

# 微/纳米结构和接枝多肽的钛表面生物活性

高 玲, 冯 波, 汪建新, 鲁 雄, 翁 杰

(西南交通大学 材料先进技术教育部重点实验室, 四川 成都 610031)

**摘 要:** 评价了经化学和仿生改性后的 4 种钛试样的矿化性能。4 种表面改性层分别为: 锐钛矿纳米管 (N), 微/纳米结构 (MN), 纳米管表面接枝精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸 (NR), 微/纳米结构表面接枝精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸 (MNR)。结果显示, 表面矿化沉积物是羟基磷灰石, 同样条件下, 试样的诱导矿化能力依次是 MNR > MN > NR > N。在生物材料表面构建微/纳米结构并接枝多肽是一种有效的表面改性方法。

**关键词:** 钛; 表面改性; 微/纳米结构; 多肽; 矿化

**中图分类号:** TG146.2<sup>+</sup>3; R318.08

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-185X(2009)08-1406-04

钛和钛合金质地轻、断裂韧性高、生物相容性和力学适应性优越, 可作为骨骼类较好的代用材料, 但金属和生物体之间不能形成牢固的化学键合, 不能满足临床上的生物活性需求。为进一步提高种植体表面的物理、化学和生物性能, 以期得到生物相容性更好、临床上愈合更快、具有更理想生物活性的种植体, 表面改性已成为研究热点。

大量研究表明, 表面多孔改性有利于增大材料的活性: 微孔形貌可以大大提高成骨细胞在材料上的黏附、增殖、分化, 改善应力传导形式, 提高界面的骨结合强度, 促进骨整合<sup>[1-3]</sup>; 而纳米形貌的材料展现出许多特有的性质<sup>[4-6]</sup>: 有类似于骨的分级结构和多孔结构, 比表面积大、表面活性中心多、表面反应活性高、强烈的吸附能力等, 对细胞的生长也有促进作用。锐钛矿纳米管有抗菌、加速矿化和增加蛋白吸附等良好的生物活性<sup>[7-9]</sup>。

Arg-Gly-Asp(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸, RGD)三肽序列是细胞外基质及体内多种粘连蛋白分子所共有的细胞黏附和分子识别位点。近年有研究表明, RGD 序列肽能促进成骨细胞的黏附和生长, 抑制破骨细胞的增殖、迁移、分化, 抑制纤维组织的生成, 从而促进骨组织的再生<sup>[10-13]</sup>, 外源性 RGD 在多种病理条件下还具有治疗作用<sup>[14]</sup>。在生物材料表面接枝含 RGD 的多肽链, 制成有专门受体的材料, 可以提高材料的生物相容性。

不同形貌的钛种植体(微孔、纳米管)的表面生

物学性能有过不少报道, 但没有与表面接枝上多肽的微/纳米结构的试样进行对比研究。为此, 本工作开展了微/纳米仿生复合改性的研究, 用化学和仿生的方法在钛表面进行改性后, 4 种植体分别具有不同形貌和表面化学成分, 并用仿生矿化的方法检测改性的效果, 用材料表面羟基磷灰石 ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA) 的生长情况评价材料的生物学行为。

## 1 实验方法

### 1.1 试样制备

纯钛片 (TA2,  $\phi 10 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$ ) 经打磨和预处理后分两组, 一组试样用文献[8]的方法, 在  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  和 HF 的电解液中, 经 20 V 阳极氧化和热处理后表面出现纳米管 (记为 N), 另一组试样经摩尔比 7:1 的 HCl 和  $\text{CaCl}_2$  混合液 60 °C 酸腐蚀 24 h, 再经阳极氧化和热处理得到一种微/纳米结构 (记为 MN), 微孔孔径在 1~60  $\mu\text{m}$ 。两种试样表面都均匀分布着纳米管阵列, 管径约 100 nm, 以锐钛矿形式存在<sup>[8]</sup>。试样 N 和 MN 的表面形貌照片如图 1。按文献[12]和[13]的方法, 用 3-氨丙基三乙氧基硅烷和 3-马来酰亚胺丙酸-N-羟基琥珀酰亚胺脂在 N 和 MN 试样表面分别接枝上多肽精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-半胱氨酸(RGDC), 接枝前后试样表面形貌不变。接枝多肽后的试样分别记作 NR、MNR。4 种试样的表面形貌和表面化学成分见表 1。

