

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5461. 2014.03.018

高温烧结羟基磷灰石靶的细胞相容性

罗乐¹, 赵读亮¹, 蒋大鹏¹,
严中亚², 程光存², 方晓东³

(1 合肥工业大学电子科学与应用物理学院, 安徽 合肥 230009;

2 安徽省立医院胸心外科, 安徽 合肥 230001;

3 中国科学院安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要: 为研究高温烧结羟基磷灰石靶的细胞相容性, 把纯度为 99% 的羟基磷灰石粉末压制成圆盘形靶, 在氩气中于 800°C 高温下烧结成型。用 X 射线衍射仪和 X 射线光电子能谱仪对羟基磷灰石靶的结构组成进行检测。用四氮唑盐比色法对羟基磷灰石靶的细胞相容性进行检测, 检测结果表明: 纯度为 99% 的羟基磷灰石粉末在压制成型和 800°C 高温烧结的过程中化学组成没有发生变化, 羟基磷灰石靶中的平均粒径为 78.2 nm, 结晶度为 89.4%, Ca/P 比值为 1.592; 具有很好的细胞相容性。

关键词: 材料; 羟基磷灰石靶; 高温烧结; 钙磷比; 细胞相容性

中图分类号: O433; TB39 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-5461(2014)03-0368-04

Cellular compatibility of hydroxyapatite target sintered at high temperature

LUO Le¹, ZHAO Du-liang¹, JIANG Da-peng¹,
YAN Zhong-ya², CHENG Guang-cun², FANG Xiao-dong³

(1 School of Electronics and Applied Physics, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2 Department of Cardiac Surgery, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China;

3 Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: In order to investigate cellular compatibility of hydroxyapatite(HA) target sintered at high temperature, the powder of 99% pure hydroxyapatite was pressed to discal targets and the targets were sintered at 800°C in argon ambience. The microstructure and composition of targets were detected with X-ray diffractometer(XRD) and X-ray photoelectron spectroscopy(XPS). The cellular compatibility of targets was detected with methyl thiazolyl tetrazolium(MTT). The experimental result demonstrates the chemical composition of targets was not changed while the powder of hydroxyapatite was pressed to targets and the targets were sintered at 800°C in argon ambience. The average particle diameter in target was 78.2 nm, the crystallinity in target was 89.4% and the ratio of Ca to P in target was 1.592. The hydroxyapatite target sintered at 800°C had cellular compatibility.

基金项目: 安徽省自然科学基金 (1308085MF104)

作者简介: 罗乐 (1963-), 安徽淮南人, 博士, 副教授, 主要从事激光技术与生物功能薄膜材料的研究。

E-mail: luoleh@fut.edu.cn

收稿日期: 2013-12-18; **修改日期:** 2014-02-20

Key words: materials; hydroxyapatite target; sintering at high temperature; ratio of Ca to P; cellular compatibility

1 引言

羟基磷灰石的化学组成与人体骨骼、牙齿中的磷酸钙无机物非常相似，含有能通过人体正常新陈代谢进行转换的Ca元素和P元素，以及能与生物组织发生键性结合的羟基(-OH)，植入人体后它所含有的多种离子可以和体液中的离子发生交换，形成一层新的生物磷灰石层，从而和组织形成牢固的键性结合^[1,2]。羟基磷灰石不会诱导细胞突变，不会引起炎性反应，不会引起异物或巨噬细胞反应，无抗原性和刺激性。多种细胞可以在它表面正常增殖发育，纤维组织也可以在它表面长期生长而不产生钙化^[3,4]。因此被用于制作各种人造器官或被沉积在材料表面以提高细胞相容性。脉冲激光沉积法制备羟基磷灰石薄膜是用脉冲激光溅射羟基磷灰石靶形成等离子体羽辉，当等离子体羽辉遇到衬底时在衬底表面形成薄膜。羟基磷灰石靶的细胞相容性将直接影响到功能薄膜的细胞相容性^[5~7]。因此研究高温烧结羟基磷灰石靶的细胞相容性，对脉冲激光沉积羟基磷灰石薄膜的研究与应用具有重要意义。

2 实验方法

把纯度为99%、颗粒尺寸为纳米量级的羟基磷灰石粉末压制为直径19.0 mm、高5.0 mm的圆盘形靶，压制时的压强为25 MPa。然后把羟基磷灰石靶放入高温管式炉(SK2-2-12)中烧结，烧结时经过2 h把温度升高到800°C；保持800°C恒温20 h；通过5 h把温度从800°C降到室温。在烧结过程中通入氩气作为保护气体，氩气流量为600 ml/min。

用D/MAX2500V型X-射线衍射仪(日本理学制造)和ESCALAB250型X射线光电子能谱仪(XPS)(美国Thermo-VG Scientific Company制造)对样品进行检测。

