DOI:10.16016/j.1000-5404.201909178

人参皂苷 Rg1 促进移植大鼠的组织工程血管内皮化

王恬然,聂志强,邹 灏,霍 达,许有前,朱楚洪 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院人体解剖学教研室,组织工程国家地方联合工程实验室,血管植入物国家地方联合工程实验室,烧伤、创伤与复合伤国家重点实验室,教育部生物力学与组织工程重点实验室,重庆市生物力学与组织工程重点实验室

[**摘要**] **目的** 包载人参皂苷 Rg1(Ginsenoside Rg1,Rg1)构建促内皮化的组织工程血管(tissue-engineered blood vessels,TEBVs),并移植大鼠颈总动脉以观察其通畅情况和内皮化效果。**方法** CCK-8 和流式细胞凋亡检测培养 48 h 后 Rg1 对内皮细胞(endothelial cells,ECs)增殖和凋亡的影响,同时确定药物适宜工作浓度;将 ECs 分为对照组(普通培养基)、Rg1 处理组(15.63 μmol/L Rg1 培养基)和联合处理组[15.63 μmol/L Rg1+0.5 μg/mL 血管内皮生长因子受体-2(VEGFR2)抑制剂 XL184 培养基],检测各组细胞培养 48 h 后增殖和划痕愈合情况;构建壳聚糖包被的 Rg1-(2-羟丙基)-γ-环糊精颗粒(Rg1-HGC/CS NPs,以下简称 NPs)并修饰至胶原血管内腔面,进行 FTIR、DLS 和 SEM 检测;体外条件下,将 ECs 与脱细胞血管和构建的 TEBVs 共培养 48 h,观察其生物相容性;动物实验分为胶原组(胶原处理的血管)、空白 CS 组(空白 CS 处理的胶原组血管)和实验组(NPs 处理的胶原组血管),将其移植至 SD 大鼠的左侧颈总动脉;分别于 30、90 d 后使用超声和 Micro-CT 检查血管通畅情况;使用 HE、Masson 和(CD31 + vWF)免疫荧光观察 90 d 后血管的内皮化效果。**结果** Rg1 通过 VEGFR2 对 ECs 产生促进增殖和迁移的作用($P<0.05$),未见明显的凋亡影响;所构建的 NPs 粒径约为 130 nm,大小均一(PDI<0.3),并已成功修饰至血管内腔面;共培养实验表明,所构建的 TEBVs 生物相容性较好,利于细胞贴附生长;移植 30、90 d 后的影像学检测显示,实验组较其他组通畅度良好;移植 90 d 后的 HE、Masson 切片染色显示,胶原组和空白 CS 组的血管发生形变,失去正常结构,且因血栓和胶原纤维增生而发生阻塞,而实验组血管外形完整且无明显阻塞;CD31 和 vWF 免疫荧光显示,实验组血管内腔面均匀覆有 ECs,内皮化效果较其他组良好。**结论** 所构建的促内皮化 TEBVs 可促进血管的内皮化进程,维持血管移植后的远期通畅。

[**关键词**] 组织工程血管;内皮细胞;人参皂苷 Rg1;内皮化

[**中图法分类号**] R285.5; R318.11; R329.28 [**文献标志码**] A

Ginsenoside Rg1 promotes endothelialization of tissue-engineered blood vessels in transplanted rats

WANG Tianran, NIE Zhiqiang, ZOU Hao, HUO Da, XU Youqian, ZHU Chuhong State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined injury, Department of Human Anatomy, National and Regional Engineering Laboratory for Tissue Engineering, National and Regional Engineering Laboratory for Vascular Implants, Key Laboratory of Biomechanics and Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To prepare the endothelialization-promoting tissue-engineered blood vessels (TEBVs) with encapsulated Ginsenoside Rg1 (Rg1) to promote endothelialization, and to evaluate its patency and endothelialization after implantation into the rat common carotid artery. **Methods** CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect the effects of Rg1 on the proliferation and apoptosis of endothelial cells (ECs) after 48 hours' treatment, and the optimal dose of the agent was also determined. ECs was divided into control

[**基金项目**] 国家重点研发计划(2016YFC1101100)

[**通信作者**] 朱楚洪,E-mail:zhuch99@yahoo.com

group, Rg1 treatment group (15.63 μmol/L Rg1), and Rg1+XL184 (15.63 μmol/L Rg1+0.5 μg/mL XL184, VEGFR2 inhibitor) treatment group. Cell proliferation and wound healing of ECs were examined after the treatment for 48 h. Chitosan coated Rg1-(2-hydroxypropyl)-cyclodextrin particles (Rg1-HGC/CS NPs, abbreviated as NPs) were prepared and modified to the lumen of blood vessels (after decellularization and collagen treatment), and then Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM) were used to detect these obtained samples. ECs were co-cultured with acellular vessels and TEBVs for 48 h to observe the biocompatibility. For *in vivo* study, the acellular vessels were divided into collagen group (collagen treatment), blank CS group (collagen and chitosan treatment), and NPs group (modified with NPs). Then these vessel samples were transplanted into the left common carotid artery of SD rats respectively. Ultrasound and micro-CT scanning were performed to observe the vascular patency in 30 and 90 d after transplantation. HE and Masson staining and immunofluorescence assay for CD31 and vWF were used to observe the endothelialization in each group in 90 d after transplantation. **Results** Rg1 promoted the proliferation and migration of ECs *via* VEGFR2 ($P<0.05$), and showed no significant effect on apoptosis. The prepared NPs were about 130 nm in diameter and uniform in shape (PDI<0.3), and could be successfully modified to the lumen of blood vessels. The co-cultured study showed that endothelialization-promoting TEBVs displayed better biocompatibility for favorable of cell adhesion and growth. In 30 and 90 d after transplantation, radiological studies displayed that the NPs-treated vessels showed better vascular patency than the other groups. HE and Masson staining indicated that in 90 d after transplantation, the collagen and blank CS groups had blood vessels deformed, without normal structures and blocked due to the thrombosis and collagen fibrosis, while the NPs group had intact blood vessels and better patency. Immunofluorescence assay for CD31 and vWF showed that the lumen in the vessles from the NPs group had ECs well-covered, suggesting better endothelialization when compared with other groups. **Conclusion** Endothelialization-promoting TEBVs shows better promoting effect on endothelialization, and is helpful in maintenance of long-term patency of blood vessels after transplantation.

