

促血管生成物质在组织工程中的研究进展

张莹雪,王蔚*,袁直*

(功能高分子材料教育部重点实验室,南开大学高分子化学研究所,
天津市化学化工协同创新中心,天津 300071)

摘要:组织工程是一门将细胞生物学和材料科学相结合,在体外或体内人工构建组织或器官的新兴学科。在厚组织工程研究中,如何在支架材料中构建血管网络,从而为新生组织提供必要的氧气养分已成为目前研究的热点。在促血管化的研究中,生长因子与粘附性多肽两类活性物质应用最为广泛,其中生长因子主要包括血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-1(Ang-1)、血管生成素-2(Ang-2)、血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等;粘附性多肽主要包括精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)、精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸-缬氨酸(REDV)、酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸(YIGSR)等。本文对这两类物质在组织工程,尤其是在促进血管新生方面的研究进行了综述。

关键词:组织工程;促血管化;生长因子;粘附性多肽

引言

组织工程(Tissue engineering)的概念由美国的 Joseph P. Vacanti 和 Robert Langer 教授于 1987 年提出,它是一个多学科交叉的研究领域,其根本目的在于利用生物替代品恢复、维持和改善病变、缺损的组织^[1]。

据美国器官联合分配网统计,2002 年美国每 14min 增加 1 个等待器官移植的患者,同时大约有 6000 人因未能及时得到供移植的器官而在等待中死亡。等待器官捐献的患者以每年 11% 的速度增长,而器官捐献者的增长速度仅为每年 1.6%,每天有 10 余例患者因等不到可移植的器官而死亡。而我国是继美国之后的世界第二大器官移植大国,需要接受器官移植的患者正在急剧增加。世界卫生组织的统计表明,全世界需要紧急器官移植手术的患者数量与所捐献人体器官的数量比为 20:1,如果加上那些依靠药物/透析维持但又必须做器官移植手术的患者,比值将拉大到 30:1^[2]。

现代外科学的发展,已使人类对组织和器官缺损的治疗有了很大的进步,但仍然存在许多问题。目前临床常用的治疗方法有 3 种:第一种方法是异体移植,这种移植方式存在两个致命的问题:一是组织相容性问题,二是供体严重不足;第二种方法是自体移植,如皮肤移植,这种移植方式往往不能满足移植的需求;第三种方法是通过组织工程方法人工合成可替代组织器官,这种人工器官植入后易导致排异反应,继发感染。因此,组织工程仍是生命科学、医学、材料学等学科所面临的重大研究课题之一。尽管目前全球的科学家已经在此领域取得了重大的研究进展,但仍有很多问题需要解决,其中的一个问题就是在新材料植入后的初始阶段无法提供足够的血液。

众所周知,人体内所有组织均由一个高度分支、系统庞大的血管网络提供相应的营养物质、氧气并代谢废物^[3]。毛细血管之间的最大距离不得超过 200 μm ,而在体内针对不同细胞的最优距离应该在 80 μm

10.14028/j.cnki.1003-3726.2015.09.013

收稿:2015-06-20;修回:2015-07-05;

基金项目:国家自然科学基金(51273095),天津市自然科学基金青年项目(14JQCQNJC03500),973 计划(2011CB606202),教育部长江学者创新团队发展计划(IRT1257)资助;

作者简介:张莹雪,女,硕士研究生,研究方向为生物医用材料;

* 通讯联系人:王蔚,男,博士,副研究员,研究方向为生物医用材料,E-mail: duruo@nankai.edu.cn;袁直,女,博士,教授,博士生导师,研究方向为生物医用材料,E-mail: zhiy@nankai.edu.cn.

~100 μm 。仅仅有少数组织,例如皮肤、软骨、角膜中细胞可以通过更长距离来交换营养物质和氧气^[4]。而针对心脏、肝脏等厚组织来说必须有丰富的血管网络来输送营养物质、氧气和排出代谢废物^[5]。因此,如要保证植入人体的人工组织能够在体内存活并发挥正常生理功能,就需要在组织工程支架中预先构建微血管网络结构以便给组织细胞提供营养^[6]。

1 组织工程中的血管化

体内血管的形成可通过三个过程,血管再生(vasculogenesis)、血管新生(angiogenesis)和动脉形成(arteriogenesis),相应的过程如图1所示^[6]。血管再生是指从中胚层分化出血管母细胞再进一步分化成内皮细胞逐渐形成毛细血管或者由骨髓分化形成单核细胞和内皮祖细胞,再进一步形成血管;而血管新生则是从已经存在的血管中通过萌芽形成新的毛细血管;动脉形成过程则是毛细血管的进一步成熟或者小动脉形成较大的动脉结构^[7]。血管新生避免了由细胞分化才能形成血管的方式,这种方式能够形成和原有血管一样功能的新生血管,因此在组织工程中大多都是以血管新生的方法来设计材料。

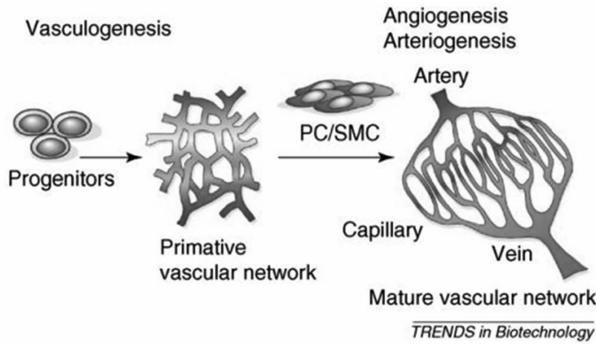


图1 血管的生成与成熟示意图^[6]

Figure 1 Schematic illustrations of the formation and maturation of blood vessel^[6]

