

植酸改性对齿科纯钛 SLA 表面生物活性的影响

钱海梅¹, 汪涛¹, 张嘉敏¹, 缪润杰¹, 汤春波², 汤易²

(1. 南京航空航天大学, 江苏 南京 211106)

(2. 江苏省口腔医院, 江苏 南京 210029)

摘要: 采用植酸对纯钛 SLA 表面进行改性处理, 然后在模拟体液 (SBF) 中矿化, 研究植酸改性对 SLA 表面生物活性的影响。通过 SEM、EDS 和接触角等测试表征样品的微观形貌、元素组成和润湿性。探讨人骨髓间充质干细胞 (hBMSCs) 在不同表面的增殖、粘附和分化行为。结果表明: 植酸改性 SLA 表面接触角为 0°, 为超亲水表面; 植酸改性处理提高了 SLA 表面诱导磷灰石沉积的能力; 植酸改性 SLA 表面可以增加细胞的增殖、粘附和分化, 提高 SLA 表面的生物活性。

关键词: 纯钛; 植酸; 表面改性; 生物活性; 超亲水性

中图分类号: TJ410.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-185X(2017)12-3832-06

纯钛由于优良的生物相容性、耐腐蚀性能和综合力学性能, 被广泛应用于外科植入材料和医疗器械^[1]。牙种植体材料表面性质如表面形貌、表面化学成分以及表面润湿性等, 会影响细胞在植入体材料表面增殖、粘附和分化^[2]。常见的纯钛表面活化处理方法有离子注入、溶胶凝胶、微弧氧化、酸碱蚀法等^[3-9]。喷砂及酸蚀 (Sandblasted, Large-grit, Acid-etched, SLA) 是一种常用的纯钛表面改性方法, 通过喷砂酸蚀处理可得到微纳米多级三维孔洞结构的表面形貌。Straumann 公司在 SLA 的基础上研发的 SLActive (亲水活性 SLA) 处理工艺, 是通过在制备过程中隔绝空气污染和在生理盐水中浸泡来获得超亲水表面, 但该方法加工和存储条件苛刻。Wei^[10]等研究表明, 表面亲水性越好, 早期细胞粘附的程度越大, 特别是在超亲水表面。Keisuke^[11]等研究发现, 对钛表面进行亲水处理可以促进蛋白质的吸附和细胞间的相互作用。与疏水性表面相比, 细胞在亲水性表面上更易扩散。故制备超亲水牙种植体表面已经成为目前的研究重点。

植酸 (肌醇六磷酸酯, 分子式为 $C_6H_{18}P_6O_{24}$) 是一种环境友好型的有机物, 可用作抗氧化剂、保鲜剂、抗癌剂等。植酸自由基分子可以与二价及二价以上的金属阳离子发生螯合反应, 螯合程度取决于植酸分子中 12 个 OH 中 H^+ 的电离程度^[12]。近年来植酸常用来制备植酸转化膜以用于提高钢铁、镁合金等金属表面的耐腐蚀性能^[13-15], 也有学者探究植酸改性对镁合金

表面黏附性能的影响^[16]。然而国内外学者对于植酸改性钛合金表面却鲜少涉及。本实验采用生物相容性优异的有机大分子植酸对 SLA 处理的纯钛表面进行改性处理得到超亲水表面, 探讨植酸改性对 SLA 纯钛表面生物相容性的影响。

1 实验

1.1 试样制备与分析测试

本实验采用商业纯钛 TA2 为原料, 使用粒度 0.3~0.8 mm 的 TiO_2 砂粒在喷砂机 (天津市精工医疗设备公司 JG5832 多用喷砂机) 上对其表面进行喷砂处理, 使表面呈均匀一致的灰黑色, 然后用丙酮、乙醇、去离子水依次超声清洗 15 min。将清洗干净的试样在 32% H_2SO_4 和 8% HCl 的混合溶液中进行 60~80 min 的酸蚀处理, 制得 SLA 样品。配制 15%~20% 的植酸溶液, 将 SLA 样品在植酸溶液中浸泡 6~12 h, 进行改性。每组取部分样品浸泡于自制的模拟体液 (Simulated Body Fluid, SBF) 中 37 °C 恒温浸泡, 观察样品表面磷灰石涂层沉积情况。

