

文章编号: 1000-324X(2002)03-0552-07

致密磷酸钙陶瓷在动态 SBF 中类骨磷灰石层形成研究

段友容, 王朝元, 陈继镛, 张兴栋

(四川大学生物材料工程研究中心, 成都 610064)

摘 要: 磷酸钙陶瓷植入体内后其表面类骨磷灰石层的形成是诱导成骨的先决条件. 本实验在模拟体液 (simulated body fluid, SBF) 以人体骨骼肌组织内体液的正常生理流率 (2mL/100mL·min) 和偏离正常生理流率流动的动态条件下, 研究在动态 SBF 中影响致密磷酸钙陶瓷表面类骨磷灰石层形成的因素. 结果表明: 在生理流率条件下, 材料的粗糙表面有利于类骨磷灰石的形成, 加大 SBF 中 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 离子浓度, 类骨磷灰石层的形成速度加快. 比起通常使用的静态浸泡试验, SBF 以生理流率流动的动态试验能够更好地模拟类骨磷灰石生长的体内环境. 动态 SBF 对了解类骨磷灰石形成, 进而了解磷酸钙陶瓷在体内诱导成骨机理是十分有用的.

关 键 词: 致密磷酸钙陶瓷; 动态 SBF; 类骨磷灰石

中图分类号: R318 **文献标识码:** A

1 引言

磷酸钙陶瓷具有优良的生物相容性, 它们的生物活性和骨传导性已得到公认, 是目前临床应用和研究最为广泛的生物陶瓷材料之一. 1991 年, 张兴栋等报道了多孔磷酸钙陶瓷在肌内和皮下的异位成骨现象^[1], 也就是说, 在一定条件下, 磷酸钙陶瓷还具有骨诱导性. 研究还发现, 骨诱导性与孔隙结构有关: 在多孔材料的内部, 其孔壁上有微孔结构的材料, 在动物体内可诱导成骨, 而在光滑的孔壁表面未见有骨特征的结构出现^[2]. 根据文献报道^[3], 磷酸钙陶瓷植入体内后其表面首先形成类骨磷灰石层, 它对骨的形成起了非常重要的作用. de Bruijn^[4] 等认为, 生物材料上类骨磷灰石层的形成是它具有骨诱导性的先决条件. 因此, 研究影响材料表面类骨磷灰石形成的因素, 对了解骨诱导的机理具有十分重要的意义. 过去常用的方法是将植入材料放于盛模拟体液的封闭容器内进行体外试验, 但机体体液在机体内是处于动态循环状态, 而非静止状态^[5], 因而体外试验结果往往与体内试验结果不一致. 为了使体外试验条件更接近体内生物环境, 模拟体内动态环境的体外实验就显得十分重要. 本实验在模拟体液 (simulated body fluid, SBF) 以人体骨骼肌组织内体液的正常生理流率 (2mL/100g·min)^[6] 流动的动态条件下, 研究影响致密磷酸钙陶瓷表面类骨磷灰石形成的因素.

2 实验

2.1 试样制备

制作试样所用双相磷酸钙粉末为本实验室自制, 是采用湿法工艺通过控制钙磷比而直接得到的, 羟基磷灰石 / 磷酸三钙 (HA/TCP 比为 7/3). 将双相磷酸钙粉末装入专用模具

收稿日期: 2001-04-27, 收到修改稿日期: 2001-10-11

基金项目: 国家重大基础研究项目 (973G1999064760)

作者简介: 段友容 (1969-), 女, 博士研究生. 通讯联系人: 陈继镛.

内, 用单轴压机在 15MPa 下保持 3min, 制成 $\phi 30\text{mm}$ 的圆片, 然后在 1200°C 烧结而得到圆片状致密磷酸钙陶瓷试样. 制得的试样具有致密平整表面, 其中一部分用喷砂处理使表面成为表面粗糙度为 $3.5\sim 4.0\mu\text{m}$ 的粗糙表面, 以比较平整和粗糙表面对类骨磷灰石生长的影响.

