

自聚肽承载的 Ephrin-b2/Fc 重组蛋白在心肌梗死治疗中的缓释效应

王晓庆^{1,3}, 张成炜², 叶榕婷^{3,4}, 王挹青^{1,3}

(1. 厦门大学医学院, 福建省厦门市 361102; 2. 厦门大学附属东南医院心内科, 福建省漳州市 363000;

3. 厦门市心脏中心心内科, 福建省厦门市 361004; 4. 福建医科大学协和临床医学院, 福建省福州市 350004)

[关键词] RAD16-II; 自聚肽; Ephrin-b2/Fc 重组蛋白; 缓释效应; 心肌梗死

[摘要] **目的** 通过体外观测和体内实验探讨自聚肽 RAD16-II 对 Ephrin-b2/Fc 重组蛋白的控制释放效应及其免疫原性, 解决心肌梗死蛋白质治疗中裸露的蛋白质在机体有效作用时间短且易被降解的问题。**方法** 体外观测 RAD16-II 的塑型及对 Ephrin-b2/Fc 重组蛋白的控制释放; 构建 SD 大鼠心肌梗死模型, 将存活大鼠分为 2 组分别予心肌内注射 Ephrin-b2/Fc 蛋白 (E 组, $n=25$) 和自聚肽 Ephrin-b2/Fc 蛋白凝胶 (ES 组, $n=25$), 在设定的时间点 (1 h, 3 h, 24 h, 7 d, 14 d) 各收集心肌组织和血清样本 5 个, 分别用免疫荧光和免疫印迹技术检测 ephrin-b2 蛋白驻留和丢失情况; 皮下注射 RAD16-II, 5 W 后 ELISA 法检测血清抗体滴度, 评估 RAD16-II 的免疫原性。**结果** RAD16-II 在 PBS 中可自我聚合组装成纳米纤维网状结构; 这种结构在体外可使 Ephrin-b2/Fc 重组蛋白的释放持续 144 h, 其中超过 50% 量在 120 h 内释放; 免疫荧光显示除注射后 1 h 外, Ephrin-b2/Fc 蛋白在 ES 组的驻留量明显高于同期的 E 组 ($P < 0.05$); 免疫印迹显示注射早期, ES 组 Ephrin-b2/Fc 蛋白的血液释入量明显少于同期的 E 组 ($P < 0.05$); ELISA 法检测血清抗 RAD16-II 抗体效价与阴性对照组无显著差异。**结论** RAD16-II 可明显地延缓 Ephrin-b2/Fc 重组蛋白的释放, 是承载 Ephrin-b2/Fc 蛋白用于心肌梗死治疗和缺血性研究的较为可靠和安全的生物载体材料。

[中图分类号] R318.08

[文献标识码] A

Controlled Release of Recombinant Ephrin-b2/Fc from Self Assembling-peptide in Myocardial Infarction Therapy

WANG Xiao-Qing^{1,3}, ZHANG Cheng-Wei², YE Rong-Ting^{3,4}, and WANG Yi-Qing^{1,3}

(1. Medical College of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China; 2. Department of Cardiology, Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China; 3. Department of Cardiology, Xiamen Heart Center, Xiamen, Fujian 361004, China; 4. Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China)

[KEY WORDS] RAD16-II Peptide; Self-assembling Peptide; Recombinant Ephrin-b2/Fc; Controlled-release; Myocardial Infarction

[ABSTRACT] **Aim** To explore the controlled release effect of the recombinant Ephrin-b2/Fc chimera from self assembling peptide of RAD16-II and the immunogenicity of RAD16-II. Take RAD16-II as a delivery vehicle to prevent the unglycosylated Ephrin-b2/Fc protein from being degraded in vivo and increase therapeutic effect. **Methods** The moulding of the oligopeptide was observed by macroscopy and microscopy. The releasing effect was assayed by releasing curve obtained from test in vitro. In vivo, Sprague-Dawley rats were prepared to acute myocardial infarction models by ligation of the left anterior descending branch. The survival rats were divided into 2 groups and separately intra myocardially injected recombinant Ephrin-b2/Fc proteins (E group, $n=25$) and sapeptide- Ephrin-b2/Fc protein complex (ES group, $n=25$). At set time (1 h, 3 h, 24 h, 7 d, 14 d), the samples of the myocardial tissue and sera were collected and respectively used for immunofluorescence and westernblot to determine the remaining or losing of the protein. RAD16-II

