



肝素对 CaCO_3 晶体形貌和结构的控制

刘新荣^{①②}, 朱保庆^①, 邵颖娅^①, 杨新林^{①*}

① 北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081;

② 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031

* 联系人, E-mail: xlyang@bit.edu.cn

2009-03-02 收稿, 2009-05-27 接受

北京市科技基金资助项目(批准号: Y0905001000091)

摘要 有机物对 CaCO_3 晶体生长的调控作用是其矿化机制与仿生制备的一个重要组成部分. 利用扫描电子显微镜、X 射线衍射仪、红外吸收光谱仪和荧光分光光度计研究了低分子量肝素(heparin, HEP)对 $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 体系中 CaCO_3 晶体形貌与结构的影响. 结果发现, 在纯水溶液中 CaCO_3 为菱形方解石; HEP 的加入促使 CaCO_3 形貌与结构发生变化. 当 HEP 浓度达到 2.5 mg/mL 时, 可成功诱导 CaCO_3 晶体取向生长并形成直径为 1.5 μm 左右的球霏石型晶体. X 射线衍射分析显示, HEP 浓度为 5 和 20 mg/mL 时, 球霏石晶体含量分别为 57.4% 和 64.9%. 这种 HEP/ CaCO_3 微球对 HEP 的包封率达到 80% 以上. 实验研究结果可以为探讨生物矿化机制和制备肝素功能化材料提供新的参考依据.

关键词

肝素

CaCO_3 晶体

肝素功能化材料

近年来, 由于仿生材料在催化剂、分离膜、生物医用植入体等方面的应用, 具有特定大小和形貌的无机材料的仿生合成成为一个重要的研究领域^[1,2]. CaCO_3 是常见的生物矿物之一, 其矿化机制与仿生制备受到了广泛关注^[3,4]. CaCO_3 一般以最稳定的方解石型晶体存在, 但是在多种有机聚合物如生物大分子、树形聚合物/双亲水嵌段共聚物的存在下, CaCO_3 往往会以方解石以外的其他晶型存在, 或者以几种晶型的混合形式存在, 并且其微粒形貌、尺寸也会有所不同^[5-10]. 这些有机聚合物通过与无机离子的超分子预组装、界面分子识别、矢量调节等作用, 来控制 CaCO_3 晶体的生长^[11].

肝素(Heparin, HEP)是一种硫酸化的糖胺聚糖, 带有大量的羧基和磺酸基团, 这些阴离子基团可能与钙离子发生相互作用, 从而改变 CaCO_3 晶体的生长过程. 基于这一假设, 本文研究了低分子量 HEP 对 CaCO_3 晶体的晶型和形貌的影响.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

材料: 无水 CaCl_2 , Na_2CO_3 (均为分析纯), 北京化学试剂公司; 肝素钠(Mw 3 kDa, 北京奥博星生物技术公司); 异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC, Sigma); 实验中所用水均为去离子水.

仪器: 扫描电子显微镜(SEM-4700, 日立公司); X 射线粉末衍射仪(XRD-6000, 日本岛津公司); 红外吸收光谱仪(FITR-NOX55, 日本 Bruker); 冷冻干燥机(LGJ-12, 北京松源华兴科技发展有限公司); 荧光分光光度计(F-2500 FL, 日立公司).

1.2 实验方法

(i) 不同浓度 HEP 存在条件下 CaCO_3 晶体的生长. 在 25 mL 烧瓶中, 分别加入不同浓度(0, 2, 6, 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) HEP 溶液和 0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 溶液各 5 mL, 1200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌 10 min; 然后快速加入 10

