

光交联剂 SANPAH 在处理后的牛颈静脉血管表面接枝生物短肽 RGD

乔刚 胡建国 吴忠仕 李小冰 赵向东 高华

(中南大学湘雅二医院心胸外科 湖南长沙 410011)

摘要 目的:通过不同摩尔浓度、摩尔比的光交联剂 SANPAH 和 RGD 接枝于经过去细胞和光氧化后的牛颈静脉(BJVC)表面的初步研究,以明确接枝 RGD 的效果和最佳浓度。**方法:**分别取 4 个不同浓度的 SANPAH 和 RGD 进行 3 个摩尔比的反应,经过紫外线照射光化学接枝后,各组血管片进行快速冰冻切片,荧光显微镜下观察,看不同浓度下和摩尔比反应、结合的荧光效果,从而初步推断出最佳的反应和结合浓度。**结果:**应用光交联剂后,血管内膜面有一层较强的荧光,随着 RGD 和 SANPAH 的浓度的升高,荧光整体上是越来越强,但是二者的浓度高于 0.6mM 时,荧光差别不是很明显;当二者的反应摩尔比为 1:1 时,荧光最强。**结论:**光交联剂 SANPAH 能够把 RGD 接枝到 BJVC 上,最佳的 RGD 和 SANPAH 反应及接枝的浓度是 0.6mM,最佳的摩尔比是 1:1。

关键词:牛颈静脉;RGD;SANPAH

中图分类号:R654 **文献标识码:**A

Biological Short Peptide RGD Grafted on the Bovine Jugular Vein Conduit by Photo Cross-linker SANPAH

QIAO Gang, HU Jian-guo, WU Zhong-shi, et al

(Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hu'nan, China)

ABSTRACT Objective: To identify the optimal concentration and grafting effect on the bovine jugular vein conduit(BJVC) which was decellularized and photooxidated, by the reactions between RGD and cross-linker SANPAH with different concentrations and ratios. **Methods:** After the reaction of between RGD and SANPAH with 4 different mole concentrations and 3 mole ratios, they were grafted on the patches of BJVC irradiated by ultraviolet ray. The fast frozen sections of the specimens were observed under the fluorescent microscope. The grafting effects were viewed by different brightness the fluorescence, so the optimal reactive concentration was educed. **Results:** The brighter fluorescence on the side of endangium was viewed in the SANPAH group. The higher the concentrations of RGD and SANPAH were, the brighter the fluorescence was. But when the concentration of them was higher than 0.6mM, the different brightness of fluorescence was not so clear. The fluorescence was brightest when the reactive mole ratio between them was 1:1. **Conclusion:** RGD could be grafted on the BJVC by photo cross-linker SANPAH. The optimal concentration of RGD and SANPAH was 0.6mM, and the optimal reactive mole ratio between them was 1:1.

Key Words: SANPAH; Bovine jugular vein conduit(BJVC); Arg-Gly-Asp(RGD)

目前的心血管外科治疗常需要植入替代物,最好的供体是同种移植,但因为受供体数量的限制,常不能满足需求。人造移植体虽已经广泛应用于临床,但鉴于目前存在某些缺点,人们把注意力集中在生物材料上,牛颈静脉(BJVC)不但可以大量获取,又是生物材料,所以有着巨大的优势。含精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸序列短肽(Arg-Gly-Asp, RGD 肽)是一段由 3 个氨基酸组成的短肽序列,是许多粘附蛋白共有的细胞最小识别序列,也是许多细胞表面某些整合素特异性配体之一。

目前生物短肽 RGD 已被广泛应用,且被大量实验^[1]证明是最有效的促黏附多肽,这一序列会促进识别细胞的粘附、迁移和生长。如何把这一短肽结合到材料表面已有很多研究,但结合异种移植体的研究尚未见报道。我们设想把 RGD 共价结合到 BJVC 上,不但可以促进内皮细胞的粘附、迁移和生长,而且因为这种共价结合可能比较牢靠,不易被血流冲掉,同时也使 BJVC 成为可以被自体逐步吸收、重建的真正的组织工程材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

