

促细胞黏附生长的自组装肽水凝胶

王春婷 贺诗华¹ 鞠 躬*

(第四军医大学神经生物学教研室, 西安 710032; ¹西安科技大学化学与化工系, 西安 710054)

摘要 随着细胞与组织工程的迅猛发展, 能够促进细胞黏附、生长和分化的生物材料基质支架的研究日益重要。具有生物相容性且含水量超过 99% 的自组装肽水凝胶因其很好地符合理想的生物材料基质支架标准而备受重视。这类自我互补的两亲寡肽含 50% 的带电残基, 并且以交替的离子亲水性和不带电的氨基酸残基周期性重复为特征; 在其寡肽的氨基末端可用直接固相合成法修饰几个短序列生物活性模体进行功能化, 用以促进不同细胞的黏附生长和靶向定位。现对自组装肽水凝胶的结构特征、自组装机制、对细胞黏附生长的影响以及未来自组装肽生物材料设计的目标进行综述。

关键词 水凝胶; 自组装肽; 生物材料基质支架; 组织工程; 细胞黏附与生长

人体组织损伤的修复, 特别是神经系统损伤修复, 一直是科学家们追求的目标之一。为了创造更安全和更有效的、能够促进受损组织再生和功能恢复的组织损伤修复技术, 科学家努力设计新颖的组织工程桥接装置, 同时寻找新生物材料和新细胞来源。近年来, 生物活性模体(motif)修饰的、促细胞黏附生长的自组装肽及肽模拟物等生物材料支架(细胞外基质)倍受关注^[1~5]。目前公认的理想生物材料支架(基质)标准^[5]是:

- (1)有易于设计和修饰的基本单元;
- (2)生物降解速度可以调控;
- (3)无细胞毒性;
- (4)具有特异性促进或抑制细胞-材料相互作用的特性;
- (5)引发的免疫反应和炎症达到最小;
- (6)易于生产、纯化和处理且可升级;
- (7)与水溶液和生理环境有良好的化学相容性;
- (8)几何特性易于控制^[6~8]。这与基质蛋白(或肽)本身无关。

不符合上述标准中的任何一项将给该生物材料的潜在应用带来限制。几种天然来源的动物产品(如基于胶原蛋白及其衍生物、层黏连蛋白、纤维连接蛋白、有机蛋白与无机矿物质片组成的片状生物材料等)及其衍生物和生物相容性共聚物能够用做促细胞吸附的支架。但是, 对所有动物来源的生物材料来说, 一个潜在的问题是它们能够携带危险的病原菌(例如朊病毒)。然而, 所有合成的生物材料

都有一个优点即它们能将携带生物源性的病原体或污染物的危险降到最低并且能够被设计成符合特定需要的东西。

现今, 细胞与组织工程在多种现代技术的支持下正迅速发展, 无免疫反应和炎症反应人工合成的自组装肽水凝胶基质支架^[2, 9~15]引起巨大反响。与传统的自组装多肽不同, 它们有着规则的重复单位: 自我互补的寡肽包含 50% 的带电残基, 以离子亲水性和不带电的疏水性氨基酸残基交替并且周期性重复为特征。这类交替极性和非极性氨基酸序列在天然蛋白质中相当稀少, 其自组装生物材料基质的形成是高度依赖某些外界条件的, 并且无免疫和炎症反应。在其寡肽的氨基末端可以用直接固相合成法修饰几个短序列生物活性模体进行功能化, 用以促进不同细胞的黏附生长。

1 新型自组装肽的结构特征和自组装机制

近几年来, 人工设计的、可自组装成具有 2D、1D 和 0D 特性的超分子体系^[16, 17]得到了深入的研究。自组装形成的超分子结构通常含有 $10^1 \sim 10^5$ 个分子, 它们是依靠大量弱相互作用而组装在一起。这些弱相互作用(非共价相互作用)包括: 手性的偶极-偶极相互作用、 π - π 堆垛作用、氢键、非特异

收稿日期: 2005-04-05 接受日期: 2006-07-01

国家重点基础研究发展规划项目(973计划)(No. 2003CB515301)资助

*通讯作者。Tel: 029-83374557, Fax: 029-83246270, E-mail:

jugong@fmmu.edu.cn

性范德华(Van der Waals)相互作用(可用Hamaker constant 代表因范德华力引起的吸引力)、疏水作用力、静电相互作用和空间立体排斥力(包括自组装体表面的几何结构、表面电势等)。所有的自组装系统均涉及这些弱相互作用力的组合,以平衡因多分子聚合引起的大量平移熵和转动熵减小所产生的代价。在某些场合^[4,17,18],自组装结构以共价键(分子内二硫键)方式在内部交叉连接,形成真实的聚合物,其各式各样的形状和维数受自组装控制,并且与传统聚合物的“串珠(beads-on-a-chain)”结构显著不同。但是,正如在天然蛋白质折叠中所看到的那样,这种内部共价键交连是可逆的。