引用格式: 刘新荣, 朱保庆, 邵颖娅, 等. 肝素对 CaCO_3 晶体形貌和结构的控制. 科学通报, 2009, 54: 3326-3330

Liu X R, Zhu B Q, Shao Y Y, et al. Control of morphology and structure of calcium carbonate crystals by heparin. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0551-2

mL的 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2$ 溶液, 溶液立刻变为白色, 继续搅拌 30 min; 静置 10 min 后加入适量去离子水离心 ($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4 min), 沉淀再用去离子水洗涤 2 次得到 CaCO_3 晶体. 用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察晶体形貌, X 射线粉末衍射仪 (X-ray diffraction, XRD) 和红外吸收光谱仪 (Fourier transform infrared spectroscopy, FITR) 分析其结构. XRD 和 FITR 分析所用的样品通过冷冻干燥制备. 球霏石的质量百分比用下面公式计算^[12]:

$$F_v = \frac{(I_{110v} + I_{112v} + I_{114v})}{(I_{110v} + I_{112v} + I_{114v} + I_{104c})} \times 100\%$$

其中 I_{110v} , I_{112v} , I_{104c} 和 I_{114v} 分别代表 2θ 在 24.92° , 27.00° , 29.41° 和 32.78° 附近的 XRD 谱线特征衍射峰的相对强度.

(ii) HEP/ CaCO_3 晶体中 HEP 含量的测定. 先参照 Ruponen 等人的方法, 将 HEP 进行 FITC 标记^[13], 然后按照 (i) 中所述方法在不同 HEP 浓度时制备 FITC-HEP/ CaCO_3 晶体. 用荧光分光光度计检测上清中 FITC-HEP 的荧光强度, 根据标准曲线计算得到上清中 HEP 含量, 并按照以下公式进一步得到 HEP/ CaCO_3 晶体中 HEP 的装载量 (encapsulation amount, EA) 与包封率 (encapsulation efficiency, EE).

$$EA = \text{HEP 总量} - \text{上清中 HEP 含量},$$

$$EE = \frac{\text{HEP 总量} - \text{上清中 HEP 含量}}{\text{HEP 含量}}.$$

2 结果

2.1 SEM 分析

图 1 中的 (a), (b) (c), d 分别是体系中 HEP 终浓度分别为 0, 0.5, 1.5 和 2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 CaCO_3 晶体的扫描电子显微镜图. 图 1(a) 显示典型的方解石碳酸钙晶体形貌, 晶体直径大约在 4~6 μm 左右; 图 1(b) 显示产物形貌由不规则的菱形, 逐渐开始趋于圆形, 晶体直径大约在 3 μm 左右; 图 1(c) 显示产物开始由菱形向圆形过渡, 出现比较多的圆形晶体, 生成的 CaCO_3 晶体为方解石和球霏石的共存体; 图 1(d) 显示球形 CaCO_3 晶体进一步增多, 球体直径大约在 1.5 μm 左右. 由此可见, HEP 对 CaCO_3 晶体的形貌和尺寸产生了较大的影响, 随着其浓度升高 CaCO_3 晶体的形貌由菱形变为圆形, 晶体的粒径呈现减小的趋势.

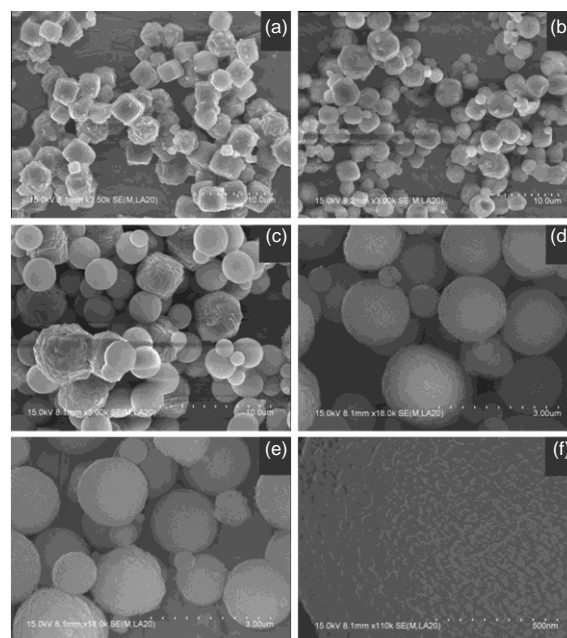


图 1 不同肝素浓度 (a) 0 mg/mL ; (b) 0.5 mg/mL ; (c) 1.5 mg/mL ; (d) 2.5 mg/mL 条件下 CaCO_3 的 SEM 照片; (e) 2.5 mg/mL , 冷冻干燥后重新悬浮; (f) (e) 的放大图

