

钛基表面纳米羟基磷灰石涂层的制备及其生物性能的初步研究

陈菲¹, 林昌健² (1. 广东药学院无机化学教研室, 广东 广州 510006; 2. 厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室 化学系, 福建 厦门 361005)

摘要:目的 制备具有与自然骨类似表面性能的植体材料纳米羟基磷灰石 [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, HAp]涂层/钛基复合材料。方法 电泳沉积法 (EPD)。为改善涂层与基体之间的结合, 对钛表面进行了粗糙化和氧化处理。结果 烧结前后, 涂层成分没有发生变化, 具有纳米结构, 表面均匀无裂缝。体外干细胞培养试验结果表明, 细胞在材料表面和周围生长良好, 繁殖速度比钛和常规尺寸的 HAp 涂层快。结论 纳米涂层具有均匀的纳米结构, 表现出良好的生物相容性, 有望用于设计骨科和齿科材料。

关键词: 羟基磷灰石; 纳米涂层; 电泳沉积; 间充质干细胞; 体外细胞培养

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 1006-8783(2005)06-0652-03

Biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticle coated on titanium surface

CHEN Fei¹, LIN Chang-jian² (1. Department of Inorganic Chemistry, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006 China; 2. State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Objective To get a bone-substitute material by coating hydroxyapatite nanoparticle on titanium surface. **Methods** Titanium surface was roughened and oxidized for improving the bonding strength between hydroxyapatite coating and titanium, then hydroxyapatite nanoparticle were coated on titanium surface by electrophoretic deposition. **Results** The nanostructure and component of the coated hydroxyapatite showed no change before and after heat treatment. The coating was uniform and showed no cracks. Moreover, a preliminary study of the biactivity in vitro showed that mesenchymal stem cells exhibited higher cell proliferation potential on the hydroxyapatite nanoparticle/titanium coating than on the titanium or hydroxyapatite with normal particle size alone. **Conclusions** Hydroxyapatite nanoparticles-coated titanium implant possesses good biocompatibility, suggesting that the implant could be used in orthopaedics and dental surgery.

Key words hydroxyapatite nanoparticles; electrophoretic deposition; mesenchymal stem cells

羟基磷灰石 [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, HAp]纳米晶体是自然骨的主要无机矿物质^[1]。近年来, 在医用金属表面涂覆 HAp 涂层制备复合植入体是合成 HAp 材料研究的热点^[2-3], 它兼有 HAp 的优良生物性能与金属材料的力学性能。电泳沉积 (electrophoretic deposition, EPD) 是近年来用于制备金属基体表面 HAp 涂层的新方法^[4-5]。它条件温和, 设备简单。但为了得到致密的涂层, 并提高涂层与基体的结合力, 通常需要较高的烧结温度 (> 1 000 °C)。

本文在前期制备微米级 HAp 涂层的工作基础上^[6], 以 EPD 法制备钛基表面的纳米 HAp 涂层, 以降低涂层烧结温度及改善涂层与基体的结合。以体外间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 培养法^[7-9]初步评价涂层的生物性能, 并与空白钛板和常规尺寸 (微米级) 的 HAp 涂层进行比较。

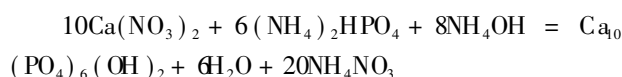
基金项目: 国家自然科学基金 (20273055); 广东药学院科研基金

作者简介: 陈菲 (1976-) 女, 博士, 讲师, 从事纳米复合生物医学材料研究; 通讯作者: 林昌健 (1954-) 男, 教授, 博士生导师, 从事生物医学材料研究。

1 实验

1.1 纳米 HAp 涂层的制备

用于电泳沉积的纳米 HAp 粉末由 Hayek 和 Stadman^[1]提出的沉淀法结合后处理制备, 详细过程可见本作者其他工作的报道^[6]。反应方程式为:



