

# 力学环境调控骨基质仿生矿化

马春阳<sup>1</sup>, 杜田明<sup>2</sup>, 牛旭锋<sup>1\*</sup>, 樊瑜波<sup>1\*</sup>

(1.北京市生物医学工程高精尖创新中心;生物力学与力学生物学教育部重点实验室;高端植介入医疗器械优化设计与评测技术北京市重点实验室;北京航空航天大学 医工交叉创新研究院,医学科学与工程学院,生物与医学工程学院,北京 100091;  
2.北京工业大学 环境与生命学部,生物医学工程系,智能化生理测量与临床转化北京市国际科技合作基地,北京 100124)

**摘要:**骨缺损一直以来都是威胁人类生命健康的重要原因,人工仿生骨修复替代材料是目前治疗骨损伤最为有效、可行的解决途径之一。要研发人工骨仿生材料,必先构建体外仿生矿化体系,以研究天然骨基质的矿化机制。胶原是矿化发生的模板,其交联度、直径、渗透压和表面电荷等性质会直接影响矿化的进行。矿化发生的生化和力学环境对矿化过程的影响也十分明显,特别是非胶原蛋白和流体切应力。流体切应力是骨组织在微观环境下受到的最主要力学刺激方式,对骨骼生长、修复以及健康维护都具有重要意义。不同水平和加载方式的切应力对无定形磷酸钙向骨磷灰石的转化、胶原纤维的自组装和定向排列以及分层纤维内矿化的形成具有显著作用。本文总结影响骨基质矿化的因素及其作用机制,重点介绍流体切应力对胶原矿化的调控作用,并展望未来的发展方向。

**关键词:** 骨基质; 仿生矿化; 胶原; 流体切应力; 骨修复材料

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.16156/j.1004-7220.2022.02.002

## Biomechanical Environment Regulates Biomimetic Mineralization of Bone Matrix

MA Chunyang<sup>1</sup>, DU Tianming<sup>2</sup>, NIU Xufeng<sup>1\*</sup>, FAN Yubo<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Advanced Innovation Center for Biomedical Engineering; Key Laboratory of Biomechanics and Mechanobiology, Ministry of Education; Beijing Key Laboratory for Optimal Design, Test & Evaluation Technology of High-End Medical Implants and Interventional Instruments; Institute for Medicine and Engineering Interdisciplinary Innovation, School of Medical Science and Engineering, School of Biological Science and Medical Engineering, Beihang University, Beijing 100091, China; 2. Beijing International Science and Technology Cooperation Base for Intelligent Physiological Measurement and Clinical Transformation, Department of Biomedical Engineering, Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

**Abstract:** Bone defects have always been an important cause of threat to human health, and artificial biomimetic bone repair replacement materials are currently one of the most effective and feasible solution approaches to treat bone damage. To develop artificial bone biomimetic materials, an *in vitro* biomimetic mineralization system must be constructed first to study *in vitro* biomimetic mineralization mechanism of natural bone matrix. Collagen is a

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(11827097, 11827803, U20A20390, 11272038), 国家重点研发计划(2020YFC0122204), 高等学校学科创新引智计划(B13003)

通信作者: 牛旭锋, 教授, E-mail: nxf@buaa.edu.cn; 樊瑜波, 教授, E-mail: yubofan@buaa.edu.cn

\* 为共同通信作者

template for mineralization, and its properties such as crosslinking degree, diameter, osmotic pressure, and surface charge can all directly affect mineralization progress. The biochemical and mechanical environments in which mineralization occurs are also quite distinct in their effects on mineralization process, particularly noncollagenous proteins and fluid shear stress (FSS). FSS is considered to be the main mechanical stimulation of bone tissues in micro-environment, which is of great significance to bone growth, repair and health maintenance. FSS at different levels and loading regimes has significant effects on transformation of amorphous calcium phosphate to bone apatite, self-assembly and directional alignment of collagen fibrils, and formation of hierarchical intrafibrillar mineralization. In this paper, the factors affecting collagen mineralization and their mechanism were summarized, with focus on regulation of FSS on collagen mineralization, and development direction in future was also prospected.

**Key words:** bone matrix; biomimetic mineralization; collagen; fluid shear stress (FSS); bone repair materials

骨骼是为人体提供力学支撑的重要器官,大面积骨缺损的再生修复一直是国内外的研究热点。自体骨移植是骨修复领域的“金标准”,但会受到供体数量有限和对病人造成二次伤害等问题的限制<sup>[1-2]</sup>。而异体骨移植则存在可能会引起免疫排斥反应、诱发传染性等疾病等诸多风险<sup>[3]</sup>。发展人工仿生骨修复材料是目前骨损伤治疗中最为有效、可行的解决途径之一<sup>[4-6]</sup>。由于人体骨组织具有复杂的多级结构,给骨修复材料的仿生构建造成困难<sup>[7]</sup>。构建体外仿生矿化体系,研究影响矿化的因素及其作用机制是实现体外仿生制备人工骨修复材料的必经之路。

根据目前被普遍认同的“液相前驱矿化理论”,在矿化过程中,钙磷离子首先会聚集形成无定形磷酸钙前驱体(amorphous calcium phosphate, ACP),然后逐渐向羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)转变<sup>[8-10]</sup>。胶原(collagen, Col)作为矿化发生的模板,其磷酸化程度、交联度、直径、渗透压、表面电荷等诸多性质都会直接影响矿化的进程<sup>[11-12]</sup>。研究表明,较高的Col交联度可以为HA的沉积提供更好的机械和结构条件,最终提高Col的矿化能力<sup>[13]</sup>。除了Col本身的性质外,矿化过程还受周围环境中多种非胶原蛋白(non-collagenous proteins, NCP)的调控<sup>[14-15]</sup>。例如:在针对牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein, DMP1)调控的体外仿生矿化实验中,HA仅在Col上有DMP1结合的部位沉积<sup>[16]</sup>。因此,NCP在Col纤维上的特异性结合可能是调控矿化的关键步骤。

人体的生命活动离不开骨骼提供的力学支撑,而骨骼在为人体提供力学支撑的同时也会受到诸多人体活动带来的力学刺激,如压力、拉力、切应力等<sup>[17-18]</sup>。根据目前的认识,骨是一种动态组织,能

够通过力学载荷诱导骨组织结构和功能的适应性改变。在骨的有序结构中,松质骨髓腔、骨小管和骨小梁中的腔隙形成一种特殊的多孔网络结构。骨的多孔网络结构充满了组织液,施加在骨上的力学载荷会导致这些腔隙的体积变化,形成液压,进而促进液体流动<sup>[19]</sup>。因此,宏观上骨所承受的各种复杂力学载荷,反映在微观水平上,其中一种最主要的表现形式是间隙液流产生的流体切应力(fluid shear stress, FSS),这在骨塑建和骨重建过程中起到十分关键的调控作用(见图1)<sup>[20-21]</sup>。在细胞和分子水平上,也有越来越多的证据表明,腔隙-小管系统内的骨细胞和间质液流动都能够对外部力学刺激进行感知和反馈<sup>[22]</sup>。因此,在体外仿生矿化的研究中,FSS对Col矿化过程的影响不容忽视。