血管新生的过程主要包括:血管基底膜降解,血管内皮细胞的激活、增殖、迁移以及重建形成新的血管并形成网络,这是一个涉及多种细胞的多种分子的复杂过程^[8,9]。它与内皮细胞、生长因子、细胞外基质的相互作用都息息相关。因而在组织工程中,人们常常用到细胞粘附性多肽与生长因子来刺激诱导血管化(见图2)。本文将对这两方面内容进行总结,概述于下。

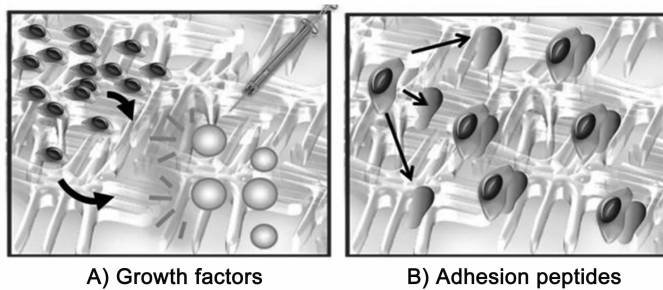


图2 刺激诱导血管化的不同方法^[9]

Figure 2 Different strategies to induce vascularization by stimulation of angiogenic processes^[9]

2 生长因子在组织工程中的应用

生长因子(growth factor, GF)是一类具有刺激和诱导细胞增殖、维持细胞存活等生物效应的蛋白类物质,对促进细胞增殖、组织或器官的修复与再生都具有重要的促进作用。在组织工程中人们经常用到

的生长因子有:血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-1(Ang-1)、血管生成素-2(Ang-2)、血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和肝细胞生长因子(HGF)等。相关研究显示不同生长因子在血管新生不同阶段所起的作用有很大差异。如图 3 所示^[10],缺血组织释放出 VEGF 与 Ang-2,刺激血管出芽式生长,血管芽释放 PDGF,激活周围组织细胞与内皮祖细胞从血管流到新生血管,而后 Ang-1 促使血管的成熟。

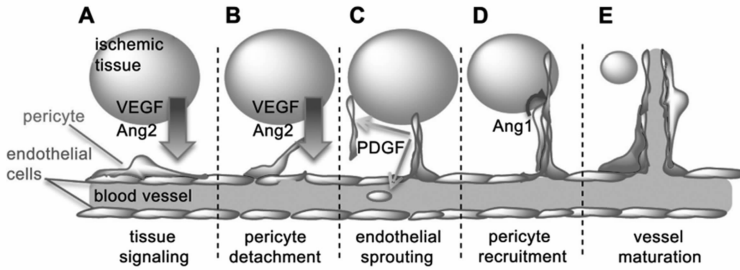


图 3 不同生长因子在血管新生不同时期的作用示意图^[10]

Figure 3 Schematic illustrations of different growth factors signaling during angiogenesis^[10]

2.1 血管内皮生长因子(VEGF)

血管内皮生长因子(VEGF)是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在体内诱导血管新生,是高度保守的同源二聚体糖蛋白,对于细胞有丝分裂具有高度的特异性。在体内,VEGF 诱导内皮细胞增殖,促进细胞迁移,并抑制细胞凋亡。而 VEGF 诱导的血管生成与血管通透性增加,在血管的生成中起着关键的调节作用^[11]。

人们对 VEGF 家族成员与它们的受体(VEGFRs)进行了非常广泛的研究。VEGF 的受体分为 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3 三种。受体 VEGFR-1 影响造血干细胞、单核细胞和巨噬细胞的迁移,受体 VEGFR-2 调节血管内皮细胞的功能,VEGFR-3 主要调节的是淋巴管内皮细胞的功能^[12,13]。如今已知的 VEGF 的异构体有五种,分别为 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E。这五种异构体的分子质量与生物特性均不尽相同,其对应的受体具有一定的选择性(如图 4 所示),此外其与细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白多糖的结合能力也有很大差别。

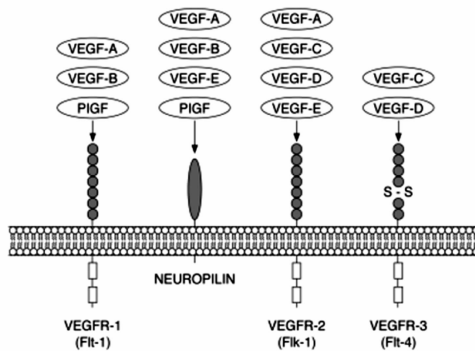


图 4 VEGF 家族成员及其受体示意图^[12]

Figure 4 VEGF family members and their receptors^[12]

在组织工程中,通过 VEGF 诱导新血管的生成是一种非常常见的办法。但是 VEGF 在体外与体内都是非常不稳定的,而且 VEGF 的大量释放又会产生一系列副作用。为了使 VEGF 能长时起效,研究者们采用多种材料作为其载体延长其释放时间并保护其生理活性。

在不同的情况下,人们会希望 VEGF 达到不一样的释放速率。在组织工程的初期,人们期待快速而又有效的血管化。Bianco 等^[14]利用京尼平交联形成的明胶膜促使 VEGF 缓慢的释放用以诱导血管的生