2.2 实验方法

试验装置示意图如图 1 所示, 试样放于样品室内, 样品室两端分别为模拟体液的进出口, 蠕动泵将 SBF 储存罐内的模拟体液从样品室一端泵入, 样品室内陈液从另一端流出回到储存罐. 由于储存罐内 SBF 液体量远多于样品室内可容量, 所以在试验过程中尽管试样溶解释放出离子到溶液中, 或表面磷灰石层形成消耗溶液中离子, 整个 SBF 溶液的离子浓度仍能基本保持不变, 与体内生物环境自动保持体液离子浓度恒定的状况吻合. 调节蠕动泵的泵速可改变样品室内溶液的更新速率, SBF 流率是以样品室中模拟体液每分钟因流动而更新的速率来表示, $2\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$ 表示样品室中的每 100mL 模拟体液每分钟流出 2mL, 同时从 SBF 贮液罐流进 2mL 新鲜模拟体液. $2\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$ 的更新速率大致相当于骨骼肌内体液流动更新速率^[6]. 静止和 $10\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$ 两组对照设置来研究流率对类骨磷灰石形成的影响, 而 1.5SBF 溶液则用来研究溶液中钙磷离子浓度的影响.

模拟体液 (SBF) 配制: 模拟体液其主要成分与人体血浆的无机成分基本相同^[7](表 1), 用三羟甲基氨基甲烷和 1:4 的盐酸溶液调其 pH 为 7.4.

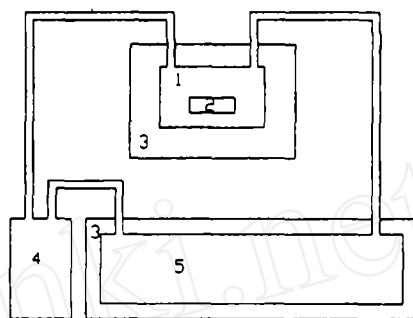


图 1 动态循环装置方框图

Fig. 1 Schematic diagram of the flow chamber system

1. Sample chamber; 2. Sample; 3. Water bath; 4. Pump; 5. SBF storage tank

表 1 模拟体液的主要成分和离子浓度

Table 1 Composition and ion concentration (mmol/L) of SBF solutions

	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	HCO_3^-	Cl^-	HPO_4^{2-}	SO_4^{2-}
Blood plasma	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	2.5	1.5	4.2	147.8	1.0	0.5

表 2 浸泡方式

Table 2 Methods of immersion (36.5°C)

Rate of SBF	$0\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$	$2\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$	$10\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$
SBF	14days	14days	14days
1.5SBF	7days	7days	7days

*1.5SBF 为 SBF 的浓度增加到 150%

材料的浸泡: 将表面喷砂处理和未处理的材料在模拟体液中按图 1 的循环装置和表 2 的方法浸泡. 循环液每隔一天更换一次, 流率选择为 $2\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$, 同时以小于生理流率 $0\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$ 和大于生理流率 $10\text{mL}/100\text{mL}\cdot\text{min}$ 作对照.

材料表面表征: 浸泡前后的样品表面形貌由扫描电子显微镜 (SEM) 观察. 浸泡后表面形成物的化学组成由 X 光电子能谱 (XPS) 和红外光谱 (IR) 测定而得. 浸泡后表面形成物的相组成由 X 射线衍射仪 (XRD) 测定.

