

血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸缓释微球的治疗性血管再生实验研究

刘崇栋, 陈 锋, 徐颖奇, 周 卫, 唐新华, 周为民

(南昌大学第二附属医院血管外科, 江西省南昌市 330006)

[关键词] 血管内皮生长因子; 缓释微球; 缺血下肢; 血管生成

[摘要] **目的** 探讨血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸缓释微球在促进大鼠缺血下肢血管生成的作用。**方法** 制备血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸微球, 扫描电镜观察其形态, 采用酶联免疫吸附测定法检测其体外释药性能。将负载血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸微球纤维蛋白凝胶注射到大鼠缺血下肢肌肉内, 1 个月后进行组织学和免疫组织化学检测, 评价血管再生情况。**结果** 血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸微球体外释放血管内皮生成因子持续时间超过 4 周, 可显著提高注射部位毛细血管和 α -平滑肌肌动蛋白阳性血管的密度, 并促进 CD34、C-kit 和血管内皮生长因子受体 2 阳性细胞的动员。**结论** 肌肉注射负载血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸微球的纤维蛋白凝胶是一种较为理想的治疗性血管再生方法。

[中图分类号] R654.4

[文献标识码] A

Experimental study on therapeutic angiogenesis of sustained release VEGF-dextran-PLGA microspheres

LIU Chongdong, CHEN Feng, XU Yingqi, ZHOU Wei, TANG Xinhua, ZHOU Weimin

(Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] vascular endothelial growth factor; sustained release microsphere; ischemia lower limb; angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of recombinant human vascular endothelial growth factor-dextran-poly-lactic acid-glycolic acid (VEGF-dextran-PLGA) sustained-release microspheres on promoting angiogenesis in ischemic lower limbs of rats. **Methods** VEGF-dextran-PLGA microspheres were prepared and their morphology was observed by scanning electron microscopy. The drug release properties were determined by ELISA in vitro. The fibrin gel loaded with VEGF-dextran-PLGA microspheres was injected into the ischemic lower limb muscle of rats, and histological and immunohistochemical staining were performed 1 month later to evaluate the angiogenesis. **Results** VEGF-dextran-PLGA microspheres released VEGF in vitro for more than 4 weeks. They could significantly increase the density of capillaries and α -smooth muscle actin-positive blood vessels at the injection site, and promote the mobilization of CD34, C-kit and VEGFR-2 positive cells. **Conclusion** Intramuscular injection of fibrin gel loaded with VEGF-dextran-PLGA microspheres is an ideal therapeutic angiogenesis method.

肢体缺血是外周缺血性血管疾病晚期并发症, 主要表现为静息痛、难以愈合的溃疡和肢体坏疽, 严重影响患者的生活质量, 并增高截肢率或死亡的风险。除了外科手术和血管腔内介入治疗外, 治疗性血管再生是一种有前景的治疗方法。它是指应

用具有血管再生作用的细胞、生长因子或其基因来促进生理性的血管再生^[1-3]。

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在血管内皮细胞 (endothelial cells, EC) 的迁移、增殖和存活中起至关重要的作用, 它可

[收稿日期] 2018-09-30

[修回日期] 2018-10-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81460083); 江西省科技厅自然科学基金资助项目 (20141BBG70032、20152ACB21026 和 20142BAB215034)

[作者简介] 刘崇栋, 硕士, 住院医师, 研究方向为周围血管, E-mail 为 550456206@qq.com。通信作者陈锋, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为血管外科基础与临床, E-mail 为 cf970422@126.com。

以诱导血管生成,促进毛细血管网的生长和扩张,从而维持或恢复局部组织的氧和营养供给,减少局部缺血。目前,应用具有较好的组织相容性和生物降解性的高分子材料制备携带 VEGF 的药物缓释系统,已经广泛地应用于缺血性血管疾病的治疗研究中,例如,水凝胶、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)、聚乳酸-乙醇酸 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 和葡聚糖 (dextran) 等^[4-6]。

