

钛基表面 PDLLA/ZnO 纳米阵列材料的制备及生物学性能

程浩艳, 曾艳, 廖慧君, 余颖, 祝志宏

(华中师范大学, 湖北 武汉 430079)

摘要: 采用水热生长法, 在钛基表面制备高度有序、尺寸可控的氧化锌纳米棒阵列, 再通过静电吸附的方法在其表面自组装一层具有良好生物相容性的聚乳酸生物涂层。利用 SEM, MTT, LDH 方法对细胞形态和生物活性进行表征。结果表明, 氧化锌阵列上细胞形态呈圆形, 无铺展现象。而经聚乳酸修饰过的材料表面 MC3T3 细胞外基质铺展较好, 细胞分泌的丝状伪足嵌入了阵列结构的空隙中, 并且表面细胞数量最多, 细胞活性明显高于氧化锌纳米棒及纯钛片。结果表明, 聚乳酸涂层提高了氧化锌阵列的生物相容性, 为细胞生长提供适宜的微环境, 有效促进了细胞的黏附与增殖。

关键词: 氧化锌纳米棒阵列; 聚乳酸生物涂层; 生物相容性; 细胞黏附

中图分类号: TG146.2⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2015)03-0703-05

具有纳米阵列结构的材料已引起人们的广泛关注, 如纳米管、纳米线、纳米棒阵列等^[1-3]。其中, 阵列材料的典型代表 ZnO 纳米棒阵列具有取向性良好, 密度可控等特点^[4,5]。单根纳米棒的长度相比于其他材料较长, 纳米棒之间的空隙大, 具有较好的亲水性, 有利于营养物质的流动, 但 ZnO 纳米棒材料具有一定的生物毒性^[6], 与纯钛片表面相比, 材料表面黏附细胞数量少, 细胞活性低, 进而抑制了成骨细胞增殖^[7]。此外, ZnO 在生理环境中不稳定, 容易被降解, 这些缺点都限制了 ZnO 在临床移植上的进一步应用。为了充分利用 ZnO 纳米棒支架结构的优点, 提高其生物相容性, 需要对 ZnO 纳米棒进行表面改性, 使其具有成为种植体材料的潜力。

在表面改性材料中, 聚乳酸是一种具有良好生物相容性的高分子材料, 广泛应用于骨组织工程中^[8,9]。聚乳酸有多种同分异构体, 最常用的是左消旋聚乳酸和外消旋聚乳酸, 其中外消旋聚乳酸 (PDLLA) 是目前研究最多的一种高分子材料。材料表面经过聚乳酸涂层的修饰可显著提高其生物相容性^[10], 如钛金属基底表面通过外消旋聚乳酸的修饰可加速骨的愈合^[11,12]。

本研究通过水热法在钛基底上制备出高度有序的 ZnO 纳米棒阵列, 采用静电吸附的方法在其表面自组装 PDLLA 涂层。该涂层可改变 ZnO 纳米棒阵列的表面化学性质, 从而有效地降低 ZnO 纳米棒的毒性, 提高材料的生物相容性, 促进细胞的黏附与增殖。

1 实验

Tensor-27 型傅里叶变换红外光谱仪 (FT-IR, 德国 Bruker 公司); SX-500 型高温灭菌锅 (日本 Tomy Digital Biology 公司); 超净工作台 (苏州净化科学仪器厂); UV2200 酶联免疫检测仪 (日本 SHIMADZU 公司); JSM-6700F 型扫描电子显微镜 (SEM, 日本 JOEL 公司); Bruker D8 型全自动 X 射线衍射仪 (XRD, 丹东射线仪器公司)

无水乙醇 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 金属钛片 (宝钛集团有限公司); 六水合硝酸锌 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氨水 (分析纯, 开封东大化工有限公司试剂厂); 去离子水; DMEM (Sigma 公司); 戊二醛 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 二甲基亚砜 DMSO (Sigma 公司); LDH 试剂盒 (南京建成); MTT 试剂盒 (Sigma 公司)

