

Quantitative Detection of Growth Factors in Porcine Small Intestinal Submucosa Matrix Materials

Yang Zhang¹, Leilei Xia¹, Jianping Gao², Fumin Men¹, Xiaolong Zheng¹, Jinhui Zhang¹, Yi Chen^{1*}, Bo Zhao^{1*}

¹Beijing Biosis Healing Biological Technology Co., Ltd., Beijing

²State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, CAS, Beijing

Email: *cy63532499@163.com, *zhaobo@biosishealing.com

Received: May 4th, 2018; accepted: May 20th, 2018; published: May 28th, 2018

Abstract

In this study, three growth factors including basic fibroblast growth factor (FGF2), transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in two SIS products (VIDASISTM and Biodesign[®]) were quantified by enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) kit through the preliminary treatment of liquid nitrogen freezing and grinding technology which was aimed to release the growth factors from the tissue. Results showed that contents of TGF $\beta 1$, VEGF and FGF2 in VIDASISTM were 8375 ± 2125 pg/g, 5486 ± 1043 pg/g and 3990 ± 1372 pg/g respectively; while the corresponding contents in Biodesign[®] were 11517 ± 1331 pg/g, 5432 ± 272 pg/g and 5417 ± 947 pg/g.

Keywords

Porcine Small Intestinal Submucosa, Acellular Matrix, Transforming Growth Factor, Basic Fibroblast Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor

脱细胞猪小肠粘膜下层基质材料中生长因子的定量检测

张 扬¹, 夏磊磊¹, 高建萍², 门福民¹, 郑晓龙¹, 张晋辉¹, 陈 毅^{1*}, 赵 博^{1*}

¹北京博辉瑞进生物科技有限公司, 北京

²中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京

Email: *cy63532499@163.com, *zhaobo@biosishealing.com

*通讯作者。

文章引用: 张扬, 夏磊磊, 高建萍, 门福民, 郑晓龙, 张晋辉, 陈毅, 赵博. 脱细胞猪小肠粘膜下层基质材料中生长因子的定量检测[J]. 材料科学, 2018, 8(5): 595-602. DOI: 10.12677/ms.2018.85070

收稿日期：2018年5月4日；录用日期：2018年5月20日；发布日期：2018年5月28日

摘 要

采取液氮冷冻粉碎技术将猪小肠粘膜下层脱细胞基质(SIS, Small Intestinal Submucosa)粉碎,再通过预处理将SIS材料中的三种活性生长因子包括碱性成纤维细胞生长因子(FGF2)、转化生长因子(TGF β 1)和血管内皮生长因子(VEGF)释放出来,以便采用特异性酶联免疫(ELISA)试剂盒检测,进而得到样品中三种活性生长因子的含量。两种不同的SIS产品(VIDASISTM和Biodesign[®])中的检测结果表明:VIDASISTM中TGF β 1的含量为 8375 ± 2125 pg/g、VEGF的含量为 5486 ± 1043 pg/g、FGF2的含量为 3990 ± 1372 pg/g; Biodesign[®]中TGF β 1的含量为 11517 ± 331 pg/g、VEGF的含量为 5432 ± 272 pg/g、FGF2的含量为 5417 ± 947 pg/g。

关键词

猪小肠粘膜下层, 脱细胞基质, 转化生长因子, 碱性成纤维细胞生长因子, 血管内皮生长因子

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

猪小肠粘膜下层脱细胞基质(SIS, Small Intestinal Submucosa)是猪小肠粘膜下层通过脱细胞、成型和灭菌等工艺制备而成的膜状材料,具有生物相容性高、生物可降解和可吸收等优点,广泛用于肌腱、硬脑膜、腹壁和皮肤等组织的修复或重建[1] [2]。传统修补术手术时间较长、张力大等缺点影响患者的恢复,SIS材料可在一定程度上改善这些缺陷,其诱导细胞黏附生长、感染率低等特点可证实SIS是一种良好的动物源植入材料。SIS补片的成分主要包括I、III型胶原、纤维连接蛋白和多种生长因子(TGF- β 、VEGF和FGF等)[2] [3]。生长因子是由多种细胞分泌,作用于特定的靶细胞,调节细胞分裂、基质合成与组织分化的细胞因子,有助于细胞功能的增强和血管化的形成[4] [5]。在体内组织中,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体内细胞生存的微环境[6]。它们是高活性、多功能的多肽或蛋白质,主要在近距离发挥局部作用,它们与受体的亲和力极高,也极易受外界影响而失活。创面愈合是一个复杂的生物学过程,生长因子在改善各种生理和病理状态、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,其关键在于在促进肉芽组织形成的同时,加速创面再上皮化进程[7]。

