



仿生矿化与硬组织修复

金晔丽^{1,2} 潘海华^{*2} 唐睿康^{*1,2}

(¹ 浙江大学化学系, 杭州 310027)

(² 浙江大学求是高等研究院, 杭州 310027)

摘要: 生物矿化(Biomineralization)是生物硬组织(软体动物的外壳, 脊椎动物的骨和牙等)形成的重要环节, 是生物体调控矿物沉积, 并利用矿物增强硬组织机能的重要生物策略。生物矿化所形成的生物矿物具有多级有序的结构、优异的机械性能和重要的生理功能, 启发了有机-无机复合生物材料的设计和仿生矿化制备, 为体内外硬组织修复提供研究思路和奠定材料基础。本文主要综述了生物矿化的基本原理和主要生物矿物, 矿物结晶原理和新认识, 与硬组织修复密切相关的胶原矿化机制和最新进展, 硬组织材料的多级结构特征, 以及仿生矿化在硬组织修复中的前沿进展。

关键词: 仿生合成; 有机-无机复合材料; 骨; 牙

中图分类号: O614.23

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2020)06-1049-14

DOI: 10.11862/CJIC.2020.121

Biomimetic Mineralization and Hard Tissue Repair

JIN Ye-Li^{1,2} PAN Hai-Hua^{*2} TANG Rui-Kang^{*1,2}

(¹Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(²Qiushi Academy for Advanced Studies, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Biomineralization is an importance process of hard tissues (such as mollusks shells, and vertebrates bones and teeth) formation, by which the precipitation of minerals are controlled in biological systems to enhance hard tissues functions. Its products, biominerals, have hierarchically ordered structures, super mechanical properties, and many important physiological functions. This inspired the designs and fabrications of organic-inorganic hybrid biomaterials for hard tissue repair via biomimetic mineralization (*in vitro* and *in vivo*). This review mainly summarizes the fundamental principles of biomineralization and the main biominerals, the principles and new findings of crystallization pathways, the mechanisms and recent advances in collagen mineralization that closely related to hard tissues repair, the hierarchical structures of hard tissues, and recent break-through of hard tissue repair via biomimetic mineralization and their perspectives.

Keywords: biomimetic synthesis; organic-inorganic hybrid composites; bone; tooth

0 引言

生物硬组织如脊椎动物的牙和骨, 软体动物的外壳等具有分层有序的结构特征、优异的机械性能,

在生物体内发挥防护、支撑、运动和咀嚼摄食等重要生理功能。生物硬组织是通过生物矿化过程形成的。35 亿年前, 生物矿化现象就普遍存在于动物、植物以及微生物中^[1], 经过漫长的生物进化, 生物体可通

收稿日期: 2020-02-28。收修改稿日期: 2020-03-19。

国家自然科学基金项目(No.21771160, 21625105)、浙江省自然科学基金项目(No.LY17B010001)和中央高校基本科研业务费(No.2016QN81020)资助。

*通信联系人。E-mail: rtang@zju.edu.cn, panhh@zju.edu.cn

过碳酸钙、磷酸钙等常见矿物晶体装配出具有多层次有序结构的牙齿、骨骼等硬组织。生物矿化学就是研究生物分子和生物基质如何调控矿物晶体的形成机制,包括生物矿物的组成、结构和形成过程,生物矿化相关蛋白质的功能,如蛋白质对矿物晶体的作用、识别和对矿物结晶的调控等。

受生物矿化启发,仿生矿化利用生物矿化原理在体外制备类似生物矿物的有机-无机复合结构材料,或者模拟生物矿化环境,研究有机分子调控矿物结晶的机制。通过仿生矿化研究,人们已成功制备出类牙、类骨和类贝壳等有机-无机分层结构材料,有助于高性能储能、催化、分离以及高强增韧和硬组织替代材料的制备。

近年来,随着我国人口老龄化和饮食结构改变,有关牙和骨的健康问题日渐凸显,比如龋齿问题、骨缺损、普遍存在于老年人群中的骨质疏松问题,这些硬组织损害和疾病往往是不可逆的,需要硬组织替代生物材料的植入来辅助生物体的修复。仿生矿化研究为体内外硬组织制备和修复提供思路,对于硬组织的修复具有十分重要的意义。我们将重点综述生物矿化从机理到硬组织仿生修复的相关内容,具体包括生物矿化的基本原理和主要矿物、无机矿物结晶调控原理和新认识、与牙骨硬组织修复密切相关的胶原矿化机制和最新进展、硬组织材料的多级结构特征以及仿生矿化在硬组织修复中的前沿进展。

1 生物矿化与仿生

生物体内无机矿物在形成过程中受到了细胞、蛋白质、有机基质及无机离子的影响^[2],生物矿化的核心是在水介质中和有机物的调控下,无机矿物的成核、生长和组装的过程。除正常生物矿外,在一些代谢异常,炎症和生物信号或激素失调等异常生理情况下也会在非硬组织部位产生矿化,称为病理性矿化,如血管钙化、肾结石、牙结石、软骨钙化、肌腱钙化和基底神经元钙化等,这些病理性生物矿化过程对人体健康十分不利。无论是促进硬组织修复还是消除病理性矿化都需要深入了解生物矿化过程。

根据生物矿化的途径,可以分为生物诱导(biologically induced)矿化和生物控制(biologically controlled)矿化^[3]。生物诱导矿化是指由于生物代谢过程引起细胞内外环境的离子富集、pH 变化等诱导矿物向沉淀反应方向移动的过程。在这一过程生物

不主动参与调控矿物的沉积和结构,生物诱导矿化一般多见于藻类、细菌等低等生物^[4]。大多数病理性矿化也是属于生物诱导矿化。生物控制矿化是指生物对矿物颗粒的成核和生长起着直接的化学控制作用。在大多数情况下,这些矿物质是在细胞内或细胞上的特定位置,在特定条件下直接合成的。生物控制矿化是生物体内基因直接程序化控制矿化过程,并且生物体营造特殊矿化环境,使矿化过程与外界环境隔绝。在这种情况下产生的矿物颗粒往往是有序的晶体,其尺寸分布窄,颗粒形态具有特异性和一致性。贝壳、牙、骨的形成过程主要涉及到生物控制矿化。

根据生物矿化中的无机矿物类型,一般可将生物矿物分为两大类:一类是钙化矿物,一类是非钙化矿物。钙化矿物主要有磷酸钙和碳酸钙,在细胞代谢中起到了重要的作用^[5]。非钙化矿物主要有硅矿物和铁矿物。

碳酸钙矿物主要有 6 种不同的结构^[2],分别是:方解石、文石、球霏石、一水合碳酸钙($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、六水合碳酸钙($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)和无定形碳酸钙(amorphous calcium carbonate, ACC)。最近 Zou 等^[6]在研究 ACC 结晶过程中加入镁离子,发现了具有单斜结构的半水合碳酸钙($\text{CaCO}_3 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$)。生物体内最广泛存在的是方解石和文石^[4]。方解石、文石、球霏石都是结晶态的碳酸钙,而 ACC 是非晶态碳酸钙,具有热力学不稳定性^[7]。Addadi^[8]课题组把 ACC 分成亚稳态的含水 ACC 和不稳定的脱水 ACC。

磷酸钙是哺乳动物生物矿化研究的主要无机矿物,可以分为稳定的磷酸钙晶体矿物和不稳定的无定形磷酸钙矿物(amorphous calcium phosphate, ACP)。生物体内最稳定和常见的磷酸钙晶体是磷灰石,结构上接近羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$),在生物体环境中,羟基可以被氟离子、氯离子、碳酸根等取代。生物体内其他结晶态磷酸钙还有磷酸氢钙(dicalcium phosphate, DCP)、磷酸八钙(octacalcium phosphate, OCP)和二水磷酸氢钙(dicalcium phosphate dihydrate, DCPD),被认为是骨形成的前体相^[9]。一些病理性矿化组织中,如钙化血管、肾结石和牙结石等,也含有不同晶型的磷酸钙。

生物矿物与生物有机基质复合在一起,具有精巧的多级分层结构,赋予了其优异的力学性能^[10],这启发了科学家们模拟生物矿物的多级分层结构,制备高性能材料。从不同角度模拟生物矿化,可以初步

将仿生矿化研究分为过程仿生、功能仿生和结构仿生。通过仿生矿化可以合成各种类贝壳^[11]、类牙^[12]和类骨^[13]材料,具有优异的力学性能或者特殊的功能,有望在临床治疗、军事、建筑材料等方面发挥重要作用。

2 矿物的结晶

2.1 晶体的经典成核和生长模型

矿物结晶是生物矿化的重要过程,一般的结晶过程包括晶体成核和晶体生长。根据经典成核理论(classical nucleation theory, CNT),成核是溶质分子从溶液中凝聚形成稳定晶核种子的过程。经典成核理论认为,在过饱和溶液晶体成核虽然是体相自由能(ΔG_v)降低的过程,但随着晶体-溶液界面形成,又增加了界面总自由能(ΔG_s)。这二者与晶核尺寸相关,但由于幂次不同,这导致总自由能(ΔG)先增加后降低(图1)^[14]。当晶核半径(r)到达临界晶核半径(r_c)后,此时晶体成核过程达到最大自由能(临界能, G_{crit})。过饱和度和固-液界面能均会影响成核能垒,是结晶的热力学驱动因素,但晶体-溶液界面能可在动力学上调控成核能垒,对成核起关键的调控作用^[15]。

