

文章编号: 1000-324X(2005)04-0914-07

γ -硅酸二钙陶瓷的生物活性和细胞毒性研究

苟中入, 常江, 翟万银, 林开利, 曾毅

(中国科学院上海硅酸盐研究所生物材料与组织工程研究中心, 上海 200050)

摘 要: 对溶胶-凝胶法合成的硅酸二钙粉体通过冷等静压成型, 在 1450°C 下无压烧结, 制备出高纯度的 γ -硅酸二钙 (γ -Ca₂SiO₄) 陶瓷, 并对 γ -Ca₂SiO₄ 陶瓷的体外 (*in vitro*) 生物活性和细胞毒性进行了研究. 实验结果表明, 该陶瓷具有优良的生物活性, 在模拟体液 (SBF) 中浸泡 72h 后陶瓷表面沉积类骨碳酸羟基磷灰石层 (CHA); 材料溶解释放的钙、硅离子对成纤维细胞无毒副作用, 在适当浓度下还能促进细胞增殖; 该陶瓷还能支持骨髓间质干细胞 (BMSCs) 的贴壁、黏附和铺展. 因此, γ -Ca₂SiO₄ 陶瓷是一种生物活性优良和无细胞毒性的新型生物活性陶瓷材料.

关键词: 硅酸二钙; 生物活性; 碳酸羟基磷灰石; 细胞毒性; 生物活性陶瓷

中图分类号: R 318, TE 332 **文献标识码:** A

1 引言

硅酸二钙 (Ca₂SiO₄) 是一种重要的硅酸盐化合物, 在水泥、耐火材料、防腐隔热涂层材料领域得到了广泛的研究^[1~4]. 目前, 文献报道 Ca₂SiO₄ 在常压下存在四种晶型变体, 其中 γ 相和 β 相分别是常温稳定相和介稳相, 也是研究和应用的主要对象. 经分析 Ca₂SiO₄ 粉体在模拟体液 (Simulated body fluid, SBF) 中浸泡实验的结果发现, 粉体颗粒上能沉积大量类骨碳酸羟基磷灰石 (carbonated hydroxyapatite, CHA)^[5]; 同时对 Ca₂SiO₄ 陶瓷的物理和力学性能的研究表明, 1450°C 烧结制备得到的 γ -Ca₂SiO₄ 陶瓷致密度达到 96%, 具有与人体皮质骨近似匹配的抗压强度 (200MPa)、抗弯强度 (97MPa) 和弹性模量 (40GPa), 比羟基磷灰石陶瓷更高的断裂韧性 (1.80MPa·m^{1/2})^[6]. 目前, 关于 γ -Ca₂SiO₄ 的生物活性和细胞毒性研究尚无报道, γ -Ca₂SiO₄ 陶瓷是否可以用于人体骨组织修复仍然是一个尚需研究的课题. 为此, 本文对 γ -Ca₂SiO₄ 陶瓷的体外生物活性和细胞毒性进行了系统研究.

2 实验

2.1 粉体合成

以分析纯硝酸钙、硅溶胶、乙二醇、柠檬酸为原料, 按化学计量比 2:1(摩尔比) 称取适量硝酸钙和硅溶胶, 用去离子水将硝酸钙溶解成近饱和溶液; 用 1.0mol·L⁻¹ 的硝酸溶液调节硅溶胶 pH 值到 1.8 以下; 按预算硅酸二钙合成量的 20% 称量乙二醇和柠檬酸 (质量比为 4:6), 搅拌混合. 将上述三种溶液混合, 在 60~65°C 下加热、搅拌, 蒸发除去水分; 然后在 60°C 下密闭陈化 24h, 并在 90°C 真空条件下干燥 24h. 最后将干燥块体在 800°C 下煅烧 2h,

收稿日期: 2004-06-09, 收到修改稿日期: 2004-08-19

基金项目: 上海市科学技术委员会基金 (02CJ14009)

作者简介: 苟中入 (1975-), 男, 博士研究生. 通讯联系人: 常江. E-mail: jchang@mail.sic.ac.cn.

