• 1566 •

纯钛表面激光熔覆处理的进一步实验研究

屠姗姗¹ 夏 荣¹ 吴先友²

摘要 目的 探讨激光熔覆后钛表面多孔形貌对细胞黏附、 增殖和分化的影响。方法 在氩气保护环境中应用脉冲式 掺钕钇铝石榴石晶体(Nd:YAG)对 45 μm 钛粉颗粒在钛片 表面进行激光熔覆 采用场发射扫描电镜(SEM)观察钛片表 面微观形貌 能量弥散 X 射线谱(EDS)检测钛片表面成分; 采用小鼠骨髓基质干细胞 BMSCs 体外培养评价喷砂酸蚀组 (A组)和激光熔覆组(B组)的生物相容性。SEM 观察 BM-SCs 在钛表面的黏附状况,细胞计数试剂盒(CCK-8)检测法 和碱性磷酸酶(AKP)活性检测评价钛片对 BMSCs 增殖和分 化的影响。结果 与 A 组比较 B 组互相连通的多孔钛表面 更有利于 BMSCs 的黏附,也有利于 BMSCs 细胞的增殖和分 化。结论 激光熔覆处理钛片表面可促进 BMSCs 黏附、增殖 及分化,有望成为一种有效有前景的钛表面处理方法。 关键词 纯钛;激光熔覆;骨髓基质干细胞;表面处理 中图分类号 R 783.1; TN 249; R 329.24 文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1566-04

种植体成功在很大程度上取决于植入后最初材 料的机械稳定性,以及随后其与骨组织间强大的活 性界面。钛是目前最常见的种植体材料,拥有足够 的机械强度,满足材料的稳定性,且给骨组织生长提 供临时的支撑,另一方面其具有良好的人体生物相 容性,可与骨组织形成牢固的骨结合。种植牙是一 种以植入骨组织内的下部结构为基础来支持、固定 上部牙修复体的缺牙修复方式,其安全性高、损伤 小,应用广泛。为了提高种植的成功率,各种表面处 理研究越来越多。表面处理是指用机械和化学等方 法使种植体表面疏松、粗糙化,从而具有更好的生物 黏附力和骨组织亲和性,加快骨结合。相对于传统 表面处理方式,激光熔覆具有机械化的精确、高效等 优点,其为加法制作原理,较减法制作节省材料,已

- 基金项目:安徽省教育厅自然科学研究项目(编号:KJ2009A037Z); 安徽省科技厅年度重点科研项目(编号:12070403070); 安徽省学术和技术带头人科研活动经费资助(编号: 2014H030)
- 作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院口腔科 ,合肥 230601 ²中国科学院医学物理与技术中心 ,合肥 230031
- 作者简介:屠姗姗,女,硕士研究生;

夏 荣,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xiarongqh@aliyun.com 涉及人体内研究^[1]。该研究利用激光熔覆技术构 建钛片表面微纳米级多孔形貌,与传统酸蚀喷砂技 术进行比较,探讨钛表面多孔形貌对小鼠骨髓基质 干细胞(bone marrow stem cells,BMSCs)黏附、增殖 和分化的影响。

- 1 材料与方法
- 1.1 材料

1.1.1 主要材料和试剂 45 μm 钛粉(纯度达为 99.9%),直径为 10 mm、厚度为 2 mm 的纯钛片由 陕西省宝鸡锐诚钛业有限公司提供;400 μm 大颗粒 氧化铝粉由广州莫秦有限公司提供;小鼠骨髓基质 干细胞、胎牛血清、细胞培养液由上海创始实业有限 公司提供;细胞计数试剂盒(CCK-8)由上海 BestBio 公司提供;碱性磷酸酶(AKP)检测试剂盒由南京建 成生物工程研究所提供。

