

## Alg-g-PEI/pVEGF 复合物体内促血管生成作用

黄忠辉<sup>1</sup>, 滕伟<sup>2</sup>, 陈盈<sup>1</sup>, 王琴梅<sup>1</sup>

1 中山大学附属第一医院卫生部辅助循环重点实验室, 广东 广州 510080

2 中山大学附属光华口腔医院, 广东 广州 510080

黄忠辉, 滕伟, 陈盈, 等. Alg-g-PEI/pVEGF 复合物体内促血管生成作用. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1817-1827.

Huang ZH, Teng W, Chen Y, et al. Angiogenic activity of alginate-graft-PEI/pVEGF complexes *in vivo*. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1817-1827.

**摘要:** 旨在研究氧化海藻酸——低分子量聚乙烯亚胺两性刷型共聚物 (Alginate-graft-PEI, Alg-g-PEI) 与血管内皮生长因子质粒 (pVEGF) 复合后对体内血管生成的影响。采用细胞和斑马鱼实验检测了 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物的毒性; 通过凝胶电泳实验评价了 Alg-g-PEI 对 DNA 的保护作用; 利用鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 和斑马鱼模型, 选用 PEI 25K/pVEGF 作为阳性对照、生理盐水为空白对照, 观察复合物对血管新生的促进作用。结果发现: Alg-g-PEI 对质粒有较好的保护作用; Alg-g-PEI/pVEGF 复合物具有较低的细胞、斑马鱼毒性, 能显著促进 CAM 和斑马鱼的血管生成, 且具有剂量依赖性, 当 pVEGF 用量等于 2.4  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  时, 复合物对 CAM 血管生成的促进作用最明显, 血管面积和 CAM 面积比 (VA/CAM) 为 44.04%, 高于阳性对照组 (35.90%) 和空白对照组 (24.03%) (\*\* $P < 0.01$ )。复合物对斑马鱼血管新生的促进作用随氮磷比 (N/P) 的增加而增强, 其中 N/P=110 时, 血管新生最明显: 肠下血管总长度和面积分别为 1.11 mm 和  $1.70 \times 10^3$  像素, 高于空白对照组 (0.69 mm 和  $0.95 \times 10^3$  像素) (\*\* $P < 0.01$ ) 和阳性对照组 (0.82 mm 和  $1.11 \times 10^3$  像素) (\*\* $P < 0.01$ )。综上所述, Alg-g-PEI/pVEGF 能于体内促进血管生成, 该载体有望用于临床缺血性疾病的治疗。

**关键词:** 两性刷状共聚物, 海藻酸, 聚乙烯亚胺, 非病毒载体, 斑马鱼, 鸡胚绒毛尿囊膜, 血管生成

**Received:** March 14, 2013; **Accepted:** June 5, 2013

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 81101153), Science and Technology Plan Funds of Guangdong Province (Nos. 2010B050700012, 2009B030801117).

**Corresponding author:** Qinmei Wang. Tel: +86-20-87330757; E-mail: wangqinm@mail.sysu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81101153), 广东省科技计划 (Nos. 2010B050700012, 2009B030801117) 资助。

网络出版时间: 2013-07-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130722.1553.002.html>

# Angiogenic activity of alginate-graft-PEI/pVEGF complexes *in vivo*

Zhonghui Huang<sup>1</sup>, Wei Teng<sup>2</sup>, Ying Chen<sup>1</sup>, and Qinmei Wang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory on Assisted Circulation, Ministry of Health, Cardiovascular Division, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

<sup>2</sup> Hospital of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

**Abstract:** To study the angiogenic activity of amphoteric brush-type copolymer complex of alginate-graft-PEI/pVEGF (Alg-g-PEI/pVEGF) *in vivo*, we evaluated the toxicity of Alg-g-PEI/pVEGF complexes to rMSCs and zebra fish first. Then, we used gel retardation assay to investigate the protection of complex to pDNA against DNase I, serum and heparin. For *in vivo* study, we evaluated the angiogenic activity of Alg-g-PEI/pVEGF complexes by using CAM and zebra fish as animal models, PEI 25K/pVEGF and saline as positive and negative controls. Our results show that Alg-g-PEI protected pVEGF from enzymolysis and displacement of heparin in some degree, and its complexes with pVEGF were less toxic to rMSCs and zebra fish. Alg-g-PEI/pVEGF complexes induced significant angiogenesis, which was dosage-dependent. In CAM, when the dosage of pVEGF was 2.4  $\mu\text{g}/\text{CAM}$ , Alg-g-PEI group achieved the maximum of angiogenesis, and the area ratio of vessel to the total surface was 44.04%, which is higher than PEI 25K group (35.90%) and saline group (24.03%) (\*\* $P<0.01$ ). In zebra fish, the angiogenesis increased with the increase of N/P ratios of Alg-g-PEI/pVEGF complexes in our studied range; when N/P ratio was 110, the optimal angiogenesis was obtained with vessel length of 1.11 mm and area of  $1.70\times 10^3$  pixels, which is higher than saline group (0.69 mm and  $0.94\times 10^3$  pixels) (\*\* $P<0.01$ ) and PEI 25k group (0.82 mm and  $1.11\times 10^3$  pixels) (\*\* $P<0.01$ ). Our results demonstrate that Alg-g-PEI/pVEGF significantly induces angiogenesis in CAM and zebra fish, and has a great potential in therapeutic angiogenesis.