与小分子或肽类药物不同,蛋白质具有三级结构,在制备缓释系统过程中接触水-油或水-空气界面张力时容易聚集或变性^[7]。聚集或变性的蛋白不仅会丧失活性,还会引起免疫原性或毒性^[8]。研究发现蛋白质-葡聚糖-PLGA 微球在制备过程中可以减少蛋白质的聚集或变性^[9]。因此本研究采用该法制备血管内皮生长因子-葡聚糖-聚乳酸-羟基乙酸 (VEGF-dextran-PLGA) 微球,将其注射于大鼠缺血的下肢肌肉内,评价其促血管再生的效果。

1 材料和方法

1.1 VEGF-dextran-PLGA 微球的制备

按 1:5:50 的质量比将重组大鼠 VEGF 165 (PeproTech) 加入葡聚糖 (Sigma-Aldrich) 和聚乙二醇 (Sigma-Aldrich) 溶液中,于 0℃、1 500 r/min 搅拌 60 s, -80℃ 过夜,冻干 24 h。用二氯甲烷洗涤冻干粉末除去 PEG,然后蒸发干燥 24 h,去除残留的二氯甲烷,得到 VEGF-葡聚糖备用。

将 VEGF-葡聚糖颗粒加入含有 PLGA (15%, w/v) (Sigma-Aldrich) 的二氯甲烷溶液中,混匀后迅速加入 5 倍体积含有聚乙烯醇 (1%, w/v) (Sigma-Aldrich) 和 NaCl (5%, w/v) (Sigma-Aldrich) 的混合液中。搅拌 60 s 形成初始 VEGF-dextran-PLGA 微球乳液,将其倒入 200 倍体积的 NaCl (10%, w/v) 溶液中,于 4℃ 搅拌 4 h 固化微球。然后用去离子水洗涤微球,最后冻干 24 h,制成 VEGF-dextran-PLGA 微球备用。

1.2 VEGF-dextran-PLGA 微球的体外特性

取适量微球,涂布于导电胶上,喷金后用扫描电镜观察其外形和大小。将 10 mg VEGF-dextran-PLGA 微球溶于 10 mL 二氯甲烷,12 000 r/min 离心 5 min,除去上清,重复 3 次,得沉淀物即 VEGF-葡聚糖颗粒,溶于 PBS,用 VEGF ELISA 试剂盒 (R&D Systems) 测定 VEGF 浓度。微球包封率 (%) = (微球中 VEGF 的含量/微球中投入 VEGF 的总量) × 100%。将 20 mg VEGF-dextran-PLGA 微球溶于 1

mL 缓释溶液 [20 mmol/L pH 7.4 PBS, 0.02% (w/v) 叠氮化钠] 中,置于 37℃ 摇床,每 2 天取样 1 次,然后补充新鲜缓释液。用 VEGF ELISA 试剂盒测定 VEGF 的浓度,绘制累积释放曲线。

1.3 下肢缺血动物模型制备及分组

雄性 SD 大鼠 (6 周龄, 200~250 g), 腹腔注射氯胺酮 (60 mg/kg) 进行麻醉。在腹股沟韧带上髂外动脉和股动脉延伸为腘动脉处用 6-0 丝线结扎,然后切除整段股动脉。24 h 后,随机分为三组 (每组 12 只)。VEGF-PLGA 组:大鼠缺血下肢肌注射携带 VEGF-dextran-PLGA 微球的纤维蛋白胶 (注入体积 200 μL, VEGF 70 μg); VEGF 组:肌注射含 VEGF 的纤维蛋白胶 (注入体积 200 μL, VEGF 70 μg); PLGA 组:肌注射葡聚糖-PLGA 微球纤维蛋白胶。