用四氮唑盐比色(MTT)法测定羟基磷灰石靶的细胞相容性：把96孔培养板分成两组：常温浸提液组、高温浸提液组，并设置阳性对照组和阴性对照组。常温浸提液制备方法：将灭菌羟基磷灰石靶0.2 g加入1.0 ml生理盐水中，在37°C下惰性容器中浸提5天。高温浸提液制备：将灭菌备用的羟基磷灰石靶0.2 g加入1.0 ml生理盐水中，置入耐高温惰性玻璃容器中在121°C下浸提0.5 h。按ISO要求用高密度聚乙烯膜片作为材料的阴性对照组，其大小与96孔培养板的孔底大小一致，灭菌备用。用苯酚作为材料的阳性对照组，浓度为64 g/L，过滤除菌备用。用细胞培养基配制 $1 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 浓度的HUVEC细胞，分注于96孔培养板内，每孔200 μl，每组每观察期8孔，置含5%(V/V)CO₂、37°C的恒温培养箱内，培养24 h使细胞贴壁。24 h后弃去原培养基，常温浸提液组加常温浸提液和培养基各100 μl；高温浸提液组加高温浸提液和培养基各100 μl。阳性对照组加浓度为64 g/L的苯酚和培养基各100 μl；阴性对照组加灭菌备用的高密度聚乙烯膜片后加生理盐水和培养基各100 μl。置含5%(V/V)CO₂、37°C的恒温培养箱内培养72 h。在培养板孔内的浸提液和培养液里，加入20 μl/孔的MTT液，继续培养6 h，吸去原液，加入200 μl/孔的二甲基亚砜。震荡10 min，在酶标仪上以570 nm波长测定吸光度值(OD值)。

3 实验结果与分析

用X-射线衍射仪对800°C高温烧结的羟基磷灰石靶进行检测的结果如图1所示。把图1和羟基磷灰石XRD的标准图谱相比没有明显差异，表明羟基磷灰石粉末经过压制成型和800°C高温烧结后其组成成分仍然是羟基磷灰石，没有发生明显的分解反应。根据“结晶度=测量样峰强之和/标准样峰强之和”，用MDI jade6软件计算出羟基磷灰石靶的平均粒径为78.2 nm；结晶度为89.4%。

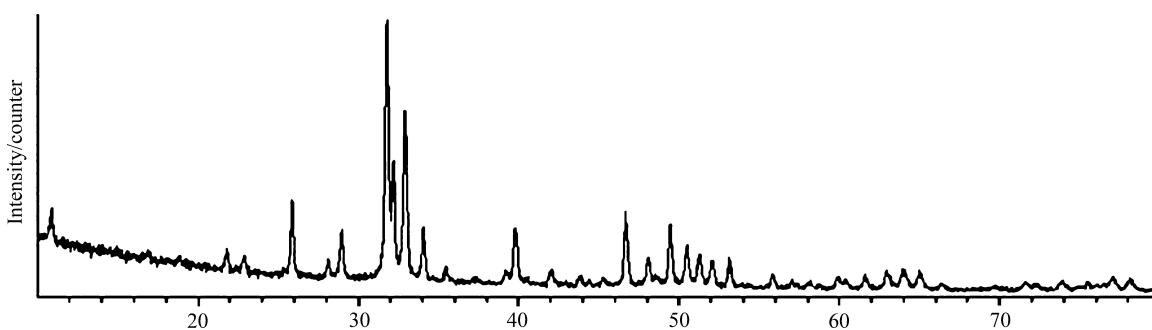


Fig.1 XRD of hydroxyapatite targets sintered at 800°C

用 ESCALAB250 型 X 射线光电子能谱仪 (XPS) 对 800°C 高温烧结的羟基磷灰石靶进行检测的结果如图 2 和表 1 所示。从 800°C 高温烧结的羟基磷灰石靶的 XPS 全谱图中可以看出靶的组成元素主要是 Ca、P、O 和 C, 表 1 给出了根据 XPS 检测数据计算出的各种元素的原子百分含量和 Ca/P 比值。羟基磷灰石化学分子式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 中并不含有 C, 说明在压制和烧结过程中掺杂了一定量的 C, 如果它以 CO_3^{2-} 的形式存在将有助于提高生物相容性和生物活性。这是因为人体骨骼磷灰石中含有微量的碳酸根离子 CO_3^{2-} , CO_3^{2-} 可以进入 PO_4^{3-} 的位置, 也可以替换 OH^{-} ^[8]。羟基磷灰石的 Ca/P 比值对生物相容性和生物活性具有显著影响, 由于人体骨骼中的无机物主要是缺 Ca 羟基磷灰石和 β -磷酸三钙的混合相, 其 Ca/P 比值在 1.51 ~ 1.67 之间, 因此 Ca/P 比值在此范围内的人工合成羟基磷灰石材料具有较好的生物相容性和生物活性。同时, 羟基磷灰石的 Ca/P 比值还直接影响材料的稳定性。当 Ca/P \leq 1.55 时, 羟基磷灰石材料的稳定性比较差, 容易分解成 α -磷酸三钙 ($\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)。从 Ca/P 比值来看 800°C 高温烧结的羟基磷灰石靶将具有较好的稳定性、生物相容性和生物活性。由于 H 原子量太小, XPS 一般检测不到 H。

