

丝蛋白对磷酸钙生长及其结晶的调控^{*}

钟佳佳 邵正中^{**}

(聚合物分子工程国家重点实验室 复旦大学先进材料实验室 高分子科学系 上海 200433)

摘 要 以氨气扩散法为基础,以再生丝蛋白(RSF)作为可溶性有机物对磷酸钙的生成实施调控.采用透射电镜包括选区电子衍射、扫描电镜、X-射线衍射及红外光谱等多种技术手段对所生成磷酸钙的形貌和晶型进行观察和检测.通过改变矿化时间、RSF 浓度以及钙/磷离子浓度等,能够在特定的条件下可控获得具有相应形貌即球形颗粒状的无定形磷酸钙(ACP)或粘连片状的羟基磷灰石(HAP).大量的实验显示出其基本规律为,在较高钙/磷离子浓度的母液中,诱导形成 ACP 所需的 RSF 浓度也较高;而在其它相同的情况下,RSF 的分子量越高,其调控产生 ACP 所需的浓度随之降低.同时,RSF 不仅对 ACP 的生成具有诱导效应,而且还能起到对 ACP 的稳定作用.相对稳定的 ACP/RSF 杂化物对骨修复材料的制备而言具有非常重要的意义.

关键词 无定形磷酸钙,丝蛋白,生物矿化

众所周知,骨骼是最复杂的生物矿化系统之一.胶原纤维预先构建有机质,在酸性蛋白的协同作用下,羟基磷灰石晶体(HAP)生成并沿着胶原纤维轴向取向生长,构成骨骼——一种高度有序的有机/无机杂化材料.一般认为,在胶原蛋白的调控下,HAP 所产生的复杂精妙且非常有序的多级结构赋予了骨骼优良的机械性能^[1].

目前,磷酸钙盐或者以其为基础的杂化体已成为骨修复材料中相当重要的一类.在巨噬细胞/破骨细胞和酸性环境的共同作用下,特定的磷酸钙盐部分溶解,同时 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} 离子被释放到周围微环境,使周围生物流体的过饱和度增大,诱导了 HAP 及碳酸磷灰石(CHAP)在磷酸钙盐表面的再次沉积^[2].通常,理想的骨修复材料应具备有良好的生物降解性以提供 Ca^{2+} 和 PO_4^{3-} ,只有这样,HAP 才能够在有机物的诱导下形成高度有序的结构.

单纯的 HAP 材料被认为是极度生物惰性的,在生物体内几乎不降解,因此,很难将以 HAP 为基础的材料直接用于骨骼的修复.与之相比,磷酸三钙(TCP)则具有更好的生物降解性能,因此对于骨修复用双相或多相磷酸钙盐材料,人们往往通过调节其中较稳定相(通常为 HAP)和可吸收

相(通常为 TCP)的比例来控制其总体降解速率^[3].但是,HAP 的不可降解性仍使此类组分成为了材料中的薄弱环节,进而影响了实用效果.

另一方面,无定形磷酸钙(ACP)是磷酸钙几种晶型中具有良好溶解性及生物降解性的材料,同时也有很好的生物相容性、骨细胞黏附性及骨传导性^[4-6].此外,ACP 在牙科材料^[7]、缓释载体^[8,9]等方面也有着广泛的应用.综合而言,ACP 在生物医学方面有着其他晶型的磷酸钙盐无法替代的地位,逐渐成为研究的热点.但是,ACP 通常需要保存在干燥的环境中或者通过在混合体系中掺杂来稳定,如 $\text{P}_2\text{O}_4^{7-}$ 、 CO_3^{2-} 、 Mg^{2+} 等^[4,10]各种正负离子以及柠檬酸盐^[11]、三磷酸腺苷(ATP)^[12]等有机小分子的加入均能够稳定 ACP.合成高分子如聚电解质^[13]能够抑制晶相磷酸钙的生长,且能使获得的 ACP 具有较小的尺寸和较高的表面带电性.同样,聚乙二醇不仅能够有效地稳定 ACP,同时聚合物本身的特性改善了 ACP 与聚合物的界面性能,为制备性能良好的复合材料提供了可能^[14,15].但是合成高分子的生物相容性和生物降解性较差,其与 ACP 的杂化材料在体内的应用仍有局限性.

丝蛋白(silk fibroin, SF)是桑蚕丝最主要的

^{*} 2014-05-30 收稿,2014-06-19 修稿;国家自然科学基金(基金号 21034003)和上海市优秀学术带头人计划(项目号 12XD1401000)资助项目.

本文附有电子支持材料,与正文一并刊载在本刊网站 <http://www.gfzxb.org>

^{**} 通讯联系人, E-mail: zszhao@fudan.edu.cn

doi:10.11777/j.issn1000-3304.2014.14155

组成部分,由 18 种氨基酸组成,与合成高分子相比具有更好的生物相容性及生物降解性^[16]. 肝素化的丝蛋白支架作为骨形态发生蛋白-2(BMP-2)的缓释载体,能够显著促进人骨肉瘤细胞(MG-63)的分化^[17]. MG-63 细胞同样能在纳米羟基磷灰石/丝蛋白复合支架材料上具有良好的粘附、增殖能力,并可引起早期的骨分化^[18]. 有研究表明,在作为可溶性添加剂调控磷酸钙的结晶生长时,丝蛋白的微观结构对矿化有较大的影响. 丝蛋白在模拟体液中的自组装结构为 HAP 的结晶生长提供成核位点^[19];无规线团/螺旋构象能够诱导形成具有片状结构的二水磷酸氢钙(DCPD),而 β -折叠构象则有利于诱导三维多孔的 HAP 的形成^[20]. 但是,以丝蛋白直接诱导 ACP 生成的研究却十分有限.

本文希望采用氨气缓慢的扩散和溶解来逐渐提高相应矿化溶液的 pH 值,以便在减缓磷酸钙盐结晶速率的前提下,有利于我们获得和观察 ACP,并结合丝蛋白对所生成磷酸钙的调控作用,通过对矿化时间及浓度等因素的研究,使 ACP 在特定的条件下可控生成并且具有相应的稳定性.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

桑蚕(*bombyx mori*)丝,来自于南通农户;溴化锂(LiBr,上海酷灵精细化工有限公司);无水碳酸钠(Na_2CO_3)、无水氯化钙(CaCl_2)、十二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 25.0% ~ 28.0%)、硝酸(HNO_3 , 65.0% ~ 68.0%)、过氧化氢(H_2O_2 , 30%)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);透析袋(再生纤维素,上海绿鸟科技发展有限公司,截留分子量 3500 和 12000 ~ 14000).

1.2 丝蛋白溶液的制备

桑蚕丝脱胶和溶解的具体过程见参考文献^[21],我们通过不同的脱胶方法得到了 3 种不同分子量的丝蛋白水溶液.(1) H-RSF, 0.5 wt% 的 Na_2HCO_3 水溶液沸水脱胶 30 min(2 次);(2) M-RSF, 0.5 wt% 的 Na_2CO_3 水溶液沸水脱胶 45 min;(3) L-RSF, 0.5 wt% 的 Na_2CO_3 水溶液中沸水脱胶 90 min(2 次). 其中 H-RSF 和 M-RSF 透析时采用截留分子量为 12000 ~ 14000 的透析袋,而 L-RSF 则采用截留分子量为 3500 的透析袋. 将新制的丝蛋白溶液置于 4 ℃ 的冰箱中保存备用.

经测量,3 种不同丝蛋白溶液的分子量分别为: $M_w(\text{H-RSF}) = 186 \times 10^3$, $M_w(\text{M-RSF}) = 95 \times 10^3$, $M_w(\text{L-RSF}) = 36 \times 10^3$. 具体测量过程参照文献[22].