**Keywords:** amphoteric brush-type copolymer, alginate, polyethyleneimine, nonviral vector, zebrafish, chick embryo chorioallantoic membrane, angiogenesis

血管新生是指在已有血管结构基础上,形成新血管网的生物过程。血管新生的机理比较复杂,诸多促进新生的因素中包括血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)等的调控作用<sup>[1]</sup>。通过基因治疗的方法来调控 VEGF 和 bFGF 的水平,具有作用特异性强、不良反应轻等优点<sup>[2-3]</sup>,在临床上有着重大的研究和应用意义。

然而,目前的基因治疗研究多集中于提高报告基因体外转染癌细胞的效率<sup>[4-6]</sup>,对治疗基因进行体内实验的研究较少。我们已证实氧化

海藻酸接枝低分子量聚乙烯亚胺 (Alginate-graft-PEI, Alg-g-PEI) (图 1) 能在体外介导 VEGF 质粒 (pVEGF) 转入大鼠骨髓间充质干细胞 (Rat mesenchymal stem cells, rMSCs), 表达出有效治疗剂量的 VEGF, 同时表现出较低的细胞毒性。在此基础上, 本研究通过模拟体内条件验证 Alg-g-PEI 能否有效保护 DNA, 并以鸡胚和斑马鱼为动物模型, 进一步探索 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物在体内促进血管新生的作用, 为该载体下一步的大动物实验及未来的临床应用提供理论和实践依据。

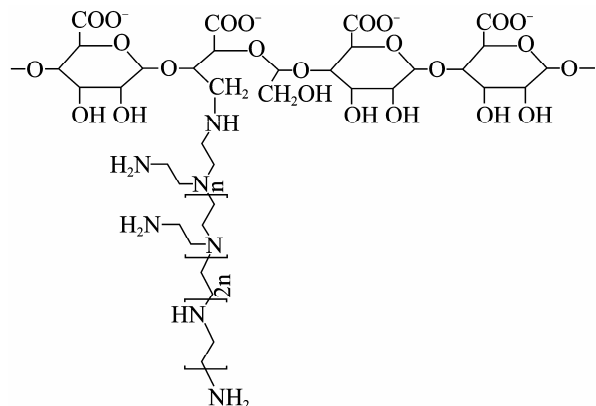


图1 Alg-g-PEI 的化学结构<sup>[7]</sup>

Fig. 1 Chemical structure of Alg-g-PEI<sup>[7]</sup>.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Alg-g-PEI: 本实验室自制, 分子量 17 000 Da, 氮含量 23.3%; 血管内皮生长因子真核表达质粒 (pVEGF) 获赠于广东省人民医院; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; Alamar Blue 购自广州国奥生物有限公司; 5 日龄受精种蛋购自华南农业大学畜牧研究所; 甲基纤维素 (Methyl cellulose, MC, 188042) 购自 Sigma 公司; 血管荧光转基因斑马鱼 (Flk-1) 由中山大学附属第一医院神经内科实验室惠赠; 斑马鱼培养液 (Holtbuffer) 的配方 (1 L): NaCl 3.5 g; KCl 0.05 g; NaHCO<sub>3</sub> 0.025 g; CaCl<sub>2</sub> 0.1 g, 加入双蒸水充分溶解。

凝胶电泳仪 (电泳仪 DYY-6C 型); 凝胶图像分析仪 (GAS7001X, UVITEC); 鸡胚孵化箱 (型号 HH.B11.260-TBS, 上海跃进医疗器械厂); 体视显微镜 (Nikon AZ100)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 复合物的制备

将 pVEGF 稀释至 40 ng/μL, 根据所需 N/P

配制不同浓度的 Alg-g-PEI 或 PEI 25K 水溶液, pVEGF 与 Alg-g-PEI 或 PEI 25K 等体积混合后涡旋 3~5 s, 室温静置 30 min, 自组装形成 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物, 立即使用。

#### 1.2.2 细胞毒性检测

常规分离、培养大鼠骨髓间充质干细胞 (rMSCs)<sup>[8]</sup>。在有血清 (10%) 条件下, 使用 Alamar Blue 法<sup>[9-10]</sup>测定 N/P 分别为 60、90、110 的 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物对 rMSCs 的毒性, 复合物在培养基中所占体积分数为 10%。以 PEI 25K/pVEGF (N/P=10) 为阳性对照, 无复合物干预的细胞存活率为 100% 对结果进行标准化, 计算细胞存活率 ( $n=3$ )。

#### 1.2.3 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物耐肝素置换能力

制备浓度分别为 10、12、16、18、20、50 mg/mL 的肝素水溶液各 10 μL, 分别加入 10 μL Alg-g-PEI 与 pVEGF 质粒 DNA 形成的复合物 (Alg-g-PEI/pVEGF, N/P=60) 溶液, 共孵育 15 min 或 2 h 后, 取样行凝胶电泳分析<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.4 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物耐 DNase I 酶降解作用

取 8 μL Alg-g-PEI 与 pVEGF 质粒 DNA 形成的复合物 (Alg-g-PEI/pVEGF, N/P=60) 溶液, 与 2 μL 1 U DNase I 或 PBS 混合, 37 °C 孵育 0.25、0.5、2、4、8、12、24 h (加 PBS 的孔仅孵育 6 h) 后, 加入 5 μL 100 mmol/L EDTA, 37 °C 孵育 10 min 使 DNase I 酶失活, 再加入 10 μL 12 mg/mL 肝素溶液, 室温孵育 2 h 使 pVEGF 和 Alg-g-PEI 充分解离, 取样进行凝胶电泳分析, 以未经酶处理的裸 pVEGF、DNase I 处理的裸 pVEGF 为对照。

### 1.2.5 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物耐血清能力

取 10  $\mu\text{L}$  Alg-g-PEI 与 pVEGF 质粒 DNA 形成的复合物 (Alg-g-PEI/pVEGF, N/P=60、90、110) 溶液, 分别与等体积新鲜血清 (50%) 混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 3、6、12、24、48 h 后, 加入 10  $\mu\text{L}$  12 mg/mL 肝素溶液, 室温孵育 2 h 后, 取样进行凝胶电泳分析, 以裸、血清同样处理的裸 pVEGF、未加血清但同样孵育处理的复合物为对照。

