

种植体表面活性肽/蛋白修饰的研究进展

曹馨综述 于卫强 张富强审校

(上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔修复科; 上海市口腔医学研究所 上海 200011)

[摘要] 种植义齿因其舒适美观、咀嚼功能恢复良好以及能够避免或减少天然牙的磨除, 越来越多地应用于临床。钛基种植体与周围组织形成良好的骨性愈合即骨整合是种植义齿临床成功的关键。尽快达到良好的骨整合, 对于实现种植体的早期负载甚至即刻负载和长期稳定十分重要。种植体表面生物化学修饰改性是提高骨整合的重要途径, 各种活性肽/蛋白因其确切的成骨效果, 近年来一直是国内外材料专家种植体表面修饰的研究热点。本文就种植体表面活性肽/蛋白修饰的研究进展作一综述。

[关键词] 种植体; 活性肽/蛋白; 改性; 骨整合

[中图分类号] R 783.1 [文献标志码] A [doi] 10.3969/j.issn.1673-5749.2012.01.021

Research progress on implant surface bioactive peptide/protein Cao Xin, Yu Weiqiang, Zhang Fuqiang. (Dept. of Prosthodontics, The Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China; Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China)

[Abstract] Implant denture has been widely used in the clinic due to its features of comfort and beauty. Besides, it brings a good recovery of masticatory function and a successful avoidance or reduction of the natural teeth's preparation. The fine bone union(osseointegration) formed between the titanium matrix implant and its surrounding tissue is key to the clinical success of implant denture. It is quite important to achieve better osseointegration as early as possible so as to realize the early loading, even immediate loading and long-term stability of the implant. The modification of the implant surface is an important means to improve osseointegration. Various kinds of bioactive peptides/proteins have been the research focus in implant surface modification by the material experts owing to their certain bone growth. A review of the research progress is given in this paper concerning the bioactive peptide/protein modification of the implant surface.

[Key words] implant; bioactive peptide/protein; modification; osseointegration

经过 30 多年的临床实践考验, 种植义齿已日趋成为成熟的口腔修复治疗手段。目前, 钛基金属因其良好的生物相容性、机械强度和抗腐蚀性能等优点, 是种植体最常用的基体材料, 钛基种植体与周围组织形成良好的骨性愈合即骨整合, 是种植义齿临床成功的关键。尽快达到良好的骨整合, 对于实现种植体的早期负载甚至即刻负载和长期稳定十分重要。种植体表面修饰改性是提高骨整合的重要途径, 主要包括: 种植体表面生物陶瓷涂层、种植体表面生物化学改性、种

植体表面纳米修饰等。其中, 各种活性肽/蛋白因其确切的成骨效果, 近年来一直是材料专家们种植体表面修饰的研究热点^[1]。本文就种植体表面活性肽/蛋白修饰的研究进展作一综述。

1 蛋白类

釉原蛋白是发育中釉质的主要蛋白, 同时它又属于黏附蛋白, 其黏附活性的产生需要有二价正离子的存在, 黏附是成骨细胞发挥作用的前提, 成骨细胞必须与材料发生黏附后才能进行迁移、增殖、分化和分泌钙基质。

Beyeler等^[2]将一些牙特定蛋白重组并检测其是否也和 N-糖蛋白(小整合素结合配体)一样能促进细胞的黏附。结果发现釉原蛋白能介导成骨细胞和成纤维细胞黏附在塑料或钛金属表面。这种介导活性依赖于釉原蛋白完整的三维结构以及黏

[收稿日期] 2011-05-25; [修回日期] 2011-11-01

[基金项目] 上海市科学技术委员会基金资助项目(08DZ2271100, 10JC1408600); 上海市重点学科建设基金资助项目(S30206); 上海市重点学科(特色学科)建设基金资助项目(T0202); 上海市纳米专项基金资助项目(1052nm04300)