1.3 丝蛋白调控磷酸钙的生长及其结晶

实验中所有的玻璃制品洗净后在无水乙醇中超声 30 min,之后在 $\text{H}_2\text{O}-\text{HNO}_3-\text{H}_2\text{O}_2$ (1:1:1, V/V/V) 混合液中浸泡 24 h,去离子水多次润洗之后,置于 80 ℃ 的烘箱中干燥.

将等体积等摩尔分数的 CaCl_2 和 NaH_2PO_4 混合,搅拌均匀. 不同分子量的丝蛋白溶液用去离子水稀释成不同浓度,分别与上述的钙/磷混合液混合,形成矿化溶液. 其中钙/磷离子的最终摩尔浓度分别为 1、2、3 和 5 mmol/L;RSF 的质量分数分别为 0.1%、0.2%、0.5%、1% 和 2%. 将装有矿化溶液或氨水的烧杯分别用带 2 个或 3 个针孔($\phi = 0.7 \text{ mm}$)的 Parafilm 封口,两者同时放置于干燥器中. 整个实验过程在 22 ℃ 下进行. 矿化不同的时间(1、3 和 24 h)后,将矿化溶液在 8000 r/min 的超速离心机中离心 8 min,用去离子水清洗沉淀物多次后真空干燥,用于各种表征和测试.

1.4 表征与测试

矿物的形貌采用场发射扫描电镜(Hitachi-S-4800)及场发射透射电镜(JEM-2100F)进行观察. 矿物的晶体结构采用荷兰 PANalytical 公司的 X'pert PRO X-射线多晶衍射仪进行分析,并采用 Nicolet 6700 傅立叶变换红外光谱仪进行辅助分析. 用 Perkin-Elmer Pyris 1 热失重分析仪对样品进行热重分析,在氮气氛(40 mL/min)中进行,升温速率为 20 K/min.

2 结果与讨论

2.1 丝蛋白对磷酸钙的调控规律

氨气通过烧杯封口膜上的小孔扩散到矿化溶液内部,使溶液的 pH 值缓慢升高. 当矿化溶液达到一定的 pH 值时析出沉淀物. 采用 A-B-C 标记不同条件下生成的磷酸钙,A 表示钙/磷离子的摩尔浓度;B 表示 RSF 的质量分数;C 则表示矿化时间. 下文未经特殊说明均采用 M-RSF 调控磷酸钙的生长及其结晶.

通过调节矿化时间、丝蛋白质量分数以及钙/磷离子的摩尔浓度,得到如图 1 所示的三维图形,表明在特定条件下能够可控地获得相对稳定的 ACP. 实验发现,当钙/磷离子浓度及丝蛋白浓度

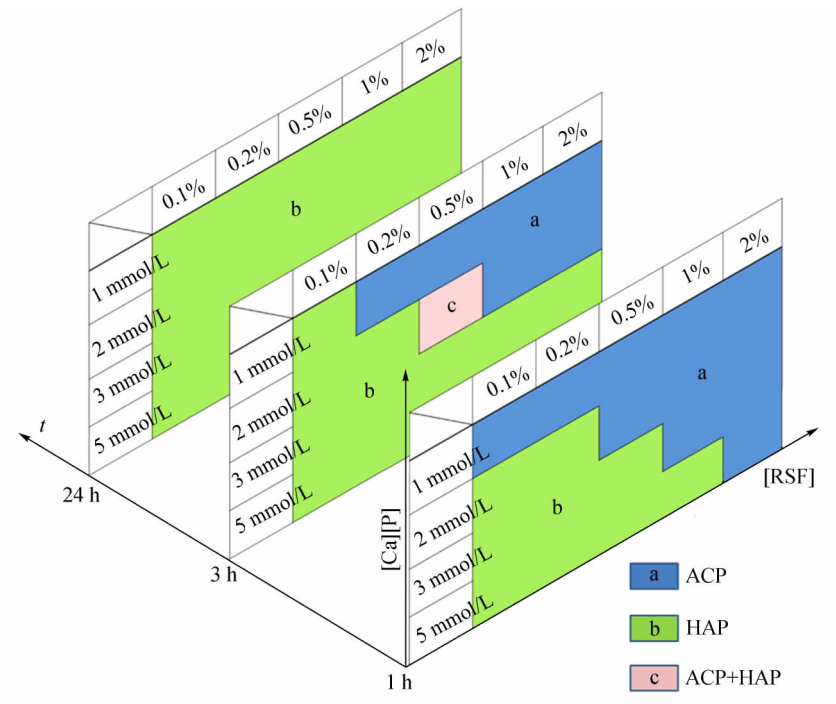


Fig. 1 Relationships among the mineralization time, the weight concentration of RSF, molar concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} and the crystalline phase of calcium phosphate

一定时,可在较短的矿化时间内获得 ACP;当矿化时间一定时,钙/磷离子浓度越高,诱导 ACP 生成所需的丝蛋白浓度越高.同时,通过多次重复试验,我们确定了生成 ACP 或 HAP 的矿化液边界浓度和相应的矿化时间(图 S1 ~ S5).

2.2 矿化时间对磷酸钙生长的影响

图 2 显示的是钙/磷离子浓度为 2 mmol/L 且丝蛋白浓度为 0.5% 时,所生成的磷酸钙形貌和晶型随着时间的变化.当矿化时间为 1 h 时,生成的是具有规整形貌的球形颗粒,且选区电子衍射

无明显的衍射斑点或衍射环,具有明显的非晶特性,表明其为 ACP 颗粒(图 2(a)).当矿化时间为 3 h 时,此时生成的磷酸钙既有粘连的片状结构,又有球形颗粒(图 2(b)),且片状结构的选区电子衍射具有明显的(211)及(002)衍射环,表明其为 HAP 晶型(图 2(d));而球形颗粒则仍具有非晶特性(图 2(e)).当矿化时间延长至 24 h 时,体系中生成的磷酸钙均为粘连的片状结构,且电子衍射具有明显的 HAP 特征衍射环(图 2(c)).可见,钙/磷矿化溶液在丝蛋白的诱导下最先生成

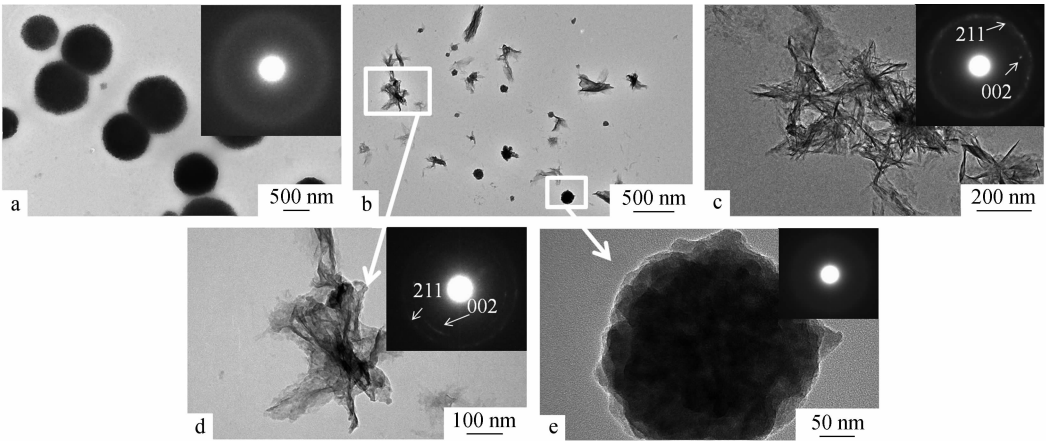


Fig. 2 TEM images of the calcium phosphate produced in (a) 2 mmol/L-0.5%-1 h, (b) 2 mmol/L-0.5%-3 h, (c) 2 mmol/L-0.5%-24 h; (d) and (e) enlarged TEM images of the white frames in (b)
The inserted images are the selected-area electron diffraction (SAED) of the corresponding samples.

