

胶原大分子自组装研究进展

闫婷婷, 郑学晶*, 刘 捷, 裴 莹, 汤克勇*

(郑州大学材料科学与工程学院, 郑州 450052)

摘要:胶原是人类最主要的结构蛋白,在体内通过自组装形成具有 D 带的纤维结构,构成人体的各种组织。胶原蛋白具有优异的生物相容性、生物可降解性、无毒性、低免疫性等特点,在材料科学、生物医学、组织工程、生物传感器等领域得到了越来越多的研究和应用。近年来,人们发现,通过合理调控外界环境,胶原蛋白在体外能自组装形成有序的超分子聚集结构,胶原蛋白在体外的自组装行为引起了研究者的广泛关注,逐渐成为研究的热点。本文概括了胶原的自组装机理、外界环境条件对胶原自组装的影响以及胶原自组装基复合材料等方面的工作。

关键词:胶原; 自组装; 超分子结构

引言

分子自组装现象在生物界中普遍存在,形成各种各样复杂的生物结构。所谓分子自组装,就是指在一定平衡条件下,分子与分子之间通过非共价键作用自发形成稳定结构的分子聚集体或超分子结构的过程^[1,2]。在分子自组装过程中,由于非共价键的作用,系统内的分子自行聚集,组装成具有一定规则的结构。分子自组装并不是大量分子简单地相加在一起,而是一种十分复杂的整体协同作用。分子自组装的协同作用源于许多非共价键弱相互作用力的协同效应,主要包括氢键、疏水作用力、静电力、范德华力、 π - π 堆积作用力等。正因为这些非共价键的弱相互作用发生了协同作用,自组装体系的结构稳定性和完整性才得以正常维持^[2~8]。

在人体内,蛋白质、糖类、遗传因子 DNA 分子等的自组装也在不停地发生着,形成人类各种组织和器官,用于完成人体各项生命活动的正常进行和生命的延续^[1,9]。

胶原是构成人体最丰富、最复杂的蛋白质,通过与细胞表面分子、细胞外基质分子、以及生长和分化因子的相互作用,来维持许多组织结构的完整性,在细胞外基质蛋白质含量中占有主导地位^[10~12]。目前,至少 28 种亚型胶原蛋白被发现广泛存在于人体内各类组织中,如软骨、骨骼、肌腱、皮肤、角膜等^[13,14]。它们以特定的结构存在于这些组织中,支持着各组织的本职功能,其形态从胶原分子最初的三股螺旋结构到原纤维、含有断续三股螺旋结构的原纤维、网状结构、串珠状纤维、跨膜结构、锚纤维等超分子结构^[15,16]。

胶原具有四级结构,其一级结构是 Gly-X-Y 序列的重复排列,Gly 代表甘氨酸,X 和 Y 可以是其它氨基酸但多为脯氨酸和羟脯氨酸;二级结构中,胶原分子的三条肽链形成左手螺旋,即 II-聚脯氨酸左螺旋结构;三级结构中,三股形成左手螺旋的多肽链进一步形成右手超螺旋结构;胶原分子进一步自组装形成有序的超分子结构天然胶原纤维,即其四级结构^[17~20]。无论从生物化学还是超分子化学角度来看,胶原都是一种迷人的蛋白质,它们具有生物相容性、两亲性、识别作用,在体内可以通过特殊的受体参与细胞-细胞外基质间的相互作用,还可以通过层层自组装,形成有序的超分子结构^[21]。用透射电镜(TEM)和原子力显微镜(AFM)可以观察到,胶原超分子结构呈纤维状,并具有交替排列的明暗横纹,称作 D 带,D 带

10.14028/j.cnki.1003-3726.2016.08.003

收稿:2015-11-23;修回:2016-02-20;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(51473150)和河南省教育厅科学技术研究重点项目科技攻关计划项目(13A430705);

作者简介:闫婷婷(1990—),女,硕士生,主要从事高分子材料结构与性能的研究;

* 通讯联系人,E-mail: x.zheng@zzu.edu.cn; kytang@zzu.edu.cn.

的长度约为 64~67nm^[22~24]。

研究胶原自组装机理以及外界环境对胶原自组装的影响,对于生物材料的发展是至关重要的。本文概述了近几年关于胶原自组装的研究,以及重要的胶原自组装基复合材料。

1 胶原自组装机理

胶原的结构复杂,给研究胶原自组装机理带来了很大的困难^[25]。为了克服这些困难,越来越多的研究者通过合成小分子量的胶原蛋白模拟多肽,在一定条件下自组装成有序的结构来研究胶原自组装机理。

Kar 等^[26]利用三股螺旋的胶原模拟多肽(Pro-Hyp-Gly)₁₀,这种多肽在一定条件下自组装形成了一种网络结构,而不是像体内自组装形成的纤维结构。他们通过调换多肽(Pro-Hyp-Gly)₁₀中心区域氨基酸的种类,发现疏水作用对胶原模拟多肽自组装动力学和形态影响很大。有一种假说认为,胶原模拟多肽没能够形成纤维结构,很可能是缺乏粘性末端^[27]。Rele 等^[28]设计了带有粘性末端的(PRG)₄(POG)₄(EOG)₄多肽,在中性模拟体液 PBS 中,N 端带正电的精氨酸与 C 端带负电的谷氨酸之间的静电作用推动了多肽的自组装,形成了具有 D 带的纤维结构,用透射电镜就可以清晰地观察到纤维的 D 带(如图 1 所示)。可能是因为胶原蛋白模拟多肽分子链比较短,观察到的 D 带只有 18nm,远小于人体内自组装形成的 D 带长度 64~67nm。尽管如此,Rele 等的发现仍具有重要意义。Hartgerink 等^[29]第一次完成了胶原自组装的整个过程,由多肽链到三股螺旋结构到纤维结构最终到水凝胶,以脯氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸为重复单元设计了(Pro-Lys-Gly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄模拟多肽,利用赖氨酸、天门冬氨酸之间的盐桥、氢键来稳定具有粘性末端的三股螺旋结构,在浓度较大时自组装形成了具有纤维结构的水凝胶,结果见图 2。

