

## 烧结方式对羟基磷灰石陶瓷颗粒性能和蛋白吸附的影响

张慧杰<sup>1</sup>, 朱向东<sup>1</sup>, 王辛龙<sup>2</sup>, 范红松<sup>1</sup>, 张兴栋<sup>1</sup>

(四川大学 1. 国家生物医学材料工程技术研究中心; 2. 化学工程学院, 成都 610064)

**摘 要:** 以常规马弗炉和微波烧结两种方式分别制备羟基磷灰石陶瓷颗粒, 对其相组成、微观形貌、表面 zeta 电位以及蛋白吸附行为进行分析对比. 结果显示, 尽管两种烧结方式制备的羟基磷灰石陶瓷颗粒具有相同的相组成, 但是它们的微观结构、表面 zeta 电位和蛋白吸附行为存在明显差异. 相对于常规烧结, 微波烧结得到的颗粒具有丰富的微孔隙和接近于纳米尺度的晶粒尺寸, 其表面 zeta 电位值更小, 能够吸附更多的牛血清白蛋白和更少的溶菌酶. 微波烧结在制备高生物活性纳米羟基磷灰石陶瓷上可能是一种较为理想的方法.

**关 键 词:** 羟基磷灰石陶瓷; 常规和微波烧结; 表面特性; 蛋白吸附

中图分类号: R318

文献标识码: A

## Effect of Sintering Processes on Surface Properties and Protein Adsorption of Hydroxyapatite Ceramic Particles

ZHANG Hui-Jie<sup>1</sup>, ZHU Xiang-Dong<sup>1</sup>, WANG Xin-Long<sup>2</sup>, FAN Hong-Song<sup>1</sup>, ZHANG Xing-Dong<sup>1</sup>

(1. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. School of Chemical Engineering, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** Two types of hydroxyapatite (HA) ceramic particles were respectively fabricated by conventional and microwave sintering processes. The conventionally sintered HA was abbreviated as HACS, and the microwave sintered one was HAMS. The phase compositions, surface morphologies and zeta potentials of both particles were respectively analyzed with X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscope (SEM) and zetasizer. Bovine serum albumin (BSA) and lysozyme (LSZ) were selected as models to study their adsorption behaviors on HACS and HAMS. Results confirm that both HA particles crystallize completely, but HACS has larger crystal grain size than HAMS. Although both HACS and HAMS show negative surface zeta potentials in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), the former has higher absolute value than the latter. Besides, both HA particles exhibit different adsorption ability for BSA and LSZ, and HACS adsorbs fewer BSA but more LSZ than HAMS. The microwave sintering can be a good method to produce nano-HA ceramics with excellent bioactivity.

**Key words:** hydroxyapatite ceramics; conventional and microwave sintering; surface property; protein adsorption

因创伤及各种疾病导致的骨缺损替换修复在临床中占据相当大的比重. 羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)因具有与人体硬组织中相近的无机成分而在临床中得到了广泛的应用, 其良好的生物相容性和骨传导性亦被大量的实验所证实<sup>[1-4]</sup>. 近年来, 为进一步模拟天然骨组织的纳米磷灰石

结构, 纳米磷酸钙生物陶瓷的研究得到了长足的发展<sup>[5-6]</sup>. 与常规的马弗炉烧结方式相比, 微波烧结作为一种新的烧结方式能够显著降低陶瓷烧成温度和缩短烧结时间, 有利于细化晶粒尺寸. 本课题组前期已经通过微波烧结工艺的优化而制备出微纳米磷酸钙陶瓷<sup>[7-8]</sup>.

收稿日期: 2009-11-18, 收到修改稿日期: 2010-01-04

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(50802060); 973 计划项目(G2005cb623901)

作者简介: 张慧杰(1986-), 男, 硕士研究生. E-mail: zhanghuijie0502@yahoo.com.cn

通讯联系人: 朱向东, 助理研究员. E-mail: zxd7303@163.com

生物材料植入体内后很快发生来自血液及其它组织液中蛋白质在植入体表面的吸附聚集,这层吸附的蛋白质将直接影响接下来的细胞粘附、增殖和分化并最终决定植入体的成败<sup>[9-10]</sup>。同时,蛋白吸附层也会影响植入材料的表面性质和降解行为<sup>[10]</sup>。因此,考察生物材料的蛋白吸附行为已经成为评价其生物相容性和生物活性的一种重要方式<sup>[11]</sup>。