根据溶液含异质的状况,可以分为均相成核(homogeneous nucleation)和异相成核(heterogeneous nucleation)^[16]。均相成核是指在没有外界干扰的均匀单一体系中形成晶核的过程,该过程需要借助过饱和度的高化学位驱动跨越成核能垒才形成稳定晶核,也称为临界核^[17]。而异相成核过程一般发生在不

同的相表面、杂质、晶界或者位错上^[18]。对于异相成核体系,结晶相在基质上形成时,增加了晶体-溶液界面,但同时减少了基质-溶液界面,所以界面自由能项要采用有效界面能,与溶液-基质-晶体三相界面的接触角(θ)有关^[14]。一般异相成核的有效界面能要小于晶体-溶液界面能,所以在溶液体系中,由于存在多种杂质或表面,可大大降低成核能垒,异相成核相对更容易发生^[19]。CNT有助于理解生物矿化过程,可以认为生物矿化中的有机基质是矿化过程的异相成核位点,可诱导矿物成核并控制矿物的物相、成核空间分布和晶体取向。

晶体成核后,在过饱和溶液中会继续生长。对于传统晶体生长的理解是晶体的离子单体首先扩散至晶体表面,然后进入晶格,实现在晶体表面生长^[14]。随着原位原子力显微镜技术的发展,科学家们发现晶体主要是通过表面的台阶生长来实现晶体的长大^[20]。晶体表面的平面区域被称作台阶平台(Terrace),台阶平台的凸起称作台阶(Step),台阶上还有许多折角,称作扭折(Kink)。晶体生长过程中最可能的途径是首先扩散到晶面进行吸附,然后扩散到台阶,最后进入扭折。相反,晶体溶解时,晶体组成的分子更容易从扭折处脱离^[21]。晶体表面台阶的来源主要有2种,一种是螺旋位错,另一种是岛状台阶。与此相对应的晶体生长模式为螺旋生长和岛状生长^[22]。螺旋生长是晶格产生螺旋位错,并以此为中心产生连续的台阶而生长;岛状生长是在晶体平面上通过二维成核形成台阶源然后生长的方式^[20]。螺旋台阶是由于晶体成核或生长过程中杂质分子嵌入或分子错误堆叠引起的,形成过程与过饱和度的关系不大;但岛状台阶的形成是二维成核,需要一定的过饱和度来克服成核能垒。所以在溶液过饱和度较低时,晶体一般按照螺旋生长方式进行;而过饱和度较高时,按照岛状形式生长。

2.2 生物矿化和仿生矿化中的非经典晶体成核与生长

生物矿物在结晶过程中受到多方面因素的影响,如蛋白质、细胞、基因、有机分子和无机离子^[23],但生物矿化是一个复杂的矿物形成过程,一些矿化途径不符合经典结晶理论所假设的通过单体附着的晶体生长过程。在仿生矿化体系中发现了许多通过颗粒的附着(particle attachment, CPA)的非经典结晶途径,其中包括寡聚体、多离子复合物、液态前驱体、无定形颗粒、纳米颗粒等结晶前驱体或生长单元^[24]。

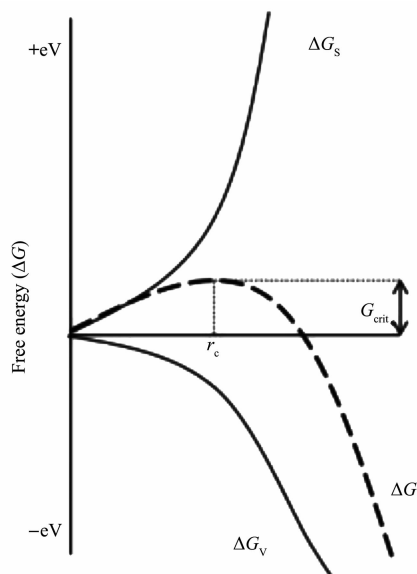


图1 均相成核自由能与尺寸关系图^[14]

Fig.1 Relationship between free energy and size^[14]

在生物矿化体系中,也发现大量经由亚稳态的无定形相相变转化为最终矿物结晶相的非经典结晶过程。例如,海胆胚胎针状体的矿化过程是通过聚集 ACC 前体的纳米颗粒,然后转化为方解石单晶^[25]。类似的无定形到晶体的转化途径广泛存在于各种生物矿物中,包括海胆的脊刺^[26]和牙^[27]、哺乳动物的牙釉质^[28]、脊椎动物的骨骼^[29]、甲壳动物的外骨骼^[30]、环节动物的石灰质结石^[31]和软体动物的幼体壳^[32]。这种无定形相的相变过程受许多因素影响,如水和添加剂等。无定形相在水溶液中会很快转变成结晶相,Ihli 等^[33]发现如果除去早期形成的 ACC 的游离水,可以使其稳定保存很久。无定形相的相变过程也会受添加剂的影响。Tao 等^[34]研究了球鼠妇(西瓜虫)的换壳机制,发现其外壳的相变过程是镁离子和富天冬氨酸(Aspartic acid, Asp)共同作用的结果。镁和富含 Asp 的化合物的协同作用可以稳定 ACC 防止其相变,而球鼠妇换壳时,这 2 种添加剂的含量会减少。

仿生矿化体系发现了更丰富的非经典结晶途径,有助于全面理解生物矿化过程。Gower 课题组^[35]最早观察到加入聚丙烯酸(polyacrylic acid, PAA)及聚天冬氨酸(polyaspartic acid, pAsp)后具有液态性质的碳酸钙液滴。Gebauer^[36]等证明了碳酸钙矿化初期含有稳定的预成核离子簇,然后这个离子簇通过液-液相分离形成致密的纳米级液滴,可继续聚结形成无定形相。这种团簇不仅存在于碳酸钙矿化过程中,也存在于磷酸钙结晶过程中。Dey 等^[37]通过冷冻电镜技术在磷酸钙结晶早期观察到了松散且尺寸仅为 1 nm 左右的团簇,他们认为这种团簇是 ACP 的前驱体。这个稳定的团簇不同于经典成核理论预测的小于临界尺寸的不稳定离子聚集体,即使在不饱和的溶液中也形成。由此提出的团簇成核前体(Pre-nucleation clusters, PNCs)、液-液相分离(Liquid-liquid phase separation)及液态前驱体假说(polymer-induced liquid precursors, PILP)是仿生矿化研究的重要发现,引起了生物矿化领域学者的广泛关注。

3 胶原矿化

牙和骨中含有丰富的 I 型胶原纤维,牙本质修复和骨修复的一个重要过程就是胶原矿化,因此研究胶原矿化对于硬组织修复具有重要的临床意义。胶原纤维具有天然带状结构,是由于纤维在不同区域所含电荷密度分布不同造成的^[38]。在骨胶原纤维内分布的是沿胶原纤维方向生长的 HAP 晶体^[39]。在

胶原矿化的过程中,有机基质对 HAP 晶体成核和生长的调控是胶原矿化研究的关键科学问题。在有机基质中,除胶原蛋白外,还存在非胶原蛋白(non-collagen proteins, NCPs),在调控和诱导胶原纤维矿化中起重要作用。常见的 NCPs 有牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)、成牙本质基质蛋白(dentin matrix protein 1, DMP1)、骨涎蛋白(bone sialoprotein)、骨钙素(osteocalcin)、骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein, BMP-2)和骨桥蛋白(osteopontin)等^[40-41]。NCPs 在体内胶原矿化过程中起重要作用已经得到了普遍的认可^[42]。Boskey^[43]认为 NCPs 可能为磷酸钙矿化提供成核位点,也可能用于调控晶体的大小、取向或晶形,或用于提供钙、磷离子。胶原矿化的仿生矿化研究中,常使用带电的大分子有机物如聚天冬氨酸、聚丙烯酸代替 NCPs 质来诱导和调控胶原矿化,然而胶原纤维内实现矿化的原因至今存在很多争议。

3.1 聚合物诱导的液态前驱体假说

Olszta 等^[10]提出了胶原在骨形成过程中是通过聚合物诱导的液态前驱体实现矿化的。PILP 可以通过毛细作用吸入胶原纤维的间隙中,然后转化为 HAP。PILP 工艺可以看作利用酸性聚合物来简单模拟 NCPs 功能诱导液-液相分离,抑制磷酸钙结晶成核,形成亚稳态 PILP。PILP 工艺首次实现胶原纤维内稳定可靠的有序矿化,是目前胶原矿化实验采用最多的工艺。但目前关于 PILP 的液态性仍缺乏相关直接证据,通过毛细作用吸入胶原纤维空隙的假说仍有待证明。

