

羟基磷灰石纳米粒子表面修饰的研究进展

范依然^a, 闫文馨^a, 韩颖超^b

(武汉理工大学 a.材料科学与工程国际化示范学院
b.材料复合新技术国家重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 羟基磷灰石是人体骨骼和牙齿的主要无机成分, 具有良好的生物相容性和生物活性, 且能诱导骨组织的生长, 促进组织缺损的修复, 是性能优异的骨修复材料。近年来, 纳米羟基磷灰石由于其独特的性能, 在生物医学领域展现出新的应用功能。但是, 为了发挥纳米羟基磷灰石独特的功能特性, 常常需要对其进行表面修饰, 以满足生物医学应用的条件和要求。从生物医学角度, 针对羟基磷灰石纳米粒子在生物显影、DNA 转染、药物递送、与高分子复合、促进成骨和抑菌等方面的应用, 对羟基磷灰石纳米粒子的表面修饰研究进行论述, 探讨相关表面修饰思路和技术及修饰应用效果。通过表面修饰, 不仅可以提高羟基磷灰石纳米粒子的分散性和悬浮稳定性, 提升药物装载能力和促进成骨能力, 还可以赋予其生物显影能力、主动靶向功能和抑菌能力。总之, 表面修饰是一种促进羟基磷灰石纳米粒子生物医学应用的有效手段。

关键词: 羟基磷灰石; 纳米材料; 表面修饰; 生物医学

中图分类号: R318.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2020)07-0017-11

DOI: 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2020.07.003

Research Progress on Surface Modification of Hydroxyapatite Nanoparticles

FAN Yi-ran^a, YAN Wen-xin^a, HAN Ying-chao^b

(a. International School of Materials Science and Engineering, b. State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT: Hydroxyapatite is the main inorganic component of human bones and teeth. It is an excellent bone repair material, which has good biocompatibility and biological activity, and can induce the growth of bone tissue and promote the repair of tissue defect. In recent years, nano-hydroxyapatite has exhibited new application functions in the field of biomedicine due to its unique properties. However, in order to take advantage of the unique functional properties of nano-hydroxyapatite, it is often necessary to modify its surface to meet the conditions and requirements of biomedical applications. From the perspective of biomedical applications, the research on surface modification of hydroxyapatite nanoparticles was reviewed for the applications in biological imaging, DNA transfection, drug delivery, compounding with polymers, promotion of bone formation and bacteriostasis, etc. Besides, the related surface modification ideas, techniques and application effects of modification were

收稿日期: 2020-05-30; 修订日期: 2020-06-25

Received: 2020-05-30; Revised: 2020-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(51672206); 先进能源科学与技术广东省实验室佛山分中心(佛山仙湖实验室)开放基金(XHT2020-008)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (51672206) and the Open Project of Foshan Xianhu Laboratory of the Advanced Energy Science and Technology Guangdong Laboratory (XHT2020-008)

通讯作者: 韩颖超(1977—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为纳米生物材料。邮箱: hanyingchao@whut.edu.cn

Corresponding author: HAN Ying-chao(1977—), Male, Ph.D., Researcher, Research focus: nano biomaterials. E-mail: hanyingchao@whut.edu.cn

引文格式: 范依然, 闫文馨, 韩颖超. 羟基磷灰石纳米粒子表面修饰的研究进展[J]. 表面技术, 2020, 49(7): 17-27.

FAN Yi-ran, YAN Wen-xin, HAN Ying-chao. Research progress on surface modification of hydroxyapatite nanoparticles[J]. Surface technology, 2020, 49(7): 17-27.

also discussed. The surface modification can not only improve the dispersibility and suspension stability as well as the drug loading capacity and promoting bone formation ability of hydroxyapatite nanoparticles, but also provide new functions including biological imaging ability, active targeting function and bacteriostatic ability. In short, the surface modification is an effective way to promote the biomedical application of hydroxyapatite nanoparticles.

KEY WORDS: hydroxyapatite; nanomaterials; surface modification; biomedicine

羟基磷灰石的分子式为 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 作为最具代表性的生物活性陶瓷材料, 其在材料领域和现代生物医学工程学科中受到人们的密切关注。羟基磷灰石 (HAP) 与人体骨骼的晶体组成和结构基本一致, 具有良好的生物学活性和相容性, 植入人体后, 对组织无刺激和排斥作用, 可与骨骼形成牢固的结合, 可作为骨骼缺损的填充物, 为新骨骼的形成提供支架, 并起到骨骼传导的作用。HAP 可以广泛应用于生活, 例如, 块体 HAP 可以用作吸附剂处理含重金属离子的工业废水^[1], 也可以与无机或有机高分子复合用于骨修复^[2]。与块体 HAP 相比, 纳米 HAP 在生物医学领域具有更广阔的应用前景。例如, 纳米 HAP 作为无机充填相与高分子进行复合, 可用于牙膏中对牙齿表面的微小破损处进行弥补^[3], 也可以作为 pH 响应载体材料, 用于药物或基因的递送, 另外纳米 HAP

本身具有促进细胞增殖分化的生物学效应。但是, 纳米 HAP 应用于生物医学中, 会面对复杂的生理环境。例如, 静脉注射进行药物或基因递送, 首先需要 HAP 纳米粒子在血液中保持良好的分散性和稳定性; 作为生物医用复合材料无机相, 需要解决 HAP 纳米粒子在高分基体中的团聚难题, 提高界面结合效果。为了促进纳米羟基磷灰石在生物医学领域的应用, 近十几年来, 研究人员通过离子掺杂^[4]、表面包覆^[5]、有机分子修饰^[6]等途径, 并结合新的制备技术 (如超声辅助法^[7]、微波辅助法^[8]), 实现了对 HAP 纳米粒子的表面修饰, 显著提高了其生物医学应用的效果^[9,10] (见表 1)。本文从生物显影、DNA 转染、药物递送、与高分子复合、促进成骨和抑菌几个方面, 对羟基磷灰石纳米粒子表面修饰研究进行论述, 为促进 HAP 纳米材料在生物医学领域的应用提供参考。

表 1 纳米羟基磷灰石的表面修饰技术^[11-70]

Tab.1 Nano-hydroxyapatite surface modification technology^[11-70]

Biomedical applications	Surface modification methods	Effect
Bioimaging	<p>Developing ability: magnetic ion doping (Fe^{3+} and Fe^{2+}); Fluorescent molecular adsorption; Rare earth element doping (Eu^{3+}, Tb^{3+}, Er^{3+}, etc.); Radioactive element doping ($^{18}\text{F}]\text{NaF}$, $^{68}\text{GaNO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$, ^{233}Ra, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, etc.)</p> <p>Dispersibility and suspension stability: heparin or D-α-tocopheryl polyethylene glycol succinate (vitamin E TPGS) micelle coating; surface modification with citrate or polyacrylic acid</p> <p>Targeted imaging function: coupled with folic acid</p> <p>Preventing fluorescence quenching: bring an initiator containing Br into the surface of the HAP nanorod after functionalization with amino acid, wrapped with $\text{Ba}_{0.55}\text{Y}_{0.3}\text{F}_2$</p>	Stable fluorescence properties in living cells; biological development with specific targeting to cancer cells; fluorescence quenching is prevented
DNA transfection	<p>Stronger binding: surface modification with aminosilane; activation of hydroxyl groups on the surface of nano-HAP with Na_2CO_3 and modification with polylysine (PLL); synthesis of layered HAP nanoplates</p> <p>Dispersion and suspension stability: modified by PEG-bp (bisphosphonate) or other bisphosphonate derivatives; modified with block copolymer poly(lactide-glycolide)-block-monoethoxy (poly Ethylene glycol) (PLGA-mPEG) and polyvinylpyrrolidone (PVP); Modified by PLL or citrate</p>	The surface-modified nano-HAP surface has a positive potential and can form a strong bond with negatively charged DNA; it has good dispersion and suspension properties
Drug delivery	<p>Combination with drugs: coated with gelatin; modified with heparin, carboxylic acid or alendronate (ALN); coated with silica shell after covalently binding antibiotic protein</p> <p>Increasing drug loading: modified with citric acid; alendronate grafted on the surface</p> <p>Targeted transport: folic acid grafted on the surface</p>	The surface potential of the modified nano-HAP is negative, which can be combined with positively charged drugs; the grafted molecules bond with the drugs to complete the drug loading; the drug loading capacity is increased; the drug is targeted to the cancer cells to release the drug