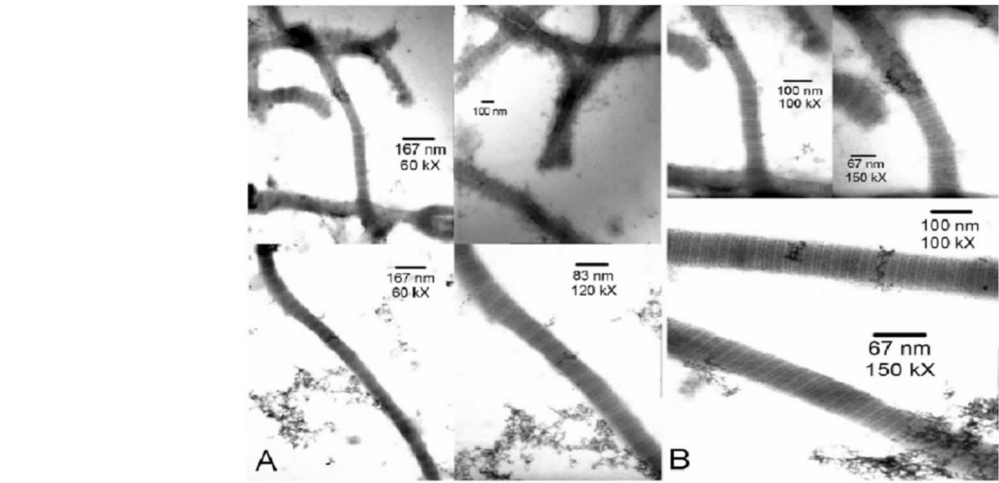


图 1 胶原蛋白模拟多肽(PRG)₄(POG)₄(EOG)₄ 自组装成具有 D 带的纤维结构
(A)室温下培养 9 天,醋酸铀染色的胶原蛋白模拟多肽纤维结构的透射电镜图;(B)具有 D 带结构纤维的高倍率透射电镜图^[28]

Figure 1 Formation of D-periodic collagen-mimetic fibers

(A) Transmission electron micrographs (TEM) of uranyl acetate-stained fibers of collagen-mimetic peptide (PRG)₄(POG)₄(EOG)₄ formed after a 9 day incubation period at room temperature; (B) High magnification transmission electron micrographs (HMTEM) reveal well-defined D-periodic structure^[28]

生命活动依赖于分子的手性,许多生理现象的产生都源于分子手性的精确识别与严格匹配。最近 Xu 等^[30]采用简化的 L-或 D-脯氨酸组成的并带有环状脂肪族侧链的、具有三螺旋结构的胶原蛋白模拟多肽,利用环状脂肪族侧链减少分子链间的静电和氢键的相互作用,他们观察到,单独的 5.5mM(L PL

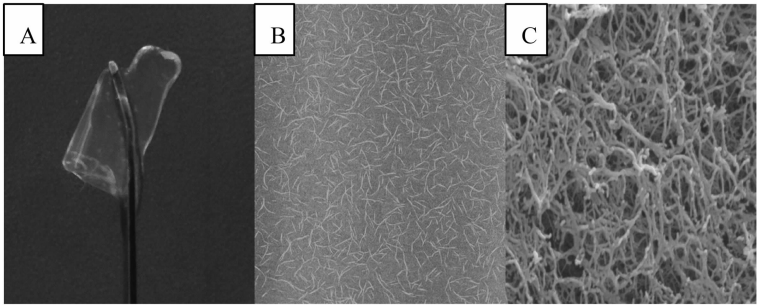


图 2 胶原蛋白模拟多肽(Pro-Lys-Gly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄在磷酸缓冲液体系中自组装结构图
A 质量浓度为 1%、胶原蛋白模拟多肽水凝胶的数码照片图;B 质量浓度为 1%、新鲜云母片上胶原蛋白模拟多肽纤维结构的原子力显微镜图;C 临界点干燥法水凝胶的扫描电镜图(×30,000)^[29]

Figure 2 Images of (Pro-Lys-Gly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄ that show self-assembled structure in phosphate buffer;
A. Photo of the shape-persistent nature of the gel with a concentration of 1.0% by weight; B. AFM of collagen-like nanofibres in phosphate as observed after spin coating onto freshly cleaved mica from solutions of peptide at concentrations of 1.0% by weight; C. SEM images of critical point dried hydrogel with a peptide concentration of 1.0% by weight that show the interconnected fibrous structure responsible for the gel forming properties at 30,000^[29]

PG)₁₀和 5.5mM(_DP_DPG)₁₀经过几周仍然保持溶液状态,而 2.75mM(_LP_LPG)₁₀+2.75mM(_DP_DPG)₁₀两个序列混合的异构体则快速聚集,这表明反手性物质的存在促进了超分子的自组装。为了进一步阐明三螺旋结构在胶原分子自组装过程中的重要性,他们在第五个三联体中去除一个甘氨酸,设计了一个 *L*-多肽的突变体(_LP_LPG)_{4L}P_LP(_DP_DPG)₅,这种类型的突变可以抑制三股螺旋结构的形成,在圆二色谱 225nm 处无正的椭圆峰出现。他们发现,突变体 *L*-多肽和 *D*-多肽混合物经过几周依旧透明,说明三螺旋结构对胶原的自组装也是极其重要的。

由此可看出,胶原分子能够自组装成有序的超分子结构,这与其本身固有的三股螺旋结构、特有的粘性末端、分子手性和分子间相互作用力氢键、静电作用、疏水作用等密切相关。正是由于胶原分子本身的这些结构特性和分子之间作用力相互协调提供的驱动力,胶原分子才能够精确地装配形成高度有序的超分子结构。

2 外界条件对胶原自组装的影响

在体内,胶原分子可以通过自组装形成具有 D 带的超分子结构,但胶原的体外自组装过程易受外界因素影响,紫外线、基底材料、温度、离子强度、电场、纳米粒子以及胶原溶液的 pH 值、浓度等都对胶原自组装行为产生影响。

