

NiTi 合金表面 HA/BMP 复合涂层的制备

欧珍艳, 朱胜利, 魏强, 崔振铎, 杨贤金

天津大学材料学院, 天津 (300072)

E-mail: ouzhenyan@yahoo.com.cn

摘要: 将预处理后的 NiTi 合金浸入添加骨形态发生蛋白的模拟体液中, 使钙磷盐和骨形态发生蛋白(BMP)共沉积到合金表面, 制备生物活性涂层。利用 SEM、XRD、IR、XPS、TEM 等分析手段对涂层进行表征。结果表明: BMP 浓度为 10mg/L=100mg/L 时对涂层网状结构生成有促进作用, BMP 和钙磷盐通过化学作用共沉积到基体表面。

关键词: NiTi 合金; 羟基磷灰石; 骨形态发生蛋白; 仿生共生长

中图分类号: TG174.44

1. 引言

自从 1963 年美国海军军械研究室发现 NiTi 合金的形状记忆效应至今, NiTi 合金因其优良的机械性能、形状记忆效应、超弹性、优良的抗腐蚀性、耐磨性和生物相容性等性质广泛应用于医学领域^[1]。其中大部分是作为异物器械植入人体。在骨科种植领域, 钛合金涂敷羟基磷灰石涂层的种植体应用较为广泛, 它既保持了钛合金优良的力学性能, 又具有羟基磷灰石的生物相容性和骨传导性, 近年来钛合金表面羟基磷灰石涂层技术已成为研究热点。

骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)是广泛存在于骨基质中的一种低分子糖蛋白多肽, 可以作用于间充质细胞表面受体, 诱导血管周围的未分化间充质细胞和骨髓基质细胞转化为软骨和骨细胞, 具有诱导骨形成的生物特性。已成为治疗骨缺损、骨折不愈合的常用新材料和方法。目前研究较多的方法是制备相应的载体, 将骨形态发生蛋白吸附在载体上, 研究其植入后对新骨生长的影响^[2]。吸附法复合的蛋白质只存在于材料表层, 发挥作用的时间有限, 在体内植入之后由于人体环境的复杂性, 有更多的蛋白质与钙磷层作用, 因而植入之后表面富集的骨形态发生蛋白含量并不理想^[3]。

本文在模拟体液中加入骨形态发生蛋白, 将预处理之后的 NiTi 片浸入其中, 在基体上仿生共生长法制备羟基磷灰石-骨形态发生蛋白复合涂层, 进一步改善 NiTi 合金的生物活性和植入骨传导性。

2. 实验材料及方法

试样为 10×10×3mm NiTi 片, 由沈阳天贺新材料开发有限公司提供。实验中使用的骨形态发生蛋白为冻干粉末状, 由天津中津生物提供。仿生共生长所用溶液为高钙磷离子浓度模拟体液(MSBF)。

试样经 360#, 600#, 800#水砂纸依次打磨至表面光滑, 无明显缺陷。去离子水超声清洗 10 分钟, 室温干燥。

为改善基体表面活性, 对 NiTi 片进行预处理: 质量分数为 30%的 HNO₃ 溶液 60℃恒温浸泡 30min, 1.2mol/LNaOH 溶液 105℃恒温浸泡 2h, 饱和 Na₂HPO₄ 溶液 40℃浸泡 15h, 饱和 Ca(OH)₂ 溶液 25℃溶液恒温浸泡 8h。

将预处理之后的试样去离子水清洗干燥后放入添加 BMP 的 MSBF 溶液中, 37℃恒温条件下仿生生长。

使用 HITACHI S-4300 扫描电子显微镜(Scanning Electron Microscopy)观察表面涂层的形貌。使用 RIGAKU/DMAX X 射线衍射仪(X-ray Diffraction)分析涂层的物相组成。仪器工作

