

一  
三  
级  
博  
士  
研  
究  
生  
学  
位  
论  
文

王  
宇

长  
春  
应  
用  
化  
学  
研  
究  
所



密级:\_\_\_\_\_



**中国科学院大学**  
University of Chinese Academy of Sciences

## 博士学位论文

特异结合重组人生长因子的设计、制备及生物医学应用

作者姓名:\_\_\_\_\_ 王 宇 \_\_\_\_\_

指导教师:\_\_\_\_\_ 危岩 教授 \_\_\_\_\_ 章培标 研究员 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ 中国科学院长春应用化学研究所 \_\_\_\_\_

学位类别:\_\_\_\_\_ 理学博士 \_\_\_\_\_

学科专业:\_\_\_\_\_ 高分子化学与物理 \_\_\_\_\_

研究所:\_\_\_\_\_ 中国科学院长春应用化学研究所 \_\_\_\_\_

2017年3月



**Design and Preparation of Specific Binding Recombinant**  
**Human Growth Factors and Their Application in**  
**Biological Medicine**

**By**  
**WANG Yu**

**A Dissertation Submitted to**

**The University of Chinese Academy of Sciences**

**In partial fulfillment of the requirement**

**For the degree of**

**Doctor of Natural Science**

**Changchun Institute of Applied Chemistry,**

**Chinese Academy of Sciences**

**March, 2017**









## 致谢

四年的博士生生活一晃而过，回首走过的岁月，心中倍感充实，论文即将完成之日，感慨良多。首先诚挚的感谢我的导师危岩教授、章培标研究员。从论文的设计到论文的定稿过程中，自始至终都倾注着先生的心血。先生以严谨的治学之道、宽厚仁慈的胸怀、积极乐观的生活态度，为我树立了一辈子学习的典范，他们的教诲与鞭策将激励我在科学和教育的道路上励精图治，开拓创新。

感谢中国科学院长春应用化学研究所生态高分子实验室再生医学课题组全体同仁们，可以说没有他们，就没有我今天的论文。感谢高分子重点实验室柳时老师，为我实验过程中使用的荧光成像仪提供的便利；感谢吉林大学第一医院的张宁博士、吉林大学第二医院的付川硕士为我的动物实验提供了无私的帮助，是他们在酷暑炎阳天下帮我做一整天一整天的实验，在我有困难的时候总是提供无私的帮助。感谢实验室王忠良老师、史新翠老师、郭敏博士和黄晶博士在仪器的使用、实验的安排、实验条件的准备上给我提供的帮助、鼓励我、为我分担各种困难。感谢实验室武振旭硕士、陈丽硕士为我的实验提供的无私帮助。在此，我不能一一的列举他们的名字来表达我的感激之情，感谢他们四年多来给我提供的帮助和关心，与他们在一起的日子开心而充实，他们将是我记忆里最美的风景。在此，我还要郑重感谢我的“饭友”同志们，焦自学、李林龙、朱宇航，他们给我单调枯燥的科研生活增添了绚丽的色彩，在我实验最困难最需要的时候，他们总是第一时间放下自己的工作无私的为我做一切，在我心情低落时为我分忧，在我信心不足时给我打气，从生活的点点滴滴中给我帮助、给我鼓励，难忘我们在一起时的欢乐和搞笑，一路笑声洒落在去食堂的路上。

我要郑重地感谢我的博士导师，清华大学化学学院危岩教授，虽然危岩教授在北京不能够天天与他朝夕相处，但是在我的心目中好像时时能感受到在他的指导之下，多次的学术上的指导为我化解了碰到难题，而他总是会耐心认真的以他博学的知识为我解答，从我论文的初始思路到实验的实施再到实验数据的分析，每一步都有危岩老师精深的思想在里面，我感谢我的恩师。

感谢我的第二指导教师中国科学院长春应用化学研究所的章培标研究员。我作为学生和职工的双重身份，章老师在日常的学习和工作中给了我无微不至的指



导和关心。在工作分配上也给与极大的照顾和帮助，使得我能够有更多的时间投身于博士研究的工作中。在研究领域内，投入了大量的财力和人力购置了重组蛋白表达和纯化相关的仪器和设备，并配备了多名研究生从事本方向的研究工作。为本博士论文的完成提供了重要的支持和帮助。

感谢我的同学，中国科学院长春应用化学研究所的崔海涛博士，他总是任劳任怨的帮助我解决实验中遇到的困难。利用我们之间的专业互补优势，我们互相帮助，一起探讨实验中遇到的困难。虽然他已经出国深造两年了，但是他的音容笑貌仿佛时时在我耳边和眼前重现。

我要感谢我的哥哥，没有他的帮助、体谅、包容和支持，相信这四年的博士生生活将是很不一样的光景。在我完成博士论文的时候，我的哥哥北京理工大学教授王丰博士为本论文中蛋白质结构和功能的预测、以及蛋白质表达和纯化的研究中帮我理清思路，寻找突破，耐心的一遍遍听我讲我的论文。

最后，谨以此文献给我挚爱的双亲，他们在背后的默默支持是我前进的动力，虽然我的母亲已经永远的离开了我，但是她对我的教诲永远也不会忘记，我将铭记父母的嘱托，在今后的工作和生活中积极、向上、努力、拼搏。做一个对国家、社会有用的科研人员。

王宇

2017年3月于长春应化所



## 特异结合重组人生长因子的设计、制备及生物学应用

王宇（高分子化学与物理）

指导老师：危岩 教授，章培标 研究员

### 摘要

近年来，由于各种疾病、意外事故等因素导致的各种组织和器官损伤的患者呈现逐年上升趋势，临床上通常需要进行自体或异体移植治疗。由于存在自体移植物缺乏和异体移植物免疫排斥等问题，需要应用生命科学与工程学的原理和技术来制备一系列组织和器官替代物，以维护和促进人体各种损伤组织和器官的修复及功能恢复，这就是组织工程所研究的内容和方向。组织工程修复损伤组织和器官所需要的三个重要因素是：种子细胞、支架、生长因子。其中，生长因子在组织工程修复中起着促进和调节细胞黏附、增殖、分化和成熟的作用，且每个阶段都需要不同种类的生长因子来促进损伤部位的再生。传统的生长因子与支架的结合方式主要有三种：共混法、吸附法和共价结合法。共混法、吸附法是通过生长因子与支架材料的静电吸附而结合在一起的，结合力相对较弱，细胞因子极容易扩散到周围组织，生物利用度较低，容易对周围或其他组织产生副作用。共价结合法是生长因子通过化学反应将氨基酸残基的侧链基团和支架材料上的活性基团共价结合的一种方式，这种结合方式虽然牢固，但存在反应条件苛刻，产率较低，生长因子易失活等缺点。

为了克服生长因子与支架材料这三种传统结合方式的缺点和不足。近年来，利用基因工程方法将具有特异结合性的结构域克隆入生长因子的末端，重组表达具有与支架材料特异结合能力的生长因子的策略应运而生。这样获得的生长因子不但具有生物学活性而且还具有与支架材料特异结合的特性。基于以上的原理，我们设计制备了一系列的具有特异结合能力的人碱性成纤维细胞生长因子（bFGF），包括能够与胶原蛋白特异结合的 C-bFGF 和 V-bFGF，和与几丁质结合的 ChtBD-bFGF。C-bFGF 的粘性末端来源于 Collagenase (TKKTLRT)，

V-bFGF 来源于 vWF (WREPSFCALS)。体外实验表明 C-bFGF、V-bFGF 和 bFGF 一样具有生物学活性, C-bFGF、V-bFGF 与胶原的结合能力要高于 bFGF。同时, 为获得与几丁质特异结合的 bFGF, 我们先利用生物信息学方法分析筛选出能够与几丁质结合的结构域 (ChtBD), 并采用计算机软件分析预测了 ChtBD 和几丁质之间可能存在的特异结合能力。利用基因工程重组技术将 ChtBD 克隆入 bFGF 的 N 端, 在大肠杆菌中原核表达 ChtBD-bFGF。体外实验结果表明, ChtBD-bFGF 与几丁质膜的结合能力是 bFGF 的 11.4 倍, 并且具有与 bFGF 相同的生物学活性, 能够明显促进成纤维细胞增殖。生长在结合有 ChtBD-bFGF 几丁质膜 (ChtBD-bFGF@chitin) 上的细胞数量显著地高于 bFGF 几丁质膜组 (bFGF@chitin) 和几丁质膜组 (chitin)。体内实验结果表明, 相对于其它实验组, ChtBD-bFGF@chitin 能够有效地促进体内植入位置周围组织的血管化, 加快兔耳创伤部位表皮的重建速度。综上所述, 我们利用基因工程重组技术制备了具有胶原结合能力的 C-bFGF 和 V-bFGF, 并且首次制备了具有几丁质结合能力的 ChtBD-bFGF。携带 ChtBD-bFGF 的几丁质膜在动物实验中表现出优异的促血管生成和促进创伤修复的能力, 因此是一种潜在的新型生物活性创伤修复敷料。

**关键词:** 重组生长因子; 生物高分子; 特异结合性; 组织工程; 创伤修复;

---

## **Design and Preparation of Specific Binding Recombinant Human Growth Factors and their Application in Biological Medicine**

