

DAI Guoliang, LAN Ding, CHEN Jialu. Effect of substrate and flow rate on hydroxyapatite growth (in Chinese). *Chin. J. Space Sci.*, 2018, 38(4): 539-545. DOI:10.11728/cjss2018.04.539

基板和流速对羟基磷灰石生长的影响^{*}

戴国亮 蓝鼎 陈珈璐

(中国科学院力学研究所 微重力重点实验室 北京 100190)

摘要 通过共混制备聚二甲基硅氧烷 (PDMS)/羟基磷灰石 (HAP) 和 PDMS/生物玻璃复合材料作为生长基板, 研究了静止条件下不同基板上 HAP 的生长. 设计了一套流速加载装置, 观察模拟体液流速对生物玻璃基板上 HAP 晶体生长的影响. 研究发现在静止条件下, HAP 晶体在 PDMS 复合材料上比在生物玻璃上生长更快, 尺寸更大; 随着流速的增加, HAP 晶体尺寸更大而且无定形沉淀数量减少.

关键词 羟基磷灰石, 模拟体液, 流速, 基板

中图分类号 V 254

Effect of Substrate and Flow Rate on Hydroxyapatite Growth

DAI Guoliang LAN Ding CHEN Jialu

(Key Laboratory of Microgravity, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

Abstract Hydroxyapatite (HAP) has excellent biocompatibility and bioactivity. Synthetic HAP can be widely used as medical and eco-friendly materials. In order to know valuable information of study and development of bone tissue engineering, the influence on HAP crystals growth by the changed of fluid field and the chosen of substrates are studied. The composites materials are used as substrates, which are made of Polydimethylsiloxane (PDMS)/HAP, PDMS/bioglass, and pure bioglass, respectively, and the effect of different substrates on HAP growth are analyzed. The results show that HAP crystals growth rates are different on different substrates when the flow rate is zero. HAP crystals growth rate is highest on PDMS/HAP substrate. However, it is lowest on pure bioglass substrate. Moreover, the influence of different flow rates of HAP growth solution (Simulated Body Fluid, SBF) by a homemade flow rate adjustment apparatus is studied. Three different flow rates, 10 ml/min, 15 ml/min, and 30 ml/min, are used in this study. Under SBF flow conditions, the sizes of HAP crystals increased and the amount of amorphous precipitate decreased.

Key words Hydroxyapatite, Simulated body fluid, Flow rate, Substrate

* 国家重点基础研究发展计划项目资助 (2011CB710901)

2017-08-22 收到原稿, 2018-01-24 收到修定稿

E-mail: dspr@imech.ac.cn

0 引言

骨是一种特殊的复合材料,人骨的主要成分是羟基磷灰石 (Hydroxyapatite, HAP). 在人体内,骨骼矿化是在成骨细胞等细胞及生物大分子的参与和调控下完成的^[1,2]. HAP 与高分子复合而成的生物材料是一种具有良好生物相容性的生物活性材料^[3-6]. 人体骨组织中的腔隙结构构成纵横交错的三维网络^[7], 这些腔隙中充满了组织液. 由于外部环境的变化,组织液在人体内的流动会发生改变,这种改变产生的剪切力在骨的生长和发育中起着重要作用^[8]. 从晶体学角度考虑,在人骨中,腔隙中组织液的流动改变对骨的生长和发育起着重要作用,其原因是流动产生的剪切力影响了 HAP 的晶体形貌和生长速度^[9-13].

HAP 生长溶液即模拟体液 (Simulated Body Fluid, SBF) 流速变化对 HAP 晶体生长影响的研究不断深入. Duan 等^[14] 将多孔磷酸钙陶瓷 (HAP/TCP 质量比为 70/30) 作为 HAP 生长基板进行实验,结果表明流速影响 HAP 成核所需离子的过饱和度,从而影响 HAP 晶体生长过程. Deng 等^[15] 使用高比表面积的陶瓷生长 HAP,结果表明 SBF 流速变化与最终产生的晶体或细小沉淀物有直接联系. 已有研究表明 SBF 流速变化与最终生长的 HAP 晶体或沉淀物有直接联系. 但这些研究采用的基板均为多孔材料, SBF 流速变化与孔内离子浓度变化存在非线性关系. 而生物相容性材料植入人体后,体液流动产生的剪切作用直接作用于材料表面. 因此,需要进一步研究非多孔生物相容性材料表面生长 HAP 时,流动产生的剪切作用对 HAP 生长的影响.