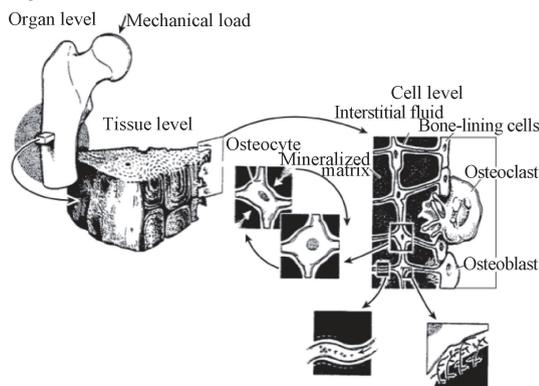


图1 在骨器官水平施加的力学载荷能够传输到细胞水平,并导致矿化基质与骨细胞周围的间质液体移动<sup>[22]</sup>

**Fig. 1** Mechanical load applied at the bone organ level enables transmission to the cellular level and results in movement of the interstitial fluid surrounding the mineralized matrix and the osteocytes

本文分别对影响 Col 矿化的因素及其作用机制进行详细描述,重点介绍 FSS 对 Col 矿化的调控作用(见图 2),并对未来研究的发展方向进行展望,指出可能会遇到的问题与挑战。

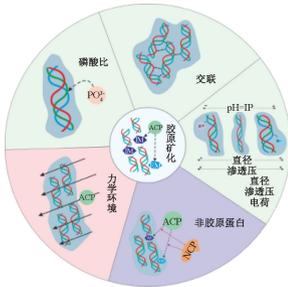


图 2 影响 Col 矿化的主要因素

Fig.2 Main factors affecting Col mineralization

## 1 Col 性质对矿化的影响

Col 是骨基质的主要有机成分,也是矿化的模板<sup>[23-24]</sup>。体液中的钙磷离子在 Col 纤维表面及内部聚集,并最终形成纤维外矿化和纤维内矿化<sup>[25]</sup>。在矿化过程中,Col 对 HA 结晶形成了明显的空间约束。实验证明,Col 的磷酸化、交联度以及直径、渗透压和表面电荷对体外仿生矿化都能造成显著影响。

### 1.1 Col 磷酸化对矿化的影响

Col 的成核位点主要是羧基和羰基<sup>[26-27]</sup>。在傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 中,1 555  $\text{cm}^{-1}$  处与羧基和羰基相关的 Col 酰胺 II 带会在整合钙后消失[见图 3 (A)]<sup>[28]</sup>。而磷酸基团可与 Col 原纤维中的氨基反应形成新的磷酸铵基团。新生成的磷酸铵基团与羧基和羰基类似,可以作为仿生矿化过程中  $\text{Ca}^{2+}$  的成核位点。因此,Col 的磷酸化程度会影响其仿生矿化结构,并诱导分层纤维内矿化 (hierarchical intrafibrillar mineralized, HIM) 的形成。为了揭示 Col 磷酸化在仿生矿化过程中的作用和 HIM 形成的潜在机制,Du 等<sup>[12]</sup>提出在模板类似物和阻滞类似物存在下的 Col 仿生矿化体系。该体系使用三聚磷酸钠(sodium tripolyphosphate, STPP)作为模板类似物对 Col 进行磷酸化处理,所得磷酸化 Col 用于与  $\text{Ca}^{2+}$  螯合,然后在矿化体系内加入聚丙烯酸 (polyacrylic acid, PAA) 进行仿生矿化。实验结果表明,随着 Col 磷酸化程度的升高,螯合在 Col 上的钙也逐渐增多[见图 3 (B)]。磷酸化 Col 螯合钙后,Col 中钙和磷的摩尔比接近于 HA 中的摩尔比。矿化结束后,观察到磷酸化 Col 具有分层形态特征。该实验验证了磷酸基团与 Col 原纤维中的氨基反应

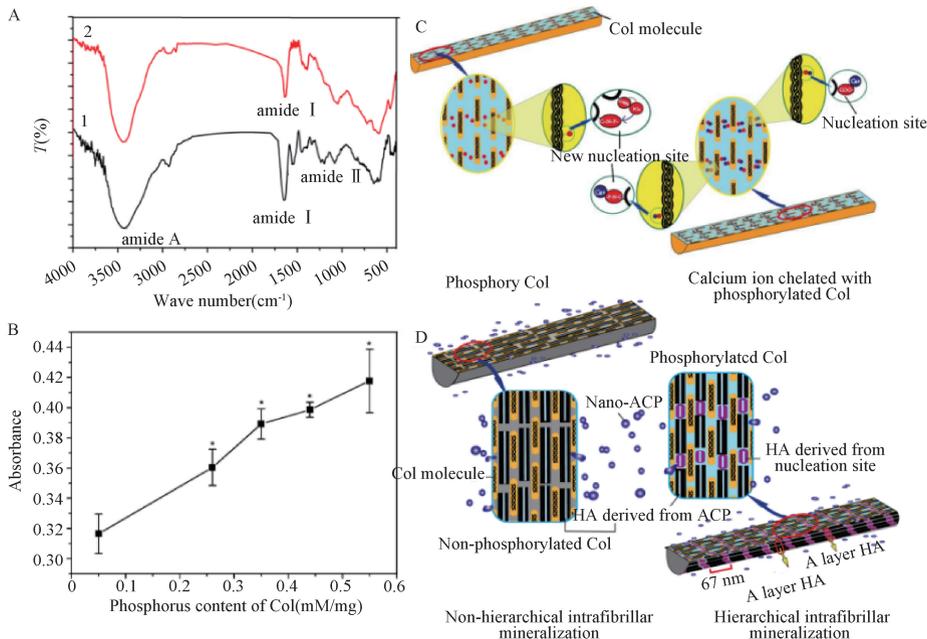


图 3 Col 磷酸化对仿生矿化的影响<sup>[12,29]</sup>

Fig.3 Effects of Col phosphorylation on biomimetic mineralization<sup>[12,29]</sup>

形成新的磷酸铵基团,进而用作生物矿化过程中 $\text{Ca}^{2+}$ 的成核位点,最终增加了 Col 的矿化度并诱导 HIM 形成的假设[见图 3(C)]<sup>[29]</sup>。总之, HIM 的本质是 PAA 诱导纳米尺寸 ACP 的形成,使其可以渗透到 Col 原纤维中,并且有助于在非磷酸化 Col 和磷酸化 Col 原纤维中分别形成非分层和分层的纤维内矿化结构[见图 3(D)]。磷酸化 Col 中的磷酸基团在成核位点处参与了 Col 原纤维内 HA 矿物质的形成。

