

熔盐法制备含钴氯磷灰石及其抗氧化性能和细胞相容性研究

舒朝琴^{1,2}, 朱敏¹, 朱钰方²

(1. 上海理工大学 材料与化学学院, 上海 200093; 2. 中国科学院 上海硅酸盐研究所, 高性能陶瓷与超微结构国家重点实验室, 上海 200050)

摘要: 生物活性陶瓷骨修复材料虽然具有优异的成骨性能, 但缺乏抗氧化应激的能力, 妨碍骨修复进程。本研究以 β 相磷酸三钙(β -TCP)粉体为原料, 采用 LiCl-KCl 熔盐体系, 以六水合氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)为钴源, 利用熔盐法制备出含钴氯磷灰石(Co-MS-TCP)。通过 Co-MS-TCP 粉体清除过氧化氢(H_2O_2)分析了含钴氯磷灰石的抗氧化能力; 通过细胞活性、胞内活性氧(ROS)含量变化评价了材料的细胞相容性和细胞水平抗氧化性能。结果表明, 熔盐处理 β -TCP 粉体能够制备含钴氯磷灰石, 钴含量随 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 加入量增加而增大; H_2O_2 清除能力随氯磷灰石中钴含量的增加而增强, 6 h 内对 H_2O_2 的清除率可达 90% 以上。细胞实验证实, 含钴氯磷灰石具有良好的细胞相容性和抗氧化性能, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加 3% Co 盐的 MS-TCP (3% Co-MS-TCP) 即可保证软骨细胞和骨髓间充质干细胞存活率大于 85%, 并且 3% Co-MS-TCP 可有效清除 H_2O_2 , 使得细胞内 ROS 含量显著降低。因此, 通过熔盐法制备含钴生物活性陶瓷是实现抗氧化应激的一种有效途径, 这也为开发催化活性高、生物相容好的功能化生物活性陶瓷提供了新的策略。

关键词: 生物活性陶瓷; 熔盐法; 钴; 抗氧化

中图分类号: TQ174 文献标志码: A

Cobalt-incorporated Chlorapatite: Preparation by Molten Salt Method, Anti-oxidation and Cytocompatibility

SHU Chaoqin^{1,2}, ZHU Min¹, ZHU Yufang²

(1. School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. State Key Laboratory of High Performance Ceramics and Superfine Microstructure, Shanghai Institute of Ceramics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China)

Abstract: Orthopedic surgery and postoperative inflammation are easy to induce oxidative stress, which hinders the process of bone repair. Bioactive ceramics have excellent osteogenic properties, but lack the ability to resist oxidative stress. Therefore, it is of great significance to develop a bioactive ceramic material with antioxidant function. Here, cobalt-incorporated chlorapatite (Co-MS-TCP) was prepared by a molten salt method, in which the mixture of lithium chloride and potassium chloride was used as a molten salt system, and β -phase tricalcium phosphate (TCP) and cobalt chloride hexahydrate ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were used as raw material and cobalt source, respectively. The antioxidant ability of Co-MS-TCP was determined by catalyzing H_2O_2 clearance. The cytocompatibility and anti-oxidation of

收稿日期: 2022-01-21; 收到修改稿日期: 2022-02-18; 网络出版日期: 2022-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (51872185, 52072246)

National Natural Science Foundation of China (51872185, 52072246)

作者简介: 舒朝琴(1995-), 女, 硕士研究生. E-mail: 1573738940@qq.com

SHU Chaoqin (1995-), female, Master candidate. E-mail: 1573738940@qq.com

通信作者: 朱敏, 副教授. E-mail: mzhu@usst.edu.cn; 朱钰方, 教授. E-mail: zjf2412@163.com

ZHU Min, associate professor. E-mail: mzhu@usst.edu.cn; ZHU Yufang, professor. E-mail: zjf2412@163.com

Co-MS-TCP were further evaluated by analyzing the changes of cell viability and intracellular reactive oxygen species (ROS). Results showed that Co-MS-TCP with controllable cobalt content can be prepared by a molten salt method with changing the addition amount of $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ source. The scavenging capacity of H_2O_2 increased with the increase of cobalt content in chlorapatite, and more than 90% of H_2O_2 could be scavenged within 6 h due to the catalytic activity of Co-MS-TCP. Furthermore, cell experiments confirmed the cytocompatibility and antioxidative property of Co-MS-TCP. 3% Co-MS-TCP at a concentration of $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ could still ensure the survival rate of bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes to be higher than 85%, and 3% Co-MS-TCP can also significantly reduce the content of intracellular ROS for the H_2O_2 -stimulated cells. Therefore, molten salt method is an effective way to prepare cobalt-incorporated bioactive ceramics with antioxidative property, which also provides a promising strategy for the development of functional bioactive ceramics with high catalytic activity and biocompatibility.

Key words: bioactive ceramics; molten salt method; cobalt; anti-oxidation

骨科手术过程和术后炎症都易诱发氧化应激, 进而阻碍骨修复进程, 因此有必要降低创伤处的氧化应激^[1-4]。在众多生物材料中, 羟基磷灰石生物陶瓷作为骨骼的重要组成部分, 具有优异的骨诱导性、骨传导性和生物降解性, 在骨组织工程领域得到了广泛应用^[5-7]。目前, 化学掺杂可以替代羟基磷灰石中的阴离子或阳离子, 进而改善羟基磷灰石的生物功能^[8]。研究发现添加氟、氯等元素的磷灰石涂层能提高种植体的稳定性, 增强骨与种植体之间的相互作用, 使得制备的种植体具有良好的生物活性和骨传导性^[9]。氯磷灰石涂层在模拟体液 (Simulated Body Fluid, SBF) 中可形成一层类似于骨矿物的羟基磷灰石薄膜进而改善钛板的骨传导性^[10]。虽然氯磷灰石在增强植入体稳定性、改善骨传导性、促进骨修复方面展现出巨大潜力, 但是其不具有抗氧化性能, 无法清除骨缺损处过量的活性氧(ROS), 阻碍了骨修复进程。因此, 开发一种具有抗氧化能力的氯磷灰石用于骨修复具有重要意义。

过渡金属钴(Co)因其良好的催化活性而被广泛应用于催化领域。近年来, 随着催化医学不断发展, Co 的催化性能也被越来越多地应用到医学领域^[11]。Cao 等^[12]通过热解法制备的 Co 单原子具有类似超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等多种酶活性, 可高效清除超氧阴离子、过氧化氢等多种 ROS, 从而有效治疗脓毒症。此外, Liu 等^[13]研究发现, 一定浓度的钴离子可以促进抗炎因子、成骨基因和成血管因子上调, 从而有利于促进骨再生。并且 Co 作为人体所必须的微量元素, 具有促进造血进程的功能, 并与 Zn、Cu、Mn 等元素协同作用促进骨形成^[13-15]。因此, 在氯磷灰石中引入钴元素有可能获得催化清除氧化应激能力, 促进成骨功能。

目前, 固相反应法、湿化学法、化学沉淀法等可有效制备含金属元素的磷灰石相^[16]。Tawalare 等^[17]以 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 CaCO_3 、 Eu_2O_3 和 Nd_2O_3 为原料, 利用固相反应法制备了 Eu、Nd 掺杂的氯磷灰石 ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl} : \text{Eu}^{2+}, \text{Nd}^{3+}$), 该材料在近红外区域有较强的荧光效应, 但制备过程需要高温处理, 且周期相对较长。Kulanthaivel 等^[18]采用化学沉淀法, 以 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和 CoCl_2 为原料制备了 Co 掺杂的羟基磷灰石(Co-HAp), 并发现其可促进 MG-63 细胞的 HIF-1 α 表达和 VEGF 生长因子的分泌, 从而促进成血管和促进骨修复。但该方法制备的粉体材料结晶性差, 离子释放较快, 易导致细胞毒性^[17]。

熔盐法是采用一种或数种低熔点的盐类作为反应介质, 在熔融盐中进行合成反应的方法^[19-20]。其工艺简单, 反应温度低, 可有效制备晶体结构稳定的磷灰石^[21-23]。Oishi 等^[23]发现 NaCl 熔盐体系提供的液态环境可以促进 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 和 CaCl_2 反应形成氯磷灰石。另一方面, 熔盐法可在基体材料中引入金属元素, 并且熔盐形成的液体环境可使金属离子分布更均匀, 产物性能更佳^[24-25]。Xiao 等^[25]采用含镍熔盐处理 TiO_2 纳米颗粒, 发现熔盐过程中强极化力可使 Ti-O 键断裂, 进而促进 Ni-O 键形成, 且引入的 Ni 原子分布均匀, 从而提高了其催化活性。这说明熔盐法有可能制备出具有良好催化清除氧化应激功能的含钴氯磷灰石。