[作者简介] 曹馨(1986—), 女, 重庆人, 硕士

[通讯作者] 张富强, Tel: 021-23271699-5694

附细胞合成的在黏附过程中需要的新的蛋白。他们的实验中通过分析发现釉原蛋白的黏附作用与一段氨基酸序列有关,这个序列并不直接与细胞表面接触,它与细胞纤维蛋白交互从而与整合素受体结合。Du等^[3]采用人胚胎腭间充质成骨细胞前体作为模型,观察到与覆盖磷灰石/釉原蛋白涂层的钛表面接触的细胞,附着和伸展能力增强;而将重组鼠釉原蛋白 rM179 加入培养液中,能明显上调细胞型胶原、碱性磷酸酶和骨钙素的表达,提示重组釉原蛋白可促进间充质细胞向成骨方向分化。骨再生过程需有间充质干细胞移向受损区域,进一步分化为成骨细胞和破骨细胞,Veis等^[4]研究了特异性釉原蛋白片段对大鼠成牙本质细胞、牙髓细胞的体外培养和体内种植体的影响,釉原蛋白通过物理吸附的方式整合到种植体表面。他们认为在牙或骨的发育过程中釉原蛋白具有潜在的信号传导功能。两种釉原蛋白选择性剪接片段能增强成骨细胞前体碱性磷酸酶活性,具有诱导成骨细胞分化的能力。

胶原蛋白是动物体内含量最丰富的蛋白质,约占人体蛋白质总量的 30% 以上,是支持组织和结缔组织极重要的结构蛋白,起着支撑器官、保护机体的功能。胶原是细胞附着和迁移的支架。胶原蛋白是主要的骨的有机组成部分,类似于骨矿化前的骨愈合,胶原蛋白作用于更早阶段,它是出现于胎儿和骨愈合时期的第一个蛋白。动物试验证实,多肽处理的胶原海绵支架材料可以在骨缺损部位诱导骨的形成及矿化^[5]。Pek等^[6]以胶原为基质,多肽纳米晶体为结晶颗粒,制备出一种高强度海绵支架材料,可以使大鼠股骨骨折后骨不粘连和猪腓骨节段性缺损成功愈合。Stadlinger等^[7]设计了 5 种不同的种植体表面涂层:喷砂、胶原蛋白、胶原蛋白和、精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(arginine-glycine-aspartic acid, RGD)多肽、矿化胶原,将其分别植入小型猪的下颌骨。经过 6 个月后处死模型动物。用组织学和组织形态计量学评估骨种植体界面。结果显示,最好的骨种植体界面是胶原蛋白、胶原蛋白和涂层的种植体,显示出胶原蛋白在体内有促进骨整合的效果。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)通过其 RGD 序列与细胞表面的整合素受体相结合,通过富含天冬氨酸的序列与骨的羟磷灰石相结合,从而成为细胞与羟磷灰石之间的桥梁。OPN 与骨形成密切

相关,其产生随不同的时间阶段而变化,在骨形成早期的增殖阶段以及矿化前、矿化发生时均有出现,被认为是成骨细胞分化成熟的标志。Liu等^[8]报道,OPN 吸附在带正电荷的表面能够较好地介导体外细胞的黏附和蔓延,并认为 OPN 涂层在种植体表面能减少异物反应。他们在体内做了同样的研究,结果显示 OPN 涂层于带正电荷的种植体表面降低了异物反应。该研究为体内生物相容性材料的设计与修饰提供了依据。