[收稿日期] 2015-06-30

[修回日期] 2015-08-20

[基金项目] 福建省科技计划重点项目 (2013D024)

[作者简介] 王晓庆, 硕士研究生, 研究方向为冠状动脉粥样硬化心肌梗死蛋白因子治疗, E-mail 为 wangxiaqing91@fox-mail.com。张成炜, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床治疗。通讯作者王挹青, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化的基础与临床治疗, E-mail 为 wang_gina@163.com。

solution was administrated through subcutaneous injection. 5 weeks later, the titer of anti-sapeptide in serum was assayed by ELISA. **Results** It is observed that RAD16-Ⅱ solution can self-assemble into nanofibers which fabricate net structure in condition of PBS. Within net structure, the releasing duration of chimeric Ephrin-b2/Fc lasted up to 144 h and more than 50% mass was released in 120 h. As shown in immunofluorescence, the retention duration of the chimeric protein in ES group was significantly longer than that in E group at the same time ($P < 0.05$). And westernbolt also demonstrated the amount of protein releasly into blood in ES group was less significant than that in E group ($P < 0.05$). The titer of the antibody was not significantly different from RAD16-Ⅱ administration to negative control group, which showed that RAD16-Ⅱ would not trigger immune response. **Conclusion** RAD16-Ⅱ oligopeptide can postpone the release of chimeric Ephrin-b2/Fc both in vivo and in vitro. It is a relatively reliable and safe biomaterial delivery vehicle of Ephrin-b2/Fc protein in myocardial infarction and ischemia research.

Ephrin-b2/Fc 常被归为一类神经生长导向分子^[1],通过诱导生长锥塌陷的方式引导生长中的神经纤维投射^[2]。同时,Ephrin-b2/Fc 于缺血性损伤如心肌梗死中,可促进梗死周围区内皮细胞的增殖与血管新生,并可促进小鼠胸主动脉上微血管的新生^[3]。由于基因治疗(genetic therapeutics)存在过表达或表达难以事先量化等不可控风险,加上 Ephrin-b2/Fc 本身又可因作用的量或作用的组织不同而产生不同甚至相反的效果,研究者往往首选将 Ephrin-b2/Fc 以蛋白质的形式给药。但是将 Ephrin-b2/Fc 蛋白直接输注于病灶,受病灶炎症环境的影响,蛋白质的快速稀释和降解不仅降低了作用时效,流失血液部分也同样可增加异位副作用的风险。为了弥补这种缺憾,本实验用自我组装聚合肽(self-assembling-peptide, SAP) RAD16-Ⅱ(序列 AcN-RARADADARARADADA-CNH2)包被 Ephrin-b2/Fc 重组蛋白,探讨 RAD16-Ⅱ对大分子的“牵制”特性,以及 Ephrin-b2/Fc 在心肌梗死后心肌组织内的释放和降解情况,为 Ephrin-b2/Fc 蛋白的体内给药提供一个可用的运送载体。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

自聚肽 RAD16-Ⅱ(上海吉尔生化),大鼠重组 Ephrin-b2/Fc 嵌合体蛋白(北京义翘神州),Alexa Fluor® 488 Mouse Anti-Human IgG1, Horseradish peroxidase conjugate mouse anti-human IgG1(美国 Life Technologies), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(上海碧云天), UV-visible spectrophotometer(美国 Thermo Scientific),小动物呼吸机(江西特力), Fluorchem E Western blot 化学发光与凝胶成像仪(美国 cell biosciences), Microplate Reader(美国 Bio-RAD),冰冻切片机(德国 Leica),荧光显微镜计算机成像系统(日本 Olympus)。

1.2 自聚肽的扩散与聚合塑型观察

将中性红和自聚肽 RAD16-Ⅱ粉末分别溶解于双蒸水,等体积混合,配制成自聚肽、中性红终浓度分别为 0.01 g/mL 和 1 mg/mL 的自聚肽中性红染液(NS)。以 1 mg/mL 中性红染液(N)作对照。取 2 个 10 cm 培养皿,各盛 0.1 mol/L PBS 10 mL,静置后于同等高度条件分别滴入上述中性红染液(N组)和自聚肽中性红染液(NS组),观察两组溶液随时间变化的扩散。移除培养皿中 PBS,光学显微镜下观测 NS 组中心部位未被稀释的凝胶情况。相同实验重复 3 次。