2.1 紫外线照射对胶原自组装的影响

Menter 等^[31]系统地研究了各种紫外波段对胶原自组装的影响,他们发现,UVC(波长 200~275nm)对胶原自组装纤维生长阶段影响很大,对成核阶段产生的影响很小,UVA(波长 320~420nm)和 UVB(波长 275~320nm)对胶原自组装成核和生长阶段产生的影响都很小。他们在胶原溶液中加入核黄素(UVA 生理光敏剂)后再进行 UVA 照射,发现对胶原自组装动力学产生了影响,这可能是胶原纤维起始形成区域附近的特定位置存在核黄素与胶原之间的基态作用,进而影响胶原纤维的形成。胶原自组装对非特异性紫外线伤害不太敏感,而对存在特定基态作用特异性伤害很敏感,这是因为非特异性的紫外光照射主要依靠胶原上发色基团的平行吸收。Metreveli 等^[32]对紫外线影响胶原自组装机理进行了研究,他们发现紫外线照射可能产生自由基,这些自由基会影响胶原二级结构中脯氨酸自由基,进而会减弱甚至断裂被破坏的自由基附近的共价键,三股螺旋结构就会遭到一定的破坏,阻碍自组装的进行。

2.2 胶原浓度对自组装的影响

胶原浓度也是影响胶原自组装很重要的一个因素,存在一个很至关重要的临界浓度值,高于这个浓度,能发生自组装;低于这个浓度,则不能。Yan 等^[33]认为胶原自组装符合成核-生长机理,即胶原自组装分为两个部分:核心的形成和核的生长。他们发现,当浓度大于 0.6mg/mL 时,发生了明显的自组装,增加浓度能加快核心的形成和核的生长,而低于这个浓度没有观察到明显的胶原自组装现象。Fang 等^[34]也有类似的发现,当胶原浓度低于 0.5 μ g/mL 时在原子力显微镜下观察不到纤维结构,而高于这个浓度就能观察到具有 D 带的纤维结构。他们还发现浓度越高,观察到的纤维结构越多,而且浓度对 D 值的影响不大。

2.3 基底对胶原自组装的影响

胶原自组装过程中,常用的基底材料有白云母、金云母、二氧化硅、聚苯乙烯(PS)、二硫化钼等,由于胶原具有各向异性和两亲性,基底的晶格排布、表面化学性质、电荷特性、疏水性等都会对胶原分子自组装产生很大影响。理解和控制胶原在界面上的吸附与自组装,为研究者指引一个新的方向——生物界面材料,在材料科学和生物医学领域有很大的应用前景。Fang 等^[34]发现,由于基底材料的晶格结构和对称性,纤维在金云母、白云母、二硫化钼上呈现出不同的排布分别为三角形、倾斜的平行线、网状。Dupont-Gillain 等^[35]研究了胶原在聚氧化乙烯(PEO)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚苯乙烯(PS)、PS/PMMA 等基底上的自组装,发现胶原在 PEO 上个别纤维形成了比较稀疏的网络,在 PMMA 上形成了单层光滑的纤维结构,在 PS 上形成了大量的纤维结构,在异质基底 PS/PMMA 形成了不均一的结构。他们发现,在 PS 上的胶原纤维密集度要大于 PMMA 上的,认为这主要与基底的疏水作用有关。他们进一步证实了这个结果,发现胶原在疏水基底 PS 比在更加疏水基底等离子氧化的聚苯乙烯(PSox)上更容易吸附自组装。这可以用来制作特定结构的界面,在癌症研究和药物开发方面将会有很大的应用价值。

2.4 溶液 pH 对胶原自组装的影响

组成胶原分子的多肽链带有不同电荷,pH 会影响胶原分子不同肽链的带电状态,从而会影响胶原分子之间的静电作用,影响胶原自组装。Yadavalli 等^[36]发现,在 pH=3 时经过几天时间胶原分子都没有发生明显的自组装,在 pH=5、7、9 时胶原分子发生了自组装,而 pH=5 时胶原分子形成原纤维的速度要比 pH=7、9 慢很多,这可能是因为 pH 值接近等电点 9(实验所用牛皮胶原所测等电点为 9.3)易发生自组装。Jiang 等^[37]发现,在 pH=2.5 和 3.5 时胶原分子在云母片上自组装形成密集排列的类似于球状突起、颗粒状的结构,在 pH=4.5 时胶原分子自组装形成细长的小球,在 pH=5.5 到 9.5 之间时胶原分子自组装形成纤维结构,pH=10.5 时只观察到少数类似于纤维结构的细长片段,当 pH 值升高到 10.7 时在云母片上没有观察到胶原纤维。Dehsorkhi 等^[38]对 pH 值影响胶原蛋白模拟多肽的自组装也做了系统工作,发现当 pH 变化时,胶原自组装形态演变如下:pH=2 时,类球状颗粒;pH=3 时,扁平带状;pH=4 时,缠绕纤维带状;pH=7 时,扁平宽带状。

2.5 离子强度对胶原自组装的影响

胶原是典型的两性分子,带有大量的亲水性氨基酸残基,这些亲水基团会与周围的水分子以氢键结合形成水合层。而且组成胶原分子的多肽链带有不同电荷,离子强度增加,离子、胶原分子、水分子发生竞争性结合,会破坏胶原与水分子之间的氢键,破坏水合层,离子强度的增加还可能屏蔽多肽链所带的静电荷。此外,离子大量增加可能会形成盐桥,这些作用都会对胶原自组装产生很大影响。魏香奕等^[24]发现,当胶原溶液中不含 NaCl 时,胶原分子无序堆积,形成致密的膜结构;当 NaCl 浓度上升到 0.2mol/L 时,胶原分子开始聚集成模糊的纤维结构;当 NaCl 浓度上升到 2mol/L 时,胶原已聚集成形状分明的纤维状聚集结构。Yan 等^[33]发现,当 NaCl 浓度逐渐升高时,胶原自组装速度也逐渐加快;但浓度超过 60mM 后,自组装速率又开始减小,这可能与核心表面性质有关。Jiang 等^[37]发现,KCl 浓度为 50mM 和 100mM 时,胶原形成了纤维结构,纤维排列大体上有一个取向,彼此之间不是严格地相互平行,而是出现了一些扭曲和交织;KCl 浓度为 200mM 时,形成了类似的结构,但纤维上出现了明显交替排列的 D 周期,结果见图 3。