球磨、筛分, 得到平均粒度为 $6.5\mu\text{m}$ 的 Ca_2SiO_4 粉体.

2.2 陶瓷制备

称取适量 Ca_2SiO_4 粉体, 并添加少量聚乙烯醇水溶液 (PVA-124, 6wt%), 搅拌混匀, 在内径为 $\phi 6\text{mm}$ 或 $\phi 10\text{mm}$ 的圆柱形不锈钢模具中预成型, 再将样品作冷等静压 (200MPa) 提高坯体致密度. 然后将样品分组在 1450°C 下烧结 3h, 自然冷却到室温. 用 X 射线衍射仪 (XRD, Rigaku Co.) 测定陶瓷的组成, 用扫描电子显微镜 (SEM, JSM-6700F, JEOL) 观察陶瓷的表面形貌.

2.3 模拟体液浸泡实验

将 1450°C 烧结的陶瓷样品 ($\phi 10\text{mm}$) 放入无水乙醇和去离子水介质中超声清洗两次、晾干, 将样品置于盛有 SBF 的小塑料瓶中浸泡, 并将小瓶置于 37°C 恒温水浴震荡 72~240h. SBF 的主要成分与人体血浆的无机成分基本相同 (见表 1), 用三羟甲基氨基甲烷和 $1.0\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液调节其 pH 值为 7.4^[7]. 浸泡结束时取出样品, 用去离子水漂洗 2 次, 然后在 60°C 真空下烘干. 经 SBF 溶液浸泡前后的样品其表面成分用 XRD 和红外光谱 (FTIR, Nicolet Co.) 测定, 陶瓷的表面和断面微结构用 SEM 观察, 并对断面 Ca、Si 和 P 元素分布作能谱线扫描.

表 1 模拟体液和人体血浆的主要无机成分和离子浓度
Table 1 Ion concentrations of SBF and human blood plasma.

	Ion concentrations/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$						
	Na^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	HPO_4^{2-}
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0
Blood plasma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0

2.4 浸提液制备

按照 ISO10993.5 中所推荐的材料与浸提介质比例进行材料浸提制备^[8], 其中浸提介质采用 RPMI1640 细胞培养液. 首先将制备的 Ca_2SiO_4 粉体, 按 $200\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的粉体与介质比例浸泡在 RPMI1640 细胞培养液中, 37°C 条件下保持 24h, 然后在无菌条件下抽取材料的浸提液, 并按指数递减逐步稀释为 200、100、50、25、12.5 和 $6.25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 备用.

2.5 细胞培养与检测

选择培养 48~72h 生长旺盛的 L-929 小鼠成纤维细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液配制成 3×10^3 个细胞 /mL 的细胞悬液, 分注于 96 孔培养板中, 每孔加注 1mL RPMI1640 细胞培养液, 置于 37°C 恒温培养箱中培养, 使细胞单层贴壁生长. 24h 后, 弃去细胞培养原液, 加入 0.5mL 新鲜培养液和 0.5mL 的材料浸提液, 阴性对照为 1mL 含 10% 小牛血清的新鲜培养液. 继续在 37°C 恒温培养箱中分别培养 24、72 和 168h. 然后经无菌磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffer solution, PBS) 漂洗, 向每孔加入 $100\mu\text{L}$ 溴化钾基噻唑基四唑 (MTT) 溶液并在 37°C 下培养 4h; 再用 PBS 漂洗一次, 加入 $100\mu\text{L}$ 结晶紫罗兰染色和十二烷基硫酸钠, 在微板记录仪 (ELX800, Bio-TEK, USA) 中 590nm 波长下测定光密度 (Optical density, OD).

