

La 对纯钛微弧氧化膜层的组织结构及细胞相容性的影响

赵 萱¹, 蔡启舟¹, 何 剑¹, 顾雪楠², 郑玉峰²

(1. 华中科技大学 材料成形与模具技术国家重点实验室, 武汉 430074;
2. 北京大学 工学院, 北京 100871)

摘 要: 在乙酸钙-磷酸二氢钙电解液中添加硝酸镧, 对纯钛进行微弧氧化处理, 利用 XRD、SEM 和 EDX 分别研究了 La 元素对膜层形貌、成分、物相的影响及作用机制, 并利用细胞接种方法研究膜层的生物活性。结果表明: 电解液中添加 La 降低膜层厚度, 增加膜层孔洞尺寸, 抑制锐钛矿向金红石型转变, 并在微弧氧化过程中具有促进羟基磷灰石 HA 形成的能力。煅烧处理使膜层中的非晶 HA 晶化, 形成片状和鳞状的 HA 晶体; 膜层经煅烧后形成的 HA/TiO₂ 复合膜具有良好的细胞相容性。

关键词: La; 纯钛; 微弧氧化; 羟基磷灰石; 细胞相容

中图分类号: TB31 文献标志码: A

Effects of La on microstructures and biocompatibility of pure Ti micro-arc oxidation coatings

ZHAO Xuan¹, CAI Qi-zhou¹, HE Jian¹, GU Xue-nan², ZHENG Yu-feng²

(1. State Key Laboratory of Material Processing and Die and Mould Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;
2. College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Ca(CH₃COO)₂·H₂O-Ca(H₂PO₄)·H₂O electrolyte system with La(NO₃)₃·6H₂O was used to carry out micro-arc oxidation treatment on pure titanium. By means of XRD, SEM and EDX, the effects of La on morphologies, phases and compositions of coatings gained from the electrolyte were investigated. The cell culture method was used to study the cyto-compatibility of the coating. The results show that the coatings formed in electrolyte with La are thinner and have larger pores than those formed in electrolyte without La. Addition of La can inhibit the transition from anatase to rutile and has stronger capability of inducing HA. After being sintered, the amorphous hydroxyapatite (HA) in coatings is crystallized into flake or scaly. The new coatings after being sintered with HA/TiO₂ are proved to have good biocompatibility.

Key words: La; pure titanium; micro-arc oxidation; hydroxyapatite; cyto-compatibility

羟基磷灰石(Hydroxyapatite, 简称 HA, 化学式为 Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)是一种生物陶瓷, 与人体硬组织成分的晶体结构相同, 且具有良好的生物相容性^[1]。但从生物力学的角度看, HA 属于脆性材料, 难以单独作为硬骨替代材料。而以不锈钢等为代表的医用金属材料具有良好的机械性能, 但金属材料的生物相容性差, 在人体环境中会向肌体释放有害的金属离子, 植入时

间久会产生腐蚀等一系列问题。结合以上两种材料各自在硬骨替代品上的优劣, 现在研究人员大多采用在 HA 涂层/金属优化的思路进行硬骨替代品的研究^[2]。

钛及钛合金的密度与人骨密度接近, 相对其他金属材料具有较好的生物相容性、力学性能和耐腐蚀性, 并且对大多数消毒方式都能适应, 是一种理想的医用材料。

近年来, 关于如何在钛及钛合金基体上制备 HA 的报道有很多。目前, 主要的方法有等离子喷涂^[3]、溶胶凝胶^[4]、电化学沉积^[5]、微弧氧化^[6]等。其中微弧氧化方法(Micro-arc oxidation, 简称 MAO)是一种在金属表面原位生长陶瓷层的表面处理工艺^[6], 可以通过调节电解液成分控制 Ca 和 P 元素的比例, 相比其他工艺具有独特的优势, 如工作温度低、工艺过程简单、可处理复杂形状的金属表面等。目前, 要制得 HA 大都要在微弧氧化后进行碱热处理和模拟体液浸泡的后续处理^[7], 但模拟体液浸泡往往要一到两周的时间, 明显不利于实际应用, 因此如何缩短获得高结晶度 HA 的工艺流程应该是一个值得探索的方向。以往对于 HA 粉末的研究结果表明, 镧掺杂具有抑制牙齿脱矿的作用, 且对成骨细胞无毒性反应^[8-9], 适量摄入有利于提高机体的免疫力, 同时, 它也是有效的抑癌物质^[10]。黄勇等^[11]报道在乙酸钙、β-甘油磷酸钙与硝酸镧电解液中, 采用微弧氧化方法在纯钛表面制得了含有 HA 的涂层。而 La 在其他电解液体系中对微弧氧化膜形成的影响鲜见报道, 且 La 元素对膜层生长、组成及结构的影响也有待深入分析。