[**Key words**] tissue-engineered blood vessels; endothelial cells; ginsenoside Rg1; endothelialization

Supported by the National Key Research and Development Plan (2016YFC1101100). Corresponding author: ZHU Chuhong, E-mail: zhuch99@yahoo.com

心血管疾病(cardiovascular disease,CVD)的治疗一般使用自体的健康血管进行手术移植,然而患者的自体血管常由于各类疾病(如高血压、糖尿病等)而不宜进行移植[1-2]。组织工程血管(tissue-engineered blood vessel,TEBVs)虽能够缓解供体血管的短缺状况[3],但在移植后常面临血栓、胶原或内膜增生等问题,导致移植失败[4-6]。内皮细胞(endothelial cells,ECs)位于血管内膜,发挥代谢、物质交换[7]、合成分泌细胞因子、抑制血小板集聚等作用[5],故促进移植后TEBVs的内皮化进程可减少上述病理情况的发生,从而保证移植的成功[8-9]。研究发现Rg1可促进ECs增殖、迁移和血管形成[10-12],且该作用与VEGFR2有关[13-15],研究两者间关系将为后续实验提供理论基础。环糊精家族作为经典的药物载体,其中(2-羟丙基)-γ-环糊精[(2-hydroxypropyl)-cyclodextrin,HGC][16-17]因其优异的水溶性、空腔容积和生物相容性,已被应用于口腔、皮肤和肠道给药[18-19]。为了解决移植后TEBVs可能产生的病理问题,本研究拟探讨人参皂苷Rg1(Ginsenoside Rg1,Rg1)对ECs增殖和迁移的影响,同时构建Rg1-(2-羟丙基)-γ-环糊精颗粒(Rg1-HGC/CS NPs,以下简称NPs)并修饰至天然血管以构建促内皮化进程的TEBVs,发挥促进血管内皮化进程的作用,为临床治疗CVD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和动物

ECs购于ATCC公司;8~10周的SD大鼠来自陆军军医大学实验动物中心。

1.2 主要试剂

RPMI培养基、青霉素-链霉素购自HyClone公司;胎牛血清(FBS)、胰酶(2.5%)购自Gibco公司;Rg1、CCK-8试剂盒、多聚甲醛固定液(4%)购自Beyotime公司;XL184(Cabozantinib malate,VEGFR2抑制剂)购自Selleck公司;HGC、壳聚糖、冰醋酸购自Aladdin公司;碘海醇造影剂购自扬子江药业;三聚磷酸钠(TPP)购自Sangon公司;胶原购自Kensey Nash公司;1-(3-二

甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自 BBI 公司;Hoechst 33342 购自 Sigma-Aldrich 公司;流式凋亡检测试剂盒购自 CWBIO 公司。

1.3 *实验方法*

1.3.1 配制 1640 培养基与细胞培养 使用 RPMI 培养基配制含有 10% FBS 的 1640 完全培养基,并加入 1% 的青霉素-链霉素。使用 1640 完全培养基培养 ECs,置于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱。换液时,使用 PBS 漂洗 3 次后加入 1640 完全培养基。当细胞几乎铺满培养瓶时,使用胰酶(2.5%)消化后传代。

1.3.2 细胞增殖能力检测 计数 ECs 并接种于 96 孔板内[(0.8~1.0)×10^4/孔]并培养过夜。细胞贴壁后使用 PBS 漂洗,然后每组加入含有不同浓度 Rg1 的培养基(0、7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000、2 000 μmol/L),每组 6 个复孔,培养 48 h。吸除孔内液体,每孔加入含有 10% CCK-8 的培养基 100 μL,温箱内继续孵育 1.5 h。酶标仪(Tecan Infinite M200 Pro)测量每组 450 nm 处的光密度值[*D*(450)]。再将细胞分为 3 组,分别用普通培养基(对照组)、Rg1(15.63 μmol/L)培养基(Rg1 处理组)和 XL184(0.5 μg/mL)+Rg1(15.63 μmol/L)联合培养基(联合处理组)培养 ECs,每组 8 个复孔,48 h 后测定相应 *D*(450)值。

1.3.3 细胞划痕实验 6 孔板内种植 ECs,待细胞几乎铺满时,垂直于水平面进行细胞划痕操作。PBS 漂洗后,每孔加入丝裂霉素(1 μg/mL)处理约 1 h 以抑制有丝分裂,结束后再次漂洗。分别使用普通培养基(对照组)、Rg1(15.63 μmol/L)培养基(Rg1 处理组)和 XL184(0.5 μg/mL)+Rg1(15.63 μmol/L)联合培养基(联合处理组)培养 ECs,以上所有分组的培养基均无 FBS,以排除细胞分裂对实验的影响,48 h 后漂洗、固定并染色,显微镜下拍照,Image J 测算相对划痕面积和划痕闭合率。

1.3.4 流式细胞凋亡检测 ECs 分为对照组和 Rg1 处理组,种植于 6 孔板内,其中 Rg1 处理组使用 Rg1(15.6 μmol/L)培养基处理,而对照组仅使用普通培养基处理。48 h 后收集两组细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后漂洗,然后使用缓冲液重悬,加入 Annexin V-FITC 和 PI 避光孵育 15 min,流式细胞仪(BD Accuri C6)上样检测。

1.3.5 Rg1-HGC/CS NPs 的制备 将 Rg1 溶液(4 mg/mL)缓慢滴入 HGC 溶液(4.53 mg/mL)并中速搅拌 4 h,冷冻干燥后得到 Rg1-HGC。将 35.0 mg 壳聚糖溶于 35.0 mL 的冰醋酸溶液(1%,体积分数),调节溶液 pH 约为 5,制得壳聚糖溶液。将 7.78 mL 的 TPP 溶液(1.0 mg/mL)缓慢滴入壳聚糖溶液并连续搅拌 4 h(50 ℃),冷冻干燥后制得空白壳聚糖 CS 颗粒。重复上述步骤,将 10.0 mg 的 Rg1-HGC 溶于 7.78 mL 的 TPP 溶液,缓慢滴入壳聚糖溶液并连续搅拌 4 h(50 ℃),冷冻干燥后制得 Rg1-HGC/CS NPs。

