

2007-08-28

Electrochemical Codeposition of HA/Collagen Coating and Preliminary in Vitro Tests

Yan-li XU

Long-xiang LIN

Zhi-wang GENG

Chang-jian LIN

Recommended Citation

Yan-li XU, Long-xiang LIN, Zhi-wang GENG, Chang-jian LIN. Electrochemical Codeposition of HA/Collagen Coating and Preliminary in Vitro Tests[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2007 , 13(3): 238-241.

DOI: 10.61558/2993-074X.1814

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol13/iss3/2>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

电化学共沉积 HA/胶原复合涂层及其生物性能初探

徐艳丽, 林龙翔, 耿志旺, 林昌健*

(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, 福建 厦门 361005)

摘要: 应用电化学恒电流共沉积法在医用纯钛基底上制备羟基磷灰石(HA)/胶原(collagen)复合涂层。SEM和XPS等测试表明:复合涂层呈特定有序的纳-微米二级多孔结构,化学组分为HA和胶原的有机-无机复合。借助体外细胞的培养实验观察种植于不同材料表面的细胞贴壁及生长形态,显示电化学共沉积的复合涂层具有比纯HA或纯钛表面更好的生物相容性。

关键词: 羟基磷灰石; I型胶原; 复合涂层; 电化学共沉积; 生物性能

中图分类号: O 646

文献标识码: A

生物活性羟基磷灰石(HA)陶瓷涂层具有良好的生物相容性、骨传导性、骨诱导性,因而广泛用于骨科和牙科骨修复,但其脆性大、强度低,抗折强度和断裂韧性指标均低于人工致密骨,从而限制了它在人体负重部位的应用。为了改进其力学性能,发展了各种复合材料,其中在医用金属钛表面涂覆HA涂层是最常用一种方法;胶原具有良好的生物相容性、低免疫原性、促进细胞粘附、生长、繁殖的功能,是一种重要的生物材料,在许多临床医学有大量的应用。自然骨是由纳米羟基磷灰石与胶原有序组装而成的无机/有机复合材料。骨质中,纳米HA长轴(即c轴)沿胶原纤维三维螺旋延伸的方向择优排列,这一有序结构保证了最大限度的力学。近年来,由羟基磷灰石与胶原以及其它生物大分子杂化制备无机/有机复合材料的研究已有许多报道^[1-3]。

本文应用电化学恒电流共沉积法于低钙磷浓度条件下在医用钛基底上制备HA/胶原纳米复合涂层,以期获得一种理想的骨替代材料。

1 实验方法

1.1 复合涂层的制备

电化学共沉积法:两电极体系,工作电极为医

用纯钛(10 mm × 10 mm × 2 mm),经水磨砂纸打磨,稀氢氟酸(含10%硝酸和1%氢氟酸)刻蚀后,清洗晾干备用,对电极为铂电极。电解液是低浓度的Ca(NO₃)₂和NaH₂PO₄溶液^[4],钙离子浓度为4.2 × 10⁻⁴ mol/L, Ca/P比为1.67,氯化钠浓度为0.9%。将I型胶原蛋白均匀分散于上述溶液中,含量0.1 mg/mL,用0.05 mol/L NaOH溶液调节反应溶液的pH值至6.0~8.0。在电流密度为1.0 mA/cm²,控温沸腾条件下,电沉积30~60 min。沉积完成后,用三次去离子水将样品清洗3次,空气中自然晾干,得到均匀的白色复合涂层。

1.2 体外细胞培养实验

将已分别在医用纯钛基底上沉积了纯HA涂层、HA/胶原复合涂层及空白纯钛样品放置于培养井中,选用MG63成骨细胞接种于各种材料表面,种植密度8.0 × 10⁴ cells/well,以DMEM(低糖)作培养基(含10%小牛血清,青霉素100 U/mL,链霉素100 μg/mL)。培养井放于二氧化碳培养箱中(5% CO₂, 37 °C, 饱和湿度),进行体外细胞培养实验,培养12 h后取出,将带有细胞的样品置于2.5%戊二醛溶液中4 °C下固定2 h, PBS清洗,依次用梯度酒精(30%、50%、70%、90%和100%)

