

## 自组装多肽骨修复水凝胶的研究进展

徐柳, 徐姗, 相堂永, 沙政舟, 张键, 陈志鹏\*

(南京中医药大学药学院, 南京 210023)

**摘要** 开发具有成骨诱导的骨填充材料是促进骨再生的重要研究方向。自组装多肽水凝胶凭借其高度的仿生人工细胞外基质结构、低免疫原性、易于合成及修饰、载药灵活等优势为骨组织修复提供了一个高效治疗手段。本文讨论了自组装多肽水凝胶的设计原则, 报道了自组装多肽结构特征及组装机制, 重点介绍了自组装多肽骨修复水凝胶在递送干细胞、血管内皮细胞、骨形成蛋白、成骨因子以及小分子化合物等方面的最新研究进展, 总结了限制自组装多肽水凝胶发展的瓶颈和未来发展方向, 为构建高成骨性能凝胶递送系统提供理论参考。

**关键词** 自组装; 多肽; 骨修复; 水凝胶; 生物材料

**中图分类号** R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2022)03-0356-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220314

引用本文 徐柳, 徐姗, 相堂永, 等. 自组装多肽骨修复水凝胶的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(3): 356 - 364.

Cite this article as: XU Liu, XU Shan, XIANG Tangyong, et al. Advances in self-assembled peptide hydrogels for bone regeneration[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(3): 356 - 364.

## Advances in self-assembled peptide hydrogels for bone regeneration

XU Liu, XU Shan, XIANG Tangyong, SHA Zhengzhou, ZHANG Jian, CHEN Zhipeng\*

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract** The development of osteoinductive bone-filling biomaterials for bone regeneration is of great significance. Self-assembled peptide hydrogels with high biomimetic extracellular matrix structure, low immunogenicity, easy synthesis and modification, and flexible loading capacity provide a highly efficient therapeutic platform for bone tissue repair. Herein, we discuss the design principles of self-assembled peptide hydrogels, report the structural characteristics and assembly mechanisms of self-assembled peptides, and highlight recent advances in self-assembled peptide hydrogels for bone regeneration, including delivery to cells, bone morphogenetic proteins, active factors and small molecular substances. Finally, the bottleneck and development direction of self-assembled peptide hydrogels are pointed out, aiming to provide guidance for the construction of hydrogel delivery systems with high osteogenic properties.

**Key words** self-assembly; peptide; bone reparation; hydrogel; biomaterials

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82173992) and the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (No. KYCX\_201491)

随着高强度体育活动的流行和人口老龄化加剧, 我国每年因各种原因导致的骨伤患者达数百万, 尤其是60岁以上的老人, 而骨质疏松直接导致骨折率上升。另外, 由于年龄的增加, 骨折部位血管新生、淋巴循环以及祖细胞等机能降低, 受损骨

组织的自我修复功能受限, 导致病程延长<sup>[1]</sup>, 患者长期卧床极易导致褥疮、肺部感染、尿路感染、四肢静脉栓塞等并发症, 严重时发生血栓脱落易导致脑梗塞、脑卒中、心肌梗死等致命性疾病, 使得与骨创伤相关医疗和社会经济成本急剧上升, 给

收稿日期 2022-02-07 \*通信作者 Tel: 13913847964 E-mail: czpepu2000@hotmail.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 82173992); 江苏省研究生科研与实践创新资助项目(No. KYCX\_201491)

患者和社会带来严重负担。因而,寻找一种快速修复受损骨组织,缩短患者病程的治疗策略具有重要的临床和社会意义<sup>[2]</sup>。目前,临床上骨缺损的治疗主要包括:自体骨或异体骨移植<sup>[3]</sup>、支架固定<sup>[4]</sup>、陶瓷<sup>[5]</sup>、生物玻璃<sup>[6]</sup>、骨水泥<sup>[7]</sup>、脱矿骨基质<sup>[8]</sup>、聚合物<sup>[9]</sup>填充等。但免疫排斥、感染等原因严重限制了移植在临床上的应用。据世界卫生组织统计,全球能够成功进行移植手术的患者不到 10%<sup>[10]</sup>。此外,陶瓷、生物玻璃和骨水泥等传统生物材料由于缺乏成骨诱导性,其对骨再生的促进作用也是有限的。因此,开发具有成骨诱导的生物材料是促进骨再生重要发展方向。凝胶递送系统其多孔性和渗透性不仅可以用作空间填充剂以及生物活性分子的输送媒介促进组织细胞生长;还可以配备多种功能,通过提供使细胞归巢的微环境以及诱导成骨细胞分化和组织形成的微环境促进骨再生;也可以装载药物直接作用于骨缺损部位,提高药物的生物利用度,此外,骨修复凝胶可以通过微创的方式在骨缺损局部给药,与骨缺损部位紧密贴合,成为骨修复递送系统的研究热点<sup>[11]</sup>。

目前研究的可注射凝胶递送系统基质多由明胶<sup>[12]</sup>、海藻酸盐<sup>[13]</sup>、透明质酸<sup>[14]</sup>、硫酸软骨素<sup>[15]</sup>、聚乙二醇<sup>[16]</sup>、和聚乙烯醇<sup>[17]</sup>等构成。与传统材料相比,自组装多肽分子通过多种非共价相互作用组装成稳定的结构,其形成过程是从分子到纳米纤维再到最终水凝胶网络,通常表现出层次化的微观结构<sup>[18]</sup>,且自组装多肽水凝胶结构与细胞外基质(ECM)相似,降解速率与许多组织的生长速率相适应,是理想的组织工程的支架<sup>[19]</sup>。通过设计和调控多肽序列,能够实现对外界刺激(pH、温度、压力等)产生良好的响应能力和靶向识别能力,这些赋予了多肽凝胶材料作为药物载体在药物递送领域中的独特优势<sup>[20]</sup>。此外,多肽还具有合成简单、易于功能化修饰以及降解产物(氨基酸)易于清除或重新吸收等优点,成为凝胶递送系统研究的新星<sup>[21]</sup>。本文讨论了自组装肽水凝胶在骨再生领域的最新研究进展,首先介绍了不同种类自组装多肽设计及其形成凝胶的自组装机制,然后重点总结了自组装多肽水凝胶在骨组织再生中的应用,最后讨论了自组装多肽水凝胶在骨再生领域面临的问题及未来发展方向。