1.3 Ephrin-b2/Fc 蛋白 + 自聚肽缓释支架的构建

将自聚肽和 Ephrin-b2/Fc 冻干粉按比例分别溶解于 0.29 mol/L 蔗糖溶液,再将 2 种溶液等体积充分混匀,最终制成 100 μg/mL Ephrin-b2/Fc 蛋白 + 0.01 g/mL 自聚肽水凝胶缓释支架(ES 凝胶)。

1.4 体外释放实验

模拟 Ephrin-b2/Fc 蛋白的体内释放过程,先吸取 ES 蛋白凝胶 100 μL 于 1.5 mL 的 eppendorf 管底,后将 100 μL 0.1 mol/L PBS 轻缓地覆盖其上,37℃ 恒温箱孵育,在既设时间点(0.5 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h……)吸取其上 PBS 并予等量补充。以分子量相近的牛血清白蛋白(BSA, 66 kDa; Ephrin-b2/Fc, 60~65 kDa)1 mg/mL + 0.01 g/mL 自聚肽水凝胶(BSA 自聚肽凝胶)为对比,每组设 3 个 eppendorf 管行独立实验。BCA 法检测蛋白浓度,酶标仪 570 nm 工作波长测定光密度(OD)并换算出上清 PBS 中的蛋白量。以释放率公式计算并绘制释放曲线。

$$\text{释放率} = M_t/M_0 \times 100\%$$

M_t 表示在既定时间 t 内的累积蛋白释放量, M_0 表示分布于凝胶中的蛋白初始量。具体方法参见文献[4]。

1.5 大鼠心肌梗死模型的构建及分组

取 12 周龄清洁级近交系雄性 SD 大鼠 50 只构建心肌梗死模型,质量 250 ± 25 g,由中国科学院上

海实验动物中心提供,许可证号:SCXK(闽)2007-0002。0.1 g/mL 水合氯醛腹腔麻醉(0.4 mL/100g)大鼠,气管插管,连通呼吸机正压通气,潮气量 15 mL,呼吸频率 60 次/分。常规消毒,铺巾,于胸骨左缘 0.5~1 cm 搏动最强处开胸,在左心耳与肺动脉圆锥之间找到冠状动脉左前降支,以 6-0 线结扎。结扎成功的标志:II 导联心电图 J 点明显抬高、结扎线以下心肌组织颜色由正常变苍白。结扎成功 30 min 后,将存活的大鼠随机分为:Ephrin-b2/Fc 组(E 组, $n = 25$), Ephrin-b2/Fc + SAP 组(ES 组, $n = 25$),以结扎线为标志,在梗死周边区选取注射位点 4 个/只,分别注射 100 μ g/mL Ephrin-b2/Fc 重组蛋白及 100 μ g/mL Ephrin-b2/Fc 蛋白 + 0.01g/mL 自聚肽水凝胶(ES 凝胶),每个位点注射 25 μ L。

1.6 免疫荧光

大鼠心肌梗死术后 1 h, 3 h, 24 h, 7 d, 14 d 每组各随机选取 5 只,麻醉开胸抽尽心脏血液后取下心脏, PBS 冲洗, 纱布拭干, 横切心脏(1~1.5 mm 厚度), 用 OCT 包埋有注射位点的心肌组织, 液氮速冻后, -80 $^{\circ}$ C 储存。心肌组织行冰冻切片切至 5 μ m 厚度, 室温下风干 15 min, 冷丙酮脱水固定 10 min, 0.3% Triton X-100 溶液 4 $^{\circ}$ C 通透 10 min, 体积分数 10% 的山羊血清室温封闭 30 min, PBS 冲洗。因所购买蛋白质产品系 Ephrin-b2/Fc 与人 IgG1 的 Fc 段重组后的蛋白, 为避免大鼠自身 Ephrin-b2/Fc 蛋白表达影响检测结果, 故选用抗人 IgG1 Fc 段 Alexa Fluor 488 标记抗体。加入此荧光抗体 4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜, PBS 冲洗, DAPI 染细胞核 4 min, 冲洗风干, 抗荧光淬灭封片剂封片。设置统一曝光时间和荧光激发强度等参数, 每只选取 4 处进行荧光显微镜下观测并拍照。image pro plus 6.0 软件测量光密度值。