这里采用三种平板状 HAP 生长基板开展 SBF 剪切流动对 HAP 生长与形貌影响研究. 三种基板分别为生物玻璃、混合 HAP 纳米颗粒的聚二甲基硅氧烷 PDMS (PDMS/HAP) 以及 PDMS 与生物玻璃的复合材料 (PDMS/Bio). 首先开展不同基板上静止生长 HAP 晶体的研究,然后进一步分析 SBF 不同流动速率条件下以生物玻璃为基板生长 HAP 时不同流速产生的影响.

1 实验

1.1 试剂

配制 SBF 所需试剂如下. 乙酸 (CH_3COOH)、

氢氧化钠 (NaOH)、氯化钠 (NaCl)、碳酸氢钠 (NaHCO_3)、氯化钾 (KCl)、三水磷酸氢二钾 ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、六水氯化镁 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化钙 (CaCl_2)、硫酸钠 (Na_2SO_4)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 及 pH 缓冲剂. 上述试剂均为分析纯. 实验使用的水为去离子水.

基板材料如下: 生物玻璃 (型号 45S5, 上海华侨科技有限公司产); PDMS (北京同乐泰化工产品有限公司产); 纳米 HAP (武汉理工大学生物医学材料与工程研究中心产, 粒径 50~100 nm).

1.2 仪器与设备

场发射扫描电子显微镜 (SEM) 为日本 HITACHI 公司 S-4300 型. X-射线粉末衍射仪 (XRD) 为德国 Bruker-AXS 公司 D8 Advance 型. SBF 流速加载装置为自制设备, 如图 1 所示.

1.3 实验方法

1.3.1 基板制备

PDMS/HAP 基板的制备如下. 按照一定质量比称量好 PDMS 和 HAP, HAP 的含量为 30% (重量百分比). 将两种材料在玛瑙研钵中研磨使其混合均匀, 然后压片得到混混较好的 PDMS/HAP 复合材料. 利用同样方法可以制得 PDMS/生物玻璃复合材料. 最后剪成小片状以露出 HAP 生长所需成核位点. HAP/Bio 基板制备方法与 PDMS/HAP 基板制备方法相同, 其中生物玻璃的含量为 30% (重量百分比).

1.3.2 HAP 的生长

(1) 静止条件下

HAP 的生长在 SBF 中进行. 根据文献 [16] 中的方法配制 SBF. 为保证 HAP 的生长, 实验中配制了 1.5 倍浓度的 SBF 溶液. 将配制好的 SBF 恒温在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$. 用 Tris 和 1.0M-HCl 调节模拟体液的 pH 值在 7.40 ± 0.05 内, 再把 1 cm^2 左右的生长基板浸入其中. 将在 SBF 中生长不同天数后的基板取出, 用去离子水清洗两遍, 自然干燥后供进一步实验观察.

(2) 流动条件下

流动条件下 HAP 的生长在自制 SBF 流动加载装置中完成. 流动加载装置主要包括多通道蠕动泵、流动样品池、恒温水浴槽、控温磁力搅拌系统、储液等, 其组成示意及实物分别如图 1(a) (b) 所示.