HEP 浓度为 2.5 mg/mL 时制备 CaCO_3 晶体, 将其冷冻干燥后再重新悬浮于水中, 然后进行 SEM 观察, 结果见图 1(e). 冻干后仍能够保持图 1(d) 中相同的形状, 说明在水分蒸发直至完全干燥的过程中, 晶体仍能稳定存在, 且重新悬浮后, 在大小、形态和分散度方面与一直保存于水中的晶体没有差别. 图 1(f) 是晶体表面的局部放大图, 可见晶体表面并不光滑, 而是呈现条块堆积的结构, 表明 CaCO_3 晶体是经过逐步堆积而成的.

2.2 FTIR 分析

图 2 显示体系中 HEP 浓度分别为 0, 1.5, 2.5 mg/mL 时 CaCO_3 晶体的红外光谱分析图 (分别对应图中曲线 (a), (b), (c)). 在 876 和 712 cm^{-1} 处的吸收峰表明, 没有肝素存在时生成的 CaCO_3 是方解石型晶体; 当肝素浓度为 1.5 mg/mL 时, 712 cm^{-1} 处的吸收峰变弱, 在 745 cm^{-1} 处开始出现新的吸收峰, 说明生成的 CaCO_3 晶体是方解石和球霏石的混合体系; 当肝素浓度为 2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 712 cm^{-1} 的吸收峰继续减弱, 745 cm^{-1} 处的吸收峰增大, 说明球霏石型晶体增多, 方解石型晶体减少^[14]. 上述结果表明, 通过控制体系中 HEP 浓度, 可以得到不同结晶态的 CaCO_3 晶体.

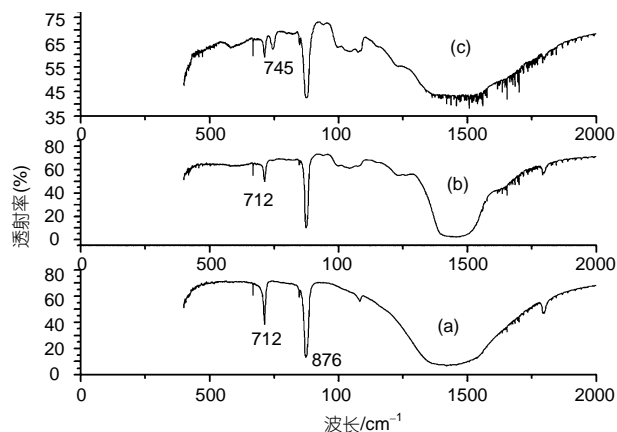


图2 不同肝素浓度(a) 0 mg/mL; (b) 1.5 mg/mL; (c) 2.5 mg·mL⁻¹条件下 CaCO₃的 FTIR 图谱

2.3 XRD 分析

XRD 分析结果如图 3 所示. 图 3(a)是没有 HEP 存在时所得菱形碳酸钙的 XRD 曲线, 其中(012), (104), (110), (113), (202), (018)和(116)晶面的衍射峰显示它是典型的方解石型 CaCO₃ 晶体. 图 3(b)为 5 mg/mL 的 HEP 存在时 CaCO₃ 晶体的 XRD 曲线图, 它既有方解石型 CaCO₃ 晶体各个晶面的衍射峰, 同时还具有球霏石型 CaCO₃ 晶体(004), (110), (112), (114), (300), (118)晶面的衍射峰^[15], 说明所得晶体是方解石和球霏石的共存体. 根据 1.2 所述公式, 计算得到球霏石的质量百分比为 57.4%. 由此可见, HEP 的加入对 CaCO₃ 的结晶特性产生了较大的影响. 此外, 将 HEP 浓度增加到 20 mg/mL 时仍不能得到单相球霏石晶体, XRD 图谱中仍显示很强的(104)峰, 球霏石的含量为 64.9%(图谱未显示).