Table 1 Computable result of XPS of hydroxyapatite targets sintered at 800°C

O _{1s}	Ca _{2p}	P _{2p}	C _{1s}	Ca/P
47.64	19.10	12.00	21.26	1.592

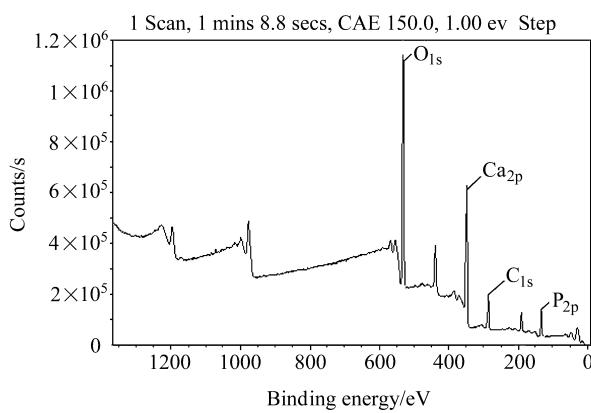


Fig.2 XPS spectra of hydroxyapatite targets sintered at 800°C

用四氮唑盐比色 (MTT) 法测定羟基磷灰石靶的细胞相容性实验中, 在酶标仪上以 570 nm 波长测定的吸光度值 (OD 值) 如表 2 所示, 数据处理采用 SPSS10.0 统计软件包, 对实验测得的 OD 值进行组间配对 t 检验。统计学检验结果表明: 常温浸提液组和高温浸提液组分别与阴性对照组进行比较, 各组对细胞的增殖均无明显差异 ($P > 0.05$), 常温浸提液组和高温浸提液组分别与阳性对照组进行比较, 常温浸提液组、高温浸提液组和阳性对照组比较都有显著差异 ($P < 0.05$)。四氮唑盐比色法是目前国际公认的利用体

外细胞培养法来评价生物材料细胞相容性的方法, 根据四氮唑盐比色法的检测原理和评价标准, 实验结果表明: 800°C 高温烧结的羟基磷灰石靶有很好的细胞相容性。

Table 2 Optical density measured with methyl thiazolyl tetrazolium

Group type	Optical density
normal temperature leaching liquor	0.904 ± 0.136
heat temperature leaching liquor	0.869 ± 0.173
negative control	0.909 ± 0.257
positive control	0.104 ± 0.065

4 结 论

纯度为 99% 的羟基磷灰石粉末在压制成型和 800°C 高温烧结的过程中没有发生分解反应, 在 800°C 高温烧结的羟基磷灰石靶中结晶度为 89.4%、平均粒径为 78.2 nm、Ca/P 比值为 1.592; 具有很好的细胞相容性。

参考文献:

- [1] Balani K, Anderson R, Laha T, et al. Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro [J]. *Biomaterials*, 2007, 28: 618-624.
- [2] Sadat-Shojaei M, Khorasani M T, Jamshidi A, et al. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2013, 33: 2776-2787.
- [3] Gentile P, Chiono V, Boccafoschi F, et al. Composite films of gelatin and hydroxyapatite/bioactive glass for tissue-engineering applications [J]. *Journal of Biomaterials Science*, 2010, 21(8-9): 1207-1226.
- [4] Saadat A, Behnamghader A A, Karbasi S, et al. Comparison of acellular and cellular bioactivity of poly 3-hydroxybutyrate/hydroxyapatite nanocomposite and poly 3-hydroxybutyrate scaffolds [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2013, 18: 587-593.
- [5] Luo Le, Zhao Duliang, Chu Yaqiong, et al. Experimental investigation of diamond-like carbon films deposited by pulsed laser deposition [J]. *Chinese Journal of Quantum Electronics* (量子电子学报), 2012, 29(6): 759-763 (in Chinese).
- [6] Nelea V, Morosanu C, Iliescu M, et al. Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and radio-frequency magnetron sputtering: Comparative study [J]. *Applied Surface Science*, 2004, 228: 346-356.
- [7] Nistor L C, Ghica C, Teodorescu V S, et al. Deposition of hydroxyapatite thin films by Nd:YAG laser ablation: A microstructural study [J]. *Materials Research Bulletin*, 2004, 39: 2089-2101.
- [8] Mihailescu I N, Torricelli P, Bigi A, et al. Calcium phosphate thin films synthesized by pulsed laser deposition: Physico-chemical characterization and in vitro cell response [J]. *Applied Surface Science*, 2005, 248: 344-348.