

羟基磷灰石微纳结构对蛋白吸附的影响

付亚康^{1,2}, 周雪¹, 肖东琴¹, 匙峰¹, 卢晓英¹, 翁杰¹

(1. 西南交通大学 材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610031; 2. 雅安职业技术学院, 雅安 625000)

摘要: 本研究采用水热反应法, 在不同浓度环己烷六羧酸(H₆E)模板调控作用下, 合成了具有不同表面微纳结构的羟基磷灰石(HAP)微粒, 并采用 XRD、BET、FTIR 和 SEM 对其进行表征。对 HAP 微粒进行了牛血清白蛋白(BSA)、纤维蛋白原(FN)和溶菌酶(LYS)的吸附及释放实验。结果表明: H₆E 能够在 HAP 微粒表面构建微纳结构, 不同微纳结构对不同蛋白质具有选择性吸附作用; 在 H₆E 浓度为 50 mmol/L 的合成条件下制备的中空结构 HAP 微粒(HAP50)其载蛋白后体外释放具有明显的蛋白缓释性能。

关键词: 羟基磷灰石; 环己烷六羧酸; 微纳结构; 蛋白吸附

中图分类号: R318; TQ174 **文献标识码:** A

Influence of Micro-nano Structure of Hydroxyapatite Particles on Protein Adsorption

FU Ya-Kang^{1,2}, ZHOU Xue¹, XIAO Dong-Qin¹, SHI Feng¹, LU Xiao-Ying¹, WENG Jie¹

(1. Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. Ya'an Vocational College, Ya'an 625000, China)

Abstract: Hydroxyapatite (HAP) particles were hydrothermally synthesized with the surface morphologies adjusted by cyclohexane-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexacarboxylic acid (H₆E) as the template. HAP particles were characterized by XRD, BET, SEM and FTIR. The protein adsorption-desorption behaviors of positively charged lysozyme (LYS), fibrinogen (FN) and negatively charged bovine serum albumin (BSA) on these HAP particles were examined. The results indicate that using H₆E as a template to fabricate micro-nano structures on HAP particles through hydrothermal reaction is simple and controllable. HAP particles with micro-nano structures show selective protein adsorption-desorption properties for different proteins. The protein-loaded shell-like HAP particle (HAP50-protein) shows an excellent protein release behavior *in vitro*.

Key words: hydroxyapatite; H₆E; micro-nano structure; protein adsorption

生物材料植入体内后很快发生来自血液及其它组织液中蛋白质在植入体表面的吸附, 这层吸附的蛋白质将直接影响细胞粘附、增殖和分化, 并最终决定植入的成败^[1]。因此, 考察生物材料蛋白吸附行

为已经成为评价其生物相容性和生物活性的一种重要方式^[2]。

羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)具有与人体硬组织中相近的无机成分, 其良好的生物相容性和

收稿日期: 2014-10-10; 收到修改稿日期: 2014-11-20

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2012CB933600); 国家自然科学基金(51172188); 四川省科技支撑计划(2010FZ0048); 四川省高校科研创新团队建设计划项目(14TD0050)

National Basic Research Program of China (2012CB933600); National Natural Science Foundation of China (51172188); Science and Technology Pillar Project of Sichuan (2010FZ0048); Research and Innovation Team Project of Sichuan for Central Universities(14TD0050)

作者简介: 付亚康(1988-), 男, 硕士研究生, 助教. E-mail: fykmail@163.com; 810667526@qq.com

通讯作者: 翁杰, 教授. E-mail: jweng@swjtu.cn

生物活性已被大量研究所证实^[3], 因而被广泛地应用于临床骨组织修复。近年来多孔 HAP 植入体显示出优良的骨诱导性, 但其骨诱导机理还存在较多不明之处^[4]。因此, 研究 HAP 表面蛋白吸附行为有助于揭示其生物活性, 尤其是骨诱导性的本质, 并且据此对其结构优化提供参考^[5]。