### 1.2 矿化实验

矿化实验是评价硬组织替换材料是否具有生物活

收到初稿日期: 2008-07-28; 收到修改稿日期: 2009-05-25

基金项目: 国家自然科学基金 (50871093); 教育部全国博士学位论文作者专项资金 (200554)

作者简介: 高 玲, 女, 1979 年生, 硕士, 西南交通大学材料科学与工程学院, 四川 成都 610031, 电话: 028-87634154; 通讯作者 冯 波, 电话: 028-87634023, E-mail: fengbo@swjtu.edu.cn

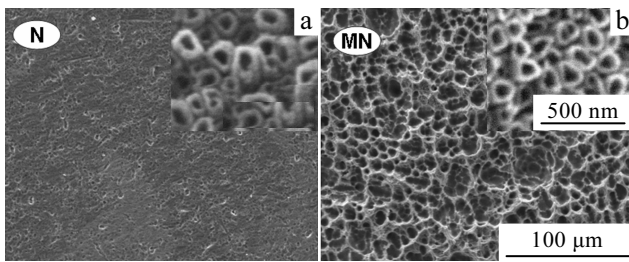


图 1 矿化前试样的 SEM 照片

Fig.1 SEM images of samples before mineralization: (a) N, nanotubes and (b) MN, micro/nanostructure

表 1 不同试样的形貌和表面成分

Table 1 Surface morphologies and chemical composition of different samples

Sample	Surface morphology	Chemical composition
N	Nanotubes	Ti + anatase
MN	Micropores+nanotubes	Ti + anatase
NR	Nanotubes	Ti + anatase + RGDC
MNR	Micropores+nanotubes	Ti + anatase + RGDC

性的体外检测的重要方法。在仿生矿化过程中,所用的模拟体液(SBF)中离子浓度接近人体血浆的无机离子浓度,形成的羟基磷灰石(HA)接近于人体骨中磷灰石的结构。模拟体液(SBF)中的离子浓度(mmol)如下:  $\text{Na}^+$  142.0,  $\text{K}^+$  5.0,  $\text{Mg}^{2+}$  1.5,  $\text{Ca}^{2+}$  2.0,  $\text{Cl}^-$  147.8,  $\text{HCO}_3^-$  4.2,  $\text{HPO}_4^{2-}$  1.0,  $\text{SO}_4^{2-}$  0.5。  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  和稀盐酸逐渐加入,调节 pH 为 7.40, 过滤备用。为加速矿化,浓度扩大至 1.5 倍。所用试剂均为分析纯。将此 4 种试样分别放入 10 mL 的浓度 1.5 倍模拟体液(1.5SBF)中,置于 37 °C 的恒温气浴摇床中矿化 2 d,每 24 h 将 1.5SBF 换液,取出试样清洗,晾干待测。

### 1.3 检测

分别用扫描电镜(SEM, FEI Quanta 200 型), X 射线能谱仪(EDX)、傅里叶变换红外光谱(FTIR, Nicolet SXFYIRI 70/Magna 550 型)和 Cu 靶薄膜 X 射线衍射(XRD, X'Pert Pro MPD 型,扫描范围  $20^\circ \sim 50^\circ$ , 掠射角  $0.5^\circ$ ) 检测试样表面的形貌、元素成分、官能团和晶型。

## 2 结果和讨论

从矿化 2 d 后 4 种试样表面的形貌照片(图 2)上可以看出,只有 N 试样表面放大后纳米管清晰可见,见不到涂层,其它 3 组试样表面均有一层纳米团簇状涂层。NR 表面的涂层没有将表面完全覆盖,还可以见到钛基底;MN 和 MNR 两组试样表面全被一层致密的涂层所覆盖,其中 MNR 表面的一些微孔也被覆盖,