1.3.6 TEBVs 的构建和移植 水合氯醛(10%)麻醉大鼠,逐层分离颈部组织,剥离颈动脉鞘并暴露颈总动脉,夹闭血管两端并剪下血管,在肝素生理盐水中冲洗血管腔,置于冰上保存。使用胰酶(0.2%)消化血管(37 ℃,30 min)得到脱细胞血管,PBS 漂洗后与胶原溶液(4 mg/mL)混合,4 ℃振荡孵育 24 h,得到胶原处理的血管。将胶原处理的血管置于 EDC/NHS 混合溶液(各 5 mmol/L)中,4 ℃振荡孵育 24 h 以活化胶原分子的羧基和氨基。处理完毕后将血管样本浸入 NPs 溶液(15 μmol/L)中,4 ℃振荡交联 24 h 得到 NPs 修饰的促内皮化 TEBVs。动物血管移植实验分为胶原组、空白 CS 组和实验组,将各组血管分别移植到大鼠的左侧颈总动脉(每组 6 只),消毒后予以缝合。置于舒适的环境中饲养,尾静脉注射肝素化生理盐水 1 周。

1.3.7 血管的生物相容性检测 体外环境下,取得脱细胞血管和构建的促内皮化 TEBVs,置于(5~10)×10^4/mL 的 ECs 悬液培养 48 h(37 ℃,5% CO_2)。PBS 轻柔漂洗以去除尚未附着的细胞,多聚甲醛(4%)浸没样本固定 20 min,PBS 漂洗后使用 Hoechst 33342 工作液(1∶2 000)染色 10 min,将血管置于载玻片上压片观察,每组取 4 个随机视野观察并拍照。

1.3.8 材料和血管的表征 将各样本的干态粉末与溴化钾混匀并研磨压片,FTIR 仪(Thermo Fisher Nicolet iS 50)检测 Rg1、HGC、CS、Rg1-HGC 和 Rg1-HGC/CS 的红外波谱;DLS 仪(Malvern Nano S90)分析 NPs 的粒径和多分散性指数(PDI);对各组血管进行固定、乙醇和叔丁醇梯度脱水和喷金处理后,使用 SEM(Zeiss Crossbeam 340)拍照。

1.3.9 小动物超声和 Micro-CT 检测血管通畅情况 血管移植 30 d 后,将各组大鼠麻醉并备皮,使用小动物超声仪(Esaote SL3323)检测血流速度和通畅情况。90 d 后,将各组大鼠麻醉,切开腹部并逐层分离组织,探查至膈肌后将其剪开,于心尖处迅速注射造影剂(0.4 mL/100 g),必要时剪开肋骨进行心外按压以使造影剂进入循环系统,将大鼠朝上置于 Micro-CT 仪(Perkin Elmer Quantum FX)扫描颈总动脉。获取各组大鼠的左侧颈总动脉样本并妥善处理遗体。

1.3.10 切片染色检测各组血管的内皮化效果 获取胶原组、空白 CS 组和实验组大鼠的左侧颈总动脉,使用 HE、Masson 和 CD31 免疫荧光染色观察每组样本的内皮化效果,该实验由 Servicebio 公司进行;另外,对

实验组血管使用 CD31(红)和 vWF(绿)双荧光染色,观察内皮化效果并拍照。

1.4　统计学分析

采用 GraphPad Prism 和 Origin 对数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　Rg1 通过 VEGFR2 产生促进 ECs 增殖的作用

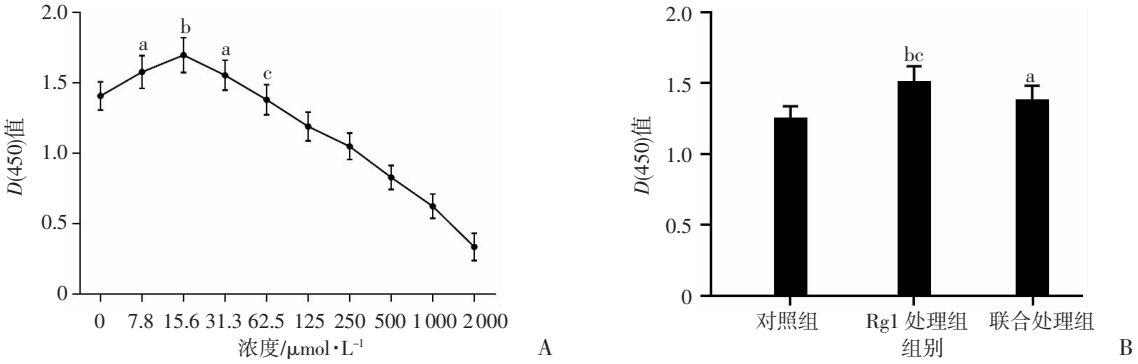
细胞培养 48 h 后,细胞活力最高的为 15.6 μmol/L Rg1 处理组。当 Rg1 浓度小于 15.6 μmol/L 时,D(450)值随着浓度的增加而升高,提示此范围内浓度与促增殖效果成正比($P<0.05$);当 Rg1 浓度大于 15.6 μmol/L 时,D(450)值随着浓度的增加而降低,提示此范围内浓度与促增殖效果成反比($P<0.05$);其中 62.5 μmol/L Rg1 处理后细胞活力较 15.6 μmol/L Rg1 处理显著降低($P<0.01$),而与 0 μmol/L Rg1 处理组差异无统计学意义。提示当上升至此浓度时,促增殖效果已不明显甚至发生抑制增殖作用(图 1A)。使用 15.6 μmol/L 浓度的 Rg1 和 XL184 分别处理细胞 48 h,Rg1 处理组 D(450)值高于对照组($P<0.01$)和联合处理组($P<0.05$),联合处理组 D(450)值高于对照组($P<0.05$),表明 Rg1 可通过 VEGFR2 途径促进 ECs 增殖,且该作用可被 XL184 部分阻断(图 1B)。

2.2　Rg1 通过 VEGFR2 产生促进 ECs 迁移的作用

图 2 中被染为紫色的细胞为 ECs,中央空白部分为划痕区域(图 2A)。Rg1 处理组的划痕闭合率显著高于对照组($P<0.01$)和联合处理组($P<0.05$),平均值之比为 3∶2和 15∶13;联合处理组的划痕闭合显著率高于对照组($P<0.05$),其平均值之比约为 13∶10。提示 Rg1 可促进 ECs 迁移,促使划痕愈合,且该作用可被 XL184 部分阻断(图 2B)。