1.7 免疫印迹

大鼠心肌梗死术后 1 h, 3 h, 24 h, 7 d, 14 d 每组

各随机选取 5 只, 适量麻醉后开胸, 用肝素钠真空管于右心房近中心静脉处抽取血液 ≥ 5 mL, 2 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清-80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存储备用。BCA 法定测定蛋白浓度并定量, 煮沸变性、上样、电泳、转膜。含 5% 脱脂牛奶的 TBS-T 封闭 1 h, 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育一抗过夜。TBS-T 清洗 3 次, 室温孵育二抗 1 h, TBS-T 清洗, ECL 浸泡后显影, WB 成像显影系统分析结果。洗膜后以 β -actin 抗体检测校正结果。采用 Photoshop CS5.0 分析光密度值。

1.8 自聚肽的免疫原性检测

取成年 SD 大鼠 10 只, 随机分为 SAP 组和对照组, 每组 5 只。于 SAP 组大鼠肢端皮下注射自聚肽溶液(10 mg/mL) 100 μ L, 4 周后补充注射自聚肽溶液 50 μ L。对照组大鼠肢端皮下注射 PBS 作为对照。5 周后收集两组大鼠血清, ELISA 法检测抗体 IgG 效价观察自聚肽的免疫原性, 具体方法参照文献[5]。

1.9 统计学分析

采用 Grappad Prism5.0 统计软件进行统计学处理, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用双因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自聚肽扩散与聚合塑型

中性红染色的自聚肽溶液(NS 组)滴入 PBS 中后, 立即铺开薄膜, 膜间散布大小不等颗粒, 中心未散开部分高度聚合, 形成肉眼可见的凝胶颗粒。相比之下, N 组不存在薄膜, 扩散半径明显大于同一时间点的 NS 组(图 1)。光学显微镜下(400 \times)可见滴入 PBS 30 min 后的 NS 组中央未被稀释部分塑型成功的自聚肽, 呈层叠状或纤维膜状结构, 其中红色部分为中性红染色的 SAP, 黑色部分为孔隙(图 1)。

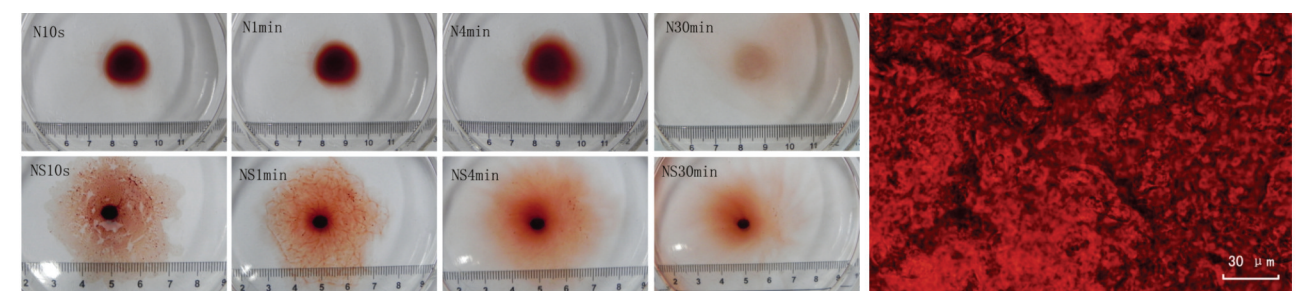


图 1. 自聚肽 RAD16-II 的扩散与聚合塑型 左图: N(上图)与 NS(下图)滴入 PBS 后不同时间点形态的肉眼观察, “N”为 N 组, “NS”为 NS 组, 从左到右依次为滴入后 10 s, 1 min, 4 min 和 30 min; 右图: NS 组(左图 NS 30 min)中央自聚肽塑型的光镜观察($\times 400$)

Figure 1. Diffusion and moulding of RAD16-II

2.2 体外缓释实验

ES 凝胶内 Ephrin-b2/Fc 蛋白与 BSA 自聚肽凝胶内 BSA 蛋白释放速率均先快后慢。其中 Ephrin-b2/Fc 蛋白的释放在 144 h 达到平台期,在观察时间内释放量超过总量的 50%; BSA 的释放在 96 h 达到平台期,在观察时间内释放量不足总量的 50% (图 2)。与维持 BSA 释放相比, RAD16- II 可维持 Ephrin-b2/Fc 更多量、更长时间的有效释放。