续表 1		
Biomedical applications	Surface modification method	Effect
Compounding with polymer	Improving the dispersibility of nano-HAP in polymer matrix: modified by dopamine, stearic acid, dodecyl alcohol or alginate Adsorption capacity: grafted oligosaccharide; modified with polyacrylic acid	The agglomeration of nano-HAP in polymer materials is reduced; the mechanical properties (bending strength, tensile strength and impact strength, etc.) of nano-HAP/polymer composite materials are improved; the adsorption capacity of nano-HAP/polymer composite materials is improved (Adsorbed protein, Cu ²⁺)
Promoting osteogenesis	Doping: double doped with Mg ²⁺ and Co ²⁺ ; Co-doped with zinc and chromium; doped with strontium ion; doped with silicon Physical adsorption: adsorption of BMP-2	The proliferation and differentiation of osteoblasts are promoted
Bacteriostasis	Doping: doped with Fe ³⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Ag ⁺ or co-doped of Ag and ZnO Surface wrapping: wrapped with curcumin Surface grafting: copolymers containing polyethylene glycol methacrylate methyl ether and ethylene glycol methacrylate phosphate are polymerized and grafted onto the surface of HAP	The activity of bacteria such as Escherichia coli, staphylococcus aureus, staphylococcus epidermidis can be inhibited

1 表面修饰应用研究

1.1 生物显影

生物显影技术是通过具有荧光、磁、放射性等功能的物质，在生物体内发射出可接收的显影信号，并转换成可视化的图像，从而了解生物体内的组织与结构，研究生物体的生理功能。纳米羟基磷灰石具有很好的生物相容性以及低毒性。以纳米羟基磷灰石为基质材料，将具有显影能力的离子、分子等通过离子掺杂、表面包覆或有机物接枝，负载在纳米羟基磷灰石上，有望成为生物安全的高性能显影剂，在生物显影方面展现出较为广泛的应用前景。图 1 为实现生物显影的表面修饰方法。

HAP 纳米粒子本身生物显影功能不足，为了赋予 HAP 纳米粒子良好的生物显影能力，可以将磁性粒子掺杂至纳米 HAP 中^[11]，但磁性较弱，应用效果不好。除此以外，还可以将荧光分子吸附到纳米 HAP 表面进行修饰^[12]，但由于纳米 HAP 遇到酸性溶液表面会溶解，溶解后吸附到纳米 HAP 表面的荧光分子会分离，导致显影效果不好。故本文不对这两种表面修饰方法做详细阐述。相比之下，通过离子掺杂将稀土元素和放射性元素等掺到晶格里面，使得纳米 HAP 相对更稳定，显影效果更好。

镧系元素的半径与羟基磷灰石中 Ca²⁺的半径接近，通常可以以镧系元素取代纳米 HAP 中的 Ca²⁺，制备荧光探针进行生物显影。Eu³⁺和 Tb³⁺为比较常见的掺杂离子，掺杂后的纳米 HAP 具有较强的发光效应，

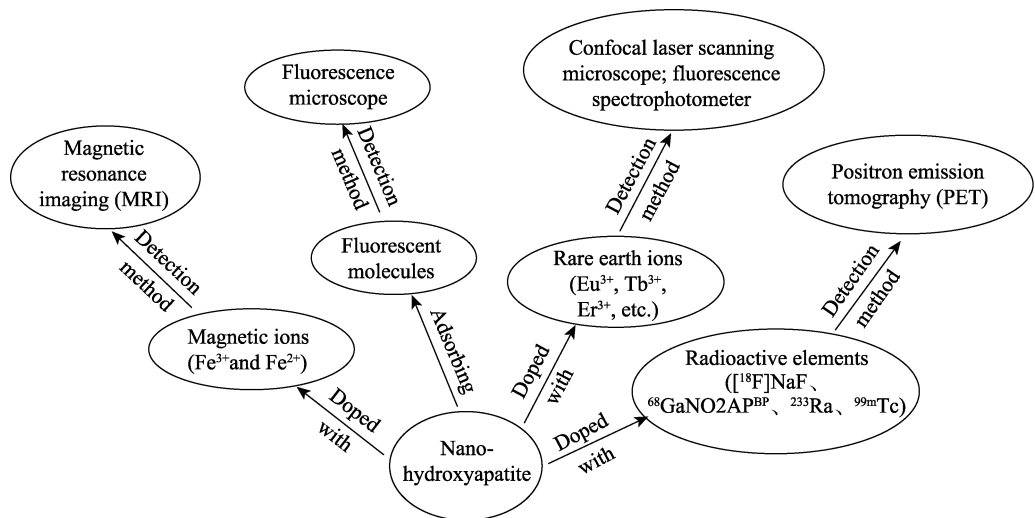


图 1 实现生物显影的表面修饰方法
Fig.1 Surface modification methods for biological imaging

而且还能保留纳米羟基磷灰石的主要物理性质和生物活性。例如, Xing Qing-guo 等^[13]制备出肝素涂层 Eu^{3+} 掺杂 HAP 纳米粒子 (Eu-nHAP), Eu^{3+} 主要与 I 位点的 Ca^{2+} 进行替换。实验表明, SH-Eu:nHAP 混悬液在约 2 h 的时间内可同时获得良好的稳定性和光致发光性能, 所得的 SH-Eu:nHAP 混悬液具有良好的生物安全性, 可用于具有特征发光发射的细胞标记。Alberto Escudero 等^[14]合成了掺铕的羟基磷灰石纳米粒子, 这种粒子发光特性好, 低毒。Li Ling 等^[15]将纳米 HAP 表面的 Ca^{2+} 用少量的 Tb^{3+} 替换, 制备了掺铽的纳米 HAP。虽然 Tb^{3+} 的掺量极低, 但修饰后的纳米 HAP 的发光效应得到了很大的改善, 在 488 nm 的持续激发光下, 纳米 HAP 颗粒的荧光强度在 1 周内降低不到 10%。鲍志伟等^[16]做了类似的研究, 他们以 CTAB 为表面活性剂, 制备出 Tb^{3+} 掺杂的纳米 HAP。除了常用的 Eu^{3+} 和 Tb^{3+} 外, Er^{3+} 掺杂的纳米羟基磷灰石也具有较好的荧光特性。Sudip Mondal 等^[17]制备出具有生物显影能力的 Er-HAP 纳米粒子, TEM 分析发现, 较大尺寸的 Ca^{2+} 被较小尺寸的 Er^{3+} 取代, 使得电荷不平衡。尺寸分布随着掺杂浓度的增大而增大, 导致原始为球形的纳米 HAP 在掺杂后变为细长状的结构。

在以离子掺杂的纳米 HAP 作为荧光探针时, 荧光淬灭会使显影剂的成像效果减弱, 故 Zeng 等^[18]以磷酸腺苷 (AMP) 为配体, 通过配体交换反应制备了氨基功能化的 HAP 纳米棒。然后通过酰胺化反应, 将含 Br 的引发剂 (HAP-Br) 引到 HAP-AMP 纳米棒表面。这种通过配体交换反应和金属自由表面引发原子转移自由基聚合 (ATRP) 相结合的方法制备出的 Eu^{3+} 掺杂的发光聚合物功能化 HAP 纳米棒, 可以克服荧光淬灭效应。同样, Sun 等^[19]也做了类似的研究, 他们用 $\text{Ba}_{0.55}\text{Y}_{0.3}\text{F}_2$ 包裹掺铕的纳米 HAP, 制备出水溶性发光立方纳米荧光粉, 可以防止表面淬灭, 提高辐射发光效率。

除了稀土离子掺杂纳米羟基磷灰石制备的荧光探针可用于生物显影外, 用放射性同位素标记的纳米羟基磷灰石同样也可用于生物显影。例如, Benedikt Sandhöfer 等^[20]将 ^{18}F NaF 或 $^{68}\text{GaNO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ 加入到磷灰石的水悬浮液中, 将悬浮液搅拌 15 s 后温育几分钟, 然后将悬浮液在室温下离心 10 min, 得到 ^{18}F NaF 和 $^{68}\text{GaNO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ 标记的纳米磷灰石。 ^{18}F NaF 作为正电子发射断层显像剂, 与纳米磷灰石中带负电的电子发生碰撞, 导致其“湮灭”, 发出两个方向相反的光子^[21]。 $^{68}\text{GaNO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ 中的双磷酸基团与纳米磷灰石中的钙位点具有亲和力, 从而形成特异吸附。羟基磷灰石作为磷灰石的一种, 用 ^{18}F NaF 或 $^{68}\text{GaNO}_2\text{AP}^{\text{BP}}$ 标记后应该也可以用于生物显影。J. Kozempel 等^[22]在纳米羟基磷灰石中加入 ^{223}Ra 溶液, 然后在实验室温度下对反应混合物进行 1 h 的涡旋振荡, 最后离心, 得