采用日本 Hitachi JEOL S4800 场发射扫描电子显微镜/EDS 观察植酸改性前后 SLA 表面浸泡 SBF 溶液前后的表面微观形貌及元素组成及细胞粘附伸展形态。采用日本 UIvac-Phi PHI5000 X 射线光电子能谱对试样表面的组成成分进行定性分析。采用 SL200B 接触角测量仪 (上海梭伦信息科技有限公司) 测量样品

收稿日期: 2016-12-14

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目 (NP2012303); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

作者简介: 钱海梅, 女, 1991 年生, 硕士, 南京航空航天大学材料科学与技术学院, 江苏 南京 211106, E-mail: haimeiqian@nuaa.edu.cn

表面的接触角。

1.2 体外细胞实验

1.2.1 细胞早期 Alkaline phosphatase(ALP)活性实验

本研究选用 hBMSCs 来观察植酸改性 SLA 表面对其生物学影响。P4 代细胞以 3×10^3 个/孔接种于植酸改性前后 SLA 表面, 每种表面选取六个样品, 接种面积为 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 。经过 5 d 孵化后, 加入 $100 \mu\text{L}$ 0.25% 的 Triton X-100 及 $200 \mu\text{L}$ ALP 底物, 经 $37 \text{ }^\circ\text{C}/1 \text{ h}$ 孵化后, 410 nm 波长下用酶标仪测定吸光度, 读取 OD 值。

1.2.2 细胞增殖实验

细胞增殖实验利用 CCK-8 试剂盒进行, 实验分为 2 组: SLA 组和植酸改性 SLA 组, 每组 3 个副孔, 3 个时间点 (接种后 3、5 和 7 d)。P4 代细胞 3×10^3 个/孔接种于不同钛片表面, 接种面积为 $8 \times 8 \text{ mm}^2$, 避光加入 $20 \mu\text{L}$ CCK-8 液, 孵育 4 h 后震荡均匀, 用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度, 读取 OD 值。

1.2.3 细胞粘附实验

细胞粘附实验利用 CCK-8 试剂盒进行, 实验分 2 组: SLA 组和植酸改性 SLA 组, 每组 3 个副孔, 4 个时间点 (接种后 3、6、12 和 24 h)。以 3×10^4 个/孔接种于不同钛片表面, 接种面积为 $8 \times 8 \text{ mm}^2$, 避光加入 $20 \mu\text{L}$ CCK-8 液, 孵育 4 h 后震荡均匀, 用酶标仪在 450 nm 下测定吸光度, 读取 OD 值。

2 结果与讨论

2.1 表面润湿性测试

对植酸改性前后 SLA 表面进行表面润湿性测试, 采用测量与纯水的静态接触角的方法来评估植酸改性前后 SLA 表面的润湿性, 处理后立即进行测量获得的接触角结果如图 1 所示。图 1a 和 1b 分别表示 SLA 表面和植酸改性 SLA 表面的接触角。从图 1a 可看出, SLA 表面与纯水的静态接触角为 32.2° ; 从图 1b 可看出, 植酸改性 SLA 表面与纯水的静态接触角为 0° 。由接触角结果可知, 植酸改性的 SLA 表面表现出了超亲水性能, 水滴在接触试样表面后, 瞬间完全铺展, 接触角为 0° 。这是由于植酸改性 SLA 表面生成的植酸保护膜中含有羟基、磷酸基等活性基团, 能增强表面亲水性。

2.2 植酸改性前后表面形貌及成分分析

对植酸改性前后 SLA 表面进行 SEM 和 EDS 测试, 观察试样表面形貌, 进行表面元素分析, 结果如图 2 所示。图 2a 和图 2b 是 SLA 表面形貌和 EDS 能谱,

图 2c 和图 2d 是植酸改性 SLA 表面形貌和 EDS 能谱。

从图 2a 可以看出, SLA 表面为不规则的微纳米多级三维孔洞结构, 表面存在十几微米到几微米的大孔

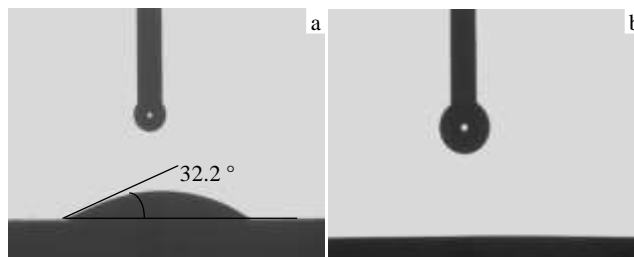


图 1 植酸改性前后 SLA 表面的接触角

Fig.1 Contact angle of SLA surface before (a) and after (b) phytic acid modification