3.2 抑制剂排除假说

Toroian 等^[44]提出了抑制剂排除假说,考虑了胶原纤维内空间可容纳分子的大小对胶原矿化的可能影响。他们认为小于 6 kDa 的分子和磷灰石晶体可以扩散到纤维内,从而导致矿化或直接影响矿化。虽然大于 40 kDa 的分子被排除在纤维外,但它们可以通过促进磷灰石晶核形成,然后扩散到纤维内实现矿化,或者通过抑制纤维外溶液中的磷灰石晶核的生长来促进纤维内矿化(小于 6 kDa 的磷灰石晶体只有几个晶胞大小,可以当作品核看待)。但假说中提及的磷灰石晶核进入胶原纤维,以及蛋白分子可抑制溶液中的磷灰石晶核的继续生长还有待实验证明。此外,胶原本身对矿化的直接调控作用也被忽略,不符合后来实验发现的胶原本身对矿化有调控作用^[45-46]。

3.3 库仑引力诱导矿化假说

Landis 等^[45]根据胶原分子的不同染色条带(bands)的序列分析提出了胶原分子的富含电荷残基的区域可能是矿化的成核位点。Nudelman 等^[47]结合冷冻电镜观察发现,矿化首先发生在富含正电荷的a条带(a-band)(靠近重叠区和空隙区的交界处),支持库仑引力诱导矿化假说。根据该假说可以解释为何酸性聚合物稳定的ACP优先发生在a条带。但该论文没有对碱性聚合物稳定ACP诱导胶原矿化的优先发生区域进行分析,库仑引力诱导矿化假说还有待更系统的评估。

3.4 协同组装矿化假说

Wang 等^[46]发现I型胶原在体外可以在没有添加任何有机大分子的情况下诱导HAP取向结晶。作者首先采用反渗透法得到高浓度的胶原蛋白基质,然后通过调节pH诱导胶原蛋白自组装成液晶态有序排列的胶原纤维凝胶。如果在高浓度酸性胶原溶液中引入高浓度的磷酸钙酸性溶液,可以使胶原组装过程和矿化过程协同进行,得到有序矿化的胶原基质。由于胶原协同组装矿化的方法不含聚电解质,充分支持了胶原本身对矿化的调控作用。该假说推测NCPs在体内的可能作用是提高胶原基质的局部离子浓度。由于形成液晶态胶原基质和胶原矿化工艺的操作复杂性,加上胶原有序矿化的实现对胶原浓度、矿化液配方比较严苛,目前采用协同组装矿化方法的研究并不多见。

3.5 渗透压/电荷双平衡诱导矿化假说

在仿生矿化领域中,大部分研究都是使用聚阴离子电解质来模拟NCPs的作用。然而,Niu 等^[48]发现聚阳离子电解质也能促进胶原纤维内矿化,对库仑引力诱导矿化假说提出了质疑并进行了完善。作者发现,胶原纤维经聚丙烯胺(poly allyamine hydrochloride, PAH)稳定ACP矿化,未发现a条带优先矿化的迹象,并且重叠区和空隙区的电子密度类似,也

就是未发现胶原纤维内有优先矿化的区域。作者还发现,胶原纤维经聚阳离子电解质修饰后,仍可通过聚正电解质稳定ACP矿化,却不能被聚负电解质稳定ACP矿化。这些发现不符合库仑引力诱导矿化假说的预判。由此,作者认为胶原纤维内外需维持Gibbs-Donnan平衡。溶液中添加聚电解质时,纤维外的渗透压更高,导致胶原纤维内的水分子向外渗透,原子力显微镜原位观测到胶原纤维的尺寸在变小。由于胶原纤维的粘弹性,因脱水压缩的胶原纤维具有恢复原貌的内驱力,作者由此猜想,含聚合物的矿化前驱体会因此进入胶原纤维内部,使压缩的胶原纤维得到恢复。虽然基于Gibbs-Donnan平衡的渗透压/电荷双平衡假说丰富了胶原矿化中矿化前驱体进入胶原机制的理解,但该假说最关键的部分(矿化前驱体进入胶原纤维的驱动力)属于猜测,目前只有分子模拟的支持,需要更多实验来佐证。

4 牙和骨的多级结构

4.1 骨的多级结构

骨是有机-无机的复合材料,其中,以HAP和碳酸磷灰石为主的无机成分约占总质量的65%,以I型胶原为主的有机质约占总质量的34%^[49]。Nair 等^[50]将骨分成六级结构(图2),从微观到宏观分别是:第一级是磷灰石,胶原纤维(fibre)和其他微量成分;第二级是具有磷灰石/胶原纤维有序复合结构的矿化胶原纤维;第三级是由胶原纤维有序排列形成的胶原纤维束(fibril);第四级是骨中发现的4种胶原纤维束有序堆叠模型;第五级是哈弗氏管,即骨单位,第六级是整体骨。Weiner 等^[51]将整体骨进一步分成皮质骨和松质骨。Reznikov 等^[52-53]基于先进的扫描透射电镜的3D成像技术将骨的结构分成十二级结构。胶原纤维本身就具有多级结构,胶原纤维由微纤维(micro-fibril)按准六边形错位堆叠形成,每个微纤维由3条链形成的三重螺旋结构蛋白,而这些螺旋

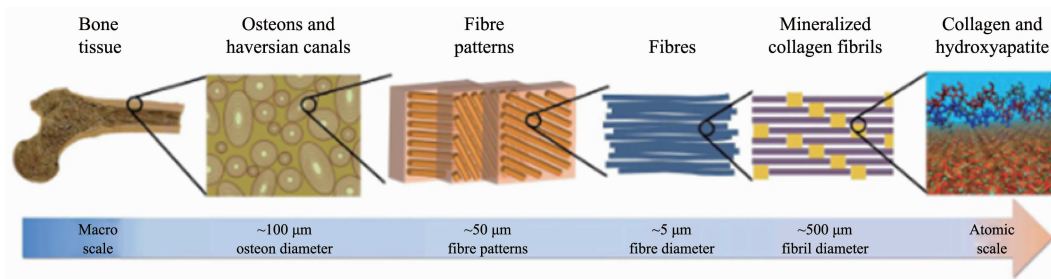


图2 骨的多级结构^[50]

Fig.2 Multistage structure of bone^[50]

结构又是由含 G-X-Y 的残基序列单元重复形成。

4.2 牙的多级结构

牙本质中无机矿物质约占总质量的 70%, 以胶原蛋白为主的有机质约占 20%, 其余是水^[54]。在解剖学结构上, 牙本质由牙本质小管、成牙本质细胞突起和细胞间质组成, 其中细胞间质中的管间牙本质富含网状矿化胶原纤维, 其结构与骨矿化胶原纤维类似。牙本质与牙釉质之间有一层牙本质-牙釉质边界(dentin-enamel boundary, DEB), 将二者牢固地结合在一起, 其中同时含有胶原蛋白和牙釉蛋白^[55]。和牙本质相比, 牙釉质的有机物含量更低, 由 96% (w/w) 的磷灰石, 1% (w/w) 的有机物和 3% (w/w) 的水组成^[56], 其结构也与牙本质有很大的不同。Cui 等^[57]将牙釉质分为 7 级结构(图 3), 牙釉质的主要成分是六方羟基磷灰石晶体, 其晶胞单元是最基本结构(1

级)。磷灰石晶胞按晶体 c 轴方向择优堆叠形成磷灰石纳米纤维(直径约为 30 nm)(2 级)。由磷灰石晶体纳米纤维聚集组装而成晶体微纤维(直径约为 100 nm)(3 级)。微纤维继续组装形成更粗的晶体纤维束(直径约为 800 nm)(4 级)。晶体纤维束按不同方向择优排列, 垂直于牙釉面的纤维束组成釉柱, 按一定夹角倾斜的纤维束组成釉柱间质, 釉柱与釉柱间质的结构不连续处为釉质鞘。釉柱、釉柱间质、釉质鞘形成连续体, 呈锁孔或鳞片状结构(直径为 6~8 μm)(5 级)。锁孔连续体紧密排列, 形成鱼鳞状斑图的釉柱群(6 级)。其中牙釉外层的釉柱群呈放射状排列, 牙釉内部的釉柱之间交错编织, 呈交叉式排列, 釉柱以不同排列方式最终构成覆盖在整个牙冠表面的釉质层(7 级)。