ZnO 纳米棒的制备: 首先将打磨处理过的钛片分别放入到盐酸、乙醇和丙酮溶液中超声 1 h。然后在 50 mL 的水中加入 0.5 g 的六水合硝酸锌配成 0.01 g/mL 的硝酸锌溶液, 逐滴加入 1.5 mL 的氨水, 得到 ZnO 的前驱体溶液。再将钛片放入到高压釜内胆中, 加入 40 mL 前驱体溶液, 70 °C 下反应 16 h, 最后将样品在 400 °C 退火 3 h。

PDLLA 和 ZnO 纳米棒复合材料的制备: 将 0.0943 g PDLLA 加入到 100 mL 的二氯甲烷中充分溶解, 将配备好的溶液逐滴滴加到钛片表面, 60 °C 干燥 30 min, 即

收稿日期: 2014-03-16

基金项目: 国家自然科学基金 (50802032); 湖北省自然科学基金重点项目 (2011CDA092)

作者简介: 程浩艳, 女, 1988 年生, 硕士, 华中师范大学, 湖北 武汉 430079, 电话: 027-67861185, E-mail: chenghaoyan@126.com

可得到 ZnO/PDLLA 复合材料。

扫描电子显微镜 (SEM; 5 kV) 用来观察复合材料的表面形貌及表面粗糙度。傅里叶变换红外线光谱仪 (FT-IR)用于分析 ZnO/PDLLA 复合材料的结构和分子组成, 样品分析范围为 400~4000 cm⁻¹ 波束。X 射线衍射仪 (铜靶 K α $\lambda=0.154\ 178\ \text{nm}$) 用于对材料进行物相分析, 扫描范围为 10°~80°。

以纯钛片为对照组, 将样品放入 96 孔细胞培养板, 每个孔中分别加入 30 μL 密度 5×10^4 个/mL 的细胞; 在含有 10% 胎牛血清 FBS 和 1% 抗菌素 (青霉素和链霉素) 的细胞培养基中培养, 培养条件为 37 °C 下 5% 的 CO₂ 气体。

细胞在材料表面分别培养 1, 3, 5 d 后, 用戊二醛将其固定, 脱水、干燥后, 通过扫描电子显微镜 (SEM; 5 kV) 观察材料表面细胞黏附形态与增殖情况。

对各实验组细胞活性进行 MTT 测试。将 1 mL 细胞悬浮液 (密度为 5×10^4 个/mL) 添加到每个培养孔中; 经 1、2 和 3 d 培养后, 将 20 μL 含有细胞的 MTT 溶液继续培养 4 h; 取出 MTT 溶液, 加入 200 μL 的二甲基亚砜 DMSO; 吸收光密度值 OD 在 595 nm, 用分光光度计进行测量, 取 3 次测量的平均值。

乳酸脱氢酶活性是检测细胞毒性的一个标准, 细胞在材料表面分别培养 1、2 和 3 d 后, 将细胞培养液离心, 取上清液进行 LDH 活性测试。乳酸脱氢酶活性用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测量其光吸收值, 取 3 次测量的平均值。

2 结果与讨论

2.1 ZnO/PDLLA 复合材料的表征

水热法制备的 ZnO 纳米棒阵列的形貌如图 1 所示。

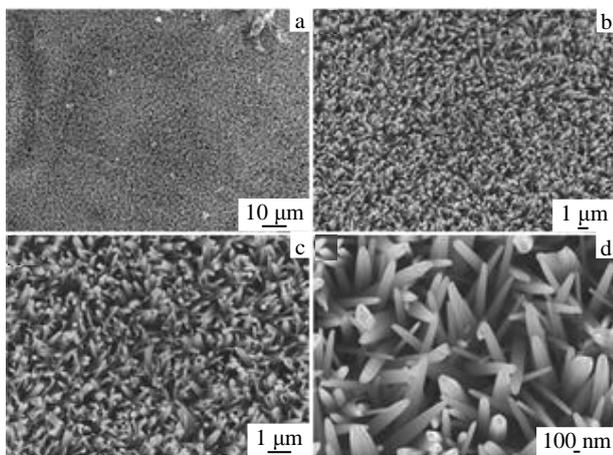


图 1 钛基表面的不同倍率氧化锌纳米棒阵列 SEM 照片
Fig.1 SEM images of the ZnO nanorod arrays on Ti substrate for different magnification

