<sub>121</sub> or pCDI, the number of ECs was counted and VEGF protein concentration was measured by ELISA method at 6, 24, 72 and 120 h. **RESULTS:** The release curve showed the plasmid was released quickly during 0.5-4 h, then slowly, but continuously even after 72 h. At 24, 72 and 120 h, the number and proliferation rate of ECs on PTFE materials carrying pCDI-hVEGF<sub>121</sub> were higher than those on PTFE materials carrying pCDI ( $P < 0.05$ ). VEGF protein concentration of the former was higher than that of the latter at 6, 24, 72 and 120 h ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** The PTFE graft can be used as a carrier of VEGF gene plasmid and help VEGF gene transfection into ECs for promoting the growth of ECs.

**【Keywords】** polytetrafluoroethylene; vascular endothelial growth factors; blood vessel prosthesis; genes; endothelium, vascular/cytology

**【摘要】** 目的: 研究聚四氟乙烯(PTFE)血管材料携载血管

收稿日期 2005-08-22; 接受日期 2005-10-14

基金项目 浙江省科研计划基金项目(991110052) 浙江省医药卫生科学基金基金项目(2000A110)

通讯作者 陈力. Tel: (0571) 87783582 Email: zhenli@mail.hz.zj.cn  
作者简介 陶思丰. 博士生(导师陈力). Tel: (0571) 87783582

Email: taosifeng@yahoo.com.cn

内皮生长因子(VEGF)基因并促进内皮细胞生长的可行性。方法: 将 pCDI-hVEGF<sub>121</sub>/pCDI 质粒溶液处理过的 PTFE 人工血管修剪成圆片, 置于生理盐水中并于 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 和 72 h 测定溶液的吸光度, 计算出溶液的 DNA 浓度, 绘出体外释放曲线。分离和培养人脐静脉内皮细胞, 将内皮细胞种植到携带基因质粒的 PTFE 材料表面, 在 6, 24, 72 和 120 h 检测细胞增殖情况并用 ELISA 法检测培养液中 VEGF 蛋白的表达量。结果: 体外释放曲线提示在 0.5~4 h 的这段时间内, 质粒释放较快, 随后进入缓慢增长期, 直至 72 h 仍有质粒的释放。在 24, 72 和 120 h 时间点, VEGF 质粒组 PTFE 材料上的内皮细胞数和增长倍率都明显高于空质粒组材料 ( $P < 0.05$ ), 在 6, 24, 72 和 120 h 时间点, VEGF 质粒组培养液的 VEGF 蛋白水平和增长倍率也明显高于空质粒组 ( $P < 0.01$ )。结论: 证实了 PTFE 材料携带 VEGF 基因转染内皮细胞并具有促进其生长的可能性。

**【关键词】** 聚四氟乙烯; 血管内皮生长因子类; 人工血管; 基因; 内皮; 血管/细胞学

**【中图分类号】** R654.3 **【文献标识码】** A

## 0 引言

聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)作为良好的人工血管材料而广泛应用于临床, 但如何促进移植血管表面内皮细胞的生长而提高通畅率还是一个有待研究的课题。近年来利用基因治疗血管性疾病已经取得了一定的疗效, 并开始运用基因来改造人工血管以期获得促进内皮生长的效果。在众多已发现的诱导血管生长的因子中, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)被认为是诱导血管内皮细胞生长作用最强、特异性最高的一种生长因子<sup>[1-2]</sup>。我们利用 PTFE 自身多孔的特性来携带 VEGF 基因, 并将血管内皮细胞种植到其表面, 期望 VEGF 基因能够转染内皮细胞并促进其生长。本实验就是基于上述设想, 探讨了 PTFE 材料携带 VEGF 基因并转染内皮细胞的可能性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** PTFE 人工血管, 美国 Bard 公司产品; 高效真核表达质粒 pCDI-hVEGF<sub>121</sub> 包含编码人类 VEGF<sub>121</sub> 的 cDNA 全长序列, 由北京大学人类疾病基因中心惠赠; 血管内皮细胞特异性培养基 MCDB,