成,通过对比不同浓度的明胶交联材料的体外释药情况,证明低浓度的交联材料具有更快的 VEGF 的释放速度,其第一天的释放量达到 77%,之后累积释放达到 90%。更为重要的是在第 14 天时 VEGF 仍保持其活性,体内与体外的血管生成实验均证明其具有刺激新血管生成的能力。Yuan 等^[15]研究了一种负载 VEGF 与 PDGF 的多层小口径支架材料。结果发现此种小口径的血管支架具有良好的抗凝血性能,可抑制内膜增生,支持新生血管组织网络的重建。这种多层的血管支架是由聚乙二醇-*b*-聚 L-乳酸-己内酯(PELCL)、聚乳酸-乙醇酸(PLGA)、聚己内酯(PCL)和明胶组成,这种材料设计能够使 VEGF 与 PDGF 在时间上顺序性释放,并且在空间上也有各自的释放区域。VEGF 在中部的 PLGA 层中,PDGF 在内层的 PELCL 中,外部的 PCL 层起到的是机械稳定的作用。研究证明,明胶降解促进了血管平滑肌细胞(VSMC)生长,而内皮细胞也在 VEGF 的作用下粘附性生长。但是此种材料的 VEGF 第一天的释放量仅有 40%,相比较明胶等材料暴释较低。

而在某些情况下,例如促进缺血组织血管的生成时,VEGF 则需要一个缓慢的平稳释放。Lee^[16]在三维的聚乳酸(PLLA)支架上负载有 VEGF 与心脏干细胞,该支架能够控制 VEGF 达到四周的缓释,并且增加内皮细胞的迁移率与心脏干细胞的体外增殖。Liu^[17]制备了聚乳酸-乙醇酸(PLGA)微球并负载 VEGF,并在其表面涂覆有 2-N,6-O-磺化壳聚糖(26SCS)。此种微球具有多孔结构,而涂覆上的 26SCS 与血管内皮生长因子之间具有良好的亲和能力,因此可对 VEGF 具有良好的截留作用,从而延缓其释放速率。Matsusaki 等^[18]采用离子交联的方法制备了负载有 VEGF 的海藻酸钠水凝胶支架,并且在此凝胶材料上涂覆上壳聚糖和葡聚糖硫酸脂组成的聚电解质膜,文章分别考察了凝胶支架的稳定性和 VEGF 释放情况。实验证明包覆有聚电解质膜的凝胶材料稳定性良好并且可在一周内保持 VEGF 的稳定释放,所释放出的 VEGF 仍保留生物活性,对血管生成具有良好的促进作用。

目前研究可知,VEGF 与肝素之间具有比较强的结合力,而肝素显负电性,因此能够让 VEGF 平缓释放的材料表面通常涂覆有带有负电性的物质,对 VEGF 有一个相对较强的吸附能力,使得 VEGF 能够缓慢释放。

表 1 负载 VEGF 不同支架材料对细胞作用的影响

Table 1 The effect of different scaffolds loading VEGF on cells

基质材料	作用细胞类型	细胞增殖相对比率 ^a	文献
京尼平交联明胶膜	hMSCs	75% ^b	[14]
多层的血管支架	VSMCs	30% ^c	[15]
聚乳酸	HUVECs	83% ^c	[16]
壳聚糖修饰 PLGA	HUVECs	40% ^c	[17]

a. 以空白参照材料为 100%, b. 以施加 PBS 为对照, c. 以没有生长因子的为对照。

通过不同材料对比,如表 1 所示,材料对 VEGF 的促细胞粘附与增殖作用有着一定的影响,最重要的是支架必须具有良好的生物降解性与组织相容性。相关研究表明,共价化的 VEGF 支架相比于包埋入支架的材料能够更好的促进内皮细胞的增殖与渗透^[19]。但是如果要达到内皮细胞的快速增殖与生长,包埋性 VEGF 支架则更具有优势。单独的 VEGF 对内皮细胞的增殖性作用相比于一些其它的生长因子并没有很大的优势^[20],因此,今后的研究将侧重于多重生长因子的协同作用对血管与内皮细胞的影响。

2.2 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是由美国科学家 Levi Montalcini 于 1986 年发现的,并因此被授予了国际最高荣誉诺贝尔生物学奖,从此该生长因子成为全球生物医学领域的研究热点。研究发现,bFGF 可以由内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞分泌。它的主要作用就是促进内皮细胞的增殖,修复内皮细胞的生理活性,以此促进新血管的生成。相关研究表明,bFGF 由相邻的毛细血管组织释放,作为血管内皮

细胞分裂的一种有效诱导物质,刺激血管内皮细胞的增殖,形成新的毛细血管^[21]。Reidy 等^[22]研究发现,在成年大鼠颈部总动脉平滑肌细胞和内皮细胞均可检测出 bFGF 的分泌,注射 bFGF 的抗体后,bFGF 的分泌显著降低而平滑肌细胞的增殖也同时降低了 80%。此研究表明,bFGF 对平滑肌细胞的增殖也有积极的促进作用。因此在组织工程中,人们常将其应用于组织的修复中。

Ho^[23]研究了负载有 bFGF 因子的胶原支架在大鼠口腔黏膜对血管生成和细胞增殖的作用。此种材料具有良好的生物相容性,而胶原蛋白支架的可降解性对血管有着积极的促进作用。与普通胶原支架相比,负载有 bFGF 的胶原支架中的细胞密度和血管数量显著提高,但这种方法会导致一定的炎症反应。而 Nagawa^[24]制备了一种负载有 bFGF 的胶原-柠檬酸复合水凝胶,作者将这种材料植入大鼠的体内,于 5 天后取出,并对凝胶中组织进行切片染色。结果说明,此凝胶在 5 天内可诱导生长丰富的血管组织,炎症反应较少,且 bFGF 的浓度在 100ng/mL 时为最优浓度。