1.4 组织学和免疫组织化学检测

在治疗后的第 5 天和第 28 天处死动物,取大腿内侧肌组织,多聚甲醛固定, OCT 包埋,行 6 μm 冰冻切片。切片行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,观察肌组织结构;用内源性碱性磷酸酶染色试剂盒检测毛细血管内皮细胞。用 α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA) 兔多克隆抗体 (Abcam) 行免疫组织化学染色检测 α-SMA 阳性血管。另外再行以下抗体的免疫组织化学染色: CD45、CD34、C-kit 和血管内皮生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 的兔源性一抗,增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的鼠源性一抗 (Abcam)。应用 Image-pro Plus 软件对组织切片中染色的毛细血管密度 (毛细血管数/肌纤维数) 和 α-SMA 阳性血管密度 (α-SMA 阳性血管数/肌纤维数) 进行定量分析。

1.5 统计学方法

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,超过两组的比较采用单因素方差分析,组间及两组的比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF-dextran-PLGA 微球体外特性

VEGF-dextran-PLGA 微球表面光滑,直径约 40~100 μm (图 1),包封率为 (85.0 ± 4.1) %。微球体外持续释放 VEGF 超过 4 周,累积释放量为 89.7% (图 2)。

2.2 VEGF-dextran-PLGA 的血管再生作用

治疗后第 5 天,肌组织碱性磷酸酶染色结果示

毛细血管被染成紫色(图 3)。VEGF-PLGA 组的毛细血管密度 $[(2.25 \pm 0.40) / \text{fiber}]$ 显著高于 VEGF 组 $[(1.85 \pm 0.30) / \text{fiber}]$ 和 PLGA 组 $[(0.92 \pm 0.30) / \text{fiber}]$ ($P < 0.05$; 表 1)。

术后第 28 天,免疫组织化学检测 α -SMA 阳性血管所示, α -SMA 阳性的成熟血管被染成棕色(图 4)。VEGF-PLGA 组 α -SMA 阳性血管密度 $[(0.48 \pm 0.13) / \text{fiber}]$ 明显高于 VEGF 组 $[(0.12 \pm 0.05) / \text{fiber}]$ 和 PLGA 组 $[(0.09 \pm 0.04) / \text{fiber}]$ ($P < 0.05$; 表 1)。

2.3 VEGF-dextran-PLGA 微球促进干/祖细胞的动员

治疗后第 5 天,肌组织切片行 HE 染色,VEGF-PLGA 组肌组织比其它组显示更明显的大量细胞浸润(图 5)。为了解这些浸润细胞的来源,用不同的抗体进行免疫组织化学染色,发现 CD45 阳性细胞较少,表明不是炎症反应导致的细胞浸润。这些浸润的细胞中有些细胞增殖相关的标记物 PCNA 阳性,有些 α -SMA 标记呈阳性,有些 CD34、C-kit 或 VEGFR-2 阳性(图 6)。

表 1. 各实验组缺血肌组织血管密度($\bar{x} \pm s$, /fiber)

Table 1. Densities of capillary in ischemic muscle in each group($\bar{x} \pm s$, /fiber)

分 组	毛细血管密度	α -SMA 阳性血管密度
PLGA 组	0.92 ± 0.30	0.09 ± 0.04
VEGF 组	1.85 ± 0.30^a	0.12 ± 0.05
VEGF-PLGA 组	2.25 ± 0.40^{ab}	0.48 ± 0.13^{ab}
F 值	29.165	43.244
P 值	0.000	0.000

a 为 $P < 0.05$, 与 PLGA 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 VEGF 组比较。

