

电化学共沉积制备有机高聚物/钙磷复合陶瓷膜层 — I XRD、SEM 表征及生物活性研究*

胡皓冰¹ 林昌健¹ 冷扬²

1(厦门大学 化学系 材料系 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

2(香港科技大学 机械工程学系, 香港)

摘要 首次提出在 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中添加水溶性乙烯类有机高聚物, 实现了通过电化学共沉积法制备具有生物活性的有机高聚物/钙磷陶瓷复合膜层。用XRD、SEM 等对膜层的组分和形貌进行表征, 证明陶瓷膜层表面形貌发生明显的变化。有机高聚物的引入, 并不影响电沉积制备的羟基磷灰石(HAP)晶体在(002)晶面生长存在的晶面择优取向。体外细胞实验表明, HAP/有机高聚物复合膜层具有优良的生物活性。

关键词 电化学共沉积 HAP 复合膜层 有机高聚物 生物活性

An Investigation of HAP/Organic Polymer Composite Coatings Prepared by Electrochemical Co-Deposition Technique

Hu Haobing¹ Lin Changjian¹ Leng Yang²

1(State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, Department of Chemistry, Department of Materials Science and Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

2(Department of Mechanical Engineering, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong)

Abstract An electrochemical co-deposition technique has been developed to prepare a hydroxyapatite (HAP)/organic polymer composite coating on Ti surface as new biomaterial of hard tissue. The composite coating of organic polymer and calcium phosphate is formed by adding a water soluble polymer of the ethylene series to $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution when conducting an appropriate electrochemical co-deposition experiment. The XRD, SEM, XPS, SMS and nano-indent measurements were performed to characterize the morphology, composition, structure and surface stiffness of the composite coating. It was found that the morphology and surface hardness of the coatings showed a remarkable modification when introducing a minor polymer to HAP coating, and the bonding force between the coating and metal substrate was distinctly increased. The incorporation of minor organic polymer into the HAP compound at molecular level will improve the mechanical properties and morphology of the composite coatings, and this may be helpful to raising its bio-activity.

Key words Electrochemical co-deposition HAP composite coatings Organic polymer Bioactivity

采用一般的等离子喷涂技术, 在金属表面制备羟基磷灰石(HAP)等钙磷生物陶瓷涂层, 虽然克服了医用金属作为植入材料存在的生物相容性差等缺点^[1], 但等离子喷涂的高温条件, 使HAP会发生热分解, 导致涂层生物活性明显下降, 喷涂的直线过程还使得制备复杂外形的植入器件受到限制^[2,3]。通过电化学沉积方法在金属表面制备钙磷生物陶瓷, 具有反应条件温和、电沉积过程非线性并可在金属表

面直接制备各种Ca/P比的陶瓷直至纯羟基磷灰石陶瓷的优点。进一步提高钙磷陶瓷膜层的生物活性, 改善钙磷陶瓷膜层相间及钙磷陶瓷与金属界面的结合力, 是电化学沉积法制备生物陶瓷涂层亟需解决的关键问题^[4~6]。

聚甲基丙烯酸甲酯作为一种骨水泥材料, 已应用临床多年, 实践证明其具有良好的生物相容性和优越的稳定性^[7]。聚碳酸酯和磷酸钙混合在金属钛表面制备生物涂层, 也见报道^[8]。骨骼中有机物的含量因部位及生物体的年龄而呈现很大的差异, 就

* 国家自然科学基金资助项目(29873039)

人体骨组织中有机成分最少的牙齿而言, 仍然有约 3% (W) 的有机高分子组分^[9]。生物体骨组织的自然形成过程通常是无机相的形成和有机相的形成同步或有机相的形成先于无机相形成, 并通过有机相的诱导以控制无机相的组成和形貌^[10]。电化学沉积方法制备有机高聚物/钙磷陶瓷复合膜层需选择生物相容性良好的有机高聚物, 本实验所使用的有机高聚物的前驱体是聚乙烯醇, 已被广泛用于制造人造血管、心脏起搏器、人造心瓣膜、人工乳房、人工皮肤等^[11]。本实验试图在 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液中, 引入水溶性乙烯类有机高聚物, 通过电化学共沉积, 使有机高聚物和 HAP 陶瓷膜层实现分子层次的掺杂, 既可改善膜层的生物活性, 又可显著提高陶瓷膜层及其与基体的结合力。

1 仪器及实验条件

电沉积溶液组成: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.001~0.1 M, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.001~0.1 M, pH=6, 水溶性乙烯类高聚物 0.15% (重量百分率)。在电沉积溶液中添加纯硝酸钠至 0.1 M, 以增加其导电性。