根据吸光度值计算细胞相对生长率 (Relative Growth Rate; RGR), 并进行细胞毒性评级 (0~5 级):

$$RGR = \frac{\text{实验组光密度 OD 值}}{\text{阴性对照组光密度 OD 值}} \times 100\%$$

当 $RGR \leq 75\%$, 即细胞毒性级 ≥ 2 级者可认为该材料存在不同程度的细胞毒性^[9].

2.6 骨髓间质干细胞贴壁实验

采用新生小牛大腿骨髓间质干细胞 (Bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 第 2~3 代细胞进行细胞贴壁实验. BMSCs 的消化和培养按 Ringe^[10] 推荐的方法进行. 取 1450°C 烧结的陶瓷样品 ($\phi 6\text{mm}$) 在无水乙醇和去离子水介质中分别超声清洗 5min, 再高压蒸汽灭菌 30min. 用无菌 PBS 洗涤两次, 然后置于 48 孔培养板中, 按 3×10^3 个细胞 / 孔加入 BMSCs 细胞悬液和 1mL 含 10% 小牛血清的新鲜 RPMI1640 培养液, 在 37°C 恒温培养箱中培养 6、24、72 和 168h. 然后, 取出陶瓷片并用 PBS 漂洗, 10% 福尔马林溶液固定细胞, 梯度乙醇脱水 and 梯度六甲基二硅烷 - 乙醇溶液干燥, 最后对陶瓷表面喷金并作 SEM 观察.

3 实验结果

3.1 SBF 浸泡前后陶瓷化学组成和形貌

3.1.1 陶瓷的表面化学组成

图 1 为陶瓷片在 SBF 中浸泡前后的 XRD 分析结果. 浸泡前, $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷的 X 射线衍射峰尖锐, 不存在其他物质的衍射峰 (图 1(a)), 说明该陶瓷纯度高、结晶性好. 在 SBF 中

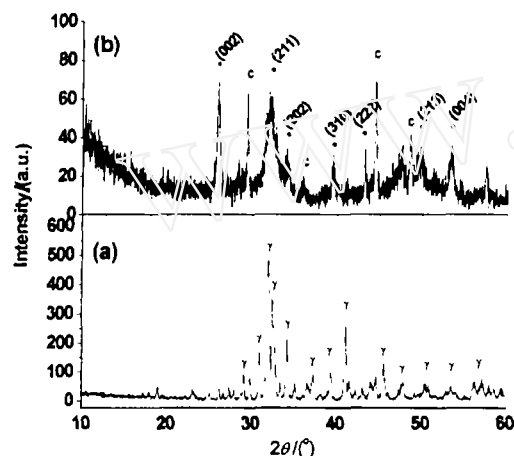


图 1 $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷浸泡前 (a) 和在 SBF 中浸泡 72h 后 (b) 的 X 射线衍射图谱

Fig. 1 XRD patterns of the ceramic sintered at 1450°C for 3h (a) and followed by immersing in SBF for 72h (b)

γ : $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$; *: CHA; c: CaCO_3

浸泡 72h 后 (见图 1(b)), XRD 图谱中衍射峰弥散展宽, 在 25.92° 、 31.98° 、 34.22° 、 39.46° 和 $53.32^\circ/2\theta$ 等位置出现新衍射峰的晶面间距 d 值与标准图谱中的磷灰石 (PDF # 84-1998) 吻合; 在 $2\theta=29.60^\circ$ 、 35.98° 、 43.36° 和 48.68° 可以看到 CaCO_3 的衍射峰 (PDF # 24-0027). 由此表明, $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷表面沉积的是磷灰石和 CaCO_3 的复合物.