许多科研人员^[9-15,19,20]设计合成的含水量超过99%的自组装肽纳米纤维水凝胶支架是一种良好的功能化生物材料,其成分自我互补的两亲寡肽,它们有着规则的重复单位:带正电的氨基酸残基(赖氨酸或者精氨酸)和带负电的氨基酸残基(天冬氨酸或者谷氨酸)被疏水性氨基酸残基(丙氨酸或者亮氨酸)隔开。自我互补的寡肽包含50%的带电残基,以离子亲水性和不带电的疏水性氨基酸残基交替并且周期性重复为特征;在寡肽的氨基末端可以用直接固相合成法修饰几个短序列生物活性模体进行功能化,用以促进不同细胞的黏附生长。例如:AcN-X-GG-RADARADARADARADA-CONH₂,其中X代表功能化模体(A、D、G和R均为单字母氨基酸代码)。这类两亲寡肽的等浮力(在溶液中自由漂浮,既不下沉也不上浮至表面)基质支架能够编织成具有相对一致厚度的各式各样的几何形状,如带子、线条或片状。除了处理仪器的尺寸规格外,肽和盐的浓度也决定宏观基质的几何结构和尺寸规格。圆二色光谱显示:RAD、ELK和EAK即具有如前所述典型周期性的各种肽在水溶液中能形成 β 片层二级结构。另有几个实验室^[21,22]也报道了具有 β 片层二级结构的其他自组装寡肽生物材料。因此,在遵循氨基酸构成和序列间隔简单规则的基础上,自我互补的两亲寡肽形成了极性和非极性的两个表面。

然而,RAD、ELK和EAK等自组装多肽形成的规则 β 片层结构与基于蛋白质螺旋偏好的Chou-Fasman统计结果相反:谷氨酸、亮氨酸和赖氨酸在Chou-Fasman模型中均具有高的 α 螺旋倾向。Xiong等^[23]对此矛盾提出了精妙的解释:决定二级结构的局部影响因素包括氨基酸的内在螺旋特性(正

如Chou-Fasman模型的预测),而非局部影响因素主要是多肽序列中周期性和氨基酸的位置排列,由于决定二级结构的分子内局部和非局部影响因素之间竞争,结果是非局部效应超过局部效应,这类自组装肽偏向形成规则 β 片层二级结构。因此,多肽序列中周期性和氨基酸位置排列的相对优势解释了已观察到的周期性交替两亲多肽的 β 片层二级结构倾向,而不是预测的 α 螺旋结构。值得注意的是对二级结构产生影响的局部和非局部因素均是分子内的,而不是分子间的。Broome等^[24]在一个拥有250 514个天然蛋白质序列数据库中,对含有周期性交替极性和非极性氨基酸序列做了搜索统计,发现交替极性和非极性氨基酸序列在天然蛋白质中相当稀少。这表明:在自然条件下,存在某种强烈的自然选择压力,进而抵消了因交替极性和非极性氨基酸序列所导致的强烈寡聚化倾向。

两亲多肽自组装生物材料基质的形成是高度依赖某些外界条件的,因而也是可以调控的,例如依赖于pH^[16-19]、盐浓度^[19]、温度^[25]等。除此之外,两亲多肽的浓度要超过其自组装临界浓度。从原则上讲,影响各种弱相互作用力的因素均可以影响自组装肽生物材料基质的形成。Caplan等^[9]用Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek(DLVO)理论(在胶体科学中广泛采用的理论)来解释这种自组装现象。但是,DLVO理论却不能圆满解释高浓度的一价和二价阳离子仍然能够使自组装结构稳定的现象^[5,26]。有人认为还存在另一种机制^[5,9]:自我互补的多肽单体在水溶液中可以折叠,进而形成分子内静电相互作用,高浓度的盐离子破坏了分子内的静电相互作用,使得分子采用有利于形成相邻分子间疏水作用的构象,从而自组装形成具有超分子结构的生物材料基质支架。之后,相邻多肽带电残基之间静电相互作用力可能在分子间疏水作用形成后进一步导致基质的稳定。当然,这些解释都是定性或半定量的,定量的理论解释尚需进一步研究。

