

PLGA 支架降解对血管化功能影响的体外研究

武延格 孙学峰 杨林* 王正

(暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院 深圳 518020)

摘要 目的:研究聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 支架材料降解产物对血管内皮细胞增殖、迁移和小管样结构形成的影响。方法:将 PLGA 支架材料放入磷酸盐缓冲液 (PBS) 中体外无菌降解 1、2、4 周。用降解液处理人脐静脉内皮细胞株 HUVEC,采用 Brdu ELISA 法、Transwell 小室法和小管形成实验检测 PLGA 支架材料降解液对血管内皮细胞增殖、迁移和小管样结构形成的影响。结果:PLGA 支架材料 1 周降解液对内皮细胞的迁移和小管形成无明显影响,对内皮细胞增殖有一定的促进作用。随着降解时间的延长 2 周降解液抑制内皮细胞的迁移和小管形成 4 周的降解液对内皮细胞增殖、迁移和小管形成均有抑制作用。结论:PLGA 支架材料降解初期有对血管内皮细胞的增殖有促进作用,降解后期可能由于降解过程中产生的酸性物质累积增多,影响了血管内皮细胞的生长和功能,从而抑制新生血管的形成。

关键词 PLGA 降解 血管化功能

中图分类号 Q2

组织工程人工器官植入体内的血运再生和营养支持是组织工程取得成功的关键。组织体外培养环境中,其营养供应源于与培养液的渗透交换,体内植入后应由宿主的血液微循环供应,迅速过渡到宿主-移植体再生血管网供应营养成分。能否迅速完成血管再生,对于较大体积的组织工程人工器官尤为重要。

聚乳酸 (PLA) 和聚乙醇酸 (PGA) 的共聚物 PLGA 是组织工程常用的聚合物材料^[1-2],具有良好的生物相容性和生物可降解性且降解速度可控。有关 PLGA 的降解研究报道较多,而其降解对血管化的影响研究未见相关报道。因此,本文研究了可降解组织工程支架材料 PLGA 体外降解与血管化功能之间的关系,寻找影响血管化的因素,为组织工程支架材料的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

PLGA 支架材料 (LA:GA = 75:25,山东济南岱罡生物科技有限公司);内皮细胞株 HUVEC (南京凯基生

物公司);磷酸盐缓冲液 (PBS,自配);Brdu ELISA 试剂盒 (5-溴脱氧尿嘧啶核苷 Bromodeoxy uridine, Roche,美国);Transwell 培养小室 (微孔滤膜孔径 8 (m, Corning 公司,美国);Matrigel 基质胶 (BD 公司,美国);pH 计 (Sartorius 公司,德国);BIO-RAD 680 型酶标仪 (BIO-RAD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 PLGA 材料体外降解 将 PLGA 材料(质量约 0.1g)完全浸泡在 15ml PBS 溶液 (pH = 7.2) 中,放入 37℃ 恒温箱内进行水解且 3 天更换溶液。于 1、2、4 周后取出材料,抽取材料降解液,测定 pH 值,留取材料降解液备用。

1.2.2 血管内皮细胞增殖试验 以细胞数 2×10^3 个/孔内皮细胞悬液接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,24h 后每孔再加入 100 μ l 不同时间点材料降解液,继续培养 24 小时。按照 Brdu-ELISA 试剂盒的操作说明处理细胞,加入 1mol/L H₂SO₄ 终止底物反应,在酶标仪 450nm/630nm 双波长处检测 OD 值。设空白对照 (无细胞,仅含培养液) 和背景对照 (含细胞,不含 Brdu 标记液),每组设 4 个复孔。

1.2.3 血管内皮细胞迁移实验 以 2×10^4 个/孔血管

收稿日期:2012-02-01 修回日期:2012-04-10

* 通讯作者,电子信箱:yanglin70@yahoo.com

内皮细胞接种于 Transwell 的上室中,下室中加入 250 μ l 降解液和 250 μ l 培养基,并设置阴性对照组用 PBS 代替降解液,每组设 4 个复孔,置 37 $^{\circ}$ C、二氧化碳培养箱培养。16h 后取出 Transwell,用棉签小心拭去上室底膜上面的细胞,结晶紫染色。200 倍显微镜下随机取 4 个视野进行计数,取其平均值作为迁移细胞数。