参数为 CuK α , 40kV, 200mA, 小角掠射, 范围 10-60°。使用傅立叶红外光谱仪 FTS-6000 对 NiTi 合金表面涂层中的基团进行表征。测试范围为 4000-400cm⁻¹, 分辨率为 0.075cm⁻¹。使用 PHL1600ESCA x 射线光电子能谱(x-ray Photoelectron Spectroscopy)表征表面复合层的元素组成及其价态分布。x 射线源为 MgK α , 功率为 250W。表面灵敏度为 2.0, 样品室和分析室真空度为 2.0×10⁻¹⁰。使用 Tecnai G2 F20 场发射透射电子显微镜观察表面涂层的微观形貌和结构特征。

3. 实验结果及分析

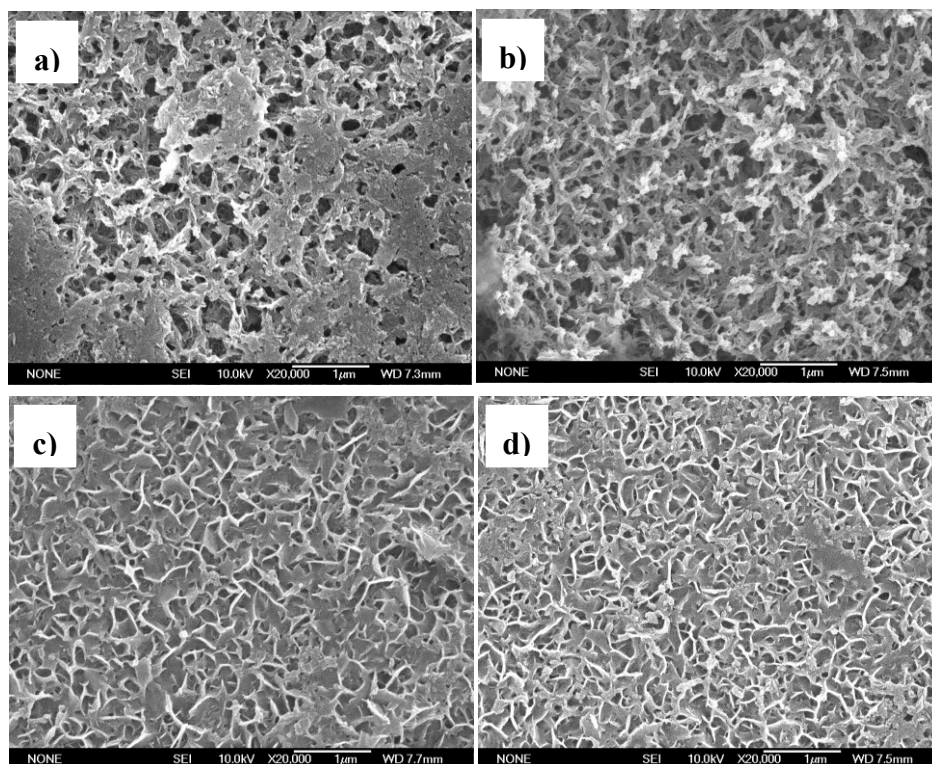


图 1 仿生共生长 3 天表面涂层形貌

Fig.1 Morphology of composite coatings on the surface of NiTi alloy after growing 3days

a) 0mg/L b)10mg/L c)50mg/L d)100mg/L BMP

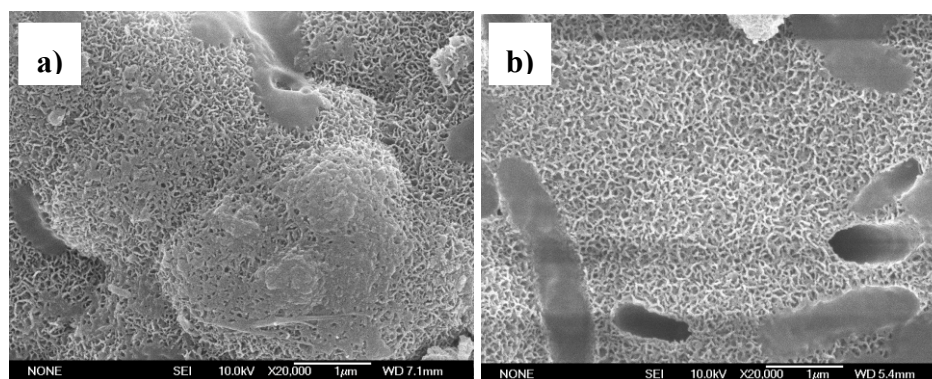


图 2 仿生共生长 7 天表面涂层形貌

Fig.2 Morphology of composite coatings on the surface of NiTi alloy after growing 7days

