清华大学学术专著

Biomineralization
(2nd Edition)

生物矿化
（第2版）

崔福斋 等著

清华大学出版社
北京

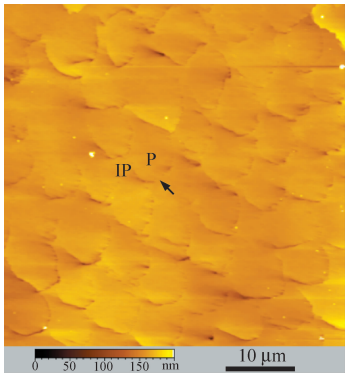
清华大学学术专著

生 物 矿 化

（第 2 版）

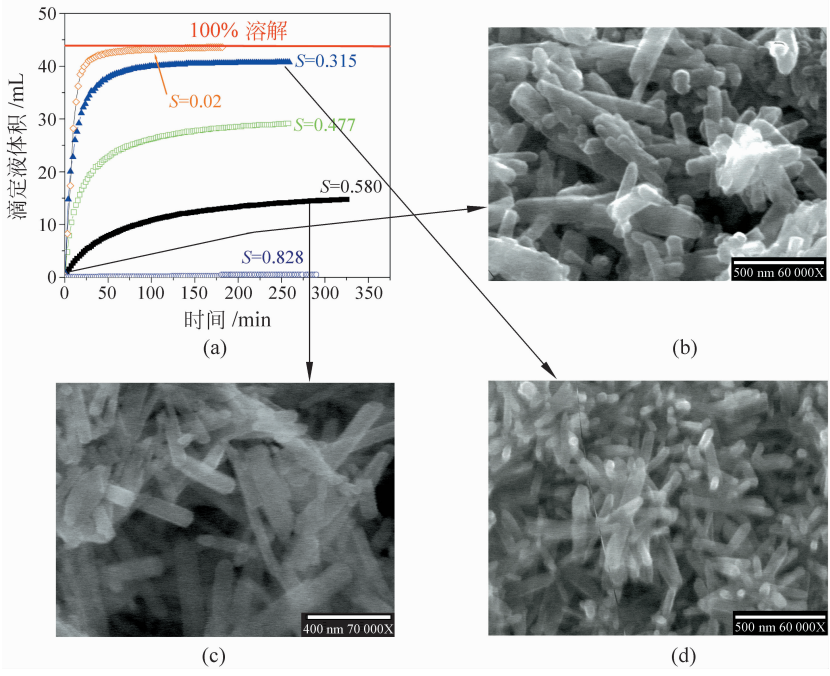
崔福斋　等著

清华大学出版社
北 京



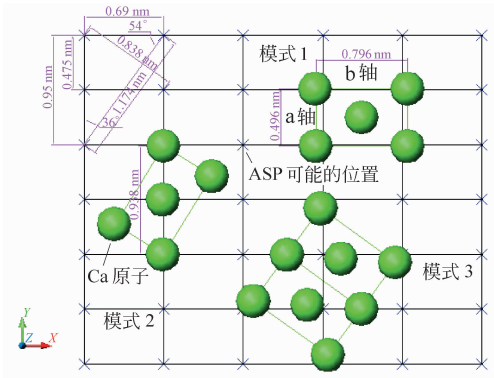
彩图 1　牙釉柱/釉柱间质连续体的 AFM 照片

黑色箭头所示为有机柱鞘[P: 釉柱(prism); IP: 釉柱间质(interprism)](第 1 章参考文献[61])

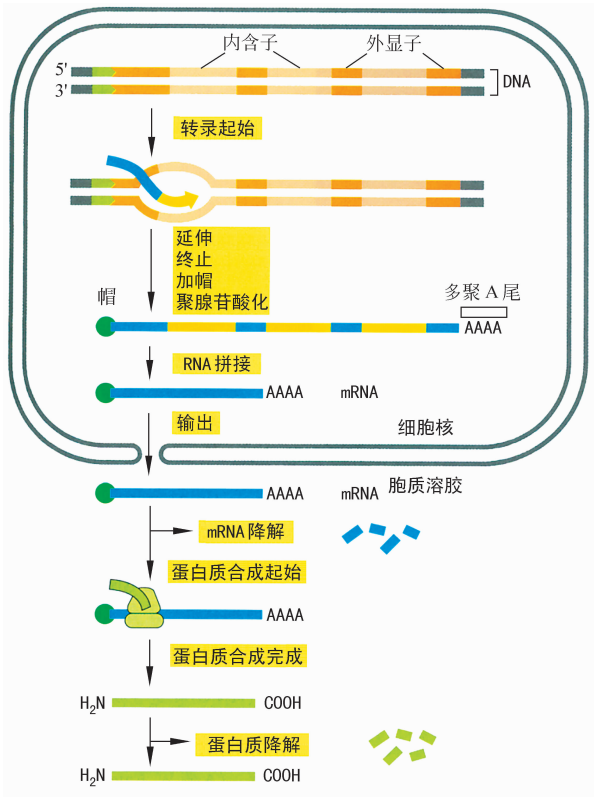


彩图 2　生物矿物在未饱和溶液中往往不能完全溶解

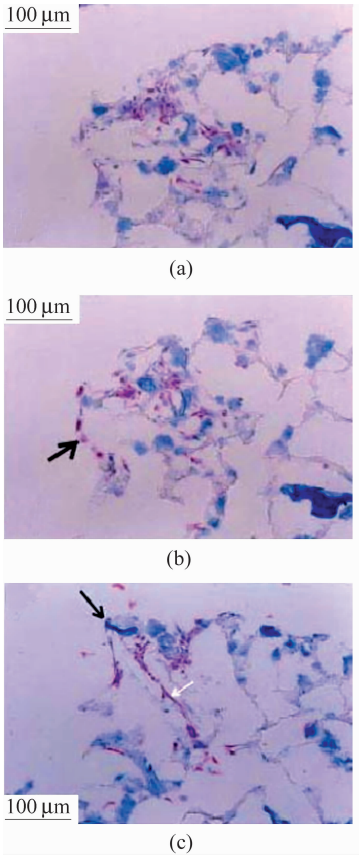
(a) 在恒组分条件(固定未饱和度)下 HA 晶体的溶解曲线; (b) 用于溶解实验的初始 HA 微晶; (c)和(d) 分别是在 *S*=0.580 及 *S*=0.315 条件下,HA 溶解停止后在溶液中收集到的未能被溶解,在未饱和溶液中可以稳定存在残余 HA(见第 2 章参考文献[71])



彩图 3　反 β 折叠结构和文石(001)钙面的 3 种可能的结构匹配模型

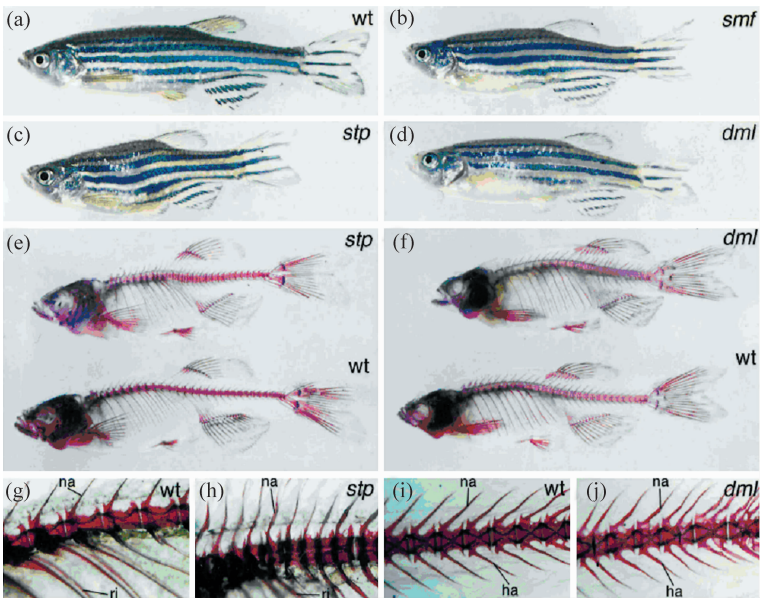


彩图 4　蛋白质的合成过程示意图

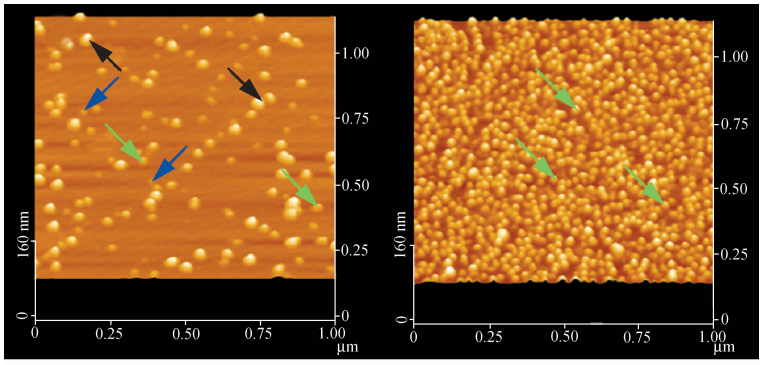


彩图 5　OB 在 nHAC/PLA 培养 12 天的生理切片(Mallory's 染色)

(a) 细胞在孔隙中繁殖；(b) 材料表面的细胞跨越孔隙；(c) 孔内细胞沿直线爬行

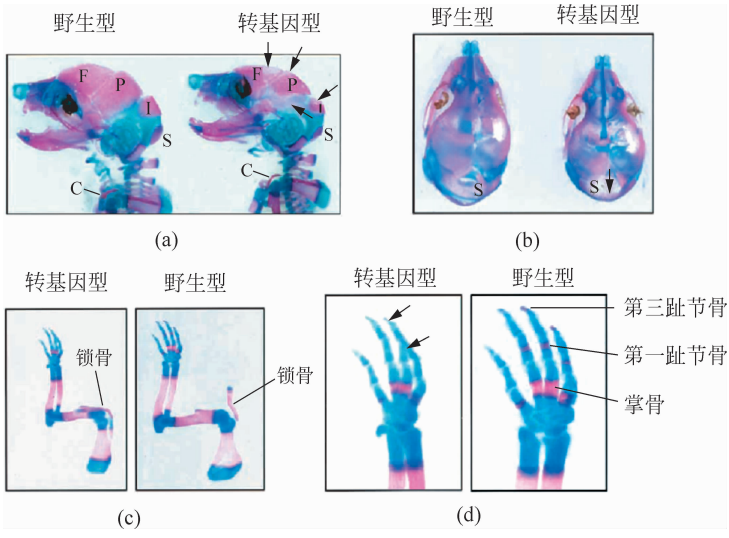


彩图 6　野生型(wild type)及几种脊椎骨突变体斑马鱼对比照片



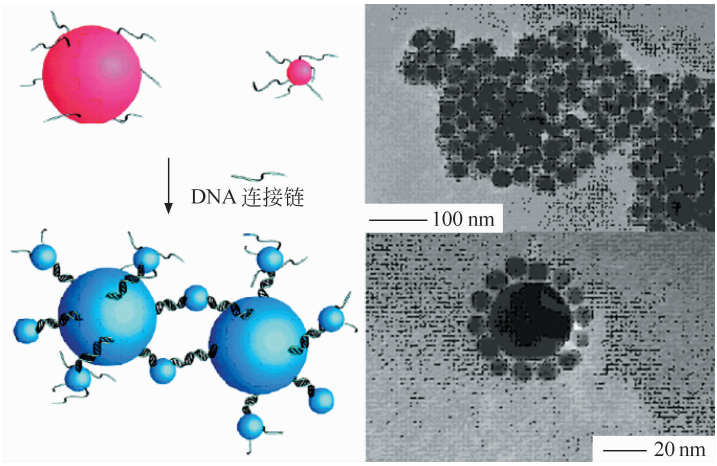
彩图 7　不同浓度

（a）25 μg/mL；（b）300 μg/mL 的重组 rM179 蛋白自组装 AFM 形貌

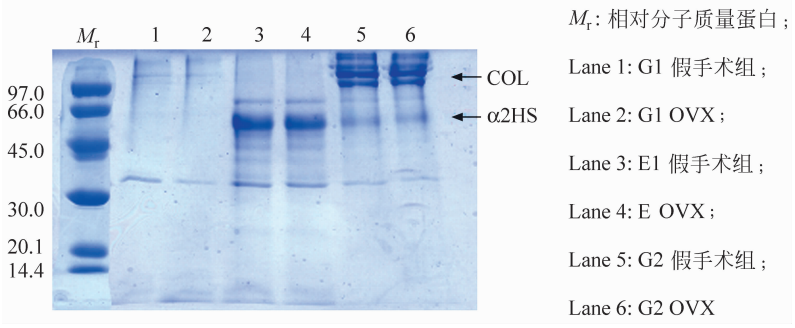


彩图 8　Alizarin 红和 Alcian 蓝染色的野生型和转基因小鼠胚胎组织切片

（a）、(b）头骨；（c）锁骨；(d) 趾骨(见第 5 章参考文献[43])

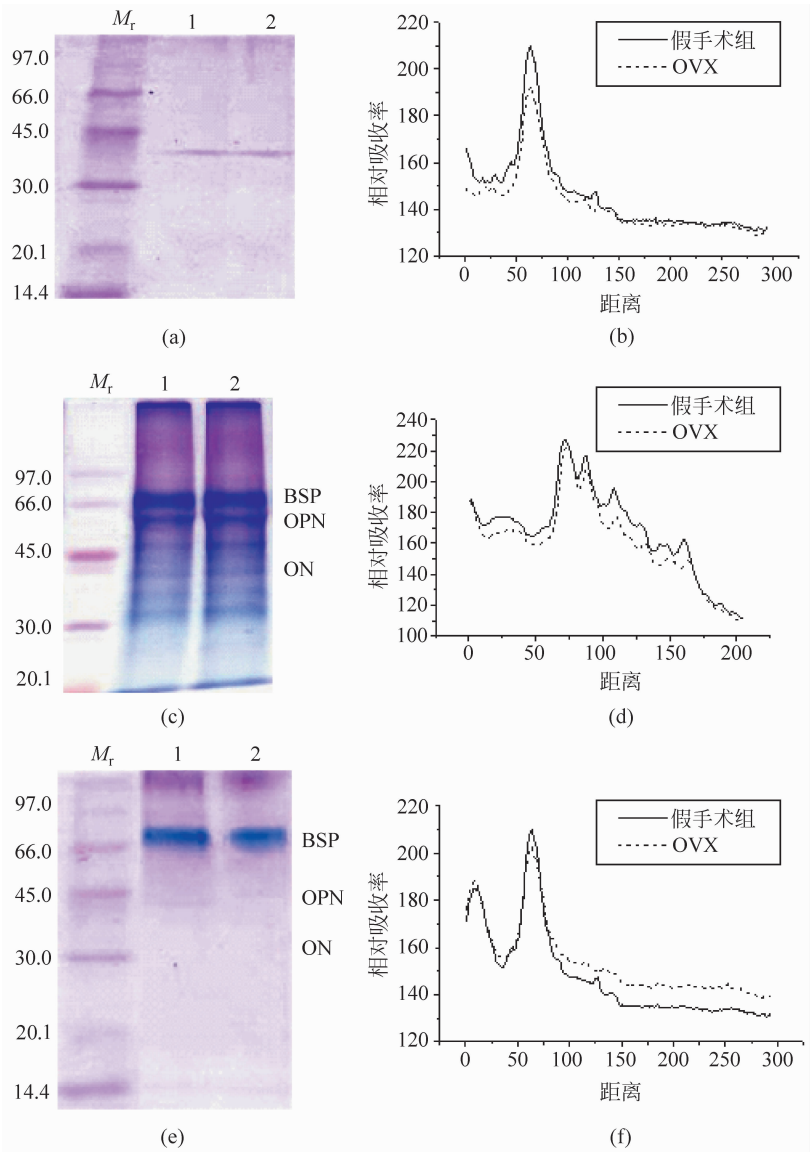


彩图 9　两种不同尺寸金纳米颗粒 DNA 修饰组装示意图及 TEM 照片



彩图 10　骨基质蛋白的聚丙稀酰氨凝胶电泳(考马斯亮蓝染色)

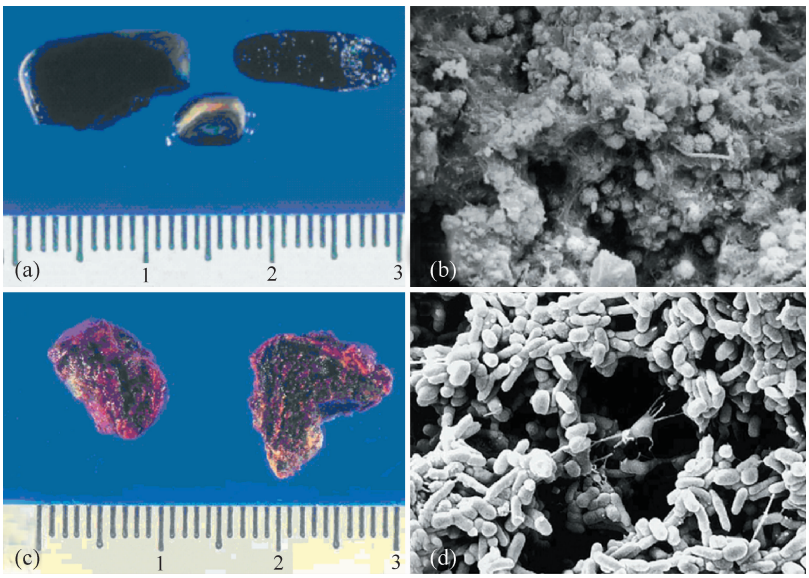
COL：Ⅰ型胶原的 α 链；α2HS: 60 kDa 血浆糖蛋白(见第 6 章参考文献[23])



彩图 11　骨基质蛋白的聚丙稀酰氨凝胶电泳(Stains-all 染色)
(见第 6 章参考文献[23])

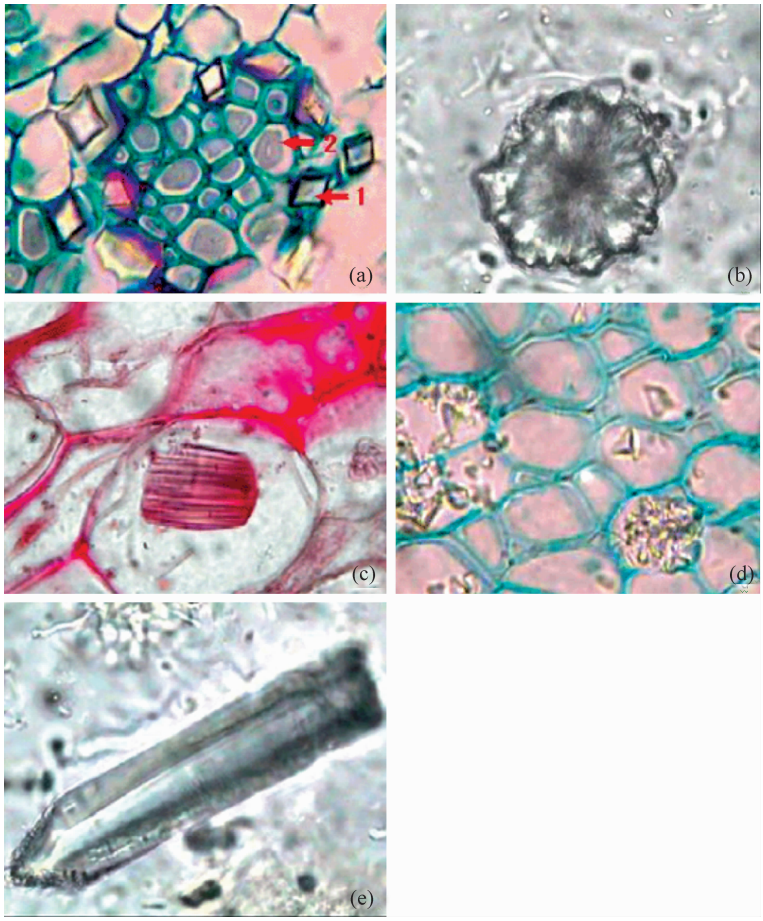
Lane 1 为对照组；Lane 2 为去势组

(a)和(b) G1；(c)和(d) E；(e)和(f) G2



彩图 12　细菌对胆结石形成的影响

(a) 无菌的黑色色素结石,这些结石里含有胆红素钙、碳酸钙和磷酸钙; (b) 结石的 SEM 图像,注意没有细菌生物膜; (c) 色素型结石,主要为棕色,同时含有少量黑色色素; (d) 显示细菌小集落的胆石 SEM 图像,注意细菌桥和生物膜的三维性质(见第 7 章参考文献[58])



彩图 13　植物体内草酸钙晶体的各种形态

(a) 甘草的草酸钙方晶：1—方晶,2—纤维束；(b) 草酸钙簇晶(大黄根茎)；(c) 草酸钙针晶(天麻块茎)；(d) 草酸钙砂晶(牛膝根)；(e) 草酸钙柱晶(射干根茎)

内 容 简 介

本书对生物矿化的过程、原理及相关研究作了较全面的介绍，其中不仅包括对天然矿物、矿化过程及机理的基本介绍，并对植物的生物硅化作了特别介绍。同时，本书介绍了国家自然科学基金项目对生物矿化的一些最新研究成果，如生物矿化的细胞调控和基因调控的相关内容，最后对病理矿化、仿生矿化模拟作了简要介绍。本书对天然材料（骨骼和牙齿等）、仿生材料、复合新材料的研究领域中有关生物矿化的工作能起较好的参考和指导作用。

本书在第1版的基础上作了修订，相对于第1版新增加了病理结石、牙本质矿化过程与细胞活动、牙釉质的发育及其生物矿化、光合生物体内的二氧化硅等内容。

本书面对广大的材料科学、生物工程、化学、医学等领域的研究人员。对纳米医药课题有兴趣的人员，也是本书潜在的读者群。

版权所有，侵权必究。侵权举报电话：010-62782989　13701121933

图书在版编目(CIP)数据

生物矿化/崔福斋等著.--2版.--北京：清华大学出版社，2012.5
（清华大学学术专著）
ISBN 978-7-302-27584-8

Ⅰ.①生…　Ⅱ.①崔…　Ⅲ.①生物材料－矿化作用　Ⅳ.①Q81

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第270930号

责任编辑：韩燕丽
封面设计：
责任校对：赵丽敏
责任印制：

出版发行：清华大学出版社
网　　址：http://www.tup.com.cn，http://www.wqbook.com
地　　址：北京清华大学学研大厦A座　**邮　　编**：100084
社 总 机：010-62770175　**邮　　购**：010-62786544
投稿与读者服务：010-62776969，c-service@tup.tsinghua.edu.cn
质量反馈：010-62772015，zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn
课件下载：http://www.tup.com.cn，010-62795954
印 刷 者：
装 订 者：
经　　销：全国新华书店
开　　本：153mm×235mm　**印张**：23.25　**插　　页**：4　**字　　数**：422千字
版　　次：2007年5月第1版　2012年5月第2版　**印　　次**：2012年5月第1次印刷
印　　数：1～　000
定　　价：　.00元

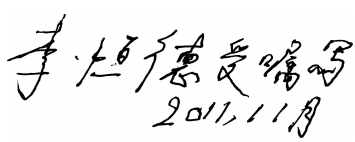
产品编号：

第二版前言

这本新书《生物矿化》将于2012年再版。它是由前第1版2006年增加了两位新作者杜昶与王荔军和两个新章节而扩增成一个新的版本，为这本书增加了新的色彩。“生物矿化”是一个十分富有创意而且跨众多学科的研究领域——Biomineralization，很受人关注。生物矿化的著作国际上很多，涉及的领域很广泛，而国内相关著作并不多见，这本《生物矿化》为从事相关研究的国内学者提供了一些参考。

20世纪生命科学领域中有两大飞跃，分别为细胞生物学和分子生物学的出现和进展。它使人类对生命本质的认识达到了一个前所未有的高度。在基因学科大步兴起之时，20世纪90年代新的一轮干细胞的研究为再生医学的发展奠定了科学基础，而组织工程学的出现又为再生医学的临床应用提供了基本手段和方法。2009年又有人提出成体干细胞研究在组织再生临床上的重要性。以上种种进步只是用几个方面的例子说明，再生医学和组织工程相结合的研究颇令人兴奋，具有非常大的前景。虽然离实际的应用还有一段距离，但终究有一天会到来，成为人类生命活动中一件具有划时代意义的事件，人们会积极努力迎接这一天的到来。

生物矿化，作为再生医学和组织工程的研究的一个方向，对硬组织的再生研究具有重要的意义。这本书是国内一部介绍生物矿化的专著。其以国家自然科学基金重点项目“生物矿化过程及模拟”为依托，不仅论述了生物矿化理论，而且着重介绍了生物矿化的前沿发展，特别是我国学者的贡献。范围涉及到骨、牙、结石、细胞行为，病理矿化控制等方面，对发现和合成新型的仿生材料以及人工骨、牙种植体的研究和应用具有一定的参考意义，以飨读者。本书作者也欢迎广大读者提出改进意见。



第一版前言

在共同完成国家自然科学基金重点项目“生物矿化过程及模拟”的基础上，课题组成员商定撰写此书。在撰写时，又邀请了在生物矿化领域学有所成刚回国工作的唐睿康教授及王爱华博士各写了一章，希望本书能较全面地阐述生物矿化(biomineralization)这门学科。

英文版的以生物矿化为题的专著有下列两本较为有名，一本是 H. A. Lowenstam 和 S. Weiner(1989) 主编的《论生物矿化》，另一本是 S. Mann (2001) 的《生物矿化》。在中国，王夔院士在《生物无机化学》(1998)一书中的第四章最早并且系统地论述生物矿化理论；同期李恒德院士倡导用生物矿化概念做材料设计。生物矿化是围绕生物矿物(biomineral)的形成过程和机制的阐明而发展起来的科学。生物矿物最早是在 20 世纪矿物学家研究“活组织形成的矿物”时命名的，这些生物矿物如化石、贝壳等。后来，因为这个研究对象涉及到有机物质，特别是与生物矿物有关的生物分子，如蛋白质、细胞、DNA，所以生物矿化研究人员逐渐从矿物学家、地质学家扩大范围到有机化学家、生物学家。近年来，随着有机物调制无机晶体成核长大以及其中相互作用的机制研究的深入，材料科学家、医药学家和仿生工程专家也加入到生物矿化研究之中，并应用其中的原理探索出重要的应用，如矿化胶原的骨移植材料、纳米自组装功能材料，以及可能抑制骨质疏松、血管钙化、结石的药物等。

如今，已发现的天然生物矿物有 70 余种，利用生物矿化原理进行室温人工合成的有机和无机材料的种类难计其数。生物矿化原理和病理矿化的研究已深入到分子、原子水平。在多年研究有机基质调制矿化的基础上，人们已提取到与矿化相关的蛋白质，并到细胞和基因中去寻找其中的关联。本书除了论述生物矿化基本理论外，对生物矿化的前沿发展，特别是我国学者的贡献，都加以了介绍，但仍然难免有疏漏之处，敬请读者指正。

本书第 1、3 章作者是冯庆玲，第 2 章唐睿康，第 4、5 章崔福斋，第 6 章张天蓝，第 7 章欧阳健明，第 8 章王爱华。各章侧重生物矿化的一个方面。特别是王夔院士为本书撰写的“向人体内钙化学习——写在书后”，实为本书画龙点睛之笔，他在文中指出当前生物矿化研究的主流方向。希望本书的出版能

使对生物矿化有兴趣的读者快步进入该领域的前沿,并推动生物矿化研究水平进一步提高。

崔福斋

2006 年 6 月于清华大学

目　　录

第 1 章　生物中的矿物 …… 1

1.1　天然生物矿物的种类 …… 2

1.1.1　碳酸钙 …… 3

1.1.2　磷酸钙 …… 7

1.1.3　氧化铁与硫化铁 …… 9

1.1.4　硅石类 …… 12

1.2　几种典型的天然生物矿物 …… 13

1.2.1　贝壳的结构与高韧性 …… 13

1.2.2　鱼耳石 …… 16

1.2.3　骨 …… 19

1.2.4　牙 …… 21

1.2.5　病理结石 …… 23

1.2.6　象牙 …… 24

1.2.7　蛋壳 …… 25

1.2.8　棘皮动物 …… 28

1.3　天然生物矿物的形貌特征 …… 29

1.3.1　对称性破坏 …… 29

1.3.2　生长方向调节 …… 31

1.3.3　有机支架 …… 34

1.3.4　囊泡在硅藻和放射虫矿化中的作用 …… 34

1.3.5　多细胞生物 …… 35

1.3.6　讨论 …… 36

1.4　天然生物矿物的结构特征 …… 37

1.4.1　分级结构 …… 38

1.4.2　预构建 …… 46

1.4.3　高度有序的自组装 …… 47

1.4.4　多级过程 …… 49

参考文献 …… 53

第 2 章　生物矿化中的结晶原理 …… 58
2.1　晶体生长基础 …… 59
2.1.1　结晶过程中的热力学 …… 60
2.1.2　成核 …… 61
2.1.3　成核动力学 …… 63
2.1.4　晶体生长动力学 …… 64
2.1.5　纳米组装 …… 67
2.1.6　前驱相和相转化 …… 70
2.2　生物矿化的调控途径 …… 72
2.2.1　晶体与台阶的形貌 …… 73
2.2.2　生物矿化中的晶面识别 …… 74
2.2.3　生物矿化中的晶体生长 …… 76
2.3　界面能量控制 …… 81
2.3.1　界面能和晶体生长 …… 82
2.3.2　接触角和 Young's 公式 …… 84
2.3.3　界面能和生物结合界面 …… 85
2.3.4　界面能和相转化 …… 87
2.3.5　相转化动力学控制 …… 89
2.3.6　晶体组装的控制 …… 92
2.4　纳米溶解 …… 94
2.4.1　溶解过程中的台阶行为 …… 95
2.4.2　纳米颗粒的稳定性 …… 99
参考文献 …… 100

第 3 章　有机基质调控生物矿化 …… 108
3.1　有机基体作为机械构架 …… 109
3.2　大分子和有机基质——一个普适的模型 …… 110
3.3　有机基质诱导成核 …… 111
3.3.1　界面处的分子识别 …… 113
3.3.2　静电积累 …… 116
3.3.3　表面形貌 …… 117
3.3.4　结构匹配——几何模型 …… 117
3.3.5　立体化学模型 …… 120
3.4　有限反应空间中的化学合成 …… 121
3.4.1　囊泡 …… 121

3.4.2 铁蛋白 …… 123
3.4.3 细胞和细菌的组装 …… 125
3.4.4 聚合物多孔材料 …… 127
3.5 天然矿物中的有机基质 …… 129
3.5.1 骨中的有机基质 …… 129
3.5.2 牙釉质基质的主要蛋白 …… 133
3.5.3 贝壳珍珠层中的大分子基体 …… 136
3.5.4 淡水珍珠中的有机大分子 …… 138
3.5.5 鱼耳石中的有机大分子 …… 139
3.6 体外模拟有机基质调控矿化 …… 140
3.6.1 晶体生长 …… 140
3.6.2 晶体生长的抑制 …… 141
3.6.3 晶体形貌 …… 142
3.6.4 多晶型 …… 146
3.7 有机模板上的取向形核 …… 148
3.7.1 LB 膜 …… 149
3.7.2 SAMs …… 151
3.8 人工合成碳酸钙晶体的晶型及形貌控制 …… 154
3.8.1 Mg^{2+} 作为添加剂 …… 154
3.8.2 有机小分子作为添加剂 …… 155
3.8.3 生物大分子作为添加剂 …… 157
3.8.4 微印法实现结晶位点控制 …… 159
3.8.5 纳米碳酸钙 …… 160
3.9 小结 …… 160
参考文献 …… 161

第 4 章 生物矿化的细胞调控 …… 168
4.1 引言 …… 168
4.2 矿化相关蛋白的细胞合成与分泌 …… 169
4.2.1 蛋白质的合成 …… 169
4.2.2 胶原的合成 …… 169
4.3 生物矿化中的细胞调控作用 …… 173
4.3.1 细胞分泌蛋白与生物矿化组织 …… 173
4.3.2 骨矿化过程中的细胞调控作用 …… 174
4.3.3 牙本质矿化过程与细胞活动 …… 189

4.3.4 牙釉质矿化过程与细胞活动 …… 190
4.4 骨修复中的细胞调制矿化 …… 194
4.4.1 骨折愈合与骨重塑 …… 194
4.4.2 骨组织工程中的细胞调制矿化 …… 195
参考文献 …… 200

第 5 章 生物矿化与基因调控 …… 202
5.1 引言 …… 202
5.2 基因的生物功能 …… 203
5.2.1 基因表达及其特点 …… 204
5.2.2 基因表达的调节方式 …… 204
5.3 生物矿化中的基因调控作用 …… 205
5.3.1 骨矿化过程中的基因调控作用 …… 206
5.3.2 牙釉质矿化过程中的基因调控 …… 220
5.4 转基因动物技术与生物矿化 …… 232
5.4.1 转基因动物技术与骨矿化研究 …… 233
5.4.2 转基因动物技术与牙釉质矿化研究 …… 234
5.5 基因治疗与生物矿化 …… 238
5.5.1 基因治疗用于骨疾病 …… 239
5.5.2 骨缺损基因治疗 …… 240
5.6 基因模板在生物模拟矿化中的应用 …… 242
5.6.1 DNA 模板纳米粒子自组装的典型结构 …… 242
5.6.2 DNA 模板组装一维金属纳米线 …… 243
5.6.3 DNA 模板自组装纳米颗粒二维及三维网络体系 …… 245
5.6.4 天然病毒 DNA 指导一维纳米材料的合成 …… 247
参考文献 …… 248

第 6 章 牙釉质的发育及其生物矿化 …… 252
6.1 牙釉质的发育过程 …… 252
6.2 牙釉质矿化过程中的细胞外基质蛋白 …… 254
6.2.1 釉原蛋白 …… 255
6.2.2 成釉蛋白 …… 257
6.2.3 釉蛋白 …… 259
6.3 牙釉质基质蛋白调控生物矿化 …… 260
参考文献 …… 262

第 7 章　病理性矿化Ⅰ——与骨质减少和血管钙化有关的生物矿化 … 265
7.1　骨的病理性矿化 …… 265
7.1.1　去势大鼠骨基质的改变：非胶原蛋白在骨矿物形成中的作用 …… 266
7.1.2　长期低剂量喂镧大鼠的骨矿物相 …… 271
7.1.3　外源性金属离子对骨相关细胞的影响 …… 273
7.1.4　氧化胆固醇抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化 … 275
7.2　血管钙化 …… 275
7.2.1　胆固醇诱导钙磷酸盐沉积：物理化学作用 …… 276
7.2.2　血管平滑肌细胞的凋亡对钙化的贡献 …… 277
7.2.3　血管平滑肌细胞的成骨样分化对钙化的贡献 …… 279
参考文献 …… 281

第 8 章　病理性矿化Ⅱ——结石与牙的病理矿化 …… 291
8.1　泌尿系结石 …… 291
8.1.1　草酸钙结石 …… 292
8.1.2　尿酸结石 …… 300
8.1.3　磷酸钙结石 …… 305
8.1.4　胱氨酸结石 …… 308
8.2　胆结石 …… 311
8.2.1　胆结石的基本理化性质和微观结构 …… 312
8.2.2　影响胆结石形成的因素 …… 315
8.2.3　对胆结石环状结构形成的体外模拟 …… 319
8.3　人体中的不常见结石 …… 320
8.3.1　胰腺结石 …… 320
8.3.2　支气管结石 …… 321
8.3.3　前列腺结石 …… 321
8.3.4　肠胃结石 …… 322
8.3.5　肺泡微结石 …… 322
8.3.6　鼻腔结石 …… 323
8.3.7　其他结石 …… 323
8.4　牙的病理矿化 …… 324
8.4.1　龋齿 …… 324
8.4.2　牙石 …… 326

8.4.3 氟牙症 …… 327
参考文献 …… 329

第 9 章 光合生物体内的二氧化硅 …… 336
9.1 硅的生物地质化学循环 …… 336
9.2 生物硅化的起源和进化 …… 337
9.3 硅化学和硅生物化学 …… 339
9.4 硅化结构和功能关系 …… 343
参考文献 …… 344

向人体内钙化学习——写在书后 …… 350

索引 …… 357

第 1 章　生物中的矿物

生物中存在各种各样的生物矿化材料，从细菌中的磁性体到牡蛎、珊瑚、象牙、骨和牙齿，即从纳米尺寸到宏观世界，生物体中包括了一种新型化学机理，它将硬物质与软物质，无机与有机材料组合在一起。最近 Ehrlic 对于生物矿化产物的数量和品种进行了综述[1]，目前已经发现大约 128 000 种软体动物；大约 800 种珊瑚；5000 多种海绵，其中包括 525 种玻璃海绵；700 多种含钙的绿藻、红藻、褐藻；300 多种深海多孔虫类；还有 200 000 多种硅藻[2]。这种在生命过程中构建以无机物为基础的结构过程称为生物矿化。简言之，生物矿化就是研究生物系统中沉积的无机固体的形成、结构和性能的科学。

生物矿化材料是指这种由生命系统参与合成的天然的生物陶瓷和生物高分子复合材料，如骨骼、牙齿、珍珠、贝壳和鹿角等。虽然组成生物矿化材料的主要无机成分均广泛存在于自然界中，甚至有的矿物质（如方解石、羟基磷灰石）从组成和结晶方式来看与岩石圈中相应的矿物都是相同的，但是一旦受控于这种特殊的生命过程，便具有常规的陶瓷不可比拟的优点，如高强度、高断裂韧性、优异的减震性能、很好的表面光洁度以及许多其他特殊的功能。这些不同寻常的性能来源于在特定生物条件下，材料的巧妙组装过程及其所具有的精细的微观结构。这便是生物矿化的魅力所在[3]。

生物矿物提供的不仅是结构支撑和力学强度，而且是一种器官。生物作为天然建筑师，所构建的生物矿物包含了许多重要的生物学功能，例如：保护、运动、咬切和磨碎、给予浮力、光学、磁性、重力传感、储存等。大量事实证明，这种高级功能来源于特殊组织的进化，而且这种结构必须在体内作为整个肌体的一部分才能充分地发挥作用。

生物矿物的研究始于 20 世纪 20—30 年代，这一时期德国、丹麦、瑞典的学者用偏光显微镜对生物矿物进行了系统的观察。第二次世界大战以后的 50—60 年代，欧洲和美国的学者借助于透射电镜和扫描电镜对生物矿物做了深入的研究，并且建立了有机基质的概念。70 年代以来，随着各种微区分析技术的发展，人们可以利用各种不同的专门仪器，如红外-拉曼光谱仪、穆斯堡尔谱仪、核磁共振等，不仅探明了绝大部分门类的主要矿物结构和成分，而且将生物矿物的研究逐步提高到生物无机化学、细胞生物学、分子生物学乃至基因的水平。自 1988 年以来，我国化学家王夔院士和材料学家李恒德院士将

生物矿化的概念介绍到国内后,国内的生物矿化研究开始逐渐形成规模,并且以很快的速度发展[4]。

1.1 天然生物矿物的种类

生物矿化包括从周围环境中选择性吸取元素、并在严格的生物控制下将其组装成功能化的结构的过程,这一过程在生命科学中占有重要位置。根据化石记录的生物硬组织材料——如骨和贝壳——的形成过程显示,骨骼类硬组织在大约 5 亿 7 000 万年以前通过生物矿化形成,从而导致生命和环境发生了根本性的变化。有证据表明,无机矿化过程中包含生物过程的现象,可以追溯到 35 亿年以前,而地球具有大约 42 亿年的历史。然而,这些结构只是偶然的化学结合的结果,而不是为某一特定功能而控制合成的无机固体材料[5]。

大约 5 亿年前,由碳酸钙、磷酸钙和硅石构成的贝类和骨骼的数量和种类在整个地球范围内突然增加,因此生物矿化在地球科学的很多领域占有重要的地位。如 Ca、Fe、C、P、Si 等元素通过复杂的途径,以某些包含了生物矿化在内的方式,已经循环了几百万年[6]。在地质学领域,生物矿化产物确实是一个大产业,许多生物矿物的结构作为化石保存了下来,如英国南海岸的白色岩石。这些沉积岩大约存在于 2 亿年以前比较温暖的浅海中,是单细胞有机物钙化的产物。

化石不仅记录了生物体的信息,而且保存了当地气候和当时海洋的化学状况。地质化学家能够以不同的方法获取这些信息。例如,通过测量化石贝壳中$^{18}O/^{16}O$同位素的比例,可以估计古代地球的温度。微量金属元素如 Sr 进入软体动物壳碳酸钙的量可以提供古代海水中盐成分的信息。

在生物器官的 20~25 种基本元素中,H、C、O、Mg、Si、P、S、Ca、Mn 和 Fe 是 70 多种不同生物矿物的主要组成元素[6]。其中 Ca 具有特殊重要的意义,这不仅是由于它的广泛存在,而且也由于它是我们熟知的骨骼和贝壳的主要成分。非常有趣的是,羟基磷灰石是骨和牙的主要无机成分,非脊椎动物即软体动物的外壳由方解石和文石构成。为什么草蛇使用碳酸钙来支撑它的软组织但脊椎动物的骨却由磷酸钙构成,造成这一显著区别的原因至今未知。在这两种情况下,无机矿物都与有机大分子和有机基质密切相关,它们共同构成复杂的分级结构,这一点是生物矿化最基本的规律所在[7],由此可以推测每种生物矿物都具有由其有机组织的进化状态决定的特殊化学、生物和力学性能[8]。

碳酸钙和磷酸钙矿物具有高的晶格能和低的溶解性,因此在生物环境中

具有很好的热力学稳定性。相反，含水的相，例如草酸钙和硫酸钙，溶解性要大得多，因而并不广泛存在于生物中。一般来说，钙盐的析出提供了一个在生物环境中控制 Ca^{2+} 离子浓度的意义，而生物细胞间的钙离子浓度约为 10^{7} mol/L。

生物矿物是在特定生物条件下形成的，从而具有特殊的高级结构和组装方式。表 1.1 列出了生物器官中存在的主要生物无机固体。不可溶的钙盐，例如碳酸盐和磷酸盐，存在于整个生物世界，许多种沉淀物用作支撑结构或者是特殊的硬组织，其中一些出现在动物的骨骼或其他坚硬部位[4]。

表 1.1　生物器官中存在的主要生物无机固体

化　学　式	俗　　名	实　　例	密度 /(g/cm³)	硬度 /莫氏
$CaCO_3$	方解石	乌龟壳、棘皮动物刺、珊瑚、海面刺	2.17	3
$CaCO_3$	文石	一些腕足动物、海洋生物、软体动物外壳	2.93	3.5～4
$CaMg(CO_3)_2$	白云石	棘皮动物的牙	2.85	3.5～4
$MgCO_3$	菱镁矿	海绵的刺	3.01	4
$Ca_5(PO_4)_3(OH)$	羟基磷灰石	骨、牙、皮肤的小骨、幼年的软体动物骨	3.1～3.2	5
$SiO_2(H_2O)$	无定形水合硅	海绵的刺	20～22	5.5～6.5
CaF_2	萤石	—	3.18	4
$CaSiO_3$	硅灰石	—	2.9	5
$(Ca, Na)(Al, Si)AlSi_2O_8$	斜长石	—	2.6～2.8	6
$Ca_2(AlSi_3O_{10})(OH)_2$	葡萄石	—	2.9	6.5
$DaAl_2\ SO_2O_7(OH)_2H_2O$	硬柱石	—	3.1	8

1.1.1　碳酸钙

自然界中有 6 种碳酸钙矿物具有相同的成分但不同的结构：方解石(calcite)，文石(aragonite)，球文石(vaterite)，一水合碳酸钙(monohydrocalcite)，六水合碳酸钙(hexahydrate-kaite)和无定型碳酸钙(amorphous calcium carbonate)[6]。在这些同素异构体中，方解石、文石和球文石均可作为生物矿物沉淀析出。文石为正交晶系结构，晶胞参数为 $a=0.494$ nm，$b=0.794$ nm，$c=0.572$ nm，Ca—O 距离为 0.25 nm。方解石为单斜晶系，晶胞参数为 $a=0.572$ nm。$\alpha=101.9°$，Ca—O 距离为 0.237 nm。球文石是碳酸钙的亚稳晶型(metastable)，属于六方晶系，由于晶格中碳酸根离子团的位置不确定(无序移位)，存在两种结构描述方法：第 1 种为 P63 空间群，晶格常数 $a=b=4.13$ Å，$c=8.48$ Å，$\alpha=\beta=90°$，$\gamma=120°$，阳离子配位数为 12；第 2 种为 Pbnm 空间群，晶胞为原来的两倍大小，$a=4.13$ Å，$b=7.15$ Å，$c=8.48$ Å，$\alpha=\beta=$

$\gamma=90^{\circ}$。图 1.1 给出了清华大学生物材料研究组在试验中观察到的几种比较常见的碳酸钙晶体以及非晶态碳酸钙。需要注意的是,镁离子经常存在于生物碳酸钙的晶格中,其含量可以高达 30%。

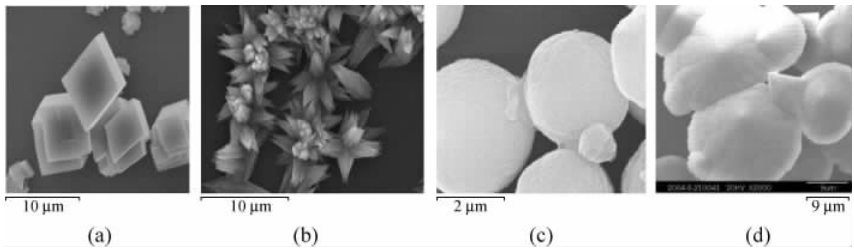


图 1.1　几种碳酸钙的形貌

(a) 方解石:$CaCl_2$ 溶液中通过 CO_2 扩散,或者直接滴加 Na_2CO_3 溶液,得到的菱状晶体;(b) 文石:8 mm 液面高度下,在 $CaCl_2$ 溶液中通过 CO_2 扩散,在盖玻片表面获得,针状,一般认为是由针状晶体聚集成束;(c) 球文石:使用天冬氨酸作为添加剂,$CaCl_2$ 溶液中通过 CO_2 扩散得到,球状晶体,一般认为由多个小胞按照滚雪球的方式堆积而成;(d) 无定形碳酸钙 ACC:不定形状,图中得到的是圆锥状,$CaCl_2$ 溶液中通过 CO_2 扩散时,在气液界面获得,一般情况下则为不规则形貌

腹足纲动物壳的珍珠层是由文石结构的碳酸钙组成。虽然在生物系统中形成的多数碳酸钙具有方解石或文石结构,但某些有机体却沉淀球文石,例如,文献[9]报道了鄂州珍珠除主要为霰石相外,还含有少量球方解石和石灰。文献[10] 报道了在浙江雷甸淡水无光珠中发现球文石。最近的研究[11]表明,淡水珍珠中的球文石呈板片结构,出现概率较高,非常稳定。从数量、尺寸和形貌考虑,无光珍珠是研究天然球文石的良好取材。优质珍珠层中的文石呈等轴板片状,而球文石板片薄且形状不规则,板片如凸透镜一般中间厚,边缘薄,层间和层内板片间分界不清晰,见图 1.2。XPS 结果显示正常珍珠和无光珍珠中的微量元素种类和含量有些差别。纳米硬度结果显示,无光珍珠硬度较正常珍珠低,约为 1.7 GPa,正常珍珠硬度为 2～3 GPa。

球文石是碳酸钙的 3 种非水合晶体中热力学状态最不稳定的一种,在含水溶液中它会迅速转变成方解石或者文石。几种海绵的针也是由球文石构成的(大多数含钙,而海绵则含有富镁的方解石针)。针刺可能起结构支撑的作用或者防止食肉动物对它的危害。这种矿物也在鱼的内耳中发现,如鲤鱼的星耳石。

耳石是以碳酸钙为晶体构成的生物矿物,存在于鱼类的内耳中,起到了听觉和平衡系统的作用,目前主要用来鉴别鱼类年龄。近年来,建立鱼耳石与水环境联系成为国内外研究鱼耳石的热点。鱼耳石由星耳石、微耳石、矢耳石各一对组成。前人的研究工作表明,文石晶体是耳石中无机矿物的主要

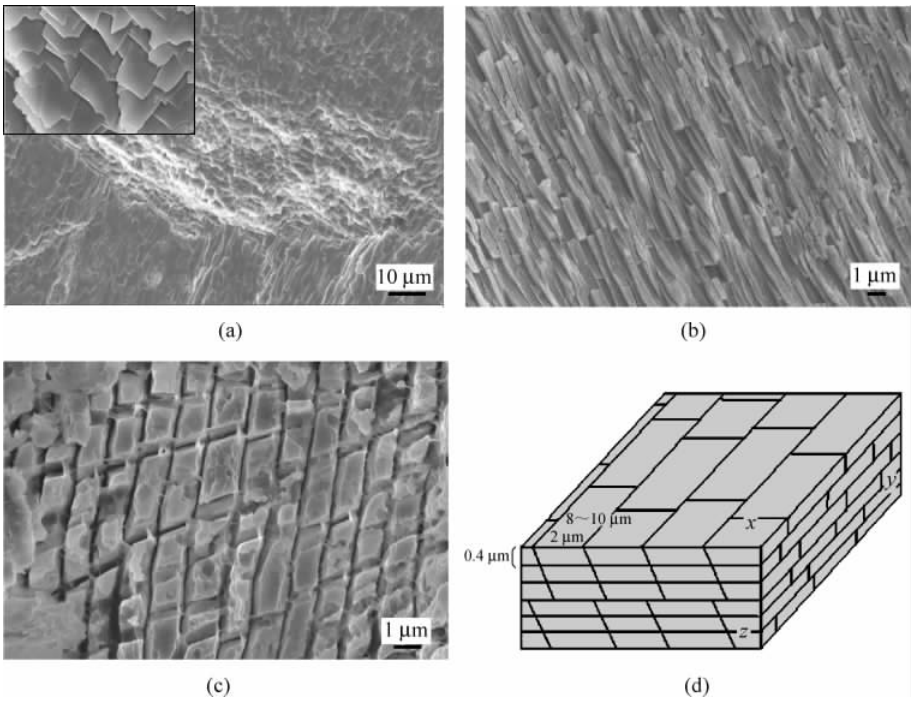


图 1.2　淡水无光珍珠中球文石板片结构的扫描电镜图(a)～(c)和三维结构示意图(d)

成分,在异常矿化的情况下,可能产生球文石晶体替代了文石晶体,球文石比文石更轻。清华大学生物材料研究组对于大量健康鲤鱼耳石进行了红外、拉曼光谱和微区 X 射线衍射分析,结果表明,星耳石中无机矿物为球文石晶体,微耳石和矢耳石中无机矿物组纯文石晶体,见图 1.3。这表明,耳石中的球文石晶体是正常矿化得到的生物矿物。球文石是碳酸钙各种晶型中极不稳定的一种晶型,在生物体内很少发现,星耳石中的纯球文石是研究生物成因的球文石矿化机制的一种理想模型。

非晶态碳酸钙沉淀在许多植物的叶子上,它的作用是储存钙。虽然这种材料在无机系统中非常不稳定,它会在含水溶液中迅速发生相变,但在生物矿物中似乎是稳定的,这一般是由于生物大分子(如聚糖)在固体表面的粘附。

碳酸盐生物矿物除了起结构支撑的作用之外,还具有一系列其他功能。陆地和海洋动物中方解石和文石也可用作重力传感器。这些装置(例如平衡石、内耳砂、耳石、耳泡)的作用方式类似于液体在半循环导管中的作用(探测角动量的变化)。例如在动物内耳中有成百的小方解石单晶体耳石构成惰性物质,人耳中的晶体是方解石,形状为纺锤形,位于一个特殊的膜上面,膜下是传感细胞。假如线性加速度变化,晶体物质相对于细胞的敏感的伸长导致

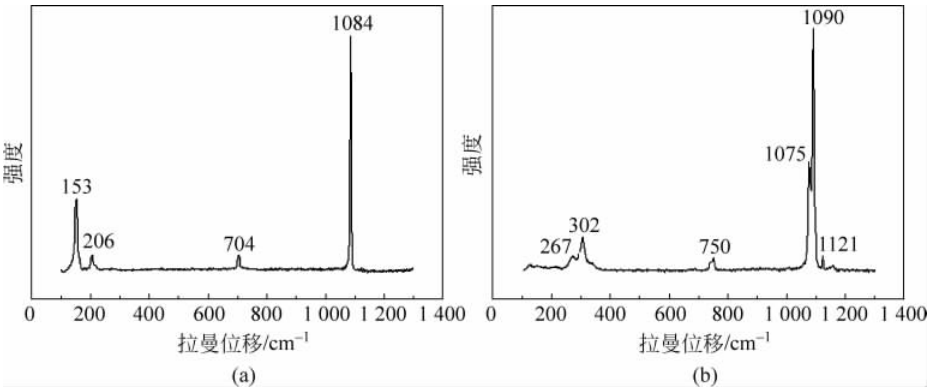


图 1.3　鲤鱼耳石的拉曼光谱

(a) 微耳石和矢耳石；(b) 星耳石

一个电信号产生，并输送到大脑中进行调节。

方解石的另外一个作用是在三叶虫的生物的眼睛里作为透镜。这类动物是以化石的形式被发现的，看起来像巨大的虱子。采用 X 射线衍射的方法确定了角膜透镜的结构和组织：眼睛由六方排列的方解石单晶组成。众所周知方解石单晶具有双倍折射白光的能力，因此三叶虫有可能一生看见的都是双影。但是，关于保存完好的三叶虫化石的研究表明，眼睛中的每个晶体都按照特殊的规律排列，以使唯一的无折射晶体 c 轴垂直于透镜表面，在这个方向上方解石晶体表现得像玻璃一样各向同性，形成一个单一的图像。生物体的独特控制能力在这个例子中表现得淋漓尽致，同样很好地证明了生物矿物的进化是基于结构、组织和功能的相互依赖。

Aizenberg 首先从矿化生物材料的结构-功能关系角度出发，详细讨论了棘皮动物海蛇尾(ophiocoma wendtii)骨骼的光受体系统[12]。它具有明显的多重功能特性。海蛇尾是很敏感的光响应物种，它可以根据白天和黑夜，相应地改变身体的颜色，同时可以探测捕食者的阴影，从而迅速逃离危险。然而，海蛇尾是没有眼睛的。那么这一切是如何进行的呢？对复杂的碳酸钙方解石骨骼进行分析后显示，骨骼内存在有序的球形微结构排列，这些微结构具有双透镜的特性，见图 1.4。光学刻蚀实验证明微结构透镜可将可见光聚焦到神经中枢系统，该神经束被认为是主要的光受体。通过构筑方解石单晶的上下表面和单晶取向，最大程度上减小相差以及双折射，微透镜达到了智能化的排列设计。此外，透镜排列是从角度选择为 10°的方向探测光线，而发光系统也通过调节到达光受体的光通量，以适应此角度选择系统。这是多么精巧的生物系统啊！

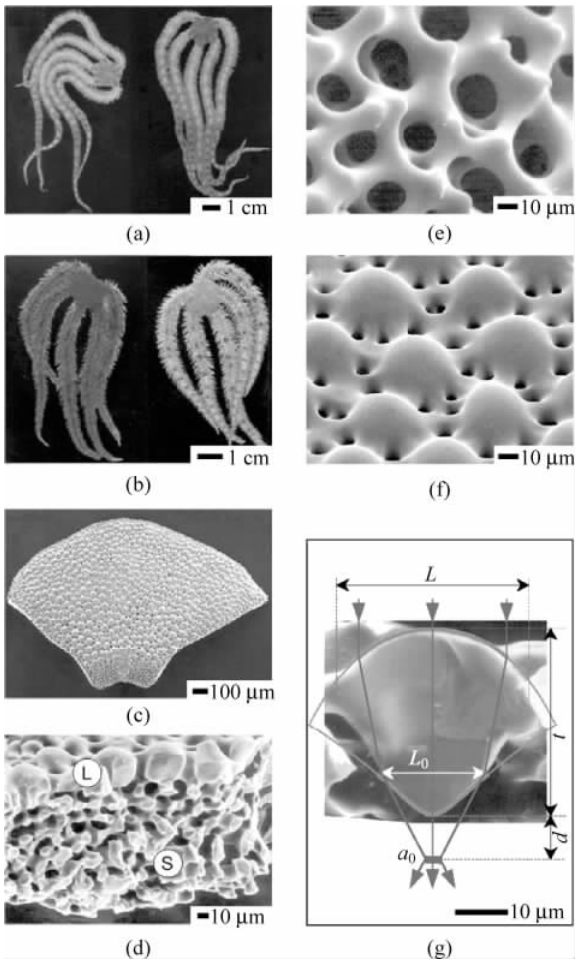


图 1.4　海蛇尾的外貌和支架结构

(a) 对光不敏感物种 ophiocoma pumila 白天(左)和夜间(右)没有颜色变化；(b) 对光敏感物种 ophiocoma wendtii 白天(左)和夜间(右)有显著的颜色变化；(c) 清除了有机组织的海蛇尾的背腕板(DAP)扫描图像；(d) DAP 的横截面扫描图像显示典型的方解石结构(S)和外层的透镜结构(L)；(e) ophiocoma pumila 的 DAP 外围层的扫描图像表明其没有透镜结构；(f) ophiocoma wendtii 的 DPA 外围层的扫描图像表明其具有透镜结构；(g) ophiocoma wendtii 中单个镜头横截面的高分辨扫描图[12]

1.1.2　磷酸钙

生物矿化中最常见的是磷酸钙类，这些不同形式的磷酸钙与矿物中对应的磷酸钙基本相同。最常见的是磷灰石类，其代表为羟基磷灰石(hydroxylapatite，$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$，HA)，以下简称 HA，它的氢氧根被氟

离子取代,会形成氟磷灰石($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$)。骨和牙由磷酸钙组成,存在形式为 HA 与大量蛋白质共存。生物 HA 的结构非常复杂,多数情况下矿物的成分不纯,钙离子经常缺少,造成各元素非化学计量比,且碳酸根离子在各种晶格位点替代磷酸根离子,这一点造成这样一个事实:尽管我们习惯称骨的矿物质为 HA,而实际上它更多的是碳酸磷灰石。除羟基磷灰石之外,磷酸钙类还包括磷酸八钙(octacalcium phosphate,$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$, OCP)、磷酸三钙(tricalcium phosphate,β-$Ca_3(PO_4)_2$, β-TCP)、二水磷酸氢钙(brushite, calcium phosphate dihydrate,$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, DCPD)等,不同的结构主要来源于钙磷的摩尔比以及 PO_4^{3-} 质子化、Ca^{2+} 的羟基化的不同。这些不同的结构在不同条件下形成,且能互相转化(见图 1.5)[6]。非晶磷酸钙则主要在骨和软骨矿化的早期阶段出现。

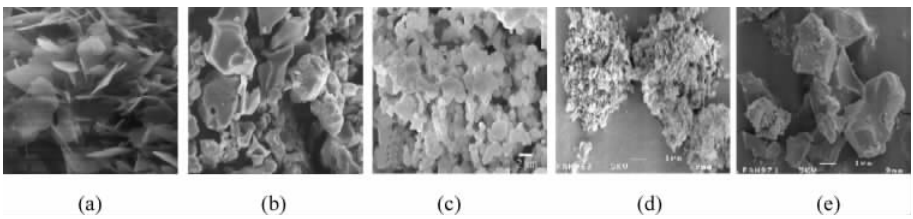


图 1.5　几种磷酸钙的形貌

(a) 磷酸八钙(OCP):室温下 PH6 的过饱和溶液中结晶,晶体在空气中干燥,得到 Ca/P 为 1.32 的 OCP 晶体[13];(b) α-磷酸三钙(α-TCP):将磷酸氢铵和碳酸钙在 1150℃下混合,2 h 后得到 α-TCP 晶体[14];(c) β-磷酸三钙(β-TCP):从日本 Taihei Chemical Industries 购买[15];(d) 羟基磷灰石(HA):未烧结,由纳米晶体组成的近球体[16];(e) 羟基磷灰石(HA):烧结,形成光滑表面[16]

骨骼作为一个典型的例子,最能反映无机物和生物无机物之间的巨大差别。骨骼中的磷酸钙——羟基磷灰石被认为是一种“活矿物”,因为它在内部信号(如怀孕期间)和外部力场(如重力)的作用下不断地生长、溶解、重构。骨骼的力学性能表明矿物不仅起结构支撑作用,而且能为保持体内平衡储存钙,并且在机体需要时提供钙。

骨骼的非化学计量性质造成这种钙化组织有压电反应。尽管准确的机理还不清楚,但压力刺激对骨骼矿物生长的作用早已为人所知[17]。骨含有一个分布在矿化结构中的细胞网,并且通过孔和管道相互连接。关于骨骼受压生长的一种可能解释是,这些骨细胞作为生物的“应力测量器”,对于压力的变化做出反应,对骨表面激发出化学或者电化学信号,激活另一套称为成骨细胞的细胞系统开始矿化过程。这套激活过程相当复杂,因为还存在另一类称为破骨细胞的细胞系统,它的任务是降解骨,它也对信号有反应。总之,这

一过程难以想象的复杂，由大量生物化学触发剂（如血液中循环的荷尔蒙）控制，而且包含多种形式的反馈。

同骨骼类似，牙釉质的结构和组织也源于一种高度复杂的设计系统，以便能适应各种特殊类型的应力[18]。牙釉质的组织很独特，包含长丝带状的羟基磷灰石晶体，在成熟组织中占了很大的质量分数（95%，骨中占 65%）。晶体生长及牙齿成熟的过程是通过对有机组元的消耗来完成的。非常有意思的是，牙釉质初始的蛋白质含量很高，主要成分是成釉蛋白。在牙釉质形成过程中，随着矿物的成熟，蛋白质量减少，于是得到高矿物含量的牙釉质。位于内部的牙本质含有胶原，其结构和成分比牙釉质更类似于骨。齿科的保健是当今生活的重要问题之一，氟离子似乎在这一过程中起到重要的作用。许多地区在齿科健康方面不断提高，主要是由于在饮用水和牙膏中使用氟。氟离子可以进入羟基磷灰石晶格，进一步地稳定晶格，降低矿物相的溶解度，从而起到保护牙齿的效果。有趣的是，鱼牙的结构非常类似于牙釉质，但含有更多的氟，例如鲨鱼牙中氟的含量是人类牙釉质中的 1 000 多倍。

在生物系统中还形成有限的草酸钙和硫酸钙。在许多植物中形成单水合草酸盐和双水合草酸盐，起着防虫，支撑和储存钙的作用。人体的泌尿系结石的主要成分为一水合草酸钙、二水合草酸钙和尿酸，也含有一定比例的三水草酸钙、羟基磷灰石、磷酸三钙、磷酸八钙、磷酸镁铵、尿酸钙和 L-胱氨酸等。这些晶体物质因晶体形态、物相和微观结构的不同，又以不同的物质形式出现，因而结石的种类共计有 20 种以上。硫酸钙的沉积是植物代谢，储钙和储硫的一种有效手段，在海蜇幼体中，则起着平衡的作用。

1.1.3　氧化铁与硫化铁

1.1.3.1　氧化铁类

在全世界的河流和池塘中都有一种令人惊异的小虫在地球磁场的操纵之中，即磁性细菌。这些磁性细菌体内有一个指南针，由不连续的晶体链组成。晶体是混合价化合物磁铁（Fe_3O_4）（图 1.6），晶体沿着地球磁场力的方向排列成链。科学家只需要一个小磁棒作为诱饵，就可在地球的淡水和海水中喂养这些磁性细菌。除了在地球的南北极之外，这些磁性细菌在北半球只需指南针朝北即可向下航行；北半球发现的这种动物种类同样存在于南半球，具有类似的磁性晶

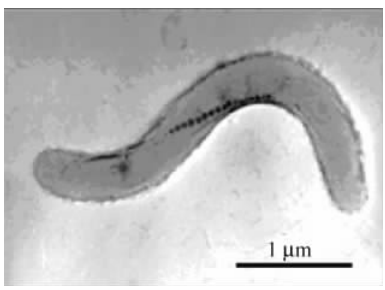


图 1.6　具有趋磁性细菌中的磁铁晶体的线性链结构[19]

体但是相反的磁极,只需指南针朝南,同样也可实现向下航行[19]。

上述磁性细菌中的 Fe_3O_4 是生物铁氧化物的一个突出代表。事实上,生物铁氧化物广泛分布,并且在生物体内起着不同的作用。生物铁氧化物常作为重要的无机补充物用于催化剂和磁性介质等方面,特别是化合物 Fe_3O_4 与生物体关系密切,研究表明在磁性细菌的活动中包含着大量分离的有取向的小晶体的合成,而这一过程包含 Fe_3O_4 的合成[20]。

在已知的磁性细菌中,磁性晶体不仅排成链状,而且具有与单磁畴相匹配的尺寸,否则系统就不能有效地作用。晶体的磁性取决于它们的形状和大小,假如它们是立方体,并且尺寸小于 5 nm,那么由于粒子尺度太小就不能保持永久磁偶极。主要原因在于如此小的粒子拥有很大的比表面积,自然的结果就是大量铁原子在不稳定的表面聚集,原子的热震动使得排列好的原子旋转沿着晶格的不同方向偏转,进而改变磁极的取向。如果温度降低,或者引入一个强场,这种磁偶极的热混合磁场就会继承一个单一方向,称为超顺磁。假如粒子尺寸大于 5 nm,或者粒子形状变成柱状,因为表面原子的相对数量降低,磁场就可以继承唯一的永久磁化方向,称为磁化轴。这是一种理想状态,单位体积上具有最大的磁。假如立方体粒子变得更大,比如大于 10 nm,单磁粒子就会分成几个反平行的磁畴。细菌中的磁体全部都控制在一个严格的尺寸范围内,保持永久单磁畴[21]。

其他铁氧化物,如针铁矿和纤铁矿,沉积在一些软体动物的牙齿中。例如,普通的笠贝牙齿像锈色的马刀,其中就含有针铁矿;石鳖的牙齿因为含有纤铁矿和磁铁矿而表现出磁性。另一种重要的分布很广的铁氧化物是氢氧化铁,它是一种褐色的胶状沉淀,能够储存蛋白——铁蛋白,构成一个由蛋白外壳包着的尺度约为 5 nm 的无机核心,这样就避免了生物体中的无机物生锈等各种问题,同时为不稳定的铁提供细胞的保护,避免各种有害的影响。铁蛋白在合成血红蛋白的过程中起着重要的作用。不同于前面介绍过的铁氧化物,氢氧化铁是一种具有较高溶解度的无序材料,可适于储铁,针铁矿和纤铁矿这类热力学很稳定的氧化物则不具有这种功能。

另一种重要的铁氧化物称为水铁矿(ferrihydrite,$5Fe_2O_3 \cdot 9H_2O$),它是棕色的凝胶状析出物,向试管中的铁离子溶液中加入氢氧化钠,可以生成这种物质。储存铁的蛋白称为铁蛋白,含有大约 30%(质量分数)铁。在铁蛋白中铁以尺度为 5 nm 的水铁矿形式存在,周围由多肽包围。每个无机粒子都是在预先形成的空多肽壳中通过一个特殊的化学过程合成的,这一过程不仅提供高达 4 500 个铁原子的铁的储存,而且也产生非聚合纳米粒子的溶胶。铁蛋白是铁氧化物的一种可溶解的形式,可被输送到不同的位置。有几种病,例如 β-重型地中海贫血(贝类动物),就与储存和输送铁以及铁的过剩有

关。一般来说铁蛋白中的铁是稳定的，并可作为缓冲剂调解自由铁的浓度。铁蛋白在中性 pH 值条件下储存铁，在弱酸条件下如 pH 值为 5.5 时释放铁。释放的铁用于其他生化过程，例如合成血红蛋白。

生物过程产生的水铁矿的结构和成分都是可变的，例如马脾脏铁蛋白的矿物核心是相对有序的单晶体，可以大量工业化生产，其中含有少量的无机磷；与此相反，细菌中的铁蛋白核心是非晶体，磷含量几乎与铁相等。这些成分上的不同也造成铁蛋白矿物核心的磁性能不同。磁性受尺寸和形状的影响极大，水铁矿属于反铁磁性氧化物，其磁性亚晶体完美地排列，使得总磁矩为零。事实上铁蛋白磁芯显示超铁磁性，来源于大量非饱和的表面原子的非补偿性旋转。通过铁的穆斯堡尔谱研究表明，铁蛋白纳米粒子的高磷含量和非晶体结构是这种蛋白质中无磁性的原因。

近期的研究还在蠕虫颚部发现了铜的存在[22]。活体 Glycera 蠕虫从马萨诸塞州的海洋生物实验室获得，下颚取自冷冻后的蠕虫，在图 1.7 中左下角直线标注的平面做含铜矿物的形貌分析。图 1.7 为显微镜下蠕虫颚部的照片，下颚锋利的尖端用于刺入猎物的皮肤并注射毒液。

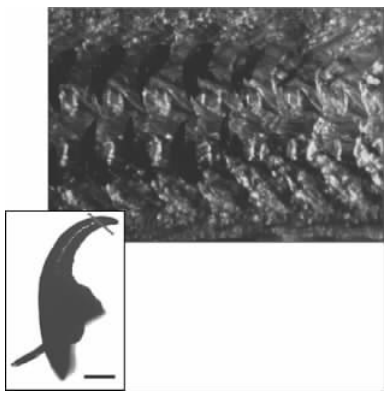


图 1.7　蠕虫颚部发现的生物矿物——铜（标尺 0.2 mm）[22]

牡蛎，例如笠贝和石鳖，一旦涨潮就用一个被称为齿舌的像舌头一样的器官把海藻从岩石上刮下来。笠贝的齿舌约 7 cm 长，几毫米宽，包含有几百个牙齿。齿舌的一边从嘴里伸出来，用完全成熟的牙齿把海藻和其他有机物从岩石上刮下来。因为海藻在岩石上长得非常结实，牙齿必须又硬又韧。笠贝和石鳖的牙齿类似马刀，牙齿的前边含有各种铁氧化物晶体，后边分别是硅石和羟基磷灰石，这样的设计获得了可观的机械性能。不过笠贝和石鳖的牙齿还是有区别的：笠贝中的矿物相一般是针铁矿，而石鳖牙是纤铁矿与磁铁矿的混合，所以石鳖的牙是磁性的，可以用一根小磁棒吸起来，而不沾染有机物。

1.1.3.2　硫化铁类

生命系统中有机硫化铁矿物的生成，最近才为人们所考虑，许多硫化铁矿物都和降硫细菌相关。大多数产物是随机形成的，或者是新陈代谢产物，如 H_2S 与周围环境中的 Fe^{3+} 反应生成硫化铁。然而近来的研究表明，某些种类的磁性细菌在富硫环境中能合成磁铁矿晶体（Fe_3S_4），包括窄条状的分散分

布的单晶体。这些晶体的形貌很特别,往往是链状排列。显然,这些过程受严格的生物学控制。而且因为在地球的早期历史中,硫化作用比氧化作用更重要,所以在细菌的细胞内形成硫化物可能代表了一种古老的过程,即无机材料适应特定环境的生物功能。

1.1.4 硅石类

虽然大多数生物矿物是离子盐类,但许多单细胞生物产生非晶硅结构,其中硅藻和放射虫壳最为著名,它们构造了精美的带状多孔壳和微骨骼,那么这些复杂的形状是如何形成的?

一些藻类、海绵等都具有以硅酸为基本成分的矿化结构,某些植物的纤维也含硅酸矿物。二氧化硅及其水合物(通常称为硅酸)有晶体和无定型两大类。与表 1.1 描述的其他生物无机物不同,生物中的硅往往处于非晶形态,包括溶胶、凝胶等形式。这些无定型硅石有别于玻璃态,生物体内的硅石颗粒极小(直径小于 50 Å),被塑造成各种形式,像硅藻一样的许多单胞有机体以这种生物矿物为骨骼。某些植物,如马尾草中含硅量极高,硅占了干重的 20%~25%,这种干植物类似于砂纸,早期美洲人把它作为一种特效的刷牙工具。类似的高硅含量也在稻米壳中发现,现在这些稻米壳已经被当作生产氮化硅的便宜的原材料。

非晶硅在生物体中的存在提出了一个重要的问题:为什么某些有机物使用非晶硅而不是晶体矿物(如碳酸钙)作为结构材料?关于这一问题目前尚没有清楚的认识。一种可能的原因是由于晶体易于发生断裂和解理面导致的破坏,而非晶生物矿物可以不降低强度地模压成各种形状[6]。Si—O—Si 单元在水中的高稳定性和 Si—O—Si 键角的变化性是在温和条件下非有序结构而不是晶体结构析出的原因。石英晶体的析出需要更高的温度,石英砂与岩石不同,不是生物的产物。硅石与离子矿物如碳酸钙、磷酸钙的结晶还有许多不同之处。在中性 pH 值条件下,硅石的可溶性形式是硅酸 $Si(OH)_4$,它是 pH 为 9.8 的弱酸。浓度大于 1 mmol/L 时,硅酸会经历一系列聚合反应产生非晶凝胶或者胶体粒子。然而由于海水对于硅的沉积是非过饱和的,有机物必须采用特殊的机理从周围环境中吸收、集中和聚合硅酸。所得到的无定形硅酸具有共价结合的聚合物网状结构,中心是自由排列的 Si—O 四面体,周围是变化的羟基化学团。这种排列从密集的—O_3SiO—中心(称为 Q4),到部分密集的—O_3SiOH(Q3)、—$O_2Si(OH)_2$(Q2)和—$OSi(OH)_3$(Q1)中心,得到一种具有统一的成分($[SiO_{n/2}(OH)_{4-n}]_m$,$n=1\sim4$)的复杂的含水材料。这些相的相对比例由固态 ^{29}Si NMR 谱确定,在不同的硅石矿物中比例可以不同。

虽然硅石矿物在分子水平上是无定形的，但它继承了如凝胶，或者是由胶体粒子组成的致密的聚集体的特殊的微结构。这些结构反映了当聚合过程进行时，最初形成的小粒子的聚集和溶解的程度上的差别。在 pH 值为中性和碱性的纯溶液中，初级粒子带少量负电，因此聚合程度由内部建立的静电荷限制，产生一些特殊的结构。这种精确的有选择的粒子排列取决于有机基质指导的沿着特殊方向的聚集过程。例如，植物中的硅有 3 种不同的形态：纤维状，片状和粒状，与不同的大分子有关。凝胶结构是用存在于周围环境中的阳离子和带正电的聚电介质去中和初级粒子表面的负电荷而形成的。

1.2　几种典型的天然生物矿物

1.2.1　贝壳的结构与高韧性

在绝大多数主要非脊椎动物中都发现了钙化组织，其中最简单、最具代表性的是珍珠和贝壳。作为一种典型的天然生物矿化材料，其构成含有令人类佩服的特殊组装方式，因而具有强韧性的最佳配合，对其结构和性能的研究将指导仿生材料的研制。长期以来，科研工作者对各种贝壳进行了研究[23～25]。表 1.2 列出了自然界中存在的五种主要类型的贝壳材料。不同的

表 1.2　贝壳材料的类型

类型	形状	晶体	蛋白质基体（质量分数）	强度/MPa（括号中为最大值）			刚　度/GPa（右面括号中为实验次数，下面括号中为最大值）	维氏硬度/（kg/mm²）（括号中为实验次数）
				拉伸	压缩	弯曲		
棱柱	多边形柱状	方解石文石	薄层(5 μm)环绕每个棱柱(1%～4%)	60 (60)	250 (300)	140	30(2) (40)	162(1)
珍珠层	平面层状	文石	层间薄片	130 (湿)	380	220	60(湿)	168(8)
			(1%～4%)	167 (干)	(420)	(280)	70(干)	
交叉 叠片	胶合板型层片	文石	超薄 (0.01%～4%)	40 (60)	250 (340)	100 (170)	60(40) (80)	250(9)
簇叶	长薄晶体叠加成形	方解石	超薄 (0.1%～0.3%)	30 (40)	150 (200)	100 (180)	40(6) (60)	110(1)
均匀分布	精细毛石	文石	超薄	30	250	80	60(1)	—

贝壳材料具有不同的成分与结构。

软体动物构建的贝壳具有各种各样的形状和尺寸,但在选择矿物这一点上都非常保守。除了几种古怪的贝壳,如海豆芽中的 HA 之外,所有贝壳都是由纯碳酸钙构成,通常以方解石和文石的形式存在。有意思的是,许多海洋贝类同时含有方解石和文石。但这两种矿物在贝壳中分布于不同的部位。通常贝壳的外层棱柱层,以及生长边缘由方解石大晶体组成,而贝壳的内层珍珠层是由砖墙结构的文石晶体构成的。棱柱层首先形成,珍珠层在贝壳厚度增加时形成。碳酸钙多晶型的控制是由一层紧密排列的细胞,称为上皮细胞来进行的,这层细胞与贝壳内层之间隔着一个液体空间——外套膜空间和液体。但是至于这个过程是如何进行的,我们并不知道。而且由于生物对于多晶型结构的选择性在生物矿化中具有关键意义,因此"方解石-文石"问题是一个亟待解决的关键问题[26]。

一般说来,材料的类型及其排列方式与生物体系统一致。同一个生物家族的钙化组织结构具有相同的排列,有时甚至包括一个超级家族。薄壳趋于由棱柱结构构成,同时还带有珍珠层或簇叶结构。超薄壳往往由交叉叠片结构组成;贝壳可能是最原始的薄壳材料,它实际上由低强度的陶瓷组成,Currey 研究了具有交叉叠片结构的贝壳的强度后指出,贝壳的结构是控制其强度的关键因素。

图 1.8 示出双壳纲贝壳的角质层、棱柱层以及珍珠层的扫描电镜(SEM)以及透射电镜(TEM)观察的典型形貌。贝壳由角质层、棱柱层和珍珠层组成。角质层是贝壳的最外层,很薄,由壳质蛋白构成(图 1.8(a))。棱柱层紧贴于角质层内侧,由垂直于贝壳壳面的极细的棱柱状方解石组成,小棱柱彼此平行,组装成整个棱柱层(图 1.8(a))。从珍珠层横断面的形貌照片(图 1.8(b)) 可以清楚地看到,珍珠层是由一些小平板状结构单元平行累积而成,这些小平板板面平行于贝壳壳面,就像建筑墙壁的砖块一样相互堆砌镶嵌,成层排列,形成整个珍珠层。每层厚度约 50 nm,镶嵌在厚约 30 nm 的蛋白质-多糖有机基质中。有机基质在限制晶体厚度中起关键作用。观察珍珠层层面,发现这些小平板的板面是很不规则的多边形,如图 1.8(c) 所示。珍珠层是贝壳内面的一层,主要由文石结晶组成。珍珠层中文石晶体的形状、尺寸比较均匀,通常为多角片形,六边形居多,晶片厚度为 0.25～0.99 μm,片尺寸约为 2～3 μm[27]。

珍珠及珍珠层由文石晶体与有机基质构成。无机相约占 95%,有机基质由三种生物大分子组成:①不可溶的多糖几丁质,呈 β 折叠片结构;②一种富甘氨酸和丙氨酸的不可溶蛋白质,具有反平行 β 折叠片结构,其 X 射线衍射谱与丝纤维相似;③一种富天冬氨酸等酸性氨基酸的可溶蛋白,同样是 β 折

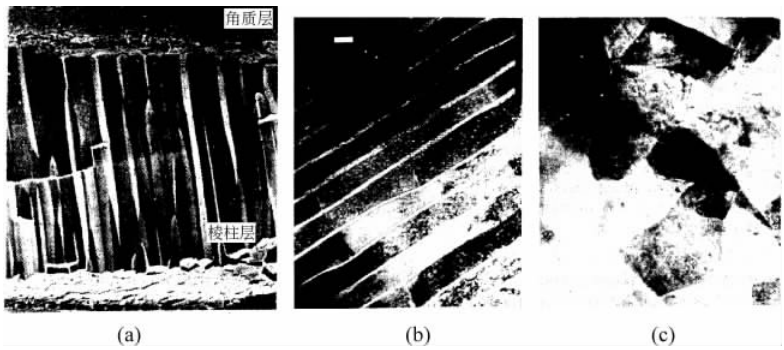


图　1.8

(a) 贝壳角质层、棱柱层的 SEM 形貌；(b) 贝壳珍珠层横断面的 TEM 形貌；(c) 贝壳珍珠层层面的 TEM 形貌[27]

叠片结构。生物矿化过程中，酸性蛋白质对无机矿物的形成起至关重要的作用，其中的酸性侧链与钙离子有强烈的亲合作用，从而成为矿物晶体的形成核心[7]。

贝壳珍珠层最突出的力学性能就是它的高韧性，因此珍珠层的韧化机制及其对材料设计制备的指导作用值得深入研究。在绝大多数情况下，裂纹是在有机层中扩展的，据此可以认为，有机基质在贝壳力学性能设计中具有结构上的重要性。它减少了贝壳壁上孔的数量，因而阻止了裂纹的传播。通过消耗能量，使缺陷沿着有机层扩展，而不是穿过无机晶体。这使得珍珠层的韧性大约是天然文石的 3 000 倍。

根据前述裂纹扩展实验以及裂纹形貌观察结果，贝壳珍珠层中存在三种主要韧化机制，它们分别是：裂纹偏转、纤维拔出以及有机基质桥接(图 1.9)[28]。

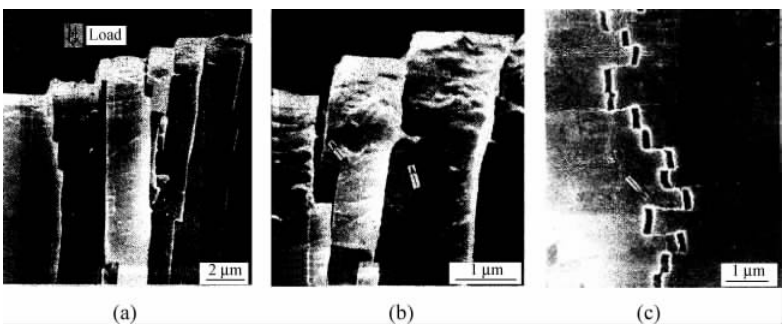


图 1.9　　珍珠层的塑性变形方式[28]

(1) 裂纹偏转

裂纹偏转是珍珠层中最常见的一种裂纹扩展现象，尤其当裂纹垂直于文

石层扩展时,这一现象最为明显。图 1.9(c)中,裂纹首先沿着文石层间的有机层扩展一段距离,然后发生偏转,穿过文石层,再二次偏转进入与之平行的另一有机层。这种裂纹的频繁偏转必然导致材料韧化。主要有两个原因:首先,与直线扩展相比,裂纹的频繁偏转造成扩展途径的延长,从而吸收的断裂功增加;其次,当裂纹从一个应力状态有利的方向转向另一个应力状态不利的方向扩展时,将导致扩展阻力的明显增加,从而引起外力增加,材料因而韧化。

(2) 纤维拔出

纤维拔出通常与裂纹偏转同时存在。在珍珠层中,"纤维"指的是文石晶片。裂纹穿过有机层后,上下两层晶片仍保持紧密接触。此时,有机相与文石层的结合力与摩擦力将阻止晶片的拔出,从而增加扩展的阻力和材料的韧性(见图 1.9(a))。

(3) 有机基质桥接

前面已经提到(图 1.9(b)),珍珠层发生变形与断裂时,文石层间的有机基质发生塑性变形且与相邻晶片粘结良好,这是珍珠层中的一种普遍现象,表明生物大分子与文石晶片间具有较强的结合晶面,因此这种现象在韧化过程中的作用是不容忽视的。首先它提高了相邻晶片间的滑移阻力,因此强化了"纤维拔出"韧化机制的作用;另外发生塑变仍与文石晶片保持良好结合的有机层在相互分离的晶片间起到桥接作用,从而降低了裂纹尖端的应力场强度因子,增加了裂纹扩展阻力并提高韧性。在此,我们称这种韧化机制为有机基质桥接。

在上述 3 种韧化机制中,第三种机制即有机基质桥接,是珍珠层这种材料所特有的。从以上分析可知,贝壳珍珠层这种生物复合材料具有高韧性的主要原因是由于裂纹偏转、纤维拔出以及有机基质桥接等多种韧化机制协同作用的结果。而这些韧化机制又与珍珠层的特殊组成、结构密切相关[29]。

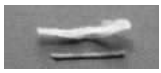
虽然自然界的生物体是利用极其普通的陶瓷材料(碳酸钙或磷酸钙等)来构成其承力的硬组织的,但它们能使所获得的材料,无论是由单晶还是多晶构成,均具有极好的强韧性配合。究其根本原因,是生物体利用其自身对于材料构筑中的强大控制能力,通过细胞的调制作用,在无机矿物内或者矿物晶体间有规律地嵌入生物高分子。虽然其比例很小,但从根本上改变了材料的断裂特性,从而大大提高了韧性。自然界生物材料的这种形成过程与组成、结构机理,对于现代材料的设计和制备无疑是一个重要的启发[30]。

1.2.2 鱼耳石

耳石(otolith)是存在于硬骨鱼类内耳(inner ear)的膜迷路(membrane

labyrinth)内，主要由碳酸钙构成，起平衡和听觉作用的硬组织，内耳的椭圆囊(utriculus)、球囊(sacculus)和听壶(lagena)中分别具有微耳石(lapillus)、矢耳石(sagittae) 和星耳石(asteriscus)各一对(表 1.3)。

表 1.3　鲤鱼耳石的形貌及矿物学特征表[31]

耳石中文名称	耳石图片	耳石位置	形状	物理性质
星状耳石(asteriscus)		听壶(lagena)	似桃心形 分左型和右型	无色、白色，透明、半透明，油脂、玻璃光泽，硬度 2.5～5.5，性脆
矢耳石(sagittae)		球囊(sacculus)	似针状 分左型和右型	
微耳石(lapillus)		椭圆囊(utriculus)	似矩形 分左型和右型	

1971 年，Pannella[32] 观察到银无须鳕耳石上日轮的存在，并将其简单地分为快生长带和慢生长带。1985 年，Campana 等人[33] 认为耳石日生长轮由增长带(incremental zone)和间歇带(discontinuous zone)组成，前者宽而透明，主要成分是碳酸钙；后者窄且不透明，主要成分为有机质。近期研究显示，耳石中的有机质是一种含 OSM(EDAT 可溶性基质)的网日状纤维物质。

耳石经打磨后，透射光下可见透明区和半透明区，反射光下，前者为暗带，后者为明带。暗带较宽(第一环除外)，形成时间长，对应于沟所在的位置；明带较窄，形成时间短，对应于脊所在的位置(图 1.10)，一般以明带作为耳石的年龄标志。

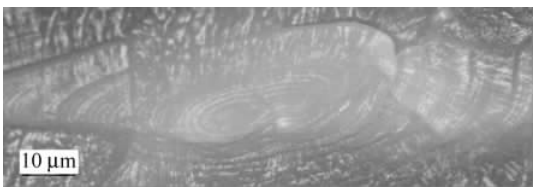


图 1.10　淡水鲤鱼微耳石日轮的显微照片

通过扫描电镜观察，发现年轮为一条、两条或几条挤在一起的较深的沟环。耳石上也存在副轮，副轮通常由几条不闭合的沟环组成，副轮的沟环比年轮的浅。

耳石核的中心是耳石原基，称之为中心原基。大多数鱼类的耳石只有一

个原基,有的鱼类的耳石除一个中心原基外,还有多个附属原基,如三棘刺鱼、罗非鱼等。日生长带在附属原基外围处同时围绕原基与附属原基,具有增宽现象;附属原基形成的机制尚不清楚,一般认为其形成与鱼体和耳石发育的变态有关。耳石的中心核由碳酸钙的不定形体组成,其外部分则由碳酸钙的针状文石晶体规则排列而成。

Campana 等[34] 1997 年组织 4 个国家 12 所大学和研究所共同测量了细须石首鱼的耳石元素组成,其中 96.2%的耳石质量由 $CaCO_3$ 组成,0.7%为痕量元素构成,余下的 3.1%为有机质。现已发现,耳石中含有钙、铝、锶、铁、钠、钾、氯、氮、硫等多种化学元素。

鱼类在与外界环境进行物质交换的过程中,环境中的化学元素不断被摄入鱼体,在鱼体内经过一系列的代谢、循环,最终沉积到耳石上。鱼类耳石的结构与组成相当稳定,可能反映鱼类的生长情况及一生所经历的环境变化。关于耳石中化学元素的沉积规律,前人作过较多的研究。海淡水洄游性鱼类从海水进入淡水或从淡水进入海水后,耳石中 Ca、Sr 等元素的沉积量会有明显的变化,生活在淡水各水体的大西洋鳟耳石中的锶含量在个体间的变化依赖于水体中该元素的含量的变化。因而,一般认为耳石各部分元素沉积量与环境中该元素的可利用率以及水化学特性等有关。此外,耳石中化学元素的沉积是一个生理过程,与环境温度关系密切。所以,很多学者认为分析耳石中化学元素的沉积规律有助于鱼类生活史的研究,甚至通过耳石中化学元素的分析来研究水域的污染度。

目前国内外正在积极开展对鱼耳石生物矿化的研究。Tomas 等[35] 对不同水域多种鱼类耳石的微结构和日轮形貌进行了观察。巴黎大学对海鱼耳石中的可溶蛋白进行分析,表明其中既含多糖又含蛋白质成分,其相对分子质量在很大范围内变化,其中多糖的酸性高于蛋白质。东京大学的 Murayama 识别了斑马鱼耳石中的 Otolin-1 和 OMP-1 两种蛋白[36],认为耳石矿化的过程主要是 OMP-1、Otolin-1 以及 starmark 相互作用并调制碳酸钙形核生长的过程。英国利物浦大学研究青鱼耳石的球文石与文石中的可溶基质后发现,球文石型耳石中的蛋白质浓度高于文石型耳石,认为半透明球文石的出现可能是由于不可溶蛋白所引起。德国 Stuttgart-Hohenheim 大学用激光扫描显微镜发现钙离子首先沉积在耳囊内感官上皮细胞和耳石膜周围,证明耳石的矿化与感官上皮细胞有密切关系。

清华大学材料系生物材料研究组[37] 对鲤鱼耳石的成分、形貌、晶型及分级结构进行了研究。红外、拉曼、X 射线结果证明,鲤鱼耳石中微耳石及矢耳石的矿物成分为文石,星耳石的矿物成分为球文石,这使其成为研究天然球文石的良好取材。利用弱酸和 EDTA 腐蚀的方法得到了耳石更加清晰的日

轮形貌图片(图 1.11(a)),这是研究鱼类生命活动周期、鱼类生长时段元素富集、耳石矿物结构的基础。此外对鲤鱼耳石的扫描电镜观察还得到了鲤鱼耳石的内部结构有规律的分级结构的信息(图 1.11(b))。体外矿化模拟是研究生物矿化的直接而有效的手段,利用耳石的新鲜自然断面进行碳酸钙的矿化模拟,结果显示在微耳石表面得到了针状的文石晶体,在星耳石表面得到了碟状的球文石晶体,证明耳石中所含有的有机质对于碳酸钙沉积物的晶型具有调控作用(图 1.12)。

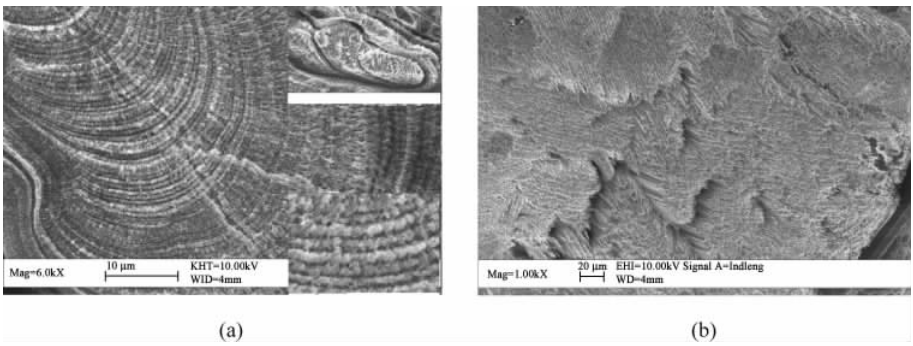


图 1.11　鲤鱼耳石的 SEM 形貌[37]

(a) 耳石的日轮结构;(b) 层内结构

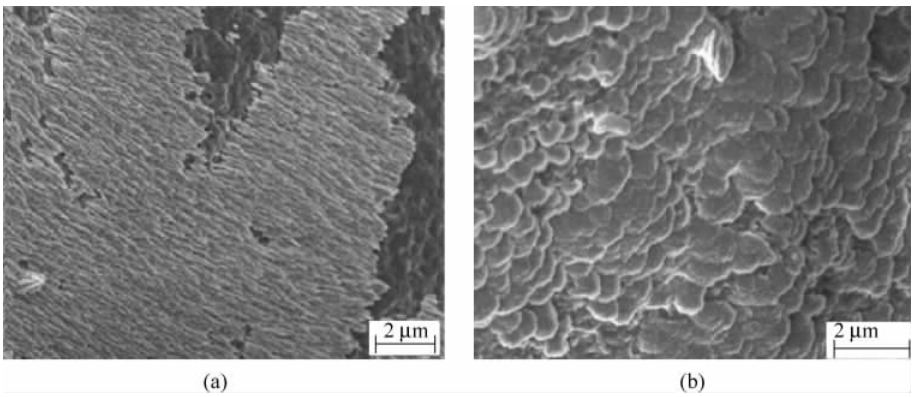


图 1.12　以耳石的新鲜断面为基体模拟体外矿化[37]

(a) 微耳石表面生长的文石晶体;(b) 星耳石表面生长的球文石晶体

1.2.3　骨

骨骼主要有松质骨和密质骨两种。图 1.13 是长骨结构的示意图,两端称为骨骺,由松质骨构成,中间称为骨干,由密质骨构成。密质骨的结构单位是

哈佛氏系统,图 1.13 所示为其横截面。纵截面为矿化胶原纤维的取向排列。松质骨的结构为三维的骨小梁框架。骨是最复杂的生物矿化系统之一,其无机成分主要是羟基磷灰石和碳酸磷灰石等,约占总质量的 65%;有机成分主要是Ⅰ型胶原纤维,约占总重量的 34%;其余为水[38]。

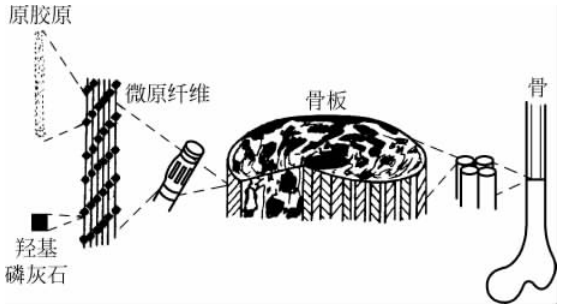


图 1.13 长骨的分级结构示意图[39]

1.2.3.1 骨中矿物相

骨具有最复杂的无机体系——磷酸钙系统。其复杂性主要体现在:

(1) 骨中的无机相具有多型性。骨中最主要的无机相是羟基磷灰石(HA),但含有 CO_3^{2-}、Cl^-、F^-、Na^+、Mg^{2+} 等杂质离子,其中 CO_3^{2-} 的含量较高。CO_3^{2-} 可取代 OH^- 或 PO_4^{3-} 的位置而形成 α 型或 β 型碳酸磷灰石(CHA)。一般骨中这两相同时存在。此外,骨中还存在非晶磷酸钙(ACP)、磷酸八钙(OCP)、二水磷酸氢钙(DCPD)、磷酸氢钙(DCP)和六方碳酸钙等多种矿物相,它们被认为是作为磷灰石的前体相而存在[12]。有关的演变机制包括:①先形成 ACP,然后转化为 OCP,最后变成 HA;②先形成 DCPD,然后转化成 HA;③先形成结晶不好的 HA,再逐渐成熟。

(2) 磷酸钙体系各个相之间具有非常接近的晶体衍射峰,为相的鉴别带来困难。磷酸钙盐的主要结晶形式有羟基磷灰石(HA):$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$,六方结构;磷酸八钙(OCP):$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$,三斜结构;二水磷酸氢钙(DCPD):$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$,单斜结构;磷酸三钙(TCP):$Ca_3(PO_4)_2$,单斜结构。

1.2.3.2 皮质骨的结构

任何结构的骨以任何方式结合,其构造都优于含有饱和胶原纤维的矿物质,原因在于骨具有复杂的分级结构。骨骼的机械性能源于其结构,羟基磷灰石(通常是含碳的磷灰石)在胶原纤维、蛋白多糖和许多其他蛋白基体上形成[38]。矿化的初始位置在胶原分子的间隙,这种片状晶体的晶体学取向与有

机基质取向有关。近年的观察表明，这种晶体往往沿着胶原纤维呈平行排列，这种组织形式和邻近的胶原纤维一致，导致长程有序，这种组织结构使得骨骼具有不寻常的断裂性能。哺乳动物的骨的结构明显地影响骨的机械性能。矿化纤维的密度以及排列控制应变的方向和大小，以及应变在骨中的传播方式。人类的肩胛骨的中子衍射研究表明，羟基磷灰石晶体的 c 轴优先位于沿着所结合在一起的肌肉的拉伸方向。在某些区域，两块肌肉作用于不同的方向，发现晶体的位向分成两组，分别相应于两块肌肉的拉伸方向。尽管仍存在关于骨形态的不同意见，但是以下论点是被普遍接受的。

纤维以两种主要方式排列：①层状排列，相互之间建立择优取向（层状骨）；②具有或多或少的随机性（松质骨）。

层状骨可以在一个平面上连成片（初级平面骨），或者像木细胞一样成为柱状（哈佛氏骨），或者与松质骨混合（层状骨）。所有类型的骨结构都是以致密骨形式存在。另外还发现，在长骨的中心和边缘具有更多的织构，而在脊椎动物中仅发现层状骨（初级层状骨或哈佛氏骨）。

哈佛氏骨是人类骨骼中最常见的骨，并普遍存在于其他脊椎动物中，它是在骨已大量钙化以后才形成的，在这个意义上讲它是替代骨。因此柱状单元相对于哈佛氏骨骨板，严格来讲是二次骨板。骨板的中间流动着血管。骨由骨细胞沉积而成，骨细胞位于纤维的中心层且以此为中心形成放射状，一般认为纤维的方向是不连续的，因此在一层与另一层之间在方向上存在一个尖锐的边界。为此人们假设了另外一种模型，其中方向的转换是逐渐的，这一模型肯定了 Bonligand 提出的“螺旋形”方向模型。整个环状层、细胞以及血管称为哈佛氏系统，附加的系统以结合线为界，钙化的蛋白聚糖的鞘明显地缺少胶原，如此形成的骨板可能是整个哈佛氏骨的基本力学单元，同样木质部细胞是木头的基本力学单元。骨板的不同点在于它可能被分成不同种类，但通常都沿着骨的长轴方向分布。

1.2.4　牙

在脊椎动物的其他主要生物矿物中，如牙齿，极少出现高的拉伸力，因此牙齿应该具有硬的表面，用于咬切和咀嚼；它应该足够耐用（强韧性），以维持动物的生命。人类的牙齿（图 1.14）是相当基本的生物矿物，具有牙本质以及釉质外壳。牙本质与骨在各种成分上都类似表 1.4，釉质含有更多的矿物。牙本质类似骨，它的结构比骨更均匀一致，但晶体更细，约 2 nm×50 nm×25 nm。牙本质充满了细管，细管由高钙化区包围，位于自由取向的晶体基体上，而晶体镶嵌在黏多糖和胶原中，胶原为片状，其位向平行于牙质的表面[40]。

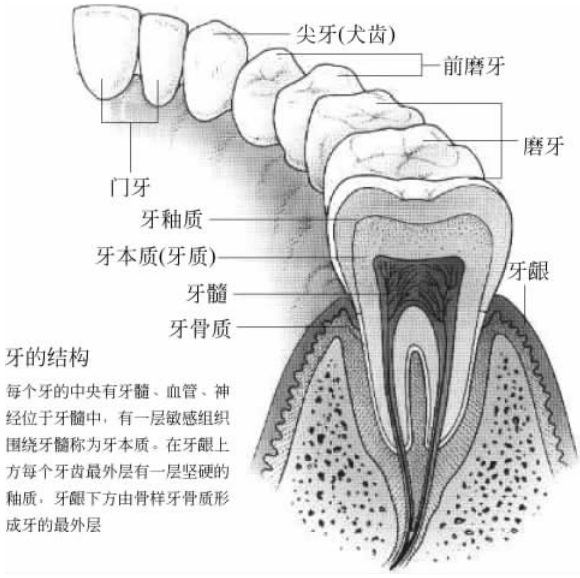


图 1.14　人的牙齿结构示意图[41]

表 1.4　骨、牙本质和釉质的成分比较

	骨	牙本质	釉　质
矿物	66%	70%	95%
有机物	24%	20%	0.5%
水	10%	10%	4.51%

牙釉质覆盖于牙冠表面，暴露于口腔中，牙釉质是一个高度矿化的系统。牙釉质的总质量的 96%～97%是无机材料，主要是羟基磷灰石，大部分以晶态存在。有机物不足 1%。牙釉质以其不同寻常的化学组成和高度有序的结构成为脊椎动物中最致密的材料。

牙釉质的结构非常复杂，釉质的基本结构是釉柱。釉柱是细长的柱状结构，起于牙本质界，呈放射状贯穿釉质全层，达到牙齿表面。牙釉质的行程并不完全是直线，近表面 1/3 较直，内 2/3 弯曲。釉柱的横断面呈匙孔状，分头部和尾部：头部表面是一弧形清晰的周界，称为柱鞘，相邻釉柱头尾相嵌。柱内晶体长(HA 的 c 轴)160～1 000 nm，截面尺寸分别为 40～90 nm 和 20～30 nm。在头部晶体长轴平行于釉柱长轴，在尾部呈 65°～70°倾斜。有机基质主要是釉蛋白和成釉蛋白。在柱鞘处有机物分布较多，主要是不溶性的釉蛋白，可溶性的成釉蛋白主要分布于晶体间隙。

在新出生的哺乳动物的牙釉质中，条状的碳酸磷灰石晶体长度至少为

100 nm，直径仅为 50 nm，因此每个晶体可以从牙齿表面到达牙本质。如此高的高宽之比允许晶体有一个沿长度方向的弯曲。晶体能够分支和熔断，导致形成具有宽基底的金字塔形状。基底与牙本质相连，在哺乳动物中，这些棒和片的排列有可能是复杂和变化的。在一个距离范围内给出一个复杂的三维的棒的排列形式。低级脊椎动物中排列又是不同的。

釉质中存在两种蛋白质，一种是酸性的釉蛋白，它们与多糖以共价键结合，且趋于继承 β 片的结构，它控制釉质晶体形状，另一种蛋白质是疏水性的。

牙本质与釉质结合在一起，成为 20 MPa、3 000 次/天负载的主要承担者。即使如此，完整牙齿的断裂是非常少见的，这部分是由于釉质的硬度和刚性，部分是由于牙本质的韧性和柔顺性。对于牙本质和釉质的机械性能已有大量的试验研究(表 1.5)。平行于细管的高韧性可能与胶原的方向有关，在这个平面上的裂纹必须穿过胶原层。与此类似，釉质的高韧性可能既与棱柱体之间的弱界面的存在有关，又与裂纹穿棱柱的路径有关。裂纹的穿过将被具有纤维形貌的晶体所阻碍。附加的韧性来自于流体穿过釉质结构的运动，在这个过程中消耗能量。同样对于棱柱，其韧性就是普通陶瓷材料的值，整个牙齿的功能已采用有限元分析的方法进行了计算分析。

表 1.5　牙本质和釉质的性质

	抗压强度 /MPa	刚度 /GPa	维氏硬度 /(kg/mm^2)	断裂面的取向 W_r/(J/m^2)
牙本质	300	12	70	垂直于釉管 270 平行于釉管 550
釉质	200	40～50	300＋	垂直于釉管 200 平行于釉管 13
	330	74～84		

1.2.5　病理结石

钙化现象在人体中广泛存在，其中，骨、牙齿之外的非骨性组织发生钙化，伴有或不伴有组织坏死或损伤，均称为异常钙化。

人们最为熟知的人体内的异常矿化的例子就是结石，特别是泌尿系结石，在我国属于非常常见的疾病。泌尿系结石是指在泌尿管道内的一种固体物质的产生，俗称尿结石或尿石。尿石包括肾结石、输尿管结石和膀胱结石等。泌尿系结石由无机晶体和有机基质两部分组成，其中晶体物质占结石干重的 97%～98%，其主要成分为一水合草酸钙、二水合草酸钙和尿酸，也含有一定比例的三水草酸钙、羟基磷灰石、磷酸三钙、磷酸八钙、磷酸镁铵、尿酸钙

和 L-胱氨酸等。这些晶体物质因晶体形态、物相和微观结构的不同,又以不同的物质形式出现,因而结石的种类共计有 20 种以上。根据尿石的化学性质,尿路结石可分为酸性结石(如尿酸、胱氨酸)、碱性结石(如磷酸铵镁等)和中性结石(如草酸钙等)。此外,不同尿结石的硬度也不同,如草酸钙的摩氏硬度(4～5)≥磷灰石(3～5)＞尿酸(2.5) ＞胱氨酸≈磷酸氢钙≈磷酸铵镁(2.0)。

牙石是无机物和有机物在牙垢上逐渐沉积而成,其中无机物占 70%～90%,主要为羟基磷灰石、碳酸钙等。采用电感耦合等离子体发射光谱对上牙龈和下牙龈结石混合样品进行测试表明,牙石中钙盐(以羟基磷灰石计)为 82.83%,镁盐及其他微量元素(Cu、Al、Fe、Zn、Ti、Mn、Pb 和 Sr)为 7.12%,有机成分为 10.05%,后者包括脱落的上皮细胞、白细胞、多种细菌、碳水化合物、唾液衍生的蛋白质及脂类等。Roberts-Harry 等认为,上牙龈和下牙龈结石存在 4 种类型的晶体:二水磷酸氢钙($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$)、磷酸八钙($Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$)、磷酸钙镁($(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$) 和碳羟基磷灰石($(CaM)_{10}(CO_3,HPO_4,PO_4)_6(OH,X)_2$),其中,M 能够取代 Ca^{2+} 的其他金属离子如 Sr^{2+}、Pb^{2+}、K^+、Na^+ 等;X 为 Cl 或 F。

人体内还有其他一些异常矿化产物,如胆结石、胰腺结石、支气管结石、前列腺结石、肠胃结石等等,其矿化特征和矿化机理详见第 8 章。

1.2.6 象牙

象牙(ivory)作为一种名贵的高级装饰性材料,具有较高的经济价值。近年来国际上不断有禁止捕象的努力,因此研究象牙的结构、成分、性能并试图人工合成象牙成为人们关注的一个问题。清华大学生物材料研究组运用多种分析手段(X 射线分析、XPS、红外吸收谱、TEM、SEM)的研究表明[42～44],象牙由无机物矿物和有机基质组成,它们分别是类羟基磷灰石晶体和胶原纤维,其晶格的一部分格点为镁离子所占据。象牙中无机物晶粒的大小不足 20 nm,并且无机物颗粒与有机物大分子之间存在着特殊的取向关系,即类羟基磷灰石晶体的[001]方向平行于胶原纤维轴,而胶原纤维的择优取向平行于象牙的轴向。研究还发现象牙中的 Ca 与 P 的原子数之比为 1.30∶1,这比羟基磷灰石晶体中相应的比 1.67∶1 小 22%。但是,如果我们进一步计算 Ca、Mg 原子数之和与 P 原子数的比,就会发现这一比例为 1.73∶1,与羟基磷灰石中的理想值只差 3.5%。象牙羟基磷灰石中的钙离子在一定程度上被它的同族元素镁离子所置换,这也是象牙中 Ca 的化学环境比羟基磷灰石晶体中的更为复杂的原因之一。

象牙中大约有 1/3 的质量为有机物,其余 2/3 为无机矿物,这一比例与骨中的结果类似。在象牙径向截面样品的透射电子显微形貌上(图 1.15),我们

看到互相平行排列的胶原纤维成族分布，相邻两簇之间为排列比较混乱的一种更为细密的纤维，两族的间隔大约为 1 μm。胶原纤维上有明暗相间的结构，每一个明暗带的长度约 65 nm。胶原纤维的直径约 50 nm，胶原纤维族之间的细纤维的直径约 6.2 nm。

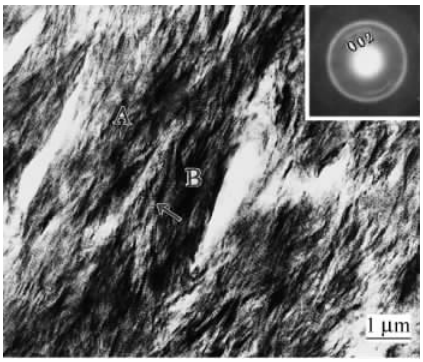


图 1.15　象牙径向截面样品的透射电镜图像[45]

取象牙不同方向的截面，在不同的载荷下分别测量其显微硬度，结果表明象牙不同面上的显微硬度不同，切向面最硬，其次是横截面，再其次才是径向面。显微硬度的方向依赖性反映出象牙微观结构本身的各向异性，它沿不同方向的塑性变形时难易程度不同。

象牙中的无机矿物晶粒与有机大分子有一定的取向关系。羟基磷灰石在象牙中形成时，其晶体学方向与象牙的宏观对称方向具有确定的取向关系，也即晶体的[001]方向趋向于与象牙的宏观对称轴平行，而其他与[001]垂直的晶体学方向则围绕象牙的宏观对称轴呈旋转对称分布。在细纤维密集处的衍射形貌中，没有发现晶面具有明显的择优取向现象，所有的衍射环都比较完整且强度均匀。由此可见，细纤维密集处的羟基磷灰石晶粒基本上是随机取向的，与纤维轴没有确定的位向关系。这里的矿物晶粒主要存在于细纤维之间，它们受细纤维的影响较少。

1.2.7　蛋壳

鸟体中的蛋壳形成是一个极其迅速的过程，例如家禽体内 20 h 中沉积了大约 5 g 的碳酸钙。如果不从食物和骨骼的储备中补充，如此的钙沉积速率足以在 15 min 内耗尽所有血液中的钙。在此过程中，鸟体内的酸碱平衡也有变化，大多数的 CO_3^{2-} 是靠新陈代谢出的二氧化碳的水合作用形成的。在壳腺体的上皮细胞中，有丰富含量的碳酸脱水酶，它可以催化反应：

$$Ca^{2+} + CO_2 + H_2O \longrightarrow CaCO_3 + 2H^+$$

蛋壳形成过程中释放的质子导致鸟体内酸液过多，因此正在下蛋的母鸡常常依靠急速的喘息来增加呼吸活动，同时质子也靠肾排出。正在产卵的鸟类在蛋壳钙化的过程中，尿液呈现明显的酸性。显然，鸟的壳腺体输送钙离子和碳酸根离子穿过上皮细胞进入输卵管，同时也把质子和反离子带到血液中。在此过程中，上皮细胞产生了一个约 10 mV 的电位差。

蛋壳由方解石构成，约占 96%～98%的体积百分比，其余是有机的水合

物物质,有机物扩展分布于整个壳材料,因此假如碳酸钙溶解,剩下的是有机物质的"灵魂"。鸵鸟蛋壳的截面图如图 1.16 所示[46]。矿物断裂面形貌随壳的厚度变化,锥状层(cone layer)的表面类似于软体动物的棱柱层,呈晶态断裂形貌,其上还可见与生长方向成 45°角(104)的微解理面。但在蛋壳的主要厚度层(栅栏层,palisade layer),断裂表面似乎并无规律,呈现碎屑状的复合物断裂形貌,有可能是有机物的分布决定了发生断裂的晶面。Rehkugler 测出蛋壳的刚度为 10～20 GPa,大约是石灰石的 1/3(忽略壳的形貌因素)。家养母鸡蛋壳的刻痕硬度随着壳厚的变化是:内外约为 170 kg/mm^2,中心降至 125 kg/mm^2。

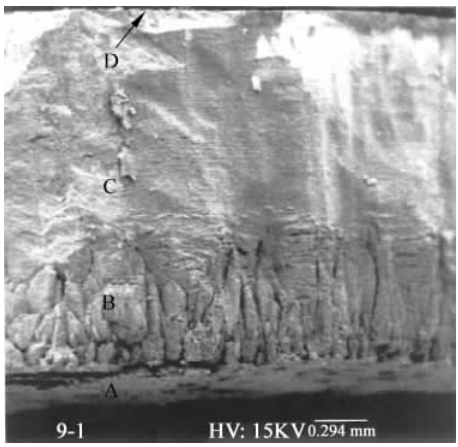


图 1.16　鸵鸟蛋壳由内向外的有机层 A、锥体层 B、栅栏层 C 和晶体层 D[46]

组成鸟类蛋壳的方解石晶体是从位于纤维状卵壳膜上的许多离散的形核点生长而成的。这些点形成了球状生长的中心,其位置可以在蛋壳截面上清楚地观察到,称为乳突。乳突是很小的(10 μm)离散蛋白质球面。在脱钙后的蛋壳上可以观察到有凹陷的小洞,小球状的方解石晶体通过这些洞排出。因此乳突是实验研究蛋白质与晶体相互作用的重要的材料来源之一。然而至今,仅有人从化学的角度分析过它们,结果显示其中含有碳酸脱水酶。

人们从晶体学和可溶性与不溶性蛋白质基质两个方面研究了蛋壳。第 1 种与整个蛋壳中阳离子的分布有关,例如镁聚集在球状结构的内部,这有力地说明蛋壳最初的晶核有着与蛋壳的主要成分方解石不同的组分和晶粒大小。第 2 种观察方法即新颖又令人兴奋:当一个小圆球生长成蛋壳时,晶体最初向各个方向生长,然而由于离子是由蛋壳外部的输卵管壁提供的,内向的生长显然被抑制,又因为各个形核点生长的晶体互相靠近,侧向的生长也被抑制。因此壳向外生长,逐渐形成一个同一的晶体取向。通过用 X 射线衍射可以观察到这一现象。这说明蛋壳是由在[001]方向自由生长的球状晶体

构成的，从单个的形核点开始，最初的晶体向所有方向扩展，但逐渐地被限制只在向外的方向生长。

鸵鸟蛋壳由于其优异的力学性能而备受重视。鸵鸟蛋壳完全由方解石型碳酸钙组成，由内向外依次可分为锥体层、栅栏层和晶体层（图 1.16）。锥体层中的单个锥体由若干个乳突结构发展而来，沿[001]方向呈辐射状生长，整个锥体层是由方解石微晶组成的片状集合体。在锥体层和栅栏层之间有明显的分界。矿物在锥体层末端的基础上形核生长，整个栅栏层是由沿[001]方向生长的方解石片状晶体组成的集合体。鸵鸟蛋壳弦切面样品 X 射线衍射分析，锥体层无[001]择优取向，栅栏层有明显择优取向，晶体层有极强择优取向（图 1.17）。说明在蛋壳内的晶体从内向外生长的过程中，其(001)面越来越趋向于平行蛋壳表面生长，而其他晶向的生长不断地受到抑制。晶体层具有整齐致密的断面形貌，是由尺寸为几十纳米的微小晶粒组成，晶粒的排列高度有序。锥体层中有机质含量很少，无机矿物相中无序夹杂的有机质，外形无规律；栅栏层中的有机质呈现特殊的团状，其密度较高；晶体层中有机质具有很高的密度。

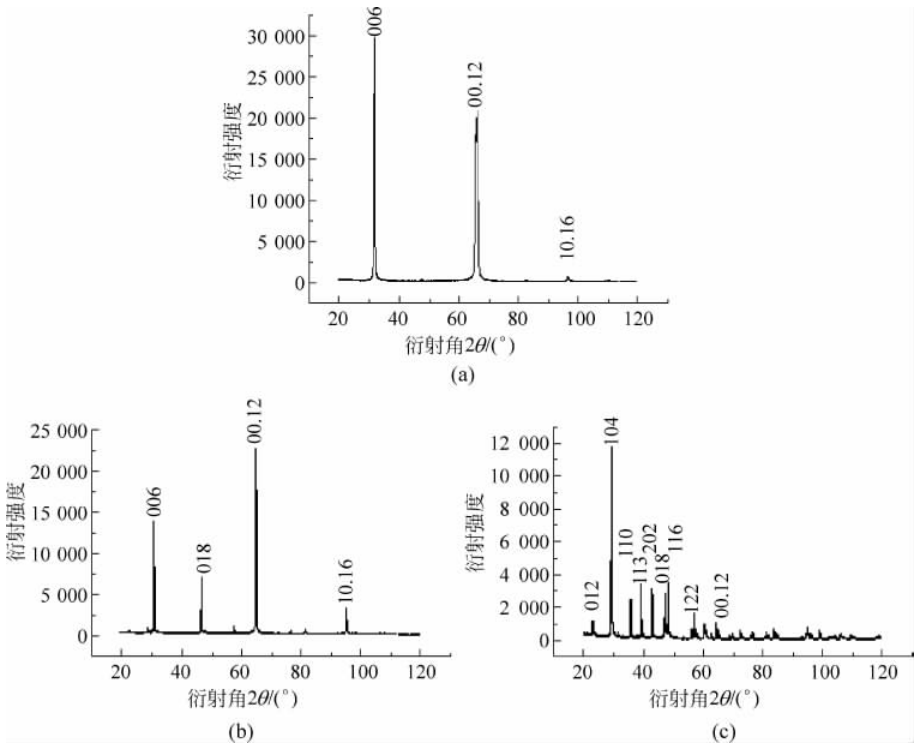


图 1.17　鸵鸟蛋壳弦切面样品 X 射线衍射图[46]

（a）晶体层；（b）栅栏层；（c）锥体层

用 SEM 分析蛋壳(光滑表面)中沿厚度方向的元素分布,结果显示在锥状层靠近内表面处较高浓度的镁(质量分数约占 16.7%,Ca+Mg+P=100%,磷约为 2.5%)。Mg 在生物矿化中一般作为矿化抑制剂出现,它可与生长中的晶体连续作用而造成台阶形表面,这可能是锥体层中颗粒表面形貌的成因。而对粗糙表面蛋壳的元素分析表明,在晶体层中磷占有 21%,而钙只占 79%。磷来源于蛋壳中的有机质,这说明粗糙表面蛋壳晶体层中有机基质的含量远大于光滑表面蛋壳,而钙化不充分。Erben[47]的研究表明,鸟类的蛋壳除了主要成分方解石之外,还有一部分文石。鉴于鸵鸟蛋壳的显微结构的基本模式同其他鸟类卵壳的结构极其一致,因此一般都相信,其生物矿物组成除占优势的方解石外,也应当有一小部分的文石存在。

1.2.8 棘皮动物

某些最富有迷惑力的陶瓷是由棘皮动物制造的。它们的骨架主要由含镁的方解石构成,其中含有低于 1%的有机物质[48]。当以 X 射线衍射或偏振光检测单独的组元(实验所用的片、壳刺、牙齿、骨针等)时,其表现如晶体;但是当它们断裂时,则有如下的几种表现形式:棘皮动物刺的湿试样被加载断裂,假如它们是立即断裂,断裂表面是光滑的和贝壳状的,属典型的脆性断裂材料(虽然是非晶态或玻璃态)。但假如试样在断裂之前保持负载一段时间(即允许应力松弛),断裂表面是粗糙的,有大量的小针竖起,达到距表面约 0.36 μm,小针的排列好像它们代表同轴的层片的断裂端。据此可以推论,这些小针被粘弹性材料所包围。这些粘弹性材料在应力松弛期间变形,得到弱的界面。

问题是,晶体是怎样以这种完美的定位方式生长的(假如它们单独存在)?研究其机理的一种方法是通过人工的方法生长晶体,Berman 等成功地在蛋白质基体上生长方解石晶体,蛋白质取自贻贝壳和海胆,与海胆基体蛋白质一起生长的方解石晶体韧性较好,以玻璃方式断裂,而不是像晶体一样劈裂;贻贝蛋白质也影响断裂方式,但所得的晶体破碎而不是劈裂。据此可以推论棘皮动物在制造“分子化合物”,其蛋白质分布于晶体的生长表面,并逐渐长满方解石,在此过程中,有可能很好地形成了蛋白质表面。由此,棘皮动物通过自身的控制得到强度和刚度兼顾的陶瓷,而且这种陶瓷不具脆性。

棘皮动物 larral 的骨针的刚度已被测量过,约为 40 GPa[17],成年棘皮动物的干燥和新鲜壳针的刚度分别为 64.4 GPa 和 52.1 GPa,Currey 的测量结果为壳针刚度为 74 GPa、甲壳刚度为 9.7 GPa,这大约是纯方解石刚度的 1/3～1/2。棘皮动物 Aristotle 下颚的 5 个牙齿具有复杂的陶瓷结构,且含有变化的有机基体量。X 射线衍射和偏振光研究表明,虽然晶体结构仍然出现,

但要比断裂所揭示的结构明显简单：最硬的部分即工作点是富碳酸镁石灰岩的化合物。目前尚不清楚纤维和基体是否含有不同的 Ca/Mg 比率，纤维直径为 2 μm，临界长度计算得 16～18 μm，硬度高达 1.685 GPa。

1.3　天然生物矿物的形貌特征

生物系统中生物矿物形貌的形成有一个产生和发展的过程。值得注意的是，像心脏、肺这样的有机软组织，以及像骨和牙这样的无机矿物硬组织，生物塑造其结构的能力几乎没有什么差别。生成精细的无机骨架和外壳是生物在形态发展中的组成部分，这说明在进化的全过程中，形态形成过程和生物矿化过程始终伴生。

一些看似不会产生结构类似性的添加物却可以诱导几何形态的变化，例如图 1.18 中所示的精致的喇叭状球石晶体。另一方面，无定形的矿物缺乏分子水平的周期结构，它们似乎应当呈现不寻常的外观和形态。但是在体外试验中，像氧化硅沉淀物这样的材料却由于无序结构各向同性的本质而呈球状颗粒。在生物矿化过程中，通过有机质耦合无机相沉积达到更高水平的有序组织，形态形成力场在生长过程中起主导作用。生物程式可以强烈到使其过程独立于矿物质的结构本质，因此，无论晶态或无定形矿物都被塑造成具有不寻常的与生命有关的许多类型[49]。

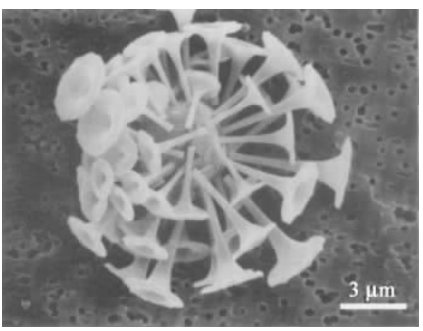


图 1.18　具有复杂形状的喇叭状球石晶体[5]

本节将讨论一些基本观点，它们构成了理解生物矿物形态形成的概念。我们主要关注囊泡中的生物矿物质的形貌。有必要强调的是，研究模型与研究工作中遇到的复杂情况存在许多差距。从生长过程中外观的对称性破坏开始讨论，引出矢量规范的概念以及它在形貌形成解析中的应用。

1.3.1　对称性破坏

形态的对称破坏发生在具有时间依赖性的形态形成过程中，矿物形态的最终结果可能包含晶体对称性的一些作用，也可能根本体现不出相关性。

形态形成中的一个关键原则是无机结构的本质对称性被外加力场替代，引起形态上的对称性破坏。例如几种类型的趋磁性细菌产生的长形磁铁矿

(Fe_3O_4)单晶,尽管这些晶体具有立方晶胞特定米勒指数所特指的面,但是它们很明显并不符合晶体结构的对称性,而这种对称性在非生物条件下应该产生具有各向同性外形的颗粒,比如立方八面体。图 1.19 给出了细菌磁铁矿物单晶的形态类型,(a)为立方八面体,(b)和(c)为六方棱柱,(d)为拉长立方八面体。实际上,这些细菌磁铁晶体沿几个等价的可能对称方向之一被特定地拉长了。大多数情况下,尽管所有 4 个等价的〈111〉轴方向在能量和结构上是完全相同的,晶体的生长却倾向于仅发生在其中一个的方向上。带来的后果是,高度对称的立方晶系被生物的生长机制改变,导致最终的晶体形态并不与磁铁矿的晶格对称性直接对应。在某些细菌中,这种作用更为明显,甚至被再生成扭曲的子弹形状晶体。总之,这些晶体在一些面上可以明显地判定出具有立方对称性,但是又由于不具有中心反演对称性而有所不同[50]。

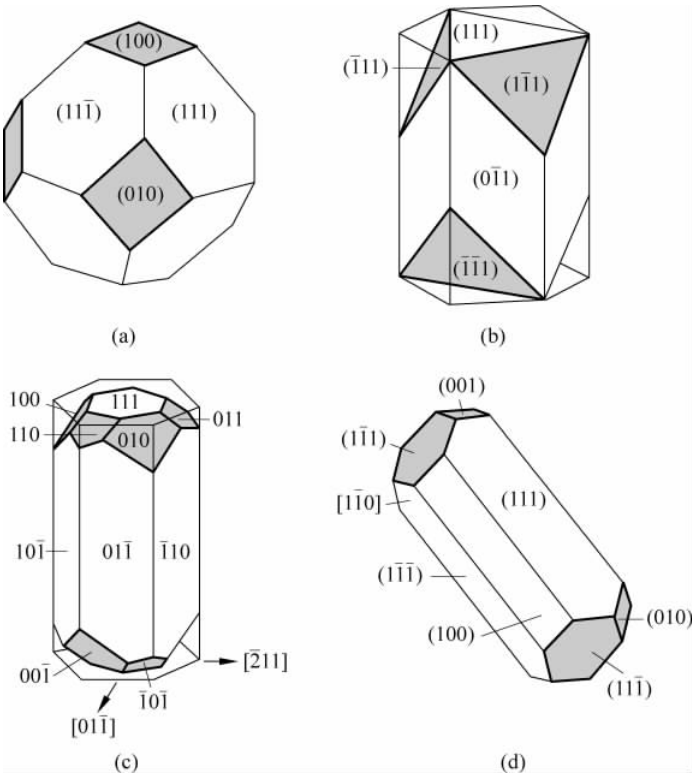


图 1.19　磁性细菌单晶的几种类型

(a) 立方八面体;(b)、(c) 六方棱柱;(d) 伸长的立方八面体[5]

理所当然地我们认为,一个生物体可以利用天然形成的生长方向决定晶体外观。例如本质结晶各向异性的方解石($CaCO_3$)晶体就可以用来形成长尖

晶石，只要使晶体生长最快的方向（c 轴）与形态长轴同方向即可。这种想法在对称破坏程度较低的情况下是有意义的。而在海绵的骨针中还有很多其他方解石的例子，这些例子中结晶学和形态学之间的对应关系就不那么确定了。具有复杂三维结构的晶态生物矿物，比如成年海胆的弯曲骨架，其形态和晶体结构间并没有明显的相关性。在这些例子中，晶体对称性被生物体内产生的外场施加的“形态可塑性”所掩盖。

一般来说，对称性在形态水平的破坏具有时间依赖性。例如，图 1.19 中所示的被拉长的细菌磁性晶体就是从最初的各向同性的立方八面体纳米颗粒形态发展而来的，所以说在生长的较早阶段在晶体形态上并没有对称破坏。事实上，在晶体尺寸达到 20 nm 之前，没有任何空间或化学限制施加于晶体生长。达到这个尺寸之后，晶体才开始演变成拉长的形态。生长不完全的球石中的碳酸钙晶体是斜方六面体，而生长完全的晶体结构则呈复杂的无规则外形。同样，在海胆幼体的骨针中的含镁方解石的初始形态基本上是一个底面为菱形的纺锤形态，后来发展成为完全不同的形态。在每一种情况下，形态的后续发展都或多或少地在一定程度上和晶体对称性的一些特定方面相关，但是却找不到一个一般的选择规律。例如，尽管每个斜方球石晶体都优先沿晶体学 c 轴生长成薄片状晶体，但接下来却延展成锤头状。海胆幼体体内的纺锤状晶体也是特定限制在沿 c 轴方向上生长的，但它们却沿 3 个不同的晶体学 a 轴方向生长成针状脊，最终形成三向辐射的骨针[51]。

1.3.2　生长方向调节

生物矿物形态学发展的对称性破坏与在生长过程中化学方面的生物定向性相关。无机矿物的晶体生长过程，是通过在晶体表面台阶、扭折等活化点添加离子或团簇而发生的，这一生长过程终止于过饱和度降到平衡溶解度水平。在形态形成学上，这些过程都是处在一个高水平的控制之下的，例如方向调节，在它的控制之下生长方向根据某个预先设定好的程式随时间变化。作为一个普遍原则，我们可以把晶体生长的方向调节看成是由与矿化相关的反应场的化学及物理性质所决定的。这些化学及物理性质形成过程根本上依赖于有形的生物隔室，如囊泡、有机大分子框架的分泌物。总之，生物矿化的方向调节与无机沉积物的化学、物理模式相关。

1.3.2.1　化学模式

化学模式是一个矢量过程，在这个过程中囊泡和有机基体中的过饱和度在时间和空间上都受到一些变化的规范的调节。这种调节包含在向矿化前沿输送离子所需要的离子泵、离子通道，以及细胞的活化、定位，或者二者兼

有的过程中。例如在 1.4 节要讨论的几种离子通道,通过在一个有形的隔室内空间编码的程序来控制其开关,从而相应地控制过饱和度的升降。此外,如果离子只流入特定位点,那么这些地方将成为矿物生长的初始区域。如果将这些特定位点关闭,而离子泵将更远处的位点打开,那么矿物将沿着离子流的矢量流动的方向倾向性地生长。在这种条件下,矿物的形态具有在有形环境下的时间和空间依赖性[52]。图 1.20 显示场发射透射电子显微镜下斑马鱼骨中固定在基质囊泡中的生物矿物的形貌。胞内可见大量的针状晶体,值得注意的是,这些晶体的析出大部分位于囊泡的内部而不是囊泡壁。

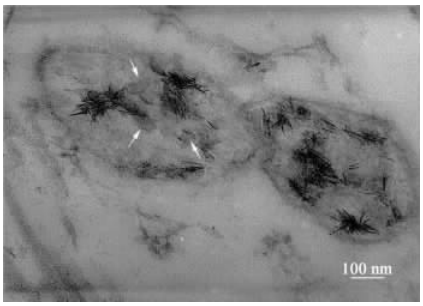


图 1.20　斑马鱼骨中固定在隔室中的生物矿物的形貌[53]

另外一种可能是流向矿化前沿的离子和分子流,或是在空间上受含有丰富离子(如钙离子)的颗粒的交换作用的指导,或是在动力学上稳定为如无定形碳酸钙或磷酸钙那样的矿化先驱体。例如在球石钙化的前期就与富含钙离子/多糖的纳米颗粒(球石小体)的迁移和沉积相关,迁移和沉积起初分布在含有球石的囊泡的侧面边缘,然后是在顶面上。由于纳米颗粒向囊泡提供钙离子,这些变化会影响到被限制在隔室里的晶体生长的形貌。调节流经膜的离子流是具有复杂形态的生物材料形成的机制。

1.3.2.2　物理模式

有形的生物隔室被用来生成生物矿化中复杂的物理形貌,生物隔室的物理模式对生物矿物生长的矢量规范具有根本性的意义。一般说来,矿物的形貌都与在矿化过程中通常保持不变的有机结构有关,就像铸模生产出来的铸件一样。如果囊泡或框架的外形随时间变化,晶体形态也可能是变化的。1.3.1 节中所讨论的被拉长的细菌磁性晶体的生长就属于这种情况。有机膜作为一种在空间上的限制,限制了被封装在其内的晶体的生长,但是这种限制的本身也是随时间变化的。目前的假设是,一旦晶体的尺寸达到 20 nm,囊泡膜就沿着与之相邻的细胞壁平行的方向伸长,之后晶体就在新获得的空间中生长并充满整个空间,这个过程在保证磁性晶体宽度不变的同时在长度方向不断延长。如图 1.19 所示,被拉长的晶体的一端是一个小端面,这是因为它是在最初规整的立方八面体的基础上发展而来的,立方八面体逐渐减少并在与不断膨胀的囊泡膜的接触中变弯曲。囊泡形状和晶体形态之间这种密

切的对应关系还可以用来解释磁性纳米粒子中常见的弯曲现象[54]。

尽管囊泡形状与细菌磁性体形成相关的变化，即简单的单轴拉伸，但在许多其他体系中的过程则相当复杂，并会导致复杂的三维矿化物结构。然而，无论哪种情况，都必定存在于一个空间，并随时间改变以协调形貌。以下部分描述这种情况是如何发生的。

1.3.2.3　生物矿化过程中的形貌形成

生物矿化过程中，通过有机-无机组装可以生成具备多级微结构的精美矿物[55, 56]。这种过程可简单概括为：有机微囊泡(vesicles)输运无机离子，在具备一定超分子结构的宏观有机组装框架处，通过与外界的离子交换，使无机矿物沉积并以框架为模板进行组装[57]。

打个比方，生物矿化中的形貌形成过程就像一个“化学水母”，它把松散的物质变成坚如磐石的结构。各种生物合成开始的过程，都包括具有特定形貌的有机结构，当它与适当的大分子模板配合好，就具有生物矿化的活性。对有机模板的直接复制可以一步就形成完全成形的矿物。或者，如果在反应空间存在矿物质，则会在生物合成过程中产生反馈，从而产生形态变化。例如一个生长在囊泡中的矿物质开始控制有机结构使其外形硬化，这样形貌形成过程就改变了，它更加依赖于晶体力场，而不是围绕在囊泡周围形成支承结构的生物合成作用。矿物和它周围的囊泡膜之间的相互作用会使磷脂分子在其上固定，从而在一定区域使囊泡膜失去流动性。这种作用影响囊泡的生长，如果囊泡要继续生长就只能向未固定磷脂囊泡的区域添加新的分子。利用这个方法，形貌形成过程中的变化可以通过组装在一起的无机和有机组分之间的协同耦合作用得以实现。