HAP 生长样品池是由光学玻璃制成的矩形容器, 实物见图 1(c). 样品池长为 30.0 mm, 宽为 10 mm,

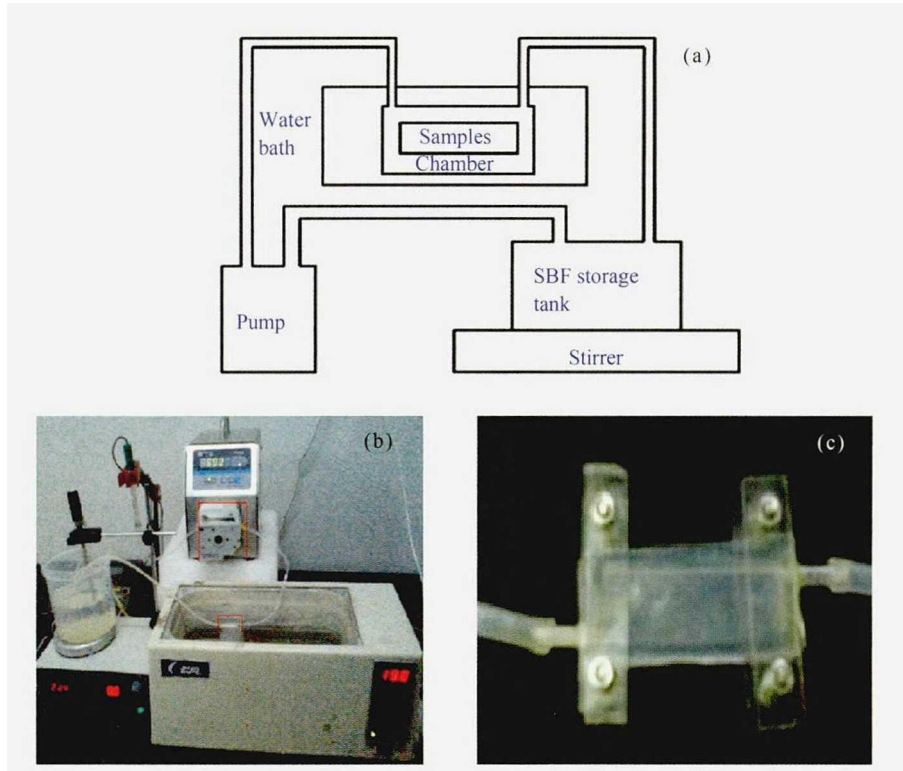


图 1 SBF 流速加载装置 (a) 及实物 (b) 与生长 HAP 的流动样品池 (c)

Fig. 1 Schematic diagram (a) and photo (b) of SBF flow apparatus, (c) HAP growth cell

高为 5.0 mm, 孔径为 2.0 mm.

流动条件下 HAP 生长实验使用的基板是生物玻璃, 将其放入流动加载装置样品池中. 实验采用的流速分别为 10, 15, 30 mL·min⁻¹. 分别取 HAP 生长 1, 3, 5 天的基板并用扫描电镜进行观察.

1.3.3 扫描电镜 (SEM) 图像分析

用扫描电镜 (SEM) 观察不同条件下生长出的 HAP 生长形貌. SEM 图片通过 Image J 和 Nano-Measurer 软件处理, 可以大致测出 HAP 晶体构成的多孔表面的孔面积及周长. 根据构成孔的边的数目, 可以求出各边长度尺寸. 由于单个孔误差较大, 所以对较大观测区域中较多数目的孔进行统计以减少误差. 对测量数据进行分析比较, 研究不同实验条件对 HAP 生长的影响.

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

图 2 是在两种基板 (PDMS/HAP 和 PDMS/Bio) 上静止生长的 HAP 样品 XRD 谱图与 HAP

标准 XRD 谱图的对比. 从图 2 可以看出, 在两种基板上生长的 HAP 主要衍射峰 33.1° (300) 面、32.3° (211) 面、26.2° (002) 面、47.2° (222) 面等与 HAP 标准图谱 (JCPDS #9-432) 基本一致, 并未发现其他物质的衍射峰, 这表明本实验中在两种基板上生长出的是 HAP 晶体.

2.2 静止条件下不同基板上 HAP 的生长

通过实验发现, 采用本方法在静止条件下生长 HAP 时, 5 天后 HAP 晶体基本停止生长. 1 天、3 天和 5 天后三种基板上生长出的 HAP 形貌如图 3 所示. 由图 3 可以看出, 基板上覆盖了 HAP 球形团簇晶体, 其由众多纳米量级的 HAP 晶体构成. 多个 HAP 球形团簇晶体间基本处于互不相连的状态. 生长 1 天后, PDMS/HAP 基板上的 HAP 生长速度明显快于纯生物玻璃基板上的. HAP 在 PDMS/Bio 和 PDMS/HAP 两种基板上第一天的生长程度分别达到纯生物玻璃基板上生长 3 天和 5 天的程度. 生长 3 天、5 天后 PDMS/HAP 基板上生长的 HAP 比 PDMS/Bio 基板上的 HAP 更为粗壮. 为进一步定量分析, 用 Image J 软件处理 HAP 生长第三天的

