

纳米羟基磷灰石-丝素蛋白仿生矿化材料的制备研究

王江^{1,2}, 左奕¹, 杨维虎¹, 周钢¹, 张利¹, 李玉宝¹

(1. 四川大学分析测试中心 纳米生物材料研究中心, 成都 610064; 2. 海南大学材料与化工学院, 儋州 571737)

摘要: 以 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 与 Na_3PO_4 为无机相的前驱体, 将丝素蛋白直接溶于 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中, 不经过脱盐处理, 直接滴入 Na_3PO_4 溶液中反应, 在 37°C 下丝素蛋白和羟基磷灰石晶体之间相互作用, 仿生合成了纳米羟基磷灰石(n-HA)-丝素蛋白(SF)生物矿化材料. 用 FTIR、XRD、XPS 和 SEM 进行表征. 结果表明, 羟基磷灰石和丝素蛋白两相间具有较强的化学键合, 矿化材料中无机相包含少量碳酸根, 为缺钙类骨羟基磷灰石并且呈现一定的长轴取向性, 说明丝素蛋白大分子对羟基磷灰石晶体的成核和生长起着模板和调控作用. 矿化物颗粒尺寸在 $50 \sim 200\text{nm}$ 之间, 其抗压强度为 32.21MPa , 可作为非承重部位骨组织缺损修复材料.

关键词: 生物矿化; 纳米羟基磷灰石; 丝素蛋白; 仿生合成

中图分类号: TB321

文献标识码: A

Study on Preparation of n-HA and Silk Fibroin Bio-mineral Material

WANG Jiang^{1,2}, ZUO Yi¹, YANG Wei-Hu¹, ZHOU Gang¹, ZHANG Li¹, LI Yu-Bao¹

(1. Research Center for Nano-Biomaterials, Analytical and Testing center, Sichuan University, Chengdu 610064, China;
2. School of Material and Chemical Engineering, Hainan University, Danzhou 571737, China)

Abstract: A new hydroxyapatite (n-HA)-Silk fibroin (SF) bio-mineral material was prepared by using a biomimetic method, with $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and Na_3PO_4 used as the starting reagent to synthesize the inorganic phase. In details, SF was dissolved in $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution without desalting procedure, the compound solution was directly dropped into Na_3PO_4 solution. In this way, HA was synthesized at 37°C by controlling Ca/P ratio, meanwhile the mineralized HA interacted with SF to form biomineral material. The morphology and structure of this n-HA-SF biomineral material were characterized by XRD, FTIR, XPS and SEM. The results show that there are strong chemical interaction between n-HA and SF. Moreover, in the biomineral material, the inorganic phase is calcium-deficient hydroxyapatite, containing a small amount of carbonated HA with an average crystal size of 37.6nm . In addition, The particle size of biomineral materials range from 50nm to 200nm . It can be deduced that silk fibroin chain can regulate the growth and morphology of HA crystals. The compressive strength of the biomineral material is 32.21MPa , which is a good potential material for bone tissue engineering and unloaded-bearing bone defects repairing.

Key words: biomineralization; nano-hydroxyapatite; silk fibroin; biomimetic synthesis

生物矿化组织的形成是有机大分子和无机矿物离子在有机无机界面处相互作用, 在分子水平上对晶体的成核和生长的精细控制过程^[1-4]. 人体骨主要由纳米羟基磷灰石和 I 型胶原组成, 采用 I 型胶原诱导纳米羟基磷灰石矿化制备仿生骨被广泛研究, 但是 I 型胶原存在着价格昂贵、纯化困难以及可能带来潜在

病原体的危险等缺点. 因此, 利用胶原以外的有机大分子作为生物矿化模板制备仿生骨是一条理想的途径^[5-9].