1.1.2 主要仪器和设备 中国科学院安徽光学精 密机械研究所提供 Nd:YAG 脉冲激光器;中国科学 院材料物理重点实验室提供场发射扫描电镜(美国 FEI 公司 sirion 200);安徽医科大学基础医学院实 验室提供 CO₂ 培养箱(德国 heraeus)、倒置显微镜 (OLYMPUS CKX41)、酶标仪(美国 BioTek 公司, ELx800)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 1000#砂纸将直径为 10 mm、厚 度为 2 mm 的钛片表面抛光,依次用丙酮、无水乙 醇、超纯水超声分别清洗 30 min 45 ℃烤箱中烘干。

A 组: 喷砂酸蚀组, 垂直光滑钛片表面用 400 μm 大颗粒氧化铝喷砂 10 s,清洗后置于 67% HCl/ H₂SO₄(1:1) 中,在 80 ℃下酸蚀 10 min,再置于蒸 馏水防氧化。

B 组:激光熔覆组,选择九水硅酸钠做为粘结剂 將 45 μm 钛粉均匀涂于干燥的钛片上烘干,选择电流110 A 峰值功率2.2 KW 对上述预涂层钛片进行激光熔覆处理。将两组钛片依次用丙酮、无水乙醇、超纯水超声分别清洗30 min 烘干。

 1.2.2 表面形态和成分 场发射扫描电镜(sacnning electron microscopy ,SEM)观察钛片表面微观
结构,能量弥散X射线谱(energy dispersion spectros-

²⁰¹⁴⁻⁰⁶⁻²⁷ 接收

copy EDS) 检测表面成分。

1.2.3 细胞黏附观察 将两组钛片采用高压蒸汽 (200 ℃)灭菌后置于 24 孔培养板中,用胰酶消化第 8 代小鼠 BMSCs,配制细胞悬液,以每孔 4 × 10⁴ 个 细胞接种至 24 孔培养板,倒置显微镜观察细胞生长 状况。每组 9 个钛片,于 24、48、72 h 各取出 3 个, 2.5% 戊二醛固定 2 h,PBS 反复冲洗,自然风干,喷 金 SEM 观察钛片表面细胞黏附、生长情况。

1.2.4 细胞增殖检测 同1.2.3 法接种细胞培养。 每组16个钛片,第1、3、5、7天时每组取出4个,置 入24孔培养板,每孔加入CCK-8 试剂,培养箱中孵 育4h,酶标仪在450 nm 波长下检测吸光度(OD) 值。

1.2.5 细胞分化检测 同1.2.3 法接种细胞培养。 每组12个钛片,第3、5、7天时每组取出4个,置入 24孔培养板,每孔加入0.1%的Triton X-100,培养 箱中孵育1h,滴加AKP检测试剂,37℃恒温水浴 15 min 后加入显色剂,酶标仪在450 nm 波长下检测 吸光度(OD)值。

 3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行分析, 统计学方法采用单因素方差分析,检验水准 α = 0.05。

2 结果

2.1 钛表面观察 电镜查看钛表面形态 A 组表面 孔径大小为 0.5 ~ 3 μm ,B 组表面相互连通的三维 孔洞直径大小为 100 nm ~ 20 μm。见图 1。

2.2 表面成分分析 EDS 分析钛表面成分,两组表面除主要成分为钛外,A 组还含有喷金后存在的金(Au)元素,B 组含少量硅和碳元素。见图 2。



图 1 两组钛表面形貌 SEM × 5 000 A:喷砂酸蚀表面;B:激光熔覆表面



6 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.06.5 7.0 7.5 8.0 Full Scale 410 cts Cursor.0.000 keV



0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 Full Scale 660 cts Cursor.2.189(8 cts) keV

图 2 两组钛表面能谱 A:喷砂酸蚀表面;B:激光熔覆表面

2.3 细胞黏附观察 BMSCs 生长 24、72 h 喷金后 钛片表面电镜形貌 ,A 组:粗糙表面细胞沿表面浅窝 生长;B 组:细胞沿表面孔洞生长 ,三维孔洞内出现 纤维蛋白网状结构。见图 3、4。图 4 B1、B2 中箭头 所示可见纤维网状结构。



