

生长因子及其与体内微环境的多重相互作用

柏金根 杨健 朱敦皖 李俊杰 姚康德*

(天津大学高分子材料研究所, 天津 300072. * 联系人, E-mail: ripm@tju.edu.cn)

摘要 细胞、生长因子及细胞外基质(extracellular matrices, ECMs)共存于一个动态的组织环境中, 三者之间的多重相互作用研究对生长因子有效发挥生物学活性、调节细胞的生长过程以及利用工程化手段设计和制备外源性载体对生长因子进行控制释放, 引导组织的再生和修复均具有重要的指导意义. 本文从不同角度阐述了生长因子的特点及功能, 生长因子与ECM的相互作用, 生长因子作用于细胞的方式和相关信号, 简要总结了生长因子控制释放载体的仿生化要求, 以期组织工程相关研究提供参考.

关键词 生长因子 细胞外基质 信号 微环境 控制释放

细胞外基质(extracellular matrices, ECMs)分布于细胞外空间, 是由细胞分泌的蛋白质和多糖所构成的网络结构. 生长因子也是细胞合成和分泌的一类活性蛋白质, 几乎都存在于ECM中. 1965年美国的Marshall Urist首先从骨基质中分离出具有骨诱导性的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs), 具有诱导和刺激新骨的形成功能^[1]. 体内组织中, 细胞、生长因子及ECM共处于一个动态环境之中, 三者之间的多重相互作用构成了生长因子体内生存的微环境. 而人们对生长因子的了解源于对血细胞发育的研究, 结果表明生长因子可通过诱导或调节基因的表达作用于细胞的增殖与分化^[2]. 近年来, 随着科研工作者对各种生长因子及其生物学特性地不断揭秘, 发现生长因子在改善各种生理、病理状态, 促进组织再生、修复及创伤愈合过程等方面日益发挥着重要的作用^[3-5], 因此, 对生长因子的研究也已成为生物化学、细胞生物学、医学及组织工程学等诸多学科研究的重要内容.

由于单种生长因子对体内多种组织均可发挥生物学作用, 系统使用会导致一定的负面影响^[6], 且绝大多数生长因子半衰期较短^[7], 易失去活性, 因此生长因子的单纯释放使用并不是最好的仿生手段, 而有赖于设计和制备适宜的载体对生长因子进行控制释放, 防止生长因子从释放部位迅速扩散, 达到有效刺激细胞的增殖、分化及生长及引导组织再生的目的. 20世纪90年代, 美国基因研究所和Stryker Biotech公司将骨形态发生蛋白BMP-7与天然高分子材料胶原进行复合, 建立了一种利用载体输运生长因子的途径. 组织工程生长因子控制释放载体的研究工作正广泛开展, 新型载体的设计和制备有赖于对生长因

子体内多重相互作用有深入的了解和掌握, Li等人^[8]也将模仿生长因子刺激机体自身修复的机理与组织体外构建、损伤组织修复及生物材料纳米化作为组织工程的4个层面. 本文拟从细胞生物学、临床医学、组织工程学等多方面综述生长因子的特点与功能及其与ECM相互作用, 探索了生长因子作用于细胞的方式和相关信号, 简要总结生长因子控释载体的仿生化要求, 以期组织工程的研究提供参考.

1 生长因子的特点和功能

生长因子是细胞分泌的一类可调节细胞功能的生物活性多肽, 由具有特定序列的多个氨基酸组成, 通过传递信号来调节细胞的活动^[9]. 依据细胞种类的不同, 生长因子可以促进也可抑制细胞的分裂、分化、迁移和基因表达, 如转化生长因子对成纤维细胞具有促进作用而对角质细胞却具有抑制作用; 生长因子的稳定性相对较差, 在体内的半衰期很短; 分配系数较低、内扩散性较差, 且不易通过生物膜; 根据带电性不同, 生长因子和聚电解质可通过静电作用形成聚电解质复合物^[9]. 部分生长因子的特点及功能如表1所示.

2 生长因子与细胞外基质之间的相互作用

组织中的ECM被认作是诸多生长因子的存储站, 而生长因子释放到周围环境中会影响到许多生理过程, 因此研究生长因子对ECM组分的合成和降解、重构过程及基因表达等的调控作用; ECM对生长因子的保护、活性和表达水平的调节作用, 对仿生组织环境保持细胞正常生长状态, 了解创伤愈合和组织修复过程, 指导生长因子控制释放载体研究等具有重要的意义.