1.2.4 内皮细胞小管样结构 (tubule like structure, TLS) 形成实验 取 Matrigel 溶液与 DMEM 培养基以 1:2 比例混合后,均匀铺在 96 孔板孔底,制成胶原凝胶备用。2 \times 10⁴ 个/孔内皮细胞悬液接种到胶原凝胶上,将各时间点降解液按 100 μ l / 孔加入 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内培养,设置阴性对照组用 PBS 代替降解液,每组设 4 个复孔。16h 后倒置显微镜下观察内皮细胞在胶原表面形成小管样结构情况,每孔随机选取 3 个视野,取其平均值。

1.2.5 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析,差异显著性采用独立样本的 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 降解过程 pH 值的变化

如图 1 所示,随着降解时间的延长,PLGA 降解液的 pH 值逐渐下降。

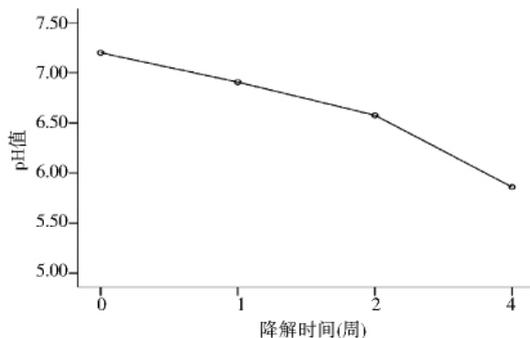


图 1 PLGA 降解液 pH 值变化

Fig. 1 pH curves of degradation fluid of PLGA

2.2 PLGA 体外降解对血管化功能的影响

2.2.1 内皮细胞增殖 1 周降解液对血管内皮细胞增殖有促进作用 ($P < 0.05$) 2 周的降解液对内皮细胞的增殖没有明显的影响 ($P > 0.05$) 4 周的降解液对内皮细胞的增殖有抑制作用 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 PLGA 降解液对内皮细胞增殖影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of degradation fluid of PLGA on HUVEs proliferation ($\bar{x} \pm s$)

分组	细胞增殖		
	1 周	2 周	4 周
对照组	0.789 \pm 0.035	0.789 \pm 0.035	0.789 \pm 0.035
PLGA 组	0.934 \pm 0.011*	0.828 \pm 0.032	0.670 \pm 0.092*

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, $n = 4$

2.2.2 内皮细胞迁移 1 周降解液作用 24h 后,对血管内皮细胞迁移无明显的抑制 ($P > 0.05$)。2 周以后迁移细胞数逐渐减少,随着降解时间的延长,降解液对细胞迁移出现抑制 ($P < 0.05$) (表 2, 图 2)。

2.2.3 小管样结构形成影响 1 周降解液对血管形成无明显影响,小管形成数目与对照组相比无显著性差别 ($P > 0.05$)。2 周和 4 周降解液对小管样结构形成有轻微抑制,小管数量低于对照组 ($P < 0.05$)。2 周和 4 周组相比小管数量没有明显差别 ($P > 0.05$) (表 3, 图 3)。

3 讨论

2008 年 Macchiarini 等^[3]首次利用患者自身干细胞种植于脱落处理的供体气管上,然后置换受体的部分左主支气管。经过 5 个月的观察,患者已痊愈,成为世界上第一例成功移植用患者自身干细胞再造器官的病例。虽然患者术后气管血供恢复良好,但并没有真正解决移植气管的再血管化问题。构建有一定体积的三维组织工程化组织,再血管化问题是保证其体内成活并发挥生物学效能的基础和关键。组织工程要取得成功的关键问题是如何解决工程化组织的血管化问题^[4-7]。