2.4 HEP 装载量与包封率

将 HEP 进行 FITC 标记, 以 480 nm 为激发波长, 513 nm 为检测波长, 在荧光分光光度计下进行检测. FITC-HEP 在 520 nm 处附近有一个比较大的吸收峰, 而没有标记的 HEP 在此处没有任何吸收峰, 说明 FITC 成功标记到 HEP 上(图 4(a)). 根据标准曲线(图 4(b)), 由 1.2 所述公式可以计算 HEP/CaCO₃ 微球中 HEP 的 EA 和 EE. 当 HEP 浓度为 0.5, 1, 1.5, 2 mg·mL⁻¹时, CaCO₃ 微球包封的 HEP 总量 EA 分别为 87.4, 160.6, 236.2, 319.1 μg, 而包封率则分别为 87.3%, 80.26%, 78.71%, 79.75%(图 4(c)). 说明 HEP 确实结合到了 CaCO₃ 晶体中, 而且随着 HEP 浓度的增加, 碳酸钙微球中装载 HEP 的量也在增加, 但包封率保持在 80%左右.

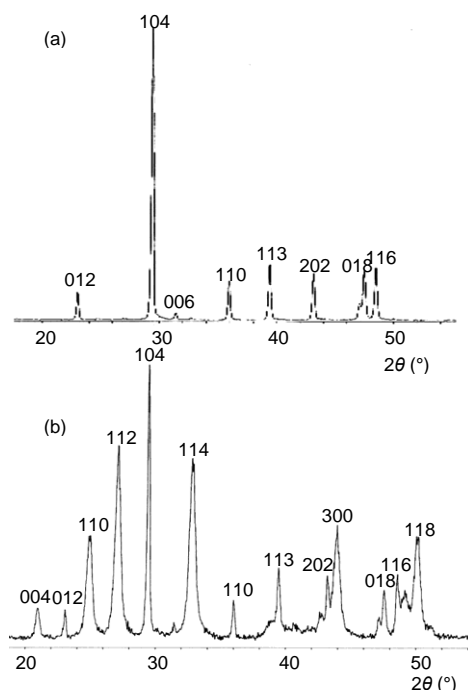


图3 不同肝素浓度(a) 0 mg/mL; (b) 5 mg/mL条件下 CaCO₃的 XRD 图谱

3 讨论

本文以 HEP 为有机基质, 研究了不同 HEP 浓度条件下对 CaCO₃ 晶体形貌和尺寸的影响. SEM, FTIR 和 XRD 结果表明: (1) 没有 HEP 存在时得到典型的方解石晶型, 0.5, 1.5 和 2.5 mg/mL HEP 存在时 CaCO₃ 晶体为方解石和球霏石晶体的共存体, 但 5 mg/mL 和 20 mg/mL HEP 存在时 CaCO₃ 晶体主要是球霏石晶体; (2) 随着体系中 HEP 浓度的增加, CaCO₃ 晶体颗粒的粒径呈现减小的趋势, 说明 HEP 是一种很好的 CaCO₃ 晶体改性剂和结晶抑制剂(图 1~3).

CaCO₃ 属于 ABO₃ 类的多型晶体, 一般以最稳定的方解石型存在. 研究发现, 有机大分子可以通过晶体生长修饰的方式控制 CaCO₃ 矿物的结构和生长, 这些有机大分子包括蛋白质类^[16]、多糖类^[17]、蛋白聚糖类^[17]和其他聚合物如聚电解质^[18,19]、枝状聚合物^[20,21]、双亲水性嵌段共聚物^[22,23]等. Manoli 和 Dalas 曾报道 3 种硫酸软骨素 A, B, C 均能诱导形成并稳定球霏石 CaCO₃ 晶体, 且 A, B, C 型硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)得到的球状晶体大小分布不同, 分别为 3.6 μm 左右、1.5~4 μm 和 3.3~5.3 μm^[24]. 本文发现 HEP 也具有调节控制 CaCO₃ 晶体生长并促进球霏石晶体形成的性质, 在一定程度上可以为生物矿化机制研究提供新的参考依据. 结果也提示, 有关 HEP 和 CS 等硫