表 1 部分生长因子的特点及生理功能

生长因子类型	特点	生理功能
转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)	分子量为 12~15 kD, 可以剂量和时间依赖性方式作用于细胞. 通常与跨膜丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶型受体结合.	TGF- β 可用于促进软、硬组织修复和愈合、抑制慢性炎症疾病、调节自身免疫及抑制移植排斥反应过程等.
骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic proteins, BMPs)	BMPs 属于转化生长因子- β 超家族成员, 是一类非水溶性的蛋白, 可以剂量和时间依赖性方式作用于细胞, 且是惟一能单独诱导骨组织形成的局部生长因子. 通常与跨膜丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶型受体结合.	BMPs 可诱导骨、软骨的形成以及皮下、肌肉等部位异位骨的形成. 在骨缺损修复、骨折愈合、骨折延迟愈合、骨不连以及创伤性、退行性骨关节炎、骨质疏松症等治疗中发挥重要的作用.
成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)	FGF 种类大约有 18 种左右, 是促进细胞生长作用较强的多肽因子, bFGF 等电点为 9.6, aFGF 等电点为 5.6. 通常与酪氨酸蛋白激酶受体结合.	FGF 参与创伤愈合、慢性炎症、新生血管的形成、胚胎横纹肌的发育、肺的成熟等过程.
血管内皮生长因子 (vessel endothelium growth factor, VEGF)	分子量为 34~45 kD 的单链糖蛋白, 是内皮细胞特异性促有丝分裂原, 属分泌性糖蛋白, 等电点为 8.5, 通常与甲状腺素蛋白激酶受体结合.	VEGF 参与新血管的形成和发育、创伤愈合、慢性炎症、肿瘤的血管增生等过程.
表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)	由 53 个氨基酸组成的分子量为 6045 Da 的单链小分子多肽, 等电点为 4.6, 通常与酪氨酸蛋白激酶受体结合.	EGF 对表皮细胞的连续增殖、皮肤、消化器官的上皮、骨髓等正常再生, 肝脏的本身再生等起着重要的作用.
肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)	由 728 个氨基酸组成的分子量为 82 kD, 由两条肽链组成, 属不耐热多糖蛋白. 通常与酪氨酸蛋白激酶受体结合.	HGF 可促进多种神经元的生存、减少大脑缺血梗死灶的面积、减少凋亡细胞、增加血管生成、保护神经元的损伤等.
神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)	分子量差别很大, 半衰期较短, 在水溶液中活性丢失快, 且易受温度、酸碱度等多种因素的影响. 通常与跨膜蛋白激酶受体 c-kit 和 c-Fms 结合.	NGF 可调节中枢和外周神经系统神经元的生长发育, 维持神经元的存活、免疫系统.
胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGF)	70 个氨基酸组成, 分子量约 7500 Da 的蛋白质, 主要由人肝细胞合成和分泌, 等电点 8.6. 通常与甲状腺素蛋白激酶受体结合.	IGF 用于治疗糖尿病极度胰岛素抵抗、充血性心力衰竭、骨质疏松症等病症.
血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF)	分子量约为 35 kD, 由成熟的小血小板分泌, 可耐热、耐酸及易被胰蛋白酶水解的阳离子多肽. 通常与甲状腺素蛋白激酶受体结合.	PDGF 可促进胚胎发生、创伤愈合, 抑制动脉硬化、恶性肿瘤等.

2.1 ECM 对生长因子的作用

() ECM对生长因子的保护作用. ECM组分大多数分子量较大, 通常含有大量的酸性基团, 是一类含有聚负离子的化合物, ECM分子所含有的特定位点可与包括生长因子在内的许多物质结合形成生长因子/ECM复合物使生长因子保持稳定^[10]. 例如, TGF- β 由细胞分泌释放后, ECM可使潜伏态的TGF- β 与外界相隔绝而保持活性, 直到生长因子与其受体结合进入生物利用状态时才从生长因子/ECM复合物中分离, 推测认为其分离过程可能是通过基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)介导ECM的蛋白酶解所致, bFGF从ECM中的释放也具有类似的过程^[11].

ECM组分也可通过抑制生长因子的降解和退化, 使细胞所需的目标生长因子在细胞外浓度增高并长期储备而发挥作用^[12]. ECM分子如硫酸肝素或肝素与FGF结合后, 可防止生长因子的降解, 长时间保持生物学活性而对细胞发挥作用. 在制备生长因子释放载体的过程中, 研究者们尝试以共价键将带有肝

素结合位点的多肽接枝到血纤蛋白上, 然后将肝素复合到结合位点, 或先将肝素接枝在海藻酸钠上, 再利用肝素对生长因子的亲和性将生长因子结合到肝素上, 使得生长因子的作用局部化, 阻碍了生长因子的降解, 可缓慢而持续的释放, 达到治疗的目的^[13,14]. ECM对生长因子的这种保护作用要求在组织工程研究中设计和制备生长因子释放载体时, 利用适宜的固定化方法将生长因子复合到载体, 达到生长因子在所需时期内稳定而持续地释放.