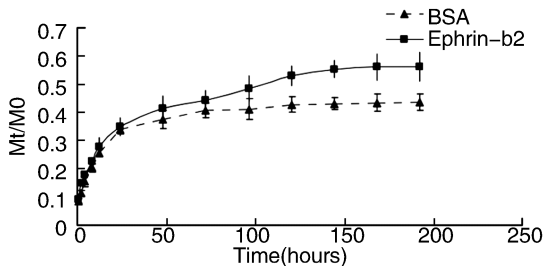


图 2. 自聚肽内 Ephrin-b2/Fc 和 BSA 不同时间点的释放率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 2. Release rate of Ephrin-b2/Fc and BSA in RAD16-II ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 免疫荧光

荧光显微镜下观察, E 组心肌组织的荧光信号分散, ES 组心肌组织荧光信号分布较为集中 (图 3)。统计学分析显示, 注射后 1 h, ES 组与 E 组平均光密度未见明显差异 ($P > 0.05$), 注射后 3 h 到 14 d 各采集时间点, ES 组平均光密度均大于同时期 E 组平均光密度 (注射后 3 h, 24 h, 7 d, $P < 0.001$; 注射后 14 d, $P < 0.05$; 图 3)。表明在缺血心肌组织内, 自聚肽 RAD16- II 凝胶可明显增加 Ephrin-b2/Fc 蛋白的驻留, 使局部药物浓度长时间维持在较高水平。

2.4 免疫印迹

注射后 1 h, 3 h, ES 组血清中 Ephrin-b2/Fc 蛋白量均低于同一时期 E 组 ($P < 0.001$), ES 组蛋白流失入血量低于 E 组。注射后 24 h, E 组血清中 Ephrin-b2/Fc 蛋白量低于 ES 组 ($P < 0.001$; 图 4), 结合心肌切片免疫荧光 (图 3) 分析, 该现象系由 E 组早期蛋白丢失过多使 24 h 后蛋白余量较少导致。免疫印迹实验表明 RAD16- II 可减缓心肌组织内 Ephrin-b2/Fc 蛋白的流失。

2.5 自聚肽的免疫原性

大鼠肢端皮下注射自聚肽 RAD16- II 5 周后, 收集血清, ELISA 法检测抗寡肽抗体 IgG 效价。在各个血清稀释度 (1:100; 1:500; 1:1000) 条件下,

SAP 组与对照组相比, OD_{450} 值差异均无显著性 [$P > 0.05$, 其中 $P(1:100) = 0.47$, $P(1:500) = 0.29$, $P(1:1000) = 0.14$; 图 5], SAP 组大鼠血清抗体处于低水平且与阴性对照组大鼠相比差零差异无显著性, 表明自聚肽 RAD16- II 注射不会引起大鼠的免疫反应。

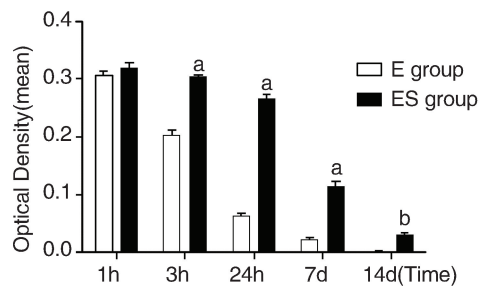
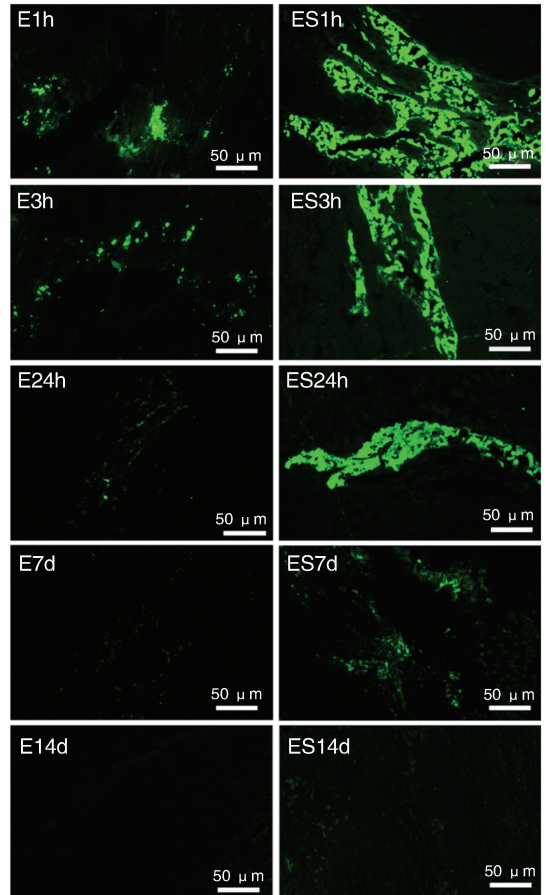