图 3 BMSCs 生长 24 h 后钛片表面电镜 A:喷砂酸蚀组;B:激光熔覆组;1:SEM ×400;2:SEM ×1 250;3:SEM ×2 500



图 4 BMSCs 生长 72 h 后钛片表面电镜 A:喷砂酸蚀组;B:激光熔覆组;1:SEM ×1 250;2:SEM ×2 500

2.4 细胞增殖检测 与A组比较,B组在第5、7天时OD值升高,差异有统计学意义(P<0.01),见图5。





2.5 细胞分化检测 与A组比较 B组在第5、7天时 OD 值升高 ,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见图 6。

3 讨论

牙种植体,最终的目标是获得种植体和天然周 围骨之间的固定、结合和稳定,此过程源自自身间充 质干细胞可以迁移到植入部位,增殖并分化为成熟 的成骨细胞,并分泌胞外基质形成骨结合。此过程 与种植体表面形态有一定关系,诸多研究^[2-3]显示, 机械光滑钛表面细胞为平层结构,主要为二维形态, 而粗糙钛表面细胞为多边形态,三维形态的粗糙表



图 6 两组钛片细胞培养 3、5、7 d 时细胞分化能力曲线

面有更大的接触面积,促进细胞黏附、增殖、扩散和 分化,从而能促进成骨细胞合成骨组织。

牙种植体成功与种植材料表面积大小直接相 关,因此为了提高种植体成功率,增加骨结合率,产 生了多种多样的表面处理方式。经典的处理方法是 喷砂酸蚀,可构造蜂窝状结构的粗糙表面,瑞士 Stratmmn 公司推出的 ITI 牙种植体系统即是喷砂 酸蚀表面处理,粗糙表面微孔直径约2μm,喷砂酸 蚀种植体有可能存在残余喷砂颗粒,对种植体有一 定影响,另一方面钛表面在喷砂过程中或喷砂酸蚀 表面暴露于空气中大于24h,易被碳氢化合物污染, 碳氢化合物封锁了种植体表面活性羟基,降低了表 面亲水性,是影响钛生物活性的一个因素,亲水改性 的粗糙钛表面促进牙种植体周围骨结合^[4-5]。本 实验中,将喷砂酸蚀处理的钛片保存在蒸馏水中可 以防止喷砂酸蚀表面进一步被污染^[6],而激光熔覆 处理的钛表面则稳定性好,无需特殊保存。

瑞士 ITI 牙种植体与市场上销售的巴西表面双 酸蚀刻种植体^[7]构造蜂窝状结构的粗糙表面有利 于骨结合形成,而本实验钛表面激光熔覆处理也构 造出相互连通的粗糙表面,三维孔洞直径大小为 100 nm ~ 20 μm,直接设定各项激光参数还可调控 三维孔洞直径大小范围,且不会形成表面杂质^[8]。

激光熔覆技术利用高能密度的激光束在原料粉 末和金属表面快速形成熔池又快速凝固,此过程增 加了涂层与基体之间的结合强度,通过激光熔覆技 术对钛表面进行改性,可以改善钛表面的性能并增 强其生物活性。激光快速成形技术将激光熔覆技术 和快速成形技术结合起来 在很多领域 特别是口腔 医学领域将得到广泛的应用。其原理是将计算机辅 助设计的三维模型转换为按一定厚度分层的二维轮 廓信息 再利用激光熔覆方法将金属粉末逐层堆积, 最终得到三维实体成品。

激光熔覆处理形成的微观钛表面为相互连通的 开放多孔结构 相对于酸蚀表面,可以为成骨细胞附 着提供更积极的诱导作用。钛表面增加了表面粗糙 度,可能有助于集中更多的蛋白质^[9],从而提高黏 接强度;钛表面的多孔结构呈开放性,有利于引导成 骨细胞向内生长和附着,也容易引导血管长入,形成 血管网又可为细胞提供更多营养;钛表面的多孔结 构相互连通,不仅增加了表面接触面积及后期成骨 的机械锁结力,还起到桥梁的作用,促进细胞定位和 体液传输;钛表面孔洞结构还易形成交错的纤维蛋 白网,纤维蛋白网可为细胞生长提供更多的引导和 支撑,从而加快加强骨结合^[10]。而酸蚀喷砂形成的 孔洞非相互连通,孔洞深度有限。