HAP 表面微纳结构、粗糙度^[6]、孔隙率^[7]、孔径大小^[8]以及比表面积^[9]等因素显著地影响其蛋白吸附能力。不同离子(Zn^{2+} ^[10], CO_3^{2-} ^[11])在 HAP 中的掺杂对 HAP 的蛋白吸附性能也具有重要影响。但是, 目前对其影响机理还不甚清楚, 有待进一步研究。

本研究旨在探讨 HAP 表面微纳结构对蛋白质吸附的影响。采用水热-模板法制备具有不同表面微纳结构的 HAP 微粒; 选用牛血清白蛋白(BSA)、纤维蛋白原(FN)和溶菌酶(LYS)三种蛋白质, 研究其不同 HAP 微粒表面的蛋白吸附-释放行为, 并对其机理进行初步的讨论。

1 实验方法

1.1 材料的合成与制备

借助模板分子 H_6E 调控, 在水热条件下完成不同 HAP 微粒的制备。主要原料为分析纯级的四水硝酸钙($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、尿素(CON_2H_4), 均购自成都市科龙化工试剂厂。模板分子为分析纯级环己烷六羧酸(cyclohexane-1, 2, 3, 4, 5, 6-hexacarboxylic acid, H_6E), 购自东京化成工业株式会社。

在 0.1 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液中加入 H_6E , 使其浓度分别为 0、0.5、1、5 和 50 mmol/L。然后加入适量的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 保持钙磷比为 1.67:1。再加入 0.56 mol/L CON_2H_4 , 稀硝酸调节 pH 为 2.5。将溶液转入反应釜, 150℃ 下反应 5 h。洗涤, 烘干, 收集。不同浓度 H_6E 条件下制备的 HAP 分别记为 HAP0、HAP0.5、HAP1、HAP5 和 HAP50。

1.2 蛋白质吸附实验

BSA、FN 和 LYS 均为分析纯, 购自上海华兰生物制剂公司。将 BSA、FN 或 LYS 分别溶解于双蒸水, 定容制备 1 mg/mL 的蛋白溶液。

取不同 HAP 微粒各 10 mg 置于 2 mL 离心管中, 分别加入 1 mL 浓度 1 mg/mL 的蛋白液。在 37℃、97 r/min 下吸附 24 h。用 BCA 试剂盒(BCATM Protein Assay Kit, 南京建成生物制剂有限公司)测试上清液中蛋白含量, 再根据质量守恒原理计算样品蛋白吸附量。

1.3 蛋白质释放实验

将吸附了蛋白质的 HAP 微粒在 PBS(0.01 mol/L)中进行体外蛋白释放。在 37℃、97 r/min 条件下, 按一定时间间隔取样, 之后补入等体积 PBS。用 BCA 法进行蛋白浓度测试, 绘制释放曲线。

1.4 仪器与测试

分别采用 X 射线衍射(XRD, Philips PW3040/60)和扫描电子显微镜(SEM, QUANTA200)对制备微粒相组成及表面形貌进行表征; 用粒度分布测试仪(LA-920 HORIBA)和比表面积仪(BET, 3H-2000BET-A)对微粒的粒径和比表面积进行测试。用红外光谱仪(FTIR, Thermo Nicolet5700)和倒置荧光显微镜(CFM, IX51)对吸附蛋白质后的样品进行表征。

2 结果与讨论

2.1 表面形貌

不同浓度 H_6E 合成条件下, 所获得的样品如图 1 所示。在合成过程中不添加 H_6E 时, 产物为带状, 宽 3 μm 、长约 30 μm (图 1(a)); 当合成体系中 H_6E 浓度为 0.5 mmol/L 时, 产物呈短带状结构组装而成的花瓣状, 短带状结构长约 10 μm (图 1(b)); 当 H_6E 浓度为 1 mmol/L 时, 产物为花椰菜状结构(图 1(c)); 可见在合成体系中 H_6E 能够抑制带状结构沿其长轴方向的生长。当合成体系中 H_6E 浓度为 5 mmol/L 时, 产物为绒球状(图 1(d)); 当 H_6E 浓度为 50 mmol/L 时, 产物为中空结构(图 1(e))。翁杰等^[12]前期研究认为, H_6E 首先与钙离子螯合形成大小为 200 nm 的颗粒, 以此纳米颗粒为模板, 在其周围自组装形成表面具有纳米片状结构的 HAP 微球, 并逐渐形成空心 HAP 微球。