ACP,但 ACP 在矿化母液中不能够长时间稳定存在,数小时后仍转变成热力学最稳定的 HAP.

2.3 矿化液浓度对磷酸钙生长的影响

尽管 ACP 向 HAP 转变速率受到温度和溶液性质如钙/磷摩尔浓度、溶液的 pH 值及添加剂含量等的影响,但实验仍发现丝蛋白浓度对 ACP 的生成有较大的作用.

当钙/磷离子浓度和丝蛋白浓度分别为 1 mmol/L 和 0.1% 且矿化时间为 3 h 时,得到的磷酸钙呈现出粘连的片状结构(图 3(a)),且 XRD 谱图在 25.9°和 31.8°处出现了 HAP 的(002)和(211)面的衍射峰(图 3(d)中谱线 1). 当其他条件相同但丝蛋白浓度升高至 0.2% 时,XRD 谱图在 17°~36°之间只呈现出一个大包峰(图 3(d)

中谱线 2),说明此时颗粒状的磷酸钙具有明显的非晶特性^[15]. 当丝蛋白浓度进一步升高至 0.5% 时,也能获得类似球形的 ACP 颗粒(图 3c 和 3d 中谱线 3).

同样,可以从 FTIR 中分辨出 ACP 和 HAP(图 3(e)). 在 0.2% 和 0.5% 丝蛋白诱导下生成的磷酸钙在 1047 cm⁻¹和 565 cm⁻¹处有分别一个大的宽峰(图 3(e)中谱线 2 和 3(e)中谱线 3),均为 ACP 的特征吸收峰,归属于 PO₄³⁻ 中 P—O 键的 ν₃ 和 ν₄ 振动^[23],表明 PO₄³⁻ 处于一个无序的环境中,在晶态磷酸钙中并不存在^[24]. 而在 0.1% 丝蛋白诱导下的磷酸钙在 1047 cm⁻¹和 565 cm⁻¹处的大包峰劈裂成 2 个尖峰(图 3(e)中谱线 1),则为晶态的磷酸钙. 这些表征结果与 XRD 的一致.

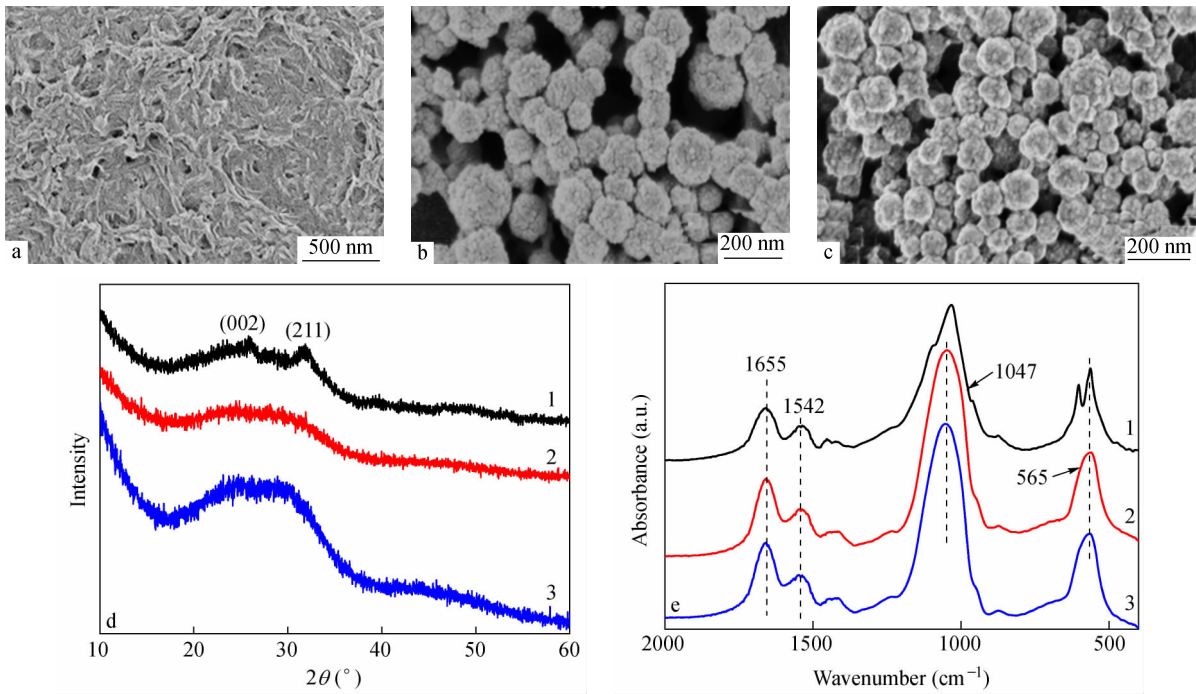


Fig. 3 SEM images of the calcium phosphate produced in (a) 1 mmol/L-0.1%-3 h; (b) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (c) 1 mmol/L-0.5%-3 h; (d) and (e) the XRD patterns and FTIR absorption curves of the products: (1) 1 mmol/L-0.1%-3 h, (2) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (3) 1 mmol/L-0.5%-3 h

综上所述,在相同的矿化时间及钙/磷离子浓度下,较高的丝蛋白浓度有利于诱导 ACP 的生成. 此外,本体系中所生成的磷酸钙形貌与其晶型有着直接的对应关系,即具有类似球形的颗粒为 ACP,而具有片状形貌的则为 HAP.

实验表明,当矿化溶液具有较高的钙/磷离子浓度时,诱导 ACP 所需的丝蛋白浓度也较高. 当矿化时间为 1 h 及钙/磷离子浓度为 3 mmol/L

时,1% 浓度的丝蛋白能够诱导 ACP 的生成(图 4(a));而钙/磷离子浓度为 5 mmol/L 时,在 1% 浓度的丝蛋白诱导下,1 h 生成的磷酸钙的电子衍射图具有明显的结晶衍射环(图 4(b)),只有当丝蛋白浓度被提高到 2% 时,相同的矿化时间下才能够生成 ACP(图 4(c)). 这从侧面证明了丝蛋白参与磷酸钙的生长过程,且能够在很大的程度上延缓磷酸钙的结晶.

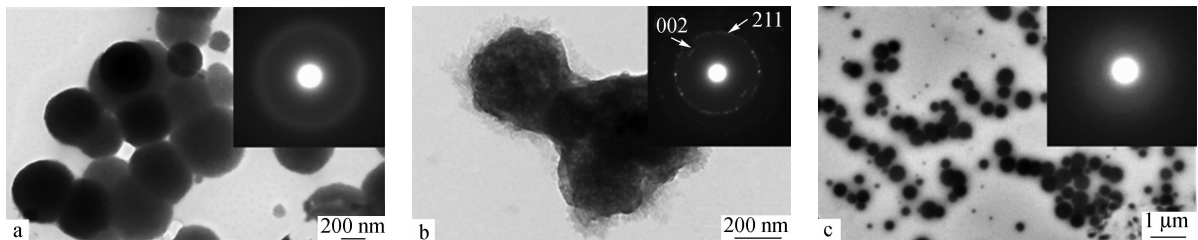


Fig. 4 TEM images of the calcium phosphate produced in (a) 3 mmol/L-1%-1 h, (b) 5 mmol/L-1%-1 h and (c) 5 mmol/L-2%-1 h

由于体系中生成的矿物质均经过了充分的后洗涤过程,而磷酸钙矿物的红外谱图中都出现了明显的丝蛋白特征吸收峰,即 1655 cm^{-1} 处的酰胺 I 及 1542 cm^{-1} 处的酰胺 II (图 3(e)). 从 TGA 的测试数据(图 S6)也可以看出,ACP 和 HAP 均含有较多的有机质. 这些都有力地证明了此类 ACP 和 HAP 均为磷酸钙/丝蛋白杂化体.