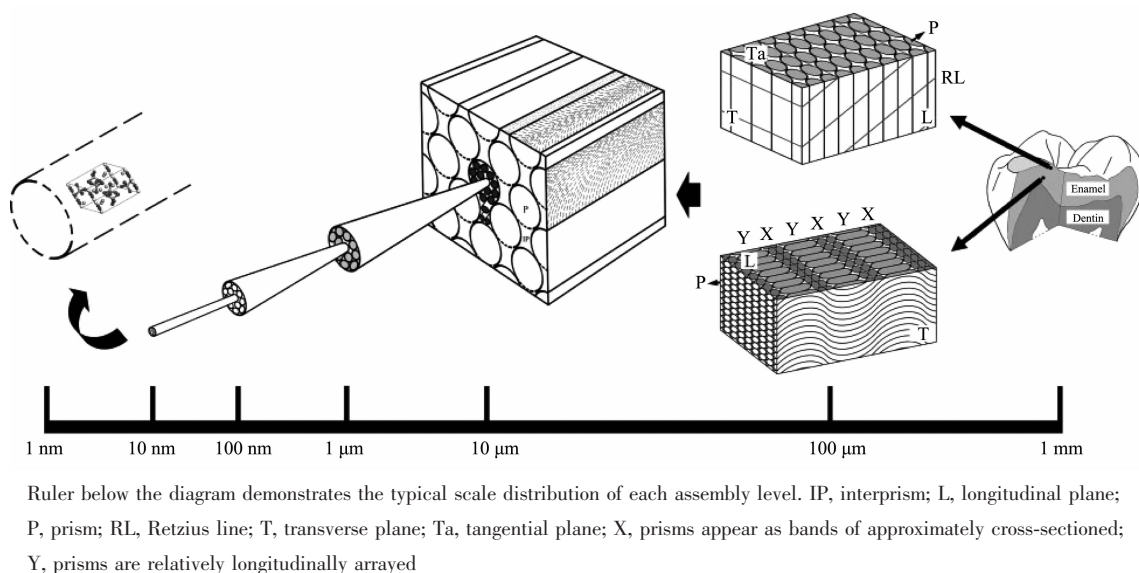


图 3 从纳米级到毫米级的牙釉质结构示意图(未按比例)^[57]

Fig.3 Schematic illustration (not drawn to scale) of the hierarchical assembly of enamel structure, from the millimetre to the nanometre scale^[57]

5 硬组织修复

硬组织是生物体通过矿化形成的组织, 如脊椎动物的牙和骨、软体动物的外壳和棘皮动物外骨骼等, 对生物体起重要的保护、支撑、运动和摄食等功能。随着人口的老齡化, 由硬组织老化或损伤引起的健康问题, 如牙龋、牙缺损、骨质疏松和骨折等, 会严重影响生存质量, 甚至威胁生命。研究硬组织修复, 对于帮助人体重建硬组织生理功能起着重要的作用。本节将主要介绍牙釉质的体外修复, 牙本质再矿化修复和骨修复方面的研究进展。

5.1 牙釉质的修复

龋齿是一种生物膜介导的、糖代谢驱动的、多因素(基因, 菌群口腔环境, 饮食卫生习惯等)诱发的进行性不可逆疾病^[58]。例如, 口腔中发酵的碳水化合物和一些细菌的酸性代谢产物会对牙釉质产生直接腐蚀^[59]。在没有细菌参与下, 长期饮食酸性物质会腐蚀牙齿, 加速磨损^[60]。牙齿处于连续的脱矿和再矿化平衡, 如果平衡被打断, 脱矿大于再矿化会导致牙釉质本体受到侵蚀, 引起牙釉质有序结构破坏, 机械性能下降, 进而导致磨损加速, 龋坏将进一步向内推

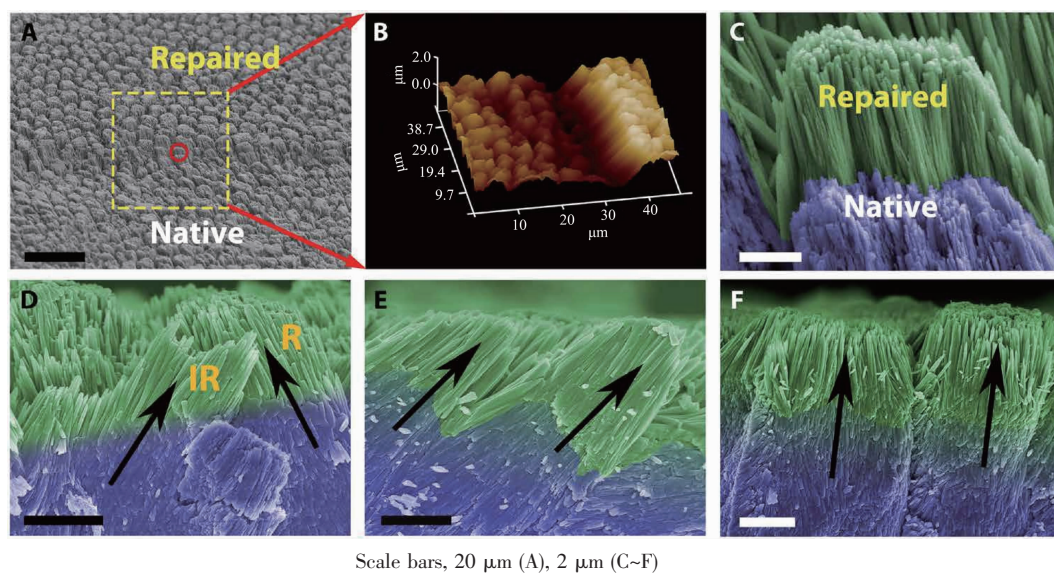
进^[61]。牙釉质是牙齿最重要的第一保护层,龋齿的原发部位往往起始于釉质层。因此牙釉质的再矿化对于牙齿初龋的修复具有重大意义。

目前临床医学上修复龋齿的手段主要是通过人工材料修补,所采用的龋齿修复材料主要有银汞合金和树脂材料等。银汞合金修复龋齿操作简单、价格经济实惠,但存在美观性欠佳、潜在的汞毒性以及重金属污染等问题,目前已逐步被树脂材料取代。树脂材料经调色可减小与残留牙体的色差,但树脂材料机械强度较差,且具有固化收缩性,修复后与牙体存在明显的间隙,易发生界面材料的生物降解,长期有效性不佳^[62]。这些人工材料无论是从材质、结构还是性能上都与天然牙体有很大的差距。因此利用仿生矿化手段,在受损牙体表面再矿化一层与天然牙齿结构相近的材料,对于修复牙龋具有重要的临床意义。

目前,牙釉质的修复和再矿化的仿生矿化实验主要是在体外模拟口腔或体液环境,对酸蚀后的牙釉质进行修复。通过模拟牙釉蛋白和其他矿化功能蛋白促进牙釉质形成的功能,仿生矿化实验中常加入矿化功能蛋白或其模拟物(多肽,双亲分子或高分子等)。Fan 等^[63]将水凝胶在添加了牙釉蛋白和氟离

子的人工唾液中培养,然后对酸蚀后的牙釉质表面进行再矿化修复,发现牙釉质表面形成了含有针状氟化羟基磷灰石晶体的矿物层。由于矿化功能蛋白获取困难,研究者们发现一些多肽残基也具有类似功能蛋白的活性。Kirkham 等^[64]发现一种可自组装成纤维的酸性多肽(P11-4)可以促进牙釉质的再矿化和抑制脱矿。除多肽外,一些合成高分子也具有促进矿化功能,其中富含电荷基团和衍生化能力的聚酰胺-胺型树枝状高分子(PAMAM)吸引了研究者的广泛关注。Yang 等^[65]合成了天冬氨酸和硬脂酸修饰的 PAMAM 双亲分子,发现具有类牙釉蛋白的组装功能,并可诱导磷灰石取向生长。Wu 等^[66]合成了阿伦磷酸(ALN)改性的羧酸化聚酰胺-胺树枝状高分子,发现其具有原位诱导牙釉质再矿化的功能,并对磷灰石有强特异吸附和诱导再矿化的功能,矿化生成的棒状磷灰石具有与人牙釉质类似的纳米结构。

上述牙釉质再矿化过程的矿物来源是矿化液中的钙磷离子,但在实际牙釉质修复时,不可能在口腔中引入大量的钙磷液。针对该难题,仿生矿化同样从生物矿化过程找到了灵感:生物矿化不是从溶液中的钙磷离子直接矿化,而是将 ACP 作为牙和骨矿化的前驱体。因此,有一些仿生矿化研究工作将 ACP



Scale bars, 20 μm (A), 2 μm (C-F)

图4 复制复杂的牙釉质结构: (A) 酸蚀和修复后的牙釉质的扫描电镜图; (B) 修复后牙釉质的三维原子力显微镜图; (C) (A) 中红色圆圈的高倍扫描电镜图像; (D) 修复后的牙釉质的横截面图, 牙釉质棒和牙釉质棒之间都修复了; R 和 IR 分别代表牙釉柱和釉柱间质; (E, F) 具有不同方向的可以修复的牙釉质棒^[71]

Fig.4 Replication of the complicated structure of enamel: (A) Scanning electron microscope image showing both acid-etched enamel and repaired enamel; (B) A three-dimensional atomic force microscope image of repaired enamel; (C) High-magnification scanning electron microscope image of the red circle in (A); (D) Cross-sectional view of final repaired enamel, where both enamel rods and inter-rods were repaired, R and IR represent for enamel rod and inter-rod, respectively; (E, F) Enamel rods with different orientations which can be repaired^[71]