用于比较的 μm 级 HAp 粉末由溶胶-凝胶法制备^[10]。

将纯钛板切割为长形 (10 mm × 20 mm × 1 mm), 以金相砂纸打磨, 露出新鲜表面。

将钛板浸入浓 H₂SO₄ 和质量分数 30% 的 H₂O₂ (1:1 体积比) 的混合液中进行刻蚀, 使钛板表面粗糙化, 然后进行沉积。沉积前, 制备 HAp 粉末在乙酸酐中的悬浮液, 超声分散。以 EPD 法制备两种 HAp 涂层: 纳米涂层 (C) 和微米涂层 (C)。金属环形电极为对电极, 沉积电压为 10 V (直流), 沉积时间为 1 min。根据前期实验确定烧结温度为 800 °C。以 XRD (Rigaku Rotaflex D/mx-C) 和 SEM (S 440) 确定涂层成分和观

察涂层表面形貌。

1.2 体外细胞培养实验

以 4 个月大新西兰白兔的长骨骨髓为骨髓干细胞的来源。利用 Ficoll-Paque Plus 试剂 (Amersham Bioscience, Sweden) 从骨髓中分离干细胞。在离心管中加 5 mL Ficoll 试剂, 小心地把骨髓注入管中, 使其在 Ficoll 的表面铺开而并不与之混合。离心 (1 500 g 18 min) 后, 将上层溶液移走, 转移所要的细胞层 (中层) 到新的离心管中并小心的与 10 mL PBS 溶液混合 (清洗细胞)。再次离心 (1 000 g 10 min), 移走上层液体。重复清洗步骤 1 次。将细胞悬浮在新鲜 DMEM 培养液中, 放入 CO₂ 培养箱 (37 °C, 湿度 95%, CO₂ 体积分数 5%)。传代 5 次后的 MSCs 细胞被用于材料的体外细胞培养实验。

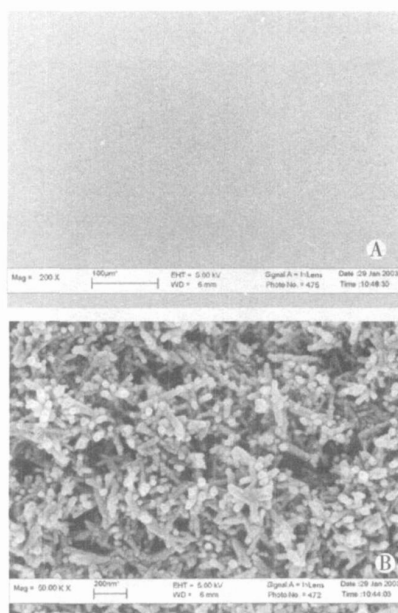
进行体外细胞培养实验的样品有: C、C 和刻蚀后的钛板, 各取 3 份, 经高温高压消毒后放入操作橱中。以胰蛋白酶处理溶液使细胞脱壁, 混合均匀成细胞悬液。以血细胞计数器, 手工进行细胞计数。离心后, 将细胞重新悬浮于新鲜 DMEM 培养液中。将样品放置在 6 个培养井的培养板中 (每井 1 个样品), 每个培养井中加入 5 × 10⁴ 个细胞, 无样品培养井为对照。在 CO₂ 培养箱内培养, 每天以光学显微镜观察细胞生长, 2 和 10 d 后, 进行扫描电镜观察。

以 XTT 试剂测量细胞的增殖情况。培养 4 d 后, 小心转移试样到装有新鲜培养液的培养井中。将 XTT 试剂加入每个培养井中 (最终的 XTT 质量浓度为 0.3 mg/mL), 继续培养 24 h。转移培养液到 96 孔的培养井中, 每个井中 150 μL。每个样品取 3 份平行试样, 用 ELISA Reader (MAX 340) 测量样品的分光光度吸收值。测量的波长为 490 nm, 参比波长为 650 nm。根据吸收值和细胞个数的标准曲线得到材料表面和材料周围的细胞数。

2 结果与讨论

2.1 钛基表面纳米 HA_p涂层的性能研究

纳米 HA_p涂层的表面形貌如图 1 所示。纳米涂层表面均匀无裂缝, 具有纳米结构。XRD 结果 (Fig 2) 表明涂层成分为纯 HA_p (JCPDS File No. 9-432)。纳米粉末具有很高的比表面积和表面能, 因此本工作采用湿化学法制备的纳米 HA_p粉末来降低烧结温度。结果表明, 采用纳米粉末后, 800 °C 下的烧结是可行的, HA_p 无分解, 而且可避免钛基体机械性能的恶化, 烧结温度与常规温度 (> 1 000 °C) 相比有显著降低。