### 1.2.6 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物促进 CAM 血管生成作用

配制 5% 的甲基纤维素 (MC) 水溶液, 高压蒸汽灭菌后, 将 160  $\mu\text{L}$  溶液分 4 次 (50、50、30、30  $\mu\text{L}$ ) 加入 96 孔板中, 每次加完后在 (60 $\pm$ 3)  $^{\circ}\text{C}$  的烘箱中烘 1 h, 最后从 96 孔板中小心挑出 MC 膜, 置于紫外灯下照射 30 min 灭菌, 备用。

参考贺国安等<sup>[11]</sup>的方法培养鸡胚种蛋, 在 (38 $\pm$ 0.5)  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40%~70% 的孵化箱中孵育到第 7 天, 选择发育正常的鸡胚开窗。将鸡胚随机分为 9 组: PEI 25K/pVEGF (N/P=10) 阳性对照组、生理盐水空白对照组、N/P=90 的空载体对照组、0.4  $\mu\text{g}$  的裸 pVEGF 对照组, Alg-g-PEI/pVEGF (N/P=90) 中分别含 0.4、0.8、1.2、1.6、2.4  $\mu\text{g}$  DNA 的实验组。鸡胚开窗揭去气室膜暴露 CAM, 将 MC 膜置于 CAM 中央血管稀少区, 再将 50  $\mu\text{L}$  样品溶液分别用移液枪滴加到 MC 膜里, 用无菌的透明胶带封贴气室端。继续常规孵育 72 h 后, 于膜表面加入 3~5 mL 冰冷的固定液 (甲醇和丙酮等体积混合) 固定 30 min, 用眼科剪小心剪下整块血管膜, 在盛有固定液的培养皿中小心摊开, 使膜平贴于培养皿表面, 置于体视显微镜下观察和拍照。照片使

用 image-pro plus 6.0 分析软件进行处理<sup>[12]</sup>, 以加样位置为中心建立一个 20 $\times$ 20  $\text{cm}^2$  的固定选区, 对选区内的血管面积进行计算, 最后计算血管面积和 CAM 选区面积的比值 (VA/CAM)<sup>[13]</sup>。

### 1.2.7 复合物对斑马鱼的毒性及促血管生成作用

按标准方法养殖和繁殖斑马鱼<sup>[14-15]</sup>, 将健康成熟的斑马鱼按雌雄 1/2 的比例放入交配鱼缸中, 次日搜集受精鱼卵。

将健康的新生受精鱼卵置于 24 孔板中, 每孔 30 个, 加入 1 mL Holtbuffer。24 h 后更换新鲜培养基, 再分别加入 N/P 为 45、60、90、110 的 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物水溶液 100  $\mu\text{L}$ , 以 PEI 25K/pVEGF (N/P=10) 为阳性对照, 未处理的受精鱼卵为空白对照。共孵育一定时间后, 评价其毒性和促血管生成作用。

毒性实验: 对复合物干预后的斑马鱼观察 96 h (隔 6 h 一次), 记录死亡例数和时间。使用 Graphpad Prism 5.0 对数据进行统计分析, 作 Kaplan-Meier 生长曲线, 与阳性对照组比较, 记录  $P$  值。

促血管生成实验: 在 72 h 后 (干预后 48 h) 将斑马鱼用 10% 多聚甲醛固定后, 置于体视显微镜下观察肠下血管新生情况, 拍照后使用 NIH Image 图像处理软件对肠下血管面积和长度进行定量分析<sup>[16-17]</sup>。

### 1.2.8 结果处理

如无特别说明, 所有结果均取 3 次实验平均值, 应用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据处理, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用  $t$  检验,  $**P < 0.01$  和  $*P < 0.05$  为差异有统计学意义。



## 2 结果

### 2.1 细胞毒性检测

Alg-g-PEI/pVEGF 复合物水溶液在有血清条件下对 rMSCs 毒性很低 (图 2), 细胞存活率均在 80% 以上; 当 N/P=60、90 时, Alg-g-PEI/pVEGF 复合物与细胞接触 4 h 后基本无毒性, 48 h 后细胞存活率仍然高于 80%, 分别为  $(84.61 \pm 3.15)\%$  和  $(82.62 \pm 1.97)\%$ , 大于阳性对照组  $(26.03 \pm 4.06)\%$  ( $**P < 0.01$ ); 当 N/P=110 时, 随着孵育时间的增加细胞存活率下降, 但 48 h 后存活率仍保持  $(72.39 \pm 2.84)\%$ , 而阳性对照组的细胞存活率一直低于 50%。

### 2.2 Alg-g-PEI 对 pVEGF 的保护作用

肝素竞争置换实验结果表明, 肝素浓度为 12 mg/mL 时, 孵育 15 min 能够置换出部分 pVEGF, 孵育 2 h 后能完全置换出 pVEGF (图 3A)。而 10 mg/mL 的肝素孵育 2 h 后仍不能完全置换出 pVEGF。复合物耐 DNase I 酶解实验

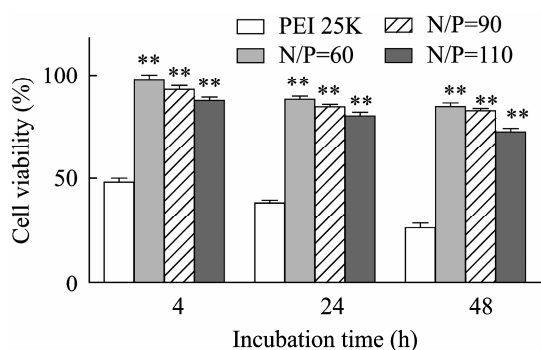


图2 rMSCs和聚合物/pVEGF复合物在有血清(10%)条件下共孵育后的细胞存活率(与PEI 25K组相比  $**P < 0.01$ )

Fig. 2 Cell viability of rMSCs after incubation with polymer/pVEGF complexes in 10% serum.  $**P < 0.01$  vs PEI 25K group.