纳米颗粒作为钙磷来源用于牙釉质的修复。然而, ACP 是磷酸钙的亚稳态, 在溶液中很容易发生相变, 不易保存, 极大地限制了它的临床应用。为此, 研究者通过添加稳定剂稳定 ACP 复合物应用于牙釉质的修复。Reynolds 等^[67]通过酪蛋白磷酸肽(casein phosphopeptides, CPP)稳定 ACP, 实现了龋坏釉质表层的再矿化。Zhang 等^[68]发现磷酸化壳聚糖-ACP 处理釉质可以快速修复釉质层。除 ACP 外, HAP 纳米颗粒也可用于牙釉质的修复的装配单元。Li 等^[69]合成了 20 nm 的纳米羟基磷灰石颗粒, 该尺寸与牙釉质的基本组成类似, 可以很好地吸附在脱矿的牙釉质表面, 形成致密矿化层, 恢复了酸蚀牙釉的机械性能。虽然合成的纳米羟基磷灰石颗粒可以修复牙釉质, 但没有实现牙釉质表面的磷灰石取向排列结构。在此基础上, Li 等^[70]利用谷氨酸调控 20 nm 磷酸钙颗粒组装, 脱矿的牙釉质表面在修复后得到了具有良好机械性能的一类牙釉修复层, 并且在矿化修复层可以看到纳米磷灰石晶体的取向排列和牙釉质的“鱼鳞”釉柱群特征。

虽然以上仿生修复手段可以得到和牙釉质的机械性能相似的修复层, 但是要得到具有天然层级结构的牙釉质再矿化层仍是一个巨大的挑战。近期, Shao 等^[71]基于纳米簇材料为生物矿化最基本单元的认识, 以及生物矿化中大量存在的晶体/无定形矿物紧密结合矿化前沿界面, 大规模制备了磷酸钙寡聚体, 并以此作为牙釉质再矿化的装配单元。研究发现, 将该材料直接滴在酸蚀的牙釉质上可形成致密 ACP 层, 模仿生物矿化前沿, 可以诱导牙釉质上棒状磷灰石的外延晶体生长, 成功使牙釉质长出了 2~10 μm 的再矿化釉质层。修复层与原始釉质层没有明显的界面和缝隙, 实现了牙釉质晶格连续修复, 并且牙釉质的多级结构得以保留。修复后机械性能与天然牙釉质相同。由于是晶格连续的外延生长修复, 磷酸钙寡聚体可以实现不同取向的牙釉柱和釉柱间质的再生, 以及大尺度的全牙釉质层修复, 这在仿生矿化修复牙釉质领域取得了重大突破, 有望将牙齿修复从“填料填补”带入“仿生再生”时代。

5.2 牙本质的修复

牙釉质内部是牙本质, 他们通过 DEB 紧密相连。牙釉进展突破牙釉质层后, 牙本质将直接裸露在口腔环境。同时, 牙本质暴露后, 细菌及其代谢产物、口腔残留物质等将侵入并扩散到牙本质内部, 并且难以通过自行清除或冲刷清除, 龋病发展将大大加

速。该阶段可能伴随着牙齿剧烈疼痛, 患者往往在这个阶段就医, 急需对龋坏部位进行修补和封闭。

牙本质具有和牙釉质截然不同的组成和结构, 它的主体部分是矿化胶原网络。在传统牙修复过程中, 一般将龋坏部位挖除后, 通过酸蚀对周围牙本质胶原进行脱矿以促进粘结剂渗入胶原纤维网络, 增加粘结剂/树脂与牙本质之间的铆合作用, 增强粘结强度。但粘结剂/树脂很难进入胶原纤维内部并且将胶原纤维紧密封闭。牙本质胶原纤维与粘结剂之间具有缝隙, 脱矿胶原纤维在胶原酶的作用下会自然降解, 粘结剂/树脂与牙本质之间的铆合作用将大大降低, 因此, 粘结的长期有效性受到严重影响。针对该问题, 研究者们探索了通过仿生矿化对牙本质胶原进行再矿化以重构牙本质和防止胶原纤维的生物降解。

在牙本质矿化中, NCPs 起到关键作用。Gower 课题组通过使用 pAsp、PAA 等功能聚阴离子电解质来模拟 NCPs, 在胶原基质矿化方面取得了很多突破性成果。Olszta 等^[72]通过基于 PAA 首次实现了胶原纤维内部矿化(碳酸钙), 并提出 PILP 促进胶原矿化的假说。后来, 又通过 pAsp 阴离子多肽模拟 NCPs, 基于 PILP 技术实现了胶原纤维的磷酸钙有序矿化^[73]。在牙本质形成过程中, 碱性磷酸酶是反映牙矿化生物活性的重要标志物。受此启发, Jee 等^[73]通过碱性磷酸酶来提供缓慢释放的无机磷酸盐离子, 模拟了牙矿化的生物调控过程, 结合 PILP 技术, 实现胶原海绵矿化。PILP 技术还可以实现天然胶原基质的矿化。Jee 等^[74]发现通过从火鸡肌腱中获得的生物胶原支架也可以通过 PILP 过程矿化。此外, 他们还发现骨桥蛋白(osteopontin, OPN)交联胶原纤维可以促进胶原的纤维内矿化^[75], 进一步理解了 NCPs 调控矿化的途径。

早期的实验中, Gower 课题组发现 PAA 难以实现胶原纤维的矿化, 转而采用 pAsp。我们发现聚电解质的浓度也是影响牙本质再矿化的关键参数。Wang 等^[76]发现低浓度的 PAA(100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)不能保持 PILP 的流动性, 因此发生的是纤维外矿化。相反, 高浓度的 PAA(1 000 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)可以稳定 ACP, 防止其相变, 纤维可以内矿化但是其矿化时间会延长, 而 300~500 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 是个合适的浓度范围。

通过 PILP 可实现牙本质胶原的再矿化, 但矿化修复时间往往以周为单位, 需要 2 周甚至 1~2 个月的时间, 这对于通过仿生矿化修复牙本质的临床应

用而言是个极大的限制因素,因此找到快速矿化的方法具有重要的意义。唐睿康课题组与牙医研究团队合作,对该问题进行了持续的探索。Chen 等^[77]研究发现牙本质胶原蛋白和戊二醛交联能促进牙本质的仿生再矿化,提高牙本质的力学性能和生物稳定性。戊二醛预处理后再矿化时间从 7 d 缩短到 2 d。戊二醛等虽然可以促进胶原纤维矿化,但是其对生物体存在一定的毒性。我们发现生物硬组织中含有极高水平的柠檬酸盐,受此启发,Shao 等^[78]发现经过柠檬酸预处理胶原可以缩短胶原纤维的矿化时间和显著提高胶原纤维的矿化度,并从矿化前驱体与胶原纤维的界面浸润角度进行了解释。从图 5 中可以看到胶原纤维上吸附的柠檬酸可以显著降低胶原纤

维与 ACP 前体之间的界面能,以增强它们在生物矿化早期的润湿效果,从而促进纤维内的矿物形成。除柠檬酸外,硫酸软骨素也广泛存在于矿化组织中,在矿化过程中起着重要作用。He 等^[79]通过随机光学重建显微镜发现了固定化的硫酸软骨素提供了磷酸钙的特异性成核位点,加速磷酸钙成核,并通过积累胶原纤维中的钙离子而显著促进胶原矿化,使矿化时间缩短到 2 d。

树脂粘接剂修复龋齿是临床的成熟技术,但自酸蚀粘结剂使胶原脱矿,会导致胶原纤维的酶促降解,影响粘结的长期有效性。研究者通过开发可矿化树脂粘接剂了解决这一难题。Gu 等^[80]用树脂粘接剂作为载体,在波特兰水泥模拟体液系统中成功再矿

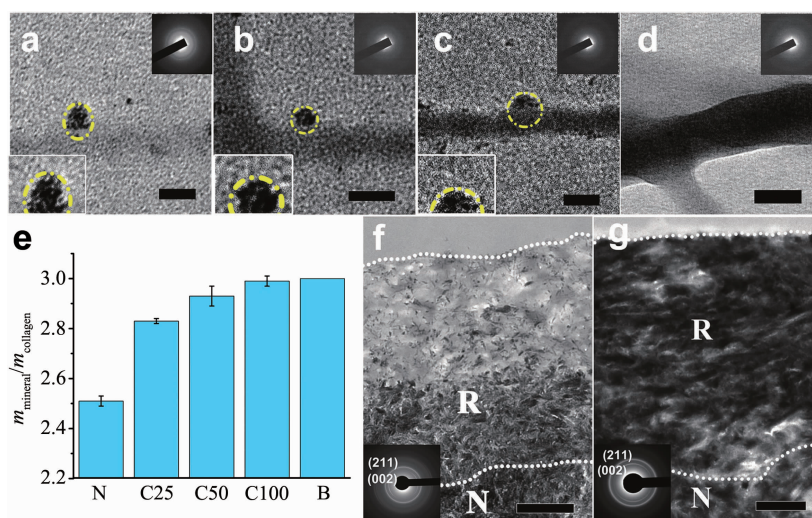


图 5 (a~d) 柠檬酸预处理/未柠檬酸预处理的胶原蛋白原纤维上沉积的 ACP 的 TEM 图; 比例尺: 50 nm; (a) 未处理胶原纤维, $\theta=106.7^{\circ}\pm 8.7^{\circ}$ (平均值 $\pm$ SD, $n=30$); (b) 胶原原纤维(用 $2.5\times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐预处理), $\theta=83.3^{\circ}\pm 4.3^{\circ}$ ($n=30$); (c) 胶原原纤维(用 $5\times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐预处理), $\theta=66.8^{\circ}\pm 7.7^{\circ}$ ($n=30$); (d) 由于 ACP 润湿($\theta=0^{\circ}$)而导致的溶胀的 C 胶原原纤维(用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐预处理)((a~d)插图: SAED 模式表示非晶相); (e) 胶原纤维的矿物质含量(N: N-胶原纤维; C25, C50, C100: 分别用柠檬酸 2.5×10^{-2} 、 5×10^{-2} 和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理的胶原原纤维; B: 猪骨); (f) 不含和(g) 含 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐预处理的再矿化牙本质超薄切片的 TEM 图(虚线是和矿化牙本质(R)/完整天然牙本质(N)的边界, 插图为与 HAP 模式匹配的 SAED 模式, 比例尺为 $1 \mu\text{m}$)^[78]