到 ^{223}Ra -HAP-NPs。由于 ^{223}Ra 是被非特异性吸附在纳米 HAP 表面或混合物中存在竞争性杂质, 标记的产率较低。相比之下, 由 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记的纳米 HAP 具有很高的产率。Marta de Souza Albernaz 等^[23]使用 150 μL 羟基磷灰石与氯化亚锡 (SnCl_2) 溶液 (80 $\mu\text{L/mL}$) 在室温下温育 20 min, 然后将该溶液与 100 μCi 的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 反应 10 min, 以便使用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记其结构。实验发现 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 的连接百分比达到 99.3%。

生物显影剂在生物成像过程中, 会遇到复杂的生理环境, 影响生物应用效果。静脉注射是生物显影剂体内应用的主要方式。因此 HAP 纳米粒子若想更好地进行生物成像应用, 需要进行表面修饰以满足静脉注射的要求, 如分散悬浮性、稳定性等。实验证明, 肝素、柠檬酸盐、聚丙烯酸 (PAA) 等对纳米 HAP 修饰可以起到分散作用。例如, Xing Qing-guo 等^[13]通过研究发现, 肝素包裹掺 Eu^{3+} 的纳米 HAP 对这种荧光粒子起到稳定的作用, 而且随着肝素浓度的改变, SH-Eu:nHAP 悬浮液的 Zeta 电位大幅变化, 说明静电稳定对 SH-Eu:nHAP 悬浮液的稳定性起着重要作用。柠檬酸盐离子是一种生物相容性钙络合剂和磷灰石的生长抑制剂。而柠檬酸盐 (Cit) 表面修饰可以使磷灰石纳米粒子 (AP) 具有更大的负表面电位, 从而增加了粒子间的排斥作用。实验发现, Cit-AP-NP 更易脱聚, 从而可以形成稳定的胶体悬浮液^[20]。用 Cit 修饰纳米 HAP 应该有类似的作用。Wan Dong 等^[24]制备出疏水性的掺氟 HAP: Eu^{3+} 纳米棒, 在溶液中不能稳定存在。为了将其转化为亲水性, 用维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS) 胶束对其进行包覆, 实验发现, 这些纳米棒在胶束中仍然保持其棒状且大小均匀。除了上述的分散方法以外, PAA 处理纳米 HAP 也能够减少其团聚, 而且用 PAA 修饰的纳米羟基磷灰石具有高比表面积^[14]。

显影剂在病变部位的富集量直接影响成像效果。通过表面修饰降低 HAP 粒子网状内皮系统 (RES) 清除率, 表面接枝靶向分子提高 HAP 粒子对病变部位的靶向能力, 是实现 HAP 纳米粒子显影剂体内良好生物成像的关键。纳米 HAP 可以通过包裹来防止被生物体的免疫系统清除而失去显影效果。如 Colzani 等^[25]用聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 纳米粒包裹能与表皮生长因子受体 2 (HER2) 特异性结合的曲妥珠单抗克隆抗体 (TZ), 避免了其被免疫系统清除。纳米 HAP 可以采取类似的表面修饰手段。肿瘤细胞膜上有 EGFR、HER-2、IGF IR 等过表达的受体^[26], 将纳米 HAP 表面接枝信号分子, 就能实现靶向功能。常用的靶向载体有抗体、多肽、叶酸、多糖等, 例如, Ashokan 等^[27]利用聚乙烯亚胺 (PEI) 将 nHAP 与叶酸 (FA) 偶联, 制备出具有分子靶向功能的 FA-PEI-nHAP, 该纳米粒子能够靶向与癌症靶向配体 FA 缀合, 具有较好的成像效果。

1.2 DNA 转染

DNA 转染是指在一定条件下主动或被动将外源 DNA 导入到细胞的过程。转染可以通过将 DNA 注射至细胞内、用化学物质改变细胞膜通透性或者用载体将 DNA 导入至细胞实现。目前最理想的是通过载体实现转染。纳米 HAP 由于其生物相容性、生物降解性且无毒, 可以用作 DNA 转染的载体。纳米 HAP 表面的钙离子带正电, 可以与 DNA 结合, 但是表面正电荷位点不足。若想要纳米 HAP 作为 DNA 的载体进行转染, 与 DNA 形成较好的结合, 需要对 HAP 表面修饰, 增加其表面的正电荷, DNA 分子加载到纳米 HAP 上的过程示意图 2。如 Babak Mostaghaci 等^[28]将 50 μL 的 N-(2-氨基乙基)-3-氨基丙基三甲氧基

硅烷 (APTMS) 滴加到 10 mL 的磷酸氢二铵溶液中, 分别用醋酸溶液将 pH 调节为 5 或 7, 制备出氨基硅烷修饰的 CaP-NPs 纳米粒, APTMS 的修饰是通过其氨基质子化传递正电荷, 实现与带负电的 DNA 结合。郑庆丰等^[29]先用 Na_2CO_3 活化纳米 HAP 表面的羟基, 使纳米 HAP 的 Zeta 负电位的绝对值增大, 然后再用多聚赖氨酸 (PLL) 修饰, 最终测得纳米 PLL-HAP 的电位为正。带正电的 PLL-HAP 与带负电的 DNA 通过静电吸引结合。Zeinah 等^[30]制备 PAA 涂层的纳米 HAP, 然后用带正电荷的聚精氨酸涂覆 PAA-HAP, 使其带更多的正电荷, 与带负电的双链 RNA 有较好的结合力。这种表面修饰方法对于 DNA 可能有类似的作用。

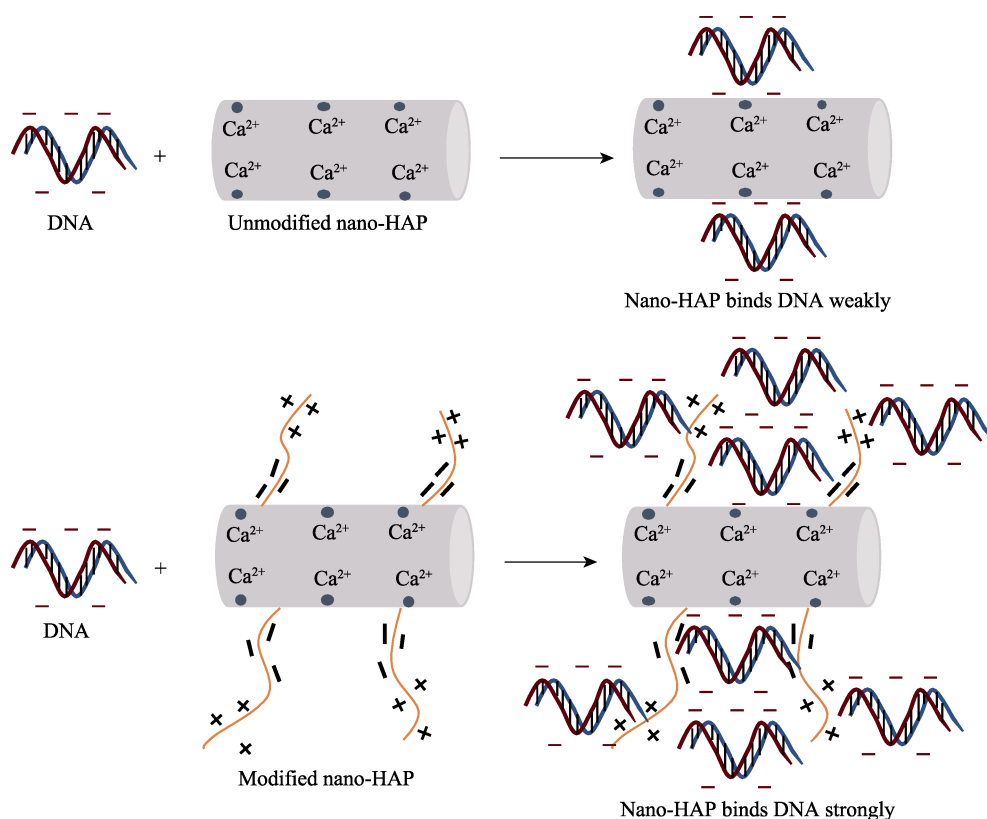


图 2 DNA 分子加载到纳米 HAP 上的过程示意图

Fig.2 Schematic diagram of the process of loading DNA molecules onto nano-HAP

除了上述的表面修饰方法外, 通过改变实验的条件, 制备出层状羟基磷灰石纳米板, HAP 表面具有更多的 Ca^{2+} , 也能使其与 DNA 形成较强的结合。例如, Wan 等^[31]通过改变模板合成条件, 包括模板剂、钙和磷酸盐前体的含量, 合成了具有不同结构和形态的层状羟基磷灰石 (L-HAP) 纳米板。DNA 的负载主要是通过插入 L-HAP 的层间空间, DNA 通过 L-HAP 上的阳离子与核酸的磷酸基团之间的静电相互作用与 L-HAP 纳米板结合, 使得 DNA 分子包裹在各个 L-HAP 纳米板上。同样 Luo 等^[32]做了类似的研究, 使用带磁性和不带磁性的 L-HAP 作为载体, 并

