

微重力下胶原蛋白纤维化及羟基磷灰石 结晶的初步研究^{*}

王 静^{1,2} 蓝 鼎² 王育人² 戴国亮² 孔黎明¹

1(扬州大学化学化工学院 扬州 225009)

2(中国科学院力学研究所 中国科学院微重力重点实验室 北京 100190)

摘 要 在长期空间飞行过程中,骨质丢失是一个严重问题.羟基磷灰石(HAP)晶体是骨骼的主要成分,骨骼中的胶原蛋白纤维在HAP生长结晶过程中起到关键作用.研究了胶原蛋白纤维化过程在模拟微重力和常重力条件下的变化,对以胶原蛋白纤维作为模板生长出的HAP晶体形貌进行了观察.结果表明,不同浓度胶原蛋白溶液中形成的胶原蛋白纤维,其内部孔隙数量和尺寸在模拟微重力条件下要明显大于常重力条件下,胶原蛋白纤维内部孔隙的分布也不同于常重力条件下的结果.以模拟微重力条件下形成的胶原蛋白纤维为模板生长出的HAP晶体主要为立方体状,而以常重力条件下形成的胶原蛋白纤维为模板生长出的HAP晶体形貌主要为板状.该结果有助于未来进一步阐明空间骨质丢失的机理.

关键词 模拟微重力, 胶原蛋白, 纤维化, 晶体生长

中图分类号 V 524

Preliminary Studies on Collagen Fibrosis and Hydroxyapatite Crystallization under Microgravity

WANG Jing^{1,2} LAN Ding² WANG Yuren²

DAI Guoliang² KONG Liming¹

1(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

2(Key Laboratory of Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract Bone loss during long-term space flight is a serious problem. Collagen fibrils in bones are a key factor of Hydroxyapatite (HAP) crystal growth in its crystallization process, which is a main constituent of bones. In this paper, the changes of collagen fibrosis process under simulated microgravity and normal gravity conditions were studied, and the morphologies of HAP crystals

* 国家重点基础研究发展计划项目资助 (2011CB710901)

2014-06-18 收到原稿, 2015-01-04 收到修定稿

E-mail: dspr@imech.ac.cn

grown on the surface of collagen fibrils were observed. Results showed that the amount and the size of pores inside collagen fibers formed under simulated microgravity condition and different concentrations of collagen were significantly larger than that under normal gravity condition and different concentrations of collagen. The distribution of the porosity under simulated microgravity condition was different with that under normal gravity condition. The morphology of HAP crystals under simulated microgravity condition was mainly cube-shaped. However, under normal gravity condition, HAP crystals were mainly plate-like. These preliminary results will help to clarify the mechanism of bone loss in space in future.

Key words Simulated microgravity, Collagen, Fibrosis, Crystal growth

0 引言

微重力是空间飞行最重要的环境特征之一, 航天员所受重力与空间飞行产生的惯性力相抵消, 相应地骨骼负荷减少, 从而导致航天员骨质丢失^[1]. 骨是一种复合材料, 其中胶原蛋白纤维形成三维框架, 其通常被认为是矿物形成的支架和模板^[2-5], 调节控制着羟基磷灰石晶体 (HAP) 生长, 使得 HAP 能够高度有序地定向排列在三维框架上形成致密结构^[6-8]. 微重力条件下, 胶原纤维排列发生变化^[9], 由于 HAP 在胶原蛋白纤维三维框架上生长, 胶原蛋白纤维排列的变化可能会导致 HAP 排列堆积不够紧密. 胶原蛋白纤维受微重力影响发生变化, 势必影响到 HAP 生长变化, 导致骨骼内部结构发生改变, 造成骨质流失. 但是相关的 HAP 在变化后的胶原蛋白纤维三维框架结构上生长的变化情况尚未见诸报道.

I 型胶原蛋白为棒状蛋白质, 其规则自组装排列形成细长的锥形胶原蛋白纤维. 关于胶原蛋白纤维化过程已有许多研究, 此过程遵守扩散限制聚集模型^[10-11]. 胶原纤维表面扩散作用会导致形成更多密集紧凑的形态, Roedersheimer^[12] 等研究了重力及邻近界面扩散效应对胶原蛋白凝胶形态的影响, 结果表明, 微重力下棒状蛋白质能够均匀扩散, 自组装形成高度均一的网状结构; 而常重力下, 胶原蛋白纤维化过程受到明显影响, 局部棒状蛋白质聚集成簇, 受重力作用而发生沉降导致形成的网状结构不均匀, 孔隙不规则.