WANG Yu (Polymer Chemistry and Physics)

Directed by Professor Wei Yen and Professor Zhang Peibiao

### **Abstract**

In recent years, due to a variety of diseases, accidents, and other factors have contributed to the various tissue and organ damage in patients with rising trends. Autologous or allogeneic transplantation usually are required in clinical treatment. In order to repair, maintain and promote human tissue and organ function recovery after injury, require the application of life sciences and engineering principles and techniques to prepare a series of substitutes for damaged tissue and organs, this is the content and direction of the study of tissue engineering. Tissue engineering in repairing damaged tissues and organs need are three important factors: seed cells, scaffolds and growth factors. Growth factor plays an important role in promoting cell adhesion, proliferation, differentiation, and maturation. In regeneration process, each stage needs different kinds of growth factors to promote the regeneration of damaged tissues and organs. There are three main methods of the traditional combination of growth factors and scaffolds: blending method, adsorption, covalent method. In blending and adsorption methods, growth factors are combined with scaffolds by electrostatic adsorption, which methods have many disadvantages, such as relatively weak adhesion, growth factors tend to spread to the surrounding tissues, low bioavailability, side effects on the surrounding tissue. In covalent methods, growth factors combined with scaffolds by chemical reaction of the side chain groups on the amino acid residues and scaffolds, although this combination has high bonding strength, but the reaction conditions are harmful for growth factors, the yield rate is very low, costs are expensive.

In order to overcome disadvantages of the traditional ways, the expression of growth factors with the ability of binding to scaffolds has been widely developed in

recent years. The amino acid sequence containing different binding domains were cloned into the terminal of growth factors and the recombinant proteins were expressed and purified. The recombinant proteins containing binding domains not only have biological activities, but also have the abilities of binding to different scaffolds. Based on the above technology, we constructed several growth factors with special ability binding to different materials. These binding growth factors included collagen binding bFGFs (C-bFGF and V-bFGF). C-bFGF and V-bFGF derived from collagenase (TKKTLRT) and vWF (WREPSFCALS). C-bFGF and V-bFGF had the same bioactivity with bFGF. The binding ability with collagen of C-bFGF and V-bFGF was higher than bFGF. We found out a chitin binding domain (ChtBD) by bioinformatics analysis. ChtBD was cloned into the N terminal of bFGF (ChtBD-bFGF) and expressed in *E. coli*. We found out that ChtBD-bFGF has the same ability on promoting cell proliferation with bFGF *in vitro*. The binding ability of ChtBD-bFGF with chitin is about 11.4 folds of bFGF. The cell number of fibroblasts growing on the ChtBD-bFGF@chitin is greatly higher than bFGF@chitin and chitin. In subcutaneous implantation experiments, the surrounding tissue of ChtBD-bFGF@chitin was obviously vascularized than bFGF@chitin and chitin groups. In rabbit ears wound model, ChtBD-bFGF@chitin as a kind of wound dressing can promote the reconstruction of wound. In summary, we use bioinformatic analysis, the technology of genetic engineering constructed and expressed ChtBD-bFGF, ChtBD-bFGF@chitin show excellent ability in wound healing, is a potential wound healing dressings with bioactivity.

**Keywords:** recombinant growth factor; biopolymer; specific binding ability; tissue engineering; wound healing;



## 目录

致谢.....	I
摘要.....	V
<b>Abstract</b> .....	VII
第一章 绪论.....	1
1.1 生长因子.....	1
1.1.1 生长因子概述.....	1
1.1.2 作用方式.....	1
1.2 生长因子与支架材料的结合方式.....	3
1.2.1 吸附法.....	3
1.2.2 共混法.....	4
1.2.3 光化学固定法.....	4
1.2.4 共价键结合.....	5
1.2.5 特异结合法.....	7
1.3 与创伤修复相关的生长因子.....	12
1.3.1 TGF- $\beta$ 在创伤修复中的生物学作用.....	13
1.3.2 bFGF 在创伤修复中的生物学作用.....	15
1.3.3 VEGF 在创伤修复中的生物学作用.....	16
1.3.4 BMPs 在创伤修复中的生物学作用.....	16
1.4 创伤修复敷料中常用的材料.....	16
1.4.1 胶原蛋白在创伤修复中的应用.....	17
1.4.2 几丁质和其衍生物在创伤修复中的应用.....	18
1.5 特异结合生长因子应用于创伤修复.....	18
1.6 本文的选题目的和主要的研究内容.....	20
第二章 具有胶原特异结合性的 bFGF 表达、纯化和鉴定.....	22
2.1 引言.....	22
2.2 实验部分.....	22
2.2.1 原料和试剂.....	22

---

2.2.2 主要器材和设备 .....	23
2.2.3 C-bFGF 和 V-bFGF 基因载体的构建 .....	24
2.2.4 重组蛋白 C-bFGF 和 V-bFGF 在大肠杆菌中的表达与纯化 .....	26
2.2.5 C-bFGF 和 V-bFGF 生物学活性表征 .....	27
2.2.6 C-bFGF 和 V-bFGF 与胶原特异结合能力表征 .....	28
2.3 结果与讨论 .....	28
2.3.1 C-bFGF 和 V-bFGF 基因载体的构建 .....	28
2.3.2 C-bFGF 和 V-bFGF 重组蛋白的表达和纯化 .....	29
2.3.3 C-bFGF 和 V-bFGF 重组蛋白 Western-blot 检测 .....	32
2.3.4 C-bFGF 和 V-bFGF 生物学活性检测 .....	33
2.3.5 C-bFGF 和 V-bFGF 与胶原蛋白的特异结合能力 .....	33
2.4 本章小结 .....	35
第三章 具有与几丁质特异结合性的结构域筛选及其与 bFGF 融合表达和纯化 ...	36
3.1 引言 .....	36
3.2 实验部分 .....	36
3.2.1 原料和试剂 .....	36
3.2.2 主要器材和设备 .....	38
3.2.3 几丁质结合结构域 (ChtBD) 筛选和分析 .....	38
3.2.4 ChtBD、bFGF 和几丁质复合物结合位点预测 .....	40
3.2.5 表达 ChtBD-bFGF 和 bFGF 基因载体的构建 .....	40
3.2.6 重组蛋白 ChtBD-bFGF 和 bFGF 在大肠杆菌中的表达与纯化 .....	44
3.2.7 重组蛋白 ChtBD/bFGF 和 bFGF Western-blot 检测 .....	46
3.2.8 重组蛋白 ChtBD/bFGF 和 bFGF 圆二色光谱(CDS) .....	47
3.2.9 ChtBD-bFGF 和 bFGF 生物学活性检测 .....	47
3.3 结果与讨论 .....	48
3.3.1 筛选几丁质结合结构域 .....	48
3.3.2 ChtBD-bFGF 与几丁质相互作用计算机模拟 .....	50
3.3.3 PET21b/ChtBD-bFGF 和 PET21b/bFGF 基因载体的构建 .....	54
3.3.4 ChtBD-bFGF 和 bFGF 重组蛋白的表达和纯化 .....	54

---

3.3.5 ChtBD-bFGF 和 bFGF 重组蛋白 Western-blot 检测 .....	56
3.3.6 ChtBD-bFGF 和 bFGF 重组蛋白圆二色谱 (CD) 检测.....	57
3.3.7 ChtBD-bFGF 和 bFGF 生物学活性检测 .....	59
3.4 本章小结 .....	59
第四章 ChtBD-bFGF 与几丁质膜的特异结合性及在创伤修复中应用.....	60
4.1 引言 .....	60
4.2 实验部分 .....	60
4.2.1 原料和试剂 .....	60
4.2.2 主要器材和设备 .....	61
4.2.3 几丁质膜的制备 .....	62
4.2.4 ChtBD-bFGF 和 bFGF 与几丁质膜绑定能力的检测 .....	62
4.2.5 几丁质膜摄取 ChtBD-bFGF 和 bFGF 的能力 .....	63
4.2.6 ChtBD-bFGF@Chitin film 和 bFGF@Chitin film 的缓释能力 .....	63
4.2.7 BALB/C 在 ChtBD-bFGF@Chitin film 和 bFGF@Chitin film 增殖能力 ..	63
4.2.8 生长在 ChtBD-bFGF@Chitin film 和 bFGF@Chitin film 的 BALB/C 细胞 周期的影响 .....	64
4.2.9 体内评价 ChtBD-bFGF@Chitin film 和 bFGF@Chitin film 血管化能力 ..	64
4.3 结果与讨论 .....	66
4.3.1 几丁质膜的表征 .....	66
4.3.2 几丁质膜的固相核磁、XRD 和亲水性 .....	67
4.3.3 ChtBD-bFGF 和 bFGF 与几丁质膜结合能力 .....	69
4.3.4 几丁质膜摄取 ChtBD-bFGF 和 bFGF 的能力 .....	70
4.3.5 ChtBD-bFGF 和 bFGF 从几丁质膜上的缓释能力 .....	71
4.3.6 细胞在 ChtBD-bFGF@Chitin film 和 bFGF@Chitin film 上的增殖能力 ..	71
4.3.7 BALB/C 细胞周期 .....	74
4.3.8 ChtBD-bFGF@chitin film 和 bFGF@chitin bFGF 大鼠皮下包埋 .....	74
4.3.9 兔耳创伤模型修复 .....	77
4.4 本章小结 .....	80
第五章 全文总结和展望.....	84

