

钛基表面 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的血液相容性研究

徐琳¹, 丁建宁², 许晓静¹, 何远清¹, 雷小春¹

(1. 江苏大学, 江苏 镇江 212013)

(2. 常州大学, 江苏 常州 213164)

摘要: 采用微弧氧化法及微弧氧化-水热法对纯钛进行改性, 制备了 TiO₂ 与 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层, 通过溶血率实验、动态凝血时间实验和血小板黏附实验等方面评价其血液相容性。结果表明: 各试样的溶血率都远小于 5%, 均符合医用材料的溶血率要求, 不会产生溶血作用。与钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层和钛基材相比, 钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的溶血率更低, 动态凝血时间曲线变化更为缓慢, 黏附的血小板更少, 且变形程度更轻, 具有更好的抑制血小板的聚集与变形的性能, 血液相容性更优。

关键词: 纯钛; 微弧氧化; 水热合成; 血液相容性; TiO₂-HA 生物陶瓷膜层

中图分类号: R138; TG146.2+3

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2017)05-1299-06

钛材凭借较好的耐腐蚀性、生物相容性和易加工性, 在人工关节、人工骨和血管支架等领域具有重要的临床应用价值^[1]。研究发现 TiO₂ 膜层可以有效抑止钛材表面血栓的形成, 改善钛材的血液相容性^[2]。但是钛材自然钝化形成的 TiO₂ 保护膜层厚度很薄, 当钛材作为体外材料植入人体长期服役后, 在长期的外力磨损和体液腐蚀作用下, 一旦钝化 TiO₂ 膜层遭到破坏, 有可能形成血栓、造成植入体松动或断裂导致置换的最终失败。因此, 对钛植入体进行表面改性以获得良好的综合性能成为必然, 需赋予其更好的生物相容性、耐腐蚀性和摩擦磨损等性能以满足临床应用需求。通过改性适当增加 TiO₂ 保护膜层的厚度以及进行对钛基 TiO₂ 膜层的活化处理可以改善钛及钛合金生物相容性^[3-5]。由于羟基磷灰石(hydroxyapatite, HA)的晶体结构和化学组成与人体骨骼及牙齿的无机物磷灰石基本相同, 具有良好的生物相容性与骨诱导性^[6], 将其涂覆于生物惰性的钛材表面, 可以得到兼具二者优势的钛基 HA 涂层。本实验采用微弧氧化(micro-arc oxidation, MAO)-水热(hydrothermal synthesis, HS)法在纯钛基材表面制备含有羟基磷灰石的钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层, 通过溶血率实验、动态凝血时间实验和血小板黏附实验等方面评价其血液相容性, 以期为其进一步的医用研究提供理论参考和技术支撑。

1 实验

1.1 膜层的制备

实验材料选用厚度为 2 mm 的纯钛 TA2 (GB/T3620.1-2007) 圆片, 以 C₄H₆CaO₄-NaH₂PO₄ 为电解液进行微弧氧化改性, 电参数: 频率为 600 Hz, 占空比为 15%, 氧化时间为 5 min, 电流密度为 25 A/dm², 获得多孔 TiO₂ 膜层, 然后置于有水热介质为氨水的高压反应釜中水热处理 7 d, 水热温度为 180 °C, 制备钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层 (Ti-TiO₂-HA)^[7]。对照组钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层 (Ti-TiO₂) 的微弧氧化电参数为: 频率为 600 Hz, 占空比为 15%, 电流密度为 8 A/dm², 氧化时间为 10 min^[8]。

1.2 膜层的表征

采用扫描电子显微镜(SEM) 及附带的 X 射线能谱仪观测膜层的微观结构与元素成分, 应用 D8 ADVANCE 型 X 射线衍射仪进行膜层的物相分析, 通过 OCA30 视频光学接触角测量仪测量蒸馏水和乙二醇在样品表面的静态接触角, 并用 Owens^[9] 二液法计算表面能。

1.3 溶血实验

取 8 mL 新鲜兔子抗凝全血, 外加 10 mL 0.9% 的氯化钠溶液(即生理盐水)按体积比 4:5 制得稀释兔子抗凝全血。将待测试样分别放入不同的加有 10 mL 0.9% 的氯化钠溶液的试管中, 于 37 °C 的水浴中恒温 30 min, 添加 0.2 mL 新鲜的稀释后兔子抗凝全血后, 再水浴 60 min。在相同的实验条件下, 阳性对照用 10 mL 蒸馏水 +0.2 mL 稀释兔子抗凝全血, 阴性对照用 10 mL 0.9% 的