本文采用鼠尾 I 型胶原蛋白作为研究对象, 利用回转控制器模拟微重力环境, 考察了模拟微重力及常重力条件下胶原蛋白纤维化过程的变化情况, 并通过在胶原蛋白纤维上生长 HAP, 观察 HAP 生长形貌变

化来进一步考察模拟微重力条件对胶原蛋白纤维化过程的影响, 以揭示航天员骨质流失发生的机制.

1 实验

1.1 试剂

实验中用到的试剂包括鼠尾 I 型胶原蛋白 (Sigma Co., 9007-34-5)、MEM (Minimum Essential Medium, Gibco Co., 41500-034)、乙酸 (CH_3COOH)、氢氧化钠 (NaOH)、氯化钠 (NaCl)、碳酸氢钠 (NaHCO_3)、氯化钾 (KCl)、三水磷酸氢二钾 ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、六水氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、氯化钙 (CaCl_2)、硫酸钠 (Na_2SO_4)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 (HCl)、pH 缓冲剂, 其均为分析纯试剂, 水为去离子水.

1.2 仪器

实验中所使用的仪器有 SM-31 回转控制器 (中国科学院空间科学与应用研究中心)、S-4300 场发射扫描电子显微镜 (HITACHI 仪器公司)、LGJ-10F 真空冷冻干燥机 (北京松源华兴仪器公司)、LRH-150 生化培养箱 (上海一恒科技有限公司)、85-2A 数显恒温测速磁力搅拌器 (金坛市荣华仪器公司)、XW-80A 旋涡混合器 (上海精科仪器公司)、pH211 台式存储酸度测定仪 (意大利 HANNA 仪器公司) 以及 FA1604s 电子天平 (上海天平仪器厂). 括号内为仪器相应的研制单位或生产厂家.

1.3 实验方法

1.3.1 胶原蛋白纤维制备

这里采用浓度分别为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胶原蛋白溶液形成胶原蛋白纤维.

将 150 mg 鼠尾 I 型胶原蛋白粉末加入到 10 mL ,

0.1 mol·L⁻¹ 乙酸溶液中, 室温搅拌直至溶解, 配成 15 mg·mL⁻¹ 胶原蛋白醋酸溶液. 取 2 mL, 15 mg·mL⁻¹ 胶原蛋白醋酸溶液加入置于冰浴的离心管中, 加入 6.9 mL H₂O, 再加入 1 mL 10×MEM 溶液 (10 倍浓度 MEM 溶液), 充分混匀, 然后加到 120 μL 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液中, 立即混匀, 即得到 3 mg·mL⁻¹ 胶原蛋白溶液. 按照上述步骤, 相应改变部分溶剂的浓度, 可以配制得到 1 mg·mL⁻¹ 和 2 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液.

将每种浓度的胶原蛋白溶液均分为两组, 一组放入回转控制器内 20°C 下回转 30 min, 控速为 15 r·min⁻¹; 另一组放入生化培养箱内, 20°C 下培养 30 min. 在此 30 min 内, 胶原蛋白完成了纤维化过程. 两组实验分别得到模拟微重力和常重力条件下制备的胶原蛋白纤维.

1.3.2 羟基磷灰石晶体生长

参照文献 [13] 配制模拟体液 (SBF), 为了加速 HAP 生长速度, 实验中配制了 1.5 倍浓度 SBF 溶液 (1.5×SBF). HAP 晶体的生长是在常重力环境中完成的. 将不同重力条件下制备的不同浓度胶原蛋白纤维浸入到模拟体液中, 并将盛放模拟体液的容器置于恒温 (37±0.5°C) 生化培养箱内 24 h.

1.3.3 SEM 图像分析

取出浸入在模拟体液中的胶原蛋白纤维, 用去离子水冲洗胶原蛋白纤维表面 3 次, 放入到真空冷冻干燥机内冷冻干燥 48 h 后取出, 用扫描电镜观察 HAP 在胶原蛋白纤维表面的生长形貌. 用胶原蛋白纤维二维截面的 SEM 图来代表三维胶原蛋白纤维, 通过 Nano-Measurer 软件分析测量 SEM 图中不同大小孔隙的尺寸, 统计孔隙数目, 计算得到不同大小孔隙占全部孔隙的百分比.