本研究提出以 β 相磷酸三钙(β -TCP)为原料, 以 LiCl-KCl 为熔盐体系, 以六水合氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 为钴源, 采用熔盐法制备含钴氯磷灰石(Co-MS-TCP)粉体。详细研究了熔盐处理保温时间和钴源加入量对制备的含钴氯磷灰石的结构、形貌、理化性能以

及抗氧化性能的影响, 探究了含钴氯磷灰石的细胞相容性和体外生物活性。

1 实验方法

1.1 实验试剂

氯化锂(LiCl)、氯化钾(KCl)、六水合氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)均为分析纯, 购自中国医药集团上海化学试剂有限公司。 β 相磷酸三钙(β -TCP)购自昆山华侨科技新材料有限公司。过氧化氢(H_2O_2)检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 材料制备

采用熔盐法制备含钴氯磷灰石。将 1.1 g KCl、0.9 g LiCl、1 g TCP 分别与 0、10、30、50 mg 的 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 混合, 在研钵中研磨 30 min, 使粉体混合均匀。将研磨后的粉体转移到半封顶刚玉坩埚中, 置于管式炉中。随后, 在氩气气氛中以 $5\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的升温速度加热到 $550\text{ }^\circ\text{C}$, 并保温 1 h。自然冷却至室温后, 用去离子水洗涤混合物 6 次, 除去粉体中的盐。将洗涤后的粉体在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 的烘箱中干燥 24 h, 过 200 目筛($75\text{ }\mu\text{m}$), 最后得到不同钴含量的氯磷灰石, 命名为 MS-TCP、1% Co-MS-TCP、3% Co-MS-TCP 和 5% Co-MS-TCP。

1.3 材料的性能表征

采用 18 kW 靶向 X 射线衍射仪(X-ray Diffraction, XRD; Bruker D8Advance, 德国)分析含钴氯磷灰石的物相组成。使用场发射扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscope, SEM; S-4800, Hitachi, 日本)观察粉体的微观形貌。通过 X 射线荧光光谱仪(X-ray Fluorescence Spectrometer, XRF; AXIOS, PANalytical, 荷兰)测定粉体中 Co 元素的含量。采用电感耦合等离子体原子发射光谱法(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, ICP-AES; Varian 715-ES, 美国)测定 Ca、P 和 Co 离子的释放情况。采用 X 射线光电子能谱仪(X-ray Photoelectron Spectrometer, XPS; ESCALab250, 英国)测定 Co 元素的价态。通过红外光谱仪(Infrared Spectrometer, IR, Spotlight400, 美国)分析粉体的官能团。

1.4 抗氧化性能测试

采用 H_2O_2 模拟体内氧化应激进行抗氧化性能测试。基于 H_2O_2 与硫酸钛生成黄色的过氧化钛复合物在 415 nm 左右有特征吸收峰的现象, 测定溶液中 H_2O_2 的含量。具体步骤: (a)根据过氧化氢检测试剂盒说明书配置检测液, 取 $25\text{ }\mu\text{L}$ 的试剂 II、 $50\text{ }\mu\text{L}$ 的试剂 III 和 $250\text{ }\mu\text{L}$ 的试剂 IV 加入离心管, 摇晃均匀,

形成检测液。(b)将 $10\text{ mg } \beta$ -TCP、MS-TCP 和 Co-MS-TCP 分别分散在 $1\text{ mL } 100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 溶液中, $120\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 机械振荡。在 37° 下反应 6 h 后离心, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 上清液和 $100\text{ }\mu\text{L}$ 待检液混合。反应 5 min 后, 取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 反应后的溶液加入到 96 孔板中, 并使用酶标仪(SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim, 德国)记录溶液在 415 nm 处的吸光度。实验重复 3 次($n=3$)。

1.5 离子释放测试

采用 ICP-AES 方法测定了含钴氯磷灰石的 Ca、P 和 Co 离子释放。将 β -TCP、MS-TCP、3% Co-MS-TCP 粉体浸泡在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中, 控制 Tris-HCl 缓冲液体积与粉体质量比为 $20\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在第 1、3、5、7、14 d 分别离心后吸取上清液, 并过孔径为 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜收集滤液, 最后测试滤液中 Ca、P 和 Co 离子浓度。实验重复 3 次($n=3$)。

1.6 体外生物活性测试

用粉体浸泡于新鲜 SBF 中形成羟基磷灰石的能力来评价体外生物活性。 β -TCP、MS-TCP、3% Co-MS-TCP 粉体以 $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度分散在 SBF 中, 并放置在恒温箱($37\text{ }^\circ\text{C}$, $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)振荡。再静置 7 d 后离心, 去离子水清洗, 重复 3 次后过滤, 并在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 的烘箱中干燥 24 h, 最后对其微观形貌和红外光谱进行分析。

1.7 细胞实验

采用兔源软骨细胞和兔源骨髓间充质干细胞评价粉体的细胞相容性。细胞实验所用粉体都经灭菌锅灭菌($121\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min)处理。细胞相容性评估采用 CCK-8 试剂盒 (Cell counting Kit-8)方法。每孔中接种 3×10^3 个软骨细胞或 1×10^3 个骨髓间充质干细胞, 然后转至 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱内培养。培养 24 h 后, 向每个孔内加入梯度稀释的工作液(60 mg 粉体加入 20 mL 培养液中, 超声振荡 30 min, 形成 $3\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的工作液), 再转至细胞培养箱内培养。继续培养 24 h 后, 每孔中加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 CCK-8 工作液(由 CCK-8 溶液和培养液按体积比 1:9 混合得到), 继续孵育 2 h 后每孔吸取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶液转移至新的 96 孔板中, 并通过多功能酶标仪(SpectraFluor Plus, Tecan, Crailsheim, 德国)测定在 450 nm 处的 OD 值, 以评估粉体的细胞相容性($n=5$)。

1.8 体外抗氧化性能测试

采用兔源软骨细胞和兔源骨髓间充质干细胞评价粉体的抗氧化活性。采用 2',7'-二氯二氢荧光素(DCFH)作为细胞内 ROS 探针检测粉体清除 ROS 功效; 采用细胞活/死的钙黄绿素-AM/碘化丙啶

(Calcein-AM/PI)染色法对粉体的作用效果进行评估。

(a)每孔中接种 3×10^4 软骨细胞或 1×10^4 骨髓间充质干细胞, 然后转至细胞培养箱培养。24 h 后, 每孔加入 500 μL 工作液(含 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粉体和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的培养液, 超声振荡 30 min 后形成工作液)。搭载荧光探针 DCFH, 即将 DCFH 和培养液按体积比 1 : 1000 混合形成工作液, 继续培养 2 h 后, 往每孔中加入 300 μL 工作液, 继续培养 30 min。最后, 经无菌磷酸缓冲液(PBS)清洗 3 次后, 使用荧光倒置显微镜拍摄细胞。实验中的探针搭载过程和拍摄过程避光进行。

(b)每孔接种 3×10^4 个软骨细胞或 1×10^4 个骨髓间充质干细胞, 置于细胞培养箱内培养 24 h 后, 向每个孔内加入 500 μL 工作液(含 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粉体和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 的培养液, 超声振荡 30 min)。继续培养 6 h 后, 利用活细胞/死细胞双染试剂盒进行染色, 将 AM、PI 和 PBS 按体积比 10 : 15 : 5000 混合形成工作液, 在每孔中加入 300 μL 工作液, 继续孵育 20 min。最后, 经无菌 PBS 清洗 3 次后, 样品使用荧光倒置显微镜拍摄细胞。实验中的染色过程和拍摄过程避光进行。

2 结果与讨论

2.1 保温时间对含钴氯磷灰石性能的影响

本研究首先表征分析了熔盐处理过程中保温不同时间制备的含钴氯磷灰石(Co-MS-TCP)的物相组成、表面形貌和催化清除 H_2O_2 性能。图 1 为熔盐处理保温不同时间得到的 Co-MS-TCP 的 XRD 图谱, 从图中可以看出, 熔盐升温处理后(0 h), β -TCP 先转变成氯磷酸二钙($\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$)析出; 进一步保温后(0.5~3 h), $\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$ 转变为更稳定的氯磷酸钙($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$), 且 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 相没有随保温时间的延长而变化。这表明 β -TCP 粉体经过 550°C 熔盐处理后得到稳定的 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 。在高熔点矿物与低