为此, 本文作者在乙酸钙-磷酸二氢钙的电解液

体系中添加硝酸镧, 利用微弧氧化法在纯钛表面制备 HA/TiO₂ 膜层, 分析膜层的结构与组成及其细胞相容性, 并探讨 La 促进 HA 形成的作用机理。

1 实验

1.1 实验材料

将尺寸为 30 mm×20 mm×1 mm 的纯钛片依次经 600#、1200#、2000#水砂纸打磨后, 用丙酮和去离子水清洗, 吹干后用于微弧氧化处理。按照表 1 所列组分配制电解液。

1.2 实验装置及参数

采用 μArc-II 型双极性脉冲微弧氧化装置对纯钛试样进行处理(MAO 装置图见图 1), 试验电源为双向脉冲方波, 正压设为 300 V, 负压为 30 V, 占空比和频率分别恒定在 0.2 和 600 Hz, 处理时间为 15 min, 溶液温度控制在 25~40 °C。经 A 组电解液处理得到的试样组标记为 MAO-A, 经 B 组处理得到的试样组标记为 MAO-B。

表 1 微弧氧化电解液成分

Table 1 Chemical compositions of micro-arc oxidation electrolyte

Group	Concentration/(mol·L ⁻¹)				
	Ca(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	NaOH	EDTA-2Na	La(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O
A	0.036	0.052	0.375	0.045	
B	0.036	0.052	0.375	0.045	0.001

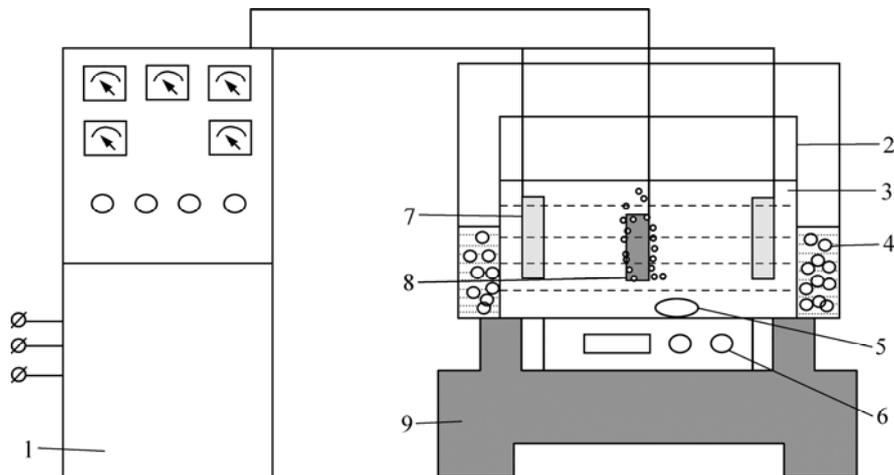


图 1 MAO 装置示意图

Fig.1 Schematic diagram of MAO system: 1—Pulse power source; 2—Electrolysis bath; 3—Electrolyte; 4—Cooling pool; 5—Magnetic rotator; 6—Magnetic stirring apparatus; 7—Stainless steel; 8—Pure titanium sample; 9—Supporting table

1.3 样品的性能及表征

采用荷兰帕纳科公司生产的X'Pert PRO型X射线衍射仪(Cu靶, K_{α} 射线, 40 kV, 40 mA, 衍射角 2θ 为 $20^{\circ}\sim 80^{\circ}$)分析膜层的相组成, 利用 Scherrer 公式 $D=k\lambda/(\beta\cos\theta)$ 求得晶粒大小。式中, k 为常数, 0.89; λ 为 X 射线波长, $\lambda=0.154\ 06\ \text{nm}$; θ 为布拉格衍射角; β 是半峰高处的宽度。用荷兰FEI公司生产的Quanta 200环境扫描(ESEM)观察膜层表面形貌及截面形貌, 对膜层进行预喷碳处理, 并利用 ESEM 附带的 EDAX 分析膜层组成中的元素。

1.4 样品的生物相容性

将制备好的微弧氧化试样, 经丙酮、乙醇、去离子水超声各 10 min, 然后紫外消毒 2 h, 放置于 24 孔

培养板内, 将 L-929 小鼠成纤维细胞以 $100\ 000/\text{mL}$ 的密度接种到样品表面。在 CO_2 体积分数为 5%、饱和湿度(相对湿度)为 100%、 $37\ ^{\circ}\text{C}$ 环境下分别培养 1、3、5 d 后终止培养, 取出样后 PBS 冲洗 3 遍, 依次用 2.5% 的戊二醛固定 2 h, 乙醇梯度脱水, 真空干燥, 喷金后在扫描电镜下观察。