细胞内生物矿化形貌形成的一般特点是，生物矿化中的囊泡形成是通过将磷脂膜固定在基体支架上实现的，这些支架包括细胞壁、内部细胞器表面和细胞内细丝。这一过程实现要借助于一种微管结构，这种微管是由韧性较高的蛋白充当囊泡的连接线，它们通过特异位点将囊泡和支架连接起来，使囊泡像一根香肠一样伸展。形貌形成过程通过有机组分逐渐地生物合成和它们在支架特定方向上的组装随时间发展。此外，囊泡及其相关的生物矿物的成形是与具有时间依赖性的流经囊泡膜的离子矢量流引发的化学过程相结合的。

作为一个普遍原理，细胞内空间交错排列着细胞骨架网络和相关的应力场，因此囊泡膜的球形平衡态很容易就会被或远或近施加的机械力或结构力所扭曲。由经验看，通过微管和支架耦合的囊泡成形可以产生两种应力场：沿细胞壁或内部细胞器的表面切线排列或者辐射状穿越细胞。在许多体系

里,微管可以附着在结构高分子上,例如血影蛋白和微管蛋白就可以分别作为切线形和辐射形形貌的媒介。切线形貌易于形成空腔形态的生物矿物,而辐射力场则会生成轮辐状排列的矿化物针,两种体系结合可以生成同时具有切线排列和辐射排列的组织。

1.3.3 有机支架

许多单细胞生物利用细胞壁表面和细胞内细胞器作为囊泡形成与之相关的生物矿化产物。生物矿化中的有机支架与细胞内微管的表面和细胞壁内膜息息相关。细胞内细胞器的类球表面可作为矿化微区的结构支持。例如,在金藻类,如淡水藻 synura petersenii 中,扁平的囊泡就被用作弯曲硅石的微矿化区,每个囊泡都通过短细丝将其一端和一种称作内质网的细胞内结构相连结,这种排列方式指导支架表面形成盘状结构,但在边缘处微管使盘的边缘弯曲而远离支架表面[58]。

类似的过程也出现在具有复杂外形的碳酸钙球石的藻类 E. huxleyi 中。在这种情况下,源于高尔基体的球石囊泡固定在细胞核表面。球石微矿化区在囊泡内形成,然后与细胞核分离,迁移到细胞表面,在那里整合成球石晶体。虽然矿化各阶段的细节已经明确,但是囊泡形成的过程目前还不清楚[59]。

细胞壁内表面和与之相关的结构蛋白质,如血影蛋白,常常被用作生物矿化中囊泡的有机支架。一种被称做 choanoflagellates 的原生生物利用靠微管连结着伸展到细胞膜外的拉长的肠状囊泡生成弯曲棒状的无定形硅石。每个囊泡都被拉出到一定程度,每个矿物棒都有一个由相邻细胞膜形态决定的曲率半径。如果将微管合成抑制剂加入到生物体的生长环境中,随后形成的矿化棒会由于失去囊泡、微管和细胞壁之间的连结而弯曲变形。

1.3.4 囊泡在硅藻和放射虫矿化中的作用

如果一个囊泡可以跨越整个细胞壁,那么最终形成的生物矿物将是一个封闭的空腔。这种情况的一个例子就是海藻细胞的硅石薄壳,海藻进入生命循环中的冬眠期时,需要保护自己免受外部环境的破坏。一个无定形硅石薄壳将包容生物体,并在冬眠结束细胞重获活性时被去掉。另一种情况是在细胞壁表面紧密堆积的囊泡形成一个多孔的球形壳。例如,硅藻和放射虫的硅石壳就源于大的网状囊泡的紧密堆积阵列,它们由还没有矿化的细胞分泌并附着在细胞外膜壁上。这些囊泡具有多边形对称性并且排列成有空隙的一层膜。值得注意的是,矿化只发生在囊泡的周围而不在囊泡内部,由此在细胞壁上形成硅石连续的多孔的框架形貌(图 1.21)[60]。

在硅藻细胞膜中观察到的多种形貌，至少可以用紧密堆积的囊泡对细胞壁弯曲的表面几何来解释。然而实际过程要复杂得多，这是因为囊泡的组织并不是由密堆模型的表面张力主要控制的，而是由特定的形态形成过程控制的。令人惊奇的是，小囊泡的排列非常精确且具可复制性，这使每个硅石框架中的细胞内都生成了纳米尺度的硅石[61]。

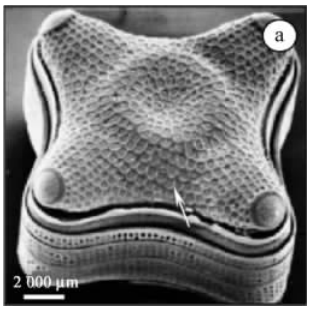


图 1.21　海藻表面形貌[60]

上述矿化机制还可以合成更加复杂的细胞内结构。特别是重复形貌形成的过程并在支架上不断扩大半径就会形成一系列同心多孔壳层。这种形态的形成是一个连续的过程，每一层的切向形貌形成和径向结构单元生长耦合就形成了多层壳。例如，一些放射虫用网状硅石建构的多层同心壳层就是通过许多的硅石小骨针形成径向连接的。而另外的一些放射虫，切向和径向生长则变得更倾向于后者，这样形成的就是单层的具有大的径向骨针的多孔矿化壳。

同样的形貌形成过程出现在 acantharians 的硫酸锶骨架结构中。在这些结构中 20 根笔直的硫酸锶骨针从细胞的中心向外辐射出。每个骨针都长在一个可能附着在微管蛋白丝的囊泡里。当骨针碰到细胞膜时，囊泡和矿物就开始沿细胞表面切向生长，形成一个薄的球形框并和径向支柱相互连接。和放射虫的结构不同，acantharian 骨架的向心骨针精确地排列在向心的轨迹上。这显然符合 D_{4h} 点群对称性的规则。

硅藻和放射虫体内的空腔多孔无机壳层的形貌形成过程是基于附着在细胞壁上的囊泡紧密堆积成阵列的。这种连续的硅石框架结构是填充囊泡中的空隙，即膜限制的隔室的结果。将这一机制和径向生长耦合就会在很多的单细胞生物内形成复杂的三维骨架。

1.3.5　多细胞生物

在多细胞生物体中，细胞分类协作，构成复杂生物矿化结构的形貌模板。在简单的多细胞生物体内许多生物矿物的形貌形成都采用了与单细胞类似的过程。不同的是，不是紧密堆积的囊泡而是多组细胞形成了骨架结构形貌，矿化只发生在细胞外基质的空隙中。最简单的例子就是生成细胞外线形骨针的双细胞，向其中加入第三种细胞就形成了三辐射形态，其中的两种形态在海绵骨针中普遍存在。同理，四种细胞一组就会得到一个准四面体结构，这也是硅石海绵骨针的基本构建方式[62]。

由此可见,当整个细胞群落共同作为矿化形貌模板时就可以得到大尺度多孔细胞外结构。一个明显的例子就是海胆壳的复杂的骨架,它是由 5 个大的弯曲盘互锁组装而成的,每个盘都是由单晶方解石形成的连续多孔网络。这些孔的尺寸为几微米,根据相关细胞的组织排列成不同结构。

分析结构中的细胞排列方式与相关矿物的形貌之间的联系,可以比较基本地解释某些特定形态的成因,但是实际情况却复杂得多。这个模型在解释相对简单的多细胞生物体时是适用的,可是无法解释像骨那样的多层结构,而骨在一定的尺度范围内却具有不少值得注意的形态。在这些情况中,细胞组的活性受到外界信号的指导,通过如激素那样的物质传输,而不再是简单的堆积。举个例子,在贝壳珍珠层中的薄层堆积结构就是一个基于基质片层和文石晶体规则相互插入式沉积而成的。有许多可能的变化,例如墨鱼的腔状结构文石壳,即墨鱼骨,就是通过垂直柱分隔矿化片层得到的。数百次地重复这种层-柱形貌形成过程,就得到了坚硬,却又质量轻到可以作为浮性装置的墨鱼骨结构。

1.3.6 讨论

生物矿物的形貌是无机矿物结晶力场和生物组织相互协调的结果。如前面提及的,这种协调存在许多不同的结合方式,从单细胞中与对称性密切相关的形态,到多细胞中复杂的非对称形态。仔细观察会发现,即使是相同种类的两个生物体,这些复杂的矿物形态也只是类似而不是完全一致。也就是说,虽然它们可以一次又一次地被组织起来,但并不是完美无瑕的复制。例如,大多数熟悉球石的科学家都会很容易地从样品中区分出各种不同类型的球石。例如,在光学显微镜下就可以辨认出 E. huxleyi 的球石盘。但是采用具有更高放大倍数的电子显微镜观察时就会发现,每个球石盘中的单个方解石晶体在尺寸和形态上略有不同。此外,虽然保留椭圆形几何外形,每个盘也不是精确含有相同数目的晶体(图 1.22)。

这种形态上的相似性或等价性反映出,生物矿物形态形成条件是预定的遗传机制和不确定的周围物理化学环境。环境的物理化学变化在生物体的寿命期内会随时间变化,每个遗传特定的生物矿物在形态上都或多或少地被打上了这种环境烙印。显然,对于像骨和牙这样的具有高等功能的生物矿物必须使外界环境加在结构上的可能变化达到最小。对于其他生物矿物,功能对形式的依赖性则不那么严格,生长过程中的形态、结构和组分可以

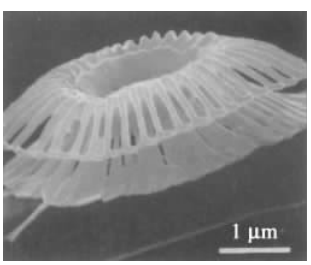


图 1.22 球石盘的侧面[63]

有比较显著的变化。例如鱼体内的文石耳石或珊瑚的方解石骨针，都是基于某个一般形貌而具有多种变化形态的多晶复合物。尽管在有界空间内形成但由于受到时间和空间局部变化的影响，每个骨针都会略有不同。

生物矿物的形貌不仅需要编制好的组装程序，还要能够控制周围物理化学环境起伏的不确定性。生物矿物并不是完全一致的复制而是极其相似。

生命中存在的无机矿物的形态形成是生物矿化的一个突出特点。本节我们讨论了生物组织在多高的水平上影响晶体的生长，使内在的对称性元素在形态中消失。我们也讨论了如何通过在不同类型的细胞内支架形成囊泡，组成化学、物理模式而获得矢量规范。我们还讨论了一个基于囊泡径向和切向形貌的简单模型，但在许多体系中我们还不了解详细的机制。

在硅藻细胞膜和放射虫骨架的形态形成研究中也取得了一些进展，主要是研究了细胞壁上囊泡的紧密堆积的形貌形成过程。在囊泡的间隙空间中的管状隔室里的矿化形成了多孔无机空腔壳。在含有径向刺的更多复杂三维网状框架中也有类似的过程，在多细胞生物体中除了细胞代替囊泡之外也是一样的过程。

最后我们揭示了许多生物矿物的形貌都是一个固定形态的变异体，而不是完全一致的复制体。由于化学反应易受到周围环境变化的影响，所以生物体要在一个范围内保证正常运转，这样就不要求形式与功能之间有很强的关联性。另一方面，像骨那样要在严格物理环境下长期使用的功能材料的结构的构建是严格规范的。这些复杂的多级结构的构建方式将在 1.4 节中讨论。

1.4　天然生物矿物的结构特征

生物矿物构造是指在一个较高级别上的有序结构在多级尺度上的建构及其结果。生物矿化中高度有序结构的形成包括一个生物矿物构建(biomineral tectonics)的过程。tectonics 一词源于希腊词汇 tekton，意为建筑者，通常被地质学者用来描述大地的大尺度结构特点，如大陆板块。而另一方面，化学家则用“分子构建”这个词来描述由分散的规整构造单元所组成的分子结构的构建方式。本节将根据在一定尺度上预制好的结构基元或分子的整合来考虑复杂多层生物矿物结构的建构。这样，我们就需要将所讨论过的原理和概念综合起来，把生物矿化的化学、空间结构和形态学特点都放入到生物矿物构建的一般过程当中去。我们将骨作为生物矿化的高级有序结构的模型开始讨论。

1.4.1 分级结构

首先以骨为例来说明天然生物矿物的分级结构。骨的性质具有下列明显的特性：强而不脆、硬而柔韧、质轻却足以支撑组织、强度高却呈多孔形貌、稳定却在不断再生等等。这些互相矛盾的性能源于骨的从分子到宏观尺度的分级结构(图 1.23)。一般来说，这些结构包括：

第一级：1 nm，原胶原蛋白纤维；

第二级：100 nm，胶原纤维/纳米晶体；

第三级：1 μm，胶原纤维束；

第四级：10 μm，胶原纤维束/骨细胞(骨单位)的同心层状结构；

第五级：1 mm，骨单位组成的各种显微结构；

第六级：>1 mm，骨的宏观结构。

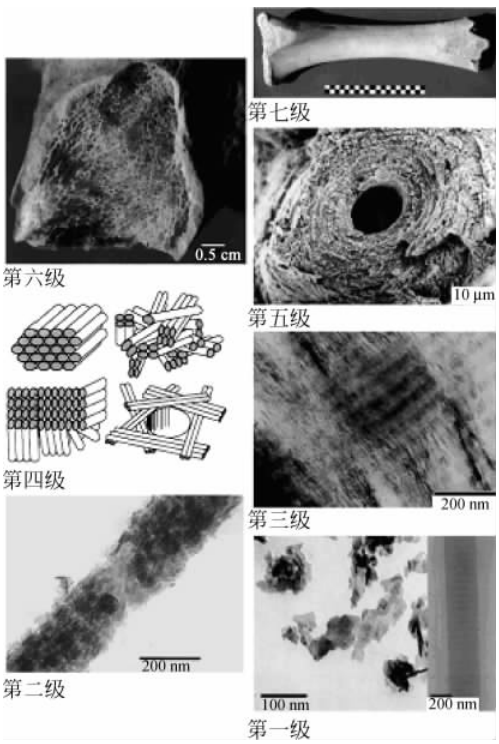


图 1.23 人类密质骨的分级结构示意图[64]

第一级：人骨中分离出的晶体(左图)和火鸡肌腱中未矿化胶原；第二级：火鸡肌腱中胶原纤维的 TEM 微观照片；第三级：已矿化火鸡肌腱薄片的 TEM 微观照片；第四级：在骨材料中发现的 4 种纤维排列模型；第五级：人骨中单个骨单位的 SEM 微观照片；第六级：人体股骨化石碎片的光学微观照片；第七级：整个牛骨(10 cm)

(图源自 Annu Rev Mater Sci)

骨具有复杂的分级结构[38, 65]，图 1.23 所示为人类密质骨的分级结构示意图。可以看到，骨组织的每一级结构都是由更微观、有序的下一级结构组成。以密质骨为例：

(1) 骨在微米尺度上的结构单元为哈佛氏骨单位(osteons)，典型的骨单位的直径约为 150～250 μm，一个骨单位由 4～20 层呈同心圆分布的 3～7 μm 厚的层状骨板(lamellae)排列在哈佛氏管周围构成。这个层次的骨中交错贯通着骨陷窝、骨小管及 volksmann 管，其体积可高达 19%(孔隙率)，它们充满着体液，并且直接与骨髓相连，来输运骨中的代谢物质。

(2) 层状骨板进一步由胶原纤维(collagen fiber)构成，每层骨板中的胶原纤维相互平行排列，相邻骨板中的胶原纤维取向则互成一定角度，这种结构又称为板层骨。对于皮质骨的哈佛氏系统，韦纳(Weiner)[66]认为这种骨板还具有更精细的结构，它由厚薄两层相叠而成，厚层的厚度约为 3～7 μm，薄层的厚度约为 0.3 μm。厚层中胶原纤维取向与骨的长轴方向呈一定角度，相邻骨板中厚层胶原纤维的取向互成一定角度，而所有薄层中胶原纤维及矿物晶体 c 轴均垂直于骨的长轴方向。

(3) 胶原纤维包含胶原微纤维(collagen fibrils)和羟基磷灰石。胶原微纤维是透射电子显微水平下可以观察到的结构，骨就是这种细小胶原微纤维连接成的网状骨架上沉积了片状或针状晶体的复合体。纤维微束的直径可以从 100～2000 nm，骨矿主要是羟基磷灰石晶体，厚度为 1.5～5 nm，宽度约为 20 nm，长度通常为 40～60 nm。

(4) 呈 3 股螺旋结构的原胶原分子，经平行排列组装成胶原微纤维。骨的哈佛氏系统来源于骨的重构和再造过程[38]，所形成的骨单元又称二次骨单元(secondary osteon)。在一个代表性的骨形成过程中，骨的形成首先开始于细胞分泌胶原分子及胶原模板在细胞外的组装，接着是矿物在胶原模板上的沉积。与其他矿化组织不同的是，骨还存在一个二次重构的过程，这包括在已形成的骨中形成血管通道，并再次矿化形成哈佛氏结构。此外，骨还不断地通过破骨吸收和成骨再造，以适应外界的应力变化。因此，骨的矿化是一个连续不断的过程，最终的成熟骨是由各个时间形成的骨构成的，它们具有不同的组成、矿物密度和机械性能。这一特点为骨的矿化研究带来了困难。

3 股螺旋结构的原胶原分子(第一级)与羟基磷灰石晶体自组装成胶原纤维(第二级)，依次组织成片层结构(第三级)，而不是排列成另外一种交错的结构，如图 1.24 所示。在各相邻片层中的骨细胞装配片层，共同堆叠成平行阵列(层状骨)或者同心排布的圆筒结构，即骨单位(第四级)。骨单位的每一层都有交替方向排列的纤维。在一个比较长的尺度上，骨单位分组形成哈佛

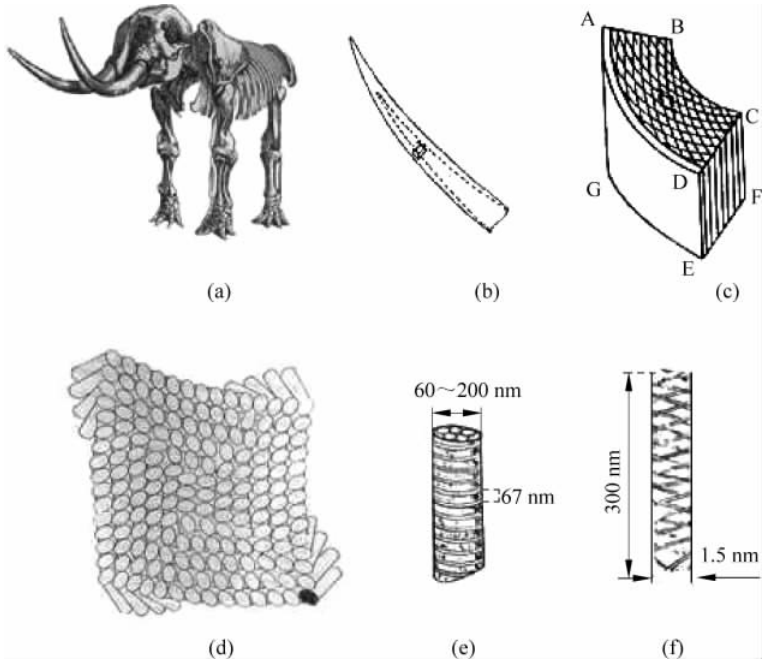


图 1.24　象牙的分级结构示意图

(a) 象的骨骼;(b) 第五级,象的长牙,外围层部分是牙骨质,内层部分是象牙;(c) 第四级,象牙的一块,ABCD 面为横截面,CDEF 面为径向面,ADEG 面为圆周切面;(d) 第三级为 C 中排列的胶原束,胶原束由 E 中所示的胶原纤维组成;(e) 第二级,单个的胶原纤维;(f) 第一级,3 股螺旋结构的胶原分子[45]

氏系统,作为多种骨显微结构的基本构成基元(第五级)。这些结构包括有多孔的框架结构(松质骨)和比较紧密的结构(皮质骨)。每种结构都具有相似的组成基元,但是根据整个骨中特定的结构/功能关系而具有不同的空间组织方式。最后,在宏观级别,每块骨都有特定的形貌和结构(第六级),因此骨骼才可以作为一个整体发挥功能[67]。

不同类型骨的宏观外形是由胚胎形成期的细胞分化决定的。例如,腿上的长骨在矿化之前的外形就是一种含大量水的柔软可降解的未矿化软骨基体。细胞首先沉积在软骨基体上,然后在其周围组装并分化为成骨细胞,成骨细胞分泌胶原。骨的矿化发生在胶原中,在软骨的周围形成矿化环。有趣的是,骨环并不给软骨基体中的细胞提供生长养分,结果使其退化形成一个包含了骨髓的空腔。然后,新形成的骨被重塑成不同的结构[68]。骨具有从分子尺度到宏观尺度的多级分级结构。细胞和矿化的胶原片层是各种显微结构的基本构成组元。整个的宏观外形在胚胎期就已经由可降解的软骨模型

决定了。

三维胶原纤维组织、羟基磷灰石晶体和胶原纤维的空间位向揭示了象牙的分级结构。象牙具有与肌腱、骨、牙类似的分级结构，不同之处是象牙中胶原纤维的直径比其他矿化组织中的小。另外象牙中胶原纤维的位向也不同于其他硬组织的模型，象牙由胶原纤维束的层结构组成，层厚约为 0.3～0.4 mm，左旋和右旋两个不同方向的层交织成网络结构。层上的胶原纤维相对于象牙的横轴平面是倾斜的，层与层之间旋转 90°。除表面两层，象牙里同一层的胶原纤维相互平行。两层之间胶原纤维位向是逐渐变化的，这种结构特性对于象牙的力学性能十分重要。

象牙的建筑结构相当复杂，至今仍无法解释胶原纤维如此精密排列的机制。只是有观点认为成骨细胞的位向和运动决定了胶原纤维的位向，基于这个理论，可以认为所有的成骨细胞能朝一个方向做一定距离的移动，使一层中的胶原纤维定向，完成后再逐渐旋转 90°去完成另一层的沉积。然而这样复杂的过程是怎样进行的依然很难想象。羟基磷灰石晶体和胶原纤维的空间构象和其他矿化组织一样，即磷灰石晶体择优沉积在胶原纤维的空隙区，但象牙里的沉积晶体较小，约为 31 nm 长、20 nm 宽、3 nm 厚的晶粒[45]。

牙釉质是通过一个典型的分级发育过程形成的。这一过程是在成釉细胞及其分泌的细胞外基质的严格调控下完成的。首先，在纳米尺度下，基因调控表达了一些蛋白（主要是牙釉蛋白），这些蛋白自组装成为纳米球。由蛋白形成的纳米球继而与羟基磷灰石微晶的特定晶面相互作用，从而调控了晶体的生长。晶体继续长大并融合成微纤维。成釉细胞控制了羟基磷灰石晶体的取向，从而构成了牙釉质的典型结构：釉柱。羟基磷灰石晶体在釉柱的中间部分沿着釉柱的长轴方向相互平行排列。随着远离釉柱中央，羟基磷灰石晶体的取向开始转为指向釉柱边缘，排列的有序性开始降低。釉柱间的部分成为釉质鞘，在这些区域，羟基磷灰石晶体的取向变得更为杂乱，并且有机基质的含量明显升高。釉柱是一些很长的圆柱，当它们被横截观察时，通常出现类似“锁孔”的形状。在宏观尺度下，釉柱在牙釉质不同区域以不同方式相互紧密排列。这些排列的形成与牙釉质发育过程中的一些特殊蛋白和细胞活动相关。

分级结构广泛存在于多种天然的或人工合成的生物材料中。Weiner 等基于 SEM 和 TEM 的观察结果，提出了人骨的七级分级结构，并得到了科学界的广泛认同。类似的分级结构也存在于斑马鱼骨结构中。一些主要由碳酸钙矿化形成的材料也存在严格有序的分级结构，这其中最典型的例子就是球石。不仅如此，一些通过自组装的方法人工合成的材料也具有分级结构。

为了研究生物自组装,清华大学生物材料研究组合成了矿化胶原纳米纤维,并且报道了这种纤维的多级组装结构特点。

基于 AFM、SEM 和 HRTEM 的观察,清华大学生物材料研究组[69, 70]对于牙釉质结构提出了新观点:牙釉质存在多级结构,并且给出了分级结构的示意图,如图 1.25 所示。牙釉质由七级分级结构:第七级:牙釉质;第六级:釉柱阵列;第五级:牙釉柱/釉柱间质连续体;第四级:羟基磷灰石粗晶体粗纤维;第三级:羟基磷灰石晶体纤维;第二级:羟基磷灰石晶体纳米纤维;第一级:主要成分,即纳米羟基磷灰石晶体以及少量有机基质。对牙釉质分级结构的观察结果如下:

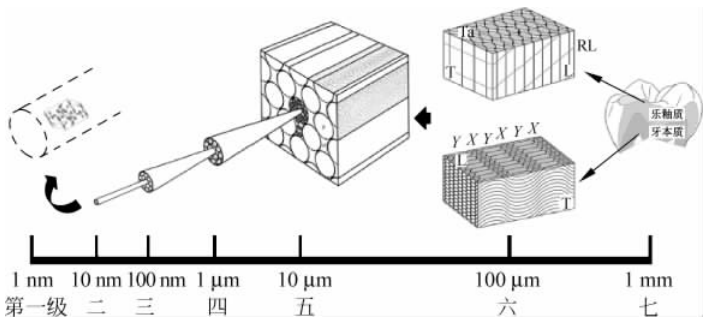


图 1.25　牙釉质的分级结构示意图

第七级:牙釉质;第六级:釉柱阵列;第五级:牙釉柱/釉柱间质连续体;第四级:羟基磷灰石粗晶体粗纤维;第三级:羟基磷灰石晶体纤维;第二级:羟基磷灰石晶体纳米纤维;第一级:主要矿物:羟基磷灰石晶体[69]

第七级,牙釉质(dental enamel):牙釉质是覆盖牙齿的最外层结构,其厚度可达 2 mm。

第六级,釉柱阵列(prism array):牙釉质是由不同结构的釉柱阵列组成的。如图 1.26(a)所示,在牙釉质的 1/3 表层中,牙釉质呈所谓的放射状结构,其釉柱取向垂直于咬合面。此外,图中可见典型的 Retzius 线(黑色箭头所示)和釉柱周期性结构(黑色三角所示)。而在牙釉质的内层 2/3 区域中,牙釉柱则呈波浪状排列(如图 1.26(b)所示)。如果牙釉质被纵切观察,则可见如图 1.26(c)所示的典型的 Hunter-Schreger 带(Hunter-Schreger bands,HSB)。

第五级,牙釉柱/釉柱间质连续体(enamel prism/interprism continuum):彩图 1 为典型的抛光并未经过酸蚀处理的牙釉柱 AFM 表面形貌图。釉柱的直径为 6～8 μm。釉柱是釉柱阵列的基本组成单位,它们相互紧密排列并被中间的有机釉质鞘隔开。

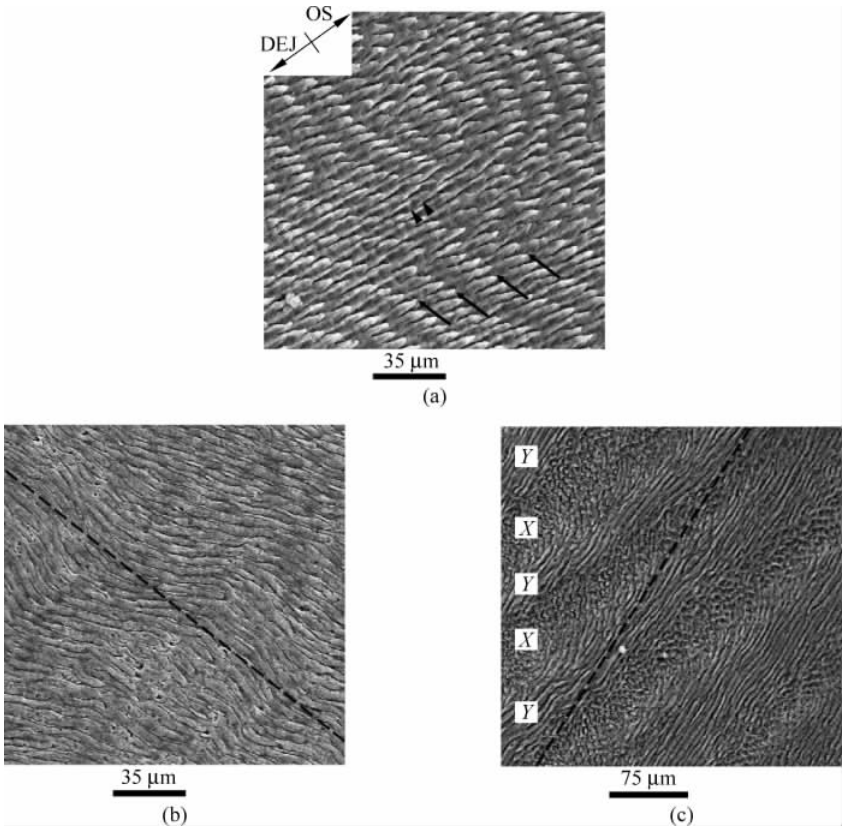


图 1.26　牙釉质的釉柱阵裂

(a) 牙釉质 1/3 外层的牙釉柱排列呈放射状[70]；(b) 牙釉质的内层 2/3 区域，牙釉柱呈波浪状排列，沿虚线切开观察的牙釉柱结构如图(c)所示[70]；(c) 牙釉质的内层 2/3 区域，牙釉柱形成取向相互垂直（$X-Y$）的交替层结构(即 HSB 结构)，沿虚线切开观察的牙釉柱结构如图(b)所示[70]

第四级，羟基磷灰石粗晶体粗纤维(hydroxyapatite crystal fibre)：图 1.27 所示为釉柱被酸腐蚀后的结构的典型 SEM 形貌图，图中显示出釉柱是由羟基磷灰石粗纤维组成的(箭头所指)。这些纤维结构被定义为牙釉质的第四级分级结构，也是组成釉柱的第一个分级结构。纤维的直径为 600～1 000 nm。粗纤维结构是由一些紧密排列的细纤维，即牙釉质第三级分级结构组成的。

第三级，羟基磷灰石晶体纤维(hydroxyapatite crystal fibril)：它们被认为是由牙釉质的基本组成单元，羟基磷灰石微纤维，紧密排列形成的，这样的纤维结构目前被定义为牙釉质的第三级分级结构。纤维的直径为 90～130 nm。纤维的横截面形状不规则。

第二级，羟基磷灰石晶体纳米纤维(hydroxyapatite crystal nano-fibril)，

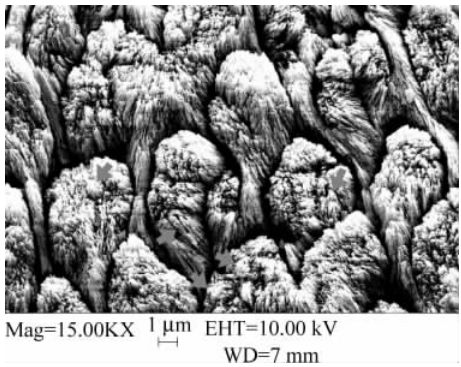


图 1.27　酸腐蚀后的牙釉质 SEM 照片,箭头所示为第四级分级结构:羟基磷灰石粗晶体粗纤维[71]

以及第一级,主要成分(major component):牙釉质的基本组成结构被普遍认为是纳米级微纤维,即牙釉质的第二级分级结构。微纤维晶体的宽度为 20～40 nm。微纤维沿釉柱长轴平行紧密排列,组成第三级分级结构。牙釉质的第一级分级结构,羟基磷灰石晶体,组成了这些微纤维。在牙釉质中,羟基磷灰石的含量高达 96%。

清华大学生物材料研究组[37,72]在基于 SEM 和 HRTEM 的观察基础上,提出了鲤鱼三种类型耳石的分级结构,其中微耳石共有七级分级结构图 1.28 显示了微耳石的前六级结构,它的基本矿物单元是文石的纳米晶,这是微耳石的第一级结构;纳米晶体按照 c 轴择优相互平行的方式排列,进而形成了直径约 60 nm 长度约 1.5 μm 的纳米纤维,这是微耳石的 2 级结构;由文石晶体纳米纤维在二维方向上彼此紧密的平行排列,形成了纤维层结构,这是微耳石分级结构的第三级;文石层沿第三级结构图中黑色箭头方向延伸至数微米,在垂直与文石层面的方向堆积至 2～3 μm,形成了长轴方向平行于文石层面的棒状聚集体,这是微耳石分级结构的第四级;文石棒的长轴方向互相平行,彼此平行的文石棒在一定的区域内形成了有一定取向结构,这是微耳石分级结构的第五级;相邻的晶体取向结构之间具有相似的取向,在微耳石日轮层内的排列,构成了微耳石分级结构的第六级;微耳石的日轮结构则为分级结构的第七级。

星耳石共有五级分级结构(图 1.29)。它的基本矿物单元是球文石的纳米晶,这是星耳石的第一级结构;纳米晶沿 c 轴堆积形成直径为 300 nm 的球文石棒,为星耳石的第二级结构;球文石晶体棒在二维方向上彼此紧密的平行排列形成球文石晶体层,为星耳石的第三级结构;多个球文石晶体层进行平行堆积形成星耳石的第四级结构,星耳石的日生长轮,厚度为 2 μm;多个日生长轮形成了星耳石轮纹结构,为星耳石的第五级结构。

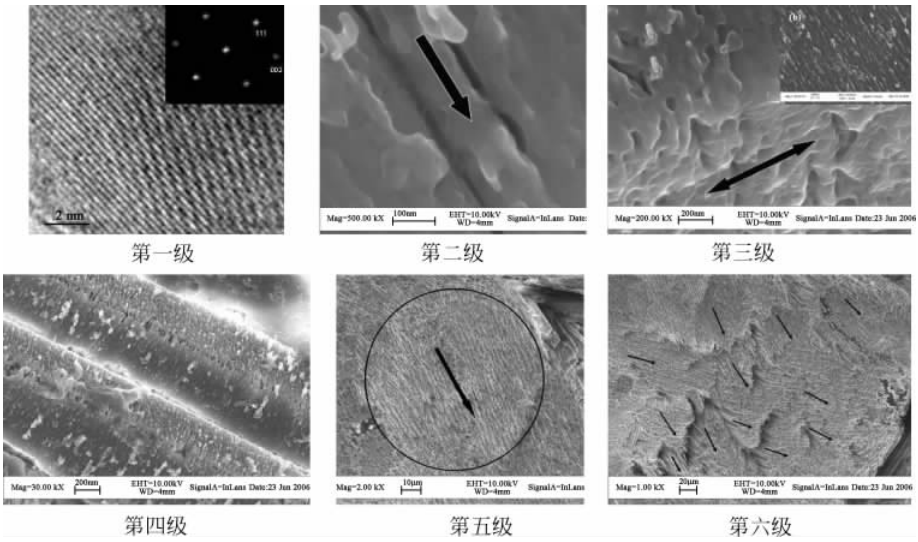


图 1.28　微耳石的前六级分级结构[37]

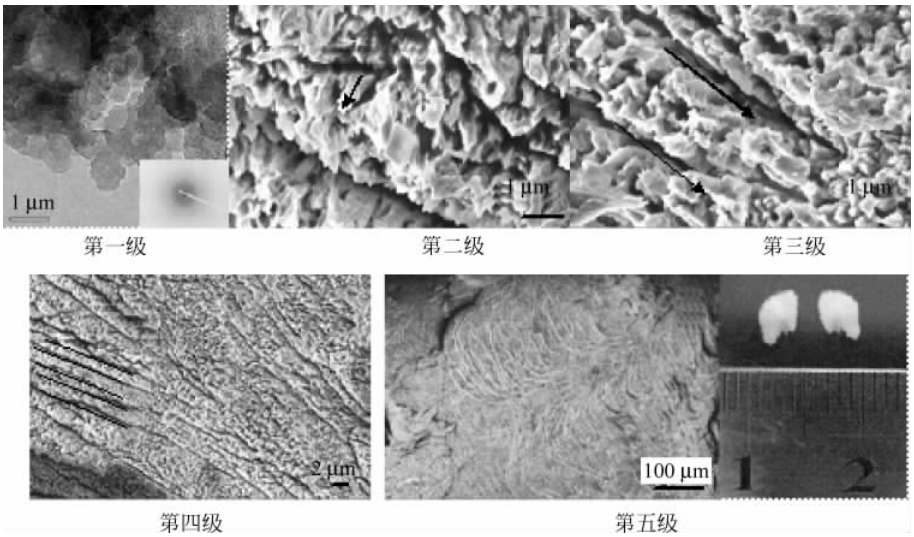


图 1.29　星耳石的分级结构[72]

矢耳石共有四级分级结构(图 1.30)。它的基本矿物单元是文石的纳米晶,这是矢耳石的第一级结构;文石晶体沿 c 轴方向生长为纳米纤维,长度为 1.5～2 μm,直径为 200～250 nm,构成矢耳石的第二级结构;矢耳石中的第二级纤维结构在耳石日增量内彼此平行排布,纤维的 c 轴方向与耳石的日增量面相垂直,这为矢耳石的第三级结构;矢耳石的日轮结构则为分级结构的第四级。

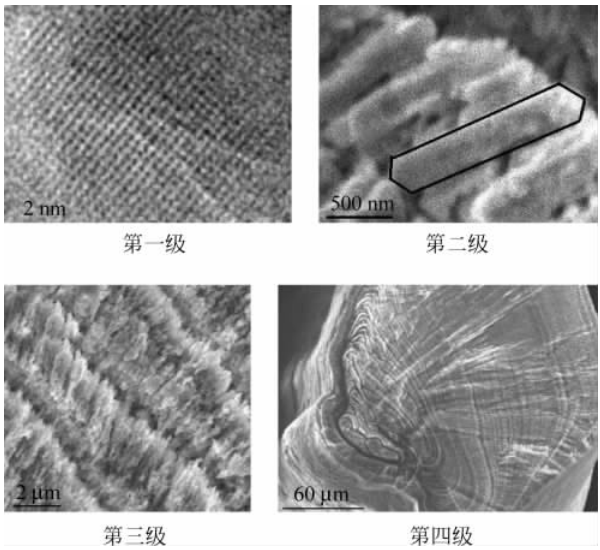


图 1.30　矢耳石的分级结构[37]

耳石的分级结构的形成与其在不同尺度上的发育分级性有密切关系,并受基因、蛋白组装的超分子结构和细胞活动的精确调控。鲤鱼耳石分级组装结构模型为研究耳石结构与环境的关系做了基础工作并提供了新的视角。

1.4.2　预构建

骨的分级结构是基于生物组织的漫长进化过程中,多细胞生物体中有机基质调制矿化的能力。大分子框架和细胞共同涉及一个构建比单个细胞大许多倍的结构的问题。另外的一种可能就是预先形成的矿物结构单元原位自组装。这样,生物矿化中囊泡和与其相关的矿化物必须融入细胞过程,以增加结构尺寸和复杂度。此外,因为和细胞特点(支架、微管等)相关的囊泡可用于形成不连续的复杂形状,如弯曲的针和盘,那么预制的矿物结构单元就形成了特定的外形和尺寸。

一般来说,小囊泡内沉积的矿物可以向细胞周边的特定区域移动,或者通过细胞膜被释放到细胞外位点,然后组织成高度有序结构。因此,基于囊泡的生物矿物构造过程中的一个基本概念就包括预制的矿物结构单元的迁移。有的情况下,含矿物的囊泡仅被用作生物运送器,包装、输运矿物到细胞外的构建点后再释放,而不是直接将它们组装成有序结构。例如,编织骨的形成和火鸡腱的最初矿化,就和包在双层磷脂囊泡,即基质囊泡中的针状羟基磷灰石晶体相关。囊泡在离矿化点一定距离的细胞外空间组装,在接近胶原基体时很快填满羟基磷灰石。在矿化前沿,它们破裂并向胶原基体释放内部

包含物(图 1.31)。接下来发生的将是一个极具争议的话题：被释放的晶体是否会进入胶原纤维的孔隙中？或者它们溶解，增加了局部的过饱和度并开始在胶原纤维的孔区成核生成晶体？关于这个问题研究者们至今仍然争论不休[73]。

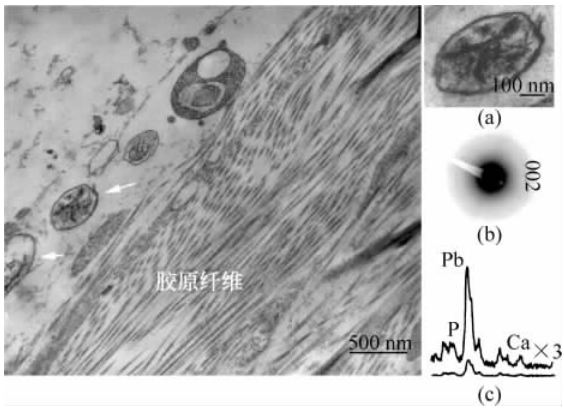


图 1.31　斑马鱼脊椎骨轻度矿化的胶原区发现的基质囊泡(箭头所示)
(a) 基质囊泡放大；(b) 基质囊泡内针状晶体 SAD 分析；(c) 基质囊泡内针状晶体 EDS 分析(醋酸双铀＋柠檬酸铅染色)[53]

然而，在单细胞生物体中，有许多证据表明，含矿物的囊泡被用于构建更有序结构的预制的矿物结构单元。在这个过程中，与囊泡相关的不仅包括不连续矿化结构的外形以及它们向远处的输运，而且还和被释放单元以及包围在整个细胞外的结构有关。例如，一种有孔虫类就构建了一个具有相互连接腔的矿化壳，而在 calcituba polymorpha 的壳中则由囊泡内形成的方解石晶体构成。针状晶体长 1～2 μm，它们在大囊泡中成束状，从细胞质被输运到被有机外层封闭的隔室中。晶体作为完整的构建单元被释放到矿化前沿，因此壳的厚度逐渐增加。尽管首先到达有机壳的晶体是沿表面平行排列，而后续的晶体则是在壁内随机排列的[74]。

总之，含有预制生物矿物的囊泡可以被迁移到细胞内或细胞外，形成更大尺度的结构。

1.4.3　高度有序的自组装

在许多单细胞生物体中，囊泡不仅运输矿物质还传递组装成有序结构的结构单元。例如，stephanoeca diplcostata ellis 是一种单胞的甲壳领襟鞭毛藻，通常在欧洲和地中海沿海水域中发现。这种细胞有一个无色的原生质体，在前面则是一个被一些触手环绕的鞭毛。这个原生质体位于一个末端开口的网状篮中，这个网篮由 150～180 条硅带所构成。尽管弯曲的硅带最初是

在细胞内囊泡中形成的,而最终它们在细胞外形成引人注目的端部开口的篮筐结构(图 1.32)[75]。

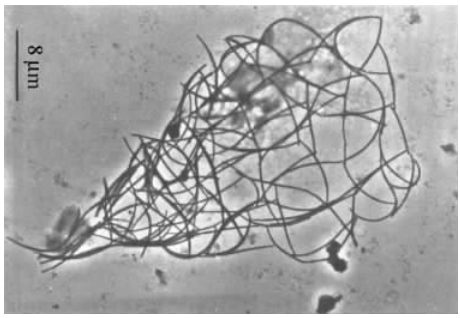


图 1.32　由相互连接的硅带组成的外壳[75]

单个硅带的高分辨电镜图像显示不规则的非晶格,而且无明显周期性。超过大约 1 nm(大约 3 个 Si—O—Si 单位)就不存在短程有序性,这种现象说明硅形成了一种连续的、无序的凝胶状结构。而且,这些图像还显示了一种由 SiO_4 单元组成的随机网络结构,这些 SiO_4 单元通过不同键角的 Si—O—Si 键连接,而不是由微晶多面体随机排列而成的微晶团块结构。

这个篮筐结构是如何形成的呢?高分辨光学显微镜可以用来观察原生动物的活动。结果显示,成熟的细胞紧紧附着在一个完全成形的兜甲上,并四处游动,用小拖网捕捉细菌。尽管兜甲是完整的,细胞还是不断地产生出额外的小棒,进入细胞内空间,在篮子的开口端以小聚集体的形式被保存下来,看上去就像成束的香蕉。一旦积累了足够的小棒,大约 150 个左右,细胞开始分裂,子细胞和额外的小棒在完整兜甲的开口端挤在一起,并进入外界环境。3 min 内,通过一系列阶段,如细胞对小棒的组装和放置,在子细胞周围就构建成了一个新的兜甲。尽管许多细节还不清楚,但是篮筐是由细胞向外推进的形式构成的。在这个过程中,单个小棒从聚集束中一个个地沿侧面滑出来,并被锁定在框架中。值得注意的是,这些棒由硅石与某种有机材料的未知化合物以头对头或 T 字形的形式粘接起来。这种方法能使网篮在海水环境中承受压力而完整无缺。两个硅带之间的连接,是在结合过程中粘在一起的,这种连接材料的电子密度通常比硅带中的低。

高分辨电子显微图像已经显示,硅和一些有机物质组成了这种连接,这说明有机高分子的流动性使硅在链硬化前加入链接。有趣的是,富硅带是介稳态的,可以缓慢地重新溶解到液态介质中,这一矿物分解过程依靠物理生长条件:20℃,活化溶液中矿物分解在 10 天内完成。有关硅矿化分解的研究在揭示硅带中硅的局部化学环境方面十分重要。假设这些区域由高溶解度

的硅组成，矿物分解的第一步反应发生在局部区域中心，沿带的中心轴进行。或者，表面硅可能被一层有机薄膜很好地保护起来。随时间的延续，反应中心加快矿物分解，直到它们沿中心轴延伸至连接在一起，从而形成了管状的脆性带。随矿物分解的进行，中空部分继续扩大，直至反应的最后，带的外层边缘才表现出矿物分解的迹象，变得粗糙凹陷，这种优先溶解的有趣现象是，带变得中空，但其力学强度却没有显著下降。于是硅篮仍保持其功能，虽然硅带已经历了严重的矿物分解，但仍完整如故。只有管壁变得十分薄时，才会发生弯折和断裂。生物硅的力学设计于是成为与生物功能有关的一个结构特性。有趣的是，硅石棒是亚稳定的，它缓慢地溶解在海水中形成完整的中空棒而不是平面刻蚀带。这种优先溶解中心而不是棒的表面的功能的优点是，在一定时间范围内有序的结构是稳定的。这是因为在一定的边界条件下，实心棒和空心圆筒之间的机械强度的下降是非常小的。出于类似的原因，管状的棒而不是实体棒用作建构支架。

除了矿物棒、针外，细胞内微区和盘也被用于多细胞生物体高度有序组装体的构建单元。例如，金藻中弯曲的硅石微区就像屋顶瓦一样组织在细胞壁上。类似地，球石盘也组装成著名的中空壳结构，我们将在下一部分详细讨论。

总之，原生动物和藻类的生物体内源于囊泡的生物矿物的控制释放导致细胞外高度有序结构的自组装。

1.4.4　多级过程

作为一个普遍原理，可以认为具有多级结构的生物矿物的构建是一个包括多尺度构建阶段的多级过程。为了说明这个多级过程的原理，我们现在讨论单细胞海藻(E. huxleyi)形成方解石颗石球的构建的不同阶段。用这个模型我们就可以提出一个一般的框架来理解与生物矿物结构相关的建构阶段[76]。

1.4.4.1　球石

单细胞海藻 E. huxleyi 产生的方解石晶体构成球石盘，球石盘相互连接成中空的球状结构，称作球石。一个完整的球石直径约 6 μm，如图 1.33 所示。我们提到球石起源于细胞内囊泡，它们迁移到细胞膜上并被释放、熔合成球石。这里我们仔细分析球石构建的各个阶段，说明在单细胞生物体中生物矿物构造的复杂性。

我们从 E. huxleyi 的球石盘开始，从剖析结构来揭示其构建过程。每个盘都是椭圆的，由 30～40 个晶体结构单元形成不同直径的管状环组成。我们下一步要分析单个球石盘。为此，要在水中超声处理几分钟，将盘内的单个结构单元释放出来，这些微米尺寸的晶体具有不同寻常的形态(图 1.34)。要

注意的是 3～4 μm 长的球石盘的精细纤维结构。只要把结构单元排布在椭圆环的周围,就形成了双边的球石盘(图 1.35)。

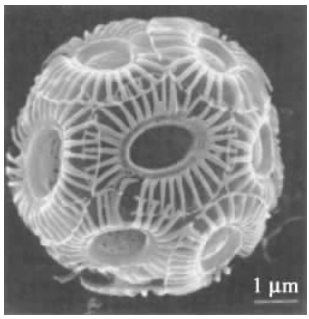


图 1.33　E. huxleyi 球石的中空结构[5]

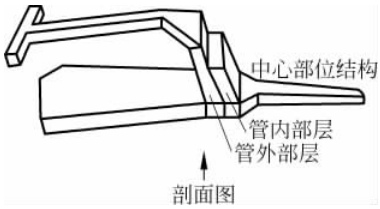


图 1.34　球石盘的单个结构单元[5]

一个关键问题是:这样奇特结构的晶体学本质是什么?由于单独单元非常小,必须用电子衍射分析。结果显示,每个单元都是一个方解石单晶,其晶体学 c 轴和 a 轴分别平行和垂直于球石盘平面。建立起球石的单晶构建单元晶体学之后,我们还要知道这些晶体是如何生长并最终形成如此精确的有取向的高度有序组装体的。显然,我们需要大量的生长过程中的球石,但是这并不容易做到,因为这种结构本身不稳定且通常隐藏在细胞内。用电子显微镜采取大海捞针的方式研究球石,构建过程的最初始阶段已经被阐述清楚。事实证明环的组装发生在球石形成的初期,几何上呈环形项链状的方解石晶体是在结构单元之前形成的(图 1.36)。最初,每个晶体单元都是 40 nm 厚的斜方六面体,晶体会长到 100 nm 那么高,并生长成沿 c 轴从顶面和底面放射状生长的产物,形成一个 z 形晶体环,并和成熟球石的晶体环相对应(图 1.37(a))。z 形单元相互连接,选择性生长,这样临近的晶体相互重叠并彼此互锁(图 1.37(b)和(c))。因为横向延伸总是朝一个方向,轴向看逆时针方向,构建过程发展成一种形态学上的手性。

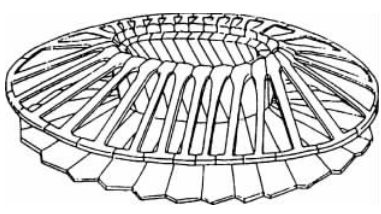


图 1.35　球石盘的结构示意图[5]

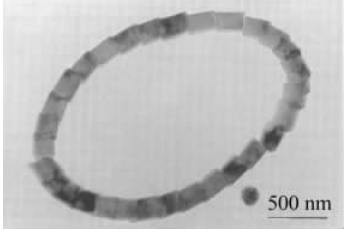


图 1.36　E. huxleyi 的球石形成初始阶段[5]

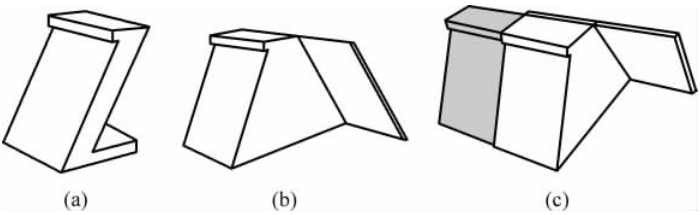


图 1.37　球石环中的结构单元

(a) 起始的 z 形晶体；(b) 侧面延伸；(c) 相互重叠并彼此互锁[5]

但是我们仍然没有阐明在初始成核阶段到底发生了什么，这一点目前仍是未知的。我们不知道 z 形晶体是如何精确有向排列在球石环周围的。我们只知道每个晶体都包含在囊泡中，而囊泡又组装在有机盘的周围。一种可能就是有机盘边缘包含功能组，可以通过界面分子识别过程诱导方解石晶体取向成核。为了说明晶体学观察到的取向，和 a 轴垂直的{110}面一定会在有机盘上优先成核，这样位于平面内的 c 轴将发射状地排列。此外，作为成熟的晶体也是和球石环呈垂直排列的，原始形核表面可能是如图 1.37(a)所示的 z 形晶体的小平面。这些观察结果说明球石的成核过程比开始预想的要复杂得多。

1.4.4.2　构建阶段

球石的整个组装过程显然是一个非常复杂的多级过程，包含几个跨越不同长度尺度的构建阶段。海藻细胞虽然不像骨那样是一个生物矿化的特例，但它采取了如此复杂的构建过程，因此可以预期在这个例子中找到一般原理来帮助我们揭示一个可以指导其他生物矿化系统的理论框架。

球石成形的第一阶段包括在矿化前的有机基盘周围囊泡的组装。我们可以把这个等同于超分子的预组织，这个原理如表 1.6 所示，可应用于不同类型的超分子组装体，包括有如胶原纤维的组织结构。一旦囊泡在有机基盘的边缘周围建立起来，球石构建的第二个阶段就开始了。包括每个囊泡中单个方解石晶体的有向成核，我们又可以把这个看作是一个一般原理，在这种情况下界面分子识别中的超分子预组装组织通过有效信息编码，指导沿某些晶体学方向的形核。一些可能的界面类型可以说明在有机基质表面的极大程度的分子特异性。形核之后，第三级构建就开始了，在球石中就包括晶体沿着预定方向生长形成复杂形式的晶体。这里的原理就是矢量规范，包含我们讨论过的形貌机制。最后，球石盘迁移到细胞壁并作为预制的结构单元形成球石的高级有序组装。从一个更广泛的角度来看，这和骨的分级结构类似，其中是一系列相关的骨结构单元随长度尺度增加而嵌入的过程[77]。

表 1.6　生物矿化中的超分子组装

组　　装	成　　分	系　　统
纳米聚集	成釉基因	牙釉质
	冰成核蛋白	细菌细胞壁
纳米囊	铁蛋白	哺乳动物,细菌
囊	磷脂	磁性细菌
		硅藻属
2-D 模板	表层蛋白	细菌细胞壁
	β-片糖蛋白	壳类
3-D 晶状网	胶原	骨
3-D 大分子网	α/β-甲壳素	帽贝牙齿
		螃蟹表皮
	纤维素	植物表层
	黏多糖	细菌细胞壁

作为进一步发展的一般模型,我们可以认为生物矿物构造是一个包含至少四个构建阶段的多级过程:超分子预组织、界面分子识别、矢量规范和高度有序组装。

一个通俗的比喻也许会有助于理解,这就像是盖房子。首先,建立建筑规划或者位置。这意味着清理一个空间,设定好边界,这样在开始建筑程序之前就可以统一对尺寸、形状和各独立细节间的关联的认识(阶段 1)。还有,接近位点时要保证安全,这样材料才能在后续阶段中保证供应。接下来,就要根据含有构建基本样式的信息的计划或蓝图来打地基(阶段 2)。一旦做完这个工作,房子就可以按预定的说明书构造了,如窗、屋顶等就会被安置在正确的位置上(阶段 3)。如果在一个地点设立了一系列的建筑位点,那么结果就不仅仅是一些预定构建的独立的房子而是一条由高度有序的房屋组成的街道(阶段 4)。对于分级来说,房屋嵌在街道中、街道在城镇中、城镇在城市中等。这种类比或许会为我们认识生物体内的生物矿物构造提供借鉴。

本章介绍了天然生物矿物的分类、典型天然生物矿物的形貌特征以及结构特征。具有多级结构的生物矿物的形成是一个关于生物过程是如何吸收无机沉积物质,构建复杂组织的典型例子。为了认识这些结构是如何构建的,本节先介绍了生物矿物构造的概念,多级过程的原理。用钙化球石作为一个例子,我们鉴别出构建至少有四个阶段:超分子预组织、界面分子识别、矢量规范和高度有序组装,在单细胞和多细胞生物体的生物矿化中具有一般意义。

把生物矿化扩展到多个长度尺寸需要一系列的协调过程和尺寸渐增的结构单元。我们讨论了在骨中是如何按照构建分级程序通过嵌入有组织的

微观结构来达到这一点的，其中的微观结构是由胶原和骨细胞组成的。在单细胞生物体中，有机基质并不普遍，尺寸的延长是靠移动到细胞外，靠近细胞壁的囊泡中包裹的预制矿物结构单元达到的。尽管结构单元可能只是简单地被抛到矿化前沿，它们还是常常组装成有序的结构。

参 考 文 献

[1] Ehrlich H, Koutsoukos P G, Demadis K D, et al. Principles of demineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part I. Common definitions and history. Micron, 2008,39: 1062～1091.

[2] Mann D G, Droop S J M. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. Hydrobiologia, 1996, 336: 19～32.

[3] H Slavkin, P Price. Chemistry and Biology of Mineralized Tissues. Excerpa Medica, 1992: 158～162.

[4] 王夔. 生物无机化学. 北京：清华大学出版社，1998.

[5] Mann S. Biomineralization. Oxford University Press, 2002.

[6] 戴永定等. 生物矿物学. 北京：石油工业出版社，1994.

[7] Weiner S, Traub W, Wagner H D. Lamellar bone: Structure-function relations. J Struct Biol, 1999b, 126: 241～255.

[8] Lowenstam H A, Weiner S. On Biomineralization. Oxford University Press, 1989.

[9] 杭云明. 鄂州淡水珍珠的宝石学特征及其加工工艺的研究. 桂林工学院硕士论文，1994.

[10] 马红艳，戴塔根，袁奎荣. 浙江雷甸淡水无光珠中球文石的首次确认. 矿物学报，2001, 21(2): 153～157.

[11] Qiao L, Feng Q L, Li Z. Special Vaterite Found in Freshwater Lackluster Pearls. Crystal Growth & Design, 2007,7(2): 275～279.

[12] J Aizenberg. Calcitic microlenses as part of the photoreceptor system in brittlestars. Nature, 2001, 412: 819～822.

[13] Burke E M, et al. Influence of polyaspartic acid and phosphophoryn on octacalcium phosphate growth kinetics. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000, 17: 49～57.

[14] Kevor S. TenHuisen. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from a-tricalcium phosphate. Biomaterials, 1998,19: 2209～2217.

[15] Yoshitake Takahashi. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. Biomaterials, 2005,26: 3587～3596.

[16] Josepha R. Effect of hydroxyapatite morphology/surface area on the rheology and processability of hydroxyapatite filled polyethylene composites. Biomaterials,2002, 23: 4295～4302.

[17] Vincent J. Structural Biomaterials. Princeton University Press, 1991.

[18] Wen S L. Human Enamel Structure Studied by HRTEM. Electron Microscopy Review, 1989, 2: 1～4.

[19] Tadashi Matsunaga. Biotechnological application of nano-scale engineered bacterial magnetic particles. Journal of Materials Chemistry,2004,14: 2009～2105.

[20] Frankel R B, Blakemore R P. Iron biominerals. New York: Plenum Press,1991.

[21] Matsunaga T, Okamura Y. Genes and proteins involved in bacterial magnetic particle formation. Review Trends in Microbiology, 2003, 11: 536～541.

[22] Lichtenegger H C, Schöberl T, Bartl M H, et al. High Abrasion Resistance with Sparse Mineralization: Copper Biomineral in Worm Jaws. Science, 2002, 298: 389～392.

[23] Huang L J, Li H D. The Microstructure of Biomineralized Bivalvia Shells, MRS Symp. Proc, 1989, 174: 164～167.

[24] Falini G, Albeck S, Weiner S, et al. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. Science, 1996, 271 (5245): 67～69.

[25] Suga S, Watabe N. Hard Tissue Mineralization and Demineralization. Springer-Verlag, 1992, 6: 101～105.

[26] Marin F, Corstjens P, Gaulejac B de, et al. Mucins and Molluscan Calcification. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(27): 20667～20675.

[27] Feng Q L, Su X W, Cui F Z, et al. Crystallographic Orientalion Domains of Flat Tablets in Nacre. Biomimetics, 1995, 3(4): 159～162.

[28] Feng Q L, Cui F Z, Li H D, Crystal Orientation, toughening mechanisms and a mimic of nacre. Materials Science & Engineering C, 2000,11: 19～25.

[29] Jackson A P, Vincent J F V,Turner R M. The Mechanical Design of Nacre. R. Soc. B, 1988, 2: 234～237.

[30] 冯庆玲.生物矿化与仿生材料的研究现状及展望.清华大学学报,1999,399(6738): 761～763.

[31] 罗军燕.用于湖库水质评价的鲤鱼耳石热释光标型研究中国地质大学硕士学位论文,2006.

[32] Pannella G. Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. Science, 1971,173: 1124～1126.

[33] Campana S E,Neilson J D. Microstructure of fish otoliths. Can J Fish Aquat Sci, 1985, 42: 1014～1032.

[34] Campana S E, Thorrold S R, Jones C M, et al. Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton-induced X-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. Can J Fish Aquat Sci, 1997, 54: 2068～2079.

[35] Tomás J, Geffen A J, Millner R S, et al. Elemental composition of otolith growth marks in three geographicallyseparated populations of European hake (Merluccius

merluccius). Marine Biology, 2006, 148: 1399～1413.

[36] Murayama E, Herbomel P, Kawakami A, et al. Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. Mechanisms of Development, 2005, 122: 791～803.

[37] 李卓. 鲤鱼耳石分级结构及其蛋白调控碳酸钙生物矿化机制的研究. 清华大学博士学位论文, 2008.

[38] Currey J D. The Mechanical Adaptations of Bones. Princeton: Princeton University Press, 1984.

[39] Vincent J. Structural Biomaterials. Princeton : Princeton University Press, 1991.

[40] Shulin Wen. Human Enamel Structure Studied by HRTEM. Electron Microscopy Review, 1989, 2: 1～4.

[41] 托尼·史密斯. 人体——人体结构、功能与疾病图解. 左焕琛主译. 上海: 上海科学技术出版社, 2003.

[42] Zhang H B, Cui F Z, Wang S, et al. Characterizing the Hierarchical Structures of Natural Ivory. MRS Symp Proc, 1991, 255: 151～154.

[43] Cui F Z, Wen H B, Zhang H B, et al. Anisotropy of Micro indentation and Morphology in Natural Ivory. J Mater Sci Eng, 1994, C2: 87～89.

[44] Cui F Z, Wen H B, Zhang H B, et al. Nanophase Hydroxyapatite-like Crystal in the Natural Ivory. J Mater Sci Lett, 1994, 13: 1024～1027.

[45] Su X W. Hierarchical structure of ivory: from nanometer to centimeter. Materials Science and Engineering C, 1999, 7: 19～29.

[46] Feng Q L, Zhu X, Li H D, et al. Crystal orientation regulation in ostrich eggshells. Journal of Crystal Growth, 2001, 233(3): 548～554.

[47] Erben H K. Ultrastrukturen und Mineralisation rezenter und fossiler Eischalen bei Voegeln und Reptilien. Biomineralisation, 1970, 1: 87.

[48] Berman A, Addadi L, Weiner S. Interactions of Sea-urchin Skeleton Macromolecules with Growing Calcite Crystals-A Study of Intracrystalline Proteins. Nature, 1988, 331: 546～548.

[49] Ball P. The self-made tapestry: pattern formation in nature Oxford: Oxford University Press, 1999, 16～49.

[50] Mann S, Frankel R B. Magnetite biomineralization in unicellular microorganisms. In Mann S, Webb J and Williams R J P, ed. Biomineralization: chemical and biochemical perspectives. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. 1989, 389～426.

[51] Okazaki K. Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. Am Zool, 1975, 166: 567～581.

[52] Williams R J P. The functional forms of biominerals. In Mann S, Webb J, Williams R J P, ed. Biomineralization: chemical and biochemical perspectives. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. 1989, 1～34.

[53] 张漾. 野生型与基因突变斑马鱼骨的生物矿化研究. 清华大学博士学位论

文,2001.

[54] Perry C C, Wilcock J R, Williams R J P. A physicochemical approach to morphogenesis: the role of inorganic ions and crystals. Experientia, 1988, 44: 638～650.

[55] Mann S. Chemistry of form. Angew Chem Int Ed. 2002, 39(19): 3392～3406.

[56] Sarikaya M, Tamerler C, JEN A K-Y, et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. Nat Mater, 2003, 2: 577～585.

[57] Mann S. Biomineralization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry. Oxford University Press, 2001.

[58] Simkiss K, Wilbur K. Biomineralization: cell biology and mineral deposiyion. San Diego: Academic Press, 1989.

[59] Westbroek R, de Jong, van der Wal E W, et al. Mechanism of calcification in the marine alga Emiliania huxleyi. Philos Trans R Soc London B, 1984, 304: 435～444.

[60] Anderson O R. Silicification in radiolaria-deposition and ontogenetic origins of form. In Leadbeater B S C and Riding R, ed. Biomineralization in lower plants and animals. Systematics Association Vol. 30, Oxford: Oxford University Press, 1986, 375～391.

[61] Leadbeater B S C. Silicification of "cell wall"of certain protistan flagellates. Philos Trans R Soc, London B, 1984, 304: 529～536.

[62] Aizenberg J, Hanson J, Koetzle T E, et al. Biologically induced reduction in symmetry: a study of crystal texture of calcitic sponge spicules. Chem Eur J, 1995, 7: 414～422.

[63] Didymus J M, Young J R, Mann S. Construction and morphogenesis of the chiral ultrastructure of coccoliths from the marine alga Emiliania huxleyi. Proc R Soc, London B, 1994, 258: 237～245.

[64] Weiner S, Wagner H D. The material bone: structure-mechanical function relations. Annu Rev Mater Sci, 1998, 28: 271～298.

[65] Hancox N M. Biology of Bone. New York: Cambridge University Press, 1972.

[66] Weiner S, Arad T, Traub W. Crystal organization in rat bone lamellae. FEBS lett, 1991, 285: 49～54.

[67] 廖素三. 矿化胶原基组织工程骨材料的研究. 清华大学博士学位论文, 2003.

[68] Francillon- Viellot H, de Buffrenil V, Castanet J, et al. Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissue. In Carter J G, ed. Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends. New York: Van Nostrand Reinhold, 1990, 471～530.

[69] Ge J, Cui F Z, Wang X M, et al. Property variations in the organic sheath within enamel by nanoindentation. Biomaterials, 2005, 26: 3333～3339.

[70] 葛俊, 崔福斋, 吉宁, 等. 人类牙釉质分级结构的观察. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2006, 16(2): 61～66.

[71] Cui F Z, Ge J, Wang X M. Quantitatively studying nano-mechanical properties within the prism and organic sheath of enamel. Mater Res Soc Symp Proc, 2005, 874: L3.6.1/BB3.6.1.

[72] 任冬妮. 淡水鲤鱼星耳石的分级结构. 中国科技论文在线, 2010.

[73] Dopping-Hepenstal P J C, Ali S J, Stamp T C B. Matrix vesicles in the osteoid of human bone. In Ascenzi A, Bonucci E and de Barnard B, ed. Matrix vesicles, Milan: Wichtig Editoe, 1981, 229～234.

[74] Hemleben Ch, Anderson O R, Berthold W, et al. Calcification, chamber formation in foraminifera-a brief overview. In Leadbeater B S C, Riding R, ed. Biomineralization in lower plants and animals, 1986, 237～249.

[75] Leadbeater B S C. Developmental studies on the loricate choanoflagellate Stephalloeca diplocostata Ellis, Ⅱ Cell division and lorica assembly. Protoplasma, 1979, 98: 311～328.

[76] Young J R, Davis S A, Bown P R, et al. Coccolith ultrastructure and biomineralisation. J Struct Biol, 1999, 12: 195～215.

[77] Young J R, Didymus J M, Bown P R, et al. Crystal assembly and phylogenetic evolution in heterococcoliths. Nature, 1992, 356: 516～518.

第 2 章　生物矿化中的结晶原理

生物矿化的实质是在生物体内进行的晶体生长过程。晶体生长是一门仍在发展中的学科，由于它的研究对象一般是非平衡态过程，所以理论发展比较缓慢。1951 年，Burton、Cabreara 和 Frank 提出了 BCF 模型[1]，奠定了晶体生长界面过程的基础，开始了以传输理论和界面过程动力学相结合的现代晶体生长理论的构建。生物矿化的出现给当今晶体生长科学带来新方向的同时，也带来了一个重要的挑战——即生物体是在哪些层次上，又通过哪些途径实现了其特殊的矿化过程，从而获得了具有生物活性的功能材料？传统的物理研究中一般通过过饱和度的控制、物质扩散和传输等因素来研究并建立晶体生长模型；而在已有的生物矿化研究中，人们发现了包含各种层次的多级调控因素（图 2.1）[2,3]。除了传统结晶学所研究的晶体生长影响因素之外，生物矿化还带来了更多并且更加复杂的化学及生物过程，比如结构互补、空间匹配和静电协同等，而这些作用往往又是通过蛋白质、细胞乃至基因来实现的。在生物体系中，这些蛋白质和细胞为矿物生长提供了合适的矿化位置，可以从多组分的复杂体液中（含有多种沉积相）选择特定的矿化形式及矿化内容（特定的沉积相），并还能够进一步控制晶体的定向组装，最终赋予这些矿物特定的生物活性及功能。还有一些研究将生物矿化视为发生在封闭体系中的结晶过程，通过隔室化的效应控制晶体的尺寸和形貌[4,5]。从小范围来说，作为矿化发生的反应器（比如细胞）和体液在空间上是分开而形成的封闭体系，晶体成核和生长过程在时间上同样被隔室分开，基质作为模板

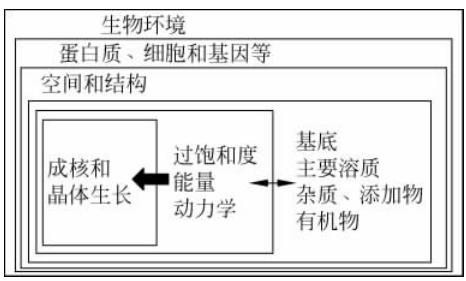


图 2.1　生物矿化中结晶的调控示意图

单纯的晶体成核与生长是物理化学问题，但生物矿化中存在着各级多种而且复杂的调控因素，从而使生物矿物不同于人工合作材料[3]

可以诱导生物矿物的结晶方式与大小，提供矿物形成的生长点，使其具有有序结构并将矿物与软组织相连；而在活的生物体系中，隔室内的过饱和度受到离子载体或离子泵的控制，基质泡、聚电解质、磷蛋白或其他钙离子成键蛋白、磷脂以及酶催化所释放的新生离子等都会对过饱和度产生影响，作为矿化反应器的隔室事实上仍然随时随地与周围隔室和环境相互交换组分和信息。所以从整个生物系统来说，生物矿化作为基本生理活动，同样和周围的自然环境密不可分。

生物矿化的控制看起来是十分复杂并且千变万化的，但上述生物因素乃至环境因素对于矿化过程的调控最终仍然要通过其最基本的物理化学过程——晶体生长来实现。所以基于晶体生长理论的深入理解，对于生物矿化的学习和研究来说是十分重要的。当前生物矿化除了和材料、医学更加紧密地联系之外，一个重要的发展趋势就是要从基本的层次上理解生物矿化的机制，通过分子识别等方法结合晶体生长的研究建立生物矿化的实验模拟体系，同时建立它们的化学和物理模型，将复杂的生物过程变成相对简单的物理化学过程，这样就有可能用科学的方法对生物矿化进行精确研究。本书将会对这些多级的生物矿化调控做出详细介绍，而本章则主要从动力学和界面能量等角度来论述生物矿化中的一些基本原理，理解生物体系通过何种途径来实现生物矿化这一特殊的结晶过程。

2.1　晶体生长基础

早期的生物矿化研究就发现了有机物可以改变晶体生长的过程及其最终形貌，并且提出了这些有机物对不同方向晶体（或晶面）生长动力学所造成的各向异性作用是生物调控的基本途径，这种观点随着生物矿化研究的迅猛发展被更多的实验结果证实，并逐步成为了一个共识。同时人们通过研究自然界中很多矿物的结构，还发现了有机基质往往是晶体成核过程中最关键的调控因素。在生物体系中，结晶过程往往不会在溶液中以均相成核的方式产生，比如骨都是沉积在骨膜基质上，因为这些有机基质或生物蛋白质可以作为“模板”来诱导特定的无机矿物在其有机基质——溶液的界面上形成并完成定向组装[3,6~8]。另外，最近的研究还揭示了磷酸钙在牙釉蛋白（amelogenin）作用下沉积形成纳米颗粒、而后通过组装形成牙釉的过程（图 2.2）[9]。20 世纪 80 年代后期以来，对于生物矿化“模板”的研究一直是该领域最活跃的方向。近年来，人们合成了大量的“有机模板”——特别是 Langmuir 膜和自组装膜（self assembled film，SAF）来模拟生物矿化过程，研究并证实“模板效应”对于异相成核的诱导和促进作用[10~16]。实验结果还发

现,被研究的晶体往往都在这些膜界面上率先形成并具有有序的排列结构。

从这些研究中可以看到,生物矿化的调控包括了成核、生长和聚集三个阶段,而它们恰巧构成了物理学上一个完整的结晶过程。和所有的物理化学过程一样,能量的最小化是结晶也就是生物矿化的最初驱动力,并且也是控制矿物的相、形貌、尺寸和排列等因子的根本因素。

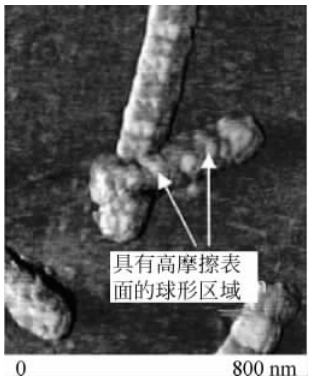


图2.2 原子力显微镜(AFM)下发现了牙釉晶体具有纳米微畴的颗粒结构,进一步的研究提出牙釉蛋白首先诱导HAP纳米颗粒的形成,然后通过纳米组装形成牙釉晶体[9]

2.1.1 结晶过程中的热力学

传统的晶体生长物理模型是建立在气相生长的实验基础和理论分析上,而生物矿化的研究对象几乎都是溶液中的结晶过程。在生物体中,体液是物质和能量传输的基本途径,矿物几乎都是从溶液相中沉积而形成的。因此,生物矿化的最主要形式是溶液结晶过程。在结晶中,无论是成核还是生长都是反应了同一个相转变过程:即物质从溶液状态变成为固体状态。从热力学的能量角度来看,这也意味着在结晶过程初始相中溶液的吉布斯(Gibbs)自由能高于所形成晶体以及最终溶液的Gibbs自由能总和,这样的初始溶液通常被定义为过饱和溶液;反之,就会发生溶解过程。由于生物矿物通常是微溶盐或者是不溶盐,而它们所处的溶液(体液)体系存在着复杂的组分,不是通常晶体研究中简单的纯水体系,所以不同于传统的溶解度及其相关表述,在生物矿化中矿物在溶液中的状态通常用通过它们的活度积(activity product,AP)来表示[17]。例如,如果某矿物的化学组分是,$A_aB_bC_c\cdots N_n$ 它在溶液中存在以下的电离平衡关系:

$$aA+bB+cC+\cdots+nN \rightleftharpoons A_aB_bC_c\cdots N_n \tag{2.1}$$

而该矿物在溶液中的活度积就被定义为

$$AP=\alpha_A^a\alpha_B^b\alpha_C^c\cdots\alpha_N^n \tag{2.2}$$

其中α代表溶液中各个组分的活度。在体系中固相和液相处于平衡状态时,溶液中该矿物的活度积就是化合物 $A_aB_bC_c\cdots N_n$ 的溶度积(solubility product,K_{sp})。一般情况下难溶盐(包括矿物)的溶解度是用K_{sp}来描述的,其单位是 $M^{a+b+c+\cdots+n}$,它是一个仅和温度有关的常数,所以也称为溶度积常数。对于难溶解盐,它们溶液的过饱和度(σ)或者是饱和度(S)分别定义如下:

$$\sigma=S-1=\frac{AP}{K_{sp}}-1 \tag{2.3}$$

当 $S=1(\sigma=0)$时，体系处于平衡状态；当 $S>1(\sigma>0)$时，体系处于过饱和状态，趋向于结晶生长；而 $S<1(\sigma<0)$时则为未饱和溶液，体系中的固体倾向于溶解。在溶解（生物脱矿）的研究中，为了表述和讨论上的方便，还定义了未饱和度，同样用 σ_{under} 表达：

$$\sigma_{\text{under}} = 1 - S \tag{2.4}$$

而在矿化或脱矿过程中的热力学驱动力，也就是两相（固相晶体与溶液）间的 Gibbs 自由能（ΔG_V）与饱和度有着必然的联系。对于结晶过程来说，其相转变的自由能的变化可以描述为

$$\Delta G_V = -kT\ln S \tag{2.5}$$

式中，k 是 Boltzmann 常数，T 为热力学温度。在一些文献（特别是在一些地球科学类的矿化领域）中，有时候也用 ΔG_V 或 $\ln S$ 来直接表达饱和度，称之为过饱和指数（supersatruation index，SI）。虽然在表述方法、称呼和数值上有所不同，但它们都是从热力学的驱动力出发，指出体系中相转变的趋势及其程度。体系如果处于平衡态，则系统的 Gibbs 自由能最小。若系统处于非平衡态，则系统中的相为亚稳相，就会出现相转变[18]。相和相之间是否能够实现转变以及如何转变，就涉及相转变动力学的内容，也就是成核。

2.1.2　成核

在亚稳相中新相（稳定相）能否出现及如何出现，就是新相的成核问题。这是结晶学要解决的第一个问题。在过饱和的亚稳相中，新相一旦成核就能自发长大，这是因为新相的长大是系统 Gibbs 自由能降低的过程。但是仅仅制造一个过饱和溶液是不足以诱导溶液中自发均相成核发生的[19,20]。从实践中我们知道，只有当溶液的过饱和度超过了一个临界值，也就是临界过饱和度的时候，结晶或者说是沉淀才能观测到。在实验和应用中，如果人为地加入固相杂质和晶种，可以不同程度地降低乃至消除临界现象的产生，人工降雨就是这方面最好的实例。

产生临界现象的主要原因是，在晶核形成的过程中，由于固相作为一个新相（晶体）在原先单一的液相（过饱和溶液）中出现，会产生了一个新的界面即固液界面[21,22]，界面的出现就会引起界面能的出现。虽然从过饱和溶液中析出固体对于相转变来说是一个自发的能量下降（$\Delta G_V<0$）过程，但是由于固体晶核的产生和随后的晶体生长分别是固液界面的形成和扩展的过程，而界面的形成和增大使晶体-溶液界面的总 Gibbs 能量上升（$\Delta G_S>0$），导致了这一过程中表面能的上升（图 2.3）。假定形成的晶核近似为半径为 r 的圆球，我们可以看到在成核过程中，晶核通过相转变获得的体相 Gibbs 自由能（体自由能）的降低为

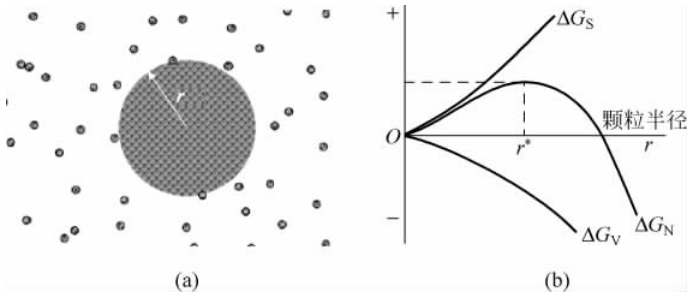


图 2.3　成核过程中各种能与晶核大小的关系

(a) 溶液中的晶核,半径为 r,小粒子代表矿物成核与生长中最基本的单元;(b) 成核过程中的总 Gibbs 自由能(ΔG_N)、体相能(ΔG_V) 和界面能(ΔG_S) 的变化和所形成晶体或晶核尺寸(r)之间的关系,r^* 是指溶液中均相自发结晶所需要的临界尺度,图中 $\Delta G_N = \Delta G_V + \Delta G_S$

$$\Delta G_V = \frac{4\pi r^3}{3\Omega}\Delta g \tag{2.6}$$

其中 Ω 是指图 2.3 中每个基本单元的体积,而 Δg 是指每个单元所含有的相转变 Gibbs 自由能。在这个过程中同时所增加的界面能 ΔG_S(面自由能)为

$$\Delta G_S = 4\pi r^2 \gamma_{SL} \tag{2.7}$$

γ_{SL} 代表界面能,单位为 J/m^2。一个完整的成核过程中总能量可以描述为体自由能和面自由能之和:

$$\Delta G_N = \Delta G_V + \Delta G_S = \frac{4\pi r^3}{3\Omega}\Delta g + 4\pi r^2 \gamma_{SL} \tag{2.8}$$

如图 2.3 所示,ΔG_V 项<0,反映了过饱和溶液中的成核是热力学趋势,而 $\Delta G_S>0$,阻止晶核作为一个新相在溶液中出现。由于 ΔG_V 与晶核半径 r 成三次方,而 ΔG_S 与 r 成二次方,所以当 r 数值较小时,后者在 ΔG_N 中会占较大的分量;只有当 r 足够大时,ΔG_N 才体现出下降的趋势,使成核过程能够自发产生。由于 Gibbs 自由能为连续函数,在 ΔG_V 和 ΔG_S 两个极值之间必然存在一个极大值,这就是由亚稳态转变为稳定态所必须克服的能量位垒,也是亚稳态能够存在而不立即转变为稳定态的必要条件。通过 $\partial \Delta G_N/\partial r$,我们可以得到这一极值,即 r^*。这样成核过程中总的 Gibbs 自由能就出现了两种状态:晶核半径小于临界值 r^* 时,界面自由能项的上升幅度大于体自由能项的下降幅度,使成核总能量($\Delta G_N = \Delta G_V + \Delta G_S$)随着晶核的长大($r$ 的增大)而上升($\partial \Delta G_N/\partial r>0$),从而使成核成为热力学上的非自发过程,抑制了结晶;只有当晶核的半径大于 r^* 时,ΔG_V 项的下降幅度开始大于 ΔG_S 项的上升幅度,晶核的进一步生长变为总能量下降($\partial \Delta G_N/\partial r<0$)的过程,从而实现自发的成核和晶体生长。结合公式(2.5) 和(2.8),我们可以得到 r^* 和界面能(γ_{SL})及

饱和度有着以下的关系：

$$r^* = \frac{2\gamma_{SL}\Omega}{kT\ln S} \tag{2.9}$$

以上讨论的是溶液中的均相成核。生物矿化的过程中的成核是在生物有机基底上发生的，当有机基质作为一个异相在溶液中存在时，就能够在很大程度上改变甚至控制无机矿物的成核过程[2,23]。通常说来，晶核沉积在一个固相基底而造成的固固界面能会低于晶核和溶液间的界面能[24]，这是因为晶体中的分子或离子可以和固体基质特别是具有官能团的有机基质产生化学的成键作用，其键能都会高于它们和溶剂分子间的作用。界面能主要是来自于两相物质间的物理、化学间的键合作用，强的键合对应于低的界面能从而使成核的势能位垒降低。同时，有机和无机间的键合作用还能赋予生物矿化中定向成核的特性。显然，这种界面间的成键作用取决于晶体和基底的表面结构。如果在分子或原子层次上，两相间的结构互补并排列一致，它们不仅能够将界面间由于晶格不匹配所产生的张力（界面能的重要组成部分）降低到最小，其化学成键还可以大大降低体系中的熵，从而促进了匹配晶面在基底上的优先选择性成核（图 2.4）。

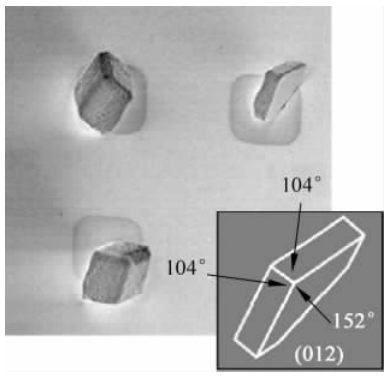


图 2.4　从 Mercaptohexadecanoic acid（MHA）自组装膜上方解石的成核发现，体系中所有的晶体都是在有机基质的表面上形成，MHA 中的羧基残基可以和钙离子发生化学成键作用，因此成核在其有机-无机界面上优先发生。由于膜本身所具备的有序点阵结构，其表面的成核也是定向的，均以（012）晶面与基底接触

2.1.3　成核动力学

如果溶液是过饱和的，那么无论它里面是否能够形成大于临界尺寸的晶核或者是否存在异相，结晶过程最终还是会发生的。上面所讨论的由界面能所产生的临界效应的重要性，在于它决定了成核过程的时间尺度，也就是成核的动力学过程。在物理化学中，热力学是状态函数决定了最终的状态，而动力学是个过程函数，决定了从亚稳态到稳定态变化的途径和速度。从另外一个角度来说，对于热力学不稳定状态，如果它在动力学上仍然处于相对的稳定状态，就产生了亚稳态。所以，尽管生物体系是一个非平衡体系，但仍然维持着相对的稳定性，就是因为其中存在大量的亚稳态。这在生物矿化的研

究中也不例外。以上面所讨论的均相体系为例,界面能所产出的成核的位垒(ΔG_N^*)是

$$\Delta G_N^* = \frac{16\pi\gamma_{SL}^2\Omega^3}{3(kT\ \ln S)^2} \tag{2.10}$$

该能量位垒决定了成核动力学。和所有的化学反应动力学过程一样,成核速度(J_N)可以通过能垒的大小来表达[25,26]:

$$J_N = Ae^{-\frac{\Delta G_N^*}{kT}} \tag{2.11}$$

其中 A 是速率常数。当成核能垒暂时未能被克服的时候,也就是体系处于亚稳态时,虽然成核反应不能即时发生,但经过一段时间后均相的结晶仍然会在溶液中发生,因为体系最终还是要回到能量最低化的稳定状态。经过的这段时间被成为成核诱导时间(induction time,τ)。经过简化处理以后,人们发现 τ 和 J_N 有着反比的关系,即 $\tau \propto J_N^{-1}$。这样我们联系公式(2.10)和(2.11)可以得到

$$\tau \propto e^{\frac{\gamma_{SL}^3}{(\ln S)^2}} \tag{2.12}$$

可以看出成核速率对于界面能及饱和度的巨大依赖程度,图 2.5 显示了实验中 τ 和过饱和度之间的典型关系。在异相成核中,诱导时间和过饱和度也有类似的关系,但由于此时界面能 γ_{SL} 往往小于均相成核体系,而界面能项在 τ 中扮演了更为重要的角色,所以异相成核相对于均相成核来说容易得多,从而优先发生。

图 2.5 均相体系中过饱和度与成核诱导时间的关系

在生物矿化的异相体系中也存在类似的关系

2.1.4 晶体生长动力学

介绍了成核以后我们面临的问题是,在晶核形成以后它又是怎样生长从而形成完整的晶体,这就是晶体生长动力学要研究的课题。生长的动力学规律决定于生长机制,生长机制又取决于生长过程中界面的微观结构。因而和成核的研究一样,晶体生长动力学规律也是与界面特性密切相关的。

图 2.6 在分子层次上展示了晶体表面状况,可以看到晶面包含了相对光滑的几何平面,称为台地(terrace);晶面上还存在有台阶(step)[27,28],而台阶自身往往也不是十分完美的,具有很多的扭折(kink)。晶体生长的微观动力学中是这样描述晶体生长过程的:溶质作为生长单元首先吸附在晶体的表面,在此过程中台阶上的扭折起着十分重要的角色。因为在晶体的表面上,扭折比台阶及台地能给生长单元提供更多的成键,这样生长单元可以被晶体

更为牢固地结合并更容易融入到晶体结构中。如果生长单元最初是吸附在台地上，那么单元可以通过晶面运动或者晶体-溶液中的解附/吸附过程接近台阶[29]特别是扭折处，从而通过更多的成键实现更好的吸附。除此之外，这些在台地上的小生长单元也可以通过聚集形成大的聚集体或称之为岛结构(island)，而岛微畴结构也产生新的台阶，这可以视为晶面上的二维成核过程[27,28]。

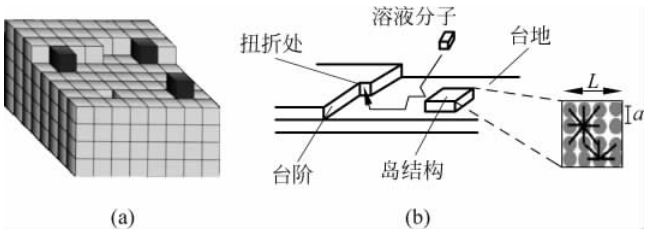


图 2.6　分子层次上的晶体表面状况

(a) 晶体的微观结构是由一个个生长单元整齐堆积而形成的，而晶体的表面在原子层次上并不是完美平整的；(b) 在晶面上存在台阶、台地和岛微畴等结构，溶质分子通过吸附及晶面上的移动和台阶特别是台阶上的扭折处结合，完成晶体生长，岛结构也可以被看作长为 L 的台阶

溶质的生长单元在晶体和溶液界面之间存在着吸附和脱附的平衡，当吸附速率大于解附速率的时候就产生了晶体生长现象。所以说，宏观上晶体生长速度在微观上可以通过台阶运动来描述。

图 2.7 描述了溶液中晶体表面的台阶生长或扩展过程，我们再次回到能量的角度上，可以发现在台阶扩展的过程中，由于 n 个溶质分子从过饱和的液相进入晶体，台阶获得了体相能为：

$$\Delta G_{\text{台阶,V}} = n\Delta g = \frac{L}{a}\Delta g \tag{2.13}$$

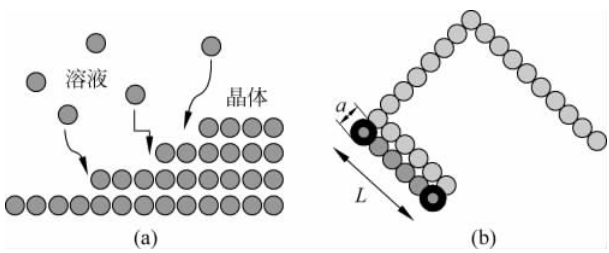


图 2.7　溶液中晶体表面的台阶生长或扩展过程

(a) 固-液界面处晶体台阶生长的示意图(侧视图)；(b) 台阶生长的俯视图，在一段长度为 L 的台阶上吸附满直径为 a 的溶质分子(深色部分)，这也意味着台阶又扩展了一层

同时由于台阶的扩展我们可以从图 2.7(b)中看到,其台阶和溶液的界面长度也增加了 $2a$。和固-液平面间的界面相似,台阶和溶液间也存在着同样的界面能,它可以被视为是在特定方向的界面能分量,称之为台阶能($\gamma_{台阶}$),这样,在台阶生长的过程中除了它所获得的体相能外,还需要付出台阶能的增加:

$$\Delta G_{台阶,S} = 2a\psi\gamma_{台阶} \tag{2.14}$$

公式中 ψ 是台阶的形状因子,而总能量为两项之和

$$\Delta G_{台阶} = \Delta G_{台阶,V} + \Delta G_{台阶},s = \frac{L}{a}\Delta g + 2a\psi\gamma_{台阶} \tag{2.15}$$

公式中体积能项为负值而台阶能项为正值,在这个二维的台阶生长过程中,只有当 L 大到一定的数值即 L_C 以后,$\Delta G_{台阶} \leqslant 0$,这时台阶的扩展才成为自发过程并推动宏观现象晶体生长的发生。在台阶生长理论中,光滑界面不能借助于热激活自发地产生晶体生长必需的台阶,只能通过二维成核(岛结构的形成)不断地形成台阶以维持晶体的持续生长。二维成核同样需要克服由于台阶能而产生的热力学位垒,因而可以导出与溶液中三维成核类似的速率和驱动力之间的指数关系,并且可以推论同样存在临界驱动力。不过 BCF 理论指出,除去二维成核之外,晶体中的缺陷如位错、孪晶,都能够消除或减少二维核的能量位垒,并往往提供天然的生长台阶[1,27,28]。

近来表面观测技术的发展,特别是溶液原子力显微镜(Atomic Force Microscopy, AFM)的应用,使发生固-液界面的晶体生长可以被实时实位地在分子层次上被观测到(图 2.8)。AFM 在当前的晶体生长以及矿化研究领域中作为一个动力学观测的先进手段被广泛使用,使我们可以更为直观地在实验层次上去观察并证实晶体生长的微观过程和理论[30,31]。图 2.9 中展示的是磷酸氢钙(DCPD,磷酸盐中的一相,被认为是羟磷灰石的前体之一)(010)晶面上的台阶在过饱和溶液中的运动。在晶体表面,三角形位错线在位错的源点不停地形成,提供了晶体生长所需要的台阶[32]。正如式(2.15)及图 2.7 所描述的那样,当位错源点上产生的初始台阶长度(L) 小于所要求的临界长度(L_C) 时,该台阶没有向外移动($V_3 = 0$),整个台阶维持静止不动,此时该台阶对于晶体生长的贡献为零;只有当其长度大于 L_C,作为生长单元的磷酸氢钙开始自发地吸附在台阶边缘从而使台阶向外移动($V_3 > 0$)。可

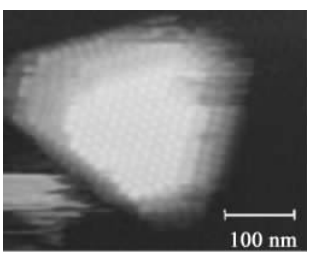


图 2.8 AFM 下分子层次上的固-液界面的晶体生长

在 AFM 中看到脱铁铁蛋白(apoferritin)晶体(111)晶面上形成的二维晶核结构,可以在分子层次上看到台阶的结构[30]

以看到，在微观的晶体生长台阶的形成和扩展过程中（也就是晶体生长），表面能的控制同样起着决定性的作用。

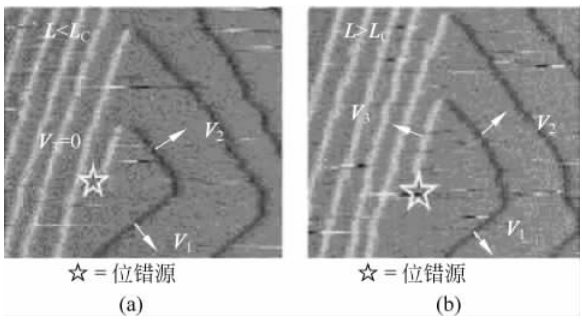


图 2.9　磷酸氢钙晶面上的台阶在过饱和溶液中的运动

(a)和(b)都是 DCPD 晶体(010)晶面在过饱和水溶液中的 AFM 实时实位观察图，直接显示了在表面的台阶生长是晶体生长的基本构成单元。但是，只有构成台阶的位错线大于临界值(L_C) 后，它才会移动扩展从而开始对晶体生长产生贡献[32]

二维晶核及其台阶一旦形成，台阶会在驱动力（过饱和度）的作用下沿着晶面运动。当台阶扫过整个晶面的时候，晶体就生长了一层。在晶体生长中，台阶的运动主要还是取决于面（晶面）扩散或者体扩散（从溶液到晶体表面）到达台阶的分子吸附流量。对于溶液生长，Burton、Cabreara 和 Frank 分析了从流体到扭折的扩散过程，得到了溶液生长中台阶生长的动力学规律[1,27,28]：

$$V(L) \approx V_\infty \left(1 - \frac{e^{\sigma L_C/L} - 1}{e^{\sigma} - 1}\right) \approx V_\infty \left(1 - \frac{L_C}{L}\right) \tag{2.16}$$

从式(2.16) 可以看出，台阶的生长速率(V)是台阶长度(L)的函数。台阶越长，其运动速率越大。当 $L \to \infty$时台阶的速率达到最大值 V_∞，这就是说单根直台阶的速度 V_∞是每个生长台阶的速率极限；当 $L \to L_C$ 时，由公式可知，台阶的运动速度趋向于零，这也可以从二维成核的热力学关系式中得到解释。同时我们还可以看出，在给定的过饱和度 σ 下，当 $L > L_C$ 时 $V > 0$，台阶可以自发生长；当 $L < L_C$ 时 $V < 0$，台阶将自发缩小乃至消失。这种性质和我们前面在成核中所描述的晶核行为是完全一致的。

2.1.5　纳米组装

上节描述的经典的晶体生长理论认为晶体是通过单个的分子或者原子进入到预先形成的晶核或者模板上来生长的。经典的 Ostwald 熟化指出颗粒构成的晶体生长过程中，大尺寸颗粒的生长能够以小颗粒的溶解为代价，这

一过程的驱动力是表面能的降低。但是这种经典的晶体生长模型最近受到了挑战。水热法合成的纳米 TiO_2 晶体的生长和形貌演化不同于传统的基于离子或分子的生长模型[33],也不同于经典的 Ostwald 熟化。最终纳米颗粒之间直接相连形成了链状的高级结构(图 2.10)。在此基础上,Banfield 等提出在许多无机纳米晶体的生长过程中,纳米颗粒与颗粒之间可以通过有向连接(oriented attachment)的方式实现生长。这种生长机理适合于相邻纳米颗粒的自发组织过程,相邻的颗粒之间通过调整而具有相同的晶体学取向,在这一过程中,当两个颗粒的距离靠到一定的范围内,颗粒之间的 van der Waals 力将颗粒吸引在一起,在这个过程中两个取向一致的晶面可以融合从而最大限度地降低界面能。到目前为止,已经有一系列的纳米晶体的生长是满足这种"取向连接"的生长模式。这种新的机理在纳米晶体的领域中比较常见,这是由于纳米颗粒尺寸小,比较容易调整构型和取向。同时纳米晶体的悬挂键比较多,靠近的颗粒通过融合使得悬挂键大幅度下降[34]。水热的锐钛矿生长,纳米颗粒自发组装成单晶的结构,在这种单晶中可以明显地看到纳米颗粒单元的形貌(图 2.11)。

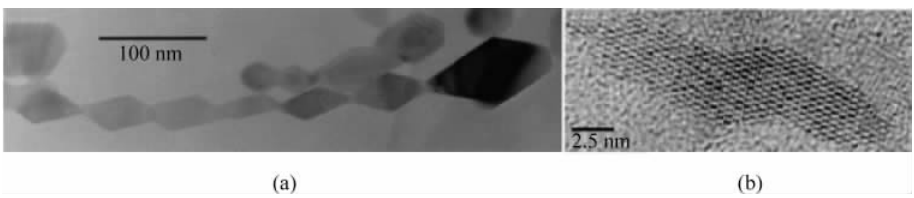


图 2.10　纳米颗粒之间直接相连形成链状的高级结构

(a) 水热法生长的锐钛矿晶体过程中纳米颗粒连接成链状结构的 TEM 图片;
(b) 表示图(a)中相邻两个颗粒的高分辨透射电镜图片 HRTEM[33]

以有向连接进行晶体生长的还有 ZnO[35]和 MnO[36],在 ZnO 中首先合成球形的纳米颗粒,通过浓缩使得颗粒的浓度上升,最终加热回流使得纳米颗粒聚集成项链状的结构,颗粒连接处可能经过溶解再生长而被填实。形成了单晶的纳米棒状结构。除此以外,Cölfen 等发现当纳米颗粒体系中存在着高分子,表面活性剂等调控分子时,纳米颗粒可以排成结构有序的有机无机复合超晶体。他们将这种结构称为介晶(mesocrystal)[37,38]。在介晶中有机分子作为连接相邻纳米颗粒的桥梁。甚至发现利用这种方法所构建出的超结构具有比单一纳米颗粒更高的对称性。其实介晶是一种广义上的胶体晶体,它的构成单元不是原子或者通常意义上的分子而是纳米颗粒,介晶中纳米颗粒排列成类似原子在晶格中的结构,而且相邻颗粒之间的晶面基本一致,所以介晶具有与单晶极其类似的散射特性。由于介晶往往具有类似单晶的形

貌和衍射特征，所以它在实际的研究中很难被发现。如果介晶中有机分子和纳米颗粒的晶面结合的强度不大，介晶很容易通过排出有机物以及颗粒的有向连接和融合而成为单晶。所以介晶往往是在大量有机高分子存在时由纳米颗粒变成单晶过程中的中间状态(图 2.11)。

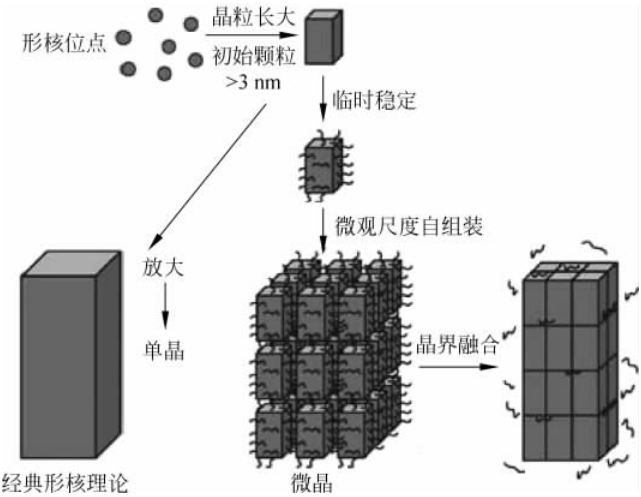


图 2.11　经典的结晶过程通过离子或者分子生长成单晶(左边)；通过纳米颗粒的介观自组装生成介晶后通过介晶中颗粒的融合和有向连接生成单晶(右边)[38]

介晶在生物矿化中也有重要的意义，在生物矿化中，纳米颗粒被认为是构成生物矿物的基本单元，而且基本单元之间是类似搭砖块的结构。其中一个典型的例子是海胆的骨刺，它主要由方解石构成，在偏光显微镜和衍射下骨刺呈现的是类似单晶的特征，但是这种生物矿物的断裂面却与经典的单晶极不相同，反而更加接近无定形体的断裂面。Weiner 等把这种奇怪的现象归因为单晶骨刺中夹带的蛋白质所引起[39]。这个问题可以利用介晶的观点进行解释，这是由于骨刺中的方解石纳米颗粒具有很好地按照晶体学的排列，所以其衍射的结果类似单晶，但是其断裂面的结构却类似于无定形体。在模拟矿化的研究工作中，人们用各种水溶性的合成高分子或天然的生物大分子模拟可溶性生物大分子的功能，亦即利用水溶性的大分子来控制碳酸钙介观结构的形成是仿生矿化的常用研究手段。取向连接和介晶模型都属于介观组装，是对经典晶体生长理论的重要补充，它回答了在纳米颗粒体系中如何得到复杂的多级结构和高有机含量的复合结构，能够用来解释为什么生物矿物具有复杂的多级结构和类似单晶的特征，但是这个模型不能解决生物体内的纳米颗粒是如何生成的，颗粒与颗粒之间的识别是如何实现的等更加基础

的问题。

2.1.6 前驱相和相转化

除了以上经典的晶体生长和介观组装以外,最近几年人们更加关注在生物矿化的早期往往存在着前驱的亚稳定相,这种亚稳定相在受控条件下转化成最终的稳定晶体相。而不是晶体直接由离(分)子生长得到。而在前驱相中受到关注最多的无定形相。最早的关于生物体内 ACC 的提及可以追溯到 1968 年,Towe 和 Hamilton 在双壳类生物的甲壳的生长过程中发现了大量存在的空心的"晶体",他们认为这在文石形成的早期是另外的物相[40]。与此同时,Posner 等也在实验中发现高过饱和磷酸钙溶液中先沉积的物相是无定形磷酸钙(ACP),ACP 的相变问题开始得到人们的关注[41,42]。最早揭示无定形前驱相在生物矿化中意义的工作是 Weiner 和 Lowenstam 于 1985 年在贻贝的牙齿的矿化过程中发现的,最早形成的物相是 ACP,经过数周 ACP 转化成含碳酸根的 HAP[43]。

目前研究的无定形相主要是无定形碳酸钙和无定形磷酸钙,这是由于其对应的结晶相构成了当前生物矿化的主题内容。这其中又以观测生物体内的无定形相为多。研究表明[44]海洋和陆生甲克纲生物的甲壳中除了结晶相以外,还存在相当多的无定形相。无定形相不仅起到前驱体的作用,由于其溶解度很大还能够作为临时离子储存的载体。许多研究发现,当钙盐和碳酸盐溶液混合时,虽然最终得到的碳酸钙沉淀是方解石或其他结晶相,但是溶液中首先形成的是胶状无定形相,然后再通过相转换变成结晶相,也就是在动力学上经过一个多步转化的过程,而不是一步直接形成最稳定的相。Cölfen 等在最近的研究中发现,溶液中的钙离子和碳酸根离子首先形成一种离子簇,这种离子簇甚至可以在欠饱和的溶液中稳定存在。并且认为成核是通过离子簇的聚集和重排来实现的。生成的 ACC 的短程有序性直接跟离子簇的构型相关[45]。在 ACP 体系,Posner 等也提出类似的思想,认为无论是结晶还是无定形磷酸钙相的基本构成单元都是 $Ca_9(PO_4)_6$(Posner cluster)。这种小团簇的尺寸为 0.95 nm。而且这种团簇在 3 nm 以内的短程序与 HAP 基本上是相同的。Wegner 等[46]提出了液-液相分离的机理来解释溶液中无定形碳酸钙的形成,并用 Spinodal 分相模型描述了这个过程。这种过程中自由能的曲率是负的,任意的浓度扰动都可以使体系的自由能下降,局部离子浓度升高,大部分区域的离子浓度降低,从而形成离子的富集区,这种区域演化成液相无定形。Gower 等[47]则提出了高分子诱导液相前驱体的过程形成无定形碳酸钙和有机物的复合物。在这个过程中高分子能够局部富集钙离子,使得局部的过饱和度升高,从而诱导无定形前驱体的生成。高分子改变

了相分离之前的体系相图。由于高分子的吸附和夹带，无定形的流动性更好，而且水合能力更强，这往往能够在基底上成膜，如果没有高分子存在，无定形的成膜性会大幅度下降。

无定形相与晶体相比，原子或分子排列混乱度更大，没有周期性和平移对称性的固体。无定形结构往往用径向分布函数来表示，无定形中原子的排列介于晶体和溶液之间。这种结构也指出无定形的自由能与溶液更加接近。无定形在偏光下是各向同性的，不会对偏光的相位进行调制。对 X 射线没有明显的衍射峰，只会出现宽度很大的衍射包。然而利用扩展的 X 射线吸收精细结构(EXAFS)方法对多种生物体内提取的无定形碳酸钙研究[48]发现，虽然没有长程有序，无定形碳酸钙的结构并非完全无规则排列，而是具有某种程度的短程有序；同时某些无定形碳酸钙的短程有序结构类似于它将要转化成的结晶碳酸钙结构。如有些无定形碳酸钙的结构接近于方解石，而有些则接近于文石。

越来越多的实验证据表明，生物体更多的是在矿化早期先沉积有序性较低的矿物相，然后再通过控制这一物相的结晶过程来得到相对稳定的结晶相。这就是通常所说的生物矿化的前驱相模型。在相同的生物体牙齿上，Weiner 和 Lowenstam 发现了无定形磷酸钙转化成为碳酸化的磷灰石的证据。Nelson 等发现在合成的碳酸化磷灰石的中心含有类似 OCP 的物相，这种通称的“中心黑线”在生物体的磷灰石中也存在，所以生物体内的磷灰石是通过 OCP 前驱相转化而来的[49]。Tohda 利用高分辨透射电镜在最先生成的牙釉质晶体中也发现了 OCP 的存在[50]。利用高分辨透射电镜在脊椎动物的硬组织中发现无序相。但是用电镜进行研究面临很多的制样工艺，脱水和电子辐射等问题，在这些过程中也有可能会引起材料晶型的改变。所以要做到无损检测瞬态无序相是很困难的，通常选取的模型生物能够同时生成大量的矿物相，同时采用的检测手段不会带来对样品的破坏，例如不需要高真空度，不需要脱水等环节。Crane 等在 2006 年用微区拉曼光谱对鼠的新生骨进行观察，激光的光斑可以聚焦到几个微米大的区域上，同时样品可以保持在湿润状态，研究发现在新生骨中存在 OCP 前驱相，虽然这一结果指出 OCP 是骨中的碳酸化的磷灰石的前驱体，但是也没有排除其他更不稳定的物相，像 ACP，作为更早的前驱体的可能性[51]。Weiner 和 Addadi 利用斑马鱼的尾鳍骨作为研究对象，发现在骨形成的早期有大量的 ACP 相，随着骨的成熟，ACP 的含量会下降，这一结果首次证明了骨中 ACP 作为前驱体的可能性，解决了几十年来关于骨中最早形成的矿物相的成分和晶型的争论(图 2.12)[52,53]。Weiner 和 Addadi 的研究工作还指出无定形碳酸钙(ACC)是棘皮动物骨骼，软体动物幼虫甲壳和甲壳类生物的外壳中成熟的

晶相(文石或者方解石)的重要的前驱体,在以上生物的矿化过程先于结晶相出现。

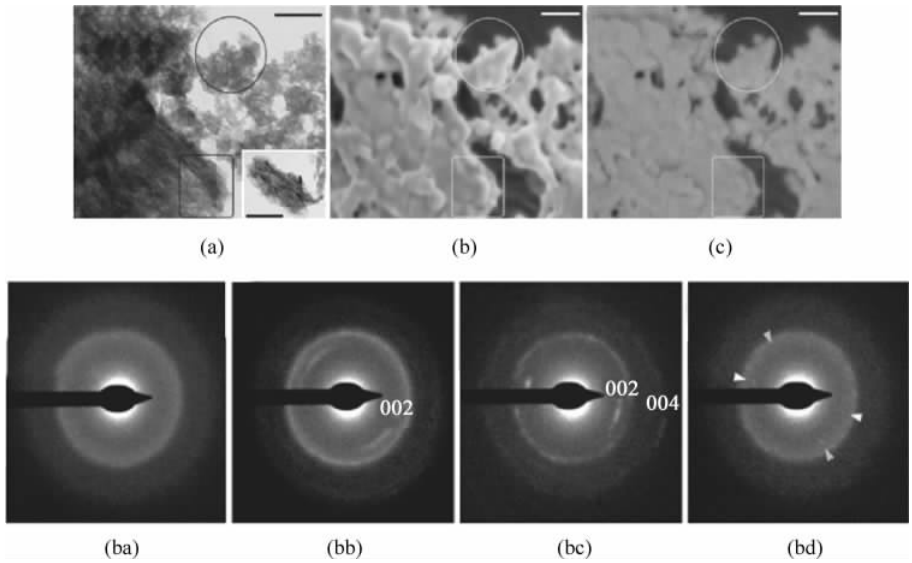


图 2.12　斑马鱼尾鳍骨端部提取的矿物样品的透射电镜(TEM)和选区电子衍射(SAED)照片

(a) TEM 图片;(ba)(a)中用圆圈包围的区域显示的是无定形的弥散环;(bb)(a)中用矩形包围的区域显示的是 HAP 弱的结晶环;(bc)(a)中插入的区域显示的是 HAP 较强的结晶环;(bd)(a)中用圆圈包围的区域室温下储存 1 周显示的是部分结晶的特征;(b) 高分辨的冷冻 SEM 图片;(c) 背散射(ESB)图片显示出无定形和结晶区域信号强度没有显著区别[53]

相对于结晶态,无定形相具有各向同性和可塑性的特点,容易被塑造成生物所需要的各种形状,然后转化为相应形状的结晶相,这和自然界中所观测到的千姿百态的生物矿物所对应。自然界的生物矿物与合成晶体最显著的不同之处在于它们具有千姿百态,形状各异的外形。也许生物正是利用了无定形碳酸钙的这一特点来构筑自身的各种结构。

2.2　生物矿化的调控途径

生物矿化的调控途径是一个十分复杂的系统过程,相对于生物矿化中晶形的控制、定向生长等研究而言,对于其调控机制的理解还存在很多不明确的地方,有待进一步探索和讨论,因此它也是当前生物矿化发展的一个重要方向。要从物理和化学基础上研究和理解生物矿化中的成核生长过程,需要

利用更多的能够精确地研究其热力学和动力学过程的物理化学方法。晶面匹配的模型被提出以后，在很长时间里几乎成了生物矿化的唯一解释，但是目前越来越多的研究表明，该模型还不能解释很多矿化中的晶体形成过程（特别是在晶体生长方面），同时对于矿化中台阶生长动力学方面的研究也正在兴起。该节就生物矿化中调控机制的研究概况作一个总结。

2.2.1　晶体与台阶的形貌

晶体形貌的控制是晶体生长过程中热力学能量及动力学控制的共同结果[54～56]。所生成的晶体，也就是通过成核与生长所形成的平衡稳定的固相形态，往往就是界面能量最小的结果（图 2.13）。也就是说，晶体的形貌仅仅取决于其在饱和平衡溶液中的界面平衡状态。另一方面，从动力学也就是晶体生长的角度来说，生长速度最慢的晶面（晶面生长速度是指垂直于该晶面方向的晶体延伸速度）将构成所生成晶体表面最大的晶面，而生长速度快的晶面将构成晶体表面的小晶面甚至消失。基于上面的分析，我们可以认为，具有较低界面能量的晶面也将是生长速度较慢的晶面。因此，晶体生长过程中生长速度较慢的晶面也通常成为最终所形成晶体的表面。同时，生长过程（非平衡状态下）的晶体形貌必然还和其他动力学因素存在联系，如生长的时间、晶面台阶或者缺陷数目等。对于晶体生长的台阶来说，也存在类似的界面现象，从而使台阶的形貌也同样受到相同的热力学和动力学过程的调控，不过需要注意的是，台阶能量相对于二维晶面的界面能具有更高层次的各向异性。

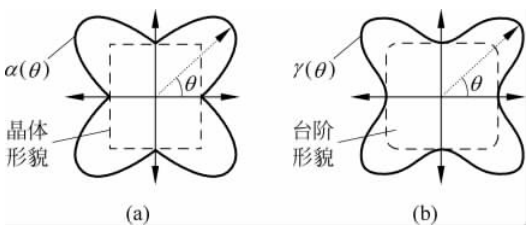


图 2.13　晶体（a）和台阶（b）的形貌与界面能以及台阶能的关系，它们的形状往往是界面能量最小化的结果

由于晶面和台阶之间具有一定的共性，一些研究还发现，晶体的形貌和生长台阶以及临界二维晶核的形状存在相当多的联系。以方解石为例（图 2.14），晶体的形貌也就是台阶的形貌，也类同于最初所形成的临界台阶的形貌。或者反过来说，台阶的形貌也决定着晶体的形貌[7]。

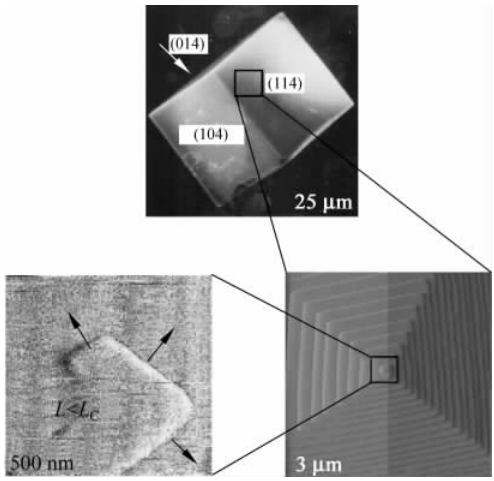


图 2.14　在很多晶体生长的体系中发现晶核、台阶和晶体的形貌具有一定的形似性,该图是以方解石为例进行的说明

2.2.2　生物矿化中的晶面识别

在生物矿化研究中有个很重要的概念叫做晶面识别[2,3],也就是说生物体系中特定的有机基质能够和无机矿物形成结构上的互补匹配,从而控制晶体的形貌、尺寸和排列等。在生物矿化中的有机模板-无机矿物体系建立以后,大量的研究集中在有机体系通过晶面识别诱导无机晶体的定向生长。关于晶面识别所包含的具体内容,如结构互补、空间匹配和静电协同等这里不具体介绍,我们结合本章从界面和晶体生长的角度来讨论。

从成核出发,简单地考虑晶体有两种不同的晶面 A 和 B(图 2.15),它们具有不同的晶面结构或点阵排列,但具有类似的界面能(界面状态 1)。在正常情况下,A 和 B 所由于界面能量所造成的成核位垒是相同的,所以晶面 A 和 B 可以随机地通过均相成核产生。当结晶体系存在异相基底时,A 和 B 晶面可以通过异相成核来降低各自的成核界面位垒,但由于基底不具备任何晶面识别功能,所以 A 和 B 仍具有相类似的界面能态 2,此时晶面 A 和 B 仍然是随机地吸附在异相基底表面成核结晶并形成无序的排列。但在生物矿化的过程中,生物有机基质通过其表面的官能团以及它们的排列,可以和特定晶体表面(例如晶面 B)的无机离子及相应的点阵结构形成互补并构成化学成键。由于有机基底的结构和 A 不能相互匹配,对 A 只可能起着一般异相成核的基底作用。由于界面能是界面两相之间键能的函数,键能越高则界面能越低,所以晶面 B 在有机基质表面的成核能垒 $2'$ 就远远低于晶面 A 的成核能垒

2′。这样 B 晶面可以在有机表面上优先形成，而且由于 B 晶面和有机基质具有更低的界面能，使晶体能以 B 晶面和有机基质接触并平行生长。在生物矿化中，这些有机基质通过界面能量的调节从而使无机结晶具有了定向成核、生长和组装的特性。图 2.4 展示了无机方解石晶体在 MHA 薄膜的诱导下，选择(012)晶面和薄膜接触并以此定向生长、排列。

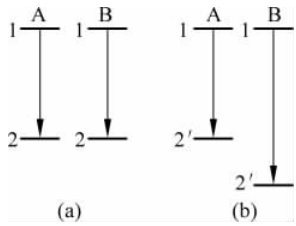


图 2.15　状态 1 是两个不同晶面 A 和 B 在溶液中均相成核的位垒(假定它们具有类似的界面能垒)，通过异相成核可以降低成核位垒至状态 2

(a) 表示当异相不具备识别能力的时候，晶面 A 和 B 均可以在其表面成核(具有相同的能垒)。(b) 表示在生物矿化过程中，有机基质可以通过互补和协同等作用和晶面 B 形成匹配，从而大幅度降低晶面 B 的界面能垒，使 B 的 2′小于晶面 A 的 2′，这样 B 晶面就能够优先在界面上成核、生长，并被赋予了定向的特性

水溶液中生长得到的晶体往往具有固定的形貌，表面上具有特定的晶面，称为惯性面。例如在图 2.16(a)中的五水硫酸铜晶体具有特殊片状结构，具有典型的惯性面(110)、($1\bar{1}0$)和(001)。但是在 HIDF Langmuir 单分子膜的诱导下，我们发现结晶是在薄膜和溶液的界面处发生，而且在薄膜诱导下晶体形貌和在普通水溶液中生长所得到的典型五水硫酸铜晶体不同。分析表明在 HIDF 诱导下的晶体出现了一个新的晶面即(010)晶面(图 2.16(b))，而五水硫酸铜的(010)晶面在通常水溶液中是很不稳定的，它具有很高的界面能，会很快地被其他稳定的晶面所覆盖，在通常状态下它是非惯性面。实验中我们还发现，这一新晶面只有通过牢固地吸附在 HIDF 薄膜上才能稳定存在，在膜诱导下所有形成的五水硫酸铜晶体均以该晶面和膜接触而定向生长。在此新晶面产生的过程中，HIDF 单分子膜通过有机-无机界面将具有高能量位垒的(010)晶面降为能垒最低的晶面，促使了非惯性面的形成。这是因为 HIDF 功能头基中的两个氮原子具有很强的配位能力，可以和溶液中的铜离子形成强键合作用，略角 X 衍射等实验结果还表明，气-液界面上所形成的 HIDF 单分子膜诱导下的铜离子具有十分规则的点阵结构，和五水硫酸铜晶体中(010)晶面上的铜离子的排列完全一致(图 2.17)。这样晶体的形貌就被有机基质所修改，而且非惯性面可以在晶体表面上出现并稳定存在[57,58]。

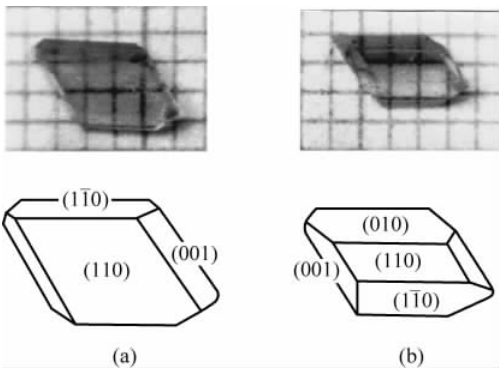


图 2.16　五水硫酸铜单品形貌

(a) 在普通水溶液中形成的；(b) 在有机(HIDF，9-hexadecylimino-4，5-diazafluorene)薄膜基底上诱导形成的

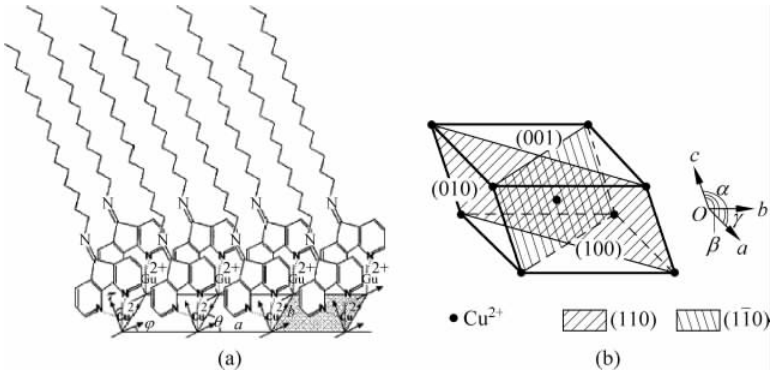


图 2.17　在 HIDF 诱导下的晶体形貌和五水硫酸铜的晶体形貌

(a) HIDF 的功能头基可以和铜离子形成配位键，而其 Langmuir 单分子膜具有很好的点阵结构，在该点阵所配位形成的铜离子也具有规则的排列：a = 6.20 Å，b = 6.00 Å 和 θ = 73.0°；(b) 五水硫酸铜的(010)晶面

2.2.3　生物矿化中的晶体生长

有机基质完成对晶面的识别并使其优先定向成核后，人们通常认为该晶面通过所吸附的有机基质稳定其界面能，被吸附的有机基质将阻止该晶面的生长，见图 2.18。而未被选择性吸附的晶面继续保持生长，这样通过动力学上的生长改变了晶体的形貌。

但是，图 2.18 并没有准确地描述晶体生长中的真实情况。而且，在真实的生物体系中，我们还发现生物矿化并不是完全通过有序排列的有机基底而诱导实现的。生物分子在水溶液中，即使没有形成有序的框架结构也同样能

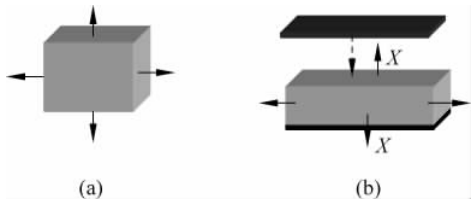


图 2.18　生物矿化中晶体的生长

(a) 在正常情况下的晶体生长；(b) 吸附的有机基质(深色部分)通过和晶面间的相互作用阻止特定晶面的生长从而改变晶体的形貌

够诱导和改变晶体生长的过程和形貌，例如在草酸钙的溶液中加入少量的柠檬酸就可以改变所生成的草酸钙形貌，但是，在这一过程中并不存在柠檬酸先组装成有机薄膜，然后再诱导草酸钙的成核和生长等这一系列过程[32]。

在前面我们已经讨论过了，晶体生长的基本过程是台阶的形成和扩展的过程，而这些有机分子(不是基质!)可以通过和晶体表面的台阶的相互作用来改变台阶的特性及其生长动力学。而台阶的形貌与生长动力学和晶体的形貌有着密切的关系。所以从物理的角度的出发，生物矿化中的晶体生长的调控应该从台阶修饰及台阶动力学来考虑。事实上在生物矿化的过程中，不仅仅是有机大分子即便是无机离子也能改变晶体生长的过程及形貌，这样从晶体台阶的讨论更具备广泛性。最近的研究指出，生物矿化中晶体生长的生物调控是通过对于台阶的台阶能以及台阶的动力学而实现的[59~62]。外来分子对台阶运动的修饰大致存在 4 种机制：①台阶分切；②台阶掺杂；③台阶活性位点抑制；④台阶能修饰(图 2.19)。这些微观台阶运动的修饰都将相应地引起宏观上晶体生长和形貌的改变。

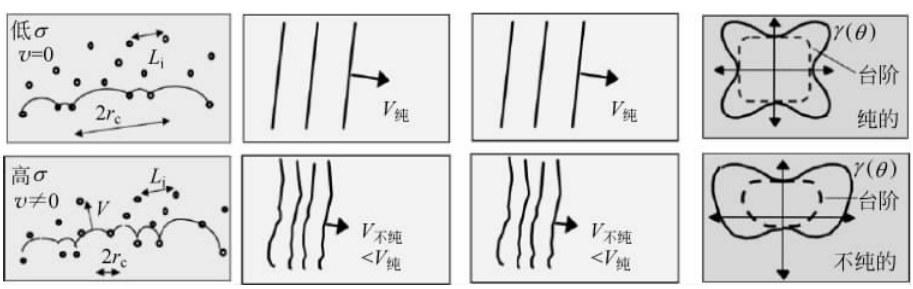


图 2.19　在 AFM 下可以看到的 4 种典型的台阶调控的形貌

从左到右分别是台阶分切、台阶掺杂、台阶活性位点抑制和台阶能修饰

台阶分切是指杂质(或生物分子)吸附在台阶边缘上的某些位点的时候，阻止了生长单元在这些位点上的吸附。这时候，生长单元就绕开这些位点，

吸附在其周围的点上[55]。我们看到,通过这些位点将一段完整的直台阶分割为各个线段,如果线段大于临界长度就可以作为独立的活性台阶生长。所以说在这种机制下,通过杂质吸附产生的平均线段长度是一个重要的参数,在AFM的观测下,台阶的运动特性表现在:在低过饱和度下,由于具有较大临界尺寸要求,在一定浓度的杂质的存在情况下,台阶没有运动。当过饱和度逐步提高后,由于临界尺寸变小,被分割形成的每一个台阶线段的长度 L 开始大于 L_c,台阶开始移动。当杂质的浓度升高的话,台阶线段的平均长度 L 会变得更短,那么相应的 L_c 也就更短而要求的过饱和度就更高。这样对于每一个含有不同浓度的杂质体系都具有特定的临界过饱和度值,溶液只有大于此过饱和度,台阶的线段型的运动才可以被观测到。由于杂质和台阶间的吸附作用取决于杂质和台阶外露离子的作用,需要有较强的化学成键作用。所以对于一种杂质分子,可能对一个方向的台阶有影响而对于其他方向的台阶却没有影响,这样造成对台阶所产生的各向异性的修改可以改变晶体的形貌。图2.20显示是在柠檬酸的作用下,一水草酸钙(COM)晶体(—101)晶面上台阶运动。可以看到,该晶面上的台阶具有[101]、[−1−20]和[−120]3个方向。在正常的水溶液中得到的COM单晶具有图2.20(e)的形貌;随着柠檬酸的加入,可以看到,在[101]方向上台阶不再完整而是分散为各个台阶线段(图2.20(b))但台阶继续保持移动。随着柠檬酸在台阶上吸附的增加,台阶的线段变得越来越短,其移动的速度也变得越来越慢,这也可以通过式(2.16)来解释,台阶线段 L 值变小后将越来越接近于在该过饱和度上的 L_c,因此其移动速度将随之降低(图2.20(c))。最终当在柠檬酸的吸附和分割下,在[101]方向上台阶线段 L 达到了 L_c(图2.20(d))因而台阶的运动就被完全抑制了。这就是一个典型的台阶分切的过程。当然,柠檬酸在其他两个方向[−1−20]和[−120]也对台阶进行了修饰,但其机制不同于台阶的分切,在下面我们还会讨论。由于柠檬酸对[101]方向台阶的抑制程度明显大于其他两个方向,这样对于晶体的形貌而言,在[101]方向的长度也随着缩小,从而使所生成的COM单晶从原先接近于针状变成更加圆滑的矩形(图2.20(e)和(f))。该机制下我们可以通过从台阶的变化特性中判断出来:完整的台阶变成了各个小段落,失去了台阶的特性[63]。

台阶掺杂作用是指这些外来的杂质离子或分子能够被生长台阶所捕获,然后可以融入到台阶中加入到晶体的生长中,然后它们就成为了所形成晶体的一部分[64,65]。通常,这些外来的离子或分子会部分改变晶体的晶格结构,造成结构上的缺陷。这样的晶体往往具有较高的内应变力,从而增加晶体的自由能。通常情况下,这些掺杂作用会造成晶体溶解度的升高从而降低了原生长体系的过饱和度。在较小的过饱和驱动力的作用下,晶体台阶的运动就

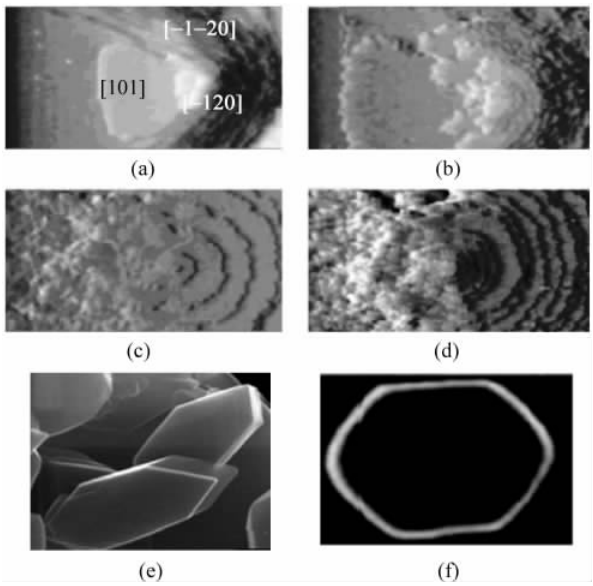


图 2.20　AFM 观测到的在 $\sigma=0.144$ 条件下柠檬酸对 COM 单晶(—101)晶面上的台阶修改情况

从(a)～(d),柠檬酸在台阶上的吸附浓度从零开始增加。其中对[101]方向具有台阶分切作用的修饰机制从而改变了晶体生长的特性。在其他两个方向[－1—20]和[－120]存在台阶能作用的修饰机制,但柠檬酸对这两个方向上的台阶运动的抑制程度小于[101]方向,在这些台阶修饰的共同作用下,SEM 发现结晶形成的 COM 的形貌随着柠檬酸对台阶的修改而发生了变化。(e)和(f)分别是没有柠檬酸及在柠檬酸参与下形成的 COM 单晶形貌

会表现为比纯溶液中显得更慢。但在这个作用机制下,台阶仍然维持完整的运动形式。不过这种机制在外来杂质浓度较低的情况下还有可能提高晶体生长的速度,这是因为由于晶体结构的掺杂,体系的热力学的熵值就会下降,可以使某些晶面或台阶变得更加稳定从而降低了它的溶解趋势。这种情况可以在含有微量 Sr 离子的方解石晶体生长中发现。当然,对于不同台阶,这些离子或分子通过化学成键也会表现出不同程度的掺杂作用,从而使它们对各个台阶的修饰也存在各向异性的行为,这样也同样修改了晶体的形貌。这种行为在含有金属离子的矿化过程中可以被大量地观察到,特别是生物中少量的二价碱土离子,如 Mg 和 Sr 等对碳酸钙矿化的调控,而且还认为方解石晶体生长中的这些掺杂作用使方解石晶体在[001]方向被拉长[66,67]。可以看到在该机制下,台阶变得粗糙,形貌也可能发生变化,移动的速度通常变小,但也有可能变大。

台阶活性位点抑制机制是指外来杂质短暂地吸附在生长台阶上,特别是

扭折处,从而阻止了晶体生长[68,69]。但该吸附和掺杂作用不一样,杂质离子或分子并没有融入到晶体结构中,其对于晶体生长的作用也就是降低了台阶上的活性位点的数量。它们的作用并没有意味着彻底地抑制了该位点的活性,其吸附不仅仅是暂时性的而且往往也是短暂的,所以它往往对于台阶的稳定性等原有的特性没有根本的改变。不过杂质在台阶上的吸附往往是通过一系列的物理及化学作用或成键来实现的,所以它同样对不同的台阶具有选择性,造成的结果是使各个台阶的生长速度有了不同的改变,同样造成了晶体形貌的改变。在 AFM 的观测中,在该机制作用下,其台阶的形貌除了变得有点粗糙化之外并没有发生大的变化,但速度是下降了。

台阶能的修改是指杂质的吸附可以改变各个方向的台阶能,引起了台阶的一系列动力学特性的变化[70,71]。不同方向上台阶的能量改变常常会引起台阶形貌的重组以重新符合能量最低的原则,乃至有新的台阶形成和旧的台阶的消失。在该机制下,台阶的形貌会发生重大的变化,如图 2.20 中所示的[−1−20]以及[−120]台阶的变化。但是,也有种可能,台阶的形貌并没有因为能量的修饰发生明显的变化,最近我们用 AFM 观测在柠檬酸的参与下[32],DCPD 在[010]晶面上的台阶的变化,我们发现其形貌没有发生变化,

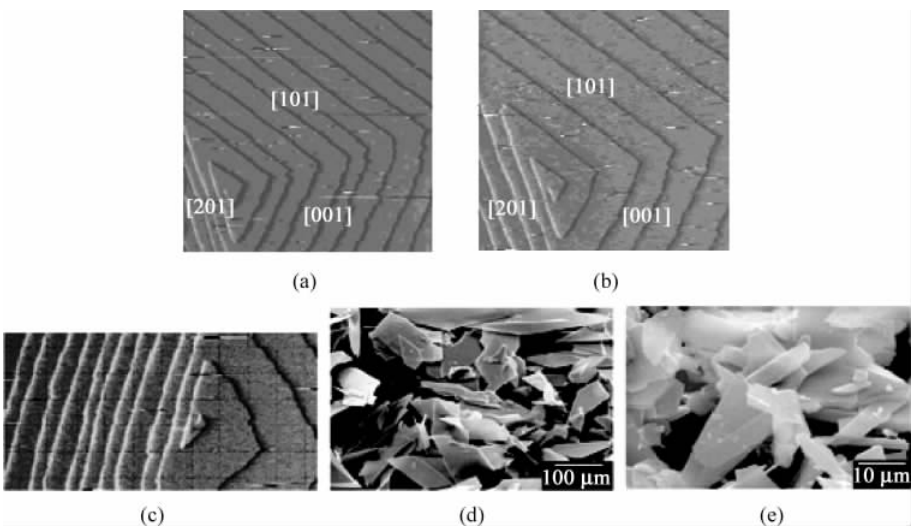


图 2.21　在柠檬酸调控下,DCPD 晶体的(010)晶面上的生长台阶没有发生明显的改变,但台阶间的间距增大了(a)和(b)。进一步的实验揭示了,柠檬酸的加入可以增大台阶的临界尺寸,从而需要更多的时间用来等待新的活性台阶的形成(c),而在等待过程中,原有的台阶保持原速度生长移动,这样就扩大了台阶间距。我们还可以看到,其对[101]、[001]方向的台阶修饰调控作用远大于对[201]台阶方向,这样的不对称的调控过程使所形成的 DCPD 晶体从正常的片状(d)变得倾向于针状(e)