A × 200 B × 5 000

图 1 HA_p纳米涂层的表面形貌

Fig 1 Surface morphology of HAp coatings with nano size

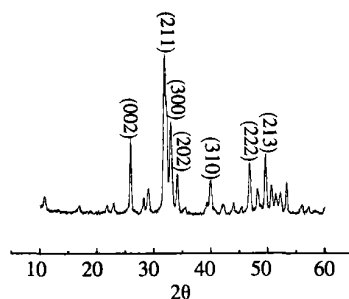


图 2 HA_p纳米涂层的 XRD 谱图

Fig 2 XRD spectra of HAp nano coatings on Ti substrate verified by JCPDS File No. 9-432

从涂层的截面形貌 (图 3) 可以看到涂层本身已烧结致密, 无大气孔, 涂层与基底之间结合很紧密。对于抗压性能较好而抗拉抗剪性能很差的羟基磷灰石来说, 如果对基体表面进行刻蚀处理, 转变为锯齿状凸起的结构, 则可以减少拉应力受力的面积, 增加压应力受力的面积, 从而将作用在基体表面上的剪应力转化为压应力。另一方面 H₂SO₄ 和 H₂O₂ 的氧化使钛表面形成 TiO₂ 薄层, 它具有介于 HA_p 和钛之间的膨胀系数, 可作为过渡层, 减少热应力和裂纹的发生。

2.2 纳米 HA_p涂层的细胞相容性

对培养井中材料周围的细胞的光学显微镜观察表明, 培养 1 d 后, 细胞可在材料周围贴壁生长, 此后每天细胞生长情况良好, 一直保持正常的形态。10 d 后, 各培养井中均无发现脱落的死亡细胞, 细胞仍保持原来的形状 (图 4), 说明培养条件合适, 各材料对细胞都

没有毒性,具生物相容性。

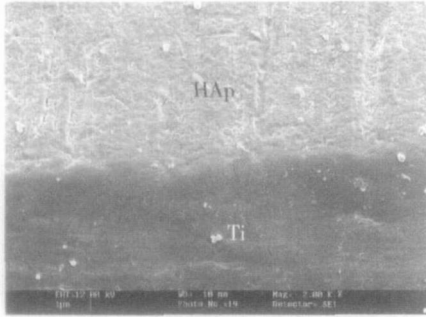


图3 HAp纳米涂层的截面形貌(×2000)
Fig 3 Cross-section morphology of HAp nano coating (×2000)

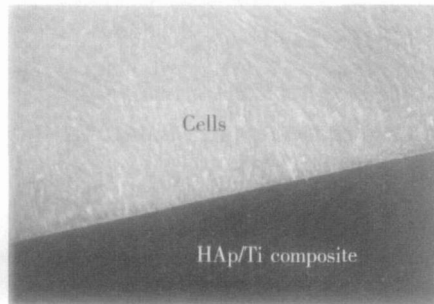


图4 培养10 d后材料周围的细胞(×50)
Fig 4 Cells growing around the materials (×50) after cultured for 10 days

SEM可用于观察细胞在材料表面的吸附,形貌等。以纳米HAp涂层表面的细胞为例,10 d后,细胞大量增殖,基本覆盖了材料表面,形成了细胞层(图5)。

表1列出了在材料表面和周围生长的细胞数量。可以看到,4 d后,与无样品的培养井相比,放有材料的培养井中细胞数量都增多了,细胞增殖了约两个数量级,表明材料对细胞无毒。而且生物材料不仅促进了材料表面的细胞增殖,也促进了材料周围的细胞增殖。在纳米HAp涂层的表面细胞数量最多,增殖速度最快,说明纳米HAp涂层的生物活性最高;而在纯钛表面细胞数量最少,增殖速度最慢,生物活性相对较低。