2.2 粒径与比表面积

不同 H_6E 浓度合成条件下, 产物的比表面积由 8.17 m^2/g 逐渐增大到 113.02 m^2/g 。具体结果见表 1 所示。

表 1 不同 H_6E 浓度合成条件下产物的比表面积
Table 1 SSA of HAP particles modified by different concentrations of H_6E for synthesis

Sample	SSA/($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)
HAP0	8.17
HAP0.5	51.83
HAP1	65.05
HAP5	105.20
HAP50	113.02

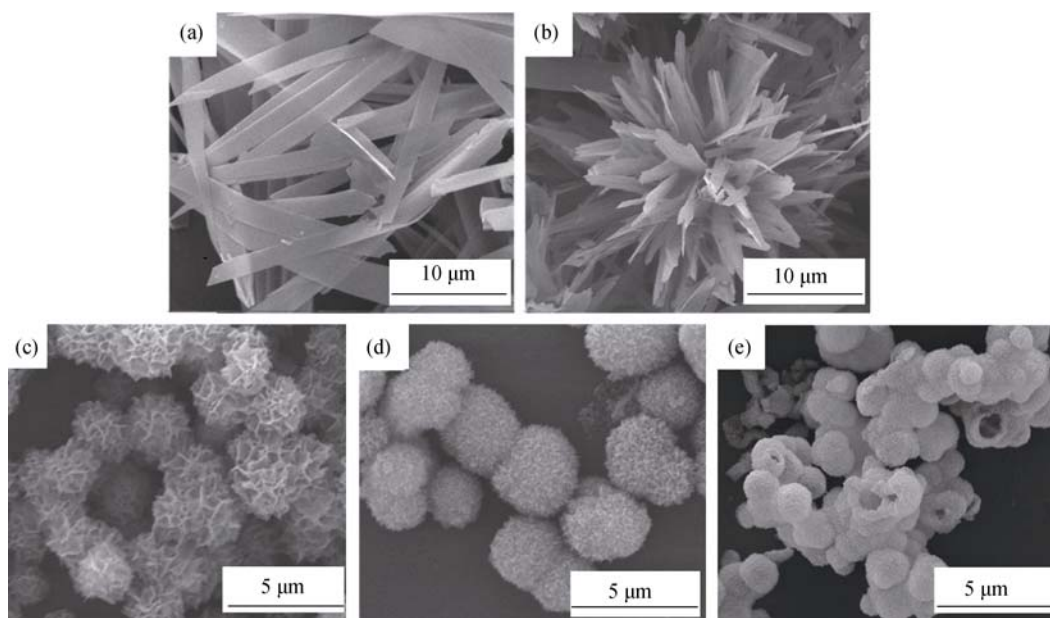


图 1 合成体系中不同浓度 H_6E 调控下产物的 SEM 照片
Fig. 1 SEM images of products synthesized at various H_6E concentrations
(a) 0; (b) 0.5 mmol/L; (c) 1 mmol/L; (d) 5 mmol/L; (e) 50 mmol/L

2.3 X 射线衍射分析

与 HAP 标准图谱(JCPDS 09-0432)相比, 不同浓度 H_6E 合成条件下, 产物均为 HAP(图 2), 但是其结晶度却各有不同。未添加 H_6E 时, 呈长带状 HAP0 产物(图 1(a))具有较强(300)晶面衍射强度; 随着合成体系中 H_6E 浓度增加, 产物中带状结构逐渐缩短(图 1(b~d)), 产物(300)晶面的衍射强度逐渐减弱。Johnsson 等^[13]认为某些小分子(柠檬酸三钠、磷酸枸橼酸盐等)能够选择性地吸附于 HAP 晶面, 选择性地抑制相应晶面的生长, 对 HAP 的形貌具有调控作用。Jokić 等^[14]在研究水热反应条件对 HAP 形貌控制的实验中发现, 通过调整反应体系的 pH, 可以使