血浆纤维蛋白(plasma fibronectin, PFN)以单体形式存在,通过 N-端的蛋白质与细胞表面特定区域发生聚合,单体之间通过二硫键桥彼此连接成纤维蛋白(fibronectin, FN)多聚体, FN 的聚合是发挥其生物学功能的先决条件。PFN 对细胞的生长、增殖分化、黏附移动、损伤修复、细胞凋亡等生理病理过程起重要作用。Jimbo等^[9]报道 PFN 具有调整活体细胞生长,分化和提高成骨细胞存活率的作用,指出 PFN 能显著提高骨髓源基质细胞的趋化性,并证实应用 PFN 处理后的种植体表面能加速早期骨整合。他们将仅酸蚀处理过的钛种植体和 PFN 涂层的钛种植体分别植入小鼠股骨,术后 7、14 d 后,将样本进行脱钙和石蜡包埋,观察其骨愈合过程。体外分析骨髓基质干细胞的生长、增殖和分化。体内实验结果显示,PFN 涂层的种植体表面的骨生长相比对照组更快。体外实验结果显示,PFN 能提高骨髓基质干细胞的趋化性。他们认为 PFN 涂层的种植体能够提高材料与骨之间的早期骨整合。

2 生长因子

在骨组织修复改建中,生长因子起着重要的作用。与骨组织相关的生长因子有:转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 、骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)、胰岛素样生长因子(insulinlike growth factor, IGF)、纤维生长因子(fiber growth factor, FGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、前列腺素 E₂、骨保护蛋白(osteoprotegerin, OPG)。由于生长因子具有促进组织再生的作用,在口腔种植领域的应用日益增多,主要有单一应用和联合应用等方式^[10]。Sena等^[11]为了探索不同用量的重组人转化生长因子(recombinant human transforming growth factor, rhTGF)- β 2 涂层与种植体表面对于骨整合的促进情况,实验对象

根据 rhTGF- β 2 的用量分为 4 组, 分别是 rhTGF- β 2(5、10、20 mg)和空白对照, 生长因子加入羟基磷灰石/磷酸三钙涂层的钛种植体表面, 植入兔股骨。术后 4 周, 观察发现生长因子组比对照组有较多骨生长量, 5、10 mg 组与对照组骨种植体接触界面没有明显差别, 20 mg 组有较少的骨种植体接触界面。Canter 等^[12]将兔模型分为 8 组, 分别是空白对照组、自身移植组、同种异体移植组、壳聚糖组、同种异体移植+壳聚糖组、TGF- β 2 组、BMP-2 组、TGF- β 2+BMP-2 组。分别在 2、8、14 周进行骨活检。用病理形态学方法检测骨愈合, 放射学方法检查骨密度。15 d 后的形态学检测中发现, BMP-2 组骨再生情况与标准的自身移植组相符甚至比它更好。TGF- β 2 单独应用促进骨再生的作用并不明显, TGF- β 2 和 BMP-2 联合使用在促进骨愈合方面的效果更加明显。

3 活性肽

RGD 三肽序列是由精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸组成的, 其广泛存在于体内多种蛋白质中, 包括纤连蛋白、骨桥蛋白、I 型胶原、骨连接素以及骨唾液蛋白等。细胞表面的整合素蛋白能够识别并结合这个序列, 从而介导细胞与细胞外基质间的黏附作用, 启动信号传导, 联系细胞外微环境与细胞内代谢活动, 对细胞生长起重要调节作用, 是最有效的促细胞黏附短肽^[13]。种植体表面 RGD 短肽修饰近年来受到了越来越多的关注。研究显示, 种植体经过 RGD 活性肽修饰后不仅可以提高成骨细胞的黏附、增殖和分化, 而且可提高骨髓基质细胞的骨向分化能力^[14-15]。其中 RGD 肽在种植体表面的修饰密度是影响其成骨效果非常重要的因素, 过高或过低都会影响其骨组织相容性。Chua 等^[16]研究发现, 钛表面涂布透明质酸/壳聚糖聚电解层后具有强效的抗菌作用, 但成骨细胞的黏附作用明显低于未经处理的钛。然而, 如果在前者的表面另外固定 RGD 肽后成骨细胞的黏附则明显增加, 生物相容性和机械性能都较未经处理的钛增强了 1~2 倍, 同时又兼具高效的抗菌作用。他们还发现, 表面所固定的 RGD 的密度对成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶的活性有明显的影响。Secchi 等^[17]认为 RGD 肽不仅可以促进细胞的黏附, 也可以促进细胞分化和抑制凋亡。实验中, 他们将 RGD 肽和作为对照组的 RGE 肽