3 结果和讨论

3.1 浸泡后材料表面的形貌

材料在动态循环 SBF 中浸泡 14 天后, 表面未见明显的改变. 在静态条件下, 粗糙表面

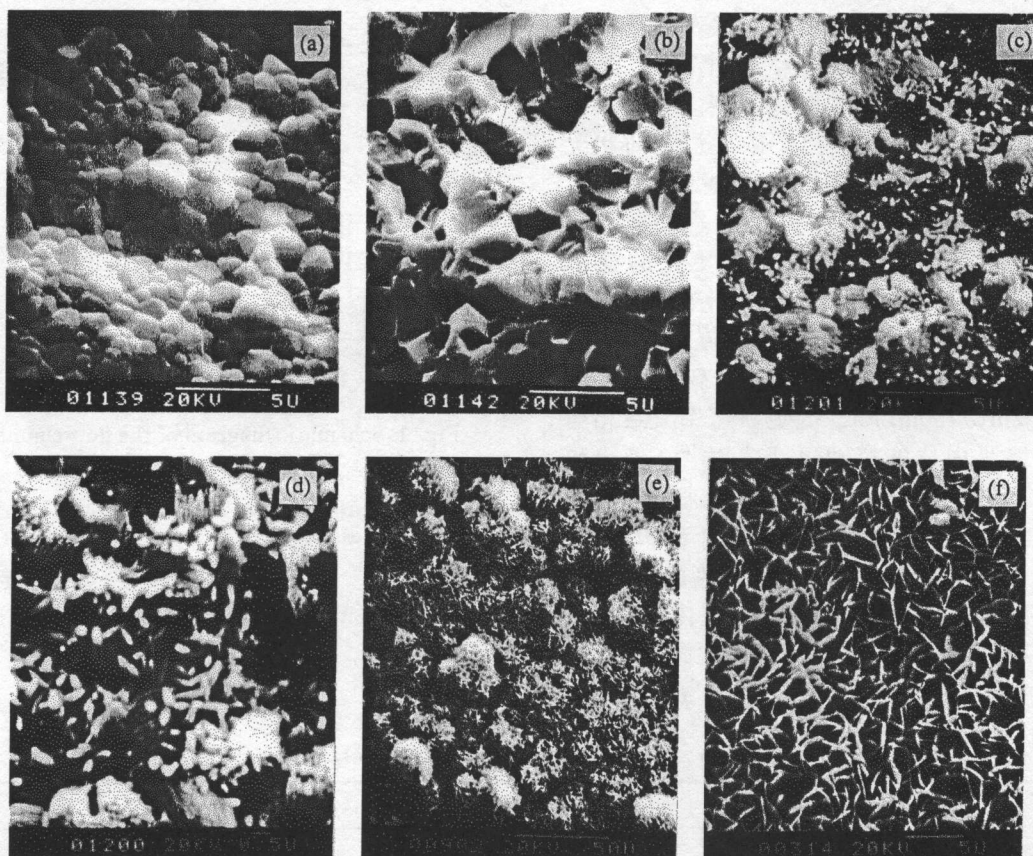


图 2 HA/TCP 浸泡在 SBF 和 1.5SBF 前后的 SEM 照片

Fig. 2 SEM pictures of the HA/TCP before and after immersion in SBF and 1.5SBF

(a) Untreated surface before immersion; (b) Sandblasted surface before immersion; (c) Sandblasted surface after immersion in SBF for 14days; (d) Sandblasted surface after immersion in SBF for 14days; (e) Untreated surface after immersion in 1.5SBF (2mL/100mL·min) for 7days; (f) Sandblasted surface after immersion in 1.5SBF (2mL/100mL·min) for 7days

有生成物, 而未处理光滑表面无变化. 在 1.5SBF 溶液中浸泡 7 天后发现表面有一层新生成的物质所覆盖, 从高倍 SEM 照片中, 可以观察到层状物的晶体结构. 表面未经喷砂处理的致密材料, 层状物晶体的形成速度比喷砂后的材料慢. 致密磷酸钙陶瓷在模拟体液中浸泡后表面形貌的改变列于表 3 中.

3.3 表面形成物的化学组成

3.3.1 XPS 分析

HA/TCP 陶瓷材料在浸泡前没有 C 元素存在, 浸泡后表面沉积物含有 Ca、P、C 和 O 四种元素. C1s 包络峰可分解成三个峰: 分别与 C-C、C-O、O-C-O 键相对应(图 3). 这一结果表明, 材料浸泡后表面的化学成分发生了改变, 从 C1s 包络峰可以推论, 其表面可能增加了 CO_3^{2-} 离子.

表 3 致密陶瓷在 SBF 和 1.5SBF 中浸泡后的形貌

Table 3 Morphology of the dense ceramics after immersion in SBF and 1.5SBF

Flow rate of SBF	0mL/100mL·min	2mL/100mL·min	10mL/100mL·min
SBF(14days)	Untreated: no change	Untreated: no change	Untreated: no change
	Treated: needle(c, d)	Treated: no change	Treated: no change
1.5SBF(7days)	Untreated: plate-like	Untreated: plate-like(e)	Untreated: no change
	Treated: plate-like	Treated: plate-like(f)	Treated: no change

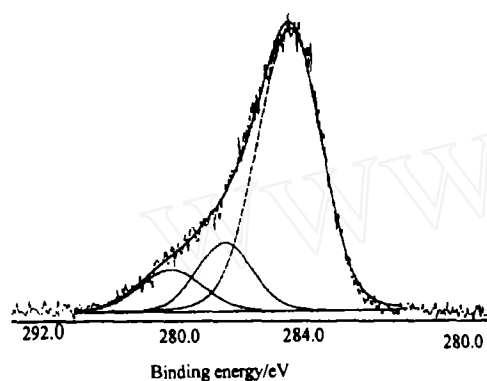


图 3 HA/TCP 在 1.5SBF(2mL/100mL·min) 中浸泡 7 天后表面形成物的 XPS C1s 谱图

Fig. 3 XPS C1s spectrum for HA/TCP after 7-day immersion in 1.5SBF (2mL/100mL·min)