收稿日期: 2016-05-06

基金项目: 江苏省高校自然基金重大项目(11KJA430004); 江苏省高校自然基金(12KJD460002)

作者简介: 徐琳, 女, 1982 年生, 博士, 讲师, 江苏大学微纳米科学技术研究中心, 江苏 镇江 212013, 电话: 0511-88780173, E-mail: xulin1982@ujs.edu.cn

氯化钠溶液+0.2 mL 稀释兔子抗凝全血。将溶液用离心机 850 r/min 离心分离 5 min 后, 吸取上清液, 用分光光度计 545 nm 波长下测定吸光度, 每个试样做 3 次平行试验, 取平均值。根据下式计算溶血率 (HR):

$$HR = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: D_t 为试样的吸光度, D_{pc} 为阳性对照组吸光度, D_{nc} 为阴性对照组吸光度。

1.4 动态凝血时间实验

取新鲜的兔子抗凝全血在待测试样表面滴 30 μ L, 分别在 10、20、30、40、50 min 时用夹子将试样轻轻放于盛有蒸馏水的烧杯中, 等待 10 min 后用分光光度计 540 nm 波长下测定吸光度。以蒸馏水作空白对照。每个试样做 3 次平行试验, 取平均值, 绘制吸光度-时间曲线。

1.5 血小板黏附实验

采集 50 mL 兔子抗凝全血, 用离心机 1000 r/min 离心分离 10 min, 取上部的富血小板血浆, 将待测试样浸入血小板血浆并在 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴培养 120 min 后将试样取出, 用 0.9% 的氯化钠溶液漂洗干净试样表面未吸附的血小板, 在 2.5% 戊二醛溶液中于固定 12 h, 试样取出后再次用 0.9% 的氯化钠溶液清洗, 分别用无水乙醇梯度脱水 (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 每次 10 min, 乙酸异五酯脱醇梯度脱醇 (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) 每次 10 min, CO_2 临界点干燥后喷金, 将试样置于扫描电镜下观测血小板黏附变形并保存图像。

2 结果与分析

2.1 膜层表面结构

采用微弧氧化-水热法制备得到的钛基 TiO_2 -HA 生物陶瓷膜层 (Ti- TiO_2 -HA) 和采用微弧氧化法制得的钛基 TiO_2 生物陶瓷膜层 (Ti- TiO_2) 的 SEM 微观形貌及相组成如图 1 所示。

由图可见, 钛基材经微弧氧化处理后, 膜层存在着众多大小不等的孔洞和孔洞外周的火山口状熔融凸起, XRD 谱检测到了来自钛基材的 Ti 相, 还有金红石相 (Rutile) 与锐钛矿相 (Anatase) TiO_2 这 3 种物相。经微弧氧化-水热法制备得到的钛基 TiO_2 -HA 生物陶瓷膜层形貌明显有别于前者, 在分布有孔洞和熔融凸起的膜层呈现出细密的结晶形核凸起状的不规则的白色晶粒, 其 XRD 谱证实了这些晶粒为羟基磷灰石(HA)。

钛基 TiO_2 -HA 生物陶瓷膜层的形成过程示意如图 2 所示。在高压反应釜中的高温高压条件下, 富含钙磷的 TiO_2 微弧氧化膜层中以非晶态形式存在的 Ca^{2+} 、 $H_2PO_4^-$ 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 被激活迁移出膜层表面, 为其与水热处理介质为 PH 为 13~14 左右的碱性氨水发生作用形成晶态的 HA 提供了必要条件^[7] (图 2a)。水热处理时, 由于高压反应釜中的强碱性氨水富含羟基, 与富含钙磷的 TiO_2 微弧氧化膜层形成 Ti-OH 基团(图 2b): 膜层表面 $HTiO_3^-$ 基团带有负电荷, 在静电势吸引