## 1 自组装多肽结构特征及组装机制

### 1.1 自组装多肽结构特征

自组装是自然界中普遍存在的现象,例如细胞膜的形成、蛋白质折叠和 DNA 双螺旋结构,这是生命科学中最重要的组成部分之一。通过模仿具有自组装功能的蛋白结构可以设计出多种具有组装功能的仿生多肽。除了仿生设计,从头设计也是自组装多肽设计的主要途径。从头设计自组装肽的关键是理解各种分子间相互作用,包括氢键、静电相互作用、 $\pi$ - $\pi$ 堆积、范德华力和色散力、金属-配体配合物和熵力,如疏水性和排除体积相互作用<sup>[22]</sup>。此外,除了非共价作用力,共价键(例如二硫键等)也被证明能够驱动超分子组装<sup>[23]</sup>。

自组装肽的结构包括:多肽氨基酸序列即一级结构,以及相邻氨基酸之间的分子内相互作用形成的二级结构,如 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲,以及多肽分子间形成的具有特定折叠结构的分子组装<sup>[24]</sup>。多肽的氨基酸类型和序列是组装形成的基础。Costantini 等<sup>[25]</sup>总结了 ProteinDataBank (PDB)数据库中二级结构状态的氨基酸频率和趋势。具有组装能力的肽的分子结构往往具有明显的特征,如两亲性、芳香性、分散电荷或异性电荷的交替排列以及对称性。其中,两亲性多肽具有与传统表面活性剂相似的性质,即结构中包含亲水和疏水两部分。对于两亲性多肽而言,亲水性和疏水性的平衡是影响其自组装形态的关键。组装的最终结构通过调节氨基酸的类型、数量和相对位置来改变它们的两亲性特性来控制<sup>[26]</sup>。芳香肽主要是一类含有芳香族氨基酸的肽,如苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)。它们的芳香性在多肽自组装和凝胶化过程中发挥重要作用。芳香作用作为一种强相互作用可以提高多肽分子的自组装能力<sup>[27]</sup>。此外,在设计自组装多肽时,分子的对称性也十分重要,许多自组装分子都具有对称性,因为具有对称性的分子在形成组装相互作用时需要更少的接触界面种类,更易于形成聚集集体<sup>[28]</sup>。

### 1.2 自组装多肽凝胶化机制

亲疏水作用、静电作用、氢键以及 $\pi$ - $\pi$ 堆积等分子间相互作用是驱动多肽自组装实现凝胶化的主要作用力。亮氨酸拉链(leucine zipper, LZ)是典

型的基于疏水作用形成的 $\alpha$ -螺旋结构,这种卷曲的螺旋结构能够在疏水作用下进一步互相聚集,形成物理交联凝胶。Huang等<sup>[29]</sup>利用亮氨酸拉链的构建了骨再生凝胶,用于负载BMP-2、VEGF和TGF- $\beta$ 1以及干细胞等,在体内表现出良好的成骨诱导作用。利用正负电荷间的静电吸引作用,Kisiday等<sup>[30]</sup>设计了以Lys-Leu-Asp(KLD)为重复序列的十二肽KLD-12,序列中K与D相反电荷间的静电作用驱动肽链间的交联组装形成凝胶。Zanotto等<sup>[31]</sup>构建了自组装KLD水凝胶负载血小板生长因子和肝素结合胰岛素生长因子-1,在体内能够促进股骨软骨缺损的再生。类似的,具有16个Glu-Ala-Lys重复单元的多肽(EAK16)和16个Arg-Ala-Asp-Ala重复单元的多肽(RADA16)可以通过肽链间的氢键形成 $\beta$ 折叠的平面,这些平面再通过静电作用进行堆叠,从而交联形成凝胶<sup>[32]</sup>。在凝胶化过程中, $\pi$ - $\pi$ 堆积也是形成凝胶的关键。尤其是源于淀粉样蛋白组装聚集的核心序列Phe-Phe(FF)具有很强的组装能力,被用于构建多种多肽水凝胶。例如,Zuo等<sup>[33]</sup>利用NapFFY制备超分子水凝胶通过共组装递送成骨生长肽,能够有效地促进颅骨再生。Ghosh等<sup>[34]</sup>将芴甲氧羰基-二苯丙氨酸(Fmoc-FF)作为形成可注射凝胶的关键组成部分,构建了能够模拟天然骨细胞外基质的水凝胶,表现出良好的诱导成骨分化和促进钙矿化作用。