图 3. 免疫荧光法检测两组大鼠不同时间点心肌组织 Ephrin-b2/Fc 的驻留情况 上图: E 组大鼠 (左图) 与 ES 组大鼠 (右图) 不同时间点心肌组织的荧光显微镜观察 ($\times 200$), 从上到下依次为注射后 1 h, 3 h, 24 h, 7 d 和 14 d。下图: 两组大鼠不同时间点心肌组织内 Ephrin-b2/Fc 驻留的统计分析 ($\bar{x} \pm s, n=5$); a 为 $P < 0.001$, 与 E 组同一时间点比较; b 为 $P < 0.05$, 与 E 组同一时间点比较。

Figure 3. Detection of Ephrin-b2/Fc from myocardia by immunofluorescence

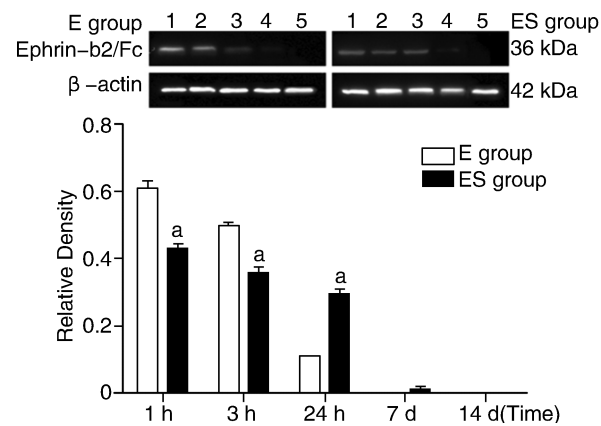


图 4. Western blot 检测两组大鼠不同时间点血清中 Ephrin-b2/Fc 蛋白含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) 1、2、3、4、5 依次为注射后 1 h、3 h、24 h、7 d 和 14 d。a 为 $P < 0.001$, 与 E 组同一时间点比较。

Figure 4. Detection of Ephrin-b2/Fc from sera by Western blot ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

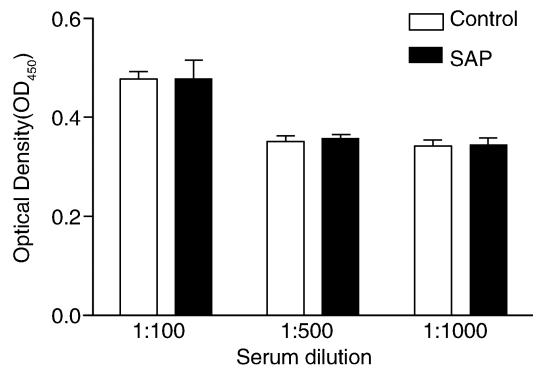


图 5. ELISA 法检测大鼠对自聚肽的免疫应答 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) 1:100、1:500、1:1000 依次表示血清稀释度为 1:100、1:500、1:1000。在各个血清稀释度条件下, SAP 组与同一稀释度对照组相比, $P > 0.05$ 。

Figure 5. Rats' immune response to SAP ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (CHD) 是威胁人类健康、导致人类死亡的重要疾病之一。恶性心律失常事件是 CHD 患者死亡的主要原因, 在急性心肌梗死死亡的人群中, 50% 以上患者死于恶性心律失常。心肌梗死后心室发生结构重构、电重构和神经重构, 三者相互作用, 共同导致了恶性心律失常与猝死的发生^[6]。心脏神经重构主要表现为心交感神经密度的增高及异常的分布, 其与心律失常产生的关系可以说是证据确凿的。诱导神经适当而均匀的再生, 可能是减少心肌梗死后心律失常、降低死亡率的有效方法之一。