2 结果与讨论

2.1 重力对胶原蛋白纤维化的影响

图 1 为不同重力及不同浓度条件下胶原蛋白纤维的 SEM 图. 从图 1 可以看出, 模拟微重力条件下形成的胶原蛋白纤维的孔隙数量明显多于常重力条件. 此外, 常重力条件下胶原蛋白纤维的孔隙数量随着胶原蛋白浓度的增大而减少.

对图 1 中胶原蛋白纤维孔隙尺寸及数目进行分析, 得到不同溶液浓度下形成的胶原蛋白纤维中孔

隙率-尺寸分布 (见图 2). 图 2(a) 所示为模拟微重力条件下的结果. 其中, 浓度 1 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维共有 44 个孔隙, 最大孔隙尺寸为 302 μm, 最小孔隙尺寸为 10 μm, 孔隙率最大的孔隙数目占全部孔隙的 54.5%; 浓度 2 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维共有 35 个孔隙, 最大孔隙尺寸为 177 μm, 最小孔隙尺寸为 11 μm, 孔隙率最大的孔隙数目占全部孔隙的 37.1%; 浓度 3 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维共有 23 个孔隙, 最大孔隙尺寸为 259 μm, 最小孔隙尺寸为 18 μm, 孔隙率最大的孔隙数目占全部孔隙的 39.1%. 图 2(a) 的结果表明, 不同浓度胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维, 其孔隙率的分布随着孔隙尺寸的变大总体呈正态分布下降趋势. 图 2(b) 为常重力条件下的结果. 其中, 浓度 1 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维共有 17 个孔隙, 最大孔隙尺寸 242 μm, 最小孔隙尺寸 14 μm, 孔隙率最大的孔隙数目占全部孔隙的 29%; 浓度 2 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维共有 13 个孔隙, 最大孔隙尺寸 134 μm, 最小孔隙尺寸 25 μm, 孔隙率最大的孔隙数目占全部孔隙的 23%; 浓度 3 mg·mL⁻¹ 的胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维共有 10 个孔隙, 最大孔隙尺寸 178 μm, 最小孔隙尺寸 22 μm, 孔隙率最大的孔隙数目占全部孔隙的 20%. 图 2(b) 的结果表明, 不同浓度胶原蛋白溶液形成的胶原蛋白纤维, 其孔隙率随着孔隙尺寸的变大总体呈振荡分布 (无规则分布).

鼠尾 I 型胶原蛋白是棒状蛋白质, 其规则组装排列形成细长的纤维, 此过程遵循扩散限制聚集模型 [10-11] 且受重力沉降的影响. 模拟微重力下, 由于棒状蛋白质不受重力作用, 能够均匀扩散, 自组装形成高度均一的网状结构 [12]; 常重力下, 局部棒状蛋白质聚集成簇, 随着簇的尺寸不断增大, 由重力产生的重力沉降越来越明显, 导致形成的网状结构不均匀, 孔隙不规则. 由于胶原蛋白溶液浓度的不同, 导致最终形成的胶原蛋白纤维形貌和结构也不相同, 浓度小的胶原蛋白纤维所形成的孔隙明显多于浓度大的胶原蛋白纤维.

此外从图 1 中还可以看出, 模拟微重力条件下形成的胶原蛋白纤维其纤维壁明显薄于常重力条件下形成的纤维, 且纤维壁厚的均匀程度高于常重力条件下的结果.