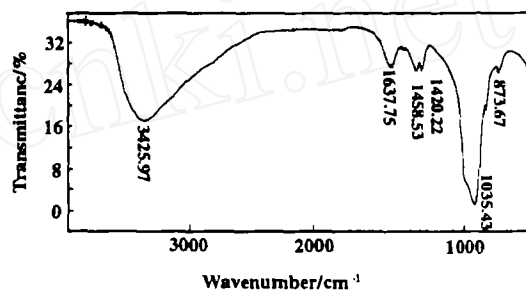


图 4 材料在 2mL/100mL·min 的 1.5SBF 中浸泡 7 天后的红外光谱图

Fig. 4 IR spectra for the HA/TCP after immersion in 1.5SBF(2mL/100mL·min)

3.3.2 红外光谱分析

从 SEM 确认材料浸泡后表面形貌发生了显著变化的样品, 对表面形成的层状物进行红外光谱分析, 结果在 1458.53、1420.22 和 873.67 cm^{-1} 出现了碳酸根的特征峰(图 4).

3.3.3 表面物相分析

X 射线衍射仪(XRD)测定结果显示, 浸泡后峰变宽, 谱线下方出现具有无定形相特征的宽包络线形, 表明晶粒平均尺寸变小, 结晶度变低, 这是由于浸泡过程中新形成的相的晶粒尺寸非常小, 接近于无定形相的特征, 与自然骨中无机相的结构成份相似(图 5).

TCP 陶瓷材料表面沉积物的 XPS、IR 和 XRD 结果表明, 磷酸钙陶瓷材料表面生成物不是单纯的羟基磷灰石, 而是含有一定 B 型碳酸磷灰石. 因其成分与骨的无机成分相似, 故称类骨磷灰石.

4 讨论

4.1 类骨磷灰石形成过程

磷酸钙陶瓷表面类骨磷灰石的形成过程实际上就是一个新相形成并长大的过程^[8]. 此

过程可以用两个阶段来概括. 第一阶段形成晶核, 第二阶段新相长大^[9].

4.1.1 晶核的形成

当磷酸钙陶瓷材料与 SBF 接触后表面首先溶解, 溶解的 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 进入 SBF 溶液, 从而提高了材料表面附近模拟体液的 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 的浓度, 随后通过静电吸引 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 与固体表面直接作用而被吸附在表面, 沉积成 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 它们再与 SBF 溶液中的 HPO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 相互作用, 在表面形成新相核心^[10].

4.1.1.1 影响晶核形成的因素

表面局域的钙磷浓度: 粗糙表面, 与未喷砂处理的表面比较, 其表面积增大, 所以表面的溶解性也就增加, 由于溶解性增加, 材料表面局域浓度相对光滑表面的浓度就高, 因此, 在同样的条件下, 粗糙表面的 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 浓度就比较容易达到成核阈值.

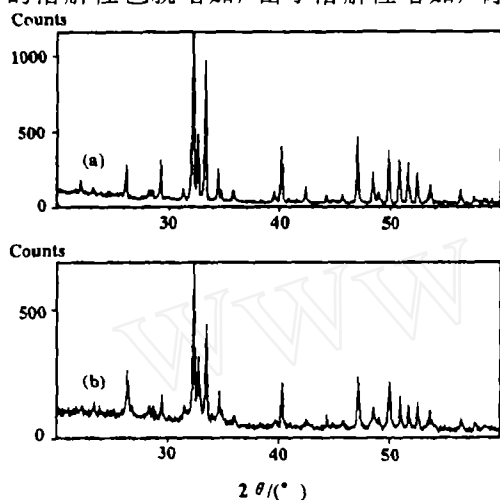


图 5 HA/TCP 材料 (a) 浸泡前 (b) 在 1.5SBF 中浸泡 7 天后的 X 射线衍射图

Fig. 5 X-ray diffraction spectra of the dense HA/TCP (a) before immersion (b) after immersed in 1.5SBF

将磷酸钙陶瓷浸泡在模拟体液中, 模拟体液未循环时, 材料表面溶解的离子不易扩散, 特别是粗糙表面溶出的离子更多, 使材料表面的局域浓度超过成核阈值, 在样品表面结晶出新相. 而平滑表面溶出离子较少, 达不到成核阈值, 故无新相形成. 但是, 模拟体液在循环的情况下, 表面的离子容易扩散, 特别是 SBF 流速高于生理流速时 (10mL/100mL·min), 材料表面的离子浓度很难达到成核阈值, 所以在光滑和粗糙的材料表面都未形成晶核. 如果加大 SBF 的 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 浓度到 1.5SBF, 在静态和正常生理流率条件下, 光滑和粗糙的材料表面都能形成晶核. 这一实验结果表明, 材料表面的局域浓度对晶核的形成起着十分关键的作用.

