

牙本质磷蛋白在牙组织仿生矿化中的研究进展

杨 阳 陈永进 张 旻

摘 要 牙本质磷蛋白(DPP)作为牙本质中非常重要的一种非胶原蛋白,与牙本质的生物矿化、再矿化有着密切关系。仿生矿化是近年来牙体硬组织研究的热门方向,受到化学、物理、生物及材料学等多学科的关注。本文就牙本质磷蛋白的结构、功能、仿生矿化机制、研究体系及牙本质磷蛋白在仿生矿化中的研究进展做一综述。

关键词 牙本质磷蛋白 仿生矿化 龋病防治 研究进展

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.039

牙本质基质中含有多种非胶原蛋白(NCP),是牙本质矿化的重要调控因子。多数 NCP 被认为有高度酸性,可以为羟基磷灰石晶体成核和成熟提供动力并减少激活能,这些都归功于其所含有的天冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸等。牙本质磷蛋白(dentin phosphoprotein, DPP)作为最重要的一种非胶原蛋白,是牙本质涎磷蛋白的裂解产物,能够参与纤维内矿化,矿物晶体的初步形成及成熟等过程,在牙本质的再矿化过程中发挥非常关键的作用^[1]。

一、牙本质磷蛋白的结构和功能

1. 牙本质磷蛋白(DPP)的结构:DPP 中含有丰富的磷酸化的丝氨酸(45% ~ 50%)和天冬氨酸(35% ~ 38%),这些氨基酸以重复序列(Asp - Pse - Pse)_n 即(DSS)_n, 3 ≤ n ≤ 14, 以及(Asp - Pse)_m 即(SD)_m, m = 2 或 3 出现,使得 DPP 带有非常多的阴离子,并有很强的钙离子结合能力^[2]。不同物种之间,DPP 的等电点均有所不同,比如大鼠的为 1.10,人的为 2.65。许多证据表明,DPP 由成牙本质细胞合成后,经过高尔基体转送,并由细胞突输送至矿化牙本质前缘,并在此处分泌至细胞外基质并与胶原直接结合^[3]。DPP 以可溶和不可溶两种形式存在于牙本质基质中:可溶性 DPP 指只使用一般方法(如中性 EDTA, 0.6 mol/L HCl 等)处理牙本质就可以从牙本质中释放的部分;不可溶性 DPP 与胶原结合紧密,只有使用一些变性剂如盐酸胍等使胶原变性后,才能

少量释放。可溶性 DPP 的数量较不可溶性 DPP 的数量较多,尽管二者的存在形式、数量均不同,但其氨基酸组成相似。

根据文献报道,不同种属动物的 DPP 相对分子质量明显不同,即使是相同种属动物的 DPP 相对分子质量也可以不同。这种结果可能是种属差异造成的,也可能是提取 DPP 的方法不同导致的。MacDougall 等^[4]认为翻译后的修饰即磷酸化造成了不同种属动物 DPP 分子的不同。也有研究者认为 DPP 相对分子质量的不同也可能是由于提取过程中蛋白的降解或在进行聚丙烯酰胺凝胶电泳走胶时蛋白行为的异常引起的。

2. DPP 的功能:DPP 中含有许多特殊的氨基酸序列,即由丝氨酸(S)和天冬氨酸(D)形成的 DSS 序列,其磷酸根和羧酸根在肽链两侧形成许多突出的嵴,是钙离子的高结合位点,可以在此部位诱导羟基磷灰石晶体成核;DPP 与细胞外基质中的胶原结合后还可以调控羟基磷灰石晶体的生长和成熟^[5]。研究表明,溶液中游离的 DPP 分子可以抑制羟基磷灰石晶体的形成,而当 DPP 固定于人工支持物表面或扩散到凝胶体系时,低浓度可以促进羟基磷灰石的形成,高浓度反而抑制其形成和生长^[3,6]。因此,可以说体内牙本质生物矿化过程中,DPP 发挥双重作用。DPP 与 I 型胶原纤维结合后能形成一种新的蛋白排布,这种新的三维结构可以更好地结合钙离子和磷酸盐进而促进羟基磷灰石初始晶体的形成;随着矿化的不断发生,高浓度的 DPP 与正在生长的晶体结合,抑制或减缓晶体的生长速度,从而影响晶体的形状和大小。

二、仿生矿化研究概况

1. 生物矿化和仿生矿化的定义:生物矿化是指在细胞的参与下,环境中的无机离子选择性地沉积于特

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81600854)