() ECM对生长因子活性的调节作用. ECM分子对生长因子活性的调节, 可能主要因ECM分子本身的结构, 或生长因子与ECM结合后引起构型、构象的某些变化所引起的. ECM中诸多黏连分子结构上具有许多EGF样的区域(一种类似于EGF的富含半胱氨酸的结构域). 该结构域可引起特定蛋白间的相互作用而促使细胞间及细胞与ECM之间相互黏连, 并通过与EGF受体相互作用来调节细胞的生长^[10]. 研究者们已证实存在于黏连蛋白中的EGF样重复结构

域可诱导上皮细胞及成纤维细胞的分裂与增殖,推测认为ECM中此结构域在通常情况下被覆盖而避免了与基膜的接触,当基膜的完整性被破坏,EGF样重复结构域暴露时,则可促进细胞的增殖和功能^[15]。同时,ECM中存有多种蛋白对处于潜伏态的生长因子具有激活作用而调节生长因子的活性。譬如,凝血栓蛋白(thrombospondin, TSP)结构中的备解素样结构域与TGF- β 结合后即可激活TGF- β 的活性,这可能是由于生长因子与TSP结合后引起潜伏性相关肽(latency-associated peptide, LAP)的构象变化所致^[9]。硫酸肝素蛋白聚糖对bFGF生物活性的影响也表明,ECM分子对生长因子活性的调节作用在于ECM分子可能改变了bFGF的分子构型而使得其与受体结合产生生物学活性,其中精确的构象变化调控机制还不太清楚。

同时ECM组分也可抑制生长因子的活性,如核心蛋白聚糖通过其富含亮氨酸重复单元的核蛋白与TGF- β 结合后可抑制TGF- β 的活性, β 多糖通过其-NH₂末端与TGF- β 的结合也可抑制TGF- β 的活性^[16]。ECM对生长因子活性的双向性调节作用,有利于根据治疗的具体目的的设计和制备智能型的生长因子释放载体及体系。

() ECM对生长因子表达水平的调节作用。ECM组分可以刺激和诱导体内多种细胞分泌生长因子,从而达到对生长因子表达水平的调节^[17],研究主要集中在ECM组分对生长因子表达的具体调节作用及对细胞过程的影响机制。在研究ECM组分对鼠外围神经B-1b细胞的黏附、增殖和细胞因子的量的选择性影响时发现,层黏连蛋白(laminin, LN)可刺激B-1b细胞分泌大量的白介素-10(Interleukin-10, IL-10),纤连蛋白(fibronectin, FN)及胶原蛋白诱导细胞分泌出大量的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α),将LN, FN和胶原蛋白结合在一起则可诱导细胞产出大量的IL-1 β , ECM组成对B-1b细胞分泌生长因子量的显著影响调节了细胞增殖和分化过程中生长因子的表达^[18]。

人结肠癌细胞中肝衍生ECM对生长因子及其受体表达也起调节作用,当细胞生长在FN上时,肝素可诱导Cripto基因的mRNA表达,而在KM12SM细胞中,肝素可诱导生长在FN和胶原上细胞中的双条曲菌素属的表达,并认为肝细胞衍生ECM是通过调节结肠癌中自分泌的生长因子及其受体的表达来

影响和调节细胞生长,且得出这种调节作用对不同的生长因子具有选择性^[19,20]。Peluso等人^[21]研究也发现,HGF能否正常表达来诱导鼠卵巢表面上皮细胞的凋亡和有丝分裂依赖于ECM,且RGD黏附肽与整联蛋白的相互作用构成了细胞从凋亡转变为有丝分裂的信号传导途径。ECM组分对生长因子表达的调节作用,在细胞的分裂、增殖、分化及凋亡等细胞过程中发挥着重要的作用。

2.2 生长因子对ECM的作用

() 生长因子对ECM组成的调节。许多事实证明,对ECM组分含量的任何改变及破坏都会导致病态,因此对处于健康或病态状况下生长因子对ECM组成的调节机制进行系统性阐明非常重要。研究表明,诸多生长因子可促进ECM中各种蛋白的合成和降解,调节了ECM的组成。在对牛血管平滑肌细胞研究时发现,TGF- β 剂量的增加对ECM中的蛋白具有诱导作用,因而对细胞的生长起作用,推测TGF- β 不但刺激了FN和胶原蛋白的合成,且通过自分泌-旁分泌的负反馈回路机制来调节细胞的生长^[22]。其他研究表明,TGF- β 的这种诱导刺激作用可能是由于其抑制了对ECM特定组成具有降解能力的MMPs的活性,促进了该酶的组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)的活性,从而刺激FN的合成^[23],同时TGF- β 也因可促进成纤维细胞合成和分泌胶原,抑制ECM组分的降解,成为调控创面愈合的关键因子。牛骶椎间IGF-1可刺激髓核中蛋白多糖的合成,并认为其也是通过自分泌-旁分泌机制而起调节作用^[24]。

多种细胞的增殖或激活均可释放PDGF,是人成骨细胞和炎症细胞强有力的化学诱导物,可刺激胶原蛋白及其他ECM组分如FN及蛋白聚糖的合成^[25],这对创伤愈合过程是非常重要的。其他生长因子如FGF, IGF等在对细胞进行刺激和诱导的过程中都能对ECM组分FN的合成和聚集进行调节,从而影响细胞的行为和功能^[26]。关于生长因子对ECM组分调节的各种更为详尽和具体的机理及对细胞行为的影响需要进一步研究。