由上图可以看出 ZnO 纳米棒阵列大面积生长均匀, 取向性良好, 棒与棒之间有较大间隙, 单根棒为铅笔状, 直径约为 100 nm, 长度为 1.5 μm 。该材料经过超声, 未从基底钛脱落, 说明 ZnO 纳米棒与基底结合紧密。

图 2 为 ZnO 纳米棒阵列的 XRD 图谱。可见, 该材料在 33° 处峰强较大, 且尖锐, 表明其结晶性较好, 且沿着 (002) 取向生长。

ZnO 纳米棒之间存在较大间隙, 可以满足细胞黏附过程中营养物质的流动, 从而有利于细胞丝状伪足的嵌入, 使细胞能迅速有效的在种植体表面黏附和增殖。但 ZnO 本身具有的毒性可抑制细胞生长, 为了提高材料的生物相容性, 在钛基 ZnO 表面自组装具有生物相容性的涂层材料 PDLLA, 复合材料的形貌如图 3 所示。由高分辨率的 SEM 照片可以看出, PDLLA 均匀包覆在每一根 ZnO 纳米棒表面, 阵列结构保存完好。PDLLA 涂层的修饰, 为细胞生长提供了适宜的微环境^[13], 有效降低 ZnO 对细胞的毒副作用, 还能充分利用 ZnO 纳米棒阵列空间间隙大的优点。所以, 这种复合材料结合了 PDLLA

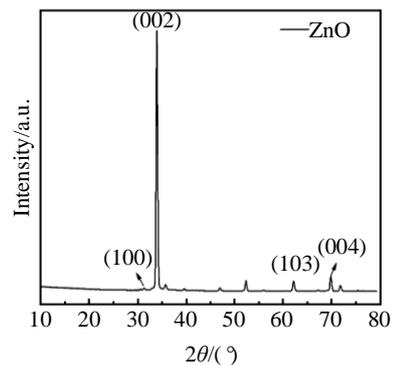


图 2 ZnO 阵列的 XRD 图谱
Fig.2 XRD pattern of the ZnO nanorod arrays

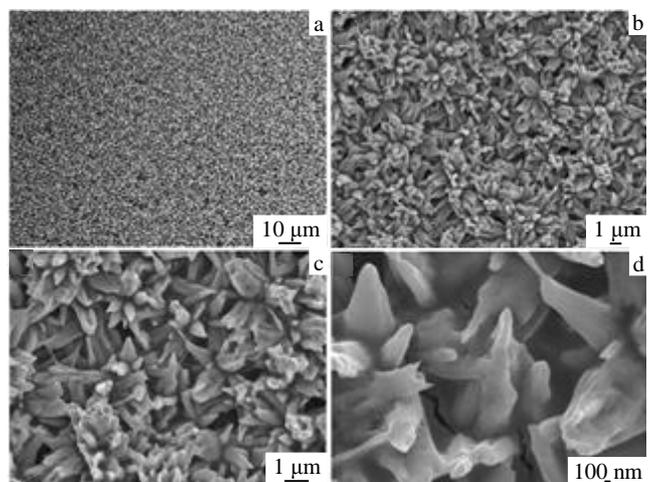


图 3 不同倍率的 ZnO/PDLLA 复合材料 SEM 照片
Fig.3 SEM images of ZnO/PDLLA for different magnification

的生物相容性和 ZnO 纳米棒作为支架材料的优点，有效提高了材料的表面特性。

2.2 ZnO/PDLLA 纳米棒复合材料的 FT-IR 分析

ZnO/PDLLA 纳米棒复合材料的傅里叶红外光谱测试结果如图 4 所示。可见，在 3441 cm⁻¹ 位置的吸收峰为 O-H 的伸缩振动峰；1453 和 2997 cm⁻¹ 吸收峰为 C-H 伸缩振动峰；1775.22 cm⁻¹ 位置出现的吸收峰是典型的 PDLLA 红外吸收峰，来源于 C=O 的伸缩振动；1122 和 1017 cm⁻¹ 的吸收峰对应的是 C-O 的伸缩振动峰。结果表明，PDLLA 成功自组装在 ZnO 纳米棒表面，这是因为 ZnO 纳米棒在空气中能分解出自由移动的电子，其表面带丰富的负电荷，易于使 PDLLA 在其表面自组装。