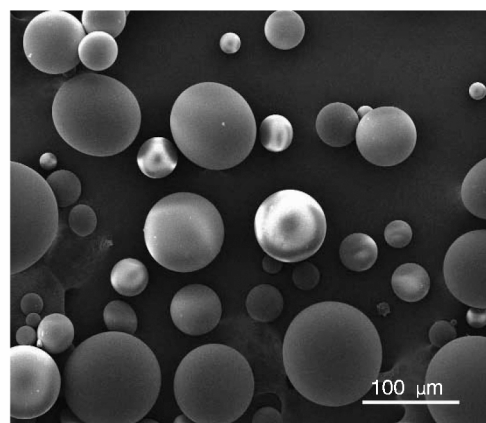


图 1. 微球电镜扫描图

Figure 1. A scanning electron micrograph of VEGF-dextran-PLGA microspheres

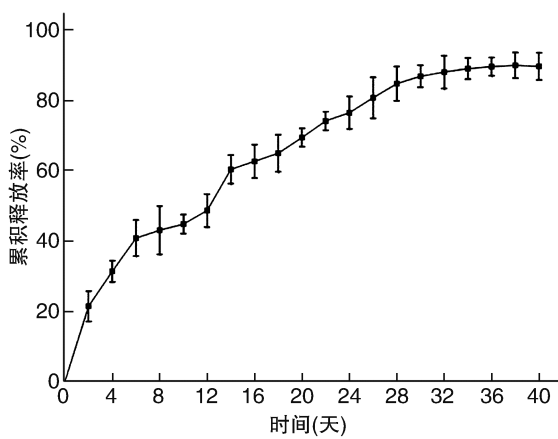


图 2. 微球体外累积释放曲线

Figure 2. In vitro release profile of VEGF from VEGF-dextran-PLGA microspheres

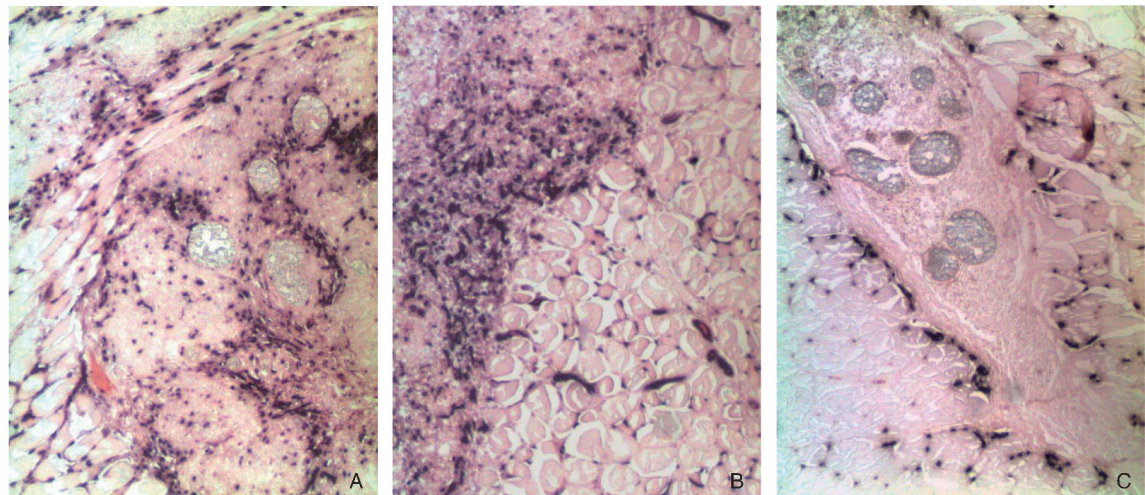


图 3. 肌组织碱性磷酸酶染色(200×) A 为 VEGF-PLGA 组, B 为 VEGF 组, C 为 PLGA 组。

Figure 3. Alkaline phosphatase staining in muscle(200×)

