

钛植入体表面生物化学改性的研究进展

庄燕燕 胡仁 陈菲 时海燕 综述 林昌健[△] 审校

(厦门大学 化学化工学院 固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要 综述近年来钛植入体表面生物化学设计和改性的研究进展,重点介绍植入体表面自组装改性新技术及其在生物医用材料中的应用。

关键词 钛表面 生化设计 表面改性 自组装

Surface Biochemical Modification for the Titanium Implants

Zhuang Yanyan Hu Ren Chen Fei Shi Haiyan Lin Changjian[△]

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

Abstract This paper reviews the progress in biochemical design and modification for the surfaces of titanium implants in recent years, the emphasis being laid on the introduction of the surface molecular construction, self-assembly technique and its application in biomedical materials.

Key words Titanium surface Biochemical design Surface modification Self-assembly

1 引言

骨修复替代材料,由于存在着力学性能的要求,常采用金属材料,如不锈钢、钴基合金等。医用钛及钛合金的出现,引起了医学界的关注,其医用价值得到了世界的公认。临床及实验研究证明钛独具魅力^[1]。钛以其优良的理化特性和生物相容性,越来越受到医学修复界学者的重视。

但钛也并非尽善尽美,主要表现为钛虽然具有足够的强度和韧性,但医用钛的结构和性质与骨组织相差很大,钛是一种惰性材料,通常不能象生物活性材料那样与骨组织发生化学键性的结合,它与骨的结合是一种机械锁合,对机体组织的愈合无明显促进作用,愈合时间较长。为了进一步提高材料和骨组织结合的质量和强度,加强骨结合的长期稳定性,新的植入材料应当具备良好的骨诱导性,能够主动地与机体组织结合,缩短愈合时间,提高结合强度。利用表面改性技术不仅可提高金属表面的稳定性和耐磨性,通过表面生物医学设计,还可赋予其生物活性,可以使新骨直接沉积于金属表面,而无纤维缔结组织的中间隔层。

目前对于医用钛表面改性的综述性文章主要侧重于物理化学方法或形态学方面^[2,3]改性的介绍,对于表面改性的新方法——生化法介绍甚少,本文对

该领域近年来国内外研究进展进行综述。

2 钛的表面生物化学设计和改性

植入材料与机体组织的相互作用是在界面之间进行的。材料表面理化特性直接影响到植入体的生物相容性和生物活性。控制生物材料表面特性对于改善和促进材料表面与生物体之间的有利相互作用至关重要。研究表明:材料表面成分、结构、形态、表面能、亲/疏水性以及电荷等表面化学特性都会影响材料与生物体之间的相互作用,采用不同的表面处理手段,从微观的角度改变材料表面的理化特性,已逐渐受到人们的重视,并取得显著进展。目前,生物材料表面已成为生物材料学科最活跃、最引人注目和发展最迅速的领域之一。

2.1 表面生物惰性化改性

表面生物惰性化指使材料表面与生物物种不发生任何作用和粘连,即所谓非污染(non-fouling)材料,防止蛋白质的吸附。钛表面涂覆聚乙二醇低聚物(Poly-ethylene glycol, PEG)是防止蛋白质吸附的有效途径。这是因为低聚物的空间排斥,可阻碍蛋白质接近材料表面。实验表明,在材料表面构筑PEG封端的烷基分子层也能防止蛋白质的吸附,此低聚物的螺旋构象能吸附多层水分子,而吸附的水层阻

碍蛋白质的吸附^[4]。这个过程必需先形成 PEG 吸附层的前驱体 PEG-OSiCl₃ 以 1% 的 NEt₃ 为催化剂, 用过量的 PEG 和 SiCl₄ 反应生成以 PEG-OSiCl₃ 为主的反应产物, 经过滤后可直接使用。PEG 末端含有 OH-可再吸附第二层 PEG, 总的 PEG 吸附层厚度可由反应时间来控制。此外, 还可以在材料表面上固定两性分子或类似于表面活性剂的分子^[5,6], 或用聚吡丙啶 (Poly-ethyleneimine, PEI) 代替 PEG^[7]。