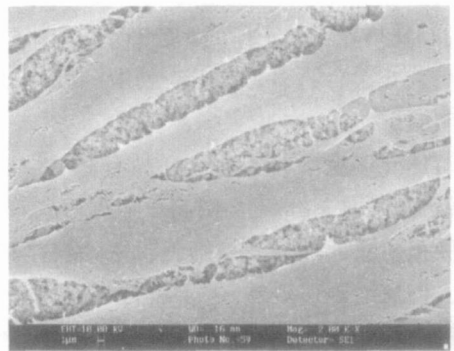


图5 10 d后HAp纳米涂层表面的细胞形貌(×2000)
Fig 5 Cells on HAp nano coating surface after cultured for 10 days

表1 培养4 d后以XTT试剂测量得到的细胞数

Table 1 The proliferation of MSCs after culture for 4 days measured by XTT assay

	原始细胞数	材料周围的细胞数	材料表面的细胞数	细胞总数
对比空白井(无样品)		-	-	1.48×10 ⁶
T板		1.6×10 ⁶	1.65×10 ⁶	3.25×10 ⁶
微米HAp涂层	5×10 ⁴	1.8×10 ⁶	1.8×10 ⁶	3.6×10 ⁶
纳米HAp涂层		2.0×10 ⁶	2.1×10 ⁶	4.1×10 ⁶

自然骨是一种纳米HAp晶体和有机基质组成的复合材料^[11],因此植骨材料的表面性能对细胞的附着起着重要的作用。对这种随着陶瓷颗粒尺寸减少,细胞吸附增强的现象,一种可能的解释是纳米材料具有更大的可与细胞接触的比表面积。而且纳米陶瓷会促进血清蛋白的作用,从而可增强成骨细胞的吸附作用^[12]。本实验的结果也证明了MSCs可以很好的吸附在纳米HAp涂层表面,并在其周围正常生长,增殖速度大于在常规尺寸的HAp涂层表面。另一方面,以湿法制备的HAp粉末在形貌和晶体结构方面都更接近于自然磷灰石。HAp纳米涂层有可能有助于MSCs的骨分化,促进材料和骨组织的融合。因此,随着纳米材料的出现,就有可能设计和合成具有类似自然骨的力学性能、表面形貌、晶体结构及化学成分的骨科与牙科

材料,使得人工生物材料具有优异的生物相容性和生物活性及优良的力学性能。

3 结论

发展了电泳沉积法(EPD)成功地在钛基表面制备纳米羟基磷灰石涂层。

纳米羟基磷灰石EPD沉积涂层显著降低了烧结温度,对钛进行一定的表面氧化和化学刻蚀处理后,改善了涂层与金属间的结合。

骨髓干细胞的体外培养结果表明,电泳沉积法制备的纳米HAp涂层在表面形貌、晶体结构及化学组分上均更接近于自然磷灰石,具有良好的生物性能。

(下转第660页)

机制^[5]。从对 R iger-peppas方程的拟合结果分析以及 m 接近 0.45表明, 该缓释片属于混合控释机制, 且以扩散为主。

表 4 缓释片累积百分释放度数据

Tab 4 The results of the accumulated release test (n= 6)

批号	t/h									
	0.5	1	2	4	6	8	10			
030923	20.13	29.65	39.90	61.58	74.04	84.59	92.16			
030924	18.09	26.99	36.91	58.68	75.36	84.48	90.90			
030925	18.45	27.94	38.12	60.00	70.75	79.13	87.59			
\bar{x}	18.89	28.19	38.31	60.09	73.39	82.73	90.22			
RSD %	5.77	4.79	3.92	2.42	3.23	3.77	2.61			

表 5 拟合方程参数 (y= ax+ b)

Tab 5 The release pattern of sustained-release tablets

释药机制	a	b	r
零级方程	7.49	22.25	0.9776
一级方程	0.22	4.54	0.9969
H iguchi方程	29.82	1.81	0.9975
R iger-peppas方程	0.53	1.44	0.9984