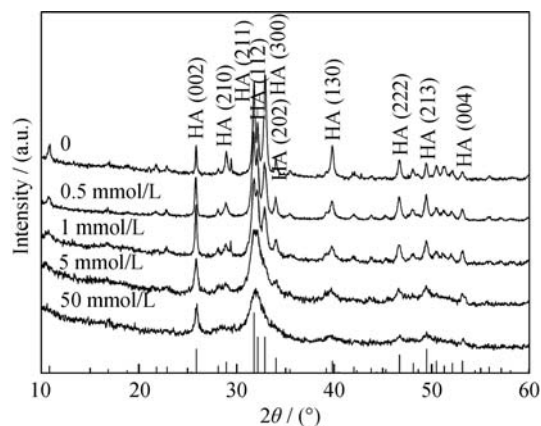


图 2 合成体系中不同浓度 H_6E 调控下产物的 XRD 图谱
Fig. 2 XRD spectra of products synthesized at various H_6E concentrations
(a) 0; (b) 0.5 mmol/L; (c) 1 mmol/L; (d) 5 mmol/L; (e) 50 mmol/L

HAP 沿着六方晶体 c 轴方向择优生长, 制备出晶须状的 HAP。可见, HAP 的形貌与小分子晶面吸附导致的生长抑制和环境参数等因素相关。本实验中, 随着合成体系中 H_6E 浓度逐渐增大, 产物中带状结构逐渐缩短, 晶粒逐渐细化, 结晶度逐渐降低。综上可知, H_6E 的引入不影响 HAP 的晶相组成, 但显著地影响 HAP 的晶粒尺寸、晶体生长的取向和产物的形貌。

2.4 红外光谱分析

实验采用红外光谱仪(FTIR, Thermo Nicolet5700)对 BSA、LYS、FN 在 HAP 颗粒样品上的吸附进行了检测。图 3 显示了 HAP0 及 HAP0 吸附 BSA、LYS、FN 后的红外光谱图。565、603 cm^{-1} 处为 PO_4^{3-} 的弯曲振动峰; 960、1033 和 1111 cm^{-1} 处^[15]为 PO_4^{3-} 的伸缩振动峰。873、1414 和 1456 cm^{-1} 处的峰源于 CO_3^{2-} 替换了 HAP 晶体结构中的 PO_4^{3-} 和 OH^- , 这说明形成了 AB 型含碳 HAP^[15]。1505 cm^{-1} 和 1545 cm^{-1} 处是 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动峰^[5], 证明了蛋白质的存在; 同时, 吸附蛋白后, HAP 表面基团的吸收峰没有发生化学位移, 这说明 BSA、LYS 和 FN 在 HAP 表面的吸附以物理吸附为主。

2.5 蛋白质吸附

随着合成体系中 H_6E 的增加, HAP 微粒对 BSA 的吸附性能逐渐减弱(图 4(a))。HAP0 对 BSA 吸附性能最强, 达 2.39 mg/m^2 ; HAP50 对 BSA 的吸附性能最弱, 仅 0.23 mg/m^2 (单个 BSA 分子吸附面积为

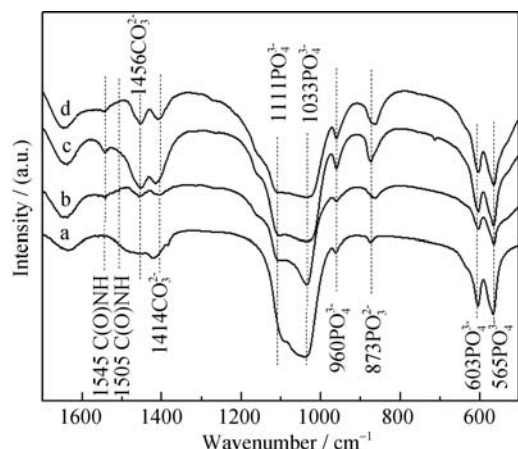


图 3 HAP0 及其吸附不同蛋白质后的 FT-IR 图谱

Fig. 3 FT-IR spectra of (a) HAP0, (b) HAP0-BSA, (c) HAP0-LYS and (d) HAP0-FN particles