2.2 表面生物活化改性

为了赋予金属材料以生物活性, 已经研究开发了多种进行表面活化处理的工艺技术, 主要包括: (1) 在钛材料表面涂覆 HA 或其它磷酸钙盐涂层; (2) 对钛进行特有的活化处理, 如钛表面制备活性二氧化钛层。这些处理方法都属于物理化学法, 其立足点是通过改善金属基体表面特性, 以提高材料的生物相容性和对活体细胞的生长诱导性, 故仍属于比较间接的表面改性方法。而生物化学技术却是将大分子蛋白质、酶或生长因子等有机生物分子引入基体表面, 使其具有更优良的生物活性, 因而具有更直接、更有效的特点。材料植入体内后, 材料表面吸附不同蛋白而随机混合组成蛋白层, 为黏附受体反应提供了许多不同的活性位, 造成细胞的许多受体反应同时被激活, 因而反应表现为无特异性, 随机性很大。金属生物材料表面改性的生物化学方法是近年发展起来的一种新技术, 利用细胞学和分子生物学方法将蛋白质、细胞生长因子、酶及多肽等有生物活性的物质固定在材料的表面上, 通过表面修饰构建新一代的分子生物材料, 引发所需的特异生物反应, 抑制非特异反应。目前, 这种技术虽仍处于实验室研究阶段, 但已引起国内外许多研究小组的兴趣和研究, 其目标是通过材料表面进行修饰, 能控制与材料表面作用的细胞种类、数量, 以及控制材料与骨整合前期细胞生物信息^[8]。

为了使生物活性更良好, 并选择合适的合成路线, 必须考虑以下几点:

(1) 材料的活性点不能和生物分子的功能团或活性点反应;

(2) 生物活性物种和基体表面的距离必须足够大以让生物分子有足够的空间移动和自我调整, 以保持其生物活性, 这样的距离可通过烷烃链或乙烯乙二醇链间隔开;

(3) 吸附的生物分子不能是变性的或者非活性的, 而且在链接过程中必须是很稳定的, 在生理环境中不能水解或是跟其它物种反应;

(4) 固定的生物分子和细胞受体之间有效的反应要求表面必须有适当数量的活性物种, 目前主要有以下几种常用生化表面改性方法。

2.2.1 光化学修饰

光化学修饰的目的是在钛表面上接枝生物分子, 主要有两种方式。(1) 合成既含有生物活性的物种又含有光活性的基团的共轭化合物。当这个分子吸附到固体表面后, 利用光或热激活光敏性基团, 使其发生非特异性反应。理想的情况是被激活的光敏基团只和基团表面反应并形成均匀的单分子层。然而, 事实上它还能和共轭分子发生其它键合反应, 导致生物活性的降低。有许多研究小组正致力于这方面的研究^[9]。(2) 先使光敏性基团通过共价键结合到钛表面, 然后再吸附上生物分子, 最后用光或热激活光敏基团引发非特异性反应。由于它的无选择性的生物分子偶合使得生物活性受损, 这种方法有待进一步深入研究^[10]。

2.2.2 电化学修饰

电化学技术已被用于钛表面的修饰以模拟生理界面。Worch 等^[11]已报道经过阳极氧化后的钛可以预先吸附 I 型胶原, 而且结合紧密, 再用阴极极化在表面上沉积钙磷盐, 其结果是表面成分含有天然骨的主要组成物质——I 型胶原和钙磷盐, 使得植入体从体内呈现出天然骨结构、成分类似的表面。

2.2.3 基于自组装单分子层的化学修饰

自组装单分子层 (Self-assembled mono-layers, SAMs) 是最近十几年发展的一种材料表面生化改性新技术。自组装成膜技术的基本原理是通过固-液界面间的化学反应或化学吸附: 将含有某种表面物质的基片浸入到表面活性剂的有机溶液中, 活性剂分子一端的反应基(头基) X 与基片表面物质发生自动、连续的化学反应, 在基片表面形成化学键链接的、紧密的二维有序自组装单分子(SAM)膜, 层内分子间作用力仍为范德华力和静电力, 分子自组装是分子在均衡条件下通过非共价键作用, 分子自发地缔结成稳定的、结构上确定的聚集体。在一定条件下通过分子的自组装, 自发产生复杂有序且具有特定功能的聚集体(超分子 super-molecule)组织的过程称为分子自组织(molecular self-organization)。分子自组织和分子自组织在生物体系中是普遍存在的, 并且是形成千姿百态、结构复杂的生命体的基础。