图 2 为陶瓷在 SBF 中浸泡前后的红外光谱分析结果. 浸泡前, FTIR 图谱中在 980cm^{-1} 处的最强峰为 Si-O-Si 伸缩振动, 852cm^{-1} 为 Si-O 伸缩振动, 472cm^{-1} 为 Si-O-Si 弯曲振动; 浸泡 72h 后, 在 1030 和 566cm^{-1} 分别出现 $(\text{PO}_4)^{3-}$ 中 P-O 伸缩振动 (ν_3) 和弯曲振动 (ν_4); 在 870 和 $1415\sim 1490\text{cm}^{-1}$ 处出现 $(\text{CO}_3)^{2-}$ 中 C-O 伸缩振动^[11]. 由此说明, 在 $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷表面沉积的是碳酸羟基磷灰石 (CHA).

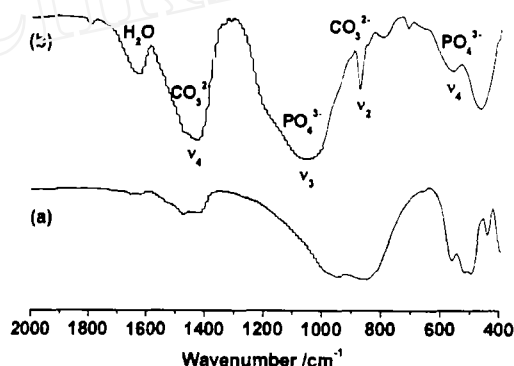


图 2 $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷在 SBF 中浸泡前 (a) 和 72h 浸泡后 (b) 的傅立叶变换红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of the $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ ceramic (a) and followed by immersing in SBF for 72h (b)

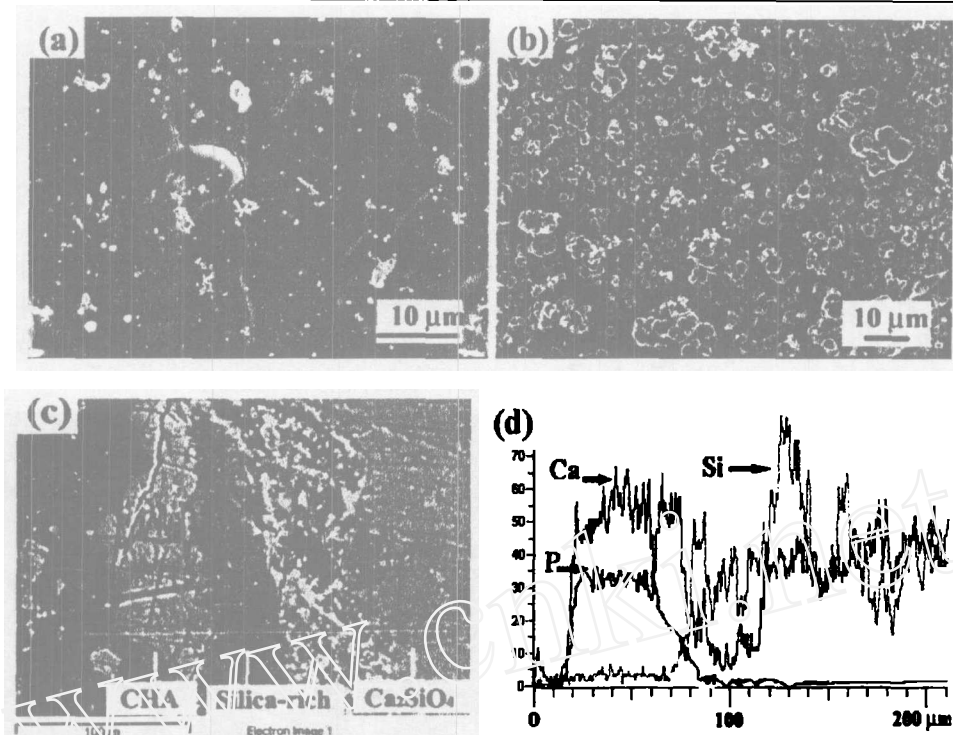


图 3 γ - Ca_2SiO_4 陶瓷表面形貌 (a) 以及在 SBF 中浸泡 72h 后陶瓷表面形貌 (b)、浸泡 240h 后的陶瓷断面形貌 (c) 和断面线扫描能谱图 (d)