显示, 裸 VEGF 与酶接触 0.5 h 后已完全降解, 而 Alg-g-PEI 和 pVEGF 复合后, 当酶解时间小于 4 h 时, 肝素置换出的 DNA 条带与未处理 pVEGF 条带的亮度接近; 酶解时间大于 4 h, 部分 pVEGF 被酶解, 置换后的条带亮度下降, 条带不清晰 (图 3B)。在耐血清实验中, 裸 pVEGF 和血清共孵育 3 h 后部分被降解, 6 h 后完全降解 (图 3C, 泳道 2)。相比之下, 有 Alg-g-PEI 保护的 pVEGF 能够在 48 h 内免受血清的降解, 肝素置换 pVEGF 后, 电泳条带的亮度、形状与裸 DNA 接近, 48 h 后 N/P=110、90 的复合物仍能很好地保护 ppVEGF (图 3C)。

### 2.3 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物促进 CAM 血管生成作用

如图 4 所示, 在显微镜下可观察到实验组血管 (图 4C) 比空白对照组 (图 4A) 和阳性对照组 (图 4B) 多, 表现为分支增多, 血管密度和直径增大。空白组的血管保持正常 CAM 的叶脉状自然生长, 血管整体分布均匀。阳性对照组的血管较实验组的稀疏, 但比空白组密。定量计算结果 (表 1) 表明, 实验组 VA/CAM 为 44.4%, 明显高于阳性对照组 (35.9%) 和空白对照组 (24.03%) ( $**P < 0.01$ ), 且具有剂量依赖性。

### 2.4 复合物对斑马鱼的毒性及促血管生成作用

如图 5 所示, 在所研究范围内, Alg-g-PEI/pVEGF 对斑马鱼受精卵基本无毒性。当 N/P < 110, 斑马鱼生存曲线平稳, 96 h 后斑马鱼的生存率均在 75% 以上, 毒性明显低于 PEI 25K/pVEGF (N/P=10), 且差异显著。而 N/P=110 时, 毒性较大, 96 h 后的生存百分率低于 60% (图 5D)。在促斑马鱼血管生成实验中, 在显微

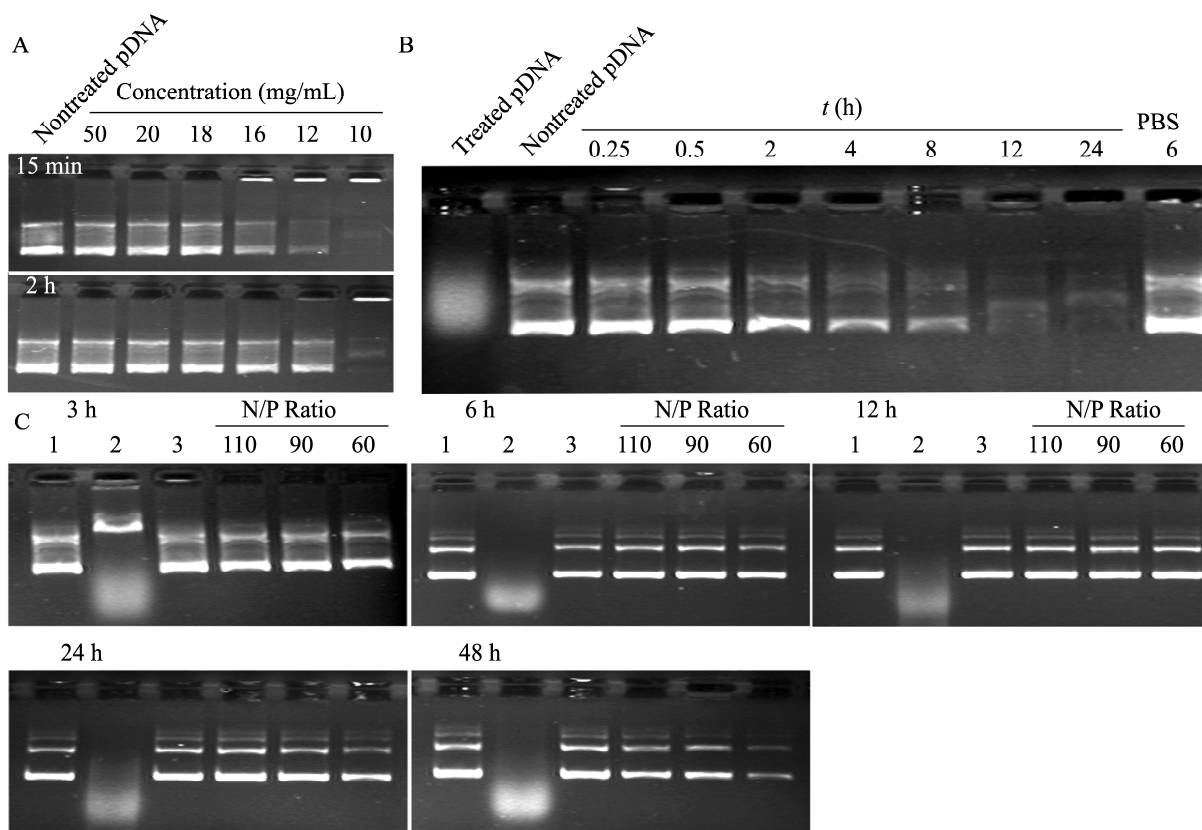


图3 Alg-g-PEI/pDNA 在不同溶液中孵育一定时间后对 pDNA 的保护能力 (A 为耐肝素竞争置换, B 为耐 DNase I 酶解, C 为耐血清降解: 1、2、3 泳道分别是裸 pVEGF、pVEGF 和 50% 血清共孵育、Alg-g-PEI/pVEGF 和 PBS 共孵育)

Fig. 3 Protection of Alg-g-PEI to pVEGF against pVEGF heparin (HEP) (A), DNase I (B) and serum (50%) (C). 1: naked pVEGF; 2: pVEGF incubated with serum (50%); 3: Alg-g-PEI/pVEGF incubated with PBS.