在对骨组织的研究中,人们经常用到的是不可降解且具有一定强度的材料,在此种材料上负载 bFGF 对骨组织与血管的生成也具有一定的促进作用。Hu^[25]制备了一种负载有 bFGF 生长因子与骨髓间充质干细胞(BMSCs)的复合纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合支架,作者认为,该生长因子对血管的生成与成骨愈合起到积极的作用。多孔的复合支架有助于血管的生成与生长因子的释放,在材料植入 4 周后有相对离散的骨组织生成,并且通过对内皮细胞分泌物 CD31 的标记染色证实该材料植入后血管密度显著提升。

此外,还有很多研究者对 bFGF 的局部给药体系进行了深入的研究。Hu^[26]设计了一个负载有 bFGF 的局部给药体系,该体系将 bFGF 与胶原结合域(CBD)的 N 端相连(简称该材料为 bFGF-CBD),从而限制 bFGF 的扩散。将复合有 bFGF-CBD 的胶原支架中植入大鼠的重度损伤子宫模型,在 30 天后对该支架细胞的增殖与周围血管的生成密度进行检测,结果表明该体系积极促进子宫内膜肌细胞的生长并且能够改善子宫内膜的血管状况。作者认为此种靶向传递系统对子宫组织的再生是一种有效的策略。Tsurkan 等^[27]也设计了一种使生长因子缓慢释放的凝胶粒子聚集体,用于在急性的肾损伤后促进肾小管的再生,这意味着再生组织的血管化需要有一个较高的程度。作者认为生长因子(GF)的局部给药可以促进受损组织的再生,因此制备了一个多臂聚乙二醇与肝素相结合的可注射水凝胶颗粒聚集体,将 bFGF、小鼠表皮生长因子(EGF)包埋进入水凝胶体系中。由于 bFGF 与肝素有着强烈的相互作用,bFGF 在小鼠体内是缓慢的释放,而 EGF 与肝素并没有特异性的相互作用,在体内应是较快速度的释放。作者将此凝胶材料注射进入小鼠的体内,实验发现负载有 GFs 的水凝胶体系对细胞的增殖具有显著的增强效果。

对负载有 bFGF 不同支架材料的总结如表 2 所示。bFGF 能够促进内皮细胞的粘附、增殖以及血管的生成。组织血管生成的速率与 bFGF 的释放速率相关。但是,bFGF 仍旧能使组织产生一些炎症反应。

表 2 负载 bFGF 不同支架材料对细胞作用的影响

Table 2 The effect of different scaffolds loading bFGF on cells

基质材料	血管相对数量 ^a	文献
胶原	125%	[23]
复合纳米羟基磷灰石/聚酰胺复合支架	72%	[25]
胶原-柠檬酸复合水凝胶	600%	[24]
bFGF-CBD 复合胶原支架	55%	[26]

a. 以空白参照材料为 100%。

2.3 血管生成素(Ang-1/Ang-2)

血管生成素(Ang)是一类常见的促血管生成生长因子,这一家族主要由 Ang-1、Ang-2、Ang-3、Ang-

4这4种因子构成。在组织工程中经常用到的是 Ang-1、Ang-2。Ang 与其受体 Tie 的相互作用可用以调节血管的通透性,在成体组织中促进血管的重塑与生成。由于它们对血管的生成有着非常重要的作用,因此一直是人们的研究重点。其中,人们研究最多的是血管生成素 Ang-1 和 Ang-2。Ang-1 在血管的成熟过程中扮演了一个重要角色,它主要介导血管内皮细胞的粘附、迁移和活性。Ang-2 主要破坏内皮细胞和血管周围细胞之间的联系,并且促进细胞的死亡和血管的退化;然而在 Ang-2 与 VEGF 相互作用下,Ang-2 起到的作用是促进血管新生^[28]。因此在组织工程中,Ang-2 与 Ang-1 经常与 VEGF 共同作用。

Radisic^[29]将 VEGF 与 Ang-1 共同固定在一个三维多孔的胶原支架上,在接种内皮细胞 3、7 天后,共固定化有 VEGF 与 Ang-1 的支架细胞数显著升高,并具有较高的乳酸产率与总糖消耗率。另外,鸡胚尿囊膜(CAM)实验测定这种支架对血管的生成具有积极的促进作用。Risau^[30]将内皮细胞单层培养于一个微型的载体珠上,并将此载体珠嵌入与三维的纤维蛋白凝胶中,通过对其单独注射 Ang-1 与共同注射 Ang-1/VEGF 的两个实验组比较发现,单独的 Ang-1 只有很微弱的促内皮细胞分裂作用,而 VEGF 与 Ang-1 的协同作用能够诱导出毛细血管芽的形成。

在组织工程中,血管生成素在血管网络形成的初期并不会发生太大的作用,因此单独使用血管生成素并不多的原因是由于其单独的作用下,对血管的生成并没有非常明显的作用,需要在 VEGF 的存在下发挥作用。

2.4 血小板衍生生长因子(PDGF)

血小板衍生生长因子(PDGF)是一种贮存于血小板中的碱性蛋白质,是一种低分子量的细胞分裂素,主要由结缔组织细胞分泌,但是当组织受到损伤时,巨噬细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞等细胞都会表达 PDGF。常见的 PDGF 是由两条多肽链通过二硫键连接而成的同型或异型二聚体,这使 PDGF 具有多种形式的二聚体结构,即 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB 等等^[30]。

PDGF-BB 在组织工程中的应用最为广泛。Dai 等^[31]研究了一种包埋有 PDGF-BB 胶原支架对血管化的作用。其将 PDGF-BB 连接在一个七个氨基酸的多肽上,此七肽源于胶原结合区域(CBD)且能限制 PDGF-BB 的快速扩散。实验结果表明,连接有七肽的生长因子对其原本的活性并没有影响,体内实验表明这种材料在体内可以促进组织渗透与血管生成。