洞结构, 在大孔洞中间嵌套着几十纳米到几百纳米的小孔洞结构。从图 2c 可以看出, 植酸改性 SLA 表面仍为不规则的微纳米多级三维孔洞结构, 不同的是, 在植酸改性 SLA 表面上纳米小孔洞形貌更多更清晰。原因可能是, SLA 表面在植酸溶液中发生点蚀, 因此在纯钛表面局部区域出现向纵深发展的腐蚀小孔。此外, 从图 2b 和 2d 中可以看出, 植酸改性后 SLA 表面能够检测出 P 元素。这是由于植酸自由基分子可以与二价及二价以上的金属阳离子发生螯合反应, 因此在植酸改性处理过程中, 植酸在 SLA 表面螯合形成一层致密的保护膜。

通过 XPS 对植酸改性前后 SLA 表面的组成成分进行分析, 如图 3 和图 4 所示。从图 3 可以看出, SLA 表面检测出 Ti、O 和 C 元素, 植酸改性 SLA 表面检测出 Ti、O、C 和 P 元素。这进一步证实了植酸改性后 SLA 表面植酸保护膜的存在。对比图 4a、4b 可以看出, XPS 高分辨图谱中的 Ti 2p 有 2 个峰, 分别是 458.5 eV 处的 $\text{Ti } 2p_{3/2}$ 和 464.2 eV 处的 $\text{Ti } 2p_{1/2}$ 。对比图 4c、4d 可以看出, 图 4d 中 O 1s 多了 P—O、C—O 和 P=O 3 个峰。对比图 4e、4f 可以看出, 植酸改性前后 SLA 表面的 C 1s 主要有碳氢化合物、C—O 和 C=O 3 个峰。对比图 4g、4h 可以看出, 图 4g 中没有 P 2p 的峰, 而图 4h 中有 P—O 和 P=O 2 个峰。说明植酸改性 SLA 表面有一层植酸保护膜。

2.3 模拟体液浸泡后表面形貌及表面成分分析

图 5a 和 5b 是 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 4 d 后的表面形貌和 EDS 能谱。图 5c 和 5d 是植酸改性 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 4 d 的表面形貌和 EDS 能谱。图 6a 和 6b 是植酸改性前后 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 7 d 的表面形貌。

将植酸改性前后 SLA 表面浸泡在自制的 SBF 溶液中，在类似于人体环境条件的水溶液中钙磷化合物

在试样表面异相成核长大，形成类骨磷灰石。观察试

Ti 元素，说明植酸改性 SLA 表面的磷灰石涂层沉积得更为均匀致密。此外，通过计算得知，图 5b 中的 Ca/P

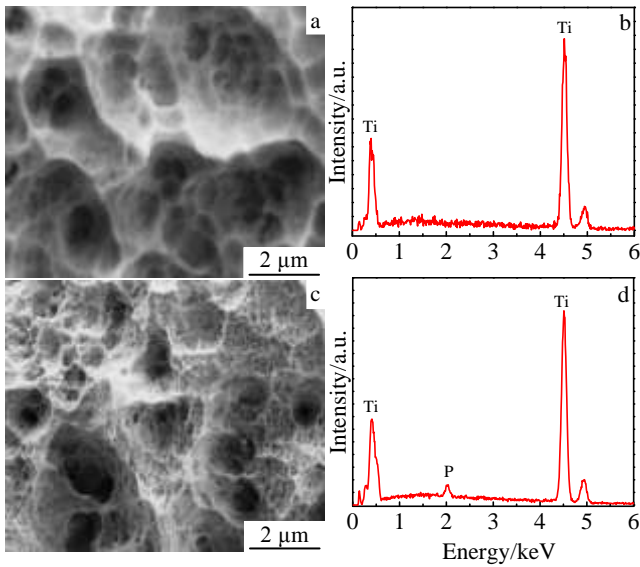


图 2 植酸改性前后 SLA 表面的表面形貌和 EDS 能谱
Fig. 2 Morphologies (a, c) and EDS spectra (b, d) of SLA surface before (a, b) and after (c, d) phytic acid modification