对于组织工程化组织的血管化研究,大多实验以复合细胞和细胞因子及利用外科手术技术来促进移植物的血管化^[8-10]。但是工程化组织血管化的形成最终是在支架内形成有功能的血管网,因此支架材料发生快速血管化可能是决定移植后效应的最重要因素。移植物的血管再生与材料种类及性质有关,支架材料要与内皮细胞有良好相容性并能促进毛细血管的长入。目前,已有研究表明^[11-12],材料表面性质、三维结构和对材料表面进行修饰等可以显著的影响血管的形成。生物可降解性是组织工程支架材料最重要的特征。生物降解类材料在降解过程中必然伴随降解产物的生成,这些降解产物是否因蓄积造成局部环境的改变从而而影响移植物的再血管化目前尚不清楚。

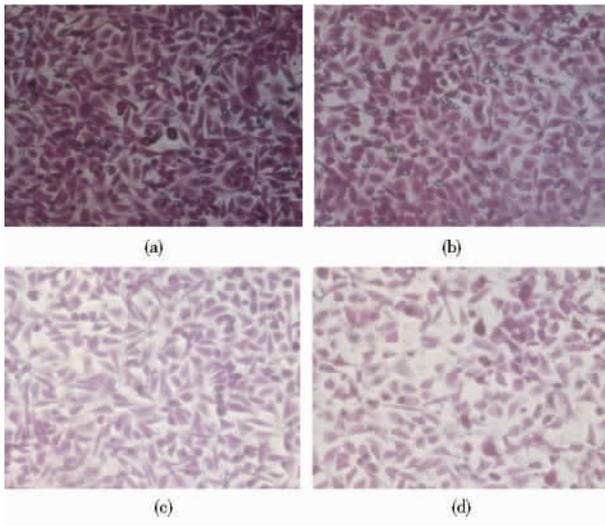


图2 PLGA 降解液对内皮细胞迁移的影响

Fig. 2 Effects of degradation fluid of PLGA on the migration ability of HUVEC ($\times 200$)

(a) Control group (b) 1 week group (c) 2 weeks group (d) 4 weeks group

表2 PLGA 降解液对内皮细胞迁移影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effects of degradation fluid of PLGA on HUVEC migration ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞迁移数		
	1周	2周	4周
对照组	186.33 \pm 10.12	186.33 \pm 10.12	186.33 \pm 10.12
PLGA组	182.67 \pm 11.02	161.00 \pm 5.13*	137.00 \pm 4.36*

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, $n = 4$

表3 PLGA 降解液对 HUVEC 形成小管数量($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effects of degradation fluid of PLGA on tube formation ($\bar{x} \pm s$)

组别	小管形成数目		
	1周	2周	4周
对照组	52.20 \pm 1.90	52.20 \pm 1.90	52.20 \pm 1.90
PLGA组	49.15 \pm 2.3	40.07 \pm 1.2*	41.51 \pm 2.4*

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$, $n = 4$

为了研究支架的降解对新生血管形成的影响,我们进行了组织工程支架材料血管化功能的研究。本实验选用血管化的体外模型,依据血管形成过程,选择内皮细胞形成血管的三大步骤:内皮细胞增殖、迁移和血管样结构的形成为前提和基础。结果发现 PLGA 的降解显著影响内皮细胞形成血管的关键步骤。降解初期,对内皮细胞增殖有一定的促进作用,而对迁移和小管形成能力无明显影响。但随着降解时间的延长,细胞行为受到抑制:降解 4 周后显著抑制内皮细胞增殖、

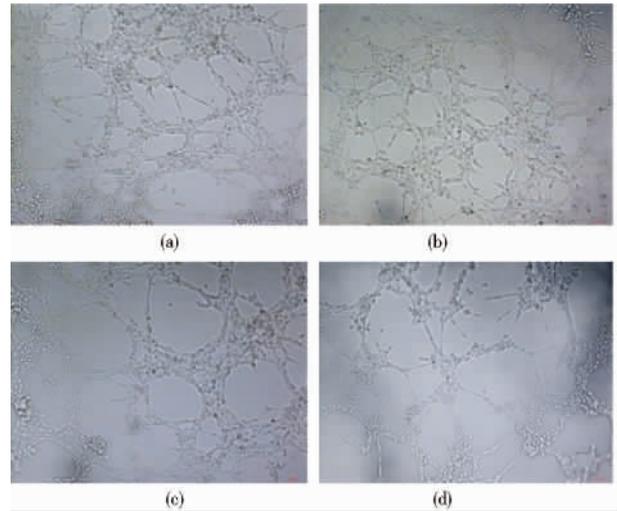


图3 PLGA 降解液对内皮细胞小管形成的影响

Fig. 3 Effects of degradation fluid of PLGA on the tube formation ability of HUVEC ($\times 100$)