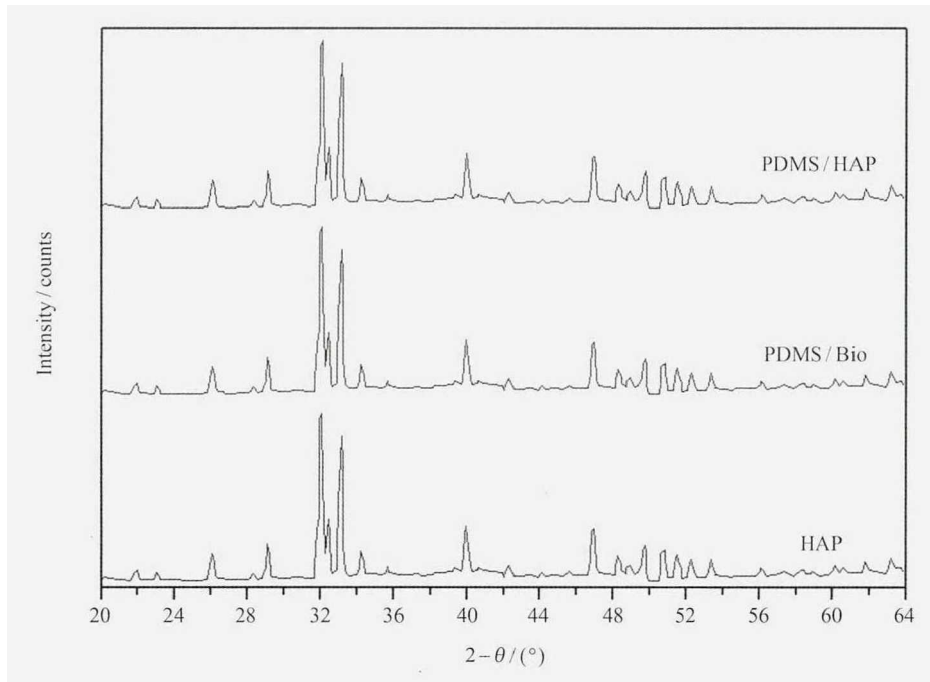


图2 两种基板上生长的 HAP 晶体 XRD 谱图与 HAP 标准 XRD 谱图的对比

Fig.2 XRD spectra of HAP grown on two different substrates and HAP standard XRD spectra