2.3 细胞黏附形态表征

为研究细胞在材料表面的黏附、增殖情况，分别对细胞在纯钛片、ZnO 纳米棒和 ZnO/PDLLA 复合材料表面培养 1, 3, 5 d 的黏附形态进行表征，如图 5 所示，插图均为高倍图。从图中可以看出纯钛片表面细胞数量较少，铺展情况差，只有少量板状伪足。与纯钛片相比，ZnO 纳米棒表面细胞数量更少，细胞发生收缩，呈圆形，无铺展和生长现象，几乎没有细胞存活。这主要是因为纳米 ZnO 在水和空气中能自行分解出自由移动的电子，同时留下带正电荷的空穴，这种空穴可以激活空气中的氧，活性氧有极强的化学活性，能与大多数有机物发生

反应。纳米 ZnO 也可能破坏生物分子的结构，从而导致其功能损伤^[14]。ZnO 纳米棒的生物毒性特征将抑制细胞的黏附与生长。而具有生物相容性的 PDLLA 涂层能够显著改善材料的表面化学特性，提高材料的生物相容性，为细胞提供保护屏障。由图 5 可知，培养 5 d 之后，ZnO/PDLLA 复合材料表面黏附细胞数量明显增多，高分辨的 SEM 结果表明，MC3T3 细胞外基质铺展较好，细胞分泌的丝状伪足嵌入了阵列结构的空隙中，与基底材料结合紧密。这种复合材料中 ZnO 纳米棒支架，生长均匀，取向性好，单根棒长度大，与基底材料结合紧密，具有其它阵列材料无法比拟的优点，同时 PDLLA 涂层