Ephrin-b2/Fc 蛋白可促进心肌梗死模型鼠梗死

周围区内皮细胞的增殖与血管新生^[3], 并且其对体外培养的来自颈上神经节的交感神经细胞轴突生长有抑制作用^[7]。然而蛋白疗法常因缺乏有效载体导致治疗效率低。近年来, 自聚肽作为一种新型纳米载体被广泛用于包裹细胞、生长因子和信号分子改善体内外细胞行为和组织功能。自聚肽在心肌梗死治疗中的应用也逐渐增多。体外实验中, 接种在自聚肽-丙烯酸乙酯支架内的脂肪间充质干细胞可维持正常表型并向外迁移^[8]。体内实验中, 将 Notch 配体与自聚肽整合后, 包裹心脏祖细胞用于心肌梗死大鼠的治疗, 可明显改善大鼠心脏功能^[9]。另外, 在大鼠心肌梗死边缘区注射包裹 Notch 配体的自聚肽水凝胶可显著减少大鼠心肌纤维化, 增加内皮血管面积和 Ki67 表达, 改善心脏功能^[10]。

自聚肽容易制造, 并且可以极好地模拟体内微环境。在体外形成有效的运载结构后, 可直接注射入心脏肌层, 这种注射给药的方式可最大限度的降低治疗损伤。本实验选用的自聚肽 RAD16-II 在生理条件下或接触一价阳离子溶液时, 可自发地形成具有纳米级孔隙且肉眼可见的水凝胶。在扩散与聚合塑型实验中, RAD16-II 在滴入 PBS 后, 中心部分迅速自我聚合成凝胶结构, 限制内容物中性红的扩散。RAD16-II 凝胶结构稳定, 可以抵抗蛋白酶的消化以及温度、酸碱度的变化。本实验在凝胶形成时直接将重组 Ephrin-b2/Fc 蛋白包裹其中, 可确保蛋白以精确的浓度掺入凝胶并均匀分布, 目前为止可能是最常用的掺入药物的方法^[11-13]。在体外缓释实验中, 自聚肽内 Ephrin-b2/Fc 蛋白较 BSA 达到平台期所需时间更长, 平台期更高。理论上, 自聚肽内蛋白的治疗效果与释放率曲线达到平台期所需时间和平台期的高度成正比^[4, 14]。决定自聚肽内蛋白释放率的因素主要有二: 一是凝胶内部孔隙与蛋白流体粒径的大小关系。治疗蛋白的流体粒径越接近自聚肽的“滤筛孔隙”, 其在凝胶内的移动就越受限。二是自聚肽与治疗蛋白的电荷极性关系。如果两者的等电点 (PI) 落在 7.4 两侧且相距较远, 那么在 pH = 7.4 条件下, 治疗蛋白会因静电引力被“牵制”于自聚肽中, 从而产生缓慢释放的效应。以上两点可能是自聚肽内 Ephrin-b2/Fc 蛋白与 BSA 释放率产生差异的原因。总之, 该实验表明, 与维持 BSA 释放相比, RAD16-II 可维持 Ephrin-b2/Fc 更多量、更充分、更长时间的有效释放。与承载 BSA 相比, 自聚肽 RAD16-II 更适合承载 Ephrin-b2/Fc 蛋白的缓慢持续释放。心肌组织免疫荧光检测显示, 自聚肽承载的 Ephrin-b2/Fc 蛋白注射入心肌梗死大

鼠心肌后,可驻留心肌组织相对较长时间(>7天)。尽管最终蛋白可能会因自聚肽的降解而完全释放,但是早期心肌组织内持续的蛋白驻留对于促进心肌梗死急性期内皮细胞迁移和增殖分裂、抑制交感神经重构十分重要。免疫印迹法检测大鼠血液中Ephrin-b2/Fc含量表明,Ephrin-b2/Fc蛋白在体内不会被自聚肽牢固地包裹不能释放,也不会大量流失于血液,进一步佐证了自聚肽RAD16-II可控制Ephrin-b2/Fc蛋白缓慢释放,是蛋白在心肌内发挥作用的有效载体,并且这种缓释效应在一定程度上可以降低Ephrin-b2/Fc蛋白产生异位副作用的风险。RAD16由其设计者受机体细胞外基质多数分子存在的粘附基序RGD的启发设计而成,理论上不会引起机体的排斥反应^[15],构成RAD16-II的氨基酸均为L-氨基酸,降解后可直接被机体吸收再利用,无毒副作用。ELISA法自聚肽免疫原性检验也表明,RAD16-II注射不会诱发大鼠的免疫反应。