Fig.5 (a~d) Representative TEM images of the deposited ACP on the collagen fibrils with/without citrate pretreatment; scale bar: 50 nm; (a) N-collagen fibrils, $\theta=106.7^{\circ}\pm 8.7^{\circ}$ (mean $\pm$ SD, $n=30$); (b) C-collagen fibrils (pretreated with $2.5\times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ citrate), $\theta=83.3^{\circ}\pm 4.3^{\circ}$ ($n=30$); (c) C-collagen fibrils (pretreated with $5\times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ citrate), $\theta=66.8^{\circ}\pm 7.7^{\circ}$ ($n=30$); (d) Swelled C-collagen fibrils (pretreated with $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ citrate) as the result of ACP wetting ($\theta=0^{\circ}$). Insets of (a~d): SAED patterns indicate the amorphous phase; (e) Mineral contents of collagen fibrils (N: N-collagen fibrils; C25, C50, C100: collagen fibrils pretreated by 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , and $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ citrate, respectively; B: pig bone); TEM image of ultrathin section of remineralized dentin without citrate pretreatment (f) and that with $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ citrate pretreatment (g) dotted lines to guide the eye for the boundary of resin/collagen and remineralized dentin (R)/intact natural dentin (N) (Insets: SAED patterns matching that of HAP; Scale bar: $1 \mu\text{m}$)^[78]

化了牙本质。但考虑粘结剂的临床实际流程, 粘结剂固化封闭牙本质后, 与口腔环境进行了隔断, 牙本质难以持续从体液中获得低浓度钙磷离子来再矿化牙本质。基于无定形为前驱相的生物矿化过程给该课题带来了启发, 通过在粘结剂体系引入无定形前驱体, 降低了牙本质矿化对溶液离子来源的依赖性。Wu 等^[81]合成了 pAsp 稳定的 Si-ACP 粒子, 以树脂粘结体为载体, 负载 Si-ACP 颗粒, 光照固化后, 依然可以实现 I 型胶原的再矿化和脱矿牙本质的再矿化。Tay 课题组^[82]采用药物载体的输送的方法来引入矿化前驱体, 他们通过多孔介孔二氧化硅来包裹和传递 PILP, 成功矿化了胶原纤维。这些前瞻性研究为胶原仿生矿化到牙本质修复的临床应用之间架起了桥梁, 对未来牙本质修复具有重要的意义。

5.3 骨修复

不同于牙, 骨在人体具有自修复功能(骨重构)。但在一些情况下, 骨不能实现完全自修复, 比如骨内富集或残留毒素引起的骨髓坏死或干细胞分化干扰, 大尺寸的骨缺损, 骨质疏松等。目前骨修复的主要研究对象包括骨缺损以及骨质疏松。骨缺损是指由创伤、肿瘤或感染引起的骨粉碎或者降解。如果不进行干预, 骨缺损是无法愈合的^[83]。骨质疏松是由于骨生长和骨吸收失衡造成的。怀孕、哺乳期、绝经、老龄化以及激素水平失调都会引起骨质疏松。骨缺损不愈和骨质疏松都可引起慢性疼痛、行动能力下降、抑郁、睡眠丧失等^[84], 严重影响患者的生活质量和生存能力, 需要通过骨修复来帮助骨重建。

骨修复的最佳方法是自体骨移植, 但存在二次手术和来源有限的风险和限制。采用异体骨移植存在排异反应和病毒/细菌感染风险。所以骨修复材料的研究引起了广泛关注。目前, 临床上采用较多的骨修复材料主要是组织耐受性好和可生物降解的材料^[3]。我们主要介绍与仿生矿化密切相关的磷酸钙材料的生物效应, 骨水泥材料、有机-无机复合材料、骨粘胶材料以及一些“软的”和“活的”的材料以及仿生矿化骨再生研究。

HAP 除作为骨矿物增强机械性能外, 还被认为具有一定的生物活性, 具有诱导骨形成能力。唐睿康课题组对磷酸钙矿物的骨诱导能力开展了细胞学研究, 发现不同尺寸和形貌的 HAP 在修复骨时具有不同的调节作用。Cai 等^[85]制备了不同尺寸的 HAP 纳米颗粒, 并研究了它们对骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSCs) 和骨肉瘤细胞(U2OS)

增殖的影响, 发现 HAP 纳米颗粒可以促进 MSCs 的增殖, 同时抑制了 U2OS 的生长。上述纳米级棒状 HAP 虽然可以促进骨干细胞生长, 但形貌不同于骨中的片状磷灰石, 其中大量暴露的是(100)晶面。为了探究类磷灰石的生物学效应, Liu 等^[86]合成了类骨片状 HAP(p-HAP)和棒状 HAP, 研究它们的细胞生物活性和对骨生成的调节作用。研究发现与棒状 HAP 相比, 具有(100)面的片状 HAP 更显著促进了间充质干细胞(MSCs)的细胞活力和成骨分化。这些研究对于全面理解骨中的纳米磷灰石的生物学效应具有重要的参考意义。

基于磷酸钙矿物的磷酸钙骨水泥材料具有良好的降解性和骨诱导能力, 是骨修复的重要替代材料, 但存在机械性能不足的问题。Moussa 等^[87]发现在制备磷酸钙生物陶瓷中引入左旋酒石酸可以减少晶体尺寸, 增强生物陶瓷的机械性能, 对骨修复具有潜在的应用价值。

除无机矿物作为主要成分外, 骨中还可能存在一定有机物质, 是有机-无机复合材料。模仿骨的有机-无机复合材料也是修复骨缺损的理想材料。Li 等^[88]合成了聚酰胺 6 (PA6)/HAP 纳米复合材料, 结合了 HAP 的生物活性、生物相容性和 PA6 优异的机械增强增韧性能的纳米复合材料, 在化学和机械性能上接近天然骨。除聚酰胺、聚乳酸等人工合成高分子外, 一些生物相容性好、机械性能优良的天然生物高分子, 如纤维素、丝素等, 也得到广泛关注, 可用于制备良好的骨修复材料。例如细菌纤维素(bacterial cellulose, BC) 具有良好的生物相容性和湿态机械性能, Hu 等^[89]制备了 BC/HAP 复合材料, 实现了骨缺损的修复。

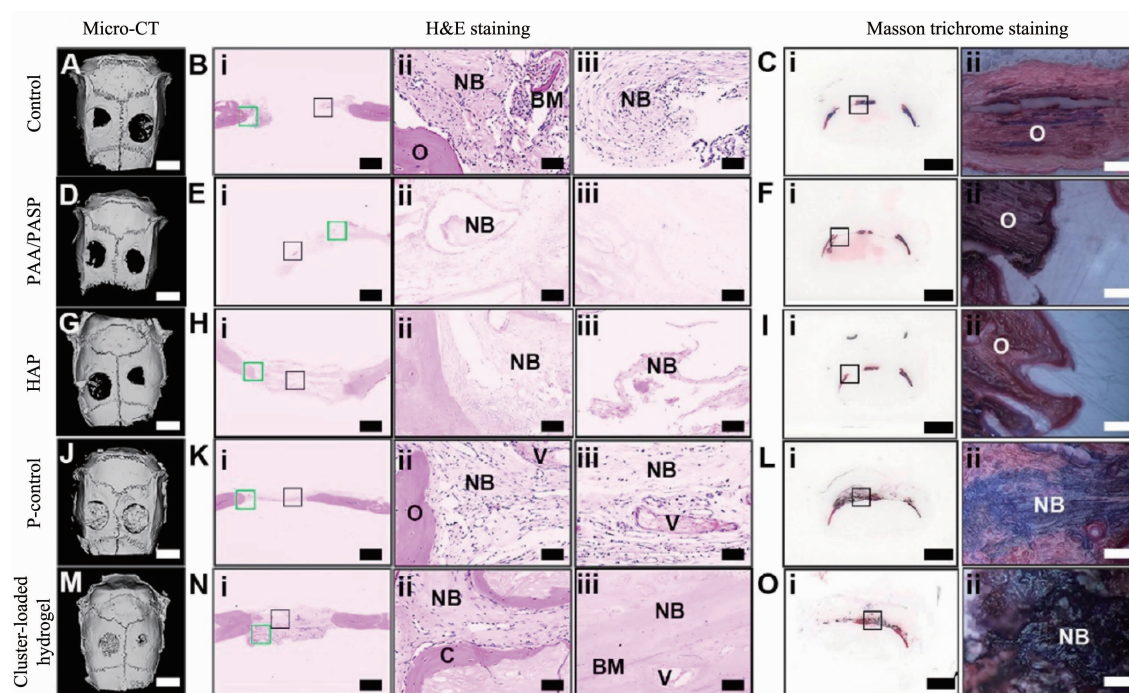
上述骨植入材料虽然具有足够的强度, 但与原骨骼系统的对接还需要依靠骨钉来铆定, 骨愈合后需要二次手术取出。受沙堡蠕虫胶水下粘结性启发, Kirillova 等^[90]制备了基于磷酸四钙(tetracalcium phosphate)和磷酸丝氨酸复合的一种新型骨粘胶剂, 可在潮湿的环境中实现骨和骨的高粘合强度, 可在几分钟内解决骨折修复问题, 并可降解吸收, 具有很好的骨整合能力。