作者单位:710032 西安,军事口腔医学国家重点实验室、口腔疾病国家临床医学研究中心、陕西省口腔疾病国际联合研究中心、第四军医大学口腔医院急诊与综合临床科

通讯作者:张旻,教授,博士生导师,电子信箱:zhangmin@fmmu.edu.cn

定的有机基质的表面,从而形成矿物质的过程,其实质为在生物体内所进行的晶体生长过程。根据受生物控制的程度 Lowenstam 把生物矿化过程分为生物诱导(biologically induced)矿化和有机基质调控(organic matrix mediated)矿化两种作用类型。生物矿化中晶体的形成主要包括以下几个步骤:在基质内蛋白表面形成晶核(即成核);晶核成长为微晶并发育成熟(即晶核生长);在某些因素的作用下小颗粒集聚并沉淀(即集聚);形成的无定型磷酸钙和磷酸八钙在环境中 pH 值、温度、Ca、P 等浓度的影响下转换为羟基磷灰石晶体(即固相转换)。生物矿化的过程主要是通过有机基质、细胞以及基因来进行调控的。

仿生矿化(biomimetic mineralization)指通过模拟生物体的生物矿化,以有机基质作为模板,对无机物的形成和生长进行调控,从而在体外合成类骨及类牙物质。通过仿生矿化可以制备具有独特的微观结构和生物性能的材料。仿生矿化的过程主要包括以下步骤:①有机大分子自组装为无机物的成核提供模板;②无机物在有机模板的端点与其相互识别,并在此部位迅速沉积;③有机模板的自组装过程持续进行并通过静电作用、电荷、极性等对无机矿物的生长进行调控;④最后亚单元矿物组装形成与自然生物矿物结构相类似的矿物质^[7]。Kikuchi 等^[8]已经使用仿生合成技术合成了一种 HAp/Col 的复合物,这种复合物与骨的微观结构相似,所形成的直径只有 50 ~ 100nm 的片状羟基磷灰石晶体的 c 轴与 Col 纤维长轴平行排列。这种复合物被纳入骨的重建过程后,可以被破骨细胞吸收并被成骨细胞形成新骨,就好像移植自体骨一样^[9]。

2. 仿生矿化体外模型:在仿生矿化相关的体外研究中,体外矿化模型是获得研究结果所必不可少的。目前应用最多的仿生矿化系统包括有机基质调控体系、有序膜模拟体系、凝胶矿化模型以及以阳离子选择膜为基础的双膜矿化系统,利用这些体外矿化模型能够有效的进行仿生矿化的研究。

(1)有机基质调控下进行的仿生矿化:这种研究方法主要是直接采用生物体内的有机基质进行体外模拟合成无机矿物。已经有研究表明,利用胶原纤维作为有机基质模板可以在体外成功的合成羟基磷灰石晶体和氟磷灰石晶体^[10]。自组装的釉原蛋白也可以诱导和控制羟基磷灰石的形成^[11]。王天达等^[12]和 Coelfen^[13]总结出在胶原纤维的矿化过程中,磷酸钙微晶开始在复杂的聚合结构间形成稳定的矿化物

滴,随后矿化物滴在胶原纤维表面和胶原内部的独特区域结合胶原分子,胶原纤维内部的液态矿化物滴弥散于胶原纤维固化成为不定型的晶相,最后,在胶原有序化结构的引导下,不定型的矿化物品相转变为定向的一定结构的磷灰石晶体。

(2)有序分子膜模型:有序分子膜体系就是单分子膜,具有非常规则的结构排布,为晶体生长提供了良好的模板能较好的模拟生物矿化过程。目前,LB 膜和自组装单分子膜是有序分子膜的两种基本形式。

LB 膜(Langmuir - Blogett film)是在 20 世纪 30 年代由 Langmuir 和 Blogett 共同建立的,即将两亲分子在气/水界面通过水平加压使分子紧密有序排列而形成有序单分子膜,利用 LB 膜技术进行生物矿化已成为生物矿化仿生合成的一种重要方法。Kimiya 等^[14]在玻璃表面形成花生酸 LB 膜,并浸泡于模拟体液中,之后通过扫描电镜、透射电镜等观察发现 LB 膜上有羟基磷灰石晶体形成。此外,还有研究者通过采用 Langmuir - Blodgett(LB)技术在不锈钢和钛表面沉积了一种化学结构简单的磷脂磷酸二十六烷基,利用该机制生成了碳化羟基磷灰石^[15,16]。