研究磷酸钙表面蛋白吸附行为有助于揭示其生物活性本质并可据此对其结构优化设计提供启示。本研究分别运用常规和微波两种烧结方式制备不同的 HA 陶瓷颗粒,对两种样品颗粒的显微结构、表面性质进行表征。白蛋白(albumin)作为血液中最丰富的蛋白质,是生物材料植入体内后最先接触的蛋白质之一。溶菌酶(lysozyme, LSZ)作为一种小分子蛋白,在生理环境下与白蛋白具有完全不同的电荷性质。这两种不同性质的蛋白质在生物材料蛋白吸附研究中通常作为模型蛋白来考察材料表面结构性质与蛋白吸附之间的相互关系。基于此,本实验选用牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)和 LSZ 作为模型蛋白,对比研究了两种 HA 陶瓷颗粒对不同性质蛋白质在吸附行为上的差异。

## 1 材料和实验方法

### 1.1 材料的合成与制备

采用液相共沉淀法制备 HA 浆料,合成的主要原料为分析纯级的硝酸钙、磷酸氢二铵、氨水和柠檬酸,均购自于成都市科龙化工试剂厂。反应物浓度为硝酸钙 0.5mol/L,磷酸氢二铵为 0.5mol/L,初始反应钙磷原子比为 1.6:1,反应温度为 25℃,反应 pH 值控制在 10.0 左右。合成时添加适量的柠檬酸以抑制晶粒生长和改善浆料的分散性。合成后的 HA 浆料静置陈化 24h 后进行离心洗涤(去离子水洗 3 次,无水乙醇洗 2 次)直至 pH 值为 7.0。再加入适量已溶解好的聚乙二醇和甲基纤维素,随后加入适量双氧水,高速搅拌器搅拌均匀后将浆料置入模具,在烘箱中 40℃发泡,然后在 80℃下保温烘干得到 HA 初坯体。

本实验采用常规马弗炉(LH 15/14, Nabertherm, Germany)和微波烧结(MKE0.8/2.45-0.6/5.8, Linn High Therm, Germany)两种方式对 HA 初坯体进行高温烧结,烧结温度均为 1100℃。常规烧结升温速率为 5℃/min,保温时间 2h;微波烧结升温速率为 80℃/min,保温时间 1min。烧成的 HA 陶瓷块经研磨和分筛后得到样品颗粒,其尺寸为 50~70μm。其

中常规烧结 HA 陶瓷颗粒简称为 HACS,微波烧结颗粒为 HAMS。

### 1.2 材料的结构与性能表征

样品颗粒的相组成和微观形貌分别通过 X 射线衍射(XRD,  $\chi^{\circ}$  Pert Pro, Philips, The Netherlands)和扫描电子显微镜(SEM, JSM-5900 OL, Jeol, Japan)进行分析和观察。样品颗粒表面 zeta 电位分析在 Zetasizer(Nano ZS90, Malvern, UK)上进行,磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)作为样品颗粒的分散剂。

### 1.3 蛋白吸附研究

实验用模型蛋白 BSA 和 LSZ 均购于美国 Ameresco 公司。蛋白定量分析采用 BCA 法,所用试剂(BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit)为美国 Pierce 公司生产。蛋白溶液的配制:称取一定量的 BSA(或 LSZ)直接溶解在 PBS 溶液中,待其自然溶解后定容,得到所需浓度的蛋白溶液。

本实验使用两种浓度的蛋白溶液(0.5 和 1.0 mg/mL)进行蛋白吸附实验。实验方法为:称取 0.1g 样品颗粒到 1.5mL 容量的聚丙烯离心管中,再加入 1mL 蛋白溶液进行充分混合。将这些离心管置于摇床上在 37℃环境条件下振荡吸附 2h 后在高速离心机上以 10000r/min 的速度离心 5min,收集上清液进行蛋白定量分析。将 25μL 样品(或标准溶液)和 200 μL BCA 工作试剂加入到 96 孔培养板中,在 37℃烘箱中孵育 2h 后,置于微孔板读板机(Microplate Reader, Model 550, Bio-Rad)中读取 570 nm 波长下的吸光度值,根据得到的标准曲线计算出样品中的蛋白含量,再根据质量平衡原理计算得到样品颗粒的蛋白吸附量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 相组成和颗粒形貌分析