牛颈静脉获取及处理:本地屠宰场获取新鲜牛颈静脉,热缺血时间 0.5h,置于冰磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)中保存 6h,取出剪除外膜组织,0.1%新洁尔灭浸泡 30min。去细胞处理方法如下:血管组织先置于 0.5%曲那通 X-100(夏斯生物公司),37℃,孵育 48h;再置于 0.025%胰蛋白酶(Trypsin)和 0.02%ED-TA(上海生工,1:1)中,37℃,孵育 30min;再采用 30U/ml DNase-I 和 0.3mg/ml RNase-A(Fermentas 公司),37℃,孵育 24h。光氧化处理方法:血管组织先置于高渗 PBS 液(pH 7.6, Osm 680mosm)中浸泡 4h,再置于含 0.1%亚甲基蓝的 PBS 液(pH 7.6, Osm 320mosm)中平衡 4h 后,500W 白炽灯照射,光氧化反应体系控制温度在 10℃左右,光源距离液面 20cm,照射过程中连续搅拌,持续吹入氧气,以提高 PBS 液内的氧浓度,并控制反应体系内的 pH 值(pH7.6),处理 48h 后取出血管,无菌

* 基金项目:本课题获湖南省科技计划重大专项基金资助(04Sk1005)

作者简介:乔刚,男,(1972-),主治医师,博士研究生,研究方向:组织工程生物管道

(收稿日期:2006-09-22 接受日期:2006-10-20)

PBS 液反复冲洗。

GRGDSPK-FITC: 含 RGD 序列的经过末端 FITC 标记短肽 GRGDSPK 订购自中国肽公司 (Chinese Peptide Company), 荧光素 FITC 标记在赖氨酸侧链氨基上 (分子量 1105, 产品号 803925)。

SANPAH 购自美国 Pierce 公司 (产品号: 22600)

紫外固化交联灯订购于湖南长沙市鑫辉特种光源电器厂

1.2 实验方法

表 1 不同浓度及摩尔比的 RGD 和 SANPAH 的配制表

Table.1 Preparation of different concentrations and mole ratios of SANPAH and RGD

RGD 与 SANPAH 的摩尔比	RGD 浓度 (mM)			
	0.12	0.6	1.2	6
1:0	A1	B1	C1	D1
1:1	A2	B2	C2	D2
1:10	A3	B3	C3	D3

1.2.1 血管片的制备及分组处理

取同一根处理后的血管, 制成 1cm×1cm 大小的 12 个血管片 (不含瓣膜区), 超声波漂洗 30min, 洗脱亚甲兰, 随机分入 12 组中 (见表 1)。

1.2.2 SANPAH 与 GRGDSPK 反应后接枝到 BJVC 上

分别在避光下配制上表中 4 种浓度的 RGD 溶液, 然后配制摩尔比为 1:1 和 1:10 的 SANPAH 溶液, 避光下混合 (共 12 管), 室温下反应 2h, 每个血管片上滴 100 μ l 的上述混合物, 室温下自然干燥; 波长为 365nm 的 300W 紫外灯预热小 10min, 于样本上 10cm 处, 照射 5min, 用蒸馏水在恒温震荡器中漂洗血管片 6h (100 次/分)。

1.2.3 检测

即刻将血管片进行快速冰冻切片, 厚度为 5 μ m, 荧光显微镜下观察、照相。

2 结果

2.1 BJVC 胶原本身的荧光

下面两图为单纯去细胞, 未光氧化, 也未作任何其他处理的冰冻切片。不同波长均能激发胶原荧光 (图 A 为波长在 510—560nm 光激发的胶原荧光, 图 B 是波长 450—490 激发的图像); 在较长波长光的激发下, 胶原呈红色, 在激发 FITC 荧光的波长下, 胶原本身颜色为黄色, 较暗, 与 FITC 的明亮的绿色荧光不同 (图 B)。

2.2 单纯涂覆 GRGDSPK-FITC 后的荧光

经过去细胞后的血管片只剩下胶原组织, 空隙较大, 很多 RGD 分子被吸附到胶原空隙中, 而且也黏附在胶原表面, A 图是血管横断面切片 (即垂直于血管片), B 图是纵切片 (即平行于血管片)。