(a) Control group (b) 1 week group (c) 2 weeks group (d) 4 weeks group

迁移和小管形成。这表明支架材料降解初期有促进血管化功能,而降解后期可能由于酸性降解产物过量积累,严重破坏内皮细胞生存环境,从而抑制其生长和功能状态。

控制材料降解速度可能是促进工程化组织快速血管化的有效途径。聚乳酸(PLA)和聚乙醇酸(PGA)的共聚物 PLGA 可以通过改变 PLA 和 PGA 的构成比例,调节 PLGA 共聚物的降解行为。哪种构成比例的 PLGA 支架更有利于再血管化生成有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Esmaili F, Ghahremani M H, Esmaili B, et al. PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 349(1-2): 249-255.
- [2] Chung T W, Wang S S, Tsai W J. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. *Biomaterials*, 2008, 29(2): 228-237.
- [3] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue engineered airway. *Lancet*, 2008, 372(9655): 2023-2030.
- [4] Griffith L G, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science*, 2002, 295(8): 1009-1014.

- [5] Cassell O C , Hofer S O , Morrison W A , et al. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg* , 2002 , 55(8) : 603-610.
- [6] Nomi M , Atala A , Coppi P D , et al. Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* , 2002 , 23(6) : 463-483.
- [7] Bouhadir K H , Mooney D J. Promoting angiogenesis in engineered tissues. *J Drug Target* , 2001 , 9(6) : 397-406.
- [8] Pelissier P , Villars F , Mathoulin-Pelissier S , et al. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats. *Plast Reconstr Surg* , 2003 , 111(6) : 1932-1941.
- [9] Elcin Y M , Dixit V , Gitnick G. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: Implications for tissue engineering and wound healing. *Artif Organs* , 2001 , 25(7) : 558-565.
- [10] Peretes A , Baruch Y , Weisbuch F , et al. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporation controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* , 2003 , 65(4) : 489-497.
- [11] Henno S , Lambotte J C , Glez D , et al. Characterization and quantification of angiogenesis in β -tricalcium phosphate implants by immunohistochemistry and transmission electron microscopy. *Biomaterials* , 2003 , 24(19) : 3173-3181.
- [12] 白峰,王臻,李爱民,等. 两种不同三维结构 β -TCP 材料体内血管化的比较研究. *中国矫形外科杂志* , 2007 , 6(15) : 451-454.
- Bai F , Wang Z , Li A M , et al. Comparative study on vascularization of two different three - dimensional structure β -TCP biomaterials in vivo. *Orthopedic Journal of China* , 2007 , 6(15) : 451-454.

Effects of PLGA Degradation on Angiogenesis *in vitro*

WU Yan-ge SUN Xue-feng YANG Lin WANG Zheng

(Shenzhen People's Hospital , the Second Clinical Medical College of Jinan University , Shenzhen 518020 , China)

Abstract Objective: To investigate the influences of degradable PLGA scaffold on proliferation , migration and the formation of tube-like structure (TLS formation) of vascular endothelial cells. Methods: PLGA scaffold were immersed in PBS fluid to stimulate the degradation for 1 , 2 , and 4 weeks. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) was cultured with degradation fluid. Cell proliferation , migration and TLS formation were detected by Brdu ELISA , Transwell chamber and tube formation. Results: The PLGA degradation fluid showed no effects on the migration , TLS formation of HUVEC , but the proliferation was increased in 1 week. With the prolonged degradation time , the migration and TLS formation were significantly decreased in 2 weeks , and the proliferation , migration and TLS formation were reduced remarkably in 4 weeks. Conclusions: At the beginning of degradation , PLGA could improve the proliferation function. The concentration of acid products increased with the increase of degradation time , and cell behaviors were retrained , thus inhibiting the angiogenesis of endothelial cells.

Key words PLGA Degradation Angiogenic function