硬的骨修复材料具有很好的机械支撑作用, 但骨形成的早期是一些“软的”和“活的”凝胶材料。“软”的水凝胶材料也可应用于骨修复, 具有很多独到的优势: 除了其潜在的骨传导性和生物降解性外, 还可利用可控生长因子释放和细胞封装等增加其骨诱导

性^[91]。Nonoyama 等^[92]开发了一种新型的双网络水凝胶系统,经 HAP 纳米球矿化后的水凝胶具有可渗透性,可用于修复骨缺损。骨形成早期是胶原基质水凝胶材料,但其中含有多重干细胞和功能细胞,是一种“活的”材料。受此启发,Thrivikraman 等^[93]在胶原纤维凝胶中内封装干细胞(hMSCs)、血管和神经细胞,并借鉴 PILP 的仿生矿化技术,在含 NCPs 的矿化液中培养,使胶原基质矿化,可在体外得到具有骨样组织特征的材料,是研究骨再生的很好体外模型。

传统骨修复材料一般是在体外构筑好,再移植到体内进行骨整合。而骨形成过程,是利用矿化前驱体实现胶原基质矿化的过程。唐睿康课题组的 Yao 等^[94-95]受此启发,对骨修复进行了一种创新尝试:向生物活体提供装配所需的原料(矿化前驱体),而不是在体外进行材料装配,让生物利用这些矿化前驱体来帮助骨再生。仿生矿化研究表明磷酸钙纳米团簇是磷酸钙形成的前驱体,但在溶液中含极少量且

容易聚集,不易分离获取和宏量制备^[37]。他们通过借鉴和改进 PILP 方法,得到了宏观体量的磷酸钙聚合物液态前体纳米簇(CaP-PILP)材料。该材料富含矿物,呈粘稠状态,具有较好的流动性。CaP-PILP 中富含 1 nm 大小的磷酸钙团簇,能实现胶原纤维的矿化,是一种矿化前驱体材料。Yao 等^[94]将该材料应用于动物颅骨缺损骨修复,取得了良好效果。从图 6 中可以看到 10 周后纳米簇在骨缺损内产生了与周围组织结合良好的修复层。由于 CaP-PILP 具有流动性,他们还将纳米簇材料注射入骨质疏松骨的骨髓腔,发现可以完全治疗骨质疏松^[95]。该研究是一个重要突破,因为骨质疏松一般认为是不可逆的过程,临床治疗往往以延缓进展为主。在这些研究中,我们是从生物矿化中学习,发展仿生矿化技术,并通过仿生矿化技术得到材料,反过来应用于生物矿化体系中,实现骨再生修复。



NB: new bone; O: Original bone; BM: bone marrow cells; V: vessel; C: cluster-loaded hydrogel. Scale bars: (A, D, G, J, M) 5 mm, (B(i), E(i), H(i), K(i), N(i))) 1 mm, (B(ii-iii), E(ii-iii), H(ii-iii), K(ii-iii), N(ii-iii))) 50 μ m, (C(i), F(i), I(i), L(i), O(i))) 2 mm, (C(ii), F(ii), I(ii), L(ii), O(ii))) 100 μ m

图6 10周后,对照组、PAA/pAsp、HAP、P-control 和纳米簇的体内骨再生;(A, D, G, J, M)代表性重建的微CT图像;(B, E, H, K, N)代表性的HE染色结果,其中包括骨缺损边缘(绿色矩形)和缺损中心(黑色矩形)的放大图像;(C, F, I, L, O)具有代表性的Masson三色染色结果,以及骨缺损区域(黑色矩形)的放大图像^[94]

Fig.6 *In vivo* bone regeneration of control, PAA/ pAsp, HAP, P-control, and cluster-loaded hydrogel group after 10 weeks: (A, D, G, J, M) Representative reconstructed micro-CT images; (B, E, H, K, N) Representative HE staining results, with zoom-in images of the bone defect margins (green rectangles) and defect center (black rectangles); (C, F, I, L, O) Representative Masson trichrome staining results, with zoom-in images of the bone defect regions (black rectangles)^[94]

6 结 论

我国已成为人口老龄化国家,由硬组织老化和损伤引起的健康问题日益严重,健康中国已成为国家发展基本方略中的重要内容。硬组织本身是生物矿化的产物,深入学习生物矿化中的生物组织结构、矿化结晶过程和矿化原理、层次结构调控策略以及结构与功能之间的关系,可以启发仿生矿化研究。发展材料构筑的工程策略以及制备类似生物矿物结构和生物功能的活性材料,有助于人体硬组织修复、帮助硬组织重建、恢复其生理功能甚至强化其生理机能。

近些年,在生物矿化和仿生矿化研究中所发现的非经典结晶途径、多级有序结构材料的仿生构筑工程策略以及胶原矿化的机制,对于深入理解生物矿化过程和调控机制、硬组织植入材料和诱导再生材料的设计和制备具有重要意义。其中,本课题组基于生物矿化前驱体的矿化策略发展了一些全新的仿生矿化技术,并应用于牙釉质修复、牙本质修复和骨修复等方面,取得了初步的创新成果。特别是最近发展的基于寡聚体和磷酸钙纳米簇材料的矿化方法,可实现全牙釉质的外延修复以及骨缺损和骨质疏松的体内修复,具有很好的应用前景,已引起社会的关注。在胶原矿化仿生研究中,与牙科团队合作,我们重点解决加速牙本质矿化,提高矿化度以及与粘结剂体系复配使用等临床应用亟需解决的重要难题,为仿生矿化的研究从基础走向应用奠定基础。我们相信,随着对生物矿化过程和矿化机制的更深入和全面的认识,生物“活”体系的仿生矿化将迎来新的突破,并期待仿生矿化从理论走向应用,从学习走向创新,从“仿生”(体外烧杯实验)走向“再生”(细胞或体内组织实验)。

参考文献:

- [1] Weiner S, Dove P M. *Rev. Mineral. Geochem.*, **2003**,**54**(1):1-29
- [2] CUI Fu-Zhai(崔福斋). *Biom mineralization*(生物矿化). Beijing: Tsinghua University Press, **2007**.
- [3] Bazylnski D A, Frankel R B. *Rev. Mineral. Geochem.*, **2003**,**54**(1):217-247
- [4] Marin F, Le Roy N, Marie B. *Front. Biosci.*, **2012**,**S4**:1099-1125
- [5] Berridge M J, Bootman M D, Lipp P. *Nature*, **1998**,**395**(6703):645-648
- [6] Zou Z Y, Habraken W J E M, Matveeva G, et al. *Science*, **2019**,**363**(6425):396-400
- [7] Faatz M, Grhn F, Wegner G. *Adv. Mater.*, **2004**,**16**(12):996-1000
- [8] Addadi L, Raz S, Weiner S. *Adv. Mater.*, **2003**,**15**(12):959-970
- [9] Olszta M J, Douglas E P, Gower L B. *Calcified Tissue International*, **2003**,**72**(5):583-591
- [10] Weiner S, Addadi L, Wagner H D. *Mater. Sci. Eng. C*, **2000**,**11**(1):1-8
- [11] Mao L B, Gao H L, Yao H B, et al. *Science*, **2016**,**354**(6308):107-110
- [12] Ruan Q C, Siddiqah N, Li X C, et al. *Connective Tissue Research*, **2014**,**55**(sup1):150-154
- [13] Hartgerink J D, Beniash E, Stupp S I. *Science*, **2001**,**294**(5547):1684-1688
- [14] Thanh N T K, Maclean N, Mahiddine S. *Chem. Rev.*, **2014**,**114**(15):7610-7630
- [15] Hu Q, Nielsen M H, Freeman C L, et al. *Faraday Discuss.*, **2012**,**159**(1):509-523
- [16] Liu X Y. *J. Chem. Phys.*, **2000**,**112**(22):9949-9955
- [17] Zhang R Y, Khalizov A, Wang L, et al. *Chem. Rev.*, **2012**,**112**(3):1957-2011
- [18] Campbell A A. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **1999**,**4**(1):40-45
- [19] Iijima M, Fan D M, Bromley K M, et al. *Cryst. Growth Des.*, **2010**,**10**(11):4815-4822
- [20] Chernov A A. *Contemp. Phys.*, **1989**,**30**(4):251-276
- [21] De Yoreo J J, Vekilov P G. *Rev. Mineral. Geochem.*, **2003**,**54**(1):57-93
- [22] Chernov A A. *Soviet Physics Uspekhi*, **1961**,**4**(1):116-148
- [23] De Yoreo J J, Dove P M. *Science*, **2004**,**306**(5700):1301-1302
- [24] De Yoreo J J, Gilbert P U P A, Sommerdijk N A J M, et al. *Science*, **2015**,**349**(6247):aaa6760
- [25] Weiner S, Levi-Kalishman Y, Raz S, et al. *Connective Tissue Research*, **2003**,**44**(1):214-218
- [26] Politi Y, Arad T, Klein E, et al. *Science*, **2004**,**306**(5699):1161-1164
- [27] Killian C E, Metzler R A, Gong Y U T, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**(51):18404-18409
- [28] Beniash E, Metzler R A, Lam R S K, et al. *J. Struct. Biol.*, **2009**,**166**(2):133-143
- [29] Mahamid J, Sharir A, Addadi L, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**,**105**(35):12748-12753
- [30] Dillaman R, Hequembourg S, Gay M. *J. Morphol.*, **2005**,**263**(3):356-374
- [31] Gago-Duport L, Briones M J I, Rodríguez J B, et al. *J. Struct.*