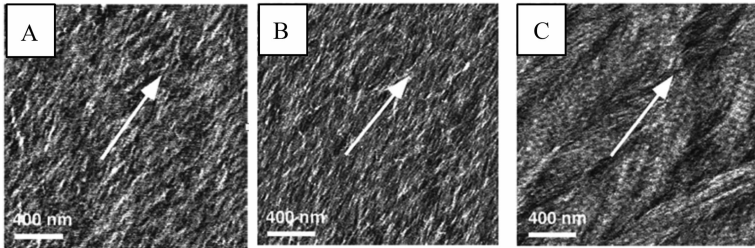


图 3 电解质对胶原自组装的影响

A. 50mM KCl; B. 100mM KCl; C. 200mM KCl;
A、B 和 C 胶原自组装纤维出现了一些扭曲和交织的现象,其中 C 图纤维上出现了明显交替排列的
D=65.3±2.7nm 的周期横纹^[37]

Figure 3 Electrolyte dependent self-assembly of collagen
A. 50mM KCl; B. 100mM KCl; C. 200mM KCl

The collagen fibrils were twisted around each other forming a rougher pattern in (A, B and C);
the collagen fibrils showed a longitudinal periodicity of 65.3±2.7nm in (C)^[37]

2.6 温度对胶原自组装的影响

体外环境中,胶原在非共价键作用的驱动下进行自组装,温度是影响胶原自组装的重要因素,且在一定温度范围内自组装过程是可逆的,即加热时发生自组装,冷却时发生解自组装,由此可知胶原自组装是一个吸热过程^[39~42]。胶原上的氨基酸与周围的水分子会以氢键结合形成水合层,当温度升高,水分子的动能增大,一些水分子克服阻力被释放出来,从而有利于胶原纤维的形成^[43~44]。De Wild 等^[42]发现,在温度为 4℃时,胶原难以形成纤维,而在 37℃时有大量的纤维生成。当温度从 37℃以一定速度降低时,胶原溶液的浊度也随之逐渐降低,这说明降温过程中胶原发生了解自组装。当温度再次升高时胶原又可以重新自组装,表明胶原自组装过程在一定温度范围内是一个可逆过程。流变实验和弹性模量实验结果也与浊度实验结果基本一致。Drzewiecki 等^[45]在胶原溶液中加入甲基丙烯酸甲酯,在 4℃和 37℃之间以一定的速度升温 and 降温,发现样品在悬浮液与半固态凝胶之间变化。流变实验结果表明,其弹性模量随温度的升高而升高,随温度的降低而降低,温度不变时弹性模量保持一恒定值。圆二色谱结果显示,温度在 4℃时,在 222nm 处存在一个正峰;温度升高至 37℃时,222nm 处正峰消失被一个负峰代替;温度再次降到 4℃时,222nm 处出现一个正峰;继续升高到 37℃时,222nm 处正峰消失被一个负峰代替,说明胶原的自组装过程是可逆的。

2.7 电场作用对胶原自组装的影响

通过自组装构建纳米级模块在生物学上是一种普遍现象,这些组装在一起的纳米级构建模块的空间分布决定了生物器件的最终尺寸和形状^[46~48]。在体内,胶原利用细胞发出的复杂网络信号,调控自组装协调有序地发生,形成具有可控结构和尺寸的生物器件,然而人们对细胞调控这个无可比拟的复杂工程还知之甚少^[49,50]。De La Rica 等^[51]发现,通过电场作用可以影响胶原自组装体在空间的分布,从而获得特定的尺寸和形状。他们运用拉曼光谱证明了胶原在微电极间的存在,AFM 图分析表明胶原在微电极之间并不是随机分散的,主要集中在微电极尖头和两者的缝隙处,这主要是因为微电极尖头和两者缝隙处的电场强度较强。微电极的几何结构决定电场线的分布,电场强度会影响胶原在微电极间的空间分布,可以通过调节微电极的几何结构和微电极的布局,来指导胶原自组装选择性地分布和生长,微电极诱导胶原自组装示意图如图 4 所示。这为以后通过交流电场来控制其它生物模块自组装提供了依据,为制造生物传感器、胶原模板化纳米线开拓了前景。

2.8 纳米粒子对胶原自组装的影响

天然骨是由胶原、羟基磷灰石和其它蛋白质等构成,形状复杂,具有高度有序的微观结构。胶原在骨

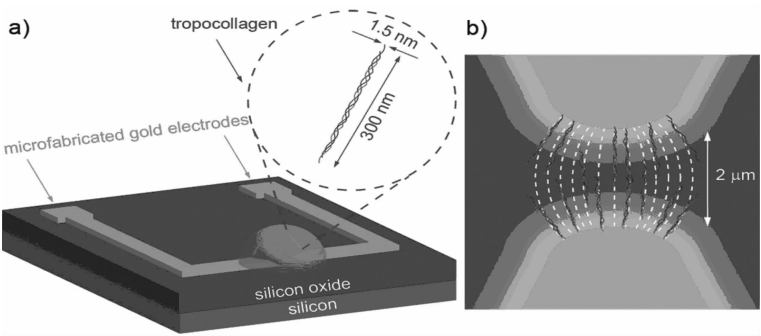


图 4 用微电极,在电场作用下诱导胶原自组装示意图

A 胶原溶液覆盖的微电极之间施加交流电场;B 微电极间电场线的分布及合适频率下胶原积聚在微电极边缘和电极之间电场强度强的区域^[51]

Figure 4 Scheme of electric field-guided assembly of collagen building blocks with arrow shaped microelectrodes

A An AC field is applied between microelectrodes covered by a solution of tropocollagen;

B Scheme of the distribution of electric field lines at the gap between the electrodes, At the correct frequency, protein building blocks accumulate at the electrode edges and the gap between the electrodes where the field is the strongest^[51].