通过 ATP 的共价键连接到钛片上, 这两种钛的定植都可以提高钛表面的粗糙度, 并降低由于 ATP 的存在而上升的材料的疏水性。随后让成骨细胞分别在这两种界面上生长。结果显示, RGD 修饰组钛片上的成骨细胞的黏附及其表型的表达都明显多于 RGE 修饰组。这是因为成骨细胞与钛片上的 RGD 发生接触后可对促进凋亡的酶产生抑制作用, 从而抑制凋亡。相反地, 与 RGE 接触的成骨细胞则死亡。由此他们认为钛表面共价连接 RGD 肽后可增加成骨细胞的黏附和存活, 而且对钛表面结构的改变是微弱的。

Elmengaard 等^[18]评估了 RGD 肽链涂层对种植体周骨整合的作用, 将柱状有和无钛链涂层的 Ti₆Al₄V 种植体以适当的压力同时植入狗的胫骨中, 无功能负重, 4 周后, 发现有 RGD 肽链涂层的种植体周骨组织形成量较无涂层组明显增多; 同时, 种植体周纤维组织形成明显减少。对于 RGD 肽链涂层种植体来说, 当骨界面受到剪切力时, 增强的骨支抗使得种植体-骨界面具有更强的机械固定性。

赖氨酸-精氨酸-丝氨酸-精氨酸(lysine-arginine-serine-arginine, KRSR)序列存在于 5 种不同的骨相关黏附蛋白中, 包括纤维结合素、玻连蛋白、骨唾液蛋白、血小板反应蛋白和骨桥蛋白^[19]。研究表明, KRSR 对成骨细胞的黏附具有选择特异性, 但对内皮细胞^[20]和纤维组织母细胞^[21]则无选择性黏附。研究证实, KRSR 修饰的材料表面对成骨细胞的黏附水平与具有代表性的黏附肽 RGD 修饰的材料表面相当^[19]。Balasundaram 等^[22]进行了体外实验, 将钛片表面纳米晶粒化, 并将 KRSR 整合在其表面, 以研究成骨细胞对这样处理后的样本的黏附性质。材料表面情况用 X 线光电子分光镜、扫描电镜和原子力显微镜进行检测。结果表明, 相对于对照组, 整合了 KRSR 的钛片, 无论是否经过纳米晶粒化, 都能够提高成骨细胞的黏附性。

P15 是 I 型胶原的一段与间充质细胞结合且高度保守的 15 个氨基酸序列, 成骨原理是这 15 个氨基酸残基组成的多肽能与成骨细胞前体细胞上的整合素受体结合, 促进细胞黏附, 模仿了胶原促进细胞增殖分化的生理修复的过程。还能增加 BMP-2 和 -7 的基因表达, 与其他成骨因子协同促进成骨细胞的分化。研究表明, 对与传统的生物惰性材料, 涂层 P15 的材料能显著提高成骨

细胞的增殖率^[23]。Palmieri等^[24]采用 miRNA 基因芯片技术比较成骨细胞分别接触一种以硅酸盐为主要成分的材料 Perio-Glas 与 P15 植骨材料后,相应的 miRNA 翻译水平改变,发现两者都能增强与成骨基因有关的 miRNA 的翻译水平,但当两者作用的 miRNA 属同源基因时,P15 骨诱导材料对成骨细胞的作用优先发生。