---

参考文献.....	86
附录.....	106
个人简历.....	110
在读期间取得的研究成果.....	111

## 第一章 绪论

### 1.1 生长因子

#### 1.1.1 生长因子概述

生长因子作为细胞间的信号分子参与调控着各种各样类型的细胞过程。生长因子能够促进细胞的增殖、分化和成熟。因此，生长因子在组织工程修复和再生医学领域中起着至关重要的作用[1]。然而大多数生长因子在体内以扩散方式发挥作用，这种作用方式在组织环境中极其不稳定。延长生长因子在体内的驻留时间被认为是一个长效维持生长因子生物学功能的最佳策略。因此，许多研究人员开展了有关提高生长因子活性和稳定性的研究。这些研究工作主要关注于如何将生长因子固定于细胞、组织工程支架材料表面上。

#### 1.1.2 作用方式

为了能够更好的了解生长因子是如何在组织工程、再生医学和细胞培养系统中发挥作用。我们首先要了解生长因子在体内的作用机制。如图 1.1 所示，概述了生长因子在细胞内的作用方式：（1）扩散作用：内分泌、旁泌性、自分泌、胞内分泌（2）非扩散作用：近泌性、局部分泌。

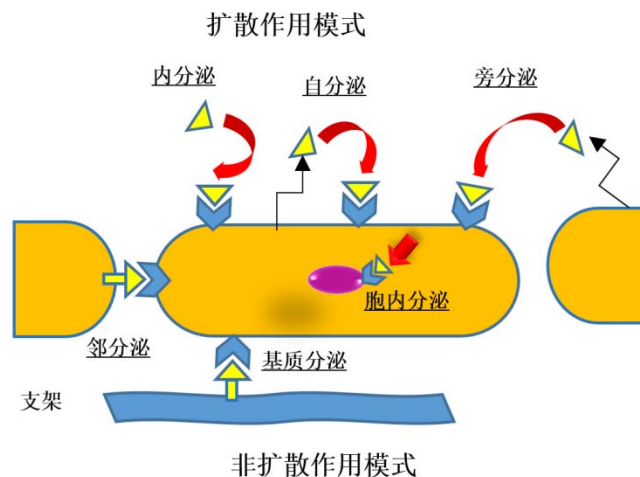


图1.1 生长因子的作用方式

大多数的生长因子以扩散作用模式来和其他细胞表面的受体结合，然后形成一个复合物。生长因子与细胞表面受体结合诱导受体磷酸化，然后再级联促发细胞

内的信号转导通路。这些复合物被细胞内吞，部分被细胞内溶酶体降解，部分循环回到细胞膜表面。因此这种生长因子/受体复合物的内吞作用使得细胞被钝化。这种细胞的钝化作用会降低细胞对生长因子的反应。与之相反，一些生长因子以非扩散作用方式发挥其作用，这些非扩散作用的生长因子被固定在细胞的表面或者一些特殊的基质表面，例如细胞外基质。早在 1990 年，细胞膜结合生长因子的发现阐述了生长因子非扩散作用机制，其中包括 heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ )、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、colony stimulating factor 1 (CSF1)[2, 3]。这些生长因子与细胞表面受体结合后也不会被细胞内吞，而是展示一个长期的不会下调的刺激细胞的生物学活性。生长因子的非扩散作用方式为我们设计制备具有特殊生物学活性的结合生长因子奠定了理论基础。生长因子是影响损伤组织和器官修复的重要因素之一(图 1.2)。在组织工程修复中，生长因子与支架材料结合能够使损伤组织得到有效的重建。目前，为了增强大多数以扩散方式作用的生长因子在体内的稳定性和长效性，主要有两种获得特异结合生长因子的方法(如图 1.3)：(1) 基于近年来蓬勃发展的基因重组表达技术，将含有与特异基质结合能力的结构域和生长因子融合表达；(2) 利用连接酶将特异结合结构域和生长因子体外连接，这个方法能够将多肽、核苷酸、寡糖等多种分子偶联到生长因子上作为特异结合识别分子。

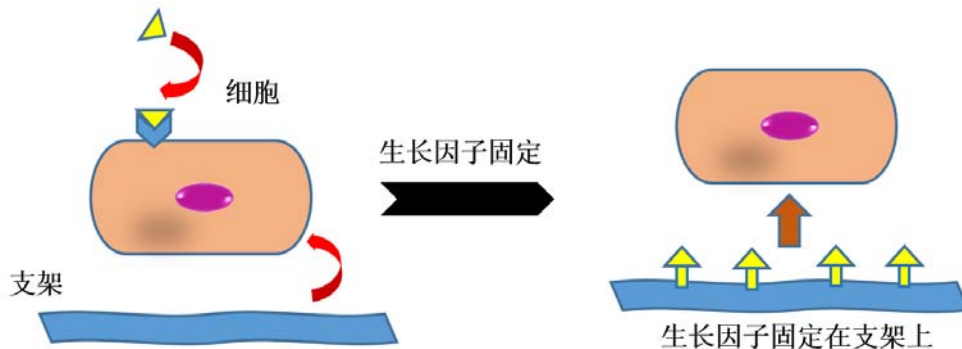


图1.2 特异结合生长因子在组织工程修复中的作用机制

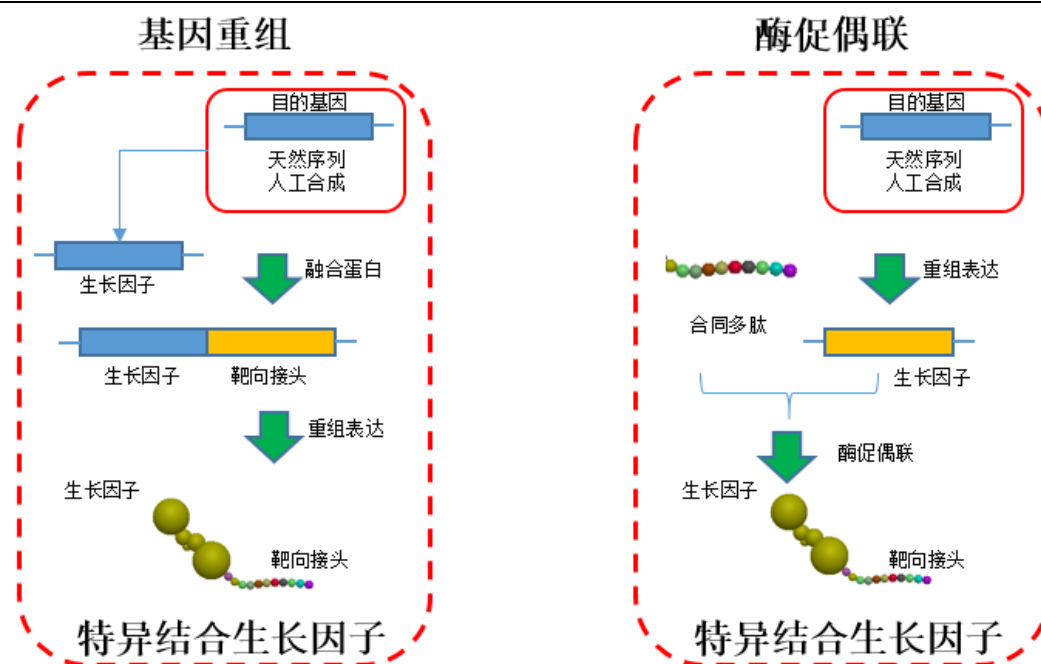


图1.3重组蛋白表达技术和酶促偶联技术制备特异结合生长因子

## 1.2 生长因子与支架材料的结合方式

### 1.2.1 吸附法

吸附法是最经典的将生长因子与材料相结合的方法。我们知道，某些特定分子本身就具有与机体组织细胞或某些修复支架材料进行非特异性结合的能力，这种结合力主要来源于静电吸附和分子间氢键等。该方法由于其成熟的理论依据和简便的操作方法而广泛用于相关研究当中。但是，由于这种非特异性的结合力并不稳定，所以生长因子与骨组织工程支架材料之间无法达到理想的结合效果，导致生长因子释放速度过快。也有学者尝试利用表面改性的方法，增强生长因子与材料之间的非特异性结合力，这其中，利用 dopamine 进行表面改性的研究是近年来比较热门的方向。利用 L-dopamine 进行材料表面改性来固定生物活性蛋白最初起源于对于贻贝足丝蛋白的研究。在变幻无常的海洋生态环境中，贻贝为了保护自身不受海浪冲击的影响，会经由其足腺细胞分泌足丝，从而将自己牢牢固定于岸礁或船体上。相关学者通过长期的研究发现，贻贝足丝中富含多种蛋白质成分，这些蛋白或多或少的都对固体表面具有黏附性。进一步研究则表明，这种黏附性主要来源于足丝蛋白中的 3,4-二羟基苯丙氨酸(L-DOPA)成分[4, 5]。对于 dopamine 与材料之间的结合原理，学术界尚无定论，普遍为大家所接受的解释是，dopamine