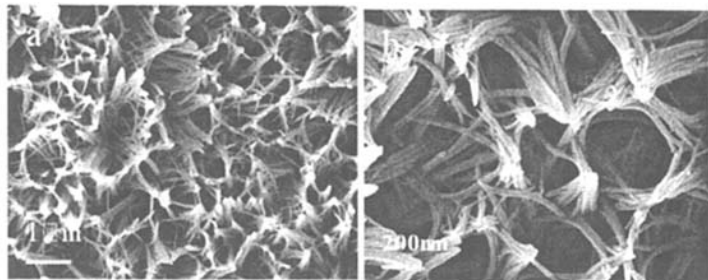


图 1 电化学共沉积 HA/胶原复合涂层的 SEM 图

Fig. 1 SEM images of the HA/Collagen coatings by electrochemical co-deposition a) $\times 10000$; b) $\times 30000$

脱水. 然后,在乙酸异戊酯的乙醇溶液中浸泡,经临界点干燥和喷金后由扫描电子显微镜观察形貌^[5-6].

2 主要结果与讨论

图 1 为在医用钛合金表面制备的 HA/胶原复合涂层的扫描电镜(SEM)照片,可看到复合涂层是由直径为几十纳米的棒状晶须组装形成的均匀纳-微米有序孔状二级结构,内部多孔结构完全贯通,孔径大小范围在几百纳米到几个微米之间,并且随着电解液 pH 值的增加,而有增大的趋势.能谱(EDS)分析显示, Ca/P 比例约 1.4,表明复合涂层为含钙离子缺陷的羟基磷灰石,与纯 HA (Ca/P 比约 1.67)涂层比较,更加接近于自然骨中的钙磷比.

图 2 是含有胶原的复合涂层的氮元素在 399.4 eV 处的 N1s 窄谱. 表 1 列出利用表面能谱技术检测 HA 和 HA/col 涂层的元素分析比较,其中纯羟基磷灰石(HA)涂层因其氮元素的原子含量低于 X-射线光电子能谱(XPS)的检测下限,故未能确实检测. 如表可见: HA/col 复合涂层的氮元素和碳元素原子含量明显增加;又该涂层表面经离子溅射 50 nm 后,发现内部也有 C、N 两种元素的存在. 由此证明,在含有胶原蛋白的复合涂层中会形成一定比例的无机-有机杂化. 而其结构和成分具有与自然骨相似的特征.

图 3 是在不同涂层或材料表面上原代成骨细胞生长形态的 SEM 照片,由图可见,各样品细胞贴附后的铺展形态及其吸附生长量差别甚大. HA/胶原涂层的表面细胞铺展情况最好,细胞培养 12 h 已经有伪足长出,且有向材料内部生长的趋势;HA 表面细胞有一定的铺展,但有些细胞还没完全铺展开,也没有伪足长出;医用纯钛表面

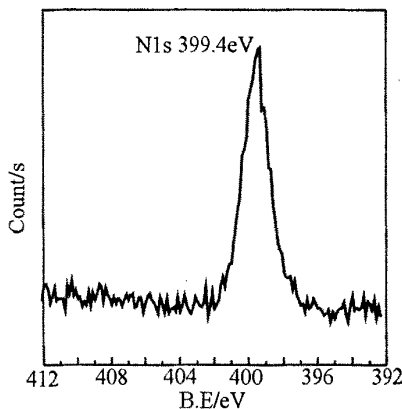


图 2 HA/col 复合涂层中 N1s 的窄谱

Fig. 2 High-resolution XPS spectra of N1s for the HA/collagen composite coating

表 1 不同涂层的 XPS 元素分析结果

Tab. 1 Chemical analysis result of different coatings from XPS

	Element/atm. %				
	C	N	O	Ca	P
HA	22.39	<0.1	49.70	16.20	11.71
HA/col	30.36	7.79	41.90	11.44	8.51
HA/col(50nm)	29.51	11.78	37.28	12.62	8.81

- a) pure HA coating;
- b) HA/Collagen composite coating;
- c) the depth of 50 nm in HA/Collagen composite coating