2.4 丝蛋白分子量对调控的影响

将矿化时间固定为 3 h,我们进一步研究了不同分子量的丝蛋白在不同钙/磷离子浓度下诱导

ACP 所需的最低浓度. 综合前文采用 M-RSF 调控的实验结果可以得到如图 5 所示的丝蛋白分子量、浓度、钙/磷离子摩尔浓度及磷酸钙晶型之间的三维图形,表明在相同的钙/磷离子浓度及矿化时间下,丝蛋白的分子量越高,诱导 ACP 所需的最低浓度越低. 如当钙/磷离子浓度为 1 mmol/L 时,0.2% 浓度的 H-RSF 能诱导 ACP 的生成(图 6(a)),而相同浓度的 L-RSF 却只能诱导片状 HAP 的生成(图 6(b)),只有当 L-RSF 的浓度达到 0.5% 时,才能够生成球状的 ACP(图 6(c)).

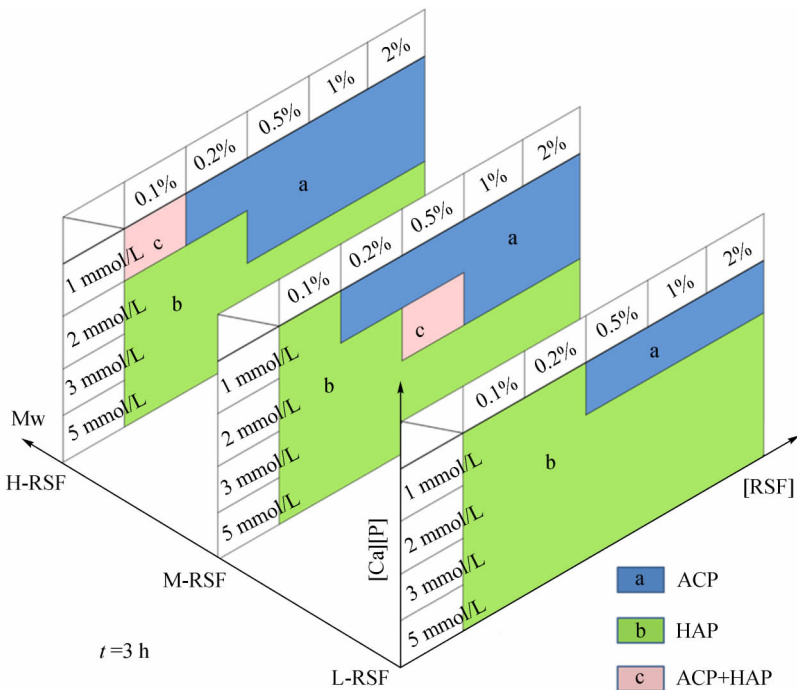


Fig. 5 Relationships among the molecular weight of RSF, weight concentration of RSF, molar concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} and the crystalline phase of calcium phosphate
The duration of mineralization: 3 h

图 S7 和 S8 则确定了当钙/磷离子浓度为 1 mmol/L 或 2 mmol/L 时,在 H-RSF 和 L-RSF 调控下生成 ACP 或 HAP 的矿化液边界浓度. 而当钙/磷离子浓度为 3 mmol/L 和 5 mmol/L 时,H-RSF、M-RSF 和 L-RSF 均不能调控 ACP 颗粒的生成.

2.5 调控机理初探

从上述实验结果中可以得出,丝蛋白的存在能在一定程度上减缓磷酸钙的结晶,并诱导 ACP 的生成,其调控效果与丝蛋白浓度和分子量有很大关系. 干燥后的 ACP 粉末再分散到不同的溶液

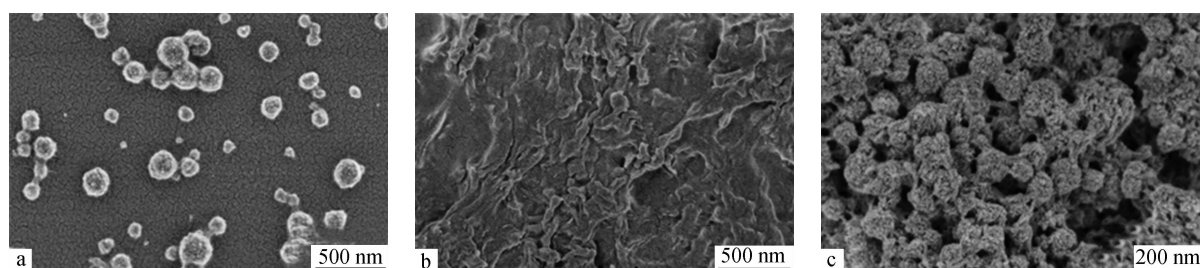


Fig. 6 SEM images of calcium phosphate (a) mediated by H-RSF in 1 mmol/L-0.2% -3 h, (b) and (c) mediated by L-RSF in 1 mmol/L-0.2% -3 h and 1 mmol/L-0.5% -3 h, respectively

体系中具有不同的稳定时间,RSF 水溶液相比于纯水体系更加有利于 ACP 稳定存在,而温度对 ACP 的稳定性也有极大的影响(图 S9).由此表明丝蛋白溶液不仅能诱导 ACP 的生成,而且能在一定程度上稳定已形成的 ACP 颗粒.

据文献报道^[25, 26],水溶液的酸性越强,丝蛋白的构象越容易从无规线团变化至 β -折叠;相对而言,碱性条件则更有利于丝蛋白无规线团构象的稳定存在.在本体系中,矿化溶液的 pH 值随着矿化时间的延长而不断升高,并一直处于碱性状态(图 S10),因此,RSF 在矿化溶液中主要以无规线团构象为主,其与钙离子作用的亲水性基团,如:羰基、羧基和羟基等被包裹在大分子内部^[20].但由于体系 pH 值上升缓慢,在钙/磷离子形成初始纳米粒子之前,丝蛋白分子链已有足够的时间与溶液中游离的钙离子作用,而分子内的作用位点无疑增加了最终形成 ACP 颗粒的稳定性.通常 ACP 向 HAP 转变时需经过溶解-再结晶过程,而较为稳定的 ACP/RSF 杂化粒子在水溶液中溶解再结晶所需的能量较高,故稳定性增加.

此外,丝蛋白溶液具有较高的黏度,大分子链

的存在在一定程度上阻碍了钙/磷离子的运动及碰撞,从而减缓了磷酸钙的结晶速率,使 ACP 能够被稳定获得.分子量越高,溶液黏度越大,所以在相同的矿化时间及钙/磷离子浓度下,稳定 ACP 所需的浓度越低.若无丝蛋白的添加,游离的钙/磷离子迅速地相互碰撞,生长为稳定的 HAP.

3 结论

通过调节矿化时间、丝蛋白的质量浓度以及钙/磷离子的摩尔浓度,使 ACP 能够在特定的条件下可控生成并具有一定的稳定性.在钙/磷离子浓度较高时,需要较高浓度的丝蛋白来减缓磷酸钙的结晶速率,才能在相同矿化时间下获得 ACP.丝蛋白的分子量越高,在相同条件下稳定 ACP 所需的浓度越低.我们认为丝蛋白对 ACP 的诱导作用与其舒展的空间结构及丰富的钙离子作用位点有关.由丝蛋白稳定的 ACP 有望作为骨修复材料,这也将进一步拓展丝蛋白在生物医学上的应用.