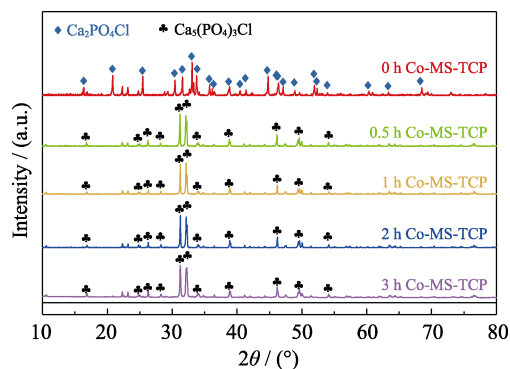


图 1 熔盐处理保温不同时间制备的 Co-MS-TCP 粉体的 XRD 图谱

Fig. 1 XRD patterns of Co-MS-TCP powders prepared by molten salt method with different holding time
The color figure can be obtained from online edition

熔点盐混合系统中, 析晶温度低于盐的熔点^[26], 且多种盐混合会进一步降低盐的熔点^[27-28]。本研究以 β -TCP 为钙和磷酸根的来源, KCl 、 LiCl 和 CoCl_2 为熔盐时, 有效降低了熔融温度, 进而降低了析晶温^[21], 且在氯磷酸盐体系中, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 比 $\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$ 具有更好的热稳定性^[26]。因此, β -TCP 经过熔盐处理后能制备得到稳定的 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 。但 XRD 图谱中并未出现 Co 元素的特征峰, 可能是因其含量极低而难以显示。本研究后续使用了更灵敏的 ICP-AES 检测设备对样品中的 Co 元素作了检测。

为了进一步探究粉体熔盐处理保温不同时间对微观形貌的影响, 本研究对 β -TCP 粉体经熔盐处理保温不同时间的微观形貌进行了观察(图 2)。从图中可以看出, β -TCP 粉体为略有团聚的球状颗粒, 但熔盐处理保温不同时间的 Co-MS-TCP 粉体表面光滑, 呈现六面晶系结构。进一步可以看出, β -TCP 粉体经 550°C 熔盐处理保温 0 h 后, 主要呈大小各异的微米级颗粒, 颗粒尺寸约为 $1 \mu\text{m}$ 。保温 0.5~2 h 后, 虽仍为微米级颗粒, 但大部分颗粒的长度明显变长, 部分颗粒长度在 $20 \mu\text{m}$ 以上。这是由于在熔盐处理过程中发生了形核和长大两个过程, 即先形成 $\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$ 晶

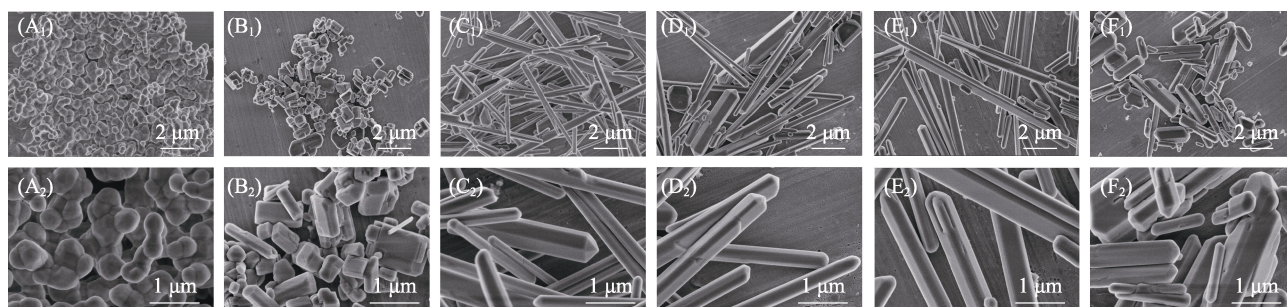


图 2 β -TCP 粉体经熔盐处理保温不同时间前后样品的微观形貌 SEM 照片

Fig. 2 SEM images of β -TCP powders before and after molten salt treatment with different holding time
(A₁-A₂) β -TCP; (B₁-B₂) 0 h Co-MS-TCP; (C₁-C₂) 0.5 h Co-MS-TCP; (D₁-D₂) 1 h Co-MS-TCP; (E₁-E₂) 2 h Co-MS-TCP; (F₁-F₂) 3 h Co-MS-TCP

体, 随着保温时间延长, 形成六方晶系的 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 。保温 3 h 后, 颗粒变粗, 但长度明显变短。这可能是由于保温时间延长使得晶粒继续长大, 但熔盐具有刻蚀作用而使得晶粒在熔盐处理过程中发生了断裂^[21]。因此, 熔盐处理 β -TCP 制备的 Co-MS-TCP 随着保温时间的延长, 从颗粒状的 $\text{Ca}_2\text{PO}_4\text{Cl}$ 逐渐长成棒状 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, 然后断裂成短棒状 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 。

为了分析熔盐处理保温时间对 Co-MS-TCP 的催化性能的影响, 本研究对保温不同时间制备的 Co-MS-TCP 粉体催化清除 H_2O_2 ($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 性能进行了探究。如图 3(A) 所示, β -TCP 和不含钴熔盐处理的 MS-TCP 粉体不具有催化清除 H_2O_2 的能力。虽然从实验结果看有一定程度的清除, 但这是由粉体对 H_2O_2 与硫酸钛生成的过氧化钛复合物有一定程度的物理吸附导致的。然而含钴熔盐处理制备的 Co-MS-TCP 粉体具有良好的催化清除 H_2O_2 的能力。如图 3(B) 所示, 含钴熔盐处理保温不同时间制备的 Co-MS-TCP 粉体与 β -TCP 粉体的 H_2O_2 清除率有显著差异, 保温 0、0.5、1、2、3 h 的 Co-MS-TCP 粉体的 H_2O_2 清除率分别为 $(41.56 \pm 3.84)\%$ 、 $(75.22 \pm 4.49)\%$ 、

$(94.02 \pm 0.31)\%$ 、 $(89.64 \pm 0.89)\%$ 和 $(71.38 \pm 3.28)\%$ 。这表明含钴熔盐处理 β -TCP 粉体不仅能够制备得到氯磷灰石, 还能将具有催化活性的钴离子引入氯磷灰石。制备的 Co-MS-TCP 粉体催化清除 H_2O_2 的能力随熔盐处理保温时间延长而呈现先增强后减弱的趋势。已有研究表明, 催化剂表面暴露的催化活性中心的数量直接影响其催化活性^[29], 面积越大, 活性中心越多, 因而催化剂的催化性能会随晶粒尺寸的增大而降低^[30-31]。本研究中熔盐处理 β -TCP 粉体形成氯磷灰石过程中, 首先 β -TCP 溶解并与熔盐反应, Co 随晶粒生长不断进入氯磷灰石中, 且随晶粒比表面积增大而增加催化活性中心, 提高催化性能。但是, 随着保温时间延长, 含钴氯磷灰石的晶粒不断长大, 比表面积相对减小, 暴露于氯磷灰石表面的钴离子相对减少, 所以其催化中心比例减少, 进而催化性能降低。综合以上结果分析, 含钴熔盐处理保温 1 h 不仅可以获得稳定的氯磷灰石相, 还具有相对较高的催化活性。因此, 本研究选取熔盐处理保温 1 h 的粉体进行后续探究。

2.2 钴含量对结构与催化清除 H_2O_2 性能的影响

本研究在熔盐处理保温 1 h 的条件下进一步探究钴源加入量对含钴氯磷灰石的结构、形貌和催化清除 H_2O_2 性能的影响。图 4 为加入不同钴盐量时获得的 Co-MS-TCP 粉体的 XRD 图谱, 从图中可以看出, 经过 550°C 熔盐处理, 钴盐加入量为 0、1%、3%、5% 的 β -TCP 粉体都制备得到了稳定的 $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ 物相, 即加入钴盐进行熔盐处理不会引起物相变化。另一方面, 随着钴盐加入量增大, 熔盐处理制备得到的氯磷灰石的 XRD 衍射峰强度没有明显差别, 表明加入钴盐没有影响氯磷灰石的结晶程度。