Fig. 3 SEM images of the ceramic surface (a, b) and the cross-section (c) together with EDS spectrum (d), before and after immersing in SBF for various periods

(a) Before soaking; (b) After soaking 72h; (c) After soaking 240h; (d) EDS of the cross-section

3.1.2 陶瓷的表面结构

图 3(a) 和 (b) 为陶瓷片在 SBF 溶液中浸泡前后的表面形貌. 浸泡前陶瓷片表面平整致密; 在 SBF 溶液浸泡 72h 后, 陶瓷表面出现球状团聚颗粒层, 由图 1 和 2 证明这是在 SBF 溶液中浸泡陶瓷材料后诱导沉积的类骨 CHA 结晶颗粒.

3.1.3 断面结构和化学组成

图 3(c) 和 (d) 为陶瓷片在 SBF 中浸泡 240h 后断面形貌 SEM 照片和化学成分 EDS 图谱. 从 SEM 照片可以观察到, 陶瓷片断面上存在明显的层状结构. EDS 分析表明, 在各层中 Ca、Si 和 P 三元素存在规律性变化: 由外到内厚度分别达到 8~10 μm 的富 Ca、P 层, 6~8 μm 的富 Si 层和富 Ca、Si 层, 这种断面层状结构进一步证明, γ - Ca_2SiO_4 陶瓷在 SBF 浸泡中能诱导类骨 CHA 在其表面沉积.

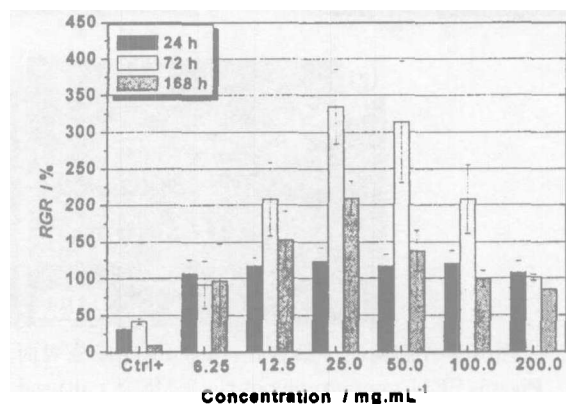


图 4 L929 成纤维细胞在 6.25~200.00mg·mL⁻¹ 浓度浸提液中培养 24、72 和 168h 后相对增殖情况 (细胞毒性级: 1 级)

Fig. 4 Relative growth rate (RGR) of L929 cells after incubation, for 24, 72, and 168h in the extract with the concentrations of 6.25~200.00mg·mL⁻¹ (Cytotoxicity type: Class 1)

3.2 生物相容性

3.2.1 细胞相对增殖率 (RGR)

Ca_2SiO_4 粉体浸提液对细胞增殖影响见图 4 所示. 细胞在不同浓度浸提液中培养 24~168h 的相对增殖率差异明显. 在 12.5~100.0mg/mL 浓度水平比阴性对照组有明显增殖, 在浸提原液 (200mg/mL) 中, RGR 仍然 >85%, 即细胞毒性级 ≤ 1 , 表明该材料生物无细胞毒性.

3.2.2 BMSCs 贴壁

BMSCs 在 $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷表面贴壁生长的形态变化如图 5 所示. BMSCs 在材料表面上培养 6h, 细胞与表面紧密接触并有少量伪足伸展; 培养 24h 后, 细胞已经黏附在材料表面, 并形成单层铺展, 同时大量丝状伪足黏附着材料; 24~168h 后, 细胞的质膜外突起发生伸展牢固黏附在材料表面, 并可见大量细胞分泌物, 细胞具有旺盛的活力.

