

·实验研究 Experimental research·

涂布镍钛合金表面的人血管内皮细胞生长因子
重组质粒转染初步研究

段 林, 何艳艳, 李天晓, 陈 松, 贺迎坤, 吴海刚, 卢韬源

【摘要】目的 制备含重组质粒涂层,提高介入医疗器材生物相容性和耐腐蚀性,降低再狭窄率。**方法** 将人脐静脉内皮细胞分别接种到涂布基质胶+黏连蛋白和基质胶+黏连蛋白+人血管内皮细胞生长因子(VEGF)重组质粒的镍钛合金丝上,37℃培养 48 h 后用正置荧光显微镜观测。**结果** 基质胶+黏连蛋白包被的镍钛合金丝表面细胞无绿色荧光,含人 VEGF 重组质粒包被的镍钛合金丝表面细胞有绿色荧光,表明人 VEGF 重组质粒转染成功。**结论** 人 VEGF 重组质粒转染成功,此种涂层具有可行性,可用于介入医疗器材表面改性。

【关键词】 血管内皮细胞生长因子;质粒;基质胶;镍钛合金;转染

中图分类号:R329.2 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2022)-05-0476-04

Preliminary study on human VEGF transfected by recombinant plasmid coated with nickel-titanium alloy DUAN Lin, HE Yanyan, LI Tianxiao, CHEN Song, HE Yingkun, WU Haigang, LU Taoyuan. Stroke center, People's Hospital of Henan University (Henan Provincial People's Hospital), Zhengzhou, Henan Province 450003, China

Corresponding author: LI Tianxiao, E-mail: dr.litianxiao@henu.edu.cn

【Abstract】Objective To prepare a coating containing recombinant plasmid, to improve the biocompatibility and corrosion resistance of interventional medical devices, and to reduce the restenosis rate. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were separately inoculated onto nitinol alloy wires coated with matrigel +fibronectin or coated with matrigel +fibronectin +recombinant plasmid of human vascular endothelial cell growth factor(VEGF), which were cultured in an incubator at 37℃ for 48 hours, and then were examined under positive fluorescence microscope. **Results** No green fluorescence was observed on the surface cells of nitinol alloy wire coated with Matrigel, but on the surface cells of nitinol alloy wire coated with recombinant plasmid containing human VEGF green fluorescence was observed, indicating that human VEGF recombinant plasmid was successfully transfected. **Conclusion** The recombinant plasmid of human VEGF has been successfully transfected. The preparation of this kind of coating is feasible, and it can be used for the surface modification of interventional medical appliances. (J Intervent Radiol, 2022, 31: 476-479)

【Key words】 vascular endothelial cell growth factor; plasmid; matrigel; nitinol alloy; transfection

目前脑血管介入技术已取得重大进展,但颅内支架应用过程中仍存在早期脑卒中风险和支架内再狭窄问题^[1-2]。这可能与支架植入时血管内皮受损导致内膜下成分暴露,炎性细胞如中性粒细胞浸

润,平滑肌细胞和成纤维细胞增殖、迁移,血管外基质重构以及炎症反应有关^[3,4]。支架植入后可发生再内皮化,防止支架与血流接触,促进活性因子的释放,从而抑制血栓形成和炎症,降低支架内再狭窄^[5]。许多

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2022.05.011

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(21A320002),河南省医学科技攻关计划省部共建青年项目(SBGJ202003004)

作者单位:450003 郑州 河南大学人民医院(河南省人民医院)卒中中心(段 林、何艳艳、李天晓、贺迎坤、卢韬源),转化医学中心(陈 松);河南大学生命科学院(吴海刚)

通信作者:李天晓 E-mail: dr.litianxiao@henu.edu.cn

学者将其视为改善支架性能的潜在突破点。Wu 等^[6]将不同程度上调和下调的血管内皮细胞生长因子(VEGF)转染的内皮细胞支架分别置入兔腹主动脉,1 周后发现 VEGF 过表达的内皮细胞支架被完全覆盖,而 VEGF 干扰组兔则延迟至 4 周,表明过 VEGF 表达可减少新内膜增生,促进内皮化,降低支架内再狭窄。不过该实验存在细胞支架储存、运输和植入操作不便问题。本实验利用细胞吞噬作用,将基质胶、黏连蛋白和人 VEGF 重组质粒作为镍钛合金丝涂层液,以便质粒主动运输至细胞内并进行表达。