2 新型自组装肽水凝胶基质对细胞黏附生长的影响

2.1 活性模体促进细胞黏附生长的机制

具有特异促进或抑制细胞-材料相互作用特性的生物活性自组装肽基质是组织工程的目标之一。细胞特别是神经元在生物材料的表面上能够选择性地黏附、快速生长、分化,定向生长穿越损伤区,

靶向制导定位等是衡量这类生物材料的性能的重要指标。因此生物材料的功能化是必须的，常用手段是用直接固相合成法在寡肽的氨基末端修饰几个短序列模体进行功能化^[20]。例如：层黏连蛋白 I 的 YIGSR、源自胶原 IV 的 TAGSCLRKFSTM 等活性模体可以促进细胞黏附生长。同时，引入功能化模体会促进自组装肽形成更软的水凝胶^[20]。

基于 RAD 的两亲多肽序列与细胞黏附受体整合素的配体 RGD(arginine-glycine-aspartate) 具有相似性，其他一些胞外基质^[27]也含有结合在整合素异构体的 RAD 序列。那么，细胞是否在整合素依赖模式的肽基质上黏附和生长呢？实验证明^[11]细胞在 EAK 和 RAD 的水凝胶基质上的黏附是整合素非依赖模式，并且两者均支持细胞黏附和生长，其中 RAD 序列能够结合到某些整合素细胞黏附受体，而 EAK 却不能，且高浓度的 RGD 肽对此没有影响。可见整合素黏附作用对在培养条件下细胞在这些基质上的黏附并不是必须的。最近的实验也显示类似的结果^[20]。自组装肽水凝胶促进细胞黏附生长的某些作用机制有待深入研究。

肽基两亲水凝胶基质支架可支持各种哺乳动物和鸟类原代和转化组织培养细胞的细胞黏附生长：能够促进原代培养神经元的黏附、分化、轴突生长和功能性突触的形成^[10,11]；中枢神经先祖细胞选择性地快速分化成神经元^[28]；内皮细胞的黏附生长^[20, 29]；胚胎干细胞的分化^[30]。另外，酵母细胞也能够在这类基质上的黏附生长^[15]。初步的体内研究^[10]表明：EAK16 和 RAD16 基质具有良好的生物相容性——不引起免疫反应和炎症反应。这些生物相容性材料在未来的脊髓损伤修复基础研究和临床实践中将发挥积极的作用。

2.2 基质支架的 2D、3D 结构对细胞-细胞和细胞-生物材料支架相互作用十分重要

生物材料已经广泛地应用于组织工程。目前具有较好生物相容性和机械特性的组织工程生物材料有：共混多聚物合成生物材料、层黏连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白及其衍生物、有机蛋白与无机矿物质组成的片状生物材料和肽基水凝胶基质生物材料等。空腔(膀胱)和骨组织工程的突破性进展^[7, 30]强调了生物材料模拟自然发生的三维的细胞-细胞之间、细胞-生物材料支架之间相互作用等所需几何结构的重要性。由于自组装多肽的分子相对较小、易于修饰和调控，较易编织成具有相对一致

厚度的各式各样的几何形状，如带子、线条或片状等^[11, 20]，另外，在自组装的过程中容易包覆或夹带合适的细胞，因此，适合于空腔组织和经横断手术后的脊髓损伤修复。为了促进成熟细胞的黏附和正确分化，足够大的细胞浓度亦特别重要。除此之外，还需要考虑的两个要素是：小心选择和处理用来接种生物材料支架的前体细胞；使用自体的供体细胞以免产生组织排斥。

2.3 细胞功能损伤因素：抗黏附和抗生长信号

对再生能力弱的细胞和组织来说，更难获得细胞与组织工程解决方案。分化的细胞功能(例如轴突再生、受损神经元形成新功能连接的能力)可能会受到损害，特别是成年动物中枢神经系统(CNS)。然而，最近的结果^[31]表明：受损组织的弱再生能力与抗生长和抗黏附的信号有关，这些信号要么来自基质(例如软骨素硫酸蛋白糖和某些胶原蛋白)，要么来自 CNS 的髓磷脂成分。这些令人鼓舞的结果表明：CNS 轴突的弱再生能力并不是神经元本身所固有的。因此使用细胞相容性的人造生物材料基质支架来掩蔽这些负面信号，则可能有助于克服那些功能性缺陷。