对 2D 和 3D 细胞培养物中的基因转染进行了比较。研究发现, 磁性 L-HAP 可能是 3D 基因转染中有前途的载体。

DNA 转染需要将 DNA 导入生物体内, 纳米 HAP 粒子的分散性和悬浮稳定性会影响 DNA 的转染效果。若要保证转染可以达到较高的效率, 需要对纳米 HAP 进行表面修饰, 以减少其团聚。如, Elisabeth V Giger 等^[33]开发了一种原始的无溶剂和无表面活性剂的方法, 该方法依赖于 PEG-bp (双膦酸盐) 或其他双膦酸盐衍生物来生产稳定的磷酸钙 DNA-NP, 在生产过程中, 颗粒大小随时间的增加而增大, 而 bp 会

中断颗粒的快速生长或阻止其聚集。Wu Guo jun 等^[34]利用嵌段共聚物聚(丙交酯-乙交酯)-嵌段-单乙氧基(聚乙二醇)(PLGA-mPEG)和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)对羟基磷灰石纳米粒子进行修饰,这两种聚合物通过—OH与C—O之间的氢键还有C—O—C基团与羟基磷灰石中的 Ca^{2+} 之间的相互作用连接到羟基磷灰石上。他们的吸附阻碍了HAP晶体的聚集,使得HAP纳米粒子有较好的分散性。除此以外,PLL和柠檬酸盐也可以提高羟基磷灰石纳米颗粒分散性,实验表明,修饰后的HAP纳米颗粒的转染效率、细胞存活率和剂量灵活性都优于商业试剂^[29,35,36]。

1.3 药物递送

药物递送是指在时间和空间上控制药物在生物体内的分布的一种技术。药物递送可以通过载体改变药物在体内的分布情况,并且控制药物的释放过程。所以与游离药物相比,药物递送可以提高药物的使用效率,提高疗效,减少毒性。纳米HAP由于生物相容性、生物可降解性,可以用作药物的载体。为了增强纳米HAP与药物的结合,可以通过表面修饰改变HAP纳米粒子表面电位,使其通过静电作用与药物结合。例如,Gunjan Verma等^[37]用明胶包覆羟基磷灰石纳米粒子(Gel-HANPs),然后利用EDC-NHS偶联反应将FA化学偶联到其上。Zeta电位测量表明,FA-Gel-HANP带有负表面电荷,这使其可以通过静电相互作用与阳离子药物结合。生长因子也可以与纳米HAP结合,实现药物递送。例如,乳铁蛋白(LF)是最有前途的骨诱导生长因子之一,能够促进成骨细胞、C2C12和人类脂肪干细胞(hADSCs)的成骨分化。用肝素(Hep)修饰后的HAP-NPs能通过静电作用将LF固定在其表面,而且LF/Hep-HAP纳米粒子分散性好,在水溶液中不形成大的聚集体,而且在体外可以促进rADSCs的成骨分化^[38]。Lee等^[39]用羧酸对羟基磷灰石功能化修饰,使其表面带有更多的负电荷,再与带正电荷的姜黄素纳米颗粒(Cur-NP)通过静电吸引相结合。

除了可以通过表面修饰改变纳米HAP表面电位,使其与药物静电作用结合外,也可以在纳米HAP表面接枝能与药物结合的分子,实现其载体的功能。例如,Selina等^[40]用抗生素蛋白与磷酸钙(CaP)纳米粒子表面共价结合,涂上一层薄薄的二氧化硅外壳,并以巯基终止。各种生物素化分子可以通过非共价亲和素-生物素复合物的形式,很容易地附着到纳米CaP-NPs表面。用抗生素蛋白修饰纳米HAP应该有类似的作用。Li等^[41]用阿仑膦酸盐(ALN)对介孔纳米HAP进行了修饰,ALN与纳米HAP通过P—O—Ca键合,可以作为布洛芬(ibu)的载体。

作为药物的载体,载药量是衡量其性能的重要指标。对HAP纳米粒子表面修饰,可以使其结合更多

的药物,提高递送效果。例如Lee等^[39]用柠檬酸修饰纳米HAP,制得羧酸官能化的HAP纳米粒子,提高了纳米HAP对姜黄素颗粒(Cur-NP)的吸附力。将HAP和修饰过的HAP纳米粒子载Cur-NP后,测量在MCF-7细胞中纳米颗粒积累量,发现修饰后的HAP纳米粒子组中细胞对Cur-NP的摄取量是未修饰HAP组中细胞对Cur-NP摄取量的两倍。Lee等^[42]用柠檬酸修饰纳米HAP,将 COO^- 基团固定在HAP,相比于未修饰的纳米HAP,柠檬酸修饰过的纳米HAP对于骨形态发生蛋白(BMPs)的载量显著提高。纳米HAP也可以通过表面修饰,增大其表面积,从而提高载药量。如Li等^[41]将阿仑膦酸盐(ALN)接枝到纳米HAP上,以ibu为模型药物,通过热重分析测量纳米HAP的药物负载和释放特性。分析发现,HAP和HAP-ALN的ibu负载量分别为16.9%和49.1%,这主要是因为HAP-ALN具有更大的表面积、孔径,以及材料表面上有更多的胺基,能够与更多的药物结合。

药物递送可以分为被动靶向和主动靶向两类。在被动靶向期间,由于高微血管渗透性和肿瘤细胞的淋巴引流不良,携带药物的纳米颗粒在肿瘤细胞中积累。主动靶向则将药物递送至肿瘤部位,对其他区域的影响不大,具有更好的治疗效果。为了实现主动靶向治疗,将纳米HAP接枝能与细胞表面受体结合的分子,通过其特异性结合,实现主动靶向功能。叶酸作为癌细胞上特异分子信号,是一种很好的接枝分子,许多研究人员通过对药物载体接枝叶酸来达到主动靶向的目的。如Gunjan Verma等^[37]将明胶包覆羟基磷灰石纳米粒子(Gel-HAP-NPs)表面接枝叶酸(FA),然后负载药物阿霉素(DOX)。实验发现,与不具有叶酸受体的细胞相比,具有叶酸受体的细胞对DOX-FA-GEL-HAP纳米粒子的摄取量明显更高。李鹏^[43]用聚乙烯亚胺修饰纳米HAP后接枝叶酸,再负载阿霉素。研究发现该粒子可以主动靶向至肝癌细胞,促进其凋亡。樊江莉等^[44]用硅烷偶联剂或氨基聚合物对纳米HAP表面氨基化处理,然后用叶酸对其进行修饰,负载阿霉素或其衍生物后实现了抗癌药物的缓慢靶向释放。

1.4 与高分子复合

纳米羟基磷灰石可以作为无机充填相与高分子复合,制备生物医用纳米复合材料。采用具备良好力学性能的高分子材料与纳米HAP复合,可以制备出机械性能好且具有成骨活性的纳米复合材料。但是,纳米粒子在分子基体中易团聚。为了解决这个问题,提高界面结合效果,可以对纳米羟基磷灰石进行表面修饰,减少其在高分子材料中的团聚,从而制备出纳米HAP在分子基体中均匀分布、且与基体牢固结合的生物医用复合材料。例如,李刚^[45]用多巴胺