REFERENCES

- 1 Cui Fuzhai(崔福斋). Biom mineralization(生物矿化). Beijing(北京):Tsinghua University Press(清华大学出版社),2007.36~42
- 2 LeGeros R Z. Chem Rev,2008,108(11):4742~4753
- 3 Dorozhkin S V. Acta Biomater,2012,8(3):963~977
- 4 Tadic D, Peters F, Epple M. Biomaterials,2002,23(12):2553~2559
- 5 Nagano M, Nakamura T, Kokubo T, Tanahashi M, Ogawa M. Biomaterials,1996,17(18):1771~1777
- 6 Balasundaram G, Sato M, Webster T J. Biomaterials,2006,27(14):2798~2805
- 7 Zhou C, Zhang D, Bai Y, Li S. J Dent,2014,42(1):21~29
- 8 Hwang E T, Tatavarty R, Chung J, Gu M B. ACS Appl Mater Interfaces,2012,5(3):532~537
- 9 Pourbaghi-Masouleh M, Hosseini V. Nanoscale Res Lett,2013,8(1):1~6
- 10 Boskey A L, Posner A S. Mater Res Bull,1974,9(7):907~916
- 11 Chen Y, Gu W, Pan H, Jiang S, Tang R. Cryst Eng Comm,2014,16:1864~1867
- 12 Qi C, Zhu Y, Zhao X, Lu B, Tang Q, Zhao J, Chen F. Chem-Eur J,2013,19(3):981~987
- 13 Bar-Yosef Ofir P, Govrin-Lippman R, Garti N, Füredi-Milhofer H. Cryst Growth Des,2004,4(1):177~183

- 14 Liu S, Weng W, Li Z, Pan L, Cheng K, Song C, Du P, Shen G, Han G. *J Mater Sci: Mater Med*, 2009, 20(1): 359 ~ 363
- 15 Li Y, Weng W, Cheng K, Du P, Shen G, Wang J, Han G. *J Mater Sci Lett*, 2003, 22(14): 1015 ~ 1016
- 16 Weng Jianchuan(文建川), Yao Jinrong(姚晋荣), Shao Zhengzhong(邵正中). *Acta Polymerica Sinica(高分子学报)*, 2011, (1): 12 ~ 23
- 17 Ma Yinsun(马寅孙), Cai Yurong(蔡玉荣), Liu Lin(刘琳), Yao Juming(姚菊明). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2012, 70(4): 479 ~ 484
- 18 Liu Lin(刘琳), Kong Xiangdong(孔祥东), Cai Yurong(蔡玉荣), Yao Juming(姚菊明). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2008, 66(16): 1919 ~ 1923
- 19 Yang M, He W, Shuai Y, Min S, Zhu L. *J Polym Sci Part B: Polym Phys*, 2013, 51(9): 742 ~ 748
- 20 Yao Juming(姚菊明), Wei Kemin(魏克民), Li Li(励丽), Kong Xiangdong(孔祥东), Zhu Yongqiang(祝永强), Lin Feng(林凤). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2007, 65(7): 635 ~ 639
- 21 Jiang Xiarong(江霞蓉), Guan Juan(管娟), Chen Xin(陈新), Shao Zhengzhong(邵正中). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2010, 68(18): 1909 ~ 1914
- 22 Wang Q, Chen Q, Yang Y, Shao Z. *Biomacromolecules*, 2012, 14(1): 285 ~ 289
- 23 Layrolle P, Ito A, Tateishi T. *J Am Ceram Soc*, 1998, 81(6): 1421 ~ 1428
- 24 Termine J D, Lundy D R. *Calcified Tissue Res*, 1974, 15(1): 55 ~ 70
- 25 Zhou P, Xie X, Knight D P, Zong X, Deng F, Yao W. *Biochem*, 2004, 43(35): 11302 ~ 11311
- 26 Yang Yuhong(杨宇红), Shao Zhengzhong(邵正中), Chen Xin(陈新). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2006, 64(16): 1730 ~ 1736

Growth and Crystallization of Calcium Phosphate Mediated by *Bombyx Mori* Silk Fibrin

Jia-jia Zhong, Zheng-zhong Shao*

(State Key Laboratory of Molecular Engineering of Polymers, Advanced Materials Laboratory,
Department of Macromolecular Science, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Amorphous calcium phosphate (ACP) has excellent biocompatibility, osteoconduction and biodegradability. However, as it can be transformed easily to a more thermal stable phase, *i. e.* HAP, ACP shows poor stability in solution. As a soluble and biocompatible additive, regenerated silk fibroin (RSF) can mediate the growth of inorganic crystals. If the RSF is capable of inducing and stabilizing of the ACP, it will be desirable to expand its application to the field of bone repair. The pH value of the mineralization solution increased slowly when the ammonia gas diffused into the solution, leading to the precipitation of calcium phosphate. The morphology and polymorph of calcium phosphates were characterized by SEM, TEM, SAED, XRD and FTIR. Generally, the spherical particles were ACP and the aggregated sheets were HAP in our work. The results also showed that ACP could be obtained by adjusting the mineralization time, the weight concentration of RSF, the molar concentrations of calcium ion and phosphate ion. When the RSF and $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ concentrations were fixed to 0.5% and 2 mmol/L, respectively, only ACP could be obtained after 1 h; however, both ACP and HAP could be produced when the duration of mineralization was increased to 3 h. Moreover, all the ACP would be transformed to HAP when the time was increased to 24 h. On the other side, when the $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ concentrations increased, a higher RSF concentration would be needed to induce the growth of ACP. For example, ACP could be produced under a certain condition that the mineralization time and the RSF concentration were 1 h and 1% respectively, supplemental with 3 mmol/L $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ concentrations, but ACP couldn't be obtained at any concentration of RSF when the ion concentration was reached to 5 mmol/L. Furthermore, it was found that RSF with higher molecular weight could induce the growth of ACP in a lower concentration under the same condition. The stable ACP/RSF hybrid may have the great potential in the bone repairing.

Keywords Amorphous calcium phosphate, Silk fibroin, Biomineralization

* Corresponding author: Zheng-zhong Shao, E-mail: zzshao@fudan.edu.cn

Supporting Information

丝蛋白对磷酸钙生长及其结晶的调控

钟佳佳 邵正中**

(教育部聚合物分子工程重点实验室 复旦大学先进材料实验室 高分子科学系 上海 200433)