图 1 为两种 HA 陶瓷颗粒的 XRD 图谱,从图中可以看出二者的衍射图谱没有明显的差异。与标准 HA 衍射峰(JCPDS 09-0432)相对比可知, HACS 和 HAMS 均由纯的 HA 相组成,在它们的衍射图谱中未发现其它的杂质峰存在。该结果说明烧结方式并不影响 HA 陶瓷颗粒的相组成,微波烧结较短的烧结时间仍然能够使 HA 结晶良好。此外,以(211)晶面的衍射峰为基准,运用谢乐公式计算得到 HAMS 的晶粒尺寸为 92.1nm,而 HACS 的晶粒尺寸因超过 100nm 而未得到具体数值。

图 2 为两种 HA 陶瓷颗粒的 SEM 照片。从图 2(a)、(c)中可以看出,两种 HA 陶瓷颗粒均具有不规则

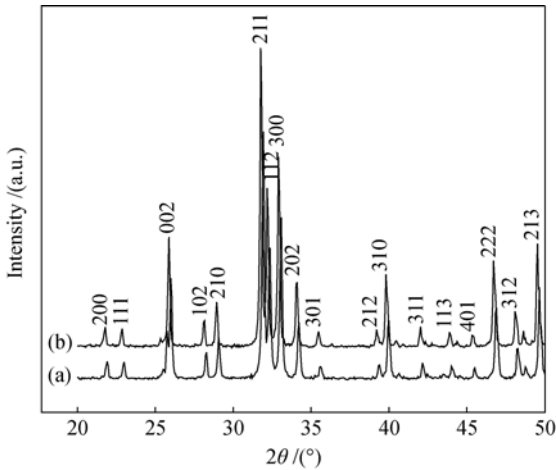


图 1 两种 HA 陶瓷颗粒的 XRD 图谱  
Fig. 1 XRD patterns of HACS (a) and HAMS (b)

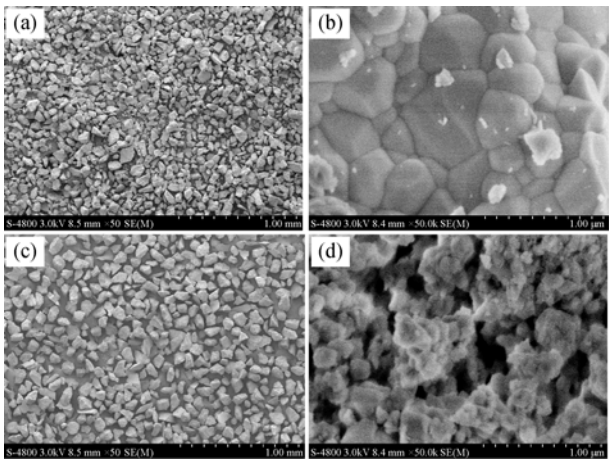


图 2 两种 HA 陶瓷颗粒的 SEM 照片  
Fig. 2 SEM images of two types of HA ceramic particles  
(a) (b) HACS; (c) (d) HAMS of different magnification

则的外形和相近的颗粒尺寸。但是对比高倍下的照片(图 2(b)、(d))可以发现,它们在微观形貌上存在明显的不同,HACS具有十分明显的晶界,其晶粒尺度大小不均,尺寸为 0.2~0.5 $\mu\text{m}$ ;而 HAMS 的晶界不明显,其晶粒尺度分布较为均匀,尺寸在 90~100nm 之间,与前面的 XRD 结果基本一致。此外,由于微波烧结时间很短,导致晶粒间融合不充分,从而可以在 HAMS 颗粒上观察到大量的微孔隙。这个结果充分说明微波烧结在大大缩短烧结时间的同时能够显著抑制晶粒的长大,并可得到纳米尺度晶粒,加之晶粒间微孔隙的存在可提高颗粒比表面积进而有助于其生物活性的增强。