2.3 单纯涂覆和用光交联剂结合 RGD 后在紫外线照射下接枝于血管片内膜面

从血管片的横切面上看, 经过光交联剂 SANPAH 的反应, 血管内表面明显有一层较亮的荧光, 而未加光交联剂 SAN-

PAH 的血管片经过反复漂洗, 表面的荧光有所丧失, 甚至没有吸附至里面胶原上的 RGD 荧光强。A 图为单纯涂覆 GRGDSPK-FITC 的照片, B 图为应用光交联剂 SANPAH 接枝 GRGDSPK-FITC 的荧光照片。

不同浓度和摩尔比的 SANPAH 和 RGD 接枝于血管片上从纵切面上看, 随着 RGD 和 SANPAH 的浓度的升高, 荧光整体上是越来越强, 但是二者的浓度高于 0.6mM 时, 荧光差别不很明显; 当二者的反应摩尔比为 1:1 时, 荧光最强, 图 4 是 GRGDSPK-FITC 与 SANPAH 不同摩尔比的荧光照片, A 图是 1:0; B 图是 1:1; C 图是 1:10。

3 讨论

现代的组织工程的目的是提供有功能、能生长、可修复、再塑性的有生命的组织, 达到这样的目的有几个手段, 一是种植细胞, 二是合适的支架材料, 三是两者都有。其优点是: 通过支架的逐步吸收, 同时黏附在移植植物上的自身细胞不断增值、分泌细胞或细胞外基质, 使移植植物最终能被取代, 从而成为自身的器官^[1]。

BJVC 是生物材料, 为了能更好、更快地融入机体, 使血管尽快内皮化是一个最佳的方法。大量研究显示生物材料经过表面修饰, 能有效地提高其促细胞黏附、增值、迁移的能力, 其中在材料表面接枝生物活性物质是最常用的方法, 含有 RGD 序列的短肽能与细胞上的整合素特异性结合并激活之, 从而调节跨膜信号以及胞浆内信号的传导, 促进细胞黏附、增殖, 通过固定 RGD 肽进行表面修饰的材料能显著增加细胞运动的持续时间。

常用的 RGD 肽固定方法包括物理吸附和化学偶联两大类。前者将肽段通过非共价 (疏水性、电荷分布、范德华力、氢键等) 作用吸附于载体表面或包埋于凝胶及微囊内部, 虽应用较广但其确切机制仍不清楚, 稳定性和重复性也不佳。后者是通过某种方法将材料活化, 如表面水解、等离子沉降、紫外辐照、自组装、模板技术等, 引入能与多肽键合的功能基团, 如 -OH、-COOH、-NH₂、巯基、活性氢等基团, 然后利用交联剂与肽段以共价键结合, 产生化学反应^[4,5]。

光化学技术固定蛋白质 (或多肽) 是利用化学不稳定性物质, 在紫外光辐射时被激活, 可结合目标分子的特性, 将蛋白质 (或多肽) 共价结合到材料表面。

SANPAH 是一种异源双功能交联剂, 其一端含有 N- 羟琥珀酰亚胺基团 (NHS) 与氨基酸的氨基 (-NH₂) 反应, 将 RGD 结合到 SANPAH 上; 另一端含有叠氮硝基苯基, 它可以在紫外线照射下, 插入 C-H 和 N-H 中, 从而将 SANPAH 共价结合固定到材料表面, 有文献^[6,7]已成功地用此方法把 RGD 共价固定到壳聚糖材料上。 (SANPAH 反应示意图见图 5)。

本实验成功地把 RGD 通过光交联剂固定到异种生物材料上, 最佳的结合浓度与文献报道^[8]相似, 为下一步的细胞种植和体内移植打下了基础。

(下转第 48 页)

[2] 曾垂省.可控多孔生物陶瓷的制备及表征[D].武汉:武汉理工大学, 2004.