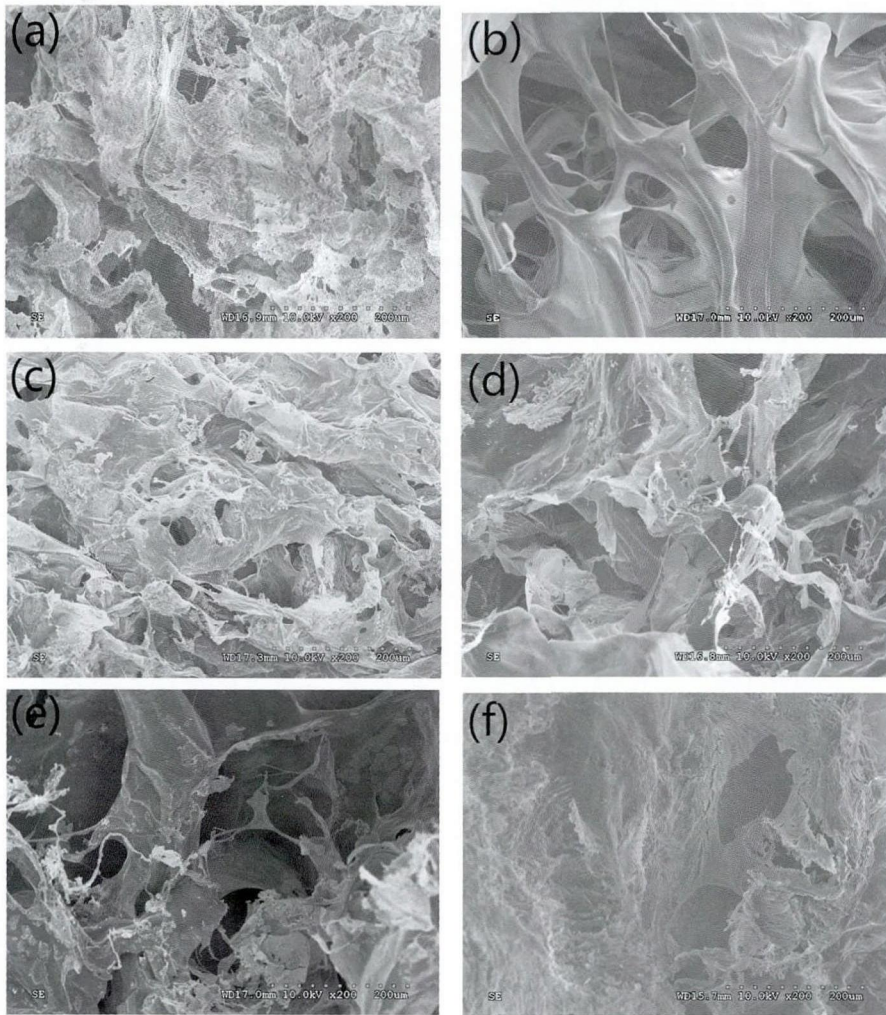


图 1 不同重力及不同溶液浓度下形成的胶原蛋白纤维 SEM 图. (a) (c) (e) 为模拟微重力条件, (b) (d) (f) 常重力条件; 胶原蛋白溶液浓度 (a) (b) 1 mg·mL⁻¹, (c) (d) 2 mg·mL⁻¹, (e) (f) 3 mg·mL⁻¹

Fig.1 SEM images of collagen fibers under different gravity conditions and different concentrations. (a) (c) (e) are under simulated microgravity condition, (b) (d) (f) are under normal gravity condition; concentrations in (a) (b) are 1 mg·mL⁻¹, (c) (d) 2 mg·mL⁻¹, (e) (f) 3 mg·mL⁻¹

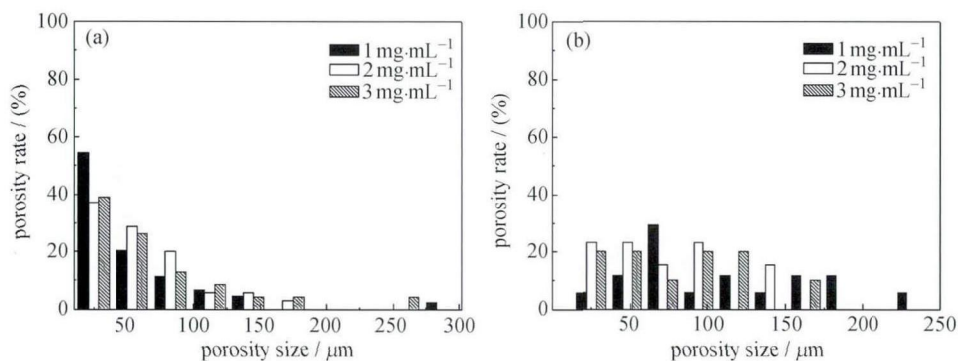


图 2 不同重力及不同浓度条件下形成的胶原蛋白纤维中孔隙率-尺寸. (a) 模拟微重力条件, (b) 常重力条件
Fig.2 Porosity distribution of collagen fibers formed under different gravity conditions and different concentrations. (a) Under simulated microgravity condition, (b) under normal gravity condition

2.2 胶原蛋白纤维对羟基磷灰石结晶的影响

图 3 给出了基于不同重力及不同胶原蛋白溶液浓度条件形成的胶原蛋白纤维所生长的羟基磷灰石晶体. 从图 3 可以看出, 相同生长时间下, 在模拟微重力条件下生长的羟基磷灰石晶体较常重力下显著增大. 分析此现象可能由两种原因导致. 其一, 常重力下, 局部棒状蛋白质聚集成密集紧凑结构, 胶原纤维密度的增加产生了更多生理微环境, 进一步导致纤维-纤维接触点大量增加及电荷浓度增加^[14], 增加