丝素蛋白(SF)由氨基酸组成, 无免疫原性, 具有生物相容性, 可降解, 适用于组织工程支架材料和人工皮肤等^[10,11]. Kong 等^[12]在合成羟基磷灰石时加入

经 CaCl_2 溶解,半透膜透析除盐的丝素蛋白为模板研究了磷灰石矿化过程,发现丝素蛋白可以调控磷灰石晶体的生长.当前制备丝素蛋白/羟基磷灰石复合材料所采用的丝素蛋白溶液,大部分都是先采用 CaCl_2 溶解,再经过透析膜透析脱盐,此法耗时长,处理量少,费用高,难以大批量生产^[13,14]. 本工作将丝素蛋白溶解于 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中,形成 $\text{SF-Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液,将其滴入 Na_3PO_4 溶液反应,仿生矿化来制备 HA-SF 生物矿化材料,并对其结构和性能进行了研究.

1 材料与方法

1.1 材料的制备

将桑蚕丝置于1.0%的 Na_2CO_3 溶液中,在 100°C 下处理 20min,重复数次,脱去对人体有过敏反应的丝胶蛋白,洗净后烘干,得到丝素材料.分析纯的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 与 Na_3PO_4 分别用去离子水溶解,按照 SF/HA 质量比为 3/7,称取丝素蛋白纤维直接溶解于 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中.在 37°C 、搅拌条件下将 $\text{SF-Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液滴入 Na_3PO_4 溶液中,反应物钙磷摩尔比为1.67,用 NaOH 控制反应体系 pH 值为 9~10.反应结束后,悬浮液保温矿化 72h.最后,用乙醇浸洗数次,离心除去多余离子,再用去离子水洗去乙醇,干燥得到 SF/HA 矿化材料(B-SF/HA).按照上述的制备工艺,待 $\text{SF-Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液与 Na_3PO_4 反应结束后,加入饱和硫酸铵溶液将 SF 与 HA 共沉淀、复合,制备出了 SF/HA 复合材料(P-SF/HA),并将其与 B-SF/HA 颗粒形貌和物相结构进行对照分析,纯 HA 按照同样的工艺自制.将 P-SF/HA 和 B-SF/HA 粉末置于柱状模具中,冷等静压 5min 成型,脱模,进行抗压强度测试.

1.2 材料的表征

采用扫描电镜(SEM)、X射线衍射仪(XRD)、傅

立叶变换红外光谱仪(FT-IR)和 X 光电子能谱仪(XPS)研究了丝素蛋白对矿化物形貌和晶体物相结构的影响.分析了 SF/HA 矿化物中各相间的相互作用,元素化学环境的变化,初步探讨了 SF-HA 仿生矿化材料的矿化机理和界面作用方式.按照 GB/T1041-92 标准,用万能材料试验机测量材料的抗压强度.

2 结果与讨论

2.1 扫描电镜观察(SEM)

桑蚕丝蛋白质的含量高达 99% 以上,主要由丝素蛋白(75%)和丝胶蛋白(24%)组成,人体对丝胶蛋白具有严重过敏反应,用于生物材料的丝素蛋白必须经过脱丝胶处理^[15].图 1 为脱丝胶前后桑蚕丝的 SEM 照片.从图 1 可以看到,每根蚕丝由两根表面覆盖着丝胶的丝素通过丝胶粘结而成,而经过 Na_2CO_3 脱丝胶处理后的蚕丝表面光滑,粘结在一起的两根丝素已经完全分离,脱丝胶效果较好.图 2 为仿生矿化材料(B-HA/SF)和没有经过矿化处理的 HA/SF 复合材料(P-HA/SF)的 SEM 照片.P-HA/SF 复合材料(图 2(b))干燥后以不规则颗粒状的结构存在,HA 晶体被胶态的 SF 完全包裹;而经过在模拟人体温度 37°C 下长时间矿化后的 B-HA/SF 矿化材料,干燥后大部分矿化颗粒以近似纺锤形的形态存在.B-HA/SF 材料的颗粒尺寸明显小于 P-HA/SF 复合材料,并呈现一定的长轴取向性.SF 溶解在 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中,在 Ca^{2+} 离子作用下,丝肽链的构象发生了变化,由无规线团向 β -折叠转变,使得更多的 OH^- 、 COO^- 等亲水基团外露,在矿化过程中 SF 不断地凝聚成微纤束,HA 晶体与微纤上的亲水性基团结合,并以 SF 微纤为模板,随着 SF 微纤生长而长大^[8,16,17].最终大量 SF 微纤与 HA 晶体缠绕在一起生成矿化物,尺寸约为 50~200nm.