酸多糖在体内与 CaCO_3 生物矿化相关的胆、胰结石生成以及与 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 生物矿化相关的牙、骨形成等生理过程的关系是一项值得探讨的研究课题。

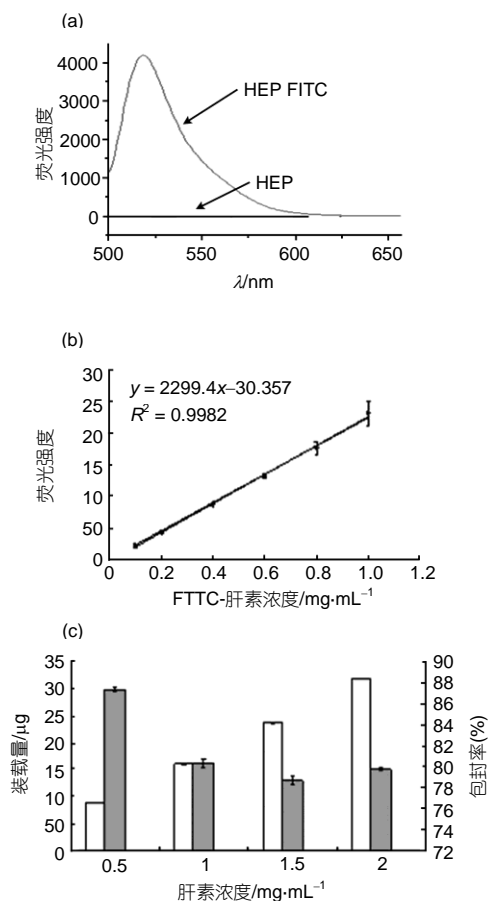


图4 (a) FITC-HEP的荧光图谱; (b) FITC-HEP标准曲线和 HEP/CaCO₃ 微球中肝素的装载量与封装率(c)

有机添加剂对 CaCO_3 晶体的成核、生长及形貌的影响比较复杂,同时结晶还受到各种环境因素的影响,如 pH 值、温度、溶液的过饱和度及外界无机离子等^[25,26]。本文发现,当这些外界条件保持一致时, CaCO_3 晶体的不同形貌只取决于 HEP 的浓度变化(图 1)。此体系中存在着两个竞争性的反应:一为钙离子和碳酸根离子的相互作用;另一为钙离子与 HEP 分子中羧酸根、磺酸根间的相互作用。当 HEP 的浓度为

$0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,反应体系中有较少的成核点,对晶型没有多大的影响,所以得到的仍是方解石的 CaCO_3 晶体,但其形貌和在纯水中的又有所不同,与氨基酸存在时情况类似^[27]。随着体系中 HEP 浓度增加,磺酸根、羧酸根与 Ca^{2+} 的相互静电作用更加明显,在 HEP/水界面富集了大量的钙离子,导致在界面区域钙离子浓度增加,使得 CaCO_3 在 HEP 链区附近的化学微环境中成核,给 CaCO_3 的结晶提供了较多的成核点,从而得到更多更小的结晶核,这些小结晶核的出现大大增加了结晶的表面能,所以就趋向于生成球霏石 CaCO_3 结晶。