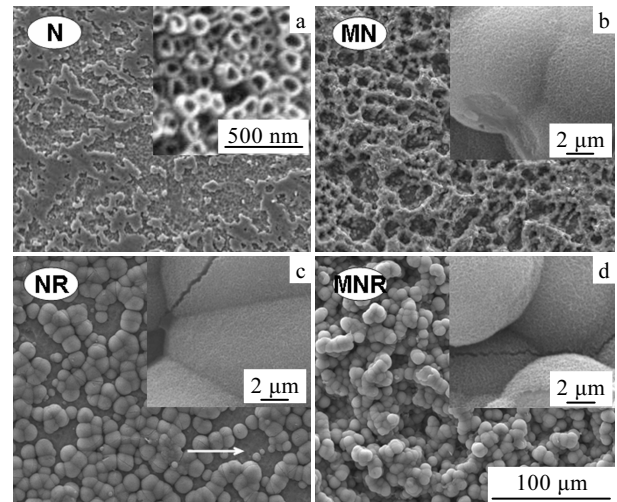


图 2 矿化 2 d 后试样的 SEM 照片

Fig.2 SEM images of samples soaked in 1.5SBF for 2 d: (a) N, nanotubes, (b) MN, micro/nanostructure, (c) NR, nanotubes with grafted RGDC, and (d) MNR, micro/nanostructure with grafted RGDC

见不到最初的多孔结构了,可以推测涂层的厚度较大。相应的 EDX(图 3)显示: N 试样表面依然是原来的 Ti、O 元素峰,没有出现 Ca、P 元素峰。其它 3 组试样表面出现了矿化后特有的 Ca、P 元素峰,说明涂层是沉积的钙磷盐。

FTIR 的反射结果(图 4)显示: N 试样表面检测到少许  $\text{OH}^-$  和  $\text{PO}_4^{3-}$  的峰,这是试样表面矿化前锐钛矿

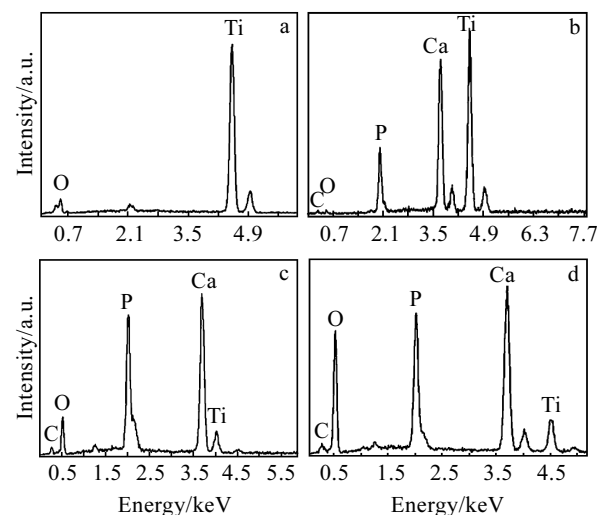


图 3 矿化 2 d 后试样的 EDX 图谱

Fig.3 EDX spectra of samples soaked in 1.5SBF for 2 d: (a) N, nanotubes, (b) MN, micro/nanostructure, (c) NR, nanotubes with grafted RGDC, and (d) MNR, micro/nanostructure with grafted RGDC

纳米管的吸附所致，其它峰都是 Ti—O 峰。另外 3 种试样表面检测到较多的 OH<sup>-</sup>、CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>峰，且强度变强。说明涂层是碳酸化和羟基化的磷酸盐。接枝 RGDC 后的试样表面除了蛋白的酰胺键（1650 cm<sup>-1</sup>），出现更多的 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>的峰。

钙磷盐的晶型通过 XRD 分析确认。XRD 分析的结果（图 5）显示：N 试样表面只有钛和锐钛矿的衍射峰，其它 3 种试样表面都出现了明显的 HA 衍射峰，说明试样表面的沉积物是 HA。相比之下，试样表面接枝 RGDC 后，HA 在 31°~32°的衍射峰变宽，说明 HA 的结晶度降低，而且 HA 在 25.9°的（002）晶面出

现了明显的生长趋势，这个晶面对应 HA 晶体的 c 轴。据报道多肽链在模拟体液中可以形成纤维凝胶，沿多肽纤维表面可以形成明显的矿化物 HA，HA 晶体的 c 轴平行于多肽纤维的长轴，这种排列方式与自然骨磷灰石的低结晶度、多孔、纳米级晶、沿 c 轴生长等一致<sup>[15,16]</sup>，接枝的多肽是一种调控 HA 生长的功能分子。