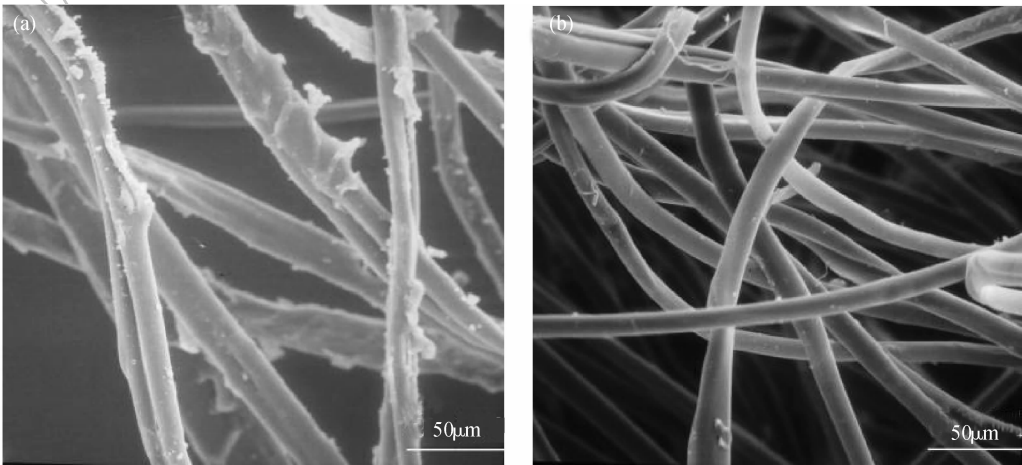


图 1 脱丝胶前后蚕丝纤维扫描电镜照片
Fig. 1 SEM images of silk fibre
(a) Before degummed; (b) After degummed

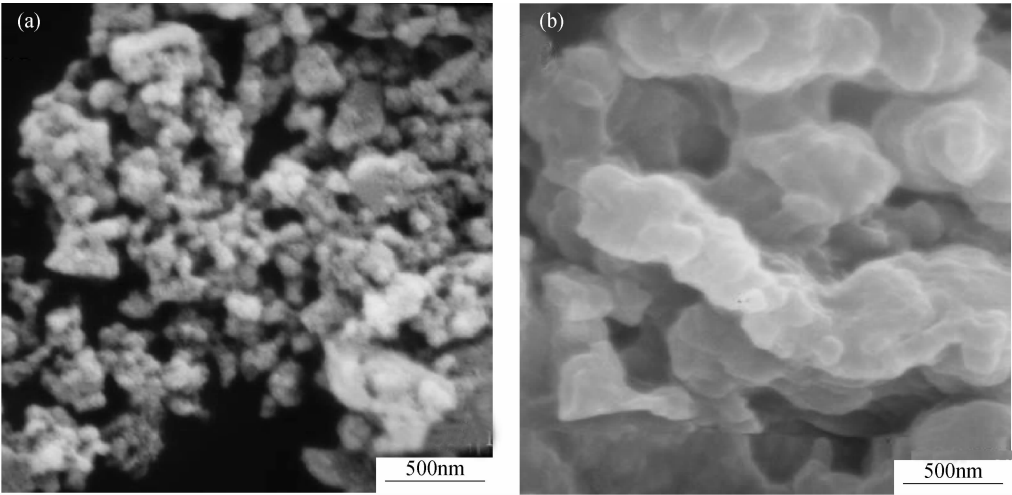


图 2 B-HA/SF 仿生矿化材料(a)和 P-HA/SF 复合材料(b)扫描电镜照片
Fig. 2 SEM images of (a) B-SF/HA composite and (b) P-HA/SF composite