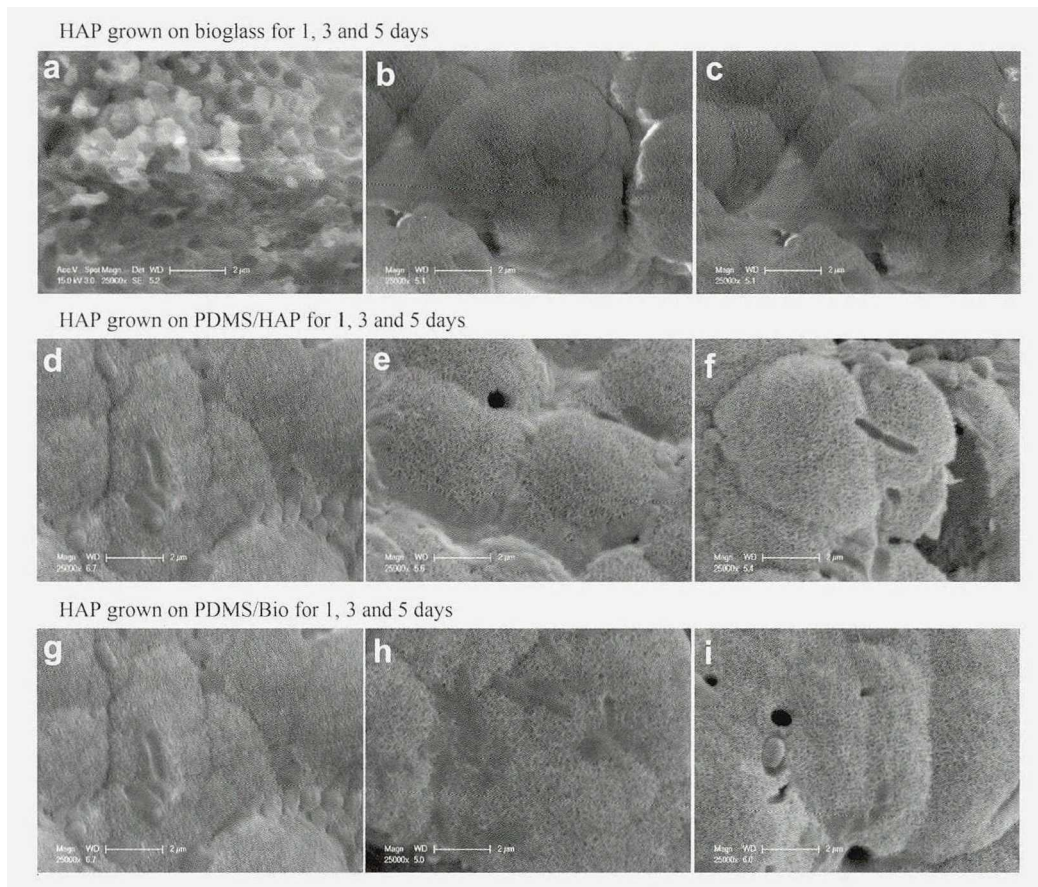


图3 静止条件下不同基板上 HAP 生长不同天数的 SEM 结果

Fig.3 SEM images of HAP under static SBF solution

扫描电镜观察结果(见图 3b, e, h), 结果如图 4 所示. 由图 4 可以看出, 生长 3 天后, PDMS/HAP 基板上生长的 100~200nm HAP 晶体数目比例(约 38%)明显高于纯生物玻璃基板(约 8%), 但与 PDMS/Bio 基板(约 36%)基本相同. 这是由于在离子浓度高于过饱和度的情况下, 复合材料上的 HAP 成核位点比纯生物基板少, 离子浓度得到更快补充, 因此生长速度比纯生物玻璃基板块, 相同时间内长出的 HAP 晶体尺寸更大. 而复合材料之间的生长速度差异在于不同的复合材料上露出的 HAP 颗粒成核位点的数目不同, 更多的成核位点数目更有利于 HAP 的成核, 且随着天数增加, 趋向生成板状.

2.3 不同流速下 HAP 的生长

由于采用 PDMS/HAP 和 PDMS/Bio 两种基板生长 HAP 时, HAP 生长速度过快, 得到的 HAP 晶体尺寸较大, 为更清晰反映 SBF 剪切作用的影响, 选择纯生物玻璃作为不同流速条件下生长 HAP 的基板. 实验中选择的 SBF 流速分别为 10, 15, 30 mL·min⁻¹, 在生长不同天数后取出 HAP, 通过 SEM 对其形貌进行观察分析, 结果如图 5 所示. 静止条件下 HAP 晶体在生物玻璃基板上生长不同天数的结果如图 3(a)~(c) 所示.

生长时间为 1 天时, 随着流速增加, 附着在生物玻璃上的小球形团簇状晶体数目逐渐减少. 生长 3 天后, 三种流速条件下 HAP 球形团簇状晶体均变大.