钴盐量不同时熔盐处理所获的 Co-MS-TCP 粉体的形貌如图 5 所示。熔盐处理后, 加入 0、1%、

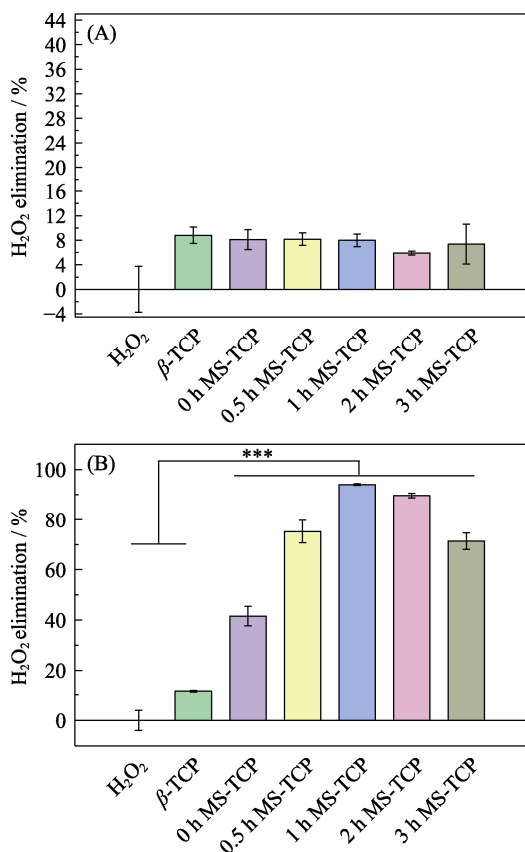


图 3 熔盐处理保温不同时间制备的(A)MS-TCP 和(B)Co-MS-TCP 粉体的清除 H_2O_2 情况

Fig. 3 H_2O_2 scavenging effect of (A) MS-TCP and (B) Co-MS-TCP powders prepared by molten salt method with different holding time

*** $p < 0.001$

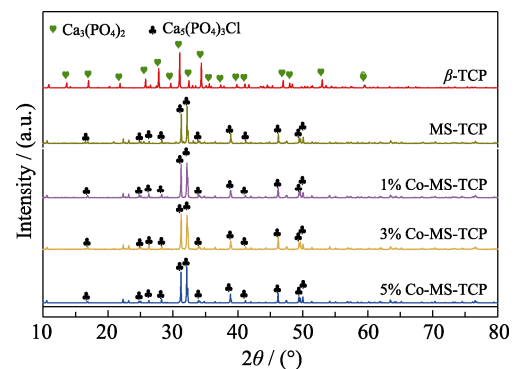


图 4 加入不同钴盐量所获熔盐处理制备的 Co-MS-TCP 粉体的 XRD 图谱

Fig. 4 XRD patterns of Co-MS-TCP powders prepared by molten salt method with different cobalt salt additions

3%和 5%钴盐制备的氯磷灰石均为六面晶系结构的棒状颗粒,部分晶粒长度可达 20 μm 以上。此外,未加钴盐进行熔盐处理得到的 MS-TCP 晶粒表面略粗糙,而加入钴盐得到的 1% Co-MS-TCP、3% Co-MS-TCP 和 5% Co-MS-TCP 晶粒表面光滑。这可能由于加入钴盐能够促进氯磷灰石的生长,使得晶粒生长更充分,晶界更完整。已有研究表明在熔盐法制备钴掺杂的氯磷灰石过程中, CoCl_2 既是助溶剂也是反应剂,可有效促进氯磷灰石的形成^[32]。因此,在本反应体系中加入钴盐,不仅引入了钴元素,而且 CoCl_2 本身还会发挥助溶剂和反应剂的作用,推动固相反应进行,进而促进氯磷灰石形核与长^[21]。

图 6(A)为不同钴盐加入量进行熔盐处理制备的氯磷灰石催化清除 H_2O_2 的情况,从图中可以看出, β -TCP 和不含钴氯磷灰石(MS-TCP)只能清除很少 H_2O_2 , 而含钴氯磷灰石(1% Co-MS-TCP, 3% Co-MS-TCP 和 5% Co-MS-TCP)都具有良好的清除 H_2O_2 作用。这表明熔盐法制备的含钴氯磷灰石具有 Co 催化活性位点,能够清除 H_2O_2 , 抵抗氧化应激。另一方面,熔盐处理制备的含钴氯磷灰石的抗氧化性与钴含量有关。3% Co-MS-TCP 的 H_2O_2 清除能力明显高于 1% Co-MS-TCP, 但是 3% Co-MS-TCP 和 5% Co-MS-TCP 的 H_2O_2 清除能力没有显著性差异。这可能是由于钴盐加入量增大使得 Co 催化活性位点增加,进而提高催化 H_2O_2 性能。另一方面,催化性能主要取决于氯磷灰石表面可接触的有效催化位点的数量。当氯磷灰石表面 Co 元素进一步增加则容易导致团聚而不能增加有效的催化活性位点,甚至有可能减弱催化活性。为进一步分析含钴氯磷灰石催化清除 H_2O_2 性能与钴含量及其价态的关系,本研究利用 ICP-AES

和 XRF 方法测试了 MS-TCP、1% Co-MS-TCP、3% Co-MS-TCP 和 5% Co-MS-TCP 粉体中的钴含量。当钴盐加入量占比为 0、1%、3%和 5%时,熔盐处理制备的氯磷灰石中钴元素的理论含量分别为 0、0.2%、0.7%和 1.2%, 但 ICP-AES 方法测试得到的钴元素实际含量分别为 $(0.01\pm 0.002)\%$ 、 $(0.17\pm 0.010)\%$ 、 $(0.38\pm 0.021)\%$ 和 $(0.71\pm 0.016)\%$ (图 6(C))。尽管氯磷灰石中实际钴含量远低于理论钴含量,但仍随着钴盐加入量的增加而提高。这表明通过在 LiCl-KCl 熔盐体系中加入钴盐可以在氯磷灰石中引入微量钴元素,且可以通过钴盐加入量来调控氯磷灰石中的钴含量。进一步利用 XRF 技术测试了 MS-TCP、1% Co-MS-TCP、3% Co-MS-TCP 和 5% Co-MS-TCP 粉体的钴元素含量分别为 0.02%、0.16%、0.36%和 0.79% (图 6(D)), 其结果与 ICP-AES 测试结果基本一致。另外,本研究利用 XPS 技术对 3% Co-MS-TCP 粉体中的 Co 元素进行价态分析以探究其催化清除 H_2O_2 活性(图 6(B))。结果表明,3% Co-MS-TCP 粉体中钴的价态为+2 价。一般来说, H_2O_2 吸附、键断裂是 H_2O_2 氧化还原反应的重要步骤。低价 Co^{2+} 能促进 H_2O_2 分子在材料表面的快速捕获和有效吸附,形成过渡态^[33]。此外,低价态的过渡金属离子具有很强的给电子能力, Co^{2+} 的电子可以在 H_2O_2 中迅速转移到 O 原子,促进 H_2O_2 分解^[34]。因此, Co-MS-TCP 粉体中的 Co^{2+} 是催化清除 H_2O_2 的活性位点。

2.3 含钴氯磷灰石的离子释放

采用 ICP-AES 法测试了 β -TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体在 Tris-HCl 缓冲液中的离子释放。如图 7 所示,随着时间延长, Ca、P、Co 离子的

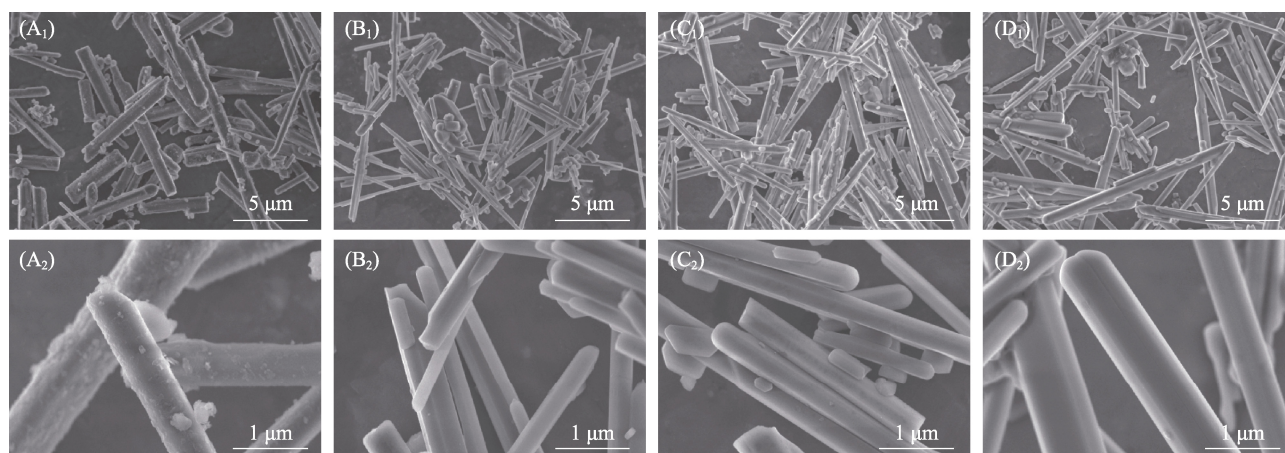


图 5 不同钴盐加入量所获熔盐处理制备的 Co-MS-TCP 粉体的 SEM 照片

Fig. 5 SEM images of Co-MS-TCP powders prepared by molten salt method with different cobalt salt additions (A₁, A₂) MS-TCP; (B₁, B₂) 1% Co-MS-TCP; (C₁, C₂) 3% Co-MS-TCP; (D₁, D₂) 5% Co-MS-TCP

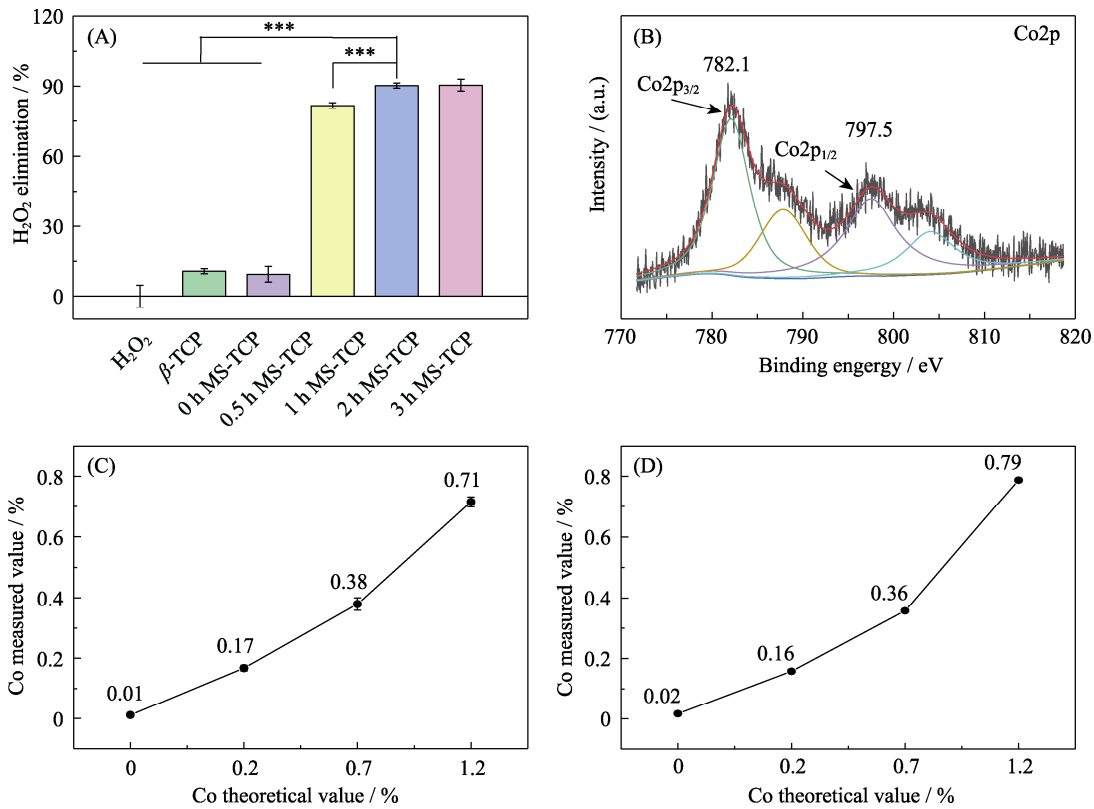


图 6 钴含量及其价态在含钴氯磷灰石催化清除 H₂O₂ 中的作用

Fig. 6 Contents and valence state of cobalt in Co-MS-TCP on H₂O₂ scavenging ability

(A) H₂O₂ scavenging effect of Co-MS-TCP powders with different cobalt contents; (B) XPS spectra of cobalt in 3% Co-MS-TCP powder; (C, D) Cobalt contents in MS-TCP, 1% Co-MS-TCP, 3% Co-MS-TCP, and 5% Co-MS-TCP powders determined by (C) ICP-AES and (D) XRF methods. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001. The color figures can be obtained from online edition

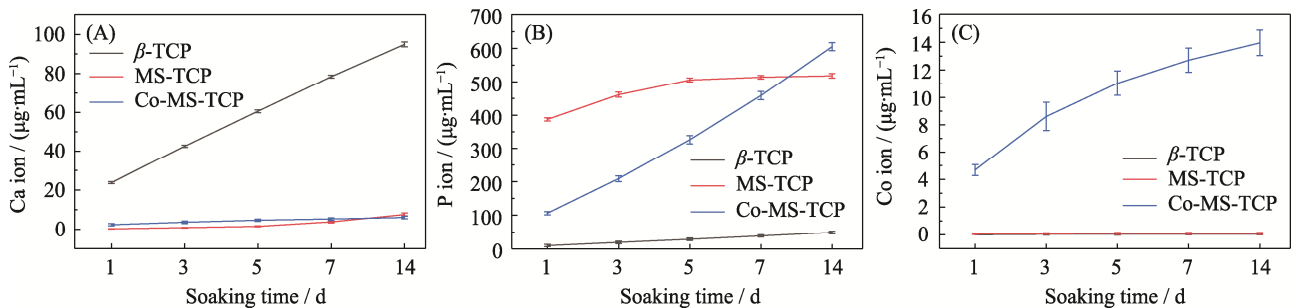


图 7 β-TCP、MS-TCP 和 3%Co-MS-TCP 粉体在 Tris-HCl 缓冲液中(A) Ca、(B) P、(C) Co 离子的释放情况

Fig. 7 Releases of (A) Ca, (B) P and (C) Co ions from β-TCP, MS-TCP and 3% Co-MS-TCP powders in Tris-HCl buffer
The color figures can be obtained from online edition

累计释放量不断增大。β-TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体在浸泡 14 d 后的 Ca 离子累计释放量依次为 94.9、7.5 和 6.0 μg·mL⁻¹。相较于 β-TCP, 氯磷灰石中 Ca 离子的释放明显减少, 这与氯磷灰石稳定性优于磷酸三钙相符。β-TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体在浸泡 14 d 后的 P 离子累计释放量依次为 48.9、518.4 和 605.1 μg·mL⁻¹, 即 MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体的 P 离子释放量远高于 β-TCP 粉体。磷灰石相的一个重要性质是结构中的 Ca²⁺ 能被其他金属离子替代, 如 Sr²⁺、Mg²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺、Pb⁴⁺、Cr³⁺、Na⁺、K⁺、Li⁺[35-36]。因此, 推测

本研究熔盐处理过程中 Ca²⁺ 易被 K⁺、Li⁺ 和 Co²⁺ 取代, 而 K⁺ 和 Li⁺ 在洗涤过程中易溶于水被去除, 使得更多 PO₄³⁻ 暴露, 从而有利于 P 离子的释放。由于 β-TCP 和 MS-TCP 中未加入钴元素, 因此皆未测得 Co 离子释放。3% Co-MS-TCP 在浸泡 1、3、5、7 和 14 d 后的 Co 离子累计释放量依次为 4.7、8.6、11.0、12.7 和 14.0 μg·mL⁻¹, 其释放速率逐渐降低, 14 d 累积释放量约占 3% Co-MS-TCP 中 Co 含量的 18%。已有研究表明, 微量的钴离子释放有利于提高细胞活性^[18]。由此推断熔盐法制备的含钴氯磷灰石具有较好的生物学效应。

2.4 含钴氯磷灰石的生物活性

本研究采用浸泡 SBF 方法评估了含钴氯磷灰石的体外生物活性。图 8(A~C)为 β -TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体在 SBF 中浸泡 7 d 后的微观形貌照片。图中显示, β -TCP 和 MS-TCP 粉体的表面只能观察到非常少量的羟基磷灰石形成, 但在 3% Co-MS-TCP 粉体表面则观察到较多的羟基磷灰石形成, 且一些粉体表面的羟基磷灰石已有明显的片状结构。为了进一步确认含钴磷灰石粉体上形成的是羟基磷灰石, 本研究利用红外光谱进一步分析了浸泡 SBF 后的 β -TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体的官能团变化情况。 β -TCP 和氯磷灰石皆无羟基官能团, 因此通过观测羟基官能团的变化情况可有效判断羟基磷灰石的形成与否。如图 8(D)所示, β -TCP 和 MS-TCP 在 3500 cm^{-1} 左右未观察到明显的伸缩振动峰, 而 3% Co-MS-TCP 在 3500 cm^{-1} 左右出现了明显的伸缩振动峰, 该峰对应 -OH 键伸缩振动峰($3650\sim 3200\text{ cm}^{-1}$)。因此, 结合 SEM 和红外光谱分析可确定 3% Co-MS-TCP 粉体比 β -TCP 和

MS-TCP 粉体更有利于羟基磷灰石形成。羟基磷灰石的形成有利于提高材料的骨整合、生物活性^[37]和骨传导性^[7-8]。因此, 3% Co-MS-TCP 粉体比 β -TCP 和 MS-TCP 粉体具有更好的生物活性。

2.5 含钴氯磷灰石的细胞相容性

为验证熔盐法制备的含钴氯磷灰石的细胞相容性, 本研究探究了不同浓度的 MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体对软骨细胞和骨髓间充质干细胞活力的影响。如图 9 所示, 对于软骨细胞而言, MS-TCP 粉体组, 细胞活力都较好。3% Co-MS-TCP 粉体浓度 $\leq 1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活力较好; 当浓度达到 $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 后, 细胞活力明显降低。对于间充质干细胞而言, MS-TCP 粉体浓度 $\leq 3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活力都可达 90% 以上。3% Co-MS-TCP 粉体浓度 $\leq 1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活力都可达 85% 以上; 但当浓度达到 $3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活力则降低至 80% 以下。因此, 3% Co-MS-TCP 和 MS-TCP 粉体在浓度 $\leq 1.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时都具有较好的细胞相容性。

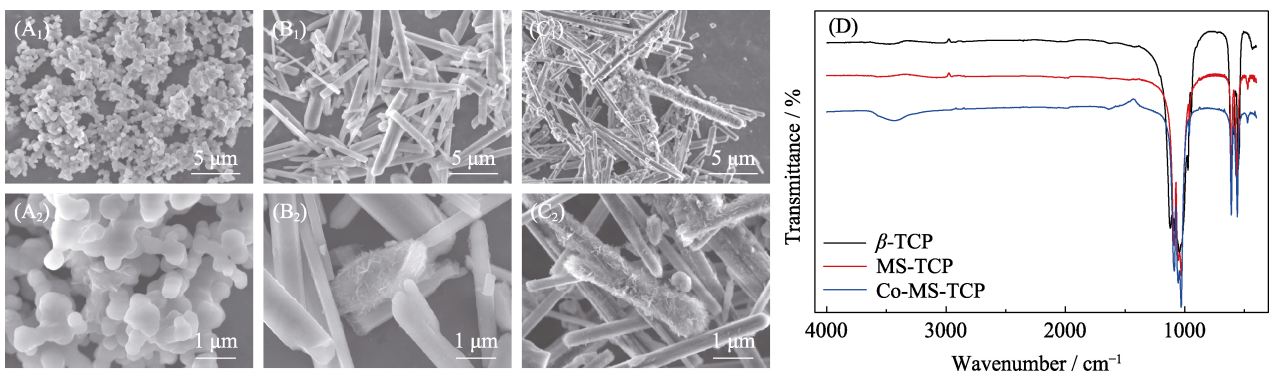


图 8 SBF 溶液中浸泡 7 d 后的 β -TCP (A₁, A₂)、MS-TCP (B₁, B₂) 和 3% Co-MS-TCP (C₁, C₂) 粉体的 SEM 照片和 (D) 红外光谱图

Fig. 8 SEM images of (A₁, A₂) β -TCP, (B₁, B₂) MS-TCP and (C₁, C₂) 3% Co-MS-TCP after soaking in SBF for 7 d and (D) their corresponding FT-IR spectra
The color figure can be obtained from online edition

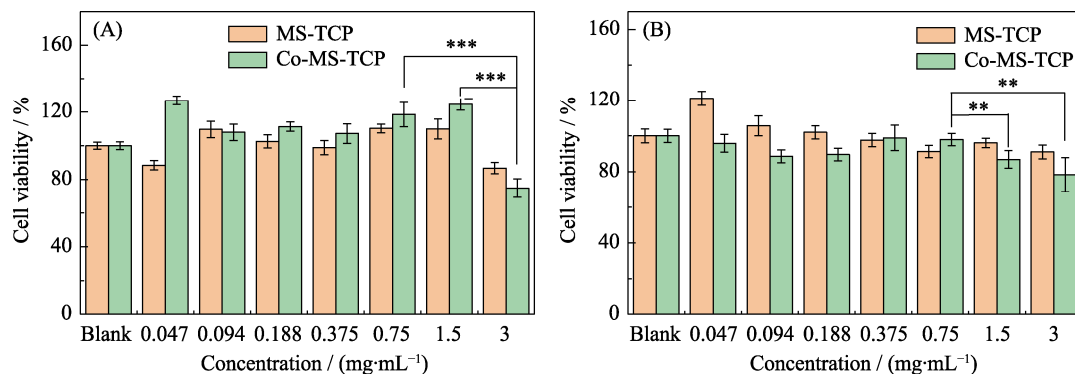


图 9 不同浓度 MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 粉体对 (A) 软骨细胞和 (B) 骨髓间充质干细胞的细胞毒性评估
Fig. 9 Cell viabilities of MS-TCP and 3% Co-MS-TCP powders with different concentrations on (A) cartilage cells and (B) bone marrow mesenchymal stem cells

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; The color figures can be obtained from online edition

2.6 含钴氯磷灰石的抗氧化性能

为了评估含钴氯磷灰石的体外抗氧化性能, 本研究通过 H_2O_2 刺激细胞来模拟氧化应激, 利用荧光探针 DCFH 来检测细胞内 ROS 含量, 并根据其荧光强度变化分析粉体的抗氧化性能。图 10 为不同粉体处理 H_2O_2 刺激的软骨细胞后的胞内荧光强度变化情况。可以看出, 空白组、 β -TCP 组和 MS-TCP 组的细胞内荧光较为明显, 而 3% Co-MS-TCP 组的细胞内荧光相对较弱。3% Co-MS-TCP 组的荧光强度不足 β -TCP 和 MS-TCP 组的荧光强度的 1/10, 存在显著性差异。图 11 为不同粉体处理 H_2O_2 刺激的骨髓间充质干细胞后的胞内荧光强度变化情况。同样地, β -TCP 和 MS-TCP 组的胞内荧光较为明显, 而 3% Co-MS-TCP 组的胞内荧光较为微弱, 且与 β -TCP 和 MS-TCP 组存在显著性差异。这表明对于软骨细胞和骨髓间充质干细胞而言, 3% Co-MS-TCP 粉体都表现出良好的抗氧化性能, 能有效清除细胞生存环境中的 H_2O_2 , 从而减弱荧光强度。本研究

采用细胞活/死的钙黄绿素-AM/碘化丙啶(Calcein-AM/PI)染色法进一步评估含钴氯磷灰石的抗氧化性能对细胞活性的影响。如图 12 所示, 在正常培养液中, β -TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 组中具有活力的软骨细胞数量与空白组没有显著性差异, 细胞存活较好。然而在 H_2O_2 刺激的情况下, 软骨细胞明显皱缩, 且空白组、 β -TCP 组和 MS-TCP 组的活细胞数量明显减少, 死细胞数量明显增多, 而 3% Co-MS-TCP 组的死细胞数量则明显较少。同样地, 对于骨髓间充质干细胞(图 13), 在正常培养液中, β -TCP、MS-TCP 和 3% Co-MS-TCP 组中具有活力的细胞数量与空白组没有显著差异, 且细胞呈梭形, 细胞触角清晰可见, 表明细胞活性较好。在 H_2O_2 刺激下, 各组细胞相较于正常培养液培养的细胞, 出现了明显的蜷缩, 细胞状态变差。明显地, 空白组、 β -TCP 组和 MS-TCP 组出现较多的死细胞, 且细胞不铺展, 蜷缩在一起。相对而言, 3% Co-MS-TCP 组的死细胞数量较少, 且细胞铺展较好, 细胞活性更

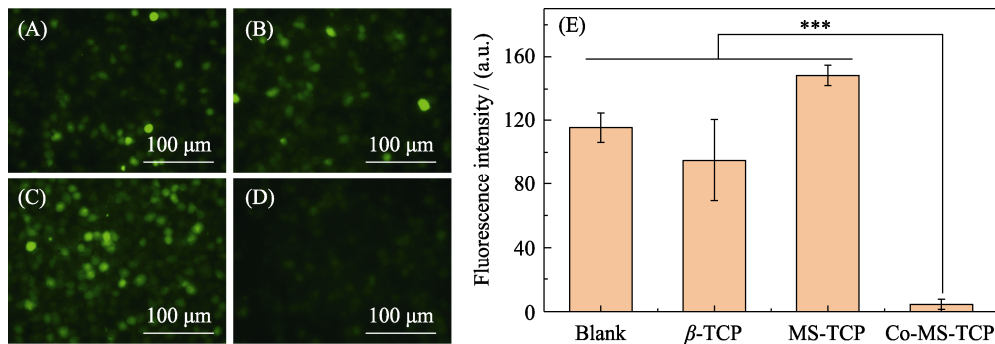


图 10 (A)空白组和(B) β -TCP, (C) MS-TCP, (D) 3% Co-MS-TCP 粉体处理 H_2O_2 刺激的软骨细胞内 ROS 染色荧光显微镜照片和(E)对应的荧光强度统计

Fig. 10 Images of intracellular ROS staining fluorescence in cartilage cells stimulated by H_2O_2 treatment with powders (A) Blank, (B) β -TCP, (C) MS-TCP, (D) 3% Co-MS-TCP and (E) corresponding fluorescence intensity statistics
*** $p < 0.001$; The color figures can be obtained from online edition

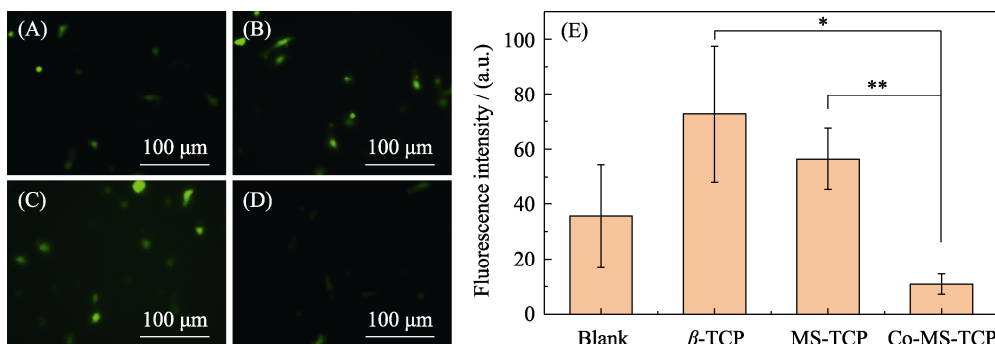


图 11 (A)空白组和(B) β -TCP, (C) MS-TCP, (D) 3% Co-MS-TCP 粉体处理 H_2O_2 刺激的骨髓间充质干细胞后的细胞内 ROS 染色荧光显微镜照片和(E)对应的荧光强度统计

Fig. 11 Images of intracellular ROS staining fluorescence in bone marrow mesenchymal stem cells stimulated by H_2O_2 treatment with powders (A) Blank, (B) β -TCP, (C) MS-TCP, (D) 3% Co-MS-TCP and (E) corresponding fluorescence intensity statistics
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; The color figures can be obtained from online edition

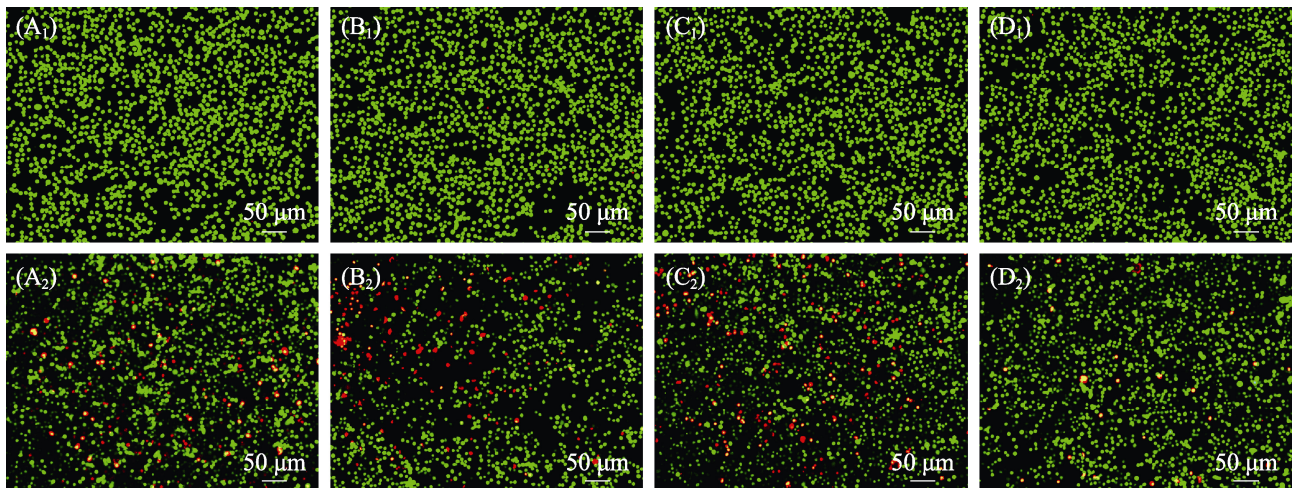


图 12 (A)空白组和(B) β -TCP, (C) MS-TCP, (D) 3% Co-MS-TCP 粉体处理(A₁-D₁) 无 H₂O₂ 刺激与 (A₂-D₂) H₂O₂ 刺激的软骨细胞后的细胞活(绿色)/死(红色)Calcein-AM-PI 染色荧光显微镜照片

Fig. 12 Calcein AM and PI fluorescence images of cartilage cells treated with different powders(A) Blank; (B) β -TCP; (C) MS-TCP; (D) 3% Co-MS-TCP; (A₁-D₁) Cells without H₂O₂ stimulation; (A₂-D₂) Cells stimulated with H₂O₂ showing live (green) and death (red) cells
The color figures can be obtained from online edition

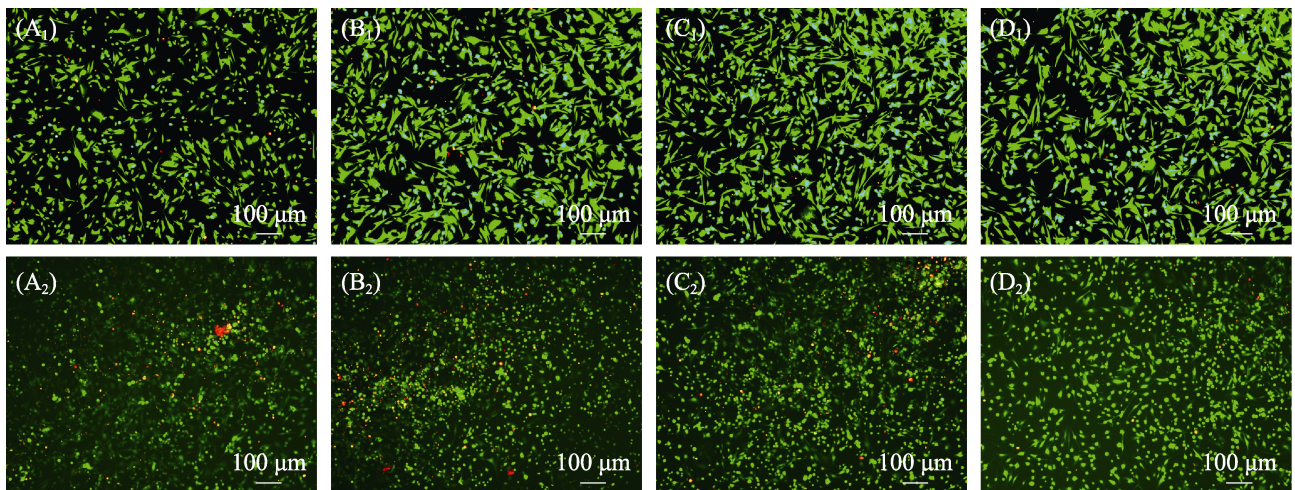


图 13 (A)空白组和(B) β -TCP, (C) MS-TCP, (D) 3% Co-MS-TCP 粉体处理(A₁-D₁)无 H₂O₂ 刺激与 (A₂-D₂) H₂O₂ 刺激的骨髓间充质干细胞的活/死 Calcein-AM-PI 染色荧光显微镜照片

Fig. 13 Calcein AM and PI fluorescence images of bone marrow mesenchymal stem cells treated with powders (A) Blank; (B) β -TCP; (C) MS-TCP; (D) 3% Co-MS-TCP; (A₁-D₁) Cells without H₂O₂ stimulation; (A₂-D₂) Cells stimulated with H₂O₂ showing live (green) and death (red) cells
The color figures can be obtained from online edition

好。因此, 软骨细胞和骨髓间充质干细胞在受到 H₂O₂ 刺激后, 其细胞状态都会变差。其中, β -TCP 和 MS-TCP 粉体因不具备清除 H₂O₂ 的能力, 造成 H₂O₂ 诱发氧化应激而导致细胞活性降低, 进而出现凋亡。然而 3% Co-MS-TCP 粉体由于存在钴催化活性位点而具有抗氧化性能, 可以有效地清除细胞生存环境中的 H₂O₂, 抑制 H₂O₂ 诱发的氧化应激, 减少细胞内产生的 ROS, 有效保护细胞, 提高细胞活力。这说明, 具有良好抗氧化性的含钴氯磷灰石有助于提高氧化应激环境中的细胞活力。