内自组装成具有 D 带的纤维结构,纳米级无定形磷酸钙盐渗入胶原纤维中,然后结晶矿化形成磷灰石,这些磷酸钙(CaP)尺寸小于 10nm,带负电荷^[52,53]。Wang 等^[54]用带负电的金纳米粒子 AuNP(2nm、5nm、10nm)粒子和带正电 AuNP(3nm)粒子对胶原自组装行为进行了系统的研究,发现带正电和带负电的粒子都能很好地、均匀地吸附在胶原纤维上,粒子没有表现出对某些区域或纤维的特异性吸附,这说明了 AuNP 粒子与胶原纤维没有特殊的作用,这不同于生物矿化过程。生物矿化过程中,CaP 粒子渗透进入到纤维的间隙区域,CaP 粒子与纤维的间隙区存在相互作用。他们还发现,较大的 AuNP(3nm、5nm、10nm)渗入胶原纤维中,胶原/金纳米粒子体系表现出类似的滞弹性反应,质量增加的同时粘度也增加。而 2nm 的 AuNP 粒子渗入胶原纤维中,粒子浓度较低时,胶原/金纳米粒子体系质量增加的同时粘度增加,当粒子浓度增加到一定值后,胶原/金纳米粒子体系质量增加粘度反而降低,胶原/金纳米粒子体系的刚度增加,纤维变得僵硬,这说明 2nm 的 AuNP 粒子渗入纤维的过程对粒子密度具有一定的依赖性。这可能是由于 2nm 的 AuNP 粒子仅仅是机械性地整合到纤维上,不同于较大的 AuNP(3nm、5nm、10nm)吸附在胶原纤维上。

3 胶原自组装基复合材料

当今,人类对材料的要求越来越苛刻,既要具有优异的刚度、强度,同时还要具备韧性、低密度,低成本,还可以被加工成各种形状^[55]。天然材料以其精细简单而又复杂的结构承载的独特性能,如自我修复性能、多孔性、兼具强度和硬度、生物相容性、自组装性等越来越受到人们的青睐,特别是天然材料的自组装性能,能够自发地形成某种超级结构深深地吸引了不少研究者。胶原作为一种重要的具有组装机能的天然材料—人类最丰富而又复杂的蛋白质,其自组装基复合材料代表一种相对较新的材料逐渐吸引了人们的眼球。

3.1 胶原-纤维素晶须层层自组装(LBL)复合材料

作为地球上最丰富的可再生资源,纤维素广泛存在于生物体内,如植物(竹子、树木、棉麻、棕榈等)、动物(如海鞘)、细菌(某些细菌可分泌纤维素)等^[56]。对纤维素进行物理机械处理或化学酸解处理可以得到微纤化纤维素、纤维素纳米晶须等,它们具有优异的机械性能、大的长径比、可再生性、低密度,使其成为新的生物基纳米复合材料的宠儿^[57,58]。De Mesquita 等^[59]利用层层自组装技术(LBL)合成了胶原-纤维素纳米晶须自组装多层膜,层层自组装可以使两物质间作用得到最大化,LBL 膜的构建是靠胶原的

氨基与纤维素纳米晶体羟基间的氢键作用驱动的,他们用紫外光谱、原子力显微镜、扫描电镜和椭圆仪等来表征组装多层薄膜的形成。自组装多层膜呈现出了一种潜在的策略用来发展生物基复合材料。Mathew 等^[60]发现,在胶原中加入纤维素后,不仅改善了胶原的强度和模量(这可能是纤维素与胶原之间的化学作用和纤维素纤维与胶原纤维之间形成的强大的物理缠结作用),而且还保持了胶原的生物相容性和无毒性。Steele 等^[61]也有类似的研究报道。

3.2 胶原-羟基磷灰石自组装基复合材料

天然骨是由纳米级的胶原纤维(长度 300nm 左右,直径 1.5nm 左右)和羟基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)纳米晶体(平板状,大小为 $50\text{nm} \times 25\text{nm}$,厚度 $1.5 \sim 4\text{nm}$)自组装形成的高度有序的微结构构成^[62,63]。羟基磷灰石纳米晶体优先在 c 轴方向取向平行于胶原原纤维,相互交错沿胶原纤维周期性地排列,如图 5^[55,64]所示。在骨组织工程方面,许多研究者模拟天然骨的组成,不少关于胶原-羟基磷灰石自组装复合材料的工作已经被报道^[65~71]。然而在体外研究中,人们常常忽略了胶原-羟基磷灰石长程有序的结构;胶原在高浓度下粘度太大而无法流动,研究者一般使用较低的胶原浓度(接近 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);这些条件导致大量空隙区域没有纤维的形成,无法与天然骨的组织与密度相比^[72~74]。考虑到这些因素,最近 Wang 等^[75]基于胶原-羟基磷灰石的矿化过程,结合和模拟细胞外液所提供胶原在骨组织中复杂的功能,从细胞外基质中添加分子,进一步完成矿化过程,最终设计出高纤维浓度、单分散纤维、长程有序的多层组织。他们还研究了胶原在骨组织矿化过程中的功能,证实了胶原诱发和定位羟基磷灰石的结晶生长和分散,并控制其长度^[76,77]。他们合成的材料具备和天然骨类似的结构,而且在绵羊体内进行材料的骨移植和诱导骨生长行为的研究。该方法展示了用原始模型来研究生物矿化过程中的根本性问题,为以后移植材料的设计提供了一个很好的开端。

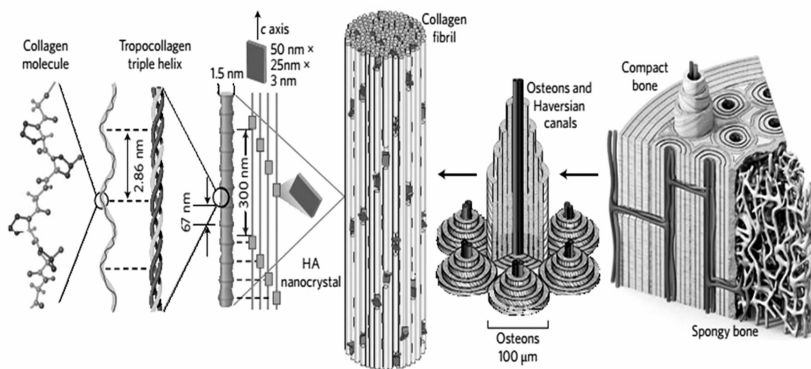


图 5 骨组织分级结构示意图^[55]

Figure 5 Hierarchical structure of bone^[55]