## 2 自组装多肽分类

### 2.1 胶原蛋白样多肽

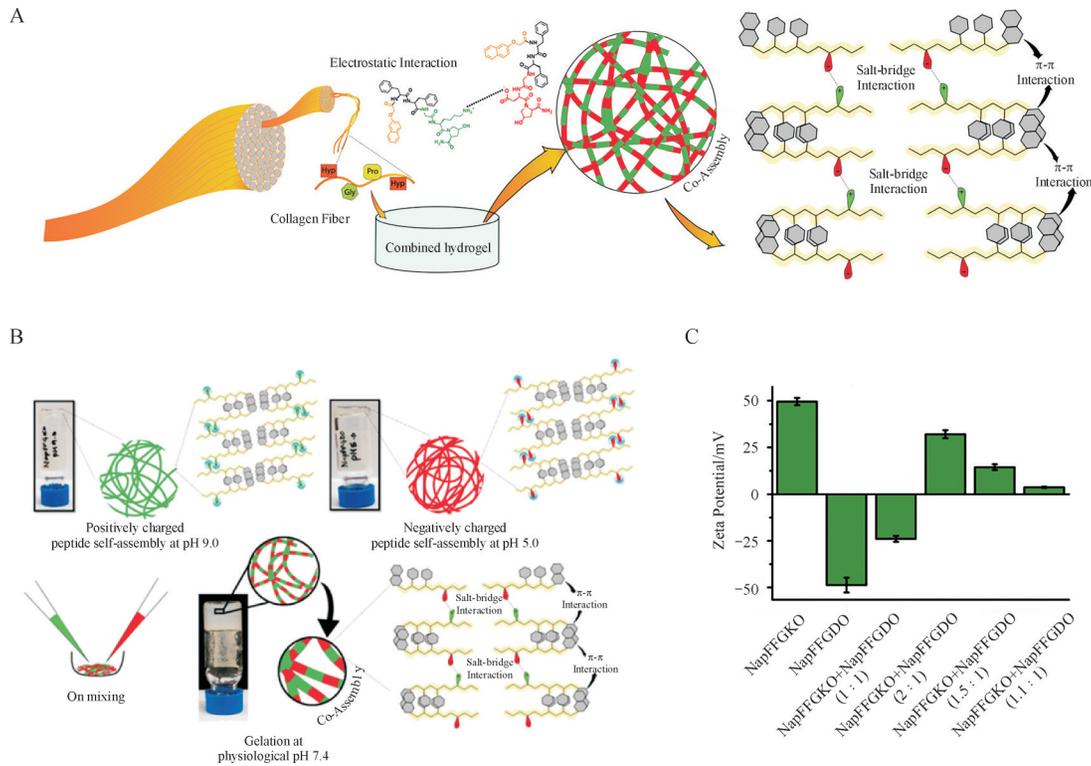
胶原蛋白是细胞外基质(ECM)的主要结构成分,占人体蛋白质含量的25%~35%。目前,已至少发现了30余种胶原蛋白链的编码基因,可以形成16种以上的胶原蛋白分子。根据其结构和超分子组织,它们可分为原纤维形成胶原蛋白(I、II、III、V和XI型)、基膜胶原蛋白(IV型)、微纤维胶原蛋白(VI型)、六边网状胶原蛋白(VIII、X型)等<sup>[35]</sup>。其中,常见的I型、II型和V型胶原原纤维可构成肌腱、皮肤和骨等组织的结构主干,II型和XI型胶原主要构成关节软骨的纤维基质<sup>[36]</sup>。尽管不同类型的胶原蛋白在结构和功能上存在差异,但都包含三螺旋结构。胶原蛋白三螺旋结构是胶原蛋白组装聚集的结构基础,由甘氨酸-X-Y三肽组成的重复序列,其中X和Y通常代表脯氨酸和羟脯氨酸,

它们通过周期性链间氢键形成螺旋纤维结构<sup>[37]</sup>。在过去的几十年中,研究人员在胶原蛋白组装结构的基础上设计出了多种自组装胶原蛋白样(CLP)肽。CLP不仅被设计用于模拟天然胶原原纤维,还能够通过 $\pi$ - $\pi$ 堆积作用、静电吸引以及金属离子螯合组装形成高度有序的纳米结构<sup>[38]</sup>。Pires等<sup>[39]</sup>通过改变CLP的长度,可以产生纳米花、纳米片和纤维状网格等多种形貌。Pal等<sup>[40]</sup>在CLP的重复单元甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸(Gly-Pro-Hyp)的基础上,分别用赖氨酸和天冬氨酸取代脯氨酸(Pro)后,在静电、 $\pi$ - $\pi$ 堆积、盐桥等多种作用力的驱动下共组装形成水凝胶,实验证明了这种仿生多肽水凝胶具有良好的生物相容性(图1)。Sun等<sup>[41]</sup>通过模拟I型胶原蛋白纤维的形成,合成了镧系元素触发的肽组装CLP-Ln<sup>3+</sup>系统,为构建模拟天然胶原蛋白结构和功能特性的纳米纤维提供了简便而有效的策略。

### 2.2 离子互补型多肽

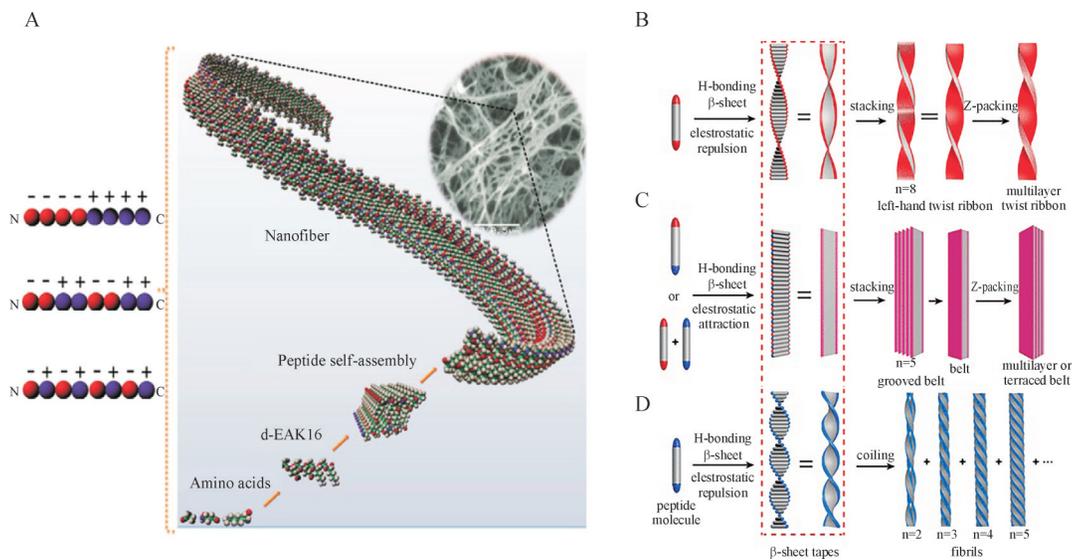
通常,离子自互补型肽的结构是由疏水氨基酸残基(丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸)和带有正电荷(赖氨酸或精氨酸)或负电荷(天冬氨酸或谷氨酸)的亲水氨基酸残基交替排列<sup>[42]</sup>。根据带电氨基酸残基的分布不同,离子互补型肽电荷分布类型主要可分为3种模式:模式I“----++++”,模式II“--+-+--+”和模式III“+-+-+--+”<sup>[43]</sup>。RADA16-I是最典型的离子互补型自组装肽,已实现商业化(PuraMatrix<sup>®</sup>)。RADA16-I序列中氨基酸残基电荷呈现模式I分布,此外,由于其与RGD序列相似,该序列构建的自组装肽水凝胶在体内外具有良好的成骨表现<sup>[44]</sup>。多肽中电荷分布模式不同,自组装形貌亦有所差异。Hu等<sup>[45]</sup>合成了两种电荷分布的离子肽,实验结果证明有一种电荷的肽EF4E和KF4K在同电荷排斥下只能形成窄的扭曲带和细纤维。但当将带相反电荷的E和K残基引入同一个条多肽序列中,形成离子互补型肽(EF4K)时,正负电荷相互中和,屏蔽了分子之间的静电排斥,组装体横向生长,最终形成宽带(图2)。通过蒙特卡罗模拟发现肽自组装纳米纤维亲水表面上带电氨基酸残基之间的静电相互作用可以稳定纤维结构,证明了静电相互作用在肽自组装过程对维持组装形态中具有重要作用<sup>[46]</sup>。当带相反电荷的氨基酸残基