## 1.2 Col 交联度对矿化的影响

I 型 Col 作为主要的骨基质组分和矿化模板,具有特殊的氨基酸序列和三螺旋结构。Col 纤维的三螺旋结构由 3 条氨基酸肽链自组装形成。氨基酸序列中的每个氨基酸重复单元都有 1 个甘氨酸,即-Gly-X-Y-,其中 X 和 Y 主要是脯氨酸和羟脯氨酸残基<sup>[30-31]</sup>。羟脯氨酸可以产生氢键,有利于提高 Col 三螺旋结构的稳定性。此外,高交联度也有助于提升胶原三螺旋结构的稳定性,即羟基化和交联两者都可以增加 Col 的构象稳定性<sup>[29]</sup>。为研究 Col 交联度在仿生矿化过程中的作用并揭示 Col 交联度对 HA 沉积的作用机制, Du 等<sup>[13]</sup>通过调控  $\gamma$  射线照射的剂量来控制 Col 蛋白的交联度,并利用 FTIR、示差扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 和热失重 (thermogravimetry, TG) 等方法对 Col 的交联度进行分析,明确了 Col 的交联度对矿化的重要作用。实验结果显示,随着交联度的升高,矿化 24 h 后的 Col 钙磷浓度也明显增加[见图 4(A)]。TG 曲线表明,随着交联度的增加矿化 Col 的重量损失逐渐减少,且矿化 Col 纤维的重量损失全部少于非矿化 Col[见图 4(B)]。DSC 曲线表明,随着  $\gamma$  射线照射剂量的增加,矿化后交联 Col 的热变性温度 Td 增加[见图 4(C)]。因此, Col 交联度的提高可以为 HA 的沉积提供更好的机械和结构条件,最终提高 Col 的矿化能力[见图 4(D)]。

## 1.3 Col 纤维的直径、渗透压和表面电荷对矿化的影响

Col 分子链上氨基酸的末端和侧基包含许多酸性和碱性基团。因此, Col 蛋白是具有等电点 (isoelectric point, IP) 的两性电解质<sup>[32]</sup>。实验证

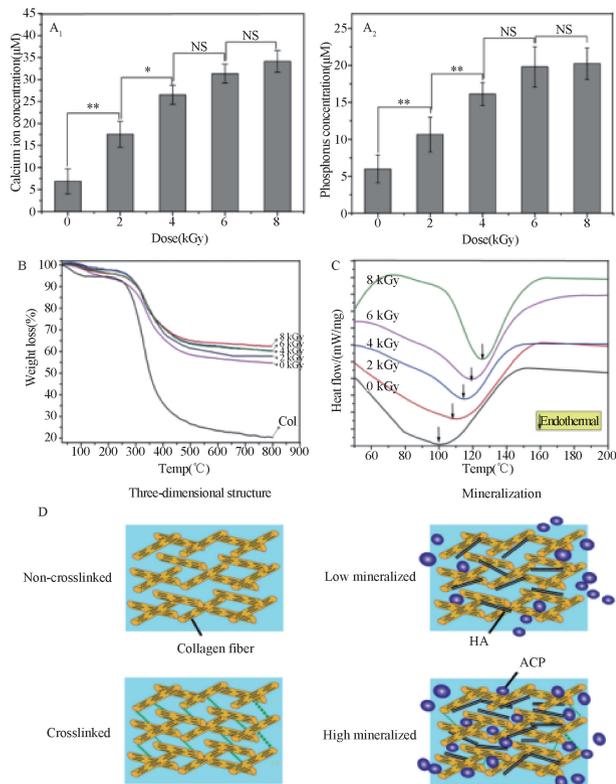


图 4 Col 交联度对仿生矿化的影响<sup>[13]</sup>

Fig.4 Effects of crosslinking degree of Col on biomimetic mineralization<sup>[13]</sup>

明,纤维内矿化是渗透压平衡和电荷平衡的结果<sup>[33]</sup>。Du 等<sup>[29]</sup>对不同 pH 范围和生理磷酸盐溶液 (PBS) 下自组装的 Col 纤维进行直径、表面电荷和渗透压的测试 (见图 3)。图 5(A) 所示为在  $\text{pH} < \text{IP}$  ( $A_1$ )、 $\text{pH} = \text{IP}$  ( $A_2$ )、 $\text{pH} > \text{IP}$  ( $A_3$ ) 和 PBS 自组装 ( $A_4$ ) 条件下 Col 纤维的直径分布。图 5(B) 所示为 Col 蛋白的渗透压与纤维直径 (或 Zeta 电位) 之间的关系。图 5(C) 所示为 Col 溶液在不同条件 ( $\text{pH} < \text{IP}$ 、 $\text{pH} = \text{IP}$ 、 $\text{pH} > \text{IP}$  以及 PBS 中自组装) 下的渗透压。因此,当外界  $\text{pH} = \text{IP}$  时, Col 蛋白的渗透压、电荷量和纤维直径最低。当外界  $\text{pH} > \text{IP}$  时, Col 纤维表面带负电荷;而当外界  $\text{pH} < \text{IP}$  时, Col 纤维表面带正电荷。无论在外部  $\text{pH} > \text{IP}$  还是  $\text{pH} < \text{IP}$  时, Col 纤维的直径和渗透压均大于  $\text{pH} = \text{IP}$  时的纤维直径和渗透压<sup>[29,34]</sup>;而在 PBS 缓冲液中,自组装成的胶原纤维直径、渗透压均为最大[见图 5(D)]。Col 纤维上钙离子的成核位点主要是羧基和羰基,属于电负性基团。为了验证 Col 纤维上的电负性基

团是成核位点,有研究选择不同 pH 和自组装条件下的 Col 蛋白螯合钙离子,并使用聚阴离子化合物 PAA 和阳离子聚丙烯酰胺 (cationic polyacrylamide, CPAM) 作为隔离类似物,在胶原纤维内矿化的形成过程中稳定 ACP,进而诱导纤维内矿化的形成<sup>[35-36]</sup>。其 Zeta 电位检测结果表明,当 Col 纤维的表面带正电荷或无电荷时,纤维表面钙的螯合量非常低,Zeta 电位的变化不明显。而当 Col 表面带有负电荷时,钙的螯合量达到最大值,并且 Zeta 电位从明显的负电位变为接近于零,表明这些溶液中 Col 和钙离子之间存在电荷平衡。由此推断,纤维内矿化的形成有两个主要过程:首先,通过电荷平衡稳定 ACP,不同的带电氨基酸可以通过静电相互作用与钙离子或磷酸根离子相互作用以稳定 ACP;然后,通过渗透压形成纤维内矿化[见图 5(E)]。由于 PAA 和 CPAM 没有参与 ACP 的形成,故推断 PAA 和 CPAM 在矿化中的作用类似于催化剂,只通过电荷平衡作用限制了 ACP 的聚集,进而影响 ACP 的尺寸,即电荷平衡影响了矿化过程中 HA 的形成[见图 5(F)]。

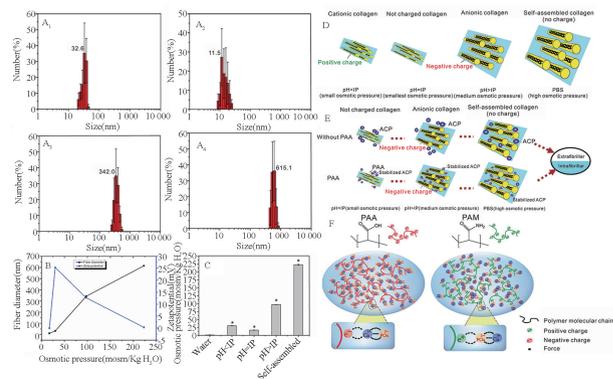


图 5 Col 纤维的直径、渗透压和表面电荷对仿生矿化的影响<sup>[29,37]</sup>

Fig.5 Effects of diameter, osmolarity, and surface charge of Col fibers on biomimetic mineralization<sup>[29,37]</sup>