2 结果与分析

2.1 膜层的形貌分析

经微弧氧化后 A 组与 B 组的表面及截面形貌如图 2 所示。从图 2(a1)和(b1)易知, 经过微弧氧化后, 两组纯钛表面均呈粗糙多孔状, MAO-B 较之 MAO-A

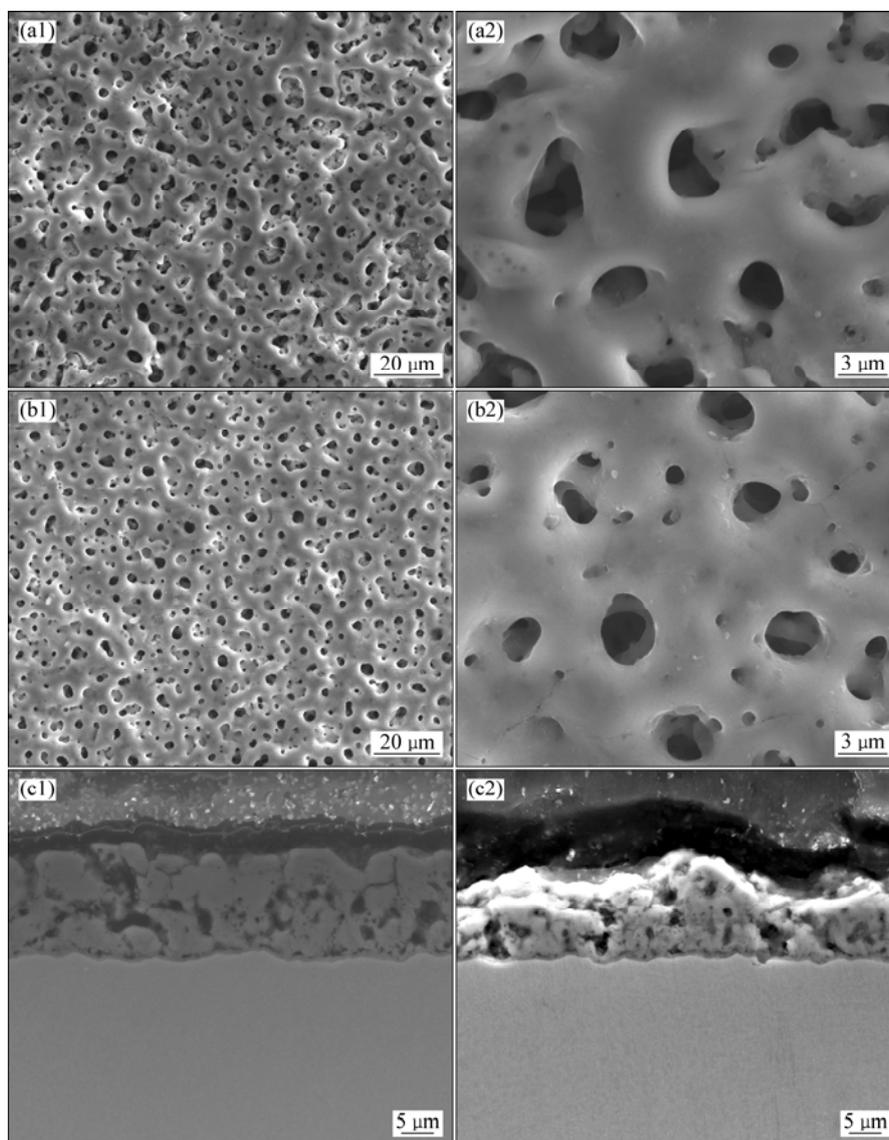


图 2 由 A、B 两组电解液制得的 MAO 膜表面及截面形貌

Fig.2 Surface morphologies ((a1), (a2), (b1), (b2)) and cross sectional morphologies ((c1), (c2)) of MAO coatings gained from electrolytes A and B: (a1), (a2), (c1) MAO-A; (b1), (b2), (c2) MAO-B