分布在肽序列的两端时,肽在自组装过程中倾向于采用反平行分子排列<sup>[47]</sup>。Behanna 等<sup>[48]</sup>证实了在带相反电荷的氨基酸残基之间的静电吸引力作用下形成的纳米纤维具有更强的热稳定性。



**Figure 1** Self-assembly and potential characterization of peptide amphiphiles

A: Mechanism of self-assembly of peptide amphiphiles; B: Self-assembly of peptide amphiphiles in their respective environment, leading to hydrogel formation at different pHs through counter ion stabilization, and upon mixing them together, they showed gelation at physiological pH because of electrostatic interaction; C: Zeta potential graph showing the overall surface charge at different mixing ratios of the peptides<sup>[40]</sup>



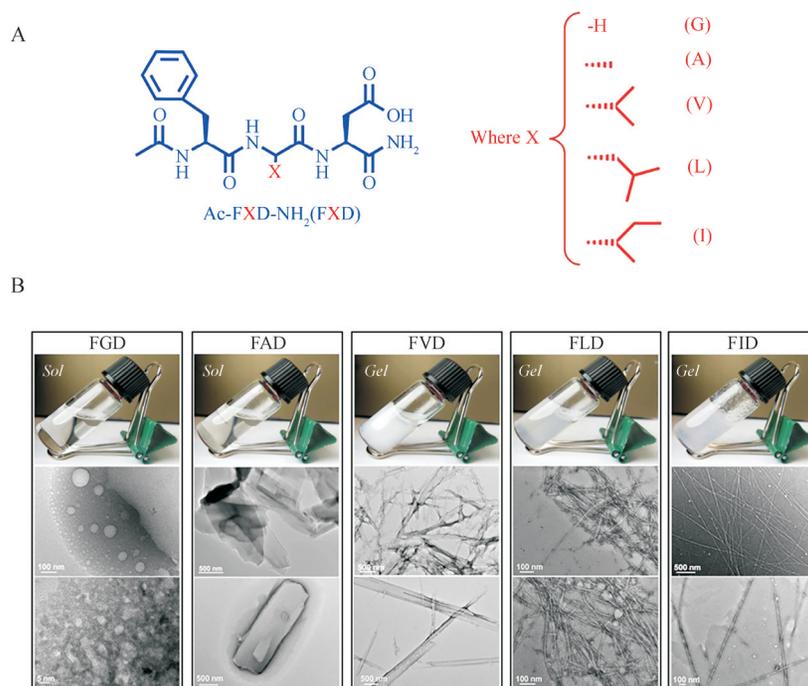
**Figure 2** Charge distribution pattern and assembly mechanism of ionic self-complementary peptides

A: Self-assembly of a peptide consisting of alanine, glutamic acid and lysine (dEAK) into nanofibers, which were then entangled into 3D scaffolds. The self-assembling process was a consequence of complementary ionic interactions between charged residues (red for negatively charged glutamic acid and blue for the positively charged lysine residues), which could have different arrangements: modulus I, ----++++; modulus II, -+----++; modulus III, -+----++-+<sup>[49]</sup>. Mechanism of twisted ribbon, belt and fibril formation by the peptides EF4E (B), EF4K, EF4E/KF4K mixture (C), and KF4K (D)<sup>[45]</sup>

### 2.3 两亲性多肽

两亲性多肽(PA)是另一种典型的自组装多肽,PA结构中主要包含N端疏水端、诱导形成 $\beta$ 折叠的中间肽序列和一个亲水的C端肽序列<sup>[50]</sup>。由于PA在结构上与天然哺乳动物细胞外基质中的丝状结构相似,因此被广泛用于仿生人工基质的构建。氢键和疏水作用是影响PA自组装能力的关键<sup>[51]</sup>。de Groot等<sup>[52]</sup>发现异亮氨酸-苯丙氨酸(Ile-Phe)二肽在疏水作用力驱动下能够自组装形成纤维网络状纳米结构,最终在水溶液中能够形成水凝胶。但当将异亮氨酸(Ile)换成少一个甲基(疏水基团)的缬氨酸(Val)时,二肽缬氨酸-苯丙氨酸(Val-Phe),不能自组装形成凝胶,表明疏水作用对自组装能力的决定性作用。为了研究氢键对两亲性多肽自组形貌的影响,Sahoo等<sup>[53]</sup>制备了含有

不同分子间氢键键合倾向的三肽:FGD、FAD、FVD、FLD和FID(图3-A),固定N端和C端分别为一个疏水苯丙氨酸残基(F)和亲水天冬氨酸残基(D),为了改变形成 $\beta$ -折叠的倾向,改变中间氨基酸残基分别为甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)。结果表明,通过改变这些肽中的一个氨基酸,可以产生具有不同纵横比和几何形状的多种纳米结构,如:球形、斑块、长带状、直纤维和交联纤维(图3)。三肽FID甚至还能够非常低的浓度下形成有利于细胞生长的水凝胶。此外,PA水凝胶是生物矿化的理想基质<sup>[54]</sup>,有利于钙沉积。Sargeant等<sup>[55]</sup>设计了含有丝氨酸或磷酸丝氨酸残基的PA纳米纤维水凝胶,在细胞培养条件下能够促进成骨分化和矿化。