图4 Alginate-Graft-PEI/pVEGF 复合物对 CAM 血管新生的影响 (A 为空白对照组, B 为 PEI 25K 组(N/P=10, DNA 含量为 2.4 μg), C 为 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物组 (N/P=90, DNA 含量为 2.4 μg))

Fig. 4 Effect of Alginate-Graft-PEI/pVEGF on angiogenesis of chick embryo chorioallantoic membrane. (A) Blank group. (B) CAM treated by PEI 25K containing 2.4 μg DNA (N/P=10). (C) CAM treated by Alg-g-PEI/pVEGF complexes containing 2.4 μg DNA (N/P=90).

表 1 不同样品处理后的 CAM 血管面积 (VA/CAM,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Vessel area in CAM treated by different samples (VA/CAM,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	The vessel area of CAM ( $\bar{x} \pm s$ )
PEI 25K	35.90 $\pm$ 2.16
Saline (blank)	24.03 $\pm$ 2.03
pVEGF control	26.22 $\pm$ 2.30
Copolymer	26.04 $\pm$ 1.87
DNA 0.4 $\mu$ g	32.64 $\pm$ 2.29
DNA 0.8 $\mu$ g	32.32 $\pm$ 0.97
DNA 1.2 $\mu$ g	37.04 $\pm$ 2.67**
DNA 1.6 $\mu$ g	36.46 $\pm$ 1.25**
DNA 2.4 $\mu$ g	44.04 $\pm$ 2.87**

\*\* $P < 0.01$  vs blank.

镜下可观察到 Alg-g-PEI 组 (图 6C~F) 血管分支明显多于空白对照组 (图 6A) 和 PEI 25K 对照组 (图 6B), 且肠下血管整体较长、血管面积较大。Alg-g-PEI 组和 PEI 组均见钉突样血管新生现象 (图 6 箭头处), 空白组血管保持正常生长, 整体分布均匀 (图 6A)。对肠下血管面积和血管整体长度进行计算后作图 (图 6G, H), 发现 Alg-g-PEI 组与空白对照组和阳性对照组相比较均有显著性差异 (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ), 当 N/P=110 时, 血管总长度和面积分别为 1.11 mm 和  $1.70 \times 10^3$  像素; N/P=90 时, 为 1.01 mm 和  $1.65 \times 10^3$  像素; 均明显大于 PEI 25K 对照组 (0.82 mm、 $1.11 \times 10^3$  像素) (\*\* $P < 0.01$ )。

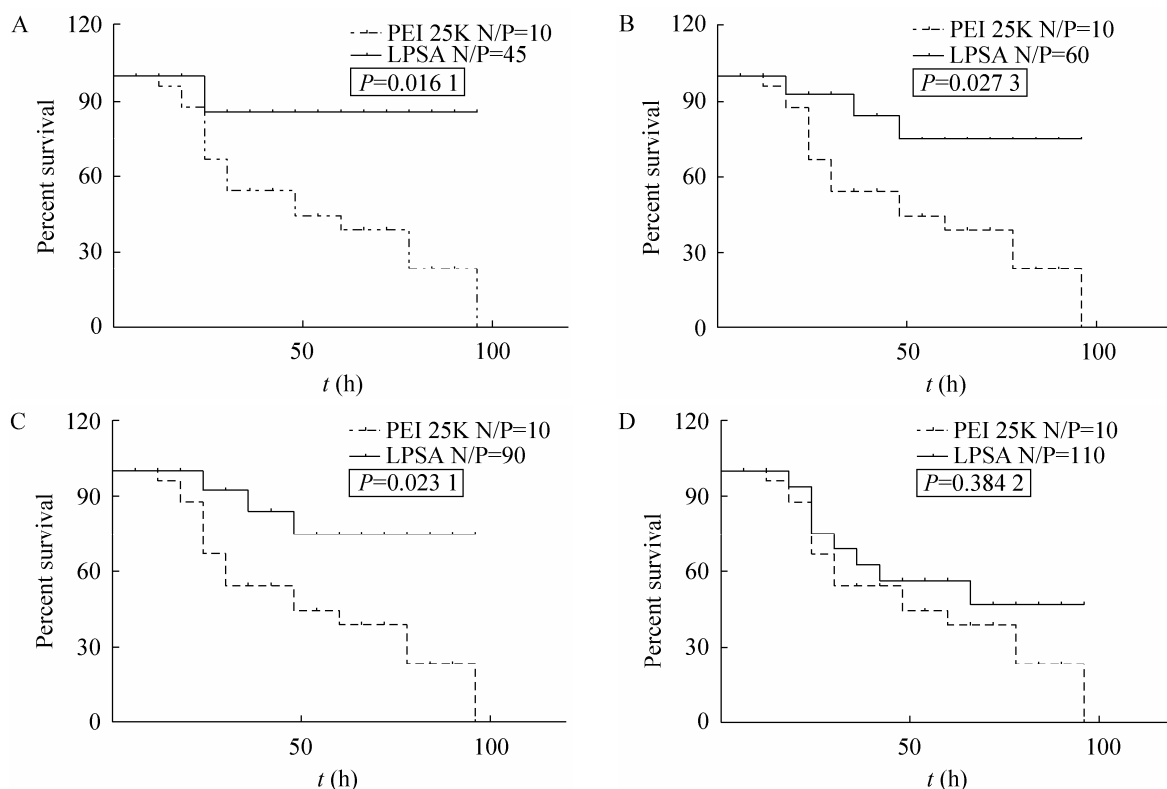


图 5 不同氮磷比 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物与斑马鱼胚胎共培养的 Kaplan-Meier 生长曲线