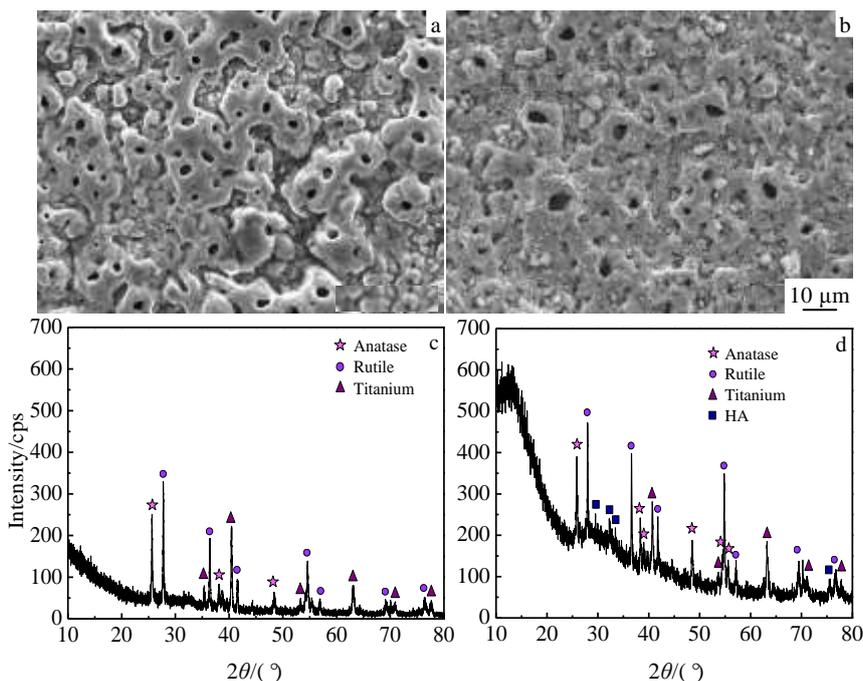


图 1 钛基生物陶瓷膜层的 SEM 形貌及 XRD 图谱

Fig.1 SEM morphologies (a, b) and XRD patterns (c, d) of bioceramic coating on titanium: (a, c) Ti-TiO₂ and (b, d) Ti-TiO₂-HA

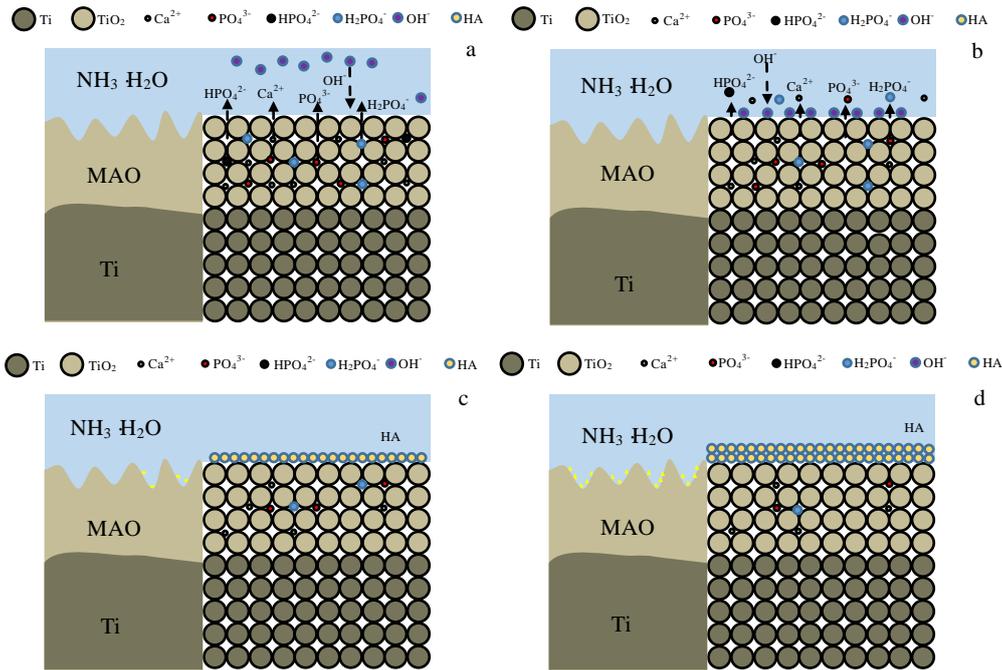


图 2 膜层表面 HA 形成示意图

Fig.2 Schematic diagram for the formation of HA: (a) the exudation of Ca²⁺, PO₄³⁻, (b) the formation of Ti-OH groups, (c) the formation of HA, and (d) growth of HA

