

II, X型胶原对钙磷酸盐生物矿化动力学的影响*

郭媛 黄健 许善锦** 王夔

北京大学药学院化学生物学系, 北京 100083

摘要 为探讨软骨基质成分II, X型胶原在软骨内成骨过程中可能起的作用, 研究了在II或X型胶原存在下, 以骨基质I型胶原为晶种时钙磷酸盐晶体生长的动力学过程. 用FT-IR方法分析了固相产物羟基磷灰石(HAP). 结果表明: II或X型胶原的存在对钙磷酸盐在I型胶原表面的生长速率有抑制作用, X型胶原的抑制作用大于II型胶原. 在II型胶原存在下, 测得其反应级数为4. 说明软骨基质II, X型胶原在软骨内成骨这一生物矿化过程中可能起积累钙离子的作用, 对结晶生长机理与矿化产物无影响.

关键词 II型胶原 X型胶原 生物矿化 动力学

在软骨内成骨过程中, 生长板内的幼稚软骨细胞要经历一系列的生化和细胞的变化. 它包括软骨细胞的增殖、肥大及软骨基质矿化等, 最后形成成骨细胞. 增殖期的软骨细胞主要分泌II型胶原, 肥大期的软骨细胞除了分泌II型胶原外, 还分泌X型胶原^[1-3], 而成骨细胞分泌I型胶原, 含I型胶原的骨基质矿化成骨^[4]. II, X型胶原在生物矿化中可能也有一定的作用. 研究发现II型胶原C端前多肽的含量与细胞富集Ca²⁺是同步增加的^[5]. 同样, 在X型胶原富集的区域, Ca²⁺的浓度也很高. 然而, 人们对II, X型胶原在生物矿化中的作用仍不清楚, 为此我们通过模拟体内生物矿化, 使用等组分溶液晶体生长法研究了在II, X型胶原存在下, 钙磷酸盐在I型胶原表面的生长动力学^[6], 为阐明II, X型胶原在生物矿化中的作用提供有意义的数据.

1 材料与方法

I型胶原由Sigma公司提供, CaCl₂, KH₂PO₄, NaCl和KOH均为A.R级, 购自北京化工厂.

II型胶原按照文献方法从鸡关节软骨提取^[7], 产品经盐析纯化, 冷冻干燥产品, 电泳检验纯度符合要求^[8]. X型胶原从长期传代培养的鸡软骨肥大期细胞的培养液中提取, 参考文献^[9]方法. 电泳检验纯度合乎要求.

1.1 生物矿化动力学实验

动力学实验在等组分溶液晶体生长装置上完成, 整个实验在37℃, pH=7.4, 离子强度为

2000-11-24 收稿, 2001-01-15 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 29871007)

** 联系人, E-mail: 1853@263.net

0.1 mol·L⁻¹及 N₂ 气氛下完成. 在实验之前先测定了溶液的稳定时间, 以此为根据决定了本实验的稳定时间为 6 h. 动力学实验如下进行: 先将一定过饱和度的溶液稳定 6 h(测定 II, X 型胶原对反应的影响时, 先将 II, X 型胶原溶解, 和过饱和溶液一起稳定), 然后加入一定量的 I 型胶原作晶种, 测钙磷盐晶体生长动力学过程. 动力学实验条件见表 1.

表 1 晶体生长动力学实验条件

样品	T _{Ca} /mmol·L ⁻¹	T _P /mmol·L ⁻¹	σ _{DCPD}	σ _{OCP}	σ _{HAP}	ΔG _{DCPD} /kJ·mol ⁻¹	ΔG _{OCP} /kJ·mol ⁻¹	ΔG _{HAP} /kJ·mol ⁻¹
1	0.8	0.48	-0.56	0.62	8.18	1.84	-4.32	-22.34
2	1.0	0.60	-0.45	0.95	10.09	1.37	-5.99	-24.05
3	1.1	0.66	-0.40	1.11	4.02	1.17	-6.70	-25.07
4	1.4	0.84	-0.26	1.57	13.70	0.66	-8.47	-27.09

温度 T = 37℃, 离子强度 0.10 mol·L⁻¹, 晶种密度 1g·L⁻¹

1.2 固相红外光谱分析

反应体系固相离心、洗净、烘干后, 其红外光谱(400 ~ 4000 cm⁻¹) 在 Magana 750 型 FT-IR 红外分光光度计上用 KBr 压片法测定.