4 参考文献

- [1] Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration[J]. Dent Mater, 2007, 23(7) :844-854.
- [2] Beyeler M, Schild C, Lutz R, et al. Identification of a fibronectin interaction site in the extracellular matrix protein ameloblastin[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(7) :1202-1212.
- [3] Du C, Schneider GB, Zaharias R, et al. Apatite/amelogenin coating on titanium promotes osteogenic gene expression[J]. J Dent Res, 2005, 84(11) :1070-1074.
- [4] Veis A, Tompkins K, Alvares K, et al. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2000, 275(52) :41263-41272.
- [5] Lee JY, Choo JE, Choi YS, et al. Assembly of collagen-binding peptide with collagen as a bioactive scaffold for osteogenesis *in vitro* and *in vivo*[J]. Biomaterials, 2007, 28(29) :4257-4267.
- [6] Pek YS, Gao S, Arshad MS, et al. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds [J]. Biomaterials, 2008, 29(32) :4300-4305.
- [7] Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, et al. Suitability of differently designed matrix-based implant surface coatings : An animal study on bone formation[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008, 87(2) :516-524.
- [8] Liu L, Chen G, Chao T, et al. Reduced foreign body reaction to implanted biomaterials by surface treatment with oriented osteopontin[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2008, 19(6) :821-835.
- [9] Jimbo R, Sawase T, Shibata Y, et al. Enhanced osseointegration by the chemotactic activity of plasma fibronectin for cellular fibronectin positive cells[J]. Biomaterials, 2007, 28(24) :3469-3477.
- [10] Bae IH, Yun KD, Kim HS, et al. Anodic oxidized nanotubular titanium implants enhance bone morphogenetic protein-2 delivery[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2010, 93(2) :484-491.
- [11] Sena K, Sumner DR, Viridi AS. Effect of recombinant human transforming growth factor-beta2 dose on bone formation in rat femur titanium implant model[J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 92(3) :1210-1217.
- [12] Canter HI, Vargel I, Korkusuz P, et al. Effect of use of slow release of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta 2 in a chitosan gel matrix on cranial bone graft survival in experimental cranial critical size defect model[J]. Ann Plast Surg, 2010, 64(3) :342-350.
- [13] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers : Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond[J]. Biomaterials, 2003, 24(24) :4385-4415.
- [14] Oya K, Tanaka Y, Saito H, et al. Calcification by MC3-T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG[J]. Biomaterials, 2009, 30(7) :1281-1286.
- [15] Michael J, Schönzart L, Israel I, et al. Oligonucleotide-RGD peptide conjugates for surface modification of titanium implants and improvement of osteoblast adhesion[J]. Bioconjug Chem, 2009, 20(4) :710-718.
- [16] Chua PH, Neoh KG, Kang ET, et al. Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion[J]. Biomaterials, 2008, 29(10) :1412-1421.
- [17] Secchi AG, Grigoriou V, Shapiro IM, et al. RGDS peptides immobilized on titanium alloy stimulate bone cell attachment, differentiation and confer resistance to apoptosis[J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 83(3) :577-584.
- [18] Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. *In vivo* study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants[J]. Biomaterials, 2005, 26(17) :3521-3526.
- [19] Dee KC, Andersen TT, Bizios R. Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials[J]. J Biomed Mater Res, 1998, 40(3) :371-377.
- [20] Dettin M, Conconi MT, Gambaretto R, et al. Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials[J]. J Biomed Mater Res, 2002, 60(3) :466-471.
- [21] Hasenbein ME, Andersen TT, Bizios R. Micropatterned surfaces modified with select peptides promote exclusive interactions with osteoblasts[J]. Biomaterials, 2002, 23(19) :3937-3942.
- [22] Balasundaram G, Webster TJ. Increased osteoblast adhesion on nanograin Ti modified with KRSR[J]. J Biomed Mater Res A, 2007, 80(3) :602-611.
- [23] Turhani D, Item C, Thurnher D, et al. Evidence of osteocalcin expression in osteoblast cells of mandibular origin growing on biomaterials with RT-PCR and SDS-PAGE/Western blotting [J]. Mund Kiefer Gesichtschir, 2003, 7(5) :294-300.
- [24] Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, et al. Differences in osteoblast miRNA induced by cell binding domain of collagen and silicate-based synthetic bone[J]. J Biomed Sci, 2007, 14(6) :777-782.