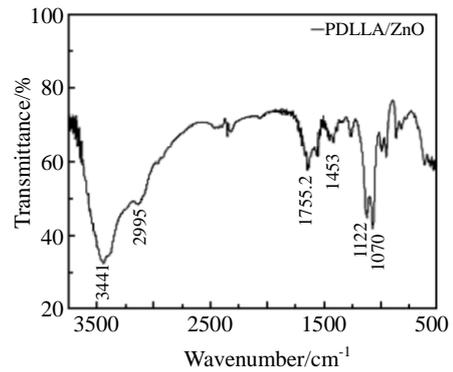


图 4 ZnO/PDLLA 纳米棒复合材料的红外光谱

Fig.4 FT-IR spectra of ZnO/PDLLA composite

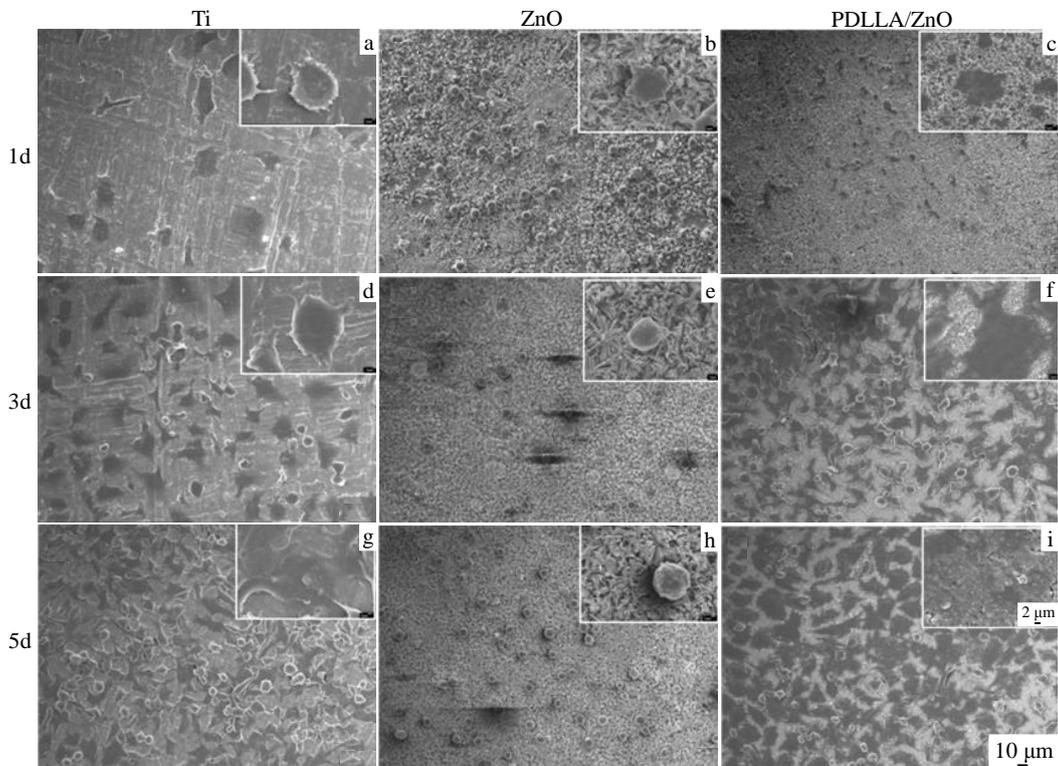


图 5 不同基底上分别培养 1, 3, 5 d 后细胞形态的 SEM 照片

Fig.5 SEM images of the cell morphology on different samples after culturing for 1, 3, and 5 d

的修饰有效的改进了材料的表面化学特性，对细胞起到一定的保护作用，提高了材料的生物相容性，使得细胞在复合材料表面黏附、生长状况良好。

2.4 细胞活性测试 MTT

材料表面培养 1、2 和 3 d 的细胞的 MTT 活性测试结果如图 6 所示。通过对比发现，纯钛片表面细胞活性较小，培养了 1, 2, 3 d 后的细胞活性变化不明显，与其他组对比，ZnO/PDLLA 复合材料表面的细胞活性在任何时间点都最强，并且随着培养时间的延长，材料表面细胞活性增长的速率最大，产生这种现象的原因是高分子聚合物 PDLLA 涂层的修饰，提高了材料的生物相容性，这说明 ZnO/PDLLA 纳米复合材料更有利于细胞的黏附和增殖。

2.5 乳酸脱氢酶测试 LDH

通过乳酸脱氢酶活性测试检测材料的毒性，结果如图 7 所示。由图可知，培养 1 d 后，ZnO 纳米棒和 ZnO/PDLLA 复合材料表面的毒性较小，但是与纯钛片区别不明显。2 d 的培养后，ZnO 纳米棒和 ZnO/PDLLA 复合材料的毒性比

纯钛片的低，这是由于阵列结构的材料更有利于细胞培养液的流动，因此毒性较低。由图 5 可知，在 3 d 的培养之后，ZnO/PDLLA 复合材料表面黏附细胞数量迅速增加，死亡细胞的数目随着细胞的增殖有所增加。因此，LDH 值也有所增加。以上实验数据表明 ZnO/PDLLA 纳米复合材料具有良好的表面特性，从而提高了材料的生物相容性，在骨组织工程中有潜在应用。

3 结 论

1) 水热法制备的 ZnO 纳米棒结构良好，生产工艺简单。但 ZnO 材料本身对细胞有一定毒副作用，PDLLA 生物相容性涂层的修饰，为细胞提供了保护屏障，使得表面微环境有利于细胞的黏附、增殖，提高了材料的生物相容性。这种材料充分利用 ZnO 纳米棒的支架结构和 PDLLA 的生物相容性。

2) ZnO 阵列上细胞形态呈圆形，无铺展现象；而 PDLLA 修饰过的材料表面细胞铺展情况良好，有较多的丝状伪足。经过 5 d 培养，复合材料表面细胞数量最多，细胞活性明显高于 ZnO 纳米棒及纯钛片。ZnO/PDLLA 复合材料更有利于细胞的铺展、黏附和增殖，该复合材料在生物移植材料中有着极好的应用前景。

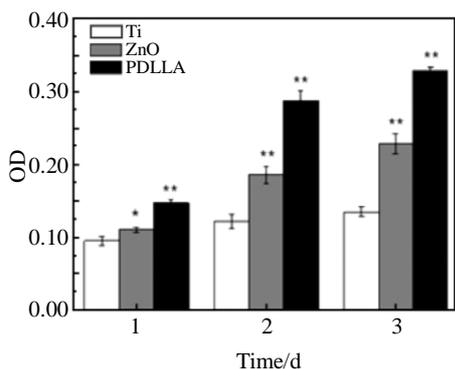


图 6 纯钛片、ZnO 和 ZnO/PDLLA 表面细胞 MTT 测试
Fig.6 MTT activity of cells on pure Ti, ZnO nanorods and ZnO/PDLLA