(DA) 修饰 HAP, DA 氧化成为聚多巴胺 (PDA), 将 HAP 包覆, 然后将 PDA 修饰的 HAP 分散至聚乳酸 (PLA) 溶液中, 制备 HAP-PLA 复合材料。实验发现, PDA 质量分数为 6% 和 8% 时, 样品的断面 HAP 分散均匀。程利等^[46]用硬脂酸对纳米 HAP 表面修饰后与 PLA 复合, 硬脂酸的羧基与 HAP 表面的 Ca^{2+} 之间发生相互反应, 可以提高 HAP 纳米粒子与聚乳酸之间界面的结合程度。扫描电镜下观察发现, 表面修饰后的 HAP 与复合材料的界面更模糊, HAP 在基体中的分散更均匀。周尧等^[47]利用十二烷基醇修饰纳米 HAP 制备的 mHAP-PLA 与 HAP-PLA 相比, mHAP 在复合材料中的聚集程度更低, 分散也更均匀。而且实验发现, 修饰后的 mHAP-PLA 的弯曲强度、拉伸强度和冲击强度均高于 HAP-PLA。由于海藻酸钠 (SA) 的 $-\text{COO}^-$ 基团与 nHAP 表面的 Ca^{2+} 之间可以形成化学键, 故 Ni 等^[48]用 SA 对 nHAP 进行表面修饰, 然后利用电纺丝法制备出 PVA/SA/nHAP 复合纤维膜。用 EDS 和 TEM 观察 nHAP 在 PVA/SA/nHAP 纤维膜中的位置, 结果发现磷元素显示出均匀的点状分布, 这表明 nHAP 颗粒很好地分散于纤维中。Wen 等^[49]用硅烷偶联剂对纳米 HAP 进行表面修饰后, 再与硅橡胶 (SR) 复合。SEM 分析发现, HAP 纳米颗粒均匀地分散在 SR 基质中而没有聚集, 并以模糊的界面与基质紧密连接。

表面修饰除了能提高纳米 HAP/高分子复合材料的力学性能外, 还能提高其吸附能力。如于婷等^[50]将纳米 HAP 接枝低聚乳糖后与 PLGA 复合, 观察复合产物的表面形貌发现, 纳米 HAP 较均匀地分散于

PLGA 表面, 形成了一定的粗糙度, 有利于蛋白质的吸附, 提高了对细胞的亲和度。Guo 等^[51]用聚丙烯酸修饰纳米 HAP 后将其与海藻酸盐复合, 通过调节纳米 HAP 与海藻酸盐的质量比, 可以提高纳米 HAP-海藻酸盐复合材料对 Cu^{2+} 的吸附能力。

1.5 促进成骨

作为构成骨骼的主要无机成分, HAP 由于具有良好的生物相容性和骨诱导性, 被广泛应用于骨修复中。经过表面修饰的纳米 HAP 能够提高成骨细胞增殖分化能力, 具有更加优异的促进成骨效果, 通过掺杂和表面接枝提高纳米 HAP 促成骨能力的示意图 3。例如, Mg^{2+} 和 Co^{2+} 双重掺杂的羟基磷灰石与未掺杂的羟基磷灰石相比, 具有更高的蛋白质吸收能力, 而且实验表明, 其可以促进成骨细胞的增殖分化以及血管的生成^[52]。同样, 锌和铬共掺杂的羟基磷灰石具有抗菌和促进成骨细胞增殖的作用^[53]。锶离子 (Sr^{2+}) 具有刺激新骨形成, 增加骨密度的能力^[54]。故 K. Sangeetha 等^[55]用 Sr^{2+} 掺杂 HAP, 用 HAP 和掺杂后的 HAP 培养 MG63 细胞, 实验分析发现, 两个样品中, 掺杂后的 HAP 样品中细胞的增殖能力显著高于 HAP 样品中细胞的增殖能力。除了上述金属元素外, 硅元素也可以用于掺杂 HAP。硅作为高等动物正常代谢所必需的微量元素, 缺硅会导致骨代谢异常^[56]。高建勇等^[57]用硅掺杂 HAP 得到 Si-HAP, 对 Si-HAP 和 HAP 进行对照, 检测成骨细胞在材料表面的黏附、增殖情况以及特异性基因 ALP、Col-I、OC 的表达情况。分析发现, 微量的 Si 掺杂可以促进成骨细胞在 HAP 表

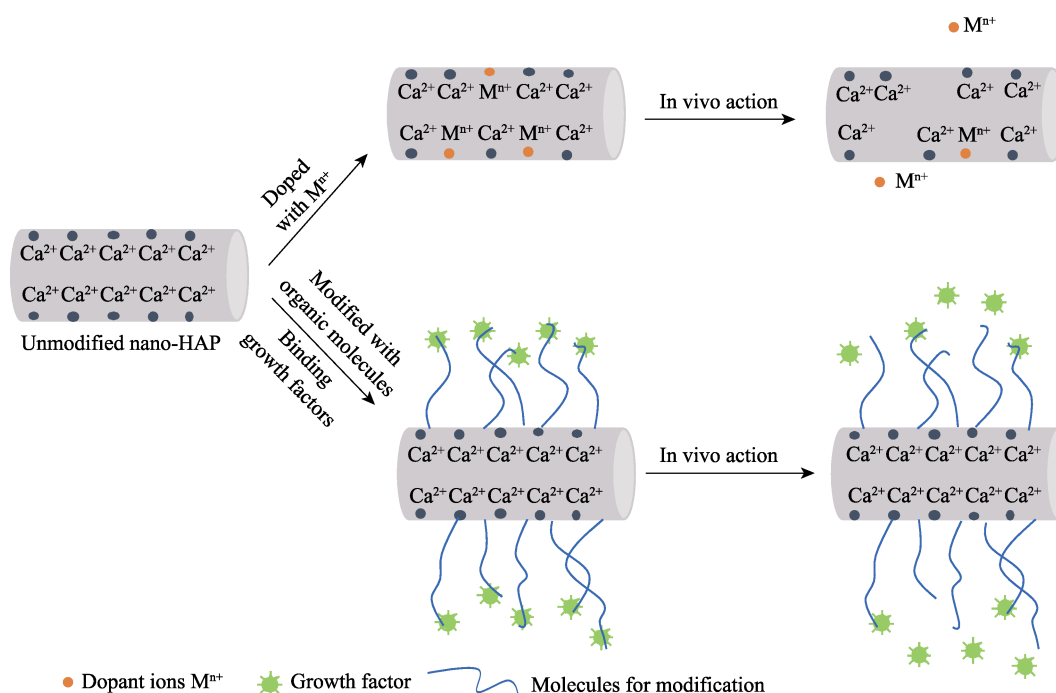


图 3 提高纳米 HAP 促成骨能力的表面修饰方法

Fig.3 Surface modification methods to improve the osteogenic potentiation of nano-HAP

面的附着、成骨细胞的增殖活性以及 MG63 成骨细胞成骨特异性基因的表达。除了对纳米 HAP 进行掺杂可以促成骨外, 还可以通过将 HAP 表面包覆或者加载生长因子来促进成骨。例如, Kim 等^[38]用肝素包裹纳米 HAP, 然后将 LF 固定在其表面。实验发现, 这种 LF/Hep-HAP 粒子在体外可以促进 rADSCs 的成骨分化。Ding 等^[58]将丝素蛋白 (SF) 用作表面稳定剂对加载了 BMP-2 的纳米 HAP 进行涂覆。通过对装载和未装载 BMP-2 的 SF/HA 复合支架进行成骨分化体外实验发现, 在载有 BMP-2 的支架中观察到的钙矿化和骨钙素表达明显高于无 BMP-2 的支架, 而且具有促进骨髓间充质干细胞 (BMSC) 分化的能力。

1.6 抑菌

抑菌剂是能够抑制细菌活性及繁殖的物质。抑菌的机理由于抑菌剂的不同而有所不同。例如, 纳米银粒子能够通过调节信号转导改变氨基酸、蛋白质的表达, 并产生活性氧簇 (ROS), 损伤细菌的 DNA, 导致细胞凋亡, 达到抑菌效果^[59]。抗菌不锈钢的抑菌作用主要是通过其表面析出相 ϵ -Cu 与细菌直接接触实现^[60]。然而, 纳米 HAP 本身不具有抑菌功能, 通过对纳米 HAP 进行掺杂铁离子、银离子、镁离子等, 或者利用姜黄素包裹, 可以赋予其抑菌能力。例如, Tiago 等^[61]用铁 (III) 离子掺杂羟基磷灰石纳米粒子得到磁性 HAP, 与未掺杂 Fe^{3+} 的 HAP 相比, Fe-HAP 可以更加显著地降低癌细胞的细胞代谢活性。Gayathri 等^[62]制备出镁取代的羟基磷灰石 (Mg-HAP) 纳米粒子, 研究合成后的纳米颗粒对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌效果。实验发现对于不同实验浓度的合成纳米颗粒, 它们均具有出色的抑菌活性。同样, 用 Zn 掺杂 HAP 也可以使其具有抑菌功效。Arjak 等^[63]通过抑菌测试发现, 在 HAP 的 Ca 位置取代 Zn 时, 掺杂 Zn 的 HAP 显示出抑菌效果。银可以治疗细菌感染^[64], 而掺银的羟基磷灰石可以控制银离子的释放速率, 并保持较长时间的抑菌活性^[65]。Zhang 等^[66]将纳米 Ag 和 ZnO 掺入纳米 HAP 中, 并通过激光熔覆沉积到 Ti6Al4V (Ti6) 植入物上, 实验发现, 复合涂层可以释放 Zn^{2+} 和 Ag^+ , 从而实现抑菌效果。而在大肠杆菌抗菌实验中发现, 未掺杂的 HAP-Ti6 的抗菌效率为 5.34%, 在掺杂 ZnO (质量分数 10%) 后, 其对大肠杆菌的抗菌效果提高了 53.3%。随着 Ag 质量分数增加至 3%, 其对大肠杆菌的抗菌功效急剧增加至 79.6%。