电沉积模式: 恒电流, 阴极电沉积, 电流密度 0.5~3 mA/cm²。反应时间 10~60 min, 反应温度: 70~90。

有机高聚物: 加入电沉积溶液中的有机高聚物是聚乙烯醇缩甲醛 ($n=5000$) 的部分水解的产物, 由于和甲醛进行缩合反应的 -OH 只是聚乙烯醇中许多 -OH 中的一部分, 因此仍然是水溶性的。

电沉积陶瓷膜层后处理: 去离子水淋洗, 自然凉干。

电沉积基体: 工业纯钛或 Ti6Al4V (金相砂纸抛光, 无水乙醇除油, 去离子水冲洗, 自然凉干), 尺寸为 1 cm × 1 cm × 0.2 cm (长 × 宽 × 厚)。

XRD 实验: Philips Powder Diffraction System, Cu 阳极, 扫描范围 20°~40°。

SEM 实验: JSM 6300 (JEOL, JAP)。

2 结果与讨论

2.1 XRD 分析

表 1 列出了电沉积制备的纯 HAP 及含有有机高聚物膜层的 XRD 衍射峰的 2θ 值, 与标准谱图的差异是 (002) 衍射峰高于 (211) 衍射峰, 这是由于晶体生长中晶面择优取向不同造成的, 即电沉积合成制备的陶瓷膜层中的 HAP 晶体在生长中存在 (002) 晶面择优取向。由此可见, 引入有机高聚物不会影响

电沉积反应的正常进行。

表 1 标准 HAP 及电沉积 HAP 2θ 值对照

Table 1 Comparison of XRD data on different HAP coatings

衍射晶面 (h k l)	标准样品 2θ 值*	加有机高聚物 样品 2θ 值	不加有机高聚物 样品 2θ 值
0 0 2	25.882	25.975	25.960
1 0 2	28.130	28.225	28.200
2 1 0	28.920	29.000	28.850**
2 1 1	31.765	31.775	31.740
1 1 2	32.194	32.275	32.250
3 0 0	32.896	32.875	32.850**
2 0 2	34.062	34.100	34.110

* 数据源于标准卡片; ** 表示峰面积较小

2.2 电沉积层表面形貌

图 1 为不加有机高聚物电沉积得到的 HAP 晶体的形貌, 单个晶粒为长 2 μm, 直径 0.2 μm 左右的圆柱体, 垂直于基体, 晶体生长的择优取向明显, 这和 XRD 提供的有关晶体取向的信息是一致的。有机高聚物的加入, 明显改变了膜层的形貌 (见图 2), 看不到异常形貌的晶体或类似于不加有机高聚物电沉积形成的柱状晶体。考虑到 XRD 谱指示 HAP 晶体生长的择优取向和不加有机高聚物的一样, 有机高聚物的加入很可能是在择优取向的 HAP 晶体间形成了连续的高聚物网络状结构 (有机相), 填充了晶间空隙, 从而使膜层变得更加致密。

2.3 生物活性实验

在消毒后, 将植入体 (在本实验中, 植入体是进行生物活性实验评价的纯金属钛板, 或两面电沉积了羟基磷灰石的金属钛板) 置于有 24 个互相隔离的培养井的培养盘里。随后, 悬浮在新鲜的 DMEM/L-Glu/10% FBS 成长介质中, 将浓度为 1.0×10^4 个/ml 有活力的成骨样细胞 SaOS₂ 加入到每一个培养井里 (一个培养井的有效体积为 1 ml)。没有放植入体的井里也加入细胞进行培养, 这样, 就可以将这些井里的细胞作为对照组, 每天用相差显微镜 (Model CK30, Olympus) 检查细胞的形貌, 以评价培养细胞的条件是否控制恰当。培养井里已加入细胞的培养盘, 被放置于 CO₂ 培养箱继续培养, 培养箱控制在 37℃, 5% CO₂, 95% 的湿空气的状态。细胞培养的时间为 4 d。

将放置在培养井里进行了 4 d 细胞培养的植入体取出, 将其转移入干净的培养井里, 用 PBS 清洗液清洗细胞 2 次, 加入 1 ml 的 MTT 试剂。将已加有 MTT 试剂的培养盘放入 CO₂ 培养箱中, 用前述的培养细胞同样的控制条件, 继续培养细胞 3 h。弃