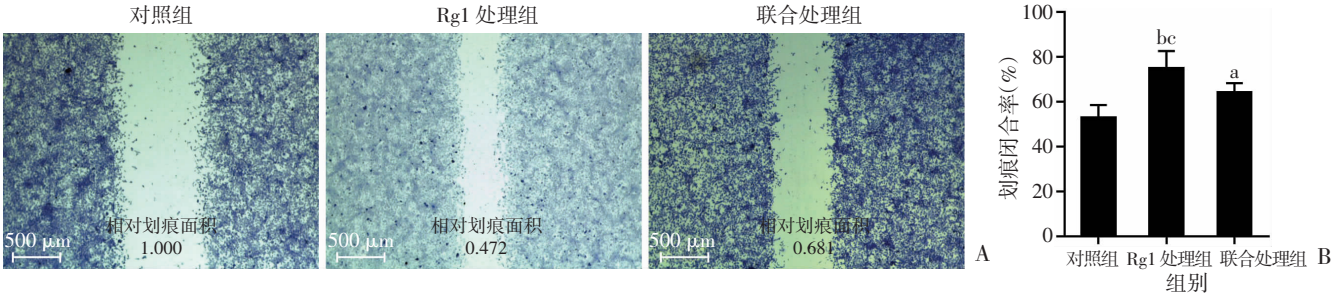
2.3　Rg1 对 ECs 无明显的凋亡影响

采用流式细胞术进一步对空白处理(对照组)和 Rg1 处理(处理组)后的细胞进行凋亡检测,每组实验重复 3 次。结果显示,对照组和处理组的早期凋亡率分别为 0.59%、0.56%、0.81% 和 0.79%、0.60%、0.56%;晚期凋亡率分别为 9.32%、9.80%、9.44%和 8.35%、8.89%、8.18%。早期凋亡率方面两组未见明显差异晚期凋亡率表现处理组略低于对照组,而结合其差异值(<1%)和实际情况分析,认为 Rg1 对 ECs 抑制凋亡作用不明显,也从另一方面提示该浓度的 Rg1 对 ECs 无明显的凋亡作用(图 3)。



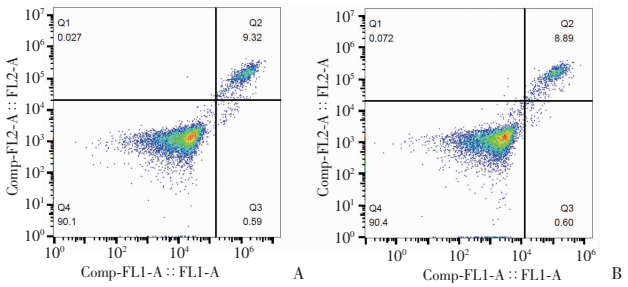
A:不同浓度 Rg1 培养 ECs 48 h 后对细胞增殖的影响($n=6$)　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L 比较;c:$P<0.01$,与 15.6 μmol/L 比较;B:各组处理 48 h 后细胞增殖能力变化($n=8$)　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与联合处理组比较

图 1　Rg1 通过 VEGFR2 产生促进 ECs 增殖的作用



A:各组细胞划痕实验;B:划痕闭合率　a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与联合处理组比较

图 2　Rg1 通过 VEGFR2 产生促进 ECs 迁移的作用



A:对照组;B:Rg1 处理组;Q1、Q2、Q3、Q4 分别代表坏死、晚期凋亡、早期凋亡和存活细胞的比率

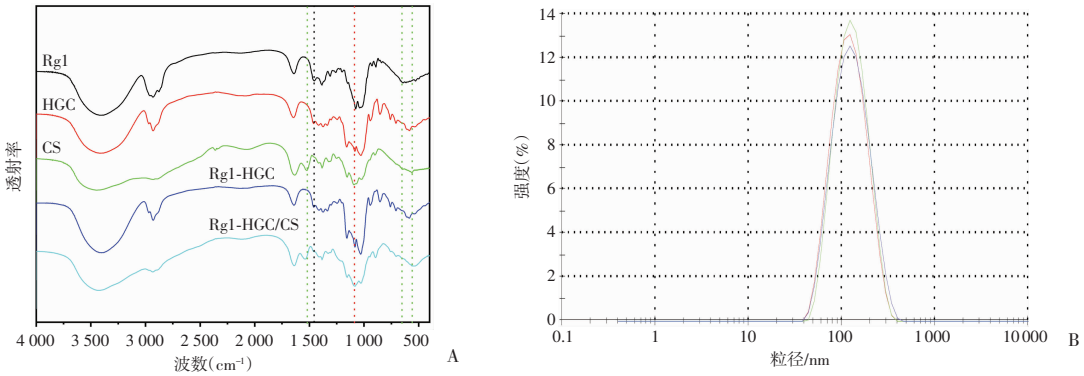
图 3 Rg1 对 ECs 无明显的凋亡影响

2.4 FTIR 和 DLS 检测

FTIR 显示,HGC 在 1 084 cm^{-1} 处具有二级羟基 C-O 吸收峰,符合 HGC 的结构特征;Rg1 和 Rg1-HGC 在 1 450 cm^{-1} 处可见较宽 C=C 吸收峰,符合 Rg1 结构特征,且在 HGC 未见该吸收峰,说明 HGC 可与 Rg1 结合;CS 在 1 525 cm^{-1}、650 cm^{-1} 和 560 cm^{-1} 处可见 C-N 和 N-H 的吸收频率,符合 CS 结构特征,且上述频率同样没有出现在 Rg1-HGC/CS 中,提示 CS 可将 Rg1-HGC 包被形成 Rg1-HGC/CS(图 4A)。粒径分析显示所合成的 Rg1-HGC/CS 直径在 40~400 nm 之间,大部分集中于 130 nm,PDI 为 0.187<0.3,表明粒径值的分布均匀且集中(图 4B)。

