

热点追踪

【编者按】当前，由于疾病、意外事故等原因引起的骨损伤、骨缺失的人数急速攀升。为了缓解和治愈骨组织疾病对患者机体造成的痛苦和功能障碍，人们对骨修复技术的依赖性亦日益俱增。目前骨修复的主要方法有自体骨移植、异体骨移植、人工合成骨移植(仿生骨修复)。其中，自体骨移植来源有限，且会造成患者病愈后的疼痛，对其康复后的行动造成一定的限制；异体骨移植虽然来源较前者丰富，但成本高、加工处理复杂，并且存在免疫排斥、新来源疾病传播等风险。因此仿生骨修复技术成为该类疾病治愈的关注热点。近日，第四军医大学口腔医院陈吉华教授和牛丽娜副教授课题组在仿生骨修复技术的研究中意外发现聚阳离子可以稳定钙磷溶液形成带正电荷的矿化前体，并能成功诱导带正电荷的胶原纤维的纤维内矿化。该发现颠覆了库伦引力诱导纤维内矿化的传统理论，为探索仿生矿化的新机制提供了可能。目前该成果以 Article 的形式发表于 *Nature Materials*。

聚阳离子诱导纤维内矿化 翻开仿生骨修复的新篇章

牛丽娜¹，陈吉华¹，宋群¹，杨耀东²

(1. 第四军医大学口腔医院，陕西 西安 710032)

(2. 西安交通大学，陕西 西安 710049)

近年来，由创伤、肿瘤等因素造成的骨缺损发生率呈上升趋势，给患者带来了巨大的痛苦。当缺损量超出自体修复能力时，就需要天然或人工骨替代材料来进行修复。据世界卫生组织报道，全世界每年约有 220 万的患者需要进行骨移植修复。在众多骨缺损修复材料中，自体骨、异体骨是常用的移植材料，但是它们存在来源有限、免疫排斥、病毒传播等问题，难以满足临床需求。另外，异种骨还因抗原性强而应用较少。所以，合成结构功能高度仿生的人工骨再生修复材料是解决这一问题的关键。好的修复材料应当尽量“靠近”自然成骨过程，对破损处进行“仿生”修复。

自然骨组织最主要的结构特点就是胶原纤维和羟基磷灰石所形成的纤维内矿化模式和 7 级分级结构，按照矿物质与胶原的相对位置关系，这些矿物质可分为纤维内矿化和纤维间矿化，其中纤维内矿化决定了骨组织优异的力学特性和生物学特征。在构建人工骨修复材料时，也应尽最大可能地模拟天然骨组织的这种纤维内矿化的结构形式。所以探索纤维内矿化的机制对于指导仿生矿化材料的构建和生物矿化机制的揭示具有重要的意义。

在天然骨组织的形成过程中，非胶原蛋白调控着整个矿化的进程，也成为仿生矿化中仿生的关键一步。这些非胶原蛋白最主要的特征是富含羧基，而呈阴离子特

性。基于这一特性，传统的仿生矿化机制认为带负电的非胶原蛋白(或者非胶原蛋白类似物)稳定钙磷溶液，形成带负电荷的矿化前体。基于正负电荷相吸的库伦引力理论，带负电荷的矿化前体与带正电荷的胶原位点间相互吸引，成为纤维内矿化形成的动力。基于这一理论，几乎所有的体外研究都使用富含羧基的酸性聚合物来模拟非胶原蛋白的功能，并集中于聚阴离子诱导的纤维内矿化上。

第四军医大学口腔医院陈吉华教授和牛丽娜副教授课题组，在前期的研究中，意外的发现聚阳离子也可以稳定钙磷溶液形成带正电荷的矿化前体，并能成功诱导带正电荷的胶原纤维的纤维内矿化(如图 1)。这一实验现象与传统的基于库伦引力的仿生矿化机制相左，提示仿生矿化机制其实存在其他的可能性。

历时 3 年，牛丽娜课题组使用鼠尾胶原、重组的牛皮胶原、脱矿的牙本质胶原、脱矿的骨胶原等不同的胶原模型反复印证了聚阳离子诱导纤维内矿化这一实验现象。通过胶原改性，发现在胶原上增加负电荷，会抑制聚阳离子诱导的纤维内矿化的形成，相反如果胶原上增加正电荷，会促进聚阳离子诱导的纤维内矿化的形成(如图 2)。这一实验发现，动摇了传统的基于库伦引力的仿生矿化机制，显示原本经典的聚阴离子诱导的纤维内矿化理论并不全面。