自组装单分子膜(self - assembled monolayers, SAMs)是近年来发展起来的一种新型有机超薄膜,在 SAMs 膜的表面反应物能够富集、定位并被催化。有研究发现在室温下 Ca/P 摩尔比为 1.66 的矿化液中,以玻片表面形成的硬脂酸自组装膜为模板成功地诱导了碳酸磷灰石薄膜的形成^[17]。Wu 等^[18,19]在钛板表面形成的磷酸(含有 16 个碳原子烷基)自组装单分子膜能够有效地促进 HA 晶体的沉积。

(3)凝胶矿化模型:凝胶法是以凝胶作为扩散和支持介质,来模拟生物矿化的一种重要的方法。已经有许多研究利用凝胶法来探索仿生矿化过程,如 Boskey 等^[20]建立了凝胶和琼脂扩散体系,并且证明了非胶原蛋白在羟基磷灰石晶体形成过程中所起的促进或抑制作用。Hunter 等^[21]利用丙烯酰胺凝胶体系来探索体外的矿化过程。Gajjeraman 等^[22]用硅胶盐凝胶作为晶体形成的介质来研究 HA 晶体的形成。

(4)双膜体系:双膜系统是近年来出现的一种新的体外矿化模型,由阳离子选择膜(cation - selective membrane)和透析膜(dialysis membrane)组成,在阳离子选择膜和透析膜之间形成反应腔隙,钙离子溶液通过阳离子选择性膜进入反应腔隙,磷酸根离子透过透析膜进入反应腔隙。目前,应用于牙齿生物矿化研究的多为双膜系统。Iijima 等^[23]在双膜系统中利用

猪釉原蛋白和氟离子作为牙釉质形成的模型,猪釉原蛋白和氟离子的结合会在调节习惯、尺寸定位及钙磷晶体形成阶段起到协同作用,从而形成类似于真实牙釉质晶体的棒状磷灰石晶体。

三、牙本质磷蛋白在牙组织仿生矿化中的研究进展

牙齿是人体唯一无细胞性,由外胚叶和间质来源的坚硬组织,结构相对较简单。牙体硬组织被破坏后是无法再生的。目前,大多数的牙体组织缺损修复均是使用复合树脂、生物陶瓷等材料,但是这些材料与牙体组织在结构、组成以及性质等方面均有很大的差异;而且这些修复材料与牙体组织之间存在的界面问题,可引起边缘微渗漏、牙本质过敏、继发龋等问题。因此,探寻一种可以使牙体组织“再生”的方法成为牙体硬组织缺损修复的关键。近年来,随着仿生合成技术的迅速发展和成熟,一些研究者将目光放在仿生矿化上,以期在体外合成类牙体硬组织样的结构,用于修复各种原因引起的牙体硬组织的缺损。

NCPs 如磷蛋白、骨桥蛋白、骨结合蛋白、骨钙素等均富含酸性氨基酸,尤其是天冬氨酸和磷酸化的丝氨酸,被称为阴聚离子蛋白。这些蛋白参与几乎所有生物的矿化过程,这些聚阴离子蛋白可与胶原结合并结合钙磷离子从而诱导晶体形成;而在可溶性条件下又可抑制钙磷离子沉积于已形成的晶体上。有研究证实,在钙磷酸盐饱和溶液中加入 I 型胶原和天冬氨酸阴离子模拟矿化环境中的富含天冬氨酸的 NCPs,可以诱导矿化并在初期形成无定型磷酸钙,并很快就在胶原支架中形成有序的类型骨的矿化^[24]。

目前,DPP 作为牙本质中最重要的 NCPs,被认为是唯一的能够形成类似于发育中的骨中所包含的矿化结节的蛋白,已经被证实在牙齿的仿生矿化中起关键性作用,并且将其引入组织工程中能促进诱导仿生矿物质的形成。DPP 与 I 型胶原结合,并在该处结合钙离子从而促进 HA 在此处成核,DPP 是羟基磷灰石晶体的形成和生长的一个重要的引发剂和调制器。体外研究表明,在中性 pH 值及较低 DPP/胶原比例时,在距离 N-末端 210nm 处会产生唯一的结合位点,可以诱导胶原的局部构象发生改变,使分子弯曲并减少其有效长度;当 DPP/胶原比例较高时,DPP 可以结合所有的胶原纤维^[25]。分子图形进一步表明,与胶原纤维比较 DPP 中羧酸与磷酸集团之间的间隔可能是决定晶体生长取向所必需的,DPP 可能提供矿物晶体与胶原纤维之间的内在联系^[26]。体外成核现