**Figure 3** Construction and characterization of amphiphilic tripeptides

A: Schematic illustration of the amphiphilic tripeptides, designed with an N-terminal phenylalanine residue and a C-terminal aspartic acid residue flanking a variable residue (X). This variable residue was modified to alter R-group volume and hydrogen bonding propensity by including a glycine (G), alanine (A), valine (V), leucine (L), or isoleucine (I) residue at this position; B: (Top row) Representative images of 20 mmol/L tripeptide solutions in water demonstrating those that form sol (FGD and FAD) and others that form hydrogels (FVD, FLD, and FID). (Second and third row) Representative TEM images for each tripeptide sequence, acquired from films cast from the 20 mmol/L solutions and negatively stained with uranyl acetate<sup>[53]</sup>

### 3 自组装多肽凝胶在骨修复方面应用

自组装多肽水凝胶能够仿生模拟细胞外基质,有助于细胞的黏附、迁移,具有低免疫原性、易

于负载多种细胞及生物活性物质等优势,一直以来,被广泛用于递送干细胞、成骨细胞、软骨细胞、内皮细胞以及多种成骨蛋白或因子等,此外,水凝胶还可以通过掺入不同的纳米填料,增强水凝胶

的机械性能,在体内外表现出良好的成骨性能。

### 3.1 自组装多肽水凝胶负载细胞

将功能性细胞如干细胞直接递送至在骨伤处能够通过成骨分化以及分泌相关生长因子促进骨再生。自组装多肽水凝胶因其良好的生物相容性以及能够为细胞黏附、迁移和培养提供良好条件已成为多种干细胞递送和培养的重要基质<sup>[56]</sup>。BD PuraMatrix 肽水凝胶是一种源于自组装肽 RADA16 凝胶 3D 细胞培养模型,已广泛应用于骨组织再生。Moradi 等<sup>[57]</sup>利用 PuraMatrix 凝胶装载培养 Schwann 细胞(SCs)然后移植到大鼠脊髓损伤模型中。体内研究结果表明,不仅植入的 SCs 能够在自组装多肽水凝胶中增殖和迁移,还发现宿主 SCs 大量迁移到凝胶中,表现出优异的骨髓损伤修复作用。He 等<sup>[58]</sup>还报道了功能化的 D-RADA16-RGD 多肽水凝胶在促进髌突缺损的骨修复方面具有重要的潜力。Kisiday 等<sup>[59]</sup>设计了一种封装 BMSCs 的可注射自组装多肽水凝胶,表现出优异的软骨再生能力。Lv 等<sup>[60]</sup>设计了一种含有连接蛋白 N 肽(LPP)的新型功能化自组装肽水凝胶(KLD-12/KLD-12-LPP, KLPP),KLPP 水凝胶能够在体外 3D 培养系统中诱导和增强软骨细胞和骨髓间充质干细胞的迁移。将 KLPP 水凝胶注射体内后,能够为软骨细胞和骨髓间充质干细胞迁移提供支撑,促进透明样软骨修复。此外,Vitale 等<sup>[61]</sup>设计了能够装载破骨细胞的自组装多肽凝胶体系,将羟基磷灰石(Hap)纳米粒子填充入基于 Fmoc 自组装的 RGD 功能化多肽水凝胶能够模拟破骨细胞-骨骼界面微环境。与其他破骨细胞培养水凝胶(如结冷胶<sup>[62]</sup>、藻酸盐<sup>[63]</sup>或胶原水凝胶<sup>[64]</sup>)不同的是,所设计的多肽水凝胶在没有 RANKL<sup>[65]</sup>等诱导因子加入的情况下就能够促使 Raw 264.7 巨噬细胞分化为成熟的破骨细胞。该多肽水凝胶还被可以负载破骨细胞分化抑制剂,用于构建出骨再生/吸收研究的新型体外模型<sup>[66]</sup>。

### 3.2 自组装多肽水凝胶负载成骨活性剂

为了促进骨组织再生,多种成骨活性剂,包括骨形成蛋白(BMPs)<sup>[67]</sup>、成骨活性因子<sup>[68]</sup>或活性肽<sup>[69]</sup>被引入骨填充材料中,水凝胶不仅能够很好地维持蛋白、因子的活性,还能够控制成骨活性剂在局部的缓慢释放,被广泛用于骨再生活性剂的递送。例如,Zhang 等<sup>[70]</sup>构建了能够同时负载血管

内皮生长因子 VEGF 和骨形成蛋白 BMP-2 的自组装多肽水凝胶 RATEA16。结果表明,该凝胶递释系统能够有效地传递生长因子,保证释放的 VEGF/BMP-2 浓度维持在活性范围内,能够促进人脐静脉内皮细胞的血管生成以及人顶乳头干细胞的成骨能力。Zhao 等<sup>[71]</sup>将碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)装载于自组装多肽 D-RADA16-羟基磷灰石水凝胶中,能够维持 bFGF 在骨缺损部位持续、稳定释放,加速骨愈合。Panek 等<sup>[72]</sup>还设计了地塞米松-RADA16 水凝胶递释系统。该研究的创新性在于水凝胶支架中使用 FDA 批准的药物地塞米松来诱导人骨髓间充质干细胞的成骨分化,而不是成本高昂的骨形成蛋白等生物活性剂。Zanotto 等<sup>[31]</sup>设计自组装 KLD 水凝胶负载血小板衍生生长因子-BB 和肝素结合胰岛素样生长因子-1 来促进软骨损伤修复。为了增强自组装多肽水凝胶的成骨活性,Onak 等<sup>[69]</sup>将成骨活性肽 EEGGC 和 EEEEE 活性肽通过化学偶联方式连接在自组装多肽 KLD 上。结果显示,所设计的自组装生物活性肽凝胶能够增强碱性磷酸酶(ALP)活性、增加钙沉积和促进人骨髓间充质干细胞增殖,上调 ALP、I 型胶原蛋白(COL-1)、骨桥蛋白(OP)和骨钙素(OCN)关键成骨标志物的表达水平。Zuo 等<sup>[33]</sup>设计了自组装多肽水凝胶 NapFFY,通过共组装负载成骨生长肽(OGP)制备超分子水凝胶 NapFFY-OGP。水凝胶的纤维网状结构,可以控制 OGP 连续缓慢释放。在大鼠颅骨缺损中,使得骨再生率达到 37.45%,有效促进颅骨缺损的再生和重建(图4)。