移动速度也没有变化。但是台阶的间距出现了变化，我们确证这是由于台阶能（或表面能）的变化所引起的，在该体系中，柠檬酸的羧基可以和台阶边缘上的钙离子作用，引起了台阶能量的升高，但其改变虽然没有对台阶的形貌特性引起明显的变化，但能够改变台阶的临界尺寸并使其值增大。AFM 实时实位的观测表明，由于对临界尺寸的要求变大，在位错源点上形成活性台阶的时间随之增长，而原有的活性台阶维持原有的速度生长，所以在速度不变化而时间延长的情况下会造成每个台阶间的距离加大。但是又由于它对于每个方向活性台阶形成的延迟时间不同，可以看到在[101]和[001]方向上的改变最为明显，所以这两个方向的生长受到显著的抑制，从而使晶体的形貌从正常的片状改变为倾向于针状的结构。

2.3　界面能量控制

在上面一节中我们提到了界面能量特别是台阶能对于晶体生长的修饰和调控作用，它们对于生长台阶的非均衡调控是晶体形貌、尺寸和功能改变的重要因素。界面现象通常亦称为表面现象，是指在不同相之间的过渡区所发生的行为。在界面，物质的分子或离子和其在各体相内部的排列和受力环境的明显不同，从而产生了特定的物理化学性质，例如界面能，界面张力和界面电势等。这些物化界面参数在物质表面特性的测定和表面修饰的研究中已经被广泛而深入地理解。在物质的结晶，溶解以及催化等过程中，界面都是这些反应的实际发生位点，其重要性远远大于反应物自身内部的体相。因此，对于界面现象的探索长期以来都是科学研究的一个重点领域，而界面特性作为一种重要的或者决定性的参数也必然会影响乃至控制着这些物理和化学过程，包括在动力学中的反应速度。和其他物理化学过程一样，能量是最终的决定性因素，所以不仅仅是材料静态的基本性质，还有其动力学性质最终都是由材料的表面能量所控制的。前面已经提到，在生物矿化的生物环境中，界面能垒可由成核位点有机分子存在而降低，这样有序的生物高分子模板表面能够提供给矿物优先成核的专一性位点。在晶体生长中，由于各个晶面方向的界面能量的不均衡的修改从而使矿化晶体的形貌得到了有效的调控。

在溶液中的化学反应通常都伴随着固体反应物的溶解或者作为反应产物的固体沉淀的析出。在固-液体系中，表面能不仅对于固（胶）体粒子在溶液中的稳定性，溶液中的分（离）子在固体表面的吸附，而且还对晶体生长的速度和形状都有着重要的影响和控制作用。可以这样认为：表面能和动力学相结合的工作将为今后物理化学的基础研究及应用提供一个新的发展点，对进

一步推动界面现象这一基本原理在化学,材料和生命科学中的理解有着深远的意义。

2.3.1 界面能和晶体生长

和其他化学反应的动力学描述相类似,宏观的体相晶体生长动力学通常也通过反应级数来表示,也就是通过测量在不同过饱和度(驱动力)下晶体生长速率。该晶体生长的速率和过饱和度(带有相应的指数 n)成正比,n 也可以称为该晶体生长动力学中的有效反应级数(effective reaction order)并且可以从 n 的数值初步判断其生长机制。

$$R = k\sigma^n \tag{2.17}$$

其中,k 是晶体生长常数,R 是晶体生长速率,σ 是过饱合度。通常我们可以由 $\ln R$ 对 $\ln\sigma$ 的作图通过斜率直接获得 n,其相应的反应机制见表 2.1 的总结,不过,几种反应机制也可能在同一个晶体生长过程中同时出现。

表 2.1 在晶体生长的动力学方程中不同的有效反应级数与对应的可能机制

n	晶体生长可能的机制
1	体扩散控制
1～2	混合机制:体扩散+面扩散控制,体扩散+多重成核控制
2	面扩散
>2	多重成核控制

在晶体生长的过程中被认为至少有两个基本的物质输送过程[28,29,72,73]:生长单元从溶液的体相输送到晶体-溶液的界面以及从界面被输送到晶格并融入晶格。晶体生长的表面模型对这两个过程在晶体生长动力学的控制效应做了相应的假设性描述,也就是当前者起决定性因素的时候被称为体扩散控制,而后者起主导作用的时候就是面扩散机制。在实验上表现为体扩散机制对于体系的搅拌速度十分敏感,而面扩散则几乎不受该实验因素的影响。当溶液的过饱和过高的时候,晶体的生长不再通过台阶生长而进行,而是通过大量的二维晶核在晶体表面上的形成从而完成晶面的扩展,此时称为多重成核控制。对于不同的反应机制其晶体生长的速率可以通过以下的方程去拟合:

$$R = \frac{AT\sigma^2}{\gamma_{SL}\left[1+\beta\ln\left(\frac{\Omega\gamma_{SL}}{kT\sigma}\sinh\frac{kT\sigma}{\beta\Omega\gamma_{SL}}\right)\right]} \tag{2.18}$$

$$R = AT\sigma\ln S\tanh\left[\frac{\beta\Omega\gamma_{SL}}{kT\ln S}\right] \tag{2.19}$$

$$R = A\exp\left(\frac{\beta\Omega\gamma_{SL}^2}{k^2T^2\ln S}\right) \tag{2.20}$$

在式(2.18)～式(2.20)中，A 是常数，β 是几何形状因子。这个关系和我们在 AFM 中所观测到的临界尺寸和晶体生长和溶解动力学的关系也是一致的。式(2.18)适用于体扩散机制，式(2.19)一般用在纯表面扩散机制的条件下，通常是在临近饱和状态附近的晶体生长或溶解；式(2.20)则用于多重成核体系。在通常的实验条件下对于无机难溶盐(矿物)的生长，式(2.20)更加普遍。我们可以看到无论何种机制，在其动力学公式中都包含着界面能量这一项，这不仅说明了界面能量在晶体生长中的重要性，而且还可以通过实验准确地测定在不同饱和度下晶体的生长或溶解速度，然后利用 $\ln R$ 和 $(\ln S)^{-1}$ 的线性关系来计算获得 γ_{SL}。我们已经在这一方面做了大量工作[74]，在不同的实验条件下，我们所测得的羟基磷灰石(HAP)的生长反应有效级数在 2.1～3.5 之间，这样也就是说属于多重成核的控制机制，可以用式(2.20)拟合，所得到的 γ_{SL} 大多是在 80～100 mJ/m^2 之间。而磷酸氢钙(DCPD)的有效生长反应级数为 2.0 左右，可以近似作为表面扩散控制机制，用式(2.19)计算后，通过生长动力学得到它们的界面能在 30～43 mJ/m^2 的范围内。通过与其他实验手段获得的数据以及其他化合物的公认的表面能数值相比较，我们通过晶体生长机制而得的这些表面能值不仅有着很好的合理性，而且很重要的是在实验中也有着极好的重复性。当然，我们也可以通过在溶液体系中的均相成核的诱导时间来估算表面能，但是由于成核的测定相对来说远没有晶体生长来得精确以及成核实验本身的不确定性，其重复性和合理性相对来说仍然很差。不过，我们的研究说明，在对晶体生长动力学模型的充分理解的基础上，通过动力学的手段来间接地测定表面能在当前的界面研究中不失是一种良好的实验方法，尤其是对于以无机矿物为代表的无机难溶盐体系。

表 2.2　在磷酸钙体系的矿化过程中通过晶体生长动力学计算所得到的界面能数据[74]

样品	生长反应的有效级数	对应的矿化动力学机制	界面能/(mJ/m^2)
HAP	2.1～2.6	多重成核控制	80
	2.9～3.2	多重成核控制	87
	约 3.5	多重成核控制	约 100
DCPD	2.0	表面扩散控制	30
	1.8～2.1	表面扩散控制	40
OCP	3.3	多重成核控制	45
	3.2～3.7	多重成核控制	60

但是,在动力学的测量界面能中除动力学实验的困难之外,有一个很重要的问题就是生长单元及其参数的确定,比如我们在上面公式中所提到过的单元的体积,尺寸以及形状因子等。在不同的研究报道中,对于同一体系往往会出现不同的参数,比如以 DCPD 为例,如果分别以 3.0Å 和 3.9Å 近似作为其计算用的生长单元的一维长度,在式(2.19)中由于界面能对于尺度存在指数级的关系,所以在这些参数上的微小变化都会对界面能的计算产生明显不同的结果,这也是通过动力学对于很多未知体系界面能量测定的难点。在通常情况下为了简化就把生长单元近似认为是立方体,所以就可以用生长单元体积的三次方根作为每个生长单元的长度,而生长单元往往被一个晶胞所替代。但晶胞是否可以被视为严格的生长单元还存在很大的争议,而且生长单元的真实形状在计算中还需引入一个修改因子进行修正。这些原本和界面能没有关系的因素被引入到界面能的计算中,因此限制了该测量方法的发展,特别不能很好地应用在晶体生长动力学未知的或者是比较复杂的体系中。

2.3.2 接触角和 Young's 公式

目前比较公认的测量固-液界面能的方法是接触角法,也就当液体在一个平整的固体样品的表面上形成液滴,达到平衡时,在气、液、固三相的交界处,气-液界面和固-液界面之间的夹角称为接触角,用 θ 表示。这种方法随着 Young's 公式

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV}\cos\theta \tag{2.21}$$

的建立而逐步发展并成熟。在式(2.21)中各项的下标中,SV,SL 和 LV 分别代表气-固,固-液和气-液界面。对于液体的热力学分析指出,在固体表面上液滴所形成的形貌必然是能量最低化的状态,这也是 Young's 公式的能量基础。在一般情况下,我们都会用 γ_S 之间取代 γ_{SV} 项,因为它们的差值可以几乎忽略不计。同样对于一些具有较高界面能的液体,γ_{LV} 也同样可以用 γ_L 来替代[75~77]。对于每一个界面能项,还可以被细化为由各个分量所组成,例如对于某相 i 而言,其 γ_i 还可以被描述为

$$\gamma_i = \gamma_i^{d} + \gamma_i^{i} + \gamma_i^{p} + \gamma_i^{H} \tag{2.22}$$

式中的上标,d 代表了色散力项,i 为诱导力项,p 则是 Keesom 力项,而 H 为氢键项。Fowkes 等最先将 Lewis 酸碱(AB)理论应用于凝聚态的界面中[75,76],这样仅仅用两个项就可以了:

$$\gamma_i = \gamma_i^{d} + \gamma_i^{AB} \tag{2.23}$$

而 Lifshitz 通过凝聚态的范德华(van der Waals)作用力的研究,提出了在界面能中色散力,诱导力和 Keesom 力项都可以归于 Lifshitz-van der Waals 作用力项,也就是 γ_i^{LW}。

$$\gamma_i^{LW} = \gamma_i^{d} + \gamma_i^{i} + \gamma_i^{p} \tag{2.24}$$

在 Lewis 酸碱作用项中发现还存在两个相关的参数 γ^+ 和 γ^-，分别对应的是电子受体(酸)项和电子给体(碱)项

$$\gamma_i^{AB} = 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} \tag{2.25}$$

对应 i，j 两项间的界面能，通过代换最终可以得到

$$\gamma_{ij} = (\gamma_i^{LW} - \gamma_j^{LW})^2 + 2(\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} + \sqrt{\gamma_j^+ \gamma_j^-} - \sqrt{\gamma_i^+ \gamma_j^-} - \sqrt{\gamma_i^- \gamma_j^+}) \tag{2.26}$$

对于液相在固体表面的接触角公式就可以改写为

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}) \tag{2.27}$$

2.3.3　界面能和生物结合界面

图 2.22 中展示的是目前在生物医学材料领域中广泛应用的人工牙钉以及人工关节及骨柄在植入人体以后的情况。对于医学植入材料来说，最重要的是材料本身和生物组织的融合程度，也就是生物结合界面是否牢固？是否稳定？是否具有活性？对于人工骨材料以及骨界面而言，可以把植入后的生物界面总结为以下几种方式：

(1) 暂时附着界面：机体组织产生强烈的异物反应，暂时性附着而在短时间内产生排异作用（失败的界面附着形式）。

(2) 纤维结合界面：植入体内后在材料表面形成结缔组织包裹层，随植入时间的加长，这种结缔组织包裹层不变薄，不消失，而且逐渐变致密钙化，阻碍了材料与机体组织间的物质代谢（不良界面）。

(3) 材料接触界面：界面有薄层纤维组织存在或有不同程度的钙盐沉积、随植入时间的加长，纤维层逐渐变薄或消失，在界面上可能出现薄层骨，

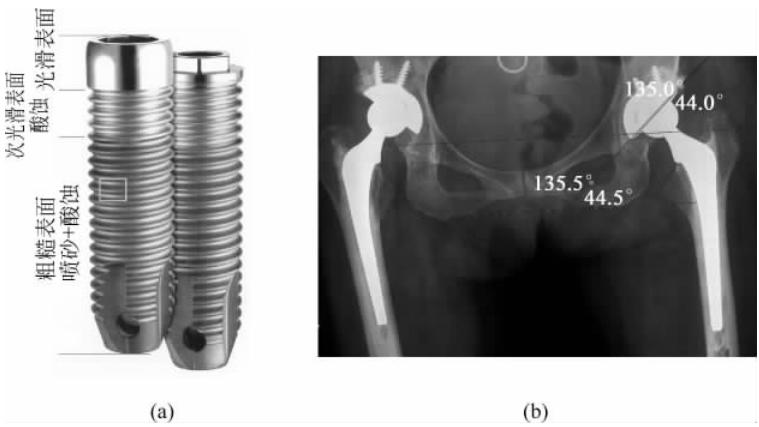


图 2.22　高度生物兼容的人工牙钉(a) 及人工关节(b)

但缺乏明显的新生骨细胞生长,骨形成缓慢(有效的界面)。

(4) 材料结合界面:材料具有类似人体骨的无机成分和结构,亲骨性好,新生骨细胞活跃,骨生长明显,材料与骨组织间很快形成稳定的骨结合界面(较理想界面)。

(5) 生物结合界面 :材料含有活性物质,能参与机体生命过程中分子的运动变化,交换物质和能量或产生相互结合(理想的界面结合形式)。

在目前的应用中,我们知道钛具有优良的生物相容性和高比强度,其弹性模量较之其他金属更为接近骨组织,作为骨替换材料已用于临床。钛植入体的生物学性能主要取决于其表面层的表面特征。而钛及其合金的结构和性质与骨组织相差较大,加之自然条件下机加工后的钛为一层钝化态氧化膜,呈生物惰性,不能与骨组织形成生物化学键合,一般认为钛不是生物活性材料。为赋予钛生物活性,通常对其表面氧化膜进行改性[78~80]或在其表面涂覆羟基磷灰石(HAP)涂层[81~84]。改性后的医用钛表面有金红石型或锐钛矿型二氧化钛膜,或是含钙磷的表面层,生理条件下,能在其表面自发生成 HAP 或类骨羟基磷灰石涂层,进而促进与骨组织的生物化学结合。

以含钙、含磷的 Ti-HAP 涂层表面以及未处理钛为对照,用小牛血清蛋白和兔成骨细胞进行了蛋白质吸附和细胞培养试验。借助 XRD 和 XPS 分析发现,血清蛋白化学结合到羟基磷灰石涂层上,改变了涂层的表面成分和结构。由 XPS 分析和溶解平衡观点可推知,随蛋白质的吸附,在 HAP 涂层表面发生 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 溶解和再沉积,使蛋白质在涂层表面下具有一定的深度分布。结合表面化学和表面电性理论,认为钛表面的 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 都是小牛血清蛋白质的结合位。蛋白质在 HA 涂层上的吸附是涉及多种元素和基团的化学协同过程。在此过程中,Ca^{2+}(Ca 结合位)起着更重要的作用,HAP 涂层中 Ca^{2+} 与蛋白质的相互作用促进了蛋白质在 PO_4^{3-} 位的结合。研究表明,在含钙表面,包括预钙化钛和 Ti-HAP 涂层,成骨细胞的粘附量和活性远大于未处理的钛金属表面。钛表面钙离子位带有净正电荷及化学作用而有利于成骨细胞的配体蛋白向表面配位,从而促进了细胞与材料表面的结合,即 Ca^{2+} 是 HAP 表面吸附配体蛋白的活性位。

将生物矿化的概念融入材料和药物领域。借鉴蛋白质和基因等生物调控因素,通过表面活性基团的有序排列来控制仿生纳米复合材料的制备,并且使人工医学材料具有高度的生物兼容性和相应的生物智能,特别是研究用仿生自组装法制备生物医用硬组织材料及器官,使其与人体骨组织更相似,从而具有更优良的生物学性能。

其实生物界面的活性和材料以及生物组织(包括体液)间的界面能是密切相关的,对于生物材料来说,界面能及其分量的特性早已在动物或临床试

验之前就可以指出材料在生物体中将具备的结合界面[85~87](表 2.3)。

表 2.3　不同基底在骨矿化环境下的界面能参数以及诱导骨沉积能力的比较[85~87]

固体样品	γ_{SL} /(mJ/m^2)	γ^{LW} /(mJ/m^2)	γ^+ /(mJ/m^2)	γ^- /(mJ/m^2)	诱导骨沉积时间 τ/min
PMMA(1)	19.0	41	0.0	12.0	无骨组织沉淀
RFGD-PMMA	3.7	40.7	0.0	24.7	825
FEP(2)	40.7	14.2	0.0	1.2	无骨组织沉淀
RFGD(3)-PMMA	8.5	24.2	1.7	38.4	700
云母(3)	12.6	42.7	1.4	50.9	550
锐钛矿相 TiO_2 薄膜	12.1	42.1	0.8	47.7	685
晶红石相 TiO_2 薄膜	11.1	40.6	1.7	15.6	910

注：(1)(聚甲基丙烯酸甲酯)(PMMA：poly)(methylmethacrylate)；(2) 全氟(乙烯-丙烯)塑料(FEP：perfluoro(ethylene-propylene))；(3) 射频辉光放电(处理)(RFGD：radiofrequency glow discharge)。

从表 2.3 中可以总结出，当植入材料和生物骨成矿溶液具有较低的界面能的时候，骨沉积就容易在该材料的表面上形成，也就意味着该材料在生物体中具有更好的活性，其生物界面的类型更倾向于生物结合界面。我们发现，经过 RFGD 处理过的 PMMA 和 FEP 这些高分子材料和原材料相比，在模拟生物溶液中具有更低的界面能，从而使这些对于钙化不敏感的材料变成了生物钙化的诱导材料，但是仅仅从 γ_{SL} 项还不能区分某些材料的生物特性，比如 PMMA，云母和不同晶相的 TiO_2 薄膜，但它们的明显区别是在 γ^- 上，而该项的物理意义一部分是体现在该界面对于钙离子的结合能力上，如果界面对钙离子的结合能量强，γ^- 的数值也相应地增大。但是正如我们前面的讨论的一样，对于 HAP 晶核的形成还是由 γ_{SL} 项来决定。所以对于一个好的生物融合材料，对它的要求，在界面能上体现为具有较低的 γ_{SL}，但同时拥有较大的 γ^-。反之，则可以成为避免钙化的生物材料的界面能要求，比如人工血管和隐形眼镜等。

2.3.4　界面能和相转化

在材料科学当中如何有效地控制无机晶体的尺寸、结构和形貌是一项十分重要的研究内容。同样的晶体由于尺寸或者形貌的改变会具有不同的特性和用途。例如铂的催化性能与暴露的晶面具有密切的关系；在以前的研究中也发现，β 相的磷酸三钙(β-TCP)和 HAP 的矿化或者脱矿行为与暴露在溶液中的晶面密切相关[88,89]，这些晶面也跟蛋白质和细胞的吸附相关[90,91]。为了控制材料的电学，光学，磁学和催化性能，针对贵金属，半导体和磁性材料的尺寸和形貌的受控合成已经发展到较高的水平。相比较而言，

在生物材料方面控制晶体形貌取得的进步很有限,但在生物体内矿物的形貌确实是多种多样的。与传统的溶液法合成不同,生物体内的许多矿物都是由无定形相受控转变得到的。生物体可以将无定形相稳定下来作为结构材料,也可以将无定形相作为不稳定相沉积下来然后受控地转化成特定的具有生物功能的晶体结构或者形貌。

以 ACP 到 β-TCP 的相转化为例[92],如果将合成的 ACP 重新分散到 $CaCl_2$-Na_2HPO_4-乙二醇溶液中,反应的最终产物是六方片状的 β-TCP 晶体。生成晶体的形貌对溶液条件具有很强的依赖性(图 2.23),利用相同的 ACP 在 $Ca(OH)_2$-$(NH_4)_2HPO_4$-乙二醇溶液中反应得到的是八面体的晶体,这对像 β-TCP 这样的具有 $R\overline{3}c$ 空间群的晶体来说是很异常的[93]。在生物体内常常可以发现违反 230 个空间群限制的具有复杂形貌的单晶。在从各向同性的无定形相到各向异性的结晶相转变过程中发生了对称性的破缺,这是一个很有趣的现象。但是目前针对这方面的研究还不多,许多物理因素还没有搞清楚。

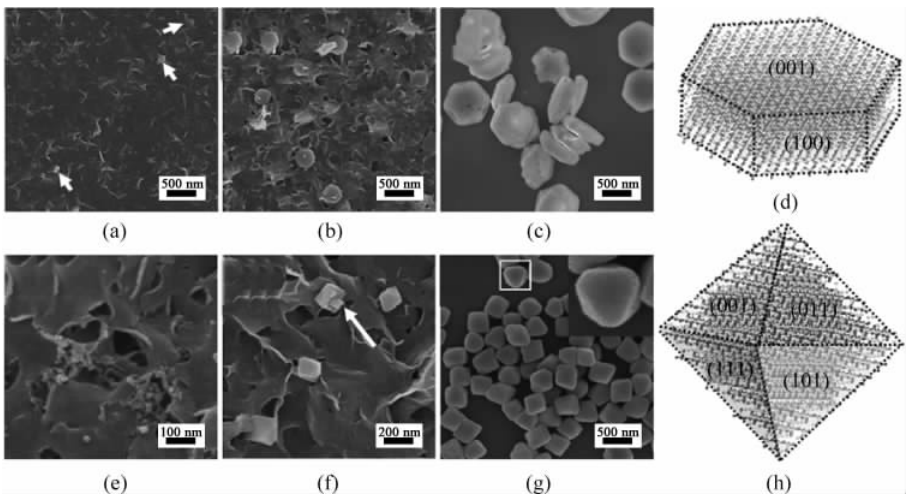


图 2.23　相变过程中的 SEM 图片和晶体外形模拟图

(a) 六方体系 30s;(b) 六方体系 1.2 min;(c) 六方体系 2.3 min;(d) 六方晶体的三维模拟图;(e) 八面体晶体体系 30 s;(f) 八面体晶体体系 2.5 min;(g) 八面体晶体体系 90 min;(h) 八面体晶体的三维模拟图[92]

根据 Ostwald 相规则,体系中最开始生成的物相的自由能与母液最接近。所以这种物相的稳定性是最低的,在相变过程中后续生成的物相的稳定性依次上升。无定形前驱物参与的结晶过程就是 Ostwald 相规则的一个特例,至今引起了广泛的关注。这一机理在另外的体系中也被观察到,例如蛋白质的

结晶过程，胶体晶体的结晶过程等。仍以 ACP 向 TCP 的相转化为例[92]，当在反应溶液中加入 ACP 后，溶液和 ACP 在界面上建立新的化学平衡，自由能垒 ΔG^* 直接取决于界面能 γ。β-TCP 六方片和 $CaCl_2$-Na_2HPO_4-乙二醇溶液之间的界面能是 1.65 mJ/m^2，β-TCP 八面体和 $Ca(OH)_2$-$(NH_4)_2HPO_4$-乙二醇溶液之间的界面能是 1.50 mJ/m^2。晶体和 ACP 之间的界面能远远小于晶体和对应生长溶液之间的界面能。β-TCP 在 ACP 上的成核势垒远远小于 β-TCP 在对应的生长溶液中的成核势垒，因此 ACP 上 β-TCP 的成核在动力学上是绝对优先的。六方片状 β-TCP 和八面体 β-TCP 的成核都是直接在 ACP 上发生的。有趣的是，无定形前驱体在两种晶体的生长溶液中的稳定时间相差很大，在六方的 β-TCP 生长过程中 ACP 在 2.3 min 时就完全消失，但是在八面体的 β-TCP 生长过程中 ACP 在 2.5 min 时仍然大量存在。晶体和非对应的生长溶液之间的界面能与晶体和对应的生长溶液之间的界面能相比很不相同。八面体 β-TCP 和六方生长溶液 $CaCl_2$-Na_2HPO_4-乙二醇之间的界面能是 2.24 mJ/m^2，六方的 β-TCP 和八面体的生长溶液 $Ca(OH)_2$-$(NH_4)_2HPO_4$-乙二醇之间的界面能是 1.80 mJ/m^2。因此，在六方生长溶液 $CaCl_2$-Na_2HPO_4-乙二醇中生成八面体晶体比生成六方晶体难得多，类似的是在八面体生长溶液 $Ca(OH)_2$-$(NH_4)_2HPO_4$-乙二醇中生成六方晶体比生成八面体的晶体相对困难。这点表明晶体的最终形貌是由晶体和生长溶液之间的界面能所决定，因为此时无定形前驱体 ACP 已经完全消失，体系中仅存在生长溶液和晶体的界面。因此，可以认为前驱体 ACP 的存在改变了晶体生长的动力学路径，但不能够改变晶体最终的形貌。晶体连接能的计算已经得到具有最小连接能的晶面，这些晶面的生长速度最慢，所以它们决定了晶体的最终形貌。

这个研究工作说明晶体的生成过程可以在无定形相上直接外延，也可能是生物矿物形成的重要途径。由于晶体和无定形前驱相之间的界面能远小于晶体和生长溶液中的界面能，这导致了晶体在无定形前驱相上具有更小的成核势垒，从而有利于生物矿化的调控。我们还注意到，在基于相转化的结晶过程中晶体的最终形貌还是由晶体和溶液之间的界面能决定。

2.3.5　相转化动力学控制

理论上纯的无定形相是高度的不稳定相，在潮湿的环境中很容易转变成相对稳定的结晶相。因此这种物相很难在生物体内储存下来。生物体内的 ACC 和 ACP 往往通过镁来稳定[94,95]。镁在天然淡水，海水和生物体液中都有分布。虽然无定形相可以通过镁来稳定，但是生物体是如何对镁暂时稳定的无定形相“去稳定”来生成最终的结晶相的过程还没有被仔细研究。生物

有机分子被认为是晶体成核和生长过程的调节剂,但对它们在相转化过程中的作用研究较少。

很多甲壳类生物周期性地经历外骨骼的换壳过程(图 2.24)[96]。在这个过程中,无定形矿物相被生物中的镁离子稳定,这种稳定后的无定形储存起来用于生成新壳的原料。虽然人们对无定形相的稳定机理有所认识,无定形如何在生物体控制下结晶的过程至今还是未知的。卷甲虫是陆生等足类的甲壳生物,这种生物每隔大约 6 周就换一次壳,换壳在生物的生长、形态转化和繁殖等方面起到重要的作用。在换壳前期,钙以 ACC 的形式储存到生物体中。在通常的情况下,换壳前期的时间可以长达 1～2 周,因此在这段时间内沉积的 ACC 是稳定的,而微量的镁在 ACC 的稳定中起了重要的作用。新

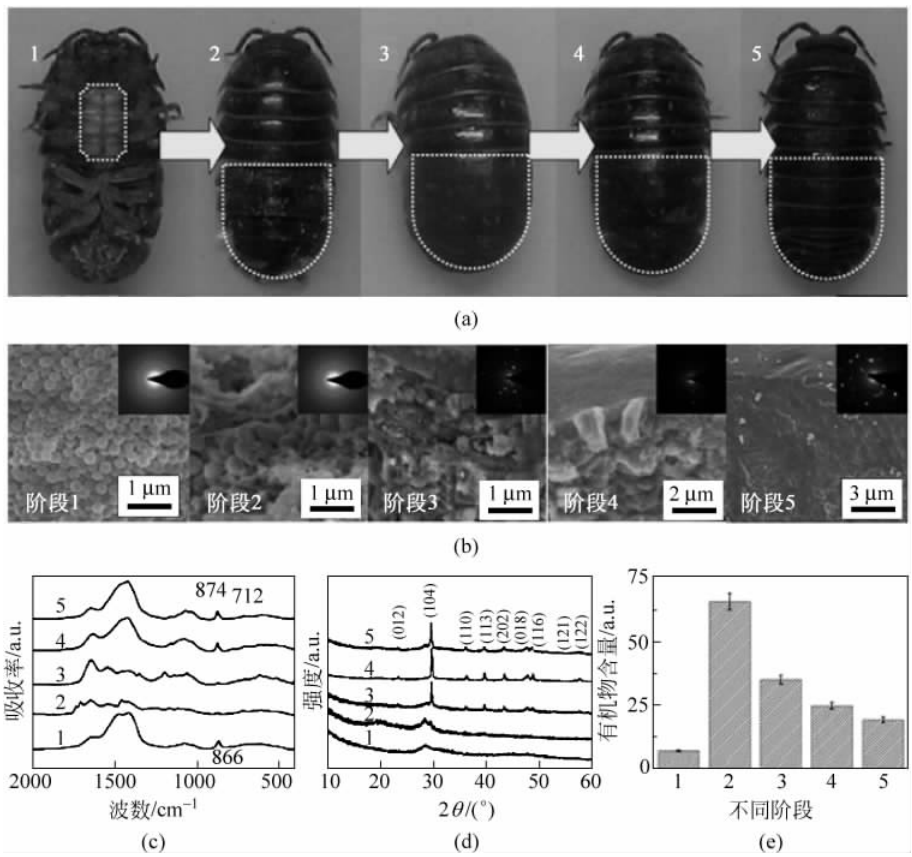


图 2.24　不同阶段的卷甲虫壳的形貌,结构和成分数据

(a) 不同阶段壳的照片;(b) 对应于(a)图中的壳截面 SEM 图片和 SAED 花样;(c) 壳的 FTIR 谱图;(d) 壳的 XRD 谱图;(e) 根据 TGA 曲线得到的甲壳中的有机物含量。图中不同阶段用不同的数字标记[97]

壳在 ACC 的基础上通过相转化形成的，但是在该阶段 ACC 完全结晶只需 8 h。生物体如何精确控制 ACC 的稳定性和相变过程是一个非常重要而有意义的问题，也是生物矿化动力学研究中的新课题。在换壳过程中，软壳的截面扫描电镜(SEM)观察中可以观察到很多的直径约为 500 nm 的球形颗粒(见图 2.24(b)中的阶段 2 图片)。这些颗粒与换壳前期腹片中储存的球形 ACC 颗粒(见图 2.24(b) 中的阶段 1 图片)在形态上很相似。SAED 和 FTIR 证明了这些颗粒主要是无定形相(见图 2.24(b)和(c) 中的阶段 2 图片和曲线)。甲壳生物的外壳中主要的有机成分是 β-几丁质，软壳的 FTIR 谱图显示了 1 655 cm^{-1}(酰胺 Ⅰ 带)，但是酰胺 Ⅱ 带的最大吸收位置移到 1 544 cm^{-1}处，酰胺 Ⅲ 带的吸收不明显。这种吸收峰强度和峰位置的变化可能是由于 β-几丁质和蛋白质骨架之间的酰胺相互作用引起的。这种类似的特征在 Falini 等研究几丁质和蚕丝蛋白的相互作用时也被报道过。[18]除此之外，在 1 242 cm^{-1}和 1 054 cm^{-1}处的吸收也对应于蛋白质的骨架振动吸收带。[18]在 1 575～1 581 cm^{-1}的红外吸收峰对应于天冬氨酸中的羧基，同时在 1 418～1 423 cm^{-1}处的红外吸收峰对应于羧基，这些都反映出软壳中含有较多的富含酸性基团的蛋白[19]。在阶段 3 中外表皮里的 ACC 转化成方解石。根据 SEM 和 SAED 观察可以看到方解石的小晶体和有机基质(见图 2.24(b)中的阶段 3 图片)，但是 XRD 结果反映这个阶段无定形相和方解石是共存的(见图 2.24(d)中的阶段 3 曲线)。小晶体的取向融合发生在阶段 4(见图 2.24(b)中的阶段 4 图片)，在这个阶段没有检测出无定形相(见图 2.24(c)和(d)中的阶段 4 曲线)，表明无定形相已经完全结晶。采用热重分析(TGA)来研究不同换壳阶段的矿化部位的有机物含量(图 2.24(e))。腹部的 ACC 的有机物含量只有约 7 质量分数；在阶段 2 软壳中有机物的含量达到最大值，质量分数约为 66。从这里我们可以合理地认为某些特定的有机物可能破坏了生物体中 ACC 的稳定性，从而启动 ACC 的相变过程。

为了在体外证实基于生物体内矿化所提出的以上设想，Tao 等构建了模型体系[97]来研究 ACC 到方解石的相变过程动力学并发现虽然单纯的 L-Asp 可以抑制 ACC 的相变，但是 L-Asp 可以开启镁稳定后的 ACC 的相变过程。类似的结果也适合磷酸钙体系的相转化。实验证实镁是无定形矿物相有效的稳定剂，它可以关闭矿物相的相变结晶过程。目前普遍认为的镁对晶体生长和相变的抑制机理主要包括两种途径：①台阶锁定和阻塞。这导致晶体生长台阶的移动速度由于镁在台阶边缘和台阶平台的吸附和镁离子的缓慢脱水而下降。[98, 99]②矿物相溶解度增大。由于镁离子在矿物中的掺杂，导致矿物晶格发生畸变而使晶格能上升，这使得晶格稳定性下降导致溶解度上升，这反过来使得矿物的有效果饱和度下降，因此生长的驱动力就下降。[100]前人

的研究表明对于离子晶体而言,阳离子的脱水过程是晶体生长的控制步骤。[101]镁由于在初始晶核表面上的吸附和比钙更强的水合能力使得 ACC 往方解石的相变被明显抑制。[102]在室温条件下,Mg^{2+} 脱水的焓变为−1 882 kJ/mol,比 Ca^{2+} 脱水的焓变−1 569 kJ/mol 大。因此,Mg^{2+} 在进入方解石晶格前的脱水给含镁的方解石的结晶引入了一个额外的势垒。这个势垒导致了相变过程的一个控制步骤。生物分子可能增强 Mg^{2+} 的去溶剂能力从而降低结晶的势垒。我们发现,天冬氨酸可能通过降低 Mg^{2+} 的脱水势垒而降低镁稳定的无定形相。

通过生物矿化相关蛋白的研究,发现它们当中的有一个共同的特点就是往往含有较多的酸性残基。在含方解石的矿化组织中的酸性蛋白常常富含天冬氨酸[103]。例如,在珊瑚的碳酸钙相中提取出来的蛋白里天冬氨酸的摩尔百分含量高达 40%～50%[104]。软体动物甲壳的方解石层里的蛋白的天冬氨酸摩尔百分含量甚至可以超过 50%[105]。以前的研究也证明很多甲壳生物的外壳中的蛋白质往往含有很多的天冬氨酸或谷氨酸的片段[106]。在传统的晶体生长过程中,人们发现富含天冬氨酸的肽在高浓度下抑制结晶,但是在低浓度下加速成核和晶体生长。[107～110]这一传统的认识和体内富含蛋白条件下的矿化过程不尽相同。但是卷甲虫体内的矿化过程不是简单的溶液晶体生长过程,而是经过无定形相的多步相变过程。富含天冬氨酸的生物分子对相变过程的影响也许与晶体生长有所不同。有一种观点认为这些氨基酸在触发生物矿化中的无机相转化起着关键的作用。相变是生物矿化体系中一个主要过程,许多研究已经强调了有机分子或无机离子在各种相形成过程中所起到的调控作用。最近一项工作还指出 DCPD 向 HAP 转变过程中生物分子改变了固-液界面能:它增加了 DCPD-液界面能而降低了 HAP 的固-液界面能,这意味着 DCPD 表面更加活跃和不稳定,DCPD 向 HAP 相转变过程的界面能垒降低从而诱发了相转化动力学过程。[111]

2.3.6 晶体组装的控制

在模拟矿化实验中,钙和磷的溶液混合后形成的过饱和溶液中会存在 4～6 nm 的磷酸钙纳米团簇,但是存在这种团簇不会引起明显的羟磷灰石沉淀。体系仍然处于介稳状态,这一现象可以通过晶体生长过程中的临界成核条件来理解。但这些纳米颗粒的团聚体并不是很稳定的,这种状态作为 HAP 形成过程的一种过渡态而存在的。这种状态跟分散溶剂和电解质的浓度有关。这一状态的存在也表明无定形态具有一定的柔韧性和连接性能。当将这种聚集体放入水中、Gly 或者 Glu 溶液中后,聚集体又会解体释放出纳米颗粒,在 Gly 和 Glu 中可以分别得到针状类牙结构和片状类骨结

构(图 2.25)。[112]在 Gly 下颗粒的重排结果导致了一维组装结构的出现,这种一维组装结构是由 5 nm 的磷酸钙颗粒所构成的。当纳米颗粒在 Gly 溶液中组装达两个月后,具有层次结构的微米级晶体束可以生成。晶体束长达 800 nm,宽约为 100 nm。在形貌上晶体束呈现出介晶的特征,这些针状晶体具有大体上一致的取向,晶体并排地排列在一起,晶体束的长轴和单根晶体的长轴在方向上一致,都是沿着 HAP 的[001]晶向,这一特征与人的牙釉质类似。这一组装结果在 Amelogenin 蛋白存在下也可以出现,且组装时间只需要三天,所以在 Amelogenin 下组装的速度至少是 Gly 的 20 倍[112]。这种蛋白是动物体内牙釉形成过程中一种重要的调控剂,它可以显著地加速纳米组装的动力学过程。不同的生物分子可以控制这些磷酸钙颗粒的组装方向,例如在 Glu 的作用下,这些颗粒进行片状堆积并形成晶体[112]。

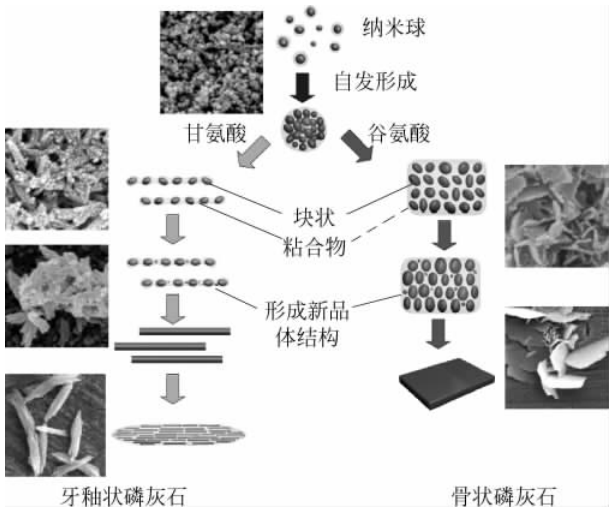


图 2.25　磷酸钙纳米颗粒在 Gly,Glu 控制下的分别组装成棒状和片状 HAP 晶体的过程[112]

为了从微观上理解有机分子是如何调控组装的,可以通过考察有机分子对组装过程中的界面能调控来入手。分子模拟表明体系中含有 Gly 可以显著增加(001)晶面的界面能,但是对(100)和(010)晶面的界面能影响不大,这一结果反映出 Gly 可以使得(001)面更加不稳定,所以在颗粒的组装过程中倾向于沿[001]方向使得(001)面尽可能发生融合而消失。当体系中含有 Glu 时,(001)晶面的界面能显著下降,而(100)和(010)晶面的界面能改变不大,这时(100)或(010)晶面变得相对更加不稳定,使得组装有利于沿着 *ab* 轴所确定的面发生(表 2.4)。

表 2.4　HAP 在各个组装体系下的各个晶面的界面能[112]

体　　系	晶　　面	界面能/(J/m²)
HAP-water	(001)	0.467 5
	(100)/(010)	0.516 4
HAP-water/ Gly	(001)	0.713 9
	(100)/(010)	0.509 6
HAP-water/ Glu	(001)	0.237 3
	(100)/(010)	0.505 2

2.4　纳米溶解

在晶体成核和生长的过程中,我们已经讨论过了临界现象的存在,而这些行为可以归因于在成核或者晶体生长过程中固-液界面积以及相应的能量升高。所以在传统的固-液相图中被分割为三个区域(见图 2.26)[113]:饱和等稳线($S=1$)将相图先分为未饱和区和过饱和区;而过饱和区又存在亚稳定过饱和区域以及不稳定的过饱和区域,在前者区域内经过溶液处于过饱和但不能够即时自发地沉积。但在未饱和区,因为是在溶解过程中,固相经历着自发缩小的过程,这样体系中的界面以及界面能量都会自发地减少,也就是在相应的公式(2.8)中,其体相能项和表面能项都小于零,所以对于溶解过程,它的总吉布斯自由能将永远小于零。这样,在未饱和区,溶解过程将自发进行直至达到新的固-液平衡或者固体完全消失。

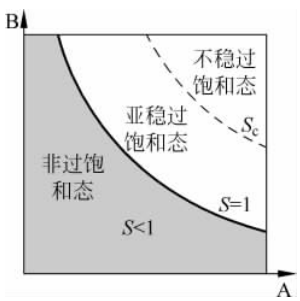


图 2.26　固体 AB 和水溶液的相图在未饱和区不存在任何的临界现象

但是,最近在生物脱矿的实验中却发现,生物矿物在一个未饱和的溶液中往往不能进行完全的溶解[114~116],尽管溶液仍然处于未饱和的区域且在体系中存在相应的固相,但该固相可以在溶液中稳定地存在且没有任何被溶解的趋势。在另外一些体系中,矿物可以被溶解,但溶解的速度会随着反应的进行显著下降,当固相达到一定的尺度的时候,其溶解动力学过程被完全抑制,而固相却继续在不饱和溶液中稳定存在(图 2.27)。

在 HAP 的溶解实验中,我们发现除去在极端未饱和的条件下,加入的晶种绝大部分可以被溶解外,在较稳和的溶解条件下(通常体液允许的溶解环境下)加入晶种后,在初始阶段往往出现较快的溶解过程,但其速度逐步放慢(图 2.27(a) 中体现为溶解曲线的斜率下降)直至趋向于零,也意味着不再存

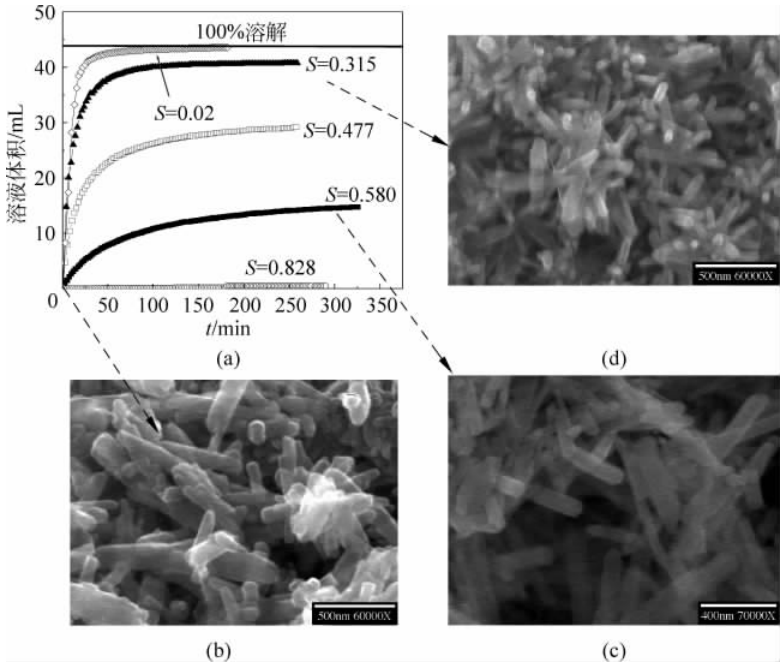


图　2.27

(a) 在恒组分条件(固定未饱和度)下 HAP 晶体的溶解曲线；(b) 用于溶解实验的初始 HAP 微晶；(c)和(d)分别是在 $S=0.580$ 及 $S=0.315$ 条件下，HAP 溶解停止后在溶液中收集到的未能被溶解，在未饱和溶液中可以稳定存在的残余 HAP[117]

在有效的溶解反应。此时，只有一部分的 HAP 经历了溶解过程，在 SEM 的照片中可以看出，在溶解后晶体的尺寸明显减小，但相应的晶体不再溶解反而稳定存在。在实验中我们还发现，如果采用不同的 HAP 晶种，在相同的未饱和度下，溶解终止时的晶体大小是一致的。也意味着残余晶体的尺寸仅仅和未饱和度相关，这些溶解的极限现象不是由晶体自身的初始状态不同而造成的[117,118]。

这些结果揭示了在溶解过程中也存在一系列的临界现象，比如溶解反应的不完全进行，溶解速度随着溶解进行而自发地减小乃至完全终止，未被溶解剩余的晶体可以在未饱和溶液中稳定存在。显然，这些实验结果是和传统的溶解理论相矛盾。进一步的研究发现溶解并不是晶体生长的一个简单的逆过程。

2.4.1　溶解过程中的台阶行为

相对于晶体生长的研究，人们对于溶解过程的研究显得十分薄弱，尽管

溶解过程在自然界中扮演着和生长同样重要的角色。前面基于相图的讨论是处于相对宏观的层次；在微观层次上，晶体溶解和晶体生长一样是通过位错和台阶所进行的，通常认为，晶体生长中所形成的位错会能够自然作为溶解台阶，而溶解也是就在这些台阶的缩小过程中伴随着晶体自身的缩小。我们最近在研究生物解矿的过程(可以视作无机难溶盐的溶解)中发现，尽管溶解反应在微观上也是通过晶体表面的位错线所造成的台阶的移动而进行的，可是在事实上它并没有直接和简单地利用现成的生长台阶。研究还发现，溶解反应是通过在固-液交界的晶面上新形成的蚀坑来生成所需要的溶解台阶[113,116,119](图 2.28)。尽管从总体来说，在溶解中晶体尺寸逐步减少，但在物体溶解的最初阶段，也就是在一个相对光滑的晶体表面上产生蚀坑的过程中则是局部表面能的上升，晶面也相应变得粗糙从而使 ΔG_S 也处在增大的状态中。即使在随后的溶解进行过程中，随着位错的扩展和蚀坑的长大，和生长台阶一样，由台阶产生的固-液界面也在不断的增大中。所以和晶体生长中的生长台阶(图 2.21)类似，对应于溶解过程中的蚀坑及其产生的溶解台阶，也同样有着临界尺寸的条件要求。

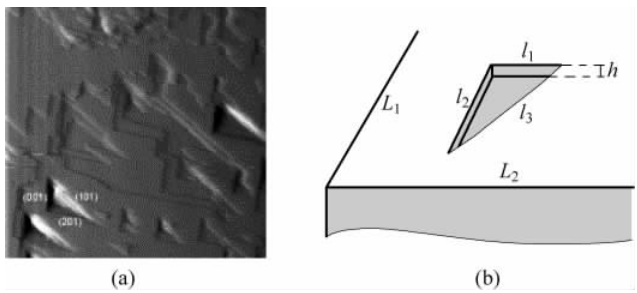


图 2.28　晶体生长中的生长台阶

(a) 溶解是由晶体表面上所形成的蚀坑而开始的，并且这些蚀坑提供了溶解所需的位错和台阶；(b) 由于蚀坑在晶体表面的形成，在这一局部的过程中，光滑的表面变得粗糙，是体系的表面能(ΔG_S)上升的过程，因为蚀坑的产生使固-液界面增加了 $h(l_1+l_2+l_3)$。随着溶解的进行，在蚀坑的扩展过程中，由这些溶解台阶所造成的界面积也将随着反应的进行而增大。所以，在溶解过程中，尽管晶体的体积和表面积是减少的趋势，但是在局域仍存在表面能上升的过程，从而出现了在表面能控制下的动力学临界现象[113]

溶解中蚀坑的临界尺寸已经在实验中被观测和证实，和图 2.21 几乎一样，在溶液 AFM 下，发现只有一些尺寸足够大的蚀坑才会自发地扩大从而对溶解过程做出贡献。而小的蚀坑尽管在溶解的晶面上形成，但要么基本维持不变，要么被临近的大蚀坑所产生的溶解台阶的快速移动所消除，要么就自发地消失。这些都是典型的动力学上的临界现象，而那些小蚀坑的尺寸就可以被视为溶解过程中的临界尺寸要求。利用 AFM 对各个台阶移动速度的测

定，也可以很准确地找出在不同实验条件下的临界尺寸，如图 2.29 所示。我们发现[113,119]，这些蚀坑产生的溶解台阶的扩展速度是和台阶的大小密切相关的，在较为初始的状态下它们的速度随着台阶的增大而明显加快，当台阶远大于临界尺寸后其移动速度也逐步趋向于一个恒定的数值。当台阶长度和临界尺寸相似的时候，随着其尺寸的减少台阶移动速度（$R(L)$）很快地趋近于零。这和经典的晶体生长中的 BCF 模型所描述的台阶速度与台阶尺寸间的关系是相一致的[1,27]

$$R(L) = R_\infty\left(1-\frac{e^{\sigma L_C/L}-1}{e^{\sigma}-1}\right)\approx R_\infty\left(1-\frac{L_C}{L}\right) \tag{2.28}$$

当 $R(L)$ 为零时，对应的 L 即为溶解中的对于蚀坑或溶解台阶的 L_C 数值。我们还可以从图 2.23 中发现，对于相同的溶解体系，其在溶解中的 L_C 是和溶液的未饱和度（S）相关，随着未饱和度的增大，图中通过动力学数据所测定的 L_C 从 $\sigma=0.060$ 的 0.2 μm（(001)台阶方向）－0.3 μm（(201)台阶方向）下降为 $\sigma=0.172$ 的 0.05 μm 左右（σ 定义为相对未饱和度，值为 $1-S$），这也和式(2.1)所揭示的临界尺度和饱和度间的关系相符合。

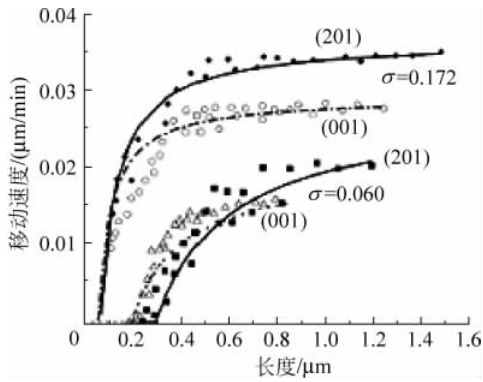


图 2.29　DCPD(010)晶面上溶解蚀坑形成的不同方向的台阶移动速度和台阶长度之间的关系，图中的实线和虚线是利用式(2.2)进行的数学模拟匹配，表明了台阶的大小及其临界尺寸能够控制和改变溶解速度。通过对于台阶移动速度的准确测定可以精确得到溶解中台阶临界尺寸(L_C)[119]

由于大的台阶或蚀坑有着较快的移动速度和溶解贡献，我们还发现在一个大的晶面上的溶解过程事实上是由一些大尺寸的蚀坑（L 大于 $20L_C$）主导着。对于这些大的晶面，在相同的溶解条件下其表面上的蚀坑密度也是相对稳定，而它们的溶解台阶因为足够大所以也有着恒定的扩展速率（如图 2.30 和式(2.28)）。这样就有了一个很稳定的溶解反应的动力学状态，这也就是

在传统模型中的溶解过程。但是,我们可以想象,随着溶解的进行,晶体的大小降到一定程度的时候,特别是其大小和所需的临界蚀坑的尺寸处于同一个尺度上,那么在这样很小的溶解的晶体表面上要形成一个和其大小类似的活性的溶解蚀坑是很困难的,即使形成,由于形成的蚀坑及其溶解台阶的尺度较小(和临界值接近),扩展的速度如式(2.28) 所示,也将受到尺寸的限制,从而不得不以一个很小的速度移动,溶解的速度被明显限制乃至接近于零。在这样的一个过程中,晶体的溶解速度是会随着反应的进行而被其尺寸而自我抑制,在动力学的实验观测中甚至可以发现溶解被终止(溶解速度的数值小于实验的灵敏度)。这时,那些未溶解的,接近临界尺寸的细小微晶可以相对稳定地存在于水溶液中,这就产生了上面所提及的溶解实验中一系列的反常现象。

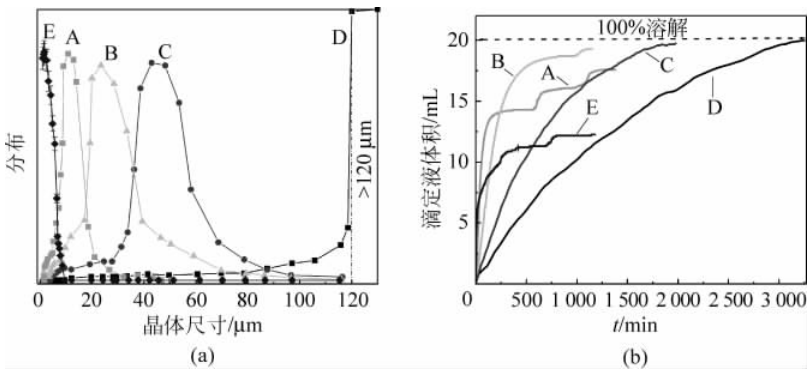


图 2.30　DCPD 的溶解

(a) 在 DCPD 的溶解实验中,使用不同尺寸大小的晶体作为溶解反应起始的晶种,E＜A＜B＜C≪D;(b) 大的晶体 D 几乎以恒定的速度完成溶解(事实上,溶液中仍有未溶解的接近于临界蚀坑尺度的小颗粒,但在这一传统的宏观的实验中不能明显表达),这和传统的溶解理论相一致,但随着晶体的尺度越来越接近临界蚀坑尺度,溶解中的"反常"现象,也就是尺寸效应越来越明显

从式(2.9) 可以看出,临界尺度的大小和表面能 γ_{SL} 密切相关。表面能大的物质在相应的条件下其临界的尺度往往相对较大。而在长期的研究总结中,人们已经发现,难溶盐往往有着比可溶盐高得多的表面能。因为溶解过程中一个合理的理解是,固体表面上的离子或分子和溶液中的水作用后脱离固体表面进入溶液体系,而这个界面反应也就是固-液界面的匹配,低的 γ_{SL} 也就意味着固体表面的离子或分子更容易脱离固体,水合后进入溶液相。一般来说,较大的 γ_{SL} 就相应有着较低的溶解度。生物体中的无机矿物通常是由难溶的钙盐构成,如磷酸钙,碳酸钙和草酸钙体系,这些钙盐在水溶液中通常有着十分高的表面能,通常是在 10^2 mJ/m^2 数量级左右[53]。这样,通过式(2.9)可

以估算出在一般实验条件下它们的临界尺度可达数十或数百纳米。同时我们也注意到作为生物矿物的无机难溶盐如人体中的磷酸钙盐通常也具有很小的晶体尺寸，都在数十纳米到数微米之间，这和它们的临界条件正处在相同的尺度内。因此，在生物解矿的动力学模拟实验中，这些溶解中“反常”的尺寸效应就变得尤其的突出了。而传统的溶解研究往往是建立在对可溶盐体系研究的基础上，如氯化钠。我们发现对氯化钠体系的其临界尺寸是在几个纳米左右，而作为研究对象的晶体往往是在毫米乃至厘米的数量级上。所以，这些“反常”的溶解现象不可能在大尺寸的可溶盐晶体的溶解中被观测到，其所形成的溶解模型并不适合于在纳米尺度上难溶盐微晶的溶解。图 2.30 则显示了，对于微溶的磷酸氢钙体系在溶解实验中，只要晶体的尺寸相对较大，其溶解的过程则十分接近于传统的理解——晶体几乎在一个恒定的速度下被完全溶解；但是，如果晶体的尺寸足够小，则溶解中尺寸效应就在实验中体现出来，而且尺寸越小越明显。从而证实了晶体尺寸的大小和溶解蚀坑的临界尺寸之间的相近是产生这些“反常”溶解行为的前提条件。在这项研究中我们通过表面能控制在溶解体系的引入和微观领域上的溶解过程的理解，建立了全新的溶解概念，极大地完善和补充了传统观念上的溶解理论，特别适用于在纳米尺度上的溶解过程。

2.4.2　纳米颗粒的稳定性

在物理化学上有一个难以解答的问题，即纳米水溶胶的稳定性问题，在传统的教科书中，表面能的讨论经常通过 Ostwald-Freundlich 公式和溶解度相联系。

$$dz\frac{RT}{M}\ln\frac{S_r}{S_\infty}=\frac{2\gamma_{SL}}{r} \tag{2.29}$$

其中，d，z 和 M 分别是固体的密度，晶体单元中化学式组成的个数和相对分子质量。公式要说明的是，对于半径为 r 的颗粒，其溶解度 S_r 比无限大的颗粒的溶解度 S_∞ 要大，而且随着 r 的缩小，小颗粒比大颗粒具有更高的溶解度而且更加容易被溶解。但是这一结论和我们前面所提及的溶解实验中的速率随着溶解的进行而减少相矛盾。最重要的是，式(2.29) 指出纳米颗粒相对于一般晶体会拥有极大的溶解度，它们在通常的水溶液中不会稳定存在，除非这个溶液的本身是过饱和的，而其过饱和度往往远远大于实验中的临界饱和度。但是，随着纳米技术的广泛而深入地研究，发现很多的纳米颗粒都可以在未饱和体系中稳定存在。那么，式(2.29) 究竟出现了什么问题呢？我们认为，Ostwald-Freundlich 论述的是热力学上的纳米颗粒在溶液中的不稳定现象，从而使其倾向于溶解。但是，溶解是一个动力学的过程，其持续和稳定

的溶解需要在颗粒的表面产生足够大的蚀坑,而纳米颗粒的自身大小就极大地限制了这些蚀坑的产生和扩展,因此同以上所观察到的溶解中的抑制现象一样,在动力学上,这个溶解的过程是惰性的。也就是说,这些纳米颗粒是热力学不稳定但通过动力学达到自我保护而实现稳定的。这也解释了生物体系不是选择大晶体,而是用接近其临界条件的纳米尺度上的微晶作为基本单元进行组装来构成生物无机材料,这不仅是功能和力学性质上的需要,更是动力学保护上的需要,使生物材料不会随着变化中的体液或环境条件的改变而快速地生长或溶解[117]。最近的一系列研究都逐步证实生物矿物的基本组成单元通常都是在纳米尺度上[9]。

参 考 文 献

[1] Burton W K.,Cabrera N., Frank F C "The growth of crystals and the equilibrium structure of their surfaces" Royal Soc London Philos Trans 1951, A243, 299～358.

[2] Mann S. Archibald D D. Didymus, J. M.; Heywood, B. R., Meldrum, F. C.; Wade, V. J. "Biomineralization: Biomimetic potential at the inorganic-organic interface", MRS Bulletin 1992, ⅩⅦ, 32～36.

[3] Mann, S Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford University Press, New York, 2001.

[4] Meldrum, F. C.; Wade, V. J.; Nimmo, D. L.; Heywood, B. R.; Mann, S. "Synthesis of inorganic nanophase materials in supramolecular protein cages" Nature 1991, 349,684～687.

[5] Douglas, T.; Young, M. "Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages", Nature 1998, 393, 152～155.

[6] Miller, A.; "Collagen: The organic matrix of bone", Philos Trans R Soc London B 1984, 304, 455～477.

[7] Weiner, S.; Dove, P. M. "An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect", Rev Mineral Geochem 2003, 54, 1～29.

[8] Berman, A.; Ahn, D. J.; Lio, A.; Salmeron, M.; Reichert, A.; Charych, D. "Total alignment of calcite at acidic polydiacetylene films: Cooperativity at the organic-inorganic interface" Science 1995, 259, 515～518.

[9] Du, C.; Falini, G.; Fermani, S.; Abbott, C.; Moradian-Oldak, J. "Supramolecular Assembly of Amelogenin Nanospheres into Birefringent Microribbons" Science 2005, 307, 1450～1454.

[10] Addadi, L; Moradian, J.; Shay, E.; Maroudas, N. G.; Weiner, S. "A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: relevance to biomineralization." Proc Nature Acad. Science 1987, 84, 2732～2736.

[11] Aizenberg, J.; Black, A. J., Whitesides, G. M. "Control of nucleation by patterned self-assembled monolayers". Nature 1999, 398, 495～498.

[12] Archibald, D. D.; Qadri, S. B., Gaber, B. P. "Modified calcite deposition due to ultrathin organic films on silicon substrates", Langmuir 1996, 12, 538～546.

[13] Collins, M. J.; Westbroek, P.; Muyzer, G.; DeLeeuw, J. W. "Experimental evidence for condensation reactions between sugars and proteins in carbonate skeletons", Geochim Cosmochim Acta 1992, 56,1539～1544.

[14] Heywood, B. R.; Mann, S. "Template-directed nucleation and growth of inorganic materials" Adv Mater. 1994, 6, 9～20.

[15] Paquette, J.; Reeder, R. J. "Relationship between surface structure, growth mechanism, and trace element incorporation in calcite" Geochim Cosmochim Acta 1995, 59, 735～749.

[16] Wheeler, A. P.; Low, K. C.; Sikes, C. S. "$CaCO_3$ crystal-binding properties of peptides and their influence on crystal growth" In: Surface Reactive Peptides and Polymers: Discovery and Commercialization. Sikes CS, Wheeler AP (Eds) ACS Books, Washington, 1990.

[17] Johnson, D. A. "Some thermodynamic aspects of inorganic chemistry" Cambridge University Press, Cambridge, 1982.

[18] Mullin, J. W. Crystallization (3rd edition), Butterworths, Oxford, 1992.

[19] Hohenberg, P. C.; Halperin, B. I. "Theory of dynamic critical phenomena", Rev. Mod. Phys. 1977, 49, 435～479.

[20] Kahlweit, M. "Nucleation in Liquid solutions" In: Physical Chemistry, Vol. Ⅶ. Eyring H (ed), Academic Press, New York, 675～698, 1969.

[21] Chaikin, P. M.; Lubensky, T. C. Principles of condensed matter physics, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

[22] Kashchiev, D, Nucleation: Basic Theory with Applications, Butterworths, Heinemann, Oxford, (1999).

[23] Wong, K. K.; Brisdon, B. J.; Heywood, B. R.; Hodson, G. W.; Mann, S. "Polymer-mediated crystallisation of inorganic solids: Calcite nucleation on the surfaces of inorganic polymers" J. Mater. Chem. 1994, 4,1387～1392.

[24] Nancollas, G. H. Biological Mineralization and Demineralization. Springer-Verlag, New York, 1982.

[25] Neilsen, A. E. "Nucleation in aqueous solutions" In: Crystal Growth. Peiser, S. (ed) Pergamon, Oxford, 419～426, 1967.

[26] Abraham, F. F. Homogeneous Nucleation Theory. Academic Press, New York, 1974.

[27] Chernov, A. A. Modern Crystallography Ⅲ: Crystal Growth. Springer, Berlin, 1984.

[28] Chernov, A. A. "Formation of crystals in solutions" Contemp. Phys. 1989, 30, 251～276.

[29] Barabási, A-L.; Stanley, E. H. Fractal Concepts in Surface Growth, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

[30] Yau, S-T.; Vekilov, P. G. "Quasi-planar nucleus structure in apoferritin

crystallization" Nature 2000, 406: 494～497.

[31] Yau, S-T.; Vekilov, P. G. "Direct observation of nucleus structure and nucleation pathways" J Am Chem Soc 2001, 123, 1080～1089.

[32] Tang, R.; Darragh, M.; Orme, C. A.; Guan. X.; Hoyer, J. R.; Nancollas, G. H. "Control of Biomineralization Dynamics by Interfacial Energies", Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 3698～3702.

[33] Penn, R. L.; Banfield, J. F.; "Morophology development and crystal growth in nanocrystalline agrregates under hydrothermal conditions: insights from titania", Geochim. Cosmochim. Acta 1999, 63, 1549～1557.

[34] Banfield, J. F.; Welch, S. A.; Zhang, H. Z.; Ebert T. T.; Penn, R. L. "Aggregation-based crystal growth and microstructure development in natural iron oxyhydroxide biomineralization products", Science 2000, 289, 751～754.

[35] Pacholski, C.; Kornowski, A.; Weller, H. "Self-assembly of ZnO: from nanodots to nanorods", Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 1188～1191.

[36] Zitoun, D.; Pinna, N.; Frolet, N.; Belin, C. "Single crystal manganese oxide multipods by oriented attachment", J. Am. Chem. Soc. 2005, 127,15034～15035.

[37] Niederberger, M.; Cölfen, H. "Oriented attachment and mesocrystals: Non-classical crystallization mechanisms based on nanoparticle assembly", Phys. Chem. Chem. Phys. 2006, 8, 3271～3287.

[38] Cölfen, H.; Antonietti, M. "Mesocrystals: Inorganic Superstructures Made by Highly Parallel Crystallization and Controlled Alignment", Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 5576～5591.

[39] Weiner, S.; Addadi, L.; Wagner, H. D. "Materials design in biology", Mater. Sci. Eng. C 2000, 11, 1～8.

[40] Towe, K. M.; Hamilton, G. H.; "Ultrastructure and inferred calcification of the mature and developing nacre in bivalve mollusks", Calcif. Tissue Res. 1968, 1, 306～318.

[41] Termine, J. D.; Posner, A. S. "Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions", Science 1966, 153, 1523～1525.

[42] Posner, A. S.; Betts, F.; "Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure", Acc. Chem. Res. 1975, 8, 273～281.

[43] Lowenstam, H. A.; Weiner, S. "Transformation of Amorphous Calcium Phosphate to Crystalline Dahillite in the Radular Teeth of Chitons", Science 1985, 227, 51～53.

[44] Addadi, L.; Raz, S.; Weiner, S. "Taking advantage of disorder: amorophous calcium carbonate and its roles in biomineralization", Adv. Mater. 2003, 15, 959～970.

[45] Gebauer, D.; Völkel, A.; Cölfen, H. "Stable prenucleation calcium carbonate clusters", Science 2008, 322, 1819～1822.

[46] Faatz, M.; Gröhn, F.; Wegner, G. "Amorphous calcium carbonate: synthesis and potential intermediate in biomineralization", Adv. Mater. 2004, 16, 996～1000.

[47] Gower, L. B.; Odom, D. J. "Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process", J. Cryst. Growth, 2000, 210, 719～734.

[48] Becker, A.; Bismayer, U.; Epple, M.; Fabritius, H.; Hasse, B.; Shi, J. M.; Ziegler, A. "Structural characterisation of X-ray amorphous calcium carbonate (ACC) in sternal deposits of the crustacea Porcellio scaber", Dalton Trans. 2003, 4, 551～555.

[49] Nelson, D. G. A.; Wood, D. J.; Barry, J. C. "The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites: a high resolution electron microscope study", Ultramicroscopy 1986, 19, 253～266.

[50] Tohda, H.; Yamada, M.; Yamaguchi, Y.; Yanagisawa, T. "High-resolution electron microscopical observation of initial enamel crystals", J. Electron Micros 1997, 46, 97～101.

[51] Crane, N. J.; Popescu, V.; Morris, M. D.; Steenhuis, P.; Ignelzi, M. A. "Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other mineral species deposited during intramembraneous mineralization", Bone 2006, 39, 431～433.

[52] Politi, Y.; Metzler, R. A.; Abrecht, M.; Gilbert, B.; Wilt, F. H.; Sagi, I.; Addadi, L.; Weiner, S.; Gilbert, P. U. P. A. "Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2008, 105, 17362～17366.

[53] Mahamid, J.; Sharir, A.; Addadi, L.; Weiner, S. "Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase", Proc. Nature. Acad. Science., U. S. A. 2008, 105, 12748～12753.

[54] Williams, E. D.; Bartelt, NC "Thermodynamics of surface morphology". Science 1991, 251: 393～400. (33)

[55] Cabrera, N.; Vermileya, D. A. Growth and Perfection of Crystals, John Wiley & Sons, New York, 1958.

[56] Herring, C. "The use of classical macroscopic concepts in surface tension problems" In: Collection: Structure and properties of solid surfaces. McGraw-Hill, New York, p. 143, 1951.

[57] Tang, R.; Jiang, C.; Tai, Z. "Oriented crystallization of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ under monolayer of a novel amphiphilic ligand of 8-hexadecylkoxy quinardic acid", J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1997, 93, 3371～3374.

[58] Tang, R.; Jiang, C.; Tai, Z. "Effect of different amphiphile and its monolayer on the crystallization of $CuSO_4 \cdot 5H_2O$", J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1997, 4037～4041.

[59] Teng, H.; Dove, P. M.; De Yoreo, J. J. "Kinetics of calcite growth: Surface processes and relationships to macroscopic rate laws", Geochim Cosmochim Acta 2000, 64, 2265.

[60] Land, T. A. ; De Yoreo, J. J. ; Lee, J. J. "In situ AFM investigation of canavalin crystallization kinetics", Surf. Science. 1997, 384, 136.

[61] Orme, C. A. ; Noy, A. ; Wierzbicki, A. ; McBride, M. Y. ; Grantham, M. ; Dove, P. M. ; DeYoreo, J. J. "Selective binding of chiral amino acids to the atomic steps of calcite" Nature 2001, 411,775～779.

[62] Teng, H; Dove, P. M. ; Orme, C. A. , De Yoreo, J. J. "Thermodynamics of calcite growth: Baseline for understanding biomineral formation". Science 1998, 282: 724～727.

[63] Voronkov, V. V. ; Rashkovich, L. N. "Step kinetics in the presence of mobile adsorbed impurity", J. Cryst. Growth. 1994, 144, 107～115.

[64] van Enckevort, W. J. P. ; van der Berg, A. C. J. F. "Impurity blocking of crystal growth: a Monte Carlo study", J. Cryst. Growth. 1998, 183, 441～455.

[65] Davis, K. J. ; Dove, P. M. ; De Yoreo, J. J. "Resolving the controversial role of Mg^{2+} in calcite biomineral formation" Science 2000, 290, 1134～1137.

[66] Astilleros, J. M. ; Pina, C. M. ; Fernndez-daz, L. ; Putnis, A. "Molecular-scale surface processes during the growth of calcite in the presence of manganese", Geochim Cosmochim Acta 2002, 66, 3177～3189.

[67] Wilson, D. S. ; Dove, P. M. ; DeYoreo, J. J. "Nanoscale effects of strontium on calcite growth: A baseline for understanding biomineralization in the absence of vital effect", Am. Geophys. Union Fall Meeting Program, 228, 2003.

[68] Chernov, A. A. "The spiral growth of crystals", Sov Phys Uspekhi 1961, 4, 116～148.

[69] Bliznakow, G. "Crystal habit and adsorption of cosolutes". Fortsch. Min. 1958, 36,149.

[70] Hartman, P. ; Kern, R. "Le changement de facies par adsorption et al. theorie dea 'PBC. '", Acad. Science. Paris 1964,258, 4591～4593.

[71] Kern, R. ; "Crystal growth and adsorption. In: Growth of Crystals", Sheftal', N. N. (ed), Consultants Bureau, New York, 3～23, 1969.

[72] Petsev, D. N. , Chen, K. ; Gliko, O. ; Vekilov, P. G. "Diffusion-limited kinetics of the solution-solid phasetransition of molecular substances", Proc. Nature. Acad. Science. (USA), 2003, 100, 792～796.

[73] Liu, X. Y. ; De Yoreo, J. J. From Solid-Fluid Interfaces to Nanostructural Engineering. Vols. Ⅰ and Ⅱ. Kluewer/Plenum Academic Press, New York, 2003.

[74] Wu, W. ; Nancollas, G. H. "Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: a comparison with other methods", Adv. Colloid Interface Science 1999, 79, 229～279.

[75] Ross, S. ; Morrison, I. D. Colloidal Systems and Interfaces, John Wiley and Sons, New York, 1988.

[76] Hiemenz, P. C. Principles of Colloid and Surface Chemistry (2^{nd} ed.). Marcel Dekker, Inc. New York, 1986.

[77] Stumm, W. ; Morgan, J. J. Aquatic Chemistry (3^{rd} ed.). John Wiley and Sons,

New York, 1996.

[78] Kasemo, B. "Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects", J Prosthet Dent 1983, 49, 832～837.

[79] Sunny, M. C.; Sharma, C. P. "Titanium-protein interaction: changewith oxide layer thickness", J. Biomater. Appl. 1991, 5, 89～98.

[80] Huang, N.; Chen, Y. R.; Liu, X. H. "In vitro investigation of blood compatibility of Ti with oxide layer of rutile structure." J. Biomater. Appl. 1994, 8, : 404～412.

[81] Leitao, E.; Barbosa, M.; de Groot, K. "In. uence of substrate material and surface. nishing on the morphology of the calcium phosphate coating", J. Biomed. Mater. Res. 1997, 36, 85～90.

[82] Wu, W.; Nancollas, G. H. "Kinetics of nucleation and crystal growth of hydroxyapatite and. uoroapatite on titanium oxide surfaces", Colloids Surf. B: Biointerfaces 1997, 10, 87～94.

[83] Barrere, F.; Layrolle, P.; van Blitterswijk, C. A., de Groot K. "Fast formation of biomimetic Ca-P coating on Ti_6Al_4V", Mater. Res. Soc. Symp. Proc. 2000, 599, 135～140.

[84] Habibovic, P.; Barrere, F.; van Blitterswijk, C. A.; de Groot, K.; Layrolle, P. "Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants", J. Am. Ceram. Soc. 2002, 85, 517～522.

[85] Nancollas, G. H., Wu, W. "Biomineralization mechanisms: a kinetics and interfacial energy approach", J. Crystal Grwoth 2000, 211, 137～142.

[86] Wu, W.; Gerard, D. E.; Nancollas, G. H. "Nucleation at surfaces: The importance of interfacial energy", J. Amer. Soc. Nephrology 1999, 10, S355～S358.

[87] Wu, W.; Nancollas, G. H. "Interfacial free energies and crystallization in aqueous media", J. Coll. Interface Science. 1996, 182, 365～373.

[88] Tao, J.; Jiang, W.; Zhai, H.; Pan, H.; Xu, X.; Tang, R. "Structural components and anisotropic dissolution behaviors in one hexagonal single crystal of beta-tricalcium phosphate", Cryst. Growth Des. 2008, 8, 2227～2234.

[89] Pan, H.; Tao, J.; Yu, X.; Fu, L.; Zhang, J.; Zeng, X.; Xu, G.; Tang, R. "Anisotropic demineralization and oriented assembly of hydroxyapatite crystals in enamel: smart structures of biominerals", J. Phys. Chem. B 2008, 112, 7162～7165.

[90] Dos Santos, E. A.; Farina, M.; Soares, G. A.; Anselme, K. "Surface energy of hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion", J. Mater. Science: Mater Med 2008, 19, 2307～2316.

[91] Yin, X.; Stott, M. J. "Surface and adsorption properties of alpha-tricalcium phosphate", J. Chem. Phys. 2006, 124, 124701～124709.

[92] Tao, J. H.; Pan, H. H.; Zhai, H. L.; Wang, J. R.; Li, L.; Wu, J.; Jiang, W. G.; Xu, X. R.; Tang, R. K. "Controls of tricalcium phosphate single crystal formation from its amorphous precursor by interfacial energy", Cryst. Growth Des. 2009, 9, 3154～3160.

[93] Grassmann, O.; Neder, R. B.; Putnis, A.; Löbmann, P. "Biomimetic control of crystal assembly by growth in an organic hydrogel network"; Am. Mineral. 2003, 88, 647～652.

[94] Raz, S.; Weiner, S.; Addadi, L. "Formation of high-magnesian calcites via an amorphous precursor phase: possible biological Implications", Adv. Mater. 2000, 12, 38～42.

[95] Blumenthal, N. C.; Betts, F.; Posner, A. S. "Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP", Calcif. Tissue Res. 1977, 23, 245～250.

[96] Dillaman, R.; Hequembourg, S.; Gay, M. "Early pattern of calcification in the dorsal carapace of the blue crab", Callinectes sapidus. J. Morphol. 2005, 263, 356～374.

[97] Tao J. H.; Zhou, D. M.; Zhang Z. S., Xu X. R., Tang R. K. "Magnesium-aspartate-based crystallization switch inspired from shell molt of crustacean", Proc. Nature. Acad. Science. USA, 2009, 106, 22096～22101.

[98] Gutjahr, A.; Dabringhaus, H.; Lacmann, R. "Studies of the growth and dissolution kinetics of the $CaCO_3$ polymorphs calcite and aragonite Ⅱ. The influence of divalent cation additives on the growth and dissolution rates", J. Cryst. Growth 1996, 158, 310～315.

[99] Kanzaki, N.; Onuma, K.; Treboux, G.; Tsutsumi, S.; Ito, A. "Inhibitory effect of magnesium and zinc on crystallization kinetics of hydroxyapatite (0001) face", J. Phys. Chem. B 2000, 104, 4189～4194.

[100] Davis, K. J.; Dove, P. M.; De Yoreo, J. J. "The role of Mg^{2+} as an impurity in calcite growth", Science 2000, 290, 1134～1137.

[101] Reddy, M. M.; Nancollas, G. H. "The crystallization of calcium carbonate: I. Isotopic exchange and kinetics", J. Colloid Interface Science. 1971, 36, 166～172.

[102] Loste, E.; Wilson, R. M.; Seshadri, R.; Meldrum, F. C. "The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies", J. Cryst. Growth 2003, 254, 206～218.

[103] Weiner, S. "Aspartic acid-rich proteins: major components of the soluble organic matrix of mollusk shells", Calcif. Tissue Int. 1979, 29, 163～167.

[104] Mitterer, R. M. "Amino acid composition and metal binding capability of the skeletal protein of corals", Bull. Mar. Science. 1978, 28, 173～180.

[105] Albeck, S.; Aizenberg, J.; Addadi, L.; Weiner, S. "Interactions of various skeletal intracrystalline components with calcite crystals", J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 11691～11697.

[106] Sugawara, A.; Nishimura, T.; Yamamoto, Y.; Inoue, H.; Nagasawa, H.; Kato, T. "Self-organization of oriented calcium carbonate/polymer composites: effects of a matrix peptide isolated from the exoskeleton of a crayfish", Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 2876～2879.

[107] Fu, G.; Qiu, S. R.; Orme, C. A.; Morse, D. E.; De Yoreo, J. J.

"Acceleration of calcite kinetics by abalone nacre proteins", Adv. Mater. 2005, 17, 2678～2683.

[108] Elhadj, S.; De Yoreo, J. J.; Hoyer, J. R.; Dove, P. M. "Role of molecular charge and hydrophilicity in regulating the kinetics of crystal growth", Proc. Nature. Acad. Science. U. S. A. 2006, 103, 19237～19242.

[109] Tsuji, T.; Onuma, K.; Yamamoto, A.; Iijima, M.; Shiba, K. "Direct transformation from amorphous to crystalline calcium phosphate facilitated by motif-programmed artificial proteins", Proc. Nature. Acad. Science. U. S. A. 2008, 105, 16866～16870.

[110] Politi, Y.; Mahamid, J.; Goldberg, H.; Weiner, S.; Addadi, L. "Asprich mollusk shell protein: in vitro experiments aimed at elucidating function in $CaCO_3$ crystallization", CrystEngComm 2007, 9, 1171～1177.

[111] Jiang W. G.; Chu X. B.; Wang B.; Pan H. H.; Xu X. R.; Tang R. K. "Biomimetically triggered inorganic crystal transformation by biomolecules: a new understanding of biomineralization", J. Phys. Chem. B, 2009, 113, 10838～10844.

[112] Tao, J. H.; Pan, H. H.; Zeng, Y. W.; Xu, X. R.; Tang. R. K. "Roles of amorphous calcium phosphate and biological additives in the assembly of hydroxyapatite nanoparticles", J. Phys. Chem. B 2007, 111, 13410～13418.

[113] Tang, R.; Orme, C. A.; Nancollas, G. H. "Dissolution of Crystallites: Surface Energetic Control and Size Effects" Chem Phys Chem 2004, 5, 688～696.

[114] Tang, R.; Nancollas, G. H. "Abnormal crystal dissolution of octacalcium phosphate at constant undersaturation" J. Crystal Growth 2000, 212, 261～269.

[115] Tang, R.; Wu, W.; Hass, M.; Nancollas, G. H. "Kinetics of dissolution of β-tricalcium phosphate", Langmuire 2001, 17, 3480～3485.

[116] Tang, R.; Nancollas, G. H.; Orme. C. A. "The mechanism of dissolution of sparingly soluble electrolytes", J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 5437～5443.

[117] Tang, R.; Wang, L.; Orme, C. A.; Bonstein, T.; Bush P. J.; Nancollas, G. H. "Dissolution at the Nanoscale: Self-Preservation of Biominerals", Angew. Chem. Int. Ed, 2004, 43, 2697～2701.

[118] Tang, R.; Wang, L.; Nancollas, G. H. "Size-effects in the Dissolution of Hydroxyapatite: An Understanding of Biological Demineralization", J. Mater. Chem. 2004, 14, 2341～2346.

[119] Tang, R.; Orme, C. A.; Nancollas, G. H. "A New Understanding of Demineralization: The Dynamics of Brushite Dissolution", J. Phys. Chem. B 2003, 107, 10653～10657.

第 3 章　有机基质调控生物矿化

与人工合成的晶体相比，活器官对晶体生长过程的控制程度令人惊叹。这种差异不仅表现在晶体成分上，也表现在晶体的形貌上[1]。图 3.1(a)所示为在密封烧杯中的纯溶液中生成的碳酸钙晶体的典型形貌，形成的晶体为简单的菱形方解石，这是碳酸钙最稳定的形式。此外，晶体的形核及生长在整个烧杯里随机发生，没有择优取向，晶体生长速度由溶液状态和材料本身的一些常数决定。图 3.1(b)～(d)所示为一些由天然生物方解石形成的有一定特殊形状的单晶范例，颗石球内的方解石晶体的形貌如图 3.1(b)所示。晶体在特定的位点生长，并沿方解石的晶体学轴有择优取向。构成软体动物壳的晶体为文石，如图 3.1(c)所示。文石是一种比方解石稳定性稍低的碳酸钙晶体。与人工合成的方解石晶体不同，人内耳中的方解石晶体为纺锤形，见图 3.1(d)。这些例子都表明，生物体器官能够控制晶体形核的位点、晶体学取向、生长中的晶体的形状以及最终生成的物相，而这些功能的实现都依赖于矿化过程中存在的有机成分，及其在矿物生长阶段起到的调节作用[4～8]。

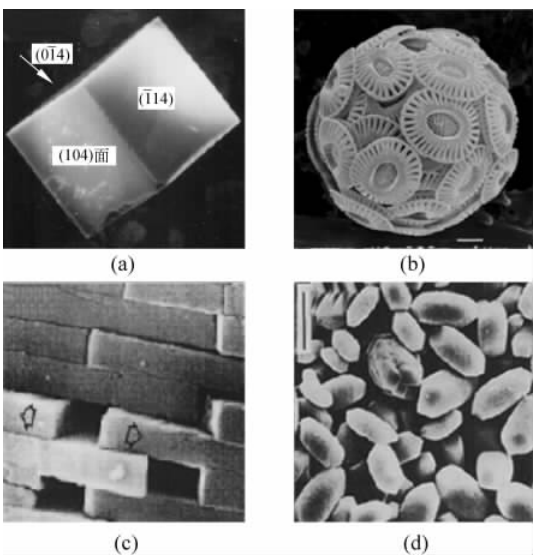


图 3.1　方解石晶体的扫描电镜照片

(a) 人工合成的方解石；(b) 颗石球 E. huxleyi；(c) 软体动物外壳的文石层[2]；(d) 人内耳的方解石晶体[3]

另一方面，有机物也能够控制晶体形核。具体说来，对生物矿物在复杂的晶体复合物的特定位点生长，以及有一定晶体学取向的晶体的生成进行解释就必须考虑形核阶段的有机物调控。此外，有很多证据表明，蛋白和其他一些有机分子能起到“模板”的作用，提供择优形核位点，并控制晶体生长的方向。包括鸟类的蛋壳[9]和软体动物的外壳[6]在内的很多有机-无机复合物都存在层状结构，这说明在这些复合物的合成过程中，无机晶体是在有机-溶液界面生长形成的。

近 20 年来，生物矿化研究的一个重要进展就是认识到了有机模板对无机晶体的调制作用，即有机分子通过有机-无机界面的分子识别在晶体形核、生长以及微结构的有序组装方面起着关键的作用。有机基质通常具有以下几个方面的功能：

（1）机械设计：力学性能，例如强度和韧性的修饰，以满足生物行为的需要；

（2）矿物稳定：通过矿物溶解或相的转变达到矿物的稳定；

（3）矿物形核：控制形核位点和组织形式，无机相的结构和晶体学位向；

（4）空间组织：控制生长的具有半渗透功能的微环境的空间分割。

3.1　有机基体作为机械构架

有机基质调制生物矿化是与生物矿物的独特的力学性质相联系的，因此我们从关于大分子构架的机械设计开始讨论。有机基体是一个预先形成的、不溶的大分子构架，它是受控生物矿化的一个关键因素。基质可以细分矿化空间，起着机械支撑的结构构架作用，并且在成核过程中具有界面活性。

多年来，科学家们对生物矿物的机械设计兴趣不减，例如骨和贝壳，它们是无机矿物和有机大分子的复杂组装，这个组装具有不同寻常的韧性、强度和硬度。已经有人报道了贝壳和骨的一些共同的生物机械性能[10, 11]。珍珠质应力可以达到大约 150 MPa，典型的股骨在断裂之前应力可以达到约 200 MPa。另一方面，应变与施加的应力有关，在鹿角等材料中可以获得相对高的应变值，鹿角可以在 300 MPa 的应力作用下持续延伸而不断裂。

将有机基体从这些生物矿物质中去除对它们的机械性能有很大的影响。例如在骨中，拉伸强度和压缩强度会分别降低 95％和 73％。然而，硬度或者杨氏模量（E）不会有明显的改变，因为它们主要是由矿物相决定的。

总的来说，矿物晶体与一个疏水大分子构架的结合，即使是在最简单的支持系统里，也必须能够抵抗存在于生物环境中的拉应力、压应力和弯曲应力。建筑师和土木工程师应该知道构建空间结构以抵御外力的最好方法。

通常都假定构架的设计采用最小的重量,这其中包括最少量的材料起到最合适的作用。

在这些论据的基础上,似乎有机基体结构的机械设计的方法有很多种,以抵御施加在有机支架上的特殊的应力,这些应力可以在支架形成过程中以及形成后施加在支架上。基体的硬度需要由一些交联的纤维或者层片的堆积产生,所以硬度可能不是最理想的,因为结构所需要的强度和硬度主要由矿物成分提供。事实上,一个硬度低的基体可能会有某些优点,例如可以吸收冲击的能量,它被设计来容纳,而不是抵抗变形。这种现象发生在帽贝的铁氧化物牙齿中。凿子状的切割边缘是通过牙齿沿着岩石表面粗挫而形成的,并且由位于其中的有机基体纤维增强,显微镜下可以看到纤维按照交替方向排列。纤维如此排列,以支持牙齿的切割能力达到最大。尤其是位于切割边缘之后有一层更厚的有机粗纤维,在这里它们可以最多地吸收冲击产生的能量。

有机支架在生物矿化组织的机械设计中起着重要的作用,这种生物矿化组织包括骨、贝壳和牙齿。这些生物矿物质的很多功能,如运动、保护、切割和摩擦,是依赖于机械性能的,例如强度和韧性,这些性质与有机和无机复合紧密相关。

3.2 大分子和有机基质——一个普适的模型

有机基体作为不溶性构架在水环境中产生,所以它们的基本大分子必须是疏水的,否则整个架构将会很容易地随着时间而溶解。很明显,如果基体被用作分割空间的半透性的膜或者作为机械骨架,那么这个疏水的性质也是必需的。但是,如此的构架在控制生物矿物成核方面具有很重要的作用,似乎与基本概念相违背,因为这涉及将离子与水合物组织在一起,而在正常的环境中水合物不会与疏水表面发生相互作用。这个与亲水疏水平衡相关的需要可以通过很多方法来满足,例如通过:

(1) 两性大分子;

(2) 最初沉积的可溶的基体的交联;

(3) 含有不同亲水、疏水性质的大分子的多组元系统。

近年来提出了一个普适的模型,既能够解释有机基体的结构,也能够解释其功能。它最简单的形式是,基体由一个疏水性占优势的交联的结构构架组成,表面固定着亲水性的大分子,亲水性的大分子能够为外部溶液提供一个活性的形核表面(图 3.2)。

这个二组元的模型最初起源于经验,证据建立于从矿化的组织中提取的

蛋白质，这些组织有骨和贝壳等。在这些研究中，两类大分子——构架大分子和酸性大分子，在生物矿物被化学方法溶解之后，分别根据大分子在水中的溶解度的高低区别开来。通常使用 HCl 和 EDTA 混合物来溶解生物矿物。构架大分子主要是不可溶的大分子，由疏水性的蛋白质和多糖组成，代表了有机基体的结构和生物机械性能。与此相反，大量的水溶性酸性大分子在溶解的过程中释放了出来。这些大分子可能在控制矿物质生长，以及与生物矿化相联系的细胞活动方面起着重要的作用，例如离子输运、酶的调节和激素的刺激等。

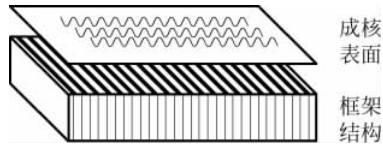


图 3.2　有机基质的模型[3]

一些研究者试图分离不溶性蛋白质中的不同种类。例如，在弱碱性溶液中进一步处理，有时能够将部分大分子分散进入溶液。由于这些组分与构架在正常的条件下结合非常紧密，所以它们很有可能扮演着重要的界面角色，例如将构架大分子和酸性大分子联系在一起。

构架大分子例如骨胶原、壳聚糖和纤维素，由于其在生物体中有着重要的作用，已经被广泛地研究过了，特别是骨胶原在骨的矿化过程中起着关键性的作用。人们对于酸性大分子的知识相对来说是非常匮乏的，因为很难分离出一种纯蛋白质，即使将某种蛋白质分离出来，其氨基酸序列也不容易得到。所能做到的就是分析氨基酸的组成，由此能够提供过饱和溶液中存在的，与矿物离子相互作用的蛋白质的类型。事实上，正是在这个意义上可以说蛋白质是酸性的，因为蛋白质大分子经常含有大量的、被共价键磷酸根修饰的天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸。多数情况下，酸性的大分子是糖蛋白质，它们是带有共价结合的多糖侧链的蛋白质，链中经常含有硫酸和羧酸残基。

作为一个普遍的模型，有机基体是疏水性大分子与酸性大分子结合在一起构成的，其中疏水性大分子组成结构构架，而酸性大分子作为生物矿化的形核面。两类组元一般都含有大分子的复杂组装，能够在实验室里通过矿物相的溶解而被提取出来。

3.3　有机基质诱导成核

我们现在来讨论关于不溶性构架大分子在控制无机矿物成核方面的作用，例如碳酸钙和磷酸钙。虽然我们的注意力主要集中在大分子的表面化学方面，这些大分子表面含有功能化基团，例如带电的氨基酸和阴性的糖族，但是了解磷脂在控制形核过程中的作用也很重要。例如，软骨钙化的初始时期就是与具有双层膜的囊泡有关，双层膜富含带负电的磷脂——磷脂酰丝氨

酸。这些磷脂能够与 Ca^{2+} 形成稳定的复合物,进一步吸引 HPO_4^{2-} 离子,从而使得沿着囊泡内表面的部位很容易形核。类似的磷脂-钙磷复合物出现在某些细菌的细胞膜处,这可以引起羟基磷灰石在牙齿表面上的沉积。

无论是由磷脂,还是由多肽、聚糖构成,有机基质在控制无机晶体形核中的核心作用是通过减少界面能来降低形核功。图 3.3 显示了自由能(ΔG)与临界形核尺寸(r^*)的关系,在有机基质存在的情况下,临界形核尺寸显著降低,从而使形核自由能降低。这个过程包含了以下几种作用:

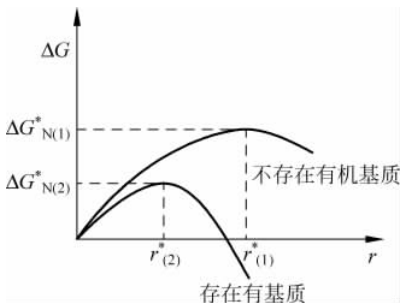


图 3.3 自由能与临界形核尺寸的关系

(1) 形核速率的改变;

(2) 有机基质表面形核位点的组织;

(3) 矿物多晶型结构的选择;

(4) 有机基质表面核心的晶体学排列。

形核率与在过饱和溶液中形核所要求的产生新的固-液界面所需的活化能直接相关,因此,通过在有机基体表面一定的位置处的分子间相互作用,从而降低活化能,矿物相的形核率及其沉积的位置都能受到高度的控制。在有机基体表面的形核过程中通过显著降低多晶型中的一种,而不降低另一种晶型的活化能,可能引起这种特殊矿物结构的优先沉积。表面结构和有机基体成分的改变可能会引起多晶型之间的转换。例如,这可以解释为什么文石和方解石分别在一些贝壳的内层和外层形成。

图 3.4 以简图的形式显示了有机基质是如何在生物矿化的形核的结构控制中降低形核功的。假如我们考虑矿物相分别在不存在(状态 1)和存在(状态 2)有机基体的情况下形核,由于有机表面促进形核,状态 2 的活化能总是小于状态 1。现在,无机相也有两种晶型:A 和 B,并且在不存在有机相的情况下,晶型 A 的结晶动力学更有利于结晶。那么,在有机基质存在的情况下,取决于 A 与 B 的形核活化能的变化情况,就会出现 3 种情况,如图 3.4 所示:

(1) 促进非特殊结构形核:在有机基质存在的情况下,两种晶型的活化能都被降低,生物矿化的结构没有变化(图 3.4(a))。

(2) 促进特殊结构形核:由于在有机基质表面的结晶学识别,晶型 B 的活化能都被大大降低,因此晶体 B 状态 2 的活化能降到低于晶体 A 的状态 2(图 3.4(b))。

(3) 促进一系列非特殊结构转变成特殊结构形核:取决于晶核 A 和晶核 B 在有机基质表面的结晶学识别的水平,以及基体结构变化的可重复性,因为基体在外界因素如基因、新陈代谢和环境影响下会发生变化(图 3.4(c))。

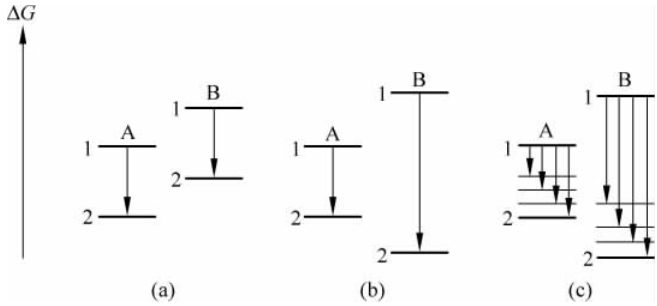


图 3.4　有机基质对生物矿化形核影响

(a) 促进非特殊结构形核；(b) 促进特殊结构形核；(c) 促进一系列非特殊结构变成特殊结构形核

当我们考虑到不仅仅是生物矿物的结构得到有机表面的控制，而且在某些情况下，矿物核心的晶体学排列也要受到有机基体的影响，那么有机基质诱导的形核就变得更加有意义了。例如，贝壳的珍珠层中的文石能够优先形核，而且晶胞的 c 轴垂直于有机层片的平面。在牙釉质中，细长的羟基磷灰石晶体成束排列组成的晶体棒的 c 轴垂直于周围釉蛋白的 β-折叠片。在骨中，片状羟基磷灰石晶体的 c 轴沿着骨胶原纤维轴向有序排列。

有时，用简单的物理机制来解释某些生物矿物晶体的排列是可能的。例如，我们已经描述了鸟类蛋壳中的方解石晶体变得沿着晶体学 c 轴优先生长，因为形核位置的有限的物理空间，其他方向的生长受到了限制。但是在大多数系统中，定向形核被认为起源于特殊的分子机制，它能够降低某一结晶方向的活化能。这种情形非常类似于在图 3.4 中讨论过的多晶型结构的控制，所不同的是，那里用 A 和 B 代表结构状态，而这里使用 A 和 B 代表两种不同的晶面。例如，在立方系中米勒指数为{100}和{111}的晶面。根据前面的讨论，如果适当的界面间相互作用特别降低了{111}面的活化能，比较不稳定的{111}晶面的形核能够发生，而不是更稳定的{100}面。

生物矿化中有机基质诱导矿化的中心原则是，无机晶体形核的活化能被降低，这种作用源于大分子表面的官能团与过饱和溶液中的离子之间的相互作用。由此可以导致对于形核速率，形核位点的数量和组织，多晶型选择以及取向形核的控制。

3.3.1　界面处的分子识别

一些有机大分子官能团在界面处与无机晶体离子相互作用，直接参与控制无机矿物的形核和生长，即“分子识别”。有机基体的生物矿化过程中降低形核活化能的作用，被认为包括了不同类型的大分子表面的官能团与过饱和

溶液中的离子之间的界面相互作用(图 3.5)。总的来讲,这些相互作用涉及在无机-有机界面上的分子识别的一些形式,例如,电荷匹配、极性、结构和立体化学可以引起活化能的特殊变化,由此可以转换成对晶体的形核速率、结晶学位点、矿物相结构和晶体学位向的控制。基于生物矿化中有机模板指导的定向形核现象,S. Mann[12]采用 Langmuir 单层膜的分子有序组合体作生长基,模拟 $CaCO_3$ 矿化体系,在拟定的溶液环境下探讨成分、溶液 pH 值及功能团、有序体的结构、形态、膜表面极性头部的荷电状况,以及脂双层内外凹凸曲面的化学势差异对晶体形成与生长的影响,以研究膜上矿化的分子识别过程与控制。研究认为,有机大分子模板对发生成核的无机离子的选择涉及表面上的分子反应,及蛋白在界面上吸附的过程,是一个界面过程。

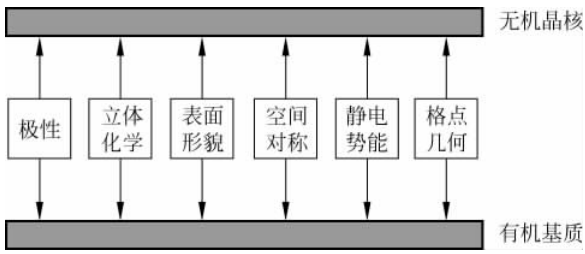


图 3.5　有机-无机界面作用[3]

在很多方面,有机基体的表面类似于溶液中的酶,只是以无机晶核取代与酶键合的基体分子。以上两种情况中,形核和反应的活化能的降低分别取决于形状和两组元之间在分子距离内的化学互补性。需要考虑的是,由静电力和离子表面的周期结构引起的长距离的相互作用对于形核的影响。

界面分子识别的理论建立在有机表面的单个离子的排列、键合部位的影响以及长距离的组织形核等基础之上。还有一种理论涉及有机基质对于在过饱和溶液中已经存在的无机晶核的优先选择和优先稳定。在这种情况下,界面识别是在超分子水平,而不是在分子水平发生的。然而,这些模型之间的差别并不大,因为它们涉及的分子识别过程都是建立在电荷、结构和立体化学匹配的基础之上的。

分子识别表现为具有一定规整的预构造的有机大分子基体在界面处,通过以下各因素的相互作用影响和控制无机矿物沉淀形核的部位、结晶物质的选择、晶体的尺寸、多晶型的选择、晶体学取向以及最终的晶体形貌。

按照 S. Mann 所提出的界面有组织矿化的观点,认为生物矿化过程存在着不同层次的控制作用,向每个隔室中运送成核所需要的分子和离子要受到隔室内物理化学参数以及外部生化反应和过程的控制,这是一个极其复杂的过程。由于界面的性质与界面两侧的体相材料之间存在明显的区别,在界面

上更易发生化学反应，这是与界面的几何特征、化学键合以及结构缺陷等因素密切相关的，故可从有机-无机界面的结构、化学环境和空间状态这三个方面去理解生物矿化中的分子识别：

（1）生物无机晶体生长的空间定位和空间约束。有机界面为晶体的空位生长提供了一个有效中心，晶体就在这个有效中心内形成，同时它又对晶体在空间上的生长予以约束和限制，从而使晶体在结构形态及尺寸上都得到控制。最典型的例子为胶原蛋白、贮铁蛋白和基质囊泡等，它们都广泛存在于生物矿化的过程之中。

（2）晶体生长的局域化学控制。晶体生长的局域化学控制主要是指在有机界面附近的化学微环境，而其中最主要的环境因素是局域过饱和度，它不仅反映了矿化环境的非平衡态的情况，而且还是决定晶体成核与生长的基本条件。在一个隔室化的体系中，往往有离子泵或其他自控系统存在于磷脂膜上，借助于主动运送的机制以保证不同的离子和分子能不断地运送到矿化区域，从而使得局域的过饱和度增大。另一方面，氧化还原过程或配体离解反应皆会使某些离子逆着它的电化学梯度而运送，改变离子强度和 pH 值也可达到调节离子活度和离解常数来影响局域的过饱和度。

（3）晶体生长中的分子互补。成核作用活化能的降低需要在有机-无机界面上分子之间存在着静电、结构与立体化学上的互补[12]。

磷酸钙盐体系是生物体内存在的极为重要的无机矿物相。在所有脊椎动物的骨骼和牙齿中，磷酸钙盐是主要的无机矿物相。占成人骨干 65%（质量分数）的无机物质的主要成分为钙磷盐晶体，牙齿冠部表面覆盖的坚硬的牙釉质中，以羟基磷灰石为主要晶态的无机物则占了总重量的 96%～97%。强度高、质量轻、结构精细的骨和结构高度有序的坚硬的牙齿均是令人们极为感兴趣的生物矿化材料。因此，在这种生物环境中发生的磷酸钙盐的生物矿化过程吸引了各个领域研究者们极大的注意力。

目前对于天然骨中的矿化机制已经有了较为深入的了解。较为传统的观点认为占骨中蛋白质 95%的胶原纤维是钙化的主要有机基质，胶原纤维上存在的功能点促进钙化的发生，这是因为在天然骨中发现的羟基磷灰石晶体以片状晶的形式规整地排列在胶原纤维组成的“槽”区（groove）内。但是越来越多的观点认为，胶原纤维的这种规整的周期性间隔的孔区和由此重叠排列形成的槽仅仅是磷酸钙盐晶体沉积的“模板”，而结合在这些“孔区”内或附近的非胶原蛋白，如磷蛋白、糖蛋白以及富含羧基谷氨酸（γ-carboxy glutamic acid containg protein）、磷酸和羟基脯氨酸（phosphate and hydroxyproline）的蛋白质才是促使矿化和指导矿化的有机基质。

尽管在骨的矿化基质问题上存在一定的分歧，但是所有的研究都不约而

同地支持这一点：有机基质中的羧基(－COOH)和磷酸根基团(－PO_4H_2)是促发和控制矿化的有利因素，与钙离子具有较强的亲和力。

胶原蛋白本身不能完成基质的全部功能，它不能引起矿化和指导矿化，起这些作用的是磷蛋白(phosphoprotein)。它们是一类富天冬氨酸及磷酸丝氨酸的蛋白质，磷酸基使这类蛋白对钙离子的亲和力大于胶原蛋白和其他无磷酸基蛋白质。这种亲和力不只表现在结合强度上，也表现在结合量上。一种牙本质的磷蛋白/载磷蛋白(phosphoryn)每个分子可结合几百个 Ca^{2+}，并使这些 Ca^{2+} 在它的分子上按磷酸基的分布而定位。磷蛋白的另一重要性是它能和胶原蛋白较强地结合。这样的配合为磷酸钙的析出与组装创造了条件。

3.3.2 静电积累

有机基体在无机矿物形核中的最基本的性质是其表面上电荷如何分配的问题。这引起了界面配合物的一种简单的形式，电荷在矿物晶格的晶面中的阳离子与阴离子之间的分配是按照有机表面上与有机基团键合的离子的排列。形核活化能的降低是因为离子已经至少通过有机基体在二维空间进行了预组织。

因此我们也希望能找到一种普遍的联系，即介于有机基体表面存在的官能团的类型和矿物相的化学性质之间的联系。在一个有限的范围内这是正确的。例如，我们已经描述了含钙的生物矿物常常与高度酸性的富含羰基(天冬氨酸，谷氨酸)和磷酸化氨基酸(磷丝氨酸)，以及硫酸化糖基的生物大分子紧密相关。这些阴离子配合基与 Ca^{2+} 离子形成很强的静电结合，使得金属阳离子在有机表面的特定位置聚集。

对这个简单的有机基体诱导离子键合的机理，我们需要增加一种机制来提高有序化过程，从而使得它能扩展到足够大的区域，来安置一种典型的 2～3 nm 的无机核心。一种可能性就是键合的部位集中到一起，在有机表面产生具有高的空间电荷密度的局部区域。这种高空间密度、低相互作用亲和力，使得离子能够运动到结晶核的周期点阵位点。

另一种可能性就是不用单个水合离子，而是将预先形成的核心和存在于过饱和溶液中的离子团簇通过一种电荷匹配的机制在有机基体表面稳定住。在这种情况下，微小的核心迁移到能量合适的区域，这个区域具有匹配的空间电荷密度。一旦它们固定在有机基体的表面，这些团簇就能进行内部的结晶，因为它们与有机基质结合而降低了表面能。

局部聚集高容量的带电离子，在高密度区具有合适的亲和力，是在功能化的有机基质表面无机相形核的活化能降低的主要机制。

有机-无机界面上的高容量和成键亲和力是控制成核作用的关键，所谓高

容量是指对于局域的基质表面附近应聚集足够数目的离子，使其超过形成临界核所需的数目，而有机基质表面特殊位点上存在着的离子电荷的静电累积作用，例如基质表面上阳离子位点与阴离子之间的初级成键作用，使界面达到高容量这一点是至关重要的。如果成核位点上的极性和电荷密度与正在形成晶核的某一特定晶面周围所产生的静电场相互匹配，其成键亲和力就低，就会在某个晶面上择优取向生长。

3.3.3　表面形貌

离子在有机表面的静电积累受到局部团簇聚集及其空间电荷分布的影响，这些又取决于有机基质的表面结构和形貌。

在铁蛋白形核过程中，谷氨酸残基沿着两个多肽链亚单元之间的分子沟槽，在一个相对较小的表面区域中集中了阴离子电荷。这个例子表明，电荷在有机基体表面的积聚受到形核位点纳米尺度的表面形貌的影响。改变表面的局部形状会影响官能团的空间电荷分配能力，从而影响了它们稳定从过饱和溶液中析出的无机团簇的能力。这里有三种可能性：

(1) 凹形表面；

(2) 凸形表面；

(3) 平面基体。

很明显，凹槽的部位可在一定空间产生高电荷密度区，以及稳定的核心(1～5 nm)。注意到高亲和力的副作用，因为它限制了分散的水化的离子团通过结构重排成为稳定核心。这样，离子对的积累可能十分重要。分子空腔的曲率为形核造成了三维的控制，并且对形核位置的尺寸也造成限制。作为比较，平面则提供了一个二维尺度的形核位置；对凸面，如果没有其他因素，其活泼性较低，因为其结合位置不像凹面那样，被限制在很近的距离。平面基体的情况非常有趣，官能团能够在表面上有规则地排列，并且能够作为表面键合离子在有机基体上周期性排列的模板。平面的优越性在于，可以稳定地建立一种长程结构配合。这就引出了晶体取向的概念，这一直是控制生物矿化的一个重要概念。

3.3.4　结构匹配——几何模型

有机基质表面取向成核一个重要的原因就是晶体中晶格间距与界面上有序排列的官能团之间存在着几何匹配。通过在有机基体表面一个有规律的区域键合离子，与形核有关的界面能的降低可以与结构控制相匹配，以使得产生的核心能够沿着一个结晶方向优先取向。这个观点是基于立体或结构匹配的观点。关于生物矿化，这个相近的匹配产生于某些晶面的空间尺寸

与官能团内周期性的距离之间的匹配。例如,在图 3.6 中,阴离子以规则间隔排列在有机基体表面,以相当于 x 轴向晶格同样的距离排列在顶面而不是侧面。因为晶面是二维的,几何匹配必须沿两个不同的定向形核的晶向发生。这意味着基体必须具有局部平整的晶体表面。

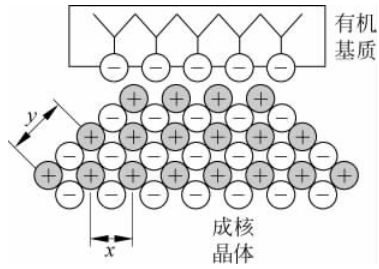


图 3.6　结构匹配示意图[3]

结构匹配是一个理论上的概念,并且在生物矿化界得到普遍认可,但是获得实验证据是受限制的。我们所拥有的最好的模型是建立在 X 射线和电子衍射对软体动物贝壳珍珠层薄片研究的基础之上的。这个结果显示了,有机基质的反平行的 β 折叠片的 a 轴和 b 轴与文石点阵的晶体学方向的 a 轴和 b 轴是一致的。说明晶体是定向结晶的,使得(001)晶面(ab 平面)和 c 轴分别平行和垂直于基体表面。如果我们现在比较(001)晶面上的钙离子与基体之间的距离,那么沿 a 轴就有很好的匹配(分别为 0.496 nm 和 0.47 nm)。相应于 b 轴的晶格匹配不高(分别为 0.797 nm 和 0.69 nm)。

是什么控制了钙离子沿反平行 β 折叠片的构建?我们知道贝壳蛋白质是富含酸性的大分子,例如天冬氨酸(Asp)能够作为钙离子结合的配体。因此如果有沿疏水基体的排列使得 Asp-X(X 是中性氨基酸)重复范围内也采用 β 折叠结构,那么在羧基官能团和文石(001)晶面上钙离子的理论晶格排列之间就有一个很强的关联。然而实际情况是复杂的,因为需要静电作用的平衡,例如一个钙离子需要两个天冬氨酸配体。钙在羧基官能团上的结合通常是互相协作的,涉及至少两个或三个配体,所以如果要形成很好的(001)面,在天冬氨酸的几何排列上需要有足够的灵活性来满足立体化学的需要。

这一模式的一个缺点是钙离子-羧基复合体的结合常数不很高,因此钙离子的周期排列是否充分稳定,以支持形核的作用位点还是个疑问。然而,我们发现贝壳蛋白质是糖基化的,也就是它们被糖基改性。一种可能性是,在基体的反平行 β 折叠片上,共价结合的硫酸多聚糖帮助在天冬氨酸结合点/形核位点周围积累足够数量的钙离子。

清华大学生物材料研究组采用柠檬酸腐蚀方法,通过边缘溶解,可以使得原本不规则的贝壳文石板片成为类似长方形的形貌,其长轴方向经过 TEM 验证即为 a 轴方向。柠檬酸腐蚀方法为研究珍珠层生长面上的大量文石晶体取向分布提供了可行性,并且可以广泛应用于其他种类的贝壳或珍珠的文石取向研究中。从统计分布上可以看出,贻贝珍珠层文石晶片的 a 轴具有明显的择优取向,63%的取向集中在主要的择优取向峰值附近 30°范围内,在主要

择优取向两侧，几乎对称地分布着两个次要择优取向峰（图 3.7）。运用建立的结构识别模型，分析有机-无机界面的匹配方式所形成的匹配点个数和匹配误差，推断出了两种较为容易发生的模式。其夹角与实验中观察到的主要次要择优取向间的夹角接近，而模式 2 具有两种取向的性质也与次峰在主峰两侧的对称分布相吻合，说明此模型与实验现象吻合。基于实验中观察到的次要择优取向集中分布的现象，运用得到广泛认同的异质形核和矿物桥的理论进行分析，提供了两种可能的晶片成长机理，并分析了两种生长理论共存的情况（图 3.8）。

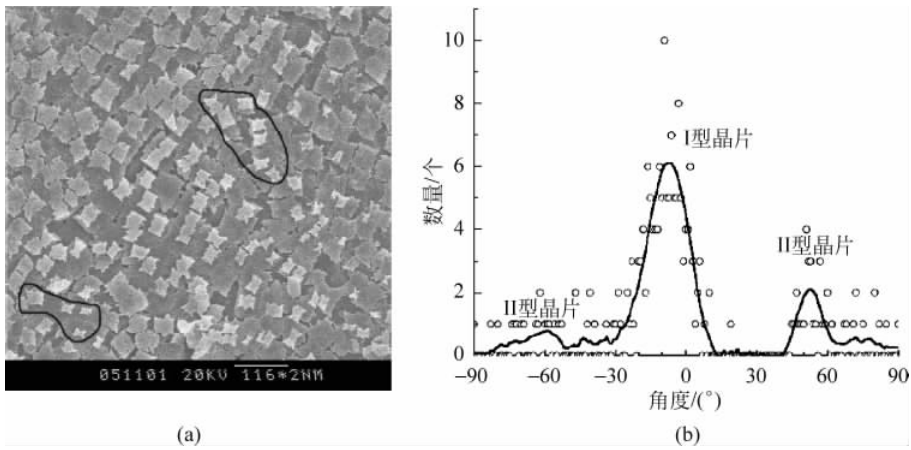


图 3.7　对于柠檬酸腐蚀后文石板片的取向统计

(a) 图为原始照片；(b) 图为统计角度的分布和 Savitzky-Golay 拟合曲线

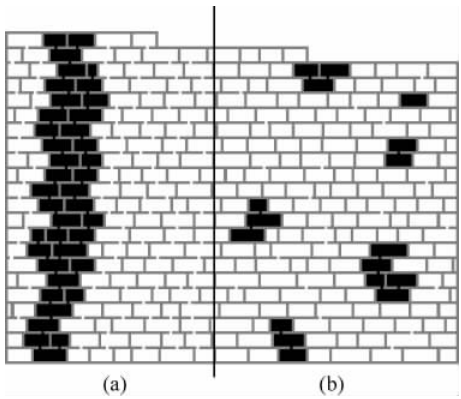


图 3.8　文石晶片的生长机理，灰色为层间基质，白色为主要择优取向晶片，黑色为次要择优取向晶片

(a) 次要择优取向晶片的连续生长；(b) 次要择优取向晶片的间断生长

无机-有机界面上的结构(几何)匹配在生物矿化的定向形核中是一个重要的概念。在这一模式中,在有机基体表面上规则排列的结合位点间的距离仅与特定晶格的特定晶面上钙离子的间距相匹配。这一模型已用于解释在贝壳珍珠层中具有反平行 β 折叠片结构的蛋白质表面上文石晶体(001)面的形核。

3.3.5 立体化学模型

有机基质界面上成键位置的构型与无机离子在空间结构尺寸上相互匹配,这个因素与晶格几何尺寸的匹配是相互制约的。例如,软体动物具有文石结构的内珍珠层为六角晶系,而具有方解石结构的外层则为斜方晶系,在方解石中,碳酸根上的三个成键的氧平行于钙的平面,最合适的平面是 ab 即(001)面。这时,基质表面成键位置的构型在立体化学上适合于晶体结构中的阴离子取向,从而为在这一特殊界面的取向成核提供了一个适宜的局域配位几何构型。

首先,外延生长对于无机晶体生长于其他具有相对应结构的无机晶体表面是有很好作用的,但大分子表面通常是不平整的并且有序的。其次,大分子经常在它们的表面残基中以及多肽或多糖脊骨中呈现出相当多的分子动态。再次就是有著名的“方解石-文石问题”。

这些问题一直让生物矿化学家不得其解。排列在文石(001)晶面上 Asp-X 与钙离子之间的结构匹配,初看不仅是一个非常别致的解释分子层结晶取向的机制,而且是相对于含方解石的贝壳外层的一个不同晶型的选择。但是晶体结构测试表明方解石(001)晶面上的钙离子间的距离与文石(001)晶面上的几乎是相同的。钙离子以 0.499 nm 的统一间距排列在方解石(001)晶面的六边形晶格中,而在文石(001)晶面上有一钙离子的假六边形晶格以 0.496 nm 或 0.797 nm 间距分别排列在正交的 a 轴和 b 轴。叠加晶格因而对(001)面的几个单元细胞给出一个合理的匹配。那么基体区别的什么方面支持了文石的取向形核呢?