TGF- β 是一种丰富的骨基质蛋白,也是一种肽类抗炎症生长因子,广泛存在于正常组织及转化细胞中,在血小板和骨组织中含量较高,在骨形成和骨重建过程中发挥着极其重要的作用,可以通过控制免疫细胞(T细胞、B细胞等)的增殖、分化和活化来进行免疫调节,促进伤口愈合以及血管发生等[8] [9] [10]。VEGF是对血管内皮细胞具有高度特异性的血管源性生长因子,由血小板、血管平滑肌细胞、内皮细胞、成骨细胞或肿瘤细胞等合成和分泌,对于新血管形成至关重要,具有增加血管通透性和促进内皮细胞增殖等功能,还具有保护神经的作用,其中对VEGF的研究最多也最深入[8] [11]。FGF是一组具有相似结构特征的多肽,广泛存在于机体组织内,目前已知FGF家族至少包括23个可编码相关结构蛋白的基因。

FGF 具有很强的促细胞分裂和增殖活性的作用，可诱导毛细血管的生成。在 FGF2 提取中使用到肝素，肝素与 FGF2 结合形成稳定的复合物，可以保持此类生长因子的生物活性，肝素也可以直接结合到 FGF2 受体上[6] [8] [12]。

ELISA 试剂盒多用于检测血清或血浆中的生长因子，而组织中的生长因子不易提取和检测，本实验采用三种方法对样品进行预处理，进而释放出 SIS 中的活性生长因子，再通过 ELISA 试剂盒检测生长因子的含量，通过对比筛选出 SIS 中不同生长因子适宜的前处理方法，并与进口同类产品生长因子的含量进行了比较。

2. 实验部分

2.1. 主要材料

SIS (VIDASIS™)由北京博辉瑞进生物科技有限公司提供；SIS (Biodesign®)购自美国库克公司；ELISA 试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司；尿素购自西陇化工股份有限公司；肝素钠购自国药集团化学试剂有限公司；I 型胶原酶购自北京欣经科生物技术有限公司。

2.2. 主要仪器

冷冻粉碎机(LT-100)，中科耐驰(北京)技术有限公司；LGI-100F 真空冷冻干燥机，北京松源华兴科技发展有限公司；HC-2518R 高速冷冻离心机，安徽中科中佳科学仪器有限公司；Thermo 全波扫描多功能酶标仪 VARIOSKAN FLASH，美国 Thermo Fisher 公司。

2.3. 主要试剂的配制

- 1) Buffer 1: 2.5 mg/mL 肝素钠；2 mol/L 尿素。
- 2) Buffer 2: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4; 0.36 mmol/L CaCl₂。

2.4. 实验方法

2.4.1. 冷冻粉碎步骤

将干燥 SIS 补片材料用无菌手术剪刀剪成尺寸小于 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的小片，便于 SIS 材料进入粉碎机内部；将粗碎 SIS 材料放在进料台上，使用不锈钢进料棒将 SIS 材料送进冷冻粉碎机进料口，并向进料口处持续注入适量液氮，在进料口处混合 SIS 与液氮，利用粉碎机粉腔体内部的负压，使 SIS 粉料与液氮吸入粉碎腔，粉碎温度 -196°C ；粉碎腔出口处设有不锈钢筛网，孔径 80~100 目，利用出口处的正压，将符合尺寸的 SIS 粉送出粉碎腔，出口处用透气性好的无菌布袋收集粉碎好的 SIS 粉料；在停止供液氮后需迅速将 SIS 粉料放入无菌密封罐或自封袋中备用，待恢复室温后方可打开取用。

2.4.2. 活性生长因子提取方法

通过以下三种方法分别提取三种活性生长因子：

方法一：称取 SIS 材料粉碎后样品 5 mg，加入 1 mL Buffer 1，高速低温匀浆 20~30 min 至液体呈胶体状，14000 rpm 高速离心 30 min，提取上清液，定容到 1 mL， 4°C 保存。