的作用下，会选择吸附带正电荷的 Ca²⁺，随着 Ca²⁺ 的大量沉积带有正电荷，从而又会吸附带负电荷的 H₂PO₄⁻、HPO₄²⁻、PO₄³⁻，产生化学反应生成 HA^[10]。由于 TiO₂ 微弧氧化膜层表面分布有众多火山状孔洞等缺陷部位的存在，降低了 HA 成核自由能，为羟基磷灰石的产生提供了更多的形核位点，Ca²⁺、HPO₄²⁻、PO₄³⁻于膜层表面微孔处发生水热反应。因此，微弧氧化膜层表面微孔处优先结晶形核出大量细小的晶态羟基磷灰石 HA(图 2c)。随着水热时间的延长，越来越多膜层内部的 Ca²⁺、HPO₄²⁻、PO₄³⁻被激活向膜层外部迁移，使得 Ca²⁺、HPO₄²⁻、PO₄³⁻浓度增大，在膜层表面与高压反应釜中氨水提供的-OH 基团反应，膜层表面不断形核出更多的 HA 晶粒，晶粒继续增大增粗，不断生长，水热数天后膜层表面密布大量光滑及针状及少量条柱状 HA 晶粒，填充了膜层表面部分微孔(图 2d)。

2.2 表面能

通过 Owens 二液法计算得到的样品表面能 γ_s 、色散力 γ_s^D 及极性力分量 γ_s^P 如表 1 所示^[7,8]。可以发现钛基材的表面能最低，仅为 27.5 mJ m⁻²，改性处理后的生物陶瓷膜层的表面自由能均显著增加。钛基

TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的表面自由能最高，达到了 251.3 mJ m⁻²。

表 1 样品的表面能

Table 1 Surface energy parameters of samples			
Samples	$\gamma_L/mJ\ m^{-2}$	$\gamma_L^D/mJ\ m^{-2}$	$\gamma_L^P/mJ\ m^{-2}$
Ti	27.5	11.8	15.7
Ti-TiO ₂	77.7	1.9	75.8
Ti-TiO ₂ -HA	251.3	198.8	52.5

2.3 溶血率

图 3 所示为钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层、钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层和钛基材测定的吸光度值。由图可得，阳性对照组和阴性对照组的吸光度值分别为 2.977

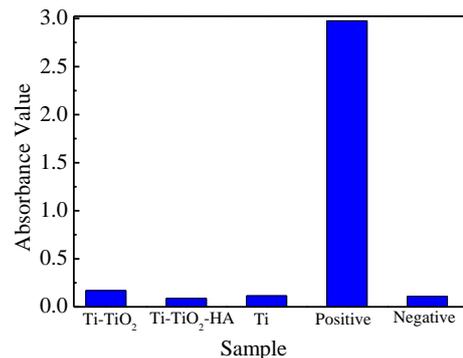


图 3 红细胞在试样表面的吸光度值

Fig.3 Optical density of red blood cells on the surfaces of samples

和 0.109,符合国家标准,实验有效。实验组 Ti-TiO₂-HA、Ti-TiO₂ 和 Ti 的吸光度值分别为 0.089、0.17 和 0.108,其中 Ti-TiO₂-HA 的吸光度值最小。

把测得的吸光度值代入公式(1)计算出的溶血率如图 4 所示。

由图可知,各试样的溶血率都远小于 5%,均符合非直接接触血液的医用材料的溶血率要求标准,不会产生溶血作用。与未经改性的钛基材的 0.24%溶血率相比,微弧氧化处理改性后的钛基 TiO₂生物陶瓷膜层的溶血率相对最高,为 2.12%。微弧氧化-水热处理改性后的钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的溶血率最低,为 0%,抗溶血性能最优,说明经水热处理后试样表面生成的 HA 晶粒减轻了试样对红细胞的破坏,抗溶血性能改善。

2.4 动态凝血时间

图 5 给出了钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层、钛基 TiO₂生物陶瓷膜层和钛基材的动态凝血时间曲线。