() 生长因子对ECM重构过程的影响。ECM的重构是一个活跃的降解与重合成过程,生长因子可诱导的ECM组分的变化引起ECM重构,或通过引起ECM的积聚及影响细胞在ECM中的迁移速率导致ECM的结构、稳定性变化,以引起ECM的重构,进而

调节组织重构过程。González等人^[27]对幼鼠和成年鼠前垂体细胞在不同胶原蛋白中的迁移速率的研究中发现,当加入EGF后,受生长因子的刺激,幼鼠细胞的迁移速率会变快,而成年鼠前垂体细胞的迁移速度则变慢,且受刺激的幼鼠细胞会一簇一簇的聚在一起,但成年鼠细胞则表现为许多细胞相对孤立分散,作者推测EGF可能是幼鼠婴儿期垂体ECM中迁移引起ECM结构变化和垂体组织重构过程的细胞调节者。在胚胎间叶细胞样组织中,生长因子能刺激和诱导细胞增殖,引起两种细胞培养体系的促有丝分裂响应,改变了细胞形态,刺激了位于细胞增殖活跃区的FN大量的沉积,调节了ECM的结构的重建^[28]。

TGF- β 发挥作用时能诱导ECM中的黏接分子的分泌和合成及这些分子的整联蛋白受体在细胞表面的表达,以引起ECM的重构,而重构的信号路径目前还不很清晰。在人克隆上皮衍生癌症细胞,认为TGF- β 引起ECM结构变化具有蛋白激酶C α 依赖性^[29]。Wang等人^[30]的研究认为,IGF-1可能是通过与白介素-1受体 的共同作用来调节软骨ECM在体内的稳定。ECM重构的功能意义在于,如TGF- β 诱导ECM重构可促进ECM中的FN, LN与细胞表面整联蛋白受体的相互作用来激活信号传导机制^[29],对于ECM重构的各种具体功能正在不断地揭示。

() 生长因子对ECM分子基因表达的调节作用。生长因子在各种生理状态或病态中,对ECM分子的基因表达具有调节作用。在TGF- β 诱导的鼠皮肤纤维化模型中结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)可促使Pro α 2()胶原基因的持续表达^[31]。其他学者在总结相关调节作用时认为,TGF- β 主要通过刺激胶原基因的启动子来转录基因,提高相应胶原的m-RNA的水平,并通过特定的细胞结构翻译成蛋白质进而提高胶原蛋白的量^[32]。Shanker等人^[33]研究认为,用TGF- β 1 处理过的肺部动脉内皮细胞可提高富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白和FN的m-RNA的稳态水平,通过将^{[3]H}胸苷注入到细胞核中测量DNA的复制的方法可探求TGF- β 1 对细胞增殖的影响,在TGF- β 1 存在的情况下,富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白的水平下降,而FN和 型胶原蛋白的量却有所增加,这对于组织再造及创伤部位愈合非常重要。HGF也可提高肾小球细胞ECM中的FN和胶原 α 1()的m-RNA的水平,并随胶原 α 1()基因转录活性的浓度依赖性增加而增加,若将HGF缓慢释放则可修复

肾的某些功能^[34]。

然而生长因子诱导ECM组分的过度表达同时也会产生负面影响,如TGF- β 能刺激胶原和FN的mRNA的表达与合成,其过度表达则会诱导创伤愈合的纤维化。对于不同种生长因子对ECM分子基因表达的调节作用及可能带来的正负双重影响,需要在研究中不断地探索、验证和总结,且生长因子对ECM分子基因表达的调节作用为利用基因手段制备适宜的生长因子控释载体提供新的可能性途径。

2.3 ECM, 生长因子的协同与拮抗作用

() ECM与生长因子之间的协同与拮抗作用。生长因子与ECM共同对各种细胞增殖和功能进行调节的研究非常广泛。研究认为,ECM分子对生长因子功能的影响可能主要表现为ECM分子对生长因子的协同作用或拮抗作用,且两者的相互作用可能是认识各种病理、生理状态及创伤愈合过程的关键。

目前的研究主要在揭示不同细胞中ECM组分与特定生长因子之间具体地协同与拮抗作用。Bottazzi等人^[35]研究认为,促有丝分裂的生长因子难以独自诱导细胞周期蛋白依赖性激酶的活性,需要生长因子与ECM的共同作用才可激活而刺激细胞的增殖和分化。属EGF家族的肝素结合表皮生长因子在细胞增殖过程中能与肝细胞衍生ECM协同作用而刺激K12细胞和KM12SM细胞的增殖^[36]。在创伤愈合过程中, β -聚糖通过某种机制可促进TGF- β 跟受体的结合,而另一种ECM分子相反核心蛋白聚糖与TGF- β 结合后可竞争性抑制TGF- β 与受体的结合,两者对TGF- β 的作用发挥进行平衡调节。Thompson等人^[37]通过研究也认为生长因子和ECM是平滑肌细胞迁移和增殖的共同调节者。