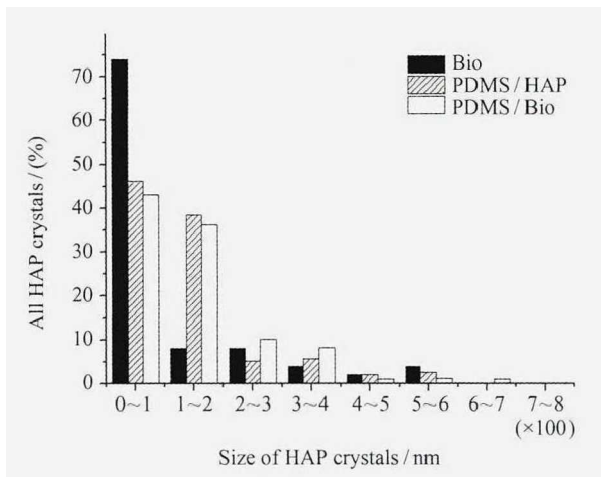


图 4 静止条件下三种基板上生长 3 天的 HAP 晶体尺寸统计

Fig. 4 Sizes of HAP crystals grown on different substrates for 3 days

除了由 HAP 晶体构成的孔外, 还有另外一种较大的孔存在. 此外, 还可明显看到在球形团簇状晶体上附着一层无定形的磷酸钙沉淀物, 并且随着流速增加, 沉积量逐渐减少. 无定形沉淀的出现表明, 在局部区域 Ca²⁺ 和 PO₄³⁻ 的浓度过高. 因为从热力学角度看, 过饱和度太大时, 无定形沉淀较结晶更容易发生. 因此出现无定形沉淀表明在出现的区域过饱和度太大. 这种情况的发生与流速有关系. SBF 流动增加时, 能更快将 HAP 晶体周围耗散层的厚度减小, 使 HAP 晶体周围始终保持足够高的离子浓度.

在静止条件下, 5 天时出现很多无定形沉淀, 而有流动时, 5 天时出现的无定形沉淀少了很多. 可能的原因是, HAP 晶体生长到一定程度后不再生长, 后续的离子以原来出现的 HAP 晶体作为新的成核中心. 由于 HAP 晶体数目太多, 即成核中心太多, 且成核中心彼此距离很近, 离子附着在成核中心后, 相互间的作用力导致出现聚集体, 即无定形沉淀. 而 SBF 流动时, 晶体的生长速率随着流速增加而降低, 即使在 5 天时 HAP 晶体仍然未到停止生长的程度, 于是后续的离子在吸附到晶体上后继续生长, 而不是出现聚集形成无定形沉淀.

为了获得更定性的结果, 用 Image J 软件对不同 SBF 流速下生长 3 天和 5 天的 HAPSEM 图进行统计分析, 结果如图 6 所示. HAP 长度大部分在 100 nm 以内, 100~200nm 也占有一定比例, 更大尺寸范围内的 HAP 晶体很少. 从图 6 中 3 天与 5 天的对比可以看出, HAP 尺寸随着时间的增加也相应有所增加, 即 100~200nm 的比例有所增加. 值得注意的是, 当流速达到 30 mL·min⁻¹ 时, 无 600~800 nm 范围内的 HAP. 由此推断该尺寸区域内出现的 HAP 并非 HAP 晶体, 而是其无定形沉淀. 当 SBF 流速达到 30 mL·min⁻¹ 时, 无定形沉淀被 SBF 冲刷离开 HAP 晶体表面, 因此无 600~800 nm 大小的 HAP 晶体.

3 结论

(1) 通过模拟体液中不同基板上静止生长的 HAP 晶体实验可以得出, 三种基板上相同生长时间下生长出的 HAP 晶体尺寸大小顺序为: PDM-S/HAP > PDMS/Bio > 纯生物玻璃.