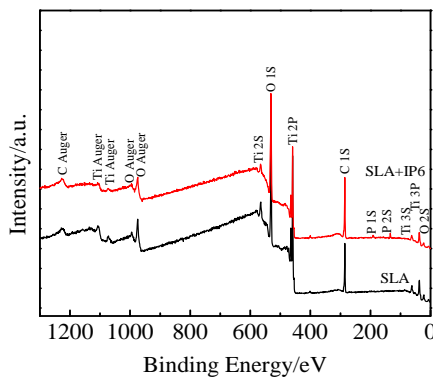


图 3 植酸改性前后 SLA 表面的 XPS 全谱图

Fig. 3 XPS multi spectra of SLA surface before and after phytic acid modification

样表面形貌，进行表面元素分析，结果如图 5 所示。从图 5a 中可以看出，SLA 表面浸泡 SBF 溶液 4 d 后表面部分沉积磷灰石涂层，表面出现大颗粒的磷灰石。从 EDS 图中可以看出，经 SBF 浸泡 4 d 的 SLA 表面检测出 Ca、P、Ti、O 元素，说明 SLA 表面并未完全覆盖磷灰石涂层或沉积层较薄，导致检测出 Ti 元素。从图 5b 中可以看出，植酸改性 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 4 d 后表面沉积更厚的一层磷灰石涂层，磷灰石的形状为球状。从 EDS 谱中可以看出，经 SBF 浸泡 4 d 的植酸改性 SLA 表面检测出 Ca、P、O 元素，并没有

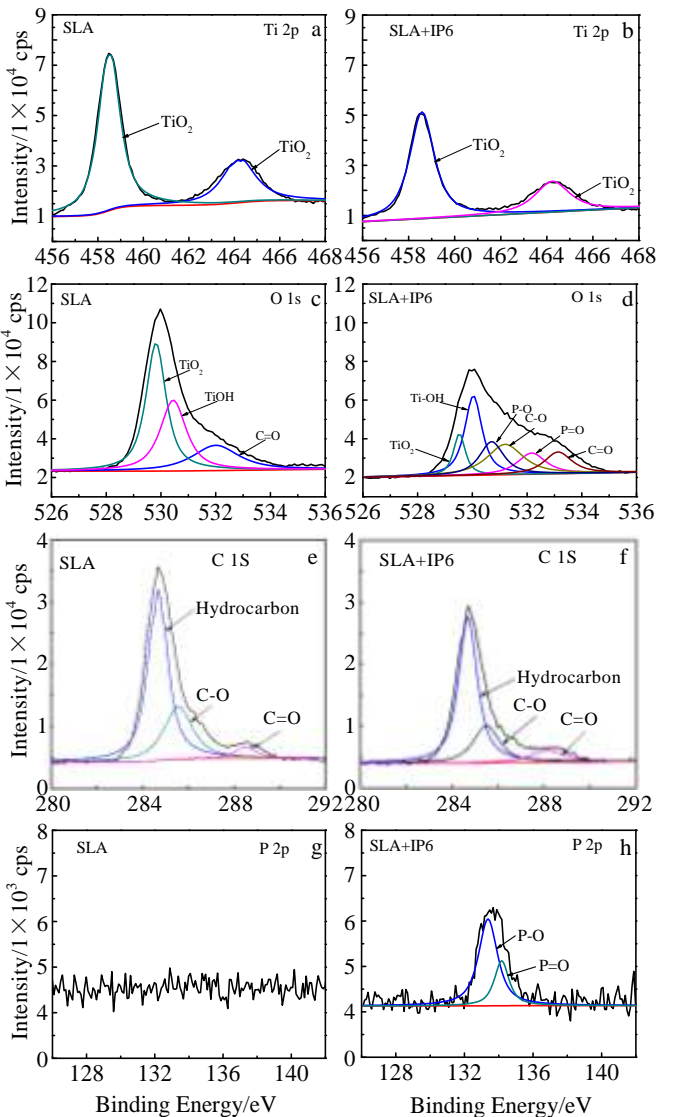


图 4 植酸改性前后 SLA 表面的 Ti 2p, O 1s, C 1s, P 2p 的 XPS 高分辨图谱

Fig. 4 XPS high-resolution spectra of Ti 2p (a, b), O 1s (c, d), C 1s (e, f) and P 2p (g, h) among SLA surface before and after phytic acid modification