SAM 从分子和原子水平上提供了对结构与性能之间的关系及各种界面现象深入理解的途径。方便灵活的分子设计使其成为研究、认识有序性生长、润湿性、粘着、润滑、腐蚀等现象的极佳体系; SAM

的空间有序性,可使其作为二维乃至三维领域内研究物理化学和统计物理学的很好模型;由于其堆积紧密和结构稳定,因而具有防止腐蚀、减小摩擦及降低磨损的作用。

目前 SAM 技术在生物材料中的应用研究主要是以硫化物在 Au 表面上进行 SAM 的,大体包括两个主要方面:一是利用生物分子本身的-SH 基或将生物分子连在以-SH 基作头基的烷基链上,在 Au 表面上形成膜表面为生物分子官能团的单层膜作为仿生膜来研究生物分子(如抗体,受体)的生物活性。此外在云母、玻璃以及单晶硅作为基体的研究也较多。近几年,国内外学者也逐渐开展了钛及其合金表面自组装单分子层的研究^[12-15]。

自组装要求基体表面是活性的,即表面必须羟基化,而钛为一种活泼金属,暴露于大气中,在其表面很快就形成一层很薄的氧化膜。然而,在大气中自然形成的氧化膜结构较松散,厚度过薄,适当增加氧化膜厚度,使其在一定条件下能与[H]或H⁺作用,形成附于基体表面的-OH 羟基。如美国科学家 Baran 等^[12]在钛自组装 OETS 之前,先把钛浸入到体积比为 1:1 的浓硫酸与 30% H₂O₂ 的混合液,以得到富含羟基的钛活性表面。

SAM 中可引入不同的末端基团或进一步通过化学反应进行官能团的转化获得不同物理化学性能的膜表面,然后再固定上生物分子,这对研究功能表面工程具有重要意义。其中,自组装主要有以下 3 种方式:

(1) TiO₂ 的硅烷化^[16-18]:硅烷化学已被广泛应用于钛的表面处理,如金属-金属-聚合物的粘连,半导体 TiO₂ 作为电极的修饰^[16],酶的固定^[17]以及印迹模板技术^[18]。氯硅烷和硅氧烷的自组装膜是最常见的两种体系。目前研究比较多是在硅、金等表面超平整的基体表面上进行,通过适当的优化,改变参数可实现钛表面的生物分子接枝。

(2) 磷酸化:氯硅烷由于不可控的聚合反应容易形成多分子层,而且氯硅烷受溶剂、温度等影响很大,以至于很难制备单分子自组装层,另外,硫醇又只局限于在金或银上自组装,而磷酸盐长链烷烃则可以在金属表面上形成非常规整、有序的单分子自组装层,避免任何难控制的聚合反应,类似于硫醇在金或银上的自组装层。Chen 等^[19]先在载玻片上镀一层纳米 TiO₂,再自组装磷酸盐长链烷烃。