3.3 胶原-二氧化硅自组装基复合材料

二氧化硅在自然界中广泛存在,储藏丰富,约占地壳质量的 12%,而且以其长久以来在生物界中进化的重要性能备受关注^[78,79]。Aimé 等^[80]基于表面工程技术构建胶原-二氧化硅的自组装生物杂化网络,首先运用 Stober 模板法合成改性的二氧化硅颗粒 NP-Si,然后将改性的二氧化硅颗粒 NP-Si 和胶原在醋酸溶液中混合,在静电作用和非共价键作用下胶原吸附在 NP-Si 颗粒上形成核壳结构。运用量热技术、动态光散射、Z 电位和电镜等证实了杂化结构的形成,并发现在这个自组装的杂化结构中,胶原纤维保留了其很好的结构和特异性识别能力,可以将其运用在化学分析和医学应用方面。这也为其它具有光学性能或磁性的粒子与具有自组装性能的蛋白质、多糖的复合提供了一种思路,即利用表面工程技术将它们组装起来形成一定的结构运用到各个领域中去。

3.4 胶原-海藻酸钠自组装基复合材料

海藻酸钠,一种天然聚多糖,在动物体内通过新陈代谢可以被降解,已经被广泛应用于医学领域中如

药物输送和缓释、牙齿细胞支架等,但其与细胞间相互作用的缺乏限制了其广泛应用^[81~85]。最近 Li 等^[86]利用层层自组装技术合成出了胶原-海藻酸钠复合膜具有高度的稳定性和优异的生物相容性。他们发现,在高的 pH 值和高的离子强度溶液中,经交联的复合膜(交联剂为 *N*-羟基琥珀酰亚胺 NHS 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 EDC)比未交联的复合膜持续更长时间而不被瓦解。这种复合膜不仅可以改善人类牙周膜细胞的粘附性和增殖性,还可以用来对生物玻璃和聚乳酸支架材料进行表面改性,有效地加强了细胞和材料之间的相互作用。Yang 等^[87]发现,将胶原水凝胶浸泡在氧化后的海藻酸钠溶液中可以实现胶原水凝胶的交联,其中海藻酸钠作为分子交联剂。交联后的水凝胶的压缩模量和降解速度都得到了很好的改善,这种浸泡的方法不仅实现了水凝胶的交联而且还保持了胶原原有的性质。软骨细胞在交联后的水凝胶中能很好地增殖并保持了细胞原有的形貌。利用氧化后含有双醛的海藻酸钠交联胶原水凝胶为软骨组织开辟了一条新途径。

3.5 胶原-壳聚糖自组装基复合材料

甲壳素作为地球上仅次于纤维素的第二大丰富的可再生资源,在节肢类动物的外骨骼中、一些昆虫的角质层以及甲壳类动物的外壳中广泛存在。甲壳素部分脱去乙酰基的衍生物为壳聚糖,其独特的结构与细胞外基质中的氨基葡聚糖 GAGs 相似。伤口愈合是一个复杂的过程,牵涉到血液凝固、炎症反应、上皮组织再生、造粒组织的形成、组织的重建^[88]。Huang 等^[89]利用 LBL 技术将带正电的壳聚糖和带负电的胶原组装在一起制备成了胶原-壳聚糖膜,用于促进伤口的愈合。他们的研究发现,胶原-壳聚糖膜可以加快细胞的迁移,增强细胞的粘附性、增殖性、分散性等,促进血管生成,进而使伤口愈合,而且胶原-壳聚糖膜降解速率、促进伤口愈合速率较快。这为快速高效地修复受伤皮肤的结构和功能提供了一个指导。

4 结语

作为细胞基质最主要的蛋白质,胶原具有独特结构赋予的特异性能,如自组装性能、分子识别性能、优异的生物相容性等。深入研究胶原自组装机理以及环境各因素对胶原自组装行为的影响至关重要。太空环境(重电离粒子和宇宙射线)对胶原自组装的影响报道不多^[90,91]。太空环境中有大量的电磁波或高能粒子,可以分为电离辐射(电磁辐射、宇宙射线-高能粒子电子、离子、质子、中子、带电的介子、正负电子对、x 射线和 γ 射线等)与非电离辐射两类(可见光、微波、电波等)。研究这些条件对胶原自组装的影响对于未来材料设计是很重要,特别是对在太空站物质的需求和太空站生命系统。考虑到未来长期太空旅行的需要,这也将会成为未来的一个研究方向。

利用层层自组装技术和表面工程技术,可以将胶原与其它功能材料(具有光学特性、磁性、高的机械性能的材料)结合在一起,形成一些新颖的材料——胶原基多功能复合材料,将会开辟一条新的道路来解决一些医学上的难题(受伤皮肤的移植、药物的可控释放、癌症的治疗、骨移植等)。胶原及其复合材料在生物医学、材料科学、组织工程等领域有很大的应用前景,但如何实现结构可控、精确地整合装配得到高度有序的结构,以及如何加工这些纳米级材料仍然具有挑战性。

参考文献:

- [1] Whitesides G M, Mathias J P, Seto C T. Science, 1991, 254: 1312~1319.
- [2] 小丁,陈昌盛,陈荆晓,张先正,卓仁禧. 中国科学化学(中文版), 2011, 41(2): 221~238.
- [3] Schnell J. Arch Biochem Biophys, 1968, 127: 496~502.
- [4] Estroff L A, Hamilton A D. Chem Rev, 2004, 104(3): 1201~1218.
- [5] Usha R, Ramasami T. Thermochim Acta, 1999, 338(1): 17~25.
- [6] Hunter C A, Sanders J K M. J Am Chem Soc, 1990, 112(14): 5525~5534.
- [7] 刘欢,翟锦,江雷. 无机化学学报, 2006, 22(4): 585~597.
- [8] 刘海林,马晓燕,袁莉,黄韵. 材料科学与工程学报, 2004, 22(2): 308~311.