方法二：称取 SIS 材料粉碎后样品 5 mg，加入 1 mL Buffer 1，高速低温匀浆 20~30 min 至液体呈胶体状，于 4°C 匀速搅拌 24 h，14000 rpm 高速离心 30 min，提取上清液，定容到 1 mL， 4°C 保存。

方法三：称取 SIS 材料粉碎后样品 50 mg，加入 8 mL Buffer 2， 100°C 变性 10 min，冷却后加入 200 μg 胶原酶 I，于 37°C 酶解 1 h，离心取上清；沉淀加入 8 mL Buffer 2 和 200 μg 胶原酶 I，于 37°C 酶解 1 h，离心取上清；反复至第五次提取上清；将上清液合并冻干收集并称量。称取 5 mg 冻干物加入 1 mL Buffer

1, 4℃保存。

方法一和方法二通过不同的处理方法尽可能多地释放生长因子,方法三则通过酶解的方式去除胶原蛋白等高丰度物质,进而提取生长因子。三种方法经高速离心之后上清液中主要含有生长因子及其他微量蛋白,由于 ELISA 试剂盒是基于抗原抗体特异性结合的检测方法,故上清液中其他物质对检测几乎无影响。

2.4.3. ELISA 检测方法

TGF β 1 和 VEGF 采用双抗夹心 ELISA 法,FGF2 采用竞争抑制 ELISA 法。

将三种方法处理的样品按 ELISA 试剂盒说明书操作,操作步骤如下(以 TGF β 1 为例):

1) 加样:分别设置标准孔、待测样品孔、空白孔,依次加入 100 μ L 不同浓度的标准品和样品,空白孔加标准品缓冲液,酶标板覆膜后 37℃温育 1 h,弃去液体后甩干;

2) 每孔加检测溶液 A 工作液 100 μ L,37℃温育 1 h,弃去液体,每孔用 350 μ L 洗涤液洗涤 1~2 min 并甩干,该过程重复 3 次;

3) 每孔加检测溶液 B 工作液 100 μ L,37℃温育 1 h,弃去液体,每孔用 350 μ L 洗涤液洗涤 1~2 min 并甩干,该过程重复 5 次;

4) 每孔加 90 μ L TMB 底物溶液,37℃避光显色(10~20 min),每孔加 50 μ L 终止溶液终止反应,轻轻摇匀;

5) 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的光密度值(O.D.值);

6) 根据标准品建立标准曲线,代入公式得到样品中活性生长因子含量,再换算成其在 SIS 补片样品干重中的含量。

3. 结果与讨论

3.1. 检测结果

3.1.1. TGF β 1 检测结果

根据 ELISA 试剂盒不同浓度的 TGF β 1 标准品在 450 nm 波长下的光密度值(O.D.值)做成标准曲线,如图 1 所示。

如图 2 所示,通过方法一检测 VIDASISTM 中 TGF β 1 的含量为 5391 ± 370 pg/g, Biodesign[®] 中 TGF β 1 的含量为 6702 ± 230 pg/g;方法二检测 VIDASISTM 中 TGF β 1 的含量为 8375 ± 2125 pg/g, Biodesign[®] 中 TGF β 1 的含量为 11517 ± 331 pg/g;方法三检测两种 SIS 补片中 TGF β 1 的含量基本为零。

3.1.2. VEGF 检测结果

根据 ELISA 试剂盒不同浓度的 VEGF 标准品在 450 nm 波长下的光密度值(O.D.值)做成标准曲线,如图 3 所示。

如图 4 所示,通过方法一检测 VIDASISTM 中 VEGF 的含量为 3974 ± 871 pg/g, Biodesign[®] 中 VEGF 的含量为 5213 ± 737 pg/g;方法二检测 VIDASISTM 中 VEGF 的含量为 5486 ± 1043 pg/g, Biodesign[®] 中 VEGF 的含量为 5432 ± 272 pg/g;方法三检测两种 SIS 补片中 VEGF 的含量基本为零。