值得一提的是,HEP 是生物体内一种重要的活性物质,通常 HEP 是通过和其他活性物质结合来发挥其生理功能的,比如它可以和抗凝酶 III(antithrombin III)、肝素结合蛋白(heparin interacting protein)和血小板因子 4(platelet factor 4)等结合,从而起到抗凝血作用。在临床上,使用 HEP 载体将大大提高 HEP 的生物利用度(bio-availability)。Luo 等曾报道一种可以生物降解的 HEP 微载体,但其对 HEP 封装率不超过 16.7%^[28];本实验室最近通过层层自组装方法制备的微载体对 HEP 的封装率为 74.4%^[29]。而本研究制备的 HEP/CaCO₃ 微球对 HEP 的封装率达到了 80%左右,提示 HEP/CaCO₃ 微球有可能成为一类新型的抗凝血材料,有必要进一步研究其对 HEP 的装载与控释特性。此外,HEP 分子中含有碱性生长因子(basic fibroblast growth factor)、骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)等生长因子的结合位点^[30]。基于这种特性,近年来利用肝素功能化材料(主要是水凝胶)进行生长因子的控释研究,在组织工程应用方面已经取得了良好的效果^[31-36]。但是,在制备材料时大都需要将 HEP 共价连接到高分子材料上^[31-36]。而本文报道的 HEP/CaCO₃ 微球工艺简单,且无需共价交联,因此为肝素功能化材料制备提供了一种新的有效手段,预计它在抗凝血医用材料与组织工程领域可能具有重要的研究与应用前景。

参考文献

- Mann S. The chemistry of form. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000, 39: 3392—3406[doi]
- Qi L, Li J, Ma J. Biomimetic morphogenesis of calcium carbonate in mixed solutions of surfactants and double-hydrophilic block copolymers. *Adv Mater*, 2002, 14: 300—303[doi]
- Yu J G, Lei M, Cheng M, et al. Facile preparation of calcium carbonate particles with unusual morphologies by precipitation reaction. *J Cryst Growth*, 2004, 261: 566—570[doi]