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

人 VEGF 重组质粒由本中心实验室原先合成。人脐静脉内皮细胞购自中国科学院,镍钛合金丝($d=0.66$ mm)由湖南瑞康通科技发展公司提供。基质胶、黏连蛋白购自北京索莱宝科技公司,Hoechst 荧光染料和 4%多聚甲醛购自上海碧云天生物技术公司,人脐静脉内皮细胞培养液购自武汉普诺赛生命科技公司,胰酶和磷酸缓冲液(PBS)购自美国 Thermo Fisher 科技公司。

1.2 镍钛合金丝表面处理和涂层制备

将镍钛合金丝剪成 1 cm 长,分别用丙酮、无水乙醇和去离子水超声 10 min,洗去表面污渍,氮气吹干后置于 4℃冰箱备用。将分装的基质胶、黏连蛋白和人 VEGF 重组质粒于 4℃冰箱过夜解冻,在低温配液恒温模块上用预冷枪头将涂层液配制成基质胶(5 mg/mL)、黏连蛋白(40 μ g/mL)、重组质粒(50 ng/ μ L)混合液,置于 4℃脱色摇床过夜摇匀。生物安全柜中,镍钛合金丝用 PBS 清洗 3 遍,浸泡于放置低温配液恒温模块上的涂层液 30 min;取出镍钛合金丝,放入 24 孔细胞培养板,一并置于 37℃细胞培养箱 1 h;取出镍钛合金丝,用 PBS 轻轻清洗 2 遍,转移至新的 24 孔板,等待细胞接种。

1.3 细胞培养和接种

生物安全柜紫外灭菌 30 min;取冻存细胞于 37℃水浴中快速溶解,离心(1 000 r/min)3 min;弃上清液,加入 2 mL 完全培养基重悬;细胞悬液转入含 8 mL 完全培养基的 10 cm 培养皿,摇匀,镜下观察细胞状态,置于细胞培养箱,次日换液,待细胞密度达 90%左右行传代和接种;吸弃旧培养基,PBS 清洗 2 遍,加入 1 mL 胰酶,镜下观察细胞形态,待细胞变圆加入 2 mL 完全培养基终止消化,移入 15 mL 离心管,1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,加入 2 mL

完全培养基重悬,从中吸取 10 μ L 悬液于血球计数板计数,以每孔 8×10^4 细胞量接种于上述镍钛合金丝,并培养 48 h。其余悬液按比铺板于 10 cm 培养皿,继续培养备用。

1.4 细胞染色和检测

48 h 后取出 24 孔板,生物安全柜中吸弃旧培养基,用 PBS 清洗 2 遍,将全部镍钛合金丝转至新的 24 孔板中,滴加多聚甲醛固定液使其淹没镍钛合金丝表面,固定 15 min,取出分装的 Hoechst 染料,避光 1:1 000 稀释,并滴加 24 孔板中,淹没镍钛合金丝表面,15 min 后用锡纸将其包裹,进行正置荧光检测。