3.1.3. FGF2 检测结果

根据 ELISA 试剂盒不同浓度的 FGF2 标准品在 450 nm 波长下的光密度值(O.D.值)做成标准曲线,如图 5 所示。

如图 6 所示,通过方法一检测 VIDASISTM 中 FGF2 的含量为 3990 ± 1372 pg/g, Biodesign[®] 中 FGF2

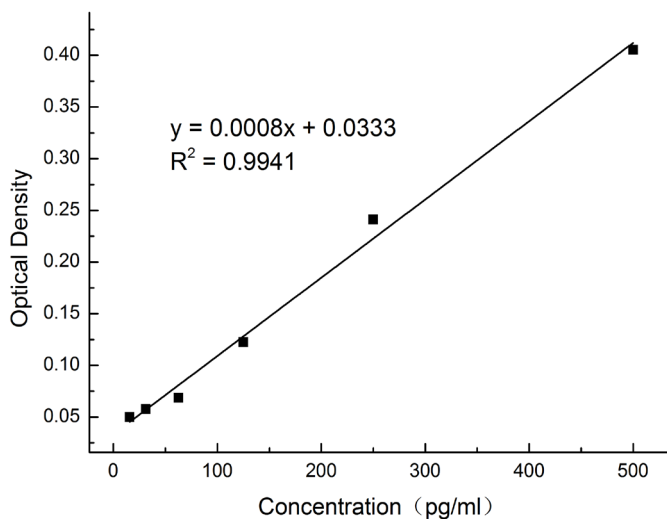


Figure 1. The correlation curve between the concentration of TGFβ1 standard and O.D. value
图 1. 不同浓度 TGFβ1 标准品的 O.D.值标准曲线

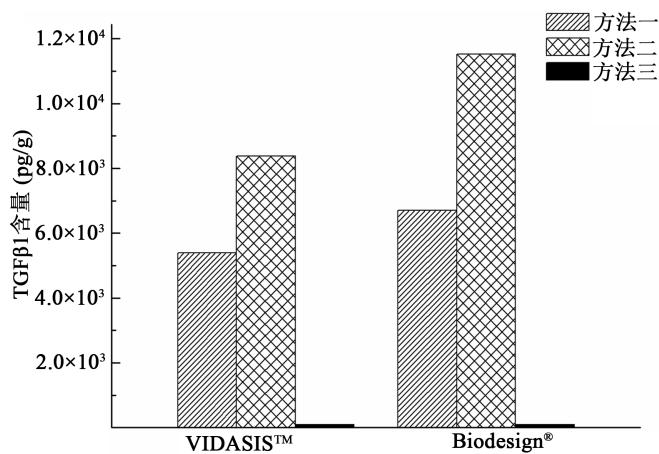


Figure 2. Comparison of TGFβ1 assay results of different sample preparation methods
图 2. 不同样品前处理方法的 TGFβ1 检测结果对比

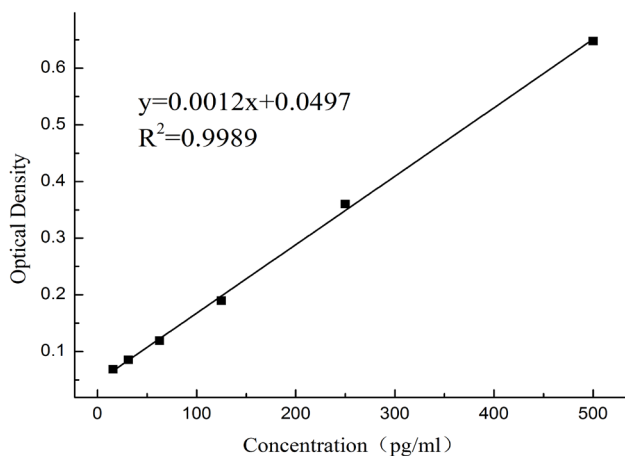


Figure 3. The correlation between the concentration of VEGF standard and O.D. value
图 3. 不同浓度 VEGF 标准品的 O.D.值标准曲线

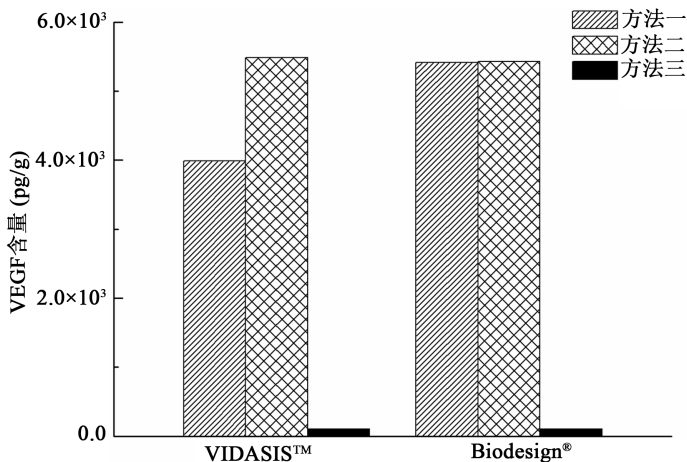


Figure 4. Comparison of VEGF assay results of different sample preparation methods
图 4. 不同样品前处理方法 VEGF 检测结果对比