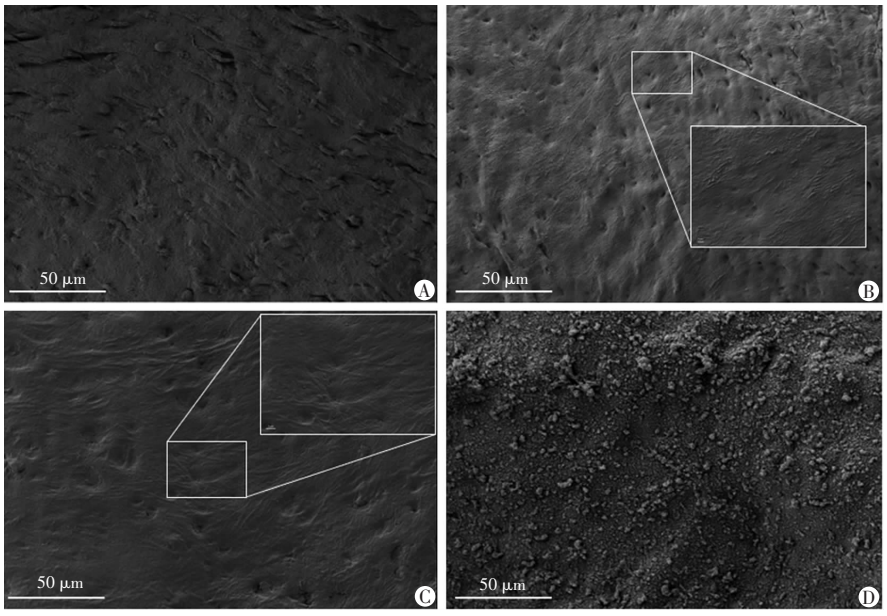
2.5 SEM 检测各组血管内表面的形态结构

正常组(正常血管)可见 ECs(8~10 μm)同向均匀地生长于内表面(图 5A);脱细胞组血管可见较细的无序网状结构(暴露于内膜层的血管胶原纤维)(图 5B);胶原组血管内表面较平滑且未见明显 ECs 和胶原纤维,说明胶原已均匀地孵育至内表面(图 5C);实验组(NPs 修饰血管)可见内表面均匀分布有大量球形微粒(图 5D),直径介于 50~200 nm 之间,与前期 DLS 结果一致,提示 NPs 已经被成功地修饰至内表面。



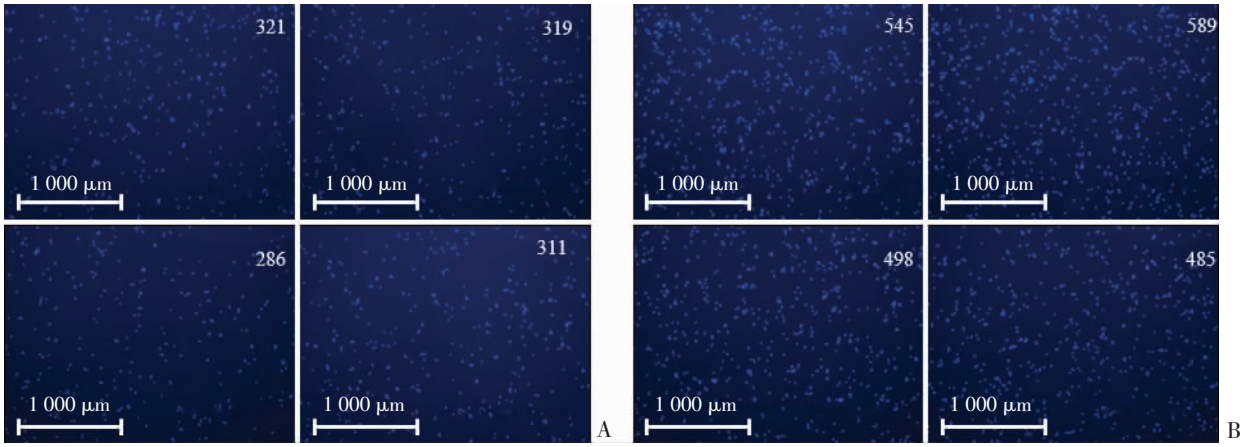
A:FTIR 谱线;B:Rg1-HGC/CS 的 DLS 粒径分析

图 4 各组样本的 FTIR 和 DLS 检测



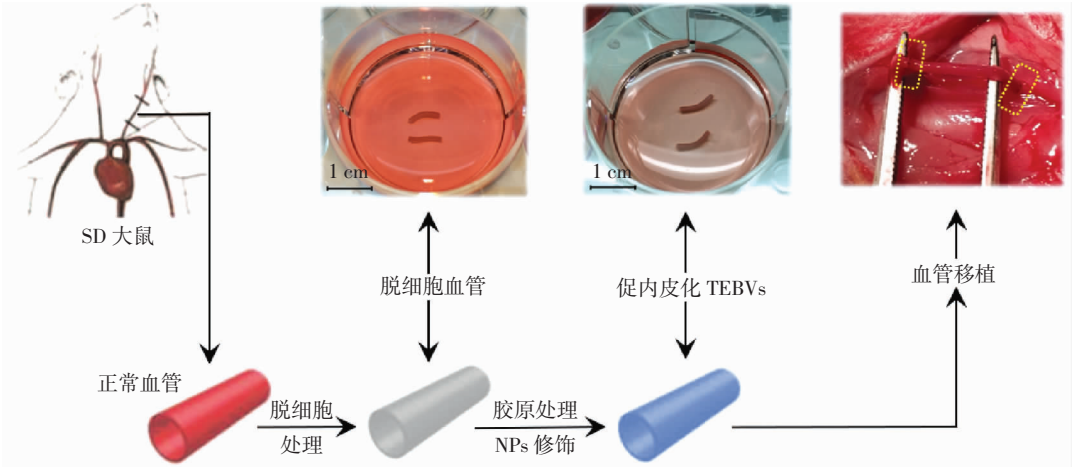
A:正常组;B:脱细胞组;C:胶原组;D:实验组

图 5 各组血管样本内表面的形态结构观察



A:脱细胞处理的血管支架;B:促内皮化的 TEBVs;每组选取 4 个随机视野,右上角数字为该视野的细胞计数值

图 6 ECs 与血管支架和促增殖 TEBVs 的共培养情况



黄色虚线框为移植血管两侧的缝合部位

图 7 促内皮化 TEBVs 的构建和血管移植

2.6 促内皮化 TEBV 的生物相容性较脱细胞血管良好

使用荧光显微镜观察并随机选取 4 个视野拍照,使用 Image J 对细胞进行计数。结果显示,脱细胞血管的计数为 321、319、286、311,其平均值为 309(图 6A);促内皮化 TEBV 的计数为 545、589、498、485,其平均值为 529(图 6B)。说明所构建的促内皮化 TEBV 生物相容性较好,利于细胞的贴附,有助于血管移植后 ECs 的生长、增殖和迁移。