牙种植体骨结合成功后还得承担咀嚼力的传导, 激光熔覆产生的互连开放的多孔结构有助于减少植 入体表面的密度,从而减少应力集中,实现长期协调 稳定^[11],该设计从机械的角度来看,孔隙率和孔的 几何形状影响支架的机械性能和应力疲劳,表面结 构的弹性模量,应该是既有足够的强度,以维持生理 负荷,又不应超过材料的刚度,防植入体的折裂。

参考文献

- [1] Palmquist A, Grandfield K, Norlindh B, et al. Bone-titanium oxide interface in humans revealed by transmission electron microscopy and electron tomography [J]. J R Soc Interface, 2012 9(67): 396 – 400.
- [2] Alves S F , Wassall T. In vitro evaluation of osteoblastic cell adhe-

sion on machined osseointegrated implants [J]. Braz Oral Res , 2009 23(2):131-6.

- [3] Ramaglia L , Postiglione L , Di Spigna G , et al. Sandblasted-acidetched titanium surface influences *in vitro* the biological behavior of SaOS-2 human osteoblast-like cells [J]. Dent Mater 2011 30(2): 183 – 92.
- [4] Mardas N, Schwarz F, Petrie A, et al. The effect of SLActive surface in guided bone formation in osteoporotic-like conditions [J]. Clin Oral Implants Res 2011 22(4):406-15.
- [5] Zhang E W , Wang Y B , Shuai K G , et al. In vitro and in vivo evaluation of SLA titanium surfaces with further alkali or hydrogen peroxide and heat treatment [J]. Biomed Mater 2011 6(2):1 – 7.
- [6] Li S , Ni L , Zhang X , et al. Surface characteristics and biocompatibility of sandblasted and acid-etched titanium surface modified by ultraviolet irradiation: An *in vitro* study [J]. Biomater , 2012 ,100 (6):1587-98.
- [7] Souza F A , Queiroz T P , Guastaldi A C , et al. Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis [J]. Biomater , 2013 ,101 (1):76-84.
- [8] Kurt M, Külünk T, Ural C, et al. The effect of different surface treatments on cement-retained implant-supported restorations [J]. Oral Implantol, 2013 39(1):44 – 51.
- [9] Gao Y , Hu J , Guan T H , et al. Physical properties and cellular responses to calcium phosphate coating produced by laser rapid forming on titanium [J]. Lasers Med Sci , 2014 29(1):9-17.
- [10] 屠姗姗 夏 荣 吴先友 等. 纯钛表面激光熔覆处理的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 10(1):1209-13.
- [11] Mangano C , De Rosa A , Desiderio V , et al. The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures [J]. Biomaterials , 2010 ,31 (13): 3543 - 51.

Study of titanium surface modified by laser cladding

Tu Shanshan¹, Xia Rong¹, Wu Xianyou²

(¹Dept of Stomatology ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230601;²Center of Medical Physics and Technology , Hefei Institutes of Physical Science , Chinese Academy of Sciences , Hefei 230031)

Abstract *Objective* This work focuses on the titanium surface with porous structure obtained by laser cladding and evaluation of cell adhesion, proliferation and differentiation. *Methods* The specimens were prepared by a pulsed Nd:YAG laser cladding of titanium powder with a particle size of 45 µm on it in an argon atmosphere. The microstructure and chemical composition analyses were performed by sacnning electron microscopy (SEM) and energy dispersion spectroscopy (EDS). SEM CCK-8 method and alkaline phosphatase activity assay were taken to evaluate the effect of the adhesion proliferation and differentiation of mice bone marrow stem cells. *Results* The titanium surface microstructure of multilevel and interconnected holes was proved of good cell biocompatibility. *Conclusion* Laser cladding proves to be an efficient means of surface modification of dental implants and the modified surface has a significant effect on the adhesion proliferation and differentiation and differentiation of BMSCs.

Key words pure titanium; laser cladding; bone marrow stem cells; surface modification