## 4 总结与展望

近年来,自组装多肽作为新兴生物材料,其良好的生物相容性、可注射性、低免疫原性以及灵活负载细胞、蛋白、小分子药物的能力使之在骨再生领域大放异彩。然而,骨再生是一个复杂的过程,受到多种因素的影响,基于凝胶灵活多样的负载性能和仿生性能,可探索利用多肽水凝胶同时负载多种干细胞及活性因子,发挥多策略协同增效的作用。此外,通过对自组装多肽进行功能化修饰,结合 3D 打印等技术进一步模拟骨组织再生微环境,除了负载干细胞及活性因子,还可以尝试在凝胶中进行骨组织的类器官培养再植入体内,以提高大段骨缺损的再生能力。本课题组在多肽长

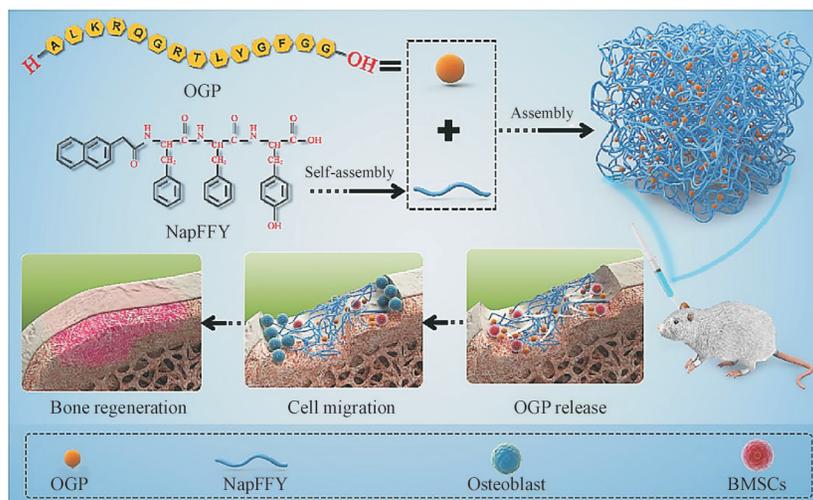


Figure 4 Schematic illustration of the construction of NapFFY-OGP hydrogel and its application in promoting bone regeneration<sup>[33]</sup>

效凝胶递释系统研究中发现,在多肽凝胶中引入MMPs的降解序列,可调控多肽凝胶在体内的降解速率。同时,天然存在的L型氨基酸具有快速水解的特点,非天然D-氨基酸残基组成的D型多肽具有抗蛋白水解性,使得D型多肽具有比L型多肽具有更高的稳定性。此外,多肽组装序列的交联度决定了凝胶的硬度和孔隙大小,对凝胶降解及其负载药物的释放速率都产生影响。为了调控凝胶的降解速率,本课题组研究了氨基酸构型和交联度这两大影响凝胶降解的因素,调控凝胶的降解动力学,能够满足长期降解释药的治疗需求。总之,在未来的发展中,自组装多肽骨修复水凝胶的开发应集中于:构建多策略联用的仿生凝胶、提高水凝胶力学强度和控制凝胶降解速率。随着骨组织工程的不断进步以及多技术的交叉融合,自组装多肽水凝胶有望为骨缺损提供更多的临床治疗方案。

## References

- [1] Nie XL, Chuah YJ, Zhu WZ, *et al.* Decellularized tissue engineered hyaline cartilage graft for articular cartilage repair [J]. *Biomaterials*, 2020, **235**: 119821.
- [2] Zhang K, Wang SP, Zhou CC, *et al.* Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration [J]. *Bone Res*, 2018, **6**: 31.
- [3] Lei PF, Hu RY, Hu YH. Bone defects in revision total knee arthroplasty and management [J]. *Orthop Surg*, 2019, **11**(1): 15-24.
- [4] Artas G, Gul M, Acikan I, *et al.* A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration [J]. *Braz Oral Res*, 2018, **32**: e59.
- [5] Zhang H, Yang L, Yang XG, *et al.* Demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: an overview [J]. *Orthop Surg*, 2019, **11**(5): 725-737.
- [6] Zheng X, Liu Y, Liu YX, *et al.* Novel three-dimensional bioglass functionalized gelatin nanofibrous scaffolds for bone regeneration [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2021, **109**(4): 517-526.
- [7] Tan SL, Wang YF, du YY, *et al.* Injectable bone cement with magnesium-containing microspheres enhances osteogenesis via anti-inflammatory immunoregulation [J]. *Bioact Mater*, 2021, **6**(10): 3411-3423.
- [8] Brink O. The choice between allograft or demineralized bone matrix is not unambiguous in trauma surgery [J]. *Injury*, 2021, **52**(Suppl 2): S23-S28.
- [9] Gaihre B, Liu XF, Li LL, *et al.* Bifunctional hydrogel for potential vascularized bone tissue regeneration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, **124**: 112075.
- [10] Ding X, Zhao HM, Li YZ, *et al.* Synthetic peptide hydrogels as 3D scaffolds for tissue engineering [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, **160**: 78-104.
- [11] Nallusamy J, Das RK. Hydrogels and their role in bone tissue engineering: an overview [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2021, **13**(Suppl 2): S908-S912.
- [12] Ranganathan S, Balagangadharan K, Selvamurugan N. Chitosan and gelatin-based electrospun fibers for bone tissue engineering [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, **133**: 354-364.
- [13] Hernández-González AC, Téllez-Jurado L, Rodríguez-Lorenzo LM. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: a review [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, **229**: 115514.
- [14] Zhai PS, Peng XX, Li BQ, *et al.* The application of hyaluronic