值为 1.66，图 5d 中的 Ca/P 值为 1.65，而人体骨骼的 Ca/P=1.6，可见沉积在试样表面上的为羟基磷灰石。由图 6a 和 6b 中可以看出，植酸改性前后 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 7 d 后表面均沉积满羟基磷灰石，不同的是图 6b 中羟基磷灰石颗粒更大，而且表面产生部分裂纹，说明植酸改性 SLA 表面沉积层更厚。由此可见，植酸改性 SLA 表面比 SLA 表面具有更好的诱导羟基

磷灰石沉积的能力。

2.4 植酸改性前后 SLA 表面对细胞的作用

ALP 活性实验可以反映 hBMSCs 细胞在不同表面的早期分化情况。采用单因素方差分析的检验方法对

($P < 0.05$)；之后，植酸改性前后 SLA 表面的细胞均迅速增殖。在第 5 d 时，植酸改性的 SLA 表面增殖速率要高于 SLA 表面的增殖速率，数据之间有显著统计学差异 ($P < 0.01$)；在 7 d 时，植酸改性前后 SLA 表面

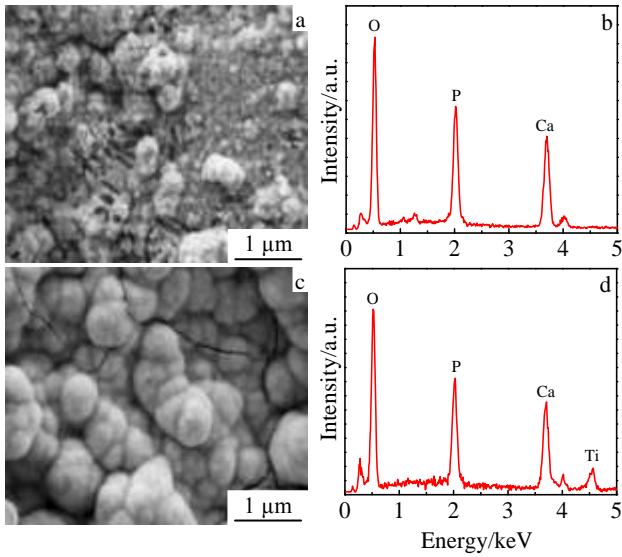


图 5 植酸改性前后 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 4 d 后的表面形貌和 EDS 能谱

Fig.5 Morphologies (a, c) and EDS spectra (b, d) of SLA surface by simulated body fluid soaking for 4 d before (a, b) and after (c, d) phytic acid modification

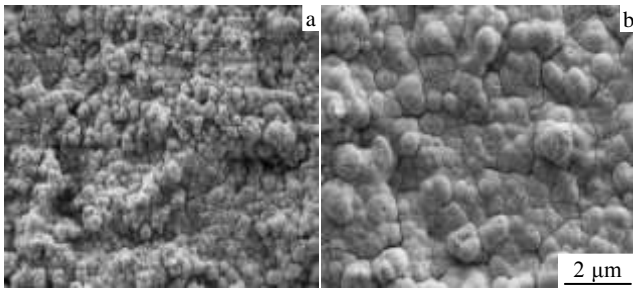


图 6 植酸改性前后 SLA 表面浸泡 SBF 溶液 7 d 后的表面形貌
Fig.6 Morphologies of SLA surface by simulated body fluid soaking for 7 d before (a) and after (b) phytic acid modification

数据进行分析。从图 7 可见，植酸改性 SLA 表面的 ALP 活性值高于 SLA 表面，数据之间有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。可见植酸改性 SLA 表面对 ALP 活性有一定的促进作用，更能促进细胞的分化。

植酸改性前后 SLA 表面上细胞增殖情况如图 8 所示。第 3 d 时，植酸改性 SLA 表面的增殖速率要高于 SLA 表面的增殖速率，且两组数据之间有统计学差异

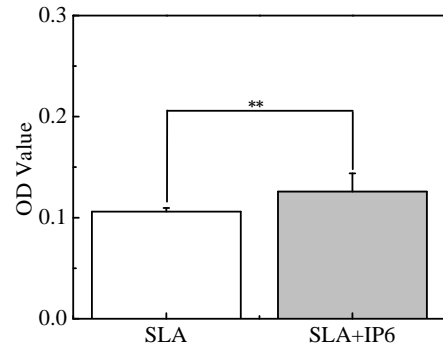


图 7 植酸改性前后 SLA 表面的 ALP 活性测试
Fig. 7 ALP assay on SLA surface before and after phytic acid modification (** indicates a highly statistically significant difference, $P < 0.01$)