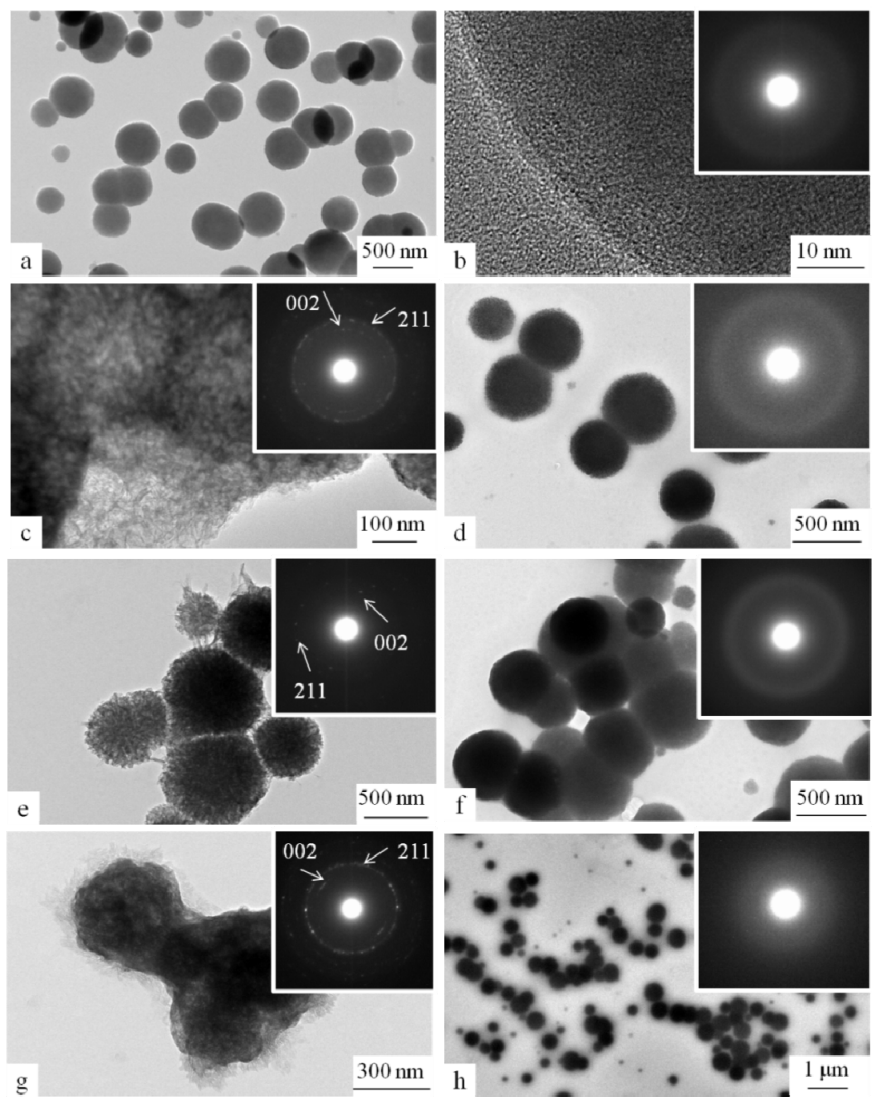


Fig. S1 TEM images of calcium phosphate produced in (a) 1 mmol/L-0.1%-1 h, (c) 2 mmol/L-0.2%-1 h, (d) 2 mmol/L-0.5%-1 h, (e) 3 mmol/L-0.5%-1 h, (f) 3 mmol/L-1%-1 h, (g) 5 mmol/L-1%-1 h and (h) 5 mmol/L-2%-1 h; (b) the high resolution TEM image of (a)

The inserted images are the selected-area electron diffraction (SAED) of the samples, respectively. The SAED images of (c), (e) and (g) show the distinct diffraction rings which assigned to the (002) and (211) faces of HAP, respectively, indicating that the samples produced on those conditions are crystalline; while the SAED images of (b), (d), (f) and (h) show no diffraction ring, indicating the amorphous feature of the samples.

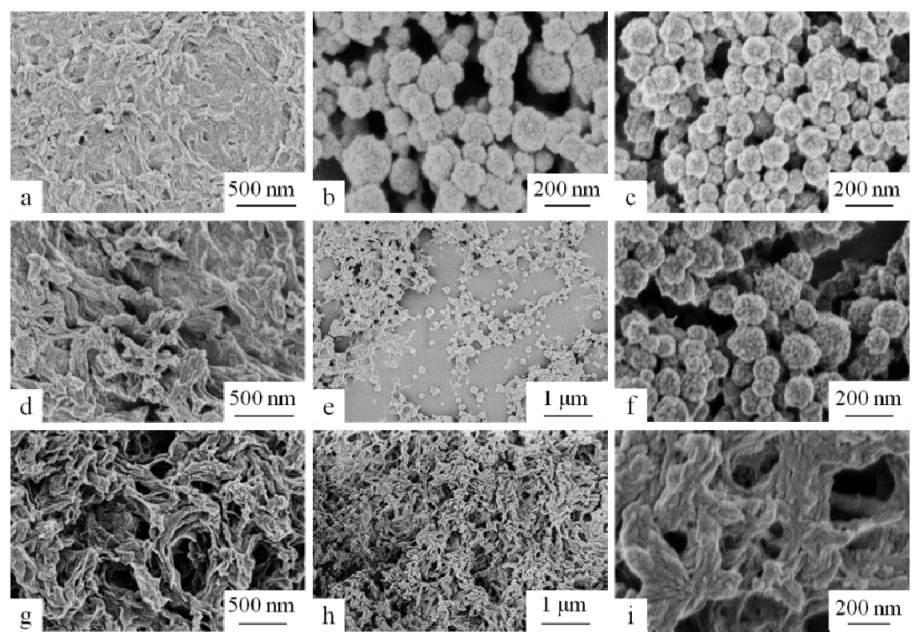


Fig. S2 SEM images of the calcium phosphate produced in (a) 1 mmol/L-0.1%-3 h, (b) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (c) 1 mmol/L-0.5%-3 h, (d) 2 mmol/L-0.2%-3 h, (e) 2 mmol/L-0.5%-3 h, (f) 2 mmol/L-1%-3 h, (g) 3 mmol/L-1%-3 h, (h) 3 mmol/L-2%-3 h and (i) 5 mmol/L-2%-3 h
The morphology of sample in (a), (d), (g), (h) and (i) is looked like to adhesive sheets, and that of in (b), (c) and (f) are spherical particles. Both of those two morphologies exist in (e).

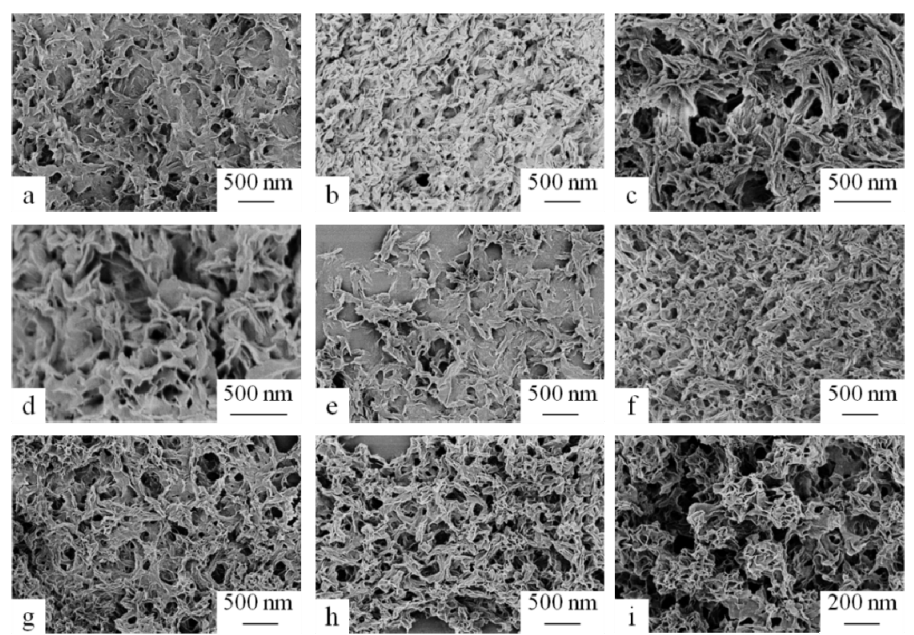


Fig. S3 SEM images of the calcium phosphate produced in (a) 1 mmol/L-0.1%-24 h, (b) 1 mmol/L-0.2%-24 h, (c) 1 mmol/L-0.5%-24 h, (d) 2 mmol/L-0.2%-24 h, (e) 2 mmol/L-0.5%-24 h, (f) 2 mmol/L-1%-24 h, (g) 3 mmol/L-1%-24 h, (h) 3 mmol/L-2%-24 h and (i) 5 mmol/L-2%-24 h
The morphology of all the sample transformed to adhesive sheets when the mineralization time reached to 24 h.