ECM与生长因子之间的协同与拮抗作用对维持细胞正常行为和平衡体内综合状态具有重要的作用,对于其中可能性产生机制的阐明需进一步研究。生长因子控制释放载体研究的目标便是寻求与生长因子可产生协同效应的载体,对生长因子进行有效控制释放,以达到组织再生和修复的目的。

() 生长因子之间的协同作用与拮抗作用。生长因子间的协同作用与拮抗作用在调节细胞的行为,维持体内状态的平衡同样发挥着重要作用。在研究炎症细胞中生长因子与ECM相互作用时发现,干扰素 γ 无论在有无血清加入的介质里均可抑制鼠脑皮层星型细胞的增殖,而bFGF则可诱导星型细胞的增殖;

同时, 干扰素 γ 可减少ECM中FN, LN及生腱蛋白的水平, bFGF却可诱导生腱蛋白的合成, 且干扰素 γ 可通过抑制bFGF对细胞增殖和蛋白的诱导作用, 达到对星型细胞合成ECM的水平进行综合调节^[38]. 在病态条件下, 鼠VEGF及胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)之间存在特异地协同作用, 因为PLGF的不足可削弱细胞对VEGF却不足以削弱对bFGF或组胺的响应, 且PLGF能激活VEGF受体-1 (VEGFR-1), 认为VEGFR-1的抗体和Src激酶抑制剂可阻断内皮对PLGF或VEGF/PLGF产生响应, 通过调节PLGF和VEGFR-1的信号类型, 则可增强许多病态条件下内皮细胞对VEGF的响应^[39].

VEGF可促进内皮细胞的生长、迁移及存活, 而PDGF-BB可通过征集近位内皮细胞调控血管的稳定作用和成熟, Richardson等人^[40]将VEGF和含有PDGF-BB的聚乳酸粒子混合后再与聚丙交酯-乙交酯多孔支架复合, VEGF会在支架植入体内数天或数周内迅速释放, 而PDGF-BB地释放相对较慢, 两种生长因子在不同时期释放可达到以自然方式构筑新的血管, 实现单个生长因子无法达到的理想效果. 研究中还运用可降解的聚反丁烯二酸乙二醇酯水凝胶对TGF- β_1 和IGF-1进行控制释放用于软骨组织工程^[41], 及利用海藻酸盐水凝胶对骨形态发生蛋白BMP2及TGF- β_3 进行释放用于骨再生^[42], 均是在组织再生和修复过程中利用多重生长因子时间和空间上的协同作用达到治疗的目的. 开发二重及多重生长因子的智能化级联控制释放体系及新型载体已成为目前组织工程生长因子载体释放研究的重要方向.

3 生长因子作用于细胞的方式及相关信号

3.1 生长因子作用于细胞的方式

生长因子是一种化学信号分子, 一般不能直接进入细胞, 而是通过与细胞表面特异受体结合, 再经信号转换机制, 在细胞内产生第二信使或激活蛋白激酶的活性或蛋白磷酸酶的活性, 引起细胞的应答反应. 生长因子作用于细胞主要存在自分泌和旁分泌两种方式.

() 生长因子主要通过旁分泌的方式作用于靶细胞. 旁分泌的作用方式最有代表性的信号途径RPTK-ras途径, 其信号通路为: 配体 受体酪氨酸蛋白激酶 受体 鸟苷酸交换因子 Ras蛋白 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Raf MAPKK蛋白激酶 有丝分裂

原活化激酶 进入细胞核 转录因子 基因表达, 被激活的有丝分裂原活化蛋白激酶进入细胞核, 促进细胞增殖相关基因的表达. Pulkkinen等人^[43]发现, FGF及其受体在胰腺原基的生长和分化中起重要的作用, 敲除成纤维生长因子受体Fgfr2b基因的小鼠, 胰腺明显较小, 导管发育受阻. 在体外培养时, 加入外源的Fgfr2b配体, 则刺激胰腺导管细胞的增殖而抑制内分泌细胞的分化.

() 生长因子存在自分泌的方式作用于同类细胞. 自分泌作用方式是指由细胞产生的一种作用于其自身同种细胞的生长因子作用方式. 研究发现鼠动脉内皮细胞(aortic endothelial cells, AEC)分泌具有生物活性的NGF, 且炎症细胞因子白介素IL-1 β 可增加分泌量, AEC体现出对NGF受体TrkA高亲和力而对p75^{NGFR}低亲和力, 添加外源性的NGF可诱导TrkA酪氨酸激酶的快速磷酸化, 添加抗NGF的中性抗体可增加AEC在S和G2/M期及染色体亚二倍区的比例, 表明NGF可能以自分泌的作用方式调节血管内皮细胞的细胞周期, 维持血管内皮细胞的生存和功能^[44].