胎牛血清,胰酶,L-谷氨酰胺均为美国 Gibco 公司产品;各种细胞培养板为美国 Falcon 公司产品;内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor, ECGF)和 VEGF-ELISA 试剂盒为美国 R&D 公司产品;内皮细胞来源于人脐静脉,本实验采用 1~3 代细胞作为研究对象。

## 1.2 方法

1.2.1 PTFE 人工血管携载 pCDI-hVEGF<sub>121</sub> 将 pCDI-hVEGF<sub>121</sub> 水溶液(1 mg/mL)与等体积的纤维连接蛋白溶液(1 mg/mL)等体积混合,将混合溶液注入一条 PTFE 人工血管,血管钳封闭人工血管两端,挤压人工血管,直至外壁有溶液渗出,使质粒进入人工血管壁孔隙,在超净台内自然晾干,并将其裁剪成直径为 6.5 mm 的圆片。另一条人工血管用相同浓度的 pCDI 和纤维连接蛋白溶液同法处理。

1.2.2 PTFE 人工血管携载基因后体外释放浓度测定 将分别经过 pCDI-hVEGF<sub>121</sub> 质粒溶液和 pCDI 质粒溶液处理后的 PTFE 圆片各 5 个分别浸入 1 mL 的生理盐水中,置于 37 °C 恒温室的摇床上。在 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48 和 72 h 分别取出 2 μL 溶液在分光光度仪下 260 nm 波长处测其吸光度 A 值,换算成溶液 DNA 浓度,计算平均值,并绘制出 PTFE 人工血管携载 pCDI-hVEGF<sub>121</sub>/pCDI 后的体外释放曲线。

1.2.3 内皮细胞在携载 pCDI-hVEGF<sub>121</sub> 的 PTFE 人工血管材料上的生长

1.2.3.1 人脐静脉内皮细胞的分离和培养 在无菌条件下取新生儿脐带,剪去钳痕和凝血块阻塞部分,找到脐静脉。一端插上带有胶管的玻璃管结扎固定,经胶管接注射器,用生理盐水灌洗。待脐静脉内的残血除净后,用 37 °C PBS(pH 7.6)冲洗 2 次,将另一端用铁夹夹闭,向脐静脉内灌注 2.5 g/L 胰蛋白酶 8~10 mL,夹闭胶管放入已灭菌的大平皿中,在 37 °C 培养箱中孵育 15 min,其间可翻动脐带使胰蛋白酶能与脐静脉内皮细胞充分接触。取出脐带后,把消化液收集于无菌烧杯中,加入 2 mL 胎牛血清以终止酶反应。再用 PBS 冲洗脐静脉管腔。将收集液以 1500 r/min 离心 15 min,弃上清,加 MCDB 全培养液(含 200 mL/L 胎牛血清,20 mg/L ECGF,肝素 100 mg/L,青霉素 100 U/mL,链霉素 100 mg/L, L-谷氨酰胺 2 mmol/L),用吸管轻轻吹打均匀,按  $1 \times 10^6$  个细胞接种于培养瓶,置于 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中,37 °C 静止培养。8 h 后第 1 次换培养液,以除去未贴壁的细胞。以后每隔 2 d 换液 1 次。传代培养用传统贴壁细胞胰蛋白酶 EDTA 消化法。

1.2.3.2 分组和处理 将上述处理的 PTFE 材料圆

片固定于 96 孔板的孔底上,携载有 pCDI-hVEGF<sub>121</sub> 的为 VEGF 质粒组,携载有 pCDI 的为空质粒组,并以没有铺垫 PTFE 材料的孔为空白组,以每孔  $2.5 \times 10^4$  cells/200 μL 培养液的密度将内皮细胞种植到 PTFE 材料上和空白孔内。6 h 后第 1 次换液去除未贴壁细胞,以后每 2 d 换液,实验所用的 MCDB 培养液中不含 ECGF。

1.2.3.3 不同时间点细胞记数 分别以细胞种植后 6, 24, 72 和 120 h 为时间点,在用 PBS 冲洗后用胰酶将各孔内的细胞消化后分别记数,并以 6 h 的细胞数作为内皮细胞在各材料上种植后的粘附率,每个时间点每组均有 5 个样本。