除了可以通过对纳米 HAP 进行掺杂实现抑菌效果外, 包裹和表面接枝也可以赋予纳米 HAP 抑菌能力。例如, 用姜黄素包裹纳米 HAP 可以达到抑菌效果。Saleth 等^[67]制备出姜黄素包裹的羟基磷灰石, 抗菌实验发现, 姜黄素包裹的 HAP 对细菌病原体弗氏链球菌具有良好的抗菌活性。纳米 HAP 还可以通

过表面接枝而具有良好的抗菌能力。Cui 等^[68]将一系列含有聚乙二醇甲基丙烯酸甲酯甲基醚 (PEGMA) 和乙二醇甲基丙烯酸磷酸酯 (Phosmer) 的侧链的共聚物聚合, 然后将聚合后的共聚物接枝于纳米 HAP 表面。由于密集覆盖在 HAP 表面的 PEGMA 与 Phosmer 产生静电排斥作用, 实现了对细菌的有效抑制。通过对表皮葡萄球菌的细菌粘附实验发现, 与未修饰的 HAP 相比, 修饰后的 HAP 表面的细菌数量显著减少。

2 总结与展望

综上所述, 通过对纳米 HAP 进行表面修饰, 可以从以下几个方面提高 HAP 纳米粒子的性能:

1) 在应用于生物显影时, 表面修饰可以使 HAP 粒子具有显影能力, 提高其分散性、悬浮稳定性, 使其具有靶向成像能力。

2) 应用于 DNA 转染时, 表面修饰可以改变纳米 HAP 表面电位, 使其与 DNA 更好地结合, 以及减少其团聚。

3) 应用于药物递送时, 表面修饰可以增强纳米 HAP 与药物的结合力, 提高载药量, 实现主动靶向输送药物功能。

4) 在应用于与高分子复合时, 表面修饰可以提高纳米 HAP 与高分子材料的界面相容性, 降低纳米 HAP 在高分子基体中的团聚。

5) 在应用于促进成骨时, 表面修饰可以提高纳米 HAP 促进成骨细胞增殖分化的能力。

6) 在应用于抑菌时, 表面修饰可以使纳米 HAP 具备抑制细菌活性及增殖能力的功效。

纳米 HAP 作为生物显影剂、DNA 与药物载体, 均需要通过血液循环在生物体内实现其功能。在这个过程中会遇到复杂的生理环境, 为了减少被机体的清除, 提高作用率, 需要对纳米 HAP 进行包裹。在这方面的研究不是很多, 所以需要开展进一步研究。例如, 可以尝试通过用蛋白质包裹纳米 HAP 进行保护^[69]。红细胞膜表面有大量的免疫识别抗体, 可以包埋纳米药物用于药物递送^[70,71], 所以应该也可以作为包覆材料修饰纳米 HAP, 减少机体清除率。PEG 可以用于修饰抗肿瘤药物, 以降低抗原性^[72], 故可以用 PEG 修饰纳米 HAP 进行实验。表面修饰的纳米 HAP 在主动靶向方面的应用非常广泛, 而其中大多以叶酸作为靶向载体, 所以未来还需要研究纳米 HAP 经其他靶向载体表面修饰后的性能。例如, 由于肝细胞膜上存在去唾液酸糖蛋白的受体^[73], 故可以用糖蛋白包裹纳米 HAP 实验, 观察其能否导向肝细胞。与肿瘤归巢肽 iRGD 偶联的化合物可以与肿瘤血管结合^[74], 故可以用 iRGD 修饰纳米 HAP 进行靶向治疗肿瘤实验。

参考文献:

- [1] 赵帅, 张新宝, 郑金峰. 羟基磷灰石的吸附性能研究[J]. 山东陶瓷, 2019, 42(5): 3-11.
ZHAO Shuai, ZHANG Xin-bao, ZHENG Jin-feng. Study on adsorption properties of hydroxyapatite[J]. Shandong ceramics, 2019, 42(5): 3-11.
- [2] 高飞, 闫明, 朱珊珊, 等. 羟基磷灰石在生物材料中的应用[J]. 现代口腔医学杂志, 2019, 33(5): 310-313.
GAO Fei, YAN Ming, ZHU Shan-shan, et al. Application of hydroxyapatite in biological materials[J]. Journal of modern stomatology, 2019, 33(5): 310-313.
- [3] 李显波. 纳米羟基磷灰石的制备方法及其在牙膏中的作用[J]. 牙膏工业, 2005(1): 28-29.
LI Xian-bo. Preparation methods of nano-hydroxyapatite and its role in toothpaste[J]. Toothpaste industry, 2005(1): 28-29.
- [4] ZENG Guang-jian, LIU Mei-ying, JIANG Ru-ming, et al. Surface grafting of Eu^{3+} doped luminescent hydroxyapatite nanomaterials through metal free light initiated atom transfer radical polymerization for theranostic applications[J]. Materials science & engineering C, 2017, 77: 420-426.
- [5] ZHAO Xue-ni, LI He-jun, XU Zhan-wei, et al. Selective preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/collagen coatings with three-dimensional network structure[J]. Surface & coatings technology, 2017, 322: 227-237.
- [6] SUN Ya-hui, QU Zhen-ping, CHEN Dan, et al. Formaldehyde catalytic oxidation over hydroxyapatite modified with various organic molecules[J]. Chinese journal of catalysis, 2014, 35(12): 1927-1936.
- [7] LEILA F, JAFAR K A. Characterization and corrosion behavior of graphene oxide-hydroxyapatite composite coating applied by ultrasound-assisted pulse electrodeposition[J]. Ceramics international, 2017, 43(16): 13885-13894.
- [8] SHKIR M, KILANY M, YAHIA I S. Facile microwave-assisted synthesis of tungsten-doped hydroxyapatite nanorods: a systematic structural, morphological, dielectric, radiation and microbial activity studies[J]. Ceramics international, 2017, 43: 14923-14931.
- [9] DIAO Hua-xin, SI Yun-feng, ZHU Ai-ping, et al. Surface modified nano-hydroxyapatite/poly(lactide acid) composite and its osteocyte compatibility[J]. Materials science & engineering C, 2012, 32(7): 1796-1801.
- [10] KOLESNIKOV I E, NIKOLAEV A M, LÄHDERANTA E, et al. Structural and luminescence properties of Ce^{3+} -doped hydroxyapatite nanocrystalline powders[J]. Optical materials, 2020, 99: 1099550.
- [11] ANNA T, ELENA L, MONICA S. Gu magnetic hydroxyapatite: Italy, CN103038161B[P]. 2016-08-10.
- [12] ZHANG Yuan, YUAN Yuan, LIU Chang-sheng. Fluorescent labeling of nanometer hydroxyapatite[J]. Journal of materials science and technology, 2008, 24(2): 187-191.
- [13] XING Qing-guo, ZHANG Xiao-jun, WU Du-lan, et al. Ultrasound-assisted synthesis and characterization of heparin-coated Eu^{3+} doped hydroxyapatite luminescent nanoparticles[J]. Colloid and interface science communications, 2019, 29: 17-25.
- [14] ESCUDERO A, CALVO M E, RIVERA-FERNÁNDEZ S, et al. Microwave-assisted synthesis of biocompatible cur-opium-doped calcium hydroxyapatite and fluoroapatite luminescent nanospindles functionalized with poly(acrylic acid)[J]. Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids, 2013, 29(6): 1985-1994.
- [15] LI Ling, LIU Yu-kan, TAO Jin-hui, et al. Surface modification of hydroxyapatite nanocrystallite by a small amount of terbium provides a biocompatible fluorescent probe[J]. Journal of physical chemistry C, 2008, 112(32): 12219-12224.
- [16] 鲍志伟, 孙瑞雪, 陈克正. Tb^{3+} 掺杂纳米羟基磷灰石的制备及其发光特性[J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2011, 32(3): 239-241.
BAO Zhi-wei, SUN Rui-xue, CHEN Ke-zheng. Preparation and luminescent properties of Tb^{3+} doped nano-hydroxyapatite[J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology (natural science edition), 2011, 32(3): 239-241.
- [17] SUDIP M, VAN T N, SUMIN P, et al. Bioactive, luminescent erbium-doped hydroxyapatite nanocrystals for biomedical applications[J]. Ceramics international, 2020, 46(10): 16020-16031.
- [18] ZENG Guang-jian, LIU Mei-ying, HENG Chun-ning, et al. Surface polyPEGylation of Eu^{3+} doped luminescent hydroxyapatite nanorods through the combination of ligand exchange and metal free surface initiated atom transfer radical polymerization[J]. Applied surface science, 2017, 399: 499-505.
- [19] CONROY S, GUILLEM P, COLIN M, et al. Synthesis and radioluminescence of PEGylated Eu^{3+} -doped nanophosphors as bioimaging probes[J]. Advanced materials, 2011, 23: H195-H199.
- [20] BENEDIKT S, MARIAN M, JOSÉ M D L, et al. Synthesis and preliminary in vivo evaluation of well-dispersed biomimetic nanocrystalline apatites labeled with positron emission tomographic imaging agents[J]. American Chemical Society, 2015, 7(19): 10623-10633.
- [21] 朱朝晖. 正电子发射断层显像[J]. 现代仪器, 2001(1): 14-17.
ZHU Zhao-hui. Positron emission tomography[J]. Modern instruments, 2001(1): 14-17.
- [22] KOZEMPEL J, VLK M, MÁLKOVÁ E, et al. Prospective carriers of ^{223}Ra for targeted alpha particle therapy[J]. Journal of radioanalytical and nuclear chemistry, 2015, 304(1): 443-447.
- [23] MARTA D, CARLOS A, ALEXANDRE M, et al. Radiolabelled nanohydroxyapatite with $^{99\text{m}}\text{Tc}$: perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction[J]. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2014, 42(2): 88-91.
- [24] WAN Dong, LIU Wei-jiao, WANG Lei, et al. Fluorinated hydroxyapatite: Eu^{3+} nanorods-loaded folate-conjugated D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate (vitamin E TPGS) micelles for targeted imaging of cancer cells[J]. Nanotechnology, 2016, 27(10): 105703.
- [25] BARBARA C, LAURA P, ADA H, et al. Investigation of antitumor activities of trastuzumab delivered by PLGA nanoparticles[J]. International journal of nanomedicine, 2018, 13: 957-973.
- [26] 胡政, 周桂生, 周光飏. 肿瘤分子靶向治疗[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(5): 335-341.
HU Zheng, ZHOU Gui-sheng, ZHOU Guang-biao. Mole-