Fig. 5 Kaplan-Meier survival curves of zebrafish embryos after incubation with Alg-g-PEI/pVEGF complexes at various N/P ratios.  $P$ -value vs PEI/pVEGF at N/P=10.

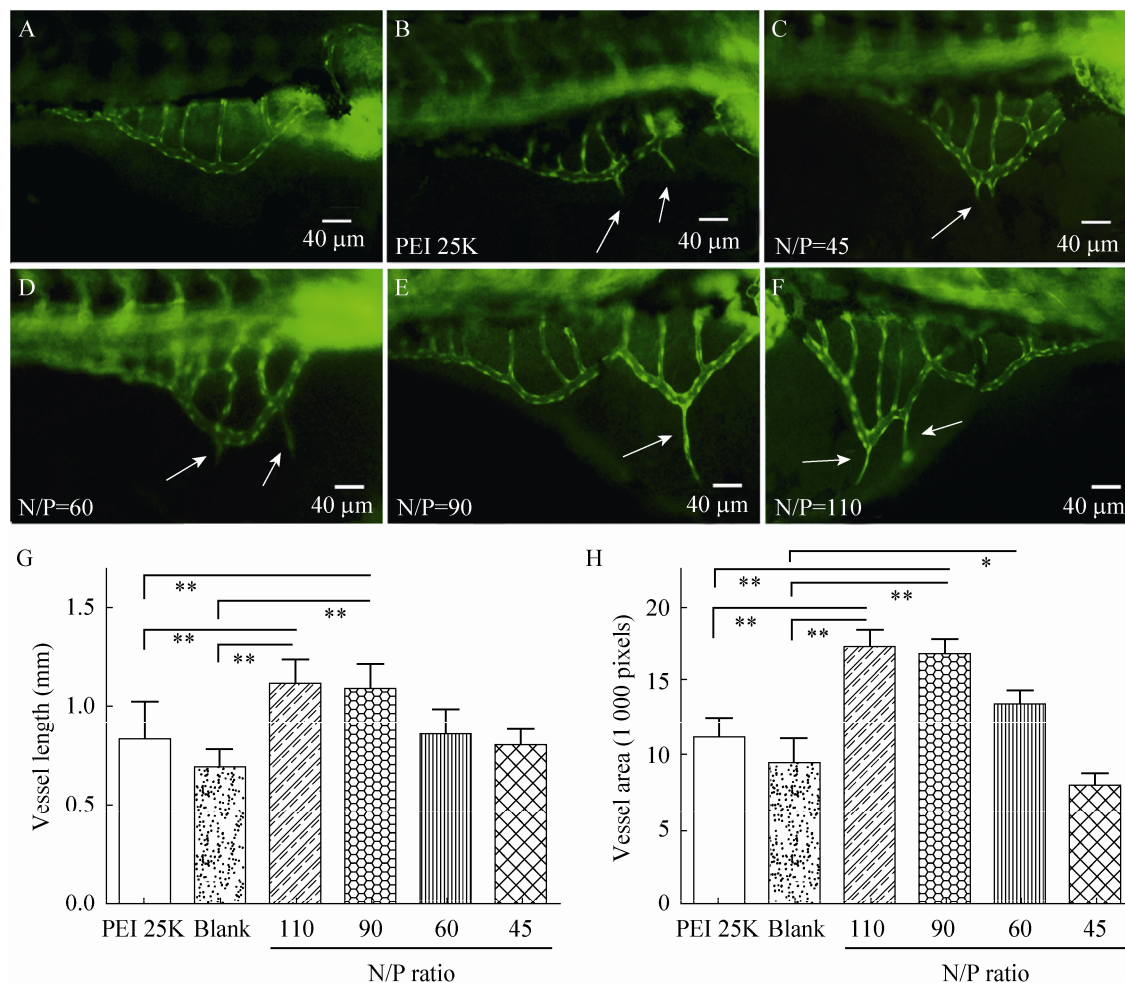


图 6 不同氮磷比 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物对斑马鱼血管生成作用的定性 (C~F) 与定量 (G, H) 分析 (A、B 分别为空白对照组和 PEI 25K/pVEGF (N/P=10) 阳性对照组, 白色箭头处为钉突样血管, \*\* $P<0.01$ , \* $P<0.05$ )  
Fig. 6 Effects of Alg-g-PEI/pVEGF on the angiogenesis of zebrafish embryos at various N/P ratios (C~F). (A) Nontreated zebrafish. (B) Zebrafish treated with PEI 25K/pVEGF (N/P=10). Quantization of length and area of subintestinal vessels (G, H) in zebrafish embryos. White arrows are vessels assembling spikes. \*\* $P<0.01$ ; \* $P<0.05$ .