材料表面的界面能: 磷灰石晶体在材料表面形成并直接生长, 可以认为是通过增加饱和溶液中离子的浓度而形成低界面能的表面. 根据 Ostwald's 成核理论, 成核自由能取决于溶液的过饱和度 (S), 成核的净界面能 (σ), 温度 (T) 和颗粒的表面积 (A):

$$\Delta G = -T \ln S + \sigma A$$

这个成核理论表明: 溶液的过饱和度 S 增加, 净界面能减少将有利于诱导异相成核. 在我们的研究中, S 增加, 将使成核自由能 ΔG 减少. 只要 S 足够高, 即使是低表面能的表面未经任何处理以便降低净界面能 σ , 也能诱导异相成核. 因为溶液离子浓度高, 足以克服材料表面成核的位垒, 而在表面成核^[11].

材料表面的几何形貌: 研究表明, 晶核首先发生在表面凹陷和有裂纹的地方, 因为这些区域阻碍体液的流动和离子的扩散, 能保持较高的局域浓度, 所以能够较快地达到成核阈值^[12]. 同时这些部位提供了成核位点. 所以喷砂处理后的材料表面成核要容易些. 实验结果已证明了这一推论 (见表 3). 也进一步验证了在动物试验中, 类骨磷灰石生成和骨诱导生长都仅发生在具有微孔的粗糙孔壁.

4.1.2 晶核的长大

磷酸钙陶瓷表面类骨磷灰石的形成过程中晶核的形成系非均匀形核, 也即是在一定的基底上成核. 通过形核过程, 晶体结构和成分的改变同时完成. 晶界形核主要作用是减少晶界面积、减低形核时的界面能, 从而降低所需的形核功, 界面能的降低驱动晶体长大^[8]. 材料表面一旦形成了晶核, 它将自然长大.

4.1.2.1 影响晶核长大的因素

材料表面的局域浓度: 有研究表明^[8]: 在低的过饱和度下, 针状新相较片状有利长大. 在静态 SBF 中, 经粗糙处理的材料表面能形成晶核, 其周围环境的离子浓度较低, 但这个浓度足以维持晶核的生长, 从扫描电子显微镜观察的形貌来看, 类骨磷灰石的晶体都是垂直于表面生长的, 这是因为低过饱和度表面上晶核形成较少, 当晶核长大的过程中, 它们都从自己的周围环境中吸附离子而生长, 在材料表面存在竞争吸附, 因而每一个晶体向远离表面区域能获得更充足的离子, 从而向离开表面方向生长, 所以从扫描电子显微镜上观察到材料表面有针状或棒状晶体生成. 当加大 SBF 的浓度, 在材料表面能保持较高的局域离子浓度, 晶体周围有足够离子使其生长, 所以表面形成片状的晶体. 实验结果表明: 材料的局域浓度是影响类骨磷灰石晶体形貌的关键因素之一.

离子交换的速率: 模拟体液在循环的情况下, 材料表面溶解的离子很容易扩散到溶液中, 材料表面的局域浓度不易保持, 所以模拟体液在动态情况下, 可能成核较慢. 当加大模拟体液中 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 浓度为原来的 150% 时, 这时在生理流速情况下, 材料表面的局域环境中 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 浓度能达到成核阈值, 因此能形成晶核, 晶核一旦形成, 由于循环状态更有利于离子的交换, 所以其晶核就象蜂窝一样长大, 并且生成的类骨磷灰石很均匀. 所以, 成核部位的局域离子浓度是成核的关键, 任何有利于成核部位离子浓度达到成核阈值的因素, 都有利于类骨磷灰石层的形成.