象表明,自然来源的 DPP 可以诱导羟基磷灰石成核,且这种晶体与矿化牙本质中的晶体有相似的形态结构;但是重组的 DPP 只能形成无定型磷酸钙^[27]。Suzuki 等^[28]通过研究 DPP 基因敲除的小鼠的牙齿,结果表明 DPP 在矿物成熟过程中(如系统有序地组装晶体结构中)是必不可少的。Sfeir 等^[29]研究发现在 NIH3T3 细胞中,DPP 的表达可以诱导细胞基质矿化形成矿物结节,这些结节通过 X 线衍射被证实为羟基磷灰石晶体。Deshpande 等^[2]研究表明非磷酸化的 DPP 不能影响胶原矿化,而磷酸化的 DPP 能够导致类似牙齿中的高度矿化胶原纤维的形成;不同浓度的 DPP 及其磷酸化的程度不同会导致不同矿物相的形成。最新的研究表明,在松散排列的胶原纤维涂层中加入 DPP 可以诱导产生矿物结节,这些矿物结节是在骨发育中可以看到;除此之外,这些矿物结节中的 Ca:P 比例明显高于正常骨组织中的^[26]。DPP 还是骨形态发生蛋白-2(BMP-2)信号通路的共激活剂,在调节信号通路方面具有潜在作用。

综上所述,生物矿化发展几十年来,研究者提出了各种模型来研究和了解生物调控机制,但由于其复杂性,精确的分子机制还不是非常清楚。牙本质磷蛋白虽然已经被证实了在生物矿化中发挥重要的作用,但其作用机制、关键结构等尚不明确,因此需要在更接近口腔环境的条件下进一步研究 DPP 的关键结构、调控机制等,为开发仿生材料实现牙体硬组织再生奠定基础。

参考文献

- Gulseren G, Tansik G, Garifullin R, *et al.* Dentin phosphoprotein mimetic peptide nanofibers promote biomineralization[J]. *Macromol Biosci*, 2019,19(1):e1800080
- Deshpande AS, Fang PA, Zhang X, *et al.* Primary structure and phosphorylation of dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization[J]. *Biomacromolecules*, 2011,12(8):2933-2945
- Rabie AM, Veis A. An immunocytochemical study of the route of secretion of phosphophoryn in odontoblasts[J]. *Connect Tissue Res*, 1995,31(3):197-209
- MacDougall M, Slavkin HC, Zeichner - David M. Characteristics of phosphorylated and non-phosphorylated dentine phosphoprotein[J]. *Biochem J*, 1992,287(Pt 2):651-655
- Uskokovic V, Li W, Habelitz S. Amelogenin as a promoter of nucleation and crystal growth of apatite[J]. *J Crystal Growth*, 2011,316(1):106-117
- 陈栋,王莹莹,李晓聪,等. 牙本质涎磷蛋白、I 型胶原蛋白在 *vps4b* 基因敲除鼠磨牙牙胚发育中的时空表达[J]. *华西口腔医学杂志*, 2019,37(3):248-252

(下转第 190 页)

- 20 Perry RJ, Zhang XM, Zhang D, *et al.* Leptin reverses diabetes by suppression of the hypothalamic – pituitary – adrenal axis[J]. *Nat Med*, 2014, 20(7):759 – 763
- 21 Perry RJ, Petersen KF, Shulman GI. Pleotropic effects of leptin to reverse insulin resistance and diabetic ketoacidosis[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(5):933 – 937
- 22 Glasow A, Bornstein SR. Leptin and the adrenal gland[J]. *Eur J Clin Invest*, 2015, 30(s3):39 – 45
- 23 Neumann UH, Denroche HC, Mojibian M, *et al.* Insulin knockout mice have extended survival but volatile blood glucose levels on leptin therapy[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(3):1007 – 1012
- 24 Pliszka M, Oleszczak B, Szablewski L. Leptin at gender – specific concentrations does not affect glucose transport, expression of glucose

- transporters and leptin receptors in human lymphocytes[J]. *Endocrine*, 2015, 49(1):97 – 105
- 25 Wang MY, Chen L, Clark GO, *et al.* Leptin therapy in insulin – deficient type I diabetes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(11):4813 – 4819
- 26 Vasandani C, Clark GO, Adams – Huet B, *et al.* Efficacy and safety of metreleptin therapy in patients with type 1 diabetes: a pilot study[J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(5):694 – 697
- 27 Standl E, Schnell O, Mcguire DK. Heart failure considerations of antihyperglycemic medications for type 2 diabetes[J]. *Circulat Res*, 2016, 118(11):1830 – 1843