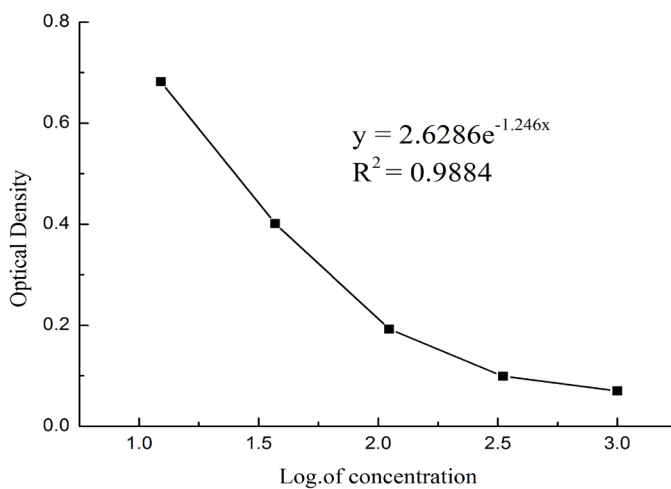


Figure 5. The correlation between the concentration of FGF2 standard and O.D. value
图 5. 不同浓度 FGF2 标准品的 O.D. 值标准曲线

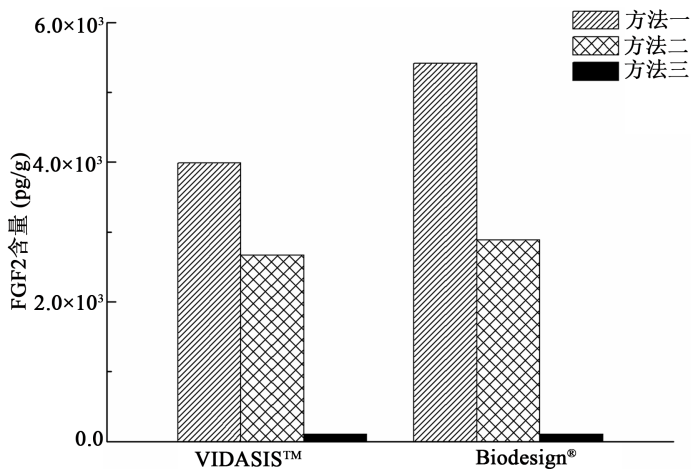


Figure 6. Comparison of FGF2 assay results of different sample preparation methods
图 6. 不同样品前处理方法 FGF2 检测结果对比

的含量为 5417 ± 947 pg/g; 方法二检测 VIDASIS™ 中 FGF2 的含量为 2668 ± 384 pg/g, Biodesign® 中 FGF2 的含量为 2887 ± 154 pg/g; 方法三检测两种 SIS 补片中 FGF2 的含量基本为零。

3.2. 讨论

本研究对猪小肠粘膜下层脱细胞基质中的三种生长因子(TGFβ1、VEGF、FGF2)进行检测, 由于生长因子对温度非常敏感, 样品前处理过程均处于低温条件下。Buffer 1 中加入肝素钠, 可使生长因子和肝素结合从而保持并促进其活性, 肝素是糖胺聚糖(GAG)的一种, 糖胺聚糖也是脱细胞基质(ECM)的重要组成部分, 许多活性生长因子通过肝素 HS 分子紧密结合到特定的 ECM 中[6], 其中 FGF2 与肝素结合是研究最透彻的。