的孔洞更加均匀、圆整, 孔径更小(1~3 μm)。同时, 对比图 2(a2)和(b2), MAO-B 表面出现的微裂纹比 MAO-A 多。

对比图 2(c1)与(c2)可以看出, 两种膜层均与基体纯钛发生啮齿状冶金结合, 膜层均由致密层和疏松层组成。MAO-B 的致密层与疏松层之间的孔隙较 MAO-A 膜层的更为细小, 即结合得更加紧密。同时, MAO-B 膜层外表面比 MAO-A 膜层外表面更为更粗糙。文献[12]表明, 细胞生长具有亲粗糙性。纯钛表面经过微弧氧化后所出现的这种粗糙的火山状多孔结构以及凹凸不平的表面有利于细胞的粘附生长。MAO-B 膜层比 MAO-A 膜层薄, 这与文献[11]报道的膜厚随电解液中 La 含量增加而减小的结果一致。

2.2 膜层表面的元素组成

图 3 所示为采用电解液 A、B 制得微弧氧化膜层的能谱结果。表 2 所列 MAO-A 和 MAO-B 两种膜层中的元素组成及其含量。MAO-A 的 $n(\text{Ca})/n(\text{P})$ 为 1.95, 而 MAO-B 的 $n(\text{Ca})/n(\text{P})$ 为 2.32, 二者均大于纯 HA 的 $n(\text{Ca})/n(\text{P})$ 。在 MAO-B 表面未检测到 La 元素的存在, 这可能是膜层中 La 元素含量过低造成的。对比两组数据发现, La 元素在一定程度上抑制了 Ca 和 P 进入膜层, 且对 P 元素的阻碍作用更大。

表 2 MAO-A 和 MAO-B 表面成分及其含量

Table 2 Chemical composition and contents of MAO-A and MAO-B surfaces

Sample	Mole fraction/%				
	O	Na	P	Ca	Ti
MAO-A	35.87	1.93	5.95	11.61	21.56
MAO-B	33.51	2.13	4.30	9.97	23.29

2.3 膜层表面的物相组成

MAO-A 和 MAO-B 的 X 射线衍射分析(XRD)分别如图 4 和 5 所示。由图 4 可以看出, MAO-A 膜层主要由 Ti 以及锐钛矿(Anatase)和金红石(Rutile)型 TiO_2 组成, 没有 Ca 和 P 元素组成的物相, 其中的 Ti 的衍射峰为纯钛基体的衍射峰。与之相对的图 5 显示 MAO-B 膜层中主要的锐钛矿和金红石组成, 未检测到 Ti 的基体峰, 这是由于 MAO-A 形成较多的通孔, X 射线可以探到基体, 而 MAO-B 中形成的孔洞中的通孔很少, 只有少量 X 射线能探到基体造成的。

2.4 膜层 MAO-B 煅烧后的物相及形貌

图 5 中 2θ 处于 $25^\circ\sim 35^\circ$ 出现了一个非晶包, 为验证非晶组成, 对 MAO-B 在 800°C 进行 2 h 的煅烧处理^[13], 将所得试样组标记为 MAO-B-H, 其 XRD 和