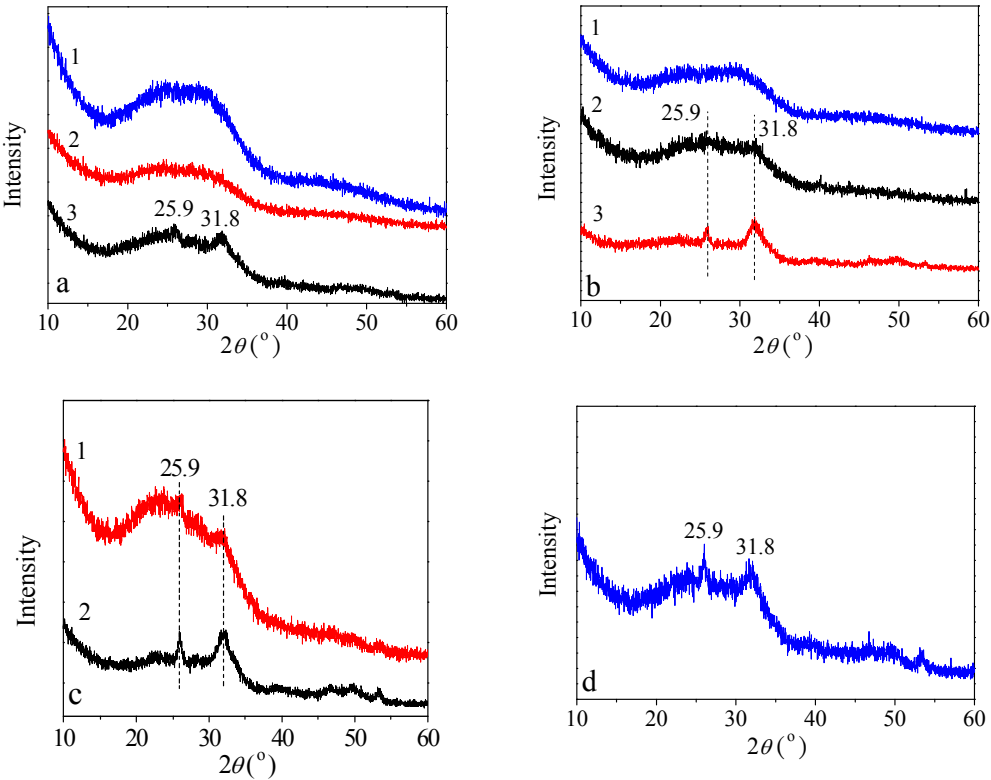


Fig. S4 XRD patterns of the calcium phosphate produced in (a-1) 1 mmol/L-0.5%-3 h, (a-2) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (a-3) 1 mmol/L-0.1%-3 h, (b-1) 2 mmol/L-1%-3 h, (b-2) 2 mmol/L-0.5%-3 h, (b-3) 2 mmol/L-0.2%-3 h, (c-1) 3 mmol/L-2%-3 h, (c-2) 3 mmol/L-1%-3 h, (d) 5 mmol/L-2%-3 h. Sample (a-1), (a-2) and (b-1) are completely amorphous with a broadened peak between 17° - 36° ; while others are HAP with characteristic peaks at 25.9° and 31.8° , respectively.

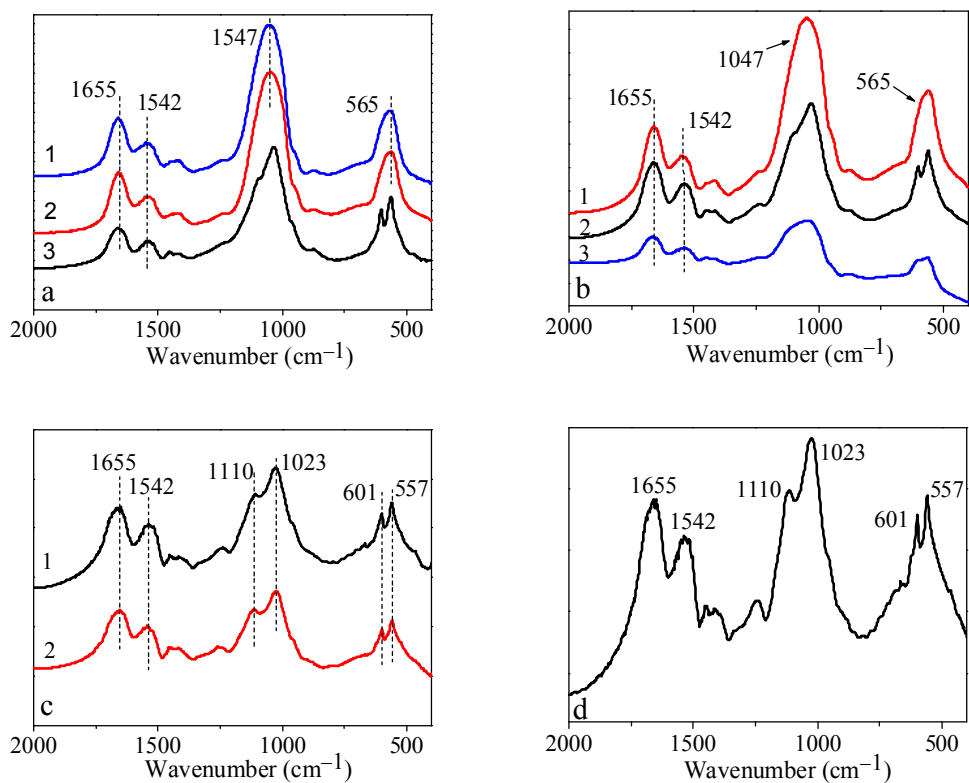


Fig. S5 FTIR absorption curves of the calcium phosphate produced in (a-1) 1 mmol/L-0.5%-3 h, (a-2) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (a-3) 1 mmol/L-0.1%-3 h, (b-1) 2 mmol/L-1%-3 h, (b-2) 2 mmol/L-0.5%-3 h, (b-3) 2 mmol/L-0.2%-3 h, (c-1) 3 mmol/L-2%-3 h, (c-2) 3 mmol/L-1%-3 h, (d) 5 mmol/L-2%-3h

The broad, unresolved bands around 1047 cm^{-1} and 565 cm^{-1} are attributed to the vibration of PO_4^{3-} , indicating that the calcium phosphates are in amorphous state (a-1, a-2 and b-1); while the resolved bands around 1047 cm^{-1} and 565 cm^{-1} in other samples indicates the calcium phosphates are crystalline. The bands at 1655 cm^{-1} and 1542 cm^{-1} existing in all the curves are attributed to amide I and amide II vibration of RSF, respectively, indicating that RSF had been involved in the formation of calcium phosphate.

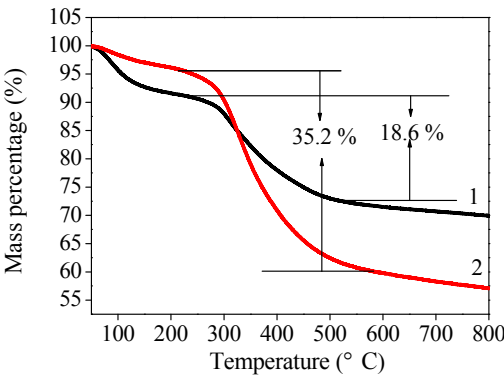


Fig. S6 TGA of the ACP hybrid produced in (1) 2 mmol/L-1%-3 h and HAP hybrid produced in (2) 2 mmol/L-1%-24 h (HAP)
Two weight lost processes happened during the measurement: water evaporation and RSF degradation. It is thought that ACP contained about 18.6 wt% RSF and HAP contains about 35.2 wt% RSF.