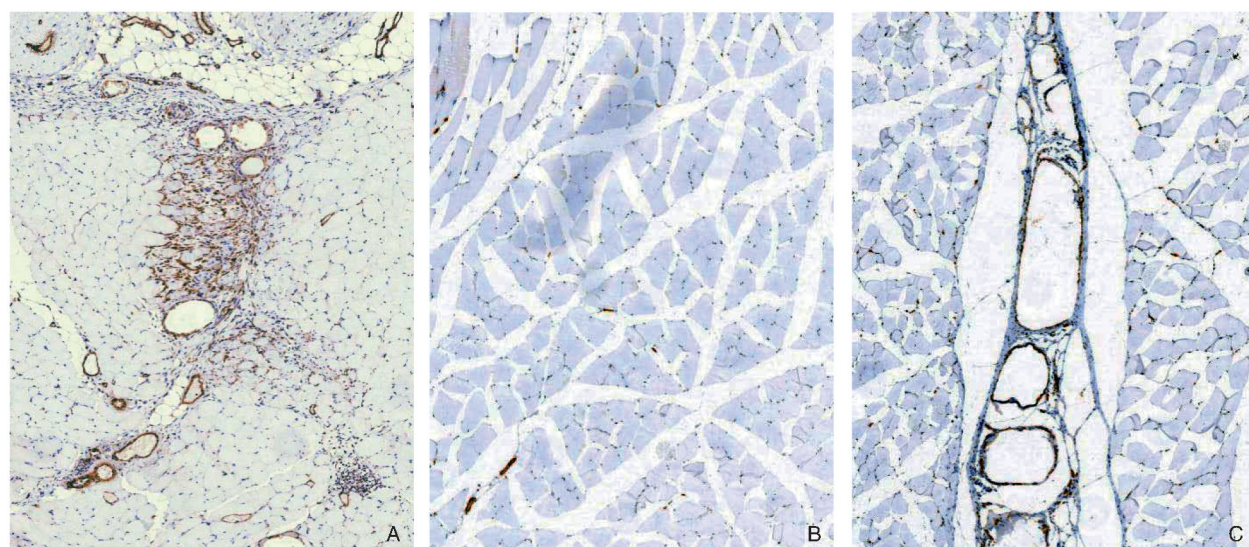


图 4. 肌组织 α -SMA 免疫组织化学染色(100 \times) A 为 VEGF-PLGA 组,B 为 VEGF 组,C 为 PLGA 组。

Figure 4. Immunohistochemical staining against α -SMA in muscle(100 \times)

