

# 复制缺陷型腺病毒载体介导人血管内皮细胞生长因子cDNA促进静脉分叶皮瓣的成活\*\*

谢红炬, 邓颖, 李明, 林彪斌, 陈碾

## Replication-defective adenovirus vector-mediated human vascular endothelial cell growth factor cDNA promotes survival of lobulated venous flap

Xie Hong-ju, Deng Ying, Li Ming, Lin Biao-bin, Chen Nian

### Abstract

**BACKGROUND:** Lobulated venous flap has some unique advantages to repair the soft tissue defects in many fingers. However, the poor viability of venous flaps limits their clinical applications.

**OBJECTIVE:** To explore the effects of replication-defective adenovirus vector-mediated human vascular endothelial cell growth factor (VEGF) gene on survival of lobulated venous flap.

**METHODS:** 24 rabbits were randomly divided into three groups. Lateral abdominal wall skin flap was created in rabbits. At 5 days before operation, Ad-VEGF165 (Ad-VEGF165 group), Ad-Gal (Ad-Gal group) and normal saline (NS group) were subcutaneously injected in the skin flap. The survival rate of the flap and the number of the new blood vessels were determined on the 7<sup>th</sup> day after operation.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The flap survival rate was (76.281±2.298)%, (50.408±1.577)% and (48.748±2.130)% in the Ad-VEGF165, Ad-Gal and NS groups, respectively. The number of the new blood vessels was (37.76±2.21) cm<sup>2</sup>, (22.68±2.15) cm<sup>2</sup>, and (23.31±3.38)/cm<sup>2</sup> in the above-mentioned three groups, respectively. Immunohistochemical staining showed that lots of VEGF was expressed in the Ad-VEGF165 group. Blood vessel hyperplasia was obvious in the Ad-VEGF165 group. The replication-defective adenovirus vector-mediated VEGF gene can increase the neovascularization in lobulated venous flap and augments their survival rate.

Xie HJ, Deng Y, Li M, Lin BB, Chen N. Replication-defective adenovirus vector-mediated human vascular endothelial cell growth factor cDNA promotes survival of lobulated venous flap. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(28):5217-5220. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 静脉分叶皮瓣可修复多个手指皮肤软组织缺损, 但静脉皮瓣普遍存在成活率不稳定, 限制了其在临床上的应用。

**目的:** 观察以复制缺陷型腺病毒介导血管内皮细胞生长因子165基因(cDNA)局部应用对兔静脉分叶皮瓣成活的影响。

**方法:** 用新西兰大白兔制作侧腹壁双蒂轴型静脉分叶皮瓣, 分别皮下注射介导血管内皮细胞生长因子165基因(Ad-VEGF)的复制缺陷型腺病毒、携带β半乳糖苷酶基因的腺病毒(Ad-Gal)和生理盐水。术后7 d对3组兔进行皮瓣存活率、免疫组织化学、新生血管计数和常规组织切片的检测。

**结果与结论:** 术后7 d, Ad-VEGF165组皮瓣成活率和平均血管数目显著高于Ad-Gal组和生理盐水组( $P < 0.01$ ), 皮瓣中血管内皮细胞及毛囊旁细胞中有大量VEGF蛋白阳性表达细胞, 皮瓣中出现肉芽组织增生, 新生血管大量形成。结果证实, 以复制缺陷型腺病毒为载体介导的人VEGF cDNA能促进新生血管的形成并提高静脉分叶皮瓣的成活率。

**关键词:** 静脉皮瓣; 血管内皮细胞生长因子; 基因治疗; 腺病毒; 分叶皮瓣; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.28.022

谢红炬, 邓颖, 李明, 林彪斌, 陈碾. 复制缺陷型腺病毒载体介导人血管内皮细胞生长因子cDNA促进静脉分叶皮瓣的成活[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(28):5217-5220. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

临床上常见多个手指皮肤软组织缺损, 修复手术比较棘手, 传统方法一般为并指后动脉皮瓣修复创面, 然后再分指, 需要多次手术, 病程较长, 术后外观、功能都不令人满意。仅以静脉血营养的静脉皮瓣摆脱了动脉血管分布区域对传统轴型皮瓣的供区与受区的限制、取材方便、皮瓣较薄、容易设计和操作, 必要时也可携带神经、肌膜进行一次性修复<sup>[1]</sup>。有研究表明静脉皮瓣早期分叶是可行的<sup>[2]</sup>。实验以