了 HAP 晶体生长时异质形核的位点数目, 虽然促进了 HAP 的形成, 但生长出的晶体尺寸较小; 而模拟微重力下, 棒状蛋白质能够均匀扩散, 形成的胶原纤维均匀, 不会出现局部胶原纤维密度变大的情况, 相应地, 异质形核的位点数目较常重力下要少, 使得生长出的晶体的尺寸更大. 其二, 胶原纤维形成的三维多孔结构对 HAP 晶体生长过程中的物质运输过程产生影响. 对于相同浓度的胶原蛋白溶液, 其在模拟微重力条件下形成的胶原蛋白纤维的孔隙数量明显

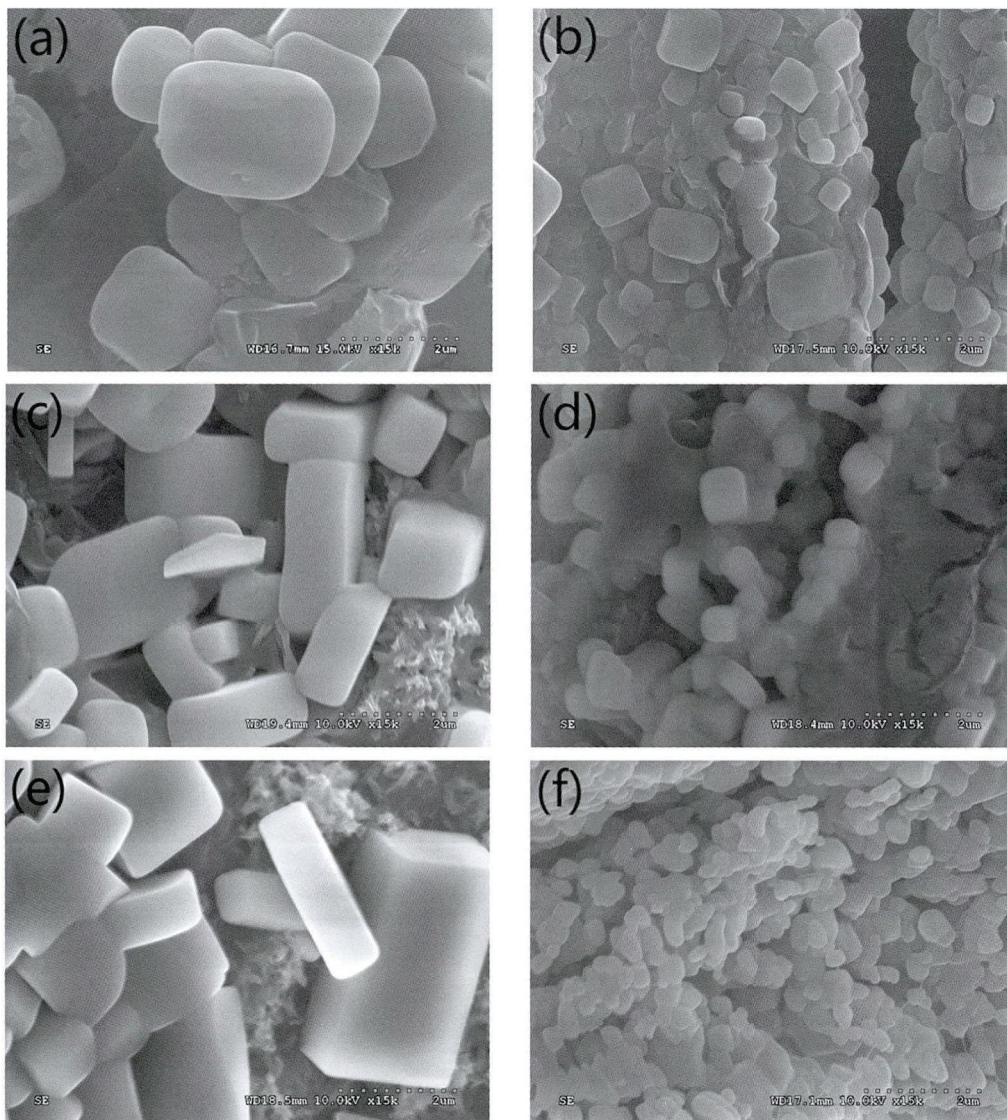


图 3 基于不同重力及不同胶原蛋白溶液浓度条件形成的胶原蛋白纤维所生长的羟基磷灰石晶体. (a) (c) (e) 为模拟微重力条件, (b) (d) (f) 为常重力条件; 胶原蛋白溶液浓度 (a) (b) $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, (c) (d) $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, (e) (f) $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Fig. 3 Morphology of hydroxyapatite crystals grown on collagen fibers formed under different gravity conditions and different concentrations. (a) (c) (e) are under simulated microgravity condition, (b) (d) (f) are normal gravity condition; concentrations in (a) (b) are $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; (c) (d) $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; (e) (f) $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