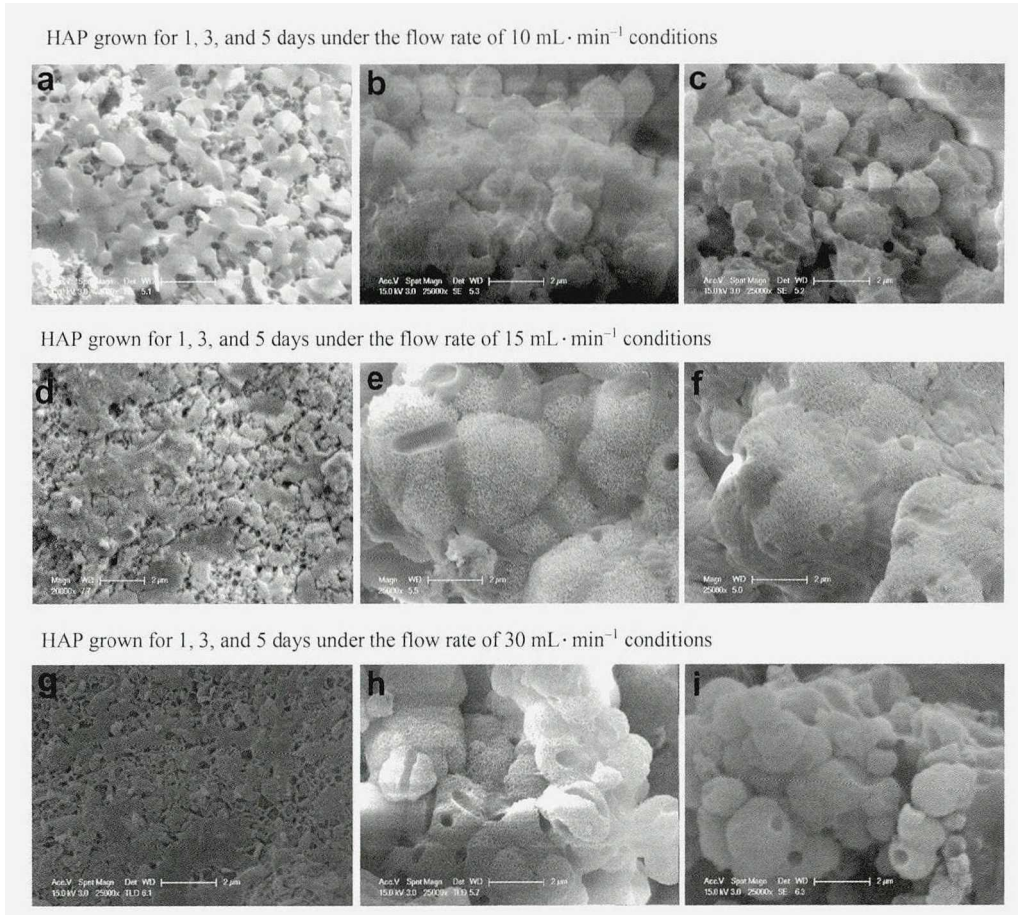


图 5 不同流速条件下生物玻璃上 HAP 生长的 SEM 结果

Fig. 5 SEM images of HAP grown on bioglass under different flow rates conditions

(2) 在 SBF 流动条件下, 以生物玻璃为基板生长 HAP, 在 HAP 生长的初始阶段, 随着流速的增加, 附着在生物玻璃上的球状颗粒逐渐减小, 但随着生长时间的增加, 相同天数的 HAP 晶体比静止条件生长出的 HAP 晶体更大, 并且随着流速的增加, HAP 上无定形沉淀的数量逐渐减少。

参考文献

- [1] STAYTON P S, DROBNY G P, SHAW W J, *et al.* Molecular recognition at the protein- hydroxyapatite interface [J]. *Crit. Rev. Oral Biol. M.*, 2003, **14**(5): 370-376
- [2] MANN S. *Biomaterialization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry* [M]. London: Oxford University Press, 2001, 6-23
- [3] MANN S, OZIN G A. Synthesis of inorganic materials with complex form [J]. *Nature*, 1996, **382**(6859): 313-318
- [4] HEYWOOD B R, MANN S. Crystal recognition at inorganic-organic interfaces: nucleation and growth of oriented BaSO₄ under compressed Langmuir monolayers [J]. *Adv. Mater.*, 1992, **4**(4): 278-282
- [5] MATSUMOTO T, OKAZAKI M, INOUE M, *et al.* Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid [J]. *Biomaterials*, 2002, **23**(10): 2241-2247
- [6] LU H B, MA C L, CUI H, *et al.* Controlled crystallization of calcium phosphate under stearic acid monolayers [J]. *J. Cryst. Growth*, 1995, **155**(1-2): 120-125
- [7] REN Wei, CAO Xianying, FENG Lingyun, *et al.* Methods of synthetic nanometer hydroxyapatite and modification of its surface [J]. *J. Chin. Ceramic Soc.*, 2001, **1**: 38-43 (任卫, 曹献英, 冯凌云, 等. 纳米羟基磷灰石合成及表面改性的途径与方法 [J]. *硅酸盐通报*, 2001, **1**: 38-43)
- [8] REICH K M, GAY C V, FRANGOS J A. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production [J]. *J Cell Physiol*, 1990, **143**(1): 100-104
- [9] BAKKER A D, SOEJIMAL K, KLEIN-NULEND J, *et al.* The production of nitric oxide and prostaglandin E₂ by primary bone cells is shear stress dependent [J]. *J. Biomech*, 2001, **34**, 671-677
- [10] MULLENDER M, EL HAJ A J, YANG Y, *et al.* Mechanotransduction of bone cells in fluid shear stress rate dependent [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