HA 的形成与否是评价生物材料是否有骨键合能力的必经步骤，对比不同试样 2 d 的矿化结果，可以得出在同样仿生条件下，试样的诱导矿化能力和 HA 在其上的生长情况依次是 MNR>MN>NR>N，说明 HA 的生长既跟试样的表面成分有关，又跟试样的形貌有关。在实验中，MNR 试样可以提供大比表面积和多级孔结构，又可以提供活性锐钛矿和蛋白层，表面的形貌和成分都可以增加材料表面的活性，便于 HA 晶体的形成<sup>[2~6,15~18]</sup>，MNR 表面是 HA 形成的最好表面。体内实验证明，磷灰石矿物的成核起始于阳离子被吸收到某些相关的生物大分子的负电荷官能团位置，所以生物矿化机理是先使基体表面官能团化，官能团化即实现有机大分子的预组织，为 HA 的成核和生长提供位点。将多肽分子引入基体表面，可以模仿自然界磷灰石的矿化过程，多肽膜的存在使有机/无机界面在识别过程中相应地发生静电结合、晶体的晶格匹配及立体构型等一系列变化<sup>[19]</sup>。而试样表面接枝 RGDC 后暴露在外的一COOH 是具有高生物活性的基团，形成带负电荷的 COO<sup>-</sup>能利用静电力的作用加速 HA 晶体的生长。2 d 的矿化结果显示，试样的诱导矿化能力 MN>NR，因为 MN 试样表面的微形貌和锐钛矿型纳米管赋予材料表面更大的比表面积和更强的吸附性能，在 pH 为 7.40 的 SBF 溶液中，锐钛矿表面会富集一层负电荷的钛羟基<sup>[20~22]</sup>，再依次利用静电力吸附 Ca<sup>2+</sup>，进而吸附 OH<sup>-</sup>和 HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>或 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>，导致试样表面附近钙磷的过饱和度增加，增加 HA 成核的机率。

钛及钛合金种植材料表面改性后可以有效地改善其各种性能，本实验中的材料经适当的表面处理，综合考虑化学和仿生改性技术的配合使用，使材料表面具有可控的微米、纳米多级孔形貌、晶体取向和多肽活性层，使基体的金属特性与表层的生物活性更好地结合起来，以期得到生物相容性更好的材料。

### 3 结 论

1) 微/纳米结构的试样（MN）表面具有大比表面积和锐钛矿纳米管，有较好的生物活性；而微/纳米空间接枝活性多肽的试样（MNR）的生物活性最好。

2) 接枝多肽后的种植体表面矿化能力加强，形成的矿化层形貌和结构更为接近天然骨磷灰石，达到仿

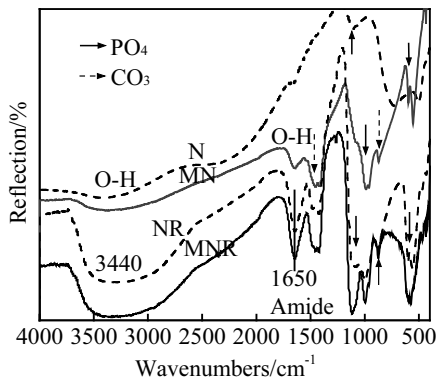


图 4 矿化 2 d 后试样的 FTIR 图谱

Fig.4 FTIR spectra of samples soaked in 1.5SBF for 2 d

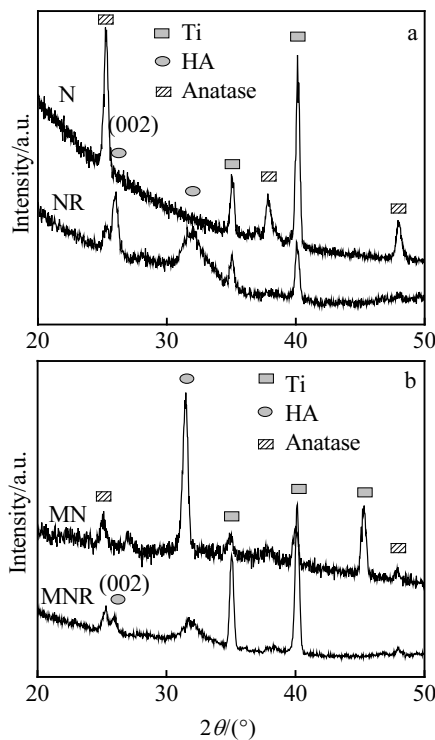


图 5 矿化 2 d 后试样的 XRD 图谱

Fig.5 XRD patterns of samples soaked in 1.5SBF for 2 d:

(a) N, NR and (b) MN, MNR

生的效果。在生物材料表面构建微/纳米结构接枝多肽膜的方法是一种有效的表面微/纳米仿生改性方法。

#### 参考文献 References

- [1] Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P *et al.* *Dental Materials*[J], 2007, 23(7): 844
- [2] Zinger O, Anselme K, Denzer A *et al.* *Biomaterials*[J], 2004, 25(14): 2695
- [3] Papalexiou V, Novaes A B J, Grisi M F *et al.* *Clinical Oral Implants Research*[J], 2004, 15(1): 44
- [4] Webster T J, Ejiogor J U. *Biomaterials*[J], 2004, 25(19): 4731
- [5] Feng Bo(冯波), Weng Jie(翁杰), Qu Shuxin(屈树新) *et al.* *Rare Metal Materials and Engineering*(稀有金属材料与工程)[J], 2007, 36(10): 1693
- [6] Huang Tao(黄涛), Lü Gang(吕刚). *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*(中国组织工程研究与临床康复)[J], 2007, 11(1): 194
- [7] Papat K C, Leoni L, Grimes C A *et al.* *Biomaterials*[J], 2007, 28(21): 3188
- [8] Chu Xueji(初薛基), Feng Bo(冯波), Weng Jie(翁杰) *et al.* *Journal of Southwest Jiaotong University*(西南交通大学学报)[J], 2007, 42: 157
- [9] Oh S H, Finões R R, Daraio C *et al.* *Biomaterials*[J], 2005, 26(24): 4938
- [10] Pallu S, Bourget C, Bareille R *et al.* *Biomaterials*[J], 2005, 26(34): 6932
- [11] Elmengaard B, Bechtold J E, Søballe K. *Biomaterials*[J], 2005, 26(17): 3521
- [12] Leary Swan E E, Papat K C, Desai T A. *Biomaterials*[J], 2005, 26(14): 1969
- [13] Bartouilh de Taillac L, Porté-Durrieu M C, Labrugère C *et al.* *Composites Science and Technology*[J], 2004, 64(6): 827
- [14] Chen Y, Xu X, Hong S *et al.* *Cancer Res*[J], 2001, 61(6): 2434
- [15] Hartgerink J D, Beniash E, Stupp S I. *Science*[J], 2001, 294(5547): 1684
- [16] Zhao Ming(赵铭), Zheng Qixin(郑启新). *Biomedical Engineering Foreign Medical Science*(国外医学生物医学工程分)[J], 2004, 27(6): 371
- [17] Huang Suping(黄苏萍), Huang Boyun(黄伯云), Zhou Kechao(周科朝) *et al.* *The Chinese Journal of Nonferrous Metal*(中国有色金属学报)[J], 2004, 14(9): 1604
- [18] Uchida M, Kim H M, Kokubo T *et al.* *Journal of Biomedical Materials Research*[J], 2003, 64(1): 164
- [19] Mann S, Archibald D D, Didymus J M *et al.* *Science*[J], 1993, 261(5126): 1286
- [20] Kasuga T, Kondo H, Nogami M. *Journal of Crystal Growth*[J], 2002, 235(1): 235
- [21] Wang X X, Yan W, Hayakawa S *et al.* *Biomaterials*[J], 2003, 24(25): 4631
- [22] Liu X, Zhao X, Fu R K Y *et al.* *Biomaterials*[J], 2005, 26(31): 6143

## Bioactivity of Titanium Surfaces with Micro/Nanostructure and Grafted Polypeptide

Gao Ling, Feng Bo, Wang Jianxin, Lu Xiong, Weng Jie

(Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, Ministry of Education, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:** The mineralization ability of 4 kinds of titanium implants after chemical and bionic modification was evaluated. The 4 kinds of surface modification layers were anatase nanotubes (N), micro/nanostructure (MN), nanotubes with grafted Arg-Gly-Asp-Cys (NR), micro/nanostructure with grafted Arg-Gly-Asp-Cys (MNR). Results show that the surface mineralization deposition is hydroxylapatite. Under the same condition, the inducing mineralization ability of the samples is MNR>MN>NR>N. Combination of developing micro/nanostructure and grafting polypeptide is an effective way of surface modification for biomaterials.

**Key words:** titanium; surface modification; micro/nanostructure; polypeptide; mineralization

Biography: Gao Ling, Master, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, P. R. China, Tel: 0086-28-87634154; Corresponding Author: Feng Bo, Tel: 0086-28-87634023, E-mail: fengbo@swjtu.edu.cn