(收稿日期:2019 – 06 – 01)

(修回日期:2019 – 09 – 14)

(上接第 185 页)

- 7 Pouget E, Dujardin E, Cavalier A, *et al.* Hierarchical architectures by synergy between dynamical template self – assembly and biomineralization[J]. *Nat Mater*, 2007, 6(6):434 – 439
- 8 Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, *et al.* Self – organization mechanism in a bone – like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(13):1705 – 1711
- 9 吴媛媛, 潘海华, 唐睿康. 胶原矿化与仿生修复[J]. *化学进展*, 2018, 30(10):1503 – 1510
- 10 Niu LN, Zhang W, Pashley DH, *et al.* Biomimetic remineralization of dentin[J]. *Dent Mater*, 2014, 30(1):77 – 96
- 11 Du C, Falini G, Fermani S, *et al.* Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons[J]. *Science*, 2005, 307(5714):1450 – 1454
- 12 王天达, 王磊, 冯海兰. 牙本质仿生再矿化的研究进展[J]. *中华口腔医学杂志*, 2016, 51(12):770 – 773
- 13 Coelfen H. Biomineralization: a crystal – clear view[J]. *Nat Mater*, 2010, 9(12):960 – 961
- 14 Kimiyasu S, Toshihiro K, Yuri K. Crystal orientation of hydroxyapatite induced by ordered carboxyl groups[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2001, 240(1):133 – 138
- 15 de Souza ID, Cruz MA, de Faria AN, *et al.* Formation of carbonated hydroxyapatite films on metallic surfaces using dihexadecyl phosphate – LB film as template[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 118:31 – 40
- 16 de Faria AN, Cruz MAE, Ruiz GCM, *et al.* Different compact hybrid Langmuir – Blodgett – film coatings modify biomineralization and the ability of osteoblasts to grow[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018, 106(7):2524 – 2534
- 17 Von Euw S, Ajili W, Chan – Chang TH, *et al.* Amorphous surface layer versus transient amorphous precursor phase in bone – a case study investigated by solid – state NMR spectroscopy[J]. *Acta Biomater*, 2017, 59:351 – 360
- 18 Wu J, Hirata I, Zhao X, *et al.* Influence of alkyl chain length on calcium phosphate deposition onto titanium surfaces modified with alky-

- lphosphonic acid monolayers[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(8):2267 – 2272
- 19 Shen J, Qi Y, Jin B, *et al.* Control of hydroxyapatite coating by self – assembled monolayers on titanium and improvement of osteoblast adhesion[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2017, 105(1):124 – 135
- 20 Boskey AL, Boyan BD, Schwartz Z. Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel[J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60(3):309 – 315
- 21 Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, *et al.* Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins[J]. *Biochem J*, 1996, 317(Pt1):59 – 64
- 22 Gajjeraman S, Narayanan K, Hao J, *et al.* Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(2):1193 – 1204
- 23 Iijima M, Du C, Abbott C, *et al.* Control of apatite crystal growth by the co – operative effect of a recombinant porcine amelogenin and fluoride[J]. *Eur J Oral Sci*, 2006, 114(Suppl 1):304 – 330
- 24 He L, Hao Y, Zhen L, *et al.* Biomineralization of dentin[J]. *J Struct Biol*, 2019, 207(2):115 – 122
- 25 Zurick KM, Qin C, Bernards MT. Mineralization induction effects of osteopontin, bone sialoprotein, and dentin phosphoprotein on a biomimetic collagen substrate[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(6):1571 – 1581
- 26 George A, Hao J. Role of phosphophoryn in dentin mineralization[J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 181(3 – 4):232 – 340
- 27 Alvares K. The role of acidic phosphoproteins in biomineralization[J]. *Connect Tissue Res*, 2014, 55(1):34 – 40
- 28 Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, *et al.* Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization[J]. *Matrix Biol*, 2009, 28(4):221 – 229
- 29 Sfeir C, Lee D, Li J, *et al.* Expression of phosphophoryn is sufficient for the induction of matrix mineralization by mammalian cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(23):20228 – 20238

(收稿日期:2019 – 10 – 05)

(修回日期:2019 – 10 – 10)