2.2 红外光谱(IR)分析

图 3 分别是纯丝素蛋白(a),纯羟基磷灰石(b),P-HA/SF 复合材料(c)和 B-HA/SF 仿生矿化材料的红外图谱(d). 图 3(a)在 1653、1548、1227 和 1110cm⁻¹处出现的吸收峰是丝素蛋白酰胺 I 区(C=O)、酰胺 II 区(N-H)、酰胺 III 区(C-N)和酰胺 IV 区的特征吸收峰^[18]. 图 3(b)在 3571 cm⁻¹处是羟基磷灰石 OH⁻的特征峰,566cm⁻¹和 1035~1093cm⁻¹为 PO₄³⁻吸收峰,同时在 872cm⁻¹附近出现微弱的 HPO₄²⁻的吸收峰,在 1420cm⁻¹处有微弱的 CO₃²⁻吸收峰,同样的吸收峰在图 3(c)和 3(d)中也存在. 说明共沉淀法制备的 P-HA/SF 复合材料和仿生矿化材料的无机相都包含少量碳酸根,为缺钙羟基磷灰石^[19,20]. 对比红外图谱还

可发现,仿生矿化材料在 3571cm⁻¹处的羟基峰减弱, SF 酰胺特征吸收谱带均明显红移而且强度减弱,说明矿化材料中无机与有机相之间发生了相互作用. 相比之下,P-HA/SF 复合材料红外图谱中 3751cm⁻¹处 OH⁻峰的变化和 SF 酰胺特征吸收谱带的位移不明显. 丝素蛋白肽链由氨基酸通过酰胺键(-CONH-)缩聚形成,因此氨基酸残基存在大量的 NH⁻、COO⁻等极性基团. 当 Ca 10(PO₄)₆(OH)₂ 的 OH⁻与 NH⁻形成氢键,Ca²⁺与 -CONH-、COO⁻配位形成配位键时,导致矿化材料在 3571cm⁻¹处的 OH⁻峰减弱以及酰胺区吸收谱带的红移.

2.3 X 射线衍射(XRD)分析

由图 4(a)可见,羟基磷灰石的主要衍射峰在 25.9°(002)、31.9°(211)、40.2°(310)、46.5°(222)、49.2°(213)、52.4°(004)和 64.4°(304)处. 对比 XRD 图谱可见,在 P-SF/HA 复合材料和 B-SF/HA 仿生矿化材料的 XRD 图谱中也出现了与羟基磷灰石同样的特征衍射峰,三者衍射峰的峰形、位置、高度和大小相似. 与 HA 和 P-SF/HA 相比,B-SF/HA 中的 HA 呈弱结晶状态,因为其谱峰没有前两者那样尖锐. 通过 Jade 6.5XRD 分析软件计算出三者 HA 的(002)粒径分别为 37.6、25.3 和 20.2nm,并通过对 XRD 测试数据的多次精修,可以得到三者的晶格常数(表 1). 从表 1 可知,羟基磷灰石、P-SF/HA 复合材料和 B-SF/HA 仿生矿化材料羟基磷灰石的晶格常数没有明显的区别,但仿生矿化羟基磷灰石结晶明显增大,说明丝素蛋白大分子具有调控羟基磷灰石晶体沿着 c 轴择优取向生长的能力.