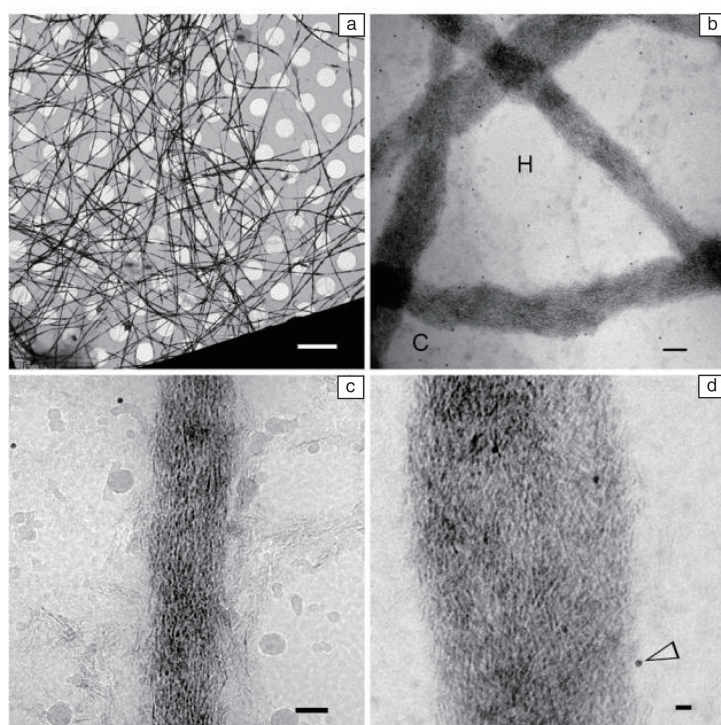


图 1 冷冻透射电镜结果显示聚丙烯氯化铵稳定的钙磷溶液能够诱导纤维内的矿化。(a)低倍镜下显示重组的单层胶原基本上被完全矿化,图中标尺=5 μm ; (b)高倍镜下,可以清楚的观察到羟基磷灰石晶体充满胶原内部间隙,图中标尺=100 nm; (c)单根矿化胶原的高倍镜观察,图中标尺=50 nm; (d)更高倍镜观察下可见羟基磷灰石晶体在胶原内部沿胶原纤维的长轴有序排列,图中标尺=20 nm

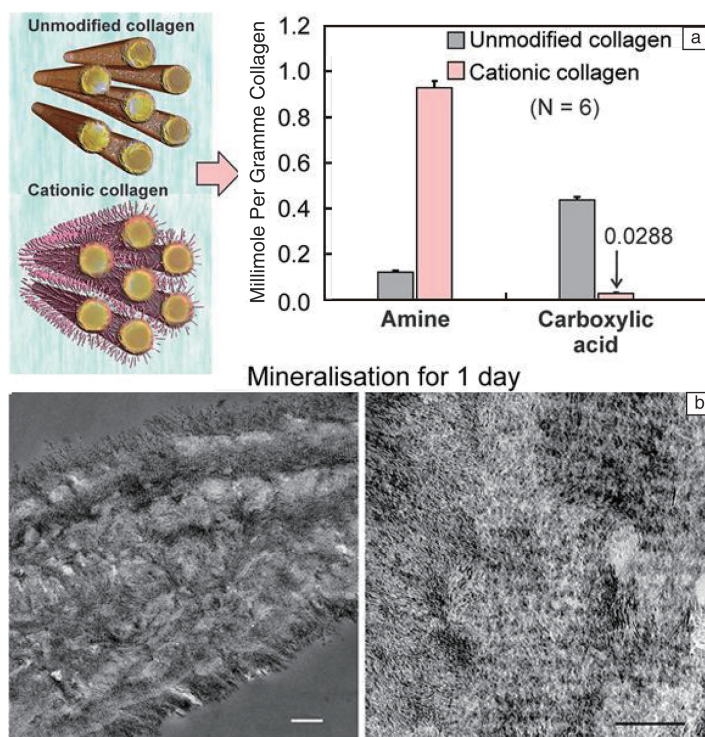


图 2 通过交联法在胶原表面接枝聚阳离子实现胶原的阳离子改性。(a)改性后胶原表面的氨基数量显著增加,而羧基数量显著降低 ($P < 0.05$); (b)左图为阳离子型胶原在聚丙烯氯化铵稳定的钙磷溶液中仅孵育 1 天即可发生显著的纤维内矿化,图中标尺=500 nm; 右图为高倍镜下观察可见羟基磷灰石晶体在胶原纤维内部有序排列,并反映了胶原的横纹结构,图中标尺=200 nm