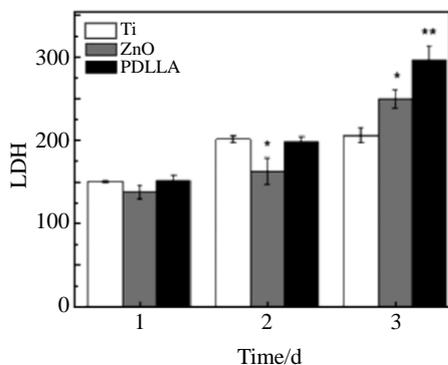


图 7 纯钛片、ZnO 和 ZnO/PDLLA 表面细胞 LDH 测试
Fig.7 LDH activity of cells on pure Ti, ZnO nanorods and ZnO/PDLLA

参考文献 References

[1] Xiang X, Yao L, Jiang M *et al. Integr Ferroelectr*[J], 2012, 136: 71
 [2] Lu Z, Zhu Z, Zheng X *et al. Nanotechnology*[J], 2011, 22: 155 604
 [3] Li Guangzhong(李广忠), Zhang Wenyan(张文彦), Han Jianye(韩建业) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2010, 39(7): 1206
 [4] Liu J, Huang X, Li Y *et al. J Phys Chem C*[J], 2007, 111: 4990
 [5] Meng F, Wang L, Zhu F *et al. J Electroanal Chem*[J], 2012, 683: 25
 [6] Mohammad E, Mohammad M, Ramin H *et al. Environ Toxicol Phar*[J], 2013, 35: 67
 [7] Jiyeon L, Kang B S, Barrett H *et al. Biomaterials*[J], 2008, 29: 3743
 [8] Sophie V, Jonny J, Veronique M *et al. Biomaterials*[J], 2004, 25: 3013
 [9] Lu Ping(逯平), Fang Mingzhong(方铭中), Cao Lu(曹路) *et al. Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2012, 40(12): 2232
 [10] Andreas K, Cornelia H, Christian K *et al. Biomaterials*[J], 2011, 32: 6850
 [11] Ana L, Sofia G. C, Ma J *et al. Dent Mater*[J], 2013, 29: 427
 [12] Matteo S, Hazel Y. S, Eleonora C *et al. Biomaterials*[J], 2013, 34: 4573
 [13] Wilda H, Catherine M, Jonny B *et al. Biomaterials*[J], 2007, 28: 2010
 [14] Zhao X, Wang S, Wu Y *et al. Aquat Toxicol*[J], 2013, 136: 49

Preparation of PDLLA/ZnO Nanorod Arrays on Ti Substrate and the Biological Properties

Cheng Haoyan, Zeng Yan, Liao Huijun, Yu Ying, Zhu Zhihong

(Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Highly ordered and size controllable ZnO nanorod arrays were prepared on Ti substrate through a hydrothermal method, and then the biocompatible PDLLA coating was self-assembled onto the surface of the prepared nanorod arrays via electrostatic adsorption process. SEM, MTT and LDH methods were used to characterize the morphology and biological activity of cells. The results show that cells on the ZnO nanorod arrays are round-like without spreading; while after the modification of PDLLA, there are the largest amount of cells on the modified nanorod arrays, the extracellular matrix become well-spread with many filopodia embedded into the gaps of the array structure, and the cell activity is significantly higher than that of ZnO nanorod arrays and titanium film. It is concluded that the PDLLA coating can improve the biocompatibility of the material to provide a suitable microenvironment for cell growth, and effectively promote the adhesion and proliferation of cells.

Key words: ZnO nanorod arrays; PDLLA coating; biocompatibility; cell adhesion

Corresponding author: Zhu Zhihong, Ph. D., Associate Professor, Central China Normal University, Wuhan 430079, P. R. China, Tel: 0086-27-67861185, E-mail: zhzhu@phy.ccn.u.edu.cn