- [9] 周希蕊, 陈龙, 罗施中. 中国科学化学(中文版), 2013, 43(8): 1005~1012.
- [10] Di Lullo G A, Sweeney S M, Körkkö J, Ala-Kokko L, San Antonio J D. J Biol Chem, 2002, 277(6): 4223~4231.
- [11] 李国英, 张忠楷, 雷苏, 石碧. 四川大学学报: 工程科学版, 2005, 37(4): 54~58.
- [12] Zhai Y, Cui F Z. J Cryst Growth, 2006, 291(1): 202~206.
- [13] Heino J. Bioessays, 2007, 29(10): 1001~1010.
- [14] Kadler K E, Baldock C, Bella J, Boot-Handford R P. J Cell Sci, 2007, 120(12): 1955~1958.
- [15] Van der Rest M, Garrone R. FASEB J, 1991, 5(13): 2814~2823.
- [16] Khoshnoodi J, Cartiailler J P, Alvares K, Veis A, Hudson B G. J Biol Chem, 2006, 281(50): 38117~38121.
- [17] Traub W, Yonath A, Segal D M. Nature, 1969, 221: 914~917.
- [18] Rich A, Crick F H C. J Mol Biol, 1961, 3(5): 483~506.
- [19] Brodsky B, Persikov A V. Adv Protein Chem, 2005, 70: 301~339.
- [20] Shoulders M D, Raines R T. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 929~958.
- [21] Fallas J A, O'Leary L E R, Hartgerink J D. Chem Soc Rev, 2010, 39(9): 3510~3527.
- [22] Erickson B, Fang M, Wallace J M, Orr B G, Les C M, Banaszak Holl M M. Biotechnol J, 2013, 8(1): 117~126.
- [23] Gross J, Schmitt F O. J Exp Med, 1948, 88(5): 555~568.
- [24] 魏香奕, 张文华, 石碧. 皮革科学与工程, 2013, 23(6): 5~11.
- [25] Orgel J P R O, Irving T C, Miller A, Wess T J. PNAS, 2006, 103(24): 9001~9005.
- [26] Kar K, Wang Y H, Brodsky B. Protein Sci, 2008, 17(6): 1086~1095.
- [27] Woolfson D N. Adv Protein Chem, 2005, 70: 79~112.
- [28] Rele S, Song Y, Apkarian R P, Qu Z, Conticello V P, Chaikof E L. J Am Chem Soc, 2007, 129(47): 14780~14787.
- [29] O'Leary L E R, Fallas J A, Bakota E L, Kang M K, Hartgerink J D. Nat Chem, 2011, 3(10): 821~828.
- [30] Xu F, Khan I J, McGuinness K, Parmar A S, Silva T, Murthy N S, Nanda V. J Am Chem Soc, 2013, 135(50): 18762~18765.
- [31] Menter J M, Patta A M, Sayre R M, Dowdy J, Willis I. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2001, 17(3): 114~120.
- [32] Metreveli N, Namicheishvili L, Jariashvili K, Mrevlishvili G, Sionkowska A. Int J Photoenergy, 2006, 2006: Article ID 76830.
- [33] Yan M, Li B, Zhao X, Qin S. Food Hydrocolloids, 2012, 29(1): 199~204.
- [34] Fang M, Goldstein E L, Matich E K, Orr B G, Banaszak Holl M M. Langmuir, 2013, 29(7): 2330~2338.
- [35] Dupont-Gillain C C. Colloids. Surf. B. Biointerfaces, 2014, 124: 87~96.
- [36] Yadavalli V K, Svintradze D V, Pidaparti R M. Int J Biol Macromol, 2010, 46(4): 458~464.
- [37] Jiang F, Hörber H, Howard J, Muller D J. J Struct Biol, 2004, 148(3): 268~278.
- [38] Dehsorkhi A, Castelletto V, Hamley I W, Adamcik J, Mezzenga R. Soft Matter, 2013, 9(26): 6033~6036.
- [39] Leikin S, Rau D C, Parsegian V A. Nat Struct Biol, 1995, 2(3): 205~210.
- [40] Leikina E, Mertts M V, Kuznetsova N, Leikin S. PNAS, 2002, 99(3): 1314~1318.
- [41] De Greef T F A, Smulders M M J, Wolffs M, Schenning A P H J, Sijbesma R P, Meijer E W. Chem Rev, 2009, 109(11): 5687~5754.
- [42] De Wild M, Pomp W, Koenderink G H. Biophys J, 2013, 105(1): 200~210.
- [43] Cooper A. Biochem J, 1970, 118(3): 355~365.
- [44] Williams B R, Gelman R A, Poppke D C, Piez K A. J Biol Chem, 1978, 253(18): 6578~6585.
- [45] Drzewiecki K E, Parmar A S, Gaudet I D, Branch J R, Pike D H, Nanda V, Shreiber D I. Langmuir, 2014, 30(37): 11204~11211.
- [46] Chung W J, Oh J W, Kwak K, Lee B Y, Meyer J, Wang E, Hexemer A, Lee S W. Nature, 2011, 478(7369): 364~368.
- [47] Pokroy B, Kang S H, Mahadevan L, Aizenberg J. Science, 2009, 323(5911): 237~240.
- [48] Kushner A M, Guan Z. Angew Chem Int Ed, 2011, 50(39): 9026~9057.
- [49] Saffarian S, Collier I E, Marmer B L, Elson E L, Goldberg G. Science, 2004, 306(5693): 108~111.
- [50] Zelzer M, Ulijn R V. Chem Soc Rev, 2010, 39(9): 3351~3357.
- [51] De La Rica R, Mendoza E, Chow L W, Cloyd K L, Bertazzo S, Watkins H C, Steele J A M, Stevens M M. Small, 2014, 10(19): 3876~3879.
- [52] Liu Y, Kim Y K, Dai L, Li N, Khan S O, Pashley D H, Tay F R. Biomaterials, 2011, 32(5): 1291~1300.
- [53] Thula T T, Svedlund F, Rodriguez D E, Podschun J, Pendi L, Gower L B. Polymers, 2010, 3(1): 10~35.
- [54] Wang D, Ye J, Hudson S D, Scott K C K, Lin-Gibson S. J Colloid Interface Sci, 2014, 417: 244~249.
- [55] Wegst U G K, Bai H, Saiz E, Tomsia A P, Ritchie R O. Nat Mater, 2014, 14: 23~36.