去培养井里的 MTT 试剂, 加入 150 μl 的酸化的异丙醇(异丙醇中 HCl 浓度为 0.04 M), 溶解温度控制在 37 $^{\circ}\text{C}$ 。用移液管从培养井里移取该溶液 50 μl , 将其加入无菌 96 孔培养板中, 在波长 570 nm 测量溶液的 OD 值。同时向 96 孔培养板中加入 50 μl 酸化的异丙醇作为比色用的空白。每一个培养井中细胞的数量通过一个标准的 OD 值-细胞数曲线图求得。

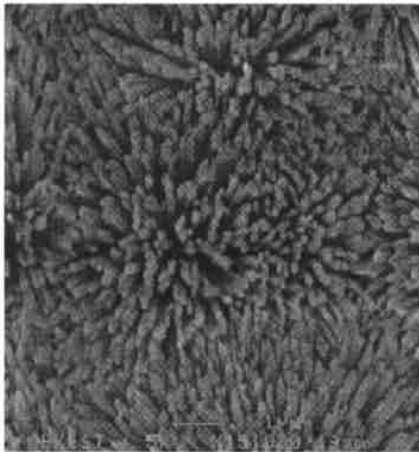


图 1 不加有机高聚物电沉积的 HAP 陶瓷形貌 ($\times 15\ 000$)

Fig 1 SEM micrographs of the electrodeposited HAP coating without organic polymer ($\times 15\ 000$)

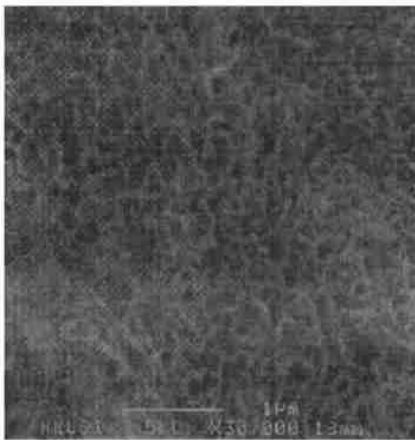


图 2 加有机高聚物电沉积的 HAP 陶瓷形貌 ($\times 30\ 000$)

Fig 2 SEM micrograph of the electrodeposited HAP coating with organic polymer ($\times 30\ 000$)

表 2 中实验结果表明, 附着在有机高聚物/HAP 复合膜层上的细胞的个数最多, 其次是纯 HAP 膜层, 附着在金属钛板上的细胞个数最少。在

将培养井里的种植体移走后, 对附着在培养井里其它地方的细胞的个数也进行了分析, 表明培养井里的细胞主要是附着在种植体上。

表 2 细胞在培养 4 d 后的数量

Table 2 The number of cells cultured after 4 days

种植体	种植体上细胞数量(个)	移走种植体后培养井中细胞数量(个)
金属钛板	15615	1572
纯 HAP 膜层	20002	15935
有机高聚物/HAP 膜层	67160	16902

羟基磷灰石主要是由钙、磷元素所组成, 它们是人类骨组织的主要无机成分, 加之其晶体结构也与人骨内的羟基磷灰石结晶相似, 因此在浸泡于培养液中进行体外细胞培养时, 会和人骨内的羟基磷灰石在体内的表现一样, 在其表面形成高钙离子层及微碱性环境^[13], 从而使其与 SaOS2 细胞有高度亲和性。因此, 电沉积有 HAP 膜层的植入体对细胞的增生扩散比纯钛更有利。表 2 所显示的结果也支持这种解释。

钛虽然很活泼, 但由于暴露于空气后立即形成一层致密的 2~6 nm 厚的很薄的 TiO_2 膜^[12], 而使其成为了惰性金属, 不会释放或很少释放有毒的金属离子, 故它在和细胞接触时, 不会引起细胞形态的改变及死亡, 即对细胞无毒性。但由于不具备羟基磷灰石那样的化学成分, 所以不具有细胞吸附与扩散增生适宜的高钙离子层及偏碱性环境。因此在体外细胞培养实验中, 在其上附着的细胞最少, 在其周围附着的细胞也最少。

在细胞培养其间, 不见有漂浮在培养井里的死细胞, 表明三种材料对于细胞都是无毒的。

作为植入体内的硬置换材料, 材料生物相容性或活性主要体现在它的表面上, 其生物行为是一种界面行为^[14]。生物材料的表面性质, 特别是它的化学性质、表面形貌, 对于细胞在它表面的增生扩散行为至关重要^[15]。通过 SMS 对 2 种 HAP 膜层的表面成分进行分析, 发现两种膜层最外面几十个 \AA 中磷酸根离子所处的化学环境有很大的不同, 也许这就是纯 HAP 膜层和有机高聚物/HAP 复合膜层上细胞增生扩散行为产生重大区别的原因。