a)10mg/L b)50mg/LBMP

图1是0mg/L、10mg/L、50mg/L、100mg/L BMP的MSBF中生长3天的表面涂层形貌图。不含BMP的溶液中生长3天后,表面开始有网状物质生成,涂层分为平坦区和多孔区。BMP浓度为10mg/L时,网状结构基本布满整个基体表面。BMP浓度为50mg/L、100mg/L时,涂层较为均匀,生成片状晶体,片状晶体长约200nm~300nm。BMP的加入对涂层的形成有影响。随着BMP浓度的增加,有利于表面网状化合物的形成。

图2是不同浓度骨形态发生蛋白的MSBF中仿生生长7天后表面涂层的形貌图。可以发现,生长时间足够长,10mg/L BMP浓度的溶液中生长所得涂层为均匀的网状化合物,BMP浓度为50mg/L时涂层亦为网状结构,图2b)中有一些孔洞分布在涂层表面,这可能是蛋白质与细菌作用导致,将试样通过紫外杀菌或无菌环境中生长可避免类似细菌污染情况出现。

在外界其它条件相同的情况下,添加骨形态发生蛋白使得涂层更加均匀。究其原因,是因为蛋白质的存在造成了基体形核能力的变化。蛋白质在形核过程的作用是非常复杂的。按照蛋白质功能的不同可分为有机模板蛋白和可溶性蛋白,其中有机模板蛋白被认为是起到限定矿化空间和位点,提供异相形核界面的作用,在矿化组织中占大多数。如胶原蛋白、壳蛋白和甲壳素等。除此之外,矿化组织中还存在许多微量可溶蛋白。这类蛋白在生物矿化中的作用更加复杂,因为它能够在基体上沉积也能在晶核上沉积^[4]。在有蛋白质存在的溶液中基体有了更好的形核能力。因为表面的形核能力与界面张力相关,在基体上沉积的蛋白质使得基体和液相的界面张力 γ_{SL} 减小,基体的形核能力降低。另一方面,蛋白质的存在使基体和晶体的界面张力 γ_{SC} 减小,这会提高基体的形核能力。在有蛋白质存在时,晶体和液体之间的界面张力 γ_{CL} 总是减小的,这会促进形核并且形成稳定的晶核。所以蛋白质在形核中的促进或抑制作用存在一个临界值^[5]。本文的研究结果来看,BMP浓度为10、50、100mg/L时对涂层的形核结晶都有促进作用。蛋白质在钙磷盐的沉积过程中能够提供大量的形核位点,由于形核位点增多使钙磷盐的形核数量增多,也就使形成的涂层更加均匀。