此设想用静脉分叶皮瓣修复多指创面缺损, 可一期愈合, 避免了分指手术的痛苦, 缩短了病程, 术后外形小巧接近正常指粗细, 不需分指去脂术。由于静脉皮瓣普遍存在成活率不稳定, 使静脉皮瓣在临床上的应用未获得突破性进展。近年来研究表明, 许多生长因子能促进新血管形成的过程, 具有增加皮瓣的成活面积的作用, 这其中以血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)促进新生血管形成的作用最为明显<sup>[3]</sup>。

为克服VEGF重组蛋白半衰期短, 有潜在不良反应的缺点, 实验采用基因治疗的方法, 利

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Xie Hong-ju★, Master, Chief physician, Master's supervisor, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan Province, China xhj1251@sina.com

Supported by: a grant from Health Department of Hunan Province, No.B2006-117\*

Received: 2011-02-09  
Accepted: 2011-05-15

华南大学附属第一医院医疗美容科, 湖南省衡阳市421001

谢红炬★, 男, 1968年生, 湖南省衡阳市人, 1995年南华大学医疗系毕业, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事皮瓣修复等方面的研究。xhj1251@sina.com

中图分类号:R318  
文献标识码:B  
文章编号:1673-8225  
(2011)28-05217-04

收稿日期: 2011-02-09  
修回日期: 2011-05-15  
(20100823007/WJ-S)

用复制缺陷型腺病毒介导, 对静脉分叶皮瓣区域局部导入人 VEGF cDNA, 对静脉皮瓣进行预制, 观察 VEGF 在皮瓣组织局部表达、新生血管情况及对兔静脉分叶皮瓣成活的影响。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于 2008-12/2009-06 在南华大学完成。

**材料:** 健康 4 月龄雄性新西兰大白兔 24 只, 清洁级, 体质量 1.5~2.0 kg, 由南华大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(湘)2004-0011。实验过程中对动物的处置符合国家科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[4]</sup>。

**试剂及仪器:**

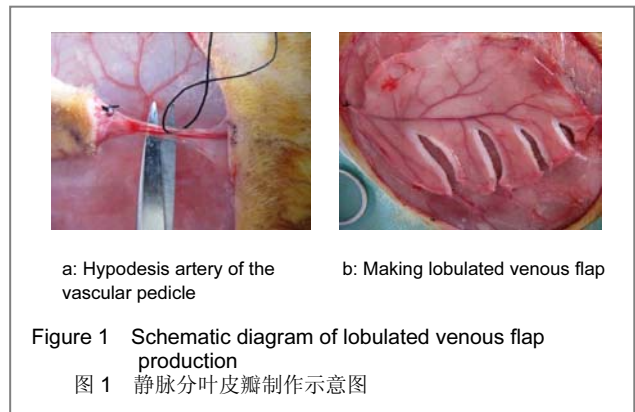
试剂及仪器	来源
Ad-VEGF165, Ad-Gal	上海医元生物基因科技发展有限公司
VEGF165 单克隆抗体	北京中杉公司
SABC 试剂盒	武汉博士德公司
BX241 数码显微镜	日本 Olympus 公司

**实验方法:**

**分组及干预:** 将 24 只新西兰大白兔随机分成 3 组, 即 Ad-VEGF165 组、Ad-Gal 组及生理盐水组, 每组 8 只。在 3 组兔侧胸腹壁设计胸背静脉自肩胛下静脉发出点与髂腰静脉吻合点之间做大小为 8 cm×5 cm 的一椭圆形皮瓣, 左右侧随机选择。术前 5 d, 皮瓣内均匀标记 30 个点, Ad-VEGF165 组注入  $2.4 \times 10^8$  pfu 重组复制缺陷型腺病毒 Ad-VEGF165, 病毒用生理盐水稀释至总量为 3 mL, 用临床皮试器 1 mL 微量注射器于皮瓣皮内注射, 每个注射点注入 0.1 mL。Ad-Gal 组同法注入  $2.4 \times 10^8$  pfu 的重组复制缺陷型腺病毒 Ad-Gal, 生理盐水组则同法注入生理盐水 3 mL。