本实验首次将自聚肽RAD16-II与Ephrin-b2/Fc蛋白结合用于心肌梗死模型内给药,探讨Ephrin-b2/Fc蛋白-自聚肽缓释支架中的Ephrin-b2/Fc在心肌梗死后心肌组织内的释放和流失情况,为将RAD16-II作为Ephrin-b2/Fc蛋白的体内给药并具有缓释效果的运送载体提供了实验依据。

总之,自聚肽RAD16-II塑型简单,构建蛋白缓释支架容易,对Ephrin-b2/Fc蛋白缓释效果较佳,且无免疫原性,可作为Ephrin-b2/Fc蛋白的运送载体用于心肌梗死和其他缺血性疾病治疗。但是Ephrin-b2/Fc蛋白-自聚肽缓释支架对心肌梗死的具体治疗效果还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] McClelland AC, Hruska M, Coenen AJ, et al. Trans-synaptic EphB2-ephrin-B3 interaction regulates excitatory synapse density by inhibition of postsynaptic MAPK signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(19): 8 830-835.

[2] Sahin M, Greer PL, Lin MZ, et al. Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexin1 modulates growth cone collapse[J]. *Neuron*, 2005, 46(2): 191-204.

[3] Månsson-Broberg A, Siddiqui AJ, Maria Genander M, et al. Modulation of ephrinB2 leads to increased angiogenesis in ischemic myocardium and endothelial cell proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008, 373(3):

355-359.

[4] Gelain F, Unsworth LD, Zhang S. Slow and sustained release of active cytokines from self-assembling peptide scaffolds [J]. *J Control Release*, 2010, 145(3): 231-239.

[5] 国海东. 纤维蛋白胶和自聚肽纳米纤维对骨髓源性心肌干细胞存活、分化和改善心功能的作用及其机制[D]. 上海:复旦大学医学院, 2010, 24-25.

[6] 珠勒皮亚. 司马义, 娜几娜. 吾格提, 布海力且木. 买买提. 大鼠心肌梗死后左心室重构、电重构和交感神经重构的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(5): 404-408.

[7] Naska S, Lin DC, Miller FD, et al. p75NTR is an obligate signaling receptor required for cues that cause sympathetic neuron growth cone collapse [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(2): 108-120.

[8] Castells-Sala C, Martine-Ramos C, Valles-Lluch A, et al. In vitro development of bioimplants made up of elastomeric scaffolds with peptide gel filling seeded with human subcutaneous adipose tissue-derived progenitor cells [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2015;00A:000-000.

[9] Boopathy AV, Che PL, Somasuntharam I, et al. The modulation of cardiac progenitor cell function by hydrogel-dependent Notch1 activation [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(28): 103-112.

[10] Boopathy AV, Martinez MD, Smith AW, et al. Intramyocardial delivery of Notch ligand-containing hydrogels improve cardiac function and angiogenesis following infarction [J]. *Tissue Eng Part A*, -Not available-, ahead of print. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0622.

[11] Mazza M, Notman R, Anwar J, et al. Nanofiber-based delivery of therapeutic peptides to the brain [J]. *ACS Nano*, 2013, 7(2): 1 016-026.

[12] Tian R, Chen J, Niu R. The development of low-molecular weight hydrogels for applications in cancer therapy [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(7): 3 474-482.

[13] Li J, Kuang Y, Shi J, et al. The conjugation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) to small peptides for generating multifunctional supramolecular nanofibers/hydrogels [J]. *Beilstein J Orq Chem*, 2013, 9: 908-917.

[14] Dipak SP, Matthew PK, Sathy VB. Delivery of therapeutic proteins [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(6): 2 557-575.

[15] Prieto AL, Edelman GM, Crossin KL. Multiple integrins mediate cell attachment to cytotactin/tenascin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90(21): 10 154-158.

(此文编辑 李小玲)