我们可以提出一个机制来回答这一问题,其中基体表面固有的结构控制仅在溶液条件下一个相对较窄的范围是有效的。例如,离子强度、过饱和程度和镁离子数量以及其他外来离子和存在于周围流体中的可溶性大分子能够使得文石优先于方解石形核。另一种可能性是文石和方解石的结构看起来更加接近。事实是尽管在两种晶型的(001)晶面钙离子的间距是很相似的,碳酸根离子的排列也是不同的。也就是说,钙离子周围的立体化学很大程度上被改变。例如,在方解石和文石晶格中的钙离子的配位数分别是 6 和 9,此在这种晶型的(001)面上的氧原子排列与间隔也是一个重要方面。特别

是，尽管碳酸根离子平行于方解石和文石的(001)晶面，方解石中的碳酸根离子取向相同，而文石中有两个不同的取向。

是否反平行 β 折叠片中天冬氨酸侧链的氧原子的构造与文石的(001)晶面的立体化学匹配比与方解石的更加接近？这意味着当钙离子结合到有机基体时，得到的在每个阳离子周围产生的配位几何类似于文石结构，类似程度使得伴随文石(001)晶面形核的表面能明显降低。由于天冬氨酸配位体仅有两个能够与钙离子作用的氧原子，而在晶体结构中的碳酸根阴离子有 3 个，那么立体化学匹配至少在含有被双配位体围绕的钙结合点的晶面上会不精确。

目前我们还没有任何直接证据证明立体化学的一致性会引起碳酸钙多晶形在生物矿化中的选择，只有一些来自某些模型系统的结晶实验的间接证明。

3.4　有限反应空间中的化学合成

有机大分子控制矿化的一个重要过程是限制矿化反应的空间。超分子隔室，如磷脂囊泡，控制许多生物矿物形成的空间范围。这提示我们，在一系列尺度范围内的材料化学合成都可利用类似的系统。在此我们讨论几种生物体内的有机界面系统——囊泡、铁蛋白、细菌组装和高分子支架，并介绍这种有限反应空间中的化学合成。

3.4.1　囊泡

许多单细胞生物通过生物控制手段沉淀析出矿物，如硅石和碳酸钙，发生于细胞内的囊泡中。这些囊泡由脂类双分子层构成，形成了特殊的充满液体的微环境。

囊泡脂膜的装配基于熟知的物理化学原理。双亲分子如表面活性剂和脂类，同时包含亲水基和疏水基，当溶于某种溶剂中时，就会表现出化学特征。表面活性剂分子有一个极性头或是带电基团和一个长的疏水尾，形成蝌蚪状的外形。脂类分子通常更为复杂，它们有两个疏水尾。在水中，亲水基能与水结合，性质比较活泼；疏水链是化学惰性，趋向于使自己远离水分子的极性作用。自由能的降低是通过自组装完成的，即疏水基向内聚集在一起，形成胶束状的超分子聚集体；另一方面，每个分子的亲水部分暴露在这个胶束体的表面，与溶剂水分子发生相互作用。在这种聚合的结构中，单个分子的形状对整个胶束体的外形影响很大。当极性头群比疏水的烷基链宽时，分子呈楔形，自组装成正曲率的胶束聚集体。如果两部分的宽度相近，比如在

脂类分子上再加上一条较大的疏水尾,这样在脂类浓度较高的情况下,双层的平面薄板结构能降低体系能量,最为稳定。虽然这种生物分子层可以很长,但在边缘,疏水基还是会暴露在水中,所以在大量水分子存在下,它们会闭合起来,形成内部充满水的球状双分子囊泡。在水中,脂类分子团自发地自组装成双分子层囊泡。这种充满液体的球状结构为细胞内的生物矿化作用提供了反应场所。

生物囊泡是许多生物矿化作用的核心。在实验室中,合成泡可通过超声处理磷脂分子如磷脂酰胆碱的水性分散液,比较容易制得。也可利用某种合成表面活性剂,但比较复杂。在超声处理前,两亲分子自组装成具有洋葱状的多层微脂粒,这种中介结构由数以百计的同心球状双分子膜构成,由里到外,膜的直径逐渐增大,其间由水层隔开。超声波的高能量将双分子壳层破坏,而释放出来的碎片又卷曲起来,封闭成为只含一个充水隔室的单层囊泡。这样,溶液中的一些离子和分子就被包含于囊泡中。通常利用柱层析法,通过移动囊泡外的剩余离子或分子,使囊泡成为一个封闭的反应空间,这样所有捕获的组分都不会外漏,形成了透膜性的反应物。例如,利用可轻易穿透双分子膜渗透进来的 OH^- 和 H_2S,与封闭空间中的金属离子反应,可分别生成一系列的金属氧化物和硫化物纳米颗粒。纳米颗粒的尺寸由单层膜内部的金属离子的数量所决定。在大多数情况下,可以产生直径小于 20 nm 的球形颗粒。由于每个颗粒都有磷脂双分子膜包裹,所以它们不会聚集或融合成更大的聚集体。

囊泡内的沉淀反应可以采用光散射技术进行监控。对于 Ag_2O 来说,在 pH 值不变的条件下,沉淀的初始速率与囊泡内的 Ag^+ 浓度 $[Ag^+]_{in}$ 呈线性(一阶)关系。有人提出两步反应机制:

(1) $[OH^-]_{out} \longrightarrow [OH^-]_{in}$

(2) $2[OH^-]_{in} + 2[Ag^+]_{in} \longrightarrow [Ag_2O]_{in} + H_2O$

第一步为扩散控制,取决于 $[OH^-]$ 穿过磷脂膜的传递速度。当外界 pH 值小于 10 时,由于浓度梯度太小,$[OH^-]$ 的流入速度非常小,所以囊泡内的过饱和无法达到。然而,当 pH 为 11～12 时,反应强烈依靠于 $[OH^-]_{out}$,但当 pH 大于 12 时,通过膜的扩散速度达到极限,囊泡内的沉淀反应不依赖于 pH,并被第二个步骤所控制。囊泡内外 pH 值的关系依赖于泡内其他阴离子的存在。在溶液为 $AgNO_3$ 情况下,泡内 NO_3^- 流出囊泡,而 OH^- 流入。这不仅保持了系统的电中性,而且使氢氧反应物的进一步汇集成为可能。虽然如此,在交换过程发生以前,囊泡膜两边还是必须建立起近似为 3 个单位的 pH 浓度梯度。相反,如果囊泡内的 NO_3^- 由无渗透性的二价阴离子如 SO_4^{2-} 代替,则 OH^- 的渗透将不会发生,而且膜两边的 pH 梯度将达到 6 个单位,并不

会产生 Ag_2O 沉淀。与此相似，如果用 Cl^- 替代 OH^-，则泡内从 $AgNO_3$ 溶液中析出 AgCl 的速率明显较慢，因为 Cl^- 的膜渗透性较差。另一方面，泡内 Ag_2S 的形成却是瞬时的，因为 H_2S 分子可以迅速通过磷脂膜。

多层囊泡的规则分布的夹层区域，使其能够用作纳米结构的预组织。例如，在多层囊泡的含水夹层空间中，质子化的表面活性剂 1，12-烷基二胺（$^+H_3N(CH_2)_{12}NH_3^+$）可与水中含有的四乙氧基硅烷（$Si(OCH_2CH_3)_4$，TEOS）发生水解和缩聚反应，形成同心的 SiO_2 薄层。每个囊泡都能产生一个微米量级的球形无机颗粒，内部为由多层 SiO_2^--表面活性剂复合层片所组成的中介结构。令人惊讶的是，表面活性剂模板可以直接去除掉，形成一个多孔硅的复制品，而不必破坏原有结构的完整性。在移去表面活性剂双分子层后，层状结构应该会坍塌，所以微小的 SiO_2 支柱必须横穿过层片以保持多孔性。一种可能性是从水解的 TEOS 分子中形成了 SiO_2 纳米颗粒，通过膜上的缺陷进入多层结构中。

在单层磷脂囊泡中的纳米颗粒的合成是受扩散控制的，而且依赖于膜两侧的电化学梯度。多层囊泡的同心分布的双分子层中的渗透作用和矿化作用，能产生出具有洋葱状内部结构的无机颗粒。

3.4.2　铁蛋白

存储铁离子的铁蛋白是一种不常见的充满液体的囊泡，由多肽堆积而成的。铁蛋白含有一个球状的多肽笼，内径大约是 8 nm，厚度大约是 2 nm，这个多肽笼是由 24 个多肽单元自组装成的。哺乳动物体内的铁蛋白中含有两种不同的多肽单元，它们分别是重单元（H）和轻单元（L），相对分子质量在 20 000～21 000 之间。H 和 L 的相对比例取决于生物种类（鼠、人类、马等）以及组织。例如，马的脾脏中的铁蛋白中含有 90%的 L 单元和 10%的 H 单元，而马心脏中的铁蛋白却含有 10%的 L 单元和 90%的 H 单元。不过，不同的 H 链或者 L 链，其氨基酸序列通常具有高度一致性，一致的比例为 80%～90%。

由于多肽链单元 L 和 H 都是由 3 大部分——4 条长的 α 螺旋（在图 3.9(b)中分别标志为 A、B、C、D），一条短螺旋 E 和剩余的 17 种氨基酸组成的环 L 组成，因此 H 和 L 通常具有相似的二级和三级结构。上述 3 大部分缠绕在一起就组成了多肽链单元，多肽链的结构包括两对反平行的螺旋（AB 和 CD）和连接螺旋 B 到螺旋 C 的环 L。其中，环 L 的连接可以让 A 和 B 反平行排列。螺旋 E 位于氨基酸链的羧基端（C 的末端）并且与缠绕束的轴成 60°。H 链和 L 链单元的不同来源于氨基酸数量的改变，这些氨基酸存在于螺旋 A 和 E 的前面或者后面延伸出来的那一部分，它们并不是螺旋或者环状二级结构的变形。蛋白质外壳的自组装在很多方面都与磷脂分子组装成囊泡相似。超分

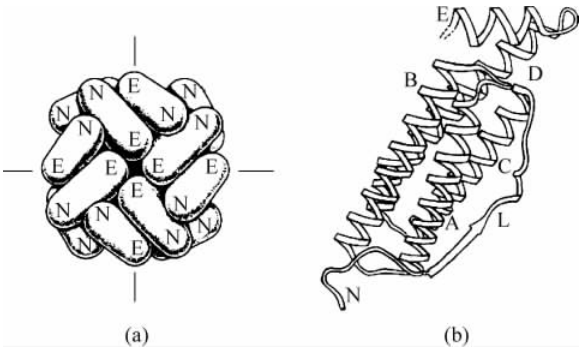


图 3.9　铁蛋白

蛋白质壳和亚单元的排列,N 多肽的氨基端,E 多肽的羰基端。1 个亚单元包含排列成束的 4 个 α 螺旋(A-D),环(L)和短螺旋(E)

子之间的相互作用涉及疏水力和亲水力,这两种力会促使系统成为有序的结构。在铁蛋白的例子中,这会导致具有明确结构的二聚物单元的形成。这些明确的结构建立在环状部分和螺旋 A 的外表面的特殊的相互交叉处。然而这种排列是亚稳的,因为两个单元的疏水螺旋溶于极性溶剂。结果是,二聚物单元通过一系列额外的相互反应而形成,例如氢键、盐桥、疏水力,直到 12 个二聚物分子被合并成为一个紧密堆积的凸形壳,并且它们的 E 螺旋都埋在内部。

这个令人惊讶的自组装过程的一个最重要的结果就是小通道贯穿了蛋白质外壳,这些小通道具有三重或者四重对称轴,位于二聚物单元的连接处。这些通道大约有 0.3 nm 宽,沿着三重或者四重轴具有 8 个亲水和 6 个疏水毛孔。后面由四个 E 螺旋围成。通过比较,亲水通道来源于 D 螺旋和 C-D 的并列。在两种情况中,通道是通过特殊的氨基酸排列而成的。例如,在哺乳动物的铁蛋白中,三个天冬氨酸(Asp)和三个谷氨酸(Glu)沿着亲水孔壁排列,然而,12 个亮氨酸(Leu)突起进入疏水通道。

铁蛋白外壳中的分子通道用于运输 Fe^{2+} 和其他物质,供铁氧化物进行矿化。铁的运输很有可能是通过亲水的三轴通道,三轴通道是金属离子结合的场所。总的来说,矿物核心的形成是个复杂的过程,蛋白质在 Fe^{2+} 的氧化和 Fe^{3+} 的水解和浓缩的过程中扮演着重要的角色。

铁蛋白是一种蛋白质囊泡,由一个具有分子通道的蛋白质外壳组成。这个外壳是由多肽二聚物单元自组装而成的,它们聚集起来产生一个充满水的具有高对称性的笼子,能够满足铁氧化物的生物矿化的需要。

铁蛋白的超分子结构对于生物分子来说是相当稳定的。在实验室中,铁氧化物(水铁矿)核心能够通过还原性的溶解作用去除而不会影响蛋白质外壳的结构。此外,通过控制与带有水合 Fe^{2+} 溶液的蛋白质的培养时间有关的

实验条件，在氧化剂如空气中的氧气存在时，去除了矿物质的蛋白质空腔能重新构成。这种独特的性质，加之铁蛋白极易从生物组织中分离，具有一定的商业用途，使我们能够利用这种生物分子，在有限空间中合成带有潜在生物亲和性的蛋白质包裹的纳米颗粒。

人造铁蛋白可通过两种化学方法合成：①天然铁氧化物核心的原位转变；②非天然材料的原位合成。第一种方法用来制备蛋白空腔中的非晶态的硫化亚铁纳米颗粒，这是通过在氩气环境下，有水合 Na_2S 存在时，铁氧化物核心的化学转变来实现的。反应溶液迅速由褐色变为深绿色，而且新的吸收最大值变为 426 nm 和 338 nm，这是铁-硫原子簇化合物的特性。因为对应的纳米颗粒在尺寸上与原来的铁氧化物核心很相似，所以可以预先确定铁氧化物的大小，通过铁蛋白的重新构成，从而将硫化亚铁相的尺寸控制在 2～7 nm 之间。

去除了矿物质的铁蛋白被用于一系列不含铁的无机颗粒的合成，如 MnOOH，CdS 和 UO_3。去铁铁蛋白在含有 Mn^{2+} 的溶液中的培养，导致了 Mn^{2+} 的吸收以及后来空气中的氧化作用和不连续非晶态 MnOOH 核在多肽空腔中的沉淀。纳米颗粒的尺寸在一定程度上可通过改变混合反应物的化学计量来加以控制。混合金属氧化物核心，如 FeOOH /MnOOH 纳米颗粒，也可以通过改变蛋白质溶液中水和 Fe^{2+} 或 Mn^{2+} 的加入量来制备。

这种重构的方法对于制备磁性铁蛋白也是可行的。尽管天然铁蛋白具有超顺磁性，只在低温时有弱磁性，而在氧化剂不足的情况下，通过厌氧培养含有 Fe^{2+} 溶液的去铁铁蛋白而制成的人造铁蛋白，在室温下也能与磁场发生反应。这是因为这种化学条件——高温(85℃)，高 pH 值(8.5)和不完全氧化，导致了混合价相，即磁铁(Fe_3O_4)的形成，而不是完全氧化的矿物水铁矿，形成于多肽空腔中。磁性铁蛋白在 300 K 时的磁化曲线表现出饱和行为。这意味着，随着施加于磁铁蛋白溶液的磁场的增大，铁矿石核心逐渐排列成行，感生磁矩也不断增加，直至达到饱和值。此时，所有的微小磁针都指向外磁场方向。将外加磁场反向，核心重新排列，没有发生任何磁滞现象，因为对于这种尺寸的颗粒，只须克服极小的活化能垒。在低温下(20 K)情况就不同了，因为热能不易打乱磁偶极子，所以就有能垒。

一系列具有纳米颗粒核心的人造铁蛋白可以通过原位化学合成或相转变方法制得。

3.4.3　细胞和细菌的组装

封闭生物矿化的空间的另一种方法涉及细胞的组合。例如，有关骨形成的理论指出，成骨细胞组装产生一个包含矿化组织的空间，与血液分开

(图 3.10)。细胞层堆积得如此紧密,以至于内部空间的化学成分要通过来自成骨细胞的离子和分子的可控扩散来调节。在细胞膜的内侧,成骨细胞与骨细胞直接相连,骨细胞在骨的内部形成互相联系的网络;在外侧,他们直接与细胞外液接触,细胞外液再与血液形成平衡。因此,促使细胞生长的外部环境和内部环境之间就有了直接的联系。骨的生长与否取决于血液中的激素是否发出信号。

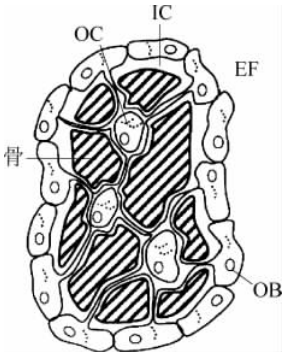


图 3.10　在界面组织的骨形成过程中细胞的组装体

IC—内部间隔;OB—成骨细胞;OC—骨细胞;EF—细胞外液体[3]

细胞能够依靠一个固态的基体而集聚在一起,培养基可以是大分子聚合层,或者是已经存在的矿物质的表面。例如,这个过程可以分别发生在软体动物的内壳层和外壳层。外部的棱柱层由方解石晶体组成,这层方解石晶体在一层紧密排列的上皮细胞和一层溶解度很低的蛋白质层(角质层)之间生长,角质层覆盖了贝壳的外表面。与此相反,内层的文石晶体在方解石晶体之后沉积,因此矿化区域被限制在细胞层和矿化结构前沿之间。细胞的组装被用来封闭矿化区域和控制内部液体环境的化学成分。

枯草杆菌是一种人类友好的杆菌类,能用来制造未发酵的大豆凝乳。它能够被培养成很长的多细胞单丝,宽度上为一个细胞,长度上由数以千计的细胞组成。如果用小钩浸入培养物中,然后缓慢地通过空气-水界面抽出,这种 0.5 μm 宽的丝状结构可以组成密排的超结构。产生出肉眼可见的几毫米宽、数十厘米长的纤维。放在手中,这种丝状物看起来像一段尼龙线,但在扫描电子显微镜下可以看到内部超结构:多细胞单丝沿这种肉眼可见纤维的长轴平行排列,而横截面上则为有序的六方阵列。

细菌丝在水中的膨胀对于基础的超结构没有明显的破坏作用,这是因为当多细胞单丝重新水合时,发生了部分分离。因此,多细胞单丝形成的水合结构由一系列有序排列的沟渠所构成。如果膨胀过程发生在硅石或沸石纳米颗粒的溶胶中,则单丝间的空隙被矿物填满,形成细菌骨架。在二氧化硅胶体的情况下,带负电的纳米颗粒穿入丝状物中,因为它们被同样带负电的细菌单丝的细胞壁所排斥。相反,带正电胶体如 TiO_2 迅速在丝状物的表面聚集,进入超结构中的渗入物可以忽略不计。

带有矿物的丝状物干燥后出现了收缩,而且无机纳米颗粒陷于多细胞单丝之间。在干燥期间,单丝间区域的离子强度大大增强,这屏蔽了 SiO_2 的表

面电荷，导致了细胞单丝周围颗粒的聚集和致密化，形成了壁厚 200 nm 的连续的矿物骨架。带有组织化内部超结构的细菌丝状物被用于 SiO_2 纳米颗粒的沉淀反应的空间控制。

3.4.4　聚合物多孔材料

通常，细胞尺寸在几微米至几十微米，因此细胞组装产生的空间往往要比囊泡产生的空间大。这是有潜在缺点的，就是矿物晶体的生长能够轻易地脱离生物的控制。为了阻止这个过程发生，有机体通常会将细胞形成的矿化空间分成小块，使用具有开放网络结构的半透性有机基质，矿物相的生长就更容易受到控制了。

在鸟类的蛋壳中，例如，方解石晶体在一个海绵状的基体中生长，这个基体位于一层上皮细胞和一层不溶性的纤维状的角蛋白与碳水化合物组成的膜之间。如图 3.11 所示，晶体在细胞膜上的特定位置形核，然后生长出球状多晶产物，这些多晶产物沿着它们的晶轴 c 向各个方向生长进入海绵状的基体。虽然海绵状的基体可以细分矿化空间并且增大了蛋壳的机械强度，但是它对晶体生长的影响很小，晶体可以一直生长到与临近的球粒碰上为止。随着时间的推移，蛋壳变厚，越来越少的晶体从细胞膜的表面向外扩展。明显的是，这个过程开始发生的厚度取决于原始的形核中心之间的距离，因此有着拥挤的空间区域的壳将会很快地沿着结晶方向向外生长。这些关系已经通过 X 射线的方法研究过了。

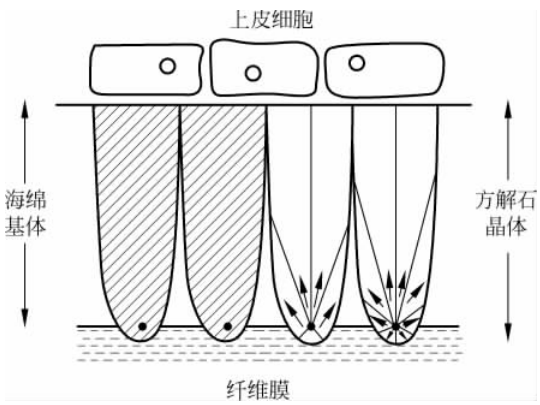


图 3.11　蛋壳形成过程

箭头指出方解石晶体 c 轴的生长方向[3]

其他生物系统使用高分子框架对生物矿化进行空间控制。例如，帽贝的牙齿包含很多列的具有针铁矿结构的针状的铁氧化物晶体。这些晶体沿着

一系列在空间中规则排列的有机细丝和小管排列,小管和细丝将晶体的厚度限制在 30～50 nm 的范围内,同时它们还可以指引晶体优先沿着结晶轴方向生长。因为基体是由壳聚糖组成的,因此基体最初是柔软的,并且可以形成一个复杂的闭合空间,这个闭合空间后来可以变得充满针状微晶,用来产生强而韧的纤维增强复合材料。

不溶性蛋白质的组装,有时候与壳聚糖纤维相连,被用来作为空间控制生物矿化的一种有效手段。珍珠的生物矿化被限制在上皮细胞层和矿物层生长前沿之间。但是正如图 3.12 所示,这个空间被一系列的有机层片分割了,这些有机层近似平行于上皮细胞层排列。这些层片存在于矿化前沿,随着时间的推移,当空间中填满了块状的文石晶体时,贝壳就会沿着厚度方向向内生长。每个晶体周围都包围着一层有机膜并且被夹在两个有机层片之间,这些有机层片之间的间隔大约 0.5 μm,使得块状物的厚度高度均衡。与此形成对比的是,片状平面的生长受的限制就比较少,晶体一直长大,直到同一层中的晶体互相接触。当层内充满了晶体,一层新的片状晶体就开始沉积,然后整个过程就开始重复。

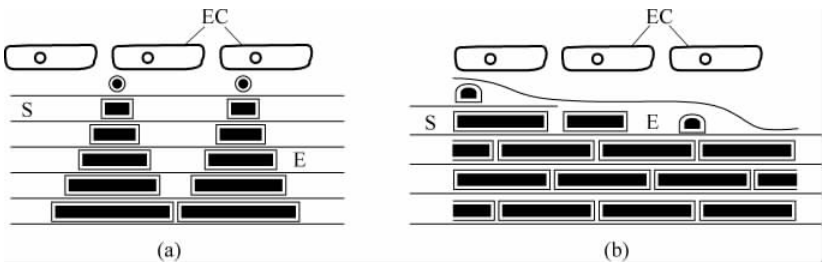


图 3.12　珍珠层在腹足纲[3]

(a) 双壳纲;(b) 贝壳中形成,黑色表示文石晶体。EC—上皮细胞;S—层片;E—薄膜

在腹足动物的外壳中,例如一只蜗牛的外壳,这个过程在生长面上产生了一个“硬币堆”结构。事实上,这种排列是由穿过有机层中心孔的晶体的生长决定的,一些小的矿物桥会穿过有机层并且在每个单独的堆内将晶体联系起来。然而,在双壳类的外壳中,每个连续的晶体层都是有偏移的,文石块的侧向生长在下一层开始生长之前就发生。如此产生的结构更加类似于一个砖墙而不是一个尺寸逐渐减小的硬币堆(图 3.12(b))。

不溶性高分子框架对封闭环境的分割在细胞外生物矿化过程中是很普遍的。这个框架影响着体系的机械性质并且在很多情况下控制着矿物晶体的空间组织。贝壳珍珠层在空间上类似于蛋白质-壳聚糖基体上发生的沉积。并且这个过程的多样性也产生了腹足动物和双壳类动物外壳建筑形式上的

多样性。

生物矿化中，形成高分子框架的一个关键任务就是：为较大的结构划分隔室，如蛋壳、帽贝科动物的牙齿和软体动物外壳。这个过程在仿生学上的对应的是合成有机聚合物凝胶的运用，它们具有海绵状内部结构，能被反应溶液和胶状悬浮体所渗透。

聚合物多孔材料可以从多种单体的混合高聚物中制备，例如丙烯酸与苯乙烯或甲基丙烯酸 2-羟乙酯的聚合物。干燥时，凝胶块在尺寸上收缩，但一接触到水，它们就会经过可逆膨胀，形成带有几纳米宽孔隙的开孔结构，使得无机组分能渗透进去，产生矿化。膨胀的程度取决于离子化基团间的静电排斥作用，也就取决于共聚物中羧酸的含量。这样，通过对高聚物化学进行调节，能够合成不同的海绵状结构。例如，在含有 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的水溶液中加入 NaOH，膨胀聚苯乙烯-聚丙烯酸酯共聚物凝胶，导致了遍及整个开孔结构的超顺磁性铁矿石纳米颗粒的原位沉淀。这种矿化复合材料的结构与石鳖类牙齿的多糖基体中磁铁矿晶体的排列大约类似。但是，与软体动物的牙齿不同的是，这种合成材料中铁矿石的质量分数只有 8%，因为在这种框架中所能达到的过饱和度很低，并且持续的时间不长。解决这个问题的一种可能途径是，利用更大的结构单元，如预成形磁铁矿纳米颗粒，渗透进这个具有可逆膨胀性质的聚合物多孔材料中去。这需要更大程度的膨胀，所以我们可以采用含有 20%聚丙烯酸酯和 80%聚甲基丙烯酸 2-羟乙酯的共聚物中形成的多孔块状物。产生的高度膨胀的、黑色的聚合物-无机复合材料，在空气中干燥，便可形成一种坚硬而且致密的固体材料，并且极易被永磁体的两极所吸引。

聚合物多孔材料的内部空间，能被如磁铁矿的矿物所渗透，来产生组织化的无机-有机复合材料。

3.5　天然矿物中的有机基质

3.5.1　骨中的有机基质

骨中的基体大分子包含有一个交联的骨胶原纤维组成的不溶性的网络，与溶于水的非胶原蛋白质结合在一起。骨胶原大约占蛋白质质量的 90%，有机成分主要是Ⅰ型胶原纤维，约占总重量的 34%[13]。其余 10%的质量中含有大约 200 种不同的非胶原蛋白，大多数来源于循环的血液。

虽然生物学中为人们所知的有 20 多种胶原，但是其中仅Ⅰ型胶原是由成骨细胞产生的。Ⅰ型胶原纤维具有特殊的结构，起源于一系列的步骤，它们

最初是在成骨细胞内出现的,然后再发展到细胞外基质中。在成骨细胞内,这些步骤包括:

多肽螺旋链的合成
↓
氨基酸(脯氨酸和赖氨酸的羟基化)的酶修饰
↓
三股螺旋的自组装
↓
分泌进入细胞外空间

一旦进入细胞外环境,初生的胶原还要经历一系列过程:

酶切除多肽链的端部
↓
胶原纤维自组装
↓
形成交联
↓
胶原纤维成形
↓
生物矿化

总的来说,这个过程是分级自组装的一个典型例子,组装中每个步骤都包含增加尺寸的构建,因此得到一个大的尺度范围内有序的组织结构。

骨的有机基体是由占有主导地位的骨胶原与大量非胶原蛋白结合而构成的。骨胶原纤维的自组装涉及一系列的始于成骨细胞内终于细胞外空间的步骤。Bundy 及 Walsh 等[11,12,14]详细研究了有机与无机组元界面键合的影响,他们的研究表明,骨中的矿物相和有机基质通过静电相互作用、范德华力、氢键、疏水键等作用力而结合在一起。

3.5.1.1 胶原

胶原[15~19]本身并不仅仅作为矿物晶体的框架,而且起着活跃的调节剂的作用,胶原和矿物之间也的确存在一定程度的联系[20,21]。已知的胶原蛋白具有两种构象,即三股螺旋和球形。成纤维胶原中基本结构单元即是三股螺旋的原胶原。图 3.13(a)是Ⅰ型原胶原分子模型。原胶原的质量约为 285 kDa,由两条 α1 和一条 α2 链共 3 条多肽链组成,每股多肽链中都有约 1 000 个氨基酸残基。所有胶原分子的多肽链中,3 个一组,共 338 组排列。每个第三残基总是甘氨酸,另两个残基中脯氨酸和羟基脯氨酸出现的频率也很大,即经常出现-Gly-X-pro-和-Gly-X-hypro-的顺序,其中 X 代表其他氨基酸残基,见

图 3.13(b)。这个序列的重复有两个重要的结果：第一，与脯氨酸残基的吡咯啉环相关的空间约束导致了多肽链有规律地弯曲成一个开放的螺旋形式。第二，螺旋能够很容易地挤在一起形成一个超分子，因为甘氨酸侧链上的单个的氢原子并不会占据太多的空间，足够的靠近能够实现 3 个分子互相包裹，产生一个超螺旋，即原胶原。图 3.13(c)显示Ⅰ型胶原是一个长约 300 nm，直径约 1.5 nm 的杆状物，其中 3 条肽链都具有螺旋构象。

图 3.13　成纤维胶原的基本单元结构

(a) Ⅰ型原胶原分子模型；(b) Ⅰ型原胶原的部分氨基酸顺序；(c) Ⅰ型原胶原的构象[3]

每个单独的胶原多肽链卷成一个互相略有不同的轴,以使得 3 个一组的螺旋包含的 3 个不共轴的螺旋多肽沿着一个共同的方向。从端面看,谷氨酸是一个充满的圆环,由于其尺寸小和紧密排列而位于螺旋的中心。与此相反,脯氨酸和羟基脯氨酸的吡咯啉环在谷氨酸的两侧,因而位于纤维的外侧。螺旋的每一圈中残基的数量是 3.3,因为每 3 个残基中需要一个甘氨酸,螺旋的每个螺距是 0.3 nm。所以,三股螺旋长 280 nm,宽 1.5 nm,相对分子质量大约为 285 000。这种排列更进一步由一些链内的相互作用来保持稳定,例如:

(1) 脯氨酸和羟基脯氨酸残基的空间锁定;

(2) 一条多肽链的谷氨酸的—NH 供体与另一条多肽链的—CO 受体之间产生的平行于纤维长轴的氢键;

(3) 羟基脯氨酸残基的羟基与水分子之间的氢键;

(4) 位于接近端点的非螺旋区域的赖氨酸侧链的丁间醇醛构成的共价交联。

这些相互作用共同产生了具有均匀尺寸、组成和结构的三股螺旋,它们可以在含水的溶液中形成稳定的纤维晶体。

Ⅰ型骨胶原的晶体是由一个特殊的纤维结构组成的,三股螺旋互相缠绕形成强度很高的原胶原纤维。5 根原胶原纤维轴向平行地聚集在一起形成直径约为 4 nm 的微纤维,其中,每两根原胶原纤维间都有 1/4.5 分子长度的错位,这种排列方式通常叫 1/4 错位。轴向相连接的微纤维之间有约 30 nm 的空隙。每根原胶原纤维都被分成了五个区域,前四个区域都长度相等,而第五个则要短些。这种排列引起了一种规则的排列,造成长 40 nm、宽 5 nm 的缝区。

微纤维进一步组装成直径在 10～300 nm 的胶原纤维,具体直径或厚度依组织而异。例如,胎儿鼠的鼠尾腱中胶原纤维直径是 30 nm,而成年鼠的是 450 nm。人类胎儿的椎间盘中的胶原纤维直径是 31 nm,而成人的是 40 nm 或 100～150 nm 两种。成人心脏瓣膜叶中的胶原纤维直径是 31 nm。纤维的这种有序排列可以看成是晶体,因为它有确定的熔点(约 60℃)。超过这个温度,胶原纤维会缩短 2/3,并变成橡胶状,与晶体熔化的相变类似。组织中的胶原纤维通常被细胞外的基质所包围,使其构成一体。在胶原介导的矿化中,胶原纤维本身可提供钙化形核的位点[22～26]。

缝区和与之相关的沟槽在骨矿化过程中的重要性已经明确了。这些部位被认为是羟基磷灰石晶体成核的场所。这些晶体最初被限制在原胶原分子间的间隙内,所以它们长成片状,34 nm 长,20 nm 宽,3 nm 厚。这些晶片非常薄,由于晶胞在这个方向上是 0.93 nm 长,所以这些晶体只有 2～5 个晶

胞的厚度。晶体的 c 轴平行于胶原纤维，这样就构成了骨的基本结构，上述基本单元在三维空间的规则排列，就构成了宏观意义上的骨结构。以皮质骨为例，Weiner 等发现它具有一种由厚薄两层交替而成的层状结构。薄层中胶原纤维与矿物晶体 c 轴垂直于骨的长轴方向，厚度约为 0.3 μm，厚层中胶原纤维相互平行，并且与骨的长轴交一角度。这种结构与哈弗氏系统内的厚、薄骨板相对应[27,28]。骨胶原基体和羟基磷灰石微晶的如此大范围的有序排列，使得骨具有非同寻常的力学性能。

3.5.1.2　骨中的非胶原蛋白质

非胶原蛋白[29,30]通常约占骨中蛋白质的 10%。随着骨的成熟和钙化，比例逐渐下降，约为 6%。目前已发现有多种对于骨的生长、再生、发育等有重要作用的蛋白质，如骨粘连素、纤维粘连素、骨钙素等。骨粘连素为磷酸糖蛋白，与软骨内成骨过程中软骨钙化区内新骨基质的形成以及膜内成骨过程中新骨的形成有关，与骨磷灰石有强的亲和力，促使游离钙离子与Ⅰ型胶原结合。但纤维粘连素有抑制骨粘连素的促钙离子结合Ⅰ型胶原的作用。纤维粘连素具有两个由二硫键连接的亚单位，含有能与胶原、肝素和细胞表面结合的位点。在处于生长过程中的骨中，骨粘连素的含量远较纤维粘连素的多。2/3 的骨钙素与磷灰石结合紧密，难以分离。骨钙素属于 γ-羧谷氨酸包含蛋白类，此蛋白类为维生素 K 依赖性。骨钙素又称骨 γ-羧谷氨酸包含蛋白。该蛋白在骨矿化峰期之后才出现积聚。使用维生素 K 拮抗剂，可使此蛋白在骨中的含量减少，但并不影响其脯氨酸的含量，也不影响骨的机械强度。另外还有蛋白多糖类和脂类。矿化骨组织所含的蛋白多糖量很少，占骨有机物的 4%～5%，其化学结构及免疫学特性皆与其他组织内的蛋白多糖有明显不同，其分子的 25%为蛋白质。蛋白多糖类可能抑制骨羟基磷灰石晶体的沉积，因此，在正在钙化的组织中，蛋白多糖的变化有可能加快组织的矿化。有资料表明，蛋白多糖聚合体抑制骨骺生长板钙化过程中羟基磷灰石生长沉积的效应高于单体，蛋白多糖单体的抑制效应强于糖胺多糖链。

脂质占骨有机基质的 7%～14%，主要分布于细胞外基质泡的膜上和细胞膜上，细胞内结构以及细胞外的沉积也有脂质的存在，主要为游离脂肪酸、磷脂类和胆固醇等。酸性磷酸脂与磷酸钙结合形成复合体，参与骨的钙化过程。可钙化的脂蛋白在骨骺软骨开始钙化时含量最高[31]。

3.5.2　牙釉质基质的主要蛋白

1960 年 Piez 等对从未萌出的人类第三臼齿中提取的发育中的牙釉质基质蛋白的完整氨基酸进行了分析[32]。Eastoe 等进行了更精细的分析，指出早

期牙釉中的蛋白有非常特殊的成分和典型的特征[33]。这些特殊成分主要包括高含量的脯氨酸、组氨酸和亮氨酸片断。这种蛋白就被认为是“成釉相关蛋白”——早期(分泌阶段)牙釉基质中的主要成分[34]。随着分离方法的不断改进和经验积累,科学家对发育的牙釉质中的“成釉相关蛋白”的成分的认识日渐清楚。这里仅介绍几种重要的牙釉基质蛋白。

3.5.2.1 成釉蛋白

成釉蛋白(amelogenin)是一组从发育釉质的基质中分离得到的釉基质特异疏水性不可溶酸性蛋白,大约由180个氨基酸组成,相对分子质量约为23kDa[35]。成釉蛋白由成釉细胞分泌,是牙釉质中存在的主要基质蛋白,主要分布于釉柱周围的柱鞘中。成釉蛋白在正常牙釉质形成中起到了很关键的作用。成釉蛋白分子序列的特点是由两个不同区域形成的两极化。碳端端肽被高度负电化,pI约为4.2,而整个分子的pI为8.0。在调制矿化过程中,成釉蛋白自组装成为纳米球结构,亲水的碳端朝外排列在纳米球表面,以致整个纳米球结构负电化,从而使带负电的纳米球与牙釉质早期形成的羟基磷灰石微晶特定晶面发生相互作用。然而,作为正在矿化的组织的牙釉质细胞外基质是否需要“主要酸性大分子”用于控制晶体形核和生长,或者成釉蛋白是否会在同一分子中提供独特的酸性和疏水性结构,现在仍然是一个有待实验解答的问题。

至今科学家已经完成了对猪[36]、牛[37,38]、人类[39,40]、鸭嘴兽等哺乳类动物,仓鼠等啮齿类动物以及凯门鳄、蟾蜍等两栖动物[41]的成釉蛋白的蛋白测序工作。已经报道的结果表明,不同物种的成釉蛋白,特别是在蛋白的N段和C段区域,有显著的序列同源性[42]。随后的深入研究表明,成釉蛋白与牙釉质的成釉细胞有完全的组织特异性。对已知成釉蛋白序列的比较可知,尽管在分子的中心区域存在序列变化,但在分子C段和N段的主要结构几乎是完全保守的,这也表明不同种生物的成釉蛋白分子间存在特定功能模块的保守性。

从发育中的牙釉质分离得到的成釉蛋白的性质显示,成釉蛋白mRNA剪接形式的不同、蛋白翻译后修饰、蛋白分泌到釉质基质后发生降解等因素使成釉蛋白存在多样性[43~47]。这一理论首先被用于解释多亮氨酸成釉蛋白多肽(leucine-rich amelogenin polypeptide,LRAP)这种C段和N段序列与成釉蛋白相同,但缺少中间段序列的蛋白多肽的来源[48]。在20世纪90年代的研究中,科学家已经成功的从小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、猪、牛、负鼠和人类的基因中分离出选择性剪切成釉蛋白mRNA。被分析的每一个物种都存在一种主要表达的成釉蛋白异构体,其长度为173~210个氨基酸[49]。除人类外,科学

家已经成功地克隆了其他很多被研究的物种的主要成釉蛋白和 LRAP 的异构体的编码信息[50]。

3.5.2.2　鞘蛋白

鞘蛋白(ameloblastin/amelin/sheathin)是一种牙特异性蛋白。它们由釉质上皮内部的一些细胞分泌。各种鞘蛋白的 C 端和 N 端在生物化学的角度看来是不相同的,而且是在对猪的釉质蛋白进行研究过程中分别被发现的。鞘蛋白的 C 端通常是表观相对分子质量分别为 27 kDa 和 29 kDa 的两种多肽,它们是在对起到束缚钙离子作用的蛋白所进行的研究中被分离的[51]。鞘蛋白的 N 端则是在寻找如牙釉蛋白这样的非成釉蛋白的过程中被发现的。在釉质基质中,鞘蛋白的 N 端表现为一系列相对分子质量在 13～17 kDa 范围内的低相对分子质量裂解产物,并且有团聚的趋势[52]。

与釉质基质中的其他蛋白相比,鞘蛋白的氨基酸成分是完全不同的。免疫组化实验发现,鞘蛋白免疫定位在整个牙釉质的发育层,但是在釉质最表层(成釉细胞以下约 30 μm)没有蛋白分布,并且鞘蛋白分布呈现蜂巢状的图案。出现这样的图案是因为鞘蛋白裂解产物主要集中在釉质鞘区域。1996 年,对鞘蛋白的 cDNA 进行克隆和测序实验表明小鼠的鞘蛋白基因位于 5 号染色体上[53],而人的则位于染色体 4q12 上[54]。

3.5.2.3　牙釉蛋白

牙釉蛋白(enamelin)实际上代表了一系列非成釉蛋白,这些蛋白很好的吸附于牙釉质晶体,直到晶体被溶解,它们才会从基质中释放出来。事实上,牙釉蛋白是一类全新的蛋白,其氨基酸序列与数据库中的其他任何蛋白都无关。牙釉蛋白是目前研究较清楚的釉质蛋白,在发育的牙中,它的表达受到了严格的控制。

发育中的牙釉质基质的免疫染色结果显示牙釉蛋白明确定位于从本质釉质界到牙表面的分泌阶段釉质中,并在成熟早期迅速消失。基于氨基酸成分分析的结果,科学家们发现牙釉蛋白在成熟早期完全降解了。这一结论也对以前的解释:成釉蛋白被选择性地降解,而牙釉蛋白依然保留在成熟牙釉质中,提出了质疑。分泌阶段牙釉质的免疫染色结果为反转的蜂巢图案,这表明牙釉蛋白被限制在釉柱和釉间质中,在釉质鞘中不存在牙釉蛋白。这样的免疫染色结果表明这些牙釉蛋白裂解产物与牙釉质晶体发生了原位结合作用。

3.5.2.4　蛋白酶

蛋白酶水解作用在牙釉质矿化过程中起到了很重要的作用,并且也是牙

釉质矿化的独特之处。首先,水解作用使釉质基质的结构和物理化学性质发生了变化(例如裂解成釉蛋白的亲水 C 端);其次,成熟阶段的快速晶体生长使釉质硬化的过程也与细胞外有机基质的完全降解相关[55,56]。重组 MMP-20 与重组成釉蛋白共孵育的实验结果显示,这种金属蛋白不仅在 C 段 6 个不同切入点对全长成釉蛋白有作用,而且可以裂解 TRAP 多肽。体外实验证明,重组成釉蛋白可以被丝氨酸蛋白酶完全裂解为 147 kDa 的多肽片断。而且这两种蛋白酶被认为对其他各种釉质蛋白,例如牙釉蛋白,成釉蛋白等也有裂解作用。这些实验证据表明,牙釉蛋白酶可以与成釉蛋白的 C 端作用,进而引起牙釉质细胞外基质的关键性结构变化,并产生对釉质发育起重要作用的 TRAP 分子。另外,丝氨酸蛋白酶具有消化作用,使羟基磷灰石晶体在成熟阶段迅速生长。

3.5.3 贝壳珍珠层中的大分子基体

珍珠层位于贝壳内层,主要由文石晶体组成。珍珠层中文石晶体的形状、尺寸比较均匀,通常为多角片状,六边形居多,晶片厚度在 0.25～0.99 μm,片尺寸为 2～3 μm[57],无机相约占 95%,有机基体是以柔韧的有机片层的形式出现的。每个有机片层都是几种组元的复合物[58～63],由 3 种生物大分子组成:①不可溶的多糖几丁质,呈 β 折叠片结构,位于有机基质的中心;②一种富甘氨酸和丙氨酸的不可溶蛋白质,具有反平行 β 折叠片二级结构,X 射线衍射发现其结构和组成与丝纤维相似,因此被称为类丝纤蛋白,位于 β 几丁质的上下表面;③一种富天冬氨酸等酸性氨基酸的可溶蛋白,同样是 β 折叠片结构,直接接触珍珠层。在珍珠及贝壳珍珠层的生物矿化过程中,酸性蛋白质对文石晶体的形成起至关重要的作用,其中的酸性侧链与钙离子有强烈的亲合作用,从而成为文石晶体的结晶核心[64～68]。

可溶蛋白(SM)和不可溶蛋白(IM)在晶体间以多层的形式存在,IM 作为预组装的构架蛋白提供珍珠层的分层结构,其表面带有一些正电荷,而 SM 由于表面带有负电荷而吸附在 IM 表面,另一面与晶体表面直接接触,诱导碳酸钙晶型和形核长大。S. Weiner 等最早提出了层间有机基质的五层结构,认为 β 几丁质在中部,两侧为类丝纤蛋白,再外层为酸性大分子即 SM,SM 与无机晶体表面接触。Y. Levi 等[69]使用低温透射电镜观察了层间基质的结构,并没有发现类丝纤蛋白的存在,因此推测在晶片生长之前应该是以凝胶状态存在,而酸性大分子则处于凝胶环境中在 β 几丁质表面组装成膜,以诱导晶体形核长大,如图 3.14 所示。

对贝壳珍珠层中疏水的大分子定性分析不是件容易的事,如果将它们从贝壳中萃取出来加以分析,它们倾向于形成一个相互作用的有机系统,沉积

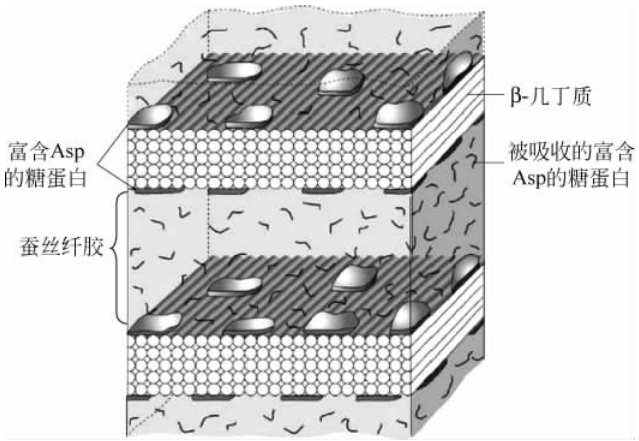


图 3.14　层间有机基质的结构示意[69]

在试管的底部。然而，借助于分子克隆技术，目前已经获得了一些从珍珠层中分离出来的蛋白质的详细的数据。最近，一种日本珍珠牡蛎（pinctada fucata）的珍珠层中的两种构架大分子已经被确定了。一种是 MSI 60，它是富含谷氨酸/丙氨酸的丝纤维状大分子；另一种是 N16。这两种蛋白质的相对分子质量分别是 60 000 和 16 000。N16 的完整的氨基酸序列现在已经得出了。试验证明，仅蛋白质 MSI 60 对不溶性的有机构架是必需的。因为，当把不可溶的大分子置于 pH 为 8.5 的 NH_4OH 溶液中处理时，N16 能够作为一个可溶性的大分子被萃取出来。N16 的大分子中的 4 个区域含有酸性的氨基酸，重复单元是$[Asn\text{-}Gly]_n$，它是极性的而不是带电的，因为含有天冬素（Asn），它是天冬氨酸盐的非电性的派生物。N14 是一个类似的蛋白质，用类似的方法从珍珠牡蛎（pinctada maxima）的珍珠层中萃取出来，它是日本珍珠牡蛎（pinctada fucata）的近亲。

蛋白质 N16 和 N14 似乎是酸性不足，不足以在碳酸钙形核过程中扮演一个重要的角色，它们也不是足够疏水性的，也不能单独作为结构基体。它们可能在丝蛋白和高度酸性的大分子的界面上产生一些作用。例如，它们可以作为连接蛋白质来帮助将这些组分配对在一起。

另一种叫做 lustrin A 的蛋白质被认为具有新型的作用，它可以从一种红鲍鱼（haliotis rufescens）外壳的珍珠层中的不溶性基体中分离出来。这种蛋白质的序列非常复杂，并且含有多重区域组成的复合结构。其中一些类似于各种各样的细胞外蛋白质，由此可以认为 lustrin A 在生物矿化中的作用是多方面的。尤其是，靠近 C 端的区域有一个序列非常类似于在蛋白酶抑制体中发现的那些蛋白质。因此，lustrin A 的一个重要的作用可能是阻止有机基体

遭受存在于周围环境中的酶的攻击。

就像描述珍珠层中的酸性大分子一样,定义不溶性的疏水架构的组元也非常难。虽然大分子是可溶性的,但它们经常带有很高的负电荷,所以它们能很强地粘附于任何可见的表面。在羧酸盐(典型的是 30% Asp 和 17% Glu)、丝氨酸(带或者不带共价结合的磷酸根基团)、硫酸化的多糖侧链中富含这类大分子。利用分子克隆技术已经提供了一些大分子中存在的重复单元序列的信息。例如,[Gly-Asp-Asn]、[Gly-Glu-Asn]、[Gly-Asn-Asn]序列已经从 nacrein 中鉴别出来。Nacrein 是从日本珍珠牡蛎中萃取出来的一种聚阴离子大分子。已有证据表明,很多这类大分子就像它们的疏水性配对物一样,在局部的区域具有反平行的 β 折叠片二级结构。

另外一种水溶性的大分子 N66 也已经研究过了。其氨基酸序列的一个引人注目的地方在于其分子的一部分类似于含碳脱水酶中的一部分。含碳脱水酶是一种在 CO_2 和 HCO_3^- 相互转变过程中涉及的一种酶。这显示了基体中的一些大分子在过饱和水平的化学控制方面会起到重要的作用。

贝类珍珠层中的有机基质是由结构和功能大分子组成的。结构大分子由疏水性大分子类丝纤蛋白构成,具有反平行的 β 折叠片结构,例如 MSI60,富含谷氨酸和丙氨酸。与此相反,功能大分子是高度酸性的糖蛋白,例如富含天冬氨酸,谷氨酸和丝氨酸的 nacrein,它们与疏水性大分子框架结合,可能在文石晶体的形核过程中起关键作用。其他的大分子(N14,N16,N66,lustrin A)介于两种之间,可能具有多种功能 β-几丁质纤维有时位于疏水性蛋白质之间。

3.5.4 淡水珍珠中的有机大分子

清华大学生物材料组利用水和醋酸法对淡水有光珍珠(文石珍珠)和无光珍珠(球文石珍珠)中的有机基质进行了提取,分别获得了水溶蛋白(WSM)、酸溶蛋白(ASM)和酸不溶蛋白(AIM)。采用 X 射线衍射方法对两种珍珠的酸不溶蛋白进行了分析,结果如图 3.15 所示[70]。根据理论分析,可以认为珍珠层中的不溶蛋白质具有一定的周期结构,这种结构可以定向地诱导碳酸钙晶体的生长。排除玻璃衬底的干扰,可以发现两种酸不溶蛋白的结构都有很强的周期或长程有序现象。根据晶体衍射分析方法可以计算得出,两种酸不溶蛋白中都应存在相当比例的 α 螺旋结构。另外,9°的衍射峰为典型的 β 折叠特征峰,说明两种酸不溶蛋白中,文石珍珠的酸不溶蛋白的结构中含有大量的 β 折叠,而球文石的酸不溶蛋白中没有 β 折叠这种结构。

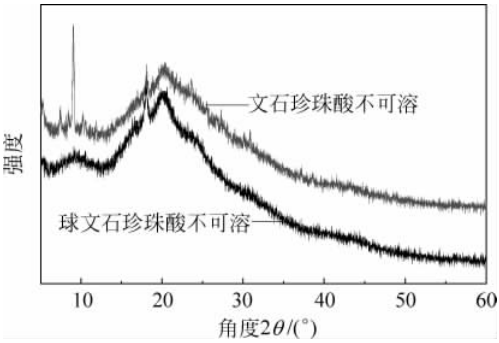


图 3.15　文石和球文石珍珠酸不溶蛋白的 XRD 结果

3.5.5　鱼耳石中的有机大分子

清华大学生物材料组[71]利用水和醋酸法对鲤鱼星耳石(球文石)和微耳石(文石)中的基质蛋白进行了提取,从微耳石中提取了三种蛋白(WSM、ASM、AIM),星耳石中提取了两种蛋白(WSM、ASM),在星耳石中未提取到酸不溶蛋白。

鲤鱼耳石各蛋白中氨基酸成分如表 3.1 所示。实验没有检测到色氨酸(tryptophane)与巯基丙氨酸(cysteine)的存在。氨基酸的成分未能表现出不同蛋白之间的明显差别。然而,球文石中 Glx 的含量较高,这种 Glx 含量较高的现象在无定型碳酸钙所含的酸性大分子中也观察到了[72]。

表 3.1　鲤鱼星耳石和微耳石中氨基酸成分分析

氨基酸种类	星耳石		微耳石	
	WSM	ASM	WSM	ASM
Asx	20.7	23.8	18.8	20.9
Thr	8.6	8.8	8.9	9.2
Ser	15.2	14.3	13.7	12.5
Glx	18.8	19.1	14.3	15.5
Pro	5.4	4.7	5.1	4.9
Gly	8.3	7.1	10.2	10.3
Ala	5.7	4.6	5.7	5.5
Val	2.9	2.1	3.5	3.7
Met	4.5	5.2	7.0	7.5
Ile	0.8	0.8	2.1	1.3
Leu	1.6	1.1	1.6	1.2
Tyr	0.8	2.1	1.6	1.9
Phe	2.1	1.7	1.8	1.7
Lys	2.2	2.4	2.9	2.1
His	1.1	0.8	1.8	1.1
Arg	1.4	1.3	1.0	0.8

图 3.16 是星耳石和微耳石中蛋白成分的电泳比较结果,M 列是相对分子质量标准。泳道 1 是星耳石水溶蛋白电泳结果,在 40 kDa 处出现蛋白带。泳道 2 是微耳石水溶蛋白结果,在 32 kDa 处出现蛋白带。泳道 3 及泳道 4 分别是星耳石酸溶蛋白与微耳石酸溶蛋白,二者均在 65 kDa 处出现蛋白带。以上结果说明星耳石与微耳石中的蛋白有所不同,尤其是在水溶蛋白部分。

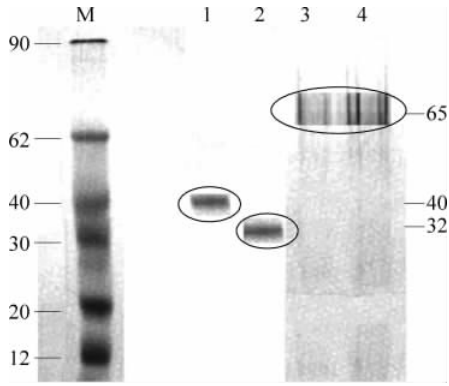


图 3.16　鱼耳石中各蛋白的电泳结果

3.6　体外模拟有机基质调控矿化

生物体的基因和细胞到底是怎样通过蛋白质达到调控晶型和形貌的目的的,是研究者最为关注的问题。为了揭示这种复杂的生物矿化的微观机理,在体外环境中模拟体内微环境进行沉积实验,可以更深入的了解这种有机-无机界面作用,为有机-无机复合材料的制备提供理论依据。

3.6.1　晶体生长

晶体的生长和中止取决于溶液的过饱和度,通过表面控制过程实施。

无机晶体在纯溶液中生长,需要将离子持续运送到表面,然后结合到晶格位置。许多关于晶体生长的理论要追溯到 20 世纪初期,在大量教科书中都有描述。不过,随着近年来原子力显微技术的出现,这个课题又焕发出新生。原子力显微技术能直接在过饱和溶液中观察晶体表面。这样,我们就能够观察到聚集的原子的运动和调节,从而解释晶体生长的基本原理。

当过饱和度降低到溶度积所确定的平衡水平以下时,晶体生长便中止了。有时候,由于大量表面缺陷的积累,也会使晶体生长停止。另一种可能是,晶体表面被附生的第二相所遮挡,例如当条件变化时,同素异构体或水合结构能在过饱和溶液中形核。在这种情况下,对于先析出的矿物来说,虽然

溶液仍是过饱和的，但晶体生长却不再继续，因为表面相处于平衡状态中。

3.6.2　晶体生长的抑制

许多生物流体对于某些无机矿物是过饱和的，但晶体在一般情况下却不会自发地形成。唾液对于羟基磷灰石来说是过饱和的，但是显然我们的牙齿不会随时间生长。存在于液体中和粘合在牙釉质表面的一系列磷蛋白阻止了这种过度的生长。通常，溶液中有许多不同类型的可溶粒子，如离子、有机分子、大分子和聚合物，通过固定在扭折区或台阶区来阻止矿物离子结合到晶体表面。这种干扰作用导致晶体生长被抑制，同时改变了晶体的性质和形貌。在添加剂含量非常高的情况下，台阶沿晶体表面的扩展受到抑制，它们相互聚成团使表面变得不规则，于是晶体生长慢慢中止[73]。

在可溶添加剂存在条件下，晶体生长被抑制了，而且通常晶体的组成、结构和形状也随之改变，见图 3.17。

图 3.17　天冬氨酸存在时，形成的方解石附聚球[74]

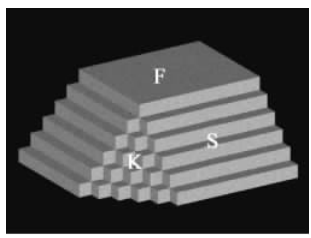


图 3.18　晶体模型图示

F 面为平面，S 面为阶梯面，K 面为曲面[75]

可以使用一种简单的晶体模型来解释有机基质对方解石晶体生长的抑制情况。在这种晶体模型中，晶体的表面被分为 3 种[75]：平面 F，阶梯面 S 和曲面 K，如图 3.18 所示。K 面和 S 面被认为分别完全由扭折和台阶组成。很明显，K 面上将获得最快的生长速度，其次是 S 面，F 面的生长速度最低。因此，晶体最初的 K 面和 S 面将决定其最终的晶体形貌，而最终形成的晶体没有新的 K 面和 S 面。

实验结果表明，当溶液中加入胶原蛋白，新的晶面就会开始在菱形方解石晶体的棱边上出现。新晶面的最初形成有可能发生在方解石籽晶的{104}面的边(S 面)角(K 面)上。Paquette 和 Reeder 提出，方解石籽晶的最初表面存在几何学上的不同类型表面位置。胶原蛋白对其中的一些特定位置具有更高的亲和力，这些位置在实验中被证实为 K 面和 S 面，胶原蛋白在调制过

程中吸附在这些表面上,从而择优性地降低了相应方向上的晶体生长速度。作为胶原蛋白抑制晶体生长的结果,新的晶体表面在边角上出现,这些新的晶面对胶原蛋白有更高的亲和力,最终导致了晶体形貌的改变。对方解石晶体新晶面的描述基于这些晶面的择优生长方向,这种方法可以用新的稳定晶面来描述晶体形貌的改变。晶体表面具有择优与酸性蛋白质相互作用的普遍特征,因此,碳酸根的方向择优垂直于晶体的一些表面,如与方解石 c 轴平行的晶体表面,即(110)晶面和(100)晶面。虽然已知一些晶面与胶原蛋白具有择优吸附的性质,但是现在还不能确定其准确的晶面指数。

蛋白质从溶液中吸附到固体表面的过程决定于其结构的稳定性。胶原蛋白具有很高的结构稳定性,它起到胶质颗粒的作用,在静电作用下,只吸附于离子性表面,如方解石表面。这种作用在生物矿化过程中必定是一种重要的影响因素。

负电性的蛋白质可以吸附溶液中的钙离子,这一层钙离子促进了方解石在其(001)面上的定向形核,交替形成钙离子和碳酸根的层面。方解石的这种取向,即 c 轴垂直于基体,是生物矿物中普遍存在的晶体取向。

是什么导致了 K 面和 S 面生长速度的降低? 其中一个原因就是新形成晶面上的胶原蛋白浓度高于方解石籽晶的最初晶面。由于高胶原蛋白浓度导致低生长速度,所以 F 面的相对生长速度就高于 K 面和 S 面。

随着胶原蛋白浓度的增加,晶面上胶原蛋白的密度也在逐渐增加,晶体的形貌也随着发生变化,在整个方解石表面面积上的胶原蛋白平均浓度也将逐渐增加,在固定的过饱和条件下,方解石晶体表面的整体生长速度和胶原蛋白/钙离子的比值将逐渐下降。在低浓度下,胶原蛋白择优吸附于 K 面和 S 面,导致了多层的晶体形貌。随着胶原蛋白浓度的增加,这些表面已经不足以负担更多的蛋白质,于是胶原蛋白可以吸附在 F 面上,并聚集在一些方解石晶体的间隙里,从而形成了球形聚集状的晶体。

3.6.3 晶体形貌

在某种添加剂的生长抑制作用下,产生的一个重要结果是晶体形貌发生了明显的改变。例如,少量的 Fe^{2+} 水合离子导致片状的 HA 晶体,而葡萄糖等糖类分子则导致针状的颗粒(图 3.19)。这一节中,我们将讨论产生特殊晶体形状的因素以及如何通过表面过程来改变这些因素。

晶体的几何形状取决于晶体表现出来的晶面的数量。一般来说,晶体中不同的面是通过它们与晶胞轴相交的方式来定义的。这被定义为米勒指数,是标注晶面的标准方法。通常米勒指数包含三个整数 hkl,而且记为$\{hkl\}$或(hkl),前者指具有对称关系的面的集合,称为晶面簇,而后者是特定的唯一的

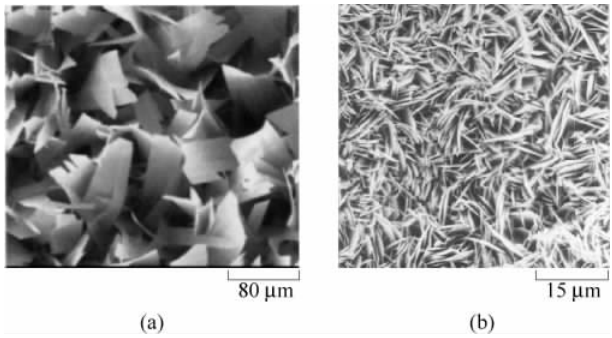


图 3.19　　HA 晶体

(a) 片状[76]；(b) 针状[77]

晶面。比如，立方体的面有(100)、(010)和(001)三个指数，分别对应于垂直于晶胞 x、y 和 z 轴的 3 个面，但它们可以集合成{100}晶面族，因为它们在对称性方面是等价的。

因为每个晶面对应于垂直于它的唯一的晶轴，由此可以断定，沿这些方向的相对生长速率将导致特定几何形态。具有立方对称的晶体沿[110]晶轴的生长速率大于沿[100]和[010]方向的速率，晶向指数记为[uvw]或〈uvw〉，分别指特定的晶向和晶向簇。这使得随着晶体的生长，与这些轴垂直的晶面在相对比例上发生了变化。特别是(110)面向外生长并且消失了，因为这个方向上的生长速率最快。

关键在于生长慢的晶面在晶体外形中体现出来，而生长快的晶面则完全消失了。因而，只沿一个轴向的快速生长就形成了针状晶体，而沿两个方向的快速生长产生片状形貌。在各个方向上具有相等的生长速率就产生出各向同性的晶体，如立方体或八面体。在所有情况下，垂直于较快生长方向的面具有较小的表面积，而生长较慢的面则在表面形貌上占较大的表面积。

为什么不同晶面的生长速率会不同呢？生长速率依赖于表面过程，对于环境中的外来离子是高度敏感的。由于晶格的不同部分暴露在外界环境中，这使得不同的面具有不同的表面结构。因为不同的面上扭折区、台阶区和螺旋位错的数量都不同，而且表面粘附和离子结合所需要的能量也各不相同，因此它们以不同的速率生长。而且，可溶添加剂对这些因素的影响程度也不一样，所以即使在外来离子和分子的浓度很低的情况下，晶体外貌也可能发生显著的变化。要想弄清楚这些是如何发生的，我们必须理解无机晶体的平衡外部形貌产生的原因。

3.6.3.1　平衡形貌

在许多晶体的生长过程中，组成晶体形貌的晶面直接与晶格中最稳定的

原子面相对应。这些晶面通常具有较低的米勒指数,而且与晶格对称性(立方、六方、菱方等)相互关联,所以晶体看起来像晶胞的宏观形式。低指数晶面通常较稳定,因为它们的原子排列紧密。但是这种简单的结构方法并不总适用,通常需要更精确的描述,这涉及米勒指数$\{hkl\}$的晶面的表面能($\sigma_{s[hkl]}$)的知识。特定晶面的表面能定义为,表面晶格层与体晶格中相同的晶面相比,单位面积上多余的能量。这样,具有较低表面能的晶面生长较慢,因而对晶体形貌贡献较大;而高表面能的晶面则被消除。

如果我们能够通过实验或计算的方法获得$\sigma_{s[hkl]}$的值,那么对于给定的体积,晶体应该占有最少的表面能,以此为基础就可以预知晶体的平衡形貌,即

$$\sum\nolimits_{hkl}\sigma_{s[hkl]} \cdot A_{\{hkl\}} = \text{最小}$$

其中$A_{\{hkl\}}$为$\{hkl\}$晶面的表面积。

因为每个晶面对应于一个垂直于晶面的晶轴,而且沿此方向的生长速率与表面能成比例,于是晶体的形状可以定义为一系列长度矢量$l_{\{hkl\}}$,每个矢量与$\sigma_{s[hkl]}$成比例并垂直于相应的$\{hkl\}$面。所以如果知道了各个晶面的表面能,那么利用计算机就能相对容易地从一组已知长度和角度关系的矢量中绘出晶体的形貌。

利用这种方法,已经对预测平衡形貌进行了一些尝试。充分的分析处理则需要表面结构的知识,也需要对表面和内部的原子间的键合进行详细的描述,所以直到最近,模型才成为半定量的。利用周期性键链(periodic bond chain)的方法将表面结构分割成存在于不同晶面中的“键链”,已取得了很大的进展。如果表面上具有大量牢固结合的原子链,那么这个面具有较低的表面能,是稳定的。模型使用了附着能的概念,即当厚度为$d_{\{hkl\}}$(d为晶面间距)的一薄片被加到已经存在的晶体表面时,每个分子所释放的能量。如果这个值很小,那么晶面键合较弱,面的生长缓慢。通过比较不同面的计算值,就可以拟定出排列的顺序,从而预测出晶体形貌。

周期性键链方法和最近采用的利用原子级模拟(atomistic simulation)来预测平衡外部形貌的方法比起来,简直是轻而易举。利用原子级模拟,我们必须对能体现晶体结构键合的力场有详细的了解。实际上,这意味着晶格能的计算,不仅要考虑所有离子间的静电相互作用(Born-Mayer 势),而且要考虑二阶短程斥力和引力(Buckingham 势),还要考虑弯曲和扭转项。要计算表面能,可以想象将晶体结构沿特定的方向劈开,并允许原子在新的$\{hkl\}$表面上弛豫,直到达到最小的能量配置。然后利用体晶格中的原子间势以及能量最小化所获得的构造细节,则可以计算出表面晶格能。最后一步是每个面的表面能的计算,可通过体晶格能和表面晶格能的差值算出。

晶体的平衡外部形貌由具有对称关系的晶面族所决定,它使晶体的表面

能最小；而且晶体形貌可以通过表面结构及其键合作用来预测。

3.6.3.2　晶体惯析面调制

通过将外来离子和分子加入到过饱和溶液中，通常会导致晶体形貌发生明显的改变。这些改变，比如添加剂会结合到特定晶面，通常是合理的，因而会影响生长速率。例如，在添加尿素($OC(NH_2)_2$)的情况下，随着添加剂浓度的增加，立方晶形的 NaCl 会转变成八面体。尿素会吸附到{111}晶面簇上，并抑制这些面的生长。起初，立方晶形转变成截角立方体，然后转变成立方八面体，最后形成八面体。如果进一步增加尿素的浓度，则会产生一种复杂的几何晶形，使得其他的晶面也显现出来，最后形成不规则形状的颗粒。由于被添加剂抑制生长的面的表面积增加了，于是我们可以根据晶面相对面积的变化，看出哪些晶面受到了可溶添加剂的直接影响。这至少为我们提供了一个建立结构模型的出发点，来理解添加剂与晶面的相互作用。

我们可以认为晶体的形貌调制就是由于添加剂的选择吸附使晶面表面能的相对次序发生改变的过程。但是这种变化的实质却通常难以解释清楚。这可能是由表面晶格能的选择性稳定化(selective stabilization)引起的(热力学因素)；也可能是由于扭折区和台阶区等活性区域的数量和类型的变化而导致的机械效应(mechanistic effect)所引发的(动力学因素)；也可能是由二者共同引起的。如果晶体生长速率可以等同于特定晶面的表面能，那么我们就可以将上述晶体平衡外部形貌的热力学原理，归纳成晶体形貌调制的动力学方法。那么，我们就可以计算出由于添加剂与特定晶面的相互作用所引起的表面能的相对改变量，从而预测晶体形貌的变化。近些年来，运用这种方法已经取得了一定的进展。例如，对于 Li^+ 或 HPO_4^{2-} 离子的覆盖率为 50%～100%的方解石晶体，可以通过计算其表面能，预测出其晶型分别为六方形片状体和细长的棱柱，这同在方解石结晶实验中发现的结果相符(图 3.20)。

其他的实验表明，大分子添加剂，包括从生物矿化结构中提取的蛋白质，对于无机晶体的形貌具有高度专一的效果。例如，从海草中提取的海藻酸钠和各种卡拉胶等多糖，当加入到氯化钠过饱和溶液中时，能通过吸附在边缘上来使位错生长，从而使边缘成核，抑制表面形核。由此产生的晶体与无抑制剂存在下产生的晶体相比，具有轮廓分明的立方晶体。如果考虑大分子与晶面相互作用的所有立体化学的可能性，那么显然识别过程将变得相当复杂。研究表明从成年海胆的含镁方解石生物矿物中提取的酸性蛋白质，能与实验室中的方解石晶体的棱柱面发生相互作用。这些分子含有较多的天冬氨酸和谷氨酸，这暗示我们，酸性氨基酸的羧基表现出与上述低相对分子质

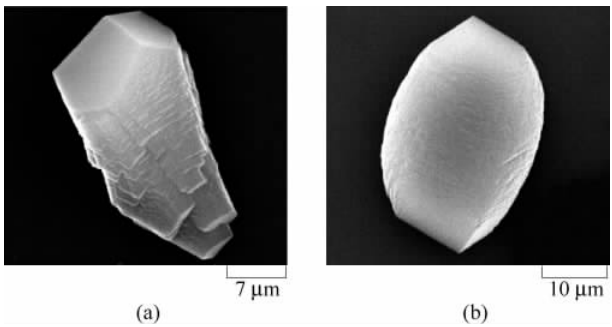


图 3.20　方解石在添加剂存在下的生长

(a) PO_4^{3-} 存在条件下,方解石的类五边形{104}面以及多级台阶[73];(b) 在天冬氨酸存在时的方解石晶体,{104}面上的两个负方向被曲化[78]

量的二元羧酸添加剂相似的立体化学类型。事实上,计算机模型表明,这些蛋白质,如含有 11 个重复羧化物单元的聚天冬氨酸$[Asp]_{11}$,能与方解石的棱柱面发生强烈的相互作用。

低相对分子质量和高相对分子质量的添加剂,包括从生物矿物中提取的蛋白质,能通过与特定表面的相互作用,改变不同晶面的相对生长速率,从而引起晶体的习性调制(habit modification)。静电的、立体化学的和结构上的匹配是重要的因素,能够明显改变表面能或生长机制,或同时改变两者。

3.6.4　多晶型

清华大学生物材料研究组[70]在以新鲜文石珍珠和球文石珍珠为基底的碳酸钙体外模拟矿化实验中发现一个有趣的现象,文石珍珠基底表面生长的为文石晶体,而球文石珍珠基底上生长的为球文石晶体(图 3.21)。

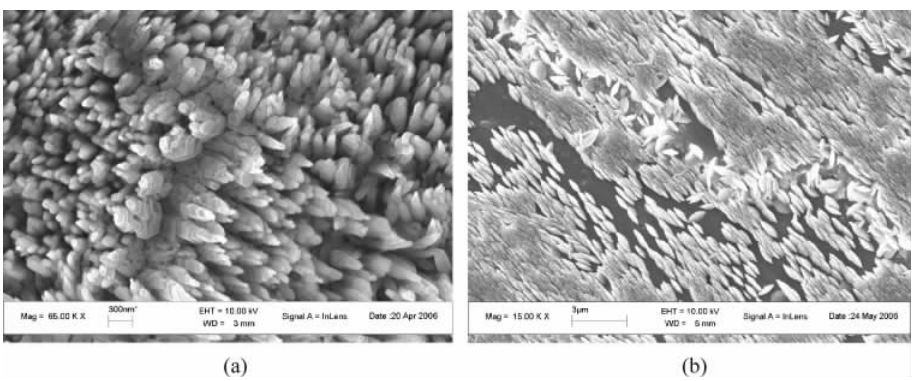


图 3.21　以新鲜珍珠表面为基底的体外模拟矿化结果

(a) 文石珍珠表面;(b) 球文石珍珠表面

鱼耳石新鲜表面的体外矿化结果也与此类似，在星耳石表面生长的晶体为球文石，而在微耳石表面生长的晶体则为文石[71]。

从化学控制的观点上看，某种多晶形的选择是因为动力学效应影响了形核和生长路径。另一种可能性是利用界面模板来控制结构形成。众所周知，在高浓度下，Mg^{2+}将会使方解石晶体转变为文石晶体。从表面看这是违反直觉的，因为一般认为 Mg^{2+}只能取代方解石中的 Ca^{2+}而无法进入文石晶格中。然而，这种热力学条件可以通过动力学效应来弥补，即 Mg^{2+}与方解石小晶体及晶核间的相互作用破坏了表面，降低了晶体生长速率。同时，文石晶核则不受添加剂影响，在过饱和溶液中持续生长，从而在结晶过程中成为占主导地位的晶体。

多晶型物的选择性也可以发生于非晶态矿物的转变过程中，其间矿物组成不变，但结构却经历了一系列变化，热力学稳定性则逐渐提高。晶体生长过程中，多晶型的出现次序的原理是基于经验观测基础上的，称为 Ostwald-Lussac 阶段定律。定律认为，在连续沉淀的条件下，最初形成的是溶解度最大的相，紧接着是水合晶型，然后是一连串溶解度递减的晶型。这明显是一个动力学论据，因为根据我们先前的讨论，溶解度最小的晶型的过饱和度，与较不稳定的晶型或非晶相的过饱和度相比要大，所以根据热力学，最先析出的应该是最稳定的晶型。溶解度最大晶型的优先形成，意味着较不稳定结构的形核速率(J_N)较快。根据形核方程，我们可以看出，只有通过明显降低的界面能(σ)来弥补较低过饱和度，上述情况才可能发生。这通常就是非晶相或具有较不稳定结构的晶型形核的原因。

如图 3.22 所示，系统是遵循单阶路线直接形成最终矿物相(途径 A)；还是经过依序的沉淀(途径 B)，这取决于形核(N)，生长(g)和转变(T)的活化能。临界晶核的实际结构是最关键的因素之一，因为这决定了初始状态在晶体生长过程中是如何被改变的。不幸的是，我们几乎无法获得结晶初始状态的结构信息，因为原子团存在的时间很短暂，而且只有纳米的尺度。

原则上，我们可以设想大量具有不同结构的晶核，这些结构取决于在晶格结点上的离子与随机分布于临界晶核中的离子及水合粒子的相互作用的强度和性质。虽然这有无数种变化，但是这许多系列的结构的一个端部单元类似于大块晶相中的一小部分。这种晶核模型涉及离子间的强相互作用，以至于晶格能量可以克服溶解作用和弥补表面能。虽然临界晶核中的离子在它们正常的晶胞位置进行了一定程度的弛豫，但晶核结构和晶体的点阵参数间仍然保持着一致性。在这种情况下，形核和生长在结构上是相联系的，在某种意义上，生长只是在重复形核过程，因此原则上，化学控制形核将决定单阶机制的多晶型的选择性，如图 3.22 途径 A 所示。另一种情况下，水合离子

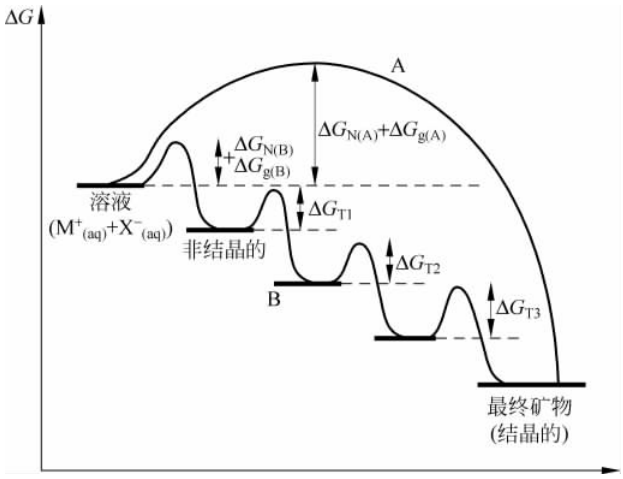


图 3.22　结晶和多晶型物选择性的途径

A—直接；B—依序

间的弱相互作用将形成无规则结构的水化固相。在这种模型中，晶格能较低，但由于水化作用，表面能也很低。首先非晶相先沉淀出来，然后是多晶型的序列，这与 Ostwald-Lussac 定律和图 3.22 途径 B 是相一致的。非晶态相将非常容易形成于那些具有高界面能和大晶胞体积的多晶型系统。例如，假设临界晶核含有的离子不够用来形成晶胞，那么形核会在周期性结构建立以前发生。

多晶型选择的控制可以通过涉及添加剂的动力学效应，或是经由一系列溶解度降低而热力学稳定性升高的结构转变过程来进行控制。临界晶核的结构在控制结晶途径中是一个重要的因素。

3.7　有机模板上的取向形核

有机基质调制生物矿化中最吸引人的一部分就是取向形核。这被认为部分是由特定晶面的点阵间隔与有机基质中周期性排列的官能团的间距二者之间的结构匹配所引起的目前已有一些实验证据和合理的实验室模型支持这种结构识别的观点。

近年来，在有机模板或添加剂存在下的仿生合成已得到越来越广泛的研究。如 Langmuir 单分子层、超薄有机薄膜、自组装薄膜已成为碳酸钙晶体生长控制的有效模板，研究主要集中于晶型和晶体定向结晶的控制；很多天然高分子材料和人工合成高分子材料已用来调制碳酸钙晶体的生长；在有机基

质和可溶性聚合物添加剂共同存在下已经成功制备了碳酸钙薄膜；从软体动物壳中提取的蛋白质大分子对晶体的晶型也表现出独特的控制作用。

3.7.1　LB 膜

无机固体在压缩单分子膜上的控制结晶，其中不溶性的表面活性剂铺展在空气-水界面上。这些薄膜被称为 Langmuir 单分子膜，可以通过小心地将一滴溶有表面活性剂的氯仿，滴在水的表面上而制得，水必须置于封闭槽或托盘中。液滴迅速在水表面扩展，然后氯仿蒸发，留下单层的表面活性剂分子取向排列，它们的烃基链近似与液体表面垂直，只有极性端与水结合。物理压力导致单分子层的表面区域逐渐紧缩，分子被挤压到一起，增大了膜表面的压力。随着压力的增大，分子不断被整理，从膨胀的“气态”到半有序的“液态”，最后成为有序的二维结晶“固态”，其中规则排列的表面活性剂极性头暴露在水中(图 3.23)。只要知道空气-水界面上加了多少表面活性剂分子和有限区域的面积，就能计算出在任何压力下，每个分子所占有的面积。带有单个烷基和小的极性头的表面活性剂，在纯水中被压缩成固相时，每个分子占据的区域为 1.8～2.4 nm^2。

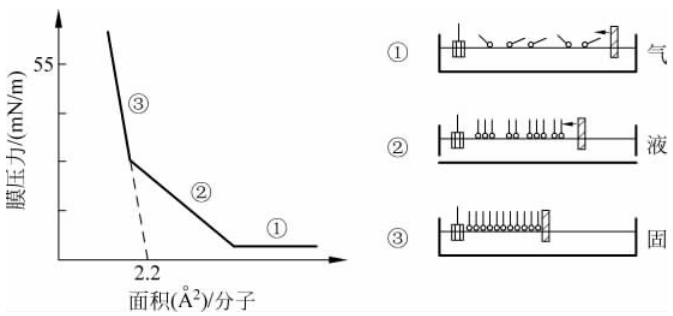


图 3.23　在空气-水表面，经压缩的表面活性剂的膜压力——每个分子所占面积的理想曲线

同时展现了单分子膜的相应气、液、固 3 态

用过饱和溶液代替 Langmuir 槽中的纯水，并改变对膜的压缩程度和表面活性剂基团的种类，我们就可以做一系列的实验，来测试生物矿化中取向形核的观点以及如何将它应用于模板法合成材料。例如 $CaCO_3$，在 pH 值为 6.0 时，通过用 CO_2 气体净化方解石悬浮液一个小时，可以得到碳酸氢钙过饱和溶液。方解石被溶解是由于系统中 CO_2 分压的增加。当气流停止并将溶液倒入 Langmuir 槽中，CO_2 气体开始缓慢地释放出来，几个小时后碳酸钙开始结晶析出，方程式如下：

$$Ca^{2+} + 2HCO_3^- \longrightarrow CaCO_3 + CO_2\uparrow + H_2O$$

在实验室中,这导致菱形方解石晶体在溶液中和空气-水界面上的凝聚。但当硬脂酸($CH_3(CH_2)_{16}COOH$)单分子膜在空气-水表面上被压缩成固相时,矿物主要在空气-水界面上形核,而且不连续菱形方解石晶体的{110}面取向平行于水表面(图 3.24(a))。令人惊讶的是,如果一个长烷基链的硫酸酯——正-二十烷基硫酸($CH_3(CH_2)_{19}OSO_3H$)被用来代替硬脂酸,那么三角方解石晶体的{001}面会平行于单分子层-水界面而取向形核(图 3.24(b))。

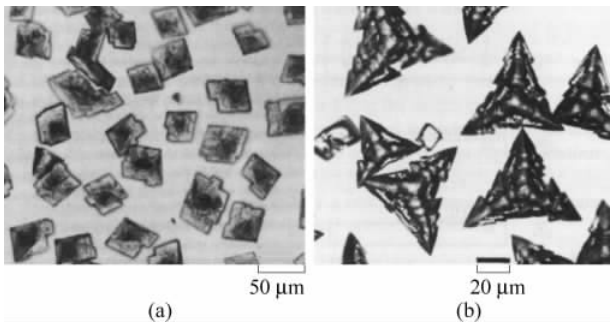


图 3.24　方解石在压缩 Langmuir 单分子膜上的结晶

(a) 硬脂酸薄膜上{110}取向晶体;(b) 正-二十烷基硫酸薄膜{001}取向晶体[3]

有一种结构模型来解释这种现象。X 射线衍射表明,带负电的表面活性剂分子密排在空气-水界面上,形成变形的六方晶格,内部基团的间隔大约为 0.5 nm。Ca^{2+} 通过与阴离子基团的静电吸引,在单分子层下形成扩散层,但只有当溶液中的金属离子溶度相对较高时(10 mmol/L),才会形成有序结构。在这种条件下,{110}或是{001}面的取向形核都是合理的,因为在这两种情况下,面上的 Ca^{2+} 和被阴离子集团束缚的 Ca^{2+} 的两个方向上都有良好的晶格匹配。那么什么机理能够解释:当用硫酸化基团取代羧基时,取向上的 90° 变化呢?模型指出:除了晶格间隙的匹配,表面活性剂基团的氧原子和晶面上碳酸根离子中的氧原子间存在着立体化学识别。对于{110}面的情况,碳酸酯基垂直于晶体表面,这样三个氧中只有两个暴露出来,而碳酸根阴离子平行于{001}面的情况中,三个氧位于同一平面上。这两种排列分别与单分子层中的羧基和硫酸酯基相仿,这样两种情况下,产生结构和立体化学匹配的扩散层。

然而,如果 Langmuir 单分子膜下的 Ca^{2+} 浓度减少到 5 mmol/L,被约束的 Ca^{2+} 是无序的,由于结构匹配不再占优势,动力学因素开始发挥作用,一种不稳定的多晶型-球文石开始形核。有趣的是,当改变单分子膜上的电荷极性时,也能观察到取向球文石晶体形成,例如,可以用带正电的质子化的十八

烷基胺分子($CH_3(CH_2)_{17}NH_3^+$)作为薄膜。相反,如果单分子膜-水界面上只存在较弱的相互作用,那么取向形核将不会发生。例如,采用十八醇($CH_3(CH_2)_{17}OH$)或胆固醇($C_{27}H_{45}OH$)制成的中性单分子膜,$CaCO_3$ 的结晶被抑制,而形成的晶体与对照实验没有什么区别。

静电的、结构的和立体化学的相互作用,对于在压缩 Langmuir 单分子膜下碳酸钙晶体的取向形核是非常重要的。这一点也可通过 $BaSO_4$ 在长烷基链硫酸酯单分子膜下的结晶,以及冰或 $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 在长链醇单分子薄膜下的形核来证实。

离子与表面活性剂官能团的有序排列间的相互作用,产生了结构的、静电的和立体化学的匹配,最终导致无机晶体在 Langmuir 单分子膜上的取向形核。

3.7.2　SAMs

自组装单层膜(self assembled monolayers,SAMs)[79,80]技术是自 20 世纪 80 年代以来快速发展起来的一个新型有机成膜技术。它是通过表面活性剂的头基与基底之间产生化学吸附,在界面上自发形成的有序的单分子层。由于 SAMs 是有机分子在溶液中(或者有机分子蒸气)自发通过化学键牢固地吸附在固体基底上所形成的超薄有机膜,因此它具有原位自发形成、成键高度有序排列、缺陷少、结合力强、呈"结晶态"等特点。其主要体系(有机物/基底物)包括:①有机硅烷/SiO_2、Al_2O_3、玻璃、石英、硅、云母、GeO_2 或 ZnSe;②烷基硫醇/金、银或铜;③二羟基硫化物(RSR')、二羟基二硫化物($RS—SR'$)P 金;④醇、胺/铂;⑤羧酸/Al_2O_3、CuO 或 AgO 等。由于 SAMs 制备方法简单、成膜效果好、稳定性强、膜层厚度及性质可通过改变成膜分子链长和尾基活性基团灵活控制,因此成为组成超分子体系和分子器件的有效手段,在制膜技术、传感技术、微电子技术等领域都有着广阔的发展前景,因而近年来备受关注。

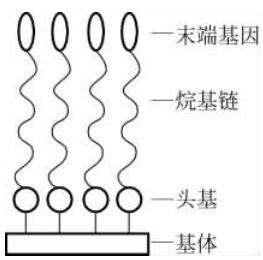


图 3.25　SAMs 的结构示意图

SAMs 是通过固-液界面间的化学反应吸附活性物质,进而在基体表面形成化合的、取向紧密排列的二维有序单层膜,如图 3.25,SAMs 包括头基、烷基链和末端基团三部分:成膜分子的头基与基底表面以共价键(如 Si—O、Au—S 键等)或离子键(如 $COO^-—Ag^+$)结合;烷基链之间靠范德华力作用使活性分子在固体表面有序且紧密排列;末端基团能使 SAMs 具有特殊的物理化学性质和功能,常见的末端基团有—PO_4H、—COOH、—OH、—NH_2、—CH_3 等。

目前报道的用于诱导生物矿物晶体生长的体系主要为有机硫和有机硅

烷类化合物,有机硫化合物的 SAMs 多为烷基硫醇和二烷基二硫化物在金表面自组装而成,有机分子与基底形成了金的一价硫醇盐。有机硅烷类 SAMs 所用单体多为烷氧基取代或氯代的长链有机硅烷分子,基底表面一般多为羟基化的 SiO_2、Al_2O_3、石英、云母、金、钛或钛合金等,SAMs 中硅烷分子与基底以共价键结合。

同普通溶液中生成的同种晶体相比,在生物体内有机基质调控下生长的生物矿物具有特殊的形态和强度。有机基质的活性位点大多为一些带负电荷的酸性蛋白化合物,当通过分子设计把这些酸性蛋白或其所带的功能基团组装到 SAMs 膜上,并以此作为模板,就能够模拟生物体内矿物晶体的生长过程。SAMs 诱导下的晶体生长具有以下特点:①晶体成核及生长速率受膜的末端基团所带的电荷性质及电荷密度影响;②由于膜的有序结构,晶体形状和尺寸相当一致,晶体排列有序,且具有特定取向性;而在无膜的本体溶液中,生成的通常是排列杂乱无章、形态各异、尺寸不一的晶体;③在不同性质的 SAMs 膜诱导下,可以得到矿物的不同晶型和不同晶相。

SAMs 诱导下晶体生长的机理:

(1) 静电控制作用

SAMs 末端功能基团所带的电荷类型和电荷密度能够通过静电作用影响晶体在膜-液界面的生长过程。静电作用还能够增强在膜-液界面上预成核晶体的稳定性。根据晶体成核热力学理论,稳定成核活化能(ΔG_n)同饱和溶液中形成固相所克服的表面能(ΔG_1)以及晶粒聚集成键所释放出的能量(ΔG_b)密切相关:

$$\Delta G_n = 16\pi(\Delta G_1)^3/(3\Delta G_b)^2$$

其中,$\Delta G_b = kT\ln S$,k 为玻耳兹曼常数,S 为溶液饱和度,T 为温度。从上述式子中可以得出:降低或增大溶液的过饱和度能抑制或促进晶体成核。由于静电作用,可能会提高或降低某种溶质在膜-液界面处的浓度,从而造成局域过饱和度发生变化。例如:受静电作用的影响,不同末端功能基团的 SAMs 对羟磷灰石(HA)的调控功能不同,带有负电荷最多的—PO_4H_2 末端基团与 Ca^{2+} 间的静电吸引最强,其 SAMs 诱导的 HA 晶体最多,其次是—COOH;由于非离子末端基团(—$CONH_2$ 和—OH)与 Ca^{2+} 间的静电作用及带正电荷末端基团(—NH_2)与 PO_4^{3-} 离子间的静电作用均较弱,因此其相应的 SAMs 诱导 HA 成核的能力均比—PO_4H_2 和—COOH 的弱很多;而—CH_3 与溶液中的 Ca^{2+} 间的静电作用最弱,因此其 SAMs 表面几乎没有 HA 生成。不同末端基团对 HA 生长速率的影响依次为:—PO_4H_2 >—COOH ≫—$CONH_2$ ≈—OH >—NH_2 ≫—CH_3 ≈0。一般情况下,由于—NH_2 与 PO_4^{3-} 离子间的静电吸引作用非常弱而不能使 PO_4^{3-} 离子在膜-液界面积聚,因此 HA 的异相成

核难以在其表面发生。然而，如果增加溶液的过饱和度使 HA 均相成核而形成的初始晶核带负电荷，那么—NH_2 与 HA 初始晶核之间较强的静电吸引会使其 SAM 表面吸附大量的 HA 初始晶核，从而使 HA 晶体在膜表面沉积。实验结果表明，带正电荷的末端基团—NH_2 的 SAMs 可以通过静电吸引作用诱导带负电荷的 HA 微粒在 SAMs 上均相成核。相反，由于静电排斥作用，在带负电荷的末端基团(—OH)的 SAMs 表面，仅有很少量的 HA 颗粒生成。

(2) 晶格和立体化学匹配

在晶体生长过程中，基质表面功能基团的有序性和表面离子的二维晶格与正在成核晶体的立体化学匹配对于晶体的选择性生长有着重要的指导作用。Travaille 等在 pH＝5.6～6.0 的溶液中研究了 16-巯基棕榈酸(MHA) SAMs 诱导下方解石晶体的取向生长。在此 SAMs 诱导下，方解石以(012)晶面平行膜取向生长，归因于方解石(012)晶面上的碳酸根离子沿 a 方向与 SAMs 的末端羧基间有很好的匹配关系。

由于 SAMs 面晶格与 $CaCO_3$ 晶体晶面间存在的晶格匹配关系，具有六边形晶格的 16-硫基十六烷($C_{16}SH$)SAMs 易诱导方解石和球文石 $CaCO_3$ 晶体生成；而具有矩形晶格的蒽基-2-羧酸 11-硫基十一烷基酯(ANTH)SAMs 易诱导以(100)面取向生长的针状文石晶体。方解石(001)面晶格中的钙原子和 $C_{16}SH$ 的 SAMs 的六边形晶格完全吻合，文石晶体的(100)和 ANTH 的 SAMs 的晶格匹配很好，其匹配误差沿 b_A 和 c_A 分别为 4%和 11%。

(3) 氢键控制作用

氢键也是影响晶体生长及形态的重要因素之一。Kang 等研究了以 4′-羟基-4-巯基联苯(Ⅰ)、4-(4-巯基苯)2-吡啶(Ⅱ)分别与 4′-甲基-4-巯基联苯(Ⅲ)的混合物的 SAMs 诱导下，甘氨酸晶体的生长。在纯的 SAMs 诱导下，甘氨酸以[011]面平行于膜面成核；在 4′-羟基-4-巯基联苯(Ⅰ)与 4′-甲基-4-巯基联苯(Ⅲ)的混合物中，当 4′-羟基-4-巯基联苯(Ⅰ)的浓度为 0 和 50%时，甘氨酸的成核面为{h01}；在 4-(4-巯基苯)2-吡啶(Ⅱ)和 4′-甲基-4-巯基联苯(Ⅲ)的混合物中，当 4-(4-巯基苯)2-吡啶(Ⅱ)的浓度分别为 25%、75%和 100%时，相应晶面分别为[010]、[121]和[105]。这主要是因为甘氨酸分子和 SAMs 表面间存在着氢键作用，化合物分子结构中的羟基能与甘氨酸晶体内的 COO^- 和 NH^{3+} 形成氢键，而化合物分子结构中仅嘧啶基与 NH^{3+} 形成氢键，化合物不能形成氢键。不同的成膜成分造成氢键作用强度不同，使得晶体以不同晶面取向生长。

SAMs 的结构类似细胞膜，基于 SAMs 为基质的矿化模拟体系，可以在体外模拟生物矿物的形成，反应物可以在 SAMs 膜的表面富集、定位并被催化，这为在理论上进一步阐明基质调控下的成矿机制创造了条件。然而，以

SAMs 为模板模拟自然界生物矿物的形成仍处于初级阶段,SAMs 诱导下生成的矿物结构和性能与生物体内矿物相比还有较大的差异。长期以来,科学家一直无法模拟合成出自然骨等硬组织材料,即使是成分和结构较为简单的贝壳,虽然其化学成分已经清楚,但仍未有人在实验室中合成出类似于天然贝壳的仿生材料。其主要原因是生物体内的矿化过程是在有活细胞参与下及在多种调控情况下在蛋白质基质上进行的复杂而有序的过程,它不仅受到矿化位点基质组成和位点附近介质的影响,而且还受到细胞以及基因的调控。

3.8 人工合成碳酸钙晶体的晶型及形貌控制

碳酸钙由于其良好的取向性和晶粒外形,成为有机-无机界面相互作用研究中采用的主要无机体系,用来分析在水溶液中使用各种生物、非生物的添加剂和模板时,对晶粒的形貌、大小、分布、晶型的影响。此外,碳酸钙由于生物相容性较优,在植入材料方面具有一定的应用,例如有通过与淀粉共混的方法制取多孔碳酸钙植入材料的报道[81]。

根据添加剂和模板的不同,对于碳酸钙调控机理的研究大致可以分为以下一些部分。

3.8.1 Mg^{2+} 作为添加剂

由于海水中含有 0.13%质量的镁(镁钙含量比约 3∶1),很早之前研究者们就在对海洋生物矿化的研究中发现了镁离子对碳酸钙晶体沉积的影响。

镁离子可以替换方解石中的钙离子位置形成含镁方解石,从而导致方解石结晶形貌的变化,但是镁离子却无法进入文石晶体的晶格。当溶液中镁离子含量较高时,这种作用可以抑制方解石晶核的形成而促使文石的晶核得以长大,达到调控晶型的目的。因此在一些模拟生物体调控文石晶型的实验中,也会采用镁离子来诱导文石的生成[82]。

此外,镁离子还可以稳定无定型碳酸钙。S. Weiner 等[83]研究了海胆幼体骨针中无定形碳酸钙过渡相,发现在没有镁离子时只有方解石相,而其中的蛋白质大分子不能诱导出无定型相,这就说明镁离子在对无定型相的稳定中起着重要作用,而含镁量很高的方解石是通过含镁无定型相的晶型转变形成的。F. C. Meldrum 等[84]也发现了镁离子结合在无定形碳酸钙中很大程度延缓了其向晶体相的转变,这一影响随结合在无定形碳酸钙中的镁离子含量增加而增大。在生物体系中,镁与有机基质的共同作用对稳定无定形碳酸钙起到了重要的作用,含镁的无定形碳酸钙在长时间内是稳定的,可以在结晶之前模造出理想的结构和形态。

清华大学生物材料组研究胶原蛋白和镁离子协同作用对碳酸钙矿化过程的影响[85]。在碳酸钙晶体沉积过程中，镁离子作为生长调节剂已经得到广泛的研究，被认为是对碳酸钙的形成具有关键性的作用。胶原蛋白对碳酸钙晶体的多晶型等方面没有显著影响，尽管能够抑制方解石的生长，但不会诱导文石相的结晶(图 3.26)。

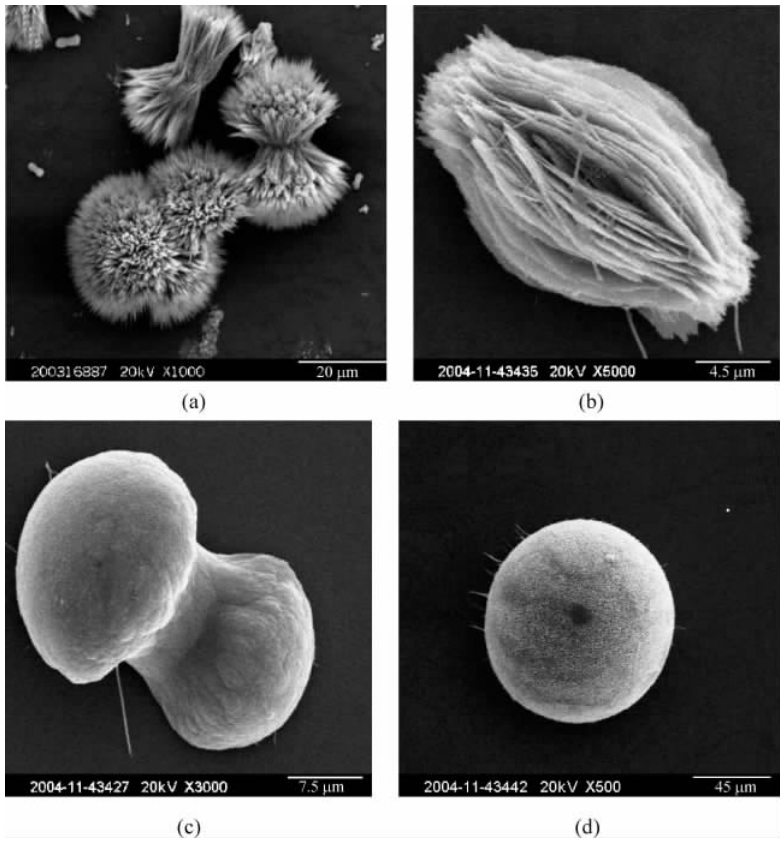


图　3.26

(a) 胶原浓度为 0.1 g/L 时得到的文石晶体；(b) 纺锤体形貌的文石晶体；(c) 镁/钙离子浓度比为 3∶1，胶原蛋白浓度为 0.1 g/L；(d) 镁/钙离子浓度比为 5∶1，胶原蛋白浓度＞1 g/L

此外还有一些实验，使用一般的金属离子，例如 Sr 或者 SO_4^{2-} 等负电性离子作为添加剂，研究其对碳酸钙沉积的影响，并且探讨其微观机理。

3.8.2　有机小分子作为添加剂

本节主要介绍使用简单氨基酸、表面活性剂作为添加剂对碳酸钙的沉积

结果进行分析的研究现状。

氨基酸按照 R 基所带电荷的负电性可分为酸性、中性和碱性三种。中性和碱性的氨基酸由于负电性偏正,与 Ca^{2+} 间的交互作用很小,对碳酸钙结晶的晶型和形貌影响很小;而酸性氨基酸由于带负电,可以与游离或者晶体表面的 Ca^{2+} 吸引,从而改变碳酸钙的结晶过程[86]。H. Tong 等[87]使用左旋天冬氨酸调制出了多孔的球文石球体,分析认为天冬氨酸与碳酸钙表面有着强烈的吸附作用,这种吸附作用抑止了方解石的形成,导致球文石晶相,同时,限制了球文石晶粒的尺寸,分散的颗粒团聚后形成多孔的结构。F. Manoli 等[88]研究了谷氨酸对碳酸钙结晶的影响,认为其稳定了球文石晶型。清华大学生物材料研究组使用珍珠层提取不可溶蛋白膜作为基底,开展了添加不同种类氨基酸的体外模拟矿化实验,生成了具有不同形貌的碳酸钙晶体,见图 3.27。

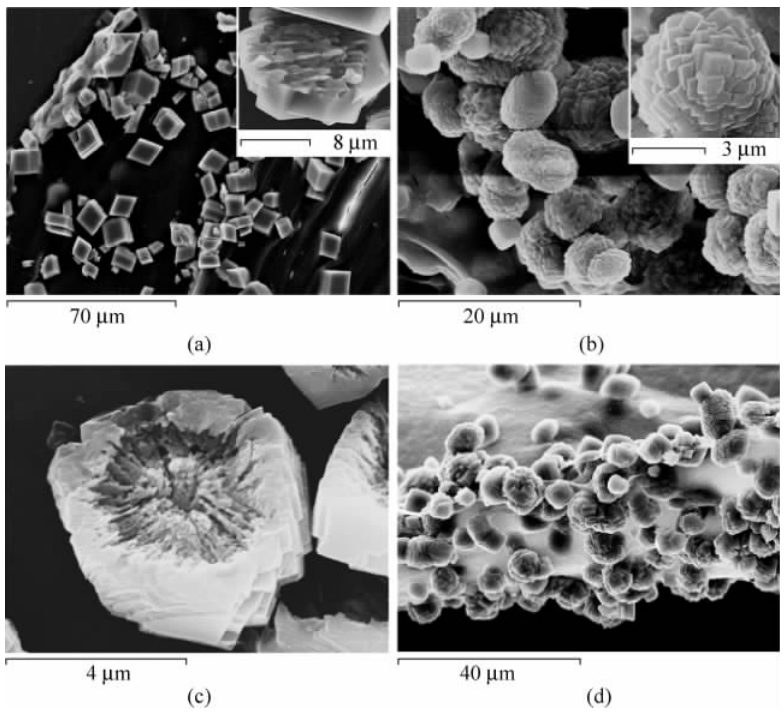


图 3.27　有机小分子做添加剂调制碳酸钙矿化

(a) 无添加;(b) 添加甘氨酸;(c) 添加甘氨酸;(d) 添加天冬氨酸[91]

表面活性剂的种类非常多,广泛应用于自组装领域,它是一种双亲分子,其分子链一端亲水、一端亲油,这种性质使其很容易聚集在固液、气液界面处,改变表面能,影响沉积过程,与氨基酸的表面吸附作用具有一定程度的类似。使用表面活性剂作为添加剂研究碳酸钙沉积的工作近年来刚刚展开,

S. Mann 等[89]制得了活性剂致稳的无定型碳酸钙纳米颗粒，这些几十纳米的颗粒在水溶液中可以转变为球文石的粒状或棒状颗粒，而晶粒的外型可以通过调节钙离子浓度、活性剂的浓度而达到。Jack J. J. M. Donners 等[90]使用了另一种表面活性剂，制得了致稳的无定型碳酸钙，并在几天后外部转变为方解石晶体。由于表面活性剂自组装形态的多样化，利用其控制碳酸钙的晶型和形貌也具有多样化的特点，具有广泛的研究前景。

3.8.3　生物大分子作为添加剂

使用人工合成或者生物体内的大分子对于碳酸钙晶体进行调控的主要手段是作为模板，其中最主要的是使用贝壳中的提取蛋白质。而使用人工合成大分子进行晶型和形貌控制的实验也主要是受生物启发的研究。

清华大学生物材料研究组[92]研究了Ⅰ型胶原蛋白存在时，生成的方解石形貌，发现方解石的表面台阶形貌随着胶原浓度的升高有着增多的趋势，因此推测胶原在台阶边缘的吸附会抑制台阶的推移。在研究珍珠层和鸵鸟蛋壳的基础上研究了生物大分子对碳酸钙形貌的调制作用，结果表明贻贝壳中提取的可溶蛋白调制碳酸钙晶体晶型、形貌和结晶取向，不可溶蛋白调制形核密度和晶粒尺寸。

清华大学生物材料研究组[93]提取了文石珍珠中的酸溶蛋白(ASM)和水溶蛋白(WSM)，并分别将其制备成一系列不同浓度的蛋白溶液(20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、150 μg/mL、200 μg/mL)，并利用上述两种不同浓度的可溶性有机基质溶液采用扩散法开展了碳酸钙的体外模拟矿化实验，以探讨两种可溶性有机质的浓度在控制 $CaCO_3$ 结晶方面的作用。通过扫描电子显微镜及显微共聚焦拉曼光谱等方法对体外模拟矿化结果进行了观察和分析。研究发现，不同浓度的酸溶蛋白对碳酸钙晶体形貌影响不大，对尺寸的影响略有不同，对晶型控制无明显作用(图 3.28)；水溶蛋白对碳酸钙晶体的晶型、形貌及尺寸均有显著影响。不同浓度的水可溶蛋白对碳酸钙晶体的形貌和尺寸影响较大，对晶型有一定的调控作用(图 3.29)。

Sukun Zhang 等[94]使用壳聚糖作为模板，发现没有添加剂时其不具有表面诱导作用；但用聚丙烯酸作为添加剂时，则诱导出了方解石和球文石晶体。分析认为吸附后的聚丙烯酸侧链羧基具有 SÅ 的周期结构，与方解石中的钙离子间距相同，这种结构诱导了钙离子的聚集和形核。

L. A. Gower 等[95]使用聚天冬氨酸沉积出了表面具有螺旋状坑洞的方解石，以及中空螺旋状形貌的球文石，在更高的聚天冬氨酸浓度下还可以在玻璃基底上形成膜层。分析认为这种形貌是由于晶核在溶液中沿着聚天冬氨酸表面形成并长大导致的。G. Falini[96,97]使用了含有聚天冬氨酸和聚谷

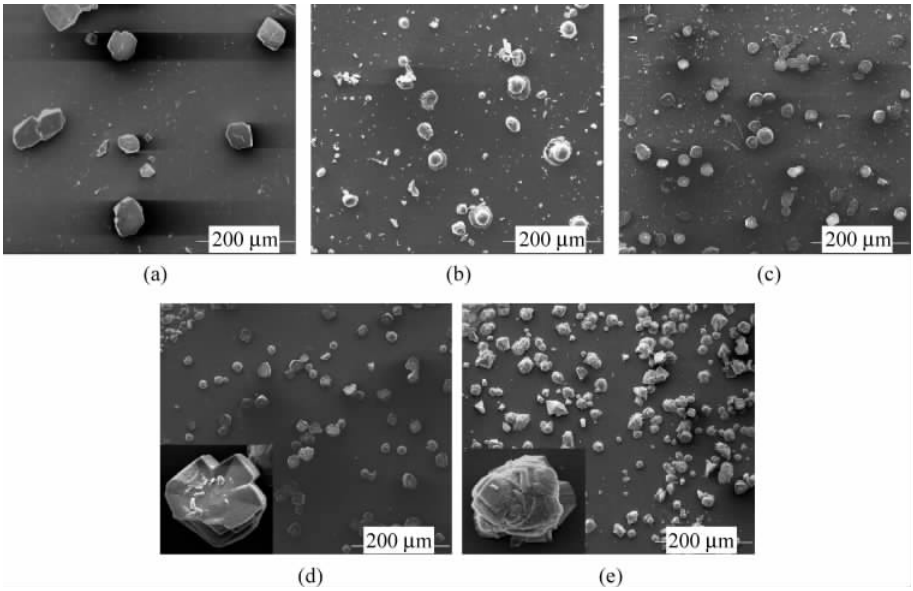


图 3.28　含不同浓度酸溶有机质的溶液中沉积的 $CaCO_3$ 的 SEM 照片

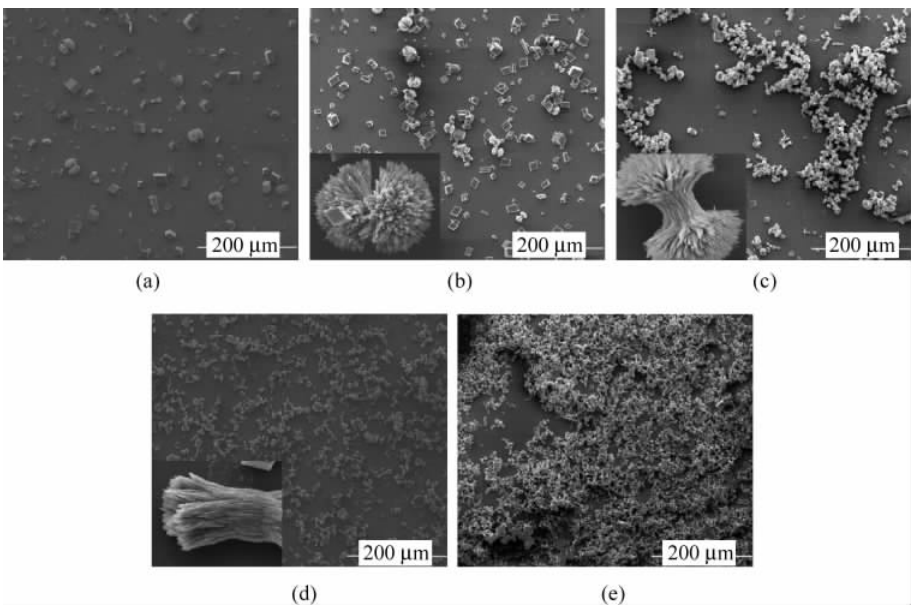


图 3.29　含不同浓度水溶有机质的溶液中沉积的 $CaCO_3$ 的 SEM 照片

氨酸的凝胶作为模板,通过改变凝胶中聚合物的含量,分别诱导出了具有一定取向的方解石、文石和球文石晶型,证明了微环境对决定晶体的晶型有着

重要的作用。T. Kato 等[82,98]使用几丁质作为基底，类似酸性大分子的聚丙烯酸作为添加剂，也得到了文石薄膜。

此外还有许多实验使用非生物相关的人造聚合物进行界面诱导的研究，例如聚丁二炔膜[99]等。

3.8.4　微印法实现结晶位点控制

前几节的研究内容主要集中在诱导矿化的机理方面，而使用胶印法控制固体表面的碳酸钙形成位点、大小、取向的研究则更倾向于工艺[100,101]，是本节要介绍的主要部分。

Aizenberg 等[102~105]所使用的胶印是使用具有微米图案结构的橡胶印，使用特制的“墨水”例如 $HS(CH_2)_nX$(X＝COOH、SO_3H、OH)，在基底上进行微接触印制以后，含硫的一端会连接在基底上，露出 X 基团，而未接触的部分需要用 $HS(CH_2)_nCH_3$ 清洗而露出甲基基团，这样的表面倒置于碳酸钙过饱和溶液中时，由于 X 基团对于钙离子的吸附、形核诱导作用，刻印过的部分会长出结晶而其他部分没有。

如图 3.30，实验中如果通过选用不同的基底和墨水，可以得到取向不同的方解石晶体；使用不同的图案的橡胶印也可以得到不同的结晶图案；使用不同的钙离子浓度，则可以控制晶粒的数量和大小。

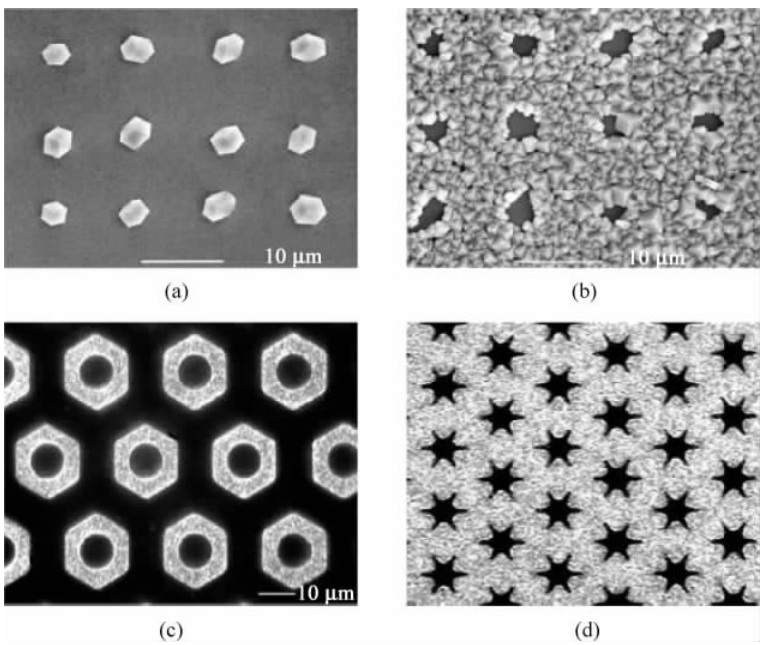


图 3.30　使用花样橡胶模板印出的方解石晶体图案[103]

S. M. D'Souza 等[106]使用的是另一种制印方法,首先在方解石或者文石的模板晶表面通过自组装形成膜层,然后使用交联剂将膜固定在聚合物上,通过酸溶除去模板晶体就得到了刻印面,刻印面置于碳酸钙过饱和溶液时就会在表面发生形核并长大为晶体。形成晶体的位置、大小等在很大程度上与模板晶类似,这种方法对于文石的结果不是很好。

3.8.5 纳米碳酸钙

纳米碳酸钙广泛应用于密封胶、塑料、橡胶、纸张、涂料、油墨改性以及医药补钙,其制备研究主要在国内展开[107,108]。

制备方法主要有物理粉碎、复分解法、间歇鼓泡碳化法、$Ca(OH)_2$ 吸收 CO_2、超重力碳化法、夹套反应釜法、乳液法、多级喷雾碳化法。目前工业生产上主要使用的是上述方法中的碳化法。

3.9 小结

有机基体调制的生物矿化过程已经将生命吸收的坚硬的无机材料(如骨、贝壳和牙齿)转换成为功能性结构。本章中,我们讨论过了有机基体的主要类型以及它们在控制无机形核的过程中的重要化学角色。一个普适的模型被提出来,其中有机基质由一类具有作为生物矿化形核表面的酸性大分子和一类作为结构构架的疏水大分子构成。不溶性的疏水大分子被用来分割细胞外的空间并且为机械支撑提供一个构架,而酸性的大分子则与周围过饱和溶液中的离子发生相互作用来影响形核的活化能势垒。

有机基体的结构构架起源于特殊种类建筑单元的交联,例如纤丝、纳米离子,这些结构是由具有独特分子和超分子结构的大分子构成的。例如,骨中的胶原由交错周期排列交联的 3 股胶原螺旋构成的纤维组成,每一股包含非共轴的具有重复三联体的诸如甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸的螺旋多肽。微小的羟基磷灰石晶体在胶原纤维上规则间隔的沟槽里形核。与此对照的是,在釉质中,羟基磷灰石晶体在一个自组装的纳米球中疏水基体中生长,基体是在生物矿化过程中从组织里逐渐迁移形成的。在贝壳的珍珠层中使用一种类型截然不同的结构基体,其中具有反平行排列的 β 折叠片结构的丝蛋白,富含丙氨酸和甘氨酸,被用来建造与几丁质纤维相结合的疏水层。

与上述疏水成分相联系的酸性大分子在细节上有很大的变化,但是有着类似的基因性质。例如,骨中非胶元质的糖蛋白富含诸如天冬氨酸、谷氨酸和硫酸盐的阴离子残基重复序列。类似的序列结构在釉质和某些贝壳蛋白质中被发现,有时候采用反平行 β 折叠二级结构。带有阴离子硫酸盐侧链的

蛋白多糖也大量的存在于骨中。显著的是，与硅藻中硅的矿化相关的大分子也是非常不同的。它们趋向于富含极性丝氨酸和苏氨酸残的蛋白质，或者是含有赖氨酸和精氨酸侧链的蛋白质，所有这些都能够与负电荷和羟基化的硅表面强烈的发生作用。

我们描述了有机表面如何通过包括在基体-核心表面的电荷匹配、极性、结构和立体化学在内的分子识别来降低无机形核的反应能量。在基体表面离子电荷的积累受配位体局部聚集的影响，反过来配位体局部聚集又依赖于有机基体的结构和形态。例如，在铁蛋白中氧化铁的形核涉及位于槽中的残余谷氨酸上的 Fe^{3+} 的静电积聚。如果基体配位体以规则距离相间隔，那么离子结合能够得到无机-有机界面上的产生取向形核的结构（几何）匹配。尽管立体化学因素也需要考虑，这一模型已经被提出，用于贝壳珍珠层中的反平行 β 折叠片蛋白质的表面上文石(001)面的形核。

在这一章的后半部分，我们也介绍了体外有机基质调制矿化的研究工作。从各种不同尺度的化学过程中产生出复杂的材料，并组装成更高等级的组织，生物矿化作用可以作为发展无机材料合成的类似策略的起点。例如，在生物矿化之前的超分子组装启发我们，基于有限域的化学反应和材料制备的想法。类似的，界面分子识别的概念也激发了许多科学家对相似的合成系统的研究，在这种系统中，功能有机表面被用于不同尺度上的形核构建的模板法控制。同样地，生物矿物形态和图样形成规律，激发了我们对于复杂无机材料形态学的研究。而与生物矿物构造学中多级处理的概念有关的是，预成型的晶体结构单元如无机纳米颗粒，所产生的组织结构体系的远程化学构建。

总之，在矿物-基体界面上可能发生静电、几何和立体化学方面的重现过程，要了解这些相互作用，很大程度上要依靠于组装的有机表面和无机聚集体表面结构的确切了解。进一步，合成体系在这方面的应用将导致无机材料有组织、有取向聚集体的新的制作过程。

参 考 文 献

[1] Weiner S and Dove P M. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. Rev Mineral Geochem, 2003, 54: 1～29.

[2] Calvert P. Biomimetic ceramics and composites. MRS Bulletin ⅩⅦ, 1992.

[3] Mann S. Biomineralization principles and concepts in bioinorganic materials chemistryed. New York: Oxford University Press, 2001.

[4] Wada K, Fujinuki T. Biomineralization in bivalve mollusks with emphasis on the chemical composition of the extrapallial fluid. In: Watabe N, and Wilbu K M ed.

The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants. Columbia: Univ. SC Press, 1976. 175～190.

[5] Crenshaw M A. The soluble matrix from mercenaria shell. In: K S F, ed. International symposium on problems in biomineralization. New York: Verlag, 1972.

[6] Collins M J, Westbroek P, Muyzer G, et al. Experimental evidence for condensation reactions between sugars and proteins in carbonate skeletons. Geochim Cosmochim, 1992, 56: 1539～1544.

[7] Sikes C S, Yeung M L, Wheeler A P. Inhibition of calcium carbonate and phosphate crystallization by peptides enriched in aspartic acid and phosphoserine. In: Sikes C S, Wheeler A P, ed. Surface reactive peptides and polymers: Discovery and commercialization, Washington: ACS Books, 1990, Ch. 5.

[8] Wheeler A P, Low K C, Sikes C S. $CaCO_3$ crystal-binding properties of peptides and their influence on crystal growth. In: Sikes C S, Wheeler A P, ed. Surface reactive peptides and polymers: Discovery and commercialization, Washington: ACS Books, 1990, Ch. 6.

[9] Fink D J, Arnold I C, Heuer A H. Eggshell mineralization: A case study of a bioprocessing strategy. MRS Bulletin ⅩⅦ, 1992.

[10] Bundy K J. Determination of mineral-organic bonding effectiveness in bone: theoretical considerations. Ann Biomed Eng, 1985, 13: 119～135.

[11] Walsh,W R Labrador D P, Kim H K, et al. Ultrasonic properties of cortical bone following fluoride ion treatment. Ann Biomed Eng, 1994, 22: 404～414.

[12] Vincent J, Structural Biomaterial. Princeton Univ. Press, 1990.

[13] Suga S, Watabe N. Hard Tissue Mineralization and Demineralization. Springer-verlag, 1992, 6: 101～105.

[14] Walsh W R, Ohno M, Guzelsu N. Bone composite behavior: effects of mineral organic bonding. J Mater Sci Mater Med, 1994, 5: 72～79.

[15] 沈同,王镜岩. 生物化学. 北京: 高等教育出版社, 1990.

[16] Vincent J. Structural Biomaterial. Princeton Univ. Press, 1990.

[17] 永井裕. 胶原蛋白实验方法. 上海: 中医学院出版社, 1992.

[18] 蒋挺大. 胶原蛋白, 北京: 化学工业出版社, 2001.

[19] Ottani V. Collagen structure and functional implication. Micron, 2001, 32: 251～260.

[20] Christiansen D L, Silver F H. Mineralization of an Axially Aligned Collagenous Matrix: a Morphological Study. Cells Mater, 1993, 3: 177～188.

[21] Lumenthal N C, Cosma V, Gomes E. Regulation of hydroxyapatite formation by gelatin and type I collagen gels. Calcif Tissue Int, 1991, 48: 440～442.

[22] limcher M J. The role of collagen and phosphoproteins in the calcification of bone and other collagenous tissues. In: Rubin R P, Weiss G B, Putney Jr J W, ed. Calcium in Biological Systems. New York: Plenum Press, 1985.

[23] Banks E, Nakajima S, Shapiro L C, et al. Fibrous apatite grown on modified collagen. Science, 1977, 198: 1164～1166.

[24] Roach H I. Why does bone matrix contain noncollagenous proteins? The possible

roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. Cell Biol Int, 1994, 18: 617～628.

[25] Boskey A L. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. Bone Min, 1989, 6: 111～123.

[26] Saito T, Yamauchi M, Crenshaw M A. Apatite induction by insoluble dentin collagen. Journal of Bone & Mineral Research, 1998, 13(2): 265～270.

[27] Weiner S, Traub W. Bone Structure: Angstroms to Microns. The FASEB Journal, 1992, 6: 879～883.

[28] Driessens F C M, R. M. H. Verbeeck. Biominerals, CRC Press, 1990.

[29] Carter D R, Spengler D M. Mechanical properties and composition of cortical bone. Clin Orthop, 1978, 135: 193～217.

[30] 杨克勤. 骨科手册. 上海：科学技术出版社，1983.

[31] 崔福斋,冯庆玲. 生物材料学. 北京：清华大学出版社,第五章，2004.

[32] Piez K A. The nature of the protein matrix of human enamel. J Dent Res, 1960, 39: 712.

[33] Eastoe J E. The amino acid composition of proteins from the oral tissues Ⅱ. The matrix proteins in dentine and enamel from developing deciduous human teeth. Arch Oral Biol, 1963, 8: 633～652.

[34] Eastoe J E. The chemical composition of bone and tooth. Adv. Fluorine Res Dent Caries Prevent, 1965, 3: 5～16.

[35] Snead M L, Lau E C, Zeichner-David M, et al. DNA sequence for cloned cDNA for murine amelogenin reveal the amino acid sequence for enamel-specific protein. Biochem Biophys Res Commun, 1985, 129: 812～818.

[36] Fukae M, Ijiri H, Tanabe T, et al. Partial amino acid sequences of two proteins in developing porcine enamel. J Dent Res, 1979, 58(B): 1000～1001.

[37] Zalut C, Henzel W J, Harris H W J. Micro quantitative edman manual sequencing. J Biochem Biophys Meth. 1980, 3: 11～30.

[38] Fincham A G, Belcourt A B, Termine J D, et al. Dental enamel matrix: Sequences of two amelogenin polypeptides. Biosci Rep, 1981, 771～778.

[39] Fincham A G, Belcourt A B, Termine J D, et al. Amelogenins: Sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. Biochem J, 1983, 211: 149～154.

[40] Catalano-Sherman J, Palmon A, Burstein Y, et al. Amino acid sequence of a major human amelogenin protein employing edman degradation and cdna sequencing. J Dent Res, 1994, 72: 1566～1572.

[41] Toyosawa S, O'hUigin C, Figueroa F, et al. Identification and characterization of amelogenin genes in monotremes, reptiles, and amphibians. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13056～13061.

[42] Simmer J P, Snead M L. Molecular biology of the amelogenin gene. In: Robinson C, Kirkham J, Shore R C, ed. Dental enamel, formation to destruction. Boca Raton: CRC Press, 1995, 59～84.

[43] Lagerström M, Dahl N, Iselius L, et al. Mapping of the gene for X-linked amelogenesis imperfecta by linkage analysis. Am J Hum Genet, 1990, 46: 120～125.

[44] Aldred M J, Crawford P J, Roberts E, et al. Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). Hum Genet, 1992, 90: 413～416.

[45] Lench N J, Winter G B. Characterisation of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). Hum Mutat, 1995, 5: 251～259.

[46] Collier P M, Sauk J J, Rosenbloom S J, et al. An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. Arch Oral Biol, 1997, 42: 235～242.

[47] Lench N J, Brook A H. DNA diagnosis of X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). J Oral Pathol Med, 1997, 26: 135～137.

[48] Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. Int J Dev Biol, 1995, 39: 127～133.

[49] Cerny R, Hammarström L. NCBI Protein Database, Accession No. AJ012200, 1999.

[50] Salido E C, Yen P H, Koprivnikar K, et al. The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. Am J Hum Genet, 1992, 50: 303～316.

[51] Fukae M, Tanabe T. ^{45}Ca-labeled proteins found in porcine developing dental enamel at an early stage of development. Adv Dent Res, 1987, 1: 261～266.

[52] Fukae M, Tanabe T. Nonamelogenin components of porcine enamel in the protein fraction free from the enamel crystals. Calcif Tissue Int, 1987, 40: 286～293.

[53] Krebsbach P H, Lee S K, Matsuki Y, et al. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin—a novel tooth-specific gene. J Biol Chem, 1996, 271: 4431～4435.

[54] MacDougall M, DuPont B R, Simmons D, et al. Ameloblastin gene (AMBN) maps within the critical region for autosomal dominant amelogenesis imperfecta at chromosome 4q21. Genomics, 1997, 41: 115～118.

[55] Moradian-Oldak J, Simmer P J, Sarte P E, et al. Specific cleavage of a recombinant murine amelogenin by a protease fraction isolated from bovine tooth enamel. Arch Oral Biol, 1994, 39: 647～656.

[56] Robinson C, Kirkham K. Enamel matrix components, alterations during development and possible interactions with the mineral phase. In: Fearnhead R W, Suga S eds. Tooth enamel Ⅳ. New York: Acad. Press, 261～265.

[57] Huang L J, Ii H D. The Microstructure of Biomineralized Bivalvia Shells, MRS Symp Proc, 1989, 174: 164～167.

[58] 沈方宏. 胶原蛋白调制碳酸钙晶体生长的研究. 清华大学硕士论文,2002.

[59] Simkiss K, Wilbur K M. Biomineralization: Cell Biology and Mineral Deposition. Academic Press, Inc. 1998.

[60] Meenakshi V R, Hare P E, Wilbur K M. Amino acids of the organic matrix of neogastropod shells. Comp Biochem Physiol, 1971, 40B: 1037～1043.

[61] Weiner S, Hood L. Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: A

potential template for shell formation. Science, 1975, 190: 987～989.

[62] Keith J, Stockwell S, Ball D. Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. Comp Biochem Physiol, 1993, 105B: 487～496.

[63] Weiner S, Addadi L. Design strategies in mineralized biological materials. Journal of Materials Chemistry, 1997, 7: 689～702.

[64] Lowenstam H A, Weimer S. On Biomineralization. Oxford: Oxford University Press, 1989.

[65] Huang L J, Li H D. Observation of the Phase Transformation in the Growth of a Biomineralized Calcium Carbonate. Biochem Biophys, 1991, 176: 654～657.

[66] Mann S, Webb J, William R J P. Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives. VCH Poblishers, 1989, 7: 177～179.

[67] Veis A, Perry A. The phosphoprotein of the dentin matrix. Biochemistry, 1967, 6(8): 2409～2416.

[68] Termine J D, Belcourt A B, Conn K M, et al. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calfbone. J Biol Chem, 1981, 256(20): 10403～10408.

[69] Levi Y, Falini G, Addadi L, et al. Structure of the Nacreous Organic Matrix of a Bivalve Mollusk Shell Examined in the Hydrated State Using Cryo-TEM. Journal of Structural Biology, 2001, 135: 8～17.

[70] 乔莉. 淡水球文石珍珠结构及其矿化机理研究. 清华大学博士论文,2009.

[71] 李卓. 鲤鱼耳石分级结构及其蛋白调控碳酸钙生物矿化机制的研究. 清华大学博士论文,2008.

[72] Aizenberg J, Lambert G, Addadi L, et al. Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates. Adv Mater, 1996, 8: 222～226.

[73] Krampitz G, Graser G. Molecular mechanisms of biomineralization in the formation of calcified shells. Angew Chem, Int Ed Engl, 1998, 27: 1145～1156.

[74] Wentao Hou, Qingling Feng. Effect of glycine and solution height on the polymorphs of calcium carbonate in CO_2-diffusion precipitation. 1999, JCG, 282(1-2): 214～219.

[75] Hartman P. Crystal Growth: An Introduction. In: Hartman P, ed. Amsterdam: North-Holland series in Crystal Growth, 1973, 1.

[76] Feng Q L, Wang H, Cui F Z, et al. Controlled crystal growth of calcium phosphate on titanium surface by NaOH-treatment. Journal of Crystal Growth, 1999, 200(3-4): 550～557.

[77] Li F, Feng Q L, Cui F Z, et al. A simple biomimetic method for calcium phosphate coating. Surface and Coatings Technology. 2002, 154(1): 88～93.

[78] Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, et al. Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. Nature, 1996, 381: 56～58.

[79] 翟怡, 张金利. 自组装单层膜的制备与应用. 化学进展, 2004, 16(4): 107～114.

[80] 欧阳健明. 自组装膜调控下生物矿物晶体的生长. 化学进展, 2005, 17(3): 563～572.

[81] Lemos A F, Ferreira J M F. Porous bioactive calcium carbonate implants processed by starch consolidation. Materials Science and Engineering C, 2000, 11: 35～40.

[82] Sugawara A, Kato T. Aragonite $CaCO_3$ thin-film formation by cooperation of Mg^{2+} and organic polymer matrices. Chemical Communications, 2000, 6: 487～488.

[83] Raz S, Weiner S, Addadi L. The transient phase of amorphous calcium carbonate in sea urchin larval spicules: the involvement of proteins and magnesium ions in its formation and stabilization. Advanced functional materials, 2003, 13: 480～486.

[84] Meldrum F C. Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. Journal of Crystal Growth. 2001, 231: 544～558.

[85] 焦云峰. 胶原蛋白-镁离子体系中碳酸钙矿化过程研究. 清华大学硕士论文,2005.

[86] 王静梅,姚松年. 壳聚糖-氨基酸体系中碳酸钙模拟生物矿化的研究. 无机化学学报, 2002, 18(3): 249～254.

[87] Tong H, Ma W T, Wang L L,et al. Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a L-aspartic acid inducing process. Biomaterials, 2004, 25: 3923～3929.

[88] Manoli F, Dalas E. Calcium carbonate crystallization in the presence of glutamic acid. Journal of Crystal Growth, 2001, 222: 293～297.

[89] Li M, Mann S. Emergent nanostructures: Water-induced mesoscale transformation of surfactant-stabilized amorphous calcium carbonate nanoparticles in reverse microemulsions. Advanced functional materials, 2002, 12(11-12): 773～779.

[90] Donners J J J M, Heywood B R, Meijer E W, et al. Control over calcium carbonate phase formation by dendrimer/surfactant templates. Chemistry-A European Journal, 2002, 8(11): 2561～2567.

[91] Hou W T, Feng Q L. Morphological and growth model of biominetic fabricated calcite crystals using amino acids and insoluble matrix membranes of mytilus edulis. Crystal Growht &Design, 2006,6(5): 1086～1090.

[92] Shen F H, Feng Q L, Wang C M. The modulation of collagen on crystal morphology of calcium carbonate. Journal of Crystal Growth. 2002, 242: 239-244.

[93] 马玉菲, 高永华, 任冬妮, 冯庆玲. 淡水文石珍珠可溶性有机质对 $CaCO_3$ 结晶的影响. 岩石矿物学杂志, 2009, 28(6): 605～610.

[94] Zhang S, Gonsalves K E. Synthesis of calcium carbonate-Chitosan composites via biomimetic processing. Journal of Applied Polymer Science, 1995, 56: 687～695.

[95] Gower L A, Tirrell D A. Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly (aspartate). Journal of Crystal Growth, 1998, 191: 153～160.

[96] Falini G. Crystallization of calcium carbonates in biologically inspired collagenous matrices. International Journal of Inorganic Materials, 2000, 2: 455～461.

[97] Falini G, Fermani S, Gazzano M, et al. Oriented crystallization of vaterite in collagenous matrices. Chemistry-A European Journal, 1998, 4(6): 1048～1052.

[98] Kato T. Polymer/calcium carbonate layered thin-film composites. Advanced Materials, 2000, 12(20): 1543～1546.

[99] Berman A, Ahn D J, Lio A, et al. Total alignment of calcite at acidic

polydiacetylene films: Cooperativity at the organic-inorganic interface. Science, 1995, 269: 515～518.

[100] Addadi L, Weiner S. Micro-printing with crystal inks. Nature, 1999, 398: 461～462.

[101] Lee I, Han S W, Lee S J, et al. Formation of patterned continuous calcium carbonate films on self-assembled monolayers via nanoparticle-directed crystallization. Advanced Materials, 2002, 14(22): 1640～1643.

[102] Aizenberg J, Black A J, Whitesides G M. Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers. Nature, 1999, 398: 495～498.

[103] Aizenberg J. Patterned crystallization of calcite in vivo and in vitro. Journal of Crystal Growth, 2000, 211: 143～148.

[104] Aizenberg J, Muller D A, Grazul J L, et al. Direct Fabrication of large micropatterned single crystals. Science, 2003, 299(5610): 1205～1208.

[105] Aizenberg J. Crystallization in patterns: a bio-inspired approach. Advanced Materials, 2004, 16(15): 1295～1302.

[106] D'Souza S M, Alexander C, Carr S W, et al. Directed nucleation of calcite at a crystal-imprinted polymer surface. Nature, 1999, 398: 312～316.

[107] 张强，刘永美. 纳米碳酸钙的制备及其应用进展. 化学工业与工程技术，2005，26(3)：30～33.

[108] 陈立军，张心亚，黄洪，等. 纳米碳酸钙制备技术评述. IM&P 化工矿物与加工，2005，1：1～21.