对于不同的基底材料进行黏附的机理不同的。既有某些活性基团如氨基、硫醇基的共价化合方式，又有儿茶酚基与金属及其氧化物的螯合方式。但无论哪种结合方式，都可以在 dopamine 与基底材料表面形成稳固的结合力[6]。Dopamine 在碱性环境下可自聚合成聚多巴胺（polydopamine），结合于材料表面的 polydopamine 具有大量吸附包括生长因子在内的活性蛋白的能力[6]。利用这一原理，台湾国立大学化学工程学院的 Chih-Yuan Chien 和 Wei-Bor Tsai 在 polydopamine 改性的钛金属基底表面同时吸附了 RGD、纳米羟基磷灰石和 BMP-2，这种改性后的钛金属支架有效促进了骨髓干细胞向成骨细胞的分化[7]。延世大学生物技术学院的 Eunkyung Ko 则尝试用 polydopamine 改性后的 PLGA 支架吸附 BMP-2 用于小鼠颅骨缺损修复的研究，同样取得了良好的成骨修复效果[8]。

### 1.2.2 共混法

共混法也是一种较常用的制备复合型生物支架的方法，由于生长因子多为可溶性蛋白，因此多采用溶液共混和胶乳共混的方法。根据塔夫兹大学 (Tafts University) 生物工程技术中心与仁荷大学 (Inha University) 高分子科学与工程学院的共同研究，用萃取得来的聚氧乙烯 (PEO) 溶液与蚕丝蛋白丝素 (SF) 溶液共混，再加入均匀分散的纳米羟基磷灰石 (nHAP) 悬浮液，经超声振荡与搅拌处理后制的配比固定的 SF/PEO/nHAP 悬浮液。然后在悬浮液中混入适量 BMP-2 后制成含有 BMP-2 的 SF/PEO/nHAP 静电纺丝液。最后利用静电纺丝的方法制成目的支架材料，并对这种支架材料进行了体外细胞增殖和体外矿化能力的评价。结果显示该种复合支架对 NIH 3T3 成纤维细胞的体外增殖有促进作用。同时，通过对体外矿化 31 天的支架进行 XRD 检测，也可以看到支架材料上有显著的磷酸钙晶体沉积，表明这种支架具有一定的促成骨能力[9]。由于共混后的支架中，生长因子同时存在于支架表面与支架内部，因此对于生长因子的控制与释放有一定的作用。但是，由于生长因子蛋白对于共混条件的要求比较严格，高温、强酸强碱、溶剂等条件都会对生长因子的活性产生较大的影响，这也就缩小了能够与生长因子进行共混的支架材料的选择范围。

### 1.2.3 光化学固定法

所谓的光化学固定法，是指以光化学偶联剂为中介，利用紫外光或可见光引发相关反应，从而达到将特定分子固定于材料表面的一种改性方法。光化学固定法



具有反应迅速、结合稳定、操作简便等优点，因此广泛的应用于各种复合型生物材料的表面改性研究。对于生长因子与高分子材料的光化学偶联，来自 RIKEN 的 Ito 的团队进行了很多研究，如以合成的对叠氮基苯基琥珀酸酰胺为偶联剂，通过化学制备具有光化学反应活性的光活性聚丙烯胺 (AzPhPAAm)，再利用其支链上的氨基与表皮生长因子末端的羧基进行缩合，制备具有光活性的表皮细胞生长因子 (AzPhPAAmEGF)。这种具有光化学反应活性的表皮细胞生长因子在 280nm 波长的紫外光照 10s 条件下，可以与某些高分子基底发生光交联反应，从而达到在材料表面固定生长因子的目的。后期细胞实验也表明，固定于材料表面的 EGF 保持了其原有的生物活性[10]。类似的方法，也被应用于其他生物大分子如明胶、LIF、胰岛素[11-13] (图 1.4) 等在高分子材料表面的固定，为相关研究提供了一种切实可行的新思路。由于光固定中所用的光交联偶联剂多为芳香族化合物，因此在释放药物的过程中无法避免的会对机体产生一定的毒性作用，这在临床应用过程中是无法忽视的。因此，在现阶段，光化学固定法的应用仍只限于实验室研究。

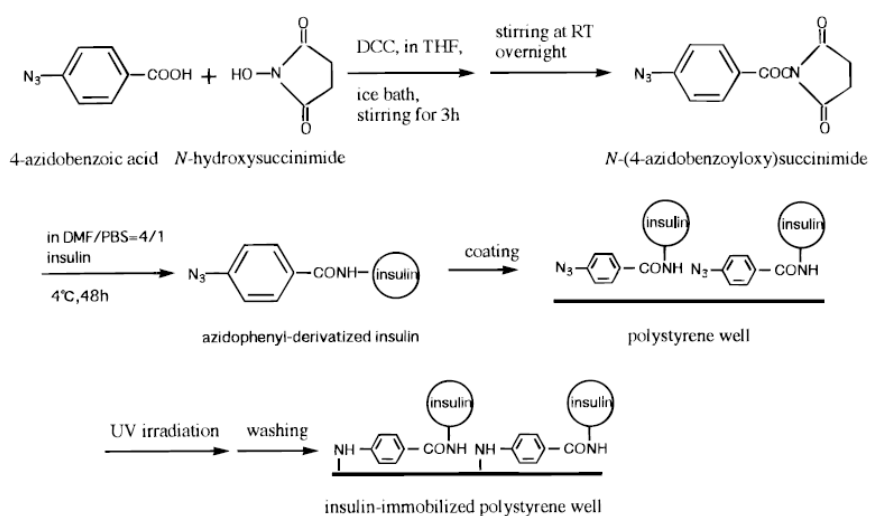


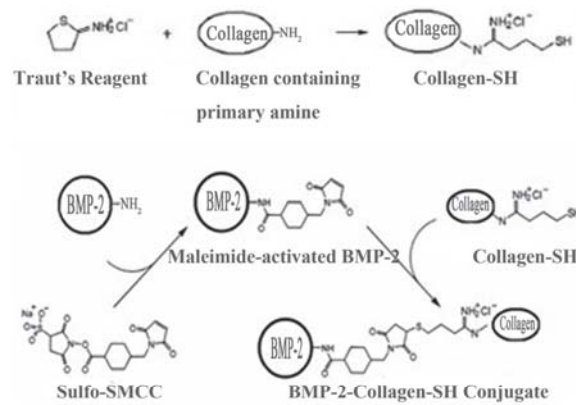
图1.4具有光化学反应活性的胰岛素合成路线以及它与高分子基底材料之间的光交联作用

#### 1.2.4 共价键结合

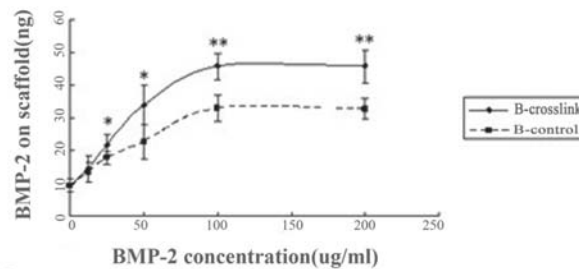
与前文所提到的分子间作用力相比，共价键所连接的两种物质之间具有更加稳固的结合力，因此在药物的控制释放方面有着极大的优势。近年来，利用共价键来增强生长因子与生物工程支架材料之间结合力的报道逐渐增多。中山大学的

Quan Zhang 利用 Traut 试剂在胶原的氨基上枝接了一个高活性巯基，同时利用 Sulfo-SMCC 与 BMP-2 上的氨基反应，制备马来酸胺活化 BMP-2。Sulfo-SMCC 是一种常用交联剂，分子结构中含有羟基琥珀酸胺酯基团和马来酸胺基团。羟基琥珀酸胺酯基团可以与巯基进行加成反应，而马来酸胺基团可以与 BMP-2 上的氨基进行缩合。经过化学改性的 BMP-2 和胶原，在 4℃ 条件下可进行交联反应。通过结合能力测试，我们可以清楚的看到，与单纯用胶原吸附纯 BMP-2 相比，经过改性的胶原支架可以吸附更多的经过改性的 BMP-2。而之后的缓释试验说明，通过共价键结合于胶原上的 BMP-2，其缓释能力也得到了显著地增强[14]。(图 1.5)。共价化合结合方式的最大缺点在于原料制备过程的复杂性，且单次制备的成本较高，很难进行大范围的推广应用。因此，接下来相关方向的研究应以简化制备过程，降低制备成本为目标。

A



B



C

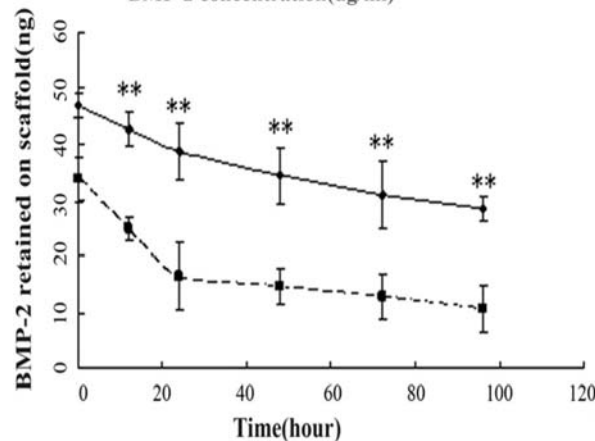


图 1.5 (A) 胶原与 BMP-2 的改性及共价结合反应路线; (B) 结合能力测试, 对照组为单纯胶原吸附纯 BMP-2; (C) 缓释试验, 对照组为单纯胶原吸附纯 BMP-2