3 设计自组装生物材料的目标

在未来，自组装肽的合理分子设计需要关注以下问题^[12]：

(1)设计有助于细胞正确分化的生物材料基质支架，使其具有更复杂的几何结构和重要物理性质(如更强的抗拉能力等)。

(2)将诸如细胞黏附模体、蛋白质-蛋白质相互作用模体等生物活性模体插入肽生物材料中，合成能够促进细胞黏附、分化和特定类型细胞迁移的生物材料基质支架。这也有助于设计出具有良好几何结构和重要物理性质的生物材料。

(3)合成的生物材料基质可以是有机-无机分子或者金属结合基团的混合材料。这样的材料具有更高的抗拉能力和硬度，正如自然材料鲍鱼壳、贝壳那样的有机-无机混合材料那样。

(4)要充分利用组合化学文库——组合肽文库，从而能够快速筛选出具有特定自组装性能的多肽物质。

这些生物材料在细胞治疗、组织工程和硬组织修复的生物矿化、神经系统损伤后轴突再生与导向修复等方面正发挥积极的作用。在新医药方面亦具有广阔的应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Schachner M. *Nature*, 2000, **405**: 747
[2] Zhang S. *Biotechnol Adv*, 2002, **20**: 321
[3] Nakagawa K *et al. Semin Thromb Hemost*, 2000, **2**: 61
[4] Zubarew ER *et al. Science*, 1999, **283**: 523
[5] Holmes TC. *Trends Biotechnol*, 2002, **20**: 16
[6] Chen CS *et al. Science*, 1997, **276**: 1425
[7] Kale S *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 954
[8] Petite H *et al. Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 959
[9] Zhang S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 3334
[10] Holmes TC *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 6728
[11] Zhang S *et al. Biomaterials*, 1995, **16**: 1385
[12] Drury JL *et al. Biomaterials*, 2003, **24**: 4337
[13] Zhang S. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 1171
[14] Kisiday J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 9996
[15] Dhadwar SS *et al. Biotechnol Adv*, 2003, **21**: 395
[16] Hartgerink JD *et al. Science*, 2001, **294**: 1684
[17] Won YY *et al. Science*, 1999, **283**: 960
[18] Liu Y *et al. J Biomed Mater Res A*, 2004, **68**: 142
[19] Caplan MR *et al. Biomaterials*, 2002, **23**: 219
[20] Genové E *et al. Biomaterials*, 2005, **26**: 3341
[21] Aggeli A *et al. Nature*, 1997, **386**: 259
[22] West MW *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 11211
[23] Xiong H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 6349
[24] Broome BM *et al. J Mol Biol*, 2000, **296**: 961
[25] Stile RA *et al. Biomacromolecules*, 2001, **2**: 185
[26] Hartgerink JD *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 5133
[27] Prieto AL *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 10154
[28] Silva GA *et al. Science*, 2004, **303**: 1352
[29] Welsh ER *et al. Biomacromolecules*, 2000, **1**: 23
[30] Levenberg S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 12741
[31] Fournier AE *et al. Curr Opin Neurobiol*, 2001, **11**: 89

Self-assembly Peptide Hydrogels for Facilitating Cell Attachment and Outgrowth

Chun-Ting Wang, Shi-Hua He¹, Gong Ju*

(Institute of Neurobiology, Forth Military Medicine University, Xi'an 710032, China;

¹ Department of Chemistry and Chemical Engineering, Xi'an University of Science and Technology, Xi'an 710054, China)

Abstract Rapid development of cell/tissue engineering has underscored the importance of biological matrix scaffolds that can enhance cell attachment, outgrowth, and differentiation. Biocompatible and self-assembling peptide-hydrogels, which contain more than 99% water and meet the criteria for ideal biomaterial matrix scaffold, are thus highly appreciated. These self-complementary peptides contain 50% charged amino acid residues, and are characterized by periodical repeats of alternating ionic hydrophilic and uncharged hydrophobic residuals. Their N-termini can be modified by addition of peptide extensions directly during the solid-phase synthesis, to meet different functional demands such as attachment, outgrowth, as well as targeting of various cell types. In this paper, we summarize the molecular structure, mechanism of self-assembly, and major factors that influence the biological roles of self-assembling peptides, and the prospect of future directions of their designing.

Key words hydrogel; self-assembly peptide; biomaterial matrix scaffold; tissue engineering; cell attachment and outgrowth

Received: April 5, 2005 Accepted: July 1, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2003CB515301)

* Corresponding author. Tel: 86-29-83374557, Fax: 86-29-83246270, E-mail: jugong@fmmu.edu.cn