由图可以观察到,所有试样的吸光度值都随其与血液接触时间的延长而降低,吸光度值与未凝血的红细胞的相对量成正比,吸光度值的改变说明各试样的

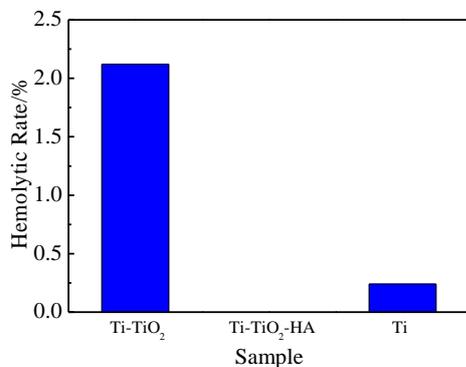


图 4 试样的溶血率

Fig.4 Hemolysis rate of samples

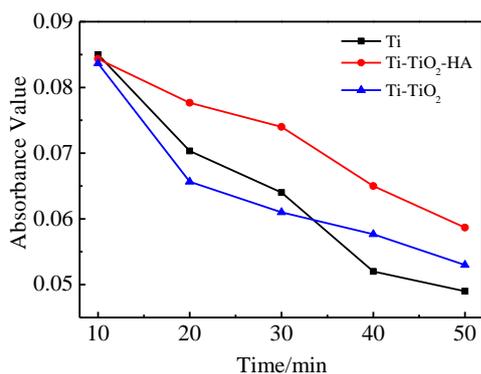


图 5 试样的动态凝血时间曲线

Fig.5 Blood coagulation profiles of samples

凝血程度都随着接触时间的延长而加剧。未经改性的 Ti 基材的动态凝血时间曲线下降陡峭,且当接触时间延长至 33 min 以后,钛基材的吸光度值低于其它改性组试样,抗凝血性能差。钛基 TiO₂生物陶瓷膜层的动态凝血时间曲线与钛基材相比略微缓慢,与血液接触时间 33 min 以后的吸光度值明显高于钛基材,血液在其微弧氧化膜层表面凝固性较弱,凝血时间变长,抗凝血性能得到改善。钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的吸光度值较钛基 TiO₂生物陶瓷膜层有所提高,动态凝血时间曲线缓慢减少,变化平稳,且从其与血液接触后 10 min 的每个时间点的吸光度值也明显高于同时测得的其余试样的吸光度值,凝血时间最长,凝血因子的激活程度最低,抗凝血性能最优。

2.5 血小板黏附行为

图 6 示出了钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层、钛基 TiO₂生物陶瓷膜层和钛基材表面的血小板黏附变形的 SEM 照片。

从图中可以明显看出,钛基材表面黏附的血小板的数量最多,血小板聚集态势形成并伸出伪足连接成网状,变形较明显,部分血小板几乎非常扁平地平铺在钛基材表面,按变形程度大多属于 IV 型。钛基 TiO₂生物陶瓷膜层表面黏附的血小板的数量显著变少,血小板变形程度轻,血小板伸出少量枝状伪足,有少量血小板的伪足深入膜层的孔洞内,大多属于 II 型。钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层表面的血小板基本呈圆盘状,黏附的血小板较少,部分发生变形,没有产生集聚,且变形程度最轻,血小板基本没有被激活,大多属于 I 型。

与钛基材相比,钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层、钛基 TiO₂生物陶瓷膜层表面具有较好防止血小板黏附与变形的性能。这主要是由于血小板在材料表面的黏附与材料表面所吸附的血浆蛋白种类、数量及立体构象变化密切相关,主要为白蛋白和纤维蛋白原。当材料表面吸附的蛋白层为白蛋白时,材料表面会出现生物钝化,减少血小板在表面的黏附,阻止凝血的发生^[2]。如图 7a 所示, Sawyer 等^[11]提出了电化学假说,研究发现纤维蛋白原的电子结构类似于本征半导体,禁带宽度窄,其带隙为 1.8 eV,当纤维蛋白原吸附在材料表面后,其价带电子会转移到和它接触的材料表面,使得纤维蛋白原的构象变化并分解成纤维蛋白单体与纤维蛋白肽,继而单体间会聚合交联成中间聚合物,加

速凝血过程^[12,13]，所以要阻止它的电荷向与它接触的材料转移，材料必须具有较小的功函数^[13]。钛基材

经微弧氧化和微弧氧化-水热改性后，形成了钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层和钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层。如图 7b