### 1.2.5 特异结合法

基于许多的研究中报道的生物大分子与其配体间存在特异的相互作用, 选择能够特异结合相应基质材料的多肽和蛋白质序列作为靶点, 利用基因工程重组技术表达含有结合接头和生长因子的融合蛋白, 如表 1.1 所示。改造后的生长因子不但能够与生物基质材料表面结合 (如胶原蛋白、纤维蛋白等), 而且还能够与人工基质材料结合 (金属、无机材料、高分子聚合物等)。这些结合接头涵盖了天然蛋白的部分序列和一些人工合成的多肽序列。

表1.1基因工程制备的与天然材料和合成材料特异结合的生长因子

特异结合靶点	生长因子	特异结合接头	来源	
天然材料	TGF $\beta$ 1 [15, 16], EGF [17], bFGF [18], BMP3 [19]	WREPSFCALS	vWF	
	PDGF [20], bFGF[21], BMP-2[22], NGF [23], BDNF [24], EGF [25], VEGF[26], NT3[27]	TKKTLRT	人的胶原酶/ Human collagenase	
	EGF [28], bFGF[29]	CBD (20kDa)	Bacterial collagenase	
	EGF[30], HGF[31], VEGF [32]	CBD (40 or 27 kDa)	粘连蛋白 /Fibronectin	
	(纤维蛋白) Fibrin Fibrinogen	NGF [33], BMP-2[34], KGF[35], VEGF[36-38], ephrin B2 [39], IGF-I[40]	FXIIIa substrate sequence (8 or 12 amino acids)	$\alpha$ 2-plasmin inhibitor
	n	EGF [41]	FBD (11 kDa)	Fibronectin
细胞 (整)	EGF[42], bFGF [43]	Cell-binding domain (30	Fibronectin	

	合素)/		kDa)	
	Cell	EGF [44, 45]	Cell adhesive sequence	Fibronectin
	(integrin)	IGF-I [46]	Vitronectin (full size)	Vitronectin
人工材料	固体表面	EGF [47, 48], LIF [49], HGF [50]	抗体 Fc 区域	免疫球蛋白 /Immunoglobulin
		EGF[44, 45], IGFBP4[51]	Elastin-like polypeptide (人工的)	弹性蛋白 /Elastin
		IGI-1[52]	DOPA-Lys-DOPA-Lys-DOPA	人工合成
	纤维素/ Cellulose	SCF[53] (extracellular domain)	纤维素结合结构域 /Cellulose-binding domain	细菌的木聚糖酶 /Bacterial xylanase

### (1) 胶原结合生长因子

由于胶原是细胞外基质中的主要组成部分,因此它是一个再生医学中非常重要的蛋白。目前,主要有 4 种能够和胶原特异结合的接头被开发和研究:① von Willebrand factor (vWF, 10 amino acids),② bacterial collagenase (~24 kDa),③ human collagenase (eight amino acids),④ fibronectin (~40 kDa or 27 kDa)。利用重组蛋白表达技术将这些能够编码胶原结合接头的核酸序列和生长因子序列克隆在一个表达载体中进行重组蛋白的融合表达和纯化。美国南加州大学 Nimni 研究团队利用 vWF 接头融合表达了能够和胶原特异结合的 TGF $\beta$ 1、EGF、bFGF 和 BMP-3 生长因子 [15-19]。研究发现,含有胶原结合接头的 EGF、bFGF 和 BMP-3 在具有与胶原更高亲和力的同时,与原始序列的生长因子具有相同的生物学活性,胶原结合接头的引入不会影响生长因子的生物学活性。日本香川大学 Nishi 等人利用细菌胶原酶与胶原的特异亲和力的特性,表达制备了具有与胶原特异结合能力的 EGF 和 bFGF [28]。这种具有与胶原结合能力的 EGF 和 bFGF 在体内大鼠植入实验中发现能够在胶原支架和其它细胞外基质上保留一周。生长因子的这种作用方式能够持续的刺激周围细胞,对细胞的增殖、总 DNA 合成等细胞过程均具有促进和调控作用。一种来源于人的胶原酶的含有 7 个氨基酸的短肽 (TKKTLRT) 也被用

来结合胶原。含有 TKKTLRT 短肽的生长因子 BB (PDGF-BB) [20]、bFGF 15 [21]、BMP-2 [22]、nerve growth factor (NGF) [23]、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [24]、EGF [25]、VEGF (vascular endothelial growth factor) [26]和 neurotrophin-3 [27] 被融合表达和纯化。研究发现结合有胶原结合多肽 TKKTLRT 的 bFGF 比 vWF-bFGF 的胶原结合力要高。一些融合有 fibronectin CBD 的生长因子也能够与胶原特异结合, 这些生长因子包括 CBD-EGF [30], CBD-HGF (HGF = hepatocyte growth factor)[31], CBD-VEGF [32], 这种类型的生长因子能够与 I-V 型胶原特异结合。这些具有特异胶原结合能力的生长因子在体内比普通的生长因子相比具有更久的半衰期, 这些生长因子引入的 CBD 能够保护生长因子不被降解。

### (2) 纤维蛋白结合生长因子

纤维蛋白是在伤口周围大量呈现的一种蛋白。它也是广泛被用于组织工程支架研究的一种生物材料。因此, 生长因子具有纤维蛋白结合能力对于组织工程修复研究是十分有帮助的。BMP-2 [34], keratinocyte growth factor (KGF) [35], VEGF [36-38], ephrin B2 [39]和 insulin-like-growth factor-I (IGF-I) [40]都已经用基因工程的办法重组表达了具有与纤维蛋白结合能力。具有与纤维蛋白结合能力的 BMP-2 与普通的 BMP-2 一样具备促进 C3H10T1/2 细胞分泌碱性磷酸酶的能力。然而, 它在纤维蛋白胶上的滞留时间比普通的 BMP-2 高出了 60%。具有与纤维蛋白结合能力的 KGF 显示了比普通 KGF 更强的促进表皮细胞增殖的能力。一种含有 fibronectin fibrin-binding domain (FBD)的 EGF 在缺少 cross-linking enzyme (FXIIIa) 下显示了具有纤维蛋白的结合能力。FBD-EGF 适合用于纤维蛋白支架上搭载 EGF, 体外角质细胞培养模型评估了这种支架的创伤修复能力。这种含有 FBD-EGF 的纤维蛋白支架显示了比 EGF 更强的创伤修复能力。

### (3) 细胞表面结合生长因子

设计细胞结合生长因子的目的是用来结合细胞表面的分子, 如整合素、受体等。一种细胞结合结构域 (30kDa, 包括能够结合整合素的 RGD 序列) 被引入到了 EGF 和 bFGF 中, 分别被称作 C-EGF[42]、FN-FGF[43]。大鼠肾成纤维细胞和人脐带内皮细胞被用来评估 C-EGF 和 FN-FGF 的生物学活性。然而, C-EGF 和 FN-FGF 的结合效率没有被深入的研究, 这些生长因子可能在培养板上的细胞上没有获得很好的保留。为了提供细胞表面的亲和力, RGD 被引到 EGF 中来提高生长因子细胞表面的亲和力。Van Lonkhuyzen 等人制备了 vitronectin (VN)-IGF1 和

IGF-BP。将这两种具有结合能力的生长因子混合使用，混合物能够同时结合细胞表面的整合素和 IGF1 受体，通过整合素和 IGF 受体细胞信号转导路径刺激细胞。这种 VN:IGF1/IGF-BP 混合物展示了比 IGF1/IGF-BP 更强的刺激细胞增殖的能力 [46]。

#### (4) 有机材料结合生长因子

许多能够特异结合人工合成材料的生长因子已经被基因工程的方法制备和开发。东京工业大学的 Ogiwara 等人将免疫球蛋白的 Fc 区域融合表达入 EGF 生长因子中 [47]。由于免疫球蛋白的 Fc 区域疏水性使得融合有该片段的生长因子能够非特异性的结合在固相表面上 [48]，EGF-Fc 能够非常稳定的吸附在细胞培养基质的表面生长，EGF-Fc 能够与 Swiss 3T3 细胞表面的 EFG 受体结合，使得 EFG 受体磷酸化激活 mitogen-activated protein kinase (MAPK)。MARK 的激活状态能够持续 4 个小时，说明了 EGF-Fc 没有被细胞内吞而失活。Fc 片段也能够和 leukemia inhibitory factor (LIF) 特异结合 [49]。小鼠的胚胎干细胞能够在黏附有 LIF-Fc 表面上维持其未分化状态。Fc-HGF 也能够不被细胞内吞而持续的激活 Akt 信号转导 [50]。人工合成多肽序列也可以被在结合生长因子中。一个类弹性蛋白重复序列 (APGVGV)<sub>n</sub> 或 (GVGVVP)<sub>n</sub> 可以被用来结合疏水固相表面，这些多肽的疏水性可以随着温度改变而改变。当环境温度低于相转变温度时，多肽可由疏水性变为亲水性。东京工业大学 Elloumi 等人制备了含有 RGD 的类弹性蛋白与 EGF 的融合体用于增强细胞的粘附性 [44, 45]。东京工业大学的 Minato 等人融合表达了 IGF-BP4，并用此生长因子成骨的促进了胚胎细胞向心肌细胞的分化 [51]。另一方面，加拿大不列颠哥伦比亚大学 Doheny 制备了含有纤维素结合结构域的 stem cell factor (SCF) [53]，这种生长因子被牢固的结合在纤维素表面能够刺激诱导小鼠和人 SCF 依赖型细胞的增殖。