14.0 nm×4.0 nm, BSA 理论最大吸附量为 2.52 mg/m²^[16])。说明 HAP0 微粒单位面积有更多吸附位点; 随着合成体系中 H₆E 增加, HAP 表面吸附位点逐渐减少, 蛋白吸附量随之减少。

研究发现^[17-18], HAP 晶体(300)晶面由于富集钙离子而带正电荷。BSA 等电点为 4.7, 在 pH 为 7 时带负电荷, 因此 HAP 晶体(300)晶面与 BSA 之间存在静电引力而促进其吸附。在 HAP0(图 1(a))中带状结构(300)晶面衍射强度最大(图 2), 其单位面积正电荷最多, 与 BSA 之间静电引力作用最强, 因而对 BSA 的吸附性能最强; 随着合成体系中 H₆E 逐渐增加, HAP(300)晶面衍射强度逐渐降低, HAP 微粒表面正电荷逐渐减少, 与 BSA 之间静电吸引作用逐渐减弱, 因而对 BSA 吸附性能逐渐减弱。

FN 等电点为 5.5, 在 pH 为 7 时带负电荷, FN 与 HAP 吸附的机制和 BSA 与 HAP 吸附的机制相同。随着合成体系中 H₆E 的增加, HAP 微粒对 FN 的吸附性能逐渐减弱(图 4(b))。HAP0 对 FN 的吸附性能最强, 达 5.41 mg/m²; HAP50 对 FN 的吸附性能最弱, 仅为 0.41 mg/m²。

然而, 具有不同表面微纳结构的 HAP 微粒对 LYS 表现出不同于 BSA、FN 的吸附行为, 随着合成体系中 H₆E 的增加, HAP 微粒对 LYS 的吸附性能逐渐增强(图 4(c))。HAP0 对 LYS 的吸附性能最弱, 仅 0.32 mg/m²; HAP50 对 LYS 的吸附性能最强, 达 0.86 mg/m²。(单个 LYS 分子吸附面积为 3.0 nm×4.5 nm, LYS 在材料表面理论最大吸附量为 2.02 mg/m²^[16])。说明 HAP50 微粒单位面积具有更多吸附位点; 随着合成体系中 H₆E 的增加, HAP 表面吸附位点逐渐增加, 蛋白吸附量随之增加。