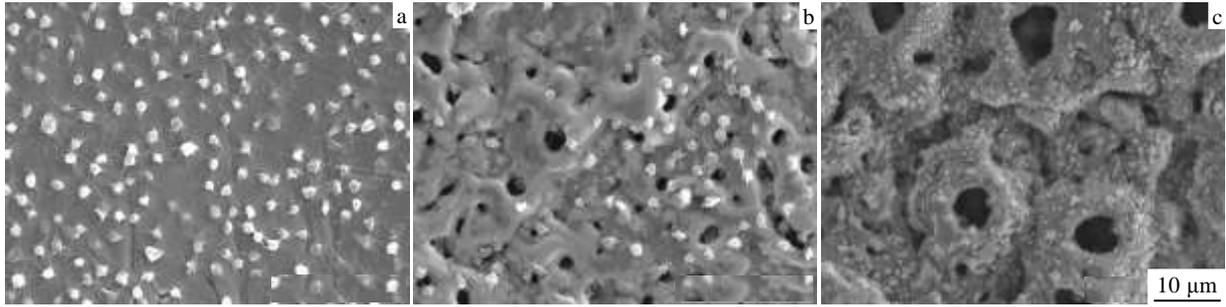


图 6 血小板在试样表面黏附变形的 SEM 照片

Fig.6 SEM morphologies of platelets adhered and aggregated on the surfaces of samples: (a) Ti, (b) Ti-TiO₂, and (c) Ti-TiO₂-HA

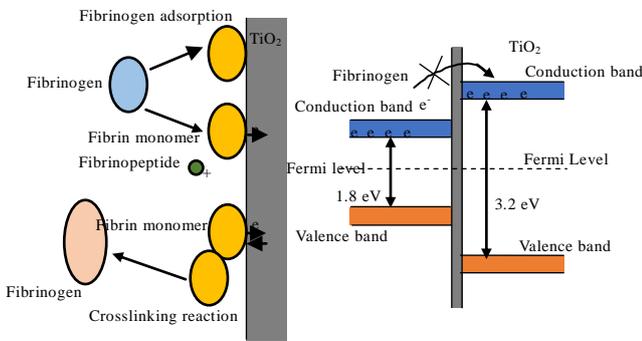


图 7 TiO₂ 与纤维蛋白原接触后的电化作用示意图

Fig.7 Schematic diagram for electrochemical action of TiO₂ and fibrinogen after adsorption: (a) electrochemical process and (b) energy band diagram^[2,11]

所示^[2,11]，TiO₂ 具有宽禁带半导体的特性，带隙为 3.2 eV，而纤维蛋白原的导带和禁带均位于 TiO₂ 的禁带间，并且 TiO₂ 的导带存在有电子，抑制了吸附于 TiO₂ 的纤维蛋白原向 TiO₂ 膜层表面转移电子，有利于维持纤维蛋白原的正常构象，进而不发生血小板在 TiO₂ 膜层表面的聚集与变形^[2]。

另一方面，不少研究者从热力学的角度对血浆蛋白在材料表面的吸附行为作出了解释。Michiardi^[14]指出当白蛋白在材料表面吸附量与其表面能的极性分量具有一定的线性关系，极性分量越大，白蛋白的吸附量就越高，白蛋白的吸附有利于减少血小板的黏附。钛基材改性处理后的 TiO₂ 生物陶瓷膜层与 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的极性力分量均显著增加，有利于白蛋白的优先吸附，抑制血小板的黏附，改善血液相容性^[15]。而钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层同时明显增高的色散力分量，可促使材料表面吸附的蛋白层更加稳定^[15]。因此，钛基

TiO₂-HA 可能具有适宜的表面能使其吸附更多的白蛋白和更少的纤维蛋白原，从而改善血液相容性^[16]。

本实验采用微弧氧化、微弧氧化-水热两种对钛材的表面改性方法中，微弧氧化-水热组试样钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层比微弧氧化试样钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层表面黏附的血小板数量更少且变形程度更轻，更能有效抑制血小板的黏附、释放及聚集，降低凝血的发生，这可能归因于微弧氧化膜层水热处理后形成 TiO₂-HA 复合陶瓷膜层具有较小的功函数与较适宜的表面能，并且其表面结晶形核出大量具有良好生物相容性的 HA 晶粒，改变了膜层表面的电荷密度、化学组成等性能影响了白蛋白和纤维蛋白原在其表面的吸附所致，使得血液相容性得到了进一步改善。