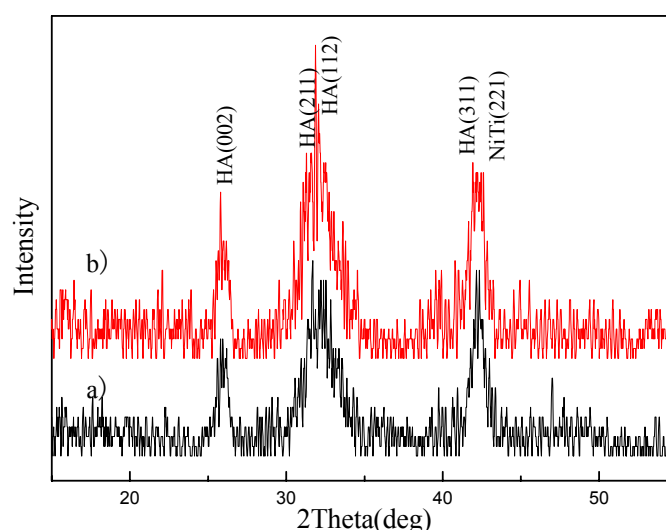


图3 仿生生长7天表面涂层XRD图谱

Fig.3 XRD pattern of composite coatings after growing 7days

a) 10mg/L b) 50mg/L BMP

图3为仿生生长7天所得涂层的x射线小角衍射谱图。掠射角为 3° ,该图扣除了背底。对谱图分析可发现,在 $2\theta=26^\circ$ 附近的衍射峰对应了羟基磷灰石的(002)晶面的衍射峰, $2\theta=$

32°附近对应羟基磷灰石的(211)、(112)晶面的衍射峰, 同时在 $2\theta=42^\circ$ 附近出现了与羟基磷灰石的(311)晶面对应的衍射峰。NiTi 基体的(211)晶面的峰也出现在这个位置附近。XRD 衍射结果说明在 NiTi 基体上生成的无机物主要为羟基磷灰石。

图 4 为涂层的 XPS 分析全谱图。由结果可知, 涂层表面的主要组成元素有 C、O、N、Ca 和 P。其中 O1s, C1s, Ca2p, N1s、P2p 是强度较大的峰。

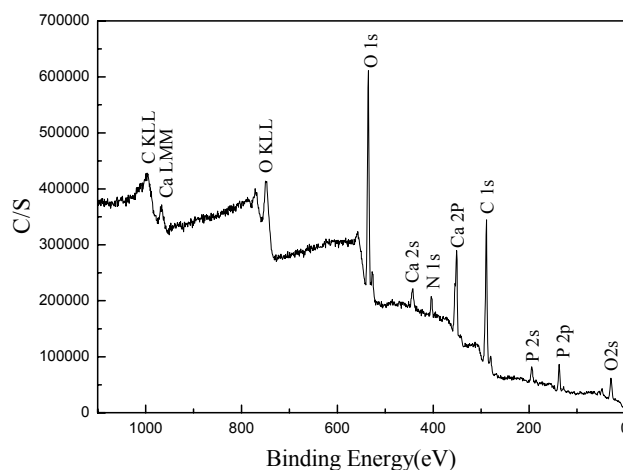


图 4 NiTi 合金表面复合涂层的 XPS 谱图

Fig.4 XPS full spectrum of composite coatings on the surface of NiTi

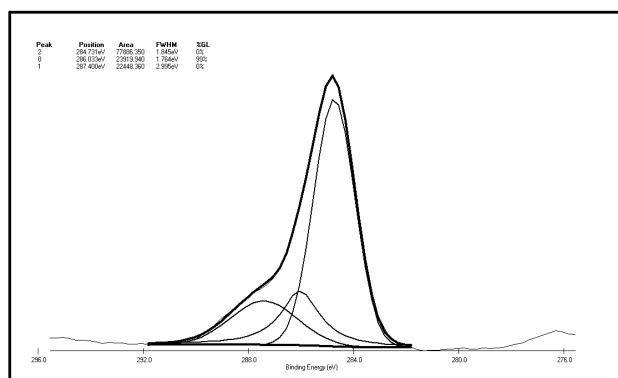


图 5 NiTi 合金表面涂层中 C1sXPS 拟合

Fig. 5 XPS spectrum of C1s in composite coating

图 5 对 C1s XPS 谱图进行了拟合分析。在 C1s 的拟合谱图中, 其中在结合能为 284.7eV 的谱峰为 C-H 峰, 286.0eV 的谱峰为 C-NH 峰, 287.4 为 C=O 峰, 又因为骨形态发生蛋白的酰胺的基本结构为: $O=CNH$, 其中 C=O 为酰胺 I 带, CNH 为酰胺 II 带。在 C1s 的谱图中出现了酰胺带的特征峰, 说明在涂层中有骨形态发生蛋白存在。同时在 C1s 中包含了 CH 可能来自骨形态发生蛋白也可能来自有机污染碳。