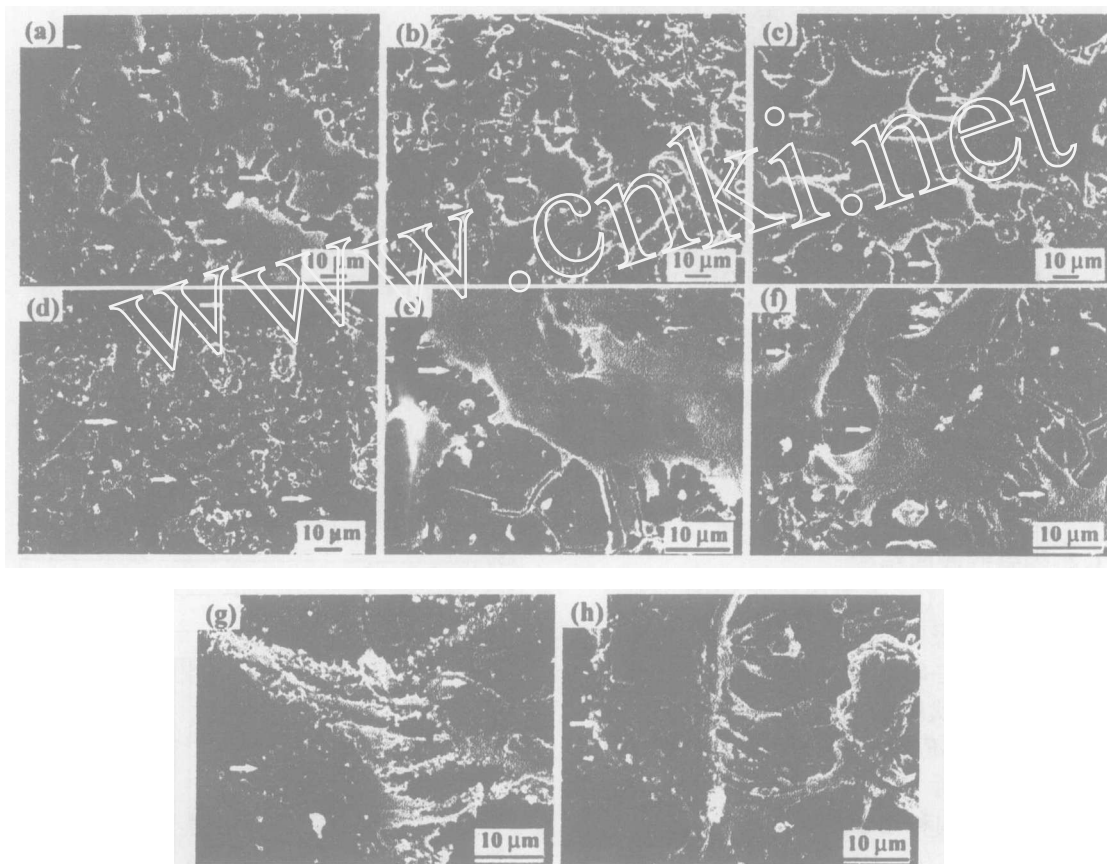


图 5 骨髓间质干细胞在 $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ 陶瓷表面培养 6、24、72 和 168h 后的扫描电镜照片

Fig. 5 SEM micrographs of the BMSCs cultured on $\gamma\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ disks for 6h to 168h after seeding

The arrows show the BMSCs on the surface of the disks. (e), (f), (g) and (h) are the high magnification images of (a), (b), (c) and (d), respectively. (a, e) 6h; (b, f) 24h; (c, g) 72h; (d, h) 168h

4 讨论

一般认为, 类骨 CHA 在人体骨组织 / 生物材料界面间的生长和键合方面起到了至关重要的作用, 并且这种 CHA 层可以在体外人体模拟体液环境下的生物活性材料表面生成; 同时, 采用体外细胞培养实验, 可以帮助筛选有应用潜力的人体组织修复材料. 结合 XRD、