1.2.3.4 ELISA 法测定 VEGF 蛋白的表达水平 将上述时间点样本的上清培养液 200 μL 加入 VEGF-ELISA 检测试剂盒的测试孔内,按试剂盒要求操作,在 450 nm 波长处测定吸光度 A 值,按标准曲线测得 VEGF 的浓度。

统计学处理:所的数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用 SPSS 软件分析数据,图 1 基因浓度比较采用 *t* 检验,图 2 各组各时间点细胞数目比较采用方差分析,表 1 各组的 VEGF 浓度采用非参数 Kruskal-Wallis *H* 检验。

## 2 结果

2.1 PTFE 人工血管携载基因质粒后的体外缓释 根据 PTFE 人工血管材料携载基因质粒后体外释放的溶液 DNA 浓度绘制了 PTFE 材料携载 pCDI-hVEGF<sub>121</sub>/pCDI 质粒后的体外缓释曲线(图 1),从中可以看到,PTFE 材料携带的两种质粒在水溶液中的释放速率基本相同,在各点的溶液 DNA 浓度无显著性差异( $P > 0.05$ )。从 0.5 h 到 4 h 的这段时间内质粒释放较快,随后进入缓慢增长期,直至 72 h 仍有释放,但释放速率明显减慢。

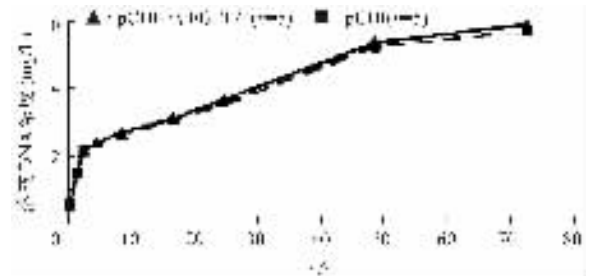
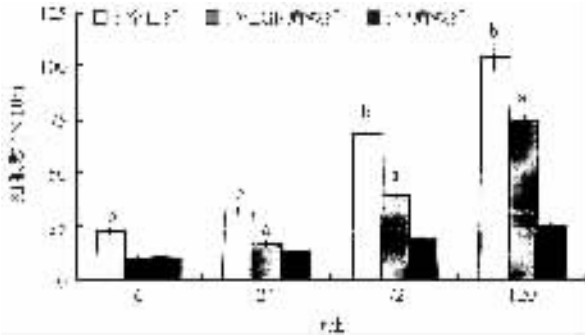


图 1 PTFE 材料携载 pCDI-hVEGF<sub>121</sub>/pCDI 质粒后的体外缓释曲线

2.2 细胞粘附和增殖 各组别在不同时间点的细胞

数如图 2 所示。6 h 内皮细胞在 VEGF 质粒组和空质粒组材料上的粘附率无显著性差异 ( $0.4 \pm 0.1$  vs  $0.4 \pm 0.1$ ,  $P > 0.05$ ) 两者均显著低于空白组的粘附率 ( $0.9 \pm 0.1$ ,  $P < 0.01$ )。在 24, 72 和 120 h, VEGF 质粒组上的内皮细胞数则明显高于空质粒组材料 ( $P < 0.05$ ) 两者的细胞数均小于相应时间点的空白组 ( $P < 0.01$ )。VEGF 质粒组内皮细胞的增殖速率 120 h 为 6 h 的 ( $7.6 \pm 0.9$ ) 倍, 明显高于空白组的 ( $4.6 \pm 0.4$ ) 倍和空质粒组的 ( $2.5 \pm 0.1$ ) 倍 ( $P < 0.01$ )。



\* $P < 0.05$  vs 空质粒组, <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs VEGF 质粒组和空质粒组。

图 2 各组在不同时间点的细胞数

**2.3 VEGF 蛋白水平** ELISA 法测定的各组别细胞培养上清中的 VEGF 蛋白在不同时间点的浓度如表 1 所示, VEGF 质粒组的 VEGF 蛋白水平明显高于空质粒组和空白组 ( $P < 0.01$ ), 空质粒组和空白组的 VEGF 蛋白水平没有差异 ( $P > 0.05$ )。在 VEGF 质粒组随着培养时间的延长, VEGF 基因不断转染内皮细胞并表达 VEGF, 在 120 h VEGF 蛋白的水平明显高于 6 h。