[3] LU J X,Flautre B, Anselme K, et al. Study of porous interconnection of bioceramic on cellular rehabilitation in vitro and invivo [J]. Bioceramics,1997,10:583~586

[4] 闫玉华,许原.可降解 β -Ca₃(PO₄)₂ 陶瓷的理化性能与生物性能.武

汉工业大学学报[J],1995,17(4):116~119

[5] 马文,沈卫平,董红英等.多孔陶瓷的制造工艺及进展.粉末冶金技术 [J],2002,20(6):365~368

[6] 左演声.材料现代分析方法[M].北京工业大学出版社,2000

[7] 李世普.特种陶瓷工艺学[M].武汉工业大学出版社,1990

乔刚(上接第 45 页)

参考文献

[1] Fussell GW, Cooper SL. Endothelial cell adhesion on RGD-containing methacrylate terpolymers [J]. J Biomed Mater Res A, 2004,70(2): 265-73

[2] K.H. Smith1, A.B. Jozwiak1, C.M. Kielty. Surface Modification of a Polyether-urethane with RGD-containing Peptides for Enhanced Cell Attachment and Signalling [J]. European Cells and Materials, 2005: 10:57

[3] Ulrich A. Stock, Joseph P.Vacanti. TISSUE ENGINEERING: Current State and Prospects[J]. Annu Rev Med, 2001,52:443-51

[4] 左斌海,付清泉,李天全,等. 含精氨酸、甘氨酸、天冬氨酸序列短肽的合成及应用研究进展 [J]. 航天医学与医学工程, 2002,15: 152-156

[5] 武志,万昌秀,赵强.结合 RGD 肽的聚酯材料表面黏附内皮细胞的抗剪切力研究[J].北京生物医学工程,2004,23:37-39

[6] Tze-Wen Chung, Ya-Fen Lu, Shoei-Shen Wang,et al.Growth of human endothelialcellsonphotochemicallygraftedGly Arg Gly Asp(GRGD) chitosans[J]. Biomaterials, 2002, 23:4803-4809

[7] Tze-Wen Chung, Ya-Fen Lu, Hsin-Ya Wang, et al. Growth of Human Endothelial Cells on Different Concentrations of Gly-Arg-Gly-Asp Grafted Chitosan Surface[J]. Artificial Organs, 2003,27(2):155-161

[8] Holland J, Hersh L, Bryhan M, et al. Culture of human vascular endothelial cells on an RGD-containing synthetic peptide attached to astarch-coated polystyrene surface: Comparison with fibronectin-coated tissue-grade polystyrene[J]. Biomaterials, 1996:17:2147

(图 1-图 4 请见封 3)

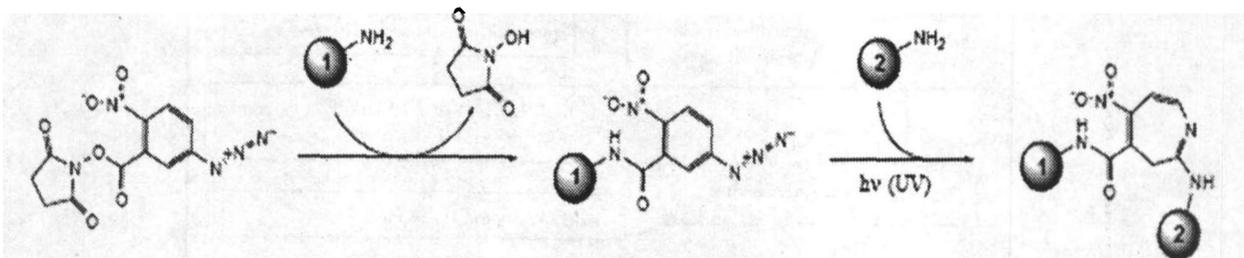


图 5 SANPAH 反应示意图
Fig 5 Conceptual diagram of SANPAH reaction

欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》(原《中国临床康复》)杂志

本刊 2007 年更名,但仍是美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘库 / 医学文摘》(EM)、俄罗斯《文摘杂志》(P *)、波兰《哥伯尼索引》(IC)、中国科技论文统计源期刊、中国中文(临床医学类)核心期刊、《中国高影响力医学期刊论文计量报告》(第 1 版)收录期刊、中国科技核心期刊、中国科技期刊精品数据库等收录期刊。更名是为了更快的实现国际化的目标。