2 结果与讨论

2.1 I 型胶原晶种浓度对晶体生长速率影响

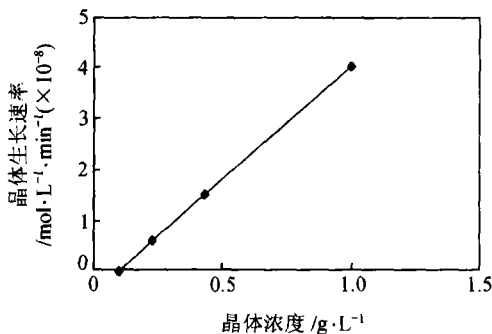


图 1 晶种浓度与反应速率关系曲线

σ 固定时 R 与 S 成正比, 而 S 与晶种浓度成正比, 故可得晶体生长速率与晶种浓度成正比的结果.

2.2 II, X 型胶原存在下钙磷酸盐晶体生长动力学

从图 2 可以看出在 II, X 型胶原存在下, 随着钙磷酸盐晶体的生长, 为维持实验体系中 Ca²⁺ 浓度不变而需滴加入的 Ca²⁺ 量(其他被消耗的物种也需补充). 不含胶原的空白滴加入的 Ca²⁺ 量最多, 其次是含 II 型胶原体系, 加入 Ca²⁺ 量最少的是含 X 型胶原体系. 说明 II, X 型胶原对钙磷酸盐晶体在 I 型胶原表面的生长有抑制作用, X 型胶原的抑制作用大于 II 型胶原. 实验体系中存在的 II, X 型胶原的量与晶体生长速率之间的关系见图 3, 同样说明了胶原存在对晶体生长的抑制作用, 并且存在的量越多晶体生长速率越慢. 这是因为 II, X 型胶原均能结合 Ca²⁺, 使溶液中 Ca²⁺ 的活度下降, 降低了过饱和度 σ, 从而引起结晶生长速率下降. 已有文献证明 X 型胶原与 Ca²⁺ 的结合能力大于 II 型胶原^[8], 故 X 型胶原存在下的钙磷酸盐晶体生长

图 1 给出了 I 型胶原晶种浓度与晶体生长速率关系曲线, 从图中可以看出, 当晶种浓度大于 0.1 g·L⁻¹ 时, 已有明显的晶体生长, 并且随着晶种浓度增加晶体生长速率也加快, 为了使生长速率较快, 以下实验均选用晶种浓度为 1 g·L⁻¹.

对于微溶盐来说, 晶体生长速率可用公式 $R = kS^n$ 表示, 取对数则得: $\lg R = \lg kS + n \lg \sigma$. 式中 R 为晶体生长速率, k 为速率常数, S 为晶体生长过程中可用于晶体生长的晶种有效表面积, n 为反应级数, σ 为过饱和度. 由于 k 为一常数, 在

速率降低更多.

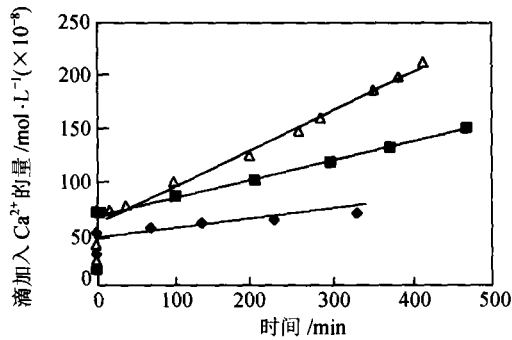


图2 II, X型胶原存在下晶体生长动力学曲线

$T(\text{Ca}) = 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $T(\text{P}) = 0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

△ 不含胶原的空白; ■ 含 $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ II型胶原;

◆ 含 $0.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ X型胶原

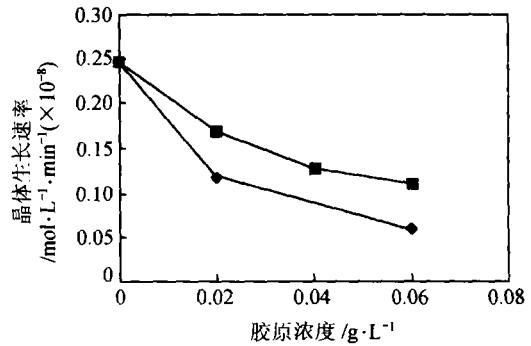


图3 II, X型胶原的量与晶体生长速率之间的关系曲线

$T(\text{Ca}) = 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $T(\text{P}) = 0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

■ II型胶原; ◆ X型胶原

2.3 II型胶原存在下钙磷酸盐晶体生长的反应级数

在II型胶原含量为 $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下,测定了不同过饱和度(σ)时钙磷酸盐在I型胶原晶种上晶体生长动力学曲线(图4).并得出不同过饱和度下的反应速率 R .用 $\lg R$ 对 $\lg \sigma$ 作图,得图5.从图中可见, $\lg \sigma$ 越大, $\lg R$ 也越大, $\lg R$ 对 $\lg \sigma$ 作图得一斜率为4的直线,说明在II型胶原存在下,其反应级数等于4.这与文献报道的没有II型胶原存在下的反应级数一样,都属于表面成核控制机理^[10],说明II型胶原的存在并不影响该晶体生长动力学反应的反应机理.