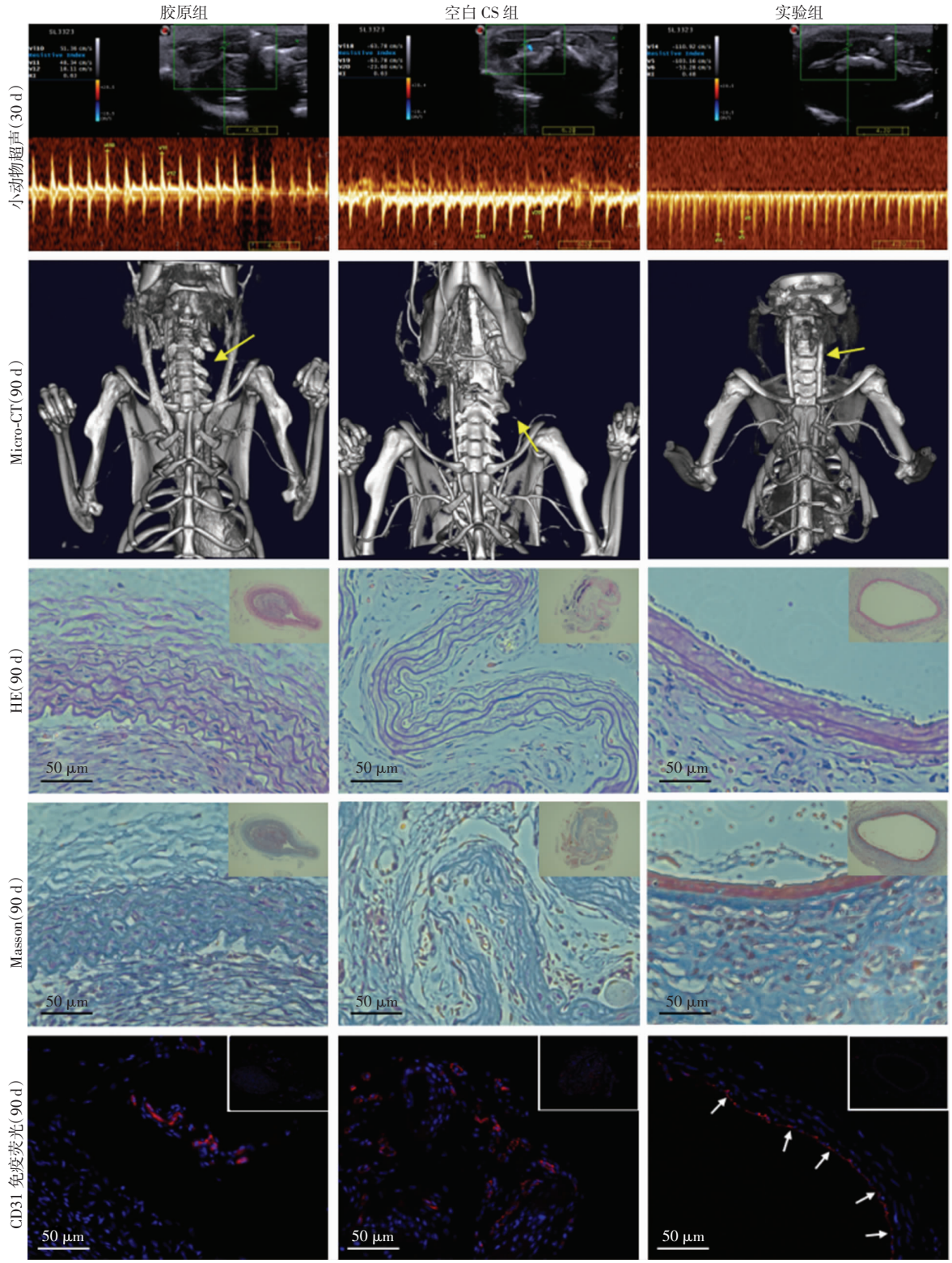
2.7 促内皮化 TEBVs 的构建和血管移植

脱细胞组血管呈白色管状结构,长约 1 cm,周围附着少量絮状物(血管外膜纤维);胶原组血管周围未见明显絮状物;实验组血管的形态与胶原组相似。在血管移植过程中,将各组血管移植至 SD 大鼠的左侧颈总动脉后,松开止血夹可见血管缝合口处有微量渗血,数分钟后渗血自行停止,同时血管由苍白色逐渐转变为浅红色,说明移植处血流状况良好,可以进行缝合(图 7)。