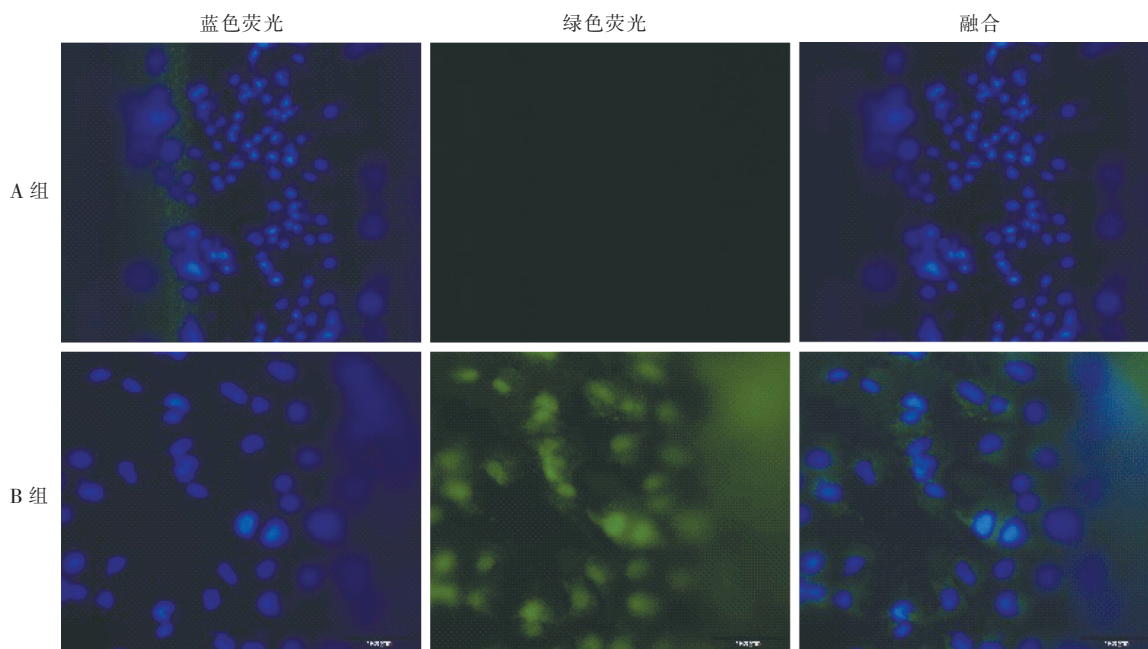
2 结果

48 h 后,正置荧光显微镜观测到基质胶+黏连蛋白包被的镍钛合金丝表面细胞有蓝色荧光,无绿色荧光;含人 VEGF 重组质粒包被的镍钛合金丝表面细胞有蓝色荧光和绿色荧光,如图 1 所示。表明人 VEGF 重组质粒已转染至人脐静脉内皮细胞并进行表达,与预期结果一致,为下一步构建此类重组质粒涂层奠定了基础。

3 讨论

随着介入器材改进,以及水凝胶、聚羟基乙酸(PGA)、乙交酯-丙交酯共聚物(PGLA)、纤维和聚四氟乙烯等修饰的弹簧圈,药物洗脱支架和覆膜支架临床应用,神经介入术治疗脑血管疾病效果不断提高^[7-8]。但目前经修饰的材料基本是不可降解材料,植入后仍会发生炎症、术后再内皮化延迟、血栓形成和支架内再狭窄等^[9-11],其基因分子层面研究与实施仍处于探索阶段。

基因治疗是将外源正常基因导入靶细胞,以纠正或补偿缺陷与异常基因引起的疾病,达到治疗目的。其中也包括转基因等方面技术应用,也就是将外源基因通过基因转移技术插入患者适当的受体细胞,使外源基因制造的产物能治疗某种疾病。基因治疗广义上还可包括从 DNA 水平采取的治疗某些疾病的措施和新技术。DNA 这种仅被称为遗传信息的物质,因其序列可编程性、分子识别性、可重构性和可预测的自组装性,以惊人的速度被鉴定并作为一种新材料被利用^[12-13]。DNA 本身是一种天然纳米尺度材料^[14],其衍生物如 DNA-RNA^[15]、DNA-金属杂合体^[16]和肽核酸(PNA)^[17]可通过编程技术转换成具有明确取向、间距、立体关系及与生物分子更



A 组(基质胶+黏连蛋白)无绿色荧光蛋白(GFP)表达,B 组(基质胶+黏连蛋白+人 VEGF 重组质粒)GFP 表达

图 1 正置荧光显微镜下质粒转染示意图

优相互作用的自组装材料,这使其在改进材料发展和临床应用中具有里程碑意义^[18-19]。质粒是基因工程最常见载体和细胞染色体外能自主复制的一种很小的环状 DNA 分子,它的存在与否一般对宿主细胞生存无决定性作用,是基因治疗中的理想媒介。Zha 等^[20]用电转法构建一种含 VEGF 重组质粒的外泌体,并将其与 3D 打印的多孔骨支架结合,体内研究表明该支架可有效诱导大量血管化骨再生。同样 Ding 等^[21]将编码基质金属蛋白酶-3 组织抑制因子的质粒冻干在金属-聚合物导体支架内表面,动物实验表明该支架可明显抑制兔模型静脉移植的内皮增生。

本实验利用细胞胞吞作用,将基质胶、黏连蛋白和人 VEGF 重组质粒作为镍钛合金丝涂层液进行表面修饰,以便质粒主动运输至细胞内并进行表达,正置荧光显微镜观测到人 VEGF 重组质粒组镍钛合金丝表面细胞含绿色荧光,表明人 VEGF 重组质粒转染成功,也为构建质粒基因涂层奠定了基础。本实验创新之处:基质胶在 10℃以上会发生凝固成胶,此特性符合人体温度;基质胶本身有促进细胞生长的作用,对人体无细胞毒性;质粒通过主动转运进入细胞,动物实验时不需其他辅助手段。但也存在不足之处,仅靠质粒主动转运作用效率较低,涂层粘附性欠缺,对于是否达到治疗的理想状态,还需进一步验证涂层的生物学特性以及后期动物实验模型验证。