## 2 NCP 对 Col 矿化的影响

人体内的 Col 并不是都会发生矿化,即使矿化和非矿化组织同时存在于非常接近的环境下。例如:牙根通过牙周韧带附着到颌骨上,颌骨和牙骨质会发生矿化,而牙周韧带不会<sup>[15]</sup>。Veis 等<sup>[38]</sup>认为,细胞外基质中的 NCP 控制着矿化的进行,特别是牙本质磷酸化蛋白在调控矿化过程中起到关键

的作用。与之类似,He 等<sup>[16]</sup>研究了 DMP1 对仿生矿化的调控作用,其实验结果显示 HA 仅在 Col 上有 DMP1 结合的部位沉积[见图 6(A)中箭头所示]。目前,针对 NCP 在体外矿化中的作用研究已经广泛开展,多种 NCP 在矿化过程中的作用已被报导。Jeremie 等<sup>[39]</sup>研究 BGLAP、Col1A1 和 BMP2 等 NCP 对骨仿生矿化的影响,指出这些 NCP 对仿生矿化均有不同程度的促进作用。Orsini 等<sup>[14]</sup>总结蛋白聚糖、糖蛋白、血清蛋白、酶以及生长因子等多种牙本质细胞外基质中 NCP 的性质、作用及功能,并指出 NCP 具有高特异性,能够与细胞表面受体结合,从而激活控制细胞增殖、分化、黏附和迁移的信号通路。NCP 在牙本质形成过程中起到积极的促进、控制和调节胶原纤维组装、晶体生长和矿化的作用。Megan 等<sup>[40]</sup>在蛋壳膜纤维中发现 49 种蛋白,这些蛋白多数属于细胞外基质蛋白,能够在不同程度上调控碳酸钙的生物矿化。

NCP 对于胶原矿化过程的作用并不都是促进,部分 NCP 也会对矿化过程起到抑制作用。Nudelman 等<sup>[15]</sup>总结 NCP 的作用,并指出溶液中磷灰石成核的抑制剂实际上促进 Col 的纤维内矿化,例如聚氨酯酸、聚丙烯酸、胎球蛋白和磷酸化牙本质磷蛋白 (phosphorylated dentin phosphophoryn, p-DPP)。图 6(B)所示为由聚氨酯酸引导的胶原矿化机制示意图(B<sub>1</sub>)和在聚氨酯酸作用下矿化进行过程中(B<sub>2</sub>)及矿化结束后(B<sub>3</sub>)胶原纤维的透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)图像。可以看出,聚氨酯酸促进纤维内矿化的形成。牙本质磷蛋白(dentin phosphophoryn, DPP)是一种同时参与牙本质和骨矿化的蛋白质<sup>[38,41]</sup>,富含天冬氨酸和丝氨酸,具有 Asp-Ser-Ser 重复序列,其中 90%的丝氨酸可被磷酸化<sup>[42]</sup>。该蛋白选择性地与 Col 间隙区的 e 带结合<sup>[43]</sup>。DPP 诱导磷灰石成核的能力取决于其磷酸化程度。在有 DPP 存在下的 Col 矿化实验表明,该蛋白的非磷酸化形式只诱导 Col 纤维表面 ACP 形成,而当其被磷酸化后,便能够促进形成纤维内矿化<sup>[44]</sup>。DMP1 对胶原矿化的作用与 DPP 相似,只有当使用该蛋白的磷酸化形式 (phosphorylated dentin phosphophoryn, p-DMP1) 时,才会发生纤维内矿化<sup>[45]</sup>。图 6(C)所示为分别在 DPP (C<sub>1</sub>)、p-DPP (C<sub>2</sub>)、DMP1 (C<sub>3</sub>) 和

p-DMP1(C<sub>4</sub>)作用下矿化胶原的 TEM 图像,可以看出在 p-DPP 和 p-DMP1 的作用下形成了纤维内矿化。因此,Nudelman 等<sup>[15]</sup>提出 p-DPP 的作用机制是抑制溶液中磷酸钙的沉淀,从而使矿物质能够渗透到 Col 中,进而形成纤维内矿化。磷酸化的作用被认为是增加了 NCP 的电荷密度,从而增强对磷酸钙沉淀的抑制作用。此外,通过基因敲除的方法研究非胶原蛋白对生物体内矿化影响的方法也十分普遍。Prajapati 等<sup>[46]</sup>对比野生型和 MMP-20 敲除小鼠体内分离出的牙釉质晶体,实验结果显示,与野生型相比,MMP-20 敲除小鼠的牙釉质晶体更短更宽,分布更加不均匀,且厚度更低。野生型小鼠和 MMP-20 敲除小鼠提取的牙釉质 TEM、扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 图像以及宽度和厚度统计分布如图 6(D) 所示。

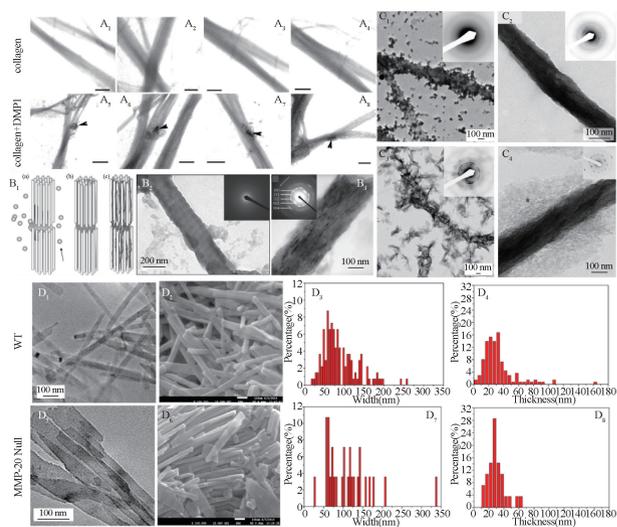


图 6 NCP 对 Col 仿生矿化的影响<sup>[15-16,45-46]</sup>

Fig. 6 Effects of NCP on biomimetic mineralization of Col<sup>[15-16,45-46]</sup>

### 3 FSS 对 Col 矿化的影响

在外载荷产生的复杂应力中,FSS 被认为是生理条件和微观水平下对骨细胞和骨基质的主要刺激<sup>[19]</sup>。因此,在体外仿生矿化的研究中,FSS 对 Col 矿化过程的影响不容忽视。本节将分别讨论恒定 FSS 和周期性 FSS 两种加载方式对 Col 矿化的作用。