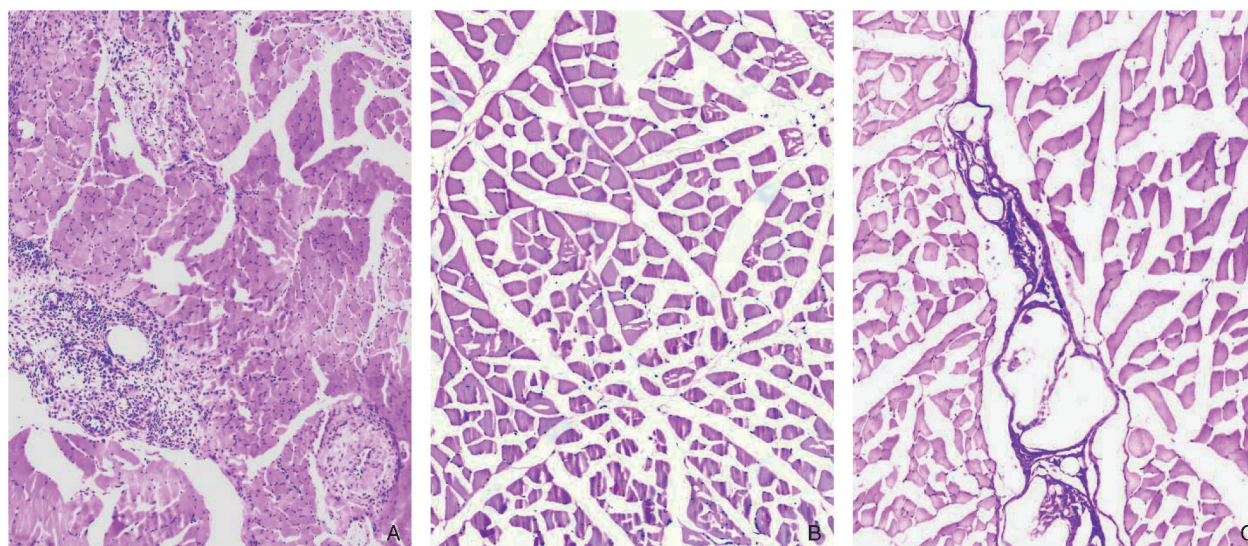


图 5. 肌组织 HE 染色(100 \times) A 为 VEGF-PLGA 组,B 为 VEGF 组,C 为 PLGA 组。

Figure 5. Staining with hematoxylin and eosin (HE) in muscle(100 \times)

3 讨论

VEGF 是 EC 的有丝分裂原,通过促进 EC 的增殖、分裂和迁移来促进血管生成,它常用于血管再生治疗研究^[10-11]。但 VEGF 在体内的半衰期较短,单次大量注射的血管再生效果不明显。水凝胶、聚乙二醇、葡聚糖、PLGA、壳聚糖等高分子材料已被广泛用于制备药物缓释系统。这些材料具有保护蛋白质类药物免受酶类降解的作用,并通过缓慢释放药物使药物在体内的活性维持较长时间^[4-6]。

PLGA 载药系统已经获得了美国食品药品监督

管理局的批准。因其优秀的生物降解性和生物相容性,在载药系统中得到广泛的应用。但是蛋白质类药物具有三级结构,在缓释药物制备过程中接触水-油或水-空气界面张力时容易聚集或变性^[7]。变性或聚集的蛋白不仅丧失治疗活性,还会引起免疫原性或毒性^[8]。研究表明,蛋白质-葡聚糖-PLGA 微球载药系统可以降低蛋白质类药物的聚集或变性^[9]。本研究应用该载药缓释系统,制备了 VEGF-dextran-PLGA 微球。体外研究结果表明,微球具有较高的包封率,持续释放 VEGF 超过 4 周。在大鼠下肢缺血动脉模型治疗研究中发现,VEGF-PLGA 组