**静脉分叶皮瓣制作:** 3 组兔皮瓣药物注射 5 d 后, 以体积分数 5% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 静脉麻醉。俯卧位四肢固定后, 侧胸腹部去毛、消毒、铺巾。在兔侧胸腹壁沿皮瓣设计线切开皮肤至筋膜层, 于筋膜下钝性分离至皮瓣蒂部, 使其与创面基底完全分离, 注意保护皮瓣内血管分支及远近端血管蒂<sup>[5]</sup>。在放大镜下, 结扎切断两端蒂内的胸背动脉及与静脉伴行的滋养动脉, 见图 1a, 去除长约 5 mm 的一段静脉周围脂肪结缔组织, 形成以肩胛下静脉与髂腰静脉为蒂的双蒂轴型静脉皮瓣。翻转皮瓣, 在轴血管的上方(皮瓣的脊柱侧), 依轴血管分支标记出 3 cm×2 cm 的瓣叶后, 组织剪沿标记剪开形成分叶皮瓣, 见图 1b。翻转皮瓣复位, 5-0 丝线间断原位缝合, 保证皮肤对合良好。术后 3 d 腹腔注射青霉素  $4 \times$

$10^5$  U, 2 次/d。



**皮瓣成活率检测:** 术后 7 d 再次麻醉 3 组动物, 肉眼观察皮瓣颜色、弹性、渗出、毛发生长等情况。用坐标贴纸法测量皮瓣成活面积。用称量纸的方法精确记录坏死面积, 用电子天平称出称量纸的质量。根据其质量推算出坏死面积。以皮瓣设计面积和坏死面积之差, 得出皮瓣成活面积, 依皮瓣成活的百分率进行统计分析。

$$\text{皮瓣成活率} = \frac{\text{皮瓣成活面积}}{\text{皮瓣总面积}} \times 100\%^{[6]}$$

**皮瓣组织学观察:** 于兔皮瓣中点切取成活皮瓣组织, 体积分数 10% 甲醛液固定, 常规石蜡包埋切片, 苏木精-伊红染色, 光镜下观察组织学变化。

**皮瓣内微血管密度(microvessel density, MVD)检测:** 将上述 3 组兔组织切片在 400 倍光镜下每张切片随机计算 5 个视野中血管断面数目。利用 Image Pro Plus 5.0 图像分析系统检测各组皮瓣皮下血管断面的数密度和面密度。

$$\text{MVD} = \frac{\text{血管断面均数}}{\text{镜下视野组织面积(单位: 个/cm}^2)}$$

**免疫组织化学染色:** 用上述 3 组兔组织切片按 SABC 免疫组织化学染色法染色, 一抗为兔抗人 VEGF165 单克隆抗体 (1:150), 二抗为生化素化山羊抗兔 IgG, DAB 染色, 观察 VEGF 在组织中的沉积情况。

**主要观察指标:** 3 组兔皮瓣进行皮瓣存活率、VEGF 在组织中的沉积情况、新生血管计数、皮瓣组织学观察检测。

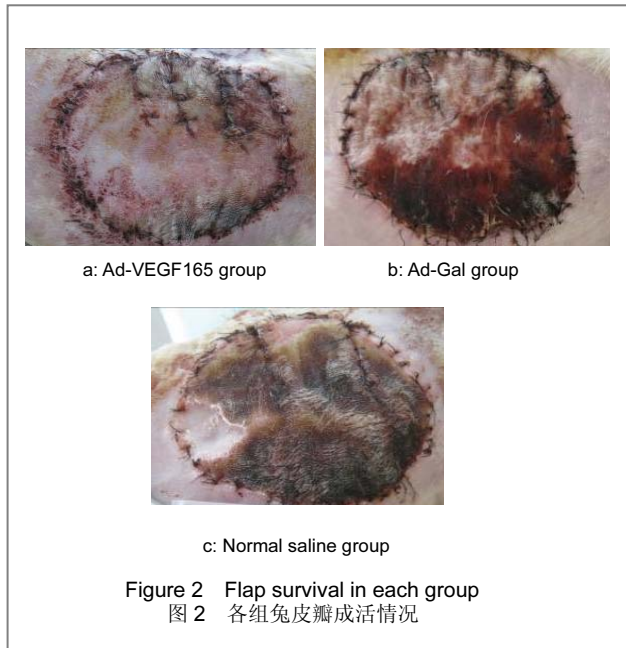
**统计学分析:** 计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计学分析, 组间数据差异比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 新西兰大白兔 24 只均进入结果分析, 无脱落。