研究还发现, 单种生长因子可能以自分泌/旁分泌的方式作用于不同组织细胞, Mayer等人^[45]在研究VEGF-A在人小梁骨成熟间质干细胞中的表达时发现, 在骨形成过程中VEGF-A的分泌具有分化依赖性, 且VEGF-A的转录水平也有所提高, 高度表达的VEGF-A可刺激骨的矿化, 表明VEGF-A是以自分泌的方式作用于成骨细胞的分化过程, 同时间质干细胞分泌的VEGF-A可促进血管内皮细胞的萌生体现其是以旁分泌的方式作用于血管形成. 目前研究主要集中在对各种生理或病理状态条件下不同生长因子对特定组织细胞的可能性作用方式及其对细胞的增殖、分化等细胞过程的具体调节作用, 以进一步揭示生长因子的生物学作用及可能性医学应用.

3.2 生长因子作用于细胞的相关信号

许多模拟体系广泛用于研究生长因子对细胞增殖的刺激作用, Jones等人^[46]的研究表明, 细胞增殖时生长因子的作用方式有两种波动, 即“两波动”学说, 第一种是急性发作, 即信号在受到生长因子刺激后立即产生, 比如Erk路径的激活, 持续时间为30~60 min; 第二种是在受生长因子刺激后的不同时间段(8~12 h)发生, 比如细胞周期蛋白依赖性激酶的激活. “两波动”学说可以解释信号刺激与细胞周期的相关性.

生长因子相关信号的发出通常包括以下 3 个阶段: () 生长因子与跨膜受体的结合. 为响应配体结合, 受体酪氨酸蛋白激酶需形成二聚体; () 激活受体的激酶活性. 配体结合引起受体的激酶活性提高, 配体的激活涉及各种结构域包括激酶的活化环的重新结构及上叶和下叶的取向, 酪氨酸蛋白激酶在活化环中常被磷酸化而引起结构变化, 进而激活激酶; () 信号酶的征集和激活. 受体酪氨酸磷酸化的结果使其征集许多信号酶, 信号酶和激活受体间的相互作用取决于受体的酪氨酸化, 信号酶的磷酸酪氨酸结合结构域(PTB)或SH2 结构域可与配体优先结合, 以赋予相互作用的特异性, 其中酪氨酸磷酸化位点的周围氨基酸结构与连接方式是受体对特异性贡献的根本原因^[47]. 对于生长因子如何将酶信号转变为细胞响应, 及细胞如何对这些可能及适宜的响应进行选择 and 介导, 最终诱导和刺激细胞的迁移、增殖、分化或防止凋亡等问题正在不断研究.

4 生长因子控释载体的仿生化要求

设计外源性载体的最佳方法就是仿生, 即模拟细胞、ECM及生长因子之间的多重作用机理, 由生物相容性良好的生物材料制备成与天然ECM分子的结构与功能相似的载体基质对生长因子进行控制释放, 载体的仿生化要求主要从以下几方面考虑: () 载体应具有适宜的结合位点与生长因子进行复合使生长因子固定于载体上, 且在载体植入体内的过程中生长因子可稳定存在而保持活性^[48]; () 载体植入体内后应能屏蔽特异酶或其他物质对生长因子的降解, 同时载体对其特异降解作用能及时产生响应, 以便在有效时间内及时释放生长因子且发挥活性; () 生长因子、ECM之间存在协同和拮抗作用, 新型载体应能与生长因子产生协同效应, 并可实现对二重及多重生长因子的级联控制释放, 有效发挥生长因子间的协同作用, 以达到按体内自然状态促进组织再生; () 由于各种组织形成过程的复杂性, 载体应能对生长因子进行缓慢而持续的释放, 以防止生长因子爆释给细胞、组织生长带来的负面效应, 要求生长因子尽量按所需生物剂量释放以便与组织生长同步. 利用仿生化方法寻求新型控制载体是生长因子控制释放载体研究的有效途径.

5 结束语

生长因子已经广泛用于骨、皮肤、神经、软骨、

血管的组织再生研究, 而重组BMPs已经商品化, 国内制备生长因子释放载体的方法已有了相关专利, 生长因子的科学研究和医学应用显示出广阔的前景和潜力, 但同时也面临着挑战. 生长因子及 ECM之间的多重相互作用机理需更深层次探究, 生长因子如何将酶信号转变成细胞响应, 及细胞对响应如何进行选择和介导等诸多问题需要进一步研究. 组织工程生长因子控释载体研究也面临以下问题: () 由于制备和加工过程较为复杂, 适用于两重及多重生长因子智能化级联释放的载体和体系相对欠缺^[40-42]. 目前的研究停留在对双重因子的协同控制释放, 多重生长因子级联释放的载体和体系还未见报道. () 从静态转变为动态条件下研究生长因子的控制释放. 目前释放体系大多在静态实验条件下进行, 而包括骨、血管、肌肉等体内组织都处于一定的机械动态环境, 考虑机械信号及力学刺激在生长因子从载体中释放刺激组织再生和形成中的作用, 这是组织工程中生长因子释放研究急需解决的问题^[49,50]. () 载体基质可刺激特定细胞分泌生长因子, 将细胞复合到材料中植入体内可达到生长因子以生物剂量释放取得治疗效果, 这要求深入地研究载体及生长因子之间的相互作用对细胞生长过程的影响机理^[51]. () 组织工程研究的生长因子的控释载体的种类虽多, 但适用于临床应用则相对较少. 这些问题的解决将推动分子生物学、再生医学和组织工程学等多学科的共同进步和发展.