#### (5) 金属表面结合生长因子

金属钛是一种在骨关节和牙科植入领域应用十分广泛的金属生物材料。由于钛具有良好的生物相容性、优良的机械性能和抗腐蚀性，因此它十分适合临床的使用。在牙科植入领域，钛金属的植入能很好的和植入位置的骨界面相融合。然而这个金属钛和骨融合的过程需要几周时间，这使得患者的恢复和痊愈是一个漫长的过程。因此，对钛金属表面进行修饰，在金属钛表面结合生长因子就能够提高其生物相容性，缩短植入位置骨的融合时间，减少患者长时间恢复期带来的痛

苦。直接在钛金属表面进行生物学修饰是十分困难的。为了克服这个困难，使用噬菌体、核糖体展示技术来筛选能够特异和钛金属结合的多肽序列就变得十分的重要。在 1990 年左右，噬菌体展示技术被用来寻找无机材料结合多肽。这些无机材料包括 BaTiO<sub>3</sub>、SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>, aluminum, steel, semiconductors, platinum, silver 和 hydroxyapatite [54-68]。能够与金属和无机材料结合的多肽接头见表 1.2。噬菌体展示技术在一个含有 109 多肽序列的库中筛选能够和不同无机材料结合的多肽，这些多肽是 7 肽和 12 肽。这个技术是一个连接生物分子和人工合成材料的桥梁。日本财团法人癌研究会 Kashiwagi 等人利用钛表面结合接头 (TBP-1) 重组表达了对金属钛有特异结合能力的 BMP-2 [69]。利用噬菌体展示技术筛选出 TBP-1 接头 [66]。然而接头 TBP-1 与 TiO<sub>2</sub> 的结合力会降低，这主要是由于接头 TBP-1 和 BMP-2 的部分序列会影响这种分子间的结合力。

表1.2 利用噬菌体展示技术发现的能够与无机材料结合的多肽序列

多肽序列	结合材料
VTKHLNQISQSY	羟基磷灰石和骨矿化材料
SVSVGMKPSRP	羟基磷灰石和牙科烤瓷
RKLPDAPGMHTW	TiO <sub>2</sub> /Si/Ag
RRTVKHHVN	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
CGPRHTDGLRRIAARGPC	Cu <sub>2</sub> O
YDSRSMRPH	ZnO
AYSSGAPPMPPF	银
PTSTGQA/CPTSTGQAC	铂
CNNPMHQNC/VISNHAESSRRL/SLTPLTTSHLRS	半导体
VPSSGPQDTRTT	铝/钢
CTKRNNKRC/CHKKPSKSC	TiO <sub>2</sub>
CRRWESKRC	SiO <sub>2</sub>
HQPANDPSWYTG/NTISGLRYAPHM	BaTiO <sub>3</sub>

### 1.3 与创伤修复相关的生长因子

创伤修复一个极其复杂，需要多种细胞配合的过程。在这个过程中需要角质细胞、成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞和血小板的联合作用。细胞经过迁移、渗入、增殖和分化促使创伤部位发生炎性反应、新组织生成和伤口的最终愈合。这个过程包含了复杂的细胞内信号转导的调控作用，因此需要多种生长因子相互配合。在这些参与创伤修复的生长因子中主要包括 EGF、transforming growth factor (TGF- $\beta$ )、bFGF、VEGF、BMPs、Granulocyte Macrophage Colony Stimulating factor (GM-CSF)、Platelet-derived Growth Factor (PDGF)、Connective Tissue Growth Factor (CTGF)、Interleukin (IL) family 和 Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )。这些生长因子在创伤修复中所起到的作用见表 1.3。在皮肤发生创伤之后，表皮天然屏障被打破，角质细胞首先会释放预储存的 Interleukin-1 (IL-1)，IL1 能够传递信息给创伤周围的细胞来抵制损伤带来的危害[70-78]。血液中的有效成分释放到伤口位置激活凝血过程。接下来对创伤修复过程中起关键作用的生长因子 TGF- $\beta$ 、bFGF、BMPs、VEGF 生物学效应进行详细的介绍。

表 1.3 创伤修复过程中主要参与的生长因子类型以及它们在急慢性创伤修复中的表达趋势

生长因子	细胞来源	急性伤口	功能	慢性伤口
EGF	血小板、巨噬细胞、成纤维细胞[79, 80]	上升 [81, 82]	表皮重建	下降 [83]
bFGF	角质细胞、肥大细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞软骨细胞 [84-86]	上升 [87]	肉芽组织形成、表皮重建、基质形成和皮肤重建	下降 [88]
TGF- $\beta$	血小板、角质细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞	上升[92]	消炎、肉芽组织形成、表皮重建、基质形成和皮肤重建	下降 [88]



	[89-91]		[93, 94]	
PDGF	血小板、角质细胞、巨噬细胞、内皮细胞、成纤维细胞 [84, 95, 96]	上升[97]	消炎、肉芽组织形成、表皮重建、基质形成和皮肤重建 [20, 96, 98, 99],	下降 [88]
VEGF	血小板、中性粒细胞、巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞 [100]	上升 [101]	肉芽组织形成[102]	下降 [88]
IL-1	中性粒细胞、单核白细胞、巨噬细胞、角质细胞 [103]	上升 242	消炎、表皮重建、 [104]	下降 51[83]
IL-6	中性粒细胞、巨噬细胞 [105]	上升 [105]	消炎、表皮重建[106, 107]	下降 [105]
TNF- $\alpha$	中性粒细胞、巨噬细胞	上升[83]	消炎、表皮重建[83]	下降 [83]

### 1.3.1 TGF- $\beta$ 在创伤修复中的生物学作用

TGF- $\beta$  和 BMPs 均属于 TGF- $\beta$  超家族的一员，它能够调节多种细胞的生长和分化。体内多种细胞都可以分泌没有活性状态的 TGF- $\beta$ 。在体外，没有活性状态的 TGF- $\beta$  又称为 latency associated peptide (LAP)。在体内，骨折附近和正在愈合的伤口位置一般呈现酸性环境，在酸性环境中 LAP 能够被活化。高水平的 TGF- $\beta$  一般被发现在细胞正处于高度分化活动的组织，如存在于成骨细胞、肾脏、骨髓和胎肝的造血细胞。Fernandezpol, JA 等人在 1985 年，从 L929 细胞中成功的纯化了 TGF- $\beta$  生长因子，并在大肠杆菌内得到表达[108]。在哺乳动物至少发现有 TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 1 $\beta$ 2 四个亚型。在鸟类和两栖类动物还分别存在着 TGF- $\beta$ 4 和 TGF- $\beta$ 5，对后两者的生物学作用所知甚少。

TGF- $\beta$  的生物学功能研究主要在炎症、组织修复和胚胎发育等方面，发现 TGF- $\beta$  对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用。TGF- $\beta$ 1、 $\beta$ 2 和  $\beta$ 3 功能相似，一般来说，TGF- $\beta$  对间充质起源的细胞起刺激作用，而对上皮或神经外胚层来源的细胞起抑制作用。TGF- $\beta$  的对于细胞的调控和刺激主要有如下一些作用：

(1) 抑制免疫活性细胞的增殖：① 抑制 IL-3、GM-CSF、M-CSF 所诱导小鼠造血前体细胞和 LTBMIC 的集落形成，并降低巨核细胞对 IL-3 和 CSF 的反应性。② 抑制 ConA 诱导或 ConA 与 IL-2、IL-6 联合诱导的胸腺细胞增殖。③ 抑制丝裂原、同种异体抗原刺激的 T 细胞增殖或 IL-2 依赖的 T 细胞生长。④ 抑制 SAC 刺激后 IL-2 依赖的 B 细胞增殖。

(2) 对细胞表型的调节：① 抑制 IL-2 诱导的 T 细胞 IL-2R、TfR 和 TLI SA1 活化抗原的表达，对 CD3 表达未见有影响。② 抑制 IFN- $\gamma$  诱导黑素瘤细胞 MHC II 类抗原表达。

(3) 抑制淋巴细胞的分化：① 抑制 IL-2 和 BCDF 依赖的 B 细胞分泌 IgM，促进 B 细胞分泌 Ig 类型转换为 IgA 和 IgE。② 抑制混合淋巴细胞培养(MLC)中 CTL、NK 和 LAK 功能，这种抑制作用可被 TNF- $\alpha$  (小鼠 MIC) 或 IL-2 (人 MLC) 所逆转。③ 抑制 PBMC 中 NK 活性以及 NK 细胞对 TNF- $\alpha$  的以应性。④ 抑制 ConA 和 IL-2、IL-6 协同诱导小鼠胸腺 MHC 非限制杀伤性细胞的活性。