2.4 X 光电子能谱(XPS)分析

丝素蛋白与纳米羟基磷灰石发生矿化后生成了稳定的生物矿化材料,其中无机相 HA 和有机相 SF

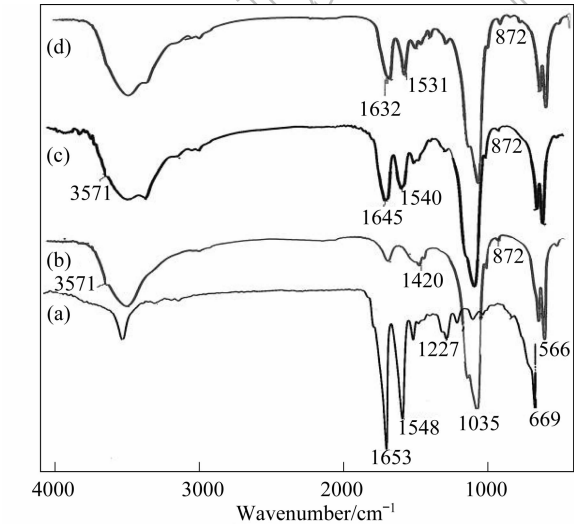


图 3 丝素蛋白(a)、纯羟基磷灰石(b)、P-SF/HA 复合材料(c)和 B-SF/HA 矿化材料(d)的红外光谱图
Fig. 3 IR spectra of (a) pure SF, (b) pure HA, (c) P-SF/HA composite and (d) B-SF/HA composite

两相间发生了相互作用,其表面原子化学环境发生了变化,原子结合能也会发生变化,可据此评价丝素蛋白与纳米 HA 的界面作用和矿化效果^[21].

图 5(b) 显示,丝素蛋白中含有 C、O、N 元素,C 峰来自 $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CONH}-$ 和 COO^- ,氧峰来自

表 1 HA 晶体大小和晶格常数

Table 1 crystal size and crystallographic parameters of HA crystals					
Lattice parameters	L_c/nm	$(a=b)/\text{\AA}$	$c/\text{\AA}$	$(\alpha=\beta)/(^{\circ})$	$\gamma(^{\circ})$
HA	20.2	9.43782	6.88033	90	120
P-SF/HA	25.3	9.43910	6.90125	90	120
B-SF/HA	37.6	9.44032	6.90340	90	120

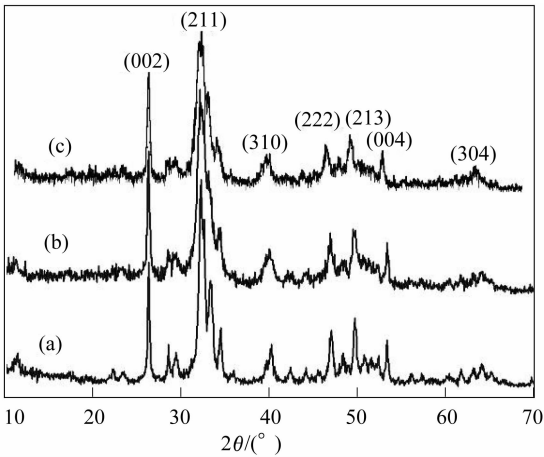


图 4 羟基磷灰石(a)、P-HA/SF 复合材料(b)和 B-SF/HA 矿化材料(c)的 XRD 图谱
Fig.4 XRD patterns of (a) HA, (b) P-SF/HA composite and (c) B-SF/HA composite

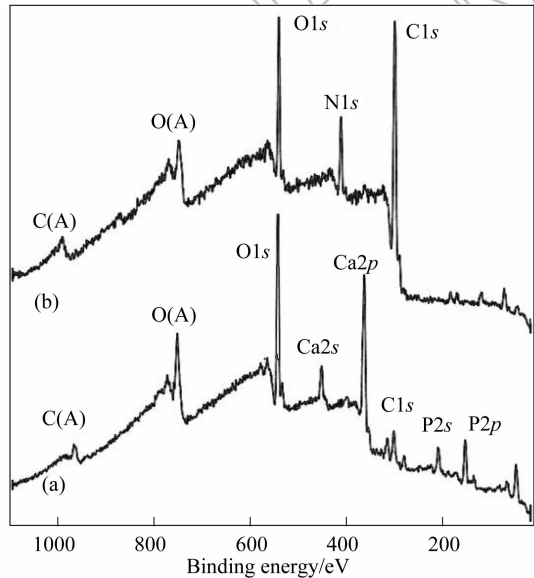


图 5 B-SF/HA 矿化材料(a)和纯丝素蛋白(b)的全扫描 XPS 能谱图
Fig.5 XPS spectra of (a) B-SF/HA composite and (b) pure SF