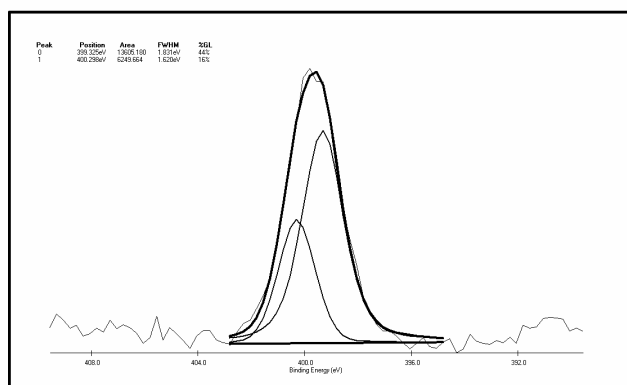


图6 NiTi合金表面涂层中N1sXPS拟合

Fig. 6 XPS spectrum of N1s in composite coating

在图6中对N1s谱图进行Gauss拟合, 399.3eV结合能所对应的为O=CNH中的N, 结合能为400.3eV对应的是—NH—, 可能来自骨形态发生蛋白, 也可能是来自生长过程中在模拟体液中添加的Tris(三羟甲基氨基甲烷)。对C1s和N1s进行拟合后, 其化学形态都出现了骨形态发生蛋白的酰胺带的特征峰。XPS分析说明在仿生生长后的涂层中有骨形态发生蛋白的存在, 生成了羟基磷灰石—骨形态发生蛋白复合涂层。

图7为骨形态发生蛋白红外光谱图。骨形态发生蛋白酰胺I带位置为 1653cm^{-1} , 酰胺II带位于 1538cm^{-1} , 酰胺III带较弱, 位于 1243cm^{-1} 。

图8是不同浓度骨形态发生蛋白生长涂层的IR全谱图。由IR结果可知在仿生生长所得涂层中出现了BMP的酰胺I带和酰胺II带, 且涂层中的酰胺II带比纯BMP中强度变弱, 酰胺III带基本消失, 涂层中的酰胺I带相对于纯BMP中的酰胺I带发生了红移。经过多次实验验证, 并非检测误差导致, 红移确实存在。可能与骨形态发生蛋白中的羧基 COO^- 与溶液中的离子发生作用有关。文献^[6]曾对骨形态发生蛋白与钙磷盐的作用作了研究, 他们认为主要是羧基与 Ca^{2+} 离子而非 PO_4^{3-} 发生作用。说明在仿生生长过程中BMP参与了羟基磷灰石的形成, 其间有化学键作用。