多于常重力条件下的,因此晶体生长过程中的物质输运在模拟微重力条件下形成的胶原蛋白纤维中更容易进行^[15],使得 HAP 晶体在模拟微重力条件下形成的胶原纤维中生长时,其周围贫乏层中的物质浓度较常重力下形成的胶原纤维中更高,生长速度也更快,更容易生长出尺寸较大的晶体。

由于胶原蛋白的纤维化过程受到重力的影响,并且后续在胶原蛋白纤维上生长出的 HAP 晶体的形貌发生显著变化,因此初步推测,这可能是产生空间骨质流失的一个原因。

3 结论

微重力条件影响胶原蛋白纤维化过程,导致胶原蛋白纤维孔隙数量和大小均不同于常重力条件下形成的胶原蛋白纤维,从而使得后续生长的羟基磷灰石晶体形貌发生变化。

参考文献

- [1] Sun Lianwen, Zhuang Fengyuan. Research progress of microgravity induced osteopenia [J]. *Chin. J. Aerospace Med.*, 2004, **15**(1):54-58. In Chinese (孙联文, 庄逢源. 微重力导致航天员骨质疏松的研究进展 [J]. 中华航空航天医学杂志, 2004, **15**(1):54-58)
- [2] Stetlerstevenson W G, Veis A. Type-I collagen shows a specific binding-affinity for bovine dentin phosphophoryn [J]. *Calcified Tissue Int.*, 1986, **38**(3):135-141
- [3] Stetlerstevenson W G, Veis A. Bovine dentin phosphophoryn-calcium-ion binding-properties of a high-molecular-weight preparation [J]. *Calcified Tissue Int.*, 1987, **40**(2):97-102
- [4] Nudelman F, Lausch A J, Sommerdijk N A J M, Sone E D. In vitro models of collagen biomineralization [J]. *J. Struc. Biol.*, 2013, **183**:258-269
- [5] Nudelman F, Pieterse K, George A, Bomans P H H, et al. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors [J]. *Nat. Mat.*, 2010, **9**:1004-1009
- [6] Hulmes D J S, Wess T J, Prockop D J, Fratzl P. Radial packing, order, and disorder in collagen fibrils [J]. *Biophys.*, 1995, **68**(5):1661-1670
- [7] Traub W, Arad T, Weiner S. 3-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen-fibers [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**(24):9822-9826
- [8] Landis W J, Jacquet R. Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues [J]. *Calcified Tissue Int.*, 2013, **93**(3):329-337
- [9] Cui Wei. Mechanism of bone mineral loss in microgravity [J]. *Prog. Phys. Sci.*, 1998, **29**(1): 84-86. In Chinese (崔伟. 微重力条件下骨矿盐丢失机理 [J]. 生理科学进展, 1998, **29**(1): 84-86)
- [10] John P, Karl E, Brass A. Simple physical model of collagen fibrillogenesis based on diffusion limited aggregation [J]. *J. Mol. Biol.*, 1995, **247**(4):823-831
- [11] John P, Karl E, Andy B. Self-assembly of rodlike particles in two dimensions: A simple model for collagen fibrillogenesis [J]. *Phys. Rev.*, 1994, **50**(4):2963-2966
- [12] Roedersheimer M T, Bateman T A, Simske S J. Effect of gravity and diffusion interface proximity on the morphology of collagen gels [J]. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1997, **37**(2):276-281
- [13] Oyane A, Kim H M, Furuya T, et al. Preparation and assessment of revised simulated body fluids [J]. *J. Biomed. Mater. Res.: Part A*, 2003, **65A**(2):188-195
- [14] Benedetto M, Chiara E G, Jake E B, Showan N N. Collagen gel fibrillar density dictates the extent of mineralization in vitro [J]. *Soft Matter*, 2011, **7**(21):9898-9907
- [15] Oaki Y, Imai H. Experimental demonstration for the morphological evolution of crystals grown in gel media [J]. *Cryst. Growth Des.*, 2003, **3**(5):711-716