$-\text{CONH}-$ 和 COO^- , N 峰主要来自 $-\text{CONH}-$. 从图 5(a) 可以看出, C1s 峰在矿化材料中分裂成两个 C 谱峰, 其中一个向高结合能方向位移. 通常, 当被测原子的氧化价态增加, 或与电负性大的原子结合时, 其核外电子云密度会发生变化, 从而导致其 XPS 峰向高结合能方向位移^[22]. $-\text{CONH}-$ 上的羰基 O 提供孤电子对与羟基磷灰石 Ca^{2+} 的空轨道结合形成配位键导致 O 原子电子云密度降低. 由于 $-\text{CONH}-$ 上 O、C 和 N 原子存在 P- π 共轭效应使 C 和 N 原子电子云的密度降低, 导致 C 元素 1s 态电子 XPS 峰分裂并向高结合能方向位移, 可推断矿化物中有机相 SF 中 N 和 C 元素的化学环境已经改变. 另外, 矿化材料的 XPS 全能谱图中, N 和 C 峰的减弱, 说明矿化材料表面 SF 的含量很少, 大部分 SF 已经被 HA 覆盖, 并且通过较强化学键相互作用矿化成为一体.

2.5 材料的抗压强度

由冷等静压成型法制备的 B-SF/HA 和 P-SF/HA 的抗压强度分别为 32.21 和 26.50 MPa, 说明经过模拟人体温度矿化后的 SF/HA 矿化材料两相存在着较强的化学结合. 一般以小梁骨为参照, 当材料的抗压强度大于 5 MPa, 植入人体后一定时间内可以保持其形状, 当抗压强度大于 10 MPa, 可以满足骨组织工程支架材料的要求^[23].

3 生物矿化机理和界面作用

生物矿化是在生物体温和内部环境和动态条件下, 通过有机质自组装形成模板, 与无机离子在界面上以静电匹配、几何相似性和立体化学互补以及化学键合等方式来控制纳米晶体的成核与生长, 从而控制纳米晶体的结构和形貌^[9].

本研究模拟人体自然骨有机无机组分, 以 SF 替代 I 型胶原纤维为模板仿生合成了 HA/SF 复合生物矿化材料. 先将 SF 与 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 在一定条件下溶解形成 SF-Ca^{2+} 配合物, 丝肽链在 Ca^{2+} 离子作用下, 其结构发生了变化, 由无规线团向 β -折叠转变, 使得更多的 NH^- 、 COO^- 等亲水基团外露, 为钙、磷在其表面反应、沉积和矿化提供模板, 从而在分子水平上控制着羟基磷灰石晶体的成核、生长、形貌、尺寸和取向. 仿生矿化材料界面作用如图 6 所示. 钙离子和磷酸根离子在舒展开来的丝肽链上反应, 生成羟基磷灰石微晶, 羟基磷灰石微晶的 Ca^{2+} 离子与丝素蛋白酰胺键上的氧通过配位键形成环状络合物(螯合物), 并且通过羟基与 NH^- 形成氢键与 SF 结合. Ca^{2+} 在 SF 和 HA 微晶之间起到了桥架作用, 同时 Ca^{2+} 在 SF 之间也起着桥联作用. 桥联作用使 SF 不断自我凝聚成微纤, 而

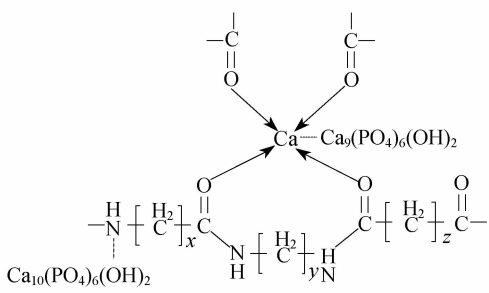


图 6 仿生矿化材料界面作用示意图
Fig. 6 Interfacial mechanism between n-HA and SF of B-SF/HA composite

桥架作用使 HA 微晶随着微纤的生长而长大,最终 SF 和 HA 通过桥联和桥架作用使整个生物矿化体系熵值增加,体系能量降低,最后生成了稳定生物矿化材料.