图 3 是细胞附着在纯 HAP 膜层上的电镜照片, 可以看到细胞的伪足发育良好, 与材料接触紧密。

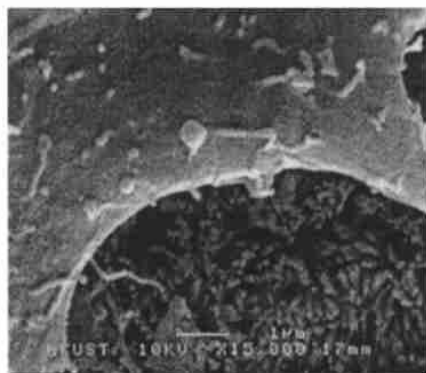


图3 SaOS₂细胞在纯HAP膜层上培养2d后的SEM照片 (×15 000)

Fig 3 SEM micrograph of SaOS₂ cultured on pure HAP coating after 2days (×15 000)

3 结论

(1) 发展了一种在NH₄H₂PO₄-Ca(NO₃)₂溶液中添加水溶性乙烯类有机高聚物,通过电化学共沉积制备具有生物活性的有机高聚物/钙磷陶瓷复合膜层的方法。

(2) 应用XRD、SEM对膜层进行综合表征,结果证明高聚物的引入明显改变了电沉积层的表面形貌。加入的高聚物很可能是通过在HAP晶间形成连续的网络结构的方式与HAP复合在一起形成更为致密的复合膜层的。

(3) 体外细胞培养实验证实,利用电化学共沉积方法制备的有机高聚物/羟基磷灰石陶瓷复合膜层及纯羟基磷灰石陶瓷膜层可成为生物活性良好的生物医学材料。

参 考 文 献

- De Groot K, Geesink RGT, Klein CPAT, *et al* Plasma sprayed coatings of hydroxyapatite J Biomed Mater Res, 1987; 21(11) 1375
- Whitedead RY. Structure and integrity of a plasma sprayed hydroxyapatite coating on titanium. J Biomed Mater Res, 1993; 27(12) 1501
- Hayashi K, Inadome T, Tsumum H, *et al* Effect of surface roughness of hydroxyapatite-coated titanium on the bone-implant interface shear strength. Biomaterials, 1994; 15(10) 1187
- Lin CJ, Dong MS, Song P. The effects of electrical field on the formation of calcium phosphates in aqueous solution. J Biomed Eng, 1993; 10(1, 2) 1 [林昌健, 董明松, 宋沛. 电场对水溶液中磷酸钙盐晶体形成的影响. 生物医学工程学杂志, 1993; 10(1, 2) 1]
- Shirkhanzadeh M. Direct Formation of Nanophase hydroxyapatite on cathodically polarized electrodes. J Mater Sci Mater Med, 1998; 9(2) 67
- Zhang JM, Lin CJ, Feng ZD, *et al* Mechanistic studies of electrodeposition for bioceramic coatings of calcium phosphates by an in situ pH microsensor technique. J Electroanalytical Chemistry, 1998; 452-235
- Dandurand J. Study of the mineral-organic linkage in an apatite reinforced bone cement. J Biomed Mater Res, 1990; 24(11) 1373
- Shangkouqiao (Japan). Bioceramics. Beijing: Chemical Industry Press, 1992: 56-56 [山口桥(日). 生物陶瓷. 北京: 化学工业出版社, 1992: 56-56]
- De Groot K. Studies of solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. Biomaterials, 1990; 11(4) 509
- Elliott J C. The problems of the composition and structure of the mineral components of the hard tissue. Clin Orthop, 1973; 93-313
- Wang DZ. Functional Polymer Materials. Beijing: Chinese Materials Press, 1998: 162-181 [王德忠. 功能高分子材料. 北京: 中国物质出版社, 1998: 162-181]
- Wisbey A, Gregson PJ, Peter LM, *et al* Effect of surface treatments on the dissolution of titanium-based implant materials. Biomaterials, 1991; 12(4) 470
- Matsuda T. The in vitro response of osteoblasts cells to bioactive glass. Biomaterials, 1987; 8(2) 275
- Pariente JL, Bordenave L, Bareille R, *et al* Cultured differentiated human urothelial cells in the biomaterials field. Biomaterials, 2000; 21(8) 835
- Matsuzaka K, Walboomers XF, De Ruijter JE, *et al* The effect of poly-L-lactic acid with parallel surface micro groove on osteoblast-like cells in vitro. Biomaterials, 1999; 20(14) 1293

(收稿: 2001-12-24 修回: 2002-04-11)