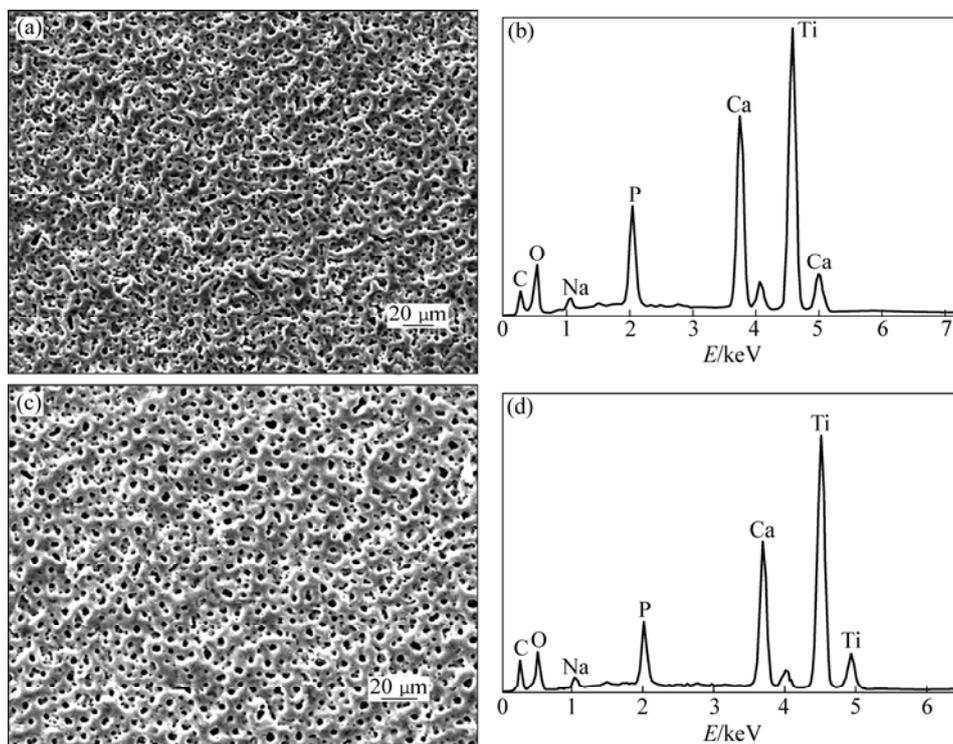


图 3 由 A、B 两组电解液制得的 MAO 膜表面形貌及相应的 EDX 谱

Fig.3 Morphologies and corresponding EDX spectra of MAO coatings gained from electrolytes A and B: (a), (b) MAO-A; (c), (d) MAO-B

SEM 结果分别如图 6 和 7 所示。

从图 6 可看出, MAO-B-H 膜层中出现了结晶度完好的 HA 和磷酸钙, 从而证实 MAO-B 中含有非晶态的 HA 和磷酸钙。根据 Scherrer 公式计算, MAO-B-H

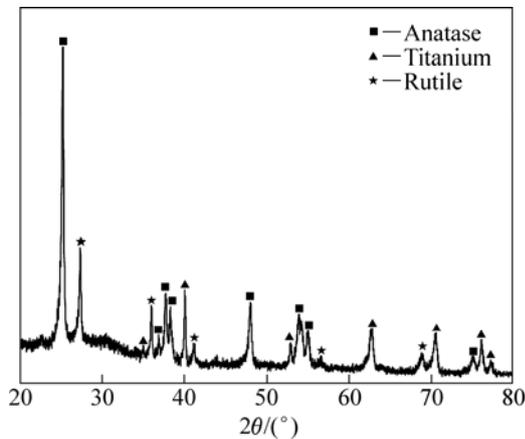


图 4 MAO-A 的 XRD 谱

Fig.4 XRD pattern of MAO-A

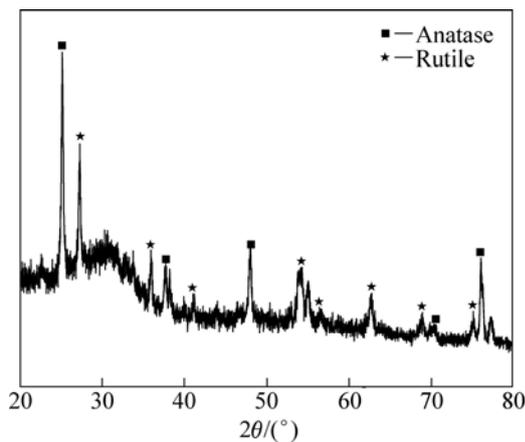


图 5 MAO-B 的 XRD 谱

Fig.5 XRD pattern of MAO-B

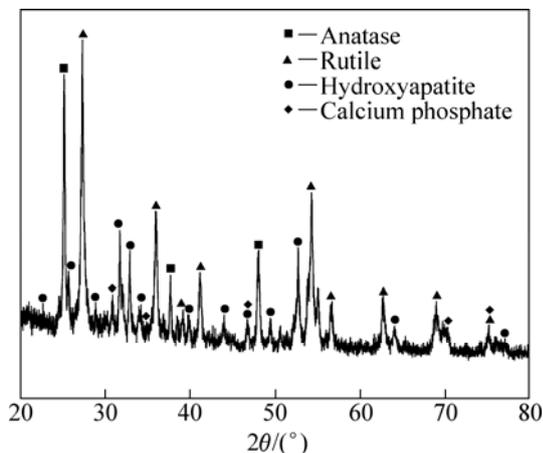


图 6 MAO-B-H 的 XRD 谱

Fig.6 XRD pattern of MAO-B-H

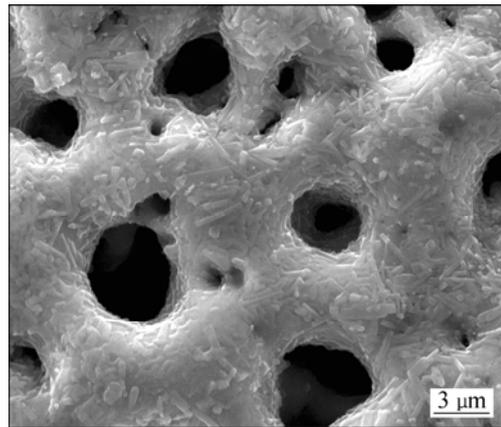


图 7 MAO-B-H 的表面形貌

Fig.7 Surface morphology of MAO-B-H

膜层中 HA 的平均粒晶尺寸为 48.8 nm。

由图 7 可以看出, 煅烧后膜层的孔径变大, 大约为 2~5 μm, 微弧氧化后, 原本比较光滑的氧化膜表面生长出棒状的晶体。这样, 更粗糙的表面形貌更有利于细胞的粘附生长。