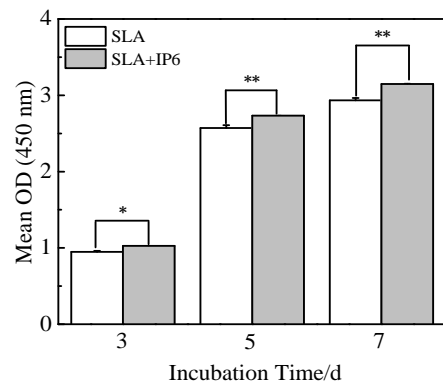


图 8 植酸改性前后 SLA 表面的增殖情况
Fig.8 Cell proliferation on SLA surface before and after phytic acid modification (* indicates a statistically significant difference, $P < 0.05$; ** indicates a highly statistically significant difference, $P < 0.01$)

的增长速度均有所减缓,但是可以明显看出植酸改性的 SLA 表面增殖速率要高于 SLA 表面的增殖速率；增殖实验结果表明，植酸改性处理可以促进 SLA 表面 hBMSCs 细胞的增殖。

植酸改性前后 SLA 表面上细胞粘附情况如图 9、图 10 所示。从图 9 可见，SLA 表面细胞的粘附数目在 3~12 h 之间增长速率缓慢，在 12~24 h 之间增长速率加快。而植酸改性 SLA 表面细胞的粘附数目在 3~6 h、12~24 h 之间增长速率缓慢，在 6~12 h 之间增长速率加快。而且在每个时间点，植酸改性 SLA 表面的细

胞粘附率均明显高于 SLA 表面, 且 2 组数据之间有显著统计学差异 ($P < 0.01$)。从图 10 可见, SLA 表面的细胞伪足较多, 骨架明显, 而植酸改性 SLA 表面的细胞生长的更大, 在钛片表面铺展更加明显, 并且紧密

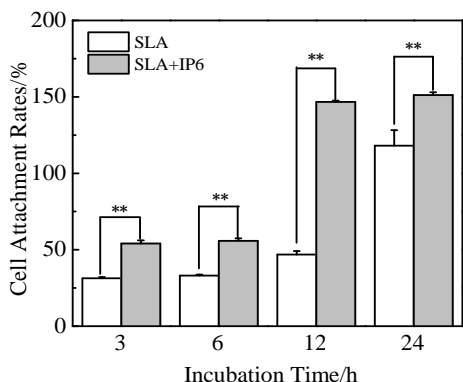


图 9 植酸改性前后 SLA 表面的粘附率测试

Fig. 9 Cell attachment on SLA surface before and after phytic acid modification (** indicates a highly statistically significant difference, $P < 0.01$)

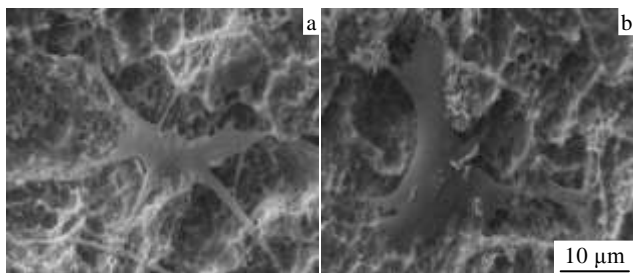


图 10 植酸改性前后 SLA 表面 hBMSs 生长形态的 SEM 像

Fig. 10 SEM micrographs of morphology of hBMSs cells cultured on SLA surface before (a) and after (b) phytic acid modification

依附于试样表面, 伪足已不易分辨。说明植酸改性 SAL 表面可以促进细胞在基体表面的粘附。原因一方面是由于植酸改性 SLA 表面上更多的纳米孔洞结构为细胞粘附提供了更多的锚定点, 另一方面也是由于超亲水表面可以促进蛋白质的吸附和细胞间的相互作用, 对细胞的早期粘附行为起到促进作用^[17]。

3 结 论

1) 植酸可以在纯钛 SLA 表面螯合生成一层植酸保护膜, SLA 表面与水的静态接触角为 32.2°, 经植酸改性处理的 SLA 表面与水的静态接触角为 0°, 为超亲水性表面。