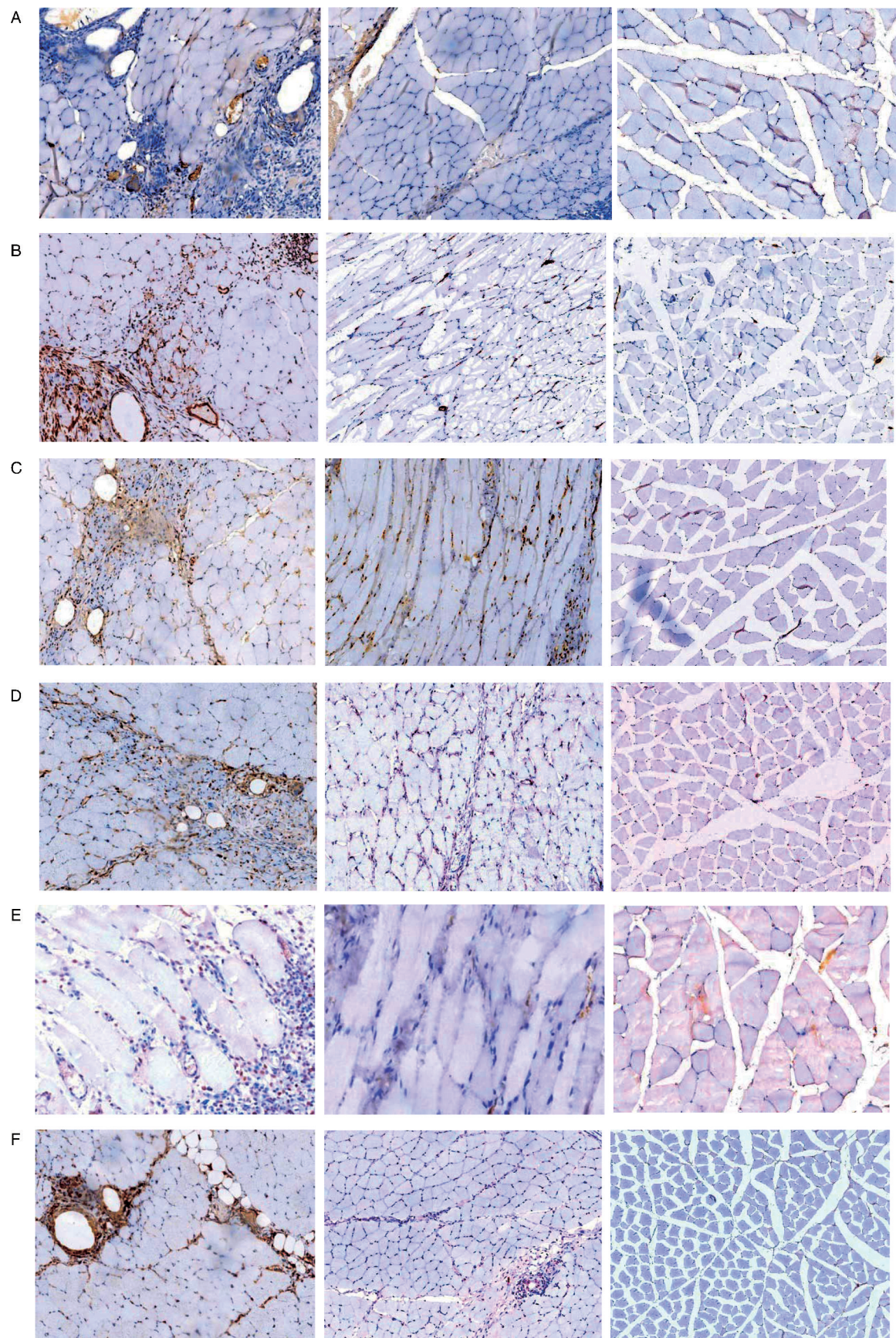


图 6. 肌组织 CD45 (A, 200 \times)、 α -SMA (B, 200 \times)、PCNA (C, 200 \times)、CD34 (D, 200 \times)、C-kit (E, 400 \times) 和 VEGFR-2 (F, 200 \times) 免疫组织化学染色结果 从左到右依次为 VEGF-PLGA 组、VEGF 组和 PLGA 组。
Figure 6. Immunohistochemical staining with antibodies against CD45 (A, 200 \times), α -SMA (B, 200 \times), PCNA (C, 200 \times), CD34 (D, 200 \times), C-kit (E, 400 \times) and VEGFR-2 (F, 200 \times) in muscle

毛细血管密度是 PLGA 组的 2 倍,其 α -SMA 阳性血管密度是 PLGA 组的 5 倍。肌注 VEGF-dextran-PLGA 微球可以明显促进血管再生。

VEGF 除了是 EC 的有丝分裂原外,还能直接作用于平滑肌细胞来促进血管的成熟^[12-13]。Springer 等人^[14]研究发现,移植持续表达 VEGF 的成纤维细胞可以促进大量具有平滑肌细胞层的小动脉生成。持续过度表达 VEGF 的转基因小鼠模型研究也有类似的发现^[12]。过早停止 VEGF 作用可能导致新生成的血管立即退化。Dor 等人^[12]发现 VEGF 作用时间短于 4 周时,新生血管很不稳定,容易退化消失。Ozawa 等人^[13]发现 VEGF 连续表达 28 天而不是 14 天才能使小鼠心脏内形成稳定的新生血管。同理,VEGF-dextran-PLGA 微球可以持续释放 VEGF 超过 4 周,因此它可以提高肌组织中 α -SMA 阳性血管的密度,促进血管再生,并使其成熟稳定。