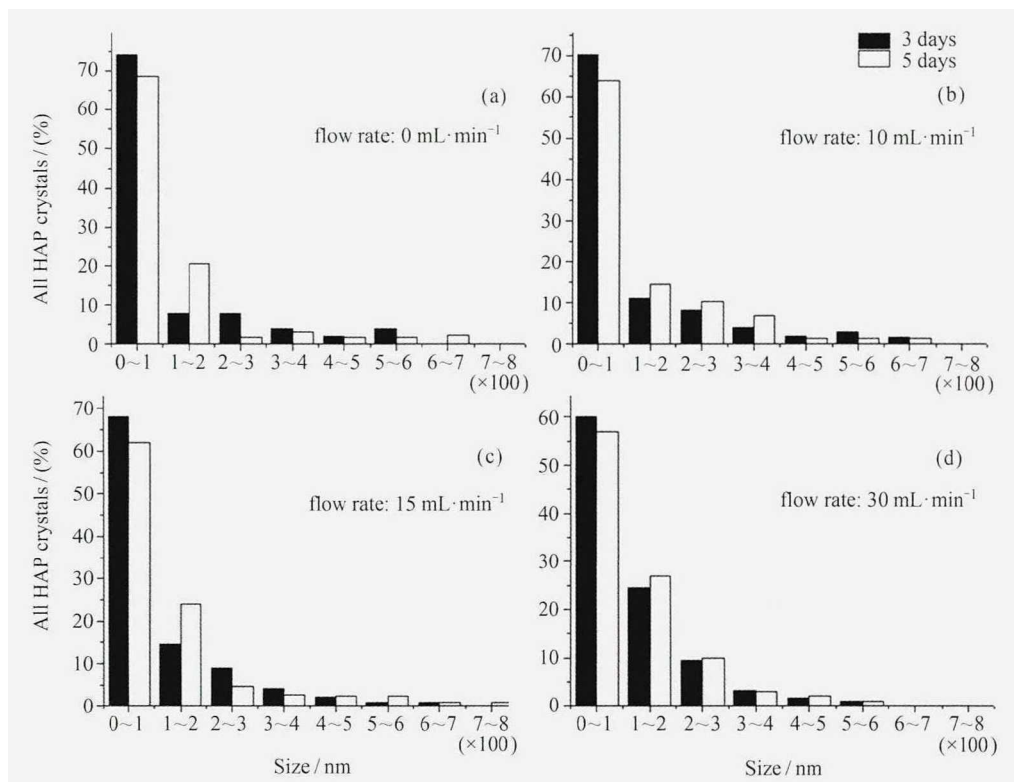


图 6 不同流速下生物玻璃基板上生长的 HAP 尺寸统计结果

Fig. 6 Statistical results of HAP grown on bioglass substrate under different flow rates

2004, **315**(4): 823-829

- [11] CHEN N X, RYDER K D, PAVALKO F M, *et al.* Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts [J]. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2000, **278**(5): C989- 997
- [12] HUO B, KANG YY, HU M, *et al.* Advances of mechanical stimulation induced calcium response and transfer in osteoblasts [J]. *J. Med. Biomech.*, 2011, **26**(4): 382-388.
- [13] BARAKAT A I, BARAKAT D K, GOJOVA A. secrets of the code: Do vascular endothelial cells use ion channels to decipher complex flow signal [J]. *Biomaterials*, 2006,

27(5): 671-678

- [14] DUAN Y R, ZHANG Z R, WANG C Y, *et al.* Dynamic study of calcium phosphate formation on porous HA/TCP ceramics [J]. *J. Mater. Sci-Mater. M.*, 2005, **16**, 795-801
- [15] DENG Chunlin, CHEN Jiyong, FAN Hongsong, *et al.* Influence of Dynamic Flow Speed on Bonelike Apatite Formation in Porous Calcium Phosphate Ceramic in RS-BF [J]. *Key Eng. Mat.* 2005, **288-289**; 273-276
- [16] OYANE A, KIM H M, FURUYA T, *et al.* Preparation and assessment of revised simulated body fluids [J]. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2002, **65A**(2): 188-195