第 4 章　生物矿化的细胞调控

4.1　引言

细胞是生命活动的基本单位，一切高等生物的生长、发育等生命活动都是以细胞的增殖、分化和凋亡为基础的。在有机体一切代谢活动与执行功能的过程中，细胞呈现为一个独立的、有序的、自动控制性很强的代谢体系。细胞代谢过程贯穿于生物体的整个生命活动中，与组织形成和个体发育密切相关。细胞代谢过程包括细胞的形成、生长、增殖、分化和凋亡等一系列细胞活动。

细胞代谢在生物矿化过程中发挥着不可替代的作用。首先，细胞的一个主要功能就是合成分泌各种蛋白质。在生物矿化系统中，起模板作用的框架蛋白和调控作用的功能蛋白都是由相应的细胞合成并分泌的。在不同发育时间，组织中存在的细胞类型可能不同，分泌的蛋白也不同。因此，在特定时间和空间，由特定的细胞类型分泌特定的蛋白，对矿化起着特定的作用，不过其细节的机理目前还在研究之中[1]。其次，直接参与矿化的细胞活动对于矿化组织分级结构的形成有着重要的影响。例如在对牙釉质分级结构的研究中知道，基因、蛋白和细胞对于牙釉质从纳米尺度到宏观尺度上分级组装结构的形成起着重要的作用。牙釉质在介观尺度上的分级与细胞水平上的调控作用有关。成釉细胞的活动包括：有序分泌作用；成釉细胞间的相互作用；成釉细胞和胞外基质间的相互作用；向牙本质方向迁移等。成釉细胞控制牙釉形成过程和生长方向，指导牙釉柱的形成，将在后文中作详细介绍。此外，非直接参与矿化的细胞在代谢过程中也会根据矿化的程度等释放特定的信号蛋白等调节因子，激活相关的信号通道，进而启动矿化调控的其他环节。

目前，关于生物矿化的细胞调控研究大多是与脊椎动物有关的磷酸钙系统有关的细胞，本章将集中这部分内容。对非脊椎动物有关的体系，如软体动物贝壳矿化相关细胞研究近年来有所增加，并发现两种动物相关蛋白有密切联系，相关文献可见[2～4]。

4.2　矿化相关蛋白的细胞合成与分泌

4.2.1　蛋白质的合成

目前，关于蛋白质生物合成的了解已很深入[5]。蛋白质生物合成包括氨基酸的活化及其与专一转运核糖核酸（tRNA）的连接，肽链的合成（包括起始、延伸和终止）和新生肽链加工成为成熟的蛋白质三大步骤。其中心环节是肽链的合成。在细胞核中，编码蛋白的信息从 DNA 转录到 RNA。RNA 进行转录后修饰形成成熟的信使 RNA（简写为 mRNA），后者从核孔进入细胞质，与核糖体结合起来。核糖体是细胞内利用氨基酸合成蛋白质的场所。氨基酸通过 tRNA 运送到核糖体中的 mRNA 上，并通过 mRNA 上 3 个碱基的密码子和 tRNA 上 3 个碱基的反密码子进行专一性的配对识别。tRNA 只能识别并转运 1 种氨基酸进入到核糖体以后，就以信使 RNA 为模板，按照碱基互补配对原则，把转运来的氨基酸放在相应的位置上。转运完毕以后，转运 RNA 离开核糖体，又去转运下一个氨基酸。当核糖体接受 2 个氨基酸以后，第 2 个氨基酸就会被移至第 1 个氨基酸的位置上，并通过肽键与第 1 个氨基酸连接起来，与此同时，核糖体在信使 RNA 上也移动 3 个碱基的位置，为接受新运载来的氨基酸做好准备。上述过程如此往复地进行，肽链也就不断地延伸，直到信使 RNA 上出现终止密码子为止。

在核糖体上翻译出的蛋白质，进入内质网腔，经过加工，如糖基化、羟基化、酰基化和二硫键的形成等修饰加工过程后才能成为比较成熟的蛋白质。糖基化伴随着多肽链的合成同时进行，是内质网中最常见的多肽链加工方式。然后，内质网腔膨大、出芽形成具膜的小泡，包裹着蛋白质转移到高尔基体，当多肽链被输送到高尔基体腔后，在内质网腔中加在多肽链上的寡糖链，还要再进行一系列复杂的加工。接着，高尔基体边缘突起形成小泡，把蛋白质包裹在小泡里，运输到细胞膜，小泡与细胞膜融合，把蛋白质释放到细胞外。这样一个具有一定氨基酸顺序的，有一定功能的蛋白质分子在细胞中合成并释放出来（图 4.1）。

4.2.2　胶原的合成

胶原在脊椎动物体内硬组织的矿化过程中起到重要的作用，下面我们对胶原的表达合成作一论述。已知有 20 多种胶原蛋白，下面以脊椎动物体内含量最多的Ⅰ型胶原为例说明[6]。

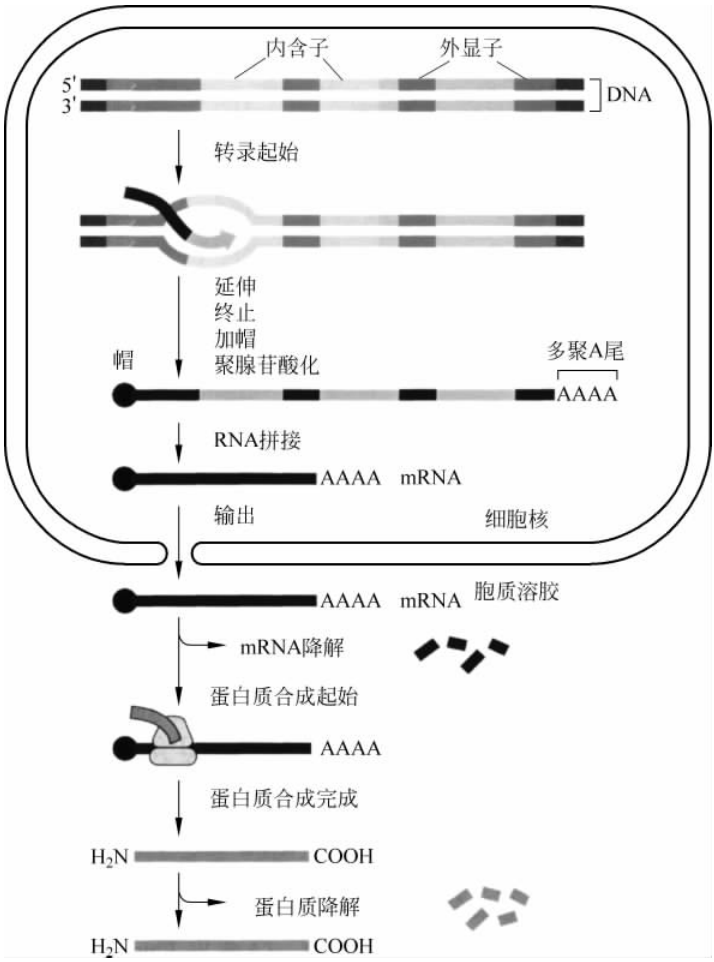


图 4.1　蛋白质的合成过程示意图

(1) 胶原的基因表达

纤维状胶原有很长的基因,是功能 mRNA 的 10 倍长。图 4.2 说明胶原的基因是由多个含 54 个碱基对的单元所组成,每个碱基对对应 18 个氨基酸的序列。在成胶原细胞的自由核糖体中。基因被翻译成约 15 万～30 万个氨基酸残基的独特序列。例如,鸡的 α2(Ⅰ)胶原基因是长为 38 kb,含有一系列外显子,是迄今分离出的最复杂的基因之一。其外显子长度多数为 54 基对,并被较长的内含子(80～2 000 bp)隔开。这样规则和规格一致的胶原分子竟然是由如此复杂,划分为如此众多的区域的基因所控制,的确令人惊奇。特别值得注意的是,α2 链基因中绝大多数外显子具有相同的长度。这个发现说明,胶原的原始基因应是由含 54 bp 的外显子多次复制而组装起来的,1 个原

生外显子很可能含有 6 次编码 gly-pro-pro 三肽的信息(3 bp×3 密码子×6 三肽)。这样组成 18 个氨基酸的多肽,可能是形成 3 股螺旋稳定结构所需的最短的肽链。已经观察到的事实表明,54 bp。外显子构造可能是所有具有带状周期结构纤维亚单元的胶原基因的共同特征。

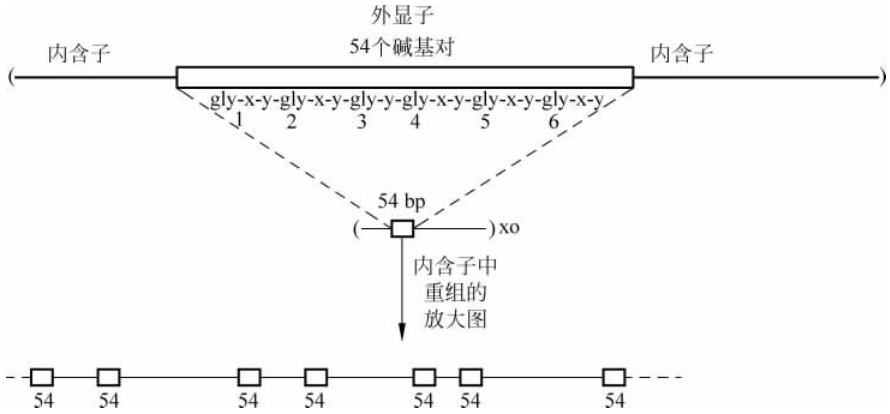


图 4.2　胶原的基因中含有 54 个碱基对的单元示意图

翻译过程见图 4.3。DNA 的遗传信息转录到约含 3 000 b 的功能 mRNA 上,对应特定胶原链的 mRNA 被移位在细胞质上,再被翻译到粗内质网(rER)多核糖体。粗内质网上合成蛋白质是在特定酶催化下进行的。例如,羟基赖氨酸和羟基脯氨酸不能自动掺入多肽,而必须在赖氨氢氧化酶调制下形成肽键后,通过赖氨酸及脯氨酸的羟基化而实现。肽链合成时延伸方向为从 N 端向 C 端。一个完全的原 α 链的合成时间约为 6.7 min。

在内质网上,新形成的多肽可能遭到糖基化修饰,如羟基赖氨酸残基被修饰成羟赖氨酸功能团。糖苷化作用是在两个特定的酶催化下实现的。这两个酶是半乳糖苷转移酶和葡萄糖苷转移酶。经过翻译、改性和修饰而成的原 α 链能形成二硫键。已测定,成纤维细胞中从 α 键形成后开始,3 股螺旋形成过程约需 8～9 min。

随后是 3 股螺丝胶原分子排出细胞的过程。在成胶原纤维细胞中,原胶原分子在核糖体上的粗内质网上形成后,被 N 端一段肽段(信号肽)控制定向输送。经过转移内质网的微腔,向高尔基体移动。在高尔基体中,原胶原分子的 C 端可能受到修饰完善,几个分子被高尔基体中的小囊泡包在一起,向细胞膜运动。在细胞骨架运动下,小囊泡向细胞膜运动,同时其中的原胶原分子并排集结成纤维晶粒。小囊泡和细胞膜接触后,由外吐作用排出。排出后,取向相同的聚集在一起的原胶原分子进一步自组装成具有有序排列的微纤维。这个自组装过程的机理,仍然是值得深入探讨的课题。

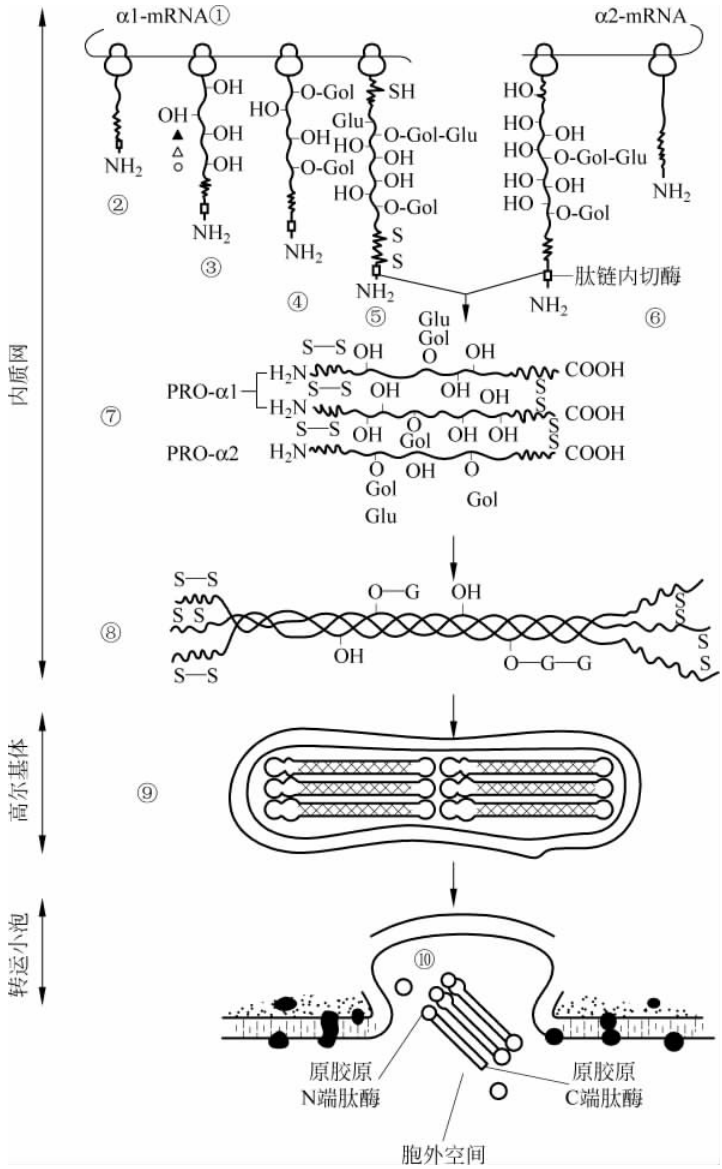


图 4.3　胶原的生物合成过程

① 合成特定 mRNA 以形成各种原胶原链；② 翻译信号到粗内质网的多核糖体上；③ 脯氨酸羟基化；④ 羟基赖氨酸糖基化；⑤ 去掉 N 端信号肽；⑥ 从核糖体上组装成完整的 α 链；⑦ C 端和二硫键交联识别三股 α 链；⑧ 三股螺旋形成；⑨ 细胞内原胶原分子转移及包入囊泡；⑩ 囊泡与细胞膜融合并排出，同时由特定肽酶撤去非螺旋 C 端和部分 N 部

4.3　生物矿化中的细胞调控作用

4.3.1　细胞分泌蛋白与生物矿化组织

细胞分泌蛋白到胞体外，多数构成细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的主要成分。细胞外基质是由生物大分子构成的错综复杂的网络。为细胞的生存及活动提供适宜的场所，并通过信号转导系统影响细胞的形状、代谢、功能、迁移、增殖和分化。构成细胞外基质的大分子种类繁多，可大致归纳为四大类：胶原、非胶原糖蛋白、氨基聚糖与蛋白聚糖，以及弹性蛋白。在生物体内，细胞外基质是完全动态的，处于不断地更新过程中，在组织修复和胚胎发育的过程是重要的支撑结构。

矿化组织的有机相主要是由胶原和非胶原基质蛋白构成，还有一定量的多糖。骨、牙本质有机物中主要是Ⅰ型胶原，软骨主要包含Ⅱ型胶原，珐琅质中几乎不含有胶原。非胶原基质蛋白决定不同矿化组织的特殊性质，在细胞分化和矿化活性等过程中起到关键作用，其表达在时间和空间受到严格的控制。它们的顺序表达依赖于产生细胞的位置和分化阶段。生成矿化组织胞外基质的多数细胞源于骨髓间充质干细胞（mesenchymal stem cells），亦称间叶细胞，包括形成骨的成骨细胞和形成软骨的软骨细胞；源自牙的成牙本质细胞和成牙骨质细胞形成牙本质和牙骨质。只有生成珐琅质的成釉细胞是源自上皮组织。

尽管矿化组织在化学组成上是相近的，但它们之间存在诸多基本差异。它们的发育途径不同。软骨内骨形成过程中，软骨支架形成并矿化。接着，矿化的软骨被破骨细胞吸收然后被骨替换。牙齿的矿化组织是直接形成的。细胞分泌组织的有机成分，羟基磷灰石晶体在有机成分的框架中沉积成为一体。牙的矿化组织在正常环境下不经历重塑过程（比如组织的活性合成和再吸收），而这在骨中是一个连续不断的过程。

转录编码釉原蛋白（amelogenin，AG）和骨基质蛋白如骨涎蛋白（bone sialoprotein，BSP），骨发生蛋白（osteogenic Protein，OP），骨联蛋白（osteonectin，ON）的发育性表达是由合成矿化基质相关的细胞合成，它们的合成在时间和空间上受到严格控制。这种表达的控制反映出这些蛋白在相应组织在矿化过程中履行的作用。

骨桥蛋白（osteopontin，OPN）和骨涎蛋白（BSP）是含有两个 RGD 的涎蛋白，存在于骨基质中。骨桥蛋白是骨中重要的非胶原蛋白之一，获得广泛的表达。它具有很多的功能，比如通过整合素受体绑定细胞，或调控矿化组织的形成和构型。当细胞信号通路被象乙酸肉豆蔻佛波醇（phorbol myristate

acetate, PMA) 的一些激活剂激活后,骨桥蛋白可以加大表达量。而且,OP在转化细胞中的表达也提高。OP和BSP在先前被认为是成骨细胞系的细胞标志,其实它们在肥大软骨细胞(hypertrophic chondrocytes)也有表达。OP和BSP在时间和空间上的表达揭示了其与骨基质的形成相关,并可作为破骨细胞的附着位点。

ON的表达在多种细胞类型中可检测到。它在矿化组织细胞如成骨细胞、软骨细胞和成牙质细胞中有表达,同时在非矿化组织细胞也有表达,比如它是血小板的主要产物。ON蛋白中低或高亲和钙位点的存在说明它在矿化中的作用。由于ON对羟基磷灰石和Ⅰ型胶原的亲和性,它可能控制骨组织中的矿化[7]。

4.3.2 骨矿化过程中的细胞调控作用

基因在骨的矿化发育和生长过程起到了重要的调控作用,然而骨的所有矿化过程均在细胞及其细胞外基质中发生,并接受其严格的控制,包括基因的调控作用也必须通过细胞的活动方式来起作用。因此,细胞在骨的形成、生长、吸收、重塑等主要生理过程中扮演了极其重要的角色。在成熟过程中的和已成熟的骨组织内,已经发现了5种骨的细胞[8],它们分别是:骨祖细胞、成骨细胞、骨细胞、破骨细胞和骨衬细胞。可以说正是各种细胞复杂而精确的配合活动构建了复杂的骨组织系统,并使其保持稳定的平衡状态以担当起极重要的功能。

4.3.2.1 骨的细胞

1. 骨祖细胞

骨祖细胞(osteoprogenitor cell)又称前骨母细胞,主要存在于内骨膜、外骨膜这些骨表面,其细胞层厚度随年龄和所在骨表面不同而有所不同。骨膜中的骨祖细胞来源于骨膜内的多向分化潜能间充质细胞。现有研究证明,骨膜血管周围的周细胞也具有和骨细胞一样的分化为成骨细胞的能力。骨髓基质中也有大量的骨祖细胞,骨髓中的骨祖细胞由骨髓内具有多向分化潜能的基质干细胞分化而来。由骨膜及骨髓来源的骨祖细胞分化后可直接通过膜化成骨的方式成骨,而不需要其他诱导物的存在。具有这样性质的骨祖细胞称为定向骨祖细胞(determined osteoprogenitor cell,DOPC)。与之相反,体内还有一类骨祖细胞出现于病理性状态,例如易位骨化、骨折修复等,其来源于全身各处组织内的未分化间充质细胞。这类骨祖细胞经过骨诱导因子如BMP的作用,才可以分化为成骨细胞,其成骨方式也不同于DOPC,而是通过软骨骨化的方式成骨,所以我们称这类骨祖细胞为诱导性骨祖细胞

(inducible osteoprogenitor cell,IOPC)。骨祖细胞有分裂繁殖和进一步分化成为专一功能细胞的能力,进一步能分化为成骨细胞。光镜观察的结果显示,骨祖细胞与成纤维细胞以及内皮细胞形态近似,均表现为:细胞长,有卵圆形或长形细胞核,核与胞质淡染。电镜下,骨祖细胞有一些内质网和不发达的高尔基体,较多的线粒体以及游离核糖体。此外,也有研究结果认为骨祖细胞也可能转化为破骨细胞。

2. 成骨细胞

成骨细胞又称骨母细胞,是形成骨组织的细胞。成骨细胞能合成并分泌骨基质,并且参与骨的矿化,调节发育中的骨的钙,磷酸根离子平衡。成骨细胞来源于骨祖细胞,由骨祖细胞分化而来。影响骨祖细胞转化的因素很多,如各种激素以及骨折后局部释放的生物活性物质等。当受到这些因素影响时,骨祖细胞可以大量进行繁殖,并开始分化为成骨细胞,执行造骨功能。成骨细胞属于功能细胞,因此很少进行分裂增殖。

成骨细胞形态多样,一般呈立方形、圆形或扁平状、柱状,直径为 20～50 μm。处于功能旺盛期的成骨细胞形态丰满,细胞质为碱性,这可能与成骨细胞的胞浆含有大量核蛋白体和粗面内质网有关。胞浆内有一个圆形或椭圆形,体积较大,但染色较淡的细胞核,核内一般有 1～3 个核仁。成骨细胞的细胞核通常位于远离新生骨一侧。

成骨细胞通常存在于新生骨的表面,呈单层排列。成骨细胞表面可见很多短茸毛突起与相邻细胞相连,穿透周围骨样组织,从而形成网状结构。当骨样组织完全埋没成骨细胞时,它就逐渐转变为骨细胞,胞突位于骨小管内。细胞微结构研究表明,成骨细胞的细胞质内细胞器很丰富,胞浆内充满发育良好的粗面内质网,同时还存在大量附着于粗面内质网的核蛋白体和游离的核蛋白体。成骨细胞的高尔基体增宽,并形成空泡,位于细胞中部。成骨细胞的线粒体为圆形,此外还有溶酶体、空泡和糖原颗粒。成骨细胞的这些结构特点表明成骨细胞具有旺盛的合成和分泌蛋白的功能。粗面内质网以及核蛋白体能合成胶原前体,转移到高尔基体进行加工并进而合成胶原原纤维。胶原原纤维然后经分泌性空泡转移到细胞外,再转化成胶原,从而最终构成骨的胶原框架。成骨细胞内存在大量的线粒体,这说明成骨细胞有较高的代谢活性。成骨细胞线粒体内含有 30～50 nm 的钙磷颗粒,现在认为它能将钙磷转运到矿化部位,对基质矿化有重要影响。线粒体内颗粒出现于软骨细胞肥大和即将矿化之前,而基质小泡在有钙沉积时减少。基质小泡先于矿化形成,可能由胞浆突起的脱落或者某种细胞器排出形成,内含钙磷和多种酶。所以我们认为线粒体内钙质可输运至高尔基体,与膜结合后排出细胞,从而释放钙磷诱导矿化。线粒体内颗粒的形成是由于线粒体内钙与磷结合

形成沉淀的结果。维持胞浆内钙离子浓度始终在10^{-6}～10^{-7} mol/L水平上,是线粒体的主要功能之一,这是通过膜结构上钠-钙交换以及钙-镁ATP酶作用来实现的。只要胞浆内钙有瞬时升高,线粒体即可以吸收钙,而当胞浆的钙水平下降时,它又可以释放钙。当线粒体内钙浓度增加到一定程度时,就可以与磷酸根离子结合形成磷酸钙矿化颗粒。骨中细胞由于受激素的影响,胞浆内常有大量的线粒体磷酸钙颗粒。对焦锑酸钾固定的成骨细胞样本观察结果发现,线粒体颗粒增多,而位于已矿化的骨质附近的成骨细胞,线粒体颗粒通常减少,这就有力地证明了这些颗粒释放参与了骨矿化过程。成骨细胞的突起以及表层细胞内均有成束的微丝和微管,借此,可起到细胞间物质的传递作用。

组织化学研究表明,功能活跃的成骨细胞胞浆内有丰富的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP),当合成功能停止时,碱性磷酸酶便消失了。碱性磷酸酶被认为对骨的矿化有重要作用,其作用机理可能是降解矿化抑制因子以及促进基质释放磷酸根离子,增加局部钙和磷酸根离子的浓度,促进矿化微晶的形成。此外,胞浆内还有酸性水解酶、磷酸化酶、葡萄糖合成酶和胶原酶等多种酶组分。

从成骨细胞的形态,构造可以推断它的功能是合成并分泌骨胶原和有机基质,并参与矿化。而且成骨细胞的形态与功能相当一致,当功能旺盛时,成骨细胞呈立方形,并合成细胞间质,自身埋于其中,逐渐转化为骨细胞。当功能静止时,成骨细胞贴于骨表面,形状扁平,此时的成骨细胞成为静止骨细胞。此层骨细胞具有分隔血管与骨组织之间的膜样功能。营养物质、矿物质、水可以通过成骨细胞伸入骨组织内的突起,从血液输运到细胞。

3. 骨细胞

骨细胞来源于成骨细胞,成骨细胞在形成骨组织的过程中将其自身埋于组织中,它自身的结构与功能也产生了转变,逐渐演变成为骨细胞。

幼稚期骨细胞仍具有活动性成骨细胞的形态,有较多细胞突起,内质网发育良好,高尔基体体积大,线粒体数量多,有较多空泡,仍具备产生细胞间质的能力。幼稚期骨细胞多位于基质的吸收陷窝内,由于陷窝壁的新骨沉积致使其体积变小,转化为比较成熟的骨细胞。较成熟的骨细胞位于矿化基质浅层,细胞体积进一步缩小,胞浆内粗面内质网减少,线粒体减少,高尔基体体积变小,但仍有多数细胞突起。成熟的骨细胞位于成熟板层骨内的骨陷窝中,细胞略呈扁平或卵圆形,长轴与板层骨的骨板平行,仍有较多突起,细胞核较大,胞浆略嗜碱,胞浆内粗面内质网极少,高尔基体不发达,线粒体较少,因而成熟骨细胞的蛋白合成功能低下。当骨细胞凋亡时,其细胞器空泡形成,此时的骨细胞处于变性期。骨细胞死亡后表现为陷窝空腔,细胞消失。

不同阶段骨细胞的功能不同，在骨细胞成熟后，其周围可见基质降解的产物，致使陷窝扩大，而且常与破骨细胞的骨吸收同时存在，这就是骨细胞性骨吸收。此时的骨细胞称为吸收期骨细胞。骨细胞性骨吸收会引起矿物盐释放，进而调节血清钙。研究证明，甲状旁腺激素可以加速骨细胞对周围骨组织的吸收，引起血钙浓度升高。骨细胞也受到钙浓度的调控。前成骨细胞和成骨细胞的突起通过骨小管伸展到骨组织中与相邻骨细胞相互连接，电解质和其他小分子物质可以在深层与浅层细胞之间移动，保持与骨内循环系统相连。骨细胞突起内的微丝和微管可供离子和分子在细胞内运输和扩散，同时骨细胞的环境信息也通过这些突起网络互相传递。骨小管尚有微骨小管（microcanal），从骨小管呈放射状散布于胶原纤维之间，从而使得血液与骨之间的矿物质迅速交换。这里值得一提的是，除了大部分骨细胞会存在于骨组织内直至死亡外，还有一部分骨细胞会在骨陷窝内骨组织被吸收，细胞外露后再转变为成骨细胞。

4. 破骨细胞

破骨细胞是多核巨细胞，发挥着吸收骨组织的功能。破骨细胞的直径一般在 20～100 μm 之间，含有 2～50 个核，更多的可到 100 个。细胞核为不规则的圆形或卵圆形，核膜光滑，染色质颗粒细微，分布均匀，染色较浅，有 1～2 个核仁。破骨细胞的胞浆呈泡沫状，有嗜酸性染色特征。在光镜下观察，破骨细胞临近的骨表面通常带有纹状缘（straited border）或刷状缘（brush border）。电镜下纹状缘由较多指状突起与凹陷构成，突起长 15～20 nm，其间有 20～25 nm 的间隙。纹状缘被透明带包围，透明带位于细胞胞浆外，处于纹状缘和骨表面之间，起到黏合作用，也可能有封闭作用，以维持骨吸收的微环境。透明带内由无定型物质构成，也有一些肌动微丝，所以可以推动纹状缘的运动。没有透明带的破骨细胞不具有骨吸收作用。

破骨细胞的胞浆内有大量分散存在的线粒体和少量粗面内质网，高尔基复合体通常围绕在核群周围。与核相关的中心粒成对出现，并聚集在中心体区。组织化学研究证明胞浆内还有大量的具有酸性磷酸酶特性的空泡，空泡存在于纹状缘处，有些空泡则包含有骨的降解产物。显然这些空泡具有溶酶体特性。破骨细胞的纹状缘与透明带共同构成了完整的骨吸收装置，提供骨吸收的微环境，使得溶酶体酶分泌到皱褶缘下，通过溶酶体酶使微环境呈酸性，进而由水解酶溶解骨组织，吸收到破骨细胞内再排出到细胞外，再被其他单核细胞消化。骨吸收的过程是先将组织中的钙移除，然后破骨细胞摄入基质成分，由胞浆溶酶体进行消化。此外，破骨细胞的胞浆内还有 β-半乳糖苷酶、β-糖苷酶、ATP 酶、芳香基硫酸脂酶、亮氨酸氨基肽酶等。

关于破骨细胞的起源，目前普遍认可的观点是破骨细胞起源于单核前体

细胞的融合作用,并不是通过有丝分裂或无丝分裂增殖。单核前体细胞是造血原性,后释放入血。因血中单核细胞和破骨细胞在形态学、组织化学和免疫表型上都十分相似,都具有强的吞噬作用,所以现在普遍认为血中的单核细胞是破骨细胞的前体细胞。细胞培养实验观察到单核细胞与破骨细胞融合,在活体骨吸收部位也是首先发现单核细胞并转化成为具有破骨细胞特征的单核细胞。同时,破骨细胞也含有白细胞的抗原,这一抗原可被所有多功能造血干细胞的有核后代表达,这就说明血液单核细胞与多核破骨细胞之间存在紧密关系,破骨细胞属于单核巨噬细胞系统的一种细胞。在骨吸收中单核细胞离开毛细血管,在其微环境下转化为完全成熟的破骨细胞。

5. 骨衬细胞

骨衬细胞通常位于成人的许多骨表面,含有梭形的核。通常骨衬细胞被认为来源于成骨细胞,由成骨细胞停止自身的活性,形状变得扁平,并包覆于骨外而形成。它们的细胞器极少,胞核通常也不超过 1 μm 厚度。相邻骨衬细胞间通过缝隙连接相通,并有突起伸入骨小管并和骨细胞的突起相连。骨细胞的功能主要有:骨衬细胞可作为可诱导成骨细胞,能够分裂分化为成骨细胞;另外,它们也可以作为一个离子屏障,隔开骨细胞陷窝区小管系统内液与组织间液。

4.3.2.2 细胞活动与骨的发生

骨的发生很复杂,包括软骨形成、骨基质形成、钙化、骨形成和骨吸收等。胚胎时期全身骨骼均以间充质凝聚为起始。间充质来源于中胚层之纤维疏松结缔组织。这是所有间充质组织的共同来源,由间充质细胞和基质组成。间充质细胞呈星状、有突起,相邻的细胞之间以突起相互连接成网状,是一种低分化的多分化潜能细胞。骨开始形成时,间充质的量与细胞间纤维均有所增加。四肢肢体在开始分化时,从间充质组织团块分化为器官。

全身骨骼都是由一些原始细胞分化而来的,这些将要分化为骨的原始细胞叫做生骨胚细胞或骨祖细胞。它们由中胚层的间充质细胞分化而来。这种分化可能受来自神经峪的外胚层原始组织的诱导。这些细胞受到的第一次诱导就是使它们成为各处的细胞群,如生骨的成骨细胞、生软骨的成软骨细胞等。这些具有相同来源,而表现出的细胞多样性,可能是在不同细胞中不同基因起作用的结果。某一特定类型骨组织中的许多细胞可能是从少数前体细胞通过有丝分裂分化而来的,在这些前体细胞中具有该组织特异性的基因首先被活化,并且在它们分化的每个后代细胞中都保持这一活性。

成骨的重要特征之一是由中胚层间充质细胞聚集形成骨原基。这些间充质细胞聚集的位置就是将来骨的位置,聚集的形状就决定了未来骨的形

状。但是由于骨组织易受微环境因素的影响，所以原来的形状可能发生明显的变化。聚集的细胞有的就是在以后形成骨的固定区域，比如椎骨的形成；有的则是从其他地方迁移到骨发生的地方，比如间充质迁移到下颌处。使聚集发生的因子大多数尚不清楚，但和细胞的亲合性和迁移性有较大的关系。中胚层间充质聚集的位置以及形状、大小和生长速度取决于它们与邻近的外胚层的相互作用。在间充质细胞聚集以后，骨组织开始出现。由于在体内部位的不同和局部外力的作用，可分化为不同类型的组织，这些组织的细胞间基质和宏观及微观结构都有各自的特性。一旦细胞开始分化，便从立体上开始发育。对于单个细胞来说在聚集的间充质内的分布是随机的，但是随着细胞外基质的合成和细胞的进一步分化，使细胞总的取向沿着聚集物的长轴，并且启动一种指导原基生长和成形的模式。此后一些外部因素可能参与起作用。不过一项关于不同骨的形态决定因素的研究基本搞清了基因遗传和后天因素的作用，认为基因控制所起的作用比原来想象的要重要得多。

骨的基本形状和大部分线性增长不受功能需要的影响，而像是受到遗传基因的直接控制。这些基因包括固有的细胞分化速度、细胞体积以及每个细胞产生的基质的类型和数量的表达。一旦这些功能形态确定之后，其他一些次要结构问题如供肌肉和肌腔附着点的隆起倒是更多地取决于功能的需要。这些次要结构的出现，决定了骨的最终的形状，并且出生后发育过程中机械力的持续作用维持这一形状的需要。

4.3.2.3　细胞活动与骨的生长及发育

发育和生长是两个不同但又是相伴发生的生物学过程。生长主要指物质量的增加，而发育主要指组织或器官由低级向高级发展的成熟过程。骨的发育主要由 5 种方式完成：结缔组织细胞分化或转变成生骨类细胞；已经分化成的成软骨细胞和成骨细胞的有丝分裂；细胞外结构蛋白质的大量合成；细胞吸收水分，使细胞内和细胞外水分含量发生转移；以及细胞外基质的增加。

骨发育分为形态发生和细胞分化 2 个阶段，前者以细胞迁移和相互作用为主要特点，形成原始的骨形状；而后者则着重表现为细胞的分化和转化，产生和改造细胞间基质。细胞间基质的基本成分包括透明质酸、硫酸软骨素/蛋白质复合物和胶原。在骨组织由间充质途径软骨向骨的转变过程中，细胞间基质在分子水平上有两个重要变化，即透明质酸酶的出现和硫酸软骨素量的增加。形态发生早期主要产生透明质酸。随着细胞分化到软骨阶段，硫酸软骨素成为主要细胞间物质，透明质酸被不断增加的透明质酸酶所破坏。透明质酸的作用在早期有助于细胞的聚集。透明质酸的这种作用受到促进生长的激素，特别是甲状腺素的控制。

在发育的不同阶段,胶原类型也发生分子变化。间充质阶段的胶原由两条 α1 链一条 α2 链构成,这跟骨中的胶原分子构成是一样的,而软骨中胶原的分子式为 3 条 α2 链构成。此外骨和间充质中的 α1 链在氨基酸组成方面稍有不同,再者不同类型胶原的分子内羟脯氨酸和羟赖氨酸交联键的位置和羟赖氨酸糖基化的位置可能不同。从生物学水平上看,骨发育过程中出现时间上有序的特殊类型的胶原,胶原类型的每一步变化都伴随着组织的结构或功能上的变化。

发育阶段和生长阶段出现异常可导致先天性畸形,比如肢体缺陷症。可能一开始就没有形成纤维或软骨性原基,或者是相应的细胞合成胶原或较多糖的时间或数量或性质不合要求。一旦骨骼有序的发育模式受到干扰,就会出现众多的异常变化,这是因为每一骨骼组分的发育都有严格的内部相关的模式。出现于胚胎期的缺陷很有可能伴有多系统异常,而出现于胎儿期的却大都引起局部畸形。

4.3.2.4 细胞活动与骨组织的吸收

骨组织的吸收包括钙磷释放到细胞外液和有机基质的除去。吸收过程可由骨表层的破骨细胞在其接触点上进行或由骨内的骨细胞进行,两者可同时发生或独立发生。其中破骨细胞性骨吸收是骨吸收的主要方式,在正常情况下骨细胞仅能吸收很少量的陷窝壁骨组织。

1. 骨组织的基本组成

骨组织由板层骨、编织骨、透明软骨和纤维组织组成。

(1) 板层骨

从化学上讲板层骨含有机质和无机质及少量水分(3%)。有机质由成骨细胞产生,其中胶原占 90%,非胶原蛋白占 10%。有机基质中有无机盐的沉积,主要离子为钙和磷,另有少量的镁、碳酸根、柠檬酸根及其他微量离子。从组织学上,在偏振光下可以看到板层骨中胶原形成平行的层状或板状结构。陷窝中有骨细胞,在板层之间被压成扁平形,细胞之间通过网状管道系统相互联络,并垂直穿过板层与邻近的血管相通,这种组织受神经支配,这种神经可能具有一种自动防止故障性能。板层骨中胶原纤维和骨细胞的排列都平行于日常情况下出现的最大压力和张力方向。一层层骨板密切叠加在一起,并不断进行着造型。板层骨构成了骨板、原生骨单位、次生骨单位、密质骨和骨小梁的基本外形。

(2) 编织骨

编织骨又称为初生骨、活性骨或纤维骨。从化学上讲它与板层骨的组成一样,结构上讲,其纤维没方向性,其外形与营养它们的成骨细胞的毛细血管

环路的几何形状一致。其中的管道和陷窝没有统一的形状和排列次序，距离也较大。板层骨沉积得较慢，而编织骨沉积得较快。当没有预先存在的硬组织时，不能沉积板层骨而能沉积编织骨。各种类型的骨肉瘤都形成编织骨，没有形成板层骨的。健康的或疾病中的活的编织骨能自身刺激转化为板层骨，因此它们通常存在不了多长时间，便被转换。

（3）透明软骨

由成软骨细胞产生，化学上类似于弹性组织，凝胶状。细胞外物质，水分占 75%，有机物基质占 25%。基质中 40%为胶原，其余为蛋白多糖。从组织学上讲，该组织没有神经。它形成胚胎期的大部分骨原基，出生后它是骨髓、关节软骨和生长板的基本组成成分，并参与骨的修复过程。矿化过程中先转化为钙化软骨，而后可能自身刺激吸收为编织骨，编织骨再为板层骨取代。成年人有一种矿化抑制机制，可使关节软骨终生保持其结构和功能特性。

像编织骨一样，透明软骨可在软组织中形成，并且在许多解剖部位它是首先形成的硬组织。一些恶性软骨肿瘤，如软骨肉瘤，以及良性肿瘤和其他一些疾病可在透明软骨发生。内分泌对软骨生长的控制及骨骼总的生长方面起重要作用。因为成年人体构造大都是生物力学因素与软骨的生长共同作用的结果，当骨代替软骨时，它的外形与原来软骨的外形一致。

（4）纤维组织

由成纤维细胞产生，化学上是透明质酸凝胶中包埋着胶原，含水量达 75%，这里的胶原在组成上和超微结构上与骨和软骨中的稍有不同。光镜下其胶原束较粗，含有扁平的被拉长了的纤维细胞群体，有营养血管和支配神经。力学性质方面，胶原好像天然的绳子，胶原在瘢痕中是无序排列的，在结缔组织中则形成三维的支撑网状结构，在筋膜中则为两维的纤维薄片，胶原的基本功能与它的高强度和坚硬性有关，有抗压、抗剪、抗弯曲性能。纤维组织可发生良性和恶性肿瘤及相关疾病（纤维肉瘤、带状纤维瘤）。

2. 破骨细胞性骨吸收

破骨细胞性骨吸收的实际机制还未完全明了，一般认为破骨细胞性骨吸收可以通过分泌酸来降解骨中无机质；摄取骨基质，包括无机物和有机物，然后把摄取的基质进一步在细胞内消化；以及分泌多种水解酶这 3 种途径来完成骨质的全部或部分溶解和吸收。

活体内破骨细胞性骨吸收可由于以下因素的影响而增加，这些因素包括：成骨细胞的作用、PTH、活性维生素 D_3、甲状腺素、肝素及由淋巴细胞培养物提取的破骨细胞激活因子等。OAF 和 PGE_2 可以提高原有破骨细胞的功能，但不影响骨祖细胞的分化。此外还有许多因素抑制骨的吸收，包括糖皮质激素、降钙素、胰高血糖素、二磷酸盐及碳酸酐酶抑制因子等。

成骨细胞对破骨细胞的分化和功能影响是多方面的。

首先,是对循环中的破骨细胞前体细胞在需要骨吸收的部位有定位和聚集作用。骨基质中存在一些破骨细胞趋化因子,这些因子能与破骨细胞上一种物质发生反应,从而引导破骨细胞及破骨细胞前体在特定部位聚集定位,启动骨吸收。这些因子正是成骨细胞分泌的,而且成骨细胞可以根据需要调节对这些因子的表达。

其次,成骨细胞分泌的巨噬细胞集落刺激因子是破骨细胞发育的关键因素,是破骨始祖细胞增殖与分化的必要条件,也能延长破骨细胞的存活期。在 op/op 型硬骨病小鼠中成骨细胞的巨噬细胞集落刺激因子基因密码的第 262 碱基对插入了额外的胸腺嘧啶,因而不能表达有功能活性的巨噬细胞集落刺激因子,致使破骨细胞减少,骨吸收降低,骨量增加。用重组人巨噬细胞集落刺激因子则可恢复破骨细胞的数目与功能,达到治疗目的。

另外,成骨细胞也产生一些中性酶,在甲状旁腺激素的作用下,抑制性因子减少,而酶类增加,从而溶解骨表面有机质,使无机物暴露,启动与活化破骨细胞。成骨细胞还是破骨细胞骨吸收系统中激素因子的第Ⅰ靶细胞。PTH、1,2-$(OH)_2D_3$ 这些骨吸收激素的受体在成骨细胞而不是在破骨细胞,这些激素直接作用于破骨细胞不能产生骨吸收,只有在成骨细胞存在时才能产生骨吸收。一些刺激破骨细胞的局部因子,如前列腺素、细胞分裂素和生长因子等,也不直接作用于破骨细胞,而是通过成骨细胞再调节破骨细胞的功能。成骨细胞与破骨细胞之间的信息传递尚不清楚。

抑制破骨细胞骨吸收的因素主要包括雌激素、降钙素、遗传性破骨细胞功能障碍以及二磷酸盐和磷酸盐等。

3. 骨细胞性骨吸收

目前有研究也认为骨细胞既形成骨也吸收骨。骨细胞扩大它们的陷窝是通过吸收陷窝壁的骨组织,这个过程通常被称为骨细胞性骨溶解,相应较幼稚的骨细胞也增加少量的骨在陷窝壁上,这种方式形成的骨含有较少量的矿物质,与成骨细胞形成的骨有区别。一般认为这种低密度的骨具有较高的可溶解性,因此能够和周围的细胞外液发生矿物质交换。在这种状况下,陷窝周围的骨可作为矿物质的储存库,对骨的整体结构没有影响。

对骨细胞性骨吸收的存在是有争议的,一些学者认为骨陷窝的相对扩大不是由于骨细胞性骨吸收造成的,而是由于骨形成的相对减慢所致,而且在电镜下从没找到骨细胞性骨吸收的证据。

4.3.2.5 骨形成及骨化方式

在胚胎期间充质细胞聚集成原始骨组织通常是在脊索、神经管、外胚层

顶隆起的机械或化学趋化的影响下发生的。这些细胞聚集物中有些直接骨化，称为膜内骨化，但大多数都是先由间充质转化为软骨后，再转化为骨，称为软骨内骨化。此外，还有一种特殊的骨化方式，即附加性成骨。分别介绍如下：

1. 膜内骨化

人体内通过膜内骨化形成的骨主要有颅盖骨、下颌骨、面骨和锁骨等。膜内骨化是从间充质组织聚集物发育而来的。其中一小部分细胞通过有丝分裂进行增殖，聚集成取向杂乱的小索，同时这些细胞产生细胞间基质，并很快地骨化为原始骨小梁。这些细胞被包埋在矿化中的类骨质中转变为骨细胞，其余大部分细胞仍以成骨细胞形式停留在外周。原始骨小梁平行地辐射向特定的颅骨表面。这些原始骨小梁通过游离端的生长而增加长度。最终产生具有初生骨化中心的骨组织，该中心一方面进一步形成或扩充外周骨小梁，另一方面与纤维细胞原基中出现的骨岛融合而迅速扩展，随着骨化中心的彼此相向扩展，外周骨小梁越来越规则化并相互连接，离心扩展速度变慢。这时颅骨穹窿表面覆盖一层特殊的膜，开始了新的成骨过程。这层膜的结构由外向内为：薄层表层纤维、有丝分裂细胞层、纤维血管层、较成熟的成骨细胞层。这时骨膜骨化成为主要的成骨过程。

在膜内成骨过程中，膜中的间充质细胞最早分化为成骨细胞，成骨细胞分泌骨的细胞间质，自身被包理其中，细胞伸出长突起，彼此接触，细胞之间有细纤维束和基质，基质嗜酸性。此时形成的是最幼稚的骨质，称为类骨质，类骨质的表面附有胞浆嗜碱性的成骨细胞。随着类骨质的增厚和矿化，成骨细胞形成更多的类骨质，大量成骨细胞被包理在新形成的骨内转化为骨细胞。这些骨细胞通过它们的胞突仍彼此保持联系，并且和表面的成骨细胞相连，形成了完整的陷窝一小管系统。此时形成的新骨为呈针状的小梁骨，互相交织成网状，形成原始的松质骨。

原始松质骨有的最终转化为密质骨，在已存在的骨小梁表面，成骨细胞不断造骨，形成骨的沉积，导致骨小梁间隙填充。在相邻骨小梁的挤压下，外侧原始的编织骨转变成已有骨小梁的表面，形成不规则的同心圆状骨质层，构成原始的哈佛系统，原始的哈佛系统与以后成熟的哈佛系统不同，外形不规则，骨细胞分布不均匀，胶原纤维方向随意分布。而有一部分原始松质骨则持续地以松质骨存在。这些原始松质骨，骨小梁的厚度不再增加，骨小梁间的结缔组织分化为骨髓造血组织，同时结束了成骨作用的成骨细胞和近骨表面的间充质细胞转变为骨内膜，所形成的骨块外的结缔组织形成骨外膜。骨外膜形成后，骨外膜的内层细胞可继续分化出成骨细胞。不断地增厚与扩大骨的外表面，形成扁骨外面的骨密质，内面的骨密质也以同样的方式形成。

2. 软骨骨化

软骨内骨化是躯干骨和四肢骨的原始发育过程。骨折正常修复过程,即骨痂的形成和成熟也存在软骨内骨化过程。软骨内骨化的过程是,在骨发生的部位,首先由间充质组织分化形成透明软骨雏形,以后逐渐被骨取代。这一过程发生得较慢,从胎儿开始,直到成年才能完成。

软骨内骨化最早先出现间充质凝聚,细胞产生基质将细胞彼此分开,称为前软骨。凝聚体周围的间充质细胞形成软骨膜构成胚基的轮廓,在胚胎的第 8 周,软骨形成骨的基本形状,即软骨雏形。在软骨雏形生长的同时,其中央部的软骨细胞开始成熟肥大,肥大的软骨细胞可能传递了某种信息给软骨外的相邻细胞,促使软骨膜中的前成骨细胞转化为成骨细胞,从而使软骨膜转化为骨膜。骨膜形成以后,以膜内成骨的方式在外围成骨形成环绕骨干的骨质,即骨领。此时,中央内部的肥大软骨细胞的酶活性增强(如碱性磷酸酶),软骨基质开始钙化,骨膜的血管穿破骨领,连同成骨细胞破骨细胞及间充质细胞一起进入钙化软骨,破骨细胞吸收钙化软骨形成许多蜂窝状裂隙,成骨细胞附着在残留的钙化软骨上成骨,以后形成附着骨的钙化软骨的骨小梁网格,即原始的松质骨,除了新形成的骨质部分,原始松质骨的大部分将被吸收逐渐转化为板层骨,同时小梁骨的间充质组织转化为骨髓,随着成骨过程的进展,所形成的骨的体积在增长。

软骨内成骨发生于短骨、扁骨和不规则骨,如肩胛骨、腕骨、趾骨以及脊椎骨等。在软骨内成骨过程中,最先出现的骨化部位,称为初级骨化中心,随着骨化进展,在其他相应的部位可以出现新的骨化中心,称为次级骨化中心。

3. 附加性骨化

附加性骨化发生于骨的膜性增大及骨重塑的过程中,是成骨细胞在现存骨表面排列并分泌连续性层状类骨质,随后钙化为板层骨的成骨模式。在骨的发育及生长中,由软骨内成骨或膜内成骨方式形成骨性原基,表面覆盖骨膜,骨膜下成骨细胞通过在骨表面分泌类骨质直接增加新骨;在骨重塑中,成骨细胞在破骨细胞造成的骨吸收区分泌新骨也是以这种模式进行。

4.3.2.6 破骨细胞与骨生理

由破骨细胞引起的骨吸收贯穿于生命的整个过程。随着分离和培养破骨细胞及评价其骨吸收活性的新方法的建立,以及通过对造血组织和外周血中前体细胞长期培养产生破骨细胞这一技术的应用,人类对破骨细胞在骨生理学中的重要作用有了更深刻的认识,从而使破骨细胞生理学有了新的进展。

1. 破骨细胞的细胞发育过程

目前普遍接受如下观点,即破骨细胞并不通过有丝分裂或无丝分裂来增

殖，而是通过它们的单核前体细胞融合而成的，而且这一过程受到系统中激素的控制。这些单核前体细胞是造血源性的，以后又释放到血液中。

既然确定破骨细胞是造血源性的并经过一个血液循环中的前体，那么很容易想到单核细胞。因为破骨细胞与其他单核吞噬细胞一样，具有强烈的吞噬作用。而且形态学、组织化学和免疫遗传表现型等方面都与之相似。在细胞培养中观察到，单核细胞与分离的鸟破骨细胞融合。在活体骨吸收部位首先出现含有非特异性酯酶的单核细胞，然后才出现含有特异性抗酒石酸酸性磷酸酶或兼含有非特异性酯酶的单核细胞。这说明单核的破骨前体细胞属于单核吞噬系统。但是单核吞噬系统的成熟细胞并不能直接融合成破骨细胞。这是因为破骨细胞有很多功能和特性是其他造血源细胞所没有的，如降钙素受体的表达、陷窝骨吸收等。可以证明，破骨细胞含有白细胞普通抗原，已知这种抗原可被所有多功能造血干细胞的分化后代所表达。这说明人破骨细胞以及它们循环中的前体是由与其他外周血白细胞相同的干细胞衍生而来的。这可能是造血细胞破骨始祖细胞特殊的细胞系，破骨细胞是这一细胞系的最终产物。

破骨细胞可以从分离出的产生粒细胞和巨噬细胞集落的造血细胞产生，还可从分离出的单核巨噬细胞群产生。这为破骨细胞是单核巨噬系统中的一员的观点提供了重要的证据。同时实验还证明，具有破骨细胞特异性能的多核细胞只有在培养中与成骨细胞或其他骨髓基质细胞接触的情况下才能形成。从所有现行的鉴别标准来看，破骨前体细胞应属于单核吞噬细胞。

在此应当指出的是，在骨髓基质细胞与造血源性破骨前体细胞或单核细胞或巨噬细胞共同培养时，只有在共同培养几天之后，才形成陷窝骨吸收细胞。这一过程包括破骨前体细胞的增殖和分化若干步骤，然后才形成成熟的破骨细胞。在这一过程中，每一步都伴随着巨噬细胞一些表现型的丢失和破骨细胞一些表现型的获得。

单核吞噬系统除了包括高效吞噬作用的细胞以外，还包括范围广泛的组织特异细胞，如小神经胶质细胞，Kupffer 细胞，滑膜 A 型细胞和破骨细胞等。它们执行一些高度特异性功能。目前有两种假设来解释这种单核巨噬系统的异质性。

第一种假设是骨髓中存在有单核吞噬系统中各种组织特异性细胞的细胞系，每种都先以前体形式释放入血液，然后定居于各自特殊组织。对骨来说，认为破骨特异细胞系是在粒细胞和巨噬细胞集落形成单位形成以后，在其中的一些部位形成的，并以特异的单核破骨前体细胞释放到血液中，当需要时定居于骨中。

另外一种假设是骨髓中有一种高性能单核吞噬细胞系。以后不同的特

异细胞类型,是表现型变化的结果。这种表现型的变化是当单核细胞离开血液循环变成组织巨噬细胞后才发生的。组织巨噬细胞的寿命从几个月到几年不等,在特殊组织中存在着诱导巨噬细胞向哪一种细胞类型分化的调整因子。在骨组织中,离开骨毛细血管的外周血单核细胞衍生的巨噬细胞,在其微环境中存在的细胞和激素因子影响下分化成为完全成熟的破骨细胞。

2. 成骨细胞对破骨细胞的调控作用

成骨细胞对破骨细胞的分化和功能的影响是多方面的。首先是对循环中的破骨前体细胞在需要进行骨吸收的部位有定位和聚集的作用。骨基质中存在着一些称为破骨细胞趋化因子的物质如骨钙素,这些因子能与破骨细胞上的一种物质发生反应,从而引导破骨细胞及破骨前体细胞在特定的部位定位和聚集,可能还启动骨吸收。这些因子正是成骨细胞分泌的,而且成骨细胞可以根据需要调节对这些因子的表达。

成骨细胞分泌的巨噬细胞集落刺激因子是破骨细胞发育的关键因素,是破骨始祖细胞增殖和分化的必要条件,也能延长破骨细胞的存活期。在 op-op 型硬骨病小鼠中成骨细胞的巨噬集落刺激因子基因密码区的第 262 碱基对插入了额外的胸腺嘧啶,因而不能表达有功能活性的巨噬细胞集落刺激因子,致使破骨细胞减少,骨吸收降低,骨量增加。给这种小鼠使用重组人巨噬细胞集落刺激因子,恢复了破骨细胞和巨噬细胞的数目,治愈了小鼠 op-op 骨吸收缺陷症。同时还证明,从 op-op 分离出的成骨细胞在与正常脾细胞共同培养中不支持破骨细胞的分化,而在介质中加入巨噬细胞集落刺激因子则可支持破骨细胞的分化。

已知骨基质成分对单核细胞具有趋化性,破骨细胞只对骨表面有机基质层被除去的骨有强烈的吸收作用,而成骨细胞则产生胶原酶和组织纤维蛋白溶酶原激活因子。这两者都可降解骨的有机基质。在 PTH 和其他骨吸收激素存在下会增加这些中性酶和减少蛋白酶抑制因子。在这些酶的作用下,骨表面非矿化类骨质被除去,破骨细胞进入矿化基质,后者启动和活化破骨细胞的骨吸收作用。

此外,成骨细胞是许多影响破骨细胞骨吸收的局部和系统中激素因子的第一靶细胞,比如骨中的细胞具有骨吸收激素 PTH 等。因此在组织培养中,这些激素对单独培养的破骨细胞不能引起陷窝吸收,只有在成骨细胞存在的条件下,它们才能使破骨细胞产生陷窝骨吸收。一些刺激破骨细胞骨吸收的局部因子如前列腺素、细胞分裂素和生长因子等也不直接作用于破骨细胞,而是通过成骨细胞的作用,再去调节破骨细胞的功能。目前对成骨细胞和破骨细胞之间的信息传递的本质还不十分清楚。

3. 病理性骨吸收

在某些全身性或局部性溶骨性疾病的情况下，破骨细胞的数量和活性升高，就产生高于正常的骨吸收。可以认为这是控制破骨细胞的形成、活化和功能的机制发生紊乱的结果。下面简单介绍几种与之相关的骨疾病机理。

(1) 甲状旁腺功能亢进

这类病人血液中 PTH 高。PTH 可通过多种途径增加破骨细胞的数量和提高破骨细胞的活性。PTH 促进骨髓始祖细胞转变为破骨前体细胞，还可通过成骨细胞介导促进破骨前体细胞向成熟破骨细胞的转化。这一作用是血液中 PTH 增加的直接结果。另外 PTH 可提高肾中 1-α 羟化酶活性，促使 1,25-$(OH)_2$-D_3 的增加。后者是破骨细胞分化的主要因子，这是 PTH 升高的间接结果。PTH 可能还通过刺激成骨细胞释放中性蛋白水解酶来为破骨细胞接近下层矿化骨基质创造了有利条件，从而启动和活化破骨细胞的骨吸收活性。再者，PTH、1,25-$(OH)_2$-D_3、PTH 相关肽都可促进成骨细胞和基质细胞合成细胞分裂素，因此，PTH 升高，使破骨细胞的数量和活性将会很快升高(应用 PTH 数小时内)，骨吸收明显加快。

(2) 绝经后骨质疏松

白细胞介素-6 在绝经后骨丢失加快过程中起关键作用。培养中的骨髓基质细胞和成骨细胞系细胞合成白细胞介素-6 的作用受到雌激素的抑制。雌激素还抑制人白细胞介素-6 基因启动因子的转录活性。在摘除性腺的小鼠中，因为骨髓微环境中白细胞介素-6 的产率的增加，所以破骨细胞的形成也增加了。对摘除卵巢小鼠的骨髓进行短期培养后，粒细胞和巨噬细胞集落形成单位的数目和破骨细胞的数目都增加了。而当把 17-羟雌二醇或抗白细胞介素-6 中和抗体用于这些小鼠时，破骨细胞的数目没见增加。这说明雌性激素的缺乏与造血组织中白细胞介素-6 的增加有明显的关系。也有报道说摘除卵巢的小鼠骨髓分泌白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子增加了，而且产生类破骨细胞的多核细胞，这种细胞抗酒石酸酸性磷酸酶阳性。使用白细胞介素-1 受体拮抗剂和肿瘤坏死因子结合蛋白以及雌激素可阻止摘除卵巢所诱发的多核细胞的增加。这些因子在体内和体外都减少骨吸收，用白细胞介素-1 受体拮抗剂可减少摘除卵巢大鼠的骨吸收。说明白细胞介素-l 或由其诱导的中介物-可能在雌激素缺乏引起的骨丢失中起重要作用。

(3) Paget's 病

这种病人的骨髓细胞长期培养后，类破骨细胞的多核细胞快速形成，其培养介质中发现大量白细胞介素-6，并且这种介质可促进培养中正常骨髓细胞产生破骨细胞。这种病人骨髓血浆和外周血也含有高水平的白细胞介素-6。Paget's 病人破骨细胞有白细胞介素-6 mRNA、白细胞介素-6 受体和白

细胞介素-6 核转录因子的表达,而正常人破骨细胞仅有白细胞介素-6 mRNA 的表达。因此白细胞介素-6 的增加以及破骨细胞对这一细胞分裂素应答能力的增加可能导致由白细胞介素-6 产生的刺激破骨细胞形成和活化作用的自身放大,从而加快了骨吸收。另外,白细胞介素-6 还参与提高多发性骨髓瘤、类风湿和 Vanishingme 骨病的骨吸收。

此外一些导致骨局部异常吸收的患者通常与肿瘤和炎症病变有关。肿瘤细胞和炎症细胞分泌大量细胞分裂素、前列腺素和其他增强破骨细胞吸收功能的局部因子,这一作用间接受成骨细胞的介导。这些因子促进破骨细胞吸收的另一个途径可能是通过释放蛋白水解酶降解覆盖在骨表面的有机基质,这可活化破骨细胞的骨吸收。炎症细胞和肿瘤细胞分泌的前列腺素、细胞分裂素和生长因子可能还通过成骨细胞和基质细胞来调节破骨前体细胞向破骨细胞的转化。巨噬细胞是宿主细胞中对肿瘤和炎症产生应答的主要细胞成分。在炎症区由于细胞分裂素的刺激,肿瘤细胞和成骨细胞产生化学趋化蛋白质,这种蛋白质诱导单核细胞向炎症区迁移。如上所述,在骨外正常组织和不正常组织中的巨噬细胞群中有一些巨噬细胞遗传表现型,能分化成功能成熟的破骨细胞。这种分化与由造血组织产生的破骨前体细胞向破骨细胞分化所需要的细胞和激素条件一样,这些巨噬细胞也只有在有成骨细胞或其他基质细胞存在的条件下才能分化为破骨细胞。

组织巨噬细胞不是同源细胞,在形态、功能、免疫、遗传表现以及酶组织化学等方面都是异质性的。这种异质性也表现在增殖能力上,有将近 5% 的组织巨噬细胞能进一步分裂。根据这一现象可以推论,含有较多巨噬细胞的组织,必有较多的能向破骨细胞分化的未成熟细胞。由于许多溶骨性疾病存在有较严重的巨噬细胞浸润,所以这种巨噬—破骨细胞分化机制代表一种不正常的骨吸收形式。现在不仅证明人肿瘤相关巨噬细胞可分化为破骨细胞,而且也有实验证明人单核细胞、腹膜巨噬细胞、游离移植物包裹膜衍生的巨噬细胞、乳腺癌衍生的巨噬细胞和风湿性关节炎滑膜衍生的巨噬细胞都可分化为成熟的破骨细胞,进行强烈的陷窝骨吸收。因此,巨噬—破骨细胞的分化,在有些情况下,如炎症肉芽肿、关节成型术或大量移植物碎片引起的巨噬细胞反应等,可能是巨噬细胞除了分泌体液因子刺激破骨细胞的骨吸收以外的另外一种促进骨吸收的形式。

另外,骨外炎症细胞和肿瘤细胞单独在骨片上培养时也能引起轻微的骨吸收,其特点是使骨表面变粗糙,暴露出矿化的胶原纤维,它与破骨细胞引起的骨吸收的区别在于后者在骨上形成边界清晰的可测深度的凹陷。可以设想,单核细胞和巨噬细胞在没有遇到进行破骨细胞分化所需要的细胞和激素条件之前,便进行着这种类型的骨吸收。由大量单核巨噬细胞共同进行这种

轻微的骨吸收，如果时间足够长，吸收量也是很大的。这种类型的骨吸收可能是引起慢性进行性炎症和肿瘤骨吸收的原因之一，比如明显与破骨细胞无关的溶骨性骨转移。

4.3.3　牙本质矿化过程与细胞活动

牙本质的矿化过程与骨的矿化非常类似，都是在Ⅰ型胶原蛋白网络基质中矿化形成的。但由于参与矿化的细胞和相关的调控蛋白不同，其矿化机制也不尽相同。牙本质中胶原蛋白、非胶原蛋白在牙本质矿化过程中由成牙本质细胞控制，具有精确的时间顺序和空间位置，它们相互协调、共同作用并最终产生了牙本质组织[9]。

成牙本质细胞分化之后，开始合成Ⅰ型胶原，并分泌到牙乳头的基质中。最先分泌到细胞外的胶原纤维比较粗大，直径为 100～200 nm，分布在基底膜下的基质中，纤维与基底膜垂直，形成最早的牙本质基质，即罩牙本质。由于成牙本质细胞体积增大，细胞外间隙消失，细胞向基底膜一侧伸出粗短的突起，同时细胞体向牙髓中央移动，在其后留下胞浆突埋在基质中，形成成牙本质细胞突起。偶然有的突起能够伸入基底膜中，还形成釉梭。

如图 4.4 所示，在成牙本质细胞突起形成的同时，胞浆内形成了大量基质小泡，并分泌到大的胶原纤维之间。基质小泡中的羟基磷灰石以单个晶体形式存在，随着晶体长大，小泡破裂，泡内的晶体成簇地分散在突起的周围和牙本质基质中。晶体继续长大并相互融合，最后形成矿化的牙本质。

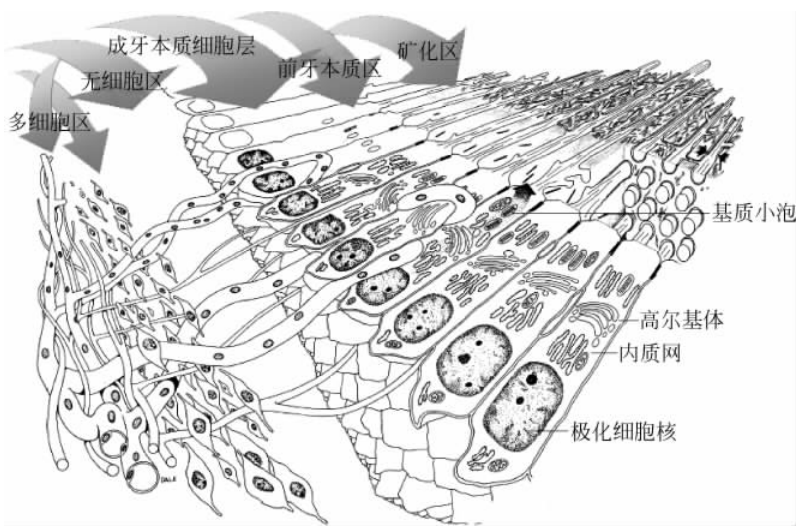


图 4.4　成牙本质细胞调控牙本质矿化示意图

牙本质的矿化形态主要是球形矿化。磷灰石晶体不断生长,形成钙球,并进一步融合,形成单个的钙化团。这种矿化形态多位于罩牙本质下方的髓周牙本质内。偶尔在该处球形钙化团不能充分融合,而存留一些小的未矿化的基质,形成球间牙本质。静止期的髓周牙本质内,钙球体积减小,在矿化的前方呈现线形矿化区。一般钙球大小取决于牙本质沉积的速度,钙球越大,表明牙本质形成越快。牙本质形成过程中,矿物质沉积晚于牙本质有机基质的形成,因此,在成牙本质细胞层与矿化的牙本质之间,总有一层有机基质,成为前期牙本质。

4.3.4 牙釉质矿化过程与细胞活动

4.3.4.1 牙釉质形态发生及分化阶段

在牙釉质发育初期,沿着牙本质突起的牙组织细胞首先组成了牙冠。内层牙上皮细胞呈立方形或矮柱状,并在中央存在大的核仁。其高尔基体存在于最接近细胞(靠近介质层)处。线粒体和其他细胞质的组成部分分散在整个细胞内。

随着在内层牙上皮细胞开始向成釉细胞进行分化,它们开始变长,同时核仁大部分向介质层移动。每个细胞中的高尔基体体积变大,并由原来的位置进行迁移。粗面内质网数量显著增加,大部分线粒体发生团聚,仅有少数仍然分布在细胞其他区域内。这些结构特点表明成骨细胞具有旺盛的合成和分泌蛋白的功能。而且细胞的这些变化使得成釉细胞成为一种极化的细胞,其主要细胞器均远离核仁。

临近的成釉细胞相互紧密排列,并且随着特殊化的粘结物或交接处的填充物的发育而一直保持紧密排列。间充质分别在细胞的末梢(靠近牙釉质)和近端(靠近介质层)处环绕着细胞。精细的含有肌动蛋白的细丝由交界处物质出发,并到达了成釉细胞的细胞质。这些细丝构成了末梢和近侧终端网络。这些连接处物质在成釉蛋白分泌过程中起到了很重要的作用,因为它们决定了在不同时间段,哪些物质可以在成釉细胞间通过,并进入或离开牙釉质,而哪些物质则不能进行这样的转运。此外,它们还具有依照所需的功能调整自身活动,变得紧密或松散的能力。支撑成釉细胞的胚基片在原牙本质沉积后的成釉细胞分化期间发生碎裂。

4.3.4.2 分泌阶段和牙釉质的生成

出于分泌期的成釉细胞结构反映了它们的合成和分泌功能。牙釉质蛋白的合成主要发生在粗面内质网处,并被转运到高尔基体。在高尔基体中,牙釉质蛋白被浓缩,并堆积成为膜边缘的分泌颗粒。这些颗粒进而被转运到

细胞远端，其中的组分在此被释放到新生成的本质覆盖物上。显然，成釉细胞发挥了控制无机离子由牙本质小囊毛细管向牙釉质表面输运的功能。羟基磷灰石晶体则随机的堆积在首先形成的牙釉质处，并与牙本质晶体相互交叉。而正如前面提到了，有一些研究人员则认为，牙本质晶体形成了牙釉质晶体的成核位点。

在首个无规牙釉质层形成后，成釉细胞开始迁移离开牙本质表面，从而使得托姆斯突(Tomes' processes，TP)得以形成。尽管成釉细胞的细胞质和托姆斯突是连续的，但是远端终端网络和连接处物质的存在标明了两者的差别。托姆斯突主要含有分泌颗粒，而胞体的细胞质含有大量合成的细胞器。

在托姆斯突建立后，牙釉质蛋白的分泌物变得交错起来，并形成了两类分泌位置。来自第一种位点的分泌物(临近托姆斯突的中心部分，围绕细胞外缘)构成了牙釉质基质墙。这些墙形成了一个坑(见图 4.5)，托姆斯突进而填充了这些坑。来自第二类位点的分泌物(在托姆斯突的表面)随后将基质填充到形成的坑内。在坑中形成的晶体与在周围的墙壁内形成的晶体的择优取向不同。这样的取向不同造就了牙釉质的结构：墙壁成为牙釉质的釉柱间质，填入坑中的变成了釉柱。然而研究证明釉柱和釉柱间质内含有相同的成分，仅仅是在晶体的取向上存在不同。生成牙釉质结构的托姆斯突在牙釉质发育过程中一直存在，直到最后的少量牙釉质形成才消失。

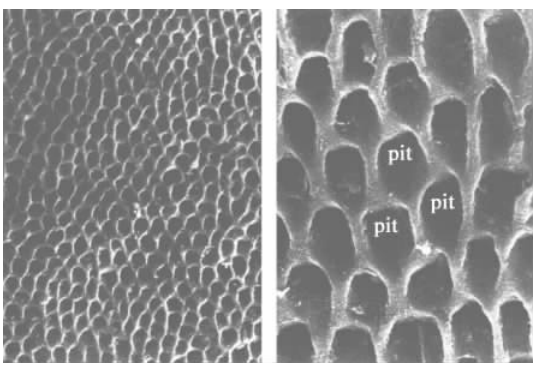


图 4.5　发育中的人牙釉质表面扫描电子显微镜照片

4.3.4.3　成熟阶段

在整个尚未成熟的牙釉质形成后，成釉细胞开始发生显著的微结构变化，以准备它们的下一步功能角色，使牙釉质最后成熟。其间发生了一个简短的转化阶段，在此阶段中，成釉细胞的高度变低，同时体积变小，细胞器含量减少。过剩的细胞器和生成物一同进入自吞噬液泡中并被溶菌酶消化。

随后,很多存留的细胞器转运到细胞的远端。

而后,成釉细胞进入一个循环过程:水和有机物被选择性的从牙釉质组织中排出,无机物则通过轮流的旺盛活动进入牙釉质。成釉细胞的形貌反映了这样的循环过程,因为在此过程中,成釉细胞的边缘从褶皱状为主到光滑为主反复变化。褶皱状末端的细胞形状与无机物的引入有关,而光滑末端形状则与排出水和有机物有关。与这样的细胞表面结构变化相对应的是相邻成釉细胞末端和近端连接处功能的变化。因而,多漏洞的近端处连接和紧密的末梢处连接主要存在于褶皱状末端的成釉细胞中,而大多数光滑末端成釉细胞包含多漏洞的末梢处连接和紧密的近端处连接。这样的改变表明,无机物必须通过有褶皱状末端的成釉细胞(因为它们的末端处连接紧密),相反离开牙釉质组织的有机大分子必须通过有光滑末端的成釉细胞的松散多漏洞的末梢处连接。蛋白降解产物也会被有褶皱末端成釉细胞的褶皱边缘吸收。成釉细胞在牙釉质成熟过程中的功能示意图见 4.6。

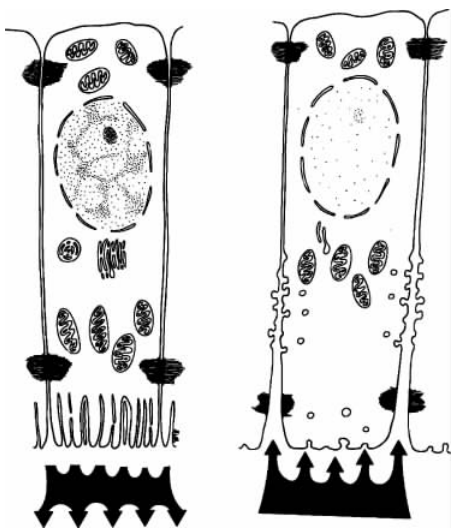


图 4.6　成釉细胞在牙釉质成熟阶段的形貌和功能示意图

4.3.4.4　小结

牙釉质结构的复杂性在于其羟基磷灰石晶体的三维排列方式[10]。正如前文提到的,这些晶体并不是随机排列。哺乳动物的牙釉质的晶体的组成结构包含两个元素:牙釉柱和釉柱间质。就我们目前所知,在这两部分晶体的唯一差异就在于其排列取向。牙釉柱中的晶体纤维大多与釉柱长轴平行,而在釉柱间质中,晶体排列则转变为垂直于牙釉质增长线(即 Retzius 线)。晶

体空间排列的结果是与这些长长的圆柱状釉质生产细胞(成釉细胞)的分泌末端形貌相关的。说明了成釉细胞与形成的牙釉质之间的关系。

对于哺乳动物来说,成釉细胞分泌末端的形貌很复杂,每个成釉细胞都首先产生一种细胞质托姆斯突。这种基质随着牙釉质开始出现而在成釉细胞远极面。托姆斯突并不包括成釉细胞的整个远极面,但在初始的远段面处留下一个边缘。成釉细胞构成了一个连续的细胞层(称为 ameloblastema),该层与发育中的牙釉质表面紧密接触。因而,发育中的牙釉质表面形貌实际上是 ameloblastema 的远极面的形貌的反模(图 4.7)。每个托姆斯突占据发育中的牙釉质表面上的一个坑,而托姆斯突的底座边缘在釉质表面相互恰当的连接起来。牙釉质基质从而能够在一个成釉细胞的两个不同位点处生成,在边缘处形成了釉柱间质生长区,而在平坦的托姆斯突处形成了牙釉柱生长区。每个牙釉柱生长区域都是不连续的,彼此被连续的釉柱间质生长区域隔开。属于釉柱生长区域的坑底部通常是倾斜的,但与坑颈部的牙釉质表面的釉柱间质生长区处连续。同时,因为在两个生长区域的牙釉质基质分泌速度相同,所以牙釉质在发育过程中一直保持着这样的坑结构。

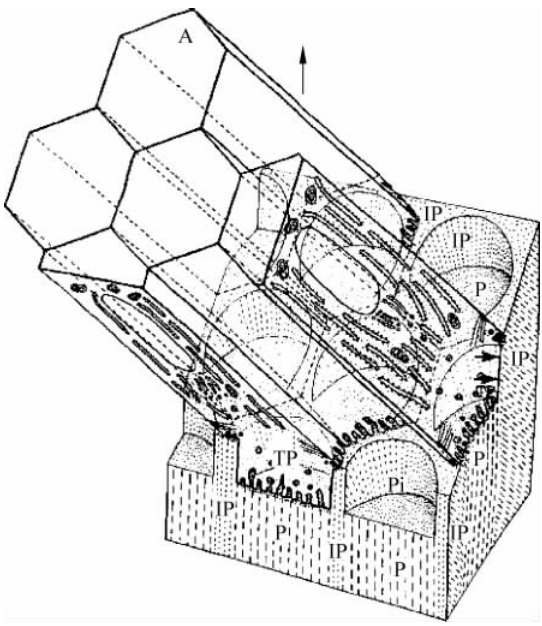


图 4.7　发育中的牙釉质与成釉细胞示意图

成釉细胞被纵切表示,以显示其内部结构。托姆斯突(TP)占据了牙釉质表面的坑(Pi)。成釉细胞沿大箭头所示方向运动,晶体取向由点划线(P=prism,IP=interprism)[11]

4.4 骨修复中的细胞调制矿化

4.4.1 骨折愈合与骨重塑

骨具有自修复功能,骨折后骨开始进行自愈合。骨折愈合的基础是骨膜中骨形成细胞的增殖与分化。骨折愈合可分为如下几个依次交替演进的过程:

(1) 血肿形成

骨折后,邻近软组织包括骨膜及血管等也被撕裂,血管破裂出血,在骨折断端之间及其周围形成血肿,随即凝固,并有纤维蛋白析出,如同支架,初步起着暂时固定断端的作用。

(2) 发炎与清创

血肿中含有大量的红细胞、白细胞、多形核嗜中性粒细胞、巨噬细胞等。巨噬细胞吞噬坏死组织、细胞碎片、残余细胞器等,并在胞体内溶解、消化和吸收。

(3) 纤维骨痂形成

从骨膜等处有新生的毛细血管、成纤维细胞、骨形成细胞等侵入血肿。成纤维细胞分泌大量胶原纤维,将血肿分化后,形成纤维骨痂,可将骨折的断端接合及包围起来,局部膨大呈梭形。纤维骨痂较软,又称暂时性骨痂,按所处部位,分为骨外膜骨痂、桥梁骨痂、连接骨痂及封闭骨痂。

(4) 初期骨质骨痂形成

纤维骨痂演化为骨质骨痂的过程包括钙盐沉积包围成纤维细胞使之直接转变为骨细胞的方式,但主要是通过骨形成细胞分化为软骨细胞和成骨细胞,分泌基质构成骨样组织,逐渐取代纤维骨痂。最初分泌的胶原纤维纵横交错,呈不规则未定向分布,矿化而成的骨小梁为编织骨。

(5) 二期骨质骨痂形成

新形成的编织骨表面存在成排的成骨细胞不断分泌骨样组织,骨小梁融合,内部空隙逐渐被新生骨组织所填充。哈佛氏系统出现,编织骨逐渐向板层骨演变,由成熟的板层骨构成的骨质骨痂又称为终期性骨痂。与此同时,软骨细胞增殖形成软骨性骨痂,通过软骨内成骨模式演变为骨质骨痂。

(6) 骨的改建与重塑

随骨痂范围和密度的逐渐增加,髓腔也被骨痂填充,最后骨痂与皮质相连,骨折间隙消失,达到骨性愈合。这种新形成的骨组织,随着肢体的运动和负重及骨周肌群的作用,骨痂重新排列,以适应生物力学的需要,破骨细胞吸收多余骨痂,并使骨髓腔再通,骨痂不足之处,通过膜内成骨补充,最后使骨

折部位恢复正常结构与功能。

骨的改建涉及骨骼外形结构的改变，而骨重塑只对骨组织内部结构进行调整。骨重塑不仅发生于骨折愈合过程，生理性骨重塑伴随人的一生。骨重塑在松质骨和密质骨的表现有所差别，但都依赖于成骨细胞和破骨细胞的活动，即骨形成和骨吸收之间的平衡与协调。在松质骨中，重塑过程在骨小梁表面进行，破骨细胞形成 Howship 陷窝，成骨细胞迁移过来，进行附加性成骨，这一现象被称为“爬行替代”；在密质骨的情形，破骨细胞对骨的吸收就像挖掘隧道一样深入骨的内部，血管组织和成骨细胞或其前体细胞随之也深入进去，成骨细胞在被吸收后的骨表面分泌和沉积出新的层板状骨，当围绕血管形成了多层同心骨板后，即为一个新的哈佛氏系统。

4.4.2　骨组织工程中的细胞调制矿化

4.4.2.1　骨组织工程

组织工程是一门融汇材料科学、生物技术和生命科学的最新进展而诞生的新兴交叉学科，它应用生命科学和工程学的原理与技术，设计与制造生物代用品，以修复或重建组织器官的结构，维持或改善组织器官的功能。临床上器官衰竭与组织缺失的频繁发生和可供移植器官的严重不足之间的矛盾是组织工程概念产生的内在动力。

具体到骨组织工程，通过成骨细胞的诱导分化与增殖并生长活体骨组织用于骨的修复和再生，将有望促进外科修复大范围骨缺损的进步。骨组织工程的 3 个关键要素为信号分子（骨生长因子、骨诱导因子）、基体材料、靶细胞。基体材料一方面作为信号分子的载体，将其运送至缺损位置，另一方面提供新骨生长的支架。骨诱导因子的靶细胞是一些血管周围游走的、未分化的间充质细胞，其具有多向分化的特性，即可分化形成肌组织、纤维组织、脂肪组织或骨组织，但在骨诱导因子的作用下，将不可逆的向软骨细胞、骨细胞的方向分化，从而增补成骨性细胞，满足修复大范围缺损的需要。骨生长因子则可以刺激成骨性细胞的有丝分裂，从而形成大量新骨。这种成骨的方式称为“诱导成骨”。因此，骨组织工程的基本出发点是以“诱导成骨”的方式而不是单纯以“爬行替代”的方式实现骨的修复和再生。

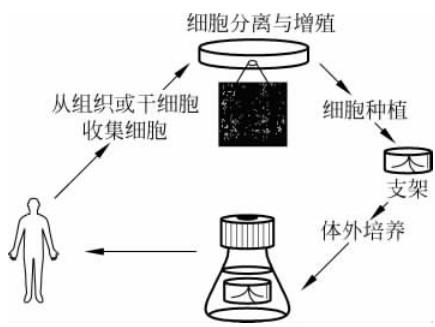


图 4.8　组织工程策略示意图

组织工程骨有望成为最早实现的组织工程产品。

关于诱导成骨的经典工作是 Urist 和 Reddi 等完成的。早在 1965 年,Urist [12] 发现当将失活的脱钙骨基质植入实验动物的肌肉内,两周内便可观察到新骨的形成,他将此现象称为诱导成骨。Reddi[13] 等揭示了诱导成骨中的一系列组织反应,将脱钙骨基质植入肌肉或皮下时,未分化的间充质细胞被激活并向植入部位迁移,细胞贴附于基质上,通过有丝分裂大量增殖,细胞分化形成软骨,软骨矿化,血管侵入软骨,成骨细胞分化形成并分泌骨基质,最后是骨基质矿化和骨髓的分化形成。

1981 年,Sampath 和 Reddi[14] 等完成了一个很重要的实验,他们发现从脱钙骨基质中提取的具有骨诱导能力但本身失活的信号分子必须与适当的载体材料重组才可以恢复骨诱导活性。他们采用的载体材料是胶原性骨基质,其主要组成是交联的Ⅰ型胶原。1984 年,Urist[15] 等采用 β-磷酸三钙作为诱导因子的载体植入肌肉,发现新骨产额比单纯植入诱导因子的新骨产额高出 12 倍。这些实验揭示了基体材料对于信号分子作用的有效及高效发挥具有举足轻重的影响。

近几年来,骨组织工程的应用研究已经在矫形外科、口腔外科及颅面外科等多个领域蓬勃展开。当前与骨组织工程相关的国际研究集中在 4 个方面:①是信号分子包括 BMP 系列和新的种类生长因子的基础研究如细胞生物学和分子生物学研究,尤其是与基因工程的结合[16,17];②是采用各种新型的仿生骨替代材料的研制和其作为载体的应用研究;③是基质干细胞的研究与应用;④是涉及新材料与 BMP 复合的临床实验。其中,对信号分子的有效输运模式及这些因子在设计制造新型骨替代材料中的应用是当前的关键内容。

具体分析可以看出,在基本原理指导下,骨组织工程应用的战略可分为两种:一种是载体材料与信号分子在体外组装后植入体内,通过信号分子诱导成骨性细胞的分化形成进而生长新骨;另一种是利用体外细胞培养技术获得足够数量的成骨性细胞,并与载体材料在体外组装后植入缺损部位。所涉及的载体材料范围较广,包括聚交酯(PLLA,聚左旋丙交酯;PLGA,乙交酯和丙交酯的共聚物),PEO/PBT 共聚物,胶原,透明质酸,去抗原牛骨,羟基磷灰石,生物活性玻璃,PLGA 与 HA 的复合,HA 与胶原的复合,HA 与 β-TCP 的复合,珊瑚骨架,以及表面镀磷酸钙盐膜的多孔钛植体。载体型式除少数为颗粒、微球和薄膜外,大多制成具有多孔结构的块材。

有希望近期得到应用的是胶原基的复合材料,一类是用胶原蛋白与磷酸钙陶瓷,胶原与异体骨或珊瑚骨架进行机械混合,或者将胶原注射到多孔陶瓷中,此种成分上的仿生较以往有一些进步。另一类是在成分和结构上都做

到了部分仿生，通过胶原的体外模拟矿化，使之与成为体内的天然骨近似的矿化胶原纤维，M. Kikuchi 和 S. Itoh[18,19]采用冷压，Chang[20]采用戊二醛交联的方法，制成块状材料，用于各类骨缺损修复。冷压得到的材料孔隙率低，并且孔径较小，强度较好，但作为框架材料不利于细胞的长入。戊二醛交联的材料的成型性差，无抗压性能，并且戊二醛的残留对于材料的生物相容性有负面的影响，而胶原基材料最大的优势是它是生物相容性很好的材料，是细胞生长的天然基底。清华大学材料系崔福斋教授生物材料组[21~24]在矿化胶原研究的基础上，采用胶原海绵作为矿化基底制备了纳米羟基磷灰石-胶原复合材料，此材料柔韧性较好，但成型性不好，抗压性能较低。为解决此问题，他们进一步引入仿生制备原理，力图制备多孔的框架材料用于骨组织工程，使之仍能保持此类复合材料优良生物相容性的特性，具有一定的强度[25]，且便于成型，达到临床的实际应用。

所研究的信号分子多为重组的人骨形态发生蛋白和重组的 OP-1，并且已经开始了其与材料复合进行临床实验。其他的生长因子还有 TGF-2，FGF，BMP-4 等。涉及到在不同的载体材料上，生长因子的复合与释放的研究直接与临床的骨愈合效果相关，不同的新生长因子的特性，甚至两种因子复合植入时的释放动力学和愈合效果也有待确认。基本上，因子的获得已经从动物骨中的提取走向了用基因工程体外表达的方法。细胞培养基本上采用骨髓基质干细胞或由其发展而成的成骨细胞系。

4.4.3.2　框架材料的细胞反应

基于仿生观念制备的 nHAC-PLA 复合材料，模仿了天然骨的成分及结构特征，可以作为支架材料用于骨组织工程。因此，为了进一步研究框架材料的细胞生物相容性，将细胞种植在框架材料上，观察其生长状态。

通过体外细胞培养的方法，建立了成骨细胞与 nHAC-PLA 材料的三维复合体。SEM 观察结果表明材料具有非常高的细胞亲和性。在种植细胞的第 2 天，细胞就贴附在多孔材料上。图 4.9 是细胞的状态，图 4.9(a)为空白对照一周的多角形的细胞已经集结成片，图 4.9(b)是 5 天时细胞在材料上完全铺展，并且细胞之间的连接如图中箭头所指。之后细胞的长入和细胞增殖，图 4.9(c)清楚地指出在框架材料的孔内细胞是如何通过其逐渐长长的伪足铆钉在材料表面。一周时达到图 4.9(d)所示的多层状态，各细胞之间有交错纤维束连接。而此时的空白对照还只是单层细胞。

因此可以得到这样的结论，成骨细胞与框架材料的初期反应进行研究的结果表明，材料具有很好的细胞亲和性，细胞在材料上正常的贴壁、增殖和迁移生长。好的细胞亲和性的原因是材料具有与天然骨在成分和结构上高度

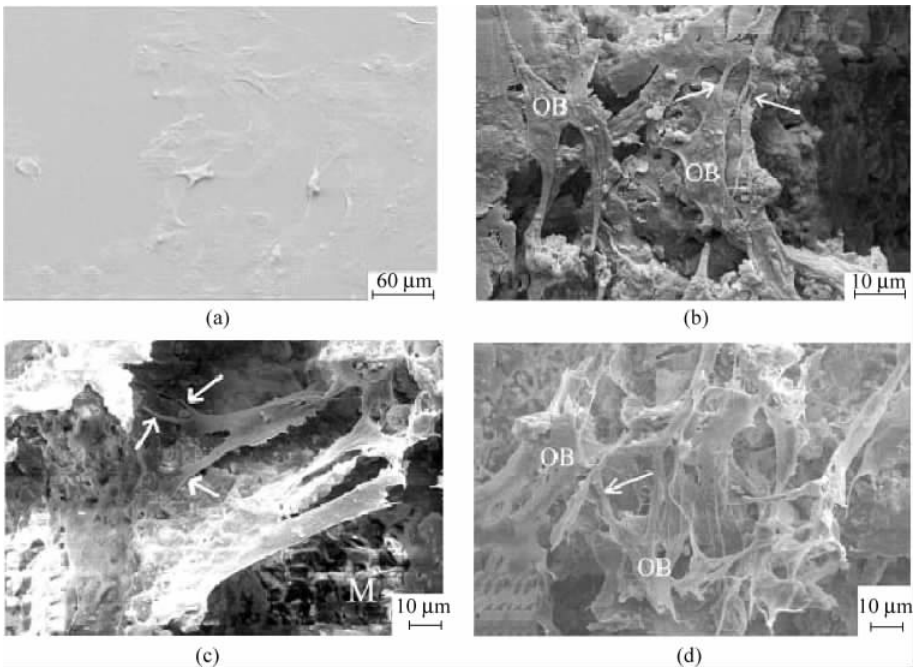


图 4.9　成骨细胞在 nHAC-PLA 材料上的培养

(a) 对照组在玻片上培养；(b) 材料上培养 5 天；(c)、(d) 材料上培养 7 天

的相似性，使得细胞在此基体上的反应积极。多孔材料支架可为细胞提供一种类似体内的微环境，使得多孔结构内部的细胞最终具有了类似在体内时的饱满的多边形形态。细胞在支架材料上分泌和形成矿化基质，同时在组织块与材料的界面上也有新的类骨基质产生。此外材料的细胞毒性研究，结果表明材料对成纤维细胞生长影响小于 5%。将成骨细胞接种在此材料上，一周时，细胞已经铺展，并且分泌许多胞外基质。

观察可得知早期细胞就可进入细胞，并且贴附在材料的内孔壁上。随着培养时间的延长，细胞增殖后就有更多的细胞进入多孔材料的内部。沿纵向进行半薄切片染色即可清楚地看到细胞在材料内部的分布状态，如图 4.10 所示。图中红色的部分是细胞，细胞在 12 天培养时进入材料达 200 μm 以上，最高值达 400 μm。图 4.10(a)可看到细胞在孔中已经密集，几乎占满整个孔，图 4.10(b)黑色箭头所指在材料表面细胞成连续分布，跨越孔径，图 4.10(c)白色箭头所指的成直线的细胞沿着黑色箭头指示的方向通过材料内部的大孔结构，到达相邻的孔洞位置。多孔材料的此种互通交互式网络结构对于细胞的长入是十分有利的。

此外，还进行了框架材料的体外与体内降解性能研究以及动物试验。结

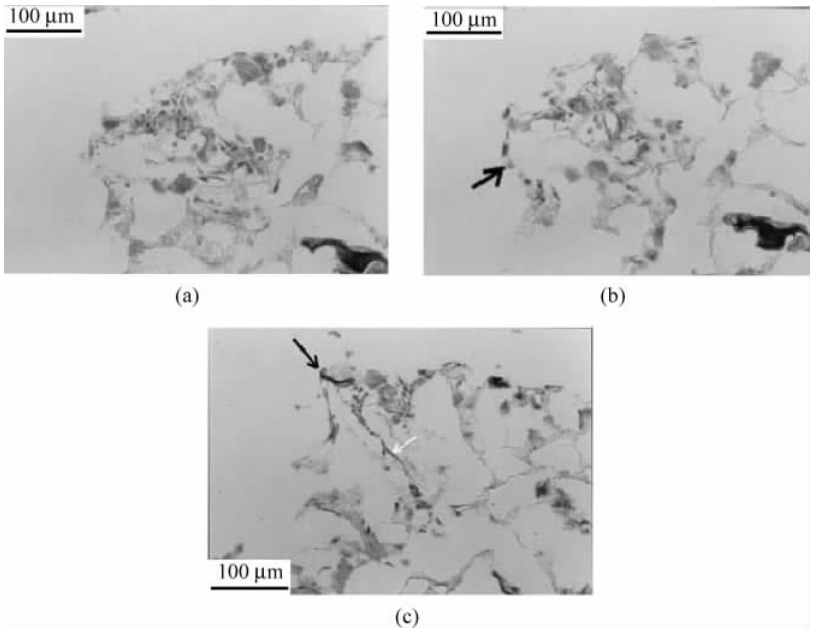


图 4.10　OB 在 nHAC/PLA 培养 12 天的生理切片，Mallory's 染色

(a) 细胞在孔隙中繁殖；(b) 材料表面的细胞跨越孔隙；(c) 孔内细胞沿直线爬行

果表明，nHAC/PLA 材料作为一种新型的骨组织工程材料，它是一种可降解的材料，体外降解时 4 周达到 19.6%。材料中的三种组分的降解速度有区别，胶原最快、羟基磷灰石和 PLA 较平缓。整个降解实验过程中，材料保持规则的初始形状，但框架材料的孔壁厚度减薄，孔壁表面变粗糙。体内降解实验发现近骨区材料的胶原与羟基磷灰石之比值要比中心材料区的高，而且体内植入 10 周的降解量达到 40%左右，其速度稍快于体外模型。整体上材料的降解是与新生骨组织的长入相匹配的。近骨区的成骨细胞聚集，新生胶原基质增加，破骨细胞对于材料的吞噬和利用相结合，新骨愈合的界面逐步从宿主骨界面向材料内部推进。

实验表明 nHAC/PLA 复合材料具有优异的骨传导性，当植入缺损后骨可在这种支架上进行爬行替代性生长，一定程度上起到缩小缺损尺寸的作用。多孔结构有利于结缔组织及微血管的长入。nHAC/PLA 与 rhBMP-2 复合后又具有了高效的骨诱导性。良好的生物可降解性，优异的生物活性和骨传导性以及高效的骨诱导性使这类材料具有较大的临床应用潜力。植体表面及内部被吸收后，伴随有新骨的沉积，这一现象类似骨组织的重塑过程，可使 nHAC/PLA 植体整合入活体骨的新陈代谢中并最终为自身骨组织所取代。在长骨缺损和脊柱融合模型中有很好的愈合效果，可与自体骨相媲美。

参 考 文 献

[1] Bauerlein E. Biomineralization from biology to biotechnology and medical application. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

[2] 张岑. 合浦珠母贝贝壳形成相关蛋白及基因的研究. 清华大学博士论文,2006.

[3] Westbrock P, Martin F. A marriage of bone and nacre. Nature, 1998, 392: 861～862.

[4] Weiss I M, Gohring W, et al. A Haliotis laevigata (abalone) nacre protein is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 285: 244～249.

[5] Karp G. Cell and Molecular Biology, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., 2002.

[6] 崔福斋, 冯庆龄. 生物材料学. 第 2 版. 北京: 清华大学出版社,2005.

[7] Lai C F, Bai S T, Uthgenannt B A, Halstead L R, McLoughlin P, Schafer B W, Chu P H, Chen J, Otey C A, Cao X, Cheng S L. Four and half lim protein 2 (FHL2) stimulates osteoblast differentiation. Journal of Bone and Mineral Research, 2006, 21: 17～28.

[8] 马克昌,冯坤,朱太咏,郭建刚. 骨生理学. 郑州: 河南医科大学出版社,2000.

[9] Hao J J, Ramachandran A, George A. Temporal and spatial localization of thedentin matrix proteins during dentin biomineralization. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2009, 57: 227～237.

[10] 葛俊. 牙釉质和骨的分级结构和纳米力学性质. 清华大学博士论文,2005.

[11] Ten Cate A R. Oral Histology, Development, Structure, and Function, 5th ed. St. Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc., 1998.

[12] Urist M R. Bone: Formation by autoinduction. Science, 1965, 150: 893～899.

[13] Reddi A H, Huggins C B. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, 69: 1601～1605.

[14] Sampath T K, Reddi A H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 7599～7602.

[15] Urist M R, Lietze A, Dawson E. β-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop Rel Res, 1984, 187: 277～280.

[16] Vicente V, Meseguer L, Martinez F, et al. Ultrastructural study of the osteointegration of bioceramics (whitlockite and composite beta-TCP plus collagen) in rabbit bone. Ultrastruct Pathol, 1996, 20: 179～188.

[17] Suh D Y, Boden S D, Louis-Ugbo J, et al. Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression-resistant matrix in posterolateral spine fusion in the rabbit and in the non-human primate. Spine, 2002, 27: 353～360.

[18] Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. Biomaterials, 2001, 22: 1705～1711.

[19] Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J. Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen composite. Biomaterials, 2002, 23: 3919～3926.

[20] Chang M C, Ikoma T, Kikuchi M, Tanaka J. Preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldhyde as a crosslinkage agent. J Mater Sci Lett, 2001, 20: 1199～1201.

[21] Wang R Z, Cui F Z, Lu H B, Wen H B, Ma C L, Li H D. Synthesis of nanophase hydroxyapatite collagen composite. J Mater Sci Lett, 1995, 14: 490～492.

[22] Du C, Cui F Z, Zhang W, Feng Q L, Zhu X D. de Groot K. Formation of calcium phosphate/collagen composites through mineralization of collagen matrix. J Biomed Mater Res, 2000, 50: 518～527.

[23] Du C, Cui F Z, Feng Q L, et al. Tissue response to nano-hydroxyapatite/ collagen composite implants in marrow cavity. J Biomed Mater Res, 1998, 42: 540～548.

[24] Du C, Cui F Z, Zhu X D, de Groot, K. Three-dimensional nano-Hap/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. J Biomed Mater Res, 1999, 44: 407～415.

[25] Li X M, Feng Q L, Cui F Z. In vitro degradation of porous nano-hydroxyapatite/ collagen/PLLA scaffold reinforced by chitin fibres. Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems, 2006, 26: 716～720.

第 5 章　生物矿化与基因调控

5.1　引言

生物矿化本质上是一个受基因精确表达与调控的过程[1]，因而研究矿化基质蛋白的基因位点和基因表达调制的细节，研究基因调控下的生物矿化过程将是搞清矿化控制机理的根本解决途径[2,3]。体内环境下的生物矿化过程是受基因、蛋白、基质和细胞等逐级调控的复杂分级过程[4~6]。在纳米尺度上，矿化组织的组装是由蛋白-蛋白相互作用和蛋白-晶体相互作用所限制的。而基因控制分泌特定的蛋白形成细胞外基质。在中等尺度上，组织的分级组装是由多种细胞活动控制的，而这些细胞活动也是通过基因表达调控的。可见，基因信息在矿化过程中的作用是决定性的，尽管其详细机理目前所知甚少，特别是基因控制功能蛋白分泌的机理。许多重要的相关课题的知识尚处于零星和片段状态。因此，开展研究和矿化相关的基因，将有助于我们更深入地认识蛋白调控矿化过程，从分子水平认识到基因同矿化材料结构、性能的相互关系，并使得仿生材料的研究从成分仿生到真正意义上的结构仿生、基因仿生[7~9]。此外，还有助于为遗传性矿化相关疾病的治疗提出可行的途径[10~12]。

基因，作为生物物质中最小的功能单位，记录着生命中重要的生物遗传信息，指导生物体一切的生物活动；作为一类复杂的生物大分子，具有独特的结构和特有的性质，具有其他一切化学模板所不具有的优异结构和特点，开辟了自组装生物矿化的新的领域。基因除了在天然生物矿化过程中起到重要的调控作用，在体外环境下也被用作矿化模板，受到越来越多的科学家的青睐，在金属纳米线、纳米管等的制备中被广泛研究，并在电子技术领域被认为可能发挥重要的作用。

从基因水平上研究生物矿化过程已经成为了生物矿化领域新的研究方向。在分子水平上理解生物矿化过程中的各种现象不仅能够对生物矿化过程进行系统的分子描述，还能为无机材料的合成和构建提供新颖的方法。此外，基因调控下的仿生矿化研究和新型纳米材料的制备也取得了较大的进展，开辟了基因材料的新领域。本章介绍有关生物矿化的基因相关知识和目前了解的研究进展。

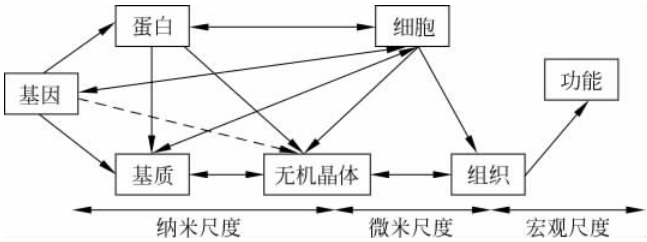


图 5.1　生物矿化中的分级调控示意图

5.2　基因的生物功能

基因是 DNA 分子中含有特定遗传信息的一段核苷酸序列，是遗传物质的最小功能单位。DNA 携带着生物体的所有遗传信息。一条极长的 DNA 分子即可以组成一个生物体的每一条染色体。单细胞是最基本的生命单元。单个细胞通过细胞分裂连续复制出更多的细胞。在进行每次分裂前，组成细胞的每个分子都需要进行复制，这其中也包括所有 DNA 分子的复制。DNA 复制使生物体的遗传信息，即基因被准确的传递到细胞分裂形成的子代细胞中去。细胞中的 DNA 分子即长且脆，因此它们不可避免地会产生各种损伤，而幸运的是，在与 DNA 复制密切相关的反应中，重组过程能修复它们[13]。

众所周知，著名的 DNA 双螺旋结构是由 James Watson 和 Francis Crick 提出的，其基本理论就是 2 条有互补核苷酸序列的 DNA 链依靠彼此碱基之间形成的氢键相连而结合在一起。这个模型使 DNA 复制和 DNA 重组过程得以准确地进行下去。一条 DNA 单链上的每个核苷酸与另一条单链上的互补核苷酸都是严格配对的，这就意味着核苷酸序列上的任何部分都可以作为互补链上对应部分的直接模板，从而序列上的任何部分都可以被用作合成或识别其互补核苷酸序列，这就是实现 DNA 复制和重组的两个核心功能。

在此，我们还要提到 DNA 的另外一个重要特点，那就是从材料学的角度看，DNA 分子因其结构特点而在纳米技术方面有极吸引人的前途：DNA 分子尺寸极小，直径仅为 2 nm 左右，此外它还有 3.4～3.6 nm 的重复性结构。因此作为基于化学基础上的组装系统，DNA 在纳米技术方面将会有极其重要的功能。这方面的研究工作开始于 20 世纪 70 年代，科研人员通过带有互补碱基的粘合性末端将分子“铆接”起来，从而首次实现了体外基因操控。这样的分子粘结研究实际上就是可控分子识别最好的例子：起到粘合性末端作用的分子可以有多种选择，这类末端粘结后的产物就是典型的 DNA 双螺旋结构。而且方便的 DNA 合成技术的出现使设计各种粘结性末端序列变得十分

简单。因此,末端粘结技术实现了可预测的分子间交联控制和结合点几何结构预测。总而言之,核酸为材料设计提供了一个容易驾驭并且富于变化的可编程系统,可以实现对分子间相互作用的精确控制。

5.2.1 基因表达及其特点

基因组(genome)是指一个细胞或生物体所携带的全部遗传信息或整套基因。生物体基因数量很多,但众多的基因只是在特定时期一部分基因能产生蛋白质、多肽等产物,其他大多数基因或以极低的速率进行转录,或处于沉寂状态。同时,不同品种、不同功能的基因产物分子数量间差异很大。即使对同一分子而言,其在细胞内的数量也会随时间、环境和发育程度的改变而变化,这符合生物最大限度的节能及用能原则。为满足这一原则,基因表达在一定调节机制控制下不断变化,随时调整不同蛋白的表达数量,以适应生物体发育及正常生理活动的需求。对于生物矿化而言,生物体也正是通过基因表达来控制细胞外基质的合成、分泌和细胞活动,从而达到控制晶体以各自特殊的方式生长,成熟,形成各种形貌,结构和性能的生物矿物。

基因表达就是基因转录及翻译的过程。具体说,在各种调节机制控制下从基因激活开始,历经转录、翻译等过程产生具有生物学功能的蛋白质分子,这就是基因表达(gene expression)。rRNA、tRNA 编码基因转录合成 RNA 的过程也属于基因表达。

无论是结构简单的病毒,还是比较复杂的单细胞、多细胞生物,或者是高等的哺乳动物,基因表达都是严格控制,表现为特定规律性的。体外培养细胞的研究表明,某些基因产物只是在分化细胞表达,在未分化细胞不表达,而有些则恰好相反,而且细胞分化后基因产物消失。这就意味着,基因表达的规律性呈现一定的时间顺序和空间顺序。在自然生长的生物体内,基因表达的规律更加复杂。生物物种越高级,基因表达规律就越复杂,越精细。生物体基因表达严格按照一定时间、空间顺序发生的规律,也就是基因表达的特点,是由一定调控机制决定的。基因表达存在阶段特异性和组织特异性,这是基因表达的显著特点。在原核生物,基因表达的阶段特异性与生长周期以及环境密切相关,而在真核生物,基因表达的阶段特异性核组织特异性与分化、发育相关,二者是一个密切协调、同时并存的整体。

5.2.2 基因表达的调节方式

为了适应环境,满足机体对不同蛋白的需求,基因表达在不断变化。我们将调节基因表达所涉及的全部机制,称为基因调控(gene control),又称为基因表达的调节(regulation of gene expression)。基因种类不同,基因表达核

调节的类型也存在极大差异，可以分为：

（1）基本的基因：即管家基因(housekeeping genes)的表达。无论表达水平高低，这类基因表达几乎是“一成不变”的，或者变化很小。

（2）基因的诱导和阻碍：这类基因的表达产物的水平在特定环境下表达会出现增高的过程，即诱导；相反，如果基因在对环境信号应答时表现为表达水平降低，即成为阻碍。

（3）协调表达：即在生物体内，一个代谢过程需要多种酶分子参与，同时还需要很多其他蛋白参与作用物在细胞内、外区间的转运，并且参与同一代谢途径的所有蛋白分子比例适当，从而确保代谢途径顺利进行。机能上相关的一组基因协调一致，相互配合，共同表达，即为协调表达(coordinate expression)。控制一组基因协调表达的共同机制称为协调调节(coordinate regulation)。协调表达和协调调节对细胞形态，生物体功能等表型的确立、代谢的正常进行具有重要意义。

在一个细胞活动中，某种蛋白浓度的调节是通过分子合成和降解等化学变化来实现的，其中设计到很多过程的平衡过程。从基因活化到蛋白合成至少有基因活化、转录起始、转录后加工、mRNA 降解、蛋白翻译、翻译后加工修饰和蛋白降解等过程。上面任一环节机制发生异常变化，均会影响一个基因的表达水平。

5.3　生物矿化中的基因调控作用

特别是随着分子生物学及其相关技术的发展，生物矿化的研究领域也越来越宽，并涌现出许多新的前沿问题。在 2003 年以来举行的 Gordon 会议上，生物矿化与基因关系一直是其中的一个重要课题。研究矿化与基因关系的模型矿化组织涉及较多的是骨[14~16]，牙[17,18]，贝壳[19,20]，硅藻(diatom)[21]，海绵[22,23]等。

从基因水平上研究生物矿化过程以及同矿化相关疾病的研究是其中重要内容。在分子水平上理解生物矿化过程中的各种现象不仅能够对生物矿化过程进行系统的分子描述，还能为无机材料的合成和构建提供新颖的方法。此外，基因调控下的仿生矿化研究和新型纳米材料的制备也取得了较大的进展，开辟了基因材料的新领域[24~26]。

在本节内容中，我们将以骨和牙釉质这两种生物体内最重要的生物矿物在基因调控下的发育、生长和成熟过程为例，对生物矿化中的基因调控作用进行介绍。

5.3.1 骨矿化过程中的基因调控作用

骨是一种被普遍认可的具有优异断裂性能的天然矿化材料,是人体重要的承重器官。长期以来,天然骨材料的矿化机理研究以及缺损骨骼的修复成为了多领域科学研究的焦点。在体外合成出具有天然骨材料复杂的分级结构和优异力学性能的仿生骨材料一直是生物材料学家们追求的梦想。最早尝试体外合成骨材料的主体思想是成分仿生。由于骨矿的主要构成是以羟基磷灰石为主的磷酸钙,所以具有良好生物相容性的羟基磷灰石就成为了研究骨修复和替代材料的热点。但事实上,天然硬组织很少是采用纯的无机矿物构建的,几乎所有的优异的生物矿化材料都采取了有机分子调控无机相生长的策略。这就意味着从基因、蛋白质分子和细胞调控的水平上去理解骨的发生和矿化过程是当前这一领域发展的关键。

5.3.1.1 骨中的有机基质

骨是非常复杂的生物体系,骨中最主要的有机成分是Ⅰ型胶原蛋白,通常占总蛋白的85%~90%。其他的蛋白被称为非胶原蛋白。骨中非胶原蛋白含量虽少,但种类很多,目前已报道的超过200种,含量较多的约有12种。种类繁多的有机基质由不同的基因所编码,所以,我们首先了解一下骨中主要的几类蛋白质。

1. Ⅰ型胶原蛋白

胶原蛋白是骨的主要基质蛋白,是由结缔组织细胞分泌的一类蛋白,已发现有20余种胶原蛋白,其种类因物种和组织而异。Ⅰ型胶原蛋白在动物体内含量最多。骨有机物中90%以上是Ⅰ型胶原蛋白。Ⅰ型胶原蛋白的相对分子质量为285 kDa。其一级结构是以(Gly-X-Y)为重复单元的多肽链,X,Y中刚性的环状氨基酸(脯氨酸 Pro 和羟脯氨酸 HPro)较多,因而限制肽链的旋转使其三级结构稳定化,由此构成的肽链呈现两种形式的α螺旋(α1、α2)。原胶原蛋白分子是由3股α螺旋结构的多肽链按照右手螺旋方式相互缠绕而形成的超螺旋(2α1+α2),宽约1.5 nm,长300 nm。3.5.1.1节有对Ⅰ型胶原蛋白更详细的介绍。

2. 非胶原蛋白

(1) γ羧基谷氨酸蛋白(γ-Carboxyglutamic Acid-containing proteins)

(a) 骨钙蛋白(osteocalcin)

骨钙蛋白于1975年首次发现,因为其在骨中的分布以及与钙结合的功能而得名(最初被称为骨 Gla 蛋白,或 BGP)。在不同动物物种中,其占非胶原基质蛋白的含量不同。在老鼠中含量丰富,占非胶原蛋白的15%以上,人骨

中含量相对很少。

分布：在骨、牙齿和其他类型的矿化组织中都有分布；

结构：人骨钙蛋白由 49 个氨基酸残基组成，计算相对分子质量为 5 300，其中的 2～3 个氨基酸残基中含有 γ 羧基谷氨酸(GLA，gamma-carboxy glutamic acid)链，与钙具有独特的结合功能；

功能：一般认为骨钙蛋白在骨形成过程中，对于细胞外基质蛋白之间的形成以及骨组织的矿化过程具有重要的调节作用。在矿化过程中可能是抑制骨中羟磷灰石结晶的形成。但基因敲除实验证明骨钙蛋白可能不直接调节骨的矿化，而可能参与调节骨细胞形成基质。骨钙蛋白还可以与骨桥蛋白(osteopontin)结合成复合物的形式，促进骨吸收的过程。

(b) 基质 Gla 蛋白(matrix gla protein)

基质 Gla 蛋白相对分子质量为 15 000 Da，含有大概 5 个 Gla 残基和 1 个二硫键。MGP 在发育的早期阶段开始表达，并且含量稳定，在整个矿化基质中含量均一。人的 MGP 基因约长 4.3 kb，包含 4 个外显子和 3 个相对较大的内含子。外显子 1 编码信号肽，外显子 2 编码分子的 α 螺旋区域，外显子 3 编码羧酸酶识别序列，外显子 4 编码 γ 羧基化区域。成熟的 mRNA 大概为 0.7 kb 长。免疫学研究表明，MGP 并非骨的特异蛋白，许多非骨组织中，如软骨、肺、心脏和肾等都含有基质 GlA 蛋白。

(2) 糖蛋白(glycoproteins)

(a) 骨连蛋白(osteonectin)

骨连蛋白又称为分泌型酸性富含半胱氨酸的蛋白(SPARC，secretedprotein acidic and rich on cystcine)。

分布：骨连蛋白的表达活性广泛分布在各种类型的组织细胞中，从多种类型的组织细胞中都可以分离纯化到骨连蛋白和克隆到骨连蛋白的 cDNA；

结构：人骨连蛋白由 303 个氨基酸残基组成，计算相对分子质量为 34 593 Da。

骨连蛋白存在着翻译后加工修饰，特别是某些位点发生糖基化修饰。其分子结构中含有钙结合位点区；骨连蛋白是一种胶原结合型糖蛋白，在细胞外基质蛋白的沉积与装配过程中起着重要的调节作用，对骨的形成、组织的分化与更新都有着极为密切的关系。骨连蛋白可以与二价金属离子、血清白蛋白和骨桥蛋白结合，也可与血小板和内皮细胞进行结合。

(b) 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)

碱性磷酸酶由成骨细胞分泌，在骨发育阶段表达水平很高。相对分子质量 100～200 kDa 不等，是由二硫键连接的相对分子质量 50～85 kDa 的不同多肽链的二聚物。尽管来源于同一基因，在不同组织中的相对分子质量有所不同。

(c) 粘连蛋白(fibronectin)

粘连蛋白在细胞外基质蛋白中最普遍,功能最多的一种蛋白就是粘连蛋白。这种多功能的分子参与了大量的细胞外活动,比如说细胞的迁移,贴附以及基质组织过程。粘连蛋白是由两个相似亚基通过C端的二硫键组装的二聚体结构,亚基的相对分子质量为250 kDa。每个亚基至少包含了9个区域,其中大部分为限制性连接特征区域:Ⅰ,纤维素,肝素,细菌;Ⅱ,明胶,胶原;Ⅳ,DNA;Ⅵ,细胞表面;Ⅶ,肝素;Ⅷ,其他纤维位点。粘连蛋白在骨代谢过程中的作用仍没有被完全研究清楚。在通过脱矿骨粉的再矿化研究中,粘连蛋白在骨发育过程中被合成。同时它也存在于骨合成过程中成骨细胞周围,尽管仍没有确定它是否是一种完整的骨基质成分。在体外研究中表明,成骨细胞可以利用粘连蛋白进行细胞贴附。同其他基质蛋白一样,成骨细胞分泌了粘连蛋白,转录生长因子-β调节它的合成。

(d) 凝血栓蛋白(thrombospondin)

凝血栓蛋白这种三聚体糖蛋白由3个完全相同的亚基经二硫键键合形成。是众多结缔组织细胞的合成产物。同时它也是血小板α颗粒的主要蛋白,说明它可能是由巨核细胞合成。类似于粘连蛋白,凝血栓蛋白亚基包含不同的区域,与结缔组织核血清蛋白结合。它通过Ca^{2+}与羟基磷灰石结合,同时也和骨连蛋白结合。有趣的是,凝血栓蛋白与骨连蛋白同时存在血小板α颗粒中,并互相结合在一起。其中的生理学意义并不清楚,但这种复杂的结合必定同实现这两种不同系统中的某种需求有关。

(3) 蛋白多糖(proteoglycan)

矿化组织中非胶原基质中主要的一类就是蛋白多糖,占全部非胶原蛋白的10%左右。这类蛋白是指蛋白质与多糖以共价和非共价键相连构成多种巨大分子。其分子组成以多糖链为主,蛋白质部分所占比例较小。往往一条多糖链上联结多条多肽链,相对分子质量可达数百万以上。蛋白多糖中的多糖链为杂多糖,因其组成成分中均含氨基己糖,所以称为氨基多糖或糖胺聚糖(glycosaminoglycans)。人体结缔组织中常见的氨基多糖包括透明质酸(hyaluronic acid)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate)、硫酸角质素(keratan sulfate)和肝素(heparin)等。蛋白多糖为"瓶刷状"分子结构,其蛋白多糖亚单位("刷毛")非共价附着于透明质酸主链上(backbone),其间相隔200～300 Å。蛋白多糖亚单位由一个核心蛋白和共价连接其上的糖胺多糖组成,后者主要为硫酸角质素和硫酸软骨素。人体中有多种不同的核心蛋白,相对分子质量达200～300 kDa,是所有组织细胞中分泌的最大的一种多肽。核心蛋白高度伸展N-末端,形成一球状区,约60～70 kDa,非共价连接于透明质酸链上,另一种约40～60 kDa的连接蛋白参与稳定球状区与透明质酸链的非共价连接。

核心蛋白及多糖组成的亚单位可分为 3 区：

① N-端区：包括球状连接区，含有较少的寡糖链。

② 富含寡糖区：为硫酸角质素寡糖链的主要附着区。寡糖链共价连接于核心蛋白分子中丝氨酸和苏氨酸残基侧链氧原子上。

③ C-末端区：富含硫酸软骨素。通过半乳糖，半乳糖，木糖三糖连接于核心蛋白的丝氨酸残基。蛋白多糖的透明质酸主链长度为 4～40 kb，可附着上百个核心蛋白，每条核心蛋白可结合 50 条硫酸角质素链和 100 条硫酸软骨素链，由此可见蛋白多糖分子巨大，相对分子质量可高达数千万。

蛋白多糖分子大，具高度亲水性，对保持结缔组织水分及与组织间物质交换均有重要作用。蛋白多糖的糖链上含有较多的酸性基团，对于细胞外液中 Ca^{2+}、Mg^{2+}、K^{+}、Na^{+}等阳离子有较大的亲和力，因此能调节这些阳离子在组织中的分布。蛋白多糖分子巨大，有较大的粘滞性，附着于组织表面，能缓冲组织之间的机械摩擦，因而具有润滑、保护作用。此外，蛋白多糖与创伤的愈合亦有密切关系。皮肤创伤后的肉芽形成过程中，通常先有糖胺多糖的增生，进而促进胶原纤维的合成，其机理尚不清楚。近年来发现蛋白多糖可调节某些蛋白生长因子的作用。例如碱性成纤维细胞生长因子（basic fibrotlast growth factor，bFGF）结合于蛋白多糖的肝素或硫酸角质素链上，而且要以 bFGF 糖胺多糖复合物形式与细胞表面受体结合。bFGF 与肝素或硫酸角质素结合能保护 bFGF 免被降解。当核蛋白水解或肝素或硫酸角质素链部分降解时可释放出活性 bFGF 糖胺多糖复合物，刺激细胞增殖及分化。

其他一些生长因子也有类似作用机制，很明显，广泛和大量存在的蛋白多糖可局限这些生长因子在其分泌细胞短距离内作用。这对于组织的特有结构具有重要意义。

(4) 唾液酸蛋白和磷蛋白(sialoproteins and phosphoproteins)

唾液蛋白(Mr＝25 000)含有大量的谷氨酰和天冬氨酰残基，唾液酸，葡萄糖酸和半乳糖酸。矿化基质中含有多种唾液蛋白，包括骨桥蛋白，骨唾液蛋白和骨酸性糖蛋白。唾液蛋白占骨非胶原蛋白的 15％左右。

(a) 骨桥蛋白(osteopontin)

骨桥蛋白，是骨组织中大量存在的一种唾液蛋白(sialoprotein)，是一种分泌型糖基化磷蛋白。

分布：除了在软骨、骨组织中分布外，在胎盘、肾远曲小管、中枢神经系统、免疫系统中的细胞等都有广泛的表达。

结构：相对分子质量为 44 kDa，含有 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser(GRGDS)氨基酸残基序列，其结构位于骨桥蛋白序列的中间部位，是几种细胞外基质蛋白细胞粘附作用的决定性位点序列。在其氨基酸序列的氨基末端，含有 9 个

连续的天门冬氨酸残基,是一段含有高比例的酸性氨基酸残基的多肽序列。

功能:与细胞具有粘附作用,也能与羟磷灰石进行结合,在细胞粘附、细胞的信号转导、肿瘤的转移、免疫调节等过程中有都具有十分重要的作用。

(b) 骨唾液蛋白(BSP-Ⅱ)

骨唾液蛋白(bone sialoprotein)是一种发生了高度翻译后修饰的蛋白质,其相对分子质量40%~50%来源于碳水化合物,13%~14%来源于唾液酸(sialicacid)。在人骨组织中,骨唾液蛋白占总的非胶原蛋白的15%左右。

其结构中含有RGD细胞粘附位点,但与骨桥蛋白的氨基酸残基序列却完全不同。骨桥蛋白中的RGD序列位于其氨基酸残基序列的中间部位,而骨唾液蛋白分子中的RGD序列则位于其分子的羧基末端。这一区域中也是一个富含酪氨酸残基的结构区。在富含酪氨酸残基序列的上游是一系列的酸性氨基酸残基,证实这是一段可以发生硫酸化修饰的保守序列。

细胞培养实验证明骨唾液蛋白的硫酸化修饰十分广泛,在23个酪氨酸残基中,有一半的酪氨酸残基已发生了硫酸化修饰,在氮和氧相关性的寡糖链上也发现有硫酸乙酯的存在。骨唾液蛋白的硫酸化修饰对于细胞粘附究竟有什么作用,目前还不十分清楚。

(c) 骨酸性糖蛋白(bone acidic glycoprotein,BAG)

第三类唾液蛋白是骨酸性糖蛋白,含有29%的酸性氨基酸、7%的唾液酸和8%的磷酸盐。BAG同小分子的骨蛋白多糖结合紧密,N端测序结果表明,BAG是不同于骨桥蛋白和骨唾液蛋白的一种唾液蛋白,更多的信息还有待研究。

(5) 基质中的其他蛋白

(a) 生长因子(growth factors)

通过高压液相色谱纯化和微测序技术,大量含量极低的生长因子被发现。主要包括TGF-β1和TGF-β2,类胰岛素生长因子Ⅰ和Ⅱ,血小板衍生生长因子,成纤维细胞生长因子,骨诱导生长因子等。大多数生长因子都是成骨细胞分泌的。

(b) 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins,BMPs)

骨形态蛋白是一组能够诱导骨组织形成的蛋白质,属于TGF-β大家族的成员。20世纪60年代末期,Urist等将牛骨置于酸溶液中去钙后的骨片段植入肌体内后发现能够诱导新骨生成,他们认为去钙骨基质中存在能诱导骨生长的未知物质,称之为骨形态发生蛋白。其后的研究表明,BMPs是一组复合物。迄今为止,人们已经分离出了40余种这类蛋白质,而且通过DNA重组技术,人的九种不同的骨形态发生蛋白BMP1~9已经得到了清楚的解释。

骨形态发生蛋白是 1 种二聚物分子，它是由数百个氨基酸残基和 7 个高度保守的胱氨酸残基通过 3 个链外二硫键和 1 个链内二硫键连接而成。这种二硫键十分重要，它维持着蛋白质的构象，使其保持生理活性。单个分子内二硫键的减少会使它的活性丧失。目前，尽管 BMPs 诱导成骨的详细机制仍不十分清楚，但通过实验观察和理论分析，人们开始了解到它在趋化性、细胞增殖、细胞分化中起着重要的作用。BMP 诱导骨形成是通过软骨化成骨或膜性成骨的过程来实现的。

5.3.1.2　基因调控骨细胞外基质及其力学性能

正如前文所述，骨具有复杂的组成、结构以及力学性能，因此影响其机械性能的因素也是复杂多样的。为了便于理解，我们可以把骨比作人体内的钢筋混凝土。众所周知，钢筋混凝土是由预先排列好的钢筋灌注混凝土复合而成的紧密混合体，具有足够的强度和弹性去支撑承力过程中来自不同方向的作用力。如果没有钢筋，易碎的混凝土在很小的力作用下就会断裂；如果没有混凝土，钢筋也不足够起到支撑的作用，极易弯曲。骨组织也是如此，骨中的胶原纤维就好比钢筋，无机矿物就好比是混凝土。无机矿物提供强度，胶原纤维提供弹性。因此，我们很容易理解，任何影响到胶原纤维的组装和排列、无机矿物的沉积以及二者之间的相互作用等因素都会影响到骨的宏观力学性能。生物矿化本质上是一个受基因精确表达与调控的过程，因而研究矿化基质蛋白的基因位点和基因表达调制的细节将有助于我们了解基因同结构和性能的相互关系。

骨中Ⅰ型胶原蛋白的排列组装、非胶原蛋白的表达是骨矿化发生的关键所在。这些基质蛋白表达过程中任何氨基酸的缺失、替代等都会直接影响蛋白的功能，进而改变骨的结构和性能。很多骨骼相关疾病都是由于某一位点的氨基酸的改变而导致的。

胶原蛋白作为骨矿化发生的模板，它在细胞外基质中的排列、组装直接决定了矿化的有序性和完整性。目前，已从 12 种胶原类型的 22 个基因中鉴定出 1 000 多个突变位点，涉及成骨不全症、骨质疏松、和软骨发育不良症等多种疾病。绝大多数的骨缺陷疾病都和Ⅰ型胶原的变异相关。

非胶原蛋白、信号蛋白等蛋白编码基因的破坏也可能会直接影响细胞外基质的构建，引起严重的骨疾病。例如，护骨素（osteoprotegerin，OPG）基因启动子区序列的变化可能影响 OPG 的转录和表达，造成骨质疏松[27]。成纤维生长因子 9（FGF9）基因突变是多发性骨性连接综合症（SYNS）的致病元凶[28]。此外，即使蛋白质编码基因正常，编码基因转录、翻译过程中酶的突变也可能影响其蛋白的正常表达，导致骨形成缺陷。

影响蛋白功能的因素很多。骨细胞外基质蛋白的编码基因的突变会直接改变蛋白的一级序列。即使在蛋白质编码基因正常的情况,编码基因转录、翻译过程中酶的突变也能够影响其蛋白的正常表达。此外,以胶原蛋白为主的细胞外基质蛋白的翻译后的修饰对蛋白的高级序列和功能的实现有着重要的意义。特别是占骨中有机基质 90%以上的胶原蛋白,是骨组织的结构框架,并具有复杂的分级结构。因此,胶原纤维组装过程中任一微小步骤的改变都会对骨材料的功能产生巨大的影响。后面将具体介绍同胶原蛋白突变相关的骨疾病。

5.3.1.3 基因缺陷引起骨矿化过程的改变

基因缺陷的骨骼疾病的形成主要由于骨蛋白异常或磷酸钙盐在胶原纤维上沉积能力遭到破坏。尽管致病的因素复杂多样,但病理特征主要表现为两大类。一类疾病出现“软骨”特性,骨骼易屈服。比方说软骨病等。另一类疾病则相反,往往出现“脆骨”特性,骨骼易脆断。这类疾病主要包括骨形成缺陷(osteogenesis imperfecta,OI)、骨质疏松症(osteoporosis)等。骨形成缺陷症是一类典型的胶原蛋白基因突变的遗传性骨疾病。本小节将主要介绍骨形成缺陷症中基因是如何影响骨的矿化过程的。

骨形成缺陷症(OI 疾病)是一类遗传性脆骨病,是由编码胶原蛋白 α1 链和 α2 链的 COL1A1 和 COL1A2 基因突变引起的[29~32]。严重程度和类型种类较多,个体差异较大。同种类型的不同个体,甚至一个家族的个体之前都存在着特性差异。比方说,有的人一生可能会发生几次骨折,有的人甚至是可以发生几百次的骨折。通常根据临床特性将 OI 疾病分为 4 种类型,各个类型的临床表现见表 5.1,不同类型严重程度不同。

表 5.1 骨形成缺陷疾病 4 种类型的临床特征

Ⅰ型	• 最普遍和最轻微的一类 OI 疾病 • 骨容易骨折,大部分骨折发生在青春期之前 • 正常或者接近正常的身高 • 关节松动,肌肉韧性降低,伸缩性能下降 • 巩膜(白眼球)通常含有蓝色、紫色或灰色斑点 • 三角脸形 • 有脊椎弯曲的倾向 • 骨畸形很少或不存在 • 牙齿有脆化的可能 • 有听觉损耗的可能,通常开始于 20~30 岁 • 胶原结构正常,但数量低于正常水平

续表

Ⅱ型	• 最严重的一种类型 • 常常致死性的，或出生后不久由于呼吸问题而死亡；近几年一些Ⅱ型病人存活到幼年时期 • 大量的骨折和严重的骨畸变 • 身材矮小，肺发育不全 • 胶原异常
Ⅲ型	• 骨易于断裂，骨折经常发生在出生时，X 光检测表明出生前发生或骨折愈合现象 • 身材矮小 • 巩膜（白眼球）含有蓝色、紫色或灰色斑点 • 关节松动，四肢肌肉发育不完善 • 桶形胸腔 • 三角脸形，脊椎弯曲 • 可能存在呼吸问题 • 骨畸变通常很严重，牙齿有脆化的可能 • 有听觉损耗的可能 • 胶原异常
Ⅳ型	• 严重程度介于Ⅰ型和Ⅲ型之间 • 骨容易骨折，大部分骨折发生在青春期之前 • 身高低于平均水平 • 巩膜白色或者接近白色 • 轻微或者中等骨畸变 • 有脊椎弯曲的趋势 • 桶形胸腔，三角脸形 • 牙齿有脆化的可能，有听觉损耗的可能 • 胶原异常

为了更好的认识 OI 疾病，搞清楚为什么胶原框架发生异常以及这些异常的胶原框架如何影响骨的结构是非常重要的。

正常胶原纤维是由刚性的胶原分子按照严格的交互式排列组装而成的。这种排列方式类似于砌墙过程中砖和石灰的关系。结实的墙体需要每一块砖都有完全相同的尺寸和形状，以便它们能够按照搭接的方式排列。胶原分子也同样按照“搭接”的方式排列。

OI 疾病中胶原纤维未能为骨骼提供足够的强度，这主要是由于胶原的数量或者形状存在异常。胶原分子结构或者数量上的缺陷主要是由于编码胶原的基因突变所致。错误的基因信号使细胞产生了异常的胶原蛋白，组装成缺陷的胶原纤维。尽管可能仍然存在一些正常的胶原纤维，但这些纤维却不能同异常的纤维正常的作用，因此骨骼变得不再强壮。

在 OI 疾病中,形成的胶原纤维或者“弯曲”或者“断裂”,导致了骨结构的不稳定。并且有 1/2 到 3/4 的胶原纤维存在缺陷。胶原纤维的缺陷越严重,胶原框架越不牢固,骨形成缺陷越严重。在 OI 患者的研究中,准确的预见病例的严重程度主要基于对胶原纤维缺陷位点的确定。

不同于严重的 OI 疾病,轻微的或者Ⅰ型 OI 疾病并不是由于异常胶原纤维的形成引起的。它们主要来源于正常胶原纤维数量的减少。在这些疾病中,突变抑制了胶原基因 DNA 某一条链的功能,这样仅有一半的胶原纤维对骨的强度产生了一定的影响,但并没有很严重的骨骼畸变。

胶原突变对骨强度产生破坏性的影响还有以下几个原因:

(1) 具有缺陷的胶原框架未能为矿物的沉积提供很好的模板,导致无机矿物沉积出现偶尔性。

(2) 具有缺陷的胶原纤维被体内正常的生理过程所探测并自动消灭,导致骨数量的减少。

(3) 成骨细胞本身受到附近异常胶原分子的影响,成骨细胞不能够正常地分泌正常的胶原纤维并把它们释放到细胞外。这样,成骨细胞就充满了大量有缺陷的胶原纤维,而且还不能释放到细胞外,导致了这些成骨细胞难于分泌其他骨蛋白,分化速度低,新骨细胞形成速度大大降低。然而,身体需要骨细胞制造更多的新骨,特别是在生长发育期,大量的新骨需要支撑不断增长的身高和体重。不幸的是,这类骨仅包含并形成具有缺陷的纤维,强度却无法提高。

这个现象可能解释了为什么快速生长的儿童容易经受大量的骨折,因为他们需要骨骼的强度要比所能提供的要高。当性发育成熟后,生长停止,这时对骨细胞活性的要求才变得安全可靠。骨细胞能够分泌足够的骨基质维持骨质量,而不再需要为生长形成新骨。因为骨细胞保持一定的含量,骨折发生的频率将减少。

总之,严重的 OI 疾病由基因突变引起,产生畸变的胶原纤维。治疗这种 OI 疾病的最重要的方法就是抑止突变胶原纤维的最初合成。如果这个目标可以实现,结果是形成Ⅰ型 OI 疾病,也就是病人含有一半的正常胶原基因,产生少量的正常胶原纤维,而没有异常的胶原纤维存在。一旦这个目标实现,药物可以刺激更多的由正常胶原基因翻译的胶原产物形成,来增加骨的强度。

下面将结合具体的病例介绍一下 OI 疾病的临床特点和致病基因。

最严重的 OI 疾病是产期死亡的情况(Ⅱ型)。突变的类型包括 COL1A1 基因或者 COL1A2 基因片断的大量缺失,COL1A1 基因的碱基插入,以及单碱基突变导致胶原分子螺旋区域甘氨酸被其他具有较大残基的氨基酸所替

代。甘氨酸被替代将改变三股螺旋的构型，这是因为每一个位于$(Gly\text{-}X\text{-}Y)_n$重复区域的甘氨酸在空间上处于螺旋的中心区域。甘氨酸被替代的Ⅰ型胶原纤维增加了翻译后的修饰作用，通常具有较低的变性温度，难于有效的分泌。

下面介绍的病例就是单碱基突变的类型。病例父母身体健康并无血缘关系，病人出生后由于心跳缓慢无呼吸而很快死亡。出生后 1.649 kg，体长 35.5 cm，头围 30.5 cm。四肢短小并且弯曲，X 光检查表明大范围长骨弯曲，骨质减少，同Ⅱ型 OI 疾病临床诊断相符。通过对胶原蛋白分子进行的基因分析表明，该病例胶原蛋白 COL1A1 基因发生单碱基突变，胸腺嘧啶(T)被鸟嘌呤(G)替代导致Ⅰ型胶原 α1 链 946-甘氨酸(Gly)被半胱氨酸(Cys)替代。

OI 疾病的病例中有很多都是由 Cys 代替 Gly 所引起的。临床病例诊断显示靠近胶原 α1 链分子 C 端部分的氨基酸突变往往引起死亡(Cys-988，Cys-904，Cys-748，Cys-718，Cys-691)。中等情况的病例有 Cys-526，Cys-382，Cys-178，Cys-175 等。轻微情况的病例有 Cys-223、Cys-205、Cys-94 等。这些数据表明突变显型依赖于 Cys 替代 Gly 发生的位置，越靠近 C 端的位置，突变造成的病例越严重。

通过对本病例的研究表明，同以往的研究结果相一致，Ⅰ型胶原蛋白被过度修饰。Cys 代替 Gly 导致蛋白分子折叠过程的延迟，这就延长了翻译后的修饰过程。同时还降低了分子完整性，变性温度降低。相关的研究还表明甘氨酸突变对 3 股螺旋构型的影响高度依赖于突变发生的位点。由于Ⅰ型胶原蛋白 3 股螺旋缠绕的方向是由 C 端朝着 N 端方向的，因此突变发生位点越靠近 C 端，对 3 股螺旋正常的形成和稳定性影响越大。

最近，张漾用斑马鱼模型，对比了基因突变与正常鱼的结构与纳米力学性能。提出该模型与 OI 疾病相关性，引起国际同行的兴趣[26]。

5.3.1.4　利用斑马鱼模式生物研究基因对骨疾病和生物矿化的影响

1995 年德国马普生物发育研究所的发育基因学家 Christiane Nüsslein-Volhard 和美国发育基因学家 Eric Wieschaus 因 70 年代开始的果蝇突变体研究和突变技术，打开了分子发育生物学的神秘大门而荣获该年度的诺贝尔生理和医学奖。这一事实推动了发育生物学的快速发展，同时也肯定了采用模式生物来处理发育问题的思路。模式生物在人类疾病(特别是多基因遗传性疾病)的预防、诊断、治疗以及新药的开发等方面起着重要的推动作用。目前，大部分模式生物还局限在大肠杆菌、酵母、线虫等低等生物。在已有的脊椎动物模型中，小鼠是唯一一个得到深入研究的脊椎动物模型。但随着

研究的深入,其他脊椎动物种类,如斑马鱼[26]、河豚等,正逐渐引起研究者的关注。

理想的现代分子发育学的研究模型要具备胚胎学和基因学两方面的优势,即易于观察胚胎的发育过程,又容易在胚胎中引入突变以研究正常发育的过程。观察现有的脊椎动物模型可以看到:小鼠虽然具有基因方面的研究优势,但其胚胎隐藏在体内,不便于直接观察。鸡和爪蟾虽然是很好的胚胎学研究模型,但它们繁殖很慢,记录后代的遗传信息很困难,并且母体太大,价格昂贵,不适合做大规模的突变体研究。这时,一种小型的鲤科硬骨鱼引起分子发育学家们的注意,这就是曾经在全世界的工业实验室里,被广泛地用于标准毒理学实验(ISO 7346 1—3,GB/T 13267—1991)的斑马鱼。

斑马鱼原产于印度的科罗曼德尔海岸。20 世纪 70 年代中期,美国 Oregon 大学的噬菌体基因学家 George Streisinger 独具慧眼地注意到斑马鱼胚胎的独特优势和潜在的基因优势,从宠物店购买了这种具有漂亮条纹的,身长仅有 3～4 cm 的小鱼,首先开始了斑马鱼的饲养及其品系、标准实验方法和基因方法的建立。此后,斑马鱼由于其个体小、价格便宜,易于在实验室内大规模的养殖;以及胚胎在体外发育,胚胎透明;且产卵量大(几十到上百)、产卵周期短(几天到两周)、发育迅速(2～3 天即可发育成幼体,3 个月成熟)、易于引入突变,易于得到单倍体、雌核二倍体等优点开始得到研究者们的看好,而成为 1990 年 Science 的年度模型。

1996 年,以 Haffter 为首的基因生物学家们在对斑马鱼的大规模突变体筛选中共得到 1 000 多种斑马鱼突变体。但遗憾的是,在所有得到的突变体中,大部分是关于胚胎发育早期的,只有少数几种具有成年显型,我们知道,骨的形成至少是在成年后才可以表现出来的。1999 年,Nature Genetics 发表了美国约翰霍普金斯医科大学 Fisher 关于骨形貌蛋白对斑马鱼骨骼形貌影响的研究,之后 Fisher 采用了 X 射线突变诱导的方法开始寻找骨骼异常的斑马鱼突变体。

清华大学崔福斋研究组首次将斑马鱼引入了生物矿化研究领域,开展了斑马鱼脊椎骨生物矿化及相关骨疾病的研究[33～36]。在分析了 1996 德国图宾根的突变体筛选中所有可能与矿化相关的类型后,最终选择了 4 种与体形突变有关的斑马鱼(图 5.2)开始研究,期望能够从中发现它们与骨的形成、矿化和疾病相关的信息。

具有体形缺陷的 stp、lil 等基因突变斑马鱼,除了身材短小,胸部骨骼畸变等外形缺陷外,还具有胶原分子、胶原纤维组装结构、矿物晶体、调控蛋白以及骨的组织形貌和纳米力学性能等多方面的异常特征。

早期的骨结构研究表面,骨具有分级组装结构。斑马鱼脊椎骨显微结构

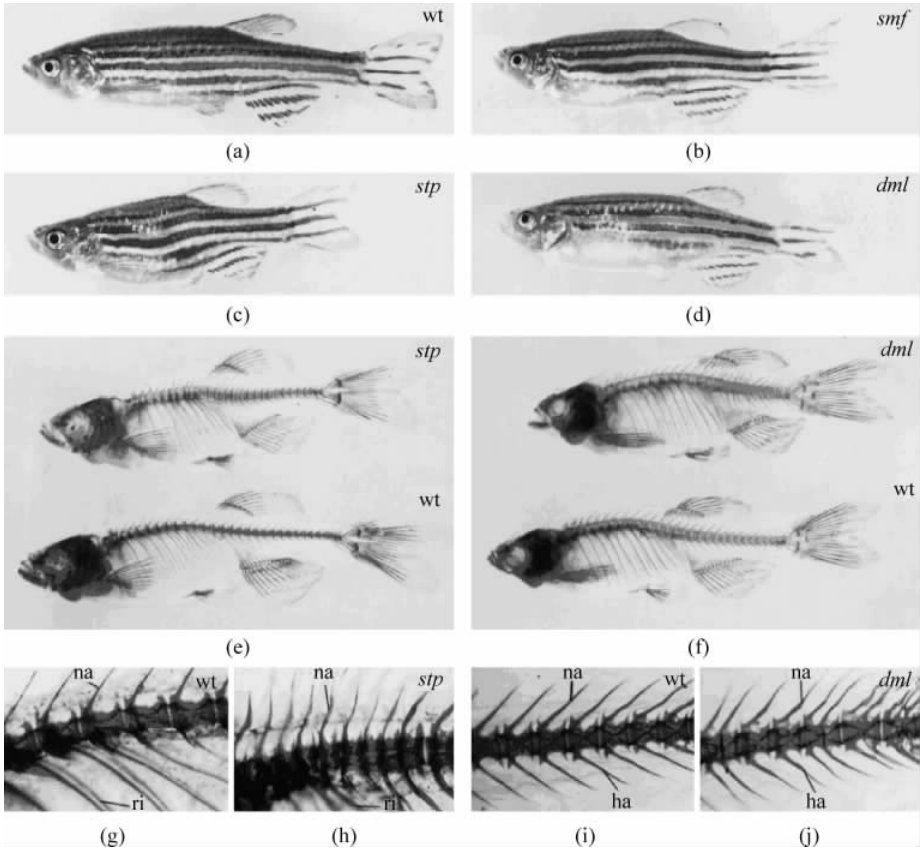


图 5.2　野生型及几种脊椎骨突变体斑马鱼对比照片

的研究显示其具有类似于人骨长骨的分级结构(图 5.3)。研究表明,stp、lil 基因突变导致了各级结构都发生了改变,影响了矿化过程和力学性能。

1. stp 基因突变体斑马鱼骨结构和力学性能的变化

具有体形缺陷的 stp 基因突变斑马鱼,除了身材短小,胸部骨骼受损等外形缺陷外,还具有从骨的组织形貌水平到胶原纤维分子、胶原纤维组装结构、矿物晶体等微观水平上的改变。

在胶原纤维水平上,stp/stp 基因突变斑马鱼脊椎骨发生了显著的变化。基因突变后,stp/stp 胶原基质的甘氨酸和脯氨酸的摩尔百分比显著降低,而甲硫氨酸和异亮氨酸的摩尔百分比显著升高,此外,丝氨酸、丙氨酸和酪氨酸的摩尔百分比也有改变。由于甘氨酸和脯氨酸是Ⅰ型胶原分子的主要氨基酸构成,可以推测 stp/stp 骨胶原分子的氨基酸序列也发生了改变。另外,胶原微纤维直径也发生了显著变化。正常胶原的纤维直径平均约为 45～55 nm,并具有

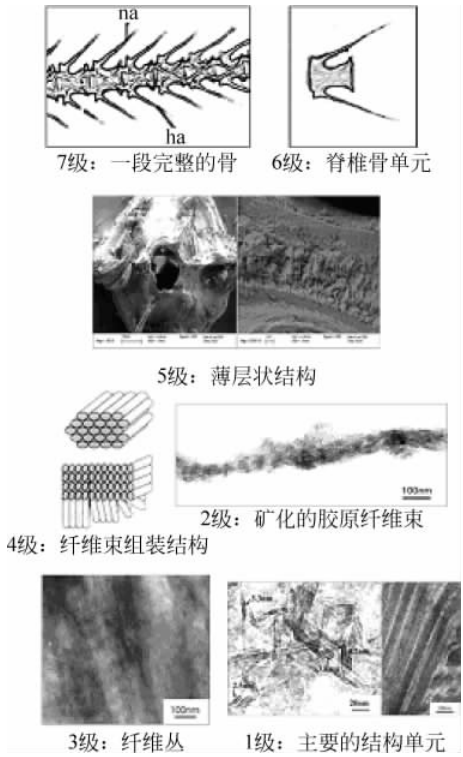


图 5.3　斑马鱼脊椎骨分级结构示意图

矿物沉积所造成的规则周期性条带。在 stp 基因突变斑马鱼脊椎骨中，胶原纤维的直径显著减小，约为正常尺寸的 1/4，且纤维走向弯曲，矿物在单根胶原纤维上的沉积没有规则的周期性，反映了在胶原分子组装水平上发生了某种改变。stp/stp 突变体中胶原纤维的交联较差，纤维之间形成较小的束，束与束之间的只有很弱的交联，从而在组织中留下缺陷。

在矿化方面，stp/stp 突变体脊椎骨的矿物相、形貌、晶体尺寸和沉积部位均发生明显改变。和正常骨对比，突变鱼骨的有机无机峰的相对高度发生变化，且峰位发生轻度漂移。经过标定，发现除了存在 HA 相的最强峰以外，发生漂移的峰均与 β-$Ca_3(PO_4)_2$，即 β-TCP 相能够与之吻合。显微电子观察和选区电子衍射谱分析表明：正常鱼骨的矿物相为典型的薄片状羟基磷灰石，具有(002)择优取向，而 stp/stp 骨的矿物相呈大块团聚状，没有明显的晶界，选区衍射谱也没有尖锐的衍射环出现，其弱环经标定为 β-TCP 相的两个最强峰衍射。此外在 stp/stp 突变鱼骨中还存在少量微米尺度的 β-TCP 相，这一结果与 X 射线衍射分析结构吻合。此外，stp/stp 突变体中的骨矿除了在单根胶原上沉积以外，大部分沉积在胶原纤维的间隙区，胶原间隙区的沉积物

为没有衍射特征的絮状团聚磷酸钙盐。

在可溶性矿化蛋白分析中，正常斑马鱼骨 EDTA 提取液中含有 7 条明显的蛋白质条带，其相对分子质量分别是 19.3 kDa、26.5 kDa、35.9 kDa、39.5 kDa、41.9 kDa、45.6 kDa、60.8 kDa，其中位于 39～50 kDa 之间的蛋白质含量最多，共有 3 条带。而突变骨的 EDTA 提取物在 30～50 kDa 之间只剩下一条蛋白质条带，其相对分子质量约为 39.5 kDa。经氨基酸测序和与人、鼠、猪、鸡、鱼的数据进行比较后，鉴别其为原肌球蛋白。原肌球蛋白是最初在肌肉中发现的调节肌肉收缩和肌肉 Ca^{2+} 敏感度的功能蛋白，现发现其在全身性的组织中均有表达，特别是在非肌肉组织的成纤维细胞中。在非肌肉细胞中，原肌球蛋白被认为是对肌动蛋白丝的组装、稳定和结构组织起着关键作用。序列比较发现，来源于人、鼠、猪、鸡、鱼的原肌球蛋白的 N 端前 30 个氨基酸残基具有完全相同的序列，这一高度保守的 N 端序列被认为是与该蛋白的功能有着密切的关系。最新研究也证明不同组织来源的原肌球蛋白的差异仅表现在其 N 端结构上的不同。

运用纳米硬度，原子力显微镜等技术，对 stp/stp 突变体的纳米力学性能的变化也进行了深入研究。结合纳米硬度测试、原子力显微镜对纳米压痕形貌扫描以及 SEM 断口观察的结果，我们可以认为，stp/stp 基因突变对骨力学性能的影响主要表现为骨的弹性模量增高、塑性变形能力减小、断口脆化等特征，说明基因突变后，stp/stp 骨的脆性增大。

2. lil 基因突变体结构和力学性能的变化

身材短小的 lil 基因突变斑马鱼在各个分级结构中均发生了明显的改变，脊椎骨的脆性增加，力学性能下降。主要表现在：

(1) 骨节及其发育特点：脊椎骨骨壁厚度减小到正常的 1/3，并且有明显的微裂纹存在。在骨节中心出现额外矿化的现象，说明了脊椎骨矿化不均匀。

(2) 胶原纤维及其组装：胶原纤维主要为平行排列，不同于野生型的胶合板的 lamella 结构。平行排列的胶原纤维减少了纤维间的交联作用，这也是突变后微裂纹形成的原因之一。在 lil 突变体中，未矿化的胶原纤维直径约为正常的 2 倍，并且纤维走向弯曲。

(3) 矿化特点；lil 突变体中，矿物含量增高，并且矿物结晶性变差，CO_3^{2-} 等杂离子含量增高。

(4) 力学性能的变化：lil 突变体斑马鱼纳米硬度和弹性模量均低于正常水平，并且数值分散，这主要是由于微裂纹的分布不均匀造成了性能的分布不均匀。同时，弹性模量随压痕深度的变化，下降显著，说明了脊椎骨脆性的增加。

基因突变骨力学性能的变化来源于其骨结构的变化。结构的变化包括：

胶原纤维直径的反常和胶原组装周期的改变、胶原束的改变和交联的减弱、矿物形貌、结晶度和尺寸的改变、胶原-矿物关系的改变等等。从结构/力学性能关系的角度的考虑,胶原分子水平上的改变导致的胶原交联的改变可能是更致命的,那些由于交联弱化在突变骨中造成的组织不致密和大量胶原束之间空隙区都可以被认为是材料本身的组织缺陷,在外界条件下,这些结构缺陷可能是导致开裂的裂纹源。

此外,突变骨中胶原-矿物关系的改变减小了胶原与无机矿物的复合程度,作为脆性材料的无机矿物大量沉积在胶原束之间,使得本来就具有缺陷的有机基体更加脆弱。从基因-结构关系的角度分析,突变骨结构上的变化是由基因突变造成的,直接反映在某些功能蛋白和结构蛋白的异常变化。由于生命体中存在复杂的基因-蛋白,蛋白-蛋白的相互关系,这给本研究中突变位点的确定带来了巨大的困难。但值得指出的是,从分子水平上研究骨材料矿化和骨疾病的发生机理将给生物矿化研究带来新的前景和研究视角,并能够为骨疾病的治疗和基因仿生骨材料的研制提供新颖的思路。

5.3.2 牙釉质矿化过程中的基因调控

牙釉质是一类很特殊的矿化生物材料。研究表明牙釉质形成过程中发生的羟基磷灰石矿化是典型的基因调控下的生物矿化过程,包含了基因控制蛋白表达,组装,控制矿化等过程,更为有趣的是,牙釉质的发育过程中,基因还控制了蛋白的降解过程,从而形成牙釉质非同寻常的成分及结构特点。认识牙釉质的矿化及其中的基因控制过程,对于加深对基因控制生物矿化概念的理解大有帮助。