(3) 等离子聚合接枝修饰: Puleo 等^[20]采用等离子聚合法通过一步法和两步法分别在 Ti-6Al-4V

接枝 NH₂,并在氨基化的表面固定溶解酵素(lysozyme)和骨形成蛋白(BMP-4),固定的生物分子仍具有高的生物活性。自组装分子单层以特定的方式实现钛表面功能化,已在很多方面取得显著的效果。表现在(1)提高钛的骨传导性^[21]:Valentini 等在清洁的钛表面镀上一层厚度为 100 纯钛,再镀上约 500 纯金,并在表面固定多肽 Arg-Gly-Asp-Cys (RGDC),体内试验表明,这种方法能明显促进新骨的生成,大大提高钛的骨传导性。(2)材料与细胞界面关系^[22]:理解细胞-表面相互作用对于开发提高或抑制细胞-基底相互作用的生物材料十分重要。通过合成可控制 SAM 的组成和性能,且在单分子层上很容易形成功能基团图样,使得这种表面成为蛋白质吸附细胞黏附机理研究的最好表面^[23]。医用钛通过表面修饰可促使细胞黏附,即材料表面吸附一层蛋白,然后细胞在其上黏附、迁移和生长,如将胶原固定在表面,或将短序列的氨基酸、多糖和糖酯固定在钛表面,均能改变材料的表面性能。某些短肽在细胞表面与受体相联,也能提高细胞的黏附功能。美国学者用不同的自组装单层(SAM)材料考察在组织培养的蛋白质环境中其对成纤维细胞的行为的影响。结果表明细胞在端羧基亲水表面较端甲基疏水表面易于黏附、生长和铺展。大多数非亲水性表面由于黏附蛋白(如粘连蛋白、胶原和玻璃体结合蛋白)的优先吸附而支持细胞生长。而非离子亲水性表面(如纤维素和聚乙烯醇)很少吸附蛋白质,为非黏附表面。因此在二维或三维表面构建亲水和非亲水微区域,就可以控制蛋白质在表面的黏附,进而控制细胞的黏附和生长^[24]。(3)材料表面润湿性:当生物材料植入人体以后首先是与血液、组织液相接触,再与机体组织细胞相接触。若要获得良好的材料与细胞界面关系,要求生物医学材料表面具有极好的润湿性。润湿性愈好,亲水性愈高,分子接触机会愈多,血液和体液细胞在材料表面的附着愈紧密愈均匀,其界面结合性能愈佳。(4)表面诱导矿化:表面诱导矿化是模拟生物体内含阴离子的大分子促进无机矿物相的成核过程。在钛和钛合金表面制得 SAM 膜,并把端基功能化(磺化、羟基化、磷化、氯化等),再进行诱导钙磷成核^[12]。根据各种磷酸钙相的溶解等温线,选择过饱和溶液的 Ca/P 比值和 pH 值,可沉积不同的磷酸钙晶粒(HA, OCP 等),膜厚达 10~15 μm。

由于生物分子种类繁多,将其固定在基体上所用的引导物质也各自不同,同时不同的生物分子对

不同的金属反应性也不一致。利用生物分子的多样性, 充分理解金属基体与生物分子之间的相互作用, 寻找适当的键合方法, 有助于设计、制造有特殊针对性功能的金属生物材料, 这些材料可促进植入处伤口的愈合, 加速植入体与周围组织的溶和, 同时也可以提高植入体的安全使用寿命, 提高基体表面与固定的生物分子的结合强度显得十分重要。

3 展 望

钛植入体经表面分子设计使表面结构具有有序性、特定分子间的可识别性和运动性。从表面生物化学设计和改性技术提出至今, 经过科学家的不懈努力, 相关的研究已取得了一系列重要进展, 自组装技术在表面生物化学的设计和改性应用中起举足轻重的作用, 发展分子生物材料是本世纪生物材料研究的重要方向之一。

参 考 文 献

- Li DH, Liu BL. The microstruction of medical-use titanium surface. Overseas Medicine-Biomedicine Engineering Fascicule, 1997; 20(1) 24 [李德华, 刘宝林. 医用钛表面的微观改造. 国外医学生物医学工程分册, 1997; 20(1) 24]
- Li B, Deng L, Wu DY, *et al.* Effect of the microstructure of pure titanium material surface on the growth and attachment of osteocyte. China Dental Implant Science Magazine, 1999; 4(3) 99 [李兵, 邓力, 吴大怡等. 纯钛金属表面显微形态对骨细胞生长的影响. 中国口腔种植学杂志, 1999; 4(3) 99]
- Lu YP, Zhu RF, Ma QS, *et al.* Current evolution of biomedical titanium and tts alloy implant materials. China Dental Implant Science Magazine, 2000; 5(1) 43 [吕宇鹏, 朱瑞富, 马泉生等. 医用钛及钛合金种植体材料的研究进展. 中国口腔种植学杂志, 2000; 5(1) 43]
- Claesson P. Poly(ethylene oxide) surface coatings relationships between intermolecular forces, layer structure and protein repellency. Colloids Surf A, 1993, 77 109
- Amiji M. Park. Analysis on the surface adsorption of PEO/PPO/PEO triblock copolymers by radiolabeling and fluorescence techniques. J Appl Polym Sci, 1994, 52 539
- Freij-Larsson C, Nylander T, Jannasch P, *et al.* Adsorption behavior of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces: effects on protein adsorption. Biomaterials, 1996; 17 2199
- Huang N, Michel R, Voros J, *et al.* Spen-cer ND Poly(L-lysine) γ poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Surface analytical characterization and resistance to serum and fibrinogen ad-sorption. Langmuir, 2001; 17(2) 489
- Zeng SY, Zhao NQ, Cui ZZ, *et al.* Progressin surface modification of metallic biomaterials. Journal of Materials Protection, 2000; 33(1) 5 [曾晟宇, 赵乃勤, 崔振铎等. 金属生物材料表面改性研究的进展. 材料保护, 2000; 33(1) 5]
- Hypolite CL, McLernon TL, Adams DN, *et al.* Formation of