对比图 5 和 6 可以清晰地看出, 膜层存在锐钛矿减少、金红石增多的现象。这是由于本实验采用的热处理温度处于锐钛矿与金红石之间的转变温度区间 (400~1 200 °C)^[14], 因而发生锐钛矿向金红石的转变。热处理之后, 在膜层表面检测到了新的相——磷酸钙, 表明 Ca 和 P 元素经过微弧氧化后已进入了膜层, 并以非晶相的形式存在于膜层中。

2.5 体外细胞培养实验

将成纤维细胞 L-929 接种于 MAO-B-H 微弧氧化膜上进行细胞培养试验。图 8 所示为成纤维细胞在薄膜上培养 1、3、5 d 后的电镜照片。由图 8 可知, 在 MAO-B-H 薄膜上, 未见细胞死亡, 可见, 材料无明显细胞毒性。接种 1 d 后, 细胞附壁生长趋势良好; 3 d 后, 细胞数明显增多, 部分细胞伪足已经伸入到微弧氧化孔洞之中, 并沿着孔洞外壁生长, 细胞与材料结合紧密; 5 d 后, 细胞几乎长满 MAO-B-H 表面, 且无细胞畸变。对比细胞培养 1、3、5 d 后的电镜结果, 可以得出结论: 本研究所制备的含 La 羟基磷灰石生物活性图层的细胞生物相容性良好, 有利于促进骨损伤部位的早期愈合。

3 讨论

从图 5 和 6 的结果可知, 电解液中的 La 元素未

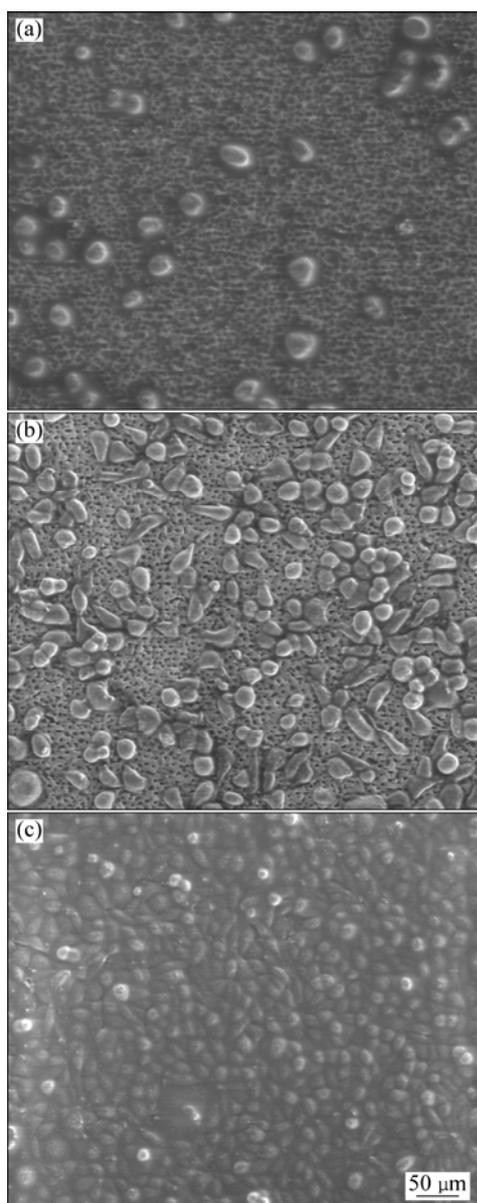
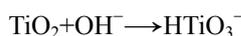


图 8 成骨细胞在 MAO-B-H 膜层上培养不同时间后的形貌
Fig.8 Morphologies of cell culture of osteoblast on MAO-B-H coating after different cell culture times: (a) 1 d; (b) 3 d; (c) 5 d