#### 3.1 恒定 FSS

在骨组织的复杂受力环境中,FSS 被认为是骨组织受到的最主要力学刺激方式<sup>[47-48]</sup>。外部力学刺激被普遍认为在骨形成中起主导作用。Col 是骨组织的重要有机组成部分,同时也是骨基质形成复杂多级结构的基础。Angelique 等<sup>[49]</sup>研究 FSS 对 Col 微观结构的影响,结果发现,Col 属于力敏感蛋白,在较高水平的 FSS 条件下,Col 纤维的直径分布较均衡,纤维密度较低,而在低水平 FSS 作用下,纤维尺寸分布范围较为宽泛。FSS 对 Col 纤维的自组装<sup>[20]</sup>和定向排列<sup>[50]</sup>都具有显著影响。Ma 等<sup>[21]</sup>对定向 Col 纤维的制备方法进行总结[见图 7(A)],利用 FSS 促进 Col 纤维取向的主要方法是微流体<sup>[51]</sup>、反向双螺旋挤压<sup>[52]</sup>[见图 7(B)]、锥板黏度计<sup>[11]</sup>和旋涂<sup>[53]</sup>。这些方法的原理是驱动 Col 蛋白溶液通过特定的装置,以形成不同形式的 FSS。这种方法提供的 FSS 往往存在分层现象,即溶液靠近容器壁的部分受到的 FSS 较大,使 Col 纤维的定向程度更高,而远离容器壁的部分受切应力影响较小,导致 Col 纤维的定向性较差。此外,Meng 等<sup>[54]</sup>诱导制备不同定向水平的 Col 纤维,实验结果表明,FSS 能够诱导 Col 的取向,同时发现 Col 纤维的取向程度对其力学性能具有显著影响。Lanfer 等<sup>[50]</sup>提出一项利用微流控系统制备覆盖范围大且排列整齐的胶原纤维的新技术。通过微流控系统将胶原溶液沉积在基底上,以形成定向胶原纤维。该实验结果表明,随着溶液流速的增加,胶原纤维的取向度增加,而随着胶原溶液的浓度升高胶原纤维的密度增加[见图 7(C)]。此外,随着溶液浓度和反应时间的增加,胶原纤维的长度逐渐增加。但对于 Col 纤维的定向性而言,FSS 的作用时间并不是越久越好。Nima 等<sup>[55]</sup>研究 FSS 对 I 型 Col 自组装的影响时发现,Col 纤维在剪切速率最低时的轴向生长速率最大,并随着剪切速率升高,纤维的生长速率逐渐变慢。该实验结果表明,Col 纤维的定向排列需要合适的剪切速率,在 20~80 s<sup>-1</sup>时最佳。为探讨恒定 FSS 对 ACP 转化的影响,Niu 等<sup>[56]</sup>使用锥板黏度计提供 FSS,利用 TEM 观察了不同剪切速率下 ACP 转化产物的结构。该实验结果表明,FSS 能够显著影响 ACP 前驱体的转化以及由 ACP 前驱体转化而成的缺钙羟基磷灰石 (cadmium-calcium

hydroxyapatite, CDHA) 的晶体结构 [见图 7(D)]。较低水平 FSS ( $\leq 1.0$  Pa) 对 ACP 的结晶有积极的影响,能够加速 ACP 的转化,且形成的 CDHA 结构组织良好。然而高水平 FSS ( $> 1.0$  Pa) 对这一转化过程有负面影响,其特征是 CDHA 晶体形态较差,结构被破坏。在 FSS 环境下,ACP 结晶为 CDHA 的假设机制示意图如图 7(E) 所示,中等程度的外部 FSS 可以加速钙和正磷酸盐离子在 ACP 体系中的局部扩散和重排,使形成的 CDHA 晶体具有良好的结构和一定取向的细长形态。此外,FSS 也可以控制 ACP 的大小,使其能够分散在 Col 原纤维内形成纤维内矿化。FSS 能够通过控制 ACP 的转化和 Col 自组装而影响 Col 蛋白的矿化。为此,Niu 等<sup>[20,56]</sup> 研究 FSS 对 Col 组装和矿化的影响。该实验结果显示,一定范围内的剪切力能够增加 ACP 转化为 HA 的程度 [见图 7(F)]。DSC 结果显示,一定范围内 FSS 对矿化 Col 的自组装有促进作用 [见图 7(G)]。图 7(H) 所示为暴露于无 FSS ( $H_1$  和  $H_2$ ) 和 1.5 Pa FSS ( $H_3$  和  $H_4$ ) 环境中 3 h 后未染色磷灰石/胶原复合材料的 TEM 图像。图 7( $H_1$ )、( $H_2$ ) 显示 ACP 在未矿化胶原原纤维表面聚集,图 7( $H_3$ )、( $H_4$ ) 显示 ACP 纳米颗粒附着并渗透到胶原原纤维中。因此,FSS 加载有利于 ACP 向胶原原纤维内的渗透。一定范围内恒定 FSS 对 Col 矿化有积极的影响,其特征是 Col 自组装程度增强,ACP 向 HA 转变的速度加速,HA 结构和取向良好,能够促进 ACP 渗透到胶原原纤维内部形成纤维内矿化。

### 3.2 周期性 FSS

在人体活动的过程中,对骨的力学刺激不可能恒定不变。鉴于周期性 FSS 与自然状态下骨骼受力情况更加相近,故有必要研究周期性 FSS 条件下 Col 矿化的情况<sup>[57-58]</sup>。Du 等<sup>[11]</sup> 研究周期性 FSS 诱导的 Col 矿化作用,并与经典的 PAA 诱导的仿生矿化作用进行比较。该实验结果表明,与相同矿化时间 PAA 作用下矿化 Col 纤维相比,周期性 FSS 可促进 HA 晶体的转变,提高其结晶速率。图 8(A) 所示为随矿化时间增加 [4 h ( $A_1$ ), 8 h ( $A_2$ ) 和 12 h ( $A_3$ )], Col 的 FTIR 光谱以及钙磷比变化 ( $A_4$ ); 其中, a~c 分别是对照组、PAA 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、周期性 FSS 情况下 Col 的红外吸收曲线。图 8(B) 所示为 3 种不同条件(对照组、PAA 和 FSS) 下 Col 矿化过程的

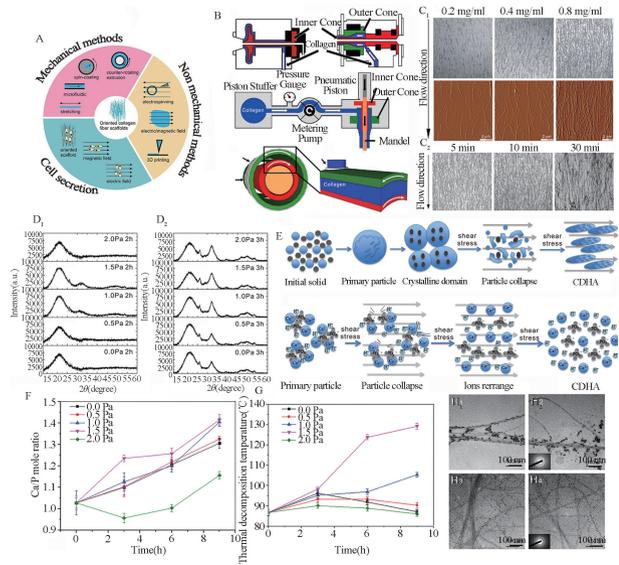


图 7 恒定 FSS 对 ACP 转化、胶原组装及矿化的影响 [20-21, 50, 52, 56]

Fig.7 Effects of constant FSS on ACP transformation, Col assembly and mineralization<sup>[20-21, 50, 52, 56]</sup>