- [56] Favier V, Chanzy H, Cavaille J Y. *Macromolecules*, 1995, 28(18): 6365~6367.
- [57] Habibi Y, Lucia L A, Rojas O J. *Chem Rev*, 2010, 110(6): 3479~3500.
- [58] Eichhorn S J, Dufresne A, Aranguren M, Marcovich N E, Capadona J R, Rowan S J, Weder C, Thielemans W, Roman M, Renneckar S, Gindl W, Veigel S, Keckes J, Yano H, Abe K, Nogi M, Nakagaito A N, Mangalam A, Simonsen J, Benight A S, Bismarck A, Berglund L A, Peijs T. *J Mater Sci*, 2010, 45(1): 1~33.
- [59] De Mesquita J P, Patrício P S, Donnici C L, Petri D F S, De Oliveira L C A, Pereira F V. *Soft Matter*, 2011, 7(9): 4405~4413.
- [60] Mathew A P, Oksman K, Pierron D, Harmad M F. *Cellulose*, 2012, 19(1): 139~150.
- [61] Steele T W J, Huang C L, Nguyen E, Sarig U, Kumar S, Widjaja E, Loo J S C, Machluf M, Boey F, Vukadinovic Z, Hilfiker A, Venkatraman S S. *J Mater Sci Mater Med*, 2013, 24:2013~2027.
- [62] Hing K A. *Phil Trans R Soc Lond A*, 2004, 362(1825): 2821~2850.
- [63] Glimcher M J. *Rev Mineral Geochem*, 2006, 64(1): 223~282.
- [64] Zhang L, Tang P, Xu M, Zhang W, Chai W, Wang Y. *Acta Biomater*, 2010, 6(6): 2189~2199.
- [65] Tcacencu I, Wendel M. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(5): 2015~2021.
- [66] Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. *Biomaterials*, 2001, 22(13): 1705~1711.
- [67] Wahl D A, Czernuszka J T. *Eur Cell Mater*, 2006, 11: 43~56.
- [68] Kikuchi M, Matsumoto H N, Yamada T, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J. *Biomaterials*, 2004, 25(1): 63~69.
- [69] Nudelman F, Pieterse K, George A, Bomans P H H, Friedrich H, Brylka L J, Hilbers P A J, De With G, Sommerdijk N A J M. *Nat Mater*, 2010, 9(12): 1004~1009.
- [70] Curtin C M, Cuniffe G M, Lyons F G, Bessho K, Dickson G R, Duffy G P, O'Brien F J. *Adv Mater*, 2012, 24(6): 749~754.
- [71] Sionkowska A, Kozłowska J. *Int J Biol Macromol*, 2013, 52: 250~259.
- [72] Weiner S, Wagner H D. *Annu Rev Mater Sci*, 1998, 28(1): 271~298.
- [73] Rhee S H, Suetsugu Y, Tanaka J. *Biomaterials*, 2001, 22(21): 2843~2847.
- [74] Deshpande A S, Beniash E. *Cryst Growth Des*, 2008, 8(8): 3084~3090.
- [75] Wang Y, Azaïs T, Robin M, Vallée A, Catania C, Legriel P, Pehau-Arnaudet G, Babonneau F, Giraud-Guille M M, Nassif N. *Nature Mater*, 2012, 11(8): 724~733.
- [76] Olszta M J, Cheng X, Jee S S, Kumar R, Kim Y Y, Kaufman M J, Douglas E P, Gower L B. *Mater Sci Eng, R: Reports*, 2007, 58(3): 77~116.
- [77] Boskey A L. *J Cell Biochem*, 1998, 72(S30/31): 83~91.
- [78] Wang X, Schröder H C, Wiens M, Bmacher U S, Muller W E G. *Adv Mar Biol*, 2012, 62: 231.
- [79] Foo C W P, Patwardhan S V, Belton D J, Kitchel B, Anastasiades D, Huang J, Naik R R, Perry C C, Kaplan D L. *PNAS*, 2006, 103(25): 9428~9433.
- [80] Aimé C, Mosser G, Pembouong G, Bouteiller L, Coradin T. *Nanoscale*, 2012, 4(22): 7127~7134.
- [81] Caterson E J, Nesti L J, Li W J, Danielson K G, Albert T J, Vaccaro A R, Tuan R S. *J Biomed Mater Res*, 2001, 57(3): 394~403.
- [82] Marijnissen W J C M, Van Osch G J V M, Aigner J, Van Der Veen S W, Hollander A P, Verwoerd-Verhoef H L, Verhaar J A N. *Biomaterials*, 2002, 23(6): 1511~1517.
- [83] Kolambkar Y M, Dupont K M, Boerckel J D, Huebsch N, Mooney D J, Hutmacher D W, Guldberg R E. *Biomaterials*, 2011, 32(1): 65~74.
- [84] Awad H A, Wickham M Q, Leddy H A, Gimble J F, Guilak F. *Biomaterials*, 2004, 25(16): 3211~3222.
- [85] Man Y, Wang P, Guo Y, Xiang L, Yang Y, Qu Y, Gong P, Deng L. *Biomaterials*, 2012, 33(34): 8802~8811.
- [86] Li W, Zhao P, Lin C, Wen X, Katsanevakis E, Gero D, Felix O, Liu Y. *Biomacromolecules*, 2013, 14(8): 2647~2656.
- [87] Yang X, Guo L, Fan Y, Zhang X. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 487~493.
- [88] Clark R A F. *J Am Acad Dermatol*, 1985, 13(5): 701~725.
- [89] Huang R, Li W, Lv X, Lei Z, Bian Y, Deng H, Wang H, Li J, Li X. *Biomaterials*, 2015, 53: 58~75.
- [90] Blakely E A, Chang P Y. *Adv Space Res*, 2007, 40(9): 1307~1319.
- [91] Cucinotta F A, Durante M. *Lancet Oncol*, 2006, 7(5): 431~435.

Advances in Study of Self-assembling Collagen

YAN Ting-ting, ZHENG Xue-jing*, LIU Jie, PEI Ying, TANG Ke-yong*

(College of Materials Science and Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Collagen represents the major structural protein found in the human body, self-assembling into the fiber with a repeating D-periodic gap/overlap spacing, is the main organic building block of many biological tissues in vivo. Collagen has been widely applied and researched in many scientific fields, such as materials science, biomedical, tissue engineering, biosensors and so on, mainly due to its characteristic biodegradability, high biocompatibility, non-toxic, low immunity compared with other biopolymers. In the last few years, collagen was found to self-assemble into the ordered supramolecular structures at appropriate conditions in vitro, which has received great attention of researchers, has been becoming a hot research. This review will focus on the self-assembly mechanism of collagen, the influence of external environmental conditions on the self-assembly of collagen and the self-assembly of collagen-based composite materials.

Key words: Collagen; Self-assemble; Supramolecular structure