细胞只有少数铺展. 显然,复合涂层具有最好的生物相容性, MTT 比色实验进一步证实上述结果. 体外细胞培养实验表明,细胞在不同材料表面贴附的状态不同,这与涂层的不同表面形貌和成分密切相关. HA 涂层具备有利于细胞贴附与伸展的

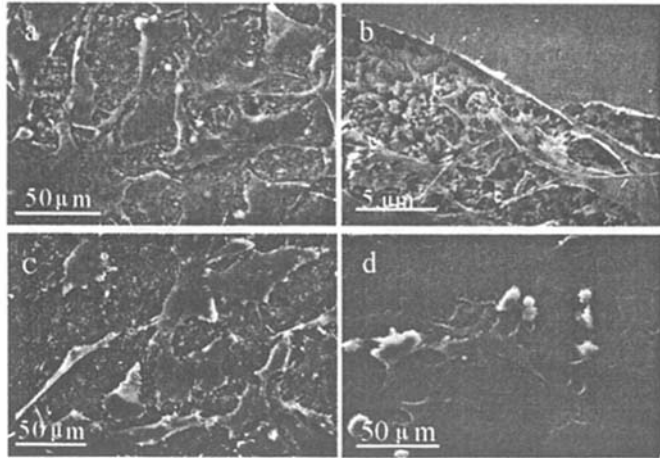


图 3 不同涂层表面原代成骨细胞生长状态的 SEM 图像

Fig. 3 SEM images of osteoblast cells cultured on different coatings; a, b HA/collagen composite coating; c pure HA; d Ti

钙离子条件,而涂层表面的粗糙度等物理因素又为细胞的贴附提供了良好的接触点,使得纯 HA 涂层的生物相容性也比较好.而复合涂层纳-微米有序的多孔结构极大地增大了涂层的有效表面积和粗糙度,大大提高了细胞与材料的接触面积.电化学共沉积制备的复合涂层具有与自然骨相似的成分和结构,特别是纳-微米有序结构内部完全贯通,有利于生物营养基质的流通和补充,从而有利于细胞伪足向材料内部生长,并在其表面形成优异的贴壁和铺展.

3 结 论

应用恒电流共沉积法在医用纯钛表面制备的羟基磷灰石(HA)/胶原(collagen)复合涂层,呈现特定的纳-微米二级多孔状结构,其表面和内部均有胶原的存在,具有与自然骨相似的成分和结构同时显示良好的生物相容性,有望成为一种综合性能良好的骨替代材料.

参考文献 (References) :

[1] Cheng Xiaoliang , Filiaggib Mark , Roscoe Sharon G . Electrochemically assisted co - precipitation of protein

with calcium phosphate coatings on titanium alloy [J] . *Biomaterials*, 2004, 25: 5395-5403.

[2] Fan Yuwei, Duan Ke, Wang Rizhi. A composite coating by electrolysis-induced collagen self-assembly and calcium phosphate mineralization[J]. *Biomaterials*, 2005, 26:1623-1632.

[3] Wan Y Z , Hong L , Jia S R , et al . Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose nanocomposites[J]. *Composites Science and Technology*, 2006, 66: 1825-1832.

[4] Hu Ren , Shi Haiyan , Lin Changjian . A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate[J]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, 80(3): 687-692.

[5] Xu J L, Khor K A. Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2007, 101: 187-195.

[6] Xue Weichang, Hosick Howard L, Bandyopadhyay Amit, et al. Preparation and cell materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating[J]. *Surface & Coatings Technology*, 2007, 201: 4685- 4693.

Electrochemical Codeposition of HA/Collagen Coating and Preliminary in Vitro Tests

XU Yan-li, LIN Long-xiang, GENG Zhi-wang, LIN Chang-jian*

(*State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surfaces, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China*)

Abstract: An electrochemical co-deposition technique has been developed to prepare a hydroxyapatite (HA)/collagen composite coating on Ti substrate. The SEM results show that the composite coating exhibits a homogeneous and porous morphology with nano-micro structure. And the XPS results demonstrate that the composite coating is formed by an organic-inorganic hybridization. In vitro cell culture tests reveal that, compared with pure HA and pure Ti, the HA/collagen composite coating exhibit a best biological properties.

Keywords: hydroxyapatite; I type collagen; composite coatings; electrochemical co-deposition; bioproperty