4 讨论

4.1 缓释制剂可按预定设计期间内向人体提供适宜的血药浓度, 并保持此种血药浓度达较长时间, 从而可避免普通制剂频繁给药所出现的“峰”“谷”现象, 减少服用次数并可获得良好的治疗效果, 使药物的安全性、有效性和适应性有所提高, 显示出较普通制剂所无法

相比的优越性。本实验将钩藤总碱制成缓释片, 可减少用药次数和用药量, 方便了患者。通过对钩藤总碱缓释片进行体外累积溶出速率测定得知, 该缓释片体外释放速度适宜, 1 h 释放量为 20% ~ 40%; 4 h 为 50% ~ 70%; 10 h 为 80% ~ 100%。对于其在体内的释药特性尚待进一步研究。

4.2 EC 为颗粒状水不溶性高分子辅料, 不易粉碎, 本实验采用少量乙醇将主药与 EC 溶解加入其他辅料制粒的方法, 颗粒可以很快地干燥, 弥补了溶剂法有机溶剂不易除尽的缺点, 并缩短了生产周期, 工艺简单, 操作简便, 所以很有推广价值。

4.3 EC 为不溶于水的缓释性载体, EC 内部存在孔径极细的错综复杂的孔道, 药物经孔道缓慢向体液扩散释出。其释药速率符合 H iguchi 方程: $Q = kt^{1/2}$ 。

参考文献:

- [1] 朱毅, 黄燮南, 刘国雄. 异钩藤碱对豚鼠心肌特性的影响 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(2): 112
- [2] 杨福楨, 侯鹏, 何光杰, 等. 溶剂法制备固体分散体的工艺研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(增刊): 267.
- [3] 张霖泽, 王兰勤, Nav i HS. 口服控释制剂的质量评价 [J]. 中国药理学杂志, 1995, 30(6): 366
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [Z]. 北京: 化学工业出版社, 2000 附录 77.
- [5] R iger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release . Fickian and anom abous release from swellable devices [J]. J Control Rel 1987, 37: 234
(收稿日期: 2005-06-16; 修回日期: 2005-07-27)

(上接第 654 页)

参考文献:

- [1] Narasana ji TSB, Phebe DE. Review: Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite [J]. J Materials Science, 1996, 31: 1
- [2] Ji H, Marquis PM. Effect of heat treatment on the microstructure of plasma-sprayed hydroxyapatite coating [J]. Biomaterials, 1993, 14: 64
- [3] Jansen JA, Wolke JCG, Waerden van der, et al. Application of magnetron sputtering for producing ceramic coating on implant materials [J]. Clin Oral Implant Res, 1993, (4): 28
- [4] Sridhar TM, Mudali UK, Subbaiyan M. Preparation and characterization of electrophoretically deposited hydroxyapatite coatings on type 316L stainless steel [J]. Corrosion Science, 2003, 45: 237.
- [5] Wei M, Ruys J, Swain MV, et al. Interfacial bond strength of electrophoretically deposited hydroxyapatite coatings on metals [J]. J Mater Sci Mater Med, 1999, 10: 401
- [6] Chen F, Wang ZC, Lin CJ. Preparation and characterization of nano-size hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan

nano-composite for use in biomedical materials [J]. Materials Letters, 2002, 57: 858

- [7] Keller R. Stem cells on the way to restorative medicine [J]. Immunology Letters, 2002, 83: 1
- [8] Wang ML, Nesti LJ, Tuli R, et al. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells [J]. J Orthopaedic Research, 2002, 20: 1175
- [9] Campoccia D, Arciola CR, Cervellati M, et al. In vitro behaviour of bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on fluorohydroxyapatite-coated substrate with different roughness [J]. Biomaterials, 2003, 24: 587.
- [10] Jilavenkatesa A, Condrate SR, RA. Sol-gel processing of hydroxyapatite [J]. J Mater Sci, 1998, 33: 4111.
- [11] Kaplan FS, Hayes WC, Keaven TM, et al. Orthopaedic Basic Science, American Academy of Orthopaedic Surgeons [M]. Columbus OH, 1994: 127.
- [12] Webster TJ, Siegel TW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics [J]. Biomaterials, 1999, 20: 1221.
(收稿日期: 2005-07-01; 修回日期: 2005-10-10)