2) SBF 浸泡实验结果表明, 植酸改性表面更容易

诱导羟基磷灰石的沉积, 植酸改性有效地提高了纯钛 SLA 表面的生物活性。

3) 植酸改性 SLA 表面可以促进成骨细胞的增殖、粘附和分化, 有效地改善了纯钛 SLA 表面的生物活性。

参考文献 References

[1] Fu Yangyang(付艳艳), Song Yueqing(宋月清) Hui Songxiao (惠松骁) *et al. Chinese Journal of Rare Metals(稀有金属)*[J], 2006, 30(6): 850

[2] Zhang Y M, Bataillon-Lines P, Hhuang P *et al. Journal of Biomedical Materials Research Part A*[J], 2004, 68(2): 383

[3] Cheng M, Qiao Y, Qi W *et al. Applied Materials & Interfaces* [J], 2015, 7(23): 13 053

[4] Guo Huan(郭欢), Weng Zhengyang(翁正阳), Liu Xiangmei (刘想梅) *et al. Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程)*[J], 2014(S1): 286

[5] Kim H M, Kim H M, Himeno T *et al. Journal of Biomedical Materials Research Part A* [J], 1978, 19(4): 1305

[6] Fu Tao(付涛), Wang Changpeng(王长鹏), Guo Zhankui(郭战魁). *Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程)*[J], 2011, 40(5): 889

[7] Oliveira D P, Palmieri A, Carinci F *et al. Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications*[J], 2015, 51: 248

[8] Xu Lin(徐琳), Ding Jianning(丁建宁) Xu Xiaojing(许晓静) *et al. Rare Metal Materials and Engineering(稀有金属材料与工程)*[J], 2016, 45(8): 2080

[9] Li Baoe, Li Jun, Liang Chunyong *et al. Rare Metal Materials and Engineering*[J], 2016, 45(4): 858

[10] Wei J, Igarashi T, Okumori N *et al. Biomedical Material*[J], 2009, 4(4): 287

[11] Keisuke Y, Tadashi M *et al. Dental Materials Journal*[J], 2015, 34(1): 120

[12] Qiao Liping(乔丽萍), Jiang Longfa(江龙发) Huang Huade (黄华德) *et al. Transactions of Nonferrous Metals Society of China(中国有色金属学报)*[J], 2015(6): 1590

[13] Wei Fanghong(魏方红), Li Muqin(李慕勤), Guo Xiaojuan(郭小娟) *et al. China Surface Engineering(中国表面工程)*[J], 2015, 28(2): 78

[14] Li Xiaojuan(荔小娟), Guo Ruiguang(郭瑞光), Li Le(李乐). *Materials Protection(材料保护)*[J], 2015, 48(2): 11

[15] Zhang Huayun(张华云), Liu Zhiguo(刘治国). *Materials Protection(材料保护)*[J], 2009, 42(8): 46

[16] Ye C H, Zheng Y F, Wang S Q *et al. Applied Surface Science* [J], 2012, 258(258): 3420

[17] Yamamura K, Miura T, Kou I *et al. Dental Materials Journal*

[J], 2015, 34(1): 120

Effect of Phytic Acid Modification on Bioactivity of Medical Titanium SLA Surface

Qian Haimei¹, Wang Tao¹, Zhang Jiamin¹, Miao Runjie¹, Tang Chunbo², Tang Yi²

(1. Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106, China)

(2. Stomatological Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210029, China)

Abstract: The effect of phytic acid on bioactivity of the surface of SLA-titanium was studied, through modification with phytic acid and subsequent mineralization in the simulated body fluid (SBF). The microstructure, composition and wettability were analyzed using SEM, EDS and contact angle analysis. Human bone marrow stromal cells (hBMSCs) were cultured on different surfaces to investigate the proliferation, adhesion and differentiation. The results demonstrate that the contact angle of surface modified with phytic acid is 0°, which means it is superhydrophilicity. The ability to induce apatite deposition, as well as the proliferation, adhesion and differentiation of cells are improved obviously on modified SLA-surface, which reflect a better bioactivation treatment as a result of phytic acid solution.

Key words: pure titanium; surface modification; phytic acid; bioactivity; super-hydrophilicity

Corresponding author: Wang Tao, Ph. D., Professor, College of Materials Science and Technology, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 211106, P. R. China, E-mail: taowang@nuaa.edu.cn