但是 PDGF 与其它生长因子相比的血管化性能并不具备优势,并且 PDGF 在体内的作用主要是刺激内皮细胞的分裂、增殖。因此,PDGF 常常与其它生长因子(例如 VEGF)相结合使用。Ekaputra^[32]利用静电纺丝技术制备了一种聚 ϵ -己内酯、胶原纤维和透明质酸水凝胶构成的三维混合支架,并在此水凝胶体系中双重负载 VEGF、PDGF-BB。体外实验研究表明该体系能够使得生长因子得到控制性释放,此种混合网络水凝胶不仅仅支持了细胞的粘附,而且能够形成原始的毛细血管网络。

2.5 多种生长因子共同作用

近年来在组织工程中,人们在材料上负载了多重信号分子(如多种细胞因子、生长因子、激素等),利用不同生长因子的不同作用协同起效并且相继性释放,从而为组织工程的进步发展提供了一个非常具有前景的方向。

在体内,血管生成是一个复杂的、多步骤的过程,因此就需要让不同的信号、生长因子或多肽各自在需要适当的时间发挥作用,促进血管的生成和成熟。Cohen 等^[33]在海藻酸钠/海藻酸钠硫酸酯水凝胶支架上负载了多重生长因子,利用 VEGF、PDGF 和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)与海藻酸钠硫酸酯间不同的亲和力,控制 VEGF、PDGF、TGF- β 1 有序地释放。结果显示:与壳聚糖硫酸酯结合能力最低的 TGF- β 1 在第一天就达到最大释放量,而 VEGF、PDGF 在第三天达到最大释放量。研究者将此凝胶体系植入大鼠背部皮下,1、3 月后取出进行分析,这种支架血管的密度与成熟血管的比例是只提供支架性能的海藻酸钠的 3 倍。

Mooney 等^[34]通过控制多种促血管生成因子、促血管成熟因子在时间上顺序性释放来增强微血管的

形成和成熟。促血管生成因子血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素 2(Ang-2)协同促进了内皮细胞出芽和内皮细胞周细胞的分离。促成熟因子血小板衍生生长因子(PDGF)和血管生成素-1(Ang-1)则会抑制 VEGF 早期阶段的血管生成和 Ang-2 介导的血管生成。研究发现,VEGF 和 Ang-2 还能够增强微血管的密度,若同时给予 PDGF 和 Ang-1,则会抑制微血管的形成。然而在一种时间可控支架的控制下,PDGF 和 Ang-1 相对延迟释放,能够促进血管生成而不会抑制发芽血管的生成。

3 粘附性多肽在组织工程中的应用

细胞外基质(ECM)蛋白主要包括纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原等^[35]。在血管新生的过程中,细胞和 ECM 的相互作用是非常重要的部分,也是一个非常复杂的过程。特定的生物信号通过这种相互作用传导到细胞内,从而调控细胞的黏附、迁移和增殖等细胞行为,进而诱导血管新生。人们发现 ECM 蛋白中某些多肽序列同样可以促进细胞的粘附作用,其中最早发现的粘附性多肽序列是由精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)组成的三肽,而这种多肽在组织工程中的应用也最多。此外,提取自纤连蛋白的精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸-缬氨酸(REDV)四肽以及源自层粘连蛋白的酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸(YIGSR)五肽也是研究较多的粘附性多肽序列。

3.1 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)

1984年,Pierschbacher等^[36]首次报道了 RGD 三肽是纤粘连蛋白(Fibronectin, FN)与其受体的特异性结合位点,它能与内皮细胞上的整合素 $\alpha_5\beta_1$ 相互作用, RGD 分子式如图 5 所示。多年的研究证实, RGD 可被多种整合素受体识别,如 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_8\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_{11}\beta_3$ 等,其中以 $\alpha_5\beta_1$ 和 $\alpha_v\beta_3$ 最为突出。整合素 $\alpha_5\beta_1$ 与纤粘连蛋白的结合是内皮细胞与细胞外基质黏附最主要的方式,人们相继发现 ECM 中很多糖蛋白如纤粘连蛋白、纤维蛋白原(Fibrinogen, Fb)、胶原蛋白(Collagen)和骨桥蛋白(Osteopontin, Opn)等均含有高度保守的 RGD 序列蛋白,并证实了 RGD 在介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质蛋白的相互作用中发挥重要作用^[37]。外源性 RGD 在多种病理条件下均具有治疗作用,研究者已将 RGD 与多种生物材料相结合,并应用于人造血管生物传感器、伤口修复等组织工程领域。

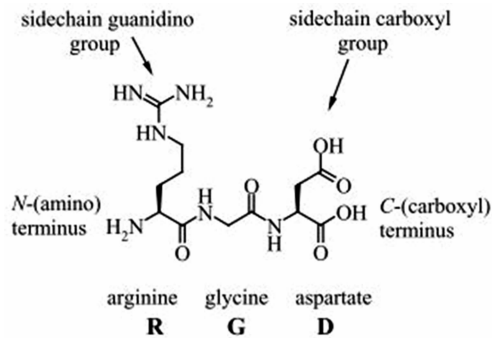


图 5 RGD 结构示意图^[38]

Figure 5 Schematic illustrations of RGD structure^[38]

相关研究已表明,在 RGD 的 N 端增加不同氨基酸序列对细胞的黏附能力并没有产生实质性的改变,仅对促进细胞黏附过程中的作用能力大小有所影响。此外,只有在 RGD 的 C 端天冬氨酸的羧基被其它氨基酸封闭或者变为其它基团时, RGD 才能保留其活性,因此人们的研究中经常把 RGD 设计为 RGDS、GRGDS、GRGDY 等序列^[38]。