本刊 2005 年所发表的文章,被美国《化学文摘》单篇收录率 >50%。因此,作者在本刊发稿可有较大机会实现单篇文章被国际数据库收录的愿望,不仅体现了该篇稿件的学术价值,同时在作者晋升、评聘、课题评奖中会起到重要的作用。

2007 年本刊对发稿重点提出新的要求:为进一步提高学术质量,①在生物材料研究方面重点突出:组织工程支架材料、组织工程材料学特征及人工器官和医学植入体的材料学与人体生物相容性等问题。②在组织构建研究方面重点突出:各组织器官构建、组织工程生物活性因子、组织工程分子生物学、组织工程实验技术方法等。③在种子细胞研究方面重点突出:干细胞生物学特征、干细胞移植、干细胞因子、干细胞实验技术方法、干细胞临床应用相关基础实验。④在器官移植研究方面重点突出:大器官移植、组织移植、细胞移植,并关注异种异体移植及医学植入体植入、人工器官植入的研究进展。⑤在康复工程研究方面重点突出:康复工程理论、康复工程临床应用、生物医学工程学、生物医学电子学、生物医学光学、生物医学成像及图像处理、计算机及脑的生物信息处理及组织器官生物力学及三维有限元分析。⑥在临床康复研究方面重点突出:康复预防、康复技术、心理康复、运动医学、康复评估、康复理论。

欢迎上述研究的英文稿件和应用中医药方法研究的相关稿件投稿。

本刊出版周期:一般稿件修回后 6 个月出版,"绿色特快通道"承诺修回稿件 3 个月内出版。

通联方式:

咨询电邮 CRTER_szb200@163.com

电话 024-23389106 024-23384352,

传真 024-23381085

投稿电邮 kf23385083@sina.com, kf22838105@sina.com。

国内订阅邮发代号:8-584;本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱 邮编:110004;12 元/册。更多信息详见 www.zglckf.com。

光交联剂 SANPAH 在处理后的牛颈静脉血管表面接枝生物短肽 RGD

乔 刚 胡建国 吴忠仕 李小冰 赵向东 高 华

(中南大学湘雅二医院心胸外科 410011)

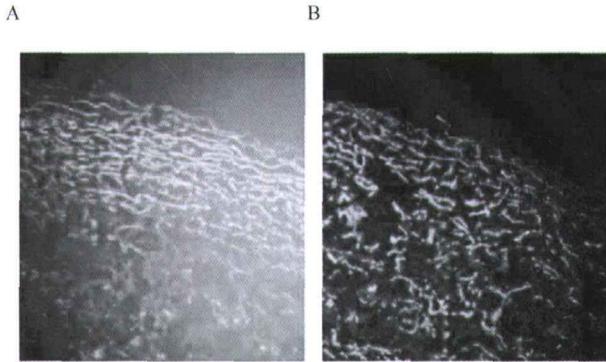


图 1 不同波长激发的胶原本身的荧光对比 (单纯去细胞后的血管切片)