进入膜层形成物相,但对 HA 的产生起了很大的作用。一方面, La 元素抑制了锐钛矿向金红石型的结构相变^[15],而锐钛矿比金红石具有更好的诱导磷灰石形成能力^[16]。另一方面, La³⁺能部分替代 Ti⁴⁺进入二氧化钛晶格形成固溶体^[17]。过量的 La³⁺不能进入晶格,而是以混合物形式存在于 TiO₂ 中。在镧-二氧化钛混合物中,三价的稀土离子可替代部分四价的钛离子,从而引起电荷的不平衡,为弥补这种电荷的不平衡, TiO₂ 将吸附较多的氢氧根离子,表面氢氧根离子可与光生空穴反应,生成活性羟基。微弧氧化过程中所产生的

TiO₂ 受到活性羟基的攻击而部分溶解发生以下反应:



同时,电解液中还伴随着钛的水合反应产生水合 TiO₂,水合 TiO₂ 进一步受到羟基的攻击就会在膜层表面生成带负电的水合离子,其反应如下:



这种带负电的物质与电解液中的碱离子结合就生成了一层碱性的 TiO₂ 水凝胶层^[18],凝胶状态的 TiO₂ 膜具有诱导液中钙和磷离子沉积产生磷灰石的能力,表现出一定的生物活性。

TiO₂ 膜层能够诱导磷灰石产生的原因就是存在高浓度的 Ti—OH 基团^[19],但由于含 La 元素的介入,电解液中形核位点附近的活性羟基远多于非含 La 电解液中的,因而,在 MAO-B 中出现了 HA 的非晶包,而在 MAO-A 中却没有。

实验中发现, La 元素的介入使得实验中电解液 B 比电解液 A 的发热量多很多,电解液 B 中发生了上述反应而产生了 TiO₂ 水凝胶层,该凝胶层同时在微弧氧化电解液中诱导 Ca 和 P 离子在膜层中的沉积,从而进一步形成了非晶态的 HA。另外,更高的温度导致在电解液中更高的溶解速度,这可以为 La 元素参与反应生成的膜层比没有 La 参与的膜层薄提供解释。

4 结论

1) 在乙酸钙-磷酸二氢钙电解液添加硝酸镧,对纯钛进行微弧氧化处理使其表面得到多孔结构的膜层。分析膜层发现,电解液中添加 La 降低了膜层的厚度,膜层孔洞尺寸增大。

2) 电解液中的 La 元素虽未进入膜层中形成新的物相,但 La 元素能抑制锐钛矿向金红石转变,并在微弧氧化过程中具有促进 HA 形成的能力。

3) 煅烧处理使膜层中的非晶 HA 晶化,形成片状、鳞状的 HA 晶体,且膜层表面孔径增大,且形成新相磷酸钙。

4) 将成纤维细胞 L-929 接种于含有 HA 晶体的生物活性膜层上,1 d 后,细胞可附着在材料表面;3 d 后,细胞数变多并形成一定铺展;5 d 后,细胞长满膜层表面,初步表明细胞相容性较好。