2.2 表面 zeta 电位分析

材料表面电荷是影响蛋白质及其它有机分子在植入体表面吸附的重要因素之一,而表面 zeta 电位正是反映了固体颗粒与溶液界面的离子分布情况,

随吸附离子的极性、材料表面固有电荷以及溶液中的离子浓度的变化而变化<sup>[12-13]</sup>。当两种 HA 陶瓷颗粒分散在 PBS 溶液中,测得它们的表面 zeta 电位如表 1 所示。HACS 和 HAMS 均具有负的表面 zeta 电位,但是前者的值稍高一些。该结果说明烧结方式对于 HA 陶瓷颗粒的表面电荷分布具有较大的影响,微波烧结陶瓷颗粒具有近于纳米尺度的晶粒尺寸和大量的微孔隙,导致其比表面积增大,表面吸附的反离子增多使其 zeta 电位绝对值相应变小。

2.3 蛋白吸附分析

BSA 和 LSZ 在两种陶瓷颗粒表面的吸附结果分别见图 3(a)和(b)。可以看出,随着初始蛋白溶液浓度从 0.5mg/mL 增加到 1.0mg/mL,两种 HA 陶瓷颗粒表面的蛋白吸附量均有明显的增加。值得注意的是对于 BSA 和 LSZ 这两种不同结构和性质的蛋白质,HACS 和 HAMS 却显示出不同的吸附能力。对于 BSA 而言,在每一种初始浓度条件下,HAMS 均显示出比 HACS 更强的吸附能力。但是对于 LSZ 来说,情况却有所不同。在初始浓度为 0.5mg/mL 的低浓度条件下,HACS 的吸附量高于 HAMS;但是当初始浓度提高到 1.0mg/mL 时,两种 HA 陶瓷颗粒的 LSZ 吸附量显示没有明显的差异。

通常认为,固体表面的蛋白吸附是一个非常复杂的过程,受到来自材料(表面形貌、组成、电荷分布和润湿性等)、蛋白质(分子尺寸、构象和带电基团分布等)以及液相环境(pH、离子成分和浓度等)方面多种因素的影响<sup>[10]</sup>。之前的一些研究表明静电作用在蛋白吸附中起着十分重要的作用,是蛋白质在材料表面吸附的主要驱动力之一<sup>[14-16]</sup>。HA 属于六角晶系,空间群为 P63/m<sup>[4]</sup>。Kawasaki 等<sup>[17-18]</sup>认为在 HA 表面主要存在两种吸附位置,即带正电的 C 位点(C-sites)和带负电的 P 位点(P-sites)。蛋白吸附正是蛋白分子的带电基团与 HA 这两个吸附位点相互作用的结果。另一方面,材料表面微结构特征,包括粗糙度、微孔隙率和比表面积等显著影响其蛋白吸附能力<sup>[10,19]</sup>。Suh 等<sup>[20]</sup>的研究发现,BSA 在硅颗粒表面的吸附量随着颗粒表面微孔尺寸的增大而大幅提高,而且这种增强效应超过了颗粒比表面积对 BSA 吸附量的影响。

表 1 两种 HA 陶瓷颗粒的表面 zeta 电位( $n=30$ )  
Table 1 Zeta potentials of HACS and HAMS dispersing in pH 7.4 PBS ( $n=30$ )