4 结论

蚕丝纤维在1.0%的 Na₂CO₃ 溶液中,在 100℃下处理 20min,可以脱去人体有过敏反应的丝胶蛋白.以 Ca(NO₃)₂ 与 Na₃PO₄ 为无机相的前驱体,丝素蛋白为模板,在模拟人体温度 37℃下,SF 与 HA 微晶相互作用,生成 SF-HA 矿化材料.矿化物中无机相为缺钙,弱结晶状态的纳米 HA,HA 和 SF 两相间存在强烈键合作用.矿化物颗粒尺寸在 50 ~ 200nm 之间,并呈现一定的长轴取向性,其抗压强度为32.21MPa,可作为非承力部位骨组织缺损修复替换材料.

参考文献:

[1] Du C, Cui F Z, Zhang W, et al. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000,**50**(4): 518-527.

[2] Bonfield W. *Nature*,1977,**270**(1):453-454.
[3] 李玉宝.生物医学材料,第一版.北京:化学工业出版社,2003: 27-28.
[4] Wang H N, Li Y B, Zuo Y, et al. *Biomaterials*,2007,**28**(22): 3338-3348.
[5] Wang Li, Li Chun zhong. *Carbohydrate Polymers*, 2007,**68**(4): 740-745.
[6] Isamu Yamaguchi, Shunsuke Iizuka, Akiyoshi Osaka, et al. *Colloids and Surfaces*,2003,**214**(1-3):111-118.
[7] Rebecca L Horan, Kathryn Antle, Adam L Collette, et al. *Biomaterials*, 2005,**26**(17):3385-3393.
[8] 姚菊明,魏克民,励丽,等. *化学学报*,2007,**65**(7):635-639.
[9] 黄志良,刘羽,王大伟,等. *材料导报*,2002,**16**(10):69-71.
[10] Gregory H Altman, Frank Diaz, Caroline Jakuba, et al. *Biomaterials*,2003,**24**(3):401-416.
[11] Eun S Gil, David J Frankowski, Samuel M Hudson, et al. *Materials Science and Engineering: C*,2007,**27**(3):426-431.
[12] Kong X D, Cui F Z, Wang X M, et al. *Journal of Crystal Growth*, 2004,**270**(1-2):197-202.
[13] 杨辉,张林,张宏,等. *复合材料学报*,2007,**24**(3):142-146.
[14] 刘佳佳,李明忠,卢神州. *高分子材料科学与工程*,2006,**22**(5): 246-248.
[15] Pe'rez-Rigueiro J, Viney C, Llorca J, et al. *Journal of Applied Polymer Science*,2000,**75**(10):1270-1277.
[16] 李贵阳,周平,孙尧俊,等. *高等学校化学学报*,2001,**22**(5): 860-862.
[17] Wilson Donna, Valluzzi Regina, Kaplan David, et al. *Biophysical Journal*,2000,**78**(5): 2690-2701.
[18] Sonoyama M, Nakano T. *Applied Spectroscopy*,2000,**54**(7):968-973
[19] 黄志良,王大伟,刘羽. *无机化学学报*,2002,**5**(18):469-474.
[20] 王学江,汪建新,李玉宝,等. *高技术通讯*,2000,**10**(11):92-94
[21] 廖建国,王学江,左奕,等(LIAO Jian-Guo, et al). *无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials)*,2008,**23**(1):146-149.
[22] 大连理工大学无机化学教研室编. *无机化学(第三版)*. 北京: 高等教育出版社,1990:4.
[23] 肖斌,周大利,杨为中,等(XIAO Bin, et al). *无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials)*,2006,**21**(2):427-432.