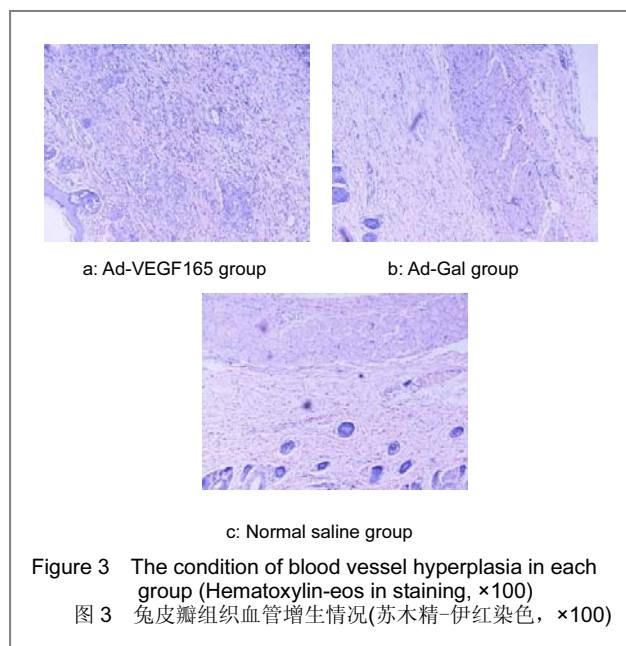
**2.2 大体观察结果** 术后 7 d, 3 组兔皮瓣成活和坏死界限已清晰, 观察成活皮瓣外观正常, 有弹性, 有少量毛发生长, 剪开皮肤有明显渗血。坏死皮瓣发黑,

干燥, 皱缩, 无弹性, 剪开皮肤无渗血, 毛发未长。Ad-VEGF165组皮瓣坏死面积小于其他2组, 见图2。坏死皮肤多见于皮瓣腹侧。



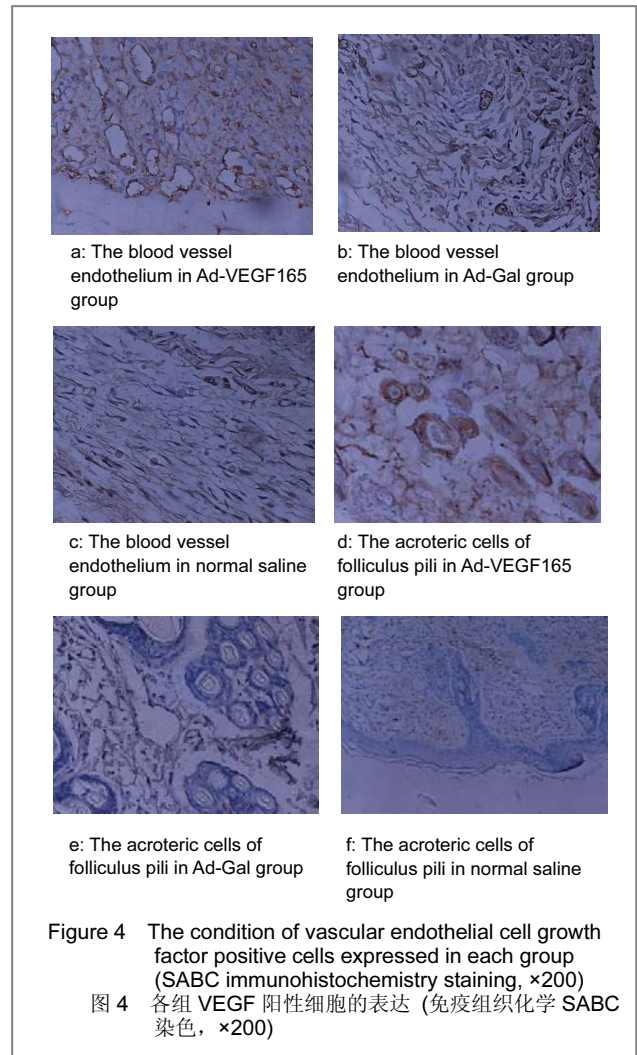
2.3 各组皮瓣成活率变化 术后7 d, Ad-VEGF165组成活率 $[(76.281 \pm 2.298)\%]$ 显著高于Ad-Gal组 $[(50.408 \pm 1.577)\%]$ 和生理盐水组 $[(48.748 \pm 2.130)\%, P < 0.01]$ 。

2.4 各组皮瓣组织学变化 术后7 d, 光镜下Ad-VEGF165组成活皮瓣标本形态主要表现为大量肉芽组织形成, 新生血管增生明显, 新生血管主要出现于肉膜的深层, 以毛细血管为主。Ad-Gal组及生理盐水组未见明显肉芽组织增生和毛细血管形成, 见图3。