Sample	Zeta potential/ mV
HACS	-21.4 $\pm$ 1.5
HAMS	-11.8 $\pm$ 0.3

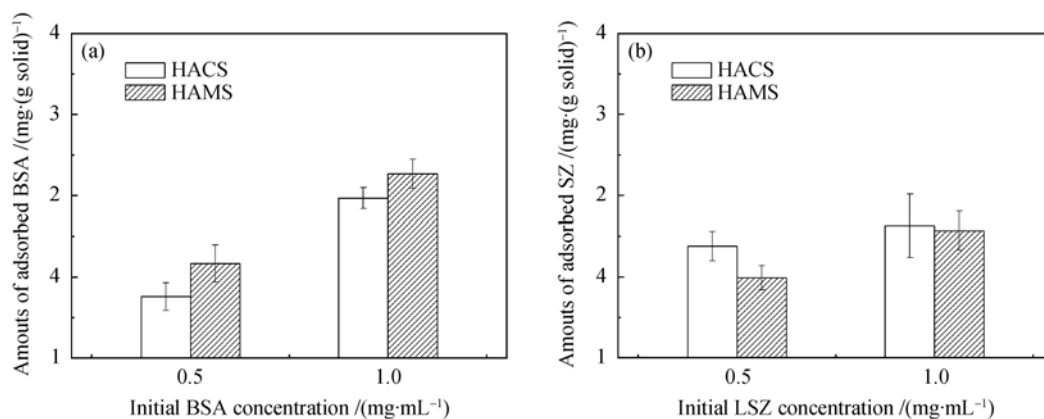


图3 BSA(a)和LSZ(b)在两种HA陶瓷颗粒表面的吸附行为( $n=4$ )

Fig. 3 Adsorption behaviors of BSA (a) and LSZ (b) on two types of HA ceramic particles ( $n=4$ )

BSA 是一种心形结构的蛋白分子, 其等电点约为 4.7<sup>[21]</sup>, 而 LSZ 是一种碱性蛋白, 其等电点约为 11.1<sup>[22]</sup>. 因此在 PBS 溶液中, BSA 具有负的表面净电荷而 LSZ 带有正的表面净电荷. 从前面 zeta 电位分析可知两种 HA 陶瓷颗粒均带有负的表面净电荷, 其中 HACS 比 HAMS 带更多的表面净电荷. 在 PBS 溶液中, 带相反电荷的 HA 陶瓷颗粒和 LSZ 分子之间存在静电吸引力, 而 HACS 与 LSZ 之间更强的静电力则能够促使更多的 LSZ 分子在 HACS 表面吸附. 但是在较高的 LSZ 初始浓度条件下, HA 颗粒表面的吸附点可能被 LSZ 分子完全占据. HAMS 颗粒更为细小的晶粒尺寸和大量存在的微孔隙导致的高比表面积则可以为 LSZ 提供更多的吸附位点, 从而抵消一部分静电力作用的影响, 导致在高初始浓度条件下 HAMS 和 HACS 具有相近的 LSZ 吸附量. 而对于 BSA 的吸附来说, 情况却有所不同. 大量的研究结果证实 BSA 分子在材料表面吸附时容易发生分子构象的改变, 使得其表面带电基团的分布发生重排<sup>[21,23-24]</sup>. 尽管 BSA 与 HA 颗粒之间的静电排斥作用会阻碍其吸附, 但是通过扩散作用和分子结构的重排, BSA 分子表面带电基团仍然可以和 HA 表面吸附位点相作用而产生较高的吸附. 一方面, BSA 与 HACS 之间更强的静电排斥力促使 BSA 分子结构重排加剧, 从而使每个 BSA 分子吸附时占据更多的 HA 表面吸附位点; 另一方面, HAMS 颗粒大的比表面积能够容纳更多 BSA 分子在其表面吸附. 这两个因素均促使 HAMS 能够比 HACS 有更高的 BSA 吸附量.

生物材料的生物活性与其蛋白吸附行为有着密切的联系, 两种烧结方式制备的 HA 陶瓷颗粒不同的蛋白吸附行为预示着它们在生物活性上可能存在的差异. HAMS 颗粒近于纳米尺度的晶粒尺寸和晶

粒间丰富的微孔隙有助于其蛋白吸附能力的增强, 但是这种增强效应同时受到与其相互作用的蛋白分子结构和性质的影响. HA 作为一种广泛应用于骨修复替换的生物材料, 其与骨形成过程中相关蛋白的相互作用对于充分认识其生物活性机理有着重要的作用. 进一步的研究将重点关注微波烧结纳米 HA 陶瓷与骨生长因子蛋白如 BMP-2 等之间的相互作用及其对成骨细胞功能的影响, 从而为深化 HA 陶瓷生物活性机理提供理论依据.

### 3 结论

相比于常规烧结, 微波烧结有利于制备具有纳米晶粒尺度和丰富微孔隙的 HA 陶瓷. HA 陶瓷颗粒蛋白吸附能力与其微结构特征紧密相关, 微波烧结 HA 陶瓷颗粒增强的蛋白吸附能力可能导致其生物活性的显著提高. 可以预见, 微波烧结在制备高生物活性纳米生物陶瓷方面可能会是一种较为理想的方式.