Perets 等^[39]研究了一种将含有 RGD 序列肽链的 PEG(PEG-RGD)酶促偶联于透明质酸-酪胺(HA-Tyr)的可注射水凝胶体系,并发现此水凝胶可以促进功能血管的形成。该体系通过辣根过氧化物酶(HRP)和过氧化氢(H_2O_2)的催化作用将 PEG-RGD 偶联到的水凝胶上,PEG-RGD 用于为 HA-Tyr 水

凝胶网络增加粘合性信号,以提高整体水凝胶网络的生物活性。结果显示,PEG-RGD 修饰的水凝胶相比于空白水凝胶表现出更好的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)粘附作用。Schenk 等^[40]将 RGD 修饰的聚 2-噁唑啉网络应用于细胞粘附的研究,发现其不仅对健康的内皮细胞有好的识别与粘附作用,对人体的癌细胞有更强的识别功能。Lei 等^[41]在聚对苯二甲酸乙二酯(PET)表面固定了多肽 RGDS,发现此材料会促进内皮细胞的粘附、扩散和迁移。为了使材料达到对内皮细胞的特异性作用,研究者还将促进内皮细胞特异性粘附的多肽 REDV、YIGSR 以及促进血管生成的 SVVYGLR 序列也固定到 PET 表面,发现修饰有四种多肽序列的材料相对于单纯的 PET 和 PET-COOH 内皮细胞粘附能力大大提高。

随着研究的不断深入,研究者们发现材料降解的速度与血管生成的速度正相关,因此将一些酶敏感(酶响应断裂)的多肽引入其中,使材料的降解速率有所提高,从而使材料促血管生成的能力也有了进一步的提高。Zhu 等^[42]将胶原敏感多肽甘氨酸-异亮氨酸-丙氨酸(GIA)嵌入 PEG 链中,形成一种胶原敏感型 PEG 链(GIA-PEG),并将其与含有 RGD 序列的肽链的 RGD-PEG 链混合形成一种仿生 PEG 水凝胶。研究发现其中的 RGD-PEG 链可促进细胞粘附与管状结构的生成,而 GIA-PEG 的引入,通过胶原敏感断裂加速了材料的降解,进一步促进了内皮化管状网络的形成。因此该仿生 PEG 水凝胶可用作促进血管新生的支架材料。

不同 RGD 修饰支架材料对细胞增殖的影响如表 3 所示,RGD 链段的引入能够有效地促进材料的内皮细胞粘附,并使内皮细胞的迁移得以实现。许多研究报道证实,细胞-材料相互作用主要是通过细胞粘附受体(如整合素)介导,从而引导细胞的行为。而且,若希望修饰后的材料能够形成管状网络,还需要让材料具有多孔结构。另外,还有研究报道表明,环形的 RGD 多肽比直链型对内皮细胞粘附的能力更强^[43]。

表 3 不同 RGD 修饰支架材料对细胞增殖的影响
Table 3 The effect of different RGD-modified scaffolds on cell proliferation

基质材料	细胞类型	细胞相对增殖率 ^a	文献
仿生 PEG 水凝胶	内皮细胞	350% ^a	[42]
透明质酸-酪胺水凝胶	内皮细胞	200% ^a	[39]
PCL/Collagen/MAP-RGD	内皮祖细胞	200% ^a	[40]
聚对苯二甲酸乙二酯	内皮细胞	140% ^a	[41]

a. 以没有粘附性多肽的空白参照材料为 100%

3.2 酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸(YIGSR)

酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸(YIGSR)来源于层粘连蛋白的 B1 链,其作用的主要受体并非 RGD 作用的整合素受体,而是 67 kDa 层粘连蛋白受体^[44]。目前研究表明,YIGSR 可以促进肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞等多种细胞的粘附,还能有效地增强内皮细胞的迁移。因此在组织工程中,YIGSR 常被用来对无细胞粘附性的材料进行修饰改性,以提高材料对内皮细胞的亲和性^[45]。

Jun 等^[46]将具有内皮细胞粘附性的 YIGSR 肽序列和生物相容性优异的 PEG 连接于聚氨酯脲上,成功地制备了一种双重改性聚氨酯脲链 PUUYIGSR-PEG。研究发现 YIGSR/PEG 改性的聚氨酯脲表现出良好的机械性能。相比于未改性聚氨酯脲,其在细胞的铺展面积、粘附和迁移上表现出优异的性能,说明 YIGSR 的存在确实促进了细胞的粘附和增殖。

YIGSR 与 RGD 最大的区别就是其对内皮细胞的迁移有着重要的影响。Ren^[47]通过一种具有 YIGSR 多肽互补密度梯度的聚 2-羟乙基丙烯酸酯材料,研究了 YIGSR 对内皮细胞的选择性诱导迁移作用。相比于平滑肌细胞,内皮细胞在该材料上表现出向高密度 YIGSR 更快的迁移行为,从而说明了 YIGSR 对于内皮细胞的选择性。研究者同时还定量考察了两种细胞在相同密度 YIGSR 材料上的迁移速率,当 YIGSR 密度较高时,内皮细胞迁移速率明显高于平滑肌细胞。因此,YIGSR 对内皮细胞的选择

性在血管生成方面具有一定的优势。

3.3 精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸-缬氨酸 (REDV)

REDV 是纤维连接蛋白 III CS 位点上的一个活性氨基酸序列,可被整合素 $\alpha_4\beta_1$ 特异性识别。整合素 $\alpha_4\beta_1$ 主要表达于内皮细胞/内皮祖细胞,因此 REDV 可选择性地促进内皮细胞的黏附和增殖,而不会与成纤维细胞、平滑肌细胞相互作用^[48]。