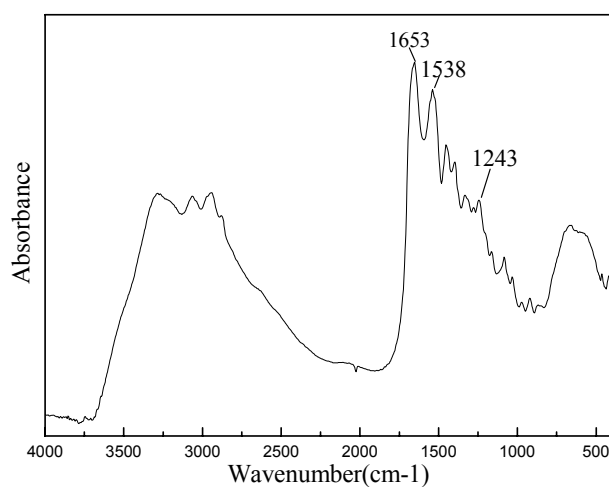


图7 骨形态发生蛋白IR光谱

Fig. 7 IR spectrum of BMP

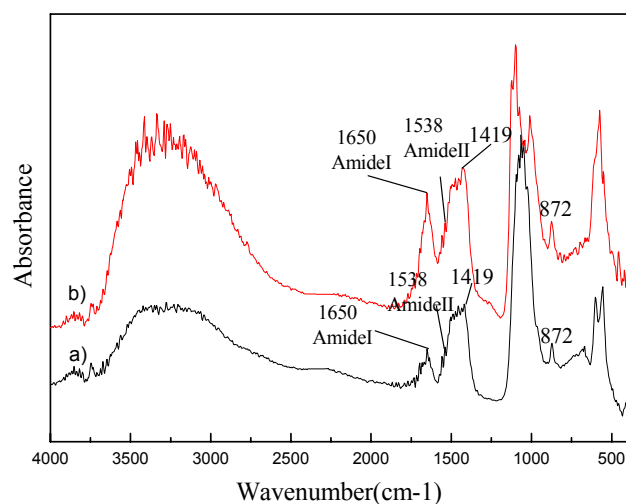


图 8 NiTi 合金表面不同浓度 BMP 复合层 IR 全谱 a) 10mg/L b) 50mg/L BMP

Fig. 8 IR spectrum of composite coatings on NiTi alloy

在仿生生长所得涂层的 IR 扫描结果中,也出现了 P-O 谱带,在 $900\sim1200\text{cm}^{-1}$ 的 $\text{PO}_4^{3-}\nu_3$ 带和 $566\sim605\text{cm}^{-1}$ 的 $\text{PO}_4^{3-}\nu_4$ 带,可看出随着浓度的增加吸收峰的峰强增加并且分裂更加明显,说明羟基磷灰石的结晶性较好。此外,在 872cm^{-1} , 1419cm^{-1} 位置还发现了基团符合 CO_3^{2-} 的 ν_2 , ν_3 带的特征谱带区域: $880\sim860\text{cm}^{-1}$, $1450\sim1410\text{cm}^{-1}$, , 这说明仿生生长的涂层中含有碳酸根,即 B 型碳酸盐替代,这种替代会导致晶体在 a 轴方向的压缩和 c 轴方向的拉伸^[7]。这说明复合层为含有碳酸根的羟基磷灰石与骨形态发生蛋白的复合层。

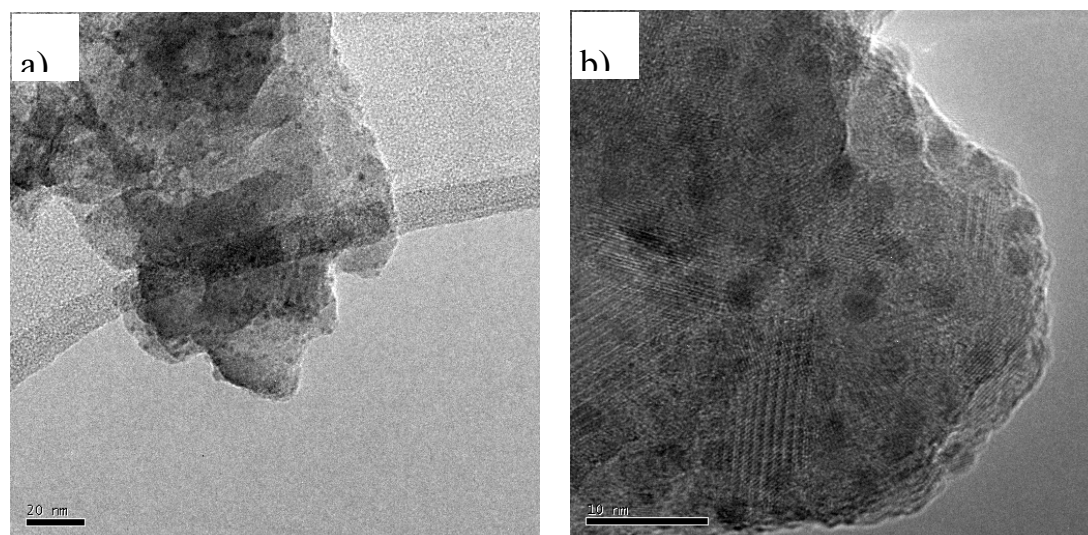


图 9 复合涂层的高分辨 TEM 观察

Fig. 9 HRTEM micrographs of the composite coatings

图 9 为 50mg/L BMP 的 MSBF 中仿生生长 7 天的涂层的透射电镜观察结果。从图 9 a)中可以看见有大量薄片状物质存在,薄片状物质中有大量颗粒状球形物,图 9b)高倍放大可看出球状物约 3nm 大小,均匀的分布在晶体中,这在不含骨形态发生蛋白的羟基磷灰石