2.5 免疫组织化学检测结果 兔抗人VEGF多克隆抗体与其相应的蛋白质抗原相结合的复合物染色, 呈现棕

黄色颗粒, 主要分布在毛囊旁细胞和血管内皮细胞内。Ad-VEGF165组皮瓣中在毛细血管、毛囊周围可见大量棕黄色染色, 显示有VEGF的沉积。Ad-Gal组与生理盐水组皮瓣成活组织中仅检测到较少阳性细胞, 见图4。



2.6 皮瓣下血管断面密度 Ad-VEGF165组 $[(37.76 \pm 2.21)$ 个/ $\text{cm}^2$ ]皮瓣皮下血管断面的数密度均显著高于Ad-Gal组 $[(22.68 \pm 2.15)$ 个/ $\text{cm}^2$ ]及生理盐水组 $[(23.31 \pm 3.38)$ 个/ $\text{cm}^2$ ], 差异有非常显著性意义( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

静脉分叶皮瓣早期存活机制分析可能是由于每一个小叶含有一条分支静脉, 通过倒流的静脉血与主干静脉相通, 静脉血在毛细血管中通过往返流动, 完成营养物质与细胞代谢废物交换, 利于皮瓣早期成活<sup>[7]</sup>, 也可以回流小叶皮瓣代谢产物及渗出液, 防止水肿及代谢废物淤积, 形成“血浆循环”, 有利于皮瓣早期血运建立<sup>[8-9]</sup>。

新生血管形成能促进皮瓣早期血运建立, 对皮瓣的成活起着很重要的作用。已有很多实验证实VEGF在多种在体模型中有强烈地促血管生成作用<sup>[10-12]</sup>。本次实验的



免疫组织化学检测结果发现, 在Ad-VEGF165治疗的皮瓣组织中, 皮瓣成活部位发现大量免疫组织化学染色阳性细胞存在, 毛囊旁细胞及血管内皮细胞见到大量的VEGF蛋白表达。组织切片显示皮瓣的肉膜深层毛细血管增生明显, 而空V组及NS组则无明显的血管增生。因此, 实验也证实了VEGF的促血管生成生物学作用, 促进了静脉分叶皮瓣的成活。由于VEGF的半衰期短、不良反应大、费用高, 故外源给予VEGF蛋白质进行治疗效力有限。为克服这一缺点, 应用VEGF基因治疗, 即将外源VEGF基因导入目的细胞并有效表达, 从而达到治疗目的。

近20年来, VEGF基因治疗方法得到了不断发展。基因治疗需要合适的载体, 目前被研究应用最多的是腺病毒载体。腺病毒载体的优点有: ①既可以感染分裂期细胞, 又可以感染非分裂期细胞。②外源基因表达水平高。③病毒滴度高, 制备纯化相对容易。④插入外源基因容量大。⑤病毒基因组较少发生重排。⑥腺病毒颗粒十分牢固, 不易突变⑦腺病毒基本不致病或只引起轻微的症状, 应用安全<sup>[13]</sup>。通过复制缺陷腺病毒为载体, 将VEGF基因导入皮瓣组织转染细胞, 因腺病毒载体可导致机体免疫反应, 所携带的基因只能短暂地表达<sup>[14]</sup>。这种自限性非常有利于皮瓣成活<sup>[15]</sup>。有研究表明腺病毒在转染后3~5 d, 成熟病毒开始从细胞中释放并感染邻近细胞, 大量复制并表达外源基因蛋白, 7 d表达最强, 20 d仍可见表达<sup>[16]</sup>。Giunta等<sup>[17]</sup>通过术前3~7 d注射Ad. VEGF165促进了随意型皮瓣成活。本次实验在术前5 d皮瓣皮内注射腺病毒载体, 术后48 h内是VEGF表达高峰期, 有利于皮瓣成活。