总之, 材料的表面性质对类骨磷灰石形成有很大影响. 即使是同一类材料, 当其比表面不同时, 类骨磷灰石形成能力也有很大的差异. 根据实验结果, 类骨磷灰石形成是一个溶解又沉积的过程. 致密磷酸钙陶瓷, 如果表面未做任何预处理, 在 SBF 中浸泡过程时, 表面的局域浓度可能达不到成核的阈值或需花很长的时间才能达到成核阈值, 所以在实验条件下, 静态的、动态的 SBF 浸泡后的材料表面都未见明显的改变. 将材料表面喷砂处理或加大模拟体液中 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 浓度, 类骨磷灰石的形成速度加快. 本研究中以生理流速进行的动态试验和已有的动物实验结果表明^[2]: 具有微小细孔结构的多孔磷酸钙陶瓷的孔壁在动物体内才有骨诱导现象, 如果多孔材料的孔壁光滑而无细微结构的陶瓷在动物体内就没有骨诱导现象发生. 骨诱导发生的部位 (具有微孔的孔壁) 正是本研究证实为有利于类骨磷灰石生成的部位: 孔隙不利于体液流动和离子扩散, 从而有利于局域离子浓度的积累增高; 带微孔的孔壁提供有利的成核位置, 能溶出更多离子提高体液过饱和度. 动物试验也证实了类骨磷灰石生成部位和诱导成骨部位是一致的 (另文即将发表), 所以本研究结果有助于了解骨诱导的机理.

5 结论

模拟体液未循环时类骨磷灰石的形成较循环时容易; 模拟体液的流速超过生理流速时不容易形成类骨磷灰石; 材料的微粗糙表面有利于类骨磷灰石的形成; 加大 SBF 中 Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 离子浓度, 能促进类骨磷灰石的形成. 对于类骨磷灰石的生成, 成核部位的局域离子浓度是成核的关键, 任何有利于成核部位离子浓度达到成核阈值的因素, 都有利于类骨磷灰石层的形成.

参考文献

- [1] Zhang X, *et al.* *Trans. of 19th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*, Birmingham, AL, USA, 1993, 299.
- [2] Chen Weiqun, Zhang Xingdong, Weng Jie, *et al.* *The 1st Far-Eastern Symposium on Biomedical Materials*. Beijing. 1993, 157-158.
- [3] Germine M, Parson J R. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1988, **22(A1)**: 55.
- [4] de Bruijn JD, Yuan H, Dekker R, *et al.* in *Bone Engineering*, Ed. By J.E.Davies, em squared incorporated, Toronto, Canada, 2000, 421-431.
- [5] 陶祖莱. 生物流体力学, 第一版. 北京: 科学出版社, 1984. 1.
- [6] 武星户. 人体正常生理数据, 第一版. 北京: 科学普及出版社, 1987. 68.
- [7] Kokubo T, Ito S, Yamamuro T, *et al.* Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass- ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990; **24**: 331-343.
- [8] 徐祖耀. 相变原理, 第一版. 北京: 科学出版社, 1988.
- [9] Chen J, Weng J, Zhang Q, *et al.* *MRS Symposium Proceedings, Mineralization in natural and synthetic biomaterials*, Ed. By P Li, P Calvert, T KoKubo, R Levy, C Scheid, MRS, Wrendale, PA, 2000, **599**: 55-60.
- [10] Ducheyne P, Kokubo T, *et al.* *Bone-bonding biomaterials*, 1992, 201.
- [11] Kim Hyun-Man, Kim Yoonji, Jea Seung Ko. *Biomaterials*, 2000, **21**: 1129-1134.
- [12] Weng Jie, Zhang Xingdong, de Groot K. *Biomaterials*, 1997, **18**: 1027-1035.

Bone-like Apatite Formation on Calcium Phosphate Dense Ceramics in Dynamic SBF

DUAN You-Rong, WANG Chao-Yuan, CHEN Ji-Yong, ZHANG Xing-Dong
(Engineering Research Center in Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: Bone-like apatite formation on the surface of calcium phosphate ceramics has been believed to be the necessary step that new bone grows on the ceramics and to be relative to the osteoinductivity of the material. The research of the factors effecting bone-like apatite formation is a great help to understanding the mechanism of osteoinduction. This study was a comparative study of in vitro formation of bone-like apatite on the surface of dense calcium phosphate ceramics with SBF flowing at different speeds. The results showed that the rough surface was beneficial to the formation of bone-like apatite and the apatite formed faster in 1.5 SBF than in SBF. Rough surface, namely, larger surface area, increased the dissolution of Ca^{2+} , HPO_4^{2-} and higher concentration of Ca^{2+} and HPO_4^{2-} ions of SBF was advantageous to the accumulation of Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} near the ceramic surface. Local supersaturating concentration of Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} near sample surface was critical for nucleation of apatite on the surface of sample.

Key words dense calcium phosphate ceramics; dynamic SBF; bone-like apatite