课题组使用改良的液相色谱法证实胶原纤维具有半透膜的性质, 小于 6 KDa 的分子可以自由通过胶原纤维的内部间隙, 大于 40 KDa 的分子无法进入胶原纤维的内部间隙。由于矿化系统所使用的聚电解质分子量较大, 这些分子会被部分或者全部排出在胶原纤维之外, 同时由于这些聚电解质带有大量的电荷, 势必在胶原内外环境间形成 Gibbs-Donnan 平衡, 也就是电荷和渗透压的双平衡。

为了印证这一假设, 通过使用计算机模拟和液相原子力显微镜技术观察发现, 当胶原纤维处于富含高分子量的聚电解质溶液中时, 胶原纤维内部的水分流出、胶原收缩、直径变小, 并在胶原内部形成弹性回缩力, 当收缩的胶原处于聚电解质稳定的钙磷溶液中时, 会吸引液态的矿化前体进入胶原内部, 并在胶原内部不同氨基酸残基的作用下, 从无定型态转化为结晶态的磷灰石,

形成纤维内矿化(如图 3)。这样的一个机制可以总结为基于渗透压和电荷平衡的纤维内仿生矿化理论。

该成果在生物矿化机制研究领域中具有里程碑式的意义。聚阳离子诱导纤维内矿化现象的发现不仅打开了仿生矿化材料构建这一新领域的大门, 扩大了非胶原蛋白类似物的范围, 更重要的是颠覆了被认为是“圣经”的库伦引力诱导纤维内矿化的理论, 表明单纯以库伦力诱导纤维内矿化理论为基础, 试图通过增加胶原表面正电荷促进聚阴离子诱导胶原矿化的方法并不完备。课题组提出并反复印证的新的矿化理论——基于渗透压和电荷平衡的矿化, 是更加全面的纤维内矿化的理论。这一新理论提示我们骨组织生物矿化的研究不应该仅仅局限于酸性的非胶原蛋白, 大量的碱性蛋白甚至是广泛存在的蛋白聚糖都有可能影响着生物矿化的进程。

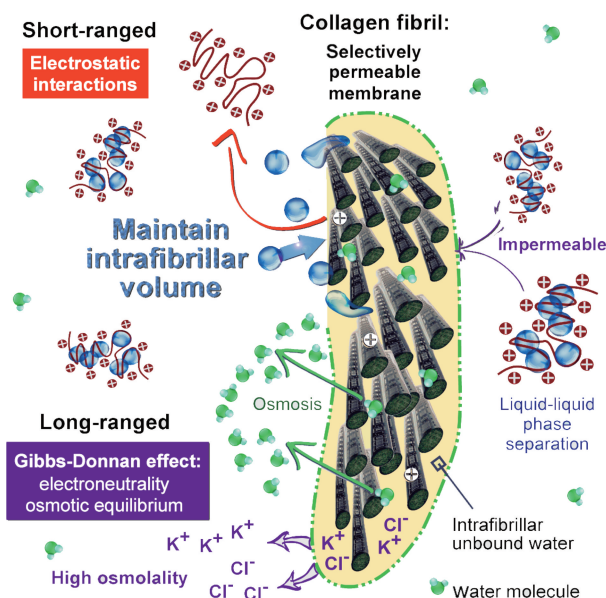


图3 离子型聚合物(以聚阳离子为例)诱导纤维内矿化的机制示意图。带正电荷的大分子阳离子聚合物无法进入胶原内部, 在胶原内外逐步形成电荷和渗透压的双平衡, 从而引起胶原内水分子外流及无定形磷酸钙前体的内流, 进入胶原内部的无定形磷酸钙在胶原内部不同氨基酸残基的作用下, 从无定型态转化为结晶态的磷灰石, 形成纤维内矿化

鉴于该研究为生物矿化机制的探索提供了强有力的理论支撑, 拓宽了生物矿化的研究范围, 该成果近日在 *Nature Materials* 以 Article 形式发表 (DOI: 10.1038/nmat4789)。我

们相信, 基于渗透压和电荷平衡的纤维内仿生矿化理论, 将翻开仿生骨修复的新篇章。

(编辑 盖少飞)