参 考 文 献

- 1 Service R F. Tissue engineers build new bone. *Science*, 2000, 289(5484): 1498~1500[DOI]
- 2 Arai K, Lee F, Miyajima A, et al. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem*, 1990, 59(1): 783~836[DOI]
- 3 Chinen N, Tanihara M, Nakagawa M, et al. Action of microparticles of heparin and alginate crosslinked gel when used as injectable artificial matrices to stabilize basic fibroblast growth factor and induce angiogenesis by controlling its release. *J Biomed Mater Res*, 2003, 67(1): 61~68[DOI]
- 4 Schmoeker H G, Weber F E, Schense J C, et al. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotech Bioeng*, 2005, 89(3): 253~262[DOI]
- 5 Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, et al. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, 2002, 23(3): 833~840[DOI]
- 6 Haller M F, Saltzman W M. Nerve growth factor delivery systems. *J Control Release*, 1998, 53(1): 1~6[DOI]

- 7 Edelman E R, Nugent M A, Karnovsky M J. Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: Vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(4): 1513~1517
- 8 Li R H, Wozhey J M. Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins. *Trends Biotech*, 2001, 19(7): 255~265 [DOI]
- 9 Nimmi M E. Polypeptide growth factors: Targeted delivery system. *Biomaterials*, 1997, 18(18): 1201~1225 [DOI]
- 10 Thierry J P, Boyer B. The junction between cytokines and cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 1992, 4(5): 782~792 [DOI]
- 11 Sozen I M D, Arici A M D. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fert Steril*, 2002, 78(1): 1~12 [DOI]
- 12 Li J, Zhang Y P, Kirsner R S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(1): 107~114 [DOI]
- 13 Sakiyama-Elbert S E, Hubbell J A. Development of fibrin derivatives for controlled release of heparin-binding growth factors. *J Control Release*, 2000, 65(3): 389~402 [DOI]
- 14 Tanihara M, Suzuki Y, Yamamoto E, et al. Sustained release of basic fibroblast growth factor and angiogenesis in a novel covalently crosslinked gel of heparin and alginate. *J Biomed Mater Res*, 2001, 56(2): 216~221 [DOI]
- 15 Yamada Y, Kleinman H K. Functional domains of cell adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 1992, 4(5): 819~823 [DOI]
- 16 Lopez-Casillas C F, Payne H M, Andres J L, et al. Betaglycan can act as a fuel modulator of TGF- β access to signaling receptors: Mapping of ligand binding and GAC attachment sites. *J Cell Biol*, 1994, 124(4): 557~568 [DOI]
- 17 Qi W N, Scully S P. Extracellular collagen regulates expression of transforming growth factor- β 1 gene. *J Orthop Res*, 2000, 18(6): 928~932 [DOI]
- 18 Ferreira K S, Almeida S R, Ribeiro C H, et al. Modulation of proliferation, differentiation and cytokine secretion of murine B-1b cells by proteins of the extracellular matrix. *Immunol Lett*, 2003, 86(1): 15~21 [DOI]
- 19 Zvibel I, Brill S, Halpern Z, et al. Hepatocyte extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth factor receptors in human colon cancer cells. *Exp Cell Res*, 1998, 245(1): 123~131 [DOI]
- 20 Zvibel I, Halpern Z, Papa M. Extracellular matrix modulates expression of growth factors and growth factor receptors in liver-colonizing colon-cancer cell lines. *Int J Cancer*, 1998, 77(2): 295~301 [DOI]
- 21 Peluso J J, Gulati R, White B A. Hepatocyte growth factor induces rat ovarian surface epithelial cell apoptosis or mitosis depending on the extracellular matrix. *J Soc Gynecol Invest*, 1998, 5(1): 103A [DOI]
- 22 Lawrence R, Hartmann D J, Sonenshein G E. Transforming growth factor beta 1 stimulates type I collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1994, 269(13): 9603~9609
- 23 Ma C, Chegini N. Regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors in human myometrial smooth muscle cells by TGF- β 1. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(10): 950~954 [DOI]
- 24 Osada R, Ohshima H, Ishihara H Y, et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs. *J Orthop Res*, 1996, 14(5): 690~699 [DOI]
- 25 Kiristy C P, Lynch A B, Lynch S E. Role of growth factors in cutaneous wound healing: A review. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1993, 4(5): 729~760
- 26 Jester J V, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res*, 2003, 77(5): 581~592 [DOI]
- 27 González B, Solano-Agama M C, González del Pliego M, et al. Differences in cell migration of cultured pituitary cells from infantile and adult rats: participation of the extracellular matrix and epidermal growth factor. *Int J Devl Neurosci*, 2004(4), 22: 231~239 [DOI]
- 28 Armstrong M T, Armstrong P B. Growth factor modulation of the extracellular matrix. *Exp Cell Res*, 2003, 288(2): 235~245 [DOI]
- 29 Wang H M, Chakrabarty S. Requirement of protein kinase α , extracellular matrix remodeling, and cell-matrix interaction for transforming growth factor β : Regulated expression of E-Cadherin and Catenins. *J Cell Physiol*, 2001, 187(2): 188~195 [DOI]
- 30 Wang J, Elewaut D, Veys E M, et al. Insulin-like growth factor 1-induced interleukin-1 receptor II overrides the activity of interleukin-1 and controls the homeostasis of the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(5): 1281~1291 [DOI]
- 31 Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, et al. Connective tissue growth factor causes persistent pro α 2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor- β in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*, 2005, 203(2): 447~456 [DOI]
- 32 Uitto J, Kouba D. Cytokine modulation of extracellular matrix gene expression: Relevance to fibrotic skin diseases. *J Dermatol Sci*, 2000, 24(1): 60~69 [DOI]
- 33 Shanker G, Olson D, Bone R, et al. Regulation of extracellular matrix proteins by transforming growth factor β 1 in cultured pulmonary endothelial cells. *Cell Biol Int*, 1999, 23(1): 61~72 [DOI]
- 34 Laping N J, Olson B A, Ho T, et al. Hepatocyte growth factor: A regulator of extracellular matrix genes in mouse mesangial Cells. *Biochem Pharm*, 2000, 59(7): 847~853 [DOI]
- 35 Bottazzi M E, Assoian R K. The extracellular matrix and mitogenic growth factors control G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Trends Cell Biol*, 1997, 7(9): 348~352 [DOI]
- 36 Zvibel I, Brill S, Halpern Z, et al. Amphiregulin and hepatocyte-derived extracellular matrix regulate proliferation and autocrine growth factor expression in colon cancer cell lines of varying liver-colonizing capability. *J Cell Biochem*, 1999, 76(2): 332~340
- 37 Thompson R, Mack C, Taylor J. Expression of an endogenous inhibitor of focal adhesion kinase in vascular smooth muscle cells is regulated by growth factors and extracellular matrix. *Cardiovasc Pathol*, 2004, 13(3): S17~S79
- 38 Diprospero N A, Meiners S, Geller H M. Inflammatory cytokines interact to modulate extracellular matrix and astrocytic support of neurite outgrowth. *Exp Neurol*, 1997, 148(2): 628~639 [DOI]
- 39 Carmeliet P, Moons L, Luttun A, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contrib-