3 结 论

- 1) 采用微弧氧化-水热法对纯钛材进行改性处理，得到了钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层。
- 2) 钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层、钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层和钛基材各试样的溶血率都远小于 5%，均符合医用材料的溶血率要求，不会产生溶血作用。
- 3) 钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层的动态凝血时间曲线变化缓慢，与血液接触 10min 后的每个时间点的吸光度值也明显高于同时间点测得的其余试样的吸光度值，抗凝血性能最优。
- 4) 与钛基 TiO₂ 生物陶瓷膜层和钛基材相比，钛基 TiO₂-HA 生物陶瓷膜层表面血小板基本呈圆盘状，黏附的血小板较少，部分发生变形，没有产生集聚，且变形程度最轻，血小板基本没有被激活，大多属于 I 型，具有更好的防止血小板的黏附与变形的性能，血液相容性更优。

参考文献 References

- [1] Satsangi A, Satsangi N, Glover R *et al. Biomaterials*[J], 2003, 24(25): 4585
- [2] Hu Tao(胡 涛), Chu Chenglin(储成林), Sun Weibin(孙卫斌) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2007, 36(6): 1074
- [3] Yu S, Yu Z T, Wang G *et al. T Nonferr Metal Soc*[J], 2011, 21(3): 573
- [4] Shao H H, Yu C H, Xu X J *et al. Appl Surf Sci*[J], 2010, 257(5): 1649
- [5] Cui X Y, Kim H M, Kawashita M *et al. J Ceramic Soc Jap*[J], 2008, 116(1350): 329
- [6] Meirelles L, Arvidsson A, Andersson M *et al. J Biomed Mater Res A*[J], 2008, 87(2): 299
- [7] Xu Lin(徐 琳), Ding Jianning(丁建宁), Xu Xiaojing(许晓静) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程) [J], 2016, 45(8): 2080
- [8] Xu Lin(徐 琳), Ding Jianning(丁建宁), Xu Xiaojing(许晓静) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程) [J], 2014, 43(12): 3100
- [9] Owens D K, Wendt R C. *J Appl Polym Sci*[J], 1969, 13(8): 174
- [10] Huang L Y, Xu K W, Lu J. *J Mater Sci Mater Med*[J], 2000, 11(11): 667
- [11] Sawyer P N. *Biomater Med Dev Artif Organs*[J], 1984, 12(3-4): 161
- [12] Bauschmidt P, Schaldach M. *J Bioeng* [J], 1977, 1: 261
- [13] Bauschmidt P, Schaldach M. *Med Bio Eng Comput*[J], 1980, 18(4): 496
- [14] Michiardi A, Aparicio C, Ratner B D *et al. Biomaterials*[J], 2007, 28(4): 586
- [15] Kaelble D H, Moacanin J. *Polymer*[J], 1977, 18(5): 475
- [16] Zhang Feng(张 峰), Li Changrong(李昌荣), Wang Xianghui(王向晖). *Journal of Biomedical Engineering*(生物医学工程学杂志)[J], 2000, 17(2): 146

Blood Compatibility of TiO₂-HA Bioceramic Coating on Titanium

Xu Lin¹, Ding Jianning², Xu Xiaojing¹, He Yuanqing¹, Lei Xiaochun¹

(1. Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2. Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Biological surface modification of titanium was conducted by micro-arc oxidation (MAO) and hydrothermal synthesis (HS) methods to prepare TiO₂ bioceramic coating and TiO₂-HA bioceramic coating. The blood compatibility of modified coatings was evaluated by hemolysis rate test, dynamic clotting time and platelet adhesion test. The results demonstrate that hemolysis rates of all samples are less than 5%, and no hemolysis is observed. Compared with titanium and TiO₂ bioceramic coating of titanium, TiO₂-HA bioceramic coating of titanium exhibits better blood compatibility, with lower hemolysis rate, longer dynamic clotting time, fewer adhered platelets and slighter formation of platelets, which could better prevent platelet shape change and aggregation.

Key words: titanium; micro-arc oxidation (MAO); hydrothermal synthesis (HS); blood compatibility; TiO₂-HA bioceramic coating

Corresponding author: Xu Lin, Ph. D., Lecturer, Center of Micro/Nano Science and Technology, Jiangsu University, Jiangsu 212013, P. R. China, Tel: 0086-511-88780173, E-mail: xulin1982@ujs.edu.cn