5.3.2.1 牙釉质的结构

牙釉质的分级结构在1.4.1节已有详细说明。它是一层覆盖在牙冠表面的高度矿化系统,也是一类目前被广泛研究的矿化生物材料。作为帮助咬合和咀嚼食物的主要部分,牙釉质具有很独特的性能。它是生物体中最硬的组织,其硬度仅次于金刚石。同时,牙釉质也具有很好的抗磨损能力以及在口腔环境中长期发挥作用的稳定性。牙釉质的这些优异性能都源于它不同寻常的化学组成和复杂而高度有序的微结构。组成牙釉质的成分中,无机物的质量含量高达96%,主要是以晶态形式存在的羟基磷灰石。其他的成分还包括1%的有机基质和3%的水。

牙釉质的基本结构单元是釉柱(图5.4)。釉柱是直径为6~8 μm的细长柱状结构,起于釉牙本质界(dentin-enamel junction,DEJ),呈放射状贯穿整个釉质层,达到牙齿表面。釉柱行程并不完全是直线,在牙釉质外层1/3范围

内，为放射状直线排列。过渡到内层的釉柱排列成为 Hunter-Schreger 带状结构(Hunter-Schreger Bands)。釉柱的横断面呈匙孔状，分为釉柱和釉间柱，相邻釉柱和釉间柱相嵌。釉柱与釉间柱，以及釉柱与釉柱间不连续的界面称为柱鞘(sheath)。在柱鞘内分布较多的有机基质，主要是不溶性的釉原蛋白(amelogenin)。釉柱结构的形成及其在牙釉质中的不同排列方式与牙釉质的发育过程中的细胞活动和细胞调控是密切相关，具体的内容将在随后的章节中进行详细介绍。

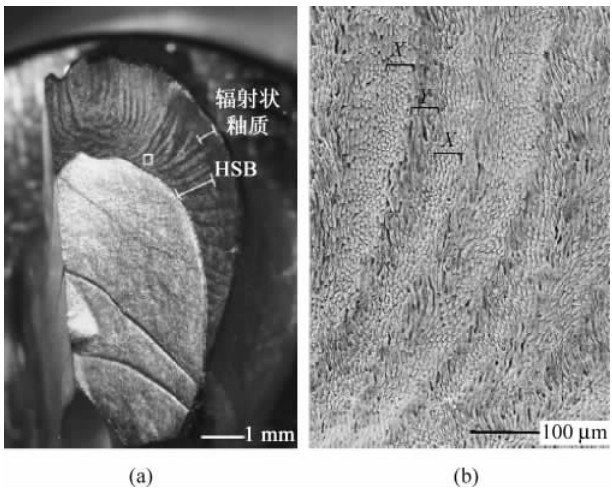


图 5.4　牙釉质的基本结构单元体

(a) 抛光的人牙纵向切片的扫描电镜照片，牙釉质由外层的辐射状结构逐渐过渡到包含 HSB 结构的内层牙釉质。HSB 带为水平取向。方框中的牙釉质的放大照片为(b)；(b) 内层牙釉质的 HSB 结构，在 X，X' 区域，牙釉柱被横截，在 Y 区域则被纵切

牙釉柱主要由细长的纤维状羟基磷灰石晶体组成。这些晶体长达 1000 nm，截面直径仅为 20～40 nm。显微镜观察表明晶体的长轴(HA 晶体的 c 轴)相互平行紧密排列。在釉柱头部，晶体长轴平行于釉柱长轴，而在尾部，晶体开始转向呈 65°～70°倾斜，从而垂直于牙釉质的生长线(retzius lines)。组成釉柱的羟基磷灰石晶体会组装成束，可溶性的牙釉蛋白(enamelin)主要分布于晶体间隙。

5.3.2.2　*牙釉质的矿化过程*

Lowenstam 和 Weiner 等曾对有机体中的生物矿物形成过程进行了描述：①空间形成；②预成型的有机基质出现；③饱和离子溶液形成；④控制晶体形核；⑤控制晶体生长；⑥晶体生长停止。通过这样的步骤最终合成的

生物晶体都具有独特的形态和高度有序性。牙釉质的生物矿化也包含了上述过程,但是与其他的矿化系统相比更具有独特的方式。例如,在牙釉质矿化中,生物矿化的基质不是预成型的,而是持续由成釉细胞分泌并进行自组装。而且在矿化过程中,成釉细胞起到了蛋白合成,分泌,离子输运和最后吸收蛋白基质等诸多作用[1]。

牙釉质的矿化发育过程是从牙本质釉质界开始向外扩展进行的。其羟基磷灰石矿化是在釉原蛋白调控下的细胞外矿化过程。Fincham 和 Simmer[37]等提出了牙釉质中细长的纤维状羟基磷灰石晶体的形成过程的自组装矿化的模型(图 5.5)。牙釉质的矿化过程大致按如下步骤进行[38,39]:

(1) 处于分泌活动期的成釉细胞(即托姆斯突)和本质釉质界形成牙釉质矿化空间;

(2) 在基因的控制下,釉原蛋白在成釉细胞(ameloblasts)中合成,并最终在细胞外基质中分泌;

(3) 大约 100 个釉原蛋白单体自组装成 20 nm 左右的纳米球结构,并与成釉蛋白等结合,使自组装纳米球表面带有强烈的负电性;

(4) 钙离子吸附在自组装纳米球周围,进一步吸引了磷酸根离子团聚在其周围,并形成过饱和溶液环境;

(5) 羟基磷灰石晶体开始在已存在的牙本质基质或在其他非釉原蛋白基质分子作用下形核,出现微晶(这些微晶的详细形成原因目前尚无定论);

(6) 负电性的纳米球最初与矿化初期形成的羟基磷灰石微晶的平行于 c 轴的 a,b 晶面发生静电相互作用,从而阻断在这些晶面发生的晶体-晶体间的融合。随后,在基因的控制下,enamelysin 釉质溶解素开始与釉原蛋白暴露在外的碳端发生作用,减弱了它们的负电特性,使这些原本亲水的蛋白纳米球逐渐疏水化。沉积在 a,b 晶面的疏水纳米球阻断了钙和磷酸根离子与这些晶面的接触,从而抑制晶体沿该晶面生长,使矿化只在暴露于离子环境中的(001)面发生,羟基磷灰石晶体沿着 c 轴方向迅速择优生长。有研究表明,牙釉蛋白肽链 1、42、157 和 173 位置的氨基酸残基在晶体择优生长方面发挥非常重要的作用;

(7) 基因控制的信号因子启动成釉细胞开始分泌 EMSP-1(蛋白酶-2)。EMSP-1 将疏水的釉原蛋白纳米球降解成小片断和其他一些未鉴定产物。这些蛋白片断最终被成釉细胞吸收;

(8) 随着釉原蛋白纳米球的降解产物被细胞吸收或被以其他方式清除,羟基磷灰石晶体开始沿着 a、b 轴方向适量生长变厚,并最终融合形成成熟的牙釉质晶体。调控蛋白在矿化末期降解吸收,无机晶体进一步生长融合并硬化是牙釉质矿化的独特之处,从而最终形成了高矿化度,高力学性能的矿化组织。

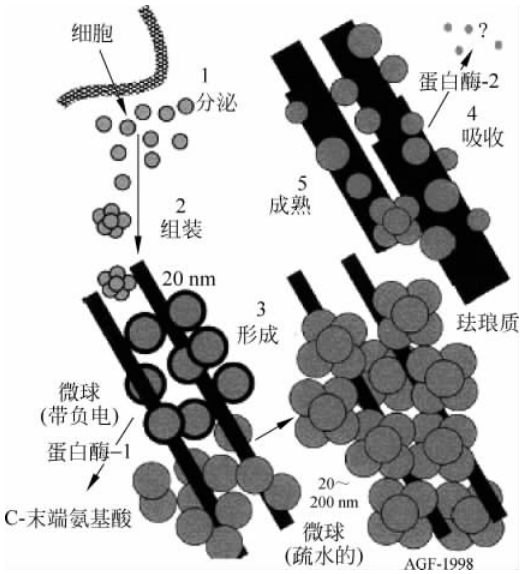


图 5.5　自组装釉原蛋白调控下的牙釉质羟基磷灰石纤维生长机理图示[38]

根据上面的步骤描述，我们可以总结出牙釉质矿化的基本特点：在牙釉质中，蛋白形成了一个有机基质“框架”，这些框架完成所起功能后大部分都降解消失了，从而形成了以无机物为主的高度有序结构。有机基质通过相对低能量机制进行自组装，这样的组装以釉原蛋白分子间的疏水相互作用为主，而没有类似于骨中胶原发生的蛋白-蛋白共价交联反应。此外，这样的自组装方式能形成热力学和动力学均稳定的结构（例如球状结构），事实上球状结构就是牙釉质细胞外基质框架的基本组成单元。正是釉原蛋白分子的结构使基质组装能以简单而有趣的方式发生。

由牙釉质的矿化过程可见，基因在牙釉质矿化过程中起到了关键的调控作用。类似于公路上的交通信号灯，基因严格而准确的管理着矿化中从釉原蛋白表达并分泌形成牙釉质细胞外基质，到矿化后期降解吸收所有的蛋白活动。而且这一调控过程是通过“基因-信号因子-细胞-蛋白”这一典型的通道实现的。

5.3.2.3　牙釉质基质结构和功能

如前所述，在釉质发育相关基因控制下，釉质基质调制了牙釉质微晶的生长，使之按照一定取向发育成细长的结构。通常认为这些早期微晶来自发育的本质釉质界，进而通过成釉细胞输运离子到其（001）晶面逐渐扩展到整个釉质基质。对于釉质微晶如何形核的问题曾经存在一些争论。其中的一

种观点认为,成核发生在釉牙本质界上,是由牙本质晶体或牙本质细胞外基质中的酸性蛋白调控、促发形核的,另外也有观点认为,釉质晶体形核是釉质基质中的酸性基质蛋白(例如成釉蛋白、釉蛋白等)引发的单独成核过程,与牙本质中的矿物和蛋白无直接关系,因此也与牙本质矿物不连续。牙釉蛋白,成釉蛋白和鞘蛋白等也被认为参与了釉质晶体形核过程。然而目前仍缺乏有力证据说明这些蛋白在晶体形核中的作用。此外,值得提到的是,不同切片角度得到的发育早期釉质基质的高分辨电子显微镜照片显示微晶与成釉细胞托姆斯突部分的细胞膜很接近,这可能暗示了晶体形核可能发源于成釉细胞膜。我们已知在成釉细胞膜修饰直径为10～20 nm的微球结构,而且这样的纳米微球也存在于成釉细胞分泌囊泡中,这就说明它们可能就是基质蛋白分泌物早期阶段。这些经过修饰的材料正是下面要讨论的釉原蛋白纳米微球组装体早期阶段的代表。

随着技术的不断进步,重组釉原蛋白以及HPLC色谱纯化方法的应用为研究这种釉质基质主要成分提供了极大的便利。1995年,Moradian-Oldak[17]等报道了使用高分辨透射电子显微镜的研究结果,证明在初期发育的釉质微晶上和微晶间存在直径为20 nm左右的柱状排列结构。此外,用电子显微镜和原子力显微镜等设备也观察到重组小鼠釉原蛋白(rM179)自组装成类似的微球状结构。因此,我们认为釉原蛋白分子有自组装形成纳米微球结构的特点,进而构成了基质微结构。纳米微球将初期微晶间隔开,彼此间的距离约为20 nm,并阻止了早期晶体-晶体间的横向融合。釉原蛋白纳米微球还可以通过"聚合物桥连"机制与合成的磷灰石晶体粘结。Landis等使用三维透射电子显微镜形貌重构技术对经过固定处理的发育的小鼠牙釉质基质进行了研究,并清楚地观察到纳米微球串呈螺旋装缠绕着初期矿物微晶。用冷冻透射电子显微镜技术——一种直接观察样品而不需要对组织进行固定预处理的显微技术——对釉质基质的研究结果也证实了纳米微球结构的存在。

5.3.2.4 牙釉质基质的主要成分

Piez[40]等首次完整地对从未萌出的人类第三臼齿中提取的发育中的牙釉质基质蛋白的完整氨基酸分析,并得出这样的结论:这种蛋白几乎完全溶解于脱钙溶液中,不含羟脯氨酸和羟赖氨酸,并且不同于其他任何已知蛋白。Eastoe[8]等进行了更精细的早期分析,指出早期牙釉中的蛋白有非常特殊的成分和典型的特征。这些特殊成分主要包括高含量的脯氨酸,组氨酸和亮氨酸片断。这种蛋白就被认为是"成釉相关蛋白"——早期(分泌阶段)牙釉基质中的主要成分。深入的研究发现发育中的牙釉质基质包含由多种与釉原蛋白相关的成分组成的复合体,这些成分的表观相对分子质量在5～27 kDa

范围内。从 20 世纪 60 年代中期起，很多研究小组致力于分离和深入研究这些成釉相关蛋白的性质，这些研究持续了随后的整个 70 年代。几乎所有的通用标准蛋白化学方法都被用来从猪或牛的发育中的牙釉质中分离这些蛋白，而这些早期的工作会频繁出现不完整的分离和混乱的数据结果。蛋白-蛋白相互作用（主要指的是釉原蛋白同非釉原蛋白之间的结合）则是导致混乱的主要因素，甚至加入分离试剂，相互作用的影响依然无法消除。

分离方法的不断改进和经验积累，使科学家对发育的牙釉质中的“成釉相关蛋白”的成分的认识日渐清楚。在随后的内容中，我们将对几种重要的基质蛋白及其特性进行描述。

1. 釉原蛋白

釉原蛋白又称为鞘蛋白，是一组从发育釉质的基质中分离得到的釉基质特异疏水性不可溶酸性蛋白。釉原蛋白由成釉细胞分泌，是牙釉质中存在的主要基质蛋白，主要分布于釉柱周围的柱鞘中。釉原蛋白在正常牙釉质形成中起到了很关键的作用。

釉原蛋白是所有釉质相关蛋白中研究最为深入的蛋白，关于其蛋白结构、功能等方面有以下共识：①天然的釉原蛋白表现出温度依赖型凝聚特性，4℃下呈半透明态而在室温下变得不透明；②釉原蛋白是疏水的，富含有脯氨酸、亮氨酸、组氨酸和谷酰胺，但其 C 端含有一系列的亲水负电性氨基酸序列；③釉原蛋白并不发生糖基化，但含有一个磷酸化的丝氨酸；④釉原蛋白在细胞外基质的分布决定于其 mRNA 转录的可变剪接和蛋白水解产物；⑤釉原蛋白最显著的特点是能够发生自组装形成纳米球，影响随后的矿化过程；⑥釉原蛋白 N 端通过三酪氨酸基序（PYPSYGYEPMGGW）能与凝集素结合。

人类牙釉质基因主要由位于 X 染色体上的一个单基因表达，Y 染色体上的釉原蛋白基因复制部分也参与少量的表达（10%）。研究证明，X 染色体上的釉原蛋白基因复制段与牙釉质发育不全疾病（amelogenesis imperfecta 或 AI），一种遗传性牙釉质疾病，密切相关。从有 AI 疾病史的家族中，科学家发现了八种不同的釉原蛋白突变体。通过使用反义低聚核苷酸（antisense oligonucleotides）和核酶技术（ribozyme），目前的研究已能对啮齿类动物的釉原蛋白表达进行人为准确的阻断，并且得到的基因敲除釉原蛋白能导致牙釉质的发育缺陷。这些结果很好地证明了釉原蛋白基因和釉原蛋白在牙釉质矿化中精细而且高度保守的功能。

最早用于测定釉原蛋白的氨基酸序列的方法是对纯化蛋白进行 Edman 测序，后来则是从釉原蛋白的 cDNA 文库的 DNA 序列推导而来。至今科学家已经完成了对猪、牛、人类、鸭嘴兽等哺乳类动物，仓鼠等啮齿类动物以及

凯门鳄、蟾蜍等两栖动物的釉原蛋白的蛋白测序工作。这些已报道的结果表明,不同物种的釉原蛋白,特别是在蛋白的 N 段和 C 段区域,有显著的序列同源性(图 5.6)。随后的深入研究表明,釉原蛋白与牙釉质的成釉细胞有完全的组织特异性。对已知釉原蛋白序列的比较可知,尽管在分子的中心区域存在序列变化,但在分子 C 段和 N 段的主要结构几乎是完全保守的,这也表明不同种生物的釉原蛋白分子间存在特定功能模块的保守性。事实上,对与人类 X 染色体相关的釉原蛋白不全的研究表明釉原蛋白对应的 X 染色体点突变造成的对分子破坏能导致脯氨酸-40 突变为苏氨酸残基。

	10	20	30	40	50
BovineX:	MPLPPHPGHP	GYINFSYEVL	TPLKWYQSMI	RHPYSPYGY	EPMGGWLHHQ-
BovineY:	MPLPPHPGHP	GYINYSYEVL	TPLKWYQNML	RYPYSPYGY	EPVGGWLHHQ-
Pig:	MPLPPHPGHP	GYINFSYEVL	TPLKWYQNMI	RHPYTSYGY	EPMGGWLHHQ-
HumanX:	MPLPPHPGHP	GYINYSYEVL	TPLKWYQS*I	RPPYPSYGY	EPMGGWLHHQ-
HumanY:	MPLPPHPGHP	GYINFSYEVL	TPLKWYQSMI	RPPYSSYGY	EPMGGWLHHQ-
Rabbit:	LPLPPHPGHP	GYINFSYEVL	TPLKWYQSLG	RPQYPAY-	
Mouse:	MPLPPHPGSP	GYINLSYEVL	TPLKWYQSMI	RQPYPSYGY	EPMGGWLHHQ-
Rat:	MPLPPHPGSP	GYINLSYEVL	TPLKWYQSMI	RQPYPSYGY	EPMGGWLHHQ-
Opossum:	IPLPPHPGHP	GYINFSYEVL	TPLKWYQSMM	RQQYPSYGY	EPMGGWLHHQ-
Hamster:	MPLPPHPGSP	GYINLSYEVL	TPLKWYQSMI	RQPYPSYGY	EPMGGWLHHQ-
Caiman:	IPLPPHPHHP	GYVNFSYEVL	TPLKWYQSLM	RQPYSSYGY	EPMGGWLHQP-
Toad1:	VPLPPHPQHP	GYVNLSYEIL	SPLKWYQSMM	THQYPNYGY	EPVSGWLQNP-
Toad2:	LPLPPQHQHP	GYVNFSYEIL	SPIKWYQSMM	KNQYPNYGY	EPVSGWLQSP-
Guinea pig:	MPLPPHPGHP	GYINFSYEVL	TPLKWYQSMI	RQPYPSYGY	ESMGGWVHHQ-

图 5.6　一些物种牙釉质中的釉原蛋白 N 段序列[41]

1996 年 Krebsback 等进行了从釉原蛋白的 cDNA 文库分析釉原蛋白的工作。他们从 3～4 周的大鼠切牙的未矿化部分组织的 cDNA 文库筛选到一个牙胚发育特异基因。经序列分析表明,该基因与已发现的其他基因没有同源性,只在成釉细胞和釉基质中表达,为一个新基因,命名为釉原蛋白基因。大鼠釉原蛋白 cDNA 长度为 1929 bp,包括 5′和 3′非翻译区。5′端有 3 个甲硫氨酸密码子,将第一个甲硫氨酸密码子的碱基定为 1,则第 2、3 分别位于 114 和 129 位置处。假定第一个蛋氨酸密码子为翻译起始位点,则 5′非翻译区为 82 bp,跟随一个编码 422 个氨基酸的开放读框,polyA 始于 1797 位碱基。如果以第 2、3 个蛋氨酸为起始密码子,氨基酸读框不变。这两个密码子的周围序列与报道的翻译起始位点共有序列一致,因而推测釉原蛋白可能有不同的翻译起始位点。

根据 cDNA 序列推导,大鼠釉原蛋白含 422 个氨基酸,$M_r = 45 \times 10^3$,偏酸性,等电点为 5.5。其中脯氨酸含量为 15.2%,甘氨酸含量为 9.9%,亮氨酸含量为 9.9%。蛋白质序列中含有数个十四烷基化位点(残基 56-61、250-255、

271-276、279-284、345-350)，可能还含有磷酸化位点。残基 241 为酪蛋白激酶识别位点，残基 51、268 和 276 为蛋白激酶 C 识别位点，残基 104 为蛋白酪氨酸激酶识别位点。釉质基质中存在的釉原蛋白 M_r 最大为 70×10^3，其次为 62×10^3。由于釉原蛋白 mRNA 剪接形式的不同、蛋白翻译后修饰、蛋白分泌到釉质基质后发生降解等因素，导致了釉原蛋白的多样性。

发育中的牙釉质分离得到的釉原蛋白的性质显示釉原蛋白是不同剪切的 RNA 信使的翻译产物，并且大多数釉原蛋白多肽已经被蛋白酶作用过。釉原蛋白的选择性剪切理论首先被用于解释多亮氨酸釉原蛋白多肽(leucine-rich amelogenin polypeptide，LRAP)的来源。

LRAP 是一种 C 段和 N 段序列与釉原蛋白相同，但缺少中间段序列的蛋白多肽。LRAP 首先被用于表示 2 种从发育中的牛牙釉质中提取的多亮氨酸釉原蛋白多肽(LRAP-1 和 LRAP-2)。对这些 LRAP 分子进行测序发现它们在 42 号到 46 号氨基酸残基有相同序列(LRAP-2 在 C 段有 4 个额外的残基)。最初认为这些多肽(包括 amino-terminal 44/45 residue sequence of the principal amelogenin，TRAP)是一些未经确认的大釉原蛋白(20kDa)N 段片断。随后的研究证明，LRAP 实际上是由一条短的 mRNA 翻译的。这条 mRNA 链有外显子 4 和外显子 5 以及部分外显子 6 的编码区，并编码 59 号氨基酸残基，其中包括 13 个保守的 C 段残基：- WPATDKTKREEVD。因此，LRAP 是选择性剪切釉原蛋白的蛋白合成产物。

在 20 世纪 90 年代的研究中，科学家已经成功地从小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、猪、牛、负鼠和人类的基因中分离出选择性剪切釉原蛋白 mRNA。被分析的每一个物种都存在一种主要表达的釉原蛋白异构体，其长度为 173～210 个氨基酸。在 mRNA 水平上，LRAP 表达的信息量大约是主要釉原蛋白异构体的 10%。除人类外，科学家已经成功地克隆了其他很多被研究的物种的主要釉原蛋白和 LRAP 的异构体的编码信息。大部分釉原蛋白异构体的差异主要表现在内核区域，但存在一个特例，那就是由小鼠外显子 4 编码合成的含有特殊亲水 14 氨基酸片断(-KSHSQAINTDRTAL-)的蛋白异构体。尽管这些含有外显子 4 编码片断的釉原蛋白只占所有被表达的釉原蛋白总量很小一部分，但它们已经通过免疫组织化学和 Western Blotting 分析的方法在发育中的牙釉质中被成功的检测到。其他一些釉原蛋白异构体也通过使用抗多肽抗体被陆续检测到，而且一些釉原蛋白的表达是发育调控的。

自从在发育中的牙釉质组织中发现了富含脯氨酸的釉原蛋白后，科学家们一直确信釉原蛋白在牙釉质矿化中起到了重要作用，它们要么是矿物的主要成核点，要么是结构实体，并试图弄清它们的二级和三级结构信息。为此，人们用经典结构分析技术做了各种尝试。早在 1965 年，低分辨的 X 射线衍

射分析结果显示其可能存在散乱的 β-或交叉 β-结构。到了 20 世纪 80、90 年代,圆二色和核磁共振技术也被用于釉原蛋白二级和三级结构信息的研究工作,结果表明这些分子同时含有 β-折叠和 β-转角结构。Renugopalakrishnan 等计算了在牛的釉原蛋白中发现的(Pro-Glu-X)$_n$ 重复序列的 β-螺旋结构,并认为这种结构可能在钙离子输运中起作用。然而后续的研究证明在人类、大鼠、小鼠和猪的釉原蛋白中并不存在这样的结构。Aoba 等用 1H-NMR 技术对溶液中的猪釉原蛋白的研究证明在从最初的全长 25 kDa(173 残基)分子转变为低相对分子质量产物的蛋白水解过程,存在结构转变。他们的后续研究证明,在釉原蛋白结构中,C 段 Trp-161 和 N 段 TRAP 序列的一些酪氨酸残基都暴露在分子表面。此外,还有使用小角 X 射线散射技术的研究结果证明猪的 20 kDa 釉原蛋白在溶液中可能以长束状组装结构存在。

2. 鞘蛋白

鞘蛋白(sheathlin)是一种牙釉特异性蛋白。它们由釉质上皮内部的一些细胞分泌。各种鞘蛋白的 C 段和 N 段在生物化学的角度看来是不相同的,而且是在对猪的釉质蛋白进行研究过程中分别被发现的。鞘蛋白的 C 段通常是表观相对分子质量分别为 27 kDa 和 29 kDa 的 2 种多肽,它们是在对起到束缚 Ca 离子作用的蛋白所进行的研究中被分离的。鞘蛋白的 N 段则是在寻找如牙釉蛋白这样的非釉原蛋白的过程中被发现的。在釉质基质中,鞘蛋白的 N 段表现为一系列相对分子质量在 13～17 kDa 范围内的低相对分子质量裂解产物,并且有团聚的趋势。

跟釉质基质中的其他蛋白相比,鞘蛋白的氨基酸成分是完全不同的,这说明它既不是釉原蛋白,也不是牙釉蛋白。免疫组化实验发现,鞘蛋白免疫定位在整个牙釉质的发育层,但是在釉质最表层(成釉细胞以下约 30 μm)没有蛋白分布,并且鞘蛋白分布呈现蜂巢状的染色图案。出现这样的图案是因为鞘蛋白裂解产物主要集中在釉质鞘区域。血凝素连接实验证明 13～17 kDa 非釉原蛋白会特异性结合 MPA(maclura pomifera)血凝素,此外使用荧光标记的 MPA 进行的组织化学实验也在整个釉质发育层呈现了蜂巢状图案。在吸附实验中,13～17 kDa 非釉原蛋白表现出对羟基磷灰石很低的吸附性,而 Edman 降解结果揭示了鞘蛋白的第一个氨基酸序列。进而在新免疫染色结果的基础上,科学家们将这些低相对分子质量非釉原蛋白以及它们的父代蛋白定义成一个新的牙釉质蛋白家族,这就是“鞘蛋白”。

1996 年,在鞘蛋白被广泛地研究了 10 余年后,两个研究小组随机测定大鼠的牙特异性 cDNA 文库,并独立克隆并测定了编码鞘蛋白的 cDNA。随后,猪的鞘蛋白 cDNA 和编码小鼠的鞘蛋白同族体的 cDNA 也被成功克隆。实验表明小鼠的鞘蛋白基因位于 5 号染色体上,而人的则位于染色体 4q12 上。

人类的鞘蛋白位点实际上位于曾经报道的与 3 个瑞典家族的釉原蛋白发育不全疾病相关的基因区域。

3. 牙釉蛋白

牙釉蛋白(enamelin)实际上代表了一系列非釉原蛋白,是非釉原蛋白中与羟基磷灰石晶体亲附性最高的蛋白,它们很好地吸附于牙釉质晶体,直到晶体被溶解,才会从基质中释放出来。进而这一定义被用于说明这一类与晶体有粘合作用的特殊釉质蛋白,既不属于血清白蛋白,也不属于蛋白酶。事实上,牙釉蛋白是一类全新的蛋白,其氨基酸序列与数据库中的其他任何蛋白都无关。牙釉蛋白是目前研究较清楚的釉质蛋白,在发育的牙中,它的表达受到了严格的控制。在猪牙中,完整的牙釉蛋白免疫定位于成釉细胞的托姆斯突 2 μm 区域内,蛋白相对分子质量为 186 kDa,是相对分子质量最大的釉相关蛋白。

目前,猪、小鼠和人类的牙釉蛋白 cDNA 已经被成功地克隆了。不同于其他釉质蛋白,目前尚未发现任何来源于选择性剪切 RNA 转录的牙釉蛋白异构体。除去信号多肽和所有转录修正,猪的牙釉蛋白有 1 104 个氨基酸,相对分子质量为 124.3 kDa,等电点为 6.5;小鼠牙釉蛋白有 1 236 个氨基酸,相对分子质量为 137 kDa,等电点为 9.4,并且小鼠牙釉蛋白的特殊之处在于它包含了 11 个氨基酸片断的 14 个拷贝,而这一片断在猪和人类的牙釉蛋白中并没有重复。

使用抗纯化 89 kDa 和 32 kDa 牙釉蛋白抗体和吸附纯化的抗多肽抗体对发育中的牙釉质基质进行免疫染色实验,结果显示牙釉蛋白明确定位于从本质釉质界到牙表面的分泌阶段釉质中,并在成熟早期迅速消失。基于氨基酸成分分析的结果,科学家们发现牙釉蛋白在成熟早期完全降解了。这一结论也对以前的解释:釉原蛋白被选择性的降解,而牙釉蛋白依然保留在成熟牙釉质中,提出了质疑。分泌阶段牙釉质的免疫染色结果为反转的蜂巢图案,这表明牙釉蛋白被限制在釉柱和釉间柱中,在釉质鞘中不存在牙釉蛋白。这样的免疫染色结果表明这些牙釉蛋白裂解产物与牙釉质晶体发生了原位结合作用。体外羟基磷灰石结合实验结果也证实了这一结论。但是,体外实验是在 4 mol/L 浓度的胍溶液中进行的,因此体外实验的结论不能外推进而揭示体内环境的结果。相反,32 kDa 牙釉蛋白可以用 50 mmol/L 中性 PBS 溶液萃取则可能暗示在体内牙釉蛋白与羟基磷灰石的结合力很弱。

4. 成釉蛋白

成釉蛋白(ameloblastin)的特点是由两个不同区域形成的两极化。其 C 端端肽(13～15 个氨基酸残基)被高度荷电化,pI 约为 4.2,而 N 端 pI 为 10.8,整个分子的 pI 为 8.0。亲水 C 端朝外排列在釉原蛋白组装形成的纳米球表面,以致整个纳米球结构负电化,从而使带负电的纳米球与牙釉质早期形成

的羟基磷灰石微晶特定晶面发生相互作用。成釉蛋白敲除后,将使成釉细胞在分泌刚开始就停止分化,进而无法形成釉质。

5. 釉丛蛋白

釉丛蛋白(tuftelin)是由成釉细胞合成、分泌的一类酸性亲水蛋白质,其氨基酸序列中富含谷氨酸、天冬氨酸,并含有多个糖基化位点和磷酸化位点。釉丛蛋白的表达贯穿釉质发生的整个阶段,主要分布在成釉细胞的托姆斯突和其下发育中的细胞外基质中,主要发挥启动矿化形核的作用。在细胞外基质中,釉丛蛋白主要存在于矿化微晶的边缘,在整个釉质中的分布是不均匀的,比较集中于釉牙本质界。

6. 蛋白酶

蛋白酶水解作用在牙釉质矿化过程中起到了很重要的作用,并且也是牙釉质矿化的独特之处。首先,水解作用使釉质基质的结构和物理化学性质发生了变化(例如裂解釉原蛋白的亲水C段);其次,成熟阶段的快速晶体生长使釉质硬化的过程也是与细胞外有机基质的完全降解相关的。在众多研究中,Metalloproteinases和丝氨酸蛋白酶的活动已经在釉质细胞外基质中被检测到。然而尽管在釉质细胞外基质中的蛋白酶的存在已经众所周知,但分离并鉴定这些酶确是很困难的工作。20世纪90年代进行的MMP-20和丝氨酸蛋白酶EMSP-1的克隆和表达研究则有助于阐明蛋白酶的存在以及功能等问题。Northern分析显示MMP-20的mRNA在发育期有较高的表达量,而在成熟阶段表达量减少,相反,EMSP-1的mRNA量在过渡期和成熟早期会显著增加。将重组MMP-20与重组釉原蛋白共孵育的实验结果显示这种Metalloproteinases不仅在C段6个不同切入点对全长釉原蛋白有作用,而且可以裂解TRAP多肽。体外孵育实验证明,重组釉原蛋白可以被丝氨酸蛋白酶完全裂解为147 kDa的多肽片断。而且这2种蛋白酶被认为对其他各种釉质蛋白,例如牙釉蛋白,釉原蛋白等都起作用。基于以上的实验证据,我们可以得到这样的结论,牙釉蛋白酶可以与釉原蛋白的C段作用,进而引起牙釉质细胞外基质的关键性结构变化,并产生对釉质发育起重要作用的TRAP分子。另外,丝氨酸蛋白酶具有消化作用,使羟基磷灰石晶体在成熟阶段迅速生长。

在牙釉质矿化过程中由基因控制表达,分泌和活动,并对矿化起重要调节的细胞外基质蛋白还有很多,例如Tuft蛋白、血清白蛋白以及硫酸化蛋白等,这里就不再一一介绍。

5.3.2.5 基因重组釉原蛋白生物矿化

重组DNA技术是现代分子生物学发展的一个重要领域。自1973年

Cohen 等首次在体外将重组的 DNA 分子形成无性繁殖系以来，经历了 30 年时间，科学家们分离、分析及操作基因的能力在实验室生物学领域几乎达到了无所不能的地步。所有这些成就与进步都与当代生物科学的技术革命——重组 DNA 技术相联系。

一个完整的 DNA 重组过程包括：目的基因的获取，基因载体的选取与构建，目的基因与载体的拼接，重组 DNA 分子导入受体细胞，筛选并无性繁殖含重组分子的受体细胞(转化子)。

1. 基因重组釉原蛋白

1999 年 Dhamija 等克隆了釉原蛋白基因的启动子[41]。研究表明，该基因 5′非翻译区包含正负调控的作用元件。启动子的活性在类成釉细胞中只有 8%～30%，而在牙龈或牙髓纤维细胞中则无活性，由此认为釉原蛋白基因的特异表达是由其启动子的活性所决定的。2000 年 Toyosawa、Macdougall 等克隆了人的釉原蛋白基因，该基因包含 13 个外显子，编码一个含 447 个氨基酸的开放读框。人的序列与鼠的序列有高度同源性，其中插入了一个 78 bp 的新片段，该片段组成 2 个小的外显子。

由于牙釉质中釉原蛋白含量有限，因此通过蛋白提取的方法很难获得足够量的纯化釉原蛋白。通过基因重组的方法获得釉原蛋白可以克服这样的局限。第一个重组釉原蛋白是 rM179，同鼠釉原蛋白 M180 相类似。rM179 相对分子质量为 20 162 Da，同天然釉原蛋白仅相差 N 末端的蛋氨酸残基和 16-丝氨酸的磷酸化基团。通常 rM179 的重组选用的表达系统为大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)细胞，将包含编码小鼠釉原蛋白(180 个氨基酸残基)基因的 pET11a 载体转染到表达系统中表达，将表达产物分离纯化后即可得到 rM179 重组釉原蛋白。

2. 重组釉原蛋白的自组装和矿化研究

在天然的情况下，大约 100 个釉原蛋白单体能够自组装成 20 nm 左右的纳米球，在调控羟基磷灰石晶体的生长起着重要的作用。在晶体生长过程中，蛋白纳米球结合在晶体的特定结晶表面而抑制晶体沿该晶向的生长，因此牙釉质中的羟基磷灰石沿晶体 c 轴方向择优生长。有研究表明，牙釉蛋白肽链 1、42、157 和 173 位置的氨基酸残基在晶体择优生长方面发挥非常重要的作用。

重组釉原蛋白最主要的目的是在体外模拟牙釉矿化环境，通过釉原蛋白对矿物形核、生长进行调控，最终实现牙釉质的仿生合成。

Wen[33]等对重组牙釉蛋白(rM179)的自组装特性和调制矿化的生物学功能进行了大量深入的研究，通过原子力显微镜观察了不同浓度的重组牙釉蛋白的组装特性。rM179 溶解在 pH＝7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中，然后吸

附在云母表面,经 Karnovsky 固定及水洗后用 AFM 观察。在较低浓度下(12.5～50 μg/ml),形成的蛋白纳米球直径从 7～53 nm 不等;在较高浓度下(100～300 μg/ml),蛋白纳米球直径集中在 10～25 nm,如图 5.7 所示。直径在 15～20 nm 的蛋白纳米球可能在调控羟基磷灰石晶体微结构组装中发挥着重要的作用。

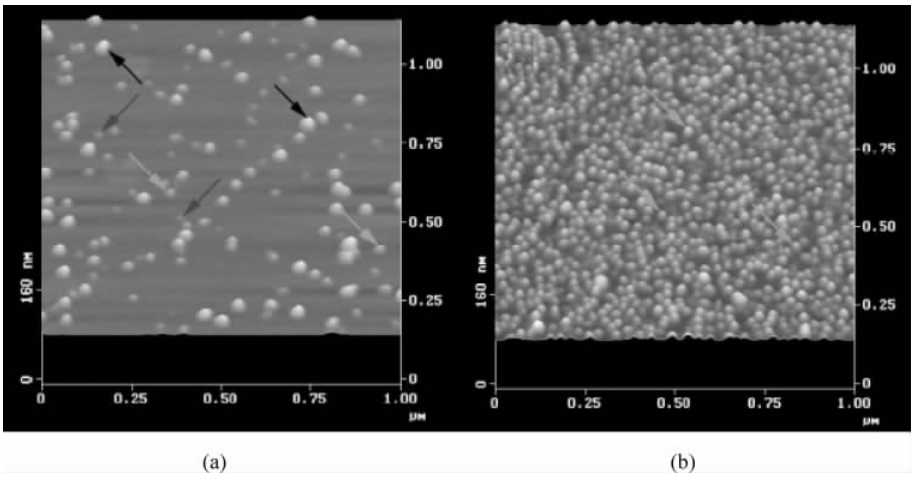


图 5.7　不同浓度

(a) 25 μg/ml; (b) 300 μg/ml 的重组 rM179 蛋白自组装 AFM 形貌[42]

牙釉质基质蛋白对羟基磷灰石晶体的形核、取向和生长起着重要的作用。通过重组釉原蛋白体外调控磷灰石晶体生长过程的模拟研究,有助于我们正确地评价釉原蛋白的生物学功能。通过研究表明,不同浓度的釉原蛋白对羟基磷灰石的生长促进和抑制作用均不明显,说明釉原蛋白并不具有其他酸性矿化组织蛋白所具有的特异性晶体调控特性。

5.4　转基因动物技术与生物矿化

转基因动物技术自 20 世纪 80 年代初诞生以来,与基因克隆、分子杂交、同源重组等分子生物学技术相结合,在生物领域得到了广泛应用。利用转基因动物技术可以将基因稳定导入动物种系细胞。例如,如果某种疾病的基因一旦被鉴定并克隆,采用同源重组技术取代种系干细胞种的正常基因就可以建立起该疾病的动物模型。如果将基因与特异组织中驱动特异基因表达的调控序列相连接,就可以活体研究该基因在特异组织中引发疾病的机理。在各种转基因技术中,基因敲除是运用很多的重要技术之一。

基因敲除是同源重组技术的形象说法。顾名思义，它是指用外源 DNA 与受体细胞基因组中顺序相同或非常相近的基因发生同源重组，整合至受体细胞基因组中并得意表达的一种外源 DNA 导入技术，此种技术的优点在于整合位点确定、精确，转移基因频率较高，既可以用正常基因敲除突变的基因，以进行形状的改良和遗传病的治疗，又可以用突变的基因敲除正常基因，以研究此基因在发育和调控方面的作用。

随着分子生物学技术的不断进步和人类对骨、牙等疾病的分子生物学治疗投入更多的关注，转基因动物技术越来越多地被用于研究与骨、牙釉质等矿化组织相关基因的功能和基因与这方面的疾病的关系。

通过改变不同的基因片段，构造不同基因调控下的动物体模型，对比其细胞生长、发育等生命活动，比较其分泌蛋白差异，比较其细胞生长形态等变化，比较其矿化结果，可以从中得到基因——结构——矿化的一体化联系，了解各段基因在矿化过程中所起到的不同作用，进而从本质上解释矿化机理。过去的几年中，国际上在此方向上做了很多努力，取得了很多结果。在本节中，我们将对这方面的研究做简要的介绍。

5.4.1　转基因动物技术与骨矿化研究

Rochester 大学的 Chen[43,44] 等利用转基因动物技术对骨发育相关基因与骨形成的关系进行了大量的研究工作。他们以转基因小鼠为模型，研究了 BMP type IB 丝氨酸/苏氨酸受体蛋白(BMPR-IB)在小鼠骨发育过程中的信号传导功能。他们首先建立了 2 个 BMPR-IB 转基因片断，其中一个连接了Ⅰ型胶原增强子/基础启动序列(0.7 kb)，另一个连接 2.3 kb Ⅰ型胶原启动序列。使用这 2 种Ⅰ型胶原启动序列控制 BMPR-IB 转基因在Ⅰ型胶原特异性细胞——成骨细胞内进行表达，他们从而得到了 2 种转基因小鼠，分别命名为 tg(Col-0.7)和 tg(Col-2.3)。其中含有高 Colal(0.7)-trBMPR-IB 转基因拷贝数的雌性小鼠体形很小，而且可能因为生殖器官缺失的疾病不能进行繁殖。其他转基因小鼠通过与野生型 CB6F1 小鼠杂交繁殖建立起了转基因小鼠体系。繁殖后得到的杂合体小鼠进行杂交，最终得到了纯合体转基因小鼠。使用 Southern 印迹法和 PCR 对转基因小鼠的基因型进行分析。所有的小鼠系的显形性状都相同。

为了研究转基因老鼠的发育变化，他们对 tg(Col-2.3)转基因老鼠的胚胎进行 Alizarin 红和 Alcian 蓝染色，并进行组织切片观察。结果发现野生型和杂合型老鼠的发育正常，但是纯合体转基因老鼠的胚胎变小，同时颅骨矿化延缓。纯合体转基因老鼠的锁骨发育正常。组织切片还能观察到野生型胚胎的趾骨骨化中心的形成，但是在转基因纯合体中却观察不到这样的骨化中

心(彩图 8)。此外,转基因老鼠的成体体重和骨密度均明显下降。

他们还从生物学角度证明了 Axin2 基因对于成骨细胞的增殖和分化有抑制作用。这主要是由于 Axin2 中的 N 端 G 蛋白调节子(RGS)能够与 APC (adenomatous polyposis coli)结合,调节 APC 诱导的 β-catenin 的降解。由于 β-catenin 是影响间充质细胞分化为成骨系细胞的重要因子,Axin2 基因敲除将促进成骨细胞的增值和分化。同时 Axin2 KO 型老鼠成骨细胞中 Bmp2、Bmp4 等蛋白表达的增加,Smad1/5 磷酸化程度提高,表明成骨细胞的活性提高。

其他一些在 BMPs 向细胞传导信号的过程中起中介作用的蛋白的功能,例如 Smads 等也通过转基因动物技术进行了广泛的研究。结果证明,这些功能蛋白在传递 BMPs 信号过程中起到了关键作用,进而影响到骨矿化的结果。

程振江[45]等对 Axin2 KO 基因变异型和野生型老鼠股骨的矿化特点进行了对比观察,分析其基因变化所引起的矿化过程中细微变化。此项研究对骨矿化过程中一些问题有所突破和认识。他们通过组织学、SEM、TEM、FTIR 以及纳米压痕等分析方法,发现:Axin2 KO 型鼠骨中,成骨细胞和骨细胞数量增加,活性提高,破骨细胞数量减少;胶原纤维分泌更加旺盛,直径更加均匀,排列组装更加有序;新生骨小梁中胶原纤维更易于形成板层结构雏形,使得骨小梁变宽变厚;皮质骨变厚,其板层结构更加密实,板层周期变小,板层数量增加;矿物晶体的结晶度和成熟度都有所提高,CO_3^{2-} 等杂质离子取代减少。这些表明,Axin2 KO 鼠骨中骨更新更加有效,使得皮质骨纳米力学性能明显增加。Axin2 KO 模型的提出,有助于为治疗骨质疏松症找到基因治疗潜在的靶分子,同时也增加了我们对于成年后骨更新过程的了解。

5.4.2 转基因动物技术与牙釉质矿化研究

正如前文所提到的,釉原蛋白在调控牙釉质矿化发育中起到了举足轻重的作用,釉原蛋白的自组装能力在调制脊椎动物牙釉质的生物矿化过程中扮演了重要角色。调制形成小鼠牙釉质的主要有机细胞外基质就是包括 180 个氨基酸的釉原蛋白(M180)。

已有研究证实,釉原蛋白上有 2 个位点是釉原蛋白的自组装的关键。已有原子力显微镜和动态激光光散射的研究结果给出了关于这 2 个位点的证据。南加州大学牙医学院的 Paine ML 等使用转基因动物技术在体内实验中进一步证实了控制釉原蛋白自组装位点的存在。

实验证明,在带有缺少了这 2 个位点中的任何一个的釉原蛋白转基因小鼠的成釉细胞表达的釉原蛋白都出现了明显变化。这些变异的釉原蛋白也

参与了牙釉质细胞外有机基质的形成，因而，这样的细胞外基质在调制牙釉质生物矿化过程中就出现了问题。在纳米尺度下，转基因小鼠牙釉质内的釉原蛋白组装纳米微球的尺寸发生了明显变化，而在介观尺度的牙釉质分级结构方面，6 周龄的转基因小鼠牙釉质内的釉柱结构出现了变异，这主要是由有机基质前体的混乱结构造成的。扫描电镜对野生型和转基因小鼠的牙釉质结构的研究结果表明：野生型小鼠的牙釉柱与相邻或相交的牙釉柱之间有明显的分界线，同时紧密排列；而与之年龄相同的转基因小鼠的牙釉质结构出现明显的无序排列，同时在釉柱间变得多孔(图 5.8)。

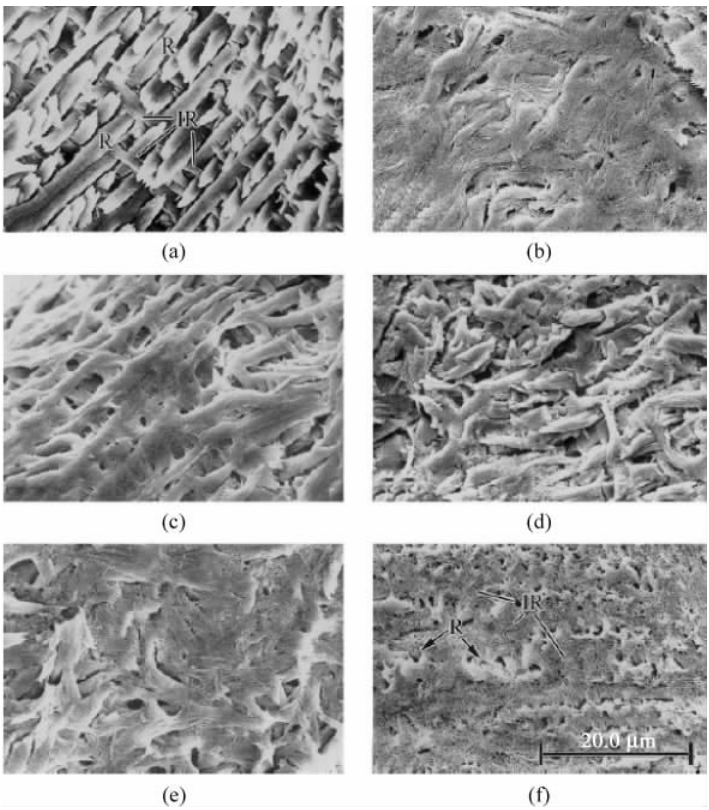


图 5.8　野生型和转基因小鼠牙釉质的扫描电子显微镜照片

(a) 野生型小鼠；(b) M180DA；(c)、(d) M180DA-FLAG；(e)、(f) M180DB-HA [46]

釉原蛋白自组装特点的转基因动物研究反应了釉原蛋白在构成牙釉质有机基质中发挥的重要作用，同时也说明影响釉原蛋白自组装的基因变化能最终导致牙釉质结构方面的缺陷。

Edar 信号因子，是一种肿瘤坏死因子受体，在外胚层器官发育中是必需

的。Edar以及其他同信号通道的分子突变会引起动物体外胚层器官的发育异常,从而引起牙齿的缺失、发育畸形,毛发汗腺发育不全等症状。芬兰赫尔辛基大学Johanna Pispa,Tuija Mustonen等通过角蛋白14启动子控制Edar在外胚层中的表达,发现异常表达的小鼠牙齿外形和分化都发生了非常大的变化。与野生正常老鼠相比,基因突变老鼠,其牙齿形态差异很大,牙冠数目减少。上述结果表明,Edar的表达是牙齿硬组织等形成、发育所必需的。

Smad3是一种细胞内信号分子,调节转化生长因子β(TGF β)和激活受体。日本德岛Masahiko Yokozeki等利用转基因技术,得到Smad3(−/−)、Smad3(+/−)以及野生正常老鼠,并发现:Smad3(−/−)老鼠门牙异常发白,而Smad3(+/−)以及野生正常老鼠均为黄褐色。脱钙后组织学分析表明,上颌骨门牙厚度三者类似,但Smad3(−/−)老鼠釉质层间断性破坏。X光断层照相发现,Smad3(−/−)老鼠的上颌骨门牙颚骨磨牙矿化明显不足。SEM观察发现,Smad3(−/−)老鼠颚骨磨牙釉质层表面明显不规则,间断性被破坏。但是脱钙后组织切片没有发现Smad3(−/−)老鼠的分泌期和成熟期中成釉细胞的形态等与Smad3(+/−)以及野生正常老鼠相比有明显变化。

挪威奥斯陆大学Steinar Risnes等对转基因Tabby老鼠(EDa基因已经改变,与人类少汗性外胚叶发育不全病理相似)进行了研究。对5只雌性Tabby老鼠和3只雌性野生型老鼠的牙齿进行观察发现,基因突变老鼠其牙齿数量、形态、尺寸等都发生了变化。对其门牙、磨牙进行横切、包埋、0.1%硝酸酸蚀45 s,喷金后进行了SEM观察,发现Tabby老鼠颚骨门牙明显宽化,其磨牙小于野生老鼠磨牙,但未发现釉质层厚度有明显变化。而Tabby老鼠,釉质一直存在于其门牙两侧,并一直沿向舌向,但是在颚骨磨牙中,只有外侧存在釉质层。同时,釉牙本质界没有中央凹陷线,大多数釉柱层仍然是复杂排列,只有少数区域存在异常排列。这表明在内外釉质上皮细胞中,Ta和Edar的相反表达对于釉牙本质界的位置等有明显的影响。

美国南加州大学Michael等对釉原蛋白(180个氨基酸分子,M180)在鼠牙的形成和发育过程中的作用进行了研究。釉原蛋白分为A、B两个结构域,一般基因转变时,分别用去除A/B来单独研究其作用。发现,转基因老鼠成釉细胞中,单独表达变异蛋白,这使得改变了蛋白在形成细胞外基质时的作用,从而使细胞外基质在诱导矿化时存在缺陷。纳米尺度上,临近成釉细胞的分泌面,正在形成的基质显示釉原蛋白尺度发生了改变,釉质层中尺度上,6周大的老鼠牙釉质在釉柱排列方向等都存在缺陷,这可能是由于先驱有机基质的紊乱而引起的。

美国华盛顿大学HANSON FONG等对转基因老鼠(表达釉原蛋白的两个独立片断)以及同窝野生正常老鼠进行了纳米结构和性能观察,发现其硬

度下降了 21%，而模量下降了 24%，并认为这种结构性能的下降是由于蛋白基质的紊乱导致矿化的缺陷。

甲状旁腺激素相关蛋白(PTHrP)的表达直接影响到牙齿成长发育的上皮层，在牙乳头发现了 PTH/PTHrP 受体(PPR)mPNA，表明 PTHrP 和 PPR 可能调节上皮细胞和间叶细胞之间的相互关系。美国罗切斯特大学医学部 Calvia，Shinb 等针对成骨细胞持续表达 PPR 的转基因老鼠进行了研究，发现这些转基因老鼠，牙齿萌发正常，但是出生后为异常宽的牙冠。如图 5.9(a)所示在出生一周后的牙乳头和成牙质细胞中第一次发现转基因 mRNA 的表达，而在其他上皮细胞结构中并没有发现转基因的表达。没有发现出生之前的

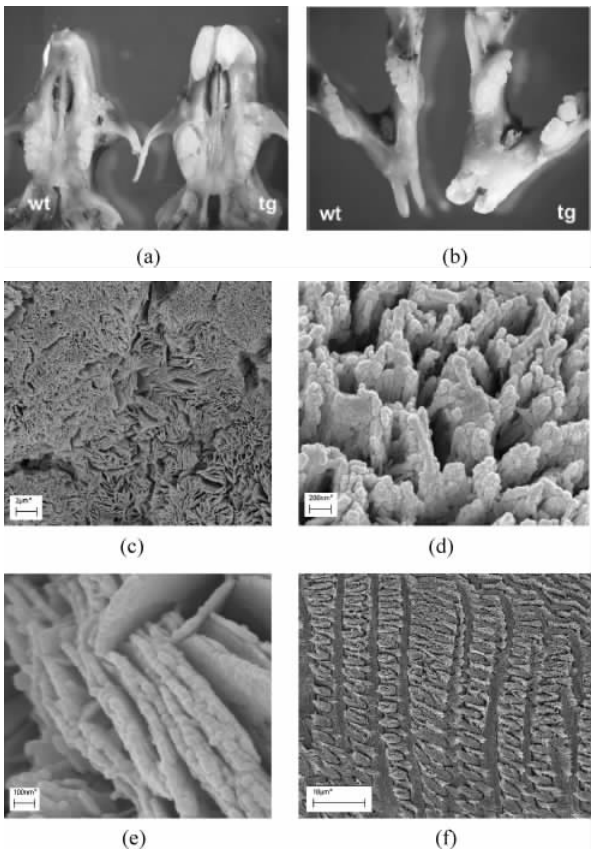


图 5.9　(a)、(b) Calvia，Shinb 等对 PTHrP 持续表达的转基因老鼠牙齿发育过程的研究，wt 为野生正常型老鼠上颌牙齿；tg 为 PTHrP 持续表达的转基因老鼠下颌牙齿；(c)～(f) 程振江等对 PTHrP 持续表达的基因突变鼠牙釉质区的 SEM 观察；(c)、(d)、(e) 转基因鼠牙门牙釉质区异常区域；(f) 正常鼠牙门牙其釉质区

转基因老鼠的磨牙和门牙与正常老鼠有何差别,出生一周之后,发现牙乳头宽化,牙本质基质减少,成牙质细胞层破坏。另外,牙冠数反常的增加,釉质基质减少,成釉细胞层紊乱,成釉细胞、成牙质细胞等细胞分化削弱。同时发现,作为成釉细胞分化的重要决定因素,转基因老鼠中,成釉细胞的表达明显地改变了。这表明 PPR 对成牙质细胞的激活作用在成牙质细胞末期发挥重要作用,从而间接地影响成釉细胞的分化,进而影响牙齿的形态发育和生长。

崔福斋、程振江等在与罗切斯特大学医学部的合作中,通过对持续表达 PPR 的转基因鼠牙进行 SEM、TEM、纳米压痕等的观察,首次发现了该转基因鼠牙釉质区的混乱情况,并对其釉质区的分级结构进行了对比研究,同时发现转基因鼠牙其纳米硬度和模量分别下降了 35.9%和 32.3%,并认为是由于甲状旁腺激素相关蛋白的持续表达,导致其矿化过程中釉原蛋白分泌及其表达的变化,并最终导致其结构和力学性能的显著差异(如图 5.9(c)~(f)所示)。

程振江[45]等以 col1-caPPR 型老鼠门牙和磨牙牙釉为模型,采用 SEM、TEM、FTIR、纳米压痕仪等分析方法,对基因变异型与野生型老鼠牙釉结构及其力学性能进行了系统的对比研究。发现:①col1-caPPR 型老鼠牙釉中晶体的形态和组装方式都发生了明显变化,出现了片状晶体 OCP、草状晶体等无釉柱结构,同时晶体结晶性和成熟度均明显下降。这表明基因操作后,釉原蛋白、成釉蛋白等蛋白的不均匀表达,对晶体的形核、定向生长以及组装排列产生了重要影响。②col1-caPPR 型鼠牙牙釉中釉柱的组装方式和空间排列走向发生了明显变化,存在扭曲、散乱排列、无釉间质等多种异常结构。这表明成釉细胞的形态和移动直接决定了牙釉结构,分化削弱、排列紊乱的成釉细胞导致了釉柱、釉间质紧密结构的破坏。③釉质晶体结晶性和成熟度的下降、无序的排列组装以及釉柱空间走向的扭曲导致牙釉力学性能明显下降。④在牙本质区域内发现了类牙釉质,进而证实了在牙齿发育过程中釉牙本质界上的确存在成釉细胞和成牙本质细胞之间的信号传导。

5.5 基因治疗与生物矿化

随着人类医学技术水平的不断发展提高,越来越多的生物技术被用于治疗人类各种疾病,提高人类生存质量上来,基因治疗便是目前刚发展起来的新兴技术之一。因为基因治疗的优异功能,它目前受到了广泛的关注,并开始用于治疗一些骨组织疾病,这也是与生物矿化最直接相关的研

究领域。

基因治疗是将具有治疗价值的基因，即“目的基因”，装配于能在人体细胞中表达所必备元件的载体中，导入人体细胞，直接进行表达。现阶段，基因治疗集中于将外源基因序列转移基因（transgenes）导入人的相应部位，目的是矫正表型或基因型异常，还有就是为细胞提供新的功能。因此，基因治疗可称为是遗传修饰（genetic modification，GM）的一种方式。现在，关于人类的基因治疗研究集中于体细胞的修饰（包括癌细胞）。

几乎所有的细胞基因，只要它具有治疗作用，理论上均可应用于基因治疗。基因治疗必须将基因直接导入人体细胞，这在技术上具有很大的难度，而且对其有效性与安全性方面提出了苛刻的要求。基因治疗要取得突破，必须解决三个关键问题：即基因导入系统、基因表达的可控性及良好的治疗基因。高效的、靶向性基因导入系统是基因治疗关键问题中的首要条件。将治疗基因输送并进入特定的靶细胞，从而要能在该细胞中得到高效表达。导入人体的过程中需要载体参与，因此选择合适的载体材料对“目的基因”能否正确和适量表达具有很大作用。

改变体细胞有两种直接的途径，一种方法是从病人的身上获得细胞，然后对细胞进行基因改变，然后再转移到病人身体。另外一种是对病人体内的细胞直接进行基因操作。这两种基因治疗（ex vivo 及 in vivo）的途径都在研究当中，并已经尝试在一定的范围内使用。这两种途径都不用考虑细胞的类型，所有基因治疗的关键问题是如何将治疗基因材料转移到目的细胞基因转移（gene transfer）。

5.5.1　基因治疗用于骨疾病

为了保持功能发挥，骨组织在不停地进行吸收和重建过程，其中骨组织的吸收过程主要由破骨细胞完成，而重建过程主要由成骨细胞完成。年轻的成年人的骨组织吸收和重建处于平衡状态，因此骨密度保持稳定。当这种吸收和重建处于非平衡状态时，一些骨疾病就会诱发。人类在 40 岁以后，骨吸收的速度会逐渐超过骨生长的速度，从而导致局部甚至系统性的骨缺损，即骨质疏松。骨质疏松是一种常见的骨疾病。尽管目前认为更年期后的女性因为雌激素减少而更容易患这类疾病，但是目前人们越来越多地认识到一些其他影响因素的存在使老年男性也容易造成骨质疏松。另外，研究发现大量的骨吸收和钙大量流失是很多癌症和乳腺癌和前列腺肿瘤骨转移的并发症。指导发展骨疾病治疗方法的基本原则主要包括：

（1）选择性，即药物必须准确地针对骨或者细胞进行作用；

（2）高效性，即发展的治疗方法必须经过对疗效/风险比率进行优化；

(3) 舒适性,即尽量减轻病人在治疗过程中的痛苦,例如使用口服药而不是注射药物。

经过科学家们的不懈努力,已经有很多治疗方法开始使用或在研究,这其中,基因治疗是很重要而且先进的方法之一,满足了以上3条原则的要求[17,47,48]。

5.5.2 骨缺损基因治疗

骨缺损是危害人类健康的骨科、颌面外科等学科的常见疾病。目前关于它的治疗已有许多种方法,如采用自体骨、异体骨或人工生物材料修复,但这些方法都有一定的缺陷。近20年来随着DNA重组技术和基因转移技术的逐步成熟,人们已经开始探索基因治疗在骨缺损方面的应用,并得到了迅速发展。

5.5.2.1 目标基因的选择

骨缺损基因治疗目的基因的选择应从能促进具有成骨潜能的细胞或细胞系向成软骨、成骨细胞方向分化的生长因子方面着手。包括骨形态发生蛋白、骨生长因子、胰岛素样生长因子(IGF-1)、TGF-β、酸性和碱性成纤维细胞生长因子、血小板源性生长因子、表皮生长因子、血管内皮生长因子等。

BMPs是一类特殊的骨生长因子,不仅能够在体内诱导骨形成,而且在体外也能调节成骨细胞的分化。此外,基因转染的实验证明BMP-2基因能在NIH3T3细胞中得到表达并促进其向成骨样细胞分化。TGF-β是较强的促成骨分化的因子,对骨髓基质细胞有作用效果。基因转染实验结果发现:基因转染后,TGF-β能促进MSCs增殖及向成软骨方向分化。VEGF最重要的生物学活性就是促血管生成作用,尤其是骨的发育、形成和改建,均离不开血管生成。因此VEGF通过促血管生成参与骨发育形成。以上各种目的基因各有其优缺点,目前倾向于多种因素联合使用或序贯使用。

5.5.2.2 基因转移的载体

当前基因治疗所面临的最大挑战,就是如何才能有效地将治疗基因导入细胞,按需要适当地表达,而且要使其对细胞毒性减到最低程度。除了直接应用“裸”DNA等外,基因治疗的关键是如何选择理想的运载治疗基因到达靶细胞使之表达的导入系统,即载体。

基因导入系统可分为病毒和非病毒导入系统2大类。可供骨缺损基因治疗选用的载体及其优缺点如表5.2所示。

表 5.2　骨缺损基因治疗的载体

载　　体	优　　点	缺　　点
病毒类逆转录病毒(RV)	转染效率高，表达时间长，感染分裂细胞，不编码病毒蛋白	随机整合，有诱发突变可能病毒滴度不够高
腺病毒(AV)	携带外源基因容量大，制备简单，病毒滴度高，感染非分裂细胞	不能长期表达，具有免疫原性，有引起炎症可能
腺病毒相关病毒(AAV)	位点特异性整和，表达时间长，安全性较高，可感染有分裂细胞，无致病性，不编码病毒蛋白	携带外源基因容量小(4 kBb)，制备较困难
非病毒类脂质体	无毒，无免疫原性，具有生物惰性，可生物降解，易于制备，使用方便	转染效率不太理想
裸 DNA	便宜、简单、安全无免疫原性	转染效率和表达时间不太理想
DNA 配体	靶向性较好，受体介导时可高效转染	可能有抗原性

5.5.2.3　基因表达的调控

有效的基因转移到适当的靶细胞还需要基因有一个适当的表达水平和时间，这就与基因表达和调节有关。目前研究最多的是特异基因启动子，它们通过调节 RNA 的合成，从而影响基因转录。但由于靶细胞的不同，一定时间后，这些启动子被关闭，这些启动子所启动的基因表达由于细胞分裂的停止而消失，可能是启动子内胞嘧啶残基在细胞甲基化酶的作用下发生甲基化的结果。为了延长目的基因在靶细胞内的表达，常用管家基因启动子。因为管家基因所编码的蛋白为细胞生存所必需，它的表达是持久的。但这些启动子调控的目的基因表达水平较低，因此可考虑两种启动子有关元件作整合作用，以设计出调控更高、更持久的基因表达的启动子。除启动子外，某些附加物质对基因表达也有影响，包括增强子(enhances，增加基因表达物质)、抑制因子(silencers，减低基因表达产物)、位点控制物质(locus control elements，控制 DNA 大片区域调节物质)和染色质的组织结构等。

研究结果证明 BMP-2 与其他生长因子、某些激素可能具有相互制约或相互协同的作用。VEGF 基因的表达受多种细胞因子、癌基因、抑癌基因产物及缺氧等因素的调控。癌基因和抑癌基因产物对 VEGF 基因的表达调控作用是通过直接或间接作用于 VEGF 基因启动子来实现的。

5.5.2.4 基因转染方式和靶细胞的选择

迄今为止,用于骨缺损基因治疗的靶细胞有骨髓基质细胞、关节软骨细胞、成纤维细胞、骨膜源成骨细胞、骨肉瘤细胞系、卵巢细胞等。1994 年,Takaoka 等将从 Dumn 鼠骨肉瘤中提取的 BMP-4 基因转染到仓鼠卵巢细胞中,然后植入裸鼠皮下,结果表明,BMP-4 具有骨诱导活性。1998 年,Liberman 等将 BMP-2 基因转染进入鼠骨髓基质细胞内,使之分泌具有生物活性的 BMP-2,再将之分泌性基质干细胞移植到股四头肌时,可诱导异位骨形成。2000 年顾洪等构建了 hVEGF 165 的真核表达载体,通过直接肌肉注射,转染至缺血部位肌细胞,结果发现肌细胞能够吸收裸 VEGF cDNA 质粒并获得局部高效表达,产生刺激体内新生血管生成和侧枝血管形成的效果。

5.6 基因模板在生物模拟矿化中的应用

DNA 分子或其片段作为组装模板的无机纳米粒子自组装技术,已引起人们广泛的关注。DNA 分子或其片段在用作纳米颗粒组装中是一种很有特色的模板,这种模板与简单有机分子模板不同,其组装过程不仅可以通过模板与纳米团簇的静电相互作用,也可通过与纳米团簇结合的低聚核苷酸分子与模板间的分子识别来实现。众所周知,DNA 分子是由两条脱氧核苷酸通过碱基配对组合而成,具有完善的分子识别功能,使得组装过程具有高度的选择性,或者说,定向组装的功能要强得多。此外,以 DNA 为模板的自组装过程还具有可逆性。组装后,只要将组装起来的纳米团簇加热到一定温度时,随着 DNA 分子的受热而碱基配对性被破坏,纳米团簇将重新分散。

再者,随着现代生物学和分子生物技术的发展,将 DNA 进行任意裁剪或用不同种类官能团进行化学修饰,各种大量的具有特定长度和特定序列的 DNA 可以在 DNA 合成器中自动生成等等,凡此种种均为采用 DNA 来精确控制纳米粒子组装的不同复杂结构提供了强有力的手段。应该强调,由于自组装驱动力总的来源于纳米团簇外包敷分子的分子识别,因此采用这种自组装方法就有可能实现不同种类、不同粒径纳米团簇,又呈现特定结构的复合组装。显然,这对于制备具有特定性质和要求的纳米器件等方面具有潜在的重要应用价值。

5.6.1 DNA 模板纳米粒子自组装的典型结构

应用 DNA 为模板进行纳米粒子自组装,最早开始于美国得克萨斯州 Christian 大学化学系教授 J. L. Coffer 实验室的工作。他们将低浓度的质粒

DNA 与 Cd^{2+} 溶液混合，借助于排布在 DNA 分子双螺旋结构外侧又具有负电荷的磷酸酯骨架，使带正电荷的 Cd^{2+} 通过静电吸引而连接到 DNA 模板上，然后再将 DNA 分子吸附到新解理的云母片上，最后在 H_2S 气氛下获得有序粒子的纳米结构。电镜图显示出相当漂亮的环状 CdS 纳米粒子的自组装结构，其中环长 1.2 μm，与质粒 DNA 分子的长度 1.17 μm 基本符合。该工作清楚地表明，CdS 自组装粒子与 DNA 分子磷酸酯骨架之间的静电相互作用，作为一种驱动力，确实使 DNA 分子起到了自组装模板的作用，显然为制备其他粒子的自组装纳米结构提供了极大的可能性。鉴于 DNA 模板的形状、长度与序列都可人为控制，因此各种几何构型的自组装纳米结构的制备原则上应该没有问题。

如果无机纳米粒子自组装的驱动力来源于 DNA 或其片段间的分子识别作用，通常能得到纳米粒子在二维或三维方向上的网络组装体系。这就更加接近实用宏观材料的形态，更有利于人们的实际利用，大大拓宽了纳米材料的应用范围。

5.6.2　DNA 模板组装一维金属纳米线

当自组装驱动力主要依靠静电相互作用时，所得的自组装纳米结构通常是一维的金属纳米线。Braun[6] 等通过在 DNA 长链上沉积银纳米微粒，成功地制得连接两个金电极的纳米银导线，线宽 100 nm，长度可达 12 μm。这样以 DNA 为高级模板生长而成的银导线，其宽度远远低于微电子技术中用常规方法所能达到的限度，测试所得的银导线具有良好的电学性质，这使得这类导线在未来的纳米电子器件应用中有着良好的前景。已经制备出的还有 Pd、Pt 和 Au 纳米线。

该过程主要分 2 个步骤（图 5.10）。第一步为 DNA 模板自组装。首先，由二硫键修饰 3′末端的 12 个碱基组成的寡聚核苷酸通过 S-Au 相互作用连接到相距 12～16 μm 的金电极上。连接到两个电极上的寡聚核苷酸序列不同。然后加入 16 μm 长具有荧光标记的 λ-DNA，该 DNA 具有 12 个碱基的粘性末端，分别同金电极上连接的寡聚核苷酸互补。杂交过程通过将电极浸入包含 λ-DNA 的水溶液中实现，引入垂直于电极方向的水流量，使得 DNA 分子沿流量方向伸展。当在荧光显微镜下显示单根 DNA 桥已形成时，流量即可中止。

第二步是使 DNA 具有导电功能，将 Ag 定向地沉积在 DNA 分子上。通过 Ag^+/Na^+ 的离子交换过程和 Ag 与碱基间的作用力，Ag^+ 吸附到 DNA 分子表面。然后在酸性对苯二酚的作用下，DNA 上的 Ag 离子形成纳米尺度的金属银的聚集体，吸附在 DNA 表面。随着金属银聚集体的长大，DNA 表面

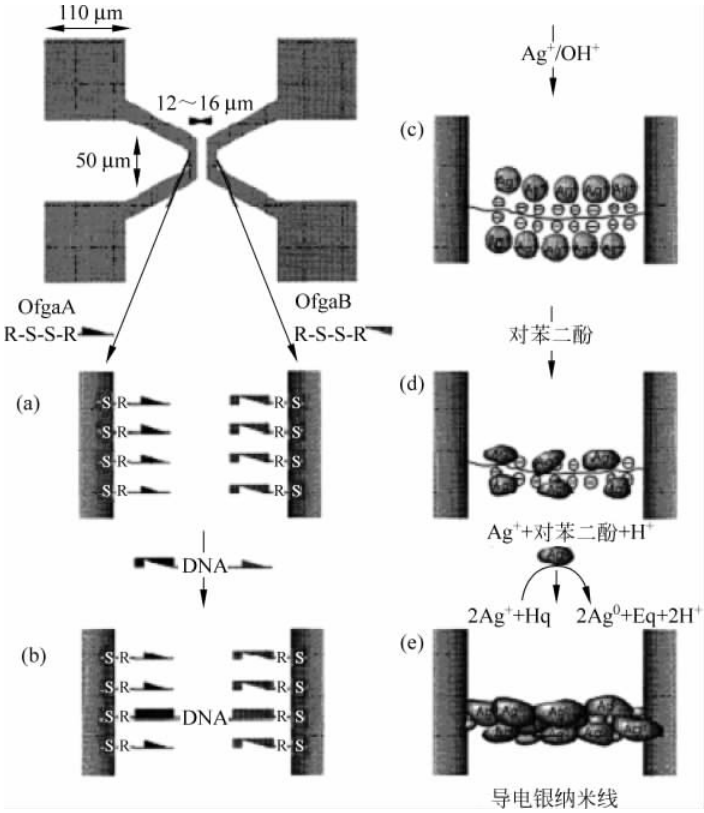


图 5.10　连接金电极的银导线构建过程。左上图显示试验中的电极形貌(0.5×0.5 mm),两个 50 μm 长的平行电极由四个基座连接

(a) 电极连接两个不同序列的寡聚核苷酸链;(b) λ-DNA 桥连接两个电极;(c) Ag^+ 沉积在 DNA 桥表面;(d) 金属 Ag 聚集在 DNA 骨架上;(e) 金属银导线的形成

被金属银包覆,形成了纳米银导线。利用 DNA 生物模板生长而成的纳米银导线,其宽度远远低于微电子所得的银导线,并具有良好的电学性质,这类导线将在未来的纳米电子器件的应用中发挥重要的作用。

以 DNA 为自组装模板,Pd、Pt 和 Au 导电纳米线的制备也相继获得成功。德国科学家 Richter 等构建了 Au 和 Pd 纳米线,并对它们的导电性能作了详细的研究。Braun 等制备的 100 nm 宽的银导线虽然具有良好的导电性,但在微小电压时存在导电不通畅的缺点。Richter 等制备的钯纳米线显示了电阻转移行为,50 nm 宽的 Pd 纳米线的电导率仅比体相钯小一个数量级。试验中,他们利用金属化的线性 λ-DNA 分子连接 2 个相距几个微米的金电极。DNA 金属化的过程包括两步钯的化学沉积过程染:Pd(Ⅱ)复合体处理使模板活化,连接到 DNA 链上;复合体还原成金属团簇。图 5.11 为在金电极间

随意沉积的多条平行排列的金属 Pd 纳米线。在这种构型中，每 1 条单个金属 Pd 纳米线的电阻均可采用在光学显微镜下的显微操纵以断开其中一部分而测得。设断开前和断开后，分别测得的体系总电阻值为 R_a 和 R_b，则被断掉部分的电阻 R 为 $R_aR_b/(R_a-R_b)$。这种测量方式的最大优点是，不但可以一次检测多条纳米线，而且能在相对较短的时间内采集到大量相关数据。该研究推动了基于 DNA 模板制备的金属纳米线在纳米电子器件的开发中的应用。同时，DNA 模板的金属化使得 DNA 链在高于变性温度时的应用成为可能。

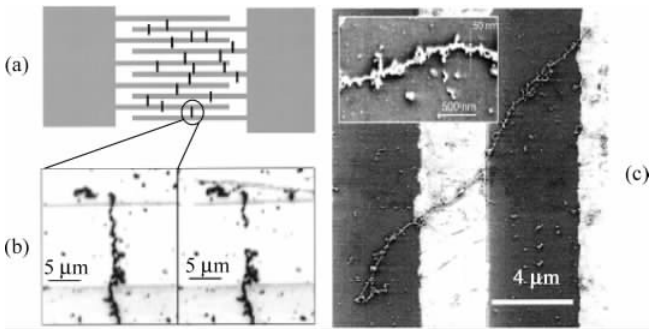


图 5.11　Pd 金属纳米线示意图

(a) 5 对梳子状金接触线(灰色)上平行排列的纳米线(垂直的黑线)的示意图；(b) Pd 纳米线的激光扫描显微照片，左边为连接状态，右边为断开状态；(c) 单根 Pd 金属 DNA 链的扫描照片

5.6.3　DNA 模板自组装纳米颗粒二维及三维网络体系

利用生化分子识别技术，通过 DNA/纳米无机颗粒的自组装获得宏观功能材料开辟了材料科学的新领域。无机纳米颗粒的自组装驱动力来源于 DNA 或其片段的分子识别作用，得到无机纳米颗粒二维和三维尺度上的网络结构体系。

美国西北大学化学系 Mirkin 等实现了使用 DNA 控制组装无机纳米粒子成为网络状的宏观材料，而且试验表明该组装过程可逆。他们已获得金属、半导体、磁性颗粒和聚合体颗粒等多种纳米颗粒作为自组装成分。这些粒子的直径可控在 1nm 到 1 μm 之间。这些粒子的自组装方式基本相近，都根据金颗粒的自组装过程发展而来的。主要的问题是将合成的 DNA 固定到纳米颗粒的表面。这看似简单的过程往往需要对颗粒表面的配位化学性质有充分的了解，以便保证两种 DNA 标记的不同类型的纳米颗粒之间不存在非特异性的相互作用。这是因为在该研究的设计中，纳米颗粒仅提供物理性

能,DNA 完成所有的化学组装工作。

下面就以金颗粒为例,介绍 DNA 为模板控制纳米颗粒组装的网络体系材料。他们从直径为 13 nm 的金纳米粒子溶胶出发,先采用 2 种带有巯基的核苷酸对金纳米微粒分别修饰,修饰所用的 2 种核苷酸彼此对应碱基为非互补,这样就得到了 2 类表面为绒毛状的金纳米粒子。混合 2 类金纳米粒子,并无反应发生,并且通过核苷酸的包敷还使溶胶更加稳定,成为单分散系统,通过紫外光谱分析,溶液在 520 nm 处有明显的吸收峰。金颗粒表面由于不完全还原反应,可以认为颗粒 Au^0 核心表面包覆 Au^1 壳层,柠檬酸根和氯离子会和 Au^1 壳层发生配位作用,使得金纳米颗粒整体带有负电。由于纳米颗粒光谱的等离子键的摩尔消光系数近似为 2.4×10^8 L/(mol·cm),因此颗粒溶液呈现肉眼可见的颜色。

当往纳米颗粒溶液中加入用作连接剂的 DNA,该 DNA 两端分别与金纳米微粒上附着的两类低聚核苷酸通过碱基配对相结合,从而连接了各个溶胶粒子。紫外光谱检测显示等离子键吸收峰从 520 nm 红移到 600 nm 处,这时胶体颜色由红变为紫色,几小时后溶液变为澄清,下部得到品红色的沉淀物。产物的 TEM(图 5.12)研究表明,沉淀物是由 DNA 连接的一个个金纳米粒子而形成的网络结构,而在无 DNA 包敷的情况下,通常这些金纳米粒子会迅速地长大。

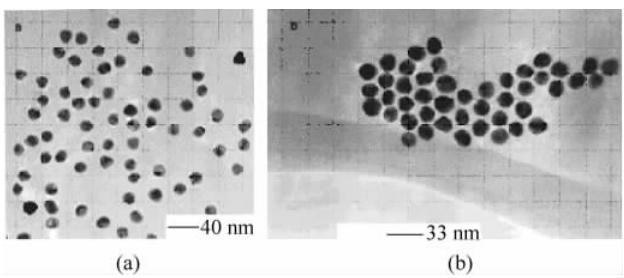


图 5.12　DNA 寡聚核苷酸链修饰金颗粒组装 TEM 照片

(a) 组装前;(b) 组装后

进行温度/时间的溶解实验研究发现,在加热复合的 DNA/金纳米粒子沉淀时,当温度大于 DNA 的熔解温度 T_m,原来的澄清溶液开始变成暗红色,这是由于加热破坏了 DNA 的连接,使该复合生物材料溶解,又产生了未连接的可溶性溶胶粒子,重新分布到溶液中,所以这种组装过程是完全可逆的。这种组装方式可以方便地控制 DNA/纳米颗粒混合物的自组装结构形态及其电子、光学等特性。为了更明确地表明自组装的周期性,选择了两种不同尺寸的纳米颗粒(30 nm 和 8 nm),通过同样的方法进行自组装。图 5.13 显示了

自组装过程示意图和自组装颗粒的 TEM 照片。

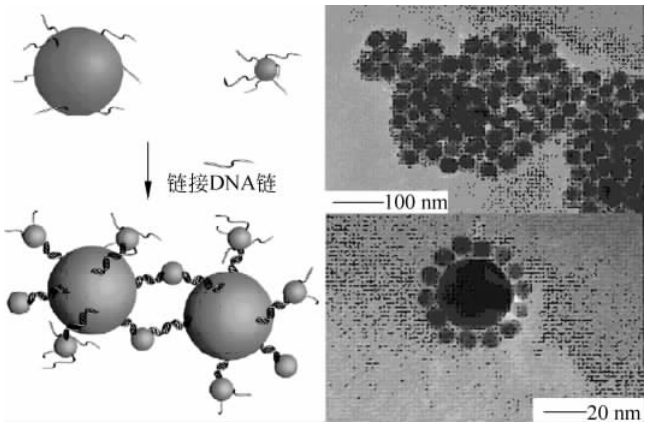


图 5.13　两种不同尺寸金纳米颗粒 DNA 修饰组装示意图及 TEM 照片

尽管 DNA 模板自组装无机纳米粒子目前并没有形式实用的纳米电子器件，但以上的研究结果重复显示了 DNA 在纳米器件领域有着广阔的应用前景，生物技术和纳米技术的结合将成为 21 世纪材料领域的新亮点。

5.6.4　天然病毒 DNA 指导一维纳米材料的合成

一维纳米材料具有独特的性能和广阔的应用前景，一直是科学家研究的热点。目前，半导体、金属和磁性纳米线通常通过气液固(VLS)、化学法、气相和模板调控等方法合成。尽管每种方法都已成功地合成出高质量的材料，但没有方法能够得到单分散性，不同成分的结晶纳米线。因为这就需要基底特异性配体能和自组装体相结合，这在自然界中却很常见。近年来，生物因子已经被用来指导纳米纤维，病毒基颗粒笼，病毒颗粒组装体以及非特异性多肽模板等的合成。这是由于天然中存在高度有序的组装过程，化学修饰以及自组装结构单元。

编码 M13 噬菌体病毒 DNA 能够储存材料的各种信息，包括成分、相和结晶性等等，能够提供一种可行的方法组装纳米材料的合成。噬菌体指示技术使人们发现了材料特异性多肽，能够择优结合，控制纳米颗粒形核，在纤维状 M13 病毒固有的各向异性形状的基础上有序排列。因为具有这样性能的蛋白和基因连接，包含在病毒的蛋白质外壳中，因此精确的病毒框架的基因拷贝可以通过转染到细菌宿主中获得。

Chuanbin Mao[25] 等通过基因修饰的病毒框架合成出了多种一维纳米材料。并通过退火，病毒-颗粒组装体转变为高度结晶的纳米线晶体。合成的不

同材料纳米线包括Ⅱ～Ⅵ族半导体 ZnS、CdS 纳米线,晶体结构 $L1_0$ 铁磁合金 CoPt 和 FePt 纳米线等。不同于其他合成方法,该方法能够通过一个通用模板基因调控结晶半导体、金属、氧化物核磁性等不同材料的合成。如图 5.14 为 M13 噬菌体及其合成纳米线示意图。ZnS 和 CdS 等的矿化过程包括病毒模板和金属盐前驱体的共培育过程,降低温度来促进形核过程中多肽分子统一排列,使纳米晶体具有择优取向。退火前,纤维锌矿的 ZnS 和 CdS 纳米晶体(3～5 nm)生长在病毒表面,密排并具有[001]择优取向。

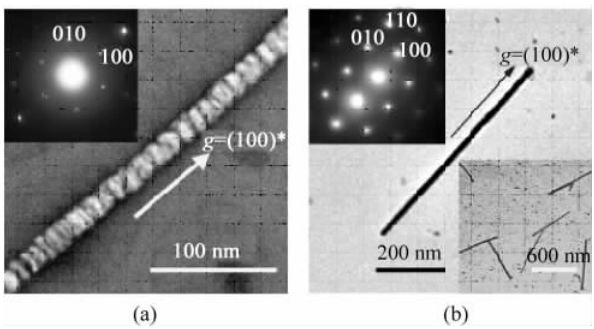


图 5.14　病毒合成 ZnS 纳米线退火前(a)和退火后(b)电镜照片[16]

用同样的方法还可以合成铁磁 $L1_0$CoPt 和 FePt 纳米线。将 CP7 CoPt-特异性多肽或 FP12 FePt-特异性多肽和 M13 噬菌体病毒外壳蛋白质融合在一起。在 gP8 修饰的病毒存在的情况下,通过金属盐溶液前驱体的化学还原反应形成 CoPt 和 FePt 纳米颗粒。350℃退火,除去病毒模板,促进 CoPt 和 FePt 纳米颗粒的生长,最终形成纳米线,为病毒模板组装合成的铁磁 $L1_0$CoPt 和 FePt 纳米线。

应用 M13 噬菌体病毒自组装体作为生物框架提供了一种利用形成的复杂,高度有序的实用模板合成单晶纳米线的方法。通过设计的基因控制纳米颗粒的成分、相和自组装,实现不同材料的广泛合成。引入特异性多肽对生物系统的修饰为合成高度有序的纳米材料和器件提供了更新颖,更具潜力的方法。

参 考 文 献

[1] Lowenstam H A, Weiner S. On Biomineralization. Oxford, UK: Oxford University Press, Inc., 1989.

[2] Paine M L, White S N, Luo W, et al. Regulated gene expression dictates enamel structure and tooth function. Matrix Biology, 2001, 20(5～6): 273～292.

[3] 崔福斋，王秀梅，胡堃. 基因材料. 北京：化学工业出版社，2004.

[4] Boyde A. Electron microscopic observations relating to the nature and development of prism decussation in mammalian dental enamel. Bull Group Int Rech Sci Stomatol，1969，12(2)：151～207.

[5] Boyde A. Microstructure of enamel. In：Dental Enamel，Proceedings of Ciba Foundation Symposium 205. Chichester，UK：John Wiley & Sons Ltd，1997，18～31.

[6] Braun E，Eichen Y，Sivan U，Ben-Yoseph G. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. Nature，1998，391：775～778.

[7] Davis M E. How life makes hard stuff. Science. 2004，305：480.

[8] Eastoe J E. Organic matrix of tooth enamel. Nature，1960，187：411～412.

[9] Farina M，Schemmel A，Weissmüller G，Cruz R，Kachar B，Bisch P M. Atomic force microscopy study of tooth surface. J Struc Biol，1999，125：39～49.

[10] Paine M L，Zhu D H，Luo W，Bringas Jr P，Goldberg M，White S N，Lei Y P，Sarikaya M，Fong H K，Snead M L. Enamel biomineralization defects results from alterations to amelogenin self-assembly. J Struc Biol，2000，132：191～200.

[11] Fincham A G，Simmer J P. Amelogenin proteins of developing dental enamel. In：Dental Enamel，Proceedings of Ciba Foundation Symposium 205. Chichester，UK：John Wiley & Sons Ltd，1997，118～130.

[12] 姜化，王稚英，姚琦. 骨缺损基因治疗研究进展. 锦州医学院学报，2002，23：73～75.

[13] 张遒蘅. 生物化学. 第 2 版. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1999.

[14] 张漾. 野生型与基因突变型斑马鱼骨的生物矿化研究. 清华大学博士论文，2003.

[15] 王秀梅. 野生型与基因突变斑马鱼骨分级结构和纳米力学性能研究. 清华大学博士论文，2004.

[16] Gopalakrishnan R，Suttamanatwong S，Carlson A E，et al. Role of matrix Gla protein in parathyroid hormone inhibition of osteoblast mineralization. Cells Tissues Organs，2005，181(3～4)：166～175.

[17] Moradian-Oldak J，Lau E C，Diekwisch T，Slavkin H C，Fincham A G. A review of the aggregation properties of a recombinant amelogenin. Connect. Tissue Res，1995，32：125～130.

[18] Kim J W，Yamakoshi Y，Iwata T，et al. Porcine dentin matrix protein 1：gene structure，cDNA sequence，and expression in teeth. European Journal of Oral Sciences，2006，114(1)：33～41.

[19] 张岑. 合浦珠母贝贝壳形成相关蛋白及基因的研究. 清华大学博士论文，2006.

[20] Tsukamoto D，Sarashina I，Endo K. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells，Biochemical and Biophysical Research Communications，2004，320(4)：1175～1180.

[21] Montsant A，Maheswari U，Bowler C，et al. Diatomics：Toward diatom functional genomics. Journal of Nanoscience and Nanotechnology，2006，5(1)：5～14.

[22] Müller W E G，Boreiko A，Wang X H，et al. Morphogenetic activity of silica and biosilica on the expression of genes，controlling biomineralization using SaOS-2 cells.

Calcif Tissue Int,2007,81: 382～393.

[23] Müller W E G,Wang X H,Kropf K,Boreiko A et al. Silicatein expression in the hexactinellid Crateromorpha meyeri: the lead marker gene restricted to siliceous sponges. Cell Tissue Res,2008,333: 339～351.

[24] Seeman N C. DNA in a material world. Nature,2003,421: 427～431.

[25] Mao C,Solis D J,Reiss B D,Kottmann S T,Sweeney R Y,Hayhurst A,Georgiou G,Iverson B,Belcher A M. Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. Science,2004,303: 213～217.

[26] Zhang Y,Cui F Z,Wang X M,et al. Mechanical properties of skeletal bone in gene-mutated stopsel(dtl128d) and wild-type zebrafish(Danio rerio) measured by atomic force microscopy-based nanoindentation,Bone,2002,30(4): 541～546.

[27] Langdahl B L,Carstens M,Stenkjaer L,et al. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. Journal of Bone and Mineral Research,2002,17: 1245～1255.

[28] Wu X L,Gu M M,Huang L,et al. Multiple synostoses syndrome is due to a missense mutation in exon 2 of FGF9 gene. American Journal of Human Genetics,2009,85: 53～63.

[29] Traub W,Arad T,Vetter U,et al. Ultrastructural studies of bones from patients with osteogenesis imperfecta. Matrix Biology,1994,14: 337～345.

[30] Rauch F,Travers R,Parfitt A M,et al. Static and dynamic bone histomorphometry in children with osteogenesis imperfecta. Bone,2000,26: 581～589.

[31] Chevrel G and Meunier P J. Osteogenesis imperfecta: lifelong management is imperative and feasible. Joint Bone Spine,2001,68: 125～129.

[32] Camacho N P,Raggio C L,Doty S B,et al. A controlled study of the effects of alendronate in a growing mouse model of osteogenesis imperfecta. Calcified Tissue International,2001,69: 94～101.

[33] Wang X M,Cui F Z,Ge J,et al. Hierarchical structural comparisons of bones from wild-type and liliput(dtc232) gene-mutated Zebrafish. Journal of Structural Biology,2004,145(3): 236～245.

[34] Wang X M,Cui F Z,Ge J,et al. Alterations in mineral properties of zebrafish skeletal bone induced by liliput(dtc232) gene mutation. Journal of Crystal Growth,2004,258(3～4): 394～401.

[35] Wang X M,Cui F Z,Ge J,et al. Variation of nanomechanical properties of bone by gene mutation in the zebrafish,Biomaterials,2002,23(23): 4557～4563.

[36] Ge J,Wang X M,and Cui F Z. Microstructural characteristics and nanomechanical properties across the thickness of the wild-type zebrafish skeletal bone. Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems,2006,26: 710～715.

[37] Fincham A G,Moradian-Oldak J,Simmer J P. The structural biology of the developing dental enamel matrix,Journal of Structural Biology,1999,126(3): 270～299.

[38] Ten Cate A R. Oral Histology, Development, Structure, and Function, 5th ed. St. Louis, Missouri, USA: Mosby-Year Book Inc., 1998.

[39] Du C, Moradian-Oldak J. Tooth regeneration: challenges and oppitunities for biomedical materials research, Biomedical Materials, 2006, 1: R10～R17.

[40] Piez K A. The nature of the protein matrix of human enamel. J. Dent. Res, 1960, 39: 712.

[41] Dhamija S, Liu Y, Yamada Y, et al. Cloning and characterization of the murine ameloblastin promoter, Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (29): 20738～20743.

[42] Wen H B, Fincham A G, Moradian-Oldak J. Matrix Biol, 2001, 20: 387～395.

[43] Shi X, Yang X, Chen D, Chang Z, Cao X. Smad1 interacts with Homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. J Biol Chem, 1999, 274: 13711～13717.

[44] Yan Y, Tang D, Chen M, et al. Axin2 controls bone remodeling through the beta-catenin-BMP signaling pathway in adult mice. Journal of Cell Science, 2009, 122: 3566～3578.

[45] 程振江. 蛋白调控骨、牙矿化的研究及模拟. 清华大学博士论文, 2010.

[46] Paine M L, Zhu D H, Luo W, Bringas Jr P, Goldberg M, White S N, Lei Y P, Sarikaya M, Fong H K, Snead M L. Enamel biomineralization defects results from alterations to amelogenin self-assembly. J Struc Biol, 2000, 132: 191～200.

[47] 詹子睿, 邵增务. 骨关节炎基因治疗进展. 中国中医骨伤科杂志, 2004, (3): 57～59.

[48] Rodan G A, Martin T J. Therapeutic approaches to bone disease. Science, 2000, 289: 1508～1514.

第 6 章　牙釉质的发育及其生物矿化

6.1　牙釉质的发育过程

与体内其他生物矿化组织如骨、牙本质、牙骨质等起源不同，牙釉质是由源自外胚层的口腔上皮组织分化发展而来。在其发育早期，上皮细胞和源自颅神经嵴的间充质细胞之间相互作用，通过自分泌或旁分泌的分子信号转导通路的调控，上皮细胞定向分化为成釉细胞，间充质细胞则定向分化为成牙本质细胞[1~3]。这个复杂的信号网络中包括了多种可扩散的蛋白信号分子及其受体和重要的转录因子。这些信号分子在时间和空间上的有序表达决定了牙齿的发生和形态形成并精确控制着牙齿发育的区域、类型、数目及其形状。

组织学的观察表明，牙齿的发生开始于局部口腔上皮的增厚，依次经历牙板期、蕾状期、帽状期、钟状期和细胞终末分化期等几个具有明确特征的发育阶段。在小鼠中，局部口腔上皮增厚形成牙板是在胚胎形成的第 11 天发生的，而在人类中这个过程开始于胚胎发育的第 6 周[1,2,4]。随着增厚处的上皮组织内陷入间充质组织即进入蕾状期[5]，此后，从蕾状结构顶端处开始，上皮组织及与之相邻的间充质组织发生一系列的特定的折叠或突起的过程，组织学形态上表现为帽状和钟状，进而建立起牙冠的结构。在帽状期的上皮组织中心部位，有一簇聚集的细胞团构成的结构称为釉质节，这一短暂存在的结构的重要特征是其中的细胞不再增殖但特异性的表达若干关键的信号分子，因此该结构被认为对牙齿的形态发生过程提供了重要的定位信息并调控了牙尖的形成[6]。帽状期突起的上皮组织将间充质组织划分成两部分，中心部位的间充质发育为牙乳突，并将由此形成牙髓和成牙本质细胞，而外周的间充质组织则发育为牙囊，这部分结构将随着牙根的发育而发展出成牙骨质细胞和牙周膜组织[1]。钟状期的细胞通过上皮与间充质的交互作用进一步地分化和发育成熟[7,8]，其中，折叠突起的上皮组织，又称为内牙釉上皮组织中的细胞分化为成釉细胞，与之接触的牙乳突中的间充质细胞分化为成牙本质细胞。两种细胞各自以单层细胞群的形式向相反方向移动，分别形成牙釉质和牙本质组织，两组织的交界面称为牙本质釉质界。

成釉细胞形成后，牙釉组织的进一步发育和成熟主要由其调控，包括基

质蛋白的合成与分泌、矿物的形成与生长以及有机基质的降解与清除等一系列过程。根据成釉细胞形态与功能的演变，这个过程又可以划分为几个连续变化但具有明显特征的阶段，包括分泌前期、分泌期、过渡期和成熟期，与之对应的是组织中化学成分与结构连续而显著的变化。分泌前期的成釉细胞呈立方形态，进入分泌期后则发育成为高达 60 μm，宽为几微米的长柱状细胞，此时的成釉细胞是一种极化的细胞，其细胞核和线粒体偏向位于细胞的近端，而远端的细胞突起呈现锥状形态，称为托姆斯突，其中主要含有分泌颗粒，而胞体的细胞质中含有大量行使蛋白合成功能的细胞器。基质蛋白的旺盛分泌及磷灰石晶体的形核与沿长度方向的快速生长主要发生在分泌期，这期间总质量的 30％为矿物质。最早的牙釉晶体是在牙本质钙化以后才出现的，但关于牙釉晶体的形核位置还存在争论，有观点认为钙化的牙本质提供了釉质晶体最初的形核位点，但也有观察表明，釉质晶体可以在釉质基质中独立形核。当釉质晶体在长度方向上布满整个牙釉质层后，成釉细胞进入过渡期，此时细胞的高度缩短，细胞内结构及细胞器构成发生调整，逐渐体现为吸收性的细胞形态，出现较多的自吞噬液泡，其中含有较多的细胞器残留物。成熟期的成釉细胞的显著特征是远端边缘从以褶皱状为主到以光滑为主反复变化。一般认为褶皱状末端的细胞形态与钙磷离子的引入相关联，而光滑末端的形态则与排出水和有机物有关。成熟期的牙釉组织经历了有机基质的大量清除以及晶体在宽度和厚度上的长大，最终矿物的含量可达到总质量的 95％以上[9~11]。

基于生物矿化过程的普遍规律，Fincham 等将牙釉质的矿化过程归纳为下列几个步骤：①分泌期的成釉细胞及其托姆斯突在牙本质釉质界处限定了矿化空间；②细胞向矿化空间内分泌有机基质，基质蛋白组装形成超分子的结构框架；③细胞向细胞外基质框架内输运无机离子，形成过饱和溶液环境；④矿物晶体在有机基质框架上形核，这既可能发生在已经存在的牙本质基体上，也可能通过釉质基质蛋白的诱导；⑤釉质基质调控晶体的生长、形貌、取向等；⑥羟基磷灰石晶体沿着 c 轴方向迅速择优生长，可以贯穿从牙本质釉质界到釉质表面的整个组织，期间基质蛋白酶的特定作用使得有机基质发生可控降解，并通过与晶体特定晶面的作用，如与平行于 c 轴的 a、b 晶面的作用可以防止在这些晶面上发生的晶体与晶体间的融合，从而控制了晶体的择优生长；⑦有机基质大量地降解和清除，同时矿物晶体在宽度和厚度上迅速长大，最终融合形成成熟的牙釉质晶体。调控基质蛋白在矿化末期的降解吸收，使得无机晶体长大融合并硬化是牙釉质组织矿化所特有的过程[12]。

除了在牙冠表面及接近牙本质釉质界处形成无釉柱型结构或者过渡型结构外，牙釉质的典型结构是由称为釉柱和柱间釉质的两种结构单元相互交

织构成的。单个釉柱的直径约为 3～5 μm,由 c 轴取向的带状磷灰石晶体集结成束而构成,一排釉柱平行排列呈现层状,进而由多层釉柱构成复杂而有序的结构。柱间釉质填充了釉柱间的空间,同样是由磷灰石晶体平行堆垛而成,但两种结构中的带状晶体长轴方向互成一定的角度,釉柱中的晶体均平行于釉柱长轴排列,而柱间釉质中的晶体倾斜的角度可达 40°～65°。釉柱的排布方式在物种间也有差别,如在啮齿类动物的门齿牙釉中,相邻两层釉柱的走向互相交叉成一定角度,而人类的牙釉中,这种"交叉"结构存在于更大的尺度上,其中多层平行排列的釉柱构成一组釉柱群,两种走向的釉柱群交替排布,形成了称为"Hunter-Schreger 带"的结构。釉柱的数目和成釉细胞的数目相同,釉柱的直径和细胞的直径相当,有观点认为每个釉柱主要是由一个成釉细胞所调控形成,尽管相邻成釉细胞的作用也不能被排除[13]。釉柱和柱间釉质的形成与成釉细胞的托姆斯突的分泌功能直接相关。在这个特殊的突起结构上有两类分泌位点,第一类位于托姆斯突表面,控制釉柱的形成,第二类临近托姆斯突的中心并围绕细胞外缘,控制柱间釉质的形成。在发育过程中,每个托姆斯突占据釉质表面上的一个坑,坑内就是釉柱生长区,边缘处则形成柱间釉质生长区。相邻牙釉柱生长区域都是不连续的,彼此被连续的柱间釉质生长区域隔开。每个釉柱生长区域的坑底部通常是倾斜的,连续过渡至坑颈部从而与釉质表面的柱间釉质生长区相连续。

6.2 牙釉质矿化过程中的细胞外基质蛋白

尽管出牙后的成熟牙釉质基本上是一种无细胞的生物陶瓷材料,处于发育过程中的牙釉质组织,特别是在成釉细胞处于活跃分泌状态的早期阶段,牙釉质的细胞外基质只发生部分矿化,其中含量最多的蛋白成分称为釉原蛋白,其次为成釉蛋白和釉蛋白。此外,蛋白酶在牙釉质矿化过程中起到了很重要的作用。金属基质蛋白酶-20 可以裂解釉原蛋白的亲水羧基端,从而使釉质基质的结构和物理化学性质发生变化;成熟阶段的细胞外基质的完全降解则是和丝氨酸蛋白酶的活动密切相关,导致晶体的快速生长及釉质的硬化[12,14,15]。

Piez 最早对从人类未萌出第 3 臼齿中分离的发育期牙釉质基质蛋白进行了完整的氨基酸分析,并得出这样的结论:该蛋白几乎完全溶解于脱钙溶液中,不含羟脯氨酸和羟赖氨酸,并且不同于其他任何已知蛋白[16]。Eastoe 对发育早期的牙釉基质蛋白进行了更精细的分析,发现其具有很高比例的脯氨酸、谷氨酰、组氨酸和亮氨酸残基,并将其中含量最多的蛋白命名为釉原蛋白(amelogenin)[17,18]。进一步的研究发现,发育期牙釉质基质中的釉原蛋白并

非是单一组分的分子，而是包含一系列表观相对分子质量在 5～27 kDa 范围内的密切相关的蛋白复合体。在早期的工作中，这些蛋白组分之间的较强的相互作用给它们的分离鉴定带来了很大困难。但随着分离技术的改进及重组基因技术的发展，科学家对发育期牙釉质中的有机基质蛋白的认识日渐清楚。下面讨论牙釉质矿化中 3 种最主要的细胞外基质蛋白。

6.2.1　釉原蛋白

釉原蛋白一般是由位于 X 染色体上的 1 个单基因表达而来，但在一些物种中，如人类的釉原蛋白也包含 Y 染色体上的 1 个基因片段所表达的分子（约 10%）。研究证明，X 染色体上的釉原蛋白基因片段的缺陷与 1 种称为釉质发育不全（amelogenesis imperfecta，AI）的遗传性牙釉质疾病密切相关。从有 AI 疾病史的家族中，科学家已经发现了 8 种不同的釉原蛋白突变体。

发育期牙釉组织中釉原蛋白的多样性，除了和蛋白酶的作用有关外，很重要的原因是由于 mRNA 的选择性剪切造成的，如图 6.1 所示为小鼠釉原蛋白基因转录过程中 mRNA 的选择性剪切形成的多种异构体[19～21]。这种选择性剪切在釉质发生过程中并不是恒定不变的，这表明釉原蛋白的异构体混合物是随着发育阶段的不同而受到调节的[22]。mRNA 的选择性剪切理论最初用来解释富亮氨酸釉原蛋白多肽（leucine-rich amelogenin polypeptide，LRAP）的来源。LRAP 的羧基端和氨基端序列与主要的釉原蛋白相同，但缺少其中间段序列。最早从发育中的牛牙釉质中提取到两种富亮氨酸釉原蛋白多肽（LRAP-1 和 LRAP-2）。对这些 LRAP 分子进行氨基酸测序发现它们分别含有 42 和 46 个氨基酸残基，并具有相同序列（LRAP-2 在羧基端有 4 个

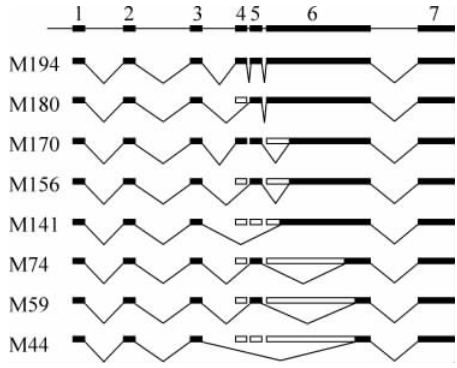


图 6.1　小鼠釉原蛋白 mRNA 的选择性剪切

第 1 行显示了釉原蛋白基因的内含子/外显子结构，细线表示内含子，柱状线表示外显子。空心的柱状线表示该段外显子信息在转录中被剪切掉。左侧的数字表示对应的釉原蛋白异构体。如 M180 表示小鼠的含有 180 个氨基酸的釉原蛋白[19～21]

额外的残基)。人们最初认为这些多肽是一个较大的(20 kDa)釉原蛋白的氨基端片断的酶解产物。随后的研究证明,这些多肽实际上是由 1 条较短的 mRNA 翻译的釉原蛋白的水解产物。这条 mRNA 链缺少外显子 4、外显子 5 以及部分外显子 6 的编码区,共编码 59 个氨基酸残基,其中包括 13 个保守的羧基端残基。上述 LRAP 多肽正是由这个选择性剪切的 mRNA 所形成的釉原蛋白异构体[23]。

釉原蛋白的氨基酸序列最早是通过对纯化蛋白进行 Edman 测序获得的,此后对很多物种都是根据釉原蛋白的 cDNA 文库的 DNA 序列推导而来。目前科学家已经完成了对猪、牛、人类、鸭嘴兽等哺乳类动物,仓鼠等啮齿类动物以及凯门鳄、蟾蜍等两栖动物的釉原蛋白的蛋白测序。研究表明,不同物种的釉原蛋白,特别是在蛋白的氨基端和羧基端区域,具有显著的序列同源性。这种序列上的高度保守表明不同物种的釉原蛋白分子间存在特定功能模块的保守性。全序列釉原蛋白分子的一个显著特点是其双极性,主体疏水性较强,但羧基端含有约 13～15 个氨基酸残基的片段具有亲水性并被高度荷电化,pI 约为 4.2,而整个分子的 pI 为 8.0。从发育期组织中提纯的釉原蛋白还带有 1 个磷酸化的翻译后修饰位点,即 16 位上的丝氨酸残基。质谱分析表明,猪和牛的釉原蛋白中的确存在并且只有这一个磷酸化位点[24,25]。从氨基酸序列来看,釉原蛋白的保守氨基端序列上存在糖基化的位点,但目前没有证据表明釉原蛋白发生糖基化修饰。

有关釉原蛋白的二级和三级结构信息也有很多报道,早期采用低分辨的 X 射线衍射分析结果显示其可能存在散乱的 β-或交叉 β-结构。圆二色和核磁共振技术的应用表明这些分子同时含有 β-折叠和 β-转角结构。Renugopalakrishnan 等认为在牛的釉原蛋白中发现的$(Pro\text{-}Glu\text{-}X)_n$重复序列可形成 β-螺旋结构,可能在钙离子输运中起作用。Aoba 等采用 1H-NMR 技术对溶液中的猪釉原蛋白的研究证明,全序列分子被酶解为低相对分子质量产物的过程中,釉原蛋白存在结构转变。此外,利用小角 X 射线散射技术发现猪牙釉组织中相对分子质量约为 20 kDa 的主要釉原蛋白异构体在溶液中可能是以棒状结构存在。总的来说,目前对该蛋白分子的二级结构和三级结构的认识还比较有限,部分原因在于其具有较强的团聚特性。

釉原蛋白的团聚特性和牙釉质发育中的基质调控生物矿化密切关联。通过对发育期牙釉组织切片的电镜观察可以发现在釉质有机基质中存在一些有序的或周期性的结构,不同的研究者对这些结构给出了不同的描述和解释[26～29],Fincham 和 Moradian-Oldak 等提出大约 100 个左右的釉原蛋白单体可自组装成为直径约 20 nm 的球状结构,他们认为这些釉原蛋白纳米球作为基本结构单元形成了釉质有机基质并调控矿物的形成[30,31]。这些自组装

的球状超分子复合体中，亲水的羧基端倾向于暴露在外，从而与矿物晶体发生特定作用。提纯的釉原蛋白在体外自组装成为纳米球结构的研究已有较多，但发育的釉质组织中有机基质纳米球单元的确切成分与结构还需要深入探讨。

6.2.2　成釉蛋白

成釉蛋白是含量最多的非釉原蛋白，有 3 个英文名称（ameloblastin、amelin、sheathlin），分别由独立发现它们的 3 个研究小组命名[32~34]。1996 年 Krebsbach 等从 3～4 周的大鼠牙特异性 cDNA 文库筛选到一个牙胚发育特异基因。经序列分析表明，该基因与已发现的其他基因没有同源性，命名为 Ameloblastin 基因。根据 cDNA 序列推导，大鼠成釉蛋白含 422 个氨基酸，相对分子质量 45 kDa，偏酸性，pI 为 5.5。其中脯氨酸含量为 15.2%，甘氨酸含量为 9.9%，亮氨酸含量为 9.9%（图 6.2）。同期，Cerny 等也克隆了相同的基因并命名为 Amelin。随后，Hu 等从猪的 cDNA 文库中克隆了一种牙特异性

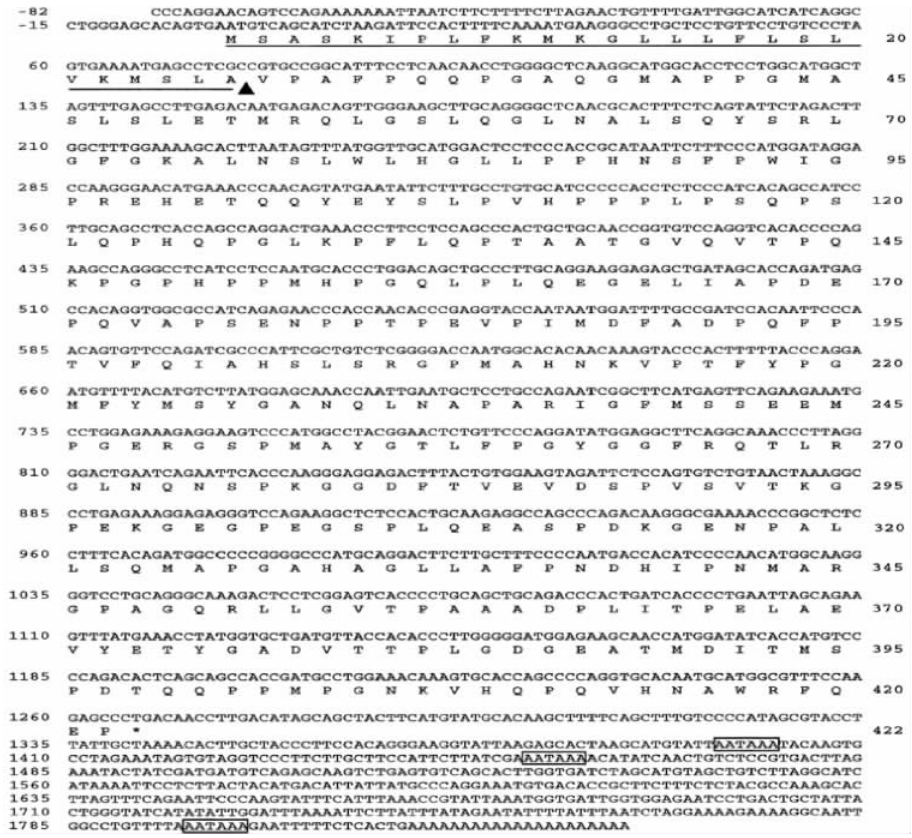


图 6.2　大鼠成釉蛋白 cDNA 及推导出的氨基酸序列[32]

蛋白,命名为 Sheathlin,并发现它和大鼠的 Ameloblastin 具有高度同源性(图 6.3)。蛋白质序列中含有数个十四烷基化位点(残基 56-61、250-255、271-276、279-284、345-350),可能还含有磷酸化位点。残基 241 为酪蛋白激酶Ⅱ(CKⅡ)识别位点,残基 51、268 和 276 为蛋白激酶 C(PKC)识别位点,残基 104 为酪氨酸激酶(TyK)识别位点。

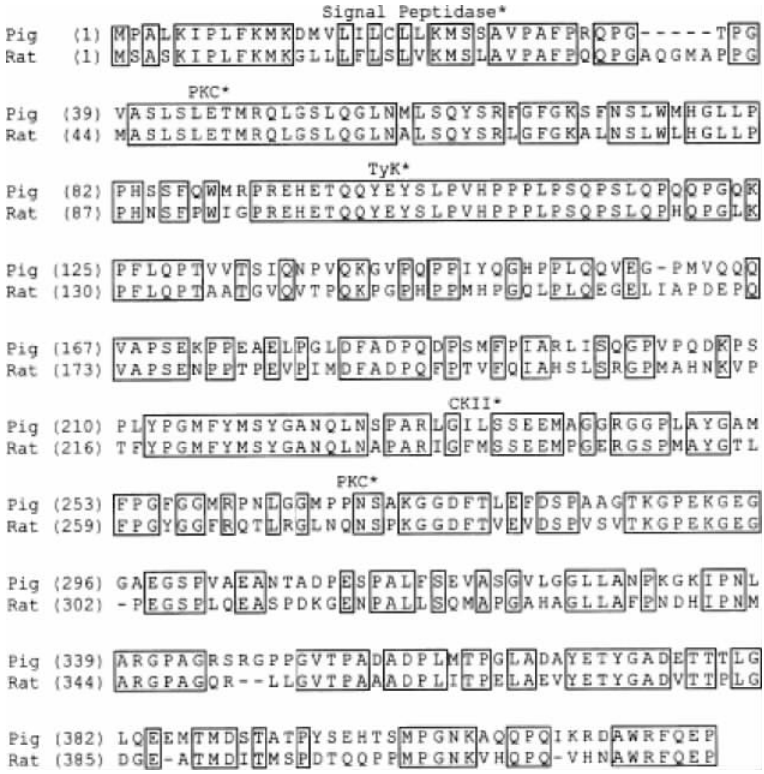


图 6.3　猪和大鼠成釉蛋白的氨基酸序列比较[34]

事实上,早在成釉蛋白的 cDNA 被克隆之前,人们已经在发育的牙釉组织中发现了若干非釉原蛋白的多肽片段,后来的分析表明这些蛋白片段主要是全序列成釉蛋白的降解产物,包括两个表观相对分子质量为 27 kDa 和 29 kDa 的多肽,是成釉蛋白羧基端的片段,具有与钙离子结合的特性,而氨基端的降解产物形成一系列 13～17 kDa 的小相对分子质量蛋白片段。在发育期牙釉质层的免疫组化研究中,这些氨基端的小分子多肽片段在不包括最表面约 30 μm 厚度外的几乎整个釉质层中均可被染色,并呈现“蜂巢”图案,这一现象是由于这些小分子多肽在分隔釉柱和柱间釉质的“鞘”区偏聚的结果。也因此,早期这些低相对分子质量非釉原蛋白被定义为“鞘蛋白”家族,并被

认为在分隔两种结构单元中起着重要作用[35]。

成釉蛋白在调控矿化中所起的作用很大程度上还不清楚。Paine 等构建了过量表达成釉蛋白的转基因小鼠动物模型，在 6 周龄的小鼠门牙过渡期釉质层内发现釉柱结构受到很大破坏，釉质变得多孔，结构以柱间釉质为主，而且其中的磷灰石晶体的直径是正常状态下的 2 倍[36]。Fukumoto 等则构建了成釉蛋白基因敲除的小鼠模型，发现不含成釉蛋白基因的小鼠牙釉发育严重受阻，尽管口腔上皮细胞可以分化为成釉细胞，但随即细胞就从基质上脱落，进而失去成釉细胞所具有的极化特征并恢复成为增殖性细胞而形成多细胞层。这一工作表明成釉蛋白是一种细胞粘附分子，对于保持成釉细胞的分化状态至关重要。但因为没有真正意义上的牙釉质层的形成，这一动物模型还无法用来研究成釉蛋白在矿化中所起的作用[37]。

6.2.3　釉蛋白

釉蛋白是目前已知的相对分子质量最大的牙釉基质蛋白。在猪牙中，完整的釉蛋白免疫定位于距离成釉细胞的托姆斯突约 2 μm 的区域内，蛋白相对分子质量为 186 kDa[38]。猪、小鼠和人类的釉蛋白 cDNA 已经被成功地克隆。不同于其他釉基质蛋白，目前尚未发现由选择性剪切 mRNA 翻译而来的釉蛋白异构体。若不考虑信号肽及翻译后的修饰，猪的釉蛋白有 1 104 个氨基酸，相对分子质量为 124.3 kDa，pI 为 6.5；小鼠的釉蛋白有 1 236 个氨基酸，相对分子质量为 137 kDa，pI 为 9.4。此外，小鼠釉蛋白的特殊之处在于它包含一段由 11 个氨基酸构成的片断连续重复 14 个拷贝的序列，而这一片段在猪和人类的釉蛋白中并没有重复。

釉蛋白和其他釉质基质蛋白一样，全序列分子在被细胞分泌后不久即被蛋白酶降解为较小的片段，只有这些降解产物被分离出来并得到鉴定。同釉原蛋白类似，釉蛋白的蛋白酶解是从羧基端开始的，较大的酶解产物如相对分子质量为 155 kDa、142 kDa 和 89 kDa 的片段都保留有原分子的氨基端序列。其中，89 kDa 的片段被进一步消化为 32 kDa 和 25 kDa 的片段。相对分子质量为 32 kDa 的片段是目前研究最多的釉蛋白。猪牙的 32 kDa 釉蛋白有 106 个氨基酸，包括 2 个磷酸丝氨酸和 3 个糖基化的天门冬酰胺。若不考虑糖基化，这个磷蛋白的相对分子质量为 11.8 kDa，pI 为 6.4。而在二维凝胶电泳中，该条蛋白带可被分离成为 7 个不同的组分，等电点介于 3～4.5 之间，这种多样性是由于不同程度的糖基化所造成的。采用 pH 值为 7.4 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液可以提取获得这一片段，其约占全部釉质基质蛋白的 1%[39,40]。

在一系列的免疫组化研究中，采用可特异识别 89 kDa 或 32 kDa 釉蛋白片段的抗体进行染色发现，釉蛋白主要分布在分泌期的牙釉质中，并定位于

从牙本质釉质界到牙表面的整个组织中,但在成熟早期则迅速消失。此外,釉蛋白的免疫染色显示为反转的蜂巢图案,也就是说蛋白被限制在釉柱和柱间釉质内,而在釉质鞘中则不存在釉蛋白。这样的结果表明这些釉蛋白的酶解片段在体内是与牙釉质晶体相结合的。不过,该釉蛋白片段可以被 50 mmol/L 中性磷酸缓冲液提取,可能暗示在体内釉蛋白与羟基磷灰石的结合力较弱。

6.3 牙釉质基质蛋白调控生物矿化

牙釉质的纳米结构的构建是通过以釉原蛋白为主要成分的釉质基质的介导完成的。基质蛋白的超分子复合体在调控磷灰石晶体的独特形貌、尺寸、择优取向及规则组装方面起着决定性作用。得益于基因重组技术和蛋白提纯技术的发展,人们可以获得足够量的纯化蛋白,在体外模拟环境中研究蛋白与蛋白、蛋白与矿物之间的相互作用。同时,转基因动物模型的建立也广泛用来研究特定基因操作下有机基质特性及其矿化行为的改变。

提纯的釉原蛋白,包括组织中提取的天然蛋白和基因重组获得的蛋白,在特定溶液环境下都可以自组装成为纳米球结构,应用动态光散射技术及高分辨率的成像技术发现,釉原蛋白可以形成尺寸在 5 nm 到超过 100 nm 的范围内变化的团簇[12,30,41]。这一过程被认为首先是通过分子的逐级组装形成多聚体,进而组装为“纳米球”,并且在一定条件下,“纳米球”结构可以相互连接为“纳米球链”,直至形成具有双折射特性的微米尺度的条带状高级结构(图 6.4)[42,43]。釉原蛋白分子的双极性特性对这些结构的形成、稳定及有序化重构具有重要作用,而高级有序结构的形成使得釉原蛋白的荷电亲水羧基端实现了一定程度的规则排布,从而可以介导形成高度取向并平行排布的磷灰石晶体,这表明釉原蛋白自组装形成的“纳米球链”结构有可能在牙釉矿化早期晶体的取向形核中起到重要的调控功能[42]。疏水作用无疑是釉原蛋白自组装中的一个重要驱动力,此外,Paine 和 Snead 发现在釉原蛋白分子的氨基端和羧基端各有一段序列对于分子间相互作用至关重要,并将氨基端的 42 个残基的序列命名为“A 区”,羧基端 17 个残基的序列命名为“B 区”。通过构建缺少了这两个区域中的任何一个的釉原蛋白转基因小鼠模型的研究表明,成釉细胞表达的变异釉原蛋白在细胞外有机基质的形成和调制牙釉质生物矿化过程中产生了不利影响。蛋白组装形成的纳米球的尺寸发生了明显变化,而有机基质的混乱结构又造成牙釉质内的釉柱结构出现很大缺陷[44,45]。

釉原蛋白的亲水羧基端端肽对于分子与矿物相的相互作用非常重要。研究显示,该段氨基酸序列被酶解去除后的釉原蛋白易于形成较大的团聚

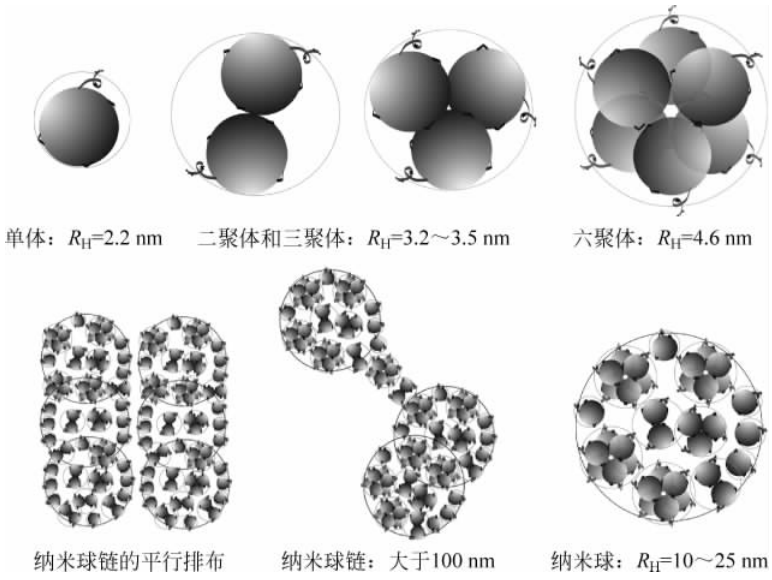


图 6.4　釉原蛋白超分子自组装的模式图[42]

体，而与磷灰石的亲和性则显著降低[46,47]。在磷灰石晶体的生长动力学研究中也发现，与全序列分子相比，去除亲水羧基端的釉原蛋白分子对晶体生长的抑制效应显著降低[48]。同时，研究表明，釉原蛋白对晶体生长的抑制作用相对于其他酸性或碱性蛋白质和多肽而言要小得多，并且，全序列釉原蛋白分子能够通过“桥接”的方式促进无机矿物粒子的团聚，但同时避免了晶体与晶体之间的融合。这对于牙釉矿化早期形成的纳米磷灰石晶体的稳定存在具有很重要的意义[48]。体外矿化的实验还表明，该段序列对于从过饱和溶液中沉积的磷灰石晶体形成有取向的集束状结构是必不可少的[49]。在人类的釉原蛋白分子中，位于该片段的遗传缺陷可导致釉质发育不全疾病的[50]。

釉原蛋白对矿物相的作用还体现在对晶体形貌的影响上。若干体外矿化实验均表明釉原蛋白可以增大磷酸八钙晶体的长径比，使原本片状的磷酸八钙晶体长成具有条带状的形貌，并且这种影响随蛋白剂量的增大而增大，然而，无论是全序列釉原蛋白还是羧基端被酶解去除的蛋白分子都体现出这种效应，因而推测这一影响和亲水羧基端的作用关系不大，而是与釉原蛋白的疏水特性有关，并且是由于蛋白与晶体不同晶面的相互作用具有差异造成的[51,52]。

釉蛋白是釉质基质中的酸性非釉原蛋白，被认为在晶体的形核与生长调制中具有重要作用[53～55]。在发育组织中釉蛋白的一系列蛋白酶解产物中，相对分子质量 32 kDa 的片段是最稳定的。体外研究表明，32 kDa 釉蛋白和磷

灰石有高度的亲和性[56],并且可以通过与釉原蛋白的协同作用促进磷灰石的形核[55]。在琼脂凝胶中的矿化实验还表明釉蛋白可以促进磷灰石晶体沿长度方向的生长[57]。转基因动物模型的研究则表明,完全敲除釉蛋白基因的小鼠无法形成真正意义上的牙釉质,而杂合体小鼠的牙釉质很快被磨损[57]。在人类的釉质发育不全疾病中也已发现某些病例是和釉蛋白基因的变异有关[58]。这些都显示了釉蛋白在釉质基质矿化中的重要性,但关于釉蛋白的结构与功能关系,特别是与其他基质蛋白组分的相互作用还有很多值得探讨的问题[59,60]。

参考文献

[1] Thesleff I and Sharpe P T. Mech. Dev. 1997,67: 111.

[2] Tucker A S and Sharpe P T. J. Dent. Res. 1999,78: 826.

[3] Jernvall J and Thesleff I. Mech. Dev. 2000,92: 19.

[4] Zhang Y D,Chen Z,Song Y Q,Liu C and Chen Y P. Cell Res. 2005,15: 301.

[5] Chai Y,Jiang X B,Ito Y,Bringas P,Han J,Rowitch D H,Soriano P,McMahon A P and Sucov H M. Development 2000,127: 1671.

[6] Vaahtokari A,Aberg T,Jernvall J,Keranen S and Thesleff I. Mech. Dev. 1996,54: 39.

[7] Ruch J V. Biochem. Cell Biol. 1998,76: 923.

[8] Zeichner-David M,Diekwisch T,Fincham A,Lau E,MacDougall M,Moradian-Oldak J,Simmer J,Snead M and Slavkin H C. Int. J. Dev. Biol. 1995,39: 69.

[9] Reith E J. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1961,9: 825～839.

[10] Reith E J. J. Ultrastruct. Res. 1970,30: 111～151.

[11] Smith C E. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1998,9(2): 128～161.

[12] Fincham A G,Moradian-Oldak J and Simmer J P. J. Struct. Biol. 1999,126: 270.

[13] Skobe Z. Anat. Rec. 1977,187: 329.

[14] Eastoe J E. Nature 1960,187: 411～412.

[15] Robinson C,Briggs H D and Atkinson P J. Calcif. Tissue Int. 1981,33: 513.

[16] Piez K A. J. Dent. Res. 1960,39: 712.

[17] Eastoe J E. Adv. Fluorine Res. Dent. Caries Prevent. 1965,3: 5～16.

[18] Eastoe J E. Arch. Oral Biol. 1963,8: 633～652.

[19] Lau E C,Simmer J P,Bringas P,Hsu D,Hu C C,Zeichner-David M,et al. Biochem. Bioph. Res. Commun. 1992,188: 1253～1260.

[20] Simmer J P,Hu C-C,Lau E C,Moradian-Oldak J,Slavkin H C,Fincham A G. Calcif. Tissue Int. 1994,55: 302～310.

[21] Simmer J P and Fincham A G. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 1995,6: 84.

[22] Couwenhoven R I,Snead M L. Dev. Biol. 1994,164: 290～299.

[23] Gibson C W,Golub E E,Ding W,Shimokawa H,Young M,Termine J D and

Rosenbloom J. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991,174: 1306～1312.
[24] Fincham A G, Moradian-Oldak J. Biochem. Biophys. Res. Comrnun. 1993, 197: 248～255.
[25] Fincham A G, Moradian-Oldak J, Sarte P E. Calcif. Tissue Int. 1994,55: 398～400.
[26] Watson M L. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960,7: 489.
[27] Travis D F and Glimcher M J. J. Cell Biol. 1964,23: 447.
[28] Smales F C. Nature 1975,258: 772.
[29] Robinson C, Fuchs P and Weatherell J A. J. Cryst. Growth 1981,53: 160.
[30] Moradian-Oldak J, Simmer J P, Lau E C, Sarte P E, Slavkin H C and Fincham A G. Biopolymers 1994,34: 1339.
[31] Fincham A G, Moradian-Oldak J, Diekwisch T G H, Lyaruu D M, Wright J T, Bringas P Jr and Slavkin H C. J. Struct. Biol. 1995,115: 50.
[32] Krebsbach P H, Lee S K, Matsuki Y, Kozak C A, Yamada K M and Yamada Y. J. Biol. Chem. 1996,271(8): 4431～4435.
[33] Cerny R, Slaby L, Hammarström L, Wurtz T. J. Bone Miner. Res. 1996, 11: 883～891.
[34] Hu C-C, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang C H, Ryu O H, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M and Simmer J P. J. Dent. Res. 1997, 76(2): 648～657.
[35] Uchida T, Fukae M, Tanabe T, Yamakoshi Y, Satoda T, Murakami C, Takahashi O and Shimizu M. Biomed. Res. 1995,16: 131～140.
[36] Paine M L, Wang H J, Luo W, Krebsbach P H and Snead M L. J. Biol. Chem. 2003, 278(21): 19447～19452.
[37] Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach P H, Nanci A, Kulkarni A B and Yamada Y. J. Cell Biol. 2004,167(5): 973～983.
[38] Hu C-C, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang C H, Ryu O H, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M and Simmer J P. J. Dent. Res. 1997,76: 1720～1729.
[39] Fukae M and Tanabe T. Calcif. Tissue Int. 1987,40: 286～293.
[40] Fukae M, Tanabe T, Murakami C, Dohi N, Uchida T and Shimizu M. Adv. Dent. Res. 1996,10: 111～118.
[41] Wen H B, Fincham A G, Moradian-Oldak J. Matrix Biol. 2001,20: 387～395.
[42] Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Science 2005,307: 1450～1454.
[43] Moradian-Oldak J, Du C, Falini G. Eur. J. Oral Sci. 2006,114(Suppl. 1): 289～296.
[44] Paine M L and Snead M L. J. Bone Miner. Res. 1997,12: 221～227.
[45] Paine M L, Zhu D H, Luo W, Bringas P, Goldberg M, White S N, Lei Y P, Sarikaya M, Fong H K, Snead M L. J. Struc. Biol. 2000,132: 191～200.
[46] Aoba T, Moreno E C, Kresak M and Tanabe T. J. Dent. Res. 1989,68: 1331～1336.
[47] Sun Z, Fan D, Fan Y, Du C, et al. J. Den. Res. 2008,87(12): 1133～1137.
[48] Moradian-Oldak J, Tan J and Fincham A G. Biopolymers 1998,46: 225～238.
[49] Beniash E, Simmer J P, Margolis H C. J. Struct. Biol. 2005,149: 182～190.
[50] Kindelan S A, Brook A H, Gangemi L, et al. J. Dent. Res. 2000,79: 1978～1982.

[51] Wen H B, Moradian-Oldak J, Fincham A G. J. Dent. Res. 2000, 79: 1902～1906.
[52] Iijima M, Moradian-Oldak J. Calcif. Tissue Int. 2004, 74: 522～531.
[53] Uchida T, Murakami C, Dohi N, Wakida K, Satoda T and Takahashi O. J. Histochem. Cytochem. 1997, 45: 1329.
[54] Hu C-C, Yamakoshi Y. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 2003, 14: 387～398.
[55] Bouropoulos N, Moradian-Oldak J. J. Dent. Res. 2004, 83: 278～282.
[56] Tanabe T, Aoba T, Moreno E C, Fukae M, Shimizu M. Calcif. Tissue Int. 1990, 46: 205～215.
[57] Hu C C, Hu Y, Smith C E, McKee M D, Wright J T, Yamakoshi Y, Papagerakis P, Hunter G K, Feng J Q, Yamakoshi F, Simmer J P. J. Biol. Chem. 2008, 283: 10858～10871.
[58] Masuya H, Shimizu K, Sezutsu H, Sakuraba Y, Nagano J, Shimizu A, Fujimoto N, Kawai A, Miura I, Kaneda H, Kobayashi K, Ishijima J, Maeda T, Gondo Y, Noda T, Wakana S, Shiroishi T. Hum. Mol. Genet. 2005, 14: 575～583.
[59] Fan D, Lakshminarayanan R, Moradian-Oldak J. J. Struct. Biol. 2008, 163: 109～115.
[60] Fan D, Du C, Sun Z, Lakshminarayanan R, Moradian-Oldak J. J. Struct. Biol. 2009, 166: 88～94.