Picture.1 The fluorescence of collagen itself under different wave-length light

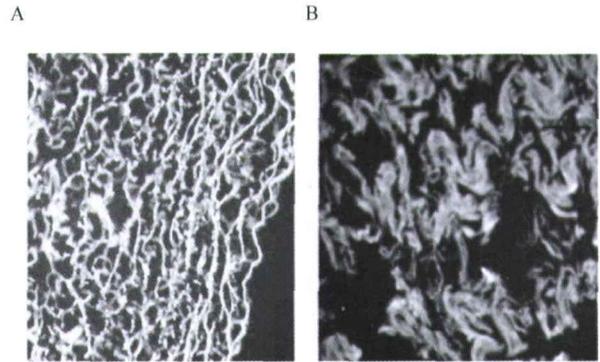


图 2 单纯 GRGDSPK-FITC 涂覆血管片的荧光照相

Picture.2 Only coating GRGDSPK-FITC on the vessel patches directly

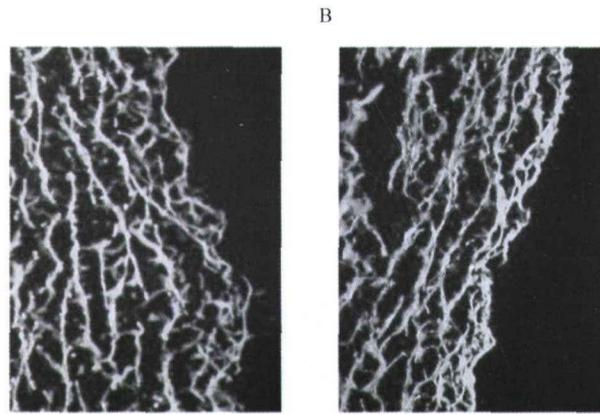


图 3 单纯涂覆 GRGDSPK-FITC 和应用光交联剂 SANPAH 接枝 GRGDSPK-FITC 的荧光照片对比

Picture.3 The contrast between using SANPAH grafting and coating GRGDSPK-FITC directly on the vessel patches

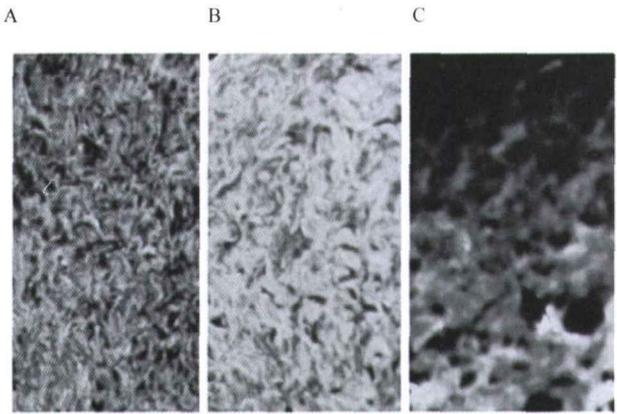


图 4 GRGDSPK-FITC 与 SANPAH 不同摩尔比的荧光照片

Picture.4 Different mole ratios of GRGDSPK-FITC and SANPAH

(正文请见第 81 页)

p27^{kip1}、E2F-1 在胃癌中的表达及其相关性研究

邵培双¹ 金晓明² 孙晓东³ 王天真² 姜 洋^{2,1}

(1 哈尔滨医科大学附属第五医院门诊部 大庆 163316; 2 哈尔滨医科大学病理教研室 哈尔滨 150086)

3 黑龙江省大庆油田总医院病理科 大庆 163316)

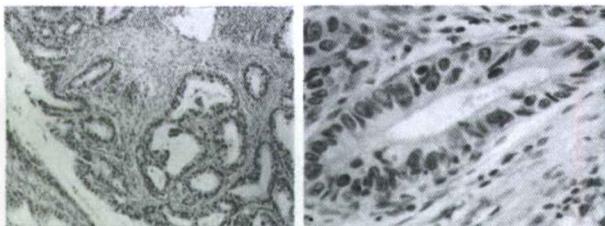


图 1 p27^{kip1} 免疫组化检测, 癌细胞胞核呈阳性表达。

sABC 法, ×115。右图为局部放大, ×460。

Figure.1 and figure 4 the expression of p27^{kip1} in gastric carcinoma

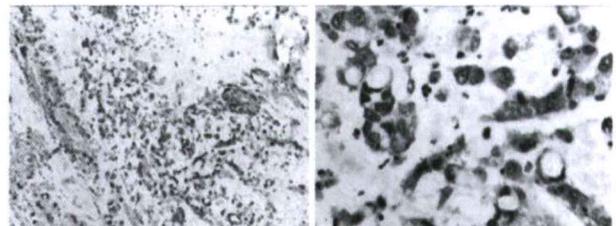


图 2 E2F-1 免疫组化检测, 癌细胞胞浆呈阳性表达。

sABC 法, ×115, 右图为局部放大×460。

Figure.2 and figure 4 the expression of E2F-1 in gastric carcinoma