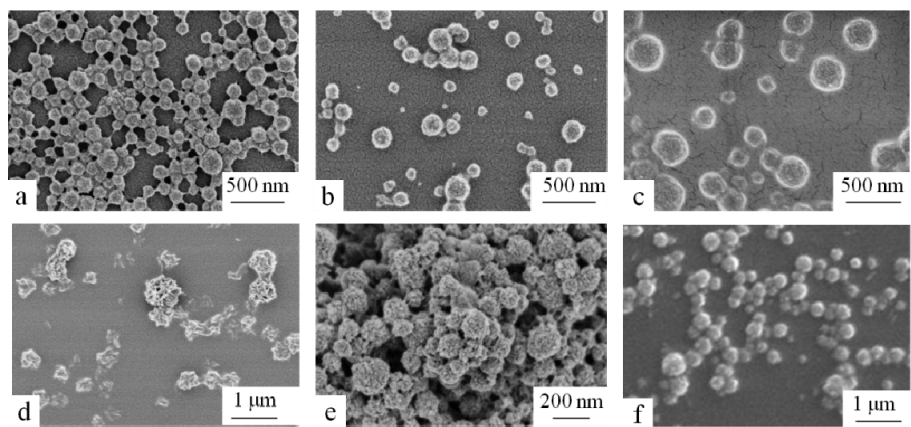


Fig. S7 SEM images of calcium phosphates mediated by H-RSF in (a) 1 mmol/L-0.1%-3 h, (b) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (c) 1 mmol/L-0.5%-3 h, (d) 2 mmol/L-0.2%-3 h, (e) 2 mmol/L-0.5%-3 h and (f) 2 mmol/L-1%-3 h

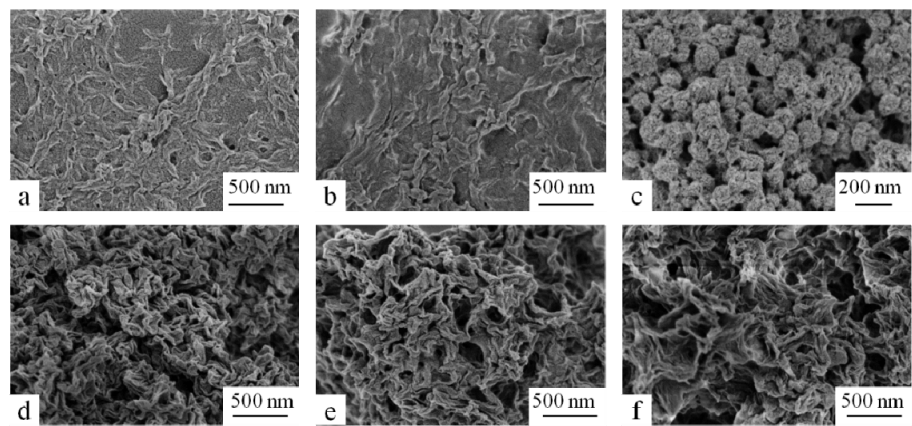


Fig. S8 SEM images of calcium phosphates mediated by L-RSF in (a) 1 mmol/L-0.1%-3 h, (b) 1 mmol/L-0.2%-3 h, (c) 1 mmol/L-0.5%-3 h, (d) 2 mmol/L-0.2%-3 h, (e) 2 mmol/L-0.5%-3 h and (f) 2 mmol/L-1%-3 h

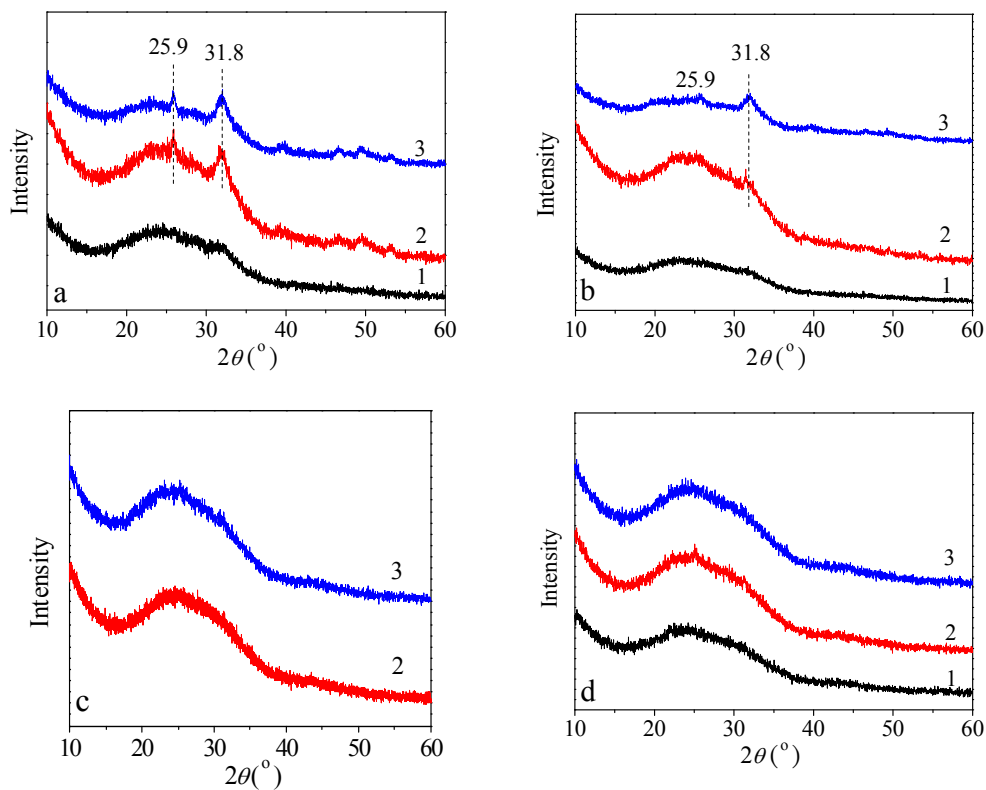


Fig. S9 XRD patterns of ACP (2 mmol/L-1%-3 h) ripened in different solutions and temperatures: (a) 22 °C, H₂O; (b) 22 °C, [SF] = 0.5 wt%; (c) 22 °C, [MgCl₂] = 2 mmol/L; (d) 4 °C, [SF] = 0.5 wt%
The ripened time was (1) 24 h, (2) 72 h, (3) 168 h. ACP could exist stably for 24 h in pure water at 22 °C; when the ripened time was 72 h, ACP transformed to HAP, the characteristic peaks of HAP apperaed at 25.9° and 31.8° (a). On the same condition, ACP could exist stably for 72 h in RSF solution (b) and even the time reached to 168 h, ACP could still keep the amorphous state in MgCl₂ solution (c). When the temperature reduced to 4 °C, ACP could exist in RSF solution stably at least for 168 h (d).

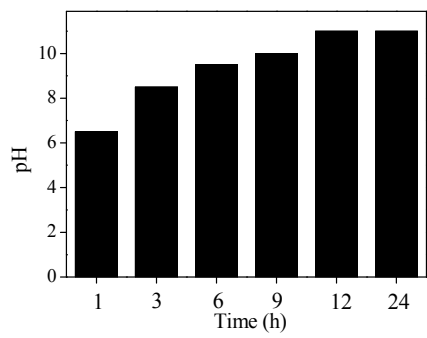


Fig. S10 pH value of the upper solution in the beaker varied with the mineralization time
The molar concentration of Ca^{2+} and PO_4^{3-} were 2 mmol/L and the weight concentration of M-RSF was 1%.