SEM、FTIR 和 EDS 等一系列分析结果表明, γ - Ca_2SiO_4 陶瓷表面类骨 CHA 的形成过程实际上是一个新相生成并不断长大的过程. 此过程主要包含四个阶段: 材料表面溶解、钙磷酸盐 (Ca-P) 晶核形成、CHA 的转变和晶体长大. 基于 Hench^[12] 和 Kokubo^[13] 等对含有 CaO-SiO_2 组元的生物活性材料表面 CHA 形成的分析, 可以类似地分析 γ - Ca_2SiO_4 陶瓷表面 CHA 的形成机理. 与 SBF 溶液接触后, 材料表面首先溶解, Ca^{2+} 和 SiO_4^{4-} 进入溶液; 溶液中 SiO_4^{4-} 不稳定, 发生聚合反应: $2\text{SiO}_4^{4-} + \text{H}_2\text{O} = \text{Si}_2\text{O}_7^{6-} + 2\text{OH}^-$, 形成的二聚体离子富集在材料表面, 在材料表面形成富 Si 的 Si-O 网络凝胶层, 溶液 pH 值升高^[14]; 随着上述反应进行和 Ca^{2+} 持续溶解, 材料表面附近 SBF 中的 Ca^{2+} 、 OH^- 浓度提高, 随后通过静电吸引, Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 HPO_4^{2-} 与固体表面直接作用而被吸附在表面, 沉积成 $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaH}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 等钙磷酸盐^[15], 它们再与溶液中的 HPO_4^{2-} 、 CO_3^{2-} 、 OH^- 相互作用, 钙磷酸盐发生转化形成 CHA 新相核心; 随着浸泡持续进行, CHA 晶核不断长大并形成微米级的结晶颗粒, 进而形成类骨 CHA 层.

γ - Ca_2SiO_4 陶瓷作为一种新研制的生物材料, 评价其应用的安全性是必要的工作. 考虑到 γ - Ca_2SiO_4 陶瓷在细胞培养液中会发生微量溶解, 在本研究中我们按 ISO10993.5 中所推荐的方法进行细胞毒性实验. 结果显示, 该材料的离子释放液对细胞无明显毒性作用, RGR 值均在 85% 以上, 比 1 级和 2 级细胞毒性的临界值 (75%) 高 10% 以上. 不仅如此, 浸提液稀释到 $12.5 \sim 100.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度时, 对细胞增殖有较明显的促进作用, 这说明 γ - Ca_2SiO_4 陶瓷析出的钙、硅离子在适当浓度时有利于细胞增殖, 与文献报道的含钙、硅组元的生物活性玻璃对细胞的作用是一致的^[16~18].

Yoshikawa^[19] 的研究表明, BMSCs 具有很强的成骨潜力, 将 BMSCs 种植在多孔生物活性陶瓷内并植入动物体内, 4 周后即可在多孔陶瓷内形成新骨. 本研究中, 我们通过观察细胞贴附后的形态角度来评价硅酸二钙陶瓷的生物相容性. 从 SEM 照片可见, γ - Ca_2SiO_4 陶瓷支持 BMSCs 贴壁, 细胞在材料表面呈现紧密的贴附状态, 培养 1 天后大量丝状伪足伸展并紧密粘连在陶瓷表面; 随着培养时间延长, 细胞开始分泌基质蛋白. 因此, 体外 SBF 浸泡和细胞相容性实验结果表明, γ - Ca_2SiO_4 陶瓷不仅能诱导类骨 CHA 在其表面沉积, 而且支持细胞贴壁、铺展, 是一种生物活性优良和无细胞毒性的陶瓷材料, 在人体骨组织修复方面具有良好的应用前景.

5 结论

模拟体液浸泡、材料浸提液细胞培养和骨髓间质干细胞贴壁实验表明, γ - Ca_2SiO_4 陶瓷能诱导类骨碳酸羟基磷灰石沉积和支持骨髓间质干细胞贴壁、黏附和铺展, 并且从材料中释放的钙、硅离子在适当浓度时对细胞增殖有良好的促进作用. 因此, γ - Ca_2SiO_4 陶瓷有良好的生物活性和无细胞毒性, 有可能成为一种性能优良的人体骨组织修复生物活性陶瓷材料.