参考文献[13]和文献[14]中活性生长因子的提取方法时, 由于两种 SIS 产品 VIDASIS™ 和 Biodesign® 在生产过程中有除去蛋白酶(胰酶等)的工艺, 故 Buffer 1 中加入肝素和尿素即可, 不必加入各种蛋白酶抑制剂的混合物。方法一采用 ELISA 试剂盒说明书中样品预处理步骤, SIS 被高速匀浆成胶体状态, 生长因子释放出来并与肝素结合保持活性; 方法二中 SIS 被匀浆成胶体状再低温搅拌 24 h, 使生长因子充分释放出来; 方法三先用胶原酶将 SIS 中的胶原蛋白酶解, 使低丰度蛋白(纤维连接蛋白和生长因子等)释放出来, 但检测过程中发现几乎检测不到生长因子, 可能是处理过程中 100℃ 的高温会导致生长因子变性, 失去活性的生长因子不能与试剂盒中的固相载体结合。TGFβ1 和 VEGF 用方法二检测含量最高, 但 FGF2 用方法一检测含量最高, 因为肝素与 FGF2 结合不但可以保持其活性, 还会抑制此类活性生长因子的释放[6]。组织中生长因子释放难、检测方法单一的问题需要进一步探究, 从而建立新的更为简便、准确的检测方法。

4. 结论

生长因子对提取条件要求非常严格, 不同的生长因子由于其种类和作用机制的不同, 其适宜的提取方法也不尽相同。该实验通过对 SIS 材料生长因子的预处理方法的比较, 得到三种生长因子(TGFβ1、VEGF、FGF2)最适宜的提取方法并检测其含量。其中 VIDASIS™ 中 TGFβ1 的含量为 8375 ± 2125 pg/g、VEGF 的含量为 5486 ± 1043 pg/g、FGF2 的含量为 3990 ± 1372 pg/g; Biodesign® 中 TGFβ1 的含量为 11517 ± 331 pg/g、VEGF 的含量为 5432 ± 272 pg/g、FGF2 的含量为 5417 ± 947 pg/g。

基金项目

本研究得到国家 863 计划新材料领域专项(2015AA033602), 北京市科技新星计划(Z181100006218013)和科技部中小企业创新基金(Z14010101281)的经费支持。

参考文献

- [1] 夏磊磊, 陈毅, 门福民, 等. 不同组织来源的胶原蛋白生物材料物理性能对比研究[J]. 材料科学, 2017, 7(4): 431-439.
- [2] 陈毅, 夏磊磊, 张扬, 等. 脱细胞猪小肠黏膜下层基质中纤维连接蛋白定量检测方法研究[J]. 生物学杂志, 2018, 35(2): 97-100.
- [3] 林茂虎, 郁华亮, 苗芮, 等. 小肠粘膜下层在膀胱组织修复中生长因子释放的研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(7): 578-580.
- [4] Traverse, J.H. (2012) Using Biomaterials to Improve the Efficacy of Cell Therapy Following Acute Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5, 67-72. <https://doi.org/10.1007/s12265-011-9330-y>
- [5] Discher, D.E., Mooney, D.J. and Zandstra, P.W. (2009) Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science*, 324, 1673-1677. <https://doi.org/10.1126/science.1171643>
- [6] 丁珊珊, 崔元璐, 宫政, 等. 肝素在生长因子控制释放中的应用[J]. 化学进展, 2008, 20(12): 1998-2011.

- [7] 付小兵, 程飏, 盛志勇. 生长因子应用于临床创伤修复——十年的主要进展与展望[J]. 中国修复重建外科杂志, 2004, 6(6): 508-512.
- [8] 张莉莉, 李玉坤. 生长因子对骨代谢影响的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(2): 121-126.
- [9] 肖亚南, 张启芳. 转化生长因子 β 与炎症性肠病的相关性研究进展[J]. 广西医学, 2017, 39(12): 1908-1911.
- [10] 徐蕴, 韩树斋. 转化生长因子- β 1 在肿瘤发生发展中的作用[J]. 济宁医学院学报, 2017, 40(6): 429-433.
- [11] 冯璐, 狄国虎, 周庆军. 血管内皮生长因子及其受体家族在角膜组织及角膜病变中的作用和研究进展[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(11): 1644-1650.
- [12] 吴素英. 碱性成纤维细胞生长因子与小儿烧伤创面的愈合[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(33): 6215-6222.
- [13] Hodde, J., Janis, A., Ernst, D., *et al.* (2007) Effects of Sterilization on an Extracellular Matrix Scaffold: Part I. Composition and Matrix Architecture. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, **18**, 537-543.
<https://doi.org/10.1007/s10856-007-2300-x>
- [14] 滕世峰. 基于两种制作猪小肠粘膜下层细胞基质方式的研究[D]: [硕士学位论文]. 上海: 第二军医大学, 2016.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-7613, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: ms@hanspub.org