2.8 各组大鼠的血管通畅情况和内皮化效果

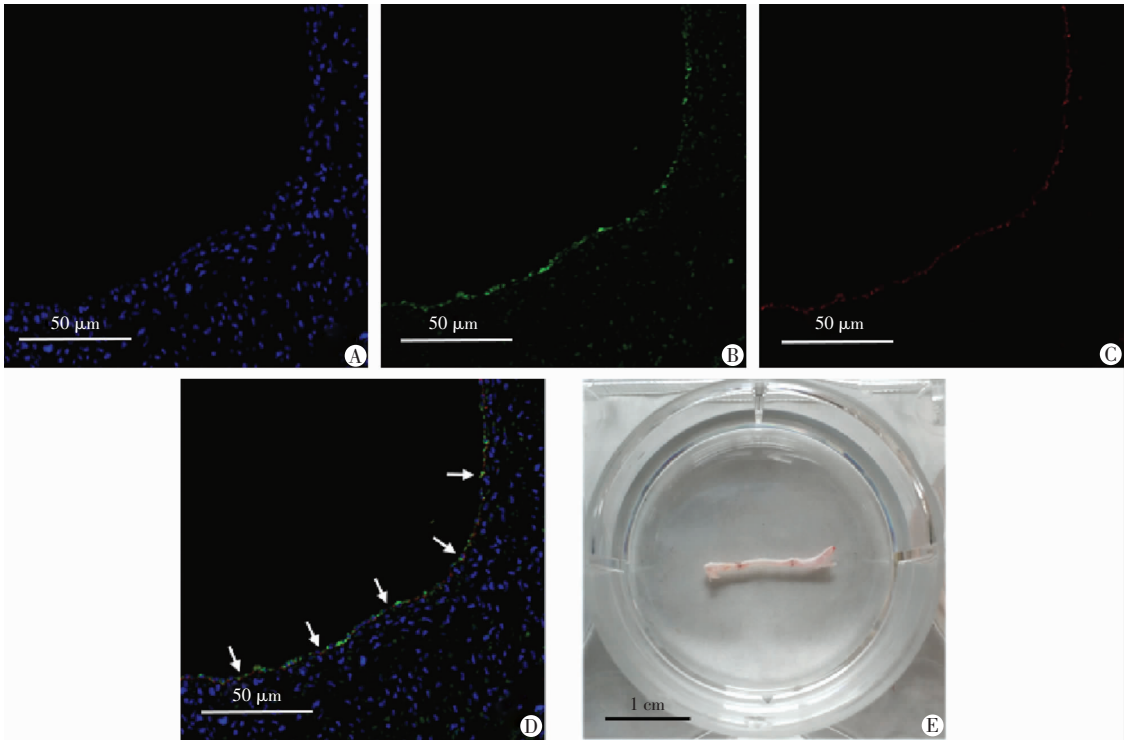
移植后 30 d 时,使用小动物超声仪检测各组大鼠的血液流速,实验组(110.92 cm/s) > 空白 CS 组(63.78 cm/s) ≥ 胶原组(51.36 cm/s),提示在此时间节点,实验组的通畅度与其他组相比较好。移植后第 90 d 时,Micro-CT 扫描发现,胶原组和空白 CS 组大鼠的左侧颈总动脉缺失,其走行方向未见血管及其分支轮廓,而实验组可见沿大鼠脊柱方向走行的左侧颈总动脉,其轮廓较为清晰,提示移植 90 d 后,实验组大鼠的通畅度仍较其他组良好;HE 切片染色观察,发现胶原组和空白 CS 组的血管壁发生内向塌陷,已呈现出不规则外形,血管内腔几乎完全阻塞,而实验组的血管壁外形完好,未发生明显形变,血管内腔较通畅;Masson 切片染色观察,发现胶原组和空白 CS 组的血管内腔除发生阻塞外,血管壁和内腔可见明显的胶原纤维(蓝色)增生现象,而实验组血管未发生明显该现

象,通畅度良好;CD31 免疫荧光观察,可见胶原组和空白 CS 组血管内腔中,杂乱分布的细胞和机化再通形成的小血管,构成血管阻塞现象,而实验组血管的通畅度较好,其内腔表面可见单层或数层的内皮细胞覆盖(图 8),提示实验组血管在此时间点已基本完成内皮化进程。



Micro-CT(90 d):黄色箭头示大鼠左侧颈总动脉移植的位置;CD31 免疫荧光(90 d):CD31(红),DAPI(蓝),白色箭头示附着生长于血管内表面的内皮细胞

图 8 各组大鼠的血管通畅情况和内皮化效果



A:细胞核染色(蓝);B:vWF 染色(绿);C:CD31 染色(红);D:融合图像 白色箭头示 ECs;E:实验组血管实物

图 9 实验组血管的免疫荧光双标志染色(vWF 和 CD31)和实物图

另外对实验组的血管样本进行 vWF(绿色)和 CD31(红色)免疫荧光双标志染色,可见细胞核(蓝色)、vWF 和 CD31 共定位于血管内表面的细胞,提示细胞种类为内皮细胞(图 9)。

3 讨论

CVD 在现代社会的发病趋势愈发严峻,临床治疗一般需要进行血管移植手术,而良好的血管供体却供不应求,为了解决临床血管供体短缺和移植后所产生的各种问题,本文包载 Rg1 构建出了促内皮化的 TEBVs。研究表明,人参的有效成分 Rg1 在血管生成方面表现出促 ECs 增殖和迁移的作用,其机制除本研究的 VEGFR2 之外,还有 PI3k/Akt、MiR-23a/RUNX2/VEGF-A、HIF-1α 非依赖性上调等机制[10-12],同时 Rg1 具有类似雌激素的活性,可作用于雌激素受体而发挥促进细胞增殖的作用[20-21]。

本研究首先观察了 Rg1 对 ECs 促进增殖和迁移的作用,同时阐述了该作用和 VEGFR2 之间的联系,为后续实验提供理论基础。在探究 Rg1 的作用浓度时,得出 Rg1 促进 ECs 增殖的浓度范围为 7.8~31.3 μmol/L,而在此区间内 15.6 μmol/L 的促进增殖作用较明显,故本文将 Rg1 的工作浓度设定为 15.6 μmol/L。本研究发现 Rg1 虽表现出抑制 ECs 晚期凋亡的作用,但结合实际效应,可认为 Rg1 对 ECs 抑制凋亡作用不显著,从另一方面提示该药物对细胞无明显的凋亡影响,对细胞和组织较安全。其次,本研究使用 CS 包裹 Rg1-HGC,利用 EDC/NHS 共同产生催化作用,使 NPs 修饰至血管内表面,其原理大致为:壳聚糖分子的氨基与胶原分子的羧基在 EDC/NHS 的催化作用下发生脱水缩合反应形成酰胺键,使 CS 包裹的 Rg1-HGC 以共价键的形式牢固修饰于血管内表面[22],减少因血流冲刷所造成的药物损失。然后,本研究对所制备的 NPs 进行表征,FTIR 和 DLS 结果显示 Rg1-HGC/CS NPs 的粒径约为 130 nm 且大小均匀。