实验以兔建立动物模型制作静脉分叶皮瓣, 通过局部应用重组复制缺陷型腺病毒介导人VEGF, 能有效的感染皮瓣组织细胞, 表达外源性VEGF, 通过促进局部新生血管的形成, 增加皮瓣成活面积。实验通过皮瓣大体观察, 皮瓣坏死皮肤多见于皮瓣腹侧, 而分叶瓣坏死较少, 这可能与分叶瓣位于脊柱侧, 处于静脉血液引流较通畅一侧。这可以用“血浆循环”理论解释, 静脉皮瓣静脉蒂回流皮瓣代谢产物及多余渗出液, 防止水肿和代谢产物聚集, 有利于皮瓣成活。这也进一步证实在通畅的静脉回流前提下早期静脉分叶皮瓣的可行性。本次实验为临床应用静脉分叶皮瓣修复多个手指皮肤软组织缺损提供了实验理论基础。但在临床通过基因治疗手段, 应用促血管生成生长因子促进血管生成的治疗性应用, 尚需在动物模型中进行长期观察。

#### 4 参考文献

[1] Baek SM, Weinberg H, Song Y, et al. Experimental studies in the survival of venous island flaps without arterial inflow. *Plast Reconstr Surg.* 1985;75(1):88-92.

[2] Xie HJ, Nanhua Daxue. 2006. 谢红炬. 静脉皮瓣早期分叶的实验研究[D]. 南华大学. 2006.

[3] Kusumanto YH, Weel VV, Mulder NH, et al. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther.* 2006; 17(6):683-691.

[4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.* 2006-09-30.

[5] Xie HJ, Li M, Deng Y, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongchen Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(51):10039-10043. 谢红炬, 李明, 邓颖, 等. 碱性成纤维细胞生长因子-聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物微球的体外释药规律: 具有促进兔静脉皮瓣成活的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(51):10039-10043.

[6] Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1980; 65(2):152-158.

[7] Thatté RL, Thatté MR. Cephalic venous flap. *Br J Plast Surg.* 1987; 40: 16-19.

[8] Matsushita K, Firrell JC, Oqden L, et al. Blood flow and tissue survival in the rabbit venous flap. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91(1): 127-135.

[9] Fukui A, Tamai S, Maeda M, et al. The pedicled venous flap. An experimental study [J]. *Br J Plast Surg.* 1993;46(2):116-121.

[10] Leberer C, von Degenfeld G, Karl A, et al. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium.* 2003;10(4-5):257-265.

[11] Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Mol Cell Biochem.* 2007;298 (1-2):151-159.

[12] Hao X, Masson-broberg A, Grinnemo KH, et al. Myocardial angiogenesis after plasmid or adenoviral VEGF-A(165) gene transfer in rat myocardial infarction model. *Cardiovasc Res.* 2007; 73(3):443-445.

[13] Ma H, Liu Y, Liu S, et al. Oral adeno-associated virus-s TRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice. *Hepatology.* 2005;42(6):1355-1363.

[14] Tang ZS. Shanghai: Shanghai Yike Daxue Chubanshe. 1999. 唐镇生. 分子外科与基因治疗[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999.

[15] Li FC, Cui L, Sun XH, et al. *Zhonghua Zhengxing Waikexue Zazhi.* 2004;20(6):435-439. 李发成, 崔磊, 孙欲晓, 等. 腺病毒载体介导人VEGF cDNA 促进随意型皮瓣成活的实验研究[J]. *中华整形外科杂志*, 2004, 20(6):435-439.

[16] Gao QW, Liu CM, Song HF, et al. *Jiefangjun Yixue Zazhi.* 2009; 34(2):192-195. 高全文, 柳春明, 宋慧锋, 等. 重组腺病毒介导的血管内皮生长因子165在大鼠骨髓基质细胞中的表达[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(2): 192-195.

[17] Giunta RE, Holzbach T, Taskov C, et al. AdVEGF165 gene transfer increases survival in overdimensioned skin flaps. *J Gene Med.* 2005;7(3):297-306.

#### 来自本文课题的更多信息——

**基金资助:** 课题受湖南省卫生厅资助课题(B2006-117)资助。

**作者贡献:** 谢红炬和邓颖进行实验设计, 实验实施为邓颖、李明和林彪斌, 实验评估为陈碾, 资料收集为邓颖和李明, 邓颖成文, 谢红炬审核并对文章负责。

**伦理批准:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准, 符合国家科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**本文创新点:** 目前, 作者尚未查及国内外未见血管内皮生长因子干预静脉分叶皮瓣存活的报道, 亦未见有静脉分叶皮瓣修复多指皮肤软组织缺损的报道。实验局部应用重组复制缺陷型腺病毒介导人血管内皮细胞生长因子, 感染皮瓣组织细胞, 表达外源性血管内皮细胞生长因子, 通过促进局部新生血管的形成, 增加皮瓣成活面积。