在 VEGF-PLGA 组中,肌组织中见大量细胞浸润。这些细胞分别呈 PCNA、 α -SMA、CD34、C-Kit、VEGFR-2 阳性,而 CD45 阴性。这些表面标记物主要在骨髓源性干细胞/祖细胞表达。这表明,VEGF 的长时间作用可以动员和募集骨髓干细胞/祖细胞至缺血肌组织内。这些干/祖细胞中有些可能是内皮祖细胞或平滑肌祖细胞,它们可以分化为内皮细胞和平滑肌细胞通过血管发生机制来促血管再生^[15-16]。这些细胞有些可能是单核细胞,它们可以分泌细胞因子和生长因子包括纤维母细胞生长因子、转化生长因子 β 、血小板源生长因子,以及众多的基质降解酶促进动脉生成^[17-19]。因此,VEGF 的持续作用可以促进干细胞/祖细胞动员至缺血组织,并通过血管发生和动脉生成机制促进血管再生。

综上所述,VEGF-dextran-PLGA 微球可以缓释 VEGF 超过 4 周,具有明显促血管再生作用,肌注 VEGF-dextran-PLGA 微球是一种较为理想的血管再生治疗方法。

[参考文献]

- [1] Bao H, Lv F, Liu T. A pro-angiogenic degradable Mg-poly(lactic-co-glycolic acid) implant combined with rhbFGF in a rat limb ischemia model[J]. *Acta Biomaterialia*, 2017, 64: 279-289.
- [2] Layman H, Sacasa M, Murphy AE, et al. Co-delivery of FGF-2 and G-CSF from gelatin-based hydrogels as angiogenic therapy in a murine critical limb ischemic model[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5(1): 230-239.
- [3] Li L, Okada H, Takemura G, et al. Sustained release of erythropoietin using biodegradable gelatin hydrogel microspheres persistently

- improves lower leg ischemia[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 53(25): 2378-2388.
- [4] Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75(1): 1-18.
- [5] Ribeiro MP, Morgado PI, Miguel SP, et al. Dextran-based hydrogel containing chitosan microparticles loaded with growth factors to be used in wound healing[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(5): 2958-2966.
- [6] Raza K, Kumar N, Misra C, et al. Dextran-PLGA-loaded docetaxel micelles with enhanced cytotoxicity and better pharmacokinetic profile[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 88: 206-212.
- [7] Zhu G, Mallery SR, Schwendeman SP. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide) [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(1): 52-57.
- [8] Maas C, Hermeling S, Bouma B, et al. A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(4): 2229-2236.
- [9] Kang J, Wu F, Cai Y, et al. Development of recombinant human growth hormone (rhGH) sustained-release microspheres by a low temperature aqueous phase/aqueous phase emulsion method [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, 62: 141-147.
- [10] Ouma GO, Zafir B, Mohler ER, et al. Therapeutic angiogenesis in critical limb ischemia[J]. *Angiology*, 2013, 64(6): 466-480.
- [11] Giacca M, Zacchigna S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond[J]. *Gene Ther*, 2012, 19(6): 622-629.
- [12] Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, et al. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy[J]. *EMBO J*, 2002, 21(8): 1939-1947.
- [13] Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, et al. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(11): 516-527.
- [14] Springer ML, Ozawa CR, Banfi A, et al. Localized arteriole formation directly adjacent to the site of VEGF-induced angiogenesis in muscle[J]. *Mol Ther*, 2003, 7(4): 441-449.
- [15] Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, et al. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 45-55.
- [16] 张航, 王照飞, 张百灵, 等. 祖细胞和干细胞与缺血性疾病的治疗[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(5): 536-540.
- [17] Avraham-Davidi I, Yona S, Grunewald M, et al. On-site education of VEGF-recruited monocytes improves their performance as angiogenic and arteriogenic accessory cells[J]. *J Exp Med*, 2013, 210(12): 2611-2625.
- [18] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells [J]. *Cell*, 2006, 124(1): 175-189.
- [19] 杨向红. 生长因子的协同作用与新血管形成的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(1): 1-5.

(此文编辑 许雪梅)