- cular targeted therapy of tumor[J]. Chinese medicinal biotechnology, 2010, 5(5): 335-341.
- [27] ASHOKAN A, MENON D, NAIR S, et al. A molecular receptor targeted, hydroxyapatite nanocrystal based multimodal contrast agent[J]. Biomaterials, 2010, 31(9): 2606-2616.
- [28] BABAK M, BRIGITTA L, ROBERT H, et al. One-step synthesis of nanosized and stable amino-functionalized calcium phosphate particles for DNA transfection[J]. Chemistry of materials, 2013, 25(18): 3667-3674.
- [29] 郑庆丰, 王建军, 应敏刚, 等. 纳米羟基磷灰石的表面修饰及其与 DNA 结合的实验研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2008, 37(6): 777-780.
ZHENG Qing-feng, WANG Jian-jun, YING Min-gang, et al. Experimental study on surface modification and DNA binding of hydroxyapatite nanoparticles[J]. Acta Medicinæ Universitatis Scientiæ et Technologiæ Huazhong, 2008, 37(6): 777-780.
- [30] BADDAR Z E, GURUSAMY D, LAISNEY J, et al. Polymer-coated hydroxyapatite nanocarrier for double-stranded RNA delivery[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68(25): 6811-6818.
- [31] WAN Yi-zao, WU Chao-qun, ZUO Gui-fu, et al. Controlled template synthesis of lamellar hydroxyapatite nanoplates as a potential carrier for gene delivery[J]. Materials chemistry and physics, 2015, 156: 238-246.
- [32] LUO Hong-lin, DONG Jiao-jiao, YANG Zhi-wei, et al. Magnetic lamellar nano-hydroxyapatite as a vector for gene transfection in three-dimensional cell culture[J]. Journal of nanoscience and nanotechnology, 2018, 18(8): 5314-5319.
- [33] GIGER E V, PUIGMARTÍ-LUIS J, SCHLATTER R, et al. Gene delivery with bisphosphonate-stabilized calcium phosphate nanoparticles[J]. Journal of controlled release, 2010, 150(1): 87-93.
- [34] WU Guo-jun, ZHOU Lin-zhu, WANG Ke-wei, et al. Hydroxyapatite nanorods: an efficient and promising carrier for gene transfection[J]. Journal of colloid and interface science, 2010, 345(2): 427-432.
- [35] 郑庆丰, 王建军, 应敏刚, 等. 纳米羟基磷灰石可介导转染人肺癌 A549 细胞[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(3): 309-313.
ZHENG Qing-feng, WANG Jian-jun, YING Min-gang, et al. Transfection of A549 human lung cancer cells is mediated by nano-hydroxyapatite[J]. Basic & clinical medicine, 2009, 29(3): 309-313.
- [36] KHAN M A, WU V M, GHOSH S, et al. Gene delivery using calcium phosphate nanoparticles: optimization of the transfection process and the effects of citrate and poly (l-lysine) as additives[J]. Journal of colloid and interface science, 2016, 471: 48-58.
- [37] VERMA G, SHETAKE N G, PANDREKAR S, et al. Development of surface functionalized hydroxyapatite nanoparticles for enhanced specificity towards tumor cells[J]. European journal of pharmaceutical sciences, 2020, 144: 105206.
- [38] KIM S E, LEE D W, YUN Y P, et al. Heparin-immobilized hydroxyapatite nanoparticles as a lactoferrin delivery system for improving osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells[J]. Biomedical Materials, 2016, 11(2): 025004.
- [39] LEE Wing-Hin, LOO Ching-Yee, ROHANIZADEH R. Functionalizing the surface of hydroxyapatite drug carrier with carboxylic acid groups to modulate the loading and release of curcumin nanoparticles[J]. Materials science & engineering C, 2019, 99: 929-939.
- [40] VAN DER MEER S B, KNUSCHKE T, FREDE A, et al. Avidin-conjugated calcium phosphate nanoparticles as a modular targeting system for the attachment of biotinylated molecules in vitro and in vivo[J]. Acta biomaterialia, 2017, 57: 414-425.
- [41] LI Dong-dong, ZHU Yun-tao, LIANG Zhi-qiang. Alendronate functionalized mesoporous hydroxyapatite nanoparticles for drug delivery[J]. Materials research bulletin, 2013, 48(6): 2201-2204.
- [42] LEE W H, LOO C Y, ZAVGORODNIY A V, et al. A novel approach to enhance protein adsorption and cell proliferation on hydroxyapatite: citric acid treatment[J]. RSC advances, 2013, 3: 4040-4051.
- [43] 李鹏. 仿生矿化制备负载阿霉素靶向纳米羟基磷灰石的研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2016: 1-53.
LI Peng. Study on the targeted nano-hydroxyapatite loading doxorubicin by biomimetic method[D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University, 2016: 1-53.
- [44] 樊江莉, 素真, 康垚, 等. 叶酸修饰的载药羟基磷灰石及其制备方法: 中国专利, CN106344927A[P]. 2017-01-25.
FAN Jiang-li, SU Zhen, KANG Yao, et al. Folate-modified medicine-carrying hydroxylapatite and preparation method: Chinese patent, CN106344927A[P]. 2017-01-25.
- [45] 李刚. 羟基磷灰石与聚乳酸复合材料的制备与性能[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019: 1-78.
LI Gang. Preparation and properties of hydroxyapatite and polylactic acid composites[D]. Guiyang: Guizhou University, 2019: 1-78.
- [46] 程利, 王鑫, 赵雄燕. 功能化纳米羟基磷灰石改性聚乳酸复合材料的研究[J]. 应用化工, 2019, 48(7): 1595-1597.
CHENG Li, WANG Xin, ZHAO Xiong-yan. Study on polylactic acid composites modified by functionalized nano hydroxyapatite[J]. Applied chemical industry, 2019, 48(7): 1595-1597.
- [47] 周尧, 赵雄燕, 孙占英, 等. 改性纳米羟基磷灰石增强聚乳酸复合材料的研究[J]. 应用化工, 2017, 46(12): 2350-2353.
ZHOU Yao, ZHAO Xiong-yan, SUN Zhan-ying, et al. Study on polylactide composite reinforced with modified nano-hydroxyapatite[J]. Applied chemical industry, 2017, 46(12): 2350-2353.
- [48] NI Pei-long, BI Hong-yan, ZHAO Gang, et al. Electrospun preparation and biological properties in vitro of polyvinyl alcohol/sodium alginate/nano-hydroxyapatite composite fiber membrane[J]. Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2019, 173: 171-177.
- [49] WEN Ji-qiu, LI Yu-bao, ZUO Yi, et al. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/silicone rubber composite[J]. Materials letters, 2008, 62(19): 3307-3309.
- [50] 于婷, 刘娅, 王宇, 等. 改性纳米羟基磷灰石/PLGA 复合材料的制备及生物活性[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(7): 1439-1444.