(4) 抑制生长因子产生：如抑制 PBMC 中 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的产生。

(5) 其它调节作用：① 促进成纤维细胞、成骨细胞和雪旺氏细胞的生长。TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 促进人成纤维细胞 IL-6 的产生，其机理可能是通过对 IL-6 基因转录的调节。② 抑制上皮细胞、破骨细胞、内皮细胞生长和脂肪、心肌、骨骼肌的形成。TGF- $\beta$  可拮抗 EGF 的某些生物学功能。③ 促进细胞外基质 (ECM) 如胶原蛋白、纤粘连蛋白的表达和抑制 ECM 的降解，对细胞的形态发生、增殖和分化过程起着重要作用，有利于胚胎发育和细胞修复。动物体内实验表明，局部注射 TGF- $\beta$  可以促进伤口愈合和典型肉芽组织形成。④ 单核细胞和成纤维细胞的趋化剂，但不引起胶颗粒和氧化物的产生。⑤ 抑制淋巴细胞与内皮细胞的粘附。⑥ 促进嗜碱性粒细胞释放组织胺。

(6) TGF- $\beta$ 1 与原癌基因表达：TGF- $\beta$ 1 能诱导 c-sis 的表达，但抑制 c-myc 的表达，这种诱导或抑制作用与作用细胞种类及 TGF- $\beta$  的不同功能有关。如 TGF- $\beta$

诱导成纤维细胞中 *c-sis* 基因表达，与促进其在软琼脂中生长有关；而对上皮角朊细胞生长的抑制则与抑制 *c-myc* 基因表达有关。TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 和 TGF- $\beta$ 3 在大多数生物学作用方面非常相似，但在有些作用方面可有很大差异，如 TGF- $\beta$ 2 对血管内皮细胞和造血祖细胞的生长抑制作用仅为 TGF- $\beta$ 1 和 TGF- $\beta$ 3 的 1%。TGF- $\beta$  在治疗伤口愈合，促进软骨和骨修复以及通过免疫抑制治疗自身免疫性疾病和移植排斥等方面有潜在的应用前景。

### 1.3.2 bFGF 在创伤修复中的生物学作用

人体中，FGFs 家族包含了 22 个主要成员，FGFs 家族成员中的分子量从 17-34kDa 不等，他们的氨基酸同源性从 13-71% [109, 110]。FGFs 是一群多功能蛋白，能够在体内发挥各种各样的作用。其中对于皮肤创伤修复影响最大的是 bFGF (FGF2)、FGF-7 和 FGF-10。FGFs 主要是角质细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、软骨细胞和肥大细胞分泌而来[84-86, 106, 107]。FGF 主要参与人体的血管生成、伤口愈合、胚胎发育和各种各样的内分泌调节作用。FGFs 是一种肝素结合生长因子，它们与细胞表面的硫酸肝素聚糖相互作用来展现重要的细胞信号转导作用。FGFs 在各种各样的细胞和组织中展现了促进细胞增殖、细胞迁移和促进细胞分化的作用。它们的最基本作用是细胞有丝分裂素，同时也能够调控细胞的形态、以及调控体内的内分泌。因此，FGFs 被人们称为“多潜能生长因子”[111]。在细胞表面主要存在 4 个 FGF 受体，FGFs 的 22 个成员都能够与这 4 种受体能够结合，从而激活细胞内响应的细胞信号转到通路。在脊椎动物和非脊椎动物的发育过程中起着至关重要的作用，任何的 FGFs 生长因子的不充分表达都能够引起各种发育缺陷 [112-115]。FGF1 和 FGF2 一个重要的功能就是促进内皮细胞的增殖，因此能够有效促进血管的生成，促进从组织内已经存在的血管处生长新的血管。FGF1 和 FGF2 促血管生成能力强于血管内皮细胞生长因子 (vascular epithelial growth factor, VEGF) 和血小板诱导生长因子 platelet-derived growth factor (PDGF)[116]。在临床中，FGF1 和 FGF2 也广泛的应用在促进心肌中血管生长的研究工作[117]。FGF1 和 FGF2 除了能促进血管生成，通过促进血管生成和成纤维细胞的增殖，还能够有效的促进伤口部位肉芽的生成，而这些新生的肉芽能够迅速填充创伤带来的缺损组织，从而实现对创伤部位的修复过程。FGF7 和 FGF10 也被称作角质细胞生长因子，通过刺激和促进上皮细胞的增殖、迁移和分化能够加速皮肤的修复和粘膜组织的再生。

在胚胎的中枢神经的发育过程中, FGFs 在神经干细胞的增殖、神经新生、轴突的生长和细胞的分化过程也起着关键的作用。FGF2 也可以被用来诱导小鼠大脑皮层褶皱的增加[118]。其它的 FGFs 家族成员 FGF8 调控大脑皮层的功能区位置和面积大小[119, 120]。FGFs 在维持成人大脑机能方面也是十分重要的。因此, FGFs 无论在胚胎发育期和成年期的神经元生长和存活方面都起着关键作用[121]。成人的海马区神经发育也依赖大量的 FGF2。

### 1.3.3 VEGF 在创伤修复中的生物学作用

VEGF 家族成员包括: VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 和 Placenta Growth Factor [122]。VEGF-A 主要由内皮细胞、角质细胞、成纤维平滑肌细胞、血小板、嗜中性细胞和巨噬细胞所产生[123, 124]。体外研究中发现, VEGF-A 在创伤修复中主要促进早期的血管生成和内皮细胞的迁移和增殖[125, 126]。在急性创伤修复过程中, VEGF-A 转录和分泌伴随着 VEGFR 上调表达, 直到创伤激活了血小板释放 VEGF-A[101, 127, 128]。另外, 巨噬细胞在创伤修复过程中也释放 VEGF-A 和 TNF- $\alpha$ , 这个过程能够刺激角质细胞和成纤维细胞表达 VEGF-A[101]。VEGF-C 也会在创伤发生过程中上调表达。VEGF-C 首先被巨噬细胞释放, 在创伤修复的炎性阶段也起到重要作用[129]。

### 1.3.4 BMPs 在创伤修复中的生物学作用

1963 年, 美国的教授 Marshall R.Urist 发现了 BMP [130], BMPs 属于 TGF- $\beta$  超级家族中的一员, BMP-2、BMP-4、BMP-6 和 BMP-7 均在创伤部位大量的表达 [131]。在急性创伤发生后, BMP-6 能够在创伤部位高表达, 进而使得角质细胞和成纤维细胞大量再生[132]。当创伤疤痕封闭后, BMP-6 大量分布于整个新形成的表皮的基底上层结构中[132]。体外研究发现了, BMP-6 在角质细胞分化过程中也起到重要的作用[133, 134]。体内研究也发现, 在慢性创伤愈合过程中, BMP-6 的过表达会导致表皮重建的滞后, 有证据显示这主要归因于 BMP-6 表达水平的提升所导致的创伤部位溃疡症状的发生[132]。

## 1.4 创伤修复敷料中常用的材料

创伤修复敷料的来源涵盖了天然材料和人工合成材料, 其中主要包括; 胶原膜、纤维蛋白毡、高分子聚合物等。创伤修复敷料在阻止损伤部位发生病原体感染和

创伤部位表皮修复的过程中发挥着重要作用。最初，创伤敷料仅仅具有创伤部位的止血和防止伤口感染的功能。目前，常用的创伤修复敷料所用的材料主要包括：生物材料、合成材料和生物/合成复合材料。临床上使用的生物材料的皮肤修复敷料主要包括：同种异体皮、猪皮。但是这种生物材料有很多的缺点，如材料的来源严重受到限制、高的免疫源性、较差的黏附性和容易发生异体间的交叉污染。相比之下，合成材料能够诱发炎性的可能性较小，也能够有效的阻止病原体的交叉感染。而生物/合成复合材料一般具有复杂精细的叠层结构，是由合成高分子聚合物和生物材料共同组成。这三种形式的材料已经被广泛的应用于创伤修复中[135-137]。

一个理想的创伤修复敷料需要具备以下特点：（1）首先需要具有良好的保湿性能（2）能够具有良好的通透性能（3）抵御外源微生物侵扰的能力（4）无毒（5）无制敏性（6）容易从伤口部位剥离的性质（7）材料易于获取（8）抗菌性（9）促进伤口愈合性。早在1980年，O'Connoret等人就将胶原蛋白就被制备成薄膜作为创伤修复的基质材料，在胶原蛋白薄膜上培养培养表皮角质细胞并获得了成功[138]。Yannas等人制备含有硅胶膜和胶原海绵并含有葡萄氨聚糖的多层结构的敷料，这种敷料能够模拟皮肤的一些结构和功能[139]。近些年来，很多种合成的和修饰的生物相容性材料被开发用来制备创伤修复敷料[140-142]。目前研发目标和策略是用系统化的设计研制促进创伤愈合的敷料。