第 7 章　病理性矿化 Ⅰ——与骨质减少和血管钙化有关的生物矿化

因为骨矿物相和血管钙化斑块中无机物的主要成分都是钙磷酸盐，所以通常人们把这类生物矿化称为钙化。一方面，骨质减少(osteopenia)是骨质疏松症(osteoporosis)的重要特征；另一方面，在动脉粥样硬化进程中，血管内的斑块中出现钙化产物。这两种病理性矿化具有大致相同的矿物组成，这两个过程之间也存在着千丝万缕的联系[1,2]。本章将通过一些实例，讨论与之有关的问题及其研究方法。

7.1　骨的病理性矿化

从组织发生和组成成分来看，骨骼属于结缔组织的范畴，它由骨细胞和骨基质构成。骨基质包括矿物相和有机基质。骨矿物相占骨干重的 65％～75％，其中 95％是钙磷酸盐，主要以羟基磷灰石(Hydroxyapatite，$Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$)结晶的形式分布于有机基质中。由于碳酸根取代了羟基磷灰石中的少量磷酸根和氢氧根，因此骨矿物相的成分常被称作碳酸根取代的磷灰石(Carboxyapatite)[3]。除了碳酸根之外，还有极少量其他杂质(如酸性磷酸根、镁离子)和由于缺少氢氧根而产生的晶格缺陷。正常的羟基磷灰石呈六面体结构，平面结构的碳酸根取代四面体结构的磷酸根之后，磷灰石结构发生明显改变[4]：①晶胞 a 轴变短，c 轴加长；②晶体粒度减小；③晶体张力增加；④晶体形态改变。此外，还有一些酸性磷酸根附着在骨矿物晶体的表面[5]，也会影响性质。这些有着微小缺陷的晶体比羟基磷灰石晶体更易溶解，从而使骨成为生物体内钙、磷和镁离子的储存库。

骨的有机基质约 90％是胶原蛋白，它通过交联形成胶原纤维，并“编织”成网状结构，为矿化提供位点，也为诱导矿物成核与调控晶体生长的非胶原蛋白(其含量不足有机基质的 10％)[6,7]提供表现其功能的空间。已知的非胶原骨基质蛋白的功能尚未完全阐明，新的非胶原骨基质蛋白还在不断地被发现。这类蛋白的作用可能是[8～15]：①作为骨基质的结构成分，维持骨组织的结构完整和正常功能；②作为信息传递的载体或中介物，通过异位磷酸化、聚

合或分解等方式传递代谢信息;③参与骨微环境的调节,有利于稳定正常代谢所需要的局部环境;④调节骨矿化和骨吸收过程。

骨的独特的组成使其具有相应的机械强度和保护机体、维持机体矿物质代谢平衡的功能。胶原纤维的抗压性较差,羟基磷灰石晶体微粒脆而易碎;然而两者结合在一起后,使骨组织具有硬而抗冲击力的特性。

骨基质矿化是一个以正常人全身为基础的生理过程。当人体生理状态发生改变、或者受到外界因素干扰时,骨矿化过程会受到明显影响;尤其是某些代谢性骨病,会严重影响骨矿物相的溶解和沉积,导致矿物相和有机基质的含量发生变化。若二者之间的比例减少,就可能出现骨质疏松症。

骨质疏松症是严重威胁中老年人健康的常见病和多发病之一,随着人类寿命的延长,其发病率正逐年上升。原发性骨质疏松症是一种全身性骨骼疾病,它以骨量减少和骨的微观结构退化为特征,在临床上表现为骨的脆性增加和易于发生骨折[16,17]。了解骨质疏松症的特点及其发生和发展过程是采取有效的预防和治疗措施的基础。

7.1.1 去势大鼠骨基质的改变:非胶原蛋白在骨矿物形成中的作用

在骨的有机基质中,非胶原蛋白占的比例虽然很小,但它在调控骨代谢中的重要性正越来越为人们所认识。有些非胶原蛋白通过调节细胞生长与分化影响骨代谢,它们称为"生长因子";而另一些则直接参与矿物形成过程。根据免疫组织化学的研究结果,从非胶原蛋白在矿化位点出现的时间和空间,可以推测其作用[18]。近年来采用转基因动物作为实验模型,为研究非胶原蛋白的功能提供了新的途径[19]。然而,骨代谢包括骨吸收和骨形成两个方面,一种非胶原蛋白可能参与其中之一,也可能两者都参与;因此,在后一种情形,基因敲除实验并不能指出该蛋白确切的作用方式。有些非胶原蛋白可以不通过细胞而直接参与矿化过程;对于这类蛋白,体外脱矿和再矿化实验能够提供更直接的证据。

人们在研究有机基质时发现,与正常骨相比,疏松骨非胶原蛋白总量降低,而不是个别蛋白的选择性减少;并将这些现象归因于骨周转(bone turnover)速率减慢[20]。与老年骨质疏松有所不同,绝经妇女由于缺乏雌激素而引起的初期骨质减少却是与骨周转加快相关联[21],这意味着后者可能具有与前者不同的特点。切除双侧卵巢的大鼠(称为去势大鼠)骨量丢失的情形与绝经妇女的相似,因而常被用来作为动物模型进行初步研究[22~24]。

同时测定去势大鼠骨中矿物相、胶原和非胶原蛋白的改变量,并考察骨粉在不同程度地抽提非胶原蛋白后的再矿化动力学,有助于认识矿物相、胶

原和非胶原蛋白之间的关系以及它们之间的相互作用[25]。实验是这样进行的：将 20 只 6 月龄的雌性 SD 大鼠随机平分为两组，一组摘除双侧卵巢，称为去势(ovariectomized，OVX)组；另一组不摘除卵巢，只是从大网膜取出少许脂肪，称为假手术(sham operated)组。第 12 周末处死动物。取大鼠长骨(股骨和胫骨)，去掉软组织后，以左侧股骨做骨密度分析。剩下的长骨去掉软组织和骨髓后，研成小于 20 μm 的粉末，用来做矿物相分析、有机基质分析和动力学实验。

采用双能 X 射线骨密度仪测定在股骨近干骺端下 1 cm 处和远干骺端上 1 cm 处的骨密度，结果显示去势组股骨密度显著低于假手术组(股骨远端(153±18) mg/cm^2 和 176±16 mg/cm^2，$p<0.05$，$n=10$；股骨近端去势组(168±16) mg/cm^2 假手术组 201±18 mg/cm^2，$p<0.01$，$n=10$)。与此相应，去势组的矿物相含量也降低。这两个指标都证实了去势大鼠动物模型所造成的骨质减少。然而，从化学成分看，虽然去势后 Ca 和 P 的含量都比假手术组显著减少，但是二者的摩尔比并不具有显著差异。

采用小角 X 射线散射(small-angle x-ray scattering，SAXS)可以测定骨矿物相微晶的平均厚度。与有机基质相比较，矿物相的电子密度较高，因此检测得到的散射主要来源于骨矿物相，有机基质的作用可忽略。应用同步辐射光源大大增加了测量的分辨率。厚度是粒度的一种表示方式，它定义为微晶的长、宽、高中数值最小者，由体积/表面积比值求得，无需假定微晶的形状、单分散性和晶体习性的均匀性[26]。正常矿物相晶体的平均厚度为(2.24±0.05) nm，而去势组的平均厚度为(2.26±0.07) nm。统计分析表明二者之间没有显著差异($p=0.2$，$n=6$，t-test)。最近关于疏松骨的二维和三维结构的研究进一步证实，其晶体粒度与对照组相比没有显著差异[27,28]。

采用以同步辐射为光源的扩展的 X 射线吸收精细结构(synchrotron radiation extended x-ray absorption fine structure，SR-EXAFS)分析方法，可以检测骨矿物相中钙原子的配位环境，所得到的数据是在原子层次描述结构的晶格参数。与其他衍射技术不同，此法并不要求样品具有良好的结晶度和长程有序性，能够在较为复杂的情况下测量某一种特定原子的局部结构。因为羟基磷灰石的配位环境较为复杂，所以只能得到钙离子的平均配位键长。两种骨粉中钙离子和周围其他原子之间的距离都与羟基磷灰石中的情形相近。Debye-Waller 因子(σ^2)表明骨矿物相的微观无序性。尽管两种骨粉的 σ^2 数值很相近，可是它们却比羟基磷灰石的高得多，这是由在钙原子周围的其他原子使钙原子的配位环境发生变化所致。关于去势组的矿物相，可以概括为“总含量减少，但晶体粒度和微观结构基本不变”。

许多内在的和外在的因素影响骨矿物相的含量、组成、晶体粒度和微观

结构,其中包括作为骨矿物相沉积模板的胶原和在矿物成核和生长中起调控作用的非胶原蛋白。采用级次抽提(sequential extraction)的方法[29],可以将非胶原蛋白分为3类。将骨粉依次用4 mol/L盐酸胍(GdmCl)、0.5 mol/L的EDTA和4 mol/L的GdmCl抽提,相应提取物分别标记为G1(主要含与非矿化胶原结合的蛋白)、E(主要含与矿物相结合的蛋白)和G2(主要含与矿化胶原结合的蛋白)。每次抽提后,都取出一部分剩余的骨样,用于比表面积测定(specific surface area,SSA)和动力学研究。

将G1、E和G2的提取液超滤浓缩、透析、冷冻干燥,然后测定蛋白含量。去势大鼠股骨中可抽提蛋白的总量占有机基质的9.4%,明显低于对照组的12.7%($p<0.05$,$n=6$)。去势组E和G2提取液中的蛋白含量均比相应的对照组低。将除去矿物相和可抽提蛋白后的残余物用HCl水解后,检测羟脯氨酸的含量。正常组和去势组残余物中羟脯氨酸/脯氨酸比例分别为0.70±0.06和0.71±0.06,没有显著差异($p=0.1$,$n=3$),证实两组残余物中的主要成分均为胶原蛋白。

各提取液中的蛋白成分可以采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。因为一些磷酸化蛋白难以用考马斯亮蓝染色,所以要将电泳后的胶板分别用考马斯亮蓝和stains-all染色。stains-all是一种阳离子羰花青染料,可将与钙离子结合蛋白和含有磷酸基的蛋白染成蓝色,而将其他蛋白染成粉红色[30]。对电泳条带进行光密度扫描,可以方便地比较对照组和去势组的蛋白变化情况。在G1、E和G2提取液中,非胶原蛋白总含量减少,但各主要蛋白之间的比例基本不变。

将去势组非胶原蛋白和矿物相的结果联系起来看,这些现象似乎意味着:骨矿物相的晶体粒度和微观结构与几种重要非胶原蛋白之间的比例有关,而骨矿物相的总量则与符合特定比例的那几种非胶原蛋白的总量相联系。此前,在采用牙周韧带(periodontal ligament,PDL)细胞进行的体外实验中,人们曾推测非胶原蛋白的总量和几种非胶原蛋白之间的比例会影响钙化结节[31]。

采用恒组成法[32]可以研究骨粉在37℃再矿化的动力学。溶液的过饱和度σ为11.0,其中总钙和总磷的含量分别为1.20 mmol/L和0.72 mmol/L。待溶液稳定一定时间后,加入适量骨粉样品,启动反应。当反应进行时,加入两种滴定液(一种含有3.0 mmol/L的$CaCl_2$和269 mmol/L的NaCl,另一种含有1.8 mmol/L的KH_2PO_4和2.26 mmol/L的NaOH),用以补偿形成钙磷酸盐沉淀时所消耗的钙和磷酸根离子。

骨粉再矿化动力学曲线示于图7.1。纵坐标表示所消耗的滴定液体积,已经换算为单位表面积的数值。曲线初始段斜率越大,表示钙磷酸盐的初始

生成速率越快。非胶原蛋白含量的变化会影响其对钙磷酸盐形成过程的调控能力。根据骨粉样品中骨基质蛋白被抽提的程度，可分为以下 4 种情况讨论：①未经处理的骨粉(图 7.1(d))；②G1 抽提剩余物：胶原＋矿物相＋与矿物相结合蛋白(图 7.1(c))；③E 抽提剩余物：胶原＋与胶原非共价结合蛋白(图 7.1(b))；④G2 抽提剩余物：胶原(图 7.1(a))。

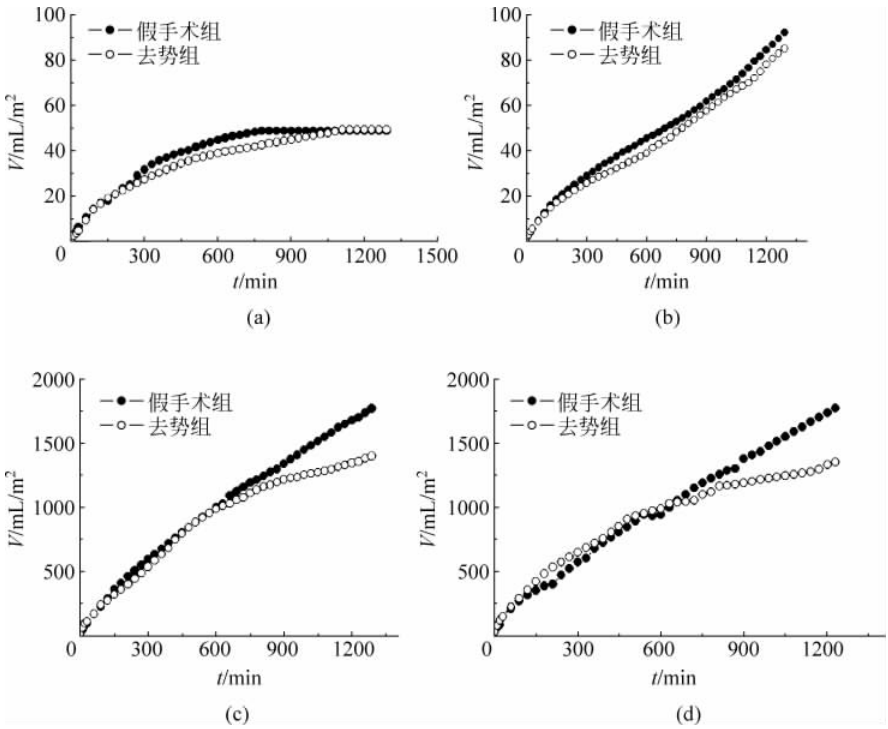


图 7.1　骨粉再矿化动力学曲线[25]

(a) 胶原；(b) 胶原和 G2 蛋白；(c) 胶原、G2 蛋白、矿物相及 E 蛋白；(d) 未处理骨粉

基于这些动力学数据，可以判断去势组与假手术组骨粉样品的主要差别，并评估这 3 种提取液中所含成分对于钙磷酸盐沉积的相对重要性。比较图 7.1(c)和(d)可以看出，G1 提取液中所含蛋白的存在与否对骨粉再矿化影响甚微。G1 组分主要是与细胞和软组织结合蛋白，Stains-all 染色结果表明，其中不含有与钙离子结合的蛋白。经 E 抽提液处理后，去势组与假手术组之间的差别几乎消失了(图 7.1(a)和(b))。由此可见，两组骨粉样品的差别主要在于 E 提取液所含的成分(包括非胶原蛋白和矿物)，这反映在(图 7.1(c))所示的动力学曲线上。在实验条件下，钙磷酸盐沉积的速率主要取决于骨粉表面的物理和化学特性。在前 600 min，两条曲线几乎重叠，意味着两组骨粉

的一部分表面特性相同。在 600 min 以后,去势组的矿化速率开始明显低于假手术组,表明去势组骨粉表面的矿化位点改变,钙磷酸盐开始沉积在与先前不同的表面上。这些动力学实验结果证实了前面讨论过的矿物相和非胶原蛋白的变化特点。

两组骨粉样品部分表面特性的不同可能源于其化学组成的不同。从 E 提取液中已鉴定出骨涎蛋白、骨桥蛋白和骨粘连蛋白。骨涎蛋白与Ⅰ型胶原有亲和性,可能存在于胶原纤维的孔洞区,早期骨矿物相就是沉积在这些孔洞区中。它对于钙离子和羟基磷灰石也都有很好的亲和性;既出现在 G2 提取液中,也出现在 E 提取液中,意味着它可能参与诱导矿化成核与调节晶体生长。结构分析表明,骨涎蛋白是一种高度糖基化的、酪氨酸-硫酸化、丝氨酸-磷酸化的糖蛋白,它所含有的两个呈 α 螺旋构型的多聚谷氨酸富集区域可能是成核位点。显然,去势组中矿物相的减少和 E 提取液中骨涎蛋白的减少应当是导致 600 min 以后矿化速率低于假手术组的主要原因。其他非胶原蛋白的作用,以及非胶原蛋白、胶原蛋白和矿物相之间的相互影响也不能忽视。例如,有文献报道,骨涎蛋白、骨桥蛋白和骨粘连蛋白对于已有晶体的生长起抑制作用[33~36]。考虑到图 7.1(c)的骨粉中为晶体的形成和生长提供表面的并非单一物质,而是由胶原纤维、多种非胶原蛋白和已经存在的矿物晶体共同构成的混合物,此时蛋白的结构和功能都可能不同于其单独存在时的情形。从这个角度看,我们所观察到的"多种非胶原蛋白(包括骨涎蛋白、骨桥蛋白和骨粘连蛋白)的减少使反应速率降低"的现象与前人报道的单一蛋白的抑制作用并不矛盾。

如图 7.1(a)和(b)所示,当构成骨粉表面的物质只有胶原纤维和同时具有胶原纤维以及与之结合的 G2 组分非胶原蛋白时,它们诱导钙磷酸盐固相形成的作用也不相同。尽管胶原是承载骨矿物相的重要蛋白,然而动力学结果却表明,胶原本身直接诱导矿化的作用很小。G2 提取液中的非胶原蛋白的存在使矿化速率和矿化程度显著增加,在 1 300 min 后尚未达到平衡。图 7.1(b)中的结果提供了与胶原纤维结合着的非胶原蛋白(主要是骨涎蛋白和来自于血浆的 α2HS 蛋白)促进钙磷酸盐晶体形成的直接证据。此前已有在凝胶中的骨涎蛋白诱导羟基磷灰石成核的报道[37]。值得注意的是,图 7.1(a)和(b)的纵坐标仅是图 7.1(c)和(d)的 1/20,其原因可能是由胶原纤维(图 7.1(a))和(胶原纤维+G2 组分蛋白)(图 7.1(b))诱导的成核过程比(胶原纤维+矿物+E 组分蛋白)调节的晶体生长过程(图 7.1(c)和(d))有更高的活化能。将所有这些动力学实验结果联系起来考虑,可以看出:在这 3 种提取液所含成分中,正是 E 提取液中的矿物相和非胶原蛋白显示出了去势组与假手术组骨粉样品的主要差别,也正是 E 提取液中的矿物相和非胶原蛋白(而不是 G1 和 G2 提

取液所含成分)以及它们与胶原纤维之间的相互影响在骨粉再矿化中起重要作用。

7.1.2　长期低剂量喂镧大鼠的骨矿物相

稀土元素的生物效应已经在化学、生物学、医药学和毒理学等领域引起广泛的关注[38]。稀土虽然能够通过消化道和呼吸道进入人体,但是由于经胃肠道吸收率很低,因此在通常情况下不会引起严重的中毒。然而,在一些稀土矿区情况会有所不同,那里植物[39]、动物[40]和人[41]的稀土摄入量都非常高。此外,稀土元素在工业、农林畜牧业和水产养殖业等方面具有广泛应用。在我国,自从 20 世纪 70 年代以来,含有稀土的肥料被用来提高一些农作物的产量和质量;90 年代,含有稀土添加剂的草料也已用于水产业和家禽饲养业[42,43]。最近,碳酸镧作为治疗高磷酸血症的新型药物已经用于临床[44,45]。因此,作为非必需元素的稀土进入人体的机会大大增加了。本文作者研究了长期低剂量喂镧大鼠的骨矿物相,以寻找稀土元素影响生物矿化的规律[46]。

骨骼是镧(La)元素在体内慢性蓄积的主要部位[47,48]。La 对骨的亲和性可能与 La^{3+} 和 Ca^{2+} 具有相近的离子半径和配位倾向有关[49]。若将水中氧的原子半径当作 1.34 Å,则八配位的 La^{3+} 和 Ca^{2+} 的离子半径都是 1.14 Å[50,51]。骨中蓄积的 La 既可能进入骨中羟基磷灰石的晶格,也可能以难溶盐($LaPO_4$,$pK_{sp}=26.15$)或与细胞外基质蛋白结合的形式附着在羟基磷灰石晶体表面。此外,La 也可能干扰由成骨细胞和破骨细胞介导的骨重建,从而影响骨的矿物相。在评价 La 对骨的影响时,长期低剂量的动物实验会使结论更接近于真实环境。目前动物实验中最长的实验时间持续 1 000 h[52]。我们用 2.0 mg/(kg·d)的 $La(NO_3)_3$ 灌胃喂养 Wistar 大鼠 6 个月后,观察骨组织的改变。

骨矿物晶体的化学组成、晶体结构和短程有序性在骨的结构和生物功能中起着重要的作用。骨矿物相和有机基质相的微小变化都会影响骨的生物力学性能。将骨粉在 HNO_3-$HClO_4$ 混酸中消解后,用 ICP-MS 测 Ca 和 La 的含量,用磷钼酸蓝光度法测磷。矿物相的含量(表示为矿物相/有机基质相,质量比)和碳酸根的含量(表示为 CO_3%,质量比)采用热重分析法测定。元素分析数据显示,喂 La 大鼠骨中 La 的含量约为对照组的 3 倍。虽然 Ca 和 P 的含量均显著下降($p<0.05$),但二者的比值没有显著性改变($p>0.05$)。热重分析表明,喂 La 大鼠骨中矿物相含量降低,而碳酸根含量升高。矿物相的含量减少与 Ca 和 P 含量的降低是一致的。这些结果表明,La 不仅在骨中有蓄积,而且还会引起骨矿物相中碳酸根含量的变化。由于进入骨中

的 La 仅为 Ca 含量的 $1/10^8$,因此 La 对 Ca/P 摩尔比的影响可忽略不计。

碳酸根并不是羟基磷灰石晶体的天然成分,但是在骨矿物相的生长过程中会取代晶格中的 OH^-(A 型)和 PO_4^{3-}(B 型),或者吸附在羟基磷灰石晶体表面("不稳定"碳酸根)。由于对碳酸根总量是否随年龄的增长而增加有两种截然相反的观点,因此我们用"不稳定"碳酸根(而非碳酸根的总量)作为评价骨成熟的指标,即"不稳定"碳酸根含量越低,骨成熟度就越高[53,54]。此外,还可以参考酸性磷酸根含量的变化:它在年轻的骨中较为丰富,随着年龄增加其含量降低[55,56]。

通过 FT-IRM 分析,可以测定同一个样品中 3 种碳酸根各自所占的比例和不同样品中酸性磷酸根的相对含量。测量范围是 650～4 000 cm^{-1}。对 υ_2 CO_3^{2-}(845～900 cm^{-1})去卷积拟合后产生 3 个亚峰:A 型,位于 877 cm^{-1},CO_3^{2-} 取代羟基磷灰石中的 OH;B 型,位于 871 cm^{-1},CO_3^{2-} 取代的取代羟基磷灰石中的 PO_4^{3-};位于 867 cm^{-1} 的峰表示在矿物相表面吸附的 CO_3^{2-}("不稳定" CO_3^{2-})。与对照组相比,喂 La 大鼠股骨中 A 型和 B 型碳酸根含量略降低,而相应的"不稳定"碳酸根含量则增加了 12.3%($p<0.01$)。对 PO_4^{3-} 的 υ_1,υ_3 峰(900～1 200 cm^{-1})去卷积拟合后,在 1 145 cm^{-1} 和 1 075 cm^{-1} 处的亚峰分别与酸性磷酸根的含量和晶体粒度成正比。结果显示,喂 La 大鼠股骨的矿物相晶体粒度减小,"不稳定"碳酸根和酸性磷酸根含量增加,这些现象一致表明:喂 La 大鼠股骨成熟度较低。

晶体粒度在骨代谢中是一个很重要的因素。采用传统实验方法很难测得其准确数值。从 X 射线晶体衍射方法得到的数据会因为骨中晶体的缺陷和无序而使 X 射线衍射峰变宽,而刚才谈到的 FT-IR 数据只能得到晶体粒度的相对值。小角 X 射线散射信号来源于物质中电子密度的空间波动。由于散射和电子密度的平方成正比,而有机基质的电子密度较低,因此其干扰可以忽略。尤其是同步辐射光源的应用,大大提高了信/噪比,使得小角 X 射线散射能提供更为可靠的晶体厚度信息。我们用小角 X 射线散射得到的晶体厚度值为:正常骨(2.56±0.05) nm,喂 La 组(2.40±0.05) nm;有显著差异($p=0.01$,t-test)。这些数据证实了由 FT-IR 测出的"喂 La 大鼠股骨矿物相晶体厚度较小"的定性结果。

采用以同步辐射为光源的扩展的 X 射线吸收精细结构分析检测骨矿物相的晶体结构参数的方法已在前一节中说明。测定结果显示,两种骨矿物晶体中钙与邻近原子之间的距离几乎和羟基磷灰石中的相同,Ca 原子周围的环境并没有因 La 的掺入而改变。可是,两种骨粉样品的 Debye-Waller 因子数值均比羟基磷灰石的相应值高,表明骨矿物晶体中 Ca 原子周围的其他原子发生偏离,使晶体的微观无序性增加。两种骨粉样品相比较,喂 La 大鼠骨矿

物晶体的 Debye-Waller 因子数值要小一些；也就是说，喂 La 大鼠股骨矿物晶体的无序性较小。尽管该结果和“骨越成熟，晶体尺寸越大，结晶度越高”的传统观念相矛盾，然而却与前面讨论过的“喂 La 大鼠股骨矿物相中有较少的碳酸根取代羟基磷灰石晶格中的 OH^- 和 PO_4^{3-}”的实验结果一致。事实上，在不成熟的骨中，结晶度比羟基磷灰石高的、低的和相同数值在文献中都有报道[56,57]。因此，Debye-Waller 因子与晶体粒度、骨的成熟度并不必然直接相关。倒是由于喂 La 组 Debye-Waller 因子数值较小（表明羟基磷灰石晶格的无序度较小）与 A 型和 B 型碳酸根含量的降低及“不稳定”碳酸根含量升高相对应，因此 SR-EXAFS 数据也支持“喂 La 大鼠股骨成熟度较低”的论断。

La 所导致的骨矿物相的变化，如粒度较小、“不稳定”碳酸根和酸性磷酸根较多，应当使得骨矿物相更易于溶解。骨矿物相的溶解性在骨代谢中有重要意义。可以采用恒 pH 法测量粒径为 0.45～0.90 mm 的骨粉在 pH＝4.0 溶液中的溶解动力学。在 pH 自动电位滴定计的控制下，通过滴加 100 mmol/L 的 HAc 中和骨矿物溶解所产生的 OH^-，使溶液的 pH 值维持在 4.00。反应耗酸速率表明骨的溶解速率。同时采用离子分析仪和 Ca^{2+} 选择电极检测溶液中 Ca^{2+} 浓度的变化。结果显示，喂 La 组骨矿物相溶解速率确实比对照组高，这是“La 延缓了骨成熟过程”的又一证据。

目前仍不清楚 La 延缓骨成熟过程的机制。与 Ca 和 P 相比，在骨中积累的 La 的含量如此之低，似乎不会对矿物相的化学组成、微观结构和溶解特性造成直接的、显著的影响。关于喂 La 大鼠股骨矿物相的那些改变，一种解释是：因为骨骼在不断地进行由破骨细胞介导的骨吸收和由成骨细胞介导的骨形成（这种偶联称为骨重建），所以 La 有可能通过影响成骨细胞和破骨细胞的活性而影响这种偶联。动物实验已经证实，稀土可进入骨髓中[52,58]。也有体内实验表明，一些稀土可诱导骨髓细胞染色体失常，而且失常的染色体的数目与稀土的剂量和处理时间成正比[59]。体外实验也表明，La 能够影响成骨细胞系 UMR106 和兔成熟破骨细胞的活性（详见 7.1.3 节内容）。综合以上各组实验结果判断，La 可能通过干扰细胞活动而延缓骨成熟过程，并导致了骨矿物相的改变。

7.1.3　外源性金属离子对骨相关细胞的影响

正常骨代谢依赖于骨形成和骨吸收之间的动态平衡。介导这一平衡的细胞主要是成骨细胞和破骨细胞。只要二者之一的功能或数量发生改变，上述平衡就会失调，导致骨矿物代谢异常。成骨细胞是骨形成细胞，对骨组织

的生长发育、骨代谢和损伤修复起关键作用。成熟的成骨细胞分泌大量的细胞外基质蛋白(包括胶原蛋白和非胶原蛋白),它们通过自组装构成了矿化环境;成骨细胞分泌的碱性磷酸酶可使磷酸化蛋白去磷酸化,增加矿化所需的磷酸根。

La^{3+}对成骨细胞系 UMR106 增殖功能和钙化能力的影响均呈现依赖浓度的两面性[60]。如图 7.2(a)所示,当 La^{3+}浓度由对照组的 0 增加到 1.0×10^{-9} mol/L 时,成骨细胞的相对增殖率达到极大值 31.78%。当浓度继续增加时,促进成骨细胞增殖的能力单调地减弱。在 $1.0\times10^{-9}\sim1.0\times10^{-5}$ mol/L 范围内,相对增殖率逐渐减小;当浓度大于 1.0×10^{-5} mol/L 时,对细胞增殖产生抑制作用。整条曲线呈弓形。矿化结节数的变化情况与此类似(图 7.2(b)),在 $0\sim1.0\times10^{-7}$ mol/L 浓度范围内,La^{3+}对矿化结节形成的作用曲线也呈弓形。

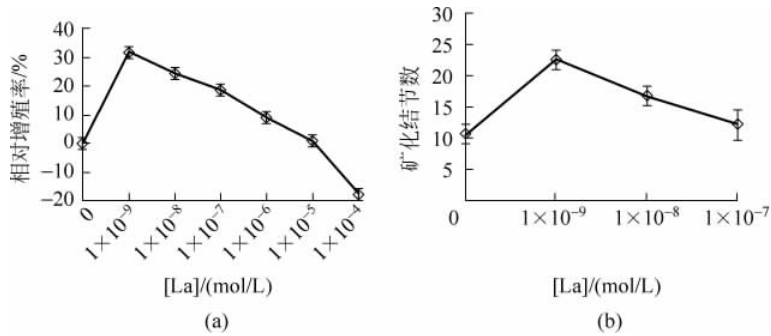


图 7.2 La^{3+}对成骨细胞 UMR106 的影响[60]

(a) 细胞增殖功能;(b) 细胞钙化能力

在 1,25-二羟基维生素 D_3 诱导下,兔骨髓细胞可分化为破骨样细胞(osteoclast-like cell)。La^{3+}影响分化过程及其所形成的破骨样细胞的骨吸收功能,而且也呈现与浓度相关的两面性[61]。低浓度的 La^{3+}(1.0×10^{-8} mol/L)促进分化,当浓度增大到 $1.0\times10^{-5}\sim1.0\times10^{-7}$ mol/L 范围时,这种促进作用随浓度增加而单调地减弱,直至转变为抑制作用。直接从骨中分离出成熟破骨细胞,然后评价 La^{3+}对其骨吸收功能的影响,其浓度曲线依然呈弓形[62]。

综上所述,La^{3+}可以影响在骨代谢中起重要作用的成骨细胞和破骨细胞的功能,这可能是造成喂镧大鼠骨矿物相改变的主要原因。在体外细胞实验中,La^{3+}的作用呈现出依赖浓度的两面性:低浓度促进,高浓度抑制。其他稀土元素(如 Nd^{3+}、Sm^{3+}、Gd^{3+}、Dy^{3+}、Er^{3+})和 Cu^{2+}与破骨细胞作用时也有此现象[63]。最近的研究结果显示,稀土离子在高、低浓度下的存在形态不同,这

可能是产生“两面性”生物效应的原因。例如，成骨细胞表面具有钙感应受体(calcium-sensing receptor)[64]，稀土离子 La^{3+} 与 Gd^{3+} 都是已知的钙感应受体激动剂[65]。低浓度的 La^{3+} 在细胞膜外侧与钙感应受体结合后，通过细胞膜内侧与该受体偶联的一类 G 蛋白，可激活细胞内信号，从而影响成骨细胞的活性与功能[66]。较高浓度的 Gd^{3+} 可在细胞培养基中诱发沉淀反应，产生含 Gd 的钙磷酸盐[67]。在较高浓度下，La^{3+} 很可能与 Gd^{3+} 类似，以含 La 的钙磷酸盐的形态存在。它影响细胞的方式可能不是通过钙感应受体，而是通过其他途径。例如，浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 的 La^{3+} 可使体外培养的成骨细胞 UMR106 超微结构改变：内质网扩张，部分扩张的内质网池中出现高絮状物质，核膜外凸，核周隙扩张[60]；浓度为 1.0×10^{-7} mol/L 的 La^{3+} 可使体外培养的破骨细胞体积变小，伪足不能正常伸展[62]。

7.1.4　氧化胆固醇抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化

如前所述，成骨细胞和破骨细胞在骨矿物代谢中起重要作用，而且外源性物种 La^{3+} 可以影响骨髓细胞向破骨样细胞分化的过程。内源性物种 3β，5α，6β-三羟基胆固醇是氧化胆固醇的一种，也是氧化低密度脂蛋白的主要成分之一。下面，我们介绍 3β，5α，6β-三羟基胆固醇对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响[68]。

在 β-甘油磷酸钠和地塞咪松的诱导下，在体外培养的骨髓基质细胞可以分化为成骨细胞[69,70]。碱性磷酸酶和骨钙素分别是向成骨细胞分化早期和晚期的标志性蛋白[70,71]，因此可以用碱性磷酸酶的活性、骨钙素的含量和基质钙沉积量作为骨髓基质细胞向成骨细胞分化的指标。当细胞培养到第 7、14 和 21 天时，检测碱性磷酸酶活性和骨钙素分泌量；在进行上述检测的前 3 天，加入终浓度为 5.0 μmol/L 的三羟基胆固醇。在第 14 和 21 天检测基质钙沉积量，在第 4 天加入终浓度为 5.0 μmol/L 的三羟基胆固醇。结果显示，三羟基胆固醇使得碱性磷酸酶活性在第 14 天显著降低，使骨钙素和基质钙沉积量在第 21 天显著减少。也就是说，3β，5α，6β-三羟基胆固醇抑制了骨髓基质细胞向成骨细胞的分化和骨矿物形成。

7.2　血管钙化

难溶钙盐在除了骨和牙齿以外的非骨性组织或体液中沉积，无论是否伴随组织坏死或损伤，均称为异位性钙化(heterotopic calcification)[72]。血管钙化是一种发生在心血管系统的异位性钙化(此外还有主动脉瓣膜钙化)，它包括动脉粥样硬化斑块区的钙化[73]和主动脉中层的广泛钙化[74]。下面的讨论

将只限于前者。

动脉粥样硬化的病理进程可以分为 6 个阶段[73]：潜在损伤期、脂纹形成期、粥样瘤前期、粥样瘤期、纤维粥样瘤期和复合损伤期。其中前三个阶段为早期病变，第四和第五阶段为晚期病变，最后一期为复合病变。虽然较早的钙化可在脂质条纹形成后开始[75]，但是在动脉粥样硬化病变的晚期和复合期，钙化更为多见。在人的粥样硬化主动脉的钙化沉积物中，钙磷灰石占 71%，碳酸盐占 9%；还有 15%的蛋白类物质、约 5%的水分和极少量的其他盐类；沉积物的 Ca/P(mol/mol)约 1.67，与羟基磷灰石相当；沉积物中的磷灰石由平均大小约 0.10 μm 的微晶构成[76]。

诱发血管钙化的因素很复杂，既有分子，也有细胞；既有与骨形成类似之处，也有不同于骨形成的特点。被动的钙磷酸盐沉积、主动的细胞调控过程和炎症响应都会对血管钙化有贡献[77]。已提出的钙化发生位点有基质小泡(matrix vesicle)[73]、非脂化胆固醇[78~80]和变性的弹性蛋白[80]等。一些血浆蛋白[81]、糖蛋白和基质 Gla(γ-carboxyglutamic acid)蛋白[82~85]抑制血管钙化；而低密度脂蛋白、胆固醇以及它们的氧化产物则对血管钙化具有促进作用[86,87]，并因此被称为心血管危险因子。一些细胞也参与血管钙化过程。在细胞外基质的调节下，血管平滑肌细胞可发生表型转变，获得成骨细胞样特征，表达成骨细胞标志性蛋白[88]。近年来还发现，血管平滑肌细胞的凋亡小体可作为发生钙化的基质小泡的来源[89]。在钙化斑块形成的不同阶段，分子、细胞和凋亡小体可能以不同的方式诱发钙化；因此，血管钙化机制呈现出多样性。

7.2.1 胆固醇诱导钙磷酸盐沉积：物理化学作用

尽管人们早就认识到了胆固醇对血管钙化的促进作用，然而关于其确切的作用方式却并不清楚。1976 年，Craven[90]在报道一水胆固醇晶体结构时指出，鉴于一水胆固醇与羟基磷灰石(001)晶面的结构互补性，借助于以氢键结合的水分子形成的过渡层，二者可以互为晶种；也就是说，一种物质的微晶可诱发另一种微晶在其表面形成。1990 年，有人将胆固醇溶于乙醇溶液，然后将其加入含有羟基磷灰石微晶的水溶液，证实了羟基磷灰石微晶可作为胆固醇沉积的晶种[91]，这为“血管钙化可诱发高胆固醇血症(hypercholesteraemia)”提供了证据。1994 年，Sarig 等[92]报道，在人的粥样硬化斑块中，存在着围绕胆固醇形成的羟基磷灰石，这表明高胆固醇血症也可能诱发血管钙化。该现象虽然也已得到一些体外实验的证实[79]，但是由于胆固醇在水溶液中的溶解度很低，研究者们不得不在溶液中加入了较多的乙醇，这显然与生理条件偏离较大。

在不含乙醇的水溶液中，可以利用恒 pH 技术[93]研究胆固醇微粒诱导钙

磷酸盐沉淀反应的动力学[78]。在 pH＝7.40、初始 Ca^{2+} 和无机磷 Pi 总浓度分别为 1.82 mmol/L 和 1.23 mmol/L 的溶液中加入中径为 40.64 μm 的胆固醇微粒，使其在该溶液中的含量为 71.4 mg/L。由于无机磷在该 pH 下的主要存在形式为 HPO_4^{2-} 和 $H_2PO_4^-$，而它在钙磷酸盐沉淀中的存在形式可能为 HPO_4^{2-} 和 PO_4^{3-}，因此一旦有钙磷酸盐沉淀生成，就会释放出 H^+，从而使 pH 值降低。利用恒 pH 自动滴定仪控制反应体系，通过滴入 50 mmol/L 的 KOH 溶液使体系的 pH 值维持在 7.40。这样，滴定速率就反映出沉淀生成速率。

加入 71.4 mg/L 胆固醇后，反应的诱导期由原来的 390 min 缩短为 300 min；若加入胆固醇的量增加 1 倍，诱导期进一步缩短到 270 min。这些现象表明，胆固醇对于钙磷酸盐沉淀的形成有促进作用。在动力学实验完成后，过滤并洗涤沉淀，在扫描电镜下观察，可见无机物沉淀（因电子密度较大而呈白色）内部存在一个有机物“核”。X 射线衍射分析表明，该有机物正是胆固醇，其结构在反应前后没有变化；而围绕有机物“核”形成的无机物“壳”，则可能是有缺陷的羟基磷灰石（calcium-deficient hydroxyapatite）或磷酸八钙（$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$）。采用能量色散 X 射线分析测得无机物“壳”的 Ca/P 摩尔比自内向外逐渐降低，分别是 1.53（靠近有机物）、1.47（“壳”横断面的中部）和 1.42（靠近外表面）。由 Ca/P 摩尔比判断，该沉淀物不是二水磷酸氢钙（$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$，Ca/P＝1.0）和磷酸八钙（Ca/P＝1.33），而 β-磷酸钙（β-$Ca_3(PO_4)_2$，Ca/P＝1.5）通常需要在更高温度下才能形成[94]。由以上情况判断，靠近有机物内层的物质可能是有缺陷的羟基磷灰石；随着反应的进行，在中层和外层，磷酸八钙的成分逐渐增大。有报道[95]指出，由于磷酸八钙与羟基磷灰石在晶体结构上的部分相似性，前者会在后者表面形成。从沉淀快速形成到实验结束的间隔约 5 h；在这段时间内，磷酸八钙没能完全转化成热力学更稳定的羟基磷灰石。需要指出的是，在没有细胞参与的条件下，胆固醇微粒可作为晶种诱导钙磷酸盐晶体形成；这种情形在成骨过程中似乎并不存在，因而可能是血管钙化的特点之一。

7.2.2　血管平滑肌细胞的凋亡对钙化的贡献

细胞凋亡与血管钙化之间的联系正越来越引起人们的注意[96～98]。在动脉粥样硬化病变中，发生凋亡的细胞以平滑肌细胞和巨噬细胞为主，也有一定量的内皮细胞。凋亡程度与动脉粥样硬化的病变程度密切相关。一般情况下，在发生内膜增厚及脂纹出现的早期阶段，凋亡率很低；当病变发展至晚期，凋亡率较高[99,100]。在人的平滑肌细胞体外钙化实验中[101]，当细胞培养至第七天时观察到凋亡，但此时凋亡率很低；当培养至第 28 天时，凋亡率突然

增高,同时细胞也出现了钙化。值得注意的是,凋亡出现在钙化之前[89],而且抑制细胞凋亡能够抑制钙化,诱导细胞凋亡则加速钙化。由此看来,细胞凋亡是启动血管钙化的重要因素之一。

3β,5α,6β-三羟基胆固醇既与骨质疏松有关,也与血管钙化有关。在动脉粥样斑块中,氧化胆固醇的水平升高[102]。然而,在恒 pH 实验中,三羟基胆固醇却抑制钙磷酸盐沉淀的形成[78]。这种与体内作用相反的现象意味着,三羟基胆固醇在体内的作用方式不同于胆固醇;它并不直接诱导钙磷酸盐沉淀形成,而是通过血管平滑肌细胞表现出对血管钙化的促进作用。氧化低密度脂蛋白与三羟基胆固醇情况相似,在恒 pH 实验中抑制钙磷酸盐沉淀的形成[78],却能够通过促进血管平滑肌细胞成骨样分化而促进钙化[103]。

普通的血管平滑肌细胞在体外培养时并不自发钙化,但是在 β-甘油磷酸钠的诱导下可以发生表型转变,其表现为平滑肌细胞标志性蛋白(如 α-actin 和 SM22)的表达降低,而成骨细胞标志性蛋白(如骨桥蛋白、骨钙素、碱性磷酸酶和 Cbfa-1)的表达增强,最终在细胞外基质中形成钙化沉淀[104,105]。这类细胞称为钙化血管细胞。

采用从雄性 SD 大鼠胸腔主动脉分离出的血管平滑肌细胞作为模型,可以考察三羟基胆固醇在血管钙化中的作用[106]。待血管平滑肌细胞在生长培养基中生长融合之后,改为钙化培养基,继续培养 12 天;其间,每 2～3 天换液一次。这时,血管平滑肌细胞已转变成血管钙化细胞。加入三羟基胆固醇,继续培养 4 天,即可测定钙化程度。用 0.60 mol/L HCl 脱钙,用原子吸收光谱法测定上清液中钙含量,然后将钙沉积量按细胞蛋白含量归一化。结果显示,对于血管平滑肌细胞,加入三羟基胆固醇并未使其钙化加剧。对于钙化血管细胞,当氧化胆固醇的浓度不小于 5 μmol/L 时,明显表现出促进钙化的作用。三羟基胆固醇碱性磷酸酶活性的影响与此类似。用维生素 C 和维生素 E 预处理,可以削弱三羟基胆固醇的上述作用。

血管平滑肌细胞的钙化与细胞凋亡有关。在钙化血管细胞中加入终浓度为 15 μmol/L 的三羟基胆固醇。48 h 后,将细胞用 FITC 标记的 Annexin V(绿色荧光)和 PI(红色荧光)双染后,在激光扫描共聚焦荧光显微镜下可观察其凋亡情况。与对照组相比,三羟基胆固醇使钙化结节中的凋亡细胞增多了。值得注意的是,伴随着钙化和凋亡,三羟基胆固醇还使细胞内的反应性氧物种(reactive oxygen species)水平增高,而且该作用也可以被维生素 C 和维生素 E 削弱。由此可见,三羟基胆固醇可以通过增加碱性磷酸酶的活性和诱导细胞凋亡的方式促进钙化,而它所诱导的细胞凋亡可能与细胞内活性氧物种含量增加有关。

在凋亡过程中,细胞通过碎裂、出芽等方式形成凋亡小体[107]。在生理情

况下，凋亡小体会被其周围的吞噬细胞（如巨噬细胞和平滑肌细胞）识别并吞噬。然而，在病理情况下，由于巨噬细胞和平滑肌细胞吞噬了大量的脂质而变成泡沫细胞，清除凋亡小体的能力下降，因此使凋亡小体得以在病变处存在较长时间，从而可能为钙化提供成核位点。

处于不同状态的血管平滑肌细胞，它们产生的凋亡小体促进钙化的能力也不相同。将 SD 大鼠胸腔主动脉分离出的血管平滑肌细胞在钙化培养基中培养 12 天，可以得到钙化血管细胞。将正常血管平滑肌细胞和钙化血管细胞经紫外光照射后，均可出现典型的凋亡特征，并于照射后 48 h 得到钙化血管细胞凋亡小体。恒 pH 实验可以显示出这两种凋亡小体钙化能力的差别。在钙化血管细胞凋亡小体的存在下，诱导期为 20 min；对于含有正常平滑肌细胞凋亡小体的体系，诱导期为 45 min；而对照组则为 70 min。也就是说，钙化血管细胞的凋亡小体比正常平滑肌细胞的凋亡小体更容易引起钙磷酸盐沉积。这两种凋亡小体的大小基本相同，但是，钙化细胞凋亡小体中碱性磷酸酶的活性和钙含量都是正常细胞凋亡小体的大约 10 倍。

在动脉粥样硬化进程的不同阶段，起作用的主要因素可能不同。在病变初期，如内膜增厚和脂纹早期，血浆中的胆固醇微粒对钙化的促进作用可能是主要因素之一[79,80]。当病变发展到中、晚期，斑块附近细胞凋亡率增高，凋亡小体在血管钙化中的作用可能变得较突出。因此，凋亡小体促进血管钙化的机理是一个值得深入研究的问题。凋亡小体的钙化能力与其细胞来源及细胞所处的病理微环境有密切关系。血管平滑肌细胞是一个多亚群细胞，其中的钙化平滑肌细胞具有成骨细胞的分化表型，这一亚群细胞所产生的凋亡小体最具钙化潜力。一些学者[89,108～110]认为，凋亡小体的细胞膜上含有钙通道及钙结合蛋白，使钙离子能结合在凋亡小体的外表面或通过钙通道进入小体内；与基质小泡不同的是，凋亡小体对钙离子的聚集作用不需要三磷酸腺苷的参与。此外，细胞发生凋亡时磷脂酰丝氨酸外翻，它们携带的负电荷也为钙离子的聚集提供了结合位点。基质小泡作为钙化位点在骨和软骨形成中的作用已被证实。这些直径在 30～300 nm 的膜包被结构是通过发芽或出胞的方式由成骨细胞、软骨细胞产生的[111]，它们含有作为成核位点所必须的钙结合蛋白和磷酸酶类。最近的研究表明[112]，软骨细胞的凋亡小体与基质小泡有许多共同点，它们在体外钙化实验中的作用有许多共同之处。二者之间的确切关系仍有待于进一步探索。

7.2.3　血管平滑肌细胞的成骨样分化对钙化的贡献

血管钙化是一个多因素调节的过程，血管平滑肌细胞在其中起关键作用[113]。在钙化斑块中，除了来源于死亡平滑肌细胞的基质小泡[114]和凋亡小

体[89]可以作为钙化的成核位点之外,还发现了与骨和软骨矿化有关的胶原蛋白和非胶原基质蛋白[115~119],这表明血管平滑肌细胞可能发生了表型转变(phenotype conversion)。发生成骨样分化、并表达相应的基因和蛋白也是血管平滑肌细胞参与血管钙化的一种方式[81,88,120]。在生理条件下,正常血管平滑肌细胞表达诸如基质 Gla 蛋白[82]和骨桥蛋白[113]之类的钙化抑制剂。然而,当平滑肌细胞在钙化促进因子的作用下发生成骨样分化[121],就会表达与骨形成相关的基因和蛋白,并导致钙化结节的形成[122]。体外实验证实,发生表型转变的细胞加剧钙化[123]。

在血管平滑肌细胞受某些因素刺激而发生成骨样分化的过程中,纤连蛋白(fibronectin)的作用值得关注。纤连蛋白在骨发生的早期出现,该蛋白在大鼠颅骨膜和植入物周边的定位表明,它是在成骨细胞前体募集和定型的骨组织区域被合成出来,并沉积在那里[124,125]。纤连蛋白影响细胞粘附、增殖、迁移和分化的现象已有报道[126]。当血管壁基底膜的完整性遭到破坏时,平滑肌细胞会暴露于富含纤连蛋白的细胞外基质[127]。在钙化促进因子的作用下,有的血管平滑肌细胞由中膜迁移至内膜,并且由收缩样表型分化为合成样表型。纤连蛋白可以促进这种表型转变[128]。

纤连蛋白是一种细胞外基质蛋白,通常以二聚体形式存在,通过二硫键相连,单体相对分子质量约 450~500 kDa[129]。在人血浆中,可溶性纤连蛋白的浓度可达 1 μmol/L。纤连蛋白具有多个功能域和 RGD(精-甘-天冬氨酸残基)序列,因而可与多种生物分子和细胞表面的整联蛋白(integrin)结合。在骨组织中,纤连蛋白沉积在成骨细胞前体募集与定型的区域[124,125];在血管中,血管壁受损伤之后,一旦基底膜的完整性遭到破坏,血管平滑肌细胞也会暴露于血浆中的纤连蛋白。纤连蛋白影响钙化血管细胞的 ALP 活性、分泌的基质组成和钙化结节形成能力,人们推测它可能通过细胞膜上的整联蛋白受体引发的信号通路调控血管钙化[130]。

鉴于纤连蛋白在血管钙化中的重要性,我们研究了它对血管平滑肌细胞成骨样分化的影响[131]。将第 3~7 代血管平滑肌细胞接种到具有纤连蛋白(15 μg/cm^2)涂层的培养板上,10 天后可见细胞聚集成多层结节;采用 Alizarin Red S 染色,可显示出钙化产物。即纤连蛋白可以诱导平滑肌细胞转化为钙化细胞。对照组细胞在普通培养板上培养,12 天后才出现结节。虽然仅加入 β-甘油磷酸钠就可使细胞钙化程度增加,但是含纤连蛋白的涂层使钙沉积量和与钙化密切相关的碱性磷酸酶活性都增加了。

采用半定量 RT-PCR 技术,可以测定与血管平滑肌细胞向成骨样细胞分化有关的一些特征蛋白的 mRNA 的表达。与对照组相比,在含纤连蛋白的涂层上培养的细胞中,一些特征蛋白的 mRNA 的表达水平升高了,这些蛋白包

括一种成骨分化的转录因子 Cbfa-1、Ⅰ型胶原蛋白、骨钙素和碱性磷酸酶。其中 Cbfa-1 不仅是成骨分化的标志性分子之一，而且起着“管家基因”的作用，参与调节其他蛋白（诸如骨钙素和碱性磷酸酶）的基因表达[126,132]；因此，Cbfa-1 表达水平上调对纤连蛋白呈现出的剂量依赖性表明，纤连蛋白所促进的血管平滑肌细胞钙化与细胞向成骨样细胞分化有关。

细胞内的信号转导是由蛋白-蛋白之间的逐级相互作用完成的。丝裂原活化的蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）基因编码一套信号蛋白，这些蛋白依其结构同源性和功能类似性可分为 3 类；ERK 是一类激酶，也表示 MAPK 的 3 条信号通路之一。PD98059 抑制 ERK 磷酸化级联系统的一个上游分子 MEK，因此是 ERK 的一种特异性抑制剂；利用免疫印迹技术考察 ERK 抑制剂对 ERK 及其磷酸化形式的表达水平的影响，有助于发现血管平滑肌细胞向成骨样细胞分化与细胞内信号通路之间的联系。尽管 ERK 总量基本不受培养皿涂层中纤连蛋白含量的影响，然而其磷酸化水平却随着纤连蛋白含量的增加而升高。在 ERK 抑制剂 PD98059 的存在下，钙沉积量、碱性磷酸酶活性、骨钙素和转录因子 Cbfa-1 的表达水平也都降低了。这些事实说明，纤连蛋白对血管平滑肌细胞钙化的促进作用是通过 ERK 信号通路调制的细胞成骨样分化而实现的。

致谢　本章主要内容是在北京大学药学院生物矿化研究组近年来的研究结果基础上写成的。在国家自然科学基金（批准号：20031010 和 20271005）的资助下，张金超、王和平、刘红梅、丁海涛、黄健和苟宝迪等为这项研究付出了辛勤的努力。

参 考 文 献

[1] Nawroth P, Pirzer R, Fohr B, Schilling T, Ziegler R, Bierhaus A, Kasperk C. Osteoporosis and cardiovascular disease-two sides of the same coin? Medizinische Klinik(Muenchen,Germany) 2003,98(8): 437～446.

[2] Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. Trends in Molecular Medicine 2009,15: 405～416.

[3] Thompson D D, Simmons H A, Pirie C M, Ke H Z. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. Bone 1995,17: 125S～133S.

[4] Consensus Development Conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med 1993,94: 646～650.

[5] Wu Y, Ackerman K, Kim H-M, et al. Nuclear magneticresonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel and synthetic hydroxyapatite. J Bone Miner Res 2002,17: 472～480.

[6] Lian J B, Stein G S, Canalis E, Robey P G, Boskey A L. Bone formation: osteoblast

lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In: Favus M J, Ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 4th ed.; Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 14～29.

[7] Young M F. Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. Osteoporos Int, 2003, 14: S35～S42.

[8] Boskey A L. mineral-matrix interactions in bone and cartilage. Clin Orthop 1992, 281: 244～274.

[9] Donley G E, Fitzpatrick L A. Noncollagenous matrix proteins controlling mineralization: possible role in pathologic calcification of vascular tissue. Trends Cardiovasc Med 1998, 8: 199～206.

[10] Gehron R P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian J P, Raisz L G, Rodan G A, Eds. Principles of bone biology, San Diego: Academic Press, 1996: 155～165.

[11] Gehron R P, Boskey A L. The biochemistry of bone. In: Marcus R, Feldman D, Eds. Osteoporosis, New York: Raven Press, 1996; 97～184.

[12] Gokhale J A, Robey P G, Boskey A L. The biochemistry of bone. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey A, Eds. Osteoporosis, San Diego, CA: Academic Press, 2001; Vol. 1, 107～188.

[13] Gorski J P. Acidic phosphoproteins from bone matrix: A structural rationalization of their role in biomineralization. Calcif Tissue Int 1992, 50: 391～396.

[14] Gorski J P. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. Crit Rev Oral Biol Med 1998, 9: 201～223.

[15] Termine J D, Kleinman H K, Whitson S W, Conn K M, McGarvey M L, Martin G R. Osteonectin, a bone-specifc protein linking mineral to collagen. Cell 1981, 26: 99～105.

[16] Hodgson S F, Watts N B, Bilezikian J P, et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. 2001 edition, with selected updates for 2003. Endocr Pratt. 2003, 9: 544～564. (Published correction appears in Endocr Pratt. 2004, 10: 90); 544～564.

[17] Riggs B L, Melton L D. Involutional osteoporosis. N Engl J Med 1986, 314: 1676～1686.

[18] Derkx P, Nigg A L, Bosman F T, Birkenhäger-Frenkel D H, Houtsmuller A B, Pols H A P, van Leeuwen J P T M. Immunolocalization and quantification of non-collagenous bone matrix proteins in methylmethacrylate-embedded adult human bone in combination with histomorphometry. Bone 1998, 22: 367～373.

[19] Xu T S, Bianco P, Fisher L W, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Jeffrey B, Boskey A, Heegaard A M, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C Y, Kulkarni A B, Robey P G, Young M F. Targeted disruption of the biglycan gene

leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. Nat Genet 1998,20: 78～82.

[20] Grynpas M D, Tupy J H, Sodek J. The distribution of soluble, mineral bond and matrix-bound proteins in osteoporotic and normal bones. Bone 1994,15: 505～513.

[21] Khosla S, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. In: Favus M J, Ed. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 4th ed.; Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 1999: 128～134.

[22] Cai D J, Zhao Y, Glasier J, Cullen D, Barnes S, Turner C H, Wastney M, Weaver C M. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17beta-estradiol on bone metabolism in adult ovariectomized rats. J Bone Miner Res 2005,20: 828～839.

[23] Frost H M, Jee W S. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. Bone Miner 1992,18: 227～236.

[24] Kalu D N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 1991,15: 175～192.

[25] Huang J, Wang X, Zhang T-L, Wang K. Alterations of ovariectomized rat bone and impact of non-collagenous proteins on mineralization. Joint Bone Spine 2009, 76: 176～183.

[26] Rinnerthaler S, Roschger Jakob P H F, Nader A, Klaushofer K, Fratzl P. Scanning small angle X-ray scattering analysis of human bone sections. Calcif Tissue Int 1999, 64: 422～429.

[27] Rohanizadeh R, LeGeros R Z, Bohic S, Pilet P, Barbier A, Daculsi G. Ultrastructural properties of bone mineral of control and tiludronate-treated osteoporotic rat. Calcif Tissue Int 2000,67: 330～336.

[28] Rubin M A, Jasiuk I, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian R P. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. Bone 2003,33: 270～282.

[29] Termine J D, Belcourt A B, Conn K M, Kleinman H K. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. J Biol Chem 1981,256: 10403～10408.

[30] King L E, Morrison M. The visualization of human erythrocyte membrane proteins and glycoproteins in SDS polyacrylamide gels employing a single staining procedure. Anal Biochem 1976,71: 223～230.

[31] Ramakrishnan P R, Lin W-L, Sodek J, Cho M-I. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. Calcif Tissue Int 1995,57: 52～59.

[32] Koutsoukos P G, Amjad Z, Tomson M B, Nancollas G H. Crystallization of calcium phosphates. A constant composition study. J Am Chem Soc 1980,102: 1553～1557.

[33] Romberg R W, Werness P G, Riggs B L, Mann K G. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins. Biochemistry 1986,25: 1176～1180.

[34] Hunter G K, Hauschka P V, Poole A R, Rosenberg L C, Goldberg H A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. Biochem J 1996,317: 59～64.

[35] Fujisawa R, Wada Y, Nodasaka Y, Kuboki Y. Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals. Biochim Biophys Acta 1996, 1292: 53～60.

[36] Boskey A L, Maresca M, Ullrich W, Doty S B, Butler W T, Prince C W. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. Bone Miner 1993, 22: 147～159.

[37] Hunter G K, Goldberg H A. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90: 8562～8565.

[38] Sigel A, Sigel H. Metal ions in biological systems. Marcel Dekker: New York, NY, 2003; Vol. 40.

[39] Qi D, Chen L. A spectrochemical study on the distribution of rare earth contents in plant. J Pek Univ(Nat Sci) 1985, 6: 68～74.

[40] Chen Z, Liu Y, Wang Y. Study on distributions and accumulations of rare earth element cerium(141Ce) in mice. J Nanjing Agricult Univ 2000, 23: 101～103.

[41] Zhu W, Xu S, Shao P, Zhang H, Feng J, Wu D, Yang W. Investigation on intake allowance of rare earth: A study on bio-effect of rare earth in South Jiangxi. Chin Environ Sci 1997, 17: 63～65.

[42] Pang X, Li D, Peng A. Application of rare-earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. Environ Sci Pollut Res Int 2002, 9: 143～148.

[43] Ji Y J, Li J L. Recent development in the study of biological effects of rare earth elements in China. J Health Toxicol 2000, 14: 23～28.

[44] Behets G J, Verberckmoes S C, D'Haese P C, De Broe M E. Lanthanum carbonate: a new phosphate binder. Curr Opin Nephrol Hypertens 2004, 13: 403～409.

[45] Albaaj F, Hutchison A J. Lanthanum carbonate(Fosrenol): a novel agent for the treatment of hyperphosphataemia in renal failure and dialysis patients. Int J Clin Pract 2005, 59: 1091～1096.

[46] Huang J, Zhang T-L, Xu S-J, Li R-C, Wang K, Zhang J, Xie Y-N. Effects of lanthanum on composition, crystal size and lattice structure of femur bone mineral of Wistar rats. Calcif Tissue Int 2006, 78: 241～247.

[47] Vanholder R, Cornelis R, Dhondt A, Lameire N. The role of trace elements in uremic toxicity. Nephrol Dial Transplant 2002, 17(Suppl. 2): 2-8 and references therein.

[48] Jarup L. Cadmium overload and toxicity. Nephrol Dial Transplant 2002, 17(Suppl. 2): 35～39.

[49] Wang K. The analogy in chemical and biological behavior between non-special ions compared with essential ions. S Afr J Chem 1997, 50: 232～238.

[50] Jalilehvand F, Spångberg D, Lindqvist-Reis P, Hermansson K, Persson I, Sandström M. Hydration of the calcium ion: An EXAFS, large-angle x-ray scattering, and molecular dynamics simulation study. J Am Chem Soc 2001, 123: 431～441.

[51] Hardie M J, Raston C L, Salinas A. A 3, 12-connected vertice sharing adamantoid hydrogen bonded network featuring tetrameric clusters of cyclotriveratrylene. Chem Commun 2001, 21: 1850～1851.

[52] Yumiko N, Yakari T, Yasuhide T, Tadashi S, Yoshio I. Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats. Fundam Appl Toxicol 1997,37: 106～116.

[53] Rey C, Renugopalakrshanan V, Collins B, Glimecher M J. Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging. Calcif Tissue Int 1991,49: 251～258.

[54] Boskey A L, Gadaleta S, Gundberg C, Doty S B, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. Bone 1998,23: 187～196.

[55] Miller L M, Vairamurthy V, Chance M R, Mendelsohn R, Paschalis E P, Betts F, Bosky A L. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the $v3$ PO_4^{3-} vibration. Biochim Biophys Acta 2001,1527(11～19).

[56] Huang R Y, Miller M L, Carlson C S, Chance M R. Charaterization of bone mineral composition in the proximal tibia of cynomolgus monkeys: Effect of ovariectomy and nandrolone deaconate treatment. Bone 2002,30: 492～497.

[57] Harries J E, Hukins D W, Hasnain S S. Calcium environment in bone mineral determined by EXAFS spectroscopy. Calcif Tissue Int 1988,43: 250～253.

[58] Suzuki S, Ogawa Y, Kisi Y, Chiba M. Accumulation of orally administered rare earth elements of yttrium, lanthanum, europium and gadolinium in rat femur. Biomed Res Trace Elem 1992,3: 253～254.

[59] Anand M J, Akhilesh C S. Clastogenicity of lanthanides: induction of chromosomal aberration in bone marrow cells of mice in vivo. Mutation Res 1995,341: 193～197.

[60] 张金超，李晓新，许善锦，王夔，于世凤，林琴. 稀土离子对体外培养的成骨细胞增殖、分化和功能表达的影响. 自然科学进展 2004,14(4): 404.

[61] Zhang J C, Zhang T L, Xu S J, Wang K, Yu S F, Yang M S. Effects of lanthanum on formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. J Rare Earths 2004,22(6): 891～895.

[62] Zhang J C, Xu S J, Wang K, Yu S F. Effects of the rare earth ions on bone resorbing function of rabbit mature osteoclasts in vitro. Chin Sci Bull 2003,48(20): 2170～2175.

[63] Zhang J C, Huang J, Xu S J, Wang K, Yu S F. The effects of copper ion and pH on osteoclastic bone resorption in vitro. Prog Nat Sci 2003,13(4): 266～270.

[64] Dvorak M M, Siddiqua A, Ward D T, et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. Proc Natl Acad Sci USA 2004,101: 5140～5145.

[65] Smajilovic S, Tfelt-Hansen J. Calcium acts as a first messenger through the calcium-sensing receptor in the cardiovascular system. Cardiovasc Res 2007,75: 457～467.

[66] Wang X, Yuan L, Huang J, Zhang T-L, Wang K. Lanthanum enhances in vitro osteoblast differentiation via pertussis toxin-sensitive Gi protein and ERK signaling pathway. J Cell Biochem 2008,105: 1307～1315.

[67] Gou B-D, Bian S, Zhang T-L, Wang K. Gadolinium-promoted precipitation of calcium

phosphate is associated with profibrotic activation of RAW 264.7 macrophages. Toxicology in Vitro 2010,DOI: 10.1016/j.tiv.2010.1005.1004.

[68] Liu H, Yuan L, Xu S, Wang K, Zhang T. Cholestane-3β, 5α, 6β-triol inhibits osteoblastic differentiation and promotes apoptosis of rat bone marrow stromal cells. J Cell Biochem 2005,94: 198～208.

[69] Maniatopoulos C,Sodek J,Melcher A H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 1988, 254: 317～330.

[70] Malaval L,Modrowski D,Gupta A K,Aubin J E. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. J Cell Physiol 1994,158: 555～557.

[71] Stein G, Lian J. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocr Rev 1993,14: 424～444.

[72] Watson K E. Pathophysiology of coronary calcification. J Cardiovasc Risk 2000, 7(2): 93～97.

[73] Stary H C,Chandler A B,Dinsmore R E,et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. Circulation 1995,92: 1355～1374.

[74] 戴成祥,荆忱. 动脉钙化的分子遗传机制. 国外医学 老年医学分册, 2000,21: 121～123.

[75] Stary H C. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. Eur Heart J 1990,11(Suppl E): 3～19.

[76] Schmid K, McSharry W O, Pameijer C H, et al. Chemical and physicochemical studies on the mineral deposits of the human atherosclerotic aorta. Atherosclerosis 1980,37: 199～210.

[77] Touyz R M, Montezano A C. Vascular smooth muscle cells sense calcium: a new paradigm in vascular calcification Cardiovasc Res 2009,81: 237～239.

[78] Wang H-P, Feng X-J, Gou B-D, Zhang T-L, Xu S-J, Wang K. Effects of LDL, cholesterol and their oxidized forms on the precipitation kinetics of calcium phosphates. Clin Chem 2003,49(12): 2027～2036.

[79] Hirsch D, Azoury R, Sarig S, Kruth H S. Colocalization of cholesterol and hydroxyapatite in human atherosclerotic lesions. Calcif Tissue Int 1993,52: 94～98.

[80] Bobryshev Y V,Lord R S A,Warren B A. Calcified deposit formation in intimal thickenings of the human aorta. Atherosclerosis 1995,118: 9～21.

[81] Garnett J, Dieppe P. The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth. Biochem J 1990,266: 863～868.

[82] Luo G,Ducy P, McKee M D, Pinero G J, Loyer E, Behringer R R, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. Nature 1997,385: 78～81.

[83] Ketteler M, Vermeer C, Wanner C, Westenfeld R, Jahnen Dechent W, Floege J. Novel insights into uremic vascular calcification: role of matrix glaprotein and alpha-2-heremans schmid glycoprotein/fetuin. Blood Purification 2002,20: 473～476.

[84] Farzaneh-Far A, Proudfoot D, Shanahan C, Weissberg P L. Vascular and valvar calcification: recent advances. Heart 2001,85(1): 13～17.

[85] Boström K. Insights into the mechanism of vascular calcification. Am J Cardiol 2001,88(Suppl): 20～22.

[86] Steinberg D S. Oxidative modification of LDL and atherosclerosis. Circulation 1997, 95: 1062～1071.

[87] Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. Clin Chem 1996,42(4): 498～506.

[88] Watson K E, Boström K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer L L. TGF-β1 and 25-hydroxycholesterol stimulated osteoblast-like vascular cells to calcify. J Clin Invest 1994,93: 2106～2113.

[89] Proudfoot D, Skeppe J N, Hegyi L, Bennett M R, Shanahan G M, Weissberg P L. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: Evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. Cir Res 2000,87: 1055～1062.

[90] Craven B M. Crystal structure of cholesterol monohydrate. Nature 1976, 260: 727～729.

[91] Hirsch D, Azoury R, Sarig S. Co-crystallization of cholesterol and calcium phosphate as related to atherosclerosis. J Cryst Growth 1990,104: 759～765.

[92] Sarig S, Weiss T A, Katz J, Kahana F, Azoury R, Okon E, Kruth H S. Detection of cholesterol associated with calcium mineral using confocal fluorescence microscopy. Laboratory Investigation 1994,71: 782～787.

[93] Hunter G K, Kyle C L, Goldberg H A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin-mediated inhibition of hydroxyapatite formation. Biochem J 1994,300: 723～728.

[94] Heughebaert J C, Nancollas G H. Kinetics of crystallization of octacalcium phosphate. J Phys Chem 1984,88: 2478～2481.

[95] Nancollas G H, Tomažič B. Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals. Effect of supersaturation and ionic medium. J Phys Chem 1974,78: 2218～2225.

[96] Kockx M M, De Meyer G R Y, Muhring J, Bult H, Bultinck J, Herman A. Distribution of cell replication and apoptosis in atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 1996,(120): 115～124.

[97] Isner J M, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. Circulation 1995,91: 2703～2711.

[98] Hegyi L, Skepper J N, Cary N R, Mitchinson M J. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. J Pathol 1996,180: 423～429.

[99] Libby P, Geng Y J, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton S K, Sukhova G K, Lee R T. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol 1996, 7: 330～335.

[100] Davies M J. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. Circulation 1996,94: 2013～2020.

[101] Proudfoot D, Skepper J N, Shanahan C M, Weissberg P L. Calcification of human vascular cells in vitro is correlated with high levels of matrix gla protein and low levels of osteopontin expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998,18: 379～388.

[102] Brown A J, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. Atherosclerosis 1999, 142: 1～28.

[103] Bear M, Butcher M, Shaughnessy S G. Oxidized low-density lipoprotein acts synergistically with β-glycerophosphate to induce osteoblast differentiation in primary cultures of vascular smooth muscle cells. J Cell Biochem 2008, 105: 185～193.

[104] Wada T, McKee M D, Steitz S, Giachelli C M. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibited by osteopontin. Cir Res 1999,84: 166～178.

[105] Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. β-Glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995,15: 2003～2009.

[106] Liu H, Yuan L, Xu S, Zhang T-L, Wang K. Cholestane-3β, 5α, 6β-triol promotes vascular smooth muscle cells calcification. Life Sci 2004,76: 533～543.

[107] Bauriedel G, Huuter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Lüderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. Cardiovasc Res 1999,41: 480～488.

[108] Skrtic D, Eanes E D. Membrane mediated precipitation of calcium phosphate in model liposomes with matrix vesicle-like lipid composition. Bone Miner 1992,16: 109～119.

[109] Hsu H H T, Camacho N P, Anderson H C. Further characterisation of ATP-initiated calcification by matrix vesicles isolated from rachitic rat cartilage: membrane perturbation by detergents and deposition of calcium pyrophosphate by rachitic matrix vesicles. Biochim Biophys Acta 1999,1416: 320～332.

[110] Cotmore J M, Nichol G, Wuthier R E. Phospholipid-calcium phosphate complex: enhanced calcium migration in the presence of phosphate. Science 1971, 172: 1339～1341.

[111] Anderson H C. Molecular biology of matrix vesicles. Clin Orthop Rel Res 1995, 314: 266～280.

[112] Hashimoto S, Ochs R L, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller J E, Terkeltaub R, Lotz M. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcifi-cation of articular cartilage. Proc Natl Acad Sci USA 1998,95: 3094～3099.

[113] Giachelli C M, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. Matrix Biol 2000,19: 615～622.

[114] Tanimura A, McGregor D H, Anderson H C. Matrix vesicles in atherosclerotic calcification. Proc Soc Exp Biol Med 1983,2: 173～177.

[115] Shanahan C M, Cary N R, Osbourn J K, Weissberg P L. Identification of

osteoglycin as a component of the vascular matrix. Differential expression by vascular smooth muscle cells during neointima formation and in atherosclerotic plaques. Atherioscler Thromb Vasc Biol 1997,17: 2437～2447.

[116] Shanahan C M, Cary N R, Metcalfe J C, Weissberg P L. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. J Clin Invest 1994,93: 2393～2402.

[117] Rekhter M D, Zhang K, Narayanan A S, Phan S, Schork M A, Gordon D. Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. Am J Pathol 1993,143: 1634～1648.

[118] Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S, Hirokawa K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth musclederived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. J Clin Invest 1993,92: 2814～2820.

[119] Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim H M, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. Am J Pathol 1993, 143: 1003～1008.

[120] Topouzis S, Majesky M W. Smooth muscle lineage diversity in the chick embryo. Two types of aortic smooth cell differ in growth and receptor-mediated transcriptional responses to transforming growth factor-beta. Dev Biol 1996, 178: 430～445.

[121] Steitz S A, Speer M Y, Curinga G, Yang H Y, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli C M. Smooth muscle cell phenotype transition associated with calcification: Upregulation of Cbfal and downregulation of smooth muscle lineage markers. Circ Res 2001,89: 1147～1154.

[122] Mohler E R, Ⅲ, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keana M G, Kaplan F S. Bone formation and inflammation in cardiac valves. Circulation 2001,103: 1522～1528.

[123] Parhami F, Tintut Y, Patel J K, Mody N, Hemmat A, Demer L L. Regulation of vascular calcification in atherosclerosis. Z Kardiol 2001,90(Suppl 3): 27～30.

[124] Weiss R E, Reddi A H. Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 1980,77: 2074～2078.

[125] Moursi A M, Damsky C H, Lull J, Zimmerman D, Doty S B, Aota S, Globus R K. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. J Cell Sci 1996, 109: 1369～1380.

[126] Katow H, Hayashi M. Role of fibronectin in primary mesenchyme cell migration in the sea urchin. J Cell Biol 1985,101: 1487～1491.

[127] Morla A O, Mogford J E. Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. Biochem Biophys Res Commun 2000,272: 298～302.

[128] Hedin U, Bottger B A, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle

cells. J Cell Biol 1988,107: 307～319.

[129] Laurent P, Olivier G, Myriam R, et al. Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. Protein Expression and Purification 1999,17: 146～152.

[130] Watson K E, Parhami F, Shin V, Demer L L. Fibronectin and collagen I matrixes promote calcification of vascular cells in vitro, whereas collagen IV matrix is inhibitory. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998,18: 1964～1971.

[131] Ding H-T, Wang C-G, Zhang T-L, Wang K. Fibronectin enhances in vitro vascular calcification by promoting osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells via ERK pathway. J Cell Biochem 2006,99: 1343～1352.

[132] Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang A, Deng J M, Behringer R R, de Crombrugghe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 2002,108: 17～29.

第 8 章　病理性矿化Ⅱ——结石与牙的病理矿化

生物矿化包括正常生物矿化和异常生物矿化。正常生物矿化是指各种生物矿物的正常生成，如骨骼、牙齿和贝壳等硬组织或矿物的形成，这些硬组织或矿物中含有的组分如羟磷灰石（HAP）、方解石等在组成上与自然界岩石相同，但由于生物矿物是在特定的生物条件下形成，因而具有特殊的高级结构与组装方式。

异常矿化也称病理矿化，如泌尿系结石、胆结石、牙石和龋齿等的形成。病理矿化与正常矿化的区别是：正常矿化是在生物体内一定部位上发生、并按照特定的组成、结构和程度完成的受控过程，即在热力学上控制矿化/脱矿平衡，在动力学上控制矿化速率。病理矿化则属于失控过程，是在不应该形成的部位矿化（即异位矿化），如结石的形成，或矿化进行的程度过高或过低，如牙石、龋齿等的形成。

异常生物矿化过程涉及医学、生物学、化学、结晶学、材料学和矿物学等多种学科，因而也引起了这些领域专家的广泛关注和高度重视。深入研究它们的形成机理和生物矿化特征，不但有助于治疗异常矿化引发的人体疾病，而且有助于新型材料的开发和应用。

8.1　泌尿系结石

泌尿系结石是指在泌尿管道内的一种固体物质的产生，俗称尿结石或尿石。尿石包括肾结石、输尿管结石和膀胱结石等。尿石症是一种世界范围的常见病、多发病，其发病率呈上升趋势[1]。不同地区的结石发病率在 3%～14%之间。在我国，尤其是在广东省及港澳地区，尿石与鼻咽癌一样，成为一种严重的地方病。许四虎等[2]于 1997 年对深圳市 5 个区的尿石调查表明，仅肾结石的患病率就高达 4.87%，如果加上输尿管结石、膀胱结石和尿道结石等，尿石的总发病率应在 10%～15%。欧阳健明课题组 2003 年对广东省东莞市桥头镇进行了病例普查，在接受普查的 15 040 人中，发现尿石患者 2 273 例，患病率高达 15.11%。

在研究过程中,不同的学者已从不同的角度讨论过这些问题,但至今,有关尿石的形成机理、尿石的诱导因素和抑制因素仍然没有完全弄清楚,80%以上的尿结石患者病因不明[3]。目前临床上对尿石症的预防也尚无十分理想的方法,在治疗上主要采用无机磷酸盐、枸橼酸盐类及噻嗪类利尿药等,但对上述药物的具体作用机理的了解还很不清楚[4]。因此,预防尿石形成、延缓其复发、减轻尿石症患者的痛苦,具有极为重要的科学和现实意义。

泌尿系结石由无机晶体和有机基质两部分组成,其中晶体物质占结石干重的 97%~98%,其主要成分为一水合草酸钙($CaC_2O_4 \cdot H_2O$,COM),二水草酸钙($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$,COD)和尿酸($C_5H_4N_4O_3$,UA),也含有一定比例的三水草酸钙($CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$,COT)、羟基磷灰石($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$,HAP)、磷酸三钙($Ca_3(PO_4)_2$,TCP)、磷酸八钙($Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot H_2O$,OCP)、磷酸镁铵($MgNH_4PO_4$)、尿酸钙($CaC_5H_2N_4O_3$)和 L-胱氨酸($C_6H_{12}N_2O_4S_2$)等。这些晶体物质因晶体形态、物相和微观结构的不同,又以不同的物质形式出现,因而结石的种类共计有 20 种以上。不同的结石具有不同的硬度,从高到低依次为:羟磷灰石(5.0)→COD(4.0)→COM(2.5~3.0)→尿酸(2.5)→胱氨酸、磷酸氢钙和磷酸镁铵(2.0)。

一般情况下,泌尿系结石中草酸钙(CaC_2O_4)约占 70%,其中纯草酸钙结石约占 40%[5],其他的钙盐和镁盐约占 15%、尿酸约占 15%、L-胱氨酸约占 1%。其中尿酸盐和胱氨酸结石易在酸性尿中形成;磷酸盐、碳酸盐结石易在碱性尿中形成;而在生理尿 pH 值条件下易形成草酸盐结石,因而草酸钙结石最为常见。肾和输尿管结石(即上尿路结石)以草酸钙与磷酸钙为主,而膀胱结石和尿道结石(即下尿路结石)则以尿酸盐及磷酸盐成分为多。

8.1.1 草酸钙结石

8.1.1.1 草酸钙在结石中的存在形式

在草酸钙晶体的 3 种存在形式中,COM 是热力学稳定的。虽然尿中会发现 COD 晶体,但是 COM 是尿中最普遍的晶体形态。属于三斜晶系 COT 热力学不稳定,其首先是在合成沉积实验中发现的,以后通过 X 射线和光学方法在对 25 000 个尿结石样品的研究过程中,发现其亦为尿石中一种成分[6]。在德国德沃尔姆的国立泌尿系疾病治疗中心,用红外分析和扫描光电子显微镜研究发现,12.7%的结石表面含有 COT。COT 在草酸钙结石形成过程中可能起着前驱体的作用。

COM 晶体的生成与草酸根的浓度有关。病理学上认为，如果患有高草酸尿、肠道炎症或摄入富含草酸的饮食，便容易在尿中形成高浓度的草酸根，从而引发 COM 的形成。钙离子与草酸根离子的比例过高则易引起 COD 的形成[7]，如肾中钙含量过高、甲状腺功能亢进或肠道吸收的钙过多都易引发高尿钙的形成，从而引发 COD 的生成。区别 COM 和 COD 对于准确诊断结石的成因非常重要，而正确检测判断尿石中两者的比例，对于提出正确的治疗方法和防止其复发亦必不可少。

COM 属于单斜晶系，晶胞参数 $a=9.976$ nm，$b=7.294$ nm，$c=6.291$ nm；COD 属于四方晶系，体内 COD 常以四角双锥的形式存在，晶胞参数 $a=12.30$ nm，$c=7.34$ nm[8]。COD 不但存在于人体结石中，在心脏、骨骼、中枢神经组织以及动脉组织液中也发现有 COD 的沉积[9]。由于 COM 和 COD 晶体在某些晶面存在尺度、电荷密度等的差异，COM 晶体与肾小管细胞的接触程度比 COD 更大，因而 COM 与肾小管细胞表面有较强的亲和力[10]。

草酸钙究竟以 3 种水合物的何种形式析出，不但取决于溶液的 pH 值、温度、过饱和度和钙离子/草酸根离子的比率等参数，还取决于尿液中存在的大分子物质。在草酸钙结石患者的尿液中，草酸钙的过饱和度要稍高于非结石患者，但钙离子、草酸根离子的浓度、草酸钙过饱和度在两类人群的分布相互交替[11]，因此说过饱和度只是结石形成的一个充分条件而非必要条件。

正常情况下，尿液中含有草酸钙结晶生长和聚集的抑制物和促进物，其中钙离子、草酸和尿酸是主要的促进物。尿液中草酸钙的过饱和度是草酸钙结石形成的化学驱动力，尿中钙离子和草酸根离子浓度过高导致尿液过饱和度增加，导致尿中草酸钙晶体生长和聚集的化学动力学速率加快，加大尿石复发概率。尿液中的大分子、镁离子和枸橼酸等小分子物质和微量元素是草酸钙结石的主要抑制物。它们与草酸钙晶体作用，并影响不同的矿化动力学过程。在正常人尿液中存在的各组分混合物，呈现出下述 3 种影响作用：动力学控制、结构改变和形态改变[12]。增加尿内抑制物浓度、降低尿内促进物浓度，是阻止草酸钙结石复发和生长的重要措施。

8.1.1.2　草酸钙结石中的有机基质及其作用机理

草酸钙结石中有机基质占干重的 2%～3%，虽然含量不多但组成却十分复杂。采用双向电泳法可分辨出草酸钙结石的有机基质中含有 700 多种蛋白质[12]，其中主要有尿凝血酶原片段 1(UPTF1)、TH 蛋白、肾钙素、葡氨聚糖和骨桥蛋白等。

这些基质中的大分子物质部分，由于已形成的结石对肾小管产生损伤而

释放出来,并随后参与草酸钙结石的形成。由于这些大分子物质的相对分子质量、化学结构和化学性质各不相同,因而对草酸钙结石形成的影响也互不相同。对于正常人和尿石患者,即使是相对分子质量相同的大分子,其影响也存在明显差异,这种差异是引起尿石形成的一个重要因素,同时也极有可能是进一步探讨尿石症发病机理的一个新突破口。现已发现,尿中有机大分子物质包覆在草酸钙结石中是一个有选择的过程。

有机基质大分子在草酸钙结石形成过程中起着如下作用:①作为矿化的模板,提供晶体的生长位点,既能诱导晶体有序成核,又能在结晶生长和聚集中起抑制作用。尿液的有机基质大分子表面带有大量的来自糖醛酸与硫酸基的负电荷,在尿中形成大分子聚阴离子,吸附在草酸钙晶体表面,并与晶相的生长位点结合,导致晶体的生长产生缺陷,并阻止游离的晶体粒子的渗入。②作为钙离子的配位剂。例如,每微摩尔硫酸软骨素二糖可结合 0.757 μmol 钙离子,从而降低草酸钙晶体的饱和度,提高尿液抑制草酸钙晶体形成的活性。③作为软组织与硬组织的联结物。④保护尿路黏膜,防止细菌粘附在尿石盐晶体表面。⑤作为矿化的促进剂。

必须注意的是,某些物质在不同的矿化动力学过程中,其作用可能也会不同,既可以表现为抑制剂,也可以表现为促进剂。抑制活性的强弱不单与其相对浓度的大小和分子结构有关,还与尿液本身的理化性质有关。例如,尿液 pH 值对焦磷酸盐、二磷酸盐、枸橼酸的抑制活性有影响;高浓度的尿酸盐对酸性粘多糖的抑制活性有影响;非聚合状态的 TH 蛋白为抑制物,而聚合状态的 TH 蛋白变为促进剂。

下面分别讨论草酸钙结石中几种主要基质大分子对草酸钙结石的作用机理。

1. 尿凝血酶原片段 1(UPTF1)

尿中蛋白质含量最多的是尿凝血酶原片段 1(UPTF1),原来被称为晶体基质蛋白(CMP)。其相对分子质量为 30 kD,等电点为 5.1～5.8。UPTF1 是草酸钙晶体生长和聚集的强抑制物,对防止体内结石形成具有重要作用。

尿凝血酶原(PT)在体内可分解为 3 个片段——分别为片段 1(UPTF1)、片段 2(UPTF2)和凝血酶™,其中 UPTF1 具有在体内原位指导草酸钙晶体形成的作用[13]。UPTF1 能在人或老鼠的肾脏中生物合成,这一事实为利用已经建立的研究草酸钙结石的老鼠模型来评价结石形成条件对凝血酶基因表达的影响以及 UPTF1 在体内的潜在作用提供了一个机会。UPTF1 仅在肾脏中发生作用,在这个矿化区域中,结石病人所含的 UPTF1 要比健康人的含量低。女性尿草酸钙晶体基质中 UPTF1 的含量高于男性,这也许是女性尿石发病率低于男性的原因之一。从黑人尿中分离的 UPTF1 对结石盐晶体

的生长和聚集具有比白人更强的抑制活性，因此，黑人对尿结石具有较强的免疫功能，其尿石症患病率低于白人。

Grover 等[14]比较研究了 PT、UPTF1、UPTF2 和凝血酶™对草酸钙晶体生长的影响。在空白实验组（没加添加物）中，晶体粒径大都为 13.3 μm 左右；加入凝血酶™后，粒子的平均尺寸稍有下降，为 11.8 μm；加入 UPTF2、PT 后，平均粒径分别为 9.2 μm 和 8.7 μm；但加入 UPTF1 后，平均粒径仅为 5.6 μm，并且有一部分晶体检测不到。由此可见，在尿凝血酶原及其 3 个分解片段中，UPTF1 对草酸钙晶体生长的抑制作用最为显著。用^{14}C 标记草酸根实验表明，尿凝血酶原及其三个分解片段对草酸钙晶体生长抑制能力大小顺序依次为[14]：UPTF1(44%)＞PT(27.4%)＞凝血酶™(10.2%)＞UPTF2(6.5%)。分析这 4 个蛋白质分子结构可知，PT 和 UPTF1 抑制活性高是由于其存在 γ-羧基谷氨酸残基，而 TM 和 UPTF2 不具有 γ-羧基谷氨酸残基。实验表明[15]，UPTF1 对草酸钙结石的抑制作用依赖或部分依赖其 N-末端区域 10 个谷氨酸残基的 γ-羧基化，γ-羧基化程度越高，对草酸钙的结合能力越大，抑制作用越强。

用^{14}C 标记草酸同位素方法实验进一步表明[16]，晶体在肾上皮细胞发生粘附和胞吞作用后，UPTF1 对草酸钙晶体的生长和聚集均有明显的抑制作用，且对草酸钙晶体聚集的抑制大于对生长的抑制，如当 UPTF1 浓度达到 10 mg/L 时，将彻底阻止草酸钙形成大的结晶体。Stapleton 等[17]从 8 个肾脏、2 个脾和 1 个肝脏中分离出核苷酸，通过逆转录聚合酶链反应，用琼脂糖-胶体电泳等方法分析出了与 UPTF1 相对应的 mRNA，首次证明了凝血酶基因在人肾脏中表达，此发现对结石病的治疗具有潜在的应用价值。

2. Tamm-Horsfall 蛋白

Tamm-Horsfall 蛋白（TH 蛋白）是尿液中未被透析部分的第一个被确定的粘蛋白，早在 1950 年，Tamm 和 Horsfall 就分离并鉴定了此尿粘蛋白，并取名为 TH 蛋白。TH 蛋白的相对分子质量约为 7×10^3 kD，其中 66%是蛋白，12%是己糖，11%是 N-乙酰己糖胺，其余为岩藻糖、唾液酸和少量的脂[18]。TH 蛋白是尿液中含量最多的蛋白质，24 h 排泄量为 20～200 mg。TH 蛋白可在肾结石和膀胱结石中找到，尿类粘蛋白可能是 TH 蛋白与未鉴定粘蛋白的聚合体。

TH 蛋白由于其特殊结构及物理化学性质，使得它与晶体的结合不同于其他尿大分子，TH 蛋白主要以胶体化学中的“空间稳定机理”或“空间阻碍”起作用。在晶体基质形成过程中，TH 蛋白因电荷和糖基的修饰及分子空间构象发生变化，引起等电点的改变。体外实验证明，TH 蛋白对草酸钙结石形成的动力学过程有双重作用[19]。在生理状态下（pH 较高，离子强度较低），

TH 蛋白附在晶体表面,对草酸钙晶体生长和聚集均具有强的抑制作用;当 pH 降低、尿液浓缩(自身浓度增加)、离子强度增大,或有二价金属离子(如 Ca^{2+}、Mg^{2+} 等离子)存在时,TH 蛋白自身可迅速聚合,进而变性成凝胶状、粘度增加,从而减弱或失去其抑制作用,甚至转而有促进作用[20]。

Laube 等[19]用 Bonn 危险指数(BRI,$BRI=[Ca^{2+}]/[C_2O_4^{2-}]$)数据说明了尿中 TH 蛋白与草酸钙结晶的关系,BRI 值反映了个体形成草酸钙结石的危险性。当尿中草酸钙饱和度相同时,尿大分子的组成不同可导致不同的 BRI 值。正常人与尿石患者尿液中 TH 蛋白的浓度与 BRI 的关系如图 8.1 所示,病人的 BRI>1,表明其处在"危险"状态,结石发生率高;而正常人 BRI≤1,表明其处在"不危险"状态,结石发生率低。

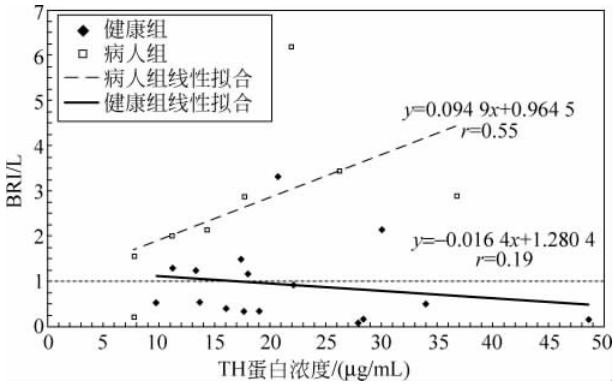


图 8.1　尿 TH 蛋白平均浓度与 BRI 关系图[19]

当 TH 蛋白和柠檬酸盐协同作用时,可以增加对 COM 晶体的聚集抑制性[18]。草酸钙结石患者的 TH 蛋白和枸橼酸盐的排泄量均比正常人低。Harold 等跟踪调查了 33 例钙结石病人,测定了口服枸橼酸钾对尿液中 TH 蛋白、柠檬酸盐排泄速率的影响,以及对 COM 聚集抑制活性的影响,得出如下结论:枸橼酸钾对钙结石病人的有效治疗是由于 TH 蛋白含量提高所致。

3. 肾钙素

肾钙素(NC)是相对分子质量相同而等电点不同的一组物质。不同来源的 NC,其相对分子质量及蛋白含量略有不同,分别为 13.3～17 kDa 和 61.6%～96.5%[21]。在患有肾脏癌细胞的病人尿液中,肾钙素的含量随着病情的发展而升高。肾钙素在尿中可以通过与钙、镁等二价离子连接,形成二聚、三聚甚至四聚体,以物理性吸附结合到草酸钙晶体表面;而二价金属离子通过与 NC 作用,参与到草酸钙晶体的结晶过程中。

草酸钙结石病人的肾钙素中，酸性的 γ-羧基谷氨酸（Gla）总量低于正常人，而碱性的 γ-羧基谷氨酸总量高于正常人。当 γ-羧基谷氨酸与铜离子、维生素 C 作用时，肾钙素的 γ-羧基谷氨酸被铜离子分成两个肽链部分。进一步的实验表明，从哺乳动物尿中分离得到的肾钙素至少有 4 种异构体，按洗提的顺序，分别为 NC-A、NC-B、NC-C 和 NC-D[22]。4 种异构体的区别在于 γ-羧基谷氨酸残基的不同。NC-A 和 NC-B 中含有 γ-羧基谷氨酸残基，而 NC-C 和 NC-D 比 NC-A 和 NC-B 含有更多的磷酸根。正常人排泄更多的 NC-A 和 NC-B 异构体，而结石病人尿含有更多的 NC-C 和 NC-D。分析结石中的有机基质，同样发现 NC-C 和 NC-D 的含量比 NC-A 和 NC-B 异构体多。体外模拟表明，NC-A 和 NC-B 异构体是 COM 晶体生长和聚集的强抑制剂；而 NC-C 和 NC-D 不具有抑制活性。

用 Lauda 薄膜平衡测量得到的表面张力揭示 NC-A 和 NC-B 异构体是较强的两亲分子，而 NC-C 和 NC-D 异构体具有更小的两亲性。在形成 Langmuir 单分子膜时，NC-A 具有伸长的形状，可以形成稳定的单分子层，每个分子占据较小的面积，最高表面压为 41.5 mN/m[22]，这有利于抑制草酸钙晶体的生长。在体内，肾钙素可以可逆地结合到草酸钙晶体表面的生长点上，从而达到抑制晶体生长的目的。而结石病人尿液及结石基质中提取出的 NC-C 和 NC-D 由于缺少 γ-羧基谷氨酸，在气-液界面形成的单分子层所占据的面积大，能耐受的最大崩溃压仅为正常人尿液中肾钙素的一半，导致其对 COM 晶体生长和聚集的抑制活性降低。正常人尿中肾钙素对 COM 的抑制活性最强，其次是结石中的肾钙素，结石病人的肾钙素抑制活性最低。NC-A 在低浓度下使草酸钙几乎全形成 COM，但在高浓度下，NC-A 有利于 COD 的形成。

从草酸钙结石患者尿中得到的肾钙素（L-NC）和从草酸钙结石中分离得到的肾钙素（S-NC）均抑制 COM 晶体的聚集，但其抑制能力只及正常人尿中肾钙素的十分之一。因此，肾钙素是正常人尿液中 COM 晶体聚集的主要抑制剂之一，而 L-NC 和 S-NC 是有缺陷的聚集抑制剂。

用平衡透析法、^{31}P-NMR 和电子自旋共振光谱研究表明，每个肾钙素分子通过氧原子与 4 个钙离子定量结合[23]。NC-A 和 NC-B 异构体与 Ca^{2+} 结合后，自身结构发生改变，而 NC-C 和 NC-D 的结构不变。从 3 组小鼠尿液肾钙素的氨基酸分析观察到，肾钙素均含有较多的酸性氨基酸，其中谷氨酸（Glu）、天冬氨酸（Asp）和 γ-羧基谷氨酸（Gla）占总氨基酸的 19.4%～21.1%[24]。结石病人尿肾钙素中酸性氨基酸总量低于正常肾钙素，碱性氨基酸总量高于正常。

4. 葡胺聚糖

葡胺聚糖(GAGs)是一系列没有分支的具有不同长度的聚阴离子多糖链,由己糖醛酸和己糖胺通过 β_{1-3} 和 β_{1-4} 交联组成[20]。除己糖醛酸外,其余部分均硫酸化。部分 GAGs 的化学结构式如图 8.2 所示。

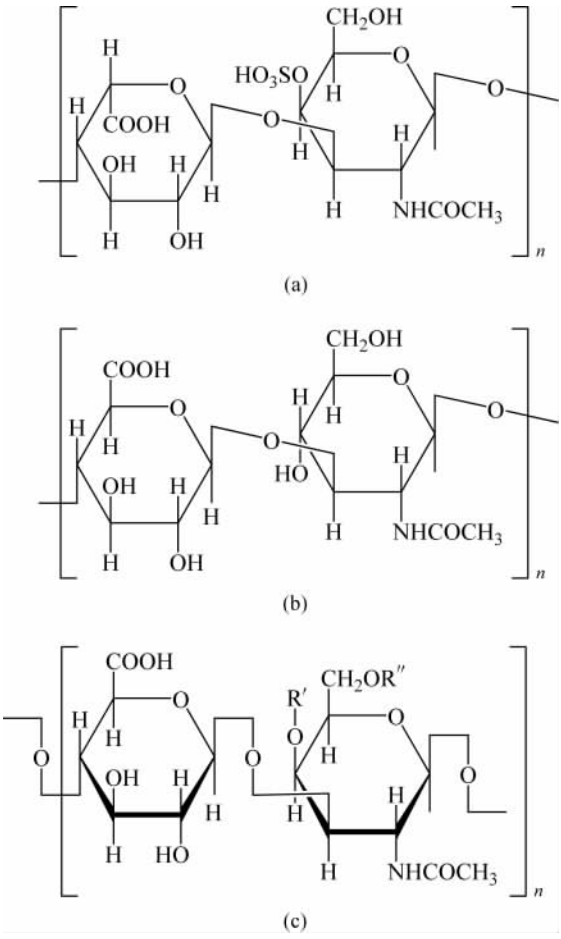


图 8.2　尿中部分 GAGs 的化学结构式[20]

(a) 透明质酸(HA);(b) 硫酸皮肤素(DS);(c) 硫酸软骨素 A(C_4S),$R'=SO_3H$,$R''=H$;硫酸软骨素 C(C_6S),$R'=H$,$R''=SO_3H$

GAGs 包括 8 种物质:软骨素、硫酸软骨素 A、硫酸软骨素 C、硫酸皮肤素、透明质酸、肝素、硫酸已酰肝素和硫酸角质素。正常人尿液的葡胺聚糖中,55%～60%为硫酸软骨素 A 或 C,15%～22%为硫酸类肝素,11%～15%为低硫酸化的硫酸软骨素和硫酸角质素,4%～10%为透明质酸[25]。

肝素是唯一不在尿液中自然存在的葡胺聚糖成分。硫酸已酰肝素和硫酸皮肤素均为非游离体，其与蛋白质结合，以蛋白聚糖或糖蛋白形式存在。葡胺聚糖在不同情况下被草酸钙晶体吸收到活性生长部位，是降低结晶生长率的原因。

临床统计表明，妇女和儿童的草酸钙结石患病率低于成年男性的患病率。Osamu 等[26]研究了儿童和成年人尿中大分子对草酸钙晶体的抑制作用，观察到儿童原尿的抑制作用比成年人的明显要强；但去除尿液中的大分子之后，两者作用相同。同时还观察到儿童和成年人尿液对草酸钙晶体生长的抑制作用相当，但对于草酸钙晶体的聚集，儿童尿的抑制作用明显增强。通过进一步的比较分析得知，尽管儿童和成年人尿液中其他尿大分子浓度没有什么区别，但儿童尿中所含葡胺聚糖要多于成人尿。妇女肾脏中葡胺聚糖的排泄量也大于成年男性，因此妇女和儿童草酸钙结石患病率低于成年男性是后者葡胺聚糖排泄量相对较小所致。

Winter 等[24]研究了 50 例草酸钙结石患者在体外震波碎石(ESWL)之前和之后 5 天内葡胺聚糖总量，及其 4 个组分硫酸软骨素 A(C_4S)、硫酸软骨素 C(C_6S)、硫酸皮肤素(DS)和硫酸已酰肝素(HS)的排泄量差异。以健康人尿中葡胺聚糖的排泄量为标准，结石患者的葡胺聚糖排泄量明显偏低。体外震波碎石 24 h 后，葡胺聚糖排泄量明显提高，但 3 天后又恢复正常值，同时体外震波碎石对葡胺聚糖中的 C_4S、C_6S、DS 和 HS 的组成比例没有影响。体外震波碎石治疗后葡胺聚糖排泄量的提高表明，肾组织和尿道上皮黏液层在此过程中应有短暂受损。

不同组分葡胺聚糖对 COM 晶体的形态有不同的影响。在有硫酸软骨素 C 存在时，晶体在长度方向生长更快，而在宽度和厚度上生长较慢。X 射线微量分析发现，溶液中的硫酸皮肤素或肝磷脂可以嵌入到 COM 晶体中，但没发现硫酸软骨素[20]。葡胺聚糖在结石形成中的抑制作用取决于其硫酸化程度，硫酸软骨素比硫酸类肝素的硫酸化程度高，因而其抑制作用也大，透明质酸(HA)中不含有酸性硫酸盐，故其抑制活性较低。一些人工合成的葡胺聚糖，如对硫酸聚戊糖(SPP)、G871 和 G872 的结构与肝素类似，故也能抑制草酸钙晶体的生长和聚集，如硫酸聚戊糖试用于临床已经初见成效。

用晶体粒度分布测定技术，测定水解前后正常人及结石患者尿中硫酸聚戊糖对草酸钙晶体形成的影响，研究结果表明：葡胺聚糖含量分别与草酸钙晶体的生长抑制指数(I_g)和聚集抑制指数(I_a)成正比，进一步明确了 GAGs 对草酸钙结石形成的抑制作用，I_g 和 I_a 分别为

$$I_g = \frac{(V_c - V_o) - (V_t - V_o)}{V_c - V_o} \times 100\%;$$

$$I_a = \frac{(N_c - N_o) - (N_t - N_o)}{N_c - N_o} \times 100\%$$

式中 V_o、N_o 分别为零时刻的粒子体积和总数；V_t、V_c 分别为孵育后实验组与对照组的粒子体积；N_t、N_c 分别为孵育后实验组与对照组的粒子总数。

葡胺聚糖对草酸钙晶体生长和聚集的抑制机理，在于 GAGs 的分子表面带有大量的来自糖醛酸与硫酸基的负电荷，在尿中形成大分子聚阴离子，它吸附在草酸钙晶体表面，并导致晶体的生长缺陷，阻止游离的晶体粒子的渗入，增加晶体的 Zeta 电位，使尿液中晶体颗粒之间相互排斥，从而起到抑制草酸钙晶体生长和聚集的作用。同时，葡胺聚糖可与游离钙离子结合，降低草酸钙晶体的饱和度。动物实验表明，强亲水性的葡胺聚糖可形成水膜屏障，阻挡晶体与膀胱黏膜之间的作用，从而阻止草酸钙晶体的粘附。

5. 其他基质大分子

除 TH 蛋白外，还有含 γ-羧基谷氨酸的蛋白质、骨桥蛋白(OPN)、白蛋白、α 球蛋白、γ 球蛋白和血清蛋白等对尿结石的形成能够形成影响。含 γ-羧基谷氨酸的蛋白质，由于 γ-羧基谷氨酸具有结合钙的能力，可造成一个局部高浓度钙负荷，有促进结石最初的成核作用，然后又可被吸附到晶体表面，加速结晶的生长和聚集。骨桥蛋白是一种富含唾液酸的磷酸化糖蛋白，近来的研究发现，在体外骨桥蛋白具有抑制草酸钙晶体生长的活性。关于其他几类蛋白对于尿结石形成的研究尚在进行之中。

8.1.2 尿酸结石

8.1.2.1 尿酸结石的分类和理化性质

尿酸结石常见于肾和输尿管，其发病率随国家与地区的不同而不同，占尿石的 5%～40%，如美国的尿酸结石占 5%～10%[27]，仅次于草酸钙结石。欧阳健明等[28]研究表明，广东省泌尿系结石患者中尿酸结石的比例占 30%，比 20 年前的 20%[3]明显增加。

尿酸即 2,6,8-三羟基嘌呤，是一种弱的有机酸，难溶于水，易溶于碱。当尿液中尿酸浓度超过其溶解度时即会出现结晶，进而沉积为结石。尿酸结石包括纯尿酸结石、部分含钙的尿酸结石和混合型尿酸结石。含钙的尿酸结石中，常以 COM 为晶核或 COM 散布尿酸结石中，但未观测到有磷酸钙或磷酸镁掺杂于尿酸结石中。混合型尿酸结石常常由尿酸、尿酸铵、尿酸钠等混合而形成。尿酸结石中含有约 2%(质量分数)的细丝状有机基质，以形成晶体边缘的连续网状结构。

按照其形成机制不同，尿酸结石可分为Ⅰ型和Ⅱ型两类[29]：Ⅰ型尿酸结石由尿酸的微细结晶自然生长而成，大约占尿酸结石的 53%；Ⅱ型尿酸结石

为沉淀型结石，约占尿酸结石的 39%，主要由无水尿酸晶体、能转化成无水尿酸的大块二水尿酸晶体、有机物和一水合草酸钙颗粒组成。二水尿酸晶体表面有平行纵向裂纹(图 8.3(b))，结石内部呈现多孔状(图 8.3(a))。

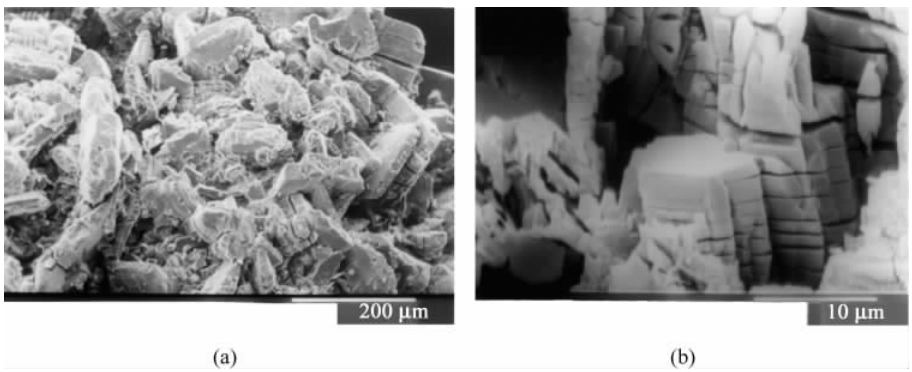


图 8.3　沉积型尿酸结石的 SEM

(a) 内部的无序结构；(b) 大块的将转化为无水尿酸的原生二水尿酸晶体[29]

无水尿酸的晶体的晶胞参数为：$a=14.464$ Å，$b=7.403$ Å，$c=6.208$ Å，$\beta=65.10°$。在 37℃饱和溶液中生成的无水尿酸晶体主要为分层结构，层与层之间存在 6.56 Å 的空隙。每一层都由相同的带状物——尿酸分子间的氢键以头碰头、尾对尾的方式组成，但层与层之间没有氢键。二水尿酸晶体的晶胞参数为：$a=7.237$ Å，$b=6.363$ Å，$c=17.449$ Å，$\beta=90.51°$。在 24℃饱和溶液中生成的大部分晶体为无序或双生的二水尿酸。二水尿酸不稳定，会缓慢地脱水变为无水尿酸。二水尿酸的层状结构与无水尿酸相似，加上氢键上的水分子，其相邻层的空隙达到 8.73 Å。

人体中的尿酸来源于饮食、人体自身合成和组织分解。饮食来源主要是由人体摄入的肉类、鱼类、禽类等富含嘌呤的食物分解而来。虽然受个体影响差异很大，但大多数情况下饮食来源的尿酸占总生成量的 40%[30]，也有人认为人体中的尿酸只有少数来源于饮食。目前尿酸结石患病率增加可能与人们的饮食条件改善有关。人体合成的尿酸主要在肝细胞中进行，其反应步骤复杂，包括次黄嘌呤核苷酸(IMP)的生成以及腺嘌呤核苷酸(AMP)、鸟嘌呤核苷酸(GMP)的合成。组织分解的尿酸来源于人体正常的新陈代谢产生的嘌呤核苷酸，经由次黄嘌呤核苷酸分解为尿酸，一般经此来源的尿酸量相对较少且稳定。但在异常情况下(如骨髓增生性疾病、化疗等)，由于体内细胞大量坏死，核酸分解，将造成嘌呤、尿酸异常增多。

8.1.2.2 尿酸结石形成机理

1. 低pH值尿引发尿酸结石

尿酸生成以后,在血液循环中99%的尿酸以尿酸钠的形式存在,尿酸钠可溶于水,其中约2/3通过肾小球滤过后经尿液排出,其余1/3由肠道细菌分解为尿素、或由尿酸酶作用进一步氧化成氨和二氧化碳排出。

尿酸在37℃时的pK_a=5.35,其在尿液中的溶解度前取决于尿液的pH值。当尿液pH=5.0时,尿酸溶解度为80 mg/L;pH升至6.0和7.0时,溶解度增加至240和1 540 mg/L。pH为7.4时,绝大多数尿酸以尿酸钠的形式存在于血液、组织间液及肾间质中;当pH超过7.4时,尿液中钙盐易形成结石沉淀,并有促进磷酸盐结石形成的危险;而当pH低于5.5时,所有正常人尿中的尿酸都呈过饱和状态;当pH<5.0时,即析出尿酸结晶。

低pH值尿液是尿酸结石形成的最主要原因。虽然非尿石患者体内也间歇地产生尿酸,但周期性的碱化尿液可以充分保护他们免受尿酸结石的痛苦。有学者通过每隔3 h测定尿液pH值研究每天尿pH值的起伏变化,发现正常人一天的尿pH值范围(4.8~7)变化大,而尿酸结石患者则保持在比较低的水平(4.8~5.5)[31],因而易形成尿酸结石。

2. 高尿酸尿和尿量不足引发尿酸结石

嘌呤代谢紊乱所致高尿酸血症和高尿酸尿症,使血液和尿液中的尿酸量剧增,易引起尿酸结石和诱发含钙结石形成。正常人尿液中尿酸含量在170~500 mg/L的范围内。当尿酸浓度超过550 mg/L时,为高尿酸尿症,尿酸浓度的最高纪录为1 200 mg/L[29]。夏天天气炎热,汗腺排出较多,导致尿量减少,尿液中尿酸浓度急剧上升,易引发尿酸结石;冬季饮水量降低也容易导致尿量不足而引发尿酸结石。

3. 基因突变引发尿酸结石

据报道,美国的尿酸结石占尿石的5%~10%,德国占25%,以色列则高达39.5%[27,31],这种明显的地理和人种差异与遗传基因和周围环境息息相关。基因突变是在分子层面上引发尿酸结石的本质原因之一,尿酸结石与基于关键转化酶基因突变引起的各种先天性代谢缺陷有关。Craig[32]认为,意大利撒丁岛上的居民患尿酸肾结石与人类染色体10q21-q22有关,10q21-q22是一段新发现的基因。

虽然从基因的方面看,对尿酸结石产生的因素和地区性还未清楚,但是一种核苷编码变异,即丙氨酸被苏氨酸于62位替代(Ala62Thr),被认为与结石的显性有强烈的关系。近期又有研究者提出[32],尿酸代谢途径中的关联基因突变,与正染色体的隐性黄嘌呤尿以及肾结石的形成有关。

4. 其他原因引发尿酸结石

尿酸结石成因很复杂，除上述原因外，还与地区、环境、饮食、职业、性别、遗传因素、自身钙磷、草酸、嘌呤、代谢紊乱等因素有关。恶性肿瘤、骨髓增殖性疾病、慢性粒细胞性白血病和小儿白血病均可引起高尿酸尿症。在进行化疗时，由于大量细胞坏死，致使尿酸结晶沉淀，更易形成结石。胃肠道疾病所导致的失水过多也可引发尿酸含量激增。服用药物（如阿司匹林）过多也可能引起高尿酸尿，引发结石。人体缺少微量元素钼会使黄嘌呤氧化酶活性降低，嘌呤代谢不彻底，在肾中形成尿酸结石。

8.1.2.3　尿酸结石的体外模拟

由于不能在体内直接观察尿酸结石的形成过程，因而缺乏对其形成过程全面和直观的认识。在各种理论假设的基础上，科学工作者以尽可能与泌尿系统环境相似的实验条件下，在体外模拟尿酸结石的形成，以此提出假设和模型。

Felix 等[29]在 37℃将适量尿酸加入到合成尿中，先以氢氧化钠调节混合物的 pH 值，确保尿酸全部溶解，然后再加入盐酸，调节其 pH 值分别为 4.0 和 5.5，静置，在黑色背景下，肉眼即可看见液体中有明亮的颗粒。pH＝4.0 时，溶液中尿酸浓度为 170 mg/L；pH＝5.5 时，尿酸浓度为 1 500 mg/L，增加了 8 倍。此研究结果证明，尿酸在一定酸性条件下会自然形成结晶而析出于溶液。

在 pH＝4～5.5 的溶液中，尿酸生成薄而拉长的二水尿酸晶体（图 8.4(a)），或者生成薄片状二水尿酸晶体的聚集体（图 8.4(b)）。当二水尿酸晶体从悬浮液中分离 8 h 后，部分晶体会转化成厚六边形的无水尿酸晶体（图 8.4(c)）。而在悬浮液中的二水尿酸晶体则在 36 h 后仍然存在，48 h 后完全消失。在干燥的空气中，4℃下二水尿酸晶体要 4 天才完全转化为无水尿酸晶体，但在 40℃下只需 3 h。由此可见，在尿酸饱和度较高情况下，尿酸结石开始是以无水尿酸和二水尿酸形式共存的，且二水尿酸比无水尿酸更易形成；随着时间的推移，二水尿酸会全部转变成无水尿酸，即一段时间后，尿酸结石的成分为单一的无水尿酸；而在尿酸饱和度较低时，二水尿酸根本不会形成，尿酸结石成分仍为单一的无水尿酸[29]。

混合型尿酸结石中常含有 COM，研究尿酸与草酸钙混合溶液中晶体生长对了解混合型尿酸结石的形成具有重要意义。Bouropoulos 等[33]在 37℃和 pH＝4.5 条件下，用恒过饱和度方法在体外研究了 COM 在饱和尿酸中晶体的生长。结果表明，尿酸晶体可以诱导 COM 晶体的生长，在尿酸晶体上生成了长约 2 μm 的菱形 COM 晶体（图 8.5(b)）。动力学研究表明，在饱和尿酸中 COM 晶体的生长是由表面扩散机理控制的。

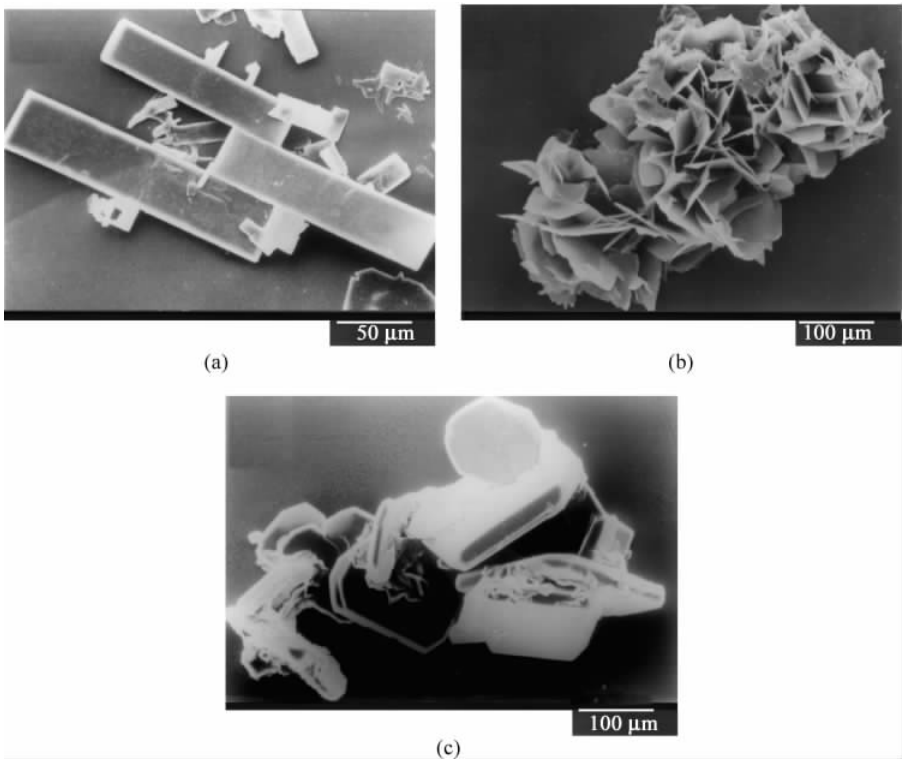


图 8.4　不同条件下尿酸晶体的 SEM

(a) 薄长型的二水尿酸,形成条件:37℃,pH=4.0,原尿酸浓度 170 mg/L;(b) 聚集的片状二水尿酸,形成条件:37℃,pH=5.5,原尿酸浓度 1 500 mg/L;(c) 由二水尿酸转化而来的六边形无水尿酸[29]

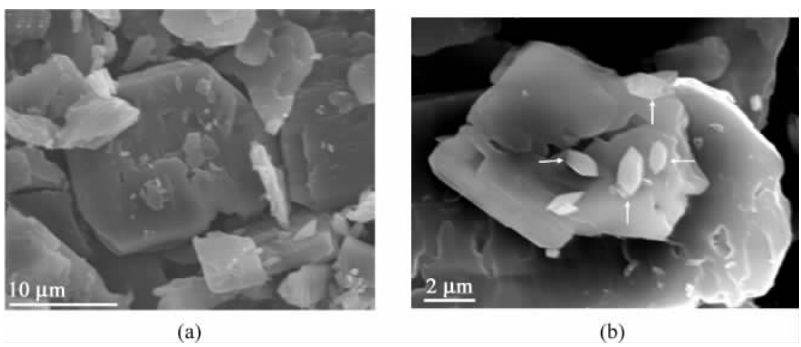


图　8.5

(a) 饱和尿酸溶液中形成的尿酸晶体;(b) 在尿酸晶体上生长的 COM 晶体(箭头所示)的 SEM 图像,生成条件为$[Ca^{2+}]=[C_2O_4^{2-}]=0.4$ mmol/L,pH=4.5,[NaCl]=0.15 mol/L,37℃[33]

8.1.3　磷酸钙结石

8.1.3.1　磷酸盐结石的分类及其理化性质

人体泌尿系结石中磷酸盐占 12%～20%。近 30 年来，磷酸盐结石呈上升趋势，特别是在女性结石患者中。尿结石中存在 8 种不同的磷酸盐：羟基磷灰石(HAP)、碳酸磷灰石、二水磷酸氢钙、三水磷酸氢钙、一水磷酸铵镁、六水磷酸铵镁、磷酸三钙和磷酸八钙，其化学命名、矿物名和化学式如表 8.1 所示。

表 8.1　磷酸盐尿结石

化学命名	矿物名	化学式
磷酸三钙	磷钙石	$Ca_3(PO_4)_2$
羟磷灰石	羟磷灰石	$Ca_5(PO_3)_3(OH)$
碳酸磷灰石	—	$Ca_{10}(PO_4,O_3)_6(OH,CO_3)_2$
磷酸八钙	—	$Ca_8H_2(PO_4)_6\cdot 5H_2O$
二水磷酸氢钙	透钙磷石	$CaHPO_4\cdot 2H_2O$
三水磷酸氢钙	—	$MgH(PO_4)\cdot 3H_2O$
六水磷酸铵镁	鸟粪石	$MgNH_4(PO_4)\cdot 6H_2O$
一水磷酸铵镁	—	$MgNH_4(PO_4)\cdot H_2O$

不同种类磷酸盐结石的理化性质(如密度和硬度)存在明显差异，其中碳酸磷灰石的密度最大(1.732 g/cm^3)，而二水磷酸氢钙的硬度最大(Vicker 硬度，727 MPa)。它们的 Ca/P 摩尔比也不同，磷酸铵镁结石(感染结石)的 Ca/P 摩尔比为 1.4～1.6，二水磷酸氢钙结石中 Ca/P 的摩尔比大约为 1，而羟磷灰石为 1.67。Ca/P 比可作为判别磷酸盐结石类别的依据之一。

8.1.3.2　磷酸盐结石形成和抑制的物理化学基础

尿液 pH 值是影响磷酸盐结石形成的一个主要因素。在较低 pH 值条件下，磷酸钙盐(碳酸磷灰石，HAP 和透钙磷石)的溶解度较大，随着 pH 值升高，所有磷酸钙盐的溶解度降低。同时，pH 值变化也会导致磷酸钙盐晶相发生转变。

Hojgaard 等[34]研究了不同 pH 值对溶液中磷酸盐沉淀类型和晶相的影响。当起始 pH 在 5.5～6.5 之间时，羟基磷灰石所占的百分数几乎相同，为 70%左右，但当起始 pH 值升至 7.0 时，羟基磷灰石百分含量降低至 40%。在起始 pH 值为 5.5 或 6.0 时没发现透钙磷石，而 pH 值升至 6.5 时发现少量的透钙磷石，pH 值为 7.0 时透钙磷石百分含量增大到 50%，而碳酸磷灰石的

百分含量几乎不随 pH 值而变化。Hojgaard 等还在离子组成与肾小管远端相同的溶液中研究了 pH 值对钙盐结晶的影响,当溶液体积减少至原始体积的 30%～40%,初始 pH 为 7.28 和 6.45 时形成的是磷酸钙盐,而 pH 值为 5.8 时可观察到磷酸钙盐和草酸钙的混合物。

Murayama 等[35]研究了结石病人的结石成分和尿 pH 值的昼间变化。尿酸结石病人的尿液 pH 值一直很低;草酸钙结石和草酸钙-磷酸钙混合结石的门诊病人的尿液 pH 值在清晨较低,白天逐渐升高,在夜间又降低;而磷酸铵镁结石病人的尿液 pH 值在全天中都很高。尿酸和草酸钙结石在酸性尿液中形成,而磷酸钙结石在碱性尿液中形成。在草酸钙-磷酸钙混合结石病人中,草酸钙晶体在 pH 值较低的早晨形成,而磷酸钙盐在 pH 值较高的下午和晚上形成,且当 pH 升高时形成的磷酸钙晶体更多。这些发现表明,尿液 pH 值可能在决定结石成分中起重要作用。

肾小管酸中毒和甲状旁腺机能亢进主要发生在女性群体中,这可能是女性结石患者易形成磷酸钙结石的原因。在结石和空白组中,女性血液均比男性更容易酸中毒,甲状旁腺机能亢进的病人血液也容易酸中毒,酸中毒后其尿液 pH 值会升高。

磷酸铵镁结石多见于泌尿感染,这可能与所感染的细菌能产生尿素酶有关。尿素酶分解尿素,形成 NH_3 和 CO_2,NH_3 进一步水解导致尿液中 NH_4^+ 浓度升高和碱性增强[36],从而使得尿液中磷酸铵镁处于过饱和状态,晶体析出。

由于磷酸钙结石多在碱性尿中形成,临床上防治磷酸盐结石的主要途径是降低尿液 pH 值,以增大磷酸盐的溶解度,如口服橙汁有利于预防磷酸钙结石形成。

8.1.3.3 抑制磷酸盐结石形成的体外模拟

尿液中存在柠檬酸盐、氨基葡聚糖和肌醇六磷酸等尿石形成的抑制剂,它们通过吸附在晶体表面、封闭晶体表面上的生长点、改变晶体表面电荷与能量分布等途径,改变晶体生长的动力学过程,对尿石的生长和聚集起抑制作用。

Grases 等[37]利用动力学比浊法研究了人造尿液中磷酸类抑制剂对羟基磷灰石(HAP)和二水磷酸氢钙($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$)结晶的抑制作用。结果表明,抑制 $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 结晶的能力按如下顺序递减:

肌醇六磷酸＞聚磷酸盐＞乙二胺-N,N,N,N-四(亚甲基二膦酸)(EDTPO)＞1-羟基-亚乙基-1,1-二膦酸＞焦磷酸盐＞三磷酸盐＞亚甲基二磷酸;

而抑制羟基磷灰石结晶的能力为

乙二胺-N，N，N，N-四（亚甲基二膦酸）（EDTPO）＞1-羟基-亚乙基-1，1-二膦酸＝焦磷酸＞三磷酸＞亚甲基二磷酸＞聚磷酸＞肌醇六磷酸。

从以上结果可见，尿液中存在的肌醇六磷酸能最有效地抑制二水磷酸氢钙沉积，而焦磷酸是有效阻止羟基磷灰石沉积的最强尿液抑制剂。不同磷酸类抑制剂对二水磷酸氢钙和羟基磷灰石结晶的影响，取决于抑制剂与所形成晶核之间的相互作用，或在二水磷酸氢钙和羟基磷灰石表面上不同的吸附/解吸速率。1-羟基-亚乙基-1，1-二膦酸对羟基磷灰石和二水磷酸氢钙形成的结晶抑制作用明显优于亚甲基二磷酸，这说明与磷酸基团相邻 α-C 上的羟基对磷酸钙结晶有影响。

白蛋白是 1 个比磷蛋白弱而比镁离子或柠檬酸盐强的抑制剂。Gilman 等[38]在 37℃和 pH＝7.4 时研究了白蛋白对羟基磷灰石生长的影响。随着白蛋白浓度增加，羟基磷灰石的起始生长速率呈线性下降，白蛋白抑制晶体生长，其抑制动力学与 Langmuir 模型一致。在 Langmuir 模型中，1 个白蛋白分子能与多个生长位点相结合。纯化的牛软骨蛋白多糖对种晶羟基磷灰石生长具有抑制作用，归因于这种蛋白多糖的流体动力学尺寸和高电荷密度。实验表明，蛋白多糖中的硫酸基团在磷酸盐沉积中起重要作用。在羟基磷灰石种晶上预涂上一层蛋白多糖，羟基磷灰石沉积量减少，表明蛋白多糖可以吸附在羟基磷灰石上，阻止其活性成核位点，减慢其生长速率。

柠檬酸盐是尿液中常见的小分子抑制剂，它能与尿钙络合，减少了钙离子与草酸盐和磷酸根离子相结合的机会，从而减少肾结石形成的可能性。在生理柠檬酸浓度范围内，柠檬酸抑制磷酸钙盐晶体生长和聚集，使磷酸钙盐晶体的尺寸较小。Højgaard 等[39]研究了不同 pH 值下柠檬酸盐对羟基磷灰石聚集的影响。[柠檬酸]＝0.05～4 mmol/L 时，柠檬酸对羟基磷灰石晶体聚集的抑制能力与浓度有关。在 pH＝6.8 的全尿中，添加柠檬酸盐可使磷酸钙盐晶体减少 42%，这说明尿柠檬酸盐在治疗磷酸钙结石中起有效作用。

在体外研究中发现，镁离子也能对磷酸盐的沉积产生影响。当[Mg^{2+}]＜4 mmol/L 时，只抑制缺钙羟磷灰石的成核，而当[Mg^{2+}]＞4 mmol/L 时，不但能抑制其成核，而且能抑制其生长，且磷酸镁的抑制作用比氯化镁要强。Mg^{2+} 抑制羟基磷灰石生长时，一部分 Mg^{2+} 取代 Ca^{2+}，掺和到羟基磷灰石结构中，Mg^{2+} 能使羟基磷灰石稳定性降低，有利于它转化为 β-磷酸三钙；剩下的 Mg^{2+} 吸附在晶面上抑制羟基磷灰石结晶，当聚丙烯酸与 Mg^{2+} 共存时，这种抑制作用得到加强。

8.1.3.4　磷酸钙结石形成和抑制的动物实验模型

应用尿石动物模型可以深入了解磷酸盐结石的形成过程，印证某些涉及

磷酸盐结石的代谢问题。将 30 只同系交配 44 代的雌性 Sprague-Davley 高钙鼠分为 3 组：第一组接受高磷饮食，第二组只接受中等磷饮食，第三组接受低磷饮食。实验持续 18 周，每隔 2 周收集 24 h 尿样，测量所有相关离子的浓度、草酸钙和磷酸钙的过饱和度，并在实验结束时解剖其肾、输尿管和膀胱，用 X 射线检测结石是否形成[40]。结果表明，高磷饮食的大鼠中有结石形成，而低磷和中等磷饮食的大鼠中无肾结石形成，表明降低饮食中磷的摄入可导致尿磷排泄降低，同时降低了尿液中磷酸钙的过饱和度。

8.1.4 胱氨酸结石

胱氨酸结石是指胱氨酸在肾脏异常积聚而形成的肾石病，常常在酸性尿中形成，尿液 pH 值大于 7.0 时胱氨酸结石溶解[41]。胱氨酸尿症是胱氨酸结石唯一的病因，胱氨酸尿症在全世界范围内的发病率为 1/7 000，在美国为 1/15 000，而在以色列为 1/2 500，在英国则高达 1/2 000。胱氨酸结石的发病率约为 1/15 000～1/7 000。尿路胱氨酸结石是这种疾病的唯一表现，占成年泌尿系结石病人的 1%～2%和儿童结石病人的 6%～8%。但在狗中胱氨酸结石的发病率为 2%～27%。

大多数人的胱氨酸结石在组成上几乎是纯胱氨酸，43%混有其他成分，主要为草酸钙和磷酸镁铵。

8.1.4.1 胱氨酸结石的基本性质

胱氨酸是一种含硫的氨基酸，L-胱氨酸的化学结构见图 8.6，熔点为 249.7℃。在所有氨基酸中，胱氨酸的溶解度最低[42]。胱氨酸的溶解度与 pH 值有关，在 pH=7.0 的尿中，胱氨酸的溶解度是 250 mg/L(相当于 1 mmol/L)，随着 pH 值增加其溶解度增加。当尿 pH 值提高至 7.5 时，其溶解度增加到大约 500 mg/L。虽然胱氨酸在尿中的溶解度比较低，但并不是所有胱氨酸尿病人都形成结石。

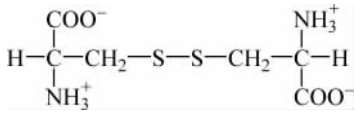


图 8.6 L-胱氨酸的化学结构

胱氨酸结石常呈黄绿色，带有闪亮微晶所形成的斑点，圆形外貌，不透明。图 8.7 为 Gürdal 等[43]报道的一例来自于 24 岁男性病人的胱氨酸膀胱结石，其质量高达 540 g，尺寸为 8.0 cm×10.0 cm×5.0 cm。胱氨酸结石的密度为 2.06 g/cm^3，比钙类结石密度小，其维氏硬度为 238 MPa，断裂韧性为 200 kPa/m$^{1/2}$，因此，胱氨酸结石属于弹性物质，变形力强，抗裂性高。胱氨酸结石的 X 线影像呈磨砂玻璃状，这是由于其分子中含有硫原子所致，胱氨酸结石亦可因含有其他成分而使 X 线影像密度有所改变。另外，少数患者晨尿中可

见苯环状结晶(即六方胱氨酸结晶)。

胱氨酸晶体的典型外貌为片状六边形,在 SEM 检测下,一些胱氨酸晶体呈现出几乎完美的六边形菱柱(图 8.8(a)),能量弥散 X 射线分析(EDX)获得了期望的硫特征峰。小球状磷灰石经常出现在人体和犬体胱氨酸结石核心(图 8.8(b)),有时甚至出现在那些被认为是纯胱氨酸的晶体中,这些小球的 EDX 分析仅给出磷和钙元素的峰。在一些样品也有时看到鸟粪石(EDX:磷和镁)的出现。含铵和钾的尿酸盐也出现在一些胱氨酸结石中,图 8.8(c)展现了含混合尿酸盐的一个区域的 SEM[41]。

图 8.7　巨大胱氨酸膀胱结石在骨盆内的显像图。该结石质量 540 g,尺寸 8.0 cm×10.0 cm×5.0 cm[43]

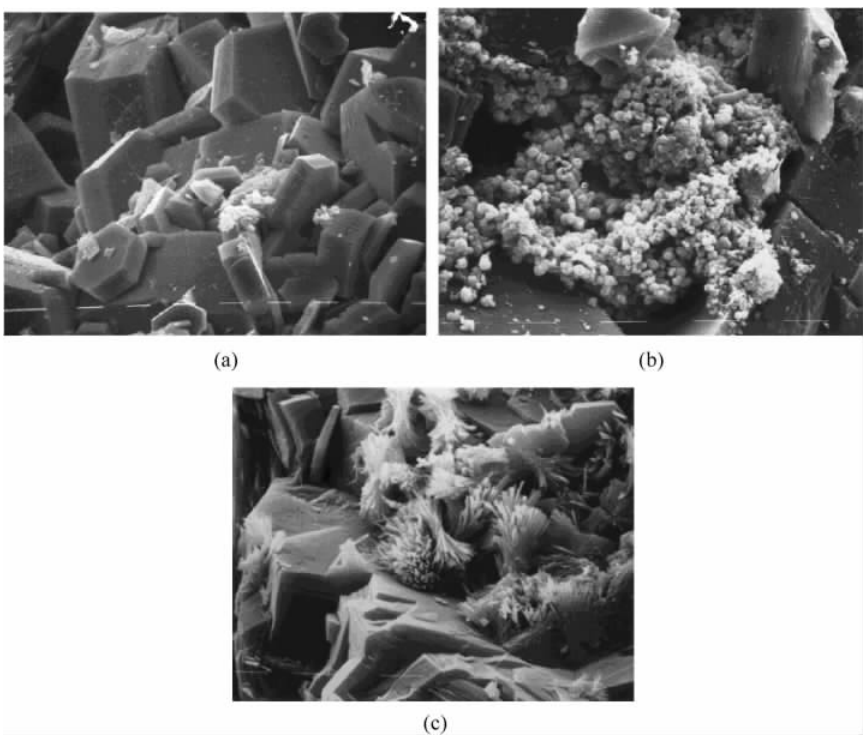


图 8.8　不同性质胱氨酸结石的 SEM

(a)片状六边形胱氨酸晶体(×640),EDX:硫;(b) 富含磷酸钙的胱氨酸结石(×1250),EDX:磷和钙;(c) 富含混合尿酸盐束晶的胱氨酸结石(×1250),EDX:钾[41]

8.1.4.2 胱氨酸结石的形成机理

1. 化学因素

如前所述,胱氨酸结晶主要取决于尿中胱氨酸浓度和尿液酸碱度(pH 值)[44]。在 pH=7.0 时,一旦尿液中胱氨酸的浓度超过 250 mg/L,胱氨酸就会从溶液中沉淀出来。如果能保持胱氨酸浓度在 200 mg/L 以下,胱氨酸结石就不会出现。由于电解质和大分子物质具有增溶作用,因而不同个体尿标本中的胱氨酸的溶解度迥异。

Nakagawa 等[45]研究了 24 例胱氨酸尿病人、22 例钙结石病人和 15 例正常人。正如所有研究者发现的那样,胱氨酸的溶解度随着 pH 值升高而升高,如图 8.9(a)所示。图 8.9(b)给出了尿液中胱氨酸的过饱和度,在正常人和钙结石病人中,没有一种尿液中胱氨酸的过饱和度大于 1.0(形成胱氨酸晶体的条件);而在胱氨酸病人中,有 9 个样品的过饱和度超过 1.0[45]。

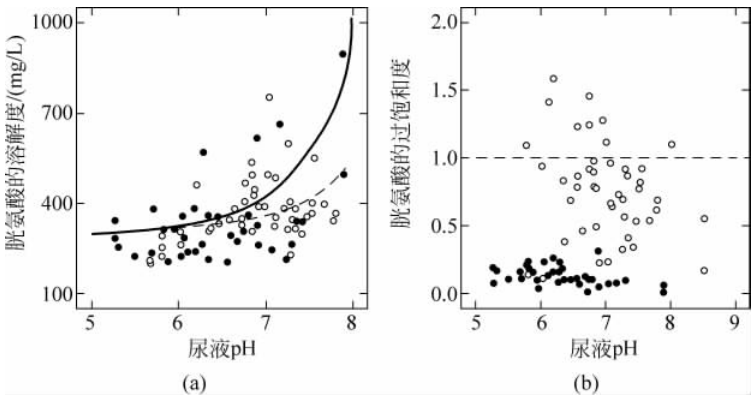


图 8.9

(a) 尿中胱氨酸的溶解度;(b) 尿中胱氨酸的过饱和度随尿液 pH 的变化关系图

空心圈:胱氨酸尿病人;实心圈:钙结石病人或正常人[45]