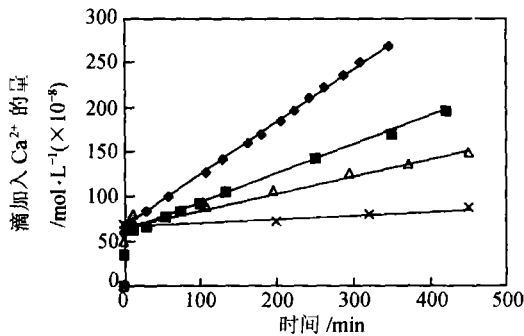


图4 不同过饱和度条件下晶体生长动力学曲线

含II型胶原 $0.04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

■ $T(\text{Ca}) = 0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $T(\text{P}) = 0.48 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

□ $T(\text{Ca}) = 1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $T(\text{P}) = 0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

△ $T(\text{Ca}) = 1.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $T(\text{P}) = 0.66 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

× $T(\text{Ca}) = 1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $T(\text{P}) = 0.84 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

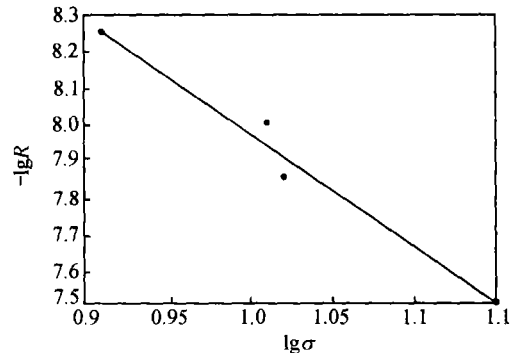


图5 反应级数曲线

2.4 反应产物的红外光谱

从反应固相产物,纯 HAP 和 I 型胶原 3 者的红外光谱比较可见(表 2),固相产物与纯的 HAP 在 1100 cm^{-1} 以下的峰位都比较接近. 固相产物在 $563, 603, 1049$ 和 1081 cm^{-1} 有较强的吸收峰,这些峰的出现说明固相产物中存在着钙磷酸盐. 1080 与 1049 cm^{-1} 这两个强吸收峰的峰位差为 31 cm^{-1} , 小于 60 cm^{-1} , 说明产物是 HAP, 而其他钙磷酸盐这两个峰位差较大.

表 2 HAP, I 型胶原和反应产物的主要 IR 光谱

样品	ν/cm^{-1}								
HAP	571(vs)	601(vs)	1041(vs)	1090(vs)					1458(m)
I 型胶原	570(m)				1164(m)	1239(m)	1336(m)	1404(m)	1452(m)
反应产物	563(m)	603(m)	1049(s)	1080(s)	1161(s)	1232(s)	1336(w)	1404(w)	1454(m)

因此我们认为在软骨内成骨这一过程中, II, X 型胶原因能结合钙离子而起到积累钙离子的作用, 为生物矿物的生成准备了条件而不影响结晶生长机理, 也不影响矿化产物的组成, 矿化产物仍为 HAP.

参 考 文 献

- 1 Gibson G J, et al. Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol*, 1985, 101: 277
- 2 Shuji Tanaka, et al. Structure of amidohydrolases. *J Biol Chem*, 1988, 263: 8583
- 3 Linsomnayer T M, et al. Collagen types IX and X in the developing chick tibiotarsus: analysis of mRNAs and proteins. *Development*, 1991, 111: 191
- 4 William B, et al. *A Textbook of Histology*. London: W. B. Saunders Company, 1975
- 5 Aleksander H, et al. The calcification of cartilage matrix in chondrocyte culture: Studies of the C-propeptide of type II collagen (chondrocalcin). *J Cell Biol*, 1987, 104: 1435
- 6 Tomson M B, et al. Mineralization kinetics: A constant composition approach. *Science*, 1978, 200: 1059
- 7 Cumingham L W, eds. *Methods in Enzymology*. Vol 82, Part A. New York: Academic Press, 1982
- 8 郭 媛, 等. II、X 型胶原与 Ca^{2+} 的相互作用. *科学通报*, 1996, 41(4): 364
- 9 Schmid T M, et al. A short chain (pro) collagen from aged endochondral chondrocytes. *J Cell Biol*, 1982, 258: 9504
- 10 Koutsoukos P G, et al. The mineralization of collagen in vitro. *Colloids and Surfaces*, 1987, 28: 95