在动物实验中,本研究以 SD 大鼠的颈总动脉作为基础材料,通过使用低浓度的胰酶将血管的细胞消化裂解,目的在于减少移植后因同种异体的细胞或组织产生的免疫排斥反应。使用胶原孵育血管,一方面可以覆盖脱细胞处理后的血管内表面所暴露的胶原纤维,阻止因暴露的胶原纤维而产生的凝血系统激活效应,另一方面能够为接下来的 TEBVs 修饰提供化学基团(如氨基和羧基)。SEM 证实 NPs 能够均匀地修饰于 TEBVs 内腔面,表明已成功构建促内皮化的 TEBVs。在构建完成促内皮化 TEBVs 后,将 ECs 与脱细胞血管和促内皮化 TEBVs 进行共培养,以观察其生物相容性,结果显示后者较好,利于细胞贴附和生长。在移植后 30 d 和 90 d,对各组大鼠进行了血管通畅率的检测,两个时间点的检测结果显示实验组的通畅度

优于其他两组,说明所构建的促内皮化 TEBVs 能够保持移植后血管的通畅率。对移植 90 d 后的各组血管进行 HE、Masson 和 CD31+vWF 免疫荧光染色,以观察血管的内皮化效果,结果显示实验组的血管比较于其他两组,已基本完成内皮化进程,最终维持血管的通畅性。综上所述,本研究所构建的促内皮化 TEBVs 可促进 ECs 的增殖和迁移作用,保证移植后通畅率,为临床治疗 CVD 提供了理论支撑和实验依据。

由于生物体的内环境是一套高度复杂且动态变化的系统,血管的生成和修复也不例外。血管在移植后首先将面临血栓(或栓塞)形成的问题,移植后的短期内可能诱发急性免疫排斥反应导致血管被免疫细胞攻击而失去功能,移植后的长期阶段则会面临着慢性免疫排斥反应和神经化支配的问题,关于血管移植后神经化的问题有待在后续研究中进一步探究和阐明。

参考文献:

[1] DAHL S L, KYPSON A P, LAWSON J H, *et al*. Readily available tissue-engineered vascular grafts[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(68): 68ra9. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001426.

[2] GAUDINO M, ANTONIADES C, BENEDETTO U, *et al*. Mechanisms, consequences, and prevention of coronary graft failure[J]. Circulation, 2017, 136(18): 1749-1764. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027597.

[3] RATCLIFFE A. Tissue engineering of vascular grafts[J]. Matrix Biol, 2000, 19(4): 353-357. DOI: 10.1016/s0945-053x(00)00080-9.

[4] MEDZHITOV R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame[J]. Cell, 2010, 140(6): 771-776. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.006.

[5] SEIFU D G, PURNAMA A, MEQUANINT K, *et al*. Small-diameter vascular tissue engineering[J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10(7): 410-421. DOI: 10.1038/nrcardio.2013.77.

[6] SONG H G, RUMMA R T, OZAKI C K, *et al*. Vascular tissue engineering: progress, challenges, and clinical promise[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(3): 340-354. DOI: 10.1016/j.stem.2018.02.009.

[7] VAN HINSBERGH V W. Endothelium: role in regulation of coagulation and inflammation[J]. Semin Immunopathol, 2012, 34(1): 93-106. DOI: 10.1007/s00281-011-0285-5.

[8] SERBO J V, GERECHT S. Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis[J]. Stem Cell Res Ther, 2013, 4(1): 8. DOI: 10.1186/scrt156.

[9] MELCHIORRI A J, HIBINO N, FISHER J P. Strategies and techniques to enhance the *in situ* endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2013, 19(4): 292-307. DOI: 10.1089/ten.TEB.2012.0577.

[10] WU X D, GUO T, LIU L, *et al*. MiR-23a targets RUNX2 and suppresses ginsenoside Rg1-induced angiogenesis in endothelial cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(35): 58072-58085. DOI: 10.18632/oncotarget.19489.

[11] SENGUPTA S, TOH S A, SELLERS L A, *et al*. Modulating angiogenesis: the Yin and the Yang in ginseng[J]. Circulation, 2004, 110(10): 1219-1225. DOI: 10.1161/01.CIR.0000140676.88412.CF.

[12] LEUNG K W, NG H M, TANG M K, *et al*. Ginsenoside-Rg1 mediates a hypoxia-independent upregulation of hypoxia-inducible factor-1α to promote angiogenesis[J]. Angiogenesis, 2011, 14(4): 515-522. DOI: 10.1007/s10456-011-9235-z.

[13] YANCOPOULOS G D, DAVIS S, GALE N W, *et al*. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. Nature, 2000, 407(6801): 242-248. DOI: 10.1038/35025215.

[14] VEIKKOLA T, ALITALO K. VEGFs, receptors and angiogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 1999, 9(3): 211-220. DOI: 10.1006/scbi.1998.0091.

[15] YANG J Y, WEI K Y, WANG Y Q, *et al*. Construction of a small-caliber tissue-engineered blood vessel using icariin-loaded β-cyclodextrin sulfate for *in situ* anticoagulation and endothelialization[J]. Sci China Life Sci, 2018, 61(10): 1178-1188. DOI: 10.1007/s11427-018-9348-9.

[16] REKHARSKY M V, INOUE Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins[J]. Chem Rev, 1998, 98(5): 1875-1918. DOI: 10.1021/cr970015o.

[17] SZEJTLI J. Medicinal applications of cyclodextrins[J]. Med Res Rev, 1994, 14(3): 353-386. DOI: 10.1002/med.2610140304.

[18] UEKAMA K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation[J]. Chem Pharm Bull, 2004, 52(8): 900-915. DOI: 10.1248/cpb.52.900.

[19] UEKAMA K, HIRAYAMA F, IRIE T. Cyclodextrin drug carrier systems[J]. Chem Rev, 1998, 98(5): 2045-2076. DOI: 10.1021/cr970025p.

[20] CHAN R Y, CHEN W F, DONG A, *et al*. Estrogen-like activity of ginsenoside Rg1 derived from Panax notoginseng[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(8): 3691-3695. DOI: 10.1210/jcem.87.8.8717.

[21] LU X Z, WANG J H, WU X, *et al*. Ginsenoside Rg1 promotes bone marrow stromal cells proliferation *via* the activation of the estrogen receptor-mediated signaling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(10): 1209-1214. DOI: 10.1111/j.1745-7254.2008.00874.x.

[22] BUTTAFOCO L, ENGBERS-BUIJTENHUIJS P, POOT A A, *et al*. Physical characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor[J]. Biomaterials, 2006, 27(11): 2380-2389. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.017.

(**收稿**:2019-09-24;**修回**:2019-12-16)

(编辑 黄 超)