### 3 讨论

基因载体是基因治疗中不可缺少的一部分, 病毒载体因为不易大批量生产、DNA 装载量少、安全性不高等原因并没有得到广泛的临床应用<sup>[18]</sup>。鉴于基因治疗的无限潜能, 人们将注意力转到阳离子非病毒载体, 但与病毒载体相

比, 阳离子聚合物转染效率较低, 因此如何提高转染效率并降低毒性成为急需解决的问题。本课题组用低分子量的 PEI 1.8K 和可降解的氧化海藻酸钠接枝, 合成出 Alg-g-PEI, 体外转染实验表明它对不同细胞均有较高转染效率和较低的细胞毒性<sup>[7]</sup>。为了探索 Alg-g-PEI 在体内条件下是否依然具备低毒性和高转染能力, 本研究模

拟体内条件,先考察了 Alg-g-PEI/pVEGF 复合物对 rMSCs 的毒性,结果显示复合物在有血清条件下对 rMSCs 基本无毒性(图 2)。当 N/P < 110 时,复合物与 rMSCs 孵育 48 h 后,细胞仍然具有较高存活率(大于 80%),明显高于 PEI 25K (\*\* $P < 0.01$ ),初步证明 Alg-g-PEI 在体内有血清条件下转染的安全性。体内转染时,阴离子多糖对 pDNA 的竞争置换及体内血清中非特异性酶、内切酶等对外源 DNA 的降解是转染的主要障碍,因此体内转染要求载体/pDNA 复合物具有稳定性,能够有效保护 pDNA 在传递过程中以及到达靶细胞之后免遭核酸酶等的降解<sup>[19-20]</sup>。本研究以 VEGF 质粒作为实验 DNA,通过耐肝素阴离子置换、耐 DNase I 酶和血清实验考查 Alg-g-PEI 对 DNA 的保护作用,结果表明, pVEGF 与 Alg-g-PEI 复合后,肝素 (12 mg/mL) 需要 2 h 完全置换 pVEGF (图 3A); DNase I 酶需要 24 h 完全降解 p pVEGF (图 3B);血清则在 48 h 内仍不能完全降解 pVEGF (图 3C),而无保护的 pVEGF 在 0.5 h 就已被 DNase I 酶解完全;6 h 被血清降解完全。说明 Alg-g-PEI/pVEGF 对 pVEGF 具有较好保护作用,预示了 Alg-g-PEI 体内转染的可行性。

本研究选择 CAM 模型作为体内转染促进血管生成的模型,主要因为 CAM 操作性强、可信度高、实验结果易于观察、指标明确、结果易于定量,适合促血管生成药物高通量初筛<sup>[21-22]</sup>。我们选择 7 d 的鸡胚进行开窗加样,是因为 CAM 血管网络在这个时期形成的速度比较稳定,鸡胚生命力旺盛, CAM 血管发育稳定<sup>[23]</sup>;鸡胚早期免疫系统发育不全,对所加测试药物无强烈排

斥反应<sup>[21]</sup>,对实验结果影响较小。选择 MC 膜作为载药模具,是因其质地光滑、质量轻、生物相容性好、48 h 左右降解消失,与滤纸片、琼脂糖片及塑料盖玻片相比较,具有较大优势<sup>[24-25]</sup>。

在前期研究中,我们先固定 pVEGF 用量为 1.2  $\mu\text{g}$ ,考察不同 N/P 比复合物对 CAM 血管生成的促进作用,结果发现 N/P=90 时,复合物具有最佳促进血管生成作用,然后固定 N/P=90,观察血管生成的 pVEGF 剂量的依赖性。结果发现当 pVEGF 用量为 2.4  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  时,促血管生成作用最明显,VA/CAM 为 44.4%,高于阳性对照组 (35.9%) 和空白对照组 (24.03%)。说明 Alg-g-PEI 在体内环境下能够成功将目的基因导入到细胞里,并表达出能够促进局部血管生成的蛋白量,且蛋白量可通过剂量调控。

为进一步验证 Alg-g-PEI/pVEGF 在体内的安全性和有效性,我们考察了 Alg-g-PEI 对 Flk-1 斑马鱼胚胎的毒性和血管新生的促进作用。与大鼠等模型相比,斑马鱼具有与人类在血管发育过程中的基因及信号通路有高度同源性、成本低适合高通量筛选、易于观察、指标容易定量等特点,被广泛应用于血管发生机制研究及促血管新生相关药物的筛选<sup>[26]</sup>。斑马鱼的 Kaplan-Meier 生存曲线结果(图 5)显示,当 N/P=45、60、90, Alg-g-PEI/pVEGF 几乎不影响斑马鱼的存活与发育,斑马鱼生存百分率 75% 以上,与 PEI 25K/pVEGF 对照组相比 \* $P < 0.05$ ,说明体内应用时 Alg-g-PEI/pVEGF 具有低毒性。

因斑马鱼肠下血管由血管新生形成,且易操作、易定量,我们通过定性观察和定量计算斑马鱼肠下血管长度、面积来探讨 Alg-g-PEI/pVEGF

复合物对斑马鱼血管新生的促进作用。一般斑马鱼肠下血管呈篮子形状,从体节的腹部边缘往卵黄方向延伸,横向长约 50~100  $\mu\text{m}$ <sup>[27]</sup>。本研究发现,Alg-g-PEI/pVEGF 有效地促进了斑马鱼肠下血管新生,主要表现在:肠下血管网在体节方向延长超过 150  $\mu\text{m}$ ;血管网整体面积增大;血管的直径增大、分支增多;血管篮子底部有钉突样血管生成(图 6 箭头处)。这说明 VEGF 得到了有效表达,斑马鱼实验再一次证明了 Alg-g-PEI/pVEGF 具有较低的毒性,并且能促进体内血管生成。