TEM 图像。由图可见,大尺寸 ACP 附着在对照组的 Col 纤维表面上,并且在 PAA 和周期性 FSS 的作用下形成纳米尺寸的 ACP (三角形标识),随着矿化时间的增加,球形 ACP 逐渐变成针状 HA (箭头标识),并在周期性 FSS 的作用下很好地附着在 Col 纤维上。在没有 FSS 和 PAA 作用的情况下,大尺寸的 ACP 聚集成连续的无定形矿物相,并且在矿化的早期阶段附着在 Col 纤维表面上。随着矿化时间的增加,对照组中的 Col 形成了纤维外矿化。在 PAA 和周期性 FSS 的作用下,Col 纤维表面形成了均匀分布的纳米尺寸的 ACP。在周期性 FSS 的作用下,球形纳米 ACP 渗入 Col 纤维并逐渐转变为针状 HA 晶体,最终形成纤维内矿化。而 PAA 组中 Col 纤维上附着的纳米级 ACP 多于周期性 FSS 组。图 8(C) 所示为分别在 PAA 和周期性 FSS 条件下矿化 12 h 后 Col 的形态特征。在 PAA 作用下,磷酸化 Col 也能够形成 HIM。在周期性 FSS 的作用下,纳米级球形 ACP 形成并渗透到 Col 纤维中并逐渐转化为 HA 晶体,诱导形成 HIM 胶原,与 PAA 存在下的分层矿化结构一致。此外,在周期性 FSS 的作用下,SEAD 的环形图案和晶体的晶格条纹也比 PAA 组更清晰。该结果表明,在周期性 FSS 作用下,HIM 晶体转化

率更高。与 PAA 相比,周期性 FSS 的应用不仅有助于晶内矿化的形成,而且可以促进 ACP 向 HA 晶体的转变,诱导 Col 定向排列[见图 8(D)]。周期性 FSS 可以在促进高度定向的 HIM 胶原的形成方面发挥比阻滞类似物更好的作用。最重要的是使用周期性 FSS 不需要引入外源物质,这可以更好地保障材料的安全性。

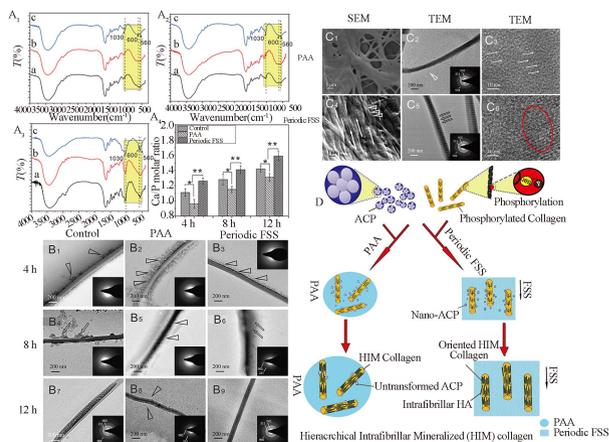


图 8 周期性 FSS 对胶原矿化的作用<sup>[11]</sup>

Fig.8 Effects of periodic FSS on Col mineralization<sup>[11]</sup>

环境对 Col 矿化的影响是一个复杂的过程,其中广泛存在多种影响因素共同作用的情况。对此, Du 等<sup>[11]</sup>研究了周期性 FSS 与 PAA 对 Col 矿化的共同作用。图 9(A) 所示为 FSS 和不同浓度 PAA 对 ACP 的共同作用效果。随着 PAA 浓度增加, ACP 尺寸减小,在周期性 FSS 和低浓度 PAA 作用下,这些 ACP 的高倍放大图像(A<sub>7</sub>~A<sub>12</sub>)出现了晶格线(箭头所示)。没有周期性 FSS 加载的情况下,随着 PAA 浓度增加, ACP 尺寸显著减小。同时,这些 ACP 的高倍放大图像显示在不同 PAA 浓度下均没有晶格线,表明 ACP 是无定形的,且 PAA 在控制 ACP 大小的同时限制了其向晶体转化。周期性 FSS 和 PAA 对于控制 ACP 大小具有相似的作用。然而,与 PAA 作用不同的是,周期性 FSS 加载能够促进 ACP 向晶体转化的作用。同时,晶格线的出现表明周期性 FSS 可以减轻 PAA 对 ACP 转化的抑制。当 PAA 浓度较高时,在周期性 FSS 作用下 ACP 尺寸没有显著差异,即当 ACP 尺寸足够小时,低强度的周期性 FSS 干扰将无法进一步降低其尺寸。周期性 FSS 和不同浓度 PAA 对 Col 矿化的共同作用

如图 9(B) 所示。在周期性 FSS 和 PAA 的共同作用下形成了纳米尺寸的 ACP,并渗透到 Col 纤维中形成纤维内矿化(三角形所示),插图所示单个矿化原纤维的选区电子衍射图像形成环形图案,随着 PAA 浓度的增加,环形图案变得模糊。随着 PAA 浓度的增加,晶格条纹变得模糊(细箭头),在周期性 FSS 的作用下,晶格条纹交织形成没有 PAA 的晶格网络(红色圆圈所示)。在相同的矿化时间内,Col 在无 FSS 和 PAA 的条件下形成了纤维外矿化。而在周期性 FSS 和 PAA 作用下,形成了纳米尺寸的 ACP,纳米尺寸的 ACP 渗透到 Col 纤维中以形成纤维内矿化。单个矿化原纤维的选区电子衍射图像显示,随着 PAA 浓度增加,环形图案从清晰到模糊;同时,晶格条纹也变得模糊。没有 PAA 存在时,在周期性 FSS 的作用下,晶格线交织形成晶格网络并且广泛分布。随着 PAA 浓度增加, ACP 向 HA 晶体矿物相的转化能力变差。相反,在周期性 FSS 作用下, ACP 向晶体的转变速度快于其他组的转变。因此,周期性 FSS 可以减轻 PAA 对 ACP 转化的抑制作用,更好促进 Col 的矿化过程。图 9(C) 显示了随着 PAA 浓度[0 μg/mL (C<sub>1</sub>)、30 μg/mL (C<sub>2</sub>) 和 60 μg/mL (C<sub>3</sub>)]增加,矿化 12 h 胶原的 FTIR 光谱(C<sub>1</sub>~C<sub>3</sub>)和钙磷摩尔比直方图(C<sub>4</sub>)。在矿化后,Col 酰胺 A、酰胺 B、酰胺 I、酰胺 II、酰胺 III 的主要酰胺吸收峰仍然没有显著变化。随着 PAA 浓度增加,1 030 cm<sup>-1</sup> 处磷

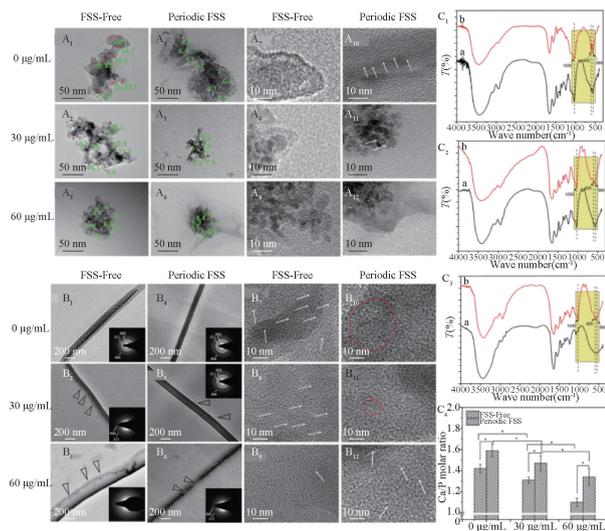


图 9 周期性 FSS 与 PAA 对 ACP 转化和胶原矿化的共同作用<sup>[11]</sup>

Fig.9 Combined effects of periodic FSS and PAA on ACP transformation and Col mineralization<sup>[11]</sup>