3 结论

本研究通过熔盐法成功制备出含钴氯磷灰石 (Co-MS-TCP) 粉体。通过改变熔盐中钴盐加入量可调控氯磷灰石中的钴含量, 但不会改变氯磷灰石的物相和微观形貌; 含钴氯磷灰石具有催化清除 H₂O₂ 能力, 并且其清除能力随着氯磷灰石中的钴含量增加而增强。细胞实验证实, 3% Co-MS-TCP 粉体在浓度 $\leq 1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 软骨细胞和骨髓间充质干细胞的细胞活力均大于 85%, 具有良好的细胞相容性;

在 H_2O_2 刺激模拟炎症条件下, 3% Co-MS-TCP 粉体可有效清除细胞生存环境中的 H_2O_2 , 抑制氧化应激, 从而减少细胞凋亡。因此, 通过熔盐法制备的含钴氯磷灰石是一种具有潜力的抗氧化应激的骨修复材料。

参考文献:

- [1] LI X, LI B, SHI Y, *et al.* Targeting reactive oxygen species in stem cells for bone therapy. *Drug Discovery Today*, 2021, **5(26)**: 1226–1244.
- [2] CERQUENI G, SCALZONE A, LICINI C, *et al.* Insights into oxidative stress in bone tissue and novel challenges for biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, 2021, **130(11)**: 112433–12.
- [3] ADJEI I M, PLUMTON G, SHARMA B. Oxidative stress and biomaterials: the inflammatory link. *Oxidative Stress and Biomaterials*, 2016: 89–115.
- [4] LI J, DENG C, LIANG W, *et al.* Mn-containing bioceramics inhibit osteo-clastogenesis and promote osteoporotic bone regeneration via scavenging ROS. *Bioactive Materials*, 2021, **6(11)**: 3839–3850.
- [5] RAJULA M, PREM B, VENKATASUBBU G, *et al.* Nano-hydroxyapatite: a driving force for bone tissue engineering. *Journal of Pharmacy & Biomedical Sciences*, 2021, **13(1)**: S11–S14.
- [6] SHI H, ZHOU Z Q, LI W D, *et al.* Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: a brief and comprehensive introduction. *Crystals*, 2021, **11(2)**: 149–167
- [7] XIN Z, SHUN H. Nano-hydroxyapatite and its compound in repairing bone defects. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, **16(34)**: 6403–6406.
- [8] RATNAYAKE J T B, MUCALO M, DIAS G J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: a review of current trends. *Journal Biomedical Materials Research Part B*, 2017, **105 B**: 1285–1299.
- [9] OVERGAARD S, LIND M, JOSEPHSEN K, *et al.* Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite ceramic coatings on weight-bearing implants: a quantitative and morphological study in dogs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2015, **39(1)**: 141–152.
- [10] DEMNATI I, GROSSIN D, COMBES C, *et al.* A comparative physicochemical study of chlorapatite and hydroxyapatite: from powders to plasma sprayed thin coatings. *Biomedical Materials*, 2012, **7(5)**: 054101–11.
- [11] WARIS A, DIN M, ALI A, *et al.* Green fabrication of Co and Co_3O_4 nanoparticles and their biomedical applications: a review. *Open Life Sciences*, 2021, **16(1)**: 14–30.
- [12] CAO F, ZHANG L, YOU Y, *et al.* An enzyme-mimicking single-atom catalyst as an efficient multiple reactive oxygen and nitrogen species scavenger for sepsis management. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, **59(13)**: 5146–5153.
- [13] LIU G, WANG X, ZHOU X, *et al.* Modulating the cobalt dose range to manipulate multisystem cooperation in bone environment: a strategy to resolve the controversies about cobalt use for orthopedic applications. *Theranostics*, 2020, **10(3)**: 1074–1089.
- [14] LI Y, PAN Q, XU J, *et al.* Overview of methods for enhancing bone regeneration in distraction osteogenesis: potential roles of biometals. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2021, **27(2)**: 110–118.
- [15] USANEE P, MARCELA A O, BOCCACCINI A R. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2022, **33(1)**: 3–41.
- [16] SADAT S M, KHORASANI M T, DINPANAH K E, *et al.* Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomaterialia*, 2013, **9(8)**: 7591–7621.
- [17] TAWALARE P K, BHATKAR V B, OMANWAR S K, *et al.* Near-infrared emitting $Ca_5(PO_4)_3Cl:Eu^{2+}, Nd^{3+}$ phosphor for modification of the solar spectrum. *Luminescence*, 2018, **33(7)**: 1288–1293.
- [18] KULANTHAIVEL S, ROY B, AGARWAL T, *et al.* Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application. *Materials Science & Engineering*, 2016, **58(1)**: 648–658.
- [19] JAIRTON D, ROBERTO F, SOUZA D, *et al.* Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. *Chemical Reviews*, 2002, **102(10)**: 3667–3692.
- [20] LIU D, FU Q G, CHU Y H. Molten salt synthesis, formation mechanism, and oxidation behavior of nanocrystalline HfB_2 powders. *Journal of Advanced Ceramics*, 2020, **9(1)**: 35–44.
- [21] SUCHANEK W, YASHIMA M, KAKIHANA M, *et al.* Hydroxyapatite ceramics with selected sintering additives. *Biomaterials*, 1997, **18(13)**: 923–933
- [22] WANG Y P, YING D W, ZHU N W, *et al.* Improved removal of phosphorus from incinerated sewage sludge ash by thermo-chemical reduction method with $CaCl_2$ application. *Journal of Cleaner Production*, 2020, **258(10)**: 120779–8.
- [23] OISHI S, SUGIURA I. Growth of chlorapatite crystals from a sodium chloride flux. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1997, **70(10)**: 2483–2487.
- [24] XIE J F, LI J, KANG L Y, *et al.* Molten-salt-protected pyrolytic approach for fabricating borate-modified cobalt-iron spinel oxide with robust oxygen-evolving performance. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2021, **9(43)**: 14596–14704.
- [25] XIAO M, ZHANG L, LUO B, *et al.* Molten-salt-mediated synthesis of an atomic nickel Co-catalyst on TiO_2 for improved photocatalytic H_2 evolution. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, **59(18)**: 7230–7234.
- [26] CHRIS T. Thermodynamics of mixing of liquids in the system $Ca_3(PO_4)_2-CaCl_2-CaF_2-Ca(OH)_2$. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1994, **58(12)**: 2755–2755.
- [27] ZENG K, YANG X, Xie Y, *et al.* Molten salt pyrolysis of biomass: the evaluation of molten salt. *Fuel*, 2021, **302(5)**: 121103–10.
- [28] PRENER J S. The growth and crystallographic properties of calcium fluor- and chlorapatite crystals. *Journal of the Electrochemical Society*, 1967, **114(1)**: 77–84
- [29] KATHLEEN M, JOCHEN L. Synthesis-structure-activity relationships in Co_3O_4 catalyzed CO oxidation. *Frontiers in Chemistry*, 2018, **6**: 185–197.
- [30] LAN Y P, SOHN H Y, MOHASSAB Y, *et al.* Nanoceria synthesis in the KCl-LiCl salt system: crystal formation and properties. *Journal of the American Ceramic Society*, 2017, **100**: 1863–1875.
- [31] MO Z Y, YANG W Y, GAO S, *et al.* Efficient oxygen reduction reaction by a highly porous, nitrogen-doped carbon sphere electrocatalyst through space confinement effect in nanopores. *Journal of Advanced Ceramics*, 2021, **10(4)**: 714–728.
- [32] ANDERSON J B, KOSTINER E. The crystal structure of cobalt-substituted calcium chlorapatite. *Journal of Solid State Chemistry*, 1987, **66(2)**: 343–349.
- [33] LIU P, ZHONG D, XU Y, *et al.* Co/Fe co-doped porous graphite carbon derived from metal organic framework for microelectrolysis-fenton catalytic degradation of Rhodamine B. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021, **9(5)**: 105924–11.
- [34] GAO Y, KONG D R, ZHANG Z Y, *et al.* Spinel $CoMn_2O_4$ hollow nanospheres for very wide linear and sensitive detection of hydrogen peroxide. *Journal of Alloys and Compounds*, 2022, **897(15)**: 163158–9.
- [35] PALUSZKIEWICZ C, LÓSCARCZYK A, PIJOCHA D, *et al.* Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite. *Journal of Molecular Structure*, 2010, **976(1/3)**: 301–309.
- [36] AAIF A, KHALID, CHAUDHRY, *et al.* Zinc containing calcium phosphates obtained via microwave irradiation of suspensions. *Materials Chemistry and Physics*, 2022, **276(15)**: 124921–11.
- [37] LIU W Y, ZUO R T, ZHU T L, *et al.* Forsterite-hydroxyapatite composite scaffolds with photothermal antibacterial activity for bone repair. *Journal of Advanced Ceramics*, 2021, **10(5)**: 1095–1106.