总之,本研究通过系列实验证明了 Alg-g-PEI 与 pVEGF 复合后对 rMSCs 和斑马鱼都具有较低的毒性,且能有效保护 pDNA。Alg-g-PEI 能介导 pVEGF 在组织细胞内表达出治疗量的 VEGF,促进血管生成。预示 Alg-g-PEI 作为一种基因载体具有较好的应用前景和开发潜力,我们将进一步研究 Alg-g-PEI 的转染机制以及在大动物体内促血管生成的量效、时效关系,为将来的临床应用提供更加充分的理论和实践依据。

## REFERENCES

- [1] Xie Q, Tang N, Wan R, et al. Recombinant snake venom cystatin inhibits tumor angiogenesis *in vitro* and *in vivo* associated with downregulation of VEGF-A165, Flt-1 and bFGF. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(4): 663–671.
- [2] Gong Y, Koh DR. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an *in vivo* corneal model. *Cell Tissue Res*, 2010, 339(2): 437–448.
- [3] Claes F, Vandeveld W, Moons L, et al. Another angiogenesis-independent role for VEGF: SDF1-dependent cardiac repair via cardiac stem cells. *Cardiovasc Res*, 2011, 91(3): 369–370.
- [4] Brzoska AJ, Firth N. Two-plasmid vector system for independently controlled expression of green and red fluorescent fusion proteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(9): 3133–3136.
- [5] Dierselhuis MP, Schrama E, Scott DW, et al. Gene therapy with IgG-HY fusion proteins to reduce male-specific T-cell reactivity *in vitro*. *Hum Gene Ther*, 2011, 22(1): 44–54.
- [6] Gomez E, Perez-Pascual D, Fernandez L, et al. Construction and validation of a GFP-based vector for promoter expression analysis in the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Gene*, 2012, 497(2): 263–268.
- [7] He W, Guo Z, Wen Y, et al. Alginate-graft-PEI as a gene delivery vector with high efficiency and low cytotoxicity. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2012, 23(1/4): 315–331.
- [8] Tan Q, Huang ZD, Wang LF. Study on isolation and culture of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Tradit Chin Med Univ Hunan*, 2011, 31(7): 74–76 (in Chinese).  
谭琦, 黄政德, 王立凤. 大鼠骨髓间充质干细胞分离和培养方法的研究. *湖南中医药大学学报*, 2011, 31(7): 74–76.
- [9] Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 2012, 12(9): 12347–12360.
- [10] Schoonen WG, Stevenson JC, Westerink WM, et al. Cytotoxic effects of 109 reference compounds on rat H4IIE and human HepG2 hepatocytes. III: Mechanistic assays on oxygen consumption with MitoXpress and NAD(P)H production with Alamar Blue. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(3): 511–525.
- [11] He GA, Luo JX, Zhang TY, et al. Improved chick chorioallantoic membrane technique—incubation without air chamber. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*, 2003, 42(2): 126–128 (in Chinese).

- 贺国安, 罗进贤, 张添元, 等. 改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术——无气室孵育法. 中山大学学报自然科学版, 2003, 42(2): 126–128.
- [12] Xu Y, Zhao YK, Bi MG, et al. Quantitation of angiogenesis in chick chorioallantoic membrane using Image-Pro Plus software. Chin J Compar Med, 2007, 17(12): 745–747 (in Chinese).  
许扬, 赵英凯, 毕明刚, 等. Image-Pro Plus 图像分析软件定量鸡胚尿囊膜血管新生面积的方法. 中国比较医学杂志, 2007, 17(12): 745–747.
- [13] Reizis A, Hammel I, Ar A. Regional and developmental variations of blood vessel morphometry in the chick embryo chorioallantoic membrane. J Exp Biol, 2005, 208(Pt13): 2483–2488.
- [14] Akimenko MA, Johnson SL, Westerfield M, et al. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. Development, 1995, 121(2): 347–357.
- [15] Westerfield M, Doerry E, Kirkpatrick AE, et al. An on-line database for zebrafish development and genetics research. Semin Cell Dev Biol, 1997, 8(5): 477–488.
- [16] Amin MR, Kurosaki M, Watanabe T, et al. A comparative study of MIB-1 staining indices of gliomas measured by NIH Image analysis program and conventional manual cell counting method. Neurol Res, 2000, 22(5): 495–500.
- [17] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods, 2012, 9(7): 671–675.
- [18] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nat Rev Genet, 2003, 4(5): 346–358.
- [19] Bacalocostantis I, Mane VP, Goodley AS, et al. Investigating polymer thiolation in gene delivery. J Biomater Sci Polym Ed, 2013, 24(8): 912–926.
- [20] Tian H, Chen J, Chen X. Nanoparticles for gene delivery. Small, 2013, 9(12): 2034–2044.
- [21] Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. Rom J Morphol Embryol, 2008, 49(2): 131–135.
- [22] Tufan AC, Satioglu-Tufan NL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5(4): 249–266.
- [23] Ayalasomayajula SP, Ashton P, Kompella UB. Fluocinolone inhibits VEGF expression via glucocorticoid receptor in human retinal pigment epithelial (ARPE-19) cells and TNF- $\alpha$ -induced angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (CAM). J Ocul Pharmacol Ther, 2009, 25(2): 97–103.
- [24] Richardson M, Singh G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2003, 3(2): 155–185.
- [25] Wilting J, Christ B, Bokeloh M, et al. *In vivo* effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane. Cell Tissue Res, 1993, 274(1): 163–172.
- [26] Jin S, Sarkar KS, Jin YN, et al. An *in vivo* zebrafish screen identifies organophosphate antidotes with diverse mechanisms of action. J Biomol Screen, 2013, 18(1): 108–115.
- [27] Serbedzija GN, Flynn E, Willett CE. Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. Angiogenesis, 1999, 3(4): 353–359.

(本文责编 郝丽芳)