### 参考文献:

- [1] Hench L L. Biomaterials. *Science*, 1980, **208**(4446): 826–831.
- [2] Boyde A, Corsi A, Quarto R, et al. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*, 1999, **24**(6): 579–589.
- [3] Chang B S, Lee C K, Hong K S, et al. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, 2000, **21**(12): 1291–1298.
- [4] Vallet-Regi M, Gonzalez-Calbet J M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Chem.*, 2004, **32**(1/2): 1–31.
- [5] 章庆国, 赵士芳, 郭宗科, 等. 纳米相陶瓷支架与人成骨细胞生

- 物相容性的体外实验研究. 东南大学学报(自然科学版), 2004, 34(2): 219–223.
- [6] Thomas J W, Celaletdin E, Robert H, *et al.* Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, **51(3)**: 475–483.
- [7] Wang X L, Fan H S, Xiao Y M, *et al.* Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite/  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics by microwave sintering. *Mater. Lett.*, 2006, **60(4)**: 455–458.
- [8] Li B, Chen X N, Guo B, *et al.* Fabrication and cellular biocompatibility of porous carbonated biphasic calcium phosphate ceramics with a nanostructure. *Acta Biomater.*, 2009, **5(1)**: 134–143.
- [9] Puleo D A, Nanci A. Understanding and controlling the bone–implant interface. *Biomaterials*, 1999, **20(23/24)**: 2311–2321.
- [10] Dee K, Puleo D, Bizios R, *et al.* An Introduction to Tissue-biomaterial Interactions. New York: John Wiley, 2002: 37–52.
- [11] Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, 1999, **20(23/24)**: 2287–2303.
- [12] Ducheyne P, Kim C S, Pollack S R. The effect of phase differences on the time-dependent variation of the zeta potential of hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992, **26(2)**: 147–168.
- [13] Kowalchuk R M, Pollack S R, Ducheyne P, *et al.* Particle microelectrophoresis of calcium-deficient hydroxyapatite: solution composition and kinetic effects. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1993, **27(6)**: 783–790.
- [14] van der Veen M, Norde W, Stuart M C. Electrostatic interactions in protein adsorption probed by comparing lysozyme and succinylated lysozyme. *Colloid. Surf. B*, 2004, **35(1)**: 33–40.
- [15] Yin G, Liu Z, Zhan J, *et al.* Impacts of the surface charge property on protein adsorption on hydroxyapatite. *Chem. Eng. J.*, 2002, **87(2)**: 181–186.
- [16] Zhu X D, Fan H S, Li D X, *et al.* Protein adsorption and zeta potentials of a biphasic calcium phosphate ceramic under various conditions. *J. Biomed. Mater. Res. B*, 2007, **82B(1)**: 65–73.
- [17] Kawasaki T, Niikura M, Kobayashi Y. Fundamental study of hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. III, direct experimental confirmation of the existence of two types of absorbing surface on the hydroxyapatite crystal. *J. Chromatogr.*, 1990, **515**: 125–148.
- [18] Ohta K, Monma H, Takahashi S. Adsorption characteristics of proteins on calcium phosphates using liquid chromatography. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, **55(3)**: 409–414.
- [19] Price R L, Ellison K, Haberstroh K M, *et al.* Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, **70A(1)**: 129–138.
- [20] Suh C W, Kim M Y, Choo J B, *et al.* Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy. *J. Biotechnol.*, 2004, **112(3)**: 267–277.
- [21] Norde W, Giacomelli C E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *J. Biotechnol.*, 2000, **79(3)**: 259–268.
- [22] Buijs J, Hlady V. Adsorption kinetics, conformation, and mobility of the growth hormone and lysozyme on solid surfaces, studied with TIRF. *J. Colloid Interface Sci.*, 1997, **190(1)**: 171–181.
- [23] Serro A P, Bastos M, Pessoa J C, *et al.* Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2004, **70A(3)**: 420–427.
- [24] Zeng H, Chittur K K, Laceyfield W R. Analysis of bovine serum albumin adsorption on calcium phosphate and titanium surfaces. *Biomaterials*, 1999, **20(4)**: 377–84.