- acid in bone regeneration[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, **151**: 1224-1239.
- [15] Ma FB, Li SJ, Ruiz-Ortega LI, *et al.* Effects of alginate/chondroitin sulfate-based hydrogels on bone defects healing[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2020, **116**: 111217.
- [16] Yang YC, Feng YT, Qu RM, *et al.* Synthesis of aligned porous polyethylene glycol/silk fibroin/hydroxyapatite scaffolds for osteoinduction in bone tissue engineering[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, **11**(1): 522.
- [17] Parivatphun T, Sangkert S, Meesane J, *et al.* Constructed micro-bubble porous scaffolds of polyvinyl alcohol for subchondral bone formation for osteoarthritis surgery[J]. *Biomed Mater*, 2020, **15**(5): 055029.
- [18] Fu K, Wu HG, Su ZQ. Self-assembling peptide-based hydrogels: fabrication, properties, and applications[J]. *Biotechnol Adv*, 2021, **49**: 107752.
- [19] Gong CC, Sun SW, Zhang YJ, *et al.* Hierarchical nanomaterials via biomolecular self-assembly and bioinspiration for energy and environmental applications[J]. *Nanoscale*, 2019, **11**(10): 4147-4182.
- [20] Zhang CY, Li X, Qian H, *et al.* Self-assembled peptide: insights and biomedicine applications[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2015, **46**(2): 250-256.
- [21] Chen J, Zou XN. Self-assemble peptide biomaterials and their biomedical applications[J]. *Bioact Mater*, 2019, **4**: 120-131.
- [22] Ren H, Wu LF, Tan LN, *et al.* Self-assembly of amino acids toward functional biomaterials[J]. *Beilstein J Nanotechnol*, 2021, **12**: 1140-1150.
- [23] Dong L, Chen H, Liu T, *et al.* Poly(l-cysteine) peptide amphiphile derivatives containing disulfide bonds: synthesis, self-assembly-induced  $\beta$ -sheet nanostructures, pH/reduction dual response, and drug release[J]. *Biomacromolecules*, 2021, **22**(12): 5374-5381.
- [24] Zhu J, Avakyan N, Kakkis A, *et al.* Protein assembly by design[J]. *Chem Rev*, 2021, **121**(22): 13701-13796.
- [25] Costantini S, Colonna G, Facchiano AM. Amino acid propensities for secondary structures are influenced by the protein structural class[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**(2): 441-451.
- [26] Zhao CQ, Chen HY, Wang FS, *et al.* Amphiphilic self-assembly peptides: rational strategies to design and delivery for drugs in biomedical applications[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, **208**: 112040.
- [27] Ghosh G, Kartha KK, Fernández G. Tuning the mechanistic pathways of peptide self-assembly by aromatic interactions[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, **57**(13): 1603-1606.
- [28] Škrbić T, Hoang TX, Maritan A, *et al.* Local symmetry determines the phases of linear chains: a simple model for the self-assembly of peptides[J]. *Soft Matter*, 2019, **15**(28): 5596-5613.
- [29] Huang CC, Ravindran S, Kang MY, *et al.* Engineering a self-assembling leucine zipper hydrogel system with function-specific motifs for tissue regeneration[J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, **6**(5): 2913-2928.
- [30] Kisiday J, Jin M, Kurz B, *et al.* Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(15): 9996-10001.
- [31] Zannotto G, Liebesny P, Barrett M, *et al.* Trypsin pre-treatment combined with growth factor functionalized self-assembling peptide hydrogel improves cartilage repair in rabbit model[J]. *J Orthop Res*, 2019, **37**(11): 2307-2315.
- [32] Gelain F, Luo ZL, Zhang SG. Self-assembling peptide EAK16 and RADA16 nanofiber scaffold hydrogel[J]. *Chem Rev*, 2020, **120**(24): 13434-13460.
- [33] Zuo YP, Xiong QC, Li QW, *et al.* Osteogenic growth peptide (OGP)-loaded amphiphilic peptide (NapFFY) supramolecular hydrogel promotes osteogenesis and bone tissue reconstruction[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, **195**: 558-564.
- [34] Ghosh M, Halperin-Sternfeld M, Grinberg I, *et al.* Injectable alginate-peptide composite hydrogel as a scaffold for bone tissue regeneration[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2019, **9**(4): E497.
- [35] Alcaide-Ruggiero L, Molina-Hernández V, Granados MM, *et al.* Main and minor types of collagens in the articular cartilage: the role of collagens in repair tissue evaluation in chondral defects[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(24): 13329.
- [36] Sun M, Luo EY, Adams SM, *et al.* Collagen XI regulates the acquisition of collagen fibril structure, organization and functional properties in tendon[J]. *Matrix Biol*, 2020, **94**: 77-94.
- [37] Xu YJ, Kirchner M. Collagen mimetic peptides[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2021, **8**(1): 5.
- [38] Qin JY, Luo TZ, Kiick KL. Self-assembly of stable nanoscale platelets from designed elastin-like peptide-collagen-like peptide bioconjugates[J]. *Biomacromolecules*, 2019, **20**(4): 1514-1521.
- [39] Pires MM, Lee J, Ernenwein D, *et al.* Controlling the morphology of metal-promoted higher ordered assemblies of collagen peptides with varied core lengths[J]. *Langmuir*, 2012, **28**(4): 1993-1997.
- [40] Pal VK, Jain R, Roy S. Tuning the supramolecular structure and function of collagen mimetic ionic complementary peptides via electrostatic interactions[J]. *Langmuir*, 2020, **36**(4): 1003-1013.
- [41] Sun XX, He MM, Wang L, *et al.* Luminescent biofunctional collagen mimetic nanofibers[J]. *ACS Omega*, 2019, **4**(15): 16270-16279.
- [42] Brea RJ, Reiriz C, Granja JR. Towards functional bionanomaterials based on self-assembling cyclic peptide nanotubes[J]. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(5): 1448-1456.
- [43] He B, Yuan X, Jiang DM. Molecular self-assembly guides the