- YU Ting, LIU Ya, WANG Yu, et al. Preparation and bioactivity of the composite of PLGA and hydroxyapatite nanocrystals surface-grafted with L-lactic acid oligomer[J]. Chemical journal of Chinese universities, 2009, 30(7): 1439-1444.
- [51] GUO Jia-li, HAN Ying-chao, MAO Yu-ting, et al. Influence of alginate fixation on the adsorption capacity of hydroxyapatite nanocrystals to Cu^{2+} ions[J]. Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects, 2017, 529: 801-807.
- [52] SENTHILGURU K, UPASANA M, TARUN A, et al. Improving the osteogenic and angiogenic properties of synthetic hydroxyapatite by dual doping of bivalent cobalt and magnesium ion[J]. Ceramics international, 2015, 41(9): 11323-11333.
- [53] STASYS T, KUNIO I, RIMANTAS R, et al. Zinc and chromium co-doped calcium hydroxyapatite: sol-gel synthesis, characterization, behaviour in simulated body fluid and phase transformations[J]. Journal of solid state chemistry, 2020, 284: 121202.
- [54] ZHANG Wei-bin, SHEN Yu-hui, PAN Hao-bo, et al. Effects of strontium in modified biomaterials[J]. Acta biomaterialia, 2010, 7(2): 800-808.
- [55] SANGEETHA K, ASHOK M, GIRIJA E K, et al. Strontium and ciprofloxacin modified hydroxyapatites as functional grafts for bone prostheses[J]. Ceramics international, 2018, 44(12): 13782-13789.
- [56] EMMANUEL B, THOMAS E, ANNETTE B, et al. Reference values for serum silicon in adults[J]. Analytical biochemistry, 2004, 337(1): 130-135.
- [57] 高建勇, 王铭, 田刚, 等. 微量硅掺杂改性羟基磷灰石的制备及对成骨细胞功能活性的影响[J]. 第二军医大学学报, 2016, 37(4): 405-410.
GAO Jian-yong, WANG Ming, TIAN Gang, et al. Preparation of microdosage silicon-doped hydroxyapatite and its effect on functional activity of osteoblasts[J]. Academic journal of Second Military Medical University, 2016, 37(4): 405-410.
- [58] DING Zhao-zhao, FAN Zhi-hai, HUANG Xiao-wei, et al. Silk-hydroxyapatite nanoscale scaffolds with programmable growth factor delivery for bone repair[J]. ACS applied materials & interfaces, 2016, 8(37): 24463-24470.
- [59] 夏明峰, 张帅, 田虎. 纳米银粒子抗菌原理的研究进展[J]. 中国现代普通外科进展, 2014, 17(10): 787-790.
XIA Ming-feng, ZHANG Shuai, TIAN Hu. Research progress of antibacterial principle of silver nanoparticles[J]. Chinese Journal of current advances in general surgery, 2014, 17(10): 787-790.
- [60] 吕曼祺, 陈四红, 董加胜, 等. 铁素体抗菌不锈钢杀菌过程与机理初探[J]. 金属功能材料, 2005, 12(6): 10-13.
LYU Man-qi, CHEN Si-hong, DONG Jia-sheng, et al. Pilot study about the killing bacteria process and mechanism of ferrite antibacterial stainless steel[J]. Metallic functional materials, 2005, 12(6): 10-13.
- [61] RIBEIRO T P, MONTEIRO F J, LARANJEIRA M S. Duality of iron(III) doped nano hydroxyapatite in triple negative breast cancer monitoring and as a drug-free therapeutic agent[J]. Ceramics international, 2020, 46(10): 16590-16597.
- [62] GAYATHRI B, MUTHUKUMARASAMY N, VELAUT-HAPILLAI D, et al. Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity[J]. Arabian journal of chemistry, 2016, 11(5): 645-654.
- [63] BHATTACHARJEE A, GUPTA A, VERMA M, et al. Site-specific antibacterial efficacy and cyto/hemo-compatibility of zinc substituted hydroxyapatite[J]. Ceramics international, 2019, 45(9): 12225-12233.
- [64] 胡冠松. 纳米银的制备及其体外抗菌和抗肿瘤活性研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2016: 1-73.
HU Guan-song. Preparation and in vitro study of antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016: 1-73.
- [65] DUBNIKA A, LOCA D, RUDOVICA V, et al. Functionalized silver doped hydroxyapatite scaffolds for controlled simultaneous silver ion and drug delivery[J]. Ceramics international, 2017, 43(4): 3698-3705.
- [66] ZHANG Yan-zhe, LIU Xiang-mei, LI Zhao-yang, et al. Nano Ag/ZnO-incorporated hydroxyapatite composite coatings: highly effective infection prevention and excellent osteointegration[J]. ACS applied materials & interfaces, 2018, 10(1): 1266-1277.
- [67] SEBASTIAMMAL S, FATHIMA A S L, DEVANESAN S, et al. Curcumin-encased hydroxyapatite nanoparticles as novel biomaterials for antimicrobial, antioxidant and anticancer applications: a perspective of nano-based drug delivery[J]. Journal of drug delivery science and technology, 2020, 57: 101752.
- [68] CUI Xin-nan, KOUJIMA Y, SETO H, et al. Inhibition of bacterial adhesion on hydroxyapatite model teeth by surface modification with PEGMA-phosmer copolymers[J]. ACS biomaterials science & engineering, 2016, 2(2): 205-212.
- [69] 饶荣, 杨祥良, 刘卫. 多肽蛋白质药物口服纳米载药系统研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 697-702.
RAO Rong, YANG Xiang-liang, LIU Wei. Research progress of nano drug delivery systems for oral administration of peptides and proteins[J]. Herald of medicine, 2018, 37(6): 697-702.
- [70] 王依婷, 丁晓铃, 汉琳, 等. 用于抗体药物递送的红细胞膜包裹的抗体纳米粒子及制备方法: 中国, CN105769818B[P]. 2019-03-01.
WANG Yi-ting, DING Xiao-ling, HAN Lin, et al. Antibody nanoparticles enveloped by erythrocyte membrane for transmission of antibody drugs and its preparation methods: Chinese patent, CN105769818B[P]. 2019-03-01.
- [71] 张康. 红细胞膜包裹的眼用药物的新用途: 中国, CN103550223A[P]. 2015-10-28.
ZHANG Kang. Novel application of eye medicine wrapped with erythrocyte membrane: Chinese patent, CN103550223A[P]. 2015-10-28.
- [72] 金明姬, 范博, 陈卫, 等. 聚乙二醇修饰抗肿瘤药物的研究进展[J]. 中国医药生物技术, 2013, 8(4): 289-294.
JIN Ming-ji, FAN Bo, CHEN Wei, et al. Research progress of polyethylene glycol modified antitumor drugs[J]. Chinese medicinal biotechnology, 2013, 8(4): 289-294.
- [73] 张志荣. 靶向治疗分子基础与靶向药物设计[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 1-492.
ZHANG Zhi-rong. Molecular basis of targeted therapy and targeted drug design[M]. Beijing: Science Press, 2005: 1-492.
- [74] SUGAHARA K N, TEESALU T, KARMALI P P, et al. Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors[J]. Cancer cell, 2009, 16(6): 510-520.