Ji 等^[49]研究了连接有 REDV 多肽的两性离子聚合物 CBMA-*r*-BMA,用于提高材料对内皮细胞的选择性。研究发现,将相同浓度的两种细胞 HUVECs 和血管平滑肌细胞(HUASMCs)接种在不同的表面上,可以明显看出没有多肽修饰的 C3B3 对任何细胞没有产生粘附作用,而 C3B7-REDV 对 HUVECs(内皮细胞)有非常明显的粘附作用。另外,还对 C3B7-REDV 等材料对细胞的增殖、迁移进行了考察。利用无涂层的玻璃表面进行对照,在无涂层的玻璃表面,两种细胞的迁移、增殖无显著性差异;而 C3B7-REDV 上的 HUVECs 相对 HUASMCs 有着更好的细胞增殖和迁移,表明 C3B7-REDV 对 HUVECs 有显著的选择性。Wei 等^[50]以聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)作为基底薄膜,以不同分子量 PEG 为间隔臂将 REDV 配体连接到 PET 膜上。研究结果发现,REDV 的引入可以显著降低平滑肌细胞的黏附,促进血管内皮细胞粘附、增殖和生长;而相对高分子量 PEG 手臂,具有较短间隔臂的 REDV 配体对内皮细胞的选择性更高,这是由于 PEG 长链阻止了细胞的附着能力,部分抑制了 REDV 肽对内皮细胞的粘附能力。另外,本课题组^[51]将具有 REDV 多肽的肽链 GREVD 修饰在海藻酸钠上(ALG-REDV),对比修饰 RGD 与 YIGSR 多肽海藻酸钠,ALG-REDV 在体外显示出更好的诱导细胞增殖能力。将这三种材料植入小鼠背部皮下组织,28 天取出后观察,ALG-REDV 组表现了最高的血管密度。并且,在新生的纤维组织成 ALG-REDV 形成的血管密度是其它组的 1.5 倍。

表 4 不同多肽对细胞作用的影响总结
Table 4 The effect of different peptides on cells

多肽类型	作用细胞种类及作用能力
RGD	内皮细胞,内皮祖细胞,成纤维细胞,平滑肌细胞
环形 RGD	粘附内皮细胞,内皮祖细胞作用更强
YIGSR	成纤维细胞,平滑肌细胞,对内皮细胞迁移作用更强
REDV	选择性粘附内皮细胞

4 总结与展望

组织工程作为一个非常具有前景的领域,也得到了人们的广泛关注,虽然近年来组织工程有了很快的发展,但是仍然有很多的问题需要解决。如何促进组织工程支架内的血管化就是其中的一个重要的难题。针对在体内血管生成的机制与所涉及到的物质,人们进行了多方面的研究,并将研究应用于促血管化中。

在对生长因子的研究中,VEGF 的应用最为广泛,通过对比也可以发现 VEGF 在促进快速血管化上具有明显的优势,血管生成素-1(Ang-1)、血管生成素-2(Ang-2)、血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)虽然在促进血管生成上也具有重要作用,但是它们更多的是协同 VEGF 作用。在对粘附性多肽的研究中,RGD 多肽对内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞均具有一定的粘附作用,而 YIGSR 与 REDV 相比于 RGD 具有明显的选择性作用。特别是,YIGSR 对细胞迁移的影响更为显著。

因此,今后的研究重点有可能着重于粘附性多肽与生长因子的共同作用。在组织工程促血管化方面人们探索了很多方法。但是,仍旧面临许多困难,比如:如何实现体内的快速血管化;如何在快速血管化

后使血管化进入平稳发展时期;如何减少植入材料在体内所引发的炎症反应等等。相信在未来随着人们研究的深入,组织工程会有更快的发展。

参考文献:

- [1] Langer R. *Tissue Eng*, 2000, 1 (1):12~15.
- [2] <http://health.sohu.com/20081201/n260956890.shtml>.
- [3] Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63 (4/5):300~311.
- [4] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, Butler P, Seifalian AM. *Biomaterials*, 2005, 26 (14):1857~1875.
- [5] Caspi O, Lesman A, Basevitch Y, Gepstein A, Arbel G, Habib IH, Gepstein L, Levenberg S. *Circ Res*, 2007, 100 (2):263~272.
- [6] Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. *Trends Biotechnol*, 2008, 26 (8):434~441.
- [7] Risau W, Flamme I. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11:73~91.
- [8] Carmeliet P. *Nature*, 2005, 438:932~936.
- [9] Asahara T, Murohara T, Sullivan A. *Science*, 1997, 275 (14):964~967.
- [10] Brudno Y, Ennett-Shepard AB, Chen RR, Aizenberg M, Mooney DJ. *Biomaterials*, 2013, 34 (36):9201~9209.
- [11] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak AZ. *FASEB J*, 1999, 13:9~22.
- [12] Tomanek RJ, Holifield JS, Reiter RS, Sandra A, Lin JJ. *Dev Dyn*, 2002, 225 (3):233~240.
- [13] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyst S, Kieckens L, Gertszensten M, Fahrig M, Vandebroeck A, Harpal K, Eberhardt C, Decleraq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. *Nature*, 1996, 380 (4):435~439.
- [14] Del Gaudio C, Baiguera S, Boieri M, Mazzanti B, Ribatti D, Bianco A. *Biomaterials*, 2013, 34 (31):7754~7765.
- [15] Han F, Jia X, Dai D, Yang X, Zhao J, Zhao Y, Fan Y, Yuan X. *Biomaterials*, 2013, 34 (30):7302~7313.
- [16] Chung HJ, Kim JT, Kim HJ, Kyung HW, Katila P, Lee JH, Yang TH, Yang YI, Lee SJ. *J Control Release*, 2015, 205:218~230.
- [17] Yu Y, Chen J, Chen R, Cao L, Tang W, Lin D, Wang J, Liu C. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7 (18):9982~9990.
- [18] Matsusaki M, Sakaguchi H, Serizawa T, Akash M. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2007, 18 (6):775~783.
- [19] Shen YH, Shoichet MS, Radisic M. *Acta Biomater*, 2008, 4 (3):477~489.
- [20] Chiu LL, Radisic M. *Biomaterials* 2010, 31 (2):226~241.
- [21] Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham JA, Fiddes JC, Gospodarowicz D. *Nature*, 1987, 325:257~259.
- [22] REIDY V, LINDNER V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88 (4):3739~3743.
- [23] Jansen RG, an Kuppevelt TH, Daamen WF, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. *J Oral Pathol Med*, 2009, 38 (8):630~638.
- [24] Takayama T, Taguchi T, Koyama H, Sakari M, Kamimura W, Takato T, Miyata T, Nagawa H. *Biomaterials*, 2009, 30 (21):3580~3587.
- [25] Qu D, Li J, Li Y, Gao Y, Zuo Y, Hsu Y, Hu J. *J Biomed Mater Res A*, 2011, 96 (3):543~551.
- [26] Li X, Sun H, Lin N, Hou X, Wang J, Zhou B, Xu P, Xiao Z, Chen B, Dai J, Hu Y. *Biomaterials*, 2011, 32 (32):8172~8181.
- [27] Tsurkan MV, Hauser PV, Zieris A, Carvalhosa R, Bussolati B, Freudenberg U, Camuss G, Werner C. *J Control Release*, 2013, 167 (3):248~255.
- [28] Fagiani E, Christofori G. *Cancer Lett*, 2013, 328: 18~26.
- [29] Chiu LL, Radisic M. *Biomaterials*, 2010, 31 (2):226~241.
- [30] Thomas IK, Weiss C, George D, Yancopoulos, Deutsch U, Risau W. *Curr Biol*, 1998, 8 (9):529~532.
- [31] Lin H, Chen B, Sun W, Zhao W, Zhao Y, Dai J. *Biomaterials*, 2006, 27 (33):5708~5714.
- [32] Ekaputra AK, Prestwich GD, Cool SM, Hutmacher DW. *Biomaterials*, 2011, 32 (32):8108~8117.
- [33] Freeman I, Cohen S. *Biomaterials* 2009, 30 (11):2122~2131.
- [34] Brudno Y, Ennett-Shepard AB, Chen RR, Aizenberg M, Mooney DJ. *Biomaterials*, 2013, 34 (36):9201~9209.
- [35] Werb Z. *Cell*. 1997,91(4):439~442.
- [36] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. *Science*, 1987, 238:491~497.
- [37] Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. *Int J Mol Med*, 2013, 14 (7):13447~13462.
- [38] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. *Biomaterials*, 2003, 24 (24):4385~4415.
- [39] Wang LS, Lee F, Lim J, Du C, Wan AC, Lee SS, Kurisawa M. *Acta Biomater*, 2014, 10(6):2539~2550.

- [40] Schenk V, Rossegger E, Ebner C, Bangerl F, Reichmann K, Hoffmann B, Höpfner M, Wiesbrock F. *Polymer*, 2014, 6 (2):264~279.
- [41] Lei Y, Remy M, Labrugere C, Durrieu MC. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23 (11):2761~2772.
- [42] Zhu J, He P, Lin L, Jones DR, Marchant RE. *Biomacromolecules*, 2012, 13 (3):706~713.
- [43] Verrier S, Pallu S, Bareille R, Jonczyk A, Meyer J, Dard M, Amedee J. *Biomaterials*, 2002, 23:585~596.
- [44] Jun HW, West JL. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2004,15:73~94.
- [45] Hubbell JA, Massia SP, Drumheller PD, Herbert CB. *Polym Mater Sci Eng*, 1992, 66:30~31.
- [46] Jun HW, West JL. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005, 72 (1):131~139.
- [47] Ren T, Yu S, Mao Z, Moya SE, Ha L, Gao C. *Biomacromolecules*, 2014, 15 (6):2256~22564.
- [48] Lin QK, Din X, Qiu FY, Song XX, Fu GS. *Biomaterials*, 2010, 31(14):4017~4025.
- [49] Lin Q. K, Hou Y, Ren K. F, Ji J. *Thin Solid Films*, 2012, 520 (15):4971~4978.
- [50] Wei Y, Ji Y, Xiao L, Lin Q, Ji J. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 84 (2):369~378.
- [51] Wang W, Guo L, Yu YY, Chen ZP,Zhou R, Yuan Z. *J Biomed Mater Res Part A*, 2015, 103A:1703~1712.

Recent Development of Angiogenesis Promoting Substance in Tissue Engineering

ZHANG Ying-xue, WANG Wei*, YUAN Zhi*

(Key Laboratory of Functional Polymer Materials of Ministry of Education, Institute of Polymer Chemistry, Nankai University, and Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering(Tianjin), Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Tissue engineering is a new discipline which combines biology and material science to construct tissue or organs in vitro or in vivo. In the study of promoting angiogenesis, growth factors and adhesion peptides, these two kinds of material have a wide range of applications. Growth factors includes vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin 1 (Ang-1), angiopoietin-2 (Ang-2), platelet derived growth factor (PDGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF); adhesion peptide mainly includes Arg-Gly-Asp (RGD), Ary-Glu-Asp-Val (REDV) and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR). This paper summarizes the research progress of these two kinds of materials in tissue engineering.

Key words: Tissue engineering; Angiogenesis; Growth factor; Adhesive peptide