- utes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 2001, 7(5): 575~583[DOI]
- 40 Richardson T P, Peter M C, Ennett A B, et al. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotech*, 2001, 19(11): 1029~1034[DOI]
- 41 Simmons C A, Alsborg E, Hsiong S, et al. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance *in vivo* bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone*, 2004, 35(2): 562~569[DOI]
- 42 Holland T A, Tabata Y, Mikos A G. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Control Release*, 2005, 101(1-3): 111~125[DOI]
- 43 Pulkkinen M A, Bradley S D, Dickson C, et al. The β isoform of fibroblast growth factor receptor 2 is required for proper growth and branching of pancreatic ductal epithelium but not for differentiation of exocrine or endocrine cells. *Mech Dev*, 2003, 120(2): 167~175[DOI]
- 44 Tanaka A, Wakita U, Kambe N, et al. An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(4): 1009~1014[DOI]
- 45 Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation. *J Cell Biochem*, 2005, 95(4): 827~839 [DOI]
- 46 Jones S M, Kazlauskas A. Growth-factor-dependent mitogenesis requires two distinct phases of signaling. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(2): 165~172[DOI]
- 47 Jones S M, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *Chem Rev*, 2001, 101(8): 2413~2423[DOI]
- 48 Zisch A H, Lutolf M P, Hubbell J A. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc Pathol*, 2003, 12(6): 295~310[DOI]
- 49 Wakatsuki T, Elson E L. Reciprocal interactions between cells and extracellular matrix during remodeling of tissue constructs. *Biophys Chem*, 2003, 100(1-3): 593~605[DOI]
- 50 Lee K Y, Peters M C, Anderson K W, et al. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature*, 2000, 408(6815): 998~1000[DOI]
- 51 Keshaw H, Forbes A, Day R M. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. *Biomaterials*, 2005, 26(19): 4171~4179[DOI]

(2005-09-10 收稿, 2005-12-29 接受)