REFERENCES

- [1] GARCIA R, DOREMUS R H. Electron microscopy of the

- bone-hydroxylapatite interface from a human dental implant[J]. *Journal of Materials Science: Materials In Medicine*, 1992, 3(2): 154-156.
- [2] 慈勇, 徐可为. 羟基磷灰石生物陶瓷涂层制备方法评述[J]. *硅酸盐通报*, 1997, 16(5): 47-50.
HAN Yong, XU Ke-wei. Reviews on preparation of hydroxyapatite bioceramic coating[J]. *Bulletin of the Chinese Ceramic Society*, 1997, 16(5): 47-50.
- [3] CANNILLO V, COLMENARES A J, LUSVARGHI L, PIERLI F, SAMPATH S. In vitro characterisation of plasma-sprayed apatite/wollastonite glass-ceramic biocoatings on titanium alloys[J]. *European Ceramic Society*, 2009, 29(9): 1665-1677.
- [4] METIKOS H M, TKALCEC E, KWOKAL A, PILJAC J. An in vitro study of Ti and Ti-alloys coated with sol-gel derived hydroxyapatite coatings[J]. *Surface and Coatings Technology*, 2003, 165(1): 40-50.
- [5] HU Ren, LIN Chang-jian, SHI Hai-yan. A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2006, 80(3): 687-692.
- [6] YEROKHIN A L, NIE X, LEYLAND A, MATTHEWS A, DOWEY S J. Plasma electrolysis for surface engineering[J]. *Surface and Coatings Technology*, 1999, 122(2/3): 73-93.
- [7] HAN Yong, HONG S H, XU Ke-wei. Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation[J]. *Surface and Coatings Technology*, 2003, 168(2/3): 249-258.
- [8] 金晖, 张伟国, 刘瑗如. 不同处理程序的镧、铈、氟对牙根面防龋作用研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 1997, 32(3): 143-145.
JIN Hui, ZHANG Wei-guo, LIU Ai-ru. A comparative study of lanthanum, cerium and fluoride on the prevention of root surface caries by various procedure[J]. *Chinese Journal of Stomatology*, 1997, 32(3): 143-145.
- [9] 张玉梅, 付涛, 徐可为, 王勤涛. 含镧羟基磷灰石的细胞毒性研究[J]. *牙体牙周病学杂志*, 2000, 10(3): 152-154.
ZHANG Yu-mei, FU Tao, XU Ke-wei, WANG Qin-tao. Cytotoxicity of lanthanum-substituted hydroxyapatite[J]. *Chinese Journal of Conservative Dentistry*, 2000, 10(3): 152-154.
- [10] 于思荣, 张新平, 何镇明, 刘耀辉. Ce对Ti-Fe-Mo-Mn-Nb-Zr合金在人工体液及乳酸中腐蚀性能的影响[J]. *稀有金属材料与工程*, 2004, 33(7): 723-727.
YU Si-rong, ZHANG Xin-ping, HE Zhen-ming, LIU Yao-hui. Effect of Ce on corrosiveness of Ti-Fe-Mo-Mn-Nb-Zr alloys in artificial humor and lactic acid[J]. *Rare Metal Materials and Engineering*, 2004, 33(7): 723-727.
- [11] 黄勇, 王迎军, 宁成云, 南开辉, 尹诗衡, 慈勇. 微弧氧化法制备含La羟基磷灰石生物活性涂层[J]. *稀有金属材料与工程*, 2008, 37(7): 1277-1280.
HUANG Yong, WANG Ying-jun, NING Cheng-yun, NAN Kai-hui, YIN Shi-heng, HAN Yong. Lanthanum contained hydroxyapatite coatings prepared by micro-arc oxidation[J]. *Rare Metal Materials and Engineering*, 2008, 37(7): 1277-1280.
- [12] 俞耀庭, 张兴栋. *生物医用材料*[M]. 天津: 天津大学出版社, 2000.
YU Yao-ting, ZHANG Xing-dong. *Bio-medical materials*[M]. Tianjin: Tianjin University Press, 2000.
- [13] 吕奎龙, 周玉, 孟祥才, 李星逸, 滕立群. 工艺因素对纳米羟基磷灰石结晶形态的影响[J]. *材料科学与工艺*, 2003, 11(3): 254-257.
LÜ Kui-long, ZHOU Yu, MENG Xiang-cai, LI Xing-yi, TENG Li-qun. Effect of process conditions on morphologies of nano-hydroxyapatite[J]. *Material Science and Technology*, 2003, 11(3): 254-257.
- [14] 郑遗凡, 李国华, 田伟, 马淳安. 纳米锐钛矿相变的原位XRD研究[J]. *无机化学学报*, 2007, 23(6): 1121-1125.
ZHENG Yi-fan, LI Guo-hua, TIAN Wei, MA Chun-an. In situ XRD study on the phase transformation of nanoanatase[J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2007, 23(6): 1121-1125.
- [15] 李葵英, 郭静, 刘通, 周冰晶, 李悦. 掺镧多孔TiO₂纳米晶表面电子结构与能量转换机制[J]. *物理化学学报*, 2008, 24(11): 2096-2101.
LI Kui-ying, GUO Jing, LIU Tong, ZHOU Bing-jing, LI Yue. Electron structure and energy transformation mechanism of the surface of porous nanocrystalline TiO₂ doped with La[J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2008, 24(11): 2096-2101.
- [16] SONG H W, RYU H S, HONG S E. Apatite induction on Ca-containing titania formed by micro-arc oxidation[J]. *Journal of American Ceramic Society*, 2005, 88(9): 2642-2644.
- [17] 管秀荣, 邵忠财, 田彦文. 掺杂稀土TiO₂的制备及其性能研究[J]. *中国稀土学报*, 2008, 26: 487-490.
GUAN Xiu-rong, SHAO Zhong-cai, TIAN Yan-wen. Preparing TiO₂ with doping rare earth and study of their photocatalysed performance[J]. *Journal of the Chinese Rare Earth Society*, 2008, 26: 487-490.
- [18] SONG W H, JUN Y K, HAN Yong, HONG S H. Biomimetic apatite coatings on micro-arc oxidized titania[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(17): 3341-3349.
- [19] OHTSUKI C, KOKUBO T, YAMAMURO T. Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid[J]. *J Biomed Mater Res*, 1992, 143: 84-92.

(编辑 李艳红)