2. 基因遗传因素

胱氨酸尿症是胱氨酸结石唯一的病因,是一种罕见的常染色体隐性遗传性氨基酸疾病,其病理基础是肾近曲小管基底膜和肠黏膜上皮细胞对胱氨酸、鸟氨酸、精氨酸、赖氨酸等四种二羟氨基酸吸收和转运功能存在缺陷,导致这些氨基酸在尿中排泄增加。研究表明[46],这种基因传递缺陷从一出生就存在,并持续一生。临床数据显示胱氨酸尿在男性中比在女性中更严重。

在正常情况下,肾小管近曲段重吸收 99%的过滤胱氨酸。然而,在继承

了两个基因突变的病人中，肾小管近曲段重吸收发生严重障碍，导致在收集管中，胱氨酸浓度超过过饱和度，从而形成典型的六边形晶体。这两种基因突变是：在染色体 2P（Ⅰ型，完全隐性胱氨酸尿）的二元氨基酸转运物（SLC3A，rBAT）基因和在染色体 19P（非Ⅰ型，不完全显性胱氨酸尿）的 SLC7A9 基因。现已发现[42,46] Ⅰ型胱氨酸尿症患者 SLC3A1 基因组 DNA 有近 40 个突变。在非Ⅰ型胱氨酸尿石症患者中查到了 SLC7A9 的基因突变为：V170M、G105 R、A182T、G1952、G295R、520insT 及 596delTG；SLC3A1 基因在肾小管近曲直段高度表达；在病人的肾小管近曲直段上有胱氨酸和二羟基氨基酸运输的功能障碍。由此可见，胱氨酸尿和胱氨酸结石均与 SLC3A1 基因有关。

8.1.4.3　*抑制胱氨酸结石形成的化学基础*

胱氨酸的溶解度随着 pH 值的升高而增大，因此，增加尿液 pH 是抑制胱氨酸结石行之有效的方法。

三（羟甲基）氨基甲烷（THAM）和乙酰半胱氨酸（AC）也会对胱氨酸结石的溶解度产生影响。在 pH＝10.0 时，三（羟甲基）氨基甲烷可使胱氨酸结石的溶解度增加，加入乙酰半胱氨酸到一定 pH 值的溶液中也能导致胱氨酸结石的溶解度升高；而同时加入三（羟甲基）氨基甲烷和乙酰半胱氨酸到胱氨酸溶液时，胱氨酸具有最高的溶解效果，其溶解度比在人工尿液（pH 值为 5.7）中增加 41 倍[47]。这表明，尿液碱化和加入巯基化合物（如 AC）能起协同作用，是有效地提高胱氨酸结石溶解度的主要因素，也是治疗胱氨酸结石病的一种有效方法。采用体外震波碎石和化学溶石相结合可使治疗效果增强 50%。

为了估计在个体尿样中胱氨酸沉淀的趋势，Parvex 等[48]在体外研究了胱氨酸的沉淀过程。实验中将放射性标记的胱氨酸（4 mmol/L）碱化到 pH＝10 后溶解于尿液中，然后将尿液酸化到 pH＝5，冷却和离心分离。结果表明，幼儿（0～6 岁）尿液中的胱氨酸与年纪稍大（6～10 岁）孩子相比更少发生沉淀，一种可能的解释是前者尿液含有特别高水平的不透析大分子物质（相对分子质量＞12 kDa），它们抑制胱氨酸的沉淀。

8.2　胆结石

胆结石，又称胆石症，也是一种常见病和多发病，其发病率约占世界人口的 7%～10%，且呈明显增高的趋势。2004 年徐斐等对南京市 29 458 人的调查表明，胆结石的发病率为 4.21%，城市（5.61%）比农村（1.26%）高，女性

(5.48%)比男性(2.92%)高,最高峰年龄出现在65～74岁。与泌尿系结石一样,胆结石是一种发生在胆道系统内的异常生物矿化现象。两者的区别在于:泌尿系结石是在泌尿管道内产生,其主要组分是无机矿物,如草酸钙等,有机基质含量较少;而胆结石是在胆囊内、肝内、外胆管内形成,其主要组分为生物小分子、大分子(如蛋白)、金属离子及具有非化学计量特征的胆红素络合物等[49],仅含有少量的无机盐如磷酸钙和草酸钙等。

目前对胆固醇型结石的成因及治疗的研究很多,取得了一定成果,但由于色素型结石和混合型结石组成成分非常复杂,迄今为止它们的形成原因还不清楚,治疗也不十分有效。有关肝脏胆固醇代谢导致胆汁胆固醇过饱和的机制以及致石基因的研究,是当前研究胆石病成因的重点。

8.2.1 胆结石的基本理化性质和微观结构

8.2.1.1 胆结石组分和元素组成

色素型胆结石主要包括胆红素钙聚合物、胆固醇、蛋白质、糖蛋白、多糖、胆汁酸等,也含有少量的磷酸盐、碳酸盐和脂肪酸盐,其中十多种金属离子约占胆结石的3%,各组分之间存在复杂的相互作用。黑色色素型结石还含有相当数量的胆红素铜络合物[50]。

胆固醇型结石中胆固醇的含量大多在80%～95%,少数为50%～70%,非胆固醇组分主要是蛋白,也含少量钙盐。

混合型结石与色素型结石相似,但它主要由胆固醇和胆红素钙组成。

糖蛋白是所有胆结石中的一类重要组成部分,它是以蛋白为主、糖为辅基的结合蛋白质,分为粘性糖蛋白和非粘性糖蛋白。非粘性糖蛋白的糖基含量比粘蛋白低,只有约15%～20%。白蛋白是胆汁中的主要蛋白,约占总蛋白的50%;除此之外还有钙结合蛋白、载脂蛋白、免疫球蛋白等。粘性糖蛋白在胆囊结石中以网状形式存在。粘性糖蛋白所具有的胶样物特性主要由糖基决定。不同胆石患者胆汁中粘性糖蛋白糖基的组成不同,包括半乳糖、岩藻糖、N-乙酰葡萄糖胺等。成石胆汁和正常胆汁中糖基含量的多样性无明显差别。

棕色色素型结石中蛋白质的二级结构以α-螺旋结构为主,也存在无规则卷曲。色素型和混合型胆结石,由于含有较多的胆红素钙盐等金属配合物、难溶无机盐、胆红素与粘蛋白的复合物,导致自身非常难溶。胆结石难溶的另一个原因可能是胆结石中有相当部分未测知的难溶物质存在,而粘蛋白也与难溶物质有着密切关系。

人体所含有的常量元素在胆石中均能找到,人体必需的微量元素也大多

存在于胆结石中。不同类型的结石所含有的元素及其含量均有所差异。刘刚等[51]采用电感耦合等离子发射光谱测定了 36 例胆结石(其中胆固醇型 28 例,棕色色素型 5 例,黑色结石 1 例,混合型 2 例),结果表明:

(1) 含量在 100 μg/g 以上的有 Ca、Na、Mg、P、S; 10 μg/g 以上的有 Fe、Cu、Ni、Ba; 1 μg/g 以上的有 Zn、Mn、Sr、Mo、Pb; 1 μg/g 以下的有 Se、Co、As、Cd。

(2) 混合型胆结石核心的 Ca、Na、S、Fe 比周边高; 色素型结石没有明显差异; 色素型和混合型结石 Ca、Na、Mg、P、S、Mn、Fe、Zn 高于胆固醇结石。这说明金属元素在色素型和混合型结石的形成过程中可能起着较为重要的作用。

(3) 所有结石的核心都含有 Ca 和 S,多数结石的核心区中含有 P,S 一般与蛋白质有关,因此钙盐和蛋白质在结石的成核过程中起作用。

(4) 在黑色色素型结石中,Cu 的含量比其他类型结石高,说明铜盐(主要为胆红素铜)对黑色结石可能起重要作用。

北京大学杨展澜和吴瑾光等[50]利用红外光谱、扫描电子显微镜及 EDAX 能谱对手术取出的典型色素型结石和混合型结石的组成和元素分布进行了分析。结果表明,不同类型的结石组成不同,而且同一结石中不同区域的组成也不同。

图 8.10(a)为色素型结石从中心到外壳的线扫描 EDAX 能谱分析图,结石中内层的钙和磷含量较外层高; 图 8.10(b)为该结石中间部位的微区能谱元素分析图,Ca、S、P、K 和 Fe 的相对含量依次为 6.1、1、0.3、0.2 和 1.5。图 8.10(c)为混合型胆石从中心到外壳的线扫描 EDAX 能谱,可以看出,结石不同区域的 Ca、P、Cl 和 Fe 含量不同。与色素型胆石(图 8.10(a))一样,P 含量高的区域 Ca 含量也高; 而 Fe 含量高的区域 Cl 含量也高。图 8.10(d)为结石中间部位的微区能谱元素分析图,Ca、Cl、S、P 和 K 的相对含量分别为 3.4、1.2、1.0、0.2 和 0.2。

8.2.1.2　胆结石的微观结构

在胆固醇型结石中,层板状(或长棒状)的胆固醇结晶平行堆积成一组,一组堆积与另一组之间以斜交连接,胆固醇层之间有空隙,空隙内存在水和胆红素钙等盐类[52]。

色素型结石的微观结构要复杂得多,不但存在无规堆积的块状胆固醇结晶和大量盐类颗粒堆积,而且还观察到丝条状缠绕物,这种丝条状结构可以在化学合成的胆红素盐中观察到。色素型胆石经氯仿-乙醇、乙醚-乙醇溶解后,出现了大的空洞,空洞边沿及洞与洞之间由薄膜状物相连,两层膜之间有

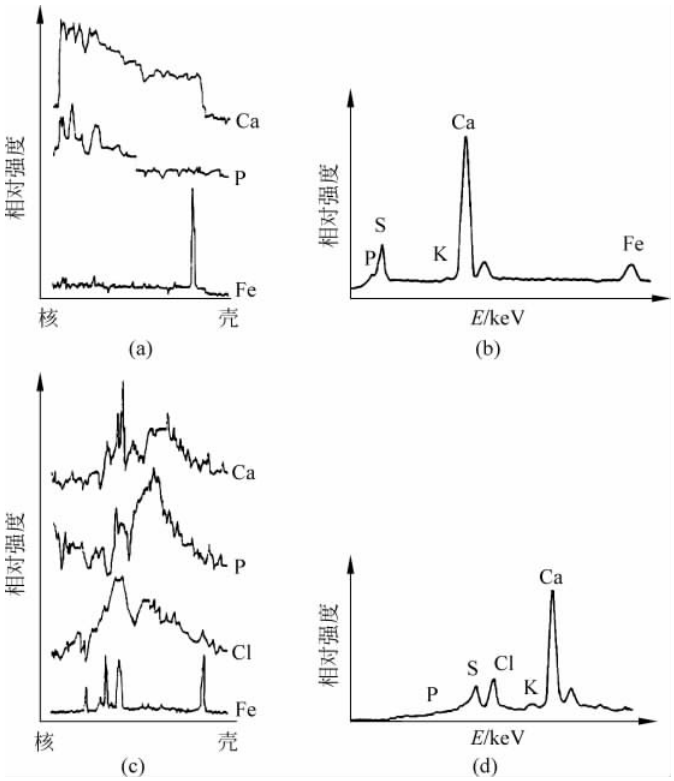


图 8.10

(a) 色素型结石横断面的线扫描 EDAX 能谱;(b) 中心部位微区的能谱元素分析;(c) 混合型胆石横断面的线扫描 EDAX 能谱;(d) 中心部位微区的能谱元素分析[50]

大量球形颗粒物堆积,红外光谱结果显示难溶物含大量磷酸盐和胆红素盐。

混合型结石常为多面体,剖面像树的年轮状,具有周期性的层状结构。混合型胆结石经氯仿-乙醇抽提再经乙醚-乙醇溶解后,出现了空洞,空洞间为絮状物连接,也可见膜状物。红外光谱显示,嵌镶在絮状物中的难溶物含有大量碳酸盐和胆红素盐。

曾繁清等[53]采用红外光谱和扫描电镜分析了 1 例珍珠形胆结石的结构,其外观为椭球形,直径约 5 mm,有珍珠光泽,呈半透明乳白色,推测这种透明状胆结石的形成机理是:胆固醇分子是典型的片状分子,这种分子构成的胆甾型晶体是典型的格兰恩组织,这种状态下的晶相具有很高的旋光本领,并且相当于负一轴晶,可以描述为螺旋形的相列晶体,因而呈透明状。而普通胆结石虽然其组分也是胆固醇,但因为其排列不定形,杂乱的排列使各个晶面对可见光的反射不同,所以不能呈现出珍珠的外观特征。

8.2.2　影响胆结石形成的因素

胆结石的形成过程是：胆囊分泌的粘糖蛋白质及来自肝脏的脂蛋白、纤连蛋白、球蛋白等蛋白质在胆汁环境中失活变性，通过化学键或静电作用将胆红素盐、脂肪酸盐、磷酸盐和碳酸盐等俘获到其上，形成较为坚固的网架基质，沉淀下来，然后胆汁中的其他难溶物质进一步填充或结合到基质上，慢慢形成胆结石。

无论在哪一类胆结石中，均含有难溶性的钙盐，如磷酸钙、碳酸钙、胆红素钙和脂肪酸钙等。难溶钙盐在胆固醇型结石中一般分布在核心和表面钙化层内，而在色素型结石中则散布于其各个部分之中。因此，研究胆汁环境中难溶性钙盐的理化性质，对于了解胆结石的形成机理和防治胆结石具有重要的意义。

8.2.2.1　胆盐的作用

人体胆汁中主要含有六种类型的胆汁酸：甘氨胆酸、牛磺胆酸、甘氨鹅脱氧胆酸、牛磺鹅脱氧胆酸、甘氨脱氧胆酸和牛磺脱氧胆酸。胆盐是指胆汁内的胆汁酸与阳离子结合形成的盐，占胆汁中固体总量的 60%～70%，在胆汁中呈离解状态。胆盐作为胆汁中最重要的生物表面活性剂，可使胆固醇、磷脂、胆红素等增溶于胆汁中。如果胆盐的浓度变化或平衡遭到破坏，将导致沉淀和结石生成。

胆盐的存在影响无定形磷酸钙沉淀的生成及其向羟磷灰石转化。杨展澜等[54]利用红外光谱、拉曼光谱和激光散射光谱对胆盐脱氧胆酸钠(NaDC)胶团与无定形磷酸钙(ACP)的相互作用进行了研究。结果表明：一方面胆盐以胶团的形式与 ACP 固体表面的钙结合，使钙离子脱离固体表面，直接增加无定形磷酸钙的溶解度；另一方面，胆盐胶团与溶液中的钙离子作用，再聚集为高一级的复合胶团，降低溶液中钙离子的活度，从而间接增加无定形磷酸钙的溶解度。无定形磷酸钙溶解度的增加提高了它的反应性，使其更容易转化为其他稳定的结构形式。此外，胆盐对无定形磷酸钙中的 HPO_4^{2-} 离子的亲和力大于对 PO_4^{3-} 离子的亲和力，使无定形磷酸钙在胆汁的环境下容易转化为羟磷灰石。正是由于上述原因，在胆汁的 pH 值条件(pH＝6～8)下，胆结石中的磷酸钙均以羟磷灰石的形式存在。而且，不同类型胆盐与无定形磷酸钙的作用能力不同，其作用能力排列顺序如下：

脱氧胆酸钠(NaDC)＞牛磺胆酸钠(NaTC)＞胆酸钠(NaC)。

脱氧胆酸钠与磷酸钙和磷酸氢钙作用后沉淀的红外光谱表明，脱氧胆酸钠与磷酸氢钙作用后的沉淀中几乎没有 P＝O 的特征谱带，而出现了很强的

归属于脱氧胆酸钠中 COO^-(约 1 550 cm^{-1})和环羟基 C—O(约 1 110 cm^{-1})的特征振动峰,表明磷酸氢钙全部与脱氧胆酸钠作用,生成了脱氧胆酸配合物沉淀。

凝胶体系中的模拟研究表明,胆盐可与金属离子共沉淀,形成与结石类似的周期和分形的图案。如二价金属离子(M^{2+})与胆盐之间存在复杂的相互作用:M^{2+} 的加入使牛磺胆酸钠的简单胶团增大,也使牛磺胆酸钠与胆固醇、磷脂形成的复合胶团增大。当脱氧胆酸钠和 M^{2+}(如 Ca^{2+} 离子)在人体正常浓度范围内,M^{2+} 不是与脱氧胆酸钠单分子反应,而是与脱氧胆酸胶团作用,同时以 M^{2+} 为桥,将不同的脱氧胆酸胶团交联,形成具有凝胶性质的、大分子网状结构的复杂络合物,并在络合物中形成 NaDC-M$(DC)_2$ 的复合胶团结构,最终改变了胆盐介质的特性,破坏了胆汁的生理平衡,降低了磷脂和胆固醇在胆汁中的溶解度,从而促进结石的形成[49]。

8.2.2.2 胆红素的作用

胆红素钙络合物是色素型胆结石的主要组分之一,在结石中沉积的胆红素钙络合物具有非化学计量特征。杨展澜等[54]研究了溶液中游离胆红素与固体碳酸钙的相互作用对色素型胆结石形成机理的影响,得出如下结论:①溶液中的游离胆红素能够与固体碳酸钙晶体表面的钙离子直接作用生成难溶性的胆红素钙络合物;②加入胆盐后可大大影响溶液中游离胆红素与固体碳酸钙的作用,且胆盐的结构和性质对胆红素与碳酸钙的作用影响很大;③在人体胆囊中,少量沉积的碳酸钙有可能与胆汁中游离的胆红素作用生成结石的核。胆汁中的钙离子与胆红素继续在核上沉积,最终形成以胆红素钙为主要成分的色素型结石。然而,纯胆红素钙很难形成单晶,也难以形成胆结石中常见的周期环状沉淀图形。

胆红素铜是黑色色素结石的主要组分之一,在胆红素铜中,铜离子优先与吡咯环和内酰胺环上的氮配位,呈现深黑色。吴瑾光等[49]认为,在铜离子的催化下,通过自由基使胆红素氧化,并以铜离子为桥交联成高分子。在此过程中,胆红素骨架的变化及共轭体系规模的增大可能是黑色结石呈现黑色的结构本质。

Nakai 等[55]发现,在胆红素浓度为 20 μmol/L 的模拟胆汁中,48 h 即出现针状沉淀,200 h 以后出现盘状沉淀;而未加胆红素时,120 h 以后才出现针状晶体,200 h 以后仍没有盘状晶体出现,这说明胆红素能够引发胆固醇晶体的形成。原因是胆红素难溶于水,形成的小颗粒沉淀为胆固醇结晶提供了晶核。但是,并不是胆红素的浓度越大,就越易引发胆固醇晶体的形成,而是遵从一定的顺序:20 μmol/L>10 μmol/L~40 μmol/L>100 μmol/L>0(对照

实验组)。

虽然胆红素能引发胆固醇结晶,但却不能促进这一过程。这是因为,一方面,胆红素与胆盐形成混合胶束能够提高胆固醇在胆汁中的的溶解度,且胆红素能抑制胆固醇的分泌,不能促进胆固醇晶体的形成;另一方面,胆红素浓度高时易发生自聚,更易生成色素型结石[55]。

8.2.2.3　蛋白质的作用

胆石中的蛋白质包括细菌性蛋白和非菌性蛋白。细菌性蛋白是由细菌分泌的,包括磷脂酶、葡萄糖苷酸酶和多糖-蛋白质复合物(glycocalyx)等。73%的色素型结石里都含有细菌性蛋白。

细菌性蛋白导致色素型结石形成的机理是:磷脂酶水解磷脂酰胆碱释放出棕榈酸,棕榈酸遇钙离子生成棕榈酸钙沉淀。细菌性蛋白质 β-葡萄糖苷酸酶水解胆红素-葡萄糖苷酸配合物,释放出非结合胆红素(UCB),非结合胆红素结合游离的钙离子生成胆红素钙沉淀[56]。

Tazuma 等[57]观察了磷脂酶 A_2(PLA_2)在大豆磷脂模型胆汁溶液中对胆固醇结石形成的影响,发现 PLA_2 对胆固醇结石的形成具有促进作用。没有 PLA_2 存在时,生成的胆固醇主要为针状或线状晶体;加入 PLA_2 后,针状晶体渐渐消失,继而出现盘状晶体,且胆固醇的结晶时间减少。在一定浓度范围内,加入 PLA_2 的量越多,结晶时间越短。

8.2.2.4　细菌的影响

大多数的色素型胆结石中含有能产生粘素、β-葡萄糖苷酸酶和磷脂酶等物质的细菌。细菌性 β-葡萄糖苷酸酶能够降解胆红素络合物产生非结合胆红素,进而形成胆红素钙沉淀。细菌产生的黏液是一种阴离子糖蛋白,它一方面能够形成细菌小集落,保护细菌抵制抗体、抗生素和吞噬作用,并且作为离子交换树脂为细菌交换营养物质,另一方面可以将棕榈酸钙和胆红素钙附聚在一起,形成胆结石。如图 8.11(a)所示,无菌性结石中碳酸钙含量较多,且没有细菌生物膜(图 8.11(b));而感染性结石中几乎都含有棕榈酸钙,且有粘素形成的生物膜来保护细菌(图 8.11(d))[58]。

用透射电子显微镜观察胆汁中纳米细菌时发现,胆汁中的确存在纳米细菌,大小约 400～550 nm,且周围有一层黑色的物质包绕,表明部分细菌尚处于分裂期(图 8.12)[59]。胆囊黏膜中纳米细菌主要分布在胆囊黏膜或黏膜下层,呈微小的黄色至棕黄色杆状或球状颗粒,钙化灶内亦有纳米细菌的存在。胆囊壁的钙化或纤维化可能与纳米细菌感染有关。

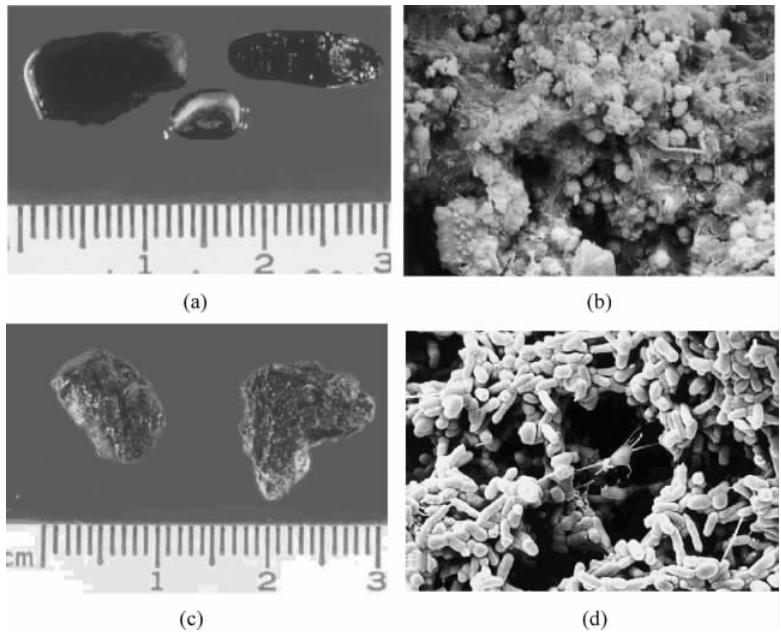


图 8.11

(a) 无菌的黑色色素结石,这些结石里含有胆红素钙、碳酸钙和磷酸钙;(b) 结石的 SEM 图像,注意没有细菌生物膜;(c) 色素型结石,主要为棕色,同时含有少量黑色色素;(d) 显示细菌小菌落的胆石 SEM 图像,注意细菌桥和生物膜的三维性质[58]

8.2.2.5 其他影响因素

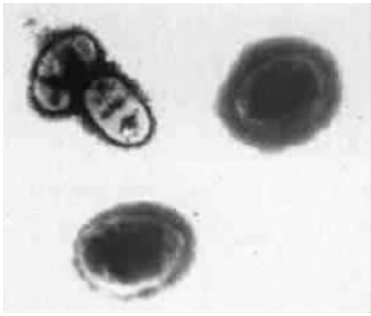


图 8.12 胆汁培养物中纳米细菌的 TEM 形貌

(负染法,尺寸:×20 000)[59]

胆结石的形成与很多因素有关,如高胆固醇饮食易形成胆固醇结石[60]。此外,遗传致石基因的研究是当前胆石病成因研究的重点,但由于普通人群具有一定的遗传混杂性,因此给胆石病基因的研究带来一定困难。环境因素似乎显得更重要,在美洲印第安人女性成年人中,胆囊结石的患病率高达 70%,但是,非洲却少见胆石病。采用回归分析对 97 例胆结石病例研究表明,有统计学意义的危险因素依次为:家族史(OR=22.25,$p<0.01$)、油腻饮食(OR=8.19,$p<0.05$)、血脂增高(OR=6.30,$p<0.01$)、饮酒(OR=4.84,$p<0.05$)[61]。

8.2.3　对胆结石环状结构形成的体外模拟

人们常常用明胶和硅胶等作为体外简化模拟体系，模拟胆结石的周期性结构。Liesegang 环结构的形成与凝胶介质组成、胆酸浓度、金属离子种类和金属离子浓度等多种因素有关，无论是过渡金属离子还是稀土金属离子，在合适的条件下均可以和胆酸分子形成周期性环状沉淀结构。

惠建斌等[62]在含有 Fe^{3+}、Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 等多离子模拟体系中，模拟形成了胆结石的环状结构，如图 8.13 所示，同时出现了环状结构与分形图案共存的现象。从环状结构形成的过程来看，每个环本身在形成过程中，是在某一确定的圆半径上从中心向外沿着不同的方向同时产生。从内到外，前 3 个环形成的时间依次约需 60 h、72 h 和 96 h。随着放置时间的延长，初始形成的两个沉淀环也逐渐地转化为分形，图 8.13 即是这种转化已经开始后约 10 h 时拍摄所得。

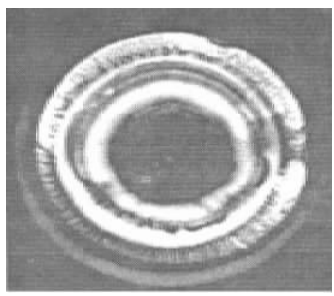


图 8.13　含有 Fe^{3+}、Ca^{2+} 和 Cu^{2+} 的模拟体系中形成的似环状结构[62]

为了进一步研究胆结石的成因，吴瑾光等[63]在接近人体环境的条件下，观察了脱氧胆酸凝胶体系中各种金属离子与脱氧胆酸的相互作用，得到了一些具有复杂空间结构的沉淀，沉淀的分形现象极其普遍，即使在周期状的 Liesegang 环结构中，每个环的内部也有微小颗粒组成的分形。由于分维数的大小与分形结构的形成过程有关，可以用其来描述复杂图形的自相似性，测量的各种分形图案的分维值可以探讨自相似性与微观成因的关系。

Zn^{2+} 离子与脱氧胆酸相互作用可产生从许多个点同时长出的分形图形（即 Cluster-Cluster Aggregation 模式），其分维数为 1.79，具有树枝状分形结构。在有 Cu^{2+} 离子形成的图形中发现了球状细致结构，这可能是空间各点成核后对称吸引周围分子形成的宏观结构，球晶的大小依赖于成核的先后。在 Cu^{2+} 与 Eu^{3+} 混合的二离子体系中，其分维数值（1.78）比单一 Cu^{2+} 离子（1.65）体系形成的图形要高，这说明可能是两种离子与脱氧胆酸以一种新的配位方式作用而导致图形具有较大的分维数。

杨展澜等[54]在琼脂扩散体系中研究了磷酸钙沉淀图形的生长，实验体系分别为磷酸氢二钠-氯化钙体系及其分别加入胆酸钠（NaC）、牛磺胆酸钠（NaTC）和脱氧胆酸钠（NaDC）后的体系。这四种体系中均可以形成磷酸钙的周期环状沉淀图形。与磷酸氢二钠-氯化钙体系相比，加入牛磺胆酸钠后沉淀产生时间延长，并使磷酸钙更易转化为羟磷灰石，这也是胆石中磷酸钙多

以羟基磷灰石形式存在的原因。

8.3 人体中的不常见结石

除泌尿系结石和胆结石外,人体内还存在一些不常见的结石,如在胃肠道形成的胃肠结石、胰腺结石、前列腺结石、肺泡微结石、支气管结石、鼻腔结石和腮腺结石等。

8.3.1 胰腺结石

胰腺结石又称胰石症、钙化性胰腺炎,是由于胆胰管汇合异常等先天性因素,酗酒、胆石症、高钙血症及蛔虫等后天性因素引起的胰腺慢性炎的病理疾病。主要分布于胰头部主胰管内,少数分布于胰管分支内和体尾部主胰管,病理表现为胰体肿大或萎缩,胰管周围则发生纤维化,质地变硬,表面呈结节状。结石多为白色,少数为米黄或褐色,质地坚硬,直径一般为 0.3～1.0 cm,形态多为不规则的颗粒状,少数为多角形或珊瑚状。

胰腺结石包括两种类型:①胰管内结石,即真性结石;②胰实质内钙化,即假性结石。胰腺结石通常由致密的表层(含 95%的碳酸钙)和不规则的中心部分(含 62.33%的硫和 31.04%的氯)构成,还含有少量的铁、铬、镍、镁等元素[64]。

胰腺结石形成后首先刺激上皮细胞肥大、增生,继而发生鳞状上皮增生,造成导管狭窄、阻塞,胰管周围则发生纤维化,进一步加剧导管畸形和阻塞,最终使胰腺实质萎缩、塌陷。病变累及胰岛可发生显性或隐性糖尿病,其发生率可高达 40%～70%。胰腺结石的其他并发症还有胰肿大、胰周纤维化和对邻近组织的压迫、总胆管下端狭窄等[65]。

胰腺结石的形成与胰腺腺胞合成和分泌的胰石蛋白(PSP)密切相关。胰石蛋白是一种相对分子质量约为 14 kDa 的磷酸糖蛋白,其 N 端有较高相对分子质量的糖基,它经外分泌作用分泌到胰管内,然后 N-端糖链被切断后形成胰石蛋白-S,它可通过结合封锁碳酸钙的活性部位,保持胰液碳酸钙浓度的稳定,抑制碳酸钙结晶和沉淀[66,67]。

当胰石蛋白基因发生错误表达或由于酒精、营养障碍、反复发作胰腺炎等病理因素的影响造成胰腺细胞的结构和功能改变,胰石蛋白合成和分泌减少,乳铁蛋白分泌增加,使胰液中胰石蛋白水平降低时,胰液中过饱和的碳酸钙活性部位不再受到封闭和抑制,形成结晶并沉积于脱落的上皮细胞、黏膜、胰酶或非酶蛋白(如乳铁蛋白)所形成的网状结构上。其后一些金属离子如铁、铬、镍、镁等通过吸附和沉淀逐渐结合到这些网架上,最终形成结石。

但对胰石蛋白是否存在抑制作用，近年来引发了众多争论[65]。Bimmler 等用防止蛋白变性的多步骤方法在纯化胰石蛋白后，在体外研究了其对碳酸钙晶体的抑制作用，发现仅 C 端多肽具有碳酸钙抑制作用。此外根据测定的 N-端肽的序列，重新合成的大鼠或人胰石蛋白的 N 端多肽并无活性。

除了胰石蛋白外，在相同实验条件和与胰石蛋白同样浓度范围内，其他的胰液成分或外分泌蛋白也可表现出抑制活性，同时无机磷酸盐也可被结合。白蛋白与碳酸钙结合的高稳定性使得白蛋白能够在尿液中抑制结石的形成，胰液中胰石蛋白、白蛋白和碳酸钙的比例关系是胰腺结石形成的决定因素。此外，骨桥蛋白也可能参与慢性胰腺炎胰管结石的形成[68]。

8.3.2　支气管结石

支气管结石是指支气管树的管腔内存在的质地坚硬、周边较锐的钙化或骨化物质。支气管结石形态各异，大小约 5～6 mm，最大直径可达 3.0 cm，表面光滑，颜色为白色、灰白色或灰褐色。由于右侧淋巴结多于左侧，故位于右侧支气管结石大约是位于左侧的 3 倍，且患者中男性较为常见[69]。

支气管结石的主要成分是碳酸钙，少数为磷酸钙或鸟粪石，部分还有铜、镍、铁、铝、锌等元素[70]。支气管结石的来源途径可能有 4 种：①因支气管软骨坏死，脱落于支气管腔内；②钙化的淋巴结或钙化灶向支气管透破；③支气管异物逐渐发生钙盐沉着而形成结石；④支气管扩张时分泌物中含有丰富的钙盐，逐渐浓缩而成[71]。

支气管结石分为肺门型和弥漫型。肺门型为支气管旁钙化淋巴结侵蚀、穿过支气管壁所致，多见于肺结核、矽肺、真菌及其他慢性炎症等，该部位组织二氧化碳含量低，呈碱性，钙盐易于沉积；弥漫型为肺泡膜上酶缺损和肺泡 pH 值改变，因而增加了钙磷沉积，并与肺泡表面活性物质失调与钙磷有关。也有学者[72]认为支气管结石与内分泌疾病及钙磷代谢失调有关。

8.3.3　前列腺结石

前列腺结石可分为真性和假性两类。真性前列腺结石指原发于前列腺腺泡和腺管内的结石，主要由磷酸钙和碳酸钙组成。假性前列腺结石指非始发于前列腺而是来源于泌尿道、但最终停留在前列腺尿道部的结石，结石的初晶成分来源于进入前列腺的尿液，形状多不规则，多由草酸钙和尿酸组成。尿液逆行进入前列腺，溶解度不大的尿酸在高的过饱和度时析出结晶，从而导致一种稳定的胶体尿酸钠形成，这是前列腺尿酸结石形成的主要原因。前列腺结石的发病率随年龄的增长而升高，多发于 50 岁以上的中老年男人[73]。

前列腺结石的形成原因目前尚不明了，可能包括下面一个或多个

因素[74,75]:

(1) 前列腺腺泡内的脱落上皮细胞与包含有脂肪、蛋白质、胆固醇和晶体嘌呤等物质的前列腺分泌物一起形成的淀粉样体,阻塞前列腺腺泡导管,使之发生炎症,促使正常前列腺液中所含的磷酸钙及碳酸钙等无机盐形成结晶,并沉积于淀粉样体上形成结石。结石形成后,前列腺液流通不畅,又可加重感染,两者相互诱导,互为因果。

(2) 尿液返流入前列腺导管内结晶,或前列腺发生炎症时腺泡扩张,腺管狭窄,使尿液中的难溶无机盐类物质沉积在前列腺内形成结石。

(3) 前列腺增生压迫尿道,尿道狭窄后致使前列腺导管内压力增加,使导管和腺泡发生扩张,有利于结石的形成。

8.3.4 肠胃结石

肠胃结石是食物和异物在胃内(偶见于小肠内)形成的不溶性的结石状物。胃结石一般多位于胃底或胃体近段,主要分布于黏膜下层,呈椭圆形或不规则形状,直径通常在 4 cm 以上,颜色可为紫褐色、黄褐色或草绿色,表面多光滑,活动性较好,多数呈中等硬度且有柔韧感,主要由钙化物、胆固醇和胆红素等组成[76,77]。

胃结石可分为植物性胃结石、动物性胃结石、药物性胃结石、继发性胃结石和混合性胃结石[78]。新鲜柿子、黑枣、山楂、栗子和韭菜等中鞣酸含量高达 25%,鞣酸在胃酸作用下能与蛋白质结合,生成大分子鞣酸蛋白质沉淀物,与柿子中果胶、树胶或其他食物纤维、残渣等极易形成难被消化的食物团块,并以此为核心,久之钙化为结石[79]。

一般情况下,胃结石在胃腔内游走,很少能进入肠道,因此,近年来患胃结石症的病例逐年增加,但肠结石患者较为少见。

8.3.5 肺泡微结石

肺泡微结石又称肺泡微石症,为罕见的慢性肺泡疾病,以两肺肺泡内广泛分布的多个微小结石为特征,大小基本一致,直径为 0.5～3 mm,数量极多。化学分析表明,肺泡微结石以钙、磷为主,已检测出磷酸钙、草酸钙和胱氨酸等成分[80]。

肺泡微石症可发生于任何年龄,但以 30～50 岁多见;在发病上无种族、性别、地区差异,但有家族倾向,按常染色体隐性遗传方式遗传,多见于同胞兄弟姐妹[82]。多数肺泡微石症患者在早期无明显症状,血常规、血钙、磷、痰、尿等实验室检查也无异常,但患者胸片改变明显[81]。

此外,肺泡微石症还可能与高血钙、慢性感染、肺淤血、变异反应等有关,

与生活环境也有一定关系。有人从理论上认为，钙质易溶解于酸性溶液而沉淀于碱性溶液，而肺泡微石症由于肺泡内呼吸代谢先天障碍，碳酸氢酶分泌量或功能异常，导致酸碱度失去平衡，pH 值增加，使肺泡的表面处于碱性状态，促使钙盐沉着于肺泡所致，但这一学说尚未得到公认。也有学者认为是胎儿期新陈代谢障碍所致，或者是炎症的结果，是渗出性改变后发生的钙化。

8.3.6　鼻腔结石

鼻腔结石比较罕见，这是一种以鼻腔异物（外源性者如水果籽、珠子等，内源性者如血块、碎屑、牙等）为核心，由矿物质盐类（如磷酸钙、氯化钠、镁盐及细菌残骸等）沉积于异物表面，将其包裹，日积月累逐渐形成的结石。因所含的成分不同，外观为形状不规则的块状物，表面不光滑，质地坚硬[83]。

杨本涛等[84]对以前治疗的 9 例鼻石分析后发现：9 例鼻石均为右侧鼻腔发病，患者平均年龄 43.6 岁，有 6 例主要由钙和磷构成，3 例主要由钙和镁构成。其中不规则形状有 5 个，类圆形 2 个，长条状、鹿角形、桑葚状、葫芦形各 1 个。

对鼻石进行电子扫描显微镜（SEM）和能量分散 X 射线分析仪（EDX）研究发现，鼻石的核心为含有镁的磷钙矿[$Ca_9(MgFe)(PO_4)_6(PO_3OH)$]，主要由磷酸钙和磷酸镁在周围沉积而成。鼻石形成过程中，单纯钙盐的沉积十分罕见，这表明除了必须的晶核外，一些诱发因素（如鼻分泌物滞留和阻塞、急慢性炎症、细菌的酶活性等）亦可促成鼻腔结石的形成，但无机盐类的凝结作用还不完全清楚[85]。

8.3.7　其他结石

除了上述 6 种不常见结石外，还有一些更不常见的结石病，如阴道结石等。赵婧[86]报道的 1 例阴道结石尺寸达 13 cm×9 cm×6 cm。近年来，由于各种结石病的发病率不断增加，已引起了人们的广泛重视。但不常见结石因为其本身比较罕见，存在许多不明确的发病因素，还经常与其他疾病并发和相互诱导，并没有明确的发病症状，因此尚有许多问题等待人们的进一步研究和解决：如胰石蛋白对胰腺结石的作用机制还没有完全明了，有待于更深入的研究和阐明；支气管结石和肺泡微石形成的主要原因是肺泡内 pH 值的碱性化还是其他因素还不确定；如何减少肠胃结石的发病率，提高手术的成功率也是一大难题。

总之，提高对这些结石的认识和提高其确诊率，更好地对结石进行预防和治疗，减少术后的复发率，是人们急需解决的问题。

8.4 牙的病理矿化

人体口腔中的疾病矿化包括龋齿、牙石和氟牙症,它们与年龄、饮食习惯、自然条件、社会生活条件等都有关系,是多种因素综合作用的结果。

8.4.1 龋齿

龋齿俗称"虫牙",是一种由口腔中多种因素复合作用所导致的牙齿硬组织进行性病损,表现为无机质的脱矿和有机质的分解[87]。龋齿是人类最常见的细菌感染性口腔疾病。任何种族、年龄、性别的人都有可能患龋齿。

虽然牙釉质是人体中最硬的组织,但牙釉质对于酸性物质缺乏抵抗力,通常存在于口腔中的酸(如乳酸或醋酸)即可使牙釉质侵蚀和溶解。当牙釉质溶解后,有机物暴露在外,在口腔蛋白质水解酶作用下,水解产生色素,加上外界环境中细菌产生的色素致使病牙的牙本质变为褐色、黑褐色甚至黑色,最后导致牙齿组织崩溃而造成龋洞,即龋齿。

8.4.1.1 影响龋齿形成的因素

影响龋齿的因素较为复杂,下面仅介绍最重要的几种。

(1) 氟的影响:唾液中低浓度氟可破坏牙齿的矿化平衡,导致龋齿发生;而适量的氟可维持牙齿的正常矿化过程。除了使用含氟的牙膏防龋外,饮用适宜氟浓度(1.0～1.5 mg/L)的饮用水亦可有利于防龋[88,89]。氟的防龋机理是:氟与牙齿内的羟基磷灰石[$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]作用,形成抗酸能力强的氟磷灰石[$Ca_{10}(PO_4)_4F_2$];氟能在釉质表层及表层下形成氟化钙沉淀,抑制菌斑,降低釉质羟基磷灰石的溶解度,增进晶体的完整性,促进再矿化。

为探讨饮水中氟浓度对人群龋齿的影响,汪旸等[89]对比研究了低氟水(<0.3 mg/L)、适宜氟水(1 mg/L)和高氟水(>4.8 mg/L)3 个氟水平对冠面龋与根面龋的影响(表 8.2)。饮用低氟水地区人群的龋患率与龋患指数均明显高于其他两组。此外,低氟水与适宜氟水组人群均无氟斑牙发生,但高饮水氟组发生了严重的氟中毒。

表 8.2 饮用水中氟浓度与成人龋患率的关系[89]($F=5.12, p<0.01$)

水氟浓度/(mg/L)	人数	冠面龋患率/%	根面龋患率/%
0.17	252	83.1	13.1
0.95	245	52.9	2.0
4.85	248	10.3	3.7

王滨滨等[90]对霸州氟中毒地区调查发现，12 岁和 18 岁年龄组在水中氟浓度分别为 1.905 mg/L 和 2.301 mg/L 时，龋齿与水中氟浓度呈正相关，说明在水中氟浓度较高的情况下也会造成龋病高发。

刘冬梅等[91]研究亦发现，重度高氟区患龋率明显高于轻度高氟区，且患龋率随氟牙症指数升高呈明显上升趋势。在水中氟浓度 1.1～1.5 mg/L 的轻病区患龋率为 21.98%，氟牙症指数 0.59；而在水中氟浓度 4.5～5.4 mg/L 的重病区患龋率 50.95%，氟牙症指数 3.02；氟牙症指数为 4 的人群，患龋率达 70.00%。因为当水中氟浓度达到一定高度，氟牙症较严重者，釉质受到明显损伤，牙齿就易受到侵蚀，患龋齿率就高。

(2) 细菌的作用：一方面，口腔内的一些细菌(如乳酸杆菌、链球菌)可以直接吸附于牙面，并集聚形成牙菌斑；另一方面，细菌的代谢产物可以致龋，如口腔中的变形链球菌群产生细胞外多糖，细菌将这些碳水化合物发酵后产生乳酸，乳酸可与牙中的钙发生络合作用，使牙齿的矿化成分(羟基磷灰石)溶解析出。细菌产生的蛋白质溶解酶也加剧牙齿硬组织的崩溃[92,93]。

(3) 食物的影响：偏食造成摄入的营养不均衡，使得牙齿所需的原料得不到供应，致使牙齿缺钙、缺磷或缺氟等物质。如缺维生素 A 使牙釉质发育不全，降低牙齿的抗病能力；缺蛋白质造成牙体形成缺陷，增加致龋的敏感性；牙内钙/磷比例不当会使儿童乳牙钙化程度降低。一些糖类、乳酸饮料的过量摄入，有利于细菌基质的形成和酸的产生，导致牙齿的去矿化，其中柠檬酸最为常见。柠檬酸通过对釉质表面的无机晶体进行腐蚀溶解，造成表面脱矿，形成一层软化的部分脱矿的釉质层[94,95]。

(4) 其他因素：学龄儿童期多发的龋齿与唾液的流出速度及唾液中钙和总蛋白的含量有关。唾液中钙离子多、蛋白质少，可抑制龋齿。

8.4.1.2　抑制龋齿的因素

除了氟的抑制作用外，其他可抑制龋齿的因素还包括：维生素 B 可刺激非致龋菌的生长，减少龋齿的发生；钙、磷和维生素 D 可促进牙齿的正常发育，提高抗龋能力。

Kawasaki 等[96]在去矿化溶液中研究了氟化硅(SiF)、氟化银(AgF)、氟磷酸(APF)和氟化钠(NaF)对牛牙齿牙釉质去矿化程度的影响。在去矿化 24 h 后，发现氟化硅和氟化银的抗龋齿能力较强，而 APF 和 NaF 不能有效阻止早期酸性条件下釉质的溶解。氟化硅和氟化银抗龋机制是：用氟化银处理牙釉质时，银覆盖在釉质即矿物表面；氟化硅可渗入牙小管内极好地阻止牙龋的进一步发展，因为牙小管是牙龋快速发展的唯一途径。

8.4.2 牙石

8.4.2.1 牙石的组分及其形成机制

牙石是无机物和有机物在牙垢上逐渐沉积而成,其中无机物占70%～90%,主要为羟基磷灰石、碳酸钙等。采用电感耦合等离子体发射光谱对上牙龈和下牙龈结石混合样品进行测试表明[97],牙石中钙盐(以羟基磷灰石计)为82.83%,镁盐及其他微量元素(包括Cu、Al、Fe、Zn、Ti、Mn、Pb和Sr)为7.12%,有机成分为10.05%,后者包括脱落的上皮细胞、白细胞、多种细菌、碳水化合物、唾液衍生的蛋白质及脂类等。

Roberts-Harry[98]等认为,上牙龈和下牙龈结石存在四种类型的晶体:透钙磷石(即二水磷酸氢钙,$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$);磷酸八钙[$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$];磷酸钙镁[$(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$]和碳羟基磷灰石[$(CaM)_{10}(CO_3,HPO_4,PO_4)_6(OH,X)_2$],M为能够取代$Ca^{2+}$的其他金属离子如$Sr^{2+}$、$Pb^{2+}$、$K^+$、$Na^+$等;X为Cl或F。这些晶体形成的差异与pH值和镁含量有关。在口水中,pH值和镁含量均低,而在牙龈流出液中,pH值升高,镁含量亦增加6倍左右,表明局部pH值升高和镁离子浓度增加是牙石形成的主要原因。

一般认为牙石是唾液中的矿物质沉积于菌斑形成,即先由隐藏在牙缝中的软垢、细菌、唾液蛋白等形成菌斑;当从腺体分泌出来的唾液随着时间的推移而挥发二氧化碳后,唾液的pH值升高,其对钙磷无机矿物的溶解度减小,使得唾液中含有的磷酸钙和碳酸钙等无机物逐渐沉淀到菌斑中去,矿化形成牙石。口腔中碱性环境能促进牙石的形成。

8.4.2.2 抑制牙石形成的化学基础

(1) 动力学因素及pH值的影响

唐睿康和Nancollas等[99]依据不同组分磷酸钙的动力学溶解性差异,研究了pH值和柠檬酸对不同磷酸钙盐溶解速率的影响。柠檬酸可显著降低羟基磷灰石的溶解速率(图8.14(a)),但对磷酸八钙、透钙磷石和碳磷灰石几乎没有影响(图8.14(b))。在pH=5.5,当柠檬酸从0增加到1.00×10^{-6}、1.00×10^{-5}和2.00×10^{-5} mol/L时,羟基磷灰石的溶解速率分别减少到原来的77%、25%和20%(图8.14(a))。柠檬酸抑制羟基磷灰石溶解归因于柠檬酸在羟基磷灰石表面的吸附。上述结果表明,可以根据牙石中磷酸盐组分与牙釉质、牙本质中磷酸盐组分的差异,通过改变pH值和使用不同浓度的柠檬酸,控制在不影响牙本质和牙釉质的前提下溶解牙石。

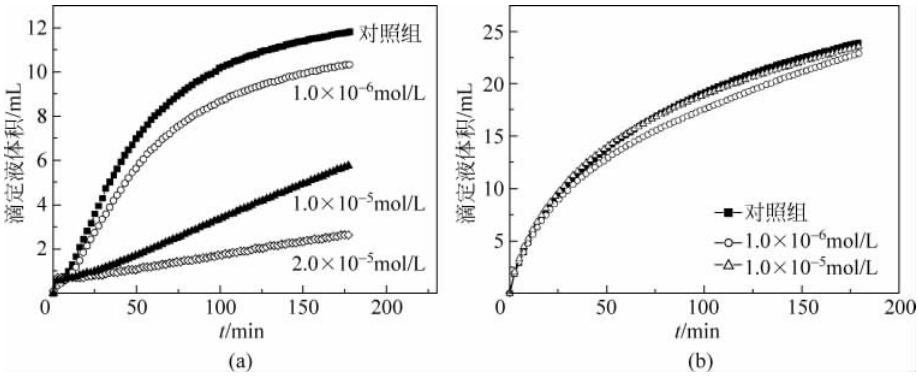


图 8.14　柠檬酸对不同磷酸钙盐溶解性质的影响

(a) 羟磷灰石；(b) 碳磷灰石。pH=5.50，离子强度 0.15 mol/L[99]

(2) 抗牙石剂的作用：较有效的抗牙石剂包括多羟基化合物、焦磷酸盐和多磷酸盐等。磷酸化多元醇(尤其是其结构重复单元至少有两个磷酸基取代的牙石软化剂)在口腔环境中对抑制磷酸钙的结晶生长非常有效，其中焦磷酸盐通过抑制牙菌斑内部矿物质的形成，抑制牙石形成。

Busscher 等[100]发现，牙的硬组织表面自由能对牙齿表面的矿化、溶解和粘附起关键作用。牙釉质表面唾液膜的表面自由能取越大的负值，对新形成矿物相粘附的表面自由能取越大的正值，抗牙石效果越好。通过比较添加抗牙石剂的牙膏对牙石形成的影响，发现含有偏六磷酸钠的牙膏产生的唾液膜在动力学上不利于牙石形成，且含有偏六磷酸钠等多聚磷酸盐活性成分的牙膏对牙石的去除率高于含有焦磷酸盐的牙膏。采用由 40%的变聚糖酶(相对分子质量 156 kDa)、20%的葡聚糖酶(相对分子质量 140 kDa)、10%的溶菌酶、10%的淀粉葡糖苷酶、10%的葡萄糖氧化酶和 10%的酵母组成的混合酶制剂，经含漱、刷牙、机械刮治三种方式对比实验，发现该制剂具有明显抑制牙石生长的作用，在适当外力作用下能有效去除牙石，是化学法洁牙的发展方向[101]。

8.4.3　氟牙症

口腔中氟的水平是牙釉质脱矿、再矿化速度的决定因子。少量氟化物的参与能加速牙齿等硬组织矿化成分中磷灰石的形成，增加其稳定性。但过量的摄入氟，则会导致氟中毒，如氟牙症。研究表明，12 岁、15 岁和 18 岁居民的氟牙症指数与饮用水中氟的浓度具有高度的正相关性[90,102]。

氟牙症又称斑釉，是牙齿形成和矿化过程中摄入过量氟所致。氟牙症临

床表现为：轻者仅有釉质白色斑纹，中等和重者出现黄褐色和坑凹状缺损，以至牙齿失去整体外型，釉质和牙本质变脆，容易磨耗。氟牙症着色物质极其复杂，任吉芳等[103]发现，氟、磷、钙、锰、砷、硒、铝、钛、铌、硼等 10 种元素含量与釉质着色程度呈正相关。

影响氟牙症形成的因素包括：

(1) 与牙齿本身的生理过程及其结构有关。流行病学及实验均已证实，釉质形成的过渡期和成熟早期最易受氟化物影响，因为此时矿物离子和氟离子能自由地进入牙胚组织，尤其是在恒牙牙冠的发育形成阶段(出生至 5 岁左右)摄入的氟化物影响显著，而当牙冠发育完成(3～5 岁)后摄入的氟化物量对牙齿几乎没有影响[104]。实验表明，不同牙位氟牙症患病率为：乳磨牙＞乳尖牙＞乳侧切牙＞乳忠切牙；而恒牙重度氟牙症患病率为：磨牙＞双尖牙＞尖牙＞切牙[105]。

(2) 与氟化物密切相关。在牙齿发育早期，氟离子主要通过三种途径干扰釉质的矿化过程，最终导致氟牙症的发生[101,106]：减少釉质蛋白分泌；干扰成釉细胞的调节机制；影响釉质基质蛋白的降解。在釉质成熟早期，氟离子可能通过抑制三磷酸腺苷酶(ATPase)的活性，影响氨基酸转运，使成釉细胞摄取氨基酸受阻，导致釉基质丝氨酸蛋白酶(EMSP1)的合成和分泌减少[107]。氟化作用使镁离子增多，碳酸盐、柠檬酸盐和锌离子减少，进一步使釉蛋白酶的水解活性降低。DenBesten[106]观察到氟化作用可使形成的釉质蛋白与氟磷灰石产生更紧密的结合，不易被釉质蛋白酶降解，这一现象可能是由于氟抑制了釉质细胞外蛋白酶的活性，从而使釉原蛋白在釉质成熟期滞留更长的时间[108]。

(3) 钙摄入量的间接影响。欧阳伟等[109]研究了不同钙摄入量对大鼠氟牙症发生的影响。分别用含低钙、中钙(即标准钙)和高钙量的饲料喂养大鼠并使其摄取含 0.1 mol/LNaF 的水，同时设对照组。2 个月后，分别用氟离子电极、显微放射照相、扫描电子显微镜检测各组动物上中切牙釉质平均氟含量及矿化程度和结构。研究表明：随钙摄入量的增加，大鼠上中切牙釉质中的氟含量减少($p<0.01$)，釉质平均吸光度值降低($p<0.01$)，釉质矿化程度增加，即牙齿发育期摄钙量越多，牙齿氟中毒程度越轻。钙离子的补充实质上保证了釉质矿化过程得以正常进行，补钙是预防氟中毒、提高硬组织矿化程度的有效手段。钙对氟的抗拒作用可能是补充了钙离子后，钙离子在胃肠道或血液中与氟离子结合为难溶的 CaF_2，被消化代谢后排出体外；同时过量的钙也可能结合了微环境中的氟，使游离氟离子减少。

参 考 文 献

[1] Ghumman C A A, Carreira Olga M T, Moutinho Augusto M C, Tolstogouzov A, Vassilenko V, Teodoro Orlando M N D. Identification of human calculi with time-of-flight secondary ion mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 2010, 24(2): 185～190.

[2] 许四虎,程锦泉,周华,张富林. 深圳市尿石流行病学调查报告. 中华泌尿外科杂志, 1999,20: 655～657.

[3] Sargut S T, Sayan P, Kiran B. Influence of essential and non-essential amino acids on calcium oxalate crystallization. Cryst. Res. Technol., 2010, 45(1): 31～38.

[4] Saw N K, Rao P N, Kavanagh J P. A nidus, crystalluria and aggregation: key ingredients for stone enlargement. Urol. Res., 2008, 36: 11～15.

[5] Girija E K, Latha S C, Kalkura S N, Subramanian C. Crystallization and microhardness of calcium oxalate monohydrate in gel. Mater Chem Phys, 1998, 52: 253～257.

[6] Ouyang J-M, Zhou Na, Duan L, Tieke B. Ability of multifunctional carboxylates to favor crystal growth of calcium oxalate dihydrate and trihydrate in lecithin-water liposome systems. Coll Surf A, 2004, 245: 153～162.

[7] Laurence M E, Levillain P, Lacour B, Daudon M. Advantage of zero-crossing-point first-derivative spectrophotometry for the quantification of calcium oxalate crystalline phases by infrared spectrophotometry. Clin Chim Acta, 2000, 298: 1～11.

[8] Deepa M, Babu K R, Vaidyan V K. Surface topographical studies of calcium oxalate grown in silica gel. J Mater Sci Lett, 1995, 14: 1321～1322.

[9] Letellier S R, Lochhead M, Vogel V. Oriented growth of calcium oxalate monohydrate crystals beneath phospholipid monolayers. Biochim Biophy Acta-Gen Subject, 1998, 1380: 31～45.

[10] Deng F, Ouyang J-M. Comparative investigation of ultrafine crystals in urine of healthy human and lithogenic patients. Mater. Sci. Eng. C-Bio S, 2006, 26(4): 688～691.

[11] Ryall R L, Fleming D E, Grover P K, et al. The hole truth: intracrystalline proteins and calcium oxalate kidney stones, Mol Urol, 2000, 4(4): 391～402.

[12] Wesson A J, Worcester M E, Wiessner J H, Mandel N S. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. Kidney Int, 1998, 53: 952～957.

[13] Grover P K, Ryall R L. Inhibition of calcium oxalate crystal growth and aggregation by prothrombin and its fragments in vitro. Eur J Biochem, 1999, 263: 50～56.

[14] Grover P K, Ryall R L. Effect of prothrombin and its activation fragments on calcium oxalate crystal growth and aggregation in undiluted human urine in vitro: relationship between protein structure and inhibitory activity. Clin Sci, 2002, 102:

425～434.

[15] Buchholz N P, Kim D S, Grover P K. The effect of warfarin therapy on the charge properties of urinary prothrombin fragment 1 and crystallization of calcium oxalate in undiluted human urine. J Bone Miner Res, 1999, 14(6): 1003～1012.

[16] 姜学军,冯陶,窦长琪,尿草酸钙晶体基质蛋白的分离及理化特征,中国泌尿外科杂志,1998,19(8): 454～456.

[17] Stapleton A M, Timme T L, Ryall R L. Gene expression of prothrombin in the human kidney and its potential relevance to kidney stone disease. Br J Urol, 1998, 81(5): 666～671.

[18] 欧阳健明,钟玖平,苏泽轩,邝荔,梁蔚波. 有机大分子在草酸钙结石形成过程中的调控作用. 中华泌尿外科杂志,2003,24(2): 138～139.

[19] Laube N, Glatz S, Hesse A. The relation of urinary Tamm-Horsfall-Protein on CaO_x-crystallization under the scope of the Bonn-Risk-Index. Urol Res, 2001, 29: 45～49.

[20] 欧阳健明. 草酸钙结石研究中的化学基础. 化学通报,2002,65(5): 326～332.

[21] 安瑞华,冯陶,郭应禄. 维生素K缺乏对肾钙素抑制草酸钙结石形成的影响. 中华实验外科杂志,1995,16(10): 583～585.

[22] Nakagawa Y. Properties and function of nephrocalcin: mechanism of kidney stone inhibition or promotion. Keio J Med, 1997, 46(1): 1～9.

[23] Mustafi D, Nakagawa Y, Makinen M W. ENDOR studies of VO^{2+}: probing protein-metal ion interactions in nephrocalcin. Cell Mol Biol, 2000, 46(8): 1345～1360.

[24] Winter P, Schoeneich G, Ganter K, et al. Extracorporeal shock wave lithotripsy and glycosaminoglycans in urine. Int Urol Nephrol, 1998, 30(2): 113～121.

[25] 曹履诚,章绍舜.《尿石症基础与临床研究》,山东科学技术出版社. 1990年.

[26] Osamu M, Kazuhiro Y, Masao T, et al. Possible causes for the low prevalence of pediatric urolithiasis. Urology, 1999, 53: 1229～1234.

[27] Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. Lancet, 2001, 358: 651～656.

[28] 欧阳健明,李祥平. 泌尿系结石的X射线光电子能谱和X射线衍射联合分析. 中国医学科学院学报,2003,25(6): 710～713.

[29] Felix G, Ana I V, Antonia C B, Otakar S. Uric acid calculi: types, etiology and mechanisms of formation. Clin Chim Acta, 2000, 302: 89～104.

[30] 周水根,孙西钊,叶章群. 尿酸结石的成因与诊治. 临床泌尿外科杂志,2001,16(4): 147～149.

[31] Maalouf N M, Cameron M A, Moe O W, Sakhaee K. Novel insights into the pathogenesis of uric acid nephrolithiasis. Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 2004, 13: 181～189.

[32] Craig B L. The molecular basis of kidney stones. Current Opinion in Pediatrics, 2004, 16: 188～193.

[33] Bouropoulos C, Vagenas N, Klepetsanis P, Stavropoulos N, Bouropoulos N. Growth of calcium oxalate monohydrate on uric acid crystals at sustained supersaturation.

Cryst. Res Technol,2004,39(8): 699～704.

[34] Hojaard I, Formander A M, Nisson M A, Tiselius H G. The influence of hydroxyapatite seed on the crystallization induced by volume reduction of solutions with an ion composition corresponding to that in distal tubule at different pH levels. Scand J Urol Neph,1998,32(5): 311～319.

[35] Murayama T, Sakai N, Yamada T, Takano T. Role of the diurnal variation of urinary pH and urinary calcium in urolithiasis: A study in outpatients. Intern J Urol,2001, 8: 525～532.

[36] Hesse A, Heimbach D. Causes of phosphate stone formation and the importance of metaphylaxis by urinary acidification: a review. World J Urol,1999,17: 308～315.

[37] Grases F, Ramis M, Costa-Bauza A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Urol Res,2000,28: 136～140.

[38] Gilman H, Hulins D W. Seeded growth of hydroxyapatite in the presence of dissolved albumin. J Inorg Biochem,1994,55(1): 21～30.

[39] Højgaard I, Tiselius H G. The effects of citrate and urinary macromolecules on the aggregation of hydroxyapatite crystals in solutions with a composition similar to that in the distal tubule. Urol Res,1998,26(2): 89～95.

[40] Bushinsky D A, Parker W R, Asplin J R. Calcium phosphate supersation regulates stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. Kidney Int, 2000, 57(2): 550～555.

[41] Elena Escolar, Juana Bellanato. Spectroscopic and ultrastructural comparative study of cystine calculi in humans and dogs. Biospectroscopy,1999,5: 237～242.

[42] Ramachandran E, Natarajan S. Crystal growth of some urinary stone constituents: Ⅲ. In vitro crystallization of L-cystine and its characterization. Cryst Res Technol, 2004,39(4): 308～312.

[43] Gürdal M, Ayyýldýz A, Huril E, Kanberoǵlu H, Karaman M I. A huge bladder cystine stone. Int Urol Neph,2003,35: 497～499.

[44] 谷现恩，闫治安，潘柏年，孙昌惕. 胱氨酸结石 16 例诊治分析. 中华医学杂志，2003，83(15): 1367.

[45] Nakagawa Y, Asplin J R, Goldfarb D S, Parks J H, Coe F L. Clinical use of cystine supersaturation measurements. J Urol,2000,164: 1481～1485.

[46] Joly D, Rieu P, Méjean A, Gagnadoux M-F, Daudon M, Jungers P. Treatment of cystinuria, Pediatr Nephrol,1999,13: 945～950.

[47] Heimbach D, Jacobs D, Muller S C, Hesse A. Improving cystine stone therapy: an in vitro study of dissolution. Urol,2000,55(1): 17～21.

[48] Parvex P, Rozen R, Dziarmaga A. Goodyer P. Studies of urinary cystine precipitation in vitro. Mol Gene Metabolism,2003,80: 419～425.

[49] 孙颖，杨展澜，吴瑾光，徐光宪等. 胆结石组成和形成机理的研究进展. 中国科学，2001,31(5): 385～392.

[50] 杨展澜，翁诗甫，吴瑾光. 色素及混合型结石组成的研究. 北京大学学报(自然科学版). 1998,34(4): 429～434.

[51] 刘刚,刘剑虹,吴杰,杨海珉.胆结石的微观结构和组成元素研究.电子显微学报,2002,21(6):889～892.

[52] Liu G,Xing D,Yang H-M,Wu J. Vibrational spectroscopic study of human pigment gallstones and their insoluble materials. J. Mol. Struct.,2002,616:187～191.

[53] 海汇,曾繁清,童华,牛菲,谷荧红,金利凡,翟达凯.珍珠形胆结石的红外光谱和扫描电镜分析.分析测试学报.2000,19(4):74～75.

[54] 古丽克孜·阿日甫,杨展澜,翁诗甫,吴瑾光.游离胆红素与固体碳酸钙的相互作用.物理化学学报,2001,17(10):948～951.

[55] Nakai K, Tazuma S, Ochi H, Chayama K. Does bilirubin play a role in the pathogenesis of both cholesterol and pigment gallstone formation? Biochim Biophy Acta,2001,1534:78～84.

[56] Nakai K,Tazuma S,Nishioka T,Chayama K. Inhibition of cholesterol crystallization under bilirubin deconjugation: partial characterization of mechanisms whereby infected bile accelerates pigment stone formation. Biochim Biophy Acta,2003,1632:48～54.

[57] Sunami Y, Tazuma S, Chayama K. Is a role of phospholipase A_2 in cholesterol gallstone formation phospholipid species-dependent? Biochim Biophy Acta, 2001, 1532:51～59.

[58] Stewart L,Oesterle A L, Erdan I, Griffiss J M, Laawrence W W. Pathogenesis of pigment gallstones in western societies: The central role of bacteria. J Gastrointest Surg.,2002,6:891～904.

[59] 文宇,李永国,杨竹林,王学军,魏红,刘威,谭爱玲,苗雄鹰,王群伟,黄生福,Kajander E O,Ciftcioglu N.胆囊结石患者血清、胆汁与胆囊黏膜中纳米细菌的分布研究.中华外科杂志,2003,41(4):267～270.

[60] 李秋荣,拱玉华,周建萍,郜青,庞保柱.高胆固醇饮食对胆结石形成的研究材料与方法.临床肝胆病杂志,2002,18(5):320～321.

[61] 汪继东.97例胆结石危险因素的病例对照研究.疾病控制杂志,2000,4(2):150～151.

[62] 惠建斌,刘会洲,吴瑾光,赵世民.人体胆结石中的环状结构及其体外化学模拟.高等学校化学学报,1998,19:1359～1362.

[63] 谢大,徐怡庄,彭卿,黄田匀,吴瑾光,徐光宪.金属-脱氧胆酸凝胶体系中的分形沉淀及维数计算.北京大学学报(自然科学版),1997,33(2):137～141.

[64] Inui K, Tazuma S, Yamaguchi T, Ohara H, Tsuji T, Miyagawa H, Igarashi Y, Nakamura Y, Atomi Y. Treatment of pancreatic stones with extracorporeal shock wave lithotripsy results of a multicenter survey. Pancreas. 2005,30(1):26～30.

[65] 叶永强,董家鸿.胰腺结石的研究进展.国外医学.外科学分册,2005,32(1):78～81.

[66] Iovanna J L,Dagorn J C. The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide. Biochimicaet Biophysica Acta,2005,1723:8～18.

[67] 易伟光,易善永,付晏,卢创新,易善忠.胰腺结石的诊断和治疗.医药世界,2007,

(3)：127～128.

[68] Reggi M D, Gharib B. Protein-X, Pancreatic Stone-, Pancreatic Thread-, reg-Protein, P19, Lithostathine, and now what? Characterization, structural analysis and putative function(s) of the major non-enzymatic protein of pancreatic secretions. Current Protein and Peptide Science, 2001, 2(1)：19～42.

[69] 成柏君，薄维娜，艾星浩. 支气管结石手术治疗(附 36 例分析). 医师进修杂志. 2001, 24(10)：29～30.

[70] 陈立辉，裘立奋，李光玉. 支气管结石的临床与电镜分析报告. 中国内镜杂志，1998, 14(6)：57～58.

[71] 孟宪昌，白萍萍. 支气管结石 2 例分析. 中国误诊学杂志，2009, 9(9)：2241～2242.

[72] 王久惠，郑玉琼，罗炎杰，汪霞. 支气管结石 2 例报告及国内文献复习. 中国实用内科杂志，2000, 20(8)：505.

[73] 安文海. 前列腺结石 23 例临床分析. 山西医药杂志，2003, 32(6)：565.

[74] 沈学成，杨杰，饶贤才，宋波，周占松. 前列腺结石患者结石中纳米细菌的分离和 16SrRNA 基因的鉴定. 第三军医大学学报，2008, 30(2)：124～126.

[75] Bedir S, Kilciler M, Akal O, Erdemir F, A Avci, Ozgok Y. Endoscopic treatment of multiple prostatic calculi causing urinary retention. Int J Urology, 2005, 12：693～695.

[76] Nokubi M, Kawanowa K, Kawata H, Hanatsuka K, Hosoya Y. Extremely well-differentiated adenocarcinoma of the gastric cardia：A unique case with columnar cells and laminated stones. Pathology Int, 2004, 54：854～860.

[77] Carbognin G, Biasiutti C, El-Khaldi M, Ceratti S, Procacci C. Afferent loop syndrome presenting as enterolith after Billroth Ⅱ subtotal gastrectomy：a case report. Abdom Imaging, 2000, 25：129～131.

[78] 曾冬竹，石彦，陈晓曼. 胃结石致肠梗阻临床分析——附 2 例报告. 消化外科，2004, (1)：42～45.

[79] 孙文丽. 小儿植物性胃结石的诊治体会. 临床小儿外科杂志，2003, 21(5)：398～399.

[80] 李坚. 肺泡微结石症的影像学诊断. 江苏临床医学杂志，2002, 6(2)：159～160.

[81] 陈向阳. 肺泡微结石症 1 例报告并文献复习. 右江民族医学院学报，1997, (2)：280～281.

[82] 陈丽珠，赖京玉. 姐妹肺泡微结石病 2 例报告. 福建医科大学学报，2003, 37(S1)：66.

[83] Hadi U, Ghossaini S, Zaytoun G. Rhinolithiasis：a forgotten entity. Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 126(1)：48～51.

[84] 杨本涛，刘延军，汪卫中，王振常，鲜军舫，梁熙虹，刘中林，高爱英，兰宝森. 鼻石的 CT 诊断. 中华放射学杂志，2003, 37：341～343.

[85] Kodaka T, Debari K, Sano T, Yamada M. Scanning electron microscopy and energy-dispersive X-ray microanalysis studies of several human calculi containing calcium phosphate crystals. Scan Microsc, 1994, 8(2)：241～257.

[86] 赵婧. 阴道巨大结石 1 例. 黔南民族医专学报，2005, 18(2)：115.

[87] 吉雅丽，刘学军，张晶，何艳丽. 河南省 5 岁儿童龋齿患病情况调查分析. 中华实用

诊断与治疗杂志,2009,23(3):311～312.
[88] 陈晨,钟圣纯.氟保护漆预防龋齿的研究进展.中国现代医药杂志,2009,11(12):129～131.
[89] 汪旸,王彩生,向全永,梁友信,盛明,周明生,陈连生,陈晓东.饮水氟对儿童龋齿的影响.中国公共卫生,2004,20(5):530～531.
[90] 王滨滨,郑宝山,王鸿颖,平雅坤,陶跃华.霸州氟中毒地区氟斑牙、龋齿与饮水氟关系的现状调查.中国地方病学杂志,2005,24(1):70～72.
[91] 刘冬梅,杨更森,郭兰英,等.高氟区龋病与氟牙症流行特点.河北医科大学学报,2003,24(5):282～284.
[92] 吴娜,孙建勋,周学东.龋齿研究的物理模型.国际口腔医学杂志,2008,35(4):365～368.
[93] 王金华,林居红.变形链球菌的致龋性及鉴别的研究进展.口腔医学,2003,24(4):247～248.
[94] Eisenburger M, shellis R P, Addy M. Scanning electron microscopy of softened enamel. Caries Res,2004,38:67～74.
[95] Lippert F, Parker D M, and Jandt K D. Toothbrush abrasion of surface softened enamel studied with tapping mode afm and afm nanoindentation. Caries Res,2004,38:464～472.
[96] Kawasaki A, Suge T, Ishikawa K, Ozaki K, Matsuo T, Ebisu S. Ammonium hexafluorosilicate increased acid resistance of bovine enamel and dentine. J Mate Sci,2005,16:461～466.
[97] Van Dijk S, Dean D D, Liu Y, Zhao Y, Chirgwin J M, Schwartz Z, Boyan B D. Purification, Amino Acid sequence, and cDNA Sequence of a Novel Calcium-Precipitting Proteolipid Involved in Calcification of Corynebacterium matruchotii. Calcif Tissue Int,1998,62:350～358.
[98] Roberts-Harry E A, Clerehugh V. Subgingival calculus: where are we now? A comparative review. J Dentistry,2000,28:93～102.
[99] Tang R-K, Hass M, Wu W-J, Gulde S, Nancollas G H. Constant composition dissolution of mixed phases Ⅱ selective dissolution of calcium phosphates. J Coll Interf Sci,2003,260:379～384.
[100] Busscher H J, White D J, Kamminga-Rasker H J, Mei H C. A surface physicochemical rationale for calculus formation in the oral cavity. J Cryst Growth,2004,261:87～92.
[101] 王永功,崔广庆,李勇鹏.Mixenzy洁治剂去除牙石的临床观察.口腔医学,2000,20(3):141～142.
[102] 刘瑶,赵梅,严玉仙.饮水与氟牙症.国外医学(医学地理分册),2008,29(1):38～40.
[103] 任吉芳,吉媛媛.31种元素在着色氟牙症釉质中的定量分析.中华口腔医学杂志,1999,34(4):229～231.
[104] 刘明,孙宏晨,欧阳喈.氟牙症发病机制的研究现状.国外医学口腔医学分册,2001,28(5):301～303.
[105] 戴秀钧,陈娥,张杰,陈再射.氟牙症严重流行地区儿童氟牙症的调查.上海口腔医

学，1998，7(2)：123～124.

[106] DenBesten P K. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. Commun Dent Oral Epidemiol，1999，27(1)：41～47.

[107] 穆亚冰，孙宏晨，欧阳喈. 釉基质丝氨酸蛋白酶的结构及生理病理学意义. 国外医学口腔分册，2003，30(3)：192～194.

[108] Hu J C，Sun X，Zhang C，Simmer J P. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. Eur J Oral Sci，2001，109：125～132.

[109] 欧阳伟，李玉晶，刘佐民，董凤英. 不同钙摄入量对大鼠氟牙症发生的影响. 中华口腔医学杂志，2000，35(1)：47～50.

第 9 章　光合生物体内的二氧化硅

2009 年是达尔文诞辰 200 周年，同年也是他的《物种起源》发表 150 周年[1]。值得一提的是达尔文理论的适用性也体现在无机化学元素在生物化学的进化历程中[2]。Williams 和 Fraústo da Silva 在关于化学元素的自然选择一书中，提出了一个详细的关于化学元素在进化过程中被不同生物所选择的逻辑框架[3]。

在本章中，我们将讨论一个被植物学家忽视了的元素——硅(Si)。35 亿年前，地球大气几乎不含氧。一些简单的微生物已经出现和开始进化，但是它们只适应一个富含氮气、二氧化碳和由火山喷发释放出的含硫的气体环境。约 34 亿年前发生了一个重大的进化事件：蓝细菌通过光合作用向大气中释放氧气，从而决定了多细胞生命最终的进化道路[4]。光合生物释放氧气，导致了许多化学元素的氧化。如今，深达 2 900 km 的地壳和地幔几乎完全由各种氧化物构成，其中大部分为不同晶相(晶体结构)的具有各种化学计量的硅酸盐[5]。在岩石圈中硅的丰度仅次于氧(47.40%)为 27.70%排在第二[6]。

9.1　硅的生物地质化学循环

地壳中硅酸盐矿物主要包括石英、长石和斜长岩。这些矿物通过风化过程形成次生粘土矿物，例如石英和钾长石通过以下简单的反应[6]：

$$\underset{\text{(石英)}}{2SiO_2} + 4CO_2 + 12H_2O \longrightarrow \underset{\text{(硅酸)}}{2Si(OH)_4} + 4HCO_3^- + 4H_3O^+$$

(pH ≈ 5，非常慢的反应速度，$10^{-15.7}$ μmol/(m² · s))　　(9.1)

$$\underset{\text{(钾长石)}}{2KAlSi_3O_8} + 2CO_2 + 11H_2O \longrightarrow \underset{\text{(高岭石)}}{Al_2Si_2O_5(OH)_4} + 2K^+ + 2HCO_3^- + 4H_4SiO_4$$

(pH ≈ 5，慢的反应速度，$10^{-15.5}$ μmol/(m² · s))　　(9.2)

$$\underset{\text{(钾长石)}}{2KAlSi_3O_8} + H_2SO_4 + 4H_2O \longrightarrow Al_2Si_4O_{10}(OH)_2 + 2K^+ + SO_4^{2-} + 2H_4SiO_4$$

(pH ≈ 4，快反应速度，$10^{-14.6}$ μmol/(m² · s))　　(9.3)

风化过程所形成的硅酸，是生物选择性吸收的主要化学形式[6]，它本身是化学惰性的弱酸。当 pH 接近 10 才失去第一个质子[7]。硅酸进入生物体内后，以无定型水合 SiO_2 形式沉积在植物细胞壁上[8]，而在硅藻[9]和海绵骨

架[10]外表面则形成精细有序的分级结构。虽然没有任何证据表明硅参与了特定的生物化学过程，也没有发现存在 Si—C 和 Si—O—C 键的生物分子，但是作为一个有益元素，硅在进化历程中对喜硅生物施加了自然选择作用。反映之一是硅酸显著地降低了铝（铝在岩石圈的丰度为 8.20%，铝在生物圈的丰度为 0.02%，而硅为 0.03%）的生物有效性[6,11]：

$$nAl^{3+} + OH^- \longleftrightarrow [Al(OH)_3]_n(\text{无定型}) + Si(OH)_4 \longleftrightarrow (AlO_n(SiO)_{n/2}(OH)_{2n}) \tag{9.4}$$

一些证据已经清晰地表明硅酸是如何通过限制铝的生物有效性，促进某些生物化学通道的自然选择。如果硅的制约作用不存在，这些生物化学过程将可能被修饰甚至被阻断。例如，水通道蛋白（aquaporins）的主要功能是跨膜运转水分[12]，同时也可以快速跨膜运转硅酸。运转效率取决于金属离子特别是 Mg(Ⅱ)，Ca(Ⅱ)和 Zn(Ⅱ)的作用[13,14]。无论在植物[15]还是动物[16]体内，水通道蛋白都是铝元素的靶标蛋白，即铝的存在将影响其正常功能。因此我们可以推测，在生物化学进化过程中硅酸将铝排除出去，从而促进水和它本身的运转。硅生物化学证据的缺失并不能完全排除硅的生物作用；相反，它的作用是可以用它的生物无机化学所描述，至少部分说明硅酸降低了铝的生物活性，从而解释了铝的非选择性。

9.2　生物硅化的起源和进化

生物能够合成具有特定功能的矿化结构是生物进化历程中最非凡的事件之一。埋藏在化石中的矿化结构印记标志着一类新化学进化历程的开始。从此生物在长期的进化过程中深入发展各自的矿化策略，其中的奥妙吸引着不同学科领域的科学家在过去 20 年中不断探索[17]。

自泥盆纪（devonian）陆生植物加速了矿物的风化速率，对全球的生物地质化学（biogeochemical）过程产生了巨大的影响，并为陆地和水生生物的矿化过程提供了可溶性的化学底物。在海洋、湖泊和陆地的光合生物中生物矿化事件普遍存在。当今陆生植物最重要的生物地质化学作用是维管植物体内（特别是在禾本科植物体内）的 SiO_2 沉积（生物硅化，biosilicification）。在海洋中占统治地位的光合浮游生物是单细胞硅藻。前寒武纪（precambrian）时期海水中硅酸浓度为过饱和，非生物 SiO_2 的化学沉积是早于海绵、放射虫和硅藻细胞内的硅化。随着海洋生物硅化过程的进行，表面海水的硅酸浓度持续下降。硅酸浓度的降低反过来促使硅化生物不断增加对硅酸的亲合力，从而促进了对不饱和硅酸吸收机制的进化[18]。

生物硅化过程有多种起源。如果不存在基因的水平转移，海绵

(sponges)、绿藻(prasinophyte green algae)、放射虫(radiolaria)、阿米巴虫(euglyphid amoebae)、太阳虫目动物(heliozoa)细胞内的硅化都是独立进化的[19]。通过比较硅酸转运子的序列发现,硅藻 bacillariophycese、金藻(chrysophytes)和 synurophytes 的硅化具有同一起源[20]。但令人费解的是在亲缘上与硅藻相近的 bolidophyceae 并不具有硅化作用[21]。此外,水稻根内的两个硅酸转运子和一个地上部调节硅分布的转运子,与硅藻的转运子序列之间也不存在任何相似性[22~24]。

硅藻具有与陆地上占统治地位的光合植物截然不同的复杂进化过程[25]。原核的蓝细菌是最早的有氧光合生物,真核自养光和生物的出现约在15亿年前。关于其进化机制,公认的是内共生(endosymbiosis)假说,即蓝细菌侵染真核异氧生物形成了红藻、绿藻和其他植物,它们共同构成了植物界(plantae)。因此植物界生物大约10%的核基因是来源于内共生的蓝细菌[26]。硅藻是由红藻的一支进化形成的,其细胞壁高度硅化。硅藻被认为是当今海洋中最成功的单细胞藻类,也是现存光合自养(photoautotrophic)生物中对 SiO_2 的需求最高的[27]。关于它的硅化过程的起源,通常认为发生在接近侏罗纪(Jurassic,180 Ma)中期[28]。海洋中 SiO_2 主要来源于陆地岩石风化形成的可溶性硅酸,由河流将它们引入到海洋。陆地的抬升是决定风化过程中形成的硅酸进入海洋的1个主要因子[29]。

目前,陆地上大约有10 000种禾本科草(poaceae 或 gramineae),有600~700个属[30],是开花植物中最大的家族,占绝对的生态优势。它们中有些种如小麦和水稻是主要的栽培作物,为人类提供大量的食物。硅化在禾本科植物如小麦和水稻叶片内普遍存在。除了沉积在细胞壁上的 SiO_2 外,细胞内也可形成各种形貌的 SiO_2。形成过程通常为细胞质首先降解,细胞核消失,分化成熟的细胞死亡,液泡变大,硅酸在硅细胞的液泡(vacuole)内聚合,最后 SiO_2 填充细胞内腔(lumen)形成各种形貌的植硅石(phytoliths)[31]。目前发现最早的草化石大约在古新世和始新世(paleocene-eocene)之交,距今约5 600万年[32]。然而,Prasad 等通过分析残余在恐龙粪化石(coprolites)中的植硅石,第一次给出一个清晰的结论:禾本科草的起源和分枝可追溯至6 500万年到7 100万年前的白垩纪(creaceous)[33],说明生物硅化在当时的禾本科草中已经存在。由13位研究者组成的草本植物系统树研究小组[34],通过对植硅石的系统分析将现存草本植物的亚科(subfamilies)和分化枝(clades)区分开来,使得系统进化树(phylogenetic tree)更加可靠,并由此推断出植硅石形貌的变化过程(图9.1)。

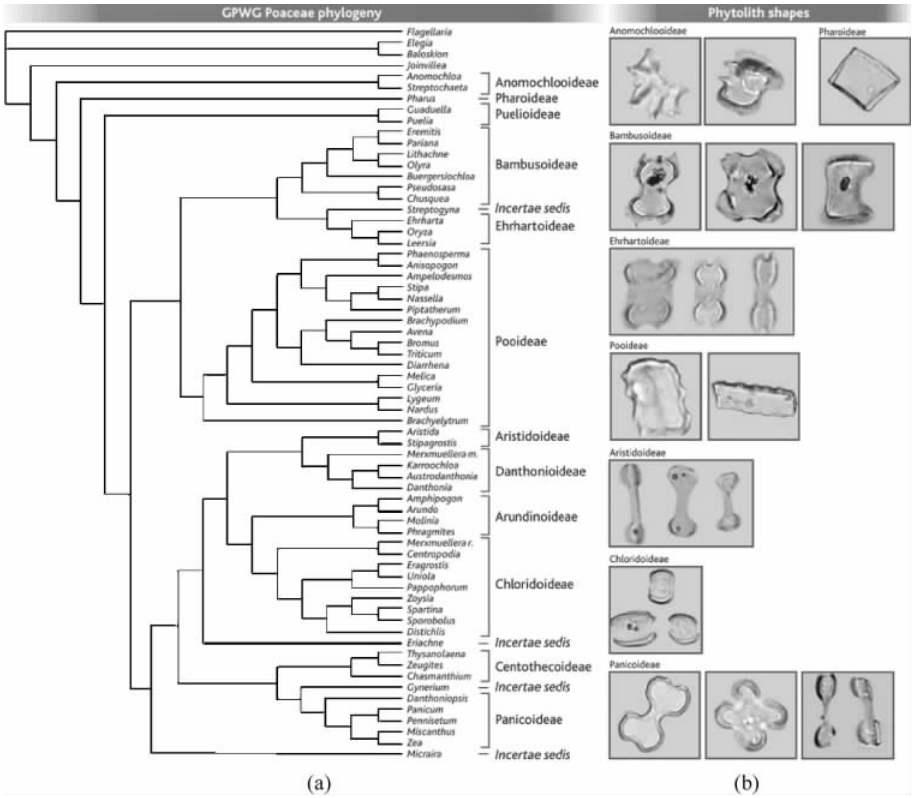


图 9.1　草世系图

(a) 禾本科草的系统树[34]；(b) 植硅石(SiO_2)形貌的变化[32,35]

9.3　硅化学和硅生物化学

截至目前，硅生物化学仍然是未知的，即在活体中没有发现有机硅的组分。最近，Kinrade 的研究小组指出，在碱性溶液中，如果碳水化合物分子含有至少 4 个相邻的羟基(其中 2 个具有苏式构型，threo configuration)，硅酸阴离子和碳水化合物就很容易形成有机硅化合物[36,37]。而胞外物质、细胞膜、木质部汁液和土壤溶液都含有这样的配体分子。形成的有机硅化合物含有五或六配位的硅中心，这与典型的含有四配位硅中心的硅酸盐阴离子不同。他们在培养介质中引入^{15}N时，^{29}Si-NMR 在 −131.5 ppm 处有一个窄的共振峰，这个共振峰被归属为一个含 N 的具有六配位的硅复合物[38]。此外，五配位含 N 的硅复合物可以解释海绵硅针中的蛋白 silicatein 催化正硅酸甲酯聚合形成 SiO_2 的化学过程[39]。

糖是生物化学过程中的重要组分，参与能量过程(形成糖元和淀粉)，结

构组成(纤维素和细胞壁)和遗传信息(DNA 和 RNA)。因此,在生命起源前的世界中,糖的合成对任何生命起源理论都有重要意义。Formose 反应是一个非生物形成糖的可能过程[40,41],此反应在一个加热的碱性条件下可将甲醛(HCHO; C1)转化形成各种糖。但是 Formose 反应需要碱性条件,同时产物是消旋的,而生物条件下形成的糖是有手性的。Gabel 和 Ponnamperuma 使用两个在地壳中常见的铝硅酸盐(高岭石和伊利石)和甲醛混合反应产生了单糖[42]。硅酸盐是组成地壳和地幔的主要矿物。无定型 SiO_2 在 pH=9 的溶液中是易溶解的(图 9.2),其溶解度在高的碱性条件下略微升高[43]。最近,Lambert 等报道了一个类似反应[44],在室温条件下硅酸钠催化简单的 C2(已醇醛)分子自发形成了 C4 和 C6 的糖-硅酸盐复合物。反应 30 min 后,^{29}Si-NMR 指出一个带负电的五配位硅出现(图 9.3(b))。通过水解将 C2-硅酸盐复合物转化为自由糖(不再和硅酸盐复合)之后,^{13}C-NMR 谱几乎完全由 C4 糖(赤藓糖和苏阿糖)构成(图 9.3(a)),反应进行 12 h 后 C6 复合物是主要产物。在相似的 pH 条件下,用 NaOH 取代 Na_2SiO_3,12 h 后反应只形成了非糖的寡聚物,表明硅酸盐对糖的形成起到了选择性和稳定性作用。在相似反应条件下使用 C3(甘油醛)为起始反应物只形成了更简单和更稳定的 C6 复合物,这和硼酸盐诱导的 Formose 反应的基本原理是相似的[45],但在地壳中的硅酸盐的有效性比硼酸盐更高。

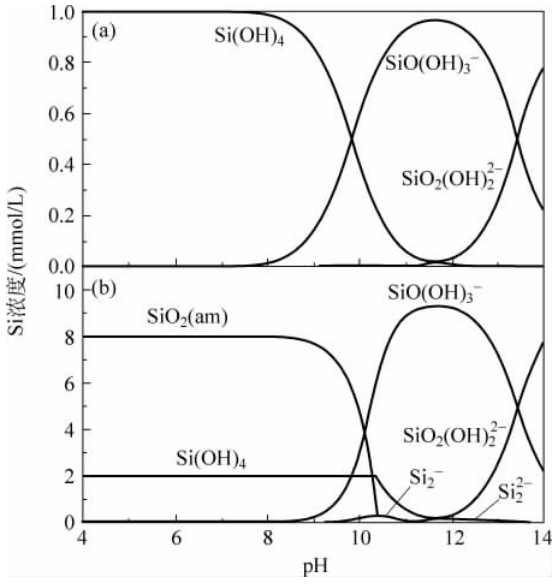


图 9.2　在不同的 pH 值下硅酸钠溶液中硅酸盐阴离子的分布[43]

(a) 1 mmol/L; (b) 10 mmol/L

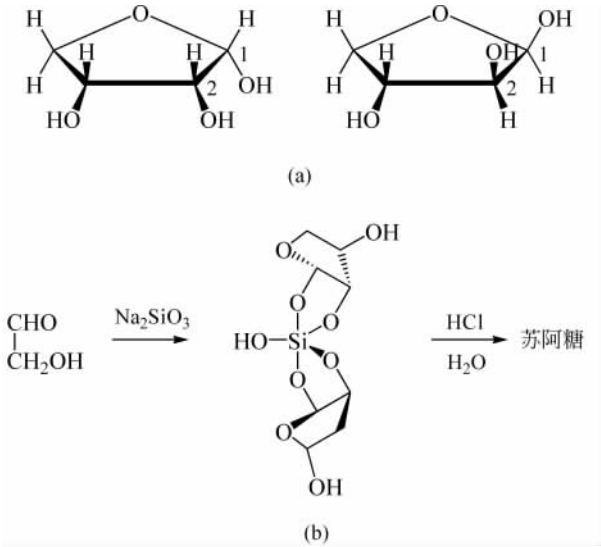


图　9.3

(a) 赤藓糖(erythrose) 和苏阿糖(threose)与硅酸钠的反应 1-和 2-羟基是顺式的；
(b) 硅酸钠催化乙醇醛合成苏阿糖的过程[44]

硅酸的自平衡调节(homeostasis) 是如何在没有硅生物化学反应的前提下进行的仍然是个谜。至今没有发现任何酶需要硅作为它的辅因子。硅没有被生物所选择(non-selection of silicon)似乎与其在地壳中的普遍存在相矛盾。硅酸是生物可以利用硅的唯一化学形式。它是一个极弱的酸，在 pH 接近 10 才能失去第一个质子[43]。在绝大多数生命所处的 pH 条件下，硅酸是一个中性小分子，几乎不发生任何无机化学和生物有机化学反应[46]。也许硅酸分子的惰性导致它在生物化学进化过程中没有被选择。硅酸将铝从生物过程中排除出去(HAS 的形成)间接地影响了硅酸的自调节。此外，硅酸并不能直接和生物模板分子结合形成有序的 SiO_2 沉积。通过铝和生物模板分子结合形成的$[Al(OH)_3]_n$ 表面，则有可能诱导硅酸的聚合反应。之后形成的硅醇表面可以作为催化剂进一步诱导硅酸的有序聚合，最终形成可控的无定型 SiO_2 沉积，因此微量的铝很有可能包覆在 SiO_2 内部[47]。

硅藻和水稻对硅酸的吸收都有一个活性的运转过程。在进化层面上体现在：如果没有这个活性机制，硅酸的运转将不可能发生(即使发生因速度太慢，不能维持正常功能)。依据 Donnan 平衡，硅酸通过生物膜达到平衡，从而确保胞内硅酸浓度的相对恒定。硅酸被吸收进入生物体后，随后将发生 SiO_2 的沉积反应。通常在自然水体中的硅酸是不饱和的，因此从热力学角度来看，生物沉积 SiO_2 需要在一个特定空间(compartment)内累积硅酸使它的活

度达到过饱和,限制沉积过程发生的动力学因子(kinetic constraints)也需要同时排除[48]。这意味着 SiO_2 的沉积是跨过一个或多个生物膜的活性运转的结果。唯一的例外可能是植物胞外沉积的 SiO_2,通过叶片蒸腾作用,木质部汁液中硅酸浓度达到过饱和,从而导致 SiO_2 沉积在质外体(apoplasm)空间内。

硅藻(thalassiosira pseudonana)是一个已经建立的模式硅化生物,全基因组已经测序[49]。作为一个典型的硅化生物,过去十年在硅藻细胞壁上已经发现了 4 种可以诱导/指导 SiO_2 沉积的生物分子:①silaffins,一个高度磷酸化的多肽[50,51];②长链的多胺(polyamines,LCPAs)[52];③酸性蛋白 silacidins[53];④几丁质多糖 poly-N-acetyl-D-glucosamine(chitin)[54]。由于高等植物的复杂性,SiO_2 在其体内聚合和沉积机制的研究相对滞后。研究发现可溶性硅酸被植物根吸收后,通过蒸腾流从根中运输到木质部。^{29}Si-NMR 谱指出在小麦木质部汁液中仅仅存在 $Si(OH)_4$ 和 $(OH)_3SiOSi(OH)_3$ 2 种形式,含量比大致是 7∶1[55]。当硅酸浓度达到 100～200 ppm 时自聚合反应(autopolycondensation)发生[56],最终形成具有一定尺寸和形貌的 SiO_2 粒子。生长的 SiO_2 粒子和植物细胞壁作用,结果这些粒子表面净带负电。

在禾本科(poales)植物和木贼属马尾草(equisetales)的细胞壁上存在的一种混合交联的半纤维素组分(1→3,1→4-β-D-葡聚糖),目前认为它很可能是 SiO_2 沉积的有机模板分子[57]。禾本科草和木贼在亲缘关系上是非常远的,但都有硅化结构[58]。相对于水稻和玉米等禾本科植物,较为原始的木贼属植物中硅的含量很高(硅被认为是木贼生长所必须的营养元素之一[59]),因此对它的研究也较深入。溶解木贼细胞壁分离和提取包覆在 SiO_2 粒子内的有机物后发现,Pro-Glu,Pro-Lys 和 Ser-Asp-Gly 含量较高,同时含有葡萄糖和木糖[60]。除了包覆在 SiO_2 粒子内的生物分子,硅也可以和细胞壁的某些高分子包括蛋白和碳水化合物组分相结合。最近 Currie 和 Perry 提取木贼细胞壁后发现,硅和半乳糖(galactose),鼠李糖(rhamnose)和阿拉伯糖(arabinose)等结合[61],表明果胶多糖结构如 rhamnogalacturonan-Ⅰ(RG-Ⅰ)和 arabionogalactans[62],可能和硅相连接。另外,细胞壁中非极性氨基酸,如丙氨酸(alanine)、亮氨酸(leucine)、苯基丙氨酸(phenylalanine)含量为 30%～38%(摩尔分数),同时含有少量的脯氨酸(proline),5%～10%(摩尔分数)和脯氨酸二肽如 Gly-Pro 和 Pro-Hyp。较高的脯氨酸含量表明蛋白可能含有刚性的主链和一种类似胶原的二级结构。这些带正电的氨基酸通过氢键增加了与硅作用的机会。硅很可能以某种化学结合方式共价交联细胞壁上的果胶分子[63],从而提高了细胞壁结构的刚性和稳定性。类似的结果在黄瓜叶片受到病原真菌的侵害时,黄瓜叶诱导表达了一个富含脯氨酸的蛋白(PRP1),它的 C 末端含有较高数量的带正电的赖氨酸和精氨酸[64]。体外合成的具有

相似序列的短肽也能够催化正硅酸聚合形成 SiO_2 粒子，表明细胞壁上带正电的 PRP 可催化 SiO_2 的沉积，从而加固了细胞壁以抵抗真菌感染叶外表皮细胞。分析小麦叶片硅质体也同样发现有糖蛋白的片段存在[65]。

9.4　硅化结构和功能关系

生物硅化结构赋予硅化生物许多功能[66~69]。对于单细胞的硅藻来说，从生态优势（结构-功能关系）角度来看，硅化的细胞壁可过滤紫外线[70]，且用 SiO_2 来构筑硅藻细胞壁比用有机碳（多糖）需要能量更少[71]。在生理功能方面，尤其是无机碳的获取过程中，硅藻 SiO_2 作为 HCO_3^- 脱氢酶的质子（pH）缓冲剂，有效地确保酶催化 HCO_3^- 向 CO_2 的转化[72]。在力学方面，硅藻细胞壁上网眼状的镶饰比中世纪最精美的盔甲还要复杂。硅藻似乎已经找到了如何平衡其重量、强度和形成防护衣的方法。来自德国 Alfred Wegener 极地和海洋研究所的 Christian Hamm 及其同事设法用玻璃针压碎活的 3 种硅藻时发现，它们可以承受的压力在 1～7 N/mm^2 范围，这相当于 100～700 t/m^2，这个压力可形象地比喻为一个餐桌可承受一个成年大象的重量。硅藻细胞壁表面上有序排列的 SiO_2 使得单个细胞可承受如此巨大的压力，使它们在不同深度的淡水或海水中均可以生存。如果细胞壁没有这层特殊的纳米结构 SiO_2 的修饰，仅需 40%的力即可将它们压碎[73]。硅藻雪花状美丽的结构长期吸引着研究者的注意力。1830 年第一次在显微镜下观察到它们时，硅藻壳上的 SiO_2 被误认为是晶体。诺贝尔生物学奖获得者 Karl von Frisch 甚至警告大家：不要被它美丽的外衣所误导。自然并非是挥霍浪费的，没有进化的理由这件美丽的硅衣是不会被创造性地设计出来的。由于各种“竞争”，生物在进化过程中不断地被环境所塑造，而外部的硅壳是适应环境而发展出的最有效的力学防护[74]。

除了 Equisetum 属的植物外，硅并不是陆生维管植物必需的营养元素。然而，硅化结构的存在显著地提高了植物抵抗环境胁迫的能力[75~78]，这包括提高植物对生物胁迫如真菌病害[64,79~82]和对非生物胁迫如重金属[83~86]、干旱[87,88]、盐碱[89]、倒伏[90]、低温[91]和高温[92]等的抗性。借助高分辨的红外热成像仪，我们系统地研究了本特草（*agrostis palustris*）在室温和高温下叶片温度后发现，硅化叶片的叶温在室温下比非硅化的对照叶片低 1℃，而在高温下则低 3℃以上（图 9.4）。这是由于 SiO_2 在中红外区（8～12 μm）有较高的红外辐射效率，可有效辐射从环境中吸收的热量，从而降低叶片温度[92]。

光合生物体内的生物硅化现象是普遍发生的。陆生植物最重要的生物地质化学作用是在维管植物特别是禾本科草体内的 SiO_2 的沉积。从系统发

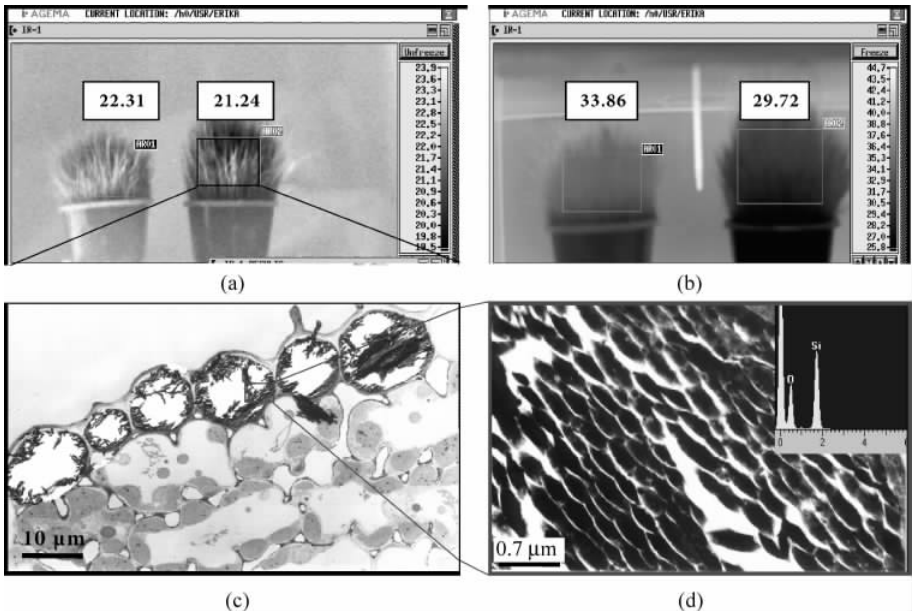


图 9.4　正常生长 55 天后本特草在(a)室温和在(b)高温下的红外热成像图。(c) 在(a)和(b)中右边的植物吸收 3 mmol/L Na_2SiO_3 后在其外表皮细胞内形成生物硅化结构的 TEM 图。左边的植物是未施用 Na_2SiO_3 的对照植物。(d)(c)图中矩形框的放大 TEM 图,显示了沉积在外表皮细胞内的 SiO_2(在图(d)中的插入图是 EDX 谱)[92]

生的角度看,硅化过程是有不同的起源和进化过程,同时也和光合作用密切相关。是否在这些硅化的光合生物和它们所处的环境之间存在共同的进化,仍然需要大量的证据加以证实。但从硅化的结构-功能关系上看,光合生物体内的 SiO_2 在生物进化过程中显然扮演了重要角色。

参 考 文 献

[1] Darwin C. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London: John Murray, 1859.

[2] Pagel M. Natural selection 150 years on. Nature, 2009, 457: 808～811.

[3] Williams R J P, Fraústo da Silva J J R. The natural selection of the chemical elements. The environment and life's chemistry. Oxford: Clarendon Press, 1996.

[4] Copley J. The story of O. Nature, 2001, 410: 862～864.

[5] Spence J C H. Oxygen in crystals, Seeing is believing. Science, 2003, 299: 839～841.

[6] Exley C. Silicon in life: A bioinorganic solution to bioorganic essentiality. J Inorganic

Biochem,1998,69: 139～144.
[7] Sjöberg S. Silica in aqueous environments. J Non-Crystall Solids,1996,196: 51～57.
[8] Wang L J,Wang Y H,Li M,Zhang W X,Zhang F S,Li T J. Biogenic nanostructured silica. Prog Nat Sci,2002,12: 401～406.
[9] Wetherbee R. The diatom glasshouse. Science,2002,298: 547.
[10] Aizenberg J,Weaver J C,Thanawala M S,Sundar V C,Morse D E,Fratzl P. Skeleton of Euplectella sp.: Structural hierarchy from the nanoscale to the nacroscale. Science,2005,309: 275～278.
[11] Exley C. Darwin,natural selection and the biological essentiality of aluminium and silicon. Trends Biochem Sci,2009,34: 589～593.
[12] Bienert G P,Schüssler M D,Jahn T P. Metalloids: essential,beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. Trends Biochem Sci,2008,33: 20～26.
[13] Gerbeau P,Amodeo G,Hnezler T,Santoni V,Ripoche P,Maurel C. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. Plant J,2002,30: 71～81.
[14] Fu D,Libson A,Miercke L J W,Weitzman C,Nollert P,Krucinski J,Stroud R M. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity,Science,2000,290: 481～486.
[15] Milla M A R,Butler E,Huete A R,Wilson C F,Anderson O,Gaustafson J P. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. Plant Physiol,2002,130: 1706～1716.
[16] Mahieu S,Millen N,del Carmen Contini M,Gonzalez M,Molinas S M,Elías M M. Urinary concentrating mechanism and aquaporin-2 abundance in rats chronically treated with aluminum lactate. Toxicology,2006,223: 209～218.
[17] Dove P M. The rise of skeletal biominerals. Elements,2010,6: 37～42.
[18] Raven J A,Giordano M. Biomineralization by photosynthetic organisms: evidence of coevolution of the organisms and their environment Geobiol,2009,7: 140～154.
[19] Knoll A H. Biomineralization and evolutionary history. In Biomineralization (eds Dove PM,de Yoreo JJ,Weiner S). Rev Minera Geochem,54,2003,329～356.
[20] Thamatrakoln K,Hildebrand M. Silicon uptake in diatoms revisited: a model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters. Plant Physiol,2008,146: 1397～1407.
[21] Sims P A,Mann D G,Medlin L K. Evolution of the diatoms: insights from fossil,biological and molecular data. Phycologia,2006,45: 361～402.
[22] Ma J F,Tamai K,Yamji N,Mitani N,Kinishi S,Katsuhara M,Ishiguro M,Murata Y,Yano M. A silicon transporter in rice. Nature 2006,440: 688～691.
[23] Ma J F,Yamaji N,Mitani N,Tamai K,Konishi S,Fujiwara T,Katsuhara M,Yano M. An efflux transporter of silicon in rice. Nature 2007,448: 209～213.
[24] Yamaki N,Mitatni N,Ma J F. A transporter regulating silicon distribution in rice shoots. Plant Cell,2008,20: 1381～1389.
[25] Armbrust E V. The life of diatoms in the world's oceans. Nature,2009,459:

185～192.

[26] Reyes-Prieto A, Hackett J D, Soares M B, Bonaldo M F, Bhattacharya D. Cyanobacterial contribution to algal nuclear genomes is primarily limited to plastid functions. Curr Biol,2006,16: 2320～2325.

[27] Falciatore A,d'Alcalá M R,Croot P,Bowler C. Perception of environmental signals by a marine diatom. Science,2000,288: 2363～2366.

[28] Falkowski P G,Katz M E,Knoll A H,Quigg A,Raven J A,Schofield O,Taylor F J R. Science,2004,305: 354～360.

[29] Huh Y,Edmond J M. The fluvial geochemistry of the rivers of Eastern Siberia: Ⅲ. Tributaries of the Lena River draining the basement terrains of the Aldan Shield and the Trans-Baikal Highlands,Geochim Cosmochim Acta,1999,63: 967～987.

[30] Kellogg E A. Evolutionary history of the grasses. Plant Physiol, 2001, 125: 1198～1205.

[31] Lawton J R. Observations on the structure of epidermal cells, particularly the cork and silica cells, from flowering stem internode of Lolium temulentum L. (Germinae). Botanical J Linnean Soc,1980,80: 161～177.

[32] Piperno D R,Sues H D. Dinosaurs dined on grass. Science,2005,310: 1126～1128.

[33] Prasad V,Strömberg C A E, Alimohammadian H, Sahni A. Dinosaur coprolites and the early evolution of grasses and grazers. Science,2005,310: 1177～1180.

[34] Grass Phylogeny Working Group. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses(Poaceae). Ann Missouri Bot Gard,2001,88: 373～457.

[35] Piperno D R. Phytolith Analysis: An archaeological and geological perspective. San Diego: Academic Press,1988.

[36] Kinrade S D,Del Nin J W, Schach A S, Sloan T A, Wilson K L, Knight C T G. Stable five- and six-coordinated silicate anions in aqueous solution. Science 1999, 285: 1542～1545.

[37] Kinrade S D, Hamilton R J, Schach A S, Knight C T G. Aqueous hypervalent silicon complexes with aliphatic sugar acids. J Chem Soc Dalton Trans,2001,961～963.

[38] Kinrade S D,Gillson A-M E,Knight C TG. Silicon-29 NMR evidence of a transient hexavalent silicon complex in the diatom Navicula pelliculosa. J Chem Soc Dalton Trans,2002,307～309.

[39] Zhou Y, Shimizu K, Cha J N, Stucky G D, Morse D E. Efficient catalysis of polysiloxane synthesis by silicatein α requires specific hydroxy and imidazole functionalities. Angew Chem Int Ed,1999,38: 780～782.

[40] Butlerow A. Bildung einer zuckerartigen substanz durch synthese. Justus Liebigs Ann Chem,1861,120: 295～298.

[41] Orgel L E. Self-organizing biochemical cycles. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97: 12503～12507.

[42] Gabel N W,Ponnamperuma C. Model for origin of monosaccharides. Nature,1967, 216: 453～455.

[43] Yang X,Roonasi P,Holmgren A. A study of sodium silicate in aqueous solution and

sorbed by synthetic magnetite using in situ ATR-FTIR spectroscopy. J Colloid Surf Sci. 2008,328: 41～47.

[44] Lambert J B, Gurusamy-Thangavelu S A, Ma K B. The Silicate-mediated formose reaction: bottom-up synthesis of sugar silicates. Science, 2010, 327: 984～986.

[45] Ricardo A, Carrigan M A, Olcott A N, Benner S. A. Borate minerals stabilize ribose. Science, 2004, 303: 196.

[46] Birchall J D. The role of silicon in biology. Chem Britain, 1990, 26: 141～144.

[47] Exley C. Silicon in life: whither biological silicification? W. E. G. Muller and M. A. Grachev (eds.), Biosilica in Evolution, Morphogenesis, and Nanobiotechnology, Progress in Molecular and Subcellular Biology, Marine Molecular Biotechnology 47, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2009, 173～184.

[48] Raven J A, Giordano M. Biomineralization by photosynthetic organisms: evidence of coevolution of the organisms and their environment? Geobiol, 2009, 7: 140～154.

[49] Armbrust E V, et al. The genome of the diatom Thalassiosira Pseudonana: ecology, evolution, and metabolism. Science, 2004, 306: 79～86.

[50] Kröger N, Deutzmann R, Sumper M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. Science, 1999, 286: 1129～1132.

[51] Kröger N, Lorenz S, Brunner E, Sumper M. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. Science, 2002, 298: 584～586.

[52] Kröger N, Deutzmann R, Bergsdorf C, Sumper M. Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 14133～14138.

[53] Wenzl S, Hett R, Richthammer P, Sumper M. Silacidins: acidic phosphopeptides from diatom shells assist in silica precipitation in vitro. Angew Chem Int Ed, 2008, 47: 1729～1732.

[54] Brunner E, Richthammer P, Ehrlich H, Paasch S, Simon P, Ueberlein S, van Pée K H. Chitin-based organic networks: an integral part of cell wall biosilica in the diatom Thalassiosira pseudonana. Angew Chem Intl Ed, 2009, 48: 9724～9727.

[55] Casey W H, Kinrade S D, Knight C T G, Rains DW, Epstein E. Aqueous silicate complexes in wheat, Triticum aestivum L. Plant Cell Environ, 2003, 27: 51～54.

[56] Perry C C. Silicification: the processes by which organisms capture and mineralize silica. Rev Mineral Geochem, 2003, 54: 291～327.

[57] Fry SC, Nesselrode B H W A, Miller J G, Mewburn B R. Mixed-linkage(1→3), (1→4)-β-D-glucan is a major hemicellulose of Equisetum (horsetail) cell walls. New Phytologist, 2008, 179: 104～115.

[58] Sørenson I, Pettolino F, Wilson S M, Doblin M S, Johansen B, Bacic A, Willats W G T. Mixed-linkage(1→3)(1→4)-β-D-glucan is not unique to the Poales and is an abundant component of Equisetum arvense cell walls. Plant J, 2008, 54: 510～521.

[59] Chen C H, Lewin J. Silicon as a nutrient element for Equisetum arvense. Can J Bot, 1969, 47: 125～131.

[60] Harrison C C. Evidence for intramolecular macromolecules containing protein from plant silicas. Phytochem, 1996, 41: 37～42.

[61] Currie H A, Perry C C. Chemical evidence for intrinsic 'Si' within Equisetum cell walls. Phytochem, 2009, 70: 2089～2095.

[62] Ridley B L, O' Neill M A, Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling. Phytochem, 2001, 57: 929～967.

[63] Schwarz K. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. Proc Natl Acad Sci USA, 1973, 70: 1608～1612.

[64] Kauss H, Seehaus K, Franke R, Gilbert S, Dietrich R A, Kröger N. Silica deposition by a strongly cationic proline-rich protein from systemically resistant cucumber plants. Plant J, 2003, 33: 87～95.

[65] Elbaum R, Melamed-Bessudo C, Tuross N, Levy A A, Weiner S. New methods to isolate organic materials from silicified phytoliths reveal fragmented glycoproteins but not DNA. Quaternary Intl, 2009, 193: 11～19.

[66] Raven J A. Cycling silicon—the role of accumulation by plants. New Phytologist, 2003, 158: 419～421.

[67] Raven J A, Waite A M. The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? New Phytologist, 2004, 162: 45～61.

[68] Epstein E. Silicon. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 641～664.

[69] Epstein E. Silicon: its manifold roles in plants. Ann Appl Biol, 2009, 155: 155～160.

[70] Davidson A T, Bramich D, Marchant H J, McMinn A. Effects of UV-B irradiation on growth and survival of Antarctic marine diatoms. Mar Biol, 1994, 119: 507～515.

[71] Raven J A. The transport and function of silicon plants. Biol Rev, 1983, 58: 179～207.

[72] Milligan A J, Morel F M M. A proton buffering role for silica in diatoms. Science, 2002, 297: 1848～1850.

[73] Hamm C E, Merkel R, Springer O, Jurkojc P, Maier C, Prechtel K, Smetacek V. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. Nature, 2003, 421: 841～843.

[74] Ball P. Beauty gives diatoms strength. Nature, 2003, doi: 10.1038/news030217-8.

[75] Neethirajan S, Gordon R, Wang L J. Potential of silica bodies (phytoliths) for nanotechnology. Trends Biotechnol, 2009, 27: 461～467.

[76] 王荔军, 王运华, 李敏, 张文绪, 张福锁, 李铁津. 生物源的纳米结构 SiO_2. 自然科学进展, 2002, 12(6): 561～565.

[77] 王荔军, 李敏, 李铁津, 王运华, 张福锁. 植物体内的纳米结构 SiO_2. 科学通报, 2001, 46(8): 625～632.

[78] 王荔军, 郭中满, 李敏, 李铁津. 生物矿化纳米结构材料和植物硅营养. 化学进展, 1999, 11(2): 119～128.

[79] 王荔军, 王运华, 周益林, 段霞喻, 李敏, 张福锁. 纳米结构 SiO_2 与植物真菌病害发生的关系. 华中农业大学学报, 2001, 20(6): 593～597.

[80] 刘彩云, 周益林, 王荔军, 段霞瑜, 张福锁, 沈慧敏. 不同硅源制剂对小麦白粉病的作用效果及对白粉病菌孢子萌发的影响. 植物病理学报, 2008, 38(3): 312～316.

[81] Fauteux F, Chain F, Belzile F, Menzies J G, Bélanger R R. The protective role of

silicon in the Arabidopsis-powdery mildew pathosystem. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103: 17554～17559.

[82] Cai K Z, Gao D, Luo S M, Zeng R S, Yang J Y, Zhu X Y. Physiological and cytological mechanisms of silicon-induced resistance in rice against blast disease. Physiol Plant, 2008, 134: 324～333.

[83] Wang L J, Wang Y H, Chen Q, Cao W D, Zhang F S. Silicon induced cadmium tolerance of rice seedlings. J Plant Nutr, 2000, 23: 1397～1406.

[84] Zhang C C, Wang L J, Nie Q, Zhang W X, Zhang F S. Long-term effects of exogenous silicon on cadmium translocation and toxicity in rice (Oryza sativa L.). Environ Exper Bot, 2008, 62: 300～307.

[85] Desouky M, Jugdaohsingh R, McCrohan C R, White K N, Powell J J. Aluminum-dependent regulation of intracellular silicon in the aquatic invertebrate Lymnaea stagnalis. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 3394～3399.

[86] Neumann D, zur Nieden U. Silicon and heavy metal tolerance of higher plants. Phytochem, 2001, 56: 685～692.

[87] Gao X P, Zou C Q, Wang L J, Zhang F S. Silicon decreases transpiration rate and conductance from stomata of maize plants. J Plant Nutri, 2006, 29: 1637～1647.

[88] Gao X P, Zou C Q, Wang L J, Zhang F S. Silicon improves water use efficiency in maize plants. J Plant Nutri, 2004, 27: 1457～1470.

[89] Yeo A R, Flowers S A, Rao G, Welfare K. Silicon reduces sodium uptake in rice (Oryza sativa L.) in saline condition and this is accounted for by a reduction in the transpirational bypass flow. Plant Cell Environ, 1999, 22: 559～565.

[90] Yamanaka S, Takeda H, Komatsubara S, Ito F, Usami H, Togawa E, Yoshino K. Structures and physiological functions of silica bodies in the epidermis of rice plants. Appl Phys Lett, 2009, 95: 123703.

[91] He Y M, Xiao H D, Wang H Z, Chen Y J, Yu M. Effect of silicon on chilling-induced changes of solutes, antioxidants, and membrane stability in seashore paspalum turfgrass. Acta Physiol Plant, 2010, 32: 487～494.

[92] Wang L J, Nie Q, Zhuang J Q, Li M, Yang W S, Zhang F S, Li T J, Wang Y H. Biosilicified structures for cooling plant leaves: A mechanism of highly efficient midinfrared thermal emission. Appl Phys Lett, 2005, 87: 194105.

向人体内钙化学习——写在书后

近十几年中，越来越多的人对于生物矿化研究兴趣大增。之所以有这么多的学科，这么多的研究者如此投入，主要是因为生物矿化研究涉及生物医学、材料学、地质学、古生物学、环境科学、冶金学等众多应用学科，而且所有这些都围绕生物学和化学的基本问题：生命体系中的复杂过程。但是，也因为如此，大家的研究目标、对象、观点和方法就大不相同。另外，还有一个生物矿化研究引人注目的原因，那就是它被几个学科最近的重要进展所推动。由于推动因素不同，不同研究者的着重点也很不同。形成一种多学科参与的少见的局面。这是世界范围的现象和趋势，影响我们的研究也是必然的。有鉴于此，必须从这个现状出发，面对目标、思路和方法的多样性，考虑如何整合各方面的研究力量，把我国的生物矿化研究引向有特色，走在世界发展前沿的境界。为了这个目的，我认为首要的是从不同学科、不同目标的研究中抽出迫切需要解决而又欠缺认识的关键问题，在深入讨论的基础上理出解决这些问题的思路来，鼓励大家从各个方面进行研究。还有一点，我们习惯于在自己的领域中，用自己惯用的思维方式，采取惯用的模式做研究工作。而且，这些研究思路又大都沿袭国外传统和流行的模式。只有打破这些习惯模式，才能找到突破口，才能把研究工作提升到新的层次。简单地说，以上两方面的关键就是要融合各家之说，采取各家之长，不分你我，兼容并蓄，提出新思路和创造新模式。要想做到这一点，就必须号召不同背景、不同目标、不同角度的生物矿化研究者讨论生物矿化的基本问题。把讨论聚焦在大家都感兴趣的基本问题上。哪些问题是值得研究的基本问题呢？在这里，我先大胆地提出两个问题，供同行参考。一个问题是向生物体内的矿化过程学习；另一个是了解细胞、基质、矿物质三者之间的相互作用。实际上，两者是关联的，而前一个是最根本的。

一、向生物体内的矿化过程学习

生物矿化（biomineralization）和生物矿物（biomineral）是两个概念。

生物矿化指生物体（从细胞到整体动物）介入的矿物质生成的过程。它是若干有关生物事件构成的事件顺序。在生物事件顺序中，每一事件又都包含若干化学事件，这些化学事件也有一定顺序。矿化过程中包含的生物事件

顺序以及每个环节中的化学事件顺序不仅因生物物种而异，而且即使在同一生物体内的不同部位也有所不同。在这里，仅以人体内的钙化为重点，讨论生物矿化的基本问题。在骨形成和再造过程中，有成骨细胞和破骨细胞参与的生物事件顺序；但是在骨形成这个环节中又有钙离子和磷酸根离子结合成簇、成核、成长、聚集和相转变等构成的化学事件顺序。生物学家和化学家的共同任务，一是精确定义和描述这些化学事件中的化学反应和反应间的互动关系；二是定义和描述这些化学事件如何组成生物事件顺序；三是认识这些事件之间的关系，以及这些关系如何受内在的和外原的因素所影响，在此基础上探讨如何干预和调整这种变动。

生物矿物（或生物矿物材料）则是指上述过程所产生的含矿物质和有关有机基质，并且按照一定高级结构组装成的复合物质，如人体的硬组织。在正常情况下，这些正常生成的生物矿物作为硬组织具有一定的功能，与结构有一定的关系，是生物体进化的产物。而且，人体内的硬组织有一个极为重要的属性，就是都是活的组织。它们的组成、结构、性质时刻在变动，而在变动中一方面应对外界环境，另一方面顺应生命进程。

虽然两方面讨论的对象不同，但是由于矿化的生物和化学过程决定矿化产物的组成和结构，所以不论抱着什么具体的目的，无论目标是为了认识、调控，还是模拟生物矿化，都要以认识生物矿化过程为基础。

在这里，我建议在生物矿化研究中，向生物体内的矿化过程学习，特别是向人体内钙化过程学习。其中，精确定义和解释生理的和病理的钙化过程是非常重要的。

向人体内钙化过程学习什么？先看我们化学家和材料科学家在过去的二三十年中的工作。我们大多数是在一个经典的认识基础上进行研究的，这就是基质决定生物矿物组成和结构。我们从 Nancollas 到 Mann 发展的轨迹可以看到从研究单纯钙磷酸盐在水溶液中形成和成长的化学反应的热力学和动力学，到研究这个过程如何受到基质的影响。这是一个很大的进步，确实得到很多有趣的结果。另外，生物钙化的研究者还从纳米科学、超分子化学等方面获得推动研究的新动力。使基质中钙化研究与仿生材料研究相结合，也有一些结果得以应用。甚至造成一个研究高潮。但是，尽管如此，始终没有离开原有的，也可以说是经典的思维方式和研究方法。因此，很难进入人体内钙化过程（特别是磷灰石为主要矿物相的过程）的研究。让我们转过来看这二三十年中，生物医学界在生物体内钙化和脱钙过程的研究方面，却取得了一系列重大突破。他们发现的这些新的现象和提出的新问题正在向我们持有的这个经典思路挑战，当然对我们又有很大启发。不过，生物医学界的这些研究结果缺少对其过程中的化学事件作出分子层次的认识，所以为了

精确地描述钙化过程,需要化学的研究。这给我们留下一个很大的空间,把它们的研究结果和化学研究衔接起来。

所以,向人体内钙化过程学习首先要向生物医学界学习,总结他们的观点,抽出其中的化学问题,提出我们的观点,引导我们的研究。

以下简单说明我对这两方面的看法。

1. 把人体内的钙化当作生命体系中的一个子系统来研究

人体内的钙化是生命体系中的一个子系统,它是构成人体生命过程的若干事件中的一个。这是一个最基本的概念。不妨设想如果能够用这个总概念考察现有研究模式,提出问题,决定研究思路,就有可能把生物矿化研究提升到一个新的水平。在这方面要从生命过程的基本特征来考虑,借助于生物学家的研究成果,而又能够在新的层次上提出新的问题。

所有生命体系中的化学过程包含以下几个指导性概念,在这些概念指导下可以分析现有研究的思路和模式,有可能寻找迷失的环节(missing link),提升认识的精度和细度。

(1) 生命体系是活的体系(living system),硬组织作为生命体系的一部分,也是活的体系。

(2) 生命体系是复杂体系。其复杂性包括:具有高级有序结构;反应物隔室化(compartmentalization),反应定位,传质定向;体系是开放的,而且一直在变动中,所以从整体来说不能达到平衡,但是要维持稳态;对环境敏感易变,但有可修复性。

(3) 生命过程,作为过程,包含有空间和时间两个坐标上的变化。生命过程是多种反应的组合和偶联(coupling)。反应构成路径,路径构成网络。过程是通过网络受到调控的。

(4) 状态,包括细胞层次的状态(细胞的增殖、分化、凋亡和坏死性死亡;细胞的定向附着和聚集等)和反应体系的状态(正常情况维持稳态;在外界因素影响下状态改变)。过程中的各个阶段的状态是在变化中的。

如果能够从上述生命过程的特点检讨已有的研究,就会发现有许多以前没有考虑到的地方。但是,也会感到还有许多我们的思想和方法都还跟不上的地方。可能这正是要努力创造的地方。

2. 生物钙化过程是人体内代谢过程的一部分,是受控的

向人体内钙化学习以寻求指导今后研究方向的另外一个重要概念是:生物钙化作为生命体系的一部分,而且是人体代谢过程的一部分,它是严格受控的。在正常条件下,人体内钙化过程能够在正确时间、正确地点,生成和维持正确量和正确结构的矿化产物,就是因为有一系列调控机制。这些调控机制有一部分是化学的,有一部分是生物的。但是都是互相涵盖的机制。不妨

把生物学与化学关于调控机制的概念结合来考虑，其中包含以下几个调控机制：

（1）适时定位机制：使钙化产物在正确时间、正确地点，生成或溶解。

（2）挽救与修复机制：对时时刻刻影响钙化系统的外界因素的应变机制。

（3）副反应最小化以及维持中间物在最低浓度、最短时间的调控机制。

（4）维持非羟基磷灰石的矿物相（包括前驱相）生成最少的机制：钙磷酸盐的多样性和其他离子在磷灰石晶格掺入的可能性要求有机制来维持非羟基磷灰石最少。

（5）适量机制：除去适时定位在时间和空间两个方面调控以外，必须保证适量，使生成的矿物相的量、矿物相与基质量的比例以及矿物相与基质总量的比例维持合适。

（6）结构调控机制：包括钙化产物的高级结构和矿物相与基质各自的结构，都是受控的。

（7）避免畸形机制：避免畸形是硬组织形成和维持的非常重要的原则。由于矿物晶体的结构固定，而骨和牙等硬组织的形态需要适应要求。

以上调控机制和生命系统的一切调控机制一样，除了利用矿物相和基质构成对热力学和动力学的依赖性的化学机制以外，在生物矿化的调控中，细胞的主动参与是最重要的，也是区分生命系统与非生命系统中的矿化的基础。

那么，以此为准检讨以前的研究，是否可以找到许多化学家和材料学家能够做而没有做的研究工作呢？

二、细胞、基质、矿物质间的互动关系——钙化调控的基础

上面主要说的是研究生物矿化要考虑生命体系的特征，特别是考虑调控机制。在过去的研究中不是没有研究矿化的调控。但是我们的核心指导思想是：细胞调控基质和成矿离子；基质调控矿化，这样一个单向的上下级关系。近年来，发现有许多不能用这个概念解决的现象。例如，细胞如何调控时间、空间、量三者的关系？如果细胞在细胞、基质、矿物质三个层次中居于最高层次，谁来指挥细胞？如果说是整体动物决定细胞的行为，为什么在离体细胞实验中也可以观察到与基质和矿物形成与降解（及溶解）相关的细胞状态的变化（特别是细胞分化和凋亡）？似乎还有调控细胞的机制在起作用。在积累了大量生理和病理矿化过程的研究结果之后，发现在钙化系统中，细胞、基质和矿物质三者在它们的行为和状态方面都是交互影响的。许多观察到的现象和研究结果都揭示一个规律：细胞、基质、矿物质的三角关系体现在双向互动关系上。由于过去过分强调上下级单向关系，对互相调控、互为因

果的机理研究不够,留下许多空白,有待我们进一步研究。

下面简单讨论基质与矿物、细胞与基质、细胞与矿物质三方面的相互作用。

1. 基质与矿物质的相互作用

关于基质与矿物质的关系,我们都熟悉基质决定矿物质的上下级关系。这包括基质诱导钙化,并且作为模板决定矿物质的组成和结构等。现在看来,把人体内钙化当作生命过程的一部分,而且考虑不仅基质决定矿物质,矿物质也影响基质,那么就需要深入分析其中的问题。例如:

(1) 按照生命过程的特点,体内钙化过程是在基质的高级有序结构中进行的多步骤生物的和化学的过程;而且,反过来,基质始终是在形成与降解、构筑与解构之中。

(2) 与之相关,不可能是在基质预制好之后再开始钙化的,而是基质与矿物质的形成与组装是按照一定程序相互交叉进行的。

(3) 那么,究竟是基质决定矿物质,还是矿物质决定基质?究竟谁是模板?除了普遍接受的概念,基质是矿物质形成的模板以外,是否矿物质也可能是基质组装的模板?有一个值得注意的现象,晶体影(crystal ghost)对回答这个问题很有启发。尽管对晶体影有不同看法,但是不能否认晶体聚集体对基质高级结构的决定作用。这是一个重要的切入点。

(4) 如果接受上述基质与矿物质相互作用,共同成长的观点,那就要解释当初始矿物质形成以后,随着矿物质的"增长",包围矿物晶体的基质如何"退却"的问题。这不是一个空想的问题,因为在牙釉质形成的过程中就观察到,随着釉柱的形成和成长,基质逐渐后退,到后来留下很少的基质。

上面提到的仅仅是基质与矿物质的直接相互作用。更复杂,但是更重要的是下述的基质与矿物质通过细胞的间接相互作用。

2. 细胞与矿物质的相互作用

这里讨论的不包括通常所说的细胞通过调控基质指导钙化,而只限于以往注意不够的细胞与矿物质的直接相互作用和细胞与矿物质溶解产生的成矿离子的间接作用。这些作用也是双向的。一方面钙化与细胞的分化和凋亡有关,另一方面钙化又影响细胞的分化和凋亡。

(1) 在讨论什么物质诱导钙化时,我们要从生物学家以往注意到的基质小泡和近来才注意到的凋亡小体入手来回答这个问题。来自细胞的基质小泡和凋亡小体被认为是钙化的成核位点,因为这是一个表面过程,所以基质小泡和凋亡小体的表面性质和成矿离子的跨膜转运、膜表面聚集等在决定矿物成核、成长和聚集方面一定发挥重要作用,但仍有待研究。

(2) 接下来要问谁诱导细胞分化和凋亡?生物学家已经发现很多路径。

其中有一条是细胞内的钙离子和磷酸根。人们发现在细胞外 Ca^{2+} 与 PO_4^{3-} 的协同作用下，平滑肌细胞向成骨样细胞分化，增加成骨样细胞的表达，减少平滑肌细胞原有的表达。那么，细胞外 Ca^{2+} 与 PO_4^{3-} 从哪里来？一个可能的来源就是磷灰石。也就是说，细胞诱导钙化，钙化产物控制细胞分化和凋亡。

（3）从生物学研究看，细胞推动钙化、脱钙过程是细胞的功能，也是细胞存活的条件。但是，细胞的这种活性又是它们自身死亡的条件。例如，破骨细胞只有在骨表面，靠骨吸收才能维持活性，但是另一方面在它进行骨吸收的过程中，就酝酿着细胞死亡。是什么促使其死亡？来自矿物质还是细胞内在的机制？

（4）从上面这个问题引申，就要提出在破骨细胞在骨表面吸收骨组织之前，有一定的生物学事件顺序：细胞在骨表面上的爬行、黏附、极化、骨吸收。整个事件离不开细胞与骨之间的界面。这就向我们提出细胞-骨组织界面化学过程的调控问题。第一，这个界面有什么特性？界面上发生的过程与骨表面结构有什么关系？第二，细胞是活的，矿物质也是在变化的，于是构成一个活的界面(living interface)。什么基质控制这个界面？第三，没有活的细胞就没有活的界面，因此细胞生命过程与界面的结构与性质的变化的关系是十分重要的。

（5）研究细胞与矿物质的相互作用时，在很多情况下，还不能忽略发生在细胞群体与矿物质之间的相互作用。最简单的是在同一类细胞作用下推动钙化。但是更重要、更多见的是不同细胞间的相互作用介导和调控钙化。在骨形成和再造过程中，成骨细胞与破骨细胞的相互作用与配合是绝对条件；在动脉钙化过程中巨噬细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞之间的密切配合和相互作用是绝对条件。

3. 细胞与基质的相互作用

细胞表达基质蛋白这个过程和它在钙化中的作用是我们熟悉的。不再细说。但是要注意：

（1）不能简单地把基质看作是在细胞指挥下的下级。因为，基质（主要是非胶原蛋白和小分子）也影响细胞的分化和凋亡，从而间接控制钙化。

（2）而且在细胞、基质、矿物质三者间的相互作用中，基质起着连接细胞和矿物质的作用。

（3）细胞除了表达基质蛋白之外，它们还通过形成有关的酶和代谢中生成的以及在矿物质作用下产生的活性氧（氮）物种改变基质。

（4）细胞与基质的相互作用很多都是靠细胞信号转导途径进行的。而这些途径构成了细胞内的信号网络。钙离子、磷酸根、活性氧（氮）物种都是在网络中起关键作用的信号分子。尤其是钙离子和活性氧（氮）物种是网络中

的关键结点(node),因此上游事件如何通过一个优先途径达到在正确时间、正确部位形成正确结构和量的矿物质和基质,是一个关键问题。

崔福斋教授要我为这本书写一前言。我未敢应命,但又难以拒绝,只好答应写一个附在书尾的短文,阐述我对生物矿化研究的一点看法。没想到,这个任务很难完成。开过几次头,都写不下去。2006 年 4 月承浙江大学唐睿康教授邀请参加生物矿化专题的西湖论坛,听大家发言,颇有启发。得以续完此文。附印在即,时间紧迫,只好如此交卷。请读者指正。

王 夔

北京大学医学部药学院化学生物系

索引

贝壳 13
病理结石 23
病理性矿化 265,291
成骨细胞 175
胆结石 311
蛋壳 25
多级结构 38
二氧化硅 336
非胶原蛋白 133
分级结构 38
分子识别 113
骨 19
骨衬细胞 178
骨矿化 212
骨细胞 176
骨修复 194
骨质减少 265
骨组织工程 195
骨祖细胞 174
硅石 12
基因调控 202
基因模板 242
基因治疗 238
棘皮动物 28
胶原 130
胶原的合成 169
结构匹配 117
结晶原理 58
结石 291
界面能 82
晶体生长 140
晶型 154
磷酸钙 7
硫化铁 9
泌尿系结石 291
囊泡 121
破骨细胞 177
取向形核 148
生物硅化 337
生物矿化 1
生物矿物 1
调控机制 72
台阶行为 95
碳酸钙 3,154
铁蛋白 123
细胞调控 168
细胞外基质蛋白 254
象牙 24
形貌控制 154
形貌特征 29
血管钙化 265,275
牙 21
牙本质 189
牙的病理矿化 324
牙釉质 190,252
牙釉质基质蛋白 260
牙釉质矿化 220
氧化铁 9
有机基质 108
鱼耳石 16
自组装 47
自组装单层膜 151

清华大学出版社数字出版网站
WQBook 书文局泉
www.wqbook.com

ISBN 978-7-302-27584-8
9 787302 275848 >
定价：78.00元