表 1 各组细胞培养上清中 VEGF 蛋白不同时间点的浓度 ( $n = 5$ , pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	t/h			
	6	24	72	120
空白	10.7 ± 0.7	11.1 ± 0.9	11.4 ± 1.1	10.8 ± 0.7
VEGF 质粒	23.4 ± 1.5 <sup>b</sup>	191.8 ± 17.5 <sup>b</sup>	303.2 ± 13.1 <sup>b</sup>	539.2 ± 16.8 <sup>b</sup>
空质粒	11.7 ± 1.3	11.5 ± 1.2	12.5 ± 1.2	11.3 ± 1.2

\* $P < 0.01$  vs 空质粒和空白。

### 3 讨论

随着对血管内皮细胞研究的深入, 研究人员发现完整的内皮细胞层是维持血管表面不产生血栓的重要因素<sup>[3]</sup>。1978 年 Herring 等首先开始了人工血管内皮细胞的种植研究, 但 20 余年来该方法在临床上用于改善人工血管通畅率的结果并不一致<sup>[4]</sup>。我们

利用 PTFE 材料的多孔特性, 在外力挤压下使溶液中 VEGF 基因质粒进入人工血管壁孔隙之中, 并使用纤维连接蛋白和基因质粒的混合溶液, 有助于质粒在 PTFE 材料表面的粘附和缓慢释放<sup>[5]</sup>。通过 PTFE 携载基因的体外释放过程可以看到初期由于粘附在血管材料外表面的基因快速溶解导致释放速度较快, 从 4 h 后基因释放变缓, 此时藏匿于 PTFE 孔隙中的基因质粒开始缓慢地释放并持续到 72 h 以上。

由于 PTFE 材料的疏水特性, 内皮细胞在其表面的生长是比较缓慢的。我们的实验结果显示, PTFE 材料携带的 VEGF 质粒已经成功转染入内皮细胞并且实现了 VEGF 蛋白的表达, 而分泌出来的 VEGF 蛋白反过来又促进了内皮细胞的快速增殖。可能的原因: ① PTFE 材料与内皮细胞紧密接触, 为藏匿其中的质粒转染内皮细胞提供了空间上的便利<sup>[6]</sup>; ② 纤维连接蛋白和基因质粒的混合提高了质粒与组织细胞的相容性, 通过细胞表面的某些粘附分子受体(如整合素  $\alpha_v\beta_3$ )与纤维连接蛋白作用后的内吞效应介导了基因质粒的协同入胞<sup>[7]</sup>。

本实验初步证明了 PTFE 血管材料可以携载 VEGF 基因质粒, 而且在血管内皮细胞种植到其表面后, VEGF 基因能够转染内皮细胞并促进其生长, 为进一步研究携载 VEGF 基因的 PTFE 人工血管移植后是否可促进内皮生长奠定了初步的实验基础。

### 【参考文献】

- [1] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4): 581-611.
- [2] Tiong A, Freedman SB. Gene therapy for cardiovascular disease: The potential of VEGF [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2004, 6(2): 151-159.
- [3] Yu H, Dai W, Yang Z, et al. Smooth muscle cells improve endothelial cell retention on polytetrafluoroethylene grafts in vivo [J]. *J Vasc Surg*, 2003, 38(3): 557-563.
- [4] Heyligers JM, Arts CH, Verhagen HJ, et al. Improving small-diameter vascular grafts: From the application of an endothelial cell lining to the construction of a tissue-engineered blood vessel [J]. *Ann Vasc Surg*, 2005, 19(3): 448-456.
- [5] Hondurilla NG, Bujan J, Lizarbe MA, et al. Adhesion and stability of fibronectin on PTFE before and after seeding with normal and synchronized endothelial cells: In vitro study [J]. *Artif Organs*, 1995, 19(2): 144-153.
- [6] Klugherz BD, Jones PL, Cui X, et al. Gene delivery from a DNA controlled-release stent in porcine coronary arteries [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1181-1184.
- [7] Hood JD, Bednarski M, Frausto R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature [J]. *Science*, 2002, 296(5577): 2404-2407.

编辑 杨湘华