- 4 Yu J G, Lei M, Cheng M, et al. Effects of PAA additive and temperature on morphology of calcium carbonate particles. *J Solid State Chem*, 2004, 177: 681—689[[doi](#)]
- 5 Zhang D B, Qi L M, Ma J M, et al. Morphological control of calcium oxalate dihydrate by a double-hydrophilic block copolymer. *Chem Mater*, 2002, 14: 2450—2457
- 6 Qi L M, Cölfen H, Antonietti M. Crystal design of barium sulfate using double-hydrophilic block copolymers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000, 39: 604—607[[doi](#)]
- 7 Yu S H, Cölfen H, Tauer K, et al. Tectonic arrangement of BaCO₃ nanocrystals into helices induced by a racemic block copolymer. *Nat Mater*, 2005, 4: 51—55[[doi](#)]
- 8 Qi L M, Cölfen H, Antonietti M. Synthesis and characterization of CdS nanoparticles stabilized by double-hydrophilic block copolymers. *Nano Lett*, 2001, 1: 61—65[[doi](#)]
- 9 Cölfen H, Qi L M. A systematic examination of the morphogenesis of calcium carbonate in the presence of a double-hydrophilic block copolymer. *Chemistry*, 2001, 7: 106—116[[doi](#)]
- 10 Manoli F, Kanakis J, Malkaj P, et al. The effect of aminoacids on the crystal growth of calcium carbonate. *J Crystal Growth*, 2002, 236: 363—370[[doi](#)]
- 11 Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature*, 1993, 365: 499—505[[doi](#)]
- 12 Kontoyannis C G, Vagenas N V. Calcium carbonate phase analysis using XRD and FT-Raman spectroscopy. *Analyst*, 2000, 125: 251—255[[doi](#)]
- 13 Ruponen M, Ronkko S, Honkakoski P, et al. Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *J Biol Chem*, 2001, 276: 33875—33880[[doi](#)]
- 14 Beniash E, Aizenberg J, Addadi L, et al. Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proc Soc London Ser B*, 1997, 264: 461—465[[doi](#)]
- 15 Fanili G, Fermani S, Gazzano M, et al. Oriented crystallization of vaterite in collagenous matrices. *Chemistry*, 1998, 4: 1048—1052[[doi](#)]
- 16 Inoue H, Yuasa-Hashimoto N, Suzuki M, et al. Structural determination and functional analysis of a soluble matrix protein associated with calcification of the exoskeleton of the crayfish. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72: 2697—2718[[doi](#)]
- 17 Arias J L, Fernandez M S. Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization. *Chem Rev*, 2008, 108: 4475—4482[[doi](#)]
- 18 Sinn C G, Dimova R, Antonietti M. Isothermal titration calorimetry of the polyelectrolyte/water interaction and binding of Ca²⁺: Effects determining the quality of polymeric scale inhibitors. *Macromolecules*, 2004, 27: 3444—3450[[doi](#)]
- 19 Holt B, Lam R, Meldrum F C, et al. Anisotropic nano-papier mache microcapsules. *Soft Matter*, 2007, 3: 188—190[[doi](#)]
- 20 Naka K, Tanaka Y, Chujo Y, Ito Y. The effect of an anionic starburst dendrimer on the crystallization of CaCO₃ in aqueous solution. *Chem Commun*, 1999, 19: 1931—1932[[doi](#)]
- 21 Torres T, Claessens G C. Synthesis, separation, and characterization of the topoisomers of fused bicyclic subphthalocyanine dimers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 2561—2565[[doi](#)]
- 22 Chen S F, Yu S H, Wang T X, et al. Polymer-directed formation of unusual CaCO₃ pancakes with controlled surface structures. *Adv Func Mater*, 2005, 17: 1461—1465
- 23 Yu S H, Cölfen H, Hartmann J, et al. Biomimetic crystallization of calcium carbonate spherules with controlled surface structures and sizes by double-hydrophilic block copolymers. *Adv Func Mater*, 2002, 12: 541—545[[doi](#)]
- 24 Manoli F, Dalas E. Spontaneous precipitation of calcium carbonate in the presence of chondroitin sulfate. *J Cryst Growth*, 2000, 217: 416—421[[doi](#)]
- 25 Gómez M J, Torrent B J, Rodríguez C R. Nucleation of calcium carbonate at different initial pH conditions. *J Crystal Growth*, 1996, 169: 331—338[[doi](#)]
- 26 Dong K K, Kensuke N, Yoshiki C. Unique crystal morphology of hydrophobic CaCO₃ composite by sodium trisilanolate in a mixture of a water-miscible organic solvent and water. *J Crystal Growth*, 2003, 259: 411—418[[doi](#)]
- 27 An J X, Yu H S, Zhang C Y, et al. Crystal growth of calcium carbonate with various morphologies in different amino acid systems. *J Crystal Growth*, 2005, 285: 436—443[[doi](#)]
- 28 Luo X, Qiu D, He B, et al. Biodegradable heparin-loaded microspheres: carrier molecular composition and microsphere structure. *Macromol Biosci*, 2006, 6: 373—381[[doi](#)]
- 29 Shao Y Y, Zhu B Q, Li J, et al. Novel chitosan microsphere-templated microcapsules suitable for spontaneous loading of heparin. *Mater Sci Eng C*, 2009, 29: 936—941[[doi](#)]
- 30 Capila I, Linhardt J. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 390—412[[doi](#)]
- 31 Benoit D S, Collins S D, Anseth K S. Multifunctional hydrogels that promote osteogenic hMSC differentiation through stimulation and sequestering of BMP2. *Adv Funct Mater*, 2007, 17: 2085—2093[[doi](#)]
- 32 Nie T, Baldwin A, Yamaguchi N, et al. Production of heparin-functionalized hydrogels for the development of responsive and controlled growth factor delivery systems. *J Control Release*, 2007, 122: 287—296[[doi](#)]
- 33 Yoon J J, Chung H J, Park T G. Photo-crosslinkable and biodegradable Pluronic/heparin hydrogels for local and sustained delivery of angiogenic growth factor. *J Biomed Mater Res A*, 2007, 83: 597—605[[doi](#)]
- 34 Lee J S, Bae J W, Joung Y K, et al. Controlled dual release of basic fibroblast growth factor and indomethacin from heparin-conjugated polymeric micelle. *Int J Pharm*, 2008, 346: 57—63
- 35 Mc J S, Tae G, Stayton P S, et al. Heparin-regulated delivery of osteoprotegerin promotes vascularization of implanted hydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008, 19: 1021—1034[[doi](#)]
- 36 Joung Y K, Bae J W, Park K D. Controlled release of heparin-binding growth factors using heparin-containing particulate systems for tissue regeneration. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5: 1173—1184[[doi](#)]