涂层中从未发现,可推测是骨形态发生蛋白的聚集体。结合 XPS、IR 分析结果,可进一步验证,涂层是复合了骨形态发生蛋白的羟基磷灰石的复合涂层。

曾有研究^[8]报道了 Ti6Al4V 表面仿生共生长法制备 BMP-2 和钙磷盐的生物仿生复合涂层,蛋白质着色后体式显微镜观察结果显示,骨形态发生蛋白呈细小聚积状,均匀的分布在涂层中。这与本文的透射观察结果相吻合。该报道还对涂层进行了蛋白质体外释放实验,结果证明通过仿生生长法制备的涂层中骨形态发生蛋白保持了良好的生物活性,与一般的涂、吸附法制备的复合涂层相比,仿生共生长法制备的复合涂层中 BMP-2 能更好地刺激碱性磷酸酶反应,是一种具有很大潜力的骨形态发生蛋白载体。

4. 结论

本文用仿生共生长法在 NiTi 合金表面制备涂层,对涂层的形貌、成分、结构等进行了分析,可得到如下结论:骨形态发生蛋白浓度对涂层生长影响较大,浓度高,有利于网状结构涂层的生成,涂层均匀性随着浓度的增加而提高。仿生共生长法所得无机物主要为结晶性较差的羟基磷灰石。IR 分析和 XPS 分析结果可知涂层中有骨形态发生蛋白。骨形态发生蛋白在涂层中以球形颗粒状均匀分布。骨形态发生蛋白通过化学作用和 Ca^{2+} 沉积到基体表面, Ca^{2+} 通过静电作用或发生螯合作用和蛋白质的官能团发生反应。仿生共生长法在 NiTi 合金表面制备了羟基磷灰石-骨形态发生蛋白复合涂层。

参考文献

- [1] 郑玉峰,赵连城.《生物医用镍钛合金》[M],北京:科学出版社,2004.
- [2] 何智勇.双梯度羟基磷灰石涂层复合 rhBMP-2 研究[J].中国矫形外科杂志.2003.11(6):395-399.
- [3] Yuan Huipin,Zuo Ping,Yang Zongjian.Bone morphogenetic protein and ceramic-induced osteogenesis [J]. J Mater Sci:Mater Med,1998,9(12),717-721.
- [4] 崔福斋,冯庆玲.《生物材料学》[M],北京:清华大学出版社,2004.212
- [5] Combes C,Rey C.Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity [J].Biomaterials,2002,23:2817-2823
- [6] Liu Y,Yang B,et al. Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate [J].Biomaterials,2003,24:65-70
- [7] Barralet J,Best S,Bonfield W.Carbonate substitution in precipitate hydroxyapatite:an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration [J]. J Biomed Mater Res,1998,41:79-86
- [8] Yuelian Liu,Ernst B. Hunziker,Pierre Layrolle.Bone Morphogenetic Protein 2 Incorporated into Biomimetic Coatings Retains Its Biological Activity [J].Tissue Engineering,2004,10:101-108

Formation of HA/BMP composite coatings on the surface of NiTi alloy

Ou Zhenyan, Zhu Shengli, Wei Qiang, Cui Zhenduo, Yang Xianjin

Department of Materials Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin, PRC, (300072)

Abstract

This work is mainly attributed to form composite coatings on the surface of NiTi alloy by adding BMP(Bone Morphogenetic Protein) into MSBF(Modified simulated body fluid). The coatings were analyzed with Scanning Electron Microscopy (SEM), X-Ray Diffraction (XRD) and Infrared Spectroscopy (IR). The results indicated: The adding of BMP will promote the coating formation. BMP and hydroxyapatite were incorporated in the coatings by chemical reaction.

Keywords: NiTi alloy; BMP;HA; biomimetic growth