酸基团的吸收峰强度逐渐减弱,580  $\text{cm}^{-1}$ 处的单峰逐渐分裂成600  $\text{cm}^{-1}$ 和560  $\text{cm}^{-1}$ 处的两个吸收峰,且强度逐渐减弱。因此,PAA对ACP的稳定作用随着浓度的增加而增加。同时,与相同PAA浓度下Col纤维的矿化相比,周期性FSS仍可促进磷酸基团尖峰的形成,再次证明了周期性FSS可以缓解PAA对ACP转化的抑制。

#### 4 总结与展望

本文总结了Col的各项性质以及NCP和FSS等环境因素对Col矿化的影响。在Col的磷酸化过程中,磷酸基团与Col原纤维中的氨基反应形成新的磷酸铵基团。新生成的磷酸铵基团与羧基和羰基类似,可以作为生物矿化过程中 $\text{Ca}^{2+}$ 的成核位点。因此,Col磷酸化能够增加钙的螯合量,并形成HIM。较高的Col交联度可以为HA沉积提供更好的机械和结构条件,最终提高Col的矿化能力。Col溶液pH值的改变会导致Col纤维直径、渗透压和表面电荷发生改变,通过电荷平衡可以稳定ACP,通过渗透压可以诱导形成纤维内矿化。细胞外基质中的多种NCP对Col矿化具有显著影响,如DPP、DMP1和MMP20等。力学环境对矿化具有非常显著的影响,而在骨组织的复杂受力环境中,FSS被认为是骨组织在微观尺度受到的最主要力学刺激方式。一定范围内恒定FSS对Col矿化有积极的影响,其特征是Col自组装程度增强,ACP向HA的转变速度加速,由恒定FSS诱导形成的HA结构和取向良好,能够诱导纤维内矿化的形成。周期性FSS和PAA均具有控制ACP大小的作用,但周期性FSS可以促进ACP向HA转化,而PAA对该转化起到抑制作用。周期性FSS和PAA共同作用的实验证明,周期性FSS可以减轻PAA对ACP转化的抑制。

在未来的研究中需要面对如下的问题:

(1)研究表明,Col性质改变将会直接影响到矿化的发生和发展。因此,对体内Col的检测将有助于对疾病的预测。但要检测骨组织中的Col进行检测可能需要手术取样,对人体造成额外的损伤,是否可以通过其他无创检测方式反映人体内胶原性质的改变?

(2)NCP对于仿生矿化体系的调控作用受到多

种因素的影响。如前所述,非磷酸化DPP只能诱导Col纤维表面ACP的形成,被磷酸化后可以诱导产生纤维内矿化。因此,在研究NCP对仿生矿化体系的调控作用时,应着重关注NCP的状态及其与其他物质的相互作用。

(3)关于FSS对体外仿生矿化调控作用的研究已取得显著成果,但如何将体外仿生矿化的理论应用于骨缺损修复以及骨骼健康的日常维护仍需要进一步的研究。例如,是否可通过对骨组织工程支架的设计与康复训练相结合以加快骨骼缺损部位的修复?不同的运动形式会对人体骨骼产生怎样的力学载荷,在腔隙/小管系统内产生怎样的液体流动,进而对骨骼造成何种影响,长期从事某项职业或参加某种运动的人应注意哪些事项?这些问题还有待研究。

#### 参考文献:

- [1] AMINI Z, LARI R. A systematic review of decellularized allograft and xenograft-derived scaffolds in bone tissue regeneration [J]. *Tissue Cell*, 2021, 69(2): 101494.
- [2] BAPTISTA R, GUEDES M. Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement [J]. *Mater Sci Eng C*, 2021, 118: 111528.
- [3] SU X, WANG T, GUO S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field [J]. *Regen Ther*, 2021, 16: 63-72.
- [4] CUI B, LIANG LF, LU XY, *et al.* Fabricating hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite by bone bionics [J]. *Key Eng Mater*, 2007, 330-332(1): 345-348.
- [5] ZHANG W, LUO XJ, NIU LN, *et al.* Biomimetic intrafibrillar mineralization of type I collagen with intermediate precursors-loaded mesoporous carriers [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 1-11.
- [6] LI Z, DU T, RUAN C, *et al.* Bioinspired mineralized collagen scaffolds for bone tissue engineering [J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(5): 1491-1511.
- [7] WEINER S, WAGNER HD. The material bone: Structure-mechanical function relations [J]. *Ann Rev Mater Res*, 1998, 28(1): 271-298.
- [8] NIU LN, ZHANG W, PASHLEY DH, *et al.* Biomimetic remineralization of dentin [J]. *Dent Mater*, 2014, 30(1): 77-96.
- [9] NIU XF, CHEN SQ, TIAN F, *et al.* Hydrolytic conversion of amorphous calcium phosphate into apatite accompanied