#### 1.4.1 胶原蛋白在创伤修复中的应用

胶原主要分布在哺乳动物的结缔组织当中，是构成动物和人体皮肤、血管、骨骼、肌腱、牙齿和软骨的主要成分，是这些结缔组织的主要物质基础，具有维持皮肤和各组织器官的形态结构的功能。由于胶原的三股螺旋结构决定了其有良好的生物特性，如低毒性、弱抗原性、生物相容性、促进细胞生长、诱导创伤修复等，因而，在创伤修复中具有广阔的前景[143, 144]。然而，胶原也存在容易生物降解、稳定性差等缺陷，限制了纯胶原作为创伤修复材料的使用。因此，近年来，人们将胶原与几丁质、壳聚糖、硫酸软骨素、透明质酸、羟基磷灰石、生物可降解高分子材料等具有良好生物特性的物质共混改性，从而使其制成的创伤修复敷料克服了上述缺点。目前为止，含有胶原的创伤修复材料在软组织创伤、骨关节创伤和内脏器官创伤的修复中得到了广泛的应用。

### 1.4.2 几丁质和其衍生物在创伤修复中的应用

目前,很多研究都专注于用生物来源的材料几丁质和它的衍生物来制备创伤修复敷料,几丁质和它的衍生物能够在分子、细胞和系统化水平上加速创伤的修复。几丁质是一个易获得、廉价的生物材料,它主要存在于无脊椎动物的骨骼和真菌的细胞壁。如图 1.6 所示,几丁质是一个 1,4 位链接的 N-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡聚糖的聚合物。几丁质和它的衍生物壳聚糖是生物相容性好、生物可降解、无毒、抗菌和亲水的材料。由于它们的这些特性,因此在创伤修复领域具有良好的应用前景和价值。很多研究已经发现基于几丁质的敷料能够加速伤口组织的收缩,调控细胞分泌一些创伤修复的生长因子:IL-8、IL-1 $\beta$ 、前列腺素等因子。壳聚糖提供了一个非蛋白 3D 基质材料用于激活巨噬细胞。壳聚糖具有止血作用,有助于伤口出血位置的凝血作用,并能够封闭神经末端减少疼痛。壳聚糖能够在体内逐步的降解成 N-乙酰-D-氨基葡萄糖, N-乙酰-D-氨基葡萄糖能够促进成纤维细胞的增殖,能够促进胶原的有序沉积、促进创伤部位透明质酸的合成。同时也能够加速伤口的愈合和阻止疤痕的形成。几丁质和壳聚糖能够被很容易的制备成凝胶[145-147]、膜[148-152]、纳米纤维[153]、珠子[154, 155]、微米颗粒[156-160]、支架[161-164]、海绵[165, 166]以及各种生物医用材料用于药物和基因传递[156, 167],创伤修复[147, 150, 168-170]和组织工程[168, 171]。

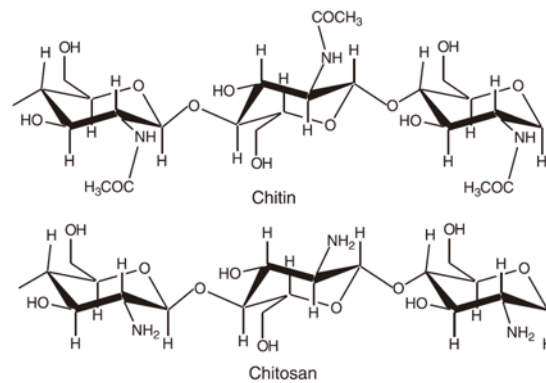


图1.6 几丁质和壳聚糖的结构

### 1.5 特异结合生长因子应用于创伤修复

如上文所述,胶原蛋白是主要的细胞外基质蛋白(Extracellular matrix, ECM),由于它具备很多的优点,因此胶原已经被广泛的应用于创伤修复敷料中。日本泰

尔茂公司 (Terumo Corp) 的 Ishikawa 使用 E.coli 原核表达系统制备了一种具有胶原蛋白特异结合能力的 FNCBD-EGF, FNCBD-EGF 含有一个胶原结合结构域。FNCBD-EGF 能够特异的结合在 I、II、III 和 IV 胶原材料表面。在动物创伤模型中, 相比于 EGF, FNCBD-EGF 能够在胶原支架滞留 4 天, 损伤的表皮也得到了很好的修复, 这些结果说明了 FNCBD-EGF 与胶原特异结合后能够应用于创伤的修复 [30, 172]。中国科学院遗传与发育生物学研究所组织工程研究实验室戴建武教授课题组研究了多种具有胶原结合能力的生长因子用于创伤修复。将具有胶原结合能力的 TKKTLRT 与 platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) 利用基因工程重组的方法融合表达了一种能够结合胶原的 CBD-PDGF。利用建立的皮肤缺血性溃疡模型研究了结合有 CBD-PDGF 的胶原膜的作用。实验结果显示了结合有 CBD-PDGF 的胶原膜能够在创伤部位维持高浓度和高生物学活性的 PDGF, 能够有效的促进皮肤缺血性溃疡表皮的重建、胶原的沉积、毛细血管的生成。这个结果说明结合有 CBD-PDGF 的胶原膜能够有效的促进溃疡的愈合 [173]。利用基因工程技术原核表达了两种具有胶原结合能力的 bFGF, 体外实验发现这两种 bFGF 具有与普通 bFGF 一样的促进成纤维细胞增殖的能力, 同时它们与胶原海绵的结合能力也显著的高于普通的 bFGF, 体内实验表面这两种胶原结合 bFGF 能够促进周围组织的血管化, 因此在创伤修复领域也具备广阔的应用前景 [21]。利用基因工程的方法制备了具有胶原结合能力的 CBD-VEGF, VEGF 有着很强的促进血管生成的能力, 因此在创伤组织再生中起着关键的作用, 用糖尿病创伤模型验证了 CBD-VEGF 的作用。实验结果显示, 结合有 CBD-VEGF 的胶原膜能够提高创伤的愈合率、新血管的生成、肉芽组织部位高浓度的 VEGF 分泌。这种结合有 CBD-VEGF 的胶原膜在糖尿病创伤修复中有着很好的应用前景 [174]。韩国釜庆大学 Kong, IS 等人利用重组蛋白表达技术构建了三种具有胶原结合能力的 hEGF (CBD<sub>12aa</sub>-EGF、CBD<sub>18aa</sub>-EGF、CBD<sub>53aa</sub>-EGF), 细胞增殖实验结果显示这三种胶原结合 EGF 和普通 EGF 一样均具有促进成纤维细胞增殖的能力。Westen-blot 实验结果显示具有胶原结合能力的 EGF 诱导 EGF 介导的细胞内磷酸化的作用要强于普通的 EGF, 这说明 EGF 被固定于胶原表面能够持续对细胞进行刺激。CBD<sub>12aa</sub>-EGF、CBD<sub>18aa</sub>-EGF、CBD<sub>53aa</sub>-EGF 能够更久的滞留在胶原表面, 提高了 EGF 在体内的半衰期, 因此 CBD<sub>12aa</sub>-EGF、CBD<sub>18aa</sub>-EGF、CBD<sub>53aa</sub>-EGF 能够用于创伤的修复 [175]。

## 1.6 本文的选题目的和主要的研究内容

正如上文所提到的,生长因子可以以很多的传统方式结合到天然的和人工的生物材料上,但是普生长因子与材料的结合都很难维持较长时间的滞留,生长因子与材料的松散的结合模式降低了它的生物学活性。使得含有生长因子的支架在组织工程中应用受到了极大的限制,为了克服生长因子与支架材料结合的这些缺点和弊端。近些年来,一系列的具有不同基质材料结合能力的生长因子被开发和利用[176-180]。这些具有与基质材料特异结合能力的生长因子能够对接触的细胞持续长时间、高浓度的作用。能够被生长因子固定的材料范围很广,从有机材料到无机材料,从金属材料到陶瓷材料。然而利用传统的共混法、吸附法和共价结合固定生长因子的方法方法存在很多弊端和缺陷,如生长因子不稳定、滞留时间短、生物活性容易降低,其中共价结合的整个过程步骤繁琐成本高昂等。相比之下,利用基因工程法一步合成制备具有与多种材料特异结合功能的生长因子具有很多的优点。这种制备结合生长因子的方法能够很好的保存原有的生长因子的活性,与之结合的基质材料的选择范围更大等优点。

特异结合生长因子的设计、制备的目的是使生长因子更好的应用于再生医学领域中。很多研究已经表面,生长因子 bFGF 在创伤修复的过程中发挥着极其重要的作用, bFGF 对于肉芽组织的形成、表皮的重建和创伤的愈合都起着至关重要的促进作用。一个理想的创伤修复敷料不但需要有伤口的遮蔽性,同时也需要有生物学活性。生长因子与创伤修复敷料材料的结合系统化的改善了伤口部位的修复和重建。本文针对一系列生长因子在组织工程修复中存在的问题,结合目前生长因子最新研究方向和发展趋势,设计和表达一系列具有与材料特异结合能力的 bFGF。这些具有特异结合能力的 bFGF 能够分别能够与胶原、几丁质结合。利用这些特异结合的 bFGF 和支架材料制备具有生物学活性的创伤修复敷料。随着特异结合生长因子研究的日益深入和广泛,结合生长因子会越来越广泛的应用于再生医学和组织工程修复各个领域。

本论文的内容主体结构主要包括以下三个部分:

(1) 生物信息学分析几丁质结合结构域,对几丁质结合结构域与几丁质特异结合能力进行分析计算。在理论上预测和评估几丁质结合结构域与几丁质之间存在的氢键。