- microscale gradients of protein using heterobifunctional photolinkers. Bioconjugate Chem, 1997; 8(5) 658
- Erdtmann M, Keller R, Baumann H. Photochemical immobilization of heparin, dermatan sulphate, dextran sulphate and endothelial cell surface heparin sulphate onto cellulose membrane for the preparation of a thrombogenic and antithrombogenic polymers. Biomaterials, 1994; 15 1043
- Worch H, Scharnweber D. Biologiserte Titanwerkstoffe. Z. Metallkd, 1998; 89(2) 153
- Qing Liu, Jinag Ding, Francis K, *et al.* The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique, Biomaterials, 2002; 23 3103
- Shin K, Kim CS. Application of EQCN for quantitative analysis of alkanethiol adsorbed on modified Ti surfaces; Materials Science & Engineering C-Biometric and Supramolecular Systems, MAR 3, 2003, 23(3) 407
- Chen HG, Wu XD, Yu QQ, *et al.* Self-assembled monolayers of n-hexadecanoic acid and alcohdyroxyl n-hexadecanoic acid on titanium surfaces. Chinese Journal of Chemistry, DEC 2002; 20(12) 146
- Jeffrey Schwartz, *et al.* Cell attachment and spreading on metal implant materials. Materials Science and Engineering C, 2003; 23 395
- Finklea HO, Murry RW. Chemically modified electrodes: Effects of silanization on titanium dioxide electrodes. J PhysChem, 1979; 83 353
- Kevin C, Olbrüch, Thomas T, *et al.* Surfaces modified with covalently immobilized adhesive peptides affect fibroblast population motility. Biomaterials, 1996; 17(8) 759
- Plueddemann EP, Leyden DE (1991) Silane Coupling Agents. Plenum Press, New York
- Yunxia Chen, Weimin Liu, Chengfeng Ye, *et al.* Preparation and characterization of self-assembled alkanephosphate monolayers on glass substrate coated with nano-TiO₂ thin film. Materials Research Bulletin, 2001; 36 2605
- Puleoa DA, Kisslinga RA, Sheub MS. A technique to immobilize bioactive proteins including bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on titanium alloy. Biomaterials, 2002; 23 2079
- Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, *et al.* RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. Biomaterials, 1999; 20 2323
- Helmy R, Fadeev AY. Self-assembled monolayers supported on TiO₂: Comparison of C₁₈H₃₇SiX₃ (X= H, Cl, OCH₃C₁₈H₃₇Si(CH₃)₂Cl, and C₁₈H₃₇PO(OH)₂). Langmuir NOV 12, 2002; 18(23) 8924
- Milan Mrksich, George M. Whitesides. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man made surfaces with proteins and cells. Annu. Rev Biophys Biomol Struct, 1996; (25) 55
- Bernhard O. Palsson, Jeffrey A. Hubbell. Tissue engineering. In The Biomedical Engineering Handbook. C R Cpress. Jose phD. Bronzino, Ph. D. P. E. 1995; 1583

(收稿: 2003-05-16 修回: 2003-11-14)