- by sustained calcium and orthophosphate ions release [J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 70: 1120-1124.
- [10] NIU XF, FAN R, TIAN F, *et al.* Calcium concentration dependent collagen mineralization [J]. *Mater Sci Eng C*, 2017, 73: 137-143.
- [11] DU TM, NIU XF, HOU S, *et al.* Highly aligned hierarchical intrafibrillar mineralization of collagen induced by periodic fluid shear stress [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(13): 2562-2572.
- [12] DU TM, NIU XF, HOU S, *et al.* Apatite minerals derived from collagen phosphorylation modification induce the hierarchical intrafibrillar mineralization of collagen fibers [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2019, 107(11): 2403-2413.
- [13] DU TM, NIU XF, LI ZW, *et al.* Crosslinking induces high mineralization of apatite minerals on collagen fibers [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 450-457.
- [14] ORSINI G, RUGGERI A, MAZZONI A, *et al.* A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1: Proteoglycans and glycoproteins [J]. *Endodontic Topics*, 2012, 21(1): 1-18.
- [15] NUDELMAN F, LAUSCH AJ, SOMMERDIJK NAJM, *et al.* *In vitro* models of collagen biomineralization [J]. *J Struct Biol*, 2013, 183(2): 258-269.
- [16] HE G. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(12): 11649-11656.
- [17] 于露, 李昊, 高丽兰, 等. 骨组织的多层次生物力学特性及本构关系[J]. *医用生物力学*, 2019, 34(4): 434-439.
- YU L, LI H, GAO LL, *et al.* Hierarchical biomechanical properties and constitutive relationships of bone tissue [J]. *J Med Biomech*, 2019, 34(4): 434-439.
- [18] MEYERS MA, MCKITTRICK J, CHEN PY. Structural biological materials: Critical mechanics-materials connections [J]. *Science*, 2013, 339(6121): 773-779.
- [19] BURGER EH, KLEIN NJ. Mechanotransduction in bone: Role of the lacuno-canalicular network [J]. *Faseb J*, 1999, 13(suppl): S101-S112.
- [20] NIU XF, FAN R, GUO XL, *et al.* Shear-mediated orientational mineralization of bone apatite on collagen fibrils [J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(46): 9141-9147.
- [21] MA CY, WANG HT, CHI YJ, *et al.* Preparation of oriented collagen fiber scaffolds and its application in bone tissue engineering [J]. *Appl Mater Today*, 2021, 22: 100902.
- [22] FRITTON SP, WEINBAUM S. Fluid and solute transport in bone: Flow-induced mechanotransduction [J]. *Ann Rev Fluid Mech*, 2009, 41(1): 347-374.
- [23] FU L, PUJARI PM, HMAN MC, *et al.* Calcium phosphate cements: Structure-related properties [M]//*The Chemistry of Inorganic Biomaterials*. Washington DC: Royal Society of Chemistry, 2021.
- [24] PANWAR P, BUTLER GS, JAMROZ A, *et al.* Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases [J]. *Matrix Biol*, 2018, 65: 30-44.
- [25] WEINER S, TRAUB W, WAGNER HD. Lamellar bone: Structure-function relations [J]. *J Struct Biol*, 1999, 126(3): 241-255.
- [26] GAL A, WIRTH R, KOPKA J, *et al.* Macromolecular recognition directs calcium ions to coccolith mineralization sites [J]. *Science*, 2016, 353(6299): 590-593.
- [27] KIKUCHI M, ITOH S, ICHINOSE S, *et al.* Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized *in vitro* and its biological reaction *in vivo* [J]. *Biomaterials*, 2001, 22(13): 1705-1711.
- [28] DU TM, YANG HS, NIU XF. Phosphorus-containing compounds regulate mineralization [J]. *Mater Today Chem*, 2021, 22: 100579.
- [29] 杜田明. 胶原/羟基磷灰石仿生矿化体系的构建及流体剪切力对该多级结构的影响[D]. 北京: 北京航空航天大学, 2020.
- [30] TAMILMOZHI S, VEERURAJ A, ARUMUGAM M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*istiophorus platypterus*) [J]. *Food Res Inter*, 2013, 54(2): 1499-1505.
- [31] 杜田明. 鱼鳞胶原基质的复合改性及其在创面中的初步应用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [32] ZHANG Z, LI G, SHI BI. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes [J]. *J Soc Leath Technol Chem*, 2006, 90(1): 23-28.
- [33] NIU LN, JEE SE, JIAO K, *et al.* Collagen intrafibrillar mineralization as a result of the balance between osmotic equilibrium and electroneutrality [J]. *Nature Mater*, 2017, 16(3): 370-378.
- [34] LI Y, ASADI A, MONROE MR, *et al.* pH effects on collagen fibrillogenesis *in vitro*: Electrostatic interactions and phosphate binding [J]. *Mater Sci Eng C*, 2009, 29(5): 1643-1649.
- [35] LIU Y, LIU S, LUO D, *et al.* Hierarchically staggered nanostructure of mineralized collagen as a bone-grafting scaffold [J]. *Adv Mater*, 2016, 28(39): 8740-8748.
- [36] LIU H, LIN H, LIU X, *et al.* Doping bioactive elements into a collagen scaffold based on synchronous self-assembly/mineralization for bone tissue engineering [J]. *Bioact Mater*, 2020, 5(4): 844-858.
- [37] DU TM, LI ZW, LI XM, *et al.* Charge balancing stabilized apatite enter into collagen fibers by osmotic pressure to

- induce the formation of intrafibrillar mineralization [J]. Mater Today Commun, 2022, 30: 103064.
- [38] GEORGE A, VEIS A. Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition [J]. Chem Rev, 2008, 108(11): 4670-4693.
- [39] SILVENT J, NASSIF N, AZAÏS T, *et al.* Collagen osteoid-like model allows kinetic gene expression studies of non-collagenous proteins in relation with mineral development to understand bone biomineralization [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57344.
- [40] ROSE MM, SMILEY S, HINCKE MT. Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization [J]. J Proteomics, 2015, 116: 81-96.
- [41] DIMUZIO MT, VEIS AA. Phosphophoryns—Major noncollagenous proteins of rat incisor dentin [J]. Calcif Tissue Res, 1978, 25(2): 169-178.
- [42] STETLER SWG, VEIS A. Bovine dentin phosphophoryn: Composition and molecular weight [J]. Biochemistry, 1983, 22(18): 4326.
- [43] TRAUB W, ARAD T, WEINER S. Origin of mineral crystal growth in collagen fibrils [J]. Matrix, 1992, 12(4): 251-255.
- [44] DESHPANDE AS, FANG PA, ZHANG X, *et al.* Primary Structure and phosphorylation of dentin matrix protein 1 (DMP1) and dentin phosphophoryn (DPP) uniquely determine their role in biomineralization [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(8): 2933-2945.
- [45] GAJJERAMAN S, NARAYANAN K, HAO J, *et al.* Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite [J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 1193-1204.
- [46] PRAJAPATI S, TAO JH, RUAN QC, *et al.* Matrix metalloproteinase-0 mediates dental enamel biomineralization by preventing protein occlusion inside apatite crystals [J]. Biomaterials, 2016, 75: 260-270.
- [47] 张春秋, 孙明林, 李江, 等. 关节软骨体外构建力学环境的研究进展 [J]. 医用生物力学, 2009, 24(6): 462-467.  
ZHANG CQ, SUN ML, LI J, *et al.* Advances of mechanical conditions in engineering cartilage tissue [J]. J Med Biomech, 2009, 24(6): 462-467.
- [48] 杨屹羚, 张鹏, 江凌勇, 等. 流体剪应力在骨髓基质干细胞成骨向分化中作用机制的研究进展 [J]. 医用生物力学, 2018, 33(4): 378-382.
- YANG YL, ZHANG P, JIANG LY, *et al.* Research progress on mechanism of fluid shear stress in osteogenesis of bone mesenchymal stem cells [J]. J Med Biomech, 2018, 33(4): 378-382.
- [49] BALGUID A, DRIESSEN N, MOL A, *et al.* Stress-related collagen ultrastructure in human aortic valves: Implications for tissue engineering [J]. J Biomech, 2008, 41(12): 2612-2617.
- [50] LANFER B, FREUDENBERG U, ZIMMERMANN R, *et al.* Aligned fibrillar collagen matrices obtained by shear flow deposition [J]. Biomaterials, 2008, 29(28): 3888-3895.
- [51] LEE P, LIN R, MOON J, *et al.* Microfluidic alignment of collagen fibers for *in vitro* cell culture [J]. Biomed Microdevices, 2006, 8(1): 35-41.
- [52] HOOGENKAMP HR, BAKKER GJ, WOLF L, *et al.* Directing collagen fibers using counter-rotating cone extrusion [J]. Acta Biomater, 2015, 12: 113-121.
- [53] SAEIDI N, SANDER EA, ZAREIAN R, *et al.* Production of highly aligned collagen lamellae by combining shear force and thin film confinement [J]. Acta Biomater, 2011, 7(6): 2437-2447.
- [54] MENG Q, AN S, DAMION RA, *et al.* The effect of collagen fibril orientation on the biphasic mechanics of articular cartilage [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2017, 65: 439-453.
- [55] SAEIDI N, SANDER EA, RUBERTI JW. Dynamic shear-influenced collagen self-assembly [J]. Biomaterials, 2009, 30(34): 6581-6592.
- [56] NIU XF, WANG LY, TIAN F, *et al.* Shear-mediated crystallization from amorphous calcium phosphate to bone apatite [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2016, 54: 131-140.
- [57] YANG S, SHI X, LI X, *et al.* Oriented collagen fiber membranes formed through counter-rotating extrusion and their application in tendon regeneration [J]. Biomaterials, 2019, 207: 61-75.
- [58] GREEN AC, LATH D, HUDSON K, *et al.* TGF $\beta$  inhibition stimulates collagen maturation to enhance bone repair and fracture resistance in a murine myeloma model [J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(12): 2311-2326.