- Biol.*, **2008**,**162**(3):422-435
- [32]Weiss I M, Tuross N, Addadi L I A, et al. *J. Exp. Zool.*, **2002**,**293**(5):478-491
- [33]Ihli J, Wong W C, Noel E H, et al. *Nat. Commun.*, **2014**,**5**(1):1-10
- [34]Tao J H, Zhou D M, Zhang Z S, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2009**,**106**(52):22096-22101
- [35]Gower L B, Odom D J. *J. Cryst. Growth*, **2000**,**210**(4):719-734
- [36]Gebauer D, Vlkel A, Clfen H. *Science*, **2008**,**322**(5909):1819-1822
- [37]Dey A, Bomans P H H, Müller F A, et al. *Nat. Mater.*, **2010**,**9**(12):1010-1014
- [38]Dai W D, Kawazoe N, Lin X T, et al. *Biomaterials*, **2010**,**31**(8):2141-2152
- [39]Nudelman F, Lausch A J, Sommerdijk N A J M, et al. *J. Struct. Biol.*, **2013**,**183**(2):258-269
- [40]Goldberg M, Kulkarni A B, Young M, et al. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed.)*, **2011**,**3**:711-735
- [41]Palmer L C, Newcomb C J, Kaltz S R, et al. *Chem. Rev.*, **2008**,**108**(11):4754-4783
- [42]Veis A. *Science*, **2005**,**307**(5714):1419-1420
- [43]Boskey A L. *Bone and Mineral*, **1989**,**6**(2):111-123
- [44]Toroian D, Lim J E, Price P A. *J. Biol. Chem.*, **2007**,**282**(31):22437-22447
- [45]Landis W J, Silver F H, Freeman J W. *J. Mater. Chem.*, **2006**,**16**(16):1495-1503
- [46]Wang Y, Azas T, Robin M, et al. *Nat. Mater.*, **2012**,**11**(8):724-733
- [47]Nudelman F, Pieterse K, George A, et al. *Nat. Mater.*, **2010**,**9**(12):1004-1009
- [48]Niu L N, Jee S E, Jiao K, et al. *Nat. Mater.*, **2017**,**16**(3):370-378
- [49]Currey J D. *The Mechanical Adaptations of Bone*. Princeton: Princeton University Press, **2014**.
- [50]Nair A K, Gautieri A, Chang S W, et al. *Nat. Commun.*, **2013**,**4**(1):1-9
- [51]Weiner S, Wagner H D. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **1998**,**28**(1):271-298
- [52]Reznikov N, Bilton M, Lari L, et al. *Science*, **2018**,**360**(6388):eaao2189
- [53]Reznikov N, Shahar R, Weiner S. *Acta Biomater.*, **2014**,**10**(9):3815-3826
- [54]YU Shi-Feng(于世凤). *Oral Histopathology*(口腔组织病理学). Beijing: People's Medical Publishing House, **2012**.
- [55]Deshpande A S, Fang P A, Simmer J P, et al. *J. Biol. Chem.*, **2010**,**285**(25):19277-19287
- [56]Boyde A. *Teeth*. Berlin: Springer, **1989**:309-473
- [57]Cui F Z, Ge J. *J. Tissue Eng. Regener. Med.*, **2007**,**1**(3):185-191
- [58]Pitts N B, Zero D T, Marsh P D, et al. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **2017**,**3**(1):1-16
- [59]Selwitz R H, Ismail A I, Pitts N B. *The Lancet*, **2007**,**369**(9555):51-59
- [60]Hemingway C A, Parker D M, Addy M, et al. *Br. Dent. J.*, **2006**,**201**(7):447-450
- [61]Fincham A G, Moradian-Oldak J, Simmer J P. *J. Struct. Biol.*, **1999**,**126**(3):270-299
- [62]Ferrari M, Mason P N, Goracci C, et al. *J. Dent. Res.*, **2004**,**83**(5):414-419
- [63]Fan Y W, Wen Z T, Liao S M, et al. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, **2012**,**27**(6):585-603
- [64]Kirkham J, Firth A, Vernals D, et al. *J. Dent. Res.*, **2007**,**86**(5):426-430
- [65]Yang S, He H, Wang L, et al. *Chem. Commun.*, **2011**,**47**(36):10100-10102
- [66]Wu D, Yang J J, Li J Y, et al. *Biomaterials*, **2013**,**34**(21):5036-5047
- [67]Reynolds E C. *J. Dent. Res.*, **1997**,**76**(9):1587-1595
- [68]Zhang X, Li Y Q, Sun X X, et al. *J. Mater. Sci.-Mater. Electron.*, **2014**,**25**(12):2619-2628
- [69]Li L, Pan H H, Tao J H, et al. *J. Mater. Chem.*, **2008**,**18**(34):4079-4084
- [70]Li L, Mao C Y, Wang J M, et al. *Adv. Mater.*, **2011**,**23**(40):4695-4701
- [71]Shao C Y, Jin B, Mu Z, et al. *Sci. Adv.*, **2019**,**5**(8):eaaw9569
- [72]Olszta M J, Cheng X G, Jee S S, et al. *Mater. Sci. Eng. R*, **2007**,**58**(3/4/5):77-116
- [73]Jee S S, Culver L, Li Y P, et al. *J. Cryst. Growth*, **2010**,**312**(8):1249-1256
- [74]Jee S S, Kasinath R K, DiMasi E, et al. *CrystEngComm*, **2011**,**13**(6):2077-2083
- [75]Rodriguez D E, Thula-Mata T, Toro E J, et al. *Acta Biomater.*, **2014**,**10**(1):494-507
- [76]Wang J M, Chen Y, Li L, et al. *CrystEngComm*, **2013**,**15**(31):6151-6158
- [77]Chen C Q, Mao C Y, Sun J, et al. *Mater. Sci. Eng. C*, **2016**,**67**:657-665
- [78]Shao C Y, Zhao R B, Jiang S Q, et al. *Adv. Mater.*, **2018**,**30**(8):1704876
- [79]He H H, Shao C Y, Mu Z, et al. *Carbohydr. Polym.*, **2020**,**229**:115547
- [80]Gu L S, Kim J, Kim Y K, et al. *Dent. Mater.*, **2010**,**26**(11):1077-1089
- [81]Wu Z F, Wang X K, Wang Z, et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**,**9**(21):17710-17717

- [82] Luo X J, Yang H Y, Niu L N, et al. *Acta Biomater.*, **2016**, **31**:378-387
- [83] Stevens B, Yang Y, Mohandas A, et al. *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **2008**, **85**(2):573-582
- [84] Xu N, Ye X J, Wei D X, et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, **6**(17):14952-14963
- [85] Cai Y R, Tang R K. *J. Mater. Chem.*, **2008**, **18**(32):3775-3787
- [86] Liu C L, Zhai H L, Zhang Z S, et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, **8**(44):29997-30004
- [87] Moussa H, Jiang W, Alsheghri A, et al. *Acta Biomater.*, **2020**, **106**:351-359
- [88] Li L J, Yang G S. *Polym. Int.*, **2009**, **58**(4):380-387
- [89] Hu Y, Zhu Y J, Zhou X, et al. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, **4**(7):1235-1246
- [90] Kirillova A, Kelly C, von Windheim N, et al. *Adv. Healthcare Mater.*, **2018**, **7**(17):1800467
- [91] Short A R, Koralla D, Deshmukh A, et al. *J. Mater. Chem. B*, **2015**, **3**(40):7818-7830
- [92] Nonoyama T, Wada S, Kiyama R, et al. *Adv. Mater.*, **2016**, **28**(31):6740-6745
- [93] Thiruvikraman G, Athirasala A, Gordon R, et al. *Nat. Commun.*, **2019**, **10**(1):1-14
- [94] Yao S S, Xu Y F, Zhou Y Y, et al. *ACS Appl. Bio Mater.*, **2019**, **2**(10):4408-4417
- [95] Yao S S, Lin X F, Xu Y F, et al. *Adv. Sci.*, **2019**, **6**(19):1900683