[参考文献]

- [1] 雷毅,管文婷,冷硕,等.急性后循环缺血机械取栓研究现状与进展[J].介入放射学杂志,2020,29:210-214.
- [2] 张一林,贺迎坤,李天晓,等.涂布介入器械的人血管内皮生长因子真核表达载体的构建[J].中华介入放射学电子杂志,2019,7:40-43.
- [3] Juni RP, Duckers HJ, Vanhoutte PM, et al. Oxidative stress and pathological changes after coronary artery interventions[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 61: 1471-1481.
- [4] 王聪霞,贾珊.冠状动脉支架内再狭窄发生机制的研究进展[J].西安交通大学学报(医学版),2018,39:303-309.
- [5] Ye W, Chen Y, Tang W, et al. Reduction-responsive nucleic acid delivery systems to prevent in-stent restenosis in rabbits[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11: 28307-28316.
- [6] Wu X, Zhao Y, Tang C, et al. Re-endothelialization study on endovascular stents seeded by endothelial cells through up- or downregulation of VEGF[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8: 7578-7589.
- [7] Vance A, Welch BG. The utility of bioactive coils in the embolization of aneurysms[J]. Neurol Res, 2014, 36: 356-362.
- [8] 张鸿祺,毛之奇.神经介入诊断与治疗的发展[J].中华神经医学杂志,2011,10:433-435.
- [9] Zhuang Y, Zhang C, Cheng M, et al. Challenges and strategies for in situ endothelialization and long-term lumen patency of vascular grafts[J]. Bioact Mater, 2021, 6: 1791-1809.
- [10] Kandala BSPK, Zhang G, LCorriveau C, et al. Preliminary study on modelling, fabrication by photo-chemical etching and in vivo testing of biodegradable magnesium AZ31 stents [J]. Bioact Mater, 2021, 6: 1663-1675.
- [11] 孔令华,贺迎坤,李天晓,等.镁基合金可生物降解支架血管

- 内应用研究进展[J]. 介入放射学杂志, 2020, 29: 626-630.
- [12] Ahn SY, Liu J, Vellampatti S, et al. DNA transformations for diagnosis and therapy[J]. Adv Funct Mater, 2020, 2020:2008279.
- [13] Zadegan RM, Norton ML. Structural DNA nanotechnology: from design to applications[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 7149-7162.
- [14] Chandrasekaran AR. Nuclease resistance of DNA nanostructures [J]. Nat Rev Chem, 2021, 5:225-239.
- [15] Wang K, Wang H, Li C, et al. Genomic profiling of native R loops with a DNA-RNA hybrid recognition sensor[J]. Sci Adv, 2021, 7: eabe3516.
- [16] Wang J, Xu D, Polsky R. Magnetically - induced solid - state electrochemical detection of DNA hybridization[J]. J Am Chem Soc, 2002, 124: 4208-4209.
- [17] Zheng H, Botos I, Clause V, et al. Conformational constraints of cyclopentane peptide nucleic acids facilitate tunable binding to DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49: 713-725.
- [18] Li X, Liu DR. DNA - templated organic synthesis: nature's strategy for controlling chemical reactivity applied to synthetic molecules[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2004, 43: 4848-4870.
- [19] Li ZH, Wang J, Li YX, et al. Self-assembled DNA nanomaterials with highly programmed structures and functions[J]. Mater Chem Front, 2018, 2: 423-436.
- [20] Zha Y, Li Y, Lin T, et al. Progenitor cell - derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects[J]. Theranostics, 2021, 11: 397-409.
- [21] Ding L, Hang C, Cheng S, et al. A Soft, conductive external stent inhibits intimal hyperplasia in vein grafts by electroporation and mechanical restriction[J]. ACS Nano, 2020, 14:16770-16780.
- (收稿日期:2021-04-25)
(本文编辑:边 信)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告

《Journal of Interventional Medicine》

网址: www.keaipublishing.com/JIM

邮箱: j_intervent_med.@163.com