参考文献

- [1] Sasaki K, Ishida H, Okada Y, et al. *J. Am. Ceram. Soc.*, 1997, **80**: 2959-2964.
- [2] Rodríguez, Rodríguez J L, De Aza M A, et al. *J. Euro. Ceram. Soc.*, 2001, **21**: 343-348.
- [3] Vogan J W, Hsu L, Stetson A R. *Thin Solid Films*, 1981, **84**: 75-87.
- [4] Jansen F, Wei X H, Dorfman M R, et al. *Surface and Coating Techn.*, 2002, **149**: 57-61.
- [5] Gou Z, Chang J. *J. Euro. Ceram. Soc.*, 2004, **24**: 93-99.
- [6] Gou Z, Chang J, Zhai W. *J. Euro. Ceram. Soc.*, (Available online; doi:10.1016).
- [7] Kokubo T, Kushitani H, Saka S, et al. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990, **24**: 721-734.

- [8] ISO/EN 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5 Tests for cytotoxicity, *invitro* methods: 8.2 tests on extract.
- [9] Zhang C X, Sun J, Meng A Y. *Chung Hua Kou Chiang Hsueh Tsa Chih*, 1990, **25**: 216-218.
- [10] Ringe J, Kaps C, Schmitt B, *et al.* *Cell Tissue Res.*, 2002, **307**: 321-327.
- [11] Koutsopoulos S. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **62**: 600-612.
- [12] Hench L L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.*, 1998, **7**: 1705-1728.
- [13] Kokubo T. *J. Non-Cryst. Solids*, 1990, **120**: 138-151.
- [14] Brenauer S, Kantro DL, Copeland L E. *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, **80**: 761-765.
- [15] Dorozhkin S V, Epple M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**: 3130-3146.
- [16] Xynos I D, Edgar A J, Buttery E L K, *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **276**: 461-465.
- [17] Ian A. Silver, Deas J, Erecińska M. *Biomaterials*, 2001, **22**: 175-185.
- [18] Patricia V, Marivalda M. Pereira, Alfredo M. Goes, *et al.* *Biomaterials*, 2004, **25**: 2941-2948.
- [19] Yoshikawa T, Noshi T, Mitsuno H, *et al.* *Mater. Sci. Eng, C.*, 2001, **17**: 19-26.

Study on *in vitro* Bioactivity and Cytotoxicity of γ -Ca₂SiO₄ Ceramic

GOU Zhong-Ru, CHANG Jiang, ZHAI Wan-Yin, LIN Kai-Li, ZENG Yi

(Biomaterials and Tissue Engineering Research Center, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: In this study, the *in vitro* bioactivity and cytotoxicity of gamma-dicalcium silicate (γ -Ca₂SiO₄) ceramic were evaluated systematically. The surface physicochemical changes of the ceramic soaked in a simulated physiological fluid (Kokubo's SBF) for various periods were determined by means of XRD, FT-IR, SEM and EDS analysis. The results indicated that the ceramic surface transformed to a carbonated hydroxyapatite (CHA) within 72h and a silica-rich layer occurred between the CHA layer and ceramic matrix after 240h. In addition, the ionic products of the material dissolution had no cytotoxicity to fibroblasts compared with the negative control. This ceramic supported the bone mesenchymal stem cells (BMSCs) adhesion and spreading, and the BMSCs established close contacts with the ceramics after 24h of culture. This combination of properties indicates that the novel γ -Ca₂SiO₄ ceramic might be suitable for potential application in the biomedical field, preferentially as materials for bone repair.

Key words γ -dicalcium silicate; *in vitro* bioactivity; carbonated apatite; cytotoxicity; bioactive ceramics