- fabrication of peptide nanofiber scaffolds for nerve repair [J]. *RSC Adv*, 2014, **4**(45):23610-23621.
- [44] Li ZQ, Hou TY, Luo F, *et al.* Bone marrow enriched graft, modified by self-assembly peptide, repairs critically-sized femur defects in goats [J]. *Int Orthop*, 2014, **38**(11):2391-2398.
- [45] Hu Y, Lin R, Zhang PC, *et al.* Electrostatic-driven lamination and untwisting of  $\beta$ -sheet assemblies [J]. *ACS Nano*, 2016, **10**(1):880-888.
- [46] Tsonchev S, Schatz GC, Ratner MA. Electrostatically-directed self-assembly of cylindrical peptide amphiphile nanostructures [J]. *J Phys Chem B*, 2004, **108**(26):8817-8822.
- [47] Mehta AK, Lu K, Childers WS, *et al.* Facial symmetry in protein self-assembly [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(30):9829-9835.
- [48] Behanna HA, Donners JJ, Gordon AC, *et al.* Coassembly of amphiphiles with opposite peptide polarities into nanofibers [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(4):1193-1200.
- [49] Rivas M, del Valle LJ, Alemán C, *et al.* Peptide self-assembly into hydrogels for biomedical applications related to hydroxyapatite [J]. *Gels*, 2019, **5**(1):E14.
- [50] Cui HG, Webber MJ, Stupp SI. Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials [J]. *Biopolymers*, 2010, **94**(1):1-18.
- [51] Koss KM, Unsworth LD. Neural tissue engineering: Bioresponsive nanoscaffolds using engineered self-assembling peptides [J]. *Acta Biomater*, 2016, **44**:2-15.
- [52] de Groot NS, Parella T, Aviles FX, *et al.* Ile-phe dipeptide self-assembly: clues to amyloid formation [J]. *Biophys J*, 2007, **92**(5):1732-1741.
- [53] Sahoo JK, Nazareth C, VandenBerg MA, *et al.* Self-assembly of amphiphilic tripeptides with sequence-dependent nanostructure [J]. *Biomater Sci*, 2017, **5**(8):1526-1530.
- [54] Chen CH, Hsu EL, Stupp SI. Supramolecular self-assembling peptides to deliver bone morphogenetic proteins for skeletal regeneration [J]. *Bone*, 2020, **141**:115565.
- [55] Sargeant TD, Aparicio C, Goldberger JE, *et al.* Mineralization of peptide amphiphile nanofibers and its effect on the differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. *Acta Biomater*, 2012, **8**(7):2456-2465.
- [56] Castelletto V, Edwards-Gayle CJC, Greco F, *et al.* Self-assembly, tunable hydrogel properties, and selective anti-cancer activity of a carnosine-derived lipidated peptide [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, **11**(37):33573-33580.
- [57] Moradi F, Bahktiari M, Joghataei MT, *et al.* BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2012, **90**(12):2335-2348.
- [58] He B, Ou YS, Zhou A, *et al.* Functionalized d-form self-assembling peptide hydrogels for bone regeneration [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, **10**:1379-1388.
- [59] Kisiday JD, Colbath AC, Tangtrongsup S. Effect of culture duration on chondrogenic preconditioning of equine bone marrow mesenchymal stem cells in self-assembling peptide hydrogel [J]. *J Orthop Res*, 2019, **37**(6):1368-1375.
- [60] Lv X, Sun CX, Hu BW, *et al.* Simultaneous recruitment of stem cells and chondrocytes induced by a functionalized self-assembling peptide hydrogel improves endogenous cartilage regeneration [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**:864.
- [61] Vitale M, Ligorio C, McAvan B, *et al.* Hydroxyapatite-decorated Fmoc-hydrogel as a bone-mimicking substrate for osteoclast differentiation and culture [J]. *Acta Biomater*, 2022, **138**:144-154.
- [62] Maia FR, Musson DS, Naot D, *et al.* Differentiation of osteoclast precursors on gellan gum-based spongy-like hydrogels for bone tissue engineering [J]. *Biomed Mater*, 2018, **13**(3):035012.
- [63] Zehnder T, Boccaccini AR, Detsch R. Biofabrication of a co-culture system in an osteoid-like hydrogel matrix [J]. *Biofabrication*, 2017, **9**(2):025016.
- [64] Hulley PA, Papadimitriou-Olivgeri I, Knowles HJ. Osteoblast-osteoclast coculture amplifies inhibitory effects of FG-4592 on human osteoclastogenesis and reduces bone resorption [J]. *JBM Plus*, 2020, **4**(7):e10370.
- [65] Collin-Osdoby P, Osdoby P. RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, **816**:187-202.
- [66] Aderibigbe B, Aderibigbe I, Popoola P. Design and biological evaluation of delivery systems containing bisphosphonates [J]. *Pharmaceutics*, 2016, **9**(1):E2.
- [67] Vantucci CE, Krishan L, Cheng A, *et al.* BMP-2 delivery strategy modulates local bone regeneration and systemic immune responses to complex extremity trauma [J]. *Biomater Sci*, 2021, **9**(5):1668-1682.
- [68] Zha Y, Li YW, Lin TY, *et al.* Progenitor cell-derived exosomes endowed with VEGF plasmids enhance osteogenic induction and vascular remodeling in large segmental bone defects [J]. *Theranostics*, 2021, **11**(1):397-409.
- [69] Onak G, Gökmen O, Yarah ZB, *et al.* Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by self-assembled peptide hydrogel functionalized with glutamic acid templated peptides [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, **14**(9):1236-1249.
- [70] Zhang RJ, Liu Y, Qi YQ, *et al.* Self-assembled peptide hydrogel scaffolds with VEGF and BMP-2 enhanced *in vitro* angiogenesis and osteogenesis [J]. *Oral Dis*, 2022, **28**(3):723-733.
- [71] Zhao WK, Li YL, Zhou A, *et al.* Controlled release of basic fibroblast growth factor from a peptide biomaterial for bone regeneration [J]. *R Soc Open Sci*, 2020, **7**(4):191830.
- [72] Panek M, Antunović M, Pribošlan L, *et al.* Bone tissue engineering in a perfusion bioreactor using dexamethasone-loaded peptide hydrogel [J]. *Materials (Basel)*, 2019, **12**(6):E919.