另外, LYS 的等电点在 11.0~11.35 之间, 在 pH

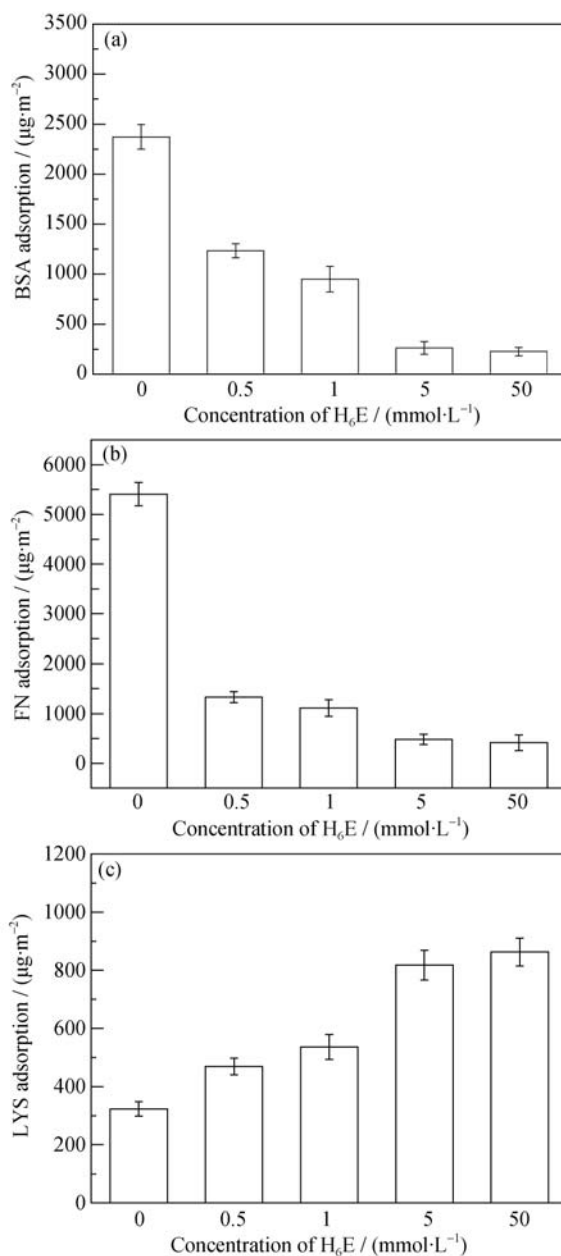


图 4 三种蛋白质在不同表面形貌的 HAP 表面的吸附行为
Fig. 4 The adsorption properties between HAP particles with different surface morphologies and different kind of proteins (a) BSA; (b) FN; (c) LYS ($p < 0.05$)

为 7 时带正电荷, 因此 HAP 晶体(300)晶面与 LYS 之间存在静电斥力而抑制其吸附。HAP0(图 1(a))的长带状结构(300)晶面衍射强度最大(图 2), 单位面积正电荷最多, 与 LYS 分子之间静电斥力作用最强, 对 LYS 的吸附性能最弱。随着合成体系中 H₆E 增加, HAP(300)晶面衍射强度逐渐降低, 单位面积正电荷逐渐减少, 与 LYS 之间静电斥力逐渐减弱, 对 LYS 的吸附增大。

如图 5 所示, 单位质量的 HAP0、HAP50 颗粒对 BSA 和 FN 的吸附总量相近, 而单位质量 HAP50 对 LYS 的吸附总量是单位质量 HAP0 对 LYS 吸附

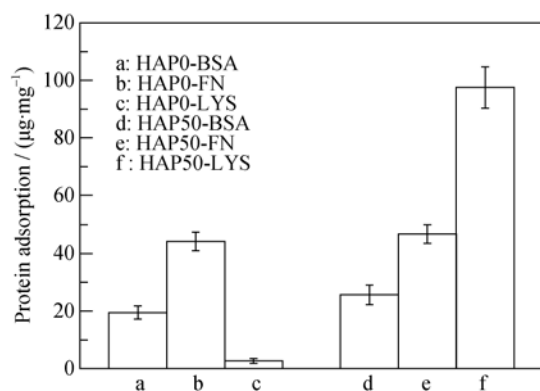


图5 单位质量 HAP0 和 HAP50 对不同蛋白质的吸附行为
Fig. 5 Adsorption behavior of different proteins on unit mass of HAP0 and HAP50 samples ($p < 0.05$)

总量的 37 倍(图 5-c、图 5-f)。说明, HAP50 的中空结构对碱性蛋白质具有较大的吸附性能。

综上可知, HAP 颗粒对蛋白质的吸附量并不仅仅随着 HAP 颗粒比表面积(表 1)增大而增大, 而与 HAP 微粒表面的晶面结构具有直接关系。

2.6 蛋白质释放

蛋白质在 HAP 微粒上吸附后的体外蛋白质释放实验结果表明: HAP0-BSA、HAP0-FN 和 HAP0-LYS 具有明显突释行为, 前 5 h 蛋白释放量达到 75% 以上, 24 h 释放量达到 95% 以上; 载蛋白 HAP0.5、HAP1 和 HAP5 微粒表现出逐渐增强的蛋白缓释性能, 前 5 h 释放量约 60%, 蛋白释放速率逐渐降低; 载蛋白 HAP50 微粒缓释效果最明显, 前 5 h 释放量在 45% 左右, 在 5 h 到 168 h 范围内呈现缓慢释放的趋势。这说明中空壳层结构 HAP50 能使释放速度降低, 释放时间延长(图 6(a~c))。鉴于红外光谱结果(图 3), 蛋白与 HAP 之间以物理吸附为主, 所以 HAP 微粒上蛋白释放行为主要决定于其表面的微纳结构。

Wang 等^[19]用水热法制备 HAP 球粒, 载布洛芬 HAP 球粒释放试验表明: 表面光滑 HAP 突释现象严重, 而烟花状 HAP 具有明显布洛芬缓释性能, 认为 HAP 表面粗糙和多孔结构能有效减缓布洛芬的释放速度。

Sun 等^[20]用喷雾干燥法制备 HAP 中空球粒, 载胰岛素 HAP 球粒体外释放实验表明: 中空球粒 HAP 对胰岛素具有缓释作用。在本实验中, 由于空间位阻^[21]、机械锁合等作用, 表面粗糙的 HAP 与蛋白质之间结合力较强, 因此蛋白释放速度较慢; 相反, 光滑表面 HAP 微粒与蛋白质分子间结合力较弱, 蛋白突释现象严重。

以上结果表明, HAP 微粒表面形貌能明显地调控其表面吸附蛋白质的释放速率。然而 HAP 表面形貌与晶粒尺寸、结晶度、微孔隙等诸多因素有关, 具

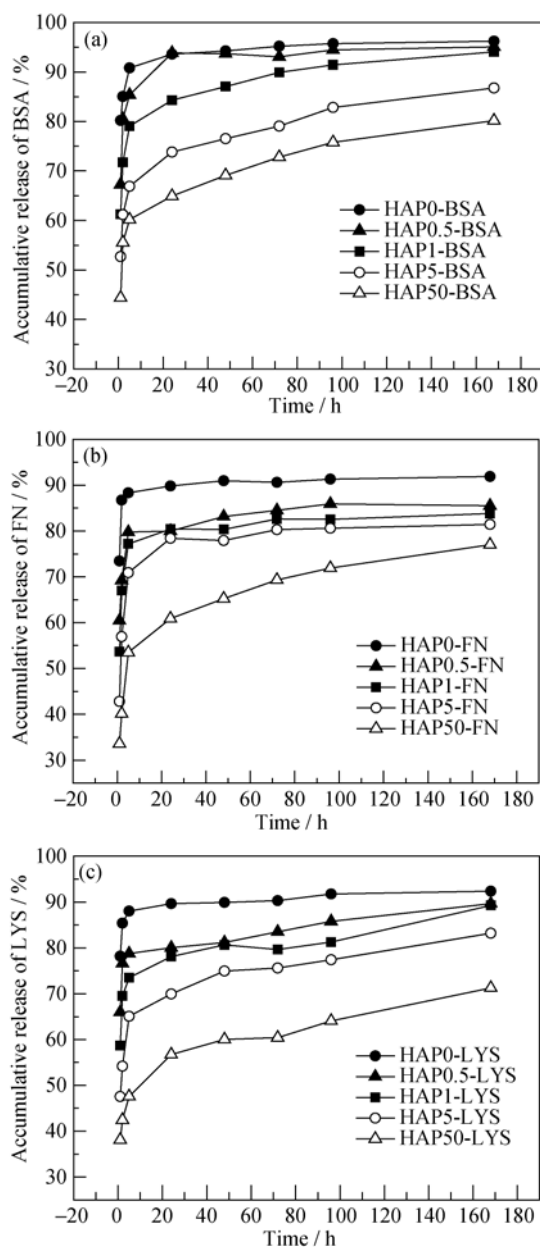


图6 具有不同表面微纳结构 HAP 载三种蛋白体外释放曲线
Fig. 6 The release curves of (a) BSA, (b) FN and (c) LYS from protein-loaded HAP particles with different surface morphologies

体导致 HAP 表现出不同蛋白缓释行为的因素还有待进一步研究。

3 结论

本研究采用水热法, 以不同浓度的 H_6E 作为模板, 制备具有不同表面微纳结构的 HAP 微粒, 并研究了 HAP 表面微纳结构对 BSA、FN、LYS 吸附及释放的作用规律。研究发现:

1) 随着合成体系中 H_6E 浓度增加, HAP 晶体生长取向发生变化, (300)晶面衍射强度逐渐降低。

2) HAP 表面微纳结构对蛋白质具有选择性吸附作用: 带状结构有利于酸性蛋白质(BSA 和 FN)的吸附, 但其单位质量对 BSA 和 FN 的吸附与 HAP50 的吸附总量相近, 并且其蛋白质体外释放存在明显的突释现象。

3) 中空结构 HAP(HAP50)对 LYS 吸附性能最强, 并且其载蛋白后具有明显的体外蛋白缓释性能。

4) 这些实验结果对研究 HAP 表面不同微纳结构与蛋白质吸附-释放之间的相互关系提供了有益的借鉴。

参考文献:

- [1] MASKARINEC S A, TIRRELL D A. Protein engineering approaches to biomaterials design. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, **16**(4): 422–426.
- [2] DUCHEYNE P, QIU Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, 1999, **20**(23/24): 2287–2303.
- [3] LIAO X L, LU S Y, ZHUO Y, *et al.* Bone physiology, biomaterial and the effect of mechanical/physical microenvironment on mesenchymal stem cell osteogenesis. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2011, **4**(4): 579–590.
- [4] YOSHIMOTO H, SHIN Y M, TERA I H, *et al.* A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2003, **24**(12): 2077–2082.
- [5] ZHANG H J, ZHU X D, WANG X L, *et al.* Effect of sintering processes on surface properties and protein adsorption of hydroxyapatite ceramic particles. *Journal of Inorganic Materials*, 2010, **25**(7): 771–774.
- [6] SANTOS E A, FARINA M, SOARES G A, *et al.* Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008, **19**: 2307–2316.
- [7] ROUAHI M, CHAMPION E, GALLET O, *et al.* Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: influence on biocompatibility of ceramics after sintering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2006, **47**(1): 10–19.
- [8] YUAN H P, YANG Z J, LI Y B, *et al.* Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Materials in Medicine*, 1998, **9**(12): 723–726.
- [9] LORD M S, FOSS M, BESENACHER F. Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. *Nanotoday February*, 2010, **5**(1): 66–78.
- [10] FUJII E, OHKUBO M, TSURU K, *et al.* Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2006, **2**(1): 69–74.
- [11] ELANGO VAN S, MARGOLIS H C, OPPENHEIM F G, *et al.* Conformational changes in salivary proline-rich protein 1 upon adsorption to calcium phosphate crystals. *Langmuir*, 2007, **23**(22): 11200–11205.
- [12] XIAO D Q, SHI F, YAO N, *et al.* Nanostructured hydroxyapatite microspheres by templated synthesis: formation and mechanisms. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, **40**(10): 935–947.
- [13] JOHNSON M, RICHARDSON C F, SALLIS J D, *et al.* Adsorption and mineralization effects of citrate and phosphocitrate on hydroxyapatite. *Calcified Tissue International*, 1991, **49**(2): 134–137.
- [14] JOKIĆ B, MITRIĆ M, RADMILOVIĆ V, *et al.* Synthesis and characterization of monetite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method. *Ceramics International*, 2011, **37**(1): 167–173.
- [15] KOUTSOPOULOS S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, **62**(4): 600–612.
- [16] ARAI T, NORDE W. The behavior of some model proteins at solid-liquid interfaces 1. adsorption from single protein solutions. *Colloids and Surface*, 1990, **51**: 1–15.
- [17] KANDORI K, SHIMIZU T, YASUKAWA A, *et al.* Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite: influence of particle texture. *Biointerfaces*, 1995, **5**(1/2): 81–87.
- [18] KANDORI K, FUDO A, ISHIKAWA T. Study on the particle texture dependence of protein adsorption by using synthetic micrometer-sized calcium hydroxyapatite particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, **24**(2): 145–153.
- [19] WANG Y S, HASSAN M S, GUNAWAN P, *et al.* Polyelectrolyte mediated formation of hydroxyapatite microspheres of controlled size and hierarchical structure. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, **339**(1): 69–77.
- [20] SUN R X, CHEN K Z, LU Y P. Fabrication and dissolution behavior of hollow hydroxyapatite microspheres intended for controlled drug release. *Materials Research Bulletin*, 2009, **44**(10): 